

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014 년 1 월 23 일 (23.01.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/014314 A1

- (51) 국제특허분류:
C07D 403/12 (2006.01) A61K 31/506 (2006.01)
C07D 403/14 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/006498
- (22) 국제출원일: 2013 년 7 월 19 일 (19.07.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0078862 2012 년 7 월 19 일 (19.07.2012) KR
- (71) 출원인: 한미약품 주식회사 (HANMI PHARM. CO., LTD.) [KR/KR]; 445-910 경기도 화성시 팔탄면 하저리 893-5, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 배인환 (BAE, In Hwan); 445-718 경기도 화성시 병점중앙로 204, 104 동 703 호, Gyeonggi-do (KR). 김호석 (KIM, Ho Seok); 445-170 경기도 화성시 삼성 1로 150, 805 호, Gyeonggi-do (KR). 전승아 (JUN, Seung Ah); 602-807 부산시 서구 보동길 185 번길 8-1, 401 호, Busan (KR). 변은영 (BYUN, Eun Young); 465-732 경기도 하남시 덕풍북로 110, 101 동 301 호, Gyeonggi-do (KR). 안영길 (AHN, Young Gil); 463-881 경기도 성남시 분당구 동판교로 123, 113 동 1204 호, Gyeonggi-do (KR). 서귀현 (SUH, Kwee Hyun); 441-390 경기도 수원시 권선구 동수원로 145 번길 24, 225 동 502 호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 제일특허법인 (FIRSTLAW P.C.); 137-739 서울시 서초구 양재동 275-7 트러스트타워, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 공개:
— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: HETEROCYCLIC DERIVATIVE HAVING DUAL INHIBITORY ACTIVITY

(54) 발명의 명칭: 이중 저해 활성을 갖는 헤테로고리 유도체

(57) Abstract: A hetrocyclic derivative, having the structure expressed by chemical formula 1, and pharmaceutically acceptable salts, isomers, hydrates, or solvates thereof inhibit apoptosis-resistant proteins and protein kinases simultaneously, and have few side effects, and thus a pharmaceutical composition containing same is selective for diseases with abnormal cell growth caused by excessive activities of apoptosis-resistant proteins and protein kinases, and can be used as an efficacious preventative or therapeutic agent.

(57) 요약서: 화학식 1 의 구조를 갖는 헤테로고리 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이성질체, 수화물 또는 용매화물은 세포사멸 저해 단백질 및 단백질 키나제를 동시에 저해하는 작용을 하면서 부작용도 적으므로, 이들을 함유하는 약학적 조성물은 세포사멸 저해 단백질 및 단백질 키나제의 과도한 활동으로 유발되는 비정상 세포 성장 질환에 선택적이고 효과적인 예방 또는 치료제로 활용될 수 있다.



WO 2014/014314 A1

명세서

이중 저해 활성을 갖는 헤테로고리 유도체

5 기술분야

본 발명은 비정상 세포 성장 질환에 대해 예방 또는 치료 효과를 갖는 헤테로고리 유도체 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

10 배경기술

세포사멸(apoptosis) 혹은 세포 예정사(programmed cell death)는 후생 동물의 항상성 유지 등에 핵심적인 역할을 수행한다. 이러한 세포사멸은 세포의 성장과 사멸을 조절함으로써 생명체를 유지하나 이러한 체계가 여러
15 요인들로 저해를 받을 경우 암이나 자가면역질환 또는 퇴행성 신경장애 등을 포함하는 병리학적 다양성을 유발할 수 있다[Thompson, C. B. *Science*, 267, 1456-1462(1995); Hanahan, D. & Weinberg, R. A., *Cell*, 100, 57-70(2000) 참조].

암세포 발생단계에서의 이러한 세포사멸의 조절 단계는, 세포사멸 저
20 해 단백질(inhibition of apoptosis protein; IAP)의 과발현으로 인하여 세포내에 IAP 단백질이 축적되고, 이를 통하여 세포사멸 단계를 거쳐야 하는 돌연변이 세포인 암세포의 세포 예정사를 저해함으로써, 다양한 세포사멸 신호(예를 들어 DNA의 손상, 화학적 작용제 및 자외선과 같은 자극)에 의한 암세포의 발생과 성장 그리고 전이과정에서의 자연적 세포사멸의 기작을 저해
25 하게 된다[George L. M., *Biochemistry*, 41, 7344-7349(2002); Yigong Shi, *Nature Rev. Mol. Cell. Bio.*, 5, 897-907,(2004) 참조].

IAP 단백질은 세포 예정사에 관여하는 시스테인 프로테아제인 캐스페이즈(caspase)에 결합하여 세포 예정사를 저해한다. 캐스페이즈는 IAP 단백질의 BIR(baculovirus inhibitory repeat)이라 불리는 아연을 포함하는 70여
30 개의 아미노산으로 구성된 부분에 결합한다. XIAP(human X chromosome encoded IAP), cIAP-1(cellular IAP 1) 및 cIAP-2(cellular IAP 2)는 3개의 나란히 연결된 BIR 도메인을 N-말단에 가지고 있으며, 다른 포유류 IAP는 한 개의 BIR 도메인을 가지고 있다. XIAP는 IAP 단백질군 중 가장 효과적인 캐스페이즈 저해제이며, 개시-캐스페이즈인 캐스페이즈-9와
35 실행-캐스페이즈인 캐스페이즈 3/7에 각각 BIR-3 도메인과 BIR-2 도메인을 통해 결합한다. cIAP-1과 -2는 아직까지 세포예정사에서의 역할이 잘 알

려져 있지 않지만 이들 모두 TNF-수용체 1 신호 복합체와 결합한다.

미토콘드리아에서 세포사멸 신호전달 과정에서 방출되어 나오는 스맥/디아블로(SMAC/Diablo: the second mitochondrial activator of apoptosis / direct IAP-binding protein with low pI) 단백질은, 자연 상태에서의 IAP 단백질에서 IAP 단백질이 캐스페이즈와 결합하는 동일한 부위에 결합함으로써 이러한 IAP 단백질의 활성을 조절한다. 또한, IAP의 유전자 증폭과 IAP 단백질의 과발현은 많은 암세포에서 발견되고 있다.

이러한 이유로 세포사멸에 대한 저항성이 암으로 진행되는 데 있어 중요한 메커니즘으로 부각되었으며, 이에 따라 종양세포에서의 정상세포와 다른 세포사멸 메커니즘을 표적으로 하는 것이 효과적인 항암제 치료 전략으로 제시되어 왔다. 또한, 이러한 약물들은 정상세포에는 영향이 없으며, 암세포에 특이적으로 작용하여 활성을 나타내어 단독 혹은 병용 요법으로 사용시 부작용을 최소화할 수 있는 장점을 갖는 것으로 보고되고 있다.

노바티스(Novartis)사의 국제 특허공개 WO 2008/073305 A1, WO 2008/073306 A1, WO 2008/016893 A2, WO 2006/107963 A1, WO 2006/113376 A1 및 WO 2005/097791 A1, 제넨텍(Genentech)사의 국제 특허공개 WO 2009/089502 A1 및 WO 2008/079735 A1, 에이게라(Aegera)사의 국제 특허공개 WO 2007/131366 A1, 테트라로직(TetraLogic)사의 국제 특허공개 WO 2008/014252 A2 등과 같이 다국적 제약회사에서도 관심 있게 연구를 진행 중에 있다.

IAP를 저해하기 위한 방법으로 천연 IAP 저해 단백질인 스맥/디아블로의 구조를 모방한 연구가 진행 중이다. 이러한 연구 결과 특히 N-말단기의 알라닌-발린-프롤린-이소루이신(Ala-Val-Pro-Ile, AVPI)의 핵심 서열이 IAP 단백질에 결합하는 필수 단백질임이 밝혀지게 되었다[Yigong Shi, *Nature structural biology*, 8, 394-401, (2001) 참조]. 이러한 핵심 서열(AVPI 또는 AVPF)은 in vitro 활성 시험에서도 120-500 nM의 활성을 보여 약리 활성이 있을 것으로 기대가 되었으나 세포 투과성이 없어 약물 개발에는 이를 수가 없었다.

아올러 단백질 키나제는 기질 단백질의 아미노산인 티로신, 세린 및 트레오닌 잔기에 위치하는 하이드록시 그룹의 인산화를 촉매하는 효소로서 세포의 성장, 분화 및 증식을 유발하는 성장 인자 신호 전달 및 과정에 중요한 역할을 담당하고 있다. 표적치료(targeted therapy)란 기존의 항암요법이 단순히 빠르게 분열하는 세포들에 대한 억제효과를 나타내는 것과는 달리 발암작용과 종양의 성장에 필요한 단백질 키나제(protein kinase) 등의 특정 표적분자(target molecule)를 방해함으로써 종양세포의 증식을 억제하는 치료를 의미한다. 따라서 표적치료는 기존의 전신항암치료와 비교해서 보다 중

양 특이적이고 효과적이며 정상세포에 미치는 영향이 적은 것을 장점으로 한다. 단백질 키나제의 조절 이상은 암세포에서 흔하게 발견되므로 항암약제 개발에 있어서 단백질 키나제는 매력적인 표적이 된다.

따라서, 세포사멸의 기전을 유도하고, 단백질 키나제를 저해하는 이중
5 저해 작용의 치료 방법은 새로운 치료 전략의 하나로 새로운 가능성을 제시할 수 있다.

표적치료의 저항성을 예방하거나 극복하기 위한 효과적인 치료전략을 수립하기 위해서는 지속적으로 저항성 발현의 기전을 밝혀내기 위해 노력해야 하고 저항성 발현을 최소화하기 위한 방법을 추구해야 한다. 이를 위해서는
10 는 무작위적인 표적치료제의 조합보다는 각 유전자형(genotype)에 따라 다른 조합을 이용한 임상연구 시도가 절실하다. 이를 위해서는 가장 설득력있는 전임상연구들이 표적치료를 위한 환자 선택에 있어서 도움을 줄 것이며 이를 통하여 가장 효과적인 표적치료 연구에 우선 순위를 정할 수 있을 것이다. 기대하던 표적치료가 효과적이지 못할 때는 그 이유를 규명해야 한다.

즉, 표적치료제가 그 해당 표적을 *in vivo* 에서 억제하지 못하는 것은 아닌지 혹은 효과적인 표적억제가 기대한 결과를 유도하지 못하는지에 대한 분석이 필요하다. 이를 위해서는 표적치료 후 암조직의 직접적인 채취나 비침습적으로 순환 종양세포(circulating tumor cell)를 이용하여 표적억제에 대한 약력학(pharmacodynamic)적인 분석이 요구된다. 이와 동시에 특정 표적
20 치료에 가장 반응이 좋을 것으로 예상되는 환자들을 선별할 수 있는 신빙성 있는 생체지표(biomarker)의 규명 또한 이루어져야 한다.

한가지 표적만을 특이적으로 억제하는 약제는 더이상 표적치료의 왕도가 아님이 밝혀졌고 한 개 이상의 신호전달 경로에서 한 개 이상의 표적을 억제하는 것이 가장 효과적인 표적치료제일 가능성이 있다. 따라서 되먹
25 임 기전을 회피하고 여러 신호 전달체계에서의 교차 작용(cross talk)을 배제시킨 근거에 입각한 병합 표적치료가 효과적인 항암능을 발휘할 수 있을 것이다.

단백질 티로신 키나제는 수용체의 성장인자의 종류에 따라 하위분류로 나누어지고, 이들 중 특히 이레사, 타세바 등의 약물이 타겟으로 하는 상
30 피세포 성장 인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFR) 티로신 키나제, 섬유모 세포 성장인자 수용체(fibroblast growth factor receptor, FGFR) 티로신 키나제 [Hubbard, Progress in Biophysics & MolecularBiology 1999; 71: 343 참조], 암세포의 신생 혈관 형성을 억제하기 위한 아바스틴이 타겟으로 하는 혈관 내피세포 성장인자(vascular
35 endothelial growth factor receptor, VEGFR) 티로신 키나제 [Schenone et al., Curr. Med. Chem. 2007; 14: 2495 참조] 등의 성장인자 키나제 등과

RET(rearranged during transfection)은 신경 및 배출 시스템 내의 원발암 유전자(protooncogen)로부터 발현되는 수용체 티로신 키나제, 세포막에 있는 인테그린(integrin)이 ECM에 존재하는 단백질과 결합한 뒤 이합체화(dimerization)되면서 세포질에 존재하는 초점 접착 키나제(focal adhesion kinase, FAK)와 결합하여, 초점 접착 복합체(focal adhesion complex)를 이루어 다양한 세포 분열 및 이동에 관여하게 되는 전이성 타겟 키나제 등 다양한 분류 기준으로 나뉜다.

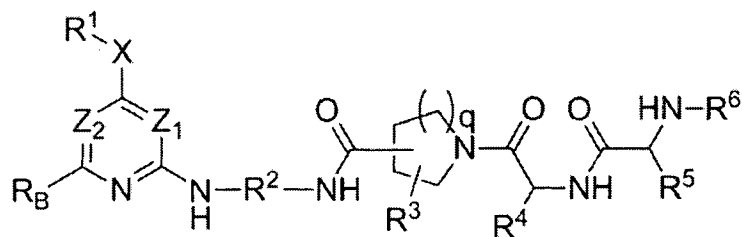
이에 본 발명자들은, 천연 IAP 저해 단백질 서열인 AVPI의 특성을 갖고, 세포사멸 저해 단백질의 과발현 및 단백질 키나제의 과도한 활동을 원인으로 하는 비정상 세포 성장 질환의 예방 또는 치료제로 활용될 수 있는 물질을 검색하고, 탐색된 화합물을 이용하여 비정상 세포 성장 질환에 대한 활성 여부를 찾고자 노력하였다. 그 결과, AVPI 모방 구조로 활성 및 효력 검색을 통하여, IAP와 키나제에 대한 선택성이 뛰어난 헤테로고리 유도체를 개발해 낼 수 있었다.

발명의 요약

본 발명의 목적은 세포사멸 저해 단백질의 과발현 및 단백질 키나제의 과도한 활동을 원인으로 하는 비정상 세포 성장 질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 신규의 화합물 및 이를 함유하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

상기 목적에 따라, 본 발명은 하기 화학식 1의 구조를 갖는 헤테로고리 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이성질체, 수화물 및 용매화물로 부터 선택되는 화합물을 제공한다:

화학식 1



상기 식에서,

X 는 -S-, -O-, -NH-, 또는 -N(C₁₋₃알킬)- 이고;

Z₁ 은 -N= 또는 -CH= 이고;

Z_2 는 $-N=$, $-CH=$ 또는 $-C(R_A)=$ 이고;

R^1 은 C_{3-8} 사이클로알킬, 3-8원의 헤테로사이클로알킬, C_{6-10} 아릴, 또는 5-10원의 헤테로아릴이고;

R^2 는 C_{3-8} 사이클로알킬렌, 3-8원의 헤테로사이클로알킬렌, C_{6-10} 아릴렌, 또는 5-10원의 헤테로아릴렌이고;

R^3 는 H, C_{1-9} 알콕시, C_{3-6} 사이클로알킬옥시, C_{3-6} 사이클로알킬- C_{1-3} 알킬옥시, 3-9원의 헤테로사이클로알킬옥시, 3-9원의 헤테로사이클로알킬- C_{1-3} 알킬옥시, C_{6-10} 아릴옥시, C_{6-10} 아릴- C_{1-3} 알킬옥시, 5-10원의 헤테로아릴옥시, 또는 5-10원의 헤테로아릴- C_{1-3} 알킬옥시이고;

R^4 는 H, C_{1-6} 알킬, C_{3-6} 사이클로알킬, 또는 C_{3-6} 알킨일옥시- C_{1-4} 알킬이고;

R^5 는 H 또는 C_{1-3} 알킬이고;

R^6 은 H, C_{1-3} 알킬, 또는 카보닐- C_{2-3} 알켄일이고;

R_A 및 R_B 는 각각 독립적으로 H, 할로젠, $-CF_3$, $-NO_2$, $-CN$, C_{1-6} 알킬 또는 $-NR^8R^9$ 이거나, 또는 서로 결합하여 방향족 또는 비방향족의 C_{5-6} 탄소고리 또는 방향족 또는 비방향족의 5-6원의 헤테로고리를 형성할 수 있고, 여기서 상기 탄소고리 및 헤테로고리는 각각 독립적으로 H, 할로젠, $-CF_3$, $-NO_2$, $-CN$, $-N_3$, $-NH_2$, $-OH$, C_{1-4} 알킬, C_{1-3} 알콕시, C_{1-3} 알킬티오 및 C_{1-3} 알킬설폰일로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있고;

q 는 0 내지 3 의 정수이고;

상기 R^1 및 R^2 는 각각 독립적으로 1 내지 3 개의 W_A 로 치환될 수 있고,

상기 W_A 는 H, 할로젠, $-CF_3$, $-NO_2$, $-CN$, $-N_3$, $-OH$, C_{1-6} 알킬, 또는, $-(CH_2)_\ell$ -로 연결된, $-NR^8R^9$, $-NR^8C(=O)R^9$, $-NR^8C(=O)NR^8R^9$, $-OR^{10}$, $-C(=O)R^{11}$, $-C(=O)OR^{10}$, $-C(=O)NR^8R^9$, $-NR^8C(=O)R^{11}$, $-SR^{12}$, $-S(=O)R^{11}$, $-S(=O)_2R^{11}$, C_{3-6} 사이클로알킬, 3-6원의 헤테로사이클로알킬, C_{6-10} 아릴 또는 5-10원의 헤테로아릴이고, 여기서 상기 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴은 각각 독립적으로 할로젠, $-CF_3$, $-NO_2$, $-CN$, $-N_3$, $-NH_2$, $-OH$, C_{1-6} 알킬, C_{3-6} 사이클로알킬 및 3-6원의 헤테로사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 3 개의 치환기로 치환될 수 있고, 상기 ℓ 은 0 내지 3 의 정수이고;

상기 R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} 및 R^{12} 는 각각 독립적으로 H, 할로젠, $-CF_3$, $-NO_2$, $-CN$, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알켄일, 또는, $-(CH_2)_p$ -로 연결된, C_{3-6} 사이클로알킬, 3-6원의 헤테로사이클로알킬, C_{1-6} 알카노일, C_{2-6} 알케노일, C_{2-6} 알키노일, C_{6-10} 아릴 또는 5-10원의 헤테로아릴이고, 이 때, p 는 0 내지 3 의 정수이

고, 상기 R⁸ 및 R⁹는 서로 결합하여 5원 내지 6원의 고리를 형성할 수 있고, 상기 헤테로아릴, 헤테로아릴렌, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬렌 및 헤테로고리는 각각 독립적으로 N, O 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 3 개의 헤테로원자를 포함한다.

5

상기 다른 목적에 따라, 본 발명은 상기 본 발명의 화합물을 유효성분으로 포함하고 세포사멸 저해 단백질의 과발현 및 단백질 키나제의 과도한 활동을 원인으로 하는 비정상 세포 성장 질환의 예방 또는 치료에 사용되는 약학적 조성물을 제공한다.

10

본 발명에 따른 화학식 1의 헤테로고리 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이성질체, 수화물 또는 용매화물은 세포사멸 저해 단백질(IAP) 및 단백질 키나제를 동시에 저해하는 작용을 하면서 부작용도 적으므로, 이들을 함유하는 약학적 조성물은 세포사멸 저해 단백질 및 단백질 키나제의 과도한 활동으로 유발되는 비정상 세포 성장 질환에 선택적이고 효과적인 예방 또는 치료제로 활용될 수 있다.

15

발명의 상세한 설명

20

본 명세서에 사용되는 용어 '할로젠'은 다른 언급이 없으면, 불소, 염소, 브롬 또는 요오드를 의미한다.

본 명세서에 사용되는 용어 '알킬'은 다른 언급이 없으면, 직쇄형, 고리형 또는 분지형의 탄화수소 잔기를 의미한다.

25

본 명세서에 사용되는 용어 '사이클로알킬'은 다른 언급이 없으면 사이클로프로필 등을 포함한 환상 알킬을 나타낸다.

본 명세서에 사용되는 용어 '아릴'은 다른 언급이 없으면 페닐, 나프틸 등을 포함하는 방향족 그룹을 나타낸다.

30

본 명세서에 사용되는 용어 '헤테로사이클로알킬'은 다른 언급이 없으면 O, N 및 S 중에서 선택된 1개 이상의 헤테로원자를 함유하는 모노사이클릭 또는 바이사이클릭 이상의 환상 알킬을 나타낸다. 모노 헤테로사이클로알킬의 예로는 피페리딘일, 모폴린일, 티아모폴린일, 피롤리딘일, 이미다졸리딘일, 테트라하이드로퓨란일, 피페라진일 및 이와 유사한 그룹을 들 수 있으나 이들로 제한되는 것은 아니다.

35

본 명세서에 사용되는 용어 '헤테로아릴'은 다른 언급이 없으면 O, N 및 S 중에서 선택된 헤테로원자를 함유하는 모노사이클릭 또는 바이사이클릭 이상의 방향족 그룹을 의미한다. 모노사이클릭 헤테로아릴의 예로는 티아

졸릴, 옥사졸릴, 티오펜일, 퓨란일, 피롤릴, 이미다졸릴, 이소옥사졸릴, 피라
 졸릴, 트리아졸릴, 티아디아졸릴, 테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 피리딘일, 피리
 다진일, 피리미딘일, 피라진일 및 이와 유사한 그룹을 들 수 있으나 이들로
 제한되는 것은 아니다. 바이사이클릭 헤테로아릴의 예로는 인돌릴, 벤조티오
 5 펜일, 벤조퓨란일, 벤즈이미다졸릴, 벤즈옥사졸릴, 벤즈이속사졸릴, 벤즈티아
 졸릴, 벤즈티아디아졸릴, 벤즈트리아졸릴, 퀴놀린일, 이소퀴놀린일, 퓨린일,
 퓨로피리딘일 및 이와 유사한 그룹을 들 수 있으나 이들로 제한되는 것은
 아니다.

10 본 발명의 화학식 1의 헤테로고리 유도체 화합물에 있어서, 바람직하
 게는, 상기 X 가 -O-, -NH, 또는 -N(C₁₋₃알킬)- 일 수 있다.

또한 바람직하게는, 상기 R¹ 및 R² 가 각각 독립적으로 상기 치환기
 W_A 로 치환되거나 비치환된 C₅₋₁₀아릴 또는 5-10원의 헤테로아릴일 수 있
 고; 상기 R³ 가 H, 페닐옥시, 또는 벤질옥시일 수 있고; 상기 R⁴ 가 t-부틸,
 15 사이클로헥실, 또는 프로파질옥시에틸일 수 있고; 상기 R⁵ 가 메틸일 수 있
 고; 상기 R⁶ 이 H 또는 메틸일 수 있고; 상기 R⁷ 이 H 또는 메틸일 수 있
 다.

또한, 상기 p 가 0 내지 2 의 정수일 수 있고, 상기 q 가 1 또는 2
 일 수 있다.

20 또한, 상기 R_A 및 R_B 가 각각 독립적으로 H, 할로젠, -CF₃, -NO₂, -
 CN, C₁₋₄알킬 또는 -NR⁸R⁹ 이거나(여기서 R⁸ 및 R⁹ 는 상기 화학식 1에서
 정의한 바와 같음); 또는 상기 R_A 및 R_B 가 서로 결합하여 방향족의 C₅₋₆탄
 소고리 또는 방향족의 5-6원 헤테로고리를 형성할 수 있으며, 이 때 상기
 탄소고리 및 헤테로고리가 각각 독립적으로 H, 할로젠, -CF₃, -CN, -NH₂, -
 25 OH, C₁₋₄알킬, C₁₋₃알콕시, C₁₋₃알킬티오 및 C₁₋₃알킬설폰일로 이루어지는 군
 으로부터 선택되는 1 내지 3 개의 치환기로 치환될 수 있고, 상기 헤테로고
 리가 N, O 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 3 개의 헤테로원자
 를 포함한다.

30 본 발명의 보다 바람직한 화합물의 구체적인 예는 다음과 같다.

- 1) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-
 N-(3-메톡시-4-((4-((2-(메틸카바모일)페닐)아미노)피리미딘-2-일)아
 미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 2) (R)-1-((R)-3,3-디메틸-2-((R)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노
 35 일)-N-(4-((4-((4-플루오로-2-메틸-1H-인돌-5-일)옥시)피리미딘-
 2-일)아미노)-3-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;

- 3) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-
N-(3-메톡시-4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)피리미딘-2-일)아미노)페
닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 4) (S)-N-(4-((4-(3-아미노페녹시)피리미딘-2-일)아미노)-3-메톡시페
5) nil)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노
일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 5) (S)-N-(4-((4-(3-아크릴아미도페녹시)피리미딘-2-일)아미노)-3-메톡
시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타
노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 10 6) (S)-N-{4-[4-(2,3-디메틸-2H-인다졸-6-일아미노)-피리미딘-2-일아
미노-3-메톡시페닐]}-1-[(S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-메틸아미노-프로
판아미도)부타노일]-피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 7) (S)-N-{4-[4-(2,3-디메틸-2H-인다졸-6-일)-메틸아미노]-피리미딘-
2-일아미노-3-메톡시페닐]}-1-[(S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-메틸아미노
15 -프로판아미도)부타노일]-피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 8) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-
N-(4-((4-((4-(4-에틸피페라진-1-일)페닐)아미노)피리미딘-2-일)아
미노)-3-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 9) (S)-1-[(S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-메틸아미노프로판아미도)부타노일]-
20 N-(4-{4-[4-(4-에틸피페라진-1-일)-3-플루오로-페닐아미노]-피리
미딘-2-일)아미노)-3-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 10) (S)-N-(4-((4-((3-클로로-4-(4-에틸피페라진-1-일)페닐)아미노)피리
미딘-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메
틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 25 11) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노
일)-N-(4-((4-((4-(4-에틸피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)아미노)피
리미딘-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산
염;
- 12) (S)-1-[(S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노
30 일]-{4-[6-(3-메톡시페닐아미노)-피리미딘-4-일아미노]}-3-메톡시페
닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 13) (S)-1-[(S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-메틸아미노프로판아미도)-부타노
일]-N-(4-{6-[3-클로로-4-(4-이소프로필피페라진-1-일)-페닐아미
노]-피리미딘-4-일아미노}-3-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드
35 염산염;
- 14) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노

일)-N-(2-메톡시-4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드;

15) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(6-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)피리딘-3-일)피롤리딘-2-카복스아마이드;

16) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드;

17) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(3-메톡시-4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;

18) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(4-((4-((4-에틸피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;

19) (S)-N-(4-((4-((3-클로로-2,4-디플루오로페닐)아미노)퀴나졸린-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염; 및

20) (S)-N-(4-((4-((4-브로모-3-클로로-2-플루오로페닐)아미노)퀴나졸린-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염.

또한, 상기 화학식 1의 화합물들의 약학적으로 허용가능한 염, 이성질체, 수화물 또는 용매화물도 가능하다.

본 발명은 또한 상기 화학식 1로 표시되는 피리미딘 접합고리 유도체의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다. 약학적으로 허용가능한 염은 인체에 독성이 낮고 모화합물의 생물학적 활성과 물리화학적 성질에 악영향을 주지 않는 것이 좋다. 약학적으로 허용가능한 염은 약학적으로 허용가능한 유리산과 화학식 1의 염기 화합물의 산부가염, 알칼리 금속염(나트륨염 등)과 알칼리 토금속염(칼슘염 등), 유기염기와 화학식 1의 카복실산의 유기염기부가염, 아미노산부가염 등이 가능하다.

본 발명에 따르는 화합물의 바람직한 염의 형태로는 무기산 또는 유기산과의 염을 들 수 있다. 이 때, 무기산은 염산, 황산, 질산, 인산, 과염소산, 브롬산 등이 사용될 수 있다. 또한, 유기산은 초산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 푸마린산, 말레산, 말론산, 프탈산, 숙신산, 젖산, 구연

산, 시트르산, 글루콘산, 타타르산, 살리실산, 말산, 옥살산, 벤조산, 엠본산, 아스파르트산, 글루탐산 등이 사용될 수 있다. 유기염기부가염 제조에 사용될 수 있는 유기염기는 트리스(하이드록시메틸)메틸아민, 다이사이클로헥실아민 등이다. 아미노산부가염기 제조에 사용될 수 있는 아미노산은 알라닌, 글라이신 등의 천연아미노산이다. 본 발명에 따르는 화합물의 바람직한 염 중 특히 염산염이 바람직하다.

이와 같은 염은 통상적인 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들어 상기한 화학식 1의 화합물을 메탄올, 에탄올, 아세톤, 1,4-다이옥산과 같은 물과 섞일 수 있는 용매에 녹인 다음에 유리산 또는 유리염기를 가한 후에 결정화시켜 제조할 수 있다.

한편, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물의 이성질체도 범주에 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 비대칭 탄소중심을 가질 수 있으므로 R 또는 S 이성질체, 라세믹 화합물, 개개의 거울상이성질체 또는 혼합물, 개개의 부분입체이성질체 또는 혼합물로서 존재할 수 있으며, 이들 모든 광학이성질체 및 혼합물은 본 발명의 범위에 포함된다.

그 외에도, 화학식 1의 화합물의 용매화물 및 수화물 형태도 본 발명의 범위에 포함된다. 이러한 수화물 또는 용매화물은 공지의 방법으로 제조될 수 있으며, 비독성 및 수용성인 것이 바람직하고, 물 또는 알코올계 용매(특히, 에탄올 등)의 분자가 1개 내지 5개 결합된 수화물 또는 용매화물인 것이 바람직하다.

또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이성질체, 수화물 및 용매화물 중 하나 이상을 포함하는 화합물 라이브러리를 제공한다.

이와 같은 본 발명의 화합물은 세포사멸 저해 단백질(IAP) 및 단백질 키나제에 대한 저해 활성이 모두 우수하다.

따라서, 본 발명의 화합물은 세포사멸 저해 단백질의 과발현 및 단백질 키나제의 과도한 활동을 원인으로 하는 비정상 세포 성장 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

즉, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이성질체, 수화물 또는 용매화물을 세포사멸 저해 단백질의 과발현 및 단백질 키나제의 과도한 활동을 원인으로 하는 비정상 세포 성장 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약제를 제조하는데 사용하는 용도를 제공한다.

상기 단백질 키나제의 예로는 ALK, AMPK, Aurora A, Aurora B, Aurora C, Axl, Blk, Bmx, BTK, CaMK, CDK2/cyclinE, CDK5/p25, CHK1,

CK2, c-RAF, DMPK, EGFR1, Her2, Her4, EphA1, EphB1, FAK, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, Flt-1, Flt-3, Flt-4, Fms, Fyn, GSK3beta, HIPK1, IKKbeta, IGF-1R, IR, Itk, JAK2, JAK3, KDR, Kit, Lck, Lyn, MAPK1, MAPKAP-K2, MEK1, Met, MKK6, MLCK, NEK2, p70S6K, PAK2, PDGFR
 5 alpha, PDGFR beta, PDK1, Pim-1, PKA, PKBalpha, PKCalpha, Plk1, Ret, ROCK-I, Rsk1, SAPK2a, SGK, Src, Syk, Tie-2, Tec, Trk, ZAP-70 및 이들의 조합이 가능하다.

이들 중 보다 바람직한 단백질 키나제의 예로는 EGFR, VEGFR, FLT-3, Bcr-Abl, ALK, IGF-1R, JAK, PDGFR, FGFR, FAK 및 이들의 조합
 10 이 가능하다.

또한, 상기 비정상 세포 성장 질환은, 위암, 폐암, 간암, 대장암, 소장암, 췌장암, 뇌암, 뼈암, 흑색종, 유방암, 경화성선종, 자궁암, 자궁경부암, 두경부암, 식도암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 육종, 전립선암, 요도암, 방광암, 혈액암, 림프종, 섬유선종, 염증, 당뇨, 비만, 건선, 류마티스성 관절염,
 15 혈관종, 급성 또는 만성 신장병, 관상동맥 재협착증, 자가면역질환, 천식, 신경변성 질환, 급성감염 및 혈관 분열로 인한 안구질환으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이성질체, 수화물 또는 용매화물을 포유류에 투여하는 것을 포함하는, 포유류에서의 세포사멸 저해 단백질의 과발현 및 단백질 키나제의 과도한 활동을 원인으로 하는 비정상 세포 성장 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

본 발명의 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 등의 유효성분의 투여량은 처리되는 대상, 질병 또는 상태의 심각도, 투여의 속도 및 처방 의사의 판단에 따를 수 있다. 유효성분으로서 화학식 1의 화합물은 사람을 포함하는 포유동물에 하루 0.01 내지 200 mg/kg(체중), 바람직하게는 10 내지 100 mg/kg(체중)의 양으로 1일 1~2회 또는 On/Off 스케줄로 경구 또는 비경구적 경로를 통해 투여할 수 있다. 일부 경우에 있어서,
 25 상기 언급된 범위 보다 적은 투여량 수치가 보다 적합할 수 있고, 해로운 부작용을 일으키지 않으면서도 보다 많은 투여량이 사용될 수도 있으며, 보다 많은 투여량의 경우는 하루에 걸쳐 수회의 적은 투여량으로 분배될 수 있다.

나아가, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이성질체, 수화물 및 용매화물 중 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 이와 같은 약학적 조성물은 세포사멸 저해
 35

단백질의 과발현 및 단백질 키나제의 과도한 활동을 원인으로 하는 비정상 세포 성장 질환의 예방 또는 치료의 용도로써 사용될 수 있다.

상기 단백질 키나제 및 비정상 세포질환의 구체적인 예는 앞서 예시한 바와 같다.

본 발명의 약학적 조성물은 유효성분 외에 통상의 약학적으로 허용가능한 담체, 보강제 및 부형제 등이 첨가되어 통상적인 방법에 따라 제제화될 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 캡셀제, 시럽, 에멀전, 마이크로에멀전 등의 다양한 경구 투여 형태, 또는 근육내, 정맥내 또는 피하 투여와 같은 비경구 투여 형태로 제조될 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물에 사용될 수 있는 부형제로는 감미제, 결합제, 용해제, 용해보조제, 습윤제, 유화제, 등장화제, 흡착제, 붕해제, 산화방지제, 방부제, 활택제, 충전제, 방향제 등이 포함될 수 있다. 예를 들면 락토스, 덱스트로스, 슈크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로오스, 글라이신, 실리카, 탈크, 스테아린산, 스테린, 마그네슘 스테아린산염, 마그네슘 알루미늄 규산염, 녹말, 젤라틴, 트라가칸트 고무, 알지닌산, 소듐 알진산염, 메틸셀룰로오스, 소듐 카복실메틸셀룰로오스, 아가, 물, 에탄올, 폴리에틸렌글리콜, 폴리비닐피롤리돈, 염화나트륨, 염화칼슘, 오렌지 엷센스, 딸기 엷센스, 바닐라 향 등을 들 수 있다.

본 발명의 약학적 조성물이 경구 투여 형태로 제제화되는 경우, 사용되는 담체의 예로는 셀룰로오스, 규산칼슘, 옥수수전분, 락토오스, 수크로스, 덱스트로스, 인산칼슘, 스테아르산, 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 젤라틴, 탈크, 계면활성제, 현탁제, 유화제, 희석제 등을 들 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물이 주사제 형태로 제제화되는 경우 상기 담체로는 물, 식염수, 포도당 수용액, 유사 당수용액, 알콜, 글리콜 에테르(예: 폴리에틸렌글리콜 400), 오일, 지방산, 지방산에스테르, 글리세라이드, 계면활성제, 현탁제, 유화제 등을 들 수 있다.

이하, 본 발명에 따르는 화학식 1의 화합물의 제조방법을 설명한다.

이하의 제조방법 및 실시예에서 다음 하기의 약자가 사용된다:

Boc-: t-부톡시카보닐

Cbz-: 2-벤질옥시카보닐아미노

DIPEA: N,N-디이소프로필에틸아민 DMAP: N,N-디메틸아미노피리딘

35 DMF: N,N-디메틸 포름아마이드 DMSO : 디메틸 설펝사이드

EtOAc: 에틸 아세테이트

Fmoc-: 9-플루오레닐옥시카보닐

Hex.: 헥산

Mass: 질량분석 크로마토그램

MeOH: 메탄올

THF: 테트라하이드로퓨란

5 Tle: t-부틸글라이신

Ala: 알라닌

EDCI: 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보다이미드 하이드로클로라이드

HATU: 2-(1H-9-아자벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트.

HOBT: N-히드록시벤조트리아졸

MC: 메틸렌클로라이드

-OBn: -O-벤질

TLC: 박막 크로마토그래피

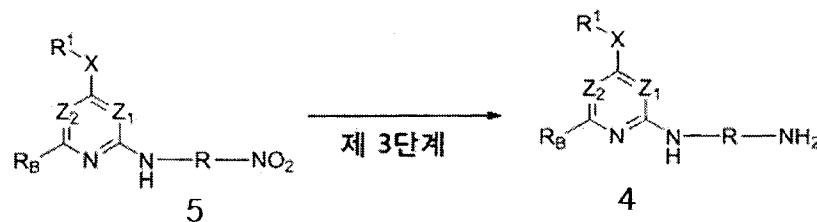
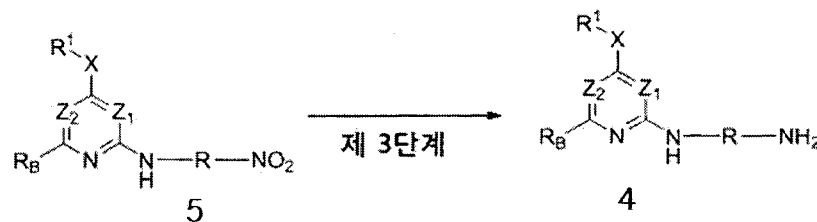
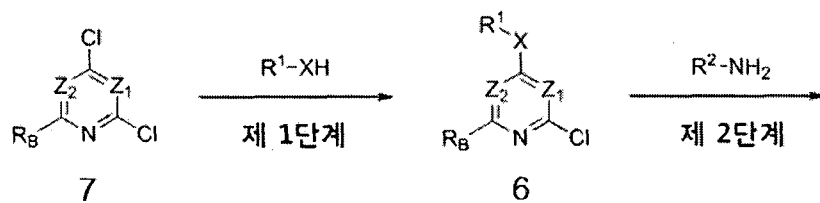
Chg: 사이클로헥실글라이신

MeAla: 메틸알라닌

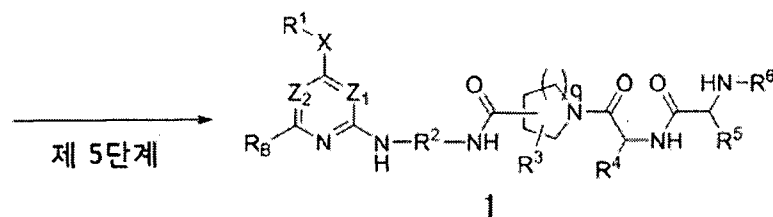
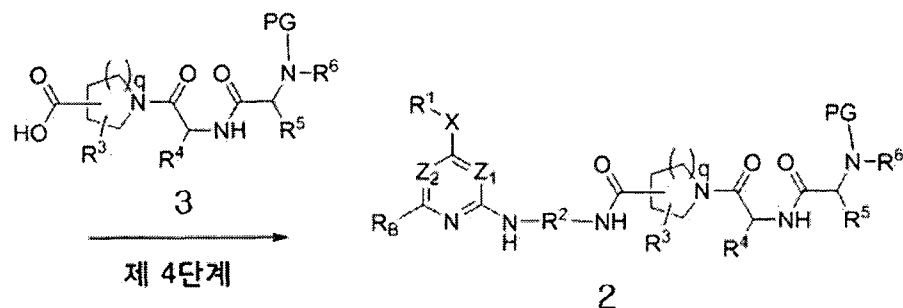
10

본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 하기 반응식 1에 나타난 합성 방법에 따라 제조할 수 있다.

반응식 1



15



상기 식에서, X, Z₁, Z₂, R¹ 내지 R⁶, R_B, 및 q은 명세서에서 정의한 바와 같으며, PG는 보호기(Protection group)이다.

- 5 상기 반응식 1에서, Y 그룹의 잔기에 따라서 제 4 단계의 반응 및 제 5 단계 반응의 순서가 바뀌어 진행될 수 있다. 상기 반응과정을 단계별로 하기에 예시한다. 단계별 예시에서 당량은 기준 물질(출발 물질)의 당량 비율로 명시하였고, 용매의 경우는 기준 물질의 mol 당 L로 표시하였다.

10 제 1 단계

- 화학식 7의 화합물(1eq), R¹-XH 화합물(0.5~1eq), 및 NaHCO₃(2~2.5eq)을 에탄올(0.2~0.3L/mol)과 THF(0.5~1.5L/mol)의 혼합 용매 하에서 75~95℃에서 40~60시간 반응시킨다. 반응이 종료되면 반응 용액을 식히고 유기층을 분리하고 정제하여 화학식 6의 화합물을 얻을 수
15 있다.

제 2 단계

- 화학식 6의 화합물(1eq), R₂-NH₂(0.1~0.2eq), Pd(OAc)₂(0.01~0.02eq), 잔트포스(0.02~0.03eq) 및 Cs₂CO₃(0.2~0.3eq)를 1,4-다이옥산(1~2L/mol) 용매 중에서 100~140℃에서 0.5~1.5시간 동안
20 교반한다. 반응이 종료되면 반응 용액을 식히고 유기층을 분리하고 정제하여 화학식 5의 화합물을 얻을 수 있다.

제 3 단계

- 철(4~5eq)을 50% 에탄올 수용액(40~50L/mol)에 묻히고 진한 염산 수용액(0.03~0.06L/mol)에 첨가한 뒤 가열하여 활성화시킨다. 여기에 화학
25 식 5의 화합물(1eq)을 첨가하고 0.5~1.5시간 동안 80~120℃에서 환류시킨다. 반응이 완결되면 여과 및 세척한 후 증류하여, 유기층을 분리하고 정제하여 화학식 4의 화합물을 얻을 수 있다.

제 4 단계

- 화학식 4의 화합물(1eq), 화학식 3의 화합물(1~2eq) 및 HATU(2~4eq), DIPEA(4~5eq)를 MC(20~30L/mol) 용매 중에 상온에서 0.5~1.5시간 동안 반응시킨다. 반응 용액을 세척 및 건조하고 정제하여 화학식 2의 화합물을 얻을 수 있다. 여기서 상기 화학식 3의 화합물은 하기
30 제조예 1의 방법에 따라 제조될 수 있다.

제 5 단계

- 35 화학식 2의 화합물(1eq)을 MC(50~70L/mol)에 녹인 후 염산 용액(8~12eq)을 첨가하고 상온에서 3~5시간 동안 반응시킨다. 생성된 고체를

여과하고 세척한 후 감압 건조하여 최종적으로 화학식 1의 화합물을 얻을 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다. 이하에서 질량 분석은 워터스(Waters)사의 MicroMass ZQ™를 사용하였다.

제조예 1: (S)-1-((S)-2-((S)-2-(t-부톡시카보닐(메틸)아미노)프로판아미도)-3,3-디메틸부타노일)피롤리딘-2-카복실산

단계 1: (S)-2-벤질 1-t-부틸 피롤리딘-1,2-디카복실레이트

Boc-Pro-OH(50.0g, 0.23mol)를 디클로로메탄(500mL)에 용해한 후, 여기에 EDCI(89.1g, 0.46mol), DMAP(5.7g, 0.05mol), DIPEA(162mL, 0.93mol) 및 벤질알콜(48mL, 0.46mol)을 적가하였다. 반응 용액을 상온에서 12시간 동안 교반하고, 5% 시트르산 수용액으로 여러 번 세척하였다. 유기층을 황산나트륨으로 건조한 후, 감압하에 여과 및 증류하여 노란색 오일상의 표제 화합물(70.0g, 99%)을 수득하였다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 7.32(m, 5H), 5.20(m, 2H), 4.27(d, 1H), 3.52(m, 2H), 1.91(m, 4H), 1.35(s, 9H).

MS(ESI^+ , m/z): 306 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

단계 2: (S)-벤질 피롤리딘-2-카복실레이트 염산염

이전 단계 1에서 수득한 화합물(70.0g, 0.23mol)을 4M 염산/다이옥산 용액(175mL)에 녹인 후, 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 후 용액을 감압 농축하고, 디에틸 에테르로 재결정하여, 흰색 고체상의 표제 화합물(42.6g, 77%)을 수득하였다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 7.32(m, 5H), 5.20(m, 2H), 4.27(d, 1H), 3.52(m, 2H), 1.91(m, 4H).

MS(ESI^+ , m/z): 206 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

단계 3: (S)-벤질 1-((S)-2-(t-부톡시카보닐아미노)-3,3-디메틸부타노일)피롤리딘-2-카복실레이트

이전 단계 2에서 수득한 화합물(30.0g, 0.12mol)을 디클로로메탄(300mL)에 용해한 후, 여기에 Boc-Tle-OH(26.7g, 0.12mol), HATU(56.6g, 0.15mol) 및 DIPEA(43mL, 0.25mol)을 적가하였다. 상기 반응 용액을 상온

에서 4시간 동안 교반하고, 불용 성분을 여과를 통해 제거한 뒤, 5% 시트르산 수용액으로 여러 번 세척하였다. 유기층을 황산나트륨으로 건조하고, 감압 하에 여과 및 증류한 후 컬럼 크로마토그래피(이동상 MC/메탄올)로 정제하여, 투명한 오일상의 표제 화합물(47.0g, 91%)을 수득하였다.

- 5 ^1H NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 7.33(m, 5H), 5.15(m, 2H), 4.61(m, 2H), 3.84(m, 2H), 2.25(m, 2H), 1.98(m, 2H), 1.43(s, 9H), 0.98(s, 9H).
MS(ESI^+ , m/z): 419 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

10 단계 4: (S)-벤질 1-((S)-2-아미노-3,3-디메틸부타노일)피롤리딘-2-카복실레이트 염산염

이전 단계 3에서 수득한 화합물(47.0g, 0.11mol)을 4M 염산/다이옥산 용액(115mL)에 녹인 후 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후 용액을 감압 농축하여, 투명한 오일상의 표제 화합물(39.0g, 98%)을 수득하였다.

- 15 ^1H NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 7.35(s, 5H), 5.18(q, 2H), 4.67(t, 1H), 4.02(m, 2H), 3.56(m, 1H), 2.32(m, 1H), 1.93(m, 3H), 1.13(s, 9H).
MS(ESI^+ , m/z): 319 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

20 단계 5: (S)-벤질 1-((S)-2-((S)-2-(t-부톡시카보닐(메틸)아미노)프로판아미도)-3,3-디메틸부타노일)피롤리딘-2-카복실레이트

- 이전 단계 4에서 수득한 화합물(29.0g, 0.08mol)을 디클로로메탄(300mL)에 용해한 후, 여기에 Boc-MeAla-OH(24.9g, 0.12mol), EDCI(23.5g, 0.12mol) 및 DIPEA(43mL, 0.25mol)를 적가하였다. 상기 반응 용액을 상온에서 12시간 동안 교반하고, 5% 시트르산 수용액으로 여러 번
25 세척하였다. 유기층을 황산나트륨으로 건조하고, 감압 하에 여과 및 증류한 후 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 투명한 오일상의 표제 화합물(30.0g, 72%)을 수득하였다.

- 30 ^1H NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 7.33(m, 5H), 5.16(q, 2H), 4.16(m, 1H), 4.54(m, 1H), 3.84(m, 1H), 3.66(m, 1H), 2.77(s, 3H), 2.18(m, 1H), 1.95(m, 3H), 1.47(s, 9H), 1.29(m, 5H), 0.96(s, 9H).
MS(ESI^+ , m/z): 504 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

단계 6: (S)-1-((S)-2-((S)-2-(t-부톡시카보닐(메틸)아미노)프로판아미도)-3,3-디메틸부타노일)피롤리딘-2-카복실산

- 35 이전 단계 5에서 수득한 화합물(28.0g, 0.06mol)을 메탄올(300mL)에 용해한 후, 10% Pd/C(2.8g)를 넣고 수소화 반응 상태에서 1.5시간 동안 교

반하였다. 불용 성분을 여과를 통해 제거하고, 용액을 감압 농축한 후, 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 흰색 고체상의 표제 화합물(21.0g, 91%)을 수득하였다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 4.57(m, 3H), 3.83(m, 1H), 3.65(m, 1H), 2.75(s, 3H), 2.31(m, 1H), 2.01(m, 3H), 1.46(s, 9H), 1.29(d, 3H), 0.98(s, 9H).

MS(ESI⁺, m/z): 414 [M+H]⁺.

실시예 1: (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(3-메톡시-4-((4-((2-(메틸카바모일)페닐)아미노)피리미딘-2-일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

단계 1: 2-((2-클로로피리미딘-4-일)아미노)-N-메틸벤즈아마이드

2-아미노-N-메틸벤즈아마이드(1.0g, 6.66mmol), 2,4-디클로로피리미딘(1.5g, 9.99mmol), 및 NaHCO_3 (1.7g, 19.98mmol)를 에탄올(2.5mL)/THF(10mL) 혼합 용매에 첨가하고 85℃에서 48시간 동안 교반하였다. 반응 온도를 상온으로 식힌 후 반응 용액을 에틸 아세테이트로 희석한 다음, 1N 염산 수용액, 물 및 브라인으로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4 으로 건조한 다음, 감압 하에 여과 및 증류한 후 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(560mg, 32%)을 수득하였다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 11.00(s, 1H), 8.49(d, 1H), 8.10(m, 2H), 7.48-7.40(m, 2H), 6.99(t, 1H), 6.67(br, 1H), 6.56(d, 1H), 2.98(d, 3H).

MS(ESI⁺, m/z): 263 [M+H]⁺.

단계 2: 2-((2-((2-메톡시-4-니트로페닐)아미노)피리미딘-4-일)아미노)-N-메틸벤즈아마이드

이전 단계 1에서 얻은 화합물(0.56g, 9.99mmol), 2-메톡시-4-니트로아닐린(239mg, 1.42mmol), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (32mg, 0.14mmol), 잔트포스(164mg, 0.28mmol), 및 Cs_2CO_3 (926mg, 2.84mmol)를 1,4-다이옥산(15mL)에 용해시키고, 120℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 온도를 상온으로 식힌 후 반응 용액을 클로로포름/이소프로필알콜(3:1, v/v) 용액으로 희석한 다음, 물과 브라인으로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4 으로 건조한 다음, 감압 하에 여과 및 증류한 후 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(379mg, 45%)을 수득하였다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 10.51(s, 1H), 8.72(d, 1H), 8.45(d, 1H), 8.15(d, 1H), 7.89(m, 2H), 7.75(d, 1H), 7.54-7.48(m, 2H), 7.10(t, 1H),

6.33(d, 1H), 6.24(br, 1H), 4.01(s, 3H), 3.02(d, 3H).

MS(ESI⁺, m/z): 395 [M+H]⁺.

단계 3: 2-((2-((4-아미노-2-메톡시페닐)아미노)피리미딘-4-일)아미노)-N-메틸벤즈아마이드

철 262mg(4.69mmol)을 50% 에탄올 수용액(40mL)에 묶히고 진한 염산 수용액(0.04mL)을 첨가한 후 반응 온도를 100℃로 올려서 활성화시켰다. 여기에 이전 단계 2에서 얻은 화합물(370mg, 0.94mmol)을 첨가하고 1시간 동안 100℃에서 환류시켰다. 반응이 완결되면 반응 용액을 셀라이트 패드에 감압 여과하고, 클로로포름/이소프로필알콜(3:1, v/v) 용액 80mL로 세척한 후 얻어진 여과액을 감압 증류하였다. 얻어진 고체를 클로로포름/이소프로필알콜(3:1, v/v) 용액에 녹인 후 포화 NaHCO₃ 수용액과 브라인으로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄으로 건조한 다음, 감압 하에 여과 및 증류하여 표제 화합물(288 mg, 84%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 10.32(br, 1H), 8.56(d, 1H), 8.01-7.95(m, 2H), 7.42-7.37(m, 2H), 7.13(br, 1H), 6.99(t, 1H), 6.35(br, 1H), 6.30-6.27(m, 2H), 6.10(d, 1H), 3.80(s, 3H), 2.97(d, 3H).

MS(ESI⁺, m/z): 365 [M+H]⁺.

단계 4: t-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((S)-2-((3-메톡시-4-((4-((2-(메틸카바모일)페닐)아미노)피리미딘-2-일)아미노)페닐)카바모일)피롤리딘-1-일)-3,3-디메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)(메틸)카바메이트

이전 단계 3에서 얻은 화합물(288mg, 0.79mmol), 상기 제조예 1에서 얻은 화합물(490mg, 1.19mmol), HATU(902mg, 2.37mmol), 및 DIPEA(0.70mL, 3.95mmol)를 MC(20mL)에 첨가하고, 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 MC로 묶힌후 포화 NaHCO₃ 수용액과 브라인으로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄으로 건조한 다음, 감압 하에 여과 및 증류한 후 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 표제 화합물(264mg, 44%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 10.18(br, 1H), 9.46(br, 1H), 8.45(d, 1H), 8.18(d, 1H), 7.96(d, 1H), 7.45-7.37(m, 3H), 7.22(br, 1H), 7.00(br, 1H), 6.90-6.83(m, 2H), 6.66(br, 1H), 6.03(d, 1H), 4.76(m, 2H), 4.65(d, 1H), 3.86(m, 1H), 3.82(s, 3H), 3.71(m, 1H), 2.98(d, 3H), 2.77(s, 3H), 2.19-2.00(m, 4H), 1.44(s, 9H), 1.32(d, 3H), 1.00(s, 9H).

MS(ESI⁺, m/z): 760 [M+H]⁺.

단계 5: (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(3-메톡시-4-((4-((2-(메틸카바모일)페닐)아미노)피리미딘-2-일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

이전 단계 4에서 얻은 화합물(260mg, 0.34mmol)을 MC(20mL)에 녹인 후 염산 용액(0.9mL, 3.42mmol, 4N 다이옥산 용액)을 첨가하였다. 반응 용액을 상온에서 4시간 동안 교반하였다. 생성된 고체를 감압 여과하고 MC와 디에틸 에테르로 세척한 후 감압 건조하여 표제 화합물(202mg, 85%)을 수득하였다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 10.37(s, 1H), 9.38(s, 1H), 8.51(d, 1H), 8.24(d, 1H), 8.01(d, 1H), 7.89(d, 1H), 7.50(s, 1H), 7.45-7.39(m, 3H), 6.97(t, 1H), 6.80(dd, 1H), 6.55(m, 1H), 6.12(d, 1H), 4.81(m, 1H), 4.61(d, 1H), 3.89(m, 1H), 3.85(s, 3H), 3.68(m, 1H), 2.98(d, 1H), 2.55(m, 1H), 2.40(s, 3H), 2.14-1.86(m, 4H), 1.32(d, 3H), 1.02(s, 9H).

MS(ESI⁺, m/z): 660 [M+H]⁺.

실시예 2: (R)-1-((R)-3,3-디메틸-2-((R)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(4-((4-((4-플루오로-2-메틸-1H-인돌-5-일)옥시)피리미딘-2-일)아미노)-3-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

실시예 1의 단계 1에서 2-아미노-N-메틸벤즈아마이드 대신 4-플루오로-2-메틸-1H-인돌-5-올을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 1의 단계 1 내지 5 와 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물(120mg, 94%)을 수득하였다.

MS(ESI⁺, m/z): 675 [M+H]⁺.

실시예 3: (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(3-메톡시-4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)피리미딘-2-일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

단계 1: 2-클로로-N-(3-메톡시페닐)피리미딘-4-아민

2-아미노-N-메틸벤즈아마이드 대신 3-메톡시아닐린을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 1의 단계 1과 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물(1.96g, 96%)을 수득하였다.

^1H NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 8.15-8.13(d, 1H), 7.34-7.28(t, 1H), 6.94(brs, 1H), 6.89-6.85(m, 2H), 6.81-6.77(dd, 1H), 6.65-6.63(d, 1H), 3.83(s, 3H).

단계 2: N²-(2-메톡시-4-니트로페닐)-N⁴-(3-메톡시페닐)피리미딘-2,4-디아민

이전 단계 1에서 얻은 화합물(500mg, 2.12mmol), 및 2-메톡시-4-니트로아닐린(364mg, 2.12mmol)을 2-부탄올(5mL)에 녹이고 TFA(0.16mL, 2.12mmol)을 적가하였다. 반응 온도를 100~120℃까지 가열하고 12시간 교반하였다. 반응 온도를 상온으로 식힌 후 2-부탄올로 세척하며 고체를 여과하여, 표제 화합물(484mg, 62%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, DMSO): δ 8.40(s, 1H), 8.13-8.11(d, 1H), 7.86(s, 1H), 7.84-7.81(d, 1H), 7.34-7.29(t, 1H), 7.20(s, 1H), 7.13-7.10(d, 1H), 6.79-6.77(d, 1H), 6.50-6.48(d, 1H), 4.02(s, 3H), 3.74(s, 3H).

단계 3: N²-(4-아미노-2-메톡시페닐)-N⁴-(3-메톡시페닐)피리미딘-2,4-디아민

2-((2-((2-메톡시-4-니트로페닐)아미노)피리미딘-4-일)아미노)-N-메틸벤즈아마이드 대신 이전 단계 2에서 얻은 화합물을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 1의 단계 3과 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물(341.9mg, 77%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 8.07(s, 1H), 8.04-8.02(d, 1H), 7.28-7.22(t, 1H), 7.13(brs, 1H), 6.96-6.90(t, 1H), 6.95(s, 1H), 6.70-6.66(dd, 1H), 6.54(brs, 1H), 6.33(s, 1H), 6.30(s, 1H), 6.17-6.15(d, 1H), 3.83(s, 3H), 3.80(s, 3H), 3.53(brs, 2H).

단계 4: t-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((S)-2-((3-메톡시-4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)피리미딘-2-일)아미노)페닐)카바모일)피롤리딘-1-일)-3,3-디메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)(메틸)카바메이트

이전 단계 3에서 얻은 화합물(340mg, 1.01mmol), 제조예 1에서 얻은 화합물(1.25g, 3.02mmol), 및 EDCI(966mg, 5.04mmol)을 피리딘/N,N-디메틸포름아마이드(10:1) 용액에 적가한 후, 40℃에서 12시간 교반하였다. 반응 용액을 상온으로 식힌 후 포화 황산구리 수용액과 에틸 아세테이트로 추출하였다. 분리된 유기층을 포화 NaHCO₃ 수용액과 브라인으로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄으로 건조한 다음, 감압 하에 여과 및 증류하고 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 표제 화합물(123mg, 56%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 9.05(brs, 1H), 8.15-8.13(d, 1H), 7.46(s, 1H), 7.33-7.26(d, 1H), 7.18-7.13(t, 1H), 6.93-6.90(d, 1H), 6.81-6.78(d, 1H), 6.73(s, 1H), 6.65-6.63(d, 1H), 6.41-6.39(d, 1H), 4.83-

4.81(d, 1H), 4.71(brs, 1H), 4.66-4.62(m, 1H), 3.86-3.84(m, 2H), 3.77(s, 3H), 3.73(s, 3H), 2.80(s, 3H), 2.57(m, 1H), 2.21-2.06(m, 4H), 1.50(s, 9H), 1.29-1.27(d, 3H), 1.00(s, 9H).

5 단계 5: (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(3-메톡시-4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)피리미딘-2-일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

출발 물질로서 이전 단계 4에서 얻은 화합물을 사용하고, MC 대신 에틸 아세테이트를 사용한 것을 제외하고는, 실시예 1의 단계 5과 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물(33mg, 29%)을 수득하였다.

MS(ESI⁺, m/z): 633 [M+H]⁺.

15 실시예 4: (S)-N-(4-((4-(3-아미노페녹시)피리미딘-2-일)아미노)-3-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

단계 1: 2-클로로-4-(3-니트로페녹시)피리미딘

2,4-디클로로피리미딘(3.0g, 20.14mmol), 3-니트로페놀(2.8g, 20.14mmol), 및 Cs₂CO₃(15.7g, 48.33mmol)를 DMSO(35mL)에 첨가하고 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 용액에 물(35mL)을 첨가하고 30분간 교반한 후 생성된 고체를 감압 여과하고 물과 헥산으로 세척하였다. 얻어진 화합물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(3.9g, 77%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, DMSO-*d*6): δ 8.67(d, 1H), 8.20(m, 2H), 7.79(m, 2H), 7.30(d, 2H).

MS(ESI⁺, m/z): 252 [M+H]⁺.

단계 2: 3-메톡시-4-((4-(3-니트로페녹시)피리미딘-2-일)아미노)벤조산

30 이전 단계 1에서 얻은 화합물(2.6g, 10.33mmol), 4-아미노-3-메톡시벤조산(1.7g, 10.33mmol), 및 트리플루오로아세트산(0.767mL, 10.33mmol)을 2-부탄올에 첨가하고, 100°C에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 온도를 상온으로 식힌 후 NaHCO₃ 수용액과 브라인으로 세척하였다. 물층을 EtOAc로 3회 추출한 후 유기층을 Na₂SO₄으로 건조한 다음 감압 증류하였다. 얻어진 고체를 EtOAc 하에서 30분간 교반한 후 감압 여과하여 표제 화합물(1.0g, 25%)을 수득하였다.

^1H NMR(300 MHz, DMSO-*d*6): δ 8.46(d, 1H), 8.20(m, 3H), 7.79(m, 3H), 7.42(d, 1H), 7.21(dd, 1H), 6.69(d, 1H), 3.85(s, 3H).

MS(ESI⁺, m/z): 383 [M+H]⁺.

5 단계 3: t-부틸 (3-메톡시-4-((4-(3-니트로페녹시)피리미딘-2-일)아미노)페닐)카바메이트

이전 단계 2에서 얻은 화합물(1.0g, 2.62mmol), DPPA(0.85mL, 3.92mmol), 및 TEA(0.55mL, 3.92mmol)을 t-부탄올에 첨가하고, 90℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 온도를 상온으로 식힌 후 EtOAc로 묶힌 다음, 10 NaHCO₃ 수용액과 브라인으로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄으로 건조한 다음 감압 하에 여과 및 증류한 후 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 표제 화합물(470mg, 40%)을 수득하였다.

^1H NMR(300 MHz, DMSO-*d*6): δ 9.17(br, 1H), 8.31(d, 1H), 8.14(m, 1H), 8.10(d, 1H), 8.04(s, 1H), 7.73(d, 2H), 7.32(m, 1H), 7.21(s, 1H), 15 6.65(m, 1H), 6.47(d, 1H), 3.69(s, 3H), 1.45(s, 9H).

MS(ESI⁺, m/z): 454 [M+H]⁺.

단계 4: 2-메톡시-N¹-(4-(3-니트로페녹시)피리미딘-2-일)벤젠-1,4-디아민

20 이전 단계 3에서 얻은 화합물(470mg, 1.04mmol) 및 TFA(1.54mL, 20.73mmol)를 MC(5mL)에 첨가하고, 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 NaHCO₃ 수용액과 브라인으로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄으로 건조한 다음 감압 하에 여과 및 증류하여 표제 화합물(343mg, 97%)을 수득하였다.

25 ^1H NMR(300 MHz, DMSO-*d*6): δ 8.24(d, 1H), 8.12(m, 1H), 8.07(s, 1H), 7.88(s, 1H), 7.71(m, 2H), 6.99(d, 1H), 6.36(d, 1H), 6.18(d, 1H), 5.87(m, 1H), 4.87(br, 2H), 3.63(s, 3H).

MS(ESI⁺, m/z): 354 [M+H]⁺.

30 단계 5: t-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((S)-2-((3-메톡시-4-((4-(3-니트로페녹시)피리미딘-2-일)아미노)페닐)카바모일)피롤리딘-1-일)-3,3-디메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)(메틸)카바메이트

이전 단계 4에서 얻은 화합물을 출발물질로 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 1의 단계 4와 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물(434mg, 35 60%)을 수득하였다.

^1H NMR(300 MHz, DMSO-*d*6): δ 9.91(s, 1H), 8.33(d, 1H), 8.15-

8.11(m, 2H), 8.07(s, 1H), 7.74-7.73(m, 2H), 7.68(d, 1H), 7.41(d, 2H), 7.32(d, 1H), 6.50(d, 1H), 4.57(m, 1H), 4.50(d, 1H), 4.39(m, 1H), 3.71(s, 3H), 3.69(m, 2H), 2.74(s, 3H), 2.13(m, 2H), 1.86(m, 2H), 1.38(s, 9H), 1.20(d, 3H), 0.95(s, 9H).

5 MS(ESI⁺, m/z): 749 [M+ H]⁺.

단계 6: (S)-N-(4-((4-(3-아미노페녹시)피리미딘-2-일)아미노)-3-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

10 이전 단계 5에서 얻은 화합물(49mg, 0.07mmol) 및 염산 용액(0.4mL, 1.36mmol, 4N 다이옥산 용액)을 MC(5mL)에 첨가하고, 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 생성된 고체를 감압 여과한 후 디에틸 에테르로 세척한 다음 감압 건조하여 표제 화합물(42mg, 89%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, DMSO-*d*6): δ 10.28(s, 1H), 9.52(br, 1H), 8.89(br, 1H), 8.56(d, 1H), 8.35(d, 1H), 7.55-7.44(m, 2H), 7.36(d, 1H), 7.16-7.06(m, 3H), 7.01(d, 1H), 6.65(d, 1H), 4.51-4.44(m, 2H), 3.96(m, 1H), 3.74(s, 3H), 3.67(m, 1H), 2.44(s, 3H), 2.14-1.86(m, 4H), 1.32(d, 3H), 1.00(s, 9H).

MS(ESI⁺, m/z): 619 [M+ H]⁺.

20

실시예 5: (S)-N-(4-((4-(3-아크릴아미도페녹시)피리미딘-2-일)아미노)-3-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

25 단계 1: t-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((S)-2-((4-((4-(3-아크릴아미도페녹시)피리미딘-2-일)아미노)-3-메톡시페닐)카바모일)피롤리딘-1-일)-3,3-디메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)(메틸)카바메이트

실시예 4에서 단계 5에서 얻은 화합물(200mg, 0.28mmol) 및 DIPEA(0.145mL, 0.84 mmo)를 MC(5mL)에 용해시키고, 여기에 아크릴로일 클로라이드(0.033mL, 0.42mmol)를 0℃에서 첨가하였다. 반응 용액을 상온에서 14시간 동안 교반한 후 EtOAc로 희석하고 물과 브라인으로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄으로 건조한 다음 감압 하에 여과 및 증류한 후 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 표제 화합물(50mg, 23%)을 수득하였다.

MS(ESI⁺, m/z): 773 [M+ H]⁺.

35

단계 2: (S)-N-(4-((4-(3-아크릴아미도페녹시)피리미딘-2-일)아미

노)-3-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

이전 단계 1에서 얻은 화합물을 출발물질로 사용하는 것을 제외하고, 실시예 1의 단계 5와 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물(39mg, 85%)을
5 수득하였다.

MS(ESI⁺, m/z): 673 [M+H]⁺.

실시예 6: (S)-N-{4-[4-(2,3-디메틸-2H-인다졸-6-일아미노)-피리미딘-2-일아미노-3-메톡시페닐]-1-[(S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-메틸아미노-프로판아
10 미도)부타노일]-피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

실시예 1의 단계 1에서 2-아미노-N-메틸벤즈아마이드 대신 2,3-디메틸-2H-인다졸-6-일아민을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 1의 단계 1 내지 5 와 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물(30mg, 52%)을 수득하였
15 다.

MS(ESI⁺, m/z): 671 [M+H]⁺.

실시예 7: (S)-N-{4-[4-(2,3-디메틸-2H-인다졸-6-일)-메틸아미노]-피리미딘-2-일아미노-3-메톡시페닐]-1-[(S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-메틸아미노-프로
20 판아미도)부타노일]-피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

실시예 1의 단계 1에서 2-아미노-N-메틸벤즈아마이드 대신 2,3-디메틸-2H-인다졸-6-일메틸아민을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 1의 단계 1 내지 5 와 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물(43mg, 62%)을 수득하였
25 다.

¹H NMR(300 MHz, DMSO-*d*6): δ 10.20(s, 1H), 9.27(br, 1H), 8.89(br, 1H), 7.74(d, 1H), 7.62(d, 1H), 7.48(s, 1H), 7.37(s, 1H), 6.95-6.88(m, 2H), 6.80(d, 1H), 5.83(d, 1H), 4.83-4.64(m, 3H), 4.12(s, 3H), 3.88(m, 1H), 3.85(s, 3H), 3.70-3.68(m, 1H), 3.55(s, 3H), 2.79(s, 3H),
30 2.64(s, 3H), 2.48-2.44(m, 1H), 2.19-2.00(m, 3H), 1.33(d, 3H), 1.01(s, 9H).

MS(ESI⁺, m/z): 685 [M+H]⁺.

실시예 8: (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노
35 일)-N-(4-((4-((4-(4-에틸피페라진-1-일)페닐)아미노)피리미딘-2-일)아미노)-3-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

실시에 1에서 단계 1에서, 2-아미노-N-메틸벤즈아마이드 대신 4-(4-에틸피페라진-1-일)아닐린을 사용하고, NaHCO₃ 대신 K₂CO₃을 사용하고, EtOH/THF 대신 DMSO를 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 1의 단계 1
5 내지 5 와 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물(130mg, 82%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 9.49(s, 1H), 7.99(d, 1H), 7.87(d, 1H), 7.72(d, 1H), 7.41(br, 1H), 7.22(m, 1H), 7.05(d, 2H), 6.90(m, 1H), 6.80(d, 2H), 6.17(d, 1H), 5.42(br, 1H), 4.80(d, 1H), 4.61(t, 2H), 3.88(m, 2H),
10 3.66(s, 3H), 3.20(m, 4H), 2.65(m, 4H), 2.52(q, 2H), 1.88(m, 4H), 1.31(d, 3H), 1.15(t, 3H), 1.01(s, 9H).

MS(ESI⁺, m/z): 715 [M+H]⁺.

실시예 9: (S)-1-[(S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-메틸아미노프로판아미도)부타노
15 일]-N-(4-{4-[4-(4-에틸피페라진-1-일)-3-플루오로-페닐아미노]-피리미딘
-2-일)아미노)-3-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

실시에 1에서 단계 1에서 2-아미노-N-메틸벤즈아마이드 대신 4-(4-에틸피페라진-1-일)-3-플루오로-페닐아민을 사용하는 것을 제외하고는, 실
20 시예 1의 단계 1 내지 5 와 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물(130mg, 70%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, DMSO-d₆): δ 9.22(s, 1H), 8.16(d, 1H), 7.75(d, 1H), 7.51 (br, 1H), 7.25(s, 1H), 7.03-6.92(m, 3H), 6.72-6.62(m, 2H), 4.81-4.63(m, 3H), 3.92-3.86(m, 2H), 3.83(s, 3H), 3.70-3.64(m, 2H),
25 3.35-3.25(m, 3H), 2.92-2.80(m, 2H), 2.79(s, 3H), 2.70-2.69(m, 1H), 2.47-2.44(m, 1H), 2.18-2.00(m, 4H), 1.43(d, 3H), 1.37(d, 3H), 1.00(s, 9H).

MS(ESI⁺, m/z): 733 [M+H]⁺.

실시예 10: (S)-N-(4-((4-((3-클로로-4-(4-에틸피페라진-1-일)페닐)아미노)
30 피리미딘-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아
미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

단계 1: 2-클로로-N-(3-클로로-4-(4-에틸피페라진-1-일)페닐)피리
35 미딘-4-아민

2,4-디클로로피리미딘(323mg, 2.17mmol)과 3-클로로-4-(4-에틸피

페라진-1-일)아닐린(520mg, 2.17mmol)을 1-부탄올(7mL)에 용해한 후 DIPEA(0.76mL, 4.34mmol)을 적가하였다. 반응 온도를 100~120℃로 높여 12시간 교반하였다. 반응 온도를 상온으로 식힌 후, 에틸 아세테이트와 물로 추출하고 분리된 유기층은 Na₂SO₄로 건조하여 감압 증류하였다. 수득한 잔류물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(500mg, 65%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 8.14-8.12(d, 1H), 7.34-7.33(d, 1H), 7.21-7.17(dd, 1H), 7.09-7.07(d, 1H), 6.91(brs, 1H), 6.53-6.51(d, 1H), 3.12(br, 4H), 2.67(br, 4H), 2.56-2.49(q, 2H), 1.17-1.12(t, 3H).

단계 2-1: ((S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(2-메톡시-4-니트로페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드

제조예 1에서 얻은 화합물(500mg, 2.97mmol), 2-메톡시-4-니트로아닐린(1.85g, 4.46mmol), 및 EDCI(2.85g, 14.85mmol)을 피리딘(10mL)에 녹이고 45℃에서 12시간 교반하였다. 온도를 상온으로 식히고 에틸 아세테이트와 포화 NaHCO₃ 수용액으로 추출하였다. 분리된 유기층을 Na₂SO₄로 건조하고 감압 증류 및 감압 여과하고 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(777mg, 58%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, DMSO): δ 9.79(s, 1H), 8.39(d, 1H), 7.88(dd, 1H), 7.81(s, 1H), 4.76(m, 1H), 4.59(m, 1H), 4.50(d, 1H), 3.98(s, 3H), 3.68(m, 2H), 2.74(s, 3H), 1.97(m, 4H), 1.38(s, 9H), 1.21(d, 3H), 0.94(s, 9H).

단계 2-2: (S)-N-(4-아미노-2-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드

철(832mg, 14.9mmol)을 50% 에탄올 수용액(15mL)에 묻히고 진한 염산 수용액(50μL)을 첨가한 후 반응 온도를 100℃로 올려서 활성화시켰다. 여기에 상기 단계 2-1에서 얻은 화합물(777mg, 1.49mmol)을 첨가하고 1시간 동안 100℃에서 환류시켰다. 반응이 완결되면 반응 용액을 셀라이트 패드에 감압 여과하고, 클로로포름/이소프로필알콜(3:1, v/v) 용액으로 세척한 후 얻어진 여과액을 감압 증류하였다. 얻어진 고체를 클로로포름/이소프로필알콜(3:1, v/v) 용액에 녹인 후 포화 NaHCO₃ 수용액과 브라인으로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄으로 건조한 다음, 감압 하에 여과 및 증류하여 표제 화합물(464 mg, 72%)을 수득하였다.

MS(ESI⁺, m/z): 434 [M+H]⁺.

단계 3: t-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((S)-2-((4-((4-((3-클로로-4-(4-에

틸피페라진-1-일)페닐)아미노)피리미딘-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)카바모
일)피롤리딘-1-일)-3,3-디메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-1-옥소프로판-
2-일)(메틸)카바메이트

이전 단계 1에서 얻은 화합물(200mg, 0.568mmol) 및 이전 단계 2-2
5 에서 얻은 화합물(303mg, 0.568mmol)을 2-부탄올(2mL)에 녹이고
TFA(0.04mL, 0.568mmol)을 적가하였다. 반응 온도를 100~120℃로 높이고
12시간 교반하였다. 반응 온도를 상온으로 식힌 후 클로로포름/이소프로필알
콜(3:1, v/v) 용액과 포화 NaHCO₃ 수용액으로 추출하였다. 분리된 유기층을
Na₂SO₄으로 건조한 다음, 감압 하에 여과 및 증류하고 컬럼 크로마토그래피
10 로 정제하여 표제 화합물(306mg, 63%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 9.03(brs, 1H), 8.27-8.24(d, 1H), 8.03-
8.02(d, 1H), 7.46-7.45(d, 1H), 7.39-7.38(d, 1H), 7.23-7.19(dd, 1H),
7.05-6.99(m, 2H), 6.95-6.91(dd, 1H), 6.57(brs, 1H), 6.10-6.08(d, 1H),
4.81-4.79(d, 1H), 4.66-4.63(d, 1H), 3.86-3.83(m, 1H), 3.80(s, 3H), 3.71-
15 3.66(m, 1H), 3.10(m, 4H), 2.80(s, 3H), 2.68(m, 4H), 2.60-2.50(q, 2H),
2.50(m, 1H), 2.17-1.89(m, 4H), 1.50(s, 9H), 1.34-1.32(d, 3H), 1.18-
1.13(t, 3H), 1.00(s, 9H).

단계 4: (S)-N-(4-((4-((3-클로로-4-(4-에틸피페라진-1-일)페닐)아
20 미노)피리미딘-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-
(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

이전 단계 3에서 얻은 화합물(306mg, 0.36mmol)을 에틸 아세테이트
(9mL)에 용해하고, 여기에 염산 용액(1.8mL, 7.2mmol, 4N 다이옥산 용액)
을 첨가하였다. 반응 용액을 상온에서 12시간 교반하였다. 생성된 고체를 감
25 압 여과하고 에틸 아세테이트와 디에틸 에테르로 세척한 후 감압 건조하여,
표제 화합물(200mg, 96%)을 수득하였다.

MS(ESI⁺, m/z): 749 [M+H]⁺.

실시예 11: (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타
30 노일)-N-(4-((4-((4-(4-에틸피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)아미노)피리미
딘-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

실시예 10의 단계 1에서 3-클로로-4-(4-에틸피페라진-1-일)아닐린
대신 4-(4-에틸피페라진-1-일)-3-플루오로아닐린을 사용한 것을 제외하고
35 는, 실시예 10의 단계 1 내지 4와 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물
(400mg, 23%)을 수득하였다.

MS(ESI⁺, m/z): 733 [M+H]⁺.

실시예 12: (S)-1-[(S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타
노일]-{4-[6-(3-메톡시페닐아미노)-피리미딘-4-일아미노]-3-메톡시페닐}피
롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

실시예 1의 단계 1에서 2,4-디클로로피리미딘 대신 4,6-디클로로피리
미딘을 사용하고, 2-아미노-N-메틸벤즈아마이드 대신 3-아니시딘을 사용하
는 것을 제외하고는, 실시예 1의 단계 1 내지 5 와 동일한 절차를 반복하여
표제 화합물(110mg, 77%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, DMSO-d₆): δ 9.50(brs, 1H), 8.30(s, 1H), 7.64(d,
1H), 7.38(brs, 1H), 6.92(brs, 1H), 6.86-6.82(m, 1H), 6.66(d, 1H), 6.13(s,
1H), 4.82-4.62(m, 3H), 3.88-3.66(m, 8H), 2.79(s, 3H), 2.56-2.54(m, 1H),
2.15-1.92(m, 4H), 1.34(d, 3H), 1.01(s, 9H).

MS(ESI⁺, m/z): 633 [M+H]⁺.

실시예 13: (S)-1-[(S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-메틸아미노프로판아미도)-부타
노일]-N-(4-{6-[3-클로로-4-(4-이소프로필피페라진-1-일)-페닐아미노]-피
리미딘-4-일아미노}-3-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

실시예 1의 단계 1에서 2,4-디클로로피리미딘 대신 4,6-디클로로피리
미딘을 사용하고, 2-아미노-N-메틸벤즈아마이드 대신 3-클로로-4-(4-이소
프로필피페라진-1-일)-페닐아민을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 1의
단계 1 내지 5 와 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물(145mg, 82%)을 수
득하였다.

MS(ESI⁺, m/z): 763 [M+H]⁺.

실시예 14: (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타
노일)-N-(2-메톡시-4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-
일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드

단계 1: 2-클로로-N-(3-메톡시페닐)티에노[3,2-d]피리미딘-4-아민

2,4-디클로로티에노[3,2-d]피리미딘(3g, 14.63mmol)을 1-프로판올
(50mL)에 적가한 후, 여기에 3-메톡시아닐린(1.64mL, 14.63mmol) 및
DIPEA(5mL, 29.26mmol)을 첨가하였다. 반응 온도를 70℃로 가열하여 3시
간 교반하였다. 반응 용액을 상온으로 식히고 에틸 아세테이트와 물로 추출

하였다. 분리된 유기층을 Na_2SO_4 로 건조하고 여액을 감압 증류하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 표제 화합물(4.1g, 96%)을 수득하였다.

^1H NMR(300 MHz, DMSO): δ 10.1(s, 1H), 8.26(d, 1H), 7.40(s, 2H), 7.31(s, 2H), 6.75(brd, 1H), 3.76(s, 3H).

5

단계 2: t-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((S)-2-((2-메톡시-4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)페닐)카바모일)피롤리딘-1-일)-3,3-디메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)(메틸)카바메이트

10 이전 단계 1에서 얻은 화합물(178mg, 0.61mmol), 실시예 10의 단계 2-2에서 얻은 화합물(200mg, 0.407mmol), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (18mg, 0.08mmol), 잔트포스(94mg, 0.16mmol), 및 Cs_2CO_3 (265mg, 0.81mmol)를 1,4-다이옥산(2mL)에 첨가하고, 120°C에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 온도를 상온으로 식힌 후 반응 용액을 클로로포름/이소프로필알콜(3:1, v/v) 용액으로 희석
15 한 다음, 물과 브라인으로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4 으로 건조한 다음, 감압 하에 여과 및 증류한 후 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(193mg, 60%)을 수득하였다.

MS(ESI⁺, m/z): 789 [M+H]⁺.

20 단계 3: (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(2-메톡시-4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복사마이드

이전 단계 2에서 얻은 화합물(193mg, 0.245mmol)을 MC(1mL)에 용해하고 TFA(1mL)를 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 교반 후 MC와 포화
25 NaHCO_3 수용액으로 추출하였다. 분리된 유기층을 Na_2SO_4 으로 건조한 다음, 감압 하에 여과 및 증류한 후 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(5.8mg, 4%)을 수득하였다.

^1H NMR(300 MHz, DMSO): δ 9.88(s, 1H), 9.40(s, 1H), 9.07(s, 1H), 8.06(d, 1H), 7.85(d, 1H), 7.69(d, 2H), 7.46(m, 2H), 7.37(s, 1H), 7.20(m,
30 2H), 6.67(d, 1H), 4.52(m, 1H), 4.41(m, 1H), 3.75(s, 3H), 3.66(m, 1H), 2.98(s, 2H), 2.01(s, 3H), 1.98(m, 4H), 1.21(d, 3H), 0.99(s, 9H).

실시예 15: (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(6-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)피롤리딘-3-일)피롤리딘-2-카복사마이드

35

단계 1: N^4 -(3-메톡시페닐)- N^2 -(5-니트로피리딘-2-일)티에노[3,2-d]피리미딘-2,4-디아민

실시예 14의 단계 2에서 (S)-N-(4-아미노-2-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 대신 5-니트로피리딘-2-아민을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 14의 단계 1 및 2와 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물(203mg, 90%)을 수득하였다.

^1H NMR(300 MHz, DMSO): δ 10.1(s, 1H), 8.26(d, 1H), 7.40(s, 2H), 7.31(s, 2H), 6.75(brd, 1H), 3.76(s, 3H).

단계 2: t-부틸 ((S)-1-((S)-2-((6-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)피리딘-3-일)카바모일)피롤리딘-1-일)-3,3-디메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)(메틸)카바메이트

실시예 3의 단계 3에서 N^2 -(2-메톡시-4-니트로페닐)- N^4 -(3-메톡시페닐)피리미딘-2,4-디아민 대신 이전 단계 1에서 얻은 N^4 -(3-메톡시페닐)- N^2 -(5-니트로피리딘-2-일)티에노[3,2-d]피리미딘-2,4-디아민을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 3의 단계 3 및 4와 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물(40mg, 11%)을 수득하였다.

MS(ESI⁺, m/z): 760 [M+H]⁺.

단계 3: (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(6-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)피리딘-3-일)피롤리딘-2-카복스아마이드

이전 단계 2에서 얻은 화합물(40mg, 0.05mmol)을 MC(1mL)에 용해하고 TFA(1mL)를 적가하였다. 실온에서 1시간 동안 교반 후 MC와 포화 NaHCO₃ 수용액으로 추출하였다. 분리된 유기층을 Na₂SO₄으로 건조한 다음, 감압 하에 여과 및 증류한 후 컬럼 트로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(4.8mg, 14%)을 수득하였다.

^1H NMR(300 MHz, DMSO): δ 9.88(s, 1H), 9.40(s, 1H), 9.07(s, 1H), 8.06(d, 1H), 7.85(d, 1H), 7.70(d, 2H), 7.46(m, 2H), 7.37(s, 1H), 7.23(m, 2H), 6.67(d, 1H), 4.51(d, 1H), 4.41(m, 1H), 3.75(s, 3H), 3.65(m, 1H), 2.97(m, 2H), 2.18(s, 3H), 1.98(m, 4H), 1.11(d, 3H), 0.99(s, 9H).

실시예 16: (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드

실시에 15의 단계 1에서 5-니트로피리딘-2-아민 대신 4-니트로아닐린을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 15의 단계 1 내지 3 과 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물(3mg, 3%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, DMSO): δ 9.87(s, 1H), 9.39(s, 1H), 9.05(s, 1H), 8.05(d, 1H), 7.83(d, 1H), 7.68(d, 2H), 7.43(m, 3H), 7.36(s, 1H), 7.22(m, 2H), 6.65(d, 1H), 4.51(d, 1H), 4.42(m, 1H), 3.74(s, 3H), 3.66(m, 1H), 2.96(m, 2H), 2.17(s, 3H), 1.99(m, 4H), 1.12(d, 3H), 0.97(s, 9H).

실시예 17: (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(3-메톡시-4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

단계 1: 2-클로로-N-(3-메톡시페닐)티에노[3,2-d]피리미딘-4-아민

2,4-디클로로티에노[3,2-d]피리미딘(500mg, 2.44mmol)과 3-메톡시아닐린(0.3mL, 2.68mmol)을 1-프로판올(5mL)에 적가하고, 여기에 DIPEA(0.85mL, 4.88mmol)을 적가하였다. 반응 용액을 60-70°C에서 3시간 교반하였다. 반응 용액을 상온으로 식힌 후 에틸 아세테이트와 물로 추출하여, 분리된 유기층을 Na₂SO₄로 건조한 후 감압 증류하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(683mg, 96%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 7.75-7.73(d, 1H), 7.37-7.34(m, 1H), 7.31(s, 1H), 7.18(s, 1H), 7.07-7.01(m, 2H), 6.91-6.88(d, 1H), 3.85(s, 3H).

단계 2: N²-(2-메톡시-4-니트로페닐)-N⁴-(3-메톡시페닐)티에노[3,2-d]피리미딘-2,4-디아민

이전 단계 1에서 얻은 화합물(683mg, 2.34mmol)을 2-부탄올(7mL)에 적가하고, 여기에 2-메톡시-4-니트로아닐린(402mg, 2.34mmol)와 TFA(0.17mL, 2.34mmol)을 적가하였다. 반응 용액을 100°C에서 12시간 교반하였다. 반응 용액을 상온으로 식힌 후 2-부탄올로 세척하며 고체를 감압 여과하여, 표제 화합물(316mg, 32%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, DMSO): δ 8.62(s, 1H), 8.25-8.23(d, 1H), 7.82(s, 1H), 7.76-7.72(d, 1H), 7.57(s, 1H), 7.37-7.35(d, 1H), 7.32-7.29(m, 1H), 6.83-6.82(d, 1H), 6.67-6.64(d, 1H), 4.03(s, 3H), 3.84(s, 3H).

단계 3: N²-(4-아미노-2-메톡시페닐)-N⁴-(3-메톡시페닐)티에노[3,2-d]피리미딘-2,4-디아민

철(231mg, 3.73mmol)을 50% 에탄올 수용액(16mL)에 묻히고 진한 염산 수용액(0.02mL)을 첨가한 후, 반응 온도를 100℃로 올려서 활성화시켰다. 여기에 이전 단계 2에서 얻은 화합물(316mg, 0.746mmol)를 첨가하고 2.5시간 동안 100℃에서 환류시켰다. 반응이 완결되면 반응 용액을 셀라이트 패드에 감압 여과하고, 클로로포름/이소프로필알콜(3:1, v/v) 용액으로 세척한 후 얻어진 여과액을 감압 증류하였다. 얻어진 고체를 클로로포름/이소프로필알콜(3:1, v/v) 용액에 녹인 후, 포화 NaHCO₃ 수용액과 브라인으로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄으로 건조한 다음, 감압 하에 여과 및 증류하고 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(208 mg, 71%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 8.20-8.17(d, 1H), 7.63-7.61(d, 1H), 7.31-7.26(t, 1H), 7.21-7.19(d, 1H), 7.14-7.12(d, 1H), 6.77-6.74(d, 1H), 6.54(s, 1H), 6.33-6.31(m, 2H), 3.84(s, 3H), 3.51(brs, 2H).

단계 4: t-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((S)-2-((3-메톡시-4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)페닐)카바모일)피롤리딘-1-일)-3,3-디메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)(메틸)카바메이트

이전 단계 3에서 얻은 화합물(208mg, 0.527mmol), 제조예 1에서 얻은 화합물(654mg, 1.581mmol), 및 EDCI(505mg, 2.635mmol)을 피리딘/N,N-디메틸포름아마이드(10:1) 용액에 적가하고, 반응 온도 70℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 상온으로 식힌 후 포화 황산구리 수용액과 에틸 아세테이트로 추출하였다. 분리된 유기층은 포화 NaHCO₃ 수용액과 브라인으로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄으로 건조한 다음, 감압 하에 여과 및 증류하고 컬럼 크로마토그래피로 정제하여, 표제 화합물(100mg, 24%)를 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 9.35(brs, 1H), 8.47-8.44(d, 1H), 7.65-7.63(d, 1H), 7.50-7.48(m, 1H), 7.33-7.28(t, 1H), 7.24-7.22(d, 1H), 7.16-7.13(d, 1H), 6.79-6.76(m, 2H), 6.60(s, 1H), 4.86-4.83(d, 1H), 4.74-4.72(brs, 1H), 4.65-4.62(d, 1H), 3.89(s, 3H), 3.82(s, 3H), 3.68(m, 2H), 2.81(s, 3H), 2.59-2.56(m, 1H), 2.18-1.81(m, 4H), 1.52(s, 9H), 1.36-1.33(d, 3H), 1.00(s, 9H).

단계 5: (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(3-메톡시-4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

이전 단계 4에서 얻은 화합물(100mg, 0.127mmol)을 에틸 아세테이트 (3mL)에 용해하고, 여기에 염산 용액(0.3mL, 4M 1,4-다이옥산 용액)을 적가 하였다. 반응 용액을 상온에서 12시간 동안 교반한 후 생성된 고체를 에틸 아세테이트와 디에틸 에테르로 세척하며 여과하여 표제 화합물(91mg, 99%)을 수득하였다.

^1H NMR(300 MHz, DMSO): δ 10.78(brs, 1H), 10.30(s, 1H), 9.31-9.22(m, 1H), 8.87-8.86(m, 1H), 8.59-8.56(d, 1H), 8.31-8.30(m, 1H), 7.50(s, 2H), 7.13(m, 1H), 6.79(m, 1H), 4.56-4.49(m, 2H), 3.96-3.95(m, 2H), 3.77-3.75(d, 6H), 2.50(s, 3H), 2.19(m, 1H), 2.04-1.87(m, 4H), 1.35-1.32(d, 3H), 1.04(s, 9H).

MS(ESI⁺, m/z): 689.3 [M+H]⁺.

실시예 18: (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(4-((4-((4-(4-에틸피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

실시예 17의 단계 1에서 3-메톡시아닐린 대신 4-(4-에틸피페라진-1-일)-3-플루오로아닐린을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 17의 단계 1 내지 5 와 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물(1mg, 1%)을 수득하였다.

MS(ESI⁺, m/z): 789 [M+H]⁺.

실시예 19: ((S)-N-(4-((4-((3-클로로-2,4-디플루오로페닐)아미노)퀴나졸린-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

단계 1: 퀴나졸린-2,4(1H,3H)-디온

2-아미노벤조산(5g, 36.5mmol)을 아세트산(12mL)에 용해하고 물 170mL에 용해된 KOCN(5.9g, 73mmol)을 천천히 적가하였다. 반응 용액을 상온에서 30분 교반한 뒤, 1N NaOH 수용액으로 pH 13이 되게 조정하였다. 이후 90℃에서 3시간 추가 교반하였다. 반응 용액을 상온으로 식힌 후, 3N 염산 수용액으로 pH 6을 조정하였다. 0℃에서 30분 교반한 뒤 생성된 고체를 디에틸 에테르로 세척하며 감압 여과하여, 표제 화합물(4.7g, 79%)을 수득하였다.

^1H NMR(300 MHz, DMSO): δ 11.22(brs, 2H), 7.90-7.87(d, 1H), 7.66-7.60(t, 1H), 7.20-7.14(t, 2H).

단계 2: 2,4-디클로로퀴나졸린

이전 단계 1에서 얻은 화합물(4.7g, 29mmol)을 POCl₃(87.7mL, 928mmol)에 용해하고 110℃에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 감
 5 압 증류하고 잔류물을 톨루엔으로 세척하여 두 번 더 감압 증류하였다. 잔류
 물을 MC와 포화 NaHCO₃ 수용액으로 추출하여 분리된 유기층을 Na₂SO₄로
 건조하고 감압 증류하여 표제 화합물(5.7g, 99%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, DMSO): δ 8.29-8.27(d, 1H), 8.04-7.98(m, 2H),
 7.79-7.73(m, 1H).

단계 3: 2-클로로-N-(3-클로로-2,4-디플루오로페닐)퀴나졸린-4-아
 민

이전 단계 2에서 얻은 화합물(500mg, 2.51mmol)과 3-클로로-2,4-디
 플루오로아닐린(492mg, 3.04mmol)을 이소프로판올(10mL)에 용해하고, 여
 15 기에 염산(0.02mL, 0.251mmol)을 적가하였다. 반응액을 상온에서 24시간
 교반하고, 생성된 고체를 이소프로판올로 세척하며 감압 여과하여 표제 화합
 물(770mg, 94%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, DMSO): δ 8.51-8.49(d, 1H), 7.93-7.90(t, 1H),
 7.77-7.69(m, 2H), 7.49-7.42(t, 2H).

단계 4: t-부틸 ((S)-1-(((S)-1-((S)-2-(((4-(((3-클로로-2,4-디플
 루오로페닐)아미노)퀴나졸린-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)카바모일)피롤리딘
 -1-일)-3,3-디메틸-1-옥소부탄-2-일)아미노)-1-옥소프로판-2-일)(메틸)카
 바메이트

이전 단계 3에서 얻은 화합물(104mg, 0.319mmol)과 실시예 10의 단
 25 계 2-2에서 제조한 화합물(170mg, 0.319mmol)을 1-부탄올(1mL)에 용해하
 고, 여기에 DIPEA(0.05mL, 0.319mmol)를 적가하였다. 반응 용액을 100℃
 에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 용액을 에틸 아세테이트와 포화
 NaHCO₃ 수용액으로 추출하고 분리된 유기층을 Na₂SO₄로 건조하여 감압 증
 30 류하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(125mg,
 48%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 9.10(brs, 1H), 8.39-8.34(m, 1H),
 8.29-8.26(d, 1H), 7.77-7.61(m, 4H), 7.43(s, 1H), 7.33-7.30(t, 1H), 7.04-
 6.92(m, 3H), 4.83-4.81(d, 1H), 4.67-4.64(d, 1H), 3.86(s, 3H), 3.72-
 35 3.70(m, 2H), 2.81(s, 3H), 2.52-2.51(m, 1H), 2.17-1.92(m, 4H), 1.51(s,
 9H), 1.35-1.33(d, 3H), 1.02(s, 9H).

단계 5: (S)-N-(4-((4-((3-클로로-2,4-디플루오로페닐)아미노)퀴나졸린-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

이전 단계 4에서 얻은 화합물(125mg, 0.152mmol)을 MC(1mL)에 용해한 후 TFA(0.2mL, 3.04mmol)을 적가하였다. 반응 용액을 상온에서 12시간 교반한 뒤 MC와 포화 NaHCO₃ 수용액으로 추출하고 분리된 유기층을 Na₂SO₄로 건조하여 감압 증류하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하고, 수득한 화합물을 에틸 아세테이트에 희석하였다. 여기에 염산용액(0.03mL, 4M 1,4-다이옥산 용액)을 첨가하고 12시간 상온에서 교반하였다. 생성된 고체를 에틸 아세테이트와 디에틸 에테르로 세척하고 감압 여과하여, 표제 화합물(98mg, 85%)을 수득하였다.

¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 9.02(s, 1H), 8.36-8.34(m, 1H), 8.29-8.26(d, 1H), 7.88-7.84(d, 1H), 7.75-7.61(m, 4H), 7.47(brs, 1H), 7.33-7.28(t, 1H), 7.05-7.01(td, 1H), 6.95-6.92(dd, 1H), 4.81-4.79(d, 1H), 4.66-4.63(d, 1H), 3.97-3.89(m, 1H), 3.86(s, 3H), 3.74-3.69(m, 1H), 3.13-3.06(q, 1H), 2.53-2.49(m, 1H), 2.41(s, 3H), 2.28-1.87(m, 4H), 1.34-1.32(d, 3H), 1.06(s, 9H).

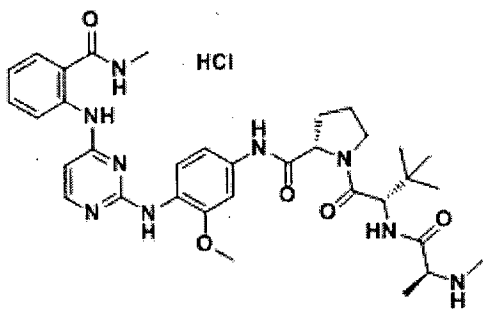
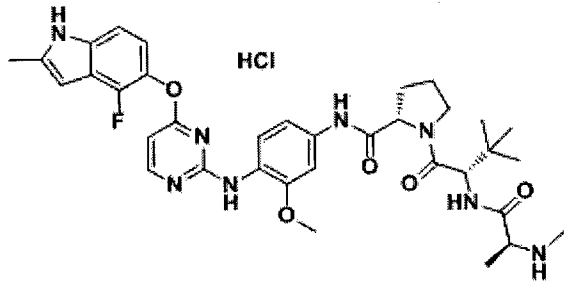
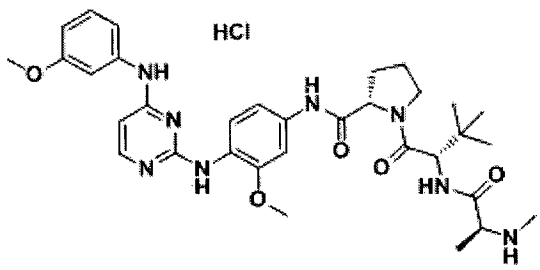
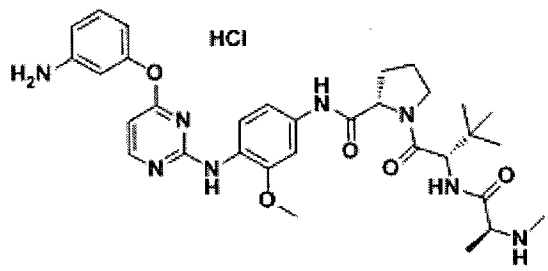
실시예 20: (S)-N-(4-((4-((4-브로모-3-클로로-2-플루오로페닐)아미노)퀴나졸린-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염

실시예 19의 단계 3에서 3-클로로-2,4-디플루오로아닐린 대신 4-브로모-3-클로로-2-플루오로아닐린을 사용한 것을 제외하고는, 실시예 19의 단계 1 내지 5 와 동일한 절차를 반복하여 표제 화합물(83mg, 30%)을 수득하였다.

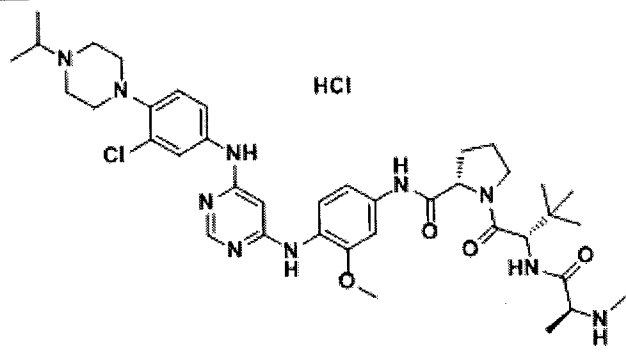
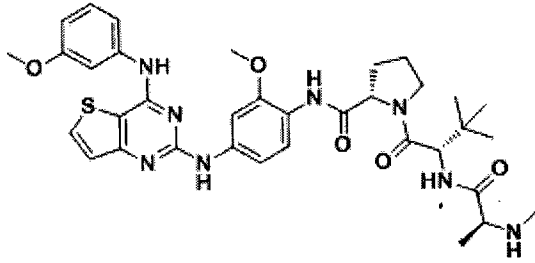
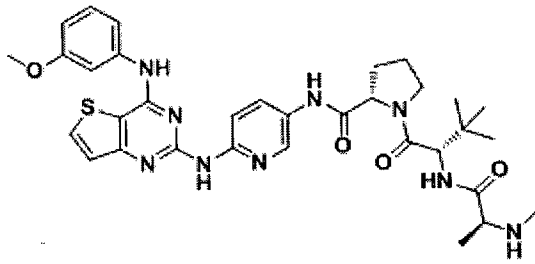
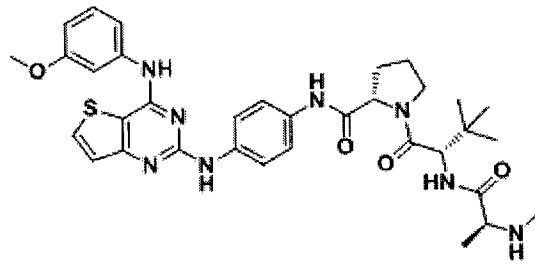
¹H NMR(300 MHz, CDCl₃): δ 9.04(brs, 1H), 8.46-8.40(t, 1H), 8.31-8.28(d, 1H), 7.84-7.78(d, 1H), 7.74-7.62(m, 4H), 7.55(brs, 1H), 7.46-7.42(dd, 1H), 7.32-7.26(t, 1H), 6.96-6.93(dd, 1H), 4.82-4.81(d, 1H), 4.67-4.63(d, 1H), 3.94-3.88(m, 1H), 3.88(s, 3H), 3.75-3.70(m, 1H), 3.13-3.06(q, 1H), 2.48(m, 1H), 2.41(s, 3H), 2.27-1.87(m, 4H), 1.34-1.32(d, 3H), 1.07(s, 9H).

상기 실시예 1 내지 20 에서 얻어진 화합물들의 구조식을 하기 표 1 에 나타내었다.

표 1

	구조식
실시예 1	
실시예 2	
실시예 3	
실시예 4	

실시예 9	HCl
실시예 10	HCl
실시예 11	HCl
실시예 12	HCl

실시예 13	 HCl
실시예 14	
실시예 15	
실시예 16	

실시예 17	
실시예 18	
실시예 19	
실시예 20	

상기 실시예에서 제조된 화합물들에 대하여 다음과 같이 생물검정 시험을 실시하였다.

시험예 1: 캐스페이즈(caspase) 활성화도 평가

MDA-MB-231 유방암 세포(ATCC # HTB-26)를 96 웰 배양판(well plate)에 $1.0 \sim 1.5 \times 10^4$ 세포/웰의 밀도로 접종하고 24시간 후 약물을 처리 하였다.

약물은 0 μ M, 0.5 μ M, 1 μ M 및 5 μ M 농도로 캐스페이즈 3/7에 대하여는 12시간, 캐스페이즈 9에 대하여는 16시간 처리한 다음 배지를 걷어내고 MDA-MB-231 유방암 세포(ATCC # HTB-26)를 4℃의 PBS로 2회 씻어낸 후 시험에 사용하였다. 프로메가(Promega)사의 캐스페이즈-글로TM(Caspase-GloTM) 9 분석키트(Cat#. G8210)와 캐스페이즈-글로TM 3/7 분석키트(Cat#. G8090)를 이용하여 분석 시료와 배지를 1:1 비율로 섞은 용액을 140 μ L/웰씩 셀 시료에 첨가하였다. 37℃에서 2시간 동안 반응시킨 다음 테칸(Tecan)사의 인피니트TM M1000 멀티리더기(InfiniteTM M1000 multi-reader)를 이용해 발광(luminescence)을 측정하였다.

실시에에서 얻은 대표적인 화합물의 0.5 μ M 농도의 측정값을 하기 표 2에 나타내었으며, 대조 물질로는 노바티스사의 LBW-242를 사용하였다.

표 2

	캐스페이즈 -3	캐스페이즈 -9		캐스페이즈 -3	캐스페이즈 -9
대조군	2.4	3.1	실시에 10	9.5	14.1
실시에 1	8.2	16.7	실시에 11	8.9	15.2
실시에 2	6.1	12.4	실시에 14	9.4	13.8
실시에 9	10.9	16.4	실시에 18	8.3	14.7

상기 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 화학식 1의 화합물들은 암 세포주의 세포사멸 기작의 중요한 단백질인 캐스페이즈의 활성도를 증가시켜 세포사멸을 유도함을 알 수 있다.

시험예 2: 친화력(binding) 평가

BIR-3 도메인과의 친화력을 분석하기 위하여, 검은색의 둥근 바닥 96-웰 플레이트에 1.25 μ M로 희석해 둔 XIAP BIR을 5 μ L/웰씩 분주한 후 0.0625 μ M로 희석해둔 4F(AbuRPF-K(5-Fam)-NH₂)를 빛을 차단한 상태에서 10 μ L/웰씩 첨가하였다. 이때, XIAP BIR-3은 인간 XIAP 단백질의 241-356번째 아미노산 잔기로서, pET28a 벡터(노바젠사)를 표준 DNA 클로닝

과정과 PCR 방법(Sambrook & Russell., Molecular cloning., Chapter 1. Third edition 참고)을 이용하여 재조합한 벡터를 E. coli BL21(DE3) 세포에 형질전환시켜 생산하였다.

본 발명에 사용된 플라스미드들은 표준 DNA 클로닝 과정과 PCR 방법에 의해 제작하였다(Molecular cloning. Chapter 1. Sambrook & Russell. Third edition 참조). 인간 XIAP BIR-3 단백질을 발현하는 유전자의 도입 및 적중에 사용되는 벡터를 제작하기 위해 pET28a(+)(노바젠사)를 사용하였다. PCR 증폭은 K562(Human blood lymphoblast-like leukemia)의 cDNA 1μL를 주형으로 하여 1.5mM의 MgCl₂, 0.2mM의 dNTPs, 0.4mM의 유전자 특이적 센스 및 안티센스 프라이머쌍 및 2.0 단위의 taq 중합효소(Elpis biotech사, 대전, 대한민국)를 사용하여 수행하였다.

반응 혼합물을 5분간 변성시킨 후 94℃로 30초, 52℃로 30초 및 72℃로 30초를 1 사이클로 하여 35 사이클을 반복 반응시켰고, 72℃로 7분간 신장시켰다. 사용한 프라이머의 염기서열을 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

	염기서열
센스 프라이머 (서열번호 1)	5'-CGC GGA TCC TCT GAT GCT GTG AGT TCT GA-3'
안티센스 프라이머 (서열번호 2)	5'-GAG CCT CGA GCT AAG TAG TTC TTA CCA GAC-3'

PCR 증폭된 인간 XIAP BIR-3 도메인을 유전 클로닝 방법으로 pET28a(+) 벡터 내로 삽입시킨 후, 상기 벡터로 E. coli BL21(DE3) 세포를 형질전환시켜 배양하였다. 상기 배양액의 OD 값이 0.6이 됐을 때 0.1mM의 IPTG를 첨가하여 사람 XIAP BIR-3 단백질을 과발현시켰다. 상기 과발현된 인간 XIAP BIR-3 단백질의 아미노산 서열은 서열번호 3에 나타나 있으며, pET28a(+) 벡터를 사용해 발현되어 인간 XIAP BIR-3 단백질의 말단에 6개의 히스티딘(His-tag)이 결합된 상태이다.

상기 과발현된 단백질이 포함된 세포를 초음파 분쇄기로 초음파 분쇄(ultrasonication)한 후 원심분리기로 원심분리하였다. 이때, 과발현된 단백질 대부분은 수용성 분획에 존재하므로, 상층액을 회수하였다. 상기 회수한 상층액을 His-tag과 특이적으로 결합할 수 있는 친화성 비드(affinity bead)에 반응시켜 다른 단백질과 분리한 후 20mM Tris, 10mM NaCl(pH 8.0) 및 100mM 이미다졸 완충액을 이용하여 상기 친화성 비드로부터 XIAP BIR-3 단백질을 용출시켰다.

100mM 인산칼륨(pH 7.5), 100 μ g/mL 소 γ -글로불린 및 0.02% 아지드화 나트륨으로 이루어진 결합분석 완충액을 105 μ L/웰씩 첨가한 후 상온에서 15분간 교반하여 반응시켰다. 이어, 양성대조물질 ARPF-NH₂(알라닌-알기닌-프롤린-페닐알라닌-NH₂)와 실험 약물을 0.01 내지 1000 μ M 농도에서 순차적으로 희석하여 5 μ L/웰씩 첨가하였다. 대신에, 0% 및 100% 억제 대조군에는 DMSO를 첨가하였다. 빛을 차단한 상태로 3시간 반응시킨 후 테칸사의 인피니트 M1000 멀티리더를 이용하여 여기 파장(excitation wavelength) 485nm 및 방출 파장(emission wavelength) 530nm에서의 형광 편광(fluorescence polarization) 값을 측정한 후, 이로부터 얻어낸 각 약물의 IC₅₀값 및 4F(ARPF-NH₂)의 K_d값을 이용하여 각 약물의 K_i값을 계산하였다. 상기 값을 하기 표 4에 나타내었다. 하기 표 4에서 얻어진 K_i 값을 표시하였으며, 대조 물질로는 노바티스사의 LBW-242를 사용하였다.

표 4

	결합 친화도(K _i , nM)		결합 친화도(K _i , nM)
대조군	371	실시예 11	23
실시예 1	36	실시예 14	32
실시예 2	256	실시예 18	84
실시예 9	11		

본 발명의 화학식 1의 화합물들은 상기 표 4에 나타난 것처럼 세포사멸 저해 단백질인 IAP의 BIR-3 도메인에 높은 친화력을 보여줌으로써 선택적 작용 기전을 갖고 있음을 확인할 수 있다.

시험예 3: 단백질 키나제 억제 평가(in-vitro)

또한 상기한 바와 같이, 인비트로젠(Invitrogen)사의 키나제 스크리닝 & 프로파일링 서비스(Screening and Profiling Service)를 이용하여 실시예 1에서 제조된 화합물의 키나제 저해 활성에 대한 IC₅₀ 값을 측정하였으며, 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

	단백질 키나제	저해활성(IC ₅₀ , nM)
실시예 1	FAK1	126 nM
	FAK2(Pyk2)	648 nM

시험예 4: 세포 성장 억제 평가(in-vitro)

XIAP를 과발현하는 것으로 보고된 MDA-MB-231 유방암 세포 (ATCC # HTB-26)를 ATCC(American type culture collection; Rockville, MD)에서 구입하여 실험에 사용하였다. MDA-MB-231 세포주는 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco BRL)을 포함하는 L-15 배지 조건하에 T-75 cm²성장 플라스크에서 배양하였다. 정상세포에 대한 독성 실험을 위하여 섬유아세포주인 Hs27(ATCC # CRL 1634) 및 Balb/c3t3(ATCC # CCL 163)를 사용하였다. 성장 배지에서 키운 여러 세포주를 3,000~5,000 세포/100μL 밀도로 96 웰 배양판에 옮긴 후 37℃, 5% CO₂, 95% 공기 및 100% 상대 습도에서 24시간 동안 배양하였다. 단, MDA-MB-231 세포는 대기 조건에서 배양하였다. 여기에 10μM~0.1nM의 농도로 시험 물질을 처리하고, MDA-MB-231 세포주는 120시간, 정상 세포주는 72시간 동안 배양하였다.

MDA-MB-231 세포주의 세포 생존율은 셀타이터 96TM(CellTiter 96 AQueous One Solution, MTS, 프로메가사)을 이용하여 490nm에서 흡광도로 측정하고, 정상세포주의 세포 생존율은 10% TCA(trichloroacetic acid)로 세포를 고정한 다음 SRB(sulforhodamine B) 용액으로 염색하여 540nm에서 흡광도로 측정하였다. 상기 흡광도 결과로부터 약물이 암세포 성장을 50% 감소시키는 농도인 IC₅₀값을 산출하였다. 암세포 성장율은 하기 수학적 식 1 또는 2에 의해 산출되었다.

수학적 식 1

$$[(Ti - Tz) / (C - Tz)] \times 100 \quad (Ti \geq Tz \text{일 경우})$$

수학적 식 2

$$[(Ti - Tz) / Tz] \times 100 \quad (Ti < Tz \text{일 경우})$$

상기 수학적 식 1 및 2에서, Tz는 0% 세포성장군에서의 흡광도로서 시험약물 처리 직전 세포 밀도를 의미하고, C는 100% 세포성장군에서의 흡광도로서 배지만을 첨가하여 배양된 세포 밀도를 의미하며, Ti는 시험약물을 처리한 세포 밀도를 의미한다.

IC₅₀ 값은 상기 수학적 식 1의 값이 50일 때의 시험약물 처리농도이며, 이는 암세포 성장을 50% 저해하는 농도를 의미한다. 매 측정시 대조물질과 비교하여 각 세포주의 비교 및 균등 실험을 수행하였다.

실시에에서 얻은 대표적인 화합물에 대한 IC₅₀ 값(nM)을 하기 표 6에 나타내었으며, 대조 물질로는 노바티스사의 LBW-242를 사용하였다.

표 6

	MDA-MB-231	BalB/C	Hs27		MDA-MB-231	BalB/C	Hs27
대조군	236	>10,000	>10,000	실시예 11	6.6	>10,000	>10,000
실시예 1	68	>10,000	>10,000	실시예 12	119	>10,000	>10,000
실시예 2	294	>10,000	>10,000	실시예 13	162	>10,000	>10,000
실시예 3	>1,000	>10,000	>10,000	실시예 14	20	>10,000	>10,000
실시예 4	237	>10,000	>10,000	실시예 15	>1,000	>10,000	>10,000
실시예 5	>1,000	>10,000	>10,000	실시예 16	134	>10,000	>10,000
실시예 6	333	>10,000	>10,000	실시예 17	156	>10,000	>10,000
실시예 7	292	>10,000	>10,000	실시예 18	55	>10,000	>10,000
실시예 8	195	>10,000	>10,000	실시예 19	106	>10,000	>10,000
실시예 9	2.2	>10,000	>10,000	실시예 20	120	>10,000	>10,000
실시예 10	11	>10,000	>10,000				

상기 표 6에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 화학식 1의 화합물들은 IAP가 과발현되어 있는 MDA-MB-231 세포주의 성장을 낮은 약물농도에서도 매우 효과적으로 억제하였다.

즉, 본 발명의 화학식 1의 화합물은 마우스 정상 세포주인 Balb/C와 인간 정상 세포주인 Hs27에 대하여는 성장 억제 활성이 낮은 반면, 상대적으로 IAP가 과발현된 세포주에 대하여는 높은 성장 억제 활성을 나타내었다.

상기 시험예의 결과들로부터 본 발명의 화합물은 세포사멸 저해 단백질인 IAP와 단백질 키나제에 선택적으로 작용하여 정상세포에는 영향이 없으며, 종양 및 비정상 세포들의 세포사멸의 정상 기작을 가능하게 하므로, 세포사멸 저해 단백질의 과발현 및 단백질 키나제의 과도한 활동을 원인으로 하는 비정상 세포 성장 질환의 예방 또는 치료에 단독 혹은 병용 요법으로 사용 가능하며, 부작용을 최소화할 수 있는 장점을 가지고 있음을 알 수 있다.

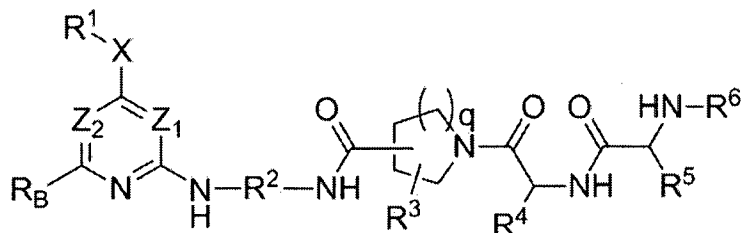
이상, 본 발명을 상기 실시예를 중심으로 하여 설명하였으나 이는 예시에 지나지 아니하며, 본 발명은 본 발명의 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 다양한 변형 및 균등한 기타의 실시예를 이하에 첨부한

청구범위 내에서 수행할 수 있다는 사실을 이해하여야 한다.

특허청구범위

1. 하기 화학식 1의 헤테로고리 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이성질체, 수화물 및 용매화물로부터 선택되는 화합물:

화학식 1



상기 식에서,

X 는 -S-, -O-, -NH-, 또는 -N(C₁₋₃알킬)- 이고;

Z₁ 은 -N= 또는 -CH= 이고;

Z₂ 는 -N=, -CH= 또는 -C(R_A)= 이고;

R¹ 은 C₃₋₈사이클로알킬, 3-8원의 헤테로사이클로알킬, C₆₋₁₀아릴, 또는 5-10원의 헤테로아릴이고;

R² 는 C₃₋₈사이클로알킬렌, 3-8원의 헤테로사이클로알킬렌, C₆₋₁₀아릴렌, 또는 5-10원의 헤테로아릴렌이고;

R³ 는 H, C₁₋₉알콕시, C₃₋₆사이클로알킬옥시, C₃₋₆사이클로알킬-C₁₋₃알킬옥시, 3-9원의 헤테로사이클로알킬옥시, 3-9원의 헤테로사이클로알킬-C₁₋₃알킬옥시, C₆₋₁₀아릴옥시, C₆₋₁₀아릴-C₁₋₃알킬옥시, 5-10원의 헤테로아릴옥시, 또는 5-10원의 헤테로아릴-C₁₋₃알킬옥시이고;

R⁴ 는 H, C₁₋₆알킬, C₃₋₆사이클로알킬 또는 C₃₋₆알킬일옥시-C₁₋₄알킬이고;

R⁵ 는 H 또는 C₁₋₃알킬이고;

R⁶ 은 H, C₁₋₃알킬, 또는 카보닐-C₂₋₃알켄일이고;

R_A 및 R_B 는 각각 독립적으로 H, 할로젠, -CF₃, -NO₂, -CN, C₁₋₆알킬 또는 -NR⁸R⁹이거나, 또는 서로 결합하여 방향족 또는 비방향족의 C₅₋₆탄소고리 또는 방향족 또는 비방향족의 5-6원의 헤테로고리를 형성할 수 있고, 여기서 상기 탄소고리 및 헤테로고리는 각각 독립적으로 H, 할로젠, -CF₃, -NO₂, -CN, -N₃, -NH₂, -OH, C₁₋₄알킬, C₁₋₃알콕시, C₁₋₃알킬티오 및 C₁₋₃알킬설폰일로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있고;

q 는 0 내지 3 의 정수이고;

상기 R¹ 및 R² 는 각각 독립적으로 1 내지 3 개의 W_A 로 치환될 수 있고,

상기 W_A 는 H, 할로젠, -CF₃, -NO₂, -CN, -N₃, -OH, C₁₋₆알킬, 또는, -

$(CH_2)_\ell$ -로 연결된, $-NR^8R^9$, $-NR^8C(=O)R^9$, $-NR^8C(=O)NR^8R^9$, $-OR^{10}$, $-C(=O)R^{11}$, $-C(=O)OR^{10}$, $-C(=O)NR^8R^9$, $-NR^8C(=O)R^{11}$, $-SR^{12}$, $-S(=O)R^{11}$, $-S(=O)_2R^{11}$, C_{3-6} 사이클로알킬, 3-6원의 헤테로사이클로알킬, C_{6-10} 아릴 또는 5-10원의 헤테로아릴이고, 여기서 상기 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 아릴 및 헤테로아릴은 각각 독립적으로 할로젠, $-CF_3$, $-NO_2$, $-CN$, $-N_3$, $-NH_2$, $-OH$, C_{1-6} 알킬, C_{3-6} 사이클로알킬 및 3-6원의 헤테로사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 3 개의 치환기로 치환될 수 있고, 상기 ℓ 은 0 내지 3 의 정수이고;

상기 R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} 및 R^{12} 는 각각 독립적으로 H, 할로젠, $-CF_3$, $-NO_2$, $-CN$, C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알켄일, 또는, $-(CH_2)_p$ -로 연결된, C_{3-6} 사이클로알킬, 3-6원의 헤테로사이클로알킬, C_{1-6} 알카노일, C_{2-6} 알케노일, C_{2-6} 알키노일, C_{6-10} 아릴 또는 5-10원의 헤테로아릴이고, 이 때, p 는 0 내지 3 의 정수이고, 상기 R^8 및 R^9 는 서로 결합하여 5원 내지 6원의 고리를 형성할 수 있고,

상기 헤테로아릴, 헤테로아릴렌, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬렌 및 헤테로고리는 각각 독립적으로 N, O 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 3 개의 헤테로원자를 포함한다.

2. 제 1 항에 있어서,
상기 X 가 $-O-$, $-NH$, 또는 $-N(C_{1-3}알킬)-$ 인 것을 특징으로 하는 화합물.
3. 제 1 항에 있어서,
상기 R^1 및 R^2 가 각각 독립적으로 상기 치환기 W_A 로 치환되거나 비치환된 C_{5-10} 아릴 또는 5-10원의 헤테로아릴인 것을 특징으로 하는 화합물.
4. 제 1 항에 있어서,
상기 R^3 가 H, 페닐옥시, 또는 벤질옥시인 것을 특징으로 하는 화합물.
5. 제 1 항에 있어서,
상기 R^4 가 t-부틸, 사이클로헥실, 또는 프로파질옥시에틸인 것을 특징으로 하는 화합물.
6. 제 1 항에 있어서,
상기 R^5 가 메틸인 것을 특징으로 하는 화합물.
7. 제 1 항에 있어서,

상기 R^6 이 H 또는 메틸인 것을 특징으로 하는 화합물.

8. 제 1 항에 있어서,
상기 R^7 이 H 또는 메틸인 것을 특징으로 하는 화합물.
9. 제 1 항에 있어서,
상기 p 가 0 내지 2 의 정수인 것을 특징으로 하는 화합물.
10. 제 1 항에 있어서,
상기 R_A 및 R_B 가 각각 독립적으로 H, 할로젠, $-CF_3$, $-NO_2$, $-CN$, C_{1-4} 알킬 또는 $-NR^8R^9$ 인 것을 특징으로 하는 화합물.
11. 제 1 항에 있어서,
상기 R_A 및 R_B 가 서로 결합하여 방향족의 C_{5-6} 탄소고리 또는 방향족의 5-6원 헤테로고리를 형성하며,
상기 탄소고리 및 헤테로고리가 각각 독립적으로 H, 할로젠, $-CF_3$, $-CN$, $-NH_2$, $-OH$, C_{1-4} 알킬, C_{1-3} 알콕시, C_{1-3} 알킬티오 및 C_{1-3} 알킬설폰일로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 내지 3 개의 치환기로 치환될 수 있고,
상기 헤테로고리가 N, O 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택된 1 내지 3 개의 헤테로원자를 포함하는 것을 특징으로 하는 화합물.
12. 제 1 항에 있어서,
상기 q 가 1 또는 2 인 것을 특징으로 하는 화합물.
13. 제 1 항에 있어서,
하기 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물:
 - 1) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(3-메톡시-4-((4-((2-(메틸카바모일)페닐)아미노)피리미딘-2-일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
 - 2) (R)-1-((R)-3,3-디메틸-2-((R)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(4-((4-((4-플루오로-2-메틸-1H-인돌-5-일)옥시)피리미딘-2-일)아미노)-3-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
 - 3) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(3-메톡시-4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)피리미딘-2-일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
 - 4) (S)-N-(4-((4-(3-아미노페녹시)피리미딘-2-일)아미노)-3-메톡시페닐)-

- 1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 5) (S)-N-(4-((4-(3-아크릴아미도페녹시)피리미딘-2-일)아미노)-3-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 6) (S)-N-{4-[4-(2,3-디메틸-2H-인다졸-6-일아미노)-피리미딘-2-일아미노-3-메톡시페닐]}-1-[(S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-메틸아미노-프로판아미도)부타노일]-피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 7) (S)-N-{4-[4-(2,3-디메틸-2H-인다졸-6-일)-메틸아미노]-피리미딘-2-일아미노-3-메톡시페닐}-1-[(S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-메틸아미노-프로판아미도)부타노일]-피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 8) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(4-((4-((4-(4-에틸피페라진-1-일)페닐)아미노)피리미딘-2-일)아미노)-3-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 9) (S)-1-[(S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-메틸아미노프로판아미도)부타노일]-N-(4-{4-[4-(4-에틸피페라진-1-일)-3-플루오로-페닐아미노]-피리미딘-2-일)아미노)-3-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 10) (S)-N-(4-((4-((3-클로로-4-(4-에틸피페라진-1-일)페닐)아미노)피리미딘-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 11) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(4-((4-((4-(4-에틸피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)아미노)피리미딘-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 12) (S)-1-[(S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일]-{4-[6-(3-메톡시페닐아미노)-피리미딘-4-일아미노]}-3-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 13) (S)-1-[(S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-메틸아미노프로판아미도)-부타노일]-N-(4-{6-[3-클로로-4-(4-이소프로필피페라진-1-일)-페닐아미노]-피리미딘-4-일아미노}-3-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 14) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(2-메톡시-4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드;
- 15) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(6-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)피리딘-3-일)피롤리딘-2-카복스아마이드;
- 16) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-

N-(4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드;

- 17) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(3-메톡시-4-((4-((3-메톡시페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 18) (S)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)-N-(4-((4-((4-(4-에틸피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)아미노)티에노[3,2-d]피리미딘-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염;
- 19) (S)-N-(4-((4-((3-클로로-2,4-디플루오로페닐)아미노)퀴나졸린-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염; 및
- 20) (S)-N-(4-((4-((4-브로모-3-클로로-2-플루오로페닐)아미노)퀴나졸린-2-일)아미노)-2-메톡시페닐)-1-((S)-3,3-디메틸-2-((S)-2-(메틸아미노)프로판아미도)부타노일)피롤리딘-2-카복스아마이드 염산염.

14. 제 1 항에 있어서,

상기 약학적으로 허용가능한 염이 염산염인 것을 특징으로 하는 화합물.

15. 제 1 항의 화합물을 유효성분으로 포함하는, 세포사멸 저해 단백질의 과발현 및 단백질 키나제의 과도한 활동을 원인으로 하는 비정상 세포 성장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

16. 제 15 항에 있어서,

상기 단백질 키나아제가 ALK, AMPK, Aurora A, Aurora B, Aurora C, Axl, Blk, Bmx, BTK, CaMK, CDK2/cyclinE, CDK5/p25, CHK1, CK2, c-RAF, DMPK, EGFR1, Her2, Her4, EphA1, EphB1, FAK, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, Flt-1, Flt-3, Flt-4, Fms, Fyn, GSK3beta, HIPK1, IKKbeta, IGFR-1R, IR, Itk, JAK2, JAK3, KDR, Kit, Lck, L/yn, MAPK1, MAPKAP-K2, MEK1, Met, MKK6, MLCK, NEK2, p70S6K, PAK2, PDGFR alpha, PDGFR beta, PDK1, Pim-1, PKA, PKBalpha, PKCalpha, Plk1, Ret, ROCK-I, Rsk1, SAPK2a, SGK, Src, Syk, Tie-2, Tec, Trk, ZAP-70 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

17. 제 15 항에 있어서,

상기 비정상 세포 성장 질환이 위암, 폐암, 간암, 대장암, 소장암, 췌장암, 뇌암, 뼈암, 흑색종, 유방암, 경화성선종, 자궁암, 자궁경부암, 두경부암, 식도암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 육종, 전립선암, 요도암, 방광암, 혈액암, 림프종, 섬유선종, 염증, 당뇨, 비만, 건선, 류마티스성 관절염, 혈관종, 급성 또는 만성 신장병, 관상동맥 재협착증, 자가면역질환, 천식, 신경변성 질환, 급성감염, 및 혈관 분열로 인한 안구질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

18. 제 1 항에 따르는 화합물을 포유류에 투여하는 것을 포함하는, 포유류에서의 세포사멸 저해 단백질의 과발현 및 단백질 키나제의 과도한 활동을 원인으로 하는 비정상 세포 성장 질환을 예방 또는 치료하는 방법.
19. 제 1 항에 따르는 화합물을 세포사멸 저해 단백질의 과발현 및 단백질 키나제의 과도한 활동을 원인으로 하는 비정상 세포 성장 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약제를 제조하는데 사용하는 용도.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/006498**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C07D 403/12(2006.01)i, C07D 403/14(2006.01)i, A61K 31/506(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 403/12; C07D 207/09; C07K 5/00; C07D 471/04; A61K 31/437; C07K 5/06; C07D 403/14; A61K 31/506; A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: IAP inhibitor, protein tyrosine kinase inhibitor, cancer, AVPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008-016893 A1 (NOVARTIS AG) 07 February 2008 See the entire description	1-17,19
A	WO 2005-097791 A1 (NOVARTIS AG) 20 October 2005 See the entire description	1-17,19
A	WO 2008-079735 A1 (GENENTECH, INC.) 03 July 2008 See the entire description	1-17,19
A	WO 2006-128455 A2 (CARLSBERG A/S) 07 December 2006 See the entire description	1-17,19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

31 OCTOBER 2013 (31.10.2013)

Date of mailing of the international search report

31 OCTOBER 2013 (31.10.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/006498

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 18 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/006498

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2008-016893 A1	07/02/2008	AR062159A1	22/10/2008
		AU 2007-281230 A1	07/02/2008
		AU 2007-281230 B2	08/09/2011
		BR P10714803A2	21/05/2013
		CA 2658525 A1	07/02/2008
		CA 2658525 C	19/02/2013
		CL22342007A1	13/06/2008
		CN101511860 A	19/08/2009
		CN101511860 B	01/05/2013
		CN102558165 A	11/07/2012
		CR10567A	18/02/2009
		DK2051990T3	13/05/2013
		DOP2013000084A	15/06/2013
		EA200900227A1	28/08/2009
		EP 2051990 A1	29/04/2009
		EP 2051990 B1	06/02/2013
		EP 2537846 A1	26/12/2012
		EP 2537850 A1	26/12/2012
		ES2405947 T3	04/06/2013
		GEP20115251B	11/07/2011
		GT200900019A	01/06/2010
		HK1127616 A1	09/08/2013
		HN2009000214A	11/10/2011
		HRP20130373T1	31/05/2013
		IL196596D0	18/11/2009
		JP 04-875749B2	15/02/2012
		JP 2009-545613 T	24/12/2009
		JP 2009-545613A	24/12/2009
		KR 10-1087878 B1	30/11/2011
		KR 10-1245945 B1	22/03/2013
		KR20090038479A	20/04/2009
		KR20110030667A	23/03/2011
		MA30652B1	03/08/2009
		ME00585A	20/12/2011
		MX2009001212 A	11/02/2009
		N020090878A	27/04/2009
		NZ574393A	30/03/2012
		PA8740901A1	23/04/2009
		PE02172011A1	01/04/2011
		PE02182011A1	01/04/2011
		PE02202011A1	11/04/2011
		PE02242011A1	05/04/2011
		PE09512008A1	11/09/2008
		PT2051990E	10/05/2013
		SI2051990T1	28/06/2013
		SMAP200900013A	11/05/2009
		SMP200900013B	19/01/2010
		SV2009003160A	13/04/2010
		TW200815399 A	01/04/2008

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/006498

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2005-097791 A1	20/10/2005	US 2011-0065726 A1	17/03/2011
		US 2013-005663 A1	03/01/2013
		US 8552003 B2	08/10/2013
		ZA200900371A	27/01/2010
WO 2005-097791 A1	20/10/2005	AR048927A1	14/06/2006
		AU 2005-231956 A1	20/10/2005
		AU 2005-231956 B2	05/11/2009
		BR P10509721A	25/09/2007
		CA 2560162 A1	20/10/2005
		CA 2560162 C	21/05/2013
		CN1964970 A	16/05/2007
		CN1964970 B	03/08/2011
		CN1964970 C0	16/05/2007
		DK2253614T3	07/01/2013
		ECSP066893A	24/11/2006
		EP 1735307 A1	27/12/2006
		EP 1735307 B1	29/08/2012
		EP 2065368 A1	03/06/2009
		EP 2253614 A1	24/11/2010
		EP 2253614 B1	19/09/2012
		ES2394441 T3	31/01/2013
		ES2396195 T3	19/02/2013
		HK1100930 A1	14/12/2012
		HRP20121023T1	31/01/2013
		IL178104D0	31/12/2006
		JP 04-691549B2	01/06/2011
		JP 2007-532504 T	15/11/2007
		JP 2007-532504A	15/11/2007
		JP 2010-215635A	30/09/2010
		JP 2013-049733A	14/03/2013
		KR 10-0892185 B1	07/04/2009
		KR 10-2008-0083220 A	16/09/2008
		KR20060134200A	27/12/2006
		KR20080083220A	16/09/2008
		MA28630B1	01/06/2007
		N020065114A	08/01/2007
		NZ549925A	27/08/2010
		PE01022011A1	07/02/2011
		PE01662006A1	25/04/2006
		PT2253614E	09/01/2013
		RS52545B	30/04/2013
		RU2006139010 A	20/05/2008
		RU2425838 C2	10/08/2011
		SG152225A1	29/05/2009
		SI2253614T1	31/01/2013
		US 2005-234042 A1	20/10/2005
		US 2008-0242658 A1	02/10/2008
		US 2011-281875 A1	17/11/2011
		US 2012-207769 A1	16/08/2012

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/006498

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2008-079735 A1	03/07/2008	US 7419975 B2	02/09/2008
		US 8207183 B2	26/06/2012
		US 8338440 B2	25/12/2012
		ZA200607696A	26/03/2008
		AU 2007-337104 A1	03/07/2008
		CA 2671607 A1	03/07/2008
		CN101605786 A	16/12/2009
		EP 2125809 A1	02/12/2009
		IL198927D0	17/02/2010
		JP 2010-513561 T	30/04/2010
		JP 2010-513561A	30/04/2010
		KR 10-2009-0094461 A	07/09/2009
		NZ577150A	27/04/2012
		RU2009127800 A	27/01/2011
		RU2466131 C2	10/11/2012
		US 2010-0130539 A1	27/05/2010
		US 2012-015974 A1	19/01/2012
		US 8063218 B2	22/11/2011
WO 2006-128455 A2	07/12/2006	AU 2005-248453 A1	08/12/2005
		AU 2005-248453 B2	08/09/2011
		AU 2006-254538 A1	07/12/2006
		CA 2568168 A1	08/12/2005
		CA 2609558 A1	08/12/2005
		EP 1759212 A1	07/03/2007
		EP 1759212 B1	17/12/2008
		EP 1761783 A2	14/03/2007
		EP 1761783 B1	29/07/2009
		EP 1888619 A2	20/02/2008
		EP 1888619 B1	17/04/2013
		US 2008-0194537 A1	14/08/2008
		US 2009-0239755 A1	24/09/2009
		US 2011-0319274 A1	29/12/2011
		US 2013-0123140 A1	16/05/2013
		US 8318717 B2	27/11/2012
		WO 2005-116643 A2	08/12/2005
		WO 2005-116643 A3	23/03/2006
		WO 2005-116656 A1	08/12/2005
		WO 2006-128455 A3	12/04/2007

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07D 403/12(2006.01)i, C07D 403/14(2006.01)i, A61K 31/506(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07D 403/12; C07D 207/09; C07K 5/00; C07D 471/04; A61K 31/437; C07K 5/06; C07D 403/14; A61K 31/506; A61P 35/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: IAP 억제제, 단백질 티로신 키나제 억제, 암, AVPI

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2008-016893 A1 (NOVARTIS AG) 2008.02.07 전체 명세서 참조	1-17, 19
A	WO 2005-097791 A1 (NOVARTIS AG) 2005.10.20 전체 명세서 참조	1-17, 19
A	WO 2008-079735 A1 (GENENTECH, INC.) 2008.07.03 전체 명세서 참조	1-17, 19
A	WO 2006-128455 A2 (CARLSBERG A/S) 2006.12.07 전체 명세서 참조	1-17, 19



추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.



대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2013년 10월 31일 (31.10.2013)

국제조사보고서 발송일

2013년 10월 31일 (31.10.2013)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

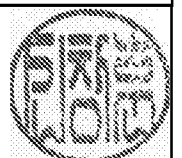
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

신창훈

전화번호 +82-42-481-8406



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 18
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제18항은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료 방법에 관한 것이므로 PCT조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2008-016893 A1	2008/02/07	AR062159A1	2008/10/22
		AU 2007-281230 A1	2008/02/07
		AU 2007-281230 B2	2011/09/08
		BR PI0714803A2	2013/05/21
		CA 2658525 A1	2008/02/07
		CA 2658525 C	2013/02/19
		CL22342007A1	2008/06/13
		CN101511860 A	2009/08/19
		CN101511860 B	2013/05/01
		CN102558165 A	2012/07/11
		CR10567A	2009/02/18
		DK2051990T3	2013/05/13
		DOP2013000084A	2013/06/15
		EA200900227A1	2009/08/28
		EP 2051990 A1	2009/04/29
		EP 2051990 B1	2013/02/06
		EP 2537846 A1	2012/12/26
		EP 2537850 A1	2012/12/26
		ES2405947 T3	2013/06/04
		GEP20115251B	2011/07/11
		GT200900019A	2010/06/01
		HK1127616 A1	2013/08/09
		HN2009000214A	2011/10/11
		HRP20130373T1	2013/05/31
		IL196596D0	2009/11/18
		JP 04-875749B2	2012/02/15
		JP 2009-545613 T	2009/12/24
		JP 2009-545613A	2009/12/24
		KR 10-1087878 B1	2011/11/30
		KR 10-1245945 B1	2013/03/22
		KR20090038479A	2009/04/20
		KR20110030667A	2011/03/23
		MA30652B1	2009/08/03
		ME00585A	2011/12/20
		MX2009001212 A	2009/02/11
		NO20090878A	2009/04/27
		NZ574393A	2012/03/30
		PA8740901A1	2009/04/23
		PE02172011A1	2011/04/01
		PE02182011A1	2011/04/01
		PE02202011A1	2011/04/11
		PE02242011A1	2011/04/05
		PE09512008A1	2008/09/11
		PT2051990E	2013/05/10
		SI2051990T1	2013/06/28
		SMAP200900013A	2009/05/11
		SMP200900013B	2010/01/19
		SV2009003160A	2010/04/13
		TW200815399 A	2008/04/01

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 2011-0065726 A1	2011/03/17
		US 2013-005663 A1	2013/01/03
		US 8552003 B2	2013/10/08
		ZA200900371A	2010/01/27
WO 2005-097791 A1	2005/10/20	AR048927A1	2006/06/14
		AU 2005-231956 A1	2005/10/20
		AU 2005-231956 B2	2009/11/05
		BR PI0509721A	2007/09/25
		CA 2560162 A1	2005/10/20
		CA 2560162 C	2013/05/21
		CN1964970 A	2007/05/16
		CN1964970 B	2011/08/03
		CN1964970 C0	2007/05/16
		DK2253614T3	2013/01/07
		ECSP066893A	2006/11/24
		EP 1735307 A1	2006/12/27
		EP 1735307 B1	2012/08/29
		EP 2065368 A1	2009/06/03
		EP 2253614 A1	2010/11/24
		EP 2253614 B1	2012/09/19
		ES2394441 T3	2013/01/31
		ES2396195 T3	2013/02/19
		HK1100930 A1	2012/12/14
		HRP20121023T1	2013/01/31
		IL178104D0	2006/12/31
		JP 04-691549B2	2011/06/01
		JP 2007-532504 T	2007/11/15
		JP 2007-532504A	2007/11/15
		JP 2010-215635A	2010/09/30
		JP 2013-049733A	2013/03/14
		KR 10-0892185 B1	2009/04/07
		KR 10-2008-0083220 A	2008/09/16
		KR20060134200A	2006/12/27
		KR20080083220A	2008/09/16
		MA28630B1	2007/06/01
		NO20065114A	2007/01/08
		NZ549925A	2010/08/27
		PE01022011A1	2011/02/07
		PE01662006A1	2006/04/25
		PT2253614E	2013/01/09
		RS52545B	2013/04/30
		RU2006139010 A	2008/05/20
		RU2425838 C2	2011/08/10
		SG152225A1	2009/05/29
		SI2253614T1	2013/01/31
		US 2005-234042 A1	2005/10/20
		US 2008-0242658 A1	2008/10/02
		US 2011-281875 A1	2011/11/17
		US 2012-207769 A1	2012/08/16

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2008-079735 A1	2008/07/03	US 7419975 B2	2008/09/02
		US 8207183 B2	2012/06/26
		US 8338440 B2	2012/12/25
		ZA200607696A	2008/03/26
WO 2008-079735 A1	2008/07/03	AU 2007-337104 A1	2008/07/03
		CA 2671607 A1	2008/07/03
		CN101605786 A	2009/12/16
		EP 2125809 A1	2009/12/02
		IL198927D0	2010/02/17
		JP 2010-513561 T	2010/04/30
		JP 2010-513561A	2010/04/30
		KR 10-2009-0094461 A	2009/09/07
		NZ577150A	2012/04/27
		RU2009127800 A	2011/01/27
		RU2466131 C2	2012/11/10
		US 2010-0130539 A1	2010/05/27
		US 2012-015974 A1	2012/01/19
		US 8063218 B2	2011/11/22
WO 2006-128455 A2	2006/12/07	AU 2005-248453 A1	2005/12/08
		AU 2005-248453 B2	2011/09/08
		AU 2006-254538 A1	2006/12/07
		CA 2568168 A1	2005/12/08
		CA 2609558 A1	2005/12/08
		EP 1759212 A1	2007/03/07
		EP 1759212 B1	2008/12/17
		EP 1761783 A2	2007/03/14
		EP 1761783 B1	2009/07/29
		EP 1888619 A2	2008/02/20
		EP 1888619 B1	2013/04/17
		US 2008-0194537 A1	2008/08/14
		US 2009-0239755 A1	2009/09/24
		US 2011-0319274 A1	2011/12/29
		US 2013-0123140 A1	2013/05/16
		US 8318717 B2	2012/11/27
		WO 2005-116643 A2	2005/12/08
		WO 2005-116643 A3	2006/03/23
		WO 2005-116656 A1	2005/12/08
		WO 2006-128455 A3	2007/04/12