



등록특허 10-2604802



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월22일

(11) 등록번호 10-2604802

(24) 등록일자 2023년11월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 487/04 (2006.01) A61K 31/551 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07D 487/04 (2022.08)
A61K 31/551 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7036596

(22) 출원일자(국제) 2022년08월10일

심사청구일자 2022년10월20일

(85) 번역문제출일자 2022년10월20일

(65) 공개번호 10-2023-0024251

(43) 공개일자 2023년02월20일

(86) 국제출원번호 PCT/KR2022/011963

(87) 국제공개번호 WO 2023/018238

국제공개일자 2023년02월16일

(30) 우선권주장

1020210105358 2021년08월10일 대한민국(KR)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

CN109879877 A

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 10 항

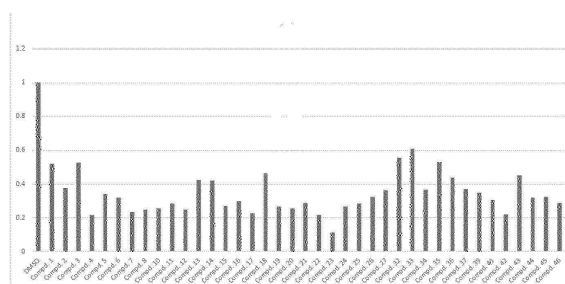
심사관 : 정현아

(54) 발명의 명칭 신규 PLK1 분해 유도 화합물

(57) 요약

본 발명은 신규 PLK1 분해 유도 화합물, 이의 제조방법, 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 화합물은 PLK1 분해를 유도하는 효과를 나타낸다. 그러므로, 본 발명의 화합물은 PLK1 관련 질환의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자

이한규

경기도 수원시 권선구 금곡로 20, 605동 1503호

김성훈

인천광역시 연수구 센트럴로 415, 107동 4506호

류혜국

인천광역시 남동구 논고개로 93, 1701호

강금영

인천광역시 남동구 문화서로23번길 51, 204호

김상윤

인천광역시 동구 새천년로38번길 11, 206동 1902호

정소현

인천광역시 연수구 함박피로 250, 102동 201호

이준규

경기도 화성시 향남읍 하길로 9, 1103동 801호

이기쁨

경기도 시흥시 해송십리로 472-54, 107동 2002호

(56) 선행기술조사문헌

US20200038513 A1

WO2009153197 A1

KR1020080109919 A

CN106977584 A

(30) 우선권주장

1020210106488 2021년08월12일 대한민국(KR)

1020210117389 2021년09월03일 대한민국(KR)

1020210126757 2021년09월24일 대한민국(KR)

1020220008456 2022년01월20일 대한민국(KR)

1020220020996 2022년02월17일 대한민국(KR)

1020220054880 2022년05월03일 대한민국(KR)

1020220075838 2022년06월21일 대한민국(KR)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염:

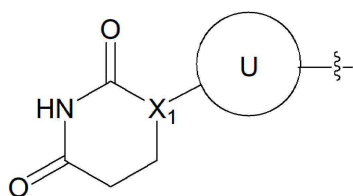
[화학식 I]

ULM—Linker—PTM

상기 화학식 I에서,

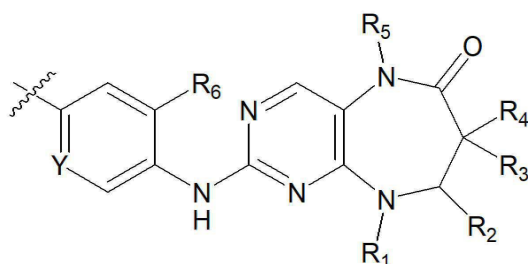
ULM은 하기 화학식 1로 표시되는 모이어티이고;

[화학식 1]



PTM은 하기 화학식 2로 표시되는 모이어티이고;

[화학식 2]



Linker는 ULM과 PTM을 화학적으로 연결하는 기이고;

X₁은 CH 또는 N이고;

고리 U는 페닐 또는 5-6원 헤테로아릴이고 {여기서, 상기 페닐 또는 5-6원 헤테로아릴 고리의 하나 이상의 H는 R_U로 치환될 수 있음};

R_U는 -C₁₋₄알킬, -C₁₋₄하이드록시알킬, -C₁₋₄아미노알킬, -C₁₋₄할로알킬, -C₁₋₄알콕시, 또는 -할로이고;

Y는 CR₇이고;

R₁은 3-7원 사이클로알킬이고;

R₂는 -H 또는 -C₁₋₄알킬이고,

R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 -H, -C₁₋₄알킬, 또는 -할로이고;

R₅는 -C₁₋₄알킬이고;

R₆는 -C₁₋₄알킬 또는 -C₁₋₄알콕시이고;

R_7 은 -H 또는 -할로이고;

Linker는 $-L_0-L_1-L_2-L_3-L_P$ -이고;

L_0 는 $-(CH_2)_x-$, $-(CH_2)_x-NH-$, $-(CH_2)_x-O-$, $-C(=O)-$, 페닐, 또는 아무 것도 아니고(null) {여기서, L_0 는 ULM과 연결되고, [이때, 상기 L_0 가 아무 것도 아닌 경우(null) L_1 이 ULM과 직접 연결됨], 상기 x 는 0, 1, 2, 3, 또는 4임};

L_1 은 헤테로사이클로알킬 또는 아무 것도 아니고(null) {여기서, 상기 L_1 이 아무 것도 아닌 경우(null) L_0 와 L_2 가 직접 연결되고, 상기 헤테로사이클로알킬은 고리 내 하나 이상의 N 원자를 포함하고, 상기 헤테로사이클로알킬 고리의 하나 이상의 H는 $-C_{1-4}$ 알킬, $-C_{1-4}$ 할로알킬, $-C_{1-4}$ 알콕시, -OH, -할로, 또는 =O로 치환될 수 있음};

L_2 는 $-(CH_2)_{y_1}-$, $-(CD_2)_{y_1}-$, $-(CH_2)_{y_2}-C(=O)-(CH_2)_{y_3}-$, $-(CH_2)_{y_2}-NH-(CH_2)_{y_3}-$, $-(CH_2)_{y_2}-N(C_{1-4}알킬)-(CH_2)_{y_3}-$, $-(CH_2)_{y_1}-(O-C_{1-4}알킬)_z-O-C_{1-4}알킬$, 또는 아무 것도 아니고(null) {여기서, 상기 y_1 내지 y_3 는 각각 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6이고, z 는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6임};

L_3 는 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 또는 아무 것도 아니고(null) {여기서, 상기 L_3 가 아무 것도 아닌 경우(null) L_2 와 L_P 가 직접 연결되고, 상기 헤테로사이클로알킬은 고리 내 하나 이상의 N 원자를 포함하고, 상기 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬 고리의 하나 이상의 H는 $-C_{1-4}$ 알킬, $-C_{1-4}$ 할로알킬, 또는 -할로로 치환될 수 있음};

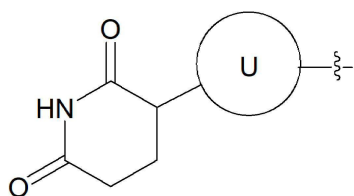
L_P 는 $-(CH_2)_p-NH-C(=O)-$ 또는 $-(CH_2)_p-O-$ 이다 {여기서, 상기 L_P 의 $-C(=O)-$ 또는 $-O-$ 가 PTM과 연결되고, p 는 0, 1, 또는 2임}.

청구항 2

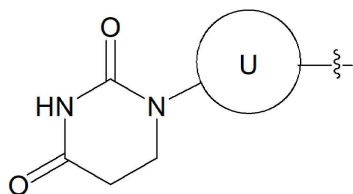
제 1 항에 있어서,

상기 ULM은 하기 화학식 1-1 또는 화학식 1-2로 표시되는 모이어티이고;

[화학식 1-1]



[화학식 1-2]



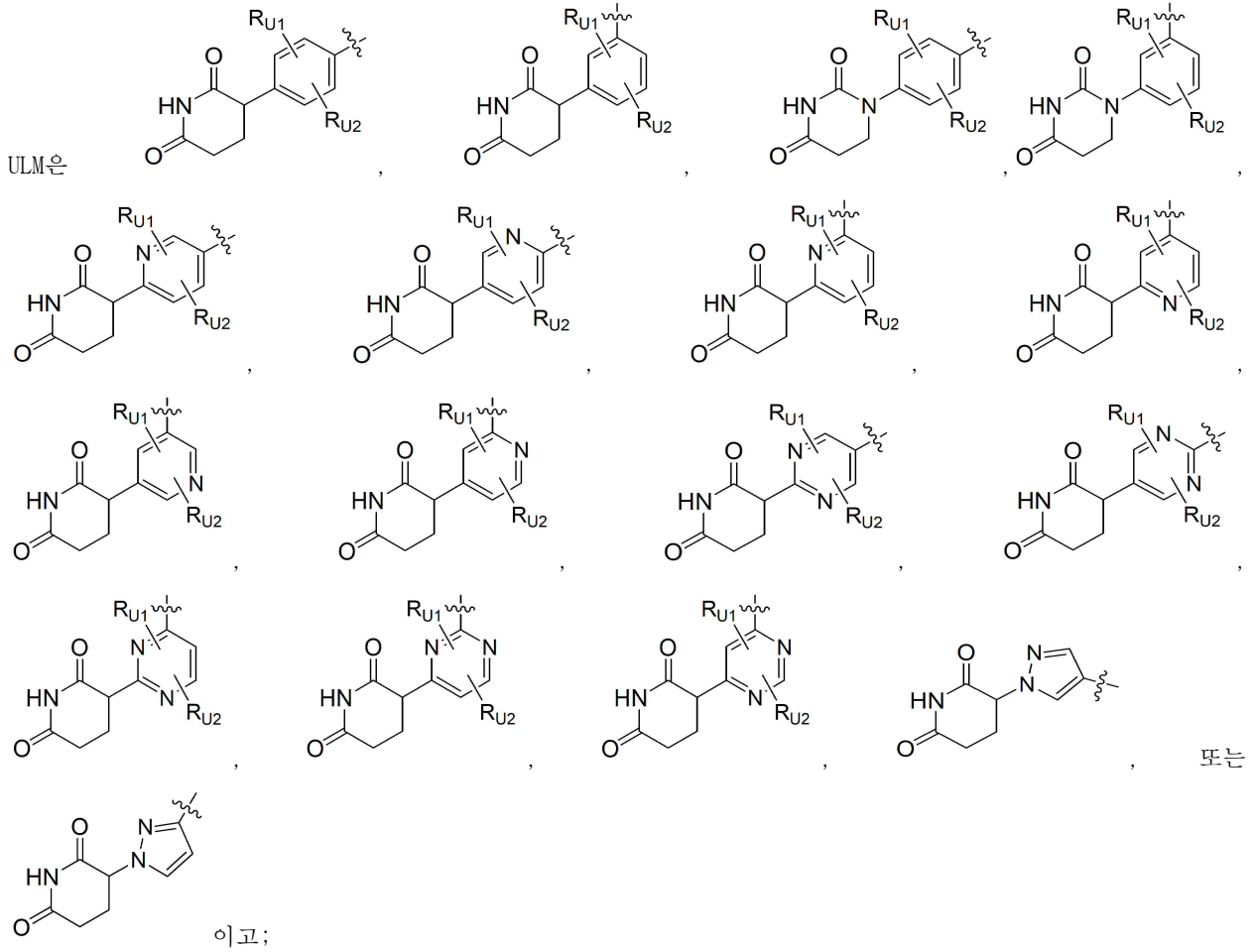
고리 U는 페닐, 피리디닐, 피리미디닐, 또는 피라졸릴이고 {여기서, 상기 페닐, 피리디닐, 피리미디닐, 또는 피라졸릴 고리의 하나 이상의 H는 R_0 로 치환될 수 있음};

R_0 는 $-C_{1-4}$ 알킬, $-C_{1-4}$ 할로알킬, $-C_{1-4}$ 알콕시, 또는 -할로인;

화합물, 이의 입체이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

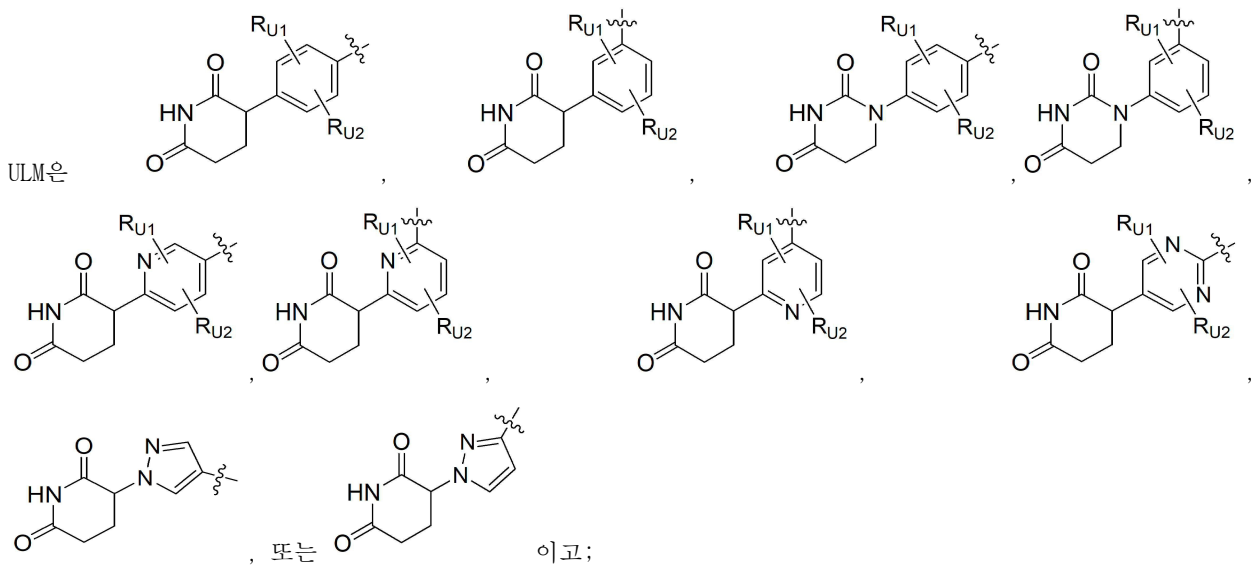


R_{U1} 및 R_{U2} 는 각각 독립적으로 $-C_{1-4}$ 알킬, $-C_{1-4}$ 할로알킬, $-C_{1-4}$ 알콕시, 또는 -할로인;

화합물, 이의 입체이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

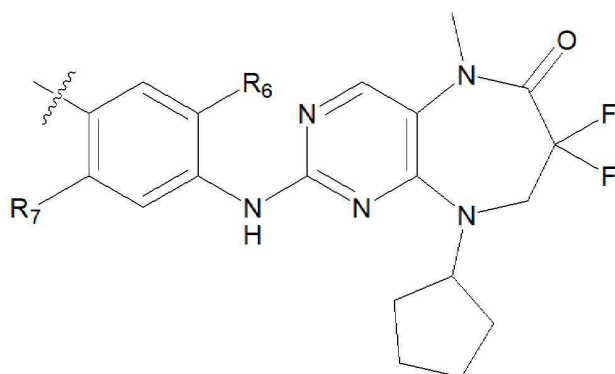


R_{U1} 및 R_{U2} 는 각각 독립적으로 $-C_{1-4}$ 알킬, $-C_{1-4}$ 할로알킬, $-C_{1-4}$ 알콕시, 또는 -할로인;

화합물, 이의 입체이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 5

제 1 항에 있어서,



상기 PTM은

이고;

R_6 는 $-C_{1-4}$ 알킬, $-C_{1-4}$ 알콕시, 또는 -할로이고;

R_7 은 -H 또는 -할로인;

화합물, 이의 입체이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1 항에 있어서,

L_0 는 $-(CH_2)_x-$, $-(CH_2)_x-NH-$, $-(CH_2)_x-O-$, 또는 페닐이고 {여기서, L_0 는 ULM과 연결되고, 상기 x 는 0 또는 1임};

L_1 은 4-12원 헤테로사이클로알킬 또는 아무 것도 아니고(null) {여기서, 상기 L_1 이 아무 것도 아닌 경우(null) L_0 와 L_2 가 직접 연결되고, 상기 4-12원 헤테로사이클로알킬은 단일 고리, 다리 연결된(bridged) 이중 고리, 또는 스파이로(spiro) 고리이고, 상기 4-12원 헤테로사이클로알킬은 고리 내 하나 이상의 N 원자를 포함하고 상기 N 원자는 L_0 또는 ULM과 직접 연결되고, 상기 헤테로사이클로알킬 고리의 하나 이상의 H는 $-C_{1-4}$ 알킬, -OH, 또는 -할로로 치환될 수 있음};

L_2 는 $-(CH_2)_{y_1}-$, $-(CH_2)_{y_2}-C(=O)-(CH_2)_{y_3}-$, $-(CH_2)_{y_2}-NH-(CH_2)_{y_3}-$, $-(CH_2)_{y_2}-N(C_{1-4}알킬)-(CH_2)_{y_3}-$, $-(CH_2)_{y_1}-(O-C_{1-4}알킬)_z-O-C_{1-4}알킬$, 또는 아무 것도 아니고(null) {여기서, 상기 y_1 내지 y_3 는 각각 독립적으로 0, 1, 2, 또는 3 이고, z 는 0, 1, 2, 또는 3임};

L_3 는 4-6원 사이클로알킬 또는 4-12원 헤테로사이클로알킬이고 {여기서, 상기 4-12원 헤테로사이클로알킬은 단일 고리, 다리 연결된(bridged) 이중 고리, 또는 스파이로(spiro) 고리이고, 상기 4-12원 헤테로사이클로알킬은 고리 내 하나 이상의 N 원자를 포함하고, 상기 4-6원 사이클로알킬 또는 4-12원 헤테로사이클로알킬 고리의 하나 이상의 H는 -할로로 치환될 수 있음};

L_p 는 $-(CH_2)_p-NH-C(=O)-$ 또는 $-(CH_2)_p-O-$ 인 {여기서, 상기 L_p 의 $-C(=O)-$ 또는 $-O-$ 가 PTM과 연결되고, p 는 0 또는 1임};

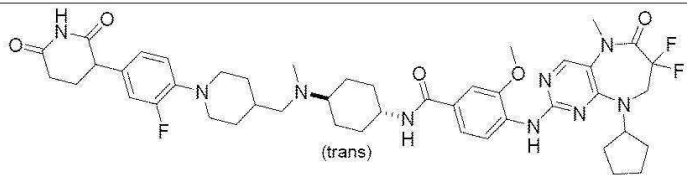
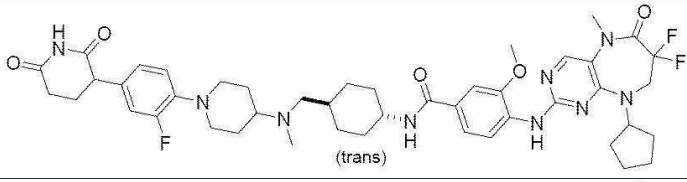
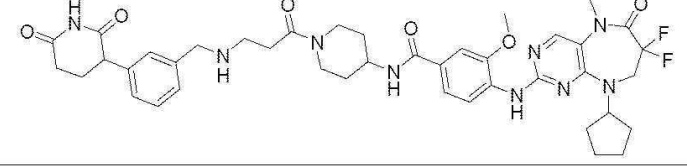
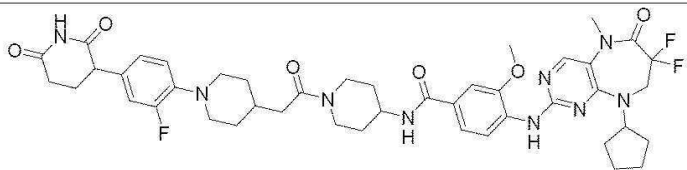
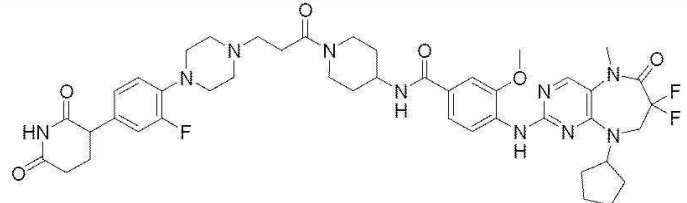
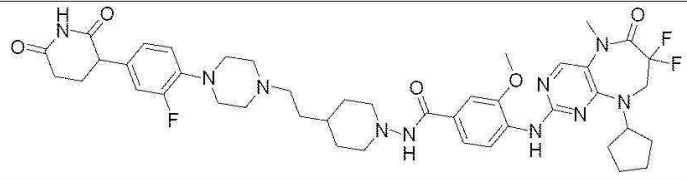
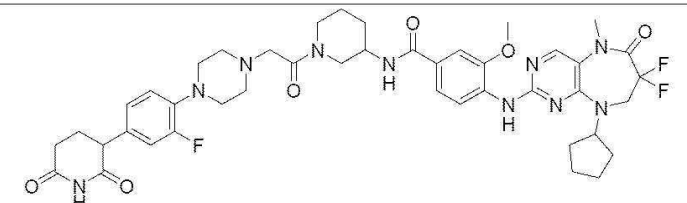
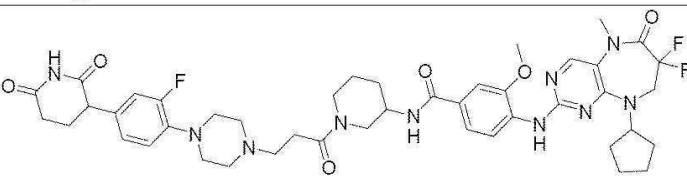
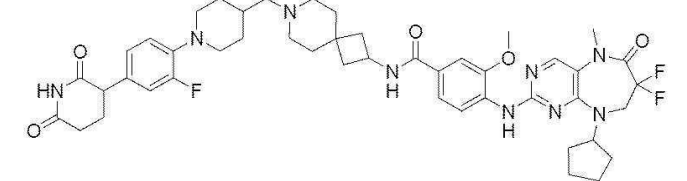
화합물, 이의 입체이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 8

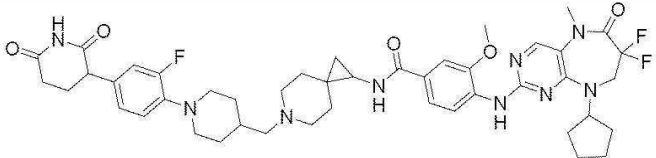
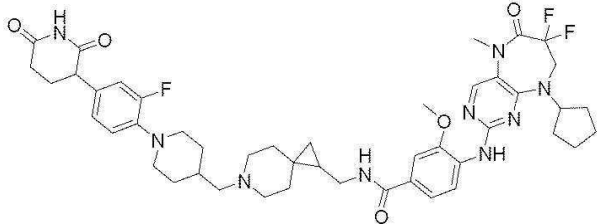
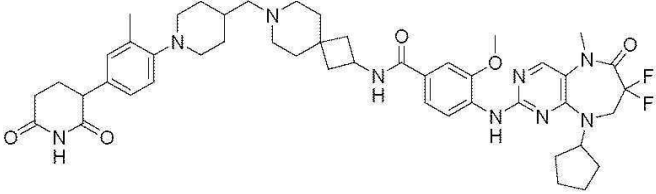
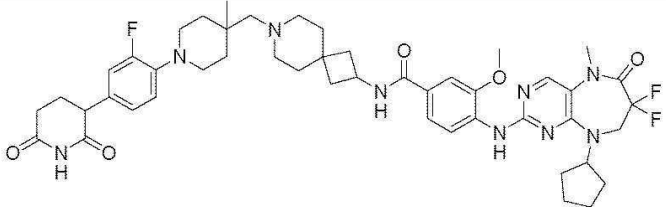
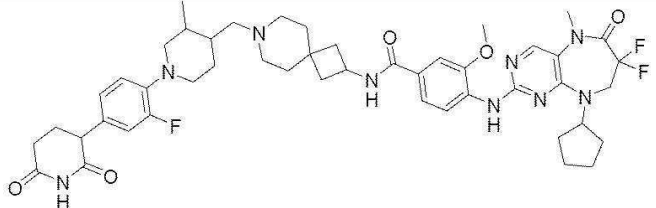
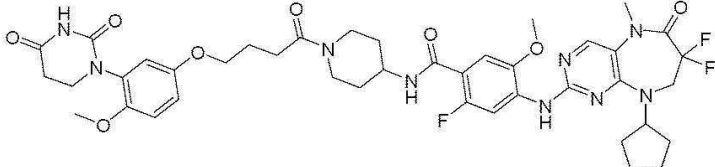
제 1 항에 있어서,

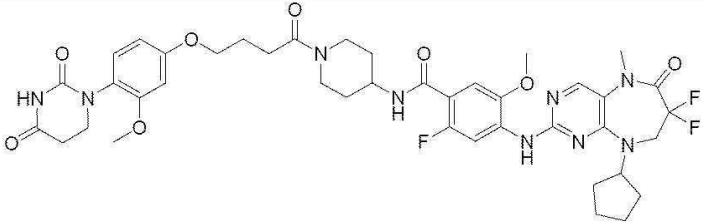
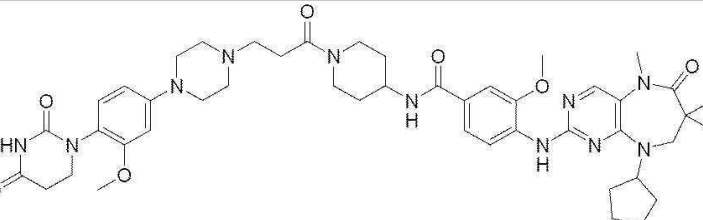
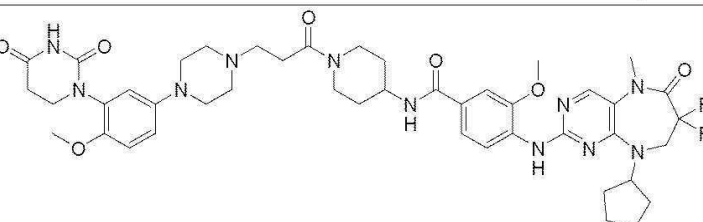
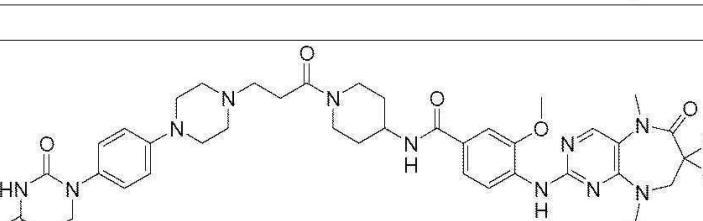
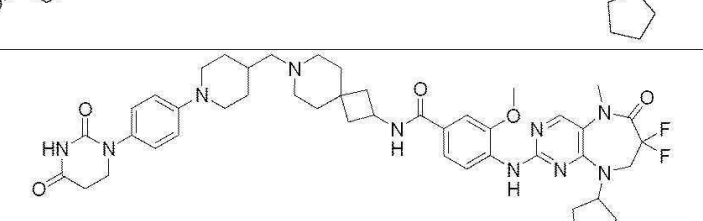
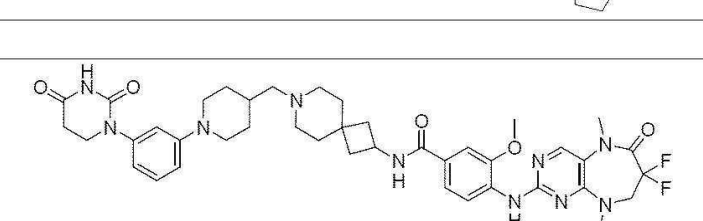
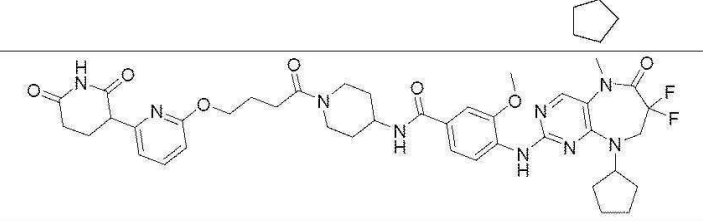
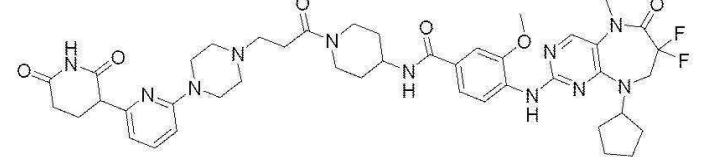
상기 화학식 I로 표시되는 화합물이 하기 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 것인, 화합물, 이의 입체이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염:

화합물	구조
1	
2	
3	
4	
5	
6	

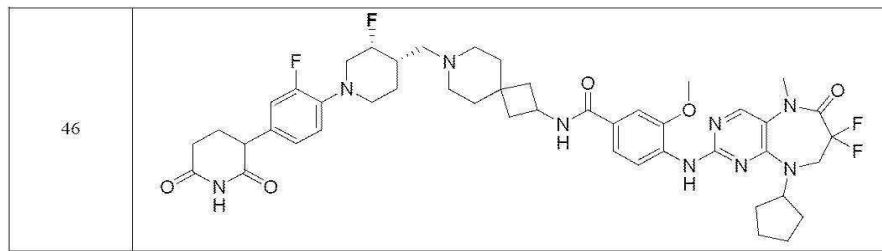
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	

16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	

23	
24	
25	
26	
27	
28	

29	
30	
31	
32	
33	
34	
35	
36	

37	
38	
39	
40	
41	
42	
43	
44	
45	



청구항 9

삭제

청구항 10

제 1 항 내지 제 5 항, 제 7 항 및 제 8 항 중 어느 하나의 항에 따른 화합물, 이의 입체이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 PLK1 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

상기 PLK1 관련 질환은 암, 양성 종양 및 신경질환으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상인, 약학적 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

제 10 항에 있어서, 상기 암 또는 양성 종양은

편평상피세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암, 복막암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 간세포암, 위장암, 위암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간 종양, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘암, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 두경부암, 뇌암, 골육종, 배럿 식도, 대장 선종 및 용종, 유방 섬유선종 및 낭종, 단세포 감마글로불린병증 (MGUS), 단클론 림프구증가증으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상인, 약학적 조성물.

청구항 13

제 10 항에 있어서, 상기 신경질환은 중추 신경계 질환, 퇴행성 신경질환, 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성경화증, 헌팅톤병, 노인성 치매, 간질, 루게릭, 및 뇌졸중으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상인, 약학적 조성물.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규 PLK1 분해 유도 화합물, 이의 제조방법, 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 PLK1의 효과적인 분해를 통해 비정상적인 세포 등에 특이적으로 작용할 수 있으며, 다양한 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

배경 기술

[0002] Polo-like kinase 1 (PLK1)은 세린/트레오닌 인산화효소로서 세포 성장 및 분열 중에 G2/M기의 전환에 관여하는 것으로 알려져 있다. PLK1은 S phase부터 G2/M기까지 펄스 형태로 발현되고 활성화되었다가, 유사분열이 종료되면서 빠르게 분해된다.

[0003] PLK1은 대장암, 폐암, 방광암, 흑색종 등 다양한 암종에서 과발현되는 양상을 띄며, PLK1이 과발현된 암세포는 여러 종류의 항암제에 대해 저항성을 나타내는 경향을 보인다. 이와 같이 다양한 암종에서 PLK1 의존성이 밝혀짐에 따라, 볼라셀팁(volasertib; BI6727로도 알려짐) 등 PLK1 억제제 화합물들의 개발이 시도된 바 있다.

[0004] 그러나, 기존 PLK1 억제제들은 임상적으로 안전성이 확보된 농도에서 PLK1 활성을 충분히 억제하지 못하여, 암 세포의 세포 주기를 일시적으로 지연시키더라도 결국 일부 암세포에서 세포 주기가 재개되어, 충분한 임상적 효과를 거두지 못한 문제가 있다(문헌[Gheghiani et al. CULM Reports, 2017] 등). 실제로 베링거인겔하임, GSK(GlaxoSmithKline) 등 다수 제약사들이 저분자 화합물 기반의 PLK1 억제제 개발을 시도하였으나 대부분 임상 시험 단계에서 실패하거나 중단되어 현재까지 상용화된 PLK1 억제제는 전무한 상태이다. 이는 암세포의 PLK1 활성을 억제하여 항암효과를 도출하고자 하는 신약개발 의도에 있어서, 저분자화합물 억제제와 같이 PLK1의 활성 부위에 결합하여 효소 활성을 억제하는 방식의 약리 기전이 충분히 효과적이지 않음을 보여준다.

[0005] 최근 들어, 표적 단백질의 체내 단백질 분해(proteolysis)를 유도할 수 있는 저분자 화합물 기반 플랫폼 기술로서 PROTAC(Proteolysis targeting chimera)이 제시된 바 있다. PROTAC이란 질환 관련 표적 단백질에 결합하는 리간드 분자와 E3 유비퀴틴 라이게이즈 결합 모이어티가 화학적 링커로 연결된 이기능성 화합물이다. 이론적으로 PROTAC 화합물은 질환 관련 표적 단백질을 E3 유비퀴틴 라이게이즈 근처에 위치시킴으로써, 표적 단백질의 분해를 유도할 수 있다. 이렇게 기존의 저해제와 다른 새로운 기전에 기반하여, 많은 PROTAC 화합물들이 암, 염증성 질환 등의 치료제로 개발되고 있으며, 다양한 확장성을 가지고 연구되고 있다 (예를 들어, ADC(항체-약물 컨쥬게이트)의 페이로드). 하지만, 모든 범위의 결합 모이어티 또는 링커에서 PROTAC이 활성을 나타내는 것은 아니며, 실제로 PROTAC이 원하는 수준의 효능을 나타내기 위해서는 각 결합 모이어티와 링커가 적절하게 연결된 구조를 가져야 함이 여러 연구를 통해 알려져 있다(문헌[US2020-0325130A]). 특히, CRBN(세레블론) E3 라이게이즈를 표적하는 모이어티의 경우, 그 결합 모이어티의 종류 또는 그에 연결되는 화합물의 구조에 따라 CRBN의 네오-기질(neo-substrate) (GSPT1, IKZF1/3 등)을 분해하거나 그에 따른 오프-타겟 독성을 나타낼 우려가 있다. 따라서, PROTAC 약물 개발시 예상치 못한 독성을 나타내지 않도록 적절한 결합 모이어티를 선정하고 전체 화합물의 구조를 최적화하는 것이 중요하다.

[0006] PLK1을 타겟 단백질로 하는 PROTAC 화합물의 경우, 중국 공개특허 제106543185 A호는 볼라셀팁 유도체 화합물과 E3 유비퀴틴 라이게이즈 CRBN에 대한 결합 모이어티를 화학적 링커로 연결한 이기능성 화합물을 일부 개시한다. 그러나, 상기 선행문헌에는 오직 일부 제한된 형태의 PROTAC 화합물의 합성예가 기재되어 있는데, 일반적으로 표적 단백질 모이어티, E3 유비퀴틴 라이게이즈 결합 모이어티 등의 선택에 따라 PROTAC의 타겟 분해 활성 및 선택성은 현저히 달라질 수 있다 (문헌[Burslem and Crews, 2017] 등).

[0007] 또한, 위 문헌에 기재된 PROTAC 화합물은 PLK1 및 BRD4를 동시에 분해하는 것에 발명의 특징이 있는 화합물이며 PLK1 이외의 다른 PLK 패밀리 단백질 및 BRD4 등 다양한 단백질 분해 역시 유도하므로 약물 개발 시 오프 타겟 독성으로 인한 부작용 발생의 문제가 있다. 특히 BRD4의 활성을 강하게 억제하면 약리 효과와 함께 혈액독성 및 위장관 독성 같은 온 타겟 부작용(on target toxicity)이 필연적으로 동반된다는 사실이 이미 알려져 있음을 감안하면, 위 문헌에 기재된 PROTAC 화합물이 BRD4를 효과적으로 분해하면 할수록 임상적 부작용이 커질 것으로 예상된다 (문헌[Bolden et al. CULM Reports, 2014] 등).

[0008] 더욱이, 위 문헌의 발명자에 의해 공개된 문헌[Mu et al. BBRC, 2019]에 따르면, 상기 PLK1 및 BRD4를 동시에 분해하는 PROTAC 화합물은 세포 수준에서 BRD4 분해능력이 PLK1 분해능력보다 월등히 강하고 세포 주기가 거의 G1 phase에 멈추는 등 기존 PLK1 억제제가 약리효과를 내는 방식과 전혀 상관없이 사실상 BRD4 억제제로서만 작용하는 것을 확인할 수 있다.

[0009] 따라서, 부작용(예를 들어, 오프 타겟 독성)이 없거나 이를 최소화하는 효과적인 PLK1 분해 유도 화합물에 대한

미충족된 수요가 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 신규 PLK1 분해 유도 화합물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 신규 PLK1 분해 유도 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 신규 PLK1 분해 유도 화합물의 용도를 제공하는 것이다.

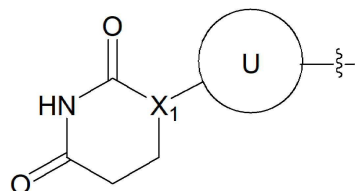
과제의 해결 수단

- [0013] 위와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 E3 라이게이즈 바인더, 타겟 결합 모이어티, 링커의 적절한 구조적 조합 및 최적화를 통해 PLK1을 과발현하는 비정상적인 세포에 특이적으로 작용하여 PLK1의 효과적인 분해를 유도하고 부작용을 최소화하는 신규 PROTAC 화합물을 발굴함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0014] PLK1 선택적 분해 유도 화합물
- [0015] 본 발명은 PLK1의 효과적인 분해를 유도하는 신규 화합물을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 PLK1 결합 모이어티와 E3 유비퀴틴 라이게이즈 결합 모이어티가 화학적 링커로 연결된 이기능성 화합물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일 실시양태는 하기 화학식 I로 표시되는 화합물, 이의 입체이성질체 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염이다:

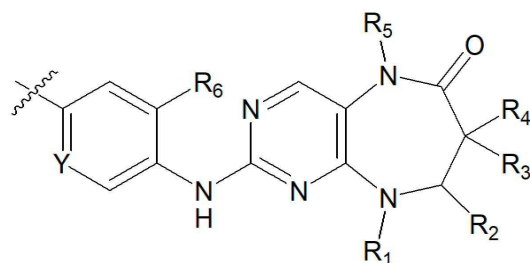
[0017] [화학식 I]

ULM—Linker—PTM

- [0018]
- [0019] 상기 화학식 I에서,
- [0020] ULM은 하기 화학식 1로 표시되는 모이어티이고;
- [0021] [화학식 1]



- [0022]
- [0023] PTM은 하기 화학식 2로 표시되는 모이어티이고;
- [0024] [화학식 2]



- [0025]
- [0026] Linker는 ULM과 PTM을 화학적으로 연결하는 기이고;
- [0027] X1은 CH 또는 N이고;
- [0028] 고리 U는 페닐 또는 5-6원 헤테로아릴이고 {여기서, 상기 페닐 또는 5-6원 헤테로아릴 고리의 하나 이상의 H는 R0로 치환될 수 있음};

[0029] R_U 는 $-C_{1-4}$ 알킬, $-C_{1-4}$ 하이드록시알킬, $-C_{1-4}$ 아미노알킬, $-C_{1-4}$ 할로알킬, $-C_{1-4}$ 알콕시, 또는 -할로이고;

[0030] Y는 CR_7 이고;

[0031] R_1 은 3-7원 사이클로알킬이고;

[0032] R_2 는 -H 또는 $-C_{1-4}$ 알킬이고,

[0033] R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 -H, $-C_{1-4}$ 알킬, 또는 -할로이고;

[0034] R_5 는 $-C_{1-4}$ 알킬이고;

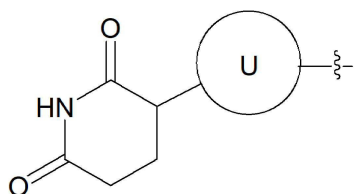
[0035] R_6 는 $-C_{1-4}$ 알킬 또는 $-C_{1-4}$ 알콕시이고; 및

[0036] R_7 은 -H 또는 -할로이다.

[0037] 본 발명의 일 실시양태에서,

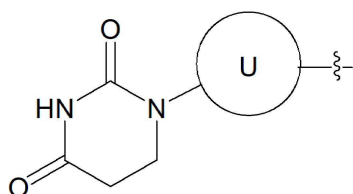
[0038] ULM은 하기 화학식 1-1 또는 화학식 1-2로 표시되는 모이어티이고;

[0039] [화학식 1-1]



[0040]

[0041] [화학식 1-2]



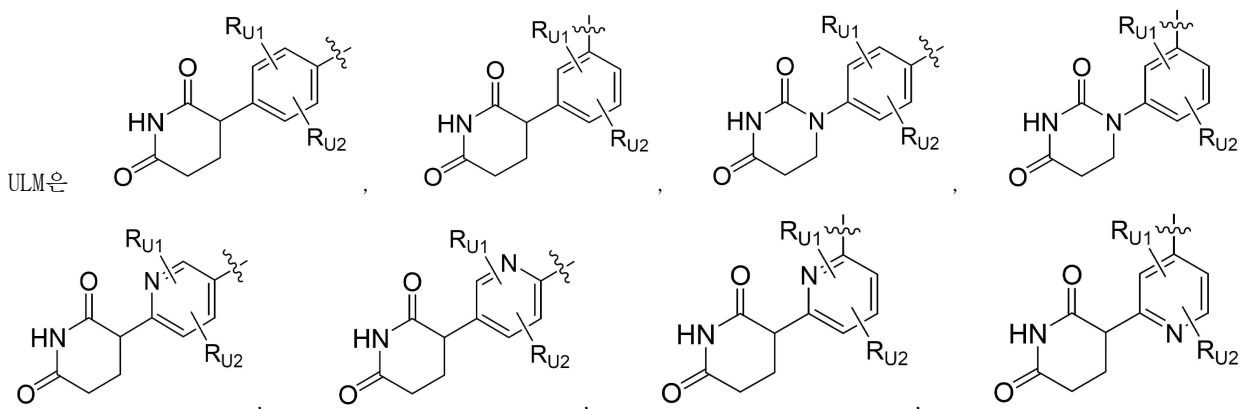
[0042]

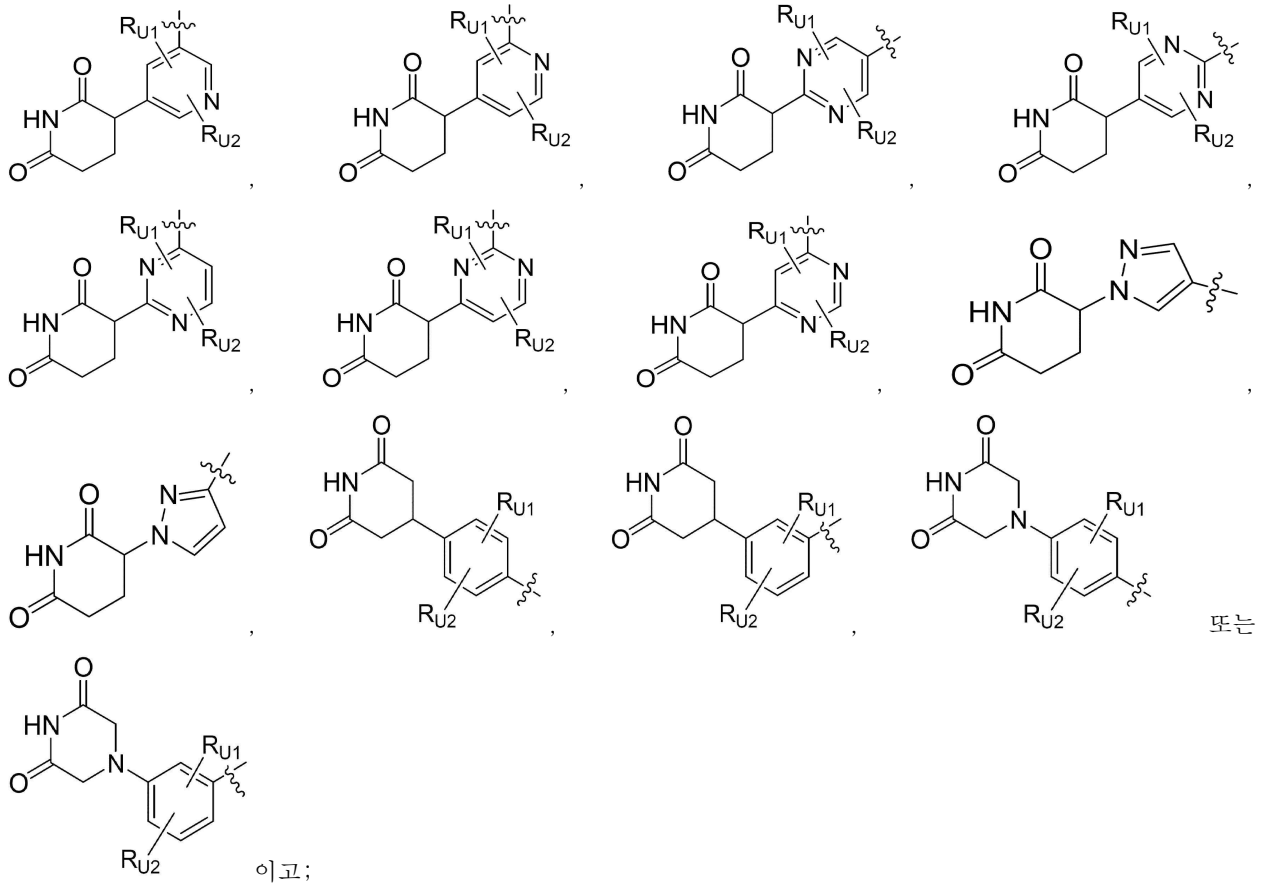
[0043] 고리 U는 페닐, 피리디닐, 피리미디닐, 또는 피라졸릴이고 {여기서, 상기 페닐, 피리디닐, 피리미디닐, 또는 피라졸릴 고리의 하나 이상의 H는 R_U 로 치환될 수 있음}; 및

[0044] R_U 는 $-C_{1-4}$ 알킬, $-C_{1-4}$ 할로알킬, $-C_{1-4}$ 알콕시, 또는 -할로이다.

[0045] 본 발명의 일 실시양태에서,

[0046]

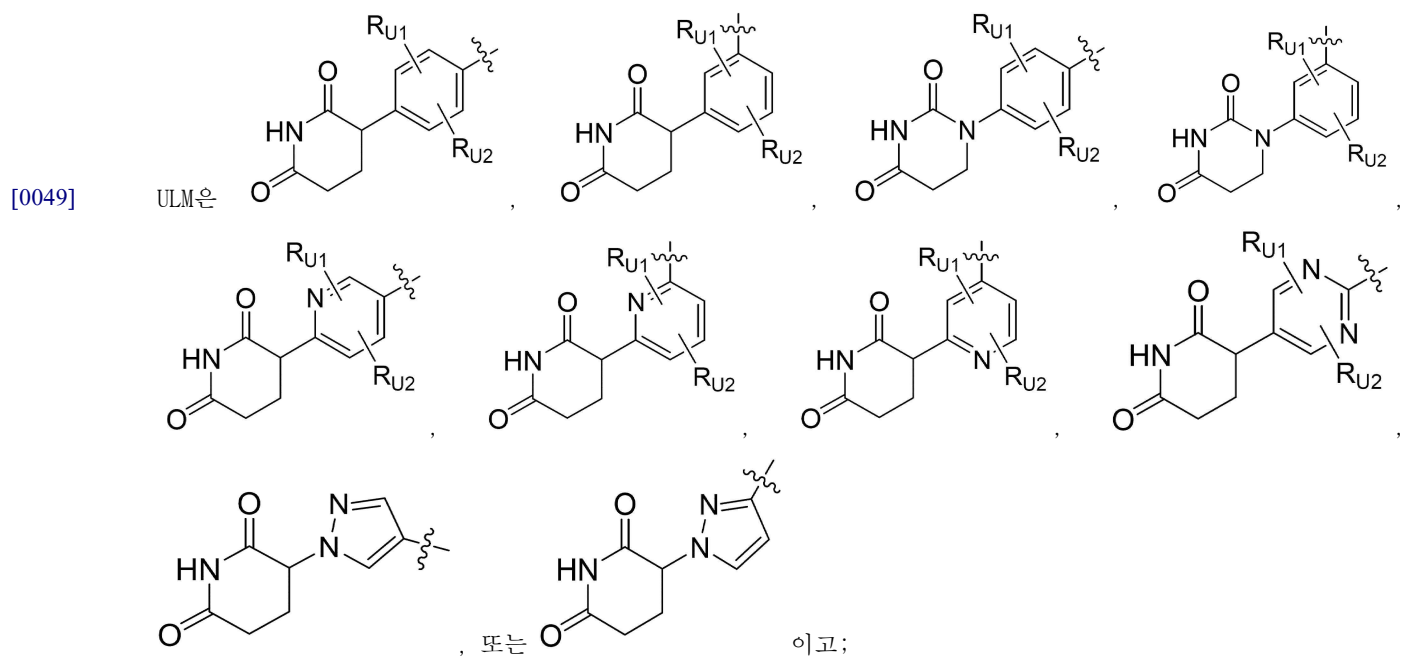




또는

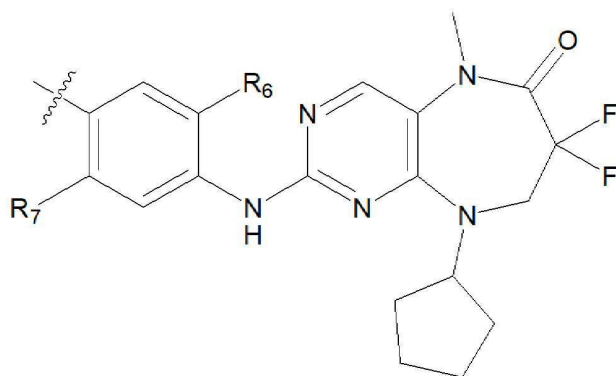
[0047] R_{U1} 및 R_{U2} 는 각각 독립적으로 $-C_{1-4}$ 알킬, $-C_{1-4}$ 할로알킬, $-C_{1-4}$ 알콕시, 또는 -할로이다.

[0048] 본 발명의 일 실시양태에서,



[0050] R_{U1} 및 R_{U2} 는 각각 독립적으로 $-C_{1-4}$ 알킬, $-C_{1-4}$ 할로알킬, $-C_{1-4}$ 알콕시, 또는 -할로이다.

[0051] 본 발명의 일 실시양태에서,



[0052] PTM은 이고;

[0053] R₆는 -C₁₋₄알킬, -C₁₋₄알콕시, 또는 -할로이고;

[0054] R₇은 -H 또는 -할로이다.

[0055] 본 발명의 일 실시양태에서,

[0056] Linker는 -L₀-L₁-L₂-L₃-L_p-이고;

[0057] L₀는 -(CH₂)_x-, -(CH₂)_x-NH-, -(CH₂)_x-O-, -C(=O)-, 페닐, 또는 아무 것도 아니고(null) {여기서, L₀는 ULM과 연결되고, [이때, 상기 L₀가 아무 것도 아닌 경우(null) L₁이 ULM과 직접 연결됨], 및 상기 x는 0, 1, 2, 3, 또는 4임};

[0058] L₁은 헤테로사이클로알킬 또는 아무 것도 아니고(null) {여기서, 상기 L₁이 아무 것도 아닌 경우(null) L₀와 L₂가 직접 연결되고, 상기 헤테로사이클로알킬은 고리 내 하나 이상의 N 원자를 포함하고, 상기 헤테로사이클로알킬 고리의 하나 이상의 H는 -C₁₋₄알킬, -C₁₋₄할로알킬, -C₁₋₄알콕시, -OH, -할로, 또는 =O로 치환될 수 있음};

[0059] L₂는 -(CH₂)_{y1}-, -(CD₂)_{y1}-, -(CH₂)_{y2}-C(=O)-(CH₂)_{y3}-, -(CH₂)_{y2}-NH-(CH₂)_{y3}-, -(CH₂)_{y2}-N(C₁₋₄알킬)-(CH₂)_{y3}-, -(CH₂)_{y1}-(O-C₁₋₄알킬)_z-O-C₁₋₄알킬, 또는 아무 것도 아니고(null) {여기서, 상기 y₁ 내지 y₃는 각각 독립적으로 0, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6이고, z는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6임};

[0060] L₃는 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 또는 아무 것도 아니고(null) {여기서, 상기 L₃가 아무 것도 아닌 경우(null) L₂와 L_p가 직접 연결되고, 상기 헤테로사이클로알킬은 고리 내 하나 이상의 N 원자를 포함하고, 상기 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬 고리의 하나 이상의 H는 -C₁₋₄알킬, -C₁₋₄할로알킬, 또는 -할로로 치환될 수 있음};

[0061] L_p는 -(CH₂)_p-NH-C(=O)- 또는 -(CH₂)_p-O-이다 {여기서, 상기 L_p의 -C(=O)- 또는 -O-가 PTM과 연결되고, p는 0, 1, 또는 2임}.

[0062] 본 발명의 일 실시양태에서,

[0063] L₀는 -(CH₂)_x-, -(CH₂)_x-NH-, -(CH₂)_x-O-, 또는 페닐이고 {여기서, L₀는 ULM과 연결되고, 상기 x는 0 또는 1임};

[0064] L₁은 4-12원 헤테로사이클로알킬 또는 아무 것도 아니고(null) {여기서, 상기 L₁이 아무 것도 아닌 경우(null) L₀와 L₂가 직접 연결되고, 상기 4-12원 헤테로사이클로알킬은 단일 고리, 다리 연결된(bridged) 이중 고리, 또는 스피로(spiro) 고리이고, 상기 4-12원 헤테로사이클로알킬은 고리 내 하나 이상의 N 원자를 포함하고 상기 N 원자는 L₀ 또는 ULM과 직접 연결되고, 상기 헤테로사이클로알킬 고리의 하나 이상의 H는 -C₁₋₄알킬, -OH, 또는 -할로로 치환될 수 있음};

[0065] L₂는 -(CH₂)_{y1}-, -(CH₂)_{y2}-C(=O)-(CH₂)_{y3}-, -(CH₂)_{y2}-NH-(CH₂)_{y3}-, -(CH₂)_{y2}-N(C₁₋₄알킬)-(CH₂)_{y3}-, -(CH₂)_{y1}-(O-C₁₋₄알킬)_z-O-C₁₋₄알킬, 또는 아무 것도 아니고(null) {여기서, 상기 y₁ 내지 y₃는 각각 독립적으로 0, 1, 2, 또는 3이고, z는 0, 1, 2, 또는 3임};

- [0066] L_3 는 4-6원 사이클로알킬 또는 4-12원 헤테로사이클로알킬이고 {여기서, 상기 4-12원 헤테로사이클로알킬은 단일 고리, 다리 연결된(bridged) 이중 고리, 또는 스파이로(spiro) 고리이고, 상기 4-12원 헤테로사이클로알킬은 고리 내 하나 이상의 N 원자를 포함하고, 상기 4-6원 사이클로알킬 또는 4-12원 헤테로사이클로알킬 고리의 하나 이상의 H는 -할로로 치환될 수 있음};
- [0067] L_p 는 $-(CH_2)_p-NH-C(=O)-$ 또는 $-(CH_2)_p-O-$ 이다 {여기서, 상기 L_p 의 $-C(=O)-$ 또는 $-O-$ 가 PTM과 연결되고, p 는 0 또는 1임}.
- [0068] 본 발명의 구체적인 실시양태에 따르면, 화학식 I로 표시되는 화합물은 화합물 1 내지 46로 구성된 군에서 선택된 화합물이다.
- [0069] 본 발명에서 약학적으로 허용가능한 염이란 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 I로 표시되는 화합물의 이로운 효능을 저하시키지 않는 임의의 유기산 또는 무기산 부가염을 의미한다. 예컨대, 약학적으로 허용가능한 염은 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 또는 질산 등일 수 있고, 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산, 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산, 구연산, 젖산, 글리콜산, 글루콘산, 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산, 글루쿠론산, 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산 또는 요오드화수소산일 수 있으나, 이들에 제한되지 않는다.
- [0070] PLK1 선택적 분해 유도 화합물의 용도
- [0071] 본 발명의 일 실시양태는 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 PLK1 분해 유도용 조성물이다. 화학식 I는 위에서 정의된 바와 같다.
- [0072] 본 발명의 실험예에서, 본 발명의 화합물은 PLK1 단백질 분해를 효과적으로 유도한다는 점을 확인하였다.
- [0073] 본 발명의 PLK1 분해 유도 PROTAC 화합물은 작용 기전의 관점에서 타겟 단백질인 PLK1를 원천 분해할 수 있으므로, PLK1의 단순 활성을 억제하는 종래 PLK1 저분자 억제제와 비교하여서도 우수한 PLK1 억제 효과를 달성한다.
- [0074] 따라서, 본 발명의 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 조성물은 PLK1의 선택적 분해를 위해 유용하게 사용될 수 있다.
- [0075] 본 발명의 일 실시양태는 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 PLK1 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다. 본 발명의 또 다른 실시양태는 이러한 조성물을 투여하여 PLK1 관련 질환을 예방 또는 치료하는 방법이다. 화학식 I는 위에서 정의된 바와 같다.
- [0076] 본 발명에서 PLK1 관련 질환은 PLK1의 분해 유도 또는 활성 억제로부터 치료, 경감, 지연, 저해 또는 예방될 수 있는 임의의 질환 또는 병태를 의미한다. 일 실시양태에서, PLK1 관련 질환은 암(악성 종양), 양성 종양, 신경 질환, 또는 그 외 지나친 세포 분열로 인해 일어나는 유전적 또는 비유전적 질환일 수 있다.
- [0077] 상기 암은 PLK1의 활성 억제로 인해 예방 또는 치료 효능을 나타낼 수 있는 모든 암을 포함하며, 고형암 또는 혈액암일 수 있다. 예컨대, 상기 암은 편평상피세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암, 복막암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 간세포암, 위장암, 위암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘암, 신장암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 두경부암, 뇌암, 골육종, 고형암, 혈액암, 골암, 거대세포 림프종, 부신피질 종양, T-세포성 림프종/백혈병, 신경내분비암, 신경내분비종양, 담관암, 신경모세포종, 교모세포종, 신경교종 등으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 암은 원발성 암뿐 아니라 전이성 암도 포함한다.
- [0078] 상기 양성 종양은 PLK1의 활성 억제로 인해 예방 또는 치료 효능을 나타낼 수 있는 모든 양성 종양, 예컨대 암 이전 단계의 양성 종양을 포함하며, 고형 종양 또는 혈액 종양일 수 있다. 예컨대, 상기 종양은 배렛 식도, 대장 선종 및 용종, 유방 섬유선종 및 낭종, 단세포 감마글로불린병증 (MGUS), 단클론 림프구증가증 등으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0079] 상기 신경질환은 PLK1의 활성 억제로 인해 예방 또는 치료 효능을 나타낼 수 있는 모든 신경질환을 포함하며, 구체적으로 중추 신경계 질환, 퇴행성 신경질환, 알츠하이머병, 파킨슨병, 다발성경화증, 헌팅톤병, 노인성 치매, 간질, 루게릭, 뇌졸중, 및 뇌 또는 척수 손상에 이은 신경손상과 축삭 변성 관련 장애 중에서 선택된 1종

이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0080] 본 발명의 약학적 조성물은 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 외에 동일 또는 유사한 약효를 나타내는 유효성분을 1종 이상 더 포함할 수 있다.

[0081] 본 발명의 일 실시양태는 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 인간을 포함하는 포유류에 투여하여 PLK1 단백질을 분해하는 방법이다.

[0082] 본 발명의 또다른 일 실시양태는 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제외에서 샘플에 투여하여 PLK1 단백질을 분해하는 방법이다. 상기 샘플은 세포, 세포 배양물, 사람을 포함한 포유동물의 체액 또는 조직일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0083] 본 발명의 화합물은 PLK1의 분해를 유도하는 효과를 나타낸다. 따라서 본 발명의 화합물은 PLK1 관련 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

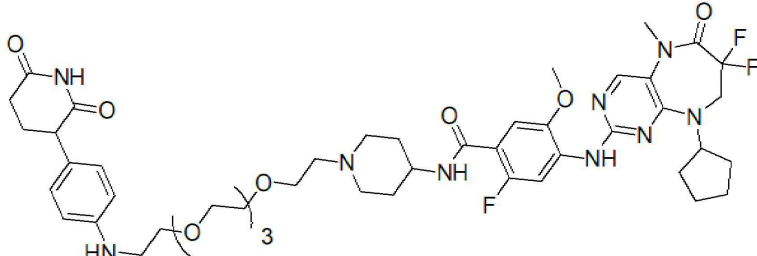
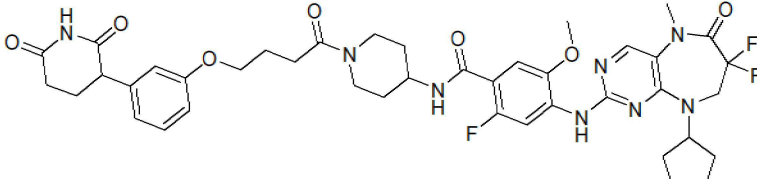
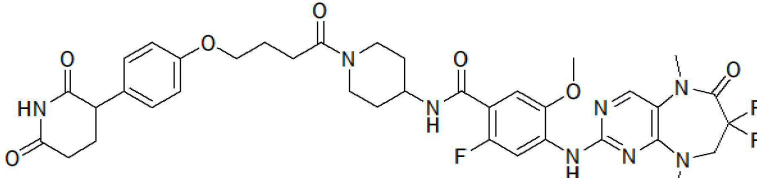
[0084] 도 1은 본 발명의 화합물 1 내지 46을 처리한 루시페라제 분석 결과를 나타낸다.

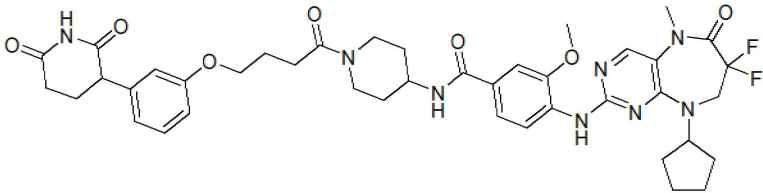
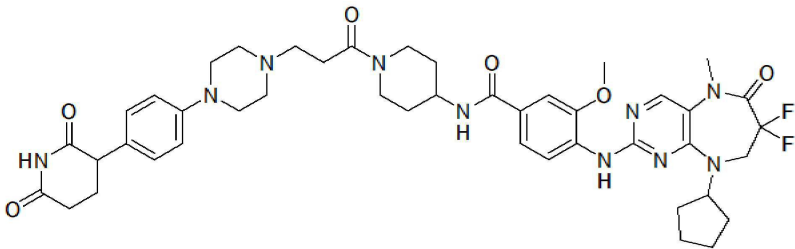
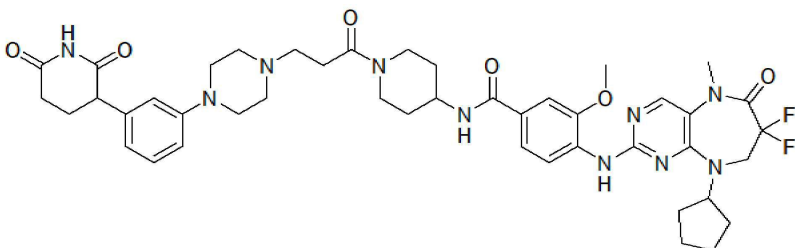
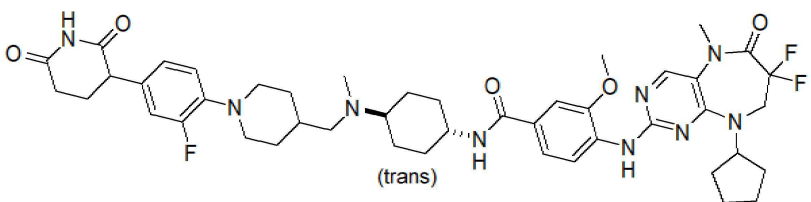
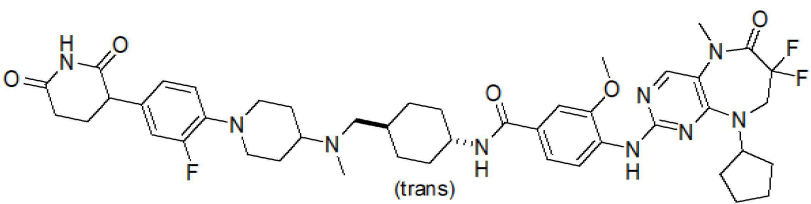
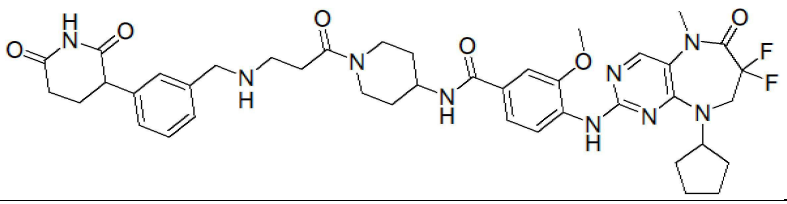
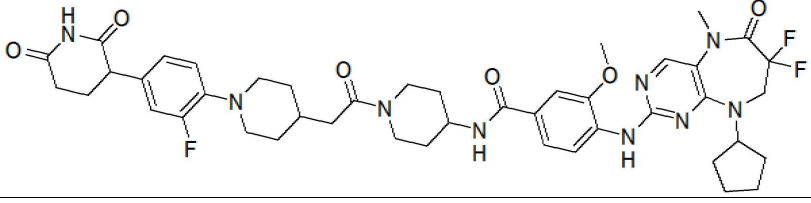
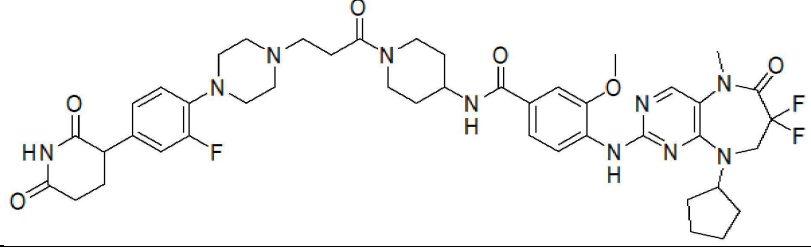
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

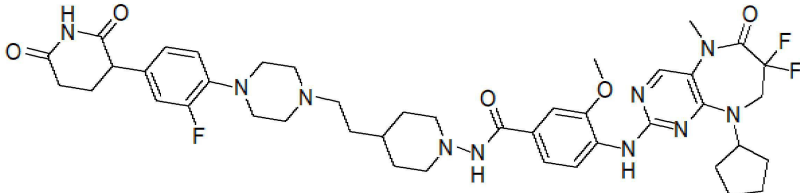
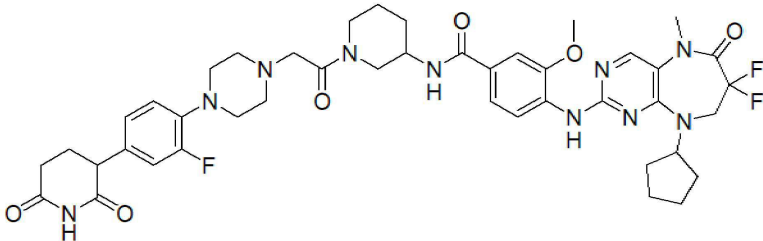
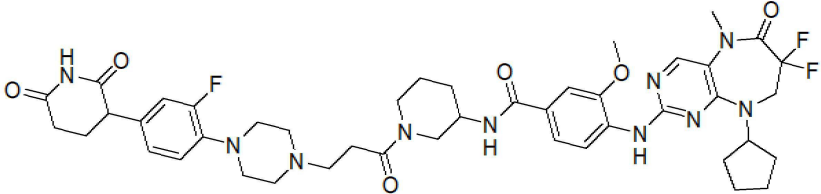
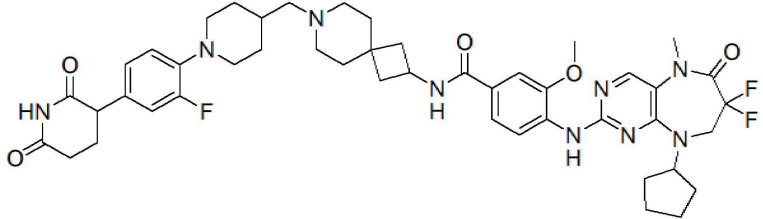
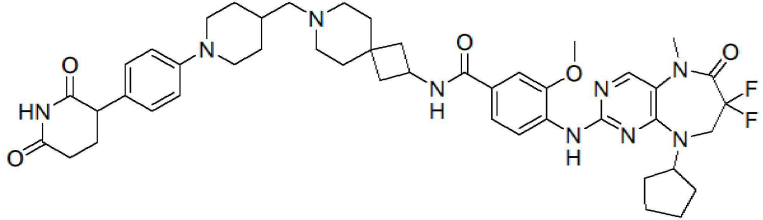
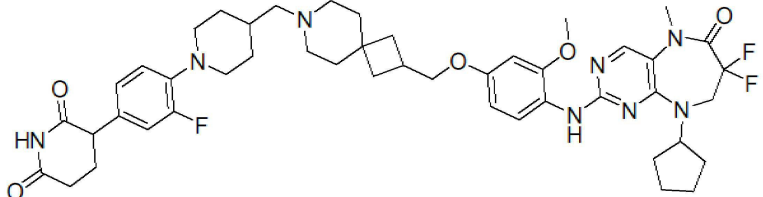
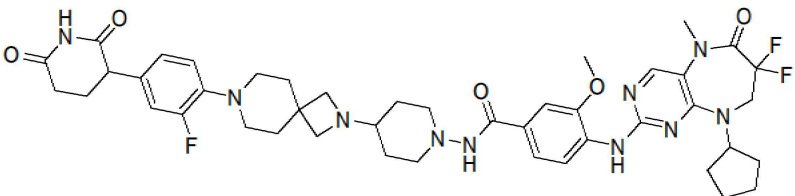
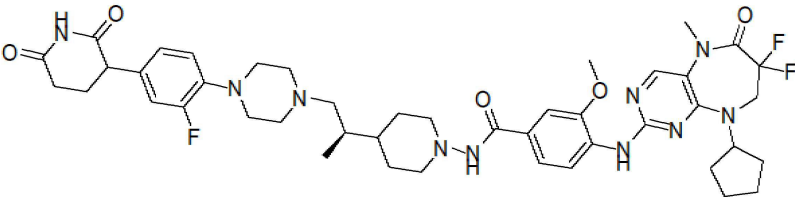
[0085] 달리 정의되지 않는한, 본원에서 사용된 모든 기술적, 과학적 용어들은 본 명세서가 속한 기술분야의 통상의 기술자에게 흔하게 이해되는 용어와 같은 의미를 가진다. 명세서에서 사용된 용어는 특정 실시양태를 설명하기 위한 것일뿐 본원을 제한하려는 의도가 아니다.

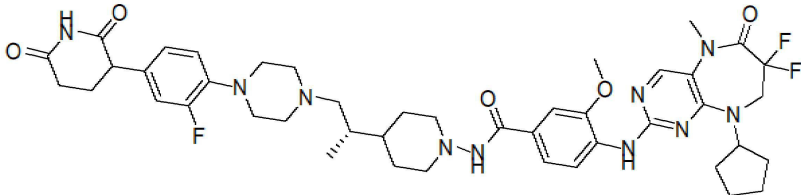
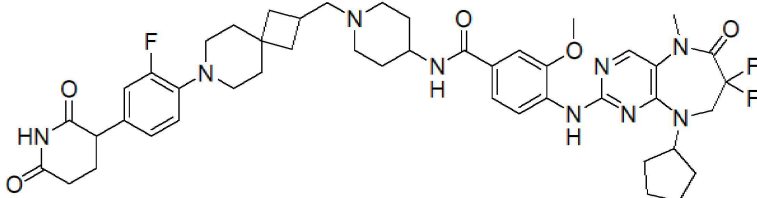
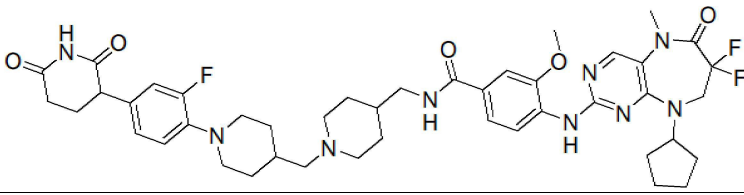
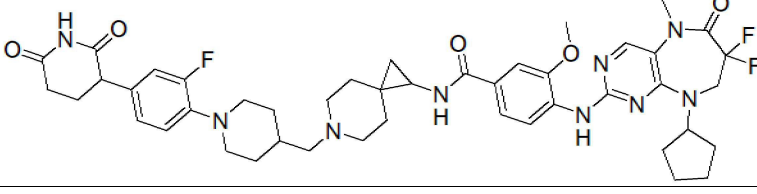
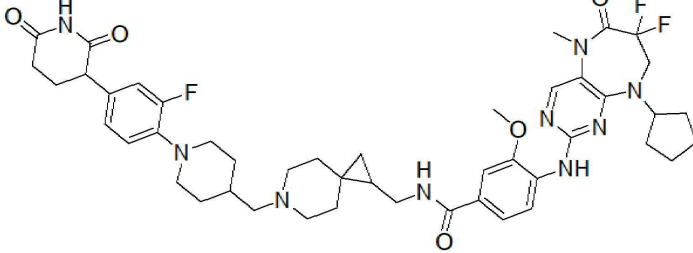
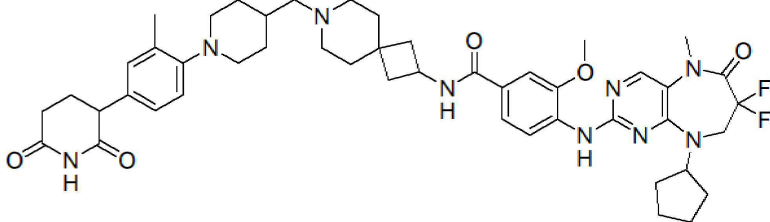
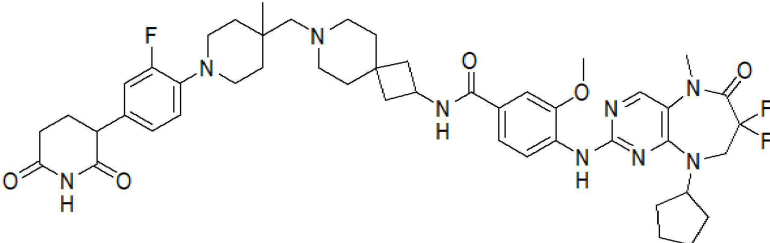
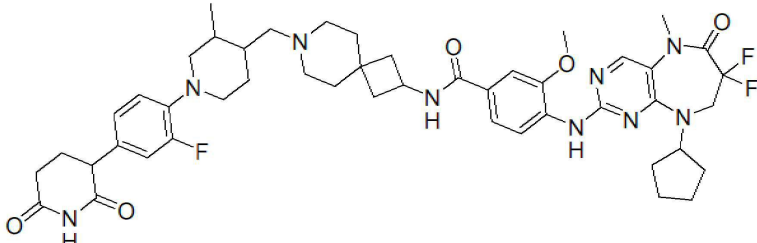
[0086] 본 발명은 하기 표에 표시된 화합물 1 내지 46에 대한 합성 방법을 제공한다.

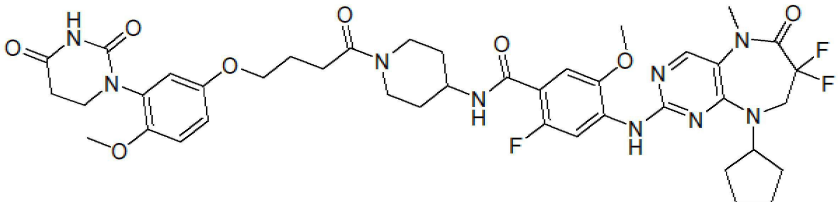
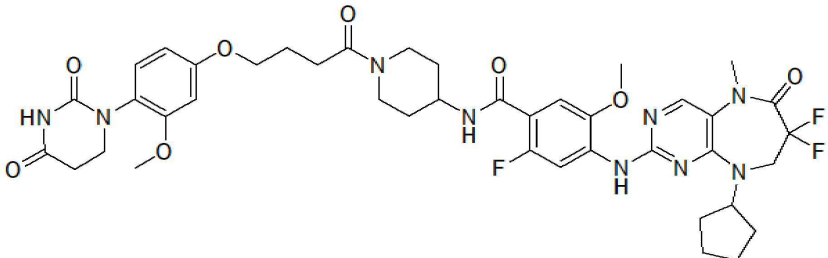
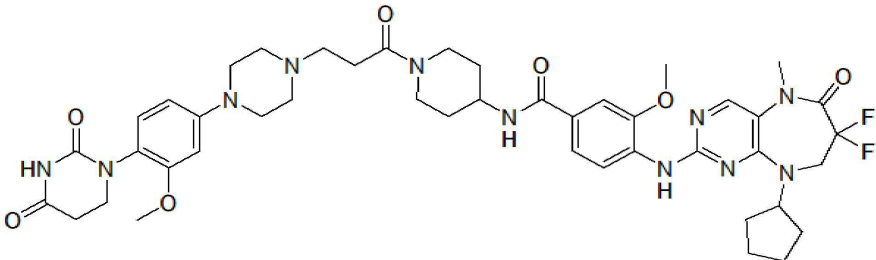
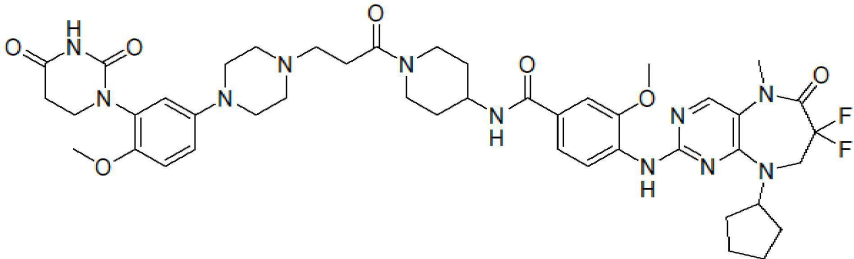
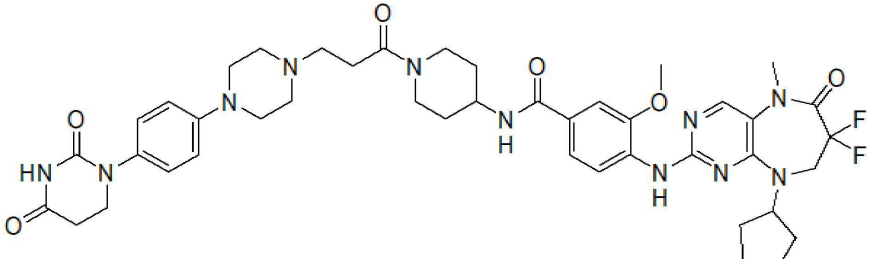
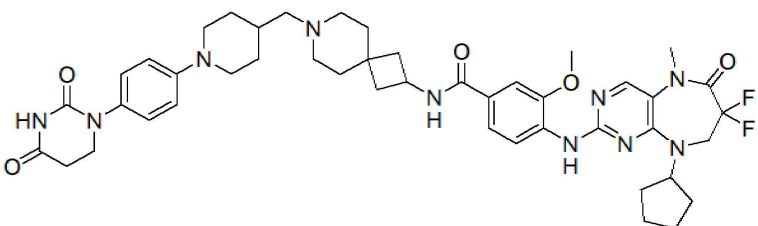
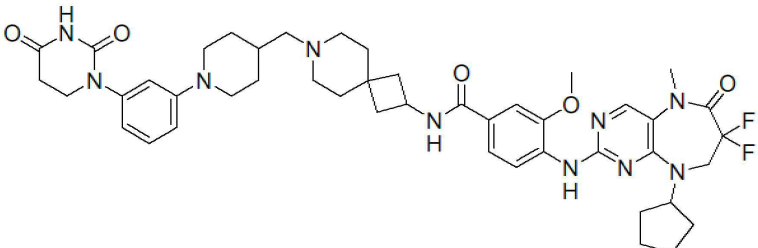
五 1

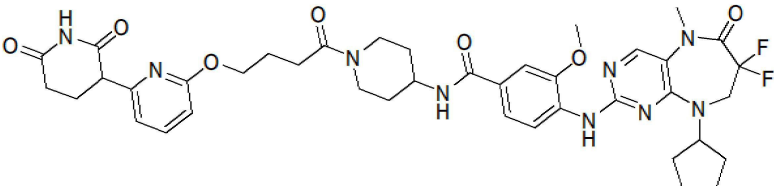
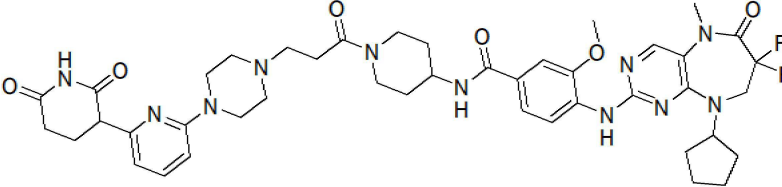
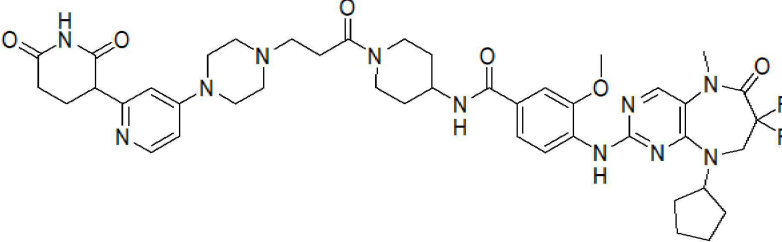
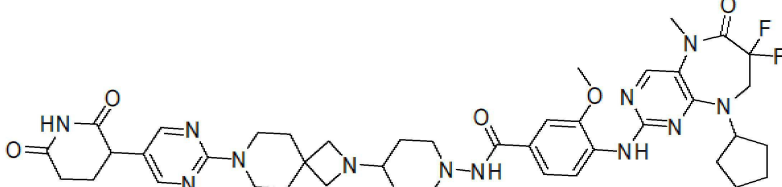
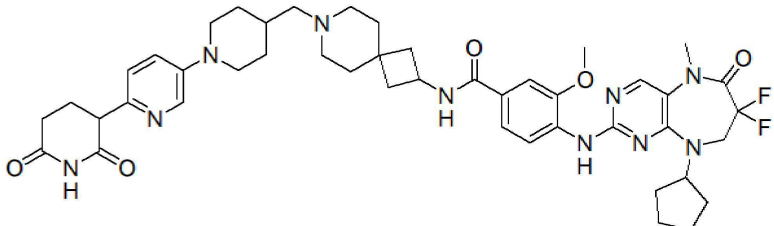
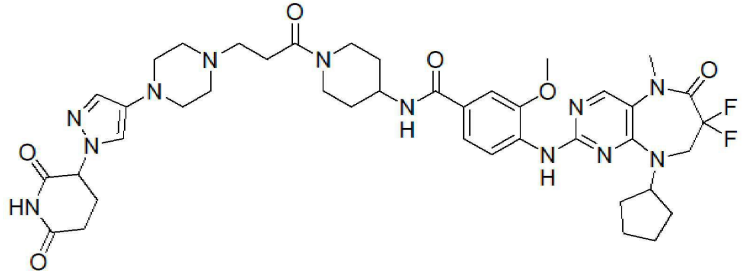
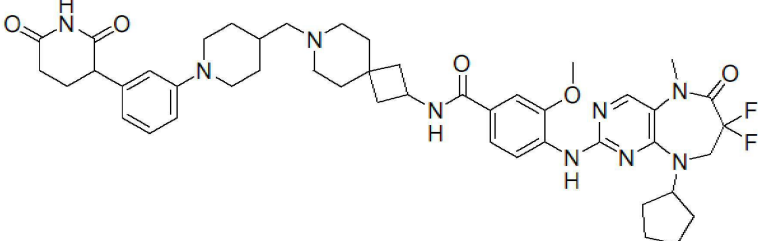
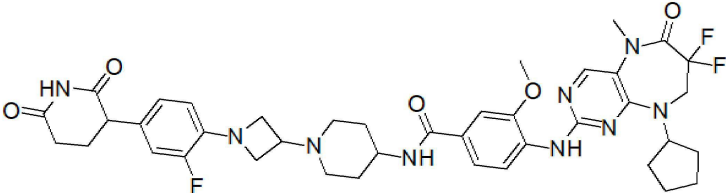
화합물	구조
1	
2	
3	

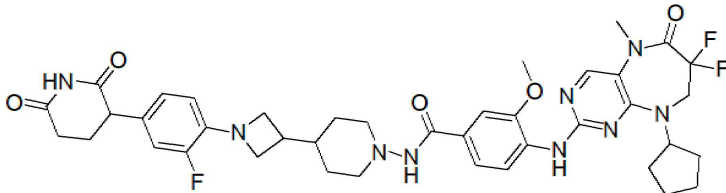
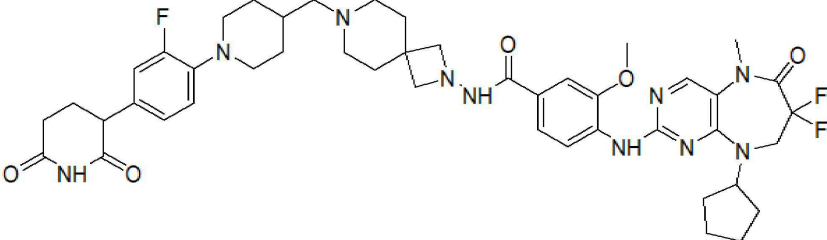
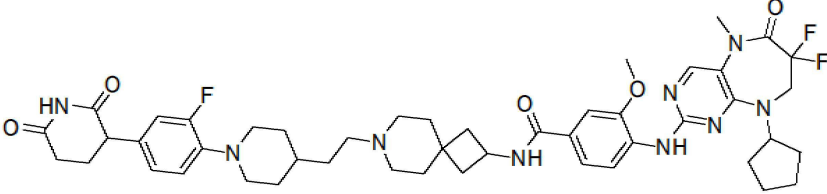
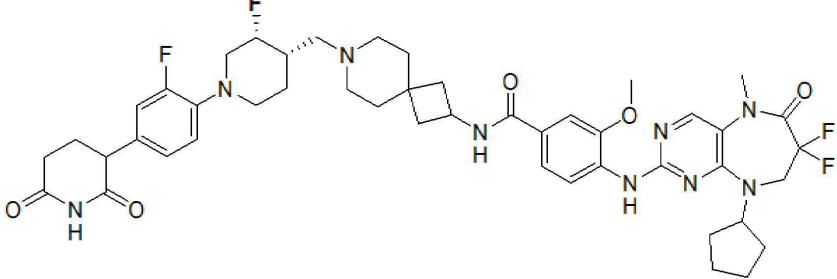
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	

12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	

20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	
27	

28	
29	
30	
31	
32	
33	
34	

35	
36	
37	
38	
39	
40	
41	
42	

43	
44	
45	
46	

[0088] 본 발명의 화합물을 아래 방법에 따라 정제하고 구조를 분석하였다.

[0089] 기기

[0090] LCMS : Shimadzu LCMS-2020, Agilent 1200/G6110A, Agilent 1200/G1956A

[0091] HPLC : Agilent 1260 II LC, Agilent 1200/G6410B

[0092] NMR : BRUKER AVANCE/400MHz

[0093] SFC : SHIMADZU LC-30ADsf, Agilent 1260

[0094] LCMS 분석

[0095] LCMS 데이터는 ESI(전자 분사 이온화; Electron Spray Ionization) 장치가 장착된 Shimadzu LCMS-2020 또는 Agilent 1200/G6110A 또는 Agilent 1200/G1956A으로 기록하였다. 물 내 0.0375 % TFA (용매 A)와 ACN 내 0.01875 % TFA (용매 B) 또는 물 내 0.025% NH₃ · H₂O (용매 A)와 ACN (용매 B)를 이동상으로 사용하였다. 컬럼은 Kinetex EVO C18 (2.1 x 30 mm, 5 μm) 또는 HALO C18 (3.0 x 30 mm, 2.7 μm)를 사용하였다.

[0096] HPLC 분석

[0097] HPLC 분석에서, Agilent 1260 II LC 또는 Agilent 1200/G6410B를 사용하였다. 물 내 0.0375 % TFA (용매 A)와 ACN 내 0.01875 % TFA (용매 B)를 이동상으로 사용하였다. 컬럼은 Zobrax Eclipse Plus C18 (4.6 x 150 mm, 3.5 μm) 또는 YMC ODS A (4.6 x 150 mm, 3 μm)를 사용하였다.

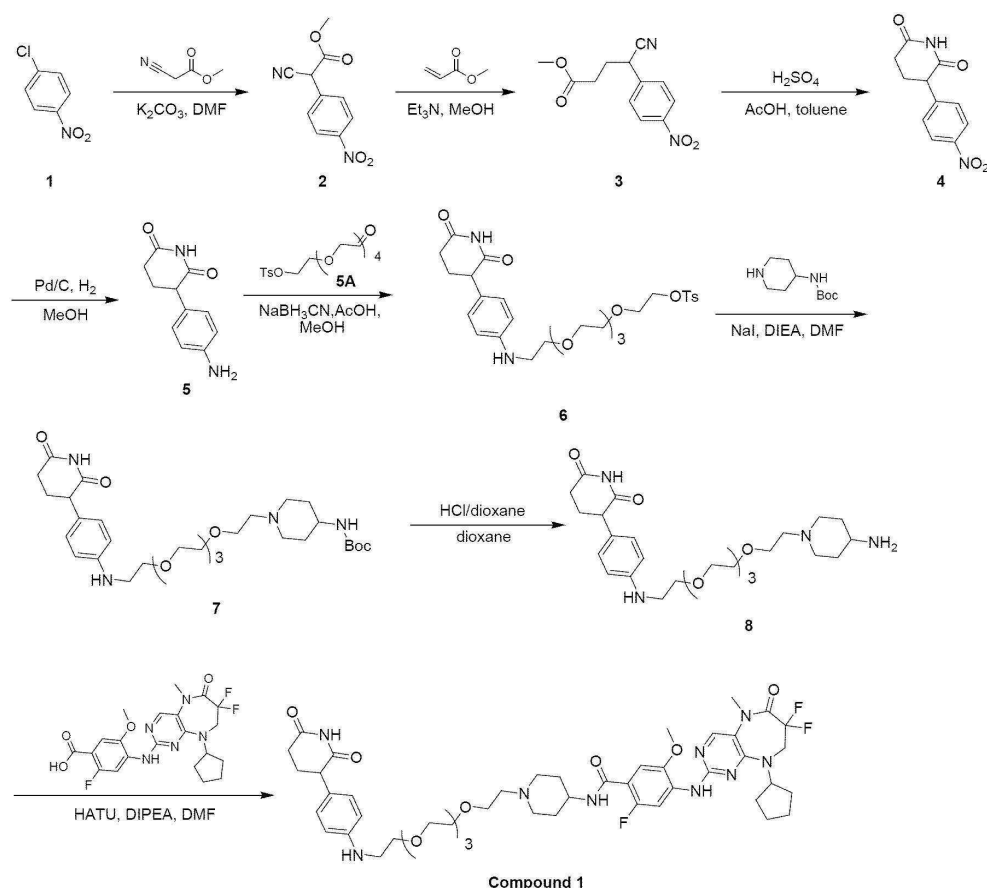
[0098] NMR 분석

[0099] ¹H NMR 스펙트럼을 Bruker AVANCE III 400MHz/5mm Probe (BBO)로 기록하였다.

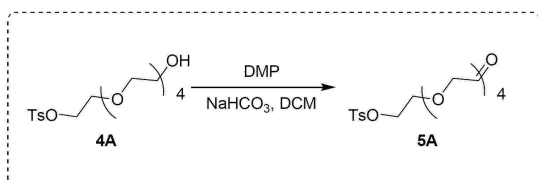
[0100] SFC 분석

[0101] SFC 분석에서, SHIMADZU LC-30ADsf 또는 Agilent 1260를 사용하였다. CO₂ (용매 A)와 IPA + ACN 내 0.05 % DEA (용매 B) 또는 CO₂ (용매 A)와 MeOH + ACN 내 0.05 % DEA (용매 B) 또는 ACN 내 0.05 % DEA (용매 A)와 EtOH 내 0.05 % DEA (용매 B)를 이동상으로 사용하였다. 컬럼은 Chiralpak AD-3 (50 x 4.6 mm, 3 μm) 또는 Chiralpak AS-3 (50 x 4.6 mm, 3 μm) 또는 Chiralpak OJ-3 (50 x 4.6 mm, 3 μm) 또는 Chiralpak IA-3 (50 x 4.6 mm, 3 μm) 또는 Chiralpak OD (50 x 4.6 mm, 3 μm) 또는 Chiralpak IC-3 (50 x 4.6 mm, 3 μm) 또는 (S,S)Whelk-01 (100 x 4.6 mm, 3.5 μm)를 사용하였다.

[0102] 실시예 1. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(14-((4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)아미노)-3,6,9,12-테트라옥사테트라데실)피페리딘-4-일)-2-플루오로-5-메톡시벤즈아미드 (화합물 1)의 합성



[0103]



[0104]

[0105] 단계 1. 메틸 2-시아노-2-(4-니트로페닐)아세테이트 (2)의 합성

[0106] DMF (150 mL) 내 1-클로로-4-니트로-벤젠 (15 g, 95.21 mmol) 및 K₂CO₃ (26.32 g, 190.41 mmol) 혼합물에 120 ° C에서 메틸 2-시아노아세테이트 (18.87 g, 190.41 mmol)를 첨가 후 120° C에서 12시간 동안 교반 하였다. TLC (석유 에터/EtOAc = 3/1)로 반응이 완료됨을 확인하였고, 반응 혼합물을 H₂O (1000 mL)로 희석 후 EtOAc (300 mL x 3)으로 추출하였다. 유기상을 염수 (800 mL x 3)으로 세척 후 Na₂SO₄로 건조, 여과 및 농축했다. 잔 여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (120 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~20% EtOAc/석유 에터 gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 황색 고체의 메틸 2-시아노-2-(4-니트로페닐)아세테이트 (27g,

crude)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 221.2$

[0107] ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ = 8.33 - 8.31 (m, 2H), 7.72 - 7.69 (m, 2H), 4.90 (s, 1H), 3.87 (s, 3H) .

[0108] **단계 2. 메틸 4-시아노-4-(4-니트로페닐)부타노에이트 (3)의 합성**

[0109] MeOH (100 mL) 내 메틸 2-시아노-2-(4-니트로페닐)아세테이트 (10 g, 45.42 mmol) 용액에 Et_3N (9.19 g, 90.83 mmol, 12.64 mL) 및 메틸 프로프-2-에노에이트 (3.91 g, 45.42 mmol, 4.09 mL)를 첨가하고 생성된 혼합물을 60 ° C에서 12시간 동안 교반 하였다. TLC (석유 에터/ $EtOAc$ = 1/1)로 반응이 완료됨을 확인하였고, 반응 혼합물을 H_2O (200 mL)로 희석 후 진공 하 증류하여 MeOH를 제거하였고, 수용상을 $EtOAc$ (100 mL x 3)으로 추출하고, 합친 유기상을 물 (200 mL x 2)로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조, 여과 및 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (80 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~50% $EtOAc$ /석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 적색 액체의 메틸 4-시아노-4-(4-니트로페닐)부타노에이트 (10 g, crude)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 249.2$

[0110] **단계 3. 3-(4-니트로페닐)피페리딘-2,6-디온 (4)의 합성**

[0111] 톨루엔 (100 mL) 내 메틸 4-시아노-4-(4-니트로페닐)부타노에이트 (10 g, 40.28 mmol) 용액에 H_2SO_4 (9.87 g, 100.63 mmol, 5.36 mL) 및 $AcOH$ (6.04 g, 100.58 mmol, 5.75 mL)를 첨가하고 생성된 혼합물을 110° C에서 12시간 동안 교반 하였다. TLC ($EtOAc$ /석유 에터 = 2/1)로 반응이 완료됨을 확인하였고, 반응 혼합물을 H_2O (10 mL)로 희석 후 $EtOAc$ (10 mL x 3)으로 추출하였다. 유기상을 염수 (30 mL x 3)으로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조, 여과 및 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (ISCO®; 80 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~50% $EtOAc$ /석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 적색 고체의 3-(4-니트로페닐)피페리딘-2,6-디온 (1.6 g, 6.83 mmol, 16.96% 수율)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 234.2$

[0112] ^1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 8.21 - 8.06 (m, 2H), 7.57 - 7.38 (m, 2H), 3.70 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 2.27 - 1.99 (m, 3H), 1.90 - 1.73 (m, 1H).

[0113] **단계 4. 3-(4-아미노페닐)피페리딘-2,6-디온 (5)의 합성**

[0114] MeOH (20 mL) 내 3-(4-니트로페닐)피페리딘-2,6-디온 (1.6 g, 6.83 mmol) 용액에 N_2 기체 하 Pd/C (200 mg, 10% 순도)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C H_2 (15 Psi) 하 12시간 동안 교반 하였다. TLC (석유 에터/ $EtOAc$ = 1/2)로 반응이 완료됨을 확인하였고, 혼합물을 여과하여 잔여물을 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (12 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~60% $EtOAc$ /석유 에터 gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 백색 고체의 3-(4-아미노페닐)피페리딘-2,6-디온 (0.6 g, 2.94 mmol, 43.01% 수율)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 205.2$

[0115] **단계 5. 14-옥소-3,6,9,12-테트라옥사트라데실 4-메틸벤젠설포네이트 (5A)의 합성**

[0116] DCM (20 mL) 내 14-하이드록시-3,6,9,12-테트라옥사트라데실 4-메틸벤젠설포네이트 (1 g, 2.55 mmol) 용액에 DMP (1.40 g, 3.31 mmol) 및 $NaHCO_3$ (2.14 g, 25.48 mmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 반응이 완료됨을 확인하였고, 생성된 혼합물을 여과 후 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (ISCO®; 20 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~10% MeOH/ $EtOAc$ gradient @ 50 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 14-옥소-3,6,9,12-테트라옥사트라데실 4-메틸벤젠설포네이트 (0.65 g, 1.66 mmol, 65.34% 수율)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 391.1$.

[0117] **단계 6. 14-((4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)아미노)-3,6,9,12-테트라옥사트라데실 4-메틸벤젠설포네이트 (6)의 합성**

[0118] MeOH (5 mL) 내 3-(4-아미노페닐)피페리딘-2,6-디온 (250 mg, 1.22 mmol) 및 14-옥소-3,6,9,12-테트라옥사트라데실 4-메틸벤젠설포네이트 (621.35 mg, 1.59 mmol) 용액에 $NaBH_3CN$ (230.78 mg, 3.67 mmol) 및 $AcOH$ (7.35 mg, 122.41 μ mol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 반응이 완료됨을

확인하였다. 혼합물에 H₂O (50 mL)를 붓고 EtOAc (20 mL x 3)으로 추출하였고, 합친 유기상을 염수 (50 mL)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고, 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (ISCO®; 20 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~100% EtOAc/석유 에터 gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 14-((4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)아미노)-3,6,9,12-테트라옥사테트라데실 4-메틸벤젠설포네이트 (0.55 g, 741.35 μ mol, 60.56% 수율, 78% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 579.1

[0119] 단계 7. tert-부틸 (1-(14-((4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)아미노)-3,6,9,12-테트라옥사테트라데실)피페리딘-4-일)카바메이트 (7)의 합성

[0120] DMF (5 mL) 내 14-((4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)아미노)-3,6,9,12-테트라옥사테트라데실 4-메틸벤젠설포네이트 (0.45 g, 777.64 μ mol) 및 tert-부틸 N-(4- 피페리딜) 카바메이트 (233.62 mg, 1.17 mmol) 용액에 NaI (11.66 mg, 77.76 μ mol) 및 DIPEA (201.01 mg, 1.56 mmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 100° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 반응이 소모됨을 확인하였고, 혼합물에 물 (20 mL)을 붓고 EtOAc (20 mL x 3)으로 추출하고, 합친 유기상을 염수 (50 mL)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고, 농축했다. 잔여물을 prep-TLC (EtOAc)로 정제하여 황색 오일의 tert-부틸 (1-(14-((4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)아미노)-3,6,9,12-테트라옥사테트라데실)피페리딘-4-일)카바메이트 (260 mg, 407.09 μ mol, 52.35% 수율, 95% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 607.4

[0121] 단계 8. 3-(4-((14-(4-아미노피페리딘-1-일)-3,6,9,12-테트라옥사테트라데실)아미노)페닐)피페리딘-2,6-디온 (8)의 합성

[0122] 디옥산 (2 mL) 내 tert-부틸 (1-(14-((4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)아미노)-3,6,9,12-테트라옥사테트라데실)피페리딘-4-일)카바메이트 (130 mg, 214.26 μ mol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 2 mL)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 반응이 완료됨을 확인 후 농축하여 황색 오일의 3-(4-((14-(4-아미노피페리딘-1-일)-3,6,9,12-테트라옥사테트라데실)아미노)페닐)피페리딘-2,6-디온 (120 mg, crude, HCl)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 507.3

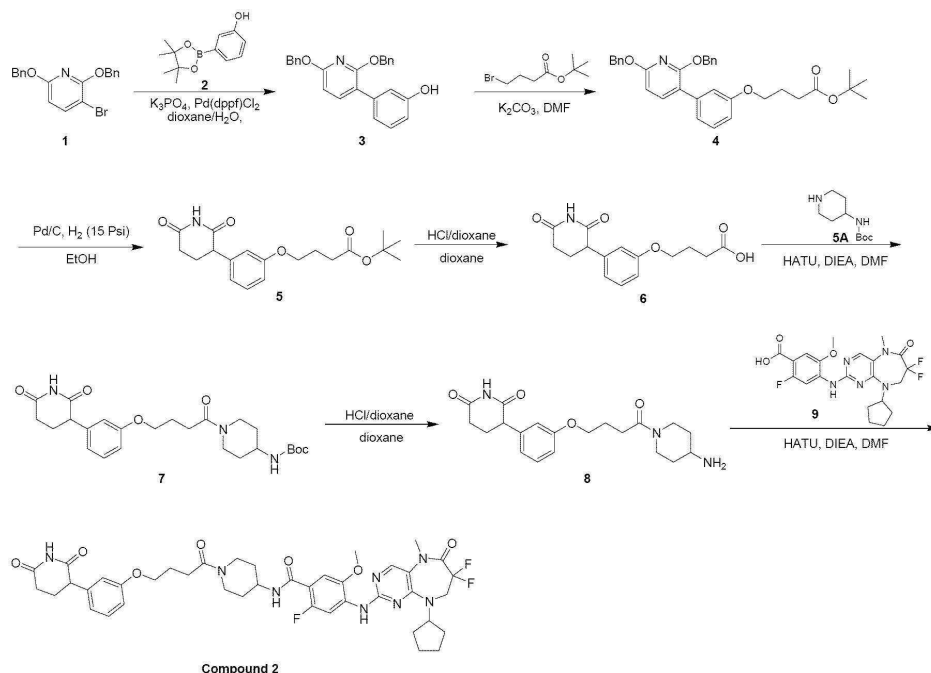
[0123] 단계 9. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(14-((4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)아미노)-3,6,9,12-테트라옥사테트라데실)피페리딘-4-일)-2-플루오로-5-메톡시벤즈아미드 (화합물 1)의 합성

[0124] DMF (2 mL) 내 3-(4-((14-(4-아미노피페리딘-1-일)-3,6,9,12-테트라옥사테트라데실)아미노)페닐)피페리딘-2,6-디온 (0.12 g, 220.96 μ mol, HCl) 및 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-2-플루오로-5-메톡시벤조산 (113.12 mg, 243.05 μ mol) 용액에 HATU (126.02 mg, 331.43 μ mol) 및 DIPEA (114.23 mg, 883.82 μ mol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 반응이 완료됨을 확인하였고, 혼합물에 물 (20 mL)을 붓고 EtOAc (20 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (50 mL)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고, 농축하고, 잔여물을 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex Synergi C₁₈ 150*25 mm* 10 μ m; 이동상: [H₂O (0.225%FA) - ACN]; B%: 16%-46%, 10 분)로 정제 후 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(14-((4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)아미노)-3,6,9,12-테트라옥사테트라데실)피페리딘-4-일)-2-플루오로-5-메톡시벤즈아미드 (52.9 mg, 52.68 μ mol, 23.84% 수율, 95% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 954.5.

[0125] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.74 (s, 1H), 8.31 (s, 1H), 8.25 (d, J = 13.3 Hz, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.93 - 7.86 (m, 1H), 7.20 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.55 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 5.48 (s, 1H), 4.83 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 4.08 (t, J = 13.8 Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.76 - 3.74 (m, 2H), 3.64 (dd, J = 5.1, 10.4 Hz, 2H), 3.59 - 3.55 (m, 6H), 3.53 - 3.52 (m, 10H), 3.18 (s, 2H), 2.90 - 2.87 (m, 2H), 2.61 - 2.55 (m, 2H), 2.47 - 2.43 (m, 1H), 2.18 - 2.05 (m, 4H), 2.03 - 1.91 (m, 4H), 1.83 - 1.72 (m, 3H), 1.63 - 1.47 (m, 6H).

[0126] 실시예 2. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)-2-플루오로-5-메

특시벤즈아미드 (화합물 2)의 합성



단계 1. 3-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페놀 (3)의 합성

H₂O (4 mL) 및 디옥산 (20 mL) 내 3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페놀 (1 g, 4.54 mmol), 2,6-비스(벤질옥시)-3-브로모피리딘 (1.68 g, 4.54 mmol) 및 K₃PO₄ (2.89 g, 13.63 mmol) 혼합물에 Pd(dppf)Cl₂ (332.48 mg, 454.40 μmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 N₂ 하 3차례 탈기 및 퍼지 후 110° C로 가열하고 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (85%)가 검출되었다. 혼합물을 물 (100 mL)로 희석 후 EtOAc (50 mL x 3)로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (100 mL)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조, 여과하고 진공하 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (ISCO; 20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0-30% EtOAc/석유 에터 gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 3-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페놀 (1.8 g, crude)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 384.1

단계 2. tert-부틸 4-(3-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페녹시)부타노에이트 (4)의 합성

DMF (30 mL) 내 3-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페놀 (1.8 g, 4.69 mmol) 및 tert-부틸 4-브로모부타노에이트 (1.15 g, 5.16 mmol) 용액에 K₂CO₃ (1.95 g, 14.08 mmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 60° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (97 %)가 검출되었다. 생성된 혼합물을 물 (100 mL)로 희석 후 EtOAc (50 mL x 3)로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (100 mL)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조, 여과 및 진공하 농축하여 황색 오일의 tert-부틸 4-(3-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페녹시)부타노에이트 (2.5 g, crude)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 526.2

단계 3. tert-부틸 4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노에이트 (5)의 합성

EtOH (40 mL) 내 tert-부틸 4-(3-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페녹시)부타노에이트 (2 g, 3.80 mmol) 용액에 N₂ 기체 하 Pd/C (200 mg, 10% 순도)를 첨가 후 H₂ (15 Psi)하 20° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (77 %)가 검출되었다. 반응물을 여과 후 여과물을 농축하여 황색 오일의 tert-부틸 4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노에이트 (1 g, 2.88 mmol, 75.65% 수율)를 수득하였다. MS(M+Na)⁺ = 370.2

단계 4. 4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부탄산 (6)의 합성

디옥산 (10 mL) 내 tert-부틸 4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노에이트 (1 g, 2.88 mmol) 용액에

HCl/디옥산 (4 M, 10 mL)를 첨가하고 생성된 혼합물을 25° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소모됨을 확인 후 반응 혼합물을 진공 하 농축하여 황색 오일의 4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부탄산 (1.0 g, crude)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 292.3$

[0136] 단계 5. tert-부틸 (1-(4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (7)의 합성

[0137] DMF (5 mL) 내 4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부탄산 (500 mg, 1.72 mmol) 및 tert-부틸 피페리딘-4-일카바메이트 (343.77 mg, 1.72 mmol) 용액에 HATU (978.97 mg, 2.57 mmol) 및 DIPEA (665.52 mg, 5.15 mmol, 896.93 μ L)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (29%)가 검출되었다. 생성된 혼합물을 물(100 mL)을 붓고 EtOAc (50 mL x 3)로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (100 mL)로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조 및 여과하여 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~90% EtOAc/석유 에터 gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 tert-부틸 (1-(4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (0.3 g, 633.50 μ mol, 36.91% 수율)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 474.1$

[0138] 단계 6. 3-(3-(4-(4-아미노피페리딘-1-일)-4-옥소부톡시)페닐)피페리딘-2,6-디온 (8)의 합성

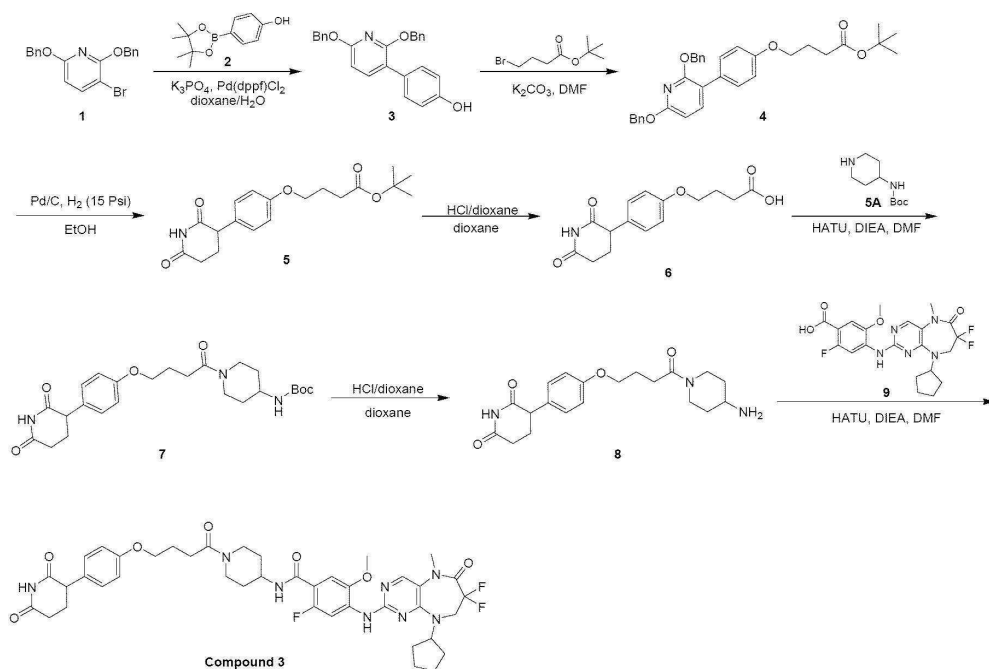
[0139] 디옥산 (5 mL) 내 tert-부틸(1-(4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (0.3 g, 633.50 μ mol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 5 mL)를 첨가하고 생성된 혼합물을 25° C에서 0.5 시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (81 %)가 검출되었다. 반응물을 여과 후 여과물을 농축하여 황색 오일의 3-(3-(4-(4-아미노피페리딘-1-일)-4-옥소부톡시)페닐)피페리딘-2,6-디온 (0.3 g, crude, HCl 염)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 374.1$

[0140] 단계 7. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)-2-플루오로-5-메톡시벤즈아미드 (화합물 2)의 합성

[0141] DMF (5 mL) 내 3-(3-(4-(4-아미노피페리딘-1-일)-4-옥소부톡시)페닐)피페리딘-2,6-디온 (260 mg, 634.29 μ mol, HCl 염) 및 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-2-플루오로-5-메톡시벤조산 (295.22 mg, 634.29 μ mol) 용액에 HATU (361.77 mg, 951.44 μ mol) 및 DIPEA (245.93 mg, 1.90 mmol, 331.45 μ L)를 첨가하고 생성된 혼합물을 25° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (59 %)가 검출되었다. 혼합물에 물(20 mL)을 붓고 EtOAc (20 mL x 3)로 추출하고, 합친 유기상을 염수 (50 mL)로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조 및 여과하여 농축했다. 생성된 혼합물을 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge C18 150 * 50 mm * 10um; 이동상: [물 (NH_4HCO_3) - ACN]; B%: 36% - 66%, 11 분)로 정제 후 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)-2-플루오로-5-메톡시벤즈아미드 (66.3 mg, 79.15 μ mol, 12.48% 수율, 98% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 821.4$

[0142] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.88 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.31 (d, J = 13.4 Hz, 1H), 8.10 (s, 1H), 8.02 (dd, J = 2.9, 7.6 Hz, 1H), 7.34 - 7.23 (m, 2H), 6.90 (dd, J = 2.1, 8.1 Hz, 1H), 6.87 - 6.82 (m, 2H), 4.94 - 4.83 (m, 1H), 4.39 (br d, J = 12.9 Hz, 1H), 4.19 - 4.08 (m, 3H), 4.04 (br t, J = 6.4 Hz, 3H), 3.98 (s, 3H), 3.95 - 3.85 (m, 2H), 3.39 (s, 3H), 3.20 (br t, J = 11.6 Hz, 1H), 2.84 - 2.66 (m, 2H), 2.54 - 2.50 (m, 2H), 2.33 - 2.20 (m, 1H), 2.11 - 1.99 (m, 4H), 1.94 - 1.90 (m, 2H), 1.82 - 1.96 (m, 2H), 1.74 - 1.61 (m, 4H), 1.57 - 1.37 (m, 2H).

[0143] 실시예 3. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)-2-플루오로-5-메톡시벤즈아미드 (화합물3)의 합성



[0144]

[0145]

[0146]

단계 1. 4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페놀 (3)의 합성

H₂O (3 mL) 및 디옥산 (15 mL) 내 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페놀 (594.40 mg, 2.70 mmol), 2,6-비스(벤질옥시)-3-브로모피리딘 (1 g, 2.70 mmol) 및 K₃PO₄ (1.72 g, 8.10 mmol) 혼합물에 Pd(dppf)Cl₂ (197.63 mg, 270.10 μmol)를 첨가하고, 생성된 혼합물을 N₂ 하 3차례 탈기 및 퍼지 후 110° C고 가열하고 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (89%)가 검출되었다. 생성된 혼합물에 물(100 mL)을 붓고 EtOAc (50 mL x 3)로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (100 mL)로 세척 후 Na₂SO₄ 로 건조 및 여과하여 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~30% EtOAc/석유 에터 gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페놀 (1 g, 2.61 mmol, 96.56 수율)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 384.1

[0147]

단계 2. tert-부틸 4-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페녹시)부타노에이트 (4)의 합성

[0148]

DMF (20 mL) 내 4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페놀 (1 g, 2.61 mmol) 및 tert-부틸 4-브로모부타노에이트 (640.04 mg, 2.87 mmol) 용액에 K₂CO₃ (1.08 g, 7.82 mmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 60° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 주 피크 (98%)가 검출되었다. 혼합물에 물 (100 mL)을 붓고 EtOAc (50 mL x 3)로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (100 mL)로 세척 후 Na₂SO₄ 로 건조, 여과 및 농축하여 황색 오일의 tert-부틸 4-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페녹시)부타노에이트 (1.5 g, crude)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 526.2

[0149]

단계 3. tert-부틸 4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노에이트 (5)의 합성

[0150]

EtOH (20 mL) 내 tert-부틸 4-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페녹시)부타노에이트 (1.5 g, 2.85 mmol) 용액에 N₂ 기체 하 Pd/C (150 mg, 10% 순도)를 첨가하고 생성된 혼합물을 H₂ (15 Psi) 하 20° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (81 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 여과 후 여과물을 농축하여 황색 오일의 tert-부틸 4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노에이트 (0.8 g, 2.30 mmol, 80.69 수율)를 수득하였다. MS(M+Na)⁺ = 370.2

[0151]

단계 4. 4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부탄산 (6)의 합성

[0152]

디옥산 (10 mL) 내 tert-부틸 4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노에이트 (0.8 g, 2.30 mmol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 8.00 mL)를 첨가하고 생성된 혼합물을 25° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소모됨을 확인하였다. 반응물을 여과하고 여과물을 농축하여 황색 오일의 4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페

녹시)부탄산 (1 g, crude)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 292.3$

[0153] 단계 5. tert-부틸 (1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (7)의 합성

[0154] DMF (5 mL) 내 4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부탄산 (500.00 mg, 1.72 mmol) 및 tert-부틸 피페리딘-4-일카바메이트 (343.77 mg, 1.72 mmol) 용액에 HATU (978.97 mg, 2.57 mmol) 및 DIPEA (665.52 mg, 5.15 mmol, 896.93 μ L)를 첨가 하고 생성된 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (63%)가 검출되었다. 혼합물에 물(100 mL)을 붓고 EtOAc (50 mL x 3)로 추출 하였다. 합친 유기상을 염수 (100 mL)로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조 및 여과하여 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~90% EtOAc/석유 에터 gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 tert-부틸 (1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (0.3 g, 589.15 μ mol, 34.32% 수율)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 474.3$

[0155] 단계 6. 3-(4-(4-(4-아미노피페리딘-1-일)-4-옥소부톡시)페닐)피페리딘-2,6-디온 (8)의 합성

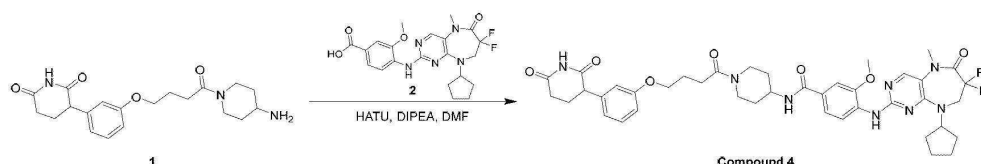
[0156] 디옥산 (5 mL) 내 tert-부틸(1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (300.00 mg, 633.50 μ mol) 용액에 HCl/디옥산 (4M, 5 mL)를 첨가하고 생성된 혼합물을 25° C에서 0.5시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소모됨을 확인하였고 원하는 질량이 검출되었다. 반응물을 여과 후 여과물을 농축하여 황색 오일의 3-(4-(4-(4-아미노피페리딘-1-일)-4-옥소부톡시)페닐)피페리딘-2,6-디온 (0.3 g, crude, HCl 염)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 374.2$

[0157] 단계 7. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)-2-플루오로-5-메톡시벤즈아미드 (화합물3)의 합성

[0158] DMF (5 mL) 내 3-(4-(4-(4-아미노피페리딘-1-일)-4-옥소부톡시)페닐)피페리딘-2,6-디온 (150.00 mg, 365.94 μ mol, HCl 염) 및 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-2-플루오로-5-메톡시벤조산 (170.32 mg, 365.94 μ mol) 용액에 HATU (208.71 mg, 548.91 μ mol) 및 DIPEA (141.88 mg, 1.10 mmol, 191.22 μ L)를 첨가하고 생성된 혼합물을 25° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (73%)가 검출되었다. 혼합물에 물 (20 mL)을 붓고 EtOAc (20 mL x 3)로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (50 mL)로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조 및 여과하여 농축했다. 생성된 혼합물을 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge C18 150 * 50 mm * 10 μ m; 이동상: [물 (NH_4HCO_3) - ACN]; B%: 35% - 65%, 11 분)로 정제 후 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)-2-플루오로-5-메톡시벤즈아미드 (69 mg, 82.38 μ mol, 22.51% 수율, 98% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 821.4$

[0159] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.79 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.25 (d, J = 13.4 Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.96 (dd, J = 3.1, 7.6 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.89 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.90 - 4.75 (m, 1H), 4.32 (br d, J = 12.9 Hz, 1H), 4.15 - 4.01 (m, 3H), 4.07 - 3.96 (m, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.89 - 3.81 (m, 1H), 3.78 - 3.76 (m, 1H), 3.33 (br s, 3H), 3.13 (br t, J = 11.7 Hz, 1H), 2.77 - 2.60 (m, 2H), 2.52 - 2.46 (m, 2H), 2.47 - 2.43 (m, 1H), 2.22 - 2.09 (m, 1H), 2.01 - 1.92 (m, 4H), 1.85 - 1.80 (m, 2H), 1.75 - 1.71 (m, 2H), 1.64 - 1.60 (m, 4H), 1.52 - 1.30 (m, 2H).

[0160] 실시예 4. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시 벤즈아미드 (화합물 4)의 합성



[0161]

[0162]

DMF (6 mL) 내 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (800 mg, 1.79 mmol) 용액에 HATU (747.82 mg, 1.97 mmol) 및 DIPEA (462.17 mg, 3.58 mmol, 622.86 μ L)를 첨가하고, 혼합물을 20 $^{\circ}$ C 에서 10분간 교반 하고, DMF (6 mL) 내 3-(3-(4-(4-아미노피페리딘-1-일)-4-옥소부톡시)페닐)피페리딘-2,6-디온 (952.77 mg, 2.32 mmol, HCl) 용액 및 DIPEA (462.17 mg, 3.58 mmol, 622.86 μ L)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20 $^{\circ}$ C 에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 모든 출발물질이 완전히 소모됨과 원하는 질량의 피크 (74 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 H₂O (60 mL)로 희석하고 EtOAc (60 mL x 5)로 추출하였다. 유기상을 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 농축하였다. 잔여물을 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex luna C18 150*40 mm* 15 μ m; 이동상:[물 (FA)-ACN]; B%: 38%-68%, 10 분)로 여과 하고 용출물을 동결 건조하여 표제 화합물 2 배치를 얻었고, 배치 1: 백색 고체로 (438.5 mg, 543.98 μ mol, 30.42% 수율, 97.7% 순도), 배치 2: (302 mg, 92% 순도), 배치 2는prep-HPLC (컬럼: Unisil 3-100 C18 Ultra 150*50 mm*3 μ m; 이동상:[물 (FA)-ACN]; B%: 35%-65%, 10 분)로 재정제하고 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (184.3 mg, 229.09 μ mol, 12.81% 수율, 99.8% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=803.1

[0163]

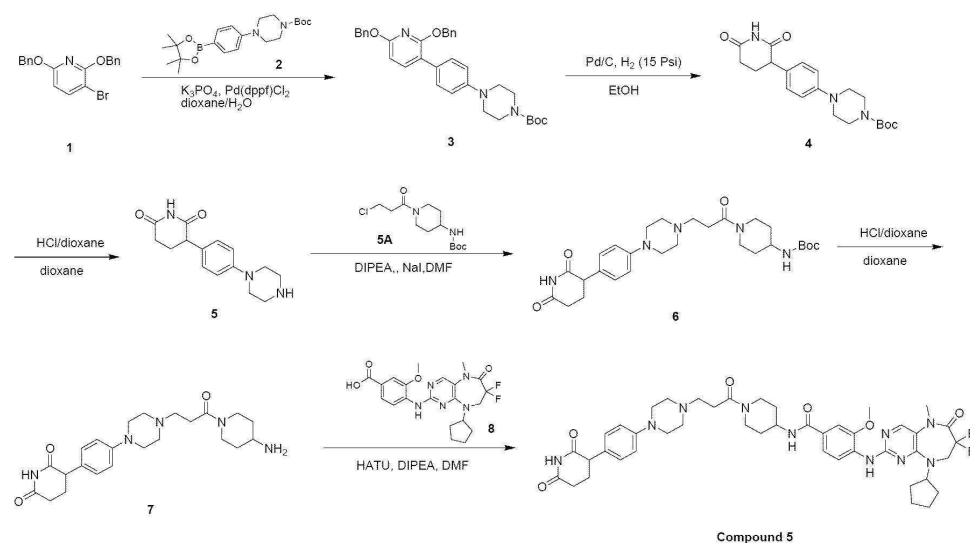
배치 1(438.5 mg): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.82 (s, 1H), 8.30-8.23 (m, 2H), 8.14 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.01 (s, 1H), 7.51-7.44 (m, 2H), 7.23 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.84 (dd, *J* = 2.1, 7.9 Hz, 1H), 6.81-6.75 (m, 2H), 4.77 (quin, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.41 (br d, *J* = 13.1 Hz, 1H), 4.13-3.86 (m, 10H), 3.81 (dd, *J* = 4.9, 11.4 Hz, 1H), 3.32 (s, 3H), 3.12 (br t, *J* = 12.1 Hz, 1H), 2.72-2.60 (m, 2H), 2.53-2.51 (m, 1H), 2.45 (br t, *J* = 4.3 Hz, 1H), 2.27-2.14 (m, 1H), 2.06-1.99 (m, 1H), 1.99-1.90 (m, 4H), 1.89-1.78 (m, 2H), 1.76-1.66 (m, 2H), 1.66-1.55 (m, 4H), 1.52-1.33 (m, 2H).

[0164]

배치 2(184 mg): ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.82 (s, 1H), 8.30-8.24 (m, 2H), 8.14 (br d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.50-7.46 (m, 2H), 7.23 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.84 (dd, *J* = 2.1, 8.0 Hz, 1H), 6.81-6.75 (m, 2H), 4.82-4.70 (m, 1H), 4.40 (br d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 4.14-3.85 (m, 10H), 3.81 (dd, *J* = 4.9, 11.4 Hz, 1H), 3.32 (br s, 3H), 3.17-3.07 (m, 1H), 2.69-2.60 (m, 2H), 2.48-2.40 (m, 2H), 2.21 (dq, *J* = 4.3, 12.1 Hz, 1H), 2.06-1.99 (m, 1H), 1.99-1.90 (m, 4H), 1.89-1.78 (m, 2H), 1.75-1.66 (m, 2H), 1.65-1.54 (m, 4H), 1.52-1.33 (m, 2H).

[0165]

실시예 5. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 5)의 합성



[0166]

[0167]

단계 1. tert-부틸 4-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페닐)피페라진-1-카복실레이트 (3)의 합성

[0168] 디옥산 (12 mL) 및 H₂O (2 mL) 내 2,6-비스(벤질옥시)-3-브로모피리딘 (500 mg, 1.35 mmol), tert-부틸 4-(4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일))페닐)피페라진-1-카복실레이트 (524.40 mg, 1.35 mmol) 및 K₃PO₄ (859.98 mg, 4.05 mmol) 혼합물에 25° C에서 Pd(dppf)Cl₂ (98.82 mg, 135.05 μmol)를 첨가했다. 생성된 혼합물을 N₂하 3차례 퍼지 및 탈기 후 100° C로 가열하고 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 메인 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 EtOAc (40 mL)로 희석하고Na₂SO₄로 건조 및 여과했다. 여과물을 농축하여 조 생산물을 얻었고 이를 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (4 g 실리카 겔 컬럼, EtOAc/석유 에터=0-5%, 40 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 tert-부틸 4-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페닐)피페라진-1-카복실레이트 (700 mg, 1.27 mmol, 93.96% 수율, 100% 순도)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 552.3

[0169] **단계 2. tert-부틸 4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-카복실레이트 (4)의 합성**

[0170] EtOH (20 mL) 내 tert-부틸 4-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페닐)피페라진-1-카복실레이트 (0.7 g, 1.27 mmol) 및 Pd/C (200 mg, 10% 순도) 혼합물을H₂로 세 번 퍼지 및 탈기하고 H₂ (15 Psi) 하 25° C에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 메인 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 여과 후 EtOH (20 mL)로 세척했다. 여과물을 농축하여 백색 고체의 tert-부틸 4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-카복실레이트 (250 mg, 669.44 μmol, 52.76% 수율)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 374.5

[0171] **단계 3. 3-(4-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (5)의 합성**

[0172] 디옥산 (5 mL) 내 tert-부틸 4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-카복실레이트 (250 mg, 669.44 μmol) 및 HCl/디옥산 (4 M, 5 mL) 용액을 25° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량이 검출되었다. 반응 혼합물을 농축하여 백색 고체의 3-(4-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (200 mg, 645.60 μmol, 96.44% 수율, HCl)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 274.1

[0173] **단계 4. tert-부틸 (1-(3-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (6)의 합성**

[0174] DMF (6 mL) 내 3-(4-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (200 mg, 645.60 μmol, HCl) 및 tert-부틸 N-[1-(3-클로로프로파노일)-4-피페리딘]카바메이트 (244.05 mg, 839.28 μmol) 용액에 25° C에서 DIPEA (250.32 mg, 1.94 mmol, 337.35 uL) 및 NaI (9.68 mg, 64.56 μmol)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 80° C에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량이 검출되었다. 반응 혼합물에 염수 (50 mL)를 부었다. 혼합물을 EtOAc (20 mL x 3)로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (10 mL x 2)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조하고 농축하여 조 생산물을 얻었다. 조 생산물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (4 g 실리카 겔 컬럼, EtOAc/석유 에터=10-100% 이후 EtOAc/MeOH=10/1, 40 mL/분)로 정제하여 황색 고체의 tert-부틸 (1-(3-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (130 mg, 246.37 μmol, 38.16% 수율)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 528.4

[0175] **단계 5. 3-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (7)의 합성**

[0176] 디옥산 (1 mL) 내 tert-부틸 (1-(3-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (120 mg, 227.42 mmol) 및 HCl/디옥산 (4 M, 3 mL) 용액을 25° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량이 검출되었다. 반응 혼합물을 농축하여 황색 고체의 3-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (100 mg, crude, HCl)을 수득하였다. 조 생산물을 다음 반응에 바로 사용하였다. MS(M+H)⁺ = 428.1

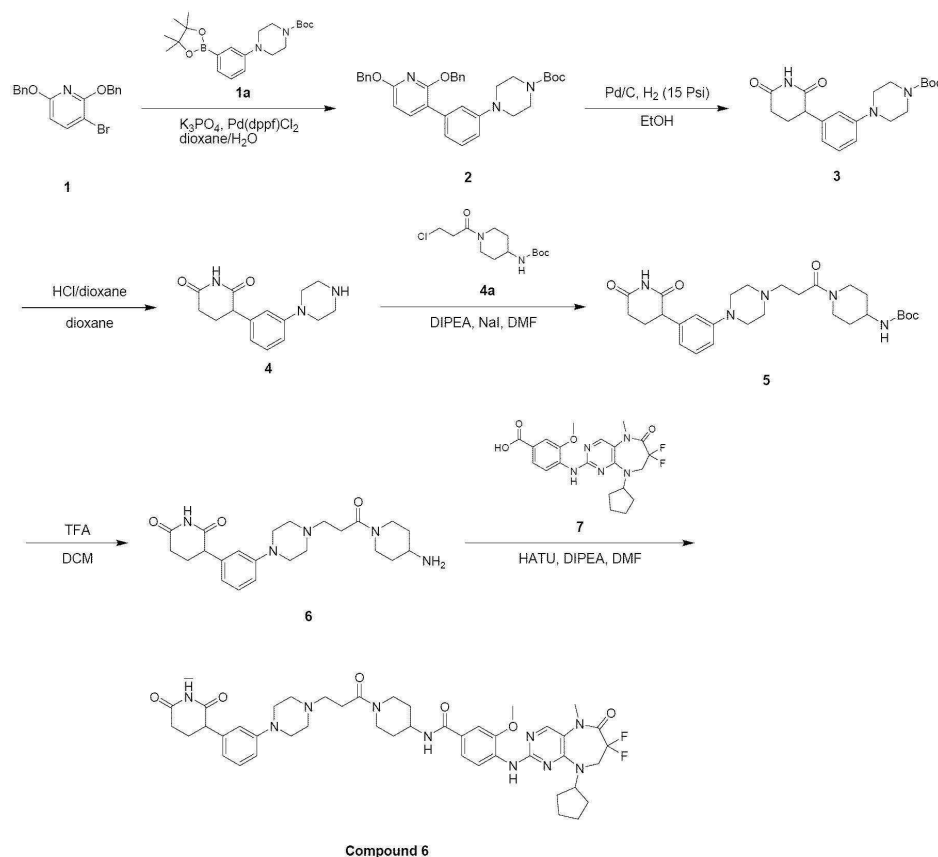
[0177] **단계 6. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 5)의 합성**

[0178] DMF (3 mL) 내 3-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (100 mg, 215.52 μmol, HCl), 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (96.43 mg, 215.52 μmol) 및 DIPEA (111.42 mg, 862.07 μmol, 150.16 uL) 용액에 25° C에서 HATU (106.53 mg, 280.17 μmol)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 25° C에

서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량이 검출되었다. 반응 혼합물을 염수 (30 mL)에 붓고 EtOAc (10 mL x 4)로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (10 mL x 2)로 세척 후 Na₂SO₄ 로 건조하고 농축하여 조 생성물을 수득했다. 조 생성물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (4 g 실리카 겔 컬럼, EtOAc/석유 에터=20-100% 이후 MeOH/EtOAc=10-30%, 40 mL/분)로 정제하여 생성물을 얻었다(70 mg). 조 생성물을 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150*25mm* 5um; 이동상:[H₂O (NH₄HCO₃)-ACN];B%: 38%-68%,10분)로 추가 정제 후 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (13.8 mg, 15.59 μ mol, 7.23% 수율, 96.8% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 857.0

[0179] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.77 (s, 1H), 8.28 - 8.26 (m, 2H), 8.16 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.49 - 7.47 (m, 2H), 7.04 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.89 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 4.78 - 4.74 (m, 1H), 4.40 - 4.37 (m, 1H), 4.07 - 3.96 (m, 4H), 3.93 (s, 3H), 3.73 - 3.70 (m, 1H), 3.32 (s, 3H), 3.15 - 3.10 (m, 5H), 2.70 - 2.62 (m, 3H), 2.60 - 2.54 (m, 7H), 2.44 - 2.42 (m, 1H), 2.13 - 2.10 (m, 1H), 2.01 - 1.79 (m, 5H), 1.74 - 1.68 (m, 2H), 1.64 - 1.52 (m, 4H), 1.50 - 1.37 (m, 2H).

[0180] 실시예 6. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 6)의 합성



[0181]

[0182] 단계 1. tert-부틸 4-(3-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페닐)피페라진-1-카복실레이트 (2)의 합성

[0183] 디옥산 (10 mL) 및 H₂O (2 mL) 내 2,6-비스(벤질옥시)-3-브로모피리딘 (0.5 g, 1.35 mmol), tert-부틸 4-(3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페닐)피페라진-1-카복실레이트 (524.40 mg, 1.35 mmol) 및 K₃PO₄ (859.98 mg, 4.05 mmol) 혼합물에 25° C에서 Pd(dppf)Cl₂ (98.82 mg, 135.05 μ mol)를 첨가했다. 생성된 혼합물을 N₂ 하 3차례 퍼지 및 탈기 후 100° C로 가열하고 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 2,6-비스(벤질옥시)-3-브로모피리딘이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 메인 피크가 검출되었다. 혼

합물을 EtOAc (30 mL)로 희석하고 Na_2SO_4 로 건조하고 농축하여 잔여물을 얻었다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (10 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~50% EtOAc/석유 에터 gradient @ 50 mL/분)로 정제하여 황색 고체의 tert-부틸 4-(3-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페닐)피페라진-1-카복실레이트 (0.7 g, 1.17 mmol, 86.44% 수율, 92% 순도)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 552.1$

[0184] 단계 2. tert-부틸 4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-카복실레이트 (3)의 합성

[0185] EtOH (20 mL) 내 tert-부틸 4-(3-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)페닐)피페라진-1-카복실레이트 (0.7 g, 1.27 mmol) 용액에 Pd/C (0.5 g, 1.27 mmol, 10% 순도)를 첨가하였다. 혼합물을 H_2 (15 Psi) 하 30°C 에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 메인 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 셀라이트 패드로 여과 후 잔여물을 진공 농축하여 황색 오일의 tert-부틸 4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-카복실레이트 (0.5 g, crude)를 수득하였고 다음 반응에 바로 사용하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 374.2$

[0186] 단계 3. 3-(3-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (4)의 합성

[0187] 디옥산 (2 mL) 내 tert-부틸 4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-카복실레이트 (0.5 g, 1.34 mmol) 용액에 25°C 에서 HCl/디옥산 (4 M, 10 mL)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 25°C 에서 0.5시간 동안 교반 하였다. TLC(석유 에터 : EtOAc=1:1; Rf=0)로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 새로운 스팟을 발견하였다. 혼합물 용액을 감압 농축하여 황색 고체의 3-(3-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (0.5 g, crude, HCl)을 수득하였고 다음 반응에 바로 사용하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 274.1$

[0188] 단계 4. tert-부틸 (1-(3-(4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (5)의 합성

[0189] DMF (5 mL) 내 tert-부틸(1-(3-클로로프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (844.79 mg, 2.91 mmol) 및 3-(3-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (450 mg, 1.45 mmol, HCl) 용액에 25°C 에서 NaI (21.77 mg, 145.26 μmol), DIEA (563.20 mg, 4.36 mmol, 759.03 μL)를 첨가하고 혼합물을 80°C 에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 3-(3-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (27 %)가 검출되었다. 혼합물 용액을 감압 농축 후 조 생성물을 얻었다. 조 생성물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (5 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~100% EtOAc/석유 에터 gradient @ 60 mL/분; Eluent of 0~50% MeOH / EtOAc @ 60 mL/분)로 정제하여 갈색 오일의 tert-부틸 (1-(3-(4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (0.8 g, crude)를 수득하였고, 다음 반응에 바로 사용하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 528.3$

[0190] 단계 5. 3-(3-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (6)의 합성

[0191] DCM (10 mL) 내 tert-부틸 (1-(3-(4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (0.8 g, 1.52 mmol) 용액에 25°C 에서 TFA (3.08 g, 27.01 mmol, 2 mL)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 25°C 에서 30분 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (41 %)가 검출되었다. 혼합물 용액을 감압 농축하여 갈색 오일의 3-(3-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (0.8 g, crude, TFA)을 수득하였고 다음 반응에 바로 사용하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 428.2$

[0192] 단계 6. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 6)의 합성

[0193] DMF (3 mL) 내 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (90 mg, 201.15 μmol) 용액에 HATU (91.78 mg, 241.38 μmol) 및 DIPEA (155.98 mg, 1.21 mmol, 210.21 μL)를 첨가하였다. 혼합물을 25°C 에서 10분 동안 교반 하였다. 혼합물에 3-(3-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (217.87 mg, 402.30 μmol , TFA)를 첨가하였다. 혼합물을 25°C 에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 3-(3-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질

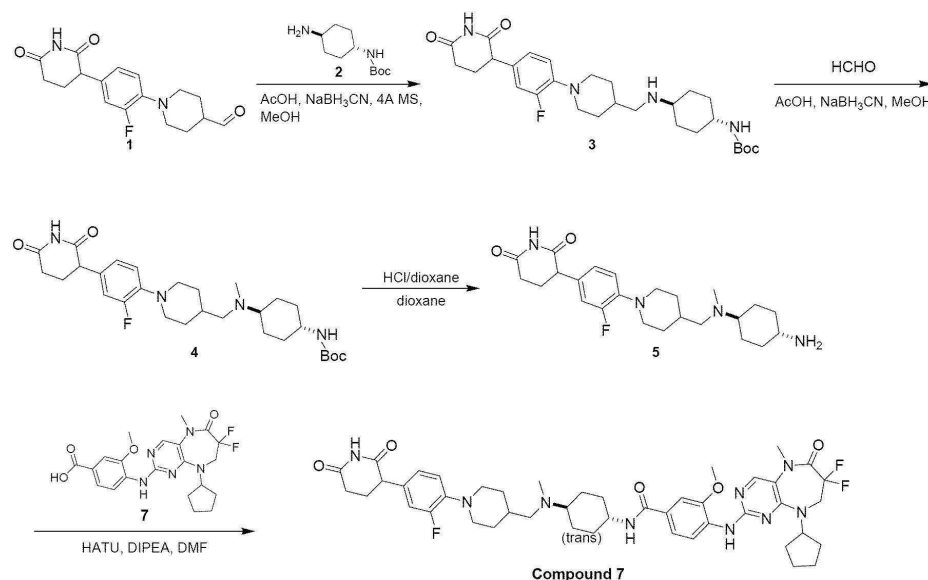
량의 피크 (62 %)가 검출되었다. 혼합물을 감압 농축하여 잔여물을 얻었다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (5 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~100% EtOAc/석유 에터 gradient @ 60 mL/분; Eluent of 0~50% MeOH / EtOAc @ 60 mL/분)로 정제하여 조 생성물을 얻었다. 조 생성물을 prep-TLC (DCM : MeOH = 10:1; Rf = 0.4) 및 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150x25 mmx 5um; 이동상: [H₂O (NH₄HCO₃) -ACN]; B%: 36%-66%, 8 분)로 정제 후 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (26.5 mg, 30.30 μ mol, 15.07% 수율, 98% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 857.3

[0194]

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.79 (s, 1H), 8.31 - 8.23 (m, 2H), 8.15 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.53 - 7.43 (m, 2H), 7.15 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.87 - 6.74 (m, 2H), 6.61 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.76 (q, J = 8.3 Hz, 1H), 4.39 (d, J = 13.1 Hz, 1H), 4.12 - 3.94 (m, 4H), 3.93 (s, 3H), 3.75 (dd, J = 4.9, 11.2 Hz, 1H), 3.30 (s, 3H), 3.19 - 3.05 (m, 5H), 2.75 - 2.53 (m, 10H), 2.46 - 2.39 (m, 1H), 2.25 - 2.12 (m, 1H), 2.06 - 1.78 (m, 5H), 1.73 - 1.34 (m, 8H).

[0195]

실시예 7. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)(메틸)아미노)시클로헥실)-3-메톡시벤즈아미드 (트랜스) (화합물 7)의 합성



[0196]

[0197]

단계 1. tert-부틸 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)아미노)시클로헥실)카바메이트 (트랜스) (3)의 합성

[0198]

MeOH (10 mL) 내 1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-카르보알데히드 (1 g, 3.14 mmol) 및 tert-부틸((1r,4r)-4-아미노시클로헥실)카바메이트 (트랜스) (673.19 mg, 3.14 mmol) 용액에 AcOH (188.64 mg, 3.14 mmol, 179.66 μ L) 및 4A MS (100 mg)를 첨가했다. 이후 20° C에서 NaBH₃CN (592.21 mg, 9.42 mmol)를 천천히 첨가 후 생성된 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (76%)가 검출되었다. 반응 혼합물을 여과 후 여과물을 농축하여 황색 오일의 tert-부틸 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)아미노)시클로헥실)카바메이트 (트랜스) (1.6 g, crude)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 517.3

[0199]

단계 2. tert-부틸 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)(메틸)아미노)시클로헥실)카바메이트 (트랜스) (4)의 합성

[0200]

MeOH (20 mL) 내 tert-부틸 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)아미노)시클로헥실)카바메이트 (트랜스) (1.6 g, 3.10 mmol) 및 HCHO (502.63 mg, 6.19 mmol, 461.13 μ L,

37% 순도) 용액에 AcOH (185.97 mg, 3.10 mmol, 177.12 μ L)를 첨가했다. 이후 20° C에서 NaBH₃CN (583.85 mg, 9.29 mmol)를 천천히 첨가 후 생성된 혼합물을 20° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (82 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 H₂O (60 mL)로 희석 후 EtOAc (60 mL x 3)으로 추출하였다. 유기상을 포화 NaHCO₃ (60 mL)으로 세척 후 Na₂SO₄ 로 건조, 여과 및 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~100 % EtOAc/석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 백색 고체의 tert-부틸 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)(메틸)아미노)시클로헥실) 카바메이트 (트랜스) (0.5 g, 942.20 μ mol, 30.42% 수율, 100% 순도)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 531.3

[0201] 단계 3. 3-(4-(4-(((1r,4r)-4-아미노시클로헥실)(메틸)아미노)메틸)피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (트랜스) (5)의 합성

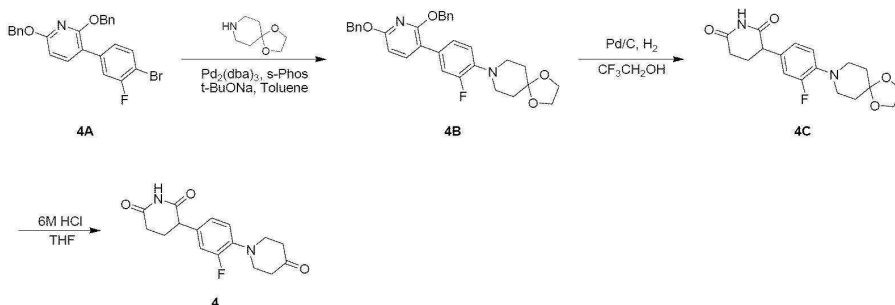
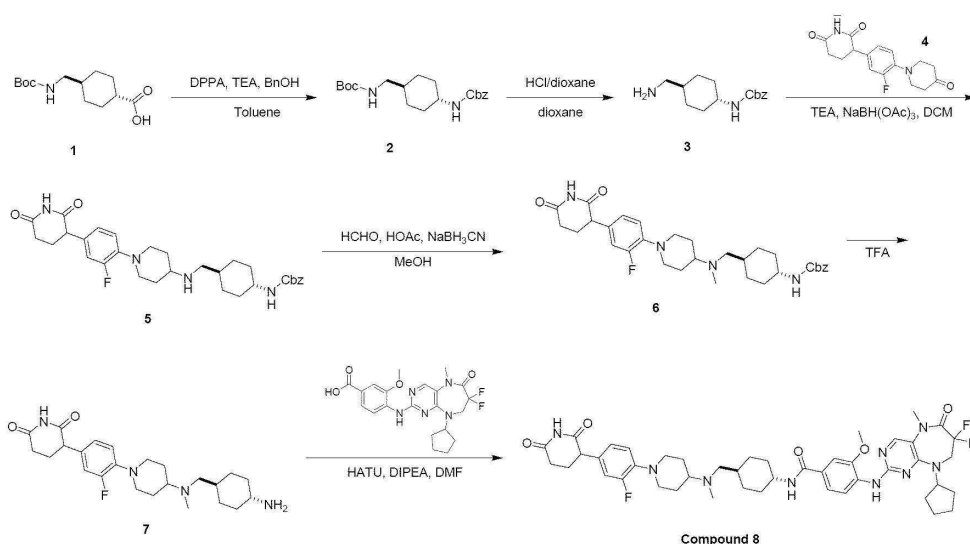
[0202] 디옥산 (5 mL) 내 tert-부틸 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)(메틸)아미노)시클로헥실)카바메이트 (트랜스) (0.5 g, 942.20 μ mol) 용액에 20° C에서 HCl/디옥산 (4 M, 10 mL)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (91%)가 검출되었다. 반응 혼합물을 진공 농축하여 백색 고체의 3-(4-(4-(((1r,4r)-4-아미노시클로헥실)(메틸)아미노)메틸)피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (트랜스) (451 mg, crude, HCl)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 431.3

[0203] 단계 4. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)(메틸)아미노)시클로헥실)-3-메톡시벤즈아미드 (트랜스) (화합물 7)의 합성

[0204] DMF (2 mL) 내 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (90 mg, 201.15 μ mol) 용액에 HATU (84.13 mg, 221.26 μ mol) 및 DIPEA (51.99 mg, 402.29 μ mol, 70.07 μ L)를 첨가하였다. 혼합물을 20° C에서 10분 동안 교반 하고, DMF (2 mL) 내 3-(4-(4-(((1r,4r)-4-아미노시클로헥실)(메틸)아미노)메틸)피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (트랜스) (103.33 mg, 221.26 μ mol, HCl) 용액 및 DIPEA (51.99 mg, 402.29 μ mol, 70.07 μ L)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (50%)가 검출되었다. 반응 혼합물을 H₂O (15 mL)로 희석 후 EtOAc (15 mL x 3)으로 추출하였다. 유기상을 Na₂SO₄ 로 건조, 여과 및 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (4 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~100% EtOAc/석유 에터 0~10% DCM/MeOH gradient @ 100 mL/분)로 정제 후 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150*25 mm* 5 μ m; 이동상: [물 (NH₄HCO₃) -ACN]; B%: 49%-79%, 8 분)로 재정제 및 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)(메틸)아미노)시클로헥실)-3-메톡시벤즈아미드 (트랜스) (31.3 mg, 35.30 μ mol, 17.55% 수율, 97% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 860.4

[0205] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.80 (s, 1H), 8.29 - 8.23 (m, 2H), 8.06 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.52 - 7.44 (m, 2H), 7.04 - 6.90 (m, 3H), 4.83 - 4.70 (m, 1H), 4.04 (t, *J* = 14.0 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.83 - 3.68 (m, 2H), 3.38 (s, 2H), 3.30 (s, 3H), 2.65 - 2.53 (m, 4H), 2.47 - 2.46 (m, 1H), 2.28 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 2.25 - 2.13 (m, 4H), 2.05 - 1.88 (m, 5H), 1.83 - 1.67 (m, 6H), 1.65 - 1.49 (m, 5H), 1.44 - 1.31 (m, 4H), 1.30 - 1.19 (m, 2H).

[0206] 실시예 8. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)아미노)메틸)시클로헥실)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 8)의 합성



단계 1. tert-부틸 (((1r,4r)-4-(((벤질옥시)카보닐)아미노)시클로헥실)메틸)카바메이트 (2)의 합성

톨루엔 (40 mL) 내 (1r,4r)-4-(((tert-부톡시카보닐)아미노)메틸)시클로헥산-1-카르복실산 (2 g, 7.77 mmol) 용액에 -10° C 드라이 아이스 배스(bath)에서 TEA (1.18 g, 11.66 mmol, 1.62 mL)를 첨가하고 그리고 나서 DPPA (2.14 g, 7.77 mmol, 1.68 mL)를 10분 동안 한 방울씩 첨가 하였다. 혼합물을 10° C로 승온 후 70° C로 천천히 가열하였다. 16시간 이후 혼합물을 47° C로 온도 하강 후 BnOH (2.52 g, 23.32 mmol, 2.42 mL)를 첨가했고 생성된 혼합물을 다시 16시간 동안 110° C로 가열하였다. LCMS로 (1r,4r)-4-(((tert-부톡시카보닐)아미노)메틸)시클로헥산-1-카르복실산이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량 (11%)이 검출되었다. 혼합물을 H₂O (80 mL)로 희석 후 pH=5~6까지 HCl 용액 (1 N)을 첨가하고 생성된 혼합물을 EtOAc (50 mL x 3)으로 추출하고, 합친 유기상을 NaHCO₃용액 (50 mL x 2)으로 세척 후 Na₂SO₄로 건조, 여과 및 진공 농축했다. 잔여물을 MTBE (7 mL) 및 석유 에터 (15 mL)로 5분 동안 분쇄 후 현탁액을 여과 및 여과 케이크를 MTBE (5 mL) 및 석유 에터 (20 mL)로 세척했다. 여과 케이크를 모아 진공 건조하여 밝은 갈색 고체의 tert-부틸 (((1r,4r)-4-(((벤질옥시)카보닐)아미노)시클로헥실)메틸)카바메이트 (1.94 g, 5.35 mmol, 68.86% 수율)를 수득하였다. MS(M-Boc+H)⁺ = 263.2

단계 2. 벤질((1r,4r)-4-(아미노메틸)사이클로헥실)카바메이트 (3)의 합성

디옥산 (6 mL) 내 tert-부틸 (((1r,4r)-4-(((벤질옥시)카보닐)아미노)시클로헥실)메틸)카바메이트 (300 mg, 827.67 μmol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 6 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 20° C에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 68%의 원하는 질량의 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 농축하여 밝은 황색 고체의 벤질((1r,4r)-4-(아미노메틸)사이클로헥실)카바메이트 (240 mg, crude, HCl)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 263.0

단계 3. 8-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸 (4B)의 합성

톨루엔 (30 mL) 내 2,6-비스(벤질옥시)-3-(4-브로모-3-플루오로페닐)피리딘 (1 g, 2.15 mmol), 1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸 (1 g, 6.98 mmol, 892.86 μL) Pd₂(dba)₃ (200.00 mg, 218.41 μmol), s-Phos (80.00 mg, 194.87 μmol) 및 t-BuONa (1 M, 6.00 mL) 혼합물을 N₂ 하 3차례 탈기 및 퍼지 후 N₂ 기체 하 100° C에서

16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (34%)가 검출되었다. 반응 혼합물을 여과 후 여과물을 H₂O (30 mL)로 희석하였고, 혼합물을 EtOAc (50 mL x 2)로 추출했고, 합친 유기상을 염수 (25 mL x 2)으로 세척 후 Na₂SO₄ 로 건조, 여과 및 감압 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage; 20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 2 ~ 20 % EtOAc : 석유 에터 gradient, 60 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 8-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸 (320 mg, 607.68 μ mol, 28.22% 수율)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 527.1

[0215] **단계 4. 3-(3-플루오로-4-(1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸-8-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (4C)의 합성**

[0216] CF₃CH₂OH (10 mL) 내 8-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸 (320 mg, 607.68 μ mol) 용액에 N₂ 기체 하 Pd/C (100 mg, 10% 순도)를 첨가 후 혼합물을 H₂ 기체 (15 Psi) 하 20° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (48 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 여과 하고 여과물을 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카겔 크로마토그래피 (Biotage; 10 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 20 ~ 100% EtOAc: 석유 에터 gradient, 60 mL/분)로 정제하여 밝은 황색 고체의 3-(3-플루오로-4-(1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸-8-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (130 mg, 373.17 μ mol, 61.41% 수율)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 349.0

[0217] **단계 5. 3-(3-플루오로-4-(4-옥소피페리딘-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (4)의 합성**

[0218] THF (3 mL) 내 3-(3-플루오로-4-(1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸-8-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (150 mg, 430.58 μ mol) 용액에 HCl (6 M, 3.00 mL)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 20° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 51%의 원하는 질량의 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 EtOAc (15 mL)로 희석 후 0° C에서 pH=8~9 까지 혼합물에 포화 NaHCO₃용액을 첨가하였고, 생성된 혼합물을 EtOAc (20 mL x 3)로 추출하고 나서, 합친 유기상을 염수 (25 mL x 2)로 세척했고 Na₂SO₄로 건조, 여과했고, 여과물을 감압 농축하여 백색 고체의 3-(3-플루오로-4-(4-옥소피페리딘-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (130 mg, crude)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 305.0

[0219] **단계 6. 벤질 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아미노)메틸)시클로헥실)카바메이트 (5)의 합성**

[0220] DCM (10 mL) 내 3-(3-플루오로-4-(4-옥소피페리딘-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (130 mg, 427.19 μ mol) 용액에 벤질((1r,4r)-4-(아미노메틸)시클로헥실)카바메이트 (130.00 mg, 435.06 μ mol, HCl) 및 TEA (436.20 mg, 4.31 mmol, 600 μ L)을 첨가하였다. 혼합물을 25° C에서 1시간 동안 교반 하였다. 이후 혼합물에 25° C에서 NaBH(OAc)₃ (350 mg, 1.65 mmol)를 첨가 후 생성된 혼합물을 25° C에서 15시간 동안 교반 하였다. LCMS로 3-(3-플루오로-4-(4-옥소피페리딘-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (70 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 여과 후 여과물을 0° C에서 H₂O (2 mL)로 희석 후 0° C에서 pH=8~9까지 포화 NaHCO₃ 용액을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 EtOAc (15 mL x 3)으로 추출하고, 합친 유기상을 염수 (10 mL x 2)으로 세척 후 Na₂SO₄ 로 건조, 여과하고, 여과물을 감압 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피

[0221] (Biotage; 4 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 2 ~ 20 % MeOH: DCM ether gradient, 50 mL/분)로 정제하여 밝은 황색 고체의 벤질 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아미노)메틸)시클로헥실)카바메이트 (80 mg, 145.28 μ mol, 34.01% 수율)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 551.1

[0222] **단계 7. 벤질 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)(메틸)아미노)메틸)시클로헥실)카바메이트 (6)의 합성**

[0223] MeOH (10 mL) 내 벤질 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아미노)메틸)시클로헥실)카바메이트 (100 mg, 181.60 μ mol) 용액에 HOAc (10.91 mg, 181.60 μ mol, 10.39 μ L) 및 HCHO (136.32 mg, 1.82 mmol, 125.06 μ L, 40% 순도)를 첨가하였다. 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. 이후 혼합물에 0° C에서 NaBH₃CN (100.00 mg, 1.59 mmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 15시간 동안

안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 하나의 메인 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 H₂O (10 mL)로 희석 후 농축하여 MeOH를 제거했고, 혼합물을 EtOAc (30 mL)로 희석 후 혼합물에 0° C에서 pH=8~9까지 포화 NaHCO₃ 용액을 첨가하였고 생성된 혼합물을 EtOAc (30 mL x 2)로 추출하고, 합친 유기상을 염수 (30 mL x 2)으로 세척 후 Na₂SO₄ 로 건조, 여과 및 감압 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage; 10 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0 ~ 20 % MeOH : DCM gradient, 60 mL/분)로 정제하여 밝은 황색 고체의 벤질 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)(메틸)아미노)메틸)시클로헥실)카바메이트 (102 mg, 180.63 μ mol, 99.47% 수율)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 565.1

[0224] 단계 8. 3-(4-(4-(((1r,4r)-4-아미노시클로헥실)메틸)(메틸)아미노)피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (7)의 합성

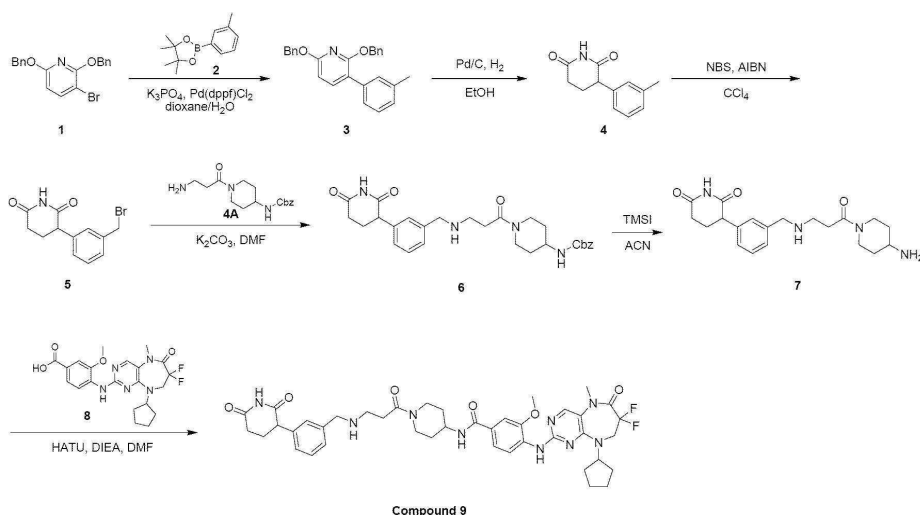
[0225] TFA (2.46 g, 21.61 mmol, 1.60 mL) 내 벤질 ((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)(메틸)아미노)메틸)시클로헥실)카바메이트 (80 mg, 141.67 μ mol) 용액을 N₂ 기체 하 40° C에서 2시간 30분 동안 교반 하였다. LCMS로 43% 피크의 원하는 질량이 검출되었다. 반응 혼합물을 감압 농축하여 밝은 황색 오일의 3-(4-(4-(((1r,4r)-4-아미노시클로헥실)메틸)(메틸)아미노)피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (77 mg, crude, TFA)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 431.1

[0226] 단계 9. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)(메틸)아미노)메틸)시클로헥실)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 8)의 합성

[0227] DMF (3 mL) 내 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (80 mg, 178.80 μ mol) 용액에 20° C에서 HATU (120.00 mg, 315.60 μ mol), DIPEA (178.08 mg, 1.38 mmol, 240.00 μ L) 및 3-(4-(4-(((1r,4r)-4-아미노시클로헥실)메틸)(메틸)아미노)피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (80.00 mg, crude, TFA)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 N₂ 기체 하 20° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (61%)가 검출되었다. 반응 혼합물을 H₂O (8 mL)로 희석 후 혼합물을 EtOAc (25 mL x 2)으로 추출하고, 합친 유기상을 염수 (20 mL x 3)으로 세척 후 Na₂SO₄ 로 건조, 여과하고, 여과물을 감압 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage; 10 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0 ~ 25 % 메탄올 : 디클로로메탄 gradient, 60 mL/분)로 정제 후 prep-HPLC (컬럼: 3_Phenomenex Luna C18 75 x 30 mm x 3 μ m; 이동상: [물 (TFA) -ACN]; B%: 28% - 48%, 10 분, 7 분; 컬럼 Temp: 30° C)로 재정제 및 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-((1r,4r)-4-(((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)(메틸)아미노)메틸)시클로헥실)-3-메톡시벤즈아미드 (62.3 mg, 54.97 μ mol, 30.74% 수율, 96% 순도, 2TFA)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 860.2

[0228] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.83 (s, 1H), 8.97 - 8.75 (m, 1H), 8.28 - 8.22 (m, 2H), 8.17 - 8.13 (m, 1H), 7.54 - 7.44 (m, 2H), 7.12 - 6.94 (m, 3H), 4.83 - 4.73 (m, 1H), 4.11 - 4.05 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.53 - 3.37 (m, 4H), 3.33 (s, 3H), 3.20 - 3.12 (m, 1H), 2.94 - 2.87 (m, 1H), 2.86 - 2.79 (m, 3H), 2.78 - 2.68 (m, 2H), 2.44 - 2.38 (m, 1H), 2.25 - 2.08 (m, 3H), 2.07 - 1.79 (m, 11H), 1.77 - 1.68 (m, 3H), 1.66 - 1.54 (m, 4H), 1.47 - 1.35 (m, 2H), 1.24 - 1.10 (m, 2H).

[0229] 실시예 9. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-((3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)벤질)아미노)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 9)의 합성



[0230]

[0231]

[0232]

단계 1. 2,6-비스(벤질옥시)-3-(*m*-톨릴)피리딘 (3)의 합성

디옥산 (100 mL) 및 H₂O (20 mL) 내 2,6-비스(벤질옥시)-3-브로모피리딘(5 g, 13.50 mmol) 및 4,4,5,5-테트라 메틸-2-(*m*-톨릴)-1,3,2-디옥사보로란 (3.09 g, 14.18 mmol) 용액에 K₃PO₄ (8.60 g, 40.51 mmol) 및 Pd(dppf)Cl₂ (494 mg, 675.14 μmol)을 첨가하고 100 ° C에서 N₂ 기체 하 14시간 동안 교반 하였다. TLC (석유 에터: EtOAc=20:1)로 새로운 스팟 형성을 확인하였다. 혼합물을 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하였다. 여과케이크를 EtOAc (100 mL)로 세척하였다. 여과물을 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (40 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0% EtOAc/석유 에터 gradient @ 60 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 2,6-비스(벤질옥시)-3-(*m*-톨릴)피리딘 (5.3 g, 13.48 mmol, 99.79% 수율, 97% 순도)을 수득하였다. MS(M+H)⁺=382.1

[0233]

[0234]

단계 2. 3-(*m*-톨릴)피페리딘-2,6-디온 (4)의 합성

EtOH (70 mL) 내 2,6-비스(벤질옥시)-3-(*m*-톨릴)피리딘 (5.3 g, 13.89 mmol) 용액에 N₂ 기체 하에서 Pd/C (0.7 g, 10% 순도)를 첨가하고, 현탁액을 탈기하고 H₂로 3차례 퍼징하고, 생성된 혼합물을 25 ° C H₂ (15 Psi) 하에 서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (60 %)를 확인하였다. 혼합물을 THF (50 mL)로 희석하 고, 여과하고 여과케이크를 THF (60 mL) 및 MeOH (80 mL)로 세척했다. 여과물을 감압 농축하여 백색 고체의 3-(*m*-톨릴)피페리딘-2,6-디온 (2.7 g, 12.62 mmol, 90.86% 수율, 95% 순도)을 수득하였다. MS(M+H)⁺=204.0

[0235]

[0236]

단계 3. 3-(3-(브로모메틸)페닐)피페리딘-2,6-디온 (5)의 합성

CCl₄ (8 mL) 내 3-(*m*-톨릴)피페리딘-2,6-디온 (0.5 g, 2.46 mmol) 및 NBS (482 mg, 2.71 mmol) 용액에 AIBN (40.40 mg, 246.02 μmol)을 첨가하고 혼합물을 80 ° C 에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량이 검출된 것을 확인하였다. 혼합물을 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (5 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 30~50% EtOAc/석유 에터 gradient @ 50 mL/분)로 황색 고체의 3-(3-(브로모메틸)페닐)피페리딘-2,6-디온 (650 mg, 2.30 mmol, 93.65% 수율)을 수득하였다. MS(M+H)⁺=281.8

[0237]

[0238]

단계 4. tert-부틸 (3-(4-(((벤질옥시)카보닐)아미노)피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)카바메이트 (3A)의 합성

DCM (30 mL) 내 3-((tert-부톡시카보닐)아미노)프로판산 (2 g, 10.57 mmol), 벤질 피페리딘-4-일카바메이트 (2.48 g, 10.57 mmol), HBTU (4.81 g, 12.68 mmol), 및 DIPEA (4.10 g, 31.71 mmol, 5.52 mL) 혼합물을 탈기 하고 N₂로 3차례 퍼징한 후, 혼합물을 25 ° C N₂ 기체 하에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (70%)를 확인하였다. 반응 혼합물을 물 (200 mL)로 희석하고 EtOAc (200 mL)로 추출하였다. 합쳐진 유기상 을 염수 (100 mL x 2)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (40 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 20~60%Ethylacetate/석유 에터 gradient @ 60 mL/분)로 정제하여 백색 고체의 tert-부틸 (3-(4-(((벤질옥시)카보닐)아미노)피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)카바

메이트 (4.5 g, crude)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 406.3$

[0239] 단계 5. 벤질 (1-(3-(4-((3-벤질옥시)카보닐)아미노)피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)카바메이트 (4A)의 합성

[0240] DCM (40 mL) 내 tert-부틸 (3-(4-((3-벤질옥시)카보닐)아미노)피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)카바메이트 (4.5 g, 11.10 mmol) 용액에 TFA (7.59 g, 66.59 mmol, 4.93 mL)를 첨가하고 혼합물을 25 ° C 에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량이 검출된 것을 확인하였다. 혼합물을 감압 농축하여 황색 오일의 벤질 (1-(3-(4-((3-벤질옥시)카보닐)아미노)피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)카바메이트 (10 g, crude, TFA)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 306.2$

[0241] 단계 6. 벤질 (1-(3-((3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)벤질)아미노)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (6)의 합성

[0242] DMF (8 mL) 내 벤질 (1-(3-(4-((3-벤질옥시)카보닐)아미노)피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)카바메이트 (1.78 g, 4.25 mmol, TFA 염) 용액에 K_2CO_3 (1.37 g, 9.93 mmol) 및 3-(3-(브로모메틸)페닐)피페리딘-2,6-디온 (0.4 g, 1.42 mmol)을 첨가하고 혼합물을 80 ° C 에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (31 %)를 확인하였다. 혼합물을 H_2O (10 mL)로 희석하고 EtOAc (10 mL x 3)로 추출하고, 합쳐진 유기상을 염수 (10 mL x 3)로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하였다. 여과물을 감압 농축하였다. 조 생성물(crude)을 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex luna C18 150 x 40 mm x 15 μm ; 이동상: [water (FA) - ACN]; B%: 12% - 42%, 10 분)로 정제하고 용출물을 동결 건조하여 2 배치의 벤질 (1-(3-((3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)벤질)아미노)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트를 수득하였다. 배치 1: 황색 고체로 39 mg, 70.57 μmol , 4.98% 수율, 100% 순도, FA 염 및 배치 2: 황색 고체로 45 mg, crude, FA 염. $MS(M+H)^+ = 507.1$

[0243] 단계 7. 3-(3-((3-(4-((3-벤질옥시)카보닐)아미노)피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)아미노)메틸)페닐) 피페리딘-2,6-디온 (7)의 합성

[0244] ACN (0.4 mL) 내 벤질 (1-(3-((3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)벤질)아미노)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (39 mg, 76.99 μmol) 용액에 TMSI (58.80 mg, 293.87 μmol , 40 μL)를 첨가하고 혼합물을 20 ° C 에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소모되었음을 확인하였다. 혼합물을 H_2O (10 mL)로 킨칭하고 MTBE (10 mL x 3)로 세척하고, 합쳐진 유기상을 H_2O (10 mL)로 추출하였다. 합쳐진 수용상을 동결 건조하여 황색 고체의 3-(3-((3-(4-((3-벤질옥시)카보닐)아미노)피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)아미노)메틸)페닐) 피페리딘-2,6-디온 (50 mg, crude, 2HI 염)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 373.2$

[0245] 단계 8. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-((3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)벤질)아미노)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 9)의 합성

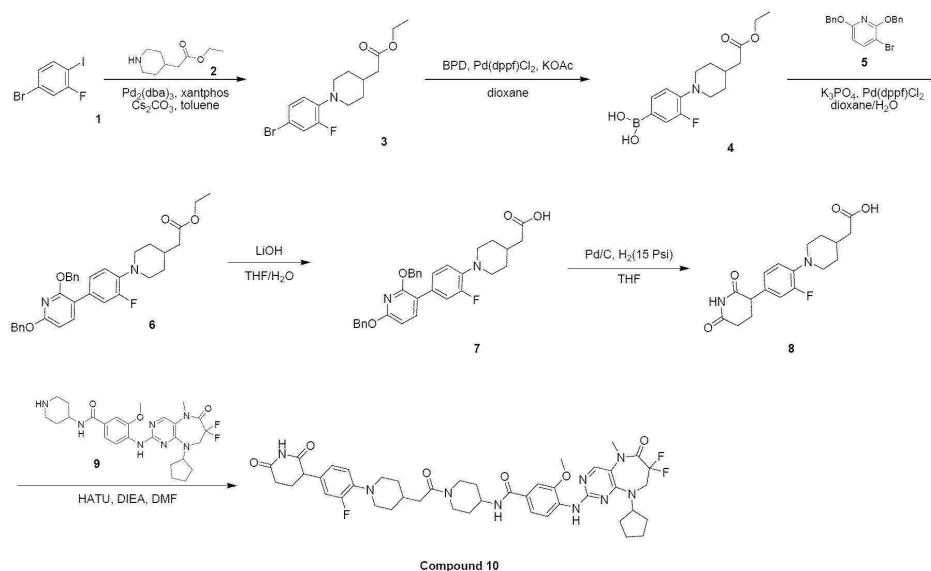
[0246] DMF (0.5 mL) 내 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (37 mg, 82.69 μmol) 용액에 HATU (37.73 mg, 99.23 μmol) 및 DIPEA (7.42 mg, 57.41 μmol , 10 μL)을 첨가하고 혼합물을 20 ° C 에서 15분간 교반 하였다. DMF (1.5 mL) 내 3-(3-((3-(4-((3-벤질옥시)카보닐)아미노)피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)아미노)메틸)페닐)피페리딘-2,6-디온 (60 mg, 95.50 μmol , 2HI 염) 및 DIPEA (59.36 mg, 459.29 μmol , 80 μL) 용액을 첨가하고 생성된 혼합물을 20 ° C 에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (80 %)를 확인하였다. 혼합물을 H_2O (10 mL)로 희석하고 EtOAc (10 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (10 mL x 3)로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하였다. 여과물을 감압 농축하였다. 조 생성물을 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150 x 25 mm x 5 μm ; 이동상: [water (NH_4HCO_3) - ACN]; B%: 38% - 68%, 8 분) 이후 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex C18 75 x 30mm x 3 μm ; 이동상: [water (FA) - ACN]; B%: 15% - 45%, 7 분)로 정제하고 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-((3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)벤질)아미노)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (11.4 mg, 13.36 μmol , 16.16% 수율, 94% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 802.5$

[0247] ^1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 10.84 (s, 1H), 8.30 - 8.24 (m, 2H), 8.17 - 8.12 (m, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.51 - 7.45 (m, 2H), 7.30 - 7.20 (m, 2H), 7.18 (s, 1H), 7.08 (br d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.79 - 4.74 (m,

1H), 4.44 - 4.33 (m, 1H), 4.10 - 3.99 (m, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.91 - 3.81 (m, 2H), 3.71 (s, 2H), 3.33 - 3.32 (m, 3H), 3.14 - 3.05 (m, 1H), 2.76 - 2.61 (m, 8H), 2.22 - 2.11 (m, 1H), 2.09 - 2.00 (m, 1H), 1.99 - 1.89 (m, 2H), 1.88 - 1.76 (m, 2H), 1.74 - 1.66 (m, 2H), 1.65 - 1.54 (m, 3H), 1.50 - 1.34 (m, 2H).

[0248]

실시예 10. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(2-(1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아세틸)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 10)의 합성



[0249]

단계 1. 에틸 2-(1-(4-브로모-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아세테이트 (3)의 합성

[0250]

[0251]

톨루엔 (10 mL) 내 4-브로모-2-플루오로-1-아이오도벤젠 (1 g, 3.32 mmol) 및 에틸 2-(피페리딘-4-일)아세테이트 (682.91 mg, 3.99 mmol) 용액에 Cs₂CO₃ (3.25 g, 9.97 mmol), Pd₂(dba)₃ (61 mg, 66.61 μmol) 및 Xantphos (58 mg, 100.24 μmol)를 첨가하고 혼합물을 100 ° C 에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소모되었음 및 원하는 질량이 검출되었음을 확인하였다. 혼합물을 여과하고 여과케이크를 EtOAc (30 mL)로 세척하였다. 여과물을 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (12 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 2~3% EtOAc/석유 에터 gradient @ 50 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 에틸 2-(1-(4-브로모-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아세테이트 (670 mg, 1.83 mmol, 55.05% 수율, 94% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=344.2

[0252]

단계 2. (4-(4-(2-에톡시-2-옥소에틸)피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)붕산 (4)의 합성

[0253]

디옥산 (10 mL) 내 에틸 2-(1-(4-브로모-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아세테이트 (670 mg, 1.95 mmol) 및 BPD (643 mg, 2.53 mmol) 용액에 KOAc (573.08 mg, 5.84 mmol) 및 Pd(dppf)Cl₂ (28.48 mg, 38.93 μmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 80 ° C 에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (60 %)를 확인하였다. 혼합물을 여과하고 여과케이크를 EtOAc (20 mL)로 세척하였다. 여과물을 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (5 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 2~3% EtOAc/석유 에터 gradient @ 50 mL/분)로 정제하여 백색 고체의 (4-(4-(2-에톡시-2-옥소에틸)피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)붕산 (690 mg, crude)을 수득하였다. MS(M+H)⁺=309.9

[0254]

단계 3. 에틸 2-(1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아세테이트 (6)의 합성

[0255]

디옥산 (15 mL) 및 H₂O (3 mL) 내 (4-(4-(2-에톡시-2-옥소에틸)피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)붕산 (640 mg, 2.07 mmol), 2,6-비스(벤질옥시)-3-브로모피리딘 (1.54 g, 4.15 mmol) 및 K₃PO₄ (1.32 g, 6.21 mmol) 용액에 Pd(dppf)Cl₂ (46 mg, 62.87 μmol)를 N₂ 기체 하에서 첨가하고 혼합물을 80 ° C N₂ 기체 하에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (68%)를 확인하였다. 생성된 혼합물을 Na₂SO₄ 로 건조하고 여과하였다. 여과케이크를 EtOAc (30 mL)로 세척하였다. 여과물을 감압 농축하고 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, 석유

에터/EtOAc=50/1 to 30/1)로 정제하여 황색 고체의 에틸 2-(1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아세테이트 (730 mg, 1.20 mmol, 57.85% 수율, 91% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=555.4

[0256] 단계 4. 2-(1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아세트산 (7)의 합성

[0257] THF (10 mL) 내 에틸 2-(1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아세테이트 (730 mg, 1.32 mmol) 용액에 LiOH·H₂O (3 M, 880 μL)를 첨가하고 혼합물을 20 ° C 에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (29%) 및 65%의 출발물질이 남아 있음을 확인하였다. LiOH·H₂O (3 M, 880 μL)를 추가로 첨가하고 혼합물을 60 ° C 에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소진되었음 및 원하는 질량의 주 피크 (91 %)를 확인하였다. 혼합물에 1N HCl을 첨가하여 pH = 3 으로 조정하고 H₂O (10 mL)로 희석하고 EtOAc (10 mL x 3)로 추출하고, 합쳐진 유기상을 H₂O (10 mL)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하였다. 여과물을 감압 농축하여 황색 고체의 2-(1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아세트산 (660 mg, crude)을 수득하였다. MS(M+H)⁺=527.3

[0258] 단계 5. 2-(1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아세트산 (8)의 합성

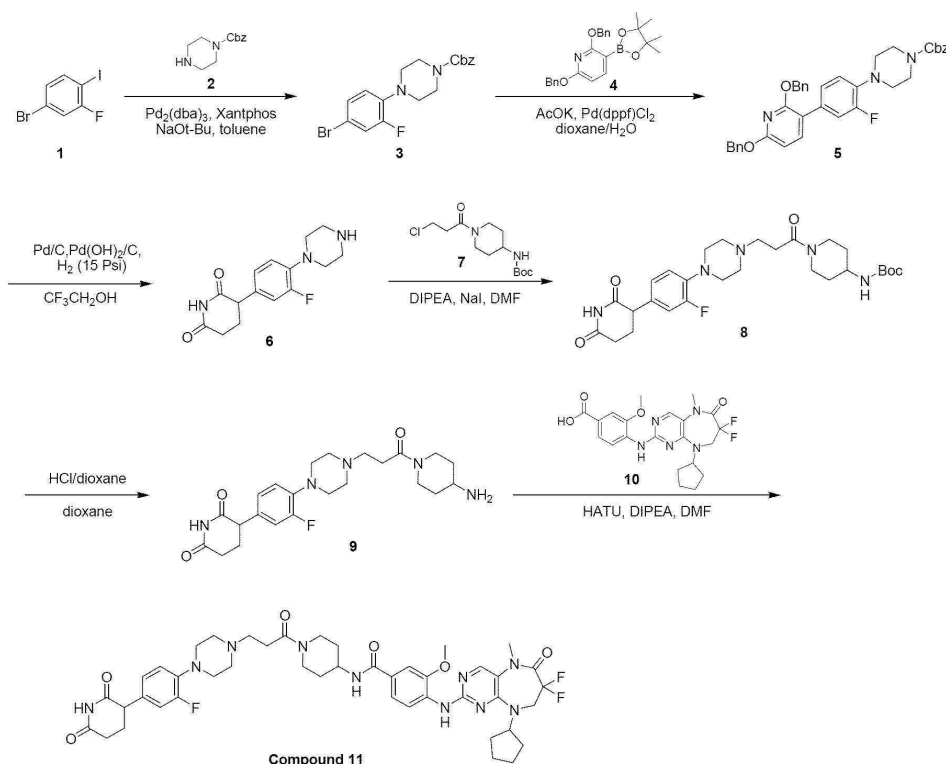
[0259] THF (5 mL) 내 2-(1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아세트산 (0.2 g, 379.80 μmol) 용액에 N₂ 기체 하에서 Pd/C (30 mg, 10% 순도)를 첨가하고, 반응 혼합물을 탈기하고 H₂로 3차례 퍼징하였다. 혼합물을 20 ° C H₂ (15 Psi) 하에서 18시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 소모되었음 및 원하는 질량의 피크가 검출되었음을 확인하였다. 혼합물을 여과하고 여과케이크를 THF (20 mL)로 세척하였다. 여과물을 감압 농축하여 갈색 고체의 2-(1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아세트산 (110 mg, crude)을 수득하였다. MS(M+H)⁺=348.9

[0260] 단계 6. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(2-(1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아세틸)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 10)의 합성

[0261] DMF (0.8 mL) 내 2-(1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아세트산 (50 mg, 143.53 μmol) 용액에 HATU (66 mg, 173.58 μmol) 및 DIPEA (22.26 mg, 172.23 μmol, 30 μL)를 첨가하고 혼합물을 20 ° C 에서 15분간 교반 하였다. 그리고 나서 DMF (0.7 mL) 내 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시-N-(피페리딘-4-일)벤즈아미드 (50.00 mg, 88.33 μmol, HCl 염) 및 DIPEA (37.10 mg, 287.05 μmol, 50.00 μL) 용액을 첨가하고 혼합물을 20 ° C 에서 30분간 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (66 %)를 확인하였다. 혼합물을 H₂O (10 mL)로 희석하고 EtOAc (10 mL x 3)로 추출하고, 합쳐진 유기상을 염수 (10 mL)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하였다. 여과물을 감압 농축하였다. 조 생성물을 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150 x 25 mm x 5 μm; 이동상: [물 (NH₄HCO₃) - ACN]; B%: 41% - 71%, 8 분) 및 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex luna C18 150 x 25mm x 10 μm; 이동상: [물 (FA) - ACN]; B%: 37% - 67%, 10 분)로 정제하고 용출물을 동결 건조하여 갈색 고체의 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(2-(1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)아세틸)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (26.8 mg, 29.92 μmol, 20.85% 수율, 96% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=860.5

[0262] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.81 (s, 1H), 8.30 - 8.25 (m, 2H), 8.16 (br d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.51 - 7.46 (m, 2H), 7.03 - 6.92 (m, 3H), 4.85 - 4.69 (m, 1H), 4.49 - 4.37 (m, 1H), 4.12 - 3.89 (m, 7H), 3.83 - 3.73 (m, 1H), 3.32 - 3.28 (m, 5H), 3.18 - 3.08 (m, 1H), 2.72 - 2.61 (m, 5H), 2.35 - 2.31 (m, 2H), 2.25 - 2.11 (m, 1H), 2.03 - 1.88 (m, 4H), 1.86 - 1.67 (m, 6H), 1.65 - 1.53 (m, 4H), 1.50 - 1.31 (m, 4H).

[0263] 실시예 11. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 11)의 합성



[0264]

[0265]

[0266]

단계 1. 벤질 4-(4-브로모-2-플루오로페닐)피페라진-1-카복실레이트 (3)의 합성

톨루엔 (100 mL) 내 4-브로모-2-플루오로-1-아이오도-벤젠 (5 g, 16.62 mmol), 벤질 피페라진-1-카복실레이트 (4.39 g, 19.94 mmol, 3.85 mL) 및 t-BuONa (2 M in THF, 24.93 mL) 혼합물에 Pd₂(dba)₃ (760.83 mg, 830.86 μmol) 및 Xantphos (961.50 mg, 1.66 mmol)를 25 ° C 에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 탈기하고 N₂로 3차례 퍼징한 후, 80 ° C 까지 승온하고 N₂ 기체 하에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨과 원하는 질량을 확인하였다. 반응 혼합물을 농축하였다. 조 생성물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (40 g 실리카 겔 컬럼, EtOAc/석유 에터 = 0-5%, 100 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 벤질 4-(4-브로모-2-플루오로페닐)피페라진-1-카복실레이트 (4 g, 10.17 mmol, 61.21% 수율)를 수득하였다.

[0267]

[0268]

단계 2. 벤질 4-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-카복실레이트 (5)의 합성

디옥산 (40 mL) 및 H₂O (7 mL) 내 벤질 4-(4-브로모-2-플루오로페닐)피페라진-1-카복실레이트 (3.5 g, 8.90 mmol), 2,6-비스(벤질옥시)-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보로란-2-일)피리딘 (4.46 g, 10.68 mmol), KOAc (2.62 g, 26.70 mmol) 및 Pd(dppf)Cl₂ (325.62 mg, 445.01 μmol) 혼합물을 100 ° C N₂ 보호하에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨과 원하는 질량을 확인하였다. 반응 혼합물을 EtOAc (100 mL)로 희석하였다. 생성된 혼합물을 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 농축하였다. 조 생성물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (40 g 실리카 겔 컬럼, EtOAc/석유 에터 = 0-10%, 100 mL/분)로 정제하고 황색 오일의 벤질 4-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-카복실레이트 (2.9 g, 4.80 mmol, 53.97% 수율)를 수득하였다.

[0269]

[0270]

단계 3. 3-(3-플루오로-4-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (6)의 합성

CF₃CH₂OH (50 mL) 내 벤질 4-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-카복실레이트 (2.9 g, 4.80 mmol) 용액에 Pd/C (300 mg, 10% 순도)를 25 ° C N₂ 보호 하에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 H₂로 3차례 퍼징 및 탈기한 후 25 ° C에서 H₂ (15 Psi) 하 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 중간체 (3-(3-플루오로-4-(피페라진-1-일)페닐)피리딘-2,6-디온)의 질량의 주 피크를 확인하였다. 그리고 나서 Pd(OH)₂/C (400 mg, 20% 순도)를 첨가하고 생성된 혼합물을 45 ° C 에서 H₂ (15 Psi) 하 4시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량을 확인하였다. 반응 혼합물을 여과하고 EtOH (50 mL)로 세척하였다. 여과물을 농축하여 백색 고체의 3-(3-플

루오로-4-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (1.2 g, crude) 을 수득하였다. 조 생성물을 다음 단계에 바로 사용하였다. $MS(M+H)^+ = 292.3$

[0271] **단계 4. tert-부틸 (1-(3-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (8)의 합성**

[0272] DMF (20 mL) 내 3-(3-플루오로-4-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (1.2 g, 4.12 mmol) 및 tert-부틸 (1-(3-클로로프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (1.92 g, 6.59 mmol) 혼합물에 DIPEA (1.60 g, 12.36 mmol, 2.15 mL) 및 NaI (61.74 mg, 411.92 μ mol)를 25 ° C 에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 25 ° C 에서 1시간 동안 교반한 후, 80 ° C 까지 승온하고 80 ° C 에서 13시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨과 원하는 질량을 확인하였다. 25 ° C 까지 온도를 낮춘 후, 반응 혼합물을 H₂O (60 mL)에 부었다. 생성된 혼합물을 EtOAc (20 mL x 5)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (15 mL x 3)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 농축하였다. 조 생성물을 석유 에터/EtOAc (30 mL, 3:1)로 분쇄하여 백색 고체의 tert-부틸 (1-(3-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (2 g, crude)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 546.7$

[0273] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.81 (s, 1H), 7.08 - 6.91 (m, 2H), 6.90-6.84 (m, 1H), 6.07 (dd, *J* = 2.4, 16.7 Hz, 1H), 4.23-4.19 (m, 1H), 3.88 - 3.72 (m, 3H), 3.58 - 3.37 (m, 2H), 3.12 - 2.94 (m, 4H), 2.71 - 2.61 (m, 2H), 2.59 - 2.52 (m, 7H), 2.06 - 1.94 (m, 1H), 1.77 - 1.68 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.28 - 1.15 (m, 2H).

[0274] **단계 5. 3-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (9)의 합성**

[0275] 디옥산 (10 mL) 내 tert-부틸 (1-(3-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (2 g, 3.67 mmol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 10 mL)을 20 ° C 에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 20 ° C 에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 반응이 완료되었음을 확인하였다. 반응 혼합물을 농축하여 황색 고체의 3-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (1.9 g, crude, 2HCl 염)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 446.0$

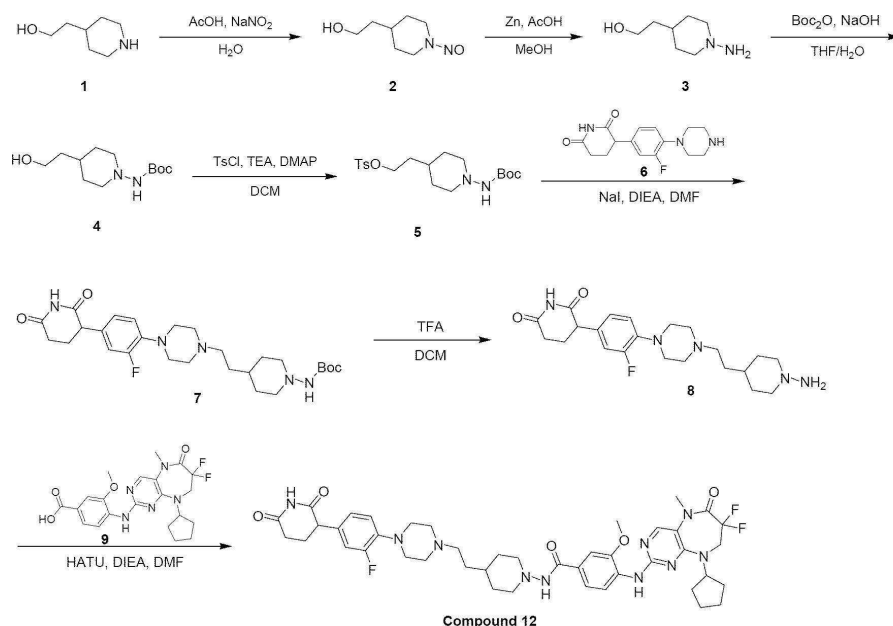
[0276] **단계 6. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 11)의 합성**

[0277] DMF (8 mL) 내 3-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (1.4 g, 2.70 mmol, 2HCl 염), 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (1.03 g, 2.30 mmol) 및 DIPEA (1.40 g, 10.80 mmol) 혼합물에 HATU (1.13 g, 2.97 mmol)를 20 ° C 에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 20 ° C 에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨과 원하는 질량을 확인하였다. 반응 혼합물을 AcOH로 pH = 6로 중화하였다. 생성된 혼합물을 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex luna C18 (250 x 70 mm, 10 μ m); 이동상: [물 (TFA) -ACN]; B%: 15% - 45%, 20 분) 후 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge C18 150 x 50 mm x 10 μ m; 이동상: [물 (NH₄HCO₃) - ACN]; B%: 30% - 60%, 10 분)로 정제하고 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (543.2 mg, 607.80 μ mol, 22.51% 수율, 97.9% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 875.5$

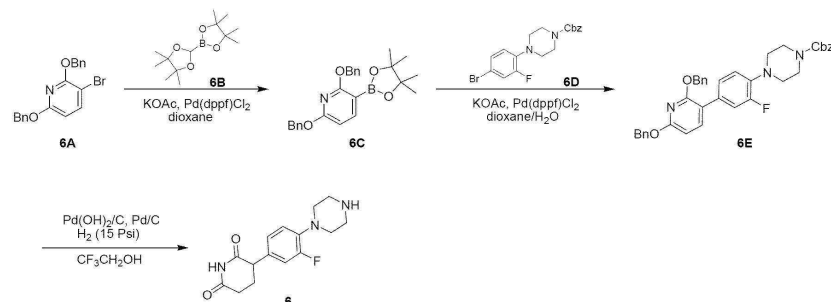
[0278] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.80 (s, 1H), 8.30 - 8.24 (m, 2H), 8.14 (br d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.53 - 7.46 (m, 2H), 7.06 - 6.92 (m, 3H), 4.80-4.70 (m, 1H), 4.46 - 4.33 (m, 1H), 4.10 - 3.94 (m, 4H), 3.93 (s, 3H), 3.79 (br dd, *J* = 4.8, 11.4 Hz, 1H), 3.32 - 3.31 (m, 3H), 3.18 - 3.09 (m, 1H), 3.05-2.91 (m, 4H), 2.65 - 2.53 (m, 10H), 2.26 - 2.14 (m, 1H), 2.04 - 1.73 (m, 6H), 1.71 - 1.65 (m, 2H), 1.65 - 1.55 (m, 4H), 1.50 - 1.35 (m, 2H).

[0279]

실시예 12. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-(2-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)에틸)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 12)의 합성



[0280]



[0281]

[0282] 단계 1. 2-(1-니트로소피페리딘-4-일)에탄-1-올 (2)의 합성

[0283]

H₂O (120 mL) 내 2-(피페리딘-4-일)에탄-1-올 (6 g, 46.44 mmol) 용액에 NaNO₂ (6.41 g, 92.88 mmol)를 0 ° C 에서 조금씩 첨가하였다. 그리고 나서 AcOH (8.37 g, 139.32 mmol, 7.97 mL)를 0 ° C 에서 한 방울씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 15 ° C 까지 천천히 승온하고 15 ° C 에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 23%의 출발물질이 남아있을 및 원하는 질량의 피크 (75 %)가 검출됨을 확인하였다. 반응 혼합물을 15 ° C 에서 추가 16시간 동안 교반하고, LCMS로 12%의 출발물질이 남아있을 및 원하는 질량의 피크 (81 %)가 검출됨을 확인하였다. 반응 혼합물에 포화 NaHCO₃ 용액을 첨가하여 pH > 7로 조정하고, 생성된 혼합물을 용액(EtOAc: MeOH = 10: 1, 250 mL x 11)으로 추출하고, 합쳐진 유기상을 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 농축하여 황색 오일의 2-(1-니트로소피페리딘-4-일)에탄-1-올 (7.98 g)을 수득하였고, 이를 다음 단계에 바로 사용하였다. MS(M+H)⁺=159.2.

[0284]

단계 2. 2-(1-아미노피페리딘-4-일)에탄-1-올 (3)의 합성

[0285]

MeOH (70 mL) 내 2-(1-니트로소피페리딘-4-일)에탄-1-올 (7.98 g, 50.44 mmol) 용액에 Zn (16.49 g, 252.22 mmol)를 0 ° C 에서 첨가하고, AcOH (45.44 g, 756.65 mmol, 43.27 mL)를 0 ° C 에서 한 방울씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 15 ° C 까지 천천히 승온하고 15 ° C 에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었을 및 원하는 질량의 주 피크 (92 %)를 확인하였다. 혼합물을 여과하고 여과케이크를 MeOH (200 mL)로 세척하였다. 여과물을 진공 농축하였다. 황색 고체를 MeOH (80 mL)로 처리하고 10분간 교반한 후, 여과하고 여과케이크를 버렸다. 여과물을 진공 농축하여 황색 점성 물질(gum)의 2-(1-아미노피페리딘-4-일)에탄-1-올 (29.7 g)을 수득하였고, 이를 다음 단계에 바로 사용하였다. MS(M+H)⁺=145.2.

[0286] 단계 3. tert-부틸 (4-(2-히드록시에틸)피페리딘-1-일)카바메이트 (4)의 합성

[0287] THF (80 mL) 내 2-(1-아미노피페리딘-4-일)에탄-1-올 (29.7 g, 205.94 mmol) 용액에 H₂O (40 mL) 내 NaOH (24.71 g, 617.83 mmol) 용액을 첨가하고, 이어서 Boc₂O (44.95 g, 205.94 mmol, 47.31 mL)을 첨가하고, 생성된 혼합물을 15 ° C 에서 16시간 동안 교반 하였다. TLC로 출발물질이 완전히 소모되었음을 확인하였다. 반응 혼합물을 여과하고 여과케이크를 EtOAc (100 mL)로 세척하고, 여과물을 H₂O (200 mL)로 희석하고 EtOAc (150 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 진공 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (40 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 14~ 40% EtOAc/석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하고 오프 화이트 고체의 tert-부틸 (4-(2-히드록시에틸)피페리딘-1-일)카바메이트 (3.58 g, 14.65 mmol, 7.11% 수율)를 수득하였다. MS(M-56+H)⁺=189.1.

[0288] 단계 4. 2-(1-((tert-부톡시카보닐)아미노)피페리딘-4-일)에틸 4-메틸벤젠설포네이트 (5)의 합성

[0289] DCM (50 mL) 내 tert-부틸 (4-(2-히드록시에틸)피페리딘-1-일)카바메이트 (3.58 g, 14.65 mmol) 용액에 TEA (2.97 g, 29.30 mmol, 4.08 mL), DMAP (17.90 mg, 146.52 μmol) 및 TosCl (4.19 g, 21.98 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 15 ° C 에서 16시간 동안 교반 하였다. TLC (SiO₂, 석유 에터: EtOAc = 3: 1)로 반응물이 완전히 소모되었음 및 낮은 극성의 하나의 새로운 스팟이 검출되었음을 확인하였다. 반응물을 진공 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 16~50% EtOAc/석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하고 백색 고체의 2-(1-((tert-부톡시카보닐)아미노)피페리딘-4-일)에틸 4-메틸벤젠설포네이트 (5.05 g, 12.67 mmol, 86.48% 수율)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=399.1.

[0290] 단계 5. 2,6-비스(벤질옥시)-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보로란-2-일)피리딘 (6C)의 합성

[0291] 디옥산 (300 mL) 내 2,6-비스(벤질옥시)-3-브로모피리딘 (20 g, 54.02 mmol), 4,4,5,5-테트라메틸-2-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3-디옥소란-2-일)-1,3,2-디옥사보로란 (17.99 g, 70.22 mmol), KOAc (10.60 g, 108.04 mmol), Pd(dppf)Cl₂ (1.98 g, 2.70 mmol) 혼합물을 탈기하고 N₂로 3차례 퍼징한 후, 혼합물을 100 ° C N₂ 기체 하에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 2,6-비스(벤질옥시)-3-브로모피리딘이 완전히 소모되었음 및 26%의 원하는 질량의 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 여과하고 여과케이크를 EtOAc (30 mL)로 세척하였다. 여과물을 진공 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (330 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~90% EtOAc/석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 갈색 점성 물질 (gum)의 2,6-비스(벤질옥시)-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보로란-2-일)피리딘 (14.05 g, 33.67 mmol, 62.33% 수율)을 수득하였다. MS(M+H)⁺=417.9.

[0292] 단계 6. 벤질 4-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-카복실레이트 (6E)의 합성

[0293] 디옥산 (90 mL) 및 H₂O (15 mL) 내 2,6-비스(벤질옥시)-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보로란-2-일)피리딘 (6 g, 14.38 mmol), 벤질 4-(4-브로모-2-플루오로페닐)피페라진-1-카복실레이트 (3.96 g, 10.06 mmol), KOAc (4.23 g, 43.13 mmol) 및 Pd(dppf)Cl₂ (526.02 mg, 718.90 μmol) 혼합물을 100 ° C N₂ 보호 하에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 10%의 2,6-비스(벤질옥시)-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보로란-2-일)피리딘이 남아있음 및 53%의 원하는 질량의 피크가 검출되었음을 확인하였다. 반응 혼합물을 농축하였다. 잔여물을 H₂O (100 mL)로 희석하고 EtOAc (80 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 진공 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (80 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 4~5% EtOAc/석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 밝은 황색 오일의 벤질 4-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-카복실레이트 (3.98 g, 6.59 mmol, 45.85% 수율)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=604.1.

[0294] 단계 7. 3-(3-플루오로-4-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (6)의 합성

[0295] CF₃CH₂OH (100 mL) 내 벤질 4-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-카복실레이트 (3.95 g, 6.54 mmol) 용액에 Pd/C (1 g, 10% 순도) 및 Pd(OH)₂/C (1 g, 10% 순도)을 15 ° C에서 N₂ 보호 하에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 탈기하고 H₂로 3차례 퍼징한 후 45 ° C에서 H₂ (15 Psi) 기체 하 16시간 동안 교반

하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 63%의 원하는 질량의 피크가 검출되었음을 확인하였다. 반응 혼합물을 여과하고 $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (100 mL)로 세척하였다. 여과물을 농축하여 밝은 갈색 점성 물질 (gum)의 3-(3-플루오로-4-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (2.53 g)을 수득하였고 이를 다음 단계에 바로 사용하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 292.1$.

[0296] 단계 8. tert-부틸 (4-(2-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)에틸)피페리딘-1-일)카바메이트 (7)의 합성

[0297] DMF (7 mL) 내 3-(3-플루오로-4-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (300 mg, 1.03 mmol) 및 2-(1-((tert-부톡시카보닐)아미노)피페리딘-4-일)에틸 4-메틸벤젠설포네이트 (615.58 mg, 1.54 mmol) 용액에 DIPEA (399.28 mg, 3.09 mmol, 538.12 μL) 및 NaI (15.44 mg, 102.98 μmol)를 첨가하고, 혼합물을 60 ° C 에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 3-(3-플루오로-4-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 이 완전히 소모되었음 및 63%의 원하는 질량의 피크가 검출되었음을 확인하였다. 반응 혼합물을 H_2O (100 mL)로 희석하고 DCM (60 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (100 mL x 4)로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하였다. 여과물을 진공 농축 하였다. 잔여물을 혼합물 (MTBE: EtOAc = 10 mL : 10 mL)로 10분간 분쇄하고, 현탁액을 여과하고 여과케이크를 MTBE (20 mL)로 세척했다. 여과케이크를 모아서 진공 건조하여 갈색 고체의 tert-부틸 (4-(2-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)에틸)피페리딘-1-일)카바메이트 (250 mg, 482.97 μmol , 46.90% 수율)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 518.2$.

[0298] 단계 9. 3-(4-(4-(2-(1-아미노피페리딘-4-일)에틸)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (8)의 합성

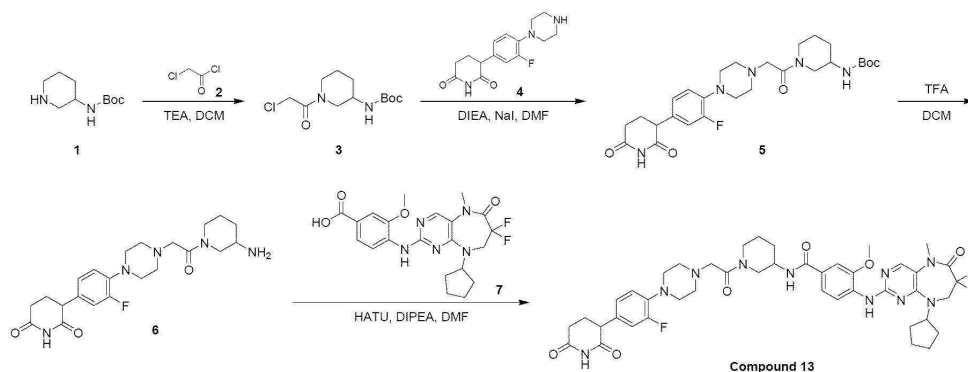
[0299] DCM (3 mL) 내 tert-부틸 (4-(2-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)에틸)피페리딘-1-일)카바메이트 (100 mg, 193.19 μmol) 용액에 TFA (220.28 mg, 1.93 mmol, 143.04 μL)를 첨가하고, 혼합물을 15 ° C 에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 77%의 원하는 질량의 피크가 검출되었음을 확인하였다. 반응 혼합물을 진공 농축하여 갈색 점성 물질(gum)의 3-(4-(4-(2-(1-아미노피페리딘-4-일)에틸)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (105 mg, TFA 염)을 수득하였고, 이를 다음 단계에 바로 사용하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 418.2$.

[0300] 단계 10. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-(2-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)에틸)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 12)의 합성

[0301] DMF (2 mL) 내 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (90 mg, 201.15 μmol) 용액에 HATU (114.72 mg, 301.72 μmol) 및 DIPEA (259.97 mg, 2.01 mmol, 350.36 μL)를 첨가하고, 혼합물을 15 ° C 에서 15분간 교반한 후, 3-(4-(4-(2-(1-아미노피페리딘-4-일)에틸)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (100.45 mg, 221.26 μmol , HCl 염)을 첨가하고 생성된 혼합물을 15 ° C 에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 47%의 원하는 질량의 피크가 검출되었음을 확인하였다. 혼합물에 CH_3COOH 를 첨가하여 pH < 7 로 조정하고 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex C18 75 x 30mm x 3 μm ; 이동상: [물(FA) - ACN]; B%: 15% - 45%, 7분) 후 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150 x 25mm x 5 μm ; 이동상: [물(NH_4HCO_3) - ACN]; B%: 43% - 73%, 8 분)로 정제하고, 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-(2-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)에틸)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (12.6 mg, 14.58 μmol , 7.25% 수율, 98% 순도)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 847.3$.

[0302] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 10.81 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 8.36 - 8.18 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.54 - 7.34 (m, 2H), 7.11 - 6.83 (m, 3H), 4.85 - 4.69 (m, 1H), 4.04 (br t, J = 14.0 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.80 (br dd, J = 4.6, 11.8 Hz, 1H), 3.30 (br s, 3H), 3.00 (br s, 6H), 2.79 - 2.73 (m, 2H), 2.70 - 2.57 (m, 6H), 2.39 - 2.33 (m, 2H), 2.24 - 2.15 (m, 1H), 2.04 - 1.98 (m, 1H), 1.94 (br s, 2H), 1.71 (br s, 4H), 1.59 (br s, 4H), 1.43 (br d, J = 2.8 Hz, 2H), 1.30 (br s, 3H).

[0303] 실시예 13. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(2-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)아세틸)피페리딘-3-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 13)의 합성



[0304]

[0305] 단계 1. tert-부틸 (1-(2-클로로아세틸)피페리딘-3-일)카바메이트 (3)의 합성

[0306] DCM (50 mL) 내 tert-부틸 피페리딘-3-일카바메이트 (4 g, 19.97 mmol) 및 TEA (4.04 g, 39.94 mmol, 5.56 mL) 용액에 2-클로로아세틸 클로라이드 (2.26 g, 19.97 mmol, 1.59 mL)를 0 ° C 에서 한 방울씩 첨가하고, 첨가 후, 생성된 물질을 15 ° C 에서 2시간 동안 교반 하였다. TLC (SiO₂, 석유 에터: EtOAc = 1: 2)로 미량의 tert-부틸 피페리딘-3-일카바메이트가 남아있음 및 낮은 극성의 새로운 스팟이 검출되었음을 확인하였다. 혼합물을 진공 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 12~18% EtOAc/석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 갈색 고체의 tert-부틸 (1-(2-클로로아세틸)피페리딘-3-일)카바메이트 (3.15 g, 11.38 mmol, 56.99% 수율)를 수득하였다. MS(M+100+H)⁺=177.1.

[0307] 단계 2. tert-부틸 (1-(2-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)아세틸)피페리딘-3-일)카바메이트 (5)의 합성

[0308] DMF (10 mL) 내 3-(3-플루오로-4-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (300 mg, 1.03 mmol) 및 tert-부틸 (1-(2-클로로아세틸)피페리딘-3-일)카바메이트 (228.00 mg, 823.84 μmol) 용액에 DIPEA (399.28 mg, 3.09 mmol, 538.12 μL) 및 NaI (15.44 mg, 102.98 μmol)를 첨가하고, 혼합물을 60 ° C 에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 254nm에서 원하는 질량의 피크 (79 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 H₂O (100 mL)로 희석하고 EtOAc (50 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (100 mL x 3)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 진공 농축하였다. 잔여물을 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex luna C18 150 x 40mm x 15 μm; 이동상: [water (FA) - ACN]; B%: 10% - 40%, 10 분)로 정제하고, 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 tert-부틸 (1-(2-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)아세틸)피페리딘-3-일)카바메이트 (150 mg, 282.16 μmol, 27.40% 수율)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=532.2

[0309] 단계 3. 3-(4-(4-(2-(3-아미노피페리딘-1-일)-2-옥소에틸)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (6)의 합성

[0310] DCM (3 mL) 내 tert-부틸 (1-(2-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)아세틸)피페리딘-3-일)카바메이트 (150 mg, 282.16 μmol) 용액에 TFA (308.00 mg, 2.70 mmol, 200 μL)를 첨가하고, 혼합물을 15 ° C 에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 진공 농축하여 갈색 오일의 3-(4-(4-(2-(3-아미노피페리딘-1-일)-2-옥소에틸)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (155 mg, TFA 염)을 수득하였다. MS(M+H)⁺=432.2.

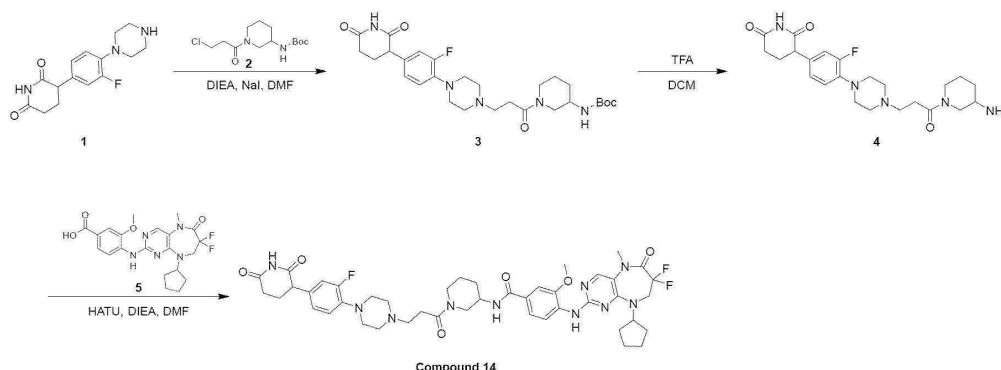
[0311] 단계 4. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(2-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)아세틸)피페리딘-3-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 13)의 합성

[0312] DMF (3 mL) 내 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (120 mg, 268.20 μmol) 용액에 HATU (132.57 mg, 348.65 μmol) 및 DIPEA (207.97 mg, 1.61 mmol, 280.29 μL)를 첨가하고, 혼합물을 15 ° C 에서 15분간 교반한 후, 3-

(4-(4-(2-(3-아미노피페리딘-1-일)-2-옥소에틸)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (146.31 mg, 268.20 μ mol, TFA 염)을 첨가하고 생성된 혼합물을 15 ° C 에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (94%)를 확인하였다. 혼합물에 CH_3COOH 을 가하여 pH < 7 로 조정하고 생성된 혼합물을 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex luna C18 150 x 25mm x 10 μ m; 이동상: [water (FA) - ACN]; B%: 26% - 56%, 10 분) 이후 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150 x 25mm x 5 μ m; 이동상: [water(NH_4HCO_3) - ACN]; B%: 40% - 70%, 8 분)로 정제하고, 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(2-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)아세틸)피페리딘-3-일)-3-메톡시벤즈아미드 (56.7 mg, 64.54 μ mol, 24.07% 수율, 98% 순도)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=861.3$.

[0313] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 10.81 (s, 1H), 8.32 - 8.23 (m, 2H), 8.17 (br t, J = 8.6 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.54 - 7.43 (m, 2H), 7.08 - 6.87 (m, 3H), 4.83 - 4.68 (m, 1H), 4.44 - 4.11 (m, 1H), 4.04 (br t, J = 14.0 Hz, 3H), 3.93 (d, J = 8.6 Hz, 3H), 3.80 (br dd, J = 5.4, 11.1 Hz, 2H), 3.36 - 3.25 (m, 5H), 3.21 - 2.92 (m, 6H), 2.77 - 2.55 (m, 6H), 2.27 - 2.12 (m, 1H), 2.06 - 1.86 (m, 4H), 1.84 - 1.67 (m, 3H), 1.66 - 1.45 (m, 6H).

[0314] 실시예 14. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-3-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 14)의 합성



[0315]

[0316] 단계 1. tert-부틸 (1-(3-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-3-일)카바메이트 (3)의 합성

[0317] DMF (10 mL) 내 3-(3-플루오로-4-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (300 mg, 1.03 mmol) 및 tert-부틸 (1-(3-클로로프로파노일)피페리딘-3-일)카바메이트 (449.17 mg, 1.54 mmol) 용액에 DIPEA (399.28 mg, 3.09 mmol, 538.12 μ L) 및 NaI (15.44 mg, 102.98 μ mol)을 첨가하고, 혼합물을 60 ° C 에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 3-(3-플루오로-4-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 피크 (65 %)가 검출되었음을 확인하였다. 반응 혼합물을 H_2O (100 mL)로 희석하고 EtOAc (50 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (100 mL x 3)로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하고 진공 농축하였다. 잔여물을 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex luna C18 150 x 40mm x 15 μ m; 이동상: [물 (FA) - ACN]; B%: 10% - 40%, 10 분)로 정제하고, 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 tert-부틸 (1-(3-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-3-일)카바메이트 (100 mg, 183.27 μ mol, 17.80% 수율)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=546.2$.

[0318] 단계 2. 3-(4-(4-(3-(3-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (4)의 합성

[0319] DCM (4 mL) 내 tert-부틸 (1-(3-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-3-일)카바메이트 (100 mg, 183.27 μ mol) 용액에 TFA (150 μ L)를 첨가하고, 혼합물을 15 ° C 에서 4 시간 동안 교반 하였다. LCMS로 3%의 출발물질이 남아있음 및 원하는 질량의 피크 (86 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 진공 농축하고 갈색 오일의 3-(4-(4-(3-(3-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)-3-플루

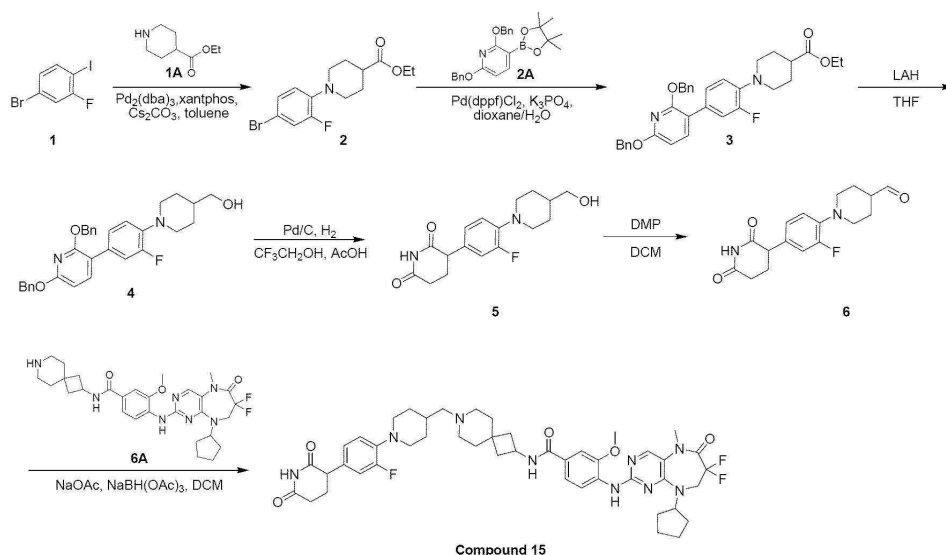
오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (105 mg, TFA 염)을 수득하였고 이를 다음 단계에 바로 사용하였다. MS(M+H)⁺=446.2.

[0320] 단계 3. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-3-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 14)의 합성

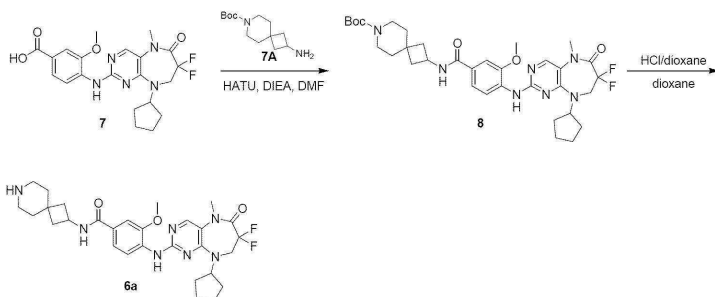
[0321] DMF (2 mL) 내 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (80 mg, 178.80 μ mol) 용액에 HATU (88.38 mg, 232.44 μ mol) 및 DIPEA (138.65 mg, 1.07 mmol, 186.86 μ L)를 첨가하고, 혼합물을 15 ° C 에서 15분간 교반한 후, 3-(4-(3-(3-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (100.05 mg, 178.80 μ mol, TFA 염)을 첨가하고 생성된 혼합물을 15 ° C 에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발 물질이 완전히 소모되었음 및 95%의 원하는 질량이 검출됨을 확인하였다. 혼합물에 CH₃COOH를 첨가하여 pH < 7로 조정 했다. 생성된 혼합물을 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex Luna C18 150 x 25mm x 10 μ m; 이동상: [물 (FA) - ACN]; B%: 26% - 56%, 10 분) 이후 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150 x 25mm x 5 μ m; 이동상: [물(NH₄HCO₃) - ACN]; B%: 38% - 68%, 8 분)로 정제하고, 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-3-일)-3-메톡시벤즈아미드 (35.7 mg, 39.99 μ mol, 22.36% 수율, 98% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=875.8.

[0322] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.93 - 10.75 (m, 1H), 8.43 - 8.11 (m, 3H), 7.98 (s, 1H), 7.67 - 7.44 (m, 2H), 7.17 - 6.85 (m, 3H), 4.88 - 4.69 (m, 1H), 4.48 - 4.10 (m, 1H), 4.04 (br t, J = 13.9 Hz, 3H), 3.94 (s, 3H), 3.85 - 3.74 (m, 2H), 3.53 - 3.36 (m, 5H), 3.11 - 2.89 (m, 5H), 2.79 - 2.57 (m, 9H), 2.28 - 2.11 (m, 1H), 2.06 - 1.87 (m, 4H), 1.85 - 1.49 (m, 9H).

[0323] 실시예 15. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난 -2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 15)의 합성



[0324]



[0325]

[0326]

단계 1. 에틸 1-(4-브로모-2-플루오로페닐)피페리딘-4-카복실레이트(2)의 합성

[0327]

톨루엔 (200 mL) 내 4-브로모-2-플루오로-1-아이오도벤젠 (10 g, 33.23 mmol) 및 에틸 피페리딘-4-카복실레이트 (5.22g, 33.23mmol, 5.12mL) 용액에 Cs_2CO_3 (32.49 g, 99.70 mmol), $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (608.66 mg, 664.69 μmol) 및 Xantphos (576.90 mg, 997.03 μmol)를 첨가하고 혼합물을 N_2 하 100° C에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (17%)가 검출되었다. 혼합물을 H_2O (500 mL)로 희석 후 EtOAc (50 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (100 mL x 2)로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조, 여과 및 감압 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~15% EtOAc/석유 에터 gradient @ 40 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 에틸 1-(4-브로모-2-플루오로페닐)피페리딘-4-카복실레이트 (2.6 g, 7.40 mmol, 22.27% 수율, 94% 순도)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 330.0$

[0328]

단계 2. 에틸 1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-카복실레이트 (3)의 합성

[0329]

디옥산 (40 mL) 및 H_2O (8 mL) 내 에틸 1-(4-브로모-2-플루오로페닐)피페리딘-4-카복실레이트 (2.1 g, 6.36 mmol) 및 2,6-비스(벤질옥시)-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)피리딘 (5.31 g, 12.72 mmol) 용액에 K_3PO_4 (4.05 g, 19.08 mmol) 및 $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ (465.36 mg, 635.99 μmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 90° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (58 %)가 검출되었고, 혼합물을 진공 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (40 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~10% EtOAc/석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 백색 고체의 에틸 1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-카복실레이트 (1.5 g, 2.77 mmol, 43.63% 수율, 100% 순도)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 541.2$

[0330]

단계 3. (1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메탄올 (4)의 합성

[0331]

THF (30 mL) 내 LAH (315.92 mg, 8.32 mmol) 현탁액에 THF (20 mL) 내 에틸 1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-카복실레이트 (3 g, 5.55 mmol)을 20° C에서 가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (97 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 0° C에서 H_2O (0.3 mL), NaOH 용액 (15 %, 0.3 mL) 및 H_2O (0.9 mL)로 켄칭하고, 그리고 나서 혼합물을 여과 후 여과물을 감압 농축하여 백색 고체의 (1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메탄올 (2.9 g, crude)을 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 499.3$

[0332]

단계 4. 3-(3-플루오로-4-(4-(히드록시메틸)피페리딘-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (5)의 합성

[0333]

$\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (100 mL) 내 (1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메탄올 (2.9 g, 5.82 mmol) 용액에 N_2 기체 하 AcOH (349.29 mg, 5.82 mmol, 332.66 μL) 및 Pd/C (0.3 g, 10% 순도)를 첨가 후 혼합물을 H_2 하 3차례 탈기 및 퍼징하고, 혼합물을 20° C에서 16시간 동안 H_2 기체 (15 Psi)하 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (80 %)가 검출되었고, 혼합물을 여과하여 백색 고체의 3-(3-플루오로-4-(4-(히드록시메틸)피페리딘-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (1.8 g, 4.94 mmol, 85.01% 수율, 88% 순도)을 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 321.2$

[0334]

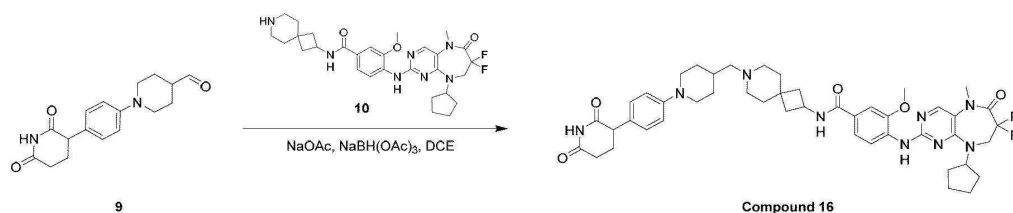
단계 5. 1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-카브알데히드 (6)의 합성

- [0335] DCM (30 mL) 내 3-(3-플루오로-4-(4-(히드록시메틸)피페리딘-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (0.8 g, 2.50 mmol) 용액에 DMP (1.59 g, 3.75 mmol, 1.16 mL)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 3-(3-플루오로-4-(4-(히드록시메틸)피페리딘-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량이 검출되었고, 혼합물을 여과 후 여과물을 감압 농축하여 황색 오일의 1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-카르보알데히드 (0.8 g, crude)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 319.0$
- [0336] 단계 6. tert-부틸 2-(4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미도)-7-아자스피로[3.5]노난-7-카복실레이트 (8)의 합성
- [0337] DMF (20 mL) 내 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (2 g, 4.47 mmol) 및 tert-부틸 2-아미노-7-아자스피로[3.5]노난-7-카복실레이트 (1.07 g, 4.47 mmol) 용액에 HATU (2.04 g, 5.36 mmol) 및 DIPEA (1.73 g, 13.41 mmol, 2.34 mL)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (72 %)가 검출되었다. 혼합물에 물(100 mL)을 붓고 EtOAc (50 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (50 mL)로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조, 여과 및 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~100% EtOAc/석유 에터 gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 황색 고체의 tert-부틸 2-(4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미도)-7-아자스피로[3.5]노난-7-카복실레이트 (1.7 g, 2.51 mmol, 56.22% 수율, 99% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 670.6$
- [0338] 단계 7. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시-N-(7-아자스피로[3.5]노난-2-일)벤즈아미드 (6a)의 합성
- [0339] 디옥산 (20 mL) 내 tert-부틸 2-(4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미도)-7-아자스피로[3.5]노난-7-카복실레이트 (1.7 g, 2.54 mmol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 17.00 mL)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (100 %)가 검출되었고 혼합물을 감압 농축하여 황색 고체의 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시-N-(7-아자스피로[3.5]노난-2-일)벤즈아미드 (1.5 g, 2.47 mmol, 97.50% 수율, HCl)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 570.3$
- [0340] 단계 8. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 15)의 합성
- [0341] DCM (50 mL) 내 1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-카르보알데히드 (0.8 g, 2.51 mmol) 용액에 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시-N-(7-아자스피로[3.5]노난-2-일)벤즈아미드 (1.22 g, 2.01 mmol, HCl 염) 및 NaOAc (309.23 mg, 3.77 mmol)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. 이후 혼합물에 20° C에서 $NaBH(OAc)_3$ (2.66 g, 12.57 mmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 15시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (38%)가 검출되었다. 혼합물에 물(100 mL)을 붓고 DCM (50 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (50 mL)로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조, 여과 및 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~30% MeOH/EtOAc gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 0.7 g의 조 생성물을 수득했고, 조 생성물을 EtOAc (20 mL)로 분쇄하여 0.6 g의 원하는 생성물 (95 % 순도)을 수득했고, 원하는 생성물을 ACN (10 mL) 및 MeOH (10 mL)로 분쇄하여 560 mg의 원하는 생성물 (96 % 순도)을 수득했고, 560 mg의 원하는 생성물을 DMF (5 mL) 및 MeOH (2 mL)로 분쇄하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (230 mg, 258.49 μ mol, 10.29% 수율, 98% 순도)을 수득하였다. 모든 모액을 농축하고 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge C18 150 * 50 mm * 10 μ m; 이동상: $[H_2O (NH_4HCO_3) - ACN]$; B%: 45%-75%, 10 분)로 재정제하고 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 15)를 수득하였다.

리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (281.4 mg, 316.26 μmol , 12.58% 수율, 98% 순도)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 872.5$.

[0342] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 10.80 (s, 1H), 8.43 (br d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.29 - 8.24 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.50 - 7.46 (m, 2H), 7.02 - 6.92 (m, 3H), 4.83 - 4.71 (m, 1H), 4.45 - 4.33 (m, 1H), 4.04 (br t, J = 14.1 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.79 (dd, J = 4.9, 11.6 Hz, 1H), 3.31 (br s, 5H), 2.68 - 2.59 (m, 3H), 2.33 - 2.12 (m, 9H), 2.04 - 1.92 (m, 3H), 1.85 - 1.70 (m, 6H), 1.65 - 1.51 (m, 10H), 1.31 - 1.20 (m, 2H).

[0343] 실시예 16. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 16)의 합성

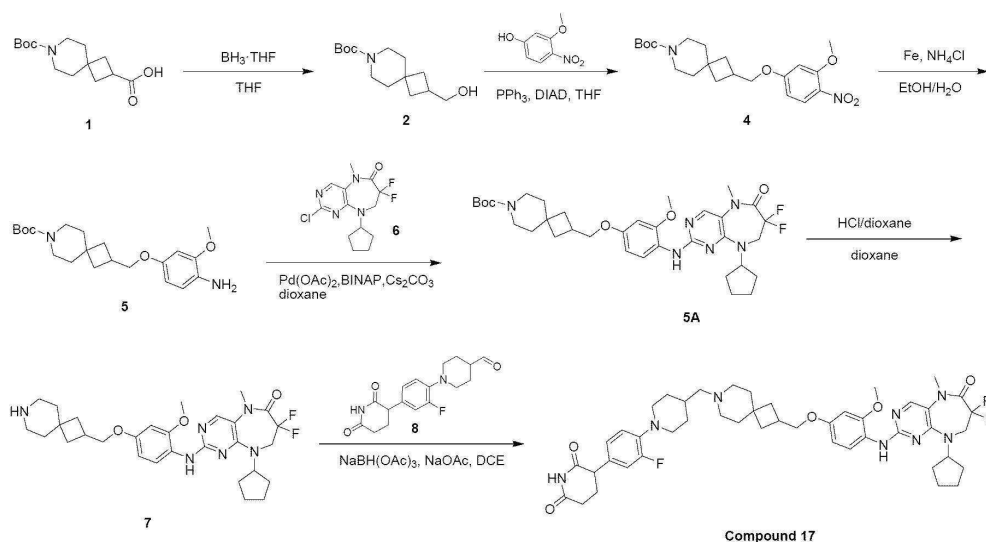


[0344]

[0345] DCE (5 mL) 내 1-[4-(2,6-디옥소-3-피페리딘)페닐]피페리딘-4-카르보알데히드 (94.15 mg, 313.48 μmol) 용액에 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시-N-(7-아자스피로[3.5]노난-2-일)벤즈아미드 (190 mg, 313.48 μmol , HCl 염) 및 NaOAc (38.57 mg, 470.22 μmol)를 첨가하였다. 혼합물을 20 ° C 에서 1시간 동안 교반 하였다. 이후 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (332.19 mg, 1.57 mmol)를 20 ° C 에서 첨가하고 혼합물을 20 ° C 에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량을 확인하였다. 반응 혼합물을 H_2O (15 mL x 3)로 세척하였다. 합쳐진 유기상을 Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하고 감압 농축하였다. 잔여물을 prep-HPLC (컬럼: 3-Phenomenex Luna C18 75 x 30 mm x 3 μm ; 이동상: [물 (TFA) - ACN]; B%: 20% - 40%, 9 분) 후 prep-TLC (SiO_2 , 디클로로메탄 : 메탄올 = 10:1)로 정제하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (28.7 mg, 32.60 μmol , 10.40% 수율, 97% 순도)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 854.7$

[0346] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 10.76 (s, 1H), 8.42 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.31 - 8.23 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.52 - 7.45 (m, 2H), 7.02 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.87 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 4.82 - 4.71 (m, 1H), 4.39 (sxt, J = 7.6 Hz, 1H), 4.04 (br t, J = 14.1 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.71 (dd, J = 5.0, 10.8 Hz, 1H), 3.64 (br d, J = 12.1 Hz, 2H), 3.32 (br s, 3H), 2.65 - 2.57 (m, 3H), 2.48 - 2.41 (m, 2H), 2.32 - 2.20 (m, 3H), 2.18 - 2.09 (m, 5H), 2.04 - 1.91 (m, 3H), 1.85 - 1.68 (m, 6H), 1.66 - 1.51 (m, 9H), 1.23 - 1.11 (m, 2H).

[0347] 실시예 17. 3-(4-(4-((2-((4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시페녹시)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (화합물 17)의 합성



[0348]

[0349]

단계 1. tert-부틸 2-(히드록시메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-카복실레이트 (2)의 합성

[0350]

THF (20 mL) 내 7-(tert-부톡시카보닐)-7-아자스피로[3.5]노난-2-카르복실산 (1 g, 3.71 mmol) 용액에 0° C에서 BH₃·THF (1 M, 10 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 N₂ 기체 하 20° C에서 2시간 동안 교반 하였다. TLC (석유 에터: EtOAc = 1:1; I₂)로 반응물 1이 완전히 소모됨과 하나의 새로운 스팟 (R_f = 0.28)이 형성됨을 확인하였다. 혼합물을 0° C에서 메탄올 (30 mL)로 킨칭하였다. 그리고 나서 혼합물을 감압 농축했다. 잔여물을 물 (100 mL)로 희석 후 EtOAc (50 mL x 3)로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (50 mL)로 세척 후 소듐 설페이트로 건조, 여과 및 감압 농축하여 밝은 황색 오일의 tert-부틸 2-(히드록시메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-카복실레이트 (940 mg, curde)를 수득하였다. MS (M+H)⁺ = 256.4

[0351]

단계 2. tert-부틸 2-((3-메톡시-4-니트로페녹시)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-카복실레이트 (4)의 합성

[0352]

THF (6 mL) 내 tert-부틸 2-(히드록시메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-카복실레이트 (740 mg, 2.90 mmol) 용액에 0° C에서 PPh₃ (1.15 g, 4.37 mmol), 3-메톡시-4-니트로페놀 (500 mg, 2.96 mmol) 및 DIAD (936.00 mg, 4.63 mmol, 900 μL)를 첨가했다. 혼합물을 N₂ 기체 하 20° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (31%)가 검출되었다. 반응 혼합물을 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage; 20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 10 ~ 33% EtOAc: 석유 에터 gradient, 60 mL/분)로 정제하여 밝은 황색 오일의 tert-부틸 2-((3-메톡시-4-니트로페녹시)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-카복실레이트 (1.16 g, 2.85 mmol, 98.48% 수율)를 수득하였다. MS(M+Na)⁺ = 429.3

[0353]

단계 3. tert-부틸 2-((4-아미노-3-메톡시페녹시)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-카복실레이트 (5)의 합성

[0354]

EtOH (10 mL) 및 H₂O (10 mL) 내 tert-부틸 2-((3-메톡시-4-니트로페녹시)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-카복실레이트 (700 mg, 1.72 mmol) 용액에 Fe (700 mg, 12.53 mmol) 및 NH₄Cl (700 mg, 13.09 mmol)를 첨가 후 80° C에서 2시간 동안 교반 하였다. TLC (석유 에터: EtOAc = 1:1)로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 하나의 새로운 스팟이 형성되었다. 반응 혼합물을 여과 후 여과물을 농축하여 EtOH를 제거했다. 이후 Na₂CO₃ (sat. aq, 8 mL)를 첨가하여 pH=9로 조정 후 EtOAc (40 mL x 3)으로 추출했다. 합친 유기상을 염수 100 ml (50 mL x 2)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조 및 여과하고 여과물을 감압 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage; 20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 20 ~ 50% EtOAc: 석유 에터 gradient, 60 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 tert-부틸 2-((4-아미노-3-메톡시페녹시)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-카복실레이트 (630 mg, 1.67 mmol, 97.17% 수율)를 수득하였다. MS (M+H)⁺ = 377.3

[0355]

단계 4. tert-부틸 2-((4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b])[1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시페녹시)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-카복실레이트 (5A)의 합성

[0356]

디옥산 (30 mL) 내 2-클로로-9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-5,7,8,9-테트라히드로-6H-피리미도[4,5-

b][1,4]디아제핀-6-온 (350 mg, 1.11 mmol), tert-부틸 2-((4-아미노-3-메톡시페녹시)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-카복실레이트 (420 mg, 1.12 mmol), Pd(OAc)₂ (56.00 mg, 249.43 μmol), BINAP (140.00 mg, 224.84 μmol) 및 Cs₂CO₃ (1.40 g, 4.30 mmol) 혼합물을 N₂로 3차례 탈기 및 퍼지 후 혼합물을 N₂ 기체 하 100° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (21 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage; 10 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 20 ~ 50% EtOAc : 석유 에터 gradient, 60 mL/분) 로 정제 후 prep-HPLC (컬럼: Unisil 3-100 C18 Ultra 150 x 50 mm x 3 um; 이동상: [H₂O (FA) -ACN]; B%: 59% - 89%, 7 분; 컬럼 Temp: 30 ° C)로 재정제하고 용출물을 동결 건조하여 황색 오일의 tert-부틸 2-((4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b])[1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시페녹시)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-카복실레이트 (240 mg, 365.43 μmol, 33.07% 수율)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 657.6

[0357] 단계 5. 2-((4-((7-아자스피로[3.5]노난-2-일)메톡시)-2-메톡시페닐)아미노)-9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-5,7,8,9-테트라히드로-6H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-6-온 (7)의 합성

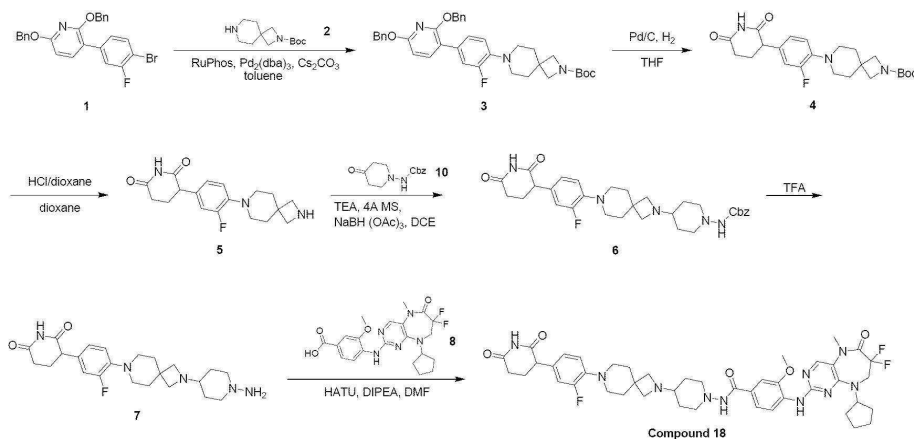
[0358] 디옥산 (3 mL) 내 tert-부틸 2-((4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b])[1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시페녹시)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-카복실레이트 (240 mg, 365.43 μmol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 12.00 mL)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (81 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 감압 농축하여 황색 오일의 2-((4-((7-아자스피로[3.5]노난-2-일)메톡시)-2-메톡시페닐)아미노)-9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-5,7,8,9-테트라히드로-6H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-6-온 (210 mg, crude, HCl 염)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 557.5

[0359] 단계 6. 3-(4-(4-((2-((4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시페녹시)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (화합물 17)의 합성

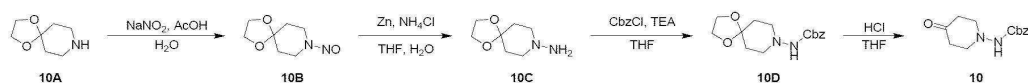
[0360] DCE (8 mL) 내 1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-카르보알데히드 (128 mg, 402.08 μmol) 용액에 2-((4-((7-아자스피로[3.5]노난-2-일)메톡시)-2-메톡시페닐)아미노)-9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-5,7,8,9-테트라히드로-6H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-6-온 (210 mg, 354.07 μmol, HCl 염) 및 NaOAc (110 mg, 1.34 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. 이후 혼합물에 0° C에서 NaBH(OAc)₃ (355 mg, 1.67 mmol)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 15시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (33 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 0° C에서 H₂O (5 mL)로 희석 후 포화 NaHCO₃ 용액으로 pH=9로 조정했고 생성된 혼합물을 EtOAc (20 mL x 3)로 추출했다. 합친 유기상을 염수 (20 mL x 3)로 세척 후 Na₂SO₄ 로 건조 및 여과하였고, 여과물을 감압 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage; 10 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0 ~ 25 % MeOH: DCM gradient, 60 mL/분)에 이어 prep-HPLC (컬럼: Unisil 3-100 C18 Ultra 150x50 mm x 3 um; 이동상: [물 (FA)-ACN]; B%: 19% - 49%, 7 분, 컬럼 Temp: 30 ° C)로 정제하고 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 3-(4-(4-((2-((4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시페녹시)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (66.3 mg, 74.10 μmol, 18.43% 수율, 96% 순도)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 859.2

[0361] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.80 (s, 1H), 8.17 (s, 0.3H), 8.14 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.71 - 7.64 (m, 1H), 7.03 - 6.90 (m, 3H), 6.60 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.50 - 6.42 (m, 1H), 4.69 - 4.43 (m, 1H), 4.00 - 3.88 (m, 4H), 3.79 (s, 3H), 3.79 - 3.75 (m, 1H), 3.36 - 3.29 (m, 5H), 2.66 - 2.60 (m, 4H), 2.34 - 2.28 (m, 2H), 2.25 - 2.10 (m, 5H), 2.02 - 1.96 (m, 1H), 1.93 - 1.73 (m, 7H), 1.66 - 1.48 (m, 13H), 1.30 - 1.19 (m, 2H).

[0362] 실시예 18. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-(7-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-일)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 18)의 합성



[0363]



[0364]

[0365]

단계 1. tert-부틸 7-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트(3)의 합성

[0366]

톨루엔 (50 mL) 내 2,6-디벤질옥시-3-(4-브로모-3-플루오로-페닐)피리딘 (1.5 g, 3.23 mmol) 및 tert-부틸 7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (804.22 mg, 3.55 mmol) 용액에 N₂ 하 20° C에서 Cs₂CO₃ (3.16 g, 9.69 mmol) 및 Pd₂(dba)₃ (147.91 mg, 161.52 μmol) 및 RuPhos (150.75 mg, 323.05 μmol)를 첨가 하고 생성된 혼합물을 100° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 모든 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (28%)가 검출되었다. 반응 혼합물을 워크업을 위해 다른 배치 (0.5 g 스케일)와 합하였다., 반응 혼합물을 여과하고 여과물을 진공 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0-15% EtOAc/석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 백색 고체의 tert-부틸 7-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (1.5 g, 1.48 mmol, 52.69% 수율, 90% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 610.3

[0367]

단계 2. tert-부틸 7-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (4)의 합성

[0368]

THF (20 mL) 내 tert-부틸 7-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (1.5 g, 2.46 mmol) 용액에 N₂ 하 Pd/C (1 g, 10% 순도)를 첨가했다. 현탁액을 H₂로 3차례 탈기 및 퍼지하였다. 혼합물을 H₂ (15 Psi) 하 20° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 남은 46%의 출발물질 및 원하는 질량의 피크가 검출되었고 이 반응 혼합물에 N₂ 하 Pd/C (1 g, 10% 순도)를 첨가 후 반응 혼합물을 H₂ (15 Psi) 하 20° C에서 24시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (67 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 THF (15 mL)로 희석 후 여과했다. 여과물을 진공 농축하여 황색 고체의 tert-부틸 7-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (917 mg, 2.13 mmol, 86.38% 수율)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 432.2

[0369]

단계 3. 3-(3-플루오로-4-(2,7-디아자스피로[3.5]노난-7-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (5)의 합성

[0370]

디옥산 (6 mL) 내 tert-부틸 7-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (917 mg, 2.13 mmol) 용액에 20° C에서 HCl/디옥산 (4 M, 12 mL)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (58 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 진공 농축하여 오프-화이트 고체의 3-(3-플루오로-4-(2,7-디아자스피로[3.5]노난-7-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (782 mg, crude, HCl)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 332.4

[0371]

단계 4. 8-니트로소-1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸 (10B)의 합성

[0372]

H₂O (300 mL) 내 1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸 (26 g, 181.59 mmol, 23.21 mL) 용액에 0° C에서 NaNO₂

(37.59 g, 544.76 mmol)를 첨가했다. 이후 0° C에서 AcOH (43.62 g, 726.34 mmol, 41.54 mL)를 한 방울씩 첨가한 후 생성된 혼합물을 20° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (98%)가 검출되었다. TLC (SiO₂, 석유 에터: EtOAc = 3:1)에서 출발물질이 완전히 소모되었고 하나의 새로운 스팟이 검출되었다. 반응 혼합물에 20° C에서 포화 NaHCO₃ (400 mL)를 첨가하여 pH=7로 조정 후 EtOAc (400 mL x 4)로 추출했다. 유기상을 NaHCO₃ (200 mL x 3)로 세척 후 Na₂SO₄ 로 건조, 여과 및 농축하여 황색 고체의 8-니트로소-1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸 (25.5 g, 148.10 mmol, 81.56% 수율)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 173.3

[0373] **단계 5. 1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸-8-아민 (10C)의 합성**

[0374] THF (200 mL) 및 H₂O (100 mL) 내 8-니트로소-1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸 (25.5 g, 148.10 mmol) 용액에 NH₄Cl (23.77 g, 444.30 mmol)를 첨가하고, 이후 0° C에서 Zn (29.05 g, 444.30 mmol)를 조금씩 첨가 후 생성된 혼합물을 20° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 THF (500 mL)로 희석 후 여과하였다. 여과물을 진공 농축하여 조 생성물을 얻었다. 조 생성물을 20° C에서 THF:EtOAc = 1:1 (200 mL x 4)로 15분 동안 분쇄 및 여과했다. 여과물을 진공 농축하여 황색 오일의 1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸-8-아민 (9.8 g, 61.95 mmol, 41.83% 수율)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 159.1

[0375] **단계 6. 벤질(1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸-8-일)카바메이트 (10D)의 합성**

[0376] THF (80 mL) 내 1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸-8-아민 (7 g, 44.25 mmol) 용액에 0° C에서 TEA (22.26 g, 220.03 mmol, 30.63 mL) 및 CbzCl (7.56 g, 44.32 mmol, 6.30 mL)를 첨가 후 혼합물을 20° C에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량이 검출되었다. 혼합물을 H₂O (100 mL)로 희석 후 EtOAc (30 mL x 3)로 추출하였고, 합친 유기상을 염수 (100 mL)로 세척 후 Na₂SO₄ 로 건조 및 여과하였다. 여과물을 감압 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (80 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 40~50% EtOAc /석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 조 생성물을 얻었다. 조 생성물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (12 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 40~50% EtOAc/석유 에터 gradient @ 70 mL/분)로 재정제하여 황색 고체의 벤질(1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸-8-일)카바메이트 (850 mg, 2.38 mmol, 5.39% 수율, 82% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 293.1

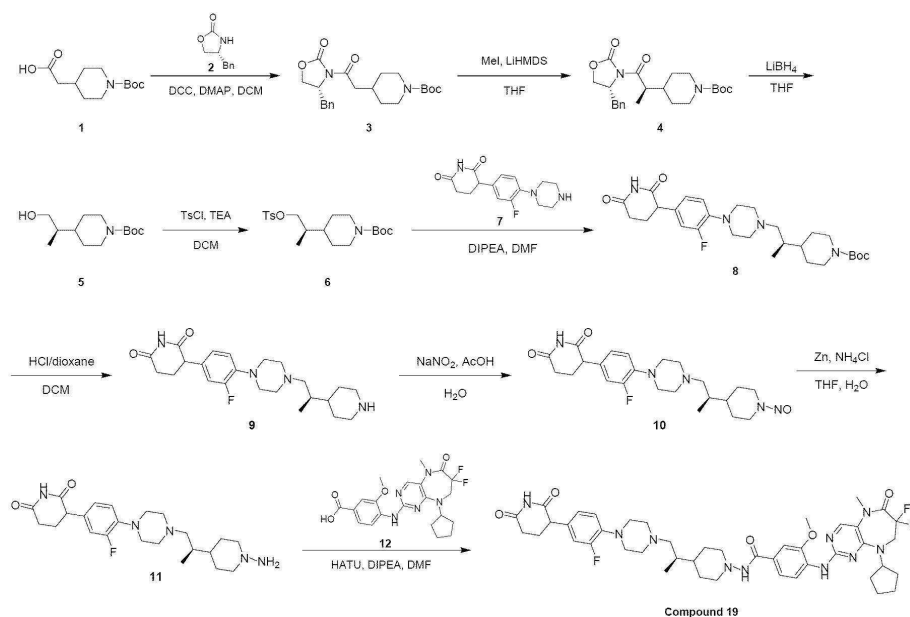
[0377] **단계 7. 벤질 N-(4-옥소-1-피페리딜) 카바메이트 (10)의 합성**

[0378] THF (20 mL) 내 벤질 N-(1,4-디옥사-8-아자스피로[4.5]데칸-8-일) 카바메이트 (930 mg, 3.18 mmol) 용액에 HCl (1 M, 12 mL)를 첨가하고 혼합물을 50° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 38%의 남은 출발물질 및 50%의 원하는 질량이 검출되었다. 혼합물을 50° C에서 1시간 동안 추가로 교반 하였다. LCMS로 18%의 남은 출발물질 및 70%의 원하는 질량이 검출되었다. 혼합물을 50° C에서 1시간 동안 교반 하였다. 혼합물을 NaHCO₃ (60 mL)로 켄칭 후 EtOAc (20 mL x 3)으로 추출하고, 합친 유기상을 물 (10 mL)로 세척 후 Na₂SO₄ 로 건조, 여과하였다. 여과물을 감압 농축하여 황색 고체의 벤질 N-(4-옥소-1-피페리딜) 카바메이트 (740 mg, crude)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 249.2

[0379] **단계 8. 벤질 (4-(7-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-일)피페리딘-1-일)카바메이트 (6)의 합성**

[0380] DCE (10 mL) 내 3-(3-플루오로-4-(2,7-디아자스피로[3.5]노난-7-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (355.58 mg, 966.66 μmol, HCl) 용액에 20° C에서 TEA (815.13 mg, 8.06 mmol, 1.12 mL), 4A MS (300 mg) 및 벤질 N-(4-옥소-1-피페리딜)카바메이트 (200 mg, 805.55 μmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 67%의 원하는 질량의 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 여과하였고, 여과물을 진공 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (10 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~100% EtOAc/석유 에터 to 0~10% 디클로로메탄/메탄올 gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 밝은 황색 고체의 벤질 (4-(7-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-일)피페리딘-1-일)카바메이트 (342 mg, 582.48 μmol, 72.31% 수율, 96% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 564.3

- [0381] 단계 9. 3-(4-(2-(1-아미노피페리딘-4-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-7-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (7)의 합성
- [0382] 20° C에서 TFA (3 mL) 내 벤질 (4-(7-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-일)피페리딘-1-일)카바메이트 (325 mg, 576.59 μmol) 혼합물을 60° C에서 3시간 동안 교반 하였다. LCMS로 26%의 남은 출발물질 및 35%의 원하는 질량 피크가 검출되었고 혼합물을 60° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 5%의 남은 출발물질 및 47%의 원하는 질량 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 진공 농축하여 황색 오일의 3-(4-(2-(1-아미노피페리딘-4-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-7-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (314 mg, crude, TFA)을 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 430.3$
- [0383] 단계 10. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-(7-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-일)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 18)의 합성
- [0384] DMF (3 mL) 내 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (100 mg, 223.50 μmol) 용액에 HATU (93.48 mg, 245.85 μmol) 및 DIPEA (57.77 mg, 446.99 μmol , 77.86 μL)를 첨가하였다. 혼합물을 20° C에서 10분 동안 교반 하고, DMF (3 mL) 내 3-(4-(2-(1-아미노피페리딘-4-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-7-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (182.22 mg, 335.24 μmol , TFA) 용액을 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (93 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 H_2O (12 mL)로 희석 후 EtOAc (12 mL x 3)로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (12 mL x 3)로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조 및 여과하여 농축했다. 잔여물을 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex Synergi Polar-RP 100*25 mm*4 μm ; 이동상: [물 (TFA) -ACN]; B%: 31%-51%, 7 분)로 정제 후 동결 건조하여 생성물 (160 mg)을 수득하였다. 생성물을 CH_3CN : $\text{H}_2\text{O} = 1:1$ (10 mL) 용액에 용해하였다. 이 혼합물에 포화 NaHCO_3 (2 mL)를 첨가하여 pH=7로 조정했다. 반응 혼합물을 DCM (10 mL x 3)으로 추출 후 Na_2SO_4 로 건조 및 여과하여 농축하여 잔여물을 얻었다. 잔여물을 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex C18 75*30 mm*3 μm ; 이동상: [H_2O (FA) -ACN]; B%: 15%-45%, 7 분)로 재정제 및 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-(7-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-일)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (68.6 mg, 73.89 μmol , 33.06% 수율, 95% 순도, 0.5FA)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 859.4$
- [0385] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) $\delta = 10.82$ (s, 1H), 9.34 (s, 1H), 8.30 - 8.20 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.47 - 7.38 (m, 2H), 7.06 - 6.90 (m, 3H), 4.82 - 4.70 (m, 1H), 4.11 - 3.98 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.79 (dd, $J = 4.7, 11.7$ Hz, 1H), 3.34 - 3.28 (m, 4H), 3.07 - 2.96 (m, 6H), 2.95 - 2.84 (m, 4H), 2.79 (t, $J = 9.1$ Hz, 2H), 2.70 - 2.58 (m, 1H), 2.25 - 2.12 (m, 2H), 2.04 - 1.88 (m, 3H), 1.86 - 1.76 (m, 4H), 1.76 - 1.65 (m, 4H), 1.65 - 1.54 (m, 4H), 1.39 - 1.26 (m, 2H).
- [0386] 실시예 19. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-((2R)-1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로판-2-일)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 19)의 합성



[0387]

[0388]

[0389]

단계 1. tert-부틸 (R)-4-(2-(4-벤질-2-옥소옥사졸리딘-3-일)-2-옥소에틸)피페리딘-1-카복실레이트 (3)의 합성

DCM (60 mL) 내 2-(1-(tert-부톡시카보닐)피페리딘-4-일)아세트산 (6 g, 24.66 mmol) 및 (R)-4-벤질옥사졸리딘-2-온 (4.4 g, 24.83 mmol) 용액에 DMAP (1.51 g, 12.33 mmol) 및 DCC (5.09 g, 24.66 mmol, 4.99 mL)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량이 검출됨을 확인하였다. 혼합물을 여과 후 여과 케이크를 MTBE (30 mL)로 세척했다. 여과물을 H₂O (50 mL x 3)로 세척 후 합친 유기상을 Na₂SO₄로 건조 및 여과했다. 여과물을 감압 농축하였다. 조 생성물을 석유 에터 (50 mL)로 희석하여 20° C에서 30분 동안 교반 하였다. 혼합물을 여과 후 여과 케이크를 석유 에터 (20 mL)로 세척했다. 여과물을 감압 농축하였다. 생성물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (120 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 50~80% EtOAc/석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 tert-부틸 (R)-4-(2-(4-벤질-2-옥소옥사졸리딘-3-일)-2-옥소에틸)피페리딘-1-카복실레이트 (10 g, 24.10 mmol, 97.73% 수율, 97% 순도)를 수득하였다. MS(M-56+H)⁺ = 347.4

[0390]

단계 2. tert-부틸 4-((R)-1-((R)-4-벤질-2-옥소옥사졸리딘-3-일)-1-옥소프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (4)의 합성

[0391]

THF (200 mL) 내 tert-부틸 (R)-4-(2-(4-벤질-2-옥소옥사졸리딘-3-일)-2-옥소에틸)피페리딘-1-카복실레이트 (10 g, 24.85 mmol) 용액에 0° C에서 LiHMDS (2 M, 25.00 mL)를 천천히 첨가하고 혼합물을 0° C에서 30분 동안 교반 하였다. 이후 -40° C에서 MeI (7.07 g, 49.80 mmol, 3.10 mL)를 첨가하고 혼합물을 -40° C에서 2시간 동안 교반하고, 이후 반응 혼합물을 20° C로 승온 후 20° C에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (52%)가 검출되었다. 혼합물을 NH₄Cl (100 mL)로 켄칭 후 EtOAc (100 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (50 mL)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조, 여과하였다. 여과물을 감압 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (120 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 20% EtOAc/석유 에터 gradient @ 50 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 tert-부틸 4-((R)-1-((R)-4-벤질-2-옥소옥사졸리딘-3-일)-1-옥소프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (5.42 g, 13.01 mmol, 52.36% 수율)를 수득하였다. MS(M-56+H)⁺ = 361.1

[0392]

단계 3. tert-부틸 (R)-4-(1-히드록시프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (5)의 합성

[0393]

THF (100 mL) 내 tert-부틸 4-((R)-1-((R)-4-벤질-2-옥소옥사졸리딘-3-일)-1-옥소프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (5.42 g, 13.01 mmol) 용액에 20° C에서 LiBH₄ (460 mg, 21.12 mmol)를 천천히 첨가하고 혼합물을 20° C에서 30시간 동안 교반 하였다. LCMS로 남아있는 미량의 출발물질이 검출되었다. 혼합물을 NH₄Cl (50 mL)로 켄칭 후 EtOAc (50 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 물 (50 mL)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조 및 여과하였다. 여과물을 감압 농축하여 황색 오일의 tert-부틸 (R)-4-(1-히드록시프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (5 g, crude)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 244.4

[0394] 단계 4. tert-부틸 (R)-4-(1-(토실옥시)프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (6)의 합성

[0395] DCM (80 mL) 내 tert-부틸 (R)-4-(1-히드록시프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (5 g, 20.55 mmol) 용액에 TEA (6.25 g, 61.79 mmol, 8.6 mL) 및 TosCl (3.92 g, 20.55 mmol)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량이 검출되었다. 혼합물을 물(50 mL)로 희석 후 EtOAc (20 mL x 2)으로 추출 하였다. 합친 유기상을 Na₂SO₄로 건조, 여과 및 진공 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 17~20% EtOAc/석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 tert-부틸 (R)-4-(1-(토실옥시)프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (2.19 g, 3.75 mmol, 18.23% 수율, 68% 순도)를 수득하였다. MS(M-100+H)⁺ = 298.3

[0396] 단계 5. tert-부틸 4-((2R)-1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (8)의 합성

[0397] DMF (8 mL) 내 3-(3-플루오로-4-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (0.5 g, 1.23 mmol, TFA 염) 및 tert-부틸 (R)-4-(1-(토실옥시)프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (1.08 g, 1.85 mmol, 68% 순도) 용액에 DIPEA (797.10 mg, 6.17 mmol, 1.07 mL) 및 NaI (18.49 mg, 123.35 μmol)를 첨가하고 혼합물을 60° C에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량이 검출되었다. 반응 혼합물을 물(20 mL)로 희석 후 EtOAc (10 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (10 mL x 3)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조, 여과하였다. 여과물을 감압 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (12 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 60% EtOAc/석유 에터 gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 백색 고체의 tert-부틸 4-((2R)-1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (330 mg, 606.80 μmol, 49.19% 수율, 95% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=517.5

[0398] SFC: 방법 상세: "컬럼: (S. S) Whelk-O₁ 50×4.6 mm I. D., 3.5μm 이동상: Phase A for CO₂, 및 Phase B for MeOH+ACN=4:1 (0.05%DEA); Gradient elution: 40% MeOH+ACN=4:1 (0.05% DEA) in CO₂ Flow rate: 3mL/분; 검출기: PDA 컬럼 온도: 35°C; Back Pressure: 100Bar ".

[0399] 단계 6. 3-(3-플루오로-4-(4-((R)-2-(피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (9)의 합성

[0400] DCM (5 mL) 내 tert-부틸 4-((2R)-1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (330 mg, 638.73 μmol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 6 mL)을 첨가하고 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. 워크업 후 LCMS로 원하는 질량의 메인 피크 (100 %)가 검출되었다. 혼합물을 감압 농축하여 백색 고체의 3-(3-플루오로-4-(4-((R)-2-(피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (290 mg, crude, HCl 염)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 417.4

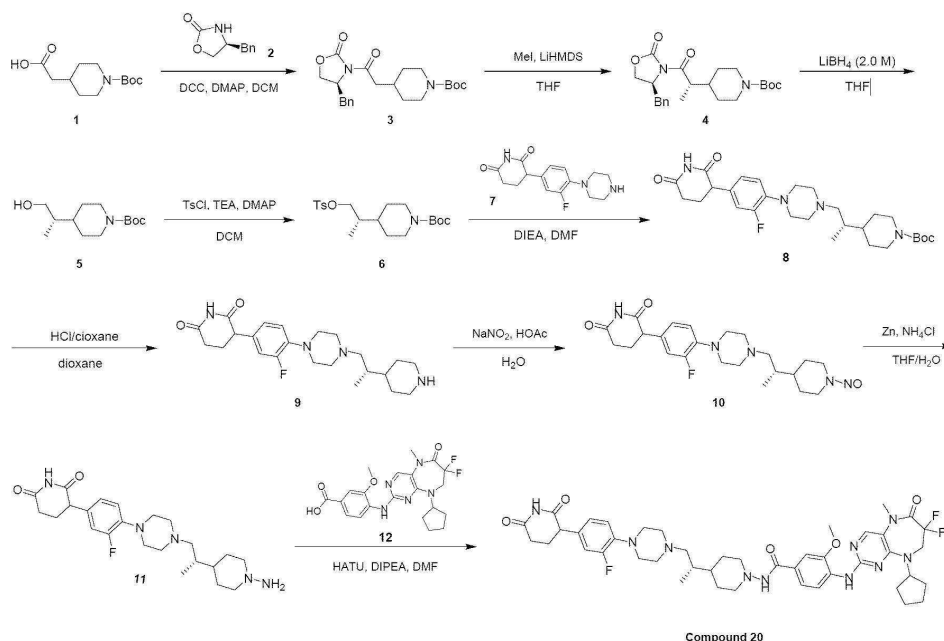
[0401] 단계 7. 3-(3-플루오로-4-(4-((R)-2-(1-니트로소피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (10)의 합성

[0402] H₂O (6 mL) 내 3-(3-플루오로-4-(4-((R)-2-(피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (290 mg, 640.19 μmol, HCl 염) 용액에 NaNO₂ (132.51 mg, 1.92 mmol)를 가하고 그리고 나서 AcOH (147.00 mg, 2.45 mmol, 140 μL)를 천천히 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (21 %) 및 70%의 남은 출발물질이 검출되었다. 추가의 NaNO₂ (132.51 mg, 1.92 mmol) 및 AcOH (147.00 mg, 2.45 mmol, 140 μL)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 다른 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 43%의 원하는 질량 및 43%의 남은 출발물질이 검출되었다. 다른 배치의 NaNO₂ (132.51 mg, 1.92 mmol)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 12시간 30분 동안 교반 하였다. LCMS로 75%의 원하는 질량 및 23%의 남은 출발물질 이 검출되었다. 혼합물을 NaHCO₃ (20 mL)로 켄칭 후 EtOAc (10 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 NaHCO₃ (10 mL) 및 물(10 mL)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조 및 여과했다. 여과물을 감압 농축하여 황색 고체의 3-(3-플루오로-4-(4-((R)-2-(1-니트로소피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (250 mg, crude)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 446.5.

[0403] 단계 8. 3-(4-(4-((R)-2-(1-아미노피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온

(11)의 합성

- [0404] THF (5 mL) 및 H₂O (2.5 mL) 내 3-(3-플루오로-4-(4-((R)-2-(1-니트로소피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (250 mg, 561.13 μ mol) 및 NH₄Cl (92 mg, 1.72 mmol) 용액에 0° C에서 Zn (111 mg, 1.70 mmol)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 4시간 동안 교반 하였다. LCMS로 17%의 남은 출발물질 및 79%의 원하는 질량이 검출되었다. 혼합물을 여과 후 여과 케이크를 THF (30 mL)로 세척했다. 여과물을 감압 농축하여 백색 고체의 3-(4-(4-((R)-2-(1-아미노피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (250 mg, crude)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 432.1.
- [0405] 단계 9. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-((2R)-1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로판-2-일)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 19)의 합성
- [0406] DMF (3 mL) 내 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (0.2 g, 446.99 μ mol) 용액에 HATU (203 mg, 533.89 μ mol) 및 DIPEA (371.00 mg, 2.87 mmol, 0.5 mL)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 15분 동안 교반 하였다. 이후 DMF (3 mL) 내 3-(4-(4-((R)-2-(1-아미노피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (250 mg, 579.31 μ mol) 용액을 첨가하고 혼합물을 20° C에서 45분 동안 교반 하였다. LCMS로 64%의 원하는 질량이 검출되었다. 반응 혼합물을 물 (15 mL)로 희석 후 EtOAc (10 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (15 mL x 2)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조 및 여과하였다. 여과물을 감압 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (12 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 8~15% MeOH/EtOAc gradient @ 80 mL/분)로 정제 후 prep-TLC (EtOAc: 디클로로메탄: 메탄올=5:5:1)로 재정제 했다. 생성물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-((2R)-1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로판-2-일)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (95.5 mg, 104.82 μ mol, 23.45% 수율, 94.5% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 861.0
- [0407] SFC 방법 상세: "컬럼: (S, S) Whelk-O₁ 100×4.6 mm I. D., 3.5 μ m 이동상: Phase A for CO₂, 및 Phase B for MeOH+ACN (0.05%DEA); Gradient elution: 60% MeOH+ACN (0.05% DEA) in CO₂ Flow rate: 3mL/분; 검출기: PDA 컬럼 온도: 35°C; Back Pressure: 100Bar ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.81 (s, 1H), 9.26 (s, 1H), 8.29 - 8.24 (m, 2H), 7.95 (s, 1H), 7.45 - 7.38 (m, 2H), 7.06 - 6.93 (m, 3H), 4.81 - 4.71 (m, 1H), 4.04 (br t, *J* = 14.1 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.80 (dd, *J* = 4.9, 12.0 Hz, 1H), 3.30 (s, 3H), 3.07 - 2.96 (m, 5H), 2.81 - 2.71 (m, 2H), 2.64 - 2.59 (m, 1H), 2.56 - 2.52 (m, 6H), 2.31 - 2.08 (m, 3H), 2.03 - 1.89 (m, 3H), 1.75 - 1.54 (m, 9H), 1.50 - 1.29 (m, 3H), 0.86 (br d, *J* = 6.6 Hz, 3H).
- [0408] 실시예 20. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-((2S)-1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로판-2-일)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 20)의 합성



[0409]

[0410] 단계 1. tert-부틸 (S)-4-(2-(4-벤질-2-옥소옥사졸리딘-3-일)-2-옥소에틸)피페리딘-1-카복실레이트 (3)의 합성

[0411] DCM (40 mL) 내 2-(1-(tert-부톡시카보닐)피페리딘-4-일)아세트산 (4 g, 16.44 mmol) 용액에 DCC (3.73 g, 18.08 mmol, 3.66 mL) 및 DMAP (1.00 g, 8.22 mmol)을 첨가하고 30분 동안 교반한 후 (S)-4-벤질옥사졸리딘-2-온(3.20g, 18.08mmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 25° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (~57 %)가 검출되었다. 혼합물을 여과하여 고체를 제거했다. 여과물을 물(100 mL)로 희석 후 DCM (50 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (50 mL)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조, 여과 및 감압 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (ISCO; 40 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~40% 석유 에터: EtOAc gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 tert-부틸 (S)-4-(2-(4-벤질-2-옥소옥사졸리딘-3-일)-2-옥소에틸)피페리딘-1-카복실레이트 (7 g, 13.22 mmol, 80.40% 수율, 76% 순도)를 수득하였다. MS(M-56+H)⁺ = 347.1.

[0412] 단계 2. tert-부틸 4-((S)-1-((S)-4-벤질-2-옥소옥사졸리딘-3-일)-1-옥소프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (4)의 합성

[0413] THF (30 mL) 내 tert-부틸 (S)-4-(2-(4-벤질-2-옥소옥사졸리딘-3-일)-2-옥소에틸)피페리딘-1-카복실레이트 (7 g, 17.39 mmol) 용액에 0° C에서 LiHMDS (1 M, 26.09 mL)를 첨가하고 30분 동안 교반한 후 -40° C에서 MeI (4.94 g, 34.78 mmol, 2.17 mL)를 첨가하고 생성된 혼합물을 25° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (57 %)가 검출되었다. 혼합물을 NH₄Cl (50 mL)로 켄칭 후 EtOAc (30 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (50 mL)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조 및 여과하였다. 여과물을 감압 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (ISCO; 80 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~40% 석유 에터: EtOAc gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 tert-부틸 4-((S)-1-((S)-4-벤질-2-옥소옥사졸리딘-3-일)-1-옥소프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (3.3 g, 7.46 mmol, 42.91% 수율, 94.2% 순도)를 수득하였다. MS(M-56+H)⁺ = 361.2

[0414] 단계 3. tert-부틸 (S)-4-(1-히드록시프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (5)의 합성

[0415] THF (20 mL) 내 tert-부틸 4-((S)-1-((S)-4-벤질-2-옥소옥사졸리딘-3-일)-1-옥소프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (3.3 g, 7.92 mmol) 용액에 0° C에서 LiBH₄ (2 M, 5.94 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 25° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였다. 혼합물을 NH₄Cl (50 mL)로 켄칭 후 EtOAc (50 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (50 mL)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조 및 여과하였다. 여과물을 감압 농축하여 황색 오일의 tert-부틸 (S)-4-(1-히드록시프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (2.7 g, crude)

를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 244.4$

[0416] 단계 4. tert-부틸 (S)-4-(1-(토실옥시)프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (6)의 합성

[0417] DCM (20 mL) 내 tert-부틸 (S)-4-(1-히드록시프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (2.7 g, 11.10 mmol) 용액에 TosCl (2.12 g, 11.10 mmol), DMAP (271.10 mg, 2.22 mmol) 및 TEA (2.25 g, 22.19 mmol, 3.09 mL)를 첨가하였다. 혼합물을 25° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (15 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 물 (50 mL)로 희석 후 DCM (50 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 포화 염수 (50 mL)로 세척 후 무수 소듐 설페이트 로 건조, 여과 및 감압 농축했다. 잔여물을 실리카 겔 크로마토그래피 (SiO₂, 1000 mesh, 석유 에터: EtOAc = 1:0 이후 20:1)로 정제하여 황색 오일의 tert-부틸 (S)-4-(1-(토실옥시)프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (1.8 g, 4.53 mmol, 40.81% 수율)를 수득하였다. $MS (M-56+H)^+ = 342.0$.

[0418] 단계 5. tert-부틸 4-((2S)-1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (8)의 합성

[0419] DMF (10 mL) 내 tert-부틸 (S)-4-(1-(토실옥시)프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (1.8 g, 4.53 mmol) 용액에 DIEA (877.82 mg, 6.79 mmol, 1.18 mL) 및 3-(3-플루오로-4-(피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (1.06 g, 3.62 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 50° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (10%)가 검출되었다. 반응 혼합물을 물 (50 mL)로 희석 후 EtOAc (50 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (50 mL)로 세척 후 무수 소듐 설페이트로 건조, 여과 및 감압 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (ISCO; 40 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0-30% 석유 에터/ EtOAc: EtOH (v: v = 3: 1) gradient @ 60mL/분)로 정제하여 황색 고체의 tert-부틸 4-((2S)-1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (1.2 g, 2.32 mmol, 51.30% 수율)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 517.5$

[0420] 단계 6. 3-(3-플루오로-4-(4-((S)-2-(피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (9)의 합성

[0421] 디옥산 (5 mL) 내 tert-부틸 4-((2S)-1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로판-2-일)피페리딘-1-카복실레이트 (1.2 g, 2.32 mmol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 10 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (40 %)가 검출되었다. 혼합물을 감압 농축하여 황색 오일의 3-(3-플루오로-4-(4-((S)-2-(피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (1 g, crude, HCl 염)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 417.2$

[0422] 단계 7. 3-(3-플루오로-4-(4-((S)-2-(1-니트로소피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (10)의 합성

[0423] H₂O (15 mL) 내 3-(3-플루오로-4-(4-((S)-2-(피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (0.8 g, 1.77 mmol, HCl 염) 용액에 NaNO₂ (609.24 mg, 8.83 mmol)를 첨가하였다. 그리고 나서 0° C에서 혼합물에 HOAc (530.27 mg, 8.83 mmol, 505.02 μ L)를 한 방울씩 첨가하였다. 혼합물을 20° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 메인 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 포화 소듐 바이카보네이트 (50 mL)로 쉐킹 후 EtOAc (50 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (50 mL)으로 세척 후 무수 소듐 설페이트로 건조, 여과 및 감압농축하여 황색 오일의 3-(3-플루오로-4-(4-((S)-2-(1-니트로소피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (0.3 g, crude)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 446.2$.

[0424] 단계 8. 3-(4-(4-((S)-2-(1-아미노피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (11)의 합성

[0425] THF (10 mL) 내 3-(3-플루오로-4-(4-((S)-2-(1-니트로소피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (0.3 g, 673.36 μ mol) 용액에 0° C에서 Zn (220.15 mg, 3.37 mmol)를 첨가했다. 이후 0° C에서 H₂O (5 mL) 내 NH₄Cl (108.05 mg, 2.02 mmol) 용액을 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 20° C에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (60 %)가 검출되었다. 혼합물을 여과하여 고체를 제거했다. 여과 케이크를 THF (30 mL)로 세척하였다. 여과물을 감압 농축하여 황색 고체의 3-(4-(4-((S)-2-(1-아미노피페리딘-4-일)프로

필)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (240 mg, crude)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 432.2$.

[0426]

단계 9. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-((2S)-1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로판-2-일)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 20)의 합성

[0427]

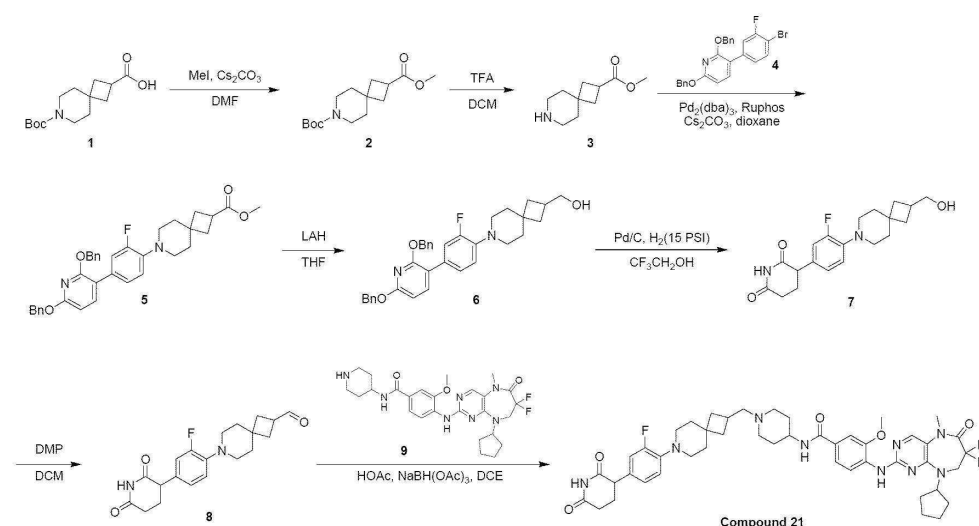
DMF (2 mL) 내 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (150 mg, 335.24 μ mol) 용액에 HATU (152.96 mg, 402.29 μ mol) 및 DIEA (216.64 mg, 1.68 mmol, 291.97 μ L)를 첨가하고, 혼합물을 30분 동안 교반 하고, 이후 DMF (2 mL) 내 3-(4-(4-((S)-2-(1-아미노피페리딘-4-일)프로필)피페라진-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (144.67 mg, 335.24 μ mol) 용액을 혼합물에 첨가 하고 생성된 혼합물을 20° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (36%)가 검출되었다. 반응 혼합물을 물(20 mL)로 희석 후 EtOAc (30 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (50 mL)로 세척 후 무수 소듐 설페이트로 건조, 여과 및 감압 농축했다. 잔여 물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (ISCO; 20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~60% 석유 에 터: EtOAc/EtOH(v/v=2/1) gradient @ 60 mL/분) 및 prep-HPLC (컬럼: Welch Ultimate C18 150 x 25 mm x 5 μ m; 이동상: [H₂O (FA)-ACN]; B%: 15% - 45%, 10 분)로 정제 후 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-((2S)-1-(4-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페라진-1-일)프로판-2-일)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (13.1 mg, 14.79 μ mol, 4.35% 수율, 96.3% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 861.4$.

[0428]

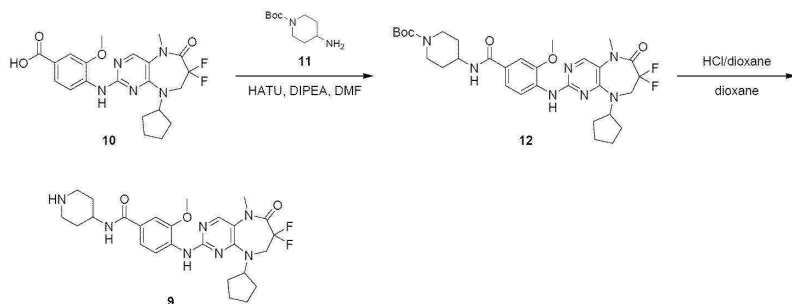
¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.81 (s, 1H), 9.25 (s, 1H), 8.41 - 8.17 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.47 - 7.36 (m, 2H), 7.08 - 6.82 (m, 3H), 4.84 - 4.67 (m, 1H), 4.12 - 3.97 (m, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.80 (dd, *J* = 4.8, 11.8 Hz, 1H), 3.32 (s, 3H), 3.06 - 2.93 (m, 6H), 2.81 - 2.61 (m, 8H), 2.28 - 2.08 (m, 3H), 2.05 - 1.88 (m, 3H), 1.80 - 1.54 (m, 9H), 1.51 - 1.27 (m, 3H), 0.86 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H).

[0429]

실시예 21. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-((7-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)메틸)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 21)의 합성



[0430]



[0431]

[0432]

단계 1. 7-(tert-부틸) 2-메틸 7-아자스피로[3.5]노난-2,7-디카복실레이트 (2)의 합성

[0433]

DMF (20 mL) 내 7-(tert-부톡시카보닐)-7-아자스피로[3.5]노난-2-카복실산 (3 g, 11.14 mmol) 용액에 MeI (2.37 g, 16.71 mmol, 1.04 mL) 및 Cs₂CO₃ (5.44 g, 16.71 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 25 ° C 에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 주 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 물 (50 mL)로 희석하고 EtOAc (50 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 포화 염수 (50 mL)로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하여 황색 오일의 7-(tert-부틸) 2-메틸 7-아자스피로[3.5]노난-2,7-디카복실레이트 (5.1 g, crude)를 수득하였다. MS(M-56+H)⁺=228.1.

[0434]

단계 2. 메틸 7-아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (3)의 합성

[0435]

DCM (20 mL) 내 7-(tert-부틸) 2-메틸 7-아자스피로[3.5]노난-2,7-디카복실레이트 (4.6 g, 16.23 mmol) 용액에 TFA (7.70 g, 67.53 mmol, 5 mL)를 0 ° C 에서 첨가하였다. 혼합물을 20 ° C 에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 7-(tert-부틸) 2-메틸 7-아자스피로[3.5]노난-2,7-디카복실레이트가 남아 있음을 확인하였다. TFA (7.70 g, 67.53 mmol, 5 mL)를 추가로 첨가하고 생성된 혼합물을 20 ° C 에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 주 피크를 확인하였다. 혼합물을 감압 농축하여 황색 오일의 메틸 7-아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (5 g, crude, TFA 염)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=184.1.

[0436]

[0437]

단계 3. 메틸 7-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-7-아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (5)의 합성

[0438]

디옥산 (20 mL) 내 메틸 7-아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (3 g, 10.09 mmol, TFA 염) 용액에 2,6-비스(벤질옥시)-3-(4-브로모-3-플루오로페닐)피리딘 (3.75 g, 8.07 mmol), Cs₂CO₃ (9.86 g, 30.28 mmol), Pd₂(dba)₃ (462.06 mg, 504.59 μmol) 및 RuPhos (470.92 mg, 1.01 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 100 ° C 에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (~16 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 여과하여 고체를 제거하였다. 여과물을 물 (100 mL)로 희석하고 EtOAc (60 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (100 mL)로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (ISCO; 120 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~10% 석유 에터: EtOAc gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 메틸 7-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐) -7-아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (1 g, 1.45 mmol, 14.34% 수율, 82% 순도)를 수득하였다. MS (M+H)⁺=567.3.

[0439]

단계 4. (7-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐) -7-아자스피로[3.5]노난-2-일)메탄올 (6)의 합성

[0440]

THF (5 mL) 내 LiAlH₄ (133.96 mg, 3.53 mmol) 현탁액에 THF (5 mL) 내 메틸 7-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-7-아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (1 g, 1.76 mmol) 용액을 한 방울씩 첨가하였다. 혼합물을 20 ° C N₂ 하에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 주 피크 (100%)를 확인하였다. 반응 혼합물을 H₂O (0.15 mL), NaOH (15% aq, 0.15 mL) 및 H₂O (0.4 mL)로 킬링하였다. 반응 혼합물을 Na₂SO₄로 건조하고 여과하였다. 여과물을 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (ISCO; 20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~30 % 석유 에터: EtOAc gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 (7-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)메탄올 (0.7 g,

1.22 mmol, 69.37% 수율, 94.2% 순도)을 수득하였다. MS(M+H)⁺=539.6.

[0441]

단계 5. 3-(3-플루오로-4-(2-(히드록시메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (7)의 합성

[0442]

CF₃CH₂OH (10 mL) 내 (7-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)메탄올 (0.6 g, 1.11 mmol) 용액에 CF₃CH₂OH (10 mL) 내 Pd/C (0.2 g, 556.95 μmol, 10% 순도) 용액을 N₂ 기체 하에서 첨가하였다. 혼합물을 탈기하고 H₂로 수차례 퍼징하고, 현탁액을 20 ° C H₂ 기체 (15 Psi) 하에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 주 피크를 확인하였다. 혼합물을 여과하여 촉매를 제거하였다. 여과물을 감압 농축하여 회색 고체의 3-(3-플루오로-4-(2-(히드록시메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (380 mg, 992.12 μmol, 89.07% 수율, 94.1% 순도)을 수득하였다. MS(M+H)⁺=361.4.

[0444]

단계 6. 7-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-7-아자스피로[3.5]노난-2-카브알데히드 (8)의 합성

[0445]

DCM (10 mL) 내 3-(3-플루오로-4-(2-(히드록시메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (150 mg, 416.18 μmol) 용액에 DMP (211.82 mg, 499.42 μmol, 154.62 μL)를 첨가하였다. 혼합물을 25 ° C 에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 주 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 물 (10 mL)로 희석하고 DCM (10 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (50 mL)로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하여 황색 오일의 7-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-7-아자스피로[3.5]노난-2-카브알데히드 (0.2 g, crude)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=359.0.

[0447]

단계 7. tert-부틸 4-(4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미도)피페리딘-1-카복실레이트 (12)의 합성

[0448]

DMF (5 mL) 내 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (0.5 g, 1.12 mmol) 용액에 HATU (509.88 mg, 1.34 mmol) 및 DIPEA (288.85 mg, 2.23 mmol, 389.29 μL)를 첨가하고, 혼합물을 30분간 교반 하고, tert-부틸 4-아미노피페리딘-1-카복실레이트 (235.00 mg, 1.17 mmol)를 첨가하고, 생성된 혼합물을 25 ° C 에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (~62 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 물 (20 mL)로 희석하고, EtOAc (30 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (50 mL)로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (ISCO; 40 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0-80% 석유 에터 : EtOAc gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 황색 고체의 tert-부틸 4-(4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미도)피페리딘-1-카복실레이트 (0.64 g, 990.95 μmol, 88.68% 수율, 97.5% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=630.3.

[0450]

단계 8. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시-N-(피페리딘-4-일)벤즈아미드 (9)의 합성

[0451]

디옥산 (5 mL) 내 tert-부틸 4-(4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미도)피페리딘-1-카복실레이트 (0.64 g, 1.02 mmol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 10 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 20 ° C 에서 2시간 동안 교반 하였다. TLC (석유 에터: EtOAc = 10:1)로 새로운 스팟 형성을 확인하였다. 혼합물을 감압 농축하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시-N-(피페리딘-4-일)벤즈아미드 (0.8 g, crude, HCl 염)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=530.3.

[0452]

단계 9. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-((7-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)메

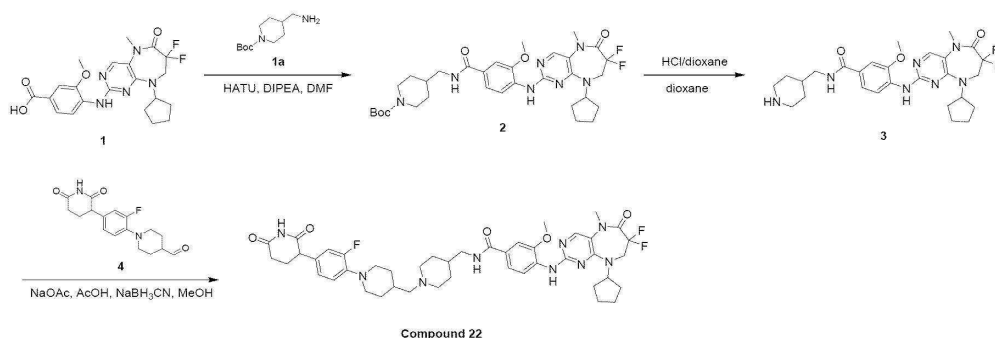
[0453]

틸)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 21)의 합성

[0454] DCE (10 mL) 내 7-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-7-아자스피로[3.5]노난-2-카르보알데히드 (0.2 g, 558.03 μmol) 용액에 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시-N-(피페리딘-4-일)벤즈아미드 (252.69 mg, 446.42 μmol , HCl 염) 및 HOAc (100.53 mg, 1.67 mmol, 95.74 μL)를 첨가하고, 혼합물을 20 ° C 에서 30분간 교반 하고, 그리고 나서 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (354.81 mg, 1.67 mmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20 ° C 에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (~24 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 포화 소듐 바이카보네이트 (50 mL)로 희석하고 DCM (30 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (50 mL)로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하였다. 잔여물을 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex luna C18 150 x 25 mm x 10 μm ; 이동상: [물 (FA) - ACN]; B%: 15% - 45%, 8 분)로 여과하고, 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-((7-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)메틸)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (29.9 mg, 31.16 μmol , 5.58% 수율, 91.6% 순도)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 872.3$.

[0455] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 10.80 (s, 1H), 8.30 - 8.21 (m, 2H), 8.09 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.53 - 7.45 (m, 2H), 7.04 - 6.89 (m, 3H), 4.81 - 4.72 (m, 1H), 4.05 (t, J = 14.1 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.80 - 3.76 (m, 2H), 3.30 - 3.27 (m, 3H), 2.95 - 2.91 (m, 2H), 2.88 - 2.80 (m, 4H), 2.68 - 2.59 (m, 3H), 2.48 - 2.33 (m, 4H), 2.22 - 2.13 (m, 1H), 2.03 - 1.91 (m, 7H), 1.80 - 1.69 (m, 6H), 1.64 - 1.56 (m, 6H), 1.50 - 1.38 (m, 2H).

[0456] 실시예 22. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-((1-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)피페리딘-4-일)메틸)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 22)의 합성



[0457]

[0458] 단계 1. tert-부틸 4-((4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미도)메틸)피페리딘-1-카복실레이트 (2)의 합성

[0459] DMF (5 mL) 내 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (0.3 g, 670.49 μmol) 용액에 HATU (305.93 mg, 804.59 μmol) 및 DIPEA (259.96 mg, 2.01 mmol, 350.35 μL)를 첨가하였다. 혼합물을 25 ° C 에서 10분간 교반 하였다. 혼합물에 tert-부틸 4-(아미노메틸)피페리딘-1-카복실레이트 (143.69 mg, 670.49 μmol)를 첨가하였다. 혼합물을 25 ° C 에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 주 피크를 확인하였다. 혼합물을 물 (30 mL)에 붓고 EtOAc (15 mL x 4)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (15 mL x 3)로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하고 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (4 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~100% EtOAc/석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 갈색 고체의 tert-부틸 4-((4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미도)메틸)피페리딘-1-카복실레이트 (0.6 g, crude)를 수득하였고, 이를 다음 단계에 바로 사용하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 644.4$

[0460] 단계 2. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시-N-(피페리딘-4-일메틸)벤즈아미드 (3)의 합성

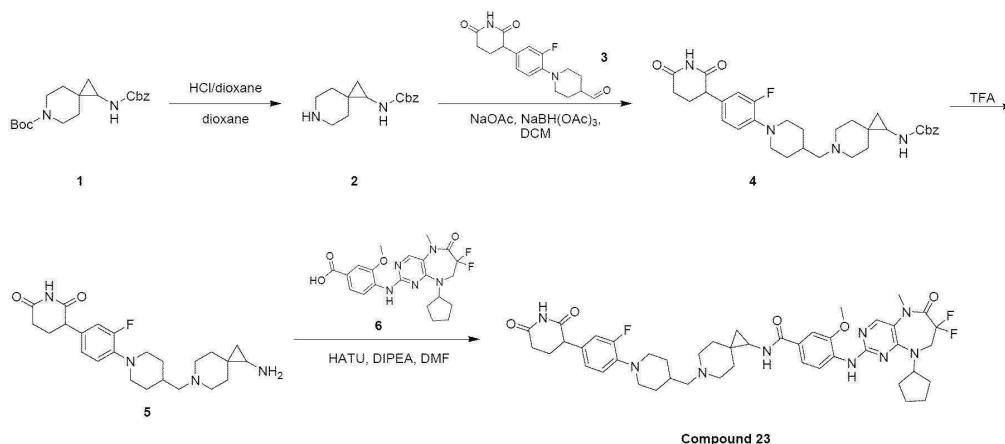
[0461] 디옥산 (2 mL) 내 tert-부틸 4-((4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미도)메틸)피페리딘-1-카복실레이트 (0.6 g, crude) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 15 mL)을 25 ° C 에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 25 ° C 에서 30분간 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 주 피크를 확인하였다. 혼합물을 감압 농축하여 갈색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시-N-(피페리딘-4-일메틸)벤즈아미드 (0.5 g, crude)를 수득하였고, 이를 다음 단계에 바로 사용하였다. $MS(M+H)^+ = 544.3$

[0462] 단계 3. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-((1-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)피페리딘-4-일)메틸)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 22)의 합성

[0463] MeOH (2 mL) 내 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시-N-(피페리딘-4-일메틸)벤즈아미드 (160 mg, 275.83 μ mol, HCl) 및 NaOAc (22.63 mg, 275.83 μ mol) 혼합물을 25 ° C 에서 20분간 교반 하였다. 상기 혼합물에 1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-카르발데히드 (131.71 mg, 413.74 μ mol) 및 AcOH (16.56 mg, 275.83 μ mol, 15.77 μ L)를 25 ° C 에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 25 ° C 에서 30분간 교반 하였다. 반응 혼합물에 $NaBH_3CN$ (52.00 mg, 827.49 μ mol)를 25 ° C 에서 첨가하고, 혼합물을 25 ° C 에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 주 피크를 확인하였다. 반응 용액을 농축하여 유기 용매를 제거하였다. 조 생성물을 EtOAc (30 mL)에 용해시키고 포화 $NaHCO_3$ (10 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하고 감압 농축하여 잔여물을 얻었다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (4 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~100% EtOAc/석유 에터 gradient @ 100 mL/분; Eluent of 0~50% MeOH / EtOAc @ 100 mL/분)로 정제하고 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150x25 mmx 5 μ m; 이동상: [물 (NH_4HCO_3)-ACN]; B%: 45%-75%, 8 분)로 재정제하고 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-((1-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)피페리딘-4-일)메틸)-3-메톡시벤즈아미드 (27.5 mg, 31.21 μ mol, 11.31% 수율, 96% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 846.5$

[0464] ^1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 10.81 (s, 1H), 8.38 (t, J = 4.9 Hz, 1H), 8.32 - 8.19 (m, 2H), 7.97 (s, 1H), 7.60 - 7.44 (m, 2H), 7.08 - 6.87 (m, 3H), 4.89 - 4.67 (m, 1H), 4.14 - 3.98 (m, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.85 - 3.72 (m, 1H), 3.32 (s, 3H), 3.31 - 3.25 (m, 2H), 3.18 - 3.15 (m, 2H), 2.91 - 2.79 (m, 2H), 2.72 - 2.57 (m, 4H), 2.26 - 2.11 (m, 3H), 2.04 - 1.89 (m, 3H), 1.88 - 1.44 (m, 14H), 1.34 - 1.10 (m, 4H).

[0465] 실시예 23. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(6-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-6-아자스피로[2.5]옥탄-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 23)의 합성



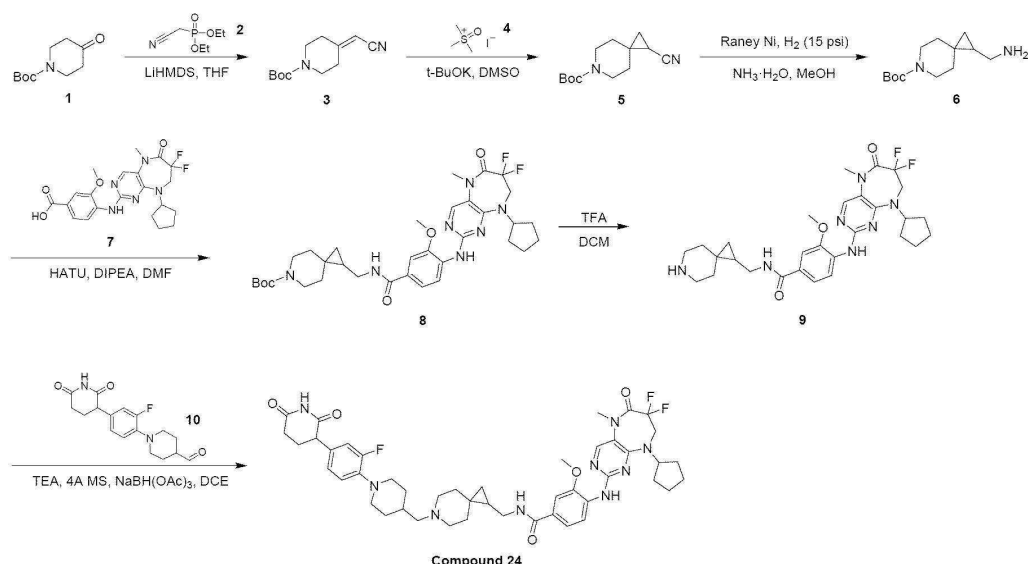
[0466] 단계 1. 벤질 (6-아자스피로[2.5]옥탄-1-일)카바메이트 (2)의 합성

[0467]

- [0468] 디옥산 (1 mL) 내 tert-부틸 1-(((벤질옥시)카보닐)아미노)-6-아자스피로[2.5]옥탄-6-카복실레이트 (200 mg, 554.87 μmol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 1 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 20 ° C 에서 1시간 동안 교반 하였다. LC-MS로 tert-부틸 1-(((벤질옥시)카보닐)아미노)-6-아자스피로[2.5]옥탄-6-카복실레이트가 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 하나의 피크 (89 %)가 검출되었음을 확인하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하여 용매를 제거하고 황색 고체의 벤질 (6-아자스피로[2.5]옥탄-1-일)카바메이트 (164 mg, 552.58 μmol , 99.59% 수율, HCl)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 261.1$
- [0469] **단계 2. 벤질 (6-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-6-아자스피로[2.5]옥탄-1-일)카바메이트 (4)의 합성**
- [0470] DCM (3 mL) 내 벤질 (6-아자스피로[2.5]옥탄-1-일)카바메이트 (164 mg, 552.58 μmol , HCl) 및 1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-카르보알데히드 (175.91 mg, 552.58 μmol) 용액에 NaOAc (90.66 mg, 1.11 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 20 ° C 에서 1시간 동안 교반한 후, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (585.57 mg, 2.76 mmol)를 첨가하고 혼합물을 추가로 16시간 동안 교반 하였다. LC-MS로 1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-카르보알데히드가 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 하나의 피크 (34 %)가 검출되었음을 확인하였다. 반응 혼합물을 물 (20 mL)로 25 ° C 에서 켄칭하고, EtOAc (50 mL $\times$ 2)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (30 mL)로 세척하고 Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하고 감압 농축하여 잔여물을 얻었다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (ISCO; 12 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~100% EtOAc/석유 에터 gradient @ 50 mL/분)로 정제하여 백색 고체의 벤질 (6-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-6-아자스피로[2.5]옥탄-1-일)카바메이트 (125 mg, 199.94 μmol , 36.18% 수율, 90% 순도)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 563.3$
- [0471] **단계 3. 3-(4-(4-((1-아미노-6-아자스피로[2.5]옥탄-6-일)메틸)피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (5)의 합성**
- [0472] TFA (3 mL) 내 벤질 (6-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-6-아자스피로[2.5]옥탄-1-일)카바메이트 (105 mg, 186.61 μmol) 혼합물을 60 ° C 에서 5시간 동안 교반 하였다. LCMS로 벤질 (6-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-6-아자스피로[2.5]옥탄-1-일)카바메이트가 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 하나의 피크 (60 %)가 검출되었음을 확인하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하여 용매를 제거하고 황색 고체의 3-(4-(4-((1-아미노-6-아자스피로[2.5]옥탄-6-일)메틸)피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (100 mg, crude, TFA)을 수득하였고, 이를 추가 정제없이 다음 단계에 사용하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 429.2$
- [0473] **단계 4. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(6-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-6-아자스피로[2.5]옥탄-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 23)의 합성**
- [0474] DMF (3 mL) 내 3-(4-(4-((1-아미노-6-아자스피로[2.5]옥탄-6-일)메틸)피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (100 mg, 184.31 μmol , TFA), 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (82.47 mg, 184.31 μmol), DIPEA (119.10 mg, 921.55 μmol , 160.52 μL), HATU (105.12 mg, 276.46 μmol) 혼합물을 20 ° C 에서 16시간 동안 교반 하였다. LC-MS로 3-(4-(4-((1-아미노-6-아자스피로[2.5]옥탄-6-일)메틸)피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 하나의 피크 (63%)가 검출되었음을 확인하였다. 반응 혼합물을 수용성 포화 NaHCO_3 (20 mL)로 0 ° C 에서 켄칭하고, 그리고 나서 EtOAc (40 mL $\times$ 2)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (30 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하고 감압 농축하여 잔여물을 얻었다. 잔여물을 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex Synergi Polar-RP 100*25 mm*4 μm ; 이동상: [water (TFA) -ACN]; B%: 33%-53%, 7분)로 정제한 후, prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150*25mm* 5 μm ; 이동상: [water (NH_4HCO_3) -ACN]; B%: 47%-77%, 8 분)로 재정제하고 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(6-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-6-아자스피로[2.5]옥탄-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (18.2 mg, 20.79 μmol , 11.28% 수율, 98% 순도)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 858.3$.

[0475] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 10.80 (s, 1H), 8.29 – 8.22 (m, 2H), 8.18 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.53 – 7.43 (m, 2H), 7.03 – 6.90 (m, 3H), 4.77 – 4.73 (m, 1H), 4.04 (t, J = 13.9 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.80 – 3.76 (m, 1H), 3.30 – 3.28 (m, 6H), 2.73 – 2.58 (m, 5H), 2.45 – 2.43 (m, 2H), 2.37 – 2.36 (m, 1H), 2.30 – 2.25 (m, 1H), 2.17 – 2.14 (m, 2H), 2.02 – 1.90 (m, 3H), 1.83 – 1.68 (m, 4H), 1.65 – 1.54 (m, 5H), 1.50 – 1.33 (m, 4H), 1.29 – 1.19 (m, 2H), 0.74 – 0.63 (m, 2H).

[0476] 실시예 24. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-((6-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-6-아자스피로[2.5]옥탄-1-일)메틸)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 24)의 합성



[0477]

[0478] 단계 1. tert-부틸 4-(시아노메틸렌)피페리딘-1-카복실레이트 (3)의 합성

[0479] THF (15 mL) 내 디에틸 (시아노메틸)포스포네이트 (933.49 mg, 5.27 mmol, 848.63 μL) 용액에 LiHMDS (1 M, 5.52 mL)를 -70°C 에서 N_2 하 한 방울씩 첨가하였다. 30분 후 tert-부틸 4-옥소피페리딘-1-카복실레이트 (1 g, 5.02 mmol)를 혼합물에 -70°C 에서 첨가하였다. 혼합물을 -70°C 에서 N_2 하에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 ~ 85%의 원하는 질량을 확인하였다. 반응 혼합물을 포화 암모늄 클로라이드 용액 (50 mL)으로 채팅하고 EtOAc (50 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 포화 염수 (50 mL)로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하여 잔여물을 얻었다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (ISCO®; 40 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0-25% 석유 에터 : EtOAc gradient@80 mL/분)로 정제하여 백색 고체의 tert-부틸 4-(시아노메틸렌)피페리딘-1-카복실레이트 (0.8 g, 3.60 mmol, 71.71% 수율)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}-\text{t-Bu}+\text{H})^+=167.1$.

[0480] 단계 2. tert-부틸 1-시아노-6-아자스피로[2.5]옥탄-6-카복실레이트 (5)의 합성

[0481] DMSO (4 mL) 내 t-BuOK (222.12 mg, 1.98 mmol) 용액에 트리메틸설폭소늄 아이오다이드 (435.62 mg, 1.98 mmol)를 20°C 에서 천천히 첨가하였다. 1.5시간 후 DMSO (4 mL) 내 tert-부틸 4-(시아노메틸렌)피페리딘-1-카복실레이트 (0.4 g, 1.80 mmol) 용액을 혼합물에 0°C 에서 첨가하였다. 혼합물을 50°C 에서 N_2 하 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 tert-부틸 4-(시아노메틸렌)피페리딘-1-카복실레이트가 완전히 소모되었음을 확인하였다. 반응 혼합물을 포화 암모늄 클로라이드 용액 (50 mL)으로 채팅하고 EtOAc (50 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (50 mL)로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하여 황색 오일의 tert-부틸 1-시아노-6-아자스피로[2.5]옥탄-6-카복실레이트 (0.56 g, crude)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=237.3$.

[0482] 단계 3. tert-부틸 1-(아미노메틸)-6-아자스피로[2.5]옥탄-6-카복실레이트 (6)의 합성

[0483] MeOH (20 mL) 및 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2 mL) 내 tert-부틸 1-시아노-6-아자스피로[2.5]옥탄-6-카복실레이트 (0.56 g, 2.37 mmol) 용액에 Raney-Ni (101.52 mg, 1.18 mmol)를 N_2 하에서 첨가하였다. 혼합물을 25°C H_2 (15 Psi) 하

에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 ~ 67%의 원하는 질량을 확인하였다. 혼합물을 여과하여 촉매를 제거하였다. 여과물을 감압 농축하여 잔여물을 얻었다. 잔여물을 물(60 mL)로 희석하고 EtOAc (50 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (50 mL)로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하여 황색 오일의 tert-부틸 1-((4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미도)메틸)-6-아자스피로[2.5]옥탄-6-카복실레이트 (0.4 g, crude)를 수득하였다. MS(M-t-Bu+H)⁺=185.1.

[0484] 단계 4. tert-부틸 1-((4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미도)메틸)-6-아자스피로[2.5]옥탄-6-카복실레이트 (8)의 합성

[0485] DMF (5 mL) 내 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (595.73 mg, 1.33 mmol) 용액에 HATU (949.23 mg, 2.50 mmol) 및 DIEA (430.20 mg, 3.33 mmol, 579.78 μ L)를 첨가하였다. 30분 후, 혼합물에 tert-부틸 1-((4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미도)메틸)-6-아자스피로[2.5]옥탄-6-카복실레이트 (0.4 g, 1.66 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 25 ° C 에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 ~ 36%의 원하는 질량을 확인하였다. 반응 혼합물을 물 (50 mL)로 희석하고 EtOAc (50 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (50 mL)로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하여 잔여물을 얻었다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (ISCO; 20 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~70% 석유 에터 : EtOAc gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 tert-부틸 1-((4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미도)메틸)-6-아자스피로[2.5]옥탄-6-카복실레이트 (0.83 g, 1.14 mmol, 68.73% 수율, 92.3% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=670.3.

[0486] 단계 5. N-((6-아자스피로[2.5]옥탄-1-일)메틸)-4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미드 (9)의 합성

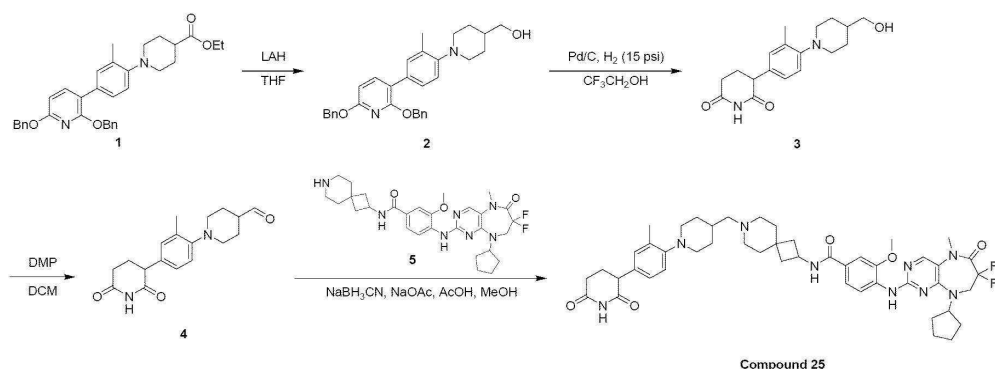
[0487] DCM (15 mL) 내 tert-부틸 1-((4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미도)메틸)-6-아자스피로[2.5]옥탄-6-카복실레이트 (0.7 g, 1.05 mmol) 용액에 TFA (4.62 g, 40.52 mmol, 3 mL)를 0 ° C 에서 첨가하였다. 혼합물을 25 ° C 에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 ~84%의 원하는 질량을 확인하였다. 혼합물을 감압 농축하여 황색 오일의 N-((6-아자스피로[2.5]옥탄-1-일)메틸)-4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미드 (1 g, crude, TFA)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=570.1.

[0488] 단계 6. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-((6-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-6-아자스피로[2.5]옥탄-1-일)메틸)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 24)의 합성

[0489] DCE (5 mL) 내 1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-카르보알데히드 (140 mg, 439.78 μ mol), N-((6-아자스피로[2.5]옥탄-1-일)메틸)-4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤즈아미드 (250.52 mg, crude, TFA) 용액에 TEA (267.00 mg, 2.64 mmol, 367.27 μ L), 4A MS (50 mg)를 첨가하고, 혼합물을 20 ° C 에서 30분간 교반 하였다. NaBH(OAc)₃ (279.62 mg, 1.32 mmol)를 첨가하고, 생성된 혼합물을 20 ° C 에서 15시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (25%)를 확인하였다. 반응 혼합물을 NaHCO₃ (10 mL) 첨가로 쉐킷하고, EtOAc (15 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (30 mL x 2)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하였다. 여과물을 진공 농축하여 잔여물을 얻었다. 잔여물을 prep-TLC (SiO₂, DCM : MeOH = 10:1)로 정제하고 역상 HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150*25 mm * 5 μ m ; 이동상 : [water (NH₄HCO₃) - ACN] ; B%: 45% - 75%, 8 분)로 재정제하였다. 용출물을 동결 건조하여 잔여물을 얻었다. 잔여물을 prep-TLC (SiO₂, DCM : MeOH = 10:1)로 재정제하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-((6-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-6-아자스피로[2.5]옥탄-1-일)메틸)-3-메톡시벤즈아미드 (29.5 mg, 31.80 μ mol, 8.47% 수율, 94% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=872.5.

[0490] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.80 (s, 1H), 8.47 – 8.38 (m, 1H), 8.31 – 8.24 (m, 2H), 7.97 (s, 1H), 7.55 – 7.46 (m, 2H), 7.04 – 6.89 (m, 3H), 4.83 – 4.70 (m, 1H), 4.04 (t, J = 14.0 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.83 – 3.75 (m, 1H), 3.47 – 3.35 (m, 2H), 3.30 – 3.15 (m, 5H), 2.65 – 2.55 (m, 4H), 2.48 – 2.37 (m, 3H), 2.32 – 2.26 (m, 1H), 2.25 – 2.09 (m, 3H), 2.03 – 1.91 (m, 3H), 1.83 – 1.68 (m, 4H), 1.68 – 1.51 (m, 6H), 1.51 – 1.33 (m, 2H), 1.29 – 1.18 (m, 3H), 1.06 – 0.89 (m, 1H), 0.50 – 0.40 (m, 1H), 0.25 – 0.15 (m, 1H).

[0491] 실시예 25. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-메틸페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 25)의 합성



[0492]

[0493] 단계 1. (1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-메틸페닐)피페리딘-4-일)메탄올 (2)의 합성

[0494] THF (3 mL) 내 LiAlH_4 (25.46 mg, 670.82 μmol) 용액에 THF (2 mL) 내 에틸 1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-메틸페닐)피페리딘-4-카복실레이트 (0.3 g, 559.01 μmol) 용액을 0 ° C N_2 기체 하에서 한 방울씩 첨가하였다. 그리고 나서 혼합물을 25 ° C 까지 승온하고 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 주 피크를 확인하였다. 반응 혼합물에 EtOAc (5 mL)를 0 ° C N_2 기체하에서 한 방울씩 첨가하여 켄칭하였다. 혼합물을 THF (20 mL)로 희석하고 셀라이트 패드로 여과하고 여과물을 농축하여 백색 고체의 (1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-메틸페닐)피페리딘-4-일)메탄올 (0.3 g, crude)을 수득하였고, 이를 다음 단계에 바로 사용하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 495.2$

[0495] 단계 2. 3-(4-(4-(히드록시메틸)피페리딘-1-일)-3-메틸페닐)피페리딘-2,6-디온 (3)의 합성

[0496] $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (10 mL) 내 (1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-메틸페닐)피페리딘-4-일)메탄올 (0.3 g, crude) 용액에 Pd/C (0.1 g, 10% 순도)를 25 ° C 에서 첨가하였다. 혼합물을 25 ° C H_2 (1.23 mg, 606.52 μmol) (15Psi) 하에서 24시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 주 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 셀라이트 패드로 여과하고 여과물을 농축하여 흑갈색 고체의 3-(4-(4-(히드록시메틸)피페리딘-1-일)-3-메틸페닐)피페리딘-2,6-디온 (150 mg, crude)을 수득하였고, 이를 다음 단계에 바로 사용하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 317.1$

[0497] 단계 3. 1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-메틸페닐)피페리딘-4-카브알데히드 (4)의 합성

[0498] DCM (3 mL) 내 3-(4-(4-(히드록시메틸)피페리딘-1-일)-3-메틸페닐)피페리딘-2,6-디온 (150 mg, 474.09 μmol) 및 DMP (301.62 mg, 711.14 μmol , 220.16 μL) 혼합물을 25 ° C 에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음을 확인하였다. 반응 혼합물을 셀라이트 패드로 여과하고 여과물을 농축하여 흑갈색 고체의 1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-메틸페닐)피페리딘-4-카브알데히드 (150 mg, crude)를 수득하였고, 이를 다음 단계에 바로 사용하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 315.1$

[0499] 단계 4. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-메틸페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 25)의 합성

[0500]

MeOH (2 mL) 내 1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-메틸페닐)피페리딘-4-카르보알데히드 (150 mg, crude) 및 NaOAc (17.59 mg, 214.48 μ mol) 혼합물을 25 ° C 에서 20분간 교반 하였다. 상기 혼합물에 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시-N-(7-아자스피로[3.5]노난-2-일)벤즈아미드 (130 mg, 214.48 μ mol, HCl) 및 AcOH (12.88 mg, 214.48 μ mol, 12.27 μ L)를 25 ° C 에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 25 ° C 에서 30분간 교반 하였다. 반응 혼합물에 NaBH₃CN (40.43 mg, 643.45 μ mol)를 25 ° C 에서 첨가하고, 혼합물을 25 ° C 에서 1시간 동안 교반 하였다.

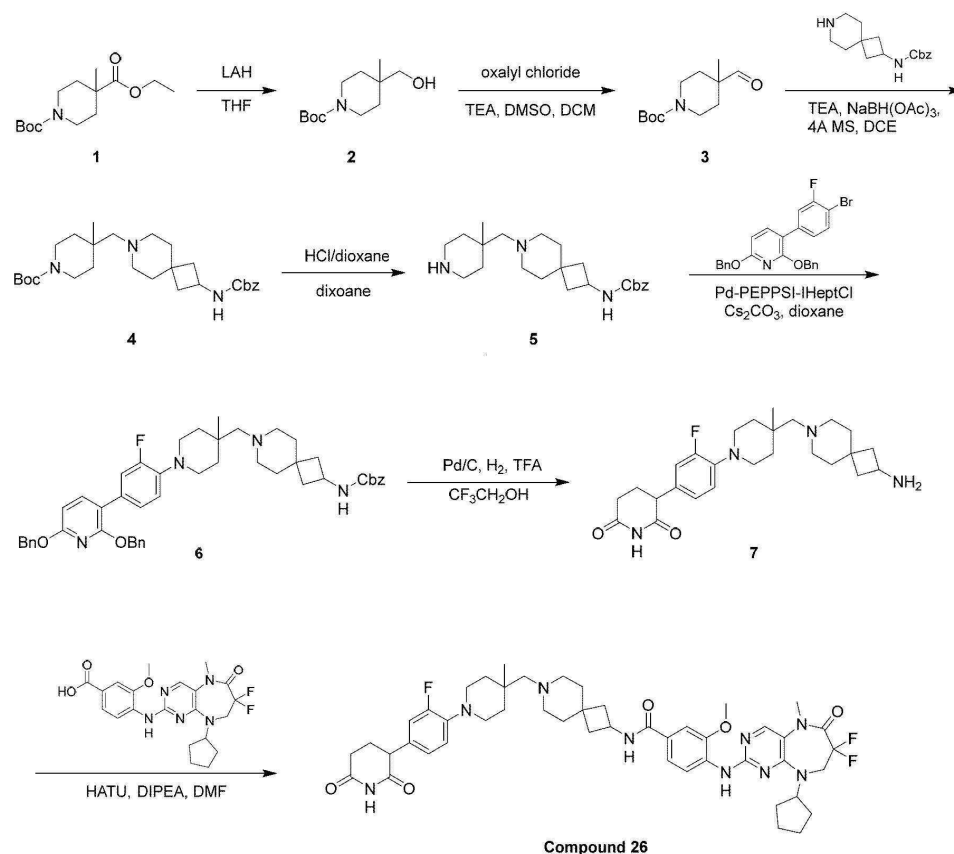
LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 피크 (28 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 농축하고 EtOAc (30 mL)에 용해시키고, 포화 NaHCO₃ (10 mL)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 감압 농축하여 잔 여물을 얻었다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (4 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~100% EtOAc/Petroleum ether gradient @ 100 mL/분; Eluent of 0~50% MeOH / EtOAc @ 100 mL/분)로 정제하여 조 생성물을 얻었다. 조 생성물을 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150x25 mmx 5um; 이동상: [물 (NH₄HCO₃)-ACN]; B%: 57%-87%, 8 분)로 정제하고 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-메틸페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (25.3 mg, 27.40 μ mol, 12.77% 수율, 94% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 868.3

[0501]

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.78 (s, 1H), 8.43 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.30 - 8.23 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.52 - 7.45 (m, 2H), 7.02 - 6.89 (m, 3H), 4.84 - 4.69 (m, 1H), 4.48 - 4.30 (m, 1H), 4.14 - 4.00 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.73 (dd, *J* = 4.9, 11.1 Hz, 1H), 3.30 (s, 3H), 3.02 (d, *J* = 11.8 Hz, 2H), 2.65 - 2.60 (m, 2H), 2.36 - 2.23 (m, 4H), 2.20 (s, 3H), 2.19 - 2.08 (m, 5H), 2.03 - 1.90 (m, 3H), 1.86 - 1.50 (m, 16H), 1.41 - 1.09 (m, 3H).

[0502]

실시예 26. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-4-메틸피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 26)의 합성



[0503]

[0504] 단계 1. tert-부틸 4-(히드록시메틸)-4-메틸피페리딘-1-카복실레이트 (2)의 합성

[0505] THF (20 mL) 내 1-(tert-부틸) 4-에틸 4-메틸피페리딘-1,4-디카복실레이트 (5 g, 18.43 mmol) 용액에 N₂ 하 0° C에서 LiAlH₄ (839.23 mg, 22.11 mmol)를 첨가하고, 혼합물을 0° C에서 30분 동안 교반 하였다. TLC (석유 에터: EtOAc = 5:1)로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였다. 반응 혼합물을 H₂O (0.8 mL), 수용성 NaOH (15 %, 0.8 mL), H₂O (2.4 mL)로 쉐킹 후 여과했다. 여과물을 Na₂SO₄로 건조 후 진공 농축하여 황색 오일의 tert-부틸 4-(히드록시메틸)-4-메틸피페리딘-1-카복실레이트 (4.1 g, crude)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 230.3

[0506] 단계 2. tert-부틸 4-포르밀-4-메틸피페리딘-1-카복실레이트 (3)의 합성

[0507] DCM (10 mL) 내 DMSO (4.43 g, 56.69 mmol, 4.43 mL) 용액에 -70° C에서 옥살릴 클로라이드 (1.08 g, 8.50 mmol, 744.36 μ L)를 첨가 후 10분 동안 교반 하고, 이후 -65° C에서 DCM (5 mL) 내 tert-부틸 4-(히드록시메틸)-4-메틸피페리딘-1-카복실레이트 (1.3 g, 5.67 mmol) 용액을 20분에 걸쳐 첨가하고, -65° C에서 TEA (2.87 g, 28.35 mmol, 3.95 mL)를 한 방울씩 첨가 후 혼합물을 20° C로 승온하고 30분 동안 교반 하였다. TLC (석유 에터: EtOAc = 1:1)로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였다. 혼합물을 물 (3 mL)로 희석 후 EtOAc (5 mL x 3)로 추출하였다. 합친 유기상을 Na₂SO₄로 건조, 여과 및 진공 농축하여 황색 오일의 tert-부틸 4-포르밀-4-메틸피페리딘-1-카복실레이트 (1.2 g, crude)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 228.3

[0508] 단계 3. tert-부틸 4-((2-(((벤질옥시)카보닐)아미노)-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)-4-메틸피페리딘-1-카복실레이트 (4)의 합성

[0509] DCE (20 mL) 내 벤질(7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (984.56 mg, 3.17 mmol, HCl 염) 및 tert-부틸 4-포르밀-4-메틸피페리딘-1-카복실레이트 (1.2 g, 5.28 mmol) 용액에 TEA (5.34 g, 52.79 mmol, 7.35 mL) 및 4A MS (10 mg)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 2시간 동안 교반 하고, 이후 NaBH(OAc)₃ (1.12 g, 5.28 mmol)를 첨가 후 혼합물을 20° C에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량이 검출되었고, 혼합물을 물(15 mL)로 희석 후 EtOAc (15 mL x 3)로 추출하였다. 합친 유기상을 Na₂SO₄로 건조 및 여과하여 진공 농축했다. 조 생성물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage, 4 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 4~90% EtOAc/석유 에터 gradient @ 40 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 tert-부틸 4-((2-(((벤질옥시)카르보닐)카보닐)아미노)-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)-4-메틸피페리딘-1-카복실레이트 (1.05 g, 1.88 mmol, 35.63% 수율, 87% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 486.3

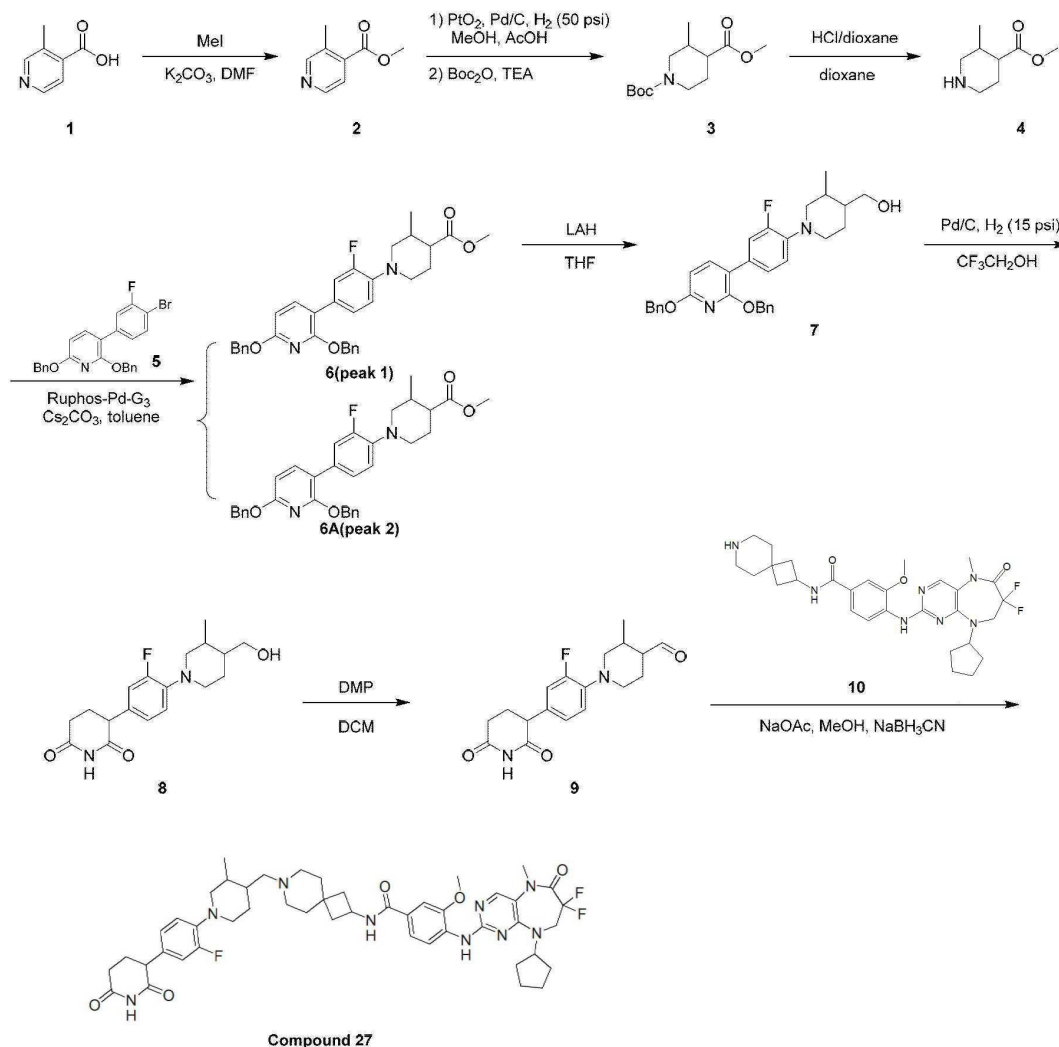
[0510] 단계 4. 벤질 (7-((4-메틸피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (5)의 합성

[0511] 디옥산 (10 mL) 내 tert-부틸 4-((2-(((벤질옥시)카보닐)아미노)-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)-4-메틸피페리딘-1-카복실레이트 (1.05 g, 2.16 mmol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 10 mL)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. TLC (석유 에터: EtOAc)는 원하는 생성물을 보여주었고 출발물질이 완전히 소모되었다. 혼합물을 진공 농축하여 황색 오일의 벤질 (7-((4-메틸피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (1 g, crude, HCl 염)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 386.6

[0512] 단계 5. 벤질 (7-((1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-4-메틸피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (6)의 합성

[0513] 디옥산 (30 mL) 내 벤질 (7-((4-메틸피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (1 g, crude, HCl 염) 및 2,6-비스(벤질옥시)-3-(4-브로모-3-플루오로페닐)피리딘 (1.10 g, 2.37 mmol) 용액에 N₂ 기체 하 Cs₂CO₃ (1.54 g, 4.74 mmol) 및 Pd-PEPPSI-IHeptCl (115.26 mg, 118.48 μ mol)를 첨가 후 혼합물을 N₂ 기체 하 100° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량이 검출되었고, 혼합물을 물(30 mL)로 희석 후 EtOAc (15 mL x 3)로 추출하였다. 유기상을 소듐 설페이트로 건조, 여과 및 진공 농축했다. 조 생성물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage, 4 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 4~98% EtOAc/석유 에터 gradient @ 35 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 벤질 (7-((1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-4-메틸피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (260 mg, 324.60 μ mol, 13.70% 수율, 96% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 769.3.

- [0514] 단계 6. 3-(4-(4-((2-아미노-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)-4-메틸피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (7)의 합성
- [0515] CF₃CH₂OH (10 mL) 내 벤질 (7-((1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-4-메틸피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (260 mg, 338.12 μmol) 용액에 N₂ 기체 하 TFA (3.86 mg, 33.81 μmol, 2.50 μL) 및 Pd/C (200 mg, 10% 순도를 첨가하였다. 혼합물을 H₂ 하 3차례 탈기 및 퍼지하고, 반응 혼합물을 H₂ (15 Psi) 하 20° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량이 검출되었고, 혼합물을 여과하였고, 여과물을 진공 농축하여 갈색 오일의 3-(4-(4-((2-아미노-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)-4-메틸피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (180 mg, crude)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 457.2
- [0516] 단계 7. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-4-메틸피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 26)의 합성
- [0517] DMF (6 mL) 내 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (200 mg, 446.99 μmol) 용액에 HATU (254.94 mg, 670.49 μmol) 및 DIPEA (173.31 mg, 1.34 mmol, 233.57 μL)에 이어 3-(4-(4-((2-아미노-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)-4-메틸피페리딘-1-일)-3-플루오로페닐)피페리딘-2,6-디온 (163.28 mg, 357.59 μmol)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량이 검출되었고, 혼합물을 물(3 mL)로 희석 후 EtOAc (5 mL x 3)로 추출하였다. 유기상을 소듐 설페이트로 건조, 여과 및 진공 농축했다. 조 생성물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage, 4 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 4~20% MeOH/EtOAc gradient @ 30 mL/분)로 정제 후 Prep-HPLC(컬럼: Waters Xbridge BEH C18 150*25mm*5um; 이동상: [H₂O (NH₄HCO₃) - ACN]; B%: 65% - 95%, 10 분)로 재정제하고 용출물을 동결 건조하여 백색 파우더의 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-4-메틸피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (5.5 mg, 6.05 μmol, 1.35% 수율, 97.5% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 886.3.
- [0518] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.81 (s, 1H), 8.43 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.32 - 8.23 (m, 2H), 7.97 (s, 1H), 7.52 - 7.45 (m, 2H), 7.05 - 6.90 (m, 3H), 4.84 - 4.71 (m, 1H), 4.47 - 4.32 (m, 1H), 4.05 (t, J = 13.8 Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.80 (dd, J = 4.7, 11.7 Hz, 1H), 3.33 (s, 3H), 3.12 - 3.01 (m, 2H), 2.92 - 2.83 (m, 2H), 2.41 - 2.36 (m, 2H), 2.18 - 2.12 (m, 4H), 2.10 - 1.89 (m, 4H), 1.81 (dd, J = 9.1, 10.5 Hz, 2H), 1.75 - 1.68 (m, 2H), 1.66 - 1.52 (m, 11H), 1.42 - 1.20 (m, 4H), 0.93 (s, 3H), 0.89 - 0.85 (m, 1H).
- [0519] 실시예 27. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-3-메틸피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 27)의 합성



[0520]

[0521]

단계 1. 메틸 3-메틸이소니코티네이트 (2)의 합성

[0522]

DMF (30 mL) 내 3-메틸이소니코틴산 (5 g, 36.46 mmol) 용액에 K_2CO_3 (6.05 g, 43.75 mmol) 및 아이오도메탄 (5.18 g, 36.46 mmol, 2.27 mL)를 첨가하고 혼합물을 15° C에서 3시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 주 피크 (96 %)가 검출되었다. 혼합물에 0° C에서 H_2O (5 mL)를 첨가하여 켄칭 후 H_2O (200 mL)로 희석 및 EtOAc (150 mL × 3)로 추출했다. 합친 유기상을 포화 $CaCl_2$ 용액 (300 mL × 5)으로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조, 여과 및 진공 농축하여 적색 오일의 메틸 3-메틸이소니코티네이트 (2.42 g)를 수득하였고 이를 다음 반응에 바로 사용하였다. $MS(M+H)^+ = 152.2$.

[0523]

단계 2. 1-(tert-부틸) 4-메틸 3-메틸피페리딘-1,4-디카복실레이트 (3)의 합성

[0524]

MeOH (70 mL) 내 메틸 3-메틸이소니코티네이트 (7.4 g, 48.95 mmol) 용액에 PtO_2 (1.00 g, 4.41 mmol), Pd/C (1 g, 48.95 mmol, 10% 순도) 및 AcOH (293.98 mg, 4.90 mmol, 279.98 μ L)를 N_2 기체 하 15° 에서 첨가하였다. 현탁액을 H_2 로 여러 차례 탈기 및 퍼지했다. 혼합물을 H_2 (50 Psi) 하 50° C에서 32시간 동안 교반 하였다. TLC (SiO_2 , 석유 에터 : EtOAc = 5 : 1)로 출발물질이 남아 있고 높은 극성의 새로운 스팟이 검출됨을 확인하였고, Boc_2O (16.03 g, 73.43 mmol, 16.87 mL) 및 TEA (9.91 g, 97.91 mmol, 13.63 mL)를 첨가하고 생성된 혼합물을 15° C에서 16시간 동안 교반 하였다. TLC (SiO_2 , 석유 에터 : EtOAc = 5 : 1)로 낮은 극성의 새로운 스팟이 검출되었다. 혼합물을 여과 후 여과 케이크를 EtOAc (300 mL)로 세척했다. 여과물을 진공 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (20 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 4-6% EtOAc/석유 에터 gradient @ 200 mL/분)로 정제하여 무색 오일의 1-(tert-부틸) 4-메틸 3-메틸피페리딘-1,4-디카복실레이트

(10.5 g, 40.80 mmol, 83.35% 수율)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 258.3$.

[0525] **단계 3. 메틸 3-메틸피페리딘-4-카복실레이트(4)의 합성**

[0526] 디옥산 (6 mL) 내 1-(tert-부틸) 4-메틸 3-메틸피페리딘-1,4-디카복실레이트 (3 g, 11.66 mmol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 30 mL)를 첨가하고 혼합물을 15° C에서 4시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량이 검출되었다. 혼합물을 진공 농축하여 오프-화이트 고체의 메틸 3-메틸피페리딘-4-카복실레이트 (2.85 g, HCl 염)를 수득하였고 이를 바로 사용하였다. $MS(M+H)^+ = 157.8$.

[0527] **단계 4. 메틸 1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-3-메틸피페리딘-4-카복실레이트 (6 및 6A)의 합성**

[0528] 톨루엔 (80 mL) 내 메틸 3-메틸피페리딘-4-카복실레이트 (2 g, 10.33 mmol, HCl 염) 및 2,6-디벤질옥시-3-(4-브로모-3-플루오로-페닐)피리딘 (5.1 g, 10.98 mmol) 용액에 N_2 기체 하 Ruphos-Pd-G3 (863.70 mg, 1.03 mmol) 및 CS_2CO_3 (10.09 g, 30.98 mmol)를 첨가하고, 현탁액을 N_2 기체 하 100° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 2,6-디벤질옥시-3-(4-브로모-3-플루오로-페닐)피리딘 이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (30 %)가 검출되었다. 혼합물을 진공 농축 후 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (80 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 5~15% EtOAc/석유 에터 gradient @ 200 mL/분)로 정제 후 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex Luna C18 200*40 mm*10um; 이동상: [물 (TFA) - ACN]; B%: 80% - 100%, 10 분)로 재정제하여 A (피크 1), B (피크 2) 및 360 mg의 A 및 B의 혼합물을 수득하였고, 이를 prep-HPLC (컬럼: Welch Ultimate C18 150*25mm*5um; 이동상: [H_2O (TFA) - ACN]; B%: 80% - 100%, 10 분)로 재정제하여 C (피크 1) 및 D (피크 2)를 수득하였다. A 및 C를 합쳐 진공 농축하여 갈색 오일의 메틸 1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-3-메틸피페리딘-4-카복실레이트 (350 mg, 647.40 μ mol, 6.27% 수율)를 수득하였다; B 및 D를 합쳐 진공 농축하여 갈색 오일의 메틸 1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-3-메틸피페리딘-4-카복실레이트 (690 mg, 1.28 mmol, 12.36% 수율)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 541.3$.

[0529] **단계 5. (1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-3-메틸피페리딘-4-일)메탄올 (7)의 합성**

[0530] THF (3 mL) 내 LAH (50 mg, 1.32 mmol)를 0° C에서 THF (7 mL) 내 메틸 1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-3-메틸피페리딘-4-카복실레이트 (350 mg, 647.40 μ mol) 용액에 한 방울씩 첨가하고 혼합물을 N_2 기체 하 20° C에서 4시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 주 피크 (95 %)가 검출되었다. 혼합물을 THF (20 mL)로 희석 후 0° C에서 H_2O (0.1 mL)를 첨가하여 켄칭하고, 그리고 나서 15% NaOH 용액 (0.1 mL) 및 H_2O (0.3 mL)를 첨가 후 현탁액을 Na_2SO_4 로 건조, 여과 및 진공 농축하여 황색 오일의 (1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-3-메틸피페리딘-4-일)메탄올 (330 mg)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 513.5$.

[0531] **단계 6. 3-(3-플루오로-4-(4-(히드록시메틸)-3-메틸피페리딘-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (8)의 합성**

[0532] CF_3CH_2OH (10 mL) 내 (1-(4-(2,6-비스(벤질옥시)피리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-3-메틸피페리딘-4-일)메탄올 (330 mg, 643.76 μ mol) 및 Pd/C (50mg, 10% 순도) 혼합물을 H_2 하 3차례 탈기 및 퍼지하고 생성된 혼합물을 H_2 (15 Psi) 하 20° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (50 %)가 검출되었다. 혼합물을 셀라이트 패드로 여과하였다. 필터 케이크를 CF_3CH_2OH (20 mL)로 세척했다. 여과물을 진공 농축하여 갈색 오일의 3-(3-플루오로-4-(4-(히드록시메틸)-3-메틸피페리딘-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (200 mg, crude)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 335.1$.

[0533] **단계 7. 1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-3-메틸피페리딘-4-카브알데히드 (9)의 합성**

[0534] DCM (1 mL) 내 3-(3-플루오로-4-(4-(히드록시메틸)-3-메틸피페리딘-1-일)페닐)피페리딘-2,6-디온 (100 mg, 299.06 μ mol) 용액에 DMP (152.21 mg, 358.87 μ mol, 111.10 μ L)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. TLC로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 새로운 하나의 주 스팟이 검출되었다. 혼합물을 여과하였다. 여과물을 진공 농축하여 갈색 오일의 1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-3-메틸피페리딘-4-카르브카르브알데히드 (99 g, crude)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 333.1$.

[0536]

[0537]

[0538]

Compound 28

[0539]

[0540]

- 82 -

반 하였다. TLC (SiO₂, 석유 에터: EtOAc = 10:1)로 4-메톡시-3-니트로-페놀이 완전히 소모됨을 확인했고 하나의 새로운 스팟이 검출되었다. 반응 혼합물을 워크업을 위해 다른 스케일 (0.5 g 스케일)과 합쳤다. 반응 혼합물을 H₂O (20 mL)로 희석 후 EtOAc (20 mL x 3)로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (20 mL x 3)로 세척 후 Na₂SO₄ 로 건조 및 여과하여 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (40 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~8 % EtOAc/석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 tert-부틸 4-(4-메톡시-3-니트로페녹시)부타노에이트 (4.6 g, 11.56 mmol, 97.79% 수율)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 312.3

[0542] **단계 2. tert-부틸 4-(3-아미노-4-메톡시페녹시)부타노에이트 (4)의 합성**

[0543] CF₃CH₂OH (50 mL) 내 tert-부틸 4-(4-메톡시-3-니트로페녹시)부타노에이트 (4.5 g, 14.45 mmol) 용액에 N₂ 하 Pd/C (0.5 g, 1.45 mmol, 10% 순도)를 첨가하였다. 현탁액을 H₂로 3차례 퍼지 및 탈기하였다. 혼합물을 H₂ (15 Psi)하 20° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 28%의 tert-부틸 4-(4-메톡시-3-니트로페녹시)부타노에이트가 남음 및 67%의 원하는 질량의 피크가 검출되었고 반응 혼합물을 H₂ (15 Psi)하 20° C에서 16시간 동안 추가로 교반 하였다. LCMS로 tert-부틸 4-(4-메톡시-3-니트로페녹시)부타노에이트가 완전히 소모됨을 확인하였고 98%의 원하는 질량 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 CF₃CH₂OH (150 mL)로 희석 후 여과했다. 잔여물을 진공 농축하여 황색 오일의 tert-부틸 4-(3-아미노-4-메톡시페녹시)부타노에이트 (3.7 g, 13.15 mmol, 90.98% 수율)를 수득하였다. MS(M+56H)⁺ = 226.5

[0544] **단계 3. 3-((5-(4-(tert-부톡시)-4-옥소부톡시)-2-메톡시페닐)아미노)프로판산 (6)의 합성**

[0545] 톨루엔 (40 mL) 내 tert-부틸 4-(3-아미노-4-메톡시페녹시)부타노에이트 (3.7 g, 13.15 mmol) 용액에 20° C에서 아크릴산 (1.90 g, 26.30 mmol, 1.81 mL)을 첨가하고 생성된 혼합물을 120° C에서 4시간 동안 교반 하였다. LCMS로 9%의 tert-부틸 4-(3-아미노-4-메톡시페녹시)부타노에이트가 남음 및 82%의 원하는 질량의 피크가 검출되었고 반응 혼합물을 120° C에서 8시간 동안 추가로 교반 하였다. LCMS로 tert-부틸 4-(3-아미노-4-메톡시페녹시)부타노에이트가 완전히 소모됨을 확인하였고 88%의 원하는 질량 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 진공 농축하여 황색 오일의 3-((5-(4-(tert-부톡시)-4-옥소부톡시)-2-메톡시페닐)아미노)프로판산 (4.7 g, crude)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 354.4

[0546] **단계 4. 4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페녹시)부탄산 (8)의 합성**

[0547] AcOH (50 mL) 내 3-((5-(4-(tert-부톡시)-4-옥소부톡시)-2-메톡시페닐)아미노)프로판산 (4.7 g, 13.30 mmol) 용액에 20° C에서 우레아 (3.99 g, 66.50 mmol, 3.57 mL)를 첨가하고 생성된 혼합물을 120° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 3-((5-(4-(tert-부톡시)-4-옥소부톡시)-2-메톡시페닐)아미노)프로판산이 완전히 소모됨을 확인하였고 74%의 원하는 질량 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 진공 농축했다. 조 생성물을 역상 HPLC (0.1% HCl, method: 컬럼 330 g Flash 컬럼 Welch Ultimate XB_C18 20-40 μm; 120 Å; Solvent for sample dissolution about 6.00 grams of sample dissolved in mL of DMF; Flow rate 100 mL/분; 이동상 MeCN/H₂O; Gradient B% 5-40% 20 분; 40-100% 20 분; Instrument TELEDYNE ISCO CombiFlashRf150)로 정제하고 용출물을 동결 건조하여 오프 화이트의 4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페녹시)부탄산 (1.8 g, 5.58 mmol, 41.99% 수율)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 323.3

[0548] **단계 5. tert-부틸 (1-(4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (9)의 합성**

[0549] DMF (6 mL) 내 4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페녹시)부탄산 (0.6 g, 1.86 mmol) 용액에 HATU (778.60 mg, 2.05 mmol) 및 DIPEA (721.78 mg, 5.58 mmol, 972.74 μL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 20° C에서 10분 동안 교반 하고, DMF (6 mL) 내 tert-부틸 N-(4-피페리딜) 카바메이트 (447.39 mg, 2.23 mmol) 용액을 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 모든 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 81%의 원하는 질량 피크가 되었다. 반응 혼합물을 H₂O (20 mL)로 희석 후 EtOAc (20 mL x 3)로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (20 mL x 3)로 세척 후 Na₂SO₄ 로 건조 및 여과하여 농축했다. 조 생성물을 20° C에서 0.5 시간 동안 EtOAc (6 mL)로 분쇄 후 여과했다. 여과 케이크를 진공 건조하여 백색 고체의 tert-부틸 (1-(4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)카바

메이트 (453 mg, 852.90 μmol , 45.82% 수율, 95% 순도)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}-100+\text{H})^+ = 405.3$

[0550] 단계 6. 1-(5-(4-(4-아미노피페리딘-1-일)-4-옥소부톡시)-2-메톡시페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (10)의 합성

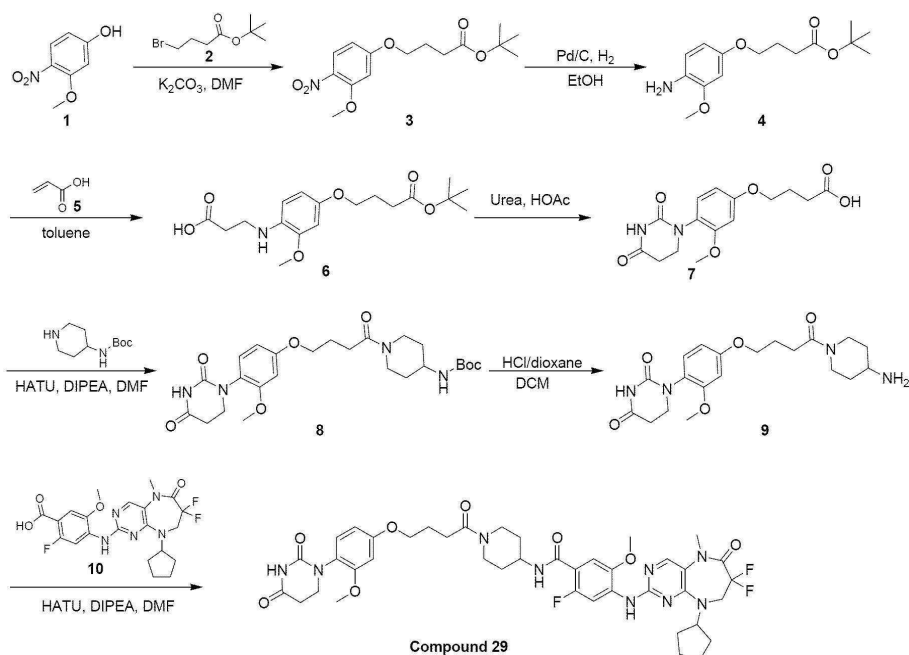
[0551] 디옥산 (5 mL) 내 tert-부틸 (1-(4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (450 mg, 891.84 μmol) 용액에 20° C에서 HCl/디옥산 (4 M, 15 mL)을 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 95%의 원하는 질량 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 진공 농축하여 오프 화이트의 1-(5-(4-(4-아미노피페리딘-1-일)-4-옥소부톡시)-2-메톡시페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (396 mg, crude, HCl 염)을 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 405.3$

[0552] 단계 7. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)-2-플루오로-5-메톡시벤즈아미드 (화합물 28)의 합성

[0553] DMF (4 mL) 내 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-2-플루오로-5-메톡시벤조산 (80 mg, 171.89 μmol) 용액에 HATU (71.89 mg, 189.07 μmol) 및 DIPEA (44.43 mg, 343.77 μmol , 59.88 μL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 20° C에서 10분 동안 교반 하고, DMF (4 mL) 내 1-(5-(4-(4-아미노피페리딘-1-일)-4-옥소부톡시)-2-메톡시페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (83.37 mg, 189.07 μmol , HCl 염) 용액 및 DIPEA (44.43 mg, 343.77 μmol , 59.88 μL)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 93%의 원하는 질량 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 H_2O (15 mL)로 희석 후 EtOAc (15 mL x 3)로 추출하였다. 유기상을 염수 (15 mL x 3)로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조 및 여과하여 농축했다. 잔여물을 prep-HPLC (컬럼: Unisil 3-100 C18 μLtra 150*50 mm*3 μm ; 이동상: [H_2O (FA) -ACN]; B%: 32%-62%, 10 분)로 정제하고 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)-2-플루오로-5-메톡시벤즈아미드 (61.8 mg, 71.10 μmol , 41.36% 수율, 98% 순도)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 852.0$

[0554] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 10.28 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.16 (d, J = 12.1 Hz, 1H), 8.04 (s, 1H), 7.89 (br d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.03 - 6.98 (m, 1H), 6.96 (d, J = 6.1 Hz, 1H), 6.89 - 6.84 (m, 2H), 4.83 - 4.72 (m, 1H), 4.32 (br d, J = 12.2 Hz, 1H), 4.05 (br t, J = 13.9 Hz, 2H), 3.92 - 3.80 (m, 6H), 3.73 (s, 3H), 3.60 - 3.50 (m, 3H), 3.32 (s, 3H), 3.19 - 3.07 (m, 1H), 3.03 - 2.91 (m, 1H), 2.65 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.22 (br t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.98 - 1.86 (m, 4H), 1.85 - 1.78 (m, 1H), 1.76 - 1.65 (m, 3H), 1.65 - 1.51 (m, 4H), 1.40 - 1.22 (m, 2H)

[0555] 실시예 29. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)-2-플루오로-5-메톡시벤즈아미드 (화합물 29)의 합성



[0556]

[0557]

단계 1. tert-부틸 4-(3-메톡시-4-니트로페녹시)부타노에이트 (3)의 합성

[0558]

DMF (25 mL) 내 3-메톡시-4-니트로페놀 (2 g, 11.82 mmol) 용액에 K_2CO_3 (4.90 g, 35.47 mmol) 및 tert-부틸 4-브로모부타노에이트 (3.96 g, 17.74 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 90 ° C 에서 3시간 동안 교반 하였다. LC-MS로 3-메톡시-4-니트로페놀이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 하나의 주 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 물 300 mL로 희석하고 EtOAc (70 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 70 mL로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하여 잔여물을 얻었다. 조 생성물을 역상 HPLC (0.1% $NH_3 \cdot H_2O$)로 정제 하고 용출물을 동결 건조하여 무색 오일의 tert-부틸 4-(3-메톡시-4-니트로페녹시)부타노에이트 (3.5 g, 11.13 mmol, 94.12% 수율, 99% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+=256.2$.

[0559]

단계 2. tert-부틸 4-(4-아미노-3-메톡시페녹시)부타노에이트 (4)의 합성

[0560]

EtOH (8 mL) 내 tert-부틸 4-(3-메톡시-4-니트로페녹시)부타노에이트 (500 mg, 1.61 mmol) 용액에 N_2 기체 하에서 Pd/C (10%, 50 mg)를 첨가하였다. 현탁액을 탈기하고 H_2 로 3차례 퍼징하였다. 혼합물을 25 ° C H_2 (15 Psi) 하에서 2시간 동안 교반 하였다. LC-MS로 tert-부틸 4-(3-메톡시-4-니트로페녹시)부타노에이트가 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 하나의 주 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 여과하고 여과케이크를 EtOAc (50 mL)로 세척하고, 여과물을 진공 농축하여 흑갈색 오일의 tert-부틸 4-(4-아미노-3-메톡시페녹시)부타노에이트 (450 mg, 1.60 mmol, 99.59% 수율)를 수득하였고 이를 다음 단계에 바로 사용하였다. $MS(M+H)^+=226.2$

[0561]

단계 3. 3-((4-(4-(tert-부톡시)-4-옥소부톡시)-2-메톡시페닐)아미노)프로판산 (6)의 합성

[0562]

톨루엔 (5 mL) 내 tert-부틸 4-(4-아미노-3-메톡시페녹시)부타노에이트 (450 mg, 1.60 mmol), 아크릴산 (230.52 mg, 3.20 mmol, 219.54 μ L) 혼합물을 110 ° C 에서 16시간 동안 교반 하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하여 용매를 제거하고 흑갈색 오일의 3-((4-(4-(tert-부톡시)-4-옥소부톡시)-2-메톡시페닐)아미노)프로판산 (530 mg, crude)을 수득하였고 이를 다음 단계에 바로 사용하였다. $MS(M+H)^+=354.4$

[0563]

단계 4. 4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페녹시)부탄산 (7)의 합성

[0564]

AcOH (6 mL) 내 3-((4-(4-(tert-부톡시)-4-옥소부톡시)-2-메톡시페닐)아미노)프로판산 (530 mg, 1.50 mmol) 및 우레아 (450.32 mg, 7.50 mmol, 402.07 μ L) 혼합물을 120 ° C 에서 16시간 동안 교반 하였다. LC-MS로 3-((4-(4-(tert-부톡시)-4-옥소부톡시)-2-메톡시페닐)아미노)프로판산이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량을 확인하였다. 반응 혼합물을 물 100 mL로 희석하고 EtOAc (30 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 30 mL로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하여 잔여물을 얻었다. 조 생성물을 역상 HPLC (0.1% FA 조건: Instrument: Agela HP1000; 컬럼: Welch μ Ltimate XB_{C18} 150x400 mm 20/40 μ m; eluent A:

물, eluent B: 아세트니트릴; gradient: 0-40 분 0-65% B; flow 50 mL/분; 온도: room temperature; 검출기: UV 220/254 nm)로 정제하고 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페녹시)부탄산 (350 mg, 912.16 μ mol, 60.82% 수율, 84% 순도)을 수득하였다. MS(M+H)⁺=323.2

[0565] 단계 5. tert-부틸 (1-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (8)의 합성

[0566] DMF (1.5 mL) 내 4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페녹시)부탄산 (300 mg, 930.77 μ mol) 및 tert-부틸 피페리딘-4-일카바메이트 (186.41 mg, 930.77 μ mol) 용액에 HATU (530.86 mg, 1.40 mmol) 및 DIPEA (360.89 mg, 2.79 mmol, 486.37 μ L)를 첨가하였다. 혼합물을 25 ° C 에서 1.5시간 동안 교반 하였다. LC-MS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량을 확인하였다. 반응 혼합물을 물 100 mL로 희석 하고 EtOAc (30 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 30 mL로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하여 잔여물을 얻었다. 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, MeOH/EtOAc = 0 - 10%)로 정제하여 밝은 황색 고체의 tert-부틸 (1-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (380 mg, 722.99 μ mol, 77.68% 수율, 96% 순도)를 수득하였다. MS(M+H-100)⁺=405.3

[0567] 단계 6. 1-(4-(4-(4-아미노피페리딘-1-일)-4-옥소부톡시)-2-메톡시페닐) 디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (9)의 합성

[0568] DCM (1.5 mL) 내 tert-부틸 (1-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페녹시) 부타노일) 피페리딘-4-일)카바메이트 (100 mg, 198.19 μ mol) 및 HCl/디옥산 (4 M, 1.5 mL) 혼합물을 25 ° C 에서 30분간 교반 하였다. LC-MS로 원하는 질량의 하나의 주 피크가 검출되었음을 확인하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하여 용매를 제거하고 밝은 황색 고체의 1-(4-(4-(4-아미노피페리딘-1-일)-4-옥소부톡시)-2-메톡시페닐) 디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (300 mg, crude, HCl 염)을 수득하였고 이를 다음 단계에 바로 사용하였다. MS(M+H)⁺=404.9

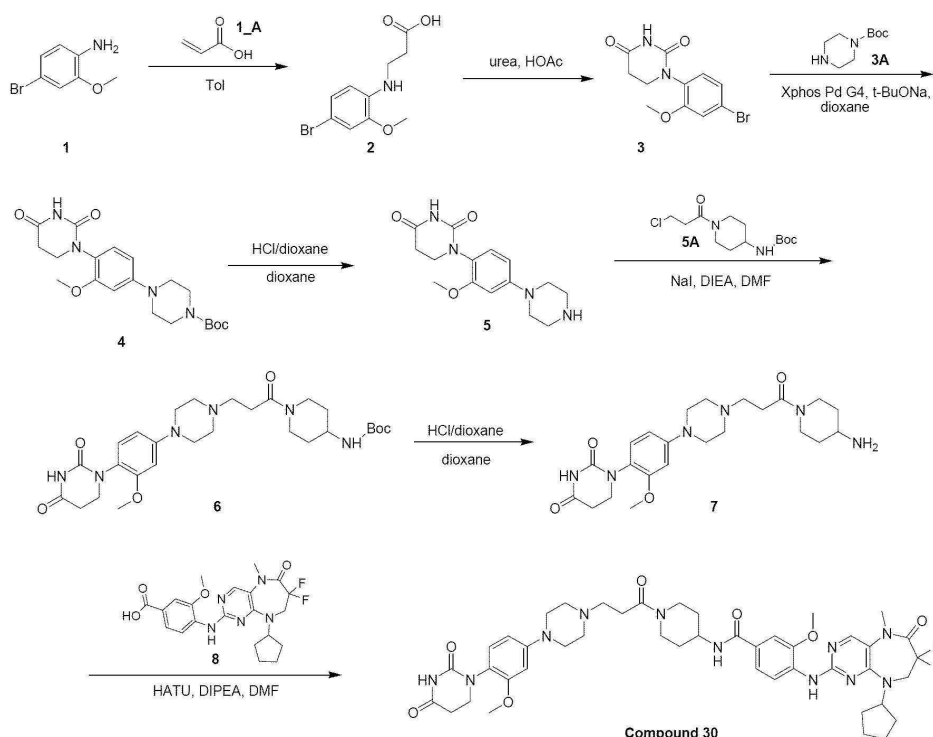
[0569] 단계 7. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)-2-플루오로-5-메톡시벤즈아미드 (화합물 29)의 합성

[0570] DMF (3 mL) 내 1-(4-(4-(4-아미노피페리딘-1-일)-4-옥소부톡시)-2-메톡시페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (100 mg, 226.80 μ mol, HCl 염) 및 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-2-플루오로-5-메톡시벤조산 (105.56 mg, 226.80 μ mol) 용액에 HATU (129.35 mg, 340.20 μ mol) 및 DIPEA (87.94 mg, 680.40 μ mol, 118.51 μ L)를 첨가하였다. 혼합물을 25 ° C 에서 2시간 동안 교반 하였다. LC-MS로 1-(4-(4-(4-아미노피페리딘-1-일)-4-옥소부톡시)-2-메톡시페닐) 디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량을 확인하였다. 반응 혼합물을 물 50 mL로 희석하고 EtOAc (20 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 20 mL로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하여 잔여물을 얻었다. 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, MeOH/EtOAc = 0 - 10%)로 정제하였다. 그리고 나서 잔여물을 prep-HPLC (neutral 조건: 컬럼: Waters Xbridge BEH C18 150 x 25mm x5 μ m; 이동상: [물 (NH₄HCO₃)-ACN]; B%: 38%-68%, 분)로 정제하고 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페녹시)부타노일)피페리딘-4-일)-2-플루오로-5-메톡시벤즈아미드 (37.9 mg, 43.16 μ mol, 19.03% 수율, 97% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=852.5

[0571] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.23 (s, 1H), 8.34 - 8.20 (m, 2H), 8.05 (s, 1H), 8.01 - 7.94 (m, 1H), 7.20 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.53 (dd, J = 2.6, 8.6 Hz, 1H), 4.89 - 4.77 (m, 1H), 4.36 - 4.32 (m, 1H), 4.12 - 4.01 (m, 5H), 3.95 (s, 3H), 3.94 - 3.80 (m, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.57 - 3.52 (m, 2H), 3.34 (s, 3H), 3.23 - 3.16 (m, 1H), 2.80 - 2.73 (m, 1H), 2.68 - 2.63 (m, 2H), 2.49 - 2.45 (m, 2H), 2.01 - 1.93 (m, 4H), 1.92 - 1.80 (m, 2H), 1.79 - 1.74 (m, 2H), 1.68 - 1.57 (m, 4H), 1.55 - 1.40 (m, 2H).

[0572] 실시예 30. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디

아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드(화합물 30)의 합성



[0573]

단계 1. 3-((4-브로모-2-메톡시페닐)아미노)프로판산 (2)의 합성

[0574]

톨루엔 (30 mL) 내 4-브로모-2-메톡시아닐린 (2g, 9.90mmol) 및 아크릴산 (1.07 g, 14.85 mmol, 1.02 mL) 혼합물을 100° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 메인 피크가 검출되었다. 혼합물을 진공 농축하여 갈색 파우더의 3-((4-브로모-2-메톡시페닐)아미노)프로판산 (2.71 g, 6.82 mmol, 68.92% 수율, 69% 순도)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 273.9$

[0575]

단계 2. 1-(4-브로모-2-메톡시페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (3)의 합성

[0576]

AcOH (15 mL) 내 3-((4-브로모-2-메톡시페닐)아미노)프로판산 (2.71 g, 9.89 mmol) 용액에 우레아 (2.97 g, 49.43 mmol, 2.65 mL)를 첨가하고 혼합물을 120° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (64%)가 검출되었다. 혼합물을 물 50 mL로 희석 후 EtOAc (20 mL x 3)으로 추출하였다. 유기상을 Na₂SO₄로 건조 및 여과하여 진공 농축했다. 조 생성물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage, 4 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 4~100% EtOAc/석유 에터 gradient @ 35 mL/분)로 정제하여 회색 파우더의 1-(4-브로모-2-메톡시페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (2.1 g, 7.02 mmol, 71.01% 수율)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 300.9$

[0577]

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.36 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.25 - 7.15 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.56 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 2.67 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H).

[0578]

단계 3. tert-부틸 4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페닐)피페라진-1-카복실레이트 (4)의 합성

[0579]

디옥산 (10 mL) 내 1-(4-브로모-2-메톡시페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (1 g, 3.34 mmol) 용액에 *t*-BuONa (2 M, 5.01 mL) 및 Xphos Pd G4 (287.67 mg, 334.31 μmol)를 첨가하고, 이후 *tert*-부틸 피페라진-1-카복실레이트 (933.99 mg, 5.01 mmol)를 첨가하고 혼합물을 90° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (54 %)가 검출되었다. 혼합물을 염수 (10 mL)로 희석 후 EtOAc (5 mL x 3)으로 추출하였다. 유기상을 Na₂SO₄로 건조, 여과 및 진공 농축했다. 조 생성물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage, 4 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 4~60% EtOAc/석유 에터 gradient @ 20 mL/분)로 정제하여 갈색 파우더의 *tert*-부틸 4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페닐)피페라진-1-카복실레이트 (830

mg, 1.81 mmol, 54.02% 수율, 88% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 405.0$

[0581] 단계 4. 1-(2-메톡시-4-(피페라진-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (5)의 합성

[0582] 디옥산 (6 mL) 내 tert-부틸 4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페닐)피페라진-1-카복실레이트 (300 mg, 741.73 μ mol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 1.85 mL)을 첨가하고 혼합물을 25° C에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크가 검출되었다. 혼합물을 진공 농축하여 황색 오일의 1-(2-메톡시-4-(피페라진-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (252 mg, 739.43 μ mol, 99.69% 수율, HCl 염)을 수득하였고, 이를 바로 사용하였다. $MS(M+H)^+ = 305.0$

[0583] 단계 5. tert-부틸 (1-(3-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (6)의 합성

[0584] DMF (20 mL) 내 1-(2-메톡시-4-(피페라진-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (446.59 mg, 1.31 mmol, 1.66 μ L, HCl 염) 및 tert-부틸 (1-(3-클로로프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (457.25 mg, 1.57 mmol) 용액에 DIEA (677.44 mg, 5.24 mmol, 912.99 μ L) 및 NaI (39.28 mg, 262.08 μ mol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 70° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량이 검출되었다. 혼합물을 염수 (10 mL)로 세척 후 EtOAc (5 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 Na_2SO_4 로 건조, 여과 및 진공 농축했다. 조 생성물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage, 4 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 4-60% MeOH/석유 에터 gradient @ 30 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 tert-부틸 (1-(3-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (370 mg, 602.68 μ mol, 45.99% 수율, 91% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 559.1$

[0585] 단계 6. 1-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)-2-메톡시페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (7)의 합성

[0586] 디옥산 (1 mL) 내 tert-부틸 (1-(3-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (370 mg, 662.29 μ mol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 7.40 mL)을 첨가하고 혼합물을 25° C에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량이 검출되었다. 혼합물을 진공 농축하여 황색 고체의 1-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)-2-메톡시페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (350 mg, 636.35 μ mol, 96.08% 수율, 90% 순도, HCl 염)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 459.0$

[0587] 단계 7. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 30)의 합성

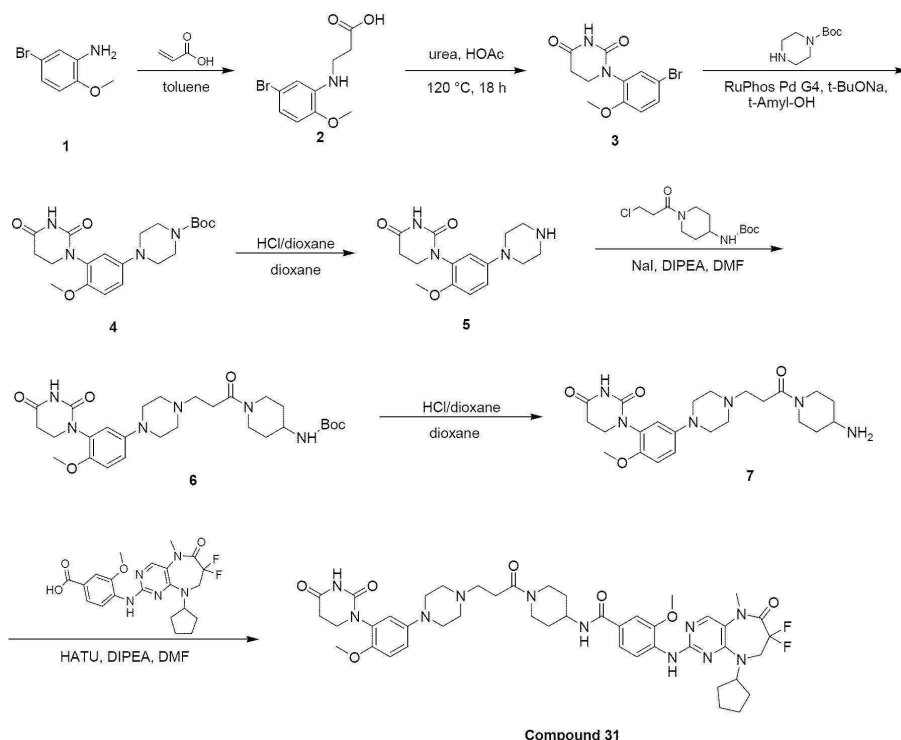
[0588] DMF (2 mL) 내 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (100 mg, 223.50 μ mol) 용액에 HATU (127.47 mg, 335.24 μ mol) 및 DIEA (86.66 mg, 670.49 μ mol, 116.79 μ L)를 첨가하고 30분 동안 교반한 후, 1-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)-2-메톡시페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (110.63 mg, 223.50 μ mol, HCl 염)를 첨가하고 생성된 혼합물을 25° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (50 %)가 검출되었다. 혼합물을 물 (5 mL)로 희석 후 EtOAc (5 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 Na_2SO_4 로 건조, 여과 및 진공 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage, 4 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 4~100% EtOAc/석유 에터 gradient @ 20 mL/분) 및 이어서 Prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150*25mm* 5 μ m; 이동상: $[H_2O (NH_4HCO_3) - ACN]$; B%: 35%-65%, 9 분)로 정제하고 용출물을 동결 건조하여 백색 파우더의 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-3-메톡시페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (31.2 mg, 34.40 μ mol, 15.39% 수율, 97.9% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 888.0$

[0589] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 10.20 (s, 1H), 8.33 - 8.25 (m, 2H), 8.16 (br d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.53 - 7.46 (m, 2H), 7.03 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.61 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 6.49 (dd, J = 2.3, 8.6 Hz, 1H), 4.85 - 4.71 (m, 1H), 4.40 (d, J = 12.6 Hz, 1H), 4.15 - 3.88 (m, 7H), 3.78 (s, 3H), 3.51

(t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.35 (s, 3H), 3.27 - 3.05 (m, 5H), 2.74 - 2.55 (m, 11H), 2.02 - 1.33 (m, 12H).

[0590]

실시예 31. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 31)의 합성



[0591]

단계 1. 3-((5-브로모-2-메톡시페닐)아미노)프로판산 (2)의 합성

[0592]

톨루엔 (50 mL) 내 5-브로모-2-메톡시-아닐린 (4 g, 19.80 mmol) 및 아크릴산 (2.14 g, 29.70 mmol) 용액을 100° C에서 3시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량이 검출되었다. 반응 혼합물을 농축하여 흑갈색 고체의 3-((5-브로모-2-메톡시페닐)아미노)프로판산 (5.4 g, crude)을 수득하였다. 조 생성물은 다음 반응에 바로 사용 하였다. $MS(M-H)^+ = 271.9$

[0593]

[0594]

단계 2. 1-(5-브로모-2-메톡시페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (3)의 합성

[0595]

AcOH (50 mL) 내 3-((5-브로모-2-메톡시페닐)아미노)프로판산 (5.4 g, 19.70 mmol) 용액을 120° C에서 10분 동안 교반 하였다. 이후 우레아 (5.92 g, 98.50 mmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 120° C에서 18시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량이 검출되었다. 반응 혼합물을 얼음물 (100 mL)에 붓고 EtOAc (50 mL x 4)로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (50 mL)로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조 및 농축하여 조 생성물을 얻었고, 이를 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (40 g 실리카 겔 컬럼, EtOAc/석유 에터 = 5 - 100%, 100 mL/분)로 정제하여 회색 고체의 1-(5-브로모-2-메톡시페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (3.5 g, 11.23 mmol, 57.02% 수율, 96% 순도)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 301.3$

[0596]

단계 3. tert-부틸 4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페닐)피페라진-1-카복실레이트 (4)의 합성

[0597]

2-메틸-2-부탄올 (10 mL) 내 1-(5-브로모-2-메톡시페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (600 mg, 2.01 mmol), tert-부틸 피페라진-1-카복실레이트 (448.32 mg, 2.41 mmol) 및 t-BuONa (2 M, 2.01 mL) 혼합물에 25° C에서 RuPhos Pd G₄ (85.29 mg, 100.29 μmol)를 첨가했다. 생성된 혼합물을 N_2 하 3차례 퍼지 및 탈기 하였고 90° C로 가열하고 14시간 동안 교반 하였다. (노트: 2개의 배치). LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량이 검출되었다. 2개 배치의 반응 혼합물을 합친 후 여과했다. 여과물을 농축하여 조 생성물을 얻고, 이를 플래시 (10 g 실리카 겔 컬럼, EtOAc/석유 에터 = 10 - 50%, 60 mL/분)로 정제하여 황색 고체의 tert-부틸 4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페닐)피페라진-1-카복실레이트 (160 mg,

300.65 μmol , 7.49% 수율, 76% 순도)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 405.2$

[0598] 단계 4. 1-(2-메톡시-5-(피페라진-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (5)의 합성

[0599] 디옥산 (1 mL) 내 tert-부틸 4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페닐)피페라진-1-카복실레이트 (160 mg, 395.59 μmol) 및 HCl/디옥산 (4 M, 3 mL) 용액을 25° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량이 검출되었다. 반응 혼합물을 농축하여 황색 고체의 1-(2-메톡시-5-(피페라진-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (130 mg, crude, HCl)을 수득하였다. 조 생성물을 다음 반응에 바로 사용하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 305.0$

[0600] 단계 5. tert-부틸 (1-(3-(4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (6)의 합성

[0601] DMF (3 mL) 내 1-(2-메톡시-5-(피페라진-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (130 mg, 381.45 μmol , HCl) 및 tert-부틸 N-[1-(3-클로로프로파노일)-4-피페리딘]카바메이트 (133.10 mg, 457.74 μmol) 용액에 25° C에서 DIPEA (147.90 mg, 1.14 mmol) 및 NaI (5.72 mg, 38.15 μmol)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 70° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량이 검출되었다. 반응 혼합물을 염수 (30 mL)에 붓고 EtOAc (10 mL x 4)로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (10 mL x 2)로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조하고 농축하여 조 생성물을 얻었고, 이를 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (4 g 실리카 겔 컬럼, EtOAc/석유 에터 = 20 - 100% 이후 MeOH/ethyl acetate = 10%, 40 mL/분)로 정제하여 황색 고체의 tert-부틸 (1-(3-(4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (50 mg, 89.50 μmol , 23.46% 수율)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 559.3$

[0602] 단계 6. 1-(5-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)-2-메톡시페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (7)의 합성

[0603] 디옥산 (2 mL) 내 tert-부틸 (1-(3-(4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (50 mg, 89.50 μmol) 및 HCl/디옥산 (4 M, 2 mL) 용액을 25° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 남은 미량의 출발물질 및 원하는 질량이 검출되었다. 반응 혼합물을 25° C에서 1시간 동안 추가로 교반 하였다. 반응 혼합물을 농축하여 갈색 고체의 1-(5-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)-2-메톡시페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (45 mg, crude, HCl)을 수득하였다. 조 생성물을 다음 반응에 바로 사용하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 459.3$

[0604] 단계 7. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 31)의 합성

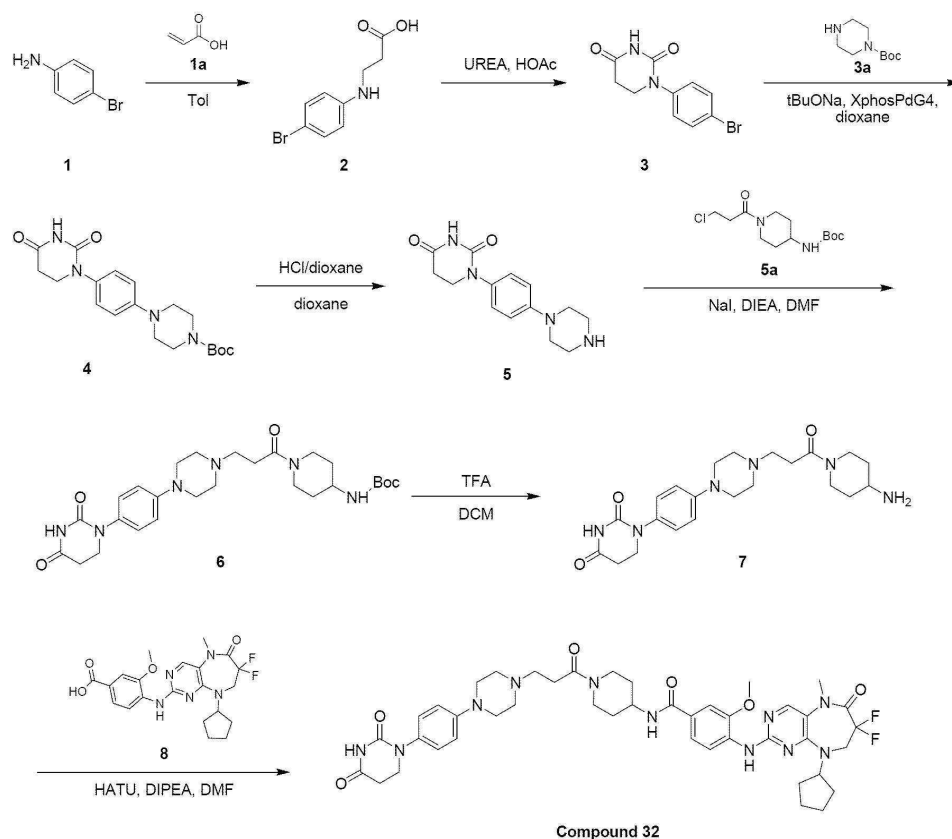
[0605] DMF (2 mL) 내 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (39.77 mg, 88.89 μmol), DIPEA (52.22 mg, 404.03 μmol) 및 HATU (39.94 mg, 105.05 μmol) 혼합물에 25° C에서 1-(5-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)-2-메톡시페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (40 mg, 80.81 μmol , HCl)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 25° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 반응이 완료됨을 확인했다. 반응 혼합물을 염수 (30 mL)에 붓고 EtOAc (10 mL x 4)로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (10 mL x 2)로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조 및 농축하여 조 생성물을 얻었다. 조 생성물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (4 g 실리카 겔 컬럼, EtOAc/석유 에터 = 20-100% 이후 MeOH/EtOAc = 10-30%, 40 mL/분)로 정제하여 생성물 (50 mg)을 수득하였다. 조 생성물을 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150*25 mm* 5um; 이동상: $[\text{H}_2\text{O} (\text{NH}_4\text{HCO}_3) - \text{ACN}]$; B%: 36%-66%, 10 분)로 추가 정제 및 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)-4-메톡시페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (10.8 mg, 11.34 μmol , 14.03% 수율, 93.2% 순도)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 888.6$.

[0606] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 10.24 (s, 1H), 8.27 - 8.25 (m, 2H), 8.14 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.95 (s,

1H), 7.48 - 7.46 (m, 2H), 6.95 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.87 - 6.84 (m, 2H), 4.79 - 4.70 (m, 1H), 4.41 - 4.35 (m, 1H), 4.06 - 3.99 (m, 4H), 3.92 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 3.54 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 3.31 (s, 3H), 3.13 - 3.08 (m, 1H), 3.04 - 2.99 (m, 4H), 2.68 - 2.62 (m, 3H), 2.59 - 2.53 (m, 8H), 1.97 - 1.83 (m, 4H), 1.73 - 1.66 (m, 2H), 1.61 - 1.53 (m, 4H), 1.48 - 1.37 (m, 2H).

[0607]

실시예 32. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페라진-1-일)프로판노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 32)의 합성



[0608]

[0609]

단계 1. 3-((4-브로모페닐)아미노)프로판산 (2)의 합성

[0610]

톨루엔 (30 mL) 내 4-브로모아닐린 (2 g, 11.63 mmol) 및 아크릴산 (1.26 g, 17.44 mmol, 1.20 mL) 혼합물을 100 ° C 에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 피크 (60%)를 확인하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하였다. 조 생성물을 석유 에터 : EtOAc = 10:1 (20 mL)에 용해시키고 20 분간 교반하고, 여과하였다. 여과케이크를 모아서 건조하여 갈색 고체의 3-((4-브로모페닐)아미노)프로판산 (3 g, crude)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 244.0$

[0611]

단계 2. 1-(4-브로모페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (3)의 합성

[0612]

AcOH (20 mL) 내 3-((4-브로모페닐)아미노)프로판산 (3 g, 5.35 mmol) 용액에 우레아 (3.22 g, 53.55 mmol, 2.87 mL)를 첨가하고, 혼합물을 120 ° C 에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 주 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하였다. 조 생성물을 EtOAc (20 mL)에서 용해시키고 20분간 교반하고, 여과하였다. 여과케이크를 모아서 건조하여 회색 고체의 1-(4-브로모페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (1.6 g, crude)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 269$

[0613]

단계 3. tert-부틸 4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페라진-1-카복실레이트 (4)의 합성

[0614]

디옥산 (100 mL) 내 1-(4-브로모페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (1.3 g, 4.83 mmol) 용액에 tBuONa (2 M, 7.25 mL) 및 tert-부틸 피페라진-1-카복실레이트 (1.08 g, 4.83 mmol)를 첨가한 후, XphosPdG₄ (415.70 mg, 483.10 μmol)를 25 ° C 에서 첨가하였다. 혼합물을 90 ° C에서 N₂ 하 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 1-

(4-브로모페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 피크 (53 %)를 확인하였다. 혼합물을 EtOAc (50 mL) 및 H₂O (100 mL)로 희석하고 여과하였다. 여과물을 EtOAc (40 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 Na₂SO₄로 건조하고, 여과하였다. 여과물을 농축하였다. 조 생성물을 석유 에터 : EtOAc = 1:1 (60 mL)로 분쇄하고 30분간 교반하였다. 그리고 나서 혼합물을 여과하였다. 여과케이크를 모아서 건조하여 회색 고체의 tert-부틸 4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페라진-1-카복실레이트 (1.5 g, crude)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=375.1

[0615] 단계 4. 1-(4-(피페라진-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (5)의 합성

[0616] 디옥산 (2 mL) 내 tert-부틸 4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페라진-1-카복실레이트 (0.5 g, 1.34 mmol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 15 mL)을 25 ° C 에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 25 ° C 에서 30분동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 주 피크를 확인하였다. 혼합물 용액을 감압 농축하여 갈색 오일의 1-(4-(피페라진-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (420 mg, crude, HCl 염)을 수득하였다. MS(M+H)⁺=275.1

[0617] 단계 5. tert-부틸 (1-(3-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (6)의 합성

[0618] DMF (3 mL) 내 tert-부틸 (1-(3-클로로프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (785.96 mg, 2.70 mmol) 및 1-(4-(피페라진-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (420 mg, 1.35 mmol, HCl 염) 용액에 NaI (20.26 mg, 135.14 μmol), DIPEA (523.98 mg, 4.05 mmol, 706.18 μL)를 25 ° C 에서 첨가하고, 혼합물을 80 ° C 에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 1-(4-(피페라진-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 피크 (30%)를 확인하였다. 혼합물을 DCM (30 mL)로 희석하고 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (4 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~100% EtOAc/석유 에터 gradient @ 70 mL/분; Eluent of 0~50% MeOH / EtOAc @ 70 mL/분)로 정제하여 갈색 고체의 tert-부틸 (1-(3-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (0.5 g, crude)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=529.3

[0619] 단계 6. 1-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (7)의 합성

[0620] DCM (5 mL) 내 tert-부틸 (1-(3-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (180 mg, 340.50 μmol) 용액에 TFA (1.54 g, 13.51 mmol, 1 mL)를 25 ° C 에서 첨가하였다. 생성된 혼합물을 25 ° C 에서 30분간 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 주 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하여 갈색 오일의 1-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (180 mg, crude, TFA 염)을 수득하였다. MS(M+H)⁺=429.2

[0621] 단계 7. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 32)의 합성

[0622] DMF (2 mL) 내 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (70 mg, 156.45 μmol) 용액에 HATU (89.23 mg, 234.68 μmol) 및 DIPEA (60.66 mg, 469.35 μmol, 81.75 μL)를 첨가하고, 10분간 교반한 후, 1-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (118.83 mg, 219.03 μmol, TFA 염)을 첨가하고 생성된 혼합물을 25 ° C 에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (48 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (4 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~100% EtOAc/석유 에터 gradient @ 60 mL/분; Eluent of 0~50% MeOH / EtOAc @ 60 mL/분)로 정제하고 prep-TLC (DCM : MeOH = 10:1; R_f = 0.5) 및 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150 x 25mm x 5 μm; 이동상: [물 (NH₄HCO₃) - ACN]; B%: 26% - 59%, 8 분)로 재정제하고, 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페라진-1-일)프로파노일)피페

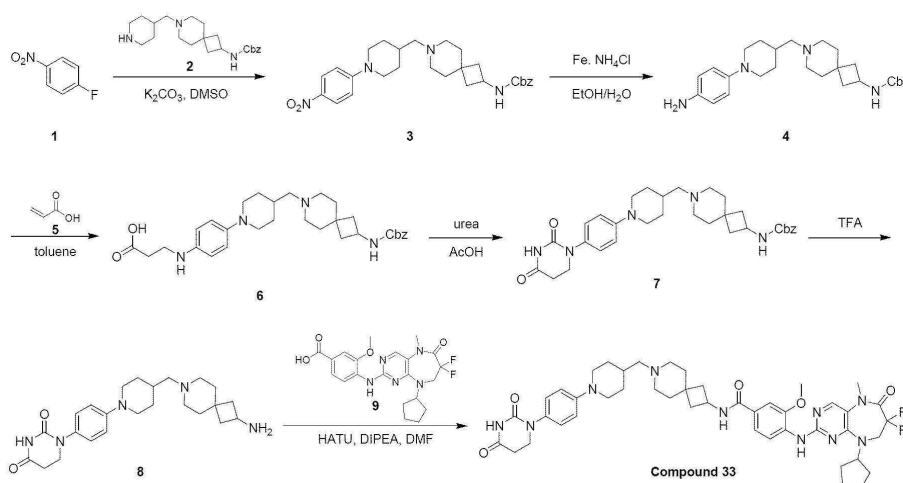
리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (23.6 mg, 26.96 μmol , 17.23% 수율, 98% 순도)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 858.5$

[0623]

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 10.25 (s, 1H), 8.30 - 8.24 (m, 2H), 8.15 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.53 - 7.44 (m, 2H), 7.14 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 6.93 (d, J = 9.1 Hz, 2H), 4.83 - 4.70 (m, 1H), 4.39 (br d, J = 12.5 Hz, 1H), 4.04 (br t, J = 14.0 Hz, 3H), 3.93 (s, 4H), 3.69 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.32 - 3.28 (m, 3H), 3.19 - 3.06 (m, 5H), 2.72 - 2.64 (m, 3H), 2.63 - 2.53 (m, 8H), 1.98 - 1.78 (m, 4H), 1.73 - 1.36 (m, 8H).

[0624]

실시예 33. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 33)의 합성



[0625]

단계 1. 벤질 (7-((1-(4-니트로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (3)의 합성

[0626]

DMSO (4 mL) 내 1-플루오로-4-니트로-벤젠 (0.2 g, 1.42 mmol, 150.38 μL) 용액에 20° C에서 K_2CO_3 (587.70 mg, 4.25 mmol) 및 벤질(7-(피페리딘-4-일메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (636.11 mg, 1.56 mmol, HCl 염)를 첨가하고 생성된 혼합물을 40° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 벤질(7-(피페리딘-4-일메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트가 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (50 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 H_2O (15 mL)로 희석 후 EtOAc (15 mL x 3)으로 추출하였다. 유기상을 염수 (15 mL x 3)으로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조, 여과 및 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (10 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~100% EtOAc /석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 황색 고체의 벤질 (7-((1-(4-니트로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (431 mg, 874.93 μmol , 61.73% 수율)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 493.3$

[0628]

단계 2. 벤질 (7-((1-(4-아미노페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (4)의 합성

[0629]

EtOH (10 mL) 및 H_2O (2 mL) 내 벤질 (7-((1-(4-니트로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (431 mg, 874.93 μmol) 용액에 20° C에서 Fe (244.30 mg, 4.37 mmol) 및 NH_4Cl (234.01 mg, 4.37 mmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 80° C에서 6시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 주 피크 (91 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 포화 NaHCO_3 (15 mL)를 사용하여 pH=10으로 조정 후 EtOAc (15 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 Na_2SO_4 로 건조, 여과 및 농축하여 보라색 오일의 벤질 (7-((1-(4-아미노페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (485 mg, crude)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+ = 463.4$

[0630]

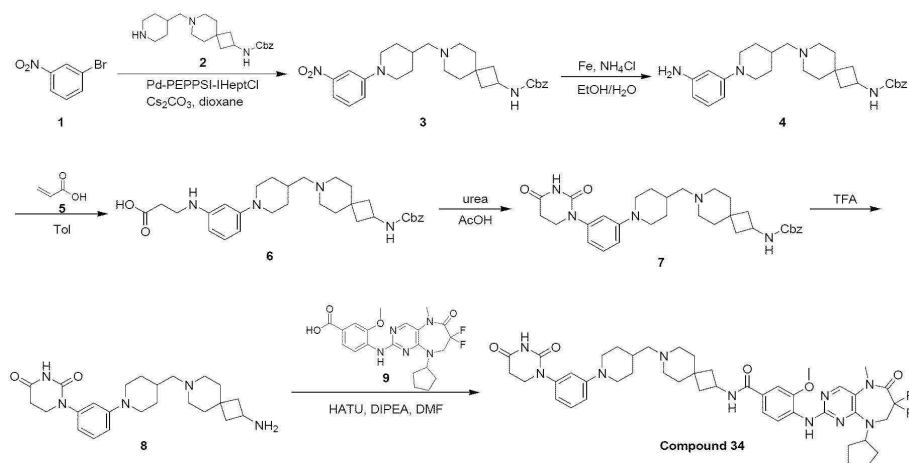
단계 3. 3-((4-(4-((2-((벤질옥시)카보닐)아미노)-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)페닐)아미노)프로판산 (6)의 합성

- [0631] 톨루엔 (6 mL) 내 벤질 (7-((1-(4-아미노페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (485 mg, 1.05 mmol) 용액에 20° C에서 아크릴산 (75.55 mg, 1.05 mmol, 71.95 μ L)를 첨가하고 생성된 혼합물을 100° C에서 15시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 남아있었고 원하는 질량의 피크가 검출되었다. 20° C에서 추가의 아크릴산 (37.77 mg, 524.18 μ mol, 35.98 μ L)을 첨가 후 반응 혼합물을 100° C에서 추가 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 남은 미량의 출발물질 및 원하는 질량의 피크 (43 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 진공 농축하여 황색 고체의 3-((4-(4-((2-((벤질옥시)카보닐)아미노)-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)페닐)아미노)프로판산 (560 mg, crude)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 535.3$
- [0632] 단계 4. 벤질 (7-((1-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (7)의 합성
- [0633] AcOH (10 mL) 내 3-((4-(4-((2-((벤질옥시)카보닐)아미노)-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)페닐)아미노)프로판산 (560 mg, 1.05 mmol) 용액에 20° C에서 우레아 (628.98 mg, 10.47 mmol, 561.59 μ L)를 첨가 하고 생성된 혼합물을 120° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (37 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 H₂O (20 mL)로 희석 후 EtOAc (20 mL x 3)으로 추출하였다. LCMS로 수층(aqueous phase)에서 원하는 생성물이 검출되었다. 수층을 진공 농축 하였다. 조 생성물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (10 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~100 % EtOAc/석유 에터 to 0~10% DCM/ MeOH gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 황색 고체의 벤질 (7-((1-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (156 mg, 262.00 μ mol, 25.02% 수율, 94% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 560.3$
- [0634] 단계 5. 1-(4-(4-((2-아미노-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (8)의 합성
- [0635] 20° C에서 TFA (2 mL) 내 벤질 (7-((1-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (56 mg, 100.05 μ mol) 혼합물 및 생성된 혼합물을 40° C에서 4시간 동안 교반 하였다. LCMS로 남은 미량의 출발물질 및 원하는 질량의 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 진공 농축하여 황색 오일의 1-(4-(4-((2-아미노-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (54 mg, crude, TFA 염)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 426.4$
- [0636] 단계 6. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 33)의 합성
- [0637] DMF (1 mL) 내 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (40 mg, 89.40 μ mol) 용액에 HATU (37.39 mg, 98.34 μ mol) 및 DIPEA (23.11 mg, 178.80 μ mol, 31.14 μ L)를 첨가하였다. 혼합물을 20° C에서 10분 동안 교반 하고, DMF (1 mL) 내 1-(4-(4-((2-아미노-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (53.06 mg, 98.34 μ mol, TFA 염) 및 DIPEA (69.32 mg, 536.39 μ mol, 93.43 μ L)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 모든 출발물질이 소모됨을 확인하였고 원하는 질량이 피크 (33%)가 검출되었다. 워크업을 위해 다른 배치 (60 mg 스케일)와 반응 혼합물을 합쳤다. 합쳐진 반응 혼합물을 H₂O (12 mL)로 희석 후 EtOAc (12 mL x 3)으로 추출하였다. 합친 유기상을 염수 (12 mL x 3)으로 세척 후 Na₂SO₄ 로 건조, 여과 및 진공 농축했다. 잔여물을 prep-TLC (SiO₂, DCM: MeOH = 8:1)로 정제 및 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex Synergi Polar-RP 100*25 mm*4 μ m; 이동상: [H₂O (TFA) - ACN]; B%: 25% - 45%, 7 분)로 재 정제하고 용출물을 동결 건조하여 순수한 생성물 B 및 불순물이 섞인 생성물 C를 수득하였다. 불순물이 섞인 생성물 C를 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex Synergi Polar-RP 100*25 mm*4 μ m; 이동상: [H₂O (TFA) - ACN]; B%: 26% - 46%, 7 분)로 재정제하고 용출물을 동결 건조하여 생성물 D를 수득하였다. 생성물 B와 D를 합치고 동결 건조 하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(4-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (16.9 mg, 15.14 μ mol, 16.93% 수율, 97% 순도, 2TFA)

를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 855.2$

[0638] ^1H NMR (400 MHz, CD_3CN) δ = 9.34 - 9.23 (m, 1H), 8.22 - 8.10 (m, 2H), 7.98 (s, 1H), 7.48 - 7.40 (m, 2H), 7.29 - 7.20 (m, 3H), 7.11 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 4.95 - 4.83 (m, 1H), 4.57 - 4.44 (m, 1H), 4.01 (t, J = 12.8 Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.75 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.70 (br d, J = 12.0 Hz, 2H), 3.52 - 3.39 (m, 2H), 3.32 (s, 3H), 3.00 - 2.94 (m, 2H), 2.90 (dt, J = 1.8, 12.2 Hz, 3H), 2.73 - 2.70 (m, 2H), 2.49 - 2.45 (m, 1H), 2.31 - 2.24 (m, 1H), 2.14 - 1.95 (m, 8H), 1.91 - 1.70 (m, 6H), 1.65 - 1.46 (m, 6H).

[0639] 실시예 34. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 34)의 합성



[0640]

[0641] 단계 1. 벤질 (7-((1-(6-클로로피리딘-2-일)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (3)의 합성

[0642] 디옥산 (10 mL) 내 1-브로모-3-니트로벤젠 (500 mg, 2.48 mmol) 및 벤질 (7-(피페리딘-4-일메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (1.11 g, 2.72 mmol, HCl 염) 용액에 N_2 기체 하 20° C에서 CS_2CO_3 (2.42 g, 7.43 mmol) 및 Pd-PEPPSI-IHeptCl (24.08 mg, 24.75 μ mol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 100° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크가 검출되었다. 반응 혼합물을 진공 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (10 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~60% EtOAc/석유 에터 gradient @ 100 mL/분)로 정제하여 황색 오일의 벤질 (7-((1-(6-클로로피리딘-2-일)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (1 g, 2.03 mmol, 82.01% 수율)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 493.2$

[0643] 단계 2. 벤질 (7-((1-(3-아미노페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (4)의 합성

[0644] EtOH (20 mL) 및 H_2O (4 mL) 내 벤질 (7-((1-(3-니트로페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (1 g, 2.03 mmol) 용액에 20° C에서 Fe (566.83 mg, 10.15 mmol) 및 NH_4Cl (542.94 mg, 10.15 mmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 80° C에서 6시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (77 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 포화 $NaHCO_3$ (15 mL)을 사용하여 pH=10으로 조정했고 EtOAc (15 mL x 3)으로 추출했다. 합친 유기상을 Na_2SO_4 로 건조, 여과 및 농축하여 황색 오일의 벤질 (7-((1-(3-아미노페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (862 mg, crude)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 463.4$

[0645] 단계 3. 3-((3-(4-((2-((벤질옥시)카보닐)아미노)-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)페닐)아미노)프로판산 (6)의 합성

[0646] 톨루엔 (10 mL) 내 벤질 (7-((1-(3-아미노페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (862 mg, 1.86 mmol) 용액에 20° C에서 아크릴산 (134.27 mg, 1.86 mmol, 127.88 μ L)를 첨가하고 생성된 혼합

물을 100° C에서 18시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (33 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 진공 농축하여 황색 오일의 3-((3-(4-((2-(((벤질옥시)카보닐)아미노)-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)페닐)아미노)프로판산 (997 mg, crude)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 535.4$

[0647] 단계 4. 벤질 (7-((1-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (7)의 합성

[0648] AcOH (10 mL) 내 3-((3-(4-((2-(((벤질옥시)카보닐)아미노)-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)페닐)아미노)프로판산 (997 mg, 1.86 mmol) 용액에 20° C에서 우레아 (1.12 g, 18.65 mmol, 999.83 μ L)를 첨가 후 120° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (21 %)가 검출되었다. 반응 혼합물을 진공 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (20 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~100 % EtOAc/석유 에터 to 0~10% DCM : MeOH gradient @ 100 mL/분)에 이어 prep-TLC (SiO₂, DCM : MeOH = 10:1)로 정제하여 황색 고체의 벤질 (7-((1-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (325 mg, 557.44 μ mol, 29.90% 수율, 96% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 560.3$

[0649] 단계 5. 1-(3-(4-((2-아미노-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (8)의 합성

[0650] TFA (4 mL) 내 벤질 (7-((1-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (100 mg, 178.67 μ mol) 혼합물을 40° C에서 18시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량이 검출되었다. 반응 혼합물을 진공 농축하여 황색 오일의 1-(3-(4-((2-아미노-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (98 mg, crude, TFA 염)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 426.4$

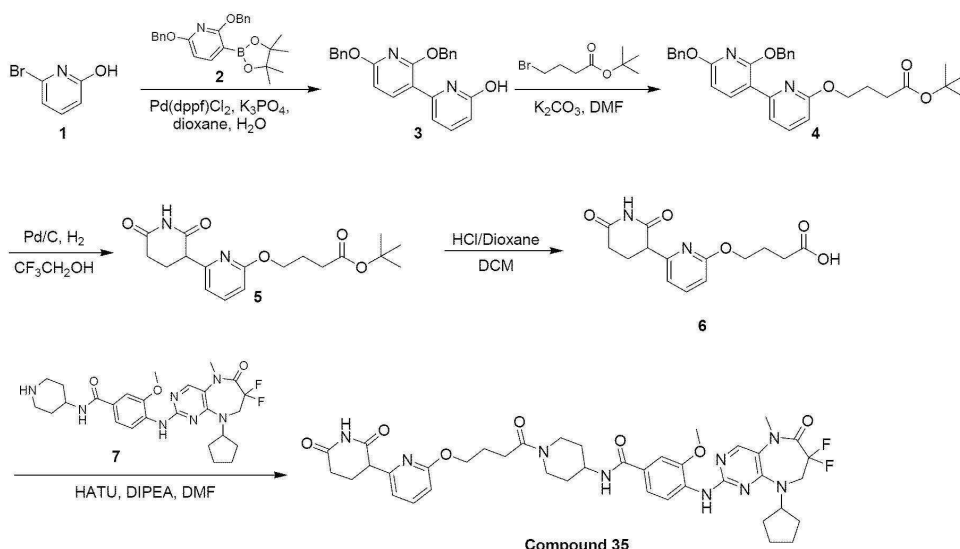
[0651] 단계 6. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 34)의 합성

[0652] DMF (1 mL) 내 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (60 mg, 134.10 μ mol) 용액에 HATU (56.09 mg, 147.51 μ mol) 및 DIPEA (51.99 mg, 402.29 μ mol, 70.07 μ L)를 첨가하였다. 혼합물을 20° C에서 10분 동안 교반 하고, DMF (1 mL) 내 1-(3-(4-((2-아미노-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)페닐)디히드로피리미딘-2,4(1H,3H)-디온 (94.07 mg, 174.33 μ mol, TFA 염) 용액을 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모됨을 확인하였고 원하는 질량의 피크 (64%)가 검출되었다. 반응 혼합물을 H₂O (12 mL)로 희석 후 EtOAc (12 mL x 3)으로 추출하였다. 유기상을 Na₂SO₄ 로 건조, 여과 및 감압 농축했다. 잔여물을 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex Synergi Polar-RP 100*25 mm*4 μ m; 이동상: [H₂O (TFA) - ACN]; B%: 24% - 44%, 7 분)로 정제하고 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150*25 mm* 5 μ m; 이동상: [H₂O (NH₄HCO₃) - ACN]; B%: 52% - 82%, 8 분)로 재정제하고, 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(3-(2,4-디옥소테트라히드로피리미딘-1(2H)-일)페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (13 mg, 14.75 μ mol, 11.00% 수율, 97% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 855.2$

[0653] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.29 (s, 1H), 8.43 (br d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.31 - 8.24 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.51 - 7.45 (m, 2H), 7.18 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.80 (br d, J = 8.3 Hz, 1H), 6.67 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.76 (quin, J = 8.0 Hz, 1H), 4.45 - 4.33 (m, 1H), 4.04 (br t, J = 14.1 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.74 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.66 (br d, J = 12.1 Hz, 2H), 3.51 - 3.32 (m, 5H), 2.71 - 2.63 (m, 4H), 2.31 - 2.22 (m, 2H), 2.18 - 2.09 (m, 4H), 1.98 - 1.89 (m, 2H), 1.85 - 1.66 (m, 7H), 1.64 - 1.53 (m, 8H), 1.24 - 1.12 (m, 2H).

[0654] 실시예 35. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디

아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(4-((6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)옥시)부타노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 35)의 합성



단계 1. 2',6'-비스(벤질옥시)-[2,3'-비피리딘]-6-올 (3)의 합성

디옥산 (8 mL) 및 H₂O (0.8 mL) 내 6-브로모피리딘-2-올 (400 mg, 2.30 mmol) 및 2,6-비스(벤질옥시)-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보로란-2-일)피리딘 (959.35 mg, 2.30 mmol) 용액에 Pd(dppf)Cl₂ (168.21 mg, 229.89 μmol) 및 K₃PO₄ (1.46 g, 6.90 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 90 ° C N₂ 기체 하에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (40 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하였다. 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, 석유 에터/EtOAc=3/4 to 0/1)로 정제하여 백색 고체의 2',6'-비스(벤질옥시)-[2,3'-비피리딘]-6-올 (420 mg, 852.18 μmol, 37.07% 수율, 78% 순도)을 수득하였다. MS(M+H)⁺=385.3.

단계 2. tert-부틸 4-((2',6'-비스(벤질옥시)-[2,3'-비피리딘]-6-일)옥시)부타노에이트 (4)의 합성

DMF (8 mL) 내 2',6'-비스(벤질옥시)-[2,3'-비피리딘]-6-올 (390 mg, 1.01 mmol) 용액에 K₂CO₃ (420.63 mg, 3.04 mmol) 및 tert-부틸 4-브로모부타노에이트 (226.34 mg, 1.01 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 70 ° C 에서 5시간 동안 교반 하였다. LCMS로 2',6'-비스(벤질옥시)-[2,3'-비피리딘]-6-올이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 하나의 주 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 물 (100 mL)로 희석하고 EtOAc (30 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (30 mL)로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하였다. 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, 석유 에터/EtOAc=1/0 to 100/3)로 정제하여 백색 고체의 tert-부틸 4-((2',6'-비스(벤질옥시)-[2,3'-비피리딘]-6-일)옥시)부타노에이트 (420 mg, 765.64 μmol, 75.47% 수율, 96% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=527.9

단계 3. tert-부틸 4-((6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)옥시)부타노에이트 (5)의 합성

CF₃CH₂OH (20 mL) 내 tert-부틸 4-((2',6'-비스(벤질옥시)-[2,3'-비피리딘]-6-일)옥시)부타노에이트 (370 mg, 702.59 μmol) 용액에 N₂ 기체 하에서 Pd/C (10%, 50 mg)를 첨가하였다. 현탁액을 탈기하고 H₂로 3차례 퍼징 하였다. 혼합물을 25 ° C H₂ (15 Psi) 하에서 4시간 동안 교반 하였다. LCMS로 tert-부틸 4-((2',6'-비스(벤질옥시)-[2,3'-비피리딘]-6-일)옥시)부타노에이트가 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 피크 (74 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 여과하고 여과케이크를 EtOAc (100 mL)로 세척하고, 여과물을 진공 농축하여 무색 오일의 tert-부틸 4-((6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)옥시)부타노에이트 (260 mg, crude)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=349.2

단계 4. 4-((6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)옥시)부탄산 (6)의 합성

HCl/디옥산 (4 M, 2 mL) 및 DCM (2 mL) 내 tert-부틸 4-((6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)옥시)부타

노에이트 (230 mg, 660.17 μmol) 혼합물을 25 ° C 에서 30분간 교반 하였다. LCMS로 tert-부틸 4-((6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)옥시)부타노에이트가 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 하나의 주 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하여 백색 고체의 4-((6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)옥시)부탄산 (190 mg, crude)을 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=292.8$

[0664]

단계 5. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(4-((6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)옥시)부타노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 35)의 합성

[0665]

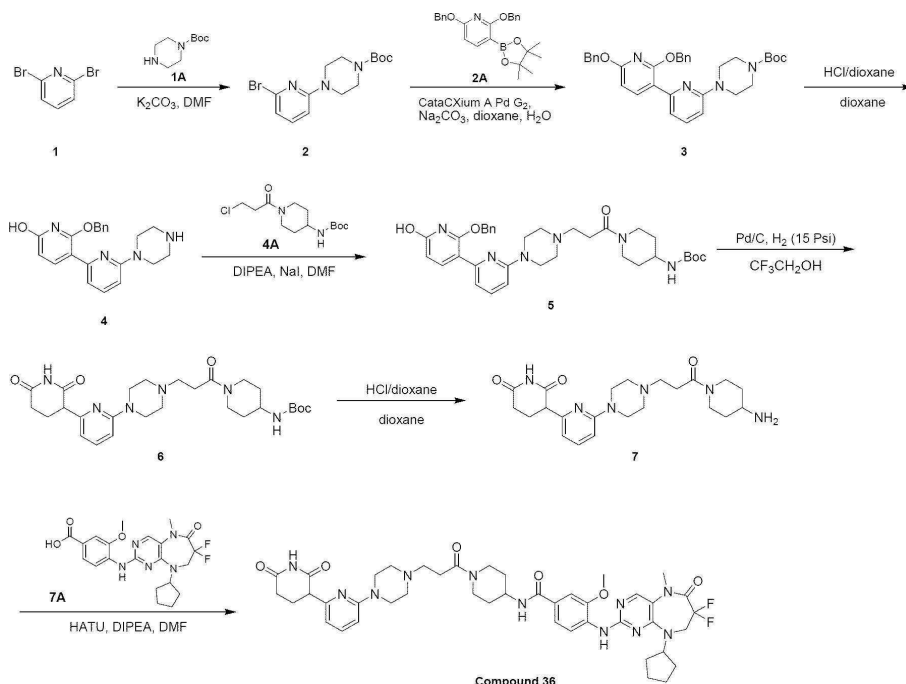
DMF (3 mL) 내 4-((6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)옥시)부탄산 (80 mg, 273.70 μmol) 및 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시-N-(피페리딘-4-일)벤즈아미드 (144.95 mg, 273.70 μmol) 용액에 HATU (156.11 mg, 410.56 μmol) 및 DIPEA (106.12 mg, 821.11 μmol , 143.02 μL)를 첨가하였다. 혼합물을 25 ° C 에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 4-((6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)옥시)부탄산이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 피크 (73 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 물 (50 mL)로 희석하고 EtOAc (20 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (20 mL)로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하였다. 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO_2 , MeOH/EtOAc=0/1 to 1/10)로 정제한 후 prep-HPLC (neutral 조건: 컬럼: Waters Xbridge 150 x 25mm x 5 μm ; 이동상: [water (NH_4HCO_3) - ACN]; B%: 40% - 70%, 8 분)로 정제하고 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(4-((6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)옥시)부타노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (56.1 mg, 65.60 μmol , 23.97% 수율, 94% 순도)를 수득하였다. $\text{MS}(\text{M}+\text{H})^+=804.0$

[0666]

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 10.87 (s, 1H), 8.32 - 8.24 (m, 2H), 8.18 - 8.07 (m, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.68 (dd, J = 7.4, 8.3 Hz, 1H), 7.53 - 7.45 (m, 2H), 6.94 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 6.73 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.83 - 4.72 (m, 1H), 4.48 - 37 (m, 1H), 4.27 - 4.17 (m, 2H), 4.10 - 4.02 (m, 3H), 3.97 - 3.86 (m, 5H), 3.33 (s, 3H), 3.17-3.06 (m, 1H), 2.74 - 2.56 (m, 3H), 2.49 - 2.40 (m, 2H), 2.30 - 2.20 (m, 1H), 2.18 - 2.10 (m, 1H), 1.99 - 1.78 (m, 6H), 1.77 - 1.69 (m, 2H), 1.66 - 1.55 (m, 4H), 1.51 - 1.35 (m, 2H).

[0667]

실시예 36. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 36)의 합성



[0668]

[0669]

[0670]

단계 1. tert-부틸 4-(6-브로모피리딘-2-일)피페라진-1-카복실레이트 (2)의 합성

DMF (20 mL) 내 2,6-디브로모피리딘(3 g, 12.66 mmol) 용액에 K_2CO_3 (3.50 g, 25.33 mmol) 및 tert-부틸 피페라진-1-카복실레이트 (2.36 g, 12.66 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 80 ° C 에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 물 (100 mL)로 희석하고 EtOAc (100 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (50 mL x 4)로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하고 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (40 g 실리카 겔 컬럼, EtOAc/석유 에터 = 10-20%, 60 mL/분)로 정제하여 백색 고체의 tert-부틸 4-(6-브로모피리딘-2-일)피페라진-1-카복실레이트 (3 g, 8.77 mmol, 69.22% 수율, 100% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 342.1$

[0671]

[0672]

단계 2. tert-부틸 4-(2',6'-비스(벤질옥시)-[2,3'-비피리딘]-6-일)피페라진-1-카복실레이트 (3)의 합성

디옥산 (20 mL) 및 H_2O (5 mL) 내 2,6-비스(벤질옥시)-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보로란-2-일)피리딘 (1.5 g, 3.59 mmol), tert-부틸 4-(6-브로모피리딘-2-일)피페라진-1-카복실레이트 (1.23 g, 3.59 mmol), CataCXium A Pd G_2 (120.02 mg, 179.50 μ mol), 및 Na_2CO_3 (761.01 mg, 7.18 mmol) 혼합물을 탈기하고 N_2 로 3차례 퍼징하고, 혼합물을 60 ° C N_2 기체 하에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 물 100 mL로 희석하고 EtOAc (100 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (50 mL x 4)로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하고 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (40 g 실리카 겔 컬럼, EtOAc/석유 에터 = 0-10%, 60 mL/분)로 정제하고 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge C18 150 x 50 mm x 10 μ m; 이동상: [water (NH_4HCO_3) -ACN]; B%: 68% - 98%, 11 분)로 재정제하고 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 tert-부틸 4-(2',6'-비스(벤질옥시)-[2,3'-비피리딘]-6-일)피페라진-1-카복실레이트 (0.5 g, 624.25 μ mol, 17.39% 수율, 69% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 553.5$

[0673]

[0674]

단계 3. 2'-(벤질옥시)-6-(피페라진-1-일)-[2,3'-비피리딘]-6'-올 (4)의 합성

디옥산 (10 mL) 내 tert-부틸 4-(2',6'-비스(벤질옥시)-[2,3'-비피리딘]-6-일)피페라진-1-카복실레이트 (0.5 g, 904.71 μ mol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 226.18 μ L)을 첨가하였다. 혼합물을 25 ° C 에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크를 확인하였다. 반응 용액을 농축하여 황색 고체의 2'-(벤질옥시)-6-(피페라진-1-일)-[2,3'-비피리딘]-6'-올 (400 mg, crude, HCl)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 363.3$

[0675]

단계 4. tert-부틸 (1-(3-(4-(2'-(벤질옥시)-6'-히드록시-[2,3'-비피리딘]-6-일)피페라진-1-일)프로파노일)피

페리딘-4-일)카바메이트 (5)의 합성

[0676] DMF (4 mL) 내 2'-(벤질옥시)-6-(피페라진-1-일)-[2,3'-비피리딘]-6'-올 (200 mg, 501.40 μ mol, HCl 염) 및 tert-부틸 (1-(3-클로로프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (437.40 mg, 1.50 mmol) 용액에 NaI (7.52 mg, 50.14 μ mol) 및 DIPEA (259.20 mg, 2.01 mmol, 349.33 μ L)를 첨가하였다. 혼합물을 80 ° C 에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 물 (50 mL)로 희석하고 EtOAc (10 mL x 2)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (20 mL x 3)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (10 g 실리카 겔 컬럼, EtOAc/석유 에터 = 0-10%, 20 mL/분)로 정제하고 황색 오일의 tert-부틸 (1-(3-(4-(2'-(벤질옥시)-6'-히드록시-[2,3'-비피리딘]-6-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (230 mg, 372.92 μ mol, 74.38% 수율)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=617.5

[0677]

단계 5. tert-부틸 (1-(3-(4-(6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (6)의 합성

[0679] 2,2,2-트리플루오로에탄올 (30 mL) 내 tert-부틸 (1-(3-(4-(2'-(벤질옥시)-6'-히드록시-[2,3'-비피리딘]-6-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (200 mg, 324.28 μ mol) 용액에 N₂ 기체 하에서 Pd/C (149.74 mg, 10% 순도)를 첨가하였다. 혼합물을 탈기하고 H₂로 3차례 퍼징하고, 생성된 혼합물을 25 ° C H₂ 기체 (50 Psi) 하에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 여과하고 여과물을 감압 농축하였다. 잔여물을 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150 x 25 mm x 5 μ m; 이동상: [water (NH₄HCO₃) - ACN]; B%: 23% - 53%, 8 분)를 정제하고, 용출물을 동결 건조하여 황색 고체의 tert-부틸 (1-(3-(4-(6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (60 mg, 110.09 μ mol, 33.95% 수율, 97% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=529.4

[0680] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.03 (br s, 1 H), 7.53 - 7.45 (m, 1 H), 6.66 - 6.52 (m, 2 H), 4.60 - 4.43 (m, 2 H), 3.92 - 3.79 (m, 2 H), 3.75 - 3.47 (m, 5 H), 3.20 - 3.08 (m, 1 H), 3.00 - 2.53 (m, 11 H), 2.40 - 2.25 (m, 2 H), 2.10 - 1.90 (m, 3 H), 1.45 (s, 9 H), 1.40 - 1.23 (m, 3 H).

[0681]

단계 6. 3-(6-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)피리딘-2-일)피페리딘-2,6-디온 (7)의 합성

[0683] 디옥산 (5 mL) 내 tert-부틸 (1-(3-(4-(6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (60 mg, 113.50 μ mol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 15.00 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 25 ° C 에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하여 황색 고체의 3-(6-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)피리딘-2-일)피페리딘-2,6-디온 (60 mg, crude, HCl 염)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 429.3

[0684]

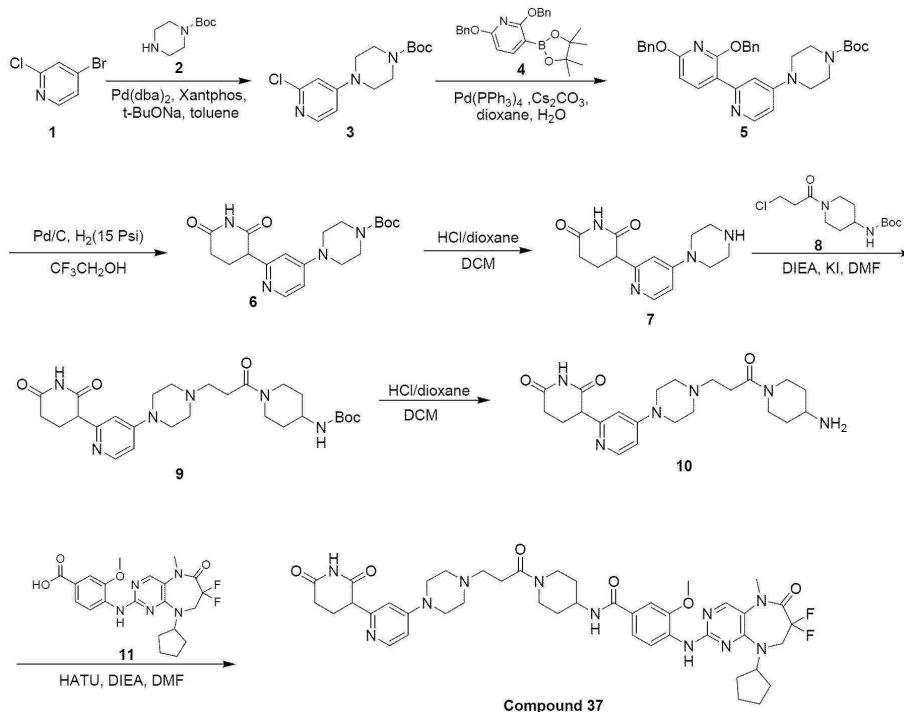
단계 7. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 36)의 합성

[0686] DMF (1 mL) 내 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (52.21 mg, 116.68 μ mol) 용액에 HATU (53.24 mg, 140.01 μ mol) 및 DIPEA (30.16 mg, 233.36 μ mol, 40.65 μ L)를 첨가하고, 혼합물을 25 ° C 에서 10분간 교반하고, DMF (0.2 mL) 내 3-(6-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)피리딘-2-일)피페리딘-2,6-디온 (50 mg, 116.68 μ mol, HCl 염) 및 DIPEA (45.24 mg, 350.04 μ mol, 60.97 μ L) 용액을 25 ° C 에서 한 방울씩 첨가하고 생성된 혼합물을 25 ° C 에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 물 (20 mL)로 희석하고 EtOAc (10 mL x 2)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (5 mL x 3)로 세

척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고 감압 농축하였다. 잔여물을 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150 x 25 mm x 5 μm; 이동상: [물 (NH₄HCO₃) - ACN]; B%: 33%-63%, 9분)로 정제하고 용출물을 동결 건조하여 황색 고체의 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-2-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (30.5 mg, 34.48 μmol, 29.55% 수율, 97% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 858.5

[0687] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.79 (s, 1 H), 8.31 - 8.23 (m, 2 H), 8.15 (d, *J*=7.70 Hz, 1 H), 7.96 (s, 1 H), 7.57 - 7.43 (m, 3 H), 6.72 (d, *J*=8.56 Hz, 1 H), 6.60 (d, *J*=7.21 Hz, 1 H), 4.83 - 4.70 (m, 1 H), 4.46 - 4.34 (m, 1 H), 4.13 - 4.00 (m, 3 H), 4.00 - 3.89 (m, 4 H), 3.81 (t, *J*=6.36 Hz, 1 H), 3.50 - 3.38 (m, 4 H), 3.28 (br d, *J*=3.55 Hz, 3 H), 3.18 - 3.07 (m, 1 H), 2.72 - 2.52 (m, 10 H), 2.48 - 2.46 (m, 1 H), 2.19 - 2.08 (m, 2 H), 1.99 - 1.79 (m, 4 H), 1.75 - 1.33 (m, 8 H).

[0688] 실시예 37. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-4-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 37)의 합성



[0689]

단계 1. tert-부틸 4-(2-클로로피리딘-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (3)의 합성

[0690]

[0691] 톨루엔 (10 mL) 내 4-브로모-2-클로로피리딘 (1 g, 5.20 mmol) 및 tert-부틸 피페라진-1-카복실레이트 (967.83 mg, 5.20 mmol) 용액에 Pd(dba)₂ (298.80 mg, 519.64 μmol), Xantphos (601.35 mg, 1.04 mmol) 및 t-BuONa (1.50 g, 15.59 mmol)을 N₂ 기체 하에서 첨가하였다. 혼합물을 90 ° C N₂ 기체 하에서 5시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (16 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하였다. 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, 석유 에터/EtOAc=3/1 to 2/1)로 정제 후 역상 HPLC (0.1% FA 조건: 컬럼: 120 g Flash 컬럼 Welch Ultimate XB-C₁₈ 20-40 μm; Flow rate: 85 mL/분; 이동상: MeCN/H₂O; Gradient B%: 5-40% 10분; 40-100% 30분, Instrument: TELEDYNE ISCO CombiFlashRf₁₅₀)로 정제하고 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 tert-부틸 4-(2-클로로피리딘-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (650 mg, 1.96 mmol, 37.81% 수율, 90% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=298.2

[0692] 단계 2. tert-부틸 4-(2',6'-비스(벤질옥시)-[2,3'-비피리딘]-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (5)의 합성

[0693] 디옥산 (10 mL) 및 H₂O (1 mL) 내 tert-부틸 4-(2-chloro피리딘-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (600 mg, 2.01 mmol) 및 2,6-비스(벤질옥시)-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보로란-2-일)피리딘 (840.83 mg, 2.01 mmol) 용액에 Pd(PPh₃)₄ (232.84 mg, 201.49 μmol) 및 Cs₂CO₃ (1.97 g, 6.04 mmol)를 N₂ 기체 하에서 첨가하였다. 혼합물을 마이크로파 하, 125 ° C 에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 tert-부틸 4-(2-chloro피리딘-4-일)피페라진-1-카복실레이트(14 %)가 남아 있음 및 원하는 질량의 피크 (60 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 감압 농축 하였다. 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, 석유 에터/EtOAc=4/1 to 3/1)로 정제하여 백색 고체의 tert-부틸 4-(2',6'-비스(벤질옥시)-[2,3'-비피리딘]-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (450 mg, 781.67 μmol, 38.79% 수율, 96% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=553.3

[0694] **단계 3. tert-부틸 4-(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (6)의 합성**

[0695] CF₃CH₂OH (10 mL) 내 tert-부틸 4-(2',6'-비스(벤질옥시)-[2,3'-비피리딘]-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (450 mg, 814.24 μmol) 용액에 N₂ 기체 하에서 Pd/C (10%, 50 mg)를 첨가하였다. 현탁액을 탈기하고 H₂로 3차례 피징하였다. 혼합물을 25 ° C H₂ (15 Psi) 하에서 4시간 동안 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 피크 (74 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 여과하고 여과케이크를 EtOAc (100 mL)로 세척하고, 여과물을 진공 농축하였다. 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, 석유 에터/EtOAc=4/5 to 0/1)로 정제하여 밝은 녹색 고체의 tert-부틸 4-(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (170 mg, 431.32 μmol, 52.97% 수율, 95% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=375.3

[0696] **단계 4. 3-(4-(피페라진-1-일)피리딘-2-일)피페리딘-2,6-디온 (7)의 합성**

[0697] DCM (1 mL) 내 tert-부틸 4-(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (140 mg, 373.90 μmol), HCl/디옥산 (4 M, 1 mL) 혼합물을 25 ° C 에서 30분간 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 하나의 주 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하여 백색 고체의 3-(4-(피페라진-1-일)피리딘-2-일)피페리딘-2,6-디온 (140 mg, crude, HCl 염)을 수득하였다. MS(M+H)⁺=275.2

[0698] **단계 5. tert-부틸 (1-(3-(4-(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-4-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (9)의 합성**

[0699] DMF (4 mL) 내 3-(4-(피페라진-1-일)피리딘-2-일)피페리딘-2,6-디온 (140 mg, 450.48 μmol, HCl 염) 및 tert-부틸 (1-(3-클로로프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (130.99 mg, 450.48 μmol) 용액에 KI (74.78 mg, 450.48 μmol) 및 DIPEA (174.66 mg, 1.35 mmol, 235.40 μL)를 첨가하였다. 혼합물을 80 ° C 에서 3시간 동안 교반 하였다. LCMS로 3-(4-(피페라진-1-일)피리딘-2-일)피페리딘-2,6-디온이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 피크 (59 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 물 (50 mL)로 희석하고 EtOAc (20 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (20 mL)로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하였다. 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, MeOH/EtOAc=0/1 to 1/10)로 정제하여 밝은 황색 고체의 tert-부틸 (1-(3-(4-(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-4-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (50 mg, 91.74 μmol, 20.37% 수율, 97% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=529.3

[0700] **단계 6. 3-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)피리딘-2-일)피페리딘-2,6-디온 (10)의 합성**

[0701] HCl/디옥산 (4 M, 0.5 mL) 및 DCM (0.5 mL) 내 tert-부틸 (1-(3-(4-(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-4-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (50 mg, 94.58 μmol) 혼합물을 25 ° C 에서 30분간 교반 하였다. LCMS로 출발물질이 완전히 소모되었음 및 원하는 질량의 피크 (46 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하여 황색 고체의 3-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)피리딘-2-일)피페리딘-2,6-디온 (50 mg, crude, HCl 염)을 수득하였다. MS(M+H)⁺=429.4

[0702] **단계 7. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-4-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 37)의 합성**

[0703]

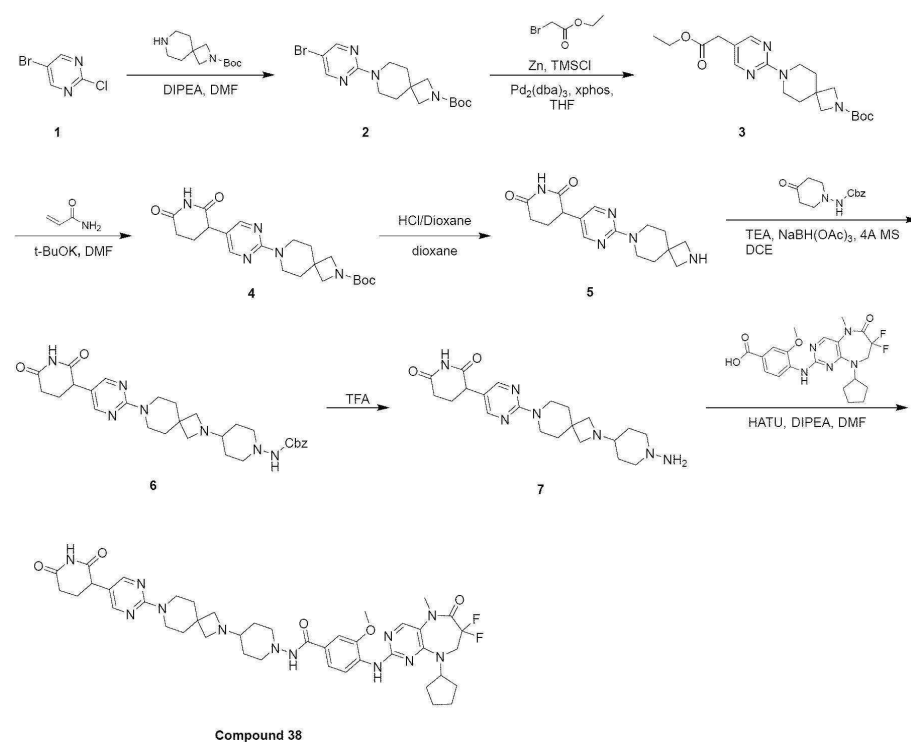
DMF (1.5 mL) 내 3-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)피리딘-2-일)피페리딘-2,6-디온 (50 mg, 107.53 μ mol, HCl 염) 및 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (48.11 mg, 107.53 μ mol) 용액에 HATU (61.33 mg, 161.29 μ mol) 및 DIPEA (41.69 mg, 322.59 μ mol, 56.19 μ L)를 첨가하였다. 혼합물을 25 ° C 에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량 (42 %)을 확인하였다. 반응 혼합물을 물 (50 mL)로 희석하고 EtOAc (20 mL x 3)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (20 mL)로 세척하고, 무수 소듐 설페이트로 건조하고, 여과하고 감압 농축하였다. 잔여물을 prep-HPLC (neutral 조건: 컬럼: Waters Xbridge 150 x 25mm x 5 μ m; 이동상: [물 (NH₄HCO₃) - ACN]; B%: 28% - 58%, 8 분)로 정제하고 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(2-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-4-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (12.6 mg, 22.27 μ mol, 20.71% 수율, 96% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=858.1

[0704]

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.77 (s, 1H), 8.30 - 8.26 (m, 2H), 8.16 (br d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 8.07 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.51 - 7.48 (m, 2H), 6.82 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 6.74 (dd, *J* = 2.4, 6.0 Hz, 1H), 4.81 - 4.75 (m, 1H), 4.43 - 4.36 (m, 1H), 4.11 - 3.97 (m, 4H), 3.94 (s, 3H), 3.85 - 3.80 (m, 1H), 3.33 (br s, 3H), 3.31 (br s, 4H), 3.17 - 3.12 (m, 1H), 2.68 - 2.54 (m, 9H), 2.23 - 2.10 (m, 2H), 1.99 - 1.79 (m, 5H), 1.75 - 1.68 (m, 2H), 1.66 - 1.55 (m, 5H), 1.51 - 1.36 (m, 2H).

[0705]

실시예 38. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-(7-(5-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리미딘-2-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-일)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 38)의 합성



[0706]

[0707]

단계 1. tert-부틸 7-(5-브로모피리미딘-2-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (2)의 합성

[0708]

DMF (25 mL) 내 5-브로모-2-클로로피리미딘 (5 g, 25.85 mmol) 및 tert-부틸 2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (6.44 g, 28.43 mmol) 용액에 DIPEA (6.68 g, 51.70 mmol, 9.00 mL)를 첨가 하고 혼합물을 100° C 에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 주 피크가 검출되었다. 혼합물을 여과 후 여과물을 물 (50 mL)로 희석 및 EtOAc (30 mL x 3)로 추출하였다. 유기상을 염수 (50 mL x 3)로 세척 후 Na₂SO₄ 로 건조, 여과 및 감압 농축하여 갈색 파우더의 tert-부틸 7-(5-브로모피리미딘-2-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (10 g, crude)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 383.0

- [0709] 단계 2. tert-부틸 7-(5-(2-에톡시-2-옥소에틸)피리미딘-2-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (3)의 합성
- [0710] THF (20 mL) 내 Zn (4.78 g, 73.05 mmol) 및 TMSCl (396.83 mg, 3.65 mmol, 463.59 μ L) 용액을 40° C로 가열 후 10분 동안 교반하고, 20° C에서 20분에 걸쳐 에틸 2-브로모아세테이트 (6.10 g, 36.53 mmol, 4.04 mL)를 한 방울씩 첨가하고, 혼합물을 20° C에 로 냉각하고, 그리고 나서 N₂ 기체 하 THF (60 mL) 내 tert-부틸 7-(5-브로모피리미딘-2-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (7 g, 18.26 mmol) 용액을 첨가하고 이어 Pd₂(dba)₃ (2.51 g, 2.74 mmol) 및 XPhos (2.61 g, 5.48 mmol)를 첨가하고 혼합물을 60° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 주 피크가 검출되었다. 혼합물을 20° C로 온도 하강 후, EtOAc (50 mL)로 희석 및 포화 수용성 NH₄Cl (10 mL)로 켄칭 했다. 유기상을 염수 (10 mL x 3)로 세척하고, Na₂SO₄ 로 건조, 여과 및 감압농축하고, 조 생성물을 플래시 실리카 겔 (Biotage, 25 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 4~35% EtOAc/석유 에터 gradient @ 40 mL/분)로 정제하여 갈색 오일의 tert-부틸 7-(5-(2-에톡시-2-옥소에틸)피리미딘-2-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (5.4 g, 12.58 mmol, 68.91% 수율, 91% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 391.2
- [0711] 단계 3. tert-부틸 7-(5-(2-에톡시-2-옥소에틸)피리미딘-2-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (4)의 합성
- [0712] DMF (10 mL) 내 tert-부틸 7-(5-(2-에톡시-2-옥소에틸)피리미딘-2-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (1 g, 2.56 mmol) 용액에 t-BuOK (287.37 mg, 2.56 mmol) 및 프로프-2-엔아미드 (182.03 mg, 2.56 mmol, 176.73 μ L)를 첨가하고 혼합물을 0° C에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 메인 피크가 검출되었고, 혼합물을 물 (10 mL)로 희석하고 EtOAc (15 mL x 3)로 추출하였다. 유기상을 Na₂SO₄ 로 건조, 여과 및 진공 농축했다. 조 생성물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage, 4 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 4~98% EtOAc/석유 에터 gradient @ 20 mL/분)로 정제하여 황색 파우더의 tert-부틸 7-(5-(2-에톡시-2-옥소에틸)피리미딘-2-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (1 g, 2.41 mmol, 93.98% 수율, 100% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 416.2
- [0713] 단계 4. 3-(2-(2,7-디아자스피로[3.5]노난-7-일)피리미딘-5-일)피페리딘-2,6-디온 (5)의 합성
- [0714] 디옥산 (10 mL) 내 tert-부틸 7-(5-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리미딘-2-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-카복실레이트 (0.5 g, 1.20 mmol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 300.85 μ L)을 첨가하고 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량이 검출되었고 혼합물을 진공 농축하여 갈색 고체의 3-(2-(2,7-디아자스피로[3.5]노난-7-일)피리미딘-5-일)피페리딘-2,6-디온 (480 mg, crude, HCl)을 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 316.1
- [0715] 단계 5. 벤질 (4-(7-(5-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리미딘-2-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-일)피페리딘-1-일)카바메이트 (6)의 합성
- [0716] DCE (8 mL) 내 3-(2-(2,7-디아자스피로[3.5]노난-7-일)피리미딘-5-일)피페리딘-2,6-디온 (200 mg, crude, HCl 염) 용액에 벤질(4-옥소피페리딘-1-일)카바메이트 (173.20 mg, 697.59 μ mol), 4A MS (10 mg, 634.18 μ mol) 및 TEA (641.72 mg, 6.34 mmol, 882.69 μ L)를 첨가하고, 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 후 NaBH(OAc)₃ (201.61 mg, 951.27 μ mol)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 15시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 주 피크가 검출되었다. 혼합물을 물 (3 mL)로 희석 후 EtOAc (5 mL x 3)로 추출하고, 유기상을 Na₂SO₄ 로 건조, 여과 및 진공 농축했다. 조 생성물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage, 4 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 4~50% MeOH/EtOAc gradient @ 20 mL/분)로 정제하여 백색 파우더의 벤질 (4-(7-(5-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리미딘-2-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-일)피페리딘-1-일)카바메이트 (190 mg, 322.65 μ mol, 50.88% 수율, 93% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 548.3
- [0717] 단계 6. 3-(2-(2-(1-아미노피페리딘-4-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-7-일)피리미딘-5-일)피페리딘-2,6-디온 (7)의 합성
- [0718] TFA (1.5 mL) 내 벤질 (4-(7-(5-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리미딘-2-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-일)피페리딘-1-일)카바메이트 (190 mg, 346.94 μ mol) 용액을 60° C에서 5시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량이 검출되었고 혼합물을 진공 농축하여 갈색 오일의 3-(2-(2-(1-아미노피페리딘-4-일)-2,7-디아자스피로[3.

5]노난-7-일)피리미딘-5-일)피페리딘-2,6-디온 (200 mg, crude, TFA)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 414.3$

[0719]

단계 7. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-(7-(5-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리미딘-2-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-일)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 38)의 합성

[0720]

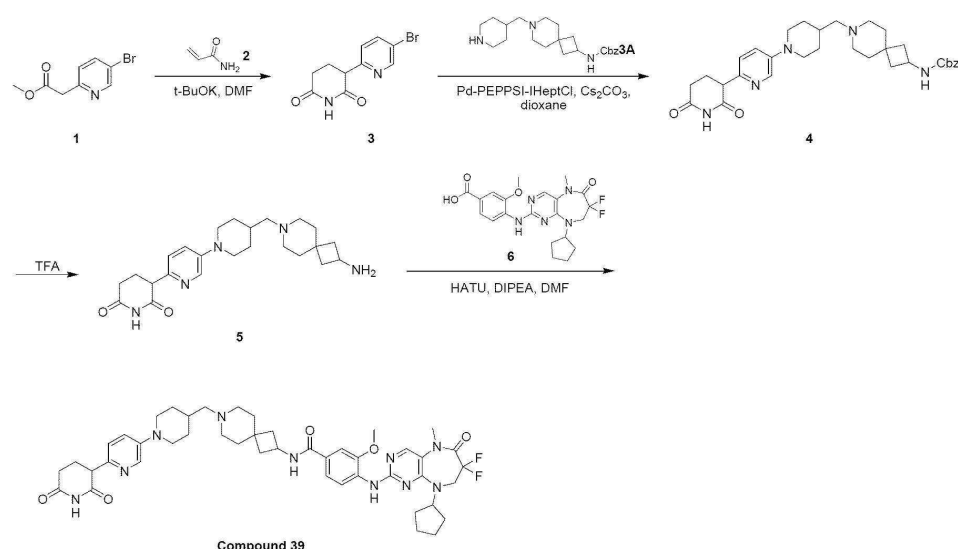
DMF (2 mL) 내 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (140 mg, 312.90 μmol) 용액에 HATU (178.46 mg, 469.34 μmol) 및 DIPEA (121.32 mg, 938.69 μmol , 163.50 μL)에 이어 3-(2-(2-(1-아미노피페리딘-4-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-7-일)피리미딘-5-일)피페리딘-2,6-디온 (200 mg, crude, TFA)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 메인 피크가 검출되었고, 혼합물을 물 (3 mL)로 희석 후 EtOAc (5 mL x 3)로 추출하고, 유기상을 Na_2SO_4 로 건조, 여과 및 진공 농축했다. 조 생성물을 Prep-HPLC(컬럼: Phenomenex Synergi Polar-RP 100*25mm*4um; 이동상: $[\text{H}_2\text{O}$ (TFA) - ACN]; B%: 29% - 49%, 7 분) 및 Prep-HPLC(컬럼: Waters Xbridge C18 150*50mm* 10um; 이동상: $[\text{H}_2\text{O}$ (NH_4HCO_3) - ACN]; B%: 26% - 56%, 10 분)로 정제하고 용출물을 동결 건조하여 백색 파우더의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-(7-(5-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리미딘-2-일)-2,7-디아자스피로[3.5]노난-2-일)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (37.5 mg, 43.20 μmol , 13.81% 수율, 97.1% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 843.5$

[0721]

^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ = 10.88 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 8.29 - 8.24 (m, 2H), 8.23 - 8.18 (m, 2H), 7.97 (s, 1H), 7.49 - 7.37 (m, 2H), 4.83 - 4.69 (m, 1H), 4.05 (t, J = 14.0 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.77 - 3.66 (m, 5H), 3.33 (s, 3H), 3.07 - 2.91 (m, 6H), 2.79 (t, J = 8.7 Hz, 2H), 2.71 - 2.56 (m, 2H), 2.28 - 2.09 (m, 2H), 2.02 - 1.91 (m, 3H), 1.74 - 1.56 (m, 12H), 1.38 - 1.25 (m, 2H).

[0722]

실시예 39. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-3-일)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 39)의 합성



[0723]

[0724]

단계 1. 3-(5-브로모피리딘-2-일)피페리딘-2,6-디온 (3)의 합성

[0725]

DMF (10 mL) 내 메틸 2-(5-브로모피리딘-2-일)아세테이트 (1 g, 4.35 mmol) 용액에 0° C에서 프로프-2-엔아미드 (308.96 mg, 4.35 mmol, 299.96 μL) 및 t-BuOK (2 M, 2.17 mL)를 첨가하고 혼합물을 0° C에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (55 %)가 검출되었다. 혼합물을 물 (50 mL)로 희석 후 EtOAc (50 mL x 3)로 추출하고, 합친 유기상을 염수 (100 mL)로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조, 여과 및 농축했다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0~20% EtOAc/석유 에터 gradient @ 80 mL/분)로 정제하여 백색 고체의 3-(5-브로모피리딘-2-일)피페리딘-2,6-디온 (0.5 g, 1.86 mmol, 42.75% 수

을, 100% 순도)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 269.1$

[0726] 단계 2. 벤질 (7-((1-(6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-3-일)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (4)의 합성

[0727] 2개 배치 병행: 디옥산 (10 mL) 내 3-(5-브로모피리딘-2-일)피페리딘-2,6-디온 100 g, 371.62 mol) 및 벤질(7-(피페리딘-4-일메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일) 카바메이트 (165.16 mg, 404.83 μ mol, HCl) 용액에 Pd-PEPPSI-IHeptCl (36.15 mg, 37.16 μ mol) 및 Cs_2CO_3 (605.40 mg, 1.86 mmol)를 첨가하고 생성된 혼합물을 N_2 하 100° C에서 12시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 메인 피크가 검출되었다. 혼합물을 물(50 mL)에 붓고 EtOAc (50 mL x 3)로 추출하고, 합친 유기상을 염수 (100 mL)로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조, 여과 및 농축했다. 잔여물을 prep-TLC (EtOAc/MeOH = 10/1)로 정제하여 황색 오일의 벤질 (7-((1-(6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-3-일)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (250 mg, 281.40 μ mol, 37.86% 수율, 63% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 560.4$

[0728] 단계 3. 3-(5-(4-((2-아미노-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)피리딘-2-일)피페리딘-2,6-디온 (5)의 합성

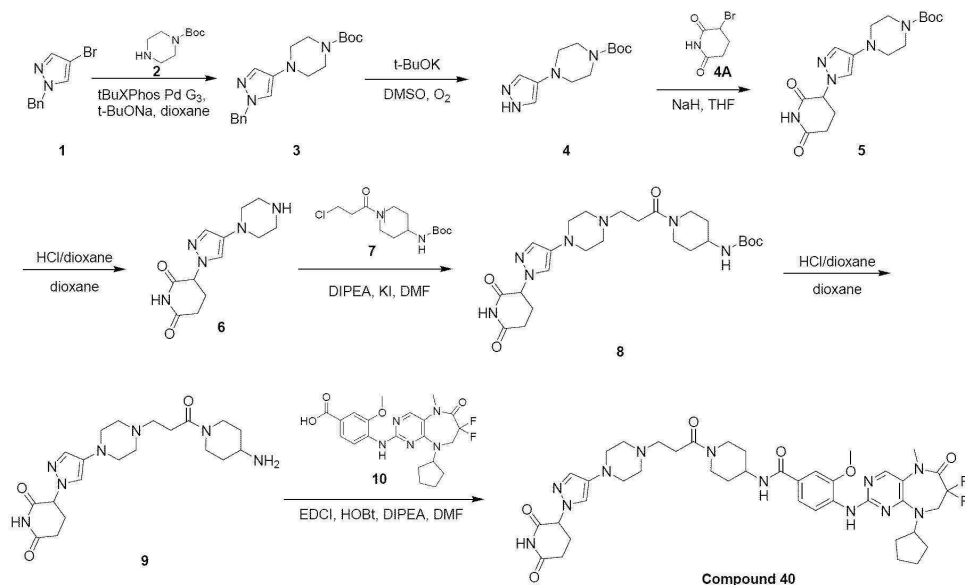
[0729] TFA (2 mL) 내 벤질 (7-((1-(6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-3-일)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)카바메이트 (0.2 g, 357.34 μ mol) 혼합물을 20° C에서 14시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 메인 피크가 검출되었다. 혼합물을 농축하여 적색 오일의 3-(5-(4-((2-아미노-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)피리딘-2-일)피페리딘-2,6-디온 (190 mg, 352.12 μ mol, 98.54% 수율, TFA)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 426.2$

[0730] 단계 4. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-3-일)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 39)의 합성

[0731] DMF (5 mL) 내 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (157.55 mg, 352.12 μ mol) 용액에 HATU (160.66 mg, 422.54 μ mol) 및 DIPEA (182.04 mg, 1.41 mmol, 245.33 μ L)를 첨가하고 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. 3-(5-(4-((2-아미노-7-아자스피로[3.5]노난-7-일)메틸)피페리딘-1-일)피리딘-2-일)피페리딘-2,6-디온 (190 mg, 352.12 μ mol, TFA)를 첨가하고 생성된 혼합물을 20° C에서 1시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 메인 피크가 검출되었다. 혼합물을 물(20 mL)에 붓고 EtOAc (20 mL x 3)로 추출하고, 합친 유기상을 (50 mL)로 세척 후 Na_2SO_4 로 건조, 여과 및 농축했다. 잔여물을 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge C18 150 * 50 mm * 10um; 이동상: $[H_2O (NH_4HCO_3) - ACN]$; B%: 38% - 68%, 10 분)로 정제 후 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex luna C18 150 * 25 mm * 10 um; 이동상: $[H_2O (FA) - ACN]$; B%: 14% - 44%, 11 분)로 재정제하고 용출물을 동결 건조하여 65mg의 조 생성물을 수득하였다. 조 생성물을 DMF (2 mL)로 분쇄 후 여과했고, 여과 케이크를 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(6-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)피리딘-3-일)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (25.1 mg, 26.72 μ mol, 7.59% 수율, 91% 순도)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 855.4$

[0732] ^1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ = 10.78 (s, 1H), 8.44 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 8.30 - 8.26 (m, 2H), 8.19 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.51 - 7.47 (m, 2H), 7.31 (dd, J = 2.9, 8.7 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 4.82 - 4.73 (m, 1H), 4.45 - 4.35 (m, 1H), 4.05 (t, J = 14.2 Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.91 - 3.86 (m, 1H), 3.76 - 3.70 (m, 2H), 3.31 (s, 3H), 2.73 - 2.61 (m, 4H), 2.29 - 2.06 (m, 10H), 1.99 - 1.93 (m, 2H), 1.86 - 1.74 (m, 6H), 1.72 - 1.55 (m, 9H), 1.25 - 1.17 (m, 2H).

[0733] 실시예 40. 4-((9-시클로헥실-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(1-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1H-피라졸-4-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 40)의 합성



단계 1. tert-부틸 4-(1-벤질-1H-피라졸-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (3)의 합성

디옥산 (40 mL) 내 1-벤질-4-브로모-1H-피라졸 (2 g, 8.44 mmol), tert-부틸 피페라진-1-카복실레이트 (3.00 g, 13.47 mmol, HCl), tBuXPhos Pd G₃ (600.00 mg, 755.31 μ mol) 및 t-BuONa (2 M, 10.00 mL) 혼합물을 탈기 하고 N₂로 3차례 퍼징하고, 혼합물을 100 ° C N₂ 기체 하에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (45%)를 확인하였다. 반응 혼합물을 여과하고 여과물을 감압 농축하였다. 반응 혼합물을 H₂O (40 mL)로 희석하고 EtOAc (80 mL x 2)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (50 mL x 3)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하였다. 여과물을 감압농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage; 40 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0 ~ 20% EtOAc: 석유 에터 gradient, 60 mL/분)로 정제하여 밝은 황색 오일의 tert-부틸 4-(1-벤질-1H-피라졸-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (1.9 g, 5.55 mmol, 65.78% 수율)를 수득하였다. MS (M+H)⁺ = 343.3

단계 2. tert-부틸 4-(1H-피라졸-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (4)의 합성

DMSO (1.5 mL) 내 tert-부틸 4-(1-벤질-1H-피라졸-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (600 mg, 1.75 mmol) 용액에 t-BuOK (1 M, 24.00 mL)를 첨가하고, 혼합물을 20 ° C O₂ 기체 (15 Psi) 하에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (6%)를 확인하였다. 반응 혼합물을 NH₄Cl (25 mL)로 0 ° C 에서 희석한 후, EtOAc (30 mL x 2)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (20 mL x 3)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하였다. 여과물을 감압 농축하였다. 잔여물을 다른 배치 (500 mg 스케일)와 합치고 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage; 40 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0 ~ 10% MeOH : EtOAc gradient, 60 mL/분)로 정제하여 밝은 황색 고체의 tert-부틸 4-(1H-피라졸-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (440 mg, 1.74 mmol, 99.53% 수율)를 수득하였다. MS(M+H)⁺ = 253.1

단계 3. tert-부틸 4-(1-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1H-피라졸-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (5)의 합성

THF (8 mL) 내 tert-부틸 4-(1H-피라졸-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (500 mg, 1.98 mmol) 용액에 NaH (160 mg, 4.00 mmol, 60% 순도)를 0 ° C 에서 첨가하고, 혼합물을 0 ° C 에서 30분간 교반 하고, THF (6 mL) 내 3-브로모피페리딘-2,6-디온 (420 mg, 2.19 mmol) 용액을 0 ° C 에서 첨가하고 생성된 혼합물을 25°C 에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 주 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 NH₄Cl (sat. aq, 15 mL)로 0 ° C 에서 희석하고 EtOAc (30 mL x 2)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 60 ml (20 mL x 3)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하였다. 여과물을 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage; 20 g SepaFlash 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 0 ~ 10% MeOH: EtOAc gradient, 60 mL/분)로 정제하여 회색 고체의 tert-부틸 4-(1-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1H-피라졸-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (710 mg, 1.95 mmol,

98.59% 수율)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 364.1$

[0741] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 10.99 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.26 (s, 1H), 5.24-5.15 (m, 1H), 3.47-3.37 (m, 4H), 2.84-2.78 (m, 4H), 2.78-2.71 (m, 1H), 2.66-2.57 (m, 1H), 2.47-2.42 (m, 1H), 2.19-2.11 (m, 1H), 1.45-1.37 (m, 9H)

[0742] 단계 4. 3-(4-(피페라진-1-일)-1H-피라졸-1-일)피페리딘-2,6-디온 (6)의 합성

[0743] 디옥산 (10 mL) 내 tert-부틸 4-(1-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1H-피라졸-4-일)피페라진-1-카복실레이트 (500 mg, 1.38 mmol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 18.75 mL)을 첨가하고, 혼합물을 20 °C 에서 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 주 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하여 밝은 황색 고체의 3-(4-(피페라진-1-일)-1H-피라졸-1-일)피페리딘-2,6-디온 (410 mg, crude, HCl 염)을 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 264.1$

[0744] 단계 5. tert-부틸 (1-(3-(4-(1-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1H-피라졸-4-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (8)의 합성

[0745] DMF (8 mL) 내 3-(4-(피페라진-1-일)-1H-피라졸-1-일)피페리딘-2,6-디온 (270 mg, 900.73 μ mol, HCl) 용액에 KI (94.86 mg, 571.46 μ mol), tert-부틸 (1-(3-클로로프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (400 mg, 1.38 mmol) 및 DIPEA (667.80 mg, 5.17 mmol, 900 μ L)를 25 °C 에서 첨가하였다. 혼합물을 80 °C 에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (41 %)를 확인하였다. 반응 혼합물을 H₂O (10 mL)로 희석하고, EtOAc (40 mL x 2)로 추출하였다. 합쳐진 유기상을 염수 (30 mL x 3)로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하였다. 여과물을 감압 농축하였다. 잔여물을 플래시 실리카 겔 크로마토그래피 (Biotage; 20 g SepaFlash® 실리카 플래시 컬럼, Eluent of 5 ~ 25% MeOH: DCM gradient, 60 mL/분)로 정제하여 밝은 황색 고체의 tert-부틸 (1-(3-(4-(1-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1H-피라졸-4-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (200 mg, 386.38 μ mol, 42.90% 수율)를 수득하였다. $MS(M+H)^+ = 518.3$

[0746] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 11.00 (s, 1H), 7.31 (s, 1H), 7.24-7.18 (m, 1H), 6.93-6.78(m, 1H), 5.25-5.13 (m, 1H), 4.27-4.19 (m, 1H), 3.88-3.79 (m, 1H), 3.48-3.41 (m, 1H), 3.37-3.26 (m, 4H), 3.09-3.01 (m, 1H), 2.88-2.80 (m, 4H), 2.79-2.72 (m, 1H), 2.68-2.54 (m, 5H), 2.20-2.11 (m, 1H), 1.78-1.66 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.30-1.15 (m, 4H).

[0747] 단계 6. 3-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)-1H-피라졸-1-일)피페리딘-2,6-디온 (9)의 합성

[0748] 디옥산 (10 mL) 내 tert-부틸 (1-(3-(4-(1-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1H-피라졸-4-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)카바메이트 (180 mg, 347.75 μ mol) 용액에 HCl/디옥산 (4 M, 10 mL)을 첨가하고, 혼합물을 20 °C 에서 2시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 주 피크를 확인하였다. 반응 혼합물을 감압 농축하여 밝은 황색 고체의 3-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)-1H-피라졸-1-일)피페리딘-2,6-디온 (120 mg, crude, HCl 염)을 수득하였다. $MS(M+H)^+=418.2$

[0749] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ = 11.23-11.09 (m, 1H), 11.03 (s, 1H), 8.43-8.29 (s, 3H), 7.47 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 5.30-5.17 (m, 1H), 4.41-4.32 (m, 1H), 4.02-3.90 (m, 1H), 3.63-3.58 (m, 1H), 3.47-3.40 (m, 2H), 3.36-3.25 (m, 3H), 3.20-3.09 (m, 3H), 3.04-2.93 (m, 4H), 2.81-2.60 (m, 3H), 2.23-2.14 (m, 1H), 2.00-1.91 (m, 2H), 1.54-1.37 (m, 2H), 1.32-1.25(m, 2H)

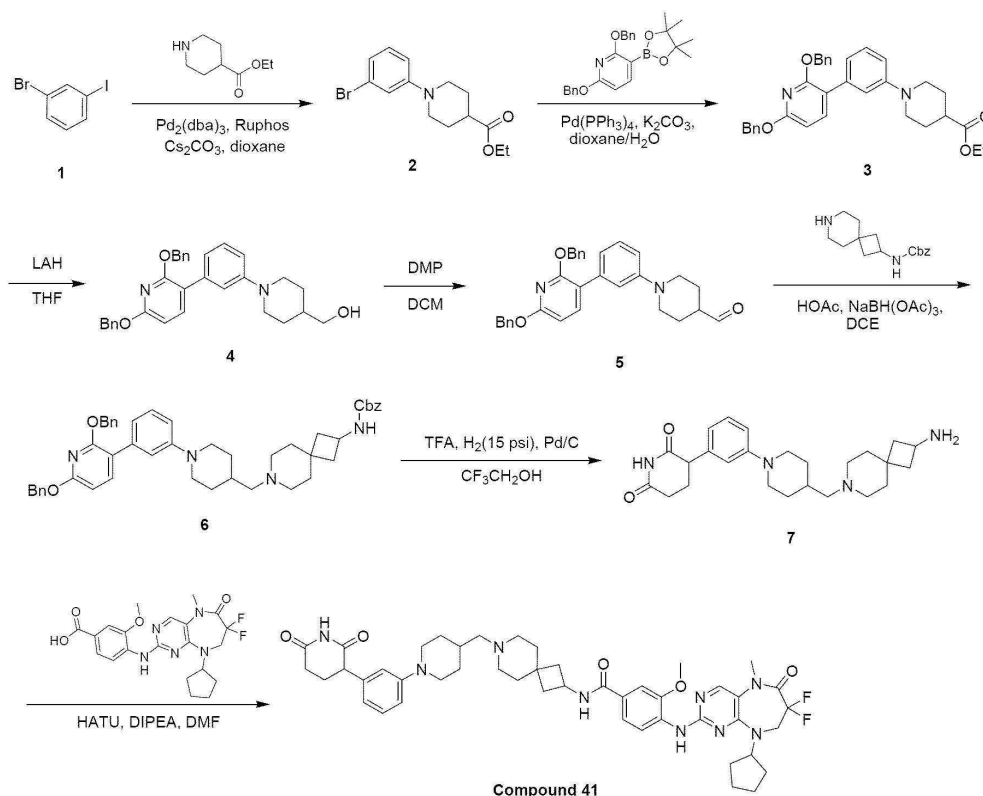
[0750] 단계 7. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(1-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1H-피라졸-4-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤조아미드 (화합물 40)의 합성

[0751] DMF (3 mL) 내 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-3-메톡시벤조산 (60 mg, 134.10 μ mol) 용액에 EDCI (60 mg, 312.99 μ mol), HOBt (30 mg, 222.02 μ mol), DIPEA (148.40 mg, 1.15 mmol, 200 μ L) 및 3-(4-(4-(3-(4-아미노피페리딘-1-일)-3-옥소프로필)피페라진-1-일)-1H-피라졸-1-일)피페리딘-2,6-디온 (80 mg, 163.12 μ mol, HCl 염)을 25 °C

에서 첨가하였다. 혼합물을 25 °C N₂ 기체 하에서 16시간 동안 교반 하였다. LCMS로 원하는 질량의 피크 (85 %)를 확인하였다. 혼합물을 여과하고 여과물을 prep-HPLC (컬럼: Phenomenex Synergi Polar-RP 100x25 mmx4 μm; 이동상:[water (TFA)-ACN]; B%: 28%-48%, 7 분; 컬럼 Temp: 30 °C) 후 prep-HPLC (컬럼: Waters Xbridge 150 x 25 mmx 5 μm; 이동상:[물 (NH₄HCO₃)-ACN]; B%: 29%-59%, 9 분; 컬럼 Temp: 30 °C)로 정제하고, 용출물을 동결 건조하여 백색 고체의 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(3-(4-(1-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-1H-피라졸-4-일)피페라진-1-일)프로파노일)피페리딘-4-일)-3-메톡시벤즈아미드 (75.5 mg, 88.25 μmol, 65.81% 수율, 99% 순도)를 수득하였다. MS(M+H)⁺=847.4

[0752] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 11.00 (s, 1H), 8.35-8.24 (m, 2H), 8.19-8.08 (m, 1H), 7.97 (s, 1H), 7.52-7.44 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 5.24-5.14(m, 1H), 4.83-4.71 (m, 1H), 4.46-4.35 (m, 1H), 4.10-3.96 (m, 4H), 3.94 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 3.17-3.09 (m, 1H), 2.90-2.83(m, 4H), 2.78-2.56 (m, 10H), 2.22-2.14 (m, 1H), 2.00-1.78 (m, 5H), 1.77-1.69 (m, 2H), 1.68-1.53 (m, 5H), 1.52-1.38 (m, 2H).

[0753] 실시예 41. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-((1-(3-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)페닐)피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 41)의 합성



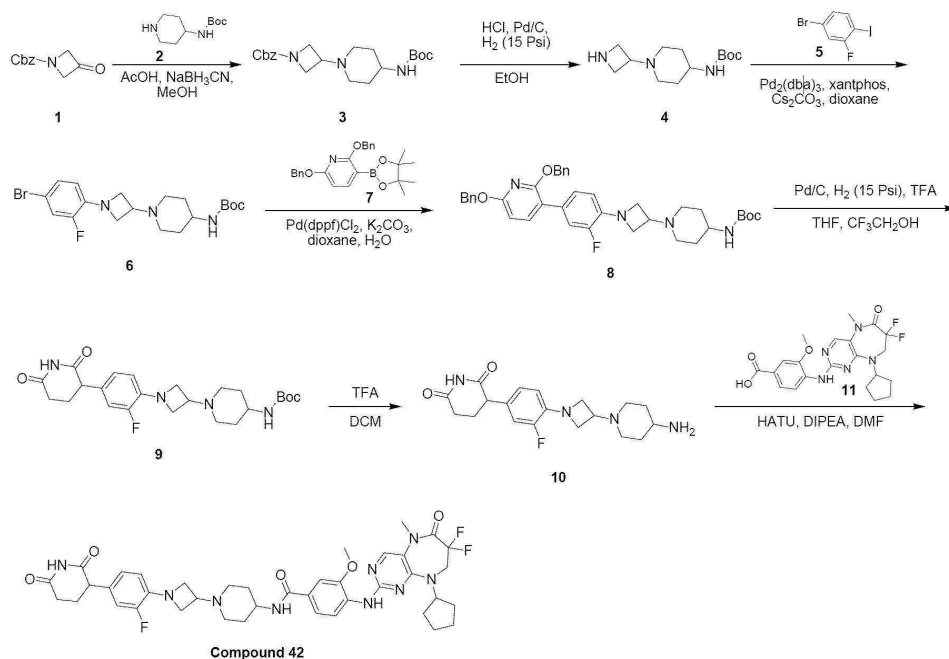
[0754]

[0755] 화합물 41은 앞선 실시예들에서 기재된 방법과 유사하게 스킴에 기재된 방법에 따라 합성되었다.

[0756] MS(M+H)⁺=854.0, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 10.79 (s, 1H), 8.43 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.30 - 8.25 (m, 2H), 7.97 (s, 1H), 7.52 - 7.46 (m, 2H), 7.14 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.84 - 6.76 (m, 2H), 6.58 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.83 - 4.70 (m, 1H), 4.46 - 4.34 (m, 1H), 4.05 (br t, J = 14.3 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.76 (dd, J = 4.7, 11.3 Hz, 1H), 3.66 (d, J = 10.9 Hz, 2H), 3.38 (s, 3H), 2.69 - 2.61 (m, 4H), 2.38 - 2.28 (m, 3H), 2.21 - 2.10 (m, 5H), 2.06 - 1.87 (m, 4H), 1.85 - 1.69 (m, 6H), 1.67 - 1.51 (m, 9H), 1.24 - 1.11 (m, 2H).

[0757] 실시예 42. 4-((9-시클로헥틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(1-(1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)아제티딘-3-일)피페리딘-4-일)-

3-메톡시벤즈아미드 (화합물 42)



[0758]

[0759]

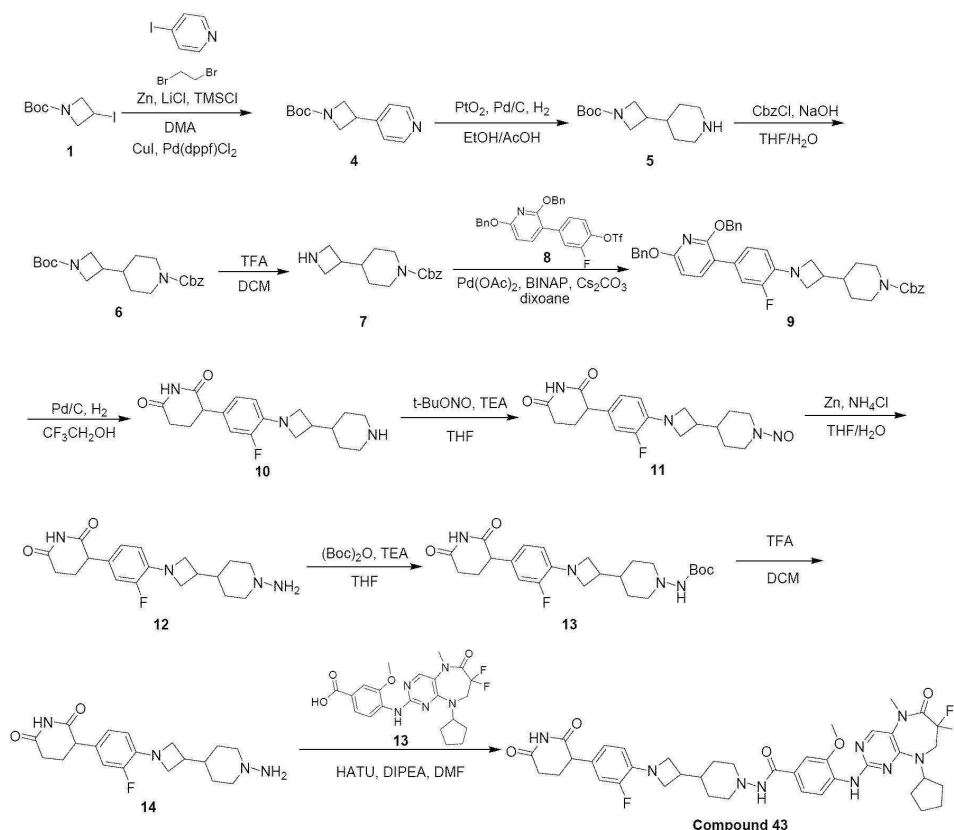
화합물 42는 앞선 실시예들에서 기재된 방법과 유사하게 스킴에 기재된 방법에 따라 합성되었다.

[0760]

MS(M+H)⁺=790.9, ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ = 8.48 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.06 (s, 1H), 8.00 - 7.95 (m, 1H), 7.75 (s, 1H), 7.44 - 7.42 (m, 1H), 7.26 - 7.22 (m, 1H), 6.86 - 6.79 (m, 2H), 6.47 (t, J = 8.9 Hz, 1H), 5.96 (br d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.87 - 4.77 (m, 1H), 4.15 - 4.03 (m, 3H), 3.99 (s, 3H), 3.94 - 3.80 (m, 4H), 3.68 (dd, J = 4.9, 9.8 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.37 - 3.30 (m, 1H), 2.93 - 2.85 (m, 2H), 2.78 - 2.58 (m, 2H), 2.30 - 2.05 (m, 8H), 1.84 - 1.68 (m, 8H).

[0761]

실시예 43. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-(1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)아제티딘-3-일)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 43)



[0762]

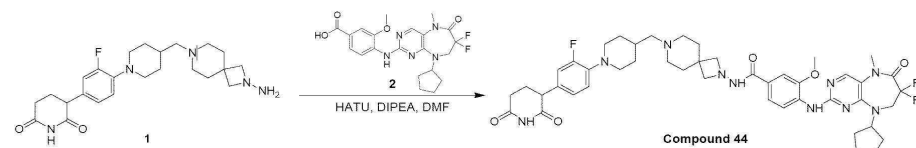
[0763] 화합물 43은 앞선 실시예들에서 기재된 방법과 유사하게 스킴에 기재된 방법에 따라 합성되었다.

[0764]

MS(M+H)⁺=790.9, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.78 (s, 1H), 9.32 (s, 1H), 8.31 - 8.22 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.46 - 7.38 (m, 2H), 6.97 - 6.82 (m, 2H), 6.49 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 4.82 - 4.70 (m, 1H), 4.04 (br t, J = 14.1 Hz, 2H), 3.97 (br t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.93 (s, 3H), 3.74 (dd, J = 4.9, 11.5 Hz, 1H), 3.66 - 3.56 (m, 2H), 3.32 (br s, 3H), 3.02 (br d, J = 10.3 Hz, 2H), 2.76 (br t, J = 10.3 Hz, 2H), 2.67 - 2.59 (m, 1H), 2.49 - 2.42 (m, 2H), 2.23 - 2.10 (m, 1H), 2.03 - 1.87 (m, 3H), 1.70 (br d, J = 9.4 Hz, 4H), 1.65 - 1.54 (m, 4H), 1.53 - 1.44 (m, 1H), 1.29 - 1.19 (m, 2H).

[0765]

실시예 44. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(4-(1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)아제티딘-3-일)피페리딘-1-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 44)



[0766]

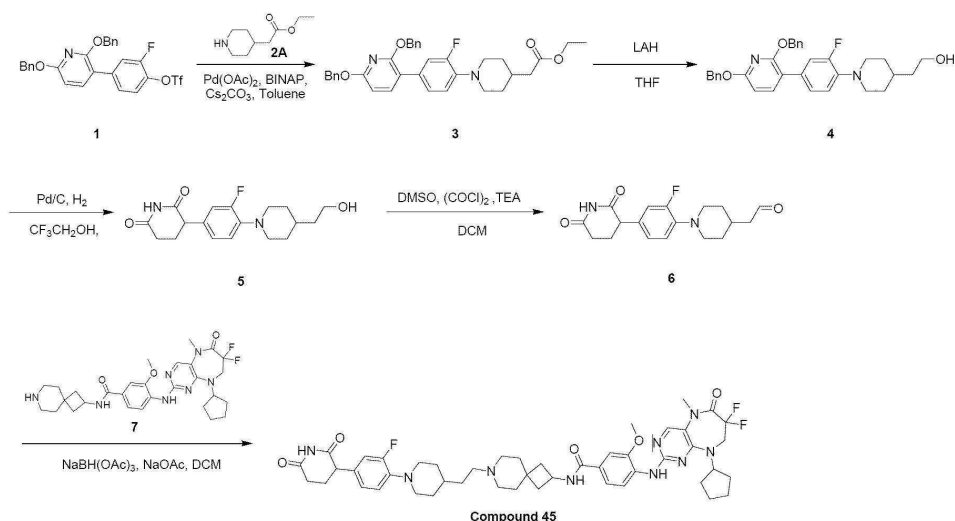
[0767] 화합물 44는 앞선 실시예들에서 기재된 방법과 유사하게 스킴에 기재된 방법에 따라 합성되었다.

[0768]

MS(M+H)⁺=873.0, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.81 (br s, 1H), 9.65 - 9.46 (m, 1H), 8.38 - 8.17 (m, 2H), 8.08 - 7.90 (m, 1H), 7.50 - 7.30 (m, 2H), 7.11 - 6.84 (m, 3H), 4.87 - 4.67 (m, 1H), 4.12 - 3.99 (m, 2H), 3.93 (br s, 3H), 3.84 - 3.74 (m, 1H), 3.68 - 3.51 (m, 4H), 3.33 - 3.32 (m, 5H), 2.70 - 2.60 (m, 3H), 2.36 - 2.07 (m, 5H), 2.05 - 1.43 (m, 18H), 1.42 - 1.03 (m, 3H).

[0769]

실시예 45. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-(2-(1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)피페리딘-4-일)에틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 45)



[0770]

[0771]

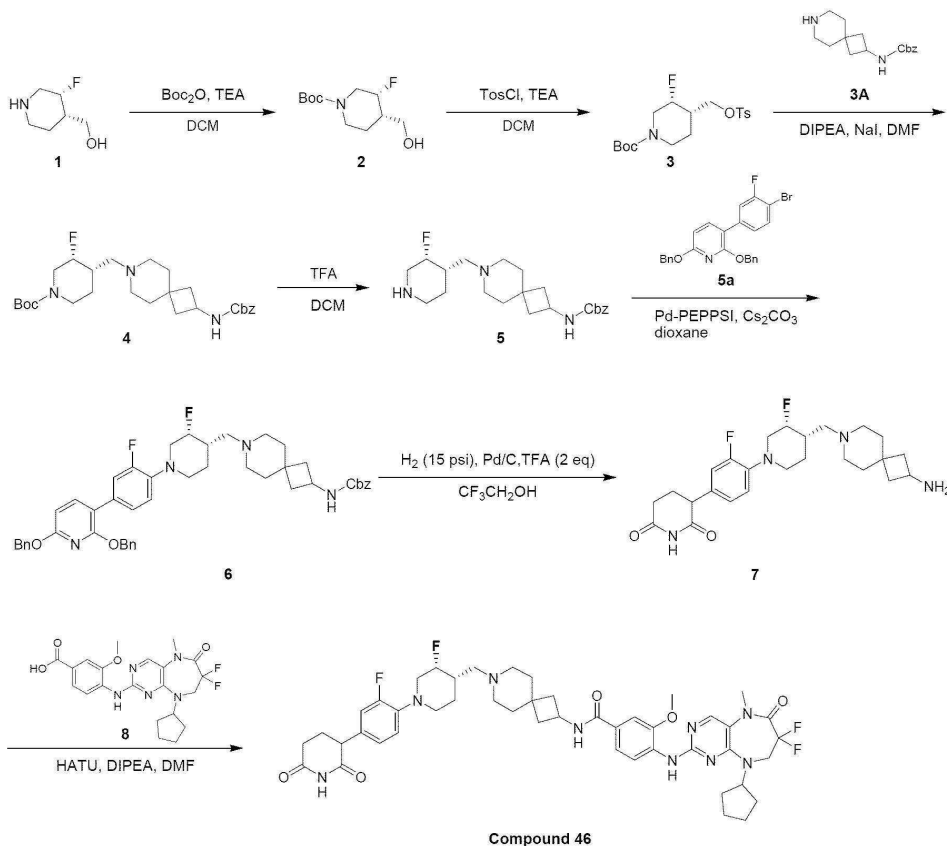
화합물 45는 앞선 실시예들에서 기재된 방법과 유사하게 스킴에 기재된 방법에 따라 합성되었다.

[0772]

MS(M+H)⁺=886.0, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.83 - 10.78 (m, 1H), 8.46 - 8.39 (m, 1H), 8.31 - 8.23 (m, 2H), 7.97 (s, 1H), 7.55 - 7.41 (m, 2H), 7.07 - 6.85 (m, 3H), 4.88 - 4.67 (m, 1H), 4.48 - 4.34 (m, 1H), 4.11 - 4.00 (m, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.83 - 3.76 (m, 1H), 3.32 - 3.28 (m, 5H), 2.70 - 2.58 (m, 3H), 2.48 - 2.44 (m, 1H), 2.33 - 2.13 (m, 8H), 2.03 - 1.92 (m, 3H), 1.84 - 1.67 (m, 6H), 1.64 - 1.51 (m, 8H), 1.51 - 1.34 (m, 4H), 1.34 - 1.21 (m, 2H).

[0773]

실시예 46. 4-((9-시클로펜틸-7,7-디플루오로-5-메틸-6-옥소-6,7,8,9-테트라히드로-5H-피리미도[4,5-b][1,4]디아제핀-2-일)아미노)-N-(7-(((3R,4S)-1-(4-(2,6-디옥소피페리딘-3-일)-2-플루오로페닐)-3-플루오로피페리딘-4-일)메틸)-7-아자스피로[3.5]노난-2-일)-3-메톡시벤즈아미드 (화합물 46)



[0774]

[0775]

화합물 46은 앞선 실시예들에서 기재된 방법과 유사하게 스킴에 기재된 방법에 따라 합성되었다.

- [0776] MS(M+H)⁺=890.0, ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ = 10.81 (s, 1H), 8.43 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.32 - 8.23 (m, 2H), 7.96 (s, 1H), 7.56 - 7.43 (m, 2H), 7.07 - 6.89 (m, 3H), 4.92 - 4.71 (m, 2H), 4.47 - 4.33 (m, 1H), 4.04 (br t, J = 14.0 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.79 (dd, J = 4.8, 11.7 Hz, 1H), 3.67 - 3.54 (m, 1H), 3.39 - 3.34 (m, 1H), 3.33 (br s, 3H), 2.96 - 2.59 (m, 3H), 2.49 - 2.11 (m, 11H), 2.02 - 1.90 (m, 3H), 1.85 - 1.78 (m, 2H), 1.77 - 1.67 (m, 2H), 1.67 - 1.50 (m, 10H).
- [0777] <실험예>
- [0778] 1. PLK1 웨스턴 블롯 분석
- [0779] (1) HeLa 세포주의 배양
- [0780] HeLa 세포주를 한국세포주은행(KCLB)에서 구입하였다. 배양 세포의 계대(Passage)를 P115 내지 P125로 유지하였다.
- [0781] 세포 계수를 위해, 세포 계수기(Thermo Fisher Scientific Inc., Catalog # AMQAX1000) 및 0.4% 트립판 블루(Trypan blue) 용액을 사용하였다.
- [0782] 세포 배양을 위해, DMEM(Gibco, Cat. No. 1195-65; Lot. No. 2085318), FBS(Gibco, Cat. No. 16000-044; Lot. No. 2097593), 페니실린/스트렙토마이신(PS)(Gibco, Cat. No. 15140-122; Lot. No. 2058855), 100 mm² 세포배양 디쉬(SPL, Cat. No. 20100), 150 mm² 세포배양 디쉬(SPL, Cat. No. 20150), 12-웰 배양 플레이트(SPL, Cat. No. 30012), PBS pH 7.4(Gibco, Cat. No. 10010-023; Lot. No. 2085080), TrypLETM Express(Gibco, Cat. No. 12605-010; Lot. No. 2070638), 카운팅 챔버(Hemocytometer)(Hirschmann, Cat. No. 8100204), 및 0.4% 트립판 블루 용액(DYNEBIO, Cat. No. CBT3710; Lot. No. 20190723)를 사용하였다.
- [0783] (2) 본 발명의 화합물 처리
- [0784] 12-웰 플레이트(SPL사)의 각 웰마다 2 X 10⁵ 개의 세포를 시딩하였고, 배양 배지 부피를 총 2 mL로 하여 세포를 배양하였다.
- [0785] 실시예 화합물은 DMSO에 완전 용해시켜 실험에 사용하였고, 티미딘(thymidine)은 DW에 완전 용해시켜 실험에 사용하였다. 티미딘 블록을 위해, 티미딘(Sigma-Aldrich Cat. No. T9250-5G) 2 mM 처리 후, 24 시간 동안 인큐베이션하였다.
- [0786] 방출(release) 및 화학적 처리를 위해, 배지를 석션하고 1× PBS로 3 회 세척하였다. 완전 배지(complete media)를 넣고 CO₂ 인큐베이터에서 4 시간 인큐베이션하였다. 각각의 화합물을 최고 농도 3 μM에서 3 fold 희석하여 최저 농도 10 point 처리한 후 다시 6 시간 인큐베이션하였다.
- [0787] (3) 웨스턴 블롯팅
- [0788] SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯팅을 위해, 1X RIPA 용해 버퍼(Rockland, Cat. No. MB-030-0050; Lot no. 39751), 100X 프로테아제 억제제 콕테일(Quartett, Cat. No. PPI1015; Lot no. PC050038424), PierceTM BCA protein assay kit(ThermoScientific, Cat. No. 23225; Lot no. UC276876), 알부민 standard(ThermoScientific, Cat. No. 23209; Lot no. UB269561), 4-15 % Mini-PROTEAN TGX stain-free gel(Bio-rad, Cat. No. 4568085; Lot no. L007041B), 10X Tris/Glycine/SDS buffer(Bio-rad, Cat. No. 1610732; Lot no. 10000044375B); 10X TBS(Bio-rad, Cat. No. 1706435; Lot no. 1000045140B), 10% Tween 20 용액(Cat. No. 1610781; Lot no. L004152B), Color protein standard broad range(NEB, Cat. No. P7719S; Lot no. 10040349), 4X Laemmli sample buffer(Bio-rad, Cat. No. 1610747; Lot no. L004133B), β-머캅토에탄올(Sigma-Aldrich, Cat. No. M3148; Lot no. 60-24-2), SuperBlockTM T20 (TBS) blocking buffer(ThermoScientific, Cat. No. 37536; Lot no. UC282578), 1M 소듐 아자이드 용액(Sigma-Aldrich, Cat. No. 08591-1mL-F; Lot no. BCBV4989), α-Rabbit pAb to Ms IgG(abcam, Cat. No. ab97046; Lot no. GR3252115-1), α-Goat pAb to Rb IgG(CST, Cat. No. 7074S; Lot no. 28), α-GAPDH(abcam, Cat. No. ab8245; Lot no. GR3275542-2), α-Plk1(CST, Cat. No. 208G4), α-BRD4(CST, Cat. No. 13440S), ECLTM Prime western blotting reagents(GE Healthcare, Cat. No. RPN2232; Lot no. 17001655), Ponceau S 용액(Sigma-Aldrich, Cat. No. P7170; Lot no. SLBV4112), DifcoTM Skim milk(BD, Cat. No. 232100; Lot no. 8346795), iBlot[®] 2 NC Regular stacks(Invitrogen, Cat. No. IB23001; Lot no. 2NR110619-02)을 사용하였다.

- [0789] 세포 수확을 위해, 트립신을 사용하여 세포를 플레이트에서 분리한 뒤 배지 및 PBS로 세척하였다. 구체적으로, 배지를 석션한 뒤 1 mL PBS로 세척하고, PBS를 석션하였다. 0.5 mL TrypLE™ Express를 37 °C 처리하여 세포를 분리시킨 다음, 0.5 mL 완전 배지를 첨가하여 1 mL의 세포 배양액을 수집하였다. 그 다음, 1 mL의 세포 수집액을 8,000 rpm에서 120 초 동안 원심분리하고, 상층액을 제거하였다. 0.2 mL의 PBS로 세척한 후, PBS를 제거하였다.
- [0790] 세포 용해(lysis)를 위해, 용해 버퍼(lysis buffer)를 첨가하고 세포 파쇄물(debris)을 제거하여 세포 용해물(lysate)을 얻었다. 구체적으로, 세포에 프로테아제 억제제가 함유된 70 µL의 1X RIPA 버퍼를 처리하고 얼음 위에서 30 분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 4 °C 5,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리하여 세포 용해물을 얻었다.
- [0791] 그 다음, BCA 어세이를 이용하여 표준 커브를 구하고 이를 대입하여 용해물 내 단백질 질량을 정량하였다. 혼합물에는 20 µL의 표준 또는 샘플 용액, 200 µL의 BCA 또는 브래드포드 용액을 사용하여 37 °C에서 30 분 동안 인큐베이션하였고, 562 nm 흡광도에서 측정하였다. 샘플은 각 웰당 15 µg이 되도록 4X 샘플 버퍼를 넣어 준비하였다.
- [0792] 4-15 % Mini-PROTEAN TGX stain-free gel (15 wULM)에 120 V로 100 분의 러닝 타임을 설정하여 SDS-PAGE를 수행하였다. iBlot® 2 NC Mini stacks에 Dry blotting system의 P0 mode를 사용하여 트랜스퍼하였다. Ponceau S 용액을 사용하여 염색한 뒤, 블로킹 버퍼(Thermo)로 1 시간 동안 블로킹하였다. 0.05% Tween20를 포함한 1X TBS로 세척한 후, 1차 항체로서 1X TBS-T 내 항-Plk1(CST) 항체(1:500), 항-BRD4 (CULM signaling) 항체(1:1000) 또는 항-GAPDH(abcam) 항체(1:10,000)와 함께 4 °C에서 16 시간 동안 반응시켰다. 0.05% Tween20를 포함한 1X TBS로 10 분 동안 3회 세척한 후, 2차 항체로서 1X TBS-T 내 항-마우스 항체(abcam)(1:10,000) 또는 항-랫빗 항체(CST)(1:5,000)와 함께 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그 다음, 0.05% Tween 20을 포함한 1X TBS로 10 분 동안 3회 세척한 후, ECL 위킹 용액(1:1)으로 검출하였다.
- [0793] 결과 분석을 위해, 이미지 애널리저(GE)를 사용하여 최종 블롯 데이터를 얻었다. 그 결과, 본 발명의 모든 화합물이 우수한 PLK1 단백질 분해능을 갖는 것을 확인하였다.
- [0794] **2. PLK1 루시퍼라제 분석**
- [0795] **(1) HeLa LgBit (Plk1-HiBit KI) 세포주의 제작 및 배양**
- [0796] HeLa 세포주에 LgBit 벡터를 형질주입하여 안정적으로 발현시킨 세포주를 제작하였다. 그 다음, 세포 내 내재하고 있는 Plk1 유전자 C-말단 뒤에 HiBit 아미노산 서열을 발현할 수 있도록 gRNA와 donor를 제작한 후 CRISPR/Cas9을 발현할 수 있는 벡터와 함께 세포 내 삽입하였다. 삽입이 완료되어 Knock-in이 진행된 세포만을 선별한 뒤 계대하여 사용하였다.
- [0797] 세포 배양을 위해, DMEM (Gibco, Cat. No. 11995-065; Lot. No. 2467189), FBS (Gibco, Cat. No. 16000-044; Lot. No. 2420173P), 페니실린/스트렙토마이신 (PS)(Gibco, Cat. No. 15140-122; Lot. No. 2321114), 100 mm² 세포배양 디쉬 (SPL, Cat. No. 20100), 150 mm² 세포배양 디쉬 (SPL, Cat. No. 20150), 96-웰 화이트 플레이트 (SPL, Cat. No. 30196), PBS pH 7.4 (Gibco, Cat. No. 10010-023; Lot. No. 2085080), TrypLE™ Express (Gibco, Cat. No. 12605-010; Lot. No. 2323417), 카운팅 챔버 (Hemocytometer)(Marienfeld Superior, Cat. No. 0650010) 및 0.4 % 트립판 블루 용액(DYNEBIO, Cat. No. CBT3710; Lot. No. 20211201)을 사용하였다.
- [0798] **(2) 본 발명의 화합물 처리 및 루시퍼라제 분석 실험법**
- [0799] 실시예 화합물은 DMSO (Sigma-Aldrich Cat. No. D2438, Lot. No. RNB9566)에 완전 용해시켜 실험에 사용하였다.
- [0800] HeLa LgBit (Plk1-HiBit KI)의 경우, 티미딘 블록 후 방출한 후 화합물을 처리하였고 그 과정은 아래와 같다. 티미딘 (Sigma-Aldrich Cat. No. T9250-5G)은 DW에 완전 용해시켜 실험에 사용하였다. 티미딘 블록을 위해, 티미딘 2 mM 처리 후 24 시간 동안 인큐베이션하였다. 방출 및 화학적 처리를 위해, 배지를 석션한 후 1× PBS로 세척하였다. TrypLE™을 넣고 37 °C CO₂ 인큐베이터에서 5 분 동안 인큐베이션하였다. 완전 배지를 넣어 중화된 세포를 계수기를 통해 카운팅하였다. 96-웰 화이트 플레이트 (SPL사)의 각 웰마다 3.3 x 10⁴ 개 만큼 배지 총 부피는 150 µL로 하여 시딩 후 CO₂ 인큐베이터에서 인큐베이션하였다.

[0801] 각각의 세포주를 CO₂ 인큐베이터에서 18 시간 동안 인큐베이션 한 뒤 Endurazine을 총 부피의 4 %가 될 수 있도록 각 웰에 첨가하였다. 본 발명의 화합물의 농도가 300 nM이 되도록 96-웰 화이트 플레이트 (SPL사)에 넣어준 뒤 플레이트 리더기 (BMG Labtech, CLARIOstar Plus)의 파장을 470 - 480 nM로 설정 후 흡광도를 실시간으로 측정하였다. 9 시간이 지난 시점에 발광값을 구한 뒤 엑셀 프로그램을 통해 막대 그래프로 표시하였다.

[0802] 결과는 하기 표 2, 도 1과 같다.

표 2

[0803]

실시에 화합물	활성도
화합물 1	++
화합물 2	++
화합물 3	++
화합물 4	+++
화합물 5	++
화합물 6	++
화합물 7	+++
화합물 8	+++
화합물 10	+++
화합물 11	+++
화합물 12	+++
화합물 13	++
화합물 14	++
화합물 15	+++
화합물 16	+++
화합물 17	+++
화합물 18	++
화합물 19	+++
화합물 20	+++
화합물 21	+++
화합물 22	+++
화합물 23	+++
화합물 24	+++
화합물 25	+++
화합물 26	++
화합물 27	++
화합물 32	++
화합물 33	+
화합물 34	++
화합물 35	++
화합물 36	++
화합물 37	++
화합물 39	++
화합물 41	++
화합물 42	+++
화합물 43	++
화합물 44	++
화합물 45	++
화합물 46	+++

[0804] 표 2에서, 활성도는 각 실시에 화합물 처리군과 DMSO 처리군의 형광값 비율에 따라 표기하였다. (+++: < 0.3, ++ < 0.6, + < 0.7).

[0805] 3. H526 세포주에서의 세포 생존능 분석

[0806] (1) NCI-H526 세포주 배양

[0807] NCI-H526 (이하, H526) 세포주는 한국세포주은행(KCLB, 서울, 한국)에서 분양받았다. 세포 배양을 위해 RPMI

1640 (Gibco, Cat. No. 22400-089; Lot. No. 2277021), FBS (Gibco, Cat. No. 16000-044; Lot. No. 2351176P), 페니실린/스트렙토마이신 (PS)(Gibco, Cat. No. 15140-122; Lot. No. 2321114), 75T 세포배양 플라스크 (SPL, Cat. No. 71075), 175T 세포배양 플라스크 (SPL, Cat. No. 71175), 96-웰 세포배양 플레이트 (SPL, Cat. No. 30096), PBS pH 7.4 (Gibco, Cat. No. 10010-023; Lot. No. 2085080), TrypLE™ Express (Gibco, Cat. No. 12605-010; Lot. No. 2323417), 카운팅 챔버 (Hematocytometer)(Marienfeld Superior, Cat. No. 0650010), 및 0.4 % 트립판 블루 용액 (DYNEBIO, Cat. No. CBT3710; Lot. No. 20211201)을 사용하였다.

(2) 본 발명의 화합물 처리 및 세포 생존능 분석 실험법

실시에 화합물은 DMSO (Sigma-Aldrich Cat. No. D2438, Lot. No. RNBj9566)에 완전 용해시켜 실험에 사용하였다.

H526 세포주를 96-웰 세포배양 플레이트에 각 웰 당 3×10^4 개가 되도록 시딩하였으며, 각 웰의 배지 부피는 150 μ L가 되도록 맞추었다.

본 발명의 화합물의 세포 내 처리 용량은 최대 농도 3000 nM이 되도록 하고, 이를 1/3 씩 희석하여 농도 별로 처리하였으며, 최저 농도는 0.46 nM이 되도록 하였다. 각 웰 마다 전체 용액의 부피가 200 μ L가 되도록 화합물을 처리한 후 5 일 동안 CO₂ 인큐베이터 (Thermo Fisher Science, Cat. No. 4111)에서 배양 하였다.

이후 각 웰에 EZ-Cytox (DOGEN, Cat.NO. EZ-3000, Lot. No. DLS2109)를 20 μ L씩 처리 후 CO₂ 인큐베이터에서 4 시간 배양 하였다. 플레이트 리더기 (BMG Labtech, CLARIOstar Plus)의 파장을 450 nM로 설정하여 배양이 종료된 샘플의 흡광도를 측정하였으며, 측정 전 플레이트 리더기 내에서 3 분간 교반한 후 측정하였다. 최종 측정 값은 엑셀 파일로 정리 후 Prism-GraphPad 프로그램을 통해 그래프를 표시하고, IC₅₀ 값을 측정하였다.

결과는 하기 표 3과 같다.

H526 세포주에서의 세포 생존능 분석

표 3

실시에 화합물	활성도
화합물 1	B
화합물 2	B
화합물 3	C
화합물 4	B
화합물 5	A
화합물 6	A
화합물 7	A
화합물 8	A
화합물 10	B
화합물 11	A
화합물 12	A
화합물 13	B
화합물 14	C
화합물 15	A
화합물 16	A
화합물 17	D
화합물 18	A
화합물 19	A
화합물 20	B
화합물 21	B
화합물 22	A
화합물 23	A
화합물 24	B
화합물 25	A
화합물 26	B
화합물 27	A
화합물 32	A

화합물 33	A
화합물 34	A
화합물 35	B
화합물 36	A
화합물 37	B
화합물 39	A
화합물 41	A
화합물 42	A
화합물 43	B
화합물 44	A
화합물 45	A

[0816] 표 3에서, 활성도는 H526 세포주에 각 실시예 화합물을 처리한 군의 IC₅₀ 값에 따라 표기하였다 (A: < 30 nM, B: < 50 nM, C: < 100 nM, D: < 200 nM, E: < 400 nM).

[0817] **4. MRC-5 세포주에서의 세포 생존능 분석**

[0818] **(1) MRC-5 세포주의 배양**

[0819] MRC-5 세포주를 한국세포주은행(KCLB, 서울, 한국)에서 구입하였다. 배양 세포의 계대(Passage)를 P15 내로 유지하였다.

[0820] 세포 배양을 위해, MEM/EBSS(Hyclone, Cat. No. SH30024.01; Lot. No. AG29697698), FBS(Gibco, Cat. No. 16000-044; Lot. No. 2234018P), 페니실린/스트렙토마이신(PS)(Gibco, Cat. No. 15140-122; Lot. No. 2211099), 175T 세포배양 플라스크(SPL, Cat. No. 71175), 96-웰 배양 플레이트(SPL, Cat. No. 30096), PBS pH7.4(Gibco, Cat. No. 10010-023; Lot. No. 2085080), TrypLE™ Express(Gibco, Cat. No. 12605-010; Lot. No. 2070638), 카운팅 챔버 (Hematocytometer)(Hirschmann, Cat. No. 8100204), 및 0.4 % 트립판 블루 용액 (DYNEBIO, Cat. No. CBT3710; Lot. No. 20190723)을 사용하였다.

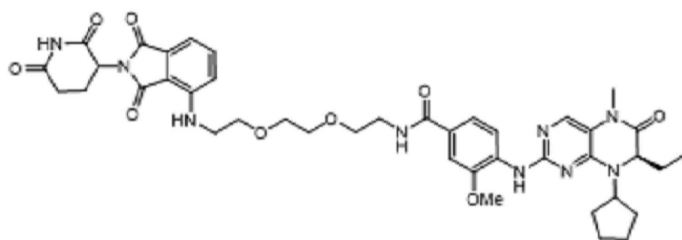
[0821] **(2) 본 발명의 화합물 처리**

[0822] 175T 세포배양 플라스크에서 배양 중인 MRC-5 세포주를 TrypLE™ Express을 이용하여 플라스크로부터 세포를 분리하였다. 96-웰 플레이트(SPL사)의 각 웰마다 6×10^3 개의 세포를 시딩하였고, 배양 배지 부피를 총 150 μ L로 하여 세포를 배양하였다.

[0823] 실시예 화합물은 DMSO(Sigma-Aldrich, Cat. No. D2438-50ML, Lot. No. RNBK6387)에 완전 용해시켜 실험에 사용하였고, 10 μ M를 최고농도로 하여 1/3씩 연속적으로 희석하여 최저 농도가 1.52nM이 되도록 계산하여 처리하였다. 각 웰에는 배지와 함께 혼합하여 처리하였으며, 부피는 50 μ L가 되도록 하여 각 웰의 총 부피는 200 μ L가 되도록 하였다. 이 후, 37°C CO₂ 인큐베이터(Thermo Fisher Science, Cat. No. 4111, Lot. No. 300512709)에서 5일간 배양 하였다.

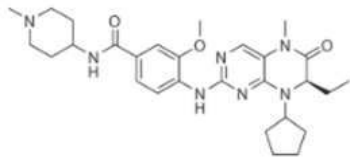
[0824] 하기의 화합물들은 비교예로서 사용되었으며, 실시예 화합물과 동일한 방법으로 세포 생존능 분석을 수행하였다.

[0825] 비교예 1. *Mu et al. BBRC, 2020, 521(4): 833* 문헌에 기재된 예시 화합물 (비교 화합물 1)



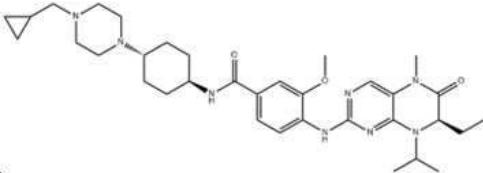
[0826]

[0827] 비교예 2. BI2536 (비교 화합물 2)



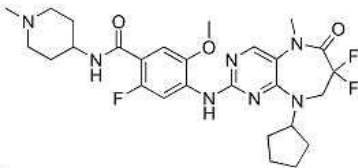
[0828]

[0829] 비교예 3. 블라셀팁 (비교 화합물 3)



[0830]

[0831] 비교예 4. TAK960 (비교화합물 4)



[0832]

[0833] (3) 세포독성 실험

[0834] 배양이 끝난 플레이트의 각 웰에 Easy-cytox(DOGEN, Cat. No. EZ-3000, Lot. No. DLS2012) 용액을 20 μ L씩 처리 후 4시간 동안 37 $^{\circ}$ C CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 96-웰 플레이트를 플레이트 리더기(BMG Labtech, Clariostar Plus)에 넣고 2분간 혼합 후, 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 데이터는 Prism (ver.9) 프로그램 이용하여 그래프로 변환하였다.

[0835] 결과는 하기의 표 4 및 표 5와 같다.

[0836] MRC-5 세포주에서의 세포 생존능 분석

표 4

[0837]

실시에 화합물	활성도
화합물 1	25557
화합물 2	N.D.
화합물 3	N.D.
화합물 4	N.D.
화합물 5	N.D.
화합물 6	N.D.
화합물 7	N.D.
화합물 8	N.D.
화합물 10	N.D.
화합물 11	N.D.
화합물 12	20028
화합물 13	N.D.
화합물 14	N.D.
화합물 15	N.D.
화합물 16	9119
화합물 19	N.D.
화합물 20	N.D.
화합물 21	N.D.
화합물 22	N.D.
화합물 24	N.D.
화합물 25	N.D.

화합물 26	5590
화합물 27	N.D.
화합물 32	N.D.
화합물 33	N.D.
화합물 35	N.D.
화합물 36	N.D.
화합물 37	N.D.
화합물 39	N.D.
화합물 45	8675

[0838] 표 4에서, 활성도는 MRC-5 세포주에 각 실시예 화합물을 처리한 군의 IC₅₀ 값 (nM)에 따라 표기하였다. N.D. (not determined)는 10 μM까지 세포독성이 나타나지 않았음을 의미한다. 그 결과, 본 발명의 모든 화합물이 정상 세포주보다 암 세포주에서 높은 수준의 세포독성을 특이적으로 나타냄을 확인하였다.

[0839] MRC-5 세포주에서의 세포 생존능 분석

표 5

비교 화합물	활성도
비교 화합물 1	106.6
비교 화합물 2	3085.4
비교 화합물 3	2939.3
비교 화합물 4	9152.5

[0841] 표 5에서, 활성도는 MRC-5 세포주에 각 실시예 화합물을 처리한 군의 IC₅₀ 값 (nM)에 따라 표기하였다. 특히 공지의 PROTAC 화합물인 비교화합물 1은 본 발명의 실시예 화합물과 달리 정상 세포주에서 높은 수준의 세포독성을 나타내었다.

도면

도면1

