



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월17일
(11) 등록번호 10-2216606
(24) 등록일자 2021년02월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 487/04 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 487/04 (2013.01)
A61K 31/519 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7015824(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년07월02일
심사청구일자 2019년06월14일
(85) 번역문제출일자 2019년05월31일
(65) 공개번호 10-2019-0064687
(43) 공개일자 2019년06월10일
(62) 원출원 특허 10-2015-7001057
원출원일자(국제) 2013년07월02일
심사청구일자 2018년06월19일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2013/055434
(87) 국제공개번호 WO 2014/006572
국제공개일자 2014년01월09일
(30) 우선권주장
2692/CHE/2012 2012년07월04일 인도(IN)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
WO2011055215 A2*
WO2012037155 A2
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
리젠 파마슈티컬스 소시에떼 아노님
스위스 세아쉬-2300 라 슈 드 폰 프릿츠 코르브와
지에 40
(72) 발명자
바카란카 스와루프 쿠마르 벤카타 사트야
스위스 세아쉬-2300 라 슈 드 폰 프릿츠 코르브와
지에 40 리젠 파마슈티컬스 소시에떼 아노님 내
무투팔라니아판 메이야판
인도 602001 타밀 나두 티발루르 디스트릭트 티루
발루르 라자지푸람 시르 씨.브이 라만 스트리트
넘버 4
나가라트남 다나팔란
스위스 세아쉬-2300 라 슈 드 폰 프릿츠 코르브와
지에 40 리젠 파마슈티컬스 소시에떼 아노님 내
(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 이정아

(54) 발명의 명칭 **선택적 PI3K 델타 억제제**

(57) 요약

본 발명은 1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘 고리계를 갖는 PI3K 델타 단백질 키나아제의 선택적 억제제들, 그들의 제조 방법, 그들을 함유하는 약제학적 조성물들, 및 그들로 키나아제 매개된 질환들 또는 장애들을 치료 및/또는 예방하는 방법들에 관한 것이다.

(30) 우선권주장

2693/CHE/2012 2012년07월04일 인도(IN)

61/691,561 2012년08월21일 미국(US)

61/691,586 2012년08월21일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

(S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온, 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염으로부터 선택된 화합물 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함하는, 암을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물은 (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염이 없는 화합물인, 약제학적 조성물.

청구항 3

PI3K 관련된 질환, 장애 또는 병태의 예방 또는 치료가 필요한 대상체에서 그 PI3K 관련된 질환, 장애 또는 병태의 예방 또는 치료를 위한, (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온, 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염으로부터 선택된 화합물을 포함하는 약제학적 조성물로서, 상기 PI3K 관련된 질환, 장애, 또는 병태가 암인, 약제학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 PI3K 관련된 질환, 장애, 또는 병태는 림프 계통의 조혈(hematopoietic) 종양, 백혈병, 급성 림프구성 백혈병(ALL), 급성 림프아세포(lymphoblastic) 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 모발 세포 림프종 및 버킷(Burkett's) 림프종, 골수 계통의 조혈 종양, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군, 전골수구 백혈병; 방광의 암종, 유방의 암종, 결장(colon)의 암종, 신장(kidney)의 암종, 간의 암종, 폐의 암종, 소세포 폐암, 식도암, 담낭암, 난소암, 췌장암, 위암, 자궁경부암, 갑상선암, 전립선암, 피부암, 편평상피 세포 암종(squamous cell carcinoma); 간엽(mesenchymal) 기원의 종양, 섬유육종, 횡문근육종; 중추 및 말초 신경계의 종양, 별아교세포종, 신경아세포종, 신경아교종, 신경집종(schwannoma); 흑색종, 정소피종(seminoma), 기형암종, 골육종, 각화극세포종, 갑상선 여포성 암, 카포시육종, 만성 림프구성 백혈병, 무증상(smoldering) 다발성 골수종, 비분비 골수종, 골경화성 골수종을 포함하는 다발성 골수종, 형질 세포 백혈병, 고립성 형질세포종, 및 골수의 형질세포종, 소림프구성 림프종(SLL), 지연성(Indolent) 비-호지킨 림프종(I-NHL), 외투 세포(mantle cell) 림프종(MCL), 여포성 림프종(follicular lymphoma), 발데스트롬 거대글로불린혈증(Waldstrom's macroglobulinemia)(WM), 및 미만성 큰 B-세포 림프종(DLBCL)으로부터 선택된, 약제학적 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 PI3K 관련된 질환, 장애, 또는 병태는, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 비-호지킨 림프종(NHL), 급성 골수 백혈병(AML), 다발성 골수종(MM), 소림프구성 림프종(SLL), 지연성 비-호지킨 림프종(I-NHL), 급성 림프구성 백혈병(ALL), 외투 세포 림프종(MCL), 여포성 림프종, 발데스트롬 거대글로불린혈증(WM), T-세포 림프종, B-세포 림프종, 및 미만성 큰 B-세포 림프종(DLBCL)으로부터 선택된, 약제학적 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 적어도 하나의 다른 항-암 제제를 추가로 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 인도 특허 출원 번호 2692/CHE/2012(2012년 7월 4일 출원), 및 2693/CHE/2012(2012년 7월 4일 출원), 및 미국 가출원 번호 61/691,561(2012년 8월 21일 출원), 및 61/691,586(2012년 8월 21일 출원)의 이점을 주장하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로 본원에 포함되어 있다.

[0002] **발명의 분야**

[0003] 본 발명은 PI3K 델타 단백질 키나아제의 선택적 억제제, 이의 제조 방법, 그것을 함유하는 약제학적 조성물 및 그것에 의한 키나아제 매개된 질환 또는 장애의 치료 및/또는 예방 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0004] 포스파티딜이노시톨(이하 "PI"로서 약칭됨)은 세포막에서 발견되는 수많은 인지질 중 하나이다. 최근에 PI가 세포내 신호 전달에서 중요한 역할을 한다는 것이 명백해졌다. 3'-인산화된 포스포이노시티드를 통한 세포 신호전달은 다양한 세포 과정, 예를 들면, 악성 형질변환, 성장 인자 신호전달, 염증, 및 면역에 연루되어 왔다(Rameh et al. (1999) *J. Biol Chem*, 274:8347-8350). 이들 인산화된 신호전달 산물을 생성하는 것을 담당하는 효소인, 포스파티딜이노시톨 3-키나아제(PI 3-키나아제 또는 PI3K으로도 지칭됨)는 본래 이노시톨 고리의 3'-하이드록실에서 포스파티딜이노시톨(PI) 및 그의 인산화된 유도체를 인산화하는 바이러스 종양단백질 및 성장 인자 수용체 티로신 키나아제와 연관된 활성으로서 확인되었다(Panayotou et al. (1992) *Trends Cell Biol* 2:358-60).

[0005] 포스포이노시티드 3-키나아제(PI3K)는 포스포이노시티드 2차-메신저 분자를 생성함으로써 모든 세포 유형에서 다양한 생물학적 기능을 조절하는 효소들의 패밀리이다. 이들 포스포이노시티드 2차 메신저의 활성화는 그의 인산화 상태에 의해 결정되므로, 이들 지질을 변형시키는 작용을 하는 키나아제 및 포스파타이제가 세포내 신호전달 사건의 정확한 실행에 중요하다. 포스포이노시티드 3-키나아제(PI3K)는 이노시톨 고리의 3-하이드록실 잔기에 있는 지질을 인산화하여(Whitman et al. (1988) *Nature*, 332:664), Akt 및 포스포이노시티드-의존적 키나아제-1(PDK1)과 같은 지질 결합 도메인(플렉스트린 상동(PH) 영역을 포함함)을 갖는 2차 메신저 동원 키나아제로서 작용하는 인산화된 인지질(PIP3)을 생성한다. Akt의 막 PIP3에의 결합은 Akt의 원형질막으로의 전좌를 야기하여, Akt를 활성화하는 것을 담당하는 PDK1와 Akt를 접촉시킨다. 종양-억제제 포스파타제인 PTEN는 PIP3을 탈인산화시킴으로써 Akt 활성화의 음성 조절물질로서 작용한다. PI3-키나아제 Akt 및 PDK1은 세포 주기 조절, 증식, 생존, 아포토시스 및 운동성을 포함하는 많은 세포 과정의 조절에서 중요하며, 암, 당뇨병 및 면역 염증과 같은 질환의 분자 기전의 중요 성분이다(Vivanco et al. (2002) *Nature Rev. Cancer* 2:489; Phillips et al. (1998) *Cancer* 83:41).

[0006] PI3K의 클래스 I 패밀리의 멤버는 조절 및 촉매 서브유닛의 이량체이다. 클래스 I 패밀리는 110 kDa 촉매 서브유닛 α , β , γ 및 δ 에 의해 결정된, 4가지 동형체로 구성된다(Engelman JA, *Nat Rev Genet* 2006;7:606-19; Carnero A, *Curr Cancer Drug Targets* 2008;8:187-98; Vanhaesebroeck B, *Trends Biochem Sci* 2005;30:194-204). 클래스 I은 2가지 서브클래스: p110 α , β , 및 δ 및 조절 서브유닛(p85, p55 또는 p50)의 조합에 의해 형성된 Ia 및 p110 γ 및 p101 조절 서브유닛에 의해 형성된 Ib로 세분화될 수 있다.

[0007] 클래스 Ia PI3K 효소가 다양한 인간 암에서 직접적으로 또는 간접적으로 종양발생에 기여한다는 것을 보여주는 상당히 많은 증거가 있다(Vivanco and Sawyers, *Nature Reviews Cancer*, 2002, 2, 489-501; Marone et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1784 (2008) 159-185). 특히, p110 델타 동형체는 B-세포 수용체, T 세포 수용체의 신호전달, 비만 세포 및 단핵구/대식세포의 FcR 신호전달, 및 파골세포 기능/RANKL 신호전달을 포함하는, 면역-염증성 질환과 관련된 생물학적 기능에 연루되어 왔다(Deane J and Fruman D A (2004) *Annu Rev Immunol*. 2004. 22:563-98; Janas et al., *The Journal of Immunology*, 2008, 180: 739-746; Marone R et al., *Biochim. Biophys. Acta* 2007, 1784:159-185). PI3K 델타 유전자의 결실 또는 PI3K 델타의 촉매적으로 불활성인 돌연변이의 선택적 도입은 B 세포 증식 및 신호전달의 거의 완전한 제거, 및 T 세포를 통한 신호전달의 손상을 야기한다.

[0008] 키나아제-매개된 사건과 연관된 질환 및 장애의 치료를 위해, 키나아제, 특히 PI3K의 형질도입을 조절 및/또는 조정하기 위한 소분자 키나아제 조절물질에 대한 충족되지 않은 그리고 엄청난 요구가 여전히 존재한다.

[0009] 국제 공보 제WO 2011/055215호 및 U.S. 특허 공보 제2011/0118257호는 PI3K 키나아제 조절물질로서 소정의 2,3 이치환된-4H-크로멘-4-온을 개시하며, 이들은 사실상 전체가 참조로 본원에 포함되어 있다.

발명의 내용

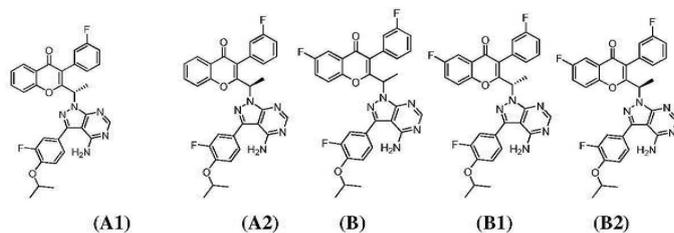
[0010] 본 발명은 PI3K 델타 단백질 키나아제의 선택적 억제제에 관한 것이다. 이들 화합물은 PI3K 연관된 질환, 장애 또는 병태, 예를 들면, 증식성 질환 예컨대 암의 치료를 위한 약제학적 조성물에서 사용하기에 적당하다.

[0011] 일 구현예에서, PI3K 델타 억제제는 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온(화합물-A1) 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염이다. 또 하나의 구현예에서, PI3K 델타 억제제는 (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온(화합물-A2) 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염이다.

[0012] 또 하나의 구현예에서, PI3K 델타 억제제는 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온(화합물-B) 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염이다. 본 발명은 또한, 라세미 형태 뿐만 아니라 그의 입체이성질체 형태로 화합물-B, 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염, (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온(화합물-B1), (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온(화합물-B2), 및 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함한다.

[0013] 일 구현예에서, PI3K 델타 억제제는 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온 4-메틸벤젠설포네이트이다. 또 하나의 구현예에서, PI3K 델타 억제제는 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온 설페이트이다. 또 하나의 구현예에서, PI3K 델타 억제제는 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온 히드록로라이드이다. 또 하나의 구현예에서, PI3K 델타 억제제는 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온 벤젠설포네이트이다. 또 하나의 구현예에서, PI3K 델타 억제제는 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온 말레에이트이다. 또 하나의 구현예에서, PI3K 델타 억제제는 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온 캠포르 설포네이트이다.

[0014] 화합물 A1, A2, B, B1, 및 B2의 화학 구조는 아래에서 보여진다.



[0015]

[0016] 하나의 바람직한 구현예에서, 본 발명은 화합물 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온(화합물-A1) 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다.

[0017] 또 하나의 바람직한 구현예에서, 본 발명은 화합물 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온(화합물-B1) 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다.

[0018] 본 발명은 이들 화합물의 프로드러그(prodrug)를 또한 포함한다.

[0019] 본 발명은 추가로, 본 발명의 하나 이상의 화합물(예컨대 화합물 A1, A2, B, B1, B2, 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 또는 그의 혼합물)을 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 약

제학적 조성물은 추가의 활성 성분, 예컨대 다른 활성제(예컨대 아래에서 논의된 활성제 및 항암제) 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 치료적 유효량 본 발명의 하나 이상의 화합물을 포함한다.

- [0020] 본 발명은 추가로, 화합물 A1을 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명은 추가로, 화합물 B를 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명은 추가로, 화합물 B1을 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0023] 일 구현예에서, 본 발명은 화합물 A1 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하고, 여기서 화합물 A1은 화합물 A2보다 과잉으로 존재한다.
- [0024] 추가 구현예에서, 화합물 A1은 화합물 A2가 실질적으로 없다.
- [0025] 추가 구현예에서, 화합물 A1은 화합물 A2에 대해 과잉으로 존재하고 적어도 약 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 거울상이성질체 과잉(e.e.)을 갖는다.
- [0026] 또 하나의 구현예에서, 본 발명은 화합물 B1 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약제학적 조성물을 제공하고, 여기서 화합물 B1은 화합물 B2보다 과잉으로 존재한다
- [0027] 추가 구현예에서, 화합물 B1은 화합물 B2가 실질적으로 없다.
- [0028] 추가 구현예에서, 화합물 B1은 화합물 B2에 대해 과잉으로 존재하고 적어도 약 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 거울상이성질체 과잉(e.e.)을 갖는다.
- [0029] 또 하나의 구현예는 화합물 B 또는 화합물 B1의 4-메틸벤젠설포네이트 (PTSA), 설페이트(SA), 히드로클로라이드(HCl), 벤젠설포네이트, 말레에이트 또는 캄포르 설포네이트 염을 제조하는 방법이다. 본 방법은 화합물 B 또는 B1, 또는 (원하는 염 이외의) 그것의 염을, 화합물 B 또는 화합물 B1의 4-메틸벤젠설포네이트, 설페이트, 히드로클로라이드, 벤젠설포네이트, 말레에이트 또는 캄포르 설포네이트 염으로 전환시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0030] 또 하나의 구현예는 화합물 B 또는 화합물 B1의 4-메틸벤젠설포네이트, 설페이트, 히드로클로라이드, 벤젠설포네이트, 말레에이트 또는 캄포르 설포네이트 염이고, 이것은 PI3K 연관된 질환, 장애 또는 병태, 예를 들면, 증식성 질환 예컨대 암의 치료용 약제학적 조성물에서 사용하기에 적당하다.
- [0031] 본 발명은 추가로, 본 발명의 화합물 B의 4-메틸벤젠설포네이트, 설페이트, 히드로클로라이드, 벤젠설포네이트, 말레에이트 또는 캄포르 설포네이트 염을 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 약제학적 조성물은 추가의 활성 성분, 예컨대 다른 활성제(예컨대 아래에서 논의된 활성제 및 항암제) 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 치료적 유효량의 본 발명의 하나 이상의 화합물을 포함한다.
- [0032] 본 발명은 추가로, 화합물 B의 4-메틸벤젠설포네이트, 설페이트, 히드로클로라이드, 벤젠설포네이트, 말레에이트 또는 캄포르 설포네이트 염을 약제학적으로 허용가능한 담체와 함께 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0033] 일 구현예에서, 화합물 B 또는 화합물 B1의 PTSA 염은 적어도 약 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 거울상이성질체 과잉(e.e.)을 갖는다.
- [0034] 일 구현예에서, 화합물 B 또는 화합물 B1의 SA 염은 적어도 약 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 거울상이성질체 과잉(e.e.)을 갖는다.
- [0035] 일 구현예에서, 화합물 B 또는 화합물 B1의 HCl 염은 적어도 약 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 거울상이성질체 과잉(e.e.)을 갖는다.
- [0036] 일 구현예에서, 화합물 B 또는 화합물 B1의 벤젠설포네이트 염은 적어도 약 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 거울상이성질체 과잉(e.e.)을 갖는다.
- [0037] 일 구현예에서, 화합물 B 또는 화합물 B1의 말레에이트 염은 적어도 약 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 거울상이성질체 과잉(e.e.)을 갖는다.
- [0038] 일 구현예에서, 화합물 B 또는 화합물 B1의 캄포르 설포네이트 염은 적어도 약 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%의 거울상이성질체 과잉(e.e.)을 갖는다.

- [0039] 또 하나의 구현예는 환자에게 유효량의 본 발명의 화합물 B 또는 화합물 B1을 PTSA 염으로서 투여하여 환자에서 PI3K 델타를 억제하는 방법이다.
- [0040] 또 하나의 구현예는 환자에게 유효량의 본 발명의 적어도 하나의 화합물을 투여하여 환자에서 PI3K 델타를 억제하는 방법이다.
- [0041] 또 하나의 구현예는 환자에게 유효량의 본 발명의 적어도 하나의 화합물을 투여하여 환자에서 PI3K 단백질 키나아제 매개된 질환, 장애 또는 병태(예컨대 암 또는 다른 증식성 질환 또는 장애)를 치료, 예방, 및/또는 억제하는 방법이다.
- [0042] 또 하나의 구현예는 환자에게 유효량의 본 발명의 적어도 하나의 화합물을 투여하여 환자에서 PI3K 연관된 질환, 장애 또는 병태를 치료하는 방법이다. 일 구현예에서, 투여된 화합물의 양은 PI3K 델타의 억제에 의해 PI3K 연관된 질환, 장애 또는 병태를 치료하기에 충분하다. 상기 PI3K 연관된 질환, 장애, 또는 병태는, 염증, 사구체신염, 포도막염, 간 질환 또는 장애, 신장 질환 또는 장애, 만성 폐쇄성 폐 질환, 류마티스성 관절염, 염증성 장질환, 맥관염(vasculitis), 피부염, 골관절염, 염증성 근육 질환, 알레르기성 비염(allergic rhinitis), 질염, 간질성 방광염, 경피증(scleroderma), 골다공증, 습진, 동종이계 또는 이종발생성 이식, 이식편 거부, 이식편대숙주(graft-versus-host) 질환, 홍반성 루프스, 폐 섬유증, 피부근염, 갑상선염, 중증 근무력증, 자가면역 용혈성 빈혈, 낭포성 섬유증, 만성 재발성 간염, 원발성 담도성 간경변증, 알리지성 안검결막염, 간염, 아토피성 피부염, 천식, 쇼그렌(Sjogren's) 증후군, 기관 이식 거부, 다발성 경화증, 길랑-바레(Guillain-Barre), 자가면역 포도막염, 악성 빈혈, 자가면역 저혈소판증, 측두동맥염(temporal arteritis), 항-인지질 증후군(anti-phospholipid syndrome), 베게너 육아종증과 같은 혈관염, 베체트 질환(Behcet's disease), 건선, 포진성 피부염, 심상성 천포창(pemphigus vulgaris), 백반증, 크론병, 대장염, 궤양성 대장염, 자가면역 간염, 유형 1 또는 면역-매개의 당뇨병, 그레이브스병, 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 자가면역 난소염 및 고환염, 부신의 자가면역 장애, 전신 홍반성 루프스(SLE), 다발성 근염, 피부근염, 강직성 척추염, 이식 거부, 피부 이식편 거부, 관절염, 증가된 골 재흡수와 연관된 골 질환; 회장염(ileitis), 바레트 증후군(Barrett's syndrome), 성인 호흡 장애 증후군, 만성 폐쇄성 기도 질환; 각막 이상증, 트라코마(trachoma), 회선사상충증(onchocerciasis), 교감성 안염(sympathetic ophthalmitis), 내안구염; 치은염, 치주염; 결핵; 나병; 요독 합병증, 신장증(nephrosis); 경화성 피부염, 신경계의 만성 탈수초 질환, AIDS-연관된 신경 퇴화, 알츠하이머 질환, 감염성 수막염, 뇌척수염, 파킨슨병, 헌팅턴 무도병(Huntington's disease), 근위축성 측삭 경화증, 바이러스성 또는 자가면역성 뇌염; 자가면역 장애, 면역-복합성 맥관염, 전신성 루프스 및 홍반성 루프스; 심근증, 허혈 심장질환, 고콜레스테롤혈증, 아테롬성 동맥 경화증, 자간전증(preeclampsia); 만성 간부전, 뇌 및 척수 외상, 암, 림프 계통의 조혈(hematopoietic) 종양, 백혈병, 급성 림프구성 백혈병(ALL), 급성 림프아세포(lymphoblastic) 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 모발 세포 림프종 및 버킷(Burkett's) 림프종; 골수 계통의 조혈 종양, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군, 전골수구 백혈병; 방광의 암종, 유방의 암종, 결장(colon)의 암종, 신장(kidney)의 암종, 간의 암종, 폐의 암종, 소세포 폐암, 식도암, 담낭암, 난소암, 췌장암, 위(stomach)암, 자궁경부(cervical) 암, 갑상선암, 전립선암, 피부암, 편평상피 세포 암종(squamous cell carcinoma); 간엽(mesenchymal) 기원의 종양, 섬유육종, 횡문근육종; 중추 및 말초 신경계의 종양, 별아교세포종, 신경아세포종, 신경아교종, 신경집종(schwannoma); 흑색종, 정상피종(seminoma), 기형암종, 골육종, 색소성 건피증(xenoderma pigmentosum), 각화극세포종, 갑상선 여포성 암, 카포시 육종, 만성 기관지염, 만성 림프구성 백혈병, 무증상(smoldering) 다발성 골수종, 비분비 골수종, 골경화성 골수종을 포함하는 다발성 골수종, 형질 세포 백혈병, 고립성 형질세포종, 및 골수의 형질세포종, 소림프구성 림프종(SLL), 지연성(Indolent) 비-호지킨 림프종(I-NHL), 외투 세포(mantle cell) 림프종(MCL), 여포성 림프종(follicular lymphoma), 발테스트롬 거대글로불린혈증(Waldstrom's macroglobulinemia)(WM) 및 미만성 큰 B-세포 림프종(DLBCL)으로부터 선택될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 또 하나의 구현예는 그와 같은 치료가 필요한 환자에게 유효량의 본 발명의 적어도 하나의 화합물을 투여하여 증식성 질환을 치료하는 방법이다. 일 구현예에서, 투여된 화합물의 양은 PI3K 델타의 억제에 의해 증식성 질환을 치료하기에 충분하다.
- [0044] 본 발명의 또 하나의 구현예는 적어도 하나의 다른 항암제와 (동시에 또는 순차적으로) 조합하여, 그와 같은 치료가 필요한 환자에게 유효량의 본 발명의 적어도 하나의 화합물을 투여하여 증식성 질환을 치료하는 방법이다. 일 구현예에서, 투여된 화합물의 양은 PI3K 델타의 억제에 의해 증식성 질환을 치료하거나 (그것의 치료를

촉진)하는데 충분하다.

- [0045] 또 하나의 구현예는 환자에서 PI3K 연관된 질환, 장애 또는 병태를 치료하는 방법이고, 이 방법은 환자에게 화합물 A1, B 또는 B1 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하되, 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 부형제와 임의로 혼합된 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 특정한 구현예에서, 본 조성물은 PI3K 연관된 질환, 장애 또는 병태의 치료를 위해 치료적 유효량의 화합물 A1, B 또는 B1의 상기 구현예 중 임의의 것의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함한다.
- [0046] 특정 구현예는 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공하고, 이 방법은, 환자에게 화합물 A1, B 또는 B1 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하되, 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 부형제와 임의로 혼합된 약제학적 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 특정한 구현예에서, 본 조성물은 환자에서 암을 치료하기 위해 치료적 유효량의 화합물 A1, B 또는 B1의 상기 구현예 중 임의의 것의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함한다.
- [0047] 본 발명의 화합물은 하기를 비제한적으로 포함하는 다양한 암의 치료에 유용하다:
- [0048] 하기의 암종을 포함하는 암종: 방광, 유방, 결장, 신장, 간, 폐(소세포 폐암 포함), 식도, 담낭, 자궁, 난소, 고환, 후두, 구강, 위장관(예를 들면, 식도, 위, 췌장), 뇌, 자궁경부, 갑상선, 전립선, 혈액, 및 피부(편평상피 세포 암종 포함);
- [0049] 하기를 포함하는 림프 계통의 조혈 종양: 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 모발 세포 림프종 및 버킷 림프종;
- [0050] 하기를 포함하는 골수 계통의 조혈 종양: 급성 및 만성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군 및 전골수구 백혈병;
- [0051] 하기를 포함하는 간엽(mesenchymal) 기원의 종양: 섬유육종 및 횡문근육종;
- [0052] 하기를 포함하는 중추 및 말초 신경계의 종양: 별아교세포종, 신경아세포종, 신경아교종 및 신경집종; 및
- [0053] 하기를 포함하는 기타 종양: 흑색종, 정상피종, 기형암종, 골육종, 색소성 건피증(xenoderoma pigmentosum), 각화극세포종, 갑상선 여포성 암 및 카포시 육종.
- [0054] 아폽토시스의 조절물질로서 본 발명의 화합물은 암(비제한적으로, 본원의 위에서 언급된 유형의 것들 포함)의 치료, 예방, 및 억제에서 유용하다.
- [0055] 본 발명의 화합물은 암의 화학적 예방에서 유용하다. 화학적 예방은 개시되는 돌연변이유발 사건을 차단하고, 공격을 이미 겪었던 전-악성 세포의 진행을 차단하고 종양 재발을 억제하여 침입성 암의 발달을 억제하는 것을 수반한다. 본 화합물은 종양 신생혈관형성 및 전이를 억제하는데 또한 유용하다. 본 발명의 하나의 구현예는 유효량의 본 발명의 하나 이상의 화합물을 투여하여 환자에서 종양 신생혈관형성 또는 전이를 억제하는 방법이다.
- [0056] 본 발명의 또 하나의 구현예는 골(bone) 장애, 신경계 질환, 대사성 질환, 호흡기 질환, 심장 질환, 면역계-관련된 질환(예를 들면, 자가면역 질환), 염증 수반 질환 또는 장애(예를 들면, 천식, 만성 폐쇄성 폐 질환, 류마티스성 관절염, 염증성 장질환, 사구체신염, 신경염증성 질환, 다발성 경화증, 포도막염 및 면역계의 장애), 암 또는 다른 증식성 질환, 간질환 또는 장애, 또는 신장 질환 또는 장애를 치료하는 방법이다. 본 방법은 유효량의 본 발명의 하나 이상의 화합물을 투여하는 것을 포함한다.
- [0057] 본 발명의 화합물에 의해 치료될 수 있는 면역 장애의 예는, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 건선, 류마티스성 관절염, 혈관염, 염증성 장질환, 피부염, 골관절염, 천식, 염증성 근육 질환, 알러지성 비염, 질염, 간질성 방광염, 경피증, 골다공증, 습진, 동종이계 또는 이종발생성 이식(장기, 골수, 줄기세포 및 다른 세포 및 조직) 이식편 거부, 이식편대숙주(graft-versus-host) 질환, 홍반성 루프스, 염증성 질환, I형 당뇨병, 특발성 폐 섬유증(IPF)(또는 잠재성 섬유화 폐포염(CFA) 또는 특발성 섬유화 간질성 폐렴), 폐 섬유증, 피부근염, 쇼그렌 증후군, 갑상선염(예를 들면, 하시모토 및 자가면역 갑상선염), 중증 근무력증, 자가면역 용혈성 빈혈, 다발성 경화증, 낭포성 섬유증, 만성 재발성 간염, 원발성 담도성 간경변증, 알러지성 안검결막염 및 아토피 피부염.
- [0058] 또 하나의 구현예는 치료적 유효량의 본 발명의 화합물을 투여하여 환자에서 백혈병을 치료하는 방법이다. 예를 들면, 본 발명의 화합물은 만성 림프구성 백혈병(CLL), 비-호지킨 림프종(NHL), 급성 골수 백혈병(AML), 다발성 골수종(MM), 소림프구성 림프종(SLL), 및 지연성 비-호지킨 림프종(I-NHL)을 치료하는데 효과적이다.
- [0059] 상기 언급된 치료 방법에서, 하나 이상의 추가의 활성제는 본 발명의 화합물과 함께 투여될 수 있다. 예를

들면, 본 발명의 화합물은 공지된 항-암 치료 예컨대 화학요법, 방사선 요법, 생물학적 요법, 골수 이식, 줄기 세포 이식 또는 임의의 다른 항암 치료와 함께 또는 하나 이상의 세포정지성, 세포독성 또는 항암제 또는 표적 치료제 단독으로 또는 그것과 조합하는 것이 유용하고 (그것과 함께 또는 순차적으로 투여되고), 그 예는 비제한적으로 하기를 포함한다: DNA 상호작용제, 예컨대 플루다라빈, 시스플라틴, 클로람부실, 벤다무스틴 또는 독소루비신; 알킬화제, 예컨대 사이클로포스파마이드; 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대 에토포사이드; 토포이소머라제 I 억제제, 예컨대 CPT-11 또는 토포테칸; 튜블린 상호작용제, 예컨대 파클리탁셀, 도세탁셀 또는 에포틸론(예를 들면 익사베필론), 자연 발생 또는 합성; 호르몬제, 예컨대 타목시펜; 티미딜레이드 합성효소 억제제, 예컨대 5-플루오로우라실; 항-대사물, 예컨대 메토포레세이트; 다른 티로신 키나아제 억제제 예컨대 이레싸 및 OSI-774; 신생혈관형성 억제제; EGF 억제제; VEGF 억제제; CDK 억제제; SRC 억제제; c-Kit 억제제; 및 성장 인자 수용체에 대항하여 유도된 모노클로날 항체 및 Her1/2 억제제 예컨대 어비투스(EGF) 및 헤르셉틴(Her2); CD20 모노클로날 항체 예컨대 리툽시맵, 우블리툽시맵(TGR-1101), 오파투무맵(HuMax; Intracel), 오크렐리주맵, 벨투주맵, GA101(오비누투주맵), AME-133v(LY2469298, Applied Molecular Evolution), 오카라투주맵(Mentrix Biotech), PRO131921, 토시투모맵, hA20(Immunomedics, Inc.), 이브리투모맵-티옥세탄, BLX-301(Biolex Therapeutics), Reditux(Dr. Reddy's Laboratories), 및 PRO70769 (WO2004/056312에 기재됨); 다른 B-세포 표적화 모노클로날 항체 예컨대 벨리주맵, 아타시셉트 또는 융합 단백질 예컨대 블리시비모드 및 BR3-Fc; 다른 모노클로날 항체 예컨대 알렘투주맵; CHOP(사이클로포스파마이드, 독소루비신, 빈크리스틴, 프레드니손); R-CHOP(리툽시맵-CHOP); hyperCV AD(과다분획화된 사이클로포스파마이드, 빈크리스틴, 독소루비신, 텍사메타존, 메토포레세이트, 시타라빈); R-hyperCV AD(리툽시맵-hyperCV AD); FCM(플루다라빈, 사이클로포스파마이드, 미톡산트론); R-FCM(리툽시맵, 플루다라빈, 사이클로포스파마이드, 미톡산트론); 보르테조밋 및 리툽시맵; 탬시롤리무스 및 리툽시맵; 탬시롤리무스 및 Velcade®; 요오드-131 토시투모맵(Bexxar®) 및 CHOP-CVP(사이클로포스파마이드, 빈크리스틴, 프레드니손); R-CVP(리툽시맵-CVP); ICE(이포스파마이드, 카보플라틴, 에토포사이드); R-ICE(리툽시맵-ICE); FCR(플루다라빈, 사이클로포스파마이드, 리툽시맵); FR(플루다라빈, 리툽시맵); 및 D.T. PACE(텍사메타존, 탈리도마이드, 시스플라틴, 아드리아마이신, 사이클로포스파마이드, 에토포사이드); 및 다른 단백질 키나아제 조절물질.

[0060] 본 발명의 화합물은 또한, 하나 이상의 (함께 또는 동시에 투여되는) 스테로이드 항-염증성 약물, 비-스테로이드 항-염증성 약물(NSAID) 또는 면역 선택적 항-염증성 유도제(ImSAID)와 조합되기에 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 검정 6a따라 측정된 바와 같이 원발성 다발성 골수종 환자 세포에서 화합물 B1 또는 대조군에 의한 치료 후의 아포토시스성 세포의 백분율의 막대 그래프이다.

도 2a, 2b, 및 2c는 검정 8에서 측정된 바와 같이 하기를 보여주는 막대 그래프이다: CLL 세포에서 세포독성의 관찰된 유도(도 2a) 및 아포토시스(도 2b) 및 PAkt의 상응하는 억제(도 2c).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 본원에서 사용된 바와 같이, 달리 지적되지 않는 한 하기 정의가 적용될 것이다.

[0063] 본원에서 기재된 소정의 화합물들은 하나 이상의 비대칭 중심을 함유하므로 (R)- 또는 (S)-와 같이, 절대적인 입체화학의 측면에서 정의될 수 있는 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 및 다른 입체이성질체 형태를 생성할 수 있다. 본 화학적 독립체, 약제학적 조성물 및 방법은 라세미 혼합물, 광학적으로 순수한 형태 및 중간체 혼합물을 포함하는, 그러한 가능한 모든 이성질체들을 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들면, 중간체 혼합물은 약 10:90, 13:87, 17:83, 20:80, 또는 22:78의 비로 이성질체들의 혼합물을 포함할 수 있다. 광학 활성인 (R)- 및 (S)- 이성질체들은 키랄 신티온(synthon) 또는 키랄 시약을 이용하여 제조되거나, 또는 공지된 기술을 이용하여 분리될 수 있다.

[0064] 용어 "프로드러그"은 정상적인 대사 과정에 의해 체내에서 그의 활성 형태로 전환되는, 화합물의 불활성 전구체인 화합물을 지칭한다. 프로드러그 설계는 문헌(Hardma, et al. (Eds.), Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed., pp. 11-16 (1996)에서 일반적으로 논의된다. 철저한 논의는 문헌(Higuchi, et al., Prodrugs as Novel Delivery Systems, Vol. 14, ASCD Symposium Series, 및 Roche (ed.), Bioreversible Carriers in Drug Design, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press (1987))에 제공되어 있다. 설명을 위해, 프로드러그는, 예를 들면, 에스테르 또는 아마이드 연결의 가수분해를 통

해 약리적으로 활성인 형태로 전환될 수 있으며, 이로써 기능기를 얻어진 생성물에 도입하거나 노출시킨다. 프로드러그는 내인성 화합물과 반응하여, 화합물의 약리적 특성, 예를 들면, 증가된 순환 반감기를 추가 향상시키는 수용성 콘주게이트를 형성하도록 설계될 수 있다. 대안적으로, 프로드러그는, 예를 들면, 글루쿠론산, 설페이트, 글루타티온, 아미노산, 또는 아세테이트를 이용하여 기능기 상에서 공유 변형을 겪도록 설계될 수 있다. 얻어진 콘주게이트는 불활성화되어 소변으로 배출될 수 있거나, 또는 모 화합물보다 더 강력하게 될 수 있다. 고분자량 콘주게이트는 또한 담즙 내로 배출되어, 효소 절단되고, 다시 순환으로 방출됨으로써 본래 투여된 화합물의 생물학적 반감기를 효과적으로 증가시킬 수 있다. 화합물 A1, B, B1 및 B2의 프로드러그는 본 발명의 범위 내에 속하도록 의도된다.

[0065] 추가로, 본 발명은 또한 하나 이상의 동위원소 농축 원자들의 존재, 예를 들면, 수소의 중수소 또는 트리튬으로의 대체, 또는 탄소의 ¹³C-또는 ¹⁴C-농축 탄소로의 대체만이 상이한 화합물을 포함한다.

[0066] 본 발명의 화합물은 또한 이러한 화합물들을 구성하는 하나 이상의 원자들에 비천연적인 비율의 원자 동위원소를 함유할 수 있다. 예를 들면, 화합물들은 예를 들면 트리튬(³H), 요오드-125(¹²⁵I) 또는 탄소-14(¹⁴C)와 같은 방사성 동위원소로 방사선표지될 수 있다. 방사성이든 아니든 간에, 본 발명의 화합물의 모든 동위원소 변이는 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0067] 본 발명의 약제학적으로 허용가능한 염 형성부는 Li, Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, 및 Mn과 같은 무기 염기로부터 유래된 염; N,N'-디아세틸에틸렌디아민, 글루카민, 트리에틸아민, 콜린, 하이드록사이드, 디사이클로헥실아민, 메트포르민, 벤질아민, 트리알킬아민, 및 티아민과 같은 유기 염기의 염; 알킬페닐아민, 글리시놀, 및 페닐 글리시놀과 같은 키랄 염기의 염; 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 노르류신, 티로신, 시스틴, 시스테인, 메티오닌, 프롤린, 하이드록시 프롤린, 히스티딘, 오미틴, 라이신, 아르기닌, 및 세린과 같은 천연 아미노산의 염; MeI 및 (Me)₂SO₄와 같은 알킬 할라이드, 알킬 설페이트를 갖는 본 발명의 화합물의 사금 암모늄 염; D-이성질체와 같은 비-천연 아미노산 또는 치환된 아미노산의 염; 구아니딘의 염; 및 치환된 구아니딘의 염을 포함하고, 여기서 상기 치환기는 니트로, 아미노, 알킬, 알케닐, 알키닐, 암모늄 또는 치환된 암모늄 염 및 알루미늄 염으로부터 선택된다. 염은 적절한 경우 산 부가염을 포함할 수 있으며, 이는 설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 퍼클로레이트, 보레이트, 히드로할라이드, 아세테이트, 타르트레이트, 말레에이트, 시트레이트, 푸마레이트, 석시네이트, 팔모에이트, 메탄설포네이트, 벤조에이트, 살리실레이트, 벤젠설포네이트, 아스코르베이트, 글리세로포스페이트, 및 케토글루타레이트이다. 일 구현예에서, 염은 4-메틸벤젠설포네이트이다. 또 하나의 구현예에서, 염은 설페이트이다. 또 하나의 구현예에서, 염은 히드로클로라이드이다. 또 하나의 구현예에서, 염은 벤젠설포네이트이다. 또 하나의 구현예에서, 염은 말레에이트이다. 또 하나의 구현예에서, 염은 캄포르 설포네이트이다.

[0068] 분자량과 같은 물리적 특성, 또는 화학식과 같은 화학적 특성에 대해 본원에서 범위가 사용될 때, 범위 및 그 안에 특정 구현예의 모든 조합 및 하위조합이 포함되는 것으로 의도된다. 숫자 또는 수치 범위를 언급할 때 용어 "약"은 상기 언급된 숫자 또는 수치 범위가 실험적 가변성 내의 (또는 통계적 실험 오차 내의) 근사치인 것을 의미하며, 따라서 상기 숫자 또는 수치 범위는, 예를 들면, 언급된 숫자 또는 수치 범위의 1% 내지 15% 사이로 달라질 수 있다.

[0069] 용어 "포함하는(comprising)"(및 "포함하다(comprise 또는 comprises)" 또는 "갖는(having 또는 "including)")과 같은 관련 용어들은, 비제한적으로, 상기 구현예, 예를 들면, 기재된 특징으로 "구성되는" 또는 "필수적으로 구성되는", 임의의 물질의 조성물, 조성, 방법, 또는 공정 등의 구현예를 포함한다.

[0070] 하기 약어 및 용어들은 전반적으로 명시된 의미를 갖는다: PI3-K = 포스포이노시티드 3-키나아제; PI = 포스포티딜이노시톨; DNA-PK = 데옥시리보스 핵산 의존적 단백질 키나아제; PTEN = 포스포타제 및 염색체 Ten 상에서 결실된 텐신 동족체; AIDS = 후천성 면역 결핍 증후군; HIV = 인간 면역 결핍 바이러스; 및 MeI = 메틸 아이오다이드.

[0071] 본원에 사용된 약어는, 달리 지적되지 않는 한, 화학적 및 생물학적 분야 내에서 그들의 종래의 의미를 갖는다.

[0072] 용어 "세포 증식"은 분열의 결과로서 세포수가 바뀐 형상을 지칭한다. 이 용어는 또한 세포 형태가 증식성 신호와 일치되게 변화된(예를 들면, 크기가 증가된) 세포 성장을 포함한다.

[0073] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "공-투여," "병용 투여된," 및 그의 문법적 동등물은 두 가지 제제 및/또는 그의 대사물이 동물 내에 동시에 존재하도록 동물에게 둘 이상의 제제를 투여하는 것을 포함한다. 공-투여는 별개

의 조성물로의 동시 투여, 별개의 조성물로의 상이한 시간에 투여, 또는 두 가지 제제들이 존재하는 조성물로의 투여를 포함한다.

- [0074] 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 비제한적으로, 질환 치료를 포함하는, 의도된 적용을 달성하는데 충분한 본원에 기재된 화합물의 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 의도된 적용(시험관내 또는 생체내), 또는 치료될 대상 및 질환 상태, 예를 들면, 대상의 체중 및 연령, 질환 상태의 중증도, 투여 방식 등에 따라 달라질 수 있으며, 이는 당해분야의 숙련가에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 상기 용어는 또한 표적 세포에서의 특정한 반응, 예를 들면, 혈소판 부착 및/또는 세포 이동의 감소를 유도할 용량에 적용된다. 특정 용량은 다른 화합물과 병용 투여되는지 여부에 관계없이 선택된 특정 화합물, 뒤따를 복용 요법, 투여 시점, 투여될 조직, 전달될 물리적 전달 시스템에 따라 달라질 것이다.
- [0075] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어들 "치료" 및 "치료하는"은, 비제한적으로, 치료적 이점 및/또는 예방적 이점을 포함하는, 유익하거나 원하는 결과를 얻기 위한 접근법을 지칭한다. 치료적 이점은 치료될 기저 장애의 박멸 또는 개선을 의미한다. 또한, 치료적 이점은, 환자가 기저 장애로 인해 여전히 고통받을 수 있음에도 불구하고, 환자에서 개선이 관찰되도록, 기저 장애와 연관된 하나 이상의 생리적 증상의 박멸 또는 개선으로 달성된다. 예방적 이점을 위해, 조성물은, 이 질환의 진단이 이뤄지지 않을 수 있음에도 불구하고, 특정 질환이 생길 위험성이 있는 환자, 또는 질환의 하나 이상의 생리적 증상을 보고하고 있는 환자에게 투여될 수 있다.
- [0076] 상기 용어가 본원에서 사용된 바와 같이, "치료 효과"는 상기에서 기재된 바와 같은 치료적 이점 및/또는 예방적 이점을 포함한다. 예방적 효과는 질환 또는 병태의 출현을 지연시키거나 제거하는 것, 질환 또는 병태의 증상의 개시를 지연시키거나 제거하는 것, 질환 또는 병태의 진행을 늦추거나, 정지시키거나, 또는 역전시키는 것, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0077] 용어 "대상" 또는 "환자"는 포유동물과 같은 동물, 예를 들면 인간을 지칭한다. 본원에서 기재된 방법은 인간 치료 및 수의적 적용 모두에 유용할 수 있다. 일부 구현예에서, 환자는 포유동물이고, 일부 구현예에서, 환자는 인간이다. 수의적 목적을 위해, 용어 "대상" 및 "환자"는, 비제한적으로, 소, 양, 돼지, 말, 및 염소를 포함하는 가축; 개 및 고양이와 같은 반려 동물; 이국적인 동물 및/또는 동물원 동물; 마우스, 랫트, 토끼, 기니아 피그, 및 햄스터를 포함하는 실험실 동물; 및 닭, 칠면조, 오리, 및 거위와 같은 가금류를 포함한다.
- [0078] "방사선 요법"은 의사에게 공지된 방법 및 조성물을 이용하여 환자를 방사선 에미터 예컨대 알파-입자 발광 방사선택종(예를 들면, 악티늄 및 토륨 방사선택종), 저선형 에너지 전이(LET) 방사선 에미터(즉 베타 에미터), 전환 전자 에미터(예를 들면 스트론튬-89 및 사마륨-153-EDTMP), 또는 비제한적으로 x-선, 감마선, 및 중성자를 포함하는 고-에너지 방사선과 같은 방사선 에미터에 노출시키는 것을 지칭한다.
- [0079] "신호 전달"은 자극 신호 또는 억제 신호가 세포 내로 전달되어 세포내 반응을 유발하는 공정이다. 신호 형질도 입 경로의 조절물질은 동일한 특정 신호 전달 경로에 맵핑된 하나 이상의 세포 단백질의 활성을 조절하는 화합물을 지칭한다. 조절물질은 신호전달 분자의 활성을 증가(작용제)시키거나 억제(길항제)할 수 있다.
- [0080] 생물학적 활성체에 적용되는 용어 "선택적 억제" 또는 "선택적으로 억제하다"는 표적과의 직접적인 또는 간접적인 상호작용을 통해, 부정확한 신호전달 활성화와 비교하여 표적 신호전달 활성을 선택적으로 감소시키는 제제의 능력을 지칭한다.
- [0081] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "PI3-키나아제 δ 선택적 억제제"는 일반적으로 PI3K 패밀리의 다른 동질효소(알파, 베타, 및 감마)보다 더 효과적으로 PI3-키나아제 δ 동질효소의 활성을 억제하는 화합물을 지칭한다. 예를 들면, PI3-키나아제 δ 선택적 억제제는 나머지 다른 I형 PI3 키나아제(즉, 알파, 베타, 및 감마)에 대한 억제제의 IC50보다 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 50배, 적어도 100배, 또는 그 이하의, 델타 I형 PI3-키나아제에 대해 50% 억제 농도(IC50)를 나타내는 화합물을 지칭할 수 있다.
- [0082] PI3-키나아제 δ 의 억제는 다양한 병태, 예를 들면, 비제한적으로 자가면역 질환, 알러지성 질환, 및 관절염 질환을 포함하는 염증성 반응을 특징으로 하는 병태의 치료에 치료적으로 이로울 수 있다. 중요하게, PI3-키나아제 δ 기능의 억제는 생존력 및 생식능력과 같은 생물학적 기능에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.
- [0083] 본원에서 사용된 바와 같이 "염증성 반응" 적열상태, 열, 부기 및 통증(즉, 염증)을 특징으로 하며, 전형적으로 조직 손상 또는 파괴를 수반한다. 염증성 반응은 조직의 손상 또는 파괴에 의해 유발된 국지화된 보호 반응이며, 이는 해로운 제제 및 손상된 조직 모두를 파괴하거나, 희석시키거나 차단하는(격리제) 기능을 한다. 염증성 반응은 백혈구 및/또는 백혈구예를 들면, 중성구) 화학주성의 유입과 현저히 연관된다. 염증성 반응은 병원성 유기체 및 바이러스로의 감염, 심근경색증 또는 뇌졸중 후 외상 또는 재관류(reperfusion)와 같은 비감

염성 수단, 외부 항원에 대한 면역 반응, 및 자가면역 질환으로부터 야기될 수 있다. 본 발명에 따른 방법 및 화합물을 이용하여 치료될 수 있는 염증성 반응은 특이적 방어 체계의 반응과 연관된 병태 뿐만 아니라 비-특이적 방어 체계의 반응과 연관된 병태를 포함한다.

[0084] 본 발명의 치료 방법은 염증 세포 활성화와 연관된 병태를 치료하기 위한 방법을 포함한다. "염증 세포 활성화"는 증식성 세포성 반응의 자극(비제한적으로, 사이토카인, 항원 또는 자가-항체를 포함함)에 의한 유도, 가용성 매개체(비제한적으로 사이토카인, 산소 라디칼, 효소, 프로스타노이드, 또는 혈관활성 아민을 포함함)의 생산, 또는 염증 세포(비제한적으로, 단핵구, 대식세포, T 림프구, B 림프구, 과립구(중성구, 호염기구, 및 호산구를 포함하는 다형핵 백혈구) 비만 세포, 수지상 세포, 랑게르한스 세포, 및 내피 세포를 포함함) 내 새롭거나 증가된 수의 매개체(비제한적으로, 주 조직적합성 항원 또는 세포 접합 부착을 포함함)의 세포 표면 발현에 의한 유도를 지칭한다. 이들 세포에서 이들 표현형 중 하나 또는 조합의 활성화는 염증성 병태의 개시, 보존, 또는 악화에 기여할 수 있다는 것이 당해분야의 숙련자에게 인식될 것이다.

[0085] 본원에서 사용된 바와 같이 "자가면역 질환"은 조직 손상이 몸 자체 구성요소에 대한 체액성 또는 세포매개성 반응과 연관된 장애의 임의의 그룹을 지칭한다.

[0086] 본원에서 사용된 바와 같이 "이식 거부"는 이식된 조직에 대한 면역 반응을 지칭한다(이식된 조직 및 주변 조직의 기능의 손실, 통증, 팽윤, 백혈구증가증, 및 혈소판감소증을 특징으로 하는 기관 또는 세포(예를 들면, 골수)를 포함함).

[0087] 본원에서 사용된 바와 같이 "알러지성 질환"은 알러지로부터 초래된 임의의 증상, 조직 손상, 또는 조직 기능의 손실을 지칭한다.

[0088] 본원에서 사용된 바와 같이 "관절염 질환"은 다양한 원인론에 기인할 수 있는 관절의 염증성 병변을 특징으로 하는 임의의 질환을 지칭한다.

[0089] 본원에서 사용된 바와 같이 "피부염"은 다양한 원인론에 기인할 수 있는 피부의 염증을 특징으로 하는 피부의 질환의 거대한 패밀리 중 어느 하나를 지칭한다.

[0090] 본 발명의 화합물은 참조로 본원에 포함된, 2013년 5월 3일에 출원된, 국제 공보 제WO 2011/055215호 및 PCT 출원 제PCT/IB2013/053544호에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 화합물 A는 국제 공보 제WO 2011/055215호의 실시예 158에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다.

[0091] **약제학적 조성물**

[0092] 본 발명은 본 발명의 하나 이상의 화합물 및 하나 이상의 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 일 구현예에서, 약제학적 조성물은 치료적 유효량의 본 발명의 화합물을 포함한다. 약제학적 조성물은 본원에서 기재된 바와 같은 하나 이상의 추가의 활성 성분을 포함할 수 있다.

[0093] 약제학적 담체 및/또는 부형제는 희석제, 충전제, 염, 붕해제, 결합제, 윤활유, 활제, 습윤제, 제어 방출 매트릭스, 착색제, 풍미제, 버퍼, 안정제, 가용화제, 및 이들의 조합으로부터 선택될 수 있다.

[0094] 본 발명의 약제학적 조성물은 단독으로 또는 하나 이상의 다른 활성제와 조합하여 투여될 수 있다. 원하는 경우, 대상 화합물 및 다른 제제(들)은 제제에 혼합될 수 있거나 성분 둘 모두는 별도로 또는 동시에 조합하여 사용하기 위해 별개의 제제로 제형화될 수 있다.

[0095] 본 발명의 화합물 및 약제학적 조성물은 화합물을 작용 부위로 전달할 수 있는 하기와 같은 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다: 경구로, 비강내로, 국소로(예를 들면, 경피로), 십이지장내로, 비경구로(정맥내로, 동맥내로, 근육내로, 혈관내로, 복강내로 또는 주사로 또는 주입 포함), 진피내로, 유선내로, 척추강내로, 안구내로, 안구 뒤로, 폐내(예를 들면, 에어로졸화된 약물) 또는 피하로(장기간 방출을 위한 데포(depot) 투여 예를 들면, 비장 캡슐, 뇌, 또는 각막 하에서 포매되는 것을 포함함), 설하로, 항문으로, 직장으로, 질로, 또는 수술적 이식으로(예를 들면, 비장 캡슐 하 포매됨, 뇌, 또는 각막 하에 포매됨).

[0096] 본 조성물은 고체, 반-고체, 액체 또는 기체 형태로 투여될 수 있거나, 건조된 분말, 예컨대 동결건조된 형태로 투여될 수 있다. 약제학적 조성물은 하기 예를 포함하는, 전달에 편리한 형태로 포장될 수 있다: 고형 복용 형태 예컨대 캡슐, 봉지(sachet), 사세(cachet), 펠라틴, 페이퍼, 정제, 좌약, 펠렛(pellet), 알약, 트로키(troch), 및 로젠지(lozenge). 포장의 유형은 일반적으로 원하는 투여 경로를 따를 것이다. 이식가능 지속 방출 제형은 경피 제형처럼 또한 고려된다.

- [0097] 투여될 화합물의 양은 치료될 포유동물, 장애 또는 병태의 중증도, 투여 속도, 화합물의 성향 및 처방의의 재량에 의존적이다. 그러나, 효과적인 복용량은 단일 또는 분할 용량으로 체중 kg 당 일일 약 0.001 내지 약 100 mg, 바람직하게는 약 1 내지 약 35 mg/kg/1일의 범위이다. 70 kg 인간에 대해, 그 범위는 약 0.05 내지 7 g/1일, 바람직하게는 약 0.05 내지 약 2.5 g/1일의 양에 해당한다. 유효량의 본 발명의 화합물은 단일 또는 다중 용량(예를 들면, 2회 또는 3 회/1일)으로 투여될 수 있다.
- [0098] 본 발명의 화합물은 적어도 하나의 다른 항-암 제제(예를 들면, 화학치료제), 항-염증성 제제, 면역억제성 제제, 스테로이드, 비-스테로이드성 항-염증성 제제, 항히스타민제, 진통제, 치료적 항체, 및 방사선 치료 중 하나 이상과 함께 사용될 수 있다.
- [0099] 본 발명의 화합물은 제형되거나 염증성 병태 예컨대 뇌척수염, 천식, 및 본원에서 기재된 다른 질환의 증상을 완화하도록 작용하는 다른 제제와 공동으로 투여될 수 있다. 이들 제제들은 비-스테로이드 항-염증성 약물(NSAID)을 포함한다.
- [0100] 다양한 약제학적 조성물의 제제는 당해기술에 공지되어 있다. 예를 들면, Anderson, Philip O.; Knoben, James E.; Troutman, William G, eds., Handbook of Clinical Drug Data, Tenth Edition, McGraw-Hill, 2002; Pratt and Taylor, eds., Principles of Drug Action, Third Edition, Churchill Livingstone, New York, 1990; Katzung, ed., Basic and Clinical Pharmacology, Ninth Edition, McGraw Hill, 2003; Goodman and Gilman, eds., The Pharmacological Basis of Therapeutics, Tenth Edition, McGraw Hill, 2001; Remingtons Pharmaceutical Sciences, 20th Ed., Lippincott Williams & Wilkins., 2000; Martindale, The Extra Pharmacopoeia, Thirty-Second Edition (The Pharmaceutical Press, London, 1999)을 참조하며, 이들 모두는 그 전체가 참조로 본원에 포함되어 있다.
- [0101] 유효량의 본 발명의 화합물은 유사한 유용성을 갖는 제제의 허용된, 하기를 포함하는 투여 방식 중 임의의 것에 의해 단일 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다: 직장, 볼, 비강내 및 경피 경로, 동맥내 주사로, 정맥내로, 복강내로, 비경구로, 근육내로, 피하로, 경구로, 국소로, 또는 흡입제로서.
- [0102] 일 구현예에서, 화합물 A1 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염은 약 20 내지 5,000 ng/mL의 혈액 중 화합물의 농도를 생성하고 투여 다음에 약 6 내지 24 시간의 기간 동안에 그와 같은 농도를 유지하도록 선택된 용량으로 투여된다. 또 하나의 특별한 구현예에서, 용량 크기 및 빈도는 약 50 내지 2,500 ng/mL인 혈액 중 화합물의 농도를 달성하고 투여 시간으로부터 약 6 내지 24 시간의 기간 동안에 농도를 유지하도록 선택된다. 일부 구현예에서, 용량 크기 및 빈도는 투여 다음에 약 100 내지 1,500 ng/mL인 혈액 중 화합물의 농도를 달성하도록 선택된다. 일부 구현예에서, 용량 크기 및 빈도는 투여 시간으로부터 약 6 내지 24 시간의 기간에 걸쳐 약 100 내지 750 ng/mL인 혈액 중 화합물의 농도를 달성하도록 선택된다. 추가 구현예에서, 용량 크기 및 빈도는 적어도 약 300 ng/mL이고 약 10,000 ng/mL를 초과하지 않는 C_{max} , 화합물 A1의 혈장 수준을 달성하기 위해 선택된다.
- [0103] 일 구현예에서, 화합물 B1 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염은 약 20 내지 5,000 ng/mL의 혈액 중 화합물의 농도를 생성하고 투여 다음에 약 6 내지 24 시간의 기간 동안에 그와 같은 농도를 유지하도록 선택된 용량으로 투여된다. 또 하나의 특별한 구현예에서, 용량 크기 및 빈도는 약 50 내지 2,500 ng/mL인 혈액 중 화합물의 농도를 달성하고 투여 시간으로부터 약 6 내지 24 시간의 기간 동안에 농도를 유지하는 혈액 중 화합물의 농도를 유지하도록 선택된다. 일부 구현예에서, 용량 크기 및 빈도는 투여 다음에 약 100 내지 1,500 ng/mL인 혈액 중 화합물의 농도를 달성하도록 선택된다. 일부 구현예에서, 용량 크기 및 빈도는 투여 시간으로부터 약 6 내지 24 시간의 기간에 걸쳐 약 100 내지 750 ng/mL 혈액 중 화합물의 농도를 달성하도록 선택된다. 추가 구현예에서, 용량 크기 및 빈도는 적어도 약 300 ng/mL이고 약 10,000 ng/mL를 초과하지 않는 C_{max} , 화합물 B1의 혈장 수준을 달성하도록 선택된다.
- [0104] **치료 방법**
- [0105] 본 발명은 PI3 키나아제의 하나 이상의 유형의 기능부전과 연관된 질환을 비제한적으로 포함하는 질환 상태를 치료하기 위해 본 발명의 화합물 또는 약제학적 조성물을 사용하는 방법을 또한 제공한다. PI3 δ 키나아제 활성에 의해 매개된 병태 및 장애의 상세한 설명은 WO 2001/81346, US 2005/043239, WO 2010/123931, WO 2010/111432 및 WO 2010/057048에서 제시되어 있고, 이들 모두는 사실상 그 전체가 참조로 본원에 포함되어 있다.
- [0106] 본원에서 제공된 치료 방법은 대상체에게 치료적 유효량의 본 발명의 화합물을 투여하는 것을 포함한다. 일 구

현예에서, 본 발명은 포유동물에서 자가면역 질환을 포함하는 염증 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 본 방법은 상기 포유동물에게 치료적 유효량의 본 발명의 화합물을 투여하는 것을 포함한다.

- [0107] 본원에서 제공된 화합물로 치료가능한 장애, 질환, 또는 병태는 비제한적으로 하기를 포함한다:
- [0108] ■ 전신 과민증 및 과민증 장애, 아토피 피부염, 두드러기, 약물 알러지, 곤충 쏘임 알러지, 음식 알러지(소아 지방변증 등 포함), 과민증, 혈청병, 약물 반응, 곤충 독 알러지, 과민증 폐렴, 맥관부종, 홍반 다형성, 스티븐-존슨 증후군, 아토피 각결막염, 성병 각결막염, 거대 유두상 결막염, 및 비만세포증을 포함하는 염증성 또는 알러지성 질환;
- [0109] ■ 하기를 포함하는 염증성 장질환: 크론병, 궤양성 대장염, 회장염, 장염, 및 괴사성 장염;
- [0110] ■ 혈관염, 및 베체트 증후군;
- [0111] ■ 피부염, 습진, 알러지성 접촉 피부염, 인간 파필로마바이러스, HIV 또는 RLV 감염, 박테리아, 진균, 및 다른 기생동물 피부 병리로부터 유도된 것을 포함하는 바이러스 피부 병리, 및 피부 홍반성 루프스를 포함하는 건선 및 염증성 피부병;
- [0112] ■ 알러지성 천식, 운동 유도된 천식, 알러지성 비염, 중이염, 과민증 폐 질환, 만성 폐쇄성 폐 질환 및 다른 호흡 문제를 포함하는 천식 및 호흡 알러지성 질환;
- [0113] ■ 홍반성 루프스, 전신 홍반성 루프스(SLE), 다발성 경화증, 다발성관절염, 원발성 담도성 간경변증, 건선, 류마티스성 관절염, 건선성 관절염, 통풍 관절염, 척추염, 반응성 관절염, 만성 또는 급성 사구체신염, 루프스성 신염, 라이터 증후군, 다카야수 동맥염, 일시적 동맥염("거대세포 동맥염"으로도 알려짐), 자가면역 폐 염증, 자가면역 갑상선염, 자가면역 염증성 안구 질환, 백반증, 및 외음부통을 비제한적으로 포함하는 자가면역 질환 및 염증성 병태. 다른 장애는 골-흡수 장애 및 혈전증을 포함한다;
- [0114] ■ 유방, 피부, 전립선, 자궁경부, 자궁, 난소, 고환, 방광, 폐, 간, 후두, 구강, 결장 및 위장관(예를 들면, 식도, 위, 췌장), 뇌, 갑상선, 혈액, 및 림프계의 암; 및
- [0115] ■ 천식, 만성 기관지염, 알러지성 비염, 성인 호흡 곤란 증후군(ARDS), 중증 급성 호흡기 증후군(SARS), 만성 폐 염증성 질환(예를 들면, 만성 폐쇄성 폐 질환), 규폐증, 폐 유육종증, 늑막염, 폐포염, 혈관염, 폐렴, 기관지 확장증, 선천성 폐공기증, 및 폐 산소 독성을 비제한적으로 포함하는 폐 또는 호흡 병태.
- [0116] 어떤 구현예에서, 본원에서 제공된 방법으로 치료가능한 암 또는 암들은 비제한적으로 하기를 포함한다:
- [0117] ■ 급성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구 백혈병 예컨대 골수아세포, 전골수구, 골수단구, 단구성, 적백혈병 및 골수이형성 증후군 또는 그것의 증상(예컨대 빈혈, 혈소판감소증, 호중구감소증, 이중혈구 또는 범혈구감소증), 난치 빈혈(RA), 관상 철아구 RA(RARS), 과다 모세포 RA(RAEB), 형질전환 동반 RAEB(RAEB-T), 전 백혈병, 및 만성 골수단구 백혈병(CMML)을 비제한적으로 포함하는 백혈병;
- [0118] ■ 만성 골수구성(과립구성) 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 및 모발 세포 백혈병을 비제한적으로 포함하는 만성 백혈병;
- [0119] ■ 진성 적혈구증가증;
- [0120] ■ 호지킨 질환 및 비-호지킨 질환을 비제한적으로 포함하는 림프종;
- [0121] ■ 무증상 다발성 골수종, 비분비 골수종, 골경화성, 형질 세포 백혈병, 고립성 형질세포종, 및 골수의 형질세포종을 비제한적으로 포함하는 다발성 골수종;
- [0122] ■ 발덴스트롬 거대글로불린혈증;
- [0123] ■ 의미 불명 모노클로날 감마글로불린병증;
- [0124] ■ 양성 모노클로날 감마글로불린병증;
- [0125] ■ 중쇄 질환;
- [0126] ■ 뼈 육종, 골육종, 연골육종, 유잉 육종, 악성 거대세포 종양, 골의 섬유육종, 척색종, 골막성 육종, 연조직 육종, 맥관육종(혈관육종), 섬유육종, 카포시 육종, 평활근육종, 지방육종, 림프관육종, 전이암, 신경집종, 횡문근육종, 및 활막 육종을 비제한적으로 포함하는 골 및 결합 조직 육종;

- [0127] ■ 신경아교종, 별아교세포종, 뇌간 신경아교종, 뇌실막세포종, 희소돌기아교세포종, 신경교 종양, 청신경종, 두개인두종, 수모세포종, 수막종, 송과체세포종, 송과체아세포종, 및 원발성 뇌 림프종을 비제한적으로 포함하는 뇌종양;
- [0128] ■ 선암종, 소엽(소세포) 암종, 도관내 암종, 수질 유방암, 점액성 유방암, 관형 유방암, 유두상 유방암, 원발암, 파제트병, 및 염증성 유방암을 비제한적으로 포함하는 유방암;
- [0129] ■ 크롬친화세포종 및 부신피질 암종을 비제한적으로 포함하는 부신암;
- [0130] ■ 유두상 또는 여포성 갑상선암, 수질 갑상선암, 및 역형성 갑상선암을 비제한적으로 포함하는 갑상선암;
- [0131] ■ 인슐린종, 가스트린종, 글루카곤종, 비포마, 소마토스타틴-분비 종양, 및 카르시노이드 또는 소도세포 종양을 비제한적으로 포함하는 췌장암;
- [0132] ■ 쿠싱 질환, 프로락틴-분비 종양, 말단비대증, 및 요붕증을 비제한적으로 포함하는 뇌하수체 암;
- [0133] ■ 안구 흑색종 예컨대 홍채 흑색종, 맥락막 흑색종, 및 모양체 흑색종, 및 망막모세포종을 비제한적으로 포함하는 안암;
- [0134] ■ 편평상피 세포 암종, 선암종, 및 흑색종을 비제한적으로 포함하는 질암;
- [0135] ■ 편평상피 세포 암종, 흑색종, 선암종, 기저 세포 암종, 육종, 및 파제트병을 비제한적으로 포함하는 외음부암;
- [0136] ■ 편평상피 세포 암종, 및 선암종을 비제한적으로 포함하는 자궁경부암;
- [0137] ■ 자궁내막암종 및 자궁 육종을 비제한적으로 포함하는 자궁암;
- [0138] ■ 난소 상피 암종, 경계선 종양, 생식세포 종양, 및 기질 종양을 비제한적으로 포함하는 난소암;
- [0139] ■ 편평상피암, 선암종, 선양 양성 암종, 점액표피양 암종, 선편평세포 암종, 육종, 흑색종, 형질세포종, 사마귀모양 암종, 및 귀리 세포(소세포) 암종을 비제한적으로 포함하는 식도암;
- [0140] ■ 선암종, 균상형(폴립형), 궤양, 표재 확장성, 확산성 퍼짐, 악성 림프종, 지방육종, 섬유육종, 및 암육종을 비제한적으로 포함하는 위암;
- [0141] ■ 결장암;
- [0142] ■ 직장암;
- [0143] ■ 간세포 암종 및 간모세포종을 비제한적으로 포함하는 간암;
- [0144] ■ 선암종을 비제한적으로 포함하는 담낭암;
- [0145] ■ 유두상, 결절성, 및 확산을 비제한적으로 포함하는 담관암종;
- [0146] ■ 비-소세포 폐암, 편평상피 세포 암종(표피모양 암종), 선암종, 대세포 암종, 및 소세포 폐암을 비제한적으로 포함하는 폐암;
- [0147] ■ 배아 종양, 정상피종, 역형성, 고전적(전형적인), 정모세포성, 비정상피종, 배아 암종, 기형종 암종, 및 융모암종(난황낭 종양)을 비제한적으로 포함하는 고환암;
- [0148] ■ 선암종, 평활근육종, 및 횡문근육종을 비제한적으로 포함하는 전립선암;
- [0149] ■ 음경암;
- [0150] ■ 편평상피 세포 암종을 비제한적으로 포함하는 구강암;
- [0151] ■ 기저암;
- [0152] ■ 선암종, 점액표피양 암종, 및 샘낭 암종을 비제한적으로 포함하는 타액샘 암;
- [0153] ■ 편평상피 세포 암 및 사마귀모양을 비제한적으로 포함하는 인두 암;
- [0154] ■ 기저 세포 암종, 편평상피 세포 암종 및 흑색종, 표재 확장성 흑색종, 결절성 흑색종, 악성 흑자 흑색종, 및 선단 흑자성 흑색종을 비제한적으로 포함하는 피부암;

- [0155] ■ 신장 세포 암, 선암종을 비제한적으로 포함하는 신장암,
- [0157] ■ 부신종, 섬유육종, 및 이행 세포 암(신장 골반 및/또는 요관);
- [0158] ■ 윌름스 종양;
- [0159] ■ 이행 세포 암종, 편평상피 세포 암, 선암종, 및 암육종을 비제한적으로 포함하는 방광암; 및 점액육종, 골육종, 내피육종, 림프관- 내피육종, 중피종, 활막종, 혈관모세포종, 상피 암종, 낭샘암종, 기관지 암종, 땀샘 암종, 피지샘 암종, 유두상 암종, 및 유두상 선암종을 비제한적으로 포함하는 기타 암
- [0160] 문헌(Fishman 등, 1985, Medicine, 2d Ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia and Murphy 등, 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States of America)을 참조한다.

[0161] 본 발명의 치료 방법은 인간 의약 및 수의적 의약의 분야에서 유용한 것으로 인정될 것이다. 따라서, 치료될 개체는 포유동물, 바람직하게는 인간, 또는 다른 동물일 수 있다. 수의적 목적을 위해, 개체는 하기를 비제한적으로 포함한다: 소, 양, 돼지, 말, 및 염소를 포함하는 가축; 반려 동물 예컨대 개 및 고양이; 외래 및/또는 동물원 동물; 실험실 마우스, 랫트, 토끼, 기니아 피그, 및 햄스터를 포함하는 실험실 동물; 및 가끔 예컨대 닭, 칠면조, 오리, 및 거위.

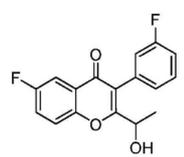
[0162] 본 발명은 또한, 상기 포유동물에게 치료적 유효량의 본 발명의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 과증식 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 하기의 치료에 관한 것이다: 암 예컨대 급성 골수 백혈병, 가슴샘, 뇌, 폐, 편평상피 세포, 피부, 눈, 망막모세포종, 안구내 흑색종, 구강 및 구강인두, 방광, 위, 위, 췌장, 방광, 유방, 자궁경부, 머리, 목, 신장(renal), 콩팥(kidney), 간, 난소, 전립선, 결직장, 식도, 고환, 부인과, 갑상선, CNS, PNS, AIDS-관련된(예를 들면 림프종 및 카포시 육종) 또는 바이러스-유도된 암. 일부 구현예에서, 상기 방법은 비-암성 과증식 장애 예컨대 피부의 양성 비대증(예를 들면, 건선), 재협착증, 또는 전립선(예를 들면, 양성 전립선 비대(BPH))의 치료에 관한 것이다.

[0163] **실시예**

[0164] 이하에서 제공된 실시예 및 제제는 본 발명의 화합물을 제조하는 방법을 추가로 설명하고 예증한다. 본 발명의 범위는 하기 실시예 및 제제에 의해 어떤 식으로든 제한되지 않는 것으로 이해된다. 하기 실시예에서 단일 키랄 중심을 갖는 분자는, 달리 지적되지 않으면, 라세미 혼합물로서 존재한다. 단일 거울상이성질체는 당해분야의 숙련자에게 공지된 방법으로 수득될 수 있다.

[0165] 달리 언급되지 않으면, 워크업(work-up)은 소괄호 내에 명시된 수상 및 유기 상 사이의 반응 혼합물의 분포, 유기층의 분리 및 Na₂SO₄ 상의 건조 및 잔여물을 얻기 위한 용매의 증발을 의미한다. 달리 언급되지 않으면, 정제는 실리카겔을 고정상으로서 그리고 석유 에테르(비점 60 내지 80℃)와 에틸 아세테이트 또는 디클로로메탄의 혼합물 및 적당한 극성의 메탄올을 이동상으로서 사용하는 칼럼 크로마토그래피를 시사한다. RT는 주위 온도(25 내지 28℃)를 의미한다.

[0166] **중간체 1**

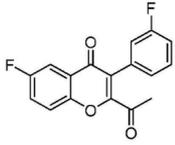


[0167]

[0168] **중간체 1:** 6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-2-(1-하이드록시에틸)-4H-크로멘-4-온: DMSO(150 ml) 중 2-(1-브로모에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온(15.0 g, 40.84 mmol)의 용액에, n-부탄올(7.5 ml)을 부가하고 3 시간 동안 120℃로 가열했다. 반응 혼합물을 RT로 냉각하고, 물로 켄칭하고 에틸 아세테이트로 추출했다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황백색 고형물(7.90 g, 64%)로서 얻었다. ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 7.85 (dd, J = 8.1, 3 Hz, 1H), 7.54 (dd, J = 9.2, 4.2 Hz, 1H), 7.47-7.37 (m, 2H), 7.15-6.98 (m, 3H), 4.74 (오중항, J = 6.8 Hz, 1H), 2.23 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 1.54 (d, J = 6.6 Hz,

3H).

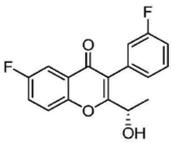
[0169] **중간체 2**



[0170]

[0171] **중간체 2:** 2-아세틸-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온: DMSO(5.60 ml, 79.14 mmol)을 -78℃로 냉각된 디클로로메탄(40 ml), 그 다음 옥살릴 클로라이드(3.40 ml, 39.57 mmol)에 부가했다. 10 분 후 디클로로메탄 (54 ml) 중 중간체 1(6.00 g, 19.78 mmol)을 적가하고 20 분 동안 교반했다. 트리에틸아민(12 ml)을 부가하고 1 시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 물로 켄칭(quench)하고 디클로로메탄으로 추출했다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황색 고형물(4.2 g, 71%)로서 얻었고, 이것을 다음 단계에서 있는 그대로 사용했다.

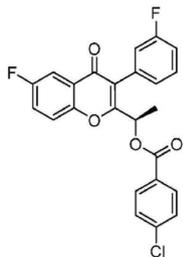
[0172] **중간체 3**



[0173]

[0174] **중간체 3:** (S)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-2-(1-하이드록시에틸)-4H-크로멘-4-온: 중간체 2(2.00 g, 6.66 mmol)에, R-알파인 보란(Alpine borane)(THF 중 0.5M, 20 ml)을 부가하고 20 시간 동안 60℃로 가열했다. 반응 혼합물 2N HCl 수용액으로 켄칭하고, 에틸 아세테이트로 추출했다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황백색 고형물로서 얻었다(1.51 g, 75%). chiralpak AD-H 칼럼상 HPLC로 측정된 바와 같이, 빠른 용출 이성질체(체류 시간: 8.78 분)에서 풍부한 거울상이성질체 과잉: 94.2%.

[0175] **중간체 4**

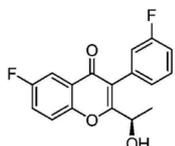


[0176]

[0177] **중간체 4:** (R)-1-(6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4-옥소-4H-크로멘-2-일)에틸 4-클로로벤조에이트: THF(15 ml) 중 중간체 3(1.45 g, 4.78 mmol)의 용액에, 4-클로로벤조산(0.748 g, 4.78 mmol) 및 트리페닐포스핀(1.88 g, 7.17 mmol)을 부가하고 45℃로 가열하고 그 다음 디이소프로필아조디카복실레이트(1.4ml, 7.17 mmol)를 부가했다. 1 시간 후, 반응 혼합물을 농축하고 잔여물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황백색 고형물(1.81 g, 86%)로서 얻었고 이것을 다음 단계에서 정제없이 사용했다.

[0178] **중간체 5**

[0179] **방법 A**



[0180]

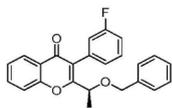
[0181] 중간체 5: (R)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-2-(1-하이드록시에틸)-4H-크로멘-4-온: 10℃로 냉각된 메탄올(17 ml) 중 중간체 4(1.75 g, 3.96 mmol)에, 탄산칼륨(0.273 g, 1.98 mmol)을 부가하고 30 분 동안 교반했다. 반응 혼합물을 농축하고, 2N HCl 용액으로 산성화하고, 에틸 아세테이트로 추출하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황색 고형물(1.05 g, 87%)로서 얻었다. chiralpak AD-H 칼럼상 HPLC로 측정된 바와 같이, 늦은 용출 이성질체(체류 시간: 11.12 분)에서 풍부한 거울상이성질체 과잉: 93.6%.

[0182] 방법 B:

[0183] 단계-1: (R)-2-(1-(벤질옥시)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온: 디클로로메탄 중 1-(5-플루오로-2-하이드록시페닐)-2-(3-플루오로페닐)에타논(11.00 g, 44.31 mmol)에, HATU(33.7 g, 88.63 mmol) 및 R-(+)-2-벤질옥시프로피온산(9.58 g, 53.17 mmol)을 부가하고 10 분 동안 교반했다. 트리에틸아민(66.7 ml, 0.47 mol)을 적가하고 실온에서 24 시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 물로 켄칭하고, 디클로로메탄으로 추출하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황색 고형물(10.5 g, 60%)로서 얻었다. ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 7.85 (dd, J = 8.1, 3 Hz, 1H), 7.58 (dd, J = 9.1, 4.1 Hz, 1H), 7.47-7.39 (m, 1H), 7.39-7.34 (m, 1H), 7.28-7.20 (m, 3H), 7.20-7.14 (m, 2H), 7.16-7.07 (m, 1H), 6.99-6.89 (m, 2H), 4.50-4.31 (m, 3H), 1.56 (d, J = 6.4 Hz, 3H).

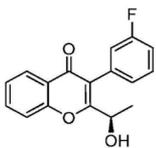
[0184] 단계-2: 0℃로 냉각된 디클로로메탄(110 ml) 중 (R)-2-(1-(벤질옥시)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온(10.5 g, 26.69 mmol)에, 알루미늄 클로라이드(5.35 g, 40.03 mmol)을 나누어서 부가하고 실온에서 6 시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 2N HCl 용액으로 켄칭하고, 디클로로메탄으로 추출하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 원하는 중간체를 황색 고형물(6.1 g, 76%)로서 얻었다. chiralpak AD-H 칼럼상 HPLC로 측정된 바와 같이, 늦은 용출 이성질체(체류 시간: 11.12 분)에서 풍부한 거울상이성질체 과잉: 97.7%.

[0185] 중간체 6



[0186] [0187] 중간체 6: (R)-2-(1-(벤질옥시)에틸)-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온: 디클로로메탄(75 ml) 중 2-(3-플루오로페닐)-1-(2-하이드록시페닐)에타논(10.0 g, 43.43 mmol)에, HATU(33.0 g, 86.86 mmol) 및 R-(+)-2-벤질옥시프로피온산(9.39 g, 52.12 mmol)을 부가하고 10 분 동안 교반했다. 트리에틸아민(65.4 ml, 0.469 mol)을 적가하고 실온에서 24 시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 물로 켄칭하고, 디클로로메탄으로 추출하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황백색 고형물(9.0 g, 55%)로서 얻었다. ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8.23 (dd, J = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 7.74-7.70 (m, 1H), 7.58 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.43 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.37 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 7.29-7.15 (m, 5H), 7.09 (dt, J = 8.6, 1.7 Hz, 1H), 7.00-6.90 (m, 2H), 4.51-4.35 (m, 3H), 1.57 (d, J = 6.4 Hz, 3H).

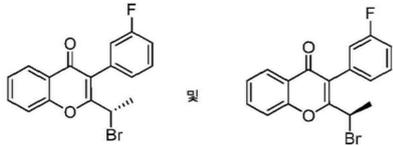
[0188] 중간체 7



[0189] [0190] 중간체 7: (R)-3-(3-플루오로페닐)-2-(1-하이드록시에틸)-4H-크로멘-4-온 : -78℃로 냉각된 디클로로메탄(50 ml) 중 중간체 6(5.0 g, 13.35 mmol)에, 붕소 트리브로마이드(디클로로메탄 중 1M, 36.5 ml, 0.145 mmol)을 적가하고 1 시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 2N HCl 용액으로 켄칭하고, 디클로로메탄으로 추출하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마

토그래피로 정제하여 중간체 II를 황백색 고형물(3.05 g, 80%)로서 얻었다. ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8.24 (dd, J = 7.9, 1.5 Hz, 1H), 7.73 (m, 1H), 7.54 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.44 (m, 2H), 7.13-7.01 (m, 3H), 4.71 (q, J = 6.6 Hz, 1H), 1.56 (d, J = 6.5 Hz, 3H). 질량: 284.9(M⁺). 순도: 99.73%. [α]_D²⁵ -0.605 (c = 1, CHCl₃). chiralpak AD-H 칼럼상 HPLC로 측정된 바와 같이, 늦은 용출 이성질체(체류 시간: 10.19 분)에서 풍부한 거울상이성질체 과잉: 95.2%.

[0191] **중간체 7a 및 7b**



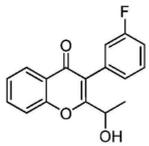
[0192]

[0193] **중간체 7a 및 7b:** (S)-2-(1-브로모에틸)-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온 및 (R)-2-(1-브로모에틸)-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온: 2 개의 거울상이성질체적으로 순수한 이성질체를 CO₂:MeOH를 사용하여 2-(1-브로모에틸)-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온(10g)으로부터 분취 SFC 조건으로 분리하고 2.0 ml/분의 유속에서 물(10mM 암모늄 바이카보네이트) : 아세토니트릴(구배 : 1.2 분 내에 5% 내지 95% 아세토니트릴)을 이동상으로 사용하여 XBridge C18 칼럼(50 x 4.6 mm; 3.5 μm) 상에서 분석했다.

[0194] 중간체 7a: 황백색 고형물(3.80 g). e.e. 100%. Rt: 1.79 분 질량: 348.9 (M⁺1).

[0195] 중간체 7b: 황백색 고형물(3.8 g). e.e. 100%. Rt: 1.79 분 질량: 348.9 (M⁺1).

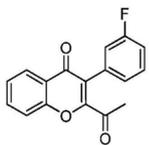
[0196] **중간체 8**



[0197]

[0198] **중간체 8:** 3-(3-플루오로페닐)-2-(1-하이드록시에틸)-4H-크로멘-4-온: DMSO(300 ml) 중 2-(1-브로모에틸)-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온(30 g, 86.51 mmol)의 용액에, n-부탄올(15 ml)을 부가하고 3 시간 동안 120 °C로 가열했다. 반응 혼합물을 RT로 냉각하고, 물로 켄칭하고 에틸 아세테이트로 추출했다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황백색 고형물(16 g, 64%)로서 얻었고, 이것을 다음 단계에서 있는 그대로 사용했다.

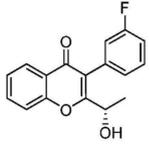
[0199] **중간체 9**



[0200]

[0201] **중간체 9:** 2-아세틸-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온: DMSO(16.0 ml, 227 mmol)을 -78°C로 냉각된 디클로로메탄(200 ml)에 부가하고, 그 다음 옥살릴 클로라이드(9.80 ml, 113.5 mmol)에 부가했다. 10 분 후 디클로로메탄(54 ml) 중 중간체 8(16.2 g, 56.79 mmol)을 적가하고 20 분 동안 교반했다. 트리에틸아민(32 ml)을 부가하고 1 시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 물로 켄칭하고 디클로로메탄으로 추출했다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황색 고형물(8.2 g, 51%)로서 얻었다. ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8.26 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.79 (m, 1H), 7.58 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.50 (dt, J = 8.0, 0.8 Hz, 1H), 7.41 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 7.01 (m, 2H), 2.37 (s, 3H).

[0202] **중간체 10**



[0203]

[0204] **중간체 10:** (S)-3-(3-플루오로페닐)-2-(1-하이드록시에틸)-4H-크로멘-4-온: THF(2 ml) 중 중간체 8(1.00 g, 3.53 mmol)에, R-알파인 보란(Alpine borane)(THF 중 0.5M, 10 ml)을 부가하고 20 시간 동안 60°C로 가열했다. 반응 혼합물 2N HCl 수용액으로 켄칭하고, 에틸 아세테이트로 추출했다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황백색 고형물(0.400 g, 40%)로서 얻었다. chiralpak AD-H 칼럼상 HPLC로 측정된 바와 같이, 빠른 용출 이성질체(체류 시간: 8.71 분)에서 풍부한 거울상이성질체 과잉: 94.8%.

[0205] **중간체 11**

[0206] **중간체 11:** 4-브로모-2-플루오로-1-이소프로폭시벤젠: THF(100ml) 중 4-브로모-2-플루오로페놀(10g, 52.35 mmol)의 용액에, 이소프로필 알코올(4.8ml, 62.62 mmol) 및 트리페닐포스핀(20.6g, 78.52 mmol)을 부가하고 45°C로 가열하고, 그 다음 디이소프로필아조디카복실레이트(15.4ml, 78.52 mmol)을 부가했다. 혼합물을 1 시간 동안 환류하고, 농축하고 잔여물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 무색 액체(13.1g, 99%)로서 얻었고, 이것을 다음 단계에서 정제없이 사용했다.

[0207] **중간체 12**

[0208] **중간체 12:** 2-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란: 칼럼 아세테이트(10.52 g, 107.2 mmol) 및 비스(피나콜레이트)디보론(15g, 58.96 mmol)을 디옥산(125 ml) 중 중간체 11(10.52 g, 107.2 mmol)의 용액에 부가하고, 용액을 30 분 동안 탈가스했다. [1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센]디클로로 팔라듐(II).CH₂Cl₂(4.4g, 5.36 mmol)을 질소 분위기 하에서 부가하고 80°C로 가열했다. 12 시간 후, 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고 농축했다. 조질 생성물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황색 오일(13.9g, 99%)로서 얻었고, 이것을 다음 단계에서 정제없이 사용했다.

[0209] **중간체 13**

[0210] **중간체 13:** 3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민: DMF(110 ml) 중 3-아이오도-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민(11.0 g, 42.14 mmol)의 용액에, 에탄올(55 ml) 및 물(55 ml), 중간체 12(23.4 g, 84.28 mmol) 및 나트륨 카보네이트(13.3 g, 126.42 mmol)을 부가하고 30 분 동안 탈가스했다. 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0)(2.4 g, 2.10 mmol)을 질소 분위기 하에서 부가하고 80°C로 가열했다. 12 시간 후, 반응 혼합물을 셀라이트(celite)를 통해 여과하고, 농축하고 에틸 아세테이트로 추출했다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 디에틸 에테르로 분쇄하고, 여과하고 진공하에서 건조하여 표제 화합물을 밝은 갈색 고형물(3.2 g, 26% 수율)로서 얻었고, 이것을 다음 단계를 위해 있는 그대로 사용한다.

[0211] **실시예 A**

[0212] **2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온**

[0213] 표제 화합물은 국제 공개 번호 WO 2011/055215의 실시예 158에서 기재된 바와 같이 제조된다.

[0214] **실시예 A1**

[0215] **(S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온**

[0216] THF(2.0 ml) 중 중간체 13(3.35 g, 11.60 mmol)의 용액에, 중간체 7(3.00 g, 10.55 mmol) 및 트리페닐포스핀(5.57 g, 15.82 mmol)을 부가하고 실온에서 5 분 동안 교반했다. 디이소프로필아조디카복실레이트(3.2 ml, 15.82 mmol)을 부가하고 45°C로 가열했다. 2 시간 후, 반응 혼합물을 물로 켄칭하고 에틸 아세테이트로 추출했

다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황백색 고형물(2.79g, 48%)로서 얻었다. MP: 200-203°C. 질량: 554.3 (M⁺+1). chiralpak AD-H 칼럼상 HPLC로 측정된 바와 같이, 빠른 용출 이성질체(체류 시간 = 12.63 분)에서 풍부한 거울상이성질체 과잉: 94.0%.

[0217] 실시예 A2

[0218] 방법 1

[0219] (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온

[0220] 중간체 13(0.039 g, 0.143 mmol)에, 에탄올 중 세슘 하이드록사이드(0.013 g, 0.074 mmol)을 부가하고 30 분 동안 환류했다. 용매를 농축하고 잔여물을 DMF(0.5 ml)에서 용해시켰다. 중간체 7a(0.050 g, 0.143 mmol)을 부가하고 실온에서 4 시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 물로 희석하고 에틸 아세테이트로 추출했다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 메탄올: 디클로로메탄을 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황백색 고형물(0.025 g, 231%)로서 얻었다. MP: 205-207°C. 질량: 554.3 (M⁺+1). chiralpak AD-H 칼럼상 HPLC로 측정된 바와 같이, 늦은 용출 이성질체(체류 시간 = 14.77 분)에서 풍부한 거울상이성질체 과잉: 74.0%.

[0221] 방법 2

[0222] (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온

[0223] THF(7.5 ml) 중 중간체 13(0.143 g, 0.527 mmol)의 용액에, 중간체 10(0.150 g, 0.527 mmol) 및 트리페닐포스핀(0.200 g, 0.791 mmol)을 부가하고 실온에서 5 분 동안 교반했다. 디이소프로필아조디카복실레이트(0.15 ml, 0.791 mmol)을 부가하고 45°C로 가열했다. 3 시간 후, 반응 혼합물을 물로 켄칭하고 에틸 아세테이트로 추출했다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황백색 고형물(0.035 g, 12%)로서 얻었다. MP: 204-206°C. 질량: 554.3 (M⁺+1). chiralpak AD-H 칼럼상 HPLC로 측정된 바와 같이, 늦은 용출 이성질체(체류 시간 = 14.77 분)에서 풍부한 거울상이성질체 과잉: 98.8%.

[0224] 실시예 B

[0225] 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온

[0226] DMF(2 ml) 중 중간체 13(0.080 g, 0.293 mmol)의 용액에, 탄산칼륨(0.081 g, 0.587 mmol)을 부가하고 실온에서 10 분 동안 교반했다. 이 혼합물에 중간체 2-(1-브로모에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온(0.215 g, 0.587 mmol)을 부가하고 12 시간 동안 교반했다. 반응 혼합물을 물로 희석하고 에틸 아세테이트로 추출했다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 메탄올: 디클로로메탄을 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 담황색 고형물(0.045 g, 270 %)로서 얻었다. MP: 175-177°C. ¹H-NMR (δ ppm, DMSO-D₆, 400 MHz): δ 8.20 (s, 1H), 7.85 (dd, J = 8.1, 3.0 Hz, 1H), 7.48-7.33 (m, 5H), 7.14 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 7.02 (m, 2H), 6.90 (m, 1H), 6.10 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 5.42 (s, 2H), 4.64 (오중항, J = 6.0 Hz, 1H), 1.99 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.42 (d, J = 6.1 Hz, 6H).

[0227] 실시예 B1

[0228] (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온

[0229] THF(2.0 ml) 중 중간체 13(0.134 g, 0.494 mmol)의 용액에, 중간체 5(0.150 g, 0.494 mmol) 및 트리페닐포스핀(0.194 g, 0.741 mmol)을 부가하고 실온에서 5 분 동안 교반했다. 디이소프로필아조디카복실레이트(0.15 ml, 0.749 mmol)을 부가하고 45°C로 가열했다. 2 시간 후, 반응 혼합물을 물로 켄칭하고 에틸 아세테이트로 추출했다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황백색 고형물(0.049 g, 20 %)로서 얻었다. MP:

139-142°C. 질량: 571.7 (M⁺). ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8.24 (s, 1H), 7.85 (dd, J = 8.2, 3.1 Hz, 1H), 7.50-7.29 (m, 5H), 7.14 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 7.02 (m, 2H), 6.92 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.11 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 5.40 (s, 2H), 4.66 (오중항, J = 6.1 Hz, 1H), 2.00 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.42 (d, J = 6.1 Hz, 6H). chiralpak AD-H 칼럼상 HPLC로 측정된 바와 같이, 빠른 용출 이성질체(체류 시간 = 10.64분)에서 풍부한 거울상이성질체 과잉: 89.8%.

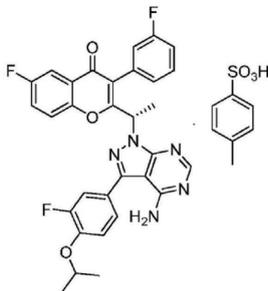
[0230] 실시예 B2

[0231] (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온

[0232] THF(5.0 ml) 중 중간체 13(0.284 g, 0.989 mmol)의 용액에, 중간체 3(0.250 g, 0.824 mmol) 및 트리스(4-메톡시)페닐포스핀(0.435 g, 1.23 mmol)을 부가하고 실온에서 5 분 동안 교반했다. 디이소프로필아조디카복실레이트(0.25 ml, 1.23 mmol)을 부가하고 실온에서 교반했다. 12 시간 후, 반응 혼합물을 물로 켄칭하고 에틸 아세테이트로 추출했다. 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고 감압 하에서 농축했다. 조질 생성물을 에틸 아세테이트: 석유 에테르를 갖는 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황백색 고형물(0.105 g, 22%)로서 얻었다. MP: 145-148°C. 질량: 571.7 (M⁺). ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8.23 (s, 1H), 7.85 (dd, J = 8.1, 3.0 Hz, 1H), 7.50-7.29 (m, 5H), 7.14 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 7.02 (m, 2H), 6.92 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 6.10 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 5.42 (s, 2H), 4.64 (오중항, J = 6.1 Hz, 1H), 1.99 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 1.42 (d, J = 6.0 Hz, 6H). chiralpak AD-H 칼럼상 HPLC로 측정된 바와 같이, 늦은 용출 이성질체(체류 시간 = 14.83분)에서 풍부한 거울상이성질체 과잉: 95.4%.

[0233] 화합물 B1의 4-메틸벤젠설포네이트 염

[0234] (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온 4-메틸벤젠설포네이트



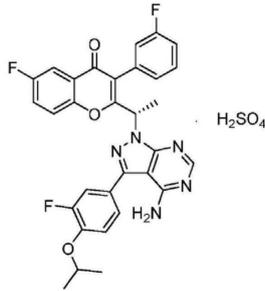
[0235]

[0236] (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온 4-메틸벤젠설포네이트: 이소프로판올(600 ml) 중 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온(22.7 g, 39.69 mmol)에, p-톨루엔설포닉산(8.30 g, 43.66 mmol)을 부가하고 1 시간 동안 환류했다. 반응 혼합물을 농축하고, 석유 에테르로 공증류했고 건조했다. 잔여물에 물(300 ml)을 부가하고 30 분 동안 교반했다. 고형물을 여과하고, 석유 에테르로 세정하고 진공하에서 건조하여 표제 화합물을 황백색 고형물(28.2 g, 95%)로서 얻었다. MP: 138-141°C. ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8.11 (s, 1H), 7.85 (dd, J = 8.0, 3.0 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.51 (dd, J = 9.3, 4.3 Hz, 1H), 7.45 (dd, J = 7.5, 3.1 Hz, 1H), 7.42-7.31 (m, 3H), 7.29 (m, 2H), 7.22 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.16 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 7.08 (dt, J = 8.5, 2.5 Hz, 1H), 6.97 (br s, 1H), 6.88 (br s, 1H), 6.11 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 4.67 (오중항, J = 6.0 Hz, 1H), 2.36 (s, 3H), 2.03 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.43 (d, J = 6.0 Hz, 6H). 질량: 572.4 (M⁺ + 1-PTSA). chiralpak AD-H 칼럼상 HPLC로 측정된 바와 같이, 빠른 용출 이성질체(체류 시간 = 12.35 분)에서 풍부한 거울상이성질체 과잉: 93.4%

[0237] 화합물 B1의 설페이트 염

[0238] (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-

(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온 설페이트



[0239]

[0240]

(S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온 설페이트: 이소프로판올(600 ml) 중 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온(15.0 g, 26.24 mmol)에 0°C로 냉각했다. 이것에 황산(2.83 g, 28.86 mmol)을 부가하고 실온에서 24 시간 동안 교반했다. 반응물을 여과하고 석유 에테르로 세정하고 진공하에서 건조하였다. 이 고형물에, 물(150 ml)을 부가하고 30 분 동안 교반했다. 고형물을 여과하고, 석유 에테르로 세정하고 진공하에서 건조하여 표제 화합물을 황백색 고형물(13.5 g, 76%)로서 얻었다. MP: 125-127°C. ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8.11 (s, 1H), 7.85 (dd, J = 8.0, 3.0 Hz, 1H), 7.51 (dd, J = 9.2, 4.2 Hz, 1H), 7.45-7.31 (m, 3H), 7.29 (m, 1H), 7.15 (t, J = 8.3 Hz, 1H), 7.08 (dt, J = 8.5, 2.4 Hz, 1H), 6.96 (br s, 1H), 6.88 (br s, 1H), 6.09 (q, J = 7.1 Hz, 1H), 4.676 (오중항, J = 6.1 Hz, 1H), 2.01 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.42 (d, J = 6.1 Hz, 6H). 질량: 572.2 (M⁺ + 1-H₂SO₄). chiralpak AD-H 칼럼상 HPLC로 측정된 바와 같이, 빠른 용출 이성질체(체류 시간 = 12.08 분)에서 풍부한 거울상이성질체 과잉: 89.6%

[0241]

화합물 B1의 다양한 다른 산 부가염이 표 1에 제공된 바와 같이 제조되었다.

표 1

[0242]

산	제조 방법	용융점 (°C)
염산	화합물 B1(1 eq.)을 THF에 용해시키고, 과잉의 HCl/Et ₂ O를 부가하고, 수득된 맑은 용액을 완전히 증발시켰다. 수득된 잔여물을 물로 세정하였다.	130-132
p-톨루엔설포산	화합물 B1(1 eq.)을 이소프로필 알코올(IPA)에 용해시키고, 30분간 환류시키고, IPA 중에 산(1.1eq.)을 부가하고, 수득된 맑은 용액을 완전히 증발시켰다. 수득된 잔여물을 물로 세정하였다.	138-141°C
벤젠설포산	화합물 B1(1 eq.)을 IPA에 용해시키고, 30분간 환류시키고, IPA 중에 산(1.1eq.)을 부가하고, 맑은 용액이 수득되지 않았고, 잔여물을 완전히 증발시키고, 물로 세정하였다.	170-172
말레산	화합물 B1(1 eq.)을 IPA에 용해시키고, 30분간 환류시키고, IPA 중에 산(1.1eq.)을 부가하고, 맑은 용액이 수득되지 않았고, 잔여물을 완전히 증발시키고, 물로 세정하였다.	107-109
캄포르 설포산	화합물 B1(1 eq.)을 IPA에 용해시키고, 30분간 환류시키고, IPA 중에 산(1.1eq.)을 부가하고, 맑은 용액이 수득되지 않았고, 잔여물을 완전히 증발시키고, 물로 세정하였다.	120-121
황산	화합물 B1(1 eq.)을 IPA에 용해시키고, 30분간 환류시키고, IPA 중에 산(1.1eq.)을 부가하고, 수득된 맑은 용액을 완전히 증발시켰다. 수득된 잔여물을 물로 세정하였다.	125-127

[0243]

대사 안정성 마우스, 랫트, 및 인간 간 마이크로솜을 이용하여 대사 안정성 연구를 수행하였다. 마우스, 랫트, 및 인간 간 마이크로솜(모두 BD Gentest, USA사로부터 얻음)를 이용한 연구를 위한 프로토콜은 하기에 제공되어 있다. 요약하면, 0.4 mg 단백질을 37°C에서 15분간 인산염 완충액(pH~7.4) 중의 2 mM NADPH(보조인자)와 함께 전인큐베이팅한 다음, 1 μM 시험 품목을 부가하고 삼반복으로 60분간 추가 인큐베이팅하였다. 상기 반응 혼합물을 내부 표준을 함유하는 메탄올로 종료시키고 추가 원심분리하여, LC-MS/MS에 의해 상청액에 남아있는 시험 품목을 분석하였다. 모 화합물이 남아있는 퍼센트를 0분에 종료된 유사한 샘플들과 비교하여 계산하였다. 결과가

하기 표에 제공되어 있다.

[0244] 하기 데이터는 놀랍게도 본 발명의 화합물 A1이 그의 거울상이성질체 A2 및 라세미 화합물 A보다 인간 간 마이크로솜에서 유의미하게 더 큰 대사 안정성을 갖는다는 것을 보여준다. 예를 들면, 실시예 A1의 화합물은 실시예 A2보다 인간 간 마이크로솜에서 거의 5배 더 큰 대사 안정성을 갖는다. 이들의 향상된 대사 안정성으로 인해, 본 발명에 청구된 화합물들은 우수한 약동학적 프로파일을 갖는다.

실시예	간 마이크로솜에서의 대사성 안정성		
실시예	마우스(Mouse)	랫트(Rat)	인간
A	32.6	43.1	38.4
A1	46.1	35.8	54.5
A2	34.7	44.2	11.4

[0245]

[0246] 유사하게, 하기 데이터는 놀랍게도 본 발명의 화합물 B1이 그의 거울상이성질체 B2 및 라세미 화합물 B보다 인간 간 마이크로솜에서, 유의미하게 더 큰 대사 안정성을 갖는다는 것을 보여준다. 예를 들면, 실시예 B1의 화합물은 실시예 B2보다 인간 간 마이크로솜에서 거의 3배 더 큰 대사 안정성을 갖는다. 이들의 향상된 대사 안정성으로 인해, 본 발명에 청구된 화합물은 우수한 약력학적 프로파일을 갖는다.

실시예	간 마이크로솜에서의 대사성 안정성		
	마우스	랫트	인간
B	54.9	51.4	46.9
B1	36.6	23.1	74.9
B2	54.1	48.6	27.5

[0247]

[0248] **약동학**

[0249] 화합물 B1(유리 염기) 및 그의 PTSA 염의 경구 생체이용률을 랫트에서 평가하였다. 랫트에서의 약동학 연구를 위한 프로토콜이 하기에 제공되어 있다.

[0250] 모든 동물을 복용 전에 밤새(12시간) 단식시켰고 시험 품목의 투여 후 4.0시간까지 계속하였다. 시험 품목 제형을 1% 트윈 80 및 99% 배지(0.5% 메틸 셀룰로오스, 4000cPs, pH 2.2)에서 제조하였다. 혈액 샘플(각 동물로부터 150 μ l)을 안와 부비강으로 수집하고, 항응고제로서 디소듐 EDTA를 함유하는 마이크로원심분리 튜브 내에 넣었다. 혈액 샘플을 4°C에서 10분간 1000g의 속도로 즉시 원심분리하고 분리된 혈장 샘플을 -80°C 미만에서 냉동시키고 분석까지 보관하였다. 모든 제형 내의 시험 품목의 농도를 HPLC에 의해 분석하였다. 모든 샘플 내 시험 품목의 혈장 농도를 LC-MS/MS에 의해 분석하였다. 약동학적 파라미터 즉, C_{max} , AUC_{0-t} , T_{max} , 및 $t_{1/2}$ 를 WinNonlin 소프트웨어를 이용하여 추정하였다.

[0251] 실시예 B1의 PTSA 염은 화합물 B1의 유리염기의 약 2배의 C_{max} 및 거의 3배의 곡선하면적(AUC)을 나타내었다.

[0252] 유사하게 화합물 B1(유리 염기) 및 그의 PTSA 염의 경구 생체이용률을 개에서 평가하였다. 화합물 B1의 PTSA 염은 화합물 B1의 유리염기의 2배가 넘는 C_{max} 및 약 4배의 곡선하면적(AUC)을 나타내었다.

[0253] **생물학적 검정**

[0254] **검정 1: PI3K 효소 활성의 형광 결정**

[0255] 균질한 시간차 형광(HTRF) 검정은 α , β , γ 또는 δ 와 같은 PI3K 동형체에 의한 포스포티딜이노시톨 4,5-바이포스페이트(PIP2)의 인산화의 결과로서 형성된 3,4,5-트리포스페이트(PIP3)의 검출을 가능하게 한다.

[0256] α , β , γ 또는 δ 에 대한 PI3K 동형체 활성을 PI3K 인간 HTRF™ 분석 검정(밀리포어, Billerica, MA)를 변형하여 결정하였다. 모든 인큐베이션은 실온에서 수행하였다. 요약하면, (100% DMSO 중) 0.5 μ l의 40X 억제제 또는 100% DMSO를 효소가 있거나 효소가 없는 14.5 μ l 1X 반응 완충제/PIP2(10 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT, 1.38 μ M

PIP2) 믹스를 함유하는 384-웰 검정 플레이트(Greiner Bio-One, Monroe, NC)의 각 웰에 부가하고 10분간 인큐베이션하였다. 초기 인큐베이션 후, 5 µl/웰의 400 µM ATP를 부가하고 추가 30분 동안 인큐베이션하였다. 5 µl/웰 정지 용액(Millipore, Billerica, MA)을 부가하여 반응을 종료시켰다. 그리고 나서, 5 마이크로리터의 검출 믹스(Millipore, Billerica, MA)를 각 웰에 부가하고 어두운 곳에서 6 내지 18시간 동안 인큐베이션하였다. HRTF 비를 400 µ초의 적분 시간으로 337 nm의 여기 파장 및 665 및 620 nm의 방출 파장에서 마이크로플레이트 판독기(BMG Labtech., Germany) 상에서 측정하였다.

[0257] 상기 결과가 하기에 나타나 있다.

[0258] 화합물 A 및 그의 각각의 이성질체 A1 & A2에 대한 비교 데이터

실시예	PI3K 델타 IC ₅₀ (nM)	1 µM에서의 % 억제		
		PI3K α	PI3K β	PI3K γ
A	37.32	2.63	9.95	55.85
A1	13.83	8.91	47.87	80.60
A2	>10 µM	0.95	38.74	86.3

[0259]

화합물 A1의 선택성 프로파일				
검정	IC ₅₀ (nM)	배수-선택성		
	PI3Kδ	PI3Kα	PI3Kβ	PI3Kγ
효소	13.83	>1000	>54	>0

[0260]

[0261] 화합물 B 및 그의 각각의 이성질체 B1 & B2에 대한 비교 데이터

실시예	PI3Kδ IC ₅₀ (nM)	1 µM에서의 % 억제		
		PI3K α	PI3K β	PI3K γ
B	24.89	37.90	18	18.3
B1	22.33	19.13	44.88	47.21
B2	1447	25.29	52.01	88.10

화합물 B1의 선택성 프로파일				
검정	IC ₅₀ (nM)	배수-선택성		
	PI3Kδ	PI3Kα	PI3Kβ	PI3Kγ
효소	22.23	>10000	>50	>48

[0262]

[0263] 검정 2: 백혈병 세포주에서의 시험관내 세포 증식 검정

[0264] 성장 억제 분석을 10% FBS 보강된 배지를 이용하여 수행하였다. 세포를 5000 내지 20,000 세포/웰의 농도로 96-웰 플레이트에 시딩(seed)하였다. 24시간 후, 0.01 내지 10000 nM의 농도 범위의 시험 화합물을 부가하였다. 시험 화합물 부가 후 0시간(시험 화합물의 부가 전) 및 48시간에 3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT) 염료 환원 시험을 이용하여 성장을 평가하였다. 흡광도(absorbance)를 450 nm의 파장에서 Fluostar Optima(BMG Labtech, Germany) 상에서 판독하였다. 데이터를 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism)을 이용하여 분석하고 이에 따라 대조군 대비 시험 화합물로 인한 퍼센트 억제를 계산하였다.

[0265] 결과: 세포 생존력에서 약간의 용량-의존적 감소가 관찰되었음에도 불구하고, 상기 화합물은 72시간 인큐베이션 기간 동안 어떤 분명한 세포독성을 나타내지 않았다.

[0266] 검정 3: 백혈병 세포주에서 AKT 인산화의 억제:

[0267] 백혈병 세포주에서 AKT 인산화의 억제: THP-1, HL-60, MOLT-4, RPMI-8226, 또는 DLBCL 세포를 48시간 동안 원하는 농도의 화합물과 함께 인큐베이션하였다. 세포를 용해시키고, pAKT를 웨스턴 블랏팅에 의해 결정하였다.

밴드를 ImageJ를 이용하여 정량화하고 이를 액틴에 대해 정규화하였다.

- [0268] 결과: 1 μ M에서 시험될 때 화합물 A1 및 화합물 B1은 50 내지 90% 억제를 나타내었다.
- [0269] **검정 4: 인간 전혈(Whole Blood)로부터 호염기구에서 PI3K δ 신호전달의 억제**
- [0270] 항-Fc ϵ R1 유도된 CD63 발현의 변경에 의해 명시되는 호염기구 내 PI3K δ 신호전달은 Flow2CAST® 키트 (Buhlmann Laboratories, Switzerland)를 이용하여 결정된 유용한 약동학적 마커이다. 요약하면, 그것은 하기 단계를 포함한다:
 - [0271] · 정맥천자(venipuncture) 튜브를 몇 번 뒤집어 항-응고된 혈액 샘플을 혼합한다
 - [0272] · 유세포측정(Flow Cytometry) 측정에 적합한 신선하고 발열성(pyrogen) 물질이 없는 3.5 ml 폴리프로필렌 또는 폴리스티렌 튜브를 준비한다
 - [0273] · 49 μ l의 환자의 전혈을 각 튜브에 부가한다.
 - [0274] · 1 μ l의 10% DMSO(백그라운드) 또는 화합물(10% DMSO)을 할당된 튜브에 부가하고, 서서히 혼합한다. 실온에서 15분간 인큐베이팅한다.
 - [0275] · 50 μ l의 자극 버퍼(백그라운드) 또는 항- Fc ϵ R1 Ab를 각 튜브에 피펫팅(pipette)한다.
 - [0276] · 100 μ l의 자극 버퍼를 각 튜브에 부가한다.
 - [0277] · 부드럽게 혼합한다. 20 μ l 염색 시약(FITC-CD63 및 PE-CCR3의 1:1 혼합)을 각 튜브에 부가한다
 - [0278] · 부드럽게 혼합하고, 튜브를 덮고, 37°C 수조에서 15분간 인큐베이팅한다(인큐베이터를 이용하는 것은 덜 효율적인 열 전달로 인해 약 10분 더 긴 인큐베이팅 시간이 걸릴 것이다)
 - [0279] · 2 ml의 미리-덥혀진(18 내지 28°C) 용해 시약을 각 튜브에 부가하고, 부드럽게 혼합한다
 - [0280] · 18 내지 28°C에서 5 내지 10분간 인큐베이팅한다
 - [0281] · 500 x g에서 5분간 튜브를 원심분리한다
 - [0282] · 블롯팅(blotting) 종이를 이용하여 상청액을 디켄팅(decant)한다
 - [0283] · 세포 펠렛을 300 내지 800 μ l의 세척 완충제로 재현탁시킨다
 - [0284] · 부드럽게 볼텍싱(Vortex)하고 같은 날 안에 유세포분석기 상에서 데이터를 취득한다.
 - [0285] · 게이트된(gated) 호염기구 모집단 내에서 퍼센트 CD63 양성 세포를 상이한 치료 그룹으로 결정하고 비히클 대조군에 대해 정규화한다.
- [0286] 결과: 화합물 A1 및 화합물 B1은 각각 \leq 100 nM의 EC50으로 인간 전혈 호염기구에서 항-Fc ϵ R1 매개된 CD63 발현을 억제하였다.
- [0287] **검정 4a: PI3K δ , α , β 또는 γ 동형체의 억제에 대한 세포기반 화합물 특이성**
- [0288] PI3K δ 에 대한 화합물 특이성을 IgM-유도된 B 세포 증식 검정에서 결정하였다. 건강한 대상의 혈액으로부터 분리된 B-세포를 96-웰 조직 배양 플레이트에 시딩(seed)하고 원하는 농도의 화합물과 함께 30분간 인큐베이팅하였다. 세포를 5 μ g/ml 정제된 염소 항-인간 IgM으로 자극시켰다. 3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT) 염료 환원 시험을 이용하여 성장을 평가하였다. PI3K α , β , 또는 γ 동형체에 대한 선택성을 위해, NIH-3T3 또는 RAW 대식세포를 6-웰 조직 배양 플레이트에 시딩하고 밤새 인큐베이팅하였다. 다음 날 완전한 배지를 무혈청 배지로 교체하고, 원하는 농도의 화합물을 부가하였다. 15분 후, 20 ng/ml PDGF, 5 μ M LPA, 또는 50 ng/ml c5a를 부가하고 추가 10분간 인큐베이팅하였다. 세포를 용해시키고, AKT 인산화를 웨스턴 블랏팅에 의해 결정하였다. 밴드의 세기를 ImageJ 1.42q(NIH, USA)를 이용하여 결정하고 액틴(로딩 대조군)에 대해 정규화하였다.

화합물 A1의 선택성 프로파일				
검정	EC ₅₀ (nM)	배수-선택성		
	PI3K δ	PI3K α	PI3K β	PI3K γ
세포-기반	<50 nM	>1000	>30	>8
화합물 B1의 선택성 프로파일				
검정	EC ₅₀ (nM)	배수-선택성		
	PI3K δ	PI3K α	PI3K β	PI3K γ
세포-기반	<30 nM	>10000	>34	>17

[0289]

[0290]

검정 5: 백혈병 세포주에서 아포토시스의 억제

[0291]

백혈병 세포에서의 아포토시스를 아래에 요약한 바와 같이 원위치 카스파제 3 키트(Millipore, US)를 이용하여 결정하였다:

[0292]

- 백혈병 세포를 6 웰 플레이트에 1 x 10⁶ 세포/웰의 밀도로 시딩한다

[0293]

- 시험 화합물/DMSO를 원하는 농도로 부가한다

[0294]

- 플레이트를 5% CO₂ 인큐베이터에서 37°C에서 24시간 동안 인큐베이팅한다

[0295]

- 세포를 2ml 원심분리 튜브에 모은다

[0296]

- 1.6 μl의 새로 제조된 5X FLICA 시약을 부가하고 튜브를 약간 쳐서 세포를 혼합한다

[0297]

- 튜브를 5% CO₂ 하에서 37°C에서 1시간 동안 인큐베이팅한다

[0298]

- 2 ml의 1X 세척 완충제를 각 튜브에 부가하고 혼합한다

[0299]

- 실온에서 5 분간 <400 x g에서 세포를 원심분리한다.

[0300]

- 상청액을 조심스레 제거하여 버리고, 세포 펠렛을 서서히 볼텍싱하여 임의의 세포-대-세포 뭉침을 파괴한다.

[0301]

- 세포 펠렛을 300 μl의 1X 세척 완충제에 재현탁시킨다

[0302]

- 100 μl의 각 세포 현탁액을 검정색 미세적정 플레이트의 두 웰 각각에 넣는다. 기포의 발생을 피한다.

[0303]

- 490 nm의 여기 파장 및 520 nm의 방출 파장을 이용하여 각 마이크로웰의 흡광도를 판독한다

[0304]

- 대조군 블랭크 대비 형광 증가에 의해 명시되는 카스파제-3 활성의 퍼센트 증가를 계산한다.

[0305]

결과: 화합물 A1 및 화합물 B1은 시험된 세포주에서 카스파제-3 활성을 용량-의존적으로 유도하였다.

[0306]

검정 6: 인간 일차 백혈병 세포에서 항암 활성에 대한 스크리닝

[0307]

6-I: 아넥신 V 및 7-AAD 염색을 이용한 화합물 처리시 AML 환자 골수 백혈병 세포에서 아포토시스유도의 유세포 측정 분석: 단핵 세포를 피콜 방법에 의해 추출하고 플레이트에 시딩하였다. 세포를 48시간 동안 상이한 화합물에 의해 처리한 후, 이들을 유세포측정에 의해 분석하였다. PBS로 세정한 후, 1x10⁵ 세포를 아넥신 V-APC 및 7-AAD에 의해 염색하였다. 아넥신 V 양성 염색은 초기 및 후기 아포토시스 세포를 포함하는 총 아포토시스 세포를 측정한다. 아넥신 V 양성 세포의 경우, 7-AAD 음성 신호가 초기 아포토시스 세포를 반영한다.

[0308]

6-II: pAKT ELISA 키트를 이용한 AML 환자 골수 샘플의 pAKT 분석: 단핵 세포를 피콜 방법에 의해 추출하고 플레이트에 시딩하였다. 세포를 48시간 동안 상이한 화합물로 처리한 후, 생성물 프로토콜에 따라 pAKT ELISA 키트에 의해 분석하였다. 요약하면, 1x10⁶ 세포를 ELISA 키트 웰로 옮기고 10 μL 5x세포 용해 믹스(포스포-AKT 1/2/3(Ser473) InstantOne™ ELISA Kit, eBioscience, 85-86042)로 용해시켰다. 그리고 나서, 세포를 마이크로 플레이트 진탕기(~300 rpm) 상에서 실온에서 1시간 동안 50 μl 항체 각테일와 함께 인큐베이팅하였다. 검출 시약과 함께 인큐베이팅한 후, 450 nm에서 SpectraMAX Plus 마이크로플레이트 분광측정기 세트를 이용하여 결과를

측정하였다.

[0309] 6-III: MTS 분석을 이용한 AML 환자 골수 샘플의 세포 증식 분석: 단핵 세포를 피콜 방법에 의해 추출하고 플레이트에 시딩하였다. 세포를 48시간 및 72시간 동안 상이한 화합물로 처리한 후, 제품 설명에 따라 이들을 MTS 분석에 의해 분석하였다. 요약하면, 20 µL의 MTS 용액을 100 µL 세포 현탁액을 함유하는 각 웰 내로 부가한 다음 5% CO₂의 존재하에 95% 습도에서 37°C에서 4시간 동안 인큐베이팅하였다. 490 nm에서의 흡광도(A490)를 SpectraMAX Plus 마이크로플레이트 분광측정기를 이용하여 판독하였다.

[0310] 결과: 화합물 A1 및 화합물 B1 처리는 수반되는 아포토시스 세포의 수 증가와 함께 증식 및 AKT 인산화의 용량 의존적 감소를 야기하였다.

화합물	결과
A1	0.3 µM에서 PAKT의 >50% 억제; 3 µM에서 아포토시스의 ~1.5배 증가 및 세포 생존력의 용량 의존적 감소.
B1	0.3 µM에서 PAKT의 >50% 억제; 3 µM에서 아포토시스의 ~1.5배 증가 및 세포 생존력의 용량 의존적 감소.

[0311]

[0312] **검정 6a: 인간 다발성 골수종 세포에서 항암 활성에 대한 스크리닝**

[0313] 새로 진단된 II 단계 IgG 카파 및 III 단계 IgG 람다 제한된 질환을 갖는 두 명의 환자로부터 샘플을 채취하였다. MTT 검정으로부터 결정된 용량 및 시간을 이용하여 아포토시스를 유도함으로써 이 스크리닝을 수행하였다. 1 내지 5 x 10⁵ 세포를 원심분리에 의해 수집하였다. 세포를 500 µl의 1X 결합 버퍼에 재현탁시켰다. 5 µl의 아넥신 V-FITC 및 5 µl의 프로피움 아이오다이드를 부가하였다. 세포를 어두운 곳에서 5분간 실온에서 인큐베이팅하였다.

[0314] 유세포측정에 의한 정량화: 아넥신 V-FITC 결합을 FITC 신호 검출기(보통 FL1)를 이용한 유세포측정(Ex = 488 nm; Em = 530 nm) 및 파이크에리트린 방출 신호 검출기(보통 FL2)를 이용한 PI 염색에 의해 분석하였다. 결과가 하기 및 도 1에 나타나 있다.

B1	3.0 µM에서 PAKT의 >75% 억제; 3 µM에서 아포토시스의 ~1.5배 증가 및 세포 생존력의 용량 의존적 감소.
----	---

[0315]

[0316] **검정 7: 다양한 백혈병 세포주에서 항암 활성에 대한 스크리닝**

[0317] 다양한 징후를 대표하는 불멸화된 백혈병 세포의 증식을 MTT(3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드) 검정에 의해 결정하였다. 세포를 그의 배증 시간(doubling time)에 기초하여 상이한 시간(72 내지 96시간) 동안 화합물 B1과 함께 인큐베이팅하였다.

세포주	질환	세포 유형	기관
TOLEDO	미만성 큰 세포 림프종/비-호지킨 B-세포 림프종	B 림프구	말초 혈액
U266B1	골수종, 형질세포종 (CD40-)	B 림프구	말초 혈액
MOLT-4	ALL	T 림프아세포	말초 혈액
Jurkat	급성 T-세포 백혈병	T 림프구	말초 혈액
THP-1	급성 단구성 백혈병	단핵구	말초 혈액
MM-1R	면역글로불린 A 람다(lambda) 골수종	B 림프아세포	말초 혈액
DLBCL	큰세포 림프종	B 림프아세포	복수액(Ascites Fluid)
MM-1S	면역글로불린 A 람다 골수종	B 림프아세포	말초 혈액
U937	조직구성(Histiocytic) 림프종	단핵구	늑막 삼출(effusion)
Raji	버킷(Burkitt's) 림프종	B 림프아세포	상악골(Maxilla)
CCRF-CEM	ALL	T 림프아세포	말초 혈액
HL-60	AML	전골수아세포	말초 혈액

[0318]

[0319]

결과: 전체적으로, 0.5 내지 7.5 μM 사이의 농도의 화합물 B1에서 대다수의 B, T, 및 단구성 세포주에 대한 50% 성장 억제제가 달성되었다. 상기 데이터는 세포 유형에 기초한 상이한 효능에도 불구하고 백혈병 세포 증식을 억제하는 화합물 B1의 능력을 입증하였다.

[0320]

검정 8: 인간 CLL 세포에서 항암 활성화에 대한 스크리닝

[0321]

일차 CLL 세포를 48시간 동안 시험 화합물(화합물 B1)의 연속 희석물과 함께 인큐베이팅하고, 활성화된 카스파제-3에 의한 아포토시스 및 유세포측정에 의해 측정된 7AAD 염색을 시험하였다. 72시간 인큐베이팅 후, 비색 MTS 시약을 이용하여 CLL 세포의 세포독성을 평가하였다. 시험 화합물의 1시간 인큐베이팅 및 항-IgM 또는 항-IgD와의 10분 인큐베이팅 후 유세포 측정에 의해 인산화된 Akt(S473)를 측정하였다. Akt 인산화를 중앙 형광 강도(MFI)에 의해 정량화하였다. 실험에 사용된 7개의 CLL 환자 샘플 중에, 5개가 돌연변이된 IGHV를 가지고 있었고, 5개는 형광 원위치 혼성화에 의해 결정된 13q 결실 또는 정상 세포유전학을 가지고 있었으며, 3개는 ZAP-70 음성이었고, 7개는 CD38 음성이었다. IgM 발현은 13% 내지 90% 범위인 반면, IgD 발현은 균일하게 상승되었다. 시험 화합물은 0.1 내지 25.6 μM 의 농도에서 용량-의존적 방식으로 아포토시스(카스파제-3+/7AAD+) 및 세포독성을 유의미하게 유도하였다. 항-표면 면역글로불린과의 인큐베이팅은 배지 단독과 비교하여 Akt 인산화를 유의미하게 유도한 반면 시험 화합물의 부가는 이 효과를 유의미하게 폐지하였으며 Akt 인산화를 기준선으로 되돌렸다.

[0322]

결과: 시험 화합물은 pAKT의 억제를 통해, CLL 세포에서 세포독성 및 아포토시스를 유도한다. 상기 결과가 또한 도 2a, 2b, 및 2c에 나타나 있다.

[0323]

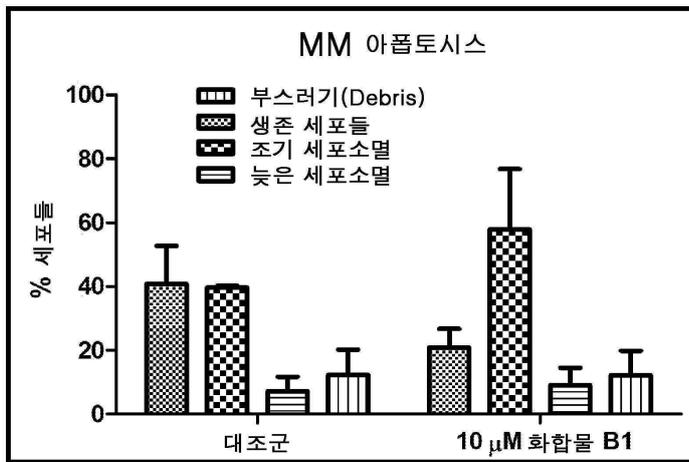
본원에서 본 발명이 특정한 구현예를 참조하여 기재되었음에도 불구하고, 이들 구현예는 단지 본 발명의 원리 및 적용을 예시하기 위한 것으로 이해되어야 한다. 따라서 예시적인 구현예에 대해 수많은 변형이 이뤄질 수 있으며, 다른 배열이 상기 기술된 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않으면서 고안될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 부가된 청구항들이 본 발명의 범위를 규정하며, 이들 청구항 및 그의 등가물의 범위 내의 방법 및 구조들이 이에 의해 포함된다는 것이 의도된다.

[0324]

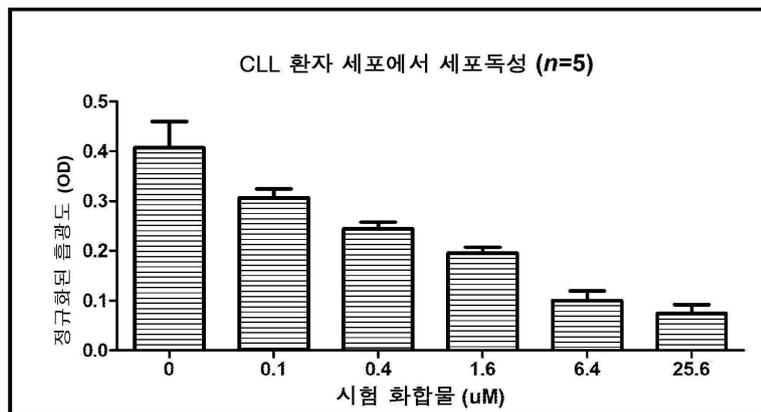
본원에 언급된 모든 공보, 특허들 및 특허 출원들은 마치 각 개별적인 공보, 특허 또는 특허 출원이 참조로 본원에 포함된 것으로 명시적으로 그리고 개별적으로 언급된 것처럼 동일한 정도로 본원에 참조로 포함되어 있다.

도면

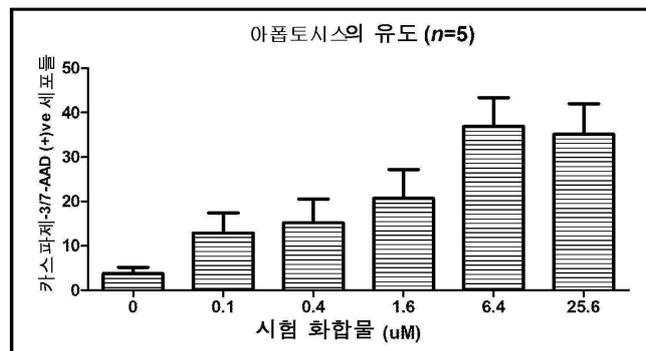
도면1



도면2a



도면2b



도면2c

