



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0110872
(43) 공개일자 2022년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/519 (2006.01) *A61K 31/436* (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 31/519 (2013.01)
A61K 31/436 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7026364 (분할)
 (22) 출원일자(국제) 2016년03월18일
 심사청구일자 없음
 (62) 원출원 특허 10-2017-7025465
 원출원일자(국제) 2016년03월18일
 심사청구일자 2021년03월18일

(85) 번역문제출일자 2022년07월28일
 (86) 국제출원번호 PCT/CN2016/000149
 (87) 국제공개번호 WO 2016/145935
 국제공개일자 2016년09월22일

(30) 우선권주장
 201510119944.5 2015년03월19일 중국(CN)

(71) 출원인
제지양 디티알엠 바이오파마 컴퍼니 리미티드
 중국 311422 저장 항저우 푸양 디스트릭트 푸셴
 로드 넘버 9 인후 이노베이션 센터 빌딩 6 플로어
 트웰프스 룸 1255

(72) 발명자
허, 웨이
 중국 200233 상하이 구이펑 로드 #471 빌딩 6 플
 로어 4 히순 파마슈티칼즈

(74) 대리인
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **암 및 자가면역 질환을 치료하기 위한 최적화된 조합 요법 및 그의 용도**

(57) 요약

신규한 일련의 다중-플루오로-치환된 피라졸로피리미딘 화합물 또는 염이 제공된다. 상기 화합물은 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제이다. 상기 화합물은 보다 양호한 키나제 억제 선택성 및 약동학적 성질을 갖는다. 상기 화합물의 제조 방법이 또한 제공된다. 상기 화합물을 또 다른 표적화된 약물 조성물 또는 또 다른 약물과 함께 포함하는 조합 요법이 또한 제공된다. 최적화된 조합 요법은, 단일 표적화된 약물에 비해 중양의 존재를 더 양호하게 억제하고 특정 중양을 완전히 소멸시킬 수 있는 상승작용 효과를 갖는다. 최적화된 조합 요법은 단일 표적화된 약물에 비해 약물 내성 및 중양의 암 재발을 더욱 양호하게 치료하고, 치료 주기를 단축시킨다. 본 발명은 또한 조합된 화합물 및 제약 제제에 관한 것이며, 상기 조합된 화합물은 활성 성분으로서 작용하고, 상기 제약 제제는 더 적은 용량에서 더욱 안전하고 상승작용 효과를 갖는다. 또한, 자가면역 질환 또는 장애, 이종성 자가면역 질환 또는 장애, 염증성 질환, 암 또는 장애를 치료 및 억제하기 위한 상기 화합물의 사용 방법 및 그의 제조법이 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/496 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 19/02 (2018.01)

A61P 29/00 (2018.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A61P 37/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

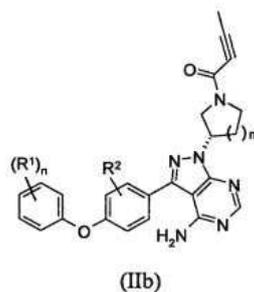
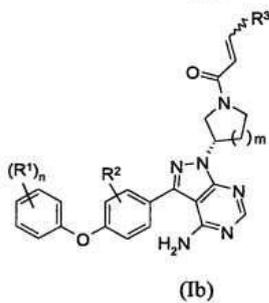
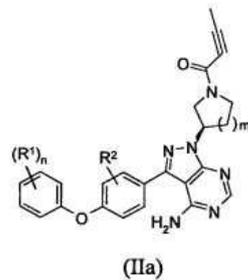
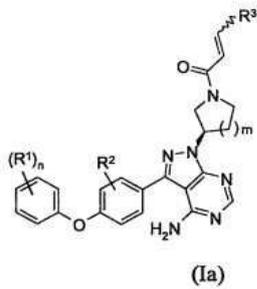
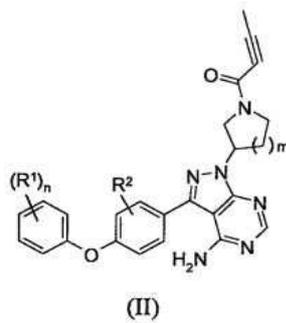
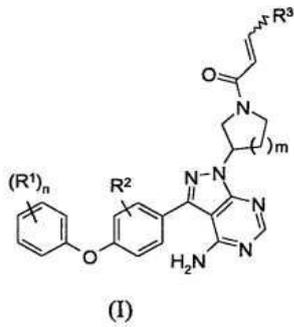
청구범위

청구항 1

브루톤 티로신 키나제(BTK) 억제제, 포유류 표적의 라파마이신(mTOR) 키나제 억제제, 및 B-세포 림프종-2(Bcl-2) 억제제를 포함하는 쓰리-인-원(three-in-one) 제약 조합물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 mTOR 키나제 억제제가 에베를리무스, 라파마이신, XL388, GDC-0349, AZD2014, AZD8055, GSK105965, MLN0128, 또는 리다포를리무스이고; 상기 Bcl-2 억제제가 ABT-199 또는 BI-97C1이고; 상기 BTK 억제제가 이브루티닙 또는 화학식 (I), (II), (Ia), (IIa), (Ib) 또는 (IIb)에 의해 나타내어진 화합물, 또는 그의 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 또는 제약상 허용되는 염인 쓰리-인-원 제약 조합물.



여기서:

R¹은 F이고;

R²는 F이고;

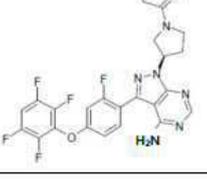
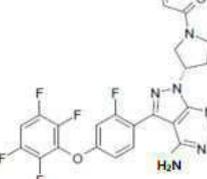
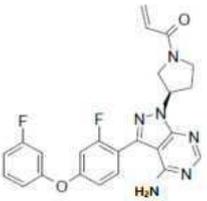
R³은 H 또는 D이고;

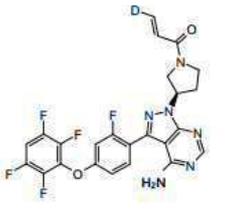
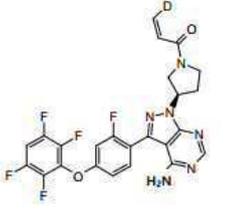
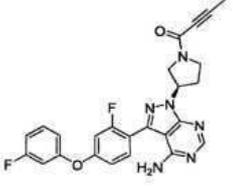
n은 1, 2, 3 또는 4이고;

m은 1 또는 2이다.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 BTK 억제제가 하기 표에 나타난 화합물 1, 화합물 2, 화합물 3, 화합물 4, 화합물 5, 화합물 6, 화합물 7 및 화합물 7x, 또는 그의 제약상 허용되는 염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 쓰리-인-원 제약 조합물.

화합물	구조	명칭
1		1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피페리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온
2		1-[(S)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피페리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온
3		1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온
4		1-[(S)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온
5		1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온

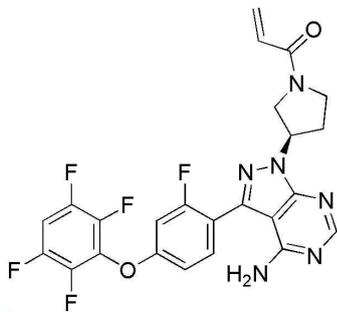
6		<p>(E)-1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]-3-듀테뮴-프로프-2-엔-1-온</p>
7		<p>(Z)-1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]-3-듀테뮴-프로프-2-엔-1-온</p>
7x		<p>1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]-부틸-2-인-1-온</p>

청구항 6

제1항에 있어서, BTK 억제제인 이브루티닙, mTOR 키나제 억제제인 에베롤리무스, 및 Bcl-2 억제제인 ABT-199를 포함하는 쓰리-인-원 제약 조합물.

청구항 7

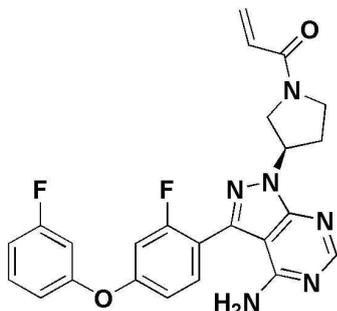
제1항에 있어서, BTK 억제제인 하기 화학식에 의해 나타내어진 화합물 3:



mTOR 키나제 억제제인 에베롤리무스, 및 Bcl-2 억제제인 ABT-199를 포함하는 쓰리-인-원 제약 조합물.

청구항 8

제1항에 있어서, BTK 억제제인 하기 화학식에 의해 나타내어진 화합물 5:



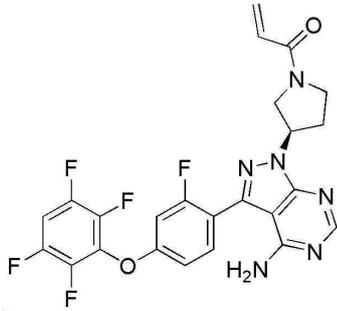
mTOR 키나제 억제제인 에베롤리무스, 및 Bcl-2 억제제인 ABT-199를 포함하는 쓰리-인-원 제약 조합물.

청구항 9

제1항에 있어서, BTK 억제제인 이브루티닙, mTOR 키나제 억제제인 라파마이신, 및 Bcl-2 억제제인 ABT-199를 포함하는 쓰리-인-원 제약 조합물.

청구항 10

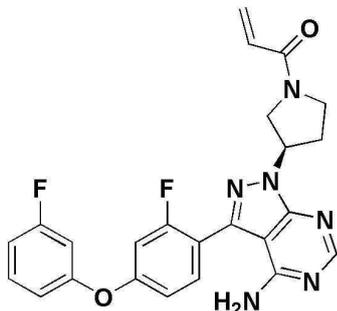
제1항에 있어서, BTK 억제제인 하기 화학식에 의해 나타내어진 화합물 3:



mTOR 키나제 억제제인 라파마이신, 및 Bcl-2 억제제인 ABT-199를 포함하는 쓰리-인-원 제약 조합물.

청구항 11

제1항에 있어서, BTK 억제제인 하기 화학식에 의해 나타내어진 화합물 5:



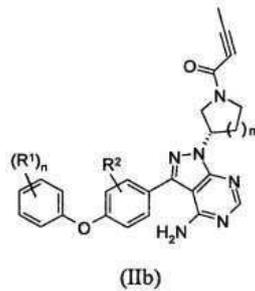
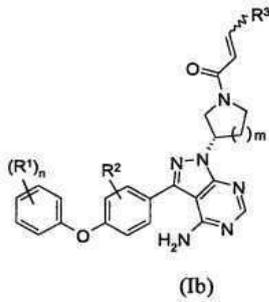
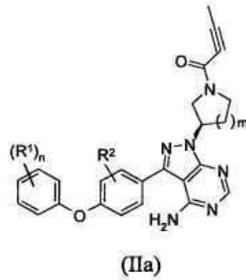
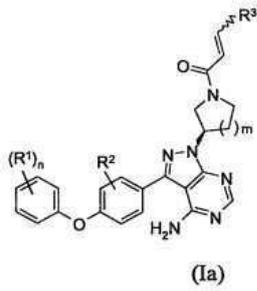
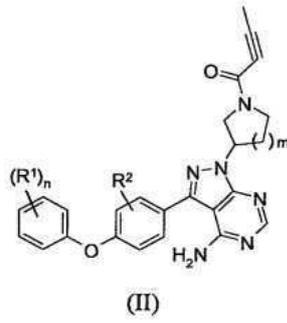
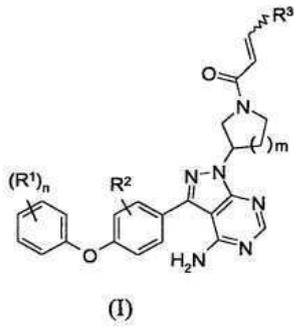
mTOR 키나제 억제제인 라파마이신, 및 Bcl-2 억제제인 ABT-199를 포함하는 쓰리-인-원 제약 조합물.

청구항 12

브루톤 티로신 키나제(BTK) 억제제 및 포유류 표적의 라파마이신(mTOR) 키나제 억제제를 포함하는 투-인-원 (two-in-one) 제약 조합물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 mTOR 키나제 억제제가 에베롤리무스, 라파마이신, XL388, GDC-0349, AZD2014, AZD8055, GSK105965, MLN0128, 또는 리다포를리무스이고; 상기 BTK 억제제가 이브루티닙 또는 화학식 (I), (II), (Ia), (IIa), (Ib) 또는 (IIb)에 의해 나타내어진 화합물, 또는 그의 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 또는 제약상 허용되는 염인 투-인-원 제약 조합물.



여기서:

R^1 은 F이고;

R^2 는 F이고;

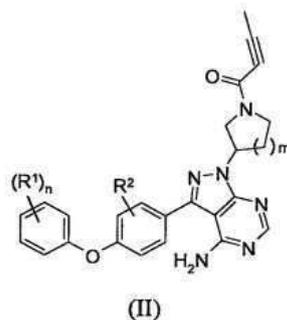
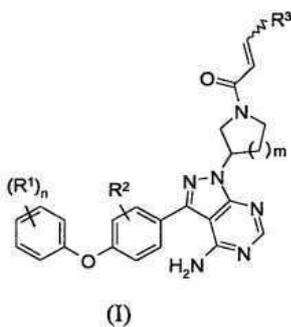
R^3 은 H 또는 D이고;

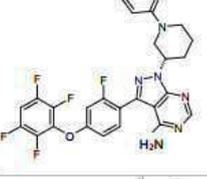
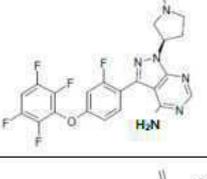
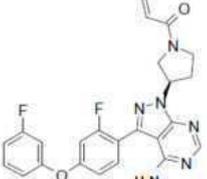
n은 1, 2, 3 또는 4이고;

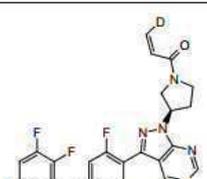
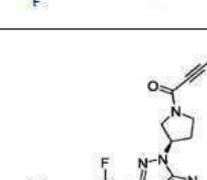
m은 1 또는 2이다.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 BTK 억제제가 이브루티닙, 또는 화학식 (I) 또는 화학식 (II)에 의해 나타내어진 화합물, 또는 그의 거울상이성질체 또는 제약상 허용되는 염인 투-인-원 제약 조합물.



화합물	구조	명칭
1		1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온
2		1-[(S)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온
3		1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온
4		1-[(S)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온
5		1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온

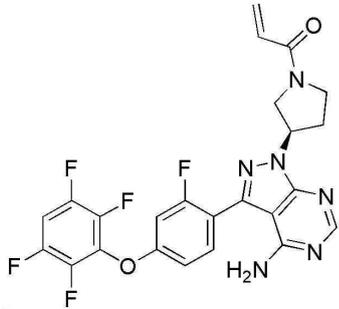
6		(E)-1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]-3-듀테륨-프로프-2-엔-1-온
7		(Z)-1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]-3-듀테륨-프로프-2-엔-1-온
7x		1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]-부틸-2-인-1-온

청구항 17

제12항에 있어서, BTK 억제제인 이브루티닙 및 mTOR 키나제 억제제인 에베롤리무스를 포함하는 투-인-원 제약 조합물.

청구항 18

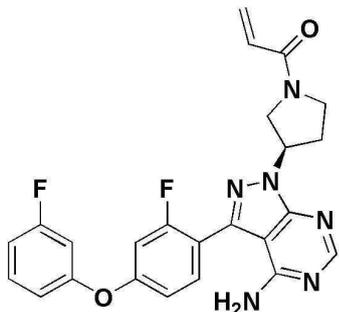
제12항에 있어서, BTK 억제제인 하기 화학식에 의해 나타내어진 화합물 3:



및 mTOR 키나제 억제제인 에베롤리무스를 포함하는 투-인-원 제약 조합물.

청구항 19

제12항에 있어서, BTK 억제제인 하기 화학식에 의해 나타내어진 화합물 5:



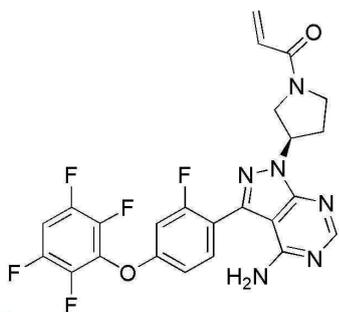
및 mTOR 키나제 억제제인 에베롤리무스를 포함하는 투-인-원 제약 조합물.

청구항 20

제12항에 있어서, BTK 억제제인 이브루티닙 및 mTOR 키나제 억제제인 라파마이신을 포함하는 투-인-원 제약 조합물.

청구항 21

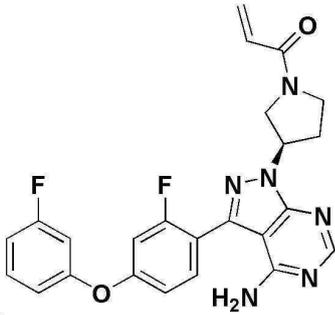
제12항에 있어서, BTK 억제제인 하기 화학식에 의해 나타내어진 화합물 3:



및 mTOR 키나제 억제제인 라파마이신을 포함하는 투-인-원 제약 조합물.

청구항 22

제12항에 있어서, BTK 억제제인 하기 화학식에 의해 나타내어진 화합물 5:



및 mTOR 키나제 억제제인 라파마이신을 포함하는 투-인-원 제약 조합물.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 다양한 B-세포 악성종양 (소형 림프구성 림프종(SLL), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 미만성 거대 B-세포 림프종(DLBCL), 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종(MCL), 및 다발성 골수종(MM) 포함), 및 BTK 활성의 억제로부터 이익을 얻는 다른 질환으로부터 선택되는 암 또는 다른 질환을 치료 또는 억제하기 위한 제약 조합물.

청구항 24

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 기관-특이적 자가면역 질환, 예컨대 만성 림프구성 갑상선염, 갑상선 기능 항진증, 인슐린-의존성 진성 당뇨병, 중증 근무력증, 만성 궤양성 대장염, 만성 위축성 위염과 연관된 악성 빈혈, 굿패스처 증후군, 심상성 천포창, 유천포창, 원발성 담즙성 간경화, 다발성 뇌척수 경화증, 급성 특발성 신경염 등; 전신 자가면역 질환, 예컨대 전신 홍반성 루푸스, 류마티스성 관절염, 전신 혈관염, 경피증, 천포창, 혼합 결합 조직 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 갑상선 질환, 및 궤양성 대장염으로부터 선택되는 자가면역 질환 또는 장애를 치료 또는 억제하기 위한 제약 조합물.

청구항 25

제24항에 있어서, 자가면역 질환이 류마티스성 관절염인 제약 조합물.

청구항 26

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 혈청병, 천식, 알레르기성 비염, 및 약물 알레르기로부터 선택되는 면역 장애를 치료 또는 억제하기 위한 제약 조합물.

청구항 27

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 각막염, 비염, 구내염, 불거리, 인두염, 편도염, 기관염, 기관지염, 폐렴, 심근염, 위염, 위장염, 담낭염, 및 충수염으로부터 선택되는 염증성 질환 또는 장애를 치료 또는 억제하기 위한 제약 조합물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 일련의 다중-플루오로-치환된 피라졸로피리미딘 화합물 및 합성 방법, 뿐만 아니라 활성 성분으로서 본원에 기재된 화합물을 포함하는 제약 조성물 및 브루톤 티로신 키나제 활성의 억제 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 시험관내 종양 세포 생존성 및 생체내 종양의 억제를 위한 다양한 약물의 최적화된 조합물에 관한 것이다. 최적화된 조합물은, 단일-표적 작용제에 비해 더 효율적으로 종양 생존을 억제할 수 있고 특정 종양을 완전히 소멸시킬 수 있는 상승작용 효과를 갖는다. 단일-표적 작용제에 비해, 최적화된 조합물은 약물 내성 및 암 재발을 더 잘 피할 수 있다. 최적화된 조합물은 보다 적은 용량으로 인해 더 안전하고, 더 양호한 치료 효과 때문에 치료 주기를 단축시킬 수 있다.

배경 기술

- [0002] 항암 치료는 독성 화학요법에서부터 조합 화학요법 (예를 들어, CHOP), 항체 (예를 들어, 리툽시맵), 화학요법과 항체 요법의 조합 (R-CHOP), 및 흥미로운 항암 면역 요법 (PD-1 및 PD-L1 항체) 및 키메라 항원 수용체 T 세포 요법 (CAR-T)으로 발전하여 왔다. 환자의 수명 및 삶의 질이 개선되었지만, 암의 복잡성으로 인해 단일 경로 또는 신호전달 경로에서의 돌연변이는 비효율적인 치료 또는 질환의 재발을 초래할 수 있다. 소분자 표적화 요법은 장기간의 매일 투여를 요하고, 약물 투여를 중단하는 경우에는 암의 반동 또는 재발이 일어날 수 있다. 항체 및 화학요법의 전달 방법은 복잡하다. 항체 및 화학요법의 조합은 부가적 또는 상승작용 효과를 가질 수 있지만, 드물게 암을 치료한다. 표적화 요법과 면역 항암 요법 또는 키메라 항원 수용체 T-세포 면역요법 (CAR-T)의 조합 요법이 개발되고 있지만, 안전성의 우려가 있을 수 있다. 경구 요법은 많은 이점을 갖는데, 예를 들어 심각한 부작용이 발생하는 경우에는 즉시 투여를 중단할 수 있다. 항체 및 세포 요법의 경우, 심각한 부작용을 조절하기가 어렵다. 현재, 단일-표적 요법, 또는 두 경로를 표적화하는 조합 요법에는 일부 제한이 있으며, 따라서 암 치료의 임상적 효능 (전체 반응률, ORR)이 거의 부분적인 반응 (PR) 또는 안정적인 질환 (SD)이며, 완전한 반응 (CR)은 드물다. 이들 치료는 보통 환자의 수명을 단지 몇 개월만 연장시킨다. 또한, 복잡한 세포 요법 또는 항체와 화학요법의 조합은 안전성의 문제를 가질 수 있다. 더욱이, 이들 치료는 병원 시설로 제한된다. 상기 언급한 불리한 점들은 암 치료를 위해 고비용을 초래할 뿐만 아니라, 치료에 대한 환자의 희망뿐 아니라 치료 협조에도 영향을 미치며, 대다수의 환자에서 암 치료를 연장하는데 장애물이 된다. 추가로, 표적화 단일-경로 요법의 가격은 환자당 US\$100,000-200,000이고, 조합 요법의 가격은 두배이거나 훨씬 더 높을 것이다. 이들 고가 치료의 진행은 지속 불가능하다. 따라서, 환자 및 시장 둘 다 보다 양호한 조합 요법의 추구에 대해 명확히 요구한다. 신규한 조합 요법은 부작용이 적으면서도 더욱 효과적이고 보다 짧은 치료 주기를 가질 것으로 예상된다. 적합한 동반 진단의 도움으로, 최적화된 조합 요법 (맞춤 의약 또는 정밀 의약)이 암 하위유형을 치료할 수 있거나, 약물 내성의 보다 양호한 조절을 허용할 수 있다.
- [0003] 첫번째 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제인 이브루티닙은 외투 세포 림프종 (MCL) 및 만성 림프구성 백혈병 (CLL)의 치료를 위해 미국 식약청으로부터 승인되었으며, 양호한 효과를 나타내지만, 임상 치료에서 약물 내성을 초래하는 C481 및 다른 돌연변이를 생성하였다 (Furman et al: Ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia, N Engl J Med, 2014, 2352). 또한, 이브루티닙의 약동학은 환자마다 크게 다르다 (Marostica et al: Population pharmacokinetic [sic] model of Ibrutinib, a Bruton tyrosine kinase inhibitor, in patients with B cell malignancies, Cancer Chemother Pharmacol (2015) 75: 111-121), 독성 역학 연구로 확인된 래트 및 개의 AUC는 1000 h*ng/mL (수컷 래트, 40mg/kg) 및 3300 h*ng/mL (암컷 래트, 40mg/kg) 및 1780 h*ng/mL (수컷 개, 24mg/kg) 및 1850 h*ng/mL (암컷 개, 24mg/kg)로 낮았다 (FDA의 NDA 승인 번호 205552Orig1s000_약리학적 검토). BTK는 세포 표면 상의 B-세포 수용체 (BCR) 자극을 하류 세포내 반응으로 연결하는 B-세포 신호전달 경로에서 중요한 역할을 한다. BTK는 B-세포 발달, 활성화, 증식 및 생존의 중요한 조절인자이다.
- [0004] 포유류 표적의 라파마이신 (mTOR) 키나제 억제제인 에베롤리무스는 유방암, 췌장암, 신세포 암종, 신장 혈관근 지방종, 및 결절성 경화증의 치료를 위해 미국 식약청으로부터 승인되었다. mTOR 단백질의 메카니즘이 명확히 밝혀졌다. mTOR은 복잡한 신호전달 경로에서 세포 성장, 증식, 대사 및 아포토시스의 중요한 조절인자이다. 또한, 장기 이식이 mTOR을 활성화시키기 때문에, 에베롤리무스는 저용량으로 장기 이식 부작용을 치료하는데 사용된다.
- [0005] 면역조절 약물 (IMiD)인 포말리도미드는 다발성 골수종 (MM)의 치료를 위해 2013년에 미국 식약청으로부터 승인되었다. 포말리도미드 및 그의 유사체 IMiD는 세포 인자 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 및 GM-CSF를 억제한다. IMiD는 항혈관신생, 항증식 및 아포토시스-유도 성질을 갖고, 이들은 또한 T 림프구를 자극하여 T 세포 증식, T 세포 시토카인 생성 및 T 세포 세포독성을 유도하며, 따라서 T 세포의 항암 활성을 증가시킨다.
- [0006] 베네토클락스 또는 ABT-199는 임상 연구중인 B-세포 림프종-2 (Bcl-2)의 신규하고 특이적인 억제제이다. Bcl-2 단백질은 아포토시스에서 중요한 역할을 한다. ABT-199는 임상 시험에서 종양 용해 증후군 (TLS)을 촉발시켜 환자의 사망을 초래하였다.
- [0007] 메토틱렉세이트 (MTX)는 주로 디히드로폴레이트 리덕타제의 억제를 통해 세포 합성을 차단하고 세포 성장 및 증식을 억제하는 항폴레이트제 항신생물성 약물 및 류마티스성 관절염 약물이다.
- [0008] BTK는 단백질 티로신 키나제의 Tec 패밀리의 구성원이다. BTK는 독특한 N-말단 도메인, 즉, 플렉스트린 상동성

(PH) 도메인, Tec 상동성 (TH) 영역, Src 상동성 3 (SH3) 도메인, Src 상동성 2 (SH2) 도메인 및 촉매적 도메인, 및 티로신 키나제 또는 키나제 도메인의 Src 상동성 1 (TK 또는 SH1) 도메인으로 구성된다 (Akinleye et al: Ibrutinib and novel BTK inhibitors in clinical development, Journal of Hematology & Oncology 2013, 6:59). B 림프구의 정상적인 발달에서, 상이한 영역에 있는 BTK 유전자의 정확한 발현은 B 세포의 기능 및 다양한 신호 변환 경로에서 중요한 역할을 한다.

[0009] BTK는 성장 인자, B-세포 항원, 케모카인 및 선천성 면역 수용체를 비롯한 여러 수용체의 하류에서 기능하며, 이로써 다양한 범위의 세포 프로세스, 예컨대 세포 증식, 생존, 분화, 이동, 혈관형성, 시토카인 생산, 및 항원 제시를 개시한다. 따라서, BTK는 여러 조혈 세포 신호전달 경로에서 중요한 역할을 하고, 또한 B 세포 활성화, 발달, 생존 및 신호 변환에서 결정적이다 (Kurosaki, Molecular mechanisms in B cell antigen receptor signaling. Curr OP Imm, 1997, 9(3): 309-18).

[0010] B 세포가 그들의 면역 반응 및 염증성 반응에 대해 면역 조절 효과를 가짐을 입증하는 증거가 있다. 예를 들어, CD20 항체 리툽시맙 (리툽산)은 B 세포를 소모함으로써 단백질을 기제로 하는 치료제이고, 자가면역 질환, 예컨대 만성 림프구성 백혈병 및 염증성 질환, 예컨대 류마티스성 관절염의 치료에 사용된다. 따라서, B 세포의 활성화에 중요한 역할을 하는 단백질 키나제는 B 세포 관련 질환에 도움이 될 것이다.

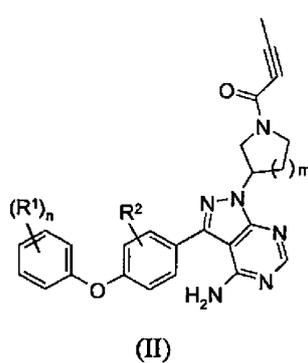
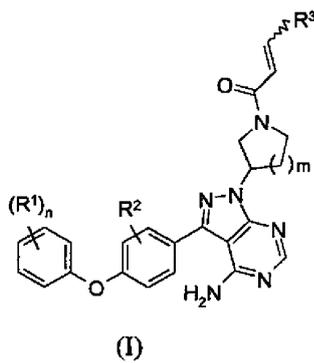
[0011] 자가면역 질환에서 BTK의 역할에 대한 증거가 BTK-결핍 마우스 및 BTK-충분 마우스 모델에 의해 제공되었다 (Kil LP, et al: Bruton's tyrosine kinase mediated signaling enhances leukemogenesis in a mouse model for chronic lymphocytic leukemia. Am J Blood Res 2013, 3(1): 71-83.). 만성 림프구성 백혈병 (CLL)의 마우스 모델에서, BTK-결핍 마우스는 만성 림프구성 백혈병을 완전히 중단시켰고, BTK 과발현은 백혈병을 가속화시켜 사망률을 증가시켰다.

[0012] 공지된 BTK 억제제의 선택성은 이상적이지 않아서, BTK를 억제할 뿐만 아니라 다양한 다른 키나제 (예컨대, ETK, EGF, BLK, FGR, HCK, YES, BRK, 및 JAK3 등)도 억제하며, 이는 더 많은 부작용을 초래할 수 있다. 보다 양호한 선택적인 억제제는 부작용을 덜 초래할 수 있다.

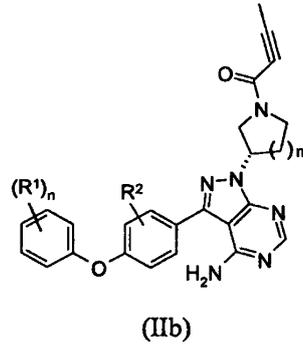
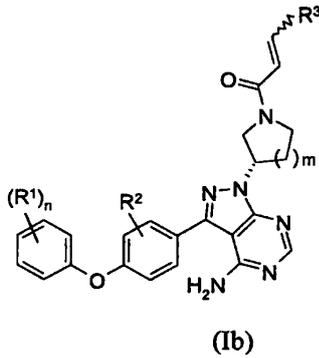
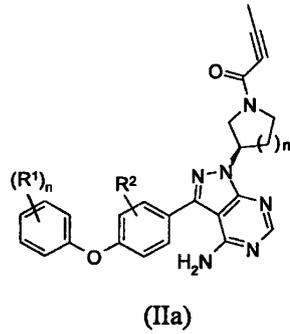
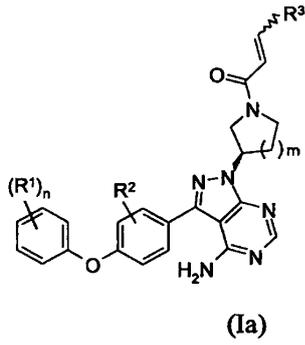
[0013] 공지된 BTK 억제제는 효능 및 부작용에 영향을 미치는 다양한 유도체를 생성한다. BTK 억제제의 약동학 또한 개선될 수 있는 것으로 공지되었다.

발명의 내용

[0014] 본 발명은 자가면역 질환, 과민성 질환, 염증성 질환 및 암을 치료 또는 억제하기 위해 BTK 억제제를 포함하는 치료 방법에 관한 것이다. 본원에 기재된 환자에 대한 효과적인 용량은 화학식 (I), (II), (Ia), (IIa), (Ib) 또는 (IIb)의 구조를 갖는 화합물, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함한다.



[0015]



[0016]

[0017] 여기서:

[0018] R¹은 플루오린이고; n은 1, 2, 3 또는 4이고;

[0019] R²는 플루오린이고; m은 1 또는 2이고;

[0020] R³은 수소 또는 중수소이다.

[0021] 용어 "제약상 허용되는 염"은 산 또는 염기와 함께 형성된 염을 지칭하고, 예컨대 (a) 산 부가염: 무기 산 (예를 들어, 염산, 브로민화수소산, 황산, 인산, 질산 및 다른 유기 산), 및 유기 산 (예를 들어, 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 숙신산, 말산, 아스코르브산, 벤조산, 탄닌산, 과모산, 알긴산, 폴리글루탐산 및 살리실산); (b) 아연, 칼슘, 나트륨, 칼륨 등과 같은 금속 양이온과 함께 형성된 염기 부가염이 있지만 이로 제한되지는 않는다.

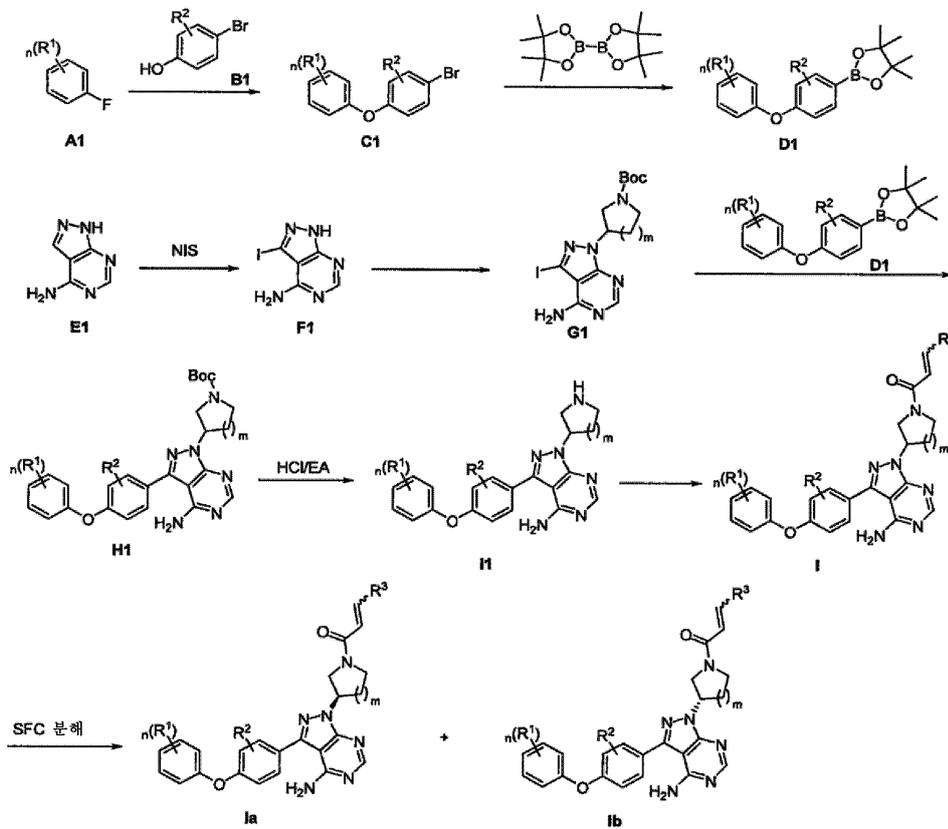
[0022] 합성 반응식

[0023] 본 발명은 본원에 개시된 실시예 및 실시양태를 예시한다. 본 발명의 특정한 실시양태는 개시된 실시양태 및 그의 제약상 허용되는 염 및 그의 개별적인 부분입체이성질체 또는 염의 군으로부터 선택된다.

[0024] 합성 방법에 대한 발명이 활발히 연구되었다. 피라졸로피리미딘 화합물의 신규한 합성 방법이 성공적으로 고안되었다 (반응식 1-2 및 구체적인 반응 예시 참조).

[0025] 하기 반응식 및 논의에서 달리 명시되지 않는다면, R¹, R², R³, m, n은 상기 정의된 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0026] 반응식 1

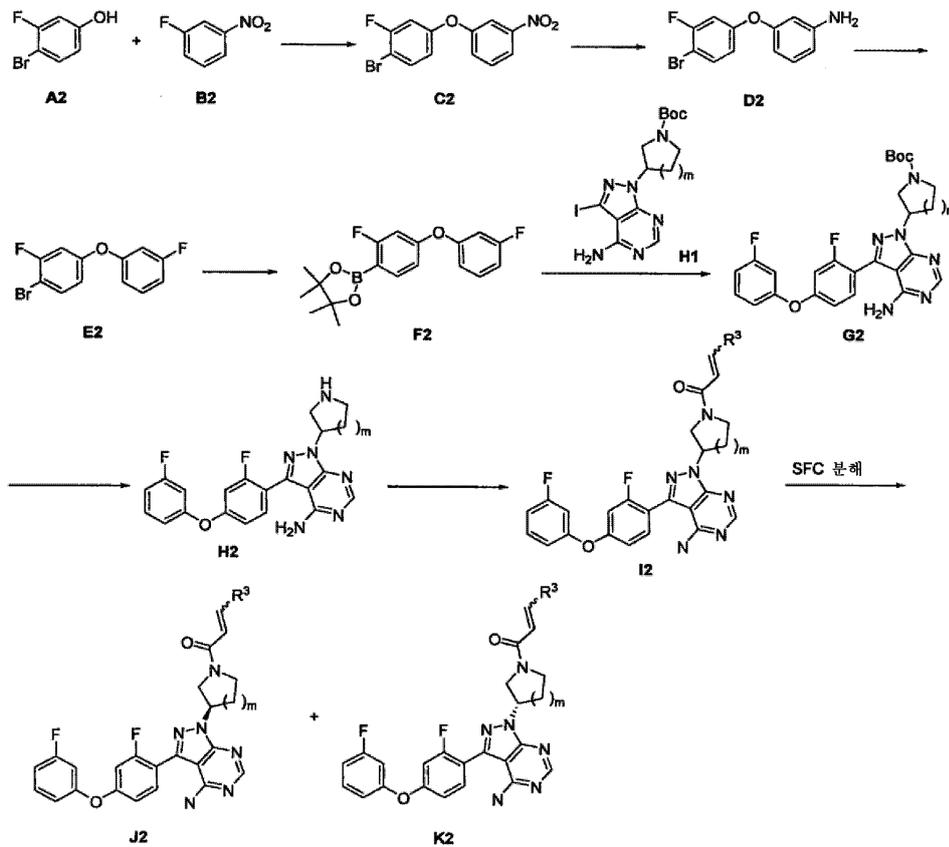


[0027]

[0028]

염기성 조건 하에 (예를 들어, 탄산칼륨) 적합한 용매 (예를 들어, DMF) 중에서 플루오로-치환된 출발 물질 A1 을 치환된 페놀 B1로 처리하여, 중간체 C1을 생성하였다. 이어서, 적합한 촉매 (예를 들어, [1,1'-비스(디페닐 포스피노)페로센]디클로로팔라듐(II))를 이용하여 염기성 조건 하에 (예를 들어, 아세트산칼륨) 적합한 용매 (예를 들어, 1,4-디옥산) 중에서 중간체 C1을 비스(피나콜레이트)디보론과 반응시켜, 중간체 D1을 수득하였다. 1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민을 NIS로 아이오딘화하여 중간체 F1을 형성한 후, 미츠노부 반응 또는 치환 반응에 의해 중간체 G1을 수득하였다. 적합한 촉매 (예를 들어, Pd-118)를 이용하여 염기성 조건 하에 (예를 들어, 인산칼륨) 적합한 용매 (예를 들어, 1,4-디옥산) 중에서 중간체 G1을 상기에서 수득한 화합물 D1로 처리 하여, 중간체 H1을 수득하였다. 산성 조건 하에 중간체 H1로부터 Boc를 탈보호시켜, 아민 I1을 수득하였다. 중간체 I1을 친전자성 시약과 반응시켜, 아마이드 J1을 수득하였다. J1이 라세미체인 경우, SFC 키랄 분해에 의해 광학 활성 화합물 K1 및 L1을 수득할 수 있다.

[0029] 반응식 2

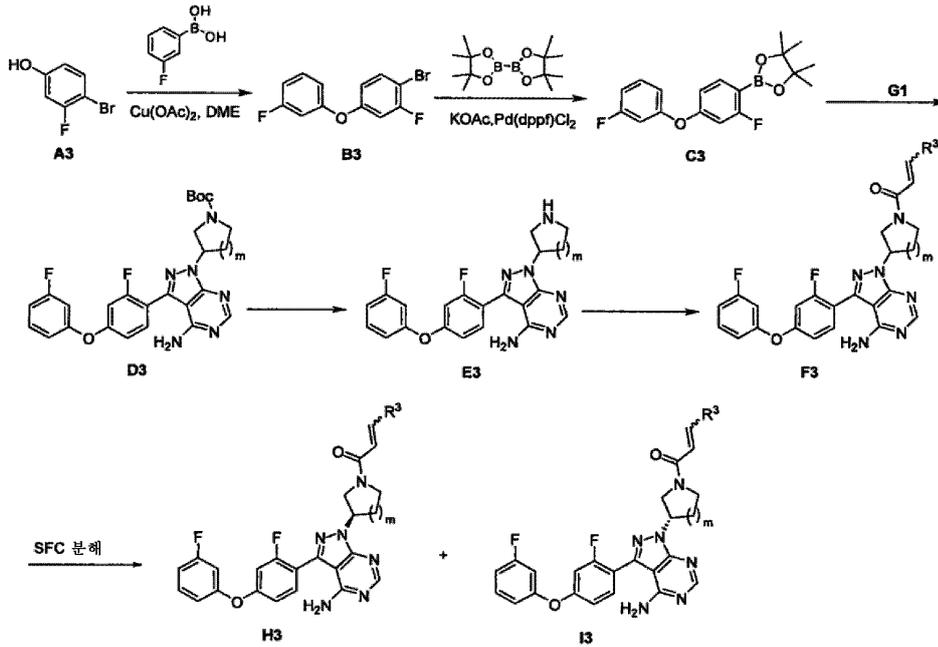


[0030]

[0031]

염기 (예를 들어, 탄산칼륨)와 함께 적합한 용매 (예를 들어, DMF) 중에서 3-플루오로-4-브로모페놀을 1-플루오로-3-니트로벤젠과 반응시켜, 중간체 C2를 획득하였다. 획득한 니트로 화합물 C2를 적절한 환원 시약 (예를 들어, 철 분말 및 염화암모늄)을 이용하여 적절한 용매 (예를 들어, 에탄올 및 물) 중에서 아민 D2로 환원시킨 후, 아질산나트륨 및 플루오린화수소 피리딘으로 처리하여, 플루오로-치환된 중간체 E2를 생성하였다. 이어서, 적합한 촉매 (예를 들어, [1,1'-비스(디페닐포스포노)페로센]디클로로팔라듐(II))를 이용하여 염기성 조건 하에 (예를 들어, 아세트산칼륨) 적합한 용매 (예를 들어, 1,4-디옥산) 중에서 중간체 E2를 비스(피나콜레이트)디보론과 반응시켜, 중간체 F2를 획득하였다. 적합한 촉매 (예를 들어, Pd-118)를 이용하여 염기성 조건 하에 (예를 들어, 인산칼륨) 적합한 용매 (예를 들어, 1,4-디옥산) 중에서 중간체 H1을 상기에서 획득한 화합물 F2로 처리하여, 중간체 G2를 획득하였다. 산성 조건 하에 중간체 G2로부터 Boc를 탈보호시켜, 아민 H2를 획득하였다. 중간체 H2를 친전자성 시약과 반응시켜, 아마이드 I2를 형성하였다. I2가 라세미체인 경우, SFC 키랄 분해에 의해 광학 활성 화합물 J2 및 K2를 획득할 수 있다.

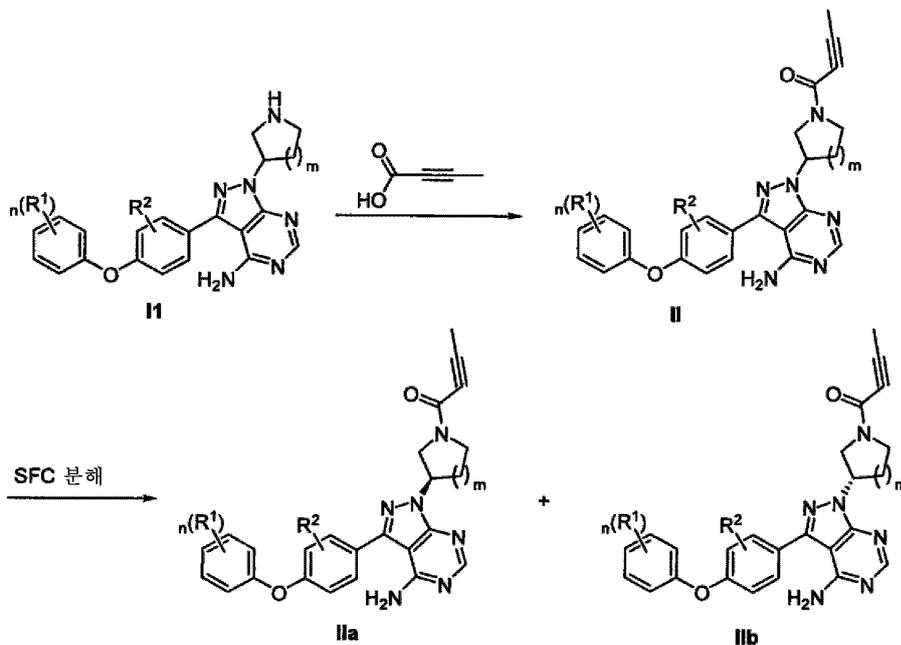
[0032] 반응식 3



[0033]

[0034] 적절한 촉매 (예를 들어, 아세트산구리)를 이용하여 3-플루오로-4-브로모페놀을 3-플루오로페닐보론산과 반응시켜, 중간체 B3을 획득하였다. 이어서, 적합한 촉매 (예를 들어, [1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센]디클로로팔라듐(II))를 이용하여 중간체 B3을 비스(피나콜레이트)디보론과 반응시켜, 중간체 C3을 획득하였다. 적절한 촉매 (예를 들어, [1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센]디클로로팔라듐(II))를 이용하여 염기성 조건 하에 (예를 들어, 아세트산칼륨) 적합한 용매 (예를 들어, 1,4-디옥산) 중에서 중간체 G1을 상기에서 획득한 화합물 C3으로 처리하여, 중간체 D3을 획득하였다. 산성 조건 하에 중간체 D3으로부터 Boc를 탈보호시켜, 아민 E3을 획득하였다. 중간체 E3을 친전자성 시약과 반응시켜, 아마이드 F3을 형성하였다. F3이 라세미체인 경우, SFC 키랄 분해에 의해 광학 활성 화합물 H3 및 I3을 획득할 수 있다.

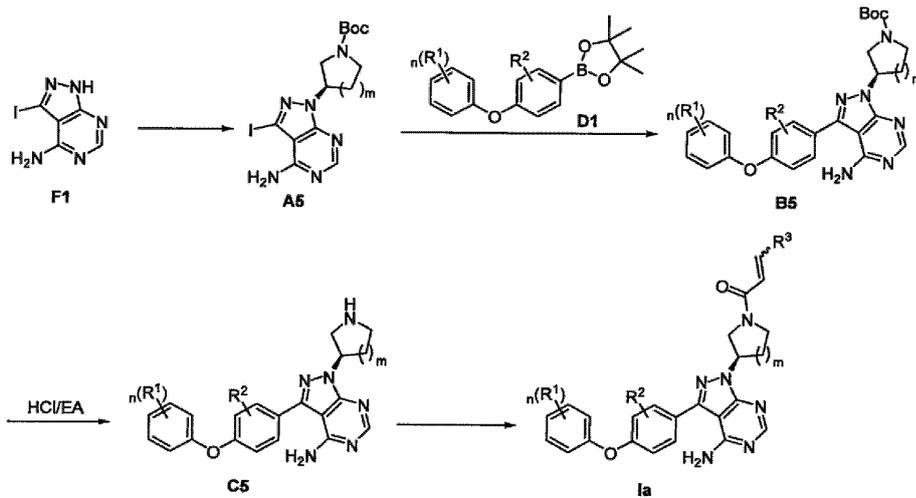
[0035] 반응식 4



[0036]

[0037] 아민 화합물 I1을 2-부틴산과 반응시켜, 화합물 II를 획득할 수 있다. 화합물 II가 라세미체인 경우, SFC 키랄 분해에 의해 광학 활성 화합물 IIa 및 IIb를 획득할 수 있다.

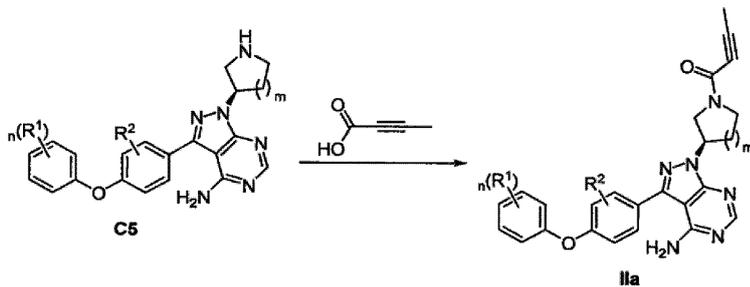
[0038] 반응식 5



[0039]

[0040] 광학 활성 중간체 A5를 중간체 F1로부터 미츠노부 반응 또는 치환 반응을 통해 형성하였다. 적합한 염기, 예를 들어 인산칼륨, 및 적합한 촉매 (예를 들어, Pd-118)의 존재 하에 적합한 용매, 예를 들어 1,4-디옥산 및 물 중에서 중간체 A5를 보로네이트 에스테르 D1과 반응시켜, 중간체 B5를 수득할 수 있다. 산성 조건에서 중간체 B5로부터 Boc를 탈보호시켜, 아민 화합물 C5를 수득할 수 있다. 아민 화합물 A5를 친전자성 시약과 반응시켜, 화합물 Ia를 수득할 수 있다.

[0041] 반응식 6



[0042]

[0043] 아민 화합물 C5를 2-부틴산과 반응시켜, 화합물 IIa를 수득할 수 있다.

[0044] 본 발명은 화학식 (I), (II), (Ia), (IIa), (Ib) 및 (IIb)에 제시된 구조를 갖는 화합물, 및 그의 거울상이성질체, 그의 부분입체이성질체, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다.

[0045] 본 발명의 화학식 (I), (II), (Ia), (IIa), (Ib) 및 (IIb)의 화합물은 1개 이상의 안정한 동위원소 또는 방사성 동위원소를 포함하고, 여기서 동위원소는 ²H, ³H, ¹³C, ¹⁴C, ¹⁵N, ¹⁸O 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0046] 본 발명은 ¹H의 동위원소인 ²H를 BTK 억제제에 도입한 첫번째 사례이다.

[0047] 화학식 (I), (II), (Ia), (IIa), (Ib) 및 (IIb)의 화합물에서 비닐 기의 이중 결합의 말단에 있는 ¹H를 ²H로 교체하여, 상기 이중 결합의 산화/환원에 의해 초래되는 약물 불활성화를 감소시킬 수 있다.

[0048] 본 발명은 화학식 (I), (II), (Ia), (IIa), (Ib) 및 (IIb)에 의해 나타내어진 화합물, 그의 거울상이성질체 및 그의 부분입체이성질체의 제조 방법을 제공한다.

[0049] 본 발명은 BTK 활성을 조절하는 방법, 및 BTK 활성과 연관된 질환을 치료 또는 억제하는 방법을 제공한다. 본원의 화합물이 BTK 활성을 억제한다는 것이 확인되었다. 본 발명은 불리한 시토카인 신호전달에 의해 초래되며 하기로 제한되지 않는 질환의 치료 및/또는 예방을 위해 제약 활성 성분으로서 화학식 (I), (II), (Ia), (IIa), (Ib) 및 (IIb)의 화합물을 제공한다:

[0050] (1) 자가면역 질환, 예컨대 만성 림프구성 갑상선염, 갑상선 기능 항진증, 인슐린-의존성 진성 당뇨병, 중증 근

무력증, 만성 궤양성 대장염, 만성 위축성 위염과 연관된 악성 빈혈, 궤양성 증후군, 심상성 천포창, 유천포창, 원발성 담즙성 간경화, 다발성 뇌척수 경화증, 급성 특발성 신경염, 전신 홍반성 루푸스, 류마티스성 관절염, 건선, 전신 혈관염, 경피증, 천포창, 혼합 결합 조직 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 갑상선 질환, 궤양성 대장염 등;

- [0051] (2) 면역 장애, 예컨대 혈청병, 천식, 알레르기성 비염, 약물 알레르기 등;
- [0052] (3) 염증성 질환, 예컨대 각막염, 비염, 구내염, 볼거리, 인두염, 편도염, 기관염, 기관지염, 폐렴, 심근염, 위염, 위장염, 담낭염, 충수염 등;
- [0053] (4) 암, 예컨대 비제한적으로 다양한 B-세포 악성종양 (소형 림프구성 림프종 (SLL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종 (MCL) 포함), 및 BTK 활성의 억제로부터 이익을 얻는 다른 질환.
- [0054] BTK 활성의 억제로부터 이익을 얻는 다른 질환, 예컨대 비제한적으로 뇌 종양, 방광암, 위암, 난소암, 췌장암, 유방암, 두경부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 결장직장암, 신암, 식도암, 전립선암, 갑상선암, 골암, 피부암, 결장암, 여성 생식관 종양, 림프종, 다발성 골수종 (MM), 고환암 등.
- [0055] 본원의 방법은 치료 유효량의 청구범위 제1항 및 제2항으로부터 선택된 화합물을 그를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0056] 표준 제약 실무에 따라, 본 발명의 화합물 (BTK 억제제)을 제약 제제 중에 단독으로 또는 제약 조합물 중에 1종 이상의 추가의 약물과 함께 사용할 수 있으며, 여기서 BTK 억제제 및 추가의 약물을 포함하는 제약 제제는 동일하거나 상이한 투여 경로 및 동일하거나 상이한 투여 시간을 가질 수 있다. 본원의 추가의 약물은 하기 약물을 포함한다 (이에 제한되지는 않음):
- [0057] 티로신 키나제 억제제 (예를 들어, 약시티닙, 다사티닙, 이코티닙);
- [0058] 토포이소머라제 억제제 (예를 들어, 토포테칸);
- [0059] 단백질 키나제 C 억제제 (예를 들어, AEB-071);
- [0060] 스펅고신-1-포스페이트 수용체 효능제 (예를 들어, 핑골리모드, KRP-203);
- [0061] 항-T 세포 이뮤노글로불린 (예를 들어, AtGam);
- [0062] 항-IL-2 수용체 항체 (예를 들어, 다클리주맙);
- [0063] 아미드 (CTX), 이포스파미드 (IFO), 아드리아마이신 (ADM), 다우노루비신 (DNR), 빈크리스틴 (VCR), 빈블라스틴 (VBL), 에토포시드 (VP16), 베르미어 (Vumon), 카르보플라틴 (CBP) 및 메토틱렉세이트 (MTX) 시클로스포린 A, 타크롤리무스, 시롤리무스, 에베롤리무스, 아자티오프린, 브레퀴나르, 리플루노미드, LEA-29Y, 항-CD3 항체 (예를 들어, OKT3), 아스피린;
- [0064] B7-CD28 차단 분자 (예를 들어, 벨라타셉트, 아바타셉트);
- [0065] CD40-CD154 차단 분자 (항-CD40 항체);
- [0066] 아세트아미노펜, 이부프로펜, 나프록센, 피록시카ם, 및 항염증성 스테로이드 (예를 들어, 프레드니솔론 또는 덱사메타손);
- [0067] 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제는 이브루티닙, 화합물 3, 화합물 5, ACP-196 (아세르타 파마(Acerta Pharma)), BGB-3111 (바이진(BeiGene)), AVL-292 (셀진(Celgene)), ONO-4059 (원 파마슈티칼(One Pharmaceutical)), HM71224 (한미 파마슈티칼(Hanmi Pharmaceutical)), RN486 (로체(Roche)), CNX-774, CGI-11746 등을 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 모두 공지되어 있다.
- [0068] mTOR 억제제는 에베롤리무스, 라파마이신, XL388, GDC-0349, AZD2014, AZD8055, GSK105965, MLN0128, 리다포를리무스 등을 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 모두 공지되어 있다.
- [0069] 면역조절 약물 (IMiD)은 탈리도미드, 레블리미드, 포말리도미드, CC-122, 및 CC-220을 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 모두 공지되어 있다.
- [0070] PI3K 키나제 억제제는 BTG226, PF-05212384 (게다톨리십), GDC-0980 (아피톨리십), GSK2126458, BEZ235, IPI-

145 (두벨리십), CAL-101 (이델라리십) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 모두 공지되어 있다.

- [0071] Bcl-2 억제제는 ABT-199 (베네토클락스), BI-97C1 (사부토클락스) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 모두 공지되어 있다.
- [0072] TOPK 억제제는 OTS964 (온코테라피 사이언스(Oncotherapy Science))를 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 모두 공지되어 있다.
- [0073] JAK3 키나제 억제제는 토파크티닙을 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 모두 공지되어 있다.
- [0074] JAK1/2 키나제 억제제는 록솔리티닙을 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 모두 공지되어 있다.
- [0075] ALK 키나제 억제제는 크리조티닙, 세리티닙 및 CH5424802 (알렉티닙)를 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 모두 공지되어 있다.
- [0076] 본 발명은 또한 시험관내 및 생체내 동물 종양 모델에서 다양한 특이적인 제약 조성물을 최적화 및 스크리닝하는 것에 관한 것이다. 종양 세포를 사멸시킬 수 있는 화합물 또는 제약 조성물은 약물 약동학적 문제 때문에 동물 종양 모델에서 반드시 효과적인 것은 아니다. 따라서, 동물 종양 억제 데이터 없이, 시험관내 억제 데이터 단독은 화합물 또는 제약 조성물의 약물성을 증명할 수 없다. 본 발명은 (복강내 주입 또는 정맥내 주입이 아니라) 경구 위관 투여를 수행하여, 약동학의 불확실성을 피하고, 다양한 동물 종양 모델에서 다양한 화합물 및 제약 조성물을 최적화 및 스크리닝하여 약물성 평가를 달성한다.
- [0077] 기존의 기술은 ALK 억제제 및 BTK 억제제가 시험관내에서 종양 세포의 억제에 대해 상승작용 효과를 가짐을 주장하는 반면에, 본 발명은 ALK 억제제 (세리티닙) 및 BTK 억제제 이브루티닙이 상승작용 효과를 갖지 않는다는 반대의 결과를 보여준다.
- [0078] 기존의 기술은 또한 JAK2 억제제 및 BTK 억제제가 시험관내에서 종양 세포의 억제에 대해 상승작용 효과를 가짐을 주장하는 반면에, 본 발명은 JAK1/2 억제제 (록솔리티닙) 및 BTK 억제제, 또는 mTOR 억제제, 또는 면역조절 약물이 상승작용 효과를 갖지 않을 뿐만 아니라, TMD-8 종양 세포도 전혀 억제하지 않는다는 반대의 결과를 보여준다.
- [0079] 본 발명은 단일 표적화된 약물보다 우수한 "투 인 원(two in one)" 및 "쓰리 인 원(three in one)" 제약 조합물 (제약 조성물 또는 제약 조합물)을 개시한다. "투 인 원" 및 "쓰리 인 원" 제약 조합물은 보다 적은 용량에서 상승작용 효과를 갖는다. 본 발명의 제약 조합물의 제형은 시험관내 및 생체내 검정에서 본원에 개시된 특정한 비로 제한되지 않는다.
- [0080] 본 발명은 또한 세포 성장, 증식, 생존 및 아포토시스를 조절하는 다중의 주요 신호전달 경로를 기재로 하는 제약 조합물의 최적화에 관한 것이다. 단일 표적화된 요법은 종종 유전자 돌연변이에 의해 초래되는 약물 내성을 유발하여, 약물 효능이 감소하고 질환이 재발하게 된다. 제약 조합물은 약물 내성을 극복할 수 있고, 보다 양호한 치료 효과를 달성하거나 질환을 치유할 수 있다. 본 발명은 제약 조합물이 종양 세포에 대해 상승작용 효과 및 부가적 치사 능력을 가짐을 보여준다. 제약 조합물의 활성은 단일 표적화된 약물의 활성에 비해 100배 더 높다. 제약 조합물은 또한 단일 표적화된 약물과 비교하여 훨씬 더 낮은 용량에서 경구 위관 투여에 의한 다양한 이종이식 모델에서 현저한 효과를 나타내고 (예를 들어, 1/18 화합물 3 (BTK 억제제) + 1/6 에베롤리무스 (mTOR 억제제) + 1/6 포말리도미드 (IMiD)), 단일 표적화된 약물에 비해 훨씬 개선된 치료 효과를 갖는다. "투 인 원" 제약 조합물은 15-일 치료 주기에서 완전한 종양 퇴행을 나타내는 반면에, "쓰리 인 원" 제약 조합물은 더 짧은 치료 주기 (9일)에서 완전한 종양 퇴행을 나타낸다. 추가로, 투여를 중단한지 12일 이내에 종양이 반동하지 않았으며, 이는 단일 표적화된 요법에 비해 유의하게 양호한 것이다. 단일 표적화된 요법은 장기간 치료를 요할 뿐만 아니라, 종종 종양 반동, 약물 내성 및 암 재발을 수반한다. 최적화된 제약 조합물은 각각의 단일 약물보다 동시에 훨씬 더 적은 용량을 갖기 때문에, 최적화된 제약 조합물은 단일 표적화된 약물에 비해 보다 양호한 안전성 및 보다 넓은 치료 범위를 가지며, 상기 조합물은 더욱 현저한 효과를 나타낸다. 본 발명의 상기 제약 조합물의 독특한 성질은 난치성 암 환자에게 새로운 희망을 가져다줄 수 있다.
- [0081] 본 발명에서, BTK 억제제 농도가 10 nM만큼 낮은 "쓰리 인 원" 제약 조합물은 종양 세포 생존성을 95%만큼 많이 억제하였다. 이는 예상치 못한 결과이고, 기존 발명에 의해 암시되거나 안내될 수 없다. 세포 생존성의 억제는 48시간의 인큐베이션 후에 시험하였다. 인큐베이션 시간을 72-96시간으로 증가시키는 경우, 제약 조성물은 세포 생존성의 훨씬 더 강력한 억제를 나타낼 것이다. 본 발명은 시험관내에서의 세포 생존성의 억제가 생체내에서의 종양의 억제와 상호관련이 있음을 보여주었다. 시험관내에서의 세포 생존성의 억제는 생체내에서의 종

양 억제제를 예측할 수 있다. 시험관내에서의 세포 생존성의 효과적인 억제는 최저 농도에서 (예를 들어, 10 nM) 종양 퇴행 또는 완전한 소멸을 유도할 수 있다. 본원에 개시된 제약 조성물은 10 nM만큼 낮은 농도에서 종양 세포를 효과적으로 억제 및 사멸시킬 수 있으며, 이는 본 발명이 매우 유의한 임상적 적용을 가짐을 보장한다. 환자의 치료시에, 종양 세포에서 조합물의 약물 농도는 용이하게 10-100 nM에 이를 수 있으며, 따라서 보다 양호한 치료 효과를 나타낸다. 현재, 단일 표적화된 요법 또는 2-경로 조합 요법은 1000 nM의 화합물 농도에서 종양 세포의 성장을 억제하는데 효과적이다. 예를 들어, ABT-199는 TMD-8 세포 생존성을 1000 nM, 100 nM 및 10 nM에서 각각 37.6%, 18.8% 및 11.1%만큼 억제하였다. ABT-199 및 BTK 억제제 (화합물 3)의 "투 인 원" 조성물은 TMD-8 세포 생존성을 각각 85.97%, 79.99% 및 65.36%만큼 억제하였다. ABT-199, BTK 억제제 (화합물 3) 및 PI3K 억제제의 "쓰리 인 원" 조성물은 TMD-8 세포 생존성을 각각 95.56%, 95.30% 및 94.62%만큼 억제하였다. ABT-199, 화합물 3 (BTK 억제제) 및 mTOR 억제제 에베롤리무스를 포함하는 "쓰리 인 원" 제약 조성물 또한 TMD-8 세포 생존성을 각각 93.44%, 94.73% 및 94.65%만큼 효과적으로 억제하였다. 본 발명의 우수한 상승작용 효과는 기존의 기술에서 암시되거나 안내되지 않았다.

[0082] 본 발명은 (1) 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제, mTOR 키나제 억제제, 및 면역조절 약물 (IMiD)의 "쓰리 인 원" 조합물이 최상의 조합물 중 하나이고; 다른 2종의 최상의 "쓰리 인 원" 조합물은 (2) 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제, mTOR 키나제 억제제, 및 Bcl-2 억제제; (3) 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제, PI3K 억제제, 및 Bcl-2 억제제를 제공한다. 두번째 최상의 제약 조합물은 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제 및 mTOR 키나제 억제제를 포함하는 "투 인 원" 제약 조합물, 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제 및 포말리도미드 (IMiD)를 포함하는 "투 인 원" 제약 조합물, 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제 및 TOPK 억제제를 포함하는 "투 인 원" 제약 조합물, TOPK 억제제 및 PI3K 억제제를 포함하는 "투 인 원" 제약 조합물, 및 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제 및 PI3K 억제제를 포함하는 "투 인 원" 제약 조합물이다.

[0083] 본 발명은 일부 조합물이 상승작용적 억제 효과를 갖고, 일부는 상승작용 효과를 갖지 않고 역효과를 낼 수 있음을 보여준다. 신호전달 경로는 과도하고 교차하며 복잡하다. 다중의 신호 경로를 동시에 억제할 수 있는 조합물은 훨씬 더 복잡하다. 따라서, 본 발명의 3종의 최상의 "쓰리 인 원" 조합물의 우수한 상승작용 효과는 기존의 기술에서 암시되거나 안내되지 않았다.

[0084] 본 발명은 시험관내에서의 세포 생존성 억제, 생체내에서의 종양 억제 및 다양한 종양 모델의 최적화 방법을 제공하고, 제약 조합물의 약물성의 평가 문제를 해결한다.

[0085] 본 발명은 경구 위관 투여에 의한 동물 종양 모델에서 "쓰리 인 원" 제약 조성물 (브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제, mTOR 키나제 억제제, 및 면역조절 약물 (IMiD)) 및 "투 인 원" (브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제 및 mTOR 키나제 억제제)만이 완전한 종양 소멸을 유도할 수 있고, 투여를 중단한 후에 종양 반동이 관찰되지 않았음을 보여준다. 다른 조합물은 종양 성장만을 억제하며, 종양 성장을 억제하기 위해 지속적으로 투여되어야 한다. 에베롤리무스 단독요법은 고용량에서 종양을 완전히 소멸시킬 수 있지만, 투여 후에 종양이 신속히 반동하였으며, 이는 단일 표적화된 요법의 결점이다. 본 발명은 상기 결점을 해결하고, 개별 사례에서 암을 치유할 것으로 예상된다.

[0086] 본 발명은 민감성 TMD-8 종양 모델에서 제약 조합물의 뛰어난 억제 효과를 입증할 뿐만 아니라, 비민감성 DoHH2 종양 모델 및 내성 불응성 WSU-DLCL 종양 모델에서 각각 양호한 억제 효과를 입증한다. 마지막 2종의 종양 모델에서 종양이 완전히 소멸되진 않았지만, "쓰리-인-원" 제약 조합물의 효능은 여전히 최상이다. 예를 들어, 에피짐(Epizyme)의 보고에 따르면 화합물 EZ-6438 (히스톤 메틸트랜스퍼라제 EZH2 억제제)은 매우 고용량 (480 mg/kg/일)에서 마우스로의 위관영양에 의한 WSU-DLCL 종양 모델에서와 유사한 효과를 달성할 수 있는 반면에, 본 발명의 "쓰리 인 원" 조합물은 단지 21 mg/kg/일이다.

[0087] 본 발명은 다중-표적화된 조합 요법이 더욱 효과적이고, 단일 약물의 용량을 크게 감소시킨다는 것을 처음으로 입증한다. 따라서, 이는 각각의 약물의 부작용을 추가로 감소시킬 수 있고, 조합 치료가 훨씬 안전하고 더욱 효과적이게 한다.

[0088] 본 발명의 다중-표적화된 조합 요법은 B-세포에 의해 유발되는 악성 림프종 및 백혈병 뿐만 아니라, T-세포에 의해 유발되는 암 및 실질 종양의 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0089] 본 발명의 다중-표적화된 조합물은 또한 류마티스성 관절염 및 다른 자가면역 질환의 치료를 위해 사용될 수 있다.

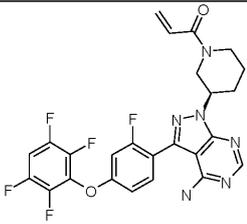
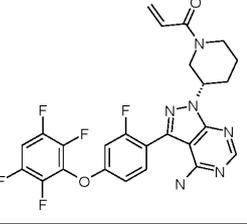
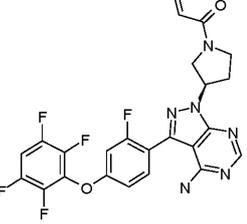
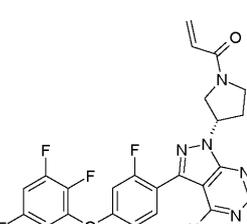
[0090] 본 발명은 또한 활성 성분으로서 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제, mTOR 억제제, 및 면역조절 약물 (IMiD)을

포함하는 제약 조성물을 제공한다.

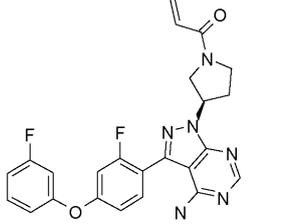
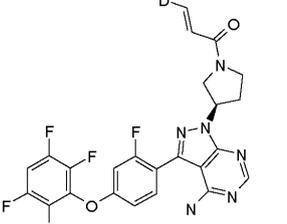
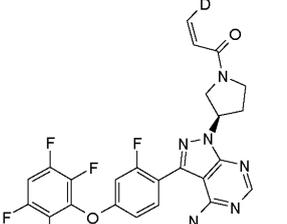
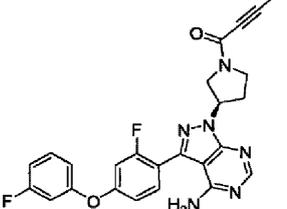
- [0091] 본 발명은 또한 활성 성분으로서 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제, mTOR 억제제, 및 Bcl-2 억제제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0092] 본 발명은 또한 활성 성분으로서 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제, PI3K 억제제, 및 Bcl-2 억제제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0093] 본 발명은 또한 BTK 활성을 조절할 뿐만 아니라 BTK 활성과 연관된 질환을 치료 또는 억제하는 약물의 제조에서의 화학식 (I), (II), (Ia), (Ib) 및 (IIb)의 화합물의 용도를 제공한다.
- [0094] 본 발명은 또한 BTK 활성을 조절할 뿐만 아니라 BTK 활성과 연관된 질환을 치료 또는 억제하는 약물의 제조에서의 화학식 (I), (II), (Ia), (Ib) 및 (IIb)의 화합물, mTOR 키나제 억제제 및/또는 면역조절 약물 (IMiD)의 용도를 제공한다.
- [0095] 본 발명은 또한 BTK 활성을 조절하고 BTK 활성과 연관된 질환을 치료 또는 억제하는 약물의 제조에서의 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제, mTOR 키나제 억제제 및 면역조절 약물 (IMiD)로부터 선택된 2종 또는 3종의 화합물을 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.
- [0096] 본 발명은 또한 BTK 활성을 조절하고 BTK 활성과 연관된 질환을 치료 또는 억제하는 약물의 제조에서의 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제, mTOR 키나제 억제제, 및 Bcl-2 억제제를 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.
- [0097] 본 발명은 또한 BTK 활성을 조절하고 BTK 활성과 연관된 질환을 치료 또는 억제하는 약물의 제조에서의 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제, PI3K 키나제 억제제 및 Bcl-2 억제제를 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.
- [0098] 제약 제제에 흔히 사용되는 담체, 부형제 및 다른 첨가제가 활성 성분으로서 화학식 (I), (II), (Ia), (Ib) 및 (IIb) 중 1종 또는 2종 또는 그 초과 화합물, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 함유하는 제약 조성물을 제조하는데 사용될 수 있다.
- [0099] 투여 형태는 경구 투여 형태, 예컨대 정제, 환제, 캡슐, 과립, 분말, 에멀전, 시럽, 현탁액, 액체 제제, 또는 비경구 투여 형태, 예컨대 정맥내 주입제 또는 근육내 주입제, 좌약, 피하제, 경피제, 비강제, 흡입제일 수 있다. 화합물의 용량을 적절히 결정하기 위해 개별 환자의 증상, 연령, 성별 등이 고려되어야 한다. 경구 투여의 경우에는, 일반적으로 성인 환자에 대한 화합물의 1일 용량이 약 0.001 mg/kg 내지 100 mg/kg이고, 단일 용량으로 또는 1일 2 내지 4회로 나누어 투여된다. 정맥내 투여의 경우에는, 일반적으로 환자의 증상에 따라 성인 환자에 대한 1일 용량이 0.0001 mg/kg 내지 10 mg/kg이고, 1일 1회 이상 투여된다. 또한, 흡입 투여를 이용하는 경우에는, 일반적으로 성인 환자에 대한 1일 용량이 0.0001 mg/kg 내지 1 mg/kg이고, 1일 1회 이상 투여된다.
- [0100] 본 발명에서, 경구 투여를 위한 고체 조성물은 정제, 분말, 과립 등일 수 있다. 이러한 고체 조성물에서, 1종 이상의 활성 물질을 1종 이상의 불활성 부형제 (예를 들어, 락토스, 만니톨, 글루코스, 히드록시프로필셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스, 전분, 폴리 비닐 피롤리돈, 마그네슘 알루미늄 실리케이트 등)와 혼합하였다. 전형적인 방법에 따라, 조성물은 불활성 첨가제, 예컨대 윤활제 (예를 들어, 스테아르산마그네슘), 붕해제 (예를 들어, 나트륨 카르복시메틸 전분) 및 용해 보조제를 함유할 수 있다. 필요에 따라, 정제 또는 환제를 당 코팅 또는, 위장 또는 장용 코팅제로 코팅할 수 있다.
- [0101] 경구 투여를 위한 액체 조성물은 제약상 허용되는 에멀전, 용액, 현탁액, 시럽, 엘릭시르, 및 흔히 사용되는 불활성 희석제 (예를 들어, 정제수, 에탄올)를 포함한다. 불활성 희석제 이외에도, 상기 조성물은 또한 첨가제, 예컨대 가용화제, 습윤제, 현탁화제, 감미제, 향미제, 향미제 및 보존제를 함유할 수 있다.
- [0102] 비경구 투여용 주입제는 멸균 수성 또는 비수성 액체 제제, 현탁액, 및 에멀전을 포함한다. 묽은 수용액을 사용할 수 있고 (예를 들어) 주사용 증류수 및 생리식염수가 포함될 수 있다. 비수성 희석제 용액을 사용할 수 있고 (예를 들어) 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성유 (예컨대 올리브유), 알콜 (예를 들어, 에탄올), 및 폴리소르베이트 80이 포함될 수 있다. 이러한 조성물은 추가로 등장화제, 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제, 분산제, 안정화제, 용해 보조제, 및 이러한 첨가제를 함유할 수 있다. 조성물을 멸균시키는 방법으로서 박테리아 보유 필터를 통한 여과, 살균제 첨가, 또는 광 조사를 이용할 수 있다. 또한, 이들 조성물은 사용하기 전에 멸균 고체 조성물로 만든 다음, 사용하기 전에 멸균수 또는 멸균 용매를 첨가하여 용해된 또는 현탁된 액체로서 사용될 수 있다.

[0103] 경점막제, 예컨대 흡입제 및 비강제 등은 고체, 액체 또는 반고체 상태로 사용될 수 있고, 이들 경점막제의 제조에 이용되는 전형적으로 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 필요에 따라 부형제 (예를 들어, 락토스 및 전분), pH 조정제, 보존제 IJ, 계면활성제, 윤활제 IJ, 안정화제 및 증점제 등이 첨가될 수 있다. 투여를 위해 적합한 흡입 또는 통기 장치를 사용할 수 있다. 예를 들어, 계량 흡입 장치로서 공지된 장치 또는 분무기가 사용될 수 있고, 화합물을 단독으로 사용하거나 또는 분말 제제를 투여한 후에 혼합물로 사용할 수 있다. 또한, 화합물을 제약상 허용되는 담체와 혼합 후, 이를 용액 또는 현탁액으로서 투여할 수 있다. 건조 분말 흡입기 등은 단일 용량 또는 다중 용량으로 사용될 수 있고, 건조 분말 또는 분말-함유 캡슐을 사용할 수 있다. 추가로, 적합한 추진제 (예를 들어, 클로로플루오로알칸, 히드로플루오로알칸, 또는 적합한 기체, 예컨대 이산화탄소)의 사용에 의해 투여되는 형태로 가압 에어로졸 스프레이 또한 사용될 수 있다.

[0104] 표 1. BTK 억제제를 위한 대표 화합물

화합물	구조	명칭	M+1
1		1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-트리플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온	531
2		1-[(S)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-트리플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온	531
3		1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온	517
4		1-[(S)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온	517

[0105]

5		<p>1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온</p>	463
6		<p>(E)-1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]-3-듀테륨-프로프-2-엔-1-온</p>	518
7		<p>(Z)-1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]-3-듀테륨-프로프-2-엔-1-온</p>	518
7x		<p>1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]-부틸-2-인-1-온</p>	475

[0106]

[0107]

비교: 구조와 명칭이 서로 다른 경우, 구조가 우선일 것이다.

도면의 간단한 설명

[0108]

도 1-A: SCID 마우스의 TMD-8 림프종 이종이식 모델에서 종양 부피에 대한 화합물 1 및 3의 다중 용량의 항종양 효과

도 1-B: SCID 마우스의 TMD-8 림프종 이종이식 모델에서 종양 중량에 대한 화합물 1 및 3의 항종양 효과

도 2: SCID 마우스의 TMD-8 림프종 이종이식 모델에서 화합물 3, 15 및 이들의 조합물의 항종양 효과

도 3: SCID 마우스의 TMD-8 림프종 이종이식 모델에서 화합물 3, 8, 15 및 이들의 조합물의 항종양 효과

도 4: SCID 마우스의 TMD-8 림프종 이종이식 모델에서 화합물 3, 14, 16 및 이들의 조합물의 항종양 효과

도 5: SCID 마우스의 TMD-8 림프종 이종이식 모델에서 화합물 3, 14, 15 및 이들의 조합물의 항종양 효과

도 6: SCID 마우스의 DoHH-2 림프종 이종이식 모델에서 화합물 3, 14, 15 및 이들의 조합물의 항종양 효과

도 7: SCID 마우스의 DoHH-2 림프종 이종이식 모델에서 화합물 3, 14, 15 및 이들의 조합물의 항종양 효과

도 8: 내성 ESU-DLCL2 마우스 모델에서 화합물 3 및 9의 항종양 효과

도 9: 내성 ESU-DLCL2 마우스 모델에서 화합물 3, 14, 15 및 이들의 조합물의 항종양 효과

도 10: 마우스의 TMD-8 림프종 이종이식 모델에서 화합물 3, 14, 15 및 이들의 "쓰리-인-원" 조합물의 항종양 효과

도 11: 마우스의 DoHH-2 림프종 이종이식 모델에서 화합물 3, 14, 15 및 화합물 9, 14, 15 및 이들의 "쓰리-인-

원" 조합물의 항종양 효과

도 12: 마우스의 TMD-8 림프종 이종이식 모델에서 화합물 3, 8, 12 및 이들의 "투-인-원" 및 "쓰리-인-원" 조합물의 항종양 효과

도 13: 발 부피 - 아주반트-유도된 관절염

도 14: 조직병리학 - 아주반트-유도된 관절염

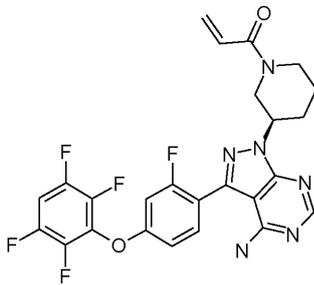
도 15: 임상적 검토포 - 콜라겐-유도된 관절염

도 16: 조직병리학 - 콜라겐-유도된 관절염

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

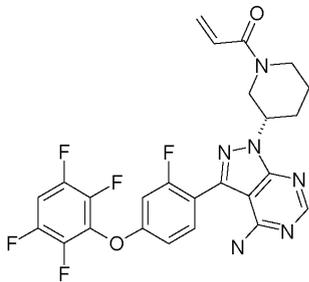
[0109] 실시예 1

[0110] 화합물 1 및 화합물 2



[0111]

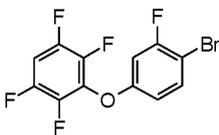
[0112] 1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-트리플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피페리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온



[0113]

[0114] 1-[(S)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-트리플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피페리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온

[0115] 단계 A :



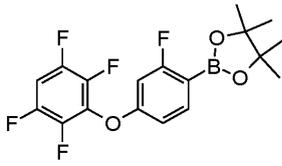
[0116]

[0117] 3-(4-브로모-3-플루오로페녹시)-1,2,4,5-테트라플루오로벤젠

[0118] 절차:

[0119] 탄산칼륨 (68.0 g, 492.1 mmol, 2.0 eq.) 및 화합물 1,2,3,4,5-펜타플루오로페닐 (49.6 g, 295.3 mmol, 1.2 eq.)을 DMF (500 mL) 중 3-플루오로-4-브로모페놀 (47.0 g, 246.1 mmol, 1.0 eq.)의 용액에 첨가하였다. 반응을 100°C에서 12시간 동안 교반하였다. 용매를 감압 하에 제거하였다. 잔류물을 에틸 아세테이트 (300 mL)에 용해시키고, 물 (100 mL) 및 염수 (100 mL)로 세척하였다. 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜, 표제 화합물 (78 g, 수율: 93%)을 수득하였다.

[0120] 단계 B:



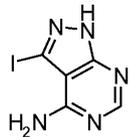
[0121]

[0122] 2-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란

[0123] 절차:

[0124] 3-(4-브로모-3-플루오로페녹시)-1,2,4,5-테트라플루오로벤젠 (73 g, 215.3 mmol, 1.0 eq.), 비스 피나콜레이트 보로네이트 (65.6 g, 258.4 mmol, 1.2 eq.), 아세트산칼륨 (31.6 g, 322.9 mmol, 1.5 eq.) 및 (dppf)PdCl₂ (9.4 g, 12.8 mmol, 0.06 eq.)를 1,4-디옥산 (1 L)에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 80°C에서 14시간 동안 질소 하에 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하였다. 여액을 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 석유 에테르)에 의해 정제하여, 표제 화합물 (60 g, 수율: 72%)을 수득하였다.

[0125] 단계 C:



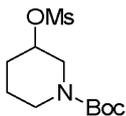
[0126]

[0127] 3-아이오도-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민

[0128] 절차:

[0129] NIS (250 g, 1.11 mol, 1.5 eq.)를 DMF (800 mL) 중 1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민 (100 g, 0.74 mol, 1.0 eq.)의 용액에 첨가하였다. 반응을 80~85°C에서 16시간 동안 질소 하에 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하였다. 여과 케이크를 에탄올 (1000 mL x 3)로 세척하여, 표제 화합물 (184 g, 수율: 95%)을 수득하였다.

[0130] 단계 D:



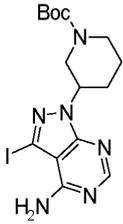
[0131]

[0132] tert-부틸 3-(메틸술포닐옥시)피페리딘-1-카르복실레이트

[0133] 절차:

[0134] 트리에틸아민 (15 g, 150 mmol, 3.0 eq.) 및 메탄술포닐 클로라이드 (6.3 g, 55 mmol, 1.1 eq.)를 0°C에서 디클로로메탄 (100 mL) 중 3-히드록시-피페리딘-1-카르복실레이트 (10.0 g, 50 mmol, 1.0 eq.)의 용액에 순차적으로 첨가하였다. 반응을 20°C에서 1시간 동안 교반한 다음, 포화 NaHCO₃ (100 mL)로 켄칭시켰다. 생성된 혼합물을 디클로로메탄 (200 mL x 3)으로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켜, 표제 화합물 (13 g, 수율: 95%)을 수득하였다.

[0135] 단계 E:



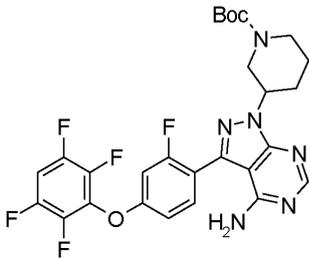
[0136]

[0137] tert-부틸 3-(4-아미노-3-아이오도-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)피페리딘-1-카르복실레이트

[0138] 절차:

[0139] 탄산세슘 (20.2 g, 62 mmol, 2.0 eq.) 및 3-(메틸술폰닐옥시) 피페리딘-1-카르복실레이트 (13 g, 46.5 mmol, 1.5 eq.)를 0℃에서 DMF (50 mL) 중 3-아이오도-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민 (8.1 g, 31 mmol, 1.0 eq)의 용액에 첨가하였다. 반응을 80℃에서 밤새 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고, 감압 하에 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 에틸 아세테이트)에 의해 정제하여, 표제 화합물 (5 g, 수율: 25%)을 수득하였다.

[0140] 단계 F:



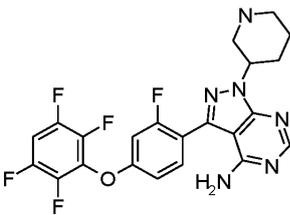
[0141]

[0142] tert-부틸 3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피페리딘-1-카르복실레이트

[0143] 절차:

[0144] tert-부틸 3-(4-아미노-3-아이오도-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)피페리딘-1-카르복실레이트 (7.6 g, 17.1 mmol, 1.0 eq.), 2-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란 (8.6 g, 22.3 mmol, 1.3 eq.), 인산칼륨 (7.3 g, 34.2 mmol, 2.0 eq.), 및 Pd-118 (0.56 g, 0.855 mmol, 0.05 eq.)을 1,4-디옥산/물의 혼합물 (5/1, v/v, 240 mL)에 첨가하였다. 반응을 60℃에서 12시간 동안 질소 분위기 하에 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 반응 혼합물을 얼음물 (300 mL)에 부은 다음, 에틸 아세테이트 (100 mL x 4)로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 분리 (용리액: 에틸 아세테이트)에 의해 정제하여, 표제 화합물 (6.8 g, 수율: 69%)을 수득하였다.

[0145] 단계 G:



[0146]

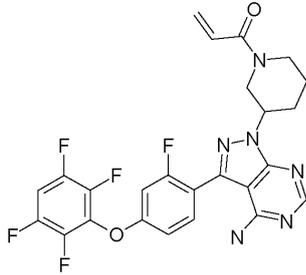
[0147] 3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1-(피페리딘-3-일)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민

[0148] 절차:

[0149] HCl/EA (20 mL, 4 mol/L)를 0℃에서 에틸 아세테이트 (50 mL) 중 tert-부틸 3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-

(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피페리딘-1-카르복실레이트 (6.8 g, 11.8 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응을 실온에서 1시간 동안 교반한 다음, 농축시켜, 표제 화합물 히드로클로라이드 (5.2 g, 수율: 86%)를 수득하였다.

[0150] 단계 H:



[0151]

[0152] 1-(3-(4-아미노-3-(2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)피페리딘-1-일)프로프-2-엔-1-온

[0153] 질차:

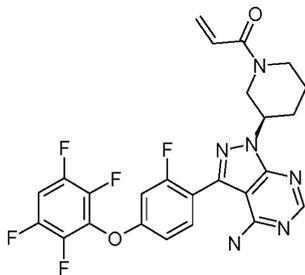
[0154] 트리에틸아민 (887 mg, 8.7 mmol, 3.0 eq.) 및 아크릴로일 클로라이드 (0.26 g, 2.9 mmol, 1.0 eq.)를 디클로로메탄 (10 mL) 중 3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1-(피페리딘-3-일)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민 (1.5 g, 2.9 mmol, 1.0 eq.)의 용액에 순차적으로 첨가하였다. 반응을 0°C에서 1시간 동안 교반하고, 물 (5 mL)로 퀀칭시키고, 디클로로메탄 (50 mL)으로 희석하고, 물 (30 mL x 2) 및 포화 염수 (30 mL)로 세척하였다. 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 석유 에테르:에틸 아세테이트 = 1:0 ~ 1:1)에 의해 정제하여, 표제 화합물 (0.94 g, 수율: 64%)을 수득하였다.

[0155] 분광 데이터:

[0156] LC/MS (방법: UFLC): RT = 3.130분; m/z = 531.1 [M+H]⁺; 총 작동 시간 = 7분.

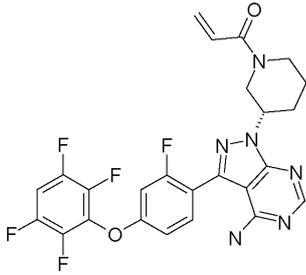
[0157] ¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 8.22 (s, 1H), 8.00-7.91 (m, 1H), 7.55-7.46 (m, 1H), 7.27 (dd, J = 2.4, 10.8 Hz, 1H), 7.12 (dd, J = 2.4, 8.8 Hz, 1H), 6.88-6.65 (m, 1H), 6.13-6.02 (m, 1H), 5.70-5.56 (m, 1H), 4.71-4.65 (m, 1H), 4.54-4.51 (m, 0.5H), 4.20-4.17 (m, 1H), 4.07-4.04 (m, 0.5H), 3.67-3.60 (m, 0.5H), 3.17-3.12 (m, 1H), 2.98-2.94 (m, 0.5H), 2.26-2.21 (m, 1H), 2.11-2.06 (m, 1H), 1.92-1.89 (m, 1H), 1.58-1.54 (m, 1H).

[0158] 단계 I:



[0159]

[0160] 1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피페리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온



[0161]

[0162] 1-[(S)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피페리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온

[0163] 절차:

[0164] 1-[3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피페리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온 (750 mg)을 SFC 키랄 분해 (CO₂:C₂H₅OH(0.2%DEA), v/v, 200 ml/분)에 의해 분리하여, 화합물 1 1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피페리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온 (280 mg, ee: 100%) 및 화합물 2 1-[(S)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피페리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온 (330 mg, ee: 98%)을 수득하였다.

[0165] 분광 데이터:

[0166] 화합물 1:

[0167] LC/MS (방법: UFLC): RT = 3.002분; m/z = 531.1 [M+H]⁺; 총 작동 시간 = 7분.

[0168] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.36 (s, 1H), 7.58 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 7.09-7.04 (m, 1H), 6.94-6.88 (m, 2H), 6.62-6.54 (m, 1H), 6.32-6.25 (m, 1H), 5.73-5.63 (m, 1H), 5.56-5.51 (m, 1H), 4.90-4.85 (m, 1.5H), 4.59-4.56 (m, 0.5H), 4.21-4.17 (m, 0.5H), 4.04-4.01 (m, 0.5H), 3.76-3.71 (m, 0.5H), 3.04-3.35 (m, 0.5H), 3.22-3.15 (m, 0.5H), 2.93-2.87 (m, 0.5H), 2.39-2.27 (m, 2H), 2.04-1.68 (m, 2H).

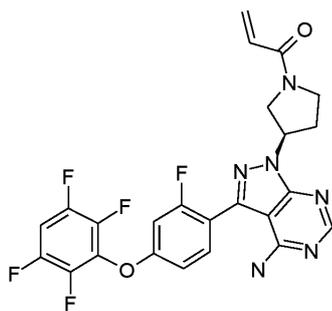
[0169] 화합물 2:

[0170] LC/MS (방법: UFLC): RT = 3.006분; m/z = 531.1 [M+H]⁺; 총 작동 시간 = 7분.

[0171] ¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.24 (s, 1H), 7.62 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 7.50-7.45 (m, 1H), 7.09-7.01 (m, 2H), 6.85-6.63 (m, 1H), 6.21-6.09 (m, 1H), 5.77-5.61 (m, 1H), 4.63-4.59 (m, 1H), 4.23-4.07 (m, 1.5H), 3.90-3.85 (m, 0.5H), 3.51-3.45 (m, 0.5H), 3.34-3.17 (m, 1.5H), 2.40-2.23 (m, 2H), 2.08-2.05 (m, 1H), 1.75-1.71 (m, 1H).

[0172] 실시예 2

[0173] 화합물 3



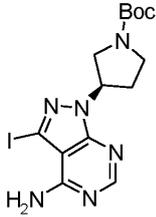
[0174]

[0175] 1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-

일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온

[0176] 방법 1:

[0177] 단계 A:



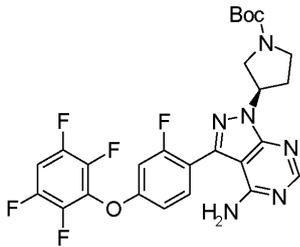
[0178]

[0179] (R)-tert-부틸 3-(4-아미노-3-아이오도-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)피롤리딘-1-카르복실레이트

[0180] 절차:

[0181] DIAD (27.6 g, 137.5 mmol, 1.5 eq.)를 0°C에서 질소 분위기 하에 테트라히드로푸란 (720 mL) 중 3-아이오도-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민 (24 g, 92 mmol, 1.0 eq.), (S)-tert-부틸 3-히드록시피롤리딘-1-카르복실레이트 (26 g, 137.5 mmol, 1.5 eq) 및 PPh₃ (36 g, 137.5 mmol, 1.5 eq)의 혼합물에 적가하였다. 반응을 0°C에서 1시간 동안 교반한 다음, 밤새 실온에서 교반하였다. 감압 하에 용매를 제거한 후, 아세트니트릴 (200 mL)을 잔류물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하고, 여과하였다. 여과 케이크를 아세트니트릴 (20 mL)로 세척하고, 건조시켜, 표제 화합물 (25 g, 수율: 63%)을 수득하였다.

[0182] 단계 B:



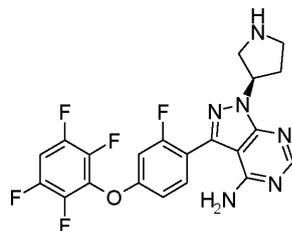
[0183]

[0184] (3R)-tert-부틸 3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-카르복실레이트

[0185] 절차:

[0186] (R)-tert-부틸 3-(4-아미노-3-아이오도-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)피롤리딘-1-카르복실레이트 (25 g, 58 mmol, 1.0 eq.), 2-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란 (30 g, 75.4 mmol, 1.3 eq.), 인산칼륨 (25 g, 116 mmol, 2.0 eq.), 및 Pd-118 (750 mg, 1.16 mmol, 0.02 eq.)을 1,4-디옥산/물의 혼합물 (5/1, v/v, 600 mL)에 첨가하였다. 반응을 60°C에서 밤새 질소 분위기 하에 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하였다. 여액을 감압 하에 농축시켰다. 물 (300 mL)을 잔류물에 첨가한 다음, 에틸 아세테이트 (300 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜, 표제 화합물 (60 g, 조 생성물)을 수득하였다.

[0187] 단계 C:



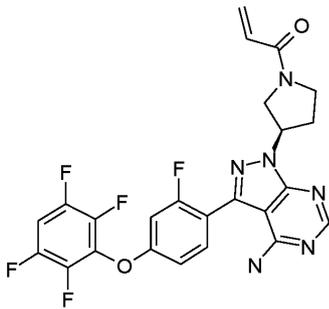
[0188]

[0189] 3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1-((R)-피롤리딘-3-일)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민

[0190] 절차:

[0191] HCl/EA (100 mL, 4 mol/L)를 0°C에서 에틸 아세테이트 (100 mL) 중 (3R)-tert-부틸 3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-카르복실레이트 (60 g, 조 생성물)의 용액에 첨가하였다. 반응을 실온에서 1시간 동안 교반하고, 농축 건조시켜, 표제 화합물의 히드로클로라이드 염을 수득하였다. 물 (500 mL)을 반응 플라스크에 첨가하고, 에틸 아세테이트 (300 mL x 3)로 추출하였다. 수성 상을 pH = 9로 조정된 다음, 에틸 아세테이트 (300 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켜, 표제 화합물 (24 g, 두 단계 수율: 90%)을 수득하였다.

[0192] 단계 D:



[0193]

[0194] 1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온

[0195] 절차:

[0196] NaOH (10%, 94 mL)를 -5°C에서 테트라히드로푸란 (470 mL) 중 3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1-[(R)-피롤리딘-3-일]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민 (23.5 g, 50.75 mmol, 1.0 eq.)의 용액에 첨가한 다음, 아크틸로일 클로라이드 (5.97 g, 66 mmol, 1.3 eq.)를 적가하였다. 반응을 -5°C에서 1시간 동안 교반하고, 포화 염수 (100 mL)로 켄칭시키고, 에틸 아세테이트 (200 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 석유 에테르:에틸 아세테이트 = 1:3 ~ 1:1)에 의해 정제하였다. 수득한 생성물을 메탄올 (500 mL)에 용해시키고, 여과하였다. 물 (1500 mL)을 교반된 여액에 첨가하고, 2시간 동안 교반하고, 여과하였다. 여과 케이크를 감압 하에 건조시켜, 표제 화합물 (16.5 g, 수율: 63%)을 수득하였다.

[0197] 분광 데이터:

[0198] LC/MS (방법: UFLC): RT = 3.764분; m/z = 517.0 [M+H]⁺; 총 작동 시간 = 7분.

[0199] ¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.45 (s, 1H), 7.70 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 7.55-7.46 (m, 1H), 7.12-7.05 (m, 2H), 6.70-6.55 (m, 1H), 6.33-6.26 (m, 1H), 5.81-5.75 (m, 1H), 4.23-3.83 (m, 5H), 2.68-2.55 (m, 2H).

[0200] 방법 2:

[0201] 절차:

[0202] NaOH (216 mg, 5.40 mmol, 2.5 eq.)를 0°C에서 테트라히드로푸란 (50 mL) 및 물 (10 mL) 중 3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1-[(R)-피롤리딘-3-일]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민 (1.0 g, 2.16 mmol, 1.0 eq.)의 용액에 첨가한 다음, 테트라히드로푸란 (10 mL) 중 클로로프로피오닐 클로라이드 (288 mg, 2.27 mmol, 1.05 eq.)의 용액을 적가하였다. 반응을 0°C에서 1시간 동안 교반한 다음, 60°C에서 12시간 동안 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 포화 염수 (10 mL)를 첨가한 다음, 에틸 아세테이트 (50 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 석유 에테르:에틸 아세테이트 = 1:3 ~ 1:1)에 의해 정제하여, 화합물 3

(0.8 g, 수율: 71%)을 수득하였다.

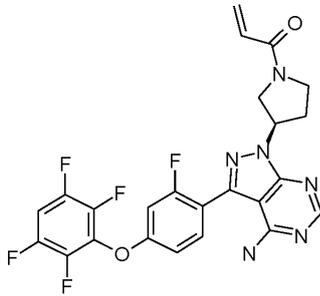
[0203] 방법 3:

[0204] 절차:

[0205] (R)-[3-(4-아미노-3-아이오도-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온 (100 g, 0.26 mmol, 1.0 eq.), 2-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란 (120 mg, 0.31 mmol, 1.2 eq.), 탄산나트륨 (55 mg, 0.52 mmol, 2.0 eq.) 및 Pd(PPh₃)₄ (30 mg, 0.026 mmol, 0.01 eq)을 1,4-디옥산/물의 혼합물 (5 mL, 1/1, v/v)에 첨가하였다. 반응을 마이크로파 조사하에 80°C에서 30분 동안 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하였다. 여액을 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 C18 컬럼 상에서 HPLC 분리 (이동상: 아세토니트릴/물/0.5% HCl, 용리액 구배 10% 내지 100% (부피 비))에 의해 정제하였다. 휘발성 용매를 제거한 후, 목적하는 분획을 동결건조시켜, 표제 화합물 (38 mg, 수율: 28%)을 수득하였다.

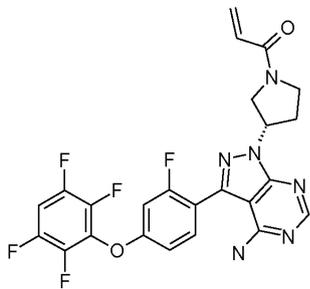
[0206] 방법 4:

[0207] 화합물 3 및 화합물 4



[0208]

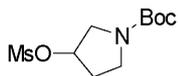
[0209] 1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온



[0210]

[0211] 1-[(S)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온

[0212] 단계 A:



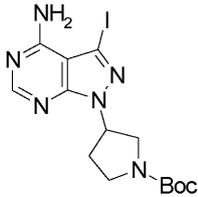
[0213]

[0214] tert-부틸 3-(메틸술폴닐옥시)피롤리딘-1-카르복실레이트

[0215] 절차:

[0216] 트리에틸아민 (35 g, 346 mmol, 2.1 eq.)을 0°C에서 디클로로메탄 (200 mL) 중 3-히드록시-피롤리딘-1-카르복실레이트 (30.0 g, 163 mmol, 1.0 eq.)의 용액에 첨가한 다음, 메틸 클로라이드 (36.6 g, 321 mmol, 1.9 eq.)를 적가하였다. 반응을 0°C에서 3시간 동안 교반하고, 물 (20 mL)로 켄칭시키고, 물 (100 mL x 2) 및 포화 염수 (100 mL)로 세척하였다. 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜, 표제 화합물 (45.6 g, 수율: 100%)을 수득하였다.

[0217] 단계 B:



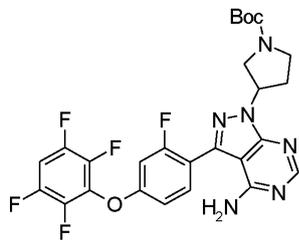
[0218]

[0219] tert-부틸 3-(4-아미노-3-아이오도-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)피롤리딘-1-카르복실레이트

[0220] 절차:

[0221] 탄산세슘 (37 g, 115 mmol, 3.0 eq.) 및 화합물 3-아이오도-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민 (10 g, 38 mmol, 1.0 eq.)을 DMF (300 mL) 중 tert-부틸 3-(메틸술포닐옥시)피롤리딘-1-카르복실레이트 (35 g, 134 mmol, 3.5 eq.)의 용액에 첨가하였다. 반응을 85°C에서 12시간 동안 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 여과하였다. 여액을 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 석유 에테르:에틸 아세테이트 = 1:1)에 의해 정제하여, 표제 화합물 (7.0 g, 수율: 44%)을 수득하였다.

[0222] 단계 C:



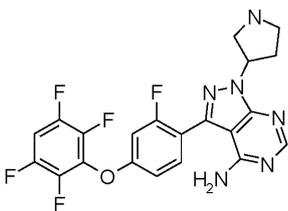
[0223]

[0224] tert-부틸 3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-카르복실레이트

[0225] 절차:

[0226] tert-부틸 3-(4-아미노-3-아이오도-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)피롤리딘-1-카르복실레이트 (8 g, 18 mmol, 1.0 eq.), 2-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란 (10.7 g, 27 mmol, 1.5 eq.), 인산칼륨 (7.6 g, 36 mmol, 2.0 eq.) 및 Pd-118 (1.2 g, 1.8 mmol, 0.1 eq.)을 1,4-디옥산/물의 혼합물 (180 mL, 5/1, v/v)에 첨가하였다. 반응을 질소 하에 두고, 60°C에서 14시간 동안 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 반응 혼합물을 얼음물 (50 mL)에 붓고, 에틸 아세테이트 (100 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 에틸 아세테이트:석유 에테르 = 1:1)에 의해 정제하여, 표제 화합물 (2.5 g, 수율 : 25%)을 수득하였다.

[0227] 단계 D:



[0228]

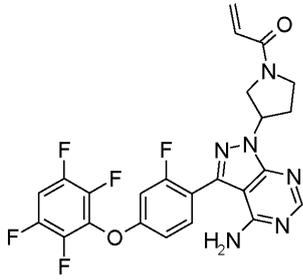
[0229] 3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1-(피롤리딘-3-일)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민

[0230] 절차:

[0231] HCl/EA (20 mL, 4 mol/L)를 0°C에서 디클로로메탄 (20 mL) 중 tert-부틸 3-[2-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-카르복실레이트 (2.5 g,

4.4 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응을 1시간 동안 실온에서 교반한 다음, 압력하에 농축시켜, 표제 화합물 히드로클로라이드 (2.2 g, 수율: 100%)를 수득하였다.

[0232] 단계 E:



[0233]

[0234] 1-[3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온

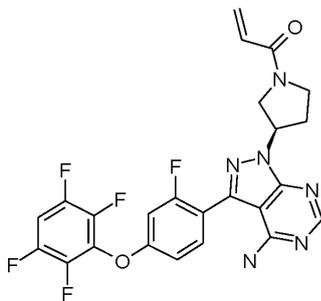
[0235] 절차:

[0236] 트리에틸아민 (1.4 g, 12.8 mmol, 3.0 eq.)을 디클로로메탄 (50 mL) 중 3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1-(피롤리딘-3-일)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민 (2.2 g, 4.4 mmol, 1.0 eq.)의 용액에 첨가한 다음, 아크릴로일 클로라이드 (0.38 g, 4.2 mmol, 0.95 eq.)를 0°C에서 적가하였다. 반응을 0°C에서 1시간 동안 교반하고, 물 (30 mL)로 쉐킷시켰다. 수성 상을 메틸렌 클로라이드 (30 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 에틸 아세테이트)에 의해 정제하여, 표제 화합물 (1.0 g, 수율: 45%)을 수득하였다.

[0237] 분광 데이터:

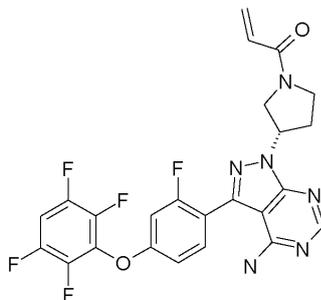
[0238] LC/MS (방법: UFLC): RT = 2.810분; m/z = 517.1 [M+H]⁺; 총 작동 시간 = 7분.

[0239] 단계 F:



[0240]

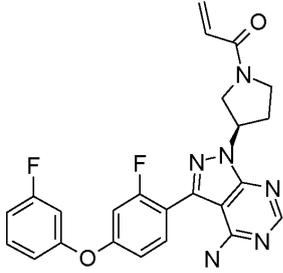
[0241] 1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온



[0242]

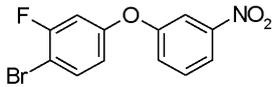
[0243] 1-[(S)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온

- [0244] 질차:
- [0245] 라세미체 1-[3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온을 SFC 키랄 분해에 의해 분리하여, 화합물 3 (270 mg) 및 화합물 4 (320 mg)를 수득하였다.
- [0246] 분광 데이터:
- [0247] LC/MS (방법: UFLC): RT = 2.808분; m/z = 517.1 [M+H]⁺; 총 작동 시간 = 7분.
- [0248] 실시예 3
- [0249] 화합물 5



- [0250]
- [0251] 1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온

- [0252] 단계 A:

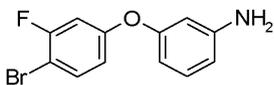


- [0253]
- [0254] 1-(3-플루오로-4-브로모-페녹시)-3-벤젠

- [0255] 질차:

- [0256] 1-플루오로-3-니트로벤젠 (29.6 g, 210 mmol, 1.0 eq.) 및 탄산칼륨 (58 g, 420 mmol, 2.0 eq.)을 DMF (400 mL) 중 3-플루오로-4-브로모페놀 (40 g, 210 mmol, 1.0 eq.)의 용액에 첨가하였다. 반응을 90°C에서 12시간 동안 질소 분위기 하에 교반하였다. 감압 하에 용매를 제거한 후, 물 (300 mL)을 잔류물에 첨가한 다음, 에틸 아세테이트 (300 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜, 표제 화합물 (65 g, 수율: 100%)을 수득하였다.

- [0257] 단계 B:

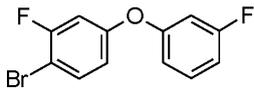


- [0258]
- [0259] 3-(3-플루오로-4-브로모-페녹시)벤젠아민

- [0260] 질차:

- [0261] 염화암모늄 (28 g, 525 mmol, 2.5 eq.) 및 철 분말 (58.8 g, 1.05 mol, 5.0 eq.)을 에탄올 (300 mL) 및 물 (60 mL) 중 1-브로모-2-플루오로-4-(3-니트로페녹시)벤젠 (65 g, 210 mmol, 1.0 eq.)의 용액에 첨가하였다. 반응 용액을 12시간 동안 질소 하에 환류시켰다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하였다. 여액을 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 HPLC C18 역상 컬럼 (이동상: 아세트니트릴/물/0.7% NH₄HCO₃, 용리액 구배 10%-100% (부피 비))에 의해 정제하였다. 휘발성 용매를 제거한 후, 목적하는 분획을 동결건조시켜, 표제 화합물 (19 g, 수율: 23%)을 수득하였다.

[0262] 단계 C:



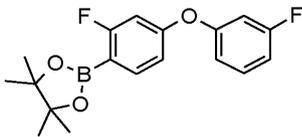
[0263]

[0264] 1-브로모-2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)벤젠

[0265] 절차:

[0266] 3-(3-플루오로-4-브로모-페녹시)벤젠아민 (9 g, 32 mmol, 1.0 eq.)을 -10℃에서 피리딘-플루오린화수소 용액 (30 mL)에 일부씩 나누어 첨가하였다. 생성된 반응 혼합물을 0℃에서 30분 동안 교반하고, -10℃로 냉각시킨 다음, 아질산나트륨 (2.42 g, 35 mmol, 1.1 eq.)을 일부씩 나누어 첨가하였다. 반응을 20℃에서 30분 동안 교반한 다음, 60℃에서 14시간 동안 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 얼음-에탄올 (50 mL)에 붓고, NaHCO₃ 포화 용액 (50 mL)으로 희석한 다음, 에틸 아세테이트 (50 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 석유 에테르)에 의해 정제하여, 표제 화합물 (5.8 g, 수율: 64%)을 수득하였다.

[0267] 단계 D:



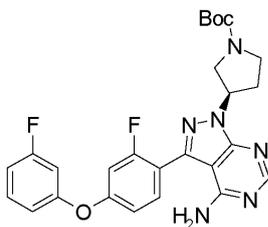
[0268]

[0269] 2-[2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐]-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란

[0270] 절차:

[0271] 1-브로모-2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)벤젠 (5.8 g, 20 mmol, 1.0 eq.), 비스 피나콜레이트 보로네이트 (6.1 g, 24 mmol, 1.2 eq.), 아세트산칼륨 (3.9 g, 40 mmol, 2.0 eq.) 및 [1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센] 디클로로팔라듐 (0.89 g, 1.2 mmol, 0.06 eq.)을 1,4-디옥산 (100 mL)에 용해시켰다. 반응 혼합물을 질소 분위기 하에 85℃에서 14시간 동안 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하였다. 여액을 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 석유 에테르)에 의해 정제하여, 표제 화합물 (6.5 g, 수율: 100%)을 수득하였다.

[0272] 단계 E:



[0273]

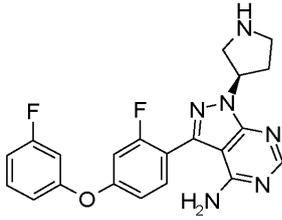
[0274] (3R)-tert-부틸 3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-카르복실레이트

[0275] 절차:

[0276] (R)-tert-부틸 3-(4-아미노-3-아이오도-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)피롤리딘-1-카르복실레이트 (6.5 g, 15.0 mmol, 1.0 eq.), 2-[2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐]-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란 (6.5 g, 19.6 mmol, 1.3 eq.), 인산칼륨 (6.4 g, 30.1 mmol, 2.0 eq.) 및 Pd-118 (0.25 g, 0.39 mmol, 0.01 eq.)을 1,4-디옥산/물의 혼합물 (16 mL, 1/1, v/v)에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 85℃에서 12시간 동안 질소 분위기 하에 교반하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 반응 혼합물을 물 (50 mL)로 희석한 다음, 에틸 아세테이트 (100 mL x 3)로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 에틸 아세테이트)에 의해 정제하여, 표제 화합물 (4.2 g, 수율:

55%)을 수득하였다.

[0277] 단계 F:



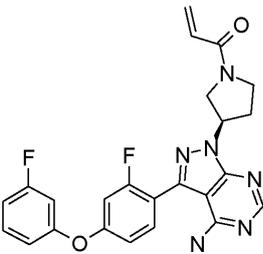
[0278]

[0279] 3-[2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐]-1-[(R)-피롤리딘-3-일]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민

[0280] 절차:

[0281] HCl/EA (10 mL, 4 mol/L)를 0℃에서 디클로로메탄 (15 mL) 중 (3R)-tert-부틸 3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-카르복실레이트 (4.2 g, 8.27 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응을 1시간 동안 실온에서 교반한 다음, 감압 하에 농축시켜, 표제 화합물 히드로클로라이드 (3.7 g, 수율: 92%)를 수득하였다.

[0282] 단계 G:



[0283]

[0284] 1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온

[0285] 절차:

[0286] 수산화나트륨 (10%, 15.3 mL) 및 아크릴로일 클로라이드 (0.67 g, 7.44 mmol, 0.9 eq.)를 0℃에서 테트라히드로푸란 (20 mL) 중 3-[2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐]-1-[(R)-피롤리딘-3-일]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민 (3.7 g, 8.27 mmol, 1.0 eq.)의 용액에 순차적으로 첨가하였다. 반응을 실온에서 10분 동안 교반하고, 포화 NaHCO₃ (20 mL)로 퀘칭시키고, 디클로로메탄 (30 mL x 3)으로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (용리액: 석유 에테르:에틸 아세테이트 = 1:0 내지 1:1)에 의해 정제하여, 표제 화합물 (2.5 g, 수율: 65%)을 수득하였다.

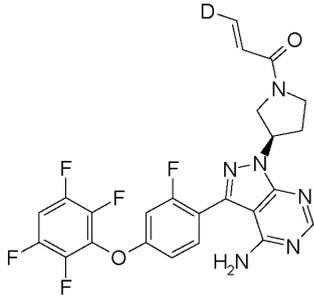
[0287] 분광 데이터:

[0288] LC/MS (방법: UFLC): RT = 3.178분; m/z = 463.0 [M+H]⁺; 총 작동 시간 = 7분.

[0289] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 8.36 (s, 1H), 7.53-7.49 (m, 1H), 7.40-7.35 (m, 1H), 6.95-6.81 (m, 4H), 6.41-6.39 (m, 2H), 5.69-5.55 (m, 3H), 4.14-3.98 (m, 3H), 3.78-3.72 (m, 1H), 2.71-2.54 (m, 2H).

[0290] 실시예 4

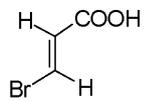
[0291] 화합물 6



[0292]

[0293] (*E*)-1-[(*R*)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]-3-듀테륨-프로프-2-엔-1-온

[0294] 단계 A:



[0295]

[0296] (*E*)-3-브로모아크릴산

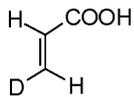
[0297] 절차:

[0298] 프로피올산 (1 g, 14.28 mmol, 1.0 eq.) 및 HBr (40% 수용액, 1.7 mL, 0.88 eq.)의 혼합물을 밤새 140°C에서 교반하였다. 용매를 감압 하에 증류하였다. 수득한 조 생성물을 물 (4 mL x 3)로부터 결정화시켜, 표제 화합물 (0.76 g, 수율: 35%)을 수득하였다.

[0299] 분광 데이터:

[0300] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, *J* = 14 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 14 Hz, 1H).

[0301] 단계 B:



[0302]

[0303] (*E*)-3-듀테륨아크릴산

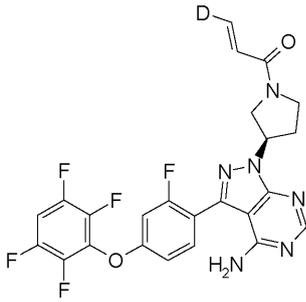
[0304] 절차:

[0305] Na-Hg (6 g, 49.67 mmol, 2.5 eq.)를 0 ~ 5°C에서 D₂O (30 mL) 중 (*E*)-3-브로모아크릴산 (3 g, 19.87 mmol, 1.0 eq.)의 용액에 첨가하였다. 반응을 실온에서 36시간 동안 교반하였다. 수성 상을 1M 염산에 의해 pH = 5로 조정 한 다음, 디에틸 에테르 (20 mL x 5)로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켜, 표제 화합물 (0.52 g, 수율: 36%)을 수득하였다.

[0306] 분광 데이터:

[0307] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.76 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H).

[0308] 단계 C:



[0309]

[0310] (*E*)-1-[(*R*)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]-3-듀테륨-프로프-2-엔-1-온

[0311]

절차:

[0312]

(*E*)-3-듀테륨아크릴산 (76 mg, 1.08 mmol, 1.0 eq.), HATU (530 mg, 1.40 mmol, 1.3 eq.) 및 *N,N*-디이소프로필 에틸아민 (419 mg, 3.24 mmol, 3.0 eq.)을 디클로로메탄 (50 mL) 중 3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1-[(*R*)-피롤리딘-3-일]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민 (500 mg, 1.08 mmol, 1.0 eq.)의 용액에 첨가하였다. 반응을 실온에서 12시간 동안 교반하고, 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 C18 역상 컬럼에서 HPLC-분리에 의해 정제하였다 (장비: LC 8A & 길스 215, 분획 수집기 컬럼: 시너지 맥스-RP 150*30mm*4u, 이동상 A: 물 (0.5% HCl), 이동상 B: 아세토니트릴, 유량: 30 mL/분, 구배 B: 36%-37%, 0-17분). 휘발성 용매를 제거한 후, 목적하는 분획을 동결건조시켜, 표제 화합물 히드로클로라이드 (76 mg, 수율: 13%)를 수득하였다.

[0313]

분광 데이터:

[0314]

LC/MS (방법: UFLC): RT = 2.765분; m/z = 518.1 [M+H]⁺; 총 작동 시간 = 7분.

[0315]

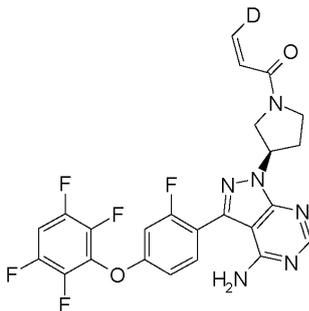
¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 8.41 (s, 1H), 7.66 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.51-7.44 (m, 1H), 7.09-7.01 (m, 2H), 6.66-6.56 (m, 1H), 6.28-6.23 (m, 1H), 5.75-5.66 (m, 1H), 4.19-4.16 (m, 1H), 4.06-4.02 (m, 1.5H), 3.89-3.85 (m, 1H), 3.78-3.72 (m, 0.5H), 2.63-2.49 (m, 2H).

[0316]

실시예 5

[0317]

화합물 7

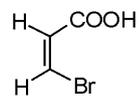


[0318]

[0319] (*Z*)-1-[(*R*)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]-3-듀테륨-프로프-2-엔-1-온

[0320]

단계 A:



[0321]

[0322]

(*Z*)-3-브로모아크릴산

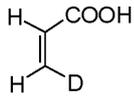
[0323] 절차:

[0324] 프로피올산 (1 g, 14.28 mmol, 1.0 eq.) 및 HBr (40% 수용액, 1.7 mL, 0.88 eq.)의 혼합물을 밤새 55°C에서 교반하였다. 용매를 감압 하에 증류하였다. 수득한 조 생성물을 석유 에테르 (4 mL x 3)로부터 결정화하여, 표제 화합물 (0.3 g, 수율: 14%)을 수득하였다.

[0325] 분광 데이터:

[0326] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 7.16 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.67 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H).

[0327] 단계 B:



[0328] (Z)-3-듀테륨아크릴산

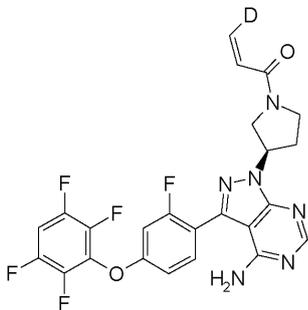
[0330] 절차:

[0331] Na-Hg (6 g, 49.67 mmol, 2.5 eq.)를 0 ~ 5°C에서 D_2O (30 mL) 중 (Z)-3-브로모아크릴산 (3 g, 19.87 mmol, 1.0 eq.)의 용액에 첨가하였다. 반응을 실온에서 36시간 동안 교반하였다. 수성 상을 1M 염산에 의해 pH = 5로 조정 한 다음, 디에틸 에테르 (20 mL x 5)로 추출하였다. 합한 유기 상을 무수 황산나트륨 상에서 건조시키고, 감압 하에 농축시켜, 표제 화합물 (0.34 g, 수율: 23%)을 수득하였다.

[0332] 분광 데이터:

[0333] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 6.14 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 5.96 (d, $J = 10.4$ Hz, 1H).

[0334] 단계 C:



[0335] (Z)-1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]-3-듀테륨-프로프-2-엔-1-온

[0337] 절차:

[0338] (Z)-3-듀테륨아크릴산 (151 mg, 2.16 mmol, 1.0 eq.), HATU (1.06 g, 2.80 mmol, 1.3 eq.) 및 N,N-디이소프로필에틸아민 (838 mg, 6.48 mmol, 3.0 eq.)을 디클로로메탄 (50 mL) 중 3-[2-플루오로-4-(2,3,5,6-테트라플루오로페녹시)페닐]-1-[(R)-피롤리딘-3-일]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민 (1.0 g, 2.16 mmol, 1.0 eq.)의 용액에 첨가하였다. 반응을 실온에서 12시간 동안 교반하고, 농축시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 C18 역상 컬럼 상에서 HPLC-분리에 의해 정제하였다 (장비: LC 8A & 길스 215, 분획 수집기 컬럼: 시너지 맥스-RP 150*30mm*4u, 이동상 A: 물 (0.5% HCl), 이동상 B: 아세토니트릴, 유량: 30 mL/분, 구배 B: 36%-37%, 0~17분). 휘발성 용매를 제거한 후, 목적하는 분획을 동결건조시켜, 표제 화합물 히드로클로라이드 (228 mg, 수율: 20%)를 수득하였다.

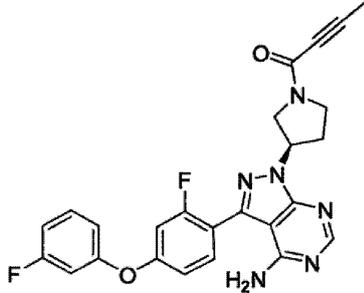
[0339] 분광 데이터:

[0340] LC/MS (방법: UFLC): RT = 2.775분; $m/z = 518.1$ [M+H] $^+$; 총 작동 시간 = 7분.

[0341] ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) δ 8.45 (s, 1H), 7.70 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 7.52-7.46 (m, 1H), 7.13-7.05 (m, 2H), 6.71-6.61 (m, 1H), 5.80-5.73 (m, 2H), 4.23-4.20 (m, 1H), 4.09-4.04 (m, 1.5H), 3.93-3.90 (m, 1H), 3.80-3.75 (m, 0.5H), 2.67-2.56 (m, 2H).

[0342] 실시예 6

[0343] 화합물 7x



[0344]

[0345] 1-[(R)-3-[4-아미노-3-[2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐]-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피롤리딘-1-일]-부틸-2-인-1-온

[0346] 절차:

[0347] 2-부틴산 (41.17 mg, 489.72 μmol , 1.00 eq.), HATU (93.10 g, 244.86 μmol , 0.50 eq.) 및 DIPEA (75.95 mg, 587.66 μmol , 102.64 μL , 1.20 eq.)를 디클로로메탄 (5.0 mL) 중 3-(2-플루오로-4-(3-플루오로페녹시)페닐)-1-((R)-피롤리딘-3-일)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민 (200.00 g, 489.72 μmol , 1.00 eq.)의 용액에 순차적으로 첨가하였다. 반응을 15-18°C의 온도에서 2시간 동안 교반한 다음, 농축시키고, 회전식 건조기에서 건조시켜, 조 생성물을 수득하였고, 이를 C18 역상 컬럼 상에서 HPLC에 의해 정제하였다 (이동상: 아세토니트릴/물 / 0.5% HCl, 용리액 구배 22% 내지 52% (부피 비)). 휘발성 성분을 감압 하에 증발에 의해 제거한 후, 목적하는 분획을 동결건조시켜, 표제 화합물의 히드로클로라이드 (82 mg, 수율: 33%)를 수득하였다.

[0348] 분광 데이터:

[0349] LC/MS (방법: UFLC): RT = 3.057분; m/z = 475.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 총 작동 시간 = 7분.

[0350] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.92 (s, 1H), 8.34 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.56 (br, 1H), 7.41-7.36 (m, 1H), 7.00-6.86 (m, 5H), 6.58 (br, 1H), 5.62-5.58 (m, 1H), 4.22-3.74 (m, 4H), 2.65-2.50 (m, 2H), 2.02-1.96 (m, 3H).

[0351] 시험관내 검정

[0352] BTK 키나제 활성의 억제 검정:

[0353] BTK 야생형 표준 HTRF 검정의 효소 반응 혼합물은 완충액 중에 1 nM BTK 야생형, 1 μM 비오틴-TK1 펩티드, 30 μM ATP, 및 50 mM HEPES를 함유하였다. 효소 반응을 실온에서 60분 동안 수행하였다. 0.2 M EDTA 5 μL 를 첨가하여 반응을 퀀칭시킨 다음, 억제제 (5 L)를 2 nM 항체 및 62.5 nM XL665의 최종 농도에서 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 60분 동안 인큐베이션한 다음, 엔비전 플레이트 판독기를 판독하였다. 판독 결과를 (Min 비)/(Max-Min)*100%의 식에 의해 억제율%로 변환시켰다. 이로써, 4 파라미터 곡선 대입을 이용하여 시험 화합물의 IC50 데이터를 생성하였다.

[0354] 종양 세포 활성의 억제 검정:

[0355] 종양 세포 (TMD-8, DoHH2, 및 WSU-DLCL2)를 96-웰 플레이트로 옮겨서 그에 부착시켰다. 하룻밤 지난 후, 블랭크 완충액 및 선택된 농도 (0.01 nM-100 μM)의 시험 화합물 용액을 첨가하였다. 48시간 동안 인큐베이션한 후, 셀타이터-고를 첨가하여 세포를 용해시켰다. 발광 신호의 기록 및 세포 생존성의 퍼센트 억제율의 계산을 수행하였다.

[0356] 생체내 검정

- [0357] 수컷 SD 래트에서의 약동학적 연구: 24시간 이내에 약동학적 연구를 위해 수컷 SD 래트를 정맥내 투여 및 경구 투여의 2개의 군으로 나누었다. 각 군은 3 마리의 동물을 가졌다. 정맥내 투여 군의 경우에는 투여 전, 투여 후 0.0833, 0.167, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 h에 혈액 샘플을 수집하였고, 경구 투여 군의 경우에는 투여 전, 투여 후 0.167, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 h에 혈액 샘플을 수집하였다. 혈액을 수집한 후, HPLC-MS/MS를 적용하여 화합물의 혈장 농도를 측정하였다. 본 연구에서 정맥내 군의 계산된 약동학적 파라미터는 평균 혈장 클리어런스 (CLp), 정상 상태에서의 평균 걸보기 부피 분포 (Vdss), 0-24 h 곡선하 면적 (AUC), 0-24 h 평균 체류 시간 (MRT), 반감기 (T1/2)를 포함하고, 경구 군의 계산된 약동학적 파라미터는 평균 피크 농도 (Cmax), 0-24 h 곡선하 면적 (AUC), 0-24 h 평균 체류 시간 (MRT); 평균 상대적 생체이용률을 포함한다.
- [0358] 비글 개에서의 약동학적 연구: 24시간 이내에 약동학적 연구를 위해 비글 개를 정맥내 투여 (1 mg/kg) 및 경구 투여 (3 mg/kg)의 2개의 군으로 나누었다. 각 군은 3 마리의 동물을 가졌다. 정맥내 투여 군의 경우에는 투여 전, 투여 후 0.033, 0.083, 0.25, 0.5, 1, 3, 6, 9, 24 h에 혈액 샘플을 수집하였고, 경구 투여 군의 경우에는 투여 전, 투여 후 0.083, 0.25, 0.5, 1, 3, 6, 9, 24 h에 혈액 샘플을 수집하였다. 혈액을 수집한 후, HPLC-MS/MS를 적용하여 화합물의 혈장 농도를 측정하였다. 본 연구에서 정맥내 군의 계산된 약동학적 파라미터는 평균 혈장 클리어런스 (CLp), 정상 상태에서의 평균 걸보기 부피 분포 (Vdss), 0-24 h 곡선하 면적 (AUC), 0-24 h 평균 체류 시간 (MRT), 반감기 (T1/2)를 포함하고, 경구 군의 계산된 약동학적 파라미터는 평균 피크 농도 (Cmax), 0-24 h 곡선하 면적 (AUC), 0-24 h 평균 체류 시간 (MRT); 평균 상대적 생체이용률을 포함한다.
- [0359] 종양 모델의 동물 TMD-8, DoHH2, 또는 WSU-DLCL2 억제에서 단독요법 및 조합 요법:
- [0360] 실험 결과는, 민감성 (TMD-8), 불응성 (DoHH-2) 뿐만 아니라 다중-약물 내성 (WSU-DLCL2) 종양 모델에 대한 상승작용 효과의 공동-투여 효능이 단일 약물 억제 효과에 비해 더 양호하였음을 보여준다.
- [0361] 암컷 CB-17SCID 마우스를 이종이식 모델 평가 화합물 (3, 9, 14, 및 표에 열거된 다른 화합물)에서 사용하여 약물의 공동 항-종양 효과를 평가하였다. TMD-8, DoHH2, WSU-DLCL2 종양 세포를 열-불활성화된 소 태아 혈청을 함유하는 10% RPMI-1640 배지에 시딩하고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 종양 세포를 주 2회 일상적으로 계대 배양하였다. 세포가 지수 성장기로 성장하였을 때, 이들을 수확하여 종양 접종을 위해 계수하였다. 각각의 마우스의 우측에 종양 세포를 0.2 mL PBS 현탁액 (10 x 10⁶) 및 매트릭젤 (1/1)과 함께 피하 접종하였다. 평균 종양 부피는 투여 시작시에 대략 100-200mm³이었다. 각 군은 6-10 마리만의 조성으로 구성되었다. 시험군 (대조군, 단일 약물군, 공동-투여군 포함)에게 미리 결정된 용량을 경구 투여하였고, 14일 또는 21일 동안 계속 투여하였다. 실험하는 동안, 종양 부피 및 마우스 체중을 2일 또는 3일에 한번씩 측정하였다.
- [0362] 콜라겐-유도된 관절염 모델:
- [0363] 수컷 DBA/1 마우스를 사용하여, 화합물 3 및 화합물 14 조합물을 사용하는 생체내 콜라겐-유도된 관절염 모델 평가에서 억제 효과를 평가하였다. 마우스를 대조군, 용매 대조군, 및 5개의 치료군을 포함하는 8개의 군으로 나누었다. 0일 및 21일째에 모든 마우스 (정상군은 제외)를 200 µg 소 콜라겐 (II 유형)으로 면역화시켰다. 면역화 접종 7일 후에 (28일), 동물들은 약 1의 평균 임상 점수로 질환의 증상을 나타내기 시작하였다. 같은 날에, 면역화된 마우스를 무작위로 하기 7개의 군으로 나누었다: 화합물 3 (1.5 mpk) 및 화합물 14 (0.15 mpk), 1일 2회 공동-투여; 화합물 3 (4.5mpk) 및 화합물 14 (0.45mpk), 1일 2회 조합 투여; 화합물 14 (0.15 mpk) 및 화합물 3 (1.5 mpk), 1일 1회 공동-투여; 화합물 3 (1.5 mpk) 단독요법, 1일 1회; 화합물 14 (1.5 mpk) 단독요법, 1일 1회; 양성 대조군 (0.2 mg/kg 텍사메타손), 및 투여 시작. 2주 동안 경구 투여하고, 체중 및 임상 점수를 기록하였다. 연구 마지막에, 동물들을 희생시키고, 조직병리학적 분석을 위해 뒷다리를 수집하였다.
- [0364] 아주반트 관절염 모델:
- [0365] 암컷 루이스 래트 래트에서의 콜라겐-유도된 관절염 모델을 위해 사용하여, 화합물 3 및 화합물 14 조합 요법의 생체내 억제 효과를 평가하였다. 면역화를 위해 제0일에 모든 래트 (대조군 제외)의 좌측 뒷다리에 완전 프로인트 아주반트 (CFA)를 주사하였다. 면역화 6일 후에, 일부 래트는 관절염의 임상적 증상, 예컨대 홍조 및 부종을 나타내기 시작하였다. 13일째에, 동물들을 하기 7개 군의 조합물로 재면역화시켰다: 용매 대조군, 화합물 3 (5 mpk) 및 화합물 14 (0.5 mpk), 1일 2회 공동-투여; 화합물 3 (15 mpk) 및 화합물 14 (1.5 mpk), 1일 2회 공동-투여; 화합물 14 (3 mpk) 및 화합물 3 (30 mpk), 1일 1회 공동-투여; 화합물 3 (5 mpk) 단독요법, 1일 2회; 화합물 14 (0.5 mpk) 단독요법, 1일 2회; 양성 대조군 (화합물 11, 3 mpk, 1일 2회), 및 투여 시작. 3주 동안 경구 투여하고, 격일로 체중, 임상 점수 및 발 부피를 기록하였다. 연구 마지막에, 동물들을 희생시키고,

조직병리학적 분석을 위해 우측 뒷발을 수집하여 HE 염색하였다.

[0366] 표 2. 본 발명의 실시예의 화합물에 의한 BTK 활성 억제의 데이터

실시예	BTK IC ₅₀ (μM)	실시예	BTK IC ₅₀ (μM)	실시예	BTK IC ₅₀ (μM)
1	0.002	2	0.023	3	0.0005
4	0.021	5	0.001		

[0367]

[0368] 표 3. TMD-8 세포주에 대한 개별 화합물의 억제 (억제%)

화합물	화합물 명칭 (메카니즘)	억제%	100 uM	10 uM	1uM	0.1uM	0.01uM
3	화합물 3 (BTK)	AVG	99.69	74.93	61.66	59.59	46.07
		SD	0.10	0.64	3.97	1.49	1.60
3	화합물 3 (BTK)	AVG			55.05	52.40	51.66
		SD			3.47	2.17	1.21
6	화합물 6 (BTK)	AVG	99.38	62.52	60.21	52.99	32.29
		SD	0.09	1.58	3.62	3.53	5.50
7	화합물 7 (BTK)	AVG	99.32	62.89	58.57	58.68	33.85
		SD	0.13	2.18	0.90	2.20	3.05
8	이텔라리십 (PI3K)	AVG	96.79	87.69	68.92	48.83	29.44
		SD	0.27	1.07	2.87	1.35	3.83
9	이브루티닙 (BTK)	AVG	99.93	81.41	66.11	59.14	56.16
		SD	0.01	2.27	2.07	1.77	2.47
10	록솔리티닙 (JAK1/2)	AVG			100.78	-5.53	0.05
		SD			0.05	10.51	10.00
11	토파크티닙	AVG			6.66	1.31	6.02

[0369]

	(JAK3)	SD			7.59	8.82	14.08
12	ABT-199 베네토클락스 (Bcl-2)	AVG			37.55	18.81	11.12
		SD			3.83	5.60	2.80
13	OTS-964 (TOPK)	AVG			101.20	49.10	8.71
		SD			0.08	4.49	10.40
14	에베롤리무스 (mTOR)	AVG			68.59	67.64	65.55
		SD			1.71	2.76	2.35
15	포말리도미드 (IMiD)	AVG			76.84	61.69	45.12
		SD			1.03	2.34	1.26
16	레날리도미드 (IMiD)	AVG			94.21	21.04	7.43
		SD			0.46	5.67	2.61
17	라파마이신 (mTOR)	AVG			64.99	59.83	58.71
		SD			2.77	1.45	2.37
18	메토트렉세이트 (항폴레이트제)	AVG			39.55	32.04	-8.45
		SD			0.71	3.05	6.02
19	세리티닙 (ALK)	AVG					
		SD					

[0370]

[0371]

비교: 상기 표에서 화합물 3, 6, 7, 8-19는 표시된 바와 같이 각각의 "중국어 또는 영어 화합물 명칭"에 상응하고, 여기서 화합물 3, 6 및 7은 본 발명의 실시예의 화합물을 나타내는 반면에, 화합물 8-19는 선행 기술에서의 상응하는 화합물을 나타낸다. 표기의 편의를 위해, 상응하는 화합물에 식별 번호를 제공하였다. 따라서, 하기에 기재되는 화합물의 식별 번호 또한 동일한 의미를 가질 것이다.

[0372] 표 4. TMD-8 세포주에 대한 "투 인 윈" 조성물의 억제 (억제%)

화합물@농도	억제%	3 @1 uM	3 @0.1 uM	3 @0.01 uM
14 @0.1 uM	AVG	65.94	67.20	66.17
	SD	1.41	0.73	1.64
15 @0.1 uM	AVG	53.25	49.26	30.27
	SD	3.19	0.67	2.67
8 @0.1 uM	AVG	68.05	64.71	63.56
	SD	2.04	2.50	5.10
13 @0.1 uM	AVG	82.60	68.80	77.27
	SD	3.50	2.64	1.91
17 @0.1 uM	AVG	75.73	80.41	75.12
	SD	0.53	1.29	6.22
12 @0.1 uM	AVG	85.97	79.99	65.36
	SD	1.50	1.54	0.83
18 @0.1 uM	AVG	59.93	46.58	35.68
	SD	2.77	6.76	5.94
화합물@농도	억제%	8 @1 uM	8 @0.1 uM	8 @0.01 uM
14 @0.1 uM	AVG	81.20	67.95	58.69
	SD	0.33	1.59	1.08
15 @0.1 uM	AVG	76.96	42.58	24.14
	SD	0.95	7.50	3.94
13 @0.1 uM	AVG	95.76	83.60	75.38
	SD	0.31	0.53	3.51
3 @0.1 uM	AVG	86.26	80.21	73.01
	SD	2.25	2.87	2.46
화합물 @농도	억제%	13 @1 uM	13 @0.1 uM	13 @0.01 uM
8 @0.1 uM	AVG	99.31	47.73	48.71
	SD	0.06	2.52	4.50
14 @0.1 uM	AVG	99.46	59.47	60.30
	SD	0.11	0.73	1.44
15 @0.1 uM	AVG	99.09	8.82	12.97
	SD	0.17	3.93	4.84
3 @0.1 uM	AVG	99.16	97.60	52.43
	SD	0.42	0.19	1.07

[0373]

화합물@농도	억제%	15 @1 uM	15 @0.1 uM	15 @0.01 uM
8 @0.1 uM	AVG	80.19	43.34	42.81
	SD	1.25	5.76	3.81
14 @0.1 uM	AVG	61.84	57.04	58.46
	SD	1.62	1.70	0.32
13 @0.1 uM	AVG	71.75	30.72	1.36
	SD	0.35	7.16	5.17
3 @0.1 uM	AVG	96.92	70.04	49.93
	SD	0.19	4.46	5.42
화합물@농도	억제%	18 @1 uM	18 @0.1 uM	18 @0.01 uM
14 @0.1 uM	AVG	54.43	52.67	56.87
	SD	0.70	2.71	2.27
3 @0.1 uM	AVG	46.90	42.73	34.99
	SD	2.34	2.91	1.26
화합물 @농도	억제%	9 @1 uM	9 @0.1 uM	9 @0.01 uM
14 @0.1 uM	AVG	71.04	58.89	56.54
	SD	2.52	9.71	13.33
19 @0.1 uM	AVG	52.60	43.68	33.70
	SD	3.67	4.16	1.51
18 @0.1 uM	AVG	55.19	42.42	32.13
	SD	2.63	3.32	3.08

[0374]

[0375]

표 4로부터 "투-인-원" 제약 조합물이 종양 세포 생존성에 대해 유의한 억제를 입증하였음을 확인할 수 있다. 이 중에서, 화합물 8 + 화합물 13, 화합물 14 + 화합물 13, 화합물 15 + 화합물 13, 및 화합물 3 + 화합물 13의 제약 조합물이 TMD-8 세포 생존성에 대해 매우 효과적인 억제를 입증하였다.

[0376]

표 5. TMD-8 세포주에 대한 "쓰리 인 원" 조성물의 억제 (억제%)

화합물@농도	억제%	3 @1 uM	3 @0.1 uM	3 @0.01 uM
14 @0.1 uM + 15 @0.1 uM	AVG	76.42	80.77	83.22
	SD	4.50	1.38	0.37
17 @0.1 uM + 15 @0.1 uM	AVG	89.89	85.62	88.57
	SD	0.72	7.68	3.37
14 @0.1 uM + 12 @0.1 uM	AVG	93.44	94.73	94.65
	SD	0.55	0.92	1.11

[0377]

8 @0.1 uM +	AVG	95.56	95.30	94.62
	SD	0.40	0.10	0.06
12 @0.1 uM +	AVG	66.44	71.70	58.27
	SD	8.75	1.91	2.80
화합물@농도	억제%	15 @1 uM	15 @0.1 uM	15 @0.01 uM
14 @0.1 uM +	AVG	92.74	82.66	75.17
	SD	0.38	1.90	2.48
화합물@농도	억제%	8 @1 uM	8 @0.1 uM	8 @0.01 uM
14 @0.1 uM +	AVG	87.17	79.06	59.45
	SD	1.70	0.73	2.16
화합물@농도	억제%	13 @1 uM	13 @0.1 uM	13 @0.01 uM
15 @0.1 uM +	AVG	98.97	22.27	-19.34
	SD	0.28	34.18	11.80
3 @0.1 uM +	AVG	99.30	29.58	-3.32
	SD	0.15	27.38	11.27
15 @0.1 uM +	AVG	99.33	19.51	-1.30
	SD	0.11	48.40	6.76
화합물@농도	억제%	10 @1 uM	10 @0.1 uM	10 @0.01 uM
15 @0.1 uM +	AVG	24.40	-6.35	-0.77
	SD	5.84	5.66	18.61
3 @0.1 uM +	AVG	16.26	2.31	-6.21
	SD	2.14	1.28	4.86
15 @0.1 uM +	AVG	-0.86	0.98	-2.40
	SD	6.50	5.87	1.06
화합물@농도	억제%	9 @1 uM	9 @0.1 uM	9 @0.01 uM
18 @0.1 uM +	AVG	72.55	66.59	64.76
	SD	0.22	11.12	8.34
14 @0.1 uM +	AVG	82.81	86.91	78.60
	SD	1.05	1.41	13.08

[0378]

[0379]

표 5로부터 "쓰리-인-원" 제약 조합물이 종양 세포 생존성에 대해 유의한 억제 효과를 입증하였음을 확인할 수 있다. 이중에서, 심지어 BTK 억제제의 농도가 10nM만큼 낮았을 때도, 화합물 3 + 화합물 14 + 화합물 12의 제약 조합물, 및 화합물 3 + 화합물 8 + 화합물 12의 제약 조합물은 여전히 종양 세포 생존성에 대해 95%만큼 높은 억제 효과를 입증하였다.

[0380] 표 6. 내성 WSU-DLCL2 세포주에 대한 개별 화합물 및 "쓰리 인 원" 조성물의 억제 (억제%)

화합물@농도	억제%	1 uM	0.1 uM	0.01 uM
3	AVG	41.04	-1.36	-10.06
	SD	7.73	2.59	11.14
15	AVG	46.61	-8.32	-14.53
	SD	1.15	4.49	13.72
14	AVG	55.35	46.71	40.81
	SD	1.67	0.53	2.67
화합물@농도	억제%	3	3	3
15 @0.1 uM +	AVG	83.76	63.69	56.67
	SD	1.33	4.19	4.36
14 @0.1 uM				

[0381]

[0382] 표 6으로부터 화합물 3 + 화합물 15 + 화합물 14의 "쓰리-인-원" 제약 조합물이 다중-약물 내성 WSU-DLCL2 세포의 세포 생존성에 대해 우수한 억제 효과를 입증하였음을 확인할 수 있고, 이는 각각의 단일-표적화된 약물에 비해 유의하게 양호하였다.

[0383] 표 7. DoHH-2 세포주에 대한 개별 화합물 및 "쓰리 인 원" 조성물의 억제 (억제%)

화합물@농도	억제%	1uM	0.1uM	0.01uM
3	AVG	49.93	34.83	15.58
	SD	2.72	0.70	5.54
15	AVG	51.32	6.75	-7.95
	SD	3.86	8.77	1.57
14	AVG	60.33	59.17	51.80
	SD	3.52	1.68	3.35
화합물@농도	억제%	3	3	3
15 @0.1 uM +	AVG	78.75	81.87	71.87
	SD	0.45	1.02	6.47
14 @0.1 uM				

[0384]

[0385] 표 7로부터 화합물 3 + 화합물 15 + 화합물 14의 "쓰리-인-원" 제약 조성물이 불응성 DoHH-2 세포의 세포 생존성에 대해 우수한 억제 효과를 입증하였음을 확인할 수 있고, 이는 각각의 단일-표적화된 약물에 비해 유의하게 양호하였다.

[0386] 표 8. TMD-8 세포주에 대한 상이한 비율의 조성물의 억제 (억제%)

화합물 비 화합물@농도	억제%	1.0 uM	0.1 uM	0.01 uM
3 + 14 (19:1 볼비)	AVG	72.97	71.71	66.64
	SD	0.93	1.49	0.83
3 + 14 + 15 (19:1:37 볼비)	AVG	97.08	89.29	67.75
	SD	0.52	1.30	1.12
3 + 14 + 15 (1:1:1 볼비)	AVG	97.16	91.23	80.09
	SD	0.17	0.85	0.96
3 + 14 + 15 (50:1:1 볼비)	AVG	78.21	72.73	63.34
	SD	2.26	1.21	0.97
3 + 14 + 15 (10:1:1 볼비)	AVG	88.09	77.18	68.76
	SD	0.70	1.66	2.12
14 @0.1 uM + 15 @0.1 uM		3 @1 uM	3 @0.1 uM	3 @0.01 uM
	AVG	85.33	88.83	87.78
	SD	0.78	0.71	2.36

[0387]

[0388] 표 8로부터 다양한 비율의 "쓰리-인-원" 제약 조합물이 TMD-8 세포의 세포 생존성에 대해 유의한 억제 효과를 입증하였음을 확인할 수 있다.

[0389] 표 9. 래트에서 화합물 3의 PK 파라미터

군	1		2	
투여 경로	IV		PO	
투여 수준	2 mg/kg		10 mg/kg	
	AVG	SD	AVG	SD
C₀ 또는 C_{max} (ng/mL)	1390	247	641	191
T_{max}(hr)	--	--	1.33	0.753
T_{1/2}(hr)	0.787	0.0895	1.71	0.489
Vdss(L/kg)	1.61	0.339	--	--
CL(mL/분/Kg)	20.2	5.60	--	--
AUC_{0-마지막} (hr*ng/mL)	1740	421	3230	1120
AUC_{0-inf} (hr*ng/mL)	1740	420	3260	1140
생체이용률(%)^a	--	--	37.1	--

[0390]

[0391] 표 10. 개에서 화합물 3의 PK 파라미터

군	1		2	
투여 경로	IV		PO	
투여 수준	2 mg/kg		5 mg/kg	
	AVG	SD	AVG	SD
C_0 또는 C_{max} (ng/mL)	663	79.5	189	53.3
T_{max} (hr)	--	--	1.17	0.408
$T_{1/2}$ (hr)	2.27	0.873	2.92	1.22
Vd_{ss} (L/kg)	4.24	0.370	--	--
CL (mL/분/Kg)	34.6	5.58	--	--
$AUC_{0-마지막}$ (hr*ng/mL)	977	181	650	247
AUC_{0-inf} (hr*ng/mL)	987	183	574	123
생체이용률(%) ^a	--	--	26.2	--

[0392]

[0393] 표 11. 래트에서 화합물 3의 TK 파라미터

투여 수준 (mg/kg)	일	성별	Cmax (ng/ml)	Tmax (h)	AUC _{0-24h} (h*ng/mL)
40	1	수컷	2160	2.0	13700
		암컷	2660	1.0	17300
	28	수컷	2090	2.0	15400
		암컷	2970	1.0	17300
100	1	수컷	2740	2.0	21700
		암컷	3700	4.0	28900
	28	수컷	3990	2.0	30300
		암컷	3830	1.0	29600
200	1	수컷	4220	2.0	37600
		암컷	4680	4.0	65200
	28	수컷	4540	2.0	45100
		암컷	5490	8.0	60200

[0394]

[0395] 표 12. 개에서 화합물 3의 TK 파라미터

투여 수준 (mg/kg)	일	성별	Cmax (ng/ml)	Tmax(h)	AUC _{0-24h} (h*ng/mL)
15	1	수컷	746 ± 18.1	2.0 (1.0-2.0)	3550 ± 562
		암컷	685 ± 212	1.0 (1.0-2.0)	2930 ± 980
	28	수컷	576 ± 145	2.0 (2.0-2.0)	3260 ± 732
		암컷	687 ± 123	2.0 (1.0-2.0)	3730 ± 549
45	1	수컷	1240 ± 381	2.0 (1.0-2.0)	6480 ± 1670
		암컷	1220 ± 431	2.0 (2.0-2.0)	6220 ± 3000
	28	수컷	1470 ± 538	2.0 (2.0-4.0)	9170 ± 3810
		암컷	1060 ± 263	2.0 (2.0-4.0)	8130 ± 1490
105	28	수컷	2700 ± 769	2.0 (2.0-2.0)	16400 ± 5410
		암컷	2420 ± 670	2.0 (2.0-4.0)	17300 ± 2830
150	1	수컷	2460 ± 858	4.0 (1.0-8.0)	22900 ± 13900
		암컷	1850 ± 605	2.0 (1.0-4.0)	11200 ± 5990

[0396]

[0397]

표 13: 동물 종양 모델에서 종양 세포에 대한 개별 약물 및 제약 조합물의 투여의 억제 효과

도면	치료 과정	화합물 (mg/kg)	종양 억제 (%)
도 1	위관영양, 1일 2회, 14일	대조군	--
		1 (10 mg/kg)	56
		1 (30 mg/kg)	77
		3 (10 mg/kg)	64
		3 (30 mg/kg)	82
		3 (90 mg/kg)	93
도 2	위관영양, 1일 2회, 14일	대조군	--
		3 (10 mg/kg)	63
		3 (30 mg/kg)	89
		15 (30 mg/kg)	24
		3 (10 mg/kg)	95
		15 (30 mg/kg)	
도 3	위관영양, 1일 2회, 21일	대조군	--
		3 (5 mg/kg)	90
		3 (10 mg/kg)	96
		15 (10 mg/kg)	-8
		8 (10 mg/kg)	26
		3 (5 mg/kg)	82
		15 (10 mg/kg)	
		3 (10 mg/kg)	89
		15 (10 mg/kg)	
		3 (5 mg/kg)	95
		8 (10 mg/kg)	
		3 (10 mg/kg)	98
		8 (10 mg/kg)	
3 (5 mg/kg)	94		
15 (10 mg/kg)			
8 (5 mg/kg)			

[0398]

		3 (10 mg/kg) 15 (10 mg/kg) 8 (10 mg/kg)	94
		15 (10 mg/kg) 8 (10 mg/kg)	86
도 4	위관영양, 1일 2회, 21일	대조군	--
		3 (10 mg/kg)	77
		16 (10 mg/kg)	16
		16 (30 mg/kg)	42
		14 (1 mg/kg)	97 (제17일에 종양 성장 반동)
		14 (3 mg/kg)	99 (제19일에 종양 성장 반동)
		3 (10 mg/kg) 14 (1 mg/kg)	100 (제15일 후에 종양 성장 반동 없음)
		3 (10 mg/kg) 14 (3 mg/kg)	100 (제15일 후에 종양 성장 반동 없음)
		3 (10 mg/kg) 16 (10 mg/kg)	72
		3 (10 mg/kg) 16 (30 mg/kg)	80
		도 5	위관영양, 1일 2회, 21일
3 (5 mg/kg)	33		
3 (5 mg/kg) 15 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	100 (제9일에 종양 완전 소멸, 반동 없음)		
대조군	--		
도 10	위관영양, 1일 2회, 14일	3 (5 mg/kg) 15 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	100 (제10일에 종양 완전 소멸, 반동 없음)
		3 (10 mg/kg) 15 (1 mg/kg)	100 (제10일에 종양 완전 소멸, 반동 없음)

[0399]

		14 (0.5 mg/kg)	
		3 (20 mg/kg) 15 (1 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	100 (제10일에 종양 완전 소멸, 반동 없음)
도 7	위관영양, 1일 2회, 21일	대조군	--
		3 (5 mg/kg)	15.9
		3 (5 mg/kg) 15 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	80.3
도 6	위관영양, 1일 2회, 21일	대조군	--
		3 (5 mg/kg)	28.8
		3 (10 mg/kg)	20.1
		3 (30 mg/kg)	35.6
		3 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	58.3
		3 (5 mg/kg) 15 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	79.4
도 8	위관영양, 1일 2회, 28일	대조군	--
		9 (30 mg/kg)	24
		3 (10 mg/kg)	22
		3 (30 mg/kg) 3 (45 mg/kg)	30 32
도 9	위관영양, 1일 2회, 18일	대조군	--
		3 (5 mg/kg)	4
		3 (10 mg/kg)	7
		3 (30 mg/kg)	23
		3 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	44
		3 (5 mg/kg)	50

[0400]

		15 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	
도 11	위관영양, 1일 2회, 14일	대조군	--
		3 (5 mg/kg) 15 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	63
		9 (4.3 mg/kg) 15 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	67
도 12	위관영양, 1일 2회, 14일	대조군	--
		3 (5 mg/kg)	75
		12 (5 mg/kg)	12
		8 (10 mg/kg)	48
		3 (5 mg/kg) 12 (5 mg/kg)	86
		8 (10 mg/kg) 12 (5 mg/kg)	37
		12 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	77
		3 (5 mg/kg) 12 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	100
		3 (5 mg/kg) 12 (5 mg/kg) 8 (10 mg/kg)	89

[0401]

[0402]

표 13으로부터 약물의 조합 투여가 종양 세포에 대해 상승작용 효과 및 부가적 치사 능력을 가졌음을 확인할 수 있다. 조합 투여의 치료 효과는 각각의 단일-표적화된 약물에 비해 훨씬 더 양호하였다. 예를 들어, 화합물 3 + 화합물 14의 "투-인-원" 조합물의 투여는 15일의 치료 기간에서 종양 세포의 완전한 소멸을 나타내었다. 한편, 화합물 3 + 화합물 14 + 화합물 15의 "쓰리-인-원" 조합물의 투여는 더 짧은 치료 기간 (9일)에서 종양 세포의 완전한 소멸을 나타낼 수 있었고, 투여를 중단한지 12일 후에 종양 성장 반응이 관찰되지 않았으며, 이는 단일-표적화된 약물에 비해 유의하게 더 양호한 치료 효과를 나타낸다.

[0403]

표 14. 동물 종양 모델에서 체중에 대한 제약 조합물의 투여의 영향

동물 체중 (g)	시간 (일)	0	2	5	7	9	12	14
대조군	AVG	22.9	22.4	22.8	23.0	23.7	23.5	23.6
	SD	0.5	0.5	0.6	0.5	0.6	0.5	0.6
3 (5 mg/kg) 15 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	AVG	21.9	21.6	22.8	22.5	22.6	22.5	22.3
	SD	0.4	0.4	0.3	0.4	0.5	0.5	0.6
9 (4.3 mg/kg) 15 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	AVG	22.2	21.7	22.7	22.9	23.1	22.7	22.6
	SD	0.5	0.5	0.6	0.5	0.4	0.4	0.6

[0404]

[0405]

표 14로부터 상이한 군의 동물들은 체중에서 유의한 차이가 없었음을 확인할 수 있고, 이는 약물 조합물을 낮은

투여 용량으로 투여하기에 안전하였음을 나타낸다.

[0406] 표 15. 동물 중앙 모델에서 체중에 대한 제약 조합물 3/14/15의 투여의 영향

동물 체중 (g)	시간 (일)	0	2	5	7	9	12	14
대조군	AVG	21.2	21.1	21.1	21.4	21.5	21.8	21.9
	SD	0.5	0.4	0.4	0.5	0.4	0.5	0.5
3 (5 mg/kg) 15 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	AVG	22.1	21.8	21.8	21.8	21.7	22.3	21.7
	SD	0.8	0.7	0.8	0.7	0.8	0.8	0.7
3 (10 mg/kg) 15 (1 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	AVG	21.6	21.5	21.8	22.2	22.4	22.4	22.1
	SD	0.5	0.6	0.6	0.7	0.7	0.6	0.7
3 (20 mg/kg) 15 (1 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	AVG	21.4	21.0	21.1	21.3	21.4	21.3	21.4
	SD	0.6	0.5	0.5	0.6	0.6	0.5	0.6

[0407]

[0408] 표 15로부터 상이한 군의 동물들은 체중에서 유의한 차이가 없었음을 확인할 수 있고, 이는 약물 조합물을 낮은 투여 용량으로 투여하기에 안전하였음을 나타낸다.

[0409] 표 16. 발 부피 - 아주반트에 의해 유도된 관절염

발 부피 (mL)	시간 (일)	0	17	26	28	31	33
일반군	AVG	1.00	1.08	1.05	1.05	1.05	1.04
	SD	0.03	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02
용매 대조군	AVG	1.12	2.18	2.71	2.71	2.69	2.70
	SD	0.09	0.09	0.15	0.11	0.11	0.11
3 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	AVG	1.03	1.77*	1.65** *	1.69** *	1.63** *	1.53** *
	SD	0.02	0.07	0.08	0.08	0.08	0.07
3 (15 mg/kg) 14 (1.5 mg/kg)	AVG	1.01	1.62** *	1.45** *	1.44** *	1.34** *	1.29** *
	SD	0.02	0.10	0.11	0.10	0.09	0.08
3 (30 mg/kg) 14 (3 mg/kg)	AVG	1.01	1.63** *	1.50** *	1.45** *	1.41** *	1.38** *
	SD	0.01	0.08	0.09	0.08	0.08	0.07
3 (5 mg/kg)	AVG	1.04	1.87ns	2.29**	2.12** *	2.12** *	2.09** *
	SD	0.01	0.12	0.14	0.19	0.19	0.20
14 (0.5 mg/kg)	AVG	1.02	1.84ns	2.01** *	2.04** *	1.94** *	1.93** *
	SD	0.01	0.08	0.13	0.12	0.11	0.10
11 (3 mg/kg)	AVG	1.00	1.54** *	1.37** *	1.33** *	1.23** *	1.23** *
	SD	0.02	0.08	0.08	0.07	0.05	0.05
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001							

[0410]

[0411] 표 16으로부터 "투-인-원" 제약 조합물이 개별 약물에 비해 더욱 효과적이었음을 확인할 수 있다.

[0412] 표 17. 병리학적 점수 - 아주반트에 의해 유도된 관절염

군	병리학적 점수 (AVG ± SD)				
	염증 세포 침윤	판누스 형성	연골 손상	골 재흡수	총 점수
일반군	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00	0.0±0.00
용매 대조군	4±0.00	4±0.00	3.8±0.13	3.7±0.15	15.5±0.27
3 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	3.5±0.22	2.8±0.25	2.6±0.27	2.8±0.29	11.7±0.96
3 (5 mg/kg) 14 (1.5 mg/kg)	2.9±0.31	1.6±0.22	1.1±0.28	2.2±0.49	7.8±1.21***
3 (30 mg/kg) 14 (3 mg/kg)	2.6±0.37	2.2±0.44	1.7±0.40	2.4±0.40	8.9±1.55***
3 (5 mg/kg) 14 (0.5 mg/kg)	3.5±0.34	3.2±0.53	2.8±0.51	3.0±0.45	12.5±1.78
11 (3 mg/kg)	3.9±0.10	3.7±0.21	3.5±0.27	3.5±0.17	14.6±0.54
11 (3 mg/kg)	1.9±0.18	0.4±0.22	0.2±0.20	0.5±0.22	3.0±0.73***
***p<0.001, 블랭크 대조군과 비교, 크루스칼-왈리스 검정, 던 사후 검정					

[0413]

[0414] 표 17로부터 "투-인-원" 제약 조합물이 개별 약물에 비해 더욱 효과적이었음을 확인할 수 있다.

[0415] 표 18. 초기 면역화 21일 후로부터 임상적 평가의 평균 점수 - 콜라겐에 의해 유도된 관절염

임상 점수	시간 (일)	21	32	39	42
일반군	AVG	0.00	0.00	0.00	0.00
	AD	0.00	0.00	0.00	0.00
블랭크 대조군	AVG	0.00	4.00	7.6	8.00
	AD	0.00	0.86	1.14	1.20
텍사메타손 (0.2 mg/kg)	AVG	0.00	0.60***	0.40***	0.20***
	AD	0.00	0.34	0.22	0.20
3 (1.5 mg/kg) 14 (0.15 mg/kg) 1일 2회	AVG	0.00	1.60*	1.40***	1.60***
	AD	0.00	0.45	0.37	0.40
3 (4.5 mg/kg) 14 (0.45 mg/kg) 1일 2회	AVG	0.00	0.40***	0.2***	0.10***
	AD	0.00	0.16	0.13	0.10
3 (1.5 mg/kg) 14 (0.15 mg/kg) 1일 1회	AVG	0.00	1.50***	1.40***	1.60***
	AD	0.00	0.40	0.50	0.58
3 (0.15 mg/kg) 1일 1회	AVG	0.00	2.60	4.20***	4.00***
	AD	0.00	0.86	1.14	1.22
14 (0.15 mg/kg) 1일 1회	AVG	0.00	1.00	5.60	5.70*
	AD	0.00	0.54	0.82	0.80
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, 블랭크 대조군과 비교, 2원 ANOVA, 본페르니 사후 검정					

[0416]

[0417] 표 18로부터 "투-인-원" 제약 조합물이 개별 약물에 비해 더욱 효과적이었음을 확인할 수 있다.

[0418] 표 19. 병리학적 점수 - 콜라겐에 의해 유도된 관절염

군	분석된 신체 부위	병리학적 점수 (평균 ± SEM)				총 점수
		염증 세포 침윤	관류스 형성	연골 손상	골 재흡수	
블랭크 대조군	좌측 뒷다리	1.60±0.65	1.30±0.56	1.40±0.58	1.00±0.42	15.50±2.30
	우측 뒷다리	2.80±0.61	2.40±0.54	2.50±0.56	2.50±0.56	
테사메타손 (0.2 mg/kg) 1일 1회	좌측 뒷다리	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00*
	우측 뒷다리	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	**
3 (1.5 mg/kg) 14 (0.15 mg/kg) 1일 2회	좌측 뒷다리	0.50±0.22	0.20±0.20	0.20±0.20	0.10±0.10	1.50±0.78*
	우측 뒷다리	0.20±0.20	0.10±0.10	0.10±0.10	0.10±0.10	**
3 (4.5 mg/kg) 14 (0.45 mg/kg) 1일 2회	좌측 뒷다리	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00*
	우측 뒷다리	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	**
3 (1.5 mg/kg) 14 (0.15 mg/kg) 1일 1회	좌측 뒷다리	0.20±0.20	0.20±0.20	0.20±0.20	0.20±0.20	0.80±0.80*
	우측 뒷다리	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	**
3 (0.15 mg/kg) 1일 1회	좌측 뒷다리	1.00±0.47	0.80±0.47	0.80±0.47	0.60±0.13	3.90±1.80*
	우측 뒷다리	0.20±0.20	0.20±0.20	0.20±0.20	0.10±0.10	**
14 (0.15 mg/kg) 1일 1회	좌측 뒷다리	2.10±0.64	2.00±0.67	2.00±0.67	1.80±0.61	15.90±4.50
	우측 뒷다리	2.00±0.67	2.00±0.67	2.00±0.67	2.00±0.67	
일반군	좌측 뒷다리	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00*
	우측 뒷다리	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	**

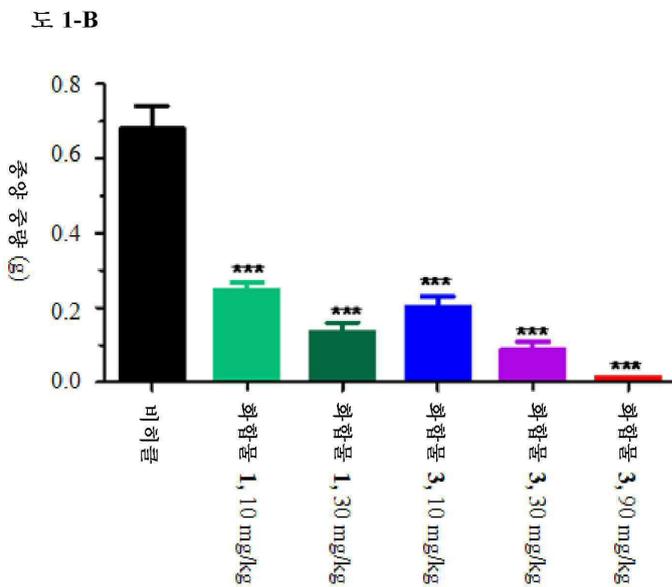
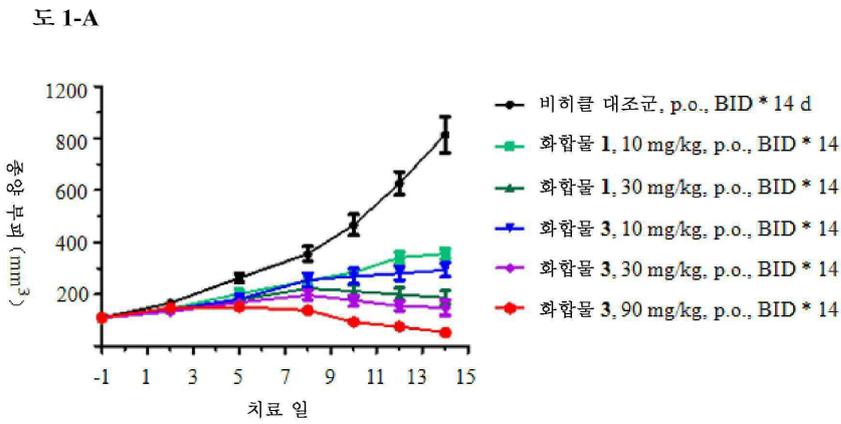
***p<0.001, 블랭크 대조군과 비교, 크루스칼-왈리스 검정, 던 사후 검정

[0419]

[0420] 표 19로부터 "투-인-원" 제약 조합물이 개별 약물에 비해 더욱 효과적이었음을 확인할 수 있다.

도면

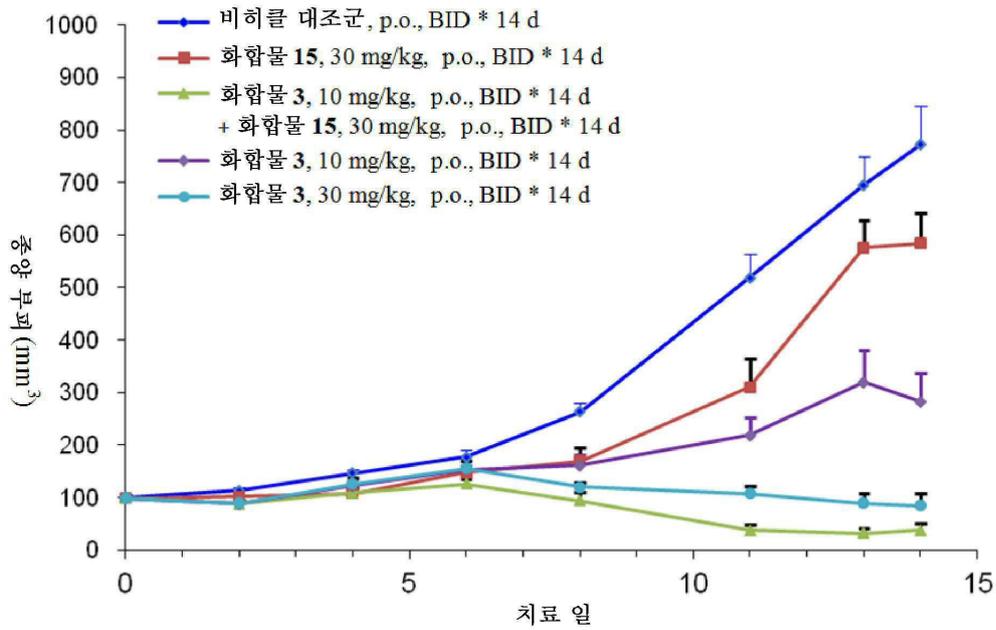
도면1



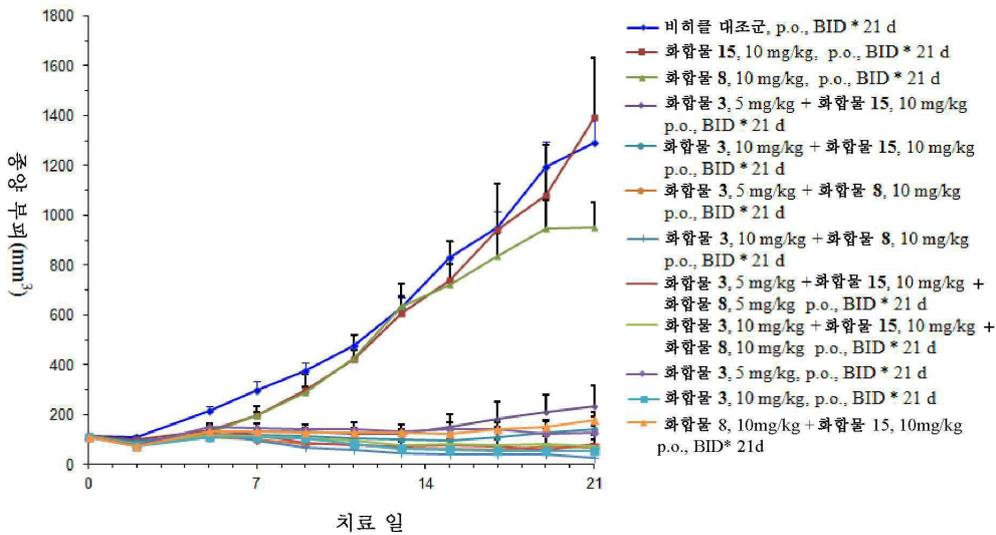
비고: 1. 치료 방법: 경구 위관영양, 1일 2회

2. 치료 일 * 14일

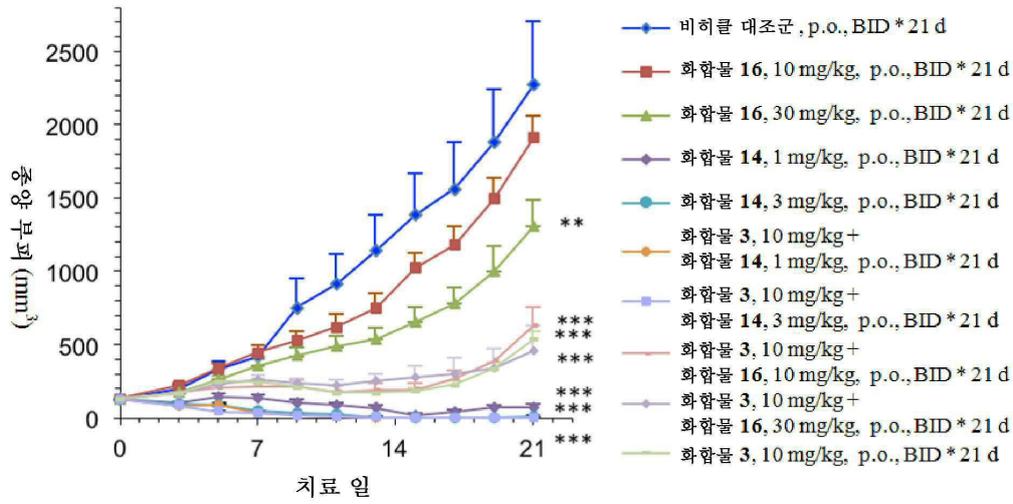
도면2



도면3

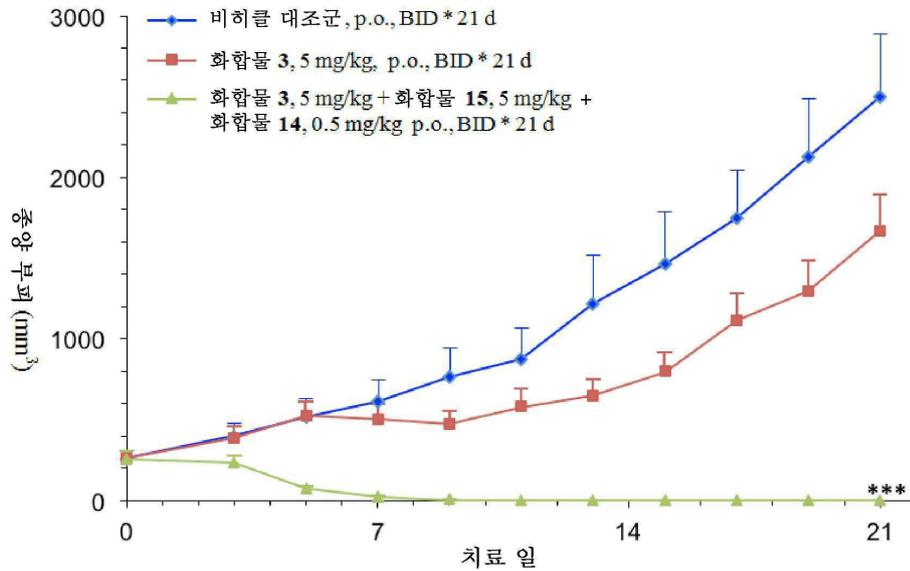


도면4



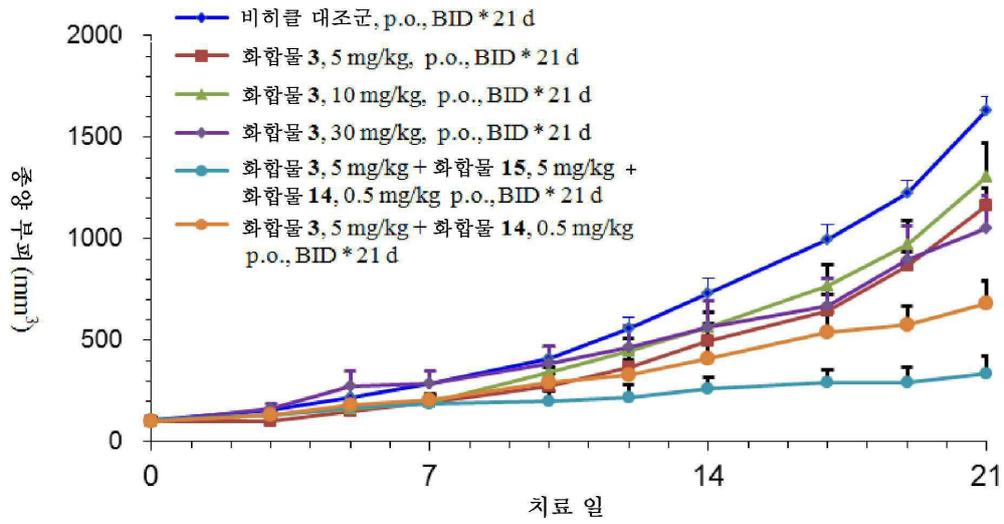
- 비교: 1. ◆, ●, ◆ 및 ▲ 치료 15일 후에 종양이 소멸되었음;
 2. ◆, ●, ◆ 및 ▲ 15일 후에 약물 전달을 중단하였음;
 3. ◆ 및 ● 약물 전달 중단 후에 종양 반동

도면5

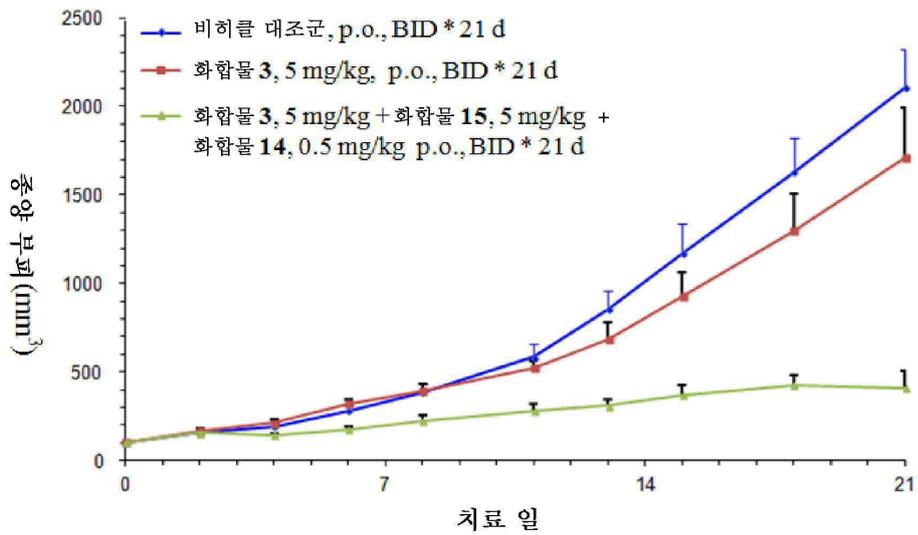


- 비교: 1. ▲ 치료 9일 후에 종양이 소멸되었음. 약물 전달을 중단하였음.
 2. ▲ 약물 전달을 중단한지 12일 후에 종양 반동이 관찰되지 않았음.
 3. ■ 21일 동안 연속 약물 전달

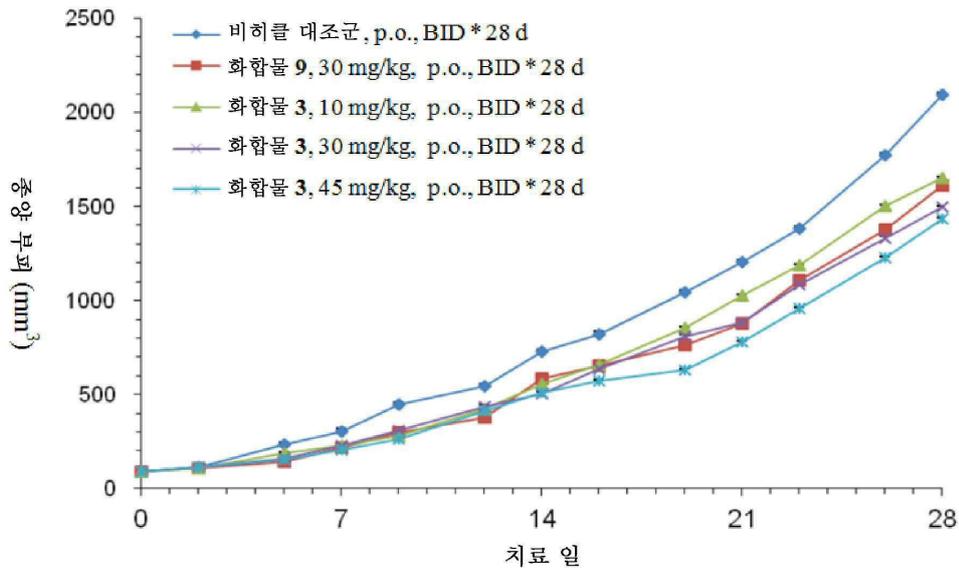
도면6



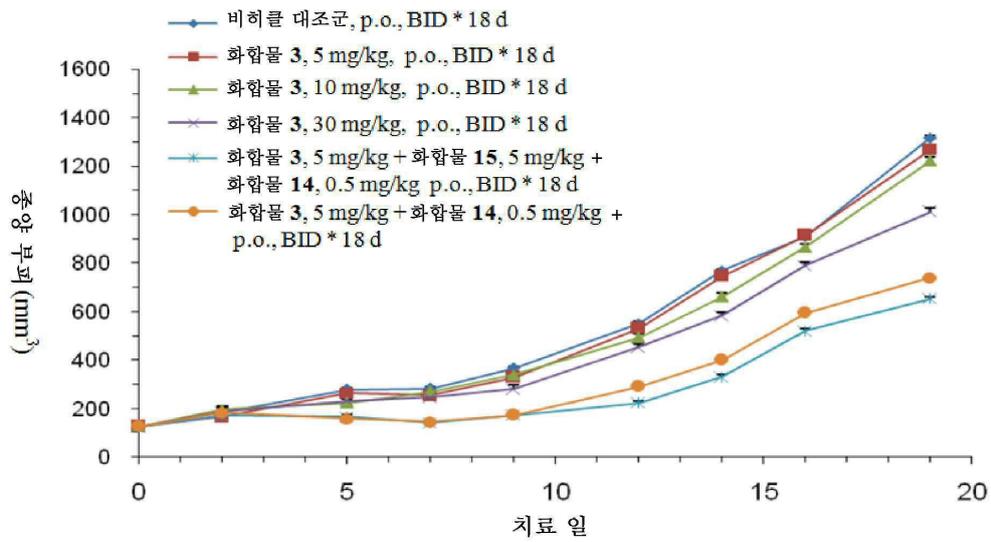
도면7



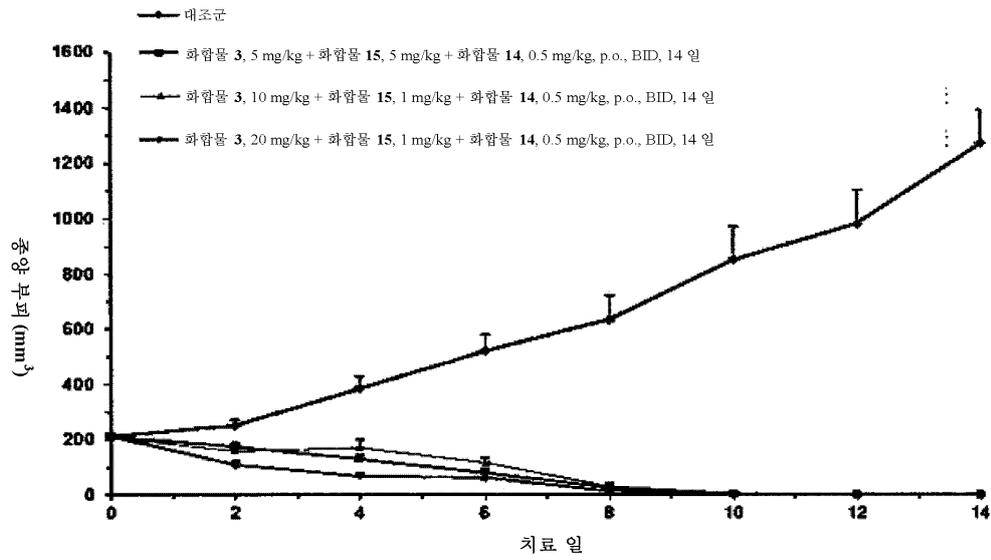
도면8



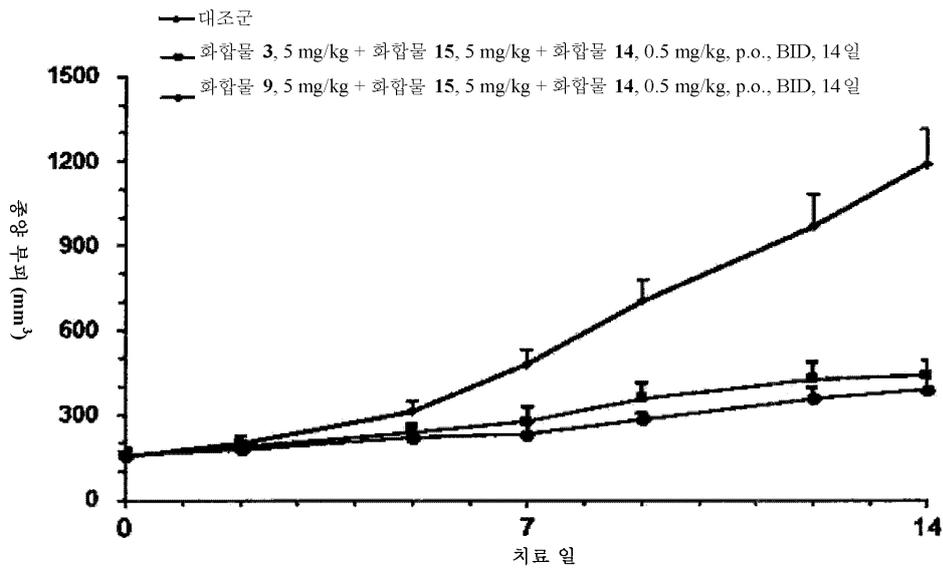
도면9



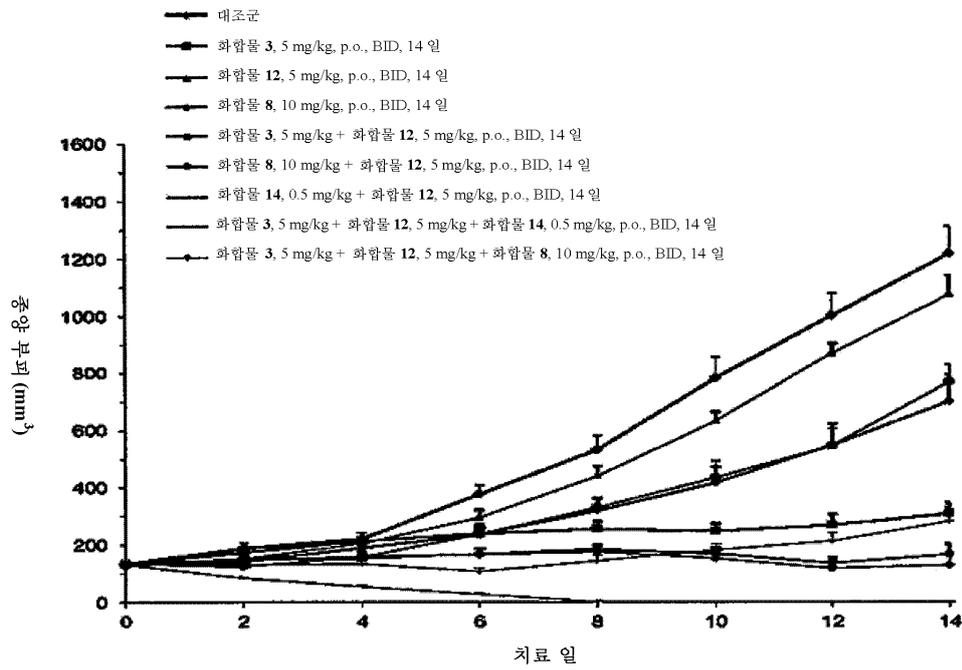
도면10



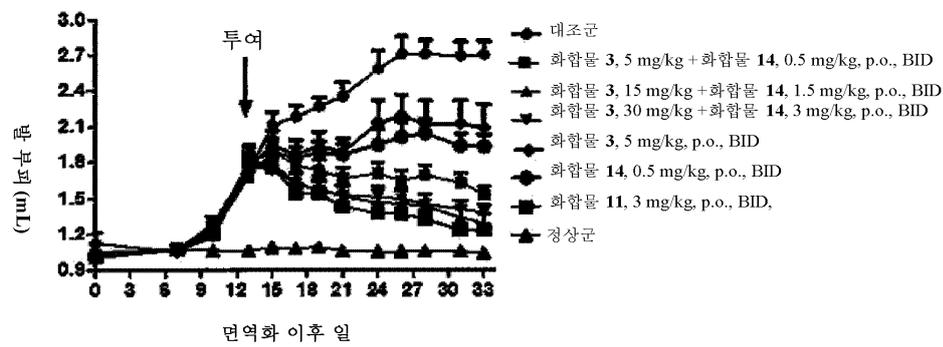
도면11



도면12



도면13



도면14



정상균 (50X)



대조군 (50X)



화합물 3, 5 mg/kg +
화합물 14, 0.5 mg/kg,
p.o., BID, (50X)



화합물 3, 15 mg/kg +
화합물 14, 1.5 mg/kg,
p.o., BID, (50X)



화합물 3, 30 mg/kg +
화합물 14, 3 mg/kg,
p.o., QD, (50X)



화합물 3, 5 mg/kg,
p.o., BID, (50X)

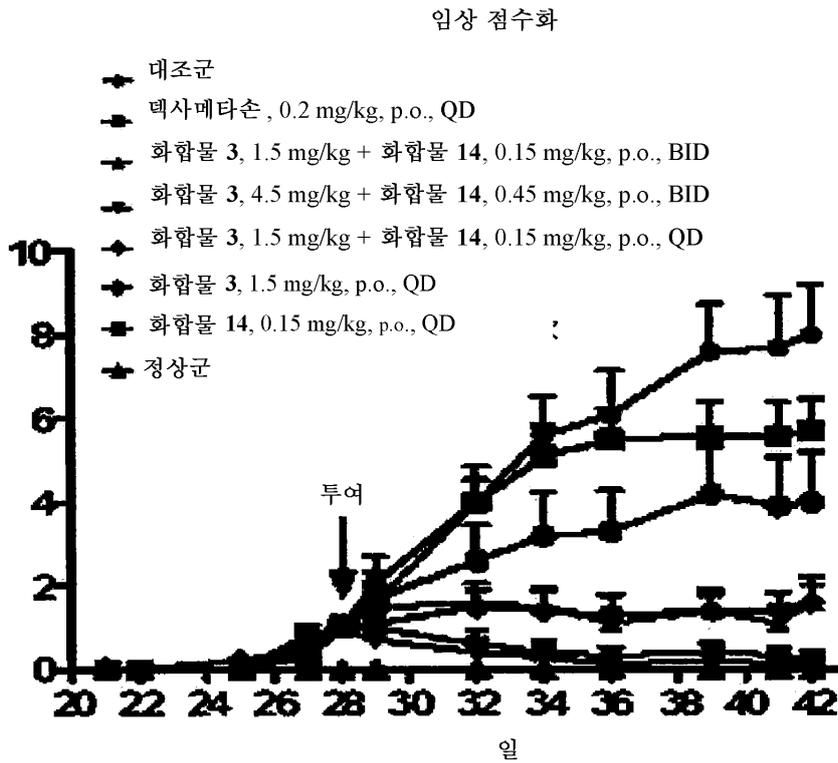


화합물 14, 0.5 mg/kg,
p.o., BID, (50X)



화합물 11, 3 mg/kg,
p.o., BID, (50X)

도면15



도면16

