(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0009977
(43) 공개일자 2025년01월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/5377 (2006.01) *A61K 31/454* (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61K 47/10 (2017.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/5377 (2013.01)
A61K 31/454 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7037653
(22) 출원일자(국제) 2023년05월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년11월12일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/062530
(87) 국제공개번호 WO 2023/217924
국제공개일자 2023년11월16일
(30) 우선권주장
22173211.8 2022년05월13일
유럽특허청(EPO)(EP)
22175302.3 2022년05월25일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
에프. 호프만-라 로슈 아게
스위스 체하-4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124
(72) 발명자
애슈케 게오르크
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
마르토글리오 브루노
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
제일특허법인(유)

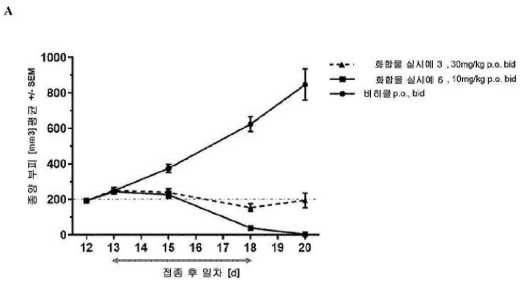
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **암 치료를 위한 알로스테릭 및 오르토스테릭 EGFR 억제제의 조합물**

(57) 요 약

본 발명은 알로스테릭 EGFR 억제제와 오르토스테릭 EGFR 억제제를 이용한 암에 대한 조합 요법, 이의 용도 및 약학 조성물에 관한 것이다.

대 표 도



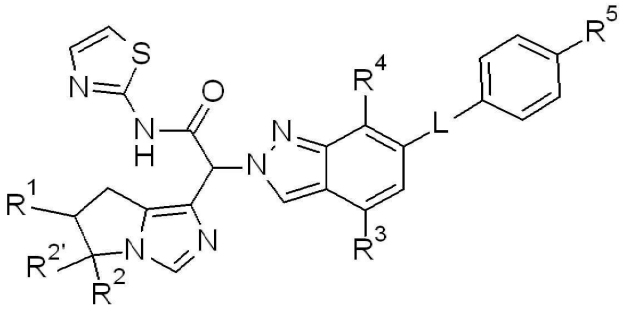
(52) CPC특허분류
A61K 31/506 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 47/10 (2013.01)
A61K 9/0053 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61K 2300/00 (2023.05)
(72) 발명자
나겔 이포네 알리체
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
오브스트-잔더 크리스타 울리케
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게
리치 안토니오
스위스 4070 바젤 그렌짜체스트라쎄 124 에프. 호프만-라 로슈 아게

명 세 서

청구범위

청구항 1

알로스테릭 EGFR 억제제와 오르토스테릭 EGFR 억제제의 조합물로서, 알로스테릭 EGFR 억제제는 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인, 조합물:



(I)

상기 식에서,

L은 결합 또는 알키닐렌이고;

R^1은 수소 또는 할로겐이고;

R^2 및 $R^{2'}$는 수소 및 알킬에서 독립적으로 선택되거나, R^2 및 $R^{2'}$는, 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 사이클로알킬을 형성하고;

R^3은 수소, 할로겐 또는 할로알킬이고;

R^4는 알킬 또는 할로겐이고;

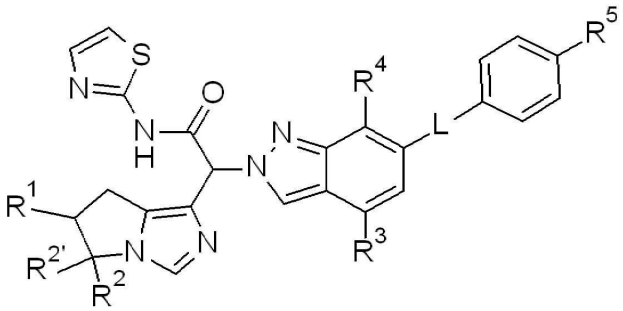
R^5는 (헤테로사이클로알킬)알킬렌 또는 헤테로사이클로알킬이고, 이때 (헤테로사이클로알킬)알킬렌은 R^6에서 독립적으로 선택된 하나 또는 두 개의 치환기로 임의로 치환되고, 헤테로사이클로알킬은 R^7에서 독립적으로 선택된 하나 또는 두 개의 치환기로 임의로 치환되고;

R^6은 각 경우에 알킬, 사이클로알킬, 하이드록시 및 하이드록시알킬에서 독립적으로 선택되고;

R^7은 각 경우에 알킬, 사이클로알킬, 하이드록시 및 하이드록시알킬에서 독립적으로 선택된다.

청구항 2

제1항에 있어서, 알로스테릭 EGFR 억제제는 하기 화학식 (I)의 화합물인, 조합물:



(I)

상기 식에서,

L은 결합 또는 알키닐렌이고;

R^1은 수소 또는 할로겐이고;

R^2 및 $R^{2'}$는 수소 및 알킬에서 독립적으로 선택되거나, R^2 및 $R^{2'}$는, 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 사이클로알킬을 형성하고;

R^3은 수소, 할로겐 또는 할로알킬이고;

R^4는 알킬 또는 할로겐이고;

R^5는 (헤테로사이클로알킬)알킬렌 또는 헤테로사이클로알킬이고, 이때 (헤테로사이클로알킬)알킬렌은 R^6에서 독립적으로 선택된 하나 또는 두 개의 치환기로 임의로 치환되고, 헤테로사이클로알킬은 R^7에서 독립적으로 선택된 하나 또는 두 개의 치환기로 임의로 치환되고;

R^6은 각 경우에 알킬, 사이클로알킬, 하이드록시 및 하이드록시알킬에서 독립적으로 선택되고;

R^7은 각 경우에 알킬, 사이클로알킬, 하이드록시 및 하이드록시알킬에서 독립적으로 선택된다.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, L은 결합 또는 에티닐렌인, 조합물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, R^1은 수소 또는 플루오로인, 조합물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 및 $R^{2'}$는 수소이거나, 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 사이클로프로필을 형성하는, 조합물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, R^3은 할로겐 또는 할로알킬인, 조합물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, R^3은 클로로 또는 디플루오로메틸인, 조합물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, R^4는 메틸 또는 클로로인, 조합물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, R^5는 하이드록시메틸로 임의로 치환된 모르폴리닐 또는 피페리디닐메틸렌인, 조합물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 (I)의 화합물은 다음에서 선택되는, 조합물:

2-[4,7-디클로로-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]-N-티아졸-2-일-아세트아마이드;

2-[4-(디플루오로메틸)-7-메틸-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤

로[1,2-c]이미다졸-1-일]-N-티아졸-2-일-아세트아마이드;

2-[4-(디플루오로메틸)-7-메틸-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-스피로[6,7-디하이드로피롤[1,2-c]이미다졸-5,1'-사이클로프로판]-1-일-N-티아졸-2-일-아세트아마이드;

2-[4-(디플루오로메틸)-6-[2-[4-[[4-(하이드록시메틸)-1-피페리딜]메틸]페닐]에티닐]-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-N-티아졸-2-일-아세트아마이드; 및

2-[4-(디플루오로메틸)-6-[2-[4-[[4-(하이드록시메틸)-1-피페리딜]메틸]페닐]에티닐]-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(5-에틸-5-메틸-6,7-디하이드로피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-N-티아졸-2-일-아세트아마이드.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 (I)의 화합물은 2-[4,7-디클로로-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]-N-티아졸-2-일-아세트아마이드인, 조합물.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 (I)의 화합물은 2-[4-(디플루오로메틸)-6-[2-[4-[[4-(하이드록시메틸)-1-피페리딜]메틸]페닐]에티닐]-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(5-에틸-5-메틸-6,7-디하이드로피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-N-티아졸-2-일-아세트아마이드인, 조합물.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 오르토스테릭 EGFR 억제제는 세툭시맙, 파니투무맙, 오시머티닙, 에를로티닙, 게피티닙, 네시투무맙, 네라티닙, 라파티닙, 반데타닙, 브리가티닙, 알모네르티닙, 레이저티닙 및 푸르모네르티닙, 및 이의 약학적으로 허용되는 염에서 선택되고, 특히, 오시머티닙, 알모네르티닙, 레이저티닙 및 푸르모네르티닙, 및 이의 약학적으로 허용되는 염에서 선택되는, 조합물.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 오르토스테릭 EGFR 억제제는 오시머티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인, 조합물.

청구항 15

치료적 활성 물질로 사용하기 위한, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 조합물.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 조합물 및 치료적 불활성 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 17

암, 특히 비소세포 폐암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 조합물.

청구항 18

암, 특히, 비소세포 폐암의 치료 또는 예방을 위한, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 조합물의 용도.

청구항 19

암, 특히, 비소세포 폐암의 치료 또는 예방을 위한 약제를 제조하기 위한, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 조합물의 용도.

청구항 20

비소세포 폐암의 치료 또는 예방을 위한 약제를 제조하기 위한, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 조합물의 용도.

청구항 21

암, 특히, 비소세포 폐암의 치료 또는 예방 방법으로서, 제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 조합물의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 22

제15항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 알로스테릭 EGFR 억제제와 오르토스테릭 EGFR 억제제는 모두 경구로 투여되는, 조합물, 용도, 방법 또는 약학 조성물.

청구항 23

제15항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 알로스테릭 EGFR 억제제는 오르토스테릭 EGFR 억제제와 동시에 투여되는, 조합물, 용도, 방법 또는 약학 조성물.

청구항 24

제15항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 알로스테릭 EGFR 억제제와 오르토스테릭 EGFR 억제제는 공동 제형화되는, 조합물, 용도, 방법 또는 약학 조성물.

청구항 25

제15항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 알로스테릭 EGFR 억제제와 오르토스테릭 EGFR 억제제는 순차적으로 투여되는, 조합물, 용도, 방법 또는 약학 조성물.

청구항 26

제17항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 del19, L858R, T790M 및 C797S에서 선택된 적어도 하나의 EGFR 돌연변이와 관련되는, 조합물, 용도, 방법 또는 약학 조성물.

청구항 27

제17항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 암은 del19, L858R, T790M 및 C797S에서 선택된 적어도 두 개의 EGFR 돌연변이와 관련되는, 조합물, 용도, 방법 또는 약학 조성물.

청구항 28

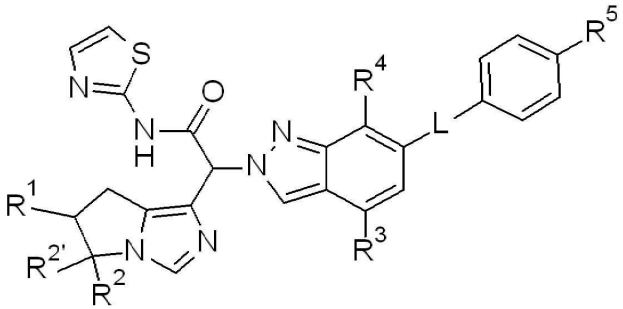
전술한 바와 같은 발명.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 EGFR 돌연변이체를 함유하는 T790M/L858R, T790M/L858R/C797S, L858R, L858R/C797S의 선택적 알로스테릭 EGFR 억제제와 오르토스테릭 EGFR 억제제의 새로운 조합물, 이의 용도 및 약학 조성물에 관한 것이다.

[0002] 본 발명은 특히 알로스테릭 EGFR 억제제와 오르토스테릭 EGFR 억제제의 조합물을 제공하며, 여기서 알로스테릭 EGFR 억제제는 다음 화학식 (I)의 화합물:



[0003] (I)

[0004] 여기서

[0005] L 은 결합 또는 알키닐렌이고;

[0006] R^1 은 수소 또는 할로겐이고;

[0007] R^2 및 $R^{2'}$는 수소 및 알킬에서 독립적으로 선택되거나;

[0008] 또는 R^2 및 $R^{2'}$는, 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 사이클로알킬을 형성하고;

[0009] R^3 은 수소, 할로겐 또는 할로알킬이고;

[0010] R^4는 알킬 또는 할로겐이고;

[0011] R^5는 (헤테로사이클로알킬)알킬렌 또는 헤테로사이클로알킬이고, 여기서 (헤테로사이클로알킬)알킬렌은 R^6에서 독립적으로 선택된 하나 또는 두 개의 치환기로 임의로 치환되고, 헤테로사이클로알킬은 R^7에서 독립적으로 선택된 하나 또는 두 개의 치환기로 임의로 치환되고;

[0012] R^6은 각 경우에 알킬, 사이클로알킬, 하이드록시 및 하이드록시알킬에서 독립적으로 선택되고; 그리고

[0013] R^7은 각 경우에 알킬, 사이클로알킬, 하이드록시 및 하이드록시알킬에서 독립적으로 선택되는

[0014] 화합물;

[0015] 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

배 경 기 술

[0016] HER 계열 수용체 티로신 키나제는 세포 성장, 분화 및 생존을 매개하는 매개체이다. 이러한 수용체 계열에는 4가지 서로 다른 구성원이 포함된다, 즉, 상피 성장 인자 수용체(EGFR, ErbB1 또는 HER1), HER2(ErbB2), HER3(ErbB3) 및 HER4(ErbB4)가 포함된다. 리간드 결합 시 수용체는 동종 및 이종 이량체를 형성하고 이후 내재적 티로신 키나제 활성이 활성화되어 수용체 자동 인산화가 일어나고 하위 신호전달 분자가 활성화된다(Yarden, Y., Sliwkowski, MX. Untangling the ErbB signalling network. Nature Review Mol Cell Biol. 2001 Feb;2(2): 127-37). 과잉 발현이나 돌연변이로 인한 EGFR의 하향조절은 대장암, 췌장암, 신경교종, 두경부암 및 폐암, 특히, 비소세포 폐암(NSCLC)을 포함한 많은 유형의 인간 암에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 수년에 걸쳐 여러 EGFR 표적화 제제가 개발되었다(Ciardiello, F. 및 Tortora, G. (2008). EGFR antagonists in cancer treatment. The New England journal of medicine 358, 1160-1174). EGFR 티로신 키나제의 가역적 억제제인 에를로티닙(Tarceva®)은 여러 국가에서 재발성 NSCLC 치료제로 승인되었다.

[0017] EGFR 티로신 키나제 억제제의 인상적인 단일 작용제 활성은 체세포 키나제 도메인 돌연변이를 지닌 종양을 가진 NSCLC 환자의 하위 집단에서 관찰되는 반면, 야생형 EGFR 환자의 임상적 이점은 크게 감소한다(Paez, J. 외, (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science (New York, NY 304, 1497-1500)). EGFR의 가장 흔한 체세포 돌연변이는 가장 일반적인 돌연변이인 델타 746-750의 엑손 19 결실 및 가장 흔한 돌연변이인 L858R로의 엑손 21 아미노산 치환이다(Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. Nat Rev Cancer. 2007 Mar;7(3): 169-81).

[0018] 치료 내성은 주로 수용체의 ATP 부위 내 2차 T790M 돌연변이로 인해 자주 발생한다. 일부 개발된 돌연변이체 선택적 비가역적 억제제는 T790M 돌연변이체에 대해 높은 활성을 나타내지만, 이들의 효능은 핵심적인 공유 결합을 형성하는 시스테인 잔기인 C797S의 후천적 돌연변이에 의해 손상될 수 있다(Thress, K. S. 외, Acquired EGFR C797S mutation mediates resistance to AZD9291 in non-small cell lung cancer harboring EGFR T790M. Nat. Med. 21, 560-562 (2015)). C797S 돌연변이는 T790M-표적화 EGFR 억제제에 대한 내성의 주요 메커니즘인 것으로 Wang에 의해 추가로 보고되었다(Wang 외, EGFR C797S mutation mediates resistance to third-generation inhibitors in T790M-positive non-small cell lung cancer, J Hematol Oncol. 2016; 9: 59). 오시머티닙에 대한 내성을 유발하는 추가 돌연변이는 Yang에 의해 설명되고, 예를 들어 L718Q이다.(Yang 외, Investigating Novel Resistance Mechanisms to Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor

Osimertinib in Non-Small Cell Lung Cancer Patients, Clinical Cancer Research, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-2310) 및 Lu 외,(Targeting EGFRL858R/T790M and EGFRL858R/T790M/C797S resistance mutations in NSCLC: Current developments in medicinal chemistry, Med Res Rev 2018; 1-32)은 NSCLC 치료에서 EGFRL858R/T790M 및 EGFRL858R/T790M/C797S 내성 돌연변이 표적화에 대한 리뷰 논문을 보고하였다.

[0019] 대부분의 이용가능한 EGFR 티로신 키나제 억제제는 키나제의 ATP 부위를 표적으로 하기 때문에, 다르게 작용하는, 예를 들어, 약물 내성 EGFR 돌연변이체를 표적으로 하는 새로운 치료제가 필요하다.

[0020] 최근의 연구는 알로스테릭 부위를 의도적으로 표적화하는 것이 돌연변이체 선택적 억제제를 유발할 수 있음을 시사한다(Jia 외, Overcoming EGFR(T790M) and EGFR(C797S) resistance with mutant-selective allosteric inhibitors, June 2016, Nature 534, 129-132).

[0021] 따라서, T790M/L858R, T790M/L858R/C797S, L858R, L858R/C797S 함유 EGFR 돌연변이체를 특이적으로 억제하는 선택적 분자를 생성할 필요성이 존재한다. 이러한 선택적 억제제는 암, 특히, T790M 및 C797S 함유 EGFR 돌연변이체를 갖는 암의 치료 및/또는 예방적 치료에 유용할 수 있다.

[0022] 중요한 점은, 이러한 선택적 알로스테릭 억제제는 오르토스테릭 EGFR 억제제에 내성을 갖는 EGFR 돌연변이체를 특징으로 하는 암을 치료하도록 설계되었다는 것이다. 합리적인 이유는 약물 내성이 생기면, 치료제를 오르토스테릭 EGFR 억제제에서 T790M 및/또는 C797S 돌연변이를 갖는 돌연변이체들을 표적하도록 특별히 설계된 알로스테릭 EGFR 억제제로 전환할 수 있기 때문이다.

발명의 내용

[0023] 본 발명은 화학식 (I)의 화합물에 상응하는 선택적 알로스테릭 EGFR 억제제와 오르토스테릭 EGFR 억제제의 조합물에 관한 것이다. 화학식 (I)의 화합물은 T790M/L858R, T790M/L858R/C797S, L858R, L858R/C797S 돌연변이를 효과적으로 표적하며 시험관 내에서 간 청소율이 낮다(표 1 및 2). 중요한 점은, 화학식 (I) 화합물이 Ba/F3 기반 이종이식편에서 오르토스테릭 EGFR 억제제에 대한 내성을 유발하는 L858R/C797S 돌연변이를 생체 내에서 효율적으로 표적한다는 것이다(도 1). 놀랍게도 승인된 오르토스테릭 EGFR 억제제인 오시머티닙과 화학식 (I)의 알로스테릭 EGFR 억제제를 임상적으로 적절한 용량으로 조합하여 치료한 결과, $EGFR^{L858R/T790M}$ 이중 돌연변이를 지닌 EGFR-유발 NSCLC의 확립된 모델인 NCI-H1975 이종이식 마우스에서 종양 퇴행이 극적으로 개선되었다(도 2). 중요한 점은, 화학식 (I)의 EGFR 억제제와 결합되면 오르토스테릭 EGFR 억제제인 오시머티닙의 체류 시간이 약 120배 늘어나고, 따라서 오시머티닙이 EGFR에 공유 결합하는 속도가 빨라진다는 것이다(도 3). 화학식 (I)의 알로스테릭 EGFR 억제제와 오르토스테릭 EGFR 억제제 사이의 이러한 놀라운 긍정적 협동성은 이전에 보고된 적이 없으며, 특히, 비소세포 폐암과 같은 EGFR 관련 암 환자에게 유망한 새로운 치료 전략을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0024] **도 1**: **(A)** Ba/F3 $EGFR^{L858R/C797S}$ 이종이식편에서 화합물 실시예 6(사각형)과 화합물 실시예 3(삼각형)의 항종양 활성은 각각 10 mpk와 30 mpk에서 BID po 투여시 나타났다. 검은색 화살표는 투여량을 나타낸다. 1.0 미만의 종양 조절 비율(TCR)은 종양 성장 억제를 나타내며 신뢰 구간(CI)은 데이터 분포를 반영한다. 1.0 미만의 상위 CI는 통계적 유의성을 확인시켜 준다. 다양한 코호트에서 체중에 유의미한 변화는 발생하지 않았다.

도 2 (A) 마우스의 NCI-H1975 NSCLC 유래 종양($EGFR^{L858R/T790M}$ 이종이식)에서 화합물 실시예 6을 단독으로 투여하거나 오시머티닙과 조합 투여했을 때의 항암 활성. 검은색 화살표는 투여량을 나타낸다. 1.0 미만의 TCR은 종양 성장 억제를 나타내며 CI은 데이터 분포를 반영한다. 1.0 미만의 상위 CI는 통계적 유의성을 확인시켜 준다. 다양한 코호트에서 체중에 유의미한 변화는 발생하지 않았다. (B) 마우스의 NCI-H1975 NSCLC 유래 종양($EGFR^{L858R/T790M}$ 이종이식)에서 화합물 실시예 1을 단독으로 투여하거나 오시머티닙과 조합 투여했을 때의 항암 활성. 검은색 화살표는 투여량을 나타낸다. 1.0 미만의 TCR은 종양 성장 억제를 나타내며 CI은 데이터 분포를 반영한다. 1.0 미만의 상위 CI는 통계적 유의성을 확인시켜 준다.

도 3 (A) 정지 흐름 형광(stopped-flow fluorescence)으로 측정한 결합 동역학. 오시머티닙은 EGFR에 결합되면 EGFR의 TRp 형광을 억제한다. (B) 결합 동역학은 오시머티닙이 알로스테릭 억제제 화합물 실시예 1의 존재 하에 EGFR 키나제 도메인(L858R)과 더 빠르게 반응한다는 것을 직접적으로 보여주며 이는 긍정적인 협동작용을 나타낸다. **(C)** 동역학 데이터의 전체 피팅은 긍정적 협동작용의 메커니즘을 보여준다: 화합물 실시예 1은 오시머티

닙의 체류 시간을 약 120배 증가시키고, 따라서 필수적인 공유 결합이 형성되는 속도를 가속화한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] "억제제"라는 용어는 특정 수용체에 대해 특정 리간드와 경쟁하거나, 특정 수용체에 대한 특정 리간드의 결합을 감소 또는 방지하거나, 특정 단백질의 기능을 감소 또는 방지하는 화합물을 의미한다. 특히, 본 명세서에 사용된 억제제는 EGFR 활성을 표적하거나 감소시키거나 억제하는 화합물을 의미하며, 특정 억제제는 1μM 미만, 500nM 미만, 200nM 미만, 100nM 미만, 50nM 미만, 25nM 미만, 10nM 미만, 5nM 미만, 2nM 또는 1nM 미만의 IC50 값을 가진다. 본 발명의 일부 실시형태에서 용어 "EGFR 억제제"는 EGFR 키나제 활성을 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99% 감소시키는 화합물을 의미한다. "오르토스테릭 EGFR 억제제"라는 용어는, 예를 들어, 에를로티닙, 게프티닙, 오시머티닙, 알모네르티닙, 레이저티닙 및 푸르모네르티닙과 같이 활성 부위에 가깝게 결합하는 EGFR 억제제 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 특히, 메실레이트 염에 관한 것이다. 오르토스테릭 EGFR 억제제의 비제한적인 예에는 세툭시맙(Erbitux®), 파니투무맙(Vectibix®), 오시머티닙(merelectinib, Tagrisso®), 에를로티닙(Tarceva®), 게피티닙(Iressa®), 네시투무맙(Portrazza™), 네라티닙(Nerlynx®), 라파티닙(Tykerb®), 반데타닙(Caprelsa®) 및 브리가티닙(Alunbrig®)이 포함된다.

[0026] "IC50"이라는 용어는 측정된 특정 활성의 50%를 억제하는 데 필요한 특정 화합물의 농도를 나타낸다.

[0027] 본원에서 용어 "알킬"은 단독으로 또는 조합하여 1 내지 8개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알킬기, 특히, 1 내지 6개 이상의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알킬기, 더욱 특히 1 내지 4개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알킬기를 의미한다. 직쇄 및 분지쇄 C1-C8 알킬기의 예는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, tert.-부틸, sec.-부틸, 이성질체 펜틸, 이성질체 헥실, 이성질체 헵틸 및 이성질체 옥틸, 특히, 메틸, 에틸, 프로필, 부틸 및 펜틸이다. "알킬"의 특정 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필 및 tert-부틸이 있다. 메틸은 화학식 (I)의 화합물의 "알킬"의 특정 예이다.

[0028] 용어 "알콕시" 또는 "알킬옥시"는 단독으로 또는 조합하여 화학식 알킬-O- 기, 예를 들어, 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 이소프로폭시, n-부톡시, 이소부톡시, sec-부톡시 및 tert-부톡시를 의미한다(여기서 용어 "알킬"은 상기 주어진 의미를 가짐). "알콕시"의 특정 예로는 메톡시, 에톡시 및 tert-부톡시가 있다.

[0029] 용어 "알킬렌"은 단독으로 또는 조합하여 1 내지 7개 탄소 원자의 선형 포화 2가 탄화수소 기 또는 3 내지 7개 탄소 원자의 2가 분지형 포화 2가 탄화수소 기를 의미한다. 알킬렌 기의 예에는 메틸렌, 에틸렌, 프로필렌, 2-메틸프로필렌, 부틸렌, 2-에틸부틸렌, 펜틸렌, 헥실렌이 포함된다. "알킬렌"의 특정한 예로는 메틸렌이 있다.

[0030] "알키닐렌"이라는 용어는 단독으로 또는 조합하여 2-6개의 탄소 원자로 구성된 선형 2가 탄화수소 사슬 또는 적어도 하나의 삼중 결합을 갖는 3-6개의 탄소 원자로 구성된 분지형 2가 탄화수소 사슬을 의미한다. 대표적인 알키닐렌으로는 에티닐렌, 2,2-디메틸에티닐렌, 프로피닐렌, 2-메틸프로피닐렌, 부티닐렌, 및 펜티닐렌 등이 있다. "알키닐렌"의 특정한 예로는 에티닐렌이 있다.

[0031] "옥시"라는 용어는 단독으로 또는 조합하여 -O- 기를 의미한다.

[0032] 용어 "할로겐" 또는 "할로"는 단독으로 또는 조합하여 불소, 염소, 브롬 또는 요오드, 특히, 불소 또는 염소를 의미한다. 특정한 "할로겐" 또는 "할로"는 불소이다. 용어 "할로"는 또 다른 기와 조합하여 적어도 하나의 할로겐, 특히, 1 내지 5개의 할로겐, 특히, 1 내지 4개의 할로겐, 즉, 1, 2, 3 또는 4개의 할로겐으로 치환된 상기 기를 의미한다.

[0033] 용어 "할로알킬"은 단독으로 또는 조합하여 적어도 하나의 할로겐, 특히, 1 내지 5개의 할로겐, 특히, 1 내지 3개의 할로겐으로 치환된 알킬 기를 나타낸다. "할로알킬"의 특정 예로는 디플루오로메틸 및 트리플루오로메틸이 있다.

[0034] 용어 "하이드록실" 및 "하이드록시"는 단독으로 또는 조합하여 -OH 기를 의미한다.

[0035] 용어 "카르보닐"은 단독으로 또는 조합하여 -C(O)- 기를 의미한다.

[0036] 용어 "헤테로사이클로알킬"은 단독으로 또는 조합하여 4-9개의 고리 원자로 구성된 1가 포화 또는 부분 불포화 모노 또는 바이사이클릭 고리계를 나타내며, 여기에는 N, O 및 S에서 선택된 1, 2 또는 3개의 고리 헤테로원

자가 포함되고 나머지 고리 원자는 탄소이다. 바이사이클릭은 공통으로 하나 또는 두 개의 고리 원자를 갖는 두 개의 고리로 구성되는 것을 의미한다. “헤테로사이클로알킬”의 예로는 모르폴리닐, 피페리디닐, 아제티디닐 및 피페라지닐이 있으며, “헤테로사이클로알킬”의 특정 예로는 피페리디닐 및 모르폴리닐이 있다.

[0037] “사이클로알킬”이라는 용어는 단독으로 또는 조합하여 3-8개의 고리 탄소 원자를 갖는 1가 포화 사이클릭 탄화수소 기를 나타낸다. “사이클로알킬”의 예로는 사이클로프로필, 사이클로부타닐, 사이클로펜틸, 사이클로헥실 또는 사이클로헵틸이 있다. “사이클로알킬” 그룹의 특정 예는 사이클로프로필이다.

[0038] “피페리디닐”과 “피페리딜”이라는 용어는 상호 교환 가능하며, 단독으로 또는 조합하여 5개의 탄소 고리 원자와 1개의 질소 고리 원자를 포함하는 포화 모노사이클을 의미한다.

[0039] 용어 “약학적으로 허용되는 염”은, 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 것은 아닌, 유리 염기 또는 유리 산의 생물학적 유효성 및 성질들을 보유하는 염들을 지칭한다. 이러한 염들은 무기산, 예를 들어, 염화수소산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등, 특히, 염화수소산, 및 유기산, 예를 들어, 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 옥살산, 말레산, 말론산, 숙신산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 신남산, 만델산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 살리실산, N-아세틸시스테인 등을 사용하여 형성된다. 또한 이들 염은 무기 염기 또는 유기 염기를 유리 산에 부가하여 제조될 수 있다. 무기 염기로부터 유도된 염들에는, 나트륨, 칼륨, 리튬, 암모늄, 칼슘, 마그네슘 염 등이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 유기 염기로부터 유도된 염들에는, 자연 발생 치환된 아민, 사이클릭 아민 및 염기성 이온 교환 수지, 예를 들어, 이소프로필아민, 트리메틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 에탄올아민, 리신, 아르기닌, N-에틸피페리딘, 피페리딘, 폴리이민 수지 등을 비롯한 1차, 2차, 및 3차 아민, 치환된 아민의 염이 포함되나 이에 제한되는 것은 아니다. 화학식 (I)의 화합물의 특정한 약학적으로 허용되는 염은 염산염, 메탄술폰산염 및 시트르산염이다. 특히 약학적으로 허용되는 오시머티닙의 염은 메탄설폰산염으로, 메실레이트염이라고도 불린다.

[0040] 한 실시형태에서 본 발명은 본원에 기술된 바와 같은 오르토스테릭 EGFR 억제제 및 화학식 (I)의 알로스테릭 EGFR 억제제, “리플렛”으로도 알려진 처방 정보, 블리스터 포장 또는 병(HDPE 또는 유리) 및 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 처방 정보에는 바람직하게는 본원에 기술된 바와 같은 오르토스테릭 EGFR 억제제와 알로스테릭 EGFR 억제제 치료의 조합물 투여에 관한 환자에 대한 조언이 포함된다.

[0041] 칸-잉골드-플렐로그 순위규칙에 따르면 비대칭 탄소 원자는 “R” 또는 “S” 배열일 수 있다. 화학식 (I)의 화합물은 여러 비대칭 중심을 함유할 수 있고 광학적으로 순수한 거울상이성질체, 거울상이성질체의 혼합물, 예를 들어, 라세미체, 광학적으로 순수한 부분입체이성질체, 부분입체이성질체의 혼합물, 부분입체이성질체 라세미체 또는 부분입체이성질체 라세미체의 혼합물의 형태로 존재할 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 적용 가능한 경우, 화학식 (I)의 화합물의 모든 치환기를 그 상응하는 중수소화된 형태로 포함한다.

[0043] 광학적으로 순수한 거울상 이성질체가 제공되는 실시형태에서, 광학적으로 순수한 거울상 이성질체는 해당 화합물이 > 90 중량%의 원하는 이성질체, 특히, > 95 중량%의 원하는 이성질체, 또는 더 특히 > 99 중량%의 원하는 이성질체를 함유함을 의미하며, 상기 중량 퍼센트는 해당 화합물의 이성질체 총 중량을 기준으로 한다. 키랄적으로 순수하거나 키랄적으로 농축된 화합물은 키랄 선택적 합성이나 거울상 이성질체들의 분리에 의해 제조될 수 있다. 거울상 이성질체들의 분리는 최종 생성물 또는 대안적으로 적합한 중간체에서 수행될 수 있다.

[0044] 화학식 (I)의 화합물 및 이의 약학적으로 허용되는 염은 약물(예를 들어, 약학적 제제 형태)로 사용될 수 있다. 약학적 제제는 경구(예를 들어, 정제, 코팅 정제, 당의정, 경질 및 연질 젤라틴 캡슐, 용액, 에멀전 또는 현탁액 형태), 비강(예를 들어, 비강 스프레이 형태), 직장(예를 들어, 좌약 형태) 또는 국소 안구(예를 들어, 용액, 연고, 젤 또는 수용성 중합체 삽입물 형태)를 통해 내부적으로 투여될 수 있다. 그러나 이러한 투여는 또한 비경구적으로, 예를 들어, 근육 내, 정맥 내 또는 안구 내(예를 들어, 멸균 주사액 형태)로 이루어질 수 있다.

[0045] 화학식 (I)의 화합물 및 이의 약학적으로 허용되는 염은 정제, 코팅 정제, 당의정, 경질 젤라틴 캡슐, 주사액 또는 국소 제형의 제조를 위한 약학적으로 불활성인 무기 또는 유기 보조제와 함께 처리될 수 있으며, 락토스, 옥수수 전분 또는 이의 유도체, 활석, 스테아르산 또는 이의 염 등은 이러한 정제, 당의정 및 경질 젤라틴 캡슐을 위한 보조제로 사용될 수 있다.

[0046] 연질 젤라틴 캡슐에 적합한 보조제로는, 예를 들어, 식물성 오일, 왁스, 지방, 반고체 물질 및 액상 폴리올 등

이 있다.

[0047] 용액과 시럽 생산에 적합한 보조제로는, 예를 들어, 물, 폴리올, 자당, 전화당, 포도당 등이 있다.

[0048] 주사용 용액에 적합한 보조제로는, 예를 들어, 물, 알코올, 폴리올, 글리세롤, 식물성 오일 등이 있다.

[0049] 좌약에 적합한 보조제로는, 예를 들어, 천연 또는 경화 오일, 왁스, 지방, 반고체 또는 액상 폴리올 등이 있다.

[0050] 국소 안과용 제형에 적합한 보조제로는, 예를 들어, 사이클로덱스트린, 만니톨 또는 당해 기술 분야에 공지된 기타 여러 담체 및 부형제가 있다.

[0051] 더욱이, 약학 제제는 방부제, 가용화제, 점성 증가 물질, 안정화제, 습윤제, 유화제, 감미제, 착색제, 향미제, 삼투압 변화용 염, 완충제, 차폐제 또는 항산화제를 함유할 수 있다. 이들은 또한 치료적으로 유용한 다른 물질들도 함유할 수 있다.

[0052] 다음 실시예들은 본 발명을 제한하는 것이 아니라 설명하는 것이나, 이들은 단지 본 발명을 대표하는 역할을 한다. 약학 조성물은 편리하게는 약 1-500 mg, 특히, 1-100 mg의 화학식 (I)의 화합물을 함유한다. 약학 조성물은 편리하게는 약 1-500 mg, 특히, 1-100 mg의 화학식 (II)의 화합물을 함유한다. 특정 실시형태에서, 화학식 (I)의 화합물을 함유하는 약학 조성물은 추가로 약 1-500 mg, 특히, 80 mg의 오르토스테릭 EGFR 억제제를 고정 용량 조합물에 함유한다.

[0053] 본 발명에 따른 조성물의 비제한적인 예는 다음과 같다:

[0054] **본 발명의 화합물을 포함하는 약학 조성물의 제조:**

[0055] 다음 조성의 정제들이 일반적인 방식으로 제조된다:

[0056]

성분	mg/정제			
	5	25	100	500
화학식 (I)의 화합물	5	25	100	500
무수 락토스 DTG	125	105	30	150
Sta-Rx 1500	6	6	6	60
미세결정질 셀룰로스	30	30	30	450
마그네슘 스테아레이트	1	1	1	1
합계	167	167	167	831

[0057] 제조 절차

[0058] 1. 성분 1, 2, 3, 4를 혼합하고 정제수로 과립화한다.

[0059] 2. 과립을 50℃에서 건조시킨다.

[0060] 3. 과립을 적절한 분쇄 장비에 통과시킨다.

[0061] 4. 성분 5를 첨가하고 3분간 혼합한다; 적절한 압력으로 가압한다.

[0062] 다음 조성의 캡슐들이 일반적인 방식으로 제조된다:

성분	mg/캡슐			
	5	25	100	500
화학식 (I)의 화합물	5	25	100	500
함수 락토스	159	123	148	-
옥수수 전분	25	35	40	70
활석	10	15	10	25
마그네슘 스테아레이트	1	2	2	5
합계	200	200	300	600

[0063]

[0064] 제조 절차

[0065] 1. 성분 1, 2 및 3을 적절한 믹서에서 30분 동안 혼합한다.

[0066] 2. 성분 4 및 5를 첨가하고 3분 동안 혼합한다.

[0067] 3. 적절한 캡슐에 채운다.

[0068] 화학식 (I)의 화합물, 락토스 및 옥수수 전분을 먼저 믹서에서 혼합한 다음 분쇄기에서 혼합한다. 이 혼합물을 믹서로 다시 넣고; 여기에 활석을 첨가하고 완전히 혼합한다. 이 혼합물을 기기를 사용하여 적합한 캡슐, 예를 들어, 경질 젤라틴 캡슐에 채운다.

[0069] 다음 조성의 주사 용액들이 일반적인 방식으로 제조된다:

성분	mg/주사 용액.
화학식 (I)의 화합물	3
폴리에틸렌 글리콜 400	150
아세트산	pH 5.0 이 되기에 충분한 양 첨가
주사 용수	1.0 ml 이 되도록 첨가

[0070]

[0071] 실시예

[0072] **약어**

[0073] AcOH = 아세트산; ATP = 아데노신 트리포스페이트; BID = 하루 두 번; CAS = 화학 초록 서비스; CDI = 1,1'-카르보닐디이미다졸; Cl_{int} = 고유 청소율; c_{max} = 최대 혈장 농도; D = 연구 일차; DCM = 디클로로메탄; DME = 디메톡시에탄; DMF = 디메틸포름아마이드; DMSO = 디메틸 설폭사이드; ESI = 전기 분무 이온화; EtOAc = 에틸 아세테이트; EtOH = 에탄올; HATU = 헥사플루오로포스페이트 아자벤조트리아졸 테트라메틸 우로늄; LDA = 리튬 디이소프로필아마이드; MeOH = 메탄올; MS = 질량 분석법; NMR = 핵자기 공명; PO = 경구, per os; QD = 하루 한 번; RT = 실온; SC = 피하로; THF = 테트라하이드로푸란.

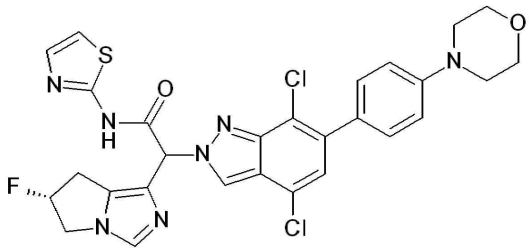
[0074] 다음의 예는 본 발명의 설명을 위해 제공된다. 이는 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안 되며, 단지 발명을 대표하는 것으로 간주되어야 한다.

[0075] 제조 실시예가 거울상 이성질체의 혼합물로 얻어지는 경우, 순수한 거울상 이성질체는 본원에 기재된 방법 또는, 예를 들어, 키랄 크로마토그래피 또는 결정화와 같은 당업자에게 알려진 방법을 통해 얻을 수 있다.

[0076] **실시예 1**

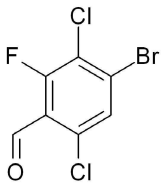
[0077] **2-[4,7-디클로로-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이**

미다졸-1-일]-N-티아졸-2-일-아세트아마이드;



[0078]

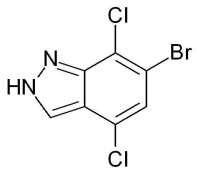
[0079] 단계 1: 4-브로모-3,6-디클로로-2-플루오로벤즈알데하이드



[0080]

[0081] 1-브로모-2,5-디클로로-3-플루오로벤젠(9.41 g, 38.6 mmol)을 테트라하이드로푸란(70 ml)에 녹인 용액을 건조 얼음/아세톤 조에서 냉각시켰다. THF(21.2 ml, 42.5 mmol, 1.1 당량)에 LDA, 2mol/l을 첨가하고 혼합물을 -75 ℃에서 20분 동안 교반하였다. N,N-디메틸포름아마이드(2.82 g, 3.0 ml, 38.6 mmol, 1 당량)를 적가하고 1시간 동안 교반하였다. 에테르에 아세트산을 넣은 용액(1:1, 10 ml)을 첨가하였다. 혼합물을 실온으로 가온하였다. 물을 첨가하고 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 물로 세척하고, 건조($MgSO_4$)하고, 여과한 후 진공에서 농축시켜 미정제 표제 화합물(정량적 수율)을 밝은 노란색 고체 형태로 얻었다. 이 화합물은 추가 정제없이 다음 단계에 사용되었다.

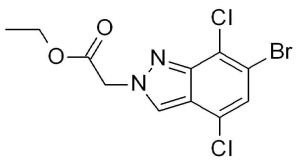
[0082] 단계 2: 6-브로모-4,7-디클로로-1H-인다졸



[0083]

[0084] 4-브로모-3,6-디클로로-2-플루오로벤즈알데하이드(실시예 1, 단계 1)(10.5 g, 38.6 mmol)를 디옥산(50ml)에 녹인 용액에 하이드라진 수화물(3.86 g. 3.78 ml, 77.2 mmol, 2.0 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 3일 동안 교반하였다. 하이드라진 수화물(386 mg, 0.38 ml, 7.72 mmol, 0.2 당량)을 첨가하고, 혼합물을 7시간 동안 70℃까지 가온시켰다. 실온으로 냉각시킨 후 물을 첨가하고 침전된 고체를 여과하여 수집하였다. 상기 고체에 소량의 아세토니트릴을 첨가하고 2시간 동안 교반하였다. 고체를 여과하여 수집하고 소량의 아세토니트릴로 세척한 후 건조하여 표제 화합물(7.8 g, 76% 수율)을 회백색 고체로 얻었다. *m/z* 267.0/269.0, $[M+H]^+$, ESI pos, Br 동위 원소.

[0085] 단계 3: 에틸 2-(6-브로모-4,7-디클로로-인다졸-2-일)아세테이트

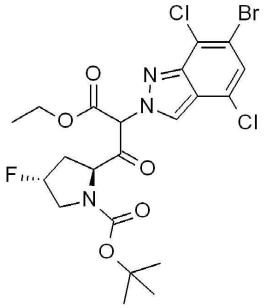


[0086]

[0087] 6-브로모-4,7-디클로로-1H-인다졸(*실시예 1, 단계 2*)(7.84 g, 29.5 mmol, 당량: 1)을 N,N-디메틸아세트아마이드(11.5 mL)에 녹인 용액에 에틸 2-브로모아세테이트(9.85 g, 6.53 ml, 59 mmol, 2.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 100℃에서 16시간 동안 교반하였다. 얼음을 첨가하고 침전된 고체를 여과하여 수집하고 물로 세척하였다. 이 화합물을 끓는 에탄올에서 결정화하였다. 고체를 여과하여 수집하고 소량의 에탄올로 세척한 후 건

조하여 표제 화합물(7.5 g, 70% 수율)을 백색 고체로 얻었다. *m/z* 353.0, 355.0, $[M+H]^+$, ESI pos, Br 동위 원소.

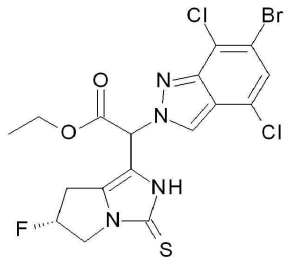
[0088] 단계 4: tert-부틸 (2S,4R)-2-[2-(6-브로모-4,7-디클로로-인다졸-2-일)-3-에톡시-3-옥소-프로파노일]-4-플루오로-피롤리딘-1-카르복실레이트



[0089]

[0090] (2S,4R)-1-(tert-부톡시카르보닐)-4-플루오로피롤리딘-2-카르복시산(2.34 g, 10 mmol, 1.55 당량)을 테트라하이드로푸란(11 ml)에 녹인 용액을 얼음 조에서 냉각시켰다. 카르보닐디이미다졸(1.63 g, 10 mmol, 1.55 당량)을 첨가하였다. 냉각조를 제거하고 혼합물을 3시간 동안 교반하여 용액 A를 얻었다. 2-(6-브로모-4,7-디클로로-인다졸-2-일)아세테이트(*실시예 1, 단계 3*)(2.28 g, 6.5 mmol)를 테트라하이드로푸란(11 ml)에 녹인 용액을 -70℃로 냉각시켰다. 테트라하이드로푸란(5.0 ml, 10 mmol, 1.55 당량)에 2mol/l의 LDA를 5분 이내에 적가하였다. 혼합물을 -70℃에서 30분 동안 교반하였다. 용액 A를 5분 이내에 적가하였다. 혼합물을 냉각조에 넣고 밤새도록 실온까지 가온시켰다. 포화 NH_4Cl 수용액을 첨가한 후, 혼합물을 에틸 아세테이트로 두 번 추출하였다. 유기층을 물로 세척하고 합친 다음 황산나트륨으로 건조시킨 후 농축시켜 최종 표제 화합물(정량적 수율)을 얻었고 이는 추가 정제 없이 다음 단계에 사용되었다. *m/z* 566.1/568.1, $[M+H]^+$, ESI pos, Br 동위 원소.

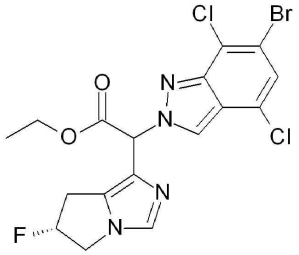
[0091] 단계 5: 에틸 2-(6-브로모-4,7-디클로로-인다졸-2-일)-2-[(6R)-6-플루오로-3-티옥소-2,5,6,7-테트라하이드로피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]아세테이트



[0092]

[0093] tert-부틸 (2S,4R)-2-[2-(6-브로모-4,7-디클로로-인다졸-2-일)-3-에톡시-3-옥소-프로파노일]-4-플루오로-피롤리딘-1-카르복실레이트(*실시예 1, 단계 4*)(4.23 g, 6.41 mmol)를 디옥산(11 ml) 중 HCl, 4M에 녹인 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 혼합물을 농축하여 건조시켰다. 잔류물을 에탄올(37 ml)에 용해시키고, 티오시안산칼륨(829 mg, 8.53 mmol, 1.33당량) 및 에탄올 중의 HCl, 1M(12.8ml)을 첨가한 후 실온에서 40시간 동안 교반하였다. 물을 첨가하고 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 물로 세척하고 $MgSO_4$로 건조한 다음 여과하고, 농축하고 건조하여 미정제 표제 화합물(2.5 g, 76 % 수율)을 얻었으며, 이는 추가 정제 없이 다음 단계에 사용되었다. *m/z* 509.0/511.0, $[M+H]^+$, ESI pos, Br 동위 원소.

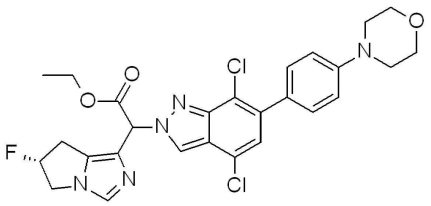
[0094] 단계 6: 에틸 2-(6-브로모-4,7-디클로로-인다졸-2-일)-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]아세테이트



[0095]

[0096] 에틸 2-(6-브로모-4,7-디클로로-인다졸-2-일)-2-[(6R)-6-플루오로-3-티옥소-2,5,6,7-테트라하이드로피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]아세테이트(*실시예 1, 단계 5*)(1.46 g, 2.88 mmol)를 아세트산(10 ml)에 녹인 용액을 10℃로 냉각시켰다. 과산화수소, 35%(1.12 g, 1.01 ml, 11.5 mmol, 4 당량)을 적가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 과량의 과산화수소는 포화된 아황산나트륨 용액을 첨가하여 파괴하였다. 약간의 물(모든 소금을 녹일 만큼)과 에틸 아세테이트를 첨가한 후, 고체 탄산나트륨을 조심스럽게 첨가하여 혼합물의 pH를 9로 맞추었다. 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 물로 세척하고, 황산나트륨으로 건조시킨 후 농축시켰다. 생성물을 크로마토그래피(SiO_2, 헵탄 중의 0-100% 에틸 아세테이트)로 정제하여 표제 화합물을 밝은 갈색 고체로 (0.81 g, 58% 수율) 얻었다. *m/z* 475.0/477.0, $[M+H]^+$, ESI pos, Br 동위 원소.

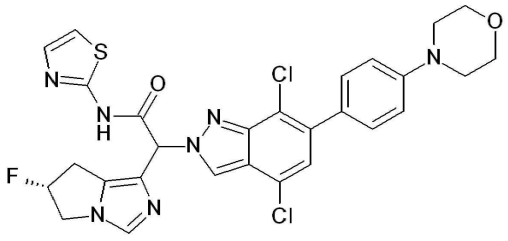
[0097] 단계 7: 에틸 2-[4,7-디클로로-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]아세테이트



[0098]

[0099] 에틸 2-(6-브로모-4,7-디클로로-인다졸-2-일)-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]아세테이트(*실시예 1, 단계 6*)(100 mg, 0.21 mmol), (4-모르폴리노페닐)보론산(130 mg, 0.63 mmol, 3당량) 및 탄산세슘(205 mg, 0.63 mmol, 3당량)을 톨루엔(3.0 ml)과 혼합한 후, 초음파 처리 하에 혼합물에 아르곤을 버블링하여 탈기하였다. [1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센]디클로로팔라듐(II)(15 mg, 0.02 mmol, 0.1 당량)을 첨가하고, 혼합물을 밀폐된 튜브에서 110℃에서 30분 동안 교반하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 에틸 아세테이트로 희석하고, 반농축 탄산나트륨 용액으로 세척하고, 황산나트륨으로 건조시킨 후 농축시켰다. 미정제 물질을 플래시 크로마토그래피(SiO_2, 에틸 아세테이트 중 0 내지 40% 메탄올)로 정제하여 표제 화합물 (82 mg, 69% 수율)을 밝은 갈색 비정질 고체로 의 얻었다. *m/z* 558.4, $[M+H]^+$, ESI pos.

[0100] 단계 8: 2-[4,7-디클로로-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]-N-티아졸-2-일-아세트아마이드;



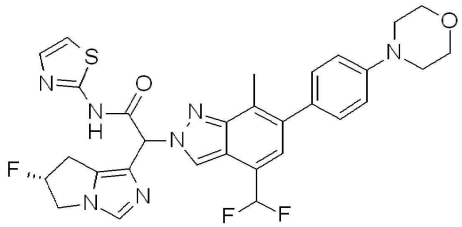
[0101]

[0102] 에틸 2-[4,7-디클로로-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]아세테이트(*실시예 1, 단계 7*)(40 mg, 0.071 mmol)를 테트라하이드로푸란(1.1 ml)에 녹인 용액에 LiOH 1M(101 μl, 0.10 mmol, 1.5당량)과 물(400 μl)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 혼합물을 농축하고 건조시켰다. 잔류물을 N,N-디메틸포름아마이드(1.1 ml)에 용해시켰다. 티아졸-2-아민(9 mg, 0.086 mmol, 1.2 당량), HATU(33 mg, 0.086 mmol, 1.2 당량) 및 휘니히 염기(28 mg, 0.037 ml, 0.21

mmol, 3 당량)를 첨가한 후, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 물을 첨가하고 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 합친 후, 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 미정제 물질을 플래시 크로마토그래피(SiO_2, 에틸 아세테이트 중 0 내지 40% 메탄올)로 정제하여 표제 화합물(22 mg, 50 % 수율)을 밝은 갈색 고체로 의 얻었다. *m/z* 612.4, $[M+H]^+$, ESI pos.

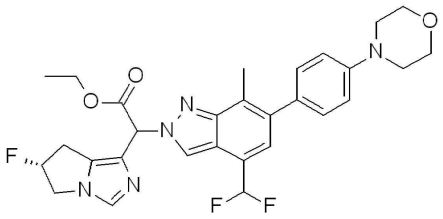
[0103] **실시예 2**

[0104] **2-[4-(디플루오로메틸)-7-메틸-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]-N-티아졸-2-일-아세트아마이드**



[0105]

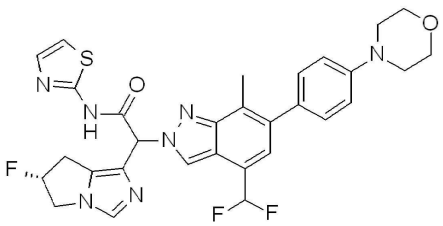
[0106] 단계 1: 에틸 2-[4-(디플루오로메틸)-7-메틸-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]아세테이트



[0107]

[0108] 중간체 1(0.5 g, 1.06 mmol, 당량: 1.0), (4-모르폴리노페닐)보론산(CAS 186498-02-2, 329 mg, 1.59 mmol, 당량: 1.5) 및 K_2CO_3 (183 mg, 1.33 mmol, 당량: 1.25)를 2-MeTHF(6 mL) 및 물(1 mL)에 현탁시킨 현탁액을 아르곤으로 10분간 탈기시켰다. 디클로로[비스(디페닐포스피노페닐)에테르]팔라듐(II) (CAS 205319-06-8, 91 mg, 127 μmol, 당량: 0.12)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 85℃에서 5시간 동안 교반하였다. AcOH(191 mg, 182 μL, 3.18 mmol, 당량: 3.0)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 EtOAc/THF 2:1에 붓고 물과 염수로 세척하였다. 유기 층을 Na_2SO_4로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, 12 g, 헵탄 중 0% 내지 50% (EtOAc/EtOH/aq. NH3 75:25:2))로 정제하여 표제 화합물을 회백색 고체(433 mg, 743 μmol, 70% 수율)로 얻었다. *m/z* 554.4 $[M+H]^+$, ESI pos.

[0109] 단계 2: 2-[4-(디플루오로메틸)-7-메틸-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]-N-티아졸-2-일-아세트아마이드



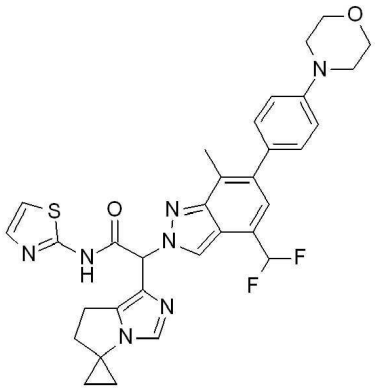
[0110]

[0111] 에틸 2-[4-(디플루오로메틸)-7-메틸-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]아세테이트(720 mg, 1.3 mmol, 당량: 1.0)를 THF(9 mL) 및 MeOH(9 mL)에 녹인 용액에 LiOH(1 M aq., 2.6 mL, 2.6 mmol, 당량: 2.0)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. HCl(5 N aq., 520 μL, 2.6 mmol, 당량: 2.0)을 첨가하였다(pH 6). 톨루엔을 첨가하고, 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켰다. 카르복실산을 DMSO(6 mL)에 용해시키고, 티아졸-2-아민(195 mg, 1.95 mmol, 당량: 1.5), DIPEA(840 mg, 1.14 mL, 6.5 mmol, 당량: 5.0) 및 HATU(742 mg, 1.95 mmol, 당량: 1.5)를 첨가하였다.

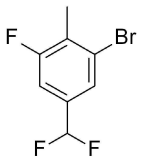
반응 혼합물을 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc/THF 2:1에 붓고 물과 염수로 세척하였다. 유기 층을 Na_2SO_4로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질은 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, 40 g, DCM 중 0% 내지5% MeOH)로 정제하였다. 생성물을 동결 건조하여 표제 화합물(501 mg, 63% 수율)을 회백색 고체로 얻었다. *m/z* 608.3 $[M+H]^+$, ESI pos.

[0112] **실시예 3**

[0113] **2-[4-(디플루오로메틸)-7-메틸-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-스피로[6,7-디하이드로피롤로[1,2-c]이미다졸-5,1'-사이클로프로판]-1-일-N-티아졸-2-일-아세트아마이드**

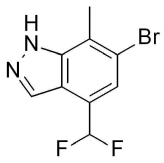
[0114] 

[0115] 단계 1: 1-브로모-5-(디플루오로메틸)-3-플루오로-2-메틸-벤젠

[0116] 

[0117] 3-브로모-5-플루오로-4-메틸벤즈알데하이드(CAS # 1370411-47-4, 20.5 g, 89.7 mmol, 1.0당량)을 디클로로메탄(98 mL)에 녹인 용액에 모르폴리노황삼불화물(CAS # 51010-74-3, 24.8 g, 17.3 mL, 135 mmol, 1.5당량)을 나누어 첨가하였다. 반응 혼합물을 0-5℃에서 20분 동안 교반한 다음, 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 얼음 냉각하에 포화된 $NaHCO_3$-수용액(300 mL)을 조심스럽게 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 디클로로메탄에 붓고 물로 세척하였다. 유기층을 황산나트륨으로 건조시킨 후, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, 120 g, 100% 펜탄)로 정제하여 표제 화합물(18.6 g, 87% 수율)을 무색 오일 형태로 얻었다. ^{1}H NMR (300 MHz, 클로로포름-*d*) δ = 7.50 (s, 1H), 7.16 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.57 (t, *J* = 56.0 Hz, 1H), 2.50 - 2.22 (m, 3H)

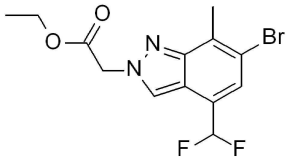
[0118] 단계 2: 6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-1H-인다졸

[0119] 

[0120] 1-브로모-5-(디플루오로메틸)-3-플루오로-2-메틸-벤젠(*실시예 1, 단계 1*)(26.4 g, 110 mmol, 1.0 당량)을 테트라하이드로푸란(240 mL)에 녹인 용액을 -75℃로 냉각시켰다. 리튬 디이소프로필아마이드 용액(테트라하이드로푸란/헵탄/에틸벤젠 중 2 M, 66.3 mL, 133 mmol, 1.2 당량)을 온도를 -70℃이하로 유지시키면서 적가하였다. 반응 혼합물을 -75℃에서 30분 동안 교반하였다. -70℃이하에서 에틸 포르메이트(16.4 g, 17.7 mL, 220 mmol, 2.0 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 -75℃에서 30분 동안 교반하였다. 아세트산(16.6 g, 15.8 mL, 277 mmol, 2.5 당량)을 -55℃이하에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온으로 가온시키고, 에틸 아세테이트에 붓고 희석한 HCl-수용액, 물, 및 염수로 세척하였다. 유기층을 황산나트륨으로 건조시킨 후 진공에서 농축시켜 4-브로모-

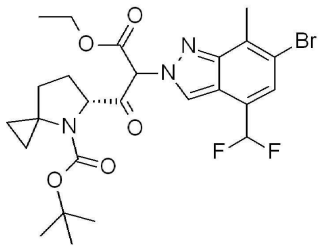
6-(디플루오로메틸)-2-플루오로-3-메틸-벤즈알데하이드(29.5 g)를 노란색 오일로 얻었으며 추가 정제 없이 사용하였다. 4-브로모-6-(디플루오로메틸)-2-플루오로-3-메틸-벤즈알데하이드로 추정되는 미정제 물질(29.5 g)을 디메톡시에탄(150 mL)에 용해시켰다. *O*-메틸하이드록실아민 염산염(10.2 g, 122 mmol, 1.1 당량)과 탄산칼륨(30.6 g, 221 mmol, 2.0 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 45℃에서 2.5시간 동안 교반한 다음, 소결 유리를 통해 여과하고 디메톡시에탄으로 세척하였다(2회). 여과액을 진공에서 농축하였다. 옥심 에테르 중간체를 디메틸설폭사이드(150 mL)에 용해시켰다. 하이드라진 수화물(83 g, 80.5 mL, 1.66 mol, 15당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 110 ℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트/테트라하이드로푸란 5:1의 혼합물에 부었다. 유기층을 물과 염수로 세척하고, 황산나트륨으로 건조시킨 후 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, 2 x 120 g, 헵탄 중 에틸 아세테이트 0% 내지 30% 농도 구배)로 정제하여 표제 화합물(13.5 g, 45% 수율)을 백색 고체(13.5 g, 45% 수율)로 얻었다. LCMS: *m/z* 260.9/262.8 $[M+H]^+$, ESI pos, Br 동위 원소.

[0121] 단계 3: 에틸 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]아세테이트

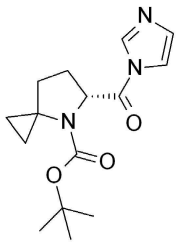
[0122] 

[0123] 6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-1H-인다졸(실시예 1, 단계 2)(19 g, 72.8 mmol, 1.0당량)을 N,N-디메틸포름아마이드(75 mL)에 녹인 용액에 에틸 2-브로모아세테이트(CAS # 105-36-2, 18.2 g, 12.2 mL, 109 mmol, 1.5 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 100 ℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트에 붓고 물과 염수로 세척하였다. 유기층을 황산나트륨으로 건조시킨 후, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, 2 x 120g, 헵탄 중 에틸 아세테이트 0% 내지 20% 농도 구배)로 정제하여 표제 화합물(21.2 g, 80% 수율)을 노란색 고체로 얻었다. LCMS: *m/z* 346.9/348.8 $[M+H]^+$, ESI pos, Br 동위 원소.

[0124] 단계 4: tert-부틸 (5R)-5-[2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-3-에톡시-3-옥소-프로파노일]-4-아자스피로[2.4]헵탄-4-카르복실레이트

[0125] 

[0126] tert-부틸 (5*R*)-5-(이미다졸-1-카르보닐)-4-아자스피로[2.4]헵탄-4-카르복실레이트의 제조

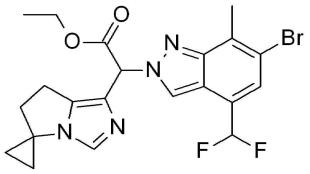
[0127] 

[0128] (5*R*)-4-tert-부톡시카르보닐-4-아자스피로[2.4]헵탄-5-카르복시산 (CAS # 2007916-06-3, 1.02 g, 4.21 mmol, 1.0 당량)을 디클로로메탄(17 mL)에 녹인 용액에 1,1'-카르보닐디이미다졸 (818 mg, 5.04 mmol, 1.2 당량)을 3회에 걸쳐 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 2.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ 수용액에 붓고 디클로로메탄으로 3번 추출하였다. 합쳐진 유기층들을 황산나트륨으로 건조시키고 여과한 후 진공에서 농축

시켜 tert-부틸 (5*R*)-5-(이미다졸-1-카르보닐)-4-아자스피로[2.4]헵탄-4-카르복실레이트 (1.30 g, 95% 수율, 90% 순도)를 회백색 고체로 얻었으며, 이를 다음 단계에 곧바로 사용하였다.

[0129] 에틸 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]아세테이트(*실시예 1, 단계 3*)(1.2 g, 3.46 mmol, 1.0 당량)를 테트라하이드로푸란(16 mL)에 녹인 용액을 -50℃로 냉각시켰다. NaHMDS(테트라하이드로푸란 중 1M)(4 mL, 4 mmol, 1.16당량)를 첨가하고 반응 혼합물을 -50℃에서 45분간 교반하였다. 전술한 tert-부틸 (5*R*)-5-(이미다졸-1-카르보닐)-4-아자스피로[2.4]헵탄-4-카르복실레이트 (1.29 g, 3.98 mmol, 1.15 당량)를 테트라하이드로푸란(16 mL)에 녹인 용액을 -50℃에서 적가하였다. 반응 혼합물을 -50℃에서 30분 동안 교반하였다. 그런 다음 냉각조를 제거하고 반응 혼합물을 실온까지 가온시켰다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 냉각시키고 포화 NH_4Cl 수용액으로 퀀칭시키고, 물로 희석한 후 아세트산 에틸로 추출하였다. 수용액층을 에틸 아세테이트로 역추출하였다. 유기층을 포화 $NaHCO_3$ 수용액으로 세척한 다음 염수로 세척하였다. 합쳐진 유기층을 황산나트륨으로 건조시킨 후, 여과하고 진공에서 농축시켜 표제 화합물(2.37 g, 96% 수율, 80% 순도)을 밝은 갈색 거품으로 얻었으며, 추가 정제 없이 사용하였다. LCMS: *m/z* 570.3/572.3 $[M+H]^+$, ESI pos, Br 동위 원소.

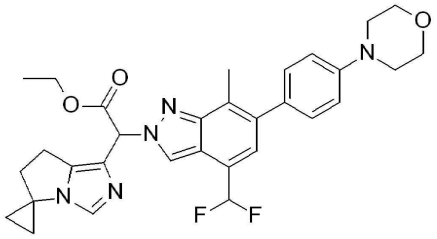
[0130] 단계 5: 에틸 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-스피로[6,7-디하이드로피롤로[1,2-*c*]이미다졸-5,1'-사이클로프로판]-1-일-아세테이트



[0131]

[0132] tert-부틸 (5*R*)-5-[2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-3-에톡시-3-옥소-프로파노일]-4-아자스피로[2.4]헵탄-4-카르복실레이트 (*실시예 1, 단계 4*) (2.36 g, 3.31 mmol, 1.0 당량, 80% 순도) 및 HCl (1,4-디옥산 중 4 M, 4.2 mL, 16.8 mmol, 5.07 당량)의 혼합물. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. HCl (1,4-디옥산 중 4 M, 1 mL, 4.0 mmol, 1.21 당량)을 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. HCl (1,4-디옥산 중 4 M, 1 mL, 4.0 mmol, 1.21 당량)을 첨가하고 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 에탄올(7.6 mL)과 물(2.0 mL)로 희석하였다. 티오시안산칼륨(419 mg, 4.31 mmol, 1.3 당량)을 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 냉각시키고 피리딘(3.91 g, 4 mL, 49.46 mmol, 14.9 당량)을 천천히 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 1 N $KHSO_4$ + 물에 붓고 에틸 아세테이트로 3번 추출하였다. 유기층을 염수로 세척하고, 황산나트륨으로 건조시킨 후, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 아세트산(7.6 mL)에 녹인 후 0℃로 냉각시켰다. 과산화수소(물 중 35 중량% 용액, 0.580 mL, 6.62 mmol, 2.0 당량)를 0℃에서 적가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 과량의 과산화수소는 1 M $Na_2S_2O_3$ 수용액을 이용하여 파괴하였다. 혼합물을 고체 Na_2CO_3로 조심스럽게 염기화하고 에틸 아세테이트로 두 번 추출하였다. 유기층을 염수로 세척하고, 합치고, 황산나트륨으로 건조시킨 후, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 ISOLUTE HM-N에 흡착시키고 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, 24 g, 헵탄 중 0% 내지 100% 에틸 아세테이트 농도 구배)로 정제하였다. 생성물을 포함하는 모든 분획을 합친 후 진공 상태에서 농축하여 표제 화합물(882 mg, 53% 수율)을 밝은 노란색 고체로 얻었다. LCMS: *m/z* 479.3/481.3 $[M+H]^+$, ESI pos, Br 동위 원소.

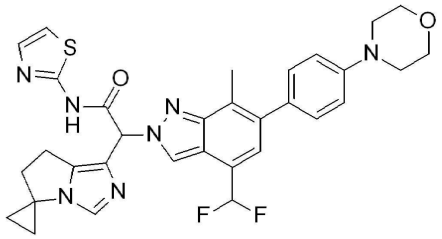
[0133] 단계 6: 에틸 2-[4-(디플루오로메틸)-7-메틸-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-스피로[6,7-디하이드로피롤로[1,2-*c*]이미다졸-5,1'-사이클로프로판]-1-일-아세테이트



[0134]

[0135] 1,4-디옥산 (6.0 mL) 중 디클로로메탄 (82 mg, 0.10 mmol, 0.14 당량)과 에틸 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-스피로[6,7-디하이드로피롤로[1,2-*c*]이미다졸-5,1'-사이클로프로판]-1-일-아세테이트 (*실시예 1, 단계 5*) (350 mg, 0.69 mmol, 1.00 당량), (4-모르폴리노페닐)보론산 (CAS # 186498-02-2, 187 mg, 0.90 mmol, 1.30 당량), 탄산세슘 (679 mg, 2.08 mmol, 3.00 당량) 및 [1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센]디클로로팔라듐(II) 복합체의 혼합물에 아르곤을 흘려넣고 100℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각한 다음 에틸 아세테이트와 물로 추출하였다. 수용액층을 에틸 아세테이트로 역추출하였다. 유기층을 물과 염수로 세척하였다. 합쳐진 유기층을 황산나트륨으로 건조시킨 후, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 ISOLUTE HM-N에 흡착시키고 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, 24 g, 헵탄 중 0% 내지 90% 에틸 아세테이트 농도 구배)로 정제하였다. 생성물을 포함하는 모든 분획을 합치고 농축하여 표제 화합물(352 mg, 81% 수율, 90% 순도)을 회백색 거품으로 얻었다. LCMS: *m/z* 562.5 $[M+H]^+$, ESI pos.

[0136] 단계 7: 2-[4-(디플루오로메틸)-7-메틸-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-스피로[6,7-디하이드로피롤로[1,2-*c*]이미다졸-5,1'-사이클로프로판]-1-일-*N*-티아졸-2-일-아세트아마이드

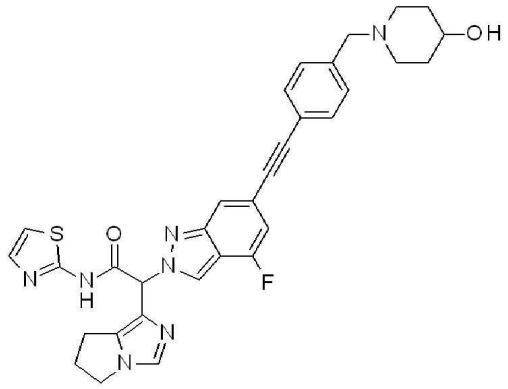


[0137]

[0138] 에틸 2-[4-(디플루오로메틸)-7-메틸-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-스피로[6,7-디하이드로피롤로[1,2-c]이미다졸-5,1'-사이클로프로판]-1-일-아세테이트 (*실시예 1, 단계 6*) (346 mg, 0.55 mmol, 1.0 당량)를 에탄올 (1.8 mL) 및 테트라하이드로푸란 (1.8 mL)에 녹인 용액에 수산화리튬(1 M 수용액, 0.64 mL, 0.64 mmol, 1.15 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 증발시키고, 톨루엔과 함께 두 번 공증발시켰다. 잔류물을 *N,N*-디메틸포름아마이드 (1.8 mL) and *N,N*-디이소프로필에틸아민 (0.30 mL, 1.72 mmol, 3.1 당량), 티아졸-2-아민 (72 mg, 0.72 mmol, 1.3 당량)에 현탁시키고 HATU (274 mg, 0.72 mmol, 1.3 당량)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 45분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트와 물로 추출하였다. 수용액층을 에틸 아세테이트로 역추출하였다. 유기층을 물로 세 번 씻고, 염수로 한 번 세척하였다. 합쳐진 유기층을 황산나트륨으로 건조시킨 후, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 미정제 생성물을 ISOLUTE HM-N에 흡착시키고 플래시 크로마토그래피 (실리카 겔, 25 g, 디클로로메탄 중 0% 내지 5% 메탄올 농도 구배)로 정제하였다. 생성물을 포함하는 모든 분획을 합친 후 진공 상태에서 농축시켰다. 잔류물을 ISOLUTE HM-N에 흡착시키고 플래시 크로마토그래피 (Si-아민, 12 g, 에틸 아세테이트 중 0% 내지 10% 메탄올 농도 구배)로 재정제하였다. 생성물을 포함하는 모든 분획을 합치고 농축하여 표제 화합물(183 mg, 53% 수율)을 회백색 거품으로 얻었다. LCMS: *m/z* 616.4 $[M+H]^+$, ESI pos.

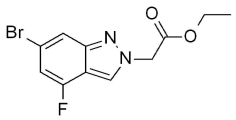
[0139] **üüüü실시예 4**

[0140] **2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-2-(4-플루오로-6-((4-((4-하이드록시피페리딘-1-일)메틸)페닐)에티닐)-2H-인다졸-2-일)-N-(티아졸-2-일)아세트아마이드**



[0141]

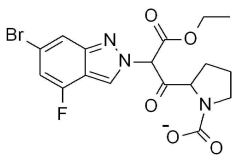
[0142] 단계 1: 에틸 2-(6-브로모-4-플루오로-인다졸-2-일)아세테이트



[0143]

[0144] 6-브로모-4-플루오로-1H-인다졸 (CAS 885520-23-0) (1 당량), 에틸 2-브로모아세테이트 (2 당량) 및 *N,N*-디메틸아세트아마이드(용액을 제조하기 위한 소량)의 혼합물을 반응이 완료될 때까지 100℃로 가열하였다. 실온으로 냉각시킨 후 얼음을 넣고 침전된 고체를 여과하여 수집한 다음 물로 세척하였다. 표제 화합물(회백색 고체, 53% 수율)을 플래시 크로마토그래피 (실리카 겔, n-헵탄 중 0% 내지 40% 에틸 아세테이트)를 사용하여 정제하였다. ^{1}H NMR (클로로포름-*d*, 300 MHz) δ = 8.08 (d, 1H, *J* = 0.8 Hz), 7.68 (t, 1H, *J* = 1.1 Hz), 6.87 (dd, 1H, *J* = 1.3, 9.6 Hz), 5.18 (s, 2H), 4.28 (q, 2H, *J* = 7.3 Hz), 1.30 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz). MS (ESI) *m/z* 302.9 $[M+H]^+$.

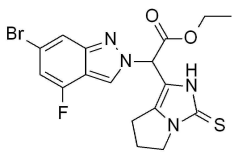
[0145] 단계 2: 2[-2-(6-브로모-4-플루오로-인다졸-2-일)-3-에톡시-3-옥소-프로파노일]피롤리딘-1-카르복실레이트



[0146]

[0147] 에틸 2-(6-브로모-4-플루오로-인다졸-2-일)아세테이트(1 당량)를 -70℃내지 실온에서 THF 중 LDA(1.55 당량)의 존재하에서 CDI 사전 활성화된 tert-부톡시카르보닐)-L-프롤린(CAS15761-39-4)(1.55 당량)과 반응시켰다. 이 반응으로 표제 화합물 2[-2-(6-브로모-4-플루오로-인다졸-2-일)-3-에톡시-3-옥소-프로파노일]피롤리딘-1-카르복실레이트가 생성되었다.

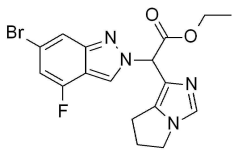
[0148] 단계 3: 에틸 2-(6-브로모-4-플루오로-인다졸-2-일)-2-(3-티옥소-2,5,6,7-테트라하이드로피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)아세테이트



[0149]

[0150] 2[-2-(6-브로모-4-플루오로-인다졸-2-일)-3-에톡시-3-옥소-프로파노일]피롤리딘-1-카르복실레이트(1 당량)를 실온에서 HCl(디옥산 중)과 반응시켰다. 다음으로, KSCN(1.33 당량)을 실온에서 에탄올 중 HCl의 존재하에 첨가하였다. 이 반응으로 에틸 2-(6-브로모-4-플루오로-인다졸-2-일)-2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)아세테이트가 생성되었다.

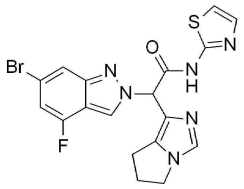
[0151] 단계 4: 에틸 2-(6-브로모-4-플루오로-인다졸-2-일)-2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)아세테이트



[0152]

[0153] 에틸 2-(6-브로모-4-플루오로-인다졸-2-일)-2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)아세테이트(2.88 mmol, 1 당량을 아세트산(10 mL)에 녹인 용액에 10℃에서 과산화수소, 35% (1.12 g, 1.01 mL, 11.5 mmol, 4 당량)를 적가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 과량의 과산화수소는 포화된 아황산나트륨 용액을 첨가하여 파괴하였다. 약간의 물(모든 소금을 녹일 만큼)과 에틸 아세테이트를 첨가한 후, 고체 탄산나트륨을 조심스럽게 첨가하여 혼합물의 pH를 9로 맞추었다. 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 물로 세척하고, 황산나트륨으로 건조시킨 후 농축시켰다. 생성물을 크로마토그래피(실리카 겔, n-헵탄 중 0-100% 에틸 아세테이트)로 정제하여 표제 화합물을 갈색 검으로 얻었다(단계 2 내지 4에서 51% 수율). 1H NMR (300 MHz, 클로로포름-d) δ = 8.22 (s, 1H), 7.66 (t, J = 1.0 Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 6.80 (dd, J = 1.2, 9.5 Hz, 1H), 6.39 (s, 1H), 4.39 - 4.19 (m, 2H), 4.10 - 3.97 (m, 2H), 2.95 - 2.60 (m, 4H), 1.42 - 1.10 (m, 3H). MS (ESI) m/z 409.0 [M+H]+.

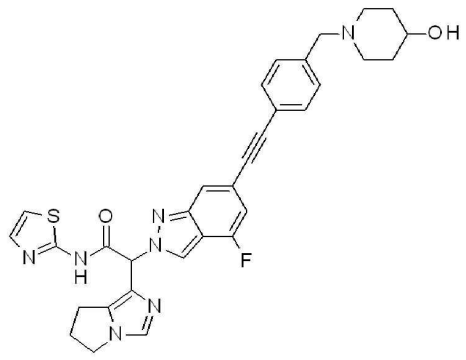
[0154] 단계 5: 2-(6-브로모-4-플루오로-인다졸-2-일)-2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-N-티아졸-2-일-아세트아마이드



[0155]

[0156] 에틸 2-(6-브로모-4-플루오로-인다졸-2-일)-2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)아세테이트(1 당량)를 에탄올 (3 mL)에 녹인 용액에 수산화리튬 1M(1.1 당량)을 첨가하였다. 반응물을 1시간 동안 교반한 후, 용매를 증발시키고 잔류물을 농축한 다음 톨루엔과 두 번 공증발시켜 물을 제거하였다. 반응 혼합물을 N,N-디메틸포름아마이드(3 mL) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(345 mg, 0.466 mL, 2.67 mmol, 3 당량)에 희석시키고, 티아졸-2-일아민 (116 mg, 1.16 mmol, 1.3 당량) 및 HATU (440 mg, 1.16 mmol, 1.3 당량)를 첨가하였다. 실온에서 1시간 동안 교반한 후, 반응물을 물로 희석하고 에틸 아세테이트로 두 번 추출하였다. 합쳐진 유기층을 황산나트륨으로 건조시킨 후, 여과하고 농축시켰다. 잔류물을 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, 디클로로메탄 중 0 % 내지 10 % 메탄올)로 정제하여 2-(6-브로모-4-플루오로-인다졸-2-일)-2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-N-티아졸-2-일-아세트아마이드를 얻었다.

[0157] 단계 6: 2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-2-(4-플루오로-6-((4-((4-하이드록시피페리딘-1-일)메틸)페닐)에티닐)-2H-인다졸-2-일)-N-(티아졸-2-일)아세트아마이드



[0158]

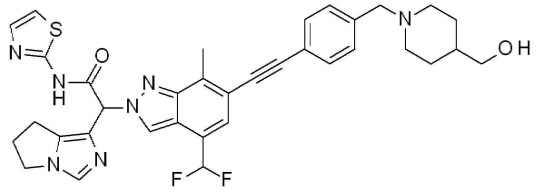
[0159] 2-(6-브로모-4-플루오로-인다졸-2-일)-2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-N-티아졸-2-일-아세트아마이드 (1 당량)를 N,N-디메틸포름아마이드 (5 mL)에 녹인 용액에 4-에티닐벤즈알데하이드 (49 mg, 0.375 mmol, 1 당량), 트리에틸아민 (113.83 mg, 0.157 mL, 1.12 mmol, 3 당량), 트리페닐포스핀 (10 mg, 0.037 mmol, 0.100 당량), 비스(트리페닐포스핀)팔라듐(II) 클로라이드 (13 mg, 0.019 mmol, 0.050 당량) 및 아이오

딘화 구리(I) (3.57 mg, 0.019 mmol, 0.050 당량)을 첨가하였다. 바이알을 뚜껑을 덮고 전자레인지에서 110℃에서 20분간 가열한 다음, 4-에티닐벤즈알데하이드(49 mg, 0.375 mmol, 1 당량)를 첨가하고 바이알을 다시 110℃에서 20분간 가열하였다. 이 과정을 세 번 반복하였다. 반응 혼합물을 110℃에서 5x20분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물에 붓고 에틸 아세테이트로 추출하였다(4x). 합쳐진 유기층을 염수로 세척하고, 황산나트륨으로 건조시킨 후, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 플래시 크로마토그래피 (실리카 겔, 에틸 아세테이트 중 0 % 내지 10 % 메탄올)로 정제한 후 피페리딘-4-올(1.3 당량)과 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드(70 mg, 0.332 mmol, 1.6 당량)와 추가로 혼합하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 NaHCO3 포화 용액에 붓고, 디클로로메탄/메탄올 9:1 혼합물로 3번 추출하였다. 합쳐진 유기층을 황산나트륨으로 건조시킨 후, 여과하고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, 에틸 아세테이트 중 0% 내지 10% 메탄올)로 정제하여 표제 화합물(16% 수율, 회백색 고체)을 얻었다.

[0160] ^{1}H NMR (300 MHz, 클로로포름-*d*) δ = 8.26 (s, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.54 - 7.46 (m, 3H), 7.34 - 7.29 (m, 2H), 7.00 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 6.87 - 6.79 (m, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.06 - 3.96 (m, 2H), 3.77 - 3.66 (m, 1H), 3.55 - 3.47 (m, 2H), 2.79 - 2.70 (m, 2H), 2.65 - 2.51 (m, 4H), 2.23 - 2.10 (m, 2H), 1.94 - 1.85 (m, 2H), 1.72 - 1.47 (m, 4H). MS (ESI) *m/z* 594.6 $[M-H]^-$.

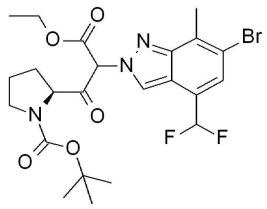
[0161] **실시예 5**

[0162] **2-[4-(디플루오로메틸)-6-[2-[4-[[4-(하이드록시메틸)-1-피페리딜]메틸]페닐]에티닐]-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-N-티아졸-2-일-아세트아마이드**



[0163]

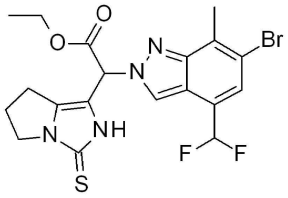
[0164] 단계 1: tert-부틸 (2R)-2-[2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸인다졸-2-일]-3-에톡시-3-옥소프로파노일]피롤리딘-1-카르복실레이트



[0165]

[0166] 에틸 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]아세테이트(0.65 g, 1.87 mmol, 당량: 1.0)를 THF(7.58 mL)에 용해시키고 -75℃로 냉각시켰다. LDA(THF 중 2 M, 1.12 mL, 2.25 mmol, 당량: 1.20)를 5분 이내에 적가하였다. 반응 혼합물을 -75℃에서 40분 동안 교반하였다. tert-부틸 (2S)-2-(이미다졸-1-카르보닐)피롤리딘-1-카르복실레이트((2S)-1-tert-부톡시카르보닐-4-플루오로-피롤리딘-2-카르복실산)(0.77 g, 2.9 mmol, 당량: 1.55)을 THF(7.58 mL)에 녹인 용액을 -75℃에서 서서히 첨가하고, -75℃에서 30분 동안 교반한 다음 실온으로 가온시키고 실온에서 18시간 동안 교반하였다. 포화 NH_4Cl 수용액을 첨가한 후, 반응 혼합물을 EtOAc로 두 번 추출하였다. 유기층을 물로 세척하였다. 합쳐진 유기층을 Na_2SO_4로 건조시킨 후 진공에서 농축시켜 표제 화합물 (1.41 g, 72% 순도, 99% 수율)을 얻었으며 이는 추가 정제 없이 다음 단계에 사용되었다. *m/z* 544.1, 546.0 $[M+H]^+$, ESI pos. Br 동위 원소.

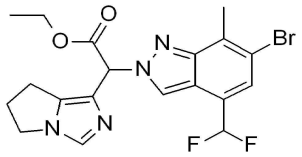
[0167] 단계 2: 에틸 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(3-티옥소-2,5,6,7-테트라하이드로피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)아세테이트



[0168]

[0169] *실시예 7, 단계 5에서와 유사하게*, tert-부틸 (2R)-2-[2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸인다졸-2-일]-3-에톡시-3-옥소프로파노일]피롤리딘-1-카르복실레이트 (1.4 g, 72% 순도, 1.85 mmol)를 디옥산 중 HCl 4 M 및 티오시안산 칼륨으로 처리하여 표제 화합물을 갈색 오일로 얻었으며(1.07 g, 85% 순도, 100% 수율) 이는 다음 단계에서 추가 정제 없이 사용되었다. *m*/z 485.0, 486.9 $[M+H]^+$, ESI pos, Br 동위 원소.

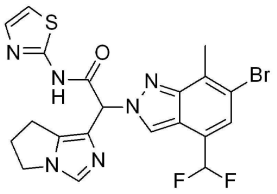
[0170] 단계 3: 에틸 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)아세테이트



[0171]

[0172] *실시예 7, 단계 6*에서와 유사하게, 에틸 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(3-티옥소-2,5,6,7-테트라하이드로피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)아세테이트 (1.06 g, 85% 순도, 1.86 mmol)를 과산화수소 및 p-톨루엔설폰산 일수화물로 처리하여 표제 화합물을 노란색 거품(360 mg, 43% 수율)으로 얻었다. *m*/z 453.0, 454.9 $[M+H]^+$, ESI pos, Br 동위 원소.

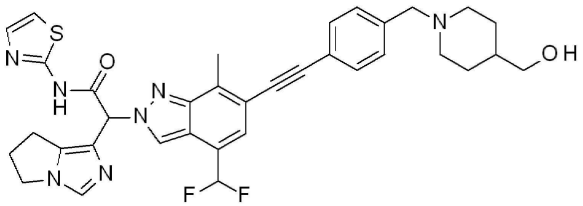
[0173] 단계 4: 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-N-티아졸-2-일-아세트아마이드



[0174]

[0175] 에틸 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)아세테이트(*실시예 5, 단계 3*) 및 티아졸-2-아민을 출발 물질로 사용하는 실시예 7, 단계 7에 기술된 것과 유사한 화학을 사용하여 표제 화합물을 밝은 노란색 거품으로 얻었다(MS: m/e = 509.1/511.1 ($M+H^+$)).

[0176] 단계 5: 2-[4-(디플루오로메틸)-6-[2-[4-[[4-(하이드록시메틸)-1-피페리딜]메틸]페닐]에티닐]-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-N-티아졸-2-일-아세트아마이드

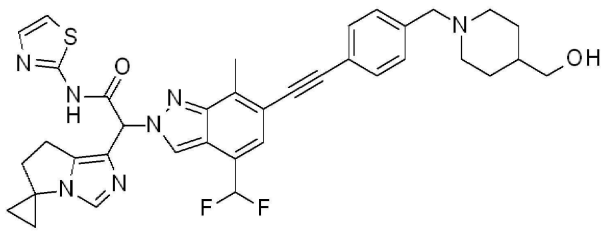


[0177]

[0178] 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-N-티아졸-2-일-아세트아마이드 *(실시예 5, 단계 4)* and [1-[(4-에티닐페닐)메틸]-4-피페리딜]메탄올 하이드로클로라이드*(실시예 7, 단계 9)*를 출발 물질로 사용하는 실시예 7, 단계 10에 기술된 것과 유사한 화학을 사용하여 표제 화합물을 갈색 고체로 얻었다(MS: m/e = 656.5 ($M+H^+$)).

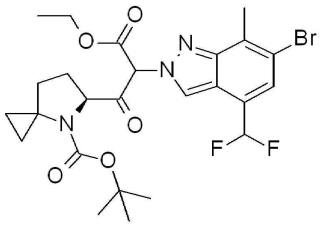
[0179] **실시예 6**

[0180] **2-[4-(디플루오로메틸)-6-[2-[4-[[4-(하이드록시메틸)-1-피페리딜]메틸]페닐]에티닐]-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(5-에틸-5-메틸-6,7-디하이드로피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-N-티아졸-2-일-아세트아마이드**



[0181]

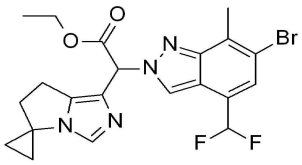
[0182] 단계 1: (5S)-5-[2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-3-에톡시-3-케토-프로파노일]-4-아자스피로[2.4]헵탄-4-카르복시산 tert-부틸 에스테르



[0183]

[0184] *실시예 1, 단계 4와 유사하게*, (5S)-4-tert-부톡시카르보닐-4-아자스피로[2.4]헵탄-5-카르복시산을 카르보닐디이미다졸로 처리하여 용액 A를 얻었다. 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]아세트산 에틸 에스테르는 LDA로 탈양성자화되었고 -78℃에서 용액 A로 처리되었다. 밤새도록 실온에서 교반하고 *실시예 7, 단계 4*와 유사한 방법으로 처리한 결과, 미정제 표제 화합물을 밝은 노란색 거품으로 얻었으며 이는 추가 정제 없이 다음 단계에 사용되었다. MS: m/e= 572.3 ($[M+H]^+$)

[0185] 단계 2: 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-스피로[6,7-디하이드로피롤[1,2-c]이미다졸-5,1'-사이클로프로판]-1-일-아세트산 에틸 에스테르

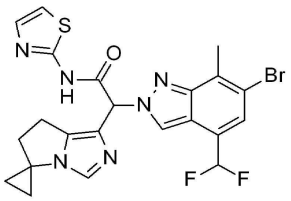


[0186]

[0187] *실시예 1, 단계 5*와 유사하게, (5S)-5-[2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-3-에톡시-3-케토-프로파노일]-4-아자스피로[2.4]헵탄-4-카르복시산 tert-부틸 에스테를 디옥산 중 HCl을 사용하여 탈보호시킨 다음, 티오시안산 칼륨과 반응시켜 미정제 중간체를 얻었으며, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다.

[0188] *실시예 7, 단계 6*과 유사하게, 중간체를 AcOH에서 과산화수소로 처리하여 표제 화합물을 밝은 노란색 거품으로 얻었다. MS: m/e= 481.2 ($[M+H]^+$)

[0189] 단계 3: 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-스피로[6,7-디하이드로피롤[1,2-c]이미다졸-5,1'-사이클로프로판]-1-일-N-티아졸-2-일-아세트아마이드

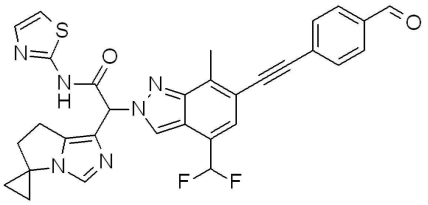


[0190]

[0191] 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-스피로[6,7-디하이드로피롤[1,2-c]이미다졸-5,1'-사이

클로프로판]-1-일-아세트산 에틸 에스테르 *(실시예 6, 단계 2)* 및 티아졸-2-아민을 출발 물질로 사용하는 실시예 7, 단계 7에 기술된 것과 유사한 화학을 사용하여 표제 화합물을 밝은 노란색 거품으로 얻었다(MS: m/e = 535.0 ($M+H^+$)).

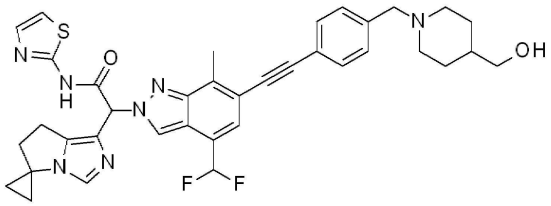
[0192] 단계 4: 2-[4-(디플루오로메틸)-6-[2-(4-포르밀페닐)에티닐]-7-메틸-인다졸-2-일]-2-스피로[6,7-디하이드로피롤[1,2-c]이미다졸-5,1'-사이클로프로판]-1-일-N-티아졸-2-일-아세트아마이드



[0193]

[0194] 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-스피로[6,7-디하이드로피롤[1,2-c]이미다졸-5,1'-사이클로프로판]-1-일-N-티아졸-2-일-아세트아마이드 *(실시예 6, 단계 3)* 및 4-에티닐벤즈알데하이드를 출발 물질로 사용하는 실시예 7, 단계 10에 기술된 것과 유사한 화학을 사용하여 표제 화합물을 갈색 고체로 얻었다(MS: m/e = 583.3 ($M+H^+$)).

[0195] 단계 5: 2-[4-(디플루오로메틸)-6-[2-[4-[[4-(하이드록시메틸)-1-피페리딜]메틸]페닐]에티닐]-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(5-에틸-5-메틸-6,7-디하이드로피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-N-티아졸-2-일-아세트아마이드

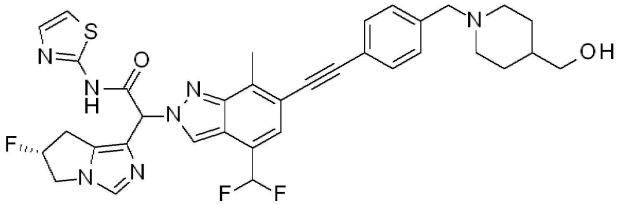


[0196]

[0197] 2-[4-(디플루오로메틸)-6-[2-(4-포르밀페닐)에티닐]-7-메틸-인다졸-2-일]-2-스피로[6,7-디하이드로피롤[1,2-c]이미다졸-5,1'-사이클로프로판]-1-일-N-티아졸-2-일-아세트아마이드 *(실시예 6, 단계 4)* 및 피페리딘-4-일메탄올을 출발 물질로 사용하는 실시예 7, 단계 8에 기술된 것과 유사한 화학을 사용하여 표제 화합물을 밝은 노란색 고체로 얻었다(MS: m/e = 682.5 ($M+H^+$)).

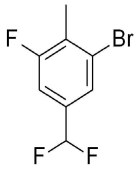
[0198] **실시예 7**

[0199] **2-[4-(디플루오로메틸)-6-[2-[4-[[4-(하이드록시메틸)-1-피페리딜]메틸]페닐]에티닐]-7-메틸-인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]-N-티아졸-2-일-아세트아마이드**



[0200]

[0201] 단계 1: 1-브로모-5-(디플루오로메틸)-3-플루오로-2-메틸벤젠

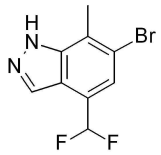


[0202]

[0203] DCM(98 mL)에 3-브로모-5-플루오로-4-메틸벤즈알데하이드(CAS 1370411-47-4, 20.5 g, 89.7 mmol, 당량: 1.0)를

녹인 용액을 얼음조로 냉각시켰다. 모르폴리노황 삼불화물(CAS 51010-74-3, 24.8 g, 17.3 mL, 135 mmol, 당량: 1.5)을 나누어 첨가하였다. 반응 혼합물을 0-5℃에서 20분간 교반한 다음, 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 얼음으로 냉각시킨 후, 포화 $NaHCO_3$ 수용액(300 mL)을 조심스럽게 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 DCM에 붓고 물로 세척하였다. 유기 층을 Na_2SO_4로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, 120 g, 100% 펜탄)로 정제하여 표제 화합물(18.6 g, 87% 수율)을 무색 오일로 얻었다. ^{1}H NMR (300 MHz, 클로로포름-d) δ = 7.50 (s, 1H), 7.16 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 6.57 (t, *J* = 56.0 Hz, 1H), 2.50 - 2.22 (m, 3H)

[0204] 단계 2: 6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-1H-인다졸

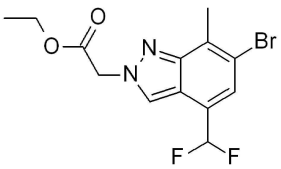


[0205]

[0206] 1-브로모-5-(디플루오로메틸)-3-플루오로-2-메틸벤젠 *(실시예 1, 단계 1)* (26.4 g, 110 mmol, 당량: 1.0)을 THF (240 mL)에 녹인 용액을 -75℃로 냉각시켰다. LDA (THF/헵탄/에틸벤젠 중 2 M, 66.3 mL, 133 mmol, 당량: 1.2)를 -70℃이하에서 적가하였다. 반응 혼합물을 -75℃에서 30분 동안 교반하였다. -70℃이하에서 에틸 포르메이트(16.4 g, 17.7 mL, 220 mmol, 당량: 2.0)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 -75℃에서 30분 동안 교반하였다. AcOH(16.6 g, 15.8 mL, 277 mmol, 당량: 2.5)를 -55℃이하에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온으로 가온시키고 EtOAc에 붓고 묽은 HCl 수용액, 물 및 염수로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조시킨 후 진공에서 농축시켜 4-브로모-6-(디플루오로메틸)-2-플루오로-3-메틸벤즈알데하이드(29.5 g)를 노란색 오일로 얻었으며 추가 정제 없이 사용하였다.

[0207] 4-브로모-6-(디플루오로메틸)-2-플루오로-3-메틸-벤즈알데하이드로 추정되는 미정제 물질(29.5 g)을 DME(150 mL)에 용해시켰다. *O*-메틸하이드록실아민 하이드로클로라이드 (10.2 g, 122 mmol, 당량: 1.84) 및 K_2CO_3 (30.6 g, 221 mmol, 당량: 3.34)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 45℃에서 2.5시간 동안 교반한 다음, 소결 유리를 통해 여과하고 DME으로 세척하였다(2회). 여과액을 진공에서 농축하였다. 옥심 에테르 중간체를 DMSO(150 mL)에 용해시켰다. 하이드라진 수화물(83 g, 80.5 mL, 1.66 mol, 당량: 25)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 110℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc/THF 5:1에 붓고 물과 염수로 세척하였다. 유기 층을 Na_2SO_4로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, 2 x 120 g, 헵탄 중 0% 내지 30% EtOAc)로 정제하여 표제 화합물을 백색 고체(13.5 g, 45% 수율)로 얻었다. LCMS: *m/z* 260.8 $[M+H]^+$, ESI pos.

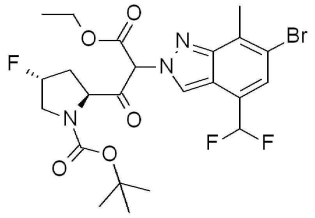
[0208] 단계 3: 에틸 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]아세테이트



[0209]

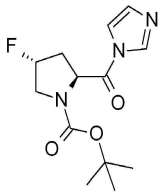
[0210] 6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-1H-인다졸 *(실시예 1, 단계 2)* (19 g, 72.8 mmol, 당량: 1.0)을 DMF (75 mL)에 녹인 용액에 에틸 2-브로모아세테이트 (18.2 g, 12.2 mL, 109 mmol, 당량: 1.5)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 100℃에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc 5:1에 붓고 물과 염수로 세척하였다. 유기 층을 Na_2SO_4로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, 2 x 120g, 헵탄 중 0% 내지 20% EtOAc)로 정제하여 표제 화합물을 노란색 고체(21.2 g, 80% 수율)로 얻었다. *m/z* 346.9, 348.8, $[M+H]^+$, ESI pos, Br 동위 원소.

[0211] 단계 4: tert-부틸 (2S,4R)-2-[2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-3-에톡시-3-옥소-프로파노일]-4-플루오로-피롤리딘-1-카르복실레이트



[0212]

[0213] tert-부틸 (2S,4R)-4-플루오로-2-(이미다졸-1-카르보닐)피롤리딘-1-카르복실레이트의 제조:

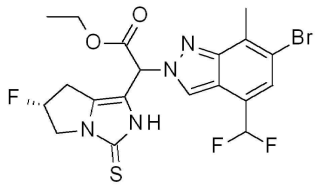


[0214]

[0215] (2S,4R)-1-tert-부톡시카르보닐-4-플루오로-피롤리딘-2-카르복시산 (CAS 203866-14-2, 30 g, 129 mmol, 당량: 1.0)을 DCM (300 mL)에 녹인 용액에 1,1'-카르보닐디이미다졸 (25 g, 154 mmol, 당량: 1.2을 0℃에서 나누어 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물(3x)과 1M $NaHCO_3$ 수용액(1x)으로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조시킨 후 30℃에서 진공에서 농축시켜 tert-부틸 (2S,4R)-4-플루오로-2-(이미다졸-1-카르보닐)피롤리딘-1-카르복실레이트 (36.6 g, 129 mmol, 100% 수율)를 백색 고체로 얻었으며 사용 전 -20℃에 보관하였다. ^{1}H NMR (클로로포름-d, 300 MHz) δ 8.27 (s, 1H), 7.56 (br d, 1H, *J*=1.4 Hz), 7.15 (br d, 1H, *J*=12.1 Hz), 4.9-5.2 (m, 1H), 3.6-4.1 (m, 2H), 2.0-2.9 (m, 2H), 1.2-1.5 (m, 9H).

[0216] KO^{t}Bu (4.53 g, 40.3 mmol, 당량: 2.0)를 THF (18 mL)에 용해시켰다. 반응 혼합물을 -55℃로 냉각시켰다. 에틸 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]아세테이트(*실시예 1, 단계 3*)(7 g, 20.2 mmol, 당량: 1.0)을 THF(24 mL)에 녹인 용액을 -50℃이하에서 적가하였다. 반응 혼합물을 -50℃와 -55℃사이에서 1시간 동안 교반하였다. 앞서 제조한 tert-부틸 (2S,4R)-4-플루오로-2-(이미다졸-1-카르보닐)피롤리딘-1-카르복실레이트 (6.85 g, 24.2 mmol, 당량: 1.2)를 THF (50 mL)에 녹인 용액을 -50℃이하에서 적가하였다. 반응 혼합물을 -50℃에서 15분간 교반한 다음, -30℃까지 가온시켰다. -20℃이하에서 10% 구연산 수용액(60 mL)을 첨가한 후, 혼합물을 0℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc 5:1에 붓고 물과 염수로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조시킨 후 진공상태에서 30℃에서 농축하여 표제 화합물을 노란색 비정질 반고체(12.9 g, 20.2 mmol, 88% 순도, 100% 수율)로 얻었다. *m/z* 562.1, 563.9 $[M+H]^+$, ESI pos, Br 동위 원소.

[0217] 단계 5: 에틸 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-3-티옥소-2,5,6,7-테트라하이드로피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]아세테이트

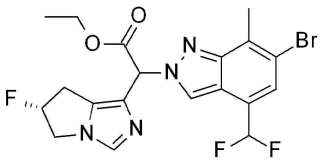


[0218]

[0219] tert-부틸 (2S,4R)-2-[2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-3-에톡시-3-옥소-프로파노일]-4-플루오로-피롤리딘-1-카르복실레이트 *(실시예 1, 단계 4)* (12.9 g, 20.2 mmol, 당량: 1.0)를 에탄올 (24 mL)에 녹인 용액에 HCl (에탄올 중 1.25 M, 80.6 mL, 101 mmol, 당량: 5.0)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 55℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각한 다음, 물(6 mL) 및 티오시안산 칼륨(2.55 g, 26.2 mmol, 당량: 1.3)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 에탄올을 진공상태에서 30℃에서 제거하고 피리딘(23.9 g, 24.5 mL, 302 mmol, 당량: 15)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 75분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc에 붓고, 2 N HCl 수용액(수용액 상의 pH가 1이 될 때까지), 물, 염수로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조시킨 후 진공상태에서 농축하여 표제 화합물을 노란색 반고체(9.65 g, 60% 순도,

57% 수율)로 얻었다. *m/z* 502.9, 505.9 $[M+H]^+$, ESI pos, Br 동위 원소.

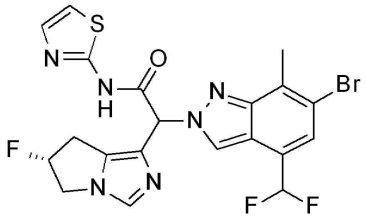
[0220] 단계 6: 에틸 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]아세테이트



[0221]

[0222] p-톨루엔설폰산 일수화물(10.9 g, 57.5 mmol, 당량: 5.0)을 아세토니트릴(70 mL)에 현탁시킨 현탁액에 과산화수소(35% 수용액, 8.38 g, 7.42 mL, 86.3 mmol, 당량: 7.5)를 0-3℃에서 적가하여 무색 용액을 얻었다. 10분 후, 아세토니트릴 (28 mL) 중 에틸 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-3-티옥소-2,5,6,7-테트라하이드로피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]아세테이트 *(실시예 1, 단계 5)* (9.65 g, 11.5 mmol, 당량: 1.0)를 8℃이하에서 적가하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc 5:1에 붓고 Na_2CO_3 용액과 염수로 세척하였다. 유기 층을 Na_2SO_4로 건조시키고 진공에서 농축시켰다. 미정제 물질을 플래시 크로마토그래피(실리카 겔, 120g, 헵탄 중 0%-60% (EtOAc/EtOH/NH_3 수용액 75:25:2))로 정제하여 표제 화합물(3.96g, 73% 수율)을 노란색 거품으로 얻었다. *m/z* 469.1, 471.1 $[M+H]^+$, ESI.

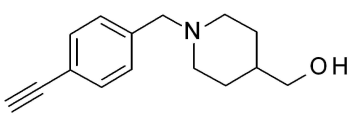
[0223] 단계 7: 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]-N-티아졸-2-일-아세트아마이드



[0224]

[0225] 에틸 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]아세테이트 *(실시예 1, 단계 6)* (200 mg, 0.424 mmol)를 메탄올 2 ml와 THF 2 ml에 용해시켰다. LiOH (물 중 1M) (0.4 ml, 0.424 mmol, 당량: 1.0)를 실온에서 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 진공상태에서 농축건조시키고 잔류물을 2 ml의 DMF에 용해시켰다. 티아졸-2-아민 (42 mg, 0.424 mmol, 당량: 1.0), 휘니그 염기(0.37 ml, 2.12 mmol, 당량: 5.0) 및 HATU (194 mg, 0.509 mmol, 당량: 1.2)를 실온에서 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 90분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물로 추출하고, 에틸 아세테이트로 두 번 추출하였다. 유기층을 물로 추출하고, 황산나트륨으로 건조시킨 후 농축 건조시켰다. 미정제 생성물을 실리카 겔 컬럼에서 플래시 크로마토그래피로 정제하여 디클로로메탄:메탄올 100:0 내지 90:10의 농도 구배로 용리하여 원하는 생성물(115 mg, 49% 수율)을 밝은 노란색 고체로 얻었다. MS: m/e = 527.1 $(M+H^+)$.

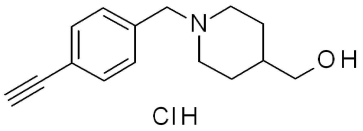
[0226] 단계 8: [1-[(4-에티닐페닐)메틸]-4-피페리딜]메탄올



[0227]

[0228] 4-에티닐벤즈알데하이드(20.5 g, 157.5 mmol)를 525 ml의 디클로로메탄에 용해시켰다. 피페리딘-4-일메탄올(20 g, 173.2 mmol, 당량: 1.1) 및 소듐 트리아세톡시보로하이드라이드(53.4 g, 252.0 mmol, 당량: 1.6)를 실온에서 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 1M 탄산나트륨 용액으로 추출하고, 디클로로메탄으로 두 번 추출하였다. 유기층을 황산나트륨으로 건조시킨 후 농축하여 원하는 생성물(34.8 g, 91% 수율)을 밝은 노란색 고체로 얻었다, MS: m/e = 527.1$(M+H^+)$.

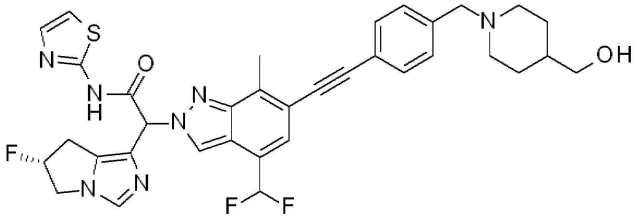
[0229] 단계 9: [1-[(4-에티닐페닐)메틸]-4-피페리딜]메탄올 하이드로클로라이드



[0230]

[0231] [1-[(4-에티닐페닐)메틸]-4-피페리딜]메탄올 *(실시예 1, 단계 8)* (34.8 g)을 200 ml 테트라하이드로푸란에 용해시켰다. 1,4-디옥산(39.4 ml, 158 mmol, 당량: 1.0) 중 4 M 염화수소 용액을 10-20℃에서 적가하였다. 백색 침전물이 형성되었고 2시간 동안 교반하였다. 침전물을 여과하여 수집하고, 테트라하이드로푸란 50 ml로 3회 세척한 후 진공 건조하여 표제 화합물(38.6 g, 92%)을 백색 고체로 얻었다. MS: m/e = 527.1 ($M+H^+$).

[0232] 단계 10: 2-[4-(디플루오로메틸)-6-[2-[4-[[4-(하이드록시메틸)-1-피페리딜]메틸]페닐]에티닐]-7-메틸-인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]-N-티아졸-2-일-아세트아마이드



[0233]

[0234] 2-[6-브로모-4-(디플루오로메틸)-7-메틸-인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]-N-티아졸-2-일-아세트아마이드 *(실시예 1, 단계 7)* (100 mg, 0.19 mmol) 및 [1-[(4-에티닐페닐)메틸]-4-피페리딜]메탄올 하이드로클로라이드 *(실시예 1, 단계 9)* (76 mg, 0.286 mmol, 당량: 1.5)를 5 ml의 DMF에 용해시켰다. 트리에틸아민 (0.1 ml, 0.76 mmol, 당량: 4.0), 비스-(트리페닐포스핀)-팔라듐(II)디클로라이드 (7 mg, 0.01 mmol, 당량: 0.05), 트리페닐포스핀 (5 mg, 0.019 mmol, 당량: 0.1) 및 아이오딘화 구리(I) (2 mg, 0.01 mmol, 당량: 0.05)을 첨가하고, 혼합물을 80℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물로 추출하고, 디클로로메탄으로 세 번 추출하였다. 유기층을 황산나트륨으로 건조시킨 후 농축 건조시켰다. 미정제 생성물을 실리카 겔 컬럼에서 플래시 크로마토그래피로 정제하여 디클로로메탄:메탄올 100:0 내지 75:25의 농도 구배로 용리하여 원하는 생성물(7 mg, 5% 수율)을 밝은 노란색 오일로 얻었다, MS: m/e = 674.5 ($M+H^+$).

[0235] **실시예 8 - 시험관 내 특성화**

[0236] **세포주**

[0237] EGFR 돌연변이체 L858R (#2039), L858R/C797S (#C2052) 및 L858R/T790M/C797S (#2056)를 안정적으로 발현하는 Ba/F3 세포주는 CrownBio에서 구입하였다. NCI-H1975 세포(#CRL-5908), NCI-H2073 세포(#CRL-5918) 및 A431 세포(#CRL-1555)는 ATCC에서 구입하였다. NCI-H3255 세포는 NCI(#CVCL_6831)에서 얻었다. 세포들을 37℃ 및 5% CO_2의 가습된 인큐베이터에서 유지시켰다. Ba/F3 EGFR-LR, Ba/F3 EGFR-LRTM, Ba/F3 EGFR-LRCS 및 Ba/F3 EGFR-LRTMCS 세포는 10% 소 태아 혈청(FBS; VWR #07068-085)이 보충된 RPMI 1640 GlutaMAX 배지(Thermo Fisher Scientific #61870010)에서 배양되었다. NCI-H1975, NCI-H3255, NCI-H2073, A431 및 PC-9 세포는 10% FBS가 보충된 ATCC 변형 RPMI 1640 배지(Thermo Fisher Scientific #A10491)에서 배양되었다. 세포주 동일성 검증 및 다른 세포주에 의한 교차 오염 없음은 단연쇄 반복(Short Tandem Repeats)-PCR 분석(인간 세포주만 해당) 및 MALDI-TOF 분석을 통해 수행되었다. MycoAlert™ 마이코플라스마 검출 키트(Lonza #LT07-318)를 사용하여 항생제를 첨가하지 않은 배양된 세포를 10-14일 동안 테스트하여 마이코플라스마 오염이 없음을 확인하였다. 설명된 모든 실험에 있어서 모든 세포주는 해동 후 20회 이상의 계대에 사용되지 않았다.

[0238] **균질 시간 분해 형광(HTRF) 세포 분석**

[0239] 균질 시간 분해 형광(HTRF) 분석을 위해, 세포를 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 페놀 레드 배지(Thermo Fisher Scientific #11835063)로 옮긴 후 15,000개 세포/웰(Ba/F3), 16,000개 세포/웰(H1975) 및 10,000개 세포/웰(H3255)의 밀도로 384웰 플레이트(Greiner #781080)에 12 μl/웰의 부피로 플레이팅하였다. 5,000개 세포/웰(H2073) 및 10,000개 세포/웰(A-431)을 11 μl/웰의 용량으로 플레이팅하였다. 배지만 있는 대조 웰들도 준비하

였다. 플레이트를 30초 동안 300g에서 원심분리하고 37℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 다음 날, 화합물을 ¼로그 희석하여 0.316 nM 내지 10 mM 범위의 농도로 첨가하고 최종 함량이 0.1%가 되도록 DMSO(Sigma #D2650)로 보정하였다. 접시를 37℃에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 특히 H2073 및 A-431 세포의 경우, 4시간 인큐베이션 후 각 웰에 300 ng/ml EGF(최종 농도 25 ng/ml) 1 μl를 첨가하고 세포들을 37℃에서 5분 더 인큐베이션하였다. 세포는 결국 키트에서 제공한 HTRF 용해 완충액(아래 참조)에 용해되었고, 추가 사용시까지 -80℃에서 보관되었다. 그런 다음 제조업체의 지침에 따라 pEGFR(CisBio #64EG1PEH) 또는 pERK(CisBio #64AERPEH)에 대한 HTRF 분석을 수행하였다.

[0240] **세포 생존력 분석**

[0241] 세포 생존력 검정을 위해, 10% FBS를 함유한 성장 배지에 있는 Ba/F3 세포를 384웰 검은색 투명 바닥 플레이트(Falcon #353962)에 50 μl당 2,000개 세포/웰로 플레이팅하고, 화합물을 ¼로그 희석하여 0.316 nM 내지 10 mM 범위의 농도까지 첨가하고, 최종 함량이 0.1%가 되도록 DMSO(Sigma #D2650)로 보정하였다. 플레이트를 37℃에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 화합물로 처리한 후, 25 μl/웰 CellTiter-Glo 2.0 시약(Promega #G9243)을 첨가하고 플레이트를 RT에서 10분 동안 인큐베이션한 후 발광을 제조업체의 프로토콜에 따라 정량화하였다.

[0242] **시험관 내 대사 안정성**

[0243] 시험관 내 대사 안정성은 인간과 래트의 단기 간세포 현탁액에서 평가되었다. BioIVT(Westbury, NY, 미국)에서 얻은 풀링된 1차 냉동보관 간세포를 해동한 후 10% 소 태아 혈청이 보충된 윌리엄 E 배지에 현탁시켰다. 현탁된 간세포를 37℃CO2)에서 사전 인큐베이션한 후, 상기 화합물을 첨가하여 반응을 개시하였다. 최종 분석 조건은 1 μM 화합물(최종 분석 용매 농도 0.01% DMSO), 1 x 106 간세포/mL 인큐베이트였다. 이후 혼합물을 37℃CO2)에서 최대 2시간 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 드라이 아이스 위에 두어 반응을 중단시킨 다음 LC-MS/MS로 분석할 때까지 -80℃에 보관하였다. 인큐베이션 샘플에서 초기 약물 농도 백분율의 자연 로그를 시간에 따라 플롯하고 윈도우즈용 GraphPad Prism 버전 7.04(GraphPad Software, La Jolla, CA)를 사용하여 선형 회귀 분석을 적용하였다. 시험관 내 간세포 고유 간세포 청소율(CL_{int})은 선형 회귀의 기울기, -기울기로부터 계산되었으며, V는 인큐베이션의 부피(μL)를 나타내고 N은 다음 방정식 X에 상세하게 설명된 바와 같이 인큐베이션 당 간세포 수를 나타낸다.

[0244] $$체외\ CLint\left(\frac{\frac{uL}{분}}{\frac{}{백만개}간세포}\right)=\frac{-기울기*V*백만개의\ 간세포}{N}$$

[0245] 다양한 시험관 내 분석 결과는 표 1 및 2에 나와 있다.

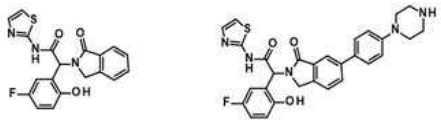
[0246] **표 1.** 실시예 1-6 및 참조 화합물 JBJ-04-125-02 및 EAI045의 시험관 내 데이터

화합물	pEGFR IC_{50} (nM)		생존력 IC_{50} / IC_{90} (nM)		CL_{int}(μL/분/10^6 개 세포)[c]	
	L858R/T790M/C797S	L858R/C797S	L858R/T790M/C797S	L858R/C797S	마우스	인간
실시예 1	6	17	13 / 33	12 / 32	16	3.5
실시예 2	7	8	8 / 19	4 / 10	21	6.1
실시예 3	10	20	16 /38	3 / 8	25	5.9
실시예 4	6	106	9 / 22	800/ 2'800	해당 없음	해당 없음
실시예 5	3	23	1 / 3	2 / 5	36	2.4
실시예 6	2	20	1/2	2/2	25	1
JBJ-04-125-02	10	100	30/40	1'550/ 7'280	해당 없음	해당 없음
EAI045	6	460	424/2251	>3'300/ >3'300	해당 없음	해당 없음

[0247]

[0248] [a] HTRF 분석을 통해 $EGFR^{L858R/C797S}$ 및 $EGFR^{L858R/T790M/C797S}$를 각각 안정하게 발현하는 Ba/F3 세포주에서 결정된 pEGFR 억제에 대한 IC_{50}. [b] 세포 역가 glo 분석을 통해 $EGFR^{L858R/C797S}$ 및 $EGFR^{L858R/T790M/C797S}$를 각각 안정하게 발현하는 Ba/F3 세포주에서 결정된 IC_{90} 및 IC_{50}. [c] 간 세포에서의 고유 청소율.

[0249] 참조 화합물 EAI045(왼쪽) 및 JBJ-04-125-02(오른쪽):

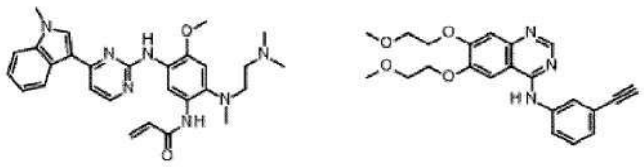
[0250] 

[0251] **표 2.** WT EGFR, $EGFR^{L858R}$ 또는 $EGFR^{L858R/T790M}$을 발현하는 인간 암세포에서 EGFR 억제제의 IC_{50}(nM) 값.

화합물	H2073 EGFR WT	A431 EGFR WT	H3255 EGFR LR	H1975 EGFR LRTM
실시예 1	~2'000	~2.500	16	7
실시예 6	545	577	16	8
JBJ-04-125-02	3'910	4'213	428	11
오시머티닙	240	322	40	30
에를로티닙	17*	92*	40	>5'000

[0252]

[0253] 오르토스테릭 EGFR 억제제 오시머티닙(왼쪽) 및 에를로티닙(오른쪽):

[0254] 

[0255] **실시예 9 - 생체 내 효능 연구**

[0256] 이 연구는 독일 Charles River Discovery Research Service GmbH에서 수행되었다.

[0257] 마우스는 병원균이 없는 조건에서 매일 12시간 명/12시간 암 주기로 관리되었다. 실험은 동물 복지 지침(유럽 실험 동물 과학 협회 연맹)에 따라 수행되었고, 연구 프로토콜은 지방 정부에서 검토하여 승인되었다.

[0258] Ba/F3 세포 클론을 가진 피하 세포주 유래 모델은 암컷 Balb/c 누드 마우스의 오른쪽 옆구리에 세포 주입($1x10^7$)을 통해 확립되었다. 종양 크기가 100-200 mm^3에 도달하였을 때 무작위 배정 후 화합물 치료를 시작하였다. 인간 NSCLC NCI-H1975의 피하 세포주에서 유래한 이종이식 모델의 경우, $5x10^6$개의 세포를 암컷 Balb/c 마우스의 오른쪽 옆구리에 주사한 후, 종양이 약 150 mm^3에 도달한 후에 치료 그룹에 무작위로 배정하였다. 접종 과정은 입체 조정 장치의 도움을 받아 진행되었으며, 흡입 마스크를 사용하여 이소플루란/O_2로 수술 마취를 실시하였다.

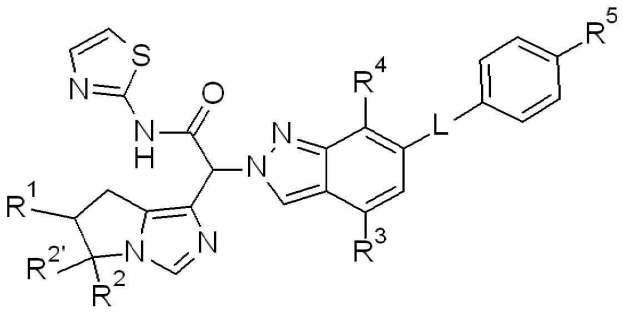
[0259] 알로스테릭 EGFR 억제제 실시예 6은 물에 PEG400 10%와 솔루톨 5%를 섞어 제형화되었고, 오시머티닙은 물에 DMSO 1%와 PEG300 30%를 섞어 제형화되었다. 마우스를 무작위 배정한 후 매일 경구 치료를 시작하였다. 개별 종양의 부피는 정기적인 캘리퍼 측정을 통해 모니터링되었으며 (TV = (길이 x 너비²)) 공식에 따라 계산되었다. 각 연구 그룹의 종양 부피는 연구 관찰 기간 동안 SEM과 함께 평균(단위 mm^3)으로 표시된다. 모든 원시 데이터는 로컬 데이터베이스에서 탭으로 제한된 csv 파일로 내보내져 통계 소프트웨어 R을 사용하여 처리되고 Shiny (스크립트 작성자는 S. Wilson 박사, PS BIOMICS, RICB)로 시각화되었다.

[0260] 1차 종양 성장과 관련된 데이터는 연구 D38(대조 그룹 마지막 날)에 비모수적 방법을 사용하여 통계적으로 분석되었는데, 데이터가 비대칭적 거동을 보였기 때문이다. 간단히 말하면, 무작위 배정된 2표본 설계에서 치료 대 대조 비율(TCR)과 양측 모수적(Fieller, 1954) 또는 비모수적(Hothorn 및 Munzel, 2000) 신뢰 구간(CI)(1-a)이 계산되었다. 1.0 미만의 TCR은 종양 성장 억제를 나타내며 CI은 데이터 분포를 반영한다. 1.0 미만의 상위 CI는 통계적 유의성을 확인시켜 준다. 종양 성장 억제는 다음 공식에 따라 계산되었다: 100 - [평균 ($TV_{치료}$-$TV_{기준선}$) / 평균 ($TV_{비히클}$-$TV_{기준선}$)](중앙값 기준). 종양 회귀는 다음 공식에 따라 계산되었다: 평균 [($TV_{기준선}$-$TV_{치료}$) / $TV_{기준}$

선) x 100 (중앙값 기준). 양의 값은 종양 퇴행을 나타낸다.

[0261] **구체적인 실시형태**

[0262] 1. 알로스테릭 EGFR 억제제와 오르토스테릭 EGFR 억제제의 조합물로서, 알로스테릭 EGFR 억제제는 다음 화학식 (I)의 화합물:

[0263] 

(I)

[0264] 여기서

[0265] L 은 결합 또는 알키닐렌이고;

[0266] R^1 은 수소 또는 할로겐이고;

[0267] R^2 및 $R^{2'}$는 수소 및 알킬에서 독립적으로 선택되거나;

[0268] 또는 R^2 및 $R^{2'}$는, 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 사이클로알킬을 형성하고;

[0269] R^3 은 수소, 할로겐 또는 할로알킬이고;

[0270] R^4는 알킬 또는 할로겐이고;

[0271] R^5는 (헤테로사이클로알킬)알킬렌 또는 헤테로사이클로알킬이고, 여기서 (헤테로사이클로알킬)알킬렌은 R^6에서 독립적으로 선택된 하나 또는 두 개의 치환기로 임의로 치환되고, 헤테로사이클로알킬은 R^7에서 독립적으로 선택된 하나 또는 두 개의 치환기로 임의로 치환되고;

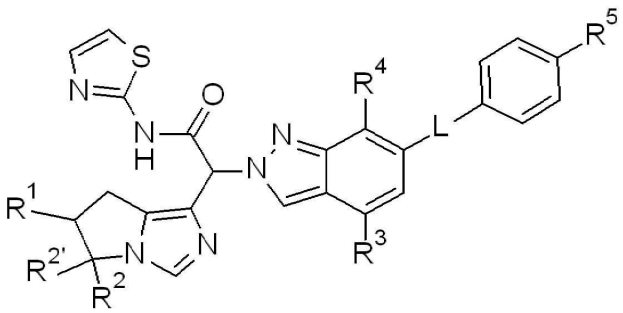
[0272] R^6은 각 경우에 알킬, 사이클로알킬, 하이드록시 및 하이드록시알킬에서 독립적으로 선택되고; 그리고

[0273] R^7은 각 경우에 알킬, 사이클로알킬, 하이드록시 및 하이드록시알킬에서 독립적으로 선택되는

[0274] 화합물;

[0275] 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인, 조합물.

[0276] 2. 실시형태 1에 있어서, 알로스테릭 EGFR 억제제는 화학식 (I)의 화합물:

[0277] 

(I)

[0278] 여기서

[0279] L 은 결합 또는 알키닐렌이고;

[0280] R^1 은 수소 또는 할로겐이고;

[0281] R^2 및 $R^{2'}$는 수소 및 알킬에서 독립적으로 선택되거나;

[0282] 또는 R^2 및 $R^{2'}$는, 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 사이클로알킬을 형성하고;

[0283] R^3 은 수소, 할로겐 또는 할로알킬이고;

[0284] R^4는 알킬 또는 할로겐이고;

[0285] R^5는 (헤테로사이클로알킬)알킬렌 또는 헤테로사이클로알킬이고, 여기서 (헤테로사이클로알킬)알킬렌은 R^6에서 독립적으로 선택된 하나 또는 두 개의 치환기로 임의로 치환되고, 헤테로사이클로알킬은 R^7에서 독립적으로 선택된 하나 또는 두 개의 치환기로 임의로 치환되고;

[0286] R^6은 각 경우에 알킬, 사이클로알킬, 하이드록시 및 하이드록시알킬에서 독립적으로 선택되고; 그리고

[0287] R^7은 각 경우에 알킬, 사이클로알킬, 하이드록시 및 하이드록시알킬에서 독립적으로 선택되는

[0288] 화합물인, 조합물.

[0289] 3. 실시형태 1 또는 2에 있어서, L은 결합 또는 에티닐렌인, 조합물.

[0290] 4. 실시형태 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, R^1은 수소 또는 플루오로인, 조합물.

[0291] 5. 실시형태 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, R^2 및 $R^{2'}$는 수소이거나, 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 사이클로프로필을 형성하는, 조합물.

[0292] 6. 실시형태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, R^3은 할로겐 또는 할로알킬인, 조합물.

[0293] 7. 실시형태 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, R^3은 클로로 또는 디플루오로메틸인, 조합물.

[0294] 8. 실시형태 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, R^4는 메틸 또는 클로로인, 조합물.

[0295] 9. 실시형태 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, R^5는 하이드록시메틸로 선택적으로 치환된 모르폴리닐 또는 피페리디닐메틸렌인, 조합물.

[0296] 10. 실시형태 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 화학식 (I)의 화합물은 다음에서 선택되는, 조합물:

[0297] 2-[4,7-디클로로-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]-N-티아졸-2-일-아세트아마이드;

[0298] 2-[4-(디플루오로메틸)-7-메틸-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]-N-티아졸-2-일-아세트아마이드;

[0299] 2-[4-(디플루오로메틸)-7-메틸-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-스피로[6,7-디하이드로피롤[1,2-c]이미다졸-5,1'-사이클로프로판]-1-일-N-티아졸-2-일-아세트아마이드;

[0300] 2-[4-(디플루오로메틸)-6-[2-[4-[[4-(하이드록시메틸)-1-피페리딜]메틸]페닐]에티닐]-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-N-티아졸-2-일-아세트아마이드; 및

[0301] 2-[4-(디플루오로메틸)-6-[2-[4-[[4-(하이드록시메틸)-1-피페리딜]메틸]페닐]에티닐]-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(5-에틸-5-메틸-6,7-디하이드로피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-N-티아졸-2-일-아세트아마이드.

[0302] 11. 실시형태 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 화학식 (I)의 화합물은 2-[4,7-디클로로-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]-N-티아졸-2-일-아세트아마이드인, 조합물.

[0303] 12. 실시형태 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 화학식 (I)의 화합물은 2-[4-(디플루오로메틸)-7-메틸-6-(4-모

르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-[(6R)-6-플루오로-6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일]-N-티아졸-2-일-아세트아마이드인, 조합물.

[0304] 13. 실시형태 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 화학식 (I)의 화합물은 2-[4-(디플루오로메틸)-7-메틸-6-(4-모르폴리노페닐)인다졸-2-일]-2-스피로[6,7-디하이드로피롤[1,2-c]이미다졸-5,1'-사이클로프로판]-1-일-N-티아졸-2-일-아세트아마이드인, 조합물.

[0305] 14. 실시형태 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 화학식 (I)의 화합물은 2-[4-(디플루오로메틸)-6-[2-[4-[[4-(하이드록시메틸)-1-피페리딜]메틸]페닐]에티닐]-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(6,7-디하이드로-5H-피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-N-티아졸-2-일-아세트아마이드인, 조합물.

[0306] 15. 실시형태 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 화학식 (I)의 화합물은 2-[4-(디플루오로메틸)-6-[2-[4-[[4-(하이드록시메틸)-1-피페리딜]메틸]페닐]에티닐]-7-메틸-인다졸-2-일]-2-(5-에틸-5-메틸-6,7-디하이드로피롤로[1,2-c]이미다졸-1-일)-N-티아졸-2-일-아세트아마이드인, 조합물.

[0307] 16. 실시형태 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 오르토스테릭 EGFR 억제제는 세툭시맙, 파니투무맙, 오시머티닙, 에를로티닙, 게피티닙, 네시투무맙, 네라티닙, 라파티닙, 반데타닙, 브리가티닙, 알모네르티닙, 레이저티닙 및 푸르모네르티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염에서 선택되고, 특히, 오시머티닙, 알모네르티닙, 레이저티닙 및 푸르모네르티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염에서 선택되는, 조합물.

[0308] 17. 실시형태 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 오르토스테릭 EGFR 억제제는 오시머티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인, 조합물.

[0309] 18. 실시형태 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 오르토스테릭 EGFR 억제제는 알모네르티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인, 조합물.

[0310] 19. 실시형태 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 오르토스테릭 EGFR 억제제는 레이저티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인, 조합물.

[0311] 20. 실시형태 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 오르토스테릭 EGFR 억제제는 푸르모네르티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인, 조합물.

[0312] 21. 치료적 활성 물질로 사용하기 위한, 실시형태 1 내지 16 중 어느 하나에 따른 조합물.

[0313] 22. 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나에 따른 조합물 및 치료적 불활성 담체를 포함하는 약학 조성물.

[0314] 23. 암, 특히, 비소세포 폐암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나에 따른 조합물.

[0315] 24. 암, 특히, 비소세포 폐암의 치료 또는 예방을 위한, 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나에 따른 조합물의 용도.

[0316] 25. 암, 특히, 비소세포 폐암의 치료 또는 예방을 위한 약제를 제조하기 위한, 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나에 따른 조합물의 용도.

[0317] 26. 비소세포 폐암의 치료 또는 예방을 위한 약제를 제조하기 위한, 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나에 따른 조합물의 용도.

[0318] 27. 암, 특히, 비소세포 폐암의 치료 또는 예방 방법으로서, 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나에 따른 조합물의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0319] 28. 실시형태 21 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 알로스테릭 EGFR 억제제와 오르토스테릭 EGFR 억제제는 모두 경구로 투여되는, 조합물, 용도, 방법 또는 약학 조성물.

[0320] 29. 실시형태 21 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 알로스테릭 EGFR 억제제는 오르토스테릭 EGFR 억제제와 동시에 투여되는, 조합물, 용도, 방법 또는 약학 조성물.

[0321] 30. 실시형태 21 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 알로스테릭 EGFR 억제제와 오르토스테릭 EGFR 억제제는 공동제형화되는, 조합물, 용도, 방법 또는 약학 조성물.

[0322] 31. 실시형태 21 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 알로스테릭 EGFR 억제제와 오르토스테릭 EGFR 억제제는 순차적으로 투여되는, 조합물, 용도, 방법 또는 약학 조성물.

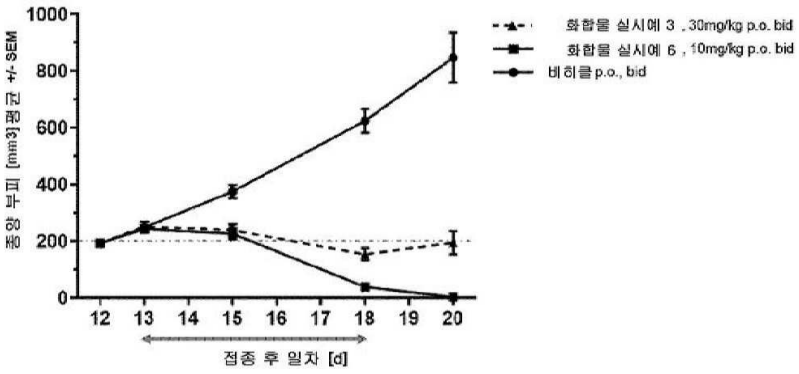
[0323] 32. 실시형태 23 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 암은 del19, L858R, T790M 및 C797S에서 선택된 적어도 하나의 EGFR 돌연변이와 관련되는, 조합물, 용도, 방법 또는 약학 조성물.

[0324] 33. 실시형태 23 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 암은 del19, L858R, T790M 및 C797S에서 선택된 적어도 두 개의 EGFR 돌연변이와 관련되는, 조합물, 용도, 방법 또는 약학 조성물.

도면

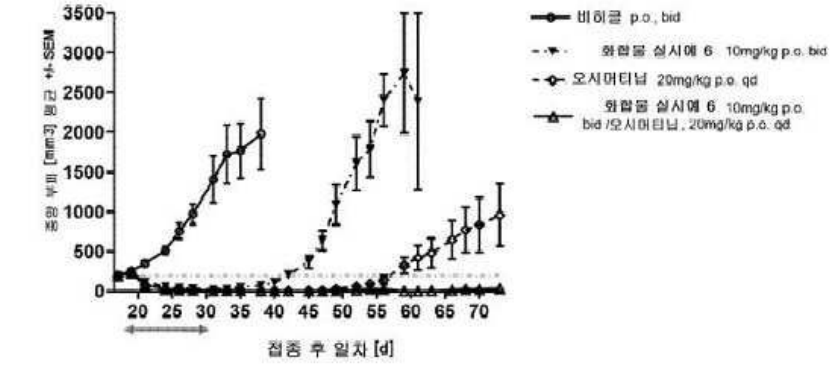
도면1

A

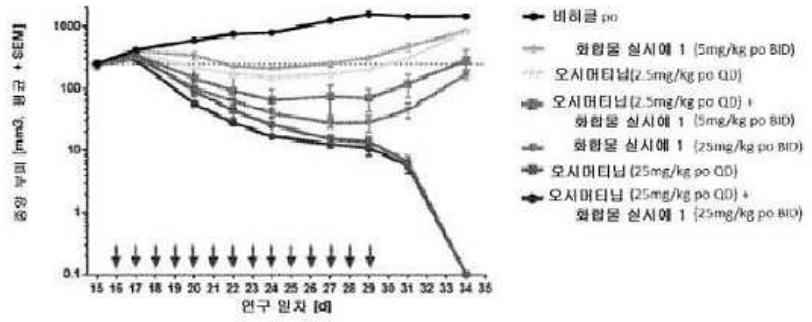


도면2

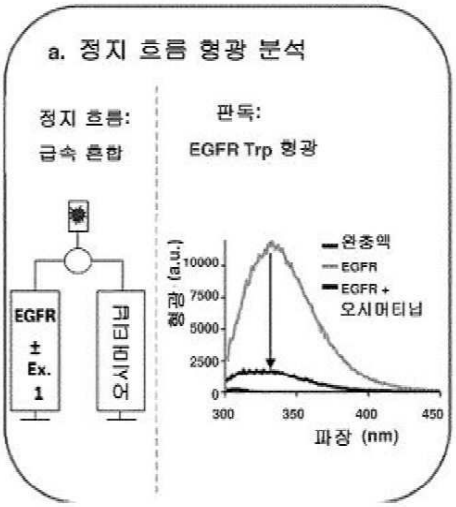
A

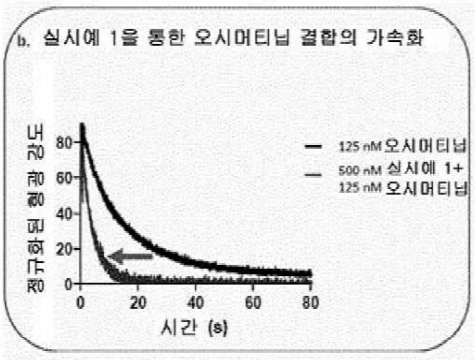

종양 부피 [mm3] 평균 +/- SEM
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70
접종 후 일차 [d]
비히클 p.o., bid
화합물 실시예 6 10mg/kg p.o. bid
오시머티닙 20mg/kg p.o. qd
화합물 실시예 6 10mg/kg p.o. bid /오시머티닙 20mg/kg p.o. qd

B


종양 부피 [mm3, 평균 + SEM]
1000
100
10
1
0.1
15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35
연구 일차 [d]
비히클 po
화합물 실시예 1 (5mg/kg po BID)
오시머티닙(2.5mg/kg po QD)
오시머티닙(2.5mg/kg po QD) + 화합물 실시예 1 (5mg/kg po BID)
화합물 실시예 1 (25mg/kg po BID)
오시머티닙 (25mg/kg po QD)
오시머티닙 (25mg/kg po QD) + 화합물 실시예 1 (25mg/kg po BID)

도면3





c.

실시예 1 결합됨?	$t_{제거}$(s)
아니오	0.15
예	17.5