



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0109385  
(43) 공개일자 2015년10월01일

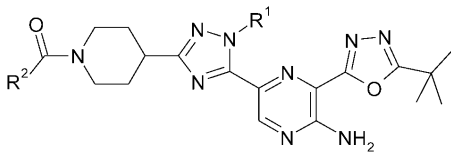
- |   |   |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>C07D 413/14 (2006.01) A61K 31/4196 (2006.01)<br/>A61K 31/4245 (2006.01) A61K 31/497 (2006.01)<br/>C12Q 1/68 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>C07D 413/14 (2013.01)<br/>A61K 31/4196 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-7021103</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2014년01월22일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2015년08월04일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/GB2014/050163</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2014/114928<br/>국제공개일자 2014년07월31일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>13305078.1 2013년01월23일<br/>유럽특허청(EPO)(EP)</p> | <p>(71) 출원인<br/>아스트라제네카 아베<br/>스웨덴 에스이-151 85 쇠더탈제</p> <p>(72) 발명자<br/>바라암 버나드 크리스토프<br/>영국 에스케이10 4티지 체셔 메이클즈필드 알덜리<br/>파크 아스트라제네카 알앤디 알덜리<br/>베리 데이빗<br/>영국 에스케이10 4티지 체셔 메이클즈필드 알덜리<br/>파크 아스트라제네카 알앤디 알덜리 아스트라제네<br/>카 인텔렉츄얼 프로퍼티 내<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>김진희, 김태홍</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **화합물**

(57) 요약

본 발명은 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 이의 제조 방법, 이를 포함하는 약학 조성물 및 세포 증식 장애의 치료에 있어 이의 용도에 관한 것이다.



(I)

상기 식에서, R<sup>1</sup> 및 R<sup>2</sup>는 명세서에서 앞서 정의된 임의의 의미를 가진다.

(52) CPC특허분류

**A61K 31/4245** (2013.01)

**A61K 31/497** (2013.01)

**C12Q 1/6886** (2013.01)

(72) 발명자

**텔레브리 베네딕트**

영국 에스케이10 4티지 체서 메이클즈필드 알덜리  
파크 아스트라제네카 알앤디 알덜리 아스트라제네  
카 인텔렉추얼 프로퍼티 내

**해리스 크레이그 스티븐**

영국 에스케이10 4티지 체서 메이클즈필드 알덜리  
파크 아스트라제네카 알앤디 알덜리 아스트라제네  
카 인텔렉추얼 프로퍼티 내

**램버트-반 더 브렘프트 크리스틴 마리 폴**

영국 에스케이10 4티지 체서 메이클즈필드 알덜리  
파크 아스트라제네카 알앤디 알덜리 아스트라제네  
카 인텔렉추얼 프로퍼티 내

**오우브리 질레스**

영국 에스케이10 4티지 체서 메이클즈필드 알덜리  
파크 아스트라제네카 알앤디 알덜리 아스트라제네  
카 인텔렉추얼 프로퍼티 내

**레이드 개리 패트릭**

영국 에스케이10 4티지 체서 메이클즈필드 알덜리  
파크 아스트라제네카 알앤디 알덜리 아스트라제네  
카 인텔렉추얼 프로퍼티 내

**툼킨슨 개리 피터**

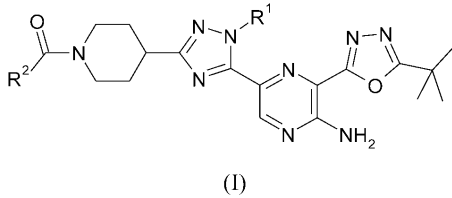
영국 에스케이10 2엔에이 체서 메이클즈필드 차터  
웨이 아스트라제네카

명세서

청구범위

청구항 1

화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염:



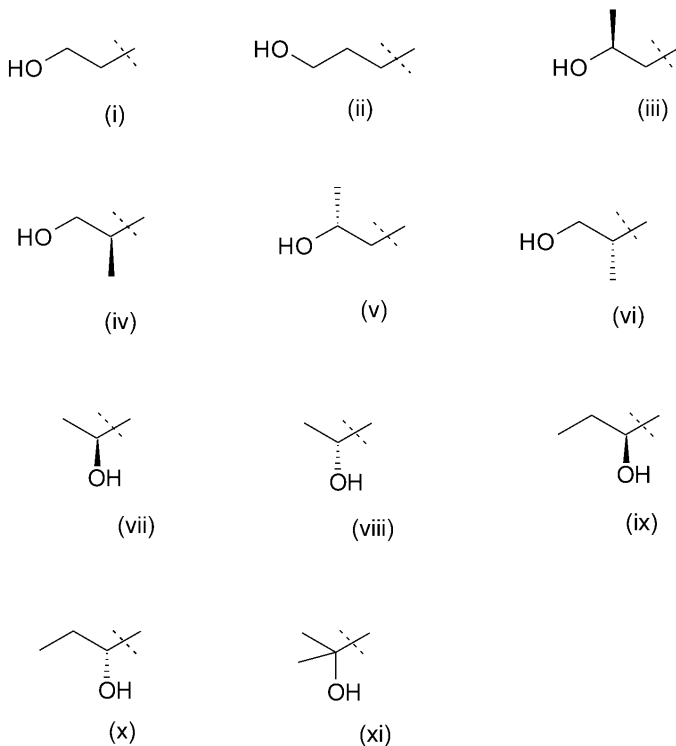
상기 식에서,

R<sup>1</sup>은 메틸 또는 에틸이고;

R<sup>2</sup>는 히드록시로 치환된(C2-3)알킬이다.

청구항 2

제1항에 있어서, R<sup>2</sup>가 기 (i) 내지 (xi)로부터 선택되는 것인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염:



청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, R<sup>2</sup>가 제2항에 정의된 기 (i) 내지 (vi)으로부터 선택되는 것인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, R<sup>2</sup>가 제2항에 정의된 기 (i)인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되

는 염.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, R<sup>1</sup>이 메틸인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

**청구항 6**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, R<sup>1</sup>이 에틸인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 화합물이 하기 화합물로부터 선택되는 것인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염:

1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-메틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-3-히드록시-프로판-1-온;

1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-에틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-3-히드록시-프로판-1-온;

(3R)-1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-메틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-3-히드록시-부탄-1-온;

(3S)-1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-메틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-3-히드록시-부탄-1-온;

(2R)-1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-메틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-3-히드록시-2-메틸-프로판-1-온;

1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-메틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-2-히드록시-2-메틸-프로판-1-온.

**청구항 8**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 결정형인 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

**청구항 9**

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 의약(medicament)으로서 사용하기 위한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

**청구항 10**

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 인간과 같은 온혈 동물에서 암의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염.

**청구항 11**

제1항에 청구된 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 또 다른 항종양제를 포함하는 암 치료에 사용하기 적합한 조합물(combination).

**청구항 12**

제1항에 청구된 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 및 약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 13**

화학식 (I)의 화합물로 치료하기 위한 환자를 선별하는 방법으로서, 종양 유래 DNA 또는 종양세포를 함유하는 환자로부터의 시료를 제공하는 단계; 환자의 종양세포 또는 종양 유래 DNA에서의 PIK3CA 유전자가 야생형인지 또는 돌연변이체인지를 결정하는 단계; 및 이를 근거로 화학식 (I)의 화합물로 치료하기 위한 환자를 선별하는

단계를 포함하는 선별 방법.

**청구항 14**

암을 앓고있는 환자의 치료 방법으로서, 환자로부터의 종양세포 함유 시료를 제공하는 단계; 환자의 종양세포에서 PIK3CA 유전자가 야생형인지 또는 돌연변이체인지를 결정하는 단계; 및 종양세포가 돌연변이 PIK3CA 유전자를 가진다면 제1항에 청구된 화학식 (I)의 화합물의 유효량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법.

**청구항 15**

돌연변이 PIK3CA 유전자를 갖는 것으로 확인된 종양세포를 가진 암을 치료하기 위한 제1항에 청구된 화학식 (I)의 화합물.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 항암 활성을 가지며, 따라서 인간 또는 동물 신체의 치료 방법에 유용한 신규의 특정 아미노피라진 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 아미노피라진 유도체의 제조 방법, 그를 포함하는 약학 조성물, 및 치료 방법에 있어 이의 용도, 예를 들어 암의 예방 또는 치료에 있어 용도를 포함하여 인간과 같은 온혈 동물에서 암의 예방 또는 치료용 의약 제조에 있어 이의 용도에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 PI3-키나아제 효소 패밀리(별법으로, 포스파티딜이노시톨-3-키나아제 패밀리 또는 PI3K 패밀리로도 공지됨), 특히 PI3K- $\alpha$  및 PI3K- $\delta$  이소형(isoforms)의 선택적 억제제인 아미노피라진 유도체에 관한 것이며, 예를 들어 항종양 요법에 유용하다.

**배경 기술**

[0003] 암 분야에서, 세포가 자신의 DNA 일부를, 활성화되는 경우 악성 종양세포 형성을 일으키는 유전자인 암 유전자로 형질전환시킴으로써 암이 될 수 있다는 것이 최근 밝혀졌다(Bradshaw, *Mutagenesis*, 1986, 1, 91). 이 같은 여러 암 유전자는 자신의 단백질 또는 지질 기질을 인산화할 수 있는 효소의 한 부류인 키나아제가 되는 펩티드의 생성을 일으킨다. 몇몇 부류의 키나아제가 존재한다.

[0004] 첫째로, 티로신 키나아제는 수용체 티로신 키나아제 또는 비수용체 티로신 키나아제일 수 있다. 다양한 수용체 티로신 키나아제의 세포 외 표면에 결합할 수 있는 성장 인자 패밀리에 기초하여 다양한 부류의 수용체 티로신 키나아제가 공지되어 있다(Wilks, *Advances in Cancer Research*, 1993, 60, 43-73); 예로서, 부류는 EGF 패밀리의 수용체 티로신 키나아제를 포함하는 I형 수용체 티로신 키나아제를 포함한다. 비수용체 티로신 키나아제는 세포 내에 위치한다; 다양한 부류의 비수용체 티로신 키나아제가 공지되어 있으며, Src 패밀리, 예를 들어 Src, Lyn, Fyn 및 Yes 티로신 키나아제를 포함한다.

[0005] 둘째로, 특정 키나아제는 세포 내에 또한 위치하는 세린/트레오닌 키나아제 부류에 속한다. 세린/트레오닌 키나아제 신호전달 경로는 Raf-MEK-ERK 캐스캐이드 및 PI3-키나아제의 하류에 있는 것, 예를 들어 PDK-1, AKT 및 mTOR를 포함한다(Blume-Jensen and Hunter, *Nature*, 2001, 411, 355).

[0006] 또한, 기타 특정 키나아제는 세포 내에 위치하고, 상기에 언급된 키나아제와 같이 종양세포 성장 및 침습에 영향을 주는 것들과 같은 생화학적 신호 전달에 관여하는 지질 키나아제 부류에 속하는 것으로 공지되어 있다. 상기 언급된 PI3-키나아제 패밀리를 포함한 다양한 부류의 지질 키나아제가 공지되어 있다.

[0007] 암 유전자 및 종양-억제 유전자의 조절 해제(deregulation)는 예를 들어 세포증식의 증가 및 세포 생존의 증가에 의해 악성 종양 형성의 원인이 된다는 것은 현재 잘 이해되고 있다. PI3-키나아제 패밀리에 의해 매개된 신호전달 경로가 증식 및 생존을 포함한 많은 세포 과정에서 중요한 역할을 하고, 상기 경로의 조절 해제가 광범위한 인간 암 및 기타 질환에서 원인이 되는 인자라는 것 또한 현재 공지되어 있다(Katso et al., *Annual Rev. Cell Dev. Biol.*, 2001, 17: 615-617 및 Foster et al., *J. Cell Science*, 2003, 116: 3037-3040).

[0008] PI3-키나아제 패밀리의 지질 키나아제는 포스파티딜이노시톨(PI)의 이노시톨 고리의 3-위치를 인산화하는 효소군이다. PI3-키나아제 효소의 세 가지 주요군은 이의 생리학적 기질 특이성에 따라 분류되는 것으로 알려져 있다(Vanhaesebroeck et al., *Trends in Biol. Sci.*, 1997, 22, 267; Engleman et al., *Nature Review Genetics*, 2006, 7, 607). III형 PI3-키나아제 효소는 PI만을 인산화한다. 반면, II형 PI3-키나아제 효소는 PI

및 PI4-포스페이트[이하에서 간략하게 PI(4)P로 나타냄] 둘 다를 인산화한다. PI(4,5)P2만이 생리학적 세포 기질로 생각되지만 I형 PI3-키나아제 효소는 PI, PI(4)P 및 PI4,5-비스포스페이트[이하에서 간략하게 PI(4,5)P2로 나타냄]를 인산화한다. PI(4,5)P2의 인산화는 2차 지질 전달자인 PI3,4,5-트리포스페이트[이하에서 간략하게 PI(3,4,5)P3으로 나타냄]을 생성한다. 상기 수퍼패밀리와 조금 먼 연관성을 갖는 일원은 mTOR와 같은 IV형 키나아제, 및 단백질 기질 내 세린/트레오닌을 인산화하는 DNA-의존성 단백질 키나아제이다. I형 PI3-키나아제 효소가 상기 지질 키나아제 중 가장 많이 연구되고 이해되고 있다.

[0009]

I형 PI3-키나아제는 p110 촉매 서브유닛 및 조절 서브유닛으로 이루어진 헤테로다이머이고, I형 패밀리는 조절 파트너 및 조절 기전을 근거로 하여 Ia형 및 Ib형 효소로 더 분류된다(Engleman et al., Nature Review Genetics, 2006, 7, 607). Ia형 효소는 5개의 다른 조절 서브유닛(p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$ , p85 $\beta$  및 p55 $\gamma$ )과 다이머를 형성하는 3개의 다른 촉매 서브유닛(명명법에 의해 p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  및 p110 $\delta$ 는 PI3-키나아제 이소형  $\alpha$ ,  $\beta$  또는  $\delta$ 로 각각 정의됨)으로 이루어져 있으며, 모든 촉매 서브유닛은 모든 조절 서브유닛과 상호작용하여 다양한 헤테로다이머를 형성할 수 있다. Ia형 PI3-키나아제 효소는 일반적으로 수용체 티로신 키나아제의 성장 인자 자극에 반응하여 활성화된 수용체 또는 어댑터 단백질, 예를 들어 IRS-1의 특이적 포스포-티로신 잔기와 조절 서브유닛 SH2 도메인 사이의 상호작용을 통해 활성화된다. p110 $\alpha$  및 p110 $\beta$  둘 다 모든 세포 유형 및 조직에 걸쳐 광범위하게 발현되는 반면, p110 $\delta$  발현은 백혈구 집단 및 일부 상피세포에 다소 제한적이다. 반면, 단일 Ib형 효소는 p101 조절 서브유닛과 상호작용하는 p110 $\delta$  촉매 서브유닛으로 이루어진다. 또한, Ib형 효소는 G-단백질 연결 수용체(GPCR:G-protein coupled receptor) 시스템에 반응하여, 그리고 상기에 기재된 기전에 의해 활성화된다.

[0010]

Ia형 PI3-키나아제 효소가 광범위한 인간 암에 직접적으로 또는 간접적으로 종양형성의 원인이 된다는 것을 나타내는 많은 증거가 현재 존재한다(Vivanco and Sawyers, Nature Reviews Cancer, 2002, 2, 489-501). 특히, PI3-키나아제의 p110 $\alpha$  촉매 서브유닛을 코딩하는 PIK3CA 유전자는 종양 형성에 광범위하게 연관되어 있다. p110 $\alpha$ 의 나선형 또는 촉매 도메인에서 가장 빈번하게 발견되는 점 돌연변이의 활성화는 전효소의 PI3-키나아제 활성을 증가시켜 세포를 형질전환시킬 수 있다. 그들은 광범위한 종양 유형에 걸쳐 유의한 빈도로 발생하는 체 세포 돌연변이로서 보고되었다(Samuels et al., Science, 2004, 304, 554; Samuels et al., Cancer Cell, 2005, 7, 561; Engleman et al., Nature Review Genetics, 2006, 7, 607; Zhao L and Vogt PK, Oncogene 2008, 27 5486). 또한, p85 $\alpha$  내 종양 관련 돌연변이가 난소암 및 결장암과 같은 암에서 확인되었다(Philp et al., Cancer Research, 2001, 61, 7426-7429). 게다가, p110 $\alpha$  서브유닛은 난소(Shayesteh et al., Nature Genetics, 1999, 21, 99-102) 및 자궁경부(Ma et al., Oncogene, 2000, 19, 2739-2744)의 종양과 같은 일부 종양에서 증폭된다.

[0011]

직접적인 영향 외에도, Ia형 PI-3 키나아제의 활성화는 신호전달 경로의 상류에서 예를 들어 수용체 티로신 키나아제, GPCR 시스템 또는 인테그린의 리간드 의존성 또는 리간드 비의존성 활성화에 의해 발생하는 종양발생 현상에 원인이 되는 것으로 생각된다(Vara et al., Cancer Treatment Reviews, 2004, 30, 193-204). 이같은 상류 신호전달 경로의 예는 PI 3-키나아제 매개된 경로의 활성화를 일으키는 다양한 종양에서 수용체 티로신 키나아제 Erb2의 과발현(Harari et al., Oncogene, 2000, 19, 6102-6114) 및 암 유전자 Ras의 과발현(Kauffmann-Zeh et al., Nature, 1997, 385, 544-548)을 포함한다. 또한, Ia형 PI3-키나아제는 다양한 하류 신호전달 현상에 의해 야기되는 종양 형성의 원인이 될 수 있다. 예를 들어, PI(3,4,5)P3의 PI(4,5)P2로의 역전환을 촉매하는 PTEN 종양 억제 포스파타제의 효과의 손실은 PI3-키나아제 매개되어 생산된 PI(3,4,5)P3의 조절 해제를 통해 매우 광범위한 종양과 연관된다(Simpson and Parsons, Exp. Cell Res., 2001, 264, 29-41). 게다가, 다른 PI3-키나아제-매개된 신호전달 현상의 효과의 증가는 예를 들어 Akt의 활성화에 의해 다양한 암의 원인이 된다고 생각된다(Nicholson and Anderson, Cellular Signalling, 2002, 14, 381-395).

[0012]

따라서, 상류 및 하류의 신호전달 경로의 것들과 함께 PI3-키나아제의 보편적인 조절 해제는 총체적으로 인간 암에서 가장 보편적으로 조절 해제되는 경로가 된다(Hennessey et al., Nature Reviews Drug Discovery, 2005, 4, 988).

[0013]

종양세포에서 세포 증식 및 생존 신호전달을 매개하는 기능 외에도, Ia형 PI3-키나아제 효소는 또한 종양 연관된 기질 세포에서의 기능을 통해 종양 형성의 원인이 될 수 있다는 좋은 증거가 있다. 예를 들어, PI3-키나아제 신호전달은 VEGF와 같은 혈관형성 촉진인자(pro-angiogenic factor)에 반응하여 내피세포 내에서 혈관 형성 현상을 매개하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Abid et al., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2004, 24, 294-300). I형 PI3-키나아제 효소는 또한 운동성 및 이동에 관련되기 때문에(Sawyer, Expert Opinion Investig. Drugs, 2004, 13, 1-19), PI3-키나아제 억제제는 종양세포 침습 및 전이의 억제를 통해 치

료 이점을 제공한다.

[0014] 또한, I형 PI3-키나아제 효소는 염증성 세포의 종양 형성 촉진에 영향을 주는 PI3-키나아제 활성화로 면역 세포의 조절에 중요한 역할을 한다(Coussens and Werb, *Nature*, 2002, 420, 860-867). 실제로, Ia형 PI3-키나아제 효소, PI3-키나아제  $\delta$ 는 혈액학적 악성 종양, 예를 들어 만성 림프성 백혈병(CLL: Chronic Lymphocytic Leukaemia), 급성 림프모구성 백혈병(ALL: Acute Lymphoblastic Leukaemia), 및 외투 세포 림프종(MCL: Mantle Cell Lymphoma)에서 종양 형성과 특히 관계가 있다. PI3K의 신호전달의 상승(주로 p110  $\delta$ )이 광범위한 악성 림프계 세포에서 보고되어 있다(Herman et al., *Blood*, 2010, 116, 2078; Ikeda et al., *Blood*, 2010, 116, 1460; Uddin et al., *Blood*, 2006, 108, 4178; Rudelius et al., *Blood* 2006, 108, 1668; Garcia-Martinez., *Br J Cancer*, 2011, 104, 1116; Renne et al., *Leukemia*, 2007, 2,780). 이는 혈액학적 악성 종양에서 기대되는 초기 임상 결과를 갖는 PI3-키나아제  $\delta$ 를 표적화하는 제제의 개발을 이끌었다(Castillo et al., *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2012, 21, 15).

[0015] 상기 발견들은 I형 PI3-키나아제 효소의 약리학적 억제제가 암종 및 육종과 같은 고형 종양, 및 백혈병 및 림프성 악성종양을 포함하는 다양한 형태의 암 질환 치료에 치료적 가치가 있음을 시사한다.

**발명의 내용**

[0016] PI3-키나아제 효소의 생리학적 및 병리학적 역할을 연구하는 초기 연구인 임상전 및 임상 연구 모두는 보다 광범위한 키나아제 패밀리, PI3-키나아제 패밀리, 또는 PI3-키나아제 I형 패밀리에 걸쳐 키나아제 억제제의 제한된 선택성을 갖는 제제를 대체로 사용해왔다. 따라서, 임상에 들어갔던 초기 제제보다 향상된 치료 한계를 가져다 줄 가능성이 있는 유용한 치료제를 제공하는 더 높은 선택성을 갖는 약학적 PI3-키나아제 I형 억제제에 대한 요구가 있다.

[0017] 일반적으로, 본 발명의 화합물은 I형 PI3-키나아제 효소의 서브세트에 대해, 특히 Ia형 PI3-키나아제- $\alpha$  및 - $\delta$  이소형에 대해 강력한 억제 활성을 가지며, - $\gamma$  및 특히 - $\beta$  이소형에 대해서는 상대적으로 부족하다. 또한, 화합물은 더 광범위한 PI3-키나아제 패밀리 및 더 광범위한 키놈(kinome)에 대해 선택적이다. 상기 화합물은 I형 PI3-키나아제 효소에 대해 충분한 효능을 가져 다른 키나아제에 대해 거의 활성을 보이지 않으면서 I형 PI3-키나아제 이소형의 서브세트, 특히 Ia형 PI3-키나아제 효소 - $\alpha$  및 - $\delta$ 을 억제하기에 충분한 양으로 사용될 수 있다.

[0018] 인간 암 및 기타 질환에서 PI3-키나아제 신호전달의 조절 해제의 이해는 맞춤 의료(PHC:Personalised Healthcare) 또는 맞춤 의학(Personalised Medicine)으로 알려진 과정을 통해 본 특허에 기재된 제제의 치료로부터 이익을 얻을 가능성이 가장 큰 환자의 서브세트를 표적화하는 가능성을 제공한다. 상기 제제의 경우, 상승되거나 그렇지 않으면 변경된 PI3K- $\alpha$  신호전달 및/또는 PI3K- $\delta$  신호전달에 의존하는 질환의 환자가 특히 치료로부터 이익할 수 있다. 진단을 이용하여 반응 예측 생물지표(biomarker) 판독 값을 제공할 수 있다는 것은 당 업계에 잘 알려져 있다. 이 같은 진단은 경로의 조절 해제의 하나 이상의 판독 값, 예를 들어 PIK3CA, PTEN 또는 p85(PIK3R) 유전자 내 돌연변이, PIK3CA 유전자의 증폭 또는 증가된 카피 수, PI3K- $\alpha$  및/또는 - $\delta$  이소형의 과발현 또는 상승된 활성, 또는 포스포-RTK 또는 포스포-AKT와 같은 경로 내에서 포스포생물지표의 판독값의 이용을 측정할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 또한, 비정상적이거나 조절 해제된 PIK3CA 또는 PI3K- $\alpha$ 를 가진 종양에서 내성의 가능한 표지인, Kras와 같은 추가의 유전자의 돌연변이 상태 또는 활성화 상태의 측정(Engelman et al., *Nature Medicine*, 2008 14, p1351-1355; Ihle et al., *Cancer Research*, 2009, 69, p143-16; Janku et al., *Molecular Cancer Therapeutics*, 2011, 10, p558-564)은 맞춤 의학 접근법의 예측성을 증가시키는 것을 도울 수 있었다. 별법으로, 표적화되지만 더 특이적인 또 다른 접근법에서, 치료는 해당 PI3K 이소형의 조절 해제가 가장 우세한 것으로 알려진 질환 서브세트에 초점이 맞춰질 수 있었다.

[0019] 기재된 화합물을 단독으로 또는 또 다른 약학 제제 또는 제제들과 조합하여 질환을 표적화하는데 사용할 수 있다. 다른 요법과 PI3-키나아제 억제제의 조합은 본래의 또는 PI3-키나아제 제제에 반응하여 유도된 내성 기전을 극복함으로써 효능을 향상시킬 수 있다. 이러한 접근법을 지지하는 실질적인 임상전 자료가 존재한다(Courtney et al., *J Clin Oncol*, 2010, 28, 1075; Engleman et al., *Nature Review Genetics*, 2006, 7, 607). 한 접근법은 PI3-키나아제 신호전달 경로에서 다른 축을 조절하는 제제와 '경로 내' 조합하는 것이다(예를 들어, mTOR, AKT, RTK, 기타 PI3-키나아제 제제). 두 번째 접근법은 하나 이상의 신호전달 경로의 억제가 단일 경로의 억제에 비해 유리할 수 있는 '경로 간' 조합이다(예를 들어, MEK 억제제, Raf 억제제, Bcl 패밀리 조절인자, RTK 억제제, 또는 PARP 억제제와 같은 DNA 손상 신호전달 조절 인자와 조합됨). 다른 접근법은 PI3-키나아제 억제제가

임상 실험에 이미 확립된 제제 또는 치료법과 조합되는 경우, 소위 표준 치료(SoC: Standard of Care) 접근법, 또는 종양 기질 세포와 같은 비종양세포 기질을, 또는 면역계를 통해, 표적화하는 제제와의 조합을 포함한다.

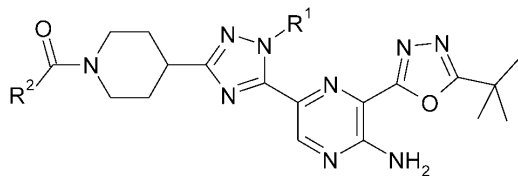
[0020] 종양 형성 외에도, I형 PI3-키나아제 효소가 다른 질환에서도 역할을 한다는 증거가 있다(Wymann et al., *Trends in Pharmacological Science*, 2003, 24, 366-376). Ia형 PI3-키나아제 효소, 특히 PI3K- $\delta$ , 및 단일 Ib형 효소(PI3K- $\gamma$ ) 둘 다는 면역계의 세포에서 중요한 역할을 하고(Koyasu, *Nature Immunology*, 2003, 4, 313-319), 따라서 염증성 또는 알러지 징후에 대한 치료 표적이 된다. 앞서 기재된 바와 같이, PI3-키나아제의 억제 는 또한 항염증성 효과를 통해 또는 심근 세포에 영향을 줌으로써 간접적으로 심혈관 질환을 치료하는데 유용하다(Prasad et al., *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2003, 13, 206-212). 따라서, I형 PI3-키나아제 효소의 억제제는 암 이외에 광범위한 질환의 예방 및 치료에 유용할 수 있다.

[0021] 화합물, 즉 본 발명의 아미노피라진 유도체는 강력한 항종양 활성을 가지며, 이는 악성종양 질환에서 일어나는 제어되지 않는 세포 증식을 억제하는데 유용하다는 것이 확인되었다. 본 발명에 개시된 화합물이 단일 생물학적 과정에 대한 영향에 의해서만 약리 활성을 갖는다는 것을 시사하기를 바라지 않고, I형 PI3-키나아제 효소의 억제, 특히 Ia형 PI3-키나아제 효소의 서브세트, 보다 바람직하게는 PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  이소형의 억제에 의해 항종양 효과를 제공한다고 생각된다.

[0022] 본 발명의 화합물은 다양한 비악성종양 질환, 예를 들어 염증성 질환(예를 들어 류마티스 관절염 및 염증성 장 질환), 심유증 질환(예를 들어, 간경화 및 폐섬유증), 사구체신염, 다발성 경화증, 건선, 양성 전립선 비대증 (BPH: benign prostatic hypertrophy), 피부의 과민 반응, 혈관 질환(예를 들어, 죽상 동맥경화증 및 재협착증), 알러지성 천식, 인슐린 의존성 당뇨병, 당뇨 망막병증 및 당뇨병성 신장질환에서 발생하는 제어되지 않는 세포 증식을 억제하는데 유용할 수 있다.

[0023] 노바티스(Novartis)는 국제 특허 출원 W02009/080705호, W02010/029082호 및 W02011/000905호에 선택적인 PI3K- $\alpha$  선택제로서 프롤린 아미드를 개시하였다. 아미노피라진 함유 ATR 키나아제 억제제는 W02011/143426호 및 W02010/071837호(Vertex)에 개시되었다.

[0024] 본 발명의 한 측면에 따르면, 하기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 제공된다.



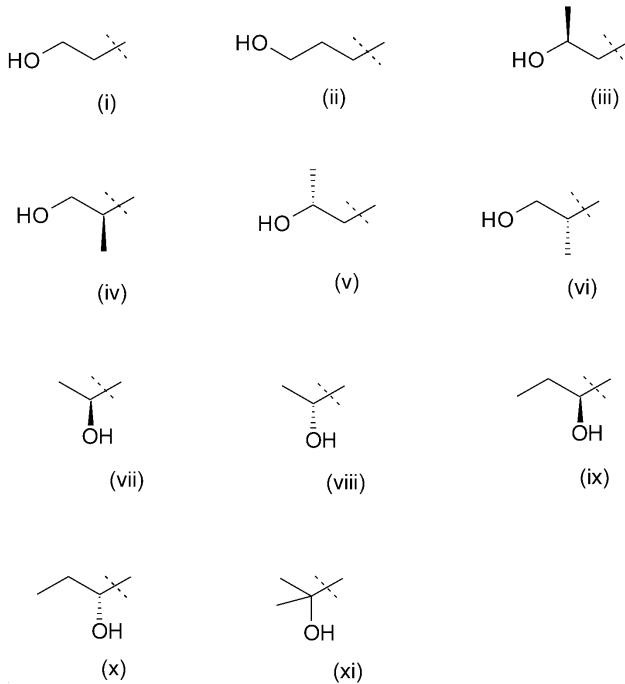
(I)

[0025] .  
 [0026] 상기 식에서,  
 [0027] R<sup>1</sup>은 메틸 또는 에틸이고; R<sup>2</sup>는 히드록실로 치환된(C2-3)알킬이다.

[0028] 본 발명의 또 다른 측면에서, 상기에 정의된 바와 같이 화학식 (I)의 화합물이 제공된다.

[0029] 용어 "히드록실로 치환된(C2-3)알킬"은 직쇄형 및 분지형 알킬기, 예를 들어 하기 기 (i) 내지 (xi)에 예시된 것을 포함하는 것으로 이해될 것이다:





[0030]

[0031]

상기에 정의된 화학식 (I)의 특정 화합물이 하나 이상의 비대칭성 탄소 원자에 의해 광학적 활성 또는 라세미 형태로 존재할 수 있는 한에 있어서 본 발명은 PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  억제 활성을 갖는 광학적 활성 또는 라세미 형태를 이의 범위에 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 광학적 활성 형태의 합성은 당 업계에 잘 알려진 유기 화학의 표준 기술에 의해, 예를 들어 광학적 활성의 출발 물질로부터의 합성에 의해 또는 라세미 형태의 분할에 의해 수행될 수 있다. 유사하게, 상기 언급된 활성은 표준 실험 기술을 이용하여 평가될 수 있다.

[0032]

본원에 기재된 화합물의 특정 거울상 이성질체는 동일한 화합물의 다른 거울상 이성질체보다 더 큰 활성을 가질 수 있다.

[0033]

본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 거울상 이성질체 과잉률(%ee)이  $\geq 95$ ,  $\geq 98\%$  또는  $\geq 99\%$ 인 단일 거울상 이성질체인 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 제공된다. 편리하게는, 단일 거울상 이성질체는  $\geq 99\%$ 의 거울상 이성질체 과잉률(%ee)로 존재한다.

[0034]

본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 거울상 이성질체 과잉률(%ee)이  $\geq 95$ ,  $\geq 98\%$  또는  $\geq 99\%$ 인 단일 거울상 이성질체인 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체와 함께 포함하는 약학 조성물이 제공된다. 편리하게는, 단일 거울상 이성질체는  $\geq 99\%$ 의 거울상 이성질체 과잉률(%ee)로 존재한다.

[0035]

화학식 (I)의 일부 화합물은 결정질일 수 있고 하나 이상의 결정형(crystalline form)을 가질 수 있다. 본 발명은 임의의 결정형 또는 무정형, 또는 이의 혼합물을 포함하며, 이들 형태는 PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  활성의 억제에 유용한 특성을 갖는다는 것을 이해해야 하며, 아래에서 기재되는 표준 시험에 의해 PI3K- $\alpha$  및/또는 - $\delta$  활성을 억제하는 결정형 또는 무정형의 효능을 결정하는 방법은 당 업계에 잘 알려져 있다.

[0036]

일반적으로, 결정질 물질(재료)은 통상의 기술, 예를 들어 X-선 분말 회절(이후로 XRPD: X-ray Powder Diffraction) 분석, 시차 주사 열량측정법(이후로 DSC: Differential Scanning Calorimetry), 열천평 분석(이후로 TGA: Thermal Gravimetric Analysis), 확산 반사율 적외선 푸리에 변환(DRIFT: Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform) 분광법, 근적외선(NIR: Near Infrared) 분광법, 용액 및/또는 고체 상태 핵 자기 공명 분광법을 이용하여 분석될 수 있다고 알려져 있다. 이러한 결정질 물질의 수분 함량은 칼 피셔(Karl Fischer) 분석에 의해 측정될 수 있다.

[0037]

예로서, 실시예 1의 화합물은 결정화도(crystallinity)를 나타내고 하나의 결정형이 확인되었다.

[0038]

따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이다.

[0039]

본 발명의 또 다른 측면에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 대략  $2\text{-}\theta = 5.1^\circ$  에서 하나의 특이적 피크

를 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0040] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 대략 2-세타 = 18.0° 에서 하나의 특이적 피크를 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0041] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 대략 2-세타 = 5.1 및 18.0° 에서 2개의 특이적 피크를 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0042] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 대략 2-세타 = 5.1, 18.0, 10.2, 11.7, 19.4, 18.5, 14.8, 26.7, 26.6, 17.8° 에서 특이적 피크를 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0043] 본 발명에 따르면, [도 1]에 나타난 X-선 분말 회절 패턴과 실질적으로 동일한 X-선 분말 회절 패턴을 보이는 결정형 A형이 제공된다.

[0044] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 대략 2-세타 = 5.1° ± 0.2° 2-세타에서 하나의 특이적 피크를 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0045] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 대략 2-세타 = 18.0° ± 0.2° 2-세타에서 하나의 특이적 피크를 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0046] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 대략 2-세타 = 5.1 및 18.0° ± 0.2° 2-세타에서 2개의 특이적 피크를 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0047] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 대략 2-세타 = 5.1, 18.0, 10.2, 11.7, 19.4, 18.5, 14.8, 26.7, 26.6, 17.8° ± 0.2° 2-세타에서 특이적 피크를 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0048] 또한, 실시예 3은 결정질이며 본원에서 세가지 형태(A, B 및 C)를 기재한다.

[0049] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 대략 2-세타 = 4.8° 에서 하나 이상의 특이적 피크를 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0050] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 대략 2-세타 = 10.0° 에서 하나의 특이적 피크를 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0051] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 대략 2-세타 = 4.8° 및 10.0° 에서 2개의 특이적 피크를 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0052] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 대략 2-세타 = 4.8, 10.0, 14.6, 5.2, 19.9, 10.4, 25.4, 23.6, 24.4, 16.2° 에서 특이적 피크를 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0053] 본 발명에 따르면, [도 3]에 나타난 X-선 분말 회절 패턴과 실질적으로 동일한 X-선 분말 회절 패턴을 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

- [0054] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 2-췌타 =  $4.8^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$  2-췌타에서 하나의 특이적 피크를 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.
- [0055] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 2-췌타 =  $10.0^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$  2-췌타에서 하나의 특이적 피크를 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.
- [0056] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 2-췌타 =  $4.8^{\circ}$  및  $10.0^{\circ}$  에서 2개의 특이적 피크를 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공되며, 상기 값은  $\pm 0.2^{\circ}$  2-췌타일 수 있다.
- [0057] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 2-췌타 = 4.8, 10.0, 14.6, 5.2, 19.9, 10.4, 25.4, 23.6, 24.4,  $16.2^{\circ}$  에서 특이적 피크를 보이는 결정형 A형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공되며, 상기 값은  $\pm 0.2^{\circ}$  2-췌타일 수 있다.
- [0058] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 대략 2-췌타 =  $5.8^{\circ}$  에서 하나의 특이적 피크를 보이는 결정형 B형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.
- [0059] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 대략 2-췌타 =  $10.9^{\circ}$  에서 하나의 특이적 피크를 보이는 결정형 B형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.
- [0060] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 대략 2-췌타 =  $5.8^{\circ}$  및  $10.9^{\circ}$  에서 2개의 특이적 피크를 보이는 결정형 B형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.
- [0061] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 대략 2-췌타 = 5.8, 10.9, 11.5, 25.9, 17.3, 24.0, 19.1, 12.9, 24.7,  $27.2^{\circ}$  에서 특이적 피크를 보이는 결정형 B형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.
- [0062] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 [도 5]에 나타난 X-선 분말 회절 패턴과 실질적으로 동일한 패턴을 보이는 결정형 B형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.
- [0063] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 2-췌타 =  $5.8^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$  2-췌타에서 하나의 특이적 피크를 보이는 결정형 B형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.
- [0064] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 2-췌타 =  $10.9^{\circ} \pm 0.2^{\circ}$  2-췌타에서 하나의 특이적 피크를 보이는 결정형 B형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.
- [0065] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 2-췌타 =  $5.8^{\circ}$  및  $10.9^{\circ}$  에서 2개의 특이적 피크를 보이는 결정형 B형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공되며, 상기 값은  $\pm 0.2^{\circ}$  2-췌타일 수 있다.
- [0066] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 2-췌타 = 5.8, 10.9, 11.5, 25.9, 17.3, 24.0, 19.1, 12.9, 24.7,  $27.2^{\circ}$  에서 특이적 피크를 보이는 결정형 B형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공되며, 상기 값은  $\pm 0.2^{\circ}$  2-췌타일 수 있다.
- [0067] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 대략 2-췌타 =  $6.9^{\circ}$  에서 하나의 특이적 피크를 보이는 결정형 C형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.
- [0068] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 대략 2-췌타 =  $12.3^{\circ}$  에서 하나의 특이적 피크를 보이는 결정

형 C형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0069] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 대략 2-세타 = 6.9° 및 12.3° 에서 2개의 특이적 피크를 보이는 결정형 C형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0070] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 대략 2-세타 = 6.9, 12.3, 10.5, 21.0, 24.6, 13.6, 16.4, 19.6, 20.2, 22.5° 에서 특이적 피크를 보이는 결정형 C형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0071] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 [도 7]에 나타난 X-선 분말 회절 패턴과 실질적으로 동일한 패턴을 보이는 결정형 C형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0072] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 2-세타 = 6.9° ± 0.2° 2-세타에서 하나의 특이적 피크를 보이는 결정형 C형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0073] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 2-세타 = 12.3° ± 0.2° 2-세타에서 하나의 특이적 피크를 보이는 결정형 C형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공된다.

[0074] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 적어도 2-세타 = 6.9° 및 12.3° 에서 2개의 특이적 피크를 보이는 결정형 C형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공되며, 상기 값은 ± 0.2° 2-세타일 수 있다.

[0075] 본 발명에 따르면, X-선 분말 회절 패턴이 2-세타 = 6.9, 12.3, 10.5, 21.0, 24.6, 13.6, 16.4, 19.6, 20.2, 22.5° 에서 특이적 피크를 보이는 결정형 C형, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온이 제공되며, 상기 값은 ± 0.2° 2-세타일 수 있다.

[0076] 본 발명이 본 발명의 화합물 예를 들어 실시예 1 또는 실시예 3의 결정형에 관한 것으로 명시될 때, 결정화도의 정도는 편리하게는 약 60% 초과, 보다 편리하게는 약 80% 초과, 바람직하게는 약 90% 초과 및 보다 바람직하게는 약 95% 초과이다. 가장 바람직한 결정화도의 정도는 약 98% 초과이다.

[0077] 본 발명이 본 발명의 화합물, 예를 들어 실시예 1 또는 실시예 3의 결정형에 관한 것으로 명시될 때, 결정형은 바람직하게는 동일한 화합물의 다른 결정형 또는 무정형이 실질적으로 존재하지 않는 상태이다. 본 문맥에서, "실질적으로 존재하지 않는"은 편리하게는 약 60% 초과, 보다 편리하게는 약 80% 초과, 바람직하게는 약 90% 초과, 보다 바람직하게는 약 95% 초과, 더욱더 바람직하게는 약 98% 초과, 훨씬 더 바람직하게는 약 99% 초과인 순수한 단일 결정형이다. 예를 들어, 실시예 3은 A형이고 B형 및 C형이 실질적으로 없는 형태일 수 있다; 별법으로, 실시예 3은 B형이고 A형 및 C형이 실질적으로 없는 형태일 수 있다; 별법으로, 실시예 3은 C형이고 A형 및 B형이 실질적으로 없는 형태일 수 있다. 유사하게, 실시예 3은 B형의 형태이고, 다른 결정질 또는 무정형 형태가 실질적으로 없을 수 있다.

[0078] X-선 분말 회절 패턴의 2-세타 값은 기계에 따라 또는 시료에 따라 서로 약간씩 다를 수 있으므로 인용된 값은 절대값으로 해석되어서는 안된다는 것을 이해할 것이다.

[0079] 측정 조건(예를 들어, 사용된 장치 또는 기계)에 따라 하나 이상의 측정 에러를 갖는 X-선 분말 회절 패턴을 얻을 수 있다고 알려져 있다. 특히, X-선 분말 회절 패턴에서 강도는 측정 조건에 따라 변동할 수 있다고 일반적으로 알려져 있다. 따라서, 상기에 기재된 본 발명의 결정형은 달리 언급되지 않는다면, [도 1, 3, 5]에 나타난 X-선 분말 회절 패턴과 동일한 X-선 분말 회절 패턴을 제공하는 결정체에 한정되지 않고 상기 도면에서 나타난 X-선 분말 회절 패턴과 실질적으로 동일한 X-선 분말 회절 패턴을 제공하는 임의의 결정체가 본 발명의 범위 내에 해당한다는 것을 이해해야 한다. X-선 분말 회절 분야의 숙련자는 X-선 분말 회절 패턴의 실질적인 정체(identity)를 판단할 수 있다.

[0080] X-선 분말 회절 분야의 숙련자는 또한 상대적인 피크 강도가 예를 들어 30 마이크론 초과 크기의 입자(grain) 및 비단일 중첩비에 의해 영향받을 수 있고, 이들이 시료 분석에 영향을 줄 수 있다는 것을 이해할 것이다. 상

기 숙련자는 또한 회절계 내 시료가 놓이는 정확한 높이 및 회절계의 영점 보정에 의해 반사 위치가 영향받을 수 있다는 것을 인식할 것이다. 시료의 표면 평면성(planarity) 또한 약간의 영향을 줄 수 있다. 따라서 제시된 회절 패턴 자료를 절대값으로 간주해서는 안 된다(문헌(Jenkins, R & Snyder, R.L. 'Introduction to X-Ray Powder Diffractometry' John Wiley & Sons 1996; Bunn, C.W.(1948), Chemical Crystallography, Clarendon Press, London; Klug, H. P. & Alexander, L. E.(1974), X-Ray Diffraction Procedures) 참조).

[0081] 일반적으로, X-선 분말 디프랙토그램(diffractogram)에서 회절각의 측정 에러는 대략  $\pm 0.2^\circ$  2-세타이며, 이러한 정도의 측정 에러는 X-선 분말 회절 자료를 고려할 때 참작되어야 한다. 또한, 실험 조건 및 시료 제조(선호되는 배향)에 따라 강도가 변동할 수 있다는 것을 이해해야 한다.

[0082] 본 발명의 특정 화합물은 각 실시예이며, 본 발명의 추가의 독립된 측면을 제공한다. 본 발명의 추가의 특정 화합물은 각 실시예의 약학적으로 허용되는 염(들)이며, 이들 각각은 본 발명의 추가의 독립된 측면을 제공한다.

[0083] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본원에 개시된 임의의 실시예를 따라 수득할 수 있는 화학식 (I)의 화합물이 제공된다.

[0084] 또 다른 특징은 구체적인 실시예, 예를 들어 실시예 1, 3, 4 등에 개별적으로 청구되지 않은 조건을 갖는 본원에 정의된 임의의 범위이다.

[0085] 당업자는 화학식 (I)의 특정 화합물이 비대칭적으로 치환된 탄소 원자를 포함하므로, 광학적 활성 및 라세미 형태로 존재할 수 있거나 분리될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 화학식 (I)의 일부 화합물은 다형성을 나타낼 수 있다. 본 발명은 임의의 라세미, 광학적 활성, 다형성, 또는 입체 이성질 형태, 또는 이의 혼합물을 포함하며, 상기 형태는 PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  활성 억제에 유용한 특성을 가지며, 광학적 활성 형태를 제조하는 방법(예를 들어, 재결정화 기술에 의한 라세미 형태의 분할, 광학적 활성인 출발 물질로부터의 합성, 키랄 합성, 효소적 분할, 생체 내 변환(biotransformation), 또는 키랄 고정상을 이용한 크로마토그래피 분리에 의해) 및 이후에 기재되는 표준 시험에 의해 PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  활성에 대한 억제 효능을 측정하는 방법이 당업계에 잘 알려져 있다는 것을 이해할 것이다.

[0086] 상기에 정의된 특정 화학식 (I)의 화합물은 호변이성질 현상을 나타낼 수 있다는 것을 이해할 것이다. 본 발명은 그 정의에 임의의 상기 호변 이성질체 또는 이의 혼합물을 포함하며, 이는 PI3K 억제 활성을 가지고 화학식 도면에서 이용되거나 실시예에서 지칭되는 임의의 한 호변 이성질체에만 제한되지 않는 것을 이해할 것이다. 일반적으로 임의의 상기 호변 이성질체의 단지 하나만이 이후에 나오는 실시예에서 지칭되거나 이후에 나오는 임의의 해당 화학식 도면에 제시된다.

[0087] 본 발명은 본 화합물에 원자의 존재하는 모든 동위원소를 포함하고자 한다. 동위원소는 동일한 원자 번호이지만 다른 질량 수를 갖는 원자를 포함하는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 수소의 동위원소는 삼중수소 및 중수소를 포함한다. 탄소의 동위원소는  $^{13}\text{C}$  및  $^{14}\text{C}$ 을 포함한다.

[0088] 화학식 (I)의 화합물에 적합한 약학적으로 허용되는 염, 예를 들어, 화학식 (I)의 화합물의 산부가 염, 예를 들어 염산, 브롬화수소산, 황산 또는 트리플루오로아세트산과 같은 강한 무기산 또는 유기산을 갖는 산부가 염이다. 화학식 (I)의 화합물에 적합한 또 다른 약학적으로 허용되는 염은 예를 들어, 화학식 (I)의 화합물의 투여 후 인간 또는 동물 체내에서 형성되는 염이다.

[0089] 또한, 화학식 (I)의 화합물에 적합한 약학적으로 허용되는 용매화물은 또한 본 발명의 한 측면을 형성하는 것으로 이해할 것이다. 적합한 약학적으로 허용되는 용매화물은, 예를 들어, 반수화물, 일수화물, 이수화물 또는 삼수화물과 같은 수화물 또는 이의 대체가능한 양이다.

[0090] 또한, 화학식 (I)의 화합물에 적합한 약학적으로 허용되는 전구 약물이 또한 본 발명의 한 측면을 형성하는 것으로 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 화합물은 인간 또는 동물 체내에서 분해되어 본 발명의 화합물을 방출하는 화합물인 전구 약물 형태로 투여될 수 있다. 전구 약물을 사용하여 본 발명의 화합물의 물리학적 특성 및/또는 약물 동역학 특성을 변경할 수 있다. 전구 약물은 본 발명의 화합물이 특성-변형기(property-modifying group)가 부착될 수 있는 적합한 기 또는 치환기를 포함하는 경우 형성될 수 있다. 전구 약물의 예는 화학식 (I)의 화합물의 히드록시기에서 형성될 수 있는 생체 내 절단 가능한 에스테르 유도체, 및 화학식 (I)의 화합물의 아미노기에서 형성될 수 있는 생체 내 절단 가능한 아미드 유도체를 포함한다.

[0091] 따라서, 본 발명은 유기 합성에 의해 가능하게 만들어지는 경우, 및 이의 전구 약물의 절단에 의해 인간 또는 동물 내에서 이용 가능하게 만들어지는 경우 상기에서 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물을 포함한다. 따라

서, 본 발명은 유기 합성 방법에 의해 생성되는 화학식 (I)의 화합물 및 전구 화합물의 대사에 의해 인간 또는 동물 체내에서 생성되는 화합물을 포함한다. 즉, 화학식 (I)의 화합물은 합성적으로 생성되는 화합물 또는 대사적으로 생성되는 화합물일 수 있다.

[0092] 화학식 (I)의 화합물에 적합한 약학적으로 허용되는 전구 약물은 바람직하지 않은 약리 활성 없이 그리고 심한 독성 없이 인간 또는 동물 체내에 투여하기에 적합한 것이라는 합리적인 의학적 판단을 근거로 하는 것이다.

[0093] 전구 약물의 여러 가지 형태는 예를 들어 하기 문헌에 기재되어 있다:

a) Methods in Enzymology, Vol. 42, p. 309-396, edited by K. Widder, *et al.*

(Academic Press, 1985);

b) Design of Pro-drugs, edited by H. Bundgaard, (Elsevier, 1985);

c) A Textbook of Drug Design and Development, edited by Krogsgaard-Larsen and H. Bundgaard, Chapter 5 “Design and Application of Pro-drugs”, by H. Bundgaard p. 113-191 (1991);

d) H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, **8**, 1-38 (1992);

e) H. Bundgaard, *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences, **77**, 285 (1988);

f) N. Kakeya, *et al.*, Chem. Pharm. Bull., **32**, 692 (1984);

g) T. Higuchi and V. Stella, “Pro-Drugs as Novel Delivery Systems”, A.C.S. Symposium Series, Volume 14; and

[0094] h) E. Roche (editor), “Bioreversible Carriers in Drug Design”, Pergamon Press, 1987.

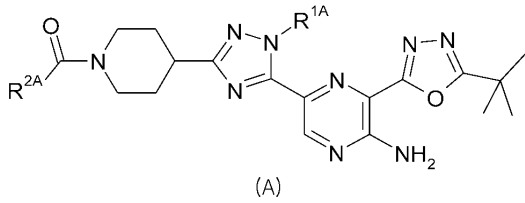
[0095] 히드록시기를 갖는 화학식 (I)의 화합물에 적합한 약학적으로 허용되는 전구 약물은, 예를 들어, 이의 생체 내 절단 가능한 에스테르 또는 에테르이다. 히드록시기를 포함하는 화학식 (I)의 화합물의 생체 내 절단 가능한 에스테르 또는 에테르는, 예를 들어 인간 또는 동물 체내에서 절단되어 히드록시 모(parent)화합물을 생성하는 약학적으로 허용되는 에스테르 또는 에테르이다. 히드록시기에 적합한 약학적으로 허용되는 에스테르 형성기는 무기 에스테르, 예를 들어 포스페이트 에스테르(포스포라미드 시클릭 에스테르 포함)를 포함한다. 히드록시기에 적합한 약학적으로 허용되는 또 다른 에스테르 형성기는 (1-10C)알카노일기, 예를 들어 아세틸, 벤조일, 페닐아세틸 및 치환된 벤조일 및 페닐아세틸기, (1-10C)알콕시카보닐기, 예를 들어 에톡시카보닐, *N,N*-[디-(1-4C)알킬]카바모일, 2-디알킬아미노아세틸 및 2-카복시아세틸기를 포함한다. 페닐아세틸 및 벤조일기에 고리 치환기의 예는 아미노메틸, *N*-알킬아미노메틸, *N,N*-디알킬아미노메틸, 모르폴리노메틸, 피페라진-1-일메틸 및 4-(1-4C)알킬피페라진-1-일메틸을 포함한다. 히드록시기에 적합한 약학적으로 허용되는 에테르 형성기는  $\alpha$ -아실옥시알킬기, 예를 들어 아세톡시메틸 및 피발로일옥시메틸기를 포함한다.

[0096] 아미노기를 갖는 화학식 (I)의 화합물에 적합한 약학적으로 허용되는 전구 약물은, 예를 들어, 이의 생체 내 절단 가능한 아미드 유도체이다. 아미노기로부터 적합한 약학적으로 허용되는 아미드는, 예를 들어(1-10C)알카노일기, 예를 들어 아세틸, 벤조일, 페닐아세틸 및 치환된 벤조일 및 페닐아세틸기로 형성되는 아미드를 포함한다. 페닐아세틸 및 벤조일기에서 고리 치환기의 예는 아미노메틸, *N*-알킬아미노메틸, *N,N*-디알킬아미노메틸, 모르폴리노메틸, 피페라진-1-일메틸 및 4-(1-4C)알킬피페라진-1-일메틸을 포함한다.

[0097] 화학식 (I)의 화합물의 생체 내 효과는 화학식 (I)의 화합물의 투여 후 인간 또는 동물 체내에서 형성되는 하나 이상의 대사물질에 의해 부분적으로 발휘될 수 있다. 상기에서 언급한 바와 같이, 화학식 (I)의 화합물의 생체 내 효과는 또한 전구 화합물(전구약물)의 대사에 의해 발휘될 수 있다.

[0098] 화학식 (I)의 화합물은 R<sup>2</sup>가 히드록실로 치환된(C2-3)알킬인 -C(O)R<sup>2</sup>에 의해 치환된 피페리딘 서브유닛을 포함한다. 상기 화합물의 대사의 가능한 한 경로는 상기 기에서 히드록실 치환기의 산화에 의해서이다. 상기 산화된 화합물은 일반적으로 약간의 PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  억제 활성을 유지한다.

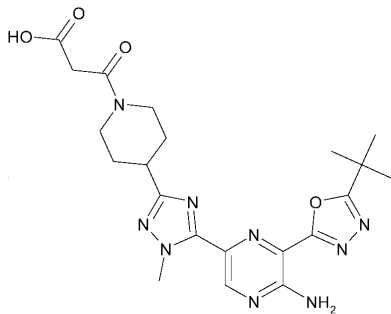
[0099] 따라서, 본 발명의 또 다른 측면에 따르면 화학식(A)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 제공된다:



[0100]

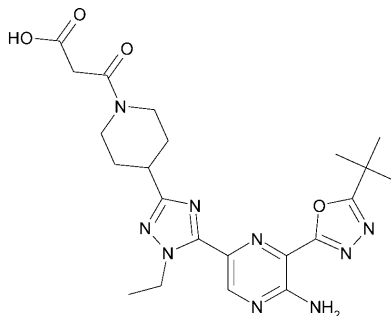
[0101] 상기에서, R<sup>1A</sup>는 메틸 또는 에틸이고; R<sup>2A</sup>는 카복시에 의해 치환된(C1-2)알킬이다.

[0102] 화학식(A)의 화합물의 예는 실시예 1의 대사물질로 확인된 실시예 8 및 실시예 3의 대사물질로 확인된 실시예 9를 포함한다.



[0103]

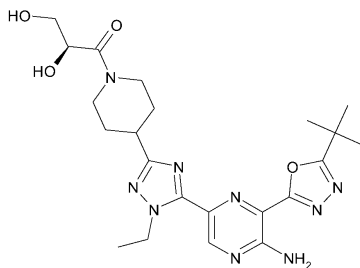
실시예 8



[0104]

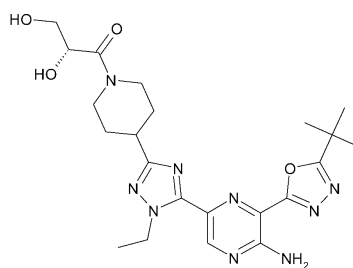
실시예 9

[0105] 실시예 3의 가능한 또 다른 대사물질은 하기에 나타내며, 실시예 10 및 11에 기재된 2개의 대체 산화 생성물이다.



[0106]

실시예 10



실시예 11

[0107] 화학식(A)의 화합물에 적합한 약학적으로 허용되는 염은, 예를 들어 알칼리 또는 알칼리 토금속 염, 예를 들어 칼슘염 또는 마그네슘염, 또는 암모늄염, 또는 유기 염기 염, 예를 들어 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 피페리딘, 모르폴린 또는 트리스-(2-히드록시에틸)아민을 포함한다.

[0108] 의심의 여지를 피하기 위해서, 본 명세서에서 기는 '상기에 정의된'(hereinbefore defined 또는 defined

hereinbefore)으로 단서를 다는 경우, 상기 기는 처음 발생하는 가장 광범위한 정의뿐 아니라 그 기에 대한 구체적인 정의 각각 및 전체를 포함한다.

[0109] 본 발명의 신규의 특정 화합물은, 예를 들어, 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다. 상기에서, 달리 언급되지 않는다면,  $R^1$  및  $R^2$  각각은 상기에서 정의된 또는 하기 설명에서 임의의 의미를 갖는다:

[0110]  $R^1$ 은 메틸이다.

[0111]  $R^1$ 은 에틸이다.

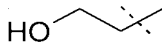
[0112]  $R^2$ 는 상기에 정의된 기 (i) 내지 (xi) 중 임의의 것이다.

[0113]  $R^2$ 는 상기에 정의된 (i) 내지 (vi)이다.

[0114]  $R^2$ 는 기 (i)이다.

[0115] 본 발명의 화합물의 특정 기는 상기 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다;

[0116] 상기에서,  $R^1$ 은 메틸 또는 에틸이고,  $R^2$ 는 기 (i)



[0117] (i) 이다.

[0118] 본 발명의 특정 화합물은, 예를 들어 이하에서 나타내는 실시예에 개시되는 화학식 (I)의 화합물이다.

[0119] 예를 들어, 본 발명의 특정 화합물은 하기 중 어느 하나로부터 선택되는 화학식 (I)의 화합물이다:

[0120] 1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-메틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-3-히드록시-프로판-1-온(실시예 1 및 2);

[0121] 1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-에틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-3-히드록시-프로판-1-온(실시예 3);

[0122] (3R)-1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-메틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-3-히드록시-부탄-1-온(실시예 4);

[0123] (3S)-1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-메틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-3-히드록시-부탄-1-온(실시예 5);

[0124] (2R)-1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-메틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-3-히드록시-2-메틸-프로판-1-온(실시예 6);

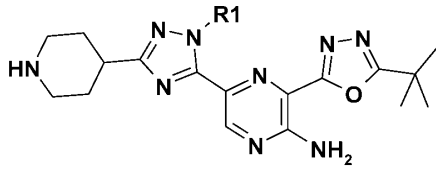
[0125] 1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-메틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-2-히드록시-2-메틸-프로판-1-온(실시예 7).

[0126] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 제조 방법을 제공한다. 적합한 방법은 하기의 대표적인 변형 방법으로 예시되며, 상기에서 달리 명시되지 않는다면  $R^1$ ,  $R^2$ 는 상기에서 정의된 임의의 의미를 갖는다. 필수적인 출발 물질은 유기 화학의 표준 방법에 의해 취득할 수 있다. 이러한 출발 물질의 제조는 하기 대표적인 변형 방법과 함께 수반되는 실시예에 기재된다. 별법으로, 필수적인 출발 물질은 유기 화학자들의 통상의 기술 내에서 예시되는 것과 유사한 방법에 의해 취득할 수 있다.

[0127] 적합한 변형 방법은 예를 들어 다음을 포함한다:

[0128] (a) 필요한 경우 적합한 염기의 존재하에서 임의의 작용기가 보호된 후 존재하는 임의의 보호기가 제거되는 것을 제외하고는, 편리하게는 적합한 활성화 시약의 존재하에서 화학식 II의 화합물과 카복실산  $R^2$ -COOH의 반응





II

[0129]

[0130]

상기 식에서, R<sup>1</sup>은 상기에 정의된 임의의 의미를 갖는다.

[0131]

상기 반응에 적합한 커플링제는 예를 들어, 2-히드록시-피리딘 N-옥시드 존재하에서 0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트, TBTU (2-(1H-벤조[d][1,2,3]트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸이소우로늄 테트라플루오로보레이트) 또는 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 히드로클로라이드 이온을 포함한다.

[0132]

반응은 편리하게는 적합한 염기의 존재하에서 수행된다. 적합한 염기는, 예를 들어, 유기 아민 염기, 예를 들어, 피리딘, 2,6-루티딘, 콜리딘, 4-디메틸아미노피리딘, 트리에틸아민, N-메틸모르폴린, 디아자비시클로[5.4.0]운데크-7-엔, 디이소프로필에틸 아민, 또는, 예를 들어, 알칼리 또는 알칼리 토금속 탄산염 또는 수산화물, 예를 들어 탄산나트륨, 탄산칼륨, 탄산칼슘, 수산화나트륨 또는 수산화칼슘; 바람직하게는 N-에틸-N,N-디이소프로필아민이다.

[0133]

반응은 편리하게는, 적합한 비활성 용매, 예를 들어 아세토니트릴, N,N-디메틸포름아미드, N-메틸피롤리돈, 테트라히드로푸란, 1,4-디옥산, 1,2-디메톡시에탄, 벤젠, 톨루엔, 자일렌, 메탄올, 에탄올, 할로겐화 용매, 예를 들어 디클로로메탄, 클로로포름 또는 사염화탄소의 존재하에서, 예를 들어 -50°C 내지 100°C 범위, 바람직하게는 0°C 내지 30°C 범위의 온도에서 수행된다.

[0134]

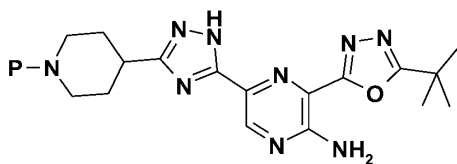
별법으로, 카복실산 R<sup>2</sup>-COOH는 활성화된 화학종으로 전환될 수 있으며, 이어서 당 업계에 잘 알려진 조건하에서 화학식 II의 화합물과 반응될 수 있다.

[0135]

히드록실기에 적합한 보호기는 실시예 2 및 3에서 기재된 바와 같이 테트라히드로피란 보호기이다. 상기 기를 제거하기 위한 적합한 조건은 20 내지 70°C 사이 온도에서 용매로서 알코올, 예를 들어 메탄올 또는 에탄올의 존재하의 약산성 조건을 포함한다. 사용되는 통상의 약산성은 피리딘 p-톨루엔설포네이트이다.

[0136]

화학식 II의 화합물은 적합한 염기 존재하에서 L이 적합한 이탈기, 예를 들어 브롬기 또는 요오드기(편리하게는 요오드기)와 같은 할로겐화기인 경우 화학식 R<sup>1</sup>-L의 화합물과 화학식 III의 화합물의 반응으로부터 수득할 있다:



III

[0137]

[0138]

상기에서, P는 보호기, 예를 들어 tert-부톡시카보닐이고, 이후에 존재하는 임의의 보호기는 제거된다.

[0139]

적합한 염기는, 예를 들어, 유기 아민 염기, 예를 들어 1,8-디아자비시클로[5.4.0]운데크-7-엔이다.

[0140]

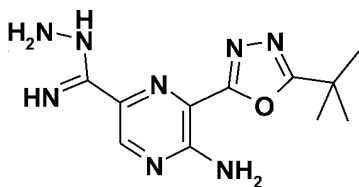
반응은 편리하게는, 예를 들어 2-메틸테트라히드로푸란, 테트라히드로푸란, 1,4-디옥산, 1,2-디메톡시에탄, 벤젠, 톨루엔, 자일렌과 같은 적합한 비활성 용매의 존재하에서, 예를 들어 50°C 내지 60°C 범위, 바람직하게는 -10°C 내지 0°C 범위의 온도에서 수행된다.

[0141]

tert-부톡시카보닐의 탈보호에 적합한 조건은 대략 실온(20-25°C)에서 디클로로메탄과 같은 비활성 용매 내 트리플루오로아세트산과 같은 산성 조건을 포함한다.

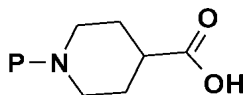
[0142]

화합물 III은 적합한 활성화 시약의 존재하에서, 바람직하게는 적합한 염기의 존재하에서, 화학식 IV의 화합물과 화학식 V의 화합물의 커플링 반응 후 약산성 조건하에서 고리화 반응으로부터 수득할 수 있다.



IV

[0143]



V

[0144]

[0145]

커플링 반응은 적합한 커플링제, 예를 들어, 0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트 또는 TBTU (2-(1H-벤조[d][1,2,3]트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸이소우로늄 테트라플루오로보레이트)의 존재 하에서 수행될 수 있다.

[0146]

커플링 반응은 편리하게는 적합한 염기 존재하에서 수행된다. 적합한 염기는, 예를 들어, 유기 아민 염기, 예를 들어, 피리딘, 2,6-루티딘, 콜리딘, 4-디메틸아미노피리딘, 트리에틸아민, N-메틸모르폴린, 디아자비스클로[5.4.0]운데크-7-엔, 디이소프로필에틸 아민, 또는, 예를 들어, 알칼리 또는 알칼리 토금속 탄산염 또는 수산화물, 예를 들어 탄산나트륨, 탄산칼륨, 탄산칼슘, 수산화나트륨 또는 수산화칼륨; 바람직하게는 N-에틸-N,N-디이소프로필아민이다.

[0147]

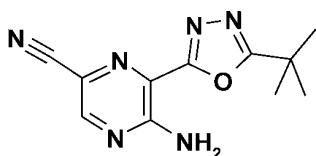
커플링 반응은 편리하게는 적합한 비활성 용매, 예를 들어, N,N-디메틸아세트아미드, N,N-디메틸포름아미드, N-메틸피롤리돈, 테트라히드로푸란, 1,4-디옥산, 1,2-디메톡시에탄, 벤젠, 톨루엔, 자일렌, 메탄올, 에탄올, 할로젠화 용매, 예를 들어 디클로로메탄, 클로로포름 또는 사염화탄소의 존재하에서 예를 들어 -50℃ 내지 100℃ 범위, 바람직하게는 0℃ 내지 30℃ 범위의 온도에서 수행된다.

[0148]

고리화 조건은 약산성, 통상 아세트산 존재하에서 수행된다. 반응은 편리하게는 적합한 비활성 용매, 예를 들어, N,N-디메틸아세트아미드, N,N-디메틸포름아미드, N-메틸피롤리돈, 테트라히드로푸란, 1,4-디옥산, 1,2-디메톡시에탄, 벤젠, 톨루엔, 자일렌의 존재하에서 예를 들어 50℃ 내지 150℃ 범위, 바람직하게는 80℃ 내지 100℃ 범위의 온도에서 수행된다.

[0149]

화합물 IV는 히드라진과 화학식 VI의 화합물의 반응으로부터 취득할 수 있다.



VI

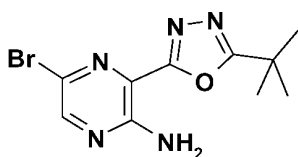
[0150]

[0151]

상기 반응은 편리하게는 적합한 비활성 용매, 예를 들어 테트라히드로푸란, 1,4-디옥산, 1,2-디메톡시에탄, 벤젠, 톨루엔, 자일렌 또는 알코올, 예를 들어 에탄올 또는 이소프로판올의 존재하에서 예를 들어 20℃ 내지 70℃ 범위의 온도, 바람직하게는 대략 50℃에서 수행된다.

[0152]

화합물 VI는 이시아노화 아연(II)과 같은 시안화물의 공급원과 화학식 VII의 화합물의 금속 촉매된 반응으로부터 취득할 수 있다.



VII

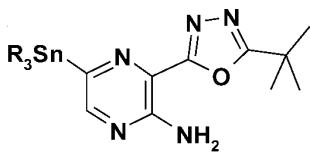
[0153]

[0154] 반응에 적합한 촉매는, 예를 들어 금속 촉매, 예를 들어 팔라듐(0), 예를 들어 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0); 또는 팔라듐(II) 염, 예를 들어 아세트산팔라듐(II), 염화팔라듐(II), 브롬화팔라듐(II), 비스(트리페닐포스핀)팔라듐(II) 클로라이드, [1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센]디클로로팔라듐(II), 또는 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐, 및 포스핀 리간드, 예를 들어, 디시클로헥실(2',4',6'-트리소프로필비페닐-2-일)포스핀으로부터 제자리 형성되는 촉매를 포함한다. 반응은 편리하게는 적합한 용매, 예를 들어, *N,N*-디메틸아세트아미드, *N,N*-디메틸포름아미드, 테트라히드로푸란, 1,4-디옥산, 1,2-디메톡시에탄, 벤젠, 톨루엔 또는 자일렌 내에서, 예를 들어 20°C 내지 150°C 범위, 바람직하게는 60°C 내지 120°C 범위의 온도에서 수행된다. 또한, 반응은 편리하게는 아연과 같은 추가의 금속의 존재하에서 수행된다.

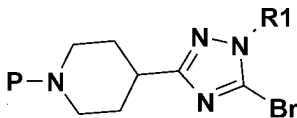
[0155] 상기 유형의 적합한 반응은 문헌('Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions', Second Edition, Edited by Armin Meijere, Francois Diederich, Wiley-VCH, 2004)에 기재되어 있다.

[0156] 화합물 VII의 합성은 실시예 1 및 2에 기재되어 있다.

[0157] 별법으로, 화학식 II의 화합물은 R이 소분자 알킬인 화합물 VIII과 P가 tert-부톡시카보닐과 같은 보호기인 화합물 IX의 금속 촉매 반응에 의해 수득할 수 있다.



VIII



IX

[0159] 반응의 적합한 촉매는, 예를 들어 금속 촉매, 예를 들어 팔라듐(0), 예를 들어 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0); 또는 팔라듐(II) 염, 예를 들어 아세트산팔라듐(II), 염화팔라듐(II), 브롬화팔라듐(II), 비스(트리페닐포스핀)팔라듐(II) 클로라이드, [1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센]디클로로팔라듐(II), 또는 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐, 및 포스핀 리간드, 예를 들어, 디시클로헥실(2',4',6'-트리소프로필비페닐-2-일)포스핀으로부터 제자리 형성되는 촉매를 포함한다.

[0161] 반응은 편리하게는 적합한 용매, 예를 들어, *N,N*-디메틸아세트아미드, *N,N*-디메틸포름아미드, 테트라히드로푸란, 1,4-디옥산, 1,2-디메톡시에탄, 벤젠, 톨루엔 또는 자일렌 또는 알콜, 예를 들어 4-메틸-2-펜타놀 내에서, 예를 들어 50°C 내지 180°C 범위, 바람직하게는 120°C 내지 150°C 범위의 온도에서 수행된다.

[0162] 또한, 반응은 편리하게는 염화리튬과 같은 추가의 염의 존재하에서 수행된다.

[0163] 상기 유형의 적합한 반응은 문헌('Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions', Second Edition, Edited by Armin Meijere, Francois Diederich, Wiley-VCH, 2004)에 기재되어 있다.

[0164] 화학식 VIII의 화합물은 적합한 헥사-알킬 디스타난과 화합물 VII의 금속 촉매 반응으로부터 수득할 수 있다. 반응의 적합한 촉매는, 예를 들어 금속 촉매, 예를 들어 팔라듐(0), 예를 들어 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0); 또는 팔라듐(II) 염, 예를 들어 아세트산팔라듐(II), 염화팔라듐(II), 브롬화팔라듐(II), 비스(트리페닐포스핀)팔라듐(II) 클로라이드, [1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센]디클로로팔라듐(II), 또는 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐, 및 포스핀 리간드, 예를 들어, 디시클로헥실(2',4',6'-트리소프로필비페닐-2-일)포스핀으로부터 제자리 형성되는 촉매를 포함한다.

[0165] 반응은 편리하게는 적합한 용매, 예를 들어, *N,N*-디메틸아세트아미드, *N,N*-디메틸포름아미드, 테트라히드로푸란, 1,4-디옥산, 1,2-디메톡시에탄, 벤젠, 톨루엔 또는 자일렌 또는 알콜, 예를 들어 4-메틸-2-펜타놀 내에서, 예를 들어 50°C 내지 100°C 범위, 바람직하게는 70°C 내지 80°C 범위의 온

도에서 수행된다.

- [0166] 화학식 IX의 화합물은 실시예 1(R<sup>1</sup>= Me이고 P= tert-부톡시카보닐)에 예시된 바와 같이 몇 단계를 거쳐 시판되는 물질로부터 수득할 수 있다.
- [0167] 상기에 기재된 변형 방법 내에서 단계의 기타 순서의 변경이 가능한 것으로 이해해야 한다.
- [0168] 상기에서 기재된 임의의 방법에 의해서 수득한 임의의 화학식 (I)의 화합물은 필요한 경우 화학식 (I)의 또 다른 화합물로 전환될 수 있다.
- [0169] 화학식 (I)의 화합물의 약학적으로 허용되는 염은, 예를 들어 산부가 염이 필요한 경우, 예를 들어, 적합한 산과 상기 화합물의 반응에 의해 수득할 수 있다.
- [0170] 화학식 (I)의 화합물의 약학적으로 허용되는 전구 약물이 필요한 경우, 통상의 방법을 이용하여 수득할 수 있다. 예를 들어, 화학식 (I)의 화합물의 생체 내 절단 가능한 에스테르는, 예를 들어 약학적으로 허용되는 카복실산과 히드록시기를 포함하는 화학식 (I)의 화합물의 반응에 의해 수득할 수 있다. 전구 약물에 대한 추가 정보는 상기에 제공되어 있다.
- [0171] 또한, 상기에 언급된 일부 반응에서, 화합물 내 임의의 민감성을 보호하는 것이 필수적이거나 바람직하다는 것을 이해할 것이다. 보호가 필수적이거나 바람직한 경우 및 적합한 보호 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 통상의 보호기는 표준 관행(예시로서 문헌(T.W. Green, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, 1991) 참조)에 따라 사용될 수 있다. 따라서, 반응물질이 예를 들어 아미노, 카복시 또는 히드록시와 같은 기를 포함하는 경우, 본원에 언급된 일부 반응에서 기를 보호하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0172] 아미노 또는 알킬아미노기에 적합한 보호기는, 예를 들어, 아실기, 예를 들어 아세틸과 같은 알카노일기, 알콕시카보닐기, 예를 들어 메톡시카보닐, 에톡시카보닐 또는 *t*-부톡시카보닐기, 아릴메톡시카보닐기, 예를 들어 벤질옥시카보닐, 또는 아릴기, 예를 들어 벤조일이다. 상기 보호기를 위한 탈보호 조건은 반드시 선택한 보호기에 따라 달라진다. 따라서, 예를 들어, 알카노일 또는 알콕시카보닐기와 같은 아실기 또는 아로일기는 적합한 염기, 예를 들어 알칼리 금속 수산화물, 예를 들어 수산화리튬 또는 수산화나트륨으로 가수분해에 의해 제거될 수 있다. 별법으로, *t*-부톡시카보닐기와 같은 아실기는, 예를 들어, 적합한 산, 예를 들어 염산, 황산, 인산 또는 트리플루오로아세트산으로 처리하여 제거될 수 있고, 벤질옥시카보닐기와 같은 아릴메톡시카보닐기는 예를 들어 탄소 상 팔라듐(palladium-on-carbon)과 같은 촉매로 수소첨가에 의해, 또는 루이스산 예를 들어 붕소 트리드(트리플루오로아세테이트)의 처리에 의해 제거될 수 있다. 1차 아미노기에 적합한 대체가능 보호기는 예를 들어, 프탈로일기이며, 이것은 알킬아민, 예를 들어 디메틸아미노프로필아민으로, 또는 히드라진으로 처리하여 제거될 수 있다.
- [0173] 히드록시기에 적합한 보호기는, 예를 들어, 아실기, 예를 들어 아세틸과 같은 알카노일기, 아로일기, 예를 들어 벤조일, 또는 아릴메틸기, 예를 들어 벤질이다. 상기 보호기에 대한 탈보호 조건은 반드시 선택한 보호기에 따라 달라질 것이다. 따라서, 예를 들어, 알카노일과 같은 아실기 또는 아로일기는 적합한 염기, 예를 들어 알칼리 금속 수산화물, 예를 들어 수산화리튬 또는 수산화나트륨으로 가수분해에 의해 제거될 수 있다. 별법으로, 벤질기와 같은 아릴메틸기는 예를 들어 탄소 상 팔라듐과 같은 촉매로 수소첨가에 의해 제거될 수 있다.
- [0174] 카복시기에 적합한 보호기는, 예를 들어, 에스테르화기, 예를 들어 수산화나트륨과 같은 염기로 가수분해에 의해 제거될 수 있는, 예를 들어 메틸 또는 에틸기이며, 또는 예를 들어 산, 예를 들어 트리플루오로아세트산과 같은 유기산으로 처리하여 제거될 수 있는, 예를 들어 *t*-부틸기, 또는 예를 들어 탄소 상 팔라듐과 같은 촉매로 수소 첨가에 의해 제거될 수 있는, 예를 들어 벤질기이다.
- [0175] 보호기는 화학 분야에 잘 알려진 통상의 기술을 이용하여 합성 시 임의의 편리한 단계에서 제거될 수 있다.
- [0176] 본원에 정의된 중간물질(예를 들어, 화학식 II, III, IV, VI, VII, VIII의 화합물)은 신규의 것이며 이들은 본 발명의 추가의 특징으로서 제공된다.
- [0177] 생물학적 분석법
- [0178] 다음 분석법을 이용하여 본 발명의 화합물의 다음으로서의 효과를 측정하여; a) 생화학 분석법에서 PI3-키나아제 효소 억제제, b) 생화학 분석법에서 다른 키나아제의 억제제, c) BT474 세포 내 포스포 AKT(Thr308)의 시험관 내 억제제, d) MDA-MB-468 세포에서 포스포 AKT(Ser473)의 시험관 내 억제제, e) JEKO 세포에서 포스포 AKT(Ser473)의 시험관 내 억제제, f) HT29 세포에서 포스포 Chk1(Ser345)의 시험관 내 억제제, g) 일련의 중앙

세포주에 대한 세포 증식 억제제, h & i) 인간 유방 선암종 세포주 MCF7로 이식된 SCID 마우스에서 각각 포스포 AKT(Ser473)의 생체 내 억제제 또는 종양 성장의 생체 내 억제제.

- [0179] 분석 프로토콜에 사용된 약어:
- [0180] PIP2: PI(4,5)P2, 포스파티딜 이노시톨 4,5-비스포스페이트
- [0181] s.c.: 피하로
- [0182] ATP: 아데노신 트리포스페이트
- [0183] DMSO: 디메틸 설펍사이드
- [0184] TRIS: 트리스(*히드록시메틸*)아미노메탄
- [0185] CHAPS: 3-[(3-콜라미도프로필)디메틸암모니오]-1-프로판설포네이트
- [0186] DTT: 디티오프레이트
- [0187] FBS: 태아 소 혈청
- [0188] DMEM: 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- [0189] EDTA: 에틸렌디아민테트라아세트산
- [0190] EGTA: 에틸렌 글리콜 테트라아세트산
- [0191] BSA: 소 혈청 알부민
- [0192] PBS: 인산 완충 생리 식염수
- [0193] HRP: 겨자무과 산화효소(Horseradish peroxidase)
- [0194] RPMI: 로즈웰 파크 메모리얼 인스티튜트(Roswell Park Memorial Institute) 1640 배지
- [0195] 4NQO: 4-니트로퀴놀린 N-옥시드
- [0196] EMEM: 이글즈 최소 필수 배지(Eagle's Minimal Essential medium)
- [0197] CO<sub>2</sub>: 이산화탄소
- [0198] PBST: 인산 완충 생리 식염수/트윈(Tween)
- [0199] Ab: 항체
- [0200] MTS 시약: [3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카복시메톡시페닐)-2-(4-설포페닐)-2H-테트라졸리움, 분자내염; MTS] 및 전자 커플링 시약(페나진 메토설펍사이드) PMS.
- [0201] (a) 시험관 내 효소 억제 분석법
- [0202] PI3K- $\beta$ , PI3K- $\alpha$ , PI3K- $\gamma$  및 PI3K- $\delta$ 의 억제는 인간 재조합 효소를 이용하는 키나아제 Glo 기재 효소 활성 분석법으로 평가하였다. 분석 플랫폼은 효소, PIP2 기질, ATP 및 화합물과 인큐베이션한 후 ATP 고갈을 간접적으로 측정하였다.
- [0203] 효소 반응을 완료한 후에, 잔여 ATP를 2차 효소 반응에 사용하여, 루시페라제가 빛을 방출하면서 딱정벌레 루시페린을 옥시루시페린으로 전환하였다. 완료된 키나아제 반응에서, 측정된 발광도와 잔여 ATP 사이에 직접적인 연관성이 존재하였다. 따라서, 발광은 키나아제 활성과 반비례 관계에 있다. 통상적으로, 12가지 상이한 화합물 농도를 시험하여, PI3K- $\beta$ , PI3K- $\alpha$ , PI3K- $\gamma$  및 PI3K- $\delta$ 의 억제로부터 원자료를 억제제 농도에 대해 그래프로 나타내었다.
- [0204] 구체적인 방법:
- [0205] 100% DMSO 내 화합물을 수동으로 분액하여 분석 플레이트에 첨가하였다. PI3K 효소를 트리스 완충액(50mM 트리스 pH7.4, 0.05% CHAPS, 2.1mM DTT, 및 10mM 염화마그네슘)에 첨가하고 화합물과 20분간 미리 인큐베이션한 후 PIP2 및 ATP 함유 기질 용액을 첨가하였다. 80분 후에 루시페린 및 루시페라제 함유 키나아제 Glo 검출용액을 첨가하여 효소 반응을 정지하였다(Kinase Glo(R) Plus Luminescent Kinase Assay kit(Promega #V3772)). 플레이

트를 실온에 30분간 방치한 후 표준 발광 필터 블록이 구비된 페라스타 인스트루먼트(Pherastar Instrument)에서 판독하였다. 분석에서 DMSO, ATP 및 PIP2의 최종 농도는 각각 1%, 8 μM, 및 80 μM이었다.

[0206] 자료 분석

[0207] IC<sub>50</sub> 값은 비선형 회귀 적합도에 맞추어진 로그 곡선을 이용하여 계산하였다. IC<sub>50</sub> 값은 효소 활성을 50% 억제한 시험 화합물의 농도였다.

[0208] (b) PI3키나아제 1형 효소보다 우수한 키나아제 선택성의 평가

[0209] 대규모 패널의 키나아제 분석은 다양한 판매사, 예를 들어 밀리포어(Millipore), 인비트로젠(Invitrogen) 및 프로키나제(ProKinase)에 의해 제공된다. 이 같은 패널은 주어진 화합물의 전체 키나아제 선택성의 평가를 가능하게 한다. 정확한 방법/기술은 판매사에 따라 달라질 것이다.

[0210] 본원에서 기재된 일부 화합물의 선택성 자료를 MRC(Division of Signal Transduction Therapy(DSTT), MRC Protein Phosphorylation Unit, Dundee, UK)에서 실행되는 효소 분석법을 이용하여 얻었다. 단백질 키나아제 분석은 방사화학 포맷을 이용하여 수행하였다. 멀티드롭(multidrop) 384 웰 플레이트에 총 분석 부피 25.5 μl로 실온에서 분석을 실시하였다. 화합물을 효소 및 펩티드/단백질 기질 존재하에서 5분간 미리 인큐베이션한 후 10 μl ATP(5, 20 또는 50 μM의 각 키나아제를 위해 선택된 최종 농도)를 첨가하여 반응을 개시하였다. 실온에서 분석을 진행하고, 5 μl 오르토인산을 첨가하여 종결하였다. 이어서, 분석 플레이트 내용물을 팩커드 하베스터(Packard Harvester)에 의해 왓만-P81-유니필터(Whatman-P81-Unifilter) 플레이트 상에 회수하고 공기 건조하였다. 이어서 건조된 유니필터 플레이트를 마이크로신티 0(MicroScint 0)를 첨가하여 밀봉하고 팩커드 톱카운트 NXT(Packard Topcount NXT) 신티레이션 계수기로 계수하였다. 본 프로토콜은 패널 내 대부분의 키나아제에 적합한 일반적인 포맷을 캡처하지만, 당업자에게 익숙할 것과 같이, 소수의 키나아제에 변형된 프로토콜이 필요하였다.

[0211] ~18가지 지질 키나아제를 위한 지질 키나아제 분석은 DSTT 에서 실시하였다. 모든 지질 키나아제 분석은 384 웰 플레이트 내 실온에서 전체 분석 부피 40 μl로 수행하였다. 분석은 ADP-GLO 분석법(Promega, #V9101)에 제공된 프로토콜에 따라 수행하였다. 본 프로토콜은 패널 내 대부분의 키나아제에 적합한 일반적인 포맷을 캡처하지만, 당업자에게 익숙할 것과 같이, 소수의 키나아제를 위해 변형된 프로토콜이 필요하였다.

[0212] 또한, 키나아제 선택성은 디스커버X(DiscoverX)를 통해 이용가능한 키놈스캔(KINOMEscan™) 스크리닝 플랫폼을 이용하여 평가하였다. 이것은 시험 화합물 및 450가지 초과인 인간 키나아제 및 돌연변이체 해당 질환 사이의 상호작용을 정량적으로 측정하는 활성 부위 지정 경쟁 결합 분석법을 이용한다. 키놈스캔™ 분석법은 ATP를 필요로 하지 않으므로써 ATP 농도에 의존할 수 있는 IC<sub>50</sub> 값과는 반대로 정확한 열역학적 상호작용 친화도를 알려준다. 방법론은 키나아제 활성 부위에 결합하고, 고정된 리간드에 대한 키나아제 결합을 직접적으로(입체적으로) 또는 간접적으로(알로스테릭하게) 방해함으로써 고상 지지체에 캡처된 키나아제 양을 감소시키는 화합물에 기초한다. 반대로, 키나아제에 결합하지 못하는 시험 분자는 고상 지지체에 캡처된 키나아제 양에 영향을 주지 못한다. "히트"의 스크리닝은 해리된 DNA 표지를 검출하는 정량 qPCR 방법을 이용하여 시험 시료 vs 대조군 시료 내 캡처된 키나아제 양을 측정함으로써 확인된다. 유사한 방법으로, 시험 화합물-키나아제 상호작용의 해리 상수(Kd)는 시험 화합물 농도의 함수로서 고상 지지체에 캡처된 키나아제 양을 측정함으로써 계산된다.

[0213] (c) BT474 세포 내 인산화된 AKT(Tyr308)를 측정하는 분석 프로토콜

[0214] 본 분석법은 세포 내에서 PI3K-α 억제를 측정하는데 사용하였다. BT474 세포(인간 유관암종 ATCC HTB-20)을 블랙 384 웰 플레이트(Costar, #3712)에 10% FBS 및 1% 글루타민 함유 DMEM 내 5600 세포 /웰의 밀도로 접종하고 밤새 유착하도록 두었다.

[0215] 다음날 아침 100% DMSO 내 화합물을 분석 플레이트에 수동으로 분액하여 첨가하였다. 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 2시간 인큐베이션 후, 배지를 흡인하고 세포를 25mM 트리스, 3mM EDTA, 3mM EGTA, 50mM 플루오르화나트륨, 2mM 오르토바나듐산나트륨, 0.27M 수크로스, 10mM β-글리세로포스페이트, 5mM 피로인산나트륨, 0.5% 트리톤 X-100 및 완전 프로테아제 억제제 카테일 정제(Roche #04 693 116 001, 50ml 용해 완충액 당 1 정 사용)을 함유하는 완충액으로 용해하였다.

[0216] 20분 후, 세포 용해액을 PBS 완충액 내 항 AKT-전향체로 미리 코팅된 ELISA 플레이트(Greiner # 781077)에 옮기고 비특이적 결합을 0.05% 트윈(Tween)20 함유 PBS 중 1% BSA로 차단하였다. 플레이트를 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날 플레이트를 0.05% 트윈 20 함유 PBS 완충액으로 세척하고 마우스 단클론 항-포스포 AKT

T308과 2시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. 플레이트를 상기와 같이 다시 세척하고 말 항-마우스-HRP 접합된 2차 항체를 첨가하였다. 실온에서 2시간 인큐베이션한 후, 플레이트를 세척하고 퀀타블루(QuantaBlu) 기질 작용액(working solution)(Thermo Scientific #15169, 판매사의 지시에 따라 제조됨)을 각 웰에 첨가하였다. 60분 후에 스톱(Stop) 용액을 웰에 첨가하여 현상된 형광 산물을 정지시켰다. 테칸 사파이어(Tecan Safire) 플레이트 판독기에서 325nm 여기 파장 및 420nm 방출 파장을 각각 사용하여 플레이트를 판독하였다. 명시된 부분을 제외하고는, 셀 시그널링(Cell Signalling)(#7144)의 패스 스캔 포스포 AKT(Thr308) 샌드위치 ELISA 키트(Path Scan phospho AKT(Thr308) sandwich ELISA kit)에 포함된 시약을 ELISA 분석에 사용하였다.

- [0217] (d) PI3키나아제-베타 억제제의 척도로서 MDA-MB-468 세포에서 포스포 AKT(Ser473)의 검출 프로토콜
- [0218] 본 분석법은 세포 내 PI3K-β 억제를 측정하는데 사용하였으며, 상기 분석법(c)와 함께 세포 내 알파 vs 베타 선택성을 결정하는데 사용하였다. MDA-MB-468 세포(인간 유방 선암종 #ATCC HTB 132)를 10% FBS 및 1% 글루타민 함유 DMEM 40μl 중 1500 세포/웰로 그라이너(Greiner) 384 웰 블랙 편평 바닥 플레이트에 접종하였다. 세포 플레이트를 37°C 배양기에서 18시간 동안 인큐베이션한 후 100 % DMSO 내 화합물을 수동 분배를 이용하여 투여하였다.
- [0219] 화합물을 12개 농도 범위로 임의의 플레이트 지도에 투여하였다. 100 % DMSO(최대 신호)를 투여하거나 pAKT 신호(최소 대조군)를 완전히 제거하는 기준 화합물(PI3K-β 억제제)을 첨가하여 대조군 웰을 생성하였다. 플레이트를 37°C에서 2시간 동안 인큐베이션한 후, 10μl의 3.7% 포르말데히드 용액을 첨가하여 세포를 고정하였다. 30분 후에 테칸 PW384 플레이트 세척기를 이용하여 PBS로 플레이트를 세척하였다. 0.5% 트윈20 및 1% 마벨(Marvel™)(건조 우유 분말)을 함유하는 PBS 40μl를 첨가하여 웰을 차단하고 세포를 투과성으로 만들고, 실온에서 60분간 인큐베이션하였다. 플레이트를 0.5%(v/v) 트윈20 함유 PBS로 세척하고 동일한 PBS-트윈 + 1% 마벨 내 토끼 항-포스포 AKT Ser473(Cell Signalling Technologies, #3787) 20μl를 첨가하고 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다.
- [0220] 플레이트를 테칸 PW384를 이용하여 PBS + 0.05% 트윈20으로 3회 세척하였다. 1% 마벨 함유 PBS + 0.05% 트윈20에 희석된 2차 항체 알렉사 플루오르 488(Alexa Fluor 488) 항-토끼(Molecular Probes, #A11008) 20μl를 각 웰에 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 3회 세척한 후 각 웰에 20μl PBS를 첨가하고 블랙 플레이트 실러로 봉합하였다.
- [0221] 플레이트를 가능한 488nm 레이저로 여기 후 녹색 형광을 측정하는 아큐먼(Acumen) 플레이트 판독기에서 판독하였다. 상기 시스템을 이용하여, IC<sub>50</sub> 값을 얻고 플레이트의 상태를 대조군 웰에 의해 측정하였다. 분석 성능을 모니터링하기 위해 매년 기준 화합물을 측정하였다.
- [0222] (e) Jeko 세포에서 포스포 AKT(ser473)의 검출 프로토콜
- [0223] 본 분석법은 세포 내 PI3K-δ 억제를 측정하는데 사용하였다. 10μl 1%(v/v) DMSO 중 x10 최종 농도의 화합물을 그라이너 V-바닥형 96 웰 플레이트(Sigma #M9686)의 웰에 첨가하였다. 화합물을 최고 용량 1μM 또는 10μM부터 10개 지점 농도 범위로 투여하여, 8개 화합물을 한 플레이트에 투여하였다. 플레이트당 8개의 최대 신호 대조군 웰을 항-IgM(AffiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment Goat Anti-Human IgM(Stratech, # 109-006-129)) 및 비히클로 투여하고, 8개의 최소 신호 대조군 웰을 항-IgM 및 기준 PI3K-δ 억제제로 투여하였다. 최종 비히클 농도는 0.1% DMSO였다. PI3K-δ 선택성 화합물에 대한 전체 용량 반응 곡선을 각 측정에 포함하였다. Jeko B 세포(인간 외투 세포 림프종, ATCC #CRL-3006)을 화합물을 포함하는 그라이너 96웰 V-바닥형 플레이트에 접종하였다. 세포를 1% 글루타민을 함유하는 RPMI 70μl로 100,000 세포/웰로 접종하였다.
- [0224] 세포 플레이트를 37°C 배양기에서 1시간 동안 화합물과 인큐베이션하였다. 상기 화합물을 미리 인큐베이션 한 후, 상기 기재한 항-IgM을 20μl 분석 완충액(1% 글루타민 함유 RPMI) 중 x5 최종 농도로 플레이트에 첨가하였다. 항-IgM 최종 농도는 0.06 μg/mL 또는 등가의 EC90 용량이었다. 플레이트를 37°C에서 10분간 인큐베이션한 후 플레이트를 즉시 얼음에 넣고 12000rpm에서 4분간 원심분리하였다. 얼음에서, 상층액을 수동 피펫으로 조심스럽게 제거하고 40μl 용해 완충액을 첨가하였다. 플레이트를 얼음에서 5분간 인큐베이션한 후 제조사(Mesoscale Diagnostics, #K11100D-3)의 지시에 따라 포스포(Ser473)/전체 Akt 전세포 용해액 키트로 분석할 때까지 -80°C 보관하였다.
- [0225] (f) HT29 세포에서 포스포 Chk1(Ser 345)의 검출 프로토콜
- [0226] ATR(모세혈관확장 운동실조(Ataxia Telangiectasia) + Rad3-연관 키나아제)는 DNA 손상 또는 복제 차단에 반응

하여 복수 기질의 세린 트레오닌 잔기를 인산화하는 PI3-키나아제-연관 키나아제이다. ATR의 하류 단백질 키나아제, Chk1은 DNA 손상 체크포인트 조절에 중요한 역할을 한다. Chk1의 활성화는 Ser317 및 Ser345의 인산화를 수반한다(Ser345가 ATR에 의한 인산화/활성화의 우선적인 표적으로 생각됨).

[0227] 이것은, 화합물 및 UV 모방제 4NQO(Sigma #N8141) 처리 후, HT29 세포에서Chk1(Ser 345)의 인산화 감소를 측정함으로써, ATR 키나아제의 억제를 측정하는 세포 기체 분석법이다. HT29 세포(ECACC #85061109)를 1% L 글루타민 및 10% FBS 함유 EMEM 배지 40 $\mu$ l 중 6000 세포/웰의 밀도로 384 웰 분석 플레이트(Costar #3712)에 접종하고 유착하도록 밤새 두었다. 다음날 아침 100% DMSO 내 화합물을 수동 분배에 의해 분석 플레이트에 첨가하였다. 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 1시간 인큐베이션 후, 100% DMSO 내 3mM 4NQO 40nl를 완전 무반응(null response) 대조군을 만들기 위해 4NQO로 처리하지 않은 채 둔 최소 대조군 웰을 제외한 모든 웰에 수동 분배에 의해 첨가하였다. 플레이트를 배양기에 다시 넣고 1시간 더 두었다. 이어서, PBS 용액 중 3.7% 포름알데히드 20 $\mu$ l를 첨가하고 실온에서 20분간 인큐베이션하여 세포를 고정하였다. 이어서 PBS 중 0.1% 트리톤 X100 20 $\mu$ l를 첨가하고 실온에서 10분간 인큐베이션하여 세포를 투과성으로 만들었다. 이어서 플레이트를 바이오텍(Biotek) EL405 플레이트 세척기를 이용하여 50 $\mu$ l/웰 PBS로 한번 세척하였다.

[0228] 포스포-Chk1 Ser 345 항체(Cell Signalling Technology #2348)을 0.05% 폴리소르베이트/트윈 함유 PBS 내 150배로 희석하고 15 $\mu$ l를 각 웰에 첨가하고 실온에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음날 아침 플레이트를 바이오텍 EL405 플레이트 세척기를 이용하여 플레이트를 50 $\mu$ l/웰 PBS로 3회 세척한 후, PBST 중에 500배 희석된 알렉사 플루오르 488 염소 항-토끼 IgG(Molecular Probes #A-11008) 및 0.002mg/ml 웨스트(Hoeschst) 염료(Molecular Probes #H-3570)를 함유하는 2차 Ab 용액 20 $\mu$ l를 첨가하였다. 실온에서 2시간 인큐베이션 후, 플레이트를 바이오텍 EL405 플레이트 세척기를 이용하여 50 $\mu$ l/웰 PBS로 3회 세척한 후, 블랙 플레이트 실로 밀봉하여 판독하였다. 플레이트는 10X 대물렌즈가 구비된 XF53 필터를 사용하는 어레이스캔(ArrayScan) VTI 장치를 이용하여 판독하였다. 설치된 두 개의 레이저를 이용하여 웨스트로 핵 염색(405nm) 및 pChk1의 2차 항체 염색(488nm)을 분석하였다.

[0229] *(g) 종양세포주에서 세포 증식 분석(맞춤 의학 가설을 증명하기 위해 사용됨)*

[0230] 화합물의 효과에 대한 일련의 인간 암세포주의 민감도를 표준 증식 분석법으로 측정하였다. 세포주는 아스트라제네카(AstraZeneca) 세포 은행을 통해 얻었다. 또한, 다수의 세포주는 당업자에게 알려진 세포 은행 보관소(Cell Bank Repositories), 예를 들어 ATCC, ECACC, DMSZ, RIKEN, KCLB, JCRB(HSRRB), LBNL, CLS 및 ICLC를 통해 이용 가능하다.

[0231] 세포를 10% FBS 함유 RPMI 배지 중 1000-6000 세포/웰의 밀도로 96 웰 플레이트에 플레이트하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 16시간 인큐베이션 후, 여러 농도의 화합물을 분석 플레이트에 첨가하였다. 추가 72시간 동안 인큐베이션한 후, 생세포를 MTS 시약(Promega #3582)을 각 웰에 2시간 동안 첨가하여 측정하였다. MTS는 전자 커플링 시약의 존재 하에서 대사적으로 활성인 세포에 의해 포르마잔으로 생환원되는 테트라졸리움염이다. 이어서 포르마잔 산물은 상대적인 생세포 수의 지시제로서 흡광도 490nm에 의해 정량하였다. GI50(세포 성장이 50% 억제된 농도)을 측정하기 위하여, 약물 첨가시 존재하는 상대적인 세포 수를 약물 첨가 전 MTS 판독값과 비교하여 결정하였고, 이 값을 분석 중 세포 성장의 척도로서 미처리 세포의 72시간 값에서 빼주었다.

[0232] 하기의 '맞춤 의료/맞춤 의학 실시예'에 기재된 상기 자료의 분석은 PI3K $\alpha$  억제제가 PIK3CA 유전자 돌연변이를 갖는 세포주의 선택적인 성장 억제를 나타내는 지를 밝히기 위해 상기 자료를 분석하는 방법을 예시한다. 이것은 반응 예측 생물지표 판독값이 PIK3CA 유전자 내 돌연변이를 포함하는 종양을 가진 환자를 확인하는데 사용될 수 있는 맞춤 의료(PHC) 또는 맞춤 의학 기회 및 본원에서 기재된 화합물에 반응할 가능성이 더 높은 대상을 예시한다.

[0233] 본원에 기재된 화합물에 대해 반응하는 기타 가능한 지표는 PIK3CA 유전자의 증가된 카피 수, 증폭 또는 전위, 및 PI33-키나아제 경로 활성화 또는 의존성의 척도를 제공하는 기타 유전, 계놈 또는 프로테옴 변화를 포함하거나 이에 제한되지 않는다; 예를 들어 하나 이상의 수용체 티로신 키나아제의 활성화, 또는 PI3-키나아제의 조절 서브유닛(p85)을 코딩하는 PIK3R 유전자에서의 돌연변이 또는 전위, 또는 신호전달 지표, 예를 들어 pAKT, pS6, 또는 FOXO 상태의 인산화를 포함하거나 이에 제한되지 않는다. 또한, 또 다른 유전자 및/또는 이의 단백질 산물의 신호전달의 분석, 예를 들어 Kras의 분석은 맞춤 의학 접근법의 예측성을 향상시키는 것을 도울 것이다.

[0234] *(h) 수컷 SCID 마우스에서 성장된 MCF-7 종양으로부터 포스포 AKT(ser473)의 검출 프로토콜*

[0235] 이것은 동물 모델에서 PI3K- $\alpha$  억제제의 척도를 제공하는 약물동력학 분석법이었다. 수컷 SCID 마우스(AZ(UK), 또



는 찰스 리버(Charles River, UK)로부터 이용가능)을 인간 유방 선암종 세포주 MCF7(ICRF(London), 또는 ATCC # HTB-22로부터 이용가능)로 피하(s.c.) 이식하여 PI3-키나아제 억제제로 AKT 인산화 억제를 측정하였다. 마우스를 세포 이식 24시간 전에 0.5mg의 21-일 에스트로겐 펠렛(Innovative Research of America, #E121)으로 이식하였다. 50% 매트릭셀(BD Bioscience) 중  $5 \times 10^6$  세포를 동물의 왼쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 동물을 8개의 대조군 및 4개의 처리군으로 임의로 나누고 종양 부피가  $400\text{mm}^3$ 에 도달하면 다음날 투여를 시작하였다. 선택한 시점에 종양을 얻고, PK 측정을 위해 혈액 시료를 채취하였다.

[0236]

마우스로부터 절제된 종양을 패스트 프랩(Fast Prep) 튜브(용해 매트릭스 A를 포함하는 2mL 리지형(ridged) 튜브(MP Biomedicals #6910-500)에 넣고 즉시 동결(snap frozen)하였다. 1mL 용해 완충액(25mM Tris, 3mM EDTA, 3mM EGTA, 50mM 플루오르화나트륨, 2mM 오르토바나듐산염, 0.27M 수크로스, 10mM 베타-글리세로포스테인, 5mM 피로인산염, 0.5% 트리톤 x-100) 및 포스파타제 억제제(Sigma #P2850 및 Sigma #P5726, 1:100 희석) 및 프로테아제 억제제(Sigma #P8340, 1:200 희석)을 각 튜브에 첨가하였다. 종양을 패스트프랩-TM 장치(MP Biomedicals #116004500)에서 1분간 균질화한 후 얼음에 5분간 두었고, 이어서 2회 추가의 균질화 단계를 거쳤으며, 각 단계 후 얼음에 5분간 인큐베이션하였다. 시료를 냉각 원심분리기에서 13,000 rpm에서 10분간 회전하였다. 이어서, 투명한 용해액을 새 튜브에 옮기고  $10\mu\text{L}$ 를 단백질 측정 분석에 사용하였다.

[0237]

전체 및 인산화된 AKT(ser473)의 검출은 MSD 멀티-스팟 분석 키트(MSD multi-spot assay kit)(Meso Scale Discovery # K15100D-3)를 이용하여 수행하였다. 플레이트의 각 웰은 4 스폿을 포함하였다; 이들 중 둘은 키트에 제공된 마우스 단클론 항체로 코팅하였다; 하나는 전체 AKT를 캡처하는 항체로 코팅하였고 하나는 인산화된 AKT(ser473)에 대한 항체로 코팅하였다. 플레이트를 냉각실의 진동기에서 웰당  $150\mu\text{L}$ 의 차단액으로 밤새 차단하였다. 차단액은 세척액의 1x 용액 20mL 및 키트에 제공된 600mg 블로커(Blocker) A를 이용하여 제조하였다. 플레이트를 웰당 세척액 0.3mL로 3회 세척하였다. 용해액 분액을 각 종양으로부터 취해 용해 완충액으로 2mg/mL 농도로 희석한 후, 희석된 용해액  $25\mu\text{L}$ 를 웰당 총량이  $50\mu\text{g}$ 이 되도록 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 진동기에 둔 후 3회 세척하였다. 차단 및 세척액에 50x 설폰-태그(SULFO-TAG-TM) 항-AKT 전항체를 50배 희석되게 더한 혼합물을 이용하여 검출 항체 용액을 준비하였다. 플레이트를 실온에서 1시간 동안 진동기에 둔 후 3회 세척하였다. 키트에 제공된 판독 완충액  $150\mu\text{L}$ 를 탈이온수로 1:4 희석하고 각 웰에 첨가한 후 MSD 플레이트 분석기에서 플레이트를 판독하였다. 판독 완충액은 전기 화학적 발광을 위한 정확한 환경을 제공하여, 플레이트 판독기가 플레이트에 전압을 적용할 때, 플레이트 바닥 위의 전극이 검출 항체에 결합된 표지자 빛을 방출하도록 한다. 방출된 광도는 존재하는 전체 또는 인산화된 AKT의 정량적인 측정값이다. 전체 AKT에 대한 인산화된 AKT의 비율을 계산하기 위하여, 메조-스케일(Meso Scale)이 제안하는 바와 같이 계산을 적용하였다: 2배 인산화된 신호를 전체 + 인산화 신호로 나눈 후 100을 곱해 %포스포단백질을 얻었다. 값을 Log 10으로 전환한 후, 상기 값을 이용하여 각 군의 기하평균(Geomean) + 표준 에러를 계산하였다. 이어서, 유의성 검사를 위해 양쪽 꼬리 공식 및 불균등 분산을 이용하여 스튜던트 T 검정을 적용하였다. 연구는 처리군 당 4마리와 8마리 동물의 대조군 군은 연구를 검정하기에 충분하다는 것을 보였다.

[0238]

(b) SCID 마우스에 이식된 인간 유방 선암종 세포주 MCF7에서 종양 성장 억제의 검출 프로토콜

[0239]

본 방법은 PI3K- $\alpha$  의존성 모델에서 PI3-키나아제 억제제의 생체 내 항종양 효능을 평가 방법을 제공한다. 상기에 나타낸 PD 연구를 위해, 수컷 SCID 마우스를 인간 유방 선암종 세포주 MCF7로 s.c. 이식하였다. 마우스를 세포 이식 24시간 전에 0.5mg의 21-일 에스트로겐 펠렛으로 이식하였다. 50% 매트릭셀 중  $5 \times 10^6$  세포를 동물의 왼쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 동물을 10-15개 군으로 임의로 나누고 종양 부피가  $\sim 200\text{-}300\text{mm}^3$ 에 도달하면 치료를 시작하였다. 동물을 원하는 경로를 통해 투여하기 적합하고 복지 요건(경구 투여용 현탁액은 pH 범위 4-7, ip/iv 투여용 용액 pH 범위 5.5-7.0)에 적합한 비히클 내 화합물로 정해진 투여량으로 2-4주 동안, 경구, 정맥 내 또는 복강 내 경로로 투여하였다. 종양은 통상 주 2회 캘리퍼로 측정하였고 종양 부피는 타원형 공식( $\pi/6 \times \text{너비} \times \text{너비} \times \text{길이}$ )를 이용하여 계산하였다.

[0240]

화학식 (I)의 화합물의 약리 특성은 예상되는 바와 같이 구조적 변화에 따라 달라지지만, 일반적으로 화학식 (I)의 화합물이 가지는 활성은 하나 이상의 상기 시험 (a) 및 (c)에서 다음 농도 또는 투여량으로 증명될 것이다:

[0241]

시험 (a):- 예를 들어, 1nM - 100 nM 범위에서  $IC_{50}$  vs PI3K- $\alpha$ ;

[0242]

시험 (c):- 예를 들어, 10nM -  $1\mu\text{M}$  범위에서 BT474 세포 내  $IC_{50}$  vs 세포 포스포 AKT(Tyr308);

[0243] 편리하게는, 본 발명의 특정 화합물은 하나 이상의 상기 시험 (a) 및 (c)에서 다음 농도 또는 투여량에서 활성을 갖는다:

[0244] 시험 (a):- 예를 들어, 1nM - 100 nM 범위에서 IC<sub>50</sub> vs PI3K- α ;

[0245] 시험 (c):- 예를 들어, 10nM - 1 μM 범위에서 BT474 세포 내 IC<sub>50</sub> vs 세포 포스포 AKT(Tyr308);

[0246] 편리하게는, 본 발명의 특정 화합물은 하나 이상의 상기 시험 (a),(c),(h) 및 (i)에서 다음 농도 또는 투여량에서 활성을 갖는다:-

[0247] 시험 (a):- 예를 들어, 1nM - 100 nM 범위에서 IC<sub>50</sub> vs PI3K- α ;

[0248] 시험 (c):- 예를 들어, 10nM - 1 μM 범위에서 BT474 세포 내 IC<sub>50</sub> vs 세포 포스포 AKT(Tyr308);

[0249] 시험 (h):- 예를 들어, 1-200 mg/kg/일 범위에서 생체 내 포스포 AKT(ser473)의 >50% 억제;

[0250] 시험 (i):- 예를 들어, 1-200 mg/kg/일 범위에서 이중이식편 활성.

[0251] 하기 자료를 실시예에서 얻었다:

[0252] [표 A]

실시예 번호	PI3K- α 억제 IC <sub>50</sub> (μM)*	PI3K- δ 억제 IC <sub>50</sub> (μM)*	PI3K- β 억제 IC <sub>50</sub> (μM)*	PI3K- α 세포 IC <sub>50</sub> (μM)**	ATR 세포 IC <sub>50</sub> (μM)#
1	0.023	<0.014	2.24	0.36	>30
3	0.007	<0.010	0.57	0.09	>30
4	0.025	<0.012	2.91	0.31	>30
5	0.030	0.012	3.31	0.27	>30
6	0.032	<0.012	3.42	0.53	>30
7	0.037	0.014	6.26	0.42	>30
8	0.024	0.012	1.52	0.59	>30
9	<0.010	<0.010	0.640	0.33	-
10	-	-	-	0.085	-
11	-	-	-	0.11	-

\* 시험 프로토콜 a: 상기는 시험을 여러 번 반복하여 계산된 평균값이다.

\*\* 시험 프로토콜 c: 상기는 시험을 여러 번 반복하여 계산된 평균값이다.

[0253] # 시험 프로토콜 f: 1 회 반복 시험만 수행하였다.

[0254] 조합 연구

[0255] 재료 및 방법

[0256] MCF7은 PIK3CA 유전자(E545K)에 돌연변이를 포함하는 에스트로겐 수용체 양성 유방 종양세포주이다. 수컷 SCID 마우스(AZ UK)를 인간 유방 선암종 세포주 MCF7(ICRF London)로 피하(s.c.) 이식하여 PI3 키나아제 억제제의 항종양 활성을 측정하였다. 마우스를 세포 이식 24시간 전에 0.5mg의 21일 에스트로겐 펠릿(Innovative Research of America)으로 이식하였다. 50% 매트릭셀(BD Bioscience) 중 5X 10<sup>6</sup> 세포를 동물의 왼쪽 옆구리에 피하주사하였다.

[0257] BT474는 Her2 발현이 상승된 에스트로겐 수용체 양성 유방 종양세포주이며 PIK3CA 유전자(K111N)에 돌연변이를 포함한다. 암컷 스위스(Swiss) 흥선제거 누드 마우스(swiss nu/nu - AZUK)을 마우스에서 계대된 인간 유관상피암종 세포주 BT474c(AZ에서 BT474 - ATCC HTB-20로부터 유도됨) 종양으로 피하 이식하였다. 마우스를 세포 이식

24시간 전에 0.36mg의 60일 에스트로겐 펠렛(Innovative Research of America)을 이식하였다. 50% 매트릭셀(BD Bioscience) 중 5X 10<sup>6</sup> 세포를 동물 왼쪽 옆구리에 s.c. 주사하였다.

[0258] HCC70은 PTEN 유전자 발현이 결핍된 유방 종양 세포주이다. 암컷 스위스 흥선제거 누드 마우스(swiss nu/nu - AZUK)를 유관 상피 종양세포주 HCC70(ATCC - CRL2315) 세포로 피하이식하였다. 50% 매트릭셀(BD Bioscience) 중 1X 10<sup>6</sup> 세포를 동물 왼쪽 옆구리에 s.c. 주사하였다.

[0259] 종양이 ~200-300mm<sup>3</sup> 부피에 도달하면 동물을 10-15개 군으로 임의로 나누고 치료를 시작하였다. 동물을 적합한 비히클 중 화합물로 정해진 투여량과 스케줄로 3-4주 동안 경구 경로로 투여하였다. 종양을 1주일에 2-3회 캘리퍼로 측정하고 종양 부피는 타원형 공식( $\pi/6 \times \text{너비} \times \text{너비} \times \text{길이}$ )를 이용하여 계산하였다.

[0260] 단독 투여시, AZD5363을 10% DMSO, 25% 클렙토스(Kleptose) 용액 중에 제제화하였다(클렙토스는 로퀘트-파마(Roquette Pharma(Trademarked)) 히드록시프로필 베타시클로텍스트린으로부터 얻음-생체 내 용도 및 제제에 적합).

[0261] 실시예 3과 동시 투여(공투여)시, AZD5363은 HPMC/트윈(0.5% 메토셀(Methocel)(히드록시프로필 메토셀룰로스)/0.1% 폴리소르베이트 80) 중에 제제화하였다. 현탁액을 밤새 불 분쇄하였다.

[0262] 실시예 3을 HPMC/트윈(0.5% 메토셀(히드록시프로필 메토셀룰로스)/0.1% 폴리소르베이트 80) 중에 제제화하였다.

[0263] AZD8186을 HPMC/트윈(0.5% 메토셀(히드록시프로필 메토셀룰로스)/0.1% 폴리소르베이트 80) 중에 제제화하였다.

[0264] 실시예 3과 동시 투여시, AZD8186을 HPMC/트윈(0.5% 메토셀(히드록시프로필 메토셀룰로스)/0.1% 폴리소르베이트 80) 중에 제제화하였다. 현탁액을 밤새 불 분쇄하였다.

[0265] 올라파립(Olaparib)을 10% DMSO/30% 클렙토스 용액 중에 제제화하였다.

[0266] **AKT 억제제(AZD5363)와 조합된 실시예 3에 의한 종양 성장 억제 - 순차적인 투여**

[0267] BT474 이종이식 모델에서 연구를 수행하였다. 실시예 3 및 AZD5363을 1일 2회(BID) 6-8시간 간격으로 2일 온(on)/5일 오프(off)의 1주일 주기로 투여하고, 순차적으로 AZD5363을 1주일 주기의 1일 및 2일에 투여하고 실시예 3을 1주일 주기의 3일 및 4일에 투여하였다. 실시예 3을 HPMC/트윈 중 50mg/kg BID로 투여하고 AZD5363은 DMSO/클렙토스 중 170mg/kg BID로 투여하였다.

[0268] 종양 성장 곡선(도 9에 나타냄)은 실시예 3 또는 AZD5363의 간헐적 투여가 비히클 단독 대조군(HPMC/트윈)에 비해 종양 성장을 부분적으로 억제하였다는 것을 나타낸다. 실시예 3과 AZD5363의 조합은 종양 퇴행을 유도하였다.

[0269] **AKT 억제제(AZD5363)과 조합된 실시예 3에 의한 종양 성장 억제 - 동시 투여**

[0270] BT474 이종이식 모델에서 연구를 수행하였다. 실시예 3 및 AZD5363을 1일 2회(BID) 6-8시간 간격으로 2일 온/5일 오프의 1주일 주기로 동시에 투여하였다. 실시예 3은 25mg/kg BID로 투여하고 AZD5363은 100mg/kg BID로 투여하였으며, 둘 다 HPMC/트윈 중에 투여하였다.

[0271] 종양 성장 곡선(도 10에 나타냄)은 실시예 3 또는 AZD5363의 간헐적 투여가 비히클 단독 대조군(HPMC/트윈)에 비해 종양 성장을 부분적으로 억제하였다는 것을 나타낸다. 실시예 3과 AZD5363의 조합은 투여기간 동안 종양 퇴행을 유도하였지만, 투여를 멈춘 기간 동안은 종양이 다시 성장하였다.

[0272] **PARP 억제제(올라파립)와 조합된 실시예 3에 의한 종양 성장 억제**

[0273] BT474 이종이식 모델에서 연구를 수행하였다. 실시예 3 및 올라파립을 연구기간에 걸쳐 매일 투여하였는데, 실시예 3은 각 투여량 25mg/kg으로 1일 2회(BID) 6-8시간 간격으로 올라파립은 실시예 3의 1일의 첫 투여 후 1시간에 100mg/kg으로 1일 1회(QD)투여하였다. 두 제제 모두 HPMC/트윈 중에 투여하였다.

[0274] 종양 성장 곡선(도 11)은 올라파립 단독은 종양 성장에 유의한 효과를 주지못하였으며, 실시예 3 단독은 성장을 부분적으로 억제하였으나, 실시예 3과 올라파립의 조합은 종양 퇴행을 유도하였다.

[0275] **PARP 억제제(올라파립)와 조합된 실시예 3에 의한 종양 성장 억제**

[0276] MCF7 이종이식 모델에서 연구를 수행하였다. 실시예 3 및 올라파립을 연구기간에 걸쳐 매일 투여하였는데, 실시예 3은 각 투여량 25mg/kg으로 1일 2회 6-8 시간 간격으로 투여하였고 올라파립은 실시예 3의 1일 첫 투여 후 1

시간에 100mg/kg으로 1일 1회(QD)투여하였다. 두 제제 모두 HPMC/트윈 중에 투여하였다.

- [0277] 종양 성장 곡선(도 12)은 올라과립 단독은 종양 성장에 최소 효과를 주었으며, 실시예 3 단독은 약간의 종양 퇴행을 일으켰으나, 실시예 3과 올라과립 조합은 더 강한 종양 퇴행을 유도하였다.
- [0278] **PI3K베타/텔타 억제제(AZD8186)와 조합된 실시예 3에 의한 종양 성장 억제**
- [0279] HCC70 이종이식 모델에서 연구를 수행하였다. 실시예 3 및 AZD8186을 연구기간에 걸쳐 매일 2회(BID), 실시예 3은 각 투여량 25mg/kg으로 AZD8186은 각 투여량 50mg/kg으로 투여하였다. 두 제제 모두 HPMC/트윈 중에 투여하였다.
- [0280] 종양 성장 곡선(도 13)은 AZD8186이 종양 성장을 부분적으로 억제하였고, 실시예 3 단독은 보다 강하게 성장을 억제하였으나, 실시예 3과 AZD8186의 조합은 종양 퇴행을 유도하였다는 것을 나타낸다.
- [0281] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기에서 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체와 함께 포함하는 약학 조성물이 제공된다.
- [0282] 정제 제제에 적합한 약학적으로 허용되는 부형제는, 예를 들어, 비활성 희석제, 과립화제 및 봉해제, 결합제, 윤활제, 방부제 및 향산화제를 포함한다. 정제 제제는 위장관에서 이의 봉해와 활성 성분의 후속적인 흡수를 조절하기 위해, 또는 안정성 및/또는 외관을 개선하기 위해, 어느 경우에도 당 업계에 잘 알려진 통상의 코팅제 및 방법을 이용하여 코팅되거나 코팅되지 않을 수 있다.
- [0283] 경구 조성물은 별법으로 활성 성분을 비활성 고상 희석제와 혼합된 경질 젤라틴 캡슐의 형태 또는 활성 성분을 물 또는 오일과 혼합한 연질 젤라틴 캡슐의 형태가 될 수 있다.
- [0284] 수성 현탁액은 일반적으로 미세한 분말 형태의 활성 성분과 함께 하나 이상의 현탁제, 분산제 또는 습윤제를 포함한다. 수성 현탁액은 또한 하나 이상의 방부제, 향산화제, 착색제, 향미제 및/또는 감미제를 포함할 수 있다.
- [0285] 유성 현탁액은 식물성 오일 또는 광물성 오일에 활성 성분을 현탁하여 제제화될 수 있다. 유성 현탁액은 또한 증점제를 포함할 수 있다. 상기에 개시된 것과 같은 감미제 및 향미제는 맛이 좋은 경구 제제를 제공하기 위해 첨가될 수 있다. 상기 조성물은 향산화제를 첨가하여 보존될 수 있다.
- [0286] 물을 첨가하여 수성 현탁액을 제조하기에 적합한 분산성 분말 및 과립은 일반적으로 활성 성분과 함께 분산제 또는 습윤제, 현탁제 및 하나 이상의 방부제를 포함한다. 추가의 부형제, 예를 들어 감미제, 향미제, 착색제 또한 존재할 수 있다.
- [0287] 본 발명의 약학 조성물은 또한 수중유 에멀전의 형태일 수 있다. 유상은 식물성 오일 또는 광물성 오일 또는 이들 중 임의의 혼합물일 수 있다. 에멀전 또한 감미제, 향미제 및 방부제를 포함할 수 있다.
- [0288] 시럽 및 엘릭시르제는 감미제와 제제화될 수 있고, 점화제, 방부제, 향미제 및/또는 착색제를 또한 포함할 수 있다.
- [0289] 또한, 약학 조성물은 멸균 주사 가능한 수성 또는 유성 현탁액의 형태일 수 있으며, 상기에서 언급한 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제 중 하나 이상을 이용하는 공지된 방법에 따라 제제화될 수 있다. 멸균 주사 가능한 제제는 또한 비독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중 멸균 주사 가능한 용액 또는 현탁액일 수 있다.
- [0290] 흡입 투여용 조성물은 미세하게 분할된 고체 또는 액체 액적을 포함하는 에어로졸로서 활성 성분을 분배하도록 배치된 통상의 가압된 에어로졸 형태일 수 있다. 통상의 에어로졸 압축가스, 예를 들어 휘발성 플루오르화탄화수소 또는 탄화수소가 사용될 수 있으며, 에어로졸 장치는 계량된 양의 활성성분을 분배하기 편리하도록 배치된다.
- [0291] 제제에 대한 추가 정보를 위해서, 문헌(Comprehensive Medicinal Chemistry(Corwin Hansch; Chairman of Editorial Board, Pergamon Press 1990)의 5권의 25.2과를 참조한다.
- [0292] 단일 제형을 제조하기 위해 하나 이상의 부형제와 조합되는 활성 성분의 양은 반드시 치료받는 주체 및 특정 투여 경로에 따라 달라진다. 예를 들어, 인간에 경구 투여는 일반적으로 투여될 활성제, 예를 들어 1 mg 내지 2 g(보다 적합하게는 100mg 내지 2g, 예를 들어 250 mg 내지 1.8g, 예를 들어 500mg 내지 1.8g, 특히 500mg 내지 1.5g, 편리하게는 500mg 내지 1g)을 필요로 하며, 전체 조성물 중량의 약 3 내지 약 98 퍼센트로 변할 수 있는 적합하고 편리한 양의 부형제와 제제화된다. 다량의 투여량이 필요한 경우, 복수 제형, 예를 들어 제형 사이에

편리하게 분리되는 활성 성분의 투여량을 갖는 2개 이상의 정제 또는 캡슐이 요구될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 편리하게는, 단일 고체 제형은 활성 성분 1 내지 300mg을 포함할 수 있다.

- [0293] 화학식 (I)의 화합물의 치료 또는 예방 목적을 위한 투여량의 크기는, 물론 잘 알려진 의약 원리에 따라, 질환 상태의 특성 및 증증도, 동물 또는 환자의 나이 및 성별 및 투여 경로에 따라 달라질 것이다.
- [0294] 치료 또는 예방 목적에 화학식 (I)의 화합물을 사용하는데 있어, 예를 들어, 1 mg/kg 내지 100 mg/kg 체중 범위의 1일 투여량, 필요한 경우 분할량으로 반도록 투여될 것이다. 일반적으로, 비경구 경로를 이용하는 경우 더 낮은 투여량이 투여될 것이다. 따라서, 예를 들어 정맥 내 투여의 경우, 예를 들어 1 mg/kg 내지 25 mg/kg 체중 범위의 투여량이 일반적으로 사용될 것이다. 유사하게, 흡입에 의한 투여의 경우, 예를 들어, 1 mg/kg 내지 25 mg/kg 체중 범위로 사용될 것이다. 그러나 경구 투여는 특히 정제 형태가 바람직하다. 전형적으로, 단위 제형은 본 발명의 화합물 약 10 mg 내지 0.5 g을 포함할 것이다.
- [0295] 본 발명의 혼합물은 매일 또는 1일 1회 초과 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 적합한 투여 일정으로 투여될 것이다. 예를 들어 본 발명의 화합물은 특정 일수 동안 1일에 1회 이상(예를 들어 1일에 1회, 2회 또는 3회) 투여한 후, 당분간 투여하지 않을 수 있다. 이어서, 상기 투여 주기(투여일과 비투여일로 이루어짐)가 반복될 것이다. 편리하게는 투여 주기는 5-14일 기간, 예를 들어 5, 7, 10 또는 14일, 보다 편리하게는 7일이다. 한 측면에서, 화학식 (I)의 화합물은 1일 또는 2 또는 3일 연일 투여 후 3, 4, 5 또는 6일 투여 없는 투여 주기로 투여된다.
- [0296] 한 측면에서, 화학식 (I)의 화합물을 1일 동안 투여한 후 2, 3 또는 4일 동안 투여하지 않는다.
- [0297] 또 다른 측면에서, 화학식 (I)의 화합물을 2일 동안 투여한 후 4, 5 또는 6일 동안 투여하지 않는다.
- [0298] 추가의 측면에서, 화학식 (I)의 화합물을 3일 동안 투여한 후 3, 4 또는 5일 동안 투여하지 않는다.
- [0299] 또 다른 측면에서, 화학식 (I)의 화합물을 4일 동안 투여한 후 2, 3 또는 4일 동안 투여하지 않는다.
- [0300] 또 다른 한 측면에서, 화학식 (I)의 화합물을 5일 동안 투여한 후 1, 2 또는 3일 투여하지 않는다.
- [0301] 또 다른 측면에서, 화학식 (I)의 화합물을 격일로 투여한다.
- [0302] 상기 투여 일정은 본 발명의 화합물이 단일요법으로 사용될 때 편리하게 적용된다. 조합 요법으로서 본 발명의 화합물을 투여하기 위한 가능한 투여 일정의 추가의 예는 하기에 기재된다.
- [0303] 상기에 언급한 바와 같이, PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  효소는 암과 다른 세포의 증식을 매개하고, 혈관형성 현상을 매개하고, 암세포의 운동성, 이동 및 침습을 매개하는 하나 이상의 효과에 의해 종양 형성의 원인이 된다고 알려져 있다. 본 발명자들은 종양세포의 증식과 생존 및 전이성 종양세포의 침습 및 이동능을 일으키는 신호전달 단계에 관련된 PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  효소의 억제에 의해 얻어진다고 생각되는 강한 항 종양 활성을 가진다는 것을 확인하였다.
- [0304] 따라서, 본 발명의 화합물은 항종양제로서, 특히 종양 성장과 생존의 억제 및 전이성 종양 성장의 억제를 일으키는 포유동물 암세포의 증식, 성장, 운동성, 전파 및 침습의 선택적 억제제로서 가치가 있다. 특히, 본 발명의 화합물은 고형 종양 질환의 억제 및/또는 치료에서 항증식제 및 항침습제로서 가치가 있다. 특히, 본 발명의 화합물은 PI3K- $\alpha$  및/또는 - $\delta$  효소의 억제에 민감하고 종양세포의 증식 및 생존 및 전이성 종양세포의 이동능 및 침습을 일으키는 신호전달 단계와 관련된 종양의 예방 또는 치료에 유용할 것으로 기대된다. 게다가, 본 발명의 화합물은 PI3K- $\alpha$  및/또는 - $\delta$  효소의 억제에 의해 단독으로 또는 부분적으로 매개되는 종양의 예방 또는 치료에 유용할 것으로 기대된다. 즉, 화합물을 이용하여 상기 치료를 필요로 하는 온혈 동물에서 PI3K- $\alpha$  및/또는 - $\delta$  효소 억제 효과를 가져올 수 있다.
- [0305] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 약학적으로 허용되는 염이 인간과 같은 온혈 동물에서 의약으로 사용하기 위해 제공된다.
- [0306] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 약학적으로 허용되는 염이 인간과 같은 온혈 동물에서 항증식 효과의 생성에 사용하기 위해 제공된다.
- [0307] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특징에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 인간과 같은 온혈 동물에서 고형 종양 질환의 억제 및/또는 치료에 있어 항침습제로서 사용하기 위해 제공된다.

- [0308] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 인간과 같은 온혈 동물에서 항 증식 효과의 생성을 위한 용도가 제공된다.
- [0309] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특징에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 인간과 같은 온혈동물에서 항 증식 효과의 생성에 사용하기 위한 의약의 제조에 있어 용도가 제공된다.
- [0310] 본 발명의 본 측면의 추가의 특징에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 인간과 같은 온혈동물에서 고형 종양 질환의 억제 및/또는 치료에 있어 항침습제로서 사용하기 위한 약물의 제조에 있어 용도가 제공된다.
- [0311] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특징에 따르면, 항증식 효과를 상기 치료를 필요로 하는 인간과 같은 온혈 동물에서 생성하기 위한 방법으로서, 상기에 기재된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 상기 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0312] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특징에 따르면, 고형 종양 질환의 억제 및 치료에 의한 항침습 효과를 상기 치료를 필요로 하는 인간과 같은 온혈 동물에서 생성하기 위한 방법으로서, 상기에 기재된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 상기 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0313] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 인간과 같은 온혈동물에서 암의 예방 또는 치료에 사용하기 위해 제공된다.
- [0314] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 인간과 같은 온혈 동물에서 암의 예방 또는 치료용 의약의 제조에 있어 용도가 제공된다.
- [0315] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특징에 따르면, 암의 예방 또는 치료를 필요로 하는 인간과 같은 온혈 동물에서 상기 치료 방법에 있어, 상기에 기재된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 상기 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0316] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 인간과 같은 온혈 동물에서 고형 종양 질환의 예방 또는 치료에 사용하기 위해 제공된다.
- [0317] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 인간과 같은 온혈 동물에서 고형 종양 질환의 예방 또는 치료용 의약 제조에 있어 용도가 제공된다.
- [0318] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특징에 따르면, 고형 종양 질환의 예방 또는 치료를 필요로 하는 인간과 같은 온혈 동물에서 상기 치료 방법에 있어, 상기에 기재된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 상기 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0319] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 종양세포의 증식, 생존, 침습 및 이동능을 일으키는 신호전달 단계에 관계된 PI3K- $\alpha$  및/또는  $-\delta$  효소의 억제에 민감한 종양의 예방 또는 치료에 사용하기 위해 제공된다.
- [0320] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특징에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 종양세포의 증식, 생존, 침습 및 이동능을 일으키는 신호전달 단계에 관계된 PI3K- $\alpha$  및/또는  $-\delta$  효소의 억제에 민감한 종양의 예방 또는 치료용 의약의 제조에 있어 용도가 제공된다.
- [0321] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특징에 따르면, 종양세포의 증식, 생존, 침습 및 이동능을 일으키는 신호전달 단계에 관계된 PI3K- $\alpha$  및/또는  $-\delta$  효소의 억제에 민감한 종양의 예방 또는 치료 방법에 있어, 상기에 기재된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 상기 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0322] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 PI3K- $\alpha$  및  $-\delta$  효소 억제 효과를 제공하는데 사용하기 위해 제공된다.
- [0323] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특징에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 PI3K- $\alpha$  및  $-\delta$  효소 억제 효과를 제공하는데 사용하기 위한 의약의 제조에 있어 용도가 제공된다.

- [0324] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특징에 따르면, PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  효소 억제 효과를 제공하는 방법에 있어, 상기 기재된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 또한 제공된다.
- [0325] 상기에 언급된 바와 같이, 본 발명의 특정 화합물은 다른 PI3-키나아제 효소 또는 다른 키나아제에 대해서보다 PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  효소에 대해 실질적으로 더 우수한 효능을 갖는다. 상기 화합물은 PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  효소에 대해 충분한 효능을 가져서 PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  효소를 억제하기에 충분한 양으로 사용될 수 있으면서, PI3K- $\beta$  효소에 대해서와 대부분 다른 키나아제 효소에 대해 거의 활성을 보이지 않는다. 상기 화합물은 PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  효소의 선택적인 억제에 유용할 가능성이 있으며, 예를 들어 PI3K- $\alpha$  및/또는 - $\delta$  효소 유래 종양의 효과적인 치료에 유용할 가능성이 있다.
- [0326] 본 발명의 상기 측면에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 선택적인 PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  효소 억제 효과를 제공하는데 사용하기 위해 제공된다.
- [0327] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특징에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 선택적인 PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  효소 억제 효과를 제공하는데 사용하기 위한 의약의 제조에 있어 용도가 제공된다.
- [0328] 본 발명의 상기 측면의 또 다른 특징에 따르면, 선택적인 PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  효소 억제 효과를 제공하는 방법에 있어, 상기에 기재된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0329] "선택적인 PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  효소 억제 효과"는 화학식 (I)의 화합물이 다른 1형 PI3-키나아제에 대해서보다 PI3K- $\alpha$  및 - $\delta$  효소에 대해서 더 강력하고, 일반적으로 더 광범위한 PI3-키나아제 중의 다른 일원, 및 티로신 및 ser/thr 키나아제를 포함하는 키나아제 효소의 더 광범위한 부류 가운데 다른 일원에 비해 우수한 선택성을 나타낸다는 것을 의미한다.
- [0330] 본 발명의 추가의 특성에 따르면, 본원에서 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 유방암, 위암(stomach/gastric cancer) 및 식도암, 편평 세포 암종(SCC: squamous cell carcinoma) 및 선암종을 포함한 비소세포폐암(NSCLC: Non Small Cell Lung Cancer), 두부 및 경부(H&N: Head and Neck)의 SCC, 부인암(Gynaecological) 암(자궁내막암, 난소암 및 자궁경부암 포함) 및 혈액암, 예를 들어 다발성 골수종, 림프종 및 백혈병(만성 림프성 백혈병(CLL), 급성 림프모구성 백혈병(ALL) 및 외투 세포 림프종(MCL)의 치료에 사용하기 위해 제공된다.
- [0331] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특성에 따르면, 본원에서 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 방광암, 뇌/CNS 암, 결장직장암, 폐암(다른 모든 형태), 담낭암 및 담관암, 및 피부암의 치료에 사용하기 위해 제공된다.
- [0332] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특성에 따르면, 본원에서 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 전립선암, 골암, 신장암, 간암, 흑색종, 위장관 조직암, 췌장암, 고환암, 갑상선암, 음경암, 외음암, 및 돌연변이, 증폭 또는 다른 이상을 통해 PI3-키나아제 의존성을 가진 기타 종양 유형의 치료에 사용하기 위해 제공된다.
- [0333] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특성에 따르면, 유방암, 위암 및 식도암, SCC 및 선암종을 포함한 NSCLC, H&N의 SCC, 부인암(자궁내막암, 난소암 및 자궁경부암 포함) 및 혈액 암, 예를 들어 다발성 골수종, 림프종 및 백혈병 (CLL, ALL 및 MCL 포함)을 상기 치료를 필요로 하는 인간과 같은 온혈 동물에서 치료하는 방법으로서, 상기에 정의된 것과 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0334] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특성에 따르면, 방광암, 뇌/CNS 암, 결장직장암, 폐암(다른 모든 형태), 담낭암 및 담관암, 및 피부암을 상기 치료를 필요로 하는 인간과 같은 온혈 동물에서 치료하는 방법으로서, 상기에 정의된 것과 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0335] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특성에 따르면, 전립선암, 골암, 신장암, 간암, 흑색종, 위장관 조직암, 췌장암, 고환암, 갑상선암, 음경암, 외음암, 및 돌연변이, 증폭 또는 다른 이상을 통해 PI3-키나아제 의존성을 가진 기타 종양 유형을 상기 치료를 필요로 하는 인간과 같은 온혈 동물에서 치료하는 방법으로서, 상기에 정의된 것과

같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

- [0336] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특성에 따르면, 상기에 정의된 것과 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 유방암, 위암 및 식도암, SCC 및 선암종을 포함한 NSCLC, H&N의 SCC, 부인암(자궁내막암, 난소암 및 자궁경부암 포함) 및 혈액암, 예를 들어 다발성 골수종, 림프종 및 백혈병(CLL, ALL 및 MCL 포함)의 치료용 의약의 제조에 있어서 용도가 제공된다.
- [0337] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특성에 따르면, 상기에 정의된 것과 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 방광암, 뇌/CNS 암, 결장직장암, 폐암(다른 모든 형태), 담낭암 및 담관암, 및 피부암의 치료용 의약의 제조에 있어서 용도가 제공된다.
- [0338] 본 발명의 상기 측면의 추가의 특성에 따르면, 상기에 정의된 것과 같은 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 전립선암, 골암, 신장암, 간암, 흑색종, 위장관 조직암, 췌장암, 고환암, 갑상선암, 음경암, 외음암, 및 돌연변이, 증폭 또는 다른 이상을 통해 PI3-키나아제 의존성을 가진 기타 종양 유형의 치료용 의약의 제조에 있어서 용도가 제공된다.
- [0339] 본 발명의 한 특징에서, 치료될 암은 유방암이다. 상기 특징의 추가의 측면에서, 유방암은 에스트로겐 수용체 양성이다. 상기 측면의 한 실시양태에서, 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 본원에서 정의된 바와 같은 항호르몬제와 조합하여 투여된다. 상기 측면의 또 다른 실시양태에서, 실시예 3은 본원에서 정의된 바와 같은 항호르몬제와 함께 투여된다. 상기 측면의 또 다른 실시양태에서, 실시예 3은 올라파티프, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염과 조합하여, 선택적으로 추가로 본원에서 정의된 바와 같은 항호르몬제와 함께 투여된다. 상기 측면의 추가의 실시양태에서, 실시예 3은 AZD5363, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염과 조합하여, 선택적으로 추가로 본원에서 정의된 바와 같은 항호르몬제와 조합하여 투여된다.
- [0340] 암의 치료가 명시되는 한 측면에서, 이것은 전이(즉 암의 전파)의 예방 및 전이의 치료를 나타낼 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 본 발명의 화합물은 전이되지 않은 환자가 전이가 발생하지 못하도록, 또는 전이 발생하기 전 기간을 연장하도록 치료하고, 이미 전이된 환자는 전이를 치료하는데 사용될 것이다. 게다가, 암 치료는 확립된 원발성 종양 또는 종양들 및 발달하는 원발성 종양 또는 종양들의 치료를 나타낼 수 있다. 따라서, 한 측면에서 암 치료는 전이의 예방에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 측면에서, 암 치료는 전이의 치료에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 측면에서 암 치료는 확립된 원발성 종양 또는 종양들 또는 발달하는 원발성 종양 또는 종양들의 치료에 관한 것이다.
- [0341] 상기에서 언급한 바와 같이, 화학식 (I)의 화합물의 생체 내 효과는 화학식 (I)의 화합물의 투여 후 인간 또는 동물 체내에서 형성되는 하나 이상의 대사 물질(예를 들어, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 A의 화합물)에 의해 부분적으로 발휘될 수 있다.
- [0342] 본 발명의 특정 화합물은 I형 PI3-키나아제 이소형, 예를 들어  $-\beta$  및  $-\gamma$ 보다 PI3-키나아제- $\alpha$  및  $-\delta$ 에 대해 더 우수한 효능을 갖는다. 한 측면에서 본 발명의 화합물은 PI3K- $\beta$  또는  $-\gamma$ 에 비해 PI3K- $\alpha$  및  $-\delta$ 에 대해 선택적이다.
- [0343] 따라서, 본 발명은 또한 환자에서 PI3-키나아제  $-\alpha$ 를 억제하는 방법에 있어, 환자에서 포스포이노시티드 3-키나아제- $\alpha$ 를 억제하는데 유효량의 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 고려한다.
- [0344] 따라서, 본 발명은 또한 환자에서 PI3-키나아제  $-\alpha$  및  $-\delta$ 를 억제하는 방법에 있어, 환자에서 PI3-키나아제- $\alpha$  및  $-\delta$ 를 억제하는데 유효량의 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 고려한다.
- [0345] PI3-키나아제 억제제인 화학식 (I)의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 또한 다양한 기타 질환 상태에 있어 가능한 치료 용도를 갖는다. 예를 들어, PI3-키나아제는 혈관계, 즉 혈관 평활근 세포(Thyberg, *European Journal of Cell Biology*, 1998, 76(1), 33-42) 및 폐(기도 평활근 세포)(Krymskaya, V.P., *BioDrugs*, 2007, 21(2), 85-95)에서 평활근 증식을 촉진하는데 중요한 역할을 한다. 혈관 평활근 세포의 과도한 증식은 죽상동맥경화반의 형성 및 혈관 침습과정에 뒤따르는 신생혈관 내막 증식증의 발달(Scwartz et al., *Progress in Cardiovascular Disease*, 1984, 26, 355-372; Clowes et al., *Laboratory Investigations*, 1978, 39, 141-150)에 중요한 역할을 한다. 게다가, 기도 평활근 세포의 과도한 증식은 천식 및 기관지염의 환경에서 COPD 발달을 일으킨다. 따라서, PI3-키나아제 활성의 억제제는 혈관 재협착증, 죽상 동맥경화증, 및 COPD를 예



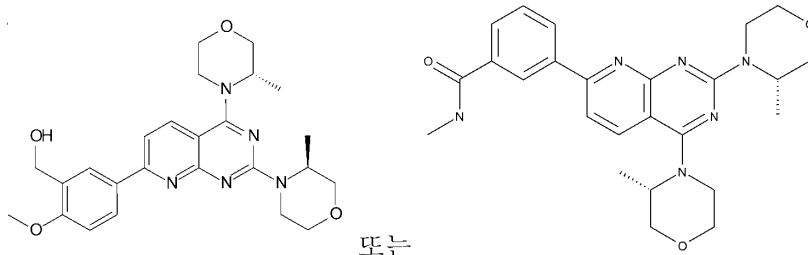
방하는데 사용될 수 있다.

- [0346] PI3-키나아제는 또한 백혈구 기능(Fuller et al., *The Journal of Immunology*, 1999, 162(11), 6337-6340; Eder et al., *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(43), 28025-31) 및 림프구 기능에 중요한 역할을 한다(Vicente-Manzanares et al., *The Journal of Immunology*, 1999, 163(7), 4001-4012). 예를 들어, 염증성 내피에 백혈구 유착은 PI3-키나아제-의존성 신호전달 과정에 의해 내인성 백혈구 인테그린의 활성화를 수반한다. 게다가, 호중구에서 산화적 폭발(Nishioka et al., *FEBS Letters*, 1998, 441(1), 63-66 및 Condliffe, A.M., et al., *Blood*, 2005, 106(4), 1432-40) 및 세포골격의 재구성(Kirsch et al., *Proceedings National Academy of Sciences USA*, 1999, 96(11), 6211-6216)은 PI3-키나아제 신호전달과 관련되는 것으로 보인다. 호중구 이동 및 지향성 운동은 또한 PI3-키나아제 활성화에 의존적이다(Camps, M., et al., *Nat Med*, 2005, 11(9), 936-43 및 Sadhu, C. et al., *J Immunol*, 2003, 170(5), 2647-54). 따라서, PI3-키나아제 억제제는 염증 부위에서 백혈구 유착 및 활성화를 감소시키는데 유용할 수 있고, 따라서 급성 및/만성 염증성 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. PI3-키나아제는 또한 림프구 증식 및 활성화에 중요한 역할을 한다(Fruman et al., *Science*, 1999, 283(5400), 393-397). 특히, PI3K- $\delta$ 는 IgM-특이적 항체-유도된 B-세포 증식(Okkenhaug K et al., *Science*, 2002, 297(5583), 1031-1034), B-세포-수용체-유도된 DNA 합성 및 증식, 및 IL-4-유도된 생존(Bilancio A et al., *Blood*, 2006, 107, 642-650)을 포함한 B 세포 발달 및 기능에 필수적이다. 상기 보고는 PI3K- $\delta$ 가 다른 I형 PI3K에 의해 보상되지 않는 B 세포 기능에서 중요하고 비중복성 기능을 갖는다는 것을 나타낸다. 자가 면역 질환에서 림프구가 중요한 역할을 하여, PI3-키나아제 활성 억제제는 상기 장애의 치료에 사용될 수 있다(Rommel C, Camps M and Ji H, *Nat Rev Immunol*, 2007, 1038, 191-201).
- [0347] 상기에 정의된 항암 치료는 단일 요법으로서 적용될 수 있거나, 본 발명의 화합물 외에 통상의 수술 또는 방사선 요법 또는 화학 요법을 수반할 수 있다. 상기 화학 요법은 하나 이상의 다음 분류의 항종양제를 포함할 수 있다:
- [0348] (i) 종양의학에 사용되는 항증식제/항신생물제 및 이의 조합, 예를 들어 알킬화제(예를 들어 시스-플라틴, 옥살리플라틴, 카보플라틴, 시클로포스파미드, 질소 머스타드, 멜팔란, 클로르암부실, 부셀판, 테모졸라미드 및 니트로소우레아); 항대사물질(예를 들어 잼시타빈 및 엽산길항제 예를 들어 5-플루오로우라실 및 테가푸르와 같은 플로우로피리미딘, 알티트렉세드, 메토틱렉세이트, 시토신 아라비노시드, 및 히드록시우레아); 항종양 항생제(예를 들어 아드리아마이신, 블레오마이신, 독소루비신, 다우노마이신, 에피루비신, 이다루비신, 마이토마이신-C, 닥티노마이신 및 미트라마이신과 같은 안트라시클린); 항유사분열제(예를 들어 빈크리스틴, 빈블라시틴, 빈데신 및 비노렐빈과 같은 빈카 알칼로이드, 택솔 및 택소텔과 같은 택소이드, 및 폴로키나아제 억제제); 및 토포이소머라제 억제제(예를 들어 에토포시드 및 테니포시드와 같은 에피도포도필로톡신, 암사크린, 토포테칸 및 캄토테신);
- [0349] (ii) 항호르몬제, 예를 들어 항에스트로겐(예를 들어 타모시펜, 풀베스트란트, 토레미펜, 탈록시펜, 드롤록시펜, 및 아이오독시펜), 항안드로겐제(예를 들어 비칼루타미드, 플루타미드, 닐루타미드 및 시프로테론 아세테이트), LHRH 길항제 또는 LHRH 작용제(예를 들어 고세렐린, 류프로렐린 및 부세렐린), 프로게스토겐(예를 들어 메게스트롤 아세테이트), 아로마타제 억제제(예를 들어 아나스트로졸, 레트로졸, 보라졸 및 엑세메스탄) 및 5 $\alpha$ -리덕타제 억제제, 예를 들어 피나스테리드;
- [0350] (iii) 성장 인자 기능 및 이의 하류 신호전달 경로의 억제제: 임의의 성장 인자 또는 성장 인자 수용체 표적의 Ab 조절인자가 포함되며, 문헌(Stern et al. *Critical Reviews in Oncology/Haematology*, 2005, 54, pp11-29)를 참조한다; 상기 표적의 소분자 억제제, 예를 들어 키나아제 억제제도 포함된다 - 예는 항-erbB2 항체 트라스투주맵[Herceptin™], 항-EGFR 항체 파니투무맵, 항-EGFR 항체 세톡시맵[Erbix, C225] 및 erbB 수용체 패밀리의 억제제를 포함하는 티로신 키나아제 억제제, 예를 들어 상피 성장 인자 패밀리의 수용체(EGFR/erbB1) 티로신 키나아제 억제제, 예를 들어 제피티닙 또는 엘로티닙, erbB2 티로신 키나아제 억제제, 예를 들어 라파티닙, 및 혼합된 erb1/2 억제제, 예를 들어 아파타닙이 포함된다; 유사한 계획이 다른 부류의 성장 인자 및 이의 수용체, 예를 들어 C-met 및 론을 포함한 간세포 성장 인자 패밀리의 또는 이의 수용체의 억제제에 이용 가능하다; 인슐린 및 인슐린 성장 인자 패밀리의 또는 이의 수용체(IGFR, IR)의 억제제, 혈소판 유래 성장 인자 패밀리의 또는 이의 수용체(PDGFR)의 억제제, 및 기타 수용체 티로신 키나아제, 예를 들어 c-kit, AnLK, 및 CSF-1R에 의해 매개된 신호전달의 억제제가 포함된다; 더 광범위한 PI3-키나아제 신호전달 경로에서 신호전달 단백질 표적화하는 조절인자, 예를 들어, 기타 PI3-키나아제 이소형, 예를 들어 PI3K- $\beta$ , 및 ser/thr 키나아제, 예를 들어 AKT, mTOR, PDK, SGK, PI4K 또는 PIP5K의 억제제가 포함된다; 상기에 열거되지 않은 세린/트레오닌 키나아제 억제제, 예를 들어 베무라페닙과 같은 raf 억제제, 셀루메티닙(AZD6244)과 같은 MEK 억제제, 이마티닙

또는 닐로티닙과 같은 Abl 억제제, 이브루티닙과 같은 Btk 억제제, 포스타마티닙과 같은 Syk 억제제, 오로라 키나아제 억제제(예를 들어 AZD1152), 기타 ser/thr 키나아제, 예를 들어 JAK, STAT 및 IRAK4의 억제제, 및 사이클린 의존성 키나아제 억제제가 또한 포함된다;

- [0351] iv) DNA 손상 신호전달 경로의 조절 인자, 예를 들어 PARP 억제제(예를 들어, 올라파립), ATR 억제제 또는 ATM 억제제;
- [0352] v) 아폽토시스 및 세포 사멸 경로의 조절 인자, 예를 들어 Bcl 패밀리 조절 인자(예를 들어, ABT-263 / 나비토클락스(ABT-199));
- [0353] (vi) 항혈관생성제, 예를 들어 혈관 내피 성장인자의 효과를 억제하는 것[예를 들어 항혈관 내피 세포 성장 인자 항체 베바시주맙(Avastin™) 및 예를 들어, VEGF 수용체 티로신 키나아제 억제제, 예를 들어 소라페닙, 악시티닙, 파조파닙, 수니티닙 및 반데타닙 및 기타 기전에 의해 작용하는 화합물(예를 들어 리노미드, 인테그린  $\alpha v\beta 3$  기능의 억제제 및 안지오스타틴)];
- [0354] (vii) 혈관 손상제, 예를 들어 콤프레타스타틴 A4;
- [0355] (viii) 항침습제, 예를 들어 다사티닙(J. Med. Chem., 2004, 47, 6658-6661) 및 보수티닙(SKI-606)과 같은 c-Src 키나아제 패밀리 억제제, 및 마리마스타트와 같은 메탈로프로테아제 억제제, 유로키나아제 플라스미노겐 활성화인자 수용체 기능의 억제제 또는 헤파라나제에 대한 항체;
- [0356] (ix) 면역요법 접근법, 예를 들어 환자 종양세포의 면역원성을 증가시키는 생체 외 및 생체 내 접근법을 포함하며, 예를 들어 인터류킨 2, 인터류킨 4 또는 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자와 같은 사이토카인으로 형질감염, T-세포 아네르기를 감소시키는 접근법, 형질 감염된 면역 세포, 예를 들어 사이토카인 형질감염된 수지상 세포를 이용한 접근법 및 사이토카인-형질감염된 종양세포주를 이용하는 접근법, 및 항-이디오타입 항체를 이용하는 접근법. 구체적인 실시예는 PD-1을 표적화하는 단클론 항체(예를 들어, BMS-936558) 또는 CTLA4(예를 들어, 이필리무맙 및 트레멜리무맙)을 포함한다.;
- [0357] (x) 안티센스 또는 RNAi 기재 요법, 예를 들어 상기 열거된 표적을 대한 것.
- [0358] (xi) 유전자 요법 접근법, 예를 들어 비정상 유전자, 예를 들어 비정상 p53 또는 비정상 BRCA1 또는 BRCA2, GDEPT(유전자-지정된 효소 전구약물 요법)를 대체하는 접근법, 시토신 데아미나제, 티미딘 키나아제 또는 세균 니트로리덕타제 효소를 이용하는 것과 같은 접근법, 및 화학요법 또는 방사선요법에 대한 환자 관용을 증가시키는 요법, 예를 들어 다중-약물 내성 유전자 요법을 포함한다.
- [0359] 본 발명의 상기 측면에 따르면, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 및 또 다른 항종양제, 특히 상기 (i)-(xi)에 열거된 항종양제 중 임의의 하나를 포함하는, 암 치료에 사용하기에 적합한 배합물(조합물)(combination)이 제공된다. 특히, 상기 (i)-(xi)에 열거된 항종양제는 치료될 특정 암을 위한 표준 치료이다; 당업자는 "표준 치료"의 의미를 이해할 것이다.
- [0360] 따라서, 본 발명의 추가의 측면에서, 또 다른 항종양제, 특히 상기 본원에서 (i)-(xi)에 열거된 것으로부터 선택된 항종양제와 조합된 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 제공된다.
- [0361] 본 발명의 추가의 측면에서, 또 다른 항종양제, 특히 상기(i)에 열거된 것으로부터 선택된 항종양제와 조합된 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 제공된다.
- [0362] 본 발명의 추가의 측면에서, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 상기 (i)에 열거된 항종양제 중 임의의 하나를 포함하는, 암 치료에 사용하기에 적합한 조합물이 제공된다.
- [0363] 본 발명의 추가의 측면에서, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 탁소이드, 예를 들어 탁솔 또는 탁소텔, 편리하게는 탁소텔을 포함하는, 암 치료에 사용하기에 적합한 조합물이 제공된다.
- [0364] 본 발명의 추가의 측면에서, 또 다른 항종양제, 특히 상기 본원 (ii)에 열거된 것으로부터 선택된 항종양제와 조합된 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 제공된다.
- [0365] 본 발명의 추가의 측면에서, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 상기 (ii)에 열거된 항호르몬제 중 임의의 하나, 예를 들어 상기 (ii)에 열거된 항에스트로겐제 중 임의의 하나를 포함하는, 암 치료에 사용하기에 적합한 조합물이 제공된다.

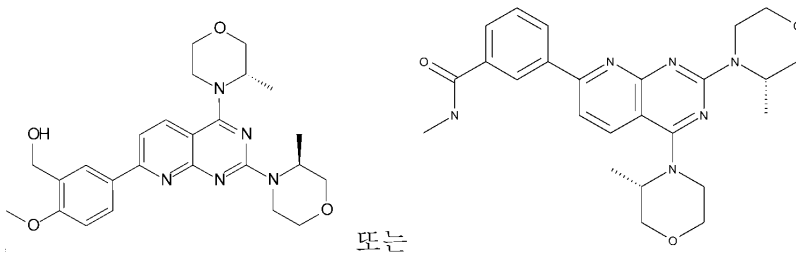
[0366] 본 발명의 추가의 측면에서, mTOR 억제제, 예를 들어 W02008/023161호에 개시된 것, 예를 들어



[0367] 또는

[0368] 과 조합하여 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 제공된다.

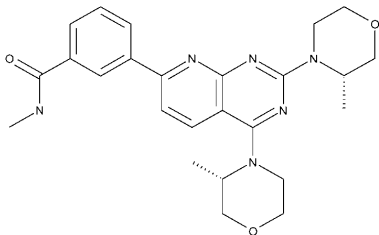
[0369] 본 발명의 추가의 측면에서, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 mTOR 억제제, 예를 들어 W02008/023161호에 개시된 것, 예를 들어



[0370] 또는

[0371] 를 포함하는, 암 치료에 사용하기 적합한 조합물이 제공된다.

[0372] 특히, mTOR 억제제는 하기 구조를 갖는 AZD2014이다:



[0373]

[0374] 한 측면에서, 화학식 (I)의 화합물과 AZD2014의 상기 조합물은, 선택적으로 표준 치료의 호르몬 요법과 조합되어, ER 양성 유방암의 치료에 사용하기 적합하다.

[0375] 본 발명의 추가의 측면에서, PI3K-β 억제제와 조합된 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 제공된다.

[0376] 화학식 (I)의 화합물과 PI3K-β 억제제의 조합물은 PTEN의 손실 배경을 가진 종양, 예를 들어 전립선암, 유방암 (예를 들어 삼중 음성 유방암), 편평 세포 NSCLC 및 신장암의 치료에 특히 유용할 수 있다.

[0377] 본 발명의 추가의 측면에서 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 PI3K-β 억제제를 포함하는, 암 치료에 사용하기 적합한 조합물이 제공된다.

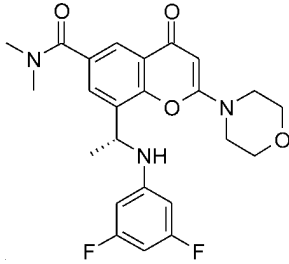
[0378] 한 측면에서, 본원에 기재된 PI3K-β의 억제제는 또한 약간의 PI3K-δ 억제 활성을 갖는다.

[0379] 본 발명의 추가의 측면에서 PI3K-β의 억제제, 예를 들어 국제 특허 출원 W02011/051704호의 임의의 한 실시예와 조합된 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 제공된다.

[0380] 본 발명의 추가의 측면에서 상기에서 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 PI3K-β의 억제제, 예를 들어 국제 특허 출원 W02011/051704호의 실시예 중 임의의 하나를 포함하는, 암 치료에 사용하기 적합한 조합물이 제공된다.

[0381] 본 발명의 추가의 측면에서 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 PI3K-β 및 PI3K-δ의 억제제, 예를 들어 8-((1R)-1-(3,5-디플루오로페닐아미노)에틸)-N,N-디메틸-2-모르폴리노-4-옥소-4H-크롬엔-6-카

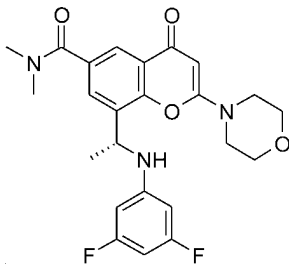
복사미드(국제 특허 출원 W02011/051704호 실시예 3.06b, AZD8186으로도 공지됨) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염과 조합하여 제공된다:



[0382]

[0383]

본 발명의 추가의 측면에서, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 PI3K- $\beta$  및 PI3K- $\delta$ 의 억제제, 예컨대 8-((1R)-1-(3,5-디플루오로페닐아미노)에틸)-N,N-디메틸-2-모르폴리노-4-옥소-4H-크롬엔-6-카복사미드(국제 특허 출원 W02011/051704호의 실시예 3.06b, AZD8186로도 공지됨) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는, 암 치료에 사용하기 적합한 조합물이 제공된다:



[0384]

[0385]

본 발명의 추가의 측면에서 AKT 키나아제 억제제, 예를 들어(S)-4-아미노-N-(1-(4-클로로페닐)-3-히드록시프로필)-1-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)피페리딘-4-카복사미드(AZD5363) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염(예를 들어 W02009/047563 참조)과 조합된 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 제공된다.

[0386]

화학식 (I)의 화합물과 AKT 억제제의 조합물은 PIK3CA 유전자 내 돌연변이의 더 높은 발생률을 가진 종양, 예를 들어 ER 양성 유방암, 자궁내막암, 난소암, 편평 세포 NSCLC, 위암, 방광암 및 담관암을 치료하는데 특히 유용할 수 있다.

[0387]

본 발명의 추가의 측면에서, 상기에서 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 AKT 키나아제 억제제, 예를 들어(S)-4-아미노-N-(1-(4-클로로페닐)-3-히드록시프로필)-1-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)피페리딘-4-카복사미드(AZD5363) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염(예를 들어 W02009/047563 호 참조)를 포함하는 암 치료에 사용하기 적합한 조합물이 제공된다.

[0388]

본 발명의 추가의 측면에서 올라파립(4-[3-(4-시클로프로판카보닐-피페라진-1-카보닐)-4-플루오로-벤질]-2H-프탈라진-1-온) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염과 조합된 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 제공된다.

[0389]

화학식 (I)의 화합물과 올라파립의 조합물은 BRCA 야생형 또는 결핍성 삼중 음성 유방암에서, 그리고 에스트로겐 수용체 양성(ER+) 유방, 특히 PIK3CA 유전자 내 돌연변이를 가진 것에서 특히 유용할 수 있다.

[0390]

본 발명의 추가의 측면에서, 상기에 정의된 바와 같은 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 올라파립(4-[3-(4-시클로프로판카보닐-피페라진-1-카보닐)-4-플루오로-벤질]-2H-프탈라진-1-온) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 암치료를 사용하기 적합한 조합물이 제공된다.

[0391]

본 발명의 특정 조합물은 본원의 실시예의 화합물 중 임의의 하나(또는 이의 약학적으로 허용되는 염) 및, 상기에서 기재된 바와 같이, mTOR 억제제, PI3K $\beta$  억제제, AKT 키나아제 억제제 또는 올라파립을 포함한다. 본 발명의 추가의 특정 조합물은 실시예 3(또는 이의 약학적으로 허용되는 염) 및, 상기에 기재된 바와 같이, mTOR 억제제, PI3K $\beta$  억제제, AKT 키나아제 억제제 또는 올라파립을 포함한다. 본 발명의 추가의 특정 조합물은 실시예 3(또는 이의 약학적으로 허용되는 염) 및, 상기에 기재된 바와 같이, PI3K $\beta$  억제제, AKT 키나아제 억제제 또는 올라파립을 포함한다. 본 발명의 조합물의 추가의 특정 예는 실시예 3(또는 이의 약학적으로 허용되는 염), 및 AZD8186, AZD5363 및 올라파립 중 임의의 하나(또는 상기 셋 중 임의의 하나의 약학적으로 허용되는 염)를 포함

한다. 본 발명의 조합물의 또 다른 예는 실시예 3 및 AZD2014를 포함한다.

- [0392] 상기 모든 조합물에서, 조합물은 또한, 당업자가 이해하는 바와 같이, 표준 치료의 치료법, 예를 들어 상기 (i) 내지 (xi)로부터의 기타 치료법과 함께 투여될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, ER+ 유방암의 치료용 임의의 상기 조합물을 사용하고자 할 때, 표준 치료의 호르몬 요법(예를 들어, 상기 (ii)에 열거된 제제들)은 본 발명의 조합물과 함께 사용될 수 있다. 다른 측면에서, 적합하게는 표준 치료는 상기 (i)로부터 선택될 수 있다.
- [0393] 따라서 본 발명의 추가의 측면에서, 암 치료에 사용하기 적합한 다음 삼중 조합물이 제공된다.
- [0394] a) 화학식 (I)의 화합물(예컨대 실시예 3) 또는 a) 이의 약학적으로 허용되는 염;
- [0395] b) mTOR 억제제, PI3K $\beta$  억제제, AKT 키나아제 억제제 또는 올라파립 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및
- [0396] c) 치료될 암을 위한 표준 치료 요법.
- [0397] 적합한 표준 치료 요법은, 당업자가 이해하는 바와 같이, 이의 통상의 투여 계획에 따라 투여될 것이다.
- [0398] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 본원에서 (i)-(xi)에 열거된 것으로부터 선택된 항종양제와 조합된 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체와 함께 포함하는 약학 조성물이 제공된다.
- [0399] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, 상기 본원에서 (i)-(xi)에 열거된 것으로부터 선택된 항종양제와 조합된 실시예 3 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체와 함께 포함하는 약학 조성물이 제공된다.
- [0400] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, AZD5363, AZD8186 또는 올라파립(또는 상기 셋 중 임의의 하나의 약학적으로 허용되는 염)과 조합된 실시예 3 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체와 함께 포함하는 약학 조성물이 제공된다.
- [0401] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, 상기 본원에서 (i)-(xi)에 열거된 것으로부터 선택된 항종양제와 조합된 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체와 함께 포함하는 암 치료용 약학 조성물이 제공된다.
- [0402] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, 상기 본원에서 (i)-(xi)에 열거된 것으로부터 선택된 항종양제와 조합된 실시예 3 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체와 함께 포함하는, 암 치료용 약학 조성물이 제공된다.
- [0403] 본 발명의 추가의 측면에 따르면, AZD5363, AZD8186 또는 올라파립(또는 상기 셋 중 임의의 하나의 약학적으로 허용되는 염)과 조합된 실시예 3 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 약학적으로 허용되는 희석제 또는 담체와 함께 포함하는, 암치료용 약학 조성물이 제공된다.
- [0404] 본 발명의 또다른 특징에 따르면, 상기 본원에서 (i)-(xi)에 열거된 것으로부터 선택된 항종양제와 조합된 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 인간과 같은 온혈동물에서 암에 사용하기 위한 의약의 제조에 있어 용도가 제공된다.
- [0405] 본 발명의 또다른 특징에 따르면, 상기 본원에서 (i)-(xi)에 열거된 것으로부터 선택된 항종양제와 조합된 실시예 3 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 인간과 같은 온혈동물에서 암에 사용하기 위한 의약의 제조에 있어 용도가 제공된다.
- [0406] 본 발명의 또다른 특징에 따르면, AZD5363, AZD8186 또는 올라파립(또는 상기 셋 중 임의의 하나의 약학적으로 허용되는 염)과 조합된 실시예 3 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 인간과 같은 온혈동물에서 암에 사용하기 위한 의약의 제조에 있어 용도가 제공된다.
- [0407] 따라서, 본 발명의 추가의 특징에서, 암 치료를 필요로 하는 인간과 같은 온혈동물에서 암 치료 방법에 있어, 상기 본원의 (i)-(xi)에 열거된 것으로부터 선택된 항종양제와 조합된 유효량의 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 상기 동물에 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0408] 따라서, 본 발명의 추가의 특징에서, 암 치료를 필요로 하는 인간과 같은 온혈동물에서 암 치료 방법에 있어, 상기 본원의 (i)-(xi)에 열거된 것으로부터 선택된 항종양제와 조합된 유효량의 실시예 3 또는 이의 약학적으로

허용되는 염을 상기 동물에 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0409] 따라서, 본 발명의 추가의 특징에서, 암 치료를 필요로 하는 인간과 같은 온혈동물에서 암 치료 방법에 있어, AZD5363, AZD8186 또는 올라파립(또는 상기 셋 중 임의의 하나의 약학적으로 허용되는 염)과 조합된 유효량의 실시예 3 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 상기 동물에 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0410] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 본원에서 (i)-(xi)에 열거된 것으로부터 선택된 항종양제와 조합된 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 키트가 제공된다.

[0411] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면,

[0412] a) 제1 단위 제형으로 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염;

[0413] b) 제2 단위 제형으로 상기 본원에서 (i)-(xi)에 열거된 것으로부터 선택된 항종양제; 및

[0414] c) 상기 제1 및 제2 제형을 포함하는 용기 수단을 포함하는 키트가 제공된다.

[0415] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면

[0416] a) 제1 단위 제형으로 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염;

[0417] b) 제2 단위 제형으로 상기 본원에서 (i)-(xi)에 열거된 것으로부터 선택된 항종양제;

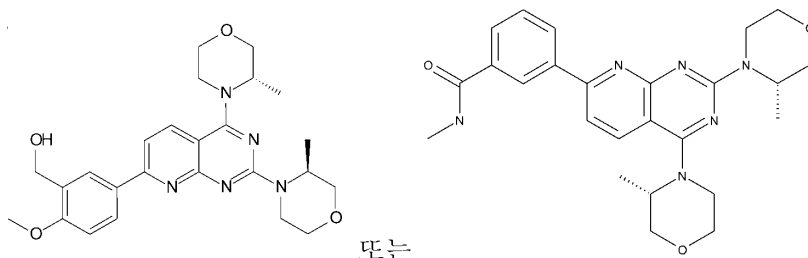
[0418] c) 상기 제1 및 제2 제형을 포함하는 용기 수단; 및 선택적으로

[0419] d) 사용 설명서를 포함하는 키트가 제공된다.

[0420] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면,

[0421] a) 제1 단위 제형으로 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염;

[0422] b) 제2 단위 제형으로 mTOR 억제제, 예를 들어 W02008/023161호에 개시된 것



[0423] ; 및

[0425] c) 상기 제1 및 제2 제형을 포함하는 용기 수단을 포함하는 키트가 제공된다.

[0426] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면,

[0427] a) 제1 단위 제형으로 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염;

[0428] b) 제2 단위 제형으로 PI3K-β의 억제제, 예를 들어 국제 특허 출원 W02011/051704호의 실시예 중 임의의 하나, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및

[0429] c) 상기 제1 및 제2 제형을 포함하는 용기 수단을 포함하는 키트가 제공된다.

[0430] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면,

[0431] a) 제1 단위 제형으로 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염;

[0432] b) 제2 단위 제형으로 PI3K-β의 억제제, 예를 들어 국제 특허 출원 W02011/051704호의 실시예 중 임의의 하나, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염;

[0433] c) 상기 제1 및 제2 제형을 포함하는 용기 수단; 및 선택적으로

[0434] d) 사용 설명서를 포함하는 키트가 제공된다.

[0435] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면,

- [0436] a) 제1 단위 제형으로 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염;
- [0437] b) 제2 단위 제형으로 PI3K- $\beta$  및 PI3K- $\delta$ 의 억제제인 8-((1R)-1-(3,5-디플루오로페닐아미노)에틸)-N,N-디메틸-2-모르폴리노-4-옥소-4H-크롬엔-6-카복사미드(국제 특허 출원 W02011/051704호의 실시예 3.06b, AZD8186로도 공지됨), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및
- [0438] c) 상기 제1 및 제2 제형을 포함하는 용기 수단을 포함하는 키트가 제공된다.
- [0439] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면,
- [0440] a) 제1 단위 제형으로 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염;
- [0441] b) 제2 단위 제형으로 PI3K- $\beta$  및 PI3K- $\delta$ 의 억제제인 8-((1R)-1-(3,5-디플루오로페닐아미노)에틸)-N,N-디메틸-2-모르폴리노-4-옥소-4H-크롬엔-6-카복사미드(국제 특허 출원 W02011/051704호의 실시예 3.06b, AZD8186로도 공지됨), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염;
- [0442] c) 상기 제1 및 제2 제형을 포함하는 용기 수단; 및 선택적으로
- [0443] d) 사용 설명서를 포함하는 키트가 제공된다.
- [0444] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면,
- [0445] a) 제1 단위 제형으로 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염;
- [0446] b) 제2 단위 제형으로 AKT 키나아제 억제제, 예를 들어(S)-4-아미노-N-(1-(4-클로로페닐)-3-히드록시프로필)-1-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)피페리딘-4-카복사미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염(AZD5363, 예를 들어 W02009/047563호 참조);
- [0447] c) 상기 제1 및 제2 제형을 포함하는 용기 수단; 및 선택적으로
- [0448] d) 사용 설명서를 포함하는 키트가 제공된다.
- [0449] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면,
- [0450] a) 제1 단위 제형으로 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염;
- [0451] b) 제2 단위 제형으로 AKT 키나아제 억제제, 예를 들어(S)-4-아미노-N-(1-(4-클로로페닐)-3-히드록시프로필)-1-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)피페리딘-4-카복사미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염(AZD5363, 예를 들어 W02009/047563호 참조); 및
- [0452] c) 상기 제1 및 제2 제형을 포함하는 용기 수단을 포함하는 키트가 제공된다.
- [0453] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면,
- [0454] a) 제1 단위 제형으로 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염;
- [0455] b) 제2 단위 제형으로 AKT 키나아제 억제제, 예를 들어(S)-4-아미노-N-(1-(4-클로로페닐)-3-히드록시프로필)-1-(7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)피페리딘-4-카복사미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염(AZD5363, 예를 들어 W02009/047563호 참조); 및
- [0456] c) 상기 제1 및 제2 제형을 포함하는 용기 수단; 및 선택적으로
- [0457] d) 사용 설명서를 포함하는 키트가 제공된다.
- [0458] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면,
- [0459] a) 제1 단위 제형으로 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염;
- [0460] b) 제2 단위 제형으로 올라파립(4-[3-(4-시클로프로판카보닐-피페라진-1-카보닐)-4-플루오로-벤질]-2H-프탈라진-1-온) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및
- [0461] c) 상기 제1 및 제2 제형을 포함하는 용기 수단을 포함하는 키트가 제공된다.
- [0462] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면,
- [0463] a) 제1 단위 제형으로 화학식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염;

- [0464] b) 제2 단위 제형으로 올라파립(4-[3-(4-시클로프로판카보닐-피페라진-1-카보닐)-4-플루오로-벤질]-2H-프탈라진-1-온) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및
- [0465] c) 상기 제1 및 제2 제형을 포함하는 용기 수단; 및 선택적으로
- [0466] d) 사용 설명서를 포함하는 키트가 제공된다.
- [0467] 모든 상기 조합물, 용도, 치료 방법 및 키트에서, AZD5363, AZD8186 및 올라파립은 유리 염기 형태 또는 약학적으로 허용되는 염의 형태일 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, AZD5363은 유리 염기 형태이다; 추가의 실시양태에서, AZD5363은 약학적으로 허용되는 염의 형태이다. 또 다른 실시양태에서, AZD8186은 유리 염기 형태이다; 추가의 실시양태에서, AZD8186은 약학적으로 허용되는 염의 형태이다. 또 다른 실시양태에서, 올라파립은 유리 염기 형태이다; 추가의 실시양태에서, 올라파립은 약학적으로 허용되는 염의 형태이다.
- [0468] 화학식 (I)의 화합물은 주로 온혈 동물(인간 포함)에서 사용하기 위한 치료제로서 가치가 있지만, 이들은 또한 PI3-키나아제- $\alpha$  및 - $\delta$ 의 효과를 억제할 필요가 있는 경우에는 언제나 유용하다. 따라서, 이들은 새로운 생물학적 시험의 개발에, 그리고 새로운 약리학적 제제의 연구에 사용하기 위한 약리학적 기준으로서 유용하다.
- [0469] 본원에서 용어 "조합(물)"이 사용되는 경우, 이는 동시, 개별 또는 순차 투여를 나타내는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명의 한 측면에서, "조합(물)"은 동시 투여를 나타낸다. 본 발명의 또 다른 측면에서, "조합(물)"은 개별 투여를 나타낸다. 본 발명의 추가의 측면에서, "조합(물)"은 순차 투여를 나타낸다. 순차 또는 개별 투여의 경우, 제2 성분을 투여하는데 있어서 지연은 조합(물)의 유의한 효과를 잃지 않는 정도가 되어야 한다.
- [0470] 한 실시양태에서, 순차 치료는 11일 기간 내에 조합물의 각 성분의 투여를 수반한다. 또 다른 실시양태에서, 치료 기간은 10일이다. 또 다른 실시양태에서, 치료 기간은 9일이다. 또 다른 실시양태에서, 치료 기간은 8일이다. 또 다른 실시양태에서, 치료 기간은 7일이다. 또 다른 실시양태에서, 치료 기간은 6일 이내이다. 또 다른 실시양태에서, 치료 기간은 5일 이내이다. 또 다른 실시양태에서, 치료 기간은 4일 이내이다. 또 다른 실시양태에서, 치료 기간은 3일 이내이다. 또 다른 실시양태에서, 치료 기간은 2일 이내이다. 또 다른 실시양태에서, 치료 기간은 24시간 이내이다. 또 다른 실시양태에서, 치료 기간은 12시간 이내이다.
- [0471] 순차 및 동시 투여 둘 다 BT474 모델에서 실시예 3 및 AZD5363을 이용한 조합물 실험으로 본원에서 예시된다. 상기 실시예에서, 순차 투여는 2일간 AZD5363를 투여하고, 2일간 실시예 3을 투여하고, 이어서 두 제제 모두 투여하지 않고, 패턴을 반복하여("투여 주기") 예시된다. 동시 투여는 AZD5363 및 실시예 3 둘 다 2일간 투여한 후 5일간 투여하지 않는 투여 계획으로 예시된다. 상기 두 실시예에서, 순차 투여는 중앙 퇴행을 유도하는데 더 효과적으로 보이며, 계획을 최적화하는 것의 잠재적인 중요성을 보여준다. 또한, 가능한 동시 투여 계획은 다음을 포함한다:
- [0472] 1) AZD5363 및 실시예 3 둘 다를 2일간 투여한 후 3일간 투여하지 않는 투여 주기;
- [0473] 2) AZD5363 및 실시예 3 둘 다를 3일간 투여한 후 4일간 투여하지 않는 투여 주기;
- [0474] 3) AZD5363 및 실시예 3 둘 다를 4일간 투여한 후 3일간 투여하지 않는 투여 주기;
- [0475] 4) AZD5363 및 실시예 3 둘 다를 5일간 투여한 후 2일간 투여하지 않는 투여 주기;
- [0476] 5) AZD5363 및 실시예 3 둘 다를 격일로 투여하는 투여 주기;
- [0477] 6) AZD5363 및 실시예 3 둘 다를 3일에 한 번 투여하는 투여 주기;
- [0478] 7) 투여 사이에 3 내지 4일 간격을 둔 주간 계획(예를 들어, 월요일/목요일)으로 투여하는 투여 주기;
- [0479] 8) 투여 사이에 2 내지 3일 간격을 둔 주간 계획(예를 들어, 월요일/수요일/금요일)으로 투여하는 투여 주기.
- [0480] 화학식 (I)의 화합물, 특히 실시예 3과 mTOR 억제제, 예를 들어 AZD2014 또는 PI3K- $\beta$  억제제(예를 들어,  $\beta$ / $\delta$  억제제 AZD8186)의 조합물은 적합하게는 실시예 3과 AZD5363의 조합물에 대한 상기에 기재된 것과 유사한 계획으로 투여될 수 있다.
- [0481] 화학식 (I)의 화합물과 올라파립의 조합물은 올라파립을 매일 투여하고 화학식 (I)의 화합물을 간헐적인 투여 계획(예를 들어 2일간 투여한 후 3 내지 5일간 투여하지 않음)에 따라 투여하는 계획에 따라 투여될 수 있다.
- [0482] 상기 예시적인 투여 계획의 각각은 본 발명의 추가의 측면을 포함한다. 상기 예시적인 투여 계획의 각각은 또한 상기 (i) 내지 (xi)에 열거된 기타 항종양제와의 조합물에 적용될 수 있다.



- [0483] 주어진 투여 주기 내에서 조합물의 특정 성분을 다른 것에 앞서 투여하는 것, 즉 순차 투여가 유리할 수 있다.
- [0484] 따라서, 할 실시양태에서 순차 투여는 주어진 투여 주기 내에서 상기 (i) 내지 (xi)에 열거된 기타 항종양제, 특히 AZD5363, AZD8186 및 올라파립으로부터 선택된 항종양제의 투여 전에 화학식 (I)의 화합물(특히 실시예 3)의 화합물의 순차 투여를 포함한다.
- [0485] 또 다른 실시양태에서, 순차 투여는 주어진 투여 주기 내에서 화학식 (I)의 화합물(특히 실시예 3)의 투여 전에 상기 (i) 내지 (xi)에 열거된 항종양제, 특히 AZD5363, AZD8186 및 올라파립으로부터 선택된 항종양제의 순차 투여를 포함한다.
- [0486] 한 실시양태에서, 상기 (i) 내지 (xi)에 열거된 항종양제 및 화학식 (I)의 화합물은 최대 2일 간격으로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 (i) 내지 (xi)에 열거된 항종양제 및 화학식 (I)의 화합물은 최대 1일 간격으로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 (i) 내지 (xi)에 열거된 항종양제 및 화학식 (I)의 화합물은 최대 18 시간 간격으로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 (i) 내지 (xi)에 열거된 항종양제 및 화학식 (I)의 화합물은 최대 12시간 간격으로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 (i) 내지 (xi)에 열거된 항종양제 및 화학식 (I)의 화합물은 최대 6시간 간격으로 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 상기 (i) 내지 (xi)에 열거된 항종양제 및 화학식 (I)의 화합물은 최대 3시간 간격으로 투여된다.
- [0487] 추가의 실시양태에서, 투여 주기는 5 내지 10일 기간 일 수 있다.
- [0488] 추가의 실시양태에서, 투여 주기는 6 내지 10일 기간 일 수 있다.
- [0489] 추가의 실시양태에서, 투여 주기는 7 내지 9일 기간 일 수 있다.
- [0490] 추가의 실시양태에서, 투여 주기는 6 내지 8일 기간 일 수 있다.
- [0491] 추가의 실시양태에서, 투여 주기는 10일 기간 일 수 있다.
- [0492] 추가의 실시양태에서, 투여 주기는 9일 기간 일 수 있다.
- [0493] 추가의 실시양태에서, 투여 주기는 8일 기간 일 수 있다.
- [0494] 추가의 실시양태에서, 투여 주기는 7일 기간 일 수 있다.
- [0495] 추가의 실시양태에서, 투여 주기는 6일 기간 일 수 있다.
- [0496] 추가의 실시양태에서, 투여 주기는 5일 기간 일 수 있다.
- [0497] 추가의 실시양태에서, 투여 주기는 6 내지 9일 기간의 투여 주기 내에 화학식 (I)의 화합물(특히 실시예 3)을 2-4일 연속 투여하고 나머지 일수는 투여하지 않을 수 있다.
- [0498] 추가의 실시양태에서, 투여 주기는 6 내지 9일 기간(예를 들어, 7일 기간)의 투여 주기 내에 화학식 (I)의 화합물(특히 실시예 3)을 3-4일 연속 투여하고 나머지 일수는 투여하지 않을 수 있다.
- [0499] 추가의 실시양태에서, 투여 주기는 7 내지 10일 기간의 투여 주기 내에 화학식 (I)의 화합물(특히 실시예 3)을 3-5일 연속 투여하고 나머지 일수는 투여하지 않을 수 있다.
- [0500] 추가의 실시양태에서, 투여 주기는 6 내지 9일 기간의 투여 주기 내에 화학식 (I)의 화합물(특히 실시예 3)을 5 일 연속 투여하고 나머지 일수는 투여하지 않을 수 있다.
- [0501] 추가의 실시양태에서, 투여 주기는 6 내지 9일 기간(예를 들어, 7일 기간)의 투여 주기 내에 화학식 (I)의 화합물(특히 실시예 3)을 4일 연속 투여하고 나머지 일수는 투여하지 않을 수 있다.
- [0502] 추가의 실시양태에서, 투여 주기는 6 내지 9일 기간의 투여 주기 내에 화학식 (I)의 화합물(특히 실시예 3)을 3 일 연속 투여하고 나머지 일수는 투여하지 않을 수 있다.
- [0503] 투여 주기는 활성 조합물 성분이 투여되지 않는 일수로 분리될 수 있다.
- [0504] 상기에 기재된 조합 요법은 이의 일반적인 처방하는 투여 일정에 따라 통상적으로 수행되는 최고의 표준 치료 요법에 추가될 수 있다.
- [0505] 맞춤 의료
- [0506] 본 발명의 또 다른 측면은 포스포이노시티드-3-키나아제 촉매 알파 폴리펩티드(PIK3CA)를 코딩하는 유전자 상태

와 화학식 (I)의 화합물을 이용한 치료에 대한 감수성 사이의 관계를 확인하는 것을 기초로 한다. 따라서, 이는 화학식 (I)의 화합물로 치료하기 위한 환자, 특히 암 환자를 선별하고/거나 치료에 치료적으로 반응할 가능성이 낮은 환자의 치료를 피함으로써 불필요한 치료와 이러한 효과없는 치료와 연관될 수 있는 부작용을 피하기 위한 기회, 방법 및 수단을 제공한다..

[0507] 본 발명은 환자 선별 도구 및 방법(맞춤 의약을 포함)에 관한 것이다. 선별은 치료할 종양세포가 야생형 또는 돌연변이형 PIK3CA 유전자를 가지는지의 여부에 기초한다. 따라서, PIK3CA 유전자 상태가 PI3K- $\alpha$  및  $-\delta$  억제제를 이용한 치료에 대한 감수성의 생물지표로서 사용될 수 있다.

[0508] 종양이 PI3K- $\alpha$  및  $-\delta$  억제제, 예를 들어 화학식 (I)의 화합물을 이용한 치료에 반응할 환자의 질을 높이거나 환자를 선별할 생물지표가 명백하게 요구되고 있다. 제제에 반응할 가능성이 가장 큰 환자를 확인하는 환자 선별 생물지표는 종양 치료에 이상적인데, 상기 제제의 가능한 부작용에 대해 반응하지 않는 종양을 가진 환자의 불필요한 치료를 감소시키기 때문이다.

[0509] 생물지표는 "정상 생물 과정, 병리 과정 또는 치료 개입에 대한 약리 반응의 지표로서 객관적으로 측정되고 평가되는 특징"으로 설명될 수 있다. 생물지표는 생물지표의 존재 또는 수준과 병태 또는 질환의 어떤 측면(병태 또는 질환의 존재, 수준 또는 변화 수준, 유형, 단계, 병태 또는 질환에 대한 감수성, 또는 병태 또는 질환을 치료하기 위해 사용되는 약물에 대한 반응성을 포함) 사이의 상관관계가 있는 특정 병태 또는 질환과 연관된 임의의 확인할 수 있고 측정할 수 있는 지표이다. 상관관계는 정량적, 정성적, 또는 정량적 및 정성적 둘 다일 수 있다. 통상적으로 생물지표는 화합물, 화합물 단편 또는 화합물 군이다. 이러한 화합물은 단백질(펩티드), 핵산 및 기타 화합물을 포함하여 생물체에서 발견되거나 이들에 의해 생산되는 임의의 화합물일 수 있다.

[0510] 생물지표는 예측능을 가질 수 있고, 이로써 특정 병태 또는 질환(특정 미생물 또는 독소의 존재 또는 수준을 포함하여)의 존재, 수준, 유형 또는 단계, 특정 병태 또는 질환에 대한 감수성(유전적 감수성 포함), 또는 특정 치료(약물 치료 포함)에 대한 반응을 예측하거나 검출하는데 사용될 수 있다. 생물지표는 연구 및 개발 프로그램의 효능을 향상시킴으로써 약물 발견 및 개발의 미래에 있어 점점 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 생물지표는 진단제, 질환 진행의 모니터, 치료 모니터 및 임상 결과의 예측 인자로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 다양한 생물지표 연구 프로젝트는 특정 암 및 특정 심혈관 질환 및 면역 질환의 표지를 확인하려고 시도하고 있다. 입증된 신규 생물지표의 개발은 의료 및 약물 개발 비용의 상당한 감소, 및 광범위한 질환 및 병태에 대한 치료에 있어 상당한 향상을 가져올 것으로 생각된다.

[0511] 임상 시험을 최적으로 설계하고 상기 시험으로부터 최상의 정보를 얻기 위해서, 생물지표가 필요할 수 있다. 표지는 대응 조직 및 종양 조직에서 측정할 수 있다. 이상적으로 이러한 표지는 또한 효능과 연관될 것이고 따라서 최종적으로 환자 선별에 사용될 수 있다.

[0512] 따라서, 본 발명의 상기 측면에 놓인 기술적인 문제는 화학식 (I)의 화합물을 이용한 치료를 위한 환자의 층별화 수단의 확인이다. 기술적 문제는 본원의 청구항 및/또는 설명에서 특징을 갖는 실시양태를 제공함으로써 해결된다.

[0513] 본원의 실시예에서 상세히 설명되는 바와 같이, PIK3CA의 돌연변이를 가진 세포는 일반적으로 화학식 (I)의 화합물에 의한 성장 억제에 더 민감하다는 것이 확인되었다.

[0514] 본 발명은 화학식 (I)의 화합물에 대한 세포의 민감도를 측정하는 방법을 제공한다. 방법은 상기 세포에서 PIK3CA 유전자의 상태를 측정하는 단계를 포함한다. 세포가 돌연변이된 PIK3CA 유전자를 갖는 경우 세포는 화학식 (I)의 화합물에 민감할 가능성이 있는 것으로 확인된다. 따라서, 돌연변이된 PIK3CA 유전자를 가진 환자는 화학식 (I)의 화합물을 이용한 치료에 특히 민감할 것으로 예측된다. 화학식 (I)의 화합물이 세포 성장 분석에서 세포 수의 증가를 억제하는 경우(세포 증식의 억제 및/또는 세포 사멸의 증가를 통해) 세포는 화학식 (I)의 화합물에 민감하다고 정의된다. 본 발명의 방법은 어느 세포가 성장 억제에 의해 화학식 (I)의 화합물에 반응할 가능성이 더 높은지를 예측하는데 유용하다.

[0515] 또한, 본 발명은 부분적으로 화학식 (I)의 화합물을 투여할지를 결정하는 단계를 포함하여 화학식 (I)의 화합물에 대한 환자의 반응성을 측정하는데 사용될 수 있는 방법에 기초한다. 구체적으로, 본 발명의 방법은 PIK3CA의 유전자 상태의 결정 단계를 포함한다. 돌연변이된 PIK3CA 유전자의 존재는 종양세포가 화학식 (I)의 화합물과 접촉하는 경우 성장 억제에 의해 반응할 가능성이 더 높다는 것을 나타낸다. 따라서, PIK3CA 유전자 상태를 이용하여 화학식 (I)로 치료할 환자를 선별할 수 있다.

[0516] 게다가, 화학식 (I)의 화합물에 민감할 가능성이 있는 환자의 시험관 내 확인 방법을 개시한다. PIK3CA 유전자

의 돌연변이 상태를 측정할 수 있는 올리고- 또는 폴리뉴클레오티드 프라이머 또는 프로브의 용도를 개시한다. PIK3CA 돌연변이 검출용 키트의 용도를 개시한다. 이러한 키트는 퀴아젠(Qiagen) 및 로체 몰레큘라 시스템(Roche Molecular Systems)을 포함한 진단 회사에 의해 시판되는 PIK3CA 돌연변이 검출 키트를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 암 환자가 화학식 (I)의 화합물을 이용한 약학적 치료에 반응자가 될 가능성이 있는지 여부를 결정하기 위한 시험관 내 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 (i) 상기 환자로부터 미리 수집한 종양의 대표하는 시료를 얻는 단계; 및 (ii) 상기 시료 중 PIK3CA 유전자가 돌연변이를 포함하는지의 여부를 결정하는 단계를 포함한다. PIK3CA 유전자에서 돌연변이는 화학식 (I)의 화합물을 이용한 치료에 반응할 증가된 가능성의 지표가 된다. 단일 유전자 생물지표 검사로서, PIK3CA 돌연변이를 포함하는 종양의 확인은 화학식 (I)의 화합물에 대한 반응의 질을 높일 것이다. PIK3CA 돌연변이를 포함하는 각각의 종양은 화학식 (I)의 화합물에 반응할 최대 가능성을 갖는다.

[0517] "종양의 대표하는" 시료는 단리된 실제 종양 시료일 수 있거나, 추가로 처리된 시료, 예를 들어 종양 시료로부터 PCR 증폭된 핵산 시료일 수 있다.

[0518] 정의:

[0519] 맞춤 의료 부분에서:

[0520] "대립유전자"는 유전자 좌의 특정 형태로 이의 특정 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열에서 다른 형태와 구분되는 것을 나타낸다.

[0521] "증폭 반응"은 비표적 핵산에 대해 표적 핵산의 특이적 증폭을 가져오는 핵산 반응이다. 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)은 잘 알려진 증폭 반응이다.

[0522] 본원에서 "암"은 세포가 신생물 표현형으로 형질전환되어 생기는 신생물 성장을 나타내는데 사용된다. 상기 세포의 형질전환은 대개 유전자 돌연변이와 관련된다.

[0523] "유전자"는 발현을 조절하는 5' 또는 3' 측부 영역(전사되는 유전자 부위 내에 존재하지 않음) 내에 위치할 수 있는 프로모터, 엑손, 인트론, 및 기타 서열 요소를 포함하는, RNA 산물의 생합성의 조절을 위한 모든 정보를 포함하는 DNA 분절이다.

[0524] "유전자 상태"는 유전자가 야생형 또는 야생형이 아닌지(즉, 돌연변이체) 여부를 나타낸다.

[0525] "표지"는 분석 시료에서 표적 폴리뉴클레오티드의 존재의 검출 가능한 신호 지표를 생산할 수 있는 조성물을 나타낸다. 적합한 표지는 방사선동위원소, 뉴클레오티드 발색단, 효소, 기질, 형광분자, 화학발광 잔기, 자성입자, 생물발광 잔기 등을 포함한다. 이같이, 표지는 분광학, 광화학, 생화학, 면역화학, 전기, 광학 또는 화학 수단에 의해 검출 가능한 임의의 조성물이다.

[0526] "비동의 변이(non-synonymous variation)"은 결과적으로 다른(변경된) 폴리펩티드를 생산하게 하는 유전자의 코딩 서열에서 변이, 또는 코딩 서열을 중복하는 변이(변화)를 나타낸다. 상기 변이는 단백질 기능에 영향을 줄 수 있거나 주지 않을 수 있으며, 미스센스 변이체(결과, 한 아미노산이 다른 아미노산으로 치환) 넌센스 변이체(결과, 미성숙 정지 코돈의 생성으로 인해 짧아진 폴리펩티드) 및 삽입/결실 변이체를 포함한다.

[0527] "동의 변이(synonymous variation)"는 코딩된 폴리펩티드의 서열에 영향을 주지 않는 유전자의 코딩 서열에서 변이(변화)를 나타낸다. 상기 변이는 단백질 기능에 간접적으로 영향을 줄 수 있지만(예를 들어, 유전자의 발현을 변경함으로써) 반대 증거가 없는 경우 일반적으로 무해하다고 추정된다.

[0528] "핵산"은 자연에서 발견되는 천연 핵산 및/또는 당업계에 공지된 바와 같이 변형된 골격 또는 염기를 갖는 변형된, 인공의 핵산을 포함하는 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA 및 RNA 분자를 나타낸다.

[0529] "프라이머"는 복제되는 핵산 가닥에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성을 위한 개시 지점으로 작용할 수 있는 단일 가닥 DNA 올리고뉴클레오티드 서열을 나타낸다. 프라이머의 길이 및 서열은 연장 산물의 합성을 개시할 수 있는 것이어야 한다. 전형적인 프라이머는 표적 서열에 실질적으로 상보적인 서열의 길이 7개 이상의 뉴클레오티드를 포함하지만, 약간 더 긴 프라이머가 바람직하다. 일반적으로, 프라이머는 약 15-26개 뉴클레오티드를 포함하나 더 길거나 더 짧은 프라이머도 사용될 수 있다.

[0530] "다형성 부위"는 집단 내에서 2가지 이상의 대체 서열이 발견되는 유전좌위 내의 위치이다.

[0531] "다형성"은 개인의 다형성 부위에서 발견되는 서열 변이를 나타낸다. 다형성은 뉴클레오티드 치환, 삽입, 결실

및 미소부수체(microsatellite)를 포함할 수 있으나, 유전자 발현 또는 단백질 기능에서 검출될 수 있는 차이를 일으킬 수 있으나 반드시 일으킬 필요는 없다. 발현 또는 단백질 기능에 대한 영향의 증거가 없는 경우, 비동의 변이체를 포함하는 공통 다형성은 일반적으로 야생형 유전자 서열의 정의 내에 포함되는 것으로 간주한다. 확인, 발견 빈도 및 질환 연관성을 포함한 인간 다형성 및 연관된 부가 설명의 카탈로그는 NCBI(dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)에 의해 유지된다. 유전자 서열의 맥락에서 사용되는 경우의 용어 "다형성"은 화합물의 결정질 또는 무정형 특성인 화합물의 고상 형태의 맥락에서 사용되는 경우의 용어 "다형성"과 혼동해서는 안된다는 것에 주의한다. 당업자는 그 맥락에서 의도된 의미를 이해할 것이다.

[0532] "프로브"는 검출될 대립유전자의 표적 서열에 정확하게 상보적인 서열을 갖는 단일 가닥의 서열 특이적 올리고 뉴클레오티드를 나타낸다.

[0533] "반응"은 고형 종양의 반응 평가 기준(RECIST: Response Evaluation Criteria in Solid Tumours)에 따른 측정 에 의해 정의된다. RECIST는 환자를 2개의 주요 군, 즉, 부분적인 반응 또는 안정한 질환을 보이는 군 및 진행성 질환의 징후를 보이는 군으로 분류된다.

[0534] "엄격한 혼성화 조건"은 50% 포름아미드, 5x SSC(750 mM NaCl, 75 mM 시트르산삼나트륨), 50 mM 인산나트륨(pH 7.6), 5x 덴하르트(Denhardt's) 용액, 10% 텍스트란 설페이트, 및 20 pg/ml 변성 전단된 연어 정자 DNA를 포함 하는 용액 중 42°C에서 밤새 인큐베이션 후 0.1x SSC 중 약 65°C에서 필터를 세척하는 것을 나타낸다.

[0535] "생존"은 환자의 전체 생존 기간 및 무진행 생존 기간을 포함한다.

[0536] "전체 생존 기간(OS: overall survival)은 약물 투여 개시부터 어떤 원인에 의한 사망까지의 시간으로 정의된다. "무진행 생존기간(PFS: Progression-free survival)"은 약물 투여 개시부터 진행성 질환의 최초 출현 또는 어떤 원인에 의한 사망까지의 시간으로 정의된다.

[0537] 본 발명의 한 측면에 따르면, 화학식 (I)의 화합물로 치료하기 위한 환자를 선별하는 방법에 있어, 환자로부터의 종양세포 함유 시료를 제공하는 단계; 환자의 종양세포 함유 시료 내 PIK3CA 유전자가 야생형 또는 돌연변이 체인지 여부를 결정하는 단계; 및 이를 근거로 하여 화학식 (I)의 화합물로 치료하기 위한 환자를 선별하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0538] 방법은 실제 환자 시료의 단리 단계를 포함할 수 있거나 배제할 수 있다. 따라서, 본 발명의 한 측면에 따르면, 화학식 (I)의 화합물로 치료하기 위한 환자를 선별하는 방법에 있어, 환자로부터 미리 단리된 종양세포를 포함 하는 시료 내 PIK3CA 유전자가 야생형 또는 돌연변이체인지 여부를 결정하는 단계; 및 이를 근거로 하여 화학식 (I)의 화합물로 치료하기 위한 환자를 선별하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0539] 한 실시양태에서, 환자는 종양세포 DNA가 돌연변이 PIK3CA를 갖는 경우 화학식 (I)의 화합물로 치료하기 위해 선택된다. 다른 실시양태에서, 종양세포 DNA가 야생형 PIK3CA 유전자를 갖는 환자는 화학식 (I)의 화합물로 치료하기 위해 선택되지 않는다.

[0540] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 화학식 (I)의 화합물에 대한 환자의 반응성을 예측하는 방법에 있어, 환자의 종양세포 내 PIK3CA 유전자가 야생형 또는 돌연변이체인지 여부를 결정하는 단계, 및 이를 근거로 하여 화학식 (I)의 화합물을 이용한 치료에 대한 환자의 반응성을 예측하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.

[0541] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 암에 걸린 인간 환자에서 화학식 (I)의 화합물을 이용한 치료 효과의 가능성을 결정하는 방법에 있어, 환자의 종양세포 내 PIK3CA 유전자가 야생형 또는 돌연변이체인지 여부를 결정하는 단계; 및 이를 근거로 하여 화학식 (I)의 화합물을 이용한 치료에 대한 환자의 반응성을 예측하는 단계를 포함 하는 방법이 제공된다.

[0542] 본 발명의 목적을 위해, 야생형의 유전자 상태는 유전자의 정상 또는 적합한 발현 및 코딩된 단백질의 정상 기능을 나타내는 것을 의미한다. 반면, 돌연변이 상태는 비정상 또는 부적절한 유전자 발현, 또는 암에서 돌연변이 PIK3CA의 공지된 역할(본원에서 기재된 바와 같이)에 일치하는 변경된 기능을 갖는 단백질의 발현을 나타내는 것을 의미한다. 돌연변이, 증폭, 결실, 게놈 재배열, 또는 메틸화 프로파일의 변화를 포함하나 이에 제한되지 않는 많은 유전적 또는 후성적 변경은 돌연변이 상태를 일으킬 수 있다. 그러나 그럼에도 불구하고 상기 변경이 정상 단백질 또는 기능적 등가의 변이체의 적절한 발현을 일으키는 경우, 유전자 상태는 야생형으로 간주 된다. 통상적으로 기능적 돌연변이 유전자 상태를 일으키지 않는 변이체의 예는 동의 코딩 변이체 및 공통 다형성(동의 또는 비동의)을 포함한다. 아래에 논의되는 바와 같이, 유전자 상태는 기능 분석에 의해 평가될 수 있거나, 기준 서열로부터 검출된 편차의 특성으로부터 추론될 수 있다.

- [0543] 특정 실시양태에서, PIK3CA 유전자의 야생형 또는 돌연변이 상태는 유전자 내 비동의 핵산 변이의 존재 또는 비존재에 의해 결정된다. 관찰된 비동의 변이가 설명되는 기능적 효과를 갖지 못하는 공지된 공통 다형성에 상응하는 경우 돌연변이의 유전자 상태의 원인이 되지 않는다.
- [0544] 돌연변이 상태를 나타내는 PIK3CA 유전자 내 다른 변이는 mRNA 전구체(pre-mRNA)에서 mRNA로의 프로세싱 과정에서 인트론/엑손 연결부위를 인식을 감소시키는 스플라이스 부위 변이를 포함한다. 이것은 엑손 스킵핑 또는 스플라이스된 mRNA 내에 정상적인 인트론 서열의 포함을 가져올 수 있다(인트론 보유 또는 잠재(cryptic) 스플라이스 결합 부위의 이용). 이것은 차례로 정상 단백질에 비해 삽입 및/또는 결실을 가진 비정상 단백질을 생성할 수 있다. 따라서, 다른 실시양태에서, 인트론/엑손 연결 부위에서 스플라이스 부위 인식 서열을 변경하는 변이체가 존재하는 경우 유전자는 돌연변이 상태를 갖는다.
- [0545] 게다가, 또 다른 유전자, 예를 들어 비정상적이거나 조절 해제된 PIK3CA 또는 PI3K- $\alpha$ 를 갖는 종양 내 내성의 가능한 표지인 Kras의 돌연변이 상태 또는 활성화 상태의 측정은 맞춤 의학 접근법의 예측도를 증가시키는 것을 도울 수 있다.
- [0546] 본 발명자들 아스트라제네카에서 유방암에 대해 실시한 조사에서(COSMIC 데이터베이스(Welcome Trust Sanger Institute, Sep 2011)에 근거), PIK3CA 유전자 내 >55 상이한 돌연변이를 >5K 인간 종양을 포함하는 데이터셋에서 확인하였다. 대부분의 돌연변이는 <1% 빈도로 발생하였으며, 3가지는 1-3% 빈도로 발생하였으나, 4가지 돌연변이는 전체 PIK3CA 돌연변이의 ~88%를 차지하였다. 이들은 키나아제 도메인 미스센스 돌연변이로서 C 말단 키나아제 도메인 내 H1047R(55%) 및 H1047L(5%), 나선형 도메인 잔기 내, E545K(18%) 및 E542K(11%)였다. 완전히 열거하고자 하지 않지만 기타 보편적인 유방암 돌연변이를 더 열거하자면 R38H, R38C, R88Q, N345K, C420R, E453Q, P539R, E542K, E545K, E545A, Q546K, Q546P, M1043I, M1043V, H1047R, H1047L, H1047Y를 포함한다. 그러므로 가장 보편적인 돌연변이 검출에 대해 중점을 두는 진단 분석법을 개발함으로써 대부분의 PIK3CA 돌연변이의 확인을 가능하게 한다. 예를 들어 로체 몰레클라 시스템의 코바스 PIK3A 뮤테이션 테스트(Cobas(TM) PIK3CA Mutation Test)는 포르말린 고정되고 파라핀 매몰된 종양 시료로부터 단리된 DNA 내 PIK3CA 유전자의 엑손 1, 4, 7, 9 및 20 내 17가지 돌연변이(E542K, E545A, E545G, E545K, E545D, Q546K, Q546R, Q546E, Q546L, N345K, C420R, R88Q, H1047L, H1047R, H1047Y, G1049R 및 M1043I)를 검출하도록 고안되어 있다. 상기 키트는 ER+ 유방암 내 ~95%까지의 돌연변이를 찾아낼 수 있다. 돌연변이의 분포는 다른 종양 유형에 따라 달라지며 진단 계획이 이에 따라 조정될 수 있다. 예를 들어, 유방암에 비해 자궁내막암에서, PIK3CA 유전자 코딩 서열에 퍼져있는 돌연변이가 더 균등하게 분포되며 단백질의 N 말단 영역 내 더 많은 돌연변이를 가진다(더글라스(Douglas A. Levine, M.D, TCGA 2nd Annual Symposium, November 28, 2012)가 전함).
- [0547] PIK3CA의 경우, 기준 서열은 유전자(진뱅크(GenBank) 승인번호: NG\_012113), mRNA(진뱅크 승인번호: NM\_006218), 및 단백질(진뱅크 승인번호: NP\_006209 또는 스위스-프로트(Swiss-Prot) 승인: P42336)으로 이용 가능하다. 기준 유전자(게놈 영역) 서열은 상류 서열의 5000개 염기 및 하류 서열의 2000개 염기를 포함한다. PIK3CA 내 돌연변이는 잘 알려져 있으며(COSMIC 데이터베이스 - Welcome Trust Sanger Institute), 당업자는 야생형과 DNA 또는 단백질 서열의 비교를 기초로 하여 PIK3CA 유전자 상태, 즉 특정 PIK3CA 유전자가 야생형 또는 돌연변이체인지의 여부를 결정할 수 있을 것이다.
- [0548] PIK3CA 및 PI3-키나아제 알파 단백질 서열의 p110 $\alpha$  촉매 서브유닛에 대해 개시된 유전자 및 mRNA 서열은 각각의 대표적인 서열이라는 것은 명백할 것이다. 정상 개체에서, 각 유전자의 두 개의 카피, 모친 카피 및 부친 카피가 존재하여, 이들은 약간의 서열의 차이를 가질 가능성이 있고, 더욱이 집단 내에서 유전자 서열의 수많은 대립유전자 변이체가 존재할 것이다. 야생형으로 간주되는 다른 서열은 핵산 서열에 하나 이상의 동의 변화(코딩된 단백질을 변경하지 못하는 변화)를 갖는 것, 단백질을 변경하지만 단백질 기능 부위 서열 변화에 영향을 주지 않는 비동의 공통 다형성(예를 들어, 생식 세포 계열 다형성) 및 인트론 비-스플라이스를 포함한다.
- [0549] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 암에 걸린 인간에서 화학식 (I)의 화합물로 치료 효과의 가능성을 결정하는 방법에 있어, 야생형 유전자에 비해 상기 환자의 PIK3CA 유전자 내 하나 이상의 비동의 핵산 변화의 존재 또는 비존재를 검출하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 상기에서 PIK3CA 유전자 내 하나 이상의 체세포 비동의 핵산 변화는 화학식 (I)의 화합물을 이용한 치료가 효과적일 가능성이 있다는 것을 나타낸다.
- [0550] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 화학식 (I)의 화합물을 이용한 치료에 대한 개인의 감수성을 평가하는 방법에 있어,

- [0551] (i) 개인으로부터 종양세포 DNA 내 PIK3CA 유전자의 비동의 돌연변이 상태를 결정하는 단계; 및
- [0552] (ii) 종양세포 내 PIK3CA 유전자의 비동의 돌연변이 상태를 참고로 하여 화학식 (I)의 화합물을 이용한 치료에 대한 개인의 가능한 감수성을 결정하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다.
- [0553] PIK3CA의 유전자 상태를 결정하는 수많은 기술이 당업자에게 이용 가능하다. 유전자 상태는 핵산 서열의 결정에 의해 결정될 수 있다. 이것은 전장의 유전자의 직접적인 서열분석 및 유전자 내 특정 부위, 예를 들어 흔히 돌연변이되는 부위의 분석을 통해 가능할 것이다.
- [0554] PIK3CA 유전자가 야생형 또는 돌연변이인지의 여부를 결정하는 대체 수단은 전사된 유전자의 기능을 평가하는 것이다. 상기 PIK3CA 유전자의 기능적 돌연변이는 Akt 및 S6 키나아제의 활성화를 포함하나 이에 제한되지 않는 세포 내 경로의 증가된 하류 신호전달을 증가시키는 지질 키나아제 활성이 증가된 단백질을 생성한다. 세포에서 발현되는 경우 PIK3CA 변이형의 기능적 상태를 평가하는 분석은 다음을 포함하나 이에 제한되지 않는다:
- [0555] (i) PIK3CA 유전자의 키나아제 활성 산물인 포스파티딜이노시톨-트리스포스페이트(PI(3,4,5)P3)의 생산 증가;
- [0556] (ii) 인산화된 Akt 또는 S6 키나아제의 수준 증가;
- [0557] (iii) PIK3CA 변이체로 형질감염된 NIH-3T3 세포의 병소 및 콜리니 형성의 증가(Ikenoue T et al., Cancer Res., 2005 65, 4562-4567)
- [0558] 시료
- [0559] 유전자 상태에 대해 시험되는 환자의 시료는 개인으로부터 얻어지거나 얻어질 수 있는 임의의 종양 조직 또는 종양세포 함유 시료일 수 있다. 시험 시료는 편리하게는 개인으로부터 얻어지는 혈액, 구강 도찰물, 생검, 또는 기타 체액, 또는 체조직의 시료이다. 특정 실시예는 순환 종양세포, 혈장 또는 혈청 내 순환 DNA, 난소암 환자의 복수액으로부터 단리된 세포, 폐 내 종양 환자의 폐 객담, 유방암 환자의 세침 흡인물, 소변, 말초혈액, 세포 칼과표본, 모낭, 피부 편치 또는 협측 시료를 포함한다.
- [0560] 시험 시료는 마찬가지로 시험 시료 내 서열에 해당하는 핵산 서열일 수 있다, 다시 말해 시료 핵산 내 영역의 전체 또는 일부는 분석 전에 임의의 편리한 기술, 예를 들어 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 이용하여 우선 증폭될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 핵산은 게놈 DNA, 또는 분획된 또는 전세포의 RNA일 수 있다. 특정 실시양태에서 RNA는 전세포 RNA이고 임의의 프라이머 또는 폴리 A 프라이머를 이용하여 제1 가닥 cDNA를 표지하기 위한 주형으로서 직접 사용될 수 있다. 시험 시료 내 핵산 또는 단백질은 표준 방법에 따라 시료로부터 추출될 수 있다(문헌(Green & Sambrook, Eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2012, 4th edition, Vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) 참조).
- [0561] 본 발명의 진단 방법은 개인 또는 환자로부터 미리 얻어진 시료를 이용하여 착수될 수 있다. 상기 시료를 동결하여 보존하거나 포르말린-파라핀에 또는 다른 매질에 고정하거나 매립할 수 있다. 별법으로, 신선한 종양세포 함유 시료를 얻어 사용할 수 있다.
- [0562] 본 발명의 방법은 임의의 종양으로부터의 세포를 이용하여 적용될 수 있다. 화학식 (I)의 화합물로 치료하기에 적합한 종양은 상기에 기재되었다.
- [0563] PIK3CA 내 돌연변이는 임상 종양에서 광범위하게 발견되지만 각 유전자 내 돌연변이의 출현율은 종양 조직 유형에 따라 크게 달라진다. 예를 들어 PIK3CA 돌연변이는 유방암에서 상대적으로 보편적이지만 신장 종양에서는 상대적으로 드물다.

[0564]

[표 1]

조직	PIK3CA 돌연변이 출현율 (%)
음경	29
자궁내막	26
유방	26
소장	20
요로	17
피부	13
대장	12
위	9
담관	9
난소	9
자궁경부	8
식도	6
간	6
상부 호흡소환관	6
CNS	5
NS	5
폐	4
갑상선	4

[0565]

뇌하수체	3
연조직	3
췌장	3
신장	2
진립선	2
뇌척수막	1
눈	1
자율신경절	1
조혈성/림프성	1
부신	0
뼈	0
나팔관	0
위장관(불명확한 부위)	0
복막	0
침샘	0
고환	0
흉선	0
질	0

임상 시료에서 PIK3CA 돌연변이의 출현율. PIK3CA 정보에 대한 출처는 COSMIC 데이터베이스(배포 v62)이다. 본 발명의 환자 선별 방법은 PIK3CA 돌연변이의 높은 발생률이 존재하는 질환(조직) 단편에서 특히 유용할 수 있다(예를 들어, 유방, 요로, 자궁내막, 대장, 자궁경부 등).

[0566]

[0567]

당업자에게 분명할 것과 같이, 상기 빈도 자료는 새롭고 더 포괄적인 데이터가 인간 암 게놈 프로파일링 협력단(Human Cancer Genome profiling consortia) 예를 들어 TCGA(The Cancer Genome Atlas) 및 ICGC(International Cancer Genome Consortium)로부터 나오면서 계속해서 개선되고 갱신되고 있다. 그러므로 PIK3CA 의존성을 가진 추가의 종양 유형이 확인될 수 있으며 본원에서 기재된 화합물로 치료하기에 적격일 수 있다.

[0568]

핵산 검출 방법

[0569]

돌연변이 PIK3CA 핵산의 검출을 이용하여 본 발명의 맥락에서 약물 치료에 대한 반응을 예측할 수 있다. 상기 유전자 내 돌연변이는 DNA 수준에서 발생하기 때문에, 본 발명이 방법은 게놈 DNA, 및 이의 전사체 및 단백질 자체 내 돌연변이 또는 변화의 검출을 기본으로 할 수 있다. 검출된 돌연변이가 피험체에서 실제로 발현되는지 확실히 하기 위해서는 전사체 및/또는 폴리펩티드의 분석에 의해 게놈 DNA 내 돌연변이를 확인하는 것이 바람직할 수 있다.

[0570]

유전자 내 하나 이상의 위치에서 변이 뉴클레오티드의 존재 또는 비존재를 검출하는데 사용될 수 있는 수많은 분석 방법이 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 일반적으로, 대립유전자 변이의 검출은 돌연변이 식별 기술, 선택적으로 증폭 반응(예를 들어 폴리머라제 연쇄 반응을 기본으로 하는 것) 및 선택적으로 신호 생성 시스템을 필요로 한다. 당 업계에 이용 가능한 다수의 돌연변이 검출 기술이 있으며 이들은 당 업계에 이용 가능한 수많은 신호 생성 시스템과 조합하여 사용될 수 있다. 대립유전자 변이의 많은 검출 방법은 문헌(Nollau et al., *Clin. Chem.*, 1997, **43**, 1114-1120; Anderson SM. *Expert Rev Mol Diagn.*, 2011, **11**, 635-642; Meyerson M. et al., *Nat Rev Genet.*, 2010, **11**, 685-696) 및 표준 교과서, 예를 들어 문헌("Laboratory Protocols for Mutation Detection", Ed. by U. Landegren, Oxford University Press, 1996 and "PCR", 2<sup>nd</sup> Edition by



Newton & Graham, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997)을 참조한다.

- [0571] 상기에 언급된 바와 같이, 암환자에서 PIK3CA 유전자 내 특정 변화 또는 다수의 변화의 존재 또는 비존재를 결정하는 단계는 여러 가지 방법으로 수행될 수 있다. 이러한 시험은 대개 생물학적 시료, 예를 들어 조직 생검, 소변, 대변, 객담, 혈액, 세포, 조직 찰과 표본, 유방 흡인물, 또는 기타 세포성 물질로부터 수집된 DNA 또는 RNA를 이용하여 수행되고, PCR, 대립유전자 특이적 프로브와 혼성화, 효소적 돌연변이 검출, 미스매치의 화학적 절단, 질량분광분석법 또는 미니서열분석을 포함한 DNA 서열분석을 포함한 다양한 방법에 의해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0572] 적합한 돌연변이 검출 기술은 증폭 불응 돌연변이 시스템(ARMS™; Amplification refractory mutation system), 증폭 불응 돌연변이 시스템 선형 신장(ALEX™; Amplification refractory mutation system linear extension), 경쟁적 올리고뉴클레오티드 프라이밍 시스템(COPS; competitive oligonucleotide priming system), 택맨(Taqman), 분자 비콘(Molecular Beacons), 제한 단편 길이 다형성(RFLP; Restriction Fragment length polymorphism), 및 제한 부위 기반 PCR 및 형광 공명 에너지 전이(FRET; fluorescence resonance energy transfer) 기술을 포함한다.
- [0573] 특정 실시양태에서 생물지표 유전자 내 뉴클레오티드(들)를 결정하기 위해 이용되는 방법은 대립유전자 특이적 증폭(대립유전자 특이적 PCR), 예를 들어 증폭 불응 돌연변이 시스템(ARMS), 서열분석, 대립유전자 식별 분석법, 혼성화, 제한 단편 길이 다형성(RFLP) 또는 올리고뉴클레오티드 결찰 분석법(OLA)으로부터 선택된다.
- [0574] 특정 실시양태에서, 대립유전자 특이적 프로브를 이용한 혼성화는 다음에 의해서 수행될 수 있다; (1) 예를 들어 DNA 칩 적용으로서, 용액 내 표지된 시료와 고상(예를 들어, 유리, 실리콘, 나일론 막)에 결합된 대립유전자 특이적 올리고뉴클레오티드에 의해; 또는 (2) 용액 내 결합된 시료(대개 클로닝된 DNA 또는 PCR 증폭된 DNA) 및 표지된 올리고뉴클레오티드(혼성화에 의해 서열분석이 가능할 정도로 특이적이거나 짧은 대립유전자). 진단 검사는 대개 고상 지지체 상에 하나 이상의 변화를 동시에 결정할 수 있는 일련의 변화를 포함할 수 있다. 이러한 혼성화 프로브는 당 업계에 잘 알려져 있으며(예를 들어, 문헌(Green & Sambrook, Eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2012, 4th edition, Vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) 참조) 두개 이상의 변화 부위를 포함할 수 있다.
- [0575] 따라서, 한 실시양태에서, 하나 이상 돌연변이의 존재 또는 비존재의 검출은 추정되는 돌연변이 부위를 포함하는 PIK3CA 핵산을 하나 이상의 프로브와 접촉하는 단계를 제공한다. 프로브는 선택적인 혼성화 조건하에서 변화 부위를 포함하고 변화 부위에서 상보적인 뉴클레오티드 염기를 포함하는 핵산 서열과 우선적으로 혼성화한다. 혼성화는 당업자에게 공지된 표지를 이용하여 검출 가능한 표지로 검출될 수 있다. 이러한 표지는 방사선, 형광, 염료 및 효소 표지를 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0576] 또 다른 실시양태에서, 하나 이상 돌연변이의 존재 또는 비존재의 검출은 추정되는 돌연변이 부위를 포함하는 PIK3CA 핵산을 하나 이상의 핵산 프라이머와 접촉하는 단계를 제공한다. 프라이머는 선택적인 혼성화 조건하에서 변화 부위를 포함하고 변화 부위에서 상보적인 뉴클레오티드 염기를 포함하는 핵산 서열과 우선적으로 혼성화한다.
- [0577] 특이적 증폭을 위한 프라이머로서 사용되는 올리고뉴클레오티드는 분자의 가운데에서(증폭은 차등 혼성화에 따라 결정된다; 예를 들어, 문헌(Gibbs, et al., 1989, Nucl. Acids Res., 17, 2437-248) 참조), 또는 적절한 조건하에서 미스매치가 폴리머라제 연장을 방해하거나 감소할 수 있는 곳인 한 프라이머의 3'의 최말단 부위에서(예를 들어, 문헌(Prossner, 1993, Tibtech, 11 238) 참조) 관심의 돌연변이에 상보적인 뉴클레오티드 염기를 포함할 수 있다.
- [0578] 또 다른 실시양태에서, 하나 이상 돌연변이의 존재 또는 비존재의 검출은 하나 이상 핵산 서열을 서열분석하는 단계 및 얻어진 서열을 공지된 야생형 핵산 서열과 비교하는 단계를 포함한다.
- [0579] 별법으로, 하나 이상 돌연변이의 존재 또는 비존재의 검출은 하나 이상 핵산 서열의 질량 분광 분석적 측정을 포함한다.
- [0580] 한 실시양태에서, 하나 이상 핵산 변화의 존재 또는 비존재의 측정은 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 수행하는 단계를 포함한다. 가상적인 변화를 포함하는 표적 핵산 서열을 증폭하고 증폭된 핵산의 뉴클레오티드 서열을 결정한다. 증폭된 핵산의 뉴클레오티드 서열을 결정하는 단계는 하나 이상 핵산 분절을 서열분석하는 단계를 포함한다. 별법으로, 증폭 산물을 이의 크기에 따라 증폭 산물을 분리할 수 있는, 자동 및 수동 겔 전기영동 등을 포

합하는 임의의 방법을 이용하여 분석할 수 있다.

- [0581] 계놈 핵산 내 돌연변이는 유리하게는 증폭된 핵산 단편에서 이동성 변화(mobility shift)에 기초한 기술에 의해 검출된다. 예를 들어, 문헌(Chen et al., Anal Biochem 1996, 239, 61-9)은 경쟁적인 이동성 변화 분석법에 의해 단일 염기 돌연변이의 검출을 개시한다. 게다가, 문헌(Marcelino et al., BioTechniques 1999, 26, 1134-1148)의 기술에 기초한 분석법은 시판되고 있다.
- [0582] 특정 실시예에서, 모세관 이형이중가닥 분석을 이용하여 미스매치의 존재의 결과로서 모세관 시스템에서 이중가닥 핵산의 이동성 변화에 근거하여 돌연변이의 존재를 검출할 수 있다.
- [0583] 시료로부터 분석용 핵산의 생성은 일반적으로 핵산 증폭을 필요로한다. 많은 증폭 방법은 효소 연쇄 반응(예를 들어 폴리머라제 연쇄 반응, 리가제 연쇄 반응 또는 자가 유지 서열 복제) 또는 클로닝된 벡터의 전체 또는 부분의 복제에 의존한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 증폭은 예를 들어 폴리머라제 연쇄 반응에 의해 나타나는 바와 같이 기하급수적인 증폭이다.
- [0584] 많은 표적 및 신호 증폭 방법은 문헌, 예를 들어, 문헌(Landegren, U. , et al., Science, 1988 242, 229-237 and Lewis, R., Genetic Engineering News 1990, 10, 54-55)의 상기 방법의 개론에 개시되어 있다. 상기 증폭 방법은 본 발명의 방법에 이용될 수 있으며, 폴리머라제 연쇄 반응(PCR), 제자리 PCR, 리가아제 증폭 반응(LAR), 리가아제 혼성화, Q $\beta$  박테리오파지 레플리카제, 전사 기반 증폭 시스템(TAS; transcription based amplification system), 전사체 서열분석을 이용한 계놈 증폭(GAWTS; genomic amplification with transcription sequencing), 핵산 서열-기반 증폭(NASBA; nucleic acid sequence based amplification) 및 제자리 혼성화를 포함한다. 다양한 증폭 기술에 사용하기 위한 프라이머는 당 업계에 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0585] 폴리머라제 연쇄 반응(PCR) PCR은 그 중에서도 미국 특허 제4,683,195호 및 제4,683,202호에 개시된 핵산 증폭 방법이다. PCR은 DNA 폴리머라제에 의해 생성된 프라이머 신장 반응의 반복된 주기로 이루어진다. 표적 DNA는 열변성되고 증폭되는 DNA의 반대 가닥에 표적 서열을 싸는 두 개의 올리고뉴클레오티드가 혼성화된다. 상기 올리고뉴클레오티드는 DNA 폴리머라제와 함께 이용할 프라이머가 된다. DNA는 프라이머 신장에 의해 복사되어 양가닥의 제2 카피를 생성한다. 열 변성, 프라이머 혼성화 및 신장을 반복함으로써 표적 DNA는 약 2 내지 4시간 안에 백만배 이상 증폭될 수 있다. 증폭 결과물을 측정하기 위한 검출방법과 함께 사용되어야만 하는 분자 생물학 수단이다. PCR의 이점은 표적 DNA 양을 약 4시간 내에 백만 내지 10억개로 증폭하여 감도를 증가시킨다는 것이다. PCR을 이용하여 진단 분야에서 임의의 공지된 핵산을 증폭할 수 있다(Mok et al., Gynaecologic Oncology, 1994, 52: 247-252).
- [0586] 또한, 대립유전자 특이적 증폭 기술, 예를 들어 증폭 불용 돌연변이 시스템(ARMS™)(Newton et al., Nucleic Acids Res., 1989, 17, 2503-2516)을 이용하여 단일 염기 돌연변이를 검출할 수 있다. 적합한 PCR 증폭 조건 하에서, 프라이머의 3' 말단에 위치한 단일 염기 미스매치는 완전히 일치하는 대립유전자를 우선적으로 증폭하기에 충분하여(상기 문헌(Newton et al., 1989)), 밀접하게 연관된 종의 식별을 가능하게 한다. 상기에 기재된 프라이머를 이용한 증폭 시스템의 기본은 미스매치된 3' 잔기를 갖는 올리고뉴클레오티드가 적합한 조건하의 PCR에서 프라이머로서 기능하지 않을 것이라는 것이다. 이러한 증폭 시스템은 아가로스 겔 전기영동 후 반응 혼합물의 조사만으로 유전자형을 결정하도록 한다.
- [0587] 증폭 산물의 분석은 이의 크기에 따라 증폭 산물을 분리할 수 있는, 자동 및 수동 전기영동, 질량분광분석법 등을 포함한 임의의 방법을 이용하여 수행된다.
- [0588] 핵산 단리, 증폭 및 분석 방법은 당 업자에게는 일상적이며 프로토콜의 예는 예를 들어 문헌(Green & Sambrook, Eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual,(2012, 4th edition, Vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.)에서 찾아볼 수 있다. PCR 증폭에 사용되는 방법에 특히 유용한 프로토콜 제공처는 문헌(PCR(Basics: From Background to Bench) by M. J. McPherson, S. G. Mailer, R. Beynon, C. Howe, Springer Verlag; 1st edition(October 15, 2000), ISBN: 0387916008)이다.
- [0589] 또한, 본 발명은 PIK3CA 유전자 내 표적 핵산을 증폭하기 위한 퇴보(degenerate) 프라이머, 및 증폭 프로토콜 및 결과 분석법을 포함하는 설명서를 포함하는 예측 및 진단 키트를 제공한다. 키트는 별법으로 증폭 산물의 증폭 및 분석을 수행하기 위한 완충액, 효소 및 용기를 포함할 수 있다. 키트는 또한 다른 도구, 예를 들어 DNA 마이크로배열, 또는 다른 지지체를 포함하는 스크리닝 또는 진단 키트의 구성 요소일 수 있다. 바람직하게는, 키트는 또한 하나 이상의 대조군 주형, 예를 들어 정상조직 시료 및/또는 기준 유전자 내 상이한 변화를 나타내는 일련의 시료로부터 단리된 핵산을 제공한다.

- [0590] 한 실시양태에서, 키트는 각각이 기준(PIK3CA) 유전자의 상이한 영역(각 영역은 가능한 변화 부위임)을 증폭할 수 있는 2개 이상의 프라이머쌍을 제공함으로써 한 반응 또는 여러 유사 반응에서 생물학적 시료 내 여러 유전자 변화의 발현을 분석하기 위한 키트를 제공한다.
- [0591] 키트 내 프라이머는 증폭 산물의 검출 및 핵산 변화의 결과 분석을 용이하게 하기 위해 표지, 예를 들어 형광 표지될 수 있다. 키트는 또한 하나 이상의 변화를 한 분석에서 검출되도록 할 수 있다. 따라서 조합 키트는 기준 유전자의 상이한 분절을 증폭할 수 있는 프라이머를 포함한다. 프라이머는 예를 들어 상이한 형광 표지를 이용하여 변화 사이를 구분하도록 구별하여 표지될 수 있다.
- [0592] PIK3CA 돌연변이용 키트의 사용이 개시되어 있으며, 여기에는 퀴아젠 및 로세 몰레클라 시스템을 포함한 진단 회사에 의해 시판되는 PIK3CA 돌연변이 검출 키트가 포함되나 이에 제한되지는 않는다.
- [0593] 또 다른 측면에서, 본 발명은 암환자의 치료 방법에 있어, 환자의 종양세포 내 PIK3CA 유전자의 돌연변이 또는 야생형 상태를 결정하는 단계, 및 PIK3CA 유전자가 돌연변이인 경우 유효량의 화학식 (I)의 화합물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0594] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "효과적인" 및 "유효성"은 약학적 유효성 및 생리적 안정성을 모두 포함한다. 약학적 유효성은 환자에서 원하는 생물학적 효과를 일으킬 수 있는 치료능을 나타낸다. 생리적 안정성은 투여의 결과로 인해 세포, 기관 및/또는 생물체 수준에서 독성의 수준 또는 다른 생리학적 부작용(보통 부작용이라고 나타냄)을 나타낸다. "덜 효과적인"은 치료가 치료적으로 상당히 더 낮은 수준의 약리학적 유효성 및/또는 치료적으로 더 높은 생리학적 부작용을 일으킨다는 것을 의미한다.
- [0595] 본 발명의 또 다른 측면에서, 종양세포가 돌연변이 PIK3A 유전자를 갖는 것으로 확인된 암환자를 치료하기 위한 화학식 (I)의 화합물의 용도가 제공된다.
- [0596] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 돌연변이 PIK3CA 유전자를 포함하는 것으로 확인된 종양세포를 가진 암을 치료하기 위한 화학식 (I)의 화합물이 제공된다.
- [0597] 추가의 실시양태에서, 본 발명은 돌연변이 PIK3CA 유전자를 포함하는 것으로 확인된 종양세포를 가진 암의 예방 및 치료에 사용하기 위한 화학식 (I)의 화합물을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0598] 상기 모든 측면의 경우, 결정된/확인된 PIK3CA의 돌연변이 형태는 유전자의 모든 위치에 있다.
- [0599] 예로서 유방암과 같은 종양을 이용하는 상기 모든 측면의 경우, 결정된/확인된 PIK3CA의 구체적인 돌연변이 형태는 위치 R38, R88, N345, C420, E453, P539, E542K, E545K, Q546, M1043 및 H1047R에 있는 것이다.
- [0600] 예로서 유방암과 같은 종양을 이용하는 상기 모든 측면의 경우, 결정된/확인된 PIK3CA의 구체적인 돌연변이 형태는 위치 E542, E545 및 H1047에 있는 것이다.

**도면의 간단한 설명**

- [0601] 도 1은 실시예 1 A형에 대한 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다.
- 도 2는 실시예 1 A형에 대한 DSC 써모그램(thermogram)을 나타낸다.
- 도 3은 실시예 3 A형에 대한 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다.
- 도 4는 실시예 3 A형에 대한 DSC 써모그램을 나타낸다.
- 도 5는 실시예 3 B형에 대한 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다.
- 도 6은 실시예 3 B형에 대한 DSC 써모그램을 나타낸다.
- 도 7은 실시예 3 C형에 대한 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다.
- 도 8은 실시예 3 C형에 대한 DSC 써모그램을 나타낸다.
- 도 9는 순차 투여로 AKT 억제제(AZD5363)와 조합된 실시예 3에 의한 종양 성장 억제를 나타낸다.
- 도 10은 동시 투여로 AKT 억제제(AZD5363)와 조합된 실시예 3에 의한 종양 성장 억제를 나타낸다.
- 도 11은 BT474 이종이식 모델에서 PARP 억제제(올라파립)와 조합된 실시예 3에 의한 종양 성장 억제를 나타낸다.

도 12는 MCF7 이종이식 모델에서 PARP 억제제(올라파립)와 조합된 실시예 3에 의한 중앙 성장 억제를 나타낸다.  
 도 13은(AZD8186)과 조합된 실시예 3에 의한 중앙 성장 억제를 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

맞춤 의료/맞춤 의학의 실시예

중앙세포주에서 세포 증식 분석법

화합물의 효과에 대한 일련의 인간 암 세포주의 민감도를 표준 증식 분석법으로 측정하였다. 분석 프로토콜의 세부내용은 상기 생물학적 분석(g)에 기재되어 있다.

돌연변이 연관성 분석

방법

실시예 3을 이용한 치료에 반응하여 세포 성장 억제를 측정하는 약리 자료는 다양한 조직 및 복수 출처의 209개 암세포주로부터 얻었다. 각 세포는 민감성(GI50 ≤ 1.0 μM), 또는 내성(GI50 > 1.0 μM)으로 분류하였다.

각 세포주에서 유전자의 돌연변이 상태를 내부(AstraZeneca) 및 공개 출처로부터 얻은 결과를 통합하여 얻었다. 공개 자료는 캔서 프로젝트 릴리스 3(Cancer Project release 3)에서 약물 민감도의 게놈학(Genomics of Drug Sensitivity)(Garnett MJ, et al. *Nature*, 2012, Mar 483, 570-5), 캔서 셀 라인 엔사이클로피디어 프로젝트(Cancer Cell Line Encyclopedia project)(Barretina J, et al., *Nature* 2012, 483, 603-7) 및 암 체세포 돌연변이의 카탈로그(COSMIC); Catalogue of Somatic Mutation In Cancer)(배포 v61;http://www.sanger.ac.uk/genetic/CGP/cosmic/;Forbes SA, et al., *Nucleic Acids Res*, 2011. 39(Database issue): D945-50; Forbes SA, et al. *Curr. Protoco Hum Genet*. 2008; Chapter 10: Unit 10.11)로부터의 모든 세포주 자료 및 선택된 저널 논문을 포함하였다. 잠재성(silent) 코딩 영역 돌연변이(동의 변이체) 및 비동의 다형성을 제외하였고, 상기 분석을 위해, 돌연변이의 접합성을 무시하였다. 세포주와 유전자의 각 조합에 대해 상태를 돌연변이(MUT), 야생형(WT) 또는 불일치(INCON)로 요약하였다. 일부 초기 불일치 경우(동일한 세포주 내 동일한 유전자에 대해 독립적인 WT 및 MUT 관찰)를 내부 관찰 및 COSMIC의 암 세포주 프로젝트(CCLP; Cancer Cell line Project) 서브세트의 것에 중점을 두으로써 또는 수동 검토 후 상태를 선택함으로써 분석하였다. 불일치하는 관찰을 분석할 수 없는 경우, INCON 표지가 유지되었고 유전자 상태는 분석하는 동안 알 수 없는 것으로 간주하였다.

돌연변이 상태와 반응 사이의 연관성을 각 유전자에 대한 우연성 표를 만들고 해당 교차비(odds ratios) 및 양측 꼬리 피셔(Fisher)의 정확 검정 p-값을 결정하여 확인하였다. 반응에 대해 미미하다고 분류되는 세포주를 후보 생물지표를 확인하기 위한 초기 분석에서 제외하였다. 돌연변이 상태의 경우, MUT 또는 WT 결과를 계수하였고 또한 4개 미만 WT을 갖는 유전자 또는 4개 MUT 세포주를 제외하였다.

결과 및 고찰

돌연변이 상태와 반응 사이의 연관성을 방법에 기재된 바와 같이 확인하였다. 실시예 3에 대한 세포주 반응 및 PIK3CA 유전자에 대한 상응하는 유전적 상태를 표 3에 나타낸다.

[0612]

[표 3]

본 연구에 사용된 세포주에 대한 약리 자료, 반응 분류 및 PIK3CA 유전자의 돌연변이 상태

세포주	분류	조직	GI50 $\mu$ M	PIK3CA
RS411	민감성	혈액/림프	9.03E-02	WT
T47D	민감성	유방	0.1982	MUT
H596	민감성	폐	0.3018	MUT
MCF7	민감성	유방	0.3094	MUT
MV411	민감성	혈액/림프	0.3816	WT
HRA19	민감성	직장	0.3926	MUT
IM95M	민감성	위	0.4359	MUT
MDAMB453	민감성	유방	0.4564	MUT
JEKO1	민감성	혈액/림프	0.4994	WT
SNU601	민감성	위	0.5063	MUT
HCC1187	민감성	유방	0.5088	WT
SW48	민감성	결장	0.5131	MUT
H1703	민감성	폐	0.5144	WT
THP1	민감성	혈액/림프	0.5281	WT
LK2	민감성	폐	0.5884	WT
HUPT4	민감성	췌장	0.6408	WT
L363	민감성	혈액/림프	0.6812	MUT
TCCSUP	민감성	방광	0.7237	MUT
VMCUB1	민감성	방광	0.7319	MUT
RERFLCSQ1	민감성	폐	0.7711	MUT
HCC1419	민감성	유방	0.7799	WT
LNCAPCASRES	민감성	전립선	0.7924	WT
CCK81	민감성	결장	0.8031	MUT

[0613]

HCC1954	민감성	유방	0.8794	MUT
SW948	민감성	결장	0.9111	MUT
PANC0203	민감성	췌장	0.9628	WT
BFTC905	민감성	방광	0.9662	WT
REH	내성	혈액/림프	1.047	WT
SNU216	내성	위	1.072	WT
SKCO1	내성	결장	1.128	WT
SUM52PE	내성	유방	1.145	WT
RT11284	내성	방광	1.171	WT
OVCAR3	내성	난소	1.179	WT
MOLM13	내성	혈액/림프	1.22	WT
C99	내성	결장	1.224	WT
CALU3	내성	폐	1.296	WT
N87	내성	위	1.301	WT
2313287	내성	위	1.339	WT
PAMC82	내성	위	1.366	WT
HCC1569	내성	유방	1.369	WT
AGS	내성	위	1.414	MUT
JIMT1	내성	유방	1.46	MUT
HGC27	내성	위	1.501	MUT
MKN1	내성	위	1.579	MUT
SKBR3	내성	유방	1.588	WT
SNU368	내성	간	1.597	WT
PANC89	내성	췌장	1.618	WT
ASPC1	내성	췌장	1.74	WT
SNU484	내성	위	1.785	WT
H2085	내성	폐	1.835	WT
HARA	내성	폐	1.906	WT
AZ521	내성	십이지장	2.063	WT
HPAC	내성	췌장	2.162	WT
NOMO1	내성	혈액/림프	2.167	WT

[0614]

PNT1A	내성	전립선	2.17	WT
H1975	내성	폐	2.262	MUT
OCUM1	내성	위	2.332	WT
BT20	내성	유방	2.36	MUT
HCT8	내성	결장	2.51	MUT
COLO320DM	내성	결장	2.512	WT
PANC1005	내성	췌장	2.607	WT
SW403	내성	결장	2.61	MUT
MONOMAC6	내성	혈액/림프	2.622	WT
HPAFII	내성	췌장	2.63	WT
HT1197	내성	방광	2.8	MUT
LNCAPCLONEFGC	내성	전립선	3.007	WT
HCC95	내성	폐	3.107	WT
SNU620	내성	위	3.144	WT
MOLP8	내성	혈액/림프	3.289	WT
H2291	내성	폐	3.291	WT
DMS114	내성	폐	3.294	WT
MHCC97L	내성	간	3.353	WT
CFPAC1	내성	췌장	3.384	WT
HS766T	내성	췌장	3.467	WT
ZR751	내성	유방	3.558	WT
PC3	내성	전립선	3.833	WT
22RV1	내성	전립선	4.144	MUT
RKO	내성	결장	4.323	MUT
977	내성	방광	4.42	WT
MOLM16	내성	혈액/림프	4.601	WT
H358	내성	폐	4.642	WT
LUDLU1	내성	폐	4.646	WT
QGP1	내성	췌장	4.865	WT
OE19	내성	식도	5.129	WT
SW1710	내성	방광	5.339	WT

[0615]

PANCI	내성	췌장	5.344	WT
SNU449	내성	간	5.41	WT
647V	내성	방광	5.464	WT
HT29	내성	결장	5.483	MUT
SNU354	내성	간	5.604	WT
HS746T	내성	위	5.978	WT
H1869	내성	폐	6.044	WT
UMUC3	내성	방광	6.217	WT
PANC0403	내성	췌장	6.468	WT
KG1	내성	혈액/림프	6.588	WT
H520	내성	폐	6.619	WT
HEP3B	내성	간	6.687	WT
HCT15	내성	결장	7.268	MUT
H1793	내성	폐	7.329	WT
U937	내성	혈액/림프	7.345	WT
H2170	내성	폐	7.644	WT
PANC0327	내성	췌장	8.025	WT
BEL7405	내성	간	8.11	WT
HT1376	내성	방광	8.199	WT
SNU638	내성	위	8.221	WT
H322	내성	폐	8.227	WT
DU145	내성	전립선	8.239	WT
EBC1	내성	폐	8.566	WT
JURKAT	내성	혈액/림프	8.691	WT
COLO205	내성	결장	8.934	WT
RT4	내성	방광	8.936	WT
KATOIII	내성	위	9.155	WT
MDAMB468	내성	유방	9.325	WT
5637	내성	방광	9.627	WT
OE33	내성	식도	9.856	WT
LS180	내성	결장	9.942	MUT

[0616]



HCCC9810	내성	담관	10.02	WT
H226	내성	폐	10.1	WT
A549	내성	폐	10.15	WT
QGY7703	내성	간	11.07	WT
H647	내성	폐	11.34	WT
MGHU3	내성	방광	11.5	WT
H23	내성	폐	12.3	WT
SCABER	내성	방광	12.4	WT
H2126	내성	폐	12.91	WT
HUPT3	내성	췌장	13.39	WT
SW620	내성	결장	13.4	WT
CAPAN2	내성	췌장	13.42	WT
J82	내성	방광	13.42	MUT
HLE	내성	간	13.47	WT
BXPC3	내성	췌장	14.08	WT
MCF7MDR+	내성	유방	14.45	WT
BEL7404	내성	간	14.9	WT
SNU1	내성	위	14.97	WT
KP4	내성	췌장	15.05	WT
CAMA1	내성	유방	15.47	WT
HCA7	내성	결장	15.49	WT
SNU668	내성	위	15.51	WT
H522	내성	폐	15.55	WT
SNU886	내성	간	15.6	WT
SW480	내성	결장	15.9	WT
HUH7	내성	간	15.97	WT
CALU1	내성	폐	16.03	WT
SNU878	내성	간	16.06	WT
HCC1806	내성	유방	16.71	WT
SNU16	내성	위	16.76	WT
GTL16	내성	위	17.38	WT

[0617]

BT549	내성	유방	17.44	WT
NAMALWA	내성	혈액/림프	17.55	WT
WSUDLCL2	내성	혈액/림프	17.71	WT
SU8686	내성	췌장	17.97	WT
H460DNP53	내성	폐	17.98	WT
SNU761	내성	간	18.49	WT
LOVO	내성	결장	18.64	WT
SW780	내성	방광	19.23	WT
SKMES1	내성	폐	19.54	WT
H2286	내성	폐	20.03	WT
SNU5	내성	위	21.19	WT
HCC1395	내성	유방	21.81	WT
HUH1	내성	간	22.34	WT
MDAMB231	내성	유방	23.61	WT
NUGC3	내성	위	24.15	WT
MIAPACA2	내성	췌장	24.2	WT
SNU739	내성	간	25.91	WT
CALU6	내성	폐	26.15	WT
AMO1	내성	혈액/림프	26.93	WT
SW1990	내성	췌장	28.28	WT
CMK	내성	혈액/림프	28.91	WT
1A6	내성	방광	30	WT
A2058	내성	피부	30	WT
ARH77	내성	혈액/림프	30	WT
CAPAN1	내성	췌장	30	WT
CC20	내성	결장	30	WT
H1299	내성	폐	30	WT
H1437	내성	폐	30	WT
H460	내성	폐	30	MUT
H526	내성	폐	30	WT
H838	내성	폐	30	WT

[0618]

HCC15	내성	폐	30	WT
HCC1937	내성	유방	30	WT
HCT116	내성	결장	30	MUT
HEL9217	내성	혈액/림프	30	INCON
HEPG2	내성	간	30	WT
HLF	내성	간	30	WT
HX147	내성	폐	30	WT
IM9	내성	혈액/림프	30	WT
JJN3	내성	혈액/림프	30	WT
JVM3	내성	혈액/림프	30	WT
K562	내성	혈액/림프	30	WT
KU1919	내성	방광	30	WT
MDAMB157	내성	유방	30	WT
MDAMB436	내성	유방	30	WT
MEC1	내성	혈액/림프	30	WT
MKN74	내성	위	30	WT
NUGC4	내성	위	30	WT
OCIAML2	내성	혈액/림프	30	WT
OCILY19	내성	혈액/림프	30	WT
PC9	내성	폐	30	WT
RAJI	내성	혈액/림프	30	WT
RAMOS	내성	혈액/림프	30	WT
RERFLCAI	내성	폐	30	WT
RPMI8226	내성	혈액/림프	30	WT
SC1	내성	혈액/림프	30	WT
SKHEP1	내성	간	30	WT
SMMC7721	내성	간	30	WT
SNU398	내성	간	30	WT
SW900	내성	폐	30	WT
T24	내성	방광	30	WT
YAPC	내성	췌장	30	WT

[0619]

[0620]

돌연변이가 실시예 3에 대한 민감도와 가장 강하게 연관된 유전자는 PIK3CA였다. 177개 PIK3CA WT 세포주 중 단지 12개(7.7%)만이 실시예 3에 민감하였던 반면, PIK3CA가 돌연변이인 32개 세포주 중 15개 세포주(46.9%)가 민감하였으며, 교차비 12.1 및 p-값  $1.2 \times 10^{-7}$ 에 해당하였다(표 4 참조).

**표 4**

돌연변이 상태 (PIK3CA)	반응	
	민감성	내성
<b>MUT</b>	<b>15</b>	<b>17</b>
<b>WT</b>	<b>12</b>	<b>165</b>

교차비: **12.1**

p-값: **1.2x10<sup>-7</sup>**

[0621]

PIK3CA 돌연변이 상태 및 실시예 3에 대한 반응의 분할표

[0622]

본원에서 나타낸 바와 같이, 추가의 유전자, 예를 들어 비정상적이거나 조절 해제된 PIK3CA 또는 PI3K- $\alpha$ 를 가진 종양 내 가능한 내성 표지인 KRAS의 돌연변이 상태 또는 활성화 상태의 측정이 맞춤 의학 접근법의 예측성을 증가시키는 것을 도울 수 있다는 것이 보고되었다.

[0623]

본 발명자들은 PIK3CA 돌연변이 세포 내 풍부한 KRAS 돌연변이를 억제에 대한 세포주의 반응과 비교하여 상기 데이터 세트에 대해 이를 예시하였다. 분석은 두 유전자의 '핫스팟' 돌연변이(PIK3CA의 코돈 E542, E545 및 H1047에서와 KRAS의 코돈 K12, 13 및 Q61)를 포함하는 세포주에 제한하였다. 이는 PIK3CA 돌연변이 세포주에서 KRAS 내 돌연변이가 실시예 3에 의한 억제에 대한 내성을 부여하였다는 것을 증명하였다.

[0624]

- 28개의 세포주가 PIK3CA 내 돌연변이 활성화를 포함하였다.

[0625]

- 활성화 PIK3CA 돌연변이 및 야생형 KRAS 유전자를 포함하는 19개 중 6개 세포주(31.6%)가 실시예 3에 내성을 보였다.

[0626]

- 9개 중 7개 PIK3CA 돌연변이 세포주(77.8%)는 공존하는 KRAS 돌연변이를 포함하였으며 실시예 3에 내성을 보였다.

[0627]

이는 교차비 7.5 및 p-값 0.042(표 5 참조)로 해석되었다.

**표 5**

돌연변이 상태	반응	
	민감성	내성
<b>KRAS 및 PIK3CA MUT</b>	<b>2</b>	<b>7</b>
<b>PIK3CA MUT 및 KRAS WT</b>	<b>13</b>	<b>6</b>

교차비: **7.5**

p-값: **0.042**

[0628]

PIK3CA 및 KRAS 돌연변이 상태 및 실시예 3에 대한 반응의 분할표

[0629]

실시예

[0630]

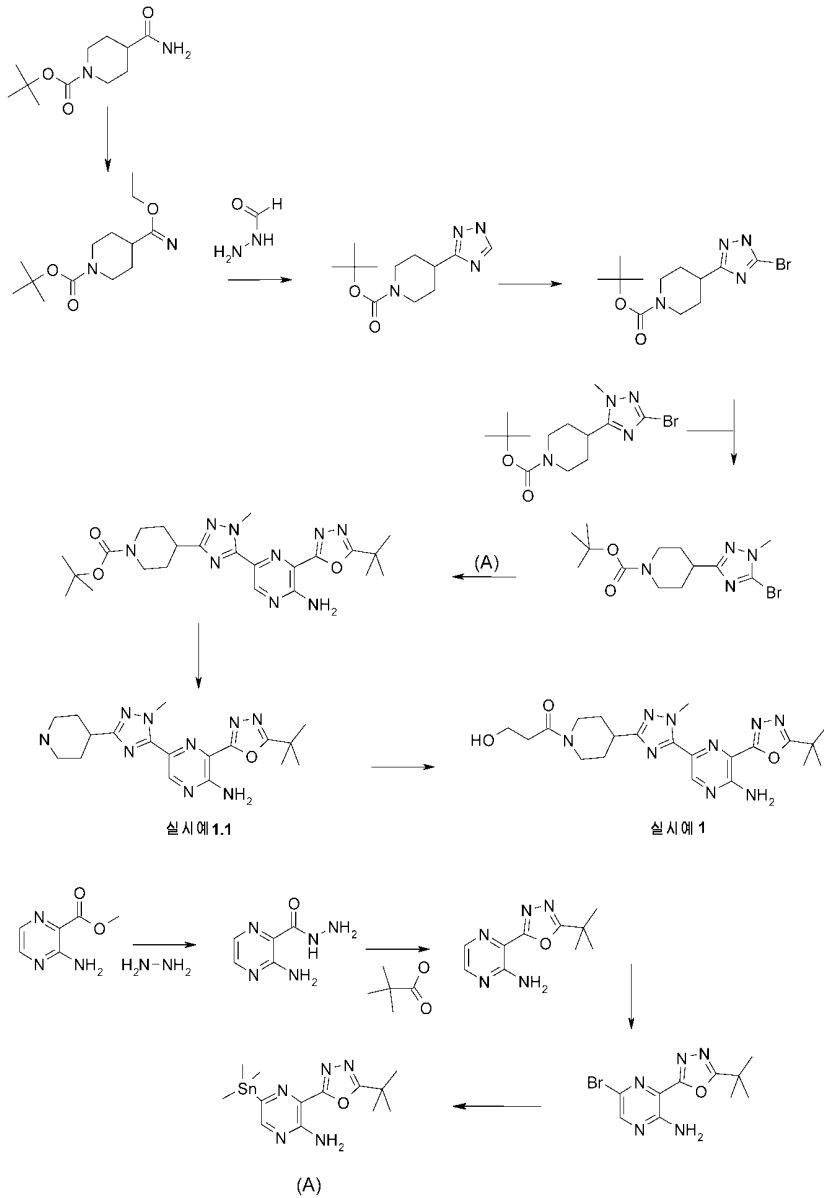
본 발명은 이제 하기 실시예에서 예시될 것이다. 여기에서 일반적으로:

[0631]

(i) 달리 명시하지 않는다면, 주변 온도, 즉 17 내지 25°C 범위에서, 질소와 같은 비활성 기체 대기하에서 실험을 실시하였다;

- [0632] (ii) 회전식 증발 또는 진백(Genevac) 장치의 진공을 이용하여 증발을 수행하였으며, 여과에 의해 잔류 고체를 제거한 후 워크-업 과정을 수행하였다;
- [0633] (iii) 자동화 아르멘 글라이더 플래시(Armen Glider Flash)에서 플래시 크로마토그래피 정제를 수행하였다: 머크(Merck, Darmstadt, Germany)로부터 얻은 프리팩트 머크((prepacked Merck) 정상 Si60 실리카 카트리지(입자 크기(granulometry): 15-40 또는 40-63 $\mu$ m)를 이용하는 스폿 II 얼티미트(Spot II Ultimate(Armen Instrument, Saint-Ave, France));
- [0634] (iv) ZMD 또는 ZQ ESCi 질량 분광분석기가 설치된 워터스(Waters) 장치(600/2700 또는 2525), 워터스 X-테라(X-Terra) 또는 워터스 X-브릿지(X-Bridge) 또는 워터스 선파이어(SunFire) 역상 컬럼(C-18, 5 마이크론 실리카, 직경 19 mm, 길이 100 mm, 유속 40 mL/분)에서 용리제로서 물(0.2% 탄산암모늄 함유)과 아세토니트릴의 점감하는 극성 혼합물을 이용하여 예비 크로마토그래피를 수행하였다;
- [0635] (v) 수율은, 존재하는 경우, 반드시 달성 가능한 최대일 필요는 없다;
- [0636] (vi) 일반적으로, 화학식 I의 최종 생성물의 구조는 핵자기 공명(NMR) 분광분석법으로 확인하였다; NMR 화학 이동 값은 델타 스케일로 측정하였다[양성자 자기 공명 스펙트럼을 브루커 아방스 500(Bruker Avance 500)(500 MHz) 장치로 측정하였다]; 달리 명시하지 않는 경우 주변 온도에서 측정하였다; 하기 약어를 사용하였다: s, 단일; d, 이중; t, 삼중; q, 사중; m, 다중; dd, 이중의 이중; ddd, 이중의 이중의 이중; dt, 삼중의 이중; bs, 광범위 신호;
- [0637] (vii) 일반적으로, 화학식 I의 최종 산물은 또한 액체 크로마토그래피(LCMS)한 후 질량 분광분석법으로 특성화하였다; 워터스 ZQ ESCi 또는 ZMD ESCi 질량 분광분석기 및 X 브리지 5 $\mu$ m C-18 컬럼(2.1 x 50 mm)이 설치된 워터스 얼라이언스 HT(Alliance HT)에서 유속 2.4 mL/분으로 용매 시스템 95% A + 5% C 내지 95% B + 5% C(여기서, A는 물, B = 메탄올, C = 1:1 메탄올:물(0.2% 탄산암모늄 함유)을 이용하여 4분에 걸쳐 LCMS를 수행하였다
- [0638] (viii) 중간물질은 일반적으로 완전히 특성화하지 않고 박막 크로마토그래피, 질량 분광분석, HPLC 및/또는 NMR 분석에 의해 순도를 평가하였다;
- [0639] (ix) 브루커 단일 실리콘 결정(SSC; single silicon crystal(SSC)) 웨이퍼 마운트에 결정질 물질 시료를 올려놓고 현미경 슬라이드를 이용하여 시료를 박막으로 퍼줌으로써 X선 분말 회절 스펙트럼(브루커 D4 어널리티컬 인스트루먼트(Bruker D4 Analytical Instrument)사 이용)를 측정하였다. 시료를 분당 30회 회전시키고(계수 확률을 향상시키기 위해) 1.5418 옹스트롬 파장으로 40kV 및 40mA에서 작동되는 길고 가는 구리 초점 튜브에 의해서 생성된 X-선으로 조사하였다. 표준된 X-선 공급원은 V20에 설정된 자동 가변 발산 슬릿을 통과하고 반사된 방사선은 5.89mm 산란방지 슬릿 및 9.55mm 검출 슬릿으로 향하였다. 셰타-셰타 모드로 2도 내지 40도의 2-셰타 범위에 걸쳐 0.00570° 2-셰타 증가 당 0.03초 동안(연속 스캔 모드) 동안 시료를 노출하였다. 작동 시간은 3분 36초였다. 장치는 포지션 센서티브 디텍터(Position sensitive detector(Lynxeye))가 구비되었다. Diffrac 소프트웨어로 구동되는 델 옵티플렉스 686 NT 4.0 워크스테이션(Dell Optiplex 686 NT 4.0 Workstation)에 의해 제어 및 자료 캡처하였다. X-선 분말 회절 분야의 숙련자는 피크의 상대적인 강도가 30 마이크론 초과 크기의 입자 및 비단일 중첩비에 의해 영향받을 수 있고, 이들이 시료 분석에 영향을 줄 수 있다는 것을 이해할 것이다. 상기 숙련자는 또한 회절계에 시료가 놓이는 정확한 높이와 회절계의 영점 보정에 의해 반사 위치가 영향받을 수 있다는 것을 인식할 것이다. 시료의 표면 평면성은 또한 약간 영향을 줄 수 있다. 따라서, 제시된 회절 패턴 자료를 절대값으로 간주해서는 안된다;
- [0640] (x) 시사주차 열량 측정법(Differential Scanning Calorimetry)은 TA 인스트루먼트(TA Instruments) Q1000 DSC 장치를 이용하여 수행하였다. 통상적으로 뚜껑이 있는 표준 알루미늄 팬에 담아진 5mg 미만의 물질을 분당 10°C의 일정한 가열 속도 25°C 내지 300°C 초과 온도 범위로 가열하였다. 질소를 이용한 정화가스를 분당 50mL의 유속으로 사용하였다; 그리고
- [0641] (xi) 하기 약어를 사용하였다:
- [0642] aq. 수성
- [0643] CDCl<sub>3</sub> 듀테로-클로로포름
- [0644] CHCl<sub>3</sub> 클로로포름

- [0645] DBU 1,8-디아자비시클로[5.4.0]운데크-7-엔
- [0646] DCM 디클로로메탄
- [0647] DEA 디에틸 아민
- [0648] DIPEA N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민
- [0649] DMA N,N-디메틸아세트아미드
- [0650] DMF N,N-디메틸포름아미드
- [0651] DMSO 디메틸 설펝사이드
- [0652] DSC 시사주차 열량 측정법
- [0653] DTAD (E)-디-tert-부틸 디아젠-1,2-디카복실레이트
- [0654] EDCI 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보디이미드 히드로클로라이드
- [0655] Ether 디에틸에테르
- [0656] EtOH 에탄올
- [0657] EtOAc 에틸 아세테이트
- [0658] %ee 거울상 이성질체 과잉률
- [0659] HOPO 2-히드록시-피리딘 N-옥시드
- [0660] HPLC 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography)
- [0661] IPA 이소프로필 알코올
- [0662] MeCN 아세토니트릴
- [0663] MeOH 메탄올
- [0664] MIBK 메틸 이소부틸 케톤
- [0665] MTBE 메틸 tert-부틸 에테르
- [0666] NMP 1-메틸-2-피롤리돈
- [0667] rt 실온
- [0668] sat. 포화
- [0669] sol. 용액
- [0670] THF 테트라히드로푸란
- [0671] TEA 트리에틸 아민
- [0672] TBTU 2-(1H-벤조[d][1,2,3]트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸이소우로늄 테트라플루오로보레이트
- [0673] v/v 부피/부피
- [0674] TFA 트리플루오로아세트산
- [0675] **실시예 1**
- [0676] **1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온**



[0677]

[0678]

3-히드록시프로판산(30% v/v 수용액)(200  $\mu$ l, 47.0 mg, 0.52 mmol)을 증발시켜 건조한 후 톨루엔과 공비혼합(azeotrope)하였다. 산을 NMP(1 mL) 중에 용해하고 분자체(100 mg, 0.26 mmol), N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민(0.136 mL, 0.78 mmol)을 첨가한 후 2-(1H-벤조[d][1,2,3]-트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸이소우로늄 테트라플루오로보레이트(209 mg, 0.65 mmol)을 첨가하였다. 30분간 교반한 후, 3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(1-메틸-3-(피페리딘-4-일)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)피라진-2-아민(100 mg, 0.26 mmol)을 첨가하고 혼합물을 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 워터스 X-브리지 역상 컬럼(C-18, 5 마이크론 실리카, 직경 19 mm, 길이 100 mm, 유속 40 ml/분)과 용리제로서 물(0.2% 탄산암모늄 함유)과 아세트니트릴의 점감적인 극성 혼합물을 이용한 예비 HPLC에 의해 정제하였다.

[0679]

원하는 화합물을 포함하는 분획을 증발 건조하여 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온(45.0mg, 37.9 %)을 투명한 황색 고체로서 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼 (CDCl<sub>3</sub>) 1.52 (9H, s), 1.79 – 1.94 (2H, m), 2.07 – 2.15 (2H, m), 2.58 (2H, t), 2.84 – 2.94 (1H, m), 3.00 – 3.10 (1H, m), 3.17 – 3.26 (1H, m), 3.53 (1H, t), 3.86 – 3.94 (3H, m), 4.30 (3H, s), 4.56 – 4.62 (1H, m), 9.02 (1H, s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> =

456.

3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(1-메틸-3-(피페리딘-4-일)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)피라진-2-아민 (실시예 1.1)을 하기에 따라 제조하였다:

20℃에서, 디클로로메탄(500 mL) 중 tert-부틸 4-카바모일피페리딘-1-카복실레이트(47 g, 205.88 mmol)을 디클로로메탄(500 mL) 중 트리에틸옥소늄 헥사플루오로포스페이트(V)(56.2 g, 226.27 mmol)의 교반된 용액에 질소하에 45분에 걸쳐 점적으로 첨가하였다. 생성된 용액을 20℃에서 밤새 교반하였다. 이어서, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화 수용액을 pH8이 될 때까지 첨가하였다. 상을 따라내고 수상을 200 mL의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 재추출한 후 유기상을 MgSO<sub>4</sub>상에서 건조하고 여과하고 농축하여 tert-부틸 4-(에톡시(이미노)메틸)피페리딘-1-카복실레이트(51.0 g, 97 %)을 무색 액체로서 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼; (CDCl<sub>3</sub>) 1.28 (3H, t), 1.46 (9H, s), 1.47 (2H, m), 1.79 – 1.93 (2H, m), 2.28 (1H, m), 2.73 (2H, m), 4.10 (2H, q), 4.13 – 4.18 (2H, m); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> =

질량 이온 없음

디옥산(500 mL) 중 tert-부틸 4-(에톡시(이미노)메틸)피페리딘-1-카복실레이트(51 g, 198.95 mmol)의 교반된 용액에 포르모히드라지드(17.92 g, 298.43 mmol)를 첨가하였다. 상기 용액을 N<sub>2</sub> 하에 40℃에서 밤새 교반하면서 두어 백색 고체 침전물(히드라지드 중간물질)을 생성하였다. 이어서, 반응 혼합물을 6시간 동안 80℃로 가열하고, 실온으로 냉각시켜 농축하였다. 잔여물을 500 mL의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 및 300 mL의 물에 용해하였다. 상을 따라내고 유기상을 염수로 세척하고 MgSO<sub>4</sub>상에서 건조한 후, 여과하고 농축하여 tert-부틸 4-(1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-카복실레이트(46.0 g, 92 %)를 백색 고체로서 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼; (CDCl<sub>3</sub>) 1.47 (9H, s), 1.76 (2H, m), 1.98 – 2.11 (2H, m), 2.91 (2H, s), 2.97 – 3.08 (m, 1H), 4.06 – 4.23 (2H, m), 8.05 (1H, s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 질량

이온 없음

디클로로메탄(250 mL) 중 tert-부틸 4-(1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-카복실레이트(22 g, 87.19 mmol)의 교반된 용액에 수산화나트륨 2N(131 mL, 261.58 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 기계 교반으로 강력하게 교반한 후 디클로로메탄(250 mL) 중 벤질트리메틸암모늄 트리브로마이드(37.4 g, 95.91 mmol) 용액을 약 15℃ 온도를 유지하면서 점적으로 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간동안 교반하면서 두고, 2N HCl을 첨가하여 pH 5가 되도록 하였다(약 15℃ 온도를 유지하면서). 상을 따라내고 유기상을 H<sub>2</sub>O(2 x 1 L)로 세척하고 MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조하여, 여과하고 농축하여 tert-부틸 4-(5-브로모-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-카복실레이트(25.00 g, 87 %)를 황백색의 고체를 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼; (CDCl<sub>3</sub>) 1.46 (9H, s), 1.67 – 1.84 (2H, m), 1.90 – 2.13 (2H, m), 2.77 – 2.96 (2H, m), 2.98 – 3.10 (1H, m), 3.94 – 4.35 (2H, m); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 질량

이온 없음

톨루엔(200 mL) 및 메탄올(50 mL) 중 tert-부틸 4-(5-브로모-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-카복실레이트(26 g, 78.50 mmol)의 교반된 현탁액에 헥산(43.2 mL, 86.35 mmol) 중 (디아조메틸)트리메틸실란 2M 용액을 N<sub>2</sub> 하에서 약 20℃를 유지하면서 점적으로 첨가하였다: 기계 발생 및 약간의 발열이 관찰되었다. 수득한 황색 용액을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 용매를 증발시키고 생성된 오일을 석유 에테르 중 40% EtOAc로 용리하여 실리카 상에서 정제하여 tert-부틸 4-(5-브로모-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-카복실레이트(15.00



g, 55.3 %)를 오일로서 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼; (CDCl<sub>3</sub>) 1.46 (9H, s), 1.65 – 1.78 (2H, m), 1.90 – 2.01 (2H, m), 2.68

– 3.02 (3H, m), 3.83 (3H, s), 3.94 – 4.31 (2H, m); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 질량 이온

없음

[0689]

[0690]

히드라진 일수화물(34 mL, 1094.95 mmol)을 에탄올(65 mL) 중 메틸 3-아미노피라진-2-카복실레이트(21.3 g, 139.09 mmol)의 교반된 현탁액에 실온에서 소량으로 첨가하였다. 생성된 슬러리를 60°C에서 2시간 동안 교반하고, 실온으로 냉각시켜 여과하였다. 고체를 냉각 에탄올(2 x 25 mL)로 세척하고 일정한 중량으로 건조하여 3-아미노피라진-2-카보히드라지드(20.75 g, 97%)를 베이지색 고체로서 얻었다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼; (DMSO-d<sub>6</sub>) 4.49 (2H, d), 7.46 (2H, br s), 7.78 (1H, d), 8.17 (1H, d),

[0691]

9.79 (1H, t); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 154.

[0692]

2-(1H-벤조[d][1,2,3]트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸이소우로늄 테트라플루오로보레이트(47.7 g, 148.69 mmol)를 아세트니트릴(350 mL) 중 N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민(70.6 mL, 405.51 mmol), 피발산(17.08 mL, 148.69 mmol) 및 3-아미노피라진-2-카보히드라지드(20.7 g, 135.17 mmol)의 교반된 현탁액에 15분에 걸쳐 소량으로 첨가하고 반응 혼합물을 80°C에서 20 분간 교반하였다(용액으로 얻음). 반응 혼합물을 0°C로 냉각하고 N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민(70.6 mL, 405.51 mmol), 이어서 4-메틸벤젠-1-설포닐 클로라이드(77 g, 405.51 mmol)를 15분에 걸쳐 첨가하였다. 반응 혼합물(황색 현탁액)을 환류(가용화)시킨 후 실온에서 14시간 동안 교반하여 진한 오렌지색 용액을 수득하였다. 용액을 농축하였다. 잔류물을 디클로로메탄으로 희석하고 물, 염수로 세척하고, 황산마그네슘 상에서 건조하여 농축하였다. 실리카 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 디클로로메탄 중 0 내지 40% 에틸 아세테이트로 용리하여 조생성물을 정제하였다. 용매를 증발시켜 건조하였다. 생성된 혼합물을 에테르(100 mL)로 연화처리하고, 여과하고, 최소량의 에테르로 세척하고 건조하여 3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-아민(20.8 g, 70.2%)을 연황색 고체로서 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼; (CDCl<sub>3</sub>) 1.53 (9H, s), 1.58 – 1.68 (2H, m), 6.67 (2H, s), 8.13 (2H, dt);

[0693]

질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 220.

[0694]

1-브로모피롤리딘-2,5-디온(18.57 g, 104.36 mmol)을 THF(320 mL) 중 3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-아민(20.8 g, 94.87 mmol) 용액에 소량으로 첨가하고 용액을 실온에서 16시간 교반하였다. 반응 혼합물을 농축하고 잔류물을 디클로로메탄(300 mL) 중에 용해하고, 물(2 x 150 mL), 염수로 세척하고 황산 마그네슘 상에서 건조하고 농축하였다. 용매를 증발시키고 실리카겔 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 디클로로메탄 중 0 내지 10% 에틸 아세테이트로 용리하여 조산물을 정제하였다. 용매를 증발시켜 건조하여 5-브로모-3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-아민(25.5 g, 90 %)을 베이지색 고체로서 수득하였다:

[0695]

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼; (CDCl<sub>3</sub>) 1.52 (9H, s), 8.23 (1H, s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 300.

[0696]

톨루엔(450 mL) 중 5-브로모-3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-아민(45 g, 150.94 mmol)의 현탁액에 1,1,1,2,2,2-헥사메틸디스타난(37.6 mL, 181.12 mmol) 및 비스(트리페닐포스핀)팔라듐(II) 클로라이드(5.30 g, 7.55 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 아르곤으로 진공으로 만들고 80°C에서 2시간 동안 가열하였다(가열 시 가용화, 이어서 오렌지색 용액을 재침전시켜 검정색으로 변화하였으며 이는 반응이 완료되었음을 나타낸다). 반응 혼합물을 냉각시켜, 농축하고 잔류물을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 중에 용해하고 데칼라이트(Decalite) 상에 여과하여 불용성 분순물을 제거하였다. 여과물을 농축하고 실리카겔 상에서 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 중 0 내지 10% EtOAc로 용리하여 정제하였다. 용매를 농축하여 3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(트리메틸스타닐)피라진-2-아민(22.63 g, 39.2 %)을 오렌지색 고체로서 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼; (CDCl<sub>3</sub>) 0.38 (9H, s), 1.53 (9H, s), 6.49 (2H, br s), 8.13 (1H, s); 질량

[0697]

스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 384.

[0698]

4-메틸-2-펜탄올(28 mL) 중 tert-부틸 4-(5-브로모-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-카복실레이트

(2700 mg, 7.82 mmol) 및 3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(트리메틸스타닐)피라진-2-아민(2988 mg, 7.82 mmol)의 교반된 현탁액에 염화리튬(995 mg, 23.46 mmol) 및 비스(트리페닐포스핀) 팔라듐(II) 클로라이드(220 mg, 0.31 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 아르곤으로 진공으로 만들고 140°C에서 2시간 동안 가열하였다. 반응을 냉각시키고 생성된 침전물을 여과하여 수집하고, 이소프로판(25 mL), 물(25 mL)로 세척하고 흡인하여 건조하였다. 이소프로판올 유기 분획을 농축하고 형성된 침전물을 수집하고 주 침전물과 합쳐 tert-부틸 4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-카복실레이트(3.0 g, 79 %)을 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.41 (9H, s), 1.45 (9H, s), 1.50 – 1.68 (2H, m), 1.95 (3H,

dd), 2.78 – 3.05 (1H, m), 3.96 (3H, d), 4.21 (3H, s), 8.86 (1H, s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup>

= 484.

[0699]

[0700]

TFA(15 mL) 및 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(15 mL) 중 tert-부틸 4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-카복실레이트(3 g, 6.20 mmol) 용액을 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. 혼합물을 톨루엔과 공비혼합하고, 메탄올 및 디클로로메탄 중 7N의 암모니아 용액을 첨가하고 혼합물을 실리카겔에 흡착하였다. 실리카겔 상 플래시 크로마토그래피에 의해 디클로로메탄 중 0 내지 8% 메탄올, 이어서 디클로로메탄 중 0 내지 10% 메탄올성 암모니아로 용리하여 조생성물을 정제하였다. 용매를 증발시켜 건조하여 3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(1-메틸-3-(피페리딘-4-일)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)피라진-2-아민(2.040 g, 86 %)을 황색 결정질 고체로서 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.45 (9H, s), 1.55 – 1.66 (2H, m), 1.86 (2H, dd), 2.52 –

2.61 (2H, m), 2.69 – 2.78 (1H, m), 2.95 – 3.02 (2H, m), 4.20 (3H, s), 8.86 (1H, s); 질량

스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 384.

[0701]

[0702]

**실시예 1의 단일 결정형의 단리**

[0703]

상기에서 단리된 물질의 X-선 분말 회절 스펙트럼은 물질이 결정질이지만 다형성 형태의 혼합물이라는 것을 보였다. 상기 물질의 융점은 226.4°C(개시)이었다.

[0704]

25°C에서 아세트니트릴 중에 원래 물질을 슬러리로 만들어 A형 물질을 생성하였다. 약 20 mg의 원래 물질을 자기 교반봉과 함께 바이알에 넣고 약 2 mL의 아세트니트릴을 첨가한 후, 바이알을 캡으로 단단히 밀봉하고 자기 교반기 플레이트에서 교반하도록 두었다. 약 5일 후에, 시료를 플레이트로부터 꺼내 캡을 열고 슬러리를 주변 조건 하에 건조하도록 둔 후, XRPD 및 DSC에 의해 분석하였다. 상기 형태(A형)은 XRPD에 의해 결정질임이 결정되었다. 상기 물질의 융점은 227.2°C(개시)이었다.

[0705]

아세트니트릴 중 조물질을 실온에서 밤새 교반한 후, 생성 고체를 여과하고, 각된 아세트니트릴로 세척하고 건조하여 동일한 결정형을 제조하였다.

[0706]

본 발명의 한 측면에서, 아세트니트릴 중에 화합물의 시료를 슬러리를 만들어 실시예 1(A형)의 결정형을 형성하는 방법이 제공된다. 10개의 X-선 분말 회절 피크는 아래 표에 제시되어있다.

**실시예 1 A형의 10개의 X-선 분말 회절 피크**

각도 2-세타 (2θ)	강도 %
5.1	100.0
18.0	22.5
10.2	22.0
11.7	17.8
19.4	14.5
18.5	14.2
14.8	12.6
26.7	11.0
26.6	10.6
17.8	9.9

[0707]

실시예 1 A형의 X-선 분말 회절 스펙트럼은 도 1에 나타난다.

[0708]

실시예 1 A형의 DSC 분석은 227.2℃의 개시 및 228.6℃에서 피크를 보이는 용융 흡열을 나타낸다(도 2).

[0709]

따라서, DSC 분석은 실시예 1 A형이 227.2℃에서 용융의 개시 및 228.6℃에서 피크를 보이는 고용융 고체라는 것을 나타낸다.

[0710]

실시예 1 A형의 DSC는 도 2에 나타난다.

[0711]

X-선 분말 회절

[0712]

분석 장치: 브루커 D4

[0713]

브루커 단일 실리콘 결정(SSC) 웨이퍼 마운트에 결정질 물질 시료를 올려놓고 현미경 슬라이드를 이용하여 시료를 박막으로 퍼줌으로써 X선 분말 회절 스펙트럼을 측정하였다. 시료를 분당 30회 회전시키고(계수 확률을 향상시키기 위해) 1.5418 옹스트롬 파장으로 40kV 및 40mA에서 작동되는 길고 가는 구리 초점 튜브에 의해서 생성된 X-선으로 조사하였다. 표준된 X-선 공급원은 V20에 설정된 자동 가변 발산 슬릿을 통과하고 반사된 방사선은 5.89mm 산란방지 슬릿 및 9.55mm 검출 슬릿으로 향하였다. 세타-세타 모드로 2도 내지 40도의 2-세타 범위에 걸쳐 0.00570° 2-세타 증가 당 0.03초 동안(연속 스캔 모드) 동안 시료를 노출하였다. 작동 시간은 3분 36초였다. 장치는 포지션 센서티브 디텍터(Lynxeye)가 구비되어 있었다. Diffrac+ 소프트웨어로 구동되는 델 옵티플렉스 686 NT 4.0 워크스테이션에 의해 제어 및 자료 캡처하였다. X-선 분말 회절 분야의 숙련자는 피크의 상대적인 강도가 30 마이크론 초과 크기의 입자 및 비단일 중첩비에 의해 영향받을 수 있고, 이들이 시료 분석에 영향을 줄 수 있다는 것을 이해할 것이다. 상기 숙련자는 또한 회절계에 시료가 놓이는 정확한 높이와 회절계의 영점 보정에 의해 반사 위치가 영향받을 수 있다는 것을 인식할 것이다. 시료의 표면 평면성은 또한 약간 영향을 줄 수 있다. 따라서, 제시된 회절 패턴 자료를 절대값으로 간주해서는 안된다.

[0714]

**시사주차 열량 측정법**

[0715]

분석 장치: TA 인스트루먼트 Q1000 DSC

[0716]

통상적으로 뚜껑이 있는 표준 알루미늄 펜에 담긴 5mg 미만의 물질을 분당 10℃의 일정한 가열 속도에서 25℃ 내지 300℃ 초과 온도 범위로 가열하였다. 질소를 이용한 정화가스를 분당 50mL의 유속으로 사용하였다;

[0717]

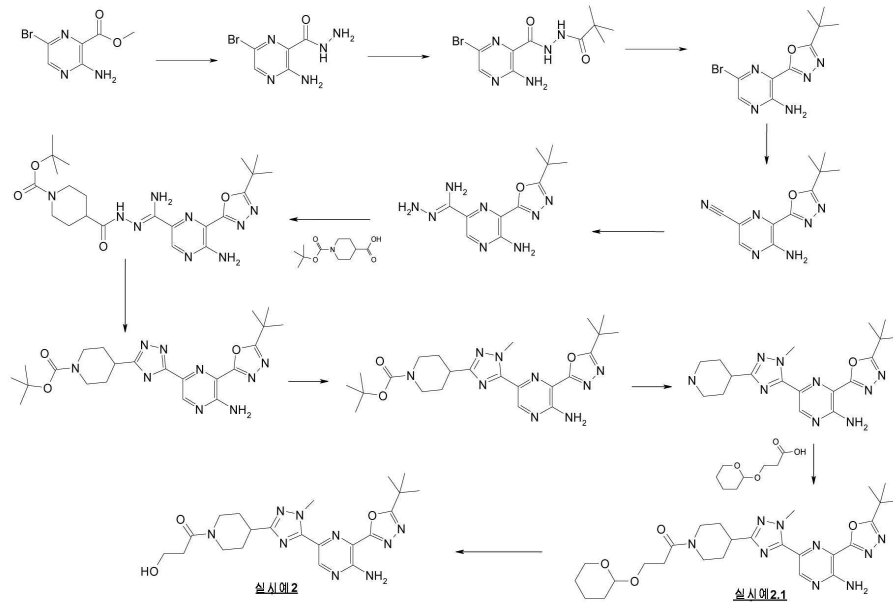
실시예 1의 화합물의 대체 합성 방법은 하기 실시예 2에 제공된다.

[0718]

**실시예 2: 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-**

[0719]

**3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온**



[0720]

[0721]

피리딘 4-메틸벤젠설포네이트(3.58 g, 14.25 mmol)를 메탄올(275 mL) 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-(테트라히드로-2H-피란-2-일옥시)프로판-1-온(37 g, 68.57 mmol)의 현탁액에 질소하에서 첨가하였다. 혼합물을 60℃에서 1.5 시간 동안 교반하였다. 혼합물은 5분 후에 용해되었다. 혼합물을 침전물이 형성되는 시간 동안 50℃에서 밤새 두었다. 반응 혼합물을 디클로로메탄(400 mL)에 용해하고, 물(300 mL), 및 염수(100 mL)로 세척하였다. 수성 추출물을 DCM(100 mL)로 역세정하고 합쳐진 유기층을 MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조하고 농축하였다. 실리카겔 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 100% 에틸 아세테이트에서 10:50:40 메탄올/에틸 아세테이트/DCM로 용리하여 조생성물을 정제하였다. 생성물을 포함하는 분획을 증발을 증발시켜 건조하여 베이지색 고체(24.5g)를 수득하였다. 고체를 아세토니트릴(500 mL) 중에 밤새 슬러리로 만들고 여과하고 고진공하에서 건조하여 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온(실시예 2)(24g, 78 %)을 크림색 고체로서 수득하였다:

**<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼:** (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.51 (9H, s), 1.55 – 1.68 (1H, m), 1.68 – 1.84 (1H, m),

1.96 – 2.13 (2H, m), 2.78 – 2.93 (1H, m), 2.98 – 3.1 (1H, m), 3.19 – 3.3 (1H, m), 3.71 (2H,

q), 3.93 – 4.04 (1H, m), 4.27 (3H, s), 4.35 – 4.48 (1H, m), 4.54 (1H, t), 7.96 (2H, s), 8.92

(1H, s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 456

[0722]

[0723]

(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-(테트라히드로-2H-피란-2-일옥시)프로판-1-온(실시예 2.1)을 다음과 같이 제조하였다:

[0724]

히드라진 수화물(23.59 mL, 480.75 mmol)을 EtOH(2 L) 중 메틸 3-아미노-6-브로모피라진-2-카복실레이트(100 g, 418.04 mmol)의 교반된 혼합물에 점적으로 첨가하였다. 혼합물을 질소하 50℃에서 가열하였다. 생성된 걸쭉한 현탁액을 50℃에서 16시간 동안 교반하였다. 추가의 히드라진(2.5 mL)을 한 번에 첨가하고 현탁액을 50℃에서 추가 24시간 동안 교반하였다. 에탄올(500 mL)을 걸쭉한 반응 혼합물에 채우고 혼합물을 실온으로 냉각하였다. 생성된 현탁액을 여과하고 고체를 에탄올(1 L)로 세척하고 진공으로 건조하여 3-아미노-6-브로모피라진-2-카보히드라지드(98 g, 정량적)을 크림색 고체로서 수득하였다.

**<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼:** (DMSO-d<sub>6</sub>) 4.52 (2H, s), 7.59 (2H, s), 8.30 (1H, s), 9.74 (1H, s);

**질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 232.**

[0725]

[0726] 피발린 무수물(165 mL, 815.38 mmol)을 아세트니트릴(1.8 L) 중 3-아미노-6-브로모피라진-2-카보히드라지드(172 g, 741.26 mmol)의 교반된 혼합물에 첨가하고 혼합물을 80°C에서 1시간 동안 가열하였다. 반응물을 16시간 동안 교반하면서 두었다. 원하는 황색 고체 물질을 여과하여 단리하였다. 여과물을 EtOAc(2 L)와 수성의 중탄산나트륨(2L) 사이에서 분배하였다. 유기층을 포화된 염수로 세척하고 MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조하였다. 용액을 여과하고 농축하여 오렌지색의 끈적한 고체를 얻어 MTBE(250 mL)로 연화처리하였다. 불용성 황색 고체를 여과에 의해 단리하였으며, 상기 물질은 최초 고체와 동일하다 것을 보였다. 합쳐진 고체를 진공 오븐 내 50°C에서 3일 동안 건조하여 3-아미노-6-브로모-N'-피발로일피라진-2-카보히드라지드(224 g, 96 %)를 황색 고체로서 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.17 (9H, s), 7.62 (2H, s), 8.37 (1H, s), 9.42 – 9.56 (1H,

[0727] m), 10.09 – 10.23 (1H, m); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 318.

[0728] *p*-톨루엔설포닐 클로라이드(164 g, 861.60 mmol)를 아세트니트릴(2200 mL) 중 3-아미노-6-브로모-N'-피발로일 피라진-2-카보히드라지드(227 g, 718.00 mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(297 mL, 1795.01 mmol)의 현탁액에 소량으로 첨가하였다. 혼합물을 70°C에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 밤새 실온으로 냉각하도록 두었다. 반응 혼합물을 에틸 아세테이트 (2 L) 및 중탄산나트륨(2 L) 용액 사이에 분배하였다. 유기층을 포화된 염수로 세척하고 황산마그네슘으로 건조하고, 여과하고 감압하에 농축하였다. 생성된 갈색/베이지색 고체를 고온의 MTBE(1000 mL)로 연화처리하고 여과하여 단리하고 건조하여 5-브로모-3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-아민(187g, 87%)을 황색 고체로서 수득하였다. 모액을 증발시켜 건조하였다. 고체 조생성물을 MTBE(500 mL)로 연화처리하고 여과하고 100 mL의 MTBE로 세척하였다. 생성된 고체를 밤새 공기 건조하여 5-브로모-3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-아민(36 g, 17 %)의 2차 생산물을 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.43 (9H, s), 7.70 (2H, s), 8.39 (1H, s); 질량 스펙트럼

[0729] [M+H]<sup>+</sup> = 298.

[0730] 대체 제조과정에서, MeCN(10.8L) 중 3-아미노-6-브로모-N'-피발로일피라진-2-카보히드라지드(2301 g, 7.28 mol)에 DIPEA(3.044 L, 17.48 mol) 및 *p*-톨루엔설포닐 클로라이드(1665 g, 8.73 mol)을 50°C에서 30분에 걸쳐 소량으로(~280 g x 6) 첨가하였다. 반응 온도는 첨가 속도를 조절하여 65-70°C 사이로 유지하였다. 첨가를 완료한 후, 반응 혼합물을 70°C에서 1시간 동안 교반하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 5% NaHCO<sub>3</sub>(수성, 24.2 L)으로 급냉(quench)하였다. 생성된 현탁액을 30분간 교반한 후 여과하였다. 생성된 현탁액을 물(14.8 L)로 세척하고, 건조하고 50°C에서 16시간 동안 건조하였다. 생성물을 DCM(12L)에 용해하고 상을 분리하였다. 유기상을 실리카 패드(6kg)에 로딩하고 생성물을 20% EtOAc/DCM(8 x 10L)로 용리하였다. 생성물을 포함하는 분획의 농도는 HPLC에 의한 순도 99.8%, 1987g(92% 수율)이었다.

[0731] 질소 기류를 DMA(1.2 L) 중 5-브로모-3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-아민(89.35 g, 239.75 mmol) 용액에 20분간 통과시켰다. 디시클로헥실(2',4',6'-트리이소프로필비페닐-2-일)포스핀(11.43 g, 23.98 mmol), 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐(0)(5.49 g, 5.99 mmole), 아연(1.568 g, 23.98 mmol) 및 디시아노아연(16.89 g, 143.85 mmol)을 교반된 혼합물에 순차적으로 첨가하였다. 혼합물을 100°C로 가열하고 1시간 동안 교반하였다. 혼합물을 냉각하고 DCM(3L)와 물(1L) 사이에 분배하였다. 검정색 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고 유기층을 분리하였다. 용액을 물, 이어서 염수로 세척하였다. 용액을 황산마그네슘으로 건조하고 감압하에서 농축하였다. 잔류물을 MTBE로 연화처리하고 여과하여 단리하고 MTBE로 세척하였다. 여과 케이크를 진공으로 건조하고 5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-카보니트릴(55.7 g, 95 %)을 연한 오렌지색 고체로서 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.46 (9H, s), 6.02 (1H, s), 8.38 (2H, s); 질량 스펙트럼

[0732] [M-H]<sup>-</sup> = 242.

[0733] 생성물을 헵탄 중에서 슬러리로 만들어 여과하여 MTBE를 이용한 연화처리의 별법으로서 건조할 수 있다.

[0734] 히드라진 수화물(82 mL, 1.69 mol)을 IPA(200 mL) 중 5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-카보니트릴(55 g, 225.18 mmol)에 첨가하고 혼합물을 질소 하에 50°C에서 16시간 동안 가열하였다. 혼합물을 얼음 통에서 냉각하였다. 생성된 침전물을 여과에 의해 수집하고 IPA 및 디에틸 에테르로 세척하고 일정 중

량으로 건조하여 (Z)-5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-카보히드라존아미드(49.2 g, 79%)를 황색 고체로서 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.45 (9H, s), 5.26 (2H, s), 5.58 (2H, s), 7.56 (2H, s), 8.75

(1H, s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 277.

[0735]

[0736]

O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 핵사플루오로포스페이트(74.3 g, 195.44 mmol)을 DMA(800 mL) 중 N-Boc-이소니페코틴산(41.1 g, 179.15 mmol) 및 4-메틸모르폴린(35.9 mL, 325.74 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 10분 동안 교반한 후 (Z)-5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-카보히드라존아미드(45 g, 162.87 mmol)를 한 번에 용액에 첨가하였다(22°C 내지 27°C의 발열반응이 관찰됨). 몇 분 후 생성물이 반응 혼합물로부터 결정체를 이루었다. 반응 혼합물을 용기로부터 꺼내어 규화를 통해 여과하였다. 용기(150 mL)의 측면으로부터 추가의 DMA를 첨가하여 생성물에 세척하였고 이것을 필터 케이크 위에 부었다. 이소프로판올(600 mL)을 용기에 첨가하고 용기 내 생성물의 잔여물을 격렬하게 교반하여 상기 용매에 현탁하였다. 이소프로판올 현탁액을 사용하여 필터 케이크를 1회 세척하고 DMA를 흡인하여 제거하였다. 필터 케이크를 흡인하여 건조한 후 MTBE로 세척하고 다시 한번 흡인하여 건조하였다. 필터 케이크를 진공 건조하여 (Z)-tert-부틸-4-(2-(아미노(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)메틸렌)히드라진카보닐)피페리딘-1-카복실레이트(76 g, 95%)을 황색 고체로서 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.40 (9H, s), 1.46 (9H, s), 1.63 - 1.9 (2H, m), 2.33 - 2.6

(2H, m, DMSO 신호에 의해 불분명함), 2.63 - 3.03 (2H, m), 3.18 - 3.48 (4H, m, 물

신호에 의해 불분명함), 3.88 - 4.11 (2H, m), 6.43 (2H, s), 7.76 (2H, br), 8.84 (0.5H, s),

8.87 (0.5H, s), 9.85 (1H, s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 488

[0737]

[0738]

대체 제조 방법으로, N-Boc-이소니페코틴산을 원위치에서 다음과 같이 제조할 수 있다:

[0739]

이소니페코틴산(858g, 3.74mol)을 DMA(25.3L)에 용해하고 4-메틸모르폴린(393mL, 3.74mol)을 첨가하였다. 5분간 교반하고 이소부틸 클로로포르메이트(489mL, 3.74mol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 25°C에서 2시간 동안 교반하고 15°C로 냉각하고 (Z)-5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-카보히드라존아미드(940g, 3.4mol)을 10분에 걸쳐 소량으로 첨가하였다. 반응 혼합물을 15°C에서 1-2시간 교반하였다. 물(20.5L)을 1시간에 걸쳐 소량으로 첨가하고 추가 1시간 동안 교반하고 여과하였다. 이어서, 필터 케이크를 물(4 x 4L)로 세척하고 필터 상에서 건조하고 원하는 생성물을 수득할 때까지 진공 오븐 50°C에서 건조하였다.

[0740]

아세트산(200 mL)을 이중 피복된 3L 고정된 용기에 있는 디옥산(500 mL)에 첨가하고 용액을 질소하에서 70°C까지 가열하였다. (Z)-tert-부틸 4-(2-(아미노(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)메틸렌)히드라진카보닐)-피페리딘-1-카복실레이트(74.5 g, 152.80 mmol)을 따뜻한 혼합물에 소량으로 첨가하였다. 10분 후 온도를 100°C로 상승시켰다(약한 환류액). 반응 혼합물을 100°C에서 1.5 시간 동안 교반한 후(현탁액) 80°C에서 밤새 지속하였다(밤새 지속한 후 용액 형성). 생성된 용액을 감압하에 농축한 후, 톨루엔으로 희석하고, 증발시켜 건조하고, 톨루엔으로 시작하여 다시 농축하였다. 잔류 오일을 약간의 에틸 아세테이트와 혼합하고 농축하여 건조하였다. 용액으로부터 결정화된 고체를 MTBE(200 mL)로 연화처리하고 여과에 의해 분리하였다. 필터 케이크를 물과 MTBE로 세척하여 tert-부틸 4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-카복실레이트(50 g, 70%)을 회색 고체로서 수득하였다.

[0741]

여과물을 감압하에 농축하여 황색 고체를 얻었다. 상기 물질을 MTBE로 연화처리하고 여과하였다. 필터 케이크를 에틸아세테이트로 이어서 MTBE로 세척하여 2차 생산물을 연황색 고체로서 얻었다(4.93g, 7%). 상기 물질은 1차 생산물과 동일하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.17 (9H, s), 1.22 (9H, s), 1.29 - 1.47 (2H, m), 1.67 -

1.78 (2H, m), 2.57 - 2.87 (3H, m), 3.57 - 3.92 (2H, m), 7.56 (2H, br), 8.56 (1H, s), 13.47

[0742]

(2H, br s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 470.

[0743]

1,8-디아자비시클로[5.4.0]운데크-7-엔(19.87 mL, 132.90 mmol)을 2-메틸THF(300 mL) 중 tert-부틸 4-(5-

(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-카복실레이트(48 g, 102.23 mmol)의 현탁액에 첨가하였다. 5분 후에 검정색 용액을 얻어 솥을 처리하고 셀라이트 패트를 통과하여 여과하고, 추가의 2-메틸THF(100 mL)로 솥을 세척하였다. 여과물을 3 L 피복 고정된 용기 내에서 질소 대기하 -5℃에서 공기 교반기로 교반하였다. 2-메틸THF(100 mL)을 첨가하여 황색 현탁액을 교반하는 것을 도왔다. 요오드메탄(7.96 mL, 127.78 mmol)을 15분에 걸쳐 점적으로 첨가하였다. 혼합물을 2시간 동안 교반하고 반응 혼합물을 실온으로 가온하였다. 16시간 후에 추가의 요오드메탄(6 mL)과 DBU(20 mL)을 첨가하고 16시간 동안 계속 교반하였다. 혼합물을 물에 붓고 5분간 교반하였다. 불용성 물질을 베이지색 고체로서 단리하고 진공 건조하여 tert-부틸 4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-카복실레이트(24.77 g, 50.1 %)을 수득하였다. 모액을 감압하에 농축하고 잔류물을 용리제로서 MTBE를 이용하여 실리카 상 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 따라서, 원하는 생성물의 2차 생산물(13.04 g, 26%)을 황색 고체로서 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.47 (9H, s), 1.51 (9H, s), 1.57 – 1.76 (2H, m), 1.94 – 2.1 (2H, m), 2.87 – 3.09 (3H, m), 3.9 – 4.08 (2H, m), 4.26 (3H, s), 7.97 (2H, br, s), 8.92 (1H,

s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 484

[0744]

[0745]

tert-부틸 4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-카복실레이트(36.81 g, 76.12 mmol)를 DCM(100 mL) 중 2,2,2-트리플루오로아세트산(100 mL, 1305.87 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 혼합물을 감압하에 농축하였다. 잔류물을 DCM(1.5L)에 용해하고 물(400 mL) 중에 격렬하게 교반된 농축 암모니아에 첨가하였다. 수성을 DCM(400 mL)로 세척하고 유기 용액을 합하여 황산마그네슘으로 건조하고, 여과하고 농축 건조하여 3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(1-메틸-3-(피페리딘-4-일)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)피라진-2-아민(30.0 g, 103 %)을 황색 고체로서 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.44 (9H, s), 1.54 – 1.69 (2H, m), 1.8 – 1.92 (2H, m), 2.53 – 2.63 (2H, m), 2.68 – 2.83 (1H, m), 2.93 – 3.05 (2H, m), 4.19 (3H, s), 7.89 (2H, br), 8.85 (1H, s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 384.

[0746]

[0747]

O-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(30.4 g, 80.04 mmol)을 아세토니트릴(200 mL) 중 용해된 3-(테트라히드로-2H-피란-2-일옥시)프로판산(12.67 g, 72.76 mmol) 및 N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민(25.3 mL, 145.52 mmol)의 교반된 용액에 25℃에서 소량으로 첨가하였다. 생성된 용액을 25℃에서 20분간 교반한 후 3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(1-메틸-3-(피페리딘-4-일)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)피라진-2-아민(30 g, 72.76 mmol)을 아세토니트릴(100 mL) 중 슬러리로서 소량으로, 마지막 양을 세척하여, 혼합물에 첨가하였다. 1시간 동안 교반한 후 침전물을 여과에 의해 수집하고, 아세토니트릴로 세척하고 진공 건조하여 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-(테트라히드로-2H-피란-2-일옥시)프로판-1-온(35.0 g, 89 %)을 베이지색 고체로서 수득하였다. 여과물을 DCM(600 mL)로 희석하고, 물로 세척하고, 황산마그네슘 상에서 건조하고 농축하였다. 잔류물을 디클로로메탄과 메탄올 중 2 내지 2.5% 7N 암모니아 구배로 용리하는 실리카겔 상 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 생성물의 2차 생산물(3.31 g, 6.13 mmol, 8.43 %)을 크림색 고체로서 수득하였다. 두 시료 모두를 합쳐서 베이지색 고체를 수득하였다:

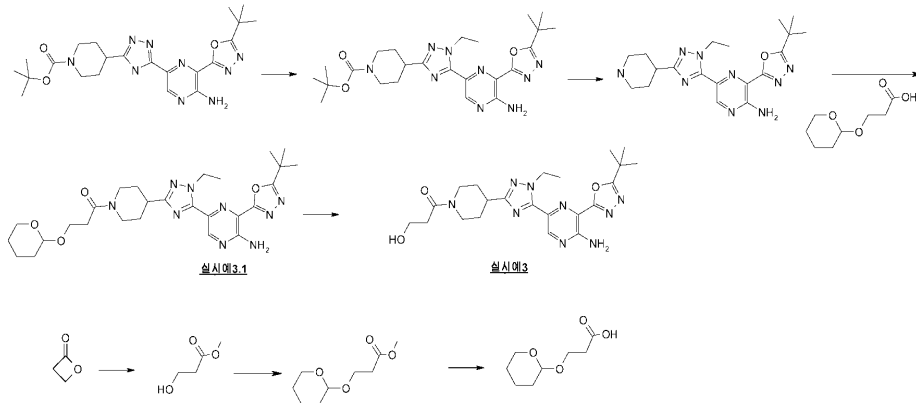
<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.44 (9H, s), 1.52 – 1.79 (4H, m), 1.88 – 2.04 (2H, m), 2.53 – 2.73 (2H, m), 2.73 – 2.87 (1H, m), 2.91 – 3.05 (1H, m), 3.13 – 3.24 (1H, m), 3.37 – 3.47 (1H, m), 3.53 – 3.65 (1H, m), 3.7 – 3.8 (1H, m), 3.81 – 3.89 (1H, m), 3.89 – 3.99 (1H, m), 4.20 (3H, s), 4.29 – 4.4 (1H, m), 4.54 – 4.61 (1H, m), 7.60 – 8.20 (2H, br), 8.85 (1H, s);

질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 540.

[0748]

[0749]

실시예 3: 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온



[0750]

[0751]

피리딘 4-메틸벤질설포네이트(11.62 g, 46.24 mmol)을 메탄올(1 L) 중 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-(테트라히드로-2H-피란-2-일옥시)프로판-1-온(128 g, 231.19 mmol)의 현탁액에 질소하에 첨가하였다. 혼합물을 60°C에서 1.5 시간 동안 교반하였다. 5분 후에 혼합물이 용해되었다. 침전물이 형성되는 동안 혼합물을 50°C에서 밤새 유지하였다. 고체 물질을 여과에 의해 분리하고 물과 아세토니트릴로 세척하였다. 상기 물질을 앞선 단계로부터의 소량의 불순물을 여전히 포함하여 추가의 정제를 필요로 하였다. 물질을 디클로로메탄 중에 용해하고 실리카겔 상에서 플래시 크로마토그래피(0% 메탄올/DCM 내지 10% 메탄올/DCM)에 의해 정제하였다. 따라서, 원하는 생성물, 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온(실시예 3)(92 g, 85 %)을 크림색 고체(A형)으로 분리하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.4 – 1.51 (12H, m), 1.51 – 1.78 (2H, m), 1.89 – 2.05

(2H, m), 2.72 – 2.86 (1H, m), 2.91 – 3.05 (1H, m), 3.12 – 3.24 (1H, m), 3.64 (2H, q), 3.83

– 4.01 (1H, m), 4.29 – 4.41 (1H, m), 4.47 (1H, t), 4.58 (2H, q), 8.26 (2H, s), 8.85 (1H, s);

질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 470.

[0752]

[0753]

1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-(테트라히드로-2H-피란-2-일옥시)프로판-1-온(실시예 3.1)을 다음과 같이 제조하였다

[0754]

1,8-디아자비시클로[5.4.0]운데크-7-엔(76 mL, 511.14 mmol)을 2-메틸THF(1.2 L) 중 tert-부틸 4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-카복실레이트(150 g, 319.46 mmol)의 현탁액에 첨가하였다. 요오드에탄(46 mL, 575.03 mmol)을 첨가하고 혼합물을 35°C에서 16시간 동안 교반하였다. 추가의 요오드에탄(46 mL, 575.03 mmol) 및 1,8-디아자비시클로[5.4.0]운데크-7-엔(76 mL, 511.14 mmol)을 첨가하고 35°C에서 24시간동안 교반을 계속하였다. 혼합물을 물에 붓고 불용성 물질을 여과에 의해 분리하고, 물과 MTBE로 세척하고 진공 건조하여 tert-부틸 4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-카복실레이트(116 g, 73.0 %)을 황색 고체로서 수득하였다. 여과물을 DCM으로 추출하고 유기 용액을 황산마그네슘으로 건조하고, 여과하고 감압하에 농축하였다. 잔류물을 구배 용리(30% MTBE/헵탄 내지 100% MTBE)를 이용한 실리카겔 상 플래시 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 따라서, 원하는 생성물의 2차 생산물(12 g, 24.12 mmol, 7.55 %)을 황색 고체로서 분리하고 이를 나중에 1차 생산물과 합하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.41 (9H, s), 1.44 (9H, s), 1.48 (3H, t), 1.52 – 1.69 (2H,

m), 1.87 – 2.04 (2H, m), 2.79 – 3.03 (3H, m), 3.86 – 4.03 (2H, m), 4.59 (2H, q), 7.89 (2H,

s), 8.85 (1H, s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 498.

[0755]

[0756]

THF 또한 상기 반응에 적합한 용매가 될 수 있다.

[0757]

TFA(400 mL)를 DCM(400 mL) 중 tert-부틸 4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-카복실레이트(126 g, 253.22 mmol)의 용액에 소량으로 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 혼합물을 감압하에 농축하고 DCM(1L)에 용해하고 격렬하게 교



반된 농축 암모니아 수용액(500 mL)에 0°C에서 천천히 첨가하였다. 유기 용액을 수성으로부터 분리하고 감압하에 농축하여 3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(1-에틸-3-(피페리딘-4-일)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)피라진-2-아민(101 g, 100 %)을 황색 고체로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.4 – 1.52 (12H, m), 1.57 – 1.73 (2H, m), 1.83 – 1.93 (2H, m), 2.57 – 2.7 (2H, m), 2.71 – 2.84 (1H, m), 2.96 – 3.09 (2H, m), 4.58 (2H, q), 8.06 (2H, s),

8.84 (1H, s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 398.

[0758]

[0759]

\*유사한 규모(출발 물질 약 170g)의 또 다른 실험에서, 다음 단리 과정을 이용하였다; 층을 분리하고 상층(고체를 포함한 에틸렌)을 여과하였다. 고체를 DCM(0.5 L)로 세척하고 여과물을 분리 깔대기에 옮겼다. 층을 분리하고 수성층을 DCM(0.5 L)로 추출하였다. 유기층을 MgSO<sub>4</sub>, 상에서 건조하고, 여과하고 농축하였다. 생성물을 50°C에서 밤새 건조하였다(81.75 g). 추출 후 고체를 실온에서 30분간 물(200 mL)에서 슬러리로 만들고 여과하였다. 생성물을 50°C 진공에서 건조하였다(61.8 g).

[0760]

또 다른 변형은 다음과 같다;

[0761]

DCM(9L) 중 tert-부틸 4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-카복실레이트(3009.5 g, 6.05mol)의 현탁액을 N<sub>2</sub>하에 5-10°C로 냉각하였다. 온도를 <30°C로 유지하면서 TFA(9L)을 현탁액에 소량으로 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 혼합물을 농축하고, 생성된 잔류물을 물(30 L)에 용해하고 0-5°C에서 35% 암모니아 수용액(12L)에 천천히 첨가하였다. 현탁액을 30분간 교반한 후 생성물을 여과하고 물(2 x 6L)로 세척하였다. 생성물을 50°C 진공에서 2일 동안 건조하였다(2496 g).

[0762]

0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(HATU, 106 g, 279.51 mmol)을 아세트니트릴(600 mL) 중에 용해된 3-(테트라히드로-2H-피란-2-일옥시)프로판산(44.3 g, 254.10 mmol) 및 N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민(89 mL, 508.21 mmol)의 교반된 용액에 25°C에서 소량으로 첨가하였다. 생성된 용액을 25°C에서 20분간 교반한 후 3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(1-에틸-3-(피페리딘-4-일)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)피라진-2-아민(101 g, 254.10 mmol)을 아세트니트릴(300 mL) 중 슬러리로 소량으로, 마지막 양을 세척하여, 혼합물에 첨가하였다. 1시간 동안 교반한 후 침전물을 여과에 의해 수거하고, 아세트니트릴로 세척하고 진공 건조하여 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-(테트라히드로-2H-피란-2-일옥시)프로판-1-온(128 g, 91 %)을 베이지색 고체로서 수득하였다. 여과물을 DCM(600 mL)로 희석하고, 물로 세척하고 황산마그네슘 상에서 건조하고 농축하였다. 잔류물을 디클로로메탄과 메탄올 중 2 내지 2.5% 7N 암모니아의 구배로 실리카겔 상 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 원하는 생성물의 2차 생산물(40 g, 72.2 mmol, 28.4 %)을 크림색 고체로서 수득하고 1차 생산물과 합하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.29 – 1.48 (16H, m), 1.48 – 1.75 (4H, m), 1.83 – 1.99 (2H, m), 2.48 – 2.68 (2H, m), 2.68 – 2.79 (1H, m), 2.87 – 2.99 (1H, m), 3.07 – 3.19 (1H, m), 3.32 – 3.42 (1H, m), 3.47 – 3.6 (1H, m), 3.64 – 3.75 (1H, m), 3.75 – 3.84 (1H, m), 3.84 – 3.95 (1H, m), 4.24 – 4.39 (1H, m), 4.47 – 4.6 (3H, m), 7.84 (2H, s), 8.79 (1H, s); 질량

[0763]

스펙트럼 [M+Na]<sup>+</sup> = 577.

[0764]

대체 제조 방법:

[0765]

THF(552 mL) 중 3-(테트라히드로-2H-피란-2-일옥시)프로판산(48.80 g 0.2774 mol) 및 N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민(86.96 mL, 0.4993 mol)의 용액에 0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(115.73 g, 0.3051 mol)을 질소하 실온에서 소량으로 첨가하였다. 생성된 혼합물을 20분간 교반한 후 3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(1-에틸-3-(피페리딘-4-일)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)피라진-2-아민(122.5 g(110.25 g 활성), 0.2774 mol)을 1시간에 걸쳐 소량으로 첨가하였다. 3.5시간 후에 혼합물을 농축하고 잔류물을 실온에서 15분간 MeCN(275 mL) 중 슬러리로 만들었다. 생성물을 여과하고, MeCN(3 x 110 mL)로 세척하고 50°C 진공에서 밤새 건조하였다. 이로써 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-(테트라히드로-2H-피란-2-일옥시)프로판-

1-온(131.9 g, 96%)을 수득하였다.

[0766] 또 다른 대체 제조방법에서, THF 중 HBTU (O-(벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트)를 HATU 대신 커플링제로서 사용할 수 있다.

[0767] 실시예 3의 대체 제조방법

[0768] 메탄올(1045 mL) 중 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-(테트라히드로-2H-피란-2-일옥시)프로판-1-온(131.9 g, 0.2382 mol)의 현탁액에 피리디늄 p-톨루엔설포네이트(11.97 g, 47.7 mmol)을 N<sub>2</sub> 하에 첨가하였다. 반응 혼합물을 60°C에서 5.5시간 동안, 이어서 50°C에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 0°C로 냉각하고 고체를 여과하였다. 생성물을 실온에서 20분간 물(250 mL) 중 슬러리로 만들고, 여과하고, (3x40 mL)로 세척하고 50°C 진공에서 건조하였다. 이로써 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온(21.4g)을 A형으로서 수득하였다(하기 참조).

[0769] 메탄올액을 농축하고 생성된 고체를 실온에서 20분간 물(0.6 L) 중 슬러리로 만들었다. 고체를 여과에 의해 단리하고 물(3x100 mL)로 세척하였다. 2차시를 위해 여과 케이크를 추가 20분 동안 물(0.5 L) 중 슬러리로 만들었다. 생성물을 여과에 의해 단리하고 물(100 mL)로 세척하고 50°C 진공에서 건조하였다. 이로써 81.9 g의 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온(81.9g)을 A형으로 수득하였다.

[0770] 두 생산물을 합하여(103.3 g), B형(16.68 g)으로 시드하고 실온에서 밤새 MeCN(826 mL) 중 슬러리로 만들었다. 이로써 117.4 g의 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온을 연황색 고체(117.4g), B형(하기 참조)으로서 수득하였다. 상기 물질을 1시간 동안 헵탄(7.5 rel vols) 중 슬러리로 만들어 추가로 정제하였다. 혼합물을 여과하고 필터 상에 건조하고, 50°C 진공 오븐에서 밤새 건조하여 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온(102.5g)을 B형으로서 수득하였다.

[0771] B형은 또한 시딩없이 MeCN 중 A형을 슬러리로 만듦으로써 제조될 수 있다

[0772] A형 또는 B형은 또한 다음과 같이 C형으로 전환할 수 있다:

[0773] IPA(12 vol) 중 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온(예를 들어, 상기에 요약된 과정에 의해 제조된 B형)의 현탁액을 고체가 용해될 때까지 환류하여 가열하였다. 용액을 가열 여과한 후 실온으로 냉각하였다. 이로써 1-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-히드록시프로판-1-온을 연황색 고체의 C형으로 수득하였다(99.3g, 97%).

[0774] C형은 또한 다음과 같이 B형으로 전환될 수 있다:

[0775] 10L 플랜지 플라스크에서, MIBK(7900 mL) 중 C형(377.8 g 1회분)을 110-115°C로 가열하여 용액을 얻었다. 용액을 97-103°C로 냉각되도록 하고 즉시 아세토니트릴(8220 mL) 중 B형(0.8 g)의 시드를 포함하고 -15°C에서 교반하고 있는 50L 용기로 폴리쉬(polish) 여과하였다. 첨가하는 동안, 50L 용기 내 온도를 재킷 냉각에 의해 -15 내지 25°C로 유지하였다. MIBK 중에 용해된 화합물의 추가의 3회분을 유사한 방법으로 첨가하였다. 생성된 슬러리에 B형의 시드(0.8 g)를 첨가한 후 혼합물을 10-20°C에서 밤새 교반하였다. 공정 중 분석은 C형 또는 무정형이 보이지 않는 원하는 형태(B형)를 확인하였다. 혼합물을 여과하고 아세토니트릴(3340 mL)로 세척하였다. 일정한 중량을 얻을 때까지 고체를 2일 동안 오븐 건조하였다(~1mm 내지 ~3-4 mm 크기의 분말 및 작은 덩어리의 혼합물로 건조되는 동안 고체가 부숴졌다). 수율 =1532.8 g(93.5 %)

[0776] 3-(테트라히드로-2H-피란-2-일옥시)프로판산을 다음과 같이 제조하였다:

[0777] 메탄올(2.4 L)과 농축 황산(44.4 mL, 832.61 mmol)의 교반된 용액에 베타-프로피오락톤(175 mL, 2.78 mol)을 질소 하 0°C에서 점적으로 첨가하였다. 상기 용액을 실온에서 2일 동안 교반하도록 두었다. 반응 혼합물을 10°C로 냉각하고 중탄산나트륨(145 g, 1.72 mol)을 소량으로 첨가하고 생성된 현탁액을 실온에서 75분간 교반하도록 두었다. 상기 용액을 여과하고, 필터 케이크를 메탄올(800mL)로 세척하였다. 여과물을 오일이 되도록 증발시켜 디클로로메탄(1.2 L) 중에 재용해하고 60분간 교반한 후 재여과하였다. 상기 용액을 여과하고 증발하여 메틸 3-

히드록시 프로파노에이트(219 g, 76 %)를 오일로서 수득하였다:

[0778] <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (CDCl<sub>3</sub>) 2.50 (2H, t), 3.63 (3H, s), 3.78 (2H, t).

[0779] 피리디늄 p-톨루엔설페이트(7.65 g, 30.45 mmol)을 디클로로메탄(650 mL) 중 메틸 3-히드록시프로파노에이트 (63.4 g, 609.00 mmol) 및 3,4-디히드로-2H-피란(78 mL, 852.60 mmol)의 투명한 용액에 질소 하 실온에서 첨가하여 탁한 용액을 얻었다. 상기를 실온에서 밤새 교반하도록 하였다. 반응 혼합물을 물(250 mL) 및 염수(250 mL)로 세척하고 건조하고(MgSO<sub>4</sub>) 오일이 되도록 증발시켰다. 상기 조생성물을 용리 구배 헵탄 중 15 내지 30% EtOAc로 플래시 실리카 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 순수한 분획을 증발시켜 건조하여 메틸 3-(테트라히드로-2H-피란-2-일옥시)프로파노에이트(67.7 g, 59%)를 무색의 오일로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (CDCl<sub>3</sub>) 1.47 (4H, dddd), 1.55 – 1.84 (2H, m), 2.55 (2H, t), 3.33 –

3.53 (1H, m), 3.53 – 3.7 (4H, m), 3.78 (1H, ddd), 3.93 (1H, dt), 4.42 – 4.72 (1H, m); 질량

[0780] 스펙트럼 [MH]<sup>+</sup> = 189.

[0781] 수산화나트륨(2M, 349 mL, 697.58 mmol)을 THF(680 mL) 중 메틸 3-(테트라히드로-2H-피란-2-일옥시)프로파노에이트(67.68 g, 359.58 mmol)의 용액에 실온에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. THF를 진공에서 제거한 후, 수성층을 에틸아세테이트(260 mL)로 세척하고, 0°C로 냉각하고 염산(2M)을 첨가하여 pH 5로 조심스럽게 산성화하였다. 생성물을 에틸 아세테이트(3 x 250 mL)로 추출하고 건조하고(MgSO<sub>4</sub>) 증발시켜 3-(테트라히드로-2H-피란-2-일옥시)프로판산(57.0 g, 91 %)을 투명한 오일로서 수득하였다. 상기 물질을 에틸 아세테이트(750 mL)에 용해한 후 물(3 x 250 mL)과 염수(250 mL)로 세척하여 잔여 아세트산을 제거하였다, 유기 용액을 건조하고(MgSO<sub>4</sub>) 증발시켜 3-(테트라히드로-2H-피란-2-일옥시)프로판산(45.67g, 72.9%)을 무색의 오일로서 수득하였다:

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) 1.43 – 1.67 (4H, m), 1.65 – 1.95 (2H, m), 2.68 (2H,

t), 3.48 – 3.58 (1H, m), 3.73 (1H, dt), 3.88 (1H, ddd), 4.02 (1H, dt), 4.59 – 4.7 (1H, m);

[0782] 질량 스펙트럼 [M-H]<sup>-</sup> = 173.

[0783] 상기와 같이 단리된 실시예 3은 본원에서 A형, B형, C형으로 기재되는 3가지 상이한 결정형의 결정질 고체였다.

[0784] 실시예 3의 A형의 결정 구조는 XRPD 및 DSC에 의해 특성화하였다.

[0785] 상기 기술을 수행하는 방법은 실시예 1에 기재된 바와 같다.

**실시예 3 A형의 10개의 X-선 분말 회절 피크**

각도 2-세타 (2θ)	강도 %
4.8	100
10.0	89.2
14.6	81.9
5.2	59.4
19.9	53.6
10.4	49.3
25.4	48.7
23.6	48.6
24.4	43.9
16.2	36.3

[0786]

실시예 3 A형의 XRPD는 도 3에 나타난다.

[0787]

실시예 3 A형의 DSC 분석은 27°C의 개시 및 63.0°C에서 피크를 보이는 초기흡열을 나타내고, 다음 온도에서 개시 및 피크를 보이는 추가로 흡열 이동을 나타낸다; 166.5°C 및 168.7°C, 172.2°C 및 173.2°C, 그리고 174.8°C에서 최종 용융 및 175.7°C에서 피크(도 4).

[0788]

[0789]

따라서, 실시예 3 A형의 DSC 분석은 약 27.0°C에서 탈용매화의 개시 및 약 63.0°C에서 피크를 보이는 용매화 물질이다.

[0790]

실시예 3(A형)의 X-선 분말 회절 스펙트럼은 물질이 결정질이라는 것을 나타내었다. 상기 물질의 탈용매화점은 28.0°C(개시)였다.

[0791]

실시예 3은 또한 본원에서 B형으로 나타내는 대체의 다형성 형태로 존재할 수 있다. B형의 제조는 상기에 기재되어 있다.

[0792]

상기 물질의 융점은 172.5°C(개시)였다.

[0793]

본 발명의 추가의 측면에서, 아세토니트릴 중 실시예 3의 시료를 슬러리로 만들어 실시예 3의 B형을 제조하는 방법이 제공된다. 본 발명의 추가의 측면에서 MIBK 중 실시예 3의 C형 용액으로부터 실시예 3의 B형의 제조 방법이 제공된다.

**실시예 3 B형의 10 개의 X-선 분말 회절 피크**

각도 2-세타 (2θ)	강도 %
5.8	100.0
10.9	59.8
11.5	33.8
25.9	18.2
17.3	15.8
24.0	14.1
19.1	13.4
12.9	11.7
24.7	11.1
27.2	9.7

[0794]

[0795]

실시예 3 B형의 XRPD는 도 5에 나타낸다.

[0796]

실시예 3 B형의 DSC 분석은 172.5°C의 개시 및 174.2°C에서 피크를 보이는 흡열 용융을 나타낸다(도 6).

[0797]

따라서, DSC 분석은 실시예 3 B형이 약 172.5°C에서 용융의 개시 및 약 174.2°C에서 피크를 보이는 고용용 고체라는 것을 나타낸다.

[0798]

실시예 3은 또한 본원에서 C형으로 나타내는 제3의 결정형으로 존재할 수 있다. 이소프로필알코올(IPA)로부터 결정화에 의해, 예를 들어 B형 물질로부터 C형물질을 제조하는 방법을 상기에 기재되어 있다.

[0799]

그러므로 본 발명의 추가의 측면에서 IPA로부터 실시예 3을 결정화하여 실시예 3의 C형을 제조하는 방법이 제공된다. 실시예 3의 C형은 Cuka 방사를 이용하여 측정된 하기 2θ 값 중 하나 이상을 제공하는 특징을 갖는다: 6.9 및 12.3. 실시예 3 C형은 실질적으로 도 A에 나타낸 바와 같은 X-선 분말 회절 패턴을 제공하는 특징을 보인다. 10개의 X-선 분말 회절 피크는 아래 표에 나타낸다;

**실시예 3 C형의 10 개의 X-선 분말 회절 피크**

각도 2-세타 (2θ)	강도 %
6.9	40.1
12.3	100.0
10.5	23.8
21.0	67.9
24.6	36.1
13.6	21.4
16.4	19.9
19.6	18.1
20.2	17.5
22.5	18.4

[0800]

[0801]

실시예 3 C형의 DSC 분석은 183.0°C의 개시 및 185.6°C에서 피크를 보이는 흡열 용융을 나타낸다(도 B).

[0802]

따라서, DSC 분석은 실시예 3 C형이 약 183.0°C에서 용융의 개시 및 약 185.6°C에서 피크를 보이는 고용용 고체라는 것을 나타낸다.

[0803] C형 분석에 사용된 기술의 상세 내용

[0804] X-선 분말 회절

[0805] 분석 장치: 패널리티컬 큐빅스(Panalytical Cubix):

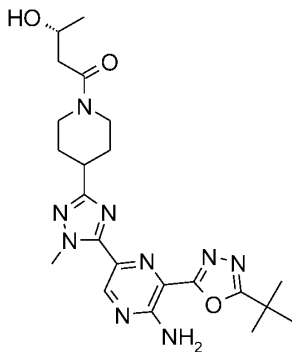
[0806] 패널리티컬 단일 실리콘 결정(SSC) 웨이퍼 마운트에 결정질 물질의 시료를 올려놓고 현미경 슬라이드를 이용하여 시료를 박막으로 퍼줌으로써 X선 분말 회절 스펙트럼을 측정하였다. 시료를 분당 30회 회전시키고(계수 확률을 향상시키기 위해) 1.5418 옹스트롬 파장으로 40kV 및 40mA에서 작동되는 길고 가는 구리 초점 튜브에 의해서 생성된 X-선으로 조사하였다. X-선은 0.04 rad 슬러 슬릿, 이어서 20mm에 설정된 자동 가변 발산 슬릿, 마지막으로 20mm 빔 마스크를 통과하였다. 반사된 방사선은 20mm 산란방지 슬릿 및 0.04 rad 슬러 슬릿으로 향하였다. 세타-세타 모드로 2도 내지 40도의 2-세타 범위에 걸쳐 0.0025067° 2-세타 증가 당 1.905초 동안(연속 스캔 모드) 동안 시료를 노출하였다. 장치는 X-셀러레이터 디텍터(X-Celerator detector)가 구비되어 있었다. 엑스퍼트 인더스트리(X'pert Industry) 소프트웨어로 구동되는 델 펜티엄(Pentium) 4HT 워크스테이션에 의해 제어 및 자료 캡처하였다. X-선 분말 회절 분야의 숙련자는 피크의 상대적인 강도가 30 마이크로론 초과 크기의 입자 및 비단일적인 중비에 의해 영향받을 수 있고, 이들이 시료 분석에 영향을 줄 수 있다는 것을 인식할 것이다. 상기 숙련자는 또한 회절계에 시료가 놓이는 정확한 높이 및 회절계의 영점 보정에 의해 반사 위치가 영향을 받을 수 있다는 것을 인식할 것이다. 시료의 표면 평면성은 또한 약간 영향을 줄 수 있다. 따라서, 제시된 회절 패턴 자료를 절대값으로 간주해서는 안된다.

[0807] 시사주차 열량 측정법

[0808] 분석 장치: TA 인스트루먼트 Q1000 DSC

[0809] 통상적으로 뚜껑이 있는 표준 알루미늄 팬에 담아진 5mg 미만의 물질을 분당 10℃의 일정한 가열 속도에서 25℃ 내지 300℃ 초과 온도 범위로 가열하였다. 질소를 이용한 정화가스를 분당 50mL의 유속으로 사용하였다.

[0810] 실시예 4: (3R)-1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)]피라진-2-일]-1-메틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-3-히드록시-부탄-1-온



[0811]

[0812] 2-(1H-벤조[d][1,2,3]트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸이소우로늄 테트라플루오로보레이트(201 mg, 0.63 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드(3 mL) 중 3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(1-메틸-3-(피페리딘-4-일)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)피라진-2-아민(200 mg, 0.52 mmol, 실시예 1에 기재됨), N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민(0.273 mL, 1.56 mmol) 및 (R)-3-히드록시부탄산(65.2 mg, 0.63 mmol)의 교반된 현탁액에 첨가하였다. 생성된 현탁액을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 워터스 X-브리지 역상 컬럼(C-18, 5 마이크로론 실리카, 직경 30 mm, 길이 150 mm, 유속 60 mL/분)을 이용하는 예비 HPLC에 의해 물(탄산암모늄(2 g/L) 함유) 중 31% 아세트오니트릴의 등용매 혼합물을 이용하여 정제하였다. 원하는 화합물을 포함하는 분획을 증발시켜 건조하고 연황색 고체를 수득하였다. 상기 고체를 아세트오니트릴(3 mL) 중 실온에서 교반하였다. 생성된 고체를 여과하고, 냉각 아세트오니트릴로 세척하고 건조하여 표제 화합물(125 mg, 51.0 %)을 연황색 고체로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (CDCl<sub>3</sub>) 1.24 (3H, d), 1.52 (9H, s), 1.85 (2H, m), 2.10 (2H, m), 2.35

(1H, dd), 2.55 (1H, d), 2.90 (1H, m), 3.05 (1H, m), 3.20 (1H, m), 3.90 (1H, m), 4.25 (1H,

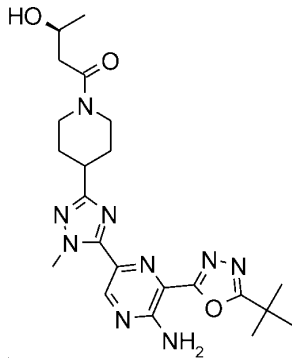
[0813] m), 4.31 (3H, s), 4.6 (1H, m), 9.03 (1H, s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 470.

[0814]

**실시예 5**

[0815]

(3S)-1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-메틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딜]-3-히드록시-부탄-1-온



[0816]

[0817]

실시예 4와 유사한 방법을 이용하여, 3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(1-메틸-3-(피페리딘-4-일)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)피라진-2-아민을 (S)-3-히드록시부탄산과 반응하여 표제 화합물(167 mg, 68.2 %)을 연황색 고체로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (CDCl<sub>3</sub>) 1.24 (3H, d), 1.52 (9H, s), 1.85 (2H, m), 2.10 (2H, m), 2.35

(1H, dd), 2.55 (1H, d), 2.90 (1H, m), 3.05 (1H, m), 3.20 (1H, m), 3.90 (1H, m), 4.25 (1H,

[0818]

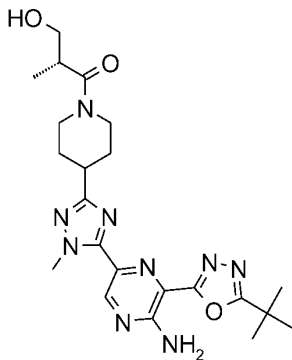
m), 4.31 (3H, s), 4.6 (1H, m), 9.03 (1H, s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 470.

[0819]

**실시예 6**

[0820]

(2R)-1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-메틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딜]-3-히드록시-2-메틸-프로판-1-온



[0821]

[0822]

실시예 4와 유사한 과정을 이용하여, 3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(1-메틸-3-(피페리딘-4-일)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)피라진-2-아민을 (R)-3-히드록시-2-메틸프로판산과 반응하여 표제 화합물(87 mg, 47.4 %)을 연황색 고체로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (CDCl<sub>3</sub>) 1.55 (9H, s), 1.61 (3H, s br), 1.8-2.0 (2H, m), 2.10-2.25 (2H,

m), 2.90 (2H, m), 3.10 (1H, m), 3.3 (2H, m), 3.77 (2H, m), 4.33 (3H, s), 4.6 (1H, m), 9.05

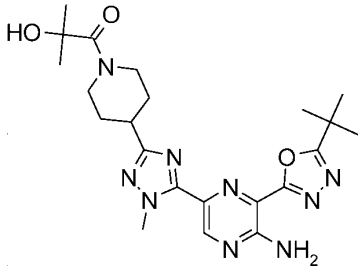
[0823]

(1H, s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 470.

[0824]

**실시예**

7:1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-메틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딜]-2-히드록시-2-메틸-프로판-1-온



[0825]

[0826]

1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보다이미드 히드로클로라이드(100 mg, 0.52 mmol)을 NMP(1.2 mL) 중에 용해된 2-히드록시-2-메틸프로판산(38.0 mg, 0.37 mmol), 3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(1-메틸-3-(피페리딘-4-일)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)피라진-2-아민(100 mg, 0.26 mmol) 및 2-히드록시-피리딘 N-옥시드(57.9 mg, 0.52 mmol)을 아르곤 하에서 한 번에 첨가하였다. 생성된 용액을 25℃에서 3시간 동안 교반하였다. 피리딘(100  $\mu$ l, 1.24 mmol)을 첨가하고 혼합물을 18시간 동안 교반하였다. 추가의 2-히드록시피리딘 1-옥시드(57.9 mg, 0.52 mmol) 및 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보다이미드 히드로클로라이드(100 mg, 0.52 mmol)을 첨가하였다. 이어서, 혼합물을 70℃까지 48시간 동안 가열하고, 추가의 2-히드록시-2-메틸프로판산(15 mg, 0.14 mmol), 1-(3-디메틸아미노프로필)-3-에틸카보다이미드 히드로클로라이드(50.0 mg, 0.26 mmol) 및 2-히드록시피리딘 1-옥시드(25.0 mg, 0.23 mmol)을 첨가한 후 혼합물을 70℃에서 8시간 동안 유지하였다. 용액을 워터스 X-브리지 역상 컬럼(C-18, 5마이크론 실리카, 직경 19 mm, 길이 100 mm, 유속 40 mL/분) 및 용리제로서 물(1% 탄산암모늄 함유)과 아세토니트릴의 점감하는 극성 혼합물을 이용하는 예비 HPLC에 의해 정제하여 표제 화합물(71 mg, 58 %)을 연황색 고체로서 수득하였다.

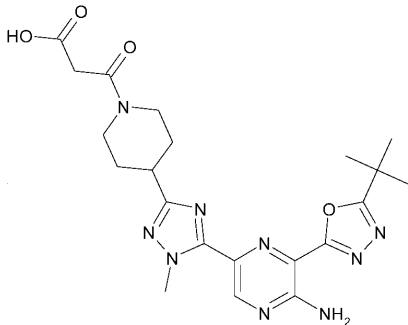
<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (CDCl<sub>3</sub>) 1.55 (15H, s br), 1.90 (2H, m), 2.15 (2H, m), 3.05-3.3 (4H,

[0827]

m), 4.32 (3H, s), 4.6 (1H, m), 9.03 (1H, s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 470.

[0828]

**실시예 8: 3-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-메틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-3-옥소-프로판산**



[0829]

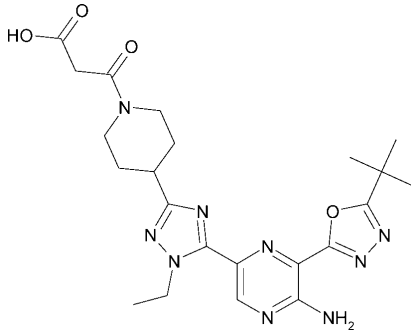
[0830]

에틸 3-클로로-3-옥소프로파노에이트(0.037 mL, 0.29 mmol)를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(1.5 mL) 중에 용해된 3-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(1-메틸-3-(피페리딘-4-일)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)피라진-2-아민(100 mg, 0.26 mmol) 및 트리ethyl아민(0.047 mL, 0.34 mmol)의 교반된 용액에 질소 하에 0℃에서 2분에 걸쳐 점적으로 첨가하였다. 혼합물을 0℃에서 10분간 교반한 후 실온으로 가온하고 1시간 동안 교반하였다. 혼합물을 증발시키고, DMF에 용해하였다; 백색 고체를 여과하고 여과물을 워터스 X-테라 역상 컬럼을 이용하는 예비 HPLC에 의해 물(0.2% 탄산암모늄 함유)과 아세토니트릴의 혼합물로 용리하여 정제하고 에틸 3-(4-(5-(5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-메틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-옥소프로파노에이트(80 mg, 61.7 %)를 황색 고체로서 수득하였다. 상기 물질을 THF(2 mL) 중에 현탁하였다. 2N 수산화나트륨(0.235 mL, 0.47 mmol) 및 물(0.5 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 2N 염산(230  $\mu$ l)을 혼합물에 첨가하였다. 용매를 증발시켰다. 잔류물을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(30 mL)와 물(5 mL)로 희석하였다. 유기상을 염수로 세척하고 MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조하였다. 용매를 증발시켰다. 생성된 포말을 에테르로 연화처리하였다. 생성된 황색 고체를 여과하고 건조하여 아세토니트릴(3 mL) 중에 연화처리하였다. 황색 고체를 여과에 의해 수집하고 40℃에서 건조하여 표제 화합물(50 mg, 68 %)을 황색 고체로서 수득하였다.



<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.46 (9H, s), 1.58 (1H, m), 1.74 (1H, m), 1.98 (2H, m), 2.84 (1H, m), 3.0 (1H, m), 3.21 (1H, m), 3.46 (2H, m), 3.83 (1H, m), 4.22 (3H, s), 4.34 (1H, m), 7.8-8.2 (1H, m), 8.87 (1H, s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 470.

**실시예 9: 3-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-에틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-3-옥소-프로판산**



0-(7-아자벤조트리아졸-1-일)-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트(474 mg, 1.25 mmol)을 DMF(20 mL) 중에 용해된 3-에톡시-3-옥소프로판산(150 mg, 1.13 mmol), N-에틸-N-이소프로필프로판-2-아민(0.394 mL, 2.26 mmol) 및 3-(5-(tert-부틸)-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(1-에틸-3-(피페리딘-4-일)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)피라진-2-아민(450 mg, 1.13 mmol)의 교반된 용액에 50°C에서 30초에 걸쳐 소량으로 첨가하였다. 생성된 용액을 1분(반응 완료) 후 시료를 채취하고 즉시 실온으로 냉각시켰다. 반응 혼합물을 농축하고 EtOAc(100 mL)로 희석하고, 물(20 mL) 및 포화 염수(20 mL)로 순차적으로 세척하였다. 유기상을 MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조하고 여과하고 증발시켜 조생성물 에틸 3-(4-(5-(5-아미노-6-(5-(tert-부틸)-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-옥소프로판오에이트(850 mg)를 수득하였다.

물질의 일부(780 mg)을 THF(20 mL)에 용해하였다. 상기 용액에 2N 수성 수산화나트륨(2.3 mL, 4.57 mmol) 및 물(5 mL), 이어서 메탄올(5 mL)을 첨가하여 투명한 용액을 수득하였다. 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. THF를 증발시켰다. 수성층을 2N 수성 염산(2.5 mL)으로 pH3으로 산성화하였다. 디클로로메탄(50 mL)을 첨가하고 유기상을 추출하였다. 유기상을 염수(10 mL)로 세척하고 MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조하였다. 용매를 증발시켰다. 생성된 검을 예비 HPLC(워터스 X-브리지 프렙 C18 OBD 컬럼, 5 μ 실리카, 직경 50 mm, 길이 100 mm)에 의해 용리체로서, 물(1% 암모니아 함유)과 아세트니트릴의 점감하는 극성 혼합물을 이용하여 정제하였다. 원하는 화합물을 포함하는 분획을 증발시켜 건조하여 순수 암모늄염을 수득하였다. 이것을 물에 용해하고 2N 염산(~ 0.3 mL)으로 pH3으로 산성화하였다. 디클로로메탄(50 mL)을 첨가하고 유기상을 분리하고 염수(5 mL)로 세척하고 MgSO<sub>4</sub> 상에서 건조하였다. 여과 후 생성된 용액을 증발하여 건조하고 잔류물을 디에틸 에테르(5 mL)로 연화처리하고 여과하여 3-(4-(5-(5-아미노-6-(5-(tert-부틸)-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)-3-옥소프로판산(195 mg, 26.5 %)을 크림색 고체로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼: (DMSO-d<sub>6</sub>) 1.45 (9H, s), 1.48 (3H, m), 1.55 - 1.62 (1H, m), 1.70 - 1.80 (1H, m), 1.95 - 2.05 (2H, m), 2.80 - 2.90 (1H, m), 2.95 - 3.05 (1H, m), 3.15 - 3.25 (1H, m), 3.45 (2H, s), 3.78 - 3.85 (1H, m), 4.30 - 4.40 (1H, m), 4.55 - 4.65 (2H, m), 7.80 - 8.00 (2H, br s), 8.88 (1H, s), 12.60 (1H, s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 484

**실시예 10: (2S)-1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-에틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-2,3-디히드록시-프로판-1-온**

DCM(5 mL) 중 3-(5-(tert-부틸)-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(1-에틸-3-(피페리딘-4-일)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)피라진-2-아민(257 mg, 0.50 mmol, TFA 염), 칼륨(S)-2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-카복실레이트(101 mg, 0.55 mmol) 및 EDCI(105 mg, 0.55 mmol)의 혼합물에 1-히드록시-1H-벤조트리아졸 수화물(85 mg, 0.56 mmol) 및 DIPEA(194 mg, 1.50 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 물을 혼합물에 첨가하고 DCM으로 추출하

였다. 유기층을 염수로 세척하고 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조하고, 여과하고 농축하여(S)-(4-(5-(5-아미노-6-(5-(tert-부틸)-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)(2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-일)메탄(320 mg)을 수득하였다. 질량 스펙트럼[M+H]<sup>+</sup> = 526. DCM(10 mL) 중 (S)-(4-(5-(5-아미노-6-(5-(tert-부틸)-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일)-1-에틸-1H-1,2,4-트리아졸-3-일)피페리딘-1-일)(2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-일)메탄(320mg)의 혼합물에 TFA(1.6 mL, 20.77 mmol)을 실온에서 점적으로 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하고 농축하고 예비 HPLC(워터스 X-브리지 프랩 C18 OBD 컬럼, 5µ 실리카, 직경 19 mm, 길이 100 mm)에 의해 용리제로서 물(0.1% NH<sub>3</sub> 함유) 및 MeCN의 점감하는 극성 혼합물을 이용하여 정제하였다. 원하는 화합물을 포함하는 분획을 증발시켜 건조하여 표제 화합물(142 mg, 48 %)을 백색 고체로서 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼 (400 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>, 30°C): 1.45 (12H, m), 1.56 (1H, m), 1.70 (1H, m),

1.98 (2H, m), 2.85 (1H, m), 3.00 (1H, m), 3.20 (1H, m), 3.45 (1H, s), 3.55 (1H, s), 4.05 (1H, m), 4.35 (2H, m), 4.60 (2H, m), 4.70 (1H, m), 4.85 (1H, m), 7.90 (2H, m), 8.85 (1H,

s); 질량 스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 486.

[0839]

**실시예 11: (2R)-1-[4-[5-[5-아미노-6-(5-tert-부틸-1,3,4-옥사디아졸-2-일)피라진-2-일]-1-에틸-1,2,4-트리아졸-3-일]-1-피페리딘]-2,3-디히드록시-프로판-1-온**

[0840]

3-(5-(Tert-부틸)-1,3,4-옥사디아졸-2-일)-5-(1-에틸-3-(피페리딘-4-일)-1H-1,2,4-트리아졸-5-일)피라진-2-아민을 실시예 10에 기재된 유사한 방법을 이용하여 칼륨(R)-2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-카복실레이트와 반응하여 표제 화합물(0.145 g, 40 %)을 고체로서 수득하였다.

[0841]

<sup>1</sup>H NMR 스펙트럼 (400 Hz, DMSO-d<sub>6</sub>, 30°C): 1.45 (12H, m), 1.60 (2H, m), 1.98 (2H, m),

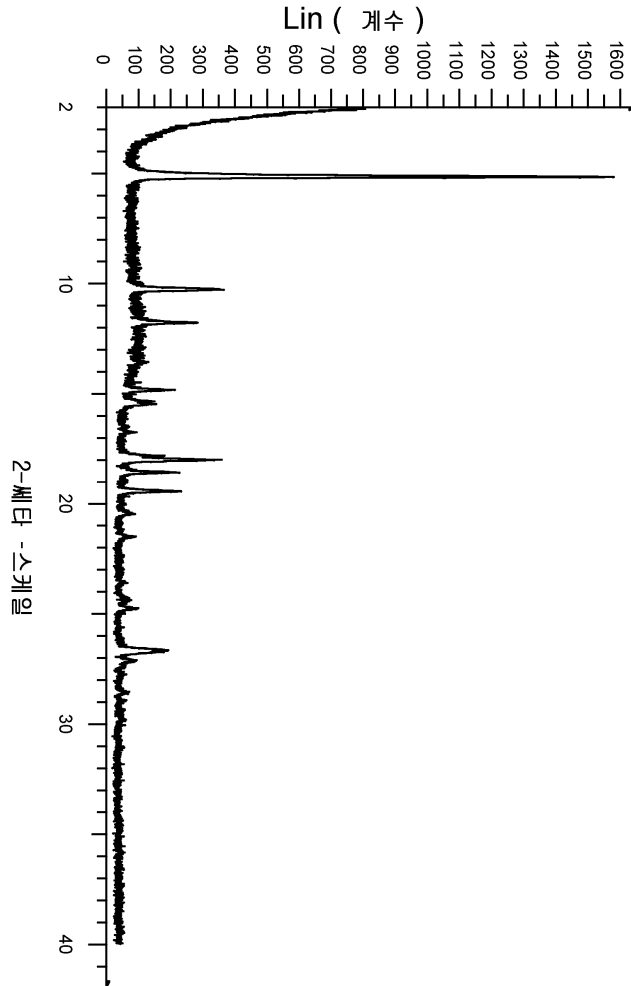
2.85 (1H, m), 3.00 (1H, m), 3.17 (1H, m), 3.45 (1H, s), 3.55 (1H, s), 4.05 (1H, m), 4.35 (2H, m), 4.60 (2H, m), 4.70 (1H, m), 4.85 (1H, m), 7.90 (2H, m), 8.85 (1H, s); 질량

스펙트럼 [M+H]<sup>+</sup> = 486.

[0842]

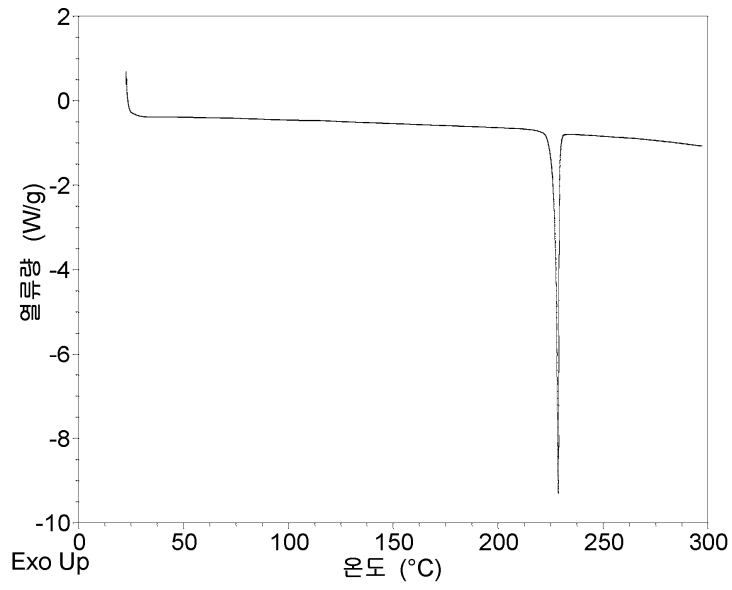
도면

도면1



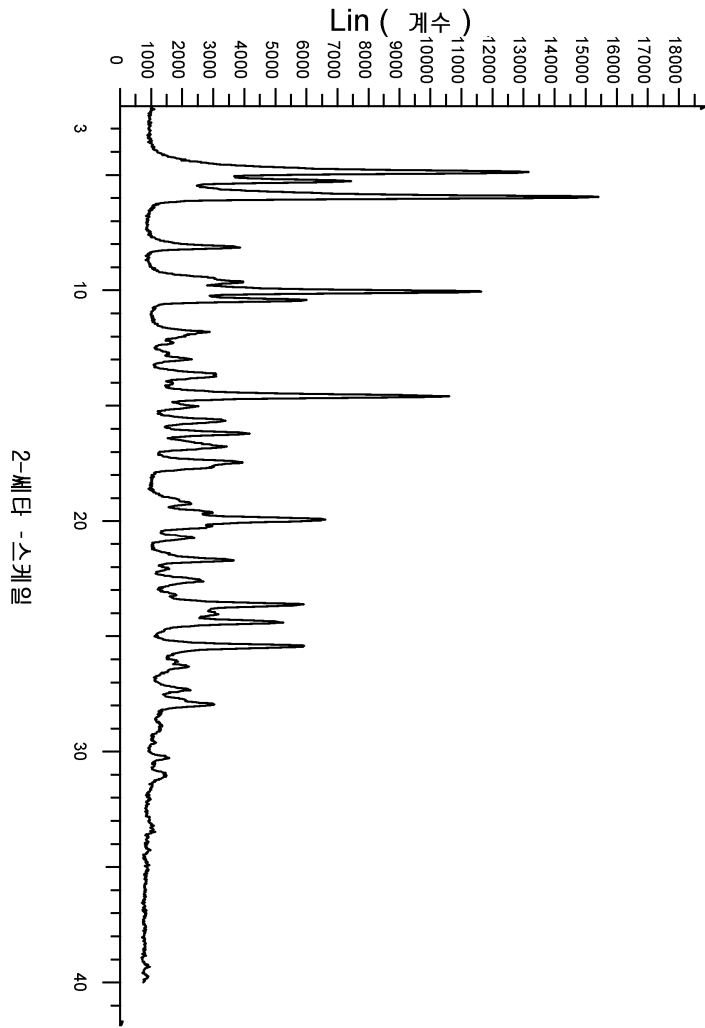
X-선 분말 회절 패턴 실시예 1A형

도면2



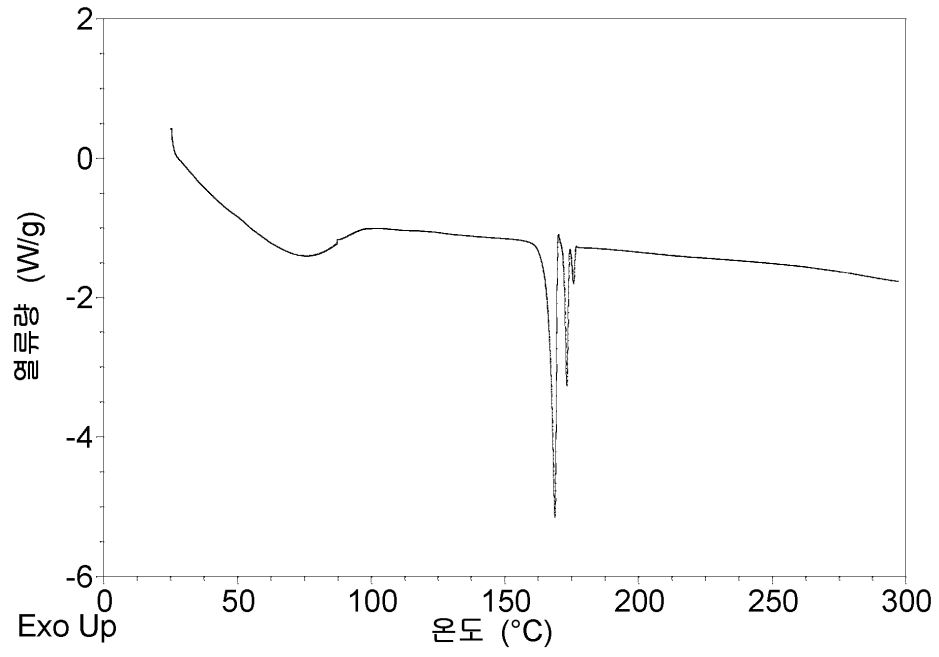
DSC 써모그램 실시예 1 A형

도면3



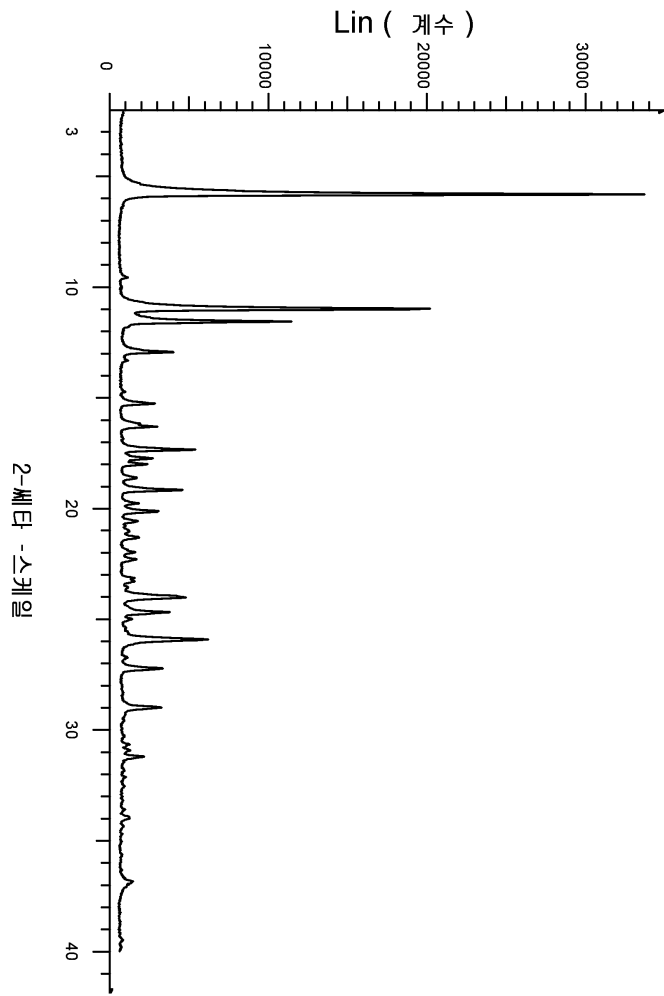
X-선 분말 회절 패턴 실시예 3 A형

도면4



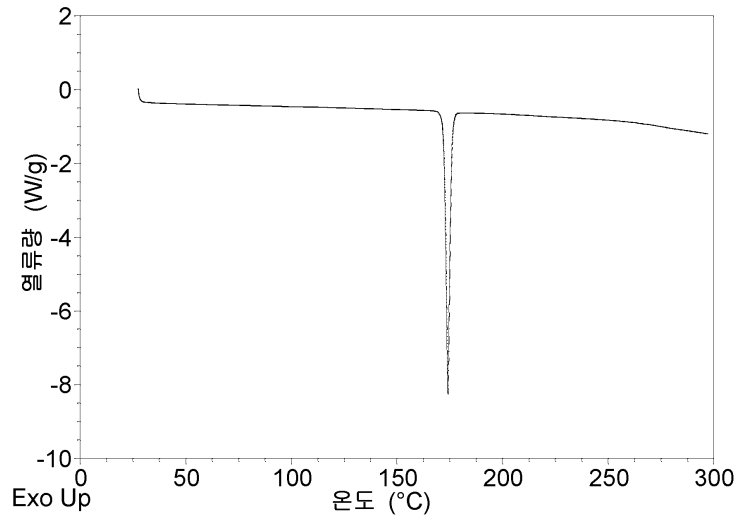
DSC 써모그램 실시예 3 A형

도면5



X-선 분말 회절 패턴 실시예 3 B형

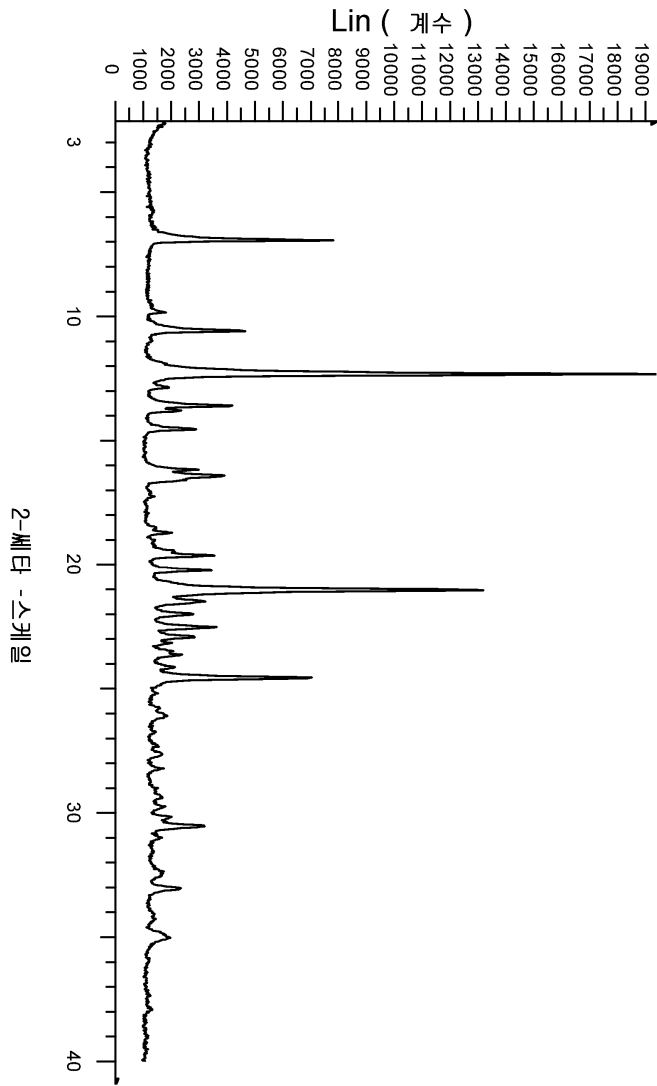
도면6



DSC 써모그램 실시예 3 B형

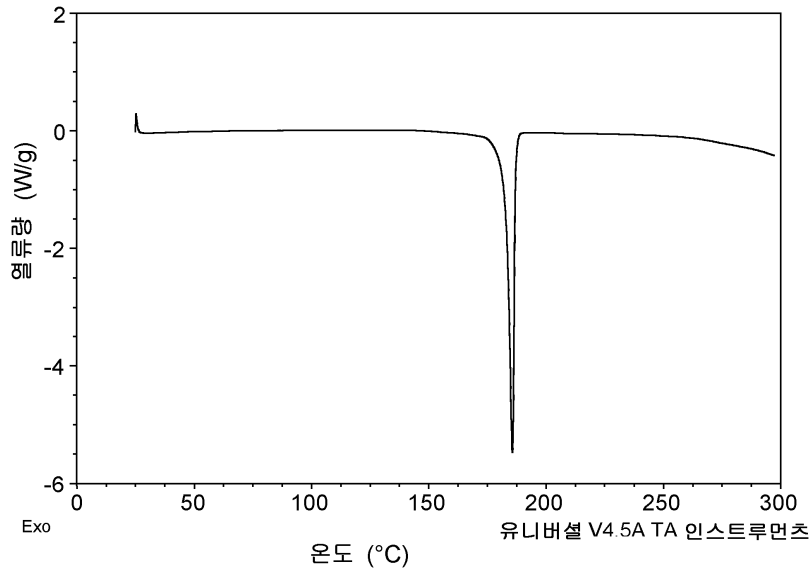


도면7



X-선 분말 회절 패턴 실시예 3 C형

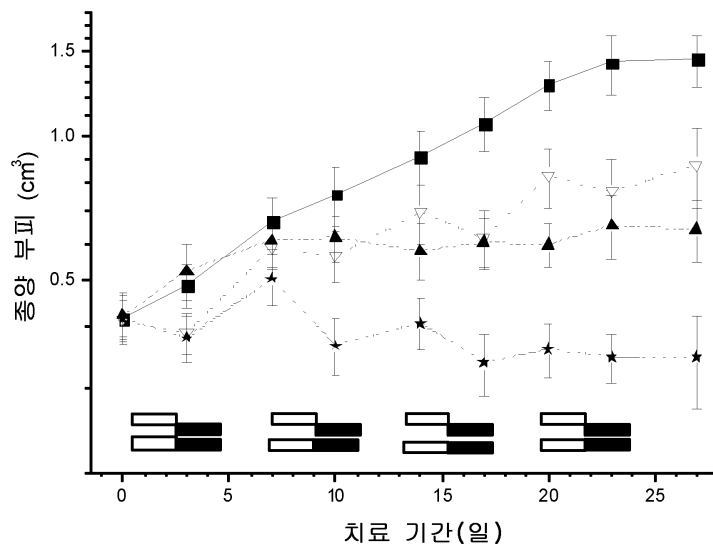
도면8



DSC 써모그램 실시예 3 C형

도면9

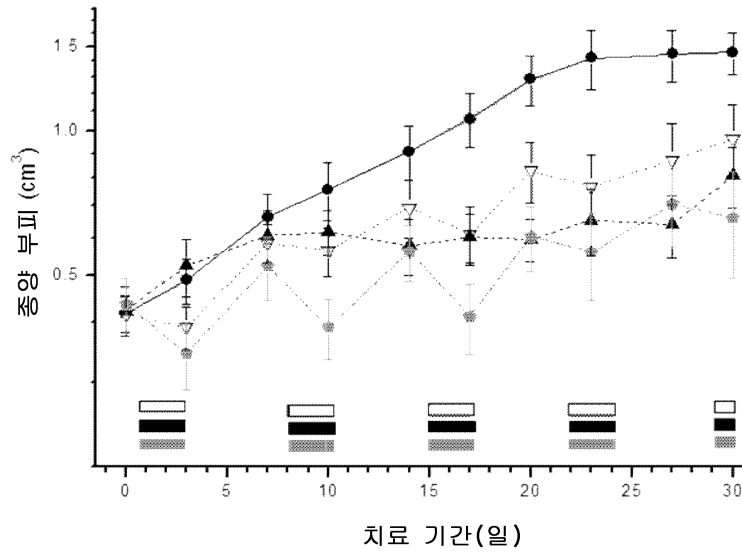
- 비히클
- ▲ 실시예 3
- ▽ AZD5363
- ★ 조합
- AZD5363 투여후 실시예 3



AKT 억제제 (AZD5363)와 조합된 실시예 3에 의한 종양 성장 억제 - 순차 투여

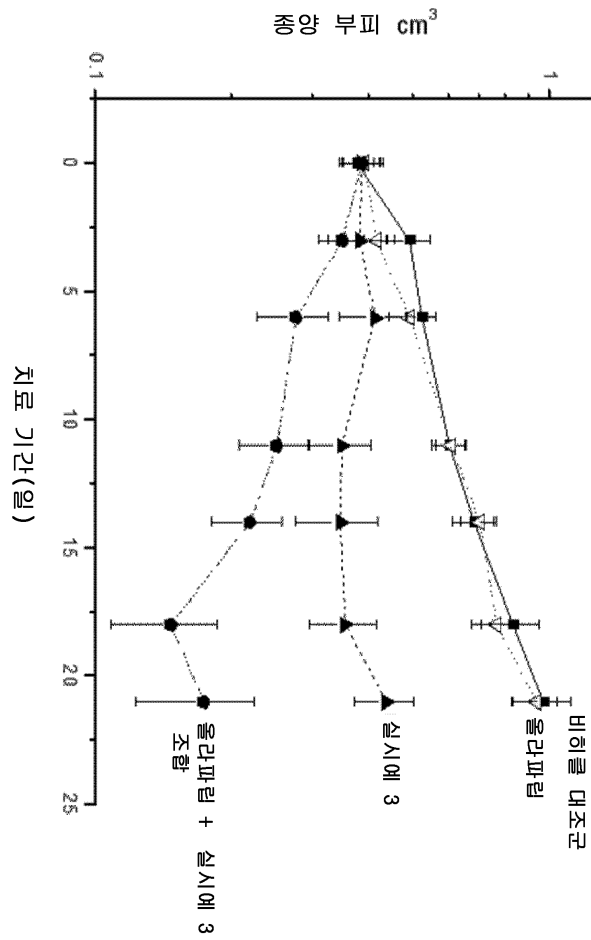
도면10

- 비히클
- ▲ 실시예 3
- ▽ AZD5363
- AZD5363 + 실시예 3  
동시 투여



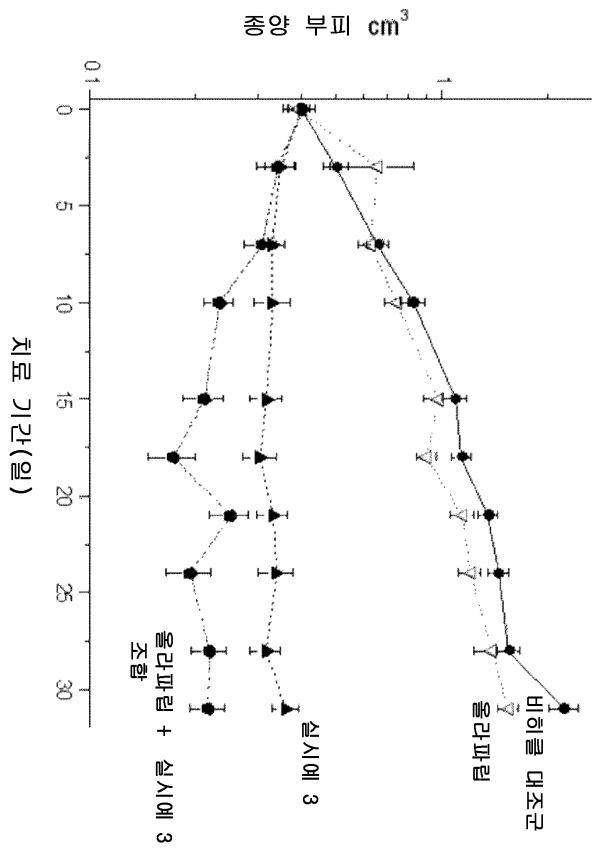
AKT 억제제(AZD5363)와 조합된 실시예 3에 의한 종양 성장 억제 - 동시 투여

도면11



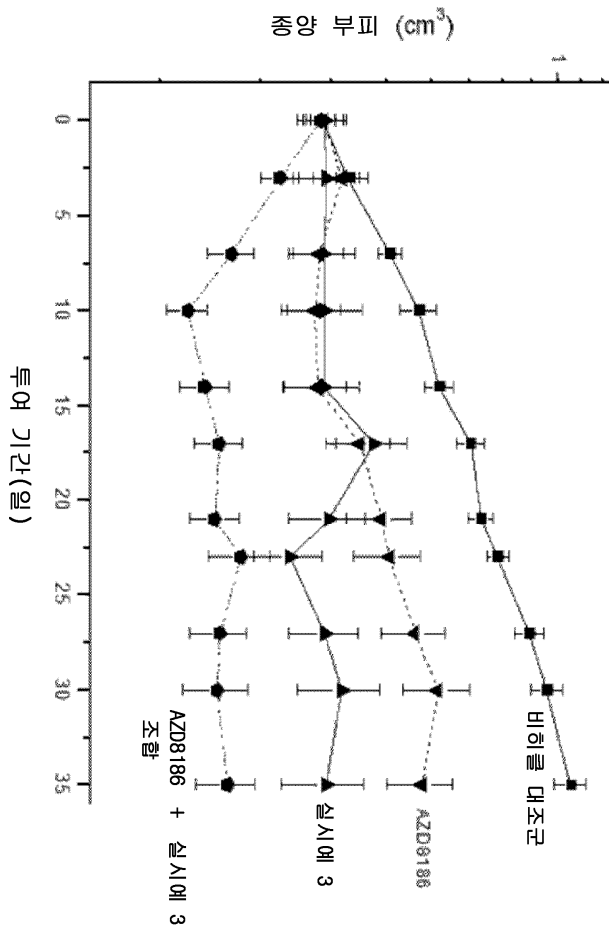
BT474 이종이식 모델에서 PARP 억제제(올라파립)와 조합된 실시에 3에 의한 종양 성장 억제

도면12



MCF7 이종이식 모델에서 PARP 억제제(올라파린)와 조합된 실시예 30에 의한 종양 성장 억제

도면13



AZD8186과 조합된 실시에 3에 의한 중량 성장 억제