(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0021808
(43) 공개일자 2024년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 487/10 (2006.01) *A61K 31/53* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
C07C 231/02 (2006.01) *C07C 235/46* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 487/10 (2013.01)
A61K 31/53 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7043027
(22) 출원일자(국제) 2022년06월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년12월13일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2022/099089
(87) 국제공개번호 WO 2022/262796
국제공개일자 2022년12월22일
(30) 우선권주장
PCT/CN2021/100466 2021년06월17일 중국(CN)
PCT/CN2022/091677 2022년05월09일 중국(CN)

(71) 출원인
얀센 파마슈티카 엔브이
벨기에왕국 베-2340-비어세 투른호우트세베크 30
(72) 발명자
카이, 웨이
중국 상하이 200233 슈후이 디스트릭트 구이 퀑 로드 65 넘버 1 빌딩 2101 존슨 앤 존슨 (차이나) 인베스트먼트 리미티드 엘티디
다이, 슈에동
중국 상하이 200233 슈후이 디스트릭트 구이 퀑 로드 65 넘버 1 빌딩 인베스트먼트 리미티드 엘티디 2101 존슨 앤 존슨 (차이나)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한성

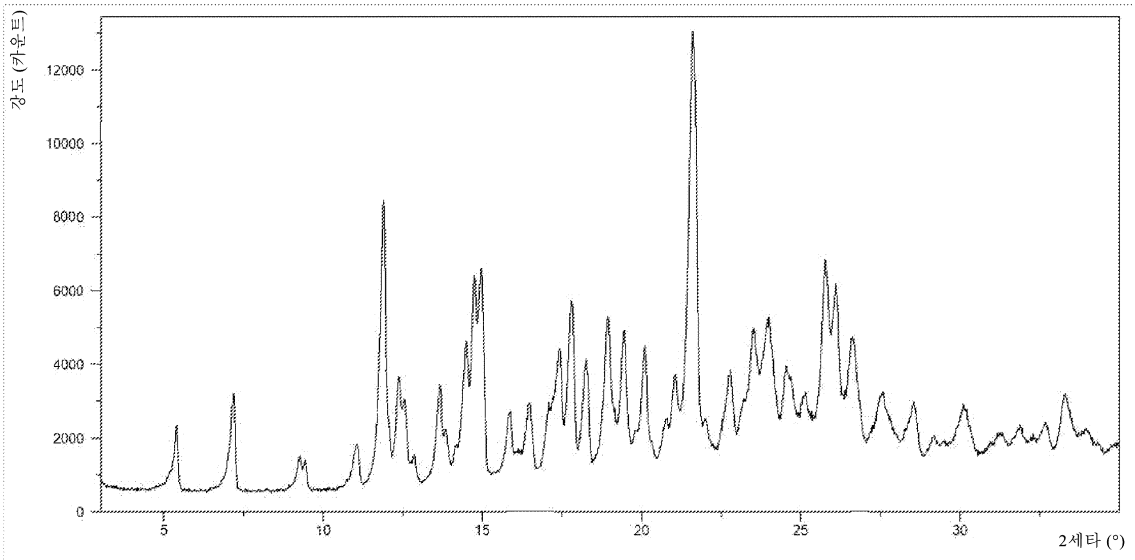
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **암과 같은 질환의 치료를 위한 (R)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 베실레이트 염**

(57) 요 약

본 발명은 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 베실레이트 염 및 이의 용매화물에 관한 것이다. 이 화합물은 포유동물의 치료 및/또는 예방에 유용할 수 있으며, 이러한 화합물을 포함하는 약제학적 조성물, 및 백혈병, 골수이형성 증후군(MDS) 및 골수증식성 신생물(MPN)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 암; 및 당뇨병과 같은 질환을 치료하는 데 유용한 메닌/MLL 단백질/단백질 상호작용 억제제로서의 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



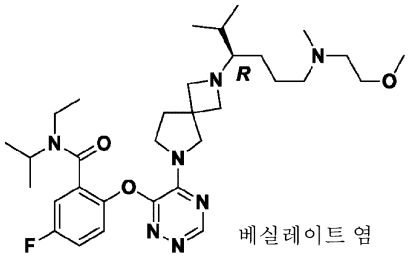
(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 35/02 (2018.01)
C07C 231/02 (2013.01)
C07C 235/46 (2013.01)
C07B 2200/13 (2013.01)
(72) 발명자
퀘롤, 올리비에 알렉시스 조지스
프랑스 이시-레 몰리노 92787 세덱스 9 티에스에이 91003 루 카밀레 데스몰린스 1 얀센-실라그
튀링, 조하네스 윌헬무스 제이.
벨기에 비어스 2340 투른호우트세베그 30 얀센 파마슈티카 엔브이
엔지, 알리시아 티 푸에이
중국 상하이 200233 슈후이 디스트릭트 구이 퀑 로드 65 넘버 1 빌딩 인베스트먼트 리미티드 엘티디 2101 존슨 앤 존슨 (차이나)
다르빌, 니콜스 프레디 자크 브루노
벨기에 비어스 2340 투른호우트세베그 30 얀센 파마슈티카 엔브이
게르트만, 로버트 마이클
벨기에 비어스 2340 투른호우트세베그 30 얀센 파마슈티카 엔브이
아후자, 디팔리
벨기에 비어스 2340 투른호우트세베그 30 얀센 파마슈티카 엔브이
리우, 잉타오
중국 상하이 200233 슈후이 디스트릭트 구이 퀑 로드 65 넘버 1 빌딩 인베스트먼트 리미티드 엘티디 2101 존슨 앤 존슨 (차이나)
판데, 비네
벨기에 비어스 2340 투른호우트세베그 30 얀센 파마슈티카 엔브이
클레이터, 애드워드
영국 에이치피12 4이쥐 하이 위컴비 50-100 홀머 팜 웨이 얀센-실라그 엘티디
벤 하임, 시릴
벨기에 비어스 2340 투른호우트세베그 30 얀센 파마슈티카 엔브이
스몰더스, 사이먼 얀 씨
벨기에 비어스 2340 투른호우트세베그 30 얀센 파마슈티카 엔브이

명 세 서

청구범위

청구항 1

(*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 베실레이트 염 또는 이의 용매화물:



베실레이트 염

.

청구항 2

제1항에 있어서, 용매화물은 수화물인, 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서, 화합물은 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 수화물의 결정질 형태 A이고,

여기서 결정질 형태는 5.4, 7.2, 11.1, 11.9, 및 21.7도 2세타 ± 0.2도 2세타에서의 피크를 포함하는 X-선 분말 회절 패턴을 생성하는, 화합물.

청구항 4

제3항 있어서, X-선 분말 회절 패턴은 13.7, 14.5, 14.7, 15.0, 16.5, 17.8, 19.0, 19.4, 및 20.1도 2세타 ± 0.2도 2세타로부터 선택된 하나 이상의 피크를 추가로 포함할 수 있는, 결정질 형태.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 실질적으로 도 1에 도시된 바와 같은 X-선 분말 회절 패턴을 추가의 특징으로 하는 결정질 형태.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화합물과, 약제학적으로 허용되는 담체, 약제학적으로 허용되는 부형제 및 약제학적으로 허용되는 희석제 중 적어도 하나를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 7

제6항에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물의 제조 방법으로서, 약제학적으로 허용되는 담체를 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 치료적 유효량과 혼합하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 8

약제로서 사용하기 위한, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 청구된 바와 같은 화합물 또는 제6항에 청구된 바와 같은 약제학적 조성물.

청구항 9

암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 청구된 바와 같은 화합물 또는 제6항

에 청구된 바와 같은 약제학적 조성물.

청구항 10

백혈병, 골수이형성 증후군(MDS) 및 골수증식성 신생물(MPN)의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 청구된 바와 같은 화합물 또는 제6항에 청구된 바와 같은 약제학적 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 백혈형의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 화합물 또는 약제학적 조성물로서, 여기서 백혈병은 (NPM1)-돌연변이된 백혈병인, 화합물 또는 약제학적 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서, 암은 백혈병, 림프종, 골수종 또는 고형 종양 암, 예를 들어 전립선암, 폐암, 유방암, 췌장암, 결장암, 간암, 흑색종 및 교모세포종으로부터 선택되는, 화합물 또는 약제학적 조성물.

청구항 13

제10항에 있어서, 백혈병은 급성 백혈병, 만성 백혈병, 골수성 백혈병, 골수구성 백혈병, 림프모구성 백혈병, 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), T 세포 전림프구성 백혈병(T-PLL), 거대 과립 림프구성 백혈병, 털세포 백혈병(HCL), MLL 재배열 백혈병, MLL-PTD 백혈병, MLL 증폭 백혈병, MLL 양성 백혈병, 및 *HOX/MEIS1* 유전자 발현 시그니처를 나타내는 백혈병으로부터 선택되는, 백혈병의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 화합물 또는 약제학적 조성물.

청구항 14

암으로부터 선택된 장애를 치료하거나 예방하는 방법으로서, 치료적 유효량의 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 청구된 바와 같은 화합물 또는 제6항에 청구된 바와 같은 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 15

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항의 결정질 형태를 제조하는 방법으로서, 화합물 A를 재결정화하는 단계를 포함하며, 여기서 재결정화는 하기 단계를 포함하는, 방법:

a) 벤젠설폰산의 존재 하에 화합물 A, 또는 이의 수화물 또는 용매화물을 적합한 용매의 혼합물에 첨가하고, 약 20℃ 내지 용매 환류 온도 범위의 온도로 조정하는 단계;

b) 결정질 형태 A를 시딩하는 단계;

c) 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항의 결정질 형태의 침전물을 수득하는 단계.

청구항 16

제15항에 있어서, 적합한 용매의 혼합물은 아세톤, 물 및 IPAc의 혼합물인, 방법.

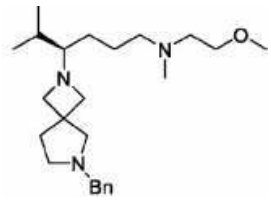
청구항 17

제15항에 있어서, 적합한 용매의 혼합물은 아이소프로판올, 물 및 IPAc의 혼합물인, 방법.

청구항 18

제15항, 제16항 또는 제17항에 있어서, 온도는 약 25℃인, 방법.

청구항 19

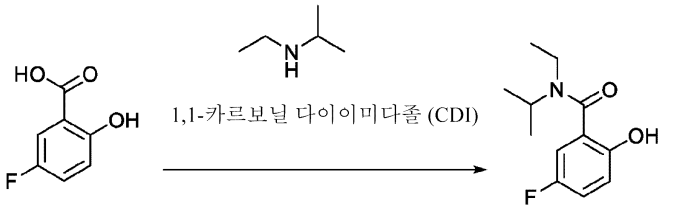


시트르산 염의 결정질 형태로서,

여기서 결정질 형태는 5.82, 10.09 및 18.42도 2세타 ± 0.2도 2세타에서의 피크를 포함하는 X-선 분말 회절 패턴을 생성하는, 결정질 형태.

청구항 20

적합한 용매에서 커플링제 CDI의 존재 하에 5-플루오로-2-하이드록시-벤조산을 반응시킴으로써 1단계 반응을 통해 N-에틸-5-플루오로-2-하이드록시-N-아이소프로필벤즈아미드를 제공하는 방법:



.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 베실레이트 염 및 이의 용매화물에 관한 것이다.

[0002] 이 화합물은 포유동물의 치료 및/또는 예방에 유용할 수 있으며, 이러한 화합물을 포함하는 약제학적 조성물, 및 백혈병, 골수이형성 증후군(MDS) 및 골수증식성 신생물(MPN)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 암; 및 당뇨병과 같은 질환을 치료하는 데 유용한 메닌/MLL 단백질/단백질 상호작용 억제제로서의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 혼합 계통 백혈병 유전자에 영향을 미치는 염색체 재배열(*MLL*; *MLL1*; *KMT2A*)은 모든 연령층에 걸쳐 공격적인 급성 백혈병을 일으키고 여전히 대부분 난치병을 나타내므로 새로운 치료법의 긴급한 필요성을 강조한다. 이러한 *MLL*의 염색체 전좌가 있는 급성 백혈병은 림프성, 골수성 또는 양성형 질환을 대표하고 성인 급성 백혈병의 5 내지 10%, 유아에서는 약 70%를 차지한다(문헌[Marschalek, Br J Haematol 2011. 152(2), 141-54; 문헌[Tomizawa et al., Pediatr Blood Cancer 2007. 49(2), 127-32]).

[0004] MLL은 리신 4(H3K4)의 히스톤 H3을 메틸화하고 다중단백질 복합체에서 기능하는 히스톤 메틸트랜스퍼라아제이다. *M111*의 유도성 기능 상실 대립유전자의 사용은 비록 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성이 조혈에 필요하지 않더라도 M111이 조혈 줄기 세포(HSC)를 유지하고 B 세포를 발달시키는 데 필수적인 역할을 함을 입증하였다(문헌[Mishra et al., Cell Rep 2014. 7(4), 1239-47]).

[0005] 60개 이상의 상이한 파트너와의 MLL 융합이 현재까지 보고되었으며 백혈병 형성/진행과 관련이 있었다(문헌[Meyer et al., Leukemia 2013. 27, 2165-2176]). 흥미롭게도 MLL의 SET(Su(var)3-9, zeste의 인핸서, 및 trithorax) 도메인은 키메라 단백질에 유지되지 않고 융합 파트너로 대체된다(문헌[Thiel et al., Bioessays 2012. 34, 771-80]). 융합 파트너에 의한 Dot1L 및/또는 pTEFb 복합체와 같은 염색질 변형 효소의 모집은 *HOXA* 유전자(예: *HOXA9*) 및 *HOX* 보조 인자 *MEIS1*을 비롯한 MLL 표적 유전자의 전사 및 전사 신장을 가장 두드러지게 유도한다. 이들 유전자의 비정상적인 발현은 결국 조혈 분화를 차단하고 증식을 향상시킨다.

[0006] 다발성 내분비 종양증 1형(*MEN1*) 유전자에 의해 암호화된 메닌은 편재적으로 발현되며 주로 핵에 국한되어 있다. 이는 수많은 단백질과 상호작용하는 것으로 나타났으며, 따라서 다양한 세포 과정에 관여한다. 메닌의 가장 잘 이해되는 기능은 MLL 융합 단백질의 발암성 보조 인자로서의 역할이다. 메닌은 모든 융합 단백질에 유

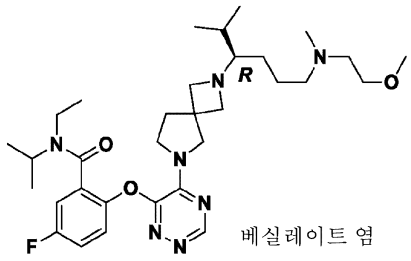
지되는 MLL의 N 말단 단편 내의 두 모티프인 MBM1(메닌 결합 모티프 1) 및 MBM2와 상호작용한다(문헌[Thiel et al., Bioessays 2012. 34, 771-80]). 메닌/MLL 상호작용은 수정체 상피 유래 성장 인자(LEDGF)에 대한 새로운 상호작용 표면을 형성한다. MLL이 LEDGF에 직접 결합하지만, 메닌은 MLL과 LEDGF 사이의 안정한 상호작용과 LEDGF의 PWWP 도메인을 통한 MLL 복합체의 유전자 특이적 염색질 모집에 대해 강제적이다(문헌[Cermakova et al., Cancer Res 2014. 15, 5139-51]; 문헌[Yokoyama & Cleary, Cancer Cell 2008. 8, 36-46]). 더욱이, 수많은 유전적 연구에 따르면 메닌은 MLL 융합 단백질에 의한 발암성 형질전환에 엄격히 요구되며, 이는 메닌/MLL 상호작용이 매력적인 치료 표적임을 시사한다. 예를 들어 *Men1*의 조건부 결실은 MLL 융합을 이소적으로 발현하는 골수 전구 세포의 백혈병 발생(leukomogenesis)을 방지한다(문헌[Chen et al., Proc Natl Acad Sci 2006. 103, 1018-23]). 유사하게, 기능 상실 돌연변이에 의한 메닌/MLL 융합 상호작용의 유전적 파괴는 MLL 융합 단백질의 발암성 특성을 폐기하고, 생체내 백혈병 발병을 차단하며, MLL 형질전환 백혈병 아세포의 분화 차단을 해제한다. 이들 연구는 또한 MLL 융합 단백질에 의한 *HOX* 유전자 발현 유지에 메닌이 필요하다는 것을 보여주었다(문헌[Yokoyama et al., Cell 2005. 123, 207-18]). 또한, 이 단백질/단백질 상호작용의 약물 가능성을 시사하는 메닌/MLL 상호작용의 소분자 억제제가 개발되었으며 또한 AML의 전임상 모델에서도 효능이 입증되었다(문헌[Borkin et al., Cancer Cell 2015. 27, 589-602]; 문헌[Cierpicki and Grembecka, Future Med Chem 2014. 6, 447-462]). 정상 조혈 동안 메닌이 MLL1의 필수 보조 인자가 아니라는 관찰과 함께(문헌[Li et al., Blood 2013. 122, 2039-2046]), 이러한 데이터는 MLL 재배열 백혈병 및 활성 *HOX/MEIS1* 유전자 시그니처를 갖는 기타 암 치료를 위한 유망한 새로운 치료 접근법으로서 메닌/MLL 상호작용의 파괴를 검증한다. 예를 들어, *MLL* 유전자의 5' 영역 내의 내부 부분 직렬 중복(PTD)은 골수성이형성증후군뿐만 아니라 신규 및 이차 AML에서 주로 발견되는 또 다른 주요 이상을 나타낸다. MLL-PTD의 분자 메커니즘 및 생물학적 기능은 잘 이해되지 않지만, 메닌/MLL 상호작용에 영향을 미치는 새로운 치료 표적화 전략은 MLL-PTD 관련 백혈병 치료에도 효과적인 것으로 입증될 수 있다. 더욱이, 거세-저항성 전립선암은 메닌/MLL 상호작용에 의존하는 것으로 나타났다(문헌[Malik et al., Nat Med 2015. 21, 344-52]).

[0007] MLL 단백질은 과학 분야에서 히스톤-리신 N-메틸트랜스퍼라제 2A(KMT2A) 단백질로도 알려져 있다(UniProt Accession # Q03164).

[0008] 여러 참고문헌에서는 메닌-MLL 상호작용을 표적으로 하는 억제제를 기술하고 있다: WO2011029054호, 문헌[J Med Chem 2016, 59, 892-913]은 티에노피리미딘 및 벤조다이아제핀 유도체의 제조를 기술하고; WO2014164543호는 티에노피리미딘 및 티에노피리딘 유도체를 기술하고; 문헌[*Nature Chemical Biology* March 2012, *8*, 277-284 and Ren, J.; *et al. Bioorg Med Chem Lett* (2016), *26(18)*, 4472-4476]은 티에노피리미딘 유도체를 기술하고; 문헌[*J Med Chem* 2014, *57*, 1543-1556]은 하이드록시- 및 아미노메틸피페리딘 유도체를 기술하고; 문헌[*Future Med Chem* 2014, *6*, 447-462]은 소분자 및 펩티도미메틱 화합물을 검토하고; WO2016195776호는 푸로[2,3-d]피리미딘, 9H-퓨린, [1,3]옥사졸로[5,4-d]피리미딘, [1,3]옥사졸로[4,5-d]피리미딘, [1,3]티아졸로[5,4-d]피리미딘, 티에노[2,3-b]피리딘 및 티에노[2,3-d]피리미딘 유도체를 기술하고; WO2016197027호는 5,6,7,8-테트라하이드로피리도[3,4-d]피리미딘, 5,6,7,8-테트라하이드로피리도[4,3-d]피리미딘, 피리도[2,3-d]피리미딘 및 퀴놀린 유도체를 기술하고; WO2016040330호는 티에노피리미딘 및 티에노피리딘 화합물을 기술한다. WO2017192543호는 메닌 억제제로 피페리딘을 기술한다. WO2017112768호, WO2017207387호, WO2017214367호, WO2018053267호 및 WO2018024602호는 메닌-MLL 상호작용의 억제제를 기술한다. WO2017161002호 및 WO2017161028호는 메닌-MLL의 억제제를 기술한다. WO2018050686호, WO2018050684호 및 WO2018109088호는 메닌-MLL 상호작용의 억제제를 기술한다. WO2018226976호는 메닌과 MLL 단백질의 상호작용을 억제하는 방법 및 조성물을 기술한다. WO2018175746호는 혈액학적 악성 종양 및 유잉 육종의 치료 방법을 제공한다. WO2018106818호 및 WO2018106820호는 췌장 세포의 증식을 촉진하는 방법을 제공한다. WO2018153312호는 의약화학 분야와 관련된 아자스피로 화합물을 개시한다. WO2017132398호는 NPM1 돌연변이를 나타내는 백혈병 세포를 MLL과 메닌 사이의 상호작용에 대한 약리학적 억제제와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법을 개시한다. WO2019060365호는 메닌-MLL의 치환된 억제제를 기술한다. WO2020069027호는 메닌 억제제를 사용한 혈액학적 악성 종양의 치료를 기술한다. 문헌[Krivtsov et al., Cancer Cell 2019. No.6 Vol.36, 660-673]은 메닌-MLL 억제제를 기술한다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 베실레이트 염(벤젠설포네이트 염):

[0010] 
베실레이트 염
,

[0011] 및 이의 용매화물에 관한 것이다.

[0012] 당업자는 이의 "용매화물"이 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드의 베실레이트 염을 지칭함을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명은 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드의 베실레이트 염, 및 또한 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드의 베실레이트 염의 용매화물을 포함한다.

[0013] 특히, 본 발명은 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 베실레이트 염 또는 이의 수화물에 관한 것이다.

[0014] 특히, 본 발명은 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 또는 이의 용매화물에 관한 것이다.

[0015] 특히, 본 발명은 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 또는 이의 수화물에 관한 것이다.

[0016] 특히, 본 발명은 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 0.5-2.0 당량 수화물에 관한 것이다.

[0017] 특히, 본 발명은 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 2.0 당량 수화물에 관한 것이다.

[0018] 더욱 특히, 본 발명은 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 수화물의 결정질 형태 A에 관한 것이다.

[0019] 더욱 특히, 본 발명은 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 0.5-2.0 당량 수화물의 결정질 형태 A에 관한 것이다.

[0020] 더욱 특히, 본 발명은 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 2.0 당량 수화물의 결정질 형태 A에 관한 것이다.

[0021] (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드의 베실레이트 염 또는 이의 용매화물은 그의 화학적/물리적 안정성, 그의 물리적 특성 및 이것이 안정한 결정질 고체로서 단리될 수 있다는 점에서 우수하다.

[0022] 본 발명의 일 실시형태는 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트

염 또는 이의 용매화물을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0023] 본 발명은 또한 약제학적으로 허용되는 담체, 약제학적으로 허용되는 부형제, 및/또는 약제학적으로 허용되는 희석제 및 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 또는 이의 용매화물을 포함하는, 이로 이루어지는 및/또는 이로 본질적으로 이루어지는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0024] 또한, (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 또는 이의 용매화물, 및 약제학적으로 허용되는 담체, 약제학적으로 허용되는 부형제, 및/또는 약제학적으로 허용되는 희석제를 포함하는, 이로 이루어지는 및/또는 이로 본질적으로 이루어지는 약제학적 조성물의 제조 방법이 제공된다.

[0025] 본 발명은 추가로 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 또는 이의 용매화물을 사용하는, 백혈병, 골수이형성 증후군(MDS) 및 골수증식성 신생물(MPN)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 암; 및 당뇨병과 같은 질환을 치료하거나 개선시키는 방법을 제공한다.

[0026] 본 발명은 또한 약제의 제조에서의 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 또는 이의 용매화물의 용도에 관한 것이며, 여기서 약제는 백혈병, 골수이형성 증후군(MDS) 및 골수증식성 신생물(MPN)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 암; 및 당뇨병과 같은 질환을 치료하기 위해 제조된다.

[0027] 특히, 본 발명에 따른 화합물 및 그의 약제학적 조성물은 백혈병, 특히 뉴클레포스민(NPM1)-돌연변이 백혈병, 예를 들어 NPM1c의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다.

[0028] 일 실시형태에서, 본 발명에 따른 화합물은 개선된 대사 안정성 특성을 가질 수 있다.

[0029] 일 실시형태에서, 본 발명에 따른 화합물은 생체내 반감기(T1/2)를 연장시킬 수 있다.

[0030] 일 실시형태에서, 본 발명에 따른 화합물은 개선된 경구 생체이용률을 가질 수 있다.

[0031] 일 실시형태에서, 본 발명에 따른 화합물은 종양 성장, 예를 들어 MLL(KMT2A) 유전자 재배열/변경 및/또는 NPM1 돌연변이를 보유하는 종양을 감소시킬 수 있다.

[0032] 일 실시형태에서, 본 발명에 따른 화합물은 연장된 기간 동안 생체내 개선된 PD 특성, 예를 들어 MEIS1과 같은 표적 유전자 발현의 억제 및 적어도 16시간에 걸친 분화 마커의 상향조절을 가질 수 있다.

[0033] 일 실시형태에서, 본 발명에 따른 화합물은 개선된 안전성 프로파일(예를 들어, 감소된 hERG 억제; 개선된 심혈관 안전성)을 가질 수 있다.

[0034] 일 실시형태에서, 본 발명에 따른 화합물은 Q.D. 투약(1일 1회)에 적합할 수 있다.

[0035] 본 발명은 또한 백혈병, 골수이형성 증후군(MDS) 및 골수증식성 신생물(MPN)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 암; 및 당뇨병의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 추가적인 약제학적 제제와 조합된, 본 발명에 따른 화합물의 용도에 관한 것이다.

[0036] 추가로 본 발명은, 약제학적으로 허용되는 담체를 치료적 유효량의 본 발명에 따른 화합물과 긴밀하게 혼합함을 특징으로 하는, 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.

[0037] 본 발명은 또한 백혈병, 골수이형성 증후군(MDS) 및 골수증식성 신생물(MPN)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 암; 및 당뇨병의 치료 또는 예방에서 동시적, 별도의 또는 순차적 사용을 위한 조합된 제제로서의, 본 발명에 따른 화합물, 및 추가적인 약제학적 제제를 포함하는 생성물에 관한 것이다.

[0038] 또한 본 발명은, 본 명세서에 정의된 바와 같은 유효량의 본 발명에 따른 화합물, 또는 본 명세서에 정의된 바와 같은 약제학적 조성물 또는 조합을 온혈 동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 동물에서 세포 증식성 질환을 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것이다.

[0039] 또다른 실시형태에서, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-

일)옥시)벤즈아미드 베실레이트 염 및 이의 용매화물에 관한 것이다.

[0040] 또다른 실시형태에서, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 및 이의 용매화물에 관한 것이다.

[0041] 또다른 실시형태에서, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 베실레이트 염 수화물의 결정질 형태 A에 관한 것이다.

[0042] 또다른 실시형태에서, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 수화물의 결정질 형태 A에 관한 것이다.

[0043] 본 발명은 또한 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 및 이의 용매화물의 제조에 관한 것이다.

[0044] 본 발명은 또한 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 수화물의 결정질 형태 A의 제조에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0045] 발명의 내용뿐만 아니라, 이에 뒤따르는 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용은 첨부된 도면과 함께 읽을 때 더 이해된다. 본 발명을 예시하기 위하여, 본 발명의 예시적인 실시형태들을 도면에 나타내지만, 본 발명은 도면의 특정 개시내용으로 제한되지 않는다. 도면에서,

도 1은 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 수화물의 결정질 형태 A의 X-선 분말 회절(XRPD) 패턴이다.

도 2: Molm-14 피하(sc) 모델의 효능 연구.

도 3: 파종성 OCI-AML3 모델의 효능 연구.

도 4는 중간체 234b의 X-선 분말 회절(XRPD) 패턴이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 본 발명은 하기 용어 해설 및 최종 실시예를 비롯하여, 하기 설명을 참조함으로써 더욱 충분히 이해될 수 있다. 명확성을 위해, 별도의 측면과 관련하여 본 명세서에 기재된 개시된 화합물, 결정질 형태 A, 조성물 및 방법의 소정 특징이 또한 단일 측면에서 조합되어 제공될 수 있음이 이해되어야 한다. 반대로, 간결성을 위해, 단일 측면의 맥락에서 기재된, 개시된 화합물, 결정질 형태 A, 조성물 및 방법의 다양한 특징은 또한 별도로 또는 임의의 하위 조합으로 제공될 수 있다.

[0047] 본 명세서에 주어진 정량적인 표현들 중 일부는 용어 "약"으로 한정되지 않는다. 용어 "약"이 명시적으로 사용되든 아니든, 본 명세서에서 주어진 모든 양은 실제 주어진 값을 지칭하고자 하는 것이며, 또한 그러한 주어진 값에 대한 실험 및/또는 측정 조건으로 인한 근사치를 포함하는, 본 기술 분야의 통상의 기술에 기반하여 합리적으로 추정될 그러한 주어진 값에 대한 근사치를 지칭하고자 하는 것임이 이해된다.

[0048] 본 명세서의 상세한 설명 및 청구범위 전체에 걸쳐, 단어 "포함하다" 및 "함유하다" 및 이들 단어의 변형, 예를 들어 "포함하는" 및 "포함한다"는 다른 성분을 "포함하지만 이로 한정되지 않음"을 의미하고, 이를 배제시키는 것으로 의도되지 않는다(그리고 배제하지 않는다).

[0049] 본 발명의 목적을 위해, 용어 "결정질 형태" 및 "다형체"는 동의어이다. 결정질 형태에 대한 특성화 정보가 본 명세서에 제공된다. 특정 형태의 결정은 당업자가 특정 형태의 존재를 확립하기에 충분하다고 인식할 특성화 정보의 임의의 일부를 사용하여 달성될 수 있음을 이해해야 한다. 예를 들어, 단일의 구별되는 피크라도 당업자가 특정 형태가 존재한다는 것을 이해하기에 충분할 수 있다.

[0050] 용어 "단리된 형태"는 화합물이 다른 화합물(들), 용매 시스템 또는 생물학적 환경과의 임의의 혼합물과 별개인 형태로 존재하는 화합물을 지칭한다. 본 발명의 일 실시형태에서, 결정질 형태는 단리된 형태로 존재한다.

[0051] 용어 "실온"(RT)은 약 15℃ 내지 약 30℃, 특히 약 20℃ 내지 약 30℃의 온도를 지칭한다. 바람직하게는, 실온은 약 25℃의 온도이다.

[0052] 각도 2Θ(2세타)로서 주어진 하나 이상의 XRPD 피크를 사용하여 결정형이 식별될 때, 각각의 2Θ 값은 달리 표현되지 않는 한 주어진 값 ±0.2도 2세타를 의미하는 것으로 이해된다.

[0053] 용어 "시딩"은 결정화 또는 재결정화를 개시하기 위해 용액 또는 혼합물에 결정질 물질을 첨가하는 것을 지칭한다.

[0054] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "(본) 발명의 화합물" 또는"(본) 발명에 따른 화합물"은, (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 베실레이트 염 및 이의 용매화물, 또는 이의 임의의 하위군을 포함하는 것으로 의도된다.

[0055] (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 베실레이트 염은 용매화물로서 존재할 수 있다. "용매화물"은 물을 갖는 용매화물(즉, 수화물) 또는 일반적인 유기 용매를 갖는 용매화물일 수 있다.

[0056] (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 베실레이트 염 또는 이의 용매화물은 실질적으로 순수한 형태로 제공될 수 있으며, 여기서 단리된 화합물 중 불순물의 몰%는 약 5몰% 미만, 바람직하게는 약 2몰% 미만, 더 바람직하게는 약 0.5몰% 미만, 가장 바람직하게는 약 0.1몰% 미만이다. 본 발명의 일 실시형태에서, (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 베실레이트 염 또는 이의 용매화물은 실질적으로 순수한 형태로서 존재할 수 있다.

[0057] (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 수화물의 결정질 형태 A는 실질적으로 순수한 형태로 제공될 수 있으며, 여기서 단리된 결정질 형태 중 불순물의 몰%는 약 5몰% 미만, 바람직하게는 약 2몰% 미만, 더 바람직하게는 약 0.5몰% 미만, 가장 바람직하게는 약 0.1몰% 미만이다. 본 발명의 일 실시형태에서, (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 수화물은 실질적으로 순수한 형태로 존재한다.

[0058] 또한, 본 명세서에는, 다른 결정질 형태 다른 염 형태, 또는 이의 용매화물을 포함한 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드의 하나 이상의 추가적인 형태와의 혼합물로서의 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 수화물의 결정질 형태 A가 제공된다. 적어도 특정 중량 백분율은 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 수화물의 결정질 형태 A일 수 있다. 특정 중량 백분율은 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 및 99.9%를 포함한다.

[0059] 또한, 본 명세서에는, 화합물 A를 재결정화하는 단계를 포함하는, 본 명세서에 기재된 결정질 형태를 제조하는 방법이 제공되며, 여기서 재결정화는 하기 단계를 포함한다:

[0060] a) 벤젠설폰산의 존재 하에 화합물 A, 또는 이의 수화물 또는 용매화물을 적합한 용매의 혼합물에 첨가하고, 약 20℃ 내지 용매 환류 온도 범위의 온도로 조정하는 단계;

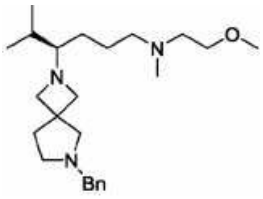
[0061] b) 결정질 형태 A를 시딩하는 단계;

[0062] c) 본 명세서에 기재된 결정질 형태의 침전물을 수득하는 단계.

[0063] 특히, 이전 단락에 기재된 방법에서 적합한 용매의 혼합물은 아세톤, 물 및 IPAc의 혼합물이다.

[0064] 특히, 이전 단락에 기재된 방법에서 적합한 용매의 혼합물은 아이소프로판올, 물 및 IPAc의 혼합물이다. 특히, 방법에서 사용된 온도는 약 25℃이다.

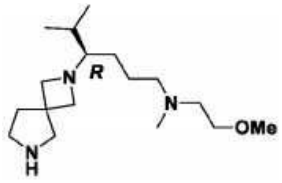
[0065] 또한,



[0066] 시트르산 염의 결정질 형태가 제공되며,

[0067] 여기서 결정질 형태는 5.82, 10.09 및 18.42도 2세타 ± 0.2도 2세타에서의 피크를 포함하는 X-선 분말 회절 패턴을 생성하고; 특히 여기서 X-선 분말 회절 패턴은 5.82, 8.52, 9.20, 10.09, 11.43, 13.61, 14.94, 15.89, 17.03 및 18.42도 2세타 ± 0.2도 2세타에서의 피크를 포함한다.

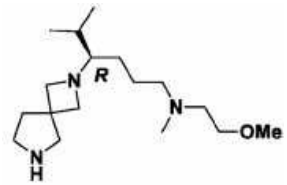
[0068] 또한 하기 중간체:



[0069] 가 이의 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매화물로서 제공된다.

[0070] 당업자는 '또는 이의 용매화물'이 중간체의 약학적으로 허용되는 염을 지칭하여 약학적으로 허용되는 염의 용매화물을 포함한다는 것을 이해할 것이다.

[0071] 또한 하기 중간체:



[0072] 가 용매화물로서 제공된다.

[0073] 약제학적으로 허용되는 염은 산 부가 염 및 염기 부가 염을 포함한다. 그러한 염은 통상적인 수단에 의해, 예를 들어, 임의로 염이 불용성인 용매 중에, 또는 매질 중에 유리 산 또는 유리 염기 형태를 1 당량 이상의 적절한 염기 또는 산과 반응시킨 후, 표준 기술을 사용하여(예를 들어, 진공 중에, 동결-건조시킴으로써, 또는 여과에 의해) 상기 용매, 또는 상기 매질을 제거함으로써 형성될 수 있다. 염은 또한, 예를 들어 적합한 이온 교환 수지를 사용하여, 염 형태의 본 발명의 화합물의 반대 이온을 다른 반대 이온으로 교환함으로써 제조될 수 있다.

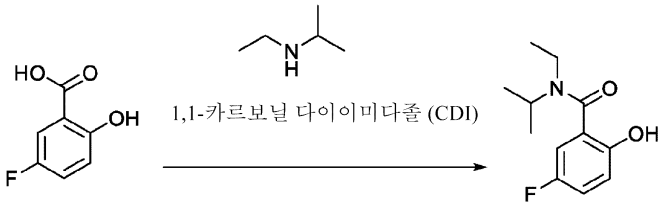
[0074] 적절한 산은, 예를 들어, 할로겐화수소산과 같은 무기산, 예를 들어 염산 또는 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등의 산; 또는, 예를 들어, 아세트산, 프로파노산, 하이드록시아세트산, 락트산, 피루브산, 옥살산(즉, 에탄다이오산), 말론산, 석신산(즉, 부탄다이오산), 말레산, 푸마르산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산, 사이클람산, 살리실산, p-아미노살리실산, 파모산 등의 산과 같은 유기산을 포함한다. 반대로, 상기 염 형태는 적절한 염기를 사용한 처리에 의해 유리 염기 형태로 전환될 수 있다.

[0075] 적절한 염기 염 형태는, 예를 들어, 암모늄 염, 알칼리 및 알칼리 토금속 염, 예를 들어 리튬, 소듐, 포타슘, 세슘, 마그네슘, 칼슘 염 등, 유기 염기, 예를 들어 1차, 2차, 및 3차 지방족 및 방향족 아민, 예컨대 메틸아민, 에틸아민, 프로필아민, 아이소프로필아민, 4개의 부틸아민 이성질체, 다이메틸아민, 다이에틸아민, 다이에탄올아민, 다이프로필아민, 다이아이소프로필아민, 다이-n-부틸아민, 피롤리딘, 피페리딘, 모폴린, 트라이메틸아민, 트라이에틸아민, 트라이프로필아민, 퀴누클리딘, 피리딘, 퀴놀린, 및 아이소퀴놀린을 갖는 염; 벤자틴, N-메틸-D-글루카민, 하이드라바민 염, 및, 예를 들어, 아르기닌, 라이신 등과 같은 아미노산을 갖는 염을 포함한다. 반대로, 상기 염 형태는 산을 사용한 처리에 의해 유리 산 형태로 전환될 수 있다.

[0076] 용어 용매화물은 용매 부가 형태를 포함한다. 그러한 용매 부가 형태의 예는, 예를 들어 수화물, 알코올화물

등이다.

[0077] 또한, 5-플루오로-2-하이드록시-벤조산의 N-에틸-5-플루오로-2-하이드록시-N-아이소프로필벤즈아미드(중간체 28)로의 1단계 전환이 제공된다:



[0078] 중간체 28

[0079] 이 반응은 커플링제 CDI의 존재 하에 THF, 톨루엔, 아세토니트릴 또는 2-메틸테트라히드로푸란과 같은 적합한 용매 중에서 수행된다. 특히, 용매는 THF이다. 반응은 전형적으로 0℃ 내지 환류 온도, 바람직하게는 0℃ 내지 50℃, 더욱 바람직하게는 10℃ 내지 30℃, 더욱 더 바람직하게는 15℃ 내지 25℃의 온도 범위에서 수행된다.

[0080] "약제학적으로 허용되는"은 동물, 더욱 특히 인간에서 사용하기 위한, 연방 또는 주정부의 규제 기관, 또는 미국 이외의 국가의 상응하는 기관에 의해 승인되거나 승인될 수 있는 것, 또는 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인정되는 약전에 열거된 것을 의미한다.

[0081] 용어 "대상체"는 치료, 관찰 또는 실험의 대상이었던 동물, 바람직하게는 포유동물, 가장 바람직하게는 인간을 지칭한다.

[0082] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "치료적 유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상의에 의해 모색되고 있는 조직 시스템, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의약적 반응 - 이는 치료 중인 질병 또는 장애의 증상의 경감 또는 역전을 포함함 - 을 나타내는 활성 화합물 또는 약제학적 제제의 양을 의미한다.

[0083] 용어 "조성물"은 명시된 성분을 명시된 양으로 포함하는 생성물뿐만 아니라, 명시된 양의 명시된 성분들의 조합으로부터 직접적으로 또는 간접적으로 생성되는 임의의 생성물을 포함하도록 의도된다.

[0084] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 달리 언급되지 않는 한, 용어 "영향을 주는" 또는 "영향을 받는"(메닌/MLL 단백질/단백질 상호작용 억제제에 의해 영향을 받는 질환, 증후군, 병태 또는 장애를 지칭하는 경우에)은 상기 질환, 증후군, 병태 또는 장애의 하나 이상의 증상 또는 징후의 빈도 및/또는 중증도의 감소를 포함하고/하거나; 상기 질환, 증후군, 병태 또는 장애의 하나 이상의 증상 또는 징후의 발생, 또는 질환, 병태, 증후군 또는 장애의 발생의 예방을 포함한다.

[0085] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "치료" 및 "치료하는"은 질환의 진행의 둔화, 차단, 정지 또는 중단, 또는 이의 하나 이상의 증상의 개선이 있을 수 있지만, 반드시 모든 증상이 완전히 사라진 것을 의미하는 것은 아닌 모든 과정을 의미하는 것으로 의도된다.

[0086] 실험 파트

[0087] (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 수화물의 결정질 형태 A의 합성

[0088] [표 1]

약어

약어	의미
$Ag(Phen)_2OTf$	은 트라이플레이트-비스(1,10-페난트롤린) 착물
2-MeTHF	2-메틸테트라하이드로푸란
ACN 또는 MeCN	아세토니트릴
AcCl	염화아세틸
AcOH	아세트산
Ac_2O	아세트산 무수물
aq.	수성
Ar	아르곤
BBr_3	트라이브로모보란
bn	벤질
Boc	*tert*-부틸옥시카르보닐
Boc_2O	다이-*tert*-부틸 다이카르보네이트
***n*-BuLi**	*n*-부틸리튬
Cbz	벤질옥시카르보닐
CD_3OD	메탄올-d_4
$CHCl_3$	클로로포름
Cs_2CO_3	탄산세슘
conc.	진한
DBU	1,8-다이아자바이사이클로[5.4.0]운데스-7-엔
DCC	다이사이클로헥실카르보다이이미드
DCE	다이클로로에탄
DCM	다이클로로메탄
DDQ	4,5-다이클로로-3,6-다이옥소사이클로헥사-1,4-다이엔-1,2-다이카르보니트릴
DEA	다이에틸아민
DIBAL-H	다이아이소부틸알루미늄 하이드라이드
DIEA 또는 DIPEA	*N,N*-다이아이소프로필에틸아민
DMAP	*N,N*-다이메틸피리딘-4-아민
DMF	*N,N*-다이메틸포름아미드
DMP	데스-마틴 페리오디난
DMSO	다이메틸 설폭사이드
dppf	1,1′-페로센다이일-비스(다이페닐포스핀)
EDCI	*N*-(3-다이메틸아미노프로필)-*N*′-에틸카르보다이이미드 하이드로클로라이드
EA 또는 EtOAc	에틸 아세테이트
EtOH	에탄올
eq.	당량(들)
FA	포름산
FCC	플래시 컬럼 크로마토그래피
h	시간(들)
H_2	수소
HATU	1-[비스(다이메틸아미노)메틸렌]-1*H*-1,2,3-트라이아졸로[4,5-b]피리디늄 3-옥사이드 헥사플루오로포스페이트
H_2O	물
HCl	염산
HOBt	1-하이드록시벤조트라이아졸
HPLC	고성능 액체 크로마토그래피
ICH_2Cl	클로로요오도메탄
IPA	아이소프로필 알코올
IPAc	아이소프로필 아세테이트

[0089]

[0090]

약어	의미
K_2CO_3	탄산칼륨
KI	요오드화칼륨
K_2HPO_4	인산이칼륨
K_3PO_4	인산삼칼륨
$LiAlD_4$	리튬 알루미늄 중수소화물
LAH	리튬 알루미늄 수소화물
$LiBH_4$	수소화붕소리튬
LDA	리튬 다이아이소프로필아미드
LiCl	염화리튬
LG	이탈기
Me	메틸
MeOH	메탄올
2-MeTHF	2-메틸테트라하이드로푸란
min	분
mL	밀리리터
mmol	밀리몰
mg	밀리그램
$MgSO_4$	황산마그네슘
MSA	메탄설폰산
MsCl	메탄설포닐 클로라이드
MS	분자체
MTBE	메틸 *tert*-부틸 에테르
N_2	질소
NA	해당 없음
$NaBH_3CN$	소듐 시아노보로하이드라이드
$NaBH(OAc)_3$	소듐 트라이아세톡시보로하이드라이드
$NaBD_3CN$	소듐 시아노보로튜테라이드
Na_2CO_3	탄산나트륨
NaH	수소화나트륨
$NaHCO_3$	중탄산나트륨
NaI	요오드화나트륨
NaOAc	아세트산나트륨
NaOH	수산화나트륨
Na_2SO_3	아황산나트륨
Na_2SO_4	황산나트륨
NH_4Cl	염화암모늄
NMM	1-4-메틸모르폴린
Pd_2dba_3	트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐(0)
$Pd(dppf)Cl_2$·DCM	[1,1′-비스(다이페닐포스피노)페로센] 다이클로로팔라듐(II)의 다이클로로메탄과의 착물
$Pd(PPh_3)_4$	테트라키스(트라이페닐포스핀)팔라듐(0)
PE	석유 에테르
PG	보호기
Phen	페난트롤린
psi	제곱인치당 파운드
p-TsOH	*p*-톨루엔설폰산
p-TsOH·H_2O	p-톨루엔설폰산 1 수화물
R_t	체류 시간
로셸 염	포타슘 소듐 타르트레이트 4 수화물
RT	실온

[0091]

약어	의미
sat.	포화
SFC	초임계 유체 크로마토그래피
TBAF	테트라부틸암모늄 플루오라이드
TBDMS	*tert*-부틸다이메틸실릴
TBDPS	*tert*-부틸다이페닐실릴
t-BuOK	포타슘 *tert*-부톡사이드
TEA	트라이에틸아민
Tf	트라이플루오로메탄설포닐
TFA	트라이플루오로아세트산
THF	테트라하이드로푸란
$Ti(OiPr)_4$	티타늄(IV) 아이소프로폭사이드
TLC	박층 크로마토그래피
TMEDA	*N,N,N′,N′*-테트라메틸에틸렌다이아민
TMG	1,1,3,3-테트라메틸구아니딘
TMSI	요오도트라이메틸실란
Ts	p-톨루엔설포닐
TsCl	*p*-톨루엔설포닐 클로라이드
v/v	부피당 부피
vol.	부피(들)
wt	중량
Xantphos	4,5-비스(다이페닐포스피노)-9,9-다이메틸잔텐

[0092] 하기 실험 프로토콜에서 명시적으로 언급되지 않은 경우에도, 전형적으로 컬럼 크로마토그래피 정제 후에, 원하는 분획을 수집하고 용매를 증발시켰음을 당업자는 인식할 것이다.

[0093] 입체화학이 표시되지 않은 경우, 달리 표시되거나 문맥으로부터 명백하지 않는 한, 이는 그것이 입체이성질체의 혼합물임을 의미한다.

[0094] 입체중심이 'RS'로 표시되어 있는 경우, 이는 달리 나타내지 않는 한, 표시된 중심에서 라세미 혼합물이 얻어졌음을 의미한다.

[0095] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 표시된 바와 같은 프로토콜을 사용하여 합성된 화합물 및 중간체는 용매화물로서, 예컨대 수소화물로서 존재할 수 있고/있거나 잔류 용매 또는 소량의 불순물을 함유할 수 있다. 염 형태 또는 용매화물(예를 들어 수화물)로서 단리된 화합물 또는 중간체는, 정수 화학량론적, 즉, 모노- 또는 다이-염, 또는 중간체 화학량론일 수 있다. 중간체 또는 화합물이 HCl의 당량수 표시 없이 'HCl 염'으로 표시되는 경우, 이는 HCl의 당량수가 결정되지 않았음을 의미한다. 중간체 또는 화합물이 H_2O의 당량수 표시 없이 '수화물'로 표시되는 경우, 이는 H_2O의 당량수가 결정되지 않았음을 의미한다.

[0096] 편의상 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드(유리 염기)는 하기 실험 파트에서 "화합물 A"로 표시된다.

[0097] **실시예 1 – (R)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드(화합물 A)의 합성 – 제조 방법 A**

[0098] **중간체 1의 제조**

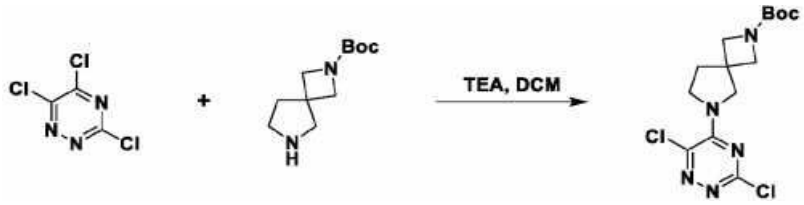
[0099] ***tert*-부틸 (5-메틸-4-옥소헥실)카르바메이트**

[0100] 

[0101] -70℃에서 냉각된 THF(60 mL) 중의 *tert*-부틸 2-옥소피롤리딘-1-카르복실레이트(5.0 g, 27 mmol) 및 TMEDA(5.0 mL, 33 mmol)의 용액에 아이소프로필마그네슘 브로마이드 용액(19 mL, 55 mmol, 2-메틸테트라하이드로푸란 중 2.9 M)을 천천히 첨가하고, 생성된 혼합물을 천천히 실온으로 가온하고 12시간 동안 교반하였다. 혼합물을 포화 수성 NH_4Cl(50 mL) 용액에 붓고 EtOAc(50 mL × 3)로 추출하였다. 합한 유기 층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조하고, 여과하고, 감압 하에 농축하여 미정제 생성물을 수득하고, 이를 FCC(PE/EtOAc = 1:0 to 100:1)에 의해 추가로 정제하여 표제 중간체(3.7 g, 60% 수율)를 황색 오일로서 수득하였다.

[0102] **중간체 13의 제조**

[0103] ***tert*-부틸 6-(3,6-다이클로로-1,2,4-트라이아진-5-일)-2,6-다이아자스피로 [3.4]옥탄-2-카르복실레이트**

[0104] 

[0105] 0℃에서 냉각된 DCM(100 mL) 중의 3,5,6-트라이클로로-1,2,4-트라이아진(10.0 g, 54.2 mmol) 및 TEA(15.2 mL, 109 mmol)의 용액에 *tert*-부틸 2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-카르복실레이트(9.21 g, 43.4 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 실온으로 가온하고 1시간 동안 교반하였다. 혼합물을 물(20 mL)로 희석하고 DCM(30 mL × 3)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고 감압 하에 농축하여 미정제 생성물을 수득하고, 이를 실리카겔 상 FCC(PE/EtOAc = 1:0에서 3:1로)에 의해 정제하여 표제 중간체(12.0 g, 58% 수율)를 황색 고체로서 수득하였다.

[0106] **중간체 27의 제조**

[0107] ***N*-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-메톡시벤즈아미드**

[0108] 

[0109] 0℃에서 냉각된 건조 DCM(150 mL) 중의 5-플루오로-2-메톡시벤조산(8.00 g, 47.0 mmol) 및 *N*-에틸프로판-2-아민(8.19 g, 94.0 mmol)의 혼합물에, HATU(21.5 g, 56.5 mmol) 및 DIEA(9.10 g, 70.4 mmol)를 천천히 나누어 첨가하였다. 생성된 혼합물을 천천히 실온으로 가온하고 8시간 동안 교반하였다. 유기 층을 물(20 mL × 3)로 세척하고 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 여과 후, 용매를 감압 하에 제거하고 미정제 생성물을 FCC(EtOAc/PE = 0%에서 20%로)에 의해 정제하여 표제 중간체(12.0 g, 96% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

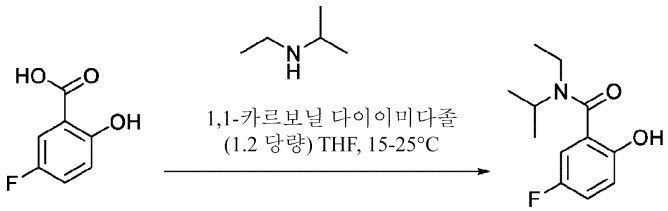
[0110] **중간체 28의 제조**

[0111] ***N*-에틸-5-플루오로-2-하이드록시-N-아이소프로필벤즈아미드**

[0112] 

[0113] -78℃에서 냉각된 건조 DCM(100 mL) 중의 *N*-에틸-5-플루오로-*N*-아이소프로필-2-메톡시벤즈아미드(**중간체 27**)(12.0 g, 50.1 mmol)의 용액에 BBr_3(14.4 mL, 152 mmol)을 천천히 첨가하고, 생성된 혼합물을 천천히 실온으로 가온하고 8시간 동안 교반하였다. 혼합물을 -78℃로 다시 냉각하고, MeOH(5 mL)를 적가하여 반응을 켄칭하였다. 생성된 혼합물을 천천히 실온으로 가온하고 포화 수성 $NaHCO_3$ 용액을 첨가함으로써 pH 값을 약 8로 조정하였다. 수성 층을 DCM(50 mL × 3)으로 추출하고 합한 유기 층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조하고, 여과하고 감압 하에 농축하여 미정제 생성물을 수득하고, 이를 FCC(EtOAc/PE = 0%에서 20%로)에 의해 정제하여 표제 중간체(9.0 g, 78% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0114] **중간체 28의 대안적인 제조**

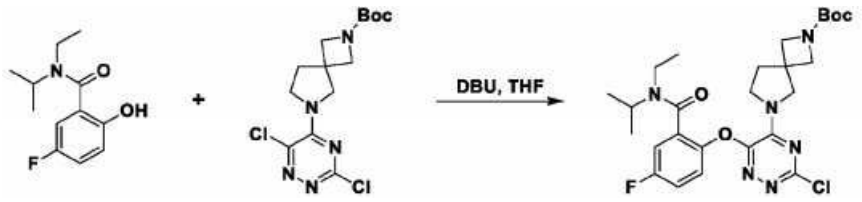
[0115] 

[0116] THF(168 L, 12 부피) 중의 5-플루오로-2-하이드록시-벤조산(14.0 kg, 89.68mol, 1.0 당량)의 혼합물을 15 내지 25℃로 조정하고, 1,1-카르보닐다이이미다졸(17.45 kg, 107.62 mol, 1.2 당량)을 1시간의 기간에 걸쳐 첨가하였다. 첨가 후, 혼합물을 18시간 동안 15 내지 25℃에서 교반하였다. 이후 N-에틸프로판-2-아민(14.85 kg, 170.39mol, 1.9 당량)을 15 내지 25℃에서 2시간의 기간에 걸쳐 혼합물에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 18 내지 24시간 동안 15 내지 25℃에서 추가로 에이징하였다. pH를 수성 10% H_2SO_4(140 kg, 10 부피)로 pH 4 내지 5로 조정하고, 층을 분리하였다. 유기 상을 온도를 40℃ 미만으로 유지하면서 42 내지 56L로 농축하고, 이어서 n-헵탄(43 kg, 4.5 부피)을 15 내지 25℃에서 3시간의 기간에 걸쳐 혼합물에 첨가하였다. 이어서 혼합물을 0 내지 10℃로 냉각시키고 추가 6시간 동안 교반하였다. 생성된 슬러리를 여과하고 케이크를 tert-부틸 메틸 에테르(MTBE):n-헵탄 혼합물(25 kg의 MTBE:n-헵탄의 2:3 부피/부피 혼합물,2.5 부피)로 세척하였다. 케이크 세척을 추가 2회 반복하고 생성된 고체를 50℃에서 진공 중에 건조시켜 중간체 28(16.5 kg, 순도: 99.1%, 수율: 80.4%)을 수득하였다.

[0117] **중간체 14의 제조**

[0118] ***tert*-부틸 6-(3-클로로-6-(2-(에틸(아이소프로필)카르바모일)-4-플루오로페녹시)-1,2,4-트라이아진-5-일)-**

2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-카르복실레이트

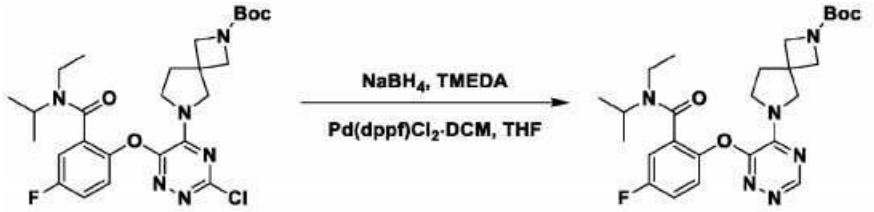
[0119] 

[0120] THF(120 mL) 중의 *tert*-부틸 6-(3,6-다이클로로-1,2,4-트라이아진-5-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-카르복실레이트(**중간체 13**)(12.0 g, 33.3 mmol), *N*-에틸-5-플루오로-2-하이드록시-*N*-아이소프로필벤즈아미드(**중간체 28**)(7.5 g, 33.3 mmol) 및 DBU(6.1 g, 40.1 mmol)의 혼합물을 25℃에서 8시간 동안 교반하였다. 혼합물을 물(30 mL)로 희석하고 DCM(30 mL × 3)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고 감압 하에 농축하여 미정제 생성물을 수득하고, 이를 FCC(PE/EtOAc = 1:0에서 3:1로)에 의해 정제하여 표제 중간체(14.0 g, 73% 수율)를 녹색 고체로서 수득하였다.

[0121] **중간체 2의 제조**

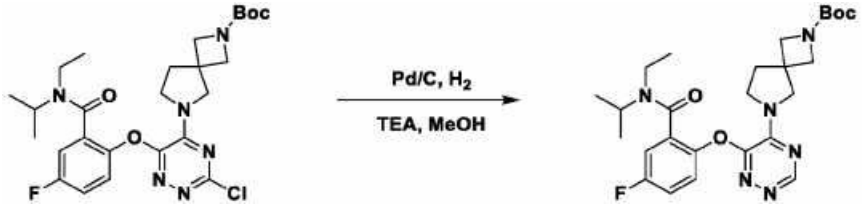
[0122] ***tert*-부틸 6-(3-클로로6-(2-(에틸(아이소프로필)카르바모일)-4-플루오로페녹시)-1,2,4-트라이아진-5-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-카르복실레이트**

[0123] 중간체 2에 대한 합성 방법 A:

[0124] 

[0125] THF(500 mL) 중의 *tert*-부틸 6-(3-클로로-6-(2-(에틸(아이소프로필)카르바모일)-4-플루오로페녹시)-1,2,4-트라이아진-5-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-카르복실레이트(**중간체 14**)(20 g, 36.4 mmol), $NaBH_4$(2.48 g, 65.7 mmol) 및 TMEDA(8.54 g, 73.5 mmol)의 혼합물에 $Pd(dppf)Cl_2 \cdot DCM$ (1.70 g, 2.08 mmol)을 N_2 분위기 하에 첨가하였다. 첨가 후, 반응 혼합물을 25℃에서 14시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고 여과액을 농축하고, 잔류물을 실리카겔 상 FCC(EtOAc)에 의해 정제하여 표제 중간체(15 g, 93% 순도, 74% 수율)를 갈색 고체로서 수득하였다.

[0126] 중간체 2에 대한 합성 방법 B:

[0127] 

[0128] MeOH(100 mL) 중의 *tert*-부틸 6-(3-클로로-6-(2-(에틸(아이소프로필)카르바모일)-4-플루오로페녹시)-1,2,4-트라이아진-5-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-카르복실레이트(**중간체 14**)(22.0 g, 40.1 mmol), TEA(15 mL)의 용액에 Pd/C(습식, 5.0 g, 10%)를 첨가하고, 생성된 혼합물을 H_2 분위기(30 psi) 하에 25℃에서 8시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트 패드를 통해 여과하고 여과액을 진공 중에 농축하여 표제 중간체(25.0 g, 미정제)를 수득하고, 이를 다음 단계에서 추가 정제 없이 사용하였다.

[0129] **중간체 3의 제조**

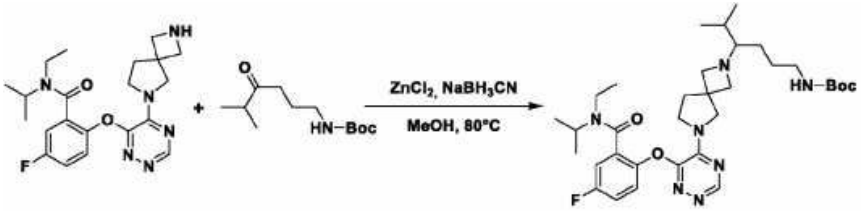
[0130] 2-((5-(2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)-*N*-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필벤즈아미드

[0131] 

[0132] DCM(5 mL) 중의 *tert*-부틸 6-(6-(2-(에틸(아이소프로필)카르바모일)-4-플루오로페녹시)-1,2,4-트라이아진-5-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-카르복실레이트(**중간체 2**)(300 mg, 0.583 mmol)의 용액에 TFA(0.5 mL, 6.4 mmol)를 첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 이어서 10% NaOH(5 mL) 용액을 혼합물에 천천히 첨가하여 pH 값을 약 12로 조정하고, 생성된 혼합물을 DCM(10 mL × 3)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조하고, 여과하고, 진공 중에 농축하여 표제 중간체(220 mg, 90% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0133] **화합물 61의 제조**

[0134] ***tert*-부틸 (4-(6-(6-(2-(에틸(아이소프로필)카르바모일)-4-플루오로페녹시)-1,2,4-트라이아진-5-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-일)-5-메틸헥실)카르바메이트**

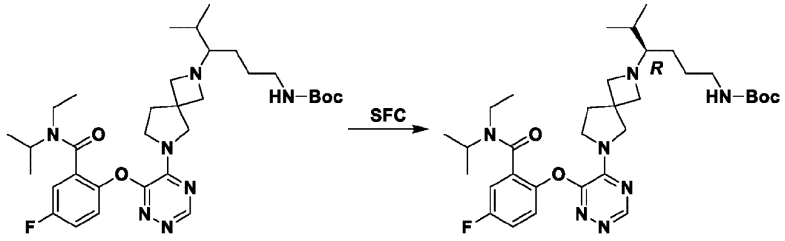
[0135] 

[0136] MeOH(15 mL) 중의 2-((5-(2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)-*N*-에틸-5-플루오로-*N*-아이소프로필벤즈아미드(**중간체 3**)(1.0 g, 2.4 mmol), *tert*-부틸 (5-메틸-4-옥소헥실)카르바메이트(**중간체 1**)(830 mg, 3.62 mmol) 및 $ZnCl_2$(660 mg, 4.84 mmol)의 혼합물을 80℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 이어서 $NaBH_3CN$(310 mg, 4.93 mmol)을 첨가하고 생성된 혼합물을 80℃에서 6시간 동안 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 감압 하에 농축하여 미정제 생성물을 수득하고, 이를 Waters Xbridge Prep OBD를 사용하는 분취용 HPLC(컬럼: C18 150×40 mm 10 um; 용리액: ACN/H_2O (0.05% 암모니아) 45%에서 75%로 v/v)에 의해 추가로 정제하여 표제 화합물(700 mg, 46% 수율)을 무색 오일로서 수득하였다.

[0137] **화합물 62 및 화합물 63의 제조**

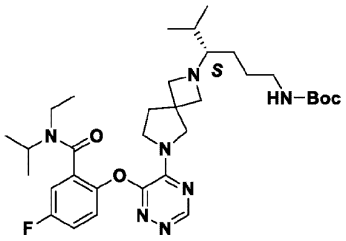
[0138] ***tert*-부틸 (R)-(4-(6-(6-(2-(에틸(아이소프로필)카르바모일)-4-플루오로페녹시)-1,2,4-트라이아진-5-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-일)-5-메틸헥실)카르바메이트**

[0139] ***tert*-부틸 (S)-(4-(6-(6-(2-(에틸(아이소프로필)카르바모일)-4-플루오로페녹시)-1,2,4-트라이아진-5-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-일)-5-메틸헥실)카르바메이트**



화합물 61 화합물 62

+



화합물 63

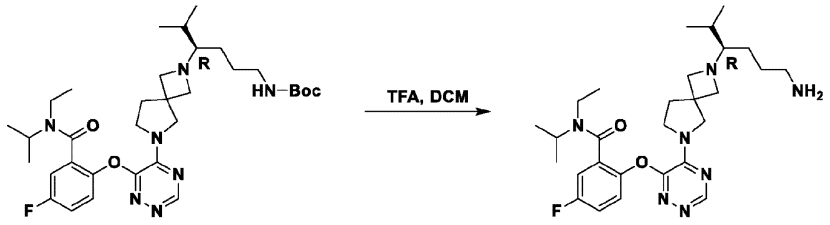
[0140]

[0141] *tert*-부틸 (4-(6-(6-(2-(에틸(아이소프로필)카르바모일)-4-플루오로페녹시)-1,2,4-트라이아진-5-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-일)-5-메틸헥실)카르바메이트(**화합물 61**)(200 mg, 0.319 mmol)를 DAICEL CHIRALPAK IG 상의 SFC(컬럼: 250×30 mm 10 um; 등용매 용리: EtOH (0.1%의 25% 암모니아 함유): 초임계 CO_2, 40% : 60% (v/v))에 의해 정제하여 표제 화합물(**화합물 62**)(85 mg, 42% 수율) 및 (**화합물 63**)(80 mg, 40% 수율)을 모두 밝은 황색 오일로서 수득하였다.

[0142] **화합물 64**

[0143] **(R)-2-((5-(2-(6-아미노-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필벤즈아미드**

[0144]

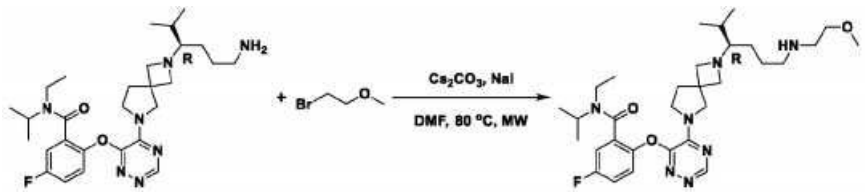


[0145] DCM(4 mL) 중의 *tert*-부틸 (*R*)-(4-(6-(6-(2-(에틸(아이소프로필)카르바모일)-4-플루오로페녹시)-1,2,4-트라이아진-5-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-일)-5-메틸헥실)카르바메이트(**화합물 62**)(550 mg, 0.876 mmol)의 용액에 TFA(4 mL)를 천천히 첨가하고, 생성된 혼합물을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압하에 농축하여 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 DCM(40 mL)에 희석하고 수성 NaOH(2 M, 16 mL) 용액에 의해 pH 값을 약 12로 조정하였다. 수성 층을 DCM(10 mL × 2)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조하고, 여과하고 진공 중에 농축하여 표제 화합물(460 mg, 미정제)을 황색 고체로서 수득하고, 이를 다음 단계에서 추가 정제 없이 사용하였다.

[0146] **화합물 11**

[0147] **(R)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드**

[0148]

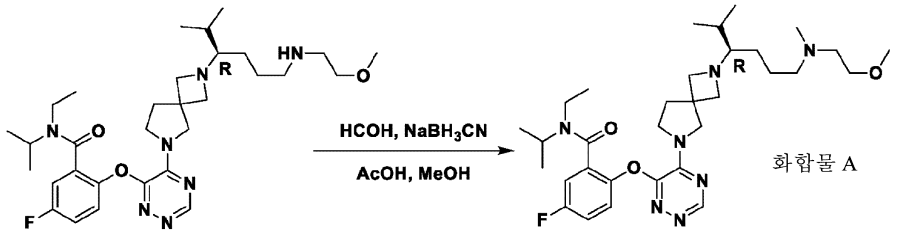


[0149] DMF(1 mL) 중의 (*R*)-2-((5-(2-(6-아미노-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)-*N*-에틸-5-플루오로-*N*-아이소프로필벤즈아미드(**화합물 64**)(120 mg, 미정제), 1-브로모-2-메톡시에탄(32 mg, 0.23 mmol), Cs_2CO_3(222 mg, 0.681 mmol), NaI(102 mg, 0.680 mmol)의 혼합물을 80℃에서 마이크로파 조사를 통해 1시간 동안 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 H_2O(10 mL)로 희석하고 EtOAc(3 × 10 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 H_2O(10 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고 감압 하에 농축하여 미정제 생성물을 수득하고, 이를 Phenomenex Gemini-NX 상의 HPLC(컬럼: 150×30 mm 5 μm; 용리액: ACN/H_2O(10mM NH_4HCO_3) 51%에서 71%로 (v/v))에 의해 추가로 정제하고 DAICEL CHIRALCEL OD-H 상의 SFC(컬럼: 250×30 mm 5 um; 용리액: 초임계 CO_2 EtOH 중(0.1% v/v 암모니아) 25/25, v/v)에 의해 추가로 정제하여 표제 화합물(5.13 mg, 96% 순도)을 황색 고체로서 수득하였다.

[0150] **LC-MS (ESI) (방법 1):** R_t = 2.997 min, m/z 실측치 586.3 $[M+H]^+$.

[0151] **화합물 A**

[0152] **(R)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸) (메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시) 벤즈아미드**



화합물 11 화합물 A

[0153]

[0154] 무수 MeOH(2 mL) 중의 (*R*)-*N*-에틸-5-플루오로-*N*-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드(**화합물 11**)(40.0 mg, 0.068 mmol), 포름알데하이드(55.4 mg, 0.683 mol, 37% 수중) 및 AcOH(8.2 mg, 0.137 mmol)의 혼합물을 45℃에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서, $NaBH_3CN$(8.6 mg, 0.137 mmol)을 혼합물에 첨가하고 생성된 혼합물을 45℃에서 추가 1시간 동안 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 반응 혼합물을 포화 수성 $NaHCO_3$(40 mL)로 처리하여 pH 값을 약 8로 조정하고 추가로 DCM(20 mL × 3)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조하고, 여과하고 감압 하에 농축하여 미정제물을 수득하고, 이를 Boston Prime 상의 분취용 HPLC(컬럼: C18 150×30mm 5um, 이동상 A: H_2O (0.04% 암모니아+10mM NH_4HCO_3), 이동상 B: ACN, 유량: 25 mL/min, 구배 조건 B/A 50%에서 80%로(50% B에서 80% B로))에 의해 정제하여 표제 화합물(9.62 mg, 99.10% 순도, 23.3% 수율)을 황색 오일로서 수득하였다.

[0155] **실시예 2 – (R)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸) (메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시) 벤즈아미드(화합물 A)의 합성 – 제조 방법 B**

[0156] **중간체 7의 제조**

[0157] **4-((*tert*-부톡시카르보닐)(메틸)아미노)부탄산**



[0158]

[0159] MeOH(30 mL) 중의 4-(메틸아미노)부탄산 염산염(3.0 g, 19.5 mmol) 및 TEA(7.78 mL, 58.6 mmol)의 용액에 Boc_2O(4.69 g, 21.5 mmol)를 적가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 감압 하에 농축하고 잔류물을 EtOAc(100 mL)로 희석하고, 냉각된 0.1 N HCl(70 mL × 2), H_2O(50 mL × 2) 및 염수(50 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고 농축하여 표제 중간체(1.80 g, 미정제)를 무색 오일로서 수득

하였다.

[0160] **중간체 8의 제조**

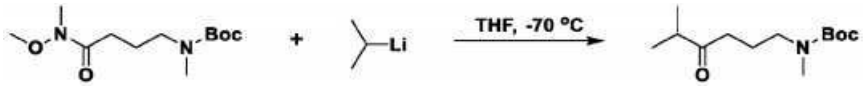
[0161] ***tert*-부틸 (4-(메톡시(메틸)아미노)-4-옥소부틸)(메틸) 카르바메이트**

[0162] 

[0163] $CHCl_3$(30 mL) 중의 4-((tert-부톡시카르보닐)(메틸)아미노)부탄산(**중간체 7**)(1.80 g, 미정제)의 용액에 *N,O*-다이메틸하이드록실아민 염산염(960 mg, 9.84 mmol), HOBt(1.24 g, 9.18 mmol) 및 NMM(2.80 mL, 25.1 mmol)을 첨가하였다. 이어서 EDCI(2.23 g, 11.6 mmol)을 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 DCM(100 mL)으로 희석하고, 1N HCl(30 mL × 3), 포화 수성 $NaHCO_3$(30 mL × 3) 및 염수(30 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고 진공 하에 농축하여 표제 중간체(1.70 g, 미정제)를 무색 오일로서 수득하였다.

[0164] **중간체 9의 제조**

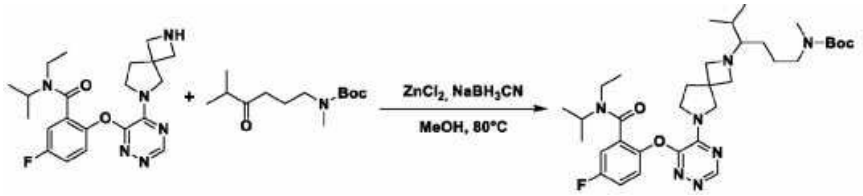
[0165] ***tert*-부틸 메틸(5-메틸-4-옥소헥실)카르바메이트**

[0166] 

[0167] -70℃에서 냉각된 THF(5 mL) 중의 *tert*-부틸 (4-(메톡시(메틸)아미노)-4-옥소부틸)(메틸)카르바메이트(**중간체 8**)(200 mg, 미정제)의 용액에 N_2 분위기 하에 아이소프로필리튬(3.2 mL, 2.24 mmol, 펜탄 중 0.7M)을 적가하였다. 생성된 혼합물을 -70℃에서 2시간 동안 교반하였다. 혼합물을 포화 수성 NH_4Cl(15 mL)로 켄칭하고, EtOAc(30 mL × 2)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜 미정제 생성물을 수득하였다. 미정제 생성물을 FCC(PE/EtOAc = 10:1)에 의해 추가로 정제하여 표제 중간체(60 mg)를 무색 오일로서 수득하였다.

[0168] **화합물 60의 제조**

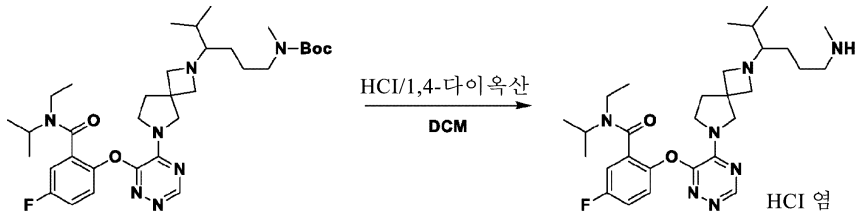
[0169] ***tert*-부틸 (4-(6-(6-(2-(에틸(아이소프로필)카르바모일)-4-플루오로페녹시)-1,2,4-트라이아진-5-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-일)-5-메틸헥실)(메틸)카르바메이트**

[0170] 

[0171] MeOH(50 mL) 중의 2-((5-(2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)-*N*-에틸-5-플루오로-*N*-아이소프로필벤즈아미드(**중간체 3**)(600 mg, 1.45 mmol) 및 *tert*-부틸 메틸(5-메틸-4-옥소헥실)카르바메이트(**중간체 9**)(330 mg, 1.37 mmol)의 용액에 $ZnCl_2$(789 mg, 5.79 mmol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 80℃에서 2시간 동안 교반하였다. 이어서 $NaBH_3CN$(729 mg, 11.6 mmol)을 첨가하고 반응 혼합물을 80℃에서 하룻밤 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 감압 하에 농축하여 미정제 잔류물을 수득하고, 이를 DCM(50 mL)으로 희석하고, 포화 수성 NH_4Cl(50 mL)로 켄칭하고 DCM(50 mL × 3)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수(50 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고 여과액을 감압 하에 농축하여 미정제 생성물을 수득하고, 이를 FCC(DCM/MeOH = 10:1)에 의해 추가로 정제하여 표제 화합물(400 mg, 42% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0172] **화합물 67**

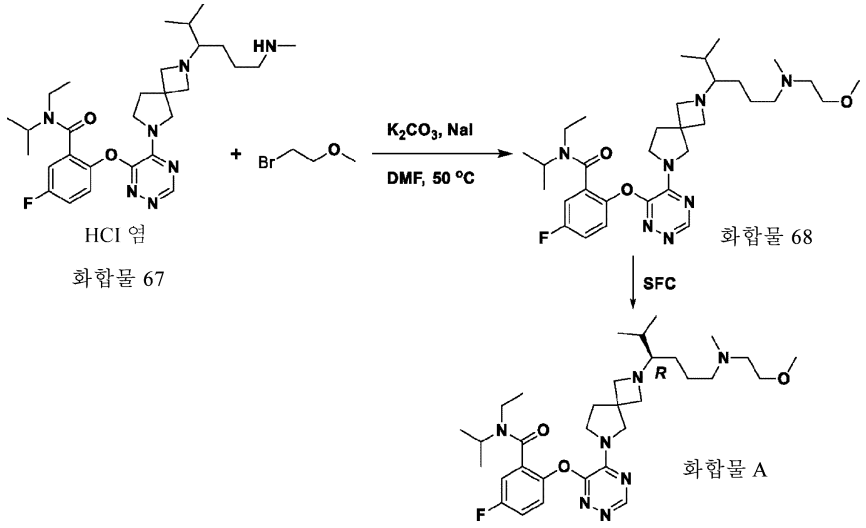
[0173] ***N*-에틸-5-플루오로-*N*-아이소프로필-2-((5-(2-(2-메틸-6-(메틸아미노)헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 염산염**

[0174] 

[0175] DCM(10 mL) 중의 *tert*-부틸 (4-(6-(6-(2-(에틸(아이소프로필)카르바모일)-4-플루오로페녹시)-1,2,4-트라이아진-5-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-일)-5-메틸헥실)(메틸)카르바메이트(**화합물 60**)(1 g, 1.56 mmol)의 용액에 다이옥산 중 4M HCl(5 mL, 20 mmol)을 첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공 중에 농축하여 표제 화합물(960 mg, 미정제, HCl 염)을 수득하고, 이를 다음 단계에서 추가 정제 없이 사용하였다.

[0176] **화합물 A**

[0177] **(*R*)-*N*-에틸-5-플루오로-*N*-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸) (메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시) 벤즈아미드**

[0178] 

[0179] DMF(5 mL) 중의 *N*-에틸-5-플루오로-*N*-아이소프로필-2-((5-(2-(2-메틸-6-(메틸아미노) 헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 염산염(**화합물 67**)(480 mg, 미정제), K_2CO_3(700 mg, 5.07 mmol) 및 NaI(400 mg, 2.67 mmol)의 혼합물에 1-브로모-2-메톡시에탄(230 mg, 1.65 mmol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 50℃에서 하룻밤 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 반응 혼합물을 H_2O(30 mL)로 켄칭하고 DCM(30 mL × 3)으로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수(30 mL × 3)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고 농축하여 미정제 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 FCC(DCM/MeOH = 10:1)에 의해 정제하여 *N*-에틸-5-플루오로-*N*-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드(**화합물 68**)(250 mg, 48% 수율)를 황색 오일로서 수득하였다.

[0180] *N*-에틸-5-플루오로-*N*-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드(**화합물 68**)(960 mg, 방법 B에 의해 수득된 여러 배치와 조합)를 우선 DAICEL CHIRALPAK IG를 이용하는 SFC(컬럼: 250×30mm 10um; 이동상: A: 초임계 CO_2, B: EtOH (0.1% 암모니아), A:B=40:60, 60 mL/분)에 의해 분리하고 추가로 Boston Prime을 이용하는 분취용 HPLC(컬럼: 150×30mm 5um, 이동상 A: H_2O(10mM NH_4HCO_3), 이동상 B: ACN, 유량: 25 mL/min, 구배 조건 B/A 55%에서 85%로)로 정제하여 표제 화합물(270 mg)을 무색 오일로서 수득하였다.

[0181] **^{1}H NMR (400 MHz, 메탄올-d_4):** δ = 8.40 (s, 1H), 7.47-7.32 (m, 1H), 7.30-7.10 (m, 2H), 4.24-4.01 (m, 2H), 3.89-3.60 (m, 3H), 3.48 (br s, 3H), 2.63-2.51 (m, 2H), 2.43-2.32 (m, 2H), 2.29-2.07 (m, 6H), 1.86-1.72

(m, 1H), 1.62-1.44 (m, 2H), 1.39-1.02 (m, 10H), 0.99-0.66 (m, 9H). 일부 양성자는 용매 피크에 의해 가려졌으며 보고되지 않는다.

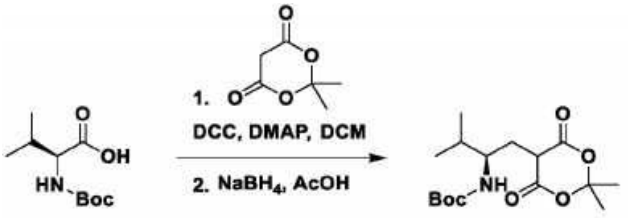
[0182] **LCMS (ESI) (방법 2):** R_t = 1.965 min, m/z 실측치 600.3 $[M+H]^+$.

[0183] **SFC (방법 11):** R_t = 4.904 min.

[0184] **실시예 3 - (R)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸) (메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시) 벤즈아미드 (화합물 A)의 합성 - 제조 방법 C**

[0185] **중간체 227의 제조**

[0186] ***tert*-부틸 (R)-(1-(2,2-다이메틸-4,6-다이옥소-1,3-다이옥산-5-일)-3-메틸부탄-2-일)카르바메이트**

[0187] 

[0188] -10 내지 0℃에서 미리 냉각된 DCM(607 kg) 중의 Boc-L-발린(44.9 kg), 2,2-다이메틸-1,3-다이옥산-4,6-다이온(32.9 kg) 및 DMAP(35.5 kg)을 DCM(613 kg) 중의 DCC(55.5 kg)의 용액에 3시간에 걸쳐 첨가하고 16시간 동안 -10 내지 0℃에서 에이징하였다. 온도를 10℃ 미만으로 유지하면서 10% 시트르산 수용액(449 kg)을 첨가하였다. 생성된 슬러리를 2시간 동안 0 내지 10℃에서 에이징하고, 이어서 여과하였다. 여과 케이크 DCM(91 kg)으로 세척하였다. 여과액을 분리하고 유기 층을 10% 시트르산 수용액(2회 450 kg) 및 10% NaCl 수용액(449 kg)으로 세척하였다. 유기 상(1200 kg)에, 온도를 -10 내지 0℃ 사이에서 유지하면서 아세트산(75.0 kg)을 첨가하였다. 온도를 -10 내지 0℃의 범위에서 유지하면서 수소화붕소나트륨(18.0 kg)을 5시간에 걸쳐 나누어 첨가하고 이어서 생성된 혼합물을 -10 내지 0℃에서 추가 16시간 동안 에이징하였다. 혼합물을 15 내지 25℃로 가온하고, 2시간 동안 에이징하였다. 혼합물을 이어서 14% NaCl 수용액(450 kg)로 세척하고 이후 14% NaCl 수용액(432 kg)으로 2차 세척하고 최종 물 세척하였다(444 kg). 유기 상을 2 내지 4부피로 감압 하에 농축하였다. 아이소-프로판올(143 kg)을 잔류물에 첨가하고 4 내지 5부피로 감압 하에 농축하였다. -10 내지 0℃로 냉각시키고 8시간 동안 에이징한 후, 생성된 슬러리를 여과하고, IPA(38 kg)로 세척하고 건조하여 표제 중간체(46.7 kg, 69% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0189] **중간체 228의 제조**

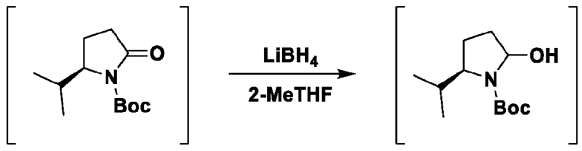
[0190] ***tert* -부틸 (R)-2-아이소프로필-5-옥소피롤리딘-1-카르복실레이트**

[0191] 

[0192] 톨루엔(333 kg) 중의 *tert*-부틸 (*R*)-(1-(2,2-다이메틸-4,6-다이옥소-1,3-다이옥산-5-일)-3-메틸부탄-2-일)카르바메이트(**중간체 227**)(46.7 kg)를 가열 환류시키고 4시간 동안 에이징하였다. 혼합물을 주위 온도로 냉각하고, 여과하고 톨루엔(20 kg)으로 세척하였다. 합한 여과액을 감압 하에 농축 건조하여 목적 화합물(31.05 kg, 96% 수율)을 오일로서 수득하고 이를 추가 정제 없이 바로 사용하였다.

[0193] **중간체 229의 제조**

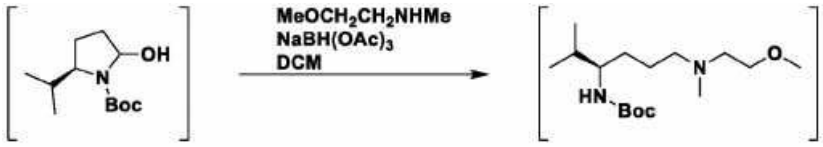
[0194] ***tert*-부틸 (5R)-2-하이드록시-5-아이소프로필피롤리딘-1-카르복실레이트**

[0195] 

[0196] 2-MeTHF(26.7 kg) 중의 *tert*-부틸 (*R*)-2-아이소프로필-5-옥소피롤리딘-1-카르복실레이트(**중간체 228**)(30.9 kg)를 -5 내지 5℃로 냉각하였다. 2-MeTHF 중의 $LiBH_4$(1M, 45.2 kg, 54.4 mol)의 용액을 3시간에 걸쳐 첨가하고 혼합물을 4시간 동안 에이징하였다. 5% $NaHCO_3$(163 kg)의 저온 수용액을 -5 내지 5℃에서 3시간에 걸쳐 첨가하고 추가 2시간 동안 에이징하였다. 혼합물을 주위 온도로 가온하고 추가 2시간 동안 에이징하였다. 수성 층을 분리하고 유기 층을 10% NaCl 수용액(170 kg) 및 물(155 kg)로 세척하였다. 수 세척 동안, 형성된 에멀젼 및 고체 NaCl(3.1 kg)을 첨가하여 분리시켰다. 수성 층을 제거한 후, 유기 층을 감압 하에 농축 건조하여 목적 화합물(28.5 kg, 91% 수율)을 오일로서 수득하고, 이를 추가 정제 없이 바로 사용하였다.

[0197] **중간체 230의 제조**

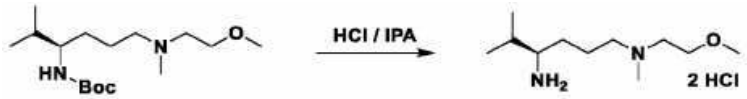
[0198] ***tert*-부틸 (R)-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)카르바메이트**

[0199] 

[0200] DCM(344 kg) 중의 *tert*-부틸 (5*R*)-2-하이드록시-5-아이소프로필피롤리딘-1-카르복실레이트(**중간체 229**)(28.55 kg)를, 15 내지 25℃에서 2-메톡시-*N*-메틸에탄-1-아민(12.3 kg, 138.0 mol)으로 처리하고, 생성된 혼합물을 1시간 동안 에이징하였다. 온도를 15 내지 25℃ 사이에서 유지하면서 나트륨 트라이아세톡시보로하이드라이드(40.12 kg)를 5시간에 걸쳐 나누어 첨가하고, 생성된 혼합물을 48시간 동안 에이징하였다. 온도를 15 내지 25 ℃ 사이에서 유지하면서 2시간에 걸쳐 8% NaOH 수용액(184 kg)을 첨가하여 반응 혼합물을 켄칭시키고 혼합물을 추가 2시간 동안 에이징하였다. 수층을 분리하고, 유기 층을 물(169 kg)로 세척하였다. 이어서 유기 층을 감압 하에 농축 건조하여 표제 중간체(33.26 kg, 88% 수율)를 오일로서 수득하고,이를 추가 정제 없이 바로 사용하였다.

[0201] **중간체 231의 제조**

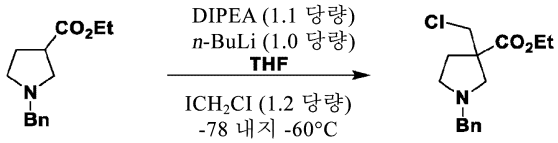
[0202] **(*R*)-N^1-(2-메톡시에틸)-N^1,5-다이메틸헥산-1,4-다이아민, 이염산염**

[0203] 

[0204] 아이소-프로판올 중 4몰 HCl 용액(84.80 kg)에 주위 온도에서 아이소-프로판올(25.6 kg) 중의 *tert*-부틸 (*R*)-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)카르바메이트(**중간체 230**)(32.38 kg)를 3시간에 걸쳐 첨가하고, 혼합물을 주위 온도에서 추가 19시간 동안 에이징하였다. 메틸 *tert*-부틸 에테르(95.25 kg)를 이어서 1시간에 걸쳐 첨가하고 혼합물을 2.5시간 동안 에이징하였다. 생성된 슬러리를 여과하고 MTBE(53 kg)로 세척하였다. 여과 케이크를 건조하여 표제 화합물(23.92 kg, 81% 수율)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0205] **중간체 232의 제조**

[0206] **에틸 1-벤질-3-(클로로메틸)피롤리딘-3-카르복실레이트**

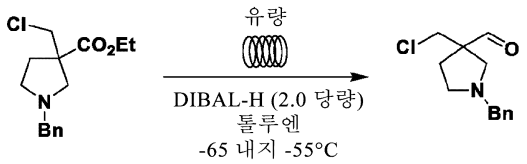
[0207] 

[0208] 온도를 -25℃ 미만으로 유지하면서 -35 내지 -25℃로 냉각된 THF(6 L) 중의 DIPEA(952 g, 1.1 당량)의 용액에

n-BuLi(2.33 kg, 헥산 중 2.5 M, 1.0 당량)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 -35 내지 -25℃에서 추가 30분 동안 에이징하고, 이어서 -78 내지 60℃ 사이로 냉각시켰다. -78 내지 -60℃에서 THF(2 L) 중의 에틸 1-벤질피롤리딘-3-카르복실레이트(2 kg, 1.0 당량)의 용액을 첨가하고 추가 30분 동안 교반하였다. 클로로요오도메탄(1.81 kg, 1.2 당량)을 이어서 -78 내지 -60℃에서 충전하였다. 반응 혼합물을 -60 내지 -40℃에서 2시간 동안 에이징하였다. 반응 혼합물을 0 내지 10℃ 사이의 온도에서 시트르산 수용액(6 L H_2O 중 660 g)에 첨가하고 생성된 혼합물을 20 내지 30℃에서 추가 20분 동안 에이징하였다. 층 분리 후, 수성 층을 EtOAc(6 L)로 추출하고, 합한 유기 층을 염수(6 L)로 세척하고 이어서 50 내지 60℃로 가온하였다. 옥살산(2.22 kg)을 50 내지 60℃에서 충전하였다. 생성된 혼합물을 50 내지 60℃에서 3시간 동안 교반하고, 이어서 20 내지 30℃로 냉각시키고 하룻밤 에이징하였다. 생성된 고체를 여과하고 케이크를 에틸 아세테이트(2 L)로 세척하였다. 습윤 케이크를 톨루엔(4 L), H_2O(8 L) 및 K_3PO_4(1.5 당량)에 가하고 생성된 혼합물을 20 내지 30℃에서 20분 동안 에이징하였다. 층 분리 후, 수성 층을 톨루엔(2 L)으로 추출하였다. 유기 층을 합치고 물(2 L)로 2회 세척하였다. 유기 상을 감압 하에 농축하여 4.2 kg의 목적 화합물을 톨루엔 용액으로서 수득하였다(46 wt % 분석에 의함, 80%의 분석 수율을 제공).

[0209] **중간체 233의 제조**

[0210] **1-벤질-3-(클로로메틸)피롤리딘-3-카르브알데하이드**

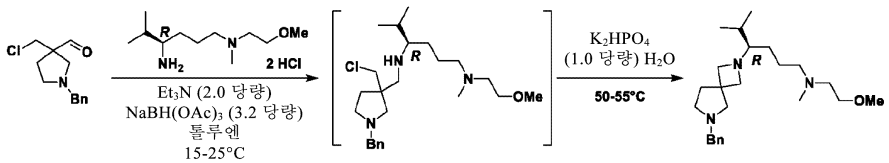
[0211] 

[0212] 유동 화학 시스템에서 수행된 반응: 톨루엔(26 L) 중의 에틸 1-벤질-3-(클로로메틸)피롤리딘-3-카르복실레이트(**중간체 232**)(4.4 kg)의 용액을 26.7 mL/분으로 펌핑하고, -60℃로 냉각시켰다. 냉각 후, 이어서 이를 -60℃에서의 톨루엔(28 L) 중의 DIBAL-H(28.1 mol)의 냉각된 용액과 32.1 mL/분의 펌핑 속도로 혼합하였다. 혼합물을 -60℃에서 퍼플루오로알콕시(PFA) 코일관 반응기에 통과시켰다(총 유량 58.8 mL/분, 체류 시간 5초). 생성된 혼합물을 냉각된 MeOH(-60℃)와 혼합하고, 이를 15.2 mL/분의 속도로 펌핑하였다. 이 혼합된 용액을 -60℃에서의 다른 PFA 코일관 반응기로 펌핑하였다(총 유량 74 mL/분, 체류 시간 5초). 생성된 혼합물을 20 중량%의 수용액 로셸 염(20 V)을 함유한 리시버 내로 수집하였다. 층을 분리하고 유기 상을 염수(2 × 44 mL)로 2회 세척하였다. 유기 상을 유사한 방식으로 제조한 다른 3.0 kg 배치와 조합하고, 감압 하에 농축시켜, 원하는 화합물의 톨루엔 용액 20.8 kg(HPLC에 의해 25.5 중량% 분석, 85%의 분석 수율을 제공함)을 수득하고, 이를 추가 정제 없이 직접 사용하였다.

[0213] **^{1}H NMR (300 MHz, 클로로포름-d)**: δ 9.62 (s, 1H), 7.39 - 7.20 (m, 5H), 3.83 - 3.57 (m, 4H), 2.96 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 2.80 - 2.55 (m, 3H), 2.17 (ddd, J = 13.9, 7.9, 6.1 Hz, 1H), 1.83 (ddd, J = 13.4, 7.8, 5.5 Hz, 1H).

[0214] **중간체 234의 제조**

[0215] **(*R*)-4-(6-벤질-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-일)-N-(2-메톡시에틸)-N,5-다이메틸헥산-1-아민**

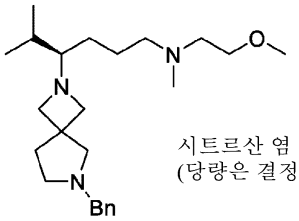
[0216] 

[0217] 톨루엔(30 L)으로 희석시킨 톨루엔 중의 1-벤질-3-(클로로메틸)피롤리딘-3-카르브알데하이드(**중간체 233**)(3.0 kg, 10 wt%) 및 (*R*)-*N*^{1}-(2-메톡시에틸)-*N*^{1},5-다이메틸헥산-1,4-다이아민, 이염산염(**중간체 231**)(3.47 kg)의 용액에 트라이에틸아민(2.55 kg, 25.2 mol)을 20 내지 30℃에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 2시간 동안 20 내지 30℃에서 에이징하였다. 이어서 나트륨 트라이아세톡시보로하이드라이드(9.0 kg)를 20 내지 30℃에서 충전하고 혼합물을 12시간 동안 에이징하였다. 반응 혼합물을 5 내지 15℃로 냉각하고 온도를 35℃ 미만으로 유지하면서 25 wt % NaOH 수용액(25 L, 약 16.75 당량)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 20 내지 30℃에서 25분 동

안 에이징하고 층을 분리하였다. 유기 층을 15 wt % 수성 NaCl(10 L)로 세척하고 층을 다시 분리하고 물(18 L)을 유기 상에 충전하였다. 내부 온도를 35℃ 미만으로 유지하면서 수성 상의 pH를 4M 수성 HCl로 6 내지 7로 조정하였다. 이어서 유기 상을 폐기하고 수성 상을 분리하고 K_2HPO_4로 pH 8 내지 9로 염기성화하였다.

[0218] 생성된 혼합물을 50 내지 55℃로 가온하고 3시간 동안 에이징하였다. 이어서 반응 혼합물을 주위 온도로 냉각시키고 다른 2개의 배치(2.4 kg + 3.0 kg)와 합쳤다. 합한 스트림을 메틸 *tert*-부틸 에테르로 3회(3 × 40 L) 세척하였다. 생성된 수성 층에 추가 메틸 *tert*-부틸 에테르(83 L)를 첨가하고 온도를 15 내지 35℃ 사이에서 유지하면서 수성 상을 8 wt % 수성 NaOH로 pH 9 내지 10으로 염기성화하였다. 수성 층을 분리하고, 유기 층을 물(3 × 30 L)로 3회 세척하였다. 이어서 유기 층을 대략 3부피로 감압 하에 농축하고, 이어서 메탄올로 3회(3 × 30 L) 플러싱하고 농축 건조하여 목적 중간체(12.4 kg, 90% 단리 수율)를 담황색 오일로서 수득하고, 이를 추가 정제 없이 바로 사용하였다.

[0219] **중간체 234a(중간체 234의 시트르산 염)의 제조**

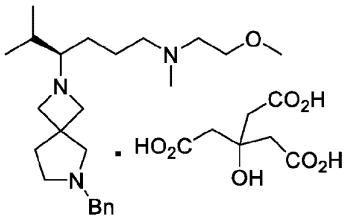


시트르산 염
(당량은 결정되지 않음)

[0220]

[0221] EtOH(80 ml) 및 중간체 234(20 g)를 둥근 바닥 플라스크에서 첨가하였다. 다음으로, 0.5 M EtOH 중의 시트르산 용액(100 ml; 1 당량)을 둥근 바닥 플라스크에서 실온에서 혼합물에 첨가하였다. 후속하여, 혼합물을 건조시까지 증발시켰다(Rotavap, 40℃). 아세토니트릴(200 ml)을 잔류물에 첨가하고 혼합물을 건조시까지 증발시켰다(Rotavap, 40℃). 아세토니트릴(100 ml)을 잔류물에 첨가하고 하룻밤 자석 가열 플레이트에서 실온에서 교반하였다. 마지막으로, 중간체 234a를 여과하고 실온에서 건조시켰다.

[0222] **중간체 234의 시트르산 염의 결정질 형태(중간체 234b)의 제조**



[0223] 결정질 비율 중간체/시트르산 3/2

[0224] 중간체 234a(3.72 g)를 아세토니트릴(20 ml)에 실온에서 첨가하고 혼합물을 교반하였다. 반응 혼합물이 균질해질 때까지(약 10분) 혼합물을 60℃로 가열하였다. 다음으로, 혼합물을 0.5℃/분의 속도로 50℃로 냉각시켰다. 다음으로, 시드를 첨가하고(19 mg의 중간체 234a; 0.5 w/w %) 혼합물을 3시간 및 30분 동안 교반하면서 에이징하였다. 다음으로, 혼합물을 2,3의 지수로 8시간에 걸쳐 20℃로 비선형으로 냉각시켰다. 수득된 혼합물을 하룻밤 교반하고 생성물을 여과하고 건조시켰다(후드 내 실온에서 하룻밤).

[0225] 단리 후, 중간체 234b를 중간체 234의 시트르산 염의 결정질 형태로서 수득하였다(2.75 g; 수율 73.9%). 중간체/시트르산의 수득된 비는 3/2 (NMR) 이다.

[0226] 상기에 언급된 비선형 냉각은 하기 식에 따라 수행되었다:

[0227] 새로운 선형 램프는 냉각 지속 기간 동안 30초마다 시작된다. 램프는 하기 식에 따라 계산된다:

$$T_{set} = T_{startvalue} - \left[(T_{startvalue} - T_{endvalue}) * (\frac{t_{action} + 30s}{Duration})^n\right]$$

[0228]

[0229] T_{set}: 각각의 새로운 램프에 대한 설정 값

[0230] $T_{start\ value}$: 냉각 궤적의 시작에서 측정된 혼합물 온도

[0231] $T_{end\ value}$: 냉각 궤적의 정의된 종료 값

[0232] t_{action}: 냉각 시작으로부터의 실제 시간

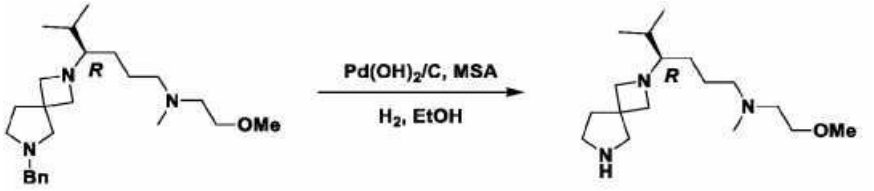
[0233] Duration: 정의된 냉각 지속기간

[0234] n: 지수

[0235] ^{1}H NMR (400 ㎒, MeOH-d_4) δ ppm 0.91 (3 H, d, *J*=6.88 ㎐) 0.98 (3 H, d, *J*=6.88 ㎐) 1.46 - 1.57 (2 H, m) 1.67 - 1.87 (2 H, m) 1.94 - 2.03 (1 H, m) 2.20 - 2.29 (2 H, m) 2.62 - 2.69 (2 H, m) 2.72 - 2.77 (4 H, m) 2.77 - 2.82 (2 H, m) 2.90 (2 H, t, *J*=7.32 ㎐) 2.95 - 3.02 (2 H, m) 3.07 - 3.16 (2 H, m) 3.16 - 3.22 (2 H, m) 3.37 (3 H, s) 3.68 - 3.72 (2 H, m) 3.83 - 3.89 (2 H, m) 3.90 - 3.92 (2 H, m) 3.94 - 4.06 (2 H, m) 7.32 - 7.43 (5 H, m)

[0236] **중간체 224의 제조**

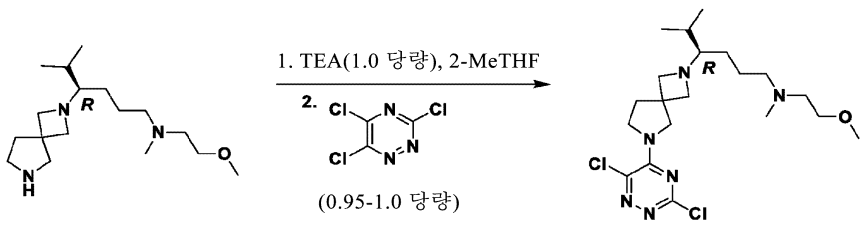
[0237] **(*R*)-N-(2-메톡시에틸)-N,5-다이메틸-4-(2,6-다이아자스피로 [3.4]옥탄-2-일)헥산-1-아민**

[0238] 

[0239] -5 내지 5℃로 냉각된 EtOH(1.47 kg) 중의 탄소상 수산화팔라듐(1.2 kg)에 메탄설폰산(MSA)(11 kg), (*R*)-4-(6-벤질-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-일-*N*-(2-메톡시에틸)-*N*,5-다이메틸헥산-1-아민(**중간체 234**)(10 kg) 및 EtOH(250L)를 첨가하였다. 혼합물을 35 내지 45℃로 가온하고 수소 분위기(0.27 내지 0.40 MPa) 하에 16 내지 20시간 동안 교반하였다. 혼합물을 규조토(20 kg) 상에서 여과하고 패드를 EtOH(24L)로 세척하였다. 여과액을 감압 하에(<40℃) 2 내지 3부피로 농축시키고, 이어서 2-MeTHF(73 kg 및 47 kg)로 2회 플러싱하여 2 내지 3부피 용액을 얻었다. 2-MeTHF(65 kg)로 희석한 후, 10% 수성 황산나트륨(30 kg)을 첨가하고 혼합물을 0 내지 10℃로 냉각한 후, 16% NaOH 수용액(50 kg)을 첨가하여 pH를 13 내지 14로 조정하였다. 온도를 15 내지 25℃로 조정하고 30 내지 60분 동안 교반하였다. 수성 층을 분리하고 2-MeTHF(47 kg × 2)로 2회 추출하였다. 합한 유기 층을 감압 하에서(<40℃) 3 내지 4부피로 농축시키고 2-MeTHF(950 g)를 첨가하였다. 감압 하에서(<40℃) 3 내지 4부피로 농축 후, 생성된 용액을 2-MeTHF(30 kg)로 희석하고, 4A 분자체(25 kg)를 통과시켜 건조시키고, 2-MeTHF(30 kg)로 세척하였다. 최종 용액을 농축시켜 90.1%의 분석 순도를 갖는 오일로서 79% 보정된 수율로 원하는 화합물(6.7 kg)을 얻었다.

[0240] **중간체 225의 제조**

[0241] **(*R*)-4-(6-(3,6-다이클로로-1,2,4-트라이아진-5-일)-2,6-다이아자스피로 [3.4]옥탄-2-일)-N-(2-메톡시에틸)-N,5-다이메틸헥산-1-아민**

[0242] 

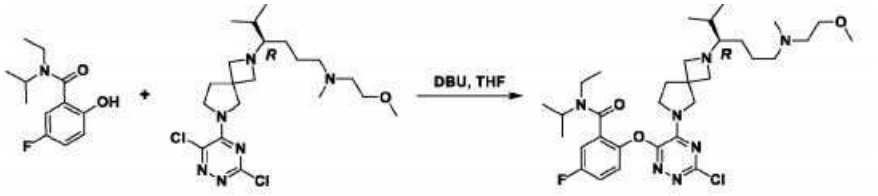
[0243] (*R*)-*N*-(2-메톡시에틸)-*N*,5-다이메틸-4-(2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-일)헥산-1-아민(**중간체 224**)(100 g)에 2-MeTHF(430 g) 및 TEA(68 g)를 첨가하고, 혼합물을 -50 내지 -40℃로 냉각하였다. 2-MeTHF(172 g) 중의 3,5,6-트라이클로로-1,2,4-트라이아진(62 g)을 첨가하고 혼합물을 1 내지 3시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 -20 내지 -10℃로 가온하고 7% $NaHCO_3$ 수용액을 첨가하고, 혼합물을 20 내지 30℃로 가온하고 30 내지 60

분 동안 교반하였다. 수성 층을 제거하고 유기 층을 10% Na_2SO_4(500 g)로 세척하였다. 유기 층을 4Å 분자체(220 g)에 통과시켜 건조시키고, 2-MeTHF(180 g)로 세척하였다. 표제 중간체를 2-MeTHF 중 14.8 wt%의 용액으로서 90% 분석 수율로 제공하였다.

[0244] **화합물 393**

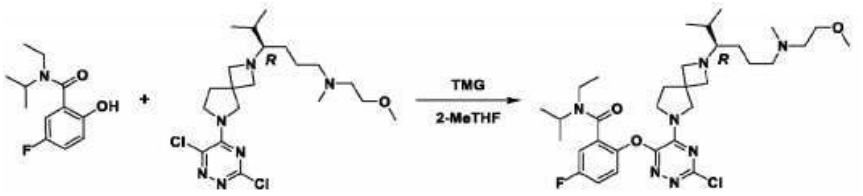
[0245] **(*R*)-2-((3-클로로-5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-벤즈아미드**

[0246] 화합물 393에 대한 합성 방법 A:

[0247] 

[0248] 무수 THF(15 mL) 중의 *N*-에틸-5-플루오로-2-하이드록시-*N*-아이소프로필벤즈아미드(**중간체 28**)(1.10 g, 4.88 mmol), (*R*)-4-(6-(3,6-다이클로로-1,2,4-트라이아진-5-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-2-일)-*N*-(2-메톡시에틸)-*N*,5-다이메틸헥산-1-아민(**중간체 225**)(1.70 g, 3.82 mmol) 및 DBU(750 mg, 4.93 mmol)의 혼합물을 40℃에서 8시간 동안 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 감압 하에 농축하고, 생성된 잔류물을 DCM(60 mL)으로 희석하고 H_2O(20 mL × 3)로 세척하였다. 유기 층을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고 감압 하에 농축하여 미정제 생성물을 수득하고, 이를 FCC(MeOH/DCM = 0%에서 10%로)에 의해 정제하여 황색 오일(1.40 g)을 수득하고, 이를 DAICEL CHIRALPAK AD 상의 SFC(컬럼: 250×50 mm, 10 um; 이동상: A: 초임계 CO_2, B: EtOH (0.1% 암모니아), A:B = 50:50, 70 mL/min; 컬럼 온도: 38℃; 노즐 압력: 100Bar; 노즐 온도: 60℃; 증발기 온도: 20℃; 트리머 온도: 25℃; 파장: 220nm)에 의해 추가로 분리하여 표제 화합물(1.0 g)을 수득하였다.

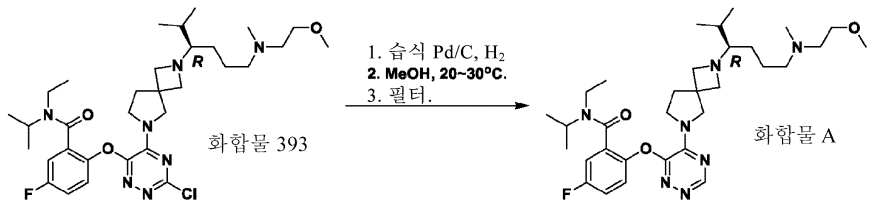
[0249] 화합물 393에 대한 합성 방법 A:

[0250] 

[0251] 2-MeTHF(40 g) 중의 (*R*)-4-(6-(3,6-다이클로로-1,2,4-트라이아진-5-일)-2,6-다이아조스피로[3.4]옥탄-2-일)-*N*-(2-메톡시에틸)-*N*,5-다이메틸헥산-1-아민(**중간체 225**)(676g의 2-MeTHF 중 14.8 wt% 용액, 보정된 100g의 **중간체 225**) 및 *N*-에틸-5-플루오로-2-하이드록시-*N*-아이소프로필벤즈아미드(**중간체 28**)(50.6 g)의 2-MeTHF 용액에 20 내지 30℃에서 테트라메틸구아니딘(31 g)을 첨가하고 혼합물을 40 내지 48시간 동안 교반하였다. 7% $NaHCO_3$ 수용액(500g)을 첨가하고 혼합물을 30 내지 60분 동안 교반하였다. 수성 층을 제거하고 유기 층을 4% NaOH 수용액(2 × 500 g)으로 2회 세척하고 10% Na_2SO_4 수용액(500 g)으로 1회 세척하였다. 유기 층을 감압 하에(<40 ℃) 2.2 내지 3.0부피로 농축하고 MeOH(1 × 790g 및 2 × 395g)로 2-MeTHF와 물 함량이 모두 <1.0%일 때까지 3회 플러싱하여 목적 화합물을 메탄올 중의 60.1 wt% 용액으로서 86% 분석 수율로 수득하였다.

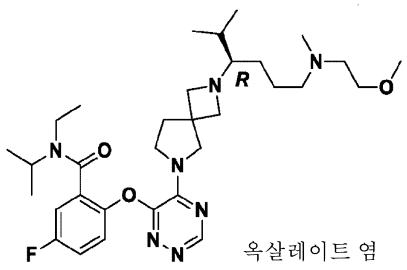
[0252] **화합물 A**

[0253] **(*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸) (메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시) 벤즈아미드**

[0254] 

[0255] (*R*)-2-((3-클로로-5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시-*N*-에틸-5-플루오로-*N*-아이소프로필벤즈아미드(**화합물 393**)(163.93g의 MeOH 중의 60.1 wt % 용액, 보정된 100g의 **화합물 393**), 탄소상 팔라듐(10 g) 및 MeOH(316 g)의 메탄올 용액을 20 내지 30℃에서 수소 분위기(0.20 내지 0.30 Mpa) 하에 18시간 동안 교반하였다. 혼합물을 규조토(75 g) 상에서 교반하고 케이크를 MeOH(158 g)로 세척하였다. 여과액을 감압 하에(< 40℃) 약 3부피로 농축하고, 이어서 아이소프로필 아세테이트(IPAc, 870 g)로 플러싱하여 약 3부피로 농축시켰다. 혼합물을 이어서 IPAc(696 g)로 희석하고 20% Na_2CO_3 수용액을 첨가하였다(500 g). 혼합물을 30 내지 60분 동안 교반하였다. 수성 층을 제거하였다. 유기 층을 물(500 g)로 세척하고, 이어서 감압 하에 <45℃에서 약 3부피로 농축하였다. 표제 중간체를 IPAc 중 48.1 wt% 용액으로서 대략 90% 분석 수율로 수득하였다.

[0256] **실시예 4 – (*R*)-*N*-에틸-5-플루오로-*N*-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시) 벤즈아미드 옥살레이트(화합물 A3)의 합성**

[0257] 
옥살레이트 염

[0258] **화합물 A3**

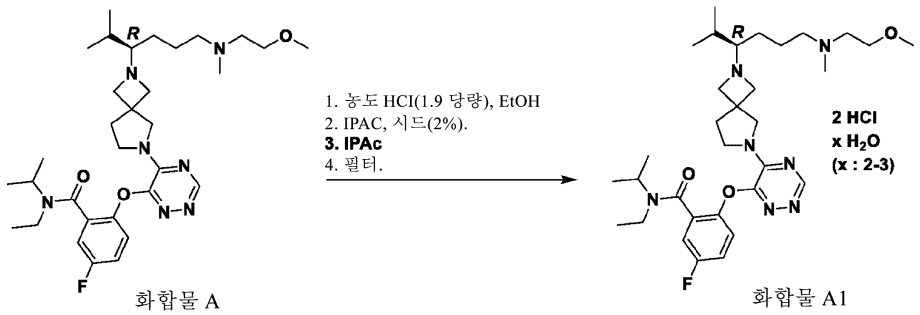
[0259] 20 mL의 ACN(20 mL) 중의 (*R*)-*N*-에틸-5-플루오로-*N*-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시) 벤즈아미드(화합물 **A**)(270 mg, 0.450 mmol)의 용액에 옥살산(81.0 mg, 0.900 mmol)을 첨가하였다. 첨가 후, 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 반응 혼합물을 농축하여, 잔류물을 ACN 및 탈이온수에 재용해시키고, 동결건조하여 표제 화합물(350 mg)을 백색 고체로서 수득하였다.

[0260] **^{1}H NMR (400 MHz, 메탄올-d_4):** δ = 8.48 (s, 1H), 7.52-7.11 (m, 3H), 4.54-3.64 (m, 12H), 3.40-3.34 (m, 5H), 3.23-3.13 (m, 2H), 2.90 (s, 3H), 2.54-2.27 (m, 2H), 2.19-2.03 (m, 1H), 1.97-1.77 (m, 2H), 1.75-1.50 (m, 2H), 1.35-0.65 (m, 17H).

[0261] **^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6):** δ = 8.51 (s, 1H), 7.51-7.29 (m, 3H), 4.29-3.34 (m, 12H), 3.23-2.84 (m, 7H), 2.70 (s, 3H), 2.35-2.09 (m, 2H), 2.05-1.85 (m, 1H), 1.81-1.58 (m, 2H), 1.56-1.33 (m, 2H), 1.18-0.60 (m, 17H).

[0262] **LCMS (ESI) (방법 2):** R_t = 1.969 min, m/z 실측치 600.4 $[M+H]^+$.

[0263] **실시예 5 - 화합물 A1의 합성**

[0264] 

화합물 A 화합물 A1

[0265] IPAc(360 g) 중의 화합물 **A**(207.90 g의 IPAc 중의 48 wt% 용액, 100g의 활성 화합물 **A**)의 용액에 20 내지 25℃에서 EtOH(63 g)를 첨가하였다. 이어서 용액을 EtOH(49.5 g) 중의 농축 HCl(32.9 g)로 약 15분에 걸쳐 처리하

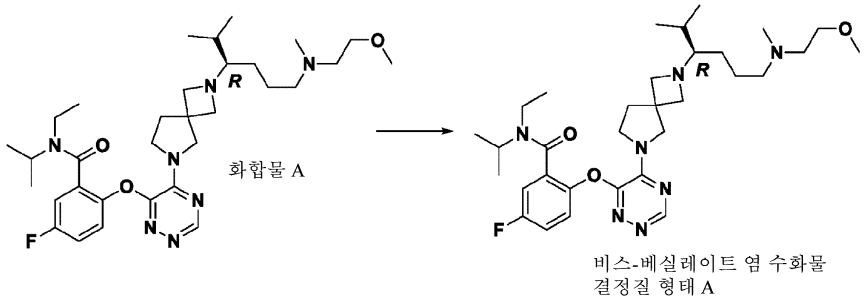
였다. 혼합물을 결정질 화합물 **A1** 시드(2 g, 2% 시드 로딩)로 시딩하고 이어서 18시간 동안 에이징하였다. IPAc(870 g)를 천천히 4시간에 걸쳐 20 내지 25℃에서 첨가하고 슬러리를 추가 18시간 동안 교반하였다. 약 5℃로 냉각시킨 후, 생성물을 여과하고, IPAc(522 g)로 세척하고 진공 하에 20 내지 30℃에서 건조하여 약한 결정질 화합물 **A1**을 백색 고체로서 수득하였다(91.0% 수율, 115.4 g). (주: 반응에 사용되는 소량의 시드 물질은 소규모에서 유사한 반응 프로토콜을 통해 수득되었다.)

[0266] 재결정화: 약한 결정질 화합물 **A1**(100 g), EtOH(166 g), 정제된 물(21.5 g) 및 IPAc(178 g)의 용액을 20 내지 30℃에서 0.5 내지 2시간 동안 교반하여 투명 용액을 수득하였다. 여분의 IPAc(522 g)를 1 내지 2시간에 걸쳐 적가하고, 이어서 혼합물을 결정질 화합물 **A1** 시드(2 g, 2% 시드 로딩)로 시딩하였다. 이어서 혼합물을 18 내지 20시간 동안 에이징하고, IPAc(348 g)를 12시간에 걸쳐 20 내지 30℃에서 천천히 교반하고, 슬러리를 추가 55 내지 60시간 동안 교반하였다. 생성물을 여과하고, IPAc(158 g)로 세척하고 진공 중에 20 내지 30℃에서 건조하여 화합물 **A1**을 백색 고체로서 수득하였다(85% 수율, 85.0 g, net).

[0267] **^{1}HNMR (DMSO-d_6, 400 MHz):** δ = 11.60 (1H, brs), 10.8 (1H, brs), 8.52 (1H, s), 7.36 (3H, m), 3.97-4.20 (7H, m), 3.64-3.71 (4H, m), 3.47 (7H, m), 3.25 (2H, m), 3.05 (3H, m), 2.73 (3H, s), 2.10-2.45 (1H, m), 1.99 (1H, m), 1.78 (2H, m), 1.55 (2H, m), 0.83-1.12 (12H, m), 0.70 (2H, m).

[0268] **LCMS (방법 7):** R_t = 0.669 min, m/z 실측치 600.5 $[M+H]^+$.

[0269] **실시예 6 – (*R*)-*N*-에틸-5-플루오로-*N*-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 수화물의 결정질 형태 A(화합물 A4)의 합성(당량 물은 결정되지 않음)**



화합물 A4

[0270]

[0271] 43.06 g 벤젠설폰산(유리 염기 화합물 A에 대한 2 당량)을 840 ml의 아세톤/물 95/5 v/v 혼합물에 첨가하고 용해시켰다. IPAc 중의 192.8 g의 화합물 A의 용액(80g API를 함유함)을 첨가하였다. 물질을 용해시켜, 투명한 용액을 생성하였다. 추가로 80 ml의 IPAc를 첨가하고, 온도를 25℃로 조정하였다. 2%의 시드를 첨가하고 혼합물을 25℃에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서, 28.8 V(2312 ml)의 IPAc를 8시간의 기간에 걸쳐 첨가하였다. 이후, 현탁액을 25℃에서 18시간 동안 교반하였다. 현탁액을 여과하고, 아세톤/물/IPAc 23.75/1.75/75 v/v/v의 혼합물 320 ml로 세척하였다. 122.91 g의 결정질 형태 A 비스-베실레이트 수화물(당량 물은 결정되지 않음)을 얻었다.

[0272] 당업자는 상기 반응에 사용되는 소량의 초기 시드 물질이 시드 첨가 없이 소규모 상에서 유사한 반응 프로토콜을 통해 수득될 수 있고 자발적인 핵형성을 기다릴 수 있음을 이해할 것이다.

[0273] 염 스크리닝 실험 동안 베실레이트 염의 초기 시드를 또한 수득하였다. 이들 실험에서, 100 mg의 유리 염기를 2 mL 바이알에 칭량하고, 이어서 200 μL의 에틸 아세테이트 또는 아세톤을 첨가하여 유리 염기를 용해시켰다. 1 당량 반대 이온(벤젠설폰산)을 샘플에 첨가하고, 샘플을 25℃에서 3일 동안 교반하였다. 수득된 현탁액을 원심분리하고 초기 시드를 수득하였다.

[0274] 적절한 양의 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 수화물의 결정질 형태 A를 중수소화 DMSO에 용해시키고 1D ^{1}H NMR 스펙트럼을 기록하였다.

[0275] Bruker 5 mm PA BBO 600S3 BB-H-D-05 Z-GRD 고해상도 프로브 및 실행 TOPSPIN 4.0 소프트웨어가 장착된 Bruker

AVANCE NEO-600 ㎒ NMR 분광기를 사용하여 중수소화 DMSO 중의 샘플 상에서 300 K에서 1차원 양성자 실험을 수집하였다.

[0276] ^{1}H NMR (600 ㎒, DMSO-d_6) δ ppm 0.69 (br s, 2 H) 0.82 - 0.98 (m, 9 H) 1.07 (br s, 4 H) 1.31 - 1.46 (m, 1 H) 1.51 (br d, *J*=2.91 ㎐, 1 H) 1.69 (br d, *J*=3.45 ㎐, 2 H) 1.98 (br s, 1 H) 2.06 - 2.45 (m, 2 H) 2.77 (br s, 3 H) 2.87 - 3.19 (m, 3 H) 3.24 (br s, 1 H) 3.31 (s, 6 H) 3.64 (br s, 4 H) 3.71 - 4.59 (m, 7 H) 7.24 - 7.54 (m, 9 H) 7.61 (br d, *J*=7.27 ㎐, 4 H) 8.45 - 8.60 (m, 1 H) 9.24 (br s, 1 H) 9.44 - 9.82 (m, 1 H).

[0277] **실시예 7 - (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 수화물의 결정질 형태 A(화합물 A4)의 대안적인 합성(당량 물은 결정되지 않음)**

[0278] 아이소프로판올/물 95/5(24 ml)의 혼합물을 플라스크에 충전하고 40℃로 가열하였다. 벤젠설폰산(4.31 g; 98 %)을 첨가하였다. 이어서, IPAc 중의 화합물 A(8 g의 화합물 A를 함유함)의 용액 19.3 g을 첨가하였다. 다른 16 ml의 IPAc를 첨가하였다. 이어서, 2%의 시드를 첨가하고, 혼합물을 40℃에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서, IPAc를 8시간의 기간에 걸쳐 적가하였다(115.2 ml). 다음으로, 혼합물을 15시간 동안 0℃로 냉각하였다. 현탁액을 여과하고 습윤 케이크를 (IPA/H_2O 95/5)/IPAc 1/6(32 ml)로 세척하였다. 습윤 케이크를 25℃에서 16시간 동안 건조시켜 11.44 g의 결정질 형태 A 비스-베실레이트 수화물을 수득하였다(당량 물은 결정되지 않음)

[0279] 실시예에서, 화합물 A4는 청구항 1에 의해 커버되는 화합물이다. 실시예의 다른 화합물들은 예시적인 목적을 위한 것이다. 일부 중간체(예를 들어, 중간체 234b)는 청구된 중간체이다.

[0280] **상기 실험 파트에 사용된 분석 방법**

[0281] 상기 화합물의 분석 정보를 하기에 기재된 분석 방법을 사용하여 생성하였다.

[0282] **NMR-방법**

[0283] 일부 NMR 실험은 주위 온도(298.6K)에서 Bruker Avance III 400 분광계를 사용하여 내부 중수소 잠금 장치를 사용하고 z 구배를 갖는 BBO 400 ㎒ S1 5mm 프로브 헤드가 장착되어 있으며 양성자의 경우 400 ㎒, 탄소의 경우 100 ㎒에서 작동하여 수행되었다. 화학적 이동(δ)을 백만분율(ppm)로 보고하였다. J 값은 Hz로 표현된다.

[0284] 일부 NMR 실험은 주위 온도(298.6K)에서 Varian 400-MR 분광계를 사용하여 내부 중수소 잠금 장치를 사용하고 z 구배를 갖는 Varian 400 4NUC PFG 프로브 헤드가 장착되어 있으며 양성자의 경우 400 ㎒, 탄소의 경우 100 ㎒에서 작동하여 수행되었다. 화학적 이동(δ)을 백만분율(ppm)로 보고하였다. J 값은 Hz로 표현된다.

[0285] 일부 NMR 실험은 주위 온도(298.6K)에서 Varian 400-VNMRS 분광계를 사용하여 내부 중수소 잠금 장치를 사용하고 z 구배를 갖는 Varian 400 ASW PFG 프로브 헤드가 장착되어 있으며 양성자의 경우 400 ㎒, 탄소의 경우 100 ㎒에서 작동하여 수행되었다. 화학적 이동(δ)을 백만분율(ppm)로 보고하였다. J 값은 Hz로 표현된다.

[0286] 일부 NMR 실험은 주위 온도(298.6K)에서 Bruker AVANCE III 300 분광계를 사용하여 내부 중수소 잠금 장치를 사용하고 z 구배를 갖는 PA BBO 300S1 BBF-H-D-05 Z 5 mm 프로브 헤드가 장착되어 있으며 양성자의 경우 300 ㎒, 탄소의 경우 75 ㎒에서 작동하여 수행되었다. 화학적 이동(d)을 백만분율(ppm)로 보고하였다. J 값은 Hz로 표현된다.

[0287] **LCMS (액체 크로마토그래피-질량 분석)**

[0288] 일반적 절차

[0289] 각각의 방법에 명시된 바와 같은 컬럼 및 LC 펌프, 다이오드-어레이(DAD) 또는 UV 검출기를 사용하여 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 측정을 수행하였다. 필요하다면, 추가의 검출기가 포함되었다(하기 표 2 참조).

[0290] 컬럼으로부터의 유동을 대기압 이온 공급원으로 구성된 질량 분석계(MS)에 도달되게 하였다. 화합물의 공칭 단일동위원소 분자량(MW)의 확인을 가능하게 하는 이온을 얻기 위하여 조정 파라미터(예를 들어, 주사 범위, 체류 시간...)를 설정하는 것은 당업자의 지식 범위 내에 있다. 적절한 소프트웨어를 사용하여 데이터 획득을 수행하였다.

[0291] 화합물은 그들의 실험 체류 시간(R_t) 및 이온에 의해 기술된다. 데이터의 표에 달리 명시되어 있지 않다면, 보

고된 분자 이온은 $[M+H]^+$(양성자화된 분자) 및/또는 $[M-H]^-$(탈양성자화 분자)에 상응한다. 화합물이 직접 이온화가능하지 않은 경우에는, 부가물의 유형이 명시된다(즉, $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$ 등…). 다수의 동위원소 패턴을 갖는 분자(Br, Cl)의 경우, 보고된 값은 최저 동위원소 질량에 대해 얻어진 값이다. 모든 결과는 사용된 방법과 일반적으로 관련된 실험 불확실성을 수반하면서 획득되었다.

[0292] 이하, "SQD"는 단일 사중극자 검출기를 의미하고, "RT"는 실온을 의미하고, "BEH"는 가교된 에틸실록산/실리카 하이브리드를 의미하고, "HSS"는 고강도 실리카를 의미하고, "DAD"는 다이오드 어레이 검출기를 의미한다.

[0293] [표 2]

LCMS 방법 코드(유량은 mL/분 단위로; 컬럼 온도(T)는 ℃ 단위로; 전개 시간은 분 단위로 표현됨)

방법 코드	기기	컬럼	이동상	구배	유량 ---- 컬럼 T	전개 시간
1	Agilent	Waters XBridge C18 (2.0×50 mm, 5 uM)	이동상 A: 0.04 % TFA 를 함유하는 H_2O; 이동상 B: 0.02 % TFA 를 함유하는 ACN	100%A 를 1 분 동안 유지하였다. 100% A 에서 40% A 로의 구배가 4 분 안에 적용되고, 2.5 분 안에 40% A 를 15% A 로 낮춘다. 그리고 이어서 2 분 안에 100% A 로 복귀시키고 0.5 분 동안 유지하였다. 포스트 타임은 0.5 분이다.	0.8 ---- 50	10
2	Agilent	Waters XBridge C18 (2.0×50 mm, 5 um)	이동상 A: 0.04 % TFA 를 함유하는 H_2O; 이동상 B: 0.02 % TFA 를 함유하는 ACN	먼저, 90% A 를 0.8 분 동안 유지하였다. 이어서 구배가 3.7 분 안에 20% A 및 80% B 로 적용되고, 3 분 동안 유지되었다. 그리고 이어서 2 분 안에 90% A 로 복귀시키고 0.5 분 동안 유지하였다. 포스트 타임은 0.5 분이다.	0.8 ---- 50	10
7	MS6120 를 갖는 Agilent LC 1260	XBridge C18, 4.6 ×150 mm, 3.5 µm	이동상 A H_2O 중의 0.05% TFA 이동상 B ACN 중의 0.05 % TFA	시간(분) A% B% 초기 95 5 11.0 65 35 13.0 5 95 15.0 5 95 16.0 95 5 20.0 95 5	1.5 ---- 45	20

[0294]

[0295] **분석용 SFC**

[0296] SFC 방법에 대한 일반적인 절차

[0297] SFC 측정은 이산화탄소(CO_2) 및 개질제를 전달하기 위한 바이너리 펌프, 오토샘플러, 컬럼 오븐, 최대 400 bar를 견디는 고압 유동 셀이 장착된 다이오드 어레이 검출기로 구성된 분석용 초임계 유체 크로마토그래피(SFC) 시스템을 사용하여 수행하였다. 분석적 SFC 세부 사항은 하기 표 3에 제공된다. 질량 분석계(MS)가 구비되어 있으면, 컬럼으로부터의 유동을 (MS)에 도달되게 하였다. 화합물의 공칭 단일동위원소 분자량(MW)의 확인을 가능하게 하는 이온을 얻기 위하여 조정 파라미터(예를 들어, 주사 범위, 체류 시간...)를 설정하는 것은 당업자의 지식 범위 내에 있다. 적절한 소프트웨어를 사용하여 데이터 획득을 수행하였다.

[0298] [표 3]

분석적 SFC 방법(유량은 mL/분으로; 컬럼 온도(T)는 ℃ 단위로; 전개 시간은 분 단위로, 배압(BPR)은 bar 또는 제곱인치당 파운드-포스(psi)로 표현됨). "ACN"은 아세토니트릴을 의미하고; "MeOH"는 메탄올을 의미하고; "EtOH"는 에탄올을 의미하고; "DEA"는 다이에틸아민을 의미한다. 표에 사용된 모든 기타 약어는 전술한 바와 같다.

방법 코드	컬럼	이동상	구배	유량 컬럼 온도	전개 시간 BPR
11	PDA 를 갖는 Waters UPCC (Chiralpak IG-3 100×4.6 mm I.D., 3 um)	A: 초임계 CO_2 B: EtOH (0.05% DEA)	4 분 안에 5%에서 40%의 B 로, 2.5 분 동안 40%를 유지하고, 이어서 1.5 분 동안 5%의 B.	2.8 35	8 1500 psi.

[0299]

[0300] **결정질 형태 중간체 234b**

[0301] 결정질 형태 중간체 234b는 X-선 분말 회절 패턴에 의해 특성화될 수 있다.

[0302] PANalytical Aeris 회절계에서 X-선 분말 회절(XRPD) 분석을 수행하였다. 이 기기에는 입사 빔과 회절 빔에 대

해 각각 iCore 및 dCore 조정 가능 광학 장치를 사용하는 Cu-Kα X선 튜브가 장착되어 있다. 백 로딩 기술을 사용하여 화합물을 16mm 샘플 홀더의 공동에 로딩하였다.

[0303] 하기 방법을 사용하여 샘플을 XRPD에 실행하였다:

[0304] 튜브: Cu: K-알파 (λ=1.541874 Å)

[0305] 발전기: 전압: 45 kV; 전류: 15 mA

[0306] 기하학적 구조: 브래그-브렌타노

[0307] 스캔 모드: 연속 스캔

[0308] 스캔 범위: 4 내지 50도

[0309] 스텝 크기: 0.0217도

[0310] 카운팅 시간: 58초

[0311] 스피너 회전 시간: 1초

[0312] 입사 빔 경로(iCore)

[0313] 발산 슬릿: 1/4°

[0314] 솔러 슬릿: 0.04 rad

[0315] 마스크 1: 9 mm

[0316] 회절 빔 경로(dCore)

[0317] 산란 방지 슬릿: 9 mm

[0318] 조사 길이: 10 mm

[0319] 솔러 슬릿: 0.04 rad

[0320] 검출기: PIXcel3D- Medipix3 1×1

[0321] 당업자는 회절 패턴 및 피크 위치가 사용된 회절계에 통상 실질적으로 독립적이고 특정 보정 방법이 이용되는지 여부에 대해 인식할 것이다. 전형적으로, 피크 위치는 약 ± 0.2° 2세타 이하 만큼 상이할 수 있다. 각각의 특정 회절 피크의 강도 (및 상대 강도)는 또한 입자 크기, 배향, 샘플 순도 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 인자에 따라서 변할 수 있다.

[0322] X-선 분말 회절 패턴은 5.82, 10.09 및 18.42도 2세타 ± 0.2도 2세타에서의 피크를 포함한다.

[0323] X-선 분말 회절 패턴은 5.82, 8.52, 9.20, 10.09, 11.43, 13.61, 14.94, 15.89, 17.03 및 18.42도 2세타 ± 0.2도 2세타에서의 피크를 포함한다.

[0324] 중간체 234b는 추가로 이러한 피크들로부터 선택된 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 그 이상의 피크를 갖는 X-선 분말 회절 패턴으로 특징화할 수 있다.

[0325] 중간체 234b는 추가로 실질적으로 도 4에 도시된 바와 같은 X-선 분말 회절 패턴으로 특징화할 수 있다.

[0326] **결정질 형태 A**

[0327] (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 수화물의 결정질 형태 A를 X-선 분말 회절 패턴으로 특징화할 수 있다.

[0328] PANalytical Empyrean 회절계에서 X선 분말 회절(XRPD) 분석을 수행했다. 이 기기에는 입사 빔과 회절 빔에 대해 각각 iCore 및 dCore 조정 가능 광학 장치를 사용하는 Cu-Kα X선 튜브가 장착되어 있다. 백 로딩 기술을 사용하여 화합물을 16mm 샘플 홀더의 공동에 로딩하였다.

[0329] 하기 방법을 사용하여 샘플을 XRPD에 실행하였다:

[0330] 튜브: Cu: K-알파 (λ=1.541874 Å)

[0331] 발전기: 전압: 45 kV; 전류: 40 mA

[0332] 기하학적 구조: 브래그-브렌타노

[0333] 스캔 모드: 연속 스캔

[0334] 스캔 범위: 3 내지 35 도

[0335] 스텝 크기: 0.0131 도

[0336] 카운팅 시간: 30초

[0337] 스피너 회전 시간: 1초

[0338] 입사 빔 경로(iCore)

[0339] 프로그램 발산 슬릿(divergence slit): 자동

[0340] 조사 길이: 10 mm

[0341] 솔러 슬릿: 0.03 rad

[0342] 마스크 1: 14 mm

[0343] 마스크 2: 6 mm

[0344] 폭: 7.7 mm

[0345] 회절 빔 경로(dCore)

[0346] 산란 방지 슬릿: 자동

[0347] 조사 길이: 10 mm

[0348] 솔러 슬릿: 0.04 rad

[0349] 검출기: PIXcel3D- Medipix3 1×1

[0350] 당업자는 회절 패턴 및 피크 위치가 사용된 회절계에 통상 실질적으로 독립적이고 특정 보정 방법이 이용되는지 여부에 대해 인식할 것이다. 전형적으로, 피크 위치는 약 ± 0.2° 2세타 이하 만큼 상이할 수 있다. 각각의 특정 회절 피크의 강도 (및 상대 강도)는 또한 입자 크기, 배향, 샘플 순도 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 인자에 따라서 변할 수 있다.

[0351] X-선 분말 회절 패턴은 5.4, 7.2, 11.1, 11.9 및 21.7도 2세타 ± 0.2도 2세타에서의 피크를 포함한다. X-선 분말 회절 패턴은 13.7, 14.5, 14.7, 15.0, 16.5, 17.8, 19.0, 19.4, 20.1도 2세타 ± 0.2도 2세타로부터 선택된 하나 이상의 피크를 추가로 포함할 수 있다.

[0352] 형태 A는 추가로 표 4에 특정된 이들 피크들로부터 선택된 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 그 이상의 피크를 갖는 X-선 분말 회절 패턴으로 특징화할 수 있다.

[0353] 형태 A는 추가로 표 4에 특정된 이들 피크를 포함하는 X-선 분말 회절 패턴으로 특징화할 수 있으며, 여기서 피크의 상대 강도는 약 2% 초과, 바람직하게는 약 5% 초과, 더욱 바람직하게는 약 10% 초과, 더욱 바람직하게는 약 15% 초과이다. 그러나, 당업자는 피크의 상대 강도가 상이한 샘플과 동일 샘플에 대한 상이한 측정과의 사이에서 변할 수 있다는 것을 인식할 것이다.

[0354] 형태 A는 추가로 실질적으로 도 1에 도시된 바와 같은 X-선 분말 회절 패턴으로 특징화할 수 있다.

[0355] 표 4는 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 수화물의 결정질 형태 A의 XRPD에 대한 피크 목록 및 상대 강도를 제공한다(도 1).

[0356] [표 4]

위치 [° 2 세타]	상대 강도 [%]
5.3965	16.30
7.1906	23.69
9.2513	8.14
9.4433	7.39
11.0719	11.34
11.9144	73.29
12.3921	29.17
12.5717	22.93
12.8791	8.93
13.6790	26.58
13.8694	15.67
14.4793	38.19
14.7398	55.26
14.9599	56.99
15.8715	20.66
16.4606	22.37
17.0459	20.43
17.4421	34.59
17.8203	46.78
18.2871	30.73
18.9573	43.91
19.4485	41.00
20.1190	35.53
20.7356	18.05
21.0535	30.09
21.6801	100.00
22.0236	18.06
22.7925	29.92
23.5044	41.92
23.9959	43.96
24.5555	31.47
25.1401	25.01
25.7588	59.24
26.0910	53.05
26.6137	39.47
27.5409	24.89
28.5493	22.44
29.1699	13.97
30.1441	21.01
31.2560	14.66
31.8783	16.47
32.7054	17.11
33.2797	24.40
33.9762	15.63

[0357]

[0358] 약리학

[0359] 본 발명의 화합물은 메닌과 MLL 단백질 및 발암성 MLL 융합 단백질의 상호작용을 차단하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물 및 이러한 화합물을 포함하는 약제학적 조성물은 백혈병, 골수이형성 증후군(MDS) 및 골수증식성 신생물(MPN)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 암; 및 당뇨병과 같은 질환의 치료 또는 예방, 특히 치료에 유용할 수 있다.

[0360] 특히, 본 발명에 따른 화합물 및 이의 약제학적 조성물은 암의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다. 일 실시형태에 따르면, 본 발명의 메닌/MLL 억제제로의 치료로부터 이익을 얻을 수 있는 암은 백혈병, 림프종, 골수종 또는 고형 종양 암(예: 전립선암, 폐암, 유방암, 췌장암, 결장암, 간암, 흑색종 및 교모세포종 등)을 포함한다. 일부 실시형태에 따르면, 백혈병은 급성 백혈병, 만성 백혈병, 골수성 백혈병, 골수구성 백혈병, 림프모구성 백혈병, 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 골수성 백혈병(CML), 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), T 세포 전림프구성 백혈병(T-PLL), 거대 과립 림프구성 백혈병, 털세포 백혈병(HCL), MLL 재배열 백혈병, MLL-PTD 백혈병, MLL 증폭 백혈병, MLL 양성 백혈병 또는 *HOX/MEIS1* 유전자 발현 시그니처를 나타내는 백혈병을 포함한다.

[0361] 특히, 본 발명에 따른 화합물 및 이의 약제학적 조성물은 골수이형성 증후군(MDS) 또는 골수증식성 신생물(MPN)의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다.

[0362] 특히, 본 발명에 따른 화합물 및 그의 약제학적 조성물은 백혈병, 특히 뉴클레포스민(NPM1)-돌연변이 백혈병, 예를 들어 NPM1c의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다.

[0363] 특히, 본 발명에 따른 화합물 및 이의 약제학적 조성물은 AML, 특히 뉴클레포스민(NPM1)-돌연변이 AML(예를 들어, $NPM1^{mut}$ AML), 더욱 특히 추상적인 NPM1-돌연변이 AML의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다.

[0364] 특히, 본 발명에 따른 화합물 및 그의 약제학적 조성물은 MLL 재배열 백혈병, 특히 MLL 재배열 AML 또는 ALL의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다.

[0365] 특히, 본 발명에 따른 화합물 및 이의 약제학적 조성물은 MLL 유전자 변경이 있는 백혈병, 특히 MLL 유전자 변경이 있는 AML 또는 ALL의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다.

[0366] 특히, 본 발명에 따른 화합물 및 이의 약제학적 조성물은 Q.D. 투약(1일 1회)에 적합할 수 있다.

[0367] 특히, 본 발명에 따른 화합물 및 이의 약제학적 조성물은 NPM1 유전자 돌연변이 및/또는 혼합 계통 백혈병 유전자(*MLL*; *MLL1*; *KMT2A*) 변경, 혼합 계통 백혈병(MLL), MLL 관련 백혈병, MLL 연관 백혈병, MLL 양성 백혈병, MLL 유발 백혈병, 재배열 혼합 계통 백혈병, MLL 재배열/변형 또는 MLL 유전자의 재배열/변형과 연관된 백혈병, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 골수이형성 증후군(MDS), 골수증식성 신생물(MPN), 인슐린 저항성, 당뇨병 전증, 당뇨병 또는 당뇨병 위험, 고혈당증, 염색체 11q23의 염색체 재배열, 1형 당뇨병, 2형 당뇨병을 나타내는 대상체에서 혈액암의 치료 또는 예방; 췌장 세포의 증식 촉진(여기서 췌장 세포는 섬 세포, 베타 세포이고, 베타 세포 증식은 베타 세포 생산 또는 인슐린 생산의 증가로 입증됨); 및 인간에서 MLL 융합 단백질 표적 유전자가 HOX 또는 MEIS1인 메닌-MLL 상호작용을 억제하는 데 유용할 수 있다.

[0368] 따라서, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한 본 발명의 화합물에 관한 것이다.

[0369] 본 발명은 또한 약제의 제조를 위한, 본 발명의 화합물의 용도에 관한 것이다.

[0370] 본 발명은 또한 인간을 포함한 포유동물에서 MLL 단백질 및 발암성 MLL 융합 단백질과 메닌의 상호작용과 연관된 장애의 치료, 예방, 개선, 제어 또는 위험 감소에 사용하기 위한 본 발명에 따른 화합물 또는 본 발명에 따른 약제학적 조성물에 관한 것으로, 이의 치료 또는 예방은 메닌과 MLL 단백질 및 발암성 MLL 융합 단백질의 상호작용, MLL 단백질 및 발암성 MLL 융합 단백질과 메닌의 상호작용을 차단함으로써 영향을 받거나 촉진된다.

[0371] 또한, 본 발명은 인간을 포함하는 포유동물에서 MLL 단백질 및 발암성 MLL 융합 단백질과 메닌의 상호작용과 관련된 장애의 위험을 치료, 예방, 개선, 제어 또는 감소시키기 위한 약제의 제조를 위한, 본 발명에 따른 화합물의 용도에 관한 것으로, 이의 치료 또는 예방은 MLL 단백질 및 발암성 MLL 융합 단백질과 메닌의 상호작용을 차단함으로써 영향을 받거나 촉진된다.

[0372] 본 발명은 또한 전술한 질환 중 어느 하나의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본 발명에 따른 화합물에 관한 것이다.

[0373] 본 발명은 또한 전술한 질환 중 어느 하나를 치료 또는 예방하는 데 사용하기 위한, 본 발명에 따른 화합물에 관한 것이다.

[0374] 본 발명은 또한 전술한 질환 병태 중 어느 하나의 치료 또는 예방을 위한 약제의 제조를 위한, 본 발명에 따른 화합물의 용도에 관한 것이다.

[0375] 본 발명의 화합물은 전술한 질환 중 어느 하나의 치료 또는 예방을 위해 포유동물, 바람직하게는 인간에 투여될 수 있다.

[0376] 본 발명에 따른 화합물의 유용성을 고려하여, 전술한 질환 중 어느 하나를 앓고 있는, 인간을 포함하는 온혈 동물을 치료하는 방법이 제공된다.

[0377] 상기 방법은, 본 발명에 따른 화합물의 치료적 유효량의, 인간을 포함하는 온혈 동물에 대한 투여, 즉 전신 또는 국소 투여를 포함한다.

[0378] 따라서, 본 발명은 또한 본 발명에 따른 화합물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 전술한 질환 중 어느 하나의 치료 또는 예방을 위한 방법에 관한 것이다.

[0379] 본 발명의 화합물의 치료적 유효량은 치료 활성을 갖기에 충분한 양이며, 이러한 양은 특히 질환의 유형, 치료제 제형 내의 화합물의 농도, 및 환자의 병태에 따라 변동된다는 것을 당업자는 인식할 것이다. 1일 치료적 유효량은 약 0.005 mg/kg 내지 100 mg/kg일 수 있다. 치료 효과를 달성하기 위해 필요한, 본 명세서에서 활성 성분으로도 지칭되는 본 발명에 따른 화합물의 양은, 예를 들어 특정 화합물, 투여 경로, 수용자의 연령 및 병태, 및 치료되는 특정 장애 또는 질환에 따라 사례별로 변동될 수 있다. 치료 방법은 또한, 1일 1 내지 4회 섭취의

투여계획으로 활성 성분을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 이러한 치료 방법에서, 본 발명에 따른 화합물은 바람직하게는 투여 전에 제형화된다.

[0380] 본 발명은 또한 본 명세서에 언급된 장애를 예방 또는 치료하기 위한 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 치료적 유효량의 본 발명에 따른 화합물, 및 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함한다.

[0381] 활성 성분은 단독으로 투여하는 것이 가능할 수 있지만, 약제학적 조성물로서 존재하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명은 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 함께, 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 추가로 제공한다. 담체 또는 희석제는 조성물의 다른 성분들과 상용성이고 이의 수용자에게 유해하지 않다는 의미에서 "허용가능"해야 한다.

[0382] 약제학적 조성물은 약학 분야에 잘 알려진 임의의 방법에 의해, 예를 들어, 문헌[Gennaro et al. Remington's Pharmaceutical Sciences (18^{th} ed., Mack Publishing Company, 1990, 특히 Part 8 : Pharmaceutical preparations and their Manufacture 참조)]에 기재된 것들과 같은 방법을 사용하여 제조할 수 있다.

[0383] 본 발명의 화합물은 단독으로 또는 하나 이상의 추가의 치료제와 조합하여 투여될 수 있다. 조합 요법은 본 발명에 따른 화합물 및 하나 이상의 추가의 치료제를 함유하는 단일 약제학적 투여 제형의 투여뿐만 아니라, 본 발명에 따른 화합물 및 각각의 추가의 치료제를 그 자체의 별도의 약제학적 투여 제형으로 투여하는 것을 포함한다.

[0384] 따라서, 본 발명의 일 실시형태는 암을 앓고 있는 환자의 치료에서 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 사용하기 위한 조합 제제로서, 제1 활성 성분으로서의 본 발명에 따른 화합물 및 추가의 활성 성분으로서의 하나 이상의 항암제를 포함하는 생성물에 관한 것이다.

[0385] 하나 이상의 다른 약학 제제 및 본 발명에 따른 화합물은 동시에(예를 들어 별도의 조성물 또는 통합된 조성물로) 또는 어느 순서로든 순차적으로 투여될 수 있다. 후자의 경우, 2종 이상의 화합물은 유리하거나 상승적인 효과가 달성됨을 보장하기에 충분한 기간 내에 양 및 방식으로 투여될 것이다. 조합의 각각의 성분에 대한 바람직한 투여의 방법 및 순서 및 각각의 투여량 및 투여계획은, 투여되는 특정한 다른 약학 제제 및 본 발명의 화합물, 이들의 투여 경로, 치료되는 특정 병태, 특히 종양, 및 치료되는 특정 숙주에 의존할 것임이 이해될 것이다.

[0386] **약리학적 연구**

[0387] 약리학적 연구에서는 이하 하기 화합물이 기술된다: 화합물 A: (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)-벤즈아미드;

[0388] 화합물 A1: (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)-벤즈아미드 .2 HCl .x H_2O (x = 2-3);

[0389] 화합물 A3: (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)-벤즈아미드 옥살레이트 염.

[0390] 화합물 A4: (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 수화물의 결정질 형태 A.

[0391] 이들 약리학적 연구 결과는 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)-벤즈아미드의 생물학적 활성을 명백히 보여준다.

[0392] *1) 메닌/MLL 균질 시간 분해 형광(HTRF) 분석*

[0393] 처리되지 않은 백색 384웰 미세역가 플레이트에 DMSO 중의 200X 시험 화합물 40 nL 및 분석 완충액(40 mM Tris·HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 1mM DTT(다이티오트레이톨) 및 0.05% Pluronic F-127) 중의 2X 테르븀 킬레이트

표지 메닌(제조 방법은 아래 참조) 4 μL를 첨가하였다. 주위 온도에서 30분 동안 시험 화합물과 테르븀 킬레이트 표지 메닌을 인큐베이션한 후, 분석 완충액 중 4 μL 2X FITC-MBM1 펩티드(FITC-β-알라닌-SARWRFPARPGT-NH_2)("FITC"는 플루오레세인 아이소티오시아네이트를 의미함)를 첨가하고, 미세역가 플레이트를 1000 rpm에서 1분 동안 원심분리하고 분석 혼합물을 주위 온도에서 15분 동안 인큐베이션했다. 분석 혼합물에 존재하는 메닌·FITC-MBM1 착물의 상대적 양은 주위 온도에서 EnVision 마이크로플레이트 판독기(ex. 337 nm/테르븀 em. 490 nm/FITC em. 520 nm)를 사용하여 테르븀/FITC 공여자/수용체 형광단 쌍의 균질 시간 분해 형광(HTRF)을 측정하여 결정된다. 형광 공명 에너지 전달 정도(HTRF 값)는 FITC와 테르븀 형광단의 형광 방출 강도(F^{em} 520 nm/F^{em} 490 nm)의 비로 표현된다. 결합 분석에서 시약의 최종 농도는 분석 완충액 중 200 pM 테르븀 킬레이트 표지 메닌, 75 nM FITC-MBM1 펩티드 및 0.5% DMSO이다. 시험 화합물의 용량-반응 적정은 일반적으로 10 μM에서 시작하는 11점, 4배 연속 희석 방식을 사용하여 수행된다.

[0394] 식 1에 따라 각 화합물 농도에서 억제율(%)을 먼저 계산하여 화합물 효능을 결정했다.

[0395] [식 1]

[0396] %억제 = ((HC - LC) - ($HTRF^{compound}$ - LC)) / (HC - LC)) *100

[0397] 여기서 LC 및 HC는 메닌 결합에 대해 FITC-MBM1과 경쟁하는 포화 농도의 화합물의 존재 또는 부재 하에 분석의 HTRF 값이고, $HTRF^{compound}$는 시험 화합물의 존재 하에 측정된 HTRF 값이다. HC 및 LC HTRF 값은 플레이트당 평균 10개 이상의 복제물을 나타낸다. 각각의 시험 화합물에 대해, %억제 값을 시험 화합물 농도의 대수에 대해 플롯팅하고, IC_{50} 값은 이들 데이터를 식 2에 피팅하는 것으로부터 유도되었다:

[0398] [식 2]

[0399] %억제 = Bottom + (Top-Bottom)/(1+10^((logIC_{50}-log[cmpd])*h))

[0400] 여기서 Bottom 및 Top은 각각 용량-반응 곡선의 하한 및 상한 점근선이고, IC_{50}은 신호를 50% 억제하는 화합물의 농도이고 h는 힐 계수이다.

[0401] 메닌의 테르븀 크립테이트 라벨링의 제조: 메닌(a.a 1-610-6xhis 태그, 20 mM Hepes(2-[4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라지닐]에탄 설폰산) 중 2.3 mg/mL, 80 mM NaCl, 5mM DTT(다이티오트레이톨), pH 7.5)를 테르븀 크립테이트로 다음과 같이 표지했다. 메닌 200 μg을 1 x Hepes 완충액으로 완충액 교환하였다. 6.67 μM 메틴을 8배 몰 과량의 NHS(N-하이드록시석신이미드)-테르븀 크립테이트와 함께 실온에서 40분 동안 인큐베이션하였다. 용리 완충액(0.1M Hepes, pH 7 + 0.1% BSA(소 혈청 알부민))을 사용하여 NAP5 컬럼에서 반응을 진행하여 표지된 단백질의 절반을 무 표지로부터 정제하였다. 나머지 절반은 0.1M 인산염 완충 식염수(PBS), pH7로 용리하였다. 400 μl의 용리액을 각각에 대해 수집하고, 분취하고 -80℃에서 냉동시켰다. 테르븀-표지된 메닌 단백질의 최종 농도는 Hepes 완충액 중 115 μg/mL 및 PBS 완충액 중 85 μg/mL였다.

[0402] *메닌 단백질 서열 (서열번호 1):*

[0403] MGLKAAQKTLFPLRSIDDVVRLFAAELGREEPDLVLLSLVLGFVEHFLAVNRVIPTNVPELTFQPSPAPDPPGGLTYFPVADLSIIAALYARFTAQIRGAVD
LSLYPREGGVSSRELVKKVSDVIWNSLSRSYFKDRAHIQSLFSFITGTKLDSSGVAFAVVGACQALGLRDVHLALSEDHAWVVFGPNGEQTAEVTWHGKGNE
DRRGQTVNAGVAERSWLYLKGSYMRCDRKMEVAFMVCAINPSIDLHTDSLELLQLQQKLLWLLYDLGHLERYPMALGNLADLEELEPTPGRPDPLTLYHKGI
ASAKTYYRDEHIYPYMYLAGYHCRNRNVREALQAWADTATVIQDYNYCREDEEIYKEFFEVANDVIPNLLKEAASLLEAGEERPGEQSQGTQSQGSALQDPE
CFAHLLRFYDGICKWEEGSPTPVLHVGWATFLVQSLGRFEGQVRQKVRIVSREAEAAEAEEPWGEEAREGRRRGPRRESKPEEPPPPKKPALDKGLGTGQGA
VSGPPRKPPGTVAGTARGPEGGSTAQVPAPAASPPPEGPVLTFQSEKMKGMKELLVATKINSSAIKLQLTAQSQVQMKKQKVSTPSDYTLSFLKRQRKGLHH
HHHH

[0404] *2a)증식 분석*

[0405] 메닌/MLL 단백질/단백질 상호작용 억제제 시험 화합물의 항증식 효과를 인간 백혈병 세포주에서 평가했다. 세포주 MOLM-14는 MLL 전좌를 보유하고 있으며 각각 MLL 융합 단백질 MLL-AF9와 제2 대립유전자의 야생형 단백질을 발현한다. NPM1c 유전자 돌연변이를 보유하는 OCI-AML3 세포를 또한 시험하였다. MLL 재배열 세포주(예: MOLM-14) 및 NPM1c 돌연변이 세포주는 줄기 세포 유사 HOXA/MEIS1 유전자 발현 시그니처를 나타낸다. 일반적인 세포독성 효과를 나타내는 화합물을 배제하기 위해 KO-52를 2개의 *MLL(KMT2A)* 야생형 대립유전자를 포함하는 대

조 세포주로 사용했다.

[0406] MOLM-14 세포를 10% 열 불활성화 소 태아 혈청(HyClone), 2 mM L-글루타민(Sigma Aldrich) 및 50 μg/ml 겐타마이신(Gibco)이 보충된 RPMI-1640(Sigma Aldrich)에서 배양했다. KO-52 및 OCI-AML3 세포주는 20% 열 불활성화 소 태아 혈청(HyClone), 2 mM L-글루타민(Sigma Aldrich) 및 50 μg/ml 겐타마이신(Gibco)이 보충된 알파-MEM(Sigma Aldrich)에서 전파되었다. 배양하는 동안 세포는 ml 당 0.3 내지 250만 개의 세포로 유지되었으며 계대 횟수는 20을 초과하지 않았다.

[0407] 항증식 효과를 평가하기 위해 200개의 MOLM-14 세포, 200개의 OCI-AML3 세포 또는 300개의 KO-52 세포를 96웰 둥근 바닥, 초저 부착 플레이트(Costar, Costar, 카탈로그 번호 7007)에 웰당 200μl 배지로 시딩하였다. 실험 전반에 걸쳐 선형 성장을 보장하기 위해 성장 곡선을 기반으로 세포 시딩 수를 선택하였다. 시험 화합물을 다양한 농도로 첨가하고 DMSO 함량을 0.3%로 정규화하였다. 세포를 37℃ 및 5% CO_2에서 8일 동안 인큐베이션하였다. 회전타원체 유사 성장은 8일차에 이미지를 획득하는 라이브 셀 이미징(IncuCyteZOOM, Essenbio, 4x 대물렌즈)을 통해 실시간으로 측정되었다. 회전타원체 크기의 척도인 컨플루언스(%)는 통합 분석 도구를 사용하여 결정되었다.

[0408] 시간 경과에 따른 시험 화합물의 효과를 결정하기 위해 회전타원체 크기의 척도로서 각 웰의 컨플루언스를 계산하였다. 기준 화합물의 최고 용량의 합류점을 LC(낮은 대조군)에 대한 기준선으로 사용하고, DMSO 처리된 세포의 컨플루언스를 0% 세포독성(높은 대조군, HC)으로 사용하였다.

[0409] 절대 IC_{50} 값은 다음과 같이 컨플루언스의 변화율로서 계산되었다:

[0410] LC = 낮은 대조군: 예를 들어 1 μM의 세포독성제 스타우로스포린으로 처리된 세포, 또는 예를 들어 고농도의 대체 기준 화합물로 처리된 세포;

[0411] HC = 높은 대조군: 평균 컨플루언스(%)(DMSO 처리된 세포);

[0412] % 효과 = 100 - (100*(샘플-LC)/(HC-LC)); 및

[0413] GraphPad Prism(version 7.00)을 사용하여 IC_{50}을 산출하였다. 가변 기울기를 갖고 최대값을 100%로, 최소값을 0%로 고정하는 % 효과 대 Log10 화합물 농도의 플롯에 대해 용량-반응 방정식이 사용되었다.

[0414] *2b)MEIS1 mRNA 발현 분석*

[0415] 화합물 처리 시 MEIS1 mRNA 발현을 Quantigene Singleplex 분석(Thermo Fisher Scientific)으로 검사했다. 이 기술을 사용하면 정의된 관심 표적 서열에 혼성화되는 프로브를 사용하여 mRNA 표적을 직접 정량화할 수 있으며 신호는 다중 모드 플레이트 판독기 Envision(PerkinElmer)을 사용하여 검출된다. 이 실험에는 MOLM-14 세포주를 사용하였다. 증가하는 농도의 화합물의 존재 하에 세포를 3,750개 세포/웰로 96웰 플레이트에 플레이팅하였다. 화합물과 함께 48시간 인큐베이션한 후, 세포를 용해 완충액에 용해시키고 55℃에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 세포 용해물을 정규화 대조군으로서 인간 MEIS1 특이적 포획 프로브 또는 인간 RPL28(리보솜 단백질 L28) 특이적 프로브 뿐만 아니라 차단 프로브와 혼합하였다. 이어서 세포 용해물을 커스텀 분석 혼성화 플레이트(Thermo Fisher Scientific)로 옮기고 55℃에서 18 내지 22시간 동안 인큐베이션하였다. 후속적으로, 플레이트를 세척하여 결합되지 않은 물질을 제거한 후 전치증폭기, 증폭기 및 라벨 프로브를 순차적으로 추가했다. 신호(= 유전자 수)는 다중 모드 플레이트 판독기 Envision으로 측정되었다. IC_{50}은 적절한 소프트웨어를 사용하여 용량-반응 모델링을 통해 계산되었다. 모든 비-하우스키퍼 유전자에 대해 반응은 배경 및 상대 발현에 대해 보정된 카운트이다. 각각의 샘플에 대해, 각각의 시험 유전자 신호(배경 차감)를 정규화 유전자 신호로 나누었다(RPL28: 배경 차감됨). 처리된 샘플에 대한 정규화된 값을 DMSO 처리된 샘플에 대한 정규화된 값으로 나눔으로써 배수 변화를 계산하였다. 각각의 표적 유전자의 배수 변화를 IC_{50}의 계산에 사용하였다.

[0416] 그 결과가 하기 표 5에 요약되어 있다.

[0417] [표 5]

생물학적 데이터 – HTRF, 증식 및 MEIS1 mRNA 발현 분석

화합물 번호	HTRF-30 분 인큐베이션 IC_{50} (nM)	MEIS1 IC_{50} (μM)	회전타원체 분석_OneTime MOLM-14 IC_{50} (μM)	OCI-AML3 IC_{50} (μM)	회전타원체 분석_OneTime KO-52 IC_{50} (μM)
A	0.09	0.02	0.021	0.091	6.85
A3	0.098	0.017	0.017	0.12	7.75
A_1	0.18	0.017	0.011	0.08	
A4		0.011	0.008	0.019	5.44

[0418]

[0419] *3) 마우스 PK(생체내 $T_{1/2}$ 및 경구 생체이용률)*

[0420] 생체내 약동학(PK)은 20%(w:vol) HP-β-CD 용액 또는 발열원 제거수에 제형화된 시험 항목의 단일 정맥내(IV, 0.5 또는 1.0 mg/kg을 2.5 ml/kg으로 투여) 또는 경구(PO, 5 mg/kg을 10 ml 용액/kg으로 투여) 투여 후 단식한 수컷 CD-1 마우스(6 내지 8주령)에서 평가했다.

[0421] 혈장 및/또는 전혈 샘플은 EDTA를 항응고제로 사용하여 연속 모세혈관 마이크로샘플링(약 0.03 mL)을 통해 원하는 시점에 등쪽 중족골 정맥에서 수집하였다. 적격 LC-MS/MS 방법을 사용하여 혈장 및 혈액 샘플의 화합물 농도를 분석하였다. WinNonlin(PhoenixTM, 버전 6.1) 또는 유사한 소프트웨어를 사용하여 주요 약동학적 매개변수의 인실리코 분석을 수행했다.

[0422] *4) 인간/마우스 간 마이크로솜의 대사 안정성*

[0423] *실험 절차*

[0424] 본 연구의 목적은 인간 및 마우스 간 마이크로솜 내 시험 화합물(들)의 시험관내 대사 안정성을 측정하고 대사 전환율에 대한 정량적 정보를 제공하는 것이다(즉, 시험의 겉보기 고유 클리어런스 결정).

[0425] 시험 항목은 DMSO 중 10 mM의 스톡 농도로 제조하였다. 대사 회전율 측정을 위해, 시험 화합물 또는 양성 대조군 화합물에 대한 10 mM DMSO 스톡 용액 2 μL를 아세토니트릴 198 μL(최종 농도 100 μM)에 첨가하여 최종 작업 용액을 제조하였다.

[0426] 인큐베이션은 다음과 같이 수행되었다: 먼저 간 마이크로솜을 얼음 위에서 해동하고 pH 7.4의 100 mM PBS(인산염 완충 식염수)에 간 마이크로솜을 포함하는 마스터 용액을 제조하였다. 다음으로, 간 마이크로솜 용액을 인큐베이션 플레이트에 첨가하고 10 mM NADPH(니코틴아미드-아데닌 디뉴클레오티드 인산염)을 첨가했다(MW: 833.4 g/mol; Roche Diagnostics GmbH, Germany. 인산염 완충액(100 mmol/L, pH 7.4)에 용해됨).

[0427] 혼합물을 10초 동안 혼합하고, 인큐베이션 플레이트에서 37℃로 10분 동안 예열하였다. 시험 화합물 또는 양성 대조군 화합물에 대한 100 μM 작업 용액 5 μL를 인큐베이션 플레이트(최종 시험 항목 농도 = 1 μM)에 첨가하여 대사 반응을 시작했다. 반응 최종 혼합물은 pH 7.4의 100 mM PBS에 1 mM NADPH, 0.5 mg/mL 마이크로솜 단백질 및 1 μM 시험 화합물 또는 양성 대조군 화합물을 포함해야 한다. 인큐베이션 혼합물의 유기 용매 비율은 1%이며 DMSO≤0.02%이다.

[0428] 선택된 시점에서 인큐베이션된 혼합물 50 μL를 차가운 메탄올 200 μL가 들어 있는 켄칭 플레이트에 옮겨 반응을 켄칭시켰다. 모든 시점의 샘플링 후 켄칭 플레이트를 4000 rpm에서 40분 동안 원심분리하여 단백질을 침전시켰다. 총 90 μL의 상등액을 분석 플레이트로 옮기고 초순수 H_2O 물을 각 웰에 첨가하여 LC/MS/MS 분석을 수행했다. 모든 인큐베이션 및 분석을 2회 수행하였다.

[0429] *데이터 분석*

[0430] 모든 계산은 마이크로소프트 엑셀을 사용하여 수행하였다. 기울기 값 k는 모 약물의 잔여 백분율 대 인큐베이션 시간 곡선의 자연 로그의 선형 회귀에 의해 결정되었다. 그 결과가 하기 표 6에 요약되어 있다.

[0431] 시험관내 반감기(시험관내 $t_{1/2}$)는 기울기 값으로부터 결정되었다:

[0432] 시험관내 $t_{1/2} = -(0.693 / k)$

[0433] 시험관내 $t_{1/2}$(분 단위)의 시험관내 내재 클리어런스(시험관 내 CL_{int}, μL/min/mg 단백질 단위)로의 전환율은 다음 식을 사용하여 수행되었다:

[0434] $$시험관내\ Cl_{int} = (\frac{0.693}{t_{\frac{1}{2}}}) * (\frac{인큐베이션\ 부피\ (\mu L)}{단백질\ 양\ (mg)})$$

[0435] [표 6]

마우스 PK 및 대사 안정성

실시예 번호	제형화제	생체내 $T_{1/2}$ (IV)(h)	생체이용률 (PO)(%)	인간 LM Clint (μl/min/mg)	마우스 LM Clint (μl/min/mg)
A	HP-β-CD	6.7	17	19	<7.5
A3	발열원 제거수	9.0	34	19	<7.5
11	HP-β-CD	NA	NA	14	<7.5

[0436] "NA"는 분석하지 않았음을 의미한다

[0437] *5) MOLM-14 또는 OCI-AML3 세포의 피하(sc 또는 SC) 이종이식편에서의 약력학(PD) 활동에 대한 프로토콜*

[0438] *시험제 및 대조군*

[0439] 화합물 A3을 20% 하이드록시프로필-베타-사이클로덱스트린(HP-β-CD)에 제형화하고 20 g 동물에 대해 용량 당 총 부피 0.2 mL(10 mL/kg)에 도달되도록 제조했다. 용량은 매일 개인의 체중에 따라 조정되었다. 각 연구에 대해 화합물 A3의 작업 스톡을 주당 1회 준비하고 실온에서 보관했다. 화합물 A3은 매일 경구(PO)로 투여되었다.

[0440] *검정*

[0441] 화합물의 생체내 약력학(PD) 활성은 MOLM-14 세포 또는 OCI-AML3 세포의 피하(SC) 이종이식편에서 평가되었다. MOLM-14 또는 OCI-AML3 종양이 있는 누드 NMRI 마우스(Crl: NMRI-Foxn1nu/-)를 3회 매일 용량의 비히클 또는 화합물로 처리했다. 혈장 샘플은 2일차 투여 후 23시간, 최종 투여 후 0.5시간, 최종 투여 후 16시간에 수집되었으며, 종양 샘플은 최종 투여 후 16시간에 수집되었다. 여러 메닌-MLL 표적 유전자(예: MEIS1, MEF2C, FLT3)의 발현에 대한 화합물의 효과를 조사하기 위해 QuantiGene Plex 기술(Thermo Fisher Scientific)을 사용했다. 동결된 종양을 균질화하고 용해 완충액이 들어 있는 개별 용해 매트릭스 튜브로 옮기고 55℃에서 30분간 인큐베이션했다. 세포 용해물을 표적 특이적 포획 프로브, Luminex 비드 및 차단 프로브와 혼합하고 커스텀 분석 혼성화 플레이트(Thermo Fisher Scientific)로 옮기고 54℃에서 18 내지 22시간 동안 인큐베이션했다. 후속적으로, 플레이트를 자기 분리 플레이트로 옮기고 세척하여 비드에서 결합되지 않은 물질을 제거한 후 전치증폭기, 증폭기 및 라벨 프로브의 순차적 혼성화 및 후속 스트렙타비딘 피코에리트린 결합이 이어졌다. 비드로부터의 신호를 Luminex FlexMap 3차원 기구로 측정하였다. 모든 비-하우스키퍼 유전자에 대해 반응은 배경 및 상대 발현에 대해 보정된 카운트이다. 각각의 샘플에 대해, 각각의 시험 유전자 신호(배경 차감)를 정규화 유전자 신호로 나누었다(RPL19, RPL28, ATP6V1A: 배경 차감됨). 처리된 샘플에 대한 정규화된 값을 DMSO 처리된 샘플에 대한 정규화된 값으로 나눔으로써 배수 변화를 계산하였다. 결과가 하기 표 7 및 표 8에 요약되어 있다.

[0442] [표 7]

MOLM-14 SC 모델로부터 선택된 유전자의 발현 수준(비히클에 대한 %)(평균 값 및 표준 편차)

화합물 A3 (mg/kg)	MEIS1	FLT3	MEF2C
0	101.30 ± 15.06	104.80 ± 10.07	103.50 ± 11.02
3	83.49 ± 25.48	78.67 ± 20.74	85.50 ± 22.77
10	62.84 ± 4.06	74.91 ± 8.97	68.04 ± 14.43
30	23.16 ± 2.75	52.61 ± 4.51	27.83 ± 2.17
50	14.40 ± 3.39	36.14 ± 3.50	18.75 ± 2.38
100	10.97 ± 3.21	35.82 ± 1.10	14.18 ± 1.56

[0443]

[0444] [표 8]

OCI-AML3 SC 모델로부터 선택된 유전자의 발현 수준(비히클에 대한 %)(평균 값 및 표준 편차).

화합물 A3 (mg/kg)	MEIS1
0	100.30 ± 8.53
3	87.90 ± 39.75
10	48.81 ± 15.30
30	32.66 ± 3.71
50	23.83 ± 1.34
100	16.76 ± 1.92

[0445]

[0446] 표 7a 및 표 8a는 신선한 종양 샘플을 사용하여 최적화된 조건에서 반복 실험을 기반으로 한 중앙값을

보여준다.

[0447] [표 7a]

MOLM-14 SC 모델로부터 선택된 유전자의 발현 수준(비히클에 대한 %)(중앙값 및 표준 편차).

화합물 A3 (mg/kg)	MEIS1	FLT3	MEF2C
0	100.0 ± 13.5	100.0 ± 10.1	100.0 ± 11.0
3	83.7 ± 22.8	89.2 ± 20.7	87.7 ± 22.8
10	49.3 ± 5.9	79.8 ± 9.0	64.6 ± 14.4
30	14.7 ± 3.9	54.5 ± 4.5	28.8 ± 2.2
50	4.7 ± 1.1	37.6 ± 3.5	18.8 ± 2.4
100	3.3 ± 1.4	35.4 ± 1.1	13.6 ± 1.6

[0448]

[0449] [표 8a]

OCI-AML3 SC 모델로부터 선택된 유전자의 발현 수준(비히클에 대한 %)(중앙값 및 표준 편차).

화합물 A3 (mg/kg)	MEIS1
0	100.0 ± 11.2
3	71.2 ± 15.1
10	26.5 ± 4.3
30	25.1 ± 11.2
50	8.5 ± 2.2
100	9.4 ± 1.2

[0450]

[0451] *6) MOLM-14 피하 모델에서의 효능 연구*

[0452] *시험제 및 대조군*

[0453] 화합물 A3을 20% 하이드록시프로필-베타-사이클로덱스트린(HP-β-CD)에 제형화하고 20 g 동물에 대해 용량 당 총 부피 0.2 mL(10 mL/kg)에 도달되도록 제조했다. 용량은 매일 개인의 체중에 따라 조정되었다. 각 연구에 대해 화합물 A3의 작업 스톡을 주당 1회 준비하고 25℃에서 보관했다.

[0454] *동물*

[0455] 암컷 NMRI 누드 마우스(MOLM-14 SC)는 대략 6 내지 8주령이고 무게가 대략 25 g일 때 사용되었다. 모든 동물은 실험에 사용하기 전 최소 7일 동안 운송 관련 스트레스에 적응하고 회복할 수 있었다. 고압증기멸균수와 조사된 먹이는 임의로 제공되었으며, 동물은 12시간의 명암 주기로 유지되었다. 케이지, 베딩 및 물병은 사용 전에 오토클레이브 처리하고 매주 교체하였다. 추가의 세부사항은 하기 표 9에 제공된다.

[0456] [표 9]

조직 배양 및 세포 주입 시약

DPBS (둘베코의 인산염 완충 식염수)
열 불활성화 소 태아 혈청
RPMI 1640 배지
L-글루타민
젠타마이신
T175 배양 플라스크
롤러 병

[0457]

[0458] *종양 모델 및 세포 배양 방법*

[0459] 인간 AML 세포 MOLM-14는 표시된 완전 배양 배지(RPMI 1640 + 10% HI-FBS + 2mM L-글루타민 + 50ug/ml 겐타마이신)에서 37℃, 5% CO_2에서 배양되었다. 세포를 대수 성장으로 수확하고, 무혈청 배지 중 차가운(4℃) Roswell Park Memorial Institute(RPMI) 1640에 재현탁시켰다.

[0460] 각 마우스는 1cc 주사기와 27게이지 바늘을 사용하여 총 부피 0.2 mL의 50% Matrigel 중 5×10^6개 MOLM-14 세포를 오른쪽 옆구리에 주입했다.

[0461] *연구 설계*

[0462] 화합물 A3은 매일 경구(PO)로 투여되었다.

[0463] 0일째는 종양 세포 이식 및 연구 개시일이다.

[0464] SC MOLM-14 종양을 갖는 마우스를 종양 이식 후 16일째에 무작위화하고 종양 부피에 따라 처리군에 할당하였다(약 130 mm^3의 평균; n=10/그룹). 비히클 또는 화합물 A3(30 및 100 mg/kg)을 사용한 치료는 같은 날 시작되었으며, 21일 동안 매일 경구 투여되었다. PK(약동학) 분석을 위해 마지막 투여 후 1, 2, 4, 8 및 23시간(n=4 내지 5/그룹/시점)에 혈장을 수집했다.

[0465] *동물 모니터링*

[0466] SC 종양 부피는 연구 기간 동안 각 동물에 대해 주당 2 내지 3회 이상 측정되었다.

[0467] *계산*

[0468] 종양 부피는 하기 식을 사용하여 계산하였다:

[0469] 종양 부피(mm^3)=($D \times d^2/2$); 여기서, 'D'는, 캘리퍼 측정에 의해 결정시, 종양의 더 큰 직경을, 'd'는 더 작은 직경을 나타낸다. 종양 부피 데이터는 평균 종양 부피 ± SEM으로서 그래프로 나타내었다.

[0470] %ΔTGI는 처리군과 대조군의 평균 종양 부하 사이의 차이로서 정의되었으며, 다음과 같이 계산된다: %ΔTGI=([(TV_cTVc_0)(TV_tTV_{t0})]/(TV_cTVc_0))×100; 여기서, 'TV_c'는 주어진 대조군의 평균 종양 부하이고, 'TVc_0'은 주어진 대조군의 평균 초기 종양 부하이고, 'TV_t'는 처리군의 평균 종양 부하이고, 'TV_{t0}'은 처리군의 평균 초기 종양 부하이다. %TGI는 다음과 같이 계산된 처리군 및 대조군의 평균 종양 부피 사이의 차이로서 정의되었다:

[0471] %TGI=((TV_cTV_t)/TV_c)×100; 여기서, 'TV_c'는 주어진 대조군의 평균 종양 부피이고, 'TV_t'는 처리군의 평균 종양 부피이다. National Cancer Institute 기준에 의거하여 규정된 바와 같이, 60% 이상의 TGI는 생물학적으로 유의한 것으로 간주된다.

[0472] 대조군과 무관하게 기준선과 비교하여 종양 부피의 치료 관련 감소를 반영하기 위해 정량화된, % 종양 퇴행(TR)은 %TR= (1-평균 ($TV_ti/TV_{t0}i$)) × 100으로 계산되었으며, 여기서 'TV_ti'는 처리군의 개별 동물의 종양 부담이고, '$TV_{t0}i$'는 동물의 초기 종양 부담이다.

[0473] *데이터 분석*

[0474] Prism 소프트웨어(GraphPad Version 7 또는 8)를 사용하여 종양 부피를 그래프로 표시했다. 대부분의 연구에 대한 통계적 유의성은 각 그룹에 2/3 이상의 마우스가 남아 있는 연구 마지막 날에 HPβCD 비히클 처리 대조군과 비교하여 화합물 A3 처리군에 대해 평가되었다. $p \leq 0.05$일 때, 그룹 간 차이는 유의한 것으로 간주되었다.

[0475] 동물 종양 부피의 통계학적 유의성은 R 소프트웨어 버전 3.4.2(Janssen에서 내부적으로 개발된 Shiny 응용 버전 4.0을 사용함)에서 선형 혼합-효과(Linear Mixed-Effect)(LME) 분석을 사용하여 계산하였으며, 이때 고정 효과로서 처리 및 시간을, 그리고 랜덤 효과로서 동물을 사용하였다. 개별 종방향 반응 궤적이 선형이 아니라면, 로그 변환을 수행하였다.

[0476] 이 모델로부터 도출된 정보를 사용하여 대조군 또는 모든 처리군 사이의 종양 부피의 쌍별 처리 비교를 실시하였다. 결과는 **도 2**에 나타낸다.

[0477] *7) Ca^{2+}-형광 분석(CTCM 인간)을 사용하여 동시에 박동하는 인간 다능성 줄기 세포 유래 심근세포(hSC-CM)에서 시험 화합물의 심장-전기생리학적 효과*

[0478] *프로토콜*

[0479] 화합물을 96웰 플레이트에서 시험하였다.

[0480] 화합물은 Cor.4U®-심근세포 또는 iCell® 심근세포2에서 0.1 μM, 0.2 μM, 0.5 μM, 1 μM, 2.5 μM 및 5 μM(용량 당 n = 4)으로 시험하였다.

[0481] 대안적으로, 화합물은 대부분 iCell® 심근세포2에서 0.1 μM, 0.3 μM; 1 μM, 3 μM, 10 μM 및 30 μM(용량 당 n = 4)으로 시험하였다.

[0482] 양성 대조군 및 음성 대조군

도페틸라이드	3 nM 에서
아이소프로테레놀	100 nM 에서
니모디핀	100-300 nM 에서
세티리진	3 μM 에서

[0483]

[0484] 비히클 대조군: 다이메틸설폭사이드(DMSO). DMSO 또는 이의 용매 중 화합물의 용액(0.1% DMSO의 최종 농도; n=8).

[0485] *시험 물품 및 대조군의 제조*

[0486] 시험된 화합물을 의도된 농도의 1000배로 DMSO에 용해시켰다. 시험 화합물과 양성 및 음성 대조군을 최종 농도의 1000배로 포함하는 화합물 "모판"을 만들었다. 실험 당일, 이러한 스톡 용액은 10 mM HEPES(Gibco)가 보충된 Tyrode(Sigma)로 의도한 농도의 2배까지 희석되었다(둥근 바닥 복합 플레이트에서). 시험 용액 및 비히클 대조군에서 최종 DMSO 농도는 0.1%였다.

[0487] *세포*

[0488] hSC-CM(Cor.4U® 심근세포)는 CDI(Ncardia, Germany)로부터 입수하였다. 세포를 단층을 형성하기에 적합한 밀도로 피브로넥틴으로 코팅된 96웰 플레이트에 미리 플레이팅하고 시딩하며, 세포 공급자의 지시에 따라 단계 배양기(37℃, 5% CO_2)에서 배양이 유지한다.

[0489] iCell® 심근세포2라고 불리는 두 번째 라인 hSC 유래 심근세포는 FUJIFILM Cellular Dynamics(USA)에서 구입했다. 시험 약물을 사용한 실험은 세포를 플레이트에 플레이팅한 후 5 내지 7일 동안 수행되어 hiPSC-유래 심근세포의 살아 있는 박동 단층을 갖게 되었다. 96웰 플레이트의 박동 단층은 일반적으로 냉동 iCell® 심근세포2의 2개의 바이알(약 500만 세포/바이알)에서 채취되며, 이는 3개의 96웰 플레이트(약 50K/웰)에 플레이팅될 것이다.

[0490] *실험 시작 전*

[0491] 실험 시작 최소 1시간 전에 정상 세포 배지를 칼슘 염료가 포함된 Tyrode 용액으로 교체했다(아래 참조).

[0492] Cal 520 염료(AAT Bioquest)를 10 mM HEPES가 보충된 Tyrode 11 ml에 용해시키고 세포에 첨가하기 전에 37℃까지 예열했다.

[0493] 세포 배양 배지 35 μl를 각 웰에서 제거하고 미리 예열된 Cal 520 염료 용액 35 μl로 교체한 다음 세포 플레이트를 37℃/5% CO_2에서 45분 동안 인큐베이션했다. 세포를 37℃에서 5분 동안 인큐베이션하였다.

[0494] *실험*

[0495] Cal520™(AAT Bioquest) 칼슘 형광 염료 신호전달을 사용하여 자발적인 전기적 활성을 기록한다. 이 염료는 웰 전체에 걸쳐 총 세포내 칼슘 활성을 통합한다. Cal520 염료(50 μg, MW: 1103/mol) 한 병을 0.9 mM의 스톡 용액인 DMSO 50 μl에 용해한다. 염료 스톡 용액 50 μL를 Tryodes 용액 10 ml에 첨가하여 염료 농도가 4.5 μM이 되도록 했다. 이어서, 이 염료 용액 35 μl를 각 웰에 첨가하여 최종 염료 농도가 1.58 μM이 되도록 했다. 이 CTCM 인간 분석에 대한 현재 염료 프로토콜은 최근에 확립되었다(문헌[Ivan Kopljar et al, Journal of Pharmacological and toxicological methods 2018. 91: 80-86]; 문헌[Lu et al., Tox Sci 2019. 170 (2): 345-356]).

[0496] Functional Drug Screen System(FDSS/μCell, Hamamatsu, Japan)을 사용하여 형광 신호(Ca^{2+} 과도 형태)를 측정하고, 이후 기록을 Notocord와 같은 적절한 소프트웨어를 사용하여 오프라인으로 분석했다.

[0497] 테스트 실행을 위해 세포 플레이트를 FDSS/μCell에 로딩했다: 각 웰에서 심근세포의 동시 박동을 확인하기 위해 Ca^{2+} 과도 현상을 4분 동안 측정했다. 모든 96개의 웰을 동시에 측정하였다(샘플링 간격: 0.06 s, 짧은 노출 시간: 10 ms; 여기 파장 480 nm; 방출 파장 540 nm; FDSS/μCell이 37℃로 가온됨). 모두 동시 박동을 나타내면, 96웰 플레이트를 3회 반복 측정했다(기준선에서 모든 96웰의 동시 박동을 확인하기 위해 미리 설정된 기준을 충족하지 않는 웰은 연구에서 제외되었으며 화합물로 처리되지 않았다):

[0498] T = 0: 컨트롤 기간(-5분 내지 -1분) + 화합물 첨가, 이후 3분 동안

[0499] T = 30: 화합물 첨가 후 29분 내지 34분에서 측정됨

[0500] 화합물 첨가 단계 동안, 각각의 이중 농축된 시험 용액 100 μl를 각 웰에 동시에 피펫팅했다.

[0501] 데이터는 Notocord-Hem(버전 4.3)과 같은 적절한 소프트웨어를 사용하여 오프라인으로 분석되었다. Ca^{2+} 과도 현상 형태의 다음 매개변수가 측정되었다:

[0502] 비트 속도(BR)

[0503] Ca^{2+} 과도 현상의 진폭(Amp),

[0504] CTD_{90}: 90%에서 Ca^{2+} 과도 현상 지속 시간(초기 기본 값의 90%에 도달하는 시간).

[0505] 실험 기간 동안 다양한 '부정맥 유사' 활동의 존재도 주목되었다. 이들은 하기를 포함하였다:

[0506] '*초기 탈분극 유사*'(EAD 유사) 이벤트("과도의 초기 피크 이후 과도 파형의 매우 작은 피크"로 정의됨),

[0507] '*심실성 빈맥 유사*'(VT 유사) 이벤트(매우 빠른 박동 속도로 정의됨) 또는

[0508] '*심실 세동 유사*'(VF 유사) 이벤트("불규칙하고 측정할 수 없는 과도 전위가 있는 작은 진폭, 빠른 속도의 Ca^{2+} 파형으로 정의됨)

[0509] '*세포의 '박동 중지*'(Ca^{2+} 과도 현상이 관찰되지 않음).

[0510] 칼슘 과도 신호에 대한 화합물 유발 변화를 소프트웨어로 분석할 수 없는 경우 이러한 신호는 BQL(품질 분석 수준 미만)로 식별되었다.

[0511] *데이터 분석*

[0512] FDSS-μCell에서 측정된 데이터는 오프라인 분석을 위해 복사되었으며 추가 분석을 위해 SPEC-II(운영 관리 시스템)에 분석 및 업로드되었다. 화합물 투여 전후의 변수 값을 수집하여 Excel 통합 문서로 옮겼다.

[0513] 모든 값(실제 단위 및 기본값으로부터의 백분율 변화)은 중앙값(최소 및 최대)으로 표시된다. Wilcoxon-Mann-Whitney 테스트를 사용하여 화합물 그룹에서 관찰된 해당 기준 값(실제 단위) 대비 변화를 용매 대조군의 변화와 비교했다. 다중도 조정을 위해 Bonferroni 보정을 사용한 양측 시험을 수행하였다. 용매군과 비교하여 각각 10개의 처리군이 있으므로, 알파 수준 0.05/10(0.005)은 용매군과의 통계적으로 유의한 차이를 반영한 것으로 간주된다. 모든 통계 분석은 R 소프트웨어 버전 3.5.2와 같은 적절한 소프트웨어를 사용하여 수행되었다.

[0514] 플레이트의 hiPSC-CM 품질 관리:

[0515] 플레이트가 다음 기준을 충족하지 않으면 거부되었다:

[0516] 안정적인 규칙적인 박동

[0517] 진폭 > 500 상대 단위

[0518] 분당 25 내지 80 비트 사이의 비트 속도

[0519] 300 내지 800 ms 사이의 CTD_{90}.

[0520] 본 연구에서 플레이트의 hiPSC-CM은 위 기준을 충족했다.

[0521] 부정맥 발생률 또는 박동 중단과 결합된 이러한 매개변수를 사용하여 가중 채점 방법을 사용하여 잠재적 위험 수준을 계산했다(문헌[Kopljar et al., Stem Cell Reports 2018. 11, 1365-1377]에 기초함). 이 위험 점수는 CTD_{90}의 변화, 심박수 및 진폭(ΔΔ%), 및 박동 정지 및 조기 후탈분극(EAD) 발생률에 대한 허용 간격(TI)을 기반으로 가중치를 추가하여 농도별로 계산된다. 결과적으로 각 농도에 대해 네 가지 위험 수준 중 하나가 생성될 것이다. 이는 화합물과 함께 인큐베이션한 후 30분 후에 수행될 것이다. 위험 수준은 다음과 같다:

[0522] 위험 없음: 비히클 효과 수준 내에서 또는 관련이 없는 작은 변화.

[0523] 낮은 위험: 관련 효과가 있지만 잠재적으로 낮은 심장 질환 위험.

[0524] 높은 위험: 상대적으로 높은 심장 질환 위험.

[0525] 매우 높은 위험: 부정맥 유사 이벤트(EAD)로 인한 매우 높은 위험.

[0526] '위험 점수' 결과는 유리 약물 등가물(혈장 단백질이 웰에 추가되지 않음)에서 잠재적인 급성 심장 약물 유발 영향에 대한 식별을 제공한다. 위험 식별에 대한 평가는 *CTCM_Scoring_version 1*(문헌[Kopljar et al., Stem Cell Reports 2018. 11: 1365-1377])이라는 'scoring reference book'를 이용하여 실시하며, 수준은 하기 표 10의 색 구성표에 따라 표시된다.

[0527] [표 10]

위험 식별 범례의 색상 도식

녹색	우려 없음
황색	낮은 우려
적색	높은 우려
흑색	부정맥 이벤트로 인한 매우 높은 우려

[0528]

[0529] Ca^{2+} 과도 현상 분석에 대한 위험 점수 심각도에 따른 시험 화합물의 순위는 다양한 색상으로 및 관련 표에서 상기에 나열된 HiPSc-CM에서 측정된다.

[0530] 결과

[0531] *iCell® 심근세포2를 세포주로서 사용*

[0532] 양성 및 음성 대조군: 양성 및 음성 대조군은 모두 이 분석에서 예상되는 약리학적 효과를 나타냈다.

[0533] 결과가 하기 표 11 및 표 12에 요약되어 있다.

[0534] [표 11]

화합물 A3에 대한 위험 점수

화합물	0.1 μM에서의 색상	0.2 μM에서의 색상	0.5 μM에서의 색상	1 μM에서의 색상	2.5 μM에서의 색상	5 μM에서의 색상
A3	녹색	녹색	녹색	녹색	녹색	녹색

[0535]

[0536] [표 12]

화합물 A1에 대한 위험 점수

화합물	0.1 μM에서의 색상	0.3 μM에서의 색상	1 μM에서의 색상	3 μM에서의 색상	10 μM에서의 색상	30 μM에서의 색상
A1	녹색	녹색	녹색	녹색	녹색	황색

[0537]

[0538] 화합물 A1의 경우: 30 mpk(mg/kg)의 마우스 이종이식 모델에서 효과적인 복용량을 사용하여, CTCM 인간 농도 대 유리 C_{max}는 다음과 같이 추정될 것이다:

[0539] 마진 CTCM 인간 10 μM 대 유리 Cmax >16(마우스, 인간)

[0540] 마진 CTCM 인간 30 μM 대 유리 Cmax >45(마우스, 인간).

[0541] 8) hERG 형질감염된 세포주에서 막 칼륨 전류 I_{Kr}에 미치는 영향

[0542] 프로토콜 1:

약칭	
CHO	중국 햄스터 난소 세포주
DMSO	다이메틸설폭사이드
hERG	인간 *ether-à-go-go* 관련 유전자
I_{Kr}	빠르게 활성화되는 지연 정류기 K^+ 전류

[0543]

[0544] *방법*

[0545] hERG 칼륨 채널을 안정적으로 발현하는 CHO 세포를 사용하여 실험을 수행하였다. 세포를 10% 열 불활성화 송아지 태아 혈청, 하이그로마이신 B(100 μg/ml) 및 제네티신(100 μg/ml)이 보충된 Ham's F12 배지의 배양 플라스크에서 37℃ 및 5% CO_2에서 성장시켰다. 자동화된 패치-클램프 시스템 QPatch(Sophion)에 사용하기 위해 세포를 수확하여 단일 세포의 세포 현탁액을 얻었다.

[0546] 용액: 배쓰 용액에는 (mM 단위로) 145 NaCl, 4 KCl, 10 글루코스, 10 HEPES((4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산), 2 $CaCl_2$ 및 1 $MgCl_2$(NaOH를 사용한 pH 7.4)가 포함되어 있다. 피펫 용액에는 (mM 단위로) 120 KCl, 10 EGTA(에틸렌 글리콜-*비스*(2-아미노에틸에테르)-*N*,*N*,*N*',*N*'-테트라아세트산), 10 HEPES, 5.374 $CaCl_2$ 및 1.75 $MgCl_2$ (KOH를 사용한 pH 7.2)가 포함되어 있다.

[0547] 패치-클램프 실험은 전압-클램프 모드에서 수행되었으며 전체 세포 전류는 QPatch 시스템(Sophion)을 활용하는 자동화된 패치-클램프 분석으로 기록되었다. QPatch 분석 소프트웨어를 사용하여 현재 신호를 증폭 및 디지털화, 저장 및 분석하였다.

[0548] 유지 전위는 -80 mV였다. hERG 전류(K^+-선택적 외부 전류)는 +60 mV까지 2초 탈분극 후 -40 mV에서 최대 테일 전류로서 결정되었다. 펄스 사이클링 속도는 15초였다. -40 mV까지의 짧은 펄스(90 ms)가 테일 전류 진폭을 계산하기 위한 기준선 단계로서 사용되었다. 전체 세포 구성 및 안정성 기간을 확립한 후, 용매 대조군(0.3% DMSO)을 5분 동안 적용한 후, 시험 물질을 3×10^{-7} M, 3×10^{-6} M, 10^{-5} M 및 3×10^{-5} M의 4가지 농도로 증가시켜 적용하였다. 시험 물질의 각 농도를 두 번 적용하였다. 각 농도의 효과는 5분 후에 3개의 순차적 전압 펄스의 평균 전류로 결정되었다. 차단 정도를 결정하기 위해 잔류 전류를 비히클 전처리와 비교하였다.

[0549] 농도/반응 관계는 개별 데이터 포인트에 대한 비선형 최소 제곱법으로 계산되었다. 최대 억제 농도의 절반(IC50)은 피팅 루틴을 통해 계산되었다.

[0550] 각각의 화합물을 적어도 5개 웰에 동일한 플레이트 상에서 복제하였다. 억제율 결과가 하기 표 13에 요약되어 있다.

[0551] [표 13]

프로토콜 1로부터의 hERG IC_{50} (μM)

[0552]

화합물 번호	hERG- IC_{50} (μM)
A	>30.2

[0553] *9) 파종성 OCI-AML3 모델의 효능 연구*

[0554] *시험제 및 대조군*

[0555] 화합물 A3을 20% 하이드록시프로필-베타-사이클로덱스트린(HP-β-CD)에 제형화하고 20 g 동물에 대해 용량 당 총 부피 0.2 mL(10 mL/kg)에 도달되도록 제조했다. 용량은 매일 개인의 체중에 따라 조정되었다. 각 연구에 대해 화합물 A3의 작업 스톡을 주당 1회 준비하고 25℃에서 보관했다.

[0556] *동물*

[0557] 암컷 SCID 베이지 마우스(CB17.Cg-PrkdcscidLystbg-J/Crl/-)는 대략 6 내지 8주령이고 무게가 대략 25 g일 때 사용되었다. 모든 동물은 실험에 사용하기 전 최소 7일 동안 운송 관련 스트레스에 적응하고 회복할 수 있었다. 고압증기멸균수와 조사된 먹이는 임의로 제공되었으며, 동물은 12시간의 명암 주기로 유지되었다. 케이지, 베딩 및 물병은 사용 전에 오토클레이브 처리하고 매주 교체하였다. 조직 배양 및 세포 주입 시약은 하기 표 14에 요약되어 있다.

[0558] [표 14]

조직 배양 및 세포 주입 시약

DPBS (둘베코의 인산염 완충 식염수)
열 불활성화 소 태아 혈청
MEM 알파 배지
L-글루타민
젠타마이신
T175 배양 플라스크
롤러 병

[0559]

[0560] *종양 모델 및 세포 배양 방법*

[0561] 인간 AML 세포주 OCI-AML3은 표시된 완전 배양 배지(MEM Alpha + 20% HI-FBS(열 불활성화 소 태아 혈청) + 2mM L-글루타민 + 50ug/ml 겐타마이신)에서 37℃, 5% CO_2에서 배양되었다. 세포를 대수 성장으로 수확하고, 무혈청 배지 중 차가운(4℃) MEM(최소 필수 배지) 알파에 재현탁시켰다.

[0562] 파종성 OCI-AML3 모델의 경우, 각 마우스는 26게이지 바늘을 사용하여 총 부피 0.2 mL로 IV 주사를 통해 5×10^5개 세포를 투여받았다.

[0563] *연구 설계*

[0564] 화합물 A3은 매일 경구(PO)로 투여되었다.

[0565] 0일째는 종양 세포 이식 및 연구 개시일이다.

[0566] 효능 연구에서, IV OCI-AML3 이종이식 종양을 보유한 마우스를 종양 세포 생착 후 3일째에 처리군에 무작위로 배정했다. 비히클 또는 화합물 A3(30, 50, 100 mg/kg으로)을 사용한 치료가 같은 날 시작되었으며, 28일 동안 매일 투약되었다.

[0567] *동물 모니터링*

[0568] 화합물 독성 또는 종양 부담 중 어느 하나와 관련된 임상적 징후(즉, 뒷다리 마비, 무기력증, 호흡곤란 등)에 대해 동물을 매일 모니터링하였다.

[0569] *계산*

[0570] 생존율 평가를 위해, 종양 이식 후 일수에 대한 생존율(%)로 결과를 플롯팅하였다. 음성 임상 징후 및/또는 20% 이상의 체중 감소가 사망에 대한 대리 평가변수로 사용되었다. 중위 생존율을 Kaplan-Meier 생존율 분석을 활용하여 결정하였다. 증가된 수명(ILS) 백분율은 다음과 같이 계산되었다: ((처리군의 중앙값 생존일 - 대조군의 중앙값 생존일) / 대조군의 중앙값 생존일) × 100. 유해 임상 징후(예컨대, 궤양화된 종양, 체중 손실 등)로 인해 대리 종점에 도달하지 못한 동물 또는 처리와 무관한 죽음을 생존율 평가를 위해 중도절단하였다. NCI 기준에 의거하여 규정된 바와 같이, 25% 이상의 ILS는 생물학적으로 유의한 것으로 간주된다. (문헌 [Johnson JI et al. Br J Cancer. 2001. 84(10), 1424-1431]).

[0571] *데이터 분석*

[0572] Prism(버전 7)을 활용하여 생존율 및 체중 데이터를 그래픽으로 나타내었다. 체중에 대한 통계적 유의성을 전술한 바와 같이 평가하였다. R 소프트웨어 버전 3.4.2에서 로그 순위(Mantel-Cox) 시험을 사용하여 처리군과 적절한 비히클 처리 대조군을 비교하는 Kaplan-Meier 생존 플롯에 대해 통계적 유의성을 평가했다. p 값이 0.05 이하일 때 그룹 간의 차이가 유의한 것으로 간주되었다.

[0573] *생존률*

[0574] Kaplan-Meier 생존 곡선은 **도 3**에 도시되어 있다. 확립된 OCI-AML3 종양을 보유하는 마우스에게 총 28일 동안 20% HP-β-CD 제형 중의 화합물 A3을 30, 50, 100 mg/kg 매일 경구 투여하였다(n=9 내지 10마리/그룹). 화합물 A3 처리군의 경우, 중앙값 생존 일수는 이후 75.5일째에 30 mg/kg, 58.5일째에 50 mg/kg, 및 75일째에 100 mg/kg에 대해 도달하였으며, 이를 비히클 처리 대조군의 경우의 38.5일의 중앙값 생존값과 비교하였다. 화합물 A3 치료는 대조군 마우스와 비교하여 OCI-AML3 종양 보유 마우스의 수명을 96.1%, 51.9% 및 94.8%(30, 50 및 100 mg/kg 용량 수준에서)까지 통계적으로 유의하게 증가시켰다($p \leq 0.001$). 이는 25% 이상의 ILS의 NCI 기준

역치에 따라 생물학적으로 유의한 ILS였다(문헌[Johnson JI et al. Br J Cancer. 2001. 84(10), 1424-1431]).

[0575] 안정성 데이터

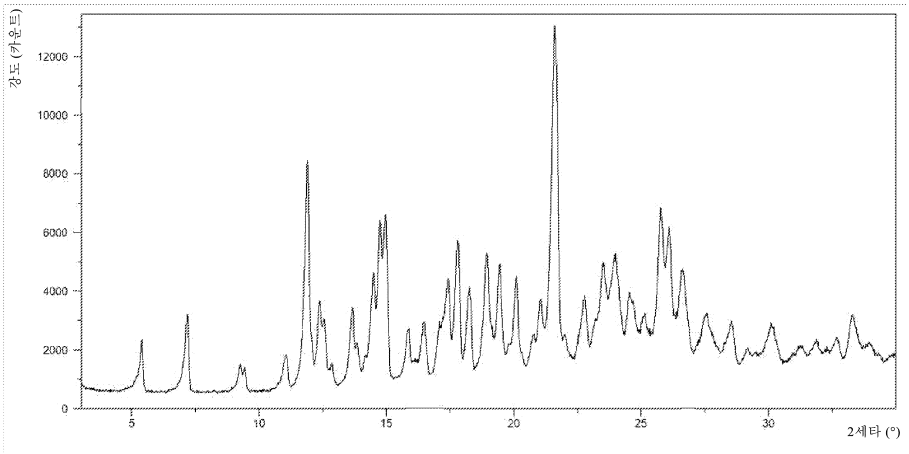
[0576] 안정성 실험을 (*R*)-N-에틸-5-플루오로-N-아이소프로필-2-((5-(2-(6-((2-메톡시에틸)(메틸)아미노)-2-메틸헥산-3-일)-2,6-다이아자스피로[3.4]옥탄-6-일)-1,2,4-트라이아진-6-일)옥시)벤즈아미드 비스-베실레이트 염 수화물의 결정질 형태 A에 대해 수행하였다. 비스-베실레이트 염 수화물은 평가된 스트레스 조건 하에서 UHPLC에 의해 관찰된 분해 없이 및 XRD에 의해 관찰된 고체 상태 변화 없이 화학적 및 물리적으로 안정한 것으로 밝혀졌다.

[0577]

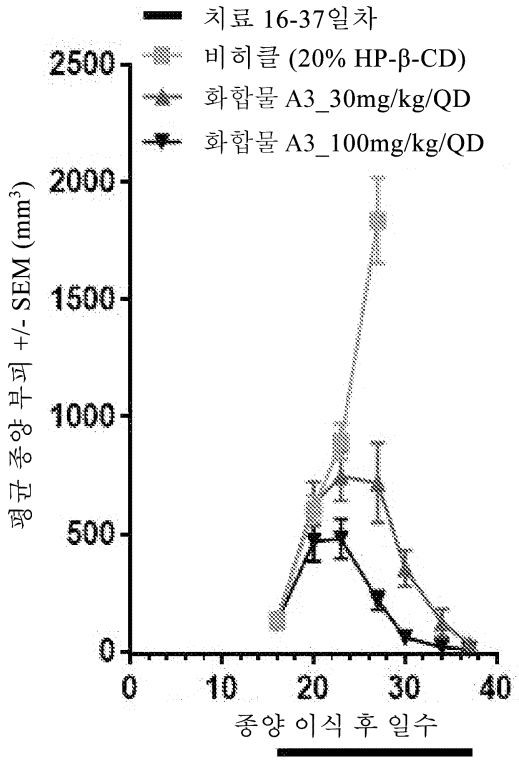
	베실레이트 염 순도	XRD
참조예	99.65	-
50 ℃ / 10% RH, 7 일	99.64	-
50 ℃ / 10% RH, 14 일	99.62	-
50 ℃ / 50% RH, 7 일	99.65	-
50 ℃ / 50% RH, 14 일	99.66	-
참조예	99.21	결정질, 형태 A, ref
50 ℃ / 30% RH, 21 일	99.32	ref 에 따름
50 ℃ / 75% RH, 21 일	99.36	ref 에 따름

도면

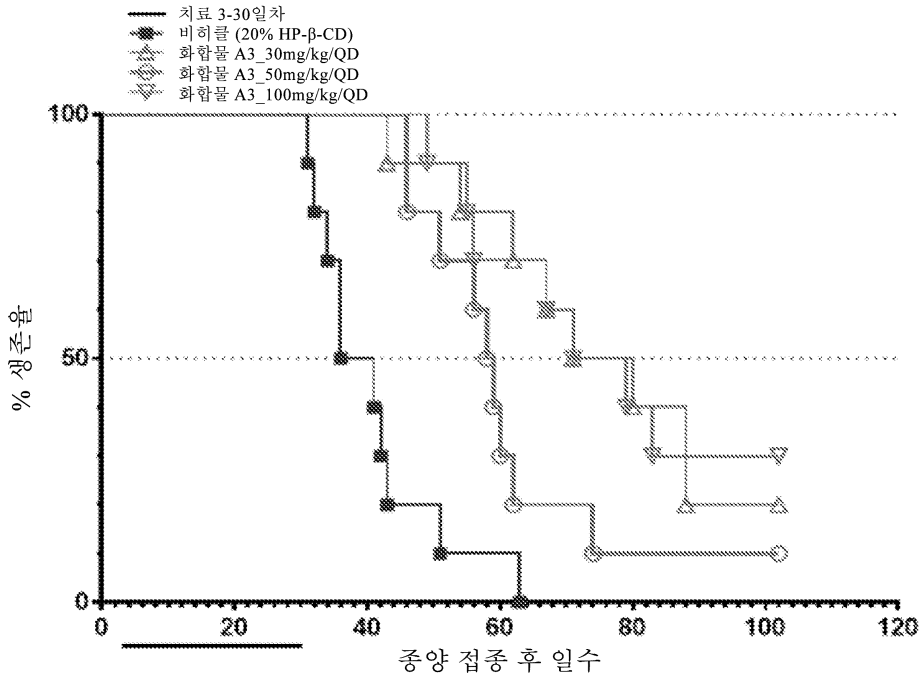
도면1



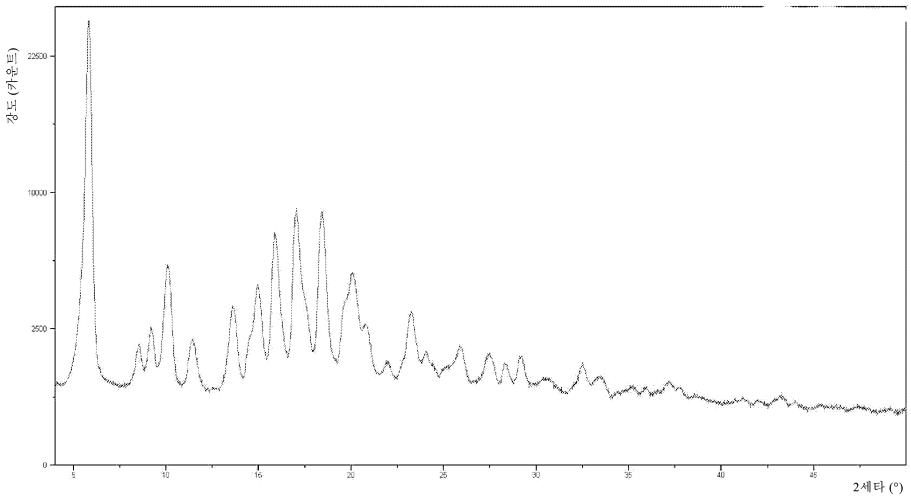
도면2


치료 16-37일차
비히클 (20% HP-β-CD)
화합물 A3_30mg/kg/QD
화합물 A3_100mg/kg/QD
평균 종양 부피 +/- SEM (mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
종양 이식 후 일수

도면3


치료 3-30일차
비히클 (20% HP-β-CD)
화합물 A3_30mg/kg/QD
화합물 A3_50mg/kg/QD
화합물 A3_100mg/kg/QD
% 생존율
100
50
0
0
20
40
60
80
100
120
종양 접종 후 일수

도면4



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Janssen Pharmaceutica NV

Johnson & Johnson (China) Investment Ltd.

<120> (R)-N-ETHYL-5-FLUORO-N-ISOPROPYL-2-((5-(2-(6-((2-METHOXYETHYL)(METHYL)AMINO)-2-METHYLHEXAN-3-YL)-2,6-DIAZASPIRO[3.4]OCTAN-6-YL)-1,2,4-TRIAZIN-6-YL)OXY)BENZAMIDE BESYLATE SALT

<130> P2022TC2021

<150> PCT/CN2021/100466

<151> 2021-06-17

<150> PCT/CN2022/091677

<151> 2022-05-09

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 616

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 1

Met Gly Leu Lys Ala Ala Gln Lys Thr Leu Phe Pro Leu Arg Ser Ile

1 5 10 15

Asp Asp Val Val Arg Leu Phe Ala Ala Glu Leu Gly Arg Glu Glu Pro

```
            20                  25                  30
Asp Leu Val Leu Leu Ser Leu Val Leu Gly Phe Val Glu His Phe Leu
        35                  40                  45
Ala Val Asn Arg Val Ile Pro Thr Asn Val Pro Glu Leu Thr Phe Gln
    50                  55                  60

Pro Ser Pro Ala Pro Asp Pro Pro Gly Gly Leu Thr Tyr Phe Pro Val
65                  70                  75                  80
Ala Asp Leu Ser Ile Ile Ala Ala Leu Tyr Ala Arg Phe Thr Ala Gln
                85                  90                  95
Ile Arg Gly Ala Val Asp Leu Ser Leu Tyr Pro Arg Glu Gly Gly Val
            100                 105                 110
Ser Ser Arg Glu Leu Val Lys Lys Val Ser Asp Val Ile Trp Asn Ser
        115                 120                 125

Leu Ser Arg Ser Tyr Phe Lys Asp Arg Ala His Ile Gln Ser Leu Phe
    130                 135                 140
Ser Phe Ile Thr Gly Thr Lys Leu Asp Ser Ser Gly Val Ala Phe Ala
145                 150                 155                 160
Val Val Gly Ala Cys Gln Ala Leu Gly Leu Arg Asp Val His Leu Ala
                165                 170                 175
Leu Ser Glu Asp His Ala Trp Val Val Phe Gly Pro Asn Gly Glu Gln
            180                 185                 190

Thr Ala Glu Val Thr Trp His Gly Lys Gly Asn Glu Asp Arg Arg Gly
        195                 200                 205
Gln Thr Val Asn Ala Gly Val Ala Glu Arg Ser Trp Leu Tyr Leu Lys
    210                 215                 220
Gly Ser Tyr Met Arg Cys Asp Arg Lys Met Glu Val Ala Phe Met Val
225                 230                 235                 240
Cys Ala Ile Asn Pro Ser Ile Asp Leu His Thr Asp Ser Leu Glu Leu
                245                 250                 255

Leu Gln Leu Gln Gln Lys Leu Leu Trp Leu Leu Tyr Asp Leu Gly His
            260                 265                 270
```

Leu Glu Arg Tyr Pro Met Ala Leu Gly Asn Leu Ala Asp Leu Glu Glu
275 280 285
Leu Glu Pro Thr Pro Gly Arg Pro Asp Pro Leu Thr Leu Tyr His Lys
290 295 300
Gly Ile Ala Ser Ala Lys Thr Tyr Tyr Arg Asp Glu His Ile Tyr Pro
305 310 315 320

Tyr Met Tyr Leu Ala Gly Tyr His Cys Arg Asn Arg Asn Val Arg Glu
325 330 335
Ala Leu Gln Ala Trp Ala Asp Thr Ala Thr Val Ile Gln Asp Tyr Asn
340 345 350
Tyr Cys Arg Glu Asp Glu Glu Ile Tyr Lys Glu Phe Phe Glu Val Ala
355 360 365
Asn Asp Val Ile Pro Asn Leu Leu Lys Glu Ala Ala Ser Leu Leu Glu
370 375 380

Ala Gly Glu Glu Arg Pro Gly Glu Gln Ser Gln Gly Thr Gln Ser Gln
385 390 395 400
Gly Ser Ala Leu Gln Asp Pro Glu Cys Phe Ala His Leu Leu Arg Phe
405 410 415
Tyr Asp Gly Ile Cys Lys Trp Glu Glu Gly Ser Pro Thr Pro Val Leu
420 425 430
His Val Gly Trp Ala Thr Phe Leu Val Gln Ser Leu Gly Arg Phe Glu
435 440 445

Gly Gln Val Arg Gln Lys Val Arg Ile Val Ser Arg Glu Ala Glu Ala
450 455 460
Ala Glu Ala Glu Glu Pro Trp Gly Glu Glu Ala Arg Glu Gly Arg Arg
465 470 475 480
Arg Gly Pro Arg Arg Glu Ser Lys Pro Glu Glu Pro Pro Pro Pro Lys
485 490 495
Lys Pro Ala Leu Asp Lys Gly Leu Gly Thr Gly Gln Gly Ala Val Ser
500 505 510

Gly Pro Pro Arg Lys Pro Pro Gly Thr Val Ala Gly Thr Ala Arg Gly

515 520 525

Pro Glu Gly Gly Ser Thr Ala Gln Val Pro Ala Pro Ala Ala Ser Pro

530 535 540

Pro Pro Glu Gly Pro Val Leu Thr Phe Gln Ser Glu Lys Met Lys Gly

545 550 555 560

Met Lys Glu Leu Leu Val Ala Thr Lys Ile Asn Ser Ser Ala Ile Lys

565 570 575

Leu Gln Leu Thr Ala Gln Ser Gln Val Gln Met Lys Lys Gln Lys Val

580 585 590

Ser Thr Pro Ser Asp Tyr Thr Leu Ser Phe Leu Lys Arg Gln Arg Lys

595 600 605

Gly Leu His His His His His His

610 615