



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0047965
(43) 공개일자 2024년04월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 47/54 (2017.01) A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07B 59/00 (2006.01) C07K 5/06 (2006.01)
C07K 5/062 (2006.01) C07K 5/065 (2006.01)
C07K 5/078 (2006.01) C07K 5/08 (2006.01)
C07K 5/087 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 47/542 (2017.08)
A61K 31/4184 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-7001733

(22) 출원일자(국제) 2022년06월20일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년01월16일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/066756

(87) 국제공개번호 WO 2022/263679

국제공개일자 2022년12월22일

(30) 우선권주장

2108818.2 2021년06월18일 영국(GB)

(71) 출원인

온코셉타이드즈 아베

스웨덴, 111 37 스톡홀름, 7 플로어, 룬트마카르
가탄 46

(72) 발명자

베르메조 고메즈 안토니오

스웨덴, 111 53 스톡홀름, 씨/오 베스트라 트레드
고르드스가탄, 15

쿠마르 친타킨디 프라빈

스웨덴, 111 53 스톡홀름, 씨/오 베스트라 트레드
고르드스가탄, 15

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 29 항

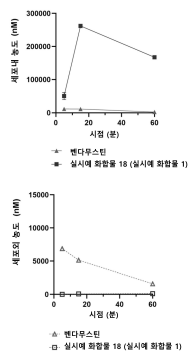
(54) 발명의 명칭 펩티드 약물 집합체

(57) 요약

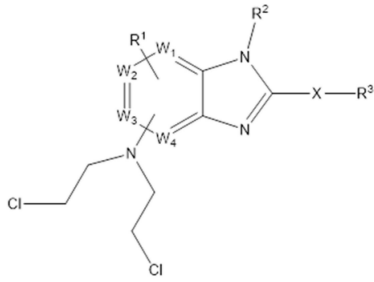
본 발명은 펩티다제 증강 세포독성제인 화학식 I의 화합물을 제공한다:

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1a



[화학식 I]



본 발명은 또한 상기 화합물을 포함하는 약제학적 조성물, 및 특히 다발성 골수종, 골육종, 유방암, 폐암, 난소암, 백혈병 및 림프종과 같은 암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 의약으로서의 상기 화합물 또는 약제학적 조성물의 용도를 제공한다.

(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07B 59/008 (2013.01)

C07K 5/06043 (2013.01)

C07K 5/06052 (2013.01)

C07K 5/06078 (2013.01)

C07K 5/06139 (2013.01)

C07K 5/06191 (2013.01)

C07K 5/0812 (2013.01)

(72) 발명자

데머 찰스

스웨덴, 111 53 스톡홀름, 씨/오 베스트라 트레드
고르드스가탄, 15

파르네가르드 카타리나

스웨덴, 111 53 스톡홀름, 씨/오 베스트라 트레드
고르드스가탄, 15

파르네가르드 마티아스

스웨덴, 111 53 스톡홀름, 씨/오 베스트라 트레드
고르드스가탄, 15

레만 프레드릭

스웨덴, 111 53 스톡홀름, 씨/오 베스트라 트레드
고르드스가탄, 15

산탄젤로 엘런

스웨덴, 111 53 스톡홀름, 씨/오 베스트라 트레드
고르드스가탄, 15

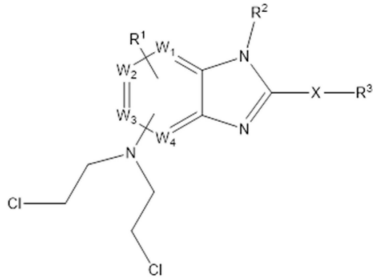
명세서

청구범위

청구항 1

화학식 I에 따른 화합물, 또는 하기한 에스테르, 아마이드 또는 카바메이트의 염을 포함하는, 이의 약제학적으로 허용되는 염, 에스테르, 아마이드 또는 카바메이트:

화학식 I



상기 화학식 I에서,

X는 C₁₋₆알킬렌이고;

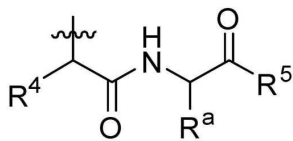
W₁, W₂, W₃ 및 W₄는 각각 CH이거나, W₁, W₂, W₃ 및 W₄ 중 하나는 N이고 나머지는 CH이고;

R¹은 H; 할로겐으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 C₁₋₄알킬; 및 할로겐으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

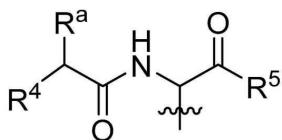
R²은 H; 할로겐으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 페닐; 및 할로겐으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 C₁₋₆알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

R³은 하기 화학식 II 또는 화학식 III에 따른 그룹이다:

화학식 II



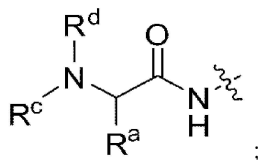
화학식 III



상기 화학식 II 및 III에서,

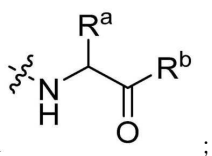
R⁴은 N(R^c)(R^d) 및 하기 화학식 IV로 이루어진 그룹으로부터 선택되고:

화학식 IV



R^4 가 화학식 IV인 경우, R^5 는 R^b 이고, R^4 가 $N(R^c)(R^d)$ 인 경우, R^5 는 R^b 및 하기 화학식 V로 이루어진 그룹으로부터 선택되고:

화학식 V



각각의 R^a 는 H; C_{1-6} 알킬; $-CH_2$ -페닐; 또는 N, O 및 S로부터 선택된 1, 2, 3 또는 4개의 헤테로원자를 포함하는 $-CH_2-3$ 내지 12원 헤테로사이클릴로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서 상기 C_{1-6} 알킬은 $-OH$, $-OC_{1-6}$ 알킬, $-NH_2$, $-NHC(=NH)NH_2$, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-SH$, $-SCH_3$ 및 할로젠으로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체에 의해 임의로 치환되고; 상기 페닐 또는 헤테로사이클릴은 할로젠, $-NH_2$, $-OH$, $-OC_{1-6}$ 알킬 및 $-NO_2$ 로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체에 의해 임의로 치환되고;

R^b 는 $-OH$; $-N(R^e)(R^f)$; 및 할로젠, $-OH$, $-CN$, $-N(R^e)(R^f)$, $-C_{6-10}$ 아릴, 또는 하나 이상의 O, N 또는 S 원자를 포함하고 1, 2 또는 3개의 할로젠에 의해 임의로 치환된 3 내지 12원 헤테로사이클로부터 선택된 하나 이상의 그룹에 의해 임의로 치환된 $-OC_{1-6}$ 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나, 상기 알킬은 1, 2 또는 3개의 O, N 또는 S 원자에 의해 임의로 차단되고;

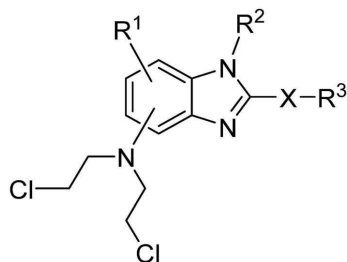
R^c 및 R^d 는 각각 독립적으로 H; $-C_{1-6}$ 알킬; $C(O)C_{1-6}$ 알킬; 및 $-CH_2$ -페닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 상기 알킬 또는 상기 페닐은 할로젠으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환되고;

R^e 및 R^f 는 각각 독립적으로 H 및 $-C_{1-6}$ 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 상기 알킬은 할로젠으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환되거나; R^e 및 R^f 는, 그들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께, 할로젠으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환되는 4, 5 또는 6원의 헤테로사이클을 형성한다.

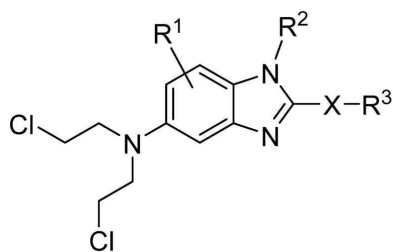
청구항 2

제1항에 있어서, 하기 화학식 Ia의 구조, 예를 들어, 하기 화학식 Ib의 구조를 갖는, 화합물:

화학식 Ia



화학식 Ib



청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, R¹이 H인, 화합물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, R²가 1, 2 또는 3개의 할로젠에 의해 임의로 치환된 페닐; 및 1, 2 또는 3개의 할로젠에 의해 임의로 치환된 -C₁₋₆알킬; 예를 들어, 1, 2 또는 3개의 할로젠에 의해 임의로 치환된 -C₁₋₄알킬, 예를 들어, 메틸로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 화합물.

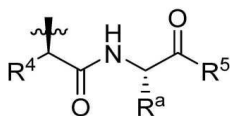
청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, X가 -CH₂- 또는 -CH₂-CH₂-인, 화합물.

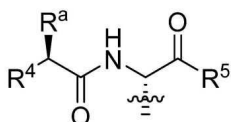
청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, R³이 하기 화학식 IIa 또는 화학식 IIIa에 따른 그룹인, 화합물:

화학식 IIa



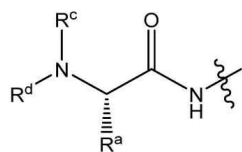
화학식 IIIa



청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, R⁴가 N(R^c)(R^d) 및 하기 화학식 IVa로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 화합물:

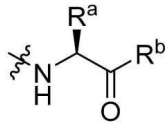
화학식 IVa



청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, R⁴가 화학식 IV 또는 IVa인 경우, R⁵가 R^b이고; R⁴가 N(R^c)(R^d)인 경

우, R^5 가 R^b 및 화학식 Va로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 화학식 Va는 하기 구조를 갖는, 화합물:



청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, R^4 가 NH_2 인, 화합물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 R^a 가 C_{1-6} 알킬 및 $-CH_2$ -페닐로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 상기 C_{1-6} 알킬은 $-OH$; $-NH_2$; $-NHC(=NH)NH_2$; $-C(O)OH$; $-C(O)NH_2$; $-SH$; $-SCH_3$; 또는 할로젠 (예: F 또는 Cl)에 의해 임의로 치환되고; 상기 페닐은 할로젠 (예: F 또는 Cl); $-NH_2$; $-OH$; $-O-C_{1-6}$ 알킬; 및 $-NO_2$ 로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체에 의해 임의로 치환되는, 화합물.

청구항 11

제10항에 있어서, 각각의 R^a 가 $-C_{1-6}$ 알킬 및 $-CH_2$ -페닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 여기서 상기 페닐은 1, 2 또는 3개의 할로젠 치환체에 의해 임의로 치환되는, 화합물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, R^4 가 화학식 IV 또는 IVa인 경우, R^5 가 $-OC_{1-6}$ 알킬이고; R^4 가 NH_2 인 경우, R^5 가 $-OC_{1-6}$ 알킬 또는 화학식 V 또는 Va인, 화합물.

청구항 13

제12항에 있어서, R^b 가 $-OC_{1-6}$ 알킬인 경우, 메톡시, 에톡시 및 이소프로폭시로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 화합물.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 화합물이 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 화합물:

에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 1);

에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(실시예 화합물 2);

에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트(실시예 화합물 3);

에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 4);

에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(실시예 화합물 5);

에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트(실시예 화합물 6);

에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-

2-일]부타노에이트(실시예 화합물 7);

에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트(실시예 화합물 8);

에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-메틸-부타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트(실시예 화합물 9);

에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노에이트(실시예 화합물 10);

에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노에이트(실시예 화합물 11);

에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-메틸-부타노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노에이트(실시예 화합물 12);

에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 13);

메틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 14);

이소프로필 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 15);

에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트(실시예 화합물 16);

에틸 (2S)-2-[[(2R)-2-[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트(실시예 화합물 21);

에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(실시예 화합물 22);

에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 23);

2-모르폴리노에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 24);

2-이소프로폭시에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 25);

이소프로필 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 26);

메틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 27);

3-(디메틸아미노)프로필 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 28);

(2-메톡시-1-메틸-에틸) (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 29);

(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-N,N,4-트리메틸-펜탄아미드(실시예 화합물 30);

(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-N,4-디메틸-펜탄아미드(실시예 화합물 31);

에틸 (2S)-2-[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(메틸아미노)부타노일]아미노]

노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 32);

에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아세트아미도-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(실시예 화합물 34);

에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아세트아미도-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 35);

에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아세트아미도-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(실시예 화합물 36);

에틸 (2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트(실시예 화합물 38);

에틸 (2R)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 45);

에틸 (2S)-2-[[(2R)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 46);

에틸 (2R)-2-[[(2R)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 47);

에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[6-[비스(2-클로로에틸)아미노]-3-메틸-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 48); 및

에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로-1,1,2,2-테트라듀테리오-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 50)

또는 이러한 아미드 또는 카바메이트의 염을 포함하는, 이의 약제학적으로 허용되는 염, 아미드 또는 카바메이트.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 화합물이 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 화합물:

(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-메틸-부탄산(실시예 화합물 19);

(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(실시예 화합물 20);

(2S)-2-[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(메틸아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(실시예 화합물 33);

(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부탄산(실시예 화합물 37);

(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로판산(실시예 화합물 39);

(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(실시예 화합물 40);

(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-메틸-부탄산(실시예 화합물 42);

(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로판산(실시예 화합물 43);

(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(실시예 화합물 44); 및

(2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로-1,1,2,2-테트라플루오로-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(실시예 화합물 51);

또는 이의 염.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 정의된 화합물을 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 추가의 치료제, 예를 들어, 스테로이드, 체크포인트 억제제(checkpoint inhibitor), 핵 수송 억제제(nuclear transport inhibitor), 항-아포토시스 억제제(anti-apoptotic inhibitor), 입양 세포 요법(adoptive cell therapy), 이중특이적 T-세포 인게이지(bi-specific T-cell engager; BiTE), 면역조절 이미드 약물(IMiD), 프로테아좀 억제제(PI), 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제, 펩티드 약물 접합체(PDC), 알킬레이터 또는 DNA 삽입제(DNA intercalator)를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항, 또는 제16항 또는 제17항에 있어서, 의약(medicament)으로서 사용하기 위한, 화합물, 또는 약제학적 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항, 또는 제16항 또는 제17항에 있어서, 암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 화합물, 또는 약제학적 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 암이 다발성 골수종(multiple myeloma), 골육종(osteosarcoma), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 난소암(ovarian cancer), 백혈병(leukaemia) 및 림프종(lymphoma), 예를 들어, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia) 또는 림프종으로부터 선택되는, 화합물 또는 조성물.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 상기 화합물 또는 조성물이 하나 이상의 추가의 치료제(들), 예를 들어, 스테로이드, 체크포인트 억제제, 핵 수송 억제제, 항-아포토시스 억제제, 입양 세포 요법, 이중특이적 T-세포 인게이지(BiTE), 면역조절 이미드 약물(IMiD), 프로테아좀 억제제(PI), 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제, 펩티드 약물 접합체(PDC), 알킬레이터 또는 DNA 삽입제와 함께 투여되는(예를 들어, 동시에, 연속적으로 또는 별도로), 화합물 또는 조성물.

청구항 22

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 화합물, 또는 제16항 또는 제17항에 따른 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 환자를 치료하기 위한 방법.

청구항 23

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 화합물, 또는 제16항 또는 제17항에 따른 약제학적 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 암을 치료 또는 예방하기 위한 방법으로서, 예를 들어, 상기 암이 다발성 골수종, 골육종, 유방암, 폐암, 난소암, 백혈병 및 림프종, 예를 들어, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병 또는 림프종 중 어느 하나인, 암을 치료 또는 예방하기 위한 방법.

청구항 24

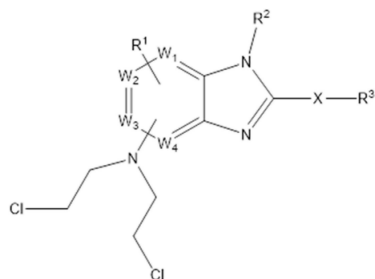
암의 치료 또는 예방용 의약을 제조하기 위한, 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 용도로서, 예를 들어, 상기 암이 다발성 골수종, 골육종, 유방암, 폐암, 난소암, 백혈병 및 림프종, 예를 들어, 다발성 골수

중, 급성 골수성 백혈병 또는 림프종 중 어느 하나인, 용도.

청구항 25

화학식 I에 따른 화합물, 또는 이의 염 또는 용매화물:

화학식 I



상기 화학식 I에서,

X는 C₁₋₆알킬렌이고;

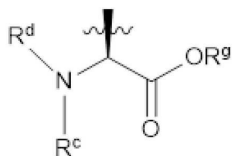
W₁, W₂, W₃ 및 W₄는 각각 CH이거나, W₁, W₂, W₃ 및 W₄ 중 하나는 N이고 나머지는 CH이고;

R¹은 H; 할로젠으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 C₁₋₄알킬; 및 할로젠으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

R²은 H; 할로젠으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 페닐; 및 할로젠으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 C₁₋₆알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

R³은 하기 화학식 VIa이다:

화학식 VIa



상기 화학식 VIa에서,

R^c 및 R^d는 각각 독립적으로 H, -C₁₋₆알킬, C(O)C₁₋₆알킬 및 -CH₂-페닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 상기 알킬 또는 상기 페닐은 할로젠으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 치환되고;

R^g은 H 및 -C₁₋₆알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 상기 알킬은 할로젠으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 치환된다.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 구조가 제2항에 제시된 바와 같은 화학식 Ia 또는 Ib이거나, R¹, R² 또는 X가 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 기재된 바와 같고; R^c 및 R^d가 각각 H이고; R^g가 H인, 화합물.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 화합물이 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 화합물:

(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로판산(실시예 화합물 17);

(S)-2-아미노-4-(5-(비스(2-클로로에틸)아미노)-1-메틸-1H-벤조[d]이미다졸-2-일)부탄산(실시예 화합물 18);

에틸 (2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤조이미다졸-2-일]부타노에이트(실시예 화합물 38);

(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤조이미다졸-2-일]부탄산(실시예 화합물 41); 및

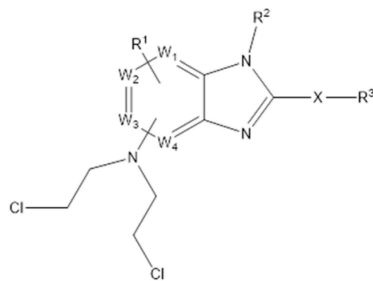
(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로-1,1,2,2-테트라플루오로-에틸)아미노]-1-메틸-벤조이미다졸-2-일]부탄산(실시예 화합물 49);

또는 이의 염.

청구항 28

다발성 골수종, 골육종, 유방암, 폐암, 난소암, 백혈병 및 림프종, 예를 들어, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병 또는 림프종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 암의 치료에 사용하기 위한, 화학식 I에 따른 화합물, 또는 이의 염 또는 용매화물:

화학식 I



상기 화학식 I에서,

X는 C₁₋₆알킬렌이고;

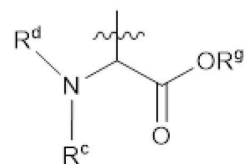
W₁, W₂, W₃ 및 W₄는 각각 CH이거나, W₁, W₂, W₃ 및 W₄ 중 하나는 N이고 나머지는 CH이고;

R¹은 H; 할로겐으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 C₁₋₄알킬; 및 할로겐으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

R²는 H; 할로겐으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 페닐; 및 할로겐으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 C₁₋₆알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

R³은 하기 화학식 VI이다:

화학식 VI



상기 화학식 VI에서,

R^ᶜ 및 R^ᵈ는 각각 독립적으로 H, -C₁₋₆알킬, C(O)C₁₋₆알킬 및 -CH₂-페닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 상기 알킬 또는 상기 페닐은 할로겐으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환되고;

R^ᵍ는 H 및 -C₁₋₆알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 상기 알킬은 할로겐으로부터 선택된 1, 2 또는

3개의 그룹에 의해 임의로 치환된다.

청구항 29

제28항에 기재된 화합물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 다발성 골수종, 골육종, 유방암, 폐암, 난소암, 백혈병 및 림프종, 예를 들어, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병 또는 림프종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 암을 치료하기 위한 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 펩티드 약물 접합체(peptide drug conjugate; PDC)인 화합물, 및 암(cancer)과 같은 질환의 치료에서 이러한 화합물의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 펩티다제, 에스테라제 및 프로테아제와 같은 다양한 가수분해 효소의 발현 증가는 몇몇 유형의 인간 악성종양, 특히 급속하게 성장하고 공격적인 표현형을 특징으로 하는 것들에서 기재되었다[참조: Pharmacol Ther. 1999; 83: 67-123]. 포유동물 세포에서 광범위하게 발현되는 Zn^{2+} -의존성 막-결합된 엑토펙티다제 아미노펩티다제 N(APN, CD13으로도 공지됨)은 종양 세포 침윤, 분화, 증식, 아포토시스, 운동성 및 혈관신생과 같은 과정을 포함하여 암의 발생에 중요한 역할을 한다[참조: Cancer Lett. 2006; 243: 135-43; Curr Med Chem. 2007; 14: 639-47; Curr Med Chem. 2008; 15: 2850-65]. APN의 다중 기능은 "문라이팅(moonlighting) 엑토엔자임"으로 지정되었다[참조: Trends Mol Med. 2008; 14: 361-71]. 함께, 이들 능력은 암의 치료에서 잠재적 치료 표적으로서 APN을 시사한다. 효소 억제제 및 APN-표적화된 담체 작제물을 포함하여 이 표적에 지시된 신규 약물을 개발하기 위해 상이한 접근법이 사용되어 왔다[참조: Cancer Sci. 2011; 102: 501-8].

[0003] 악성종양에 존재하는 펩티다제, 에스테라제 및 프로테아제와 같은 가수분해 효소의 탐색에 의해 암의 치료에 사용될 수 있는 한 부류의 약물은 펩티드 약물 접합체(PDC)이다. 본 발명자들은 암의 치료에서 유용성을 발견하는 새로운 펩티드 약물 접합체 계열을 발견했다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명은 청구항 제1항에 따른 화학식 I의 화합물, 또는 하기한 에스테르, 아마이드 또는 카바메이트의 염을 포함하는, 이의 약제학적으로 허용되는 염, 에스테르, 아마이드 또는 카바메이트를 제공한다.

[0005] 본 발명자들은 화학식 I의 화합물이 강력한 항암제임을 발견했다. 특히, 본 발명자들은 화학식 I의 화합물이 다양한 혈액암(hematological cancer) 세포주에 대해 우수한 시험관내 세포독성을 나타내는 시험관내 세포독성 검정에서 입증했다. 본 발명자들은 또한 화학식 I의 화합물이 림프종(lymphoma)의 난자내 담 배아 이중이식 모델에서 종양 성장을 감소시키는 데 효과적이었음을 발견했다. 추가로, 본 발명자들은 화학식 I의 화합물이 암 세포 내에서 용이하게 가수분해되어, 세포 내에서 우선적으로 격리 및 유지되고 강력한 알킬화 활성을 갖는 대사산물을 형성한다는 것을 발견했다.

[0006] 본 발명은 추가로 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 약제학적 조성물은 임의로 하나 이상의 추가 치료제, 예를 들어, 스테로이드, 체크포인트 억제제(checkpoint inhibitor), 핵 수송 억제제(nuclear transport inhibitor), 항-아포토시스 억제제(anti-apoptotic inhibitor), 세포 요법(입양 세포 요법(adoptive cell therapy) 포함), 이중특이적 T-세포 인게이지(bi-specific T-cell engager; BiTE), 면역조절 이미드 약물(IMiD), 프로테아좀 억제제(PI), 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제, 펩티드 약물 접합체(PDC), 알킬레이터 또는 DNA 삽입제(DNA intercalator)를 포함할 수 있다.

[0007] 본 발명은 또한 의약(medicament)으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 화합물 또는 약제학적 조성물을 제공한다. 또한, 암, 예를 들어, 다발성 골수종(multiple myeloma), 골육종(osteosarcoma), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 난소암(ovarian cancer), 백혈병(leukaemia) 및 림프종의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 본

발명에 따른 화합물 또는 약제학적 조성물도 제공된다.

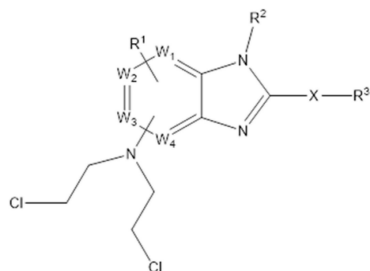
- [0008] 본 발명은 본 발명에 따른 화합물 또는 약제학적 조성물의 약제학적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 환자를 치료하는 방법을 추가로 제공한다.
- [0009] 본 발명은 암의 치료 또는 예방용 의약의 제조를 위한 본 발명에 따른 화합물의 용도를 추가로 제공한다.
- [0010] 본 발명은 청구항 제25항에 따른 본 발명의 화합물의 추가 화합물을 추가로 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1은 MM.1S 세포의 시험관내 처리 후에 본 발명의 대사산물 화합물(실시에 화합물 18)(본 발명의 실시에 화합물 1로 처리한 후에 확인됨)(도 1a) 및 벤다무스틴(도 1a) 및 멜팔란(도 1b) 비교인자의 세포내 및 세포외 농도 측정의 결과를 나타낸다.
- 도 2는 난자내 닭 배아 모델에서 SU-DHL-4 인간 림프종 세포주에서 개시된 이중이식편 상의 종양 성장에 대한 실시에 화합물 1의 효과를 나타낸다.
- 도 3a 내지 g는 MM.1S 세포의 시험관내 처리 후에 본 발명의 화합물 및 그들의 대사산물의 세포내 및 세포외 농도 측정의 결과를 나타낸다.
- 도 4(A) 내지 (C)는 본 발명의 화합물 및 대조군에 의해 유발된 DNA 손상을 평가하는 검정의 결과를 나타낸다.
- 도 5a 및 b는 본 발명의 화합물 및 대조군에 의해 유발된 DNA 단편화를 평가하는 검정의 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

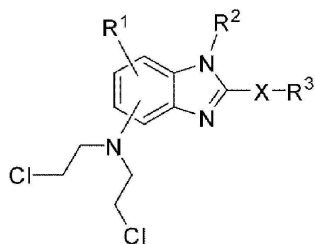
- [0012] 본 발명자들은 인간 암 세포, 특히 인간 혈액암 세포에 대해 매우 세포독성인 신규 부류의 PDC를 발견했다. 실시에 섹션에 기재된 바와 같이, 본 발명의 다양한 실시에 화합물이 합성되었고, 시험관내 세포독성 검정에서 몇몇 혈액암 세포주에 대한 그들의 세포독성이 시험되었다. 본 발명자들은, 섬유아세포 세포주인 BJ에 대한 화합물의 낮은 세포독성에 의해 제시된 바와 같이, 본 발명의 화합물이 매우 강력하고 혈액암 세포에 대한 선택성을 나타낸다는 것을 발견했다. 본 발명자들은 또한 실시에 화합물 1이 인간 림프종 세포주인 SU-DHL-4를 사용한 난자내 닭 배아 이중이식 모델에서 종양 성장을 억제하는 데 특히 효과적이라는 것을 발견했다.
- [0013] 추가 연구에서, 본 발명자들은 본 발명의 실시에 화합물이 MM.1S 암 세포 내에서 용이하게 가수분해되어, 세포 내에 격리 및 유지되고 강력한 알킬화 활성을 갖는 대사물질을 형성하는 것을 발견하고, 따라서 본 발명의 화합물이 암의 치료 또는 예방, 및 특히 혈액암의 치료 또는 예방을 위한 효과적인 새로운 부류의 PDC임을 입증했다.
- [0014] 본 발명은 화학식 I의 화합물을 제공한다:
- [0015] [화학식 I]



- [0016]
- [0017] 상기 화학식 I에서,
- [0018] W_1 , W_2 , W_3 및 W_4 는 각각 CH이거나, W_1 , W_2 , W_3 및 W_4 중 하나는 N이고 나머지는 CH이다.
- [0019] 한 구현예에서, W_2 , W_3 및 W_4 는 각각 CH이고, W_1 은 N이다.
- [0020] $-N(CH_2CH_2Cl)_2$ 그룹이 환 상의 탄소원자를 통해 분자의 코어 부분에 부착되어 있음을 용이하게 알 수 있다. 관련 W 그룹의 경우, CH 그룹의 H는 이에 상응하게 부재한다.

[0021] 바람직한 구현예에서, W_1 , W_2 , W_3 및 W_4 는 각각 CH이고, 따라서 화학식 I은 식 Ia를 갖는다:

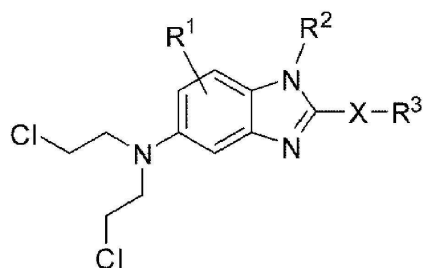
[0022] [화학식 Ia]



[0023]

[0024] 바람직한 구현예에서, 화학식 I은 화학식 Ib에 따른다:

[0025] [화학식 Ib]



[0026]

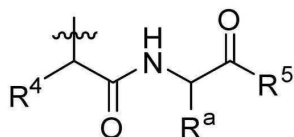
[0027] 화학식 I의 화합물에서, X는 C_{1-6} 알킬렌이다. 예를 들어, X는 C_{1-4} 알킬렌, C_{1-3} 알킬렌, C_{1-2} 알킬렌, C_2 알킬렌 또는 C_1 알킬렌일 수 있다. X는 선형 또는 분지형 알킬렌일 수 있다. 위치 X의 알킬렌은 이미다졸 모이어티 및 본 발명의 화합물의 펩티드 부분(즉, 하기에 기재된 바와 같이 화합물의 R^3 부분) 사이의 연결을 형성한다. 길이가 1개 탄소 또는 2개 탄소인 X 위치의 알킬렌 링커가 특히 효과적인 것으로 밝혀졌다. 따라서, 바람직한 구현예에서, X는 C_1 알킬렌(즉, $-CH_2-$) 또는 선형 C_2 알킬렌(즉, $-CH_2-CH_2-$)이다.

[0028] 화학식 I의 화합물에서, R^1 은 H; 할로젠으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 C_{1-4} 알킬; 및 할로젠(예를 들어, H; C_{1-4} 알킬; 및 할로젠으로 이루어진 그룹으로부터 선택됨)으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 예를 들어, R^1 은 H, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 2급-부틸, 3급-부틸, F, Cl, Br 및 I로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 임의로, 이들 그룹은 할로젠으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 치환될 수 있다. 특정 구현예에서, R^1 은 H, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 2급-부틸, 3급-부틸, F 및 Cl로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정의 바람직한 구현예에서, R^1 은 H이다.

[0029] 화학식 I의 화합물에서, R^2 는 H; 할로젠으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 페닐; 및 할로젠으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 $-C_{1-6}$ 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, R^2 는 H; 1, 2 또는 3개의 F 또는 Cl에 의해 임의로 치환된 페닐; 및 1, 2 또는 3개의 F 또는 Cl에 의해 임의로 치환된 $-C_{1-4}$ 알킬(예: 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 2급-부틸 또는 3급-부틸)로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 한 구현예에서, R^2 는 할로젠으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 페닐; 및 할로젠으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 $-C_{1-6}$ 알킬, 예를 들어, 할로젠으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 $-C_{1-4}$ 알킬(예: 메틸)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, R^2 는 비치환된 $-C_{1-2}$ 알킬(예: 메틸) 또는 비치환된 페닐이다.

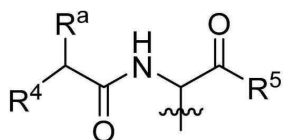
[0030] 화학식 I의 화합물에서, R^3 은 하기 화학식 II 또는 화학식 III에 따른 그룹이다:

[0031] [화학식 II]



[0032]

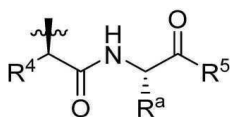
[0033] [화학식 III]



[0034]

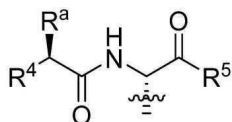
[0035] 바람직한 구현예에서, R³은 하기 화학식 IIa 또는 화학식 IIIa에 따른 그룹이다:

[0036] [화학식 IIa]



[0037]

[0038] [화학식 IIIa]

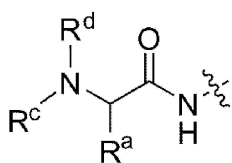


[0039]

[0040] 의심의 여지를 피하기 위해, 화학식 II, III, IIa 및 IIIa에서 는 화학식 I, Ia 또는 IIa에 대한 화학식 II, III, IIa 또는 IIIa의 부착점을 나타낸다.

[0041] 화학식 II, IIa, III 및 IIIa에서, R⁴는 N(R^c)(R^d) 및 하기 화학식 IV로 이루어진 그룹으로부터 선택된다:

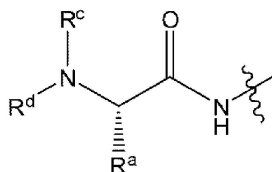
[0042] [화학식 IV]



[0043]

[0044] 바람직한 구현예에서, R⁴는 N(R^c)(R^d) 및 하기 화학식 IVa로 이루어진 그룹으로부터 선택된다:

[0045] [화학식 IVa]



[0046]

[0047] 의심의 여지를 피하기 위해, 화학식 IV 및 IVa에서 는 화학식 II, III, IIa 또는 IIIa에 대한 화학식 IV 또는 IVa의 부착점을 나타낸다.

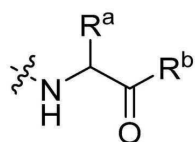
[0048] 화학식 I의 화합물에서, R⁴가 화학식 IV 또는 IVa인 경우, R⁵는 R^b이다.

[0049] R^b 는 $-OH$; $-N(R^c)(R^f)$; 및 할로젠, $-OH$, $-CN$, $-N(R^c)(R^f)$, $-C_{6-10}$ 아릴, 또는 하나 이상의 O, N 또는 S 원자를 포함하고 1, 2 또는 3개의 할로젠에 의해 임의로 치환된 3 내지 12원 헤테로사이클로부터 선택된 하나 이상의 그룹에 의해 임의로 치환된 $-OC_{1-6}$ 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나, 상기 알킬은 1, 2 또는 3개의 O, N 또는 S 원자에 의해 임의로 차단된다.

[0050] 예를 들어, R^4 가 화학식 IV 또는 IVa인 경우, R^5 (이는 R^b 임)는 $-OH$ 및 $-OC_{1-4}$ 알킬(예: 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 이소프로폭시, 부톡시, 이소부톡시, 2급-부톡시 또는 3급-부톡시)로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, R^4 가 화학식 IV 또는 IVa인 경우, R^5 는 $-OH$ 및 $-OC_{1-3}$ 알킬(예: 메톡시, 에톡시, 프로폭시 또는 이소프로폭시)로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 보다 바람직하게는, R^4 가 화학식 IV 또는 IVa인 경우, R^5 는 메톡시, 에톡시 또는 이소프로폭시로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0051] 화학식 Ia의 화합물에서, R^4 가 $N(R^c)(R^d)$ 인 경우, R^5 는 R^b 및 화학식 V로 이루어진 그룹으로부터 선택된다:

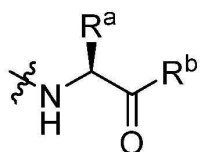
[0052] [화학식 V]



[0053]

[0054] 바람직한 구현예에서, R^4 가 $N(R^c)(R^d)$ 인 경우, R^5 는 $-OH$, $-OC_{1-6}$ 알킬 또는 화학식 Va로 이루어진 그룹으로부터 선택된다:

[0055] [화학식 Va]



[0056]

[0057] 의심의 여지를 피하기 위해, 화학식 V 및 Va에서 는 화학식 II, III, IIa 또는 IIIa에 대한 화학식 V 또는 Va의 부착점을 나타낸다.

[0058] R^4 가 $N(R^c)(R^d)$ 인 구현예에서, R^5 (이는 R^b 임)는 $-OH$, $-OC_{1-4}$ 알킬(예: 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 이소프로폭시, 부톡시, 이소부톡시, 2급-부톡시 또는 3급-부톡시)로 이루어진 그룹으로부터 선택되거나, R^5 는 화학식 V 및 화학식 Va로부터 선택될 수 있다. 바람직하게는, R^4 가 $N(R^c)(R^d)$ 인 경우, R^5 는 $-OH$, $-OC_{1-3}$ 알킬(예: 메톡시, 에톡시, 프로폭시 또는 이소프로폭시) 및 화학식 Va로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있다. 보다 바람직하게는, R^4 가 $N(R^c)(R^d)$ 인 경우, R^5 는 메톡시, 에톡시 또는 이소프로폭시로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0059] 본 발명자들은 R^4 가 $N(R^c)(R^d)$, 화학식 IV 또는 IVa이고, R^5 (이는 R^b 임)가 $-OC_{1-3}$ 알킬(예: 메톡시, 에톡시 또는 이소프로폭시)인 화학식 I의 화합물이 암 세포에 특히 세포독성임을 발견했다. 따라서, 특정의 바람직한 구현예에서, 화학식 I의 화합물에서, R^5 는 $-OC_{1-3}$ 알킬(예: 메톡시, 에톡시 또는 이소프로폭시)이다. 즉, R^4 가 $N(R^c)(R^d)$, 화학식 IV 또는 IVa인 경우, R^5 는 바람직하게는 $-OC_{1-3}$ 알킬(예: 메톡시, 에톡시 또는 이소프로폭시)이다.

[0060] 특정 구현예에서, R^5 는 $-OH$ 이다.

- [0061] 화학식 I의 화합물에서, 각 R^a 는 H; C_{1-6} 알킬; $-CH_2$ -페닐; 또는 N, O 및 S로부터 선택된 1, 2, 3 또는 4개의 헤테로원자를 포함하는 $-CH_2-3$ 내지 12원 헤테로사이클릴로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서, 상기 C_{1-6} 알킬은 $-OH$, $-OC_{1-6}$ 알킬, $-NH_2$, $-NHC(=NH)NH_2$, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-SH$, $-SCH_3$, 및 할로겐으로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체에 의해 임의로 치환되고; 상기 페닐 또는 헤테로사이클릴은 할로겐, $-NH_2$, $-OH$, $-OC_{1-6}$ 알킬 및 $-NO_2$ 로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체에 의해 임의로 치환된다. 특정 구현예에서, 각 R^a 는 H; $-C_{1-6}$ 알킬; CH_2 -인돌릴, $-CH_2$ -페닐; 및 1, 2, 3 또는 4개의 N 또는 S 원자를 포함하는 $-CH_2-5$ -원 헤테로아릴로부터 독립적으로 선택되고; 여기서, C_{1-6} 알킬은 $-OH$; $-NH_2$; $-NHC(=NH)NH_2$; $-C(O)OH$; $-C(O)NH_2$; $-SH$; $-SCH_3$; 또는 할로겐(예: F, Cl, Br 또는 I)에 의해 임의로 치환되고; 페닐은 할로겐(예: F, Cl, Br 또는 I); $-NH_2$; $-OH$; $-OC_{1-6}$ 알킬; 및 $-NO_2$ 로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체에 의해 임의로 치환된다. 바람직하게는, 각 R^a 는 H; C_{1-4} 알킬; 및 $-CH_2$ -페닐로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서, 알킬 또는 페닐은 1 또는 2개의 할로겐(예: F 또는 Cl)에 의해 임의로 치환된다. 예를 들어, 각 R^a 는 독립적으로 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 2급-부틸, $-CH_2$ -페닐, $-CH_2$ -플루오로페닐, $-CH_2$ -클로로페닐, $-CH_2$ -디플루오로페닐, 또는 $-CH_2$ -디클로로페닐일 수 있다. 특정의 바람직한 구현예에서, 각 R^a 는 독립적으로 이소프로필, 이소부틸, 2급-부틸, $-CH_2$ -페닐, 또는 $-CH_2$ -플루오로페닐(즉, 2-플루오로벤질, 3-플루오로벤질 또는 4-플루오로벤질)일 수 있다.
- [0062] 화학식 I의 화합물에서, R^b 는 $-OH$; $-N(R^e)(R^f)$; 및 할로겐, $-OH$, $-CN$, $-N(R^e)(R^f)$, $-C_{6-10}$ 아릴, 또는 하나 이상의 O, N 또는 S 원자를 포함하고 1, 2 또는 3개의 할로겐에 의해 임의로 치환된 3 내지 12원 헤테로사이클로부터 선택된 하나 이상의 그룹에 의해 임의로 치환된 $-OC_{1-6}$ 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고/되거나, 상기 알킬은 1, 2 또는 3개의 O, N 또는 S 원자에 의해 임의로 중단된다. 특정 구현예에서, R^b 는 $-OH$ 또는 $-OC_{1-6}$ 알킬이며, 여기서 상기 알킬은 1, 2 또는 3개의 O 또는 N 원자에 의해 임의로 차단된다. 특정의 추가 구현예에서, R^b 는 $-OH$ 또는 $-OC_{1-6}$ 알킬, 예를 들어, $-OC_{1-6}$ 알킬이다. 바람직하게는, R^b 는 $-OC_{1-4}$ 알킬이다. 예를 들어, R^b 는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 이소프로폭시, 부톡시, 이소부톡시 또는 2급-부톡시일 수 있다. 특정의 바람직한 구현예에서, R^b 는 메톡시, 에톡시 또는 이소프로폭시이다. 보다 바람직하게는, R^b 는 에톡시이다.
- [0063] 특정 구현예에서, R^b 는 $-OH$ 이다.
- [0064] R^c 및 R^d 는 각각 독립적으로 H, $-C_{1-6}$ 알킬, $-C(O)C_{1-6}$ 알킬 및 $-CH_2$ -페닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 상기 알킬 또는 상기 페닐은 할로겐으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된다. 바람직한 화합물에서, R^c 는 H이고, R^d 는 H, $-C_{1-6}$ 알킬 및 $-C(O)C_{1-6}$ 알킬로부터 선택되며, 여기서 상기 알킬은 할로겐으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된다. 예를 들어, R^c 는 H이고, R^d 는 H, $-C_{1-4}$ 알킬 및 $C(O)C_{1-4}$ 알킬로부터 선택된다. 예를 들어, R^c 는 H이고, R^d 는 H, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 2급-부틸, $-C(O)$ 메틸, $-C(O)$ 에틸, $-C(O)$ 프로필, $-C(O)$ 이소프로필, $-C(O)$ 부틸, $-C(O)$ 이소부틸 및 $-C(O)$ 2급-부틸로부터 선택된다. 바람직하게는, R^c 는 H이고, R^d 는 H, 메틸 및 $-C(O)$ 메틸로부터 선택된다. 바람직하게는, R^c 는 H이고, R^d 는 H이다.
- [0065] 화학식 I의 화합물에서, R^e 및 R^f 는 각각 독립적으로 H 및 $-C_{1-6}$ 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 상기 알킬은 할로겐으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환되거나, 또는 R^e 및 R^f 는, 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께, 할로겐으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환되는 4, 5 또는 6원 헤테로사이클을 형성한다. 바람직한 화합물에서, R^e 및 R^f 는 각각 독립적으로 H, 메틸, 에틸, 프로필,

이소프로필, 부틸, 이소부틸 및 2급-부틸로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 예를 들어, R^e 및 R^f 는 각각 독립적으로 H 및 메틸로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 바람직하게는, R^e 및 R^f 는 둘 다 H이거나, 둘 다 메틸이거나, R^e 및 R^f 중 하나는 H이고 다른 하나는 메틸이다.

[0066] 특정 구현예에서, 본 발명의 화합물은 화학식 Ia, 또는 하기한 에스테르, 아마이드 또는 카바메이트의 염을 포함하는, 이의 약제학적으로 허용되는 염, 에스테르, 아마이드 또는 카바메이트에 따르고, 여기서

[0067] X는 $-C_{1-2}$ 알킬렌(즉, $-CH_2-$ 또는 $-CH_2-CH_2-$)이고;

[0068] R^1 은 H이고;

[0069] R^2 는 1, 2 또는 3개의 F에 의해 임의로 치환된 $-C_{1-2}$ 알킬, 또는 1, 2 또는 3개의 F에 의해 임의로 치환된 페닐이고, 예를 들어, R^2 는 비치환된 $-C_{1-2}$ 알킬 또는 비치환된 페닐일 수 있고;

[0070] R^3 은 화학식 IIa 또는 IIIa이고;

[0071] R^4 는 $N(R^c)(R^d)$ 및 화학식 IVa로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0072] R^4 가 화학식 IVa인 경우, R^5 (이는 R^b 임)는 $-OC_{1-4}$ 알킬이고; R^4 가 $N(R^c)(R^d)$ 인 경우, R^5 는 $-OC_{1-4}$ 알킬 또는 화학식 Va이고;

[0073] 각 R^a 는 H; $-C_{1-6}$ 알킬; $-CH_2$ -인돌릴; $-CH_2$ -페닐; 또는 1, 2, 3 또는 4개의 N 또는 S 원자를 포함하는 $-CH_2$ -5원 헤테로아릴로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서 상기 $-C_{1-6}$ 알킬은 $-OH$; $-NH_2$; $-NHC(=NH)NH_2$; $-C(O)OH$; $-C(O)NH_2$; $-SH$; $-SCH_3$; 또는 할로젠에 의해 임의로 치환되고; 상기 페닐은 할로젠; $-NH_2$; $-OH$; $-O-C_{1-6}$ 알킬; 및 $-NO_2$ 로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체에 의해 치환되고;

[0074] R^b 는 $-OC_{1-6}$ 알킬이고;

[0075] R^c 는 H이고, R^d 는 H, $-C_{1-4}$ 알킬 및 $-C(O)C_{1-4}$ 알킬로부터 선택된다.

[0076] 특정의 다른 구현예에서, 본 발명의 화합물은 화학식 Ia, 또는 하기한 에스테르, 아마이드 또는 카바메이트의 염을 포함하는, 이의 약제학적으로 허용되는 염, 에스테르, 아마이드 또는 카바메이트에 따르고, 여기서

[0077] X는 $-C_{1-2}$ 알킬렌(즉, $-CH_2-$ 또는 $-CH_2-CH_2-$)이고;

[0078] R^1 은 H이고;

[0079] R^2 는 메틸 또는 페닐이고;

[0080] R^3 은 화학식 IIa 또는 IIIa이고;

[0081] R^4 는 $N(R^c)(R^d)$ 또는 화학식 IVa이고;

[0082] R^5 (이는 R^b 임)는 $-OC_{1-3}$ 알킬이고;

[0083] 각 R^a 는 H; $-C_{1-6}$ 알킬; $-CH_2$ -인돌릴; $-CH_2$ -페닐; 또는 1, 2, 3 또는 4개의 N 또는 S 원자를 포함하는 $-CH_2$ -5원 헤테로아릴로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서, C_{1-6} 알킬은 $-OH$; $-NH_2$; $-NHC(=NH)NH_2$; $-C(O)OH$; $-C(O)NH_2$; $-SH$; $-SCH_3$; 또는 할로젠에 의해 임의로 치환되고; 페닐은 할로젠; $-NH_2$; $-OH$; $-OC_{1-6}$ 알킬; 및 $-NO_2$ 로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체에 의해 임의로 치환된다.

[0084] 본 발명자들은, 화합물이 화학식 Ia, 또는 하기한 에스테르, 아마이드 또는 카바메이트의 염을 포함하는, 이의 약

제학적으로 허용되는 염, 에스테르, 아미드 또는 카바메이트에 따르는 경우, 본 발명의 화합물이 시험관내 세포 독성 검정 및 림프종의 난자내 닭 배아 이중이식 모델에서 특히 혈액암 세포에 대해 세포독성이 있음을 발견했고, 여기서

- [0085] X는 $-C_{1-2}$ 알킬렌(즉, $-CH_2-$ 또는 $-CH_2-CH_2-$)이고;
- [0086] R^1 은 H이고;
- [0087] R^2 는 메틸 또는 페닐이고;
- [0088] R^3 은 화학식 IIa 또는 IIIa이고;
- [0089] R^4 는 $N(R^c)(R^d)$ 또는 화학식 IVa이고;
- [0090] R^5 (이는 R^b 임)는 $-OC_{1-3}$ 알킬이고;
- [0091] 각 R^a 는 이소프로필, 이소부틸, 및 1개의 F에 의해 임의로 치환된 $-CH_2$ -페닐(예: 2-플루오로벤질, 3-플루오로벤질 또는 4-플루오로벤질)로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된다.
- [0092] 특정의 다른 구현예에서, 본 발명의 화합물은 화학식 Ia, 또는 하기한 에스테르, 아미드 또는 카바메이트의 염을 포함하는, 이의 약제학적으로 허용되는 염, 에스테르, 아미드 또는 카바메이트에 따르고, 여기서
- [0093] X는 $-C_{1-2}$ 알킬렌(즉, $-CH_2-$ 또는 $-CH_2-CH_2-$)이고;
- [0094] R^1 은 H이고;
- [0095] R^2 는 1, 2 또는 3개의 F에 의해 임의로 치환된 $-C_{1-2}$ 알킬 또는 1, 2 또는 3개의 F에 의해 임의로 치환된 페닐이고, 예를 들어, R^2 는 비치환된 $-C_{1-2}$ 알킬 또는 비치환된 페닐일 수 있고;
- [0096] R^3 은 화학식 IIa이고;
- [0097] R^4 는 NH_2 이고;
- [0098] R^5 (이는 R^b 임)는 $-OC_{1-4}$ 알킬이고;
- [0099] 각 R^a 는 H; $-C_{1-6}$ 알킬; $-CH_2$ -인돌릴; $-CH_2$ -페닐; 또는 1, 2, 3 또는 4개의 N 또는 S 원자를 포함하는 $-CH_2$ -5원 헤테로아릴로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서, C_{1-6} 알킬은 $-OH$; $-NH_2$; $-NHC(=NH)NH_2$; $-C(O)OH$; $-C(O)NH_2$; $-SH$; $-SCH_3$; 또는 할로겐에 의해 임의로 치환되고; 페닐은 할로겐; $-NH_2$; $-OH$; $-O-C_{1-6}$ 알킬; 및 $-NO_2$ 로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체에 의해 임의로 치환된다.
- [0100] 특정의 다른 구현예에서, 본 발명의 화합물은 화학식 Ia, 또는 하기한 에스테르, 아미드 또는 카바메이트의 염을 포함하는, 이의 약제학적으로 허용되는 염, 에스테르, 아미드 또는 카바메이트에 따르고, 상기 화학식 Ia에서,
- [0101] X는 $-C_{1-2}$ 알킬렌(즉, $-CH_2-$ 또는 $-CH_2-CH_2-$)이고;
- [0102] R^1 은 H이고;
- [0103] R^2 는 1, 2 또는 3개의 F에 의해 임의로 치환된 $-C_{1-2}$ 알킬 또는 1, 2 또는 3개의 F에 의해 임의로 치환된 페닐이고, 예를 들어, R^2 는 비치환된 $-C_{1-2}$ 알킬 또는 비치환된 페닐일 수 있고;
- [0104] R^3 은 화학식 IIIa이고;

- [0105] R^4 는 NH_2 이고;
- [0106] R^5 는 $-OC_{1-4}$ 알킬이고;
- [0107] 각 R^a 는 H; $-C_{1-6}$ 알킬; $-CH_2$ -인돌릴; $-CH_2$ -페닐; 또는 1, 2, 3 또는 4개의 N 또는 S 원자를 포함하는 $-CH_2$ -5원 헤테로아릴로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서, C_{1-6} 알킬은 $-OH$; $-NH_2$; $-NHC(=NH)NH_2$; $-C(O)OH$; $-C(O)NH_2$; $-SH$; $-SCH_3$; 또는 할로젠에 의해 임의로 치환되고; 페닐은 할로젠; $-NH_2$; $-OH$; $-O-C_{1-6}$ 알킬; 및 $-NO_2$ 로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체에 의해 임의로 치환된다.
- [0108] 특정의 다른 구현예에서, 본 발명의 화합물은 화학식 Ia, 또는 하기한 에스테르, 아마이드 또는 카바메이트의 염을 포함하는, 이의 약제학적으로 허용되는 염, 에스테르, 아마이드 또는 카바메이트에 따르고, 여기서
- [0109] X는 $-C_{1-2}$ 알킬렌(즉, $-CH_2-$ 또는 $-CH_2-CH_2-$)이고;
- [0110] R^1 은 H이고;
- [0111] R^2 는 1, 2 또는 3개의 F에 의해 임의로 치환된 $-C_{1-2}$ 알킬 또는 1, 2 또는 3개의 F에 의해 임의로 치환된 페닐이고, 예를 들어, R^2 는 비치환된 $-C_{1-2}$ 알킬 또는 비치환된 페닐일 수 있고;
- [0112] R^3 은 화학식 IIIa이고;
- [0113] R^4 는 화학식 IVa이고;
- [0114] R^5 는 $-OC_{1-4}$ 알킬이고;
- [0115] 각 R^a 는 H; $-C_{1-6}$ 알킬; $-CH_2$ -인돌릴; $-CH_2$ -페닐; 또는 1, 2, 3 또는 4개의 N 또는 S 원자를 포함하는 $-CH_2$ -5원 헤테로아릴로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서, $-C_{1-6}$ 알킬은 $-OH$; $-NH_2$; $-NHC(=NH)NH_2$; $-C(O)OH$; $-C(O)NH_2$; $-SH$; $-SCH_3$; 또는 할로젠에 의해 임의로 치환되고; 페닐은 할로젠; $-NH_2$; $-OH$; $-O-C_{1-6}$ 알킬; 및 $-NO_2$ 로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체에 의해 임의로 치환된다.
- [0116] 특정의 바람직한 구현예에서, 본 발명의 화합물은 다음과 같다:
- [0117] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 1);
- [0118] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(실시예 화합물 2);
- [0119] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트(실시예 화합물 3);
- [0120] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 4);
- [0121] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(실시예 화합물 5);
- [0122] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트(실시예 화합물 6);
- [0123] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트(실시예 화합물 7);
- [0124] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-

벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트(실시예 화합물 8);

- [0125] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-메틸-부타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트(실시예 화합물 9);
- [0126] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노에이트(실시예 화합물 10);
- [0127] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노에이트(실시예 화합물 11);
- [0128] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-메틸-부타노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노에이트(실시예 화합물 12);
- [0129] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 13);
- [0130] 메틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 14);
- [0131] 이소프로필 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 15);
- [0132] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트(실시예 화합물 16);
- [0133] 에틸 (2S)-2-[[(2R)-2-[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트(실시예 화합물 21);
- [0134] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(실시예 화합물 22);
- [0135] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 23);
- [0136] 2-모르폴리노에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 24);
- [0137] 2-이소프로폭시에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 25);
- [0138] 이소프로필 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 26);
- [0139] 메틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 27);
- [0140] 3-(디메틸아미노)프로필 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 28);
- [0141] (2-메톡시-1-메틸-에틸) (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 29);
- [0142] (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-N,N,4-트리메틸-펜탄아미드(실시예 화합물 30);
- [0143] (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-N,4-디메틸-펜탄아미드(실시예 화합물 31);
- [0144] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(메틸아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 32);
- [0145] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아세트아미도-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]

노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(실시예 화합물 34);

[0146] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아세트아미도-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 35);

[0147] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아세트아미도-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(실시예 화합물 36);

[0148] 에틸 (2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트(실시예 화합물 38);

[0149] 에틸 (2R)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 45);

[0150] 에틸 (2S)-2-[[(2R)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 46);

[0151] 에틸 (2R)-2-[[(2R)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 47);

[0152] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[6-[비스(2-클로로에틸)아미노]-3-메틸-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 48); 및

[0153] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로-1,1,2,2-테트라듀테리오-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 50);

[0154] 또는 이러한 아미드 또는 카바메이트의 염을 포함하여 이의 약제학적으로 허용되는 염, 아미드 또는 카바메이트.

[0155] 본 발명의 화합물은 유기 화학 분야의 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 화학식 I의 화합물의 제조에 대한 예시적 절차는 실시예 섹션에 기재되어 있다.

[0156] 구현예에서, 본 발명의 화합물은 동위원소 원자를 포함할 수 있다. 본원에서 정의된 바와 같이, 동위원소 원자는 가장 일반적인 천연 동위원소가 아닌 원소의 원자이다. 중수소는 수소의 안전하고 안정한 동위원소이다. 하나의 구현예에서, 본 발명의 화합물은 천연 중수소의 풍부도보다 더 큰 중수소 풍부도 수준을 갖는다. 천연 중수소의 풍부도는 0.0156mol%이며, 여기서 mol%는 중수소인 샘플 수소의 총 몰의 백분율이다. 따라서, 천연 수소 1몰에서 0.156mmol은 중수소이거나, 6.022×10^{23} 개의 천연 수소 원자의 샘플에서 9.39×10^{19} 개의 중수소 원자가 존재하거나, 또는 6413개의 천연 수소 원자의 샘플에서 1개의 중수소 원자가 존재한다. 천연 중수소보다 더 큰 중수소 풍부도 수준은 적어도 1mol%, 5mol%, 10mol%, 50mol%, 90mol% 또는 98mol% 중수소일 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명의 화합물은 적어도 1mol%, 5mol%, 10mol%, 50mol%, 90mol% 또는 98mol% 중수소의 중수소 풍부도 수준을 갖는다. 중수소 화합물을 제조하는 절차는 당업계에 공지되어 있다[참조: 예를 들어, Sajiki, New Horizons of Process Chemistry (2017), Springer, pg 29-40, and Hanson, The Organic Chemistry of Isotopic Labelling (2011), Chapter 3, RSC Publishing].

[0157] 본 발명의 화합물에 존재하는 치환체에 따라, 화합물은 에스테르, 아미드, 카바메이트 및/또는 염을 형성할 수 있다. 의약으로 사용하기에 적합한 본 발명의 화합물의 염은 반대 이온이 약제학적으로 허용되는 것들이다. 그러나, 약제학적으로 허용되는 반대 이온을 갖는 염은, 예를 들어, 본 발명의 화합물 및 그들의 약제학적으로 허용되는 염, 및 생리학적으로 기능적 유도체의 제조에서 중간체로서 사용하기 위해 본 발명의 범위 내에 있다. "생리학적으로 기능적 유도체"라는 용어는, 예를 들어, 체내에서 이로 전환 가능해짐으로써 본 발명의 화합물과 동일한 생리학적 기능을 갖는 본 발명의 화합물의 화학적 유도체를 지칭한다. 에스테르, 아미드 및 카바메이트가 생리학적으로 기능적 유도체의 예이다.

[0158] 본 발명에 사용하기에 적합한 염 형태는 유기산 또는 무기산 또는 염기로 형성된 것들을 포함한다. 특히, 본 발명에 따라 산으로 형성된 적합한 염은 무기산, 강한 유기 카복실산, 예를 들어, 비치환되거나, 예를 들어, 할로젠에 의해 치환된 탄소원자 1 내지 4개의 알칸카복실산, 또는 포화 또는 불포화 디카복실산, 또는 하이드록시카복실산, 또는 아미노산으로 형성된 것들, 또는 유기 설폰산, 예를 들어, 비치환되거나, 예를 들어, 할로젠에 의해 치환된 (C₁-C₄)-알킬- 또는 아릴-설폰산으로 형성된 것들을 포함한다. 약제학적으로 허용되는 산 부가 염은 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 시트르산, 타르타르산, 아세트산, 인산, 락트산, 피루브산, 아

세트산, 트리플루오로아세트산, 석신산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 옥살로아세트산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산, 이세티온산, 아스코르브산, 말산, 프탈산, 아스파르트산, 및 글루탐산, 리신 및 아르기닌으로부터 형성된 것들을 포함한다. 옥살산과 같은 다른 산은, 그 자체로는 약제학적으로 허용되지 않지만, 본 발명의 화합물 및 그들의 약제학적으로 허용되는 산 부가 염을 수득하는 데 중간체로서 유용할 수 있다.

[0159] 약제학적으로 허용되는 염기는 암모늄염, 알칼리 금속염, 예를 들어, 칼륨 및 나트륨의 것들, 알칼리 토금속염, 예를 들어, 칼슘 및 마그네슘의 것들, 및 유기 염기와 염, 예를 들어, 디사이클로헥실아민, N-메틸-D-글루코민, 모르폴린, 티오모르폴린, 피페리딘, 피롤리딘, 모노-, 디- 또는 트리-저급 알킬아민, 예를 들어, 에틸-, 3급-부틸-, 디에틸-, 디이소프로필-, 트리에틸-, 트리부틸- 또는 디메틸-프로필아민, 또는 모노-, 디- 또는 트리하이드록시-저급 알킬아민, 예를 들어, 모노-, 디- 또는 트리에탄올아민을 포함한다. 상응하는 내부 염이 추가로 형성될 수 있다.

[0160] 본 발명의 화합물의 바람직한 염은 염산, 브롬화수소산, 아세트산, p-톨루엔설폰산, 타르타르산, 황산, 석신산, 인산, 옥살산, 질산, 메탄설폰산, 말산, 말레산 및 시트르산으로부터 형성되는 것들과 같은 산 부가염을 포함한다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 화합물의 염은 염산염(즉, 염산으로부터 형성된 부가염)이다.

[0161] 그 자체로는 불활성이지만 수용자에게 투여시 활성 약물 화합물로 전환될 수 있는 화합물은 "프로드럭"으로 공지된다. 예를 들어, 프로드럭은, 예를 들어, 혈액내 가수분해에 의해 체내에서 의학적 효과를 갖는 활성 형태로 전환될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 프로드럭은 문헌[참조: T. Higuchi and V. Stella, Prodrugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14 of the A. C. S. Symposium Series (1976); "Design of Prodrugs" ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985; and in Edward B. Roche, ed., Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987]에 기재되어 있다.

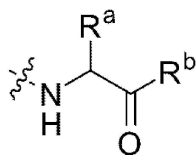
[0162] 본 발명의 청구항 제1항 또는 제25항(및 그들의 상응하는 종속 청구항)의 화합물은 프로드럭의 형태로 제공될 수 있다. 프로드럭의 예는 에스테르, 아마이드 및 카바메이트를 포함한다.

[0163] 본 발명의 화합물은 에스테르, 아마이드 또는 카바메이트로 전환된 적절한 그룹을 가질 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물에서 산 그룹으로부터 형성된 전형적인 에스테르 및 아마이드 그룹은 $-COOR^G$, $-CONR_2^G$, $-SO_2OR^G$, 또는 $-SO_2N(R)^G_2$ 를 포함하고, 본 발명의 화합물에서 $-OH$ 또는 $-NHR^G$ 그룹으로부터 형성되는 전형적인 에스테르 및 아마이드 및 카바메이트 그룹은 $-OC(O)R^G$, $-NR^G C(O)R^G$, $-NR^G CO_2R^G$, $-OSO_2R^G$, 및 $-NR^G SO_2R^G$ 를 포함하고, 여기서 R^G 는 C_{1-8} 알킬, C_{2-8} 알케닐, C_{2-8} 알키닐, C_{3-8} 사이클로알킬 및 C_{3-8} 사이클로알킬 C_{1-8} 알킬, 할로 C_{1-8} 알킬, 디할로 C_{1-8} 알킬, 페닐 및 페닐 C_{1-4} 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고; 보다 바람직하게는, R^G 는 C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐, C_{3-8} 사이클로알킬 및 C_{3-8} 사이클로알킬 C_{1-6} 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

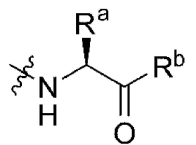
[0164] 유기 화학 분야의 당업자는 다수의 유기 화합물이 반응하거나 침전 또는 결정화되는 용매와 복합체를 형성할 수 있다는 사실을 인식할 것이다. 이러한 복합체는 "용매화물"로서 공지된다. 예를 들어, 물과의 복합체는 "수화물"로서 공지된다. 복합체는 화학량론적 또는 비화학량론적 양으로 용매를 포함할 수 있다. 용매화물은 문헌[참조: Water-Insoluble Drug Formulation, 2nd edn, R. Lui, CRC Press, page 553, and Byrn et al., Pharm. Res., 12(7), 1995, 945-954]에 기재되어 있다. 용액으로 구성되기 전에, 본 발명의 화합물, 뿐만 아니라 이의 에스테르, 아마이드, 카바메이트 및/또는 염은 용매화물의 형태일 수 있다. 의약으로 사용하기에 적합한 본 발명의 화합물의 용매화물은 관련 용매가 약제학적으로 허용되는 것들이다. 예를 들어, 수화물은 약제학적으로 허용되는 용매화물이다.

[0165] 본 발명자들은 R^5 가 $-OC_{1-6}$ 알킬, 하기 화학식 V 및 화학식 Va로 이루어진 그룹으로부터 선택되고:

[0166] 화학식 V



화학식 Va



R^b 가 $-N(R^e)(R^f)$ 및 $-OC_{1-6}$ 알킬로부터 선택된 그룹인 본 발명의 화합물이 암세포 내에서 용이하게 가수분해되어, 세포 내에서 우선적으로 격리 및 유지되고 강력한 알킬화 활성을 갖는 대사산물을 형성한다는 것을 밝혀냈다.

따라서, 본 발명은 또한 대사산물을 제공하고, 여기서 상기 대사산물은 화학식 I, Ia 또는 Ib 또는 이의 염에 따른 구조를 가지며, 여기서

X는 C_{1-6} 알킬렌이고;

W_1 , W_2 , W_3 및 W_4 는 각각 CH이거나, W_1 , W_2 , W_3 및 W_4 중 하나는 N이고 나머지는 CH이고;

R^1 은 H; 할로젠으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 C_{1-4} 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

R^2 는 H; 할로젠으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 페닐; 및 할로젠으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

R^3 은 화학식 II, III, IIa 또는 IIIa에 따른 그룹이고;

R^4 는 $N(R^c)(R^d)$, 화학식 IV 또는 IVa로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

R^4 가 화학식 IV 또는 IVa인 경우, R^5 는 $-OH$ 이고; R^4 가 $N(R^c)(R^d)$ 인 경우, R^5 는 $-OH$, 화학식 V 또는 Va이고;

각 R^a 는 H; $-C_{1-6}$ 알킬; $-CH_2$ -페닐; 또는 N, O 및 S로부터 선택된 1, 2, 3 또는 4개의 헤테로원자를 포함하는 $-CH_2-3$ 내지 12원 헤테로사이클릴로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서 상기 $-C_{1-6}$ 알킬은 $-OH$, $-OC_{1-6}$ 알킬, $-NH_2$, $-NHC(=NH)NH_2$, $-C(O)OH$, $-C(O)NH_2$, $-SH$, $-SCH_3$ 및 할로젠으로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체에 의해 임의로 치환되고; 상기 페닐 또는 헤테로사이클릴은 할로젠, $-NH_2$, $-OH$, $-OC_{1-6}$ 알킬 및 $-NO_2$ 로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체에 의해 임의로 치환되고;

R^b 는 OH 이다.

바로 위에 기재된 바와 같은 대사산물 화합물 내의 바람직한 라디칼은 화학식 I, Ia 및 Ib의 화합물에 관하여 상기 기재된 바와 같다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 대사산물은 화학식 I, Ia 또는 Ib 또는 이의 염에 따른 구조를 가지며, 여기서

X는 $-C_{1-2}$ 알킬렌(즉, $-CH_2-$ 또는 $-CH_2-CH_2-$)이고;

R^1 은 H이고;

R^2 는 메틸 또는 페닐이고;

- [0185] R^3 은 화학식 IIa 또는 IIIa이고;
- [0186] R^4 는 $N(R^c)(R^d)$ 또는 화학식 IVa로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;
- [0187] R^4 가 화학식 IVa인 경우, R^5 는 -OH이고, R^4 가 $N(R^c)(R^d)$ 인 경우, R^5 는 -OH 또는 화학식 Va이고;
- [0188] 각 R^a 는 H; $-C_{1-6}$ 알킬; $-CH_2$ -인돌릴; $-CH_2$ -페닐; 또는 1, 2, 3 또는 4개의 N 또는 S 원자를 포함하는 $-CH_2$ -5원 헤테로아릴로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서 $-C_{1-6}$ 알킬은 -OH; $-NH_2$; $-NHC(=NH)NH_2$; $-C(O)OH$; $-C(O)NH_2$; $-SH$; $-SCH_3$; 또는 할로젠에 의해 임의로 치환되고; 페닐은 할로젠; $-NH_2$; $-OH$; $-O-C_{1-6}$ 알킬; 및 $-NO_2$ 로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체에 의해 임의로 치환되고;
- [0189] R^b 는 OH이다.
- [0190] 특정 구현예에서, 대사산물은 화학식 I, Ia 또는 Ib 또는 이의 염에 따른 구조를 가지며, 여기서
- [0191] X는 $-C_{1-2}$ 알킬렌(즉, $-CH_2-$ 또는 $-CH_2-CH_2-$)이고;
- [0192] R^1 은 H이고;
- [0193] R^2 는 메틸 또는 페닐이고;
- [0194] R^3 은 화학식 IIa 또는 IIIa이고;
- [0195] R^4 는 NH_2 또는 화학식 IVa이고;
- [0196] R^5 는 -OH이고;
- [0197] 각 R^a 는 H; $-C_{1-6}$ 알킬; $-CH_2$ -인돌릴; $-CH_2$ -페닐; 또는 1, 2, 3 또는 4개의 N 또는 S 원자를 포함하는 $-CH_2$ -5원 헤테로아릴로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되고; 여기서, C_{1-6} 알킬은 -OH; $-NH_2$; $-NHC(=NH)NH_2$; $-C(O)OH$; $-C(O)NH_2$; $-SH$; $-SCH_3$; 또는 할로젠에 의해 임의로 치환되고; 페닐은 할로젠; $-NH_2$; $-OH$; $-OC_{1-6}$ 알킬; 및 $-NO_2$ 로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 치환체에 의해 임의로 치환된다. 바람직하게는, 각 R^a 는 이소프로필, 이소부틸, 및 1개의 F에 의해 임의로 치환된 $-CH_2$ -페닐(예: 2-플루오로벤질, 3-플루오로벤질- 또는 4-플루오로벤질)로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택된다.
- [0198] 특정의 바람직한 구현예에서, 대사산물은 다음과 같다:
- [0199] (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-메틸-부탄산(실시예 화합물 19)]; 및
- [0200] (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(실시예 화합물 20)];
- [0201] (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(메틸아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(실시예 화합물 33)];
- [0202] (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부탄산(실시예 화합물 37)];
- [0203] (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로판산(실시예 화합물 39)];
- [0204] (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(실시예 화합물 40)];
- [0205] (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-메

틸-부탄산(실시예 화합물 42);

[0206] (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로판산(실시예 화합물 43);

[0207] (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로판노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(실시예 화합물 44); 및

[0208] (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로-1,1,2,2-테트라듀테리오-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(실시예 화합물 51);

[0209] 또는 이의 염.

[0210] 본 발명자들은 본 발명의 화합물이 암 세포 내에서 용이하게 추가로 가수분해되어, 세포 내에서 우선적으로 격리 및 유지되고 강력한 알킬화 활성을 갖는 추가의 더욱 진보된 대사산물을 형성한다는 것을 추가로 밝혀냈다. 따라서, 본 발명은 또한 화학식 I, Ia 또는 Ib에 따른 구조를 갖는 대사산물을 제공하며, 여기서

[0211] X는 C₁₋₆알킬렌이고;

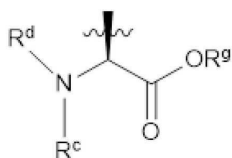
[0212] W₁, W₂, W₃ 및 W₄는 각각 CH이거나, W₁, W₂, W₃ 및 W₄ 중 하나는 N이고 나머지는 CH이고;

[0213] R¹은 H; 할로겐으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 -C₁₋₄알킬; 및 할로겐(예: F 또는 Cl)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0214] R²는 H; 할로겐(예: F 또는 Cl)으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 페닐; 및 할로겐(예: F 또는 Cl)으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 -C₁₋₆알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0215] R³은 화학식 VIa이다:

[0216] [화학식 VIa]



[0217]

[0218] 상기 화학식 VIa에서,

[0219] R^c 및 R^d는 각각 H, -C₁₋₆알킬, -C(O)C₁₋₆알킬 및 -CH₂-페닐로 이루어진 그룹으로부터 독립적으로 선택되고, 여기서 상기 알킬 또는 상기 페닐은 할로겐으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환되고(바람직하게는, R^c 및 R^d는 모두 H임);

[0220] R^g는 H 및 -C₁₋₆알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 상기 알킬은 할로겐으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된다(바람직하게는, R^g는 H임).

[0221] 의심의 여지를 피하기 위해, 화학식 VI 및 VIa에서 는 화학식 I, Ia 또는 Ib에 대한 화학식 VI 또는 VIa의 부착점을 나타낸다.

[0222] 특정 구현예에서, 대사산물은 화학식 I, Ia 또는 Ib 또는 이의 염에 따른 구조를 가지며, 여기서

[0223] X는 C₁₋₆알킬렌이고;

[0224] R¹은 H; -C₁₋₄알킬; 및 할로겐(예: F 또는 Cl)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0225] R²는 H; 1, 2 또는 3개의 할로겐(예: F 또는 Cl)에 의해 치환된 페닐; 및 1, 2 또는 3개의 할로겐(예: F 또는

C1)에 의해 치환된 $-C_{1-6}$ 알킬(예: 1, 2 또는 3개의 할로젠(예: F 또는 Cl)에 의해 치환된 페닐; 및 1, 2 또는 3개의 할로젠(예: F 또는 Cl)에 의해 치환된 $-C_{1-6}$ 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택됨)로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0226] R^3 은 화학식 VIa이고;

[0227] R^c 및 R^d 는 모두 H이다.

[0228] 특정의 다른 구현예에서, 대사산물은 화학식 I, Ia 또는 Ib 또는 이의 염에 따른 구조를 가지며, 여기서

[0229] X는 C_1 알킬렌(즉, $-CH_2-$) 또는 C_2 알킬렌(즉, $-CH_2-CH_2-$)이고;

[0230] R^1 은 H; $-C_{1-4}$ 알킬; 및 할로젠(예: F 또는 Cl)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0231] R^2 는 H; 1, 2 또는 3개의 할로젠(예: F 또는 Cl)에 의해 임의로 치환된 페닐; 및 1, 2 또는 3개의 할로젠(예: F 또는 Cl)에 의해 임의로 치환된 $-C_{1-6}$ 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0232] R^3 은 화학식 VIa이고;

[0233] R^c 및 R^d 는 모두 H이다.

[0234] 바람직하게는, 화합물은 화학식 Ia 또는 Ib 중 하나이다.

[0235] 따라서, 본 발명은 또한 화학식 I, Ia 또는 Ib에 따른 구조를 갖는 화합물을 제공하고, 여기서

[0236] X는 C_{2-6} 알킬렌이고;

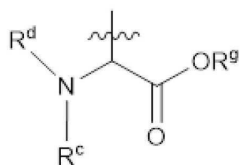
[0237] W_1 , W_2 , W_3 및 W_4 는 각각 CH이거나, W_1 , W_2 , W_3 및 W_4 중 하나는 N이고 나머지는 CH이고;

[0238] R^1 은 H; 할로젠으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 $-C_{1-4}$ 알킬; 및 할로젠(예: F 또는 Cl)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0239] R^2 는 H; 할로젠(예: F 또는 Cl)으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 페닐; 및 할로젠(예: F 또는 Cl)으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 $-C_{1-6}$ 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0240] R^3 은 하기 화학식 VI이다:

[0241] [화학식 VI]



[0242]

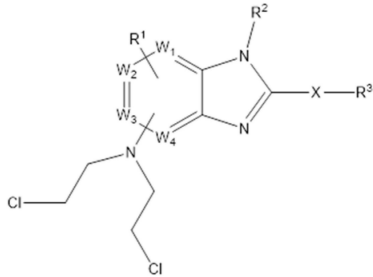
[0243] 상기 화학식 VI에서,

[0244] R^c 및 R^d 는 각각 독립적으로 H, $-C_{1-6}$ 알킬, $C(O)C_{1-6}$ 알킬 및 $-CH_2$ -페닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 상기 알킬 또는 상기 페닐은 할로젠으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환되고(예를 들어, R^c 및 R^d 는 모두 H임);

[0245] R^g 는 H 및 $-C_{1-6}$ 알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 상기 알킬은 할로젠으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된다.

[0246] 더욱 진보된 대사산물 화합물은 의학적 치료에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은, 예를 들어, 다발성 골수종, 골육종, 유방암, 폐암, 난소암, 백혈병 및 림프종, 예를 들어, 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병 또는 림프종으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 암의 치료에서 의약으로 사용하기 위한, 화학식 I에 따른 화합물, 또는 이의 염 또는 용매화물을 추가로 제공한다:

[0247] 화학식 I



[0248]

[0249] 상기 화학식 I에서,

[0250] X는 C₁₋₆알킬렌이고;

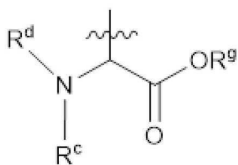
[0251] W₁, W₂, W₃ 및 W₄는 각각 CH이거나, W₁, W₂, W₃ 및 W₄ 중 하나는 N이고 나머지는 CH이고;

[0252] R¹은 H; 할로젠으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 -C₁₋₄알킬; 및 할로젠으로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0253] R²는 H; 할로젠으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 페닐; 및 할로젠으로부터 독립적으로 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된 -C₁₋₆알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고;

[0254] R³은 하기 화학식 VI이다:

[0255] 화학식 VI



[0256]

[0257] 상기 화학식 VI에서,

[0258] R^c 및 R^d는 각각 독립적으로 H, -C₁₋₆알킬, -C(O)C₁₋₆알킬 및 -CH₂-페닐로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 상기 알킬 또는 상기 페닐은 할로젠으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환되고;

[0259] R^g는 H 및 -C₁₋₆알킬로 이루어진 그룹으로부터 선택되고, 여기서 상기 알킬은 할로젠으로부터 선택된 1, 2 또는 3개의 그룹에 의해 임의로 치환된다.

[0260] 의약으로 사용하기 위한 이들 화합물의 바람직한 구현에는 본 발명의 다른 양태와 관련하여 상기 기재된 바와 같다.

[0261] 특정의 바람직한 구현예에서, 추가의 더욱 진보된 대사산물은 다음과 같다:

[0262] (2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노산(실시예 화합물 17);

[0263] (S)-2-아미노-4-(5-(비스(2-클로로에틸)아미노)-1-메틸-1H-벤조[d]이미다졸-2-일)부탄산(실시예 화합물 18);

[0264] 에틸 (2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트(실시예 화합물

38);

[0265] (2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]부탄산(실시예 화합물 41); 또는

[0266] (2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로-1,1,2,2-테트라플루오로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부탄산(실시예 화합물 49);

[0267] 또는 이의 염.

[0268] 본원에 기재된 대사산물은 화학식 I의 화합물 중 하나 이상의 화합물로 처리된 세포로부터 분리될 수 있고/있거나, 표준 유기 화학 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 본 발명의 대사산물의 제조를 위한 예시적 절차는 실시예 섹션에 기재되어 있다. 의심의 여지를 피하기 위해, 본원에 기재된 대사산물은 본 발명의 화합물의 추가 예이고, 화학식 I의 다른 화합물에 대해 본원에 기재된 바와 동일한 방식으로 조성물의 형태로 및/또는 의약으로서 사용될 수 있다.

[0269] 하기 정의는 특정 사례에서 달리 제한되지 않는 한 본 명세서 전반에 걸쳐 사용되는 용어에 적용된다.

[0270] 본원에서 사용된 용어 "알킬"은 직쇄 및 분지쇄의 포화 탄화수소 그룹 둘 다를 의미한다. 알킬 그룹의 예는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소-프로필, n-부틸, t-부틸, 이소-부틸, 2급-부틸, 펜틸 및 헥실 그룹을 포함한다. 비분지된 알킬 그룹 중에서, 바람직한 메틸, 에틸, n-프로필, 이소-프로필 및 n-부틸 그룹이 있다. 분지된 알킬 그룹 중에서, t-부틸, i-부틸, 1-에틸프로필 및 1-에틸부틸 그룹이 언급될 수 있다.

[0271] 본원에서 사용된 용어 "사이클로알킬"은 환 시스템에서 포화 그룹을 의미한다. 사이클로알킬 그룹의 예는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸 및 사이클로헥실을 포함한다.

[0272] 본원에서 사용된 용어 "할로젠"은 불소, 염소, 브롬 또는 요오드를 의미한다. 불소, 염소 및 브롬이 바람직하고, 불소 및 염소가 특히 바람직하다.

[0273] 본원에서 사용된 용어 "1, 2, 3 또는 4개의 질소, 산소 또는 황 원자를 포함하는 헤테로아릴"은 탄소 원자 중 1, 2, 3 또는 4개가 질소, 산소 및 황(바람직하게는 질소 및 황)으로부터 독립적으로 선택된 1, 2, 3 또는 4개의 헤테로원자에 의해 대체되는 탄소 원자의 방향족 사이클릭 그룹을 의미한다. 1, 2 또는 3개의 질소 및/또는 황 원자를 포함하는 5원 헤테로아릴의 예는 티오펜, 티아졸, 이소티아졸, 피롤, 피롤린, 피라졸, 피라졸린, 이미다졸, 이미다졸린, 트리아졸 및 티아디아졸을 포함한다.

[0274] 약제학적 조성물

[0275] 본 발명에 따른 화합물, 조성물 및 약제학적 조성물은 암의 치료 및/또는 예방, 종양 성장을 감소시키는 데 및/또는 종양 세포를 사멸시키는 데 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물은 암 질환을 앓고 있는 환자의 치료 및/또는 생존 연장을 위해 사용될 수 있다. 본 발명은 특히 암종(carcinoma), 육종(sarcoma), 골수종(myeloma), 백혈병, 림프종 또는 혼합형 암의 치료 및/또는 예방에 유용하다. 예를 들어, 다발성 골수종, 골육종, 유방암, 폐암, 난소암, 백혈병 및 림프종.

[0276] 본 발명에 따른 화합물을 단독으로 투여하는 것이 가능하지만, 조성물, 특히 약제학적 조성물 내에 존재하는 것이 바람직하다. 약제학적 조성물은 경구, 비경구(피하, 피내, 골내 주입, 근육내, 혈관내(볼루스 또는 주입), 유리체내 및 골수내 포함), 복강내, 경점막, 경피, 직장 및 국소(피부, 협측, 설하 및 안구내 포함) 투여에 적합한 것들을 포함하지만, 가장 적합한 경로는, 예를 들어, 치료 하의 대상체의 상태 및 장애에 따라 달라질 수 있다.

[0277] 경구 투여에 적합한 본 발명의 약제학적 조성물은 각각 소정량의 활성 성분을 함유하는 캡슐, 카세(cachet) 또는 정제와 같은 개별 단위로서; 분말 또는 과립으로서; 수성 액체 또는 비수성 액체 중의 용액 또는 현탁액으로서; 또는 수중유 액체 에멀전 또는 유중수 액체 에멀전으로서 제공될 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 볼루스, 연질제 또는 페이스트로서 제공될 수 있다. 다양한 약제학적으로 허용되는 담체 및 그들의 제형은 표준 제형 조약[참조: Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martin]에 기재되어 있다. 또한, 문헌[Wang, Y. J. and Hanson, M. A., Journal of Parenteral Science and Technology, Technical Report No. 10, Supp. 42:2S, 1988]을 참조한다.

[0278] 비경구 투여에 적합한 본 발명의 약제학적 조성물은 항산화제, 완충제, 박테리오타트, 및 제형을 의도된 수용자의 혈액과 등장성으로 되게 하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 주사 용액; 및 현탁제 및 농축제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함한다. 바람직하게는, 제형은 단위 투여량 또는 분할 투

여량 용기, 예를 들어, 밀봉된 앰플 및 바이알에 제공될 수 있다. 제형은 사용 직전에 멸균 액체 담체, 예를 들어, 식염수 또는 주사용수의 첨가만을 필요로 하는 동결-건조(동결건조) 상태로 저장할 수 있다. 즉석 주사 및 주입 용액 및 현탁액은 멸균 분말, 과립 또는 기타 건조 조성물로부터 제조할 수 있다. 비경구 투여를 위한 예시적 조성물은, 예를 들어, 적합한 무독성의 비경구적으로 허용되는 용질, 희석제 또는 용매, 예를 들어, 만니톨, 1,3-부탄디올, 물, 링거액, 등장성 염화나트륨 용액, 또는 합성 모노- 또는 디글리세라이드를 포함하는 기타 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제, 올레산을 포함한 지방산 또는 크레마포어(Cremaphor)를 함유하는 주사 가능한 용액 또는 현탁액을 포함한다.

[0279] 비강, 에어로졸 또는 흡입 투여에 적합한 본 발명의 약제학적 조성물은, 예를 들어, 벤질 알코올 또는 다른 적절한 방부제, 생체이용률을 증강시키기 위한 흡수 촉진제 및/또는 당업계에 공지된 것들과 같은 다른 가용화제 또는 분산제를 함유할 수 있는 식염수 중의 용액을 포함한다.

[0280] 직장 투여에 적합한 본 발명의 약제학적 조성물은 코코아 버터, 합성 글리세라이드 에스테르 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 통상의 담체와 함께 좌약으로 제공될 수 있다. 이러한 담체는 전형적으로 상온에서 고체이지만, 직장강 내에서 액화되고/되거나 용해되어 약물을 방출한다.

[0281] 구강내 국소 투여, 예를 들어, 협측 또는 설하 투여에 적합한 본 발명의 약제학적 조성물은 수크로스 및 아카시아 또는 트라가칸트와 같은 향미 기반의 활성 성분을 포함하는 로젠지, 및 젤라틴 및 글리세린 또는 수크로스 및 아카시아와 같은 기초로 활성 성분을 포함하는 향정을 포함한다. 국소 투여를 위한 예시적 조성물은 플라스틱베이스(Plastibase)(폴리에틸렌으로 겔화된 미네랄 오일)와 같은 국소 담체를 포함한다.

[0282] 바람직한 단위 투여량 조성물은 본 발명의 화합물의 탐색 용량 또는 치료 용량 또는 이의 적절한 분획을 함유하는 것들이다.

[0283] 바람직한 구현예에서, 본 발명의 조성물은 본질적으로 본 발명의 화합물 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 부형제로 이루어진다.

[0284] 상기에서 특별히 언급된 성분 이외에, 본 발명에 사용하기 위한 조성물은 문제의 조성물의 유형과 관련하여 당업계에서 통상적인 다른 제제를 포함할 수 있음을 이해해야 한다.

[0285] 본 발명의 조성물은 하나 이상의 추가 치료제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물에 존재할 수 있는 추가 치료제의 예는 스테로이드(프레드니손 및 텍사메타손), 체크포인트 억제제(예: CTLA-4 억제제 및 PD-1/PD-L1 억제제), 핵 수송 억제제(예: 셀리넥소르), 항-아포토시스 억제제(예: 베네토클락스), 입양 세포 요법(예: 종양 침윤성 림프구(TIL) 요법), 자연 살해(NK) 세포 요법, 키메라 항원 수용체(CAR) T-세포 요법, 및 조작된 T-세포 수용체 요법), 이중특이적 T-세포 인게이지(BiTE), 면역조절 이미드 약물(IMiD)(예: 탈리도마이드, 레날리도마이드 및 포말리도마이드), 프로테아좀 억제제(PI)(예: 보르테오미, 카르필조미, 익사조미 및 마리조미), 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제(예: 파노비노스타트), 본 발명의 화합물 이외의 펩티드 약물 접합체(PDC)(예: 멜플루덴), 및 통상의 화학요법, 예를 들어, 알킬레이터(예: 멜팔란, 사이클로포스파미드) 및 DNA 삽입제(예: 독소루비신)를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0286] 치료

[0287] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명의 화합물은 펩티드 약물 접합체(PDC)이다. 본 발명은 의약으로 사용하기 위한 본 발명에 따른 화합물, 또는 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0288] 특히, 본 발명의 화합물 및 조성물은 암의 치료 및/또는 예방에서 용도를 발견한다. 본 발명의 화합물 또는 조성물을 투여함으로써 치료 또는 예방될 수 있는 암의 특정 예는 암종, 육종, 골수종, 백혈병, 림프종 또는 혼합형의 암을 포함한다. 본 발명의 화합물 또는 조성물을 투여함으로써 치료 또는 예방될 수 있는 예시적 암은 혈액/혈액 세포 암, 예를 들어, 백혈병(예: 성인 및 소아 급성 림프모구성 백혈병(dult and childhood acute lymphoblastic leukemia)을 포함하는 급성 림프모구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia); 성인 및 소아 급성 골수성 백혈병(adult and childhood acute myeloid leukemia)을 포함한 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia); 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia), 예를 들어, B 세포 만성 림프구성 백혈병(B Cell chronic lymphocytic leukemia); 만성 골수성 백혈병(chronic myelogenous leukemia); 및 모세포 백혈병(hairy cell leukemia)); 림프종(예: 에이즈-관련 림프종(AIDS-related lymphoma); 피부 T-세포 림프종(cutaneous T-cell lymphoma); 성인 및 소아 호지킨 림프종(adult and childhood Hodgkin's lymphoma) 및 임신 중 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma during pregnancy)을 포함한 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma); 성

인 및 소아 비호지킨 림프종(adult and childhood non-Hodgkin's lymphoma) 및 임신 중 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma during pregnancy)을 포함한 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma); 균상 식육종(mycosis fungoides); 세자리 증후군(Sezary syndrome); 발덴스트롬 거대글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia); 원발성 종격동 거대 B 세포 림프종(primary mediastinal large B cell lymphoma); 맨틀세포 림프종(mantle cell lymphoma); 미만성 거대 B 세포 림프종(diffuse large B cell lymphoma); 및 원발성 중추신경계 림프종(primary central nervous system lymphoma)); 기타 혈액암(예: 만성 골수증식성 장애(chronic myeloproliferative disorders); 다발성 골수종/형질 세포 신생물(plasma cell neoplasm); 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndromes); 및 골수이형성/골수 증식성 장애); 골육종; 난소암; 유방암; 폐암; 교모세포종(glioblastoma); 망막모세포종(retinoblastoma) 및 상기 언급된 암의 전이를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

- [0289] 본 발명자들은 본 발명의 화합물이 특히 혈액암 세포에 대해 세포독성이 있다는 것을 밝혀냈다. 따라서, 본 발명의 화합물은 상기 언급된 혈액암 중 하나 이상의 치료 또는 예방에 특히 유익하다.
- [0290] 또한, 화합물은 고형 종양의 치료에도 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물 및 조성물은 또한 질환 또는 장애를 치료하거나 예방하는 방법에서 유용성을 발견하고, 상기 방법은 본 발명의 화합물 또는 본 발명의 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 따라서, 본 발명의 화합물 또는 조성물은 암, 특히 혈액암을 앓고 있거나 발병 위험에 있는 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0291] 본 발명의 화합물은 또한 의약의 제조에서 용도, 특히 암, 특히 혈액암을 앓고 있거나 발병 위험이 있는 대상체에게 투여되는 의약의 제조에서 용도를 발견한다.
- [0292] 치료 효과를 달성하기 위해 필요한 본 발명의 화합물의 양은 특정 투여 경로 및 치료 하의 대상체의 특성, 예를 들어, 종, 연령, 체중, 성별, 의학적 상태, 특정 질환 또는 상태 및 이의 중증도, 및 기타 관련 의학적 및 신체적 요인에 따라 달라질 수 있다. 통상의 숙련된 의사는 질환 또는 상태의 치료 또는 예방에 필요한 본 발명의 화합물의 유효량을 용이하게 결정하고 투여할 수 있다.
- [0293] 본 발명의 화합물, 또는 이의 염 및/또는 용매화물은 치료되는 대상체 및 질환 또는 장애에 따라 매일(1일 수회 포함), 2일 또는 3일 마다, 매주, 2주, 3주 또는 4주 마다 또는 심지어 단일 고용량으로 투여될 수 있다.
- [0294] 바람직하게는, 본 발명의 화합물, 또는 본 발명의 대사산물, 또는 이의 염 및/또는 용매화물(임의의 반대 이온 또는 용매의 질량을 제외)은 투여당 약 1mg 내지 150mg의 양으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 1mg, 2mg, 3mg, 5mg, 10mg, 15mg, 20mg, 25mg, 40mg, 50mg, 60mg, 70mg, 80mg, 90mg, 100mg, 110mg, 120mg, 130mg, 140mg 또는 150mg. 대안적으로, 본 발명의 화합물, 또는 이의 염 및/또는 용매화물(임의의 반대 이온 또는 용매의 질량을 제외)은 단일 고용량으로 투여될 수 있다. 단일 고용량은 약 150mg 내지 800mg일 수 있다. 예를 들어, 150mg, 200mg, 300mg, 400mg, 500mg, 600mg, 700mg 또는 800mg.
- [0295] 본 발명의 화합물은 본 발명에서 단일 활성 성분으로 사용될 수 있지만, 하나 이상의 추가 치료제(들)와 조합하여 사용될 수도 있으며, 이러한 조합의 사용은 본 발명의 바람직한 구현예를 제공한다. 이러한 추가 치료제는 암의 치료 또는 예방에 유용한 제제 또는 다른 약제학적 활성 물질일 수 있다. 이러한 제제는 당업계에 공지되어 있다. 본 발명에 사용하기에 적합한 추가 치료제의 예는 본원에 기재되어 있다.
- [0296] 하나 이상의 추가 치료제(들)는 본 발명의 화합물의 투여와 동시에, 순차적으로 또는 별도로 사용될 수 있다. 이러한 조합의 개별 성분은 요법의 과정 동안 상이한 시간에 개별적으로 투여되거나, 분할 또는 단일 조합 형태로 동시에 투여될 수 있다.
- [0297] 본 발명에 따라 사용하기 위한 바람직한 단위 투여량 조성물은 본 발명의 화합물의 유효량 또는 이의 적절한 분획을 함유하는 것들이다.
- [0298] **키트**
- [0299] 본 발명은 화학식 I의 화합물, 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제 및 임의로 하나 이상의 추가 치료제를 포함하는 키트를 제공한다. 이러한 추가 치료제의 예는 본 발명에 사용하기 적합하고, 본 발명의 약제학적 조성물에 추가 치료제로서 임의로 존재하는 것으로 본원에 기재된 것들을 포함한다.
- [0300] 본 발명의 키트는 암, 특히 혈액암의 치료 및/또는 예방에서 용도를 발견한다.
- [0301] 특정 구현예에서, 키트는 하나 이상의 용기를 포함하며, 샘플링 장비, 예를 들어, 병, 백(예: 정맥내 유체 백),

바이알, 시린지, 및 시험관도 포함할 수 있다. 기타 성분은 바늘, 희석제, 세척 시약 및 완충제를 포함할 수 있다. 유용하게도, 키트는 약제학적으로 허용되는 유기 용매 또는 약제학적으로 허용되는 완충제, 예를 들어, 인산염-완충 식염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 적어도 하나의 용기를 포함할 수 있다.

[0302] 바람직하게는, 본 발명의 키트는 지침, 예를 들어, 사용자에게 본 발명의 화합물 또는 조성물의 명시된 양을 생리적으로 허용되는 수성 용매 또는 희석제, 약제학적으로 허용되는 유기 용매 및/또는 임의로 하나 이상의 추가 치료제의 명시된 양과 혼합하도록 지시하는 지침을 포함한다. 이러한 지침은 또한 저장 조건 및/또는 투여 지침에 대한 가이드를 제공할 수 있다.

[0303] 의심의 여지를 피하기 위해, 본 발명의 화합물 또는 조성물, 임의의 생리학적으로 허용되는 수성 용매 또는 희석제, 임의의 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 유기 용매 및 임의의 하나 이상의 추가 치료제는 본 발명에 따른 약제학적 제제의 제조에 적합한 형태 및 양으로 본 발명에 따른 키트에 존재한다. 당업자는 본 발명에 따른 용도에 적합한 본 발명의 화합물 또는 조성물, 생리학적으로 허용되는 수성 용매 또는 희석제, 약제학적으로 허용되는 유기 용매 및 임의의 하나 이상의 추가 치료제의 양을 용이하게 결정할 수 있다.

[0304] **등가물**

[0305] 본 발명은 본원에서 광범위하고 일반적으로 기재되었다. 당업자는 본원에 기재된 모든 파라미터, 치수, 재료 및 구성이 예시적임을 의미하며, 실제 파라미터, 치수, 재료 및/또는 구성이 본 발명의 교시가 사용되는 특정 적용 또는 적용들에 따라 달라질 수 있다는 점을 용이하게 이해할 것이다. 당업자는 본원에 기재된 본 발명의 특정 구현예에 대한 다수의 등가물을 일상적인 실험만을 통해 인식하거나, 확인할 수 있다. 따라서, 전술한 구현예들은 단지 예시로서만 제시된 것이며, 첨부된 청구범위 및 이의 등가물의 범위 내에서, 본 발명은 구체적으로 기재되고 청구된 것과는 다르게 실시될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 본 발명은 본원에 기재된 각각의 개별 특징, 시스템, 물품, 재료, 키트 및/또는 방법에 관한 것이다. 또한, 이러한 특징, 시스템, 물품, 재료, 키트 및/또는 방법이 상호 모순되지 않는 경우, 2개 이상의 이러한 특징, 시스템, 물품, 재료, 키트 및/또는 방법의 조합은 본 발명의 범위 내에 포함된다. 추가로, 본 일반 개시에 속하는 각각의 협소한 종 및 하위속 그룹도 본 발명의 일부를 형성한다. 이는, 절제된 재료가 본원에서 구체적으로 기재되는지 여부에 관계없이, 속(genus)으로부터 임의의 주제를 제거하는 단서 또는 부정적 제한과 함께 본 발명의 일반적 설명을 포함한다.

[0306] **참조에 의한 통합**

[0307] 본원에서 언급되거나 인용된 논문, 특허 및 특허 출원의 내용, 및 기타 모든 문서 및 전자적으로 이용 가능한 정보는 각 개별 간행물이 참조에 의해 통합되도록 구체적으로 그리고 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도까지 전체가 참조로 본원에 통합된다. 본 출원인은 임의의 이러한 논문, 특허, 특허 출원 또는 기타 물리적 및 전자 문서의 임의의 및 모든 자료와 정보를 본 출원에 물리적으로 통합할 수 있는 권리를 보유한다.

[0308] 다음 실시예는 본 발명을 예시한다.

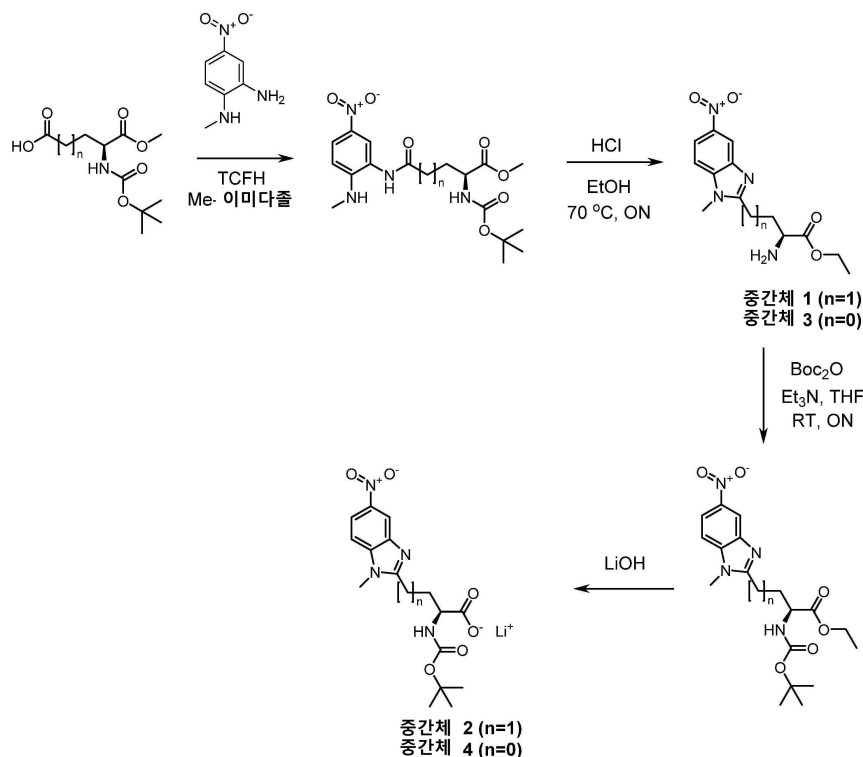
[0309] **실시예:**

[0310] **실시예 화합물:**

[0311] 본 발명의 화합물은 당업자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다. 다양한 상이한 용매, 온도 및 기타 반응 조건뿐만 아니라 다른 반응 반응식도 당업자에 의해 용이하게 고안될 수 있다.

[0312] 중간체 1-4는 일반 반응식 1에 따라 합성했다. 먼저, 상응하는 보호된 아미노산과 아닐린 사이에서 아미드화 반응을 수행했다. 수득된 생성물을 산성 조건하에 사이클리화하여 벤즈이미다졸 헥테로사이클을 형성하고, 이어서 중간체 1(n=1) 및 3(n=0)을 형성했다. BOC 보호에 이은 비누화에 의해 중간체 3(n=1)과 4(n=0)를 모두 수득하였다.

[0313] [반응식 1]

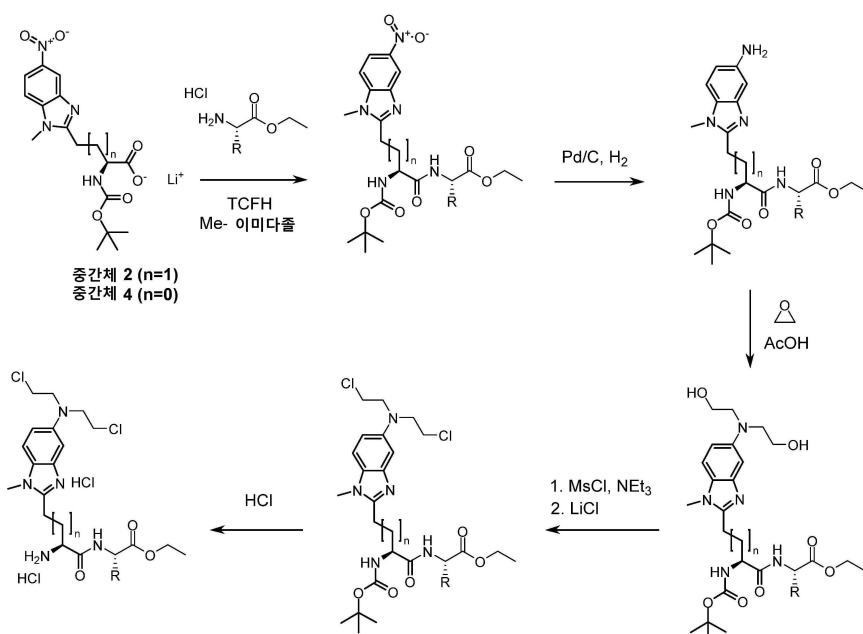


[0314]

[0315] 중간체(2 또는 4)와 상응하는 보호 아미노산 사이에 TCFH와의 펩티드 커플링은 목적하는 디펩티드를 제공했다. 니트로 그룹의 환원은 수소의 가압 분위기하에 Pd/C로 수행되었다. 형성된 아닐린은 산성 조건하에 에틸렌 옥사이드로 알킬화되었다. 메실화에 이어, 염소 치환에 의해 질소 머스타드 모이어터를 제공했다. 마지막으로, HCl 또는 TFA로 BOC 보호 그룹을 제거하면, 목적하는 유사체가 수득되었다(반응식 2).

[0316] 중간체 2와 4는 또한 반응식 13에 따라 합성할 수 있다.

[0317] [반응식 2]

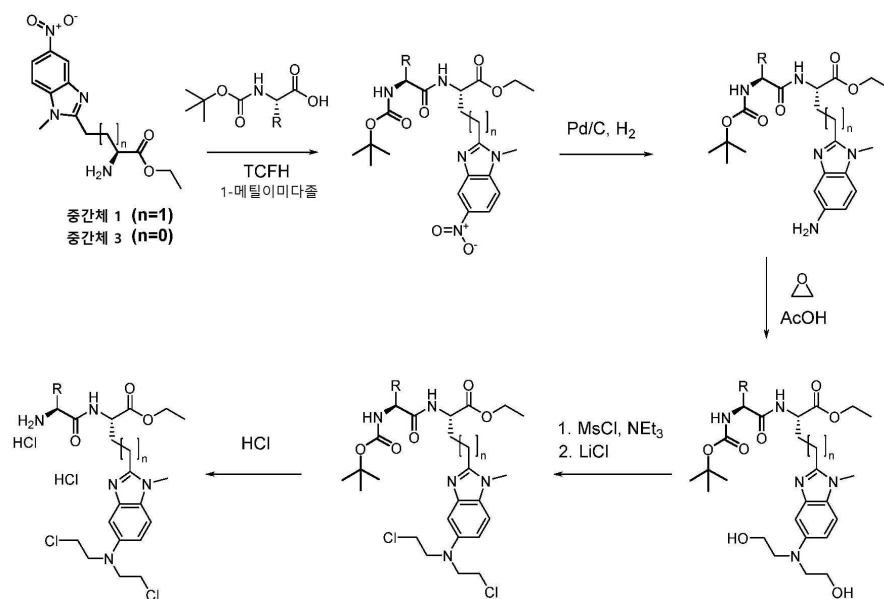


[0318]

[0319] 실시예 화합물 1 내지 6은 반응식 2에 도시된 합성 경로에 따라 합성했다. 실시예 화합물 13 내지 15, 19, 20, 22 내지 36, 39, 40 내지 42 및 44 내지 51은 하기 상세히 기재된 바와 같이 합성했다. 상기와 유사한 전략이 디펩티드의 C-말단에 벤즈이미다졸 치환체를 갖는 실시예 화합물 7 내지 12의 합성에 적용되었다(반응식

3). 실시예 화합물 16, 21, 37 및 43은 하기에 상세히 기재된 바와 같이 합성했다.

[반응식 3]



재료 및 방법

일반적 방법 A

예비 HPLC는 이동상(산성 조건)으로 MilliQ H₂O/CH₃CN 중의 0.1% TFA를 갖는 키네틱스(Kinetex) XB C₁₈(5 μm, 21 × 100mm) 컬럼을 사용하여 길슨(Gilson) HPLC 시스템에서 수행했다(유동 25mL/분, 15분에 걸쳐 구배). 분획을 UV-신호에 따라 수집했다. 분석은 이동상(산성 조건)으로 MilliQ H₂O/CH₃CN 중의 0.1% TFA를 갖는 키네틱스 XB C18(2.6 μm, 3.0 × 50mm) 컬럼을 사용하거나, 이동상(염기성 조건)으로 MilliQ H₂O/CH₃CN 중의 10mM NH₄HCO₃(pH 10)를 갖는 키네틱스 EVO C₁₈(2,6 μm, 3.0 × 50mm) 컬럼(유동 1mL/분)에서 2개 방법에 의해 아길런트 시리즈(Agilent Series) 1100 시스템에서 수행했다.

아길런트 1100 시리즈 액체 크로마토그래프/질량 선택적 검출기(MSD)를 사용하여 전기분무 이온화 질량 분석(ESI-MS)을 수행하여 표적 분자의 의사(pseudo) 분자 [M+H]⁺ 이온을 수득했다.

핵 자기 공명(NMR) 스펙트럼은 5mm 삼중 공명 프로브를 구비한 바리안 이노바(Varian Inova) 600MHz 기기에서 25°C에서 기록했다.

일반적 방법 B

일반 방법 B는 특정 예에 사용했다. 플래시 크로마토그래피는 실리카 겔 60A, 40-63 μm에서 수행했다. 예비 HPLC는 ACE 5 C₈ Prep, 100 × 21.2mm 컬럼을 사용하여 UV 검출기가 장착된 길슨 시스템에서 수행했다. 분석적 HPLC-MS는 전기분무 계면 및 UV 다이오드 어레이 검출기가 장착된 아길런트 1100 시리즈 액체 크로마토그래프/질량 선택적 검출기(MSD)(단일 4중극자)를 사용하여 수행했다. 분석은 3분에 걸쳐 1mL/분의 유동으로 0.1% 수성 TFA 중의 아세트니트릴의 구배로 ACE 3 C₈(3.0 × 50mm) 컬럼 또는 3분에 걸쳐 1mL/분의 유동으로 10mM 중탄산암모늄 중의 아세트니트릴의 구배로 Xbridge C₁₈(3.0 × 50mm) 컬럼을 사용하여 2개 방법으로 수행했다. ¹H-NMR 스펙트럼은 25°C에서 브루커(Bruker) 400MHz 기기에서 기록했다.

통상의 일반적 방법

염산염으로 제조된 실시예 화합물의 경우, 트리플루오로아세트산을 HCl로 대체하기 위해, 예비 크로마토그래피로부터 합한 순수 분획에 HCl(예: 1,4-디옥산 중의 4M)을 첨가했다.

화합물은 바이오비아(Biovia), 도트매틱스(Dotmatics) 및 퍼킨엘머(PerkinElmer)(ChemDraw)의 소프트웨어를 사

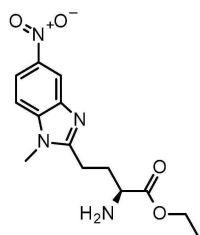
용하여 명명했다. 또한, 상업적 명칭 또는 사소한 명칭은 상업용 출발 물질과 시약에 사용했다.

[0332]

스펙트럼은 메스트랩 리서치 S.L.(Mestrelab Research S.L.)에 의해 공급되는 메스트레노바(MestReNova)를 사용하여 처리했다. 화학적 이동은 잔류 용매를 내부 표준으로 사용하여 ppm(δ)로 보고한다. Hz로 제공되는 피크 다양성은 다음과 같이 표현된다: s, 단일선; d, 이중선; dd, 이중선의 이중선; ddd, 이중선의 이중선의 이중선; t, 삼중선; dt, 삼중선의 이중선; q, 사중선; dq, 사중선의 이중선; p, 오중선; h, 육중선; m, 다중선; br s, 브로드 단일선. 하나의 다운필드 양성자(약 14.5-14.9ppm)는 때때로 범위 외이고, 항상 다중선 보고서에 포함되는 것은 아니다.

[0333]

중간체 1: 에틸 (2S)-2-아미노-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트



[0334]

[0335]

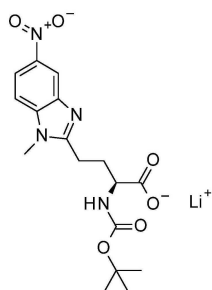
MeCN(220mL) 중의 (4S)-4-(3급-부톡시카보닐아미노)-5-메톡시-5-옥소-펜탄산(7.46g, 28.6mmol), N1-메틸-4-니트로-벤젠-1,2-디아민(5.01g, 30.0mmol), 1-메틸이미다졸(4.78mL, 60.0mmol)의 용액에 [클로로(디메틸아미노)메틸렌]-디메틸-암모늄;헥사플루오로포스페이트(8.81g, 31.4mmol)를 실온[약간의 발열]에서 첨가했다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하고, 휘발물을 감압하에 증발시켰다. 조 물질을 DCM(400mL)에 용해시키고, 2N HCl:물 1:4 용액(200mL)으로 세척했다. 유기 상을 분리하여 MgSO_4 에서 건조시키고, 여과 및 농축하여 갈색 고체를 수득했다. 조 생성물, 메틸 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-5-[2-(메틸아미노)-5-니트로-아닐리노]-5-옥소-펜타노에이트(13.4g, 28.4mmol, 수율: 99%)는 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 87%; MS(ESI+) m/z = 354 $[\text{M}+\text{H}-\text{tBu}]^+$.

[0336]

EtOH(400mL) 중의 메틸 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-5-[2-(메틸아미노)-5-니트로-아닐리노]-5-옥소-펜타노에이트(11.7g, 28.5mmol)의 용액에 염화수소(12.0mol/L, 42.3mL, 507mmol)를 첨가하고, 혼합물을 70°C에서 밤새 교반했다. 반응물을 감압하에 증발시키고, 물(500mL)을 첨가했다. 수성 상을 EtOAc($2 \times 200\text{mL}$)로 세척했다. 유기물은 버렸다. 수성 상을 EtOAc(500mL)와 혼합하고, 고체 K_2CO_3 로 pH 9-10까지 중화시켰다. 수성 상을 EtOAc($2 \times 300\text{mL}$)로 추출했다. 유기물을 MgSO_4 에서 건조시키고, 여과하고 감압하에 증발시켜 조 생성물, 에틸 (2S)-2-아미노-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(중간체 1)를 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 83%; MS(ESI+) m/z = 307 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0337]

중간체 2: 리튬;(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트



[0338]

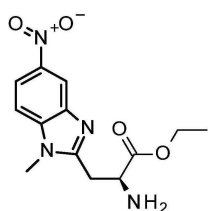
[0339]

THF(100mL) 중의 조 에틸 (2S)-2-아미노-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(중간체 1)(5.73g, 18.7mmol)의 용액에 트리에틸아민(3.13mL, 22.4mmol) 및 디-3급-부틸 디카보네이트(4.49g, 20.6mmol)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 조 물질을 감압하에 농축시키고, EtOAc(200mL)로 용해시키고, 0.5N HCl(200mL)로 세척했다. 상을 분리하고, 수성 상을 EtOAc($2 \times 50\text{mL}$)로 추출했다. 유기물을 MgSO_4 에서 건조시키고, 여과하고, 감압하에 증발시켰다. Et₂O(150mL)를 첨가하고, 고체가 침전되기 시작했다. 플

라스크를 0℃로 냉각시키고, 30분 동안 정치시켰다. 고체를 여과하여 수집하고, 차가운 Et₂O(3×50mL)로 세척했다. 고체를 감압하에 건조시켜 에틸 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(4.70g, 11.6mmol, 3단계에 걸친 수율: 55%)을 담황색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 96%, MS(ESI+) $m/z = 407$ $[M+H]^+$.

[0340] THF(20mL) 및 MeOH(20mL) 중의 에틸 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(1.47g, 3.62mmol)의 용액에 물(5mL) 및 LiOH·H₂O(0.159g, 3.80mmol)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 밤새 교반 했다. 조 생성물, 리튬; (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(중간체 2)는 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 100%; MS(ESI+) $m/z = 379$ $[M(\text{카복실산})+H]^+$.

[0341] **중간체 3: 에틸 (2S)-2-아미노-3-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)프로파노에이트**



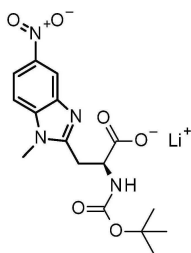
[0342]

[0343] 중간체 3은 중간체 1과 동일한 절차에 따르지만, (3S)-3-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-메톡시-4-옥소-부탄산을 출발 물질로서 사용하여 합성했다:

[0344] **단계 1:** 조 생성물, 메틸 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-[2-(메틸아미노)-5-니트로-아닐리노]-4-옥소-부타노에이트는 갈색 고체(수율 71%)로 단리되었다. HPLC 순도: 71%; $m/z = 341$ $(M+H-tBu)^+$.

[0345] **단계 2:** 에틸 (2S)-2-아미노-3-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)프로파노에이트(중간체 3)는 황색-오렌지색 고체(수율 98%)로서 단리되었다. HPLC 순도: 91%; $m/z = 293$ $(M+H)^+$.

[0346] **중간체 4: 리튬; (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)프로파노에이트**



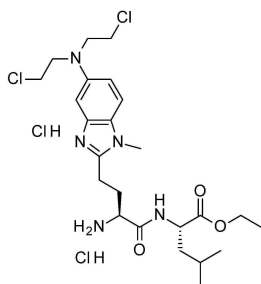
[0347]

[0348] 중간체 4는 중간체 2와 동일한 절차에 따르지만, 에틸 (2S)-2-아미노-3-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)프로파노에이트(중간체 3)를 출발 물질로서 사용하여 합성했다.

[0349] **단계 1:** 조 생성물, 에틸 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)프로파노에이트는 갈색 고체(수율 83%)로 단리되었다. HPLC 순도: 97%; $m/z = 393$ $[M+H]^+$.

[0350] **단계 2:** 리튬; (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)프로파노에이트(중간체 4)는 황색-오렌지색 고체(정량적 수율)로서 단리되었다. HPLC 순도: 91%; $m/z = 365$ $[M(\text{카복실산})+H]^+$.

[0351] **실시예 1: 에틸 (2S)-2-[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 1)**



[0352]

[0353]

단계 1: MeCN(30mL) 중의 에틸 (2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노에이트;하이드로클로라이드(0.581g, 2.97mmol), 리튬; (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(중간체 2)(1.04g, 2.70mmol) 및 1-메틸이미다졸(0.452mL, 5.67mmol)의 용액에 [클로로(디메틸아미노)메틸렌]-디메틸-암모늄;헥사플루오로포스페이트(0.834g, 2.97mmol)를 실온에서 첨가했다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반했다. 반응물을 시트르산 용액(물 중의 10%)으로 퀀칭하고, 휘발물을 증발시켰다. 조 물질을 물로 희석하고, EtOAc(×3)로 추출했다. 유기물을 MgSO₄에서 건조하고, 여과하고, 감압하에 증발시켰다. 조 물질을 실리카 크로마토그래피(DCM→DCM/MeOH(10%))에 의해 정제하여 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트를 담황색 발포체(1.27g, 2.44mmol, 90% 수율)로서 수득했다. HPLC 순도: 96%; MS(ESI+) m/z = 520 [M+H]⁺.

[0354]

단계 2: 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(1.27g, 0.00244mol)를 EtOH(30mL)에 용해시키고, H-반응기에 넣었다. Pd/C(10%, 0.130g, 0.000122mol)를 첨가하고, 반응기를 밀봉했다. 질소 퍼지를 수행했다. H₂를 3bar에서 반응기에 충전하고, 반응물을 35℃에서 1.5시간 동안 교반했다. 수소는 질소 퍼지로 배기했다. 촉매는 셀라이트를 통한 여과에 의해 제거했다. 용매를 증발시키고, 조 생성물, 에틸 (2S)-2-[[(2S)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(0.670g, 1.37mmol, 85% 수율)를 단리시키고, 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 93%; MS (ESI+) m/z = 490 [M+H]⁺.

[0355]

단계 3: 에틸 (2S)-2-[[(2S)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(670mg, 0.00137mol)를 아세트산(5mL)에 용해시키고, 옥시란(2.30mol/L, 5.95mL, 0.0137mol)을 첨가하고, 반응물을 실온에서 24시간 동안 교반했다. 휘발물을 진공하에 제거하고, 조 물질을 DCM에 용해시키고, 포화 수성 NaHCO₃로 세척했다. 유기 층을 물과 염수로 세척하고, 상 분리를 통과시키고 농축시켰다. 조 물질을 DCM→DCM/MeOH(10%)을 사용한 실리카 크로마토그래피에 의해 정제하여 에틸 (2S)-2-[[(2S)-4-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(0.340g, 0.589mmol, 43% 수율)를 연백색 발포체로서 수득했다. HPLC 순도: 96%; MS (ESI+) m/z = 578 [M+H]⁺.

[0356]

단계 4: DCM(10mL) 중의 에틸 (2S)-2-[[(2S)-4-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(340mg, 0.589mmol) 및 트리에틸아민(0.238g, 2.35mmol)의 용액에 메탄설포닐 클로라이드(0.141mL, 1.82mmol)를 첨가했다. 반응 혼합물을 실온에서 20분 동안 교반하고, 이어서 NaHCO₃(포화):물(2/5)(20mL), 0.3M HCl(20mL) 및 염수(20mL)의 혼합물로 세척했다. 유기 상을 MgSO₄에서 건조하고, 여과하고, 감압하에 증발시켰다.

[0357]

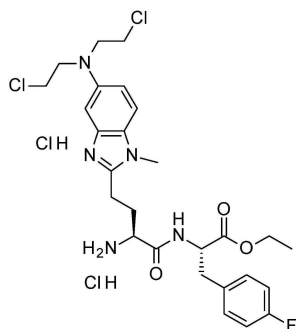
DMF(10mL) 중의 조 혼합물(메실화된 중간체) 및 염화리튬(0.374g, 8.83mmol)을 2.5시간 동안 60℃로 가열했다. 반응 혼합물을 톨루엔(40mL)과 EtOAc(40mL)의 혼합물로 희석하고, 이어서 염수(3×50mL)로 세척하고, MgSO₄로 건조하고, 용매를 증발시켜 조 잔류물을 수득했다. 조 물질을 DCM→DCM/MeOH(5%)를 용출제로서 사용하는 플래시 크로마토그래피에 의해 정제했다. 최종 화합물, 에틸 (2S)-2-[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트를 담황색 발포체(0.308g, 0.481mmol, 82% 수율)로서 수득했다. 메실화된 중간체의 HPLC: MS (ESI+) m/z = 734 [M+H]⁺. 목적 생성물의 HPLC 순도: 96%; MS (ESI+) m/z = 614 [M+H]⁺.

[0358] **단계 5:** EtOH(15mL) 중의 에틸 (2S)-2-[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(308mg, 0.476mmol)의 용액에 디옥산(4M) 중의 염화수소(4.00mol/L, 1.79mL, 7.14mmol)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 밤새 교반했다. 용매를 증발시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 Et₂O에서 교반했다. 형성된 회백색 고체를 여과하고, Et₂O(2×10mL)로 세척하고, EtOAc(2mL)로 세척하고, 진공 건조시켜 최종 생성물, 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시 화합물 1)를 회백색 고체로서 수득했다(0.170g, 0.272mmol, 수율: 57%). HPLC 순도: 95%, MS (ESI+) m/z = 514 [M+H]⁺.

[0359] ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 14.86 (br s, 1H), 9.31 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 8.60 (d, J = 5.3 Hz, 3H), 7.75 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.15 (dd, J = 9.4, 2.4 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.34 - 4.27 (m, 1H), 4.15 - 4.06 (m, 3H), 3.91 (s, 3H), 3.83 (t, J = 6.8 Hz, 4H), 3.78(t, J = 6.9 Hz, 4H), 3.43 - 3.30(m, 2H), 2.41 - 2.25(m, 2H), 1.81 - 1.71(m, 1H), 1.64(ddd, J = 13.7, 10.4, 5.1 Hz, 1H), 1.54(ddd, J = 13.8, 9.2, 4.7 Hz, 1H), 1.18(t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.92(d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.88(d, J = 6.5 Hz, 3H).

[0360] 실시예 1은 또한 실시예 46에 기재된 절차에 따라 합성했다.

[0361] **실시예 2:** 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 2)



[0362]

[0363] 표제 화합물은 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 5단계로 제조했다.

[0364] **단계 1:** 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(5.14g, 8.99mmol, 86% 수율)를 백색 고체로서 단리시켰다. HPLC 순도: 99%; MS (ESI+) m/z = 572 [M+H]⁺.

[0365] ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 로타머의 존재) δ 8.44 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.37 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.15 (dd, J = 8.9, 2.2 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.26 (dd, J = 8.4, 5.6 Hz, 2H), 7.10 - 7.01 (m, 3H), 4.51 - 4.44 (m, 1H), 4.10 - 4.04 (m, 1H), 4.02 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.06 - 2.92 (m, 2H), 2.92 - 2.83 (m, 2H), 2.13 - 2.02 (m, 2H), 1.37 (s, 8H, 주 로타머), 1.21 (s, 1H, 부 로타머), 1.08 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

[0366] **단계 2:** 조 생성물, 에틸 (2S)-2-[[(2S)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(4.83g, 0.00892mol, 93% 수율)를 담황색 발포체로서 단리시켰다. 조 물질은 다음 단계에 직접 사용했다. HPLC 순도: 96%; MS (ESI+) m/z = 542 [M+H]⁺.

[0367] ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆, 로타머의 존재) δ 8.49 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.28 (dd, J = 8.5, 5.7 Hz, 2H), 7.14 - 7.03 (m, 4H), 6.69 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.53 (dd, J = 8.5, 2.1 Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 4.49 - 4.41 (m, 1H), 4.07 - 3.98 (m, 3H), 3.58 (s, 3H), 3.07 - 2.94 (m, 2H), 2.82 - 2.70 (m, 2H), 2.08 - 1.98 (m, 1H), 1.98 - 1.87 (m, 1H), 1.37 (s, 8H, 주 로타머), 1.19 (s, 1H, 부 로타머), 1.13 - 1.03 (m, 3H).

[0368] **단계 3:** 목적 생성물, 에틸 (2S)-2-[[(2S)-4-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(3.00g, 4.76mmol, 54% 수율)를

백색 고체로서 단리시켰다. HPLC 순도: 100%, MS (ESI+) $m/z = 630$ $[M+H]^+$.

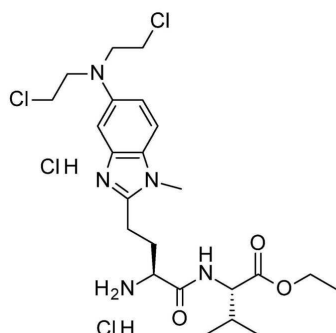
[0369] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6 , 로타머의 존재) δ 8.47 - 8.43 (m, 1H), 7.30 - 7.23 (m, 3H), 7.13 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.06 (t, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.82 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 6.73 - 6.69 (m, 1H), 4.71 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 4.46 (q, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.07 - 3.98 (m, 3H), 3.61 (s, 3H), 3.53 (q, $J = 6.2$ Hz, 4H), 3.42 - 3.35 (m, 4H), 3.07 - 2.93 (m, 2H), 2.80 - 2.74 (m, 2H), 2.09 - 2.00 (m, 1H), 2.00 - 1.92 (m, 1H), 1.37 (s, 8H, 주 로타머), 1.20 (s, 1H, 부 로타머), 1.11 - 1.05 (m, 3H).

[0370] **단계 4:** 조 생성물을 부치(Buchi) 자동 플래시 시스템(80g 컬럼, DCM/MeOH, 100:0 내지 92:8)을 사용하여 정제하여 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(1.60g, 2.40mmol, 수율 50%)를 담황색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 97%, MS (ESI+) $m/z = 666$ $[M+H]^+$.

[0371] **단계 5:** 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 2)(1.46g, 2.28mmol, 수율: 95%)를 회백색 고체로서 단리시켰다. HPLC 순도: 97%, MS (ESI+) $m/z = 566$ $[M+H]^+$.

[0372] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.75 (br s, 1H), 9.42 - 9.38 (m, 1H), 8.56 (s, 3H), 7.75 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.35 (dd, $J = 8.5, 5.6$ Hz, 2H), 7.18 - 7.09 (m, 3H), 6.93 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.52 (q, $J = 7.1$ Hz, 1H), 4.11 - 4.00 (m, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.85 - 3.82 (m, 4H), 3.79 - 3.76 (m, 4H), 3.41 - 3.26 (m, 2H), 3.10 - 3.01 (m, 2H), 2.36 - 2.27 (m, 2H), 1.11 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

[0373] **실시예 3:** 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 3)



[0374] .

[0375] 표제 화합물은 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 5단계로 제조했다.

[0376] **단계 1:** 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트(1.27g, 2.27mmol, 84% 수율)를 담황색 발포체로서 단리시켰다. HPLC 순도: 93%, MS (ESI+) $m/z = 506$ $[M+H]^+$.

[0377] **단계 2:** 조 생성물, 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트(1.2g, 97% 수율)를 베이지색 고체로서 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 97%, MS (ESI+) $m/z = 476$ $[M+H]^+$.

[0378] **단계 3:** 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트(1.38g, 98% 수율)를 갈색 오일로서 수득하고, 이는 정치시에 고형화된다. 이 화합물은 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 98%, MS (ESI+) $m/z = 564$ $[M+H]^+$.

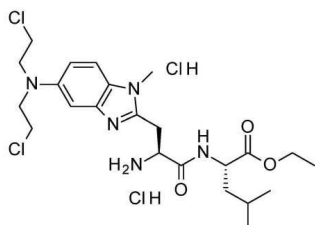
[0379] **단계 4:** 목적 화합물, 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트(836mg, 65% 수율)를 갈색 오일로서 수득했다. HPLC 순도: 93%, MS (ESI+) $m/z = 600$ $[M+H]^+$. 메실화된 중간체의 HPLC: MS (ESI+) $m/z = 720$ $[M+H]^+$.

[0380] **단계 5:** EtOH(2mL) 중의 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-

(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트(순도 93%, 216mg, 0.334mmol)의 용액에 디옥산 (4.00mol/L, 0.836mL, 3.34mmol) 중의 염화수소를 첨가하고, 25℃에서 3시간 동안 교반했다. 조 물질을 증발시키고, 예비 크로마토그래피(산성 완충제)에 의해 정제했다. prep로부터 수득된 분획은 LC-MS 분석이 수행될 때까지 병속에서 유지시켰다. 디옥산(4M, 1mL) 중의 HCl을 첨가하고, 샘플을 즉시 동결건조시켜 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 3)(54mg, 28% 수율)를 약간 연분홍색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 98%, MS (ESI+) $m/z = 500 [M+H]^+$.

[0381] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.78 (s, 1H), 9.07 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.67 - 8.50 (m, 3H), 7.75 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.15 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 6.93 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.21 (dd, $J = 7.3, 5.5$ Hz, 2H), 4.18 - 4.07 (m, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.83 (t, $J = 6.7$ Hz, 4H), 3.78 (t, $J = 6.2$ Hz, 4H), 3.33 (dq, $J = 24.7, 8.5$ Hz, 2H), 2.40 - 2.22(m, 2H), 2.14(ddt, $J = 14.0, 12.5, 6.9$ Hz, 1H), 1.19(t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.97(dd, $J = 6.9, 5.4$ Hz, 6H).

[0382] 실시예 4: 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 4 화합물)



[0383] 표적 화합물은 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 5단계로 제조했다.

[0384]

[0385] 단계 1: 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(1.36g, 2.42mmol, 89% 수율)를 담황색 발포체로서 단리시켰다. HPLC 순도: 90%, MS (ESI+) $m/z = 506 [M+H]^+$.

[0386] 단계 2: 조 생성물, 에틸 (2S)-2-[[(2S)-3-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(1.47g, 2.78mmol, 수율 100%)를 황색 오일로서 단리시키고, 추가 정제 없이 다음 단계에 직접 사용했다. HPLC 순도: 90%, MS (ESI+) $m/z = 476 [M+H]^+$.

[0387] 단계 3: 조 생성물, 에틸 (2S)-2-[[(2S)-3-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(1.50g, 2.42mmol, 86% 수율)를 갈색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 91%, MS (ESI+) $m/z = 564 [M+H]^+$.

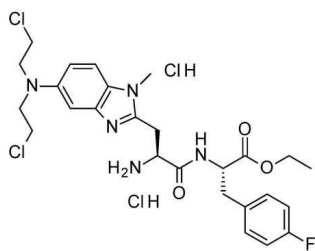
[0388] 단계 4: 에틸 (2S)-2-[[(2S)-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(0.550g, 0.870mmol, 33% 수율)를 황색 오일로서 단리시켰다. HPLC 순도: 95%, MS (ESI+) $m/z = 600 [M+H]^+$. 메실화된 중간체의 HPLC: MS (ESI+) $m/z = 720 [M+H]^+$.

[0389] 단계 5: EtOH(15mL) 중의 에틸 (2S)-2-[[(2S)-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(95%, 200mg, 0.316mmol)의 용액에 디옥산 (4M)(4.00mol/L, 1.19mL, 4.75mmol) 중의 염화수소를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 밤새 교반했다. 용매를 증발시켜 조 물질을 수득하고, 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸 펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 4)(0.112g, 0.189mmol, 60% 수율)를 백색 고체로 수득했다. HPLC 순도: 100%, MS (ESI+) $m/z = 500 [M+H]^+$.

[0390] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.75 (br s, 1H), 9.29 (dd, $J = 7.8, 2.5$ Hz, 1H), 8.86 (s, 3H), 7.78 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.18 (dd, $J = 9.4, 2.4$ Hz, 1H), 6.91 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.49 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.34 (ddd, $J = 10.0, 7.5, 4.9$ Hz, 1H), 4.06 - 4.01 (m, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.90 - 3.74 (m, 9H), 3.65

(dd, $J = 15.4, 6.6$ Hz, 1H), 1.72 (ddd, $J = 11.9, 7.9, 5.9$ Hz, 1H), 1.56(ddd, $J = 13.7, 10.0, 5.2$ Hz, 1H), 1.50(ddd, $J = 13.9, 9.0, 5.0$ Hz, 1H), 1.15(t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.88(dd, $J = 16.2, 6.6$ Hz, 6H).

[0391] 실시예 5: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 5)



[0392]

[0393] 표제 화합물은 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 5단계로 제조했다.

[0394] 단계 1: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)프로파노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(1.36g, 2.19mmol, 81% 수율)를 담황색 발포체로서 단리시켰다. HPLC 순도: 90%, MS (ESI+) $m/z = 558$ $[M+H]^+$.

[0395] 단계 2: 조 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-3-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(954mg, 73% 수율)를 회백색 고체로서 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 98%, MS (ESI+) $m/z = 528$ $[M+H]^+$.

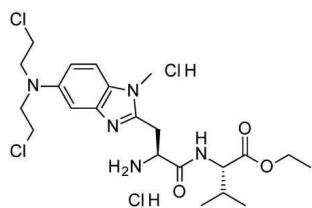
[0396] 단계 3: 조 생성물 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-3-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(964mg, 85% 수율)를 갈색 오일로서 수득하고, 이는 정치시 고체되었다. 이 화합물은 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 96%, MS (ESI+) $m/z = 616$ $[M+H]^+$.

[0397] 단계 4: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(0.635g, 0.924mmol, 69% 수율)를 황색 오일로서 단리시켰다. HPLC 순도: 95%, MS (ESI+) $m/z = 652$ $[M+H]^+$. HPLC 메실화된 중간체: MS (ESI+) $m/z = 772$ $[M+H]^+$.

[0398] 단계 5: 조 생성물을 prep-HPLC로 정제했다(산성 조건: 유동 25mL/분, 12%B에서 42%B까지 15분에 걸쳐 구배. 분획은 239nm에서 UV-신호를 기준으로 수집했다). 디옥산(1mL) 중의 4N HCl을 합한 분획에 첨가하고, 이를 동결건조시켜 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 5)(78mg, 0.121mmol, 13% 수율)를 회백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 97%, MS (ESI+) $m/z = 552$ $[M+H]^+$.

[0399] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.66 (br s, 1H), 9.31 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 8.79 (s, 3H), 7.81 - 7.67 (m, 1H), 7.33 - 7.28 (m, 2H), 7.15 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.12 - 7.06 (m, 2H), 6.88 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.59 (p, $J = 8.4, 7.7$ Hz, 1H), 4.41 (s, 1H), 4.01 (dddd, $J = 13.6, 10.8, 7.2, 3.8$ Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.84 (ddt, $J = 23.1, 12.2, 6.2$ Hz, 4H), 3.77(ddd, $J = 9.3, 7.2, 4.8$ Hz, 5H), 3.63(s, 1H), 3.05 - 2.95(m, 2H), 1.10(t, $J = 7.1$ Hz, 3H).

[0400] 실시예 6: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 6)



[0401]

[0402] 표제 화합물은 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 5단계로 제조했다.

[0403]

단계 1: 목적 생성물, 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)프로파노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트(0.992g, 1.82mmol, 67% 수율)를 담황색 발포체로서 단리시켰다. HPLC 순도: 90%, MS (ESI+) $m/z = 492$ [M+H]⁺.

[0404]

단계 2: 조 생성물, 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-3-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트(931mg, 98% 수율)를 갈색 오일로서 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 98%, MS (ESI+) $m/z = 462$ [M+H]⁺.

[0405]

단계 3: 조 생성물, 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-3-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트(0.848g, 1.39mmol, 70% 수율)를 황색 오일로서 수득하고, 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 90%, MS (ESI+) $m/z = 550$ [M+H]⁺.

[0406]

단계 4: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트(0.210g, 0.340mmol, 수율: 22%)을 황색 오일로서 단리시켰다. HPLC 순도: 95%, MS (ESI+) $m/z = 586$ [M+H]⁺. HPLC 메실화된 중간체: MS (ESI+) $m/z = 706$ [M+H]⁺.

[0407]

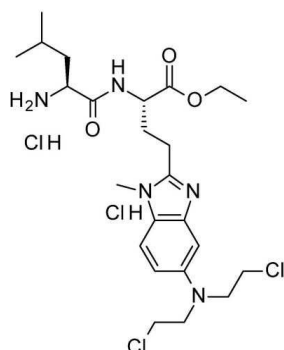
단계 5: 조 생성물을 예비 HPLC(유동 25mL/분, 8%B에서 38%B까지 15분에 걸쳐 구배; 분획은 239nm에서 UV-신호에 기초하여 수집했다)에 의해 정제하여 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 6)(85mg, 0.147mmol, 43% 수율)를 회백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 97%, MS (ESI+) $m/z = 486$ [M+H]⁺.

[0408]

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 14.77 (br s, 1H), 9.04 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.85 (s, 3H), 7.78 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.17 (dd, J = 9.6, 2.3 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.59 (s, 1H), 4.26 (dd, J = 7.9, 5.5 Hz, 1H), 4.07 - 3.99 (m, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.89 - 3.75 (m, 9H), 3.59 (dd, J = 15.5, 6.8 Hz, 1H), 2.12 - 2.03 (m, 1H), 1.15 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.92 (d, J = 6.8 Hz, 6H).

[0409]

실시예 7: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 7)



[0410]

[0411]

단계 1: MeCN(30mL) 중의 에틸 (2S)-2-아미노-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(중간체 1)(1.00g, 3.26mmol), (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-메틸-펜탄산;수화물(0.814g, 3.26mmol) 및 1-메틸이미다졸(0.546mL, 6.86mmol)의 용액에 [클로로(디메틸아미노)메틸렌]-디메틸-암모늄;헥사플루오로포스페이트(1.01g, 3.59mmol)를 실온에서 첨가했다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반했다. 반응물을 시트르산 용액(물 중의 10%)으로 퀀칭하고, 휘발물을 증발시켰다. 조 물질을 물로 희석하고, EtOAc(×3)로 추출했다. 유기 상을

MgSO₄에서 건조시키고, 여과하고 감압하에 증발시켰다. 조 물질을 DCM→DCM/MeOH(10%)를 사용하는 실리카 크로마토그래피에 의해 정제하여 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(90%, 1.47g, 2.54mmol, 78% 수율)를 담황색 발포체로서 수득했다. HPLC 순도: 90%; MS (ESI+) m/z = 520 [M+H]⁺.

[0412] **단계 2:** 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(1.47g, 0.00283mol)를 EtOH(30mL)에 용해시키고, H 반응기에 넣었다. Pd/C(10%, 0.151g, 0.000141mol)를 첨가하고, 반응기를 밀봉했다. 질소 퍼지를 수행했다. H₂를 3bar에서 반응기에 충전하고, 반응물을 35℃에서 1.5시간 동안 교반했다. 수소를 질소 퍼지로 배출했다. 촉매는 셀라이트를 통한 여과에 의해 제거했다. 용매를 증발시키고, 조 생성물, 에틸 (2S)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-메틸-펜타노일]아미노]부타노에이트(1.20g, 2.21mmol, 78% 수율)를 갈색 발포체로서 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 90%; MS (ESI+) m/z = 490 [M+H]⁺.

[0413] **단계 3:** 에틸 (2S)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-메틸-펜타노일]아미노]부타노에이트(1.26g, 2.45mmol, 95% 순수)를 아세트산(5mL)에 용해시켰다. 옥시란(2.3M, 10.6mL)을 첨가하고, 반응물을 실온에서 24시간 동안 교반했다. 휘발물을 진공하에 제거하고, 조 물질을 DCM에 용해시키고, 포화 수성 NaHCO₃로 세척했다. 유기 층을 물 및 염수로 세척하고, 상 분리기 카트리지를 통해 통과시키고, 농축시켜 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-메틸-펜타노일]아미노]부타노에이트(1.38g, 93% 수율)를 갈색 오일로서 수득하고, 이는 정치시 고화되었다. 생성물은 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z = 578 [M+H]⁺.

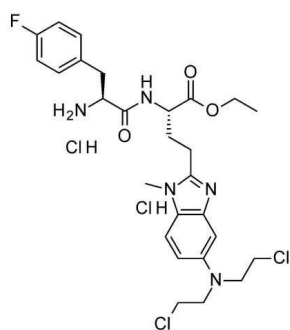
[0414] **단계 4:** DCM(50mL) 중의 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-메틸-펜타노일]아미노]부타노에이트(1.38g, 2.27mmol, 순도 95%) 및 트리 에틸아민(1.27mL, 9.08mmol)의 용액에 메탄설포닐 클로라이드(0.544mL, 7.03mmol)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 10분 동안 교반했다. 반응 혼합물을 NaHCO₃(포화):물(2:5)(100mL), 0.3M HCl(100mL) 및 염수(100mL)의 혼합물로 세척했다. 유기 상은 상 분리기 카트리지를 통해 통과시키고, 감압하에 증발시켰다. 조 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-메틸설포닐옥시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-메틸-펜타노일]아미노]부타노에이트는 추가 정제 없이 다음 단계에 즉시 사용했다.

[0415] 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-메틸설포닐옥시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-메틸-펜타노일]아미노]부타노에이트(1.82g, 1.64mmol, 순도 66%)를 DMF(5mL)에 용해시켰다. LiCl(1.04g, 24.6mmol)을 첨가하고, 반응물을 60℃에서 1시간 동안 가열했다. 반응 혼합물을 톨루엔(10mL)과 EtOAc(10mL)의 혼합물로 희석하고, 이어서 염수(3×20mL)로 세척하고, MgSO₄로 건조시키고, 여과하고 증발시켰다. 수득된 조 물질을 0-20%의 DCM에서 에틸 아세테이트의 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피에 의해 정제했다. 목적 화합물을 함유하는 분획을 합하고, 농축시켜 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-메틸-펜타노일]아미노]부타노에이트(652mg, 62% 수율)를 갈색 오일로서 수득했다. 메실화된 중간체의 HPLC: MS (ESI+) m/z = 734 [M+H]⁺. 목적 생성물의 HPLC 순도: 96%; MS (ESI+) m/z = 614 [M+H]⁺.

[0416] **단계 5:** EtOH(2mL) 중의 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-메틸-펜타노일]아미노]부타노에이트(205mg, 0.316mmol, 순도 95%)의 용액에 디옥산(4.00mol/L, 1.19mL, 4.75mmol)의 염화수소를 첨가하고, 혼합물을 25℃에서 3시간 동안 교반했다. 용매를 증발시켜 조 물질을 수득하고, 예비 크로마토그래피(산성 완충제; 유동 25mL/분, 7%B에서 37%B까지 15분에 걸쳐 구배로 정제했다. 분획은 235nm에서 UV-신호에 기초하여 수집했다. 분획은 LC-MS 분석이 수행될 때까지 병목에 정치시켰다. 디옥산(4M, 1mL) 중의 HCl을 첨가하고, 샘플을 즉시 동결건조시켜 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시에 화합물 7)(50mg, 26% 수율)를 황색 오일로서 수득했다. HPLC 순도: 95%, MS (ESI+) m/z = 514 [M+H]⁺.

[0417] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.41 (s, 1H), 9.04 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 5.3 Hz, 3H), 7.74 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.15 (dd, J = 9.4, 2.3 Hz, 1H), 6.90(d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.51(ddd, J = 9.6, 8.0, 4.9 Hz, 2H), 4.10(d, J = 7.1 Hz, 2H), 3.88(s, 3H), 3.84(t, J = 6.7 Hz, 4H), 3.78 (t, J = 6.9 Hz, 4H), 3.18 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 2.42 - 2.32 (m, 1H), 2.19 - 2.09 (m, 1H), 1.70 (dp, J = 13.4, 6.8 Hz, 1H), 1.61(dt, J = 13.9, 7.0 Hz, 1H), 1.55(dt, J = 14.1, 7.5 Hz, 1H), 1.19(t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.92(dd, J = 16.4, 6.5 Hz, 6H).

[0418] 실시예 8: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 8)



[0419]

[0420] 표제 화합물은 실시예 7에 기재된 방법을 사용하여 5단계로 제조했다.

[0421] 단계 1: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(1.87g, 2.94mmol, 90% 수율)를 담황색 발포체로서 단리시켰다. HPLC 순도: 90%, MS (ESI+) m/z = 572 $[M+H]^+$.

[0422] 단계 2: 조 에틸 (2S)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]부타노에이트(1.78g, 90% 수율)를 담황색 고체로서 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 90%, MS (ESI+) m/z = 542 $[M+H]^+$.

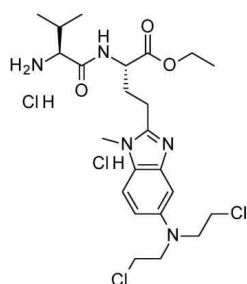
[0423] 단계 3: 조 생성물, 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]부타노에이트(1.74g, 86% 수율)를 담갈색 고체로서 수득했다. 이 화합물은 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 92%, MS (ESI+) m/z = 630 $[M+H]^+$.

[0424] 단계 4: 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]부타노에이트(628mg, 37% 수율)를 갈색 오일로서 단리시켰다. HPLC 순도: 92%, MS (ESI+) m/z = 666 $[M+H]^+$. HPLC 메실화된 중간체: MS (ESI+) m/z = 786 $[M+H]^+$.

[0425] 단계 5: 조 생성물을 예비 HPLC로 정제했다(산성 조건; 유동 25mL/분, 11%B에서 40%B까지 15분에 걸쳐 구배. 분획은 235nm에서 UV-신호에 기초하여 수집했다). 디옥산 중의 염산(4M, 1mL)을 합한 분획에 첨가하고, 샘플을 즉시 동결건조시켜 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 8)(35mg, 23% 수율)를 회백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 95%, MS (ESI+) m/z = 566 $[M+H]^+$.

[0426] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.61 (s, 1H), 9.57 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.40 (d, J = 5.5 Hz, 3H), 7.75 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.45 - 7.36 (m, 2H), 7.15 (dtd, J = 9.4, 7.4, 6.9, 2.3 Hz, 3H), 6.91 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.44 (ddd, J = 9.5, 7.6, 4.3 Hz, 1H), 4.22 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 4.08 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.83 (t, J = 6.8 Hz, 4H), 3.78 (t, J = 6.1 Hz, 4H), 3.36 - 3.25 (m, 2H), 3.19 (dd, J = 14.0, 5.7 Hz, 1H), 2.98 (dd, J = 14.0, 8.0 Hz, 1H), 2.40 - 2.31 (m, 1H), 2.17 (dtd, J = 14.6, 9.5, 5.5 Hz, 1H), 1.18 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

[0427] 실시예 9: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-메틸-부타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 9)



[0428]

[0429] 표제 화합물은 실시예 7에 기재된 방법을 사용하여 5단계로 제조했다.

[0430] 단계 1: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-메틸-부타노일]아미노]-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(0.757g, 1.35mmol, 41% 수율)를 담황색 발포체로서 단리시켰다. HPLC 순도: 90%, MS (ESI+) $m/z = 506$ [M+H]⁺.

[0431] 단계 2: 조 생성물, 에틸 (2S)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-메틸-부타노일]아미노]부타노에이트(0.642g, 1.28mmol, 수율: 86%)를 담갈색 고체로서 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 95%, MS (ESI+) $m/z = 476$ [M+H]⁺.

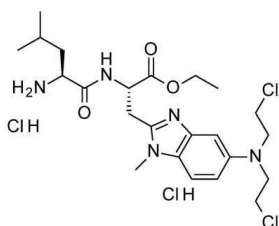
[0432] 단계 3: 조 생성물, 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-메틸-부타노일]아미노]부타노에이트(0.685g, 1.09mmol, 85% 수율)를 갈색 오일로서 수득하고, 이는 정치시 고화되었다. 이 화합물은 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 90%, MS (ESI+) $m/z = 564$ [M+H]⁺.

[0433] 단계 4: 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-메틸-부타노일]아미노]부타노에이트(0.402g, 0.623mmol, 58% 수율)를 담갈색 오일로서 단리시켰다. HPLC 순도: 93%, MS (ESI+) $m/z = 600$ [M+H]⁺. HPLC 메실화된 중간체: MS (ESI+) $m/z = 720$ [M+H]⁺.

[0434] 단계 5: 조 생성물을 증발시키고, 예비 크로마토그래피에 의해 정제했다(산성 완충제; 유동 25mL/분, 7%B에서 36%B까지 15분에 걸쳐 구배. 분획은 235nm에서 UV-신호에 기초하여 수집했다). prep로부터 수득된 분획을 병욕에서 정치시키고, 디옥산 중의 HCl(4M, 1mL)을 첨가하고, 샘플을 즉시 동결건조시켜 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-메틸-부타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 9)(12mg, 6.3% 수율)를 회백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 95%, MS (ESI+) $m/z = 500$ [M+H]⁺.

[0435] ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 14.70 (s, 1H), 9.37 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.44 (d, J = 5.7 Hz, 3H), 7.75 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.15 (dd, J = 9.3, 2.4 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.46 (ddd, J = 10.0, 7.6, 4.0 Hz, 1H), 4.10 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.83 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 3.80 - 3.77 (m, 4H), 3.74 - 3.63 (m, 1H), 3.52 - 3.41 (m, 1H), 3.31 (ddd, J = 15.9, 9.6, 6.8 Hz, 1H), 2.37(dt, J = 13.3, 4.9 Hz, 1H), 2.20 - 2.10(m, 2H), 1.18(t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.04 - 0.94(m, 6H).

[0436] 실시예 10: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 10)



[0437]

[0438] 표제 화합물은 실시예 7에 기재된 방법을 사용하여 5단계로 제조했다.

[0439] **단계 1:** 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-메틸-펜타노일]아미노]-3-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)프로파노에이트(1.68g, 2.99mmol, 87% 수율)를 담황색 발포체로서 단리시켰다. HPLC 순도: 90%, MS (ESI+) m/z = 506 $[M+H]^+$.

[0440] **단계 2:** 조 생성물, 에틸 (2S)-3-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-메틸-펜타노일]아미노]프로파노에이트(1.50g, 2.90mmol, 87% 수율)를 갈색 발포체로서 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 92%, MS (ESI+) m/z = 476 $[M+H]^+$.

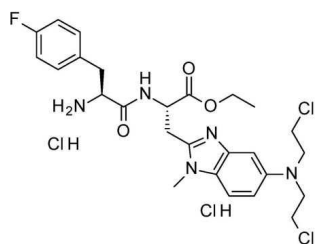
[0441] **단계 3:** 조 생성물, 에틸 (2S)-3-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-메틸-펜타노일]아미노]프로파노에이트(1.20g, 1.60mmol, 52% 수율)를 갈색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 75%, MS (ESI+) m/z = 564 $[M+H]^+$.

[0442] **단계 4:** 에틸 (2S)-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-메틸-펜타노일]아미노]프로파노에이트(0.430g, 0.680mmol, 32% 수율)를 황색 오일로서 단리시켰다. HPLC 순도: 95%, MS (ESI+) m/z = 600 $[M+H]^+$. HPLC 메실화된 중간체: MS (ESI+) m/z = 720 $[M+H]^+$.

[0443] **단계 5:** 조 생성물을 prep-HPLC에 의해 정제했다(산성 조건; 유동 25mL/분, 6%B에서 36%B까지 15분에 걸쳐 구배. 분획은 237nm에서 UV-신호에 기초하여 수집했다). 디옥산(1mL) 중의 4N HCl을 합한 분획에 첨가하고, 이를 동결건조시켜 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 10)(0.102g, 0.169mmol, 53% 수율)를 백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 95%, MS (ESI+) m/z = 500 $[M+H]^+$.

[0444] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.85 (br s, 1H), 9.56 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.40 (s, 3H), 7.76 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 5.02 (q, J = 7.6 Hz, 1H), 4.12 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.87 - 3.73 (m, 9H), 3.67 (dd, J = 15.8, 6.1 Hz, 1H), 3.58 (dd, J = 15.6, 8.2 Hz, 1H), 1.64(dt, J = 13.4, 6.7 Hz, 1H), 1.52(hept, J = 6.8 Hz, 2H), 1.14(t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.87(dd, J = 9.5, 6.5 Hz, 6H).

[0445] **실시예 11:** 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 11)



[0446] 표제 화합물은 실시예 7에 기재된 방법을 사용하여 5단계로 제조했다.

[0447] **단계 1:** 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-3-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)프로파노에이트(0.794g, 1.14mmol, 29% 수율)를 담황색 고체로서 단리시켰다. HPLC 순도: 80%, MS (ESI+) m/z = 558 $[M+H]^+$.

[0449] **단계 2:** 조 에틸 (2S)-3-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]프로파노에이트(772mg, 93% 수율)를 담갈색 고체로서 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 91%, MS (ESI+) m/z = 528 $[M+H]^+$.

[0450] **단계 3:** 조 생성물, 에틸 (2S)-3-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]프로파노에이트(817mg, 91% 수율)를 갈색 오일로서 수득하고, 이는 정치시 고화되었다. 이 화합물은 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 95%,

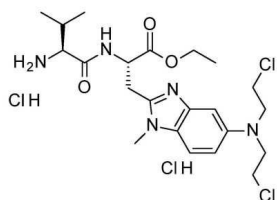
MS (ESI+) m/z = 616 $[M+H]^+$.

[0451] **단계 4:** 에틸 (2S)-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]프로파노에이트(449mg, 51% 수율)를 갈색 오일로서 단리시켰다. HPLC 순도: 86%, MS (ESI+) m/z = 652 $[M+H]^+$. HPLC 메실화된 중간체: MS (ESI+) m/z = 772 $[M+H]^+$.

[0452] **단계 5:** 조 생성물을 예비 크로마토그래피에 의해 정제했다(산성 완충제; 유동 25mL/분, 10%B에서 40%B까지 15분에 걸쳐 구배. 분획은 237nm에서 UV-신호에 기초하여 수집했다). 디옥산(4M, 1mL) 중의 HCl을 합한 분획에 첨가하고, 샘플을 즉시 동결건조시켜 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 11)(12mg, 15% 수율)를 회백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 96%, MS (ESI+) m/z = 552 $[M+H]^+$.

[0453] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.73 (s, 1H), 9.64 (s, 1H), 8.32 (s, 3H), 7.77 - 7.67 (m, 1H), 7.33 (dt, J = 9.6, 4.9 Hz, 2H), 7.14 (t, J = 8.7 Hz, 3H), 6.94 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.98 (q, J = 7.5 Hz, 1H), 4.12 (dtt, J = 10.8, 6.7, 3.7 Hz, 3H), 3.96 (s, 3H), 3.83 (t, J = 6.8 Hz, 4H), 3.77 (t, J = 6.4 Hz, 4H), 3.14 (dd, J = 14.1, 6.0 Hz, 1H), 2.97 (dd, J = 14.1, 7.8 Hz, 1H), 1.13 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.87 - 0.81 (m, 2H).

[0454] **실시예 12:** 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-메틸-부타노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 12)



[0455]

[0456] 표제 화합물은 실시예 7에 기재된 방법을 사용하여 5단계로 제조했다.

[0457] **단계 1:** 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-메틸-부타노일]아미노]-3-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)프로파노에이트(0.428g, 0.784mmol, 23% 수율)를 황색 고체로서 단리시켰다. HPLC 순도: 90%, MS (ESI+) m/z = 492 $[M+H]^+$.

[0458] **단계 2:** 조 에틸 (2S)-3-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-메틸-부타노일]아미노]프로파노에이트(393mg, 93% 수율)를 황색 고체로서 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 95%, MS (ESI+) m/z = 462 $[M+H]^+$.

[0459] **단계 3:** 조 생성물, 에틸 (2S)-3-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-메틸-부타노일]아미노]프로파노에이트(0.305g, 0.499mmol, 58% 수율)를 갈색 고체로서 수득했다. 이 화합물은 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 90%, MS (ESI+) m/z = 550 $[M+H]^+$.

[0460] **단계 4:** 에틸 (2S)-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-메틸-부타노일]아미노]프로파노에이트(0.168g, 0.272mmol, 37% 수율)를 황색 오일로서 단리시켰다. HPLC 순도: 95%, MS (ESI+) m/z = 586 $[M+H]^+$. HPLC 메실화된 중간체: MS (ESI+) m/z = 706 $[M+H]^+$.

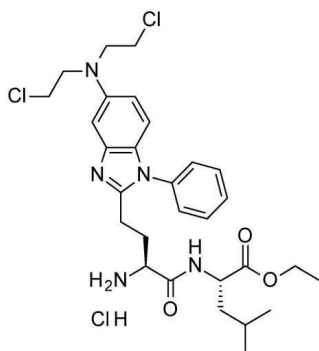
[0461] **단계 5:** 조 생성물을 증발시키고, 예비 HPLC에 의해 정제했다(산성 조건; 유동 25mL/분, 5%B에서 34%B까지 15분에 걸쳐 구배. 분획은 238nm에서 UV-신호에 기초하여 수집했다). 디옥산(4M, 1mL) 중의 HCl을 합한 분획에 첨가하고, 용액을 즉시 동결건조시켜 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-메틸-부타노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 12)(45mg, 0.0724mmol, 27% 수율)를 수득했다. HPLC 순도: 90%, MS (ESI+) m/z = 486 $[M+H]^+$.

[0462] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13.82 (br s, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.49 - 7.30 (m, 3H), 6.85 (d, J = 9.2 Hz,

1H), 6.25 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.05 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 4.15 (q, J = 7.4 Hz, 1H), 3.22 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.06 (s, 3H), 2.96 - 2.86 (m, 8H), 2.80 (dt, J = 9.3, 4.1 Hz, 2H), 2.66 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 1.22 (dq, J = 13.4, 6.7 Hz, 1H), 0.23 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.11 - 0.00 (m, 6H).

[0463]

실시예 13: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트;하이드로클로라이드(실시예 화합물 13)



[0464]

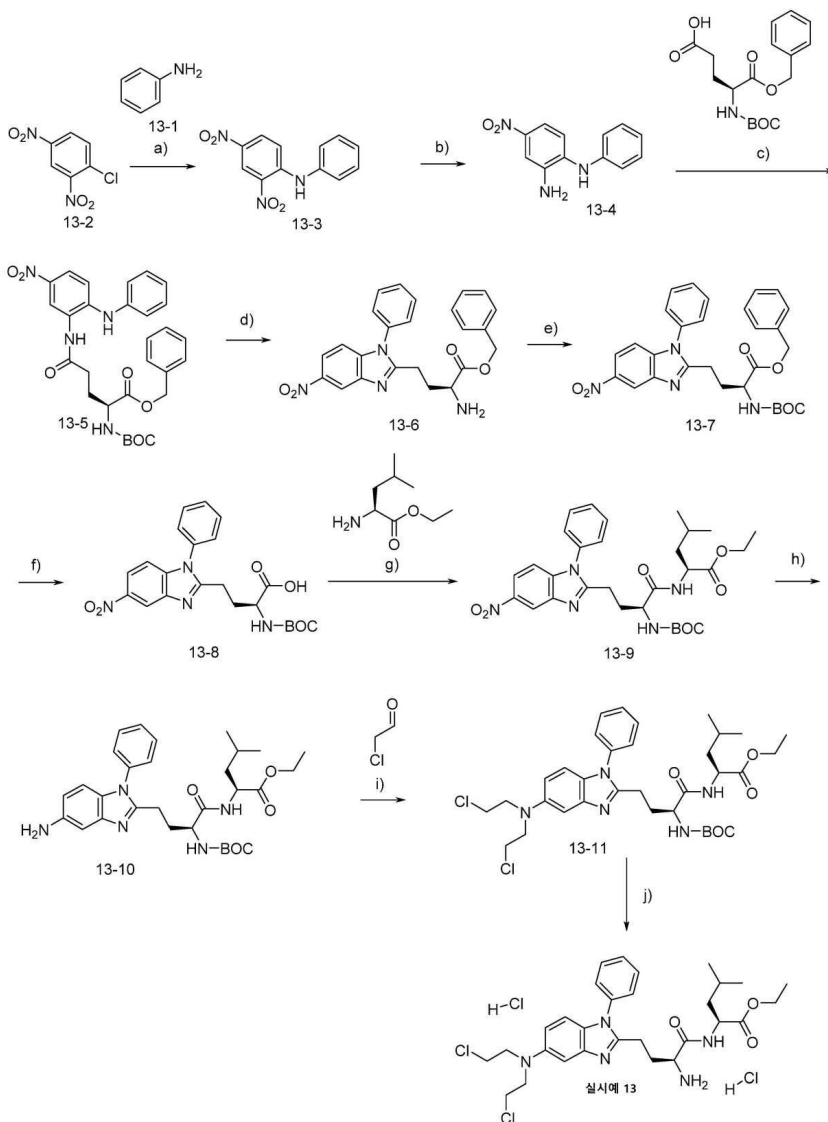
실시예 13은 아래의 반응식 4에 따라 합성했다:

[0465]

[0466]

반응식 4: a) TEA, MeOH, 60℃; b) 나트륨 디티오나이트, EtOH, 80℃; c) HATU, TEA, DMF, rt; d) 12M HCl, EtOH, 70℃; e) BOC2O, TEA, THF, rt; f) LiOH-H₂O, 1,4-디옥산, 물, 50℃; g) HATU, TEA, DMF, rt; h) Pd/C 10%, H₂ 분위기, EtOH, rt; i) NaBH₃CN, TFA, EtOH, rt; j) TFA, DCM, 이어서 12 M HCl, 실온.

[0467] [반응식 4]



[0468]

[0469] **2,4-디니트로-N-페닐-아닐린 (화합물 13-3)**

[0470] TEA(6.19mL, 44.4mmol)를 MeOH(150mL) 중의 1-클로로-2,4-디니트로벤젠(3.00g, 14.8mmol, 화합물 13-2) 및 아닐린(1.35mL, 14.8mmol, 화합물 13-1)의 용액에 첨가했다. 반응물을 60℃에서 밤새 교반했다. 반응물을 가열로부터 제거하고, 연한 벽돌 적색 고체를 형성했다. 고체를 여과하고, 빙냉 MeOH로 세척하여 표제 화합물(3.26g, 12.54mmol, 85% 수율)를 수득했다. HPLC 순도: 95%, MS (ESI+) $m/z = 260$ $[M+H]^+$.

[0471] **4-니트로-N1-페닐-벤젠-1,2-디아민 (화합물 13-4)**

[0472] 나트륨 디티오나이트(6.57g, 37.7mmol)를 80℃에서 EtOH(120mL) 및 물(30mL)의 용매 혼합물 중의 2,4-디니트로-N-페닐-아닐린(3.26g, 12.6mmol)에 첨가했다. 반응물을 1시간 동안 교반했다. 유기 용매를 증발시키고, 추가의 물을 첨가했다. 화합물을 DCM으로 추출했다. 수 상은 버렸다. DCM 상은 여과된 고체를 함유한다. 여액을 염수에 의해 세척하고, $MgSO_4$ 에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 증발시켜 표제 화합물(1.25g, 5.45mmol, 43% 수율)를 수득했다. HPLC 순도: 95%, MS (ESI+) $m/z = 230$ $[M+H]^+$.

[0473] **벤질 (2S)-5-(2-아닐리노-5-니트로-아닐리노)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-5-옥소-펜타노에이트 (화합물 13-5)**

[0474] HATU(2.28g, 6.00mmol)를 DMF(15mL) 중의 (4S)-5-벤질옥시-4-(3급-부톡시카보닐아미노)-5-옥소-펜탄산(1.93g, 5.73mmol) 및 TEA(2.28mL, 16.4mmol)에 첨가했다. 이 혼합물에 4-니트로-N1-페닐-벤젠-1,2-디아민(1.25g, 5.45mmol)을 첨가했다. 반응물을 밤새 교반했다. 톨루엔(70mL)을 첨가하고, 유기 상을 물(100mL) 및 염수(60mL)

L)로 세척했다. 유기 상을 MgSO_4 에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 증발시켜 표제 화합물(2.90g, 5.45mmol, 97% 수율)을 수득했다. HPLC 순도: 88%, MS (ESI+) $m/z = 449$ $[\text{M}+\text{H}-\text{BOC}]^+$. 이 물질은 다음 단계에서 그대로 사용했다.

[0475] **벤질 (2S)-2-아미노-4-(5-니트로-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(화합물 13-6)**

[0476] EtOH(37mL) 중의 벤질 (2S)-5-(2-아닐리노-5-니트로-아닐리노)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-5-옥소-펜타노에이트(2.99g, 5.45mmol)의 용액에 12M HCl(8.18mL, 98.1mmol)을 첨가하고, 혼합물을 70°C에서 40분 동안 교반했다. 조 물질을 물(200mL)로 희석하고, 4M NaOH로 pH 7로 조심스럽게 중화시켰다. 생성물을 에틸 아세테이트($3 \times 100\text{mL}$)로 추출하고, 유기 상을 MgSO_4 로 건조시키고, 여과하고, 용매를 증발시켜 표제 화합물(2.35g, 5.45mmol, 정량적 수율)을 수득했다. HPLC 순도: 65%, MS (ESI+) $m/z = 431$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. 이 물질은 다음 단계에서 그대로 사용했다.

[0477] **벤질 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(5-니트로-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(화합물 13-7)**

[0478] THF(25mL) 중의 벤질 (2S)-2-아미노-4-(6-니트로-3-페닐-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일)부타노에이트(2.35g, 0.00545mmol)를 TEA(2.28mL, 0.0163mmol) 및 3급-부톡시카보닐 3급-부틸 카보네이트(1.43g, 6.54mmol)에 첨가했다. 혼합물을 주말에 걸쳐 실온에서 교반했다. 과량의 BOC_2O 를 제거하기 위해, 이미다졸(0.111g, 1.63mmol)을 첨가하고, 반응물을 1시간 동안 추가로 교반했다. 용매를 증발시키고, 잔류물을 에틸 아세테이트에 용해시켰다. 유기 상을 5% 시트르산으로 세척하고, MgSO_4 로 건조시키고, 여과하고, 용매를 증발시켰다. 조 물질을 p-에테르 중의 20 내지 30%의 에틸 아세테이트로 용출시키는 실리카 구배로 플래시 크로마토그래피하여 표제 화합물(2.21g, 4.17mmol, 76% 수율)을 수득했다. HPLC 순도: 77%, MS (ESI+) $m/z = 531$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0479] **(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(5-니트로-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일)부탄산(화합물 13-8)**

[0480] 물(10mL)을 함유한 1,4-디옥산(30mL) 중의 벤질 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(5-니트로-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(2.21g, 4.17mmol)의 용액에 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.699g, 16.7mmol)를 첨가했다. 반응물을 50°C에서 40분 동안 교반하고, 실온에서 에틸 아세테이트로 희석하고, 5% 시트르산으로 세척했다. 유기 상을 MgSO_4 에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 증발시켜 표제 화합물(1.83g, 0.00415mmol, 정량적 수율)을 수득했다. HPLC 순도: 80%, MS (ESI+) $m/z = 441$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. 이 물질은 다음 단계에서 그대로 사용했다.

[0481] **에틸 (2S)-2-[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(5-니트로-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(화합물 13-9)**

[0482] HATU(1.74g, 0.00457mmol)를 DMF(30mL) 중의 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(5-니트로-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일)부탄산(1.83g, 0.00415mmol), 에틸 (2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노에이트;하이드로클로라이드(0.894g, 0.00457mmol) 및 트리에틸아민(2.32mL, 0.0166mmol)의 혼합물에 첨가했다. 반응물을 1시간 동안 교반했다. 톨루엔을 첨가하고, 혼합물을 5% 시트르산 및 염수에 의해 세척했다. 유기 상을 MgSO_4 에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 증발시켜 표제 화합물(1.82g, 0.00312mmol, 75% 수율)을 수득했다. HPLC 순도: 95%, MS (ESI+) $m/z = 582$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. 이 물질은 다음 단계에서 그대로 사용했다.

[0483] **에틸 (2S)-2-[(2S)-4-(5-아미노-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(화합물 13-10)**

[0484] 에탄올(90mL) 중의 에틸 (2S)-2-[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(5-니트로-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(1.81g, 0.00311mmol) 및 Pd/C 10%(0.331g, 0.00311mmol)의 혼합물을 H_2 분위기하에 4시간 동안 교반했다. 고체 물질을 여과하고, 용매를 증발시켜 표제 화합물(1.71g, 0.00311mmol, 정량적 수율)을 수득했다. 이 물질은 다음 단계에서 그대로 사용했다. HPLC 순도: 93%, MS (ESI+) $m/z = 552$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0485] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.26 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.60 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 7.55 - 7.49 (m, 1H), 7.43 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 6.92 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 6.80 - 6.75 (m, 2H), 6.52 (dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz,

1H), 4.81 (s, 2H), 4.24 (ddd, J = 9.9, 7.6, 5.0 Hz, 1H), 4.09 – 3.96 (m, 3H), 2.77 – 2.64 (m, 2H), 2.20 – 2.09 (m, 1H), 1.99 – 1.87 (m, 1H), 1.70 – 1.44 (m, 3H), 1.33 (s, 9H), 1.14 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.89 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.5 Hz, 3H).

에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트 (화합물 13-11)

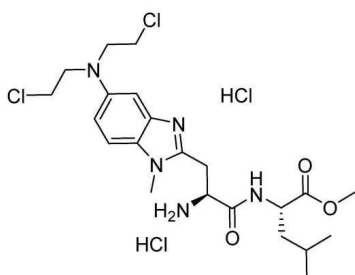
NaBH₃CN(0.137g, 0.00218mol)을 실온에서 EtOH(6mL) 중의 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-(5-아미노-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(0.300g, 0.000544mol), 2-클로로아세트알데히드(물 중의 50.0%, 0.344mL, 0.00272mol) 및 TFA(0.242mL, 3.26mmol)의 교반 혼합물에 첨가했다. 20 분 후, 추가의 2-클로로아세트알데히드(물 중의 50%, 0.344mL, 2.72mmol) 및 NaBH₃CN(0.137g, 2.18mmol)을 첨가했다. 마지막으로, 10분 후, 추가의 2-클로로아세트알데히드(물 중의 50%, 0.344mL, 2.72mmol), NaBH₃CN(0.137g, 2.18mmol) 및 TFA(0.242mL, 3.26mmol)를 첨가했다. 에틸 아세테이트를 혼합물에 첨가하고, 유기 상을 포화 중탄산나트륨 및 염수에 의해 세척했다. 이 화합물을 먼저 DCM 중의 2% EtOH로 용출시키고 석유 에테르 중의 20 내지 30% 에틸 아세테이트로 용출시키는 실리카에서 2회 플래시 크로마토그래피하여 표제 화합물(0.158g, 0.00234mol, 43% 수율)을 수득했다. HPLC 순도: 97%, MS (ESI+) m/z = 676 [M+H]⁺.

에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 하이드로클로라이드 (실시예 화합물 13)

에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(190mg, 0.281mmol)를 DCM(2mL) 중의 TFA(2mL)로 처리했다. 용매를 증발시키고, 조 잔류물을 ACE 5 C8 Prep, 100*21.2mm 컬럼(물 중의 0.1% TFA) 구배 25-50% 아세토니트릴을 사용하여 UV 검출기가 장착된 Gilson 시스템에서 수회 주입하여 예비 HPLC에 의해 정제했다. 순수한 분획을 pooling하여 750mL 용액을 수득했다. 빙냉 용액에 12M HCl(3mL)을 첨가하여 0.05M HCl 용액을 수득했다. 용매를 동결 건조시켜 표제 화합물(실시예 화합물 13)(92mg, 0.159mmol, 53% 수율)을 수득했다. MS (ESI+) m/z 576 [M+H]⁺.

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.04 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 8.54 – 8.42 (m, 3H), 7.73 – 7.62 (m, 4H), 7.16 – 7.01 (m, 3H), 4.28 – 4.20 (m, 2H), 4.06 – 3.97 (m, 3H), 3.88 – 3.73 (m, 8H), 3.14 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.41 – 2.24 (m, 2H), 1.76 – 1.65 (m, 1H), 1.61 – 1.46 (m, 2H), 1.13 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.89 (dd, J = 18.0, 6.5 Hz, 6H).

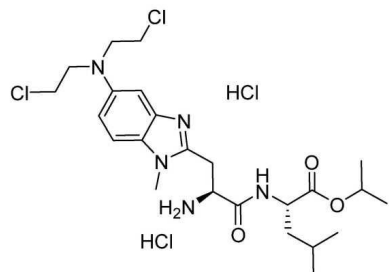
실시예 14: 메틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-헥타노에이트; 디하이드로클로라이드 (실시예 화합물 14)



에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드 (실시예 화합물 4) (11mg, 0.0182mmol)를 MeOH(2mL)에 용해시켰다. 한 방울의 HCl을 첨가하고, 반응 혼합물을 70℃에서 밤새 교반했다. 샘플을 예비 크로마토그래피에 의해 정제했다 (산성 완충제; 유동 25mL/분, 10%B에서 40%B까지 15분에 걸쳐 구배). 분획은 238nm에서 UV-신호에 기초하여 수집했다. 디옥산(4M, 0.01mL) 중의 HCl을 합한 분획에 첨가하고, 샘플을 즉시 동결건조시켜 메틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드 (실시예 화합물 14) (3.5mg, 0.00619mmol, 34% 수율)를 황색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS (ESI+) $m/z = 486$ $[M+H]^+$.

[0494] ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 14.8 (s, 1H), 9.09 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.59 (s, 3H), 7.62 (s, 1H), 6.89 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.54 (s, 1H), 4.37 (dt, J = 31.5, 7.6 Hz, 2H), 3.93 – 3.70 (m, 11H), 3.54 (s, 3H), 2.51 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 1.63 (dq, J = 12.5, 6.3 Hz, 1H), 1.56 – 1.45 (m, 2H), 1.31 – 1.17 (m, 1H), 0.85 (dd, J = 13.8, 6.5 Hz, 6H).

[0495] 실시예 15: 이소프로필 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드 (실시예 화합물 15)



[0496]

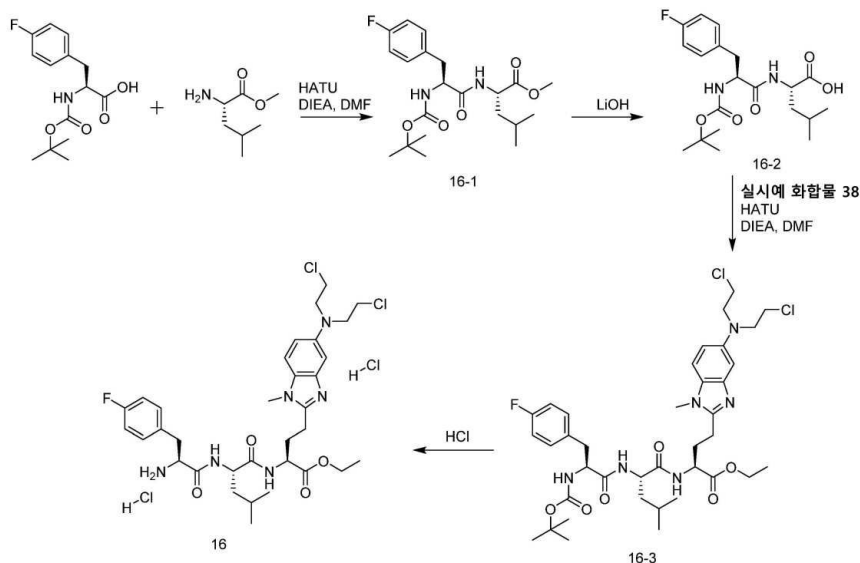
[0497] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드 (실시예 화합물 4) (10mg, 0.0166mmol)를 이소프로필 알코올(2mL)에 용해시켰다. 한 방울의 HCl을 첨가하고, 반응 혼합물을 70°C에서 밤새 교반했다. 샘플을 예비 크로마토그래피에 의해 정제했다(산성 완충제; 유동 25mL/분, 11%B에서 42%B까지 15분에 걸쳐 구배. 분획은 239nm에서 UV-신호에 기초하여 분획을 수집했다). 디옥산(4M, 0.01mL) 중의 HCl을 합한 분획에 첨가하고, 샘플을 즉시 동결건조시켜 이소프로필 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드 (실시예 화합물 15) (4.8mg, 0.00793mmol, 48% 수율)를 황색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 97%; MS (ESI+) $m/z = 514$ $[M+H]^+$.

[0498] ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 14.60 (s, 1H), 9.14 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.68 (s, 3H), 7.71 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.89 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.83 (h, J = 6.3 Hz, 1H), 4.44 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 4.28 (ddd, J = 9.8, 7.6, 5.2 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.81 (dt, J = 12.4, 6.9 Hz, 4H), 3.75 (dd, J = 9.9, 4.8 Hz, 4H), 3.58 (s, 2H), 1.68 (ddt, J = 15.3, 12.9, 6.6 Hz, 1H), 1.50(qdd, J = 13.8, 9.3, 5.3 Hz, 2H), 1.14(dd, J = 36.1, 6.3 Hz, 6H), 0.86(dd, J = 17.3, 6.6 Hz, 6H).

[0499] 실시예 16: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트; 디하이드로클로라이드 (실시예 화합물 16)

[0500] 실시예 16은 아래의 반응식 5에 따라 합성했다:

[0501] [반응식 5]



[0502]

[0503] (2S)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(화합물 16-1)]

[0504] 실온에서 DMF(5.0mL) 중의 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로판산(0.700g, 0.00247mol)의 용액에 HATU(0.940g, 0.00247mol) 및 DIEA(0.423mL, 0.00247mol)를 첨가하고, 이어서 메틸 (2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노에이트(0.395g, 0.00272mol)를 첨가했다. 생성되는 혼합물을 실온에서 밤새 교반했다. 반응 혼합물을 H₂O로 희석하고, DCM으로 추출했다. 유기 층을 건조시키고(Na₂SO₄), 20℃ 이하의 진공하에 농축시켰다. 조 물질을 부치 자동 플래시 시스템(10g 컬럼, EtOAc/석유 에테르)으로 정제하여 메틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시 카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(0.420g, 1.02mmol, 41% 수율)를 백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 75%; MS (ESI+) m/z = 411 [M+H]⁺.

[0505] (2S)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(화합물 16-2)]

[0506] THF(1.5mL) 중의 메틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(420mg, 1.02mmol)의 용액에 물(0.5mL) 중의 LiOH·H₂O(47.2mg, 1.13mmol)의 용액을 첨가했다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반했다. 침전된 고체를 여과하고, 건조시켜 (2S)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(350mg, 0.883mmol, 86% 수율)을 백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 85%; MS (ESI+) m/z = 341 [M+H-tBu]⁺.

[0507] 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2S)-2-[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]부타노에이트(화합물 16-3)]

[0508] 실온에서 DMF(3.0mL) 중의 (2S)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(95.0mg, 0.240mmol)의 용액에 HATU(91.1mg, 0.240mmol), DIEA(0.0820mL, 0.479mmol) 및 에틸 (2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트; 디하이드로클로라이드 (실시예 화합물 38)(125mg, 0.264mmol)를 첨가했다. 생성되는 혼합물을 실온에서 밤새 교반했다. 반응 혼합물을 H₂O로 희석하고, 상 분리를 사용하여 DCM으로 추출했다. 유기 층을 건조시키고(Na₂SO₄), 20℃ 이하에서 진공하에 농축시켰다. 조 물질을 예비 HPLC에 의해 정제하여(산성 완충제; 유동 25mL/분, 31%B에서 57%B까지 15분에 걸쳐 구배. 분획을 235nm에서 UV-신호에 기초하여 수집하였다) 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2S)-2-[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]부타노에이트(80.0mg, 0.103mmol, 수율: 43%)를 회백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 100%; MS (ESI+) m/z = 779 [M+H]⁺.

[0509] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-

[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 16)

[0510]

EtOH(1mL) 중의 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]부타노에이트(80.0mg, 0.103mmol)에 디옥산(4.00mol/L, 0.128mL, 0.513mmol) 중의 HCl을 첨가하고, 반응 혼합물을 밤새 교반했다. 반응의 완료 후, 용매를 약 15℃하에 증발시키고, 즉시 예비 HPLC에 제공했다(산성 완충제; 유동 25mL/분, 12%B에서 44%B까지 15분에 걸쳐 구배. 분획은 235nm에서 UV-신호에 기초하여 수집했다). 수집된 모든 순수 HPLC 분획은 아세토니트릴을 증발시키기 위해 미바쿰(Mivacuum)에 정치시키고, 디옥산(4M, 0.01mL) 중의 HCl을 풀링된 생성된 분획에 첨가했다. 혼합물을 드라이 아이스 냉각욕에서 즉시 동결시키고, 동결 건조기에 정치하여 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 16)(6.00mg, 0.00797mmol, 8% 수율)를 백색 분말로서 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) $m/z = 679$ [M+H]⁺.

[0511]

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 14.4 (br s, 1H), 8.80 - 8.71 (m, 2H), 8.24 - 8.01 (m, 3H), 7.36 - 7.25 (m, 2H), 7.18 - 7.08 (m, 2H), 6.97 - 6.82 (m, 1H), 4.53 - 4.32 (m, 2H), 4.19 - 3.99 (m, 3H), 3.90 - 3.67 (m, 12H), 3.09 (m, 4H), 2.88 (dd, J = 14.2, 8.3 Hz, 1H), 2.38 - 2.26 (m, 1H), 2.21 - 2.09 (m, 1H), 1.67 (dq, J = 13.5, 6.6 Hz, 1H), 1.55 - 1.43 (m, 2H), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.93 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.89 (d, J = 6.6 Hz, 3H).

[0512]

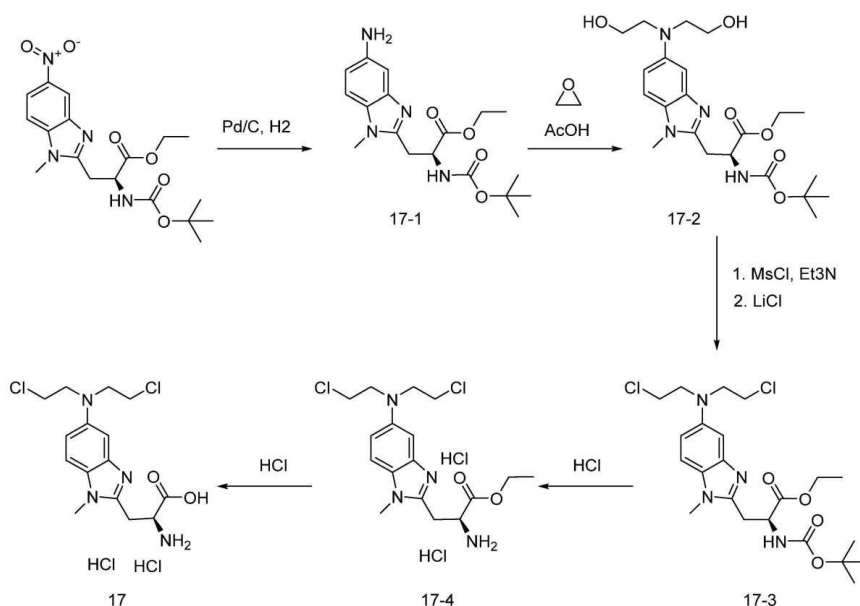
실시예 17: (2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로판산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 17)

[0513]

실시예 17은 아래의 반응식 6에 따라 합성했다:

[0514]

[반응식 6]



[0515]

에틸 (2S)-3-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노에이트(화합물 17-1)

[0516]

[0517]

에틸 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)프로파노에이트(반응식 1)(573mg, 1.42mmol)를 EtOH(10mL)에 용해시키고, H-반응기에 넣었다. 10% Pd/C(75.4mg)를 첨가하고, 반응기를 밀봉했다. 질소 퍼지를 수행했다. H₂를 3bar에서 반응기에 충전하고, 반응물을 35℃에서 3시간 동안 교반했다. 질소 퍼지를 통해 수소를 배출했다. 촉매는 셀라이트를 통한 여과에 의해 제거했다. 용매를 증발시키고, 조 에틸 (2S)-3-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노에이트(421mg, 1.13mmol, 수율 74%)를 황색 고체로서 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 90%; MS (ESI+) $m/z = 363$ [M+H]⁺.

[0518]

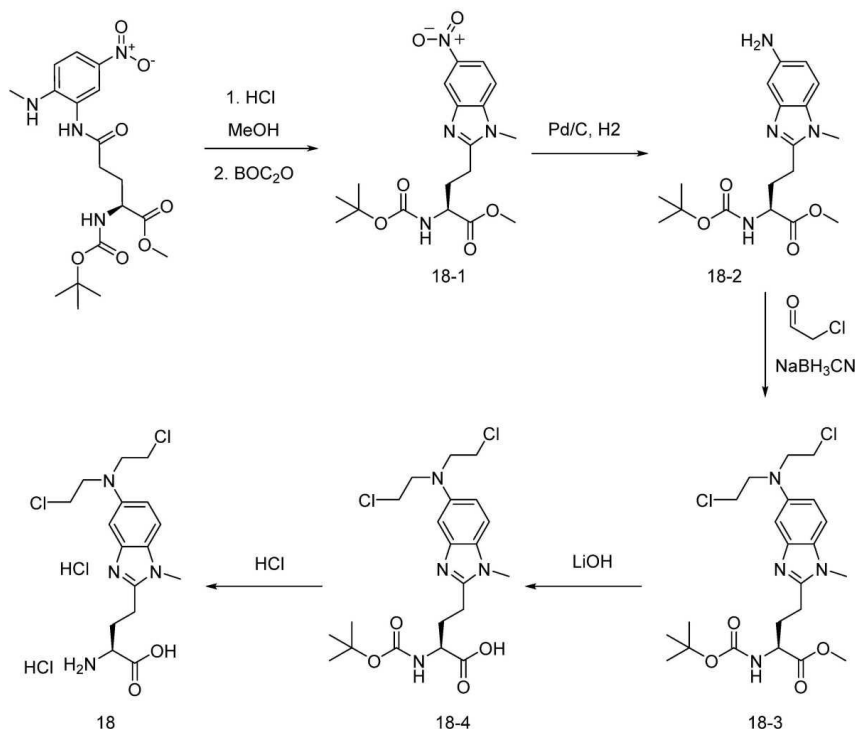
에틸 (2S)-3-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파

노에이트(화합물 17-2)

- [0519] 에틸 (2S)-3-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노에이트(421mg, 1.13mmol)를 아세트산(5mL)에 용해시켰다. 옥시란(2.3M, 4.55mL)을 첨가하고, 반응물을 실온에서 24시간 동안 교반했다. 용매를 증발시키고, 조 물질을 DCM에 용해시키고, 포화 수성 NaHCO_3 로 세척했다. 유기 층을 물 및 염수로 세척하고, 상 분리를 통해 통과시켰다. 이 물질을 농축시켜 에틸 (2S)-3-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노에이트(0.421g, 0.888mmol, 85% 수율)를 갈색 오일로서 수득하고, 이는 다음 단계에서 사용하기에 충분히 순수했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z = 451 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0520] **에틸 (2S)-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노에이트(화합물 17-3)**
- [0521] DCM(10mL) 중의 에틸 (2S)-3-[5-[비스(2-하이드록시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노에이트(421g, 0.888mmol, 순도 95%) 및 트리에틸아민(0.495mL, 3.55mmol)의 용액에 메탄 설폰일 클로라이드(0.213mL, 2.75mmol)를 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 20분 동안 교반했다. 반응 혼합물을 NaHCO_3 (포화):물(2:5)(50mL), 0.3M HCl(50mL) 및 염수(50mL)의 혼합물로 세척했다. 유기 상을 상 분리를 통해 통과시키고, 감압하에 증발시켰다. 조 에틸 (2S)-3-[5-[비스(2-메틸설폰닐옥시에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노에이트는 추가 정제 없이 즉시 다음 단계에 사용했다.
- [0522] 에틸 (2S)-3-[5-[비스(2-메틸설폰닐옥시)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노에이트(521mg, 0.79mmol, 순도 92%)를 DMF(5mL)에 용해시켰다. LiCl(0.502g, 11.9mmol)을 첨가하고, 반응물을 60°C에서 2시간 동안 가열했다. 반응 혼합물을 톨루엔(10mL) 및 EtOAc(10mL)의 혼합물로 희석하고, 이어서 염수(3×20mL)로 세척하고, MgSO_4 로 건조하고, 여과하고 증발시켰다. 수득된 조 물질을 0-20%의 DCM에서 에틸 아세테이트의 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피에 의해 정제했다. 목적 화합물을 함유하는 분획을 합하고, 농축시켜 에틸 (2S)-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시 카보닐아미노)프로파노에이트(375mg, 0.692mmol, 88% 수율)를 갈색 오일로서 수득했다. HPLC 순도: 90%; MS (ESI+) m/z = 487 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HPLC 순도(메실화된 중간체): 95%; MS (ESI+) m/z = 607 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0523] **에틸 (2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노에이트; 디하이드로클로라이드(화합물 17-4)**
- [0524] EtOH(5mL) 중의 에틸 (2S)-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)프로파노에이트(375mg, 0.692mmol, 순도 90%)의 용액에 디옥산(4.00mol/L, 1.73mL, 6.92mmol) 중의 염화수소를 첨가하고, 25°C에서 3시간 동안 교반했다. 용매를 감압하에 증발시켜 에틸 (2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노에이트; 디하이드로클로라이드(0.307g, 0.660mmol, 95% 수율)를 희백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS (ESI+) m/z = 387 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0525] **(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로판산; 디하이드로클로라이드(실시에 화합물 17)**
- [0526] 에틸 (2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노에이트(30mg, 0.064mmol) 및 5N HCl(0.025mL)을 실온에서 4시간 동안 교반했다. 온도를 60°C로 서서히 증가시켰다. 온도를 100°C로 상승시키고, 30분 동안 교반했다. 반응물을 실온까지 냉각시키고, 휘발물을 진공하에 제거했다. 조 물질을 예비 HPLC에 의해 정제하여(산성 완충제; 유동 25mL/분, 1%B에서 28%B까지 15분에 걸쳐 구배. 분획을 236nm에서 UV-신호에 기초하여 수집하였다), (2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로판산; 디하이드로클로라이드(실시에 화합물 17)(8mg, 0.022mmol, 26% 수율)를 옅은 연핑크색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z = 359 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0527] ^1H NMR (600MHz, DMSO- d_6) δ 14.90 (s, 1H), 8.93 (s, 3H), 7.75 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.15 (dd, J = 9.3, 2.4 Hz, 1H), 6.91 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 4.65 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 3.84 - 3.71 (m, 13H).
- [0528] **실시에 18: (S)-2-아미노-4-(5-(비스(2-클로로에틸)아미노)-1-메틸-1H-벤조[d]이미다졸-2-일)부탄산 디하이드로클로라이드(실시에 화합물 18)**

[0529] 실시예 18은 아래의 반응식 7에 따라 합성했다:

[0530] [반응식 7]



[0531]

[0532] **에틸 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(화합물 18-1)**

[0533]

MeOH(150mL) 중의 메틸 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-5-[2-(메틸아미노)-5-니트로-아닐리노]-5-옥소-펜타노에이트(반응식 1)(50g, 98.2mmol)의 용액에 수성 염화수소(12.0mol/L, 73.6mL, 884mmol)를 첨가하고, 혼합물을 70℃에서 30분 동안 교반했다. 반응 혼합물을 물(500mL)로 용해시키고, EtOAc(2×150mL)로 세척했다. 수성 상을 EtOAc(300mL)와 혼합하고, pH 9 내지 10까지 고체 K₂CO₃로 중화시켰다. 수성 상을 EtOAc(2×100mL)로 추출했다. 유기물을 MgSO₄에서 건조시키고, 여과하고, 감압하에 증발시켜 메틸 (2S)-2-아미노-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(26.0g, 82.7mmol, 84% 수율)를 적색 고체로서 수득했다. 조 물질은 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 93%; MS (ESI+) m/z = 293 [M+H]⁺.

[0534]

THF(100mL) 중의 메틸 (2S)-2-아미노-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(26g, 82.7mmol)의 용액에 트리에틸아민(13.8mL, 99.3mmol) 및 3급-부톡시카보닐 3급-부틸 카보네이트(20.9mL, 91mmol)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 밤새 교반했다. 조 물질을 감압하에 농축시키고, EtOAc(400mL)로 용해시키고, 0.5N HCl(400mL)로 세척했다. 상을 분리하고, 수성 상을 EtOAc(2×200mL)로 추출했다. 유기물을 MgSO₄에서 건조시키고, 여과하고, 감압하에 증발시켰다. 조 물질을 소량의 THF에 용해시키고, Et₂O를 첨가했다. 혼합물을 0℃로 냉각하고, 30분 동안 정치시켰다. 고체를 여과하고, 차가운 Et₂O로 세척했다. 고체를 감압하에 건조시켜 에틸 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(27g, 68.8mmol, 83% 수율)를 회백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 100%; MS (ESI+) m/z = 393 [M+H]⁺.

[0535]

메틸 (2S)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(화합물 18-2)

[0536]

메틸 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(1.95g, 4.97mmol)를 MeOH(15mL)에 용해시키고, H-반응기에 넣었다. 10% Pd/C(264mg)를 첨가하고, 반응기를 밀봉했다. 질소 퍼지를 수행했다. H₂를 3bar에서 반응기에 충전하고, 반응물을 35℃에서 2시간 동안 교반했다. 수소를 질소 퍼지로 배출했다. 촉매는 셀라이트를 통해 여과하여 제거했다. 용매를 증발시키고, 조 메틸 (2S)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(1.8g, 정량적 수율)를 회백색(약간 핑크색) 고체로서 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z 363 [M+H]⁺.

[0537] 메틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(화합물 18-3)

[0538] 2-클로로아세트알데히드(1.30g, 1.05mL, 8.28mmol, 50%, 10당량)를 메틸 (2S)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(300mg, 0.83mmol), TFA(0.369mL, 4.97mmol, 6당량) 및 MeOH(10mL)의 용액에 첨가했다. 반응 혼합물을 0℃에서 15분 동안 교반하고, 이어서 NaBH₃CN(104mg, 1.66mmol, 2당량)을 5분에 걸쳐 첨가하고, 혼합물을 0℃에서 20분 동안 교반했다. 물(10mL), NaHCO₃(10mL) 및 EtOAc(10mL)를 첨가하고, 층을 분할했다. 수성 층을 EtOAc(3×10mL)로 추출했다. 합한 유기 층을 염수(2×2mL)로 세척하고, 무수 MgSO₄로 건조시키고, 여과하고, 감압하에 농축시켰다. 조 잔류물을 생성물을 p-에테르 중의 80% EtOAc로 용출시키는 실리카 컬럼에서 정제했다. 분획을 폴링하고, 농축시켜 메틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(207mg, 0.425mmol, 51% 수율)를 수득했다. HPLC 순도: 93%; MS (ESI+) m/z 487 [M+H]⁺.

[0539] (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐-아미노)부탄산(화합물 18-4)

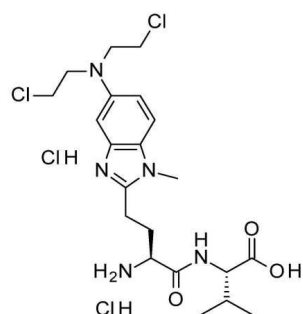
[0540] 메틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(207mg, 0.425mmol) 및 LiOH·H₂O(54mg, 1.27mmol)의 혼합물을 1,4-디옥산(12mL) 및 물(4mL)에 현탁시켰다. 반응 혼합물을 50℃에서 20분 동안 가열했다. 용액을 실온에 도달하도록 허용하고, 물(20mL)을 첨가했다. 이어서, 혼합물을 1M HCl로 pH 5까지 산성화하고, 생성물을 EtOAc(3×70mL)로 추출했다. 합한 유기 층을 염수(100mL)로 세척하고, 무수 MgSO₄로 건조시키고, 여과하고, 회전 증발기에서 농축시켜 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐-아미노)부탄산(188mg, 0.397mmol, 94% 수율)을 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z 473 [M+H]⁺.

[0541] (S)-2-아미노-4-(5-(비스(2-클로로에틸)아미노)-1-메틸-1H-벤조[d]이미다졸-2-일)부탄산 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 18)

[0542] (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐-아미노)부탄산(188mg, 0.397mmol)을 디클로로메탄(3mL)에 용해시키고, 디옥산(1.0mL) 중의 4M HCl을 적가했다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하고, 이어서 디에틸 에테르(15mL)를 첨가했다. 디에틸 에테르의 첨가시, 침전물이 형성되었고, 이를 여과하여 분리시키고, 진공하에 건조시켜 (S)-2-아미노-4-(5-(비스(2-클로로에틸)아미노)-1-메틸-1H-벤조[d]이미다졸-2-일)부탄산 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 18)(118mg, 0.288mmol, 수율 73%)를 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z 373 [M+H]⁺.

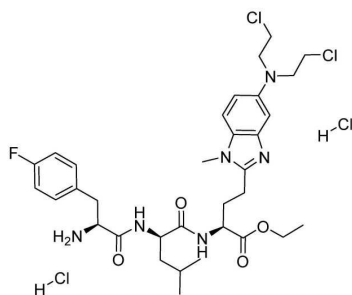
[0543] ¹H NMR (600 MHz, CD₃ OD) δ 7.71 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.18 (dd, J = 9.3, 2.4 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.23 (dd, J = 7.3, 5.5 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.89 (t, J = 6.8 Hz, 4H), 3.76 (t, J = 6.7 Hz, 4H), 3.54 - 3.44 (m, 1H), 3.44 - 3.35 (m, 1H), 2.61 - 2.49 (m, 1H), 2.49 - 2.37 (m, 1H).

[0544] 실시예 19: (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-메틸-부탄산;디하이드로클로라이드(실시예 화합물 19)



[0545]

[0546] THF:MeOH(2:1, 1mL) 중의 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-메틸-부타노에이트;디하이드로클로라이드(실시예 화합물 3)(15.3mg, 0.0264mmol)의



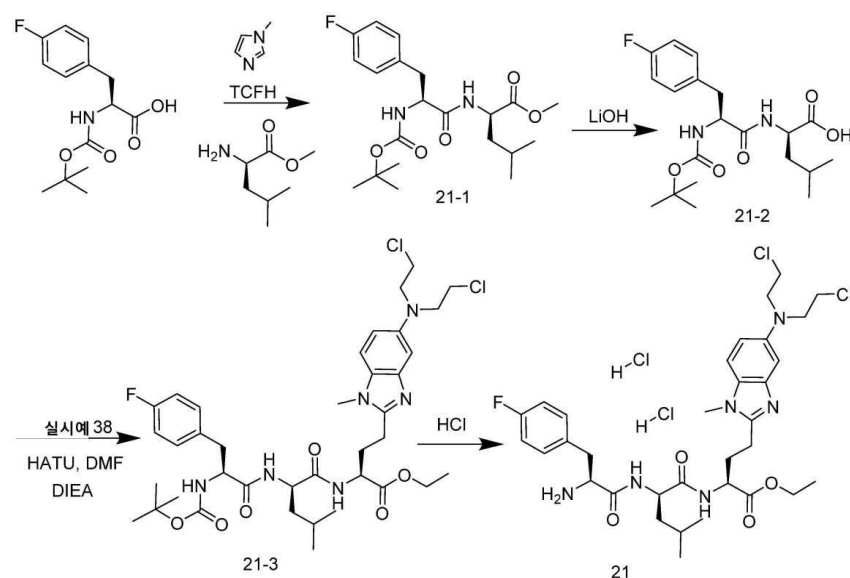
[0553]

[0554]

실시예 21은 아래의 반응식 8에 따라 합성했다:

[0555]

[반응식 8]



[0556]

[0557]

메틸 (2R)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트 (화합물 21-1)

[0558]

MeCN(8mL) 중의 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로 판산(500mg, 0.00176mol), 메틸 (2R)-2-아미노-4-메틸-펜타노에이트;하이드로클로라이드(0.417g, 0.00229mol), 1-메틸이미다졸(0.436mL, 0.00547mol)의 용액에 [클로로(디메틸아미노)메틸렌]-디메틸-암모늄;헥사플루오로포스페이트(0.545g, 0.00194mol)를 실온에서 첨가했다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반했다. EtOAc(10mL)를 첨가하고, 이어서 H₂O(10mL)를 첨가했다. 상들을 분리하고, 수성 상을 EtOAc(5mL)로 세척하고, 합한 유기 상을 MgSO₄로 건조시키고, 감압하에 증발시켰다. 조 생성물을 셀라이트에 흡착시키고, 부치 퓨어(Buchi Pure) C-810 플래시 시스템 (20g 컬럼, EtOAc:석유 에테르 0:100 내지 50:50)에서 정제하여 메틸 (2R)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(480mg, 0.00117mol, 66% 수율)를 백색 고체로 서 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z 411 [M+H]⁺.

[0559]

(2R)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(화합물 21-2)

[0560]

THF(10mL) 중의 메틸 (2R)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(200mg, 0.000487mol)의 용액에 물(0.5mL) 중의 수산화리튬 1수화물(0.0215g, 0.000512mol)의 용액을 첨가했다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반한 후, EtOAc(10mL), 1N HCl(0.5mL) 및 H₂O(10mL)를 첨가했다. 상을 분리하고, 수성 상을 EtOAc(10mL)로 추가로 추출했다. 합한 유기 상을 염수(10mL)로 세척하고, Na₂SO₄에서 건조시키고, 여과하고 감압하에 증발시켜 (2R)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(0.185g, 0.000467mol, 96% 수율)을 무색 점착성 오일로서 수득했다. HPLC 순도: 94%; MS (ESI+) m/z 341 [M-tBu]⁺.

[0561] 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2R)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]부타노에이트(화합물 21-3)

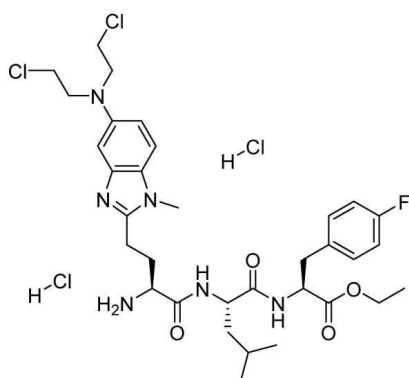
[0562] DMF(3.0mL) 중의 (2R)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸펜탄산(95.0mg, 0.240mmol)에 실온에서 HATU(91.1mg, 0.240mmol) 및 DIEA(0.0820mL, 0.479mmol), 이어서 에틸 (2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 38)(125mg, 0.264mmol)를 첨가했다. 생성되는 혼합물을 실온에서 밤새 교반했다. 반응 혼합물을 H₂O로 희석하고, DCM으로 추출했다. 유기 층을 건조시키고(Na₂SO₄), 진공하에 농축시키고, 예비 크로마토그래피에 의해 정제했다. 순수한 분획을 동결 건조시켜 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2R)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]부타노에이트(0.080g, 0.103mmol, 43% 수율)를 백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 97%; MS (ESI+) m/z = 779 [M+H]⁺.

[0563] 에틸 (2S)-2-[[[(2R)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 21)

[0564] EtOH(1mL) 중의 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[[[(2R)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]부타노에이트(80.0mg, 0.103mmol)에 디옥산 중의 HCl(4.00mol/L, 0.128mL, 0.513mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물을 밤새 교반했다. 반응이 완료된 후, 용매를 증발시키고, 조 물질을 예비 크로마토그래피에 의해 정제했다. 순수한 분획을 수집하고, 동결 건조시켜 에틸 (2S)-2-[[[(2R)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 21)(6mg, 0.0079mmol, 8% 수율)를 백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS (ESI+) m/z = 679 [M+H]⁺.

[0565] ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 14.15 (s, 1H), 8.80 - 8.64 (m, 2H), 8.06 (s, 3H), 7.38 - 7.22 (m, 2H), 7.22 - 7.08 (m, 2H), 6.95 - 6.81 (m, 1H), 4.51 - 4.27 (m, 2H), 4.14 - 3.96 (m, 3H), 3.89 - 3.67 (m, 12H), 3.13 (s, 1H), 3.14 (m, 2H), 3.07 (dd, J = 14.3, 4.9 Hz, 1H), 2.87 (dd, J = 14.2, 8.3 Hz, 1H), 2.35 - 2.25 (m, 1H), 2.21 - 2.07 (m, 1H), 1.76 - 1.60 (m, 1H), 1.58 - 1.39 (m, 2H), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.93 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.5 Hz, 3H).

[0566] 실시예 22: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 22)



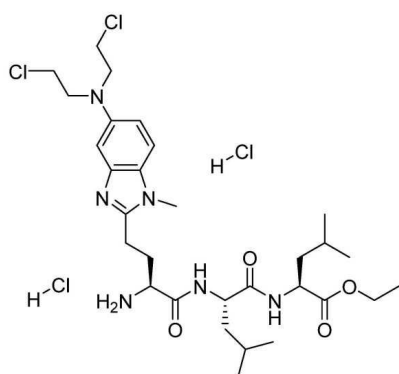
[0567] 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드

[0568] 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(1.15당량, 68mg, 0.355mmol)를 DMF(2mL) 중의 4-메틸모르폴린(1.15당량, 0.039mL, 0.355mmol), 에틸 시아노글리옥실레이트-2-옥심(1.00당량, 44mg, 0.308mmol), 에틸 (2S)-2-아미노-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트(1.15당량, 74.9mg, 0.355mmol) 및 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(실시예 화합물 20)(1.00당량, 150mg, 0.308mmol)의 혼합물에 첨가했다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반했다. 물을 첨가하고, 혼합물을 DCM으로 추출했다. 유기 상을 10% K₂HPO₄ 및 10% NaCl로 세척하고, 이어서

0.25M HCl 및 10% NaCl을 사용하여 산성 세척하고, 상 분리기 카트리지를 통해 통과시키고, 증발시켰다. 조 물질을 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 22)(4mg, 0.0053mmol, 2% 수율)를 백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS (ESI+) m/z = 679 $[M+H]^+$.

[0569] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.34 (br s, 1H), 8.72 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 8.34 (s, 3H), 7.68 (s, 1H), 7.25 (dd, J = 8.3, 5.5 Hz, 2H), 7.01 (t, J = 8.7 Hz, 2H), 6.90 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.43 (dq, J = 15.5, 7.7 Hz, 2H), 4.05 - 3.96 (m, 2H), 3.95 (q, J = 6.5, 5.8 Hz, 1H), 3.84 - 3.69 (m, 11H), 3.13 - 2.98 (m, 4H), 2.93 (dd, J = 13.9, 9.0 Hz, 1H), 2.23 (dq, J = 13.4, 6.8, 6.1 Hz, 1H), 2.10 (dd, J = 15.9, 8.1 Hz, 1H), 1.69(dp, J = 13.5, 6.7 Hz, 1H), 1.47(t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.08(t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.91(dd, J = 19.1, 6.5 Hz, 6H).

[0570] 실시예 23: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 23)

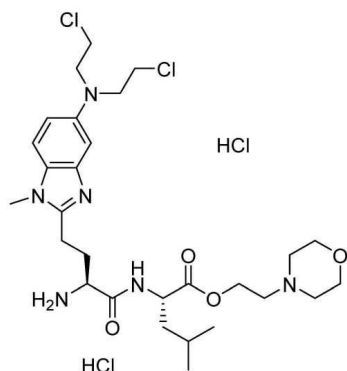


[0571]

[0572] 4-메틸모르폴린(1.15당량, 0.039mL, 0.355mmol)을 DMF(2mL) 중의 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(실시예 화합물 20)(1.00당량, 150mg, 0.308mmol), 에틸 (2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노에이트(1.15당량, 56mg, 0.355mmol), 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(1.15당량, 68mg, 0.355mmol) 및 에틸 시아노글리옥살레이트-2-옥심(1.00당량, 44mg, 0.308mmol)의 혼합물에 첨가했다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반했다. 물을 첨가하고, 혼합물을 DCM으로 추출했다. 유기 상을 10% K_2HPO_4 및 10% NaCl로 세척하고, 이어서 0.25M HCl 및 10% NaCl을 사용하여 산성 세척하고, 상 분리기 카트리지를 통해 통과시키고, 증발시켰다. 수득된 조 물질을 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 23)(5.1mg, 0.00728mmol, 2% 수율)를 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z = 627 $[M+H]^+$.

[0573] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.41 (br s, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.54 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.24 (d, J = 123.3 Hz, 3H), 7.70 (s, 1H), 6.90 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.57 (s, 1H), 4.39 (dt, J = 13.0, 6.5 Hz, 1H), 4.27 (ddd, J = 10.6, 7.5, 4.9 Hz, 1H), 4.10 - 4.00 (m, 2H), 3.97 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 3.91 - 3.71 (m, 11H), 3.1 (m, 2H), 2.25 (dt, J = 13.5, 7.2 Hz, 1H), 2.13 (s, 1H), 1.73 (dt, J = 13.4, 6.3 Hz, 1H), 1.64 (dd, J = 13.9, 7.0 Hz, 1H), 1.53 (tddd, J = 22.7, 14.1, 9.6, 5.1 Hz, 4H), 1.15(t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.95(d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.92(d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.87(d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.78(d, J = 6.5 Hz, 3H).

[0574] 실시예 24: 2-모르폴리노에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 24)



[0575]

[0576]

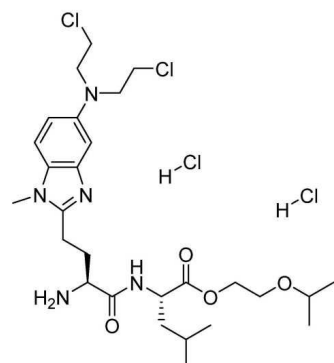
(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산;디하이드로클로라이드](1.00당량, 50mg, 0.0758mmol)를 THF(2mL)에 현탁시키고, 티오닐 클로라이드(5.53당량, 31μL, 0.420mmol)를 첨가했다. 반응물을 실온에서 30분 동안 교반하고, 이어서 4-(2-하이드록시에틸)모르폴린(5.00당량, 0.046mL, 0.379mmol)을 첨가했다. 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 여과하고, 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 2-모르폴리노에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트;디하이드로클로라이드(실시에 화합물 24)(6mg, 0.0089mmol, 12% 수율)를 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS (ESI+) m/z = 599 $[M+H]^+$.

[0577]

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 14.79 (s, 1H), 11.42 (s, 1H), 9.36 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.55 (s, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.50 (s, 1H), 4.44 (td, J = 13.5, 11.9, 5.2 Hz, 2H), 4.11 (s, 1H), 3.96 – 3.74 (m, 15H), 3.56 (s, 2H), 3.15 (s, 6H), 2.32 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.74 (dq, J = 13.3, 6.6, 6.1 Hz, 1H), 1.63(dddd, J = 18.6, 13.8, 9.1, 4.6 Hz, 2H), 0.91(dd, J = 20.5, 6.5 Hz, 6H).

[0578]

실시예 25: 2-이소프로폭시에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트 디하이드로클로라이드 (실시예 화합물 25)



[0579]

[0580]

(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산; 디하이드로클로라이드 (1.00당량, 50mg, 0.0758mmol)를 -5℃에서 MeCN(2mL) 중의 에틸렌 글리콜 모노이소프로필 에테르(5.00당량, 0.042mL, 0.379mmol) 및 티오닐 클로라이드(5.53당량, 31μL, 0.420mmol)의 용액에 분량으로 첨가했다. 반응물을 실온에 도달하도록 하고, 이어서 30℃에서 3시간 동안 가열했다. 용매를 톨루엔과의 공비혼합물로서 진공하에 제거하고, 이어서 고진공 펌프에 의해 건조시켰다. 수득된 조 물질을 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 2-이소프로폭시에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드 (실시에 화합물 25) (6.2mg, 0.0096mmol, 12% 수율)를 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z = 572 [M+H]⁺.

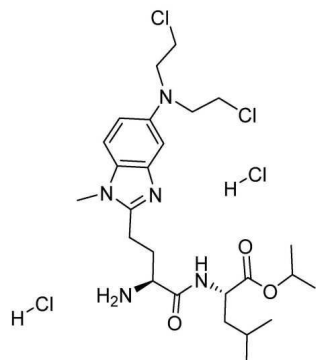
[0581]

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 14.77 (s, 1H), 9.25 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 8.56 (s, 2H), 7.72 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.93 (dd, J = 10.1, 2.4 Hz, 1H), 6.55 (s, 1H), 4.37 – 4.28 (m, 1H), 4.23 (dq, J = 8.1, 4.4,

3.9 Hz, 1H), 4.09 (ddt, J = 13.8, 10.7, 5.5 Hz, 2H), 3.90 - 3.74 (m, 11H), 3.54 (td, J = 8.6, 7.0, 3.6 Hz, 3H), 2.36 - 2.24 (m, 2H), 1.77 (dd, J = 13.9, 6.7 Hz, 1H), 1.60(ddt, J = 28.1, 13.4, 8.4 Hz, 2H), 1.05(dd, J = 18.5, 6.1 Hz, 6H), 0.91(dd, J = 25.5, 6.5 Hz, 6H). 하나의 CH₂ 신호는 H₂O 신호하에 숨겨져 있다.

[0582]

실시예 26: 이소프로필 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 26)



[0583]

[0584]

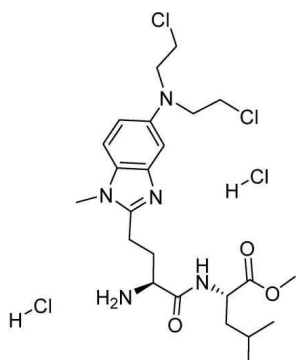
(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산;디하이드로클로라이드(1.00당량, 50mg, 0.0758mmol)를 -5℃에서 이소프로판올(200당량, 1.2mL, 15.2mmol) 및 티오닐 클로라이드(5.53당량, 31μL, 0.420mmol)의 용액에 분량으로 첨가했다. 반응이 실온에 도달하도록 허용하고, 3시간 동안 교반했다. 용매를 톨루엔과의 공비혼합물로서 증발시키고, 이어서 고진공 펌프에 의해 건조시켰다. 수득된 조 물질을 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 이소프로필 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트;디하이드로클로라이드(실시예 화합물 26)(32mg, 0.053mmol, 69% 수율)를 회백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 98%; MS (ESI+) m/z = 528 [M+H]⁺.

[0585]

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 14.79 (s, 1H), 9.20 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 8.55 (s, 3H), 7.74 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.90 (p, J = 6.3 Hz, 1H), 4.26 (dt, J = 11.0, 5.7 Hz, 1H), 4.08 (s, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.80 (dt, J = 33.7, 6.9 Hz, 8H), 3.37 - 3.32 (m, 2H), 2.31 (dh, J = 22.0, 7.3 Hz, 2H), 1.75 (p, J = 6.7 Hz, 1H), 1.62 (ddd, J = 15.0, 10.2, 5.1 Hz, 1H), 1.53(ddd, J = 13.9, 9.2, 4.9 Hz, 1H), 1.18(dd, J = 11.4, 6.3 Hz, 6H), 0.90(dd, J = 27.2, 6.5 Hz, 6H).

[0586]

실시예 27 - 메틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트;디하이드로클로라이드(실시예 화합물 27)



[0587]

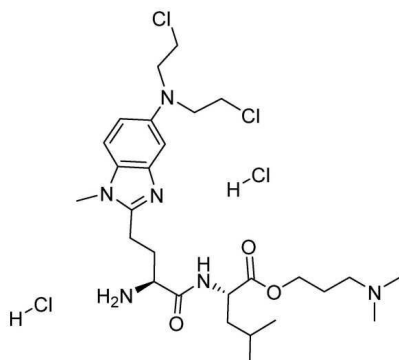
[0588]

(2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(실시예 화합물 20)(1.00당량, 35mg, 0.06260mmol)을 0.4mL MeOH(137당량)에 용해시켰다. 티오닐 클로라이드(5.72당량, 30μL, 0.411mmol)를 실온에서 용액에 적가했다. 반응물을 실온에서 4.5시간 동안 교반했다. 조 반응 혼합물을 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 메틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-

-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 27)(14mg, 0.0244mmol, 33% 수율)를 회백색으로서 수득했다. HPLC 순도: 97%; MS (ESI+) m/z = 500 $[M+H]^+$.

[0589] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.86 (s, 1H), 9.32 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 8.61 (s, 3H), 7.74 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 4.33 (dt, J = 11.1, 5.5 Hz, 1H), 4.10 (s, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.80 (dt, J = 33.0, 6.9 Hz, 8H), 3.65(s, 3H), 3.35(h, J = 10.1, 8.5 Hz, 2H), 2.33(ddq, J = 30.2, 15.1, 7.5 Hz, 2H), 1.75(p, J = 6.7 Hz, 1H), 1.65(td, J = 12.2, 10.3, 5.1 Hz, 1H), 1.54(ddd, J = 14.2, 9.6, 4.7 Hz, 1H), 0.90(dd, J = 23.3, 6.5 Hz, 6H).

[0590] 실시예 28 - 3-(디메틸아미노)프로필 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 28)

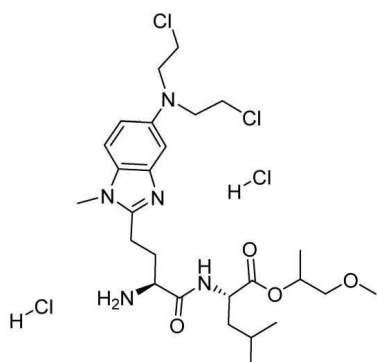


[0591]

[0592] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 1)(1.00당량, 50mg, 0.0851mmol)를 THF(1mL)에 용해시켰다. HCl(EtOAc 중의 4M)(10.0당량, 0.21mL, 0.851mmol)을 첨가하고, 이어서 3-디메틸아미노-1-프로판올(10.0당량, 0.10mL, 0.851mmol)을 첨가했다. 반응물을 80℃에서 4시간 동안 교반했다. 혼합물을 여과하고, 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 3-(디메틸아미노)프로필 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 28)(2mg, 0.0031mmol, 3% 수율)를 회백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z = 571 $[M+H]^+$.

[0593] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 15.9 (br s, 1H), 10.7 (br s, 1H), 9.43 (d, J = 7.1 Hz, 1H), 8.55 (d, J = 73.7 Hz, 3H), 7.79 (m, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.34 (s, 1H), 4.18 - 4.12 (m, 2H), 3.76 (s, 11H), 3.09 (s, 1H), 2.73 (d, J = 20.6 Hz, 6H), 2.34 (s, 1H), 2.01 (q, J = 7.8, 7.3 Hz, 2H), 1.81 - 1.52 (m, 4H), 1.23 (s, 4H), 0.97 - 0.89 (m, 6H).

[0594] 실시예 29 - (2-메톡시-1-메틸-에틸)(2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 29)



[0595]

[0596] (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 20)(1.0당량, 36mg, 0.0644mmol)를 1-메톡시-2-프로판올(55당량, 0.40mL, 4.07mmol)에 용해시키고, 티오닐 클로라이드(5.6당량, 30uL, 0.411mmol)를 실온에서 적가했다. 반응

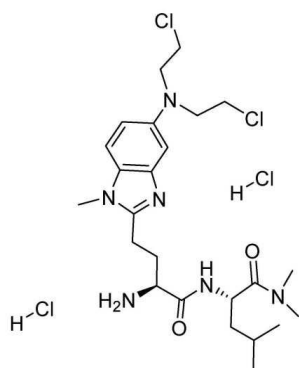
물을 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이어서 40℃에서 21시간 동안 가열했다. 조 반응 혼합물을 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 (2-메톡시-1-메틸-에틸)(2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 29)(2.7mg, 0.0043mmol, 6% 수율)를 회백색의 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS (ESI+) m/z = 558 $[M+H]^+$.

[0597]

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.88 (s, 1H), 9.30 (p, J = 6.1 Hz, 1H), 8.60 (s, 3H), 7.75 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 4.96 (dtd, J = 16.3, 6.5, 4.0 Hz, 1H), 4.28 (qd, J = 11.2, 10.4, 6.1 Hz, 1H), 4.13 - 4.05 (m, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.83 (t, J = 6.8 Hz, 4H), 3.78 (t, J = 6.5 Hz, 4H), 3.40 - 3.33 (m, 4H), 3.22 (d, J = 13.7 Hz, 3H), 2.34 (dd, J = 18.1, 9.2 Hz, 2H), 1.77 (td, J = 9.9, 9.3, 4.6 Hz, 1H), 1.62 (ddd, J = 15.1, 12.3, 7.7 Hz, 1H), 1.53 (ddt, J = 13.8, 9.6, 4.8 Hz, 1H), 1.14 (dd, J = 11.9, 6.5 Hz, 3H), 0.90 (dd, J = 26.5, 6.6 Hz, 6H).

[0598]

실시예 30 - (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-N,N,4-트리메틸-펜탄아미드; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 30)



[0599]

[0600]

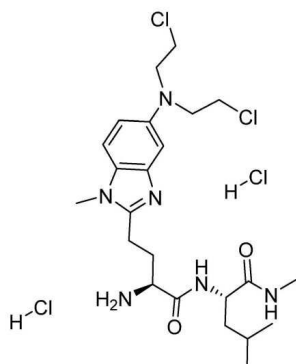
3-(3-디메틸아미노프로필)-1-에틸-카보디이미드 하이드로클로라이드(1.15당량, 59mg, 0.308mmol)를 MDF(1mL) 중의 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 20)(1.00당량, 150mg, 0.268mmol), 디메틸아민 하이드로클로라이드(1.15당량, 25mg, 0.308mmol), 에틸 (2E)-시아노(하이드록시이미노)아세테이트(1.00당량, 38mg, 0.268mmol) 및 N-메틸모르폴린(2.00당량, 0.059mL, 0.536mmol)의 혼합물에 첨가했다. 반응물을 실온에서 3시간 동안 교반했다. 물 및 DCM을 첨가하고, 혼합물을 10% K_2HPO_4 및 10% NaCl로 2회 추출하고, 이어서 0.25M HCl 및 10% NaCl을 사용하여 산성 세척했다. 유기 상을 농축시키고, 수득된 조 물질을 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-N,N,4-트리메틸-펜탄아미드; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 30)(13mg, 0.022mmol, 8% 수율)를 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS(ESI+) m/z = 513 $[M+H]^+$.

[0601]

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.63 (s, 1H), 8.87 (s, 1H), 8.51 (s, 3H), 7.73 (s, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.91 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.72 (ddd, J = 11.0, 7.5, 3.6 Hz, 1H), 4.00 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.82 (d, J = 6.7 Hz, 4H), 3.77 (t, J = 6.4 Hz, 4H), 3.3 (m, 2H), 3.04 (s, 3H), 2.84 (s, 3H), 2.39 - 2.30 (m, 1H), 2.19 (dq, J = 14.3, 7.3 Hz, 1H), 1.75 - 1.67(m, 1H), 1.50(ddd, J = 14.7, 10.8, 4.2 Hz, 1H), 1.39(ddd, J = 13.7, 9.8, 3.6 Hz, 1H), 0.92(t, J = 6.1 Hz, 6H).

[0602]

실시예 31 - (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-N,4-디메틸-펜탄아미드; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 31)



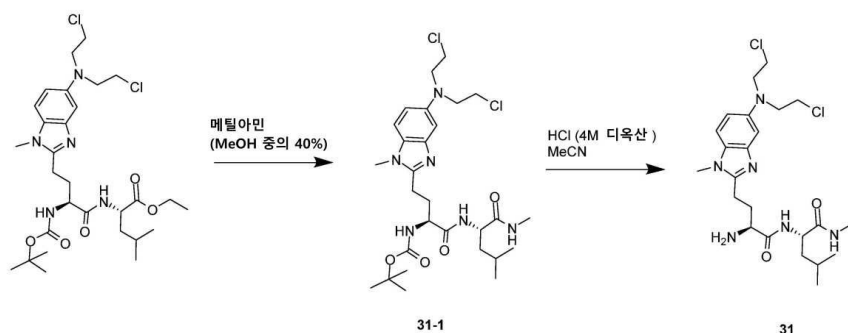
[0603]

[0604]

실시예 31은 아래의 반응식 9에 따라 합성했다:

[0605]

[반응식 9]



[0606]

[0607]

3급-부틸 N-[(1S)-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-1-[(1S)-3-메틸-1-(메틸카바모일)부틸]카바모일]프로필]카바메이트; 디하이드로클로라이드(화합물 31-1)

[0608]

메틸아민(MeOH 중의 40%)(63mg, 0.814mmol) 중의 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 1 화합물에 대한 합성 경로 중 단계 4)(50mg, 0.814mmol)를 밀폐된 튜브에서 마이크로파 조사하에 80℃에서 20분 동안 교반했다. 용매를 감압하에 제거하고, 조 물질을 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 3급-부틸 N-[(1S)-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-1-[(1S)-3-메틸-1-(메틸카바모일)부틸]카바모일]프로필]카바메이트; 디하이드로클로라이드(35mg, 0.0586mmol, 64% 수율)를 백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS (ESI⁺) m/z = 599 [M+H]⁺.

[0609]

(2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-N,4-디메틸-펜타나미드; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 31)

[0610]

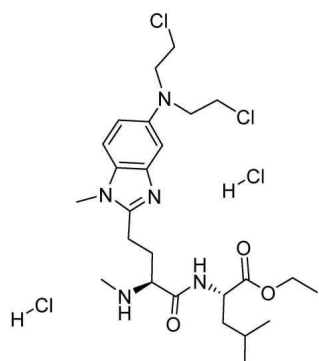
3급-부틸 N-[(1S)-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-1-[(1S)-3-메틸-1-(메틸카바모일)부틸]카바모일]프로필]카바메이트(35mg, 0.0586mmol)를 MeCN(1mL)에 용해시켰다. 염산(디옥산 중의 4M)(0.15mL, 0.586mmol)을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-N,4-디메틸-펜타나미드; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 31)(14mg, 0.024mmol, 수율 40%)를 회백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI⁺) m/z = 499 [M+H]⁺.

[0611]

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 14.62 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.48 (s, 3H), 8.18 (q, J = 4.6 Hz, 1H), 7.74 (s, 1H), 7.15 (s, 1H), 6.91 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.29 (ddd, J = 10.0, 7.6, 5.0 Hz, 1H), 3.98 (s, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.82 (s, 4H), 3.77 (t, J = 6.4 Hz, 4H), 3.3 (m, 2H), 2.59 (d, J = 4.6 Hz, 3H), 2.33 (s, 1H), 2.21 (dq, J = 14.0, 7.2 Hz, 1H), 1.66 (dt, J = 13.3, 6.5 Hz, 1H), 1.52(ddd, J = 14.7, 10.0, 5.1 Hz, 1H), 1.43(ddd, J = 13.8, 9.0, 5.1 Hz, 1H), 0.90(dd, J = 15.6, 6.6 Hz, 6H).

[0612]

실시예 32 - 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(메틸아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 32)



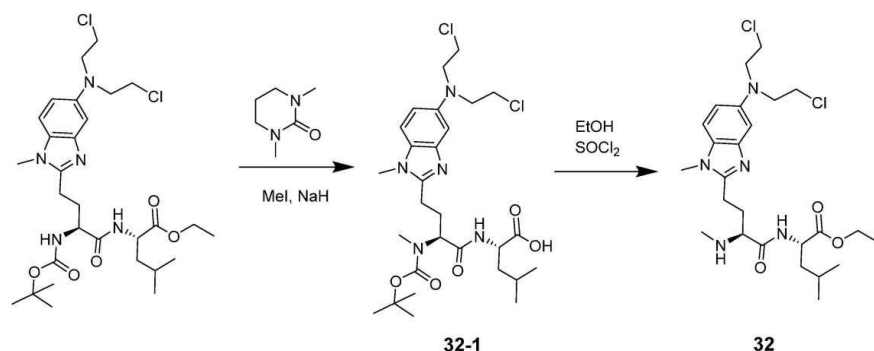
[0613]

[0614]

실시예 32는 아래의 반응식 10에 따라 합성했다:

[0615]

[반응식 10]



[0616]

[0617]

(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[3급-부톡시카보닐(메틸)아미노]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(화합물 32-1)

[0618]

무수 THF(3mL) 중의 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[3급-부톡시카보닐(메틸)아미노]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 1에 대한 합성 경로에서 단계 4)(300mg, 0.488mmol)의 용액에 수소화나트륨(50%; 59mg, 1.46mmol)을 첨가했다. 혼합물을 가스 발생이 종료될 때까지 실온에서 교반했다. 1,3-디메틸-3,4,5,6-테트라하이드로-2(1H)-피리미디논(0.12mL, 1.03mmol)을 반응 혼합물에 첨가하고, 이어서 요오도메탄(0.27mL, 4.39mmol)을 첨가했다. 반응물을 실온에서 밤새 교반했다. 반응물을 물로 조심스럽게 켄칭하고, 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[3급-부톡시카보닐(메틸)아미노]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(105mg, 0.175mmol, 36% 수율)을 백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS (ESI+) m/z = 600 $[M+H]^+$.

[0619]

에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(메틸아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 32)

[0620]

(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[3급-부톡시카보닐(메틸)아미노]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산(42mg, 0.0699mmol)을 -5°C에서 에탄올(2mL)과 티오닐 클로라이드(31μL, 0.420mmol)의 용액에 분량으로 첨가했다. 반응물을 실온에서 5분 동안 교반하고, 이어서 2시간 동안 환류시켰다. 반응물이 온도에 도달하도록 허용하고, 용매를 톨루엔과의 공비혼합물로서 진공하에 증발시키고, 이어서 고진공 펌프에 의해 건조시켰다. 조 물질을 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(메틸아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 32)(25mg, 0.041mmol, 59% 수율)를 회백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS (ESI+) m/z = 528 $[M+H]^+$.

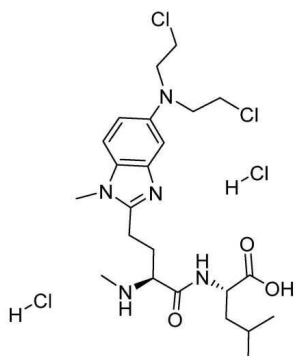
[0621]

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.84 (s, 1H), 9.43 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 7.73 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.14 (d, J = 9.4 Hz, 1H), 6.93 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 4.35(ddd, J = 11.0, 7.0, 4.7 Hz, 1H), 4.12(p, J = 7.0 Hz, 2H), 4.04(dd, J = 8.0, 4.8 Hz, 1H), 3.90(s, 3H), 3.83(t, J = 6.8 Hz, 4H), 3.77(t, J = 6.5 Hz, 4H), 3.30(t, J = 8.4 Hz, 2H), 2.55(s, 3H), 2.47(dd, J = 8.5, 4.9 Hz, 1H), 2.28(dq, J = 14.8, 7.9 Hz, 1H),

1.69 (dddd, $J = 39.0, 15.1, 9.7, 5.6$ Hz, 2H), 1.57 (ddd, $J = 13.8, 9.2, 4.8$ Hz, 1H), 1.19 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.91 (dd, $J = 26.6, 6.5$ Hz, 6H).

[0622]

실시예 33: (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(메틸아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 33)



[0623]

[0624]

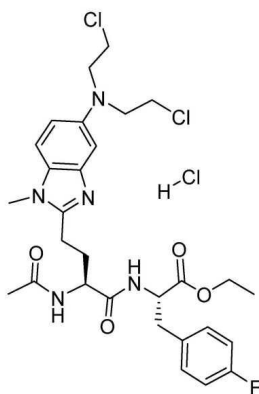
(2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-[3급-부톡시카보닐(메틸)아미노]부타노일]아미노]-4-메틸펜탄산(화합물 32-1)(12mg, 0.0200mmol)을 에탄올(1mL)에 용해시켰다. HCl(디옥산 중의 4M)(50uL, 0.200mmol)을 첨가하고, 반응물을 실온에서 3시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 여과하고, 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(메틸아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 33)(4mg, 0.0069mmol, 34% 수율)를 회백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 97%; MS(ESI+) $m/z = 500$ $[M+H]^+$.

[0625]

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.43 (s, 1H), 13.03 (s, 1H), 9.13 (s, 2H), 7.63 (s, 1H), 7.16 - 6.98 (m, 1H), 6.92 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.34 (q, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.95 (dd, $J = 7.8, 4.7$ Hz, 1H), 3.87 - 3.72 (m, 11H), 3.14 (s, 3H), 2.57 (s, 3H), 2.44 - 2.36 (m, 1H), 2.21 (ddt, $J = 19.1, 13.7, 5.8$ Hz, 1H), 1.70(dp, $J = 13.2, 6.6$ Hz, 1H), 1.62(t, $J = 7.4$ Hz, 2H), 0.92(dd, $J = 28.5, 6.5$ Hz, 6H).

[0626]

실시예 34: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아세트아미도-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트; 하이드로클로라이드(실시예 화합물 34)



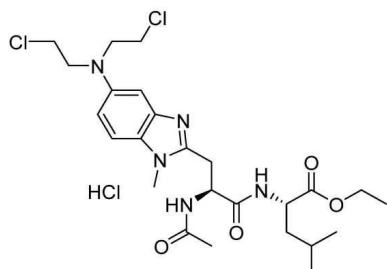
[0627]

[0628]

에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트; 하이드로클로라이드(실시예 화합물 2)(15mg, 0.0233mmol)를 아세트ونی트릴(1mL)에 용해시켰다. N,N-디이소프로필에틸아민(0.00553mL, 0.0317mmol)을 첨가하고, 이어서 아세트클로라이드(0.00227mL, 0.0318mmol)를 첨가하고, 반응물을 실온에서 3시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아세트아미도-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트; 하이드로클로라이드(실시예 화합물 34)(7mg, 0.0108mmol, 41% 수율)를 회백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS (ESI+) $m/z = 608$ $[M+H]^+$.

[0629] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.20 (s, 1H), 8.49 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.18 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.29 – 7.19 (m, 2H), 7.14 – 7.04 (m, 3H), 6.86 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.40 (dtd, J = 20.2, 8.2, 6.1 Hz, 2H), 4.00(qd, J = 7.2, 2.2 Hz, 2H), 3.84 – 3.74(m, 11H), 3.05(q, J = 9.3, 8.4 Hz, 2H), 3.00 – 2.88(m, 2H), 2.09(ddd, J = 13.9, 8.2, 4.3 Hz, 1H), 2.04 – 1.94(m, 1H), 1.76(s, 3H), 1.06(t, J = 7.1 Hz, 3H).

[0630] 실시예 35: 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아세트아미도-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 하이드로클로라이드(실시예 화합물 35)

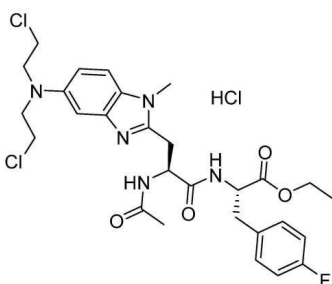


[0631]

[0632] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 4)(11mg, 0.0182mmol)를 아세트니트릴(1mL)에 용해시켰다. N,N-디이소프로필에틸아민(0.00381mL, 0.0219mmol)을 첨가하고, 이어서 아세트 클로라이드(0.00156mL, 0.0219mmol)를 첨가하고, 반응물을 실온에서 3시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아세트아미도-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 하이드로클로라이드(실시예 화합물 35)(8mg, 0.0138mmol, 76% 수율)를 백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS (ESI+) m/z = 542 $[M+H]^+$.

[0633] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.16 (s, 1H), 8.56 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 8.41 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.12 (dd, J = 9.2, 2.4 Hz, 1H), 6.87(d, J = 2.3 Hz, 1H), 4.83(td, J = 8.0, 6.5 Hz, 1H), 4.26(ddd, J = 9.8, 7.6, 5.2 Hz, 1H), 4.00(qd, J = 7.2, 1.2 Hz, 2H), 3.91(s, 3H), 3.81(dd, J = 8.9, 6.4 Hz, 4H), 3.76(t, J = 6.1 Hz, 4H), 3.29(dd, J = 15.0, 7.8 Hz, 2H), 1.80(s, 3H), 1.61 – 1.49(m, 2H), 1.46(ddd, J = 13.7, 8.9, 5.1 Hz, 1H), 1.11(t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.83(dd, J = 25.2, 6.4 Hz, 6H).

[0634] 실시예 36: 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아세트아미도-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트; 하이드로클로라이드(실시예 화합물 36)



[0635]

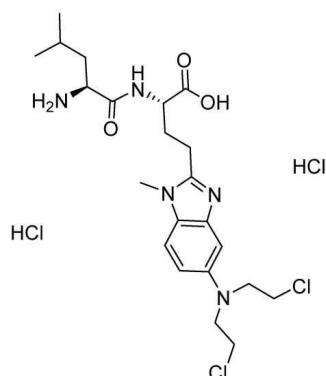
[0636] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 5)(15mg, 0.0228mmol)를 아세트니트릴(1mL)에 용해시켰다. N,N-디이소프로필에틸아민(0.00476mL, 0.0273mmol)을 첨가하고, 이어서 아세트 클로라이드(0.00195mL, 0.0273mmol)를 첨가하고, 반응물을 실온에서 3시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아세트아미도-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로파노에이트; 하이드로클로라이드(실시예 화합물 36)(10.6mg, 0.0168mmol, 71% 수율)를 백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 97%; MS (ESI+) m/z = 594 $[M+H]^+$.

[0637] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.18 (s, 1H), 8.62 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.34 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.71

(d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.24 - 7.18 (m, 2H), 7.12 (dd, J = 9.2, 2.4 Hz, 1H), 7.10 - 7.03 (m, 2H), 6.86 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.83 (td, J = 8.0, 6.5 Hz, 1H), 4.45 (td, J = 8.0, 6.1 Hz, 1H), 3.97 (qd, J = 7.1, 2.1 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.85 - 3.79 (m, 4H), 3.75 (t, J = 7.1 Hz, 4H), 3.25 (dd, J = 15.0, 7.9 Hz, 2H), 3.01 - 2.89 (m, 2H), 1.79 (s, 3H), 1.04 (t, J = 7.1 Hz, 3H).

[0638]

실시예 37: (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부탄산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 37)



[0639]

[0640]

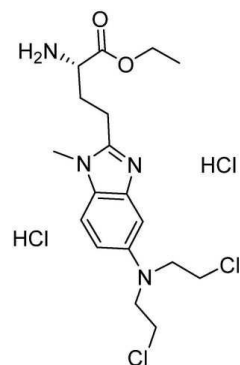
THF:MeOH(2:1, 1mL) 중의 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 7)(6mg, 0.0102mmol)의 용액에 물(0.5M, 0.0238mL) 중의 수산화리튬 1수화물의 용액을 첨가했다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하고, 이어서 여과하고, 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부탄산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 37)(1mg, 0.00177mmol, 16% 수율)를 백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS(ESI+) m/z = 486 [M+H]⁺.

[0641]

¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 14.50 (s, 1H), 13.04 (s, 1H), 9.14 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.38 (d, J = 5.4 Hz, 3H), 7.73 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.13 (dd, J = 9.3, 2.4 Hz, 1H), 6.88 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.37 (td, J = 8.8, 4.0 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.86 (q, J = 6.6 Hz, 1H), 3.81 (t, J = 6.8 Hz, 4H), 3.76 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 3.32 - 3.22 (m, 2H), 2.36 (t, J = 8.8 Hz, 1H), 2.12 (ddt, J = 14.0, 9.2, 4.7 Hz, 1H), 1.69 (dq, J = 13.3, 6.6 Hz, 1H), 1.59 (dt, J = 13.9, 7.1 Hz, 1H), 1.51 (dt, J = 14.2, 7.4 Hz, 1H), 0.90 (dd, J = 22.4, 6.5 Hz, 6H).

[0642]

실시예 38: 에틸 (2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 38)



[0643]

[0644]

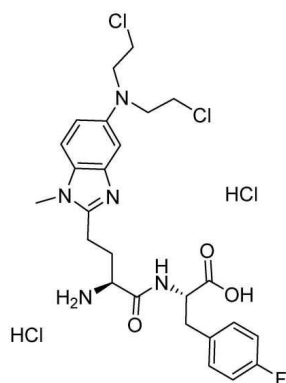
EtOH(5mL) 중의 에틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(출발 물질로서 반응식 1에 도시된 에틸 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트를 사용하여 반응식 6에 따라 합성됨)(559mg, 1.06mmol, 순도 95%)의 용액에 디옥산 중의 염화수소(4.00mol/L, 2.65mL, 10.6mmol)를 첨가하고, 반응 혼합물을 25℃에서 3시간 동안 교반했다. 용매를 감압하에 증발시켜 조 생성물을 수득하고, 이를 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 에틸 (2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노에이트; 디하이드로클로라이드

(실시예 화합물 38)(416mg, 0.877mmol, 83% 수율)를 백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS (ESI+) m/z = 401 $[M+H]^+$.

[0645] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.81 (s, 1H), 8.86 (s, 3H), 7.85 - 7.68 (m, 1H), 7.15 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 6.92 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 4.27 (s, 1H), 4.21 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.93(t, J = 4.4 Hz, 3H), 3.84(q, J = 6.0 Hz, 4H), 3.78(t, J = 5.8 Hz, 4H), 3.36(dq, J = 16.9, 6.1 Hz, 2H), 2.44 - 2.31(m, 2H), 1.25(q, J = 6.3 Hz, 3H).

[0646]

[0647] 실시예 39: (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로판산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 39)

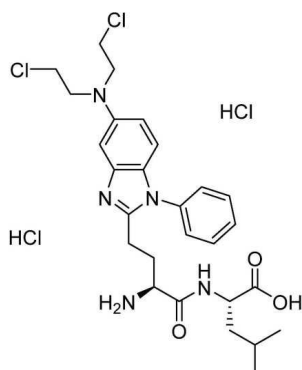


[0648]

[0649] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로판산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 2)(10.2mg, 0.015mmol)를 HCl(디옥산 중의 4M, 0.0758mL)에 용해시키고, 실온에서 48시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 예비 크로마토그래피에 의해 정제하여 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-3-(4-플루오로페닐)프로판산; 디하이드로클로라이드 부타노에이트(실시예 화합물 39)(2.3mg, 0.00348mmol, 수율 25%)를 백색 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS (ESI+) m/z = 538 $[M+H]^+$.

[0650] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.74 (s, 1H), 13.10 (s, 1H), 9.23 (s, 1H), 8.54 (s, 3H), 7.73 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 7.36 (ddd, J = 8.1, 5.6, 2.1 Hz, 2H), 7.16 - 7.07 (m, 3H), 6.91 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 4.47 (td, J = 8.4, 4.8 Hz, 1H), 4.04 (q, J = 5.9 Hz, 1H), 3.87 (d, J = 1.5 Hz, 3H), 3.82 (d, J = 6.9 Hz, 4H), 3.76 (d, J = 6.2 Hz, 4H), 3.32(s, 2H), 3.10(dd, J = 14.1, 4.7 Hz, 1H), 2.98(dd, J = 14.1, 8.9 Hz, 1H), 2.38 - 2.22(m, 2H).

[0651] 실시예 40: (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 40)

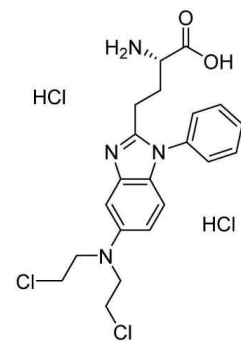


[0652]

[0653] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)

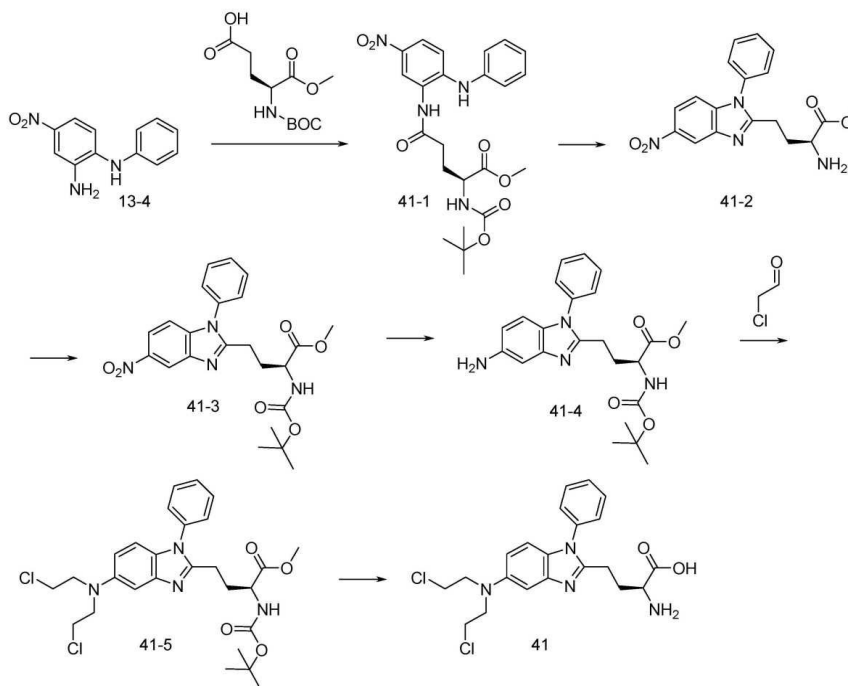
부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(화합물 13-11)(90.0mg, 0.000133mol)를 1,4-디옥산(5.0mL)에 용해시키고, 이어서 물(1.0mL) 및 LiOH·H₂O(3당량, 16mg)를 첨가했다. 혼합물을 50℃에서 2시간 동안 교반했다. 물(10mL) 및 DCM(10mL)을 첨가하고, HCl(수성)을 사용하여 pH를 5-6으로 조정했다. 혼합물의 상이한 상을 분리하고, 유기 상을 물로 세척하고, MgSO₄에서 건조시켰다. 용매를 진공하에 제거했다. 잔류물을 DCM(2mL)에 재용해시키고, 이어서 HCl(1,4-디옥산 중의 4M, 1.0mL)을 첨가하고, 용액을 실온에서 30분 동안 교반했다. 혼합물을 건조 증발시켜 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 40)(70mg, 0.113mmol, 90% 수율)를 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 89%; MS (ESI+) m/z = 548 [M+H]⁺.

실시예 41: (2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]부탄산(실시예 화합물 41)



실시예 41은 아래의 반응식 11에 따라 합성했다:

[반응식 11]



메틸 (2S)-5-(2-아닐리노-5-니트로-아닐리노)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-5-옥소-펜타노에이트(화합물 41-1)

Boc-Glu-OMe(1.63g, 0.00624mol)를 무수 DMF(15mL)에 용해시켰다. DIEA(2.97mL, 0.0170mol)를 첨가하고, 이어서 4-니트로-N1-페닐-벤젠-1,2-디아민(1.30g, 0.00567mol; 13-4) 및 COMU(2.91g, 0.00681mol)를 첨가했다. 반응물을 실온에서 밤새 교반했다. 대부분의 DMF를 진공하에 증발하여 제거하고, 이어서 톨루엔(10mL)을 첨가하고, 유기 상을 물(3×100mL)로 세척했다. 유기 상을 MgSO₄에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 증발시켜 표제 화합물(41-1)을 암갈색 유성 조 생성물(5.61g)로서 수득했다. HPLC 순도: 48%; (ESI+) m/z 373 [M+H-

BOC]⁺. 이 물질은 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다.

[06661] 메틸 (2S)-2-아미노-4-(5-니트로-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(화합물 41-2)

[06662] EtOH(100mL) 중의 조 메틸 (2S)-5-(2-아닐리노-5-니트로-아닐리노)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-5-옥소-펜타노에이트(5.61g, 순도 48%, 41-1)의 용액에 12M HCl(15mL)을 첨가하고, 혼합물을 70℃에서 45분 동안 교반했다. 반응 혼합물을 물(100mL)로 희석하고, 4M NaOH(약 45mL)를 사용하여 pH 7로 조심스럽게 중화시키고, EtOAc(3×100mL)로 추출했다. 유기 상을 MgSO₄에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 증발시켜 표제 화합물(41-2)을 암적갈색 고체 생성물(2.04g)로서 수득했다. HPLC 순도: 60%; MS (ESI+) m/z 355 [M+H]⁺. 이 물질은 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다.

[06663] 메틸 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(5-니트로-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(화합물 41-3)

[06664] THF(25mL) 중의 조 메틸 (2S)-2-아미노-4-(5-니트로-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(2.04g)의 용액에 TEA(2.38mL) 및 3급-부톡시카보닐 3급-부틸 카보네이트(1.49g)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반했다. 용매를 증발시키고, 잔류물을 EtOAc에 용해시켰다. 유기 상을 5% 시트르산으로 세척하고, MgSO₄로 건조시키고, 여과하고, 이어서 용매를 증발시켰다. 조 물질을 구배로서 석유 에테르 중의 20 내지 80% EtOAc로 용출시키는 실리카 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물(41-3)(1.13g, 0.00249mmol, 44% 수율)을 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z 455 [M+H]⁺.

[06665] 메틸 (2S)-4-(5-아미노-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(화합물 41-4)

[06666] MeOH(20mL) 중의 메틸 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(5-니트로-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일)부타노에이트(0.330g, 0.000581mol, 순도 80%)의 용액에 Pd/C(10.0%, 0.0734g, 0.000069mol)를 첨가하고, 이를 배기시켰다. 벌룬 중의 수소가스를 부착하고, 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반했다. Pd/C를 여과 제거하고, 용매를 건조 증발시켜 메틸 (2S)-4-(5-아미노-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(190mg, 0.000636mol; 41-4)를 수득했다. HPLC 순도: 90%; MS (ESI+) m/z 425 [M+H]⁺.

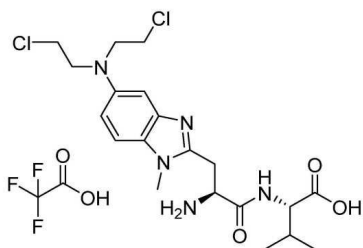
[06667] 메틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(화합물 41-5)

[06668] NaBH₃CN(120mg)을 EtOH(20mL) 중의 메틸 (2S)-4-(5-아미노-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(90%, 300mg, 0.636mmol, 순도 90%), 2-클로로아세트알데히드(50%, 0.24mL) 및 TFA(0.19mL)의 혼합물에 첨가했다. 혼합물을 3시간 동안 실온에서 교반했다. 3 과잉 당량의 NaBH₃CN, 2-클로로아세트알데히드 및 TFA를 첨가하고, 반응물을 1시간 동안 실온에서 교반했다. 톨루엔 및 포화 NaHCO₃를 첨가하고, 유기 상을 분리하여 물로 세척했다. 용매를 증발시키고, 담갈색 고체 잔류물을 석유 · 에테르 중의 50 내지 100% EtOAc로 용출시키는 실리카 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 메틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(190mg, 0.000311mol, 49% 수율)를 수득했다. HPLC 순도: 90%; MS (ESI+) m/z = 550 [M+H]⁺.

[06669] (2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]부탄산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 41)

[06670] 메틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(190mg, 0.000311mol)를 1,4-디옥산(5.00mL)에 용해시키고, 이어서 물(1.5mL) 및 LiOH·H₂O(44mg)를 첨가했다. 혼합물을 50℃에서 20분 동안 교반한 후, 물(10mL) 및 DCM(10mL)을 첨가하고, 1M HCl(수정)을 사용하여 pH를 6-7로 조정했다. 상들을 분리하고, 유기 상을 물로 세척하고, MgSO₄에서 건조시켰다. HCl(1,4-디옥산 중의 4M, 0.50mL, 0.004mol)을 유기 상에 첨가하고, 투명한 용액을 실온에서 1시간 동안 교반했다. 용매 상을 침전물로부터 제거하고, 디에틸 에테르로 세척했다. 이어서, 소량의 물에 재용해시키고, 즉시 동결 건조시켜 (2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-페닐-벤즈이미다졸-2-일]부탄산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 41)(138mg, 0.000242mol, 78% 수율)를 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 89%; MS (ESI+) m/z = 435 [M+H]⁺.

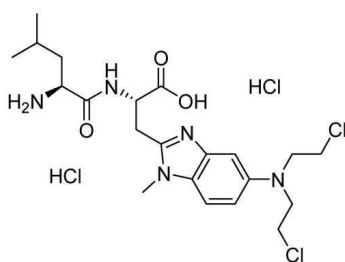
[0671] 실시예 42: (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-메틸-부탄산; 2,2,2-트리플루오로아세트산(실시예 화합물 42)



[0672]

[0673] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-메틸-부탄산에이트; 디하이드로클로라이드(화합물 6)(12mg, 0.02mmol)를 THF(1mL), MeOH(0.5mL) 및 0.5M LiOH(수정, 0.13mL, 0.065mmol)의 혼합물에 용해시켰다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반했다. 유기 용매를 증발시키고, 잔류물을 예비 HPLC에 의해 정제하여 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-3-메틸-부탄산; 2,2,2-트리플루오로아세트산(실시예 화합물 42)(2.6mg, 0.00454mmol, 21% 수율)을 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) $m/z = 458 [M+H]^+$.

[0674] 실시예 43: (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로판산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 43)

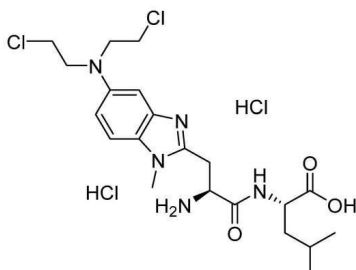


[0675]

[0676] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 10)(12mg, 0.02mmol)에 1M HCl(수정)(1mL)을 첨가하고, 반응물을 실온에서 밤새 교반했다. 농축 HCl을 첨가했다(10방울). 4시간 후, 추가로 0.3mL의 농축 HCl을 첨가하고, 혼합물을 밤새 교반했다. 혼합물을 환저 플라스크로 옮기고, 물을 혼합물에 첨가하고, 이를 동결건조시켜 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노일]아미노]-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로판산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 43)(5mg, 0.00917mmol, 44% 수율)를 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) $m/z = 472 [M+H]^+$.

[0677] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.78 (s, 1H), 9.40 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.38 (s, 3H), 7.76 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H), 7.16 (dd, $J = 9.2, 2.4$ Hz, 1H), 6.94 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 4.93 (td, $J = 7.9, 5.7$ Hz, 1H), 3.96(s, 3H), 3.80(dt, $J = 33.0, 6.8$ Hz, 9H), 3.64(dd, $J = 15.5, 5.9$ Hz, 1H), 3.60 - 3.56(m, 2H), 1.67 - 1.60(m, 1H), 1.50(t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 0.85(t, $J = 7.2$ Hz, 6H).

[0678] 실시예 44: (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜탄산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 44)

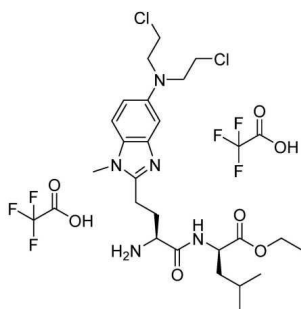


[0679]

[0680] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 4)(10mg, 0.017mmol)에 1M HCl(수성)(1mL)를 첨가하고, 반응물을 실온에서 밤새 교반했다. 농축 HCl(10방울)을 첨가하고, 반응물을 밤새 교반했다. 혼합물을 환저 플라스크로 옮기고, 물로 희석시키고, 동결건조시켜 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-3-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]프로파노일]아미노]-4-메틸-펜탄산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 44)(5mg, 0.00917mmol, 53% 수율)를 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) $m/z = 472$ $[M+H]^+$.

[0681] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.61 (s, 1H), 9.11 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H), 8.73 (s, 3H), 7.75 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H), 7.16 (d, $J = 9.4$ Hz, 1H), 6.92 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H), 4.51 - 4.44 (m, 1H), 4.27 (q, $J = 7.6$ Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.87 - 3.75 (m, 9H), 3.66 (d, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.76 - 1.68 (m, 1H), 1.55 (dt, $J = 8.8, 4.6$ Hz, 2H), 0.88 (dd, $J = 19.5, 6.5$ Hz, 6H).

[0682] 실시예 45: 에틸 (2R)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트 디-2,2,2-트리플루오로아세트산(실시예 화합물 45)

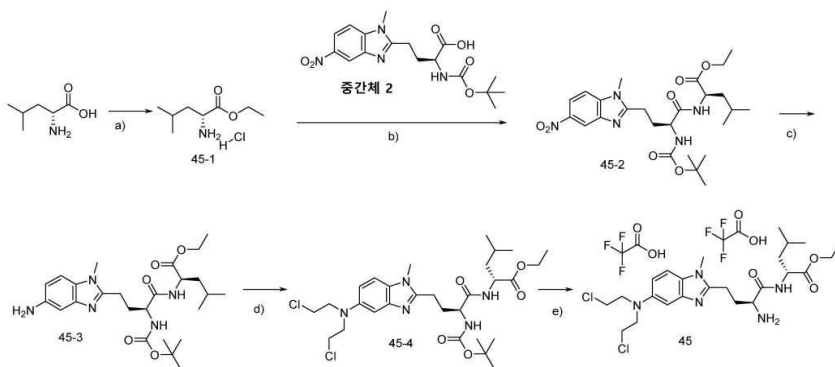


[0683]

[0684] 실시예 45는 아래의 반응식 12에 따라 합성했다:

[0685] 반응식 12. 시약 및 조건: a) 1.2당량 SOCl_2 , 에탄올, 0°C 내지 환류; b) HATU, TEA, DMF; c) 탄소 상 10% 팔라듐(약 55%의 물, EtOH, 5% AcOH로 습윤됨); d) 2-클로로아세트알데히드(15당량), NaBH_3CN (10당량), TFA(12당량), EtOH; e) 디옥산 중의 4M HCl: EtOH : DCM

[0686] [반응식 12]



[0687]

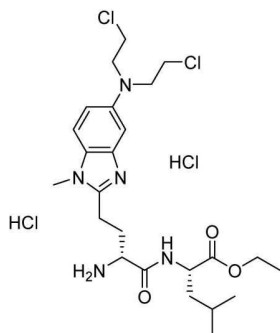
[0688] R-류신 에틸 에스테르 하이드로클로라이드(화합물 45-1)

[0689] 25mL 플라스크에서, (2R)-2-아미노-4-메틸-펜탄산(1.00g, 0.00762mol) 및 무수 에탄올(6.00mL)을 첨가했다. 반응물을 빙욕에서 냉각시키고, 티오닐 클로라이드(0.667mL, 0.00915mol)를 적가하여 슬러리를 생성했다. 첨가 후, 반응물을 2시간 30분 동안 환류에서 교반했다. 용매를 증발시키고, 잔류물을 Et_2O (16mL)에 현탁시키고, 1시간 동안 교반했다. 생성물을 여과하여 표제 화합물(45-1)(1.36g, 0.00693mol, 91% 수율)을 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS(ESI+) $m/z = 160$ $[M+H]^+$

[0690] 에틸 ((S)-2-((3급-부톡시카보닐)아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-1H-벤조[d]이미다졸-2-일)부타노일)-D-류시네이트

(화합물 45-2)

- [0691] DMF(4.60mL) 중의 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부탄산(중간체 2)(0.500g, 0.00132mol), R-류신 에틸 에스테르 하이드로클로라이드(0.259g, 0.00132mol) 및 TEA(0.553mL, 0.00396mol)의 혼합물에 HATU(0.502g, 0.00132mol)를 첨가했다. 반응물을 2시간 동안 교반하고, 이어서 물(9mL)을 첨가했다. 생성물이 오일링 아웃되었다. 액체를 피펫에 의해 제거했다. 습윤 반고체에 EtOH(5mL)를 첨가했다. 반고체를 80℃로 가열하여 용해시켰다. 침전의 정후까지 물(5mL)을 첨가했다. 가열을 중지했다. 생성물이 오일링 아웃되었다. 용매를 증발시키고, 잔류물을 톨루엔에 용해시키고, 물로 세척했다. 유기 상을 MgSO₄에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 증발시켜 표제 화합물(45-2)(0.575g, 0.00111mol, 수율: 84%)을 수득했다. HPLC 순도: 97%; MS (ESI+) m/z = 520 [M+H]⁺. 이 물질은 다음 단계에서 추가 정제 없이 사용했다.
- [0692] 에틸 (2R)-2-[[[(2S)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(화합물 45-3)
- [0693] 에틸 (2R)-2-[[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(575mg, 0.00111mol) 및 탄소상 팔라듐 10%(약 55% 물(0.262g, 0.00111mol)로 습윤됨)의 혼합물을 AcOH(1.30mL)를 함유한 EtOH(25.0mL)에서 밤새 교반했다. 고체 물질을 셀라이트에서 여과하여 표제 화합물(542mg, 1.11mmol, 수율 100%)을 수득했다. HPLC 순도: 98%; MS (ESI+) m/z = 490 [M+H]⁺. 이 물질은 다음 단계에서 추가 정제 없이 사용했다.
- [0694] 에틸 (2R)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(화합물 45-4)
- [0695] 실온에서 NaBH₃CN(0.348g, 0.00554mol)을 EtOH(30mL) 중의 에틸 (2R)-2-[[[(2S)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(0.542g, 0.00111mol; 45-3), 2-클로로로아세트알데히드(50%, 0.701mL, 0.00554mol) 및 TFA(0.493mL, 0.00664mol)의 혼합물에 첨가했다. 20분 동안 교반한 후, 추가의 NaBH₃CN(0.348g, 0.00554mol) 및 2-클로로로아세트알데히드(5.0%, 0.701mL, 0.00554mol)를 첨가했다. 반응물을 20분 동안 추가로 교반한 후, 2-클로로로아세트알데히드(50%, 0.701mL, 0.00554mol)를 첨가했다. 반응물은 톨루엔을 첨가한 후 2시간 동안 추가로 교반하고, 유기 상을 중탄산나트륨 및 염수로 세척했다. 유기물을 MgSO₄에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 증발시켰다. 이 화합물을 DCM 중의 2% EtOH로 용출시키는 구형 실리카 겔 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물 45-4(209mg, 0.340mmol, 31% 수율)를 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z = 614 [M+H]⁺.
- [0696] 에틸 (2R)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트 디-2,2,2-트리플루오로아세트산(실시예 화합물 45)
- [0697] 디옥산(1.40mL) 중의 4M HCl을 DCM(1.40mL) 및 EtOH(0.860mL)의 혼합물 중의 에틸 (2R)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(0.209g, 0.000340mol)에 첨가했다. 반응물을 5시간 동안 교반하고, 이어서 용매를 증발시켜 순도 90%의 조 생성물을 수득했다. 이 조 생성물을 30% 물을 함유한 MeCN에 용해시키고, 10 내지 60% MeCN/물(0.1% TFA)로 용출시키는 예비 HPLC, ACE 컬럼에서 정제하여 표제 화합물(실시예 화합물 45)을 수득했다(104mg, 0.140mmol, 49% 수율). HPLC 순도: 99%; MS (ESI+) m/z = 514 [M+H]⁺.
- [0698] ¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 9.18 - 8.99 (m, 1H), 8.41 (s, 3H), 7.70 - 7.59 (m, 1H), 7.13 - 7.02 (m, 1H), 6.94 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 4.33 (q, J = 7.8 Hz, 1H), 4.13 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.07 - 4.01 (m, 1H), 3.85 - 3.71 (m, 11H), 3.17 - 3.07 (m, 2H), 2.25 (q, J = 7.4 Hz, 2H), 1.65 - 1.52 (m, 3H), 1.21 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.89 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 0.86 (d, J = 6.1 Hz, 3H).
- [0699] 실시예 46: 에틸 (2S)-2-[[[(2R)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 46)



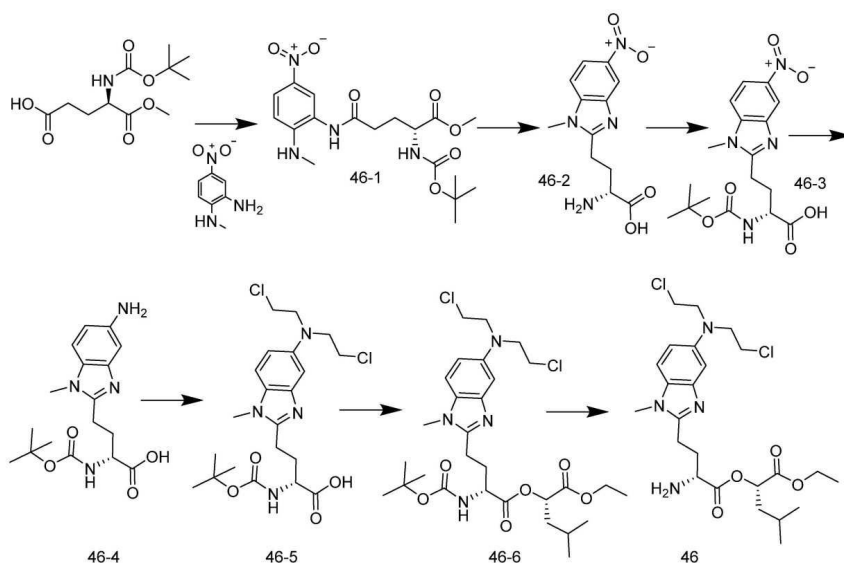
[0700]

[0701]

실시예 46은 아래의 반응식 13에 따라 합성했다:

[0702]

[반응식 13]



[0703]

[0704]

메틸 (2R)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-5-[2-(메틸아미노)-5-니트로-아닐리노]-5-옥소-펜타노에이트(화합물 46-1)

[0705]

MeCN(20mL) 중의 N-3급-부톡시카보닐-D-글루탐산 α-메틸 에스테르(1.00당량, 2.00g, 7.65mmol), 1-메틸이미다졸(1.00당량, 0.61mL, 7.65mmol) 및 N1-메틸-4-니트로-벤젠-1,2-디아민(1.34g, 8.037mmol)의 용액에 클로로(디메틸아미노)-N,N-디메틸에탄이미늄 헥사플루오로포스페이트(TCFH)(1.10당량, 2.36g, 8.42mmol)를 서서히 첨가했다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하고, 이어서 물(200mL)을 첨가했다. 유기 상을 상 분리기 카트리지를 통해 통과시키고, 증발시키고, 진공하에 건조시켜 메틸 (2R)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-5-[2-(메틸아미노)-5-니트로-아닐리노]-5-옥소-펜타노에이트(3.1g, 7.55mmol, 수율 99%)를 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS(ESI+) m/z = 843 [2M+Na]⁺

[0706]

(2R)-2-아미노-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부탄산(화합물 46-2)

[0707]

메틸 (2R)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-5-[2-(메틸아미노)-5-니트로-아닐리노]-5-옥소-펜타노에이트(1.00당량, 3.10g, 7.55mmol)를 염산(4M, 수성)(18.0당량, 34mL, 136mmol)에 첨가했다. 첨가 후, 혼합물을 가열하고, 2시간 동안 스톱퍼 없이 100℃에서 교반했다. 반응물을 실온에 도달하도록 하고, 소량의 갈색 고체를 여과했다. 여액을 빙욕에서 냉각하고, 10M NaOH를 pH2에 도달할 때까지 조심스럽게 첨가했다. 그 후, pH 5.2가 수득될 때까지 4M NaOH 용액을 첨가했다. 수득된 고체를 여과하고, 물 및 Et₂O로 세척하고, 진공하에 건조시켜 (2R)-2-아미노-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부탄산(2.3g, 7.52mmol, >99% 수율)을 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 91%; MS(ESI+) m/z = 279 [M+H]⁺

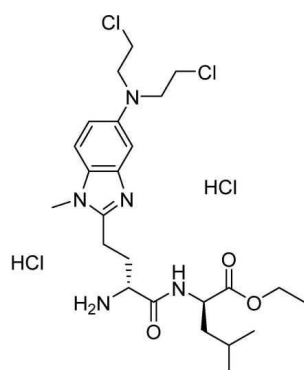
[0708]

(2R)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부탄산(화합물 46-3)

- [0709] 물(10mL) 중의 (2R)-2-아미노-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부탄산(1.00당량, 2.30g, 7.52mmol)의 용액에 NaOH(4M, 수성)(1.10당량, 2.1mL, 8.27mmol)를 첨가했다. 용액에 디-3급-부틸 디카보네이트(1.40당량, 2.4mL, 10.5mmol)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반했다. 침전물이 형성되었다. 추가의 4M NaOH(0.5당량)를 첨가하고, 반응물을 실온에서 3시간 동안 교반했다. pH를 9.2로 조정하고, 반응 혼합물을 Et₂O(3×300mL)로 세척했다. 수득된 유기 상은 폐기하고, 수성 상을 증발시켜 Et₂O 잔류물을 제거했다. 4M HCl을 수성 상에 적가했다. 수득된 고체를 수집하고, 물로 세척하고, 건조시켜 (2R)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부탄산(1.85g, 4.59mmol, 61% 수율)을 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 94%; MS (ESI+) m/z = 379 [M+H]⁺.
- [0710] **(2R)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부탄산(화합물 46-4)**
- [0711] (2R)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(1-메틸-5-니트로-벤즈이미다졸-2-일)부탄산(1.00당량, 300mg, 0.769mmol)을 에탄올(5mL)에 용해시키고, H-반응기에 넣었다. Pd/C 10%(0.0500당량, 8.2mg, 0.0385mmol)를 첨가하고, 반응기를 밀봉했다. 질소 퍼지를 수행했다. H₂를 3bar에서 반응기에 충전하고, 반응물을 실온에서 2시간 동안 교반했다. 질소 퍼지를 통해 수소를 배출했다. 촉매는 셀라이트를 통해 여과하여 제거했다. 용매를 증발시켜 (2R)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부탄산(235mg, 0.690mmol, 94% 수율)을 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z = 349 [M+H]⁺.
- [0712] **(2R)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부탄산(화합물 46-5)**
- [0713] (2R)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부탄산(1.00당량, 253mg, 0.690mmol)을 에탄올(2mL)에 현탁시켰다. 수소화시아노보소나트륨(3.00당량, 130mg, 2.07mmol)을 첨가하고, 이어서 트리플루오로아세트산(1.50당량, 0.079mL, 1.03mmol)을 첨가한 다음, 클로로아세트알데히드(50%, 3.00당량, 0.26mL, 2.07mmol)를 적가했다. 반응 혼합물을 30분 동안 교반했다. 2 과잉 당량의 NaBH₃CN, 클로로아세트알데히드 및 TFA를 첨가하고, 반응물을 실온에서 2시간 동안 교반했다. 4M NaOH를 적가 첨가하여 pH를 3.6으로 조정했다. 에탄올을 증발시키고, 물을 첨가하고, 수성 상을 EtOAc로 추출했다. 유기 상을 증발시키고, 조 (2R)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부탄산(303mg, 0.557mmol, 81% 수율)을 고체로서 단리시켰다. HPLC 순도: 87%; MS (ESI+) m/z = 473 [M+H]⁺.
- [0714] **에틸 (2S)-2-[[[(2R)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(화합물 46-6)**
- [0715] 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 하이드로클로라이드(1.15당량, 41mg, 0.211mmol)를 MeCN(3mL) 중의 (2R)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부탄산(1.00당량, 100mg, 0.184mmol), 에틸 (2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노에이트(1.15당량, 34mg, 0.211mmol), 에틸 시아노글리옥실레이트-2-옥심(1.00당량, 26mg, 0.184mmol) 및 4-메틸모르폴린(1.15당량, 23uL, 0.211mmol)의 혼합물에 첨가했다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반했다. 반응 혼합물을 여과하고, 예비 크로마토그래피에 의해 정제했다. 순수한 분획을 동결 건조시켜 에틸 (2S)-2-[[[(2R)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(17mg, 0.0275mmol, 15% 수율)를 수득했다. HPLC 순도: 99%; MS (ESI+) m/z = 614 [M+H]⁺.
- [0716] **에틸 (2S)-2-[[[(2R)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트;디하이드로클로라이드(실시예 화합물 46)**
- [0717] 에틸 (2S)-2-[[[(2R)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(1.00당량, 17.1mg, 0.0275mmol)를 MeCN(2mL)에 용해시키고, 염산(디옥산 중의 4M)(5.00당량, 35uL, 0.139mmol)을 첨가했다. 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반했다. 혼합물을 여과하고, 예비 크로마토그래피에 의해 정제하고, 순수한 분획을 폴링하고, 동결 건조시켜 에틸 (2S)-2-[[[(2R)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트;디하이드로클로라이드(실시예 화합물 46)(14.3mg, 0.0234mmol, 84% 수율)를 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 96%; MS (ESI+) m/z = 514 [M+H]⁺.

[0718] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.81 (s, 1H), 9.23 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 8.59 (s, 3H), 7.75 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 6.94 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 4.30 - 4.24 (m, 1H), 4.11 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.04 (s, 1H), 3.89 (s, 3H), 3.83 (t, J = 6.7 Hz, 4H), 3.77 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 3.2-3.3 (m, 2H), 2.32 (dp, J = 29.8, 7.6 Hz, 2H), 1.69 - 1.57 (m, 2H), 1.53 (ddd, J = 13.8, 8.5, 5.6 Hz, 1H), 1.20 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.87 (dd, J = 21.4, 6.3 Hz, 6H).

[0719] 실시예 47: 에틸 (2R)-2-[[[(2R)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드 (실시예 화합물 47)



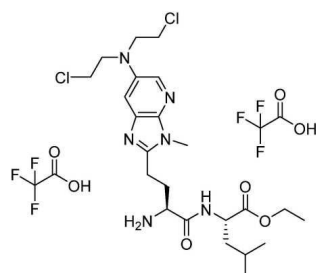
[0720]

[0721] 실시예 47은 반응식 13에 따르지만, D-류신, 에틸 에스테르, 하이드로클로라이드(1.15당량, 41mg, 0.211mmol)를 화합물 46-5와의 펩티드 커플링에서 출발 물질로서 사용하여 합성하여 에틸 (2R)-2-[[[(2R)-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 2,2,2-트리플루오로아세트산(27mg, 0.0375mmol, 20% 수용)을 수득하고, 고체로서 단리시켰다. HPLC 순도: 99%; MS (ESI+) m/z = 614 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0722] 에틸 (2R)-2-[[[(2R)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드 (실시예 화합물 47)(6mg, 0.0097mmol, 수용 25%)를 고체로서 단리시켰다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z = 514 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0723] ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 14.79 (s, 1H), 9.25 (d, J = 7.0 Hz, 1H), 8.69 - 8.47 (m, 3H), 7.75 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 6.93 (s, 1H), 4.31 (dt, J = 11.3, 5.7 Hz, 1H), 4.16 - 4.04 (m, 3H), 3.90 (s, 3H), 3.83 (d, J = 6.7 Hz, 4H), 3.78 (d, J = 6.4 Hz, 4H), 3.38 - 3.33 (m, 2H), 2.32 (dp, J = 23.6, 7.6, 7.0 Hz, 2H), 1.75 (h, J = 6.9 Hz, 1H), 1.64 (td, J = 12.3, 10.8, 5.1 Hz, 1H), 1.55 (ddd, J = 14.0, 9.4, 4.8 Hz, 1H), 1.18 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 0.90 (dd, J = 25.1, 6.5 Hz, 6H).

[0724] 실시예 48: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[6-[비스(2-클로로에틸)아미노]-3-메틸-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트 디-2,2,2-트리플루오로아세트산 (실시예 화합물 48)



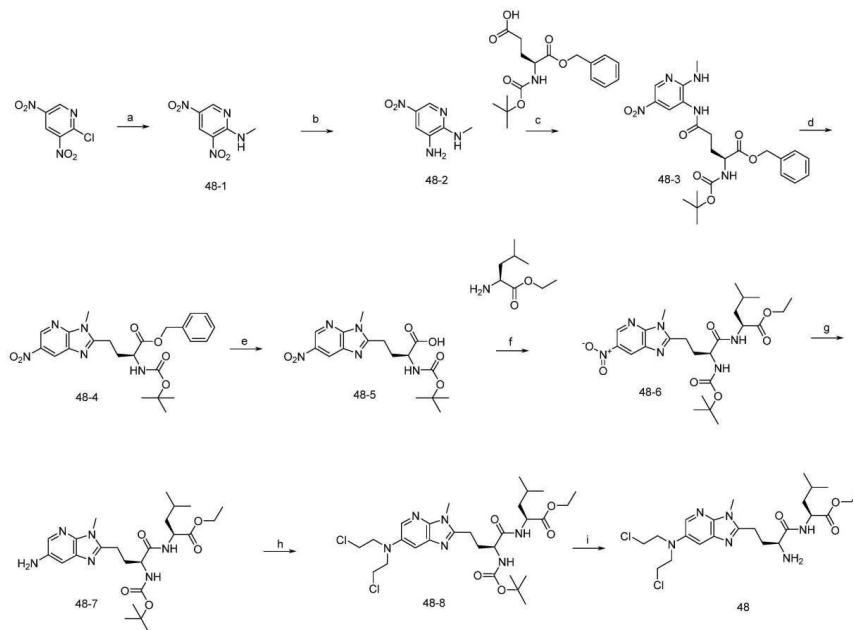
[0725]

[0726] 실시예 48은 아래의 반응식 14에 따라 합성했다:

[0727] 반응식 14. 시약 및 조건. a) MeNH_2 , MeOH, 0°C; b) 20% 수용 황화암모늄, MeOH, 열; c) HATU, DIPEA, DMF, 실온; d) $n\text{-PrOH}$, 100°C; e) $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$, THF, MeOH, H_2O , 실온; f) HATU, DIPEA, DMF, 실온; g) Pd/C 10%, H_2 ,

EtOH; h) 클로로아세트알데히드 용액(H₂O 중의 약 55wt%), NaBH₃CN, TFA, EtOH; i) TFA, DCM 0℃-실온, 12M HCl.

[0728] [반응식 14]



[0729]

[0730] **N-메틸-3,5-디니트로-피리딘-2-아민(화합물 48-1)**

[0731] MeOH(40mL) 중의 2-클로로-3,5-디니트로피리딘(4.0g, 0.0196mol)의 현탁액에 0-5℃에서 MeNH₂(4.32mL, 40vol%, 0.059mol) 및 MeOH(16mL)의 수용액의 혼합물을 적가했다. 황색 침전물이 형성되었고, 여과하여 수집하고, MeOH 및 물로 세척하고, 진공하에 밤새 건조시켜 N-메틸-3,5-디니트로-피리딘-2-아민(3.00g, 0.0151mol, 수율 77%)을 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z=199 [M+H]⁺.

[0732] **N2-메틸-5-니트로-피리딘-2,3-디아민(화합물 48-2)**

[0733] N-메틸-3,5-디니트로-피리딘-2-아민(2.80g, 14.1mmol)을 메탄올(60mL)에 현탁시키고, 황화암모늄(24.1mL)의 20% 수용액을 첨가했다. 온도를 75℃로 증가시키고, 혼합물을 2.5시간 동안 교반했다. 이어서, 반응물을 밤새 실온에서 교반했다. 혼합물을 병육에 넣고, 침전물을 형성했다. 고체를 여과하여 수집하고, 진공하에 밤새 건조시켜 N2-메틸-5-니트로-피리딘-2,3-디아민(3.39g, 이론적 수율 이상)을 적갈색 고체로서 수득했다. 이 물질은 추가 정제 없이 다음 단계로 제공했다. HPLC 순도: 90%; MS (ESI+) m/z=169 [M+H]⁺.

[0734] **벤질 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-5-[[2-(메틸아미노)-5-니트로-3-피리딜]아미노]-5-옥소-펜타노에이트(화합물 48-3)**

[0735] 디메틸포름아미드(7.50mL) 중의 (4S)-5-벤질옥시-4-(3급-부톡시카보닐아미노)-5-옥소-펜탄산(1.00g, 2.97mmol)의 용액에 HATU(1.36g, 3.57mmol) 및 DIEA(1.04mL, 5.45mmol)를 첨가하고, 반응물을 2분 동안 교반한 후, N2-메틸-5-니트로-피리딘-2,3-디아민(화합물 48-2)(0.500g, 2.97mmol)을 첨가했다. 반응물을 22시간 동안 실온에서 교반했다. EtOAc를 첨가하고, 유기 상을 염수(3배)로 세척하고, 황산마그네슘으로 건조시키고, 경사 제거하고 농축시켜 벤질 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-5-[[2-(메틸아미노)-5-니트로-3-피리딜]아미노]-5-옥소-펜타노에이트(2.74g, 이론적 수율 이상)를 수득했다. 이 물질은 추가 정제 없이 다음 단계로 제공했다. HPLC 순도: 80%; MS (ESI+) m/z=488 [M+H]⁺.

[0736] **벤질 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(3-메틸-6-니트로-이미다조[4,5-b] 피리딘-2-일)부타노에이트(화합물 48-4)**

[0737] 1-프로판올(20.0mL) 중의 벤질 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-5-[[2-(메틸아미노)-5-니트로-3-피리딜]아미노]-5-옥소-펜타노에이트(1.07g,

2.19mmol)를 100℃에서 6일 동안 가열했다(작은 규모로 수행한 경우와 비교하여 반응이 느림). 1-프로판올을 증발시키고, EtOAc를 첨가했다. 유기 상을 염수로 세척하고, 황산마그네슘으로 건조시키고, 농축시켰다. 조 물질을 플래시 크로마토그래피(SiO₂, 12g, 석유 에테르/EtOAc 0-100%)에 의해 정제하여 벤질 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(3-메틸-6-니트로-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일)부타노에이트(280mg, 27% 수율)를 수득했다. HPLC 순도: 90%; MS (ESI+) m/z= 470 [M+H]⁺.

[0738] (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(3-메틸-6-니트로-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일)부탄산(화합물 48-5)

[0739] 물(0.2mL)을 함유한 테트라하이드로푸란(1.20mL)/메탄올(1.20mL) 중의 벤질 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(3-메틸-6-니트로-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일)부타노에이트(0.280g, 0.596mmol)의 용액에 LiOH·H₂O(0.0425g, 1.01mmol)를 첨가했다. 반응물을 2시간 동안 실온에서 교반했다. EtOAc 및 5% 시트르산을 첨가하고, 상을 분리시켰다. 유기 상을 황산마그네슘으로 건조시키고, 여과하고, 용매를 증발시켜 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(3-메틸-6-니트로-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일)부탄산(0.240g)을 수득했다. 이 물질은 추가 정제 없이 다음 단계로 제공했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z= 380 [M+H]⁺.

[0740] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(3-메틸-6-니트로-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(화합물 48-6)

[0741] N,N-디메틸포름아미드(1.50mL) 중의 (2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(3-메틸-6-니트로-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일)부탄산(0.240g, 0.633mmol)의 용액에 에틸 (2S)-2-아미노-4-메틸-펜타노에이트;하이드로클로라이드(0.124g, 0.633mmol) 및 HATU(0.289g, 0.759mmol), 이어서 N,N-디이소프로필에틸아민(0.204g, 1.58mmol)을 첨가했다. 이어서, 반응물을 실온에서 밤새 교반했다. EtOAc를 첨가하고, 유기 상을 염수(3배)로 세척하고, MgSO₄로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 조 물질을 플래시 크로마토그래피(SiO₂, 석유 에테르/EtOAc 0-100%)에 의해 정제하여 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(3-메틸-6-니트로-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(0.340g)를 수득했다. HPLC 순도: 90%; MS (ESI+) m/z= 521 [M+H]⁺.

[0742] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-4-(6-아미노-3-메틸-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(화합물 48-7)

[0743] 에탄올(20.0mL) 중의 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)-4-(3-메틸-6-니트로-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(0.340g, 0.653mmol) 및 Pd/C 10%(0.0695g, 0.653mmol)의 혼합물을 H₂(대기압)하에 밤새 교반했다. 촉매를 여과하고, 용매를 증발시켜 표제 화합물 에틸 (2S)-2-[[(2S)-4-(6-아미노-3-메틸-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(0.273g, 85% 수율)를 투명한 점착성 오일로서 수득했다. 이 물질은 추가 정제 없이 다음 단계로 제공했다. HPLC 순도: 90%; MS (ESI+) m/z= 491 [M+H]⁺.

[0744] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-4-[6-[비스(2-클로로에틸)아미노]-3-메틸-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(화합물 48-8)

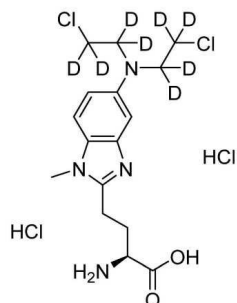
[0745] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-4-(6-아미노-3-메틸-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(170mg, 0.346mmol)에 클로로아세트알데히드(0.22mL, 물 중의 50% 용액) 및 TFA(0.12mL)를 실온에서 첨가했다. 이어서, 수소화시아노붕소나트륨(109mg, 1.73mmol)을 첨가하고, 반응물을 30분 동안 실온에서 교반하고, 이 시점에서 50% 전환이 관찰되었다. 또한, 상기 모든 시약의 동일한 양을 첨가하고, 반응물을 30분 동안 추가로 교반했다. 휘발물을 진공하에 증발시켰다. 조 생성물을 에틸 아세테이트에 용해시키고, 포화 탄산나트륨 수용액, 염수로 세척하고, 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하고 농축시켰다. 조 물질을 플래시 크로마토그래피(12g 실리카 컬럼, DCM 중의 70-90% MeOH)에 의해 정제하여 표제 화합물 에틸 (2S)-2-[[(2S)-4-[6-[비스(2-클로로에틸)아미노]-3-메틸-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(75mg, 35% 수율)를 농후한 무색 오일로서 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z= 615 [M+H]⁺.

[0746] 에틸 (2S)-2-[[(2S)-2-아미노-4-[6-[비스(2-클로로에틸)아미노]-3-메틸-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트;디-2,2,2-트리플루오로아세트산(실시예 화합물 48)

[0747] DCM(2mL) 중의 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-[6-[비스(2-클로로에틸)아미노]-3-메틸-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(화합물 48-8)(35mg, 0.057mmol)의 용액에 5℃에서 TFA(0.1mL)를 첨가했다. 반응물을 5℃에서 30분 동안 교반한 후, 실온으로 가온되도록 했다. 이어서, 추가의 TFA(0.2mL)를 첨가하고, 반응물을 3시간 동안 실온에서 교반했다. 조 물질을 역상 산성 예비 HPLC(10-90% 아세토니트릴, 물 중의 0.1% TFA)에 의해 정제했다. 순수한 분획을 농축시켜 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[6-[비스(2-클로로에틸)아미노]-3-메틸-이미다조[4,5-b]피리딘-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디-2,2,2-트리플루오로아세트산(실시예 화합물 48)(11.3mg, 39% 수율)을 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) m/z= 515 [M+H]⁺.

[0748] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 9.04 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.57 - 8.26 (m, 3H), 8.10 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 4.38 - 4.30 (m, 1H), 4.12 - 4.08 (m, 2H), 4.05 - 4.02 (m, 1H), 3.81 - 3.73 (m, 11H), 3.13 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 2.39 - 2.22 (m, 2H), 1.77 - 1.67 (m, 1H), 1.65 - 1.52 (m, 2H), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.93 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.89 (d, J = 6.5 Hz, 3H).

[0749] 실시예 49: (2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로-1,1,2,2-테트라듀테리오-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부탄산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 49)



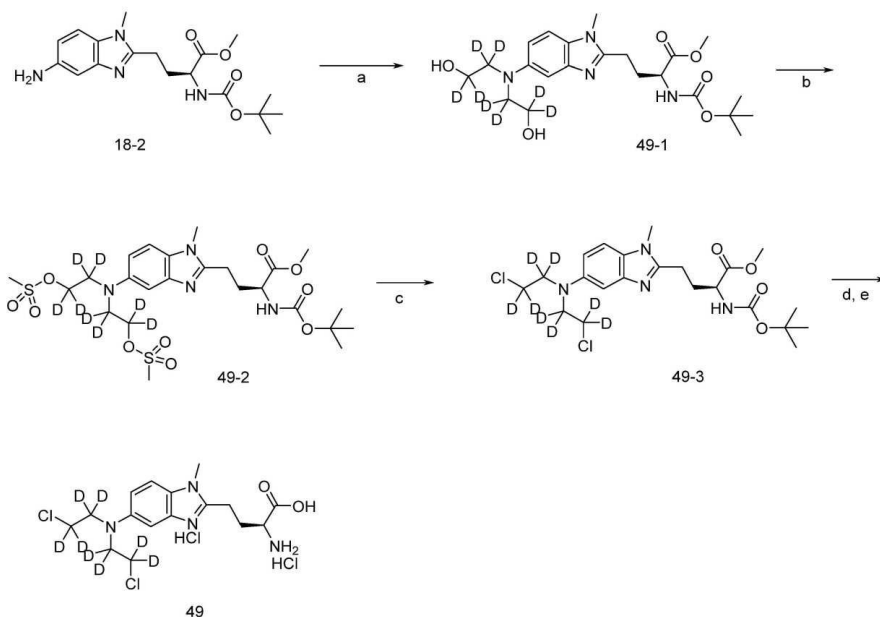
[0750]

[0751] 실시예 49는 아래의 반응식 15에 따라 합성했다:

[0752] 반응식 15

[0753] 반응식 15. 시약 및 조건: a) 2-브로모에탄올-d₄, KI, CaCO₃, 1,4-디옥산/물, 90℃, 17시간; b) 메실 클로라이드, 트리에틸아민, 실온, 1시간; c) LiCl, DMF, 60℃, 2시간; d) LiOH · H₂O, 1,4-디옥산, 50℃, 20분; e) 1,4-디옥산 중의 HCl, DCM, 실온, 1시간.

[0754] [반응식 15]



[0755]

[0756] 메틸 (2S)-4-[5-[비스(1,1,2,2-테트라듀테리오-2-하이드록시-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(화합물 49-1)

[0757] 밀폐된 반응 튜브에서 1,4-디옥산(1.00mL)/물(0.500mL) 혼합물 중의 메틸 (2S)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(화합물 18-2)(50mg, 0.138mmol)의 용액에 CaCO_3 (21.5mg, 0.214mmol) 및 촉매량의 KI(5.1mg, 0.0306mmol), 이어서 2-브로모에탄올-d4(39.5mg, 0.306mmol)를 첨가했다. 반응물을 90℃에서 17시간 동안 가열한 후, 혼합물을 아세트니트릴로 희석하고, 50mM NH_4HCO_3 를 함유한 물 중의 10 내지 80% MeCN으로 용출시키는 XBridge 컬럼 상에서 예비 HPLC에 의해 정제했다. 표제 화합물(49-1)을 최대 19%의 모노알킬화 및 2%의 과알킬화 부산물(29mg)을 함유하는 백색 고체로서 수득했다. MS (ESI+) m/z =459 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0758] 메틸 (2S)-4-[5-[비스(1,1,2,2-테트라듀테리오-2-메틸설포닐옥시-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(화합물 49-2)

[0759] 메틸 (2S)-4-[5-[비스(1,1,2,2-테트라듀테리오-2-하이드록시-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(29mg, 0.06mmol)를 무수 디클로로메탄(1.00mL)에 용해시키고, 0℃로 냉각시켰다. 이어서, 트리에틸아민(20mg, 0.20mmol) 및 메실 클로라이드(0.0096mL, 0.124mmol)를 첨가하고, 혼합물을 완전히 전환될 때까지 실온에서 교반했다. 물을 첨가하고, DCM 상을 세척하고, 건조시켜 표제 화합물(49-2)을 갈색 오일성 조 생성물로 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에 사용했다(31mg). MS (ESI+) m/z =615 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0760] 메틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로-1,1,2,2-테트라듀테리오-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(화합물 49-3)

[0761] 메틸 (2S)-4-[5-[비스(1,1,2,2-테트라듀테리오-2-메틸설포닐옥시-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노에이트(21mg, 0.035mmol)를 무수 디메틸포름아미드(0.50mL)에 용해시키고, 이어서 LiCl(30mg, 0.70mmol)을 첨가하고, 혼합물을 완전히 전환될 때까지 60℃에서 교반했다. 혼합물을 석유 에테르 중의 50 내지 100% EtOAc를 사용하여 실리카 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 회백색의 오일성 생성물(14mg, 92% 수율)을 수득했다. HPLC 순도: 90%; MS (ESI+) m/z =495 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

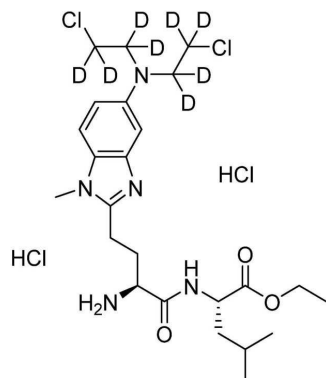
[0762] (2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로-1,1,2,2-테트라듀테리오-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부탄산 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 49)

[0763] 메틸 (2S)-4-[5-[비스(2-클로로-1,1,2,2-테트라듀테리오-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡

시카보닐아미노)부타노에이트(13mg, 0.026mmol)를 1,4-디옥산(1.0mL)에 용해시키고, 이어서 물(0.3mL) 및 LiOH·H₂O(26mg, 0.063mmol)를 첨가했다. 혼합물을 50℃에서 20분 동안 교반한 후, 물(2mL) 및 디클로로메탄(1mL)을 첨가하고, HCl 수용액으로 pH를 5-6으로 설정했다. 상을 분리하고, 유기 상을 물로 세척하고 건조시켰다. 건조된 유기 상에 1,4-디옥산(4mol/L) 중의 과량의 HCl을 첨가하고, 투명한 용액을 실온에서 30분 동안 교반했다. 혼합물을 농축 건조시켜 (2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로-1,1,2,2-테트라듀테리오-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부탄산 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 49)(6mg, 55% 수율)를 고체로서 수득했다. HPLC 순도: 97%; MS (ESI+) m/z=381 [M+H]⁺.

[0764]

실시예 50: 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로-1,1,2,2-테트라듀테리오-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 50)



[0765]

[0766]

실시예 50은 아래의 반응식 16에 따라 합성했다:

[0767]

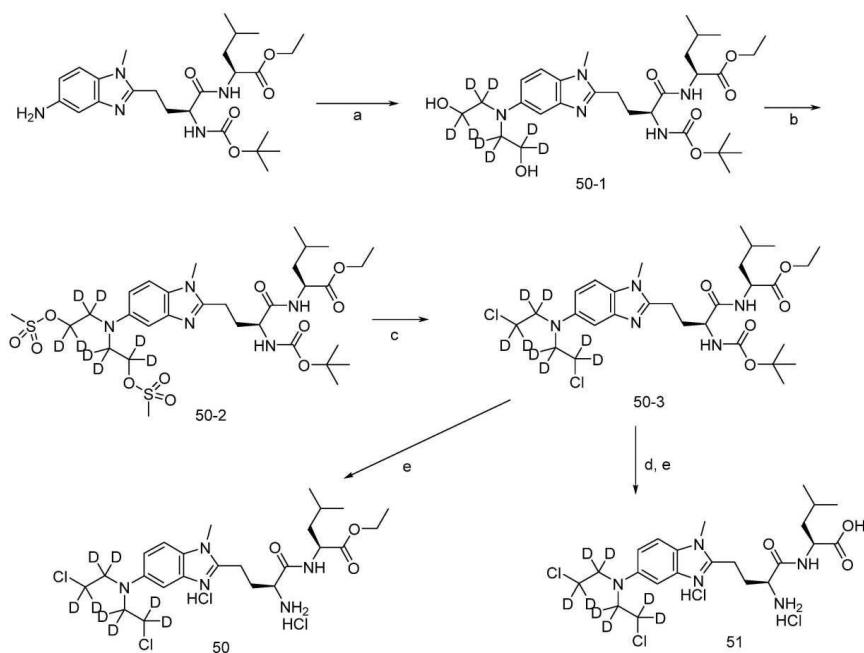
반응식 16

[0768]

반응식 16. 시약 및 조건: a) 2-브로모에탄올-d₄, KI, CaCO₃, 1,4-디옥산/물, 90℃, 17시간; b) 메실 클로라이드, 트리에틸아민, 실온, 1시간; c) LiCl, DMF, 60℃, 2시간; d) LiOH·H₂O, 1,4-디옥산, 50℃, 20분; e) 1,4-디옥산 중의 HCl, DCM, 실온, 1시간.

[0769]

[반응식 16]



[0770]

[0771]

에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(1,1,2,2-테트라듀테리오-2-하이드록시-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(화합물 50-1)

[0772] 표제 화합물(50-1)은 화합물 49-1의 합성에 대해 기재된 절차에 따라 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-(5-아미노-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일)-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 1에 대해 단계 2에 기재된 바와 같이 제조됨)로부터 제조했다(39mg, 65% 수율). HPLC 순도: 80%; MS (ESI+) $m/z=586$ $[M+H]^+$.

[0773] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(1,1,2,2-테트라듀테리오-2-메틸설포닐옥시-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(화합물 50-2)

[0774] 표제 화합물(50-2)은 화합물 49-2의 합성에 대해 기재된 절차에 따라 화합물 50-1로부터 제조했다(26mg, 71% 수율). MS (ESI+) $m/z=742$ $[M+H]^+$.

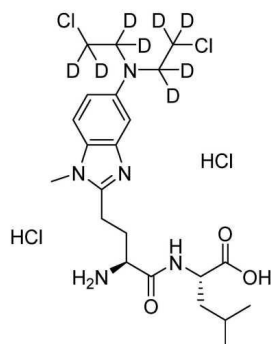
[0775] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-4-[5-[비스(2-클로로-1,1,2,2-테트라듀테리오-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]-2-(3급-부톡시카보닐아미노)부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(화합물 50-3)

[0776] 표제 화합물(50-3)은 화합물 49-3의 합성에 대해 기재된 절차에 따라 화합물 50-2로부터 제조했다(20mg, 92% 수율). HPLC 순도: 90%; MS (ESI+) $m/z=622$ $[M+H]^+$.

[0777] 에틸 (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로-1,1,2,2-테트라듀테리오-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜타노에이트(실시예 화합물 50)

[0778] 표제 화합물(실시예 화합물 50)은 약간 변형된 조건(용매로서 DCM, 반응 시간으로서 1시간)으로 실시예 화합물 1의 합성의 단계 5에 기재된 절차에 따라 화합물 50-3으로부터 제조했다(9mg, 4% 수율). HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) $m/z=522$ $[M+H]^+$.

[0779] 실시예 51: (2S)-2-[[[(2S)-2-아미노-4-[5-[비스(2-클로로-1,1,2,2-테트라듀테리오-에틸)아미노]-1-메틸-벤즈이미다졸-2-일]부타노일]아미노]-4-메틸-펜탄산; 디하이드로클로라이드(실시예 화합물 51)



[0780]

[0781] 실시예 51은 반응식 16에 따라 합성했다. 이 화합물은 실시예 화합물 49의 합성의 마지막 단계에 기재된 절차에 따라 화합물 50-3으로부터 제조했다(8mg, 68% 수율). HPLC 순도: 95%; MS (ESI+) $m/z=494$ $[M+H]^+$.

[0782] 생물학적 실시예:

[0783] 생물학적 실시예 1 - MM.1S 세포 생존력 검정에서 시험관내 세포독성 효능의 평가:

[0784] 방법: MM.1S 세포를 $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 페니실린/스트렙토마이신, 10% 열 불활성화 FBS, 0.1mM 나트륨 피루베이트, $1 \times \text{MEM NEAA}$ (ThermoFisher) 및 1mM HEPES가 보충된 RPMI 배지 1640(IX)에서 배양했다. 세포는 시험 화합물에 노출하기 전에 로드 단계에 도달하도록 성장시켰다.

[0785] 시험 화합물(실시예 화합물 1 내지 36, 38 내지 41, 45 내지 48) 및 비교 화합물(벤다무스틴, 부설판, 멜팔란, 클로람부실 및 4-하이드로퍼옥시 사이클로포스파미드)을 100% DMSO에 용해시키고, 384 검정 플레이트에 첨가했다. 모든 웰에서 동일한 최종 DMSO 농도(0.2%)를 유지하기 위해 추가의 DMSO를 첨가했다. 100,000세포/mL 농도로 $25 \mu\text{L}$ 세포 현탁액을 각 웰에 첨가했다. 세포를 37°C 에서 72시간 동안 CO_2 인큐베이터에서 배양했다. 플레이트를 30분 동안 실온으로 평형화시킨 후, 모든 웰에 $20 \mu\text{L}$ CellTiter-Glo[®] 2.0(Promega) 시약을 첨가했다. 이어서, 플레이트를 20분 동안 안정화시킨 후, 엔비전(Envision) 플레이트 판독기에서 발광(방출 필터 700nm)을 기록했다. 플레이트 판독기 데이터는 음성 대조군(무처리) 대 양성 대조군($400 \mu\text{M}$ 클로르프로마진으로 72시간

동안 처리된 세포)으로 정규화하고, IC_{50} 은 4 파라미터 로지스틱 회귀 곡선 피팅으로부터 유도되었다.

[0786] 결과: 시험 화합물은 MM.1S 세포 증식을 억제하고 시험관내에서 세포독성을 유발하는 능력에 대해 평가했다. 용량 반응은 실험으로부터 추출할 수 있었고, 하기 표 1에 제시되어 있다. 시험 화합물은 MM.1S 세포에 대해 우수한 세포독성을 나타냈다. 실시예 화합물 1 내지 16, 21 내지 32, 34 내지 36, 38 및 45 내지 48은 이 검정에서 벤다무스틴, 부설판, 멜팔란, 클로람부실 및 4-하이드로피옥시 사이클로포스파미드보다 더욱 세포독성인 것으로 밝혀졌다.

[0787] [표 1]

MM.1S 세포에서 세포독성

실시예 번호	MM.1S IC_{50} (μM)	MM.1S, IC_{50} , st dev (μM)	MM.1S, n
1	0.0068	0.0022	20
2	0.0078	0.0029	7
3	0.0068	0.0012	2
4	0.0066	0.0017	2
5	0.0226	0.0079	2
6	0.0987	0.0381	4
7	0.0229	0.0108	2
8	0.0144	0.0031	2
9	0.0225	0.0025	2
10	0.0192	0.0037	8
11	0.0147	0.0011	2
12	0.0125	0.0045	2
13	0.049	0.0249	7
14	0.0087	0.0012	2
15	0.0091	0.0007	2
16	0.025	0.0076	2
17	39.967	4.5325	2
18	20.244	20.968	14
19	4.0199	0.6051	2
20	5.753	1.149	6
21	0.0266	0.0016	3
22	0.0313	0.0018	2
23	0.0418	0.0017	2
24	0.1561	0.0247	2
25	0.0185	0.002	3
26	0.0068	0.0019	2
27	0.0082	0.0014	2

[0788]

28	0.352	-	1
29	0.0014	-	1
30	0.0397	0.0081	4
31	0.181	0.008	2
32	0.0143	0.002	3
33	79.872	13.613	2
34	0.0683	0.0087	8
35	0.0867	0.0087	2
36	0.0575	0.0047	2
38	0.052	0.0158	7
39	>1.996	-	1
40	7.177	0.709	2
41	16.507	4.3134	2
45	0.512	0.1113	3
46	0.0591	0.0137	3
47	1.7124	0.7595	3
48	0.205	0.0262	2
벤다무스틴	23.963	6.7392	12
멜팔란	4.2451	0.7017	10
부셀판	180.3	-	1
클로람부실	6.873	6.4333	2
4-하이드로퍼옥시 사이클로포스파미드	7.2953	-	1

[0789]

[0790]

생물학적 실시예 2 - 혈액 세포주, 인간 말초 혈액 단핵 세포 및 정상 섬유아세포의 시험관내 세포독성의 평가:

[0791]

방법: 이러한 실험에 사용된 세포주는 하기 표 2에 나열되어 있다. 모든 세포는 RPMI 배지 1640(IX)에서 배양했다. 모든 배지는 10 μ g/ μ l 페니실린/스트렙토마이신, 10% 열 불활성화 FBS, 0.1mM 나트륨 피루베이트, 1 $\times$ MEM NEAA(ThermoFisher) 및 1mM HEPES가 보충되었다. DERL-2 세포는 더 높은 FBS(20%)를 갖고, 40ng/mL IL-2를 첨가했다. hPBMC를 해동시키고, 밤새 적응시키고, 이어서 4시간 동안 10 μ g/mL PHA-M 및 40ng/mL IL-2로 자극한 후, 시험 화합물에 노출시켰다. hPBMC를 제외한 모든 세포를 로그 단계에 도달하도록 성장시킨 후, 시험 화합물에 노출시켰다.

[0792] [표 2]

시험관내 세포독성 실험에 사용된 세포주

세포주 ID	설명
U937	조직구성 림프종
THP-1	급성 골수성 백혈병
DOHH-2	B 세포 림프종
HG-3	만성 림프구성 백혈병 (CLL)
SC-1	B 세포 림프종
SU-DHL-8	B-세포 비호지킨 림프종
톨레도	미만성 거대 B 세포 림프종
DERL-2	T 세포 림프종
SUP-T1	T 세포 림프종
AMO-1	다발성 골수종
EJM	다발성 골수종
KMS-12-BM	다발성 골수종
MM.1S	다발성 골수종
OPM-2	다발성 골수종
RPMI8226	다발성 골수종 (내성)
U266	다발성 골수종
SK-MM-1	형질 세포 백혈병
hPBMC	인간 말초 혈액 단핵 세포
BJ	섬유아세포 (정상 세포)

[0793]

[0794]

시험 화합물을 100% DMSO에 용해시키고, 384 검정 플레이트에 첨가했다. 추가 DMSO를 첨가하여 모든 웰에서 동일한 최종 DMSO 농도(0.2%)를 유지시켰다. 100,000세포/mL 농도로 25 μ L 세포 현탁액을 각 웰에 첨가했다. 세포를 37°C의 CO₂ 인큐베이터에서 72시간 동안 배양했다. 플레이트를 30분 동안 실온으로 평형화시킨 후, 모든 웰에 20 μ L CellTiter-Glo[®] 2.0(Promega) 시약을 첨가했다. 이어서, 플레이트를 20분 동안 안정화시킨 후, 엔비전 플레이트 판독기에서 발광(Em 필터 700nm)을 기록했다. 플레이트 판독기 데이터를 음성 대조군(무처리) 대 양성 대조군(400 μ M 클로르프로마진으로 72시간 동안 처리된 세포)으로 정규화하고, IC₅₀은 4개 파라미터 로지스틱 회귀 곡선 피팅으로부터 유도되었다.

[0795]

결과: 시험 화합물은 혈액학적 기원의 몇몇 상이한 세포주를 사용하여 시험관내에서 세포 증식을 억제하는 능력에 대해 평가했다. 또한, 세포독성은 비악성 인간 말초 혈액 단핵 세포(hPBMC) 및 섬유아세포(BJ)에서 평가했다. 표 3은 시험된 모든 화합물에 대한 실험으로부터 추출된 용량 반응을 나타낸다. 표에서, 결과는 세포독성 IC₅₀ μ M +/- 표준편차(시험의 수)로 제공된다. nd= 값이 결정되지 않음.

[0796]

표 3a 및 b. 정상 및 암성 세포주에서 시험 화합물의 세포독성

[0797] [표 3a]

화합물:	1	2	10	13
THP-1	0.016 +/- 0 (1)	nd	nd	nd
U937	0.0098 +/- 0.0025 (4)	0.0142 +/- 0.0042 (2)	0.0194 +/- 0.0049 (2)	nd
AMO-1	0.0497 +/- 0.0196 (3)	nd	nd	0.9646 +/- 0.2196 (3)
EJM	0.0271 +/- 0.0059 (2)	nd	nd	0.356 +/- 0.0451 (2)
KMS-12-BM	0.0079 +/- 0.002 (2)	nd	nd	0.1373 +/- 0.0142 (2)
MM.1S	0.0068 +/- 0.0022 (20)	0.0078 +/- 0.0029 (7)	0.0192 +/- 0.0037 (8)	0.049 +/- 0.0249 (7)
OPM-2	0.1734 +/- 0.0576 (2)	nd	nd	2.1102 +/- 0.6334 (2)
RPMI-8226	0.0906 +/- 0.0549 (6)	0.0415 +/- 0.004 (2)	0.3352 +/- 0.0102 (2)	1.7213 +/- 0.391 (2)
SK-MM-1	0.0347 +/- 0.024 (5)	0.0383 +/- 0.0316 (3)	0.0624 +/- 0.0288 (2)	nd

[0798]

U266	0.0214 +/- 0.0085 (2)	nd	nd	0.4002 +/- 0.136 (2)
DOHH-2	0.0042 +/- 0.0005 (4)	0.0053 +/- 0.0007 (2)	0.0639 +/- 0.0237 (2)	nd
HG-3	0.0257 +/- 0.0052 (4)	0.0257 +/- 0.0103 (2)	0.0713 +/- 0.0069 (2)	nd
SC-1	0.0133 +/- 0.0051 (5)	0.021 +/- 0.0044 (2)	0.1686 +/- 0.0874 (2)	0.1344 +/- 0 (1)
SU-DHL-8	0.0199 +/- 0.0032 (4)	0.0204 +/- 0.0009 (2)	0.0221 +/- 0.0054 (2)	nd
틀레도	0.0045 +/- 0.0026 (4)	0.0066 +/- 0.0021 (2)	0.0085 +/- 0.0003 (2)	nd
DERL-2	0.006 +/- 0.0007 (3)	0.0078 +/- 0.0011 (3)	0.0226 +/- 0.0058 (3)	nd
SUP-T1	0.0127 +/- 0.004 (3)	0.0178 +/- 0.0053 (3)	0.0356 +/- 0.0076 (3)	nd
BJ	1.0745 +/- 0 (1)	nd	nd	>1.996 +/- (1)
hPBMC	0.0054 +/- 0.0021 (2)	0.0075 +/- 0.002 (2)	0.0264 +/- 0.0097 (2)	nd

[0799]

[0800] [표 3b]

화합물:	30	34	38	벤다무스틴	멜팔란
THP-1	nd	nd	nd	40.204 +/- 28.995 (2)	4.3058 +/-0 (1)
U937	nd	0.3966 +/- 0.0382 (2)	0.0253 +/- 0.0008 (2)	27.061 +/- 7.409 (3)	nd
AMO-1	0.6528 +/- 0.0666 (3)	0.7576 +/- 0.1497 (3)	nd	56.977 +/- 8.7068 (4)	8.3424 +/- 1.8996 (3)
EJM	0.1734 +/- 0.0191 (2)	0.6368 +/- 0.0192 (2)	nd	64.64 +/- 2.4078 (3)	40.017 +/- 1.2365 (2)
KMS-12- BM	0.045 +/- 0.0164 (2)	0.1046 +/- 0.0047 (2)	nd	27.469 +/- 6.1077 (3)	9.829 +/- 1.1877 (2)
MM.1S	0.0397 +/- 0.0081 (4)	0.0683 +/- 0.0087 (8)	0.052 +/- 0.0158 (7)	23.963 +/- 6.7392 (12)	4.2451 +/- 0.7017 (10)
OPM-2	0.3218 +/- 0.0557 (2)	0.9609 +/- 0.336 (2)	nd	81.878 +/- 7.837 (3)	10.176 +/- 1.7559 (2)
RPMI-8226	0.4924 +/- 0.0701 (2)	1.4476 +/- 0.2263 (2)	0.6764 +/- 0.1445 (2)	111.12 +/- 34.705 (10)	32.486 +/- 3.8841 (2)

[0801]

SK-MM-1	nd	0.6039 +/- 0.4592 (3)	0.1752 +/- 0.0525 (2)	73.498 +/- 21.704 (3)	nd
U266	0.1314 +/- 0.0024 (2)	0.2661 +/- 0.1386 (2)	nd	83 +/- 41.993 (3)	18.85 +/- 3.4229 (2)
DOHH-2	nd	0.5428 +/- 0.1497 (2)	0.0281 +/- 0.0099 (2)	10.701 +/- 5.9963 (2)	nd
HG-3	nd	0.8877 +/- 0.1628 (2)	0.0498 +/- 0.0236 (2)	25.787 +/- 13.589 (2)	nd
SC-1	0.0537 +/-0 (1)	1.0624 +/- 0.2814 (3)	0.0772 +/- 0.0116 (2)	25.141 +/- 7.3961 (3)	8.6422 +/-0 (1)
SU-DHL-8	nd	0.2022 +/- 0.1099 (2)	0.0714 +/- 0.0244 (2)	14.264 +/- 3.6275 (3)	nd
틀레도	nd	0.3276 +/- 0.0368 (2)	0.0162 +/- 0.0047 (2)	12.519 +/- 6.2427 (3)	nd
DERL-2	nd	nd	nd	21.071 +/- 3.1768 (3)	1.8822 +/- 0.3506 (3)
SUP-T1	nd	nd	nd	33.527 +/- 11.372 (3)	2.9645 +/- 0.371 (3)
BJ	>1.996 +/- (1)	>1.996 +/- (1)	nd	>598.8 +/- (2)	103.64 +/- 38.599 (2)
hPBMC	nd	nd	nd	15.803 +/- 6.6175 (2)	3.6018 +/- 1.8923 (2)

[0802]

[0803] 본 발명의 화합물은 종래 기술의 2개 화합물보다 일관되게 더욱 세포독성인 것으로 나타났다.

[0804] 생물학적 실시예 3 - 세포 보유/유출 실시예 18(실시예 1로 처리 후), 벤다무스틴 및 멜팔란의 평가:

[0805] 방법: 2×10^6 세포/mL로 MM.1S 세포를 96웰 플레이트에 웰당 250 μ L로 씨딩했다. 세포를 시험 화합물의 존재하에 5분, 15분, 60분 동안 배양한 후, +4°C에서 5분 동안 원심분리하여 세포를 펠렛화했다. 세포 배지는 즉시 제 2 플레이트로 수거하고, 추가 분석까지 -80°C에서 저장했다. 펠렛화된 세포는 빙냉 PBS로 1회 세척한 후, 추가 분석까지 -80°C에서 저장했다.

[0806] 세포를 용해시키고, 내부 표준을 함유하는 아세트오니트릴:디메틸포름아미드(9:1)를 사용하여 배지 중의 단백질을 침전시켰다. 샘플을 원심분리하고, 상청액을 LC-MS/MS(ACQUITY UPLC-Xevo TQ-S micro)로 분석하여 화합물 농도를 결정했다.

[0807] 실시예 화합물 1, 벤다무스틴 및 멜팔란을 시험 화합물로서 사용했다.

[0808] **결과:** 결과는 도 1에 제시되어 있다. 도 1a는 벤다무스틴 및 실시예 화합물 1로부터 형성된 대사산물 화합물 (실시예 화합물 18)의 세포내 농도 및 세포외 농도를 나타낸다. 실시예 화합물 18은 실시예 화합물 1로 처리한 후, 세포 내부에서 급속하게 형성되고, 세포 외부의 배지에서는 낮은 수준으로 발견된다는 것을 알 수 있다. 이들 결과는 실시예 화합물 1의 가수분해가 세포 내부에서 발생되고 실시예 화합물 1의 대사산물이 세포 내에 유지되었음을 나타낸다. 벤다무스틴의 낮은 세포내 농도가 검출될 수 있고, 수준은 시간 경과에 따라 감소된다. 벤다무스틴의 세포외 농도는 상당히 높았고, 시간 경과에 따라 감소했다.

[0809] 도 1b에서, 실험의 시간 경과에 따라 멜팔란의 세포내 및 세포외 농도가 제시되어 있다. MM.1S 세포를 멜팔란으로 시험관내 처리 후, 멜팔란의 낮은 세포내 농도가 검출되었다. 멜팔란의 세포외 농도는 실험 전반에 걸쳐 높고 일정했다.

[0810] **생물학적 실시예 4 - 닭 배아 이중이식 모델에서 시험 화합물 세포독성의 생체내 평가:**

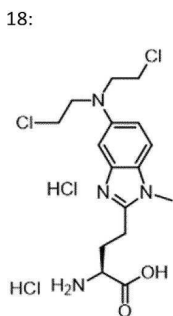
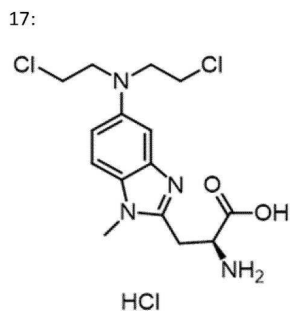
[0811] **방법:** 수정된 백색 레건(White Leghorn) 난자의 접종은 9일째(수정 후)에 3×10^6 SU-DHL-4 종양 세포로 수행했다. 생존 가능한 난자에, 100 μ L의 실시예 화합물 1(8.4 μ M(0.008mg/kg), 33.5 μ M(0.033mg/kg), 167.5 μ M(0.164mg/kg)), 벤다무스틴(8.4 μ M(0.005mg/kg), 33.5 μ M(0.02mg/kg), 167.5 μ M(0.1mg/kg)) 또는 비히클을 11일, 13일, 15일 및 17일째에 주사했다. 18일째에, 종양을 제거하고 칭량했다.

[0812] **결과:** 실시예 화합물 1의 경우, 종양 중량에 대한 용량 의존적 효과가 명백했다(도 2). 실시예 화합물 1의 경우, 비히클과 비교한 종양 감소는 8.4 μ M, 33.5 μ M 및 167.5 μ M에서 각각 38%, 70% 및 82%였다. 벤다무스틴의 경우, 비히클과 비교한 종양 감소는 33.5 μ M 및 167.5 μ M에서만 명백했고, 각각 30% 및 76% 감소였다. 따라서, 실시예 화합물 1은 이 모델에서 강력한 종양 세포독성을 나타낸다.

[0813] **생물학적 실시예 5 - PDC 화합물 및 대사산물의 세포 체류/유출의 평가:**

[0814] **방법:** 생물학적 실시예 3에 기재된 방법.

[0815] 실시예 화합물 1, 2, 3, 4, 6, 7 및 10을 조사했다. 세포내 대사산물은 시험된 모든 화합물로부터 형성된다. 세포 처리에 사용된 화합물은 에스테르-가수분해 화합물(여기서 대사산물 A라고 함) 및 아미드-가수분해 화합물(대사산물 B라고 함)로 대사되었다. 실시예 화합물 구조 및 각각의 화합물에 대한 2개 대사산물의 구조는 표 4에 제시되어 있다. 시험된 조건하에 형성된 대사산물 B는 실시예 17 및 18과 같은 구조를 갖는 화합물이었다:

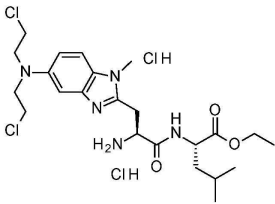
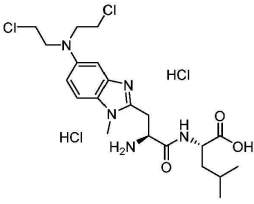
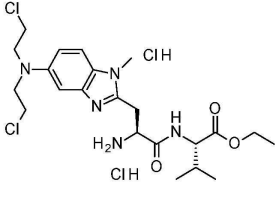
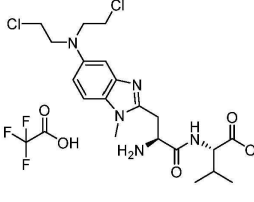
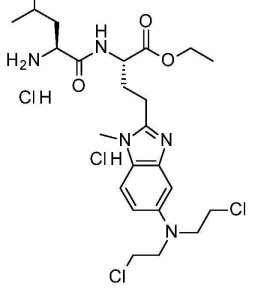
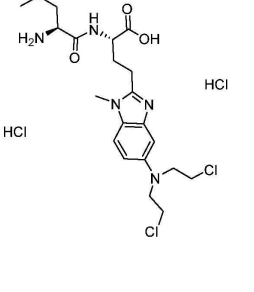
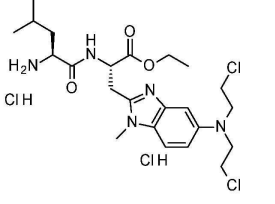
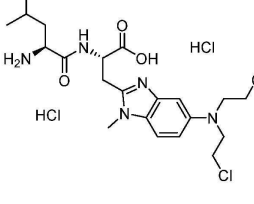


[0816]

[0817] [표 4]

실시예	구조	대사산물 A	대사산물 B
1	1	20	18
2	2	39	18
3	3	19	18

[0818]

4	4	44	17
			
6	6	42	17
			
7	7	37	18
			
10	10	43	17
			

대사산물의 세포내 농도는 시간 경과에 따라 서서히 감소했다. 대사산물의 세포외 농도는 세포 외부의 배지에 서 거의 검출할 수 없거나, 또는 검출할 수 없었다. 이러한 결과는 실시예 화합물의 가수분해가 세포 내부에서 발생했고, 실시예 화합물의 대사산물이 세포 내에 유지되었음을 나타낸다.

생물학적 실시예 6 - 시험 화합물에 의한 직접 DNA 손상의 평가:

방법: DNA는 문헌[참조: Furda et al., Methods Mol Biol, 2012]에 기재된 프로토콜에 따라 QIAGEN 게놈 팁 20/G에 의해 MM.1S 세포로부터 제조했다. 1 μ g의 DNA를 37°C에서 30분 동안 0.25 μ M 화합물로 처리했다. DMSO를 대조군 처리로서 사용했다. 20ng의 처리된 DNA를 퓨전 핫 스타트(Phusion Hot Start) II 고충실도 PCR 마스터 믹스(Thermo Scientific)를 사용하여 PCR 증폭시키고, HPRT에 지시된 프라이머 또는 미토콘드리아 DNA(mtDNA)에 지시된 프라이머를 사용하여 각각 10.4 또는 8.9kb 단편을 생성했다. PCR 반응물은 1% 아가로스 겔 상에서 분리하고, ChemiDoc™ MP 이미징 시스템(BioRad)으로 가시화했다. 실시예 화합물 1, 2 및 38을 조사했고, 화합물 1의 대사산물인 화합물 18 및 20도 조사했다. 그들을 벤다무스틴, 멜팔란 및 DMSO 대조군과 비교했다. HPRT 프라이머에 의한 화합물 1, 2, 18 및 20의 결과는 도 4(A)에 제시되어 있고; mtDNA 프라이머에 의한 결과는 도 4(B)에 제시되어 있다. HPRT 프라이머 및 mtDNA 프라이머를 사용한 화합물 18 및 38의 결과는 도 4(C)에 제시되어 있다.

결과: 도 4에서, 멜팔란 및 벤다무스틴은 시험된 농도에서 핵 및 미토콘드리아 DNA 모두에 대한 DNA 손상에 전혀 영향을 미치지 않거나, 매우 미미한 영향을 미쳤음을 알 수 있다. 실시예 화합물 1 및 2는, 겔에서 PCR 밴드가 검출될 수 없었다는 사실에 의해 알 수 있는 바와 같이, 핵 및 미토콘드리아 DNA 모두에 대해 강력한 DNA 손

상 효과를 가졌다. 실시예 화합물 18 및 38은 핵과 미토콘드리아 DNA 모두를 효과적으로 손상시켰고, 약한 PCR 밴드만을 검출할 수 있었다. 실시예 화합물 20도 DNA 손상 효과를 가졌지만, 실시예 화합물 1, 2 및 18과 비교하여 그 정도는 낮았고, 벤다무스틴 또는 멜팔란보다는 높았다.

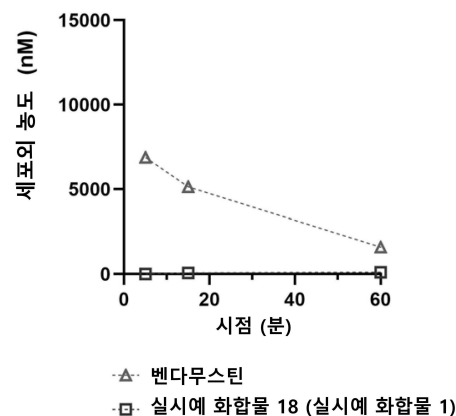
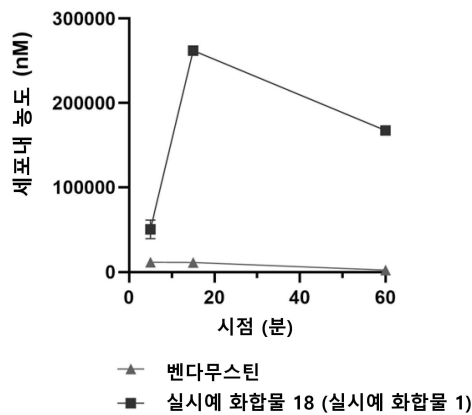
[0824] **생물학적 실시예 7 - 시험 화합물에 의한 DNA 단편화의 평가**

[0825] **방법:** 1×10^6 MM.1S 세포(CRL-2974, ATCC)를 0.006, 0.06, 0.6 또는 $6 \mu\text{M}$ 의 실시예 화합물 1 또는 벤다무스틴으로 24시간 동안 처리했다. 배양 후, 세포를 PBS(10010-015, Gibco)로 세척하고, 유세포 분석 고정화 완충제(FC004, R&D Systems)에서 10분 동안 고정하고, -20°C 에서 70% 에탄올에 밤새 저장했다. 테옥시티미딘 유사체(BrdUTP)가 실험에 존재하였고, DNA 절단 부위를 표지하는 역할을 했다. 다음 날, 세포를 세척하고, 제조업체의 프로토콜(A23210, Invitrogen)에 따라 APO-BrdUTM TUNEL 검정 키트를 사용하여 염색하고, 이어서 BD FACSCantoTM II를 사용하여 분석했다. TUNEL 양성 세포의 백분율은 단편화된 DNA를 갖는 세포의 백분율을 나타낸다.

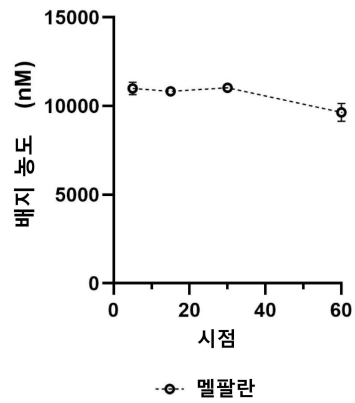
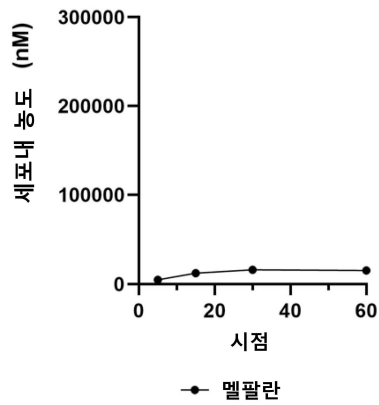
[0826] **결과:** 24시간 배양에서 DNA 손상에 대한 실시예 화합물 1 및 벤다무스틴의 용량 반응 효과는 도 5a에 제시되어 있다. 모든 데이터는 SD를 포함한 평균으로 표시되었다($n = 2$). 실시예 화합물 1에 대한 24시간 노출은 용량 의존적 방식으로 DNA 손상을 유도한 반면, DNA 손상에 대한 벤다무스틴의 명백한 효과는 24시간 배양시 발견되지 않았다. $0.6 \mu\text{M}$ 시험 화합물 또는 벤다무스틴($n=2$)의 24시간 처리 후의 Alexa fluor 488 강도의 대표적인 FACS 히스토그램은 도 5(B)에 제시되어 있다. FACS 히스토그램의 상부 쌍은 실시예 화합물 1에 대한 것이고; 중앙 쌍은 벤다무스틴에 대한 것이며, 하부 쌍은 DMSO 대조군에 대한 것이다. 주목할 것으로, $0.6 \mu\text{M}$ 실시예 화합물 1로 24시간 동안 처리하면, 시험된 세포의 90% 초과에서 DNA 절단이 유발되었지만, 벤다무스틴의 경우에는 그렇지 않았다. 실시예 화합물 1이 DNA 손상을 유발하는 데 더욱 강력하다.

도면

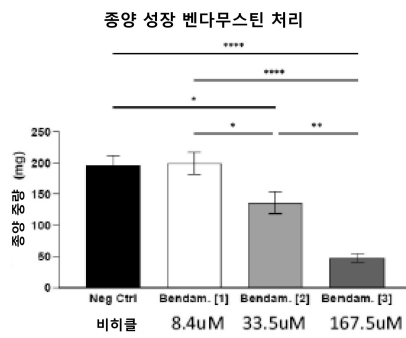
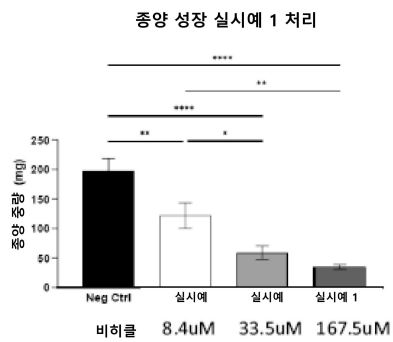
도면 1a



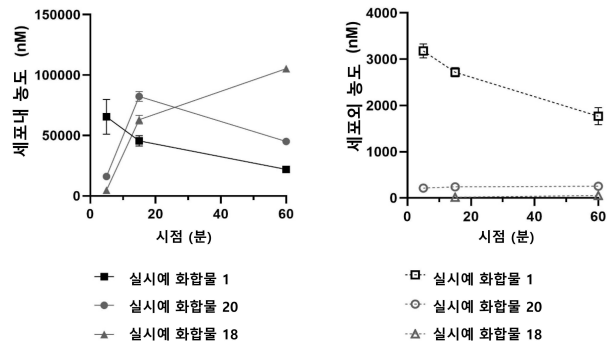
도면1b



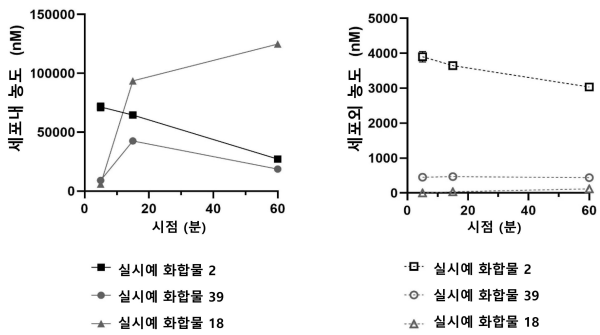
도면2



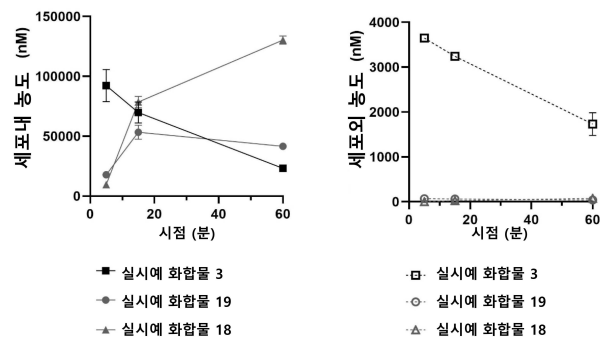
도면3a



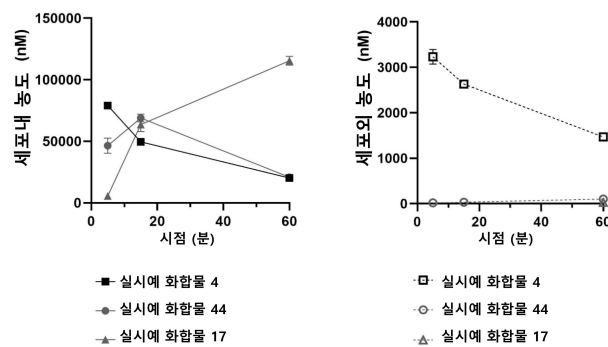
도면3b



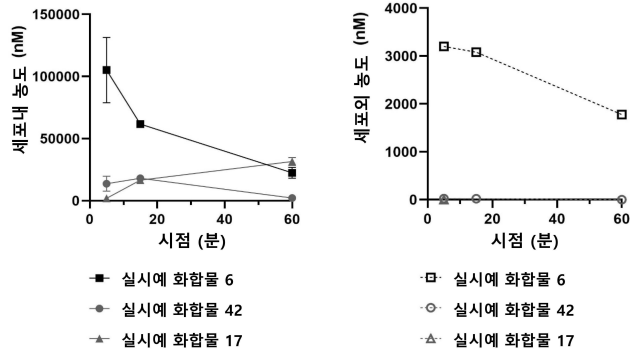
도면3c



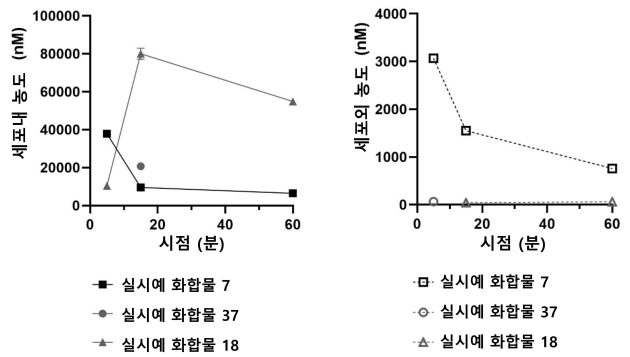
도면3d



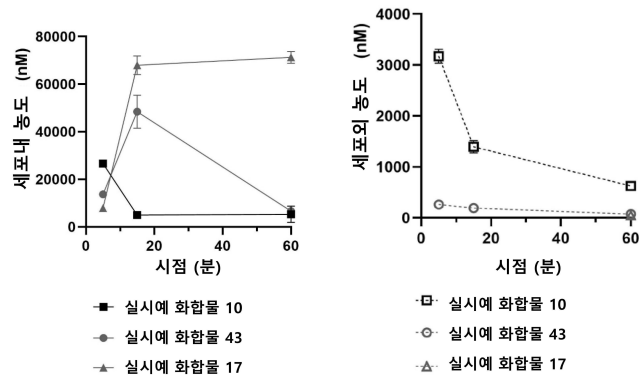
도면3e



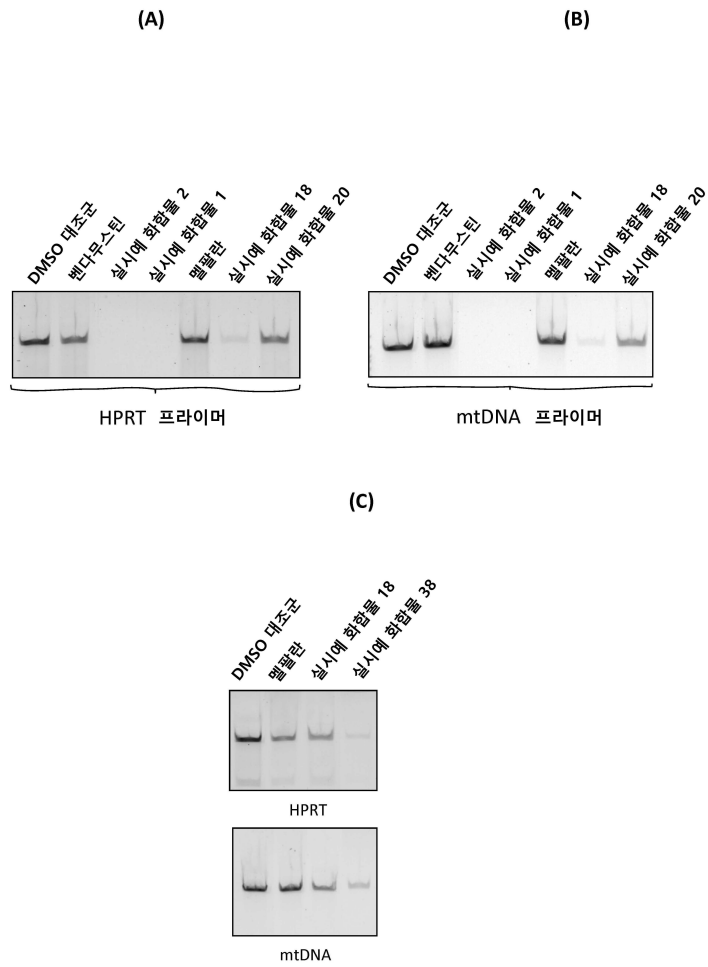
도면3f



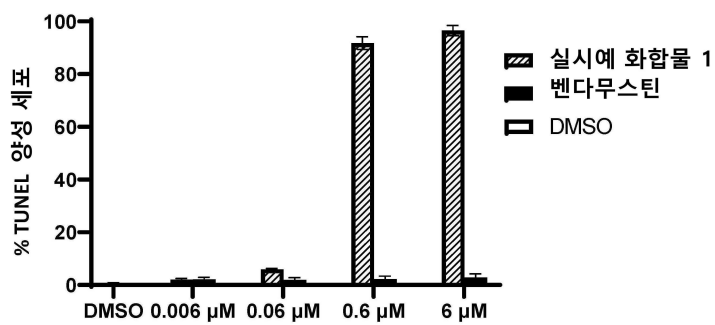
도면3g



도면4



도면5a



도면5b

