(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0119210
(43) 공개일자 2015년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 31/519* (2006.01) *A61K 31/506* (2006.01)
*A61K 31/513* (2006.01) *A61K 31/517* (2006.01)
*A61K 31/5377* (2006.01) *A61K 31/553* (2006.01)
*A61K 31/66* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 31/519* (2013.01)
*A61K 31/404* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7024916
(22) 출원일자(국제) 2014년03월03일
심사청구일자 2015년09월11일
(85) 번역문제출일자 2015년09월11일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2014/059401
(87) 국제공개번호 WO 2014/140989
국제공개일자 2014년09월18일
(30) 우선권주장
61/786,130 2013년03월14일 미국(US)

(71) 출원인
**화이자 인코포레이티드**
미국 뉴욕주 10017 뉴욕 이스트 42번 스트리트 235
(72) 발명자
**골드베르그 젤란나 아이리스**
미국 캘리포니아주 92122 샌 디에고 플로레이 스트리트 7260
**케이트 존 찰스**
미국 캘리포니아주 91941 라 메사 이스트릿지 4168
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**제일특허법인**

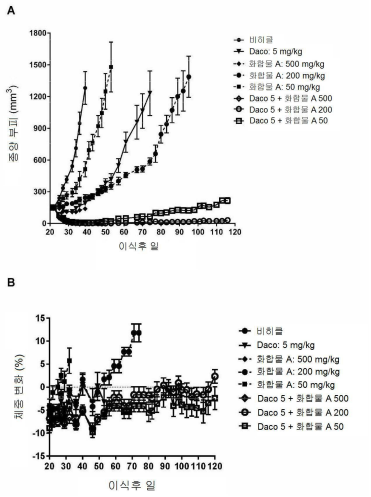
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 **비소세포 폐암의 치료를 위한 EGFR T790M 억제제와 EGFR 억제제의 조합**

## (57) 요 약

본 발명은 EGFR T790M 억제제를 적은 투여량의 panHER 억제제와 조합하여 투여함으로써 비소세포 폐암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 비가역성 EGFR T790M 억제제를 EGFR 억제제와 조합하여 투여함으로써 비소세포 폐암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

*대 표 도* - 도13



(52) CPC특허분류
*A61K 31/4709* (2013.01)
*A61K 31/506* (2013.01)
*A61K 31/513* (2013.01)
*A61K 31/517* (2013.01)
*A61K 31/5377* (2013.01)
*A61K 31/553* (2013.01)
*A61K 31/66* (2013.01)
(72) 발명자
**레트렌트 스티븐 폴**
미국 뉴저지주 08540 프린스톤 카롤린 드라이브 25
**웨인리치 스코트 로렌스**
미국 캘리포니아주 92130 샌 디에고 코트 드 라 폰다 4340

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

비가역성 EGFR T790M 억제제의 효과량을 EGFR 억제제의 효과량과 조합하여 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하는 비소세포 폐암의 치료 방법.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

비가역성 EGFR T790M 억제제가 1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인 방법.

### 청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

EGFR 억제제가 게피티닙, 에를로티닙, 이코티닙, 반데타닙, 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙, 카네르티닙, 세툭시맙 및 파니투무맙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염인 방법.

### 청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

EGFR 억제제가 게피티닙, 에를로티닙, 아파티닙 및 다코미티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염인 방법.

### 청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

EGFR 억제제가 에를로티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인 방법.

### 청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

EGFR 억제제가 다코미티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인 방법.

### 청구항 7

EGFR T790M 억제제의 효과량을 panHER 억제제와 조합하여 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하는 비소세포 폐암의 치료 방법으로, 상기 panHER 억제제를 비표준 임상 투여 양생법에 따라 투여하는 방법.

### 청구항 8

제 7 항에 있어서,

비표준 임상 투여 양생법이 비표준 임상 투여량 또는 비표준 투여 일정인 방법.

### 청구항 9

제 7 항에 있어서,

비표준 임상 투여 양생법이 적은 투여량의 panHER 억제제인 방법.

**청구항 10**

제 7 항에 있어서,

비표준 임상 투여 양생법이 간헐적인 투여 양생법인 방법.

**청구항 11**

제 7 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

EGFR T790M 억제제가 Go6976, PKC412, AP26113, HM61713, WZ4002, CO-1686 및 TAS-2913으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염인 방법.

**청구항 12**

제 7 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

EGFR T790M 억제제가 1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인 방법.

**청구항 13**

제 7 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

panHER 억제제가 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙 및 카네르티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염인 방법.

**청구항 14**

제 7 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

panHER 억제제가 아파티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인 방법.

**청구항 15**

제 7 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,

panHER 억제제가 다코미티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인 방법.

**청구항 16**

EGFR T790M 억제제를 EGFR 억제제와 조합하여 상승적인 양으로 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하는 비소세포 폐암의 치료 방법.

**청구항 17**

제 16 항에 있어서,

EGFR T790M 억제제가 Go6976, PKC412, AP26113, HM61713, WZ4002, CO-1686 및 TAS-2913으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염인 방법.

**청구항 18**

제 16 항에 있어서,

EGFR T790M 억제제가 1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인 방법.

**청구항 19**

제 16 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서,

EGFR 억제제가 게피티닙, 에를로티닙, 이코티닙, 반데타닙, 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙, 카네르티닙, 세툭시맙 및 파니투무맙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염인

방법.

**청구항 20**

제 16 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서,

EGFR 억제제가 게피티닙, 에를로티닙, 아파티닙 및 다코미티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염인 방법.

**청구항 21**

제 16 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서,

EGFR 억제제가 에를로티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인 방법.

**청구항 22**

(a) EGFR T790M 억제제; 및

(b) EGFR 억제제

의 상승적인 조합으로, 상기 성분 (a) 및 성분 (b)가 상승적인 조합.

**청구항 23**

제 22 항에 있어서,

EGFR T790M 억제제가 Go6976, PKC412, AP26113, HM61713, WZ4002, CO-1686 및 TAS-2913으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염인 조합.

**청구항 24**

제 22 항에 있어서,

EGFR T790M 억제제가 1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인 조합.

**청구항 25**

제 22 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서,

EGFR 억제제가 게피티닙, 에를로티닙, 이코티닙, 반데타닙, 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙, 카네르티닙, 세툭시맙 및 파니투무맙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염인 조합.

**청구항 26**

제 22 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서,

EGFR 억제제가 게피티닙, 에를로티닙, 아파티닙 및 다코미티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염인 조합.

**청구항 27**

제 22 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서,

EGFR 억제제가 에를로티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염인 조합.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 EGFR T790M 억제제를 적은 투여량의 panHER 억제제와 조합하여 투여함으로써 비소세포 폐암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 비가역성 EGFR T790M 억제제를 EGFR 억제제와 조합하여 투여함으로서

비소세포 폐암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

## 배 경 기 술

[0002] 비소세포 폐암은 전 세계적으로 암 사망의 주요 원인이며 매년 약 140 만명의 새로운 환자가 진단된다. 비소세포 폐암의 가장 흔한 형태인 폐 선암에서, 표피 성장 인자 수용체(EGFR)에 돌연변이를 가진 환자는 전체 인구의 10 내지 30%를 차지한다. 이는 EGFR 억제제, 예컨대 에를로티닙 또는 게피티닙이 가장 효과적일 수 있는 환자의 부분이다(Paez et al., Science 2004; Lynch et al., NEJM 2004; Pao et al., PNAS 2004). 이러한 억제제에 대한 우수한 반응과 관련된 가장 통상의 활성화 돌연변이는 엑손 19 내에서의 결실(예컨대 E746-A750) 및 활성화 루프에서의 점 돌연변이(엑손 21, 특히 L858R)이다. 현재까지 적은 정도로 확인된 추가 체세포 돌연변이는 점 돌연변이, 즉 G719S, G719C, G719A, L861 및 엑손 20에서의 작은 삽입을 포함한다(Shigematsu et al., JNCI 2005; Fukuoka et al., JCO 2003; Kris et al., JAMA 2003; Shepherd et al., NEJM 2004).

[0003] 이러한 제제는 EGFR 돌연변이체 하위개체에 대하여 효과적인 치료일 수 있지만, 초기에 반응하는 대다수의 환자는 내성이 발달된다. 약 50%의 환자에서 발견된 내성의 1차 기전은 게이트키퍼 트레오닌 잔기에서 발생하는 2차 돌연변이(T790M)에 기인한다(Kosaka et al., CCR 2006; Balak et al., CCR 2006; Engelman et al., Science 2007).

[0004] 비소세포 폐암의 치료에 대한 개선된 요법은 크게 충족되지 않은 의료 요구를 포함하고, 치료 결과를 개선하기 위한 신규한 조합 양생법의 검증을 필요로 한다.

## 발명의 내용

[0005] 하기 각각의 실시양태는 조합된 실시양태와 모순되지 않는 본원에 기재된 임의의 다른 실시양태와 조합될 수 있다. 또한, 본원에 기재된 각각의 실시양태는 그의 범주 내에서 본원에 기재된 화합물의 약학적으로 허용되는 염을 구상한다. 따라서, 어구 "또는 이의 약학적으로 허용되는 염"은 본원에 기재된 모든 화합물의 설명에 내포된다.

[0006] 본원에 기재된 일부 실시양태는 비가역성 EGFR T790M 억제제의 효과량을 EGFR 억제제의 효과량과 조합하여 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하는 비소세포 폐암의 치료 방법에 관한 것이다.

[0007] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, 비가역성 EGFR T790M 억제제는 1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0008] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, 비가역성 EGFR T790M 억제제는 N-메틸-N-[트랜스-3-({2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-5-(피리딘-2-일)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)사이클로부틸]프로프-2-엔아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0009] 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, 비가역성 EGFR T790M 억제제는 N-[트랜스-3-({5-클로로-2-[(1,3-다이메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}아미노)사이클로부틸]-N-메틸프로프-2-엔아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0010] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, 비가역성 EGFR T790M 억제제는 1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(3-메톡시-1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0011] 본 발명의 방법의 실시양태에서, EGFR 억제제는 게피티닙, 에를로티닙, 이코티닙, 반데타닙, 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙, 카네르티닙, 세툭시맙 및 파니투무맙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0012] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, EGFR 억제제는 게피티닙, 에를로티닙, 이코티닙, 반데타닙, 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙 및 카네르티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0013] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, EGFR 억제제는 게피티닙, 에를로티닙, 아파티닙 및 다코미티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0014] 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, EGFR 억제제는 게피티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0015] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, EGFR 억제제는 에를로티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0016] 본 발명의 방법의 실시양태에서, EGFR 억제제는 아파티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0017] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, EGFR 억제제는 다코미티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0018] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, EGFR 억제제는 가역성 EGFR 억제제이다.

[0019] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, 가역성 EGFR 억제제는 게피티닙, 에를로티닙, 이코티닙, 반데타닙 및 라파티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0020] 본 발명의 방법의 실시양태에서, 가역성 EGFR 억제제는 게피티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0021] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, 가역성 EGFR 억제제는 에를로티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0022] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, EGFR 억제제는 비가역성 EGFR 억제제이다.

[0023] 본 발명의 방법의 실시양태에서, 비가역성 EGFR 억제제는 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙 및 카네르티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0024] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, 비가역성 EGFR 억제제는 아파티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0025] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, 비가역성 EGFR 억제제는 다코미티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0026] 본 발명의 일부 실시양태는 EGFR T790M 억제제의 효과량을 panHER 억제제와 조합하여 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하는 비소세포 폐암을 치료하는 방법에 관한 것이고, 이때 panHER 억제제는 비표준 임상 투여 양생법에 따라 투여된다.

[0027] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, 비표준 임상 투여 양생법은 비표준 임상 투여량 또는 비표준 투여 일정이다.

[0028] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, 비표준 임상 투여 양생법은 적은 투여량의 panHER 억제제이다.

[0029] 본 발명의 방법의 실시양태에서, 비표준 임상 투여 양생법은 간헐적인 투여 양생법이다.

[0030] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, EGFR T790M 억제제는 Go6976, PKC412, AP26113, HM61713, WZ4002, CO-1686 및 TAS-2913으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0031] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, EGFR T790M 억제제는 1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0032] 본 발명의 방법의 실시양태에서, EGFR T790M 억제제는 N-메틸-N-[트랜스-3-({2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-5-(피리딘-2-일)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)사이클로부틸]프로프-2-엔아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0033] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, EGFR T790M 억제제는 N-[트랜스-3-({5-클로로-2-[(1,3-다이메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}아미노)사이클로부틸]-N-메틸프로프-2-엔아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0034] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, EGFR T790M 억제제는 1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(3-메톡시-1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0035] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, panHER 억제제는 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙

및 카네르티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0036] 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, panHER 억제제는 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙 및 카네르티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0037] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, panHER 억제제는 아파티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0038] 본 발명의 방법의 실시양태에서, panHER 억제제는 다코미티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0039] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, panHER 억제제는 비가역성 EGFR 억제제이다.

[0040] 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, 비가역성 panHER 억제제는 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙 및 카네르티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0041] 본 발명의 방법의 실시양태에서, 비가역성 panHER 억제제는 아파티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0042] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, 비가역성 panHER 억제제는 다코미티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0043] 본 발명의 특정 실시양태는 EGFR T790M 억제제를 EGFR 억제제와 조합하여 상승적인 양으로 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하는 비소세포 폐암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0044] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, EGFR T790M 억제제는 Go6976, PKC412, AP26113, HM61713, WZ4002, CO-1686 및 TAS-2913으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0045] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, EGFR T790M 억제제는 1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0046] 본 발명의 방법의 실시양태에서, EGFR T790M 억제제는 N-메틸-N-[트랜스-3-({2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-5-(피리딘-2-일)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)사이클로부틸]프로프-2-엔아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0047] 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, EGFR T790M 억제제는 N-[트랜스-3-({5-클로로-2-[(1,3-다이메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}아미노)사이클로부틸]-N-메틸프로프-2-엔아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0048] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, EGFR T790M 억제제는 1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(3-메톡시-1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0049] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, EGFR 억제제는 게피티닙, 에를로티닙, 이코티닙, 반데타닙, 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙, 카네르티닙, 세툭시맙 및 파니투무맙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0050] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, EGFR 억제제는 게피티닙, 에를로티닙, 이코티닙, 반데타닙, 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙 및 카네르티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0051] 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, EGFR 억제제는 게피티닙, 에를로티닙, 아파티닙 및 다코미티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0052] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, EGFR 억제제는 게피티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0053] 본 발명의 방법의 실시양태에서, EGFR 억제제는 에를로티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0054] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, EGFR 억제제는 panHER 억제제이다.

[0055] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, panHER 억제제는 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙 및 카네르티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0056] 본 발명의 방법의 실시양태에서, panHER 억제제는 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙 및 카네르티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0057] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, panHER 억제제는 아파티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0058] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, panHER 억제제는 다코미티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0059] 본 발명의 방법의 추가 실시양태에서, panHER 억제제는 비가역성 EGFR 억제제이다.

[0060] 본 발명의 방법의 일부 실시양태에서, 비가역성 panHER 억제제는 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙 및 카네르티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0061] 본 발명의 방법의 실시양태에서, 비가역성 panHER 억제제는 아파티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0062] 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, 비가역성 panHER 억제제는 다코미티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0063] 본 발명의 일부 실시양태는 (a) EGFR T790M 억제제; 및 (b) EGFR 억제제의 상승적인 조합에 관한 것이고, 이때 성분 (a) 및 성분 (b)는 상승적이다.

[0064] 본 발명의 조합의 일부 실시양태에서, EGFR T790M 억제제는 Go6976, PKC412, AP26113, HM61713, WZ4002, CO-1686 및 TAS-2913으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0065] 본 발명의 조합의 추가 실시양태에서, EGFR T790M 억제제는 1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0066] 본 발명의 조합의 실시양태에서, EGFR T790M 억제제는 N-메틸-N-[트랜스-3-({2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-5-(피리딘-2-일)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)사이클로부틸]프로프-2-엔아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0067] 본 발명의 조합의 추가 실시양태에서, EGFR T790M 억제제는 N-[트랜스-3-({5-클로로-2-[(1,3-다이메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}아미노)사이클로부틸]-N-메틸프로프-2-엔아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0068] 본 발명의 조합의 일부 실시양태에서, EGFR T790M 억제제는 1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(3-메톡시-1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0069] 본 발명의 조합의 일부 실시양태에서, EGFR 억제제는 게피티닙, 에를로티닙, 이코티닙, 반데타닙, 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙, 카네르티닙, 세툭시맙 및 파니투무맙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0070] 본 발명의 조합의 실시양태에서, EGFR 억제제는 게피티닙, 에를로티닙, 이코티닙, 반데타닙, 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙 및 카네르티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0071] 본 발명의 조합의 실시양태에서, EGFR 억제제는 게피티닙, 에를로티닙, 아파티닙 및 다코미티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0072] 본 발명의 조합의 특정 실시양태에서, EGFR 억제제는 게피티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0073] 본 발명의 조합의 추가 실시양태에서, EGFR 억제제는 에를로티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0074] 본 발명의 조합의 일부 실시양태에서, EGFR 억제제는 panHER 억제제이다.

[0075] 본 발명의 조합의 추가 실시양태에서, panHER 억제제는 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙 및 카네르티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0076] 본 발명의 조합의 추가 실시양태에서, panHER 억제제는 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙 및 카네르티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0077] 본 발명의 조합의 실시양태에서, panHER 억제제는 아파티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0078] 본 발명의 조합의 일부 실시양태에서, panHER 억제제는 다코미티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0079] 본 발명의 조합의 실시양태에서, panHER 억제제는 비가역성 EGFR 억제제이다.

[0080] 본 발명의 조합의 추가 실시양태에서, 비가역성 panHER 억제제는 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙 및 카네르티닙으로 이루어진 군으로부터 선택되거나 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0081] 본 발명의 조합의 일부 실시양태에서, 비가역성 panHER 억제제는 아파티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

[0082] 본 발명의 조합의 실시양태에서, 비가역성 panHER 억제제는 다코미티닙 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이다.

## *도면의 간단한 설명*

[0083] 도 1은 총 EGFR 대립유전자에 대하여 캐스트PCR 정량화된 EGFR T790M 대립유전자를 나타내는 백분율과 함께 RPC9 클론 3 및 클론 6에서 C>T EGFR T790M 돌연변이가 확인된 생거(Sanger) 서열결정을 도시한다.

도 2는 다코미티닙(도 2A) 또는 에를로티닙(도 2B)의 다양한 농도로 처리된 PC9 및 RPC9 클론 3 및 6에 대한 세포 생존력 분석시 용량 반응 곡선을 도시한다.

도 3은 RPC9 클론 6 세포 생존력 분석시 용량 반응 곡선을 도시한다. 도 3A는 화합물 A(화합물 A) 및 다코미티닙(daco) 단독 및 조합의 용량 반응 곡선을 도시한다. 도 3B는 화합물 A 및 에를로티닙(erlo) 단독 및 조합의 용량 반응 곡선을 도시한다. 도 3C는 단일 제제로서 화합물 A의 선택된 농도, 및 다코미티닙 및 에를로티닙과 조합시 선택된 농도에서 억제(%)를 도시한다.

도 4는 RPC9 클론 6 세포 생존력 분석시 용량 반응 곡선을 도시한다. 도 4A는 화합물 B(화합물 B) 및 다코미티닙(daco) 단독 및 조합의 용량 반응 곡선을 도시한다. 도 4B는 화합물 B 및 에를로티닙(erlo) 단독 및 조합의 용량 반응 곡선을 도시한다. 도 4C는 단일 제제로서 화합물 B의 선택된 농도, 및 다코미티닙 및 에를로티닙과 조합시 선택된 농도에서 억제(%)를 도시한다.

도 5는 RPC9 클론 6 세포 생존력 분석시 용량 반응 곡선을 도시한다. 도 5A는 화합물 A(화합물 A) 단독 및 다코미티닙(daco)과 조합시 용량 반응 곡선을 도시한다. 도 5B는 화합물 A 단독 및 게피티닙(gefi)과 조합시 용량 반응 곡선을 도시한다. 도 5C는 화합물 A 단독 및 아파티닙(afat)과 조합시 용량 반응 곡선을 도시한다. 도 5D는 단일 제제로서 화합물 A의 선택된 농도, 및 다코미티닙, 게피티닙 및 아파티닙과 조합시 선택된 농도에서 억제(%)를 도시한다.

도 6은 RPC9 클론 6 세포 생존력 분석시 용량 반응 곡선을 도시한다. 도 6A는 화합물 B(화합물 B) 단독 및 다코미티닙(daco)과 조합시 용량 반응 곡선을 도시한다. 도 6B는 화합물 B 단독 및 게피티닙(gefi)과 조합시 용량 반응 곡선을 도시한다. 도 6C는 화합물 B 단독 및 아파티닙(afat)과 조합시 용량 반응 곡선을 도시한다. 도 4D는 단일 제제로서 화합물 B의 선택된 농도, 및 다코미티닙, 게피티닙 및 아파티닙과 조합시 선택된 농도에서 억제(%)를 도시한다.

도 7은 RPC9 클론 6 세포에서 EGFR, AKT 및 ERK의 인산화 수준의 웨스턴 면역블롯(Western Immunoblot)을 도시한다. GAPDH를 단백질 로딩 대조군으로서 포함하였다. 도 7A는 DMSO, 다코미티닙, 화합물 A, 또는 다코미티닙 + 화합물 A(화합물 A)을 조합하여 처리된 RPC9 클론 6 세포를 도시한다. 도 7B는 DMSO, 에를로티닙, 화합물 A, 또는 에를로티닙 + 화합물 A(화합물 A)을 조합하여 처리된 RPC9 클론 6 세포를 도시한다.

도 8은 DMSO, 다코미티닙, 화합물 A, 또는 다코미티닙(Daco) + 화합물 A(화합물 A)을 조합하여 처리된 RPC9 클론 6 세포의 웨스턴 면역 블롯의 밴드(도 7A)에서 밀도계측 결과를 도시한다. pEGFR Y1068(도 8A), pAKT S473(도 8B), 및 pERK T202/Y204(도 8C)의 억제를 DMSO 대조군과 비교하여 측정하였다.

도 9는 DMSO, 에를로티닙, 화합물 A, 또는 에를로티닙(Erlo) + 화합물 A(화합물 A)을 조합하여 처리된 RPC9 클론 6 세포의 웨스턴 면역블롯의 밴드(도 7B)에서 밀도계측 결과를 도시한다. pEGFR Y1068(도 9A), pAKT S473(도 9B), 및 pERK T202/Y204(도 9C)의 억제를 DMSO 대조군과 비교하여 측정하였다.

도 10은 RPC9 클론 6 세포에서 EGFR, AKT 및 ERK의 인산화 수준의 웨스턴 면역블롯을 도시한다. GAPDH를 단백질 로딩 대조군으로서 포함하였다. 도 10A는 DMSO, 다코미티닙, 화합물 B, 또는 다코미티닙 + 화합물 B(화합물 B)을 조합하여 처리된 RPC9 클론 6 세포를 도시한다. 도 10B는 DMSO, 에를로티닙, 화합물 B, 또는 에를로티닙 + 화합물 B(화합물 B)을 조합하여 처리된 RPC9 클론 6 세포를 도시한다.

도 11은 DMSO, 다코미티닙, 화합물 B, 또는 다코미티닙(Daco) + 화합물 B(화합물 B)을 조합하여 처리된 RPC9 클론 6 세포의 웨스턴 면역블롯 밴드(도 10A)에서 밀도계측 결과를 도시한다. pEGFR Y1068(도 11A), pAKT S473(도 11B), 및 pERK T202/Y204(도 11C)의 억제를 DMSO 대조군과 비교하여 측정하였다.

도 12는 DMSO, 에를로티닙, 화합물 B, 또는 에를로티닙(Erlo) + 화합물 B(화합물 B)을 조합하여 처리된 RPC9 클론 6 세포의 웨스턴 면역블롯의 밴드(도 10B)에서 밀도계측 결과를 도시한다. pEGFR Y1068(도 12A), pAKT S473(도 12B), 및 pERK T202/Y204(도 12C)의 억제를 DMSO 대조군과 비교하여 측정하였다.

도 13은 무작위화되고 비히클, 다코미티닙, 화합물 A, 또는 다코미티닙(Daco) + 화합물 A(화합물 A)로 매일 경구 처리된, RPC9 클론 6 종양을 가진 SCID 마우스의 이종이식 모델의 결과를 나타낸 그래프이다. 도 13A는 종양 부피를 주당 3회 측정하고 이의 평균 및 평균의 표준 오차를 나타낸 그래프이다. 도 13B는 각각의 군의 체중을 매일 기록하고 이의 변화(%)를 평균 및 평균의 표준 오차로 나타낸 그래프이다.

도 14는 무작위화되고 비히클, 다코미티닙, 화합물 B, 또는 다코미티닙(Daco) + 화합물 B(화합물 B)로 매일 경구 처리된, RPC9 클론 6 종양을 가진 SCID 마우스의 이종이식 모델의 결과를 나타낸 그래프이다. 도 14A는 종양 부피를 주당 3회 측정하고 이의 평균 및 평균의 표준 오차를 나타낸 그래프이다. 도 14B는 각각의 군의 체중을 매일 기록하고 이의 변화(%)를 평균 및 평균의 표준 오차로 나타낸 그래프이다.

도 15는 무작위화되고 비히클, 다코미티닙, 화합물 B, 또는 다코미티닙(Daco) + 화합물 B(화합물 B)로 매일 경구 처리된, RPC9 클론 6 종양을 가진 SCID 마우스의 이종이식 모델의 결과를 나타낸 그래프이다. 도 15A는 단일 제제 처리 군의 종양 부피를 나타낸 그래프이다. 도 15B는 조합 처리 군의 종양 부피를 나타낸 그래프이다.

도 16은 무작위화되고 비히클, 에를로티닙, 화합물 A, 또는 에를로티닙(Erlo) + 화합물 A(화합물 A)로 매일 경구 처리된, RPC9 클론 6 종양을 가진 SCID 마우스의 이종이식 모델의 결과를 나타낸 그래프이다. 도 16A는 종양 부피를 주당 3회 측정하고 이의 평균 및 평균의 표준 오차를 나타낸 그래프이다. 도 16B는 각각의 군의 체중을 매일 기록하고 이의 변화(%)를 평균 및 평균의 표준 오차로 나타낸 그래프이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0084] 수용체의 인간 표피 성장 인자 수용체/표피 성장 인자 수용체(HER/EGFR) 계열의 일원은 EGFR/HER-1, HER2/neu/erbB-2, HER3/erbB-3 및 HER4/erbB-4를 포함한다.

[0085] EGFR 억제제는 EGFR의 통상의 활성화 돌연변이(L858R 및 delE746-A750)를 효과적으로 억제한다. 통상의 활성화 돌연변이는 또한 단일 돌연변이체 또는 단일 돌연변이체 형태로서 지칭된다. EGFR 억제제의 예는 게피티닙, 에를로티닙, 이코티닙, 반데타닙, 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙 및 카네르티닙을 포함한다. EGFR의 단클론 항체 억제제, 예컨대 세툭시맙 및 파니투무맙은 또한 본원에 정의된 바와 같이 EGFR 억제제이다.

[0086] EGFR의 억제제는 가역성 또는 비가역성 억제제일 수 있다. EFGR 분자의 티로신 키나아제 도메인의 가역성 억제제는 수용체에 부착되고 주기적으로 수용체로부터 탈착된다. 게피티닙, 에를로티닙, 이코티닙, 반데타닙 및 라파티닙은 가역성 EGFR 억제제의 예이다. EFGR 분자의 티로신 키나아제 도메인의 비가역성 억제제는 EGFR에 비가역적으로 조합한다. 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙 및 카네르티닙은 비가역성 EGFR 억제제의 예이다.

[0087] EGFR 억제제는 HER 계열의 하나 이상의 일원의 억제제이다. 게피티닙, 에를로티닙, 이코티닙 및 반데타닙은 선택적인 EGFR/HER-1 티로신 키나아제 억제제(TKI)이다. 세툭시맙 및 파니투무맙은 EGFR/HER-1에 특이적인 단클론 항체이다.

[0088] pan-HER 억제제는 HER 계열의 다중 일원을 차단하는 제제이다. 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙, 페리티닙, 다코미티닙 및 카네르티닙은 pan-HER 억제제의 예이다. 라파티닙, 네라티닙, 아파티닙 및 페리티닙은 HER 계열의 EGFR 및 GER2 일원을 억제한다. 다코미티닙 및 카네르티닙은 HER 계열의 EGFR, HER2 및 HER4를 억제한다.

[0089] EGFR T790M 억제제는 통상의 활성화 돌연변이(L858R 및 delE746-A750) 및 게이트키퍼 돌연변이(T790M)를 효과적으로 억제한다. 본 발명의 EGFR T790M 억제제는 단일 돌연변이체(L858R 및 delE746-A750)에 비해 EGFR의 이중 돌연변이체 형태(L858R/T790M 및 delE746-A750/T790M)를 우선적으로 억제한다. EGFR T790M 억제제의 예는 Go6976, PKC412, AP26113, HM61713, WZ4002, CO-1686 및 TAS-2913을 포함한다.

[0090] EGFR T790M의 억제제는 가역성 또는 비가역성 억제제일 수 있다. Go6976, PKC412 및 AP26113은 가역성 EGFR T790M 억제제의 예이다. HM61713, WZ4002, CO-1686 및 TAS-2913은 비가역성 EGFR T790M 억제제의 예이다.

[0091] 또한, 본 발명의 EGFR T790M 억제제는 1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온(화합물 A), N-메틸-N-[트랜스-3-({2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-5-(피리딘-2-일)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)사이클로부틸]프로프-2-엔아미드(화합물 B), N-[트랜스-3-({5-클로로-2-[(1,3-다이메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}아미노)사이클로부틸]-N-메틸프로프-2-엔아미드(화합물 C), 및 1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(3-메톡시-1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온(화합물 D), 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다. 화합물 A, 화합물 B, 화합물 C 및 화합물 D는 비가역성 EGFR T790M 억제제의 예이다.

[0092] 하기 약어가 본원에 사용될 수 있다: Ac(아세틸); APCI(원자 압력 화학 이온화); Boc(t-부톡시카본일); $Boc_2O$(다이-t-부틸 다이카보네이트); 브렛포스 팔라다사이클(BrettPhos Palladacycle)(클로로[2-(다이사이클로헥실포스피노)-3,6-다이메톡시-2',4',6'-트라이이소프로필-1,1'-바이페닐][2-(2-아미노에틸)페닐]팔라듐(II)); DCC(1,3-다이사이클로헥실카보다이이미드); DCM(다이클로로메탄); 데옥소-프루오르(Deoxo-Fluor: 등록상표)(비스(2-메톡시에틸)아미노설퓨르 트라이플루오리드); DIAD(다이이소프로필 아조다이카복실레이트); DIEA(다이이소프로필에틸아민); DIPEA(N,N-다이이소프로필에틸아민); DMAP(4-다이메틸아미노피리딘); DMEM(듀벨코 개질된 이글 배지); DMF(다이메틸포름아미드); DMSO(다이메틸설폭시드); DPPA(다이페닐 포스포라지데이트); EGTA([에틸렌비스(옥시에틸렌니트릴로)]테트라아세트산); eq(당량); Et(에틸); EtOH(에탄올); EtOAc(에틸 아세테이트); $Et_2O$(다이에틸 에터); FBS(소 태아 혈청); HATU(2-(7-아자-1H-벤조트라이아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트); HEPES(4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산); HMDS(비스(트라이메틸실릴)아민, 이는 헥사메틸다이실라잔 또는 헥사메틸다이실록산으로도 공지됨); HOAc(아세트산); HPLC(고성능 액체 크로마토그래피); iPr(이소프로필); iPrMgCl(이소프로필마그네슘 클로라이드); iPrOH(이소프로필 알코올); KHMDS(칼륨 비스(트라이메틸실릴)아미드); LAH(리튬 알루미늄 하이드리드); LCMS(액체 크로마토그래피-질량 분광법); LiHMDS(리튬 비스(트라이메틸실릴)아미드); Me(메틸); MeOH(메탄올); MeCN(아세토니트릴); MTBE(메틸 t-부틸 에터); N(정상); N/A(이용할 수 없음); NaHMDS(나트륨 비스(트라이메틸실릴)아미드); N/D(측정되지 않음); NIS(N-요오도숙신이미드); NMM(N-메틸모폴린); NMR(핵 자기 공명); $Pd_2(dba)_3$(트리스(다이벤질리덴아세톤)다이팔라듐(0)); PG(보호기); Ph(페닐); $PhI(OAc)_2$(요오도벤젠 다이아세테이트); PMSF(페닐메틸설폰일 플루오라이드); psi(제곱 인치당 파운드); Rf(체류 인자); RPMI(로스웰 파크 메모리얼 연구소: Roswell Park Memorial Institute); rt(실온); sat.(포화된); SCX(강양이온 교환); SEM(2-(트라이메틸실릴)에톡시메틸); SEM-Cl(2-(트라이메틸실릴)에톡시메틸 클로라이드); SFC(초임계 유체 크로마토그래피); TBAF(테트라부틸암모늄 플루오라이드); TBDPS(t-부틸다이페닐실릴); TBS(t-부틸다이메틸실릴); t-BuXPhos 팔라다사이클(클로로[2-(다이-t-부틸포스피노)-2',4',6'-트라이이소프로필-1,1'-바이페닐][2-(2-아미노에틸)페닐)]팔라듐(II); TFA(트라이플루오로아세테이트); THF(테트라하이드로푸란); TLC(박층 크로마토그래피); 톨루엔(메틸벤젠); 토실(p-톨루엔설폰일); 및 Xantphos(4,5-비스(다이페닐포스피노)-9,9-다이메틸잔텐).

[0093] 일부 실시양태는 본원에 기재된 화합물의 약학적으로 허용되는 염에 관한 것이다. 본원에 기재된 화합물의 약학적으로 허용되는 염은 이의 산 부가 염 및 염기 부가 염을 포함한다.

[0094] 또한, 일부 실시양태는 본원에 기재된 화합물의 약학적으로 허용되는 산 부가 염에 관한 것이다. 적합한 산 부가 염은 무독성 염을 형성하는 산으로부터 형성된다. 적합한 산 부가 염, 즉 약학적으로 허용되는 음이온을 함유하는 염의 비제한적인 예는 아세테이트, 산 시트레이트, 아디페이트, 아스파테이트, 벤조에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 바이타르트레이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 사이클라메이트, 에디실레이트, 에실레이트, 에탄설포네이트, 하이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오다이드/요오다이드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말레에이트, 말론에이트, 메실레이트, 메탄설포네이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-나프실레이트, 니코티네이트, 니트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 팜오에티오, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 피로글루타메이트, 사카레이트, 스테아레이트, 숙시네이트, 탄네이트, 타르트레이트, p-톨루엔설포네이트, 토실레이트, 트라이플루오로아세테이트 및 지노포에이트 염을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0095] 추가 실시양태는 본원에 기재된 화합물의 염기 부가 염에 관한 것이다. 적합한 염기 부가 염은 무독성 염을 형

성하는 염기로부터 형성된다. 적합한 염기 염의 비제한적인 예는 알루미늄, 아르기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 다이에틸아민, 다이올아민, 글리신, 리신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민 및 아연 염을 포함한다.

[0096] 천연에서 염기성인 본원에 기재된 화합물은 다양한 무기 산 및 유기 산을 사용하여 매우 다양한 염을 형성할 수 있다. 본원에 기재된 상기 염기성 화합물의 약학적으로 허용되는 산 부가 염을 제조하기 위해 사용될 수 있는 산은 무독성 산 부가 염, 예를 들면 약학적으로 허용되는 음이온을 함유하는 염, 예컨대 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로요오다이드, 니트레이트, 설페이트, 바이설페이트, 포스페이트, 산 포스페이트, 이소니코티네이트, 아세테이트, 락테이트, 살리실레이트, 시트레이트, 산 시트레이트, 타르트레이트, 판토테네이트, 바이타르트레이트, 아스코르베이트, 숙시네이트, 말레에이트, 겐티시네이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 사카레이트, 포름에이트, 벤조에이트, 글루타메이트, 메탄설포네이트, 에탄설포네이트, 벤젠설포네이트, p-톨루엔설포네이트 및 팜오에이트[즉, 1,1'-메틸렌-비스-(2-하이드록시-3-나프토에이트)] 염을 형성하는 것이다. 염기성 잔기, 예컨대 아미노 기를 포함하는 본원에 기재된 화합물은 상기한 산 이외에 다양한 아미노산을 사용하여 약학적으로 허용되는 염을 형성할 수 있다.

[0097] 천연에서 산성인 본원에 기재된 화합물의 약학적으로 허용되는 염기 염을 제조하기 위한 약제로서 사용될 수 있는 화학 염기는 상기 화합물을 사용하여 무독성 염기 염을 형성하는 것이다. 상기 무독성 염기 염은, 상기 약학적으로 허용되는 양이온, 예컨대 알칼리 금속 양이온(예를 들면, 칼륨 및 나트륨) 및 알칼리 토금속 양이온(예를 들면, 칼슘 및 마그네슘), 암모늄으로부터 유도된 것 또는 수용성 아민 부가 염, 예커대 N-메틸글루카민-(메글루민), 및 저급 알칸올암모늄 및 약학적으로 허용되는 유기 아민의 다른 염기 염을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0098] 본원에 기재된 실시양태의 화합물은 모두 입체이성질체(예를 들면, 시스 및 트랜스 이성질체) 및 본원에 기재된 화합물의 모든 광학 이성질체(예를 들면, R 및 S 거울상이성질체), 뿐만 아니라 라세미체, 부분입체이성질체 및 상기 이성질체의 다른 혼합물을 포함한다. 모든 입체이성질체는 본 발명의 청구범위의 범주 내에 포괄되고, 당업자는 특정한 입체이성질체가 바람직할 수 있음을 인지할 것이다.

[0099] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 화합물은 엔올 및 이민 형태, 및 케토 및 엔아민 형태 및 기하이성질체 및 이의 혼합물을 비롯한 여러 호변이성질체 형태로 존재할 수 있다. 모든 상기 호변이성질체 형태는 본 실시양태의 범주 내에 포함된다. 호변이성질체는 호변이성질체 세트의 혼합물로서 용액 중에 존재한다. 고체 형태에서, 일반적으로 1개의 호변이성질체가 우선시된다. 비록 1개의 호변이성질체가 기재될 수 있을지라도, 본 실시양태는 본 화합물의 모든 호변이성질체를 포함한다.

[0100] 또한, 본 실시양태는 본원에 기재된 아트로프이성질체를 포함한다. 아트로프이성질체는 회전적으로 제한된 이성질체로 분리될 수 있는 화합물을 지칭한다.

[0101] 산 및 염기의 헤미염은 또한 예를 들면 헤미설페이트 및 헤미칼슘 염을 형성할 수 있다.

[0102] 적합한 염기에 대한 검토를 위해, 문헌[Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use by Stahl and Wermuth(Wiley-VCH, 2002)]을 참조한다. 본원에 기재된 화합물의 약학적으로 허용되는 염을 제조하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0103] 용어 "용매화물"은 본원에 기재된 화합물 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 용매 분자, 예를 들면 에탄올을 포함하는 분자 착체를 설명하기 위해 본원에서 사용된다.

[0104] 또한, 본원에 기재된 화합물은 비용매화된 형태 및 용매화된 형태로 존재할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태는 본원에 기재된 화합물의 수화물 및 용매화물에 관한 것이다.

[0105] 하나 이상의 비대칭 탄소 원자를 함유하는 본원에 기재된 화합물은 2개 이상의 입체이성질체로서 존재할 수 있다. 본원에 기재된 화합물이 알켄일 또는 알켄일렌 기를 함유하는 경우, 기하 시스/트랜스(또는 Z/E) 이성질체가 가능하다. 위치이성질체가 낮은 에너지 장벽을 통해 호환성이 있는 경우, 호변이성질체 이성질(호변이성질)이 발생할 수 있다. 이는 예를 들면, 이미노, 케토 또는 옥심 기를 함유하는 본원에 기재된 화합물의 양성자 호변이성질의 형태, 또는 소위 방향족 잔기를 함유하는 화합물 중 원자가 호변이성질을 취할 수 있다. 단일 화합물은 하나의 유형의 이성질체보다 많이 존재할 수 있다.

[0106] 하나의 유형의 이성질체보다 많이 존재하는 화합물, 이의 하나 이상의 혼합물을 비롯한 본원에 기재된 화합물의 모든 입체이성질체, 기하이성질체 및 호변이성질체 형태가 본 실시양태의 범주 내에 포함된다. 또한, 반대 이

온이 광학적으로 활성인 산 부가 염 또는 염기 염, 예를 들면 d-락테이트 또는 l-리신, 또는 라세미체, 예를 들면 dl-타르트레이트 또는 dl-아르기닌이 포함된다.

[0107] 시스/트랜스 이성질체는 당업자에게 널리 공지된 통상적인 기법, 예를 들면 크로마토그래피 및 분별 결정화에 의해 분리될 수 있다.

[0108] 개별적인 거울상이성질체의 제조/단리를 위한 통상적인 기법은 예를 들변 키랄 고압 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용하여 적합한 광학적으로 순수한 전구체로부터의 키랄 합성 또는 라세미체(또는 염 또는 전구체의 라세미체)의 분해를 포함한다.

[0109] 다르게는, 라세미체(또는 라세믹 전구체)는 적합한 광학적으로 활성인 화합물, 예를 들면, 알코올, 또는 본원에 기재된 화합물이 산성 또는 염기성 잔기를 함유하는 경우, 염기 또는 산, 예컨대 1-페닐에틸 아민 또는 타르타르산과 반응할 수 있다. 생성된 부분입체이성질체 혼합물은 크로마토그래피 및/또는 분별 결정화에 의해 분리될 수 있고, 부분입체이성질체 중 1 또는 2개는 당업자에게 널리 공지된 수단에 의해 상응하는 순수한 거울상이성질체로 전환된다.

[0110] 본원에 사용된 용어 "치료하는"은, 달리 나타내지 않는 한, 상기 용어를 적용하는 장애 또는 질환, 또는 상기 장애 또는 질환의 하나 이상의 증상을 역전시키거나 완화하거나 진행 억제하거나 예방하는 것을 의미한다. 본원에 사용된 용어 "치료"는, 달리 나타내지 않는 한, 바로 위에 정의된 "치료하는"과 같이 치료하는 작용을 지칭한다.

[0111] 본 발명에 따라 치료될 환자는 임의의 온혈 동물, 예컨대 인간, 원숭이 또는 다른 하위 영장류, 말, 개, 토끼, 기니아 피그 또는 마우스를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 예를 들면, 환자는 인간이다. 의학 분야의 숙련자는 비소세포 폐암으로 고통을 받고 있고 치료를 필요로 하는 개별적인 환자를 용이하게 확인할 수 있다.

[0112] 용어 "첨가제"는, 2개의 화합물 또는 표적된 제제와 조합한 결과가 개별적으로 각각의 제제를 합한 것임을 의미한다. 용어 "상승효과" 또는 "상승적인"은, 2개의 제제와 조합한 결과가 각각의 제제를 함께 합한 것보다 큼을 의미하기 위해 사용된다. "상승적인 양"은 상승적인 효과를 야기하는 2개의 제제와 조합한 양이다.

[0113] 1 또는 2개의 성분 사이의 상승적인 상호작용을 결정하여, 최적 효과 범위 및 각각의 성분 효과의 절대 투여량 범위를, 치료를 필요로 하는 환자에게 상이한 w/w 비 범위 및 투여량 이상의 성분을 투여함으로써 명확하게 측정할 수 있다. 인간의 경우, 환자에 대한 임상 연구를 수행하는 복잡성 및 비용은 상승효과에 대한 기본적인 모델로서 시험하는 이러한 양식의 사용을 비현실적으로 제시한다. 그러나, 시험관내 모델 또는 생체내 모델에서 상승효과의 관찰은 인간 및 다른 종에서의 효과를 예측할 수 있고, 본원에 기재된 바와 같은 시험관내 모델 또는 생체내 모델은 상승적인 효과를 측정하도록 존재하고, 또한 상기 연구의 결과를 사용하여 효과적인 투여량 및 혈장 농도 비 범위, 및 약동학/약역학 방법의 적용에 의해 인간 및 다른 종에서 요구되는 절대 투여량 및 혈장 농도를 예측할 수 있다.

[0114] 실시양태에서, 본 발명의 방법은 EGFR T790M 억제제의 효과량을 panHER 억제제의 효과량과 조합하여 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하는 비소세포 폐암의 치료 방법에 관한 것이고, 이때 panHER 억제제는 상승적인 효과를 달성하기에 충분한 양으로 비표준 임상 투여 양생법에 따라 투여된다. 이 실시양태에서, 본 발명의 방법은 표적화된 치료제, 구체적으로 EGFR T790M 억제제 및 panHER 억제제의 상승적인 조합에 관한 것이다.

[0115] 일 실시양태에서, 본 발명의 방법은 EGFR T790M 억제제의 효과량을 적은 투여량의 panHER 억제제와 조합하여 상승적인 효과를 달성하기에 충분한 양으로 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하는 비소세포 폐암의 치료 방법에 관한 것이다. 이 실시양태에서, 본 발명의 방법은 표적화된 치료제, 구체적으로 EGFR T790M 억제제 및 panHER 억제제의 상승적인 조합에 관한 것이다.

[0116] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 방법은 비가역성 EGFR T790M 억제제의 효과량을 EGFR 억제제의 효과량과 조합하여 상승적인 효과를 달성하기에 충분한 양으로 이를 필요로 하는 환자에게 투여함을 포함하는 비소세포 폐암의 치료 방법에 관한 것이다. 이 실시양태에서, 본 발명의 방법은 표적화된 치료제, 구체적으로 비가역성 EGFR T790M 억제제 및 EGFR 억제제의 상승적인 조합에 관한 것이다.

[0117] 본원에 사용된 "효과"량은 본 발명의 조합시 종양 세포의 성장 또는 암 전이의 진행을 예방하거나 억제하기에 충분한 물질, 제제, 화합물 또는 조성물의 양을 지칭한다. 또한, 투여량 및 투여 양생법의 치료적 또는 약학적 효과는 특정한 종양을 경험하는 환자에게서 완화를 유도하거나 강화하거나 유지하거나 연장하는 능력으로서 특징될 수 있다.

[0118] 본원에 사용된 "비표준 임상 투여 양생법"은, EGFR의 단일 돌연변이체 형태(L858R 및 delE746-A750)를 효과적으로 억제하지만, 임상적인 설정에 통상적으로 사용되는 양 또는 투여량과 상이한, 물질, 제제, 화합물 또는 조성물을 투여하는 양생법을 지칭한다. "비표준 임상 투여 양생법"은 "비표준 임상 투여량" 또는 "비표준 투여 일정"을 포함한다.

[0119] 본원에 사용된 "적은 투여량"은, EGFR의 단일 돌연변이체 형태(L858R 및 delE746-A750)를 효과적으로 억제하지만, 임상적인 설정에 통상적으로 사용되는 양 또는 투여량보다 적은 양 또는 투여량의 물질, 제제, 화합물 또는 조성물의 양 또는 투여량을 지칭한다.

[0120] 당업자는 공지된 방법에 따라, 연령, 체중, 일반적인 건강, 투여된 화합물, 투여 경로, 치료를 필요로 하는 비소세포 폐암의 특성 및 발달, 다른 약제의 존재와 같은 인자를 고려하여, 본 발명의 조합에 사용된 바와 같이 환자에게 투여하기 위한 각각의 화합물의 적절한 양 또는 투여를 결정할 수 있을 것이다.

[0121] 본 발명의 방법의 실시는 다양한 투여 양생법을 통해 수행될 수 있다. 본 발명의 조합 화합물은 간헐적으로, 동시적으로 또는 연속적으로 투여될 수 있다. 투여 양생법의 반복은 필요에 따라 암 세포의 목적 감소 또는 축소를 달성하기 위해 수행될 수 있다. 일 실시양태에서, 본 발명의 조합 화합물은 간헐적인 투여 양생법으로 투여될 수 있다.

[0122] 본 발명의 조합 화합물의 투여는 화합물을 작용 부위에 전달할 수 있는 임의의 방법에 의해 영향받을 수 있다. 이러한 방법은 경구 경로, 십이지장내 경로, 비경구 주사(정맥내, 피하, 근육내, 혈관내 또는 투입 포함), 국소 및 직장 투여를 포함한다.

[0123] 본 발명의 방법 또는 조합 화합물은 투여 전에 제형화될 수 있다. 제형은 바람직하게는 특정한 투여 방식으로 채택될 것이다. 이러한 화합물은 당해 분야에 공지된 약학적으로 허용되는 담체로 제형화될 수 있고 당해 분야에 공지된 광범위한 투여 형태로 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물을 제조하는데 있어서, 활성 성분은 통상적으로 약학적으로 허용되는 담체와 혼합되거나, 담체로 희석되거나, 담체 내에 동봉될 것이다. 이러한 담체는 고체 희석제 또는 충전제, 부형제, 멸균수 배지 및 다양한 무독성 유기 용매를 포함하지만 이로 제한되지 않는다. 투여 단위 형태 또는 약학 조성물은 정제, 캡슐, 예컨대 젤라틴 캡슐, 알약, 분말, 과립, 수성 및 비수성 경구 용액 및 현탁액, 로젠지, 트로키, 하드 캔디, 스프레이, 크림, 고약(salve), 좌제, 젤리, 젤, 페이스트, 로션, 연고, 주사용수, 엘릭시르, 시럽 및 개별적인 투여량으로 세분하기 위해 채택된 용기에 포장된 비경구 용액을 포함한다.

[0124] 비경구 제형은 약학적으로 허용되는 수성 또는 비수성 용액, 분산제, 현탁제, 유화제, 및 이의 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜), 식물성유, 및 주사용 유기 에스터, 예컨대 에틸 올레에이트를 포함한다. 유동성을 코팅제, 예컨대 레시틴, 계면활성제의 사용에 의해 유지하거나, 적합한 입자 크기를 유지할 수 있다. 예시적인 비경구 투여 형태는 멸균 수용액, 예를 들면 수성 프로필렌 글리콜 또는 텍스트로스 용액 중 본 발명의 화합물의 용액 또는 현탁액을 포함한다. 이러한 투여 형태는 필요에 따라 적절하게 완충될 수 있다.

[0125] 추가적으로, 윤활제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 라우릴 설페이트 및 활석은 종종 정제화 목적에 유용하다. 또한 유사한 유형의 고체 조성물은 충전된 연질 및 경질 젤라틴 캡슐에 이용될 수 있다. 따라서, 바람직한 물질은 락토스 또는 유당 및 고분자량 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 수성 현탁액 또는 엘릭시르가 경구 투여에 바람직한 경우, 이의 활성 화합물은 다양한 감미료 또는 착향료, 착색 물질 또는 염료, 및 필요에 따라 유화제 또는 현탁제와 함께 희석제, 예컨대 물, 에탄올, 프로필렌 글리콜, 글리세린, 또는 이들의 조합물과 혼합될 수 있다.

[0126] 특정한 양의 활성 화합물을 사용하여 다양한 약학 조성물을 제조하는 방법은 당업자에게 공지되어 있거나, 당업자에게 이해될 것이다. 예를 들면, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easter, Pa., 15th Edition (1975)]을 참조한다.

[0127] 또한, 본 발명은 본 발명의 조합 치료제 및 상기 치료제의 투여에 대하여 서면으로 된 설명서를 포함하는 키트에 관한 것이다. 일 실시양태에서, 서면으로 된 설명서는 치료제의 투여 방식, 예를 들면, 본 발명의 치료제의 동시적 또는 연속적 투여에 대하여 상세하게 한정한다.

[0128] 하기 제공된 실시예 및 제조예는 본원에 기재된 화합물 및 상기 화합물의 제조 방법을 추가로 서술하고 예시한다. 본원에 기재된 실시양태의 범주는 어떠한 방식으로도 하기 실시예 및 제조예를 제한하지 않는다. 하기

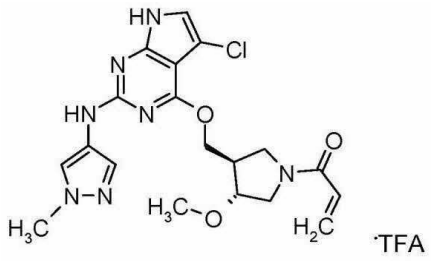
실시예에서, 단일 키랄 중심을 갖는 분자는, 달리 나타내지 않는 한 라세믹 혼합물로서 존재한다. 2개 이상의 키랄 중심을 갖는 이러한 분자는, 달리 나타내지 않는 한 부분입체이성질체의 라세믹 혼합물로서 존재한다. 단일 거울상이성질체/부분입체이성질체는 당업자에게 공지된 방법으로 수득될 수 있다.

[0129] 제시된 실시예에서, 염 형태는 때때로 크로마토그래피 정제에 기초된 HPLC 동안 이동상 첨가제의 결과로서 단리된다. 이러한 경우에, 염, 예컨대 포름에이트, 트라이플루오로아세테이트 및 아세테이트는 추가 가공없이 단리되고 시험된다. 당업자는 표준 방법론(예컨대 이온 교환 컬럼을 사용하거나, 가벼운 수성 기제를 사용하여 단순 염기성 추출을 수행함)에 의해 자유 염기 형태를 달성할 수 있음이 인지될 것이다.

[0130] 일반적으로, 본원에 기재된 화합물은 화학 분야에 공지된 공정, 특히 본원에 함유된 설명에 비추어 제조될 수 있다. 본원에 기재된 화합물의 특정한 제조 공정은 실시양태의 추가 특징으로서 제공되고 하기 제공된 반응식 및 실험 부분에 예시된다.

[0131] **실시예**

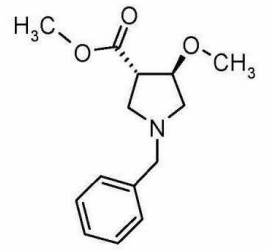
[0132] **실시예 1: 1-{(3R,4R)-3-[5-클로로-2-(1-메틸-1H-피라졸-4-일아미노)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일옥시메틸]-4-메톡시-피롤리딘-1-일}프로펜논 트라이플루오로아세테이트(또한 "1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온 트라이플루오로아세테이트" 및 "1-((3R,4R)-3-(((5-클로로-2-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)옥시)메틸)-4-메톡시피롤리딘-1-일)프로프-2-엔-1-온 트라이플루오로아세테이트"로 공지됨)(" 화합물 A"의 트라이플루오로아세테이트 염)의 제조**



·TFA

[0133]

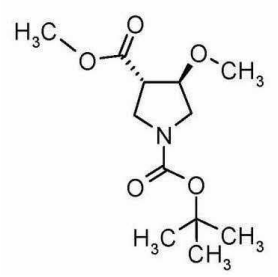
[0134] 단계 1: (3S,4R)-1-벤질-4-메톡시-피롤리딘-3-카복실산 메틸 에스터의 제조



[0135]

[0136] 0℃에서 2-Me-THF(600 mL) 및 TFA(6.7 mL) 중 (E)-3-메톡시-아크릴산 메틸 에스터(50 g, 430.6 mmol)의 용액에 N-(메톡시메틸)-N-(트라이메틸실릴메틸)-벤질아민(204 g, 2 eq)을 적가하였다. 첨가 후, 반응 생성물을 실온으로 가온하고 2 시간 동안 교반하였다. 반응 생성물을 분별 깔때기로 옮기고, 포화 $NaHCO_3$, 포화 NaCl로 세척한 후, $Na_2SO_4$로 건조하고 용매를 제거하여 황색 오일로서 조질 라세믹 생성물을 수득하고, 이를 $SiO_2$(10% 내지 35% EtOAc/헵탄)로 정제하여 황색 오일로서 라세믹 트랜스 생성물(82.7 g)을 수득하였다. 키랄-SFC(키랄팩(Chiralpak) AD-H 4.6 x 250 mm 컬럼 4% MeOH w/0.1% 다이에틸아민, 140 바, 3.0 mL/분)로 거울상이성질체를 분리하여 목적 단일 이성질체 생성물(34 g, 31.7% 수율)을 수득하고, 이를 공지된 표준물과 비교하여 확인하였다. 비회전(specific rotation) $[\alpha]_D^{27}$ = +23.8° (C=1.3, MeOH). $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 2.55-2.63(m, 2 H) 2.69(dd, J=9.95, 6.42 Hz, 1 H) 2.82-2.88(m, 1 H) 2.90-2.96(m, 1 H) 3.23(s, 3 H) 3.51-3.63(m, 2 H) 3.66(s, 3 H) 4.07-4.12(m, 1 H) 7.22-7.39(m, 5 H). ($C_{14}H_{19}NO_3$)에 대한 m/z (APCI+): 250.0$(M+H)^+$.

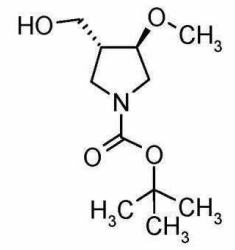
[0137] 단계 2: (3S,4R)-4-메톡시-피롤리딘-1,3-다이카복실산 1-t-부틸 에스터 3-메틸 에스터의 제조



[0138]

[0139] 에탄올(500 mL) 중 (3S,4R)-1-벤질-4-메톡시-피롤리딘-3-카복실산 메틸 에스터(35 g, 140.4 mmol)의 용액을 질소로 퍼징한 후 $Pd(OH)_2$(2 g, 0.1 eq)를 첨가하고, 혼합물을 약 15 psi에서 (질소 풍선을 통해) 질소 가스의 대기하에 밤새 교반하였다. 이어서, 반응 생성물을 셀라이트를 통해 여과하고, 다이-t-부틸다이카보네이트(30.9 g, 1 eq)를 생성된 여액에 교반하면서 천천히 첨가하였다. 1 시간 후, 반응 생성물을 농축하고, 생성물이 완전히 용리될 때까지 조질 물질을 10% EtOAc/헵탄(2 용량), 이어서 1:1 EtOAc/헵탄으로 용리하는 짧은 실리카 컬럼을 통해 정제하였다. 생성물 분획을 합하고 농축하여 투명한 오일로서 표제 화합물(35.81 g, 98% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 1.39(s, 9 H) 3.17(br. s., 1 H) 3.23-3.28(m, 4 H) 3.35-3.53(m, 3 H) 3.65(s, 3 H) 4.06(d, J=4.78 Hz, 1 H). 생성물 - Boc($C_7H_{13}NO_3$)에 대한 m/z (APCI+): 160.1(M+H)$^+$. 비회전: [a]D = -12.5° (C=0.87, MeOH).

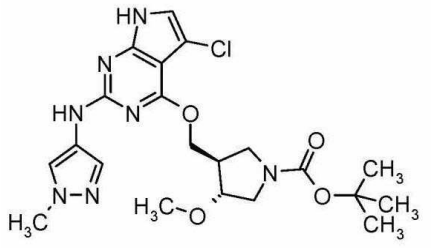
[0140] 단계 3: (3R,4R)-3-하이드록시메틸-4-메톡시-피롤리딘-1-카복실산 t-부틸 에스터의 제조



[0141]

[0142] 리튬 보로하이드리드(12.7 g, 4 eq)를 THF(600 mL) 중 (3S,4R)-4-메톡시-피롤리딘-1,3-다이카복실산 1-t-부틸 에스터 3-메틸 에스터(35.81 g, 138.1 mmol)의 용액에 나눠서 첨가한 후, 반응 생성물을 60℃로 4 시간 동안 가열하였다. 반응 생성물을 0℃에서 물로 급랭하고 EtOAc로 추출하였다. 유기 층을 포화 NaCl로 세척하고 $Na_2SO_4$로 건조하였다. 용매를 제거하고, 잔사를 $SiO_2$(3:1 EtOAc/헵탄)의 플러그를 통해 정제하여 투명 오일로서 표제 화합물(29.35 g, 92% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 1.46(s, 9 H) 2.37-2.47(m, 1 H) 3.19(dd, J=11.08, 5.29 Hz, 1 H) 3.33(d, J=4.03 Hz, 4 H) 3.50-3.66(m, 4H) 3.77-3.83(m, 1 H). 생성물 - Boc($C_6H_{13}NO_2$)에 대한 m/z (APCI+): 132.2(M+H)$^+$. 비회전: [a]D= +9.3° (C=0.86, MeOH).

[0143] 단계 4: (3R,4R)-3-[5-클로로-2-(1-메틸-1H-피라졸-4-일아미노)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일옥시메틸]-4-메톡시-피롤리딘-1-카복실산 t-부틸 에스터의 제조



[0144]

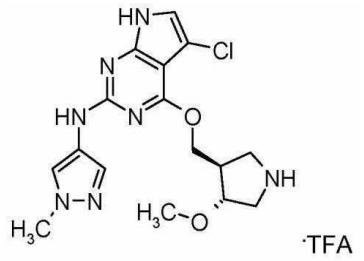
[0145] 방법 A: 마이크로파 가열을 사용함

[0146] 바이크로파 바이알 중에서 1,4-다이옥산(15 mL) 중 2,4,5-트라이클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘(904 mg, 4.1 mmol) 및 (3R,4R)-3-하이드록시메틸-4-메톡시-피롤리딘-1-카복실산 t-부틸 에스터(940 mg, 4.1 mmol)의 용액에 칼륨 t-부톡사이드(톨루엔 중 25% w/w, 1.6 mL, 3.5 mmol)를 첨가하였다. 생성된 용액을 상온에서 15 분 동안 교반하였다. LCMS는 (3R,4R)-3-(2,5-다이클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일옥시메틸)-4-메톡시-피롤리딘-1-카복실산 t-부틸 에스터의 양적 형성을 나타낸다. 이 생성된 반응 용액에 1-메틸-1H-피라졸-4-일아민(474 mg, 4.9 mmol) 및 t-BuXPhos 팔라다사이클(110 mg, 0.04 mol eq)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 교반하고 45 분 동안 정상 흡수 수준에서 마이크로파를 사용하여 100℃로 가열하였다. 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고, 여액을 증발시켜 담색 잔사를 수득하였다. 조질 물질을 헵탄 중 0% 내지 100% EtOAc의 구배로 용리하는 플래시 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(1.78 g, 76% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 11.50(br. s., 1 H) 9.06(s, 1 H) 7.85(s, 1 H) 7.52(s, 1 H) 7.05(d, J=2.27 Hz, 1 H) 4.30-4.53(m, 2 H) 3.86-3.96(m, 1 H) 3.80(s, 3 H) 3.55-3.68(m, 1 H) 3.43-3.53(m, 1 H) 3.24-3.31(m, 3 H) 2.71(br. s., 1 H) 1.39(br. s., 9 H). 생성물 - Boc에 대한 m/z (APCI+); Cl 동위원소 패턴을 갖는 $C_{16}H_{20}ClN_7O_2$: 378.1(M+H)$^+$.

[0147] 방법 B: 열역학적 가열을 사용함

[0148] 환저 플라스크 중에서 1,4-다이옥산(100 mL) 중 2,4,5-트라이클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘(9.28 g, 41.7 mmol) 및 (3R,4R)-3-하이드록시메틸-4-메톡시-피롤리딘-1-카복실산 t-부틸 에스터(9.65 g, 41.7 mmol)의 용액에 칼륨 t-부톡사이드(톨루엔 중 25% w/w, 80 mL, 167 mmol)를 첨가하였다. 생성된 반응 용액을 상온에서 30 분 동안 교반하였다. LCMS는 (3R,4R)-3-(2,5-다이클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일옥시메틸)-4-메톡시-피롤리딘-1-카복실산 t-부틸 에스터의 양적 형성을 나타낸다. 생성된 반응 용액에 1-메틸-1H-피라졸-4-일아민(4.86 g, 50.1 mmol) 및 t-BuXPhos 팔라다사이클(1.1 g, 1.67 mmol, 0.04 mol eq)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 교반하고, 오일 욕에서 90℃로 1 시간 동안 가열하였다. 이어서, 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고, 여액을 증발시켜 휘발성 물질을 제거하여 담샘 검을 수득한 후 이를 에틸 아세테이트(300 mL)에 용해하고 실리카 셀 플러그를 통해 여과하였다. 여액을 증발시키고, 잔사를 헵탄 중 0% 내지 100% EtOAc의 구배로 용리하는 플래시 크로마토그래피를 통해 정제하여 표제 화합물(12.4 g, 62% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 11.51(br. s., 1 H) 9.07(s, 1 H) 7.86(s, 1 H) 7.52(s, 1 H) 7.06(d, J=2.20 Hz, 1 H) 4.31-4.54(m, 2 H) 3.92(br. s., 1 H) 3.80(s, 3 H) 3.55-3.68(m, 1 H) 3.44-3.55(m, 1 H) 3.30(d, J=18.34 Hz, 3 H) 2.72(br. s., 1 H) 1.39(br. s., 9 H). Cl 동위원소 패턴을 갖는 $C_{21}H_{28}ClN_7O_4$에 대한 m/z (APCI+): 378.2(M+H)$^+$.

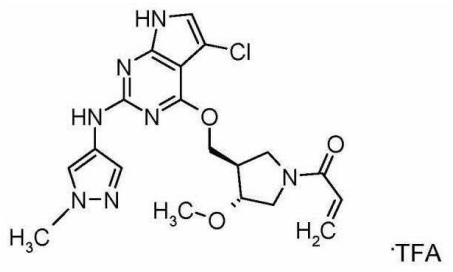
[0149] 단계 5: [5-클로로-4-((3R,4R)-4-메톡시-피롤리딘-3-일메톡시)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-2-일]-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-아민 트라이플루오로아세테이트의 제조

[0150] 


[0151] 0℃에서 DCM(60 mL) 중 (3R,4R)-3-[5-클로로-2-(1-메틸-1H-피라졸-4-일아미노)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일옥시메틸]-4-메톡시-피롤리딘-1-카복실산 t-부틸 에스터(12.40 g, 26 mmol)의 용액에 TFA(10.1 mL, 208 mmol)를 첨가하고, 생성된 용액을 상온에서 2.5 시간 동안 교반하였다. 휘발성 물질을 제거하고, 잔사에 에틸 에터(150 mL)를 첨가하였다. 생성된 현탁액을 2 시간 동안 교반한 후 여과하여 연분홍색 고체를 수득하였다. 이를 에틸 에터(30 mL)로 세척하고, 건조하여 TEA 염으로서 표제 화합물(15.69 g, 정량)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 11.56(br. s., 1 H) 9.09(s, 3 H) 7.85(s, 1 H) 7.54(s, 1 H) 7.09(d, J=2.32 Hz, 1 H) 4.48(d, J=6.48 Hz, 2 H) 4.11(br. s., 1 H) 3.81(s, 3 H) 3.46-3.60(m, 1 H) 3.35-3.45(m, 2 H) 3.32(s, 3 H) 3.15(dq, J=12.01, 6.02 Hz, 1 H) 2.88(m, J=6.42, 6.42 Hz, 1 H). Cl 동위원소 패턴을 갖는 모 분자

$C_{16}H_{20}ClN_7O_2$에 대한 m/z (APCI+): 378.2(M+H)$^+$.

[0152] 단계 6: 1-{(3R,4R)-3-[5-클로로-2-(1-메틸-1H-피라졸-4-일아미노)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일옥시메틸]-4-메톡시-피롤리딘-1-일}프로페논 트라이플루오로아세테이트의 제조

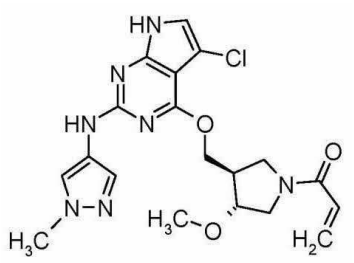


·TFA

[0153]

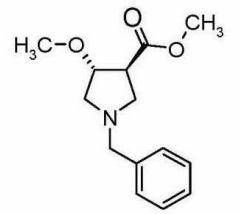
[0154] [5-클로로-4-((3R,4R)-4-메톡시-피롤리딘-3-일메톡시)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-2-일]-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-아민(15.0 g(2 TFA 염)), 24.7 mmol), 에틸 아세테이트(200 mL) 및 포화 수성 $NaHCO_3$(100 mL)의 혼합물을 0℃에서 10 분 동안 교반하였다. 아크릴로일 클로라이드(2.3 mL, 29 mmol, 1.1 mol eq)를 적가하고, 생성된 혼합물을 상온에서 30 분 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(150 mL)를 첨가하고, 유기 층을 분리하였다. 수성 층을 에틸 아세테이트(150 mL)로 추출하고, 합한 유기 층을 $Na_2SO_4$로 건조하고 증발시켜 고체를 수득하고, 이를 SFC(120 바에서 $CO_2$ 중 35% EtOH로 용리하는 ZymorSPHER HAP 5 μ 21.2 x 150 mm 컬럼, 유동 64 mL/분)로 정제하여 회백색 고체로서 표제 화합물(8.3 g, 78% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 11.51(s, 1 H) 9.07(s, 1 H) 7.86(s, 1 H) 7.52(s, 1 H) 7.05(s, 1 H) 6.59(ddd, J=16.75, 10.27, 1.34 Hz, 1 H) 6.14(dd, J=16.75, 2.32 Hz, 1 H) 5.68(dt, J=10.27, 2.32 Hz, 1 H) 4.44(d, J=6.24 Hz, 2 H) 3.82-4.09(m, 2 H) 3.80(s, 3 H) 3.57-3.76(m, 2 H) 3.47-3.54(m, 1 H) 3.31(d, J=4.65 Hz, 3 H) 2.67-2.92(m, 1 H). Cl 동위원소 패턴을 갖는 모 분자 $C_{19}H_{22}ClN_7O_3$에 대한 m/z (APCI+): 431.9(M+H)$^+$.

[0155] **대체 실시예 1: 1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온("1-((3R,4R)-3-(((5-클로로-2-((1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)옥시)메틸)-4-메톡시피롤리딘-1-일)프로프-2-엔-1-온"으로도 공지됨)(화합물 A)의 제조**



[0156]

[0157] 단계 1: 메틸(3,4-트랜스)-1-벤질-4-메톡시피롤리딘-3-카복실레이트의 제조

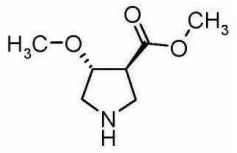


[0158]

[0159] 자기로 교반하면서 질소 대기하에, 메틸 트랜스-3-메톡시아크릴레이트(500 mL, 540 g, 4.65 mol) 및 벤질 메톡시메틸트라이메틸실릴아민(595 mL, 552.1 g, 2.3 mol)을 혼합하였다. 이 혼합물에 약 95℃로 30 초 동안 발열하여 생성된 TFA(2.7 mL, 4.14 g, 36.3 mmol)를 첨가하였다. 이어서, 생성된 혼합물을 1 시간 동안 환류 가열

하였다(주: 초기 환류 온도는 약 104℃이었고 1 시간 후 이를 약 90℃로 떨어뜨렸다). 벤질 메톡시메틸트라이메틸실릴아민 화합물(325 mL)을 사용하여 이러한 규모의 3개의 배치(batch) 및 또 다른 배치를 수행하였다. 이러한 배치 중 2개를 합하고 2 N HCl(5 L)에 부었다. 혼합물을 EtOAc(3 L 및 2 L)로 추출하였다. 얼음으로 냉각하면서, 50% NaOH(수성)를 첨가하여 수성 층의 pH가 9가 되게 하였다. 수성 층을 EtOAc(2.5 L, 1.5 L 및 1 L)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수(3 L)로 세척하고, $Na_2SO_4$로 건조하였다. 나머지 배치에 대하여 동일한 후처리를 수행하였다. 모든 유기 층을 여과하고, 여액을 진공에서 농축하여 표제 화합물(라세믹-트랜스, 1640 g)을 수득하였다. 벌브-대-벌브 증류(0.1 mbar, 100℃ 내지 145℃)로 배치를 정제한 후, 황색 오일로서 표제 화합물(69% 전체 수율)을 단리하였다.

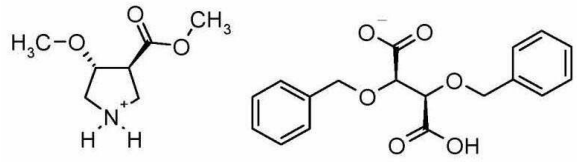
[0160] 단계 2: 메틸(3,4-트랜스)-4-메톡시피롤리딘-3-카복실레이트의 제조



[0161]

[0162] 메틸(3,4-트랜스)-1-벤질-4-메톡시피롤리딘-3-카복실레이트(463.3 g, 1858 mmol)를 iPrOH(2 L)에 용해하였다. 이 용액에 20% $Pd(OH)_2/C$(50 g, 37% 수분, 알드리치(Aldrich))를 첨가하고, 혼합물을 격렬하게 교반하였다. 11.8 바 $H_2$의 압력을 적용하고, $^1$H-NMR이 완전 전환을 나타낼 때까지 수회 재충전을 수행하였다. 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고, 셀라이트를 iPrOH로 헹궜다. 여액을 진공에서 농축하여 담황색 액체로서 표제 화합물(266 g, 90% 수율)을 수득하였다. 다음 단계에서 사용하였다.

[0163] 단계 3: (3R,4S)-3-메톡시-4-(메톡시카본일)피롤리디늄(2R,3R)-2,3-비스(벤질옥시)-3-카복시프로판오에이트의 제조



[0164]

[0165] 에탄올(5 L) 중 O,O-다이벤조일-L-타르타르산(1 kg, 2.79 mol)의 가온 용액에 에탄올(1 L) 중 메틸(3,4-트랜스)-4-메톡시피롤리딘-3-카복실레이트(480 g, 2.84 mol)의 용액을 첨가하였다. 투명 용액을 시딩하고, 밤새 결정화하였다. 생성된 고체를 단리하고 에탄올로 세척하였다. 이 농축된 물질을 에탄올로부터 5회 재결정화하여(5 L 2회, 4 L, 3.5 L 및 3 L) 98%의 과잉 거울상이성질체를 갖는 염(216 g, 15% 수율)을 수득하였다(하기 조건을 사용하여 Rt = 12.18 분).

[0166] 키랄 순도 측정:

[0167] 샘플 제조: 염(5 mg)을 DCM(1.5 mL) 및 2 N NaOH(0.2 mL)와 혼합하였다. DCM 층을 건조하고 기체 크로마토그래피로 분석하였다.

[0168] 컬럼: 아질런트 사이클로실(Agilent Cyclosil) B; 30 m x 250 cm x 0.25 cm

[0169] 온도: 90℃(0 분) 내지 5℃/분 내지 180℃(4 분). 총 실행 시간: 22 분.

[0170] 주입 온도: 250℃

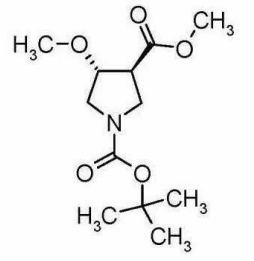
[0171] 검출기: 250℃; FID

[0172] 주입 용량: 1.0 ㎕

[0173] 분할 비: 25:1

[0174] 컬럼 유동: 2.2 mL/분(H2)

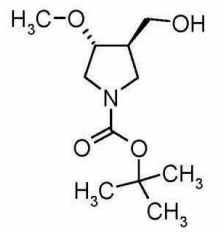
[0175] 단계 4: 1-t-부틸 3-메틸(3S,4R)-4-메톡시피롤리딘-1,3-다이카복실레이트의 제조



[0176]

[0177] DCM 중 (3R,4S)-3-메톡시-4-(메톡시카본일)피롤리디늄(2R,3R)-2,3-비스(벤질옥시)-3-카복시프로판오에이트(216 g, 420 mmol) 및 포화 $NaHCO_3$의 혼합물을 기계적으로 교반하고, $Boc_2O$(119 g, 546 mmol)를 나눠서 첨가하였다. 혼합물을 밤새 실온에서 교반하고, 층을 분리하였다. 수성 상을 DCM으로 추출하고, 합한 유기 층을 염수로 세척하고, 건조하고 농축하였다. 33% $Boc_2O$와 혼합된 조질 표제 생성물(138 g, 85% 수율)을 수득하였다. 다음 단계에서 직접 사용하였다.

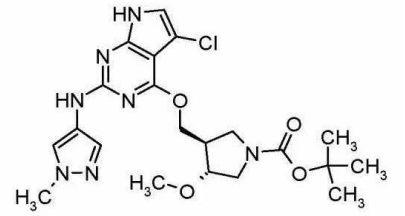
[0178] 단계 5: t-부틸(3R,4R)-3-(하이드록시메틸)-4-메톡시피롤리딘-1-카복실레이트의 제조



[0179]

[0180] 1-t-부틸 3-메틸(3S,4R)-4-메톡시피롤리딘-1,3-다이카복실레이트(138 g, $Boc_2O$ 함유, 약 2:1, 약 0.35 mol)를 THF(2 L)에 용해하였다. 용액을 기계적으로 교반하고, -78℃로 냉각하였다. 리튬 알루미늄 하이드리드(THF 중 2.4 M, 200 mL, 0.5 mol)의 용액을 30 분간에 걸쳐서 적가하면서, -70℃ 미만의 온도로 유지하였다. 이어서, 온도를 -30℃로 올렸다. 나트륨 칼륨 타르트레이트 테트라하이드레이트(수성, 100 mL)의 포화 용액을 천천히 첨가하여 반응 생성물을 급랭하였다. 고체 물질을 $Na_2SO_4$의 베드로 여과 제거하였다. 여액을 진공에서 농축하여 거의 무색 시럽으로서 표제 화합물(66 g, 0.28 mol, 약 80% 수율)을 수득하였다. $^1$H-NMR(300 MHz, $CDCl_3$): ppm 3.80(q, J= 5.1 Hz, 1H), 3.62(d, J=6.2 Hz, 2H), 3.56(m, 1H), 3.52(d, J=7.4 Hz, 1H), 3.40-3.30(m, 1H), 3.36(s, 3H), 2.42(m, 1H), 1.46(s, 9H). $C_{11}H_{21}NO_4$에 대한 m/z (GCMS): 231.2(M)$^+$. $C_{11}H_{21}NO_4$에 대한 m/z (APCI+): 132.0(M+H)$^+$. 비회전: [a]D = +11.6° (c 0.77, MeOH). 키랄 순도 측정 방법: 키랄팩 AD-H 21.2 x 250 mm 5 μ 컬럼을 35℃에서 2% MeOH:88% $CO_2$의 이동상으로 용출하고, 120 바로 보유하였다. 유속: 62 mL/분. 체류 시간: 3.36 분.

[0181] 단계 6: t-부틸(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-카복실레이트의 제조

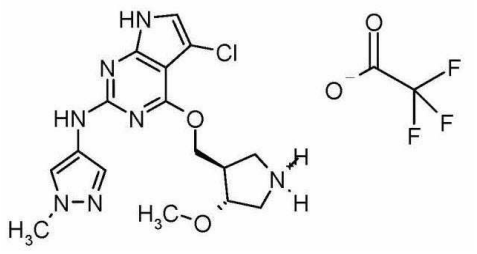


[0182]

[0183] 환저 플라스크 중에서 1,4-다이옥산(100 mL) 중 2,4,5-트라이클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘(9.28 g, 41.7 mmol) 및 t-부틸(3R,4R)-3-(하이드록시메틸)-4-메톡시피롤리딘-1-카복실레이트 9.65 g, 41.7 mmol)의 용액에 칼륨 t-부톡사이드(톨루엔 중 25% w/w, 80 mL, 167 mmol)를 첨가하였다. 생성된 반응 용액을 상온에서 30 분

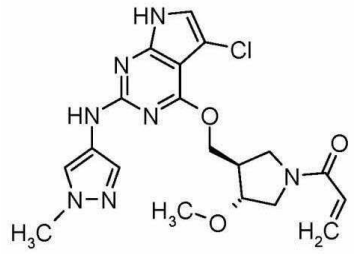
동안 교반하였다. LCMS는 중간체 t-부틸(3R,4R)-3-{[(2,5-다이클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)옥시]메틸}-4-메톡시피롤리딘-1-카복실레이트의 양적 형성을 나타낸다. 상기 반응 용액에 1-메틸-1H-피라졸-4-일아민(4.86 g, 50.1 mmol) 및 t-BuXPhos 팔라다사이클(1.1 g, 1.67 mmol, 0.04 mol eq)을 첨가하고, 반응 혼합물을 교반하고 오일 욕에서 1 시간 동안 90℃로 가열하였다. LCMS는 반응이 완료됨을 나타낸다. 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고, 셀라이트를 에틸 아세테이트(200 mL)로 세척하였다. 합한 여액을 증발시켜 휘발성 물질을 제거하여 담색 잔사를 수득하였다. 이 잔사를 에틸 아세테이트(300 mL)에 용해하고, 실리카 겔 플러그를 통해 여과하였다. 여액을 증발시키고, 잔사를 헵탄 중 0 내지 100% EtOAc의 구배로 용리하는 플래시 크로마토그래피를 통해 여과하여 표제 화합물(12.4 g, 62% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 11.51(br. s., 1 H) 9.07(s, 1 H) 7.86(s, 1 H) 7.52(s, 1 H) 7.06(d, J=2.20 Hz, 1 H) 4.31-4.54(m, 2 H) 3.92(br. s., 1 H) 3.80(s, 3 H) 3.55-3.68(m, 1 H) 3.44-3.55(m, 1 H) 3.30(d, J=18.34 Hz, 3 H) 2.72(br. s., 1 H) 1.39(br. s., 9 H). Cl 동위원소 패턴을 갖는 $C_{21}H_{28}ClN_7O_4$에 대한 m/z (APCI+): 378.2(M+H)$^+$. 광학 회전: [a]d= -8.3° (c=0.24, MeOH).

[0184] 단계 7: (3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리디늄 트라이플루오로아세테이트의 제조

[0185] 

[0186] 수욕에서 DCM (60 mL) 중 t-부틸(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-카복실레이트(12.40 g, 26 mmol)의 용액에 TFA(10.1 mL, 208 mmol)를 첨가하고, 생성된 용액을 상온에서 2.5 시간 동안 교반하였다. 휘발성 물질을 제거하여 잔사를 수득하고, 이에 에틸 에터(150 mL)를 첨가하였다. 생성된 현탁액을 2 시간 동안 교반하고, 연분홍색 고체를 여과로 수집하고, 에틸 에터(30 mL)로 세척하고 건조하여 표제 생성물(15.69 g, 100% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 11.56(br. s., 1 H) 9.09(s, 3 H) 7.85(s, 1 H) 7.54(s, 1 H) 7.09(d, J=2.32 Hz, 1 H) 4.48(d, J=6.48 Hz, 2 H) 4.11(br. s., 1 H) 3.81(s, 3 H) 3.46-3.60(m, 1 H) 3.35-3.45(m, 2 H) 3.32(s, 3 H) 3.15(dq, J=12.01, 6.02 Hz, 1 H) 2.88(m, J=6.42, 6.42 Hz, 1 H). Cl 동위원소 패턴을 갖는 모 분자 $C_{16}H_{20}ClN_7O_2$에 대한 m/z (APCI+): 378.2(M+H)$^+$. 광학 회전: [a]d= -4.1° (c=0.24, MeOH).

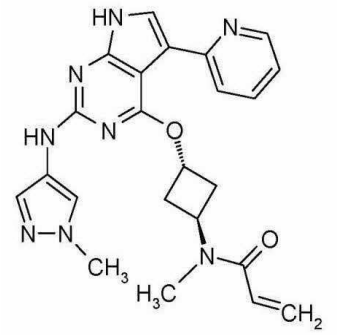
[0187] 단계 8: 1-{(3R,4R)-3-[5-클로로-2-(1-메틸-1H-피라졸-4-일아미노)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일옥시메틸]-4-메톡시-피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온의 제조

[0188] 

[0189] (3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리디늄 트라이플루오로아세테이트(15.0 g 24.7 mmol), 에틸 아세테이트(200 mL) 및 포화 수성 $NaHCO_3$(100 mL)의 혼합물을 0℃에서 10 분 동안 교반하였다. 아크릴로일 클로라이드(2.3 mL, 29 mmol, 1.1 mol eq)를 적가하고, 생성된 혼합물을 상온에서 30 분 동안 교반하였다. 에틸 아세테이트(150 mL)를 첨가하고, 유

기 층을 분리하고, 수성 층을 에틸 아세테이트(150 mL)로 추출하고, 합한 유기 층을 $Na_2SO_4$로 건조하고, 증발시켜 고체를 수득하고, 이를 에틸 아세테이트 중 0 내지 50% 에탄올의 구배로 용리하는 플래시 크로마토그래피를 통해 정제하여 백색 고체를 수득하였다. 이어서, 이 고체를 열총을 사용하여 살짝 가열하여 에탄올(1 g의 조질에 대하여 10 mL 에탄올)로부터 재결정화하고, 결정 시드로 시딩하였다. 냉각시 백색 결정을 여과로 수집하고, 에탄올(1 g의 조질에 대하여 3 mL의 에탄올)로 세척하여 백색 고체로서 표제 화합물(7.47 g, 70%)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 11.50(br. s., 1 H) 9.06(s, 1 H) 7.85(s, 1 H) 7.51(s, 1 H) 7.04(d, J=2.32 Hz, 1 H) 6.58(ddd, J=16.78, 10.30, 1.16 Hz, 1 H) 6.13(dd, J=16.81, 2.38 Hz, 1 H) 5.67(dt, J=10.33, 2.23 Hz, 1 H) 4.43(d, J=6.24 Hz, 2 H) 3.95-4.05(m, 1 H) 3.68-3.85(m, 4 H) 3.56-3.66(m, 2 H) 3.44-3.53(m, 1 H) 3.30(d, J=4.65 Hz, 3 H) 2.68-2.90(m, 1 H). Cl 동위원소 패턴을 갖는 모분자 $C_{19}H_{22}ClN_7O_3$에 대한 m/z (APCI+): 432.1(M+H)$^+$. 키랄 순도 측정: 140 바, 3 mL/분에서 Whelk-O1(R,R) 4.6 x 250 mm 컬럼 30% EtOH. Rt = 약 8.8 분, 피크 1, >99% ee. 광학 회전: [a]D22 = -3.1° (c 0.14, EtOH). 원소 분석: 이론치: C, 52.84; H, 5.13; Cl, 8.21; N, 22.70. 실측치: C, 52.45; H, 5.38; Cl, 7.91; N, 22.02.

[0190] **실시예 2: N-메틸-N-[트랜스-3-({2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-5-(피리딘-2-일)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)사이클로부틸]프로프-2-엔아미드(화합물 B)의 제조**



[0191]

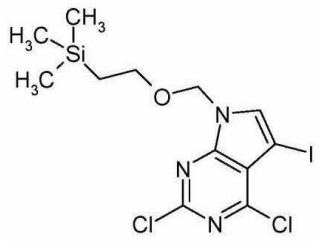
[0192] 단계 1: 2,4-다이클로로-5-요오도-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘의 제조



[0193]

[0194] DMF(266 mL, 1.0 M) 중 2,4-다이클로로-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘,(50.0 g, 266 mmol, 1.00 eq)의 용액에 내부 온도를 50℃ 미만으로 유지하는 속도로 N-요오도숙신이미드(62.8 g, 279 mmol, 1.05 eq)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 격렬하게 교반하고 상온 욕에서 1.5 시간 동안 냉각하였다. 반응 혼합물을 빙수(1.5 L)로 희석하고, 생성된 침전물을 여과로 단리하였다. 침전물을 빙수(2 x 500 mL)로 세척하고, 진공에서 45℃로 36 시간 동안 건조하여 회백색 고체로서 표제 화합물(81.5 g, 98% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 13.09(br. s., 1 H), 7.95(s, 1 H). $C_6H_2Cl_2IN_3$에 대한 m/z (APCI+): 313.9(M+H)$^+$.

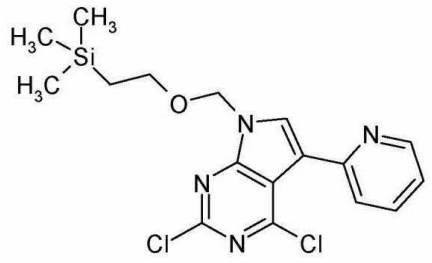
[0195] 단계 2: 2,4-다이클로로-5-요오도-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘의 제조



[0196]

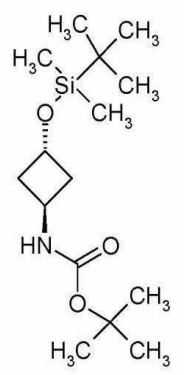
[0197] THF(600 mL) 중 2,4-다이클로로-5-요오도-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘(81.4 g, 259 mmol, 1.00 eq) 및 다이이소프로필에틸아민(105 mL, 596 mmol, 2.30 eq)의 냉 용액(0℃)에 2-(트라이메틸실릴)에톡시메틸 클로라이드(59.5 mL, 337 mmol, 1.30 eq)를 적가 방식으로 5 분간에 걸쳐서 첨가하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 3 시간 동안 교반하도록 하였다. 그때 반응 혼합물을 여과하고, 여액을 진공에서 농축하였다. 생성된 농축된 오일을 EtOAc(400 mL)로 희석하고, 연속적으로 포화 수성 $NH_4Cl$(2 x 200 mL) 및 염수(2 x 200 mL)로 세척하고, $Na_2SO_4$로 건조하고 진공에서 농축하였다. 생성된 물질을 최소량의 DCM(50 mL)에 용해하고 헵탄(200 mL)으로 희석하였다. 이 용액을 150 mL의 총량으로 농축하고, 표제 화합물의 마쇄를 촉진하였다. 이 혼합물을 여과하여 표제 화합물(84.1 g)을 수득하고, 여액을 농축하고 헵탄 중 0 내지 15% EtOAc의 구배로 용리하는 플래시 크로마토그래피를 통해 추가 정제하여 표제 화합물의 추가 부분(26.5 g)을 수득하였다. 이러한 2개의 부분을 합하여 회백색 고체로서 목적 생성물(110.6 g)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 7.50(s, 1 H), 5.57(s, 2 H), 3.61(t, J=8.0 Hz, 2 H), 0.95(t, J=8.0 Hz, 2 H), 0.01(s, 9 H). $C_{12}H_{16}Cl_2IN_3OSi$에 대한 m/z (APCI+): 444.0$(M+H)^+$.

[0198] 단계 3: 2,4-다이클로로-5-(피리딘-2-일)-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘의 제조

[0199] 

[0200] THF(350 mL) 중 2,4-다이클로로-5-요오도-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘(30.0 g, 68.0 mmol, 1.00 eq)의 냉 용액(-78℃)에 i-PrMgCl(47.3 mL, 94.6 mmol, 1.40 eq, 1.00 M THF)의 용액을 적가 방식으로 4 분간에 걸쳐서 첨가하였다. 반응 혼합물을 -78℃에서 2 시간 동안 교반한 후 THF(100 mL) 중 $ZnBr_2$(24.7 g, 110 mmol, 1.62 eq, 130℃에서 건조됨)의 신선하게 제조된 용액으로 적가 방식으로 15 분간에 걸쳐서 처리하였다. 혼합물을 -78℃에서 추가 1 시간 동안 교반한 후 상온에서 가온하고 추가 0.5 시간 동안 교반하였다. 이 시간에 반응 혼합물을 $Pd(PPh_3)_4$(3.94 g, 3.38 mmol, 0.05 eq) 및 2-요오도피리딘(10.8 mL, 101 mol, 1.50 eq)으로 처리하고, 65℃로 10 시간 동안 가열하였다. 상온으로 냉각시, 반응 혼합물을 약 200 mL의 용량으로 농축하고, 물(600 mL), 포화 수성 나트륨 칼륨 타르트레이트(100 mL) 및 EtOAc(400 mL)로 희석하였다. 층을 분리하고, 수성 층을 EtOAc(4 x 300 mL)로 추출하였다. 합한 유기물을 염수(300 mL)로 세척하고, $Na_2SO_4$로 건조하고, 진공에서 농축하였다. 생성된 오일을 헵탄 중 0 내지 30% EtOAc의 구배로 용리하는 플래시 크로마토그래피를 통해 정제하여 오일로서 표제 화합물(23.5 g, 87% 수율)을 수득하였고 방치시 연황갈색 고체로 전환되었다. $^1$H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 8.76-8.63(m, 1 H), 7.83-7.77(m, 1 H), 7.74(s, 1 H), 7.67(d, J=7.8 Hz, 1 H), 7.35-7.29(m, 1 H), 5.68(s, 2 H), 3.61(dd, J=7.6, 8.9 Hz, 2 H), 1.03-0.92(m, 2 H), -0.01(s, 9 H). $C_{17}H_{20}Cl_2N_4OSi$에 대한 m/z (APCI+): 395.1$(M+H)^+$.

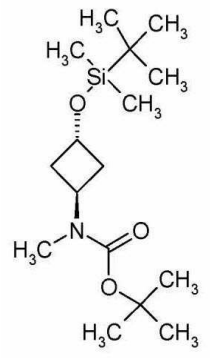
[0201] 단계 4: t-부틸(트랜스-3-{[t-부틸(다이메틸)실릴]옥시}사이클로부틸)-카바메이트의 제조



[0202]

[0203] THF(1.0 L) 중 t-부틸(시스-3-하이드록시사이클로부틸)카바메이트(62.0 g, 330 mmol, 1.00 eq) 및 4-니트로벤조산(60.8 g, 360 mmol, 1.10 eq)의 냉용액(0℃)에 $PPh_3$(130 g, 490 mol, 1.48 eq) 및 다이에틸 아조다이카복실레이트(86.3 g, 490 mmol, 1.48 eq)로 연속적으로 처리하였다. 추가 반응 혼합물을 4 일 동안 환류한 후, 상온으로 냉각하고, 진공에서 농축하였다. 잔사를 i-PrOH로부터 결정화하여 백색 고체(63 g)를 수득하였다. MeOH(1.0 L) 및 $H_2O$(200 mL) 중 상기 수득된 4-니트로 벤조에이트 에스터(63 g)의 용액에 $K_2CO_3$(51.6 g, 370 mmol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 2 시간 동안 환류하고, 상온을 냉각하고, 여과하였다. 여액을 진공에서 농축하고, EtOAc와 수성 10% $Na_2CO_3$ 사이에 분배하였다. 생성된 유기 층을 염수로 세척하고 농축하여 백색 고체(31.0 g)를 수득하였다. 피리딘(1.0 L) 중 상기 수득된 알코올(75.0 g, 400 mmol, 1.00 eq)의 용액에 TBSCl(91.0 g, 600 mmol, 1.50 eq)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 상온에서 2 시간 동안 교반한 후 진공에서 농축하였다. 생성된 잔사를 석유 에터 중 0 내지 10% EtOAc의 구배로 용리하는 플래시 크로마토그래피로 정제하여 백색 고체로서 표제 화합물(111 g, 92% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 7.13(d, 1 H) 4.38-4.47(m, 1 H) 3.90(br. s., 1 H) 2.00-2.16(m, 4 H) 1.36(s, 9 H) 0.81-0.89(m, 9 H) -0.01-0.01(m, 6 H). $C_{10}H_{23}NOSi$에 대한 m/z (APCI+): 202.1(M-Boc+H)$^+$.

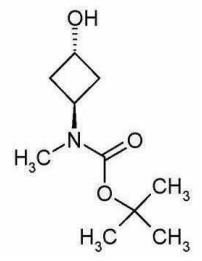
[0204] 단계 5: t-부틸(트랜스-3-{[t-부틸(다이메틸)실릴]옥시}사이클로부틸)-메틸카바메이트의 제조



[0205]

[0206] THF(1.0 L) 중 t-부틸(트랜스-3-{[t-부틸(다이메틸)실릴]옥시}사이클로부틸)카바메이트(111 g, 370 mmol, 1.00 eq)의 용액에 NaH(오일 중 60% 현탁액, 22.2 g, 550 mmol, 1.50 eq)를 나눠서 첨가하였다. 첨가 후, 반응 혼합물을 추가 0.5 시간 동안 교반하고, 0℃로 냉각하고, 메틸 요오다이드(38.2 mL, 615 mmol, 1.66 eq)로 적가 방식으로 처리하였다. 상온에서 추가 5 시간 후, 반응 혼합물을 진공에서 농축하고, 생성된 잔사를 석유 에터 중 10% EtOAc로 용리하는 플래시 크로마토그래피로 정제하여 오일로서 표제 화합물(97.5 g, 84% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 4.64(br. s., 1 H) 4.29-4.37(m, 1 H) 2.73(s, 3 H) 2.31-2.43(m, 2 H) 1.97-2.08(m, 2 H) 1.37(s, 9 H) 0.86(s, 9 H) -0.01-0.05(m, 6 H). $C_{11}H_{25}NOSi$에 대한 m/z (APCI+): 216.2(M-Boc+H)$^+$.

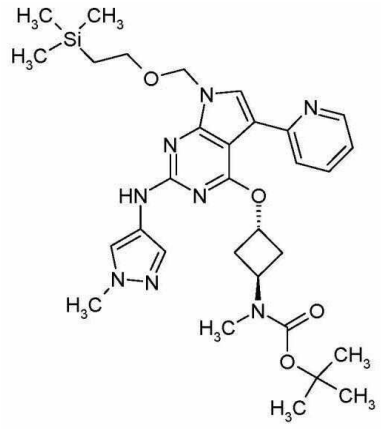
[0207] 단계 6: t-부틸(트랜스-3-하이드록시사이클로부틸)메틸카바메이트의 제조



[0208]

[0209] THF(1.0 L) 중 t-부틸(트랜스-3-{[t-부틸(다이메틸)실릴]옥시}사이클로부틸)-메틸카바메이트(195 g, 600 mmol, 1.00 eq)의 용액에 TBAF(930 mL, 930 mmol, 1.55 eq, THF 중 1 M)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 상온에서 3 시간 동안 교반한 후 진공에서 농축하였다. 생성된 잔사를 EtOAc(1.0 L)와 포화 수성 $NH_4Cl$(500 mL) 사이에 분배하였다. 생성된 유기 층을 진공에서 농축하고, 생성된 잔사를 석유 에터 중 10% EtOAc로 용리하는 플래시 크로마토그래피로 정제하여 백색 고체로서 표제 화합물(88 g, 76% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 4.78(s, 1 H), 4.41-4.38(m, 1 H), 2.82(s, 3 H), 2.41-2.38(m, 2 H), 2.23-2.20(m, 2 H), 1.47(s, 9 H). $C_{10}H_{18}NO_3$에 대한 m/z (ESI+): 146.1($M-{}^t$Bu+H)$^+$.

[0210] 단계 7: t-부틸 메틸{트랜스-3-[(2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-5-(피리딘-2-일)-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)옥시]사이클로부틸}카바메이트의 제조

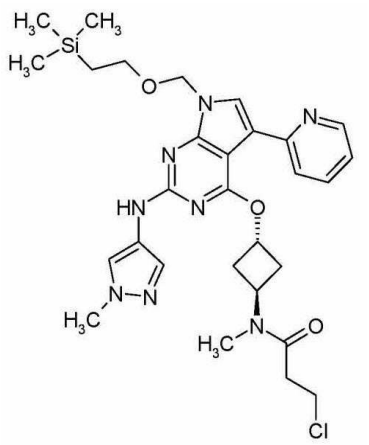


[0211]

[0212] THF(100 mL) 중 t-부틸(트랜스-3-하이드록시사이클로부틸)메틸카바메이트(12.9 g, 64.0 mmol, 1.15 eq)의 냉 용액에 칼륨 비스(트라이메틸실릴)아미드(12.4 g, 62.3 mmol, 1.12 eq)를 3분량으로 첨가하였다. 첨가 후, 알콕사이드 용액을 상온으로 0.5 시간에 걸쳐서 가온하였다. 분리 플라스크를 2,4-다이클로로-5-(피리딘-2-일)-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘(22.0 g, 55.6 mmol, 1.00 eq) 및 THF(300 mL)로 충전하고 0℃로 냉각하였다. 이 용액을 캐눌라를 통해 5분간에 걸쳐서 알콕사이드 용액으로 처리한 후 추가 0.5 시간 동안 0℃에서 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 염수(100 mL), 물(200 mL) 및 EtOAc(600 mL)로 희석하였다. 층을 분리하고, 수층을 EtOAc(4 x 200 mL)로 추출하였다. 이어서, 합한 유기 층을 염수(200 mL)로 세척하고, $Na_2SO_4$로 건조하고, 진공에서 농축하였다. 생성된 점성 오일(31.0 g)을 다음 단계에서 추가 정제 없이 사용하였다. 1,4-다이옥산(300 mL) 중 상기 수득된 오일(31.0 g)의 용액에 1-메틸-1H-피라졸-4-아민(7.57 g, 77.9 mmol, 1.40 eq), $Pd_2dba_3$(2.68 g, 2.78 mmol, 0.05 eq), 4,5-비스(다이페닐포스피노)-9,9-다이메틸잔텐(3.25 g, 5.56 mmol, 0.10 eq) 및 $Cs_2CO_3$(45.8 g, 139 mmol, 2.5 eq)을 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 질소 가스의 스트림으로 20 분 동안 살포하고, 격렬하게 교반하면서 105℃에서 10 시간 동안 가열하였다. 상온으로 냉각시, 반응 혼합물을 EtOAc(500 mL)로 희석하고, 셀라이트를 통해 여과하고, 진공에서 농축하였다. 생성된 잔사를 헵탄 중 0 내지 80% EtOAc의 구배로 용리하는 플래시 크로마토그래피로 정제하여 주황색 포말로서 표제 화합물(25.6 g, 74% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 9.17(s, 1 H), 8.56(d, J=4.3 Hz, 1 H), 8.14(d, J=7.9 Hz, 1 H), 7.93(br. s., 1 H), 7.87-7.79(m, 1 H), 7.69(s, 1 H), 7.55(s, 1 H),

7.23(dd, J=5.0, 7.2 Hz, 1 H), 5.57(br. s., 2 H), 5.47(br. s., 1 H), 4.84-4.66(m, 1 H), 3.82(s, 3 H), 3.63-3.53(m, 2 H), 2.84(s, 3 H), 2.75-2.62(m, 2 H), 2.47-2.34(m, 2 H), 1.38(s, 9 H), 0.86(t, J=8.0 Hz, 2 H), -0.11(s, 9 H). $C_{31}H_{44}N_8O_4Si$에 대한 m/z (APCI+): 621.3(M +H)$^+$.

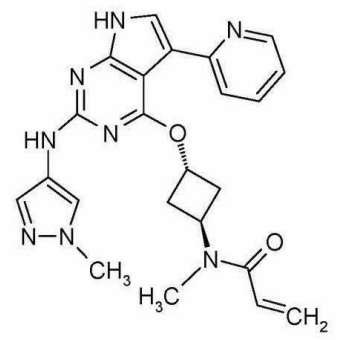
[0213] 단계 8: 3-클로로-N-메틸-N-{트랜스-3-[(2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-5-(피리딘-2-일)-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)옥시]사이클로부틸}프로판아미드의 제조



[0214]

[0215] MeCN(600 mL) 중 t-부틸 메틸{트랜스-3-[(2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-5-(피리딘-2-일)-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)옥시]사이클로부틸}카바메이트(25.0 g, 40.3 mmol, 1.00 eq)의 냉 용액(0℃)에 TFA(70.0 mL, 914 mmol, 22.7 eq)를 적가 방식으로 첨가하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 교반한 후 상온으로 밤새 가온하였다. 이어서, 반응 혼합물을 0℃로 냉각하고, 수성 NaOH를 사용하여 pH를 8로 조정하고, 상을 분리하였다. 수성 상을 EtOAc(3 x 300 mL)로 추출하고, 합한 유기 상을 염수(2 x 200 mL)로 세척하고, $Na_2SO_4$로 건조하고, 진공에서 농축하였다. 생성된 잔사를 DCM 중 2 내지 7% MeOH의 구배로 용리하는 플래시 크로마토그래피를 통해 부분적으로 정제하여 황색 검으로서 4-{[트랜스-3-(메틸아미노)사이클로부틸]옥시}-N-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-5-피리딘-2-일-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-2-아민을 수득하고, 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다. DCM(500 mL) 중 4-{[트랜스-3-(메틸아미노)사이클로부틸]옥시}-N-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-5-피리딘-2-일-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-2-아민 및 DIPEA(16.0 mL, 91.9 mmol, 1.61 eq)의 용액에 3-클로로프로피온일 클로라이드(8.25 mL, 86.4 mmol, 1.51 eq)를 적가 방식으로 첨가한 후 상온에서 1 시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 $H_2O$(2 x 100 mL) 및 염수(100 mL)로 세척하고, $Na_2SO_4$로 건조하고, 진공에서 농축하였다. 생성된 검을 MTBE(250 mL)로 마쇄하고, 고체를 여과하고 진공에서 농축하여 황색 고체로서 표제 화합물(24.0 g, 68.9% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 9.10-9.25(m, 1 H) 8.51-8.61(m, 1 H) 8.10-8.25(m, 1 H) 7.92-8.05(m, 1 H) 7.82-7.91(m, 1 H) 7.67-7.76(m, 1 H) 7.47-7.60(m, 1 H) 7.17-7.30(m, 1 H) 5.55-5.64(m, 2 H) 5.40-5.54(m, 1 H) 4.63-5.31(m, 1 H) 3.83(s, 3 H) 3.74-3.81(m, 2 H) 3.53-3.66(m, 2 H) 2.92-3.08(m, 3 H) 2.81-2.89(m, 2 H) 2.58-2.79(m, 2 H) 2.29-2.46(m, 2 H) 0.75-0.93(m, 2 H) -0.10(s, 9 H). $C_{29}H_{39}ClN_8O_3Si$에 대한 m/z (APCI+): 611.2(M +H)$^+$.

[0216] 단계 9: N-메틸-N-[트랜스-3-({2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-5-(피리딘-2-일)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)사이클로부틸]프로프-2-엔아미드의 제조

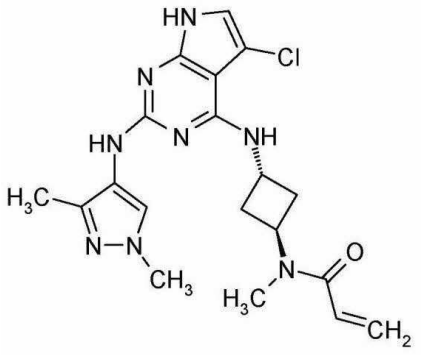


[0217]

[0218] DCM/iPrOH(9:1, 250 mL) 중 3-클로로-N-메틸-N-{트랜스-3-[(2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-5-(피리딘-2-일)-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)옥시]사이클로부틸}프로판아미드(24.0 g, 39.2 mmol, 1.00 eq)의 용액에 HCl 용액(250 mL, 1,4-다이옥산 중 4 M)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 상온에서 밤새 교반하고, 진공에서 농축하여 3-클로로-N-[트랜스-3-({7-(하이드록시메틸)-2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-5-피리딘-2-일-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)사이클로부틸]-N-메틸프로판아미드를 수득하고, 이를 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. 이전 단계로부터의 중간체를 1,4-다이옥산(80 mL) 및 농축된 수성 $NH_4OH$(50 mL)에 용해하였다. 반응 혼합물을 상온에서 3 시간 동안 교반한 후 진공에서 농축하였다. 잔사를 MTBE(100 mL)로 마쇄하고, 고체를 여과하고 진공에서 농축하여 황색 고체로서 3-클로로-N-메틸-N-[트랜스-3-({2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-5-피리딘-2-일-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)사이클로부틸]프로판아미드를 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. EtOH(400 mL) 중 3-클로로-N-메틸-N-[트랜스-3-({2-[(1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-5-피리딘-2-일-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)사이클로부틸]프로판아미드의 용액에 $K_2CO_3$(21.4 g, 155 mmol, 3.95 eq)을 첨가하고, 반응 혼합물을 상온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하여 무기 염을 제거하고, 진공에서 농축하고, EtOAc(100 mL)에 용해하였다. MTBE(200 mL)를 첨가하여 조질 생성물을 침전시키고, 이를 여과로 수집하였다. 여액을 농축하고, DCM 중 2 내지 7% MeOH의 구배로 용리하는 플래시 크로마토그래피로 정제하여 조질 생성물의 추가 부분을 수득하였다. 합한 조질 물질을 $H_2O$(0.225% HCOOH) 중 5% MeCN 내지 $H_2O$(0.225% HCOOH) 중 25% MeCN의 구배로 용리하는 YMC-액투스 트라이액트(Actus Triact) C18(150 mm x 30 mm x 5 μM) 컬럼을 사용하여 역상 크로마토그래피를 통해 정제하여 황색 고체로서 표제 화합물의 포름에이트 염(7.14 g, 3 단계에 걸쳐서 37%)을 수득하였다.

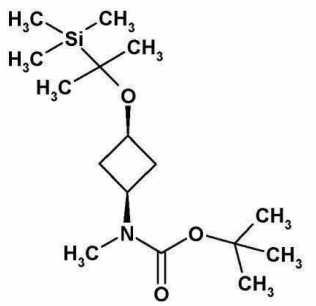
[0219] $H_2O$(200 mL) 중 표제 화합물의 포름에이트 염(5.14 g)의 용액에 포화 수성 $NaHCO_3$(100 mL) 및 EtOAc(200 mL)를 연속적으로 첨가하였다. 층을 분리하고, 수층을 EtOAc(8 x 100 mL)로 추출하였다. 합한 유기물을 $Na_2SO_4$로 건조하고, 진공에서 농축하여 무정형 고체로서 표제 화합물을 수득하였다. 이 무정형 고체의 사용되는 양(약 3 g)를 최소량의 EtOH/EtOAc(약 1:1, 약 120 mL)에 용해하고, 약 10 mL의 용량으로 진공에서 농축하고, EtOAc(40 mL)로 희석하였다. 이 용액을 결정질 생성물(약 5 mg)로 시딩하고, 상온에서 밤새 교반하였다. 결정화 플라스크를 1 시간 동안 0℃로 냉각하여 추가 결정화를 촉진하였다. 생성물을 여과로 수집하고, 진공에서 농축하여 EtOAc(0.038 eq) 및 EtOH(0.03 eq)을 함유하는 백색 결정질 물질로서 표제 화합물(2.63 g)을 수득하였다. 융점 = 204.9℃. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6, 30℃) δ ppm 11.65(s, 1 H), 8.93(s, 1 H), 8.54(d, J=3.9 Hz, 1 H), 8.14(d, J=8.1 Hz, 1 H), 7.86(s, 1 H), 7.82(t, J=7.3 Hz, 1 H), 7.53(s, 1 H), 7.52(s, 1 H), 7.20(ddd, J=1.0, 4.9, 7.4 Hz, 1 H), 6.71(br. s., 1 H), 6.08(br. s., 1 H), 5.66(br. s., 1 H), 5.53(br. s., 1 H), 5.31-4.79(m, 1 H), 3.82(s, 3 H), 3.15-2.93(m, 3 H), 2.76(br. s., 2 H), 2.46(br. s., 2 H). $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6, 80℃) δ ppm 11.41(br. s., 1 H), 8.59(s, 1 H), 8.55-8.52(m, 1 H), 8.13(d, J=8.1 Hz, 1 H), 7.84(s, 1 H), 7.80(dt, J=1.9, 7.7 Hz, 1 H), 7.55(s, 1 H), 7.50(s, 1 H), 7.18(ddd, J=1.0, 4.8, 7.4 Hz, 1 H), 6.66(dd, J=10.6, 16.8 Hz, 1 H), 6.05(dd, J=2.3, 16.8 Hz, 1 H), 5.63(dd, J=2.3, 10.5 Hz, 1 H), 5.59-5.53(m, 1 H), 5.00(t, J=8.0 Hz, 1 H), 3.82(s, 3 H), 3.04(s, 3 H), 2.82-2.71(m, 2 H), 2.55-2.45(m, 2 H). $C_{23}H_{24}N_8O_2$에 대한 m/z (APCI+): 445.2(M +H)$^+$. 원소 분석: 측정치 C, 61.96; H, 5.50; N, 24.93. $C_{23}H_{24}N_8O_2$ + 0.038 EtOAc + 0.030 당량 EtOH는 C, 62.06; H, 5.49; N, 24.95를 필요로 한다.

[0220] **실시예 3: N-[트랜스-3-({5-클로로-2-[(1,3-다이메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}아미노)사이클로부틸]-N-메틸프로프-2-엔아미드(화합물 C)**



[0221]

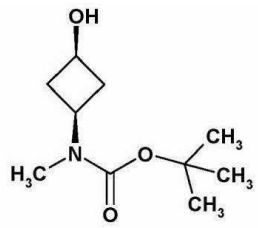
[0222] 단계 1: t-부틸 메틸{시스-3-[1-메틸-1-(트라이메틸실릴)에톡시]사이클로부틸}카바메이트의 제조



[0223]

[0224] 피리딘(150 mL) 중 t-부틸(시스-3-하이드록시사이클로부틸)카바메이트(10.5 g, 56 mmol, 1.00 eq)의 용액에 TBSCl(12.7 g, 84 mmol, 1.50 eq)을 첨가하였다. 첨가 후, 혼합물을 상온에서 3 시간 동안 교반하였다. TLC(석유 에터/EtOAc = 3/1)는 출발 물질이 완전히 소비됨을 나타낸다. 반응 혼합물을 농축하고, 잔사를 EtOAc(3 x 100 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 농축하여 오일로서 조질 t-부틸 {시스-3-[1-메틸-1-(트라이메틸실릴)에톡시]사이클로부틸}카바메이트를 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계를 위해 사용하였다. 조질 t-부틸 {시스-3-[1-메틸-1-(트라이메틸실릴)에톡시]사이클로부틸}카바메이트를 THF(300 mL)에 희석하고, NaH(60%, 3.36 g, 84 mmol, 1.50 eq)로 나눠서 처리하고 실온에서 30 분 동안 교반하였다. 혼합물을 0℃로 냉각하고, 메틸 요오다이드(23.9 g, 168 mmol, 3.0 eq)로 적가 방식으로 첨가하였다. 첨가 후, 반응 혼합물을 상온에서 5 시간 동안 교반하였다. TLC(석유 에터/EtOAc = 10/1)는 출발 물질이 완전히 소비되었음을 나타낸다. 반응 혼합물을 농축하고 실리카 겔 크로마토그래피(석유 에터/EtOAc = 10/1)를 통해 정제하여 오일로서 표제 화합물(18 g, 100%)을 수득하였다.

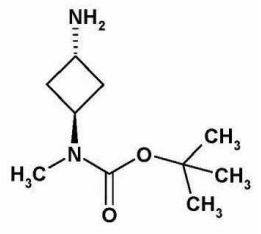
[0225] 단계 2: t-부틸(시스-3-하이드록시사이클로부틸)메틸카바메이트의 제조



[0226]

[0227] THF(200 mL) 중 t-부틸 메틸{시스-3-[1-메틸-1-(트라이메틸실릴)에톡시]사이클로부틸}카바메이트(18 g, 56 mmol, 1.0 eq)의 용액에 TBAF(22.0 g, 84 mmol, 1.50 eq)를 나눠서 첨가하였다. 첨가 후, 혼합물을 상온에서 3 시간 동안 교반하였다. TLC(석유 에터:EtOAc = 2:1)는 출발 물질이 완전히 소비되었음을 나타낸다. 반응 혼합물을 농축하고, 잔사를 컬럼 크로마토그래피(석유 에터:EtOAc = 2:1)로 정제하여 백색 고체로서 표제 화합물(8.9 g, 79% 수율)을 수득하였다.

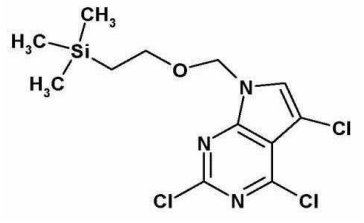
[0228] 단계 3: t-부틸(트랜스-3-아미노사이클로부틸)메틸카바메이트의 제조



[0229]

[0230] DCM(300 mL) 중 t-부틸(시스-3-하이드록시사이클로부틸)메틸카바메이트(18.0 g, 0.089 mol, 1.0 eq) 및 트라이에틸아민(37 mL, 0.267 mol, 3.0 eq)의 격렬하게 교반된 냉 용액(0℃)에 MsCl(14.1 g, 0.123 mol, 1.38 eq)을 적가 방식으로 30 분간에 걸쳐서 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 상온으로 가온하고 1 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물(100 mL) 및 DCM(200 mL)으로 희석하였다. 유기 상을 분리하고, 물(2 x 100 mL), 포화 수성 $NH_4Cl$(3 x 100 mL) 및 염수(100 mL)로 세척하고, 무수 $Na_2SO_4$로 건조하고, 여과하여 황색 고체로서 조질 시스-3-[(t-부톡시카본일)(메틸)아미노]사이클로부틸 메탄설포네이트를 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. 상기 수득된 조질 시스-3-[(t-부톡시카본일)(메틸)아미노]사이클로부틸 메탄설포네이트를 DMF(250 mL)에 용해하고, $NaN_3$(28.77 g, 0.44 mol, 5 eq)으로 처리하였다. 이어서, 생성된 혼합물을 70℃로 가열하고 밤새 교반하였다. 냉각 후, 물(1500 mL) 및 EtOAc(300 mL)를 반응 혼합물에 첨가하였다. 상을 분리하고 수층을 EtOAc(3 x 300 mL)로 추출하였다. 합한 유기 상을 포화 수성 $NaHCO_3$(2 x 100 mL), 물(2 x 200 mL) 및 염수(100 mL)로 세척하고, 무수 $Na_2SO_4$로 건조하고, 증발시켜 조질 t-부틸(트랜스-3-아지도사이클로부틸)메틸카바메이트를 수득하고, 이를 다음 단계에서 직접 사용하였다. 수소 대기하에 MeOH(100 mL) 중 상기 조질 t-부틸(트랜스-3-아지도사이클로부틸)메틸카바메이트 및 Pd/C(2.5 g)의 혼합물에 MeOH(200 mL) 중 포화 $NH_3$을 주사기를 통해 첨가하였다. 생성된 혼합물을 상온에서 36 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 여액을 감압하에 농축하였다. 이 조질 물질을 EtOAc/석유 에터(1/10 내지 1/1)를 사용하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 황색 액체로서 표제 화합물(13.6 g, 3 단계에 걸쳐서 76.4% 수율)을 수득하였다.

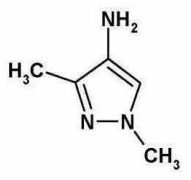
[0231] 단계 4: 2,4,5-트라이클로로-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘의 제조



[0232]

[0233] 실시예 2의 단계 1에서 제조된 바와 같이, DMF(1800 mL) 중 2,4-다이클로로-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘(100.0 g, 316 mmol, 1.0 eq)에 N-클로로숙신이미드(44.5 g, 332 mmol, 1.05 eq)를 상온에서 첨가하였다. 이어서, 생성된 혼합물을 80℃에서 3 시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 상온으로 냉각하고 빙수(3 L)에 부었다. 형성된 백색 침전물을 수집하고 진공에서 농축하여 회색 고체로서 표제 화합물(99.7 g, 90% 수율)을 수득하였다. $^1H$ NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm = 7.35(s, 1H), 5.58(s, 2H), 3.60-3.49(m, 2H), 1.00-0.89(m, 2H), -0.02(s, 9H). $C_{12}H_{16}Cl_3N_3OSi$에 대한 m/z (APCI+): 352.0$(M+H)^+$.

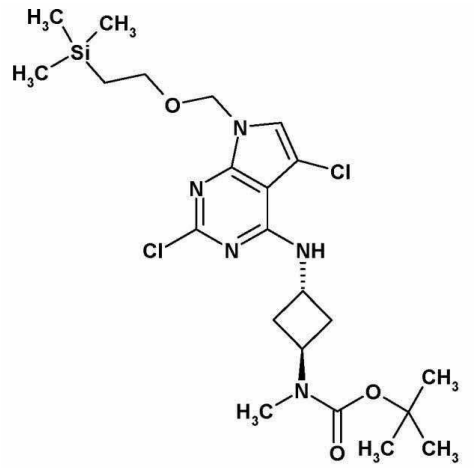
[0234] 단계 5: 1,3-다이메틸-1H-피라졸-4-아민의 제조



[0235]

[0236] MeOH(15 mL) 중 1,3-다이메틸-1H-피라졸-4-아민 하이드로클로라이드(800 mg)의 용액을, pH가 약 8이 될 때까지 하이드록사이드 수지[바이오 래드(Bio Rad) AG 1-X2 수지, 카탈로그 번호 143-1255]로 처리하였다. 혼합물을 15 분 동안 교반하였다. 수지를 여과 제거하고, MeOH로 여러 번 나눠서 세척하였다. 여액을 감압하에 농축하여 표제 화합물(615.3 mg, 94% 수율)을 수득하였다. 이 물질을 추가 정제없이 사용하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm = 6.89(s, 1H) 3.57(s, 3H) 3.54(br. s., 2H) 1.96(s, 3H). $C_5H_9N_3$에 대한 m/z (APCI+): 112.1$(M+H)^+$.

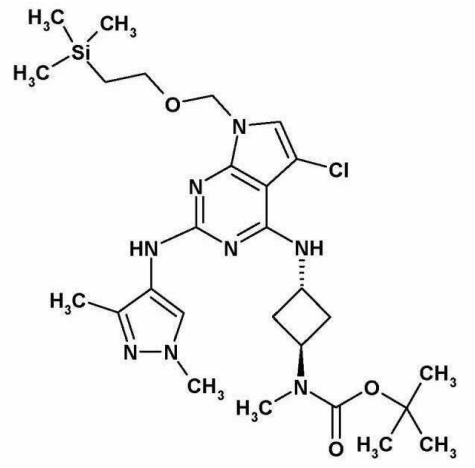
[0237] 단계 6: t-부틸 {트랜스-3-[(2,5-다이클로로-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)아미노]사이클로부틸}메틸카바메이트의 제조



[0238]

[0239] MeCN(21.0 mL, 0.2 M) 중 t-부틸(트랜스-3-아미노사이클로부틸)메틸카바메이트 (1020 mg, 5.1 mmol, 1.2 eq), 2,4,5-트라이클로로-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘(1500 mg, 4.253 mmol, 1.0 eq) 및 DIPEA(2.12 mL, 12.8 mmol, 3.0 eq)의 혼합물을 80℃에서 5.5 시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 물로 희석하고, EtOAc로 추출하였다. 유기 층을 $Na_2SO_4$로 건조하고 농축하였다. 잔사를 플래시 크로마토그래피(헵탄 중 10 내지 30% EtOAc)로 정제하여 투명한 검으로서 표제 화합물(2.22 g, 100% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm = 7.54(s, 1H) 7.05(d, J=5.99 Hz, 1H) 5.40(s, 2H) 4.74(br. s., 1H) 4.41-4.54(m, 1H) 3.45-3.54(m, 2H) 2.83(s, 3H) 2.52-2.63(m, 2H) 2.28-2.42(m, 2H) 1.40(s, 9H) 0.78-0.89(m, 2H) -0.08(s, 9H). $C_{22}H_{35}Cl_2N_5O_3Si$에 대한 m/z (APCI+): 516.2$(M+H)^+$.

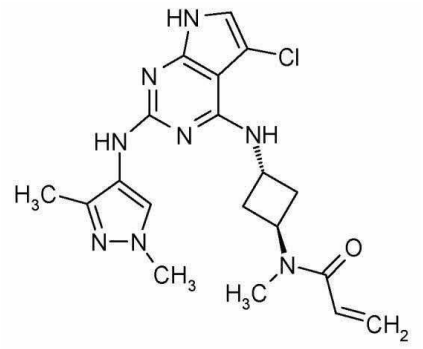
[0240] 단계 7: t-부틸 {트랜스-3-[(5-클로로-2-[(1,3-다이메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)아미노]사이클로부틸}메틸카바메이트의 제조



[0241]

[0242] 1,3-다이메틸-1H-피라졸-4-아민(567 mg, 5.10 mmol, 1.2 eq) 및 t-부틸 {트랜스-3-[(2,5-다이클로로-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)아미노]사이클로부틸}메틸카바메이트(2197 mg, 4.253 mmol, 1.00 eq)를 함유하는 플라스크를 $Pd_2(dba)_3$(393 mg, 0.425 mmol, 0.1 eq), Xantphos(259 mg, 0.425 mmol, 0.1 eq) 및 $Cs_2CO_3$(4160 mg, 12.8 mmol, 3.0 eq)으로 충전하였다. 1,4-다이옥산(42 mL, 0.1 M)을 첨가하고, 혼합물을 105℃로 18 시간 동안 가열하였다. 반응 생성물을 실온으로 냉각하고, 셀라이트의 패드를 통해 여과하였다. 여액을 농축하고, 잔사를 플래시 크로마토그래피(헵탄 중 40 내지 60% EtOAc)로 정제하여 포말로서 표제 화합물(1950 mg, 78% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm = 8.03(s, 1H) 7.87(s, 1H) 7.10(s, 1H) 6.33(d, J=6.24 Hz, 1H) 5.35(s, 2H) 4.67(br. s., 1H) 4.55(br. s., 1H) 3.68-3.75(m, 3H) 3.45-3.53(m, 2H) 2.85(s, 3H) 2.52-2.60(m, 2H) 2.29-2.38(m, 2H) 2.12(s, 3H) 1.40(s, 9H) 0.78-0.88(m, 2H) -0.10(s, 9H). $C_{27}H_{43}ClN_8O_3Si$에 대한 m/z (APCI+): 591.3(M+H)$^+$.

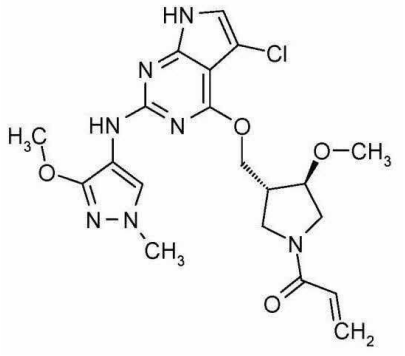
[0243] 단계 8: N-[트랜스-3-({5-클로로-2-[(1,3-다이메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}아미노)사이클로부틸]-N-메틸프로프-2-엔아미드의 제조



[0244]

[0245] DCM(42 mL) 중 t-부틸 {트랜스-3-[(5-클로로-2-[(1,3-다이메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7-{[2-(트라이메틸실릴)에톡시]메틸}-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)아미노]사이클로부틸}메틸카바메이트(1950 mg, 3.30 mmol, 1.0 eq)의 냉 용액(0℃)에 TFA(31 mL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온으로 만들고, 추가 16 시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 톨루엔(30 mL)으로 희석하고 농축하여 건조하였다. 생성된 조질 잔사를 1,4-다이옥산(20 mL) 및 농축 수성 $NH_4OH$(20 mL)에 용해하고 상온에서 3 시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 증발시켜 건조하였다. 생성된 조질 고체를 EtOAc(140 mL)와 포화 수성 $Na_2CO_3$(140 mL) 사이에 분배하고, 1 시간 동안 격렬하게 교반하면서 아크릴로일 클로라이드(0.420 mL, 5.19 mmol, 1.58 eq)로 처리하였다. 이 시간에 층을 분리하고, 수층을 EtOAc(50 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 $Na_2SO_4$로 건조하고, 톨루엔(30 mL)으로 희석하고, 증발시켜 건조하였다. 생성된 고체를 4%/분, 140 바, 55 mL/분에서 20 내지 40% EtOH을 사용하는 ZymorSpher HAP 150 x 21.2 mm 컬럼을 사용하여 정제하여 회색 분말로서 표제 화합물(950 mg, 69% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6, 26℃) δ ppm = 11.16(br. s., 1H), 7.80(br. s., 1H), 7.77(s, 1H), 6.88(d, J=2.4 Hz, 1H), 6.74(dd, J=10.5, 16.7 Hz, 1H), 6.32(br. s., 1H), 6.07(d, J=15.9 Hz, 1H), 5.66(d, J=10.4 Hz, 1H), 5.30-4.75(m, 1H), 4.59(br. s., 1H), 3.71(s, 3H), 3.15-2.88(m, 3H), 2.62(br. s., 2H), 2.40(br. s., 2H), 2.08(s, 3H). $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6, 80℃) δ ppm = 10.93(br. s., 1H), 7.73(s, 1H), 7.41(br. s., 1H), 6.82(d, J=2.2 Hz, 1H), 6.68(dd, J=10.5, 16.9 Hz, 1H), 6.16(d, J=5.9 Hz, 1H), 6.05(dd, J=2.4, 16.8 Hz, 1H), 5.63(dd, J=2.4, 10.5 Hz, 1H), 4.94(t, J=8.0 Hz, 1H), 4.60(dd, J=4.0, 8.7 Hz, 1H), 3.72(s, 3H), 3.04(s, 3H), 2.72-2.57(m, 2H), 2.41(ddd, J=4.5, 8.9, 13.6 Hz, 2H), 2.10(s, 3H). $C_{19}H_{23}ClN_8O_3$에 대한 m/z (APCI+): 415.1(M+H)$^+$.

[0246] **실시예 4: 1-{(3R,4R)-3-[({5-클로로-2-[(3-메톡시-1-메틸-1H-피라졸-4-일)아미노]-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온(화합물 D)의 제조**

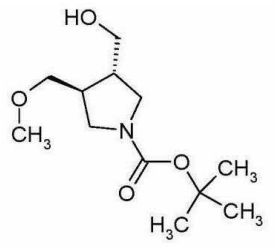


[0247]

[0248] 1-메틸-1H-피라졸-4-아민을 3-메톡시-1-메틸-1H-피라졸-4-아민 및 다른 비임계 치환기로 치환하여 실시예 1과 유사한 방식으로 제조하였다.

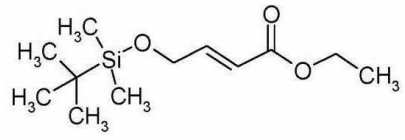
[0249] **주요 중간체에 대한 실험 과정**

[0250] **제조예 1: t-부틸-3-(하이드록시메틸)-4-(메톡시메틸)피롤리딘-1-카복실레이트의 제조**



[0251]

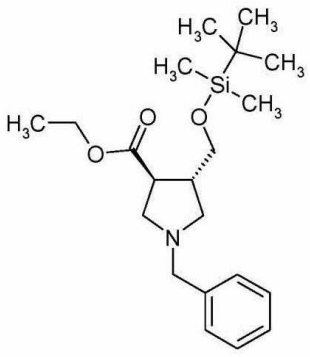
[0252] 단계 1: 에틸(2E)-4-{[t-부틸(다이메틸)실릴]옥시}부트-2-엔오에이트의 제조



[0253]

[0254] DIEA(2.75 mL, 16.6 mmol) 및 LiCl(5.54 g, 129 mmol)를 $CH_3CN$(40 mL) 중 t-부틸다이메틸실릴옥시 아세트알데하이드(3.22 g, 18.5 mmol) 및 다이에틸메틸포스포노아세테이트(4.66 g, 22.2 mmol)의 용액에 첨가하고, 혼합물을 실온에서 24 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 물(50 mL)로 급랭하고, EtOAc(50 mL)로 추출하였다. 유기 층을 $MgSO_4$로 건조하고 농축하였다. 잔사를 25% EtOAc/헵탄로 용리하는 플래시 크로마토그래피로 정제하여 무색 오일로서 표제 화합물(3.27 g, 72% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 6.91(dt, J=15.42, 3.49 Hz, 1 H) 6.01(dt, J=15.61, 2.27 Hz, 1 H) 4.25(dd, J=3.27, 2.27 Hz, 2 H) 4.12(q, J=7.22 Hz, 2 H) 1.21(t, J=7.18 Hz, 3 H) 0.84(s, 9 H) 0.00(s, 6 H).

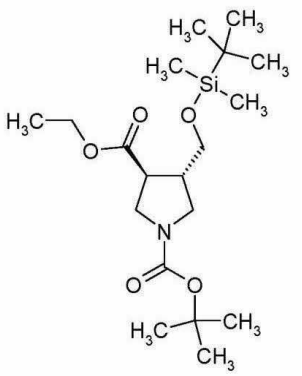
[0255] 단계 2: 트랜스-에틸-1-벤질-4-({[t-부틸(다이메틸)실릴]옥시}메틸) 피롤리딘-3-카복실레이트의 제조



[0256]

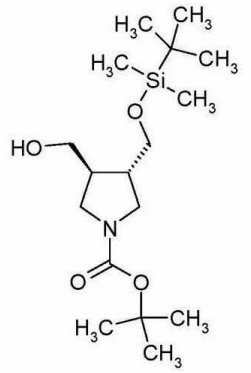
[0257] $CH_2Cl_2$(30 mL) 중 에틸(2E)-4-{[t-부틸(다이메틸)실릴]옥시}부트-2-엔오에이트(3.27 g, 13.4 mmol) 및 N-벤질-1-메톡시-N-((트라이메틸실릴)메틸)메탄아민(4.14 g, 17.5 mmol)의 용액에 TFA(0.280 mL, 3.64 mmol)를 0℃에서 첨가하였다. 반응 생성물을 실온에서 밤새 교반하였다. 혼합물을 물(50 mL)로 급랭하고, EtOAc(2 x 50 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 $MgSO_4$로 건조하고 농축하였다. 잔사를 20% EtOAc/헵탄으로 용리하는 플래시 크로마토그래피로 정제하여 담황색 오일로서 표제 화합물(2.61 g, 53% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 7.08-7.41(m, 5H), 4.10(q, J = 7.13 Hz, 2H), 3.42-3.73(m, 4H), 2.37-2.90(m, 6H), 1.22(t, J = 7.05 Hz, 3H), 0.84(s, 9H), 0.00(d, J = 1.26 Hz, 6H).

[0258] 단계 3: 트랜스-1-t-부틸 3-에틸-4-({[t-부틸(다이메틸)실릴]옥시}메틸) 피롤리딘-1,3-다이카복실레이트의 제조

[0259] 

[0260] EtOH(40 mL) 중 트랜스-에틸-1-벤질-4-({[t-부틸(다이메틸)실릴]옥시}메틸) 피롤리딘-3-카복실레이트(트랜스 혼합물)(3.25 g, 8.61 mmol)의 용액에 $Pd(OH)_2$(300 mg) 및 $Boc_2O$(1.90 g, 8.61 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 $H_2$(50 psi, 50℃)하에 밤새 교반하였다. 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하고, 여액을 농축하였다. 잔사를 5% 내지 10% EtOAc/헵탄으로 용리하는 플래시 크로마토그래피로 정제하여 무색 오일로서 표제 화합물(3.08 g, 92% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 4.13-4.25(m, 2 H) 3.65(m, 5 H) 3.14-3.29(m, 1 H) 2.84-3.00(m, 1 H) 2.47-2.70(m, 1 H) 1.46(s, 9 H) 1.27(td, J=7.11, 2.64 Hz, 3 H) 0.85-0.92(m, 9 H) 0.05(s, 6 H).

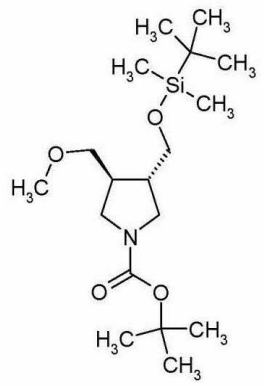
[0261] 단계 4: 트랜스-t-부틸-3-({[t-부틸(다이메틸)실릴]옥시}메틸)-4-(하이드록시메틸)피롤리딘-1-카복실레이트의 제조

[0262] 

[0263] $LiBH_4$(911 mg, 39.7 mmol)를 THF(25 mL) 중 트랜스-1-t-부틸 3-에틸-4-({[t-부틸(다이메틸)실릴]옥시}메틸)피롤리딘-1,3-다이카복실레이트(3.08 g, 7.95 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 3 시간 동안 환류 가열하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각한 후, 물(15 mL)로 급랭하고 실온에서 1 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 물(60 mL)로 희석하고 에틸 아세테이트(2 x 80 mL)로 추출하였다. 합한 유기 층을 염수로 세척하고, $Na_2SO_4$로 건조하고, 진공에서 농축하여 무색 오일을 수득하였다. 조질 생성물을 30% EtOAc/헵탄으로 용리하는 플래시 크로마토그래피로 정제하여 무색 오일로서 표제 화합물(2.34 g, 86% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, 클로로포름-

d) δ ppm 3.73(m, 1H), 3.61(m, 2H), 3.52(m, 2H), 3.45(m, 1H), 2.90-3.09(m, 2H), 2.04-2.32(m, 2H), 1.46(s, 9H), 0.92(s, 9H), 0.10(d, J = 1.01 Hz, 6H).

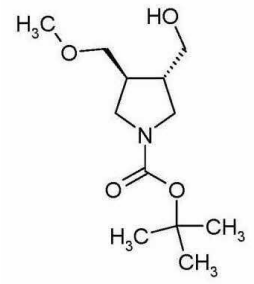
[0264] 단계 5: 트랜스-t-부틸-3-({[t-부틸(다이메틸)실릴]옥시}메틸)-4-(메톡시메틸)피롤리딘-1-카복실레이트의 제조



[0265]

[0266] 테트라부틸암모늄 요오다이드(0.110 g, 0.28 mmol), 50% 수성 NaOH(20 mL) 및 다이메틸 설페이트(0.325 mL, 3.41 mmol)를 $CH_2Cl_2$(20 mL) 중 트랜스-t-부틸-3-({[t-부틸(다이메틸)실릴]옥시}메틸)-4-(하이드록시메틸)피롤리딘-1-카복실레이트(0.982 g, 2.84 mmol)의 용액에 첨가하였다. 반응 생성물을 실온에서 밤새 교반하였다. TLC는 일부 출발 물질이 남아 있음을 보여주고, 추가 다이메틸 설페이트(0.150 mL)를 반응 혼합물에 첨가하고 실온에서 3 시간 동안 교반하였다. 수성 $NH_3OH$(30 mL)를 반응 혼합물에 첨가하고, 실온에서 1 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 물(20 mL)로 희석하고 $CH_2Cl_2$(2 x 30 mL)로 추출하였다. 유기 층을 $MgSO_4$로 건조하고 농축하였다. 잔사를 10% EtOAc/헵탄으로 용리하는 플래시 크로마토그래피로 정제하여 무색 오일로서 표제 화합물(451 mg, 44% 수율)을 수득하였다. $^1$H NMR(400 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 3.60-3.70(m, 1H), 3.55(br. s., 2H), 3.37-3.48(m, 1H), 3.34(m, 4H), 3.05-3.23(m, 2H), 2.22-2.40(m, 1H), 2.07-2.21(m, 1H), 1.43-1.49(m, 9H), 0.89(s, 9H), 0.05(s, 6H).

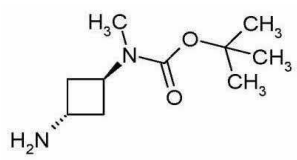
[0267] 단계 6: 트랜스-t-부틸-3-(하이드록시메틸)-4-(메톡시메틸)피롤리딘-1-카복실레이트의 제조



[0268]

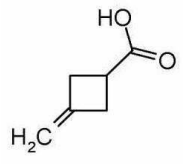
[0269] TBAF(THF 중 1.0 M, 2.45 mL, 2.45 mmol)를 THF(5 mL) 중 트랜스-t-부틸-3-({[t-부틸(다이메틸)실릴]옥시}메틸)-4-(메톡시메틸)피롤리딘-1-카복실레이트(290 mg, 0.81 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 1 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 물로 급랭하고, EtOAc로 추출하였다. 유기 층을 $MgSO_4$로 건조하고 농축하였다. 조질 생성물을 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다.

[0270] **제조예 2: t-부틸(트랜스-3-아미노사이클로부틸)메틸카바메이트의 제조**



[0271]

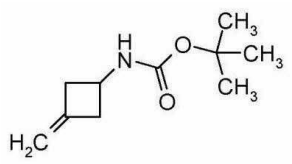
[0272] 단계 1: 3-메틸리덴사이클로부탄카복실산의 제조



[0273]

[0274] 에탄올(500 mL) 및 물(500 mL) 중 3-메틸리덴사이클로부탄카보니트릴(110 g, 1.18 mol)의 용액에 칼륨 하이드록사이드(264 g, 4.7 mol)를 첨가하고, 생성된 혼합물을 밤새 환류하였다. 에탄올을 감압하에 제거한 후, 용액을 10℃ 미만으로 냉각하고 농축 HCl을 사용하여 pH 1로 산성화하였다. 혼합물을 EtOAc(2 x 500 mL)로 농축하고, 합한 유기 추출물을 무수 나트륨 설페이트로 건조하고 진공하에 농축하여 황색 오일로서 표제 화합물(132 g, 100% 수율)을 수득하였다.

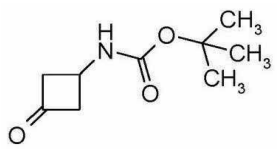
[0275] 단계 2: t-부틸(3-메틸리덴사이클로부틸)카바메이트의 제조



[0276]

[0277] t-부틸 알코올(1 L) 중 3-메틸리덴사이클로부탄카복실산(132 g, 1.17 mol) 및 $Et_3N$(178 g, 1.76 mol)의 용액에 DPPA(574 g, 1.41 mol)를 적가하고, 생성된 혼합물을 밤새 환류하였다. 이어서, 혼합물을 물(100 mL)로 급랭하였다. t-부틸 알코올을 제거한 후, 잔사를 포화 $NH_4Cl$(500 mL)로 처리하고, 남아있는 고체 침전물을 수집하고, 포화 $NH_4Cl$ 및 포화 $NaHCO_3$으로 세척하여 백색 고체로서 표제 화합물(165 g, 77% 수율)을 수득하였다.

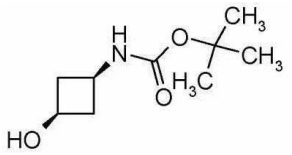
[0278] 단계 3: t-부틸(3-옥소사이클로부틸)카바메이트의 제조



[0279]

[0280] $CH_2Cl_2$(1000 mL) 및 MeOH(1000 mL) 중 t-부틸(3-메틸리덴사이클로부틸)카바메이트(165 g, 0.91 mol)의 용액에 -78℃에서 용액이 청색으로 변할 때까지 $O_3$을 발포하였다. TLC(석유 에터:EtOAc = 10:1)는 출발 물질이 완전히 소비되었음을 나타낸다. 이어서, 질소 가스를 반응 생성물을 통해 발포하여 과잉 $O_3$을 제거한 후, 혼합물을 $Me_2S$(200 mL)로 급랭하고 1 시간 동안 교반하였다. 용액을 농축하여 잔사를 수득하고, 이를 포화 $NaHCO_3$ 및 물로 세척하여 백색 고체로서 표제 화합물(118 g, 70% 수율)을 수득하였다.

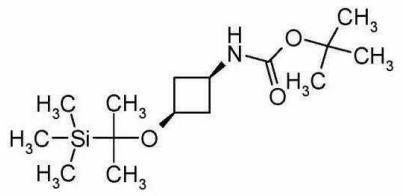
[0281] 단계 4: t-부틸(시스-3-하이드록시사이클로부틸)카바메이트의 제조



[0282]

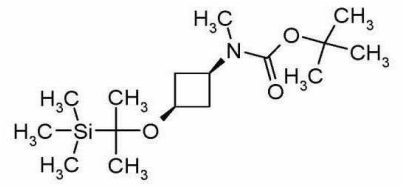
[0283] -72℃에서 THF(2000 mL) 중 t-부틸(3-옥소사이클로부틸)카바메이트(100 g, 54 mmol)의 용액에 THF 중 리튬 트라이 s-부틸하이드리도보레이트(648 mL, 1 M)의 용액을 1.5 시간에 걸쳐서 적가하였다. 생성된 용액을 실온으로 가온하고, 추가 1 시간 동안 교반하였다. TLC(석유 에터:EtOAc = 2:1)는 출발 물질이 완전히 소비되었음을 나타낸다. 반응 생성물을 수성 $NH_4Cl$로 급랭하였다. 물(1000 mL) 및 EtOAc(2000 mL)를 혼합물에 첨가하였다. 유기 층을 분리하고, $MgSO_4$로 건조하고, 농축하여 조질 물질을 수득하고, 이를 석유 에터:EtOAc(10:1 내지 1:2)로 용리하는 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 백색 고체로서 표제 화합물(62 g, 61% 수율)을 수득하였다.

[0284] 단계 5: t-부틸 {시스-3-[1-메틸-1-(트라이메틸실릴)에톡시]사이클로부틸}카바메이트의 제조

[0285] 

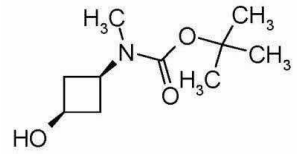
[0286] 피리딘(1 L) 중 t-부틸(시스-3-하이드록시사이클로부틸)카바메이트(62 g, 0.33 mol)의 용액에 TBSCl(159 g, 1.056 mol)을 첨가하였다. 첨가 후, 혼합물을 상온에서 밤새 교반하였다. TLC(석유 에터:EtOAc = 2:1)는 출발 물질이 완전히 소비되었음을 나타낸다. 이어서, 반응 생성물을 농축하고 EtOAc(1 L)로 희석하고, 유기 층을 분리하고, 물(3 x 300 mL) 및 염수(200 mL)로 세척하고, $MgSO_4$로 건조하고, 여과하고 농축하여 조질 표제 화합물(108 g)을 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에서 직접 사용하였다.

[0287] 단계 6: t-부틸 메틸{시스-3-[1-메틸-1-(트라이메틸실릴)에톡시]사이클로부틸}카바메이트의 제조

[0288] 

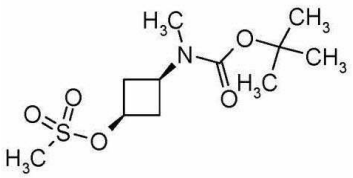
[0289] THF(1 L) 중 조질 t-부틸 {시스-3-[1-메틸-1-(트라이메틸실릴)에톡시]사이클로부틸}카바메이트(108 g)의 용액에 NaH(오일 중 60%, 39.6 g, 0.99 mol)를 나눠서 첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 30 분 동안 교반하였다. 이어서, 혼합물을 0℃로 냉각하고, 요오도메탄(140.58 g, 0.99 mol)을 적가하였다. 적가 후, 혼합물을 0℃ 내지 실온으로 밤새 교반하였다. 혼합물을 포화 $NH_4Cl$로 급랭하고, 물(200 mL)을 첨가하고, EtOAc로 추출하였다. 유기 층을 염수로 세척하고, $Na_2SO_4$로 건조한 후, 증발시켜 조질 생성물을 수득하고, 이를 실리카 겔 크로마토그래피를 통해 정제하여 오일로서 표제 화합물(68.9 g, 87% 수율)을 수득하였다.

[0290] 단계 7: t-부틸(시스-3-하이드록시사이클로부틸)메틸카바메이트의 제조

[0291] 

[0292] 피리딘(800 mL) 중 t-부틸 메틸{시스-3-[1-메틸-1-(트라이메틸실릴)에톡시]사이클로부틸}카바메이트(68.9 g, 0.217 mol)의 용액에 TBAF(62 g, 0.24 mol)를 나눠서 첨가하였다. 첨가 후, 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 증발시켜 건조하고, 잔사를 에틸 아세테이트(1000 mL)에 용해하고, 농축 $NH_4Cl$(3 x 200 mL)로 세척하였다. 유기 층을 $Na_2SO_4$로 건조하고, 여과하고 농축하여 조질 생성물을 수득하고, 이를 EtOAc/석유 에터(1/20 내지 1/5)를 사용하는 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 백색 고체로서 표제 화합물(26.3 g, 60% 수율)을 수득하였다.

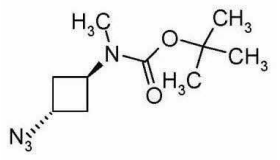
[0293] 단계 8: 시스-3-[(t-부톡시카본일)(메틸)아미노]사이클로부틸 메탄설포네이트의 제조

[0294] 

[0295] 트라이에틸아민(4.14 mL, 29.79 mmol)을 $CH_2Cl_2$(30 mL) 중 t-부틸(시스-3-하이드록시사이클로부틸)메틸카바메이

트(2.0 g, 9.93 mmol)의 용액 내에 첨가하고, 생성된 혼합물을 격렬하게 교반하면서 -30℃로 냉각하였다. 메실 클로라이드(1.36 g, 11.91 mmol)를 10 분간에 걸쳐서 적가하였다. 이어서, 혼합물을 실온으로 가온하고, TLC 분석($MeOH/CH_2Cl_2$ = 1/15)이 반응의 완료를 나타낼 때까지 1 시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 물(2 x 10 mL), 수성 $NH_4Cl$(10 mL) 및 염수(10 mL)로 세척하고, 무수 $Na_2SO_4$로 건조하고, 농축하여 황색 고체로서 표제 화합물(2.5 g, 91% 수율)을 수득하고, 이를 다음 단계를 위해 직접 사용하였다.

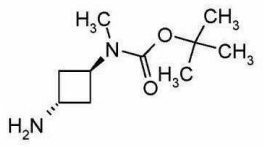
[0296] 단계 9: t-부틸(트랜스-3-아지도사이클로부틸)메틸카바메이트의 제조



[0297]

[0298] 시스-3-[(t-부톡시카본일)(메틸)아미노]사이클로부틸 메탄설포네이트(2.5 g, 8.94 mmol)를 DMF(25 mL)에 용해하고, $NaN_3$(2.84 g, 43.69 mmol)을 첨가하였다. 이어서, 생성된 혼합물을 70℃로 가열하고 밤새 교반하였다. 냉각 후, 물(150 mL)을 첨가하고, 혼합물을 EtOAc(3 x 50 mL)로 추출하였다. 합한 유기 상을 물(3 x 20 mL) 및 염수(20 mL)로 세척하고, 무수 $Na_2SO_4$로 건조한 후 진공에서 농축하여 황색 액체로서 표제 화합물(1.8 g, 89% 수율)을 수득하고, 이를 추가 정제 없이 사용하였다.

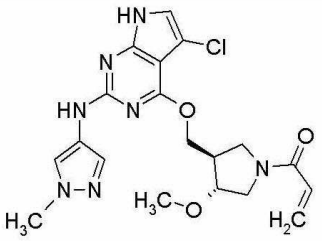
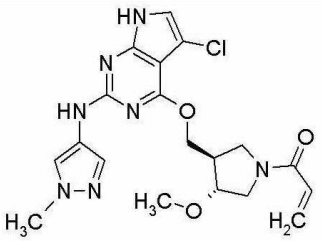
[0299] 단계 10: t-부틸(트랜스-3-아미노사이클로부틸)메틸카바메이트의 제조



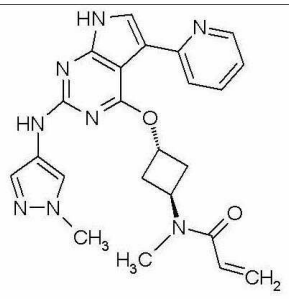
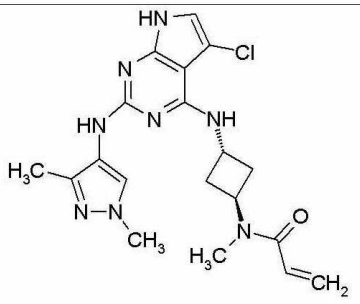
[0300]

[0301] 수소 대기(수소 풍선)하에 MeOH(5 mL) 중 t-부틸(트랜스-3-아지도사이클로부틸)메틸카바메이트(1.8 g, 7.95 mmol) 및 Pd/C(200 mg)의 혼합물에 $NH_3$(g)/MeOH(포화됨, 50 mL)를 주사기를 통해 첨가하였다. 생성된 혼합물을, TLC 분석(EtOAc:석유 에터 = 1:2)이 반응이 완료되었음을 나타낼 때까지 실온에서 3 시간 동안 교반하였다. Pd/C를 여과 제거하고, 생성된 용액을 농축하고 진공에서 건조하여 조질 표제 화합물(1.6 g)을 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계를 위해 사용하였다.

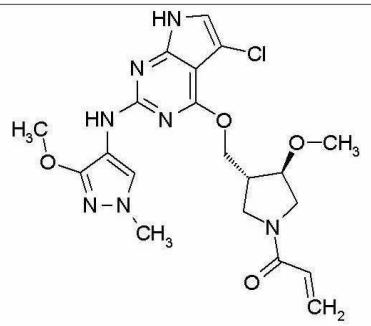
표 1

| 실시예 번호 (반응식) | 구조 및 화합물 명칭 | LRMS m/z | $^1$H NMR |
|---|---|---|---|
| 1 (반응식 F) 화합물 A의 TFA 염 |  ·TFA 1-{(3*R*,4*R*)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1*H*-피라졸-4-일)아미노]-7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온 트라이플루오로아세테이트 | 431.9 | $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 11.51(s, 1H) 9.07(s, 1H) 7.86(s, 1H) 7.52(s, 1H) 7.05(s, 1H) 6.59(ddd, J=16.75, 10.27, 1.34Hz, 1H) 6.14(dd, J=16.75, 2.32Hz, 1H) 5.68(dt, J=10.27, 2.32Hz, 1H) 4.44(d, J=6.24Hz, 2H) 3.82-4.09(m, 2H) 3.80(s, 3H) 3.57-3.76(m, 2H) 3.47-3.54(m, 1H) 3.31(d, J=4.65 Hz, 3H) 2.67-2.92(m, 1H). |
| 대체 1 화합물 A |  1-{(3*R*,4*R*)-3-[({5-클로로-2-[(1-메틸-1*H*-피라졸-4-일)아미노]-7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온 | 432.1 | $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 11.50(br. s., 1H) 9.06(s, 1H) 7.85(s, 1H) 7.51(s, 1H) 7.04(d, J=2.32Hz, 1H) 6.58(ddd, J=16.78, 10.30, 1.16 Hz, 1H) 6.13(dd, J=16.81, 2.38 Hz, 1H) 5.67(dt, J=10.33, 2.23Hz, 1H) 4.43(d, J=6.24Hz, 2H) |

[0302]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | | 3.95-4.05(m, 1H) 3.68-3.85(m, 4H) 3.56-3.66(m, 2H) 3.44-3.53(m, 1H) 3.30(d, J=4.65 Hz, 3H) 2.68-2.90(m, 1H). |
| 2<br>(반응식 I)<br><br>화합물 B | <br>*N*-메틸-*N*-[트랜스-3-({2-[(1-메틸-1*H*-피라졸-4-일)아미노]-5-(피리딘-2-일)-7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-4-일}옥시)사이클로부틸]프로프-2-엔아미드 | 445.1 | $^1$H NMR(700 MHz, DMSO) δ ppm 11.68(br. s., 1H) 8.96(s, 1H) 8.55(d, J=3.96 Hz, 1H) 8.15(d, J=7.70 Hz, 1H) 7.75-7.94(m, 2H) 7.54(d, J=8.36 Hz, 2H) 7.21(dd, J=6.93, 5.17 Hz, 1H) 6.57-6.92(m, 1H) 5.92-6.22(m, 1H) 5.61-5.82(m, 1H) 5.54(br. s., 1H) 5.25(br. s., 1H) 3.83(s, 3H) 2.97-3.15(m, 3H) 2.76(br. s., 2H) 2.34-2.49(m, 2H) |
| 3<br>(반응식 B)<br><br>화합물 C | <br>*N*-[트랜스-3-({5-클로로-2-[(1,3-다이메틸-1*H*-피라졸-4-일)아미노]-7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-4-일}아미노)사이클 | 415.1 | $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 11.16(br. s., 1H) 7.77(s, 2H) 6.88(s, 1H) 6.74(dd, J=16.63, 10.52Hz, 1H) 6.30(d, J=6.11Hz, 1H)6.07(d, J=15.89Hz, 1H) 5.66(d, J=10.03Hz, 1H) 4.81-5.19(m, 1H) 4.59(br. s., 1H) 3.71(s, 3H) 2.93- |

[0303]

| | | | |
|---|---|---|---|
| | 로부틸]-*N*-메틸프로프-2-엔아미드 | | 3.15(m, 3H) 2.62(br. s., 2H) 2.39(br. s., 2H) 2.08(s, 3H) |
| 4<br>(반응식 F)<br><br>화합물 D | <br>1-{(3*R*,4*R*)-3-[({5-클로로-2-[(3-메톡시-1-메틸-1*H*-피라졸-4-일)아미노]-7*H*-피롤로[2,3-*d*]피리미딘-4-일}옥시)메틸]-4-메톡시피롤리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온 | 462.1 | $^1$H NMR(400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 11.43(br. s., 1H) 7.80(s, 1H) 7.56(d, J=2.27Hz, 1H) 6.91(s, 1H) 6.49(dd, J=16.80, 10.23Hz, 1H) 6.04(dd, J=16.67, 2.27 Hz, 1H) 5.58(dt, J=10.29, 1.80Hz, 1H) 4.21-4.39(m, 2H) 3.89-3.99(m, 1H) 3.79-3.87(m, 1H) 3.64-3.74(m, 3H) 3.62(d, J=5.05Hz, 1H) 3.55-3.60(m, 3H) 3.45-3.54(m, 1H) 3.29-3.44(m, 1H) 3.20(d, J=4.55Hz, 3H) 2.59-2.77(m, 1H) |

[0304]

[0305] **생물학적 실시예**

[0306] **실시예 5: pEGFR Y1068 ELISA 분석**

[0307] 상이한 EGFR 돌연변이 상태를 갖는 세포에서 EGFR T790M 억제제의 효과를 프로파일하기 위해, 야생형 EGFR 및 EGFR 이중 돌연변이체(L858R+T790M, EGFR delE746-A750+T790M)를 갖는 세포에서 Tyr1068에서 EGFR의 인산화의 억제를 측정하였다. Y1068에서 EGFR의 인산화를 패쓰스캔(PathScan: 등록상표) 포스포-EGF 수용체(Try1068) 샌드위치 ELISA 키트[# 7240, 셀 시그날링 테크놀로지(Cell Signaling Technology), 미국 매사추세츠주 덴버 소재]로 측정하였다. 패쓰스캔(등록상표) 포스포-EGF 수용체(Tyr1068) 샌드위치 ELISA 키트는 포스포-EGF 수용체(Tyr1068) 단백질의 내인성 수준을 검출하는 고체 상 샌드위치 효소-연결된 면역흡착 분석(ELISA)이다. 하기 세포주를 이 분석에서 평가하였다: A549(EGFR 야생형, 내인성), NCI-H1975(EGFR L858R+T790M, 내인성), NIH3T3/EGFR_야생형, NIH3T3/EGFR L858R+T790M 및 PC9-DRH(EGFR delE746-A750 +T790M). NIH/3T3 모, A549, 및 NCI-H1975 세포를 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection: ATCC, 미국 버지니아주 매너새스 소재)으로부터 구입하였다. 모든 세포를 ATCC 권고에 따라 배양하였다. A549 세포를 10% FBS[시그마(Sigma), 미국 미주리주 세인트루이스 소재], 및 1% 페니실린/스트렙토마이신[인비트로겐(Invitrogen)]이 보충된 RPMI 배지(인비트로겐, 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)에서 배양하였다. NCI-H1975 세포를 10% FBS(시그마), 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(인비트로겐)이 보충된 RPMI(인비트로겐)에서 배양하였다. NIH/3T3 세포를 10% 갓 태어난 송아지 혈청(인비트로겐)이 보충된 DMEM(인비트로겐)에서 배양하고, NIH3T3/EGFR 돌연변이체 세포를 5 μg/mL 퓨로마이신(인비트로겐)을 갖는 완전 배지에서 배양하였다. PC9-DRH 세포를 실시예 6에 기재된 바와 같이 생성하고 배양하였다. 다양한 EGFR 구축물을 갖는 플라스미드(pLPCX)를 젠스크립트(GenScript, 미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재)를 제조하고, 이러한 구축물을 발현하는 NIH3T3 세포의 안정된 풀을 화이자(Pfizer, 미국 캘리포니아주 라호이아 소재)에서 제조하였다. 세포를 투명한 조직 배양물이 처리된 마이크로역가 플레이트[#3595, 코닝 인코포레이티드(Corning Inc), 미국 뉴욕주 코닝 소재]의 바닥에 완전 배양 배지(50 μL/웰) 중에 플레이팅하고, 밤새 37℃, 5% $CO_2$에서 부착하도록 하였다. 세포를 하기 농도로 시딩하였다: A549: 40,000/웰, NCI-H1975: 40,000/웰, NIH3T3: 20,000/웰, PC9-DRH: 50,000/웰. 다음날, 화합물 희석 플레이트를 96-웰 투명 V-바닥 0.5 mL 폴리프로필렌 차단 플레이트(#3956, 코닝 인코포레이티드) 중에 제조하였다.

모든 세포주를 각각의 화합물에 대하여 평가하지 않았다. 평가된 각각의 화합물을 DMSO 스톡 용액(10 mM)으로 제조하였다. 화합물을 11-점 연속 희석 곡선(1:3 희석)으로 각각의 플레이트에 대하여 2회 시험하였다. 화합물 처리물(50 μL)을 화합물 희석 플레이트로부터 세포 플레이트에 첨가하였다. 가장 높은 화합물 농도는 0.3% 최종 DMSO(#D-5879, 시그마) 농도와 함께 1 또는 10 μM(최종)이었다. 이어서, 플레이트를 2 시간 동안 37℃, 5% $CO_2$에서 항온처리하였다. NIH3T3/야생형 분석을 위해, 세포를 24 시간 동안 혈청 결칩시킨 후 화합물 처리하고, 세포를 기재된 바와 같이 무혈청 배지로 처리한 후 10 분 동안 EGF[100 ng/mL, 칼바이오켐/이엠디 케미칼스(Calbiochem/EMD Chemicals), 미국 뉴저지주 깁스타운 소재]로 자극하였다. A549/야생형 분석을 위해, 세포를 화합물 처리 전에 24 시간 동안 완전 혈청(10%) 배지에 플레이팅하고, 세포를 기재된 바와 같은 완전 혈청으로 처리한 후, 10 분 동안 EGF(40 ng/mL/기아 배지, 인비트로겐)로 자극하였다. 항온처리가 끝나기 직전에, 순수한 물 중 빙냉 용해 완충액[1x 세포 용해 완충액(#9803, 셀 시그날링 테크놀로지), 1 mM 나트륨 오르토바나데이트($Na_3VO_4$, #96508, 시그마), 1 mM 페닐메탄설폰일 플루오라이드(PMSF, 52332, 칼바이오켐/이엠디 케미칼스), 완전 미니 EDTA-무함유 프로테아제 억제제 칵테일 정제(1 정제/10 mL, #11836170001, 로슈(Roche), 미국 인디애나주 인디애나폴리스 소재), 및 PhosSTOP 포스파타아제 억제제 칵테일 정제(1 정제/10 mL, #04906837001, 로슈]를 제조하였다. 2 시간 끝에, 배지를 털어 버리고, 세포를 PBS 중 빙냉 1 mM $Na_3VO_4$(100 ㎕/웰, 인비트로겐)로 1회 세척하였다. 이어서, 세척액을 털어 버리고, 빙냉 용해 완충액을 세포에 첨가하였다(50 ㎕/웰). 플레이트를 20 내지 30 분 동안 4℃에서 교반하여 세포를 완전히 용해시켰다. 샘플 희석액(50 ㎕/웰)을 ELISA 플레이트에 첨가하고, 용해물(50 ㎕)을 ELISA 플레이트의 각각의 웰의 샘플 희석액으로 희석하였다. 플레이트를 밀봉하고, 교반하면서 4℃에서 밤새 항온처리하였다. 다음날, 웰을 1x 세척 완충액으로 4회 세척하고, 최종 세척 후 플레이트를 린트 프리(lint-free) 종이로 테이핑한 후 첨가 검출 항체(녹색, 100 ㎕/웰)를 각각의 웰에 첨가하고, 1 시간 동안 37℃에서 항온처리하였다. 항온처리 후, 웰을 기재된 바와 같이 세척하였다. HRP-연결된 2차 항체(적색, 100 ㎕/웰)를 각각의 웰에 첨가하고, 30 분 동안 37℃에서 항온처리하였다. 항온처리 후, 웰을 기재된 바와 같이 세척하였다. TMB 기질(100 ㎕/웰)을 각각의 웰에 첨가하고, 플레이트를 10 분 동안 37℃에서 또는 30 분 동안 최대 실온에서 항온처리하였다. 정지액(100 ㎕/웰)을 항온처리의 끝에 각각의 웰이 첨가하고, 플레이트를 몇 초 동안 부드럽게 교반하였다. 정지액을 첨가한 후 30 분 이내에 450 nm에서 흡광도용 퍼킨엘머 엔비젼 엑사이트 멀티라벨(PerkinElmer EnVision Excite Multilabel) 판독기 또는 흡광도용 몰레큘라 디바이스 스펙트라맥스(molcular Devices SpectraMax$^{384}$) 판독기로 흡광도를 판독하였다. 마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel)의 4-매개변수 맞춤을 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0308] 시험된 화합물에 대한 pEGFR Y1068 ELISA 분석의 결과를 하기 표 2에 제시하였다. T790M_L858R에 대하여 표 2에 제시된 pEGFR ELISA $IC_{50}$ 데이터는 달리 나타내지 않는 한 3T3 세포주에 대한 것이다.

*표 2*

[0309]

| 실시예 번호 | pEGFRY1068 ELISA3T3T790M_L858R $IC_{50}$(nM) | pEGFRY1068 PC9-DRH $IC_{50}$(nM) | pEGFRY1068 ELISAA549 $IC_{50}$(nM) |
|---|---|---|---|
| 1 | 7 | N/D | >4,287 |
| 대체 1 | | 15 | |
| 2 | 6(H1975) | N/D | 1650 |
| 3 | 27 | 14 | 4286 |
| 4 | 12 | 6 | >10,000 |

[0310] **실시예 6: RPC9 및 PC9-DRH 세포의 생성 및 특성화**

[0311] 단계 1: PC9 세포로부터 RPC9 세포의 생성

[0312] 모 PC9 세포에서, EGFR delE746-A750 돌연변이체 대립유전자를 증폭시켰고, 야생형 EGFR 대립유전자를 검출할 수 없었다. 모 PC9 세포를 RPC9 세포의 생성에 이용하였다. PC9 세포를 10% 열 비활성화된 FBS가 보충된 RPMI 1640 배지 중에서 37℃ 및 5% $CO_2$에서 배양하였다. EGFR 억제제 내성 세포주를 생성하기 위해, PC9 세포를 먼저 0.5 nM 다코미티닙으로 처리하였다. 세포가 90%의 점유율까지 자라면, 세포를 분열시키고 약물 농도를 2배까지 증가시켰다. 상기 처리로부터 6 주 후, PC9 세포는 2 nM 다코미티닙에서 자랄 수 있다. 단일 세포 클론

을 생성하고 추가 특성화를 위해 10개를 선택하였다. 이러한 내성 세포를 2 μM 에를로티닙을 함유하는 성장 배지에서 유지하고, 내성 PC9에 대하여 RPC9로 명명하였다.

[0313] 단계 2: 캐스트PCR(CastPCR) 분석

[0314] 게놈 DNA를, 제조자의 권고에 따라 퀴아겐(Qiagen) DNA 미니 키트를 사용하여 RPC9 세포의 클론으로부터 추출하고, 제조자(ABI)의 프로토콜에 따라 캐스트PCR(프라이머 세트: Hs00000106_wt 및 Hs00000105)에 이용하였다. ABI 돌연변이 검출기 소프트웨어를 통해 데이터를 분석하였다.

[0315] 단계 3: 세포 생존력 $IC_{50}$ 측정

[0316] 웰당 3000개의 RPC9 세포를 96-웰 플레이트[코닝(Corning)]의 성장 배지(90 ㎕)에 중복 웰로 시딩하였다. 24 시간 후, 세포를 성장 배지(10 ㎕)의 3배 희석의 11 점 역가로 다코미티닙 또는 에를로티닙으로 처리하였다. 가장 높은 최종 농도는 10 μM이었다. 72 시간 처리한 후, 세포를 제조자의 설명서에 따라 CTG 분석[프로메가(Promega)]을 통해 분석하였다.

[0317] 단계 4: EGFR T790M 돌연변이를 갖는 RPC9 세포의 특성화

[0318] 단계 1에서 생성된 10 클론에서, 생거 서열결정은 임상적으로 관련된 T790M 돌연변이에 상응하는 EGFR 엑손 20의 C>T 돌연변이를 동정하였다. 각각의 RPC9 클론 3 및 클론 6의 서열을 도 1에 제시하였다. 캐스트PCR을 통한 추가 확인은 EGFR T790M 돌연변이를 갖는 EGFR 대립 유전자가 RPC9 클론 3 및 6에 각각 10.2% 및 11.9% 존재함을 나타낸다(도 1). PC9 세포는 다코미티닙에 매우 민감하다(도 2A). 다코미티닙의 가장 낮은 농도(0.17 nM)에서 조차도 PC9 세포 생존력을 96% 억제하였다(도 2A). $IC_{50}$은 용량 반응 곡선에 따라 계산될 수 없다. RPC9 클론 3 및 6은 73 nM 및 64 nM의 $IC_{50}$에 더욱 내성이다(도 2A). RPC9 클론 3 및 6을 에를로티닙으로 처리한 경우, RPC9 클론 3 및 6은 세포 생존력 분석시 PC9 세포와 비교하여 $IC_{50}$에서 200배 이상 증가함을 보여준다(도 2B).

[0319] 따라서, EGFR T790M 돌연변이를 갖고 EGFR 억제제, 예컨대 다코미티닙 및 에를로티닙에 내성인 RPC9 세포를 생성하였다. RPC9 세포는 단일 돌연변이체(EGFR delE746-A750) 및 이중 돌연변이체(EGFR delE746-A750 및 T790M) EGFR 대립유전자 둘다의 혼합물을 함유하므로, EGFR T790M 대립유전자는 RPC9 세포의 전체 EGFR 대립유전자 중 약 10%를 구성한다.

[0320] 단계 5: PC9-DRH 세포의 생성 및 특성화

[0321] RPC9 세포 이외에, PC9-DRH 세포(DRH = 다코미티닙 내성 고 T790M)를 또한 생성하였다. 2 nM 다코미티닙에 내성인 RPC9 세포 풀을 단계 1에 기재된 바와 같이 8 주에 2 nM 내지 2 μM의 다코미티닙의 농도를 증가시켜 추가로 도전하였다. PC9-DRH 세포를 단계 1에 기재된 바와 같이 2 μM 다코미티닙을 함유하는 성장 배지에서 유지하였다. PC9-DRH 세포를 단계 2, 3 및 4에 기재된 바와 같이 분석하였다. PC9-DRH 세포는 이중 돌연변이체 EGFR delE746-A750 및 T790M과 같이 이의 EGFR 대립유전자의 70%를 함유한다. RPC9 세포와 유사하게, PC9-DRH 세포는 다코미티닙($IC_{50}$ = 1,651 nM), 에를로티닙($IC_{50}$ >10,000 nM), 및 게피티닙($IC_{50}$ >10,000 nM)에 내성이다. pEGFR Y1068 ELISA 분석에서 실시예 5에 기재된 바와 같이 사용된 경우, 2 μM 다코미티닙을 성장 배지로부터 제거하고, 세포를 36 시간 동안 자라도록 한 후 ELISA 분석에 사용하였다.

[0322] **실시예 7: EGFR T790M 억제제를 단독으로, 또는 다코미티닙 또는 에를로티닙과 함께 이용하는 RPC9 세포 생존력**

[0323] 실시예 6에 기재된 바와 같이 웰당 3000개의 RPC9 세포를 96-웰 플레이트(코닝)의 웰 중 성장 배지(90 ㎕)에 중복하여 시딩하였다. 24 시간 후, 세포를 성장 배지(10 ㎕) 중 4 nM 다코미티닙 또는 300 nM 에를로티닙을 함유하거나 함유하지 않는 3배 희석의 11 점 역가로 EGFR T790M 억제제, 화합물 A, 화합물 B, 화합물 C 또는 화합물 D 중 하나로 처리하였다. 화합물 A, 화합물 B, 화합물 C 또는 화합물 D의 가장 높은 최종 농도는 10 μM이었다. 72 시간 처리 후, 세포를 제조자의 설명서에 따라 CTG 분석(프로메가)을 통해 분석하였다.

[0324] 정지 상태에서 표준 임상적 투여 양생법으로부터 다코미티닙 및 에를로티닙 자유 혈장 농도는 각각 4 nM 및 300 nM이었다. 이러한 농도에서, 다코미티닙 및 에를로티닙은 모 PC9 세포 생존력을 완전히 억제하였다(도 2A 및 2B). 동일한 농도에서 어떤 약물도 RPC9 세포 생존력을 유의하게 억제하지 않았다(도 2A 및 2B).

[0325] RPC9 클론 6 세포에서 생존력의 억제는 화합물 A, 및 다코미티닙 또는 에를로티닙의 조합에 의해 강화되었다(도 3A 및 3B). 화합물 A의 생존력 $IC_{50}$은 4 nM 다코미티닙과 조합된 경우 17 nM이었고, 300 nM 에를로티닙과 조합

된 경우 15 nM이었다(표 3). 조합된 화합물 A에 대한 생존력 $IC_{50}$은 화합물 A를 단독으로 처리한 것과 비교하여 11배 이상 감소하였다. 유사하게, RPC9 클론 6 세포를 화합물 B로 처리한 경우, 다코미티닙 및 에를로티닙은 또한 화합물 B에 대한 ROC9 클론을 민감하게 하였다(도 4A 및 4B). 화합물 B의 $IC_{50}$은 다코미티닙과 조합하여 4 nM이고, 에를로티닙과 조합하여 5 nM이었다(표 3). 생존력 $IC_{50}$은 화합물 B를 단독으로 처리한 것과 비교하여 9.5배 및 7.6배까지 감소하였다. 중요하게, 화합물 A에 대한 계획된 인간 노출은 세포 생존력이 약 40% 억제된 화합물 A 단독 농도에서 190 nM이다. 다코미티닙 또는 에를로티닙과 조합된 경우, 동일한 농도의 화합물 A는 최대 억제(83%)를 달성하였다(도 3A 및 3B). 화합물 B와 유사하게, 계획된 인간 노출은 64% 억제된 화합물 B 단독 농도에서 90 nM이다. 또한, 조합은 84%까지 억제를 강화하였다(도 4A 및 4B). 따라서, 다코미티닙 또는 에를로티닙과 조합하여 화합물 A 및 화합물 B의 생존력 효과를 강화한다. 화합물 A 및 화합물 B 이외에, 화합물 C 및 화합물 D는 다코미티닙 및 에를로티닙의 임상적으로 관련된 농도로 상승한다(표 3).

*표 3*

[0326] RPC9 클론 6에서 EGFR T790M 억제제 단독, 또는 다코미티닙 또는 에를로티닙과의 조합의 생존력 $IC_{50}$

| | $IC_{50}$(nM) | | |
|---|---|---|---|
| 화합물 | 단일 제제 | 다코미티닙과 조합 | 에를로티닙과 조합 |
| 다코미티닙 | 67 | | |
| 에를로티닙 | 6433 | | |
| 화합물 A | 199 | 17 | 15 |
| 화합물 B | 38 | 4 | 5 |
| 화합물 C | 234 | 19 | 16 |
| 화합물 D | 441 | 30 | 21 |

[0327] 결론적으로, 임상적으로 관련된 농도에서 사용된 EGFR의 단일 돌연변이체를 특이적으로 표적하는 화합물, 예컨대 다코미티닙 및 에를로티닙은, EGFR의 이중 돌연변이체 및 단일 돌연변이체 형태를 둘다 갖는 임상적으로 관련된 모델에서 EGFR의 이중 돌연변이체 형태를 우선적으로 억제하는 화합물, 예컨대 화합물 A, 화합물 B, 화합물 C 및 화합물 D를 강화하였다.

[0328] **실시예 8: EGFR T790M 억제제를 단독으로, 또는 다코미티닙, 게피티닙 또는 아파티닙과 함께 사용하는 RPC9 클론 6 세포 생존력**

[0329] 실시예 7의 방법을 사용하여, 세포를 4 nM 다코미티닙, 20 nM 게피티닙 또는 20 nM 아파티닙을 사용하거나 사용하지 않고, EGFR T790M 억제제, 화합물 A 또는 화합물 B 중 하나로 처리하였다.

[0330] 정상 상태에서 표준 임상적 투여 양생법으로부터 다코미티닙의 자유 혈장 농도는 4 nM이다. 정상 상태에서 표준 임상적 투여 양생법으로부터 게피티닙 및 아파티닙의 자유 혈장 농도는 20 nM이다.

[0331] RPC9 클론 6 세포에서 생존력의 억제는 화합물 A를 다코미티닙, 게피티닙 또는 아파티닙과 조합하여 강화하였다(도 5A, 5B 및 5C). 유사하게, RPC9 클론 6 세포를 화합물 B로 처리한 경우, 다코미티닙, 게피티닙 또는 아파티닙은 또한 화합물 B에 대한 RPC9 클론 6을 민감하게 만든다(도 6A, 6B 및 6C). 따라서, 화합물 A 및 화합물 B는 각각 다코미티닙, 게피티닙 및 아파티닙의 임상적으로 관련된 농도까지 상승한다(도 5 및 6). 실시예 7에서의 설명과 유사하게, 화합물 A의 생존력 $IC_{50}$은 게피티닙 및 아파티닙과 조합된 경우 각각 19배 및 14배 감소하였다. 화합물 B의 $IC_{50}$은 게피티닙 및 아파티닙과 조합된 경우 각각 10배 및 8배 감소하였다.

[0332] 결론적으로, 임상적으로 관련된 농도에서 사용된, EGFR의 단일 돌연변이체 형태를 특이적으로 표적하는 화합물, 예컨대 다코미티닙, 게피티닙 또는 아파티닙은 EGFR의 이중 돌연변이체 및 단일 돌연변이체 형태를 둘다 갖는 임상적으로 관련된 모델에서 EGFR의 이중 돌연변이체 형태를 우선적으로 억제하는 화합물, 예컨대 화합물 A 및 화합물 B를 강화하였다.

[0333] **실시예 9: 대립유전자 혼합물 모델에서 EGFR T790M 억제제와 다코미티닙 또는 에를로티닙의 조합**

[0334] 방법

[0335] 세포 배양: RPC9 클론 6 세포를 실시예 6에 기재된 바와 같이 제조하고 서브클로닝하였다. 세포를 10% FBS를

갖는 RPMI에서 배양하고, 선택압 하에 유지하였다(2 nM 다코미티닙). 실험을 위해, 선택압을 제거하고, 세포를 10 cm 접시 위에 플레이팅하고 밤새 항온처리하여(37℃, 5% $CO_2$) 처리를 위한 70 내지 80% 점유율을 달성하였다.

[0336] 처리: 다코미티닙, 에를로티닙, 화합물 A 및 화합물 B를 100% DMSO에 용해하였다. 다코미티닙(4 nM) 및 에를로티닙(300 nM)을 표준 임상적 투여 양생법으로부터의 자유 혈장 노출에서 사용하였다. 화합물 A 및 화합물 B를 각각 표적 조절 $IC_{50}$ 값 미만에서 출발하고 각각의 화합물에 대한 예상된 임상적 자유 혈장 노출까지의 범위에서 사용하였다. 세포를 다코미티닙 또는 에를로티닙 및/또는 화합물 A 또는 화합물 B의 역가로, 또는 대조군(DMSO)으로 처리하였다. 6 시간 동안 처리를 적용하고, 항온처리 기간의 끝에서, 세포 펠렛을 수집하고 분석을 위한 준비가 될 때까지 냉동시켰다.

[0337] 면역블로팅: 세포 펠렛을 1 mM $Na_3VO_4$, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, 1 mM β-글리세로포스페이트, 프로테아제 억제제 칵테일(로슈(Roche), 미국 인디애나주 인디애나폴리스 소재) 및 포스파타아제 억제제 칵테일(로슈)이 보충된 용해 완충액(150 mM NaCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 50 mM HEPES, 10% 글리세롤, 1 mM EGTA, 1% 트리톤(Triton: 등록상표) X-100, 0.5% NP-40)으로 처리하였다. 세포 용해물의 단백질 농도를 제조자의 설명서에 대하여 BCA 단백질 분석[피어스/써모 피셔 사이언티픽(Pierce/Thermo Fisher Scientific), 미국 일리노이주 락포드 소재]을 사용하여 측정하였다. 단백질(10 μg)을 SDS-PAGE로 분해하고, 니트로셀룰로스 막[바이오-라드 크리테리온(Bio-Rad Criterion: 상표) 시스템, 미국 캘리포니아주 에르쿨레스 소재] 위로 옮겼다. 블롯을 1차 항체로 침지하여 관심 단백질을 검출하였다. EGFR, pEGFR Y1068, AKT, pAKT S473, ERK 및 pERK T202/204 항체를 셀 시그날링 테크놀로지 인코포레이티드(Cell Signaling Technology, Inc., 미국 매사추세츠주 댄버스 소재)로부터 구입하였다. GAPDH 항체는 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology, 미국 캘리포니아주 산타 크루즈 소재)로부터 구입하였다. 2차 항체로 항온처리한 후, 화학발광(피어스/써모 피셔 사이언티픽)으로 막을 시각화하고, 플루오르켐 큐 이미징(FluorChem Q Imaging) 시스템[프로틴심플(ProteinSimple), 미국 캘리포니아주 산타 클라라 소재]으로 밀도측정을 수행하였다.

[0338] 결과

[0339] 다코미티닙 및 화합물 A 둘다로 처리된 세포는 2가지 가장 낮은 용량(다코미티닙으로 77% 억제, 10 nM 화합물 A로 24% 억제 대 다코미티닙 + 10 nM 화합물 A로 91% 억제; 30 nM 화합물 A로 21% 억제 대 다코미티닙 + 30 nM 화합물 A로 99% 억제)에서 조합 요법 대 단일 제제 요법의 더 큰 효과와 일치하는 pEGFR 신호화 감소를 나타낸다(도 7A, 8A). 이러한 조합은 가장 낮은 용량(다코미티닙으로 34% 억제, 10 nM 화합물 A로 27% 억제 대 다코미티닙 + 10 nM 화합물 A로 100% 억제)에서 pERK 신호화의 첨가제 억제 및 다음의 가장 높은 투여량(다코미티닙으로 34% 억제, 30 nM 화합물 A로 64% 억제 대 다코미티닙 + 30 nM 화합물 A로 99% 억제)에서 부가 효과보다 더 크게 나타났다(도 7A, 8C). 많은 용량의 단일 제제 요법은 pEGFR 및 pERK 신호화의 더 큰 억제를 야기하고; 분석시 관찰된 최대 억제에 의해 가성성 계산을 제한하였다. 반대로, pAKT의 억제는 최저 농도(다코미티닙으로 37% 억제, 10 nM 화합물 A로 22% 억제 대 다코미티닙 + 10 nM 화합물 A로 66% 억제)에서 부가되는 것으로 보이지만, 더 높은 용량에서조차도 60 내지 65% 이하의 억제를 달성한다(도 7A, 8B).

[0340] 에를로티닙 및 화합물 A 둘다로 처리된 세포는 pEGFR 신호화에서 화합물 A의 3가지 최저 농도(에를로티닙으로 61% 억제, 10 nM 화합물 A로 41% 억제 대 에를로티닙 + 10 nM 화합물 A로 86% 억제; 30 nM 화합물 A로 27% 억제 대 에를로티닙 + 30 nM 화합물 A로 91% 억제; 100 nM 화합물 A로 16% 억제 대 에를로티닙 + 100 nM 화합물 A로 95% 억제)에서 단일 약제 요법의 첨가제 효과보다 더 큰 감소를 나타낸다(도 7B, 9A). 이러한 처리는 pERK 신호화의 첨가제 억제보다 2가지 최저 용량(에를로티닙으로 31% 억제, 10 nM 화합물 A로 38% 억제 대 에를로티닙 + 10 nM 화합물 A로 100%; 30 nM 화합물 A로 54% 억제 대 에를로티닙 + 30 nM 화합물 A로 100%)에서 더 크게 나타났다(도 7B, 9C). 고용량의 단일 제제 요법은 pEGFR 및 pERK 신호화의 더 큰 억제를 야기하고; 가성성 계산은 분석에서 관찰된 최대 억제에 의해 제한되었다. 반대로, pAKT의 억제는 화합물 A(에를로티닙으로 18% 억제, 10 nM 화합물 A로 3% 억제 대 에를로티닙 + 10 nM 화합물 A로 48%; 도 7B, 9B)의 최저 농도에서의 첨가제 및 2번째 최고 용량(에를로티닙으로 18% 억제, 30 nM 화합물 A로 31% 억제 대 에를로티닙 + 30 nM 화합물로 49%; 도 7B, 9B)에서의 첨가제보다 더 큰 것으로 나타났지만, 심지어 고용량에서 50% 이하의 억제를 달성하였다.

[0341] 다코미티닙 및 화합물 B로 처리된 세포는 2개의 최저 용량(다코미티닙으로 54% 억제, 3 nM 화합물 B로 46% 억제 대 다코미티닙 + 3 nM 화합물 B로 81%; 10 nM 화합물 B로 17% 억제 대 다코미티닙 + 10 nM 화합물 B로 90%)에

서 단일 제제 요법의 첨가제 효과 및 2번째 최고 용량(다코미티닙으로 54% 억제, 30 nM 화합물 B로 33% 억제 대 다코미티닙 + 30 nM 화합물 B로 90%)에서의 첨가제보다 더 큰 pEGFR 신호화에서 감소를 나타낸다(도 10A, 11A). 이러한 동일한 세포는 최저 용량(다코미티닙으로 57% 억제, 3 nM 화합물 B로 55% 억제 대 다코미티닙 + 3 nM 화합물 B로 100%; 도 10A, 11C)에서 pERK 신호화의 첨가제 억제를 나타낸다. 고용량의 단일 제제 요법은 pEGFR 및 pERK 신호화의 더 큰 억제를 야기하고; 분석시 관찰된 최대 억제에 의해 가성성 계산을 제어하였다. 반대로, pAKT의 억제는 심지어 고용량에서 72% 이하의 억제를 달성하였고, 첨가제 결과보다 일부 또는 더 크게 달성하지 않았다(도 10A, 11B).

[0342] 에를로티닙 및 화합물 B로 처리된 세포는 화합물 B의 모든 농도(에를로티닙으로 12% 억제, 3 nM 화합물 B로 2% 억제 대 에를로티닙 + 3 nM 화합물 B로 74%; 10 nM 화합물 B로 8% 억제 대 에를로티닙 + 10 nM 화합물 B로 66% 억제; 30 nM 화합물 B로 22% 억제 대 에를로티닙 + 30 nM 화합물 B로 82%; 100 nM 화합물 B로 60% 억제 대 에를로티닙 + 100 nM 화합물 B로 84%)에서 단일 제제 요법의 첨가제 효과보다 더 큰 pEGFR 신호화에서 감소를 나타낸다(도 10B, 12A). 이러한 처리는 화합물 B의 최저 투여량(에를로티닙으로 41% 억제, 3 nM 화합물 B로 39% 억제 대 에를로티닙 + 3 nM 화합물 B로 99%)에서 pERK 신호화의 첨가제 억제보다 더 크게 보여졌다(도 10B, 12C). 고용량의 단일 제제 요법은 pEGFR 및 pERK 신호화의 더 큰 억제를 야기하고; 분석에서 관찰된 최대 억제에 의해 가성성 계산을 제한하였다. 반대로, pAKT의 억제는 화합물 B의 최저 농도(에를로티닙으로 29% 억제, 3 nM 화합물 B로 15% 억제 대 에를로티닙 + 3 nM 화합물 B로 54%)에서 첨가제보다 더 큰 것으로 보여졌지만, 심지어 고용량에서 62% 이하의 억제를 달성하였다(도 10B, 12B).

[0343] **실시예 10: RPC9 클론 6(다코미티닙 및 에를로티닙 내성) 이종이식 모델에서 EGFR T790M 억제제와 다코미티닙 또는 에를로티닙의 조합**

[0344] 배경:

[0345] RPC9 클론 6 세포를 실시예 6에 기재된 바와 같이 모 PC9 세포로부터 생성하였다. 모 PC9 세포는 EGFR delE746-A750을 함유하고, 다코미티닙 및 에를로티닙의 처리에 민감하다. RPC9 클론 6 세포주는 다코미티닙(daco)으로의 용량-증가 처리에 의해 생성된 선택된 내성 클론 중 하나이었다. RPC9 클론 6 세포는 약 10%의 EGFR delE746-A750 및 T790M, 및 90%의 EGFR delE746-A750 대립유전자를 함유한다. 따라서, 생체내 분석에서, RPC9 클론 6은 EGFR delE746-A750 및 T790M 대립유전자로 인해 다코미티닙/에를로티닙 단일 제제 처리에 내성일 뿐만 아니라 EGFR delE746-A750 대립유전자로 인해 화합물 A(화합물 A) 및 화합물 B(화합물 B) 단일 제제 처리에 내성이었다. 화합물 A 또는 화합물 B와 임상적으로 관련된 농도의 다코미티닙 또는 에를로티닙의 조합은 EGFR 신호 경로의 상승적인 억제를 통해 세포 생존력에 대한 상승적인 효과를 생성하였다. 따라서, 생체내 동물 연구를 수행하여 화합물 A 또는 화합물 B와 다코미티닙 또는 에를로티닙의 조합이 RPC9 클론 6 이종이식 모델에서 상승적인 항종양 효과를 생성할 수 있는지 여부를 평가하였다.

[0346] 방법:

[0347] 4주령 내지 6주령의 SCID 베이지 암컷 마우스를 찰스 리버 랩(Charles River lab)으로부터 수득하고, 화이자 라 호이아(Pfizer La Jolla) 동물 시설에서 가압된 환기 우리에서 유지하였다. 모든 연구는 화이자 기관 동물 관리 및 사용 위원회(Pfizer Institutional Animal Care and Use Committees)에 의해 승인되었다. 재구성된 기저 막[마트리겔(Matrigel), 비디 바이오사이언시스(BD Biosciences)]으로 1:1(v/v) 현탁된 5 x $10^6$ RPC9 클론 6 세포를 피하로 주사하여 종양을 수립하였다. 종양 성장 억제(TGI) 연구를 위해, 약 300 $mm^3$의 수립된 종양을 가진 마우스를 선택하고 무작위화한 후, 제시된 용량 및 양생법을 사용하여 단일 제제로서 EGFR T790M 억제제, 또는 다코미티닙 또는 에를로티닙과 함께 처리하였다. 버니어 캘리퍼를 사용하여 종양 치수를 측정하고, 수학식: π/6 x 큰 직경 x(작은 직경)$^2$를 사용하여 종양 부피를 계산하였다. 종양 성장 억제(%)(TGI%)를 100 x (1-T/-C)로 계산하였다. 종양 퇴행(%)를 100 x(1-T/출발 종양 크기)로 계산하였다.

[0348] 화합물 A를 0.5% 메토셀/20 mM 트리스 완충액(pH 7.4) 중 스프레이 건조된 분산 현탁액으로 제형화하였다. 화합물 B를 동일반응계에서 0.5% 메토셀을 함유하는 락테이트 염 용액으로 제형화하였다. 다코미티닙을 0.1 M 락트산 용액(pH 4.5)으로 제형화하였다. 에를로티닙을 40% 캅티솔(Captisol: 등록상표)로 제형화하였다. 모든 약물을 제형화하고 10 mL/kg의 농도로 투여하였다. 종양을 가진 마우스에 제시된 처리로 경구로 매일 투여하고, 체중 및 건강 관찰은 매일 기록하였다.

[0349] 결과:

[0350] 연구 I: 화합물 A 및 다코미티닙의 조합

[0351] 이 연구에서, RPC9 클론 6 종양을 가진 마우스를 무작위화하고 화합물 A 또는 다코미티닙의 단일 제제로, 또는 화합물 A와 다코미티닙을 함께 처리하였다. 5 mg/kg에서 다코미티닙은 마우스 혈장에서 4 nM의 평균 미조합 약물 농도를 제공하였고, 이는 45 mg/kg/일의 임상 투여량으로부터의 평균 임상 노출에 부합한다. 체중 변화(%)를 도 13B에 제시하였고, 이 연구의 모든 투여량 군은 10% 미만의 체중 손실을 잘 견디는 것으로 나타났다. 화합물 A를 도 13A에 제시된 바와 같이 500 mg/kg, 200 mg/kg, 및 단일 제제로서 50 mg/kg 또는 5 mg/kg으로 다코미티닙과 함께 투여하였다. 39일에, 비히클 군의 종양 크기가 평균 1200 $mm^3$에 달하는 경우, 도 13A 및 표 4에 도시된 바와 같이 다코미티닙의 단일 제제 처리는 종양 성장 정체를 발생시키고 화합물 A의 단일 제제 처리는 용량-의존성 종양 성장 억제를 발생시켰다. 화합물 A와 다코미티닙의 모든 투여량 범위의 조합은 표 4에 도시된 바와 같이 완전 종양 퇴행을 발생시켰다.

[0352] 종양 퇴행시 조합 효과를 추가로 평가하기 위해, 화합물 A의 단일 처리 군 및 조합 치료 군의 마우스는 연구일로부터 61일까지 200 mg/kg 및 50 mg/kg을 계속 받았다. 종양 성장 억제 및 종양 퇴행을 계산하고 표 4에 제시하였다. 결과는, (1) 화합물 A와 다코미티닙의 조합은 모든 투여량 범위에서 완전 종양 퇴행을 발생시키고, (2) 화합물 A의 단일 제제 처리 군에서의 종양은 200 mg/kg 및 50 mg/kg 모두에서 EGFR delE746-A750 대립유전자에 의해 구동될 수 있는 시험관 내 내성에서 유사한 용량-의존 방식으로 진행되고, (3) 다코미티닙의 단일 처리 군에서의 종양은 또한 이 RPC9 클론 6 이종이식 모델에서 EGFR delE746-A750 및 T790M 대립유전자에 의해 구동될 수 있는 시험관내 내성에서 유사하게 진행됨을 나타낸다.

[0353] 또한, 처리 기간을 단일 제제 처리 및 조합 처리에 의한 시험관내 내성을 평가하기 위해 연장하였다. 다코미티닙의 단일 처리 군은 계속 진행하고, 종양 크기가 1200 $mm^3$을 초과할 때 74 일에 종료하였다. 마찬가지로, 200 mg/kg의 화합물 A의 단일 처리 군을 계속 진행하고, 종양 크기가 1400 $mm^3$을 초과할 때 95 일에 종료하였다. 따라서, 다코미티닙 또는 화합물 A의 단일 처리 군에서의 종양은 계속 진행되고, 생체내 내성이 시험관내 특성과 유사함을 입증하였다. 다코미티닙 및 50 mg/kg의 화합물 A의 조합 군은 100% TGI를 달성할 수 있을 뿐만 아니라, 다코미티닙 및 200 mg/kg의 화합물 A의 조합은 도 13A 및 표 4에 제시된 바와 같이 120 일의 연구 종료까지 종양 퇴행을 유지하였다.

*표 4*

[0354] 연구 I에서 종양 성장 억제 및 퇴행

| 연구 일 | 제 39 일 | | 제 61 일 | | 제 120 일 | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | TGI | 퇴행 | TGI | 퇴행 | TGI | 퇴행 |
| daco_5 mg/kg | 96% | | 45% | | NA[b] | |
| 화합물 A_500 mg/kg | | 7% | | NA* | | |
| 화합물 A_200 mg/kg | 91% | | 65% | | NA[c] | |
| 화합물 A_50 mg/kg | 68% | | NA[a] | | | |
| 화합물 A_500 mg/kg + daco_5 mg/kg | | 100% | | NA* | | |
| 화합물 A_200 mg/kg + daco_5 mg/kg | | 100% | | 100% | 100% | |
| 화합물 A_50 mg/kg + daco_5 mg/kg | | 100% | | 100% | | 80% |

*: 이 연구 군은 조합 아암에 대하여 종양이 전혀 검출되지 않았으므로 39일에 종료되었고 동물은 안전성 종점에 대해 사용되었다.

[a]: 이 연구 군은 53일에 종료되었고, 평균 종양 부피는 1200 $mm^3$을 초과하였다.

[b]: 이 연구 군은 74일에 종료되었고, 평균 종양 부피는 1200 $mm^3$을 초과하였다.

[c]: 이 연구 군은 95일에 종료되었고, 평균 종양 부피는 1400 $mm^3$을 초과하였다.

[0355] 연구 II: 화합물 B 및 다코미티닙의 조합

[0356] 이 연구에서, RPC9 클론 6 종양을 가진 마우스를 무작위화하여 화합물 B 또는 다코미티닙의 단일 제제로, 또는

화합물 B와 다코미티닙의 조합으로 처리하였다. 다코미티닙을 5 mg/kg 및 1.5 mg/kg 투여하였다. 화합물 B를 도 14A에 제시된 바와 같이 50 mg/kg, 15 mg/kg 및 5 mg/kg 투여하였다. 체중 변화(%)를 도 14B에 플롯팅하고, 이 연구의 모든 투여 군은 10% 미만의 체중 손실을 잘 견뎠다. 제 36 일에, 비히클 군의 종양 크기가 평균 1000 $mm^3$에 도달할 때, 다코미티닙의 단일 제제 처리는 도 15A에 도시된 바와 같이 용량-의존성 종양 성장 억제를 발생시켰다. 5 mg/kg 및 15 mg/kg의 화합물 B의 단일 제제 처리는 극심한 낮은 투여로 인해 유의하게 효과적이지 않은 반면, 50 mg/kg의 화합물 B의 단일 제제 처리는 도 15A에 제시된 바와 같이 47% TGI를 제공하였다. 화합물 B 및 다코미티닙의 조합은 도 15B에 도시된 바와 같이 용량-의존성 종양 퇴행을 발생시켰다. 종양 성장 억제 및 퇴행을 계산하고 하기 표 5에 제시하였다.

*표 5*

[0357] 연구 II에서 종양 성장 억제 및 퇴행

| 연구 일 | 제 36 일 | |
|---|---|---|
| | TGI | 퇴행 |
| 다코미티닙 5 mg/kg | 97% | |
| 다코미티닙 1.5 mg/kg | 80% | |
| 화합물 B_50 mg/kg | 47% | |
| 화합물 B_15 mg/kg | 2% | |
| 화합물 B_5 mg/kg | 18% | |
| 화합물 B_50 mg/kg + 다코미티닙 5 mg/kg | | 92% |
| 화합물 B_15 mg/kg + 다코미티닙 5 mg/kg | | 72% |
| 화합물 B_5 mg/kg + 다코미티닙 5 mg/kg | | 52% |
| 화합물 B_50 mg/kg + 다코미티닙 1.5 mg/kg | | 31% |

[0358] 연구 III: 화합물 A 및 에를로티닙의 조합

[0359] 이 연구에서, RPC9 클론 6 종양을 가진 마우스를 무작위화하고 화합물 A 또는 에를로티닙의 단일 제제로, 또는 화합물 A와 에를로티닙의 조합으로 처리하였다. 25 mg/kg의 에를로티닙은 마우스 혈장에서 300 nM의 평균 미조합된 약물 농도를 제공하였고, 이는 평균 임상 노출에 부합한다. 체중 변화(%)를 도 16B에 제시하고, 이 연구에서 모든 투여량 군은 10% 미만의 체중 손실을 잘 견뎠다. 화합물 A를 도 16A에 제시된 바와 같이 단일 제제로서 400 mg/kg, 200 mg/kg, 및 50 mg/kg으로, 또는 에를로티닙과 함께 25 mg/kg을 투여하였다. 45 일에, 비히클 군의 종양 크기가 1500 $mm^3$을 초과하여 도달하는 경우, 도 16A 및 표 6에 예시된 바와 같이 에를로티닙의 단일 제제 처리는 51% 종양 성장 억제를 발생시켰고, 화합물 A의 단일 제제 처리는 용량-의존성 종양 성장 억제를 발생시켰다. 화합물 A와 에를로티닙의 모든 투여량 범위의 조합은 표 6에 예시된 바와 같이 종양 퇴행을 발생시켰다.

[0360] 종양 퇴행에 대한 조합 효과를 추가로 평가하기 위해, 200 mg/kg 및 50 mg/kg으로 화합물 A의 단일 군 및 조합 처리 군의 마우스에 73일까지 계속 투여하였다. 종양 성장 억제 및 종양 퇴행을 계산하고 표 6에 예시하였다. 다코미티닙과 조합하는 연구 I의 결과와 유사하게, 이 연구로부터의 결과는 또한 화합물 A와 에를로티닙의 조합이 모든 투여량 범위에서 종양 퇴행을 발생시키고, 화합물 A 또는 에를로티닙의 단일 제제 처리 군에서의 종양은 진행을 계속하여, del 또는 del/T790M 대립유전자에 의해 구동된 생체내 내성을 시사하였다.

[0361] 따라서, 결론적으로, 화합물 A와 다코미티닙 또는 에를로티닙의 조합은 내성 RPC9 클론 6 이종이식 모델에서 종양 퇴행을 유도하는 상승적인 항종양 활성을 달성하였다.

*표 6*

[0362] 연구 III에서 종양 성장 억제 및 퇴행

| 연구 일 | 제 45 일 | | 제 73 일 | |
|---|---|---|---|---|
| | TGI | 퇴행 | TGI | 퇴행 |
| 에를로티닙 25 mg/kg | 51% | | NA[a] | |
| 화합물 A 400 mg/kg | | 39% | | NA* |
| 화합물 A 200 mg/kg | 94% | | 76% | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 화합물 A 50 mg/kg | 63% | | NA[b] | |
| 화합물 A 400 mg/kg + 에를로티닙 25 mg/kg | | 92% | | NA* |
| 화합물 A 200 mg/kg + 에를로티닙 25 mg/kg | | 80% | | 75% |
| 화합물 A 50 mg/kg + 에를로티닙 25 mg/kg | | 44% | | 35% |

*: 이 연구 군은 조합 아암에 대하여 종양이 전혀 검출되지 않았으므로 45일에 종료되었고 동물은 안전성 종점에 대해 사용되었다.

[a]: 이 연구 군은 52일에 종료되었고, 평균 종양 부피는 1500 $mm^3$을 초과하였다.

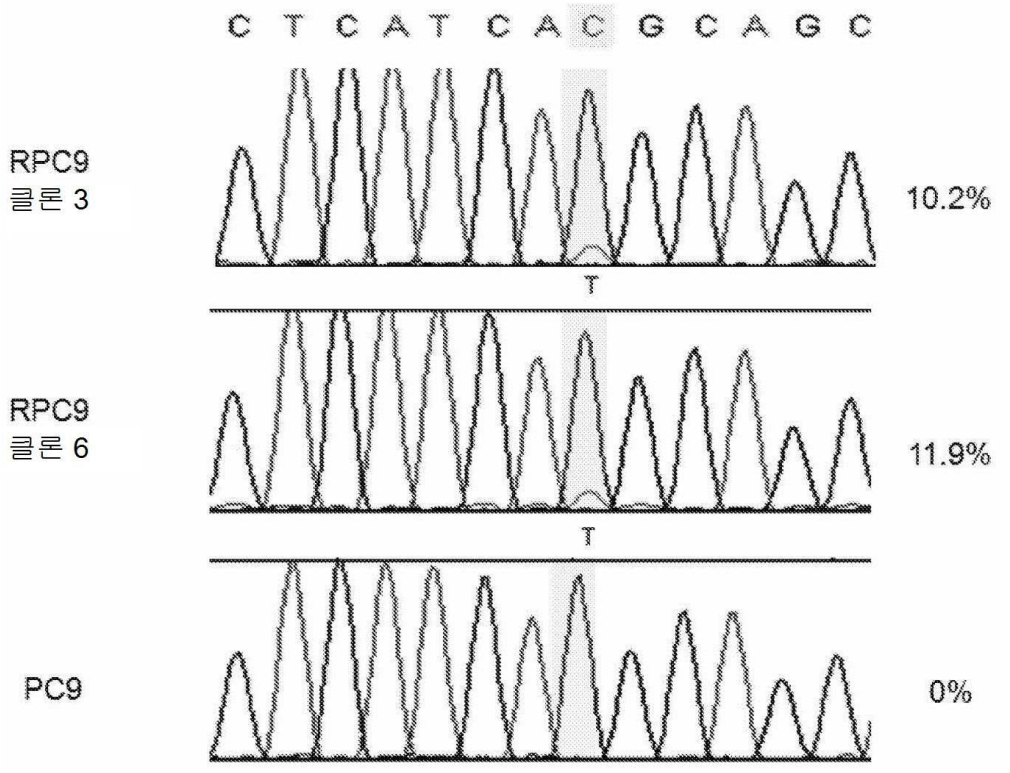
[b]: 이 연구 군은 55일에 종료되었고, 평균 종양 부피는 1500 $mm^3$을 초과하였다.

[0363] 결론:

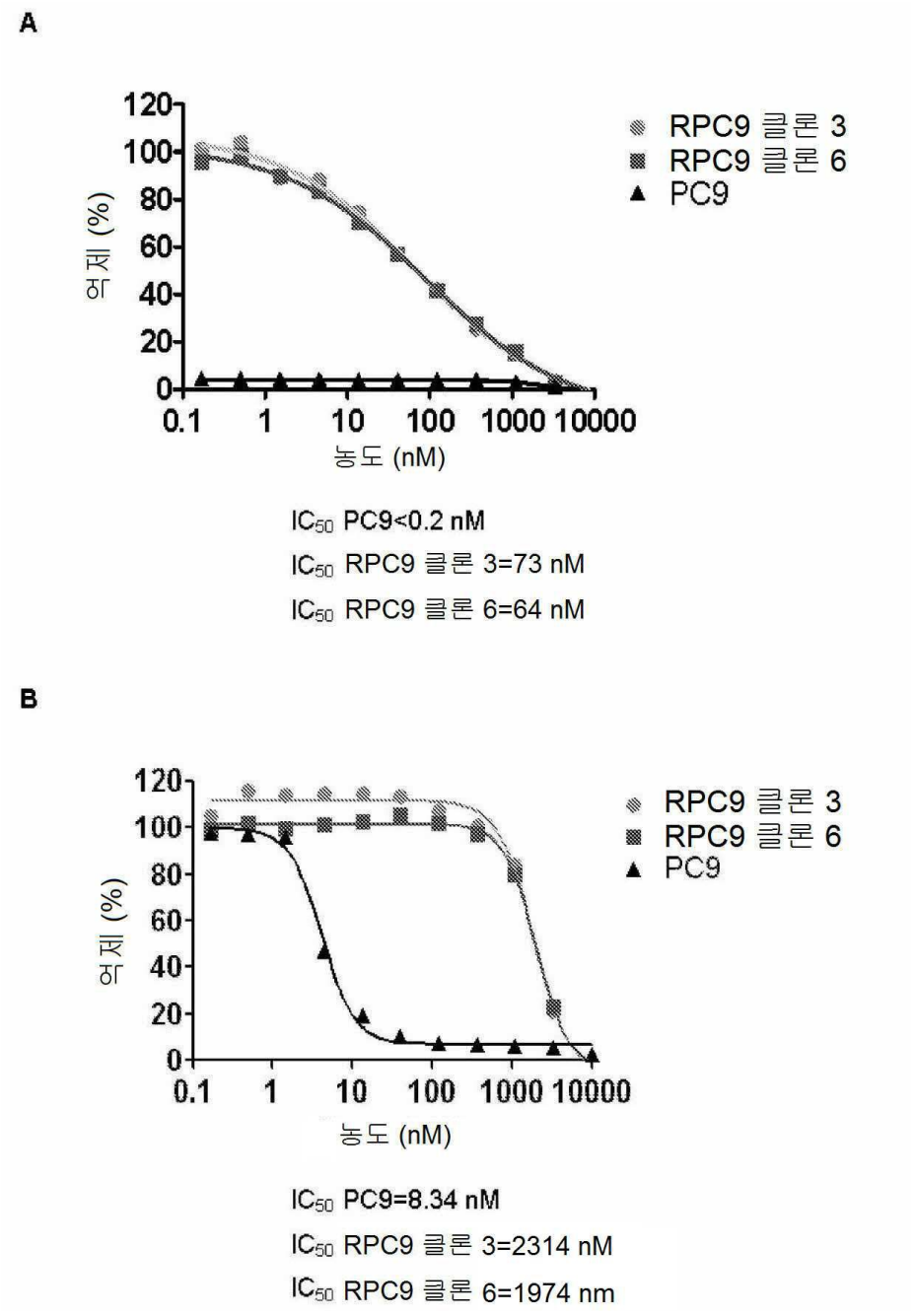
[0364] EGFR delE746-A750 및 EGFR delE746-A750/T790M 대립유전자 둘다를 갖는 RPC9 클론 6 이종이식 모델은 단일 제제 치료로서 화합물 A, 화합물 B, 다코미티닙 또는 에를로티닙으로 처리된 경우 종양 진행을 나타냈다. 상기 모델은 조합 요법으로서 고용량의 화합물 A, 및 다코미티닙 또는 에를로티닙의 임상적으로 관련된 투여량으로 처리된 경우 완전 퇴행을 보여주고, 또한 화합물 B 및 다코미티닙의 적은 용량으로 처리된 경우 용량-의존성 종양 퇴행을 보여주었다. 따라서, 현재 전임상적 동물 연구는, EGFR T790M 선택적인 억제제와 다코미티닙 또는 에를로티닙의 조합 요법이 선천적 및 후천적 FR 돌연변이 둘다를 갖는 NSCLC 환자에서 EGFR T790M 임상적 후보를 개발하는데 기전 기초의 강력하고 임상적으로 변환가능한 전략임을 성공적으로 입증하였다.

## 도면

### 도면1

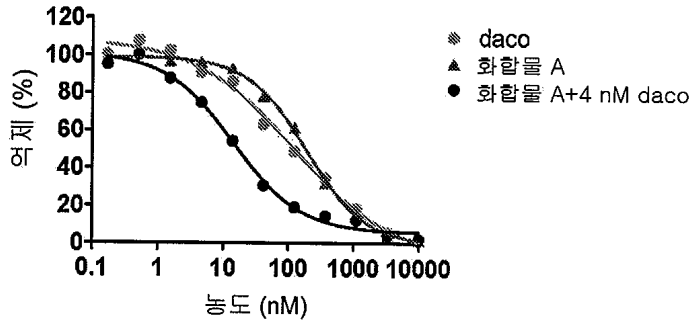


도면2

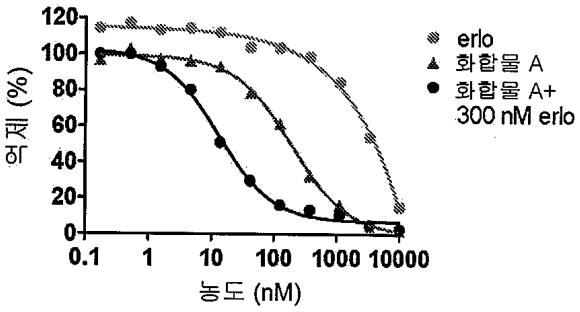

A
120
100
80
60
40
20
0
억제 (%)
0.1
1
10
100
1000
10000
농도 (nM)
RPC9 클론 3
RPC9 클론 6
PC9
IC50 PC9<0.2 nM
IC50 RPC9 클론 3=73 nM
IC50 RPC9 클론 6=64 nM
B
120
100
80
60
40
20
0
억제 (%)
0.1
1
10
100
1000
10000
농도 (nM)
RPC9 클론 3
RPC9 클론 6
PC9
IC50 PC9=8.34 nM
IC50 RPC9 클론 3=2314 nM
IC50 RPC9 클론 6=1974 nm

도면3

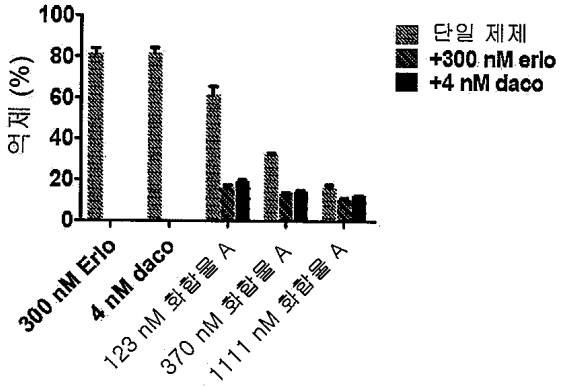
A


120
100
80
60
40
20
0
억제 (%)
0.1
1
10
100
1000
10000
농도 (nM)
daco
화합물 A
화합물 A+4 nM daco

B

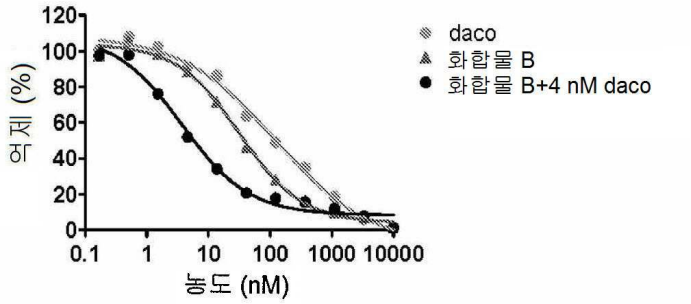

120
100
80
60
40
20
0
억제 (%)
0.1
1
10
100
1000
10000
농도 (nM)
erlo
화합물 A
화합물 A+
300 nM erlo

C

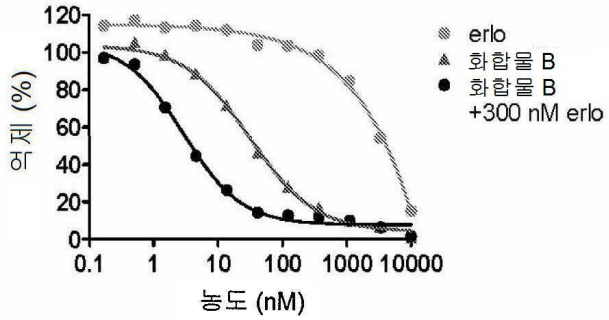

100
80
60
40
20
0
억제 (%)
단일 제제
+300 nM erlo
+4 nM daco
300 nM Erlo
4 nM daco
123 nM 화합물 A
370 nM 화합물 A
1111 nM 화합물 A

도면4

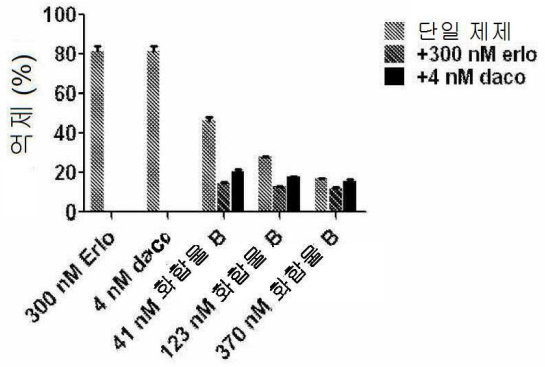
A


억제 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
1000
10000
농도 (nM)
daco
화합물 B
화합물 B+4 nM daco

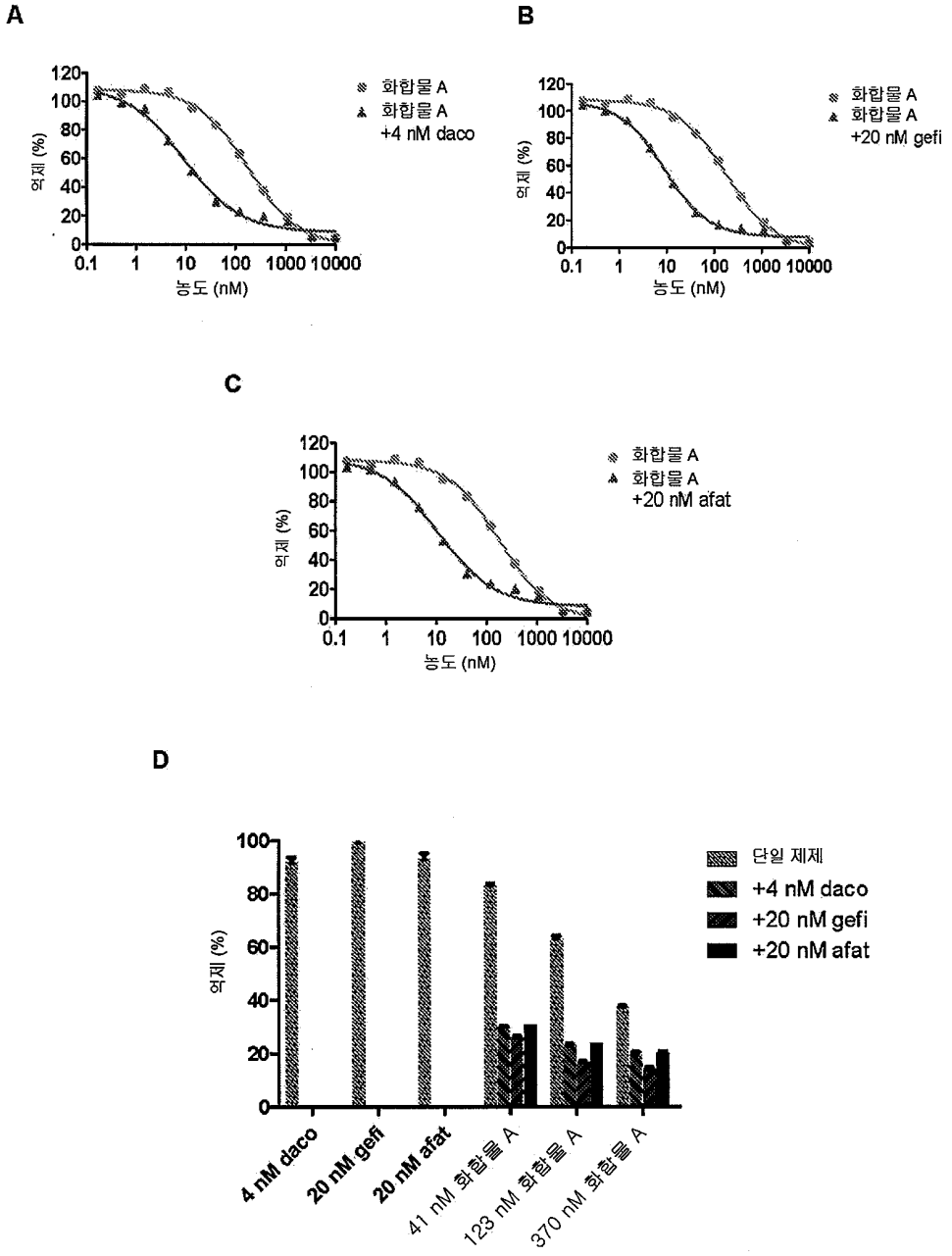
B


억제 (%)
120
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
1000
10000
농도 (nM)
erlo
화합물 B
화합물 B
+300 nM erlo

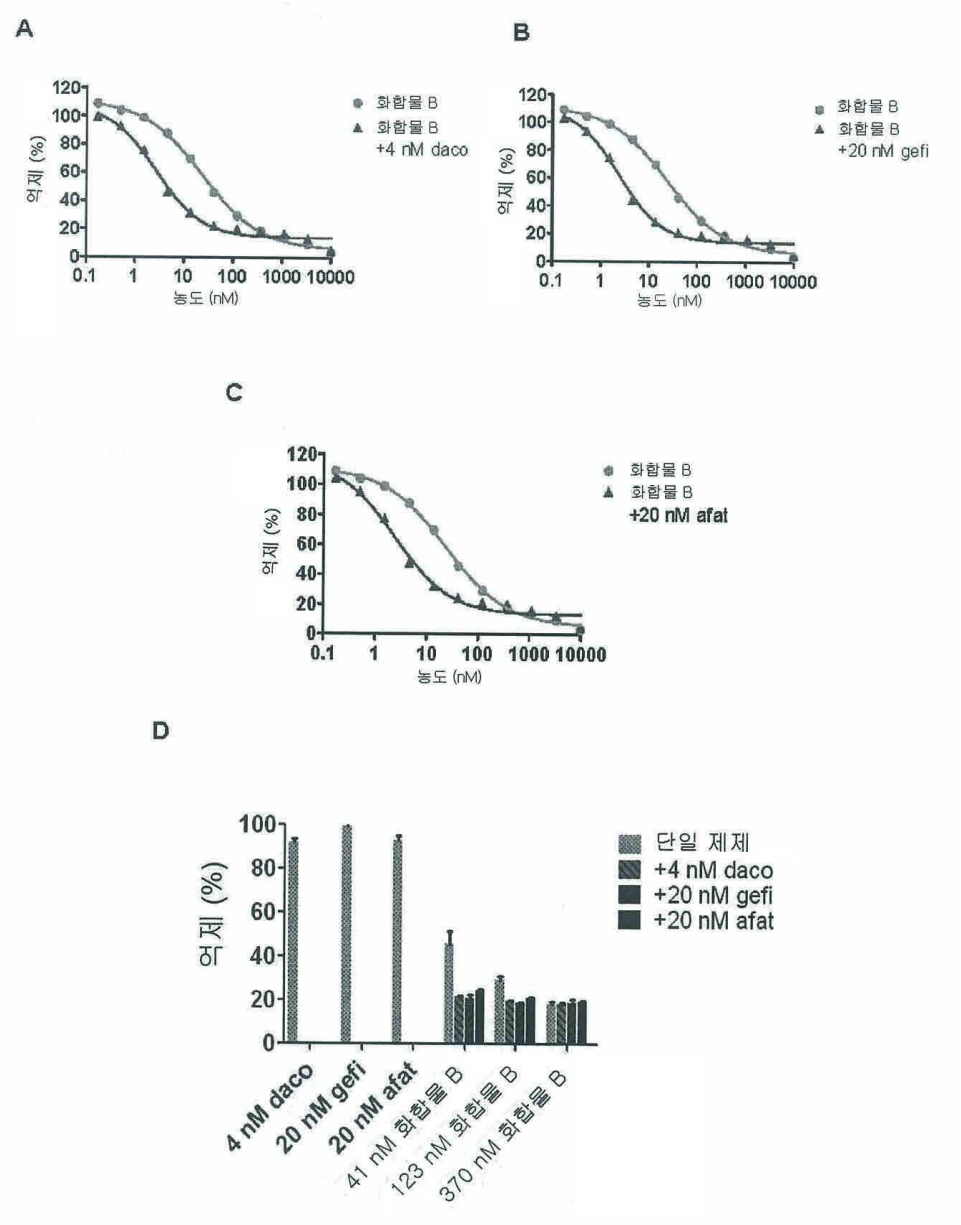
C


억제 (%)
100
80
60
40
20
0
단일 제제
+300 nM erlo
+4 nM daco
300 nM Erlo
4 nM daco
41 nM 화합물 B
123 nM 화합물 B
370 nM 화합물 B

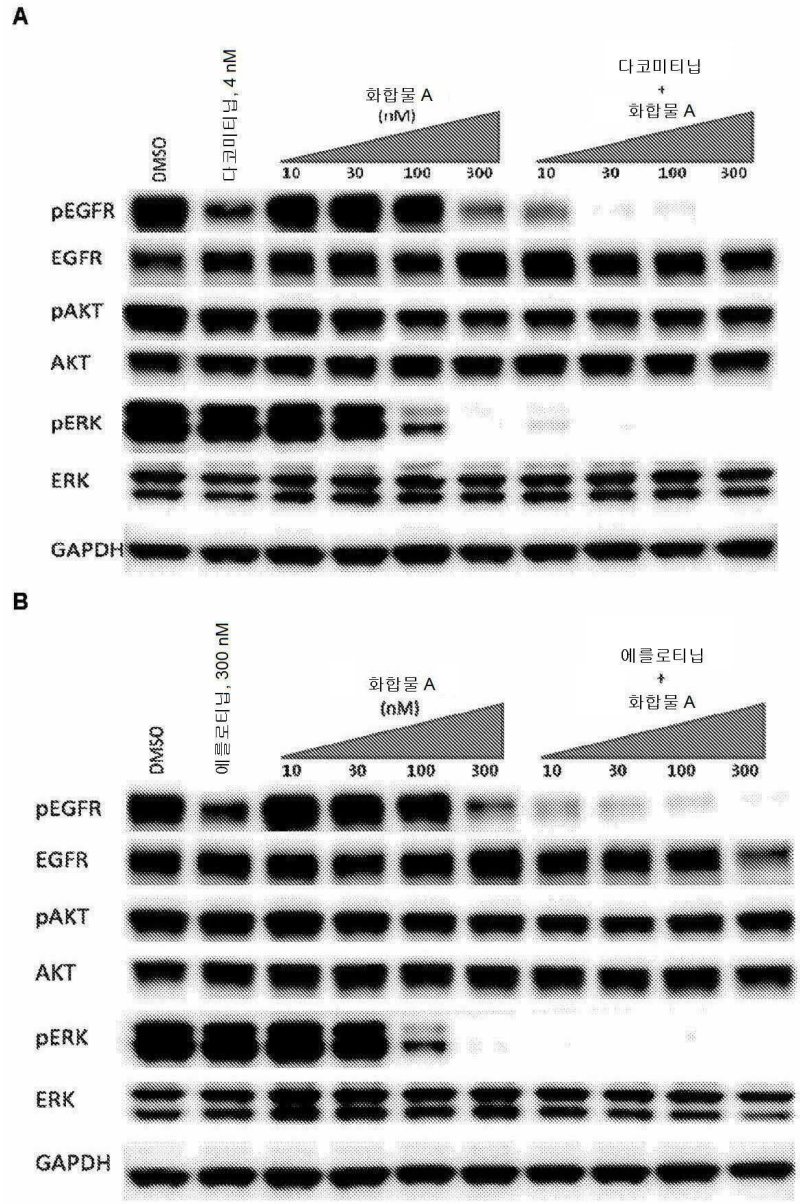
도면5


A
억제 (%)
농도 (nM)
화합물 A
화합물 A
+4 nM daco
B
억제 (%)
농도 (nM)
화합물 A
화합물 A
+20 nM gefi
C
억제 (%)
농도 (nM)
화합물 A
화합물 A
+20 nM afat
D
억제 (%)
단일 제제
+4 nM daco
+20 nM gefi
+20 nM afat
4 nM daco
20 nM gefi
20 nM afat
41 nM 화합물 A
123 nM 화합물 A
370 nM 화합물 A

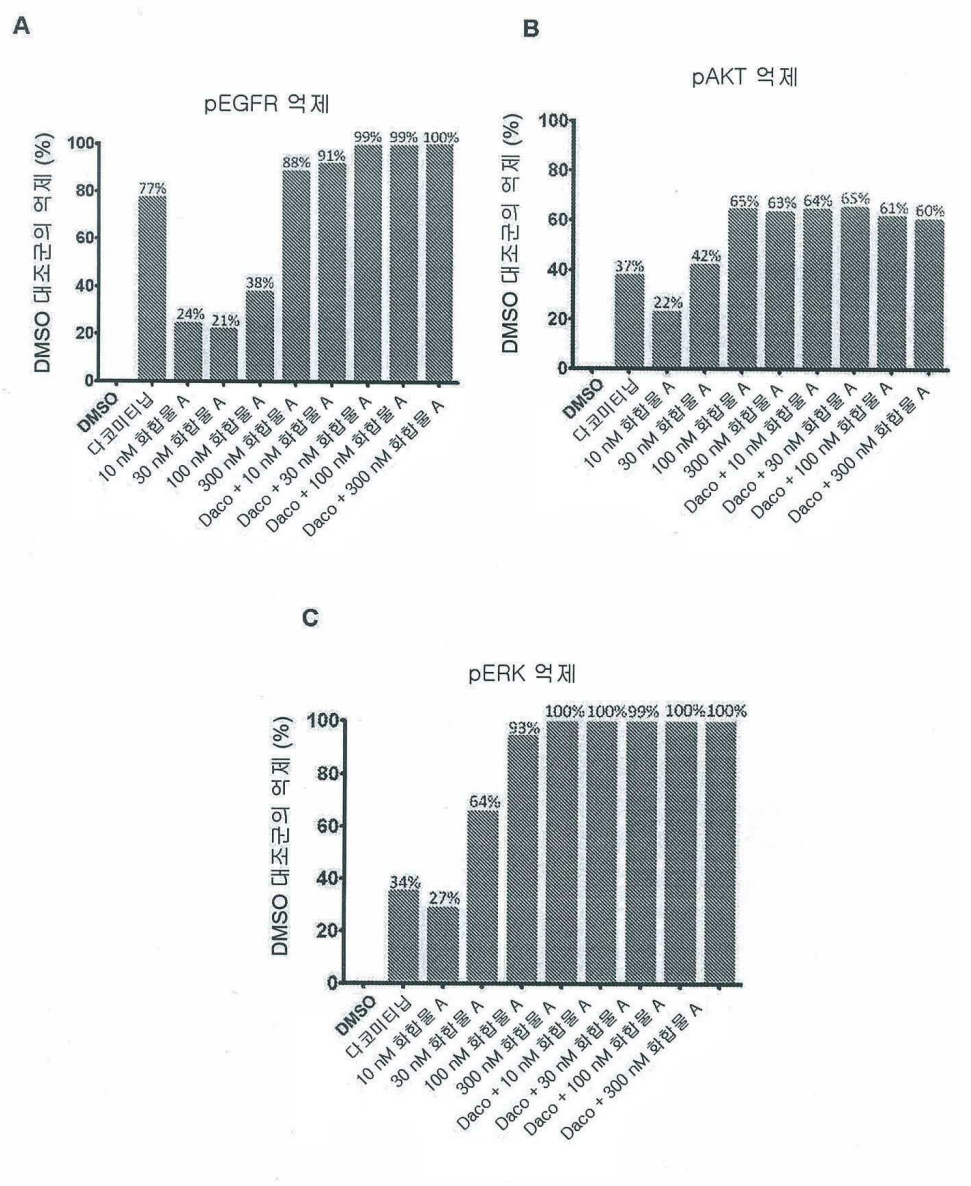
도면6


A
억제 (%)
농도 (nM)
화합물 B
화합물 B
+4 nM daco
B
억제 (%)
농도 (nM)
화합물 B
화합물 B
+20 nM gefi
C
억제 (%)
농도 (nM)
화합물 B
화합물 B
+20 nM afat
D
억제 (%)
단일 제제
+4 nM daco
+20 nM gefi
+20 nM afat
4 nM daco
20 nM gefi
20 nM afat
41 nM 화합물 B
123 nM 화합물 B
370 nM 화합물 B

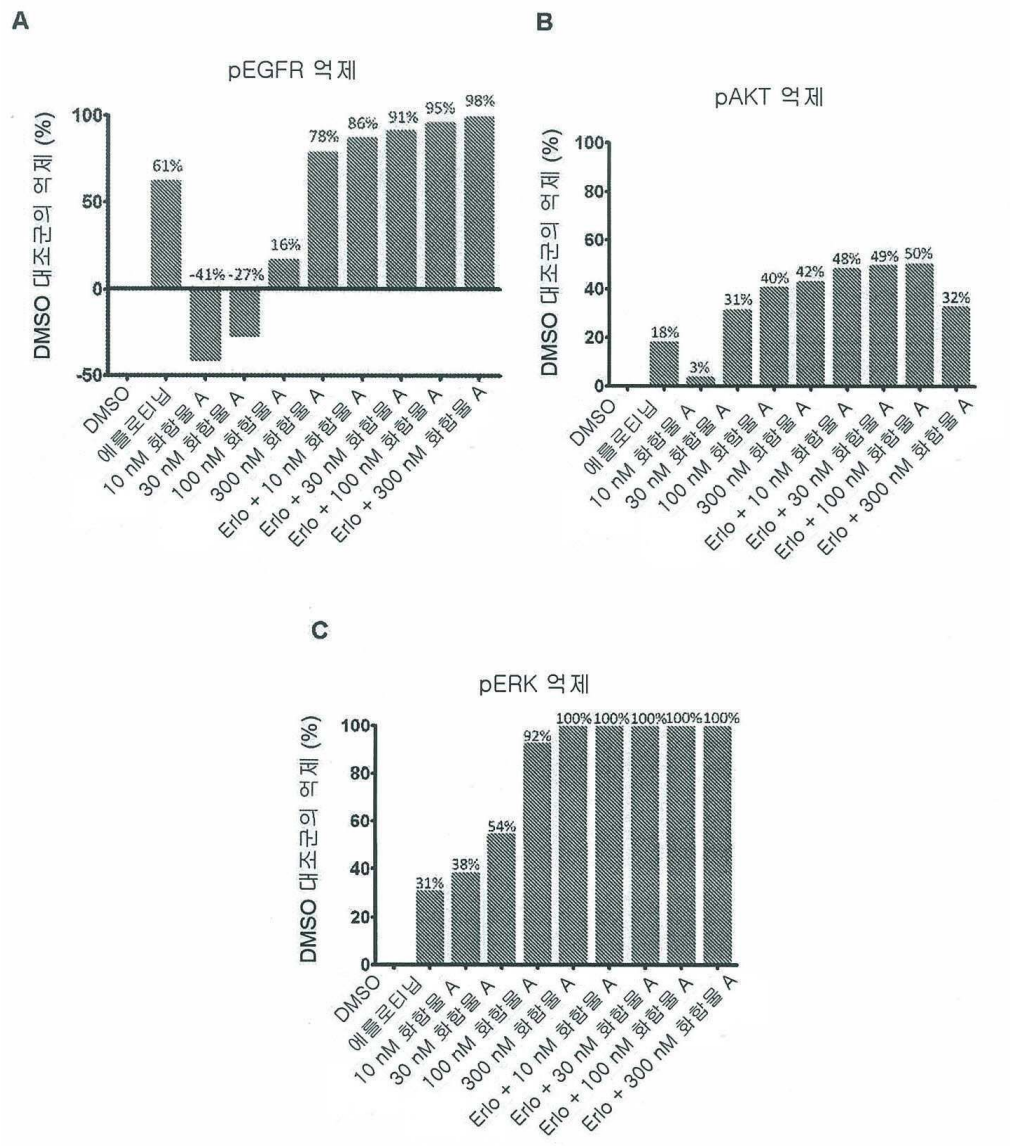
도면7


A
DMSO
다코미티닙, 4 nM
화합물 A
(nM)
10
30
100
300
다코미티닙
+
화합물 A
10
30
100
300
pEGFR
EGFR
pAKT
AKT
pERK
ERK
GAPDH
B
DMSO
에를로티닙, 300 nM
화합물 A
(nM)
10
30
100
300
에를로티닙
+
화합물 A
10
30
100
300
pEGFR
EGFR
pAKT
AKT
pERK
ERK
GAPDH

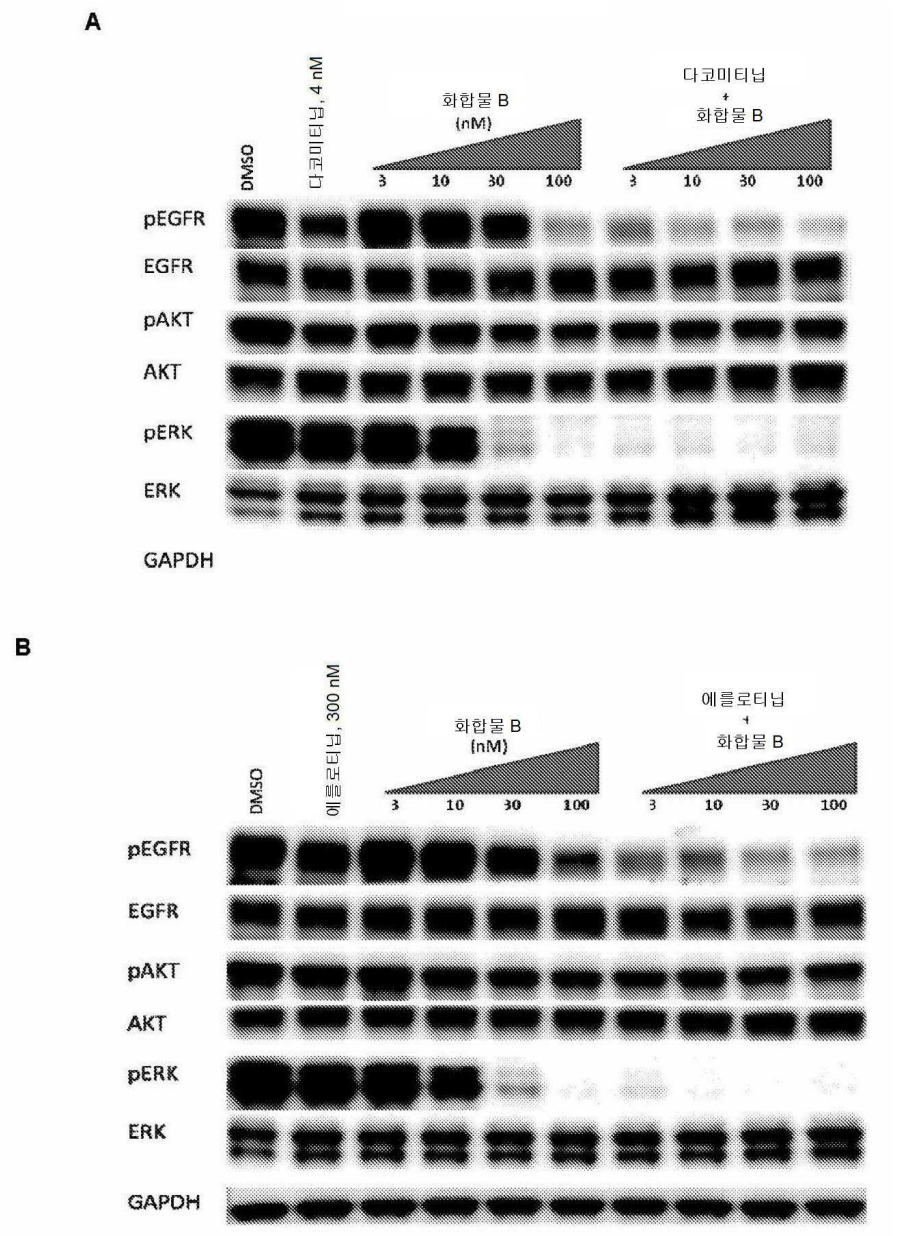
도면8


A
pEGFR 억제
DMSO 대조군의 억제 (%)
100
80
60
40
20
0
77%
24%
21%
38%
88%
91%
99%
99%
100%
DMSO
다코미티닙
10 nM 화합물 A
30 nM 화합물 A
100 nM 화합물 A
300 nM 화합물 A
Daco + 10 nM 화합물 A
Daco + 30 nM 화합물 A
Daco + 100 nM 화합물 A
Daco + 300 nM 화합물 A
B
pAKT 억제
DMSO 대조군의 억제 (%)
37%
22%
42%
65%
63%
64%
65%
61%
60%
C
pERK 억제
DMSO 대조군의 억제 (%)
34%
27%
64%
93%
100%
100%
99%
100%
100%

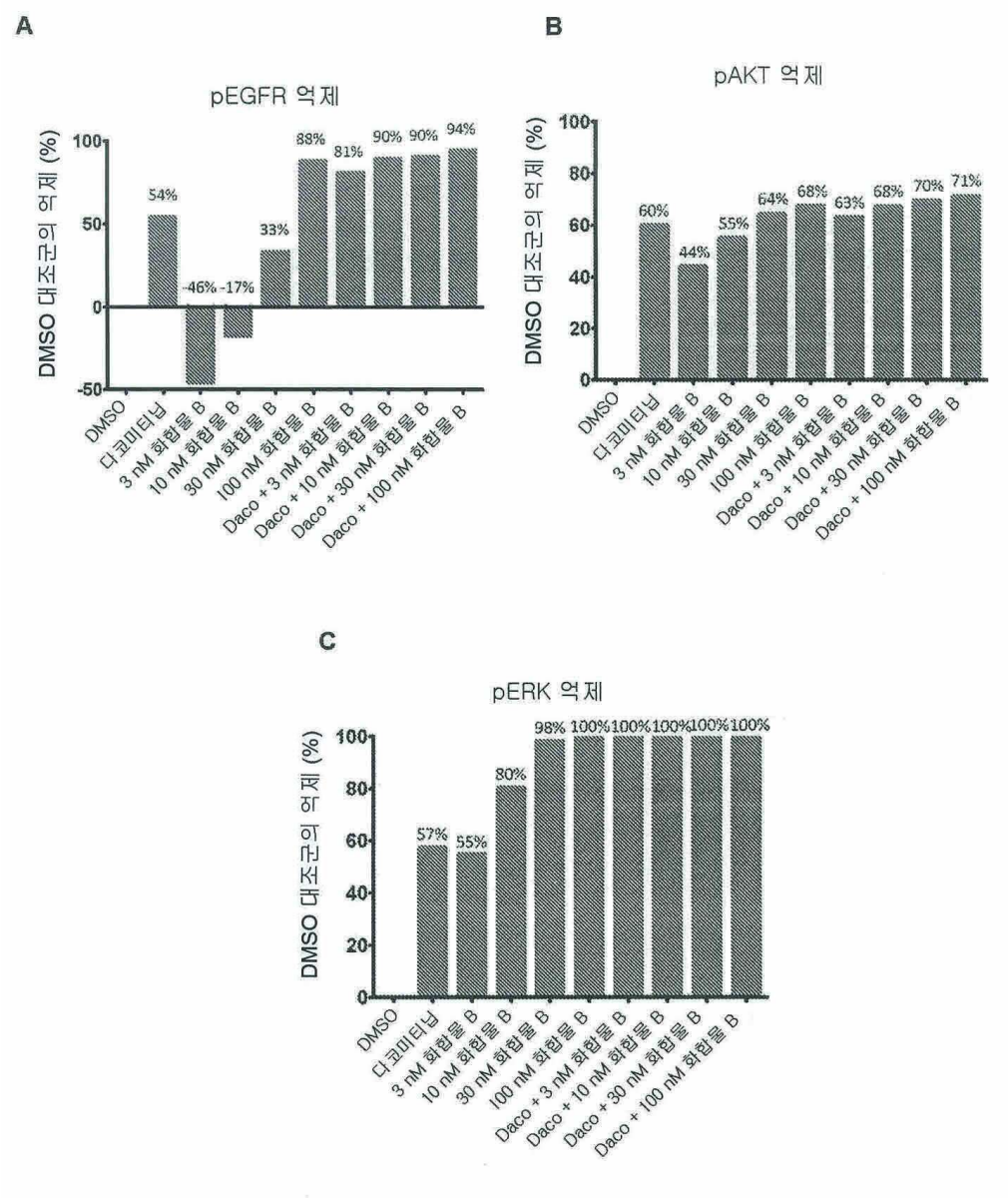
도면9


A
pEGFR 억제
DMSO 대조군의 억제 (%)
100
50
0
-50
61%
-41%
-27%
16%
78%
86%
91%
95%
98%
DMSO
에틀로티닙
10 nM 화합물 A
30 nM 화합물 A
100 nM 화합물 A
300 nM 화합물 A
Erlo + 10 nM 화합물 A
Erlo + 30 nM 화합물 A
Erlo + 100 nM 화합물 A
Erlo + 300 nM 화합물 A
B
pAKT 억제
DMSO 대조군의 억제 (%)
100
80
60
40
20
0
18%
3%
31%
40%
42%
48%
49%
50%
32%
C
pERK 억제
DMSO 대조군의 억제 (%)
100
80
60
40
20
0
31%
38%
54%
92%
100%
100%
100%
100%
100%

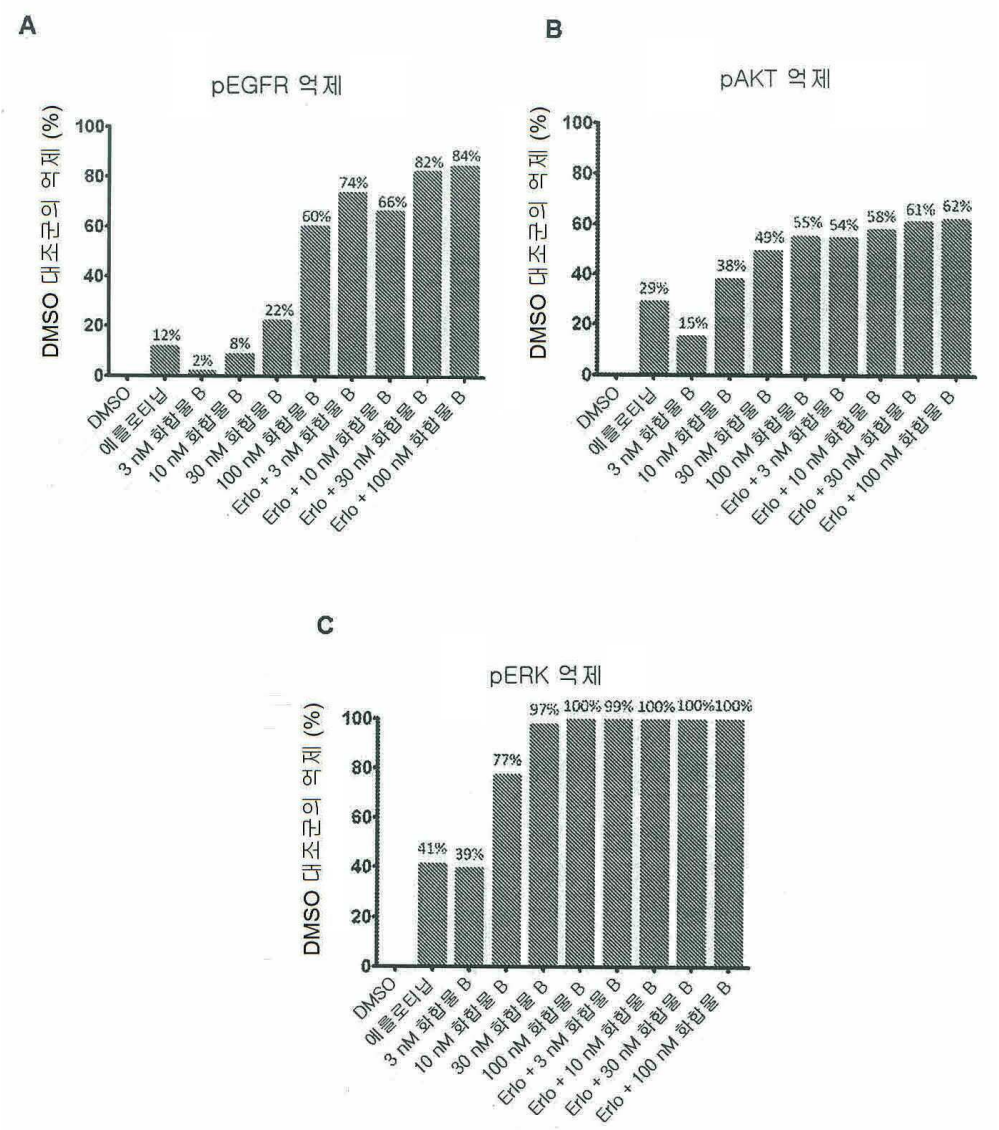
도면10


A
DMSO
다코미티닙, 4 nM
화합물 B
(nM)
3
10
30
100
다코미티닙
+
화합물 B
3
10
30
100
pEGFR
EGFR
pAKT
AKT
pERK
ERK
GAPDH
B
DMSO
에를로티닙, 300 nM
화합물 B
(nM)
3
10
30
100
에를로티닙
+
화합물 B
3
10
30
100
pEGFR
EGFR
pAKT
AKT
pERK
ERK
GAPDH

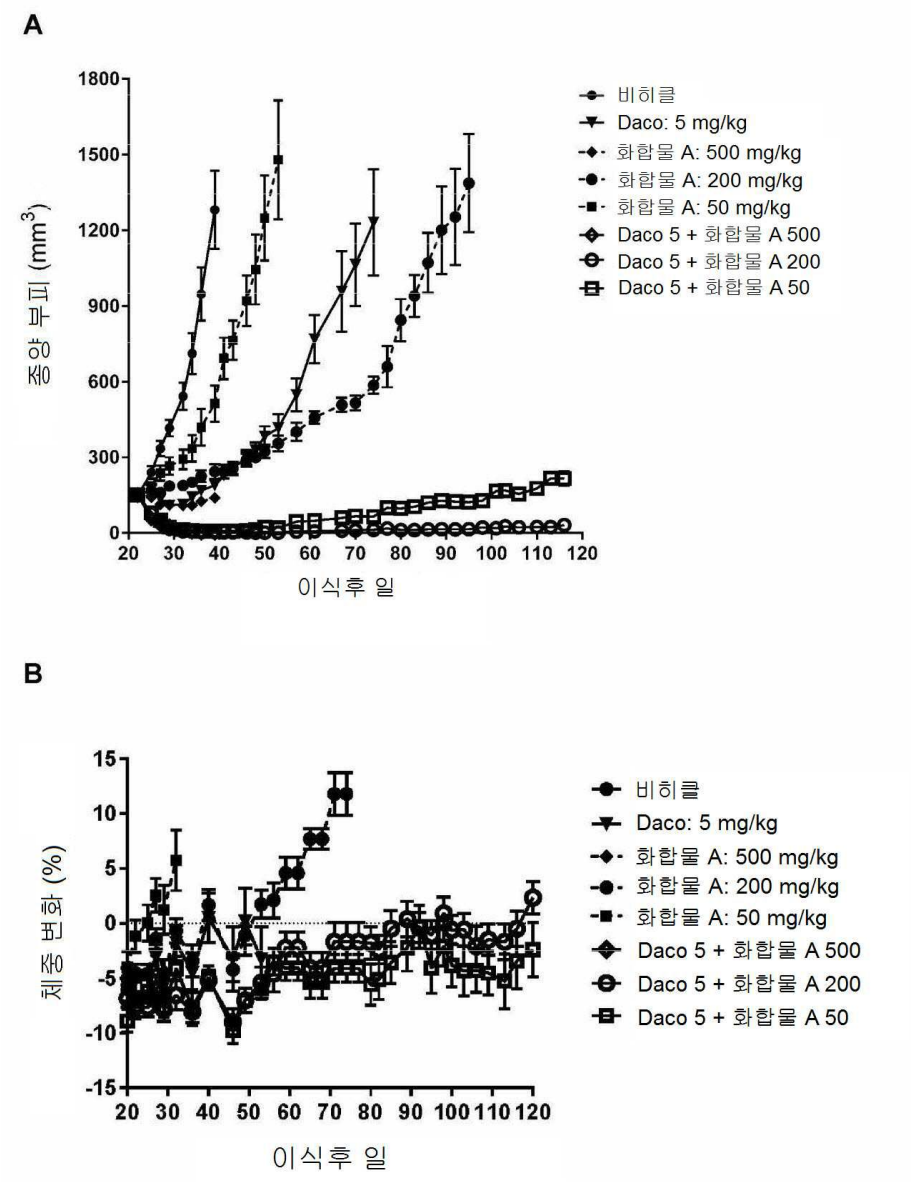
도면11


A
pEGFR 억제
DMSO 대조군의 억제 (%)
100
50
0
-50
54%
-46%
-17%
33%
88%
81%
90%
90%
94%
DMSO
디코미티닙
3 nM 화합물 B
10 nM 화합물 B
30 nM 화합물 B
100 nM 화합물 B
Daco + 3 nM 화합물 B
Daco + 10 nM 화합물 B
Daco + 30 nM 화합물 B
Daco + 100 nM 화합물 B
B
pAKT 억제
DMSO 대조군의 억제 (%)
100
80
60
40
20
0
60%
44%
55%
64%
68%
63%
68%
70%
71%
DMSO
디코미티닙
3 nM 화합물 B
10 nM 화합물 B
30 nM 화합물 B
100 nM 화합물 B
Daco + 3 nM 화합물 B
Daco + 10 nM 화합물 B
Daco + 30 nM 화합물 B
Daco + 100 nM 화합물 B
C
pERK 억제
DMSO 대조군의 억제 (%)
100
80
60
40
20
0
57%
55%
80%
98%
100%
100%
100%
100%
100%
DMSO
디코미티닙
3 nM 화합물 B
10 nM 화합물 B
30 nM 화합물 B
100 nM 화합물 B
Daco + 3 nM 화합물 B
Daco + 10 nM 화합물 B
Daco + 30 nM 화합물 B
Daco + 100 nM 화합물 B

도면12

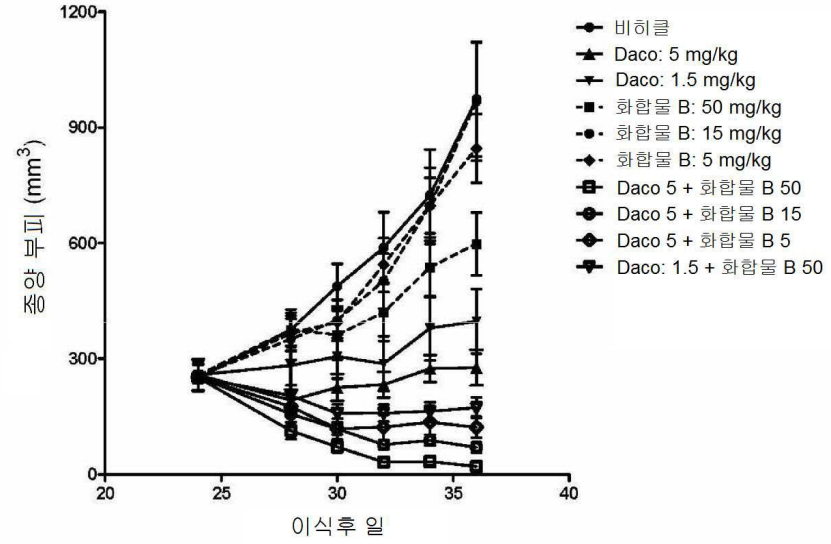

A
pEGFR 억제
DMSO 대조군의 억제 (%)
100
80
60
40
20
0
12%
2%
8%
22%
60%
74%
66%
82%
84%
DMSO
에를로티닙
3 nM 화합물 B
10 nM 화합물 B
30 nM 화합물 B
100 nM 화합물 B
Erlo + 3 nM 화합물 B
Erlo + 10 nM 화합물 B
Erlo + 30 nM 화합물 B
Erlo + 100 nM 화합물 B
B
pAKT 억제
DMSO 대조군의 억제 (%)
100
80
60
40
20
0
29%
15%
38%
49%
55%
54%
58%
61%
62%
DMSO
에를로티닙
3 nM 화합물 B
10 nM 화합물 B
30 nM 화합물 B
100 nM 화합물 B
Erlo + 3 nM 화합물 B
Erlo + 10 nM 화합물 B
Erlo + 30 nM 화합물 B
Erlo + 100 nM 화합물 B
C
pERK 억제
DMSO 대조군의 억제 (%)
100
80
60
40
20
0
41%
39%
77%
97%
100%
99%
100%
100%
100%
DMSO
에를로티닙
3 nM 화합물 B
10 nM 화합물 B
30 nM 화합물 B
100 nM 화합물 B
Erlo + 3 nM 화합물 B
Erlo + 10 nM 화합물 B
Erlo + 30 nM 화합물 B
Erlo + 100 nM 화합물 B

도면13

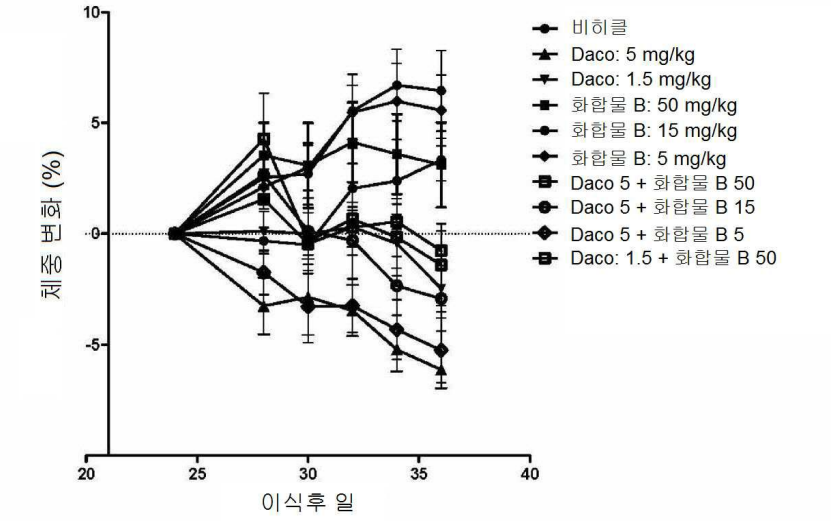

A
1800
1500
1200
900
600
300
0
종양 부피 (mm3)
20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
이식후 일
비히클
Daco: 5 mg/kg
화합물 A: 500 mg/kg
화합물 A: 200 mg/kg
화합물 A: 50 mg/kg
Daco 5 + 화합물 A 500
Daco 5 + 화합물 A 200
Daco 5 + 화합물 A 50
B
15
10
5
0
-5
-10
-15
체중 변화 (%)
20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
이식후 일
비히클
Daco: 5 mg/kg
화합물 A: 500 mg/kg
화합물 A: 200 mg/kg
화합물 A: 50 mg/kg
Daco 5 + 화합물 A 500
Daco 5 + 화합물 A 200
Daco 5 + 화합물 A 50

도면14

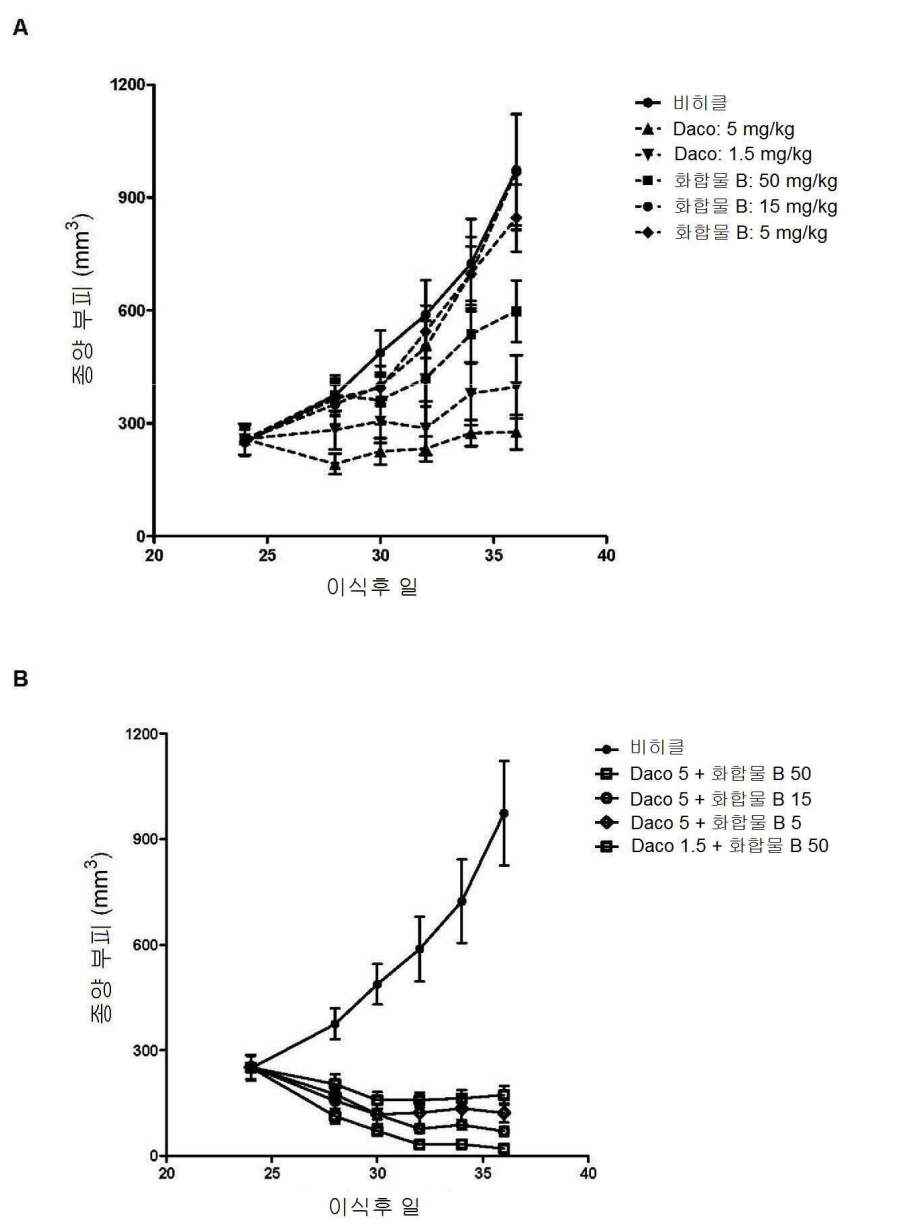
A


종양 부피 (mm3)
1200
900
600
300
0
20
25
30
35
40
이식후 일
비히클
Daco: 5 mg/kg
Daco: 1.5 mg/kg
화합물 B: 50 mg/kg
화합물 B: 15 mg/kg
화합물 B: 5 mg/kg
Daco 5 + 화합물 B 50
Daco 5 + 화합물 B 15
Daco 5 + 화합물 B 5
Daco: 1.5 + 화합물 B 50

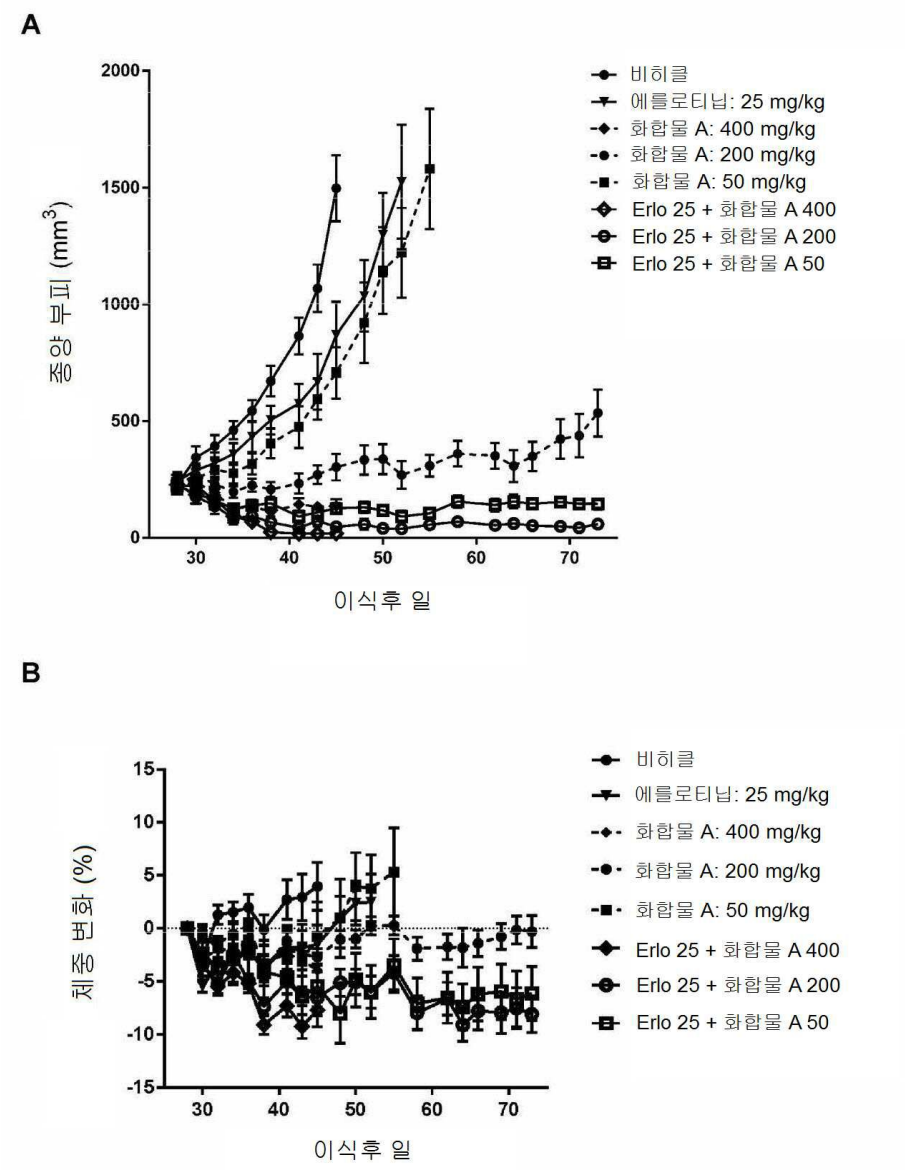
B


체중 변화 (%)
10
5
0
-5
20
25
30
35
40
이식후 일
비히클
Daco: 5 mg/kg
Daco: 1.5 mg/kg
화합물 B: 50 mg/kg
화합물 B: 15 mg/kg
화합물 B: 5 mg/kg
Daco 5 + 화합물 B 50
Daco 5 + 화합물 B 15
Daco 5 + 화합물 B 5
Daco: 1.5 + 화합물 B 50

도면15


A
종양 부피 (mm3)
1200
900
600
300
0
20
25
30
35
40
이식후 일
비히클
Daco: 5 mg/kg
Daco: 1.5 mg/kg
화합물 B: 50 mg/kg
화합물 B: 15 mg/kg
화합물 B: 5 mg/kg
B
종양 부피 (mm3)
1200
900
600
300
0
20
25
30
35
40
이식후 일
비히클
Daco 5 + 화합물 B 50
Daco 5 + 화합물 B 15
Daco 5 + 화합물 B 5
Daco 1.5 + 화합물 B 50

도면16




서 열 목 록

<110> PFIZER INC.

<120> Combination of an EGFR T790M Inhibitor and an EGFR Inhibitor for the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer

<130> PC72016A

<140> PCT/IB2014/059401

<141> 2014-03-03

<150> US 61/786,130

<151> 2013-03-14

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> RPC9 Clone 3

<400> 1

ctcatcatgc agc 13

<210> 2

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> RPC9 Clone 6

<400> 2

ctcatcatgc agc 13

<210> 3

<211> 13

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> PC9

<400> 3

ctcatcacgc agc 13