(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0020502
(43) 공개일자 2025년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/196 (2006.01) *A61P 9/04* (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/196 (2013.01)
A61P 9/04 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2024-7042965
(22) 출원일자(국제) 2023년06월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년12월26일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/065045
(87) 국제공개번호 WO 2023/237511
국제공개일자 2023년12월14일
(30) 우선권주장
63/365,971 2022년06월07일 미국(US)

(71) 출원인
아스트라제네카 아베
스웨덴 에스이-151 85 쇠더탈제
(72) 발명자
가브리엘슨, 앤더스
스웨덴 에스이-151 85 쇠더탈제 아스트라제네카 아베
조지 주니어, 리처드 토마스
미국 19850-5437 델라웨어 윌밍턴 콩코드 파이크 1800 아스트라제네카 파마수티컬스 엘피
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장덕순, 류현경

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **저항성 고혈압 또는 폐고혈압을 동반한 심부전의 치료를 위한 RXFP1 조절제**

(57) 요 약

일반적으로 본 명세서는 특히 저항성 고혈압 및 폐고혈압을 동반한 심부전을 치료하는 방법에서의 RXFP1 조절제의 용도에 관한 것이다.

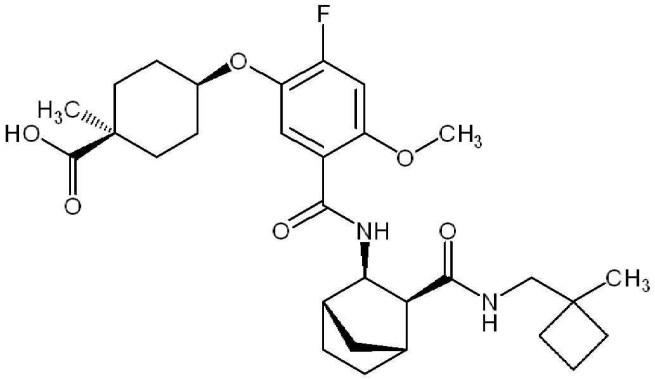
(52) CPC특허분류
A61P 9/12 (2018.01)
(72) 발명자
코놀리, 캐슬린 마리
영국 씨비2 0에이에이 케임브리지셔 케임브리지 케임브리지 바이오메디컬 캠퍼스 프랜시스 크릭 애비뉴 1 아스트라제네카 유케이 리미티드
오마르, 사미 알리 압델 하페스
영국 씨비2 0에이에이 케임브리지셔 케임브리지 케임브리지 바이오메디컬 캠퍼스 프랜시스 크릭 애비뉴 1 아스트라제네카 유케이 리미티드
우프날, 마르신
폴란드 02-676 바르샤바 퍼스템프 14 아스트라제네카 파마 폴란드 에스피. 제트 오.오

명 세 서

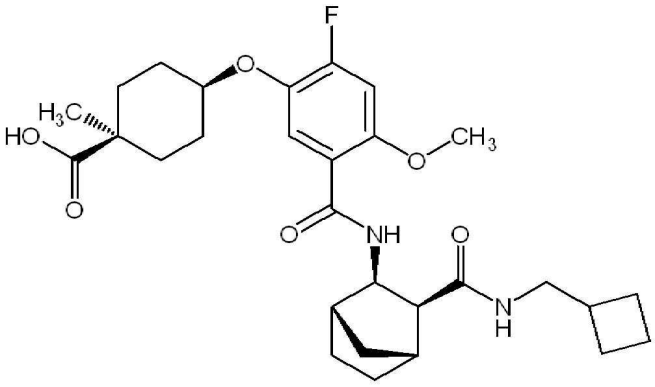
청구범위

청구항 1

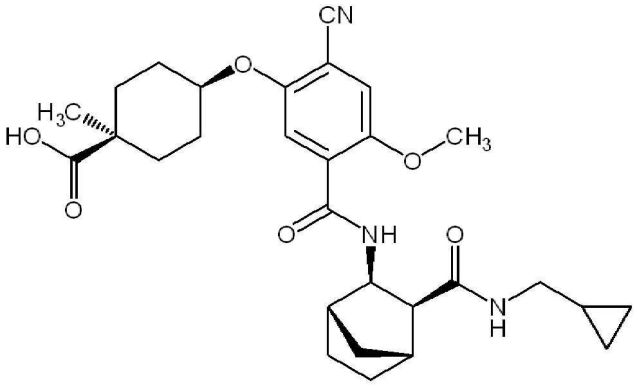
저항성 고혈압 또는 폐고혈압을 동반한 심부전인 병태를 갖는 대상체의 치료 방법으로서, 상기 대상체에게



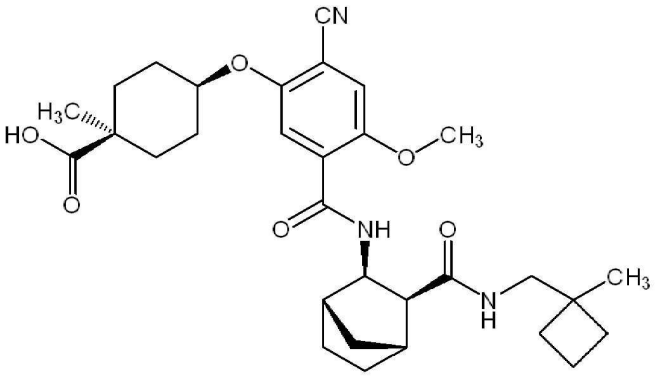
(화합물 1);



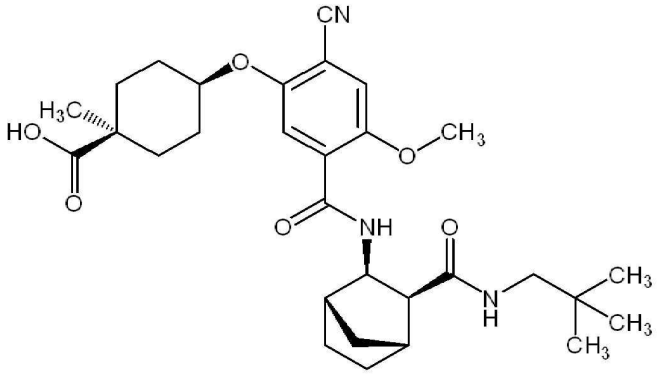
(화합물 2);



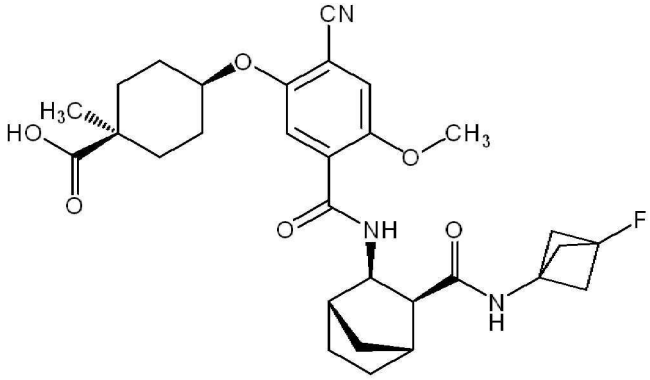
(화합물 3);



(화합물 4);



(화합물 5); 및



(화합물 6);

또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염으로부터 선택된 치료적 유효량의 RXFP1 조절제를 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 RXFP1 조절제는 화합물 1 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염인, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 병태는 폐고혈압을 동반한 심부전인, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 심부전은 박출률 감소 심부전, 중간 범위 박출률 심부전 또는 박출률 보존 심부전인, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 병태는 저항성 고혈압인, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체의 평균 폐동맥압은 약 25 mmHg 이상이고/이거나 우심실 수축기압은 약 40 mmHg 이상인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체의 폐혈관 저항은 3.0 미만의 우드 단위인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체의 폐혈관 저항은 3.0 이상의 우드 단위인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게는 혈압 모니터링 장치, 선택적으로는 폐동맥압 모니

터링 장치가 장착되어 있는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,상기 폐동맥압 모니터링 장치는 CardioMEMS 압력 모니터링 장치인, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RXFP1 조절제는 상기 RXFP1 조절제 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물로서 투여되는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 방법에 사용하기 위한 RXFP1 조절제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 명세서는 RXFP1의 조절제인 화합물(이의 염 포함)을 사용하는 치료 방법을 기재한다.

배 경 기 술

[0002] 릴랙신(relaxin)은 임신 중 전신 혈류역학 및 신장 적응 변화를 매개하는 것으로 알려진 다면발현성 호르몬이다. 릴랙신은 또한 항섬유화 특성을 갖고 있으며, 예를 들어 급성 비대상성 심부전(acute decompensated heart failure; ADHF)과 같은 심부전에 유익한 효과가 있는 것으로 나타났다. 심부전은 상당한 이환율 및 사망률과 관련이 있다. 이는 증가된 심근세포 사멸 및 간질 섬유증을 수반하는 복잡한 조직 리모델링을 특징으로 한다. 릴랙신은 허혈-재관류 및 심부전 상황에 유익한 것으로 밝혀진 여러 신호전달 캐스케이드를 활성화시킨다. 이들 신호전달 경로는 포스포이노시티드 3-키나제 경로의 활성화 및 산화질소 신호전달 경로의 활성화를 포함한다(Bathgate RA et al. (2013) *Physiol. Rev.* 93(1): 405-480; Mentz RJ *et al.* (2013) *Am. Heart J.* 165(2): 193-199; Tietjens J *et al.* (2016) *Heart* 102: 95-99; Wilson SS *et al.* (2015) *Pharmacology* 35: 315-327).

[0003] 심부전 환자에서, 상당한 하위 집단이 폐고혈압(HF+PH 환자)도 앓고 있다. 박출률 보존 심부전(heart failure with preserved ejection) 환자의 약 50%는 또한 폐고혈압을 앓고 있으며, 박출률 감소 심부전 환자의 60%까지 증가하는 것으로 추정되었다(Guazzi, (2014) Circ Heart Fail., 7:367-377; Miller et al., (2013) JACC Heart Fail., 1(4):290-299). 폐고혈압을 동반한 심부전을 앓고 있는 환자는 폐고혈압이 없는 심부전 환자에 비해 생존율이 감소한 것으로 나타났다(Barnett and De Marco, (2012) Heart Fail. *Clin.* 8: 447-459). 심부전 환자에서, 예상 폐동맥 확장기압(Estimated Pulmonary Artery Diastolic Pressure; ePAD)의 3 mmHg 증가 또는 감소는 (평균 폐동맥압(mean Pulmonary Arterial Pressure; mPAP)의 약 4 mmHg 증가 또는 감소와 동일) 심혈관 사망률에서 각각 24%의 증가 또는 19%의 감소와 관련이 있었다(Zile MR, et al. (2017) *Circ Heart Fail.*, 10:e003594). mPAP의 4 mmHg의 감소는 심부전 및 폐고혈압을 앓는 환자에서 호흡곤란 개선과도 관련이 있다(Solomonica A, et al. (2013) *Circ Heart Fail.*, 6:53-60).

[0004] 저항성 고혈압(resistant hypertension; rHT)은 상이한 계열의 3가지 항고혈압제(그 중 하나는 이뇨제)의 최적화된 용량을 동시에 사용했음에도 불구하고 고혈압 환자의 혈압이 목표치를 초과하여 상승되어 유지되는 것으로 정의된다. 현재 고혈압의 초기 치료를 위한 SoC는 칼슘 채널 차단제(calcium channel blocker; CCB), 레닌-안지오텐신 시스템 차단제(안지오텐신 전환 효소[ACE] 저해제 또는 안지오텐신 수용체 차단제[ARB]) 및 이뇨제이다. rHT 환자의 경우, 다음에 무엇을 추가할지에 대한 여러 옵션(예컨대, 미네랄코르티코이드 수용체 길항제(mineralocorticoid-receptor antagonist; MRA), 베타 차단제 또는 알파 차단제)이 존재하며, 현재 지침에서는 rHT의 치료에 대한 바람직한 옵션으로 MRA가 권장된다. rHT는 4가지 이상의 항고혈압제를 동시에 공급받는 경우 혈압이 적절히 조절되는 환자를 포함한다(Carey et al., Hypertension, 2018, 72, e53-e90). rHT 환자는 일반적으로 심각한 혈압 상승의 오랜 병력이 있는데, 이것이 혈압이 조절된 치료된 고혈압 환자보다 심혈관 위험이 더 높게 만든다(Acelajado et al., Circulation Research, 2019, 124, 1061-1070). 릴렉신이 고혈압 질환에 대한 치료적 잠재력을 가질 수 있다는 의견이 제시되어 있다(Lekgabe et al., Hypertension, 2005, 46, 412-8).

[0005] 변형되지 않은 재조합 인간 릴랙신-2, 세레락신(serelaxin)을 사용하여 임상 시험이 수행되었다. 입원 환자에

대한 세레락신의 지속적 투여는 심장, 신장 및 간 손상 및 울혈의 마커를 개선시켰다(Felker GM *et al.* (2014) *J. Am. Coll. Cardiol.* 64(15): 1591-1598; Metra M *et al.* (2013) *J. Am. Coll. Cardiol.* 61(2): 196-206; Teerlink JR *et al.* (2013) *Lancet* 381(9860): 29-39). 그러나, 환자의 순환계로부터 세레락신이 빠르게 제거됨으로 인해 치료 효과가 제한되었고, 긍정적 효과는 정맥 주사가 중단되면 빠르게 사라졌다. 또한, 환자의 약 1/3이 세레락신의 정맥내 투여 후 유의미한 혈압 강하(>40 mm Hg)를 경험했으며, 그 결과 용량을 절반 이상 줄여야 했다.

[0006] 인간 릴랙신에 대한 동족 수용체는 RXFP1이며, 호르몬 릴랙신에 의한 활성화가 혈류역학, 항섬유화, 및 항염증 특성과 관련이 있는, 잘 검증된 약리학적으로 중요한 GPCR 계열 1c 구성원이다(Halls ML et al., (2015), Pharmacol Rev. 67(2): 389-440).

[0007] RXFP1의 소분자 조절제가 릴랙신 모방체로서 모색된 바 있다. 예를 들어, 문헌[Marugan, J. J., et al., WO2013/165606A1; Xiao J et al. (2013) Nat. Commun. 4:1953; 및 McBride A et al. (2017) Scientific Reports 7:10806]에는 RXFP1의 소분자 조절제가 논의되어 있다.

[0008] 전술한 것에도 불구하고, 화합물의 치료제로서의 개발이 특히 기대될 수 있는 RXFP1의 조절제인 추가 화합물에 대한 필요성이 계속 존재한다. 이러한 화합물(들)은 또한, 다른 알려진 RXFP1 조절제와 비교하여 개선된 RXFP1 조절을 나타낼 수 있다. 이러한 화합물(들)은 또한, 다른 알려진 RXFP1 조절제와 비교하여 유리한 약동학적 프로파일(예를 들어, 더 낮은 고유 클리어런스) 및/또는 이로운 물리적 특성(예를 들어, 더 높은 수용해도)을 나타낼 수 있다. 따라서, 이러한 화합물(들)은 RXFP1의 조절이 유익한 질환 상태의 치료에 특히 유용할 수 있다.

발명의 내용

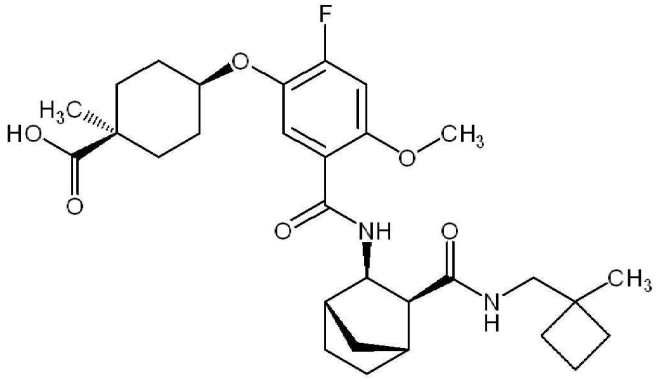
[0009] 본 개시내용은 저항성 고혈압을 앓고 있는 대상체 및 폐고혈압을 동반한 심부전(HF+PH)을 앓고 있는 대상체의 치료에서의 본 명세서에 기재된 RXFP1 조절제의 용도에 관한 것이다. HF+PH 대상체 및 저항성 고혈압을 앓고 있는 대상체의 치료는 여전히 충족되지 않은 중요한 요구 사항이다.

[0010] 본 명세서는 부분적으로 저항성 고혈압 또는 폐고혈압을 동반한 심부전인 병태를 갖는 대상체의 치료 방법을 기재하며, 이 방법은 대상체에게 유효량의 본 명세서에 기재된 바와 같은 RXFP1 조절제를 투여하는 단계를 포함한다.

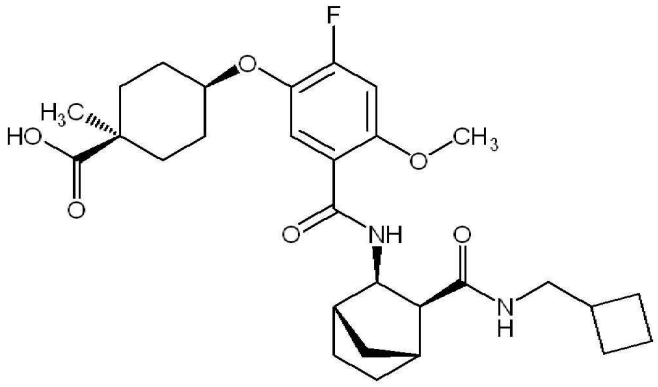
[0011] 유사하게, 본 명세서에는 저항성 고혈압 또는 폐고혈압을 동반한 심부전인 병태를 갖는 대상체를 치료하는 데 사용하기 위한 본 명세서에 기재된 바와 같은 RXFP1 조절제를 부분적으로 기재한다.

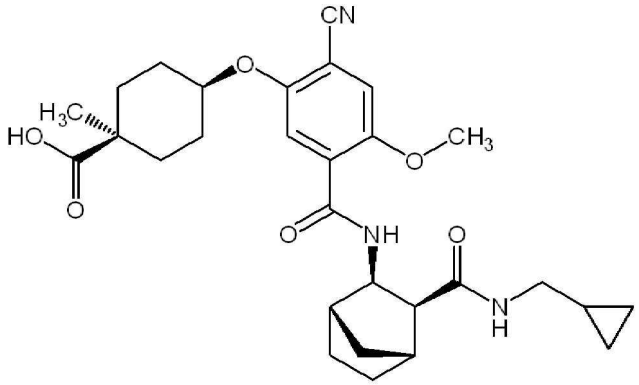
[0012] 유사하게, 본 명세서에는 저항성 고혈압 또는 폐고혈압을 동반한 심부전인 병태를 갖는 대상체를 치료하기 위한 의약의 제조에서의 본 명세서에 기재된 바와 같은 RXFP1 조절제의 용도를 부분적으로 기재한다.

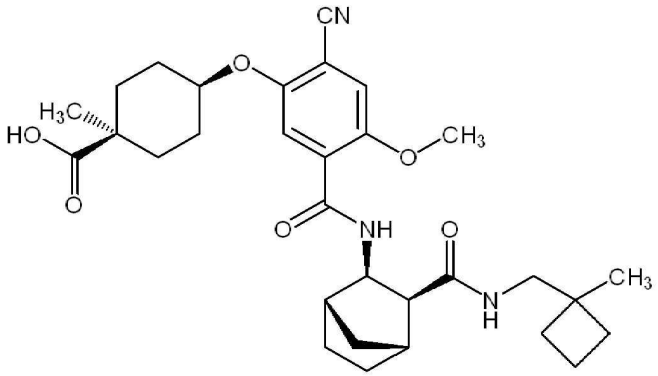
[0013] 일 실시형태에서, RXFP1 조절제는 하기로부터 선택된다:

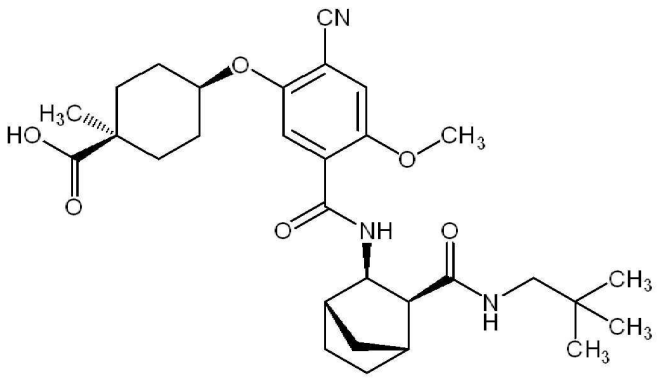


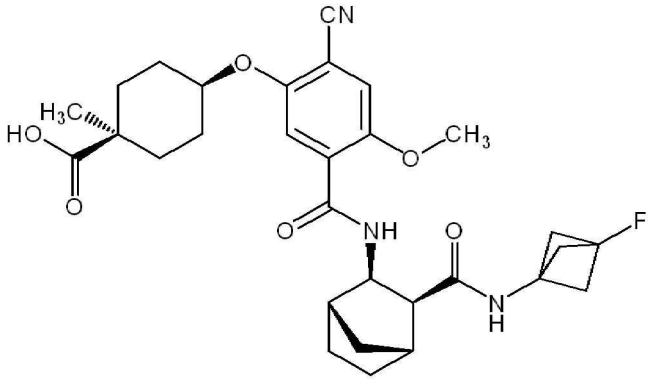
[0014] (화합물 1);

[0015]  (화합물 2);

[0016]  (화합물 3);

[0017]  (화합물 4);

[0018]  (화합물 5); 및



[0019] (화합물 6);

[0020] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

[0021] 본 개시내용의 추가 양태는 본 명세서를 읽음으로써 당업자에게 명백해질 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 여러 실시형태가 본 명세서 전반에 걸쳐 상세히 설명되며 당업자에게 명백할 것이다. 본 명세서는 본 명세서에 기술된 임의의 특정 실시형태(들)에 한정되는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0023] 본 명세서에 구체적으로 정의되지 않은 용어는 개시내용 및 문맥에 비추어 당업자에 의해 부여될 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다.

[0024] "약"은 일반적으로 측정의 특성 또는 정밀도를 고려하여 측정된 양에 대해 허용 가능한 정도의 오차를 의미할 수 있다. 예시적인 오차 정도는 주어진 값 또는 값의 범위의 백분율(%) 이내, 전형적으로 10% 이내, 더 전형적으로는, 5% 이내이다.

[0025] 하나 이상의 특징을 "포함하는" 것으로 본 명세서에 기술된 실시형태는 또한 이러한 특징들"로 "이루어진" 대응하는 실시형태의 개시로서 간주될 수 있다.

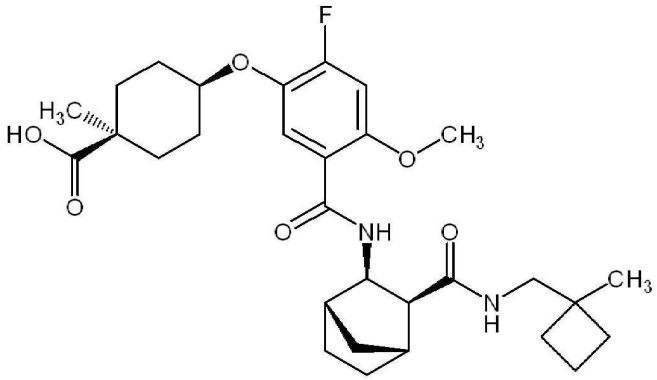
[0026] 농도, 양, 부피, 백분율, 및 기타 수치 값은 본 명세서에서 범위 형식으로 제시될 수 있다. 또한 이러한 범위 형식은 단지 편의와 간결성을 위해 사용되며 명시적으로 범위의 한계로 언급된 수치 값을 포함할 뿐만 아니라 해당 범위 내에 포함된 모든 개별 수치 값 또는 하위 범위를 각각의 수치 값 및 하위 범위가 명시적으로 언급된 것처럼 포함하는 것으로 유연하게 해석되어야 함이 이해되어야 한다.

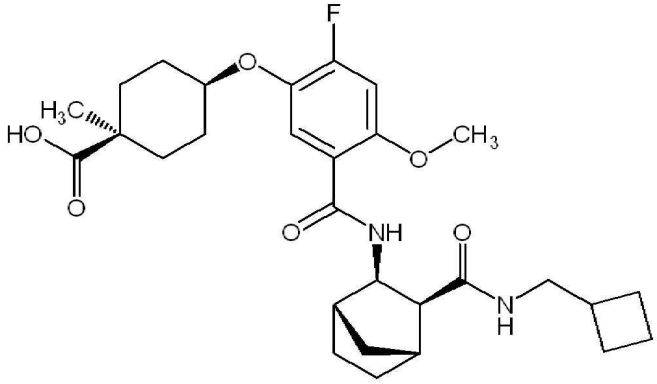
[0027] 본 명세서에 기재된 화합물의 화학명은 PerkinElmer®의 ChemDraw® Professional 버전 19.0.0.22를 사용하여 생성되었다. 당업자는 상이한 화학적 명명 소프트웨어가 특정 화합물에 대해 상이한 화학명을 생성할 수 있음을 이해할 것이다. 본 명세서에 기재된 화합물이 화학명 및 화학식 형태로 표시되는 경우, 불일치가 있으면 화학식이 우선한다.

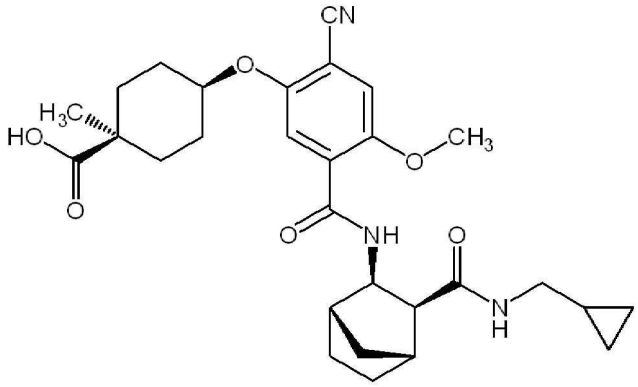
[0028] *RXFP1 조절제*

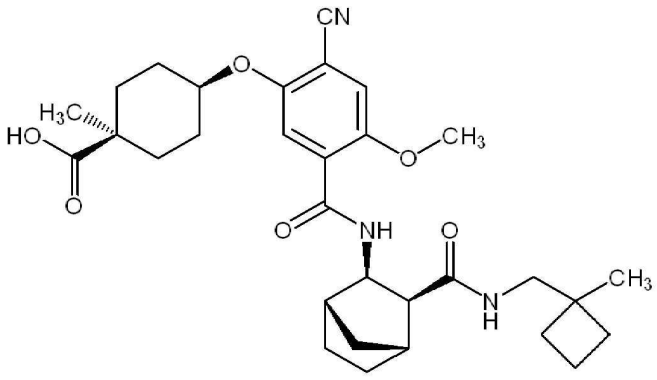
[0029] 본 명세서에는 저항성 고혈압 또는 폐고혈압을 동반한 심부전인 병태를 갖는 대상체의 치료 방법이 개시되며, 이 방법은 대상체에게 유효량의 RXFP1 조절제를 투여하는 단계를 포함한다.

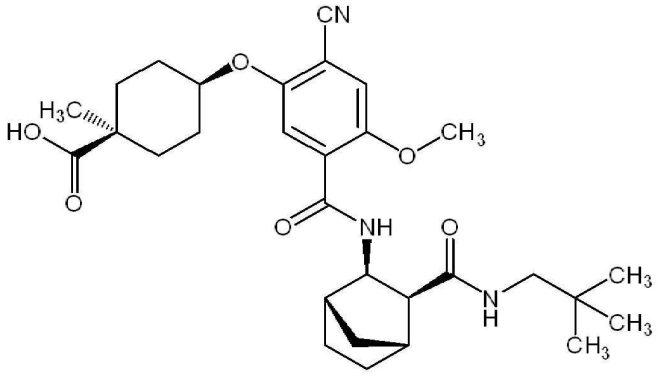
[0030] 일 실시형태에서, RXFP1 조절제는 하기로부터 선택된다:

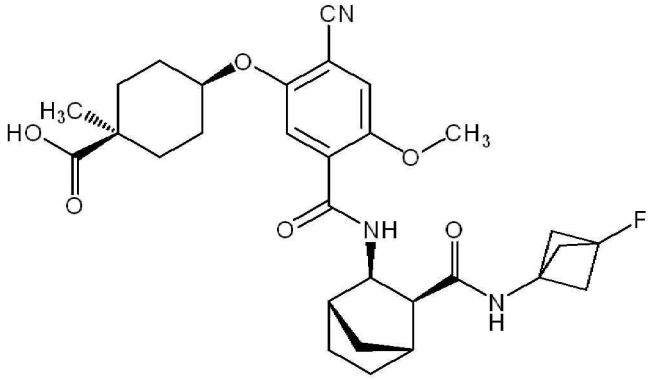
[0031]  (화합물 1);

[0032]  (화합물 2);

[0033]  (화합물 3);

[0034]  (화합물 4);

[0035]  (화합물 5); 및

[0036]  (화합물 6);

[0037] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

[0038] 일 실시형태에서, RXFP1 조절제는 화합물 1 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다.

[0039] 일 실시형태에서, RXFP1 조절제는 화합물 2 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다.

[0040] 일 실시형태에서, RXFP1 조절제는 화합물 3 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다.

[0041] 일 실시형태에서, RXFP1 조절제는 화합물 4 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다.

[0042] 일 실시형태에서, RXFP1 조절제는 화합물 5 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다.

[0043] 일 실시형태에서, RXFP1 조절제는 화합물 6 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염이다.

[0044] 일 실시형태에서, RXFP1 조절제는 화합물 1이다.

[0045] 일 실시형태에서, RXFP1 조절제는 화합물 2이다.

[0046] 일 실시형태에서, RXFP1 조절제는 화합물 3이다.

[0047] 일 실시형태에서, RXFP1 조절제는 화합물 4이다.

[0048] 일 실시형태에서, RXFP1 조절제는 화합물 5이다.

[0049] 일 실시형태에서, RXFP1 조절제는 화합물 6이다.

[0050] 일 실시형태에서, RXFP1 조절제는 하기로부터 선택된다:

[0051] (1S,4s)-4-(2-플루오로-4-메톡시-5-(((1S,2R,3S,4R)-3-(((1-메틸시클로부틸)메틸)카바모일)바이시클로[2.2.1]헵탄-2-일)카바모일)페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실산;

[0052] (1S,4s)-4-(2-시아노-4-메톡시-5-(((1S,2R,3S,4R)-3-(((1-메틸시클로부틸)메틸)카바모일)바이시클로[2.2.1]헵탄-2-일)카바모일)페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실산;

[0053] (1S,4s)-4-(2-시아노-5-(((1S,2R,3S,4R)-3-((시클로프로필메틸)카바모일)바이시클로[2.2.1]헵탄-2-일)카바모일)-4-메톡시페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실산;

[0054] (1S,4s)-4-(2-시아노-4-메톡시-5-(((1S,2R,3S,4R)-3-(네오펜틸카바모일)바이시클로[2.2.1]헵탄-2-일)카바모

일)페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실산;

[0055] (1S,4s)-4-(2-시아노-5-(((1S,2R,3S,4R)-3-((3-플루오로바이시클로[1.1.1]펜탄-1-일)카바모일)바이시클로[2.2.1]헵탄-2-일)카바모일)-4-메톡시페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실산; 및

[0056] (1S,4s)-4-(5-(((1S,2R,3S,4R)-3-((시클로부틸메틸)카바모일)바이시클로[2.2.1]헵탄-2-일)카바모일)-2-플루오로-4-메톡시페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실산;

[0057] 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염.

[0058] 일 실시형태에서, RXFP1 조절제는 국제 출원 제PCT/EP2021/084673호 또는 미국 특허 출원 제17/457,953호(이들 두 출원은 이들의 전문이 참조에 의해 포함됨)에 청구되거나 예시된 바와 같은 화합물이다.

[0059] "약제학적으로 허용 가능한"이라는 용어는 개체(예를 들어, 염, 투약 형태, 또는 부형제)가 환자에게 사용하기에 적합함을 명시하기 위해 사용된다. 약제학적으로 허용 가능한 염의 예시적인 목록은 문헌[Handbook of Pharmaceutical Salts: *Properties, Selection and Use*, P. H. Stahl and C. G. Wermuth, editors, Weinheim/Zürich:Wiley-VCH/VHCA, 2002]에서 찾아볼 수 있다. 본 명세서에 기재된 화합물의 적합한 약제학적으로 허용 가능한 염은 예를 들어 산 부가염 또는 염기 부가염이다. 본 명세서에 기재된 화합물의 산 부가염은 당업자에게 알려진 조건에서 화합물을 적합한 무기산 또는 유기산과 접촉시켜 형성될 수 있다. 산 부가염은 예를 들어 염산, 브롬화수소산, 황산, 및 인산으로 이루어진 군으로부터 선택된 무기산을 사용하여 형성될 수 있다. 산 부가염은 또한, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레산, 옥살산, 아세트산, 포름산, 벤조산, 푸마르산, 석신산, 타타르산, 락트산, 피루브산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 및 파라-톨루엔설폰산으로 이루어진 군으로부터 선택된 유기산을 사용하여 형성될 수 있다.

[0060] 따라서, 일 실시형태에서 RXFP1 조절제는 약제학적으로 허용 가능한 염이며, 약제학적으로 허용 가능한 염은 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레산, 옥살산, 아세트산, 포름산, 벤조산, 푸마르산, 석신산, 타타르산, 락트산, 피루브산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 또는 파라-톨루엔설폰산 염이다.

[0061] 본 명세서에 기재된 화합물은 염기 부가염을 형성할 수 있다. 본 명세서에 기재된 화합물의 염기 부가염은 당업자에게 알려진 조건에서 화합물을 적합한 무기 염기 또는 유기 염기와 접촉시켜 형성될 수 있다. 예를 들어, 화합물을 수성 매질에서 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 수산화물 또는 알콕시드(예를 들어, 에톡시드 또는 메톡시드) 또는 적절하게 염기성인 유기 아민(예를 들어, 콜린 또는 메글루민)으로 처리함으로써 알칼리 금속(예컨대 나트륨, 칼륨, 또는 리튬) 또는 알칼리 토금속(예컨대 칼슘) 염을 제조하는 것이 가능할 수 있다. 따라서, 일 실시형태에서 RXFP1 조절제는 약제학적으로 허용 가능한 염이며, 약제학적으로 허용 가능한 염은 나트륨, 칼륨, 리튬, 칼슘, 콜린, 또는 메글루민 염이다.

[0062] 본 명세서에 기재된 화합물 및 염은 용매화 형태 및 비용매화 형태로 존재할 수 있다. 예를 들어, 용매화 형태는 반수화물, 일수화물, 이수화물, 삼수화물, 또는 이의 대안적인 양과 같은 수화된 형태일 수 있다. 본 명세서에 기재된 화합물의 이러한 모든 용매화 및 비용매화 형태가 본 명세서에 포함된다.

[0063] 본 명세서에 기재된 화합물 및 염의 원자는 이의 동위원소로서 존재할 수 있다. 원자가 이의 동원원소 중 하나 이상으로 대체된 본 명세서에 기재된 모든 화합물(예를 들어, 하나 이상의 탄소 원자가 ^{11}C 또는 ^{13}C 탄소 동위원소이거나, 하나 이상의 수소 원자가 ^{2}H 또는 ^{3}H 동위원소인 화학식 I의 화합물)이 본 명세서에 포함된다.

[0064] 본 명세서에 기재된 화합물은 시스- 및 트랜스-형태, E- 및 Z-형태, 및 R-, S-, 및 메소-형태를 포함하는(이에 한정되지 않음) 하나 이상의 기하학적, 광학적, 거울상이성질체, 및 부분입체이성질체 형태로 존재할 수 있다. 달리 언급되지 않는 한, 특정 화합물에 대한 언급은 라세미 및 이의 다른 혼합물을 포함하는 상기 모든 이성질체 형태를 포함한다. 적절한 경우, 이러한 이성질체는 공지된 방법(예를 들어, 크로마토그래피 기술 및 재결정화 기술)을 적용하거나 채택하여 혼합물로부터 분리될 수 있다. 적절한 경우 이러한 이성질체는 공지된 방법의 적용 또는 수정에 의해 제조될 수 있다.

[0065] 본 명세서에 기재된 화합물은 하나 이상의 키랄 중심을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 구조 또는 화학명이 키랄성을 나타내지 않는 한, 구조 또는 명칭은 해당 구조 또는 명칭에 상응하는 임의의 단일 입체이성질체뿐만 아니라 입체이성질체의 임의의 혼합물(예를 들어, 라세미체)을 포함하는 것으로 의도된다. 본 명세서에서 구조가 솔리드 웨지 및 해시 웨지(즉, 및)로 그려진 결합을 포함하는 경우, 솔리드 웨지 및 해시 웨지는

키랄 중심의 절대적 배열을 나타내는 것으로 의도된다.

[0066] 이러한 광학 활성 형태가 분리될 수 있는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, 단일 입체이성질체는 예를 들어 키랄 크로마토그래피 분리를 사용하여 이성질체의 혼합물(예를 들어, 라세미체)로부터 단리시킴으로써 수득될 수 있다. 다른 실시형태에서, 단일 입체이성질체는 예를 들어, 키랄 출발 물질로부터의 직접적 합성을 통해 수득된다.

[0067] 일 실시형태에 따르면, RXFP1 조절제는 단일 거울상이성질체가 95% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상의 거울상이성질체 과잉률(ee%)로 존재하는 것으로 제공된다. 편리하게는 단일 거울상이성질체는 99% 이상의 거울상이성질체 과잉률로 존재한다.

[0068] 일 실시형태에 따르면, RXFP1 조절제는 단일 거울상이성질체가 95 내지 100% 범위의 거울상이성질체 과잉률(ee%)로 존재하는 것으로 제공된다.

[0069] 본 명세서에 기재된 화합물은 케토- 및 에놀-형태를 포함하는(이에 한정되지 않음) 하나 이상의 호변이성질체 형태로 존재할 수 있다. 특정 화합물에 대한 언급은 모든 호변이성질체 형태(이의 혼합물 포함)를 포함한다. 따라서, 본 명세서에서 하나의 호변이성질체로 표시된 구조는 다른 호변이성질체도 포함하는 것으로 의도된다.

[0070] 본 명세서에 기재된 RXFP1 조절제는 인간 또는 동물 체내에서 분해되어 이러한 RXFP1 조절제를 방출하는 화합물인 전구약물의 형태로 투여될 수 있다. RXFP1 조절제의 이러한 약제학적으로 허용 가능한 전구약물도 일 실시형태를 형성한다. 다양한 형태의 전구약물이 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 아래 문헌을 참조한다:

[0071] a) Design of Pro-drugs, edited by H. Bundgaard, (Elsevier, 1985);

[0072] b) A Textbook of Drug Design and Development, edited by Krogsgaard-Larsen and H. Bundgaard, Chapter 5 "Design and Application of Pro-drugs", by H. Bundgaard p. 113-191 (1991);

[0073] c) H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, 8, 1-38 (1992);

[0074] d) H. Bundgaard, *et al*., Journal of Pharmaceutical Sciences, 77, 285 (1988); 및

[0075] e) N. Kakeya, *et al*., Chem. Pharm. Bull., 32, 692 (1984).

[0076] *RXFP1 조절제를 사용한 치료*

[0077] RXFP1의 조절 결과, 본 명세서에 기재된 RXFP1 조절제는 요법에 유용할 것으로 예상된다.

[0078] "요법"이라는 용어는 질환 또는 병태의 증상 중 하나, 일부, 또는 전부를 전체적으로 또는 부분적으로 완화시키거나, 기저 병인을 교정 또는 보상하기 위해 질환 또는 병태를 다루는 일반적인 의미를 갖는 것으로 의도된다. "요법"이라는 용어는 또한, 달리 명시하지 않는 한, "예방"을 포함한다. "치료적" 및 "치료적으로"라는 용어는 상응하는 방식으로 해석되어야 한다.

[0079] "예방"이라는 용어는 일반적인 의미를 갖는 것으로 의도되며, 질환 또는 병태의 발생을 방지하기 위한 1차 예방, 및 질환 또는 병태가 이미 발생되었고 환자가 일시적 또는 영구적으로 질환 또는 병태의 악화 또는 심화로부터 보호되거나 질환 또는 병태와 관련된 새로운 증상의 발생으로부터 보호되는 2차 예방을 포함한다.

[0080] "치료"라는 용어는 "요법"과 같은 의미로 사용된다. 이와 유사하게, 용어 "치료하다"는 "요법을 적용하는 것"으로서 간주될 수 있으며, 여기서 "요법"은 본 명세서에 정의된 바와 같다.

[0081] 본 명세서에 기재된 XFP1 조절제는 저항성 고혈압 및 폐고혈압을 동반한 심부전과 같은 병태의 치료에 사용될 수 있음이 이해될 것이다.

[0082] 본 명세서에서 사용되는 "심부전"이라는 용어는 급성 심부전, 만성 심부전(chronic heart failure; CHF), 및 급성 비대상성 심부전(ADHF)을 포함한다. "심부전"이라는 용어는 또한 박출률 보존 심부전(HFpEF), 중간 범위 박출률 심부전(HFmrEF; 박출률이 약간 감소된 심부전이라고도 지칭됨), 또는 박출률 감소 심부전(HFrEF)과 같은 보다 구체적인 진단을 포함할 수 있다. 이는 또한 비대성 심근병증이나 확장성 심근병증으로 인한 심부전을 포함할 수 있다.

[0083] 본 명세서에서 사용되는 용어 "폐고혈압"은 일반적으로 대상체가 휴식을 취하고 있을 때 평균 폐동맥압이 약 20 mmHg 이상, 선택적으로는 25 mmHg 이상인 대상체로서 정의될 수 있다. 이는 또한 일반적으로 대상체가 운동 중이거나 최근에 운동을 했을 때 약 30 mmHg 이상의 평균 폐동맥압으로 정의될 수 있다. 따라서, 대상체의 평균

폐동맥압은 약 20 mmHg 내지 약 30 mmHg, 선택적으로는 약 25 mmHg 내지 약 30 mmHg 또는 그 이상의 범위일 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 대상체는 다음을 가질 수 있다:

[0084] a. 약 40 mmHg 이상의 우심실 수축기압; 및/또는

[0085] b. 다음의 폐혈관 저항:

[0086] i. 3.0 미만의 우드 단위; 또는

[0087] ii. 3.0 이상의 우드 단위.

[0088] 따라서, 일부 경우에, 폐고혈압은 세계보건기구(WHO)에서 정의한 그룹 2 폐고혈압으로 분류될 수 있다. 다른 경우에, 폐고혈압은 세계보건기구에서 정의한 그룹 1 폐동맥 고혈압으로 분류될 수 있다(문헌[Ryan et al., 2012, Pulm. *Circ*. 2(1):107-121).

[0089] 폐고혈압 및 심부전의 매개변수는 당업계에 공지된 기술을 사용하여 측정되거나 추정될 수 있다. 예를 들어, 여기에는 심장초음파검사, 폐동맥 카테터 및 이식형 모니터링 장치가 포함된다. 특정 실시형태에서, 대상체에게는 당업계에 공지된 혈압 모니터링 장치, 선택적으로는 폐동맥압 모니터링 장치가 장착되어 있을 수 있다. 특정 실시형태에서, 폐동맥압 모니터링 장치는 CardioMEMS 압력 모니터링 장치이다. 전형적으로, 장치는 본 명세서에 개시된 RXFP1 조절제로 치료하기 전에 장착된다. 대안적으로, 치료 기간 동안 또는 치료 기간 후에 대상체에게 장치가 장착된다.

[0090] 본 명세서에서 사용되는 "폐고혈압을 동반한 심부전"이라는 용어는 동시에 폐고혈압을 앓고 있는 심부전 대상체(HF+PH 대상체)의 하위 집합을 지칭한다.

[0091] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "저항성 고혈압"은 상이한 계열의 3가지 항고혈압제(그 중 하나는 이뇨제)의 최적화된 용량을 동시에 사용했음에도 불구하고 고혈압 환자의 혈압이 목표치를 초과하여 상승되어 유지되는 것 또는 4가지 이상의 항고혈압제를 동시에 공급받는 경우 혈압이 적절히 조절되는 환자로서 정의된다(Carey et al., Hypertension, 2018, 72, e53-e90). 고혈압의 초기 치료는 칼슘 채널 차단제(CCB), 레닌-안지오텐신 시스템 차단제(안지오텐신 전환 효소[ACE] 저해제 또는 안지오텐신 수용체 차단제[ARB]) 및 이뇨제일 수 있다. rHT 환자의 경우, 추가 치료는 미네랄코르티코이드-수용체 길항제(MRA), 베타-차단제 및/또는 알파-차단제를 포함할 수 있다. 저항성 고혈압 대상체는 전형적으로 대상체가 휴식 중에 수축기 혈압이 140 mm Hg 이상이고/이거나 확장기 혈압이 90 mm Hg 이상일 수 있다. 대안적으로, 저항성 고혈압 대상체는 전형적으로 대상체가 휴식 중에 수축기 혈압이 130 mm Hg 이상이고/이거나 확장기 혈압이 80 mm Hg 이상일 수 있다. 대안적으로, 저항성 고혈압 대상체는 전형적으로 대상체가 휴식 중에 수축기 혈압이 150 mm Hg 이상이고/이거나 확장기 혈압이 90 mm Hg 이상일 수 있다. 일부 예에서, 저항성 고혈압은 저항성 본태성 고혈압일 수 있다. 원발성 고혈압이라고도 알려진 본태성 고혈압은 식별된 2차 원인이 알려지지 않은 고혈압의 형태이다.

[0092] "치료"는 표적 질환의 하나 이상의 증상 또는 원인의 개선 및/또는 제거를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 이는 하나 이상의 생물학적 마커 또는 기능의 수준을 (건강한 코호트와 비교하여) 질환이 없는 범위 내로 조정하는 것을 수반할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 개시된 RXFP1 조절제는 대상체에서 폐동맥압(Pulmonary Artery Pressure; mPAP)을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, mPAP는 적어도 1 mmHg 내지 15 mmHg 이상만큼 감소될 수 있다. 따라서, 본 명세서에 개시된 RXFP1 조절제는 대상체의 평균 폐동맥압을 적어도 1 mmHg, 적어도 2 mmHg, 적어도 3 mmHg, 적어도 4 mmHg, 적어도 5 mmHg, 적어도 6 mmHg, 적어도 7 mmHg, 적어도 8 mmHg, 적어도 9 mmHg, 적어도 10 mmHg, 적어도 11 mmHg, 적어도 12 mmHg, 적어도 13 mmHg, 적어도 14 mmHg 또는 적어도 15 mmHg 또는 그 이상만큼 감소시킬 수 있다. 마찬가지로, 본 명세서에 개시된 RXFP1 조절제는 대상체에서 예상 폐동맥 확장기압(estimated Pulmonary Artery Diastolic Pressure; ePAD)을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, ePAD는 적어도 1 mmHg 내지 15 mmHg 이상만큼 감소될 수 있다. 따라서, 본 명세서에 개시된 RXFP1 조절제는 대상체의 예상 폐동맥 확장기압을 적어도 1 mmHg, 적어도 2 mmHg, 적어도 3 mmHg, 적어도 4 mmHg, 적어도 5 mmHg, 적어도 6 mmHg, 적어도 7 mmHg, 적어도 8 mmHg, 적어도 9 mmHg, 적어도 10 mmHg, 적어도 11 mmHg, 적어도 12 mmHg, 적어도 13 mmHg, 적어도 14 mmHg 또는 적어도 15 mmHg 또는 그 이상만큼 감소시킬 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 본 명세서에 개시된 RXFP1 조절제는 심박출량의 척도로서 대상체의 박출률(EF%)을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, EF%는 적어도 1%~10%, 1%~20%, 1%~30%, 1%~40% 또는 1%~50% 이상만큼 증가할 수 있다. 따라서, 본 명세서에 개시된 RXFP1 조절제는 대상체에서 박출률(EF%)을 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 이상만큼 증가시킬 수 있다. 추가로 또는 대안적으로, 본 명세서에 개시된 RXFP1 조절제는 대상체에서 수축기 및/또는 이완기 혈압을 감소시킬 수 있다.

[0093] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 mPAP의 감소는 문헌[Solomonica A, et al. (2013) Circ Heart Fail. 6:53-60]에 기재된 바와 같이 호흡곤란의 개선을 초래할 수 있다.

[0094] 일 실시형태에서, 저항성 고혈압 또는 폐고혈압을 동반한 심부전인 병태를 갖는 대상체의 치료 방법이 제공되며, 이 방법은 대상체에게 유효량의 RXFP1 조절제를 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 폐고혈압을 동반한 심부전을 갖는 대상체의 치료 방법이 제공되며, 이 방법은 대상체에게 유효량의 RXFP1 조절제를 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 심부전은 박출률 감소 심부전, 중간 범위 박출률 심부전 또는 박출률 보존 심부전이다.

[0095] 일 실시형태에서, 저항성 고혈압을 갖는 대상체의 치료 방법이 제공되며, 이 방법은 대상체에게 유효량의 RXFP1 조절제를 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 항성 고혈압은 본태성 고혈압이다.

[0096] 일 실시형태에서, 대상체의 평균 폐동맥압은 약 25 mmHg 이상이고/이거나 우심실 수축기압은 약 40 mmHg 이상이다. 일 실시형태에서, 대상체의 폐혈관 저항은 3.0 미만의 우드 단위이다. 일 실시형태에서, 대상체의 폐혈관 저항은 3.0 이상의 우드 단위이다. 일 실시형태에서, 대상체에게는 혈압 모니터링 장치, 선택적으로는 폐동맥압 모니터링 장치가 장착되어 있다. 일 실시형태에서, 폐동맥압 모니터링 장치는 CardioMEMS 압력 모니터링 장치이다.

[0097] 용어 "치료적 유효량"은 대상체에 "요법"을 제공하거나 대상체에서 질환 또는 병태를 "치료하는" 데 효과적인, 본 명세서의 임의의 실시형태에 기술된 바와 같은 RXFP1 조절제의 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 상기 "요법", "치료" 및 "예방"의 정의에 기재된 바와 같은 대상체에서의 관찰 가능하거나 측정 가능한 임의의 변화를 야기할 수 있다. 당업자가 인식하는 바와 같이, 유효량은 투여 경로, 부형제 사용, 및 다른 작용제와의 공동 사용에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 조합용 요법이 사용되는 경우, RXFP1 조절제의 양 및 다른 약제학적 활성제(들)의 양은 조합되었을 때 대상체의 표적 장애 또는 병태를 치료하는 데 공동으로 효과적이다. 이와 관련하여, 조합된 양은 조합되었을 때 전술한 바와 같은 RXFP1의 조절 및/또는 효능작용에 반응하는 질환 또는 병태의 증상을 감소시키기에 충분한 경우 "치료적 유효량"이다. 전형적으로, 이러한 양은 당업자가 결정할 수 있다.

[0098] 본 명세서에 사용되는 용어 "대상체" 및 "환자"는 상호교환적으로 사용된다. "대상체"는 예를 들어 포유동물, 예를 들어 인간을 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체는 인간이다.

[0099] 일 실시형태에서, 저항성 고혈압 또는 폐고혈압을 동반한 심부전인 병태의 치료에 사용하기 위한 RXFP1 조절제가 제공된다. 일 실시형태에서, 폐고혈압을 동반한 심부전의 치료에 사용하기 위한 RXFP1 조절제가 제공된다. 일 실시형태에서, 저항성 고혈압의 치료에 사용하기 위한 RXFP1 조절제가 제공된다. 일 실시형태에서, 저항성 고혈압은 저항상 본태성 고혈압이다.

[0100] 일 실시형태에서, 저항성 고혈압 또는 폐고혈압을 동반한 심부전인 병태의 치료를 위한 의약의 제조에서의 RXFP1 조절제의 용도가 제공된다. 일 실시형태에서, 폐고혈압을 동반한 심부전의 치료를 위한 의약의 제조에서의 RXFP1 조절제의 용도가 제공된다. 일 실시형태에서, 저항성 고혈압의 치료를 위한 의약의 제조에서의 RXFP1 조절제의 용도가 제공된다. 일 실시형태에서, 저항성 고혈압은 저항상 본태성 고혈압이다.

[0101] *약제학적 조성물*

[0102] 본 명세서에 기재된 RXFP1 조절제는 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물로서 투여될 수 있다.

[0103] 따라서, 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법이 제공되며, 여기서 RXFP1 조절제는 RXFP1 조절제 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물로서 투여된다.

[0104] 일 실시형태에서 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법에 사용하기 위한 RXFP1 조절제 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0105] 특정한 조성물에 포함시키기 위해 선택된 부형제(들)는 투여 방식 및 제공된 조성물의 형태와 같은 요인에 따라 달라질 것이다. 적합한 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어 문헌[*Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Sixth edition, Pharmaceutical Press, edited by Rowe, Ray C; Sheskey, Paul J; Quinn, Marian]에 기재되어 있다. 약제학적으로 허용 가능한 부형제는, 예를 들어, 아쥬반트, 희석제, 담체, 안정화제, 착향제, 착색제, 충전제, 결합제, 붕해제, 활택제, 글리단트, 증점제 및 코팅제로 기능할 수 있다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 특정한 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 하나보다 많은 기능을 제공할 수 있으며, 얼마나 많은 부형제가 조성물에 존재하는지 및 다른 부형제가 조성물에 존재하는지에 따라

대안적 기능을 제공할 수 있다.

[0106] 약제학적 조성물은 경구 사용(예를 들어, 정제, 로젠지, 경질 또는 연질 캡슐, 수성 또는 유성 현탁액, 에멀션, 분산성 분말 또는 과립, 시럽, 또는 엘릭서), 국소적 사용(예를 들어, 크림, 연고, 젤, 또는 수성 또는 유성 용액 또는 현탁액), 흡입 투여(예를 들어, 미분 분말 또는 액체 에어로졸), 주입 투여(예를 들어, 미분 분말), 또는 비경구 투여(예를 들어, 정맥내, 피내, 근육내 또는 근육내 투약을 위한 멸균 수성 또는 유성 용액)에 적합한 형태, 또는 직장 투약을 위한 좌제로서 적합한 형태일 수 있다. 조성물은 당업계에 잘 알려진 통상적인 절차에 의해 수득될 수 있다. 경구용 조성물은 추가 성분, 예를 들어 하나 이상의 착색제, 감미제, 착향제, 및/또는 보존제를 함유할 수 있다.

[0107] **실시예**

[0108] 본 명세서에 기재된 화합물은 하기 실시예에서 추가로 설명된다. 이들 실시예는 단지 예시로서 제공되며 제한적이지 않다.

[0109] 실시예에서, 고분해능 질량 스펙트럼은 전기분무 인터페이스가 장착된 Micromass LCT 질량 분석계(LC-HRMS)에서 기록되었다.

[0110] ^{1}H NMR 측정은 300, 400, 500, 및 600 MHz의 ^{1}H 주파수에서 각각 작동하는 Bruker Avance III 300, 400, 500, 및 600 분광계에서 수행되었다. 실험은 전형적으로 25℃에서 기록되었다. 화학적 이동은 용매를 내부 표준으로 하여 ppm 단위로 표시된다. 헤테로원자 상의 양성자, 예를 들어 NH 및 OH 양성자는 NMR에서 검출될 때에만 보고되므로, 누락될 수 있다. 다음과 같은 약어(및 이의 파생어, 예를 들어 dd, 이중선의 이중선 등)가 사용되었다: s, 단일선; d, 이중선; t, 삼중선; q, 사중선; m, 다중선; br, 브로드; qn, 오겹선; p, 오중선.

[0111] 달리 명시되지 않는 한, 플래시 크로마토그래피는 순상 실리카 FLASH+®(40M, 25M 또는 12M), Biotage® SNAP 카트리지 KP-Sil(340, 100, 50, 또는 10), 또는 Agela® 플래시 칼럼 실리카-CS 카트리지(330, 180, 120, 80)를 사용하여 수행되었다.

[0112] 달리 명시되지 않는 한, 역상 플래시 크로마토그래피는 Agela® C-18 구형 20-35 μm 100A 카트리지를 사용하여 수행되었다.

[0113] 일반적으로, 사용된 모든 용매는 상업적으로 입수 가능하였고 분석용 등급이었다. 무수 용매가 통상적으로 반응에 사용되었다.

[0114] 실시예에 사용된 상 분리기는 ISOLUTE® 상 분리기 칼럼이다.

[0115] 하기의 중간체 및 실시예는 PerkinElmer의 ChemDraw Professional 버전 19.0.0.22를 사용하여 명명되었다.

[0116] 다음과 같은 약어가 사용되었다.

[0117] Aq Aq

[0118] $B_2Pin_2$4,4,5,5-테트라메틸-2-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1,3,2-디옥사보롤란

[0119] Calcd 계산치

[0120] DCM 디클로로메탄

[0121] DIA 디이소프로필아민

[0122] DIAD 디이소프로필 (E)-디아젠-1,2-디카복실레이트

[0123] DIPEA N-에틸-N-이소프로필-프로판-2-아민

[0124] DMF N,N-디메틸포름아미드

[0125] DMSO 디메틸설폭사이드

[0126] DPPA 디페닐포스포릴 아지드

[0127] DTBBPY 4,4'-디-tert-부틸-2,2'-디피리딜

[0128] EDC 3-(에틸이미노메틸렌아미노)-N,N-디메틸-프로판-1-아민;염산염

[0129] ESI 전기분무 이온화

[0130] Et 에틸

[0131] Et2O 디에틸 에테르

[0132] EtOAc 에틸아세테이트

[0133] EtOH 에탄올

[0134] h/hr 시간(들)

[0135] HATU (디메틸아미노)-N,N-디메틸(3-옥시도-1H-[1,2,3]트리아졸로[4,5-b]피리디닐)메타니미늄 헥사플루오로포스페이트

[0136] HOBt 1-하이드록시벤조트리아졸;수화물

[0137] HPLC 고성능 액체 크로마토그래피

[0138] HRMS 고분해능 질량분석법

[0139] IPA 이소프로필 알코올

[0140] IPAC 이소프로필 아세테이트

[0141] $[Ir(COD)OMe]_2$비스(1,5-시클로옥타디엔)디-μ-메톡시디이리듐(I)

[0142] L 리터

[0143] Me 메틸

[0144] MeCN 아세토니트릴

[0145] mL 밀리리터

[0146] MeOH 메탄올

[0147] 2-Me-THF 2-메틸테트라하이드로푸란

[0148] Min 분

[0149] MS 질량분석법

[0150] MTBE 메틸 tert-부틸 에테르

[0151] NMR 핵자기 공명

[0152] OAc 아세테이트

[0153] PE 석유 에테르

[0154] Pd/C 차콜상 팔라듐

[0155] Rt 실온

[0156] Sat 포화

[0157] SFC 초임계 유체 크로마토그래피

[0158] T3P 2,4,6-트리프로필-1,3,5,2,4,6-트리옥사트리포스피난 2,4,6-트리옥사이드

[0159] TEA 트리에틸아민

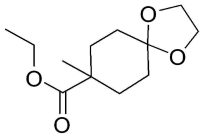
[0160] TFA 트리플루오로아세트산

[0161] THF 테트라하이드로푸란

[0162] TLC 박층 크로마토그래피

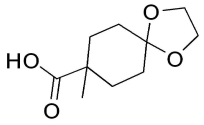
[0163] **중간체**

[0164] **중간체 1: 에틸 8-메틸-1,4-디옥사스피로[4.5]데칸-8-카복실레이트**

[0165] 

[0166] THF(3.50 L) 중 DIA(576 mL, 413 g, 4.08 mol)의 용액을 -50 내지 -40℃까지 냉각시키고, 온도를 -50 내지 -40℃로 유지하면서 n-BuLi(헥산 중 2.5 M, 1.09 kg, 3.92 mol)의 용액을 3시간에 걸쳐 첨가하였다. 용액을 -50 내지 -40℃에서 3시간 동안 교반한 후, 온도를 -50 내지 -40℃로 유지하면서 에틸 1,4-디옥사스피로[4.5]데칸-8-카복실레이트(700 g, 3.27 mol, THF 중 2.34 M)의 용액을 2시간에 걸쳐 첨가하였다. 반응 혼합물을 -50 내지 -40℃에서 4시간 동안 교반한 후, 온도를 -50 내지 -30℃로 유지하면서 요오드화메틸(603 g, 4.25 mol, THF 중 3.04 M)을 3시간에 걸쳐 첨가하였다. 반응 혼합물을 -50 내지 -30℃에서 추가로 2시간 동안 교반한 후, 온도를 0℃ 미만으로 유지하면서 수성 NH_4Cl(3.50 L, H_2O 중 20% w/w)을 1시간에 걸쳐 첨가하였다. 용액을 15 내지 25℃로 가온시키고, 0.5시간 동안 유지한 다음, 층을 분리시키고, 유기층을 수성 NH_4Cl(2×3.50 L, H_2O 중 20% w/w)로 세척하였다. 온도를 45℃ 미만으로 유지하면서 감압하에 유기 반응 용매를 THF에서 EtOH로 교환하여 표제 화합물을 EtOH 중 27% w/w 용액으로서 수득하였다(2.51 kg, 2.91 mol, 89%). 정제된 화합물에 대한 ^{1}H NMR (400 MHz $CDCl_3$) δ 1.18 (3H, s), 1.27-1.22 (3H, m), 1.47-1.35 (2H, m), 1.70-1.56 (4H, m), 2.13 (2H, d), 3.92 (4H, s), 4.14 (2H, q), MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ 229.2.

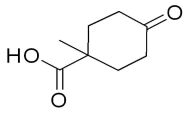
[0167] **중간체 2: 8-메틸-1,4-디옥사스피로[4.5]데칸-8-카복실산**

[0168] 

[0169] 중간체 1(1.13 kg, 1.31 mol, EtOH 중 27% w/w)의 용액에 EtOH(900 mL)를 첨가한 후, 온도를 15 내지 30℃로 유지하면서 수성 NaOH(2.63 L, 5.26 mol, H_2O 중 2 M)를 첨가하였다. 용액을 50 내지 60℃로 가열한 다음, 6시간 동안 유지한 후, 15 내지 30℃까지 냉각시키고, 감압하에 용액을 1.8 내지 2.4 L로 농축하였다. 헥산(1.50 L)을 첨가하고, 층을 분리시켰다. 수성층을 수집하고, 온도를 20℃ 미만으로 유지하면서, 수성 HCl(1.30 L, 5.2 mol, H_2O 중 4 M)을 첨가하여 pH를 3 내지 4로 조정하였다. 이 수성층을 DCM(2×1.50 L)으로 추출하고, 합한 유기상을 온도를 30℃ 미만으로 유지하면서, 감압하에 농축하여 표제 화합물을 DCM 중 17% w/w 용액으로서 수득하였다(1.43 kg, 1.24 mol, 94%). 정제된 화합물에 대한 ^{1}H NMR (500 MHz $CDCl_3$) δ 1.25 (3H, s), 1.53 (2H, dt), 1.62-1.72 (4H, m), 2.05-2.19 (2H, m), 3.93 (4H, s). MS (ESI): *m/z* $[M+Na]^+$ 223.1.

[0170] **중간체 3: 1-메틸-4-옥소시클로헥산-1-카복실산**

[0171] **<u>방법 A</u>**

[0172] 

[0173] 중간체 2의 용액(367 g, 250 mmol, DCM 중 14% w/w)에 TFA(95.3 mL, 142 g, 1.25 mol)를 첨가하였다. 반응 온도를 25 내지 35℃로 20시간 동안 유지한 후, 0 내지 10℃까지 냉각시켰다. 반응 용액에 H_2O(250 mL)를 첨가하고, 수성 NaOH(440 mL, 1.76 mol, H_2O 중 4 M)를 첨가하여 수성상의 pH를 9 내지 10으로 조정하였다. 층을 분리시키고 수성층을 유지하고 0 내지 10℃까지 냉각시켰다. 수성 HCl(73.5 mL, 294 mmol, H_2O 중 4 M)을 첨가하여 pH를 2 내지 3으로 조정한 다음, DCM(3×250 mL)으로 추출하고, 합한 DCM 용액을 감압하에 150 내지 200 mL로 농축하였다. 온도를 40℃ 미만으로 유지하면서 감압하에 유기 반응 용매를 DCM에서 MeCN으로 교환하여 표제 화합물을 MeCN 중 30% w/w 용액으로서 수득하였다(119 g, 227 mmol, 91%). 정제된 화합물에 대한 ^{1}H NMR (400 MHz

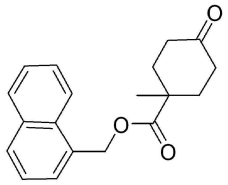
CDCl3) δ 1.39 (3H, s), 1.73 (2H, td), 2.43 (6H, m). MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ 157.1.

[0174] **방법 B**

[0175] 중간체 2의 용액(6.17 kg, 3.83 mol, DCM 중 12.4%)에 TFA(1.42 L, 2.18 kg, 19.13 mol)를 첨가하였다. 반응 온도를 25 내지 35℃로 20시간 동안 유지한 후, 0 내지 10℃까지 냉각시켰다. NaOH 수용액(918 g, 7.66 L H_2O에 용해된 22.96 mol)을 반응 용액에 첨가하고, 수성상의 pH를 9 내지 11로 조정하였다. 층을 분리시키고 수성층을 유지하고 0 내지 10℃까지 냉각시켰다. DCM(3.83 L)에 이어 수성 HCl(1.52 L, 6.08 mol, H_2O 중 4 M)을 첨가하여 pH를 3 내지 4로 조정한다. 유기층을 유지하고 수성층을 DCM(2×3.83 L)으로 추출하고, 합한 유기상을 염수(2.3 L, 15% w/w NaCl)로 세척하였다. 유기상을 감압하에 2.3 내지 3.1 L로 농축하였다. 온도를 45℃ 미만으로 유지하면서 감압하에 유기 반응 용매를 DCM에서 MeCN으로 교환하여 표제 화합물을 MeCN 중 18% 용액으로서 수득하였다(2.85 kg, 3.32 mol, 87%). 정제된 화합물에 대한 ^{1}H NMR (400 MHz CDCl3) δ 1.39 (3H, s), 1.73 (2H, td), 2.43 (6H, m). MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ 157.1.

[0176] **중간체 4: 나프탈렌-1-일메틸 1-메틸-4-옥소시클로헥산-1-카복실레이트**

[0177] **방법 A**

[0178] 

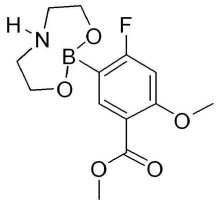
[0179] 중간체 3(119 g, 192 mmol, MeCN 중 25% w/w)의 용액에 1-클로로메틸나프탈렌(32.2 g, 183 mmol)에 이어 DIPEA(70.0 mL, 49.7 g, 384 mmol) 및 NaI(2.88g, 19.2 mmol)를 첨가하였다. 용액을 8시간 동안 50 내지 60℃로 가열한 후, 0 내지 10℃까지 냉각시켰다. H_2O(240 mL)를 첨가하고, 수성 HCl(55.0 mL, 220 mmol, H_2O 중 4 M)을 첨가하여 반응 혼합물의 pH를 3 내지 4로 조정하였다. 반응 혼합물을 MTBE(2×150 mL)로 추출하고, 합한 유기상을 수성 $NaHCO_3$(150 mL, 144 mmol, H_2O 중 8% w/w)로 세척하였다. 온도를 40℃ 미만으로 유지하면서 감압하에 유기 반응 용매를 MTBE에서 IPA로 교환하였다. 반응 용액의 온도를 -10 내지 3℃까지 낮추고 용액을 2시간 동안 교반하자 고체 침전물이 형성되었다. 고체를 여과하고 N_2 하에 15시간 동안 건조시켜 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다(42.8 g, 144 mmol, 74%); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 1.30 (3H, s), 1.65 (2H, td), 2.16-2.47 (6H, m), 5.66 (2H, s), 7.46 (1H, dd), 7.51-7.63 (3H, m), 7.78-7.93 (2H, m), 7.93-8.05 (1H, m). MS (ESI): *m/z* $[M+Na]^+$ 319.1.

[0180] **방법 B**

[0181] 중간체 3(2.66 kg, 3.09 mol, MeCN 중 18.2%)의 용액에 1-클로로메틸나프탈렌(535 g, 2.94 mol)에 이어 탄산칼륨(513 g, 3.71 mol) 및 새로운 MeCN의 추가 부분(714 mL)을 첨가하였다. 현탁액을 17시간 동안 50 내지 60℃로 가열한 후, 25 내지 30℃까지 냉각시켰다. 셀라이트 패드를 통해 여과하여 고체를 제거하고, 이를 MeCN(2×967 mL)으로 세척하였다. 여과액을 감압하에 1.45 내지 1.93 L로 농축한다. 온도를 50℃ 미만으로 유지하면서 감압하에 MeCN을 이소프로판올로 교환하였다. 혼합물의 온도를 20 내지 25℃까지 낮추자 고체 침전물이 형성되었다. 혼합물을 -10 내지 0℃까지 더 냉각시킨 후, 고체를 여과하고, 이소프로판올로 세척하고 N_2 하에 건조시켜 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다(752.6 g, 2.49 mol, 80.5%); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) 1.30 (3H, s), 1.65 (2H, td), 2.16-2.47 (6H, m), 5.66 (2H, s), 7.46 (1H, dd), 7.51-7.63 (3H, m), 7.78-7.93 (2H, m), 7.93-8.05 (1H, m). MS (ESI): *m/z* $[M+Na]^+$ 319.1.

[0182] **중간체 5: 메틸 5-(1,3,6,2-디옥사자보로칸-2-일)-4-플루오로-2-메톡시벤조에이트**

[0183] **방법 A**



[0184]

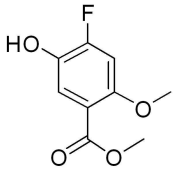
[0185] N_2로 1% 미만의 산소까지 탈기된 2-Me-THF(1.75 L)에 B_2Pin_2(362 g, 1.43 mol)를 첨가하였다. 용액을 20 내지 30℃로 유지하고 메틸 4-플루오로-2-메톡시벤조에이트(250 g, 1.36 mol)를 첨가하였다. DTBBPY(1.09 g, 4.10 mmol)를 첨가하고, 반응 용기를 배기시키고, 산소 수준이 0.5% 미만이 될 때까지 N_2로 다시 채웠다. $[Ir(COD)OMe]_2$(1.35 g, 2.04 mmol)를 첨가하고, 반응 용기를 배기시키고, 산소 수준이 0.5% 미만이 될 때까지 N_2로 다시 채웠다. 반응 혼합물을 80 내지 85℃로 가열하고 그 온도에서 추가로 2시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 0 내지 5℃까지 냉각시킨 후, 디에탄올아민(428 g, 4.07 mol, IPA 중 10.9 M)을 2.5시간에 걸쳐 천천히 첨가함과 동시에 H_2 가스가 생성되었다. 반응 혼합물을 0 내지 5℃에서 2.5시간 동안 교반한 후, 여과하고 고체를 2-Me-THF(3×750 mL)로 세척하였다. 고체를 N_2 하에 10시간 동안 건조시켜 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다(356 g, 1.20 mol, 88%); ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 2.81-2.89 (2H, m), 3.14 (2H, dq), 3.71 (2H, ddd), 3.74 (3H, s), 3.78 (3H, s), 3.84 (2H, td), 6.77 (1H, d), 7.10 (1H, s), 7.83 (1H, d). MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ 297.1.

[0186] **방법 B**

[0187] N_2로 1% 미만의 산소까지 탈기된 2-Me-THF(140 mL)에 B_2Pin_2(29.0 g, 114 mmol) 및 메틸 4-플루오로-2-메톡시벤조에이트(20.6 g, 109 mmol)를 첨가하였다. 용액을 20 내지 30℃로 유지한 다음, DTBBPY(88 mg, 0.33 mmol) 및 $[Ir(COD)OMe]_2$(108 mg, 0.16 mmol)를 첨가하고, 반응 용기를 배기시키고, 산소 수준이 0.5% 미만이 될 때까지 N_2로 다시 채웠다. 반응 혼합물을 80 내지 85℃로 가열하고 그 온도에서 추가로 3시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 0 내지 10℃까지 냉각시킨 후, 이소프로판올(12.4 mL, 218 mmol)을 천천히 첨가함과 동시에 H_2 가스가 생성되었다. 시드(100 mg의 중간체 5)를 첨가한 다음, IPA(20 mL)에 용해된 디에탄올아민(22.84 g, 218 mmol)을 첨가하여 유동적인 슬러리를 수득하였다. 슬러리를 20 내지 30℃로 가온시키고 고체를 여과로 수집하였다. 이어서 2-Me-THF(160 ml)로 세척하고 고체를 N_2 하에 10시간 동안 건조시켜 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다(29.1 g, 96 mol, 88%); ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 2.81-2.89 (2H, m), 3.14 (2H, dq), 3.71 (2H, ddd), 3.74 (3H, s), 3.78 (3H, s), 3.84 (2H, td), 6.77 (1H, d), 7.10 (1H, s), 7.83 (1H, d). MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ 297.1.

[0188] **중간체 6: 메틸 4-플루오로-5-하이드록시-2-메톡시벤조에이트**

[0189] **방법 A**



[0190]

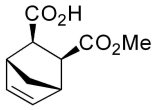
[0191] H_2O(1.05 L) 중 중간체 5(350 g, 1.18 mol)의 현탁액에 THF(1.75 L)를 첨가하고, 투명한 용액이 얻어질 때까지 반응 혼합물을 교반하였다. $(NH_4)_2CO_3$(136 g, 1.41 mol)를 첨가하고, 비균질 혼합물을 0 내지 10℃까지 냉각시켰다. 반응 온도를 0 내지 30℃로 유지하면서 $NaBO_3.4H_2O$(217 g, 1.41 mol)를 2시간에 걸쳐 10등분으로 첨가하였다. 반응 온도를 20 내지 30℃로 조정하고 1시간 동안 유지하였다. $NaHSO_3$ 수용액(1.96 L, 942 mmol, H_2O 중 0.48 M)을 3시간에 걸쳐 첨가하고, 반응 혼합물을 추가로 0.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고,

고체를 에틸아세테이트(700 mL)로 세척하고, 여과액과 세척액을 합하여 2상 용액을 수득하였다. 용액을 분리시키고, 온도를 40℃ 미만으로 유지하면서 감압하에, 남아있는 유기상 용매를 THF/에틸아세테이트에서 MeOH로 교환하였다. H_2O(3.50 L)를 4시간에 걸쳐 적가하고, 반응 혼합물을 0 내지 5℃까지 냉각시키고 2시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 수집된 고체를 H_2O(3×350 mL)로 세척하고 40℃ 미만의 열풍으로 건조시켜 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다(195 g, 974 mmol, 83% 수율); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 3.82 (3H, s), 3.86 (3H, s), 6.72 (1H, d), 7.54 (1H, d). MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ 201.0.

[0192] **방법 B**

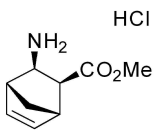
[0193] 중간체 5(32.41 g, 67.3 mmol)를 아세트산(12.13 g, 202 mmol)과 함께 2-Me-THF(100 mL)에 용해시키고 0 내지 10℃까지 냉각시켰다. 과산화수소 용액(30% w/w, 9.16 g, 80.8 mmol)을 2시간에 걸쳐 첨가한 후, 반응 온도를 20 내지 30℃로 조정하고 18시간 동안 유지하였다. $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 수용액(20% w/w, 50 mL)으로 혼합물을 퀜칭하고 상을 분리시킨다. 수성액을 버리고, 유기상을 $Na_2S_2O_3.5H_2O$ 수용액(5% w/w, 100 mL)으로 2회 세척하였다. 유기상을 감압하에 60 mL로 농축한 다음, 2-Me-THF(100 mL)로 또 다른 2회 진공 증류를 하여 35 내지 45℃의 용해된 용액을 수득하였다. 시드(100 mg의 중간체 6)를 첨가한 후, 300 mL의 n-헵탄을 5시간에 걸쳐 천천히 첨가하여 핵생성을 제어하였다. 생성된 슬러리를 20 내지 30℃로 조정하고 밤새 교반한 후 여과하였다. 수집된 고체를 n-헵탄(2×60 mL)으로 세척하고 건조시켜 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다(12.5 g, 62.5 mmol, 93% 수율); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 3.82 (3H, s), 3.86 (3H, s), 6.72 (1H, d), 7.54 (1H, d). MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ 201.0.

[0194] **중간체 7: (1R,2R,3S,4S)-3-(메톡시카보닐)바이시클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-카복실산**

[0195] 

[0196] 톨루엔(4.64 L) 중 (3aR,4R,7S,7aS)-3a,4,7,7a-테트라하이드로-4,7-메타노이소벤조푸란-1,3-디온(387 g, 2.36 mol)의 용액에 퀴니딘(843 g, 2.60 mol)에 이어 톨루엔(774 mL)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 -10 내지 -5℃까지 냉각시키고 MeOH(227 g, 286 mL, 7.08 mol)를 1.5시간에 걸쳐 적가한 후, -10 내지 -5℃에서 14시간 동안 유지하였다. 반응 혼합물을 -5 내지 5℃로 가온시키고, 2시간 동안 유지한 후, 여과하였다. 고체를 톨루엔(3×387 mL)으로 세척하고, 여과액과 세척액을 합하고 0 내지 10℃까지 냉각시켰다. 별도의 용기에서 HCl 수용액(590 mL, 7.08 mol, H_2O 중 12 M) 및 NaCl(1.24 kg, 21.2 mol)을 H_2O(6.39 L)에 첨가하고, 반응 용액을 10℃ 미만으로 유지하면서, 생성된 용액을 주 반응 용기에 적가하였다. 반응 혼합물을 10 내지 20℃로 가온시키고, 0.5시간 동안 유지한 후, 여과하였다. 고체를 톨루엔(1.94 L)으로 세척하고, 여과액과 세척액을 합하고, 2상 용액을 분리시켰다. 유기상을 수성 NaCl(3.87 L, H_2O 중 20% w/w)로 세척하고 5℃ 미만에서 보관하여 표제 화합물을 톨루엔 중 5.9% w/w 용액으로서 수득하였다(6.19 kg, 1.83 mol, 78%); 정제된 화합물에 대한 ^{1}H NMR (400 MHz DMSO-d_6) δ 1.25-1.32 (1H, m), 1.95 (1H, d), 2.48-2.50 (2H, m), 2.93 (2H, s), 3.51 (3H, s), 6.15-6.22 (2H, m), 12.21 (1H, s). MS (ESI): *m/z* [M+Na]+ 219.1.

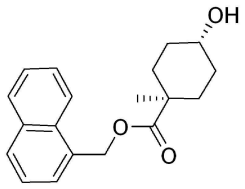
[0197] **중간체 8: 메틸 (1S,2S,3R,4R)-3-아미노바이시클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-카복실레이트 하이드로클로라이드**

[0198] 

[0199] 반응 용액을 5℃ 미만으로 유지하면서, -5 내지 5℃의 톨루엔 중 중간체 7의 용액(6.19 kg, 5.9% w/w, 1.85 mol)에 TEA(307 mL, 223 g, 2.22 mol)에 이어 DPPA(538 g, 1.94 mol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 -5 내지 5℃에서 4시간 동안 교반한 후, TEA(767 mL, 557 g, 5.55 mol)에 이어 시트르산(352 g, 1.85 mol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 -5 내지 5℃에서 6시간 동안 교반한 후, 반응 용액을 10℃ 미만으로 유지하면서 H_2O(3.6 L)를 첨가하였다. 2상 반응 용액을 0.5시간 동안 교반하고, 상을 분리시키고 유기상을 H_2O(3.6 L) 및

수성 NaCl(3.6 L, H_2O 중 15% w/w)로 세척한 다음, 2 내지 8℃에서 보관하여 메틸 (1S,2S,3R,4R)-3-(아지도카보닐)바이시클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-카복실레이트(중간체 9)를 톨루엔 중 용액으로서 수득하고 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다. 반응 온도를 80℃ 미만으로 유지하면서, 2 내지 8℃의 톨루엔 중 용액으로서의 중간체 9를 70 내지 80℃의 톨루엔(1.80 L) 함유 반응기에 2시간에 걸쳐 첨가하였다. 생성된 용액을 1시간 동안 교반한 후, 20 내지 30℃까지 냉각시켰다. 온도를 50℃ 미만으로 유지하면서 감압하에 유기 반응 용매를 톨루엔에서 1,4-디옥산으로 교환하여 메틸 (1S,2S,3R,4R)-3-이소시아나토바이시클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-카복실레이트(중간체 10)를 1,4-디옥산 중 용액으로서 수득하고 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다. 10 내지 20℃에서 1,4-디옥산 중 중간체 10의 용액에 HCl(420 mL, 1.68 mol, 1,4-디옥산 중 4 M)에 이어 H_2O(360 mL, 1.68 mol, 1,4-디옥산 중 4.67 M)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 25 내지 35℃로 가온시키고 16시간 동안 유지하였다. MTBE(1.65 L)를 적가하고, 반응 혼합물을 여과하고, 고체를 MTBE/1,4-디옥산(1:1, 660 mL) 및 MTBE(660 mL)로 세척한 후, 30 내지 40℃에서 진공 건조시켜 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다(258 g, 1.27 mol, >99% ee, 75%); ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 1.45 (1H, d), 2.04 (1H, d), 2.52-2.67 (1H, m), 2.94-3.10 (2H, m), 3.19 (1H, d), 3.65 (3H, s), 6.21 (1H, m), 6.30 (1H, m), 8.34 (3H, s). MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ 168.1.

[0200] **중간체 11: 나프탈렌-1-일메틸 (1*r*,4*r*)-4-하이드록시-1-메틸시클로헥산-1-카복실레이트**

[0201] 

[0202] **경로 A**

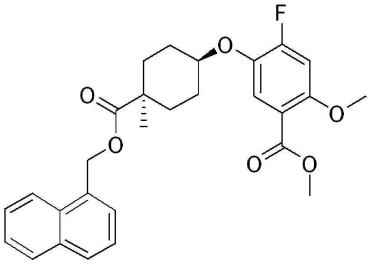
[0203] 20 내지 30℃에서 H_2O(550 mL) 중 $Na_2HPO_4.12H_2O$(8.25 g, 23.0 mmol), NaH_2PO_4(0.55 g, 4.48 mmol), 및 $MgCl_2$(0.11 g, 1.10 mmol)의 용액에 IPA(450 mL) 중 용액으로서 중간체 4(50.0 g, 169 mmol)를 첨가하였다. 6 M HCl을 사용하여 반응 용액의 pH를 7.3 내지 7.8로 조정하고 NAD+(0.66 g, 1.00 mmol)에 이어 ADH-230(7.50 g, 0.15 wt%)을 첨가하였다. ADH-230은 Johnson Matthey PLC(UK, 카탈로그 번호 ADH-230)에서 입수할 수 있는 알코올 탈수소효소이다. 이어서 반응 혼합물을 33 내지 37℃에서 18시간 동안 유지한 후, 온도를 45℃ 미만으로 유지하면서 감압하에 300 내지 400 mL로 농축하였다. NaCl(150 g), Celite®(20.0 g, 0.4 wt%), 및 MTBE(500 mL)를 첨가하고 반응을 0.5시간 동안 유지하였다. 혼합물을 여과하고 필터 케이크를 MTBE(250 mL)로 세척하였다. 합한 여과액을 분리시키고 수성상을 MTBE(500 mL)로 추출하였다. 유기상을 합하고 H_2O(250 mL)로 세척한 후, 온도를 45℃ 미만으로 유지하면서 감압하에 용매를 THF로 교환하여 표제 화합물(138 g, 33% w/w%, 99:1 초과의 트랜스:시스, 0.1% 미만의 IPA, 92% 수율)을 THF 중 용액으로서 수득하고 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다. 정제된 화합물에 대한 ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.21 (3H, s), 1.48-1.58 (2H, m), 1.62-1.77 (4H, m), 1.82-1.93 (2H, m), 3.74-3.77 (1H, m), 5.57 (2H, s), 7.41-7.48 (1H, m), 7.48-7.57 (3H, m), 7.85 (1H, d), 7.87-7.91 (1H, m), 7.98 (1H, d). MS (ESI): *m/z* [M+Na]+ 321.1.

[0204] **경로 B**

[0205] -78℃까지 냉각된 THF(10 mL) 중 중간체 4(1.00 g, 3.37 mmol)의 교반 용액에 THF(5 mL) 중 리튬 트리-sec-부틸보로하이드라이드(1.06 g, 5.6 mmol)의 용액을 질소하에 1분에 걸쳐 적가하였다. 생성된 용액을 -78℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 -78℃의 0.1 M HCl(10 mL)로 퀜칭한 후, EtOAc(3×50 mL)로 추출하였다. 유기층을 모으고 Na_2SO_4로 건조시키고, 여과하고 증발시켰다. 잔류물을 정제용 TLC(EtOAc/PE, 1:3)로 정제하여 표제 화합물(0.488 g, 48.5%)을 담황색 검으로서 수득하였다. 단리된 물질은 3:100의 시스/트랜스 비를 가졌다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ1.21 - 1.25 (s, 3H), 1.37 - 1.49 (m, 1H), 1.49-1.61 (m,2H), 1.61 - 1.74 (m, 4H), 1.83 - 1.95 (m, 2H), 3.74 - 3.83 (dq, 1H), 5.57 - 5.61 (s, 2H), 7.43 - 7.54 (dd, 1H), 7.50 - 7.61 (m, 3H), 7.84 - 7.94 (m, 2H), 7.97 - 8.04 (m, 1H).). MS (ESI): *m/z* $[M+Na]^+$ 321.

[0206] **중간체 12: 메틸 4-플루오로-2-메톡시-5-(((1*s*,4*s*)-4-메틸-4-((나프탈렌-1-일메톡시)카보닐)시클로헥실)옥시)벤**

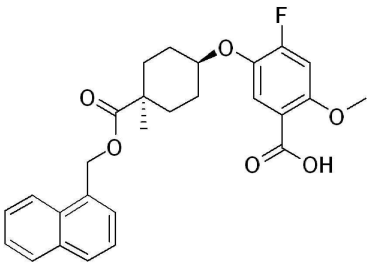
조에이트



[0207]

[0208] THF 중 중간체 11의 용액(736 g, 34% w/w, 839 mmol)에 THF(156 mL), PPh_3(248 g, 944 mmol), 및 중간체 6(140 g, 699 mmol)을 첨가하였다. 용액을 30℃로 가열한 후, 반응 온도를 40℃ 미만으로 유지하면서 DIAD(184 g, 909 mmol)를 1시간에 걸쳐 적가하였다. 용액을 30 내지 40℃에서 1시간 동안 유지한 후, 20 내지 30℃까지 냉각시킨 다음, NaCl 수용액(700 mL, H_2O 중 20% w/w)을 첨가하였다. 층을 분리시키고 THF 중 표제 화합물의 미정제 용액을 다음 단계에서 직접 사용하였다. 정제된 화합물에 대한 ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.17 (3H, s), 1.20-1.30 (2H, m), 1.58 (2H, qd), 1.88-1.98 (2H, m), 2.29 (2H, d), 3.84 (3H, s), 3.88 (3H, s), 4.05 (1H, tq), 5.61 (2H, s), 6.72 (1H, d), 7.43-7.58 (5H, m), 7.82-7.94 (2H, m), 8.00 (1H, d). MS (ESI): *m/z* [M+Na]+ 503.2.

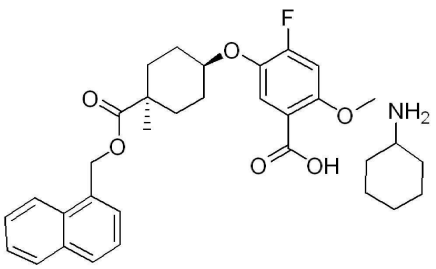
[0209] **중간체 13: 4-플루오로-2-메톡시-5-(((1*s*,4*s*)-4-메틸-4-((나프탈렌-1-일메톡시)카보닐)시클로헥실)옥시)벤조산**



[0210]

[0211] 반응 온도를 10℃ 미만으로 유지하면서, 0 내지 5℃의 이전 단계로부터 직접 사용된 중간체 12의 미정제 용액에 $LiOH \cdot 2H_2O$ 수용액(88.0 g, 2.10 mol, H_2O 중 525 mL)을 1시간에 걸쳐 첨가하였다. 용액을 15 내지 30℃로 가온시키고 16시간 동안 격렬하게 교반하였다. IPAC(1.68 L)를 첨가하고 용액을 0 내지 10℃까지 냉각시킨 후, 반응 온도를 10℃ 미만으로 유지하면서 H_3PO4(1.26 L, 2.52 M, H_2O 중 2 M)를 적가하여 pH 4.0 내지 5.0의 용액을 수득하였다. 유기층을 분리시키고 NaCl 수용액(700 mL, H_2O 중 20% w/w)으로 세척하였다. 온도를 50℃ 미만으로 유지하면서 감압하에 THF를 제거하고 IPAC(4.20 L)를 첨가하여 IPAC 중의 표제 화합물을 수득하고 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다. 정제된 화합물에 대한 ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 1.18 (3H, s), 1.22-1.36 (2H, m), 1.58 (2H, qd), 1.95 (2H, dt), 2.29 (2H, d), 4.02 (3H, s), 4.19 (1H, td), 5.60 (2H, s), 6.82 (1H, d), 7.46 (1H, dd), 7.49-7.62 (3H, m), 7.78 (1H, d), 7.82-7.94 (2H, m), 7.99 (1H, d).

[0212] **중간체 14: 4-플루오로-2-메톡시-5-(((1*s*,4*s*)-4-메틸-4-((나프탈렌-1-일메톡시)카보닐)시클로헥실)옥시)벤조에이트 시클로헥산아미늄 염**



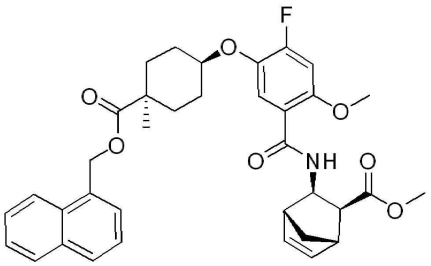
[0213]

[0214] 50 내지 55° C에서 이전 단계로부터 바로 사용된 IPAC 중 중간체 13의 미정제 용액에 시클로헥실아민의 용액

(280 mL, 699 mmol, IPAC 중 2.5 M)을 3시간에 걸쳐서 적가하였다. 비균질 슬러리를 50 내지 55℃에서 0.5시간 동안 그 다음 40 내지 45℃에서 추가 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 40 내지 45℃까지 미리 가온된 IPAC(3×0.98 L)로 고체를 세척하고, 45℃에서 16시간 동안 N_2 유동하에 건조시켰다. 건조된 수집된 고체에 MeOH(3.64 L)를 첨가하고, 혼합물을 55 내지 56℃까지 가열하였다. H_2O(1.58 L)를 1시간에 걸쳐 적가한 후, 혼합물을 1시간 동안 교반한 후 0 내지 5℃까지 3시간 동안 냉각시켰다. 비균질 슬러리를 추가로 1시간 동안 정치시킨 후 여과하고, 0℃에서 5:3 MeOH:H_2O(2×750 mL)로 세척하고, 고체를 N_2하에 45℃에서 16시간 동안 건조시켜 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다(332 g, 메틸 4-플루오로-5-하이드록시-2-메톡시벤조에이트로부터 85%); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 0.96 (1H, ddt), 1.03-1.36 (6H, m), 중첩 1.14 (3H, S), 1.46-1.7 (5H, m), 1.91 (4H, dt), 2.26 (2H, d), 2.81 (1H, t), 3.76 (3H, s), 4.03 (1H, tt), 5.59 (2H, s), 6.65 (1H, d), 7.37-7.49 (2H, m), 7.49-7.6 (3H, m), 7.81-7.93 (2H, m), 7.98 (1H, d). MS (ESI): *m/z* [M+Na]+ 489.2.

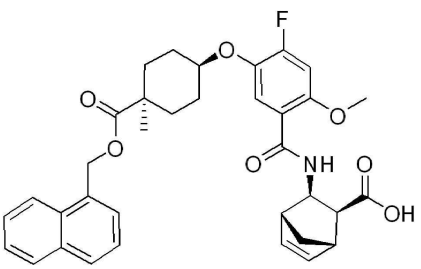
[0215] ℃

[0216] **중간체 15: 메틸 (1S,2S,3R,4R)-3-(4-플루오로-2-메톡시-5-(((1s,4S)-4-메틸-4-((나프탈렌-1-일메톡시)카보닐)시클로헥실)옥시)벤즈아미도)바이시클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-카복실레이트**

[0217] 

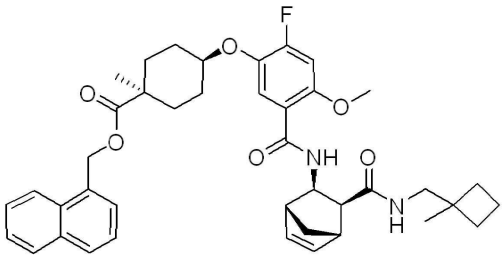
[0218] 15 내지 30℃에서 DCM(750 mL) 중 중간체 14(149 g, 264 mmol)의 용액에 H_2O(450 mL)를 첨가한 다음, HCL(300 mL, H_2O 중 1 M)을 천천히 첨가하였다. 2상 용액을 0.5시간 동안 교반한 후 분리시키고, 유기상을 HCl(750 mL, H_2O 중 0.2 M)에 이어 H_2O(3×750 mL)로 세척하였다. 온도를 30℃ 미만으로 유지하면서 감압하에 유기상 용액을 농축하여 0.1% 미만의 H_2O까지 건조시켰다. 용액을 DCM(450 mL)으로 희석하여 총 부피를 750 mL로 한 후, 중간체 8(59.3 g, 291 mmol)을 첨가하여 비균질 슬러리를 수득하였다. 이 혼합물에 DIPEA(137 g, 1.06 mol)에 이어 T3P(252 g, 397 mmol, EtAOc 중 50% w/w)를 첨가하고, 용액을 1시간 동안 교반하였다. 용액을 0 내지 10℃까지 냉각시킨 후, H_2O(750 mL)를 첨가한 다음, 추가로 0.5시간 동안 교반하였다. 2상 용액을 분리시키고 유기상을 H_2O(2×750 mL)로 세척한 후, 감압하에 용매를 THF로 교환하여 THF 중의 표제 화합물을 수득하고 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다. 정제된 화합물에 대한 ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ1.16 (3H, s), 1.25 (2H, td), 1.49-1.69 (3H, m), 1.92-2.01 (2H, m), 2.04-2.1 (1H, m), 2.28 (2H, d), 2.71 (1H, dd), 2.83 (1H, s), 2.92-3.05 (1H, m), 3.61 (3H, s), 3.93 (3H, s), 4.17 (1H, td), 4.46 (1H, td), 5.60 (2H, s), 6.25 (2H, ddd), 6.72 (1H, d), 7.46 (1H, dd), 7.48-7.6 (3H, m), 7.81-7.95 (3H, m), 7.99 (1H, d), 8.60 (1H, d). MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ 616.3.

[0219] **중간체 16: (1S,2S,3R,4R)-3-(4-플루오로-2-메톡시-5-(((1*s*,4*S*)-4-메틸-4-((나프탈렌-1-일메톡시)카보닐)시클로헥실)옥시)벤즈아미도)바이시클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-카복실산**

[0220] 

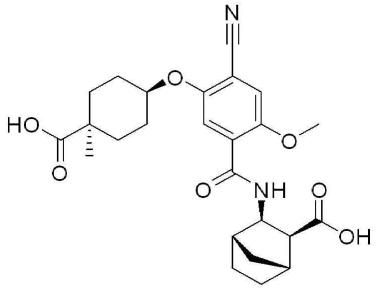
[0221] 이전 단계의 THF(750 mL) 중 중간체 15의 미정제 용액을 0 내지 5℃까지 냉각시켰다. LiOH·$2H_2O$ 수용액(27.7 g, 661 mmol, 150 mL H20 중)을 첨가하고 용액을 36시간 동안 유지하였다. HCl(0.5 M, 1.45 L, 2.90 mol)을 조금씩 천천히 첨가하여 용액의 pH를 2로 조정하고 0 내지 5℃로 1시간 동안 유지하였다. 비균질 슬러리를 여과하고 고체를 0℃의 1:3 MeOH:H_2O(600 mL)로 세척하고, 고체를 N_2 하에 45℃에서 16시간 동안 건조시켜 미정제 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다(158 g, 99%). 미정제물(150 g)을 60 내지 65℃에서 0.5시간 동안 IPAC(1.13 L)에 슬러리화하였다. 비균질 혼합물을 3시간에 걸쳐 0 내지 5℃까지 냉각시킨 다음, 1시간 동안 추가로 교반한 후 여과하였다. 수집된 고체를 0 내지 5℃의 IPAC(2×300 mL)로 처리한 후 N_2 하에 45℃에서 12시간 동안 건조시켜 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다(127 g, 중간체 14로부터 82%); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ1.16 (3H, s), 1.2-1.35 (2H, m), 1.50-1.69 (3H, m), 1.89-2.08 (3H, m), 2.27 (2H, ddd), 2.72 (1H, dd), 2.80 (1H, s), 3.06 (1H, s), 3.75 (3H, s), 4.15 (1H, tt), 4.43-4.54 (1H, m), 5.59 (2H, s), 6.24 (2H, ddd), 6.53 (1H, d), 7.45 (1H, dd), 7.47-7.58 (3H, m), 7.8-7.9 (3H, m), 7.94-8.05 (1H, m), 8.59 (1H, d). MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ 602.3.

[0222] **중간체 17: 나프탈렌-1-일메틸 (1*S*,4*s*)-4-(2-플루오로-4-메톡시-5-(((1R,2R,3S,4S)-3-(((1-메틸시클로부틸)메틸)카바모일)바이시클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-일)카바모일)페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실레이트**

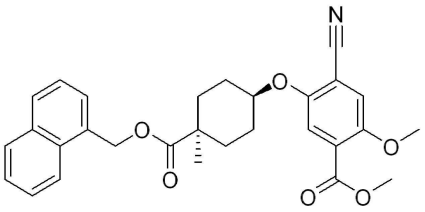
[0223] 

[0224] 0 내지 5℃에서 DCM(300 mL) 중 DIPEA(6.45 g, 49.9 mmol)의 용액에 중간체 16(30.6 g, 49.9 mmol)에 이어 (1-메틸시클로부틸)메탄아민 하이드로클로라이드(8.63 g, 62.4 mmol)를 첨가하였다. 온도를 0 내지 5℃로 유지하면서 DIPEA(25.8 g, 200 mmol)를 적가한 후, T3P(50.8 g, 79.8 mmol, EtAOc 중 50% w/w)를 0.5시간에 걸쳐 첨가하였다. 용액을 15 내지 25℃로 가온시키고 1시간 동안 교반한 후, 온도를 30℃ 미만으로 유지하면서 H_2O(150 mL)를 적가하였다. 2상 용액을 분리시키고 유기상을 H_2O(2×150 mL)로 세척한 후, 감압하에 용매를 EtOH로 교환하여 표제 화합물을 EtOH 중 미정제 용액으로서 수득하고(128 g, 26% w/w, 96% 수율) 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다. 정제된 화합물에 대한 ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 0.98 (3H, s), 1.16 (3H, s), 1.21-1.29 (2H, m), 1.51-1.66 (5H, m), 1.66-1.76 (3H, m), 1.76-1.82 (1H, m), 1.88-2.02 (2H, m), 2.26 (3H, dd), 2.40 (1H, dd), 2.80 (1H, s), 3.00 (1H, s), 3.05 (1H, dd), 3.21 (1H, dd), 3.93 (3H, s), 4.06-4.2 (1H, m), 4.39 (1H, td), 5.60 (2H, s), 5.64 (1H, t), 6.19-6.38 (2H, m), 6.70 (1H, d), 7.46 (1H, dd), 7.49-7.62 (3H, m), 7.75-7.93 (3H, m), 8.00 (1H, d), 8.66 (1H, d). MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ 683.3.

[0225] **중간체 19: (1R,2S,3R,4S)-3-(5-(((1s,4S)-4-카복시-4-메틸시클로헥실)옥시)-4-시아노-2-메톡시벤즈아미도)바이시클로[2.2.1]헵탄-2-카복실산**

[0226] 

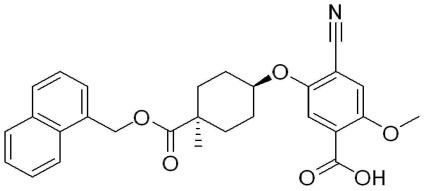
[0227] **단계 A. 중간체 20: 메틸 4-시아노-2-메톡시-5-(((1s,4s)-4-메틸-4-((나프탈렌-1-일메톡시)카보닐)시클로헥실)옥시)벤조에이트**



[0228]

[0229] THF(30 mL) 중 메틸 4-시아노-5-하이드록시-2-메톡시벤조에이트(1.4 g, 6.7 mmol), 중간체 11, 및 PPh_3(2.6 g, 10.1 mmol)의 용액을 60℃에서 10분 동안 교반하였다. DIAD(1.97 mL, 10.1 mmol)를 천천히 첨가한 후, 반응 혼합물을 60℃에서 14시간 동안 교반하였다. 이어서 감압하에 용매를 제거하고, 잔류물을 EtOAc(150 mL)에 재용해시키고, $NaHCO_3$(포화, 200 mL), NH_4Cl(포화, 250 mL), 및 염수(포화, 250 mL)로 순차 세척하였다. 유기층을 분리시키고 Na_2SO_4로 건조시키고, 여과하고, 감압하에 용매를 제거하였다. 이동상으로서 PE 중 0~18% EtOAc의 구배를 사용하는 플래시 크로마토그래피로 미정제 생성물을 정제하여 표제 화합물(3.25 g, 99%)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI): *m/z* $[M+Na]^+$ 510.3.

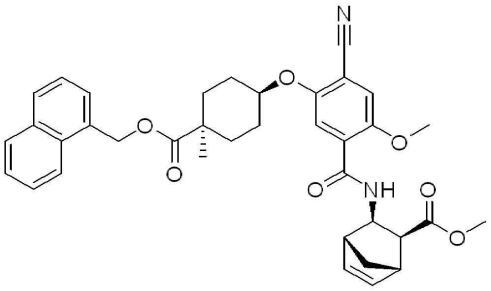
[0230] **단계 B. 중간체 21: 4-시아노-2-메톡시-5-(((1s,4s)-4-메틸-4-((나프탈렌-1-일메톡시)카보닐)시클로헥실)옥시)벤조산**



[0231]

[0232] 10℃에서 H_2O:THF 1:3(80 mL) 중 중간체 20(3.25 g, 6.7 mmol)의 교반 용액에 LiOH(1.6 g, 66.7 mmol)를 나누어 첨가하고, 생성된 현탁액을 20℃에서 교반하였다. 3시간 후, HCl(2 M)을 첨가하여 반응 혼합물의 pH를 pH 3으로 조정하였다. 반응 혼합물을 EtOAc(350 mL)로 희석하고, 염수(포화, 350 mL), H_2O(350 mL), 및 염수(350 mL)로 순차 세척하였다. 유기층을 분리시키고 Na_2SO_4로 건조시키고, 여과하고, 감압하에 용매를 제거하였다. IPA/EtOAc로부터 결정화를 통해 미정제 생성물을 정제하여 표제 화합물(3.16 g, 100%)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI): *m/z* $[M+Na]^+$ 496.3.

[0233] **단계 C. 중간체 22: 메틸 (1S,2S,3R,4R)-3-(4-시아노-2-메톡시-5-(((1s,4S)-4-메틸-4-((나프탈렌-1-일메톡시)카보닐)시클로헥실)옥시)벤즈아미도)바이시클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-카복실레이트**

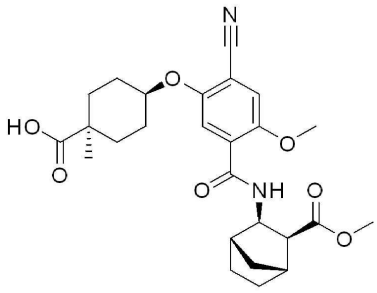


[0234]

[0235] 10℃에서 DMF(60 mL) 중 중간체 21(3.16 g, 6.67 mmol), 중간체 8(1.291 g, 6.34 mmol), EDC(1.9 g, 10 mmol), 및 HOBt(1.533 g, 10.01 mmol)의 용액에 DIPEA(3.5 mL, 20 mmol)를 첨가하고, 생성된 현탁액을 실온에서 13시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc(500 mL)로 희석하고, NH_4Cl(포화, 200 mL), H_2O(300 mL), 및 염수(포화, 250 mL)로 순차 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조시키고, 여과하고, 감압하에 용매를 제거하였다. 이동상으로서 PE 중 0~20% EtOAc의 구배를 사용하는 플래시 크로마토그래피로 미정제 생성물을 정제하여 표제 화합물(2.6 g, 62%)을 백색 고체로서 수득하였다. MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ 623.4.

[0236] **단계 D. 중간체 23: (1S,4s)-4-(2-시아노-4-메톡시-5-(((1S,2R,3S,4R)-3-(메톡시카보닐)바이시클로[2.2.1]헵탄**

-2-일)카바모일)페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실산



[0237]

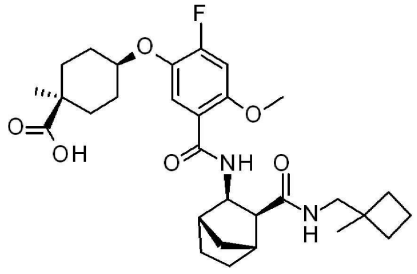
[0238] MeOH(100 mL) 중 중간체 22(5.7 g, 9.15 mmol) 및 Pd/C(0.584 g, 0.55 mmol)를 수소(1.5 atm) 분위기하에 20℃에서 14시간 동안 교반하였다. 혼합물을 Celite® 패드를 통해 여과하고, 감압하에 용매를 제거하였다. EtOAc/EtOH로부터 결정화를 통해 미정제 생성물을 정제하여 표제 화합물(5.1 g)을 담황색 고체로서 수득하였다. MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ 485.4.

[0239] **단계 E. (1R,2S,3R,4S)-3-(5-(((1s,4S)-4-카복시-4-메틸시클로헥실)옥시)-4-시아노-2-메톡시벤즈아미도)바이시클로[2.2.1]헵탄-2-카복실산**

[0240] 10℃에서 THF(100 mL) 중 중간체 23(5.1 g, 10.5 mmol)의 교반 용액에 LiOH 용액(50 mL, 52.6 mmol, H_2O 중 1.05 M)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온까지 가온시키고 14시간 동안 교반한 후, HCl(1 M, 수성)을 사용하여 pH 2로 산성화시켰다. 반응 혼합물을 EtOAc(350 mL)로 희석하고, 염수(300 mL, 포화), H_2O(300 mL), 및 염수(300 mL, 포화)로 순차 세척하였다. 유기상을 분리시키고 Na_2SO_4로 건조시키고, 여과하고, 감압하에 용매를 제거하였다. EtOAc/Et_2O로부터의 침전에 이어 이동상으로서 HCl(0.4%, 수성) 중 0~50% MeCN의 구배를 사용하는 C18 칼럼에서의 역상 플래시 크로마토그래피로 미정제 생성물을 정제하여 표제 화합물(4.00 g, 82%)을 백색 고체로서 수득하였다; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 1.13 (s, 3H), 1.20 (s, 1H), 1.23 (s, 2H), 1.33 (t, 2H), 1.46 (q, 4H), 1.84 (d, 1H), 1.92 (d, 2H), 2.03-2.14 (m, 4H), 2.38 (d, 1H), 2.67 (d, 1H), 3.89 (s, 3H), 4.23 (t, 1H), 4.43 (dt, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 8.67 (d, 1H), 12.30 (s, 2H). MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ 471.3.

[0241] <u>실시예</u>

[0242] **실시예 1: (1*S*,4*s*)-4-(2-플루오로-4-메톡시-5-(((1S,2R,3S,4R)-3-(((1-메틸시클로부틸)메틸)카바모일)바이시클로[2.2.1]헵탄-2-일)카바모일)페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실산(형태 A)**



[0243]

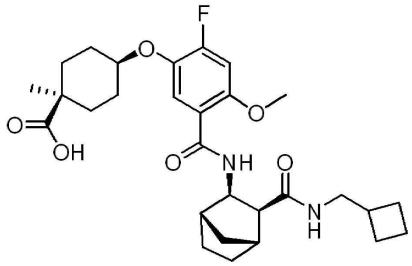
[0244] EtOH 중 중간체 17(206 g, 19% w/w, 57.9 mmol)의 용액에 EtOH (385 mL)에 이어 10 wt% Pd/C(3.96 g, 5% w/w)를 첨가하였다. 용기를 N_2로 6회 퍼징한 후 H_2로 6회 더 퍼징하였다. 용기를 H_2로 0.4 MPa까지 가압하고, 반응 용액을 20 내지 30℃에서 20시간 동안 교반하였다. H_2 분위기를 N_2로 완전히 대체한 후, 반응 혼합물을 여과하고 고체를 EtOH(3×80 mL)로 세척하였다. 동일한 제2 배치를 수행하고, 수집된 EtOH 용액을 합하여 단일 용액을 수득하였다. 온도를 45℃ 미만으로 유지하면서 감압하에 용매를 EtOAc로 교환하였다. EtOAc 용액(280 mL)을 70 내지 75℃로 0.5시간 동안 가열한 후, 40 내지 45℃까지 냉각시키고, n-헵탄(475 mL)을 0.5시간에 걸쳐 적가하였다. 혼합물을 0.5시간 동안 교반한 후, 20 내지 25℃까지 2시간에 걸쳐 냉각시킨 다음, 추가로 2시간 동안 유지하였다. 비균질 슬러리를 여과한 다음, 고체를 1:2 EtOAc/n-헵탄(160 mL)으로 2회 세척한 후, 45℃ 미만에서 20

시간 동안 건조시켜 미정제 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다(55.7 g, 87%).

[0245] 파트 1: 미정제 표제 화합물(2.50 g, 4.59 mmol)을 EtOH(15.0 mL)에 용해시켰다. 물(7.50 mL)을 적가하는 동안 용액의 온도를 25.0 ± 2.0℃로 유지하였고, 그 동안 침전물이 형성되었다. 비균질 슬러리를 추가로 1.0시간 동안 교반한 후, 여과를 통해 수집하였다. 고체를 EtOH/물(2×5.00 mL)의 (2:3) 혼합물로 세척하고, 수집하고 N_2 하에 건조시켜 표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다(1.80 g, 72%). 이 물질은 형태 A로 특성화되었으며 파트 2에 설명된 방법에 따라 시드로 사용되었다.

[0246] 파트 2: 미정제 표제 화합물(50.0 g, 91.8 mmol)을 EtOH(350 mL)에 용해시킨 후, 필터에 통과시켰다. EtOH(100 mL)를 용기에 첨가한 후, 필터에 통과시켜 합쳐진 EtOH 용액을 수득하였다. H_2O(150 mL)를 0.5시간에 걸쳐 천천히 첨가하는 동안 용액의 온도를 25.0 ± 2.0℃로 유지하였다. 용액을 추가로 0.5시간 동안 교반한 후, 파트 1로부터의 시드 물질(0.005 g, 0.1% w/w)을 첨가하였다. 용액을 6시간 동안 유지한 다음, 2시간에 걸쳐 20.0 ± 0.5℃까지 냉각시킨 후, 추가로 6시간 동안 유지하였다. H_2O(150 mL)를 6시간에 걸쳐 천천히 첨가한 다음, 혼합물을 추가로 2시간 동안 유지한 후 여과하였다. EtOH(45 mL) 및 H_2O(30 mL)를 용기에 첨가한 다음, 필터 케이크를 세척하는 데 사용하였다. 고체를 수집하고 N_2 하에 45℃ 미만에서 12시간 동안 건조시켜 표제 화합물 형태 A를 백색 고체로서 수득하였다(42.2 g, 85%); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 0.97 (3H, s), 1.12-1.42 (5H, m), 중첩 1.25 (3H, S), 1.43-1.82 (10H, m), 1.92-2.1 (3H, m), 2.25 (3H, dd), 2.51 (2H, dd), 2.96 (1H, dd), 3.18 (1H, dd), 3.92 (3H, s), 4.12-4.28 (1H, m), 4.41 (1H, t), 5.81 (1H, t), 6.70 (1H, d), 7.86 (1H, d), 8.60 (1H, d). HRMS (ESI) *m/z* $[M+H]^+$ C30H42FN2O6에 대한 계산치: 545.3022 실측치: 545.3019.

[0247] **실시예 2: (1S,4s)-4-(5-(((1S,2R,3S,4R)-3-((시클로부틸메틸)카바모일)바이시클로[2.2.1]헵탄-2-일)카바모일)-2-플루오로-4-메톡시페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실산**

[0248] 

[0249] **단계 A 중간체 18: 나프탈렌-1-일메틸 (1S,4s)-4-(5-(((1R,2R,3S,4S)-3-((시클로부틸메틸)카바모일)바이시클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-일)카바모일)-2-플루오로-4-메톡시페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실레이트**

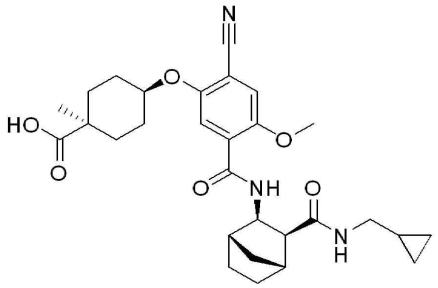
[0250] 0 내지 5℃에서 DCM(50.5 mL) 중 DIPEA(1.07 g, 8.31 mmol)의 용액에 중간체 16(5.00 g, 8.31 mmol)에 이어 시클로부틸메탄아민 하이드로클로라이드(1.26 g, 10.4 mmol)를 첨가하였다. 온도를 0 내지 5℃로 유지하면서 DIPEA(4.21 g, 32.6 mmol)를 적가한 후, T3P(8.46 g, 13.3 mmol, EtOAc 중 50% w/w)를 0.5시간에 걸쳐 첨가하였다. 용액을 15 내지 25℃로 가온시키고 2시간 동안 교반한 후, 온도를 30℃ 미만으로 유지하면서 물(25.0 mL)을 적가하였다. 2상 용액을 분리시키고 유기상을 물(2×25.0 mL)로 세척한 후, 감압하에 용매를 EtOH(75.0 mL)로 교환하여 표제 화합물을 EtOH 중 용액으로서 수득하고 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다.

[0251] **단계 B: (1S,4s)-4-(5-(((1S,2R,3S,4R)-3-((시클로부틸메틸)카바모일)바이시클로[2.2.1]헵탄-2-일)카바모일)-2-플루오로-4-메톡시페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실산**

[0252] 중간체 18의 EtOH 용액에 10 wt% Pd/C(290 mg, 5% w/w)를 첨가하였다. 용기를 N_2로 6회 퍼징한 후 H_2로 6회 더 퍼징하였다. 용기를 H^2로 0.4 MPa까지 가압하고, 반응 용액을 20 내지 30℃에서 20시간 동안 교반하였다. H_2 분위기를 N_2로 완전히 대체한 후, 반응 혼합물을 여과하고 고체를 EtOH(2×12.2 ml)로 세척하였다. 온도를 45℃ 미만으로 유지하면서 감압하에 용매를 EtAOc로 교환하였다. EtAOc 용액(41.0 mL)을 70 내지 75℃로 0.5시간 동안 가열한 후, 40 내지 45℃까지 냉각시키고, n-헵탄(34.8 mL)을 0.5시간에 걸쳐 적가하였다. 혼합물을 0.5시간 동안 교반한 후, 20 내지 25℃까지 2시간에 걸쳐 냉각시킨 다음, 추가로 2시간 동안 유지하였다. 비균질 슬러리를 여과한 다음, 고체를 1:2 EtOAc/n-헵탄(11.6 mL)으로 2회 세척한 후, 45℃ 미만에서 20시간 동안 건조시켜

표제 화합물을 백색 고체로서 수득하였다(3.28 g, 74%). ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ 1.04-1.30 (6H, m), 중첩1.10 (3H, s), 1.35-1.58 (5H, m), 1.59-1.69 (2H, m), 1.71-1.82 (2H, m), 1.83-1.92 (2H, m), 1.95-2.02 (1H, m), 2.01-2.10 (3H, d), 2.18-2.31 (2H, m), 2.50-2.55 (1H, d), 2.92-3.00 (1H, m), 3.06-3.14 (1H, m), 3.89 (3H, s), 4.07-4.17 (2H, m), 7.11 (1H, d), 7.67 (1H, d), 7.94 (1H, t), 8.83 (1H, d). MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ 531.3.

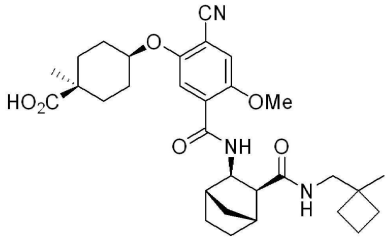
[0253] **실시예 3. (1S,4s)-4-(2-시아노-5-(((1S,2R,3S,4R)-3-((시클로프로필메틸)카바모일)바이시클로[2.2.1]헵탄-2-일)카바모일)-4-메톡시페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실산**



[0254]

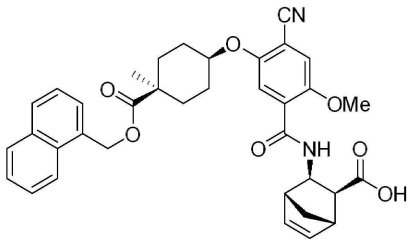
[0255] 중간체 19의 용액(500 μL, 0.024 g, 0.05 mmol, DMF 중 0.1 M), 시클로프로필메탄아민의 용액(500 μL, 0.05 mmol, DMF 중 0.1 M), 및 DIPEA의 용액(500 μL, 0.15 mmol, DMF 중 0.3 M)을 실온에서 바이알에 첨가하였다. HATU의 용액(500 μL, 0.15 mmol, DMF 중 0.3 M)을 첨가하고, 반응 혼합물을 40℃에서 밤새 교반하였다. 미정제 혼합물을 DMSO(3×500 μL)로 세척하고, 여과하고, 감압하에 여과액을 증발시켰다. 미정제 생성물을 이동상으로서 CO_2 중 MeOH/20 mM NH_3을 사용하여 Phenomenex Luna HILIC 칼럼(5 μm 250 x 30 ID mm)상 분취용 SFC에 의해서 정제하여 표제 화합물(10.3 mg, 39%)을 수득하였다. HRMS (ESI) *m/z* $[M+H]^+$ $C_{29}H_{38}N_3O_6$에 대한 계산치: 524.2756 실측치: 524.2752.

[0256] **실시예 4: (1S,4s)-4-(2-시아노-4-메톡시-5-(((1S,2R,3S,4R)-3-(((1-메틸시클로부틸)메틸)카바모일)바이시클로[2.2.1]헵탄-2-일)카바모일)페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실산**



[0257]

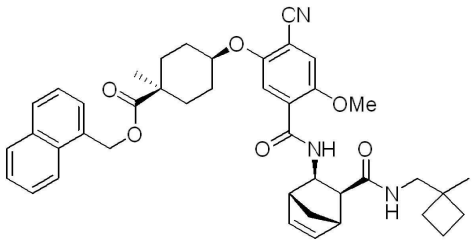
[0258] **단계 A: 중간체 24: (1S,2S,3R,4R)-3-(4-시아노-2-메톡시-5-(((1s,4S)-4-메틸-4-((나프탈렌-1-일메톡시)카보닐)시클로헥실)옥시)벤즈아미도)바이시클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-카복실산**



[0259]

[0260] DME(50 mL) 중 중간체 22(2.60 g, 4.18 mmol)의 용액에 2 M 수성 LiOH(10.6 mL, 21.12 mmol)를 첨가한 후, 반응 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. pH가 3 미만이 될 때까지 반응 혼합물에 10% 수성 시트르산을 첨가한 후, 반응 혼합물을 EtOAc로 2회 추출하고, 합한 유기층을 진공 농축하여 표제 화합물(2.5 g, 97%)을 수득하였다. MS (ESI) *m/z* 609.3 $[M+H]^+$.

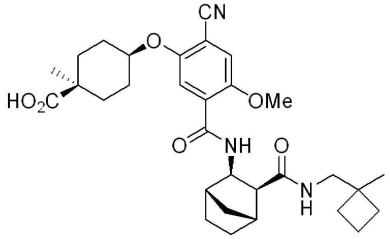
[0261] **단계 B: 중간체 25: 나프탈렌-1-일메틸 (1S,4s)-4-(5-(((1R,2R,3S,4S)-3-(((1-메틸시클로부틸)메틸)카바모일)바이시클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-일)카바모일)-2-시아노-4-메톡시페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실레이트**



[0262]

[0263] DMF(4 mL) 중 중간체 24(500 mg, 0.821 mmol) 및 (1-메틸시클로부틸)메틸아민 하이드로클로라이드(134 mg, 0.986 mmol)에 HATU(344 mg, 0.904 mmol) 및 DIPEA(0.43 mL, 2.46 mmol)를 첨가한 후, 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물에 H_2O(50 mL)를 첨가하고, 잔류 침전물을 여과로 수집한 후, 잔류물을 진공 펌프로 건조시켜 표제 화합물(611 mg, 100%)을 수득하였다. MS (ESI) *m/z* 690.4 $[M+H]^+$.

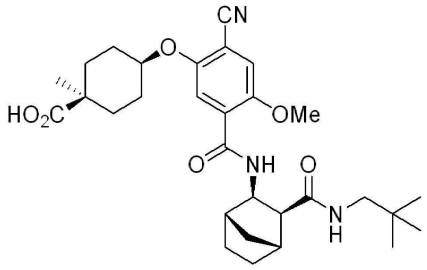
[0264] **단계 C: (1S,4s)-4-(2-시아노-4-메톡시-5-(((1S,2R,3S,4R)-3-(((1-메틸시클로부틸)메틸)카바모일)바이시클로[2.2.1]헵탄-2-일)카바모일)페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실산**



[0265]

[0266] MeOH(4.4 mL) 중 중간체 25(609 mg, 0.883 mmol)의 용액에 팔라듐(10% Pd/C, 수분 50% H_2O, 200 mg)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1 atm의 수소 분위기하에 3시간 동안 교반하였다. 반응 용기의 수소를 아르곤으로 대체하고 반응 혼합물을 Celite®로 여과하였다. 여과액을 진공 농축한 후, 이동상으로서 $CHCl_3$ 중 0~5% MeOH의 구배를 사용하는 플래시 크로마토그래피로 미정제 생성물을 정제하여 표제 화합물(389 mg, 80%)을 수득하였다. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 0.99 (s, 3H), 1.21 (s, 3H), 1.23-1.41 (m, 5H), 1.45-1.85 (m, 10H), 1.96-2.13 (m, 3H), 2.18-2.29 (m, 3H), 2.35-2.40 (m, 1H), 2.65-2.71 (m, 1H), 3.06 (dd, J = 13.2, 5.8 Hz, 1H), 3.17 (dd, J = 13.2, 6.3 Hz, 1H), 3.98 (s, 3H), 4.26-4.33 (m, 1H), 4.34-4.43 (m, 1H), 7.37 (s, 1H), 7.72 (s, 3H), 7.84-7.91 (m, 1H), 9.09 (d, J = 8.5 Hz, 1H). HRMS (ESI) *m/z* $[M+H]^+$ C31H42N3O6에 대한 계산치: 552.3068 실측치: 552.3064.

[0267] **실시예 5: (1S,4s)-4-(2-시아노-4-메톡시-5-(((1S,2R,3S,4R)-3-(네오펜틸카바모일)바이시클로[2.2.1]헵탄-2-일)카바모일)페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실산**

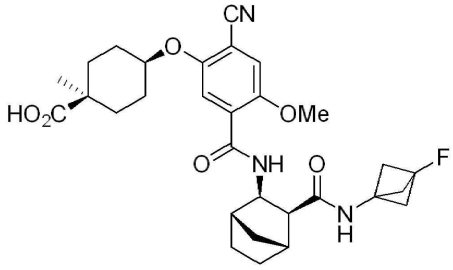


[0268]

[0269] 시클로프로필메탄아민 대신 2,2-디메틸프로판-1-아민을 사용하여, 실시예 3과 유사하게 표제 화합물을 제조하였다. HRMS (ESI) *m/z* $[M+H]^+$ C30H42N3O6에 대한 계산치: 540.3068 실측치: 540.3076.

[0270] **실시예 6: (1S,4s)-4-(2-시아노-5-(((1S,2R,3S,4R)-3-((3-플루오로바이시클로[1.1.1]펜탄-1-일)카바모일)바이**

시클로[2.2.1]헵탄-2-일)카바모일)-4-메톡시페녹시)-1-메틸시클로헥산-1-카복실산



[0271]

[0272] 시클로프로필메탄아민 대신3-플루오로바이시클로[1.1.1]펜탄-1-아민을 사용하여, 실시예 3과 유사하게 표제 화합물을 제조하였다. HRMS (ESI) *m/z* $[M+H]^+$ C30H37FN3O6에 대한 계산치: 554.2666 실측치: 554.2670.

[0273] 생물학적 및 물리화학적 데이터

[0274] RXFP1 Hu cAMP(시험 A)

[0275] hRXFP1의 조절제를 스크리닝하기 위해, Gs-커플링된 hRXFP1 수용체를 통해 cAMP 생성을 자극하는 화합물을 식별하는 검정을 사용하였다. 전반적으로 cAMP의 검출을 위한 제조사의 권장 사항에 따라 cAMP HiRange HTRF 키트(CisBio Bioassays(France)에서 입수 가능; 카탈로그 번호 62AM6PEJ)를 사용하였다. HTRF 방법은 세포에서 생성된 천연 cAMP와 염료 d2로 표지된 cAMP 사이의 경쟁적 면역검정법이다. 추적자 결합은 cAMP에 대한 크립테이트 표지 항체로 시각화되므로, 신호는 생성된 cAMP의 양에 반비례한다.

[0276] **검정 시약의 제조:**

[0277] 검정 버퍼: 0.1% BSA(Sigma, A8806)를 함유하는 pH 7.4의 5 mM Hepes(ThermoFisher, 15630)가 포함된 HBSS(ThermoFisher, 14065)

[0278] 세포: 인간 RXFP1로 안정적으로 형질감염된 Jump-In쎄 T-REx쎄 CHO-K1 세포(ThermoFisher)를 사용하였다. 세포를 10 ng/ml 독시사이클린으로 24시간 동안 처리하여 인간 RXFP1을 발현하도록 유도하였다. 이어서 장기 보관을 위해 세포를 저온보존하였다. 각 실험의 시작 시, 세포를 해동하고, PBS로 세척하고, 검정 버퍼에 1.875*10^5개 세포/ml로 재현탁시켰다.

[0279] cAMP 표준: CisBio 키트에 제공된 스톡 표준 cAMP를 분석물 중 최고 2.8 μM의 최종 농도로 검정 버퍼에 희석하였다.

[0280] HTRF 검출 시약: CisBio 지침에 따라 재구성된 cAMP-d2 및 항-cAMP 크립테이트를 HTRF-키트와 함께 제공된 용해 버퍼에 1:40으로 희석하였다.

[0281] **검정 실행을 위한 단계별 절차:**

[0282] 1. DMSO에 용해된 40 nL 시험 화합물을 백색 384웰 플레이트(Greiner; 784075)에 음파적으로 분배하고(Labcyte Echo), 밀봉하고, 검정할 때까지 실온에서 보관하였다.

[0283] 2. DMSO 중 40 nL 200 nM 릴랙신-2(1 nM 최종 농도)를 100% 대조군 웰에 첨가하고, 검정 당일에 음파 분배기로 0% 웰에 40 nL DMSO를 첨가하였다.

[0284] 3. 포스포디에스테라제를 차단하기 위한 1 mM IBMX(0.5 mM 최종 농도)가 포함된 4 μL 검정 버퍼를 Multidrop Combi(ThermoFisher)로 첨가하였다.

[0285] 4. Multidrop Combi로 1.875*10^5개 세포/ml의 4 μL 세포 용액을 첨가하여 750개 세포/웰을 얻었다.

[0286] 5. 실온에서 45분 인큐베이션.

[0287] 6. Multidrop Combi로 용해 버퍼 중 4 μL cAMP-d2를 첨가하였다.

[0288] 7. Multidrop Combi로 용해 버퍼 중 4 μL 항-cAMP 크립테이트를 첨가하였다.

[0289] 8. 실온에서 2시간 인큐베이션.

[0290] 9. Envision(PerkinElmer) 또는 Pherastar(BMG Labtech) 판독기로 균일 시간차 형광(HTRF) 신호를 검출하였다

(λex = 340 nm, λem = 665 및 615 nm).

[0291] cAMP 표준 곡선을 사용하여 HTRF 데이터를 샘플에서 생성된 cAMP의 양으로 변환하여 이후에 농도 반응 계산에 사용하였다. 4-파라미터 로지스틱 피트인 Hill 방정식으로 농도 반응 데이터를 피팅하였다. 검정 결과는 표 1에 EC_{50}(μM) 및 S_{inf}(%)로 보고된다.

[0292] EC_{50}은 자극 활성이 최대 수준의 50%에 도달하는 농도로 정의된다. 동일한 화합물에 대해 여러 번 검정이 실행된 경우, 기하 평균이 보고된다.

[0293] Sinf는 시험 화합물의 무한 농도에서 피팅된 활성 수준, 효능이다. 효능 데이터의 비교를 용이하게 하기 위해, 포화 농도의 릴랙신(1 nM)에 의해 자극된 반응의 효과 %로 효능을 정규화하였다. 동일한 화합물에 대해 여러 번 검정이 실행된 경우, 산술 평균이 보고된다.

[0294] 인간 혈장 단백질 결합(시험 B)

[0295] 문헌[Wernevik, J. et al., *"A Fully Integrated Assay Panel for Early Drug Metabolism and Pharmacokinetics Profiling"*, Assay and Drug Development Technologies, 2020, 18(4), 157-179]의 167-170 페이지에 기술된 인간 혈장 단백질 결합 검정법에 따라 검정을 수행하였다. 데이터는 표 1에 결합되지 않은 분율(f_u)(유리 %)로 보고된다. 동일한 화합물에 대해 여러 번 검정이 실행된 경우, 산술 평균이 보고된다.

[0296] 인간 간 마이크로솜 안정성(시험 C)

[0297] 문헌[Wernevik, J. et al., *"A Fully Integrated Assay Panel for Early Drug Metabolism and Pharmacokinetics Profiling"*, Assay and Drug Development Technologies, 2020, 18(4), 157-179]의 170-174 페이지에 기술된 인간 간 마이크로솜 안정성 검정법에 따라 검정을 수행하였다. 데이터는 표 1에 CL_{int}(μl/분/mg 단백질)로 보고된다. 동일한 화합물에 대해 여러 번 검정이 실행된 경우, 산술 평균이 보고된다.

[0298] 인간 간세포 안정성(시험 D)

[0299] 인간 간세포에서의 화합물의 대사 안정성을 하기 프로토콜을 사용하여 평가하였다:

[0300] 1에 제시된 서열을 갖는 프람린티드 내의 상응하는 위치에 따라 넘버링된다. 적절한 용매(DMSO) 중 화합물 및 대조군 화합물의 10 mM 스톡 용액을 제조한다. 37℃ 수조에 인큐베이션 배지(L-15 배지)를 넣고, 사용 전에 적어도 15분 동안 가온시킨다.

[0301] 2. 96웰 딥 웰 플레이트("퀜칭 플레이트")의 각각의 웰에 80 μL의 아세토니트릴을 첨가한다.

[0302] 3. 새로운 96웰 플레이트에서, 198 μL의 아세토니트릴 및 2 μL의 10 mM 스톡 용액을 합하여 10 mM 시험 화합물 및 대조군 화합물을 100 μM로 희석한다.

[0303] 4. 저온보존된(-150℃ 미만) 인간 간세포(Bioreclamation IVT(제품 번호 S01205)로부터 얻은 LiverPool™ 10-Donor Human 간세포)의 바이알을 저장 용기에서 꺼내, 해동 과정이 뒤따를 때까지 바이알이 극저온 온도를 유지하도록 한다. 가능한 한 빨리, 바이알을 37℃ 수조에 넣고 가볍게 바이알을 진탕시켜 세포를 해동한다. 모든 얼음 결정이 녹아 더 이상 보이지 않을 때까지 바이알을 수조에 유지해야 한다. 해동이 완료된 후, 바이알에 70% 에탄올을 분무하고, 바이알을 생물학적 안전 캐비닛으로 옮긴다.

[0304] 5. 바이알을 열고, 해동 매질이 포함된 50 mL 코니컬 튜브에 내용물을 붓는다. 50 mL 코니컬 튜브를 원심분리기에 넣고 10분 동안 100 g로 회전시킨다(실온). 회전이 완료되면, 해동 배지를 흡인하고, 약 $1.5X10^6$개 세포/mL를 수득하기에 충분한 인큐베이션 배지에 간세포를 재현탁시킨다.

[0305] 6. Cellometer® Vision을 사용하여 세포를 계수하고 생존 세포 밀도를 결정한다. 생존력이 낮은(80% 미만의 생존력) 세포는 사용할 수 없다. 인큐베이션 배지로 세포를 $1.0X10^6$개 생존 세포/mL의 작업 세포 밀도로 희석한다.

[0306] 7. 247.5 μL의 간세포를 96웰 세포 인큐베이션 플레이트의 각각의 웰로 옮긴다. 플레이트를 Eppendorf Thermomixer Comfort 플레이트 진탕기에 놓고 간세포를 10분 동안 가온시킨다.

[0307] 8. 2.5 μL의 100 μM 시험 화합물 또는 대조군 화합물을 세포가 포함된 인큐베이션 웰에 첨가하여 반응을 일으

킨다.

[0308] 9. 플레이트를 Eppendorf Thermomixer Comfort 플레이트 진탕기에서 37℃ 및 900 rpm으로 인큐베이션한다. 0.5, 5, 15, 30, 45, 60, 80, 100, 및 120분에, 20 μL의 인큐베이션된 혼합물을 별개의 "퀜칭 플레이트"로 옮긴 후, 샘플을 2분 동안 볼텍스 혼합한다.

[0309] 10. 퀜칭 플레이트를 4,000 rpm으로 20분 동안 원심분리한다. 각 화합물의 상청액 30 μL를 96웰 분석 플레이트로 옮긴다.

[0310] 4개의 화합물을 하나의 카세트에 함께 모은다.

[0311] 그 다음 180 μl의 순수한 물을 첨가하여 모은 샘플을 희석한다.

[0312] 모든 인큐베이션은 단회 수행된다.

[0313] 모든 계산은 마이크로소프트 엑셀을 사용하여 수행되었다. 피크 면적은 추출된 이온 크로마토그램으로부터 결정되었다. 모 화합물의 시험관내 고유 제거율(시험관내 C_{lint}, μL/분/10^6개 세포 단위)은 Ln 백분율 모체 소멸 대 시간 곡선의 회귀 분석에 의해 결정되었다. 시험관내 고유 제거율(시험관내 C_{lint}, μL/분/10^6개 세포 단위)은 표 1에 보고되며, 하기 식을 사용하여 기울기 값으로부터 결정되었다.

[0314] 시험관내 Cl_{int} = kV/N

[0315] V = 인큐베이션 부피(0.25 mL);

[0316] N = 웰당 간세포의 수(0.25×10^6개 세포)

[0317] 동일한 화합물에 대해 여러 번 검정이 실행된 경우, 기하 평균이 보고된다.

[0318] 래트 간세포 안정성(시험 E)

[0319] 문헌[Wernevik, J. et al., *"A Fully Integrated Assay Panel for Early Drug Metabolism and Pharmacokinetics Profiling"*, Assay and Drug Development Technologies, 2020, 18(4), 157-179]의 170-174 페이지에 기술된 래트 간세포 안정성 검정에 따라 검정을 수행하였다. 데이터는 표 1에 Cl_{int}(μl/분/10^6개 세포)로 보고된다. 동일한 화합물에 대해 여러 번 검정이 실행된 경우, 기하 평균이 보고된다.

[0320] 용해도(시험 F)

[0321] 문헌[Wernevik, J. et al., *"A Fully Integrated Assay Panel for Early Drug Metabolism and Pharmacokinetics Profiling"*, Assay and Drug Development Technologies, 2020, 18(4), 157-179]의 164-167 페이지에 기술된 용해도 검정에 따라 검정을 수행하였다. 데이터는 표 1에 용해도(μM)로 보고된다. 동일한 화합물에 대해 여러 번 검정이 실행된 경우, 산술 평균이 보고된다.

표 1

검정 데이터

[0322]

실시예	시험 A		시험 B 인간 혈장 단백질 결합 (유리 %)	시험 C 인간 간 마이크로솜 안정성 Cl_{int} (μl/분/mg)	시험 D 인간 간세포 안정성 Cl_{int} (μL/분/10^6개 세포)	시험 E 래트 간세포 안정성 Cl_{int} (μL/분/10^6개 세포)	시험 F 용해도 (μM)
	EC_{50} (μM)	S_{inf} (%)					
1	0.017	109	4.3	23	4.8	11	>500
2	0.23	101	1.9	14	2	27	>1000
3	0.39	97	17	<3		28	940
4	0.0058	100	6.3	19	5.6	18	>890
5	0.024	114	12	<3	<1.2	15	910
6	0.024	105	17	<5.1	1.7	11	>860

[0323] 인간 RXFP1 cGMP 생산 검정(시험 G)

[0324] cGMP 생성과 관련하여 RXFP1 작용제 활성에 대한 화합물을 프로파일링하기 위해, Green GENIe cGMP Assay(Montana Molecular; 카탈로그 번호 D800G)를 사용하였다. 검정은 BacMam 벡터의 포유류 세포에 전달된 mNeonGreen 융합 단백질 형광 바이오센서를 기반으로 한다. cGMP가 바이오센서에 결합되면 형광이 감소한다.

[0325] **검정 시약의 제조:**

[0326] 검정 버퍼: 0.1% BSA(Sigma; A8806)를 함유하는 DPBS(Gibco; 14040133)

[0327] 세포: pIRESneo3에서 인간 RXFP1로 안정적으로 형질감염된 HEK293 세포를 사용하였다. RXFP1 발현을 유지하기 위해 0.8 mg/mL로 보완된 10% FBS가 포함된 DMEM 배지(Gibco; 31966)에서 세포를 배양하였다.

[0328] **검정 실행을 위한 단계별 프로토콜:**

[0329] 1일차

[0330] 1. 형질도입 1일 전에 세포를 분할하고, 조직 배양 플라스크에서 항생제 없이 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 63,000개 세포/cm2로 시딩하였다.

[0331] 2일차

[0332] 2. PBS 세척 후, 세포를 accutase(Gibco; 1737341)를 사용하여 분리하고, 배지에 재현탁시키고 50 mL 튜브에 수집하였다.

[0333] 3.세포를 CEDEX(Innovatis)로 계수하고 배지를 사용하여 267,000개 세포/mL로 희석하였다.

[0334] 4. 단일 웰에 대해 다음의 비율로 시약을 혼합하여 바이러스 형질도입 마스터믹스를 제조하였다:

[0335] 6 µL GENIe BacMAM 벡터

[0336] 0.2 µL 500 mM 부티르산나트륨

[0337] 10% FBS가 포함된 13.8 µL DMEM 배지

[0338] 20 µL 총 부피

[0339] 5. 세포와 형질도입 마스터믹스를 단일 웰에 대해 30 µL 세포와 20 µL 마스터믹스 비율로 혼합하였다.

[0340] 6. Black 폴리-D-라이신 코팅된 µclear 384웰 플레이트(Greiner; 781946)에 웰당 상기 50 µL 세포-형질도입 믹스를 분배하였다.

[0341] 7. 플레이트를 37℃, 5% CO2의 암실에서 24시간 동안 인큐베이션하였다.

[0342] 3일차

[0343] 8. Bluewasher(BluCatBio)를 사용하여 플레이트에서 배지를 제거하였다.

[0344] 9. Multidrop Combi(ThermoFisher)로 20 µL 검정 버퍼를 첨가하였다.

[0345] 10. 검정 전에 30분 동안 실온의 암실에서 플레이트를 인큐베이션하였다.

[0346] 11. FLIPR Tetra(Molecular Devices)를 사용하여 플레이트를 검정하였다: 검정 버퍼로 희석된 10 µL 화합물을 FLIPR Tetra로 각 웰에 첨가하고 최대 3시간 동안 녹색 형광을 측정하였다.

[0347] Screener 소프트웨어(Genedata AG)를 사용하여 데이터를 처리하였다. (화합물의 첨가 전) 백그라운드 형광을 뺀 후, 화합물 첨가 0 내지 90분 후의 곡선 아래 면적 값을 반응 계산에 사용하였다. 농도 반응 데이터를 4-파라미터 로지스틱 피트로 피팅하였고 EC_{50} 값(nM)은 표 2에 보고된다.

[0348] 인간 RXFP1 포스포-ERK 검정(시험 H)

[0349] ERK 인산화와 관련하여 RXFP1 작용제 활성에 대한 화합물을 프로파일링하기 위해, 고급 포스포-ERK(Thr202/Tyr204) 세포 키트(CisBio; 64AERPEH)를 사용하였다. 검정은 2개의 항체를 사용한다. 하나는 공여자 형광단(Eu 크립테이트)으로 표시되고, 다른 하나는 수용자(d2)로 표시된다. 첫 번째 항체는 인산화된 ERK에 특이적으로 결합하고, 두 번째 항체는 ERK의 또 다른 모티프에 인산화 상태와 무관하게 결합한다. ERK 인산화는

두 항체를 포함하는 면역 복합체 형성을 가능하게 하여 FRET 신호를 생성한다. 신호 강도는 샘플 내 인산화된 ERK의 농도에 비례한다. 제조사의 권장 사항에 따라 검정을 수행하였다.

[0350] **검정 시약의 제조:**

[0351] 세포: pIRESneo3에서 인간 RXFP1로 안정적으로 형질감염된 HEK293 세포를 사용하였다. RXFP1 발현을 유지하기 위해 0.8 mg/mL로 보완된 10% FBS가 포함된 DMEM 배지(Gibco; 31966)에서 세포를 배양하였다. 연속 배양 상태로 유지된 세포에 대해 검정을 수행하였다.

[0352] 시험 화합물의 희석: 페놀 레드가 없는 무혈청 DMEM(Gibco; 31053-038)으로 화합물을 원하는 농도로 희석하였다. DMSO 농도를 0.4%로 조정하였다.

[0353] 항체 믹스: Eu 및 d2 표지된 항 ERK1/2 항체를 키트에 제공된 검출 버퍼로 개별적으로 20배 희석하였다. 실험 직전에, 동일 부피의 각각의 희석된 항체 용액을 항체 믹스에 합하였다.

[0354] **검정 실행을 위한 단계별 프로토콜:**

[0355] 1일차

[0356] 1. 세포를 accutase(Gibco; 1737341)를 사용하여 배양 플라스크로부터 분리하고, 페놀 레드 없이 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에 재현탁시키고 50 mL 튜브에 수집하였다.

[0357] 2. 세포를 CEDEX(Innovatis)로 계수하고 상기 배지를 사용하여 320,000개 세포/mL로 희석하였다.

[0358] 3. Black μclear 폴리-D-라이신 코팅된 μclear 96웰 플레이트(Greiner; 655946)에 웰당 100 μL 세포 현탁액을 분배하였다.

[0359] 4. 플레이트를 37℃, 5% CO2에서 24시간 동안 인큐베이션하였다.

[0360] 2일차

[0361] 5. 혈청 고갈: 배지를 제거하고 페놀 레드가 없는 50 μL 무혈청 DMEM로 교체하였다. 플레이트를 37℃, 5% CO2에서 5시간 동안 인큐베이션하였다.

[0362] 6. 웰당 50 μL 시험 화합물 용액을 첨가하였다.

[0363] 7. 플레이트를 실온에서 5분 동안 인큐베이션하였다.

[0364] 8. 배지를 빠르게 제거하고 웰당 50 μL 용해 버퍼(첨가 전에 1x 최종 농도로 희석)를 첨가하여 자극을 중단하였다.

[0365] 9. 플레이트를 -80℃로 옮기고 용해물을 동결시켰다.

[0366] 3일차

[0367] 10. 플레이트를 해동하고 실온에서 30분 동안 진탕시켰다.

[0368] 11. 세포 용해물을 피펫팅으로 균질화하였다.

[0369] 12. 웰당 16 μL 균질액을 백색 저용량 384웰 플레이트(Greiner; 784075)로 옮겼다.

[0370] 13. 웰당 4 μL 항체 믹스를 첨가하였다.

[0371] 14. 플레이트를 실온의 암실에서 4시간 동안 인큐베이션하였다.

[0372] 15. Pherastar(BMG Labtech) 판독기로 균일 시간차 형광(HTRF) 신호를 검출하였다(λex = 340 nm, λem = 665 및 615 nm).

[0373] Screener 소프트웨어(Genedata AG)를 사용하여 HTRF 비율 데이터를 처리하였다. 농도 반응 데이터를 4-파라미터 로지스틱 피트로 피팅하였고 EC_{50} 값(nM)은 표 2에 보고된다.

표 2

검정 데이터

화합물	시험 G cGMP 검정 EC_{50} (nM)	시험 H 포스포-ERK 검정 EC_{50} (nM)
실시예 1	50	6.3
실시예 4	29	2.5
실시예 5	72	6.8
실시예 6	107	5.2
릴랙신 2	0.085	0.038

[0374]

[0375] 당업자는 결과에 유의한 영향을 미치지 않으면서 대체 장비 및 약간의 프로토콜 변화를 사용하여 상기 생물학적 검정이 수행될 수 있음을 이해할 것이다.

[0376] 이러한 설명 및 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 구체적인 예는 특정 실시형태를 나타내지만, 단지 예시를 목적으로 하는 것이다. 따라서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 예시적 실시형태에 제한되지 않으며, 다양하게 변형될 수 있다. 추가적으로, 명확성을 위하여 별도의 실시형태의 맥락에서 기재된 다양한 실시형태가 또한 조합되어 단일 실시형태를 형성할 수 있다는 것을 인지하여야 한다. 반대로, 간결함을 위하여, 단일 실시형태의 맥락에서 기재된 다양한 실시형태가 또한 조합되어 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 하위조합을 형성할 수 있다.

[0377] 명세서 내에 개시된 모든 간행물은 본 명세서에 참조에 의해 포함된다.