



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0078504
(43) 공개일자 2016년07월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 487/04 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) C07C 255/17 (2006.01)
C07C 255/24 (2006.01) C07D 239/26 (2006.01)
C07D 277/24 (2006.01) C07D 405/04 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07D 487/04 (2013.01)
A61K 31/519 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7016033
- (22) 출원일자(국제) 2014년11월19일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2016년06월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/CA2014/000836
- (87) 국제공개번호 WO 2015/074135
국제공개일자 2015년05월28일
- (30) 우선권주장
2,833,701 2013년11월19일 캐나다(CA)

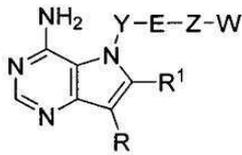
- (71) 출원인
파마사이언스 인크.
캐나다 몬트리올 스위트 100 로얄마운트 애비뉴
6111 (우: 에이치4피 2티4)
- (72) 발명자
로랑, 알랭
캐나다 퀘벡 에이치4피 2티4 몬트리올 스위트 100
로얄마운트 애비뉴 6111 파마사이언스 내
- 로즈, 야니크**
캐나다 퀘벡 에이치4피 2티4 몬트리올 스위트 100
로얄마운트 애비뉴 6111 파마사이언스 인코퍼레이
티드 내
- (74) 대리인
특허법인아주

전체 청구항 수 : 총 42 항

(54) 발명의 명칭 **단백질 키나제 저해제**

(57) 요약

본 발명은 단백질 키나제 저해제의 신규한 패밀리에 관한 것이고, 보다 구체적으로는 본 발명은 Tec 또는 Src 단백질 키나제 패밀리의 구성원의 저해제에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이들 화합물, 이들의 중간체의 제조방법, 이들을 포함하는 약제학적 조성물, 그리고 단백질 키나제 활성이 연루된 증식성, 염증성, 자가면역 또는 감염성 질환, 장애 또는 병태의 치료에서의 그들의 용도에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 하기 화학식 I의 화합물에 관한 것이다:



화학식 I

(52) CPC특허분류

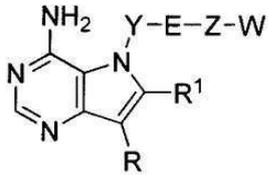
A61K 45/06 (2013.01)
C07C 255/17 (2013.01)
C07C 255/24 (2013.01)
C07D 239/26 (2013.01)
C07D 277/24 (2013.01)
C07D 405/04 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I의 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물:



화학식 I

식 중,

R은

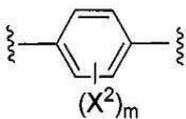
- 1) 수소,
- 2) 알킬,
- 3) 헤테로알킬,
- 4) 카보사이클릴,
- 5) 헤테로사이클릴,
- 6) 아릴, 또는
- 7) 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되;

상기 알킬, 헤테로알킬, 카보사이클릴, 헤테로사이클릴, 아릴 또는 헤테로아릴은 선택적으로 치환되고;

R¹은

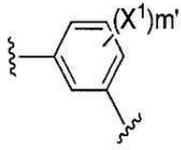
- 1) 수소,
- 2) 알킬,
- 3) 헤테로알킬,
- 4) 카보사이클릴,
- 5) 헤테로사이클릴, 또는
- 6) 할로젠으로 이루어진 군으로부터 선택되되,

상기 알킬, 헤테로알킬, 카보사이클릴 또는 헤테로사이클릴은 선택적으로 치환되며;



Y는 이고;

E는 산소이며;

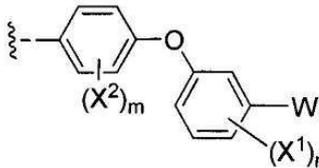


Z는 이고;

W는

1) $-OCH_2R^2$ 또는

2) $-CH_2OR^2$ 로부터 선택되며,



Y-E-Z-W는 이고;

R^2 는 치환된 또는 비치환된 아릴, 치환된 또는 비치환된 헤테로아릴로부터 선택되며;

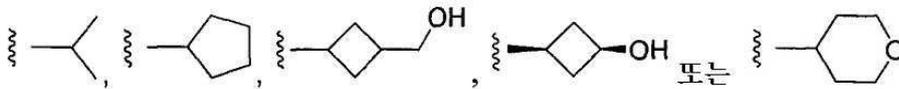
X^1 및 X^2 는 독립적으로 수소 또는 할로겐이고;

m은 0 내지 4의 정수이며, 또는

m' 은 0 내지 4의 정수이다.

청구항 2

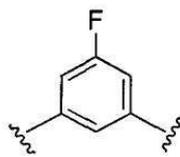
제1항에 있어서, R은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물:



청구항 3

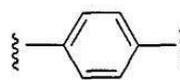
제1항에 있어서, R^1 은 수소인, 화합물.

청구항 4



제1항에 있어서, Z는 로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물

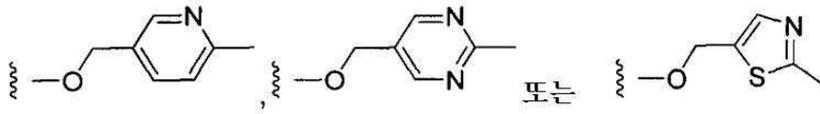
청구항 5



제1항에 있어서, Y는 인, 화합물.

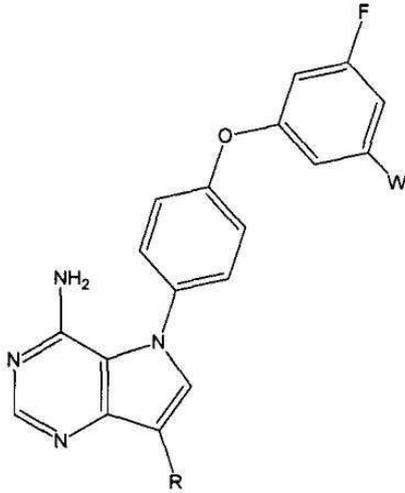
청구항 6

제1항에 있어서, W는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물:



청구항 7

하기 화학식 II의 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물:



화학식 II

식 중,

R은

- 1) 수소,
- 2) 알킬,
- 3) 헤테로알킬,
- 4) 카보사이클릴,
- 5) 헤테로사이클릴,
- 6) 아릴, 또는
- 7) 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되;

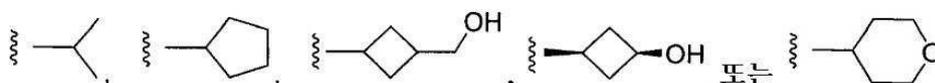
상기 알킬, 헤테로알킬, 카보사이클릴, 헤테로사이클릴, 아릴 또는 헤테로아릴은 선택적으로 치환되고;

W는 $-OCH_2R^2$ 또는 $-CH_2OR^2$ 로 이루어진 군으로부터 선택되되,

R^2 는 치환된 또는 비치환된 아릴, 치환된 또는 비치환된 헤테로아릴로부터 선택된다.

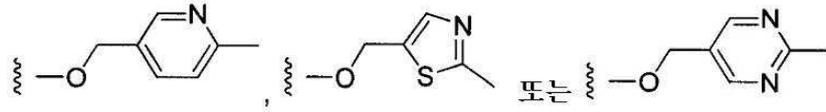
청구항 8

제7항에 있어서, R은 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물:



청구항 9

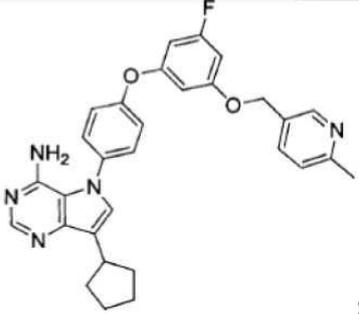
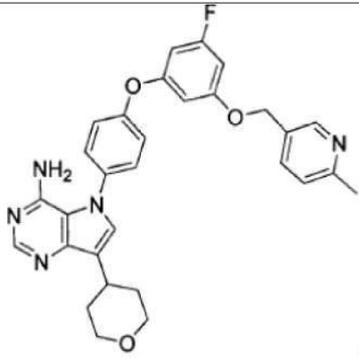
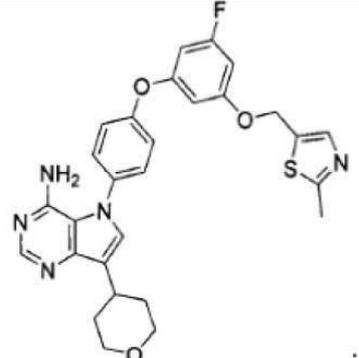
제7항에 있어서, W는 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물:

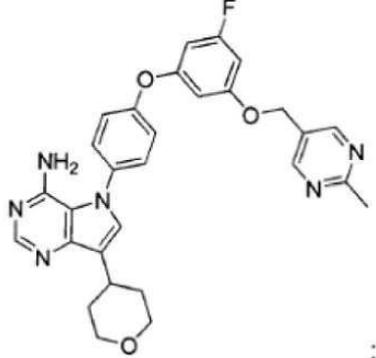
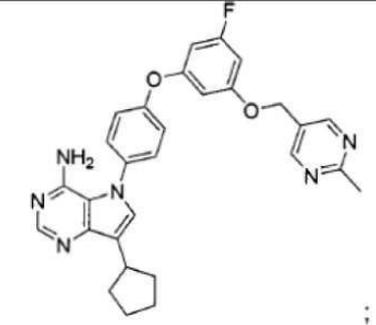
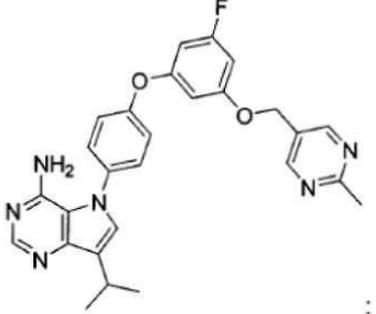
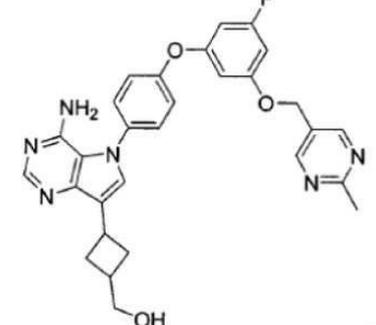


청구항 10

하기로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물:

화합물	구조
1	
2	
3	

<p>4</p>	 <p>;</p>
<p>5</p>	 <p>;</p>
<p>6</p>	 <p>;</p>

7	
8	
9	
10	

청구항 13

증식성, 염증성, 감염성 또는 자가면역 질환의 치료에 이용하기 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 14

제13항에 있어서, 증식성 질환은 암인, 화합물.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 증식성 질환은 자가면역 질환, 염증성 장애, 또는 염증 또는 세포 증식을 특징으로 하는 상태인, 화합물.

청구항 16

Tec 키나제 패밀리 구성원 활성이 연루된 단백질 키나제 매개 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체의 치료에 이용하기 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 17

Src 키나제 패밀리 구성원 활성이 연루된 단백질 키나제 매개 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체의 치료에 이용하기 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 18

Btk 키나제 패밀리 구성원 활성이 연루된 단백질 키나제 매개 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체의 치료에 이용하기 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 19

에스트로겐 수용체 조절제; 안드로겐 수용체 조절제; 레티노이드 수용체 조절제; 세포독성제; 아드리아마이신, 텍사메타손, 빈크리스틴, 사이클로포스파마이드, 플루오로유라실, 포토테칸, 탁솔, 인터페론, 또는 백금 유도체를 포함하는 항증식제; 코르티코스테로이드, TNF 차단제, IL-1 RA, 아자티오프린, 사이클로포스파마이드 또는 설파살라진을 포함하는 항염증제; 프레닐-단백질 전이효소 저해제; HMG-CoA 환원효소 저해제; HIV 프로테아제 저해제; 역전사효소 저해제; 소라페닙, 수니티닙, 파조파닙 또는 에베롤리무스를 포함하는 혈관신생 저해제; 사이클로스포린, 타크롤리무스, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 인터페론, 코르티코스테로이드, 사이클로포스파마이드, 아자티오프린 또는 설파살라진을 포함하는 면역조절제 또는 면역억제제; 티아졸리딘다이온을 포함하는 PPAR- γ 작용제; PPAR- δ 작용제; 내인성 다제내성의 저해제; 적혈구생성-자극제, 비타민 또는 철분 보충제를 포함하는 빈혈 치료제; 5-HT₃ 수용체 길항제, 도파민 길항제, NK1 수용체 길항제, H1 히스타민 수용체 길항제, 카나비노이드, 벤조디아아제핀, 항콜린제 또는 스테로이드를 포함하는 구토방지제; 호중구감소증 치료제; 면역증강제; 프로테아좀 저해제; HDAC 저해제; 프로테아좀에서의 케모트립신-유사 활성의 저해제; E3 리가제 저해제; 인터페론-알파, 칼메트 게랭 간균(*Bacillus Calmette-Guerin*: BCG), 또는 사이토카인, 인터류킨, TNF의 방출을 유도할 수 있거나 또는 TRAIL을 포함하는 사멸 수용체 리간드의 방출을 유도할 수 있는 이온화 방사선(UVB)을 포함하는 면역계 조절제; 인간화 항체 HGS-ETR1 또는 HGS-ETR2를 포함하는 사멸 수용체 TRAIL 또는 TRAIL 작용제의 조절제; 세틸콜린에스테라제 저해제, MAO 저해제, 인터페론, 항경련제, 이온 통로 차단제 또는 릴루졸로부터 선택된 신경영양 인자; 도파민 전구체, 모노아민 옥시다제 B 저해제, COMT 저해제 또는 도파민 수용체 작용제를 포함하는, 항콜린제 또는 도파민제제를 포함하는 항파킨슨제; 베타-차단제, ACE 저해제, 이노제, 질산염, 칼슘 통로 차단제 또는 스타틴을 포함하는 심혈관 질환 치료제; 코르티코스테로이드, 콜레스티라민 또는 인터페론을 포함하는 간 질환 치료제; 뉴클레오사이드 역전사효소 저해제, 비-뉴클레오사이드 역전사효소 저해제, 프로테아제 저해제, 인테그라제 저해제, 융합 저해제, 케모카인 수용체 길항제, 중합효소 저해제, 바이러스성 단백질 합성 저해제, 바이러스성 단백질 변형 저해제, 뉴라민가수분해효소 저해제, 융합 또는 진입 저해제를 포함하는 항-바이러스제; 코르티코스테로이드, 항백혈병제 또는 성장 인자를 포함하는 혈액 장애 치료제; 감마 글로불린, 아달리무맙, 에타네셉트 또는 인플릭시맙을 포함하는 면역결핍 장애 치료제; 토바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴, 심바스타틴 또는 피타바스타틴을 포함하는 HMG-CoA 환원효소 저해제로부터 선택된 제제와 조합하여, 또는 방사선 또는 적어도 하나의 화학요법제와 조합하거나 순차로, 증식

성 장애, 질환 또는 병태의 치료에 이용하기 위한, 제1항 내지 제10항 및 제12항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 20

사멸 수용체 작용제와 조합하여 증식성 장애 또는 질환 상태의 치료에 이용하기 위한, 제1항 내지 제10항 및 제12항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 21

관절염 또는 면역 과민증의 치료 또는 예방에 이용하기 위한, 제1항 내지 제10항 및 제12항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 22

자가면역 질환의 치료 또는 예방에 이용하기 위한, 제1항 내지 제10항 및 제12항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 23

염증 또는 감염성 질환의 치료 또는 예방에 이용하기 위한, 제1항 내지 제10항 및 제12항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 24

혈전증, 심장마비 또는 뇌졸중의 예방 또는 치료에 이용하기 위한, 제1항 내지 제10항 및 제12항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 25

Tec 키나제 패밀리 구성원 활성이 연루된 단백질 키나제 매개 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체의 치료에 이용하기 위한 약제학적 조성물의 제조를 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 용도.

청구항 26

Src 키나제 패밀리 구성원 활성이 연루된 단백질 키나제 매개 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체의 치료에 이용하기 위한 약제학적 조성물의 제조를 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 용도.

청구항 27

Btk 키나제 패밀리 구성원 활성이 연루된 단백질 키나제 매개 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체의 치료에 이용하기 위한 약제학적 조성물의 제조를 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 용도.

청구항 28

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물, 및 적어도 1종의 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 29

인간 또는 동물 대상체에서 키나제 활성을 조절하는데 이용하기 위한, 제28항의 약제학적 조성물.

청구항 30

티로신 키나제 패밀리 구성원 활성이 연루된 단백질 키나제 매개 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체의 치료에 이용하기 위한, 제28항에 따른 약제학적 조성물.

청구항 31

제28항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 Src 키나제 패밀리 구성원과 연관된 단백질 키나제 매개 질환, 장애

또는 병태를 앓고 있는 대상체의 치료에 이용하기 위한 것인, 약제학적 조성물.

청구항 32

단백질 키나제 매개 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체의 치료에 이용하기 위한 제28항에 따른 약제학적 조성물로서, 상기 단백질 키나제 매개 질환은 Btk 키나제 활성 저해와 연관된, 약제학적 조성물.

청구항 33

티로신 키나제 패밀리 구성원 활성이 연루된 단백질 키나제 매개 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체의 치료에서 단독으로 또는 적어도 1종의 약제학적으로 허용가능한 제제와 병용하여 이용하기 위한, 제28항에 따른 약제학적 조성물.

청구항 34

Src 키나제 패밀리 구성원 활성이 연루된 단백질 키나제 매개 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 대상체의 치료에서 단독으로 또는 다른 제제와 병용하여 사용하기 위한, 제28항에 따른 약제학적 조성물.

청구항 35

Btk 키나제 패밀리 구성원 활성이 연루된 단백질 키나제 매개 질환, 장애 또는 병태를 앓고 있는 치료에서 단독으로 또는 다른 제제와 병용하여 사용하기 위한, 제28항에 따른 약제학적 조성물.

청구항 36

관절염 또는 면역 과민증의 치료 또는 예방에 이용하기 위한, 제28항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 약제학적 조성물.

청구항 37

자가면역 질환의 치료 또는 예방에 이용하기 위한, 제28항 내지 제35항 중 어느 한 항에 따른 약제학적 조성물.

청구항 38

염증 또는 세포 증식을 특징으로 하는 장애 또는 질환 상태를 치료 또는 예방하기 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 제28항에 따른 약제학적 조성물의 용도.

청구항 39

인간 또는 동물 세포, 또는 조직에서 단백질 키나제 활성을 저해하는데 이용하기 위한, 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 제28항에 따른 약제학적 조성물의 용도.

청구항 40

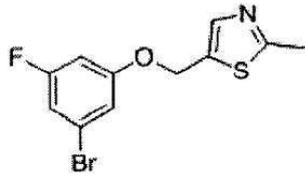
제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 화합물 또는 상기 화합물용의 검출 가능한 표지 또는 친화도 태그를 포함하는 프로브.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 검출 가능한 표지는 형광 모이어티, 화학발광 모이어티, 상자성 조영제, 금속 킬레이트, 방사성 동위원소 함유 모이어티 또는 바이오틴으로 이루어진 군으로부터 선택된, 프로브.

청구항 42

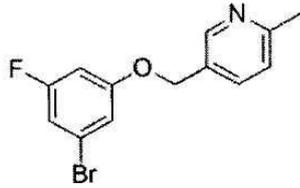
하기 화학식 2-c



2-c

로;

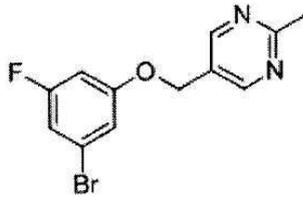
하기 화학식 3-b



3-b

로;

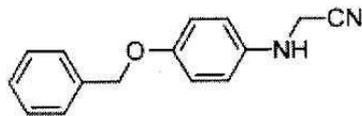
하기 화학식 4-b



4-b

로;

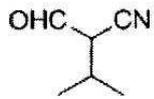
하기 화학식 5-b



5-b

로;

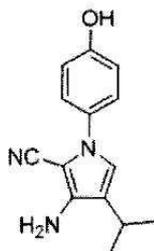
하기 화학식 6-b



6-b

로;

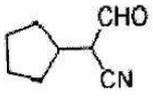
하기 화학식 7-c



7-c

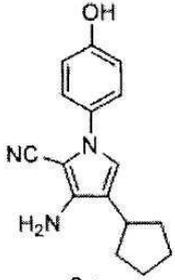
로;

하기 화학식 8-d



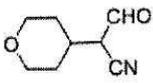
8-d 로;

하기 화학식 9-c



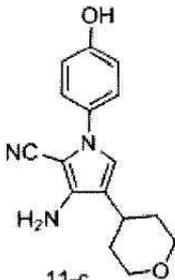
9-c 로;

하기 화학식 10-d



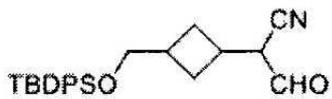
10-d 로;

하기 화학식 11-c



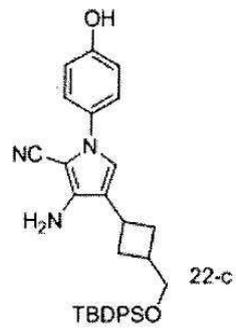
11-c 로;

하기 화학식 21-g



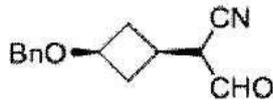
21-g 로;

하기 화학식 22-c



22-c 로;

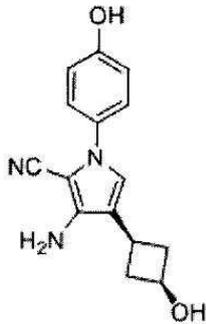
하기 화학식 24-d



24-d

로; 또는

하기 화학식 25-c



25-c

로 표시되는 중간체 화합물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 단백질 키나제 저해제의 신규한 패밀리, 화합물 및 이들의 중간체의 제조방법, 이들을 포함하는 약제학적 조성물, 및 단백질 키나제 활성이 연루된 증식성, 염증성, 감염성 또는 자가면역 질환, 장애 또는 병태의 치료에서의 그들의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단백질 키나제는 진핵 세포에서 세포내 및 막관통 신호전달 단백질의 많은 군이다(Manning G. et al, (2002) Science, 298: 1912-1934). 이 효소는 ATP로부터 표적 단백질의 특이적 아미노산 잔기로의 말단(감마) 포스페이트의 전달을 담당한다. 표적 단백질 내의 특정 아미노산 잔기의 인산화는 이의 활성을 조절하여 세포 신호전달 및 대사의 심오한 변화를 발생시킬 수 있다. 단백질 키나제는 세포막, 사이토솔 및 세포소기관, 예컨대, 핵에서 발견될 수 있고, 대사, 세포 성장 및 분열, 세포 신호전달, 면역 반응의 조절 및 세포 사멸을 포함하는 다수의 세포 기능을 매개하는 것을 담당한다. 세린 키나제는 구체적으로 표적 단백질 내의 세린 또는 티로신 잔기를 인산화시킨다. 마찬가지로, 티로신 수용체 키나제를 포함하는 티로신 키나제는, 표적 단백질 내 티로신 잔기를 인산화시킨다. 티로신 키나제 패밀리는 Tec, Src, Abl, Jak, Csk, Fak, Syk, Fer, Ack 및 수용체 티로신 키나제 서브패밀리를 포함하며, 해당 수용체 티로신 키나제 서브패밀리는 EGFR, FGFR, VEGFR, RET 및 Eph를 포함한다.

[0003] 키나제는 건강 및 질환과 관련된 주된 생물학적 과정에 대한 제어를 행한다. 또한, 각종 단백질 키나제의 비정상적 활성화 또는 과도한 발현은 양성 및 악성 증식을 특징으로 하는 다수의 질환 및 장애뿐만 아니라, 면역계의 부적절한 활성화에 기인하는 질환의 기전에 연루된다(Kyttaris V.C., Drug Des. Devel. Ther. 2012, 6:245-50 및 Fabbro D. et al. Methods Mol. Biol., 2012, 795:1-34). 이와 같이 해서, 선택 키나제 또는 키나제 패밀리의 저해제는, 고형 종양, 혈액학적 악성종양, 혈전, 관절염, 이식편 대 숙주 질환, 홍반성 낭창, 건선, 대장염, 회장염, 다발성 경화증, 포도막염, 관상 동맥 맥관장애, 전신 경피증, 죽상동맥경화증, 천식, 이식 거부, 알러지, 피부근염, 천포창 등을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아닌, 암, 혈관 질환, 자가면역 질환 또는 염증성 병태의 치료에 유용한 것으로 예상된다.

[0004] Tec 키나제는 조혈 기원의 세포에서 배타적이지는 않지만 주로 발현되는 비수용체 티로신 키나제이다(Bradshaw J.M. Cell Signal., 2010, 22:1175-84). Tec 패밀리는 Tec, 브루톤(Bruton)의 티로신 키나제(Btk), 유도성 T-세포 키나제(Itk), 휴먼 림프구 키나제(R1k/Txk) 및 골수-발현 키나제(Bmx/Etk)를 포함한다. Btk는 B-세포 발달 및 활성화의 B-세포 수용체 신호전달 및 조절에서 중요하다(W.N. Khan et al. Immunity, 1995, 3:283-299 및 Satterthwaite A.B. et al. Immunol. Rev. 2000, 175: 120-127). 인간에서 BTK를 암호화하는 유전자의 돌연변이는 B 세포의 돌연변이 손상, 면역글로블린 및 말초 B 세포의 수준 감소, T-세포 독립적 면역 반응의 감소를

포함하는 면역 기능 저감을 특징으로 하는 X-관련 무감마글로블린혈증을 초래한다(Rosen F.S. et al., N. Engl. J. Med., 1995, 333:431-440; 및 Lindvall J.M. et al. Immunol. Rev. 2005, 203:200-215). Btk는 Src-패밀리 키나제에 의해 활성화되고 B-세포 기능 및 생존에 대한 영향을 초래하는 PLC 감마를 인산화시킨다. 또한, Btk는 대식세포, 비만세포 및 호중구에 의한 면역 복합 인지에 반응하여 신호 전달에 중요하다. Btk 저해는 또한 림프 중 세포의 생존에도 중요한데(Herman SEM. Blood, 2011, 117:6287-6289), 이는 Btk의 저해가 림프종의 치료에서 유용할 수 있음을 시사한다. 그와 같이, Btk 및 관련된 키나제의 저해제는 항염증제뿐만 아니라 항암제로서 크게 관심받고 있다. Btk는 또한 혈소판 기능 및 혈전 형성에 중요한데, 이는 Btk-선택적 저해제가 유용한 항혈전제인 것을 입증할 수 있다(Liu J. Blood, 2006, 108:2596-603).

[0005] 염증, 심혈관 질환 및 암에서 역할을 가진 다른 Tec 패밀리 구성원인 Bmx(Cenni B. et al. Int Rev. Immunol. 2012, 31: 166-173)는 또한 교모세포종 줄기 세포의 자기 재생 및 종양형성 잠재성을 위하여 중요하다 (Guryanova O.A. et al. Cancer Cell 2011, 19:498-511). 그와 같이, Bmx 저해제는 암, 심혈관 질환 및 염증을 포함하는 각종 질환의 치료에서 유용할 것으로 예상된다.

[0006] 티로신 키나제의 SRC 패밀리는 cSRC, Lyn, Fyn, Lck, Hck, Fgr, Blk, Syk, Yrk 및 Yes를 포함한다. cSRC는 암에 관련된 신호전달 경로에 중요하게 관여되고 흔히 인간 악성종양에서 과발현된다(Kim L.C. et al. (2009) Nat. Rev. Clin. Oncol. 6(10):587-9). cSRC는 성장 인자 수용체 티로신 키나제의 하류의 신호전달에 포함되고 세포 주기 진행을 조절하여 cSRC 저해가 암 세포 증식에 영향을 미치는 것을 시사한다. 또한 Src 저해제 또는 Hck의 하향 조절은 종양 세포를 면역독소에 민감하게 한다(Lui X.F., Mol. Cancer Ther. 2013, Oct. 21).

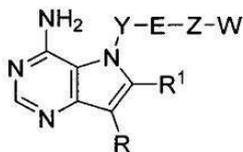
[0007] SRC 패밀리 구성원의 저해는 면역 기능을 조절하도록 설계된 치료에서 유용할 수 있다. Lck를 포함하는 SRC 패밀리 구성원은 사이토카인 방출, 생존 및 증식을 발생시키는 유전자 조절 사건을 발생시키는 T-세포 수용체 신호 전달을 조절한다. 따라서, Lck의 저해제는 이식편 거부 및 T-세포 조절 자가면역 질환에서 잠재적 적용을 갖는 유용한 면역억제제일 수 있다(Martin et al. Expert Opin Ther Pat. 2010, 20:1573-93). Src 패밀리 구성원 HCK는 사이토카인 생성의 조절에 연루되며, 이것은 이 키나제의 저해가 염증성 질환의 치료에 유용할 수 있는 것을 시사한다(Smolinska M.J. et al. J. Immunol. 2011;187:6043-51). 또한, Src 패밀리 키나제 Fgr는 비만세포 및 IgE-매개 아나팔락시스의 활성화에 중요한데, 이것은 이 키나제가 알러지 질환용의 강력한 치료 표적임을 시사한다(Lee J.H. et al. J. Immunol. 2011;187:1807-15).

[0008] 소분자 저해제를 사용한 키나제의 저해는 각종 질환, 장애 및 병태의 치료에 사용되는 몇몇 승인된 치료학제를 성공적으로 유도하였다. 본 명세서에서, 본 발명자들은 키나제 저해제의 신규한 패밀리를 개시한다. 추가로, 본 발명자들은 화합물 치환의 변형이 키나제 선택성 그리고 이에 따라 그 치료제의 생물학적 기능에 영향을 미칠 수 있음을 입증한다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은 키나제 저해제의 신규한 패밀리에 관한 것이다. 이 부류의 화합물은 Tec 또는 Scr 단백질 키나제 패밀리의 구성원에 대해 저해 활성을 갖는 것으로 판명되었다.

[0010] 본 발명의 일 양상은 하기 화학식 I의 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물에 관한 것이다:



화학식 I

[0011]

[0012] R은

[0013] 1) 수소,

[0014] 2) 알킬,

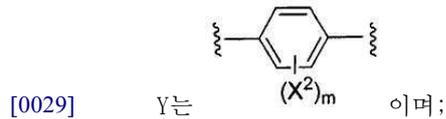
[0015] 3) 헤테로알킬,

- [0016] 4) 카보사이클릴,
- [0017] 5) 헤테로사이클릴,
- [0018] 6) 아릴, 또는
- [0019] 7) 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되;
- [0020] 여기서, 상기 알킬, 헤테로알킬, 카보사이클릴, 헤테로사이클릴, 아릴 또는 헤테로아릴은 선택적으로 치환되고;

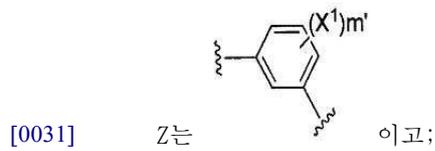
[0021] R¹은

- [0022] 1) 수소,
- [0023] 2) 알킬,
- [0024] 3) 헤테로알킬,
- [0025] 4) 카보사이클릴,
- [0026] 5) 헤테로사이클릴, 또는
- [0027] 6) 할로겐으로 이루어진 군으로부터 선택되되;

[0028] 여기서, 상기 알킬, 헤테로알킬, 카보사이클릴 또는 헤테로사이클릴은 선택적으로 치환되고;

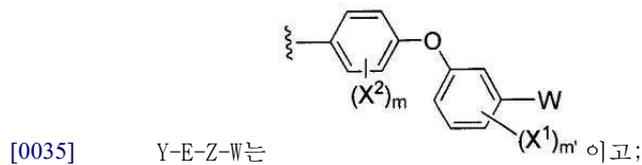


[0030] E는 산소이며;



[0032] W는

- [0033] 1) -OCH₂R² 또는
- [0034] 2) -CH₂OR²로부터 선택되되,



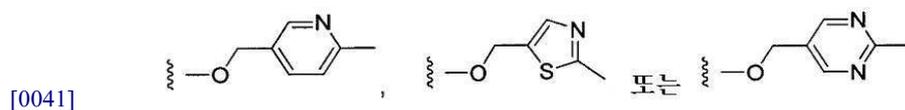
[0036] R²는 치환된 또는 비치환된 아릴, 치환된 또는 비치환된 헤테로아릴로부터 선택되며;

[0037] X¹ 및 X²는 독립적으로 수소 또는 할로겐이고;

[0038] m은 0 내지 4의 정수이며,

[0039] m'은 0 내지 4의 정수이다.

[0040] 본 발명의 또 다른 실시형태는, W가 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화학식 I의 화합물을 포함한다:

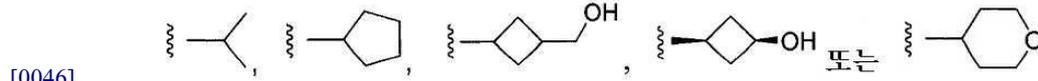


[0042] 또 다른 실시형태는, Z가  인, 화학식 I의 화합물을 포함한다:

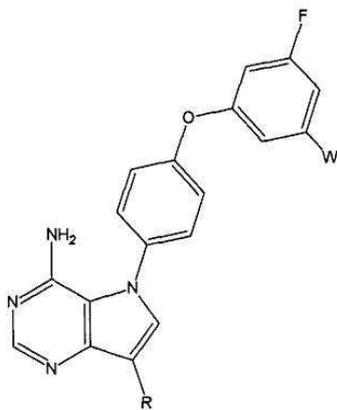
[0043] 본 발명의 또 다른 실시형태는, Y가  인, 화학식 I의 화합물을 포함한다.

[0044] 바람직한 실시형태는, R¹이 수소인, 화학식 I의 화합물을 포함한다.

[0045] 본 발명의 다른 실시형태는, R이 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화학식 I의 화합물을 포함한다:



[0047] 본 발명의 또 다른 실시형태는, 하기 화학식 II의 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물을 포함한다:



화학식 II

[0048]

[0049] 식 중,

[0050] R은

[0051] 1) 수소,

[0052] 2) 알킬,

[0053] 3) 헤테로알킬,

[0054] 4) 카보사이클릴,

[0055] 5) 헤테로사이클릴,

[0056] 6) 아릴, 또는

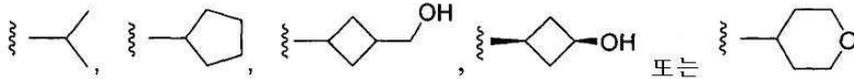
[0057] 7) 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되되;

[0058] 여기서, 상기 알킬, 헤테로알킬, 카보사이클릴, 헤테로사이클릴, 아릴 또는 헤테로아릴은 선택적으로 치환되고;

[0059] W는 -OCH₂R² 또는 -CH₂OR²로 이루어진 군으로부터 선택되며;

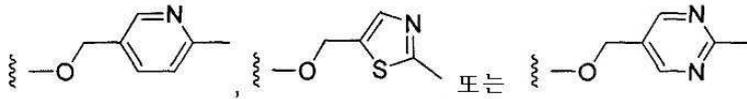
[0060] 여기서 R²는 치환된 또는 비치환된 아릴, 치환된 또는 비치환된 헤테로아릴로부터 선택된다.

[0061] 본 발명의 또 다른 실시형태는, R이 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화학식 II의 화합물을 포함한다:



[0062]

[0063] 본 발명의 또 다른 실시형태는, W가



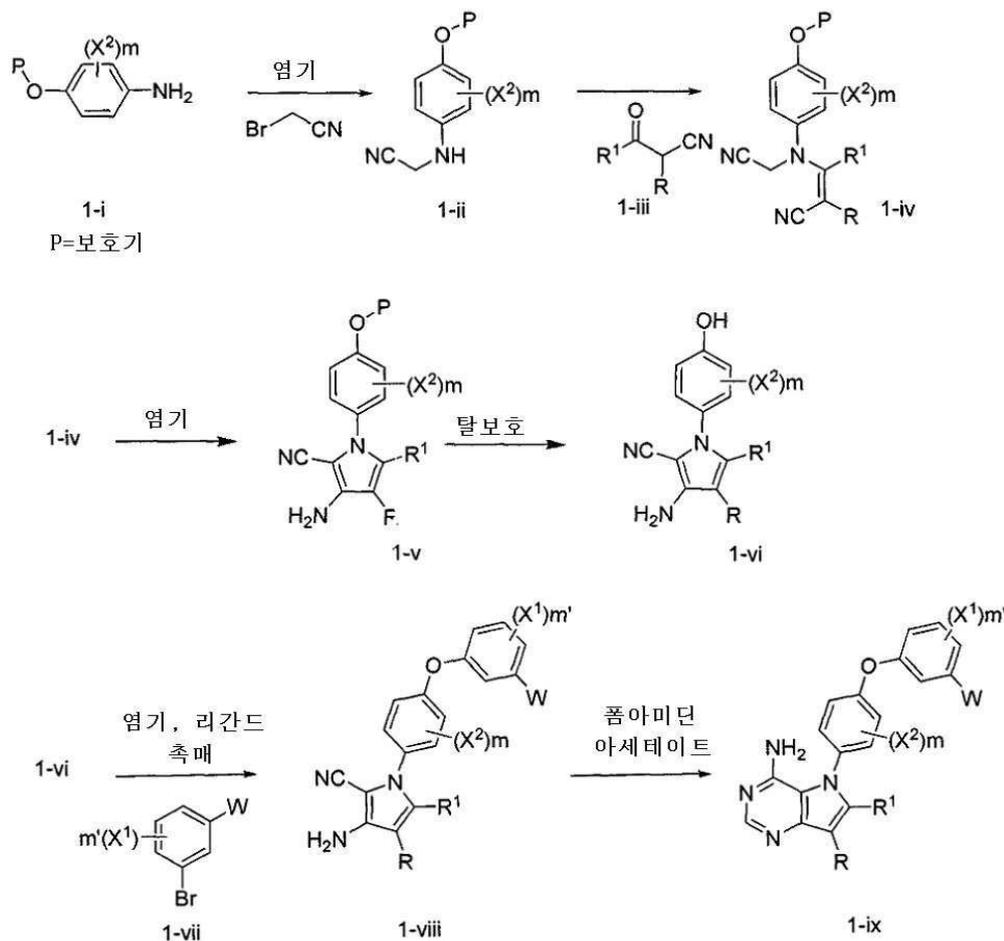
[0064]

인, 화학식 II의 화합물을 포함한다.

[0065] 본 발명의 또 다른 양상은, 본 명세서에서 정의된 바와 같은 본 발명의 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물, 또는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 약제학적 조성물의 제조 방법에 관련된 중간체 및 그들의 합성을 제공한다.

[0066]

또 다른 양상에 있어서, 본 발명은 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물의 제조방법에 관한 것으로, 해당 방법은 하기를 포함한다:



[0067]

[0068] 본 발명의 또 다른 양상은, 화학식 I의 화합물, 화학식 II의 화합물, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물, 및 적어도 1종의 약제학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0069]

또 다른 양상에 있어서, 본 발명은, 치료법에 이용하기 위한, 본 명세서에서 정의된 바와 같은 본 발명의 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물에 관한 것이다.

[0070]

또 다른 양상에 있어서, 본 발명은, 단백질 키나제 매개 질환 또는 병태를 앓고 있는 대상체의 치료에 이용하기 위한, 본 명세서에서 정의된 바와 같은 본 발명의 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화

물, 또는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 약제학적 조성물에 관한 것이다.

- [0071] 본 발명의 또 다른 양상은, 단백질 키나제의 저해제로서의, 더욱 특히, 키나제의 Src 또는 Tec 패밀리의 구성원의 저해제로서의, 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물의 용도를 제공한다.
- [0072] 본 발명의 또 다른 양상은, 단백질 키나제의 저해제로서의, 더욱 특히, 키나제의 Src 또는 Tec 패밀리의 구성원의 저해제로서의, 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물의 용도를 제공한다.
- [0073] 또 다른 양상에 있어서, 본 발명은, 단백질 키나제 매개 질환 또는 병태를 앓고 있는 대상체의 치료에 이용하기 위한 약제의 제조에서의, 본 명세서에서 정의된 바와 같은 본 발명의 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물의 용도에 관한 것이다.
- [0074] 본 발명의 추가의 양상은, 증식성, 염증성, 감염성 또는 자가면역 질환의 치료에 이용하기 위한, 약제학적 조성물의 제조에서 이용하기 위한, 약제학적으로 허용가능한 염, 또는 그의 용매화물을 제공한다.
- [0075] 본 발명의 또 다른 양상은, 증식성 장애, 염증성 또는 자가면역 질환의 치료에서 이용하기 위한, 본 발명에서 정의된 바와 같은, 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물, 또는 약제학적 조성물을 제공한다. 특정 실시형태에 있어서, 증식성 장애, 염증성 또는 자가면역 질환은 암이다. 더욱 구체적으로는 인간 암이다.
- [0076] 본 발명의 추가의 양상은, 암 등과 같은 증식성 장애의 치료에서 이용하기 위한 약제의 제조에서의, 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물의 용도를 제공한다.
- [0077] 본 발명의 또 다른 양상은, 에스트로겐 수용체 조절제; 안드로겐 수용체 조절제; 레티노이드 수용체 조절제; 세포독성제; 아드리아마이신, 텍사메타손, 빈크리스틴, 사이클로포스파마이드, 플루오로유라실, 포토테칸, 탁솔, 인터페론, 또는 백금 유도체를 포함하는 항증식성; 코르티코스테로이드, TNF 차단제, IL-1 RA, 아자티오프린, 사이클로포스파마이드 또는 설파살라진을 포함하는 항염증제; 프레닐-단백질 전이효소 저해제; HMG-CoA 환원효소 저해제; HIV 프로테아제 저해제; 역전사효소 저해제; 소라페닙, 수니티닙, 파조파닙 또는 에베롤리무스를 포함하는 혈관신생 저해제; 사이클로스포린, 타크롤리무스, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 인터페론, 코르티코스테로이드, 사이클로포스파마이드, 아자티오프린 또는 설파살라진을 포함하는 면역조절제 또는 면역억제제; 티아졸리딘다이온을 포함하는 PPAR- γ 작용제; PPAR- δ 작용제; 내인성 다체내성의 저해제; 적혈구생성-자극제, 비타민 또는 철분 보충제를 포함하는 빈혈 치료제; 5-HT₃ 수용체 길항제, 도파민 길항제, NK1 수용체 길항제, H1 히스타민 수용체 길항제, 카나비노이드, 벤조디아아제핀, 항콜린제 또는 스테로이드를 포함하는 구토 방지제; 호중구감소증 치료제; 면역증강제; 프로테아좀 저해제; HDAC 저해제; 프로테아좀에서의 케모트립신-유사 활성의 저해제; E3 리가제 저해제; 인터페론-알파, 칼메트 게랭 간균(*Bacillus Calmette-Guerin*: BCG), 또는 사이토카인, 인터류킨, TNF의 방출을 유도할 수 있거나 또는 TRAIL을 포함하는 사멸 수용체 리간드의 방출을 유도할 수 있는 이온화 방사선(UVB)을 포함하는 면역계 조절제; 인간화 항체 HGS-ETR1 또는 HGS-ETR2를 포함하는 사멸 수용체 TRAIL 또는 TRAIL 작용제의 조절제; 세틸콜린에스테라제 저해제, MAO 저해제, 인터페론, 항경련제, 이온 통로 차단제 또는 틸루졸의 군으로부터 선택된 신경영양 인자; 도파민 전구체, 모노아민 옥시다제 B 저해제, COMT 저해제, 도파민 수용체 작용제를 포함하는, 항콜린제 또는 도파민제제를 포함하는 항파킨슨제; 베타-차단제, ACE 저해제, 이뇨제, 질산염, 칼슘 통로 차단제 또는 스타틴을 포함하는 심혈관 질환 치료제; 코르티코스테로이드, 콜레스티라민 또는 인터페론을 포함하는 간 질환 치료제; 뉴클레오사이드 역전사효소 저해제, 비뉴클레오사이드 역전사효소 저해제, 프로테아제 저해제, 인테그라제 저해제, 융합 저해제, 케모카인 수용체 길항제, 중합효소 저해제, 바이러스성 단백질 합성 저해제, 바이러스성 단백질 변형 저해제, 뉴라민가수분해효소 저해제, 융합 또는 진입 저해제를 포함하는 항-바이러스제; 코르티코스테로이드, 항백혈병제 또는 성장 인자를 포함하는 혈액 장애 치료제; 감마 글로불린, 아달리무맙, 에타네셉트 또는 인플릭시맙을 포함하는 면역결핍 장애 치료제; 토바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴, 심바스타틴 또는 피타바스타틴을 포함하는 HMG-CoA 환원효소 저해제로부터 선택된 제제와 조합하여, 또는 방사선 또는 적어도 하나의 화학요법제와 조합하거나 순차로, 증식성, 염증성, 감염성 또는 자가면역 질환, 장애 또는 상태의 치료에 이용하기 위한, 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물을 제공한다.
- [0078] 더욱 바람직하게는, 약제는 사멸 수용체 작용제와 조합하여 증식성 장애 또는 질환 상태의 치료를 위한 것이다.
- [0079] 본 발명의 또 다른 양상은, 암, 골수 증식성 장애, 폐 섬유증, 간 섬유증, 심혈관 질환: 심장비대증, 심근증, 재협착증; 혈전증, 심장마비 또는 뇌졸중; 탈모, 폐기종; 죽상동맥경화증, 건선 또는 피부과 장애, 루푸스, 다

발성 경화증, 황반 변성, 천식, 반응성 시노비오티드(reactive synoviotide), 바이러스성 장애; CNS 장애; 자가면역 장애: 사구체신염 또는 류마티스 관절염; 호르몬-관련 질환, 대사 장애; 염증성 질환; 감염성 또는 진균 질환, 말라리아 또는 기생충 장애로부터 선택된 질환 또는 장애의 치료에 이용하기 위한, 본 발명에서 정의된 바와 같은 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물, 또는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0080] 본 발명의 다른 양상은, 키나제 활성의 저해에 의한 관절염, 힘줄윤활막 거대 세포 증양, 색소성 용모결절성 활막염, 또는 기타 반응성 시노비오티드, 골 전이 형성 또는 진행, 급성 골수성 백혈병 또는 인간 암 또는 암의 선택 서브세트, 예를 들어 유방 증양 또는 위암의 치료에 이용하기 위한 약제의 제조에서 이용하기 위한, 본 발명에서 정의된 바와 같은, 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물, 또는 약제학적 조성물을 제공한다.

[0081] 또 다른 양상에 있어서, 본 발명은 단백질 키나제 활성과 연관된 질환 또는 병태를 치료하기 위한 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 치료적 유효량의 본 명세서에서 정의된 바와 같은 본 발명의 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물, 또는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 약제학적 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0082] 또 다른 양상에 있어서, 본 발명은 증식성 장애를 치료하기 위한 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 치료적 유효량의 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물, 또는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 약제학적 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에 있어서, 증식성 장애는 암이다.

[0083] 본 발명의 다른 양상은 키나제 기능을 조절하는 방법을 제공하되, 상기 방법은 세포를 Src 또는 Tec 패밀리 키나제로부터의 주어진 키나제 혹은 키나제들의 효소 활성을 조절하기에 충분한 양의 본 발명의 화합물과 접촉시키는 단계, 이에 따라서 키나제 기능을 조절하는 단계를 포함한다.

[0084] 본 발명의 또 다른 양상은, 시험관내 또는 생체내 세포 증식 또는 생존을 저해하는 방법을 제공하되, 상기 방법은 세포를 유효량의 본 명세서에서 정의된 바와 같은 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0085] 일 실시형태에 있어서, 본 발명은 세포 또는 조직에서 단백질 키나제 저해 효과를 발생시키는 방법을 제공하되, 상기 방법은 세포 또는 조직을 유효량의 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0086] 다른 실시형태에 있어서, 본 발명은 생체내 단백질 키나제 저해 효과를 발생시키는 방법을 제공하되, 상기 방법은 유효량의 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 투여는 비경구 또는 경구 등과 같은 임의의 적절한 투여 경로에 의한 것일 수 있다. 투약 단위는 임의의 적절한 양일 수 있고, 예를 들어, 비경구 또는 경구 투여를 위한 용량 단위는 50mg 내지 5000mg의 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 함유할 수 있다. 본 발명의 화합물은 1일 1 내지 4회 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물의 0.01 내지 100 mg/kg 체중/일의 투약량이 이들 조성물을 공급받는 환자에게 투여될 수 있다.

[0087] 본 발명의 화합물은 단독으로 또는 하나 이상의 다른 치료제와 조합(또는 병용)하여 이용될 수 있다. 이 조합은 치료의 개별 성분의 동시, 순차 또는 개별 투약에 의해서 달성될 수 있다. 이러한 조합 제품은 본 명세서에 기재된 용량 범위 내의 본 발명의 화합물과 승인된 용량 범위 내의 다른 약제학적 활성제를 이용한다.

[0088] 본 발명의 다른 양상은 표적 키나제 기능을 조절하는 방법을 제공한다. 상기 방법은,

[0089] a) 세포를 표적 키나제 기능을 조절하기에 충분한 양의 본 발명의 화합물과 접촉시키는 단계, 이에 따라서

[0090] b) 표적 키나제 활성 및 신호전달을 조절하는 단계를 포함한다.

[0091] 본 발명은 또한 본 명세서에서 정의된 바와 같은 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 합성하는 방법을 제공한다.

[0092] 본 발명의 다른 양상은 프로브를 제공하되, 상기 프로브는 검출 가능한 표지 또는 친화도 태그로 표지된 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물을 포함한다. 즉, 프로브는 검출 가능한 표지에 공유 접합된 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물의 잔기를 포함한다. 이러한 검출 가능한 표지는 형광 모이어티, 화학발광 모이어티, 상자성 조영제, 금속 킬레이트, 방사성 동위원소 함유 모이어티 또는 바이오틴을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

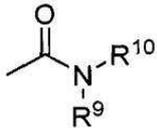
- [0093] 본 발명은 신규한 키나제 저해제에 관한 것이다. 이들 화합물은, Src 또는 Tec 키나제 패밀리의 구성원을 포함하는, 단백질 키나제의 저해제로서의 활성을 갖는 것으로 판명되어 있다.
- [0094] 본 발명의 화합물은, 유효량의 본 발명의 화합물을, 적어도 하나의 약제학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제와 함께 포함하는 약제학적 조성물로 제형화된다.
- [0095] 용어 "약제학적 유효량"은 단백질 키나제 활성과 연관된 질환, 장애 또는 병태를 치료하는데 효과적인 인간 또는 동물의 예방 및 치료를 위한 조성물의 임의의 양을 지칭한다.
- [0096] **약제학적 조성물**
- [0097] 본 발명에 따르면, 화학식 I의 화합물, 화학식 II의 화합물, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물, 또는 본 발명의 화합물의 혼합물을 적어도 1종의 약제학적으로 허용가능한 희석제, 담체 또는 부형제와 함께 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0098] 약제학적 조성물은 경구 투여용(예컨대, 정제, 캡슐, 과립, 분말, 액체 용액, 현탁액 또는 시럽); 비경구 투여용(피부, 피하, 근육내, 복강내, 정맥내, 동맥내, 뇌내, 안구내 주사 또는 주입을 포함함); 좌제(직장 또는 질); 기관지, 비강, 국소, 협측, 설하, 경피에 적합한 통상의 약제학적 형태, 또는 분말 및 액체 에어로졸 투여, 점적 주입 제제, 점안약을 포함하는 흡입 또는 통기에 의한, 또는 서방형 시스템에 의한 투여에 적합한 형태의 것들일 수 있다. 선택된 투여 경로와 무관하게, 화합물은 당업자에게 공지된 종래의 방법에 의해 형성된 약제학적으로 허용가능한 용량으로 제형화될 수 있다.
- [0099] 투약 형태 제형의 개발에 있어서, 코어 부형제의 선택은 극히 중요하다. 활성 제약 성분(active pharmaceutical ingredient: API)의 속성, API의 의도된 전달 방법(즉방형, 변형, 지속, 연장, 지연 방출 등) 및 제조방법 등과 같은 완성된 투약 형태의 몇몇 양상이 고려되어야 한다.
- [0100] 비제한적인 약제학적 조성물은, 적절한 방출 투약 형태의 제형: "서방출"(prolonged release), "연장 방출", "변형 방출"(modified release), "지연 방출", "지속 방출" 또는 "즉방형", "경구 봉해 정제" 또는 "지속 방출 비경구 데포" 약제학적 조성물에 이용하기 위하여, 본 발명에 따른 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물(또는 본 발명의 화합물들의 조합) 및 적어도 1종의 약제학적으로 허용가능한 부형제, 예컨대, 바인더, 봉해제, 윤활제, 희석제, 가용화제, 유화제, 코팅제, 사이클로덱스트린 또는 완충제를 포함한다.
- [0101] 복수의 "조절 방출" 약제학적 조성물, 특히 "서방출", "연장 방출", "변형 방출", "지연 방출" 또는 "지속 방출" 조성물을 이용한 상이한 투약 형태가 있다. 조절 방출 약제학적 조성물의 예는 즉방형 약제학적 조성물, 장용 코팅된 약제학적 조성물, 펄스식 방출 약제학적 조성물 또는 지속 방출 약제학적 조성물이다.
- [0102] 경구 조절 방출 약제학적 조성물은 적어도 1종의 약제학적으로 허용가능한 필름 형성 폴리머, 및 선택적으로 적어도 1종의 약제학적으로 허용가능한 부형제와 함께 조제된 적어도 1종의 활성 제약 성분을 포함하는 약제학적 조성물을 의미하며, 여기서 약제학적 조성물은 pH-의존적, 또는 pH-독립적 재현 방출 프로파일을 보인다.
- [0103] 본 명세서에서 지칭되는 바와 같은 용어 "경구 조절 방출 약제학적 조성물"은, 투여될 경우, 활성 성분을 비교적 일정한 속도에서 방출하고, 24-시간 기간에 걸쳐서 활성 성분의 치료 범위 내에서 시간에 따라 실질적으로 변함이 없이 유지되는 활성 성분의 혈장 농도를 제공하는 경구 약제학적 조성물을 지칭하며, "서방출", "연장 방출", "변형 방출", "지연 방출" 또는 "지속 방출" 조성물을 포괄한다.
- [0104] 본 명세서에서 지칭되는 바와 같은 용어 "변형 방출"은 정제로부터의 약물의 방출이 몇몇 방식으로 변형된 것을 의미한다. 통상, 이것은 의약이 너무 자주 복용되지 않아야 하고 따라서 순응도를 향상시키도록 약물의 방출을 늦추는 것이다. 방출의 변형으로부터의 다른 유익은, 약물 방출이 조절되고, 혈중 수준에 더 작은 최고점과 저점이 있으므로 피크 효과의 기회를 줄이고 더 긴 시간 기간 동안 치료 효과의 우도를 증가시킨다는 점이다.
- [0105] 용어 "연속 방출"은, 연장된 기간에 걸쳐서 소정 용량의 약물을 전달하도록 설계된 약물에 적용되는 기간을 의미한다. 이 목적을 위하여 가장 통상적인 기구는, 펠릿 상의 오일, 지방, 왁스 또는 수지 코팅의 두께와 속성에 따라서, GI관에서 상이한 속도로 방출용의 약물의 미소한 펠릿을 수용하는 연질의 가용성 캡슐이다. 다른 시스템은 약물이 함침된 다공성 플라스틱 담체와, 약물로부터 서서히 침출되는 GI 유체의 진입을 용이하게 하는 계면활성제로 구성된다. 약물에 결합되는 이온교환수지 및 서방성 약물 과립의 액체 함유 현탁액이 또한 연장된

기간에 걸쳐서 약물을 제공하는데 이용된다.

- [0106] 용어 "맥동식 방출"(pulsatile release)은, 약물이 미리 결정된 시간 간격에 걸쳐서 최대 용량과 최소 용량 사이에 변동하는 하나 이상의 용량으로 전달되는 것을 의미한다. 이것은 하나 이상의 뚜렷한 최고점 또는 계곡을 가진 약물 방출 프로파일에 의해 표시될 수 있다. 그러나, 2 이상의 펄스식 방출은, 나타나거나 또는 효과적으로 일정한 중첩하거나, 전체적이거나 또는 복합적인 방출 프로파일을 생성할 수 있다. 맥동식 방출을 위한 필요성은 위 또는 초회 통과 대사에서 약물 분해를 피하기 위한 요구를 포함할 수 있다. 맥동식 방출은, 소망의 방출 프로파일을 달성하기 위하여 pH 의존적 및/또는 장벽 막 코팅 시스템을 가진 다입자의 코팅에 이어서 해당 다입자를 배합시킴으로써 달성될 수 있다.
- [0107] 용어 "지연 방출"은, 약물의 투여와 관련된 방출의 개시를 지칭한다. "지연"이란, 약물의 방출이 투여 후 소정 시간 기간(예컨대, 지체 시간), 전형적으로 비교적 장기간, 예컨대, 1시간 초과 동안 지연되고, 개시되거나 촉발되는 것을 의미한다.
- [0108] 본 명세서에서 지칭되는 바와 같은 용어 "즉방형"은, 경구 약제학적 조성물이 투여된 경우에 투여 후 적은 시간 기간, 전형적으로 45분 미만 내에 활성 성분을 방출하는 것을 의미한다. 즉방형 약물 전달 시스템용의 경구 제형은, 속도 제어 특성을 가지지 않은 채 약제학적 활성 성분을 봉해시켜 방출하도록 설계된 종래 유형의 약물 전달 시스템, 예컨대, 특정 코팅 및 기타 수법이다.
- [0109] 용어 "경구 봉해 정제"(ODT)는, 1%를 초과하지 않는 이취성(friability) 및 양호한 구강 촉감을 가지면서 60초 미만의 봉해 시간을 가진 정제를 지칭한다. 경구 봉해 정제(ODT)는, 특히, 소아과, 위 및 시설 환자 또는 화학요법-유발 구역질을 가진 환자에서 환자 순응도를 개선할 수 있다.
- [0110] 본 발명에서 이용될 수 있는 경구 투약 형태는, 정제, 과립, 구체 또는 캡슐 내 펠릿 또는 임의의 다른 적절한 고체 형태를 포함한다.
- [0111] "데포 제형"은, 투여 부위로부터 화학식 I 또는 화학식 II의 분자, 또는 이들의 조합 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염, 유도체, 이성질체, 다형체, 용매화물, 수화물, 유사체, 거울상이성질체, 호변이성질체 형태 또는 혼합물의 느린 흡수를 제공하고, 흔히 한번에 수일 또는 수주 동안 환자의 체내에서 분자 또는 활성 대사산물의 치료적 수준을 유지하도록 제형화될 수 있다. 대안적으로, 데포 제형은 만성 약물을 필요로 하는 환자에게 GI관에의 노출 없이 본 발명의 분자를 전달함으로써 편리성을 제공할 수 있다. 게다가, 데포 제형은 드문 투약 요법 및 편리성으로 의해 더 양호한 순응도를 제공할 수 있다. 환자 순응도를 증대시키는 데포 제형의 추가적인 특징은 투여 용이성 및 주사 부위에서의 양호한 국부 내성이다.
- [0112] 투약 형태는 환자의 증상, 연령 및 체중, 치료 혹은 예방될 장애의 속성 및 중증도, 투여 경로 및 약물의 형태에 따라서 다양할 것이다. 일반적으로 0.01 내지 2000mg의 화합물의 1일 용량이 성인 인간 환자를 위하여 권장되며, 이것은 1회 용량으로 또는 분할 용량으로 투여될 수 있다. 단일 투약 형태를 생성하기 위하여 적어도 하나의 담체와 조합될 수 있는 활성 성분의 양은, 일반적으로 치료 효과를 내는 화합물의 양일 것이다.
- [0113] 주어진 환자에서 치료의 효능의 관점에서 가장 효과적인 결과를 수득하게 되는 조성물의 투여 시간 및/또는 양은, 특정 화합물의 활성, 약동학 및 생체 이용률, 환자의 생리적 조건(연령, 성별, 질환 유형 및 병기, 일반적 신체 상태, 주어진 투약 형태에 대한 반응 및 약물 유형을 포함함), 투여 경로 등에 따라 좌우될 것이다.
- [0114] 용어 "약제학적으로 허용가능한"은, 합당한 의학 판단 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 인간 및 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고, 합리적인 유익/유해비에 상응하는 리간드, 재료, 조성물 및/또는 투약 형태를 지칭하도록 본 명세서에서 사용된다.
- [0115] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "약제학적으로 허용가능한 담체"는, 약제학적으로 허용가능한 재료, 조성물 또는 비히클, 예컨대, 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매 또는 캡슐화 재료를 의미한다. 각각의 담체는, 활성 성분을 비롯하여 제형의 다른 성분과 상용성이고 환자에게 손상을 주거나 해가 되지 않는다는 점에서 허용될 수 있어야 한다. 약제학적으로 허용가능한 담체로서 역할할 수 있는 재료의 몇몇 예는, 당, 예컨대, 락토스, 글루코스 또는 수크로스; 전분, 예컨대, 옥수수 전분, 감자 전분 및 치환 또는 비치환 β -사이클로덱스트린; 셀룰로스 또는 이의 유도체, 예컨대, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 또는 셀룰로스 아세테이트; 분말화 트래거캔스; 맥아; 젤라틴; 펠크; 또는 기타 부형제, 예컨대, 코코아 버터 또는 좌제 왁스; 오일, 예컨대, 땅콩유, 면실유, 홍화유, 참깨유, 올리브유, 옥수수유 또는 대두유; 글리콜, 예컨대, 프로필렌 글리콜; 폴리올, 예컨대, 글리세린, 솔비톨, 만니톨 또는 폴리에틸렌 글리콜; 에스터, 예컨대, 에틸 올레이트 또는 에틸 라우레이트; 한천; 완충제, 예컨대, 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; 알긴산; 발열원 비함유수;

등장성 식염수; 링거액; 에틸 알코올; 인산염 완충 용액; 및 약제학적 제형에 사용되는 기타 비독성의 상용성 물질을 포함한다.

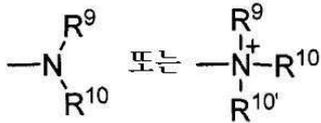
- [0116] 용어 "약제학적으로 허용가능한 염"은 화합물(들)의 비교적 비독성의 무기산 및 유기산 부가염을 의미한다. 화합물(들)의 마지막 단리 및 정제 동안 동소에서(*in situ*), 또는 정제된 화합물(들)을 그의 유리 염기 형태로 적합한 유기산 또는 무기산과 분리하여 반응시키고 이렇게 형성된 염을 단리함으로써 이 염을 제조할 수 있다. 대표적인 염은 브롬산염, 염산염, 황산염, 중황산염, 인산염, 질산염, 아세트산염, 발레르산염, 올레산염, 팔미트산염, 스테아르산염, 라우르산염, 벤조산염, 락트산염, 인산염, 토실산염, 시트르산염, 말레산염, 푸마르산염, 숙신산염, 타르타르산염, 나프틸산염, 메실산염, 글루코헵토산염, 락토비온산염, 라우릴설포산염 및 아미노산염 등을 포함한다(예를 들어, 문헌[Berge et al. (1977) "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.* 66: 1-19] 참조).
- [0117] 용어 "할로" 또는 "할로겐"은 염소, 브로민, 플루오린 또는 요오드를 지칭한다. 플루오린이 바람직한 할로겐이다.
- [0118] 본 발명의 약제학적 조성물은 당업계에 충분히 공지된 통상의 약제학적 부형제를 이용해서 통상의 절차에 의해 얻어질 수 있다.
- [0119] 다른 경우에, 본 발명의 화합물은 하나 이상의 산성 작용기를 포함할 수 있고, 따라서 약제학적으로 허용가능한 염기와 약제학적으로 허용가능한 염을 형성할 수 있다. 이들 염은, 마찬가지로, 예를 들어, 약제학적으로 허용가능한 금속 양이온의 수산화물, 탄산염 또는 중탄산염 등과 같은 적절한 염기와, 암모니아와, 또는 약제학적으로 허용가능한 유기 1차, 2차 또는 3차 아민과 유리산 형태의 정제된 화합물(들)을 개별적으로 반응시킴으로써 또는 화합물(들)의 최종 단리 및 정제 동안 동소에서 제조될 수 있다. 대표적인 알칼리염 또는 알칼리 토금속염은 리튬염, 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 마그네슘염 또는 알루미늄염 등을 포함한다. 염기 부가염의 형성에 유용한 대표적인 유기 아민은 에틸아민, 다이에틸아민, 에틸렌다이아민, 에탄올아민, 다이에탄올아민, 피페라진 등을 포함한다(예를 들어, 문헌[Berge et al. 1977, "Pharmaceutical Salts"] 참조).
- [0120] 본 명세서에서 사용되는 용어 "친화도 태그"는, 접합체가 용액으로부터 추출되게 하는, 본 발명의 화합물에 또는 단백질 키나제 도메인에 연결된, 리간드 또는 기를 의미한다.
- [0121] 용어 "알킬"은 할로알킬기, 예컨대, 트라이플루오로메틸 및 2,2,2-트라이플루오로에틸 등을 포함하는 직쇄 알킬 및 분지쇄 알킬기를 포함하는 치환 또는 비치환 포화 탄화수소기를 지칭한다. 대표적인 알킬기는 메틸, 에틸, n-프로필, 아이소프로필, n-부틸, t-부틸, 아이소부틸, sec-부틸, (사이클로헥실)메틸, 사이클로프로필메틸, n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸 등을 포함한다.
- [0122] 용어 "알켄일" 및 "알킨일"은 상기 기재된 알킬에 대한 가능한 치환 및 길이가 유사하지만, 각각 적어도 하나의 이중 결합 또는 삼중 결합을 포함하는 치환 또는 비치환 불포화 지방족 기를 지칭한다. 대표적인 알켄일기는 비닐, 프로펜-2-일, 크로틸, 아이소펜텐-2-일, 1,3-부타다이엔-2-일, 2,4-펜타다이엔일 또는 1,4-펜타다이엔-3-일을 포함한다. 대표적인 알킨일기는 에틴일, 1-프로핀일, 3-프로핀일 또는 3-부틴일을 포함한다. 소정의 바람직한 실시형태에서, 알킬 치환기는 예를 들어 1개 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 알킬기이다. 유사하게, 알켄일 또는 알킨일은 바람직하게는 예를 들어 2개 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 저급 알켄일 또는 알킨일기를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 "알킬렌"은 (단일 원자가보다는) 2개의 개방 원자를 갖는 알킬기, 예컨대, $-(CH_2)_{1-10}-$ 및 이의 치환 변이체를 지칭한다.
- [0123] 용어 "알콕시"는 산소가 부착된 알킬기를 지칭한다. 대표적인 알콕시기는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, tert-부톡시 등을 포함한다. "에터"는 산소에 의해 공유 결합된 2개의 탄화수소이다. 따라서, 알킬이 에터가 되게 하는 알킬의 치환기는 알콕시이거나 이와 닮은 것이다.
- [0124] 용어 "알콕시알킬"은 알콕시기로 치환되어 에터를 형성하는 알킬기를 의미한다.
- [0125] 용어 "아마이드" 및 "아미도"는 아미노-치환 카보닐로서 당해 분야에서 인정되어 있고 하기 일반적으로 표시될 수 있는 모이어터를 포함한다:



[0126]

[0127] 식 중, R^9 , R^{10} 은 위에서 정의한 바와 같다. 아마이드의 바람직한 실시형태는 불안정할 수도 있는 이미드를 포함하지 않을 것이다.

[0128] 용어 "아민" 및 "아미노"는 당해 분야에서 인정되어 있고, 비치환 및 치환 아민 둘 다 및 이들의 염, 예컨대, 하기 일반식으로 표시될 수 있는 모이어티를 의미한다:



[0129]

[0130] 식 중, R^9 , R^{10} 및 $R^{10'}$ 은 각각 독립적으로 수소, 알킬, 알켄일, $-(CH_2)_p-R^8$ 을 나타내거나, R^9 와 R^{10} 은 이들이 부착된 N 원자와 함께 고리 구조에서 4개 내지 8개의 원자를 갖는 헤테로사이클(즉, 복소환)을 완성하고; R^8 은 아릴, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 헤테로사이클릴 또는 폴리사이클릴을 나타내고; p는 0 또는 1 내지 8의 정수이다. 바람직한 실시형태에서, R^9 또는 R^{10} 중 오직 하나는 카보닐일 수 있고, 예를 들어 R^9 , R^{10} 및 질소는 함께 이미드를 형성하지 않는다. 훨씬 더 바람직한 실시형태에서, R^9 또는 R^{10} (및 임의로 $R^{10'}$)은 각각 독립적으로 수소, 알킬, 알켄일 또는 $-(CH_2)_p-R^8$ 을 나타낸다. 소정 실시형태에서, 아미노기는 염기성이고, 이는 양성자화 형태가 $pK_a \geq 7.00$ 을 갖는다는 것을 의미한다.

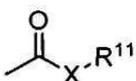
[0131] 본 명세서에서 사용되는 용어 "아르알킬"은 아릴기로 치환된 알킬기, 예를 들어 $-(CH_2)_p-Ar$ 을 지칭한다.

[0132] 본 명세서에서 사용되는 용어 "헤테로아르알킬"은 헤테로아릴기로 치환된 알킬기, 예를 들어 $-(CH_2)_p-Het$ 를 지칭한다.

[0133] 본 명세서에서 사용되는 용어 "아릴"은 고리의 각각의 원자가 탄소인 5원, 6원 및 7원 치환 또는 비치환 단일 고리 방향족 기를 포함한다. 용어 "아릴"은 또한 2개 이상의 탄소가 2개의 인접한 고리에 공통인 2개 이상의 환식 고리를 갖는 다환식 고리계를 포함하되, 여기서 적어도 하나의 고리는 방향족이고, 예를 들어 다른 환식 고리는 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 사이클로알킨일, 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로사이클릴일 수 있다. 아릴기는 벤젠, 나프탈렌, 페난트렌, 페놀, 아닐린, 안트라센 또는 페난트렌을 포함한다.

[0134] 본 명세서에서 사용되는 용어 "카보사이클"(즉, 탄소환) 및 "카보사이클릴"은 고리의 각각의 원자가 탄소인 비방향족 치환 또는 비치환 고리를 지칭한다. 용어 "카보사이클" 및 "카보사이클릴"은 2개 이상의 탄소가 2개의 인접한 고리에 공통인 2개 이상의 환식 고리를 갖는 다환식 고리계를 또한 포함하되, 여기서 적어도 하나의 고리는 카보사이클릭이고, 예를 들어, 다른 환식 고리는 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 사이클로알킨일, 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로사이클릴일 수 있다. 대표적인 카보사이클릭기는 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 1-사이클로헥세닐 또는 3-사이클로헥센-1-일 또는 사이클로헵틸을 포함한다.

[0135] 용어 "카보닐"은 당해 분야에서 인정되어 있고, 하기 일반식으로 표시될 수 있는 모이어티를 포함한다:



[0136]

[0137] 식 중, X는 결합이거나 산소 또는 황을 나타내고, R^{11} 은 수소, 알킬, 알켄일, $-(CH_2)_p-R^8$ 또는 약제학적으로 허용 가능한 염을 나타낸다. X가 산소이고, R^{11} 이 수소가 아닌 경우, 화학식은 "에스터"를 나타낸다. X가 산소이고, R^{11} 이 수소인 경우, 화학식은 "카복실산"을 나타낸다.

- [0138] 용어 "헤테로아틸"은 고리 구조가 1개 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 치환 또는 비치환 방향족 5원 내지 7원 고리 구조, 더 바람직하게는 5원 내지 6원 고리를 포함한다. 용어 "헤테로아틸"은 2개 이상의 탄소가 2개의 인접한 고리에 공통인 2개 이상의 환식 고리를 갖는 다환식 고리계를 또한 포함하되, 여기서 적어도 하나의 고리는 헤테로방향족이고, 예컨대, 다른 환식 고리는 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 사이클로알킨일, 아틸, 헤테로아틸 또는 헤테로사이클릴일 수 있다. 헤테로아틸기는 예를 들어 피롤, 푸란, 티오펜, 이미다졸, 아이소옥사졸, 옥사졸, 티아졸, 트리아아졸, 피라졸, 피리딘, 피라진, 피리다진 및 피리미딘 등을 포함한다.
- [0139] 본 명세서에서 사용되는 용어 "헤테로원자"는 탄소 또는 수소 이외의 임의의 원소의 원자를 의미한다. 바람직한 헤테로원자는 질소, 산소 및 황이다.
- [0140] 용어 "헤테로사이클릴" 또는 "헤테로사이클릭"은 고리 구조가 1개 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 치환 또는 비치환 비방향족 3원 내지 10원 고리 구조, 더 바람직하게는 3원 내지 7원 고리를 의미한다. 용어 "헤테로사이클릴" 또는 "헤테로사이클릭"은 2개 이상의 탄소가 2개의 인접한 고리에 공통인 2개 이상의 환식 고리를 갖는 다환식 고리계를 또한 포함하되, 여기서 적어도 하나의 고리는 헤테로사이클릭이고, 예를 들어 다른 환식 고리는 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 사이클로알킨일, 아틸, 헤테로아틸 및/또는 헤테로사이클릴일 수 있다. 헤테로사이클릴기는 예를 들어 테트라하이드로푸란, 테트라하이드로피란, 피페리딘, 피페라진, 피롤리딘, 몰폴린, 락톤 또는 락탐을 포함한다.
- [0141] 본 명세서에서 사용되는 용어 "탄화수소"는, =O 또는 =S 치환기를 갖지 않고 전형적으로 적어도 하나의 탄소-수소 결합 및 주로 탄소 골격을 갖지만, 임의로 헤테로원자를 포함할 수 있는, 탄소 원자를 통해 결합된 기를 지칭한다. 따라서, 메틸, 에톡시에틸, 2-피리딜 또는 트라이플루오로메틸과 같은 기는 본 출원의 목적 상 하이드로카빌인 것으로 여겨지고, 아세틸(결합 탄소 상에 =O 치환기를 가짐) 및 에톡시(탄소가 아닌 산소를 통해 연결됨)와 같은 치환기는 아니다. 하이드로카빌기는 아틸, 헤테로아틸, 카보사이클, 헤테로사이클, 알킬, 알켄일, 알킨일 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0142] 용어 "폴리사이클릴" 또는 "폴리사이클릭"은 2개 이상의 탄소가 2개의 인접한 고리에 공통인 2개 이상의 고리(예를 들어, 사이클로알킬, 사이클로알켄일, 사이클로알킨일, 아틸, 헤테로아틸 및/또는 헤테로사이클릴)를 지칭하고, 예를 들어 고리는 "축합 고리"이다. 폴리사이클(즉, 다환)의 각각의 고리는 치환 또는 비치환일 수 있다.
- [0143] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "프로브"는 검출 가능한 표지 또는 친화도 태그로 표지되고 단백질 키나제 도메인에 대해 공유로 또는 비공유로 결합할 수 있는 본 발명의 화합물을 의미한다. 예를 들어, 프로브가 비공유 결합될 때, 이는 시험 화합물로 대체될 수 있다. 예를 들어, 프로브가 공유 결합될 때, 이는 가교 결합된 부가물을 형성하도록 사용될 수 있고, 이 부가물은 시험 화합물에 의해 정량화되고 억제될 수 있다.
- [0144] 용어 "치환된"은 골격의 하나 이상의 탄소 상에 수소를 대체하는 치환기를 갖는 모이어티를 지칭한다. "치환" 또는 "으로 치환된"은, 이러한 치환이 치환된 원자 및 치환기의 허용되는 원자가에 따르며, 치환이 예컨대 제배열, 고리화, 제거 등에 의해 자발적으로 변형을 겪지 않는 예를 들어 안정한 화합물을 생성시킨다는 암시적 조건을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "치환된"은 유기 화합물의 모든 허용되는 치환기를 포함하는 것으로 고려된다. 광의의 양상에서, 허용되는 치환기는 유기 화합물의 비환식 또는 환식, 분지형 또는 비분지형, 카보사이클릭 또는 헤테로사이클릭, 방향족 또는 비방향족 치환기를 포함한다. 허용되는 치환기는 하나 이상이고 적절한 유기 화합물에 대해 동일하거나 상이할 수 있다. 본 발명의 목적을 위해, 헤테로원자, 예컨대, 질소는 수소 치환기 및/또는 헤테로원자의 원자가를 만족시키는 본 명세서에 기재된 유기 화합물의 임의의 허용되는 치환기를 가질 수 있다. 치환기는 예를 들어 할로젠, 하이드록실, 카보닐(예컨대, 카복실, 알콕시카보닐, 폼일 또는 아실), 티오카보닐(예컨대, 티오에스터, 티오아세테이트 또는 티오폴에이트), 알콕실, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 포스포네이트, 아미노, 아미도, 아미딘, 이민, 사이아노, 나이트로, 아자이도, 설프하이드릴, 알킬티오, 설페이트, 설포네이트, 설프아미도, 설포닐, 헤테로사이클릴, 아르알킬, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티를 포함할 수 있다. 당업자라면 탄화수소 사슬 상에 치환된 모이어티는 그 자체가 적절한 경우 치환될 수 있는 것임을 이해할 것이다.
- [0145] 본 발명의 화합물은 또한 중간체 및/또는 최종 화합물에 존재하는 원자의 동위원소를 포함한다. 동위원소는 동일한 원자 번호를 갖지만 상이한 질량수를 갖는 원자를 포함한다. 예를 들어, 수소의 동위원소는 중수소 또는 삼중수소를 포함한다.
- [0146] **치료 용도 및 적용**

- [0147] 본 발명의 화합물은 단백질 키나제 활성의 저해제이다.
- [0148] 본 발명의 일 양상은, 치료법에 이용하기 위한, 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물 또는 이들의 조합, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물을 제공한다.
- [0149] 본 발명의 화합물은 생체내 단백질 키나제 저해 효과를 발생시키는데 적합하고, 따라서 단백질 키나제 표적들 중 하나 이상이 연루되는 질환 또는 병태의 치료에 적합하다.
- [0150] 일 실시형태에 있어서, 단백질 키나제는 다음의 군: Tec, Src, Abl, Jak, Csk, Fak, Syk, Fer 또는 Ack 키나제, 및 수용체 단백질 키나제로부터 선택된다. 바람직하게는 단백질 키나제는 Tec 또는 Src 키나제 패밀리로부터 유래된다.
- [0151] 일 실시형태에 있어서, 화합물은 Tec 키나제 표적에 의해 매개된 증식성 장애의 저해를 위하여 적합하다.
- [0152] 다른 실시형태에 있어서, 화합물은 Src 키나제 표적에 의해 매개된 증식성 장애의 저해를 위하여 적합하다.
- [0153] 본 발명의 일 양상은 세포 내에서 단백질 키나제 활성을 저해하는 방법을 제공하되, 해당 방법은, 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물, 이들의 조합, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물을 상기 세포에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0154] 추가의 양상에 있어서, 본 발명은 시험관내 또는 생체내에서 단백질 키나제를 저해하는 방법을 제공하되, 해당 방법은, 세포를 유효량의 본 명세서에서 정의된 바와 같은 화합물, 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물과 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0155] 본 발명의 추가의 양상은 인간 또는 동물 대상체에서 단백질 키나제 활성을 저해하는 방법을 제공하되, 해당 방법은 유효량의 본 명세서에서 정의된 바와 같은 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물, 이들의 조합, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0156] 본 발명의 화합물은 위에서 개요된 단백질 키나제 표적들 중 하나 이상이 연루된 질환 또는 병태의 치료에 적합하다.
- [0157] 용어 "증식성 장애"는 유해한 세포 증식의 제어를 필요로 하는 임의의 장애, 예를 들어 암 또는 제어되지 않은 세포 증식과 연관된 기타 장애, 예컨대, 건선과 같은 피부과 장애, 소정의 바이러스성 장애, 재협착증 또는 심근증과 같은 심혈관 질환, 소정의 CNS 장애, 사구체신염 또는 류마티스 관절염과 같은 자가면역 장애, 호르몬-관련 질환, 대사 장애, 혈전증, 뇌졸중, 탈모, 폐기종, 염증성 질환 또는 감염성 질환, 예컨대, 진균 질환, 또는 말라리아 등과 같은 기생충 장애를 포함하도록 광의로 본 명세서에서 이용된다. 이들 장애에서, 본 발명의 화합물은 필요한 경우 목적으로 하는 세포 내에서 세포자멸사를 유도하거나 정체를 유지할 수 있다.
- [0158] 용어 "단백질 키나제 매개 질환"은 단백질 키나제-매개 이벤트에 의해 촉발된 비정상 세포 반응과 연관되는 것으로 본 명세서에서 이용된다. 또한, 각종 단백질 키나제의 비정상적 활성화 또는 과도한 발현은 양성 또는 악성 증식을 특징으로 하는 다수의 질환 및 장애의 기전에 연루된다. 이들 질환은 알리지 또는 천식, 알츠하이머병, 자가면역 질환, 골 질환, 암, 심혈관 질환, 염증성 질환, 호르몬-관련 질환, 대사 질환, 신경 또는 신경변성 질환을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아니다. 따라서, 키나제 패밀리의 저해제는 고형 종양, 혈액학적 악성종양, 혈전, 관절염, 이식편 대 숙주 질환, 홍반성 낭창, 건선, 대장염, 회장염, 다발성 경화증, 포도막염, 관상 동맥 맥관장애, 전신 경피증, 죽상동맥경화증, 천식, 이식 거부, 알리지 또는 피부근염을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아닌, 암, 혈관 질환, 자가면역 질환 또는 염증성 병태의 치료에 적합한 것으로 예상된다.
- [0159] 일 실시형태에 있어서, 화학식 I의 화합물, 화학식 II의 화합물, 이들의 조합, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물은, 세포 증식, 세포 생존, 바이러스성 복제, 심혈관 장애, 신경변성, 자가면역, 대사 장애, 뇌졸중, 탈모, 염증성 질환 또는 감염성 질환에 연루된 숙주세포 키나제들 중 하나 이상을 저해함으로써 작용한다.
- [0160] 또 다른 실시형태에 있어서, 증식성 장애는 암이다. 암은 만성 림프구성 백혈병(CLL), 림프종, 백혈병, 유방암, 폐암, 전립선암, 결장암, 흑색종, 췌장암, 난소암, 편평세포암종, 두경부 암종, 자궁내막 또는 식도 암종으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0161] 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 감염성 질환은 인간 및 동물에서 원생동물의 체내 침입에 의해 초래되는 질환

을 포함한다. 이러한 수의과 및 인간 병원성 원생동물(*Protozoas*)은 바람직하게는 정단복합체충류(*Apicomplexa*)문 또는 육질편모충류(*Sarcomastigophora*)문의 세포내 활성 기생충, 특별히 트리파노소마(*Trypanosoma*), 플라스모디아(*Plasmodia*), 리슈마니아(*Leishmania*), 바베시아(*Babesia*) 또는 테일레리아(*Theileria*), 크립토스포리디아(*Cryptosporidia*), 사르코시스티다(*Sarcocystida*), 아모에비아(*Amoebia*), 코시디아(*Coccidia*) 또는 트라이코모나디아(*Trichomonadia*)이다. 본 발명의 화합물은 플라스모듐 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*)에 의해 초래되는 열대성 말라리아, 플라스모듐 비박스(*Plasmodium vivax*) 또는 플라스모듐 오발레(*Plasmodium ovale*)에 의해 초래되는 삼일열 말라리아의 치료를 위하여, 또는 플라스모듐 말라리에(*Plasmodium malariae*)에 의해 초래되는 사일열 말라리아의 치료를 위하여 특히 적합하다. 이들 화합물은 또한 톡소플라즈마 곤디이(*Toxoplasma gondii*)에 의해 초래되는 톡소플라즈마증(*Toxoplasmosis*), 아이소스포라 벨리(*Isospora belli*)에 의해 초래되는 콕시듐증, 사르코시스티스 수이호미니스(*Sarcocystis suihominis*)에 의해 초래되는 장내 주육포자충증(*Sarcosporidiosis*), 엔타모에바 히스톨리티카(*Entamoeba histolytica*)에 의해 초래되는 세균성 이질, 크립토스포리듐 파븀(*Cryptosporidium parvum*)에 의해 초래되는 크립토스포리디오시스증(*Cryptosporidiosis*), 트리파노소마 크루지(*Trypanosoma cruzi*)에 의해 초래되는 사가스병(*Chagas disease*), 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 로데시엔스(*rhodesiense*) 또는 감비엔스(*gambiense*)에 의해 초래되는 수면병, 피부 또는 내장뿐만 아니라, 레이쉬마니아증(*Leishmaniosis*)의 기타 형태의 치료에 적합하다. 본 발명은 또한 수의과 병원균 원충(*Protozoa*), 예컨대, 소 이스트 코스트 열병을 초래하는 병원균인 테일레리아 파바(*Theileria parva*), 아프리카에서 나가나 소 질환을 초래하는 병원균인 트리파노소마 콩골렌스(*Trypanosoma congolense*) 또는 트리파노소마 비박스(*Trypanosoma vivax*), 트리파노소마 브루세이(*Trypanosoma brucei*), 수라증을 초래하는 트리파노소마 브루세이 에반시(*Trypanosoma brucei evansi*), 소 및 물소에서 텍사스 열을 초래하는 병원균인 바베시아 비게미나(*Babesia bigemina*), 개, 고양이 및 양에서의 바베시아증뿐만 아니라 유럽 소 바베시아증(*European bovine Babesiosis*)을 초래하는 병원균인 바베시아 보비스(*Babesia bovis*), 양, 소 및 돼지에서 근육포자충증을 초래하는 병원균인 사르코시스티스 오비카니스(*Sarcocystis ovis*) 및 사르코시스티스 오비펠리스(*Sarcocystis ovifelis*), 소 및 조류에서 크립토스포리디오시스증을 초래하는 병원균인 크립토스포리디아, 토끼, 소, 양, 염소, 돼지 및 조류, 특별히 닭 및 칠면조에서 콕시듐증을 초래하는 병원균인 아이메리아(*Eimeria*) 및 아이소스포라(*Isospora*)종에 의해 감염된 동물의 치료에 적합하다. 본 발명의 화합물은 특히 콕시듐증 또는 말라리아 감염의 치료에 이용하기 위하여 또는 이들 질환의 치료를 위한 약물 또는 사료의 제조를 위하여 바람직하다. 이들 치료는 예방적 또는 치유적일 수 있다. 말라리아의 치료에 있어서, 단백질 키나제 저해제는, 위에서 정의된 바와 같이, 적어도 1종의 다른 항말라리아제와 조합될 수 있다. 기술된 본 발명의 화합물은 또한 바이러스성 감염 또는 뉴모시스티스 카리니이(*Pneumocystis carinii*)에 의해 초래되는 기타 감염에 이용될 수 있다.

- [0162] Tec 키나제는 조혈 기원 세포에서 배타적이지는 않지만 주로 발견되는 비수용체 티로신 키나제의 패밀리아다. Tec 패밀리는 Tec, 브루톤의 티로신 키나제(Btk), 유도성 T-세포 키나제(Itk), 휴면 림프구 키나제(R1k/Txk) 및 골수-발현 키나제(Bmx/Etk)를 포함한다.
- [0163] Btk는 Src-패밀리 키나제에 의해 활성화되고 B-세포 기능 및 생존에 대한 영향을 초래하는 PLC 감마를 인산화시킨다. 또한, Btk는 대식세포, 비만세포 및 호중구에 의한 면역 복합 인지에 반응하여 신호 전달에 중요하다. Btk 저해는 또한 림프종 세포의 생존에도 중요한데(Herman SEM. Blood, 2011, 117:6287-6289), 이는 Btk의 저해가 림프종의 치료에서 유용할 수 있음을 시사한다. 다른 Tec 패밀리 구성원인 Bmx는 암, 심혈관 질환 또는 염증을 포함하는 각종 질환의 치료에 적합할 것으로 예상된다.
- [0164] 본 발명의 추가의 양상에 있어서, 화학식 I의 화합물, 화학식 II의 화합물, 이들의 조합, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물은, 세포 키나제의 저해제로서, 항염증제로서, 항암제 또는 항혈전제로서 작용한다. 이들 화합물은 암, 염증성 질환 또는 혈전의 치료를 위하여 단독으로 또는 하나 이상의 제제와 조합하여 이용될 수 있다.
- [0165] 더욱 구체적으로는, 본 발명의 화합물은 또한 특히 암 또는 기타 신생물의 치료에서 이용되는 1종 이상의 화학요법제와 조합하여 이용될 수 있다.
- [0166] 본 발명의 화학식 I의 화합물, 화학식 II의 화합물, 이들의 조합, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물, 대상은, 하기로 제한되는 것은 아니지만 하기와 조합하여 이용될 수 있다:

- [0167] 1. 아드리아마이신, 텍사메타손, 빈크리스틴, 사이클로포스파마이드, 플루오로유라실, 토포테칸, 탁솔, 인터페론 또는 백금 유도체 등과 같은 항증식제; 코르티코스테로이드, TNF 차단제, IL-1 RA, 아자티오프린, 사이클로포스파마이드 또는 설파살라진 등과 같은 항염증제;
- [0168] 2. 프레닐-단백질 전이효소 저해제;
- [0169] 3. 소라페닙, 수니티닙, 파조파닙, 또는 에베롤리무스를 포함하는 혈관신생 저해제;
- [0170] 4. 하기를 포함하는 면역조절제 또는 면역억제제: 사이클로스포린, 타크롤리무스, 라파마이신, 마이코페놀레이트 모페틸, 인터페론, 코르티코스테로이드, 사이클로포스파마이드, 아자티오프린 또는 설파살라진;
- [0171] 5. 티아졸리딘다이온 등과 같은 PPAR- γ 작용제;
- [0172] 6. PPAR- δ 작용제;
- [0173] 7. 내인성 다제내성의 저해제;
- [0174] 8. 적혈구생성, 자극제, 비타민 또는 철분 보충제를 포함하는 빈혈 치료제;
- [0175] 9. 5-HT3 수용체 길항제, 도파민 길항제, NK1 수용체 길항제, H1 히스타민 수용체 길항제, 카나비노이드, 벤조디아제핀, 항콜린제 또는 스테로이드를 포함하는 구토방지제;
- [0176] 10. 호중구감소증의 치료제;
- [0177] 11. 면역증강제;
- [0178] 12. 프로테아좀 저해제;
- [0179] 13. HDAC 저해제;
- [0180] 14. 프로테아좀에서의 케모트립신-유사 활성의 저해제;
- [0181] 15. E3 리가제 저해제;
- [0182] 16. 하기를 포함하는 면역계의 조절제: 인터페론-알파, 칼메트 게랭 간균(BCG), 또는 사이토카인, 예컨대, 인터류킨, TNF의 방출을 유도할 수 있거나 또는 TRAIL 등과 같은 사멸 수용체 리간드의 방출을 유도할 수 있는 이온화 방사선(UVB);
- [0183] 17. 방사선 요법과 조합하여 또는 방사선 요법과 순차적으로 인간화 항체 HGS-ETR1 또는 HGS-ETR 등과 같은 사멸 수용체 TRAIL 또는 TRAIL-작용제의 조절제;
- [0184] 18. 아세틸콜린에스테라제 저해제, MAO 저해제, 인터페론, 항경련제, 이온 통로 차단제 또는 릴루졸을 포함하는 신경영양 인자;
- [0185] 19. 항콜린제, 도파민제제, 예컨대, 도파민 전구체, 모노아민 옥시다제 B 저해제, COMT 저해제, 또는 도파민 수용체 작용제를 포함하는 항파킨슨제;
- [0186] 20. 베타-차단제, ACE 저해제, 이노제, 질산염, 칼슘 통로 차단제 또는 스타틴 등과 같은 심혈관 질환 치료제;
- [0187] 21. 코르티코스테로이드, 콜레스티라민 또는 인터페론을 포함하는 간 질환 치료제;
- [0188] 22. 뉴클레오타이드 역전사효소 저해제, 비뉴클레오타이드 역전사효소 저해제, 프로테아제 저해제, 인테그라제 저해제, 융합 저해제, 케모카인 수용체 길항제, 중합효소 저해제, 바이러스성 단백질 합성 저해제, 바이러스성 단백질 변형 저해제, 뉴라민가수분해효소 저해제, 융합 또는 진입 저해제를 포함하는 항-바이러스제;
- [0189] 23. 코르티코스테로이드, 항백혈병제 또는 성장 인자 등과 같은 혈액 장애를 치료제;
- [0190] 24. 감마 글로불린, 아달리무맙, 에타네셉트 또는 인플릭시맙 등과 같은 면역결핍 장애 치료제; 또는
- [0191] 25. 토바스타틴, 플루바스타틴, 로바스타틴, 프라바스타틴, 로수바스타틴, 심바스타틴 또는 피타바스타틴을 포함하는 HMG-CoA 환원효소 저해제.
- [0192] 본 명세서에서 정의된 바와 같이, 본 발명의 범위 내에서 키나제에 의해 매개된 증식성 장애에 대한 효과는, 시험관내 세포 검정에서, 예를 들어, Btk 키나제 저해 검정 및 비장 세포 증식 검정에서 시험관내 정제된 키나제를 저해하거나 세포 증식 또는 생존을 저해하는 능력에 의해 입증될 수 있다. 이들 검정은 첨부 실시예들에서

더욱 상세히 설명된다.

[0193] 본 발명은 인간 또는 동물 대상체에 대한 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물, 또는 이들의 조합, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물의 경피, 직장, 비경구 또는 경구 투여를 포함한다. 투여를 위한 용량 단위는 임의의 적절한 양, 예를 들어, 10mg 내지 5000mg의 화학식 I의 화합물, 화학식 II의 화합물, 이들의 조합(또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물 또는 이들의 조합)을 함유할 수 있다. 바람직하게는, 경구 투여용의 용량 단위는 인간 대상체 당 50mg 내지 500mg을 함유할 수 있다.

[0194] 본 발명의 화학식 I 또는 화학식 II의 화합물, 이들의 조합, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 용매화물은 1일당 1 내지 4회 투여될 수 있다. 용량은 임의의 적절한 치료적 유효량일 수 있고, 예를 들어, 본 발명의 화합물 0.01 내지 100 mg/kg 체중/일이 이러한 조성물을 공급받은 환자에게 투여될 수 있다. 용량은 넓은 한계치 내에서 변할 수 있고, 각 개인의 사례에서 개인 병태에 적합화되어야 한다. 상기 용도를 위하여, 적절한 용량은 투여 방식, 치료될 특정 병태 및 목적으로 하는 효과에 따라 달라질 것이다. 바람직하게는 1 내지 50 mg/kg 체중/일의 용량이 사용될 수 있다.

[0195] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 대형 포유동물, 예를 들어, 인간에 대한 적절한 용량 비율은, 1회 또는 분할된 용량으로, 예컨대, 1일 2 내지 4회 또는 서방성 형태로 경구 투여되는 약 10mg 내지 3g/일 정도이다. 국소 전달을 위하여, 피부의 투과율, 질환의 유형과 중증도 그리고 제형의 종류 및 적용 빈도에 따라서, 약제 내 상이한 농도의 활성 화합물이 국소 적용에 의한 치료 효과를 발휘하기에 충분할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 약제 내의 활성 화합물, 그의 약제학적으로 허용가능한 염, 용매화물, 염의 용매화물, 입체이성질체, 호변이성질체, 동위원소, 전구약물, 복합체 또는 생물학적 활성 대사산물의 농도는 1 $\mu\text{mol}/\ell$ 내지 100 mmol/ℓ 의 범위이다.

[0196] **구체적인 약어들**

- [0197] MS 질량 분광법
- [0198] ml 밀리리터
- [0199] $\mu\ell$ 마이크로리터
- [0200] mmol 밀리몰
- [0201] THF 테트라하이드로퓨란
- [0202] H₂ 수소
- [0203] Pd/C 탄소 상 팔라듐
- [0204] PTSA p-톨루엔설폰산
- [0205] HCl 염화수소
- [0206] NaH 수소화나트륨(광유 중 60%)
- [0207] tBuOK 칼륨 tert-부톡사이드
- [0208] LDA 리튬 다이아이소프로필아마이드
- [0209] CuI 요오드화구리(I)
- [0210] Cs₂CO₃ 탄산세슘
- [0211] DIPEA N,N-다이아이소프로필에틸아민
- [0212] MgSO₄ 황산마그네슘
- [0213] NaHCO₃ 중탄산나트륨
- [0214] TBAF 테트라-n-부틸암모늄 플루오라이드

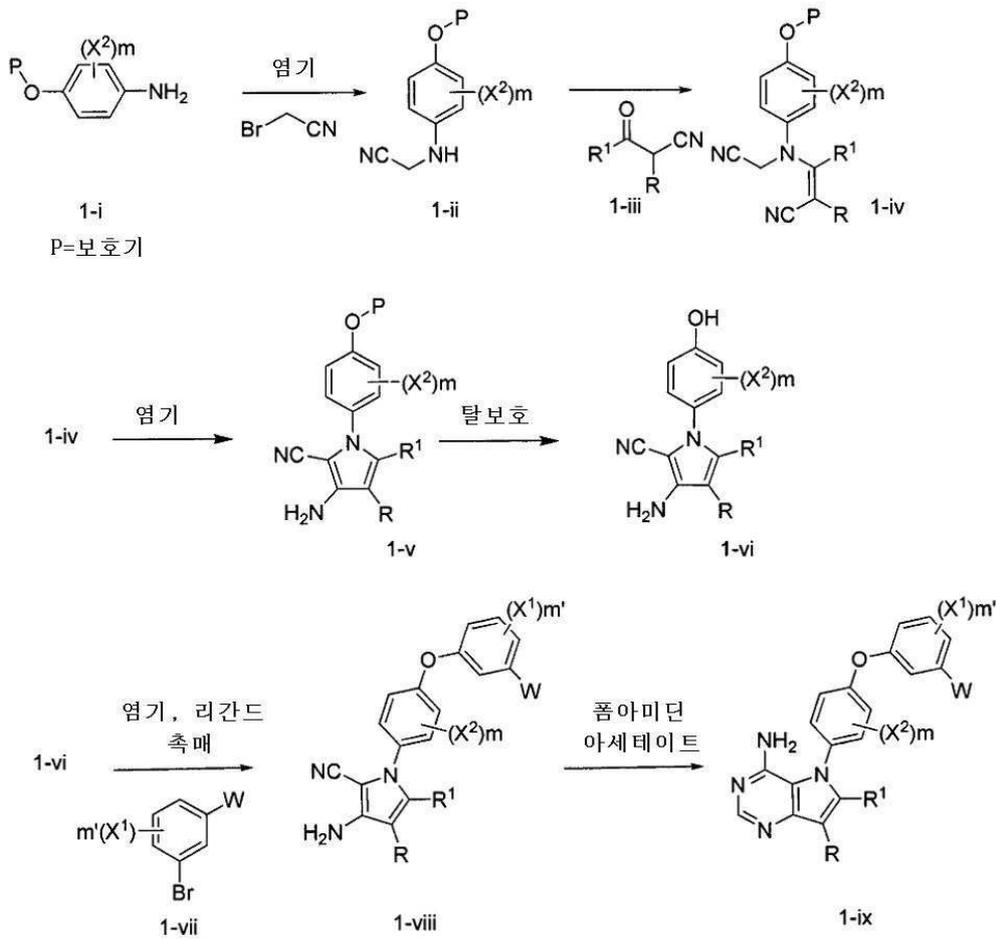
[0215] H₂O₂ 과산화수소

[0216] BH₃.Me₂S 보란 다이메틸 설과이드 복합체

[0217] **합성 방법**

[0218] 이하에 기재된 합성 방법의 설명에서 그리고 출발 물질을 제조하는데 이용되는 참조 합성 방법에 있어서, 용매의 선택, 반응 분위기, 반응 온도, 실험 기간 및 후처리 절차 등을 비롯한 모든 제안된 반응 조건은 당업자에 의해 선택될 수 있음이 이해되어야 한다.

[0219] 본 발명의 추가의 실시형태에서는, 본 명세서에 기재된 화합물을 제조하는 방법에서 유용한 일반적인 합성 방법(들)이 제공된다.



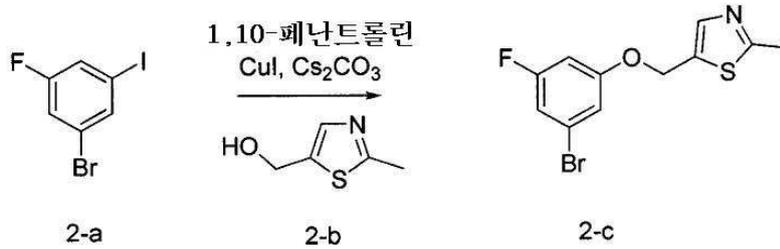
반응식 1

[0220]

[0221] **실시예**

[0222] 이하의 합성 방법은 본 발명의 화합물을 제조하는데 이용되는 화학을 나타내도록 의도된 것이며, 제한이 되도록 의도된 것은 아니다.

[0223] 중간체 2-c의 합성:



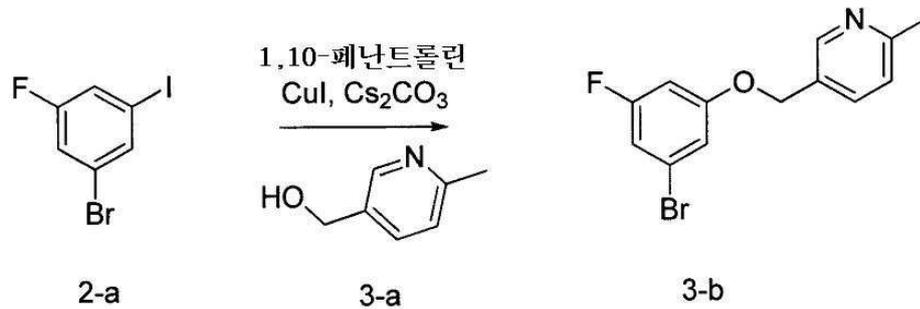
반응식 2

[0224]

[0225] 1,4-다이옥산(12.5ml) 중 1-브로모-3-플루오로-5-아이오도벤젠 2-a(7.5g, 25.0 mmol)의 용액에 (2-메틸티아졸-5-일)메탄올 2-b(3.5g, 27.5 mmol), 1,10-페난트롤린(901mg, 5.0 mmol), 요오드화구리(I)(476mg, 2.5 mmol) 및 탄산세슘(11.40g, 35.0 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 110℃에서 2일 동안 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시키고, 에틸 아세테이트로 희석시키고 나서, 셀라이트 상에서 여과시켰다. 염화암모늄의 포화 수용액을 이 여과액에 첨가하고, 유기 층을 분액시키고 나서, 수성층을 에틸 아세테이트로 2회 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후, 감압 하에 농축시켰다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 2-c를 베이지색 오일로서 제공하였다.

[0226]

중간체 3-b의 합성:



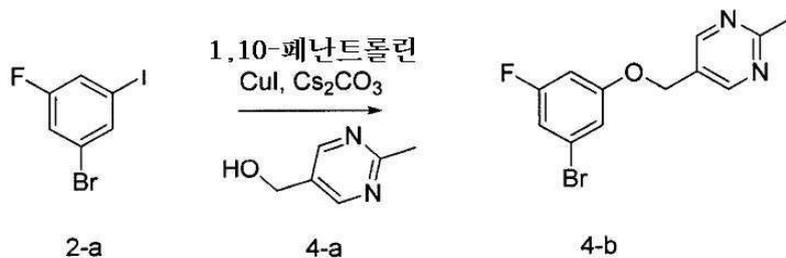
반응식 3

[0227]

[0228] 톨루엔(8.3ml) 중 1-브로모-3-플루오로-5-아이오도벤젠 2-a(5.0g, 16.6 mmol)의 용액에 (6-메틸피리딘-3-일)메탄올 3-a(2.2g, 18.2 mmol), 1,10-페난트롤린(599mg, 3.3 mmol), 요오드화구리(I)(316mg, 1.66 mmol) 및 탄산세슘(7.6g, 23.2 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 110℃에서 2일 동안 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시키고, 에틸 아세테이트로 희석시키고 나서, 셀라이트 상에서 여과시켰다. 염화암모늄의 포화 수용액을 이 여과액에 첨가하고, 유기 층을 분액시키고 나서, 수성층을 에틸 아세테이트로 2회 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후 감압 하에 농축시켰다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 3-b를 베이지색 고체로서 제공하였다.

[0229]

중간체 4-b의 합성:



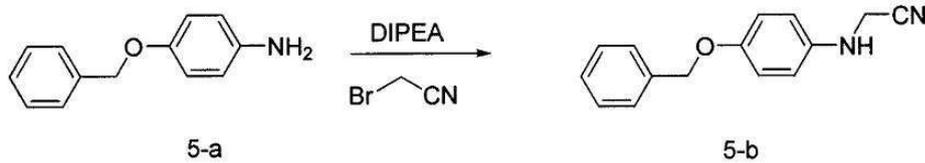
반응식 4

[0230]

[0231] 톨루엔(8.3ml) 중 1-브로모-3-플루오로-5-아이오도벤젠 2-a(5.0g, 16.6 mmol)의 용액에 (2-메틸피리미딘-5-일)메탄올 4-a(2.2g, 18.3 mmol), 1,10-페난트롤린(599mg, 3.3 mmol), 요오드화구리(I)(316mg, 1.7 mmol) 및 탄산세슘

(7.6g, 23.3 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 110℃에서 2일 동안 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시키고, 에틸 아세테이트로 희석시키고 나서, 셀라이트 상에서 여과시켰다. 염화암모늄의 포화 수용액을 이 여과액에 첨가하고, 유기 층을 분액시키고 나서, 수성층을 에틸 아세테이트로 2회 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후 감압 하에 농축시켰다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 4-b를 베이지색 고체로서 제공하였다.

[0232] **중간체 5-b의 합성:**

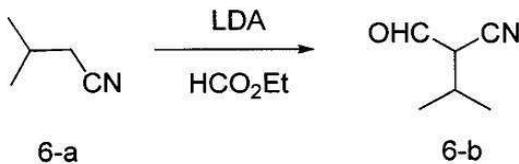


반응식 5

[0233]

[0234] THF(242ml) 중 4-(벤질옥시)아닐린, HCl 5-a(40.0g, 170.0 mmol) 및 2-브로모아세트나이트릴(26.7g, 223.0 mmol)의 용액에 DIPEA(65.2ml, 373.0 mmol)를 첨가하였다. 이 반응물을 80℃에서 하룻밤 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. 염화암모늄의 포화 수용액 및 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 수성층을 에틸 아세테이트로 2회 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후, 감압 하에 농축시켰다. 헥산을 잔류물에 첨가하여, 형성된 석출물을 여과에 의해 수집하여 중간체 5-b를 베이지색 고체로서 제공하였다.

[0235] **중간체 6-b의 합성:**

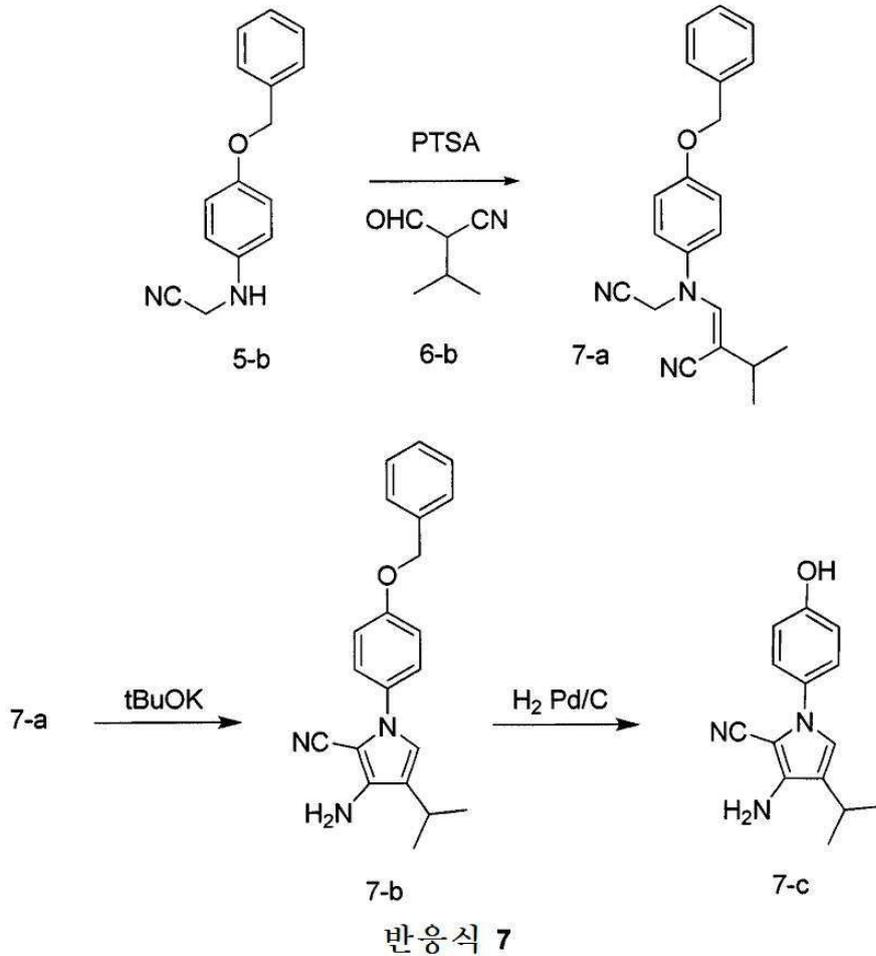


반응식 6

[0236]

[0237] -78℃로 냉각된 THF(40.2ml) 중 3-메틸부탄나이트릴 6-a(10.0g, 120.0 mmol)의 용액에 THF 중 LDA의 2.0M 용액(60.1ml, 120.0 mmol)을 적가 첨가하였다. 이 용액을 10분 동안 교반하고 나서, -78℃로 냉각된 THF(50.2ml) 중 에틸 폼에이트(9.4g, 126.0 mmol)의 용액에 첨가하였다. 이 반응물을 -78℃에서 30분 동안 교반하고 나서, 실온으로 서서히 가온시키고, 하룻밤 교반하였다. 이 반응물을 pH=3이 될 때까지 1N 수성 HCl의 첨가에 의해 반응 중지시키고 나서, 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기 추출물을 합하여 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후 진공 중 농축시켜, 중간체 6-b를 황색 오일로서 제공하였다.

[0238] 중간체 7-c의 합성:



[0239]

[0240] 단계 1: 중간체 7-a

[0241] 톨루엔(20ml) 중 중간체 5-b(8.9g, 37.5 mmol)의 용액에 중간체 6-b(5.0g, 45.0 mmol) 및 PTSA(713mg, 3.7 mmol)를 첨가하였다. 이 반응물을 딤-스타크 장치(Dean-Stark apparatus)를 이용해서 환류 하에 하룻밤 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. NaHCO₃의 포화 수용액 및 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 수성층을 에틸 아세테이트로 2회 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후, 감압 하에 농축시켜 중간체 7-a를 베이지색 고체로서 제공하였다.

[0242]

단계 2: 중간체 7-b

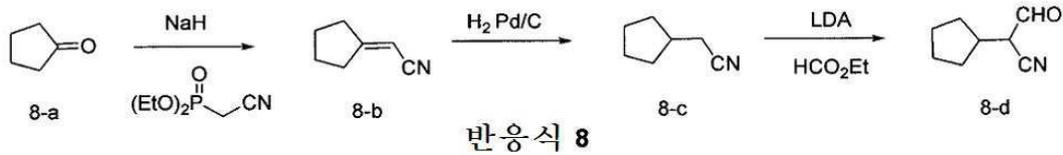
[0243] tert-부탄올(97.0ml) 중 중간체 7-a(5.0g, 15.1 mmol)의 용액에 tert-부탄올 중 칼륨 tert-부톡사이드의 1.0M 용액(16.6ml, 16.6 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 80°C에서 30분 동안 교반하고 나서 실온까지 냉각시키고 10% 수성 HCl에 부었다. 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후, 감압 하에 농축시켰다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 7-b를 베이지색 고체로서 제공하였다.

[0244]

단계 5: 중간체 7-c

[0245] 에틸 아세테이트 중 중간체 7-b(2.8g, 8.4 mmol)의 용액을 질소 하에 교반하고 10% Pd/C(1.8g, 0.8 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 H₂로 퍼지시키고 수소의 1기압 하에 1시간 동안 교반하였다. 이 반응물을 이어서 셀라이트를 통해 여과시키고, 여과액을 진공 중에서 농축시켜 중간체 7-c를 베이지색 고체로서 제공하였다.

[0246] 중간체 8-d의 합성:



[0247]

[0248] 단계 1: 중간체 8-b

[0249] 0℃로 냉각된 다이에틸 에터(100ml) 중 NaH(2.6g, 65.4 mmol)의 현탁액에 다이에틸 사이아노메틸포스포네이트(11.58g, 65.4 mmol)를 적가 첨가하고 나서 다이에틸 에터(100ml) 중 사이클로펜탄온 8-a(5.0g, 59.4 mmol)의 용액을 첨가하였다. 첨가가 완료된 후, 반응물을 실온까지 가온시키고, 하룻밤 교반하였다. 물 및 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후, 감압 하에 농축시켜 중간체 8-b를 무색 오일로서 제공하였다.

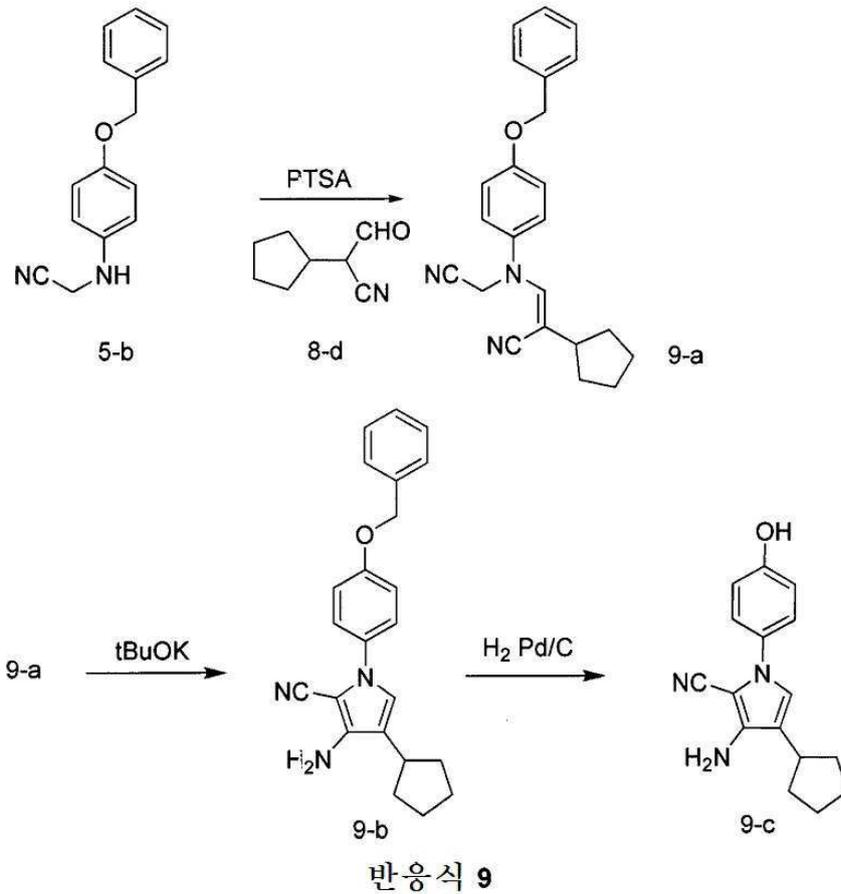
[0250] 단계 2: 중간체 8-c

[0251] 에틸 아세테이트 및 아세트산(1ml) 중 중간체 8-b(7.0g, 65.3 mmol)의 용액을 질소 하에 교반하고 10% Pd/C(2.8g, 1.32 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 H₂로 퍼지시키고, 수소의 1기압 하에 3시간 동안 교반하였다. 이 반응물을 이어서 셀라이트를 통해 여과시키고, 여과액을 진공 중에서 농축시켜 중간체 8-c를 베이지색 오일로서 제공하였다.

[0252] 단계 3: 중간체 8-d

[0253] -78℃로 냉각된 THF(21.4ml) 중 중간체 8-c(7.0g, 64.1 mmol)의 용액에 THF 중 LDA의 2.0M 용액(32.1ml, 64.2 mmol)을 적가 첨가하였다. 이 용액을 10분 동안 교반하고, 이어서 -78℃로 냉각된 THF(50.2ml) 중 에틸 폼에이트(9.36g, 126.0 mmol)의 용액에 첨가하였다. 이 반응물을 -78℃에서 30분 동안 교반하고 나서, 실온으로 서서히 가온시키고, 하룻밤 교반하였다. 이 반응물을 pH=3이 될 때까지 1N 수성 HCl의 첨가에 의해 반응 중지시키고 나서, 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기 추출물을 합하여 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후 진공 중 농축시켜, 중간체 8-d를 황색 오일로서 제공하였다.

[0254] 중간체 9-c의 합성:



[0255]

[0256] 단계 2: 중간체 9-a

[0257] 톨루엔(20ml) 중 중간체 5-b(7.2g, 30.4 mmol)의 용액에 중간체 8-d(5.0g, 36.4 mmol) 및 PTSA(578mg, 3.0 mmol)를 첨가하였다. 이 반응물을 단-스타크 장치를 이용해서 환류 하에 하룻밤 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. NaHCO₃의 포화수용액 및 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 수성 상을 에틸 아세테이트로 2회 추출하고, 유기 추출물을 합하여 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후, 감압 하에 농축시켜 중간체 9-a를 베이지색 고체로서 제공하였다.

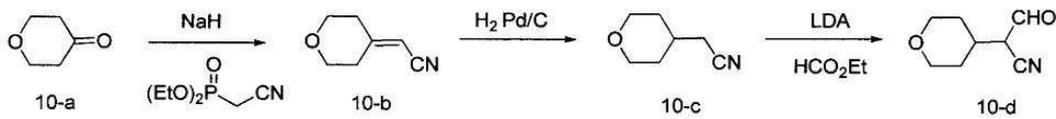
[0258] 단계 3: 중간체 9-b

[0259] tert-부탄올(69.9ml) 중 중간체 9-a(5.0g, 13.9 mmol)의 용액에 tert-부탄올 중 칼륨 tert-부톡사이드의 1.0M 용액(15.4ml, 15.4 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 80°C에서 30분 동안 교반하고 나서 실온까지 냉각시키고 10% 수성 HCl에 부었다. 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후, 감압 하에 농축시켰다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 9-b를 베이지색 고체로서 제공하였다.

[0260] 단계 4: 중간체 9-c

[0261] 에틸 아세테이트 중 중간체 9-b(5.0g, 14.0 mmol)의 용액을 질소 하에 교반하고 10% Pd/C(2.9g, 1.4 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 H₂로 퍼지시키고 수소의 1기압 하에 3시간 동안 교반하였다. 이 반응물을 셀라이트를 통해 여과시키고, 그 여과액을 진공 중 농축시켜, 중간체 9-c를 베이지색 고체로서 제공하였다.

[0262] 중간체 10-d의 합성:



[0263]

[0264] 단계 1: 중간체 10-b

[0265] 0℃로 냉각된 디에틸 에터(100ml) 중 NaH(2.2g, 54.9 mmol)의 현탁액에 디에틸 사이아노메틸 포스포네이트(9.7g, 54.9 mmol)를 적가 첨가하고 나서, 디에틸 에터(100ml) 중 다이하이드로-2H-피란-4(3H)-온 10-a(5.0g, 59.4 mmol)의 용액을 첨가하였다. 첨가 완료 후, 반응물을 실온까지 가온시키고, 하룻밤 교반하였다. 물 및 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후 감압 하에 농축시켜, 중간체 10-b를 무색 오일로서 제공하였다.

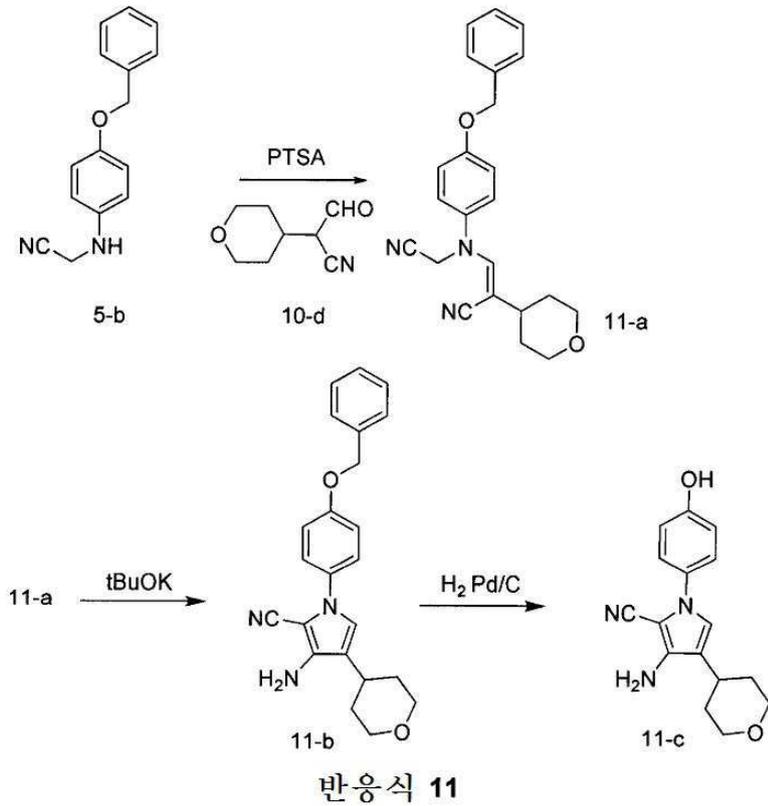
[0266] 단계 2: 중간체 10-c

[0267] 질소 하에 교반된 에틸 아세테이트 및 아세트산(1ml) 중 중간체 10-b(6.0g, 48.7 mmol)의 용액에 10% Pd/C(2.0g, 0.9 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 H₂로 퍼지시키고 수소의 1기압(atm) 하에 하룻밤 교반하였다. 이 반응물을 이어서 셀라이트를 통해 여과시키고, 여과액을 진공 중에서 농축시켜 중간체 10-c를 베이지색 오일로서 제공하였다.

[0268] 단계 3: 중간체 10-d

[0269] -78℃로 냉각된 THF(16.0ml)의 중간체 10-c(6.0g, 47.9 mmol)의 용액에 THF 중 LDA의 2.0M 용액(23.9ml, 47.8 mmol)을 적가 첨가하였다. 이 용액을 10분 동안 교반하고 나서 -78℃로 냉각된 THF(20.0ml) 중 에틸 폼에이트(3.7g, 50.3 mmol)의 용액에 첨가하였다. 이 반응물을 -78℃에서 30분 동안 교반하고 나서, 실온으로 서서히 가온시키고, 하룻밤 교반하였다. 이 반응물을 pH=3이 될 때까지 1N 수성 HCl의 첨가에 의해 반응 중지시키고 나서, 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기 추출물을 합하여 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후, 감압 하에 농축시켜 중간체 10-d를 황색 오일로서 제공하였다.

[0270] 중간체 11-c의 합성:



[0271]

[0272] 단계 2: 중간체 11-a

[0273] 톨루엔(20ml) 중 중간체 5-b(6.9g, 29.0 mmol)의 용액에 중간체 10-d(5.3g, 34.7 mmol) 및 PTSA(551mg, 2.9 mmol)를 첨가하였다. 이 반응물을 딘-스타크 장치를 이용해서 환류 하에 하룻밤 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. NaHCO₃의 포화수용액 및 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 수성층을 에틸 아세테이트로 2회 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후, 감압 하에 농축시켜 중간체 11-a를 베이지색 고체로서 제공하였다.

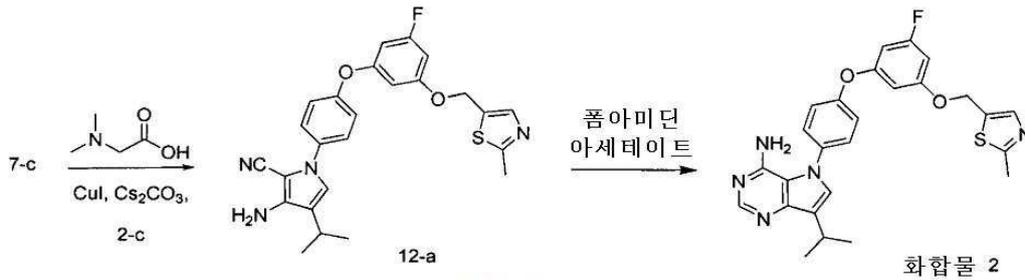
[0274] 단계 3: 중간체 11-b

[0275] tert-부탄올(147.0ml) 중 중간체 11-a(11.0g, 13.9 mmol)의 용액에 tert-부탄올 중 칼륨 tert-부톡사이드의 1.0M 용액(32.4ml, 32.4 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 80℃에서 30분 동안 교반하고 나서 실온까지 냉각시키고 10% 수성 HCl에 부었다. 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후, 감압 하에 농축시켜 중간체 11-b를 갈색 고체로서 제공하였다.

[0276] 단계 4: 중간체 11-c

[0277] 질소 하에 교반된 에틸 아세테이트 중 중간체 11-b(11.0g, 29.5 mmol)의 용액에 10% Pd/C(1.25g, 0.59 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 H₂로 퍼지시키고 수소의 1기압 하에 3시간 동안 교반하였다. 이 반응물을 이어서 셀라이트를 통해 여과시키고, 여과액을 진공 중 농축시켰다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 11-c를 베이지색 고체로서 제공하였다.

[0278] 화합물 2의 합성:



반응식 12

[0279]

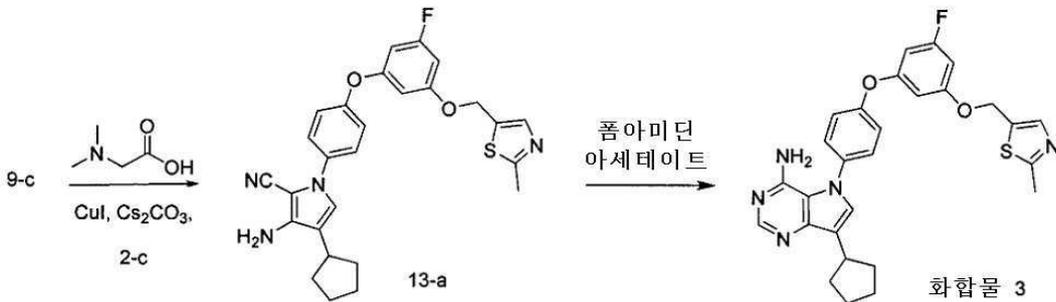
[0280] 단계 1: 중간체 12-a

[0281] 1,4-다이옥산(2.2ml) 중 중간체 7-c(375.0mg, 1.3 mmol)의 용액에 중간체 2-c(601mg, 1.9 mmol), N,N-다이메틸글리신(342mg, 3.3 mmol), 요오드화구리(I)(208mg, 1.1 mmol) 및 탄산세슘(2.1g, 6.6 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 110°C에서 하룻밤 가열하고, 이어서 실온까지 냉각시키고, 에틸 아세테이트로 희석시키고 나서, 셀라이트 상에서 여과시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 12-a를 베이지색 발포물로서 제공하였다.

[0282] 단계 2: 화합물 2

[0283] 메탄올(2.5ml) 중 중간체 12-a(580mg, 1.2 mmol)의 용액에 폼아미딘 아세테이트(653mg, 6.3 mmol)를 첨가하고, 이 반응물을 하룻밤 환류 하에 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 0.1% 폼산/메탄올 구배로 용리시키는 역상 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 화합물 2를 희백색 고체로서 제공하였다. MS (m/z) M+H= 490.1

[0284] 화합물 3의 합성:



반응식 13

[0285]

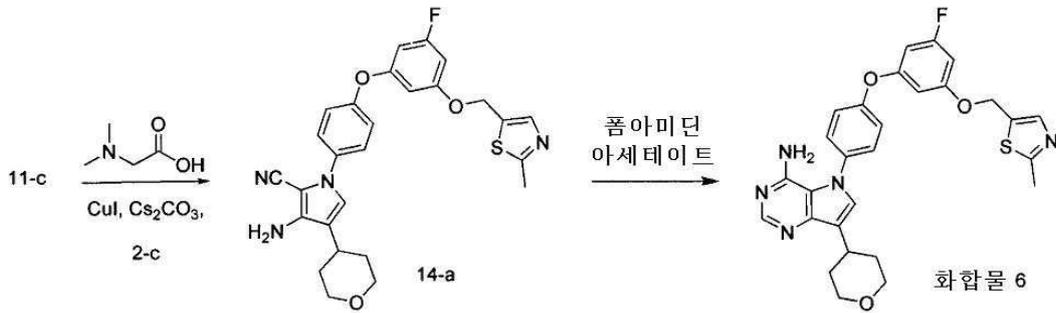
[0286] 단계 1: 중간체 13-a

[0287] 1,4-다이옥산(2.0ml) 중 중간체 9-c(400mg, 1.5 mmol)의 용액에 중간체 2-c(500mg, 1.6 mmol), N,N-다이메틸글리신(309mg, 2.9 mmol), 요오드화구리(I)(188mg, 0.9 mmol) 및 탄산세슘(2.1g, 6.6 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 110°C에서 하룻밤 가열하고, 이어서 실온까지 냉각시키고, 에틸 아세테이트로 희석시키고 나서, 셀라이트 상에서 여과시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 13-a를 베이지색 발포물로서 제공하였다.

[0288] 단계 2: 화합물 3

[0289] 메탄올(1.3ml) 중 중간체 13-a(310mg, 0.6 mmol)의 용액에 폼아미딘 아세테이트(330mg, 3.2 mmol)를 첨가하고, 이 반응물을 하룻밤 환류 하에 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 0.1% 폼산/메탄올 구배로 용리시키는 역상 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 화합물 3을 백색 고체로서 제공하였다. MS (m/z) M+H= 516.2

[0290] 화합물 6의 합성:



반응식 14

[0291]

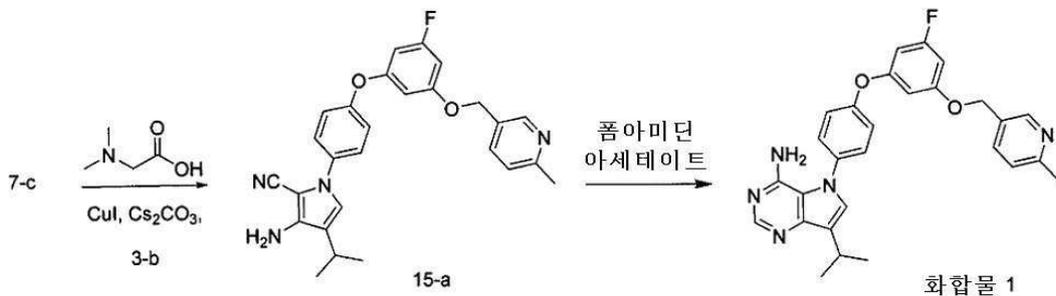
[0292] 단계 1: 중간체 14-a

[0293] 1,4-다이옥산(1.9ml) 중 중간체 11-c(400mg, 1.4 mmol)의 용액에 중간체 2-c(500mg, 1.6 mmol), N,N-다이메틸글리신(291mg, 2.8 mmol), 요오드화구리(I)(177mg, 0.9 mmol) 및 탄산세슘(1.8g, 5.6 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 110℃에서 하룻밤 가열하고, 이어서 실온까지 냉각시키고, 에틸 아세테이트로 희석시키고 나서, 셀라이트 상에서 여과시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 14-a를 베이지색 발포물로서 제공하였다.

[0294] 단계 2: 화합물 6

[0295] 메탄올(2.5ml) 중 중간체 14-a(630mg, 1.2 mmol)의 용액에 폼아미딘 아세테이트(650mg, 6.2 mmol)를 첨가하고, 이 반응물을 하룻밤 환류 하에 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 화합물 6을 베이지색 고체로서 제공하였다. MS (m/z) M+H= 532.2

[0296] 화합물 1의 합성:



반응식 15

[0297]

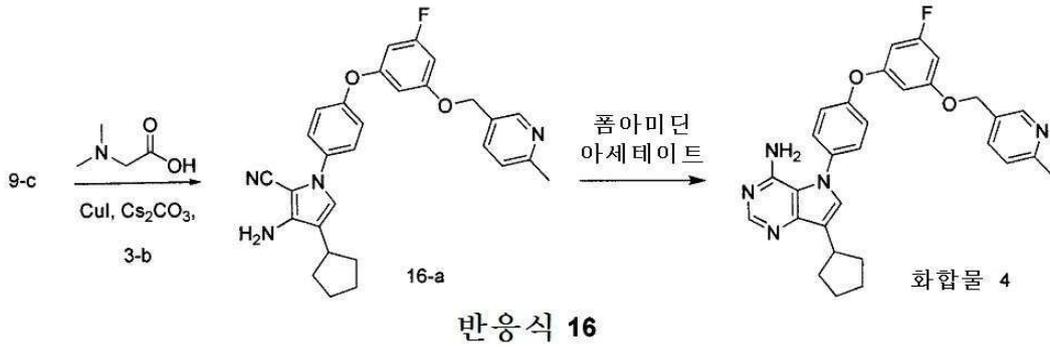
[0298] 단계 1: 중간체 15-a

[0299] 1,4-다이옥산(2.0ml) 중 중간체 7-c(407mg, 1.7 mmol)의 용액에 중간체 3-b(600mg, 2.0 mmol), N,N-다이메틸글리신(348mg, 3.4 mmol), 요오드화구리(I)(212mg, 1.1 mmol) 및 탄산세슘(2.2g, 6.7 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 110℃에서 하룻밤 가열하고, 이어서 실온까지 냉각시키고, 에틸 아세테이트로 희석시키고 나서, 셀라이트 상에서 여과시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 15-a를 베이지색 발포물로서 제공하였다.

[0300] 단계 2: 화합물 1

[0301] 메탄올(2.4ml) 중 중간체 15-a(550mg, 1.2 mmol)의 용액에 폼아미딘 아세테이트(627mg, 6.0 mmol)를 첨가하고, 이 반응물을 하룻밤 환류 하에 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 0.1% 폼산/메탄올 구배로 용리시키는 역상 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 화합물 1을 회백색 고체로서 제공하였다. MS (m/z) M+H= 484.2

[0302] 화합물 4의 합성:



[0303]

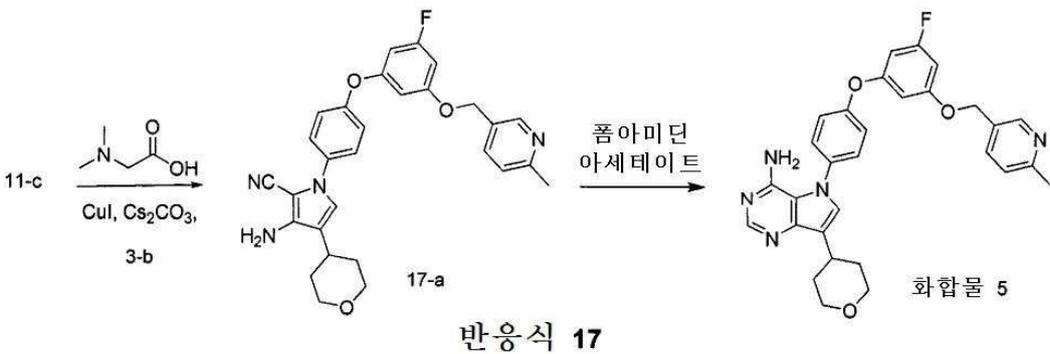
[0304] 단계 1:중간체 16-a

[0305] 1,4-다이옥산(2.0ml) 중 중간체 9-c(400mg, 1.5 mmol)의 용액에 중간체 3-b(487mg, 1.6 mmol), N,N-다이메틸글리신(309mg, 3.0 mmol), 요오드화구리(I)(188mg, 0.9 mmol) 및 탄산세슘(1.9g, 6.0 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 110℃에서 하룻밤 가열하고, 이어서 실온까지 냉각시키고, 에틸 아세테이트로 희석시키고 나서, 셀라이트 상에서 여과시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 16-a를 베이지색 발포물로서 제공하였다.

[0306] 단계 2: 화합물 4

[0307] 메탄올(2.1ml) 중 중간체 16-a(550mg, 1.0 mmol)의 용액에 폼아미딘 아세테이트(539mg, 5.2 mmol)를 첨가하고, 이 반응물을 하룻밤 환류 하에 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 0.1% 폼산/메탄올 구배로 용리시키는 역상 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 화합물 4를 백색 발포물로서 제공하였다. 1N HCl을 화합물 4에 첨가하여, 형성된 석출물을 여과에 의해 수집하여, 화합물 4·2HCl을 베이지색 고체로서 제공하였다. MS (m/z) M+H= 510.2

[0308] 화합물 5의 합성:



[0309]

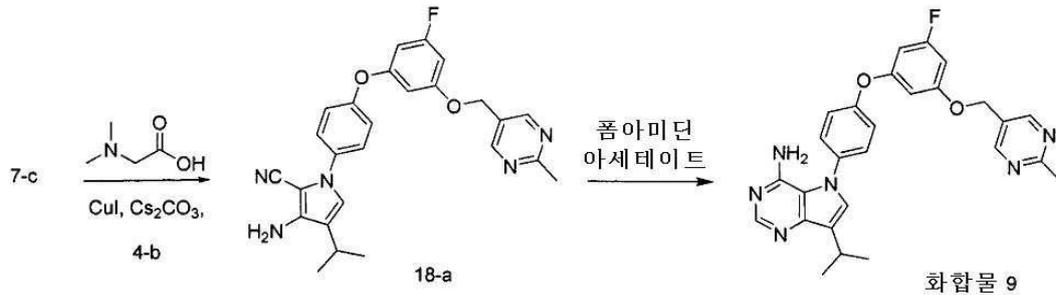
[0310] 단계 1:중간체 17-a

[0311] 1,4-다이옥산(1.9ml) 중 중간체 11-c(400mg, 1.4 mmol)의 용액에 중간체 3-b(460mg, 1.5 mmol), N,N-다이메틸글리신(291mg, 2.8 mmol), 요오드화구리(I)(177mg, 0.9 mmol) 및 탄산세슘(1.9g, 5.6 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 110℃에서 하룻밤 밀봉관에서 가열하고, 이어서 실온까지 냉각시키고, 에틸 아세테이트로 희석시키고 나서, 셀라이트 상에서 여과시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 17-a를 베이지색 발포물로서 제공하였다.

[0312] 단계 2: 화합물 5

[0313] 메탄올(2.1ml) 중 중간체 17-a(520mg, 1.0 mmol)의 용액에 폼아미딘 아세테이트(543mg, 5.2 mmol)를 첨가하고, 이 반응물을 하룻밤 환류 하에 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 화합물 5를 백색 발포물로서 제공하였다. 1N HCl을 화합물 5에 첨가하여, 형성된 석출물을 여과에 의해 수집하여 화합물 5·2HCl을 베이지색 고체로서 제공하였다. MS (m/z) M+H= 526.2

[0314] 화합물 9의 합성:



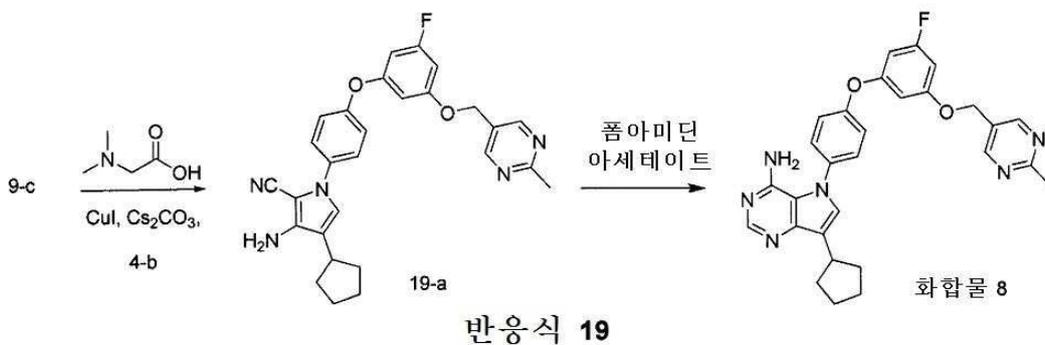
[0315] 단계 1: 중간체 18-a

[0317] 1,4-다이옥산(1.6ml) 중 중간체 7-c(300mg, 1.2 mmol)의 용액에 중간체 4-b(443mg, 1.5 mmol), N,N-다이메틸글리신(256mg, 2.5 mmol), 요오드화구리(I)(156mg, 0.8 mmol) 및 탄산세슘(1.6g, 4.9 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 110°C에서 하룻밤 가열하고, 이어서 실온까지 냉각시키고, 에틸 아세테이트로 희석시키고 나서, 셀라이트 상에서 여과시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 18-a를 베이지색 발포물로서 제공하였다.

[0318] 단계 2: 화합물 9

[0319] 메탄올(8.7ml) 중 중간체 18-a(400mg, 0.9 mmol)의 용액에 폼아미딘 아세테이트(910mg, 8.7 mmol)를 첨가하고, 이 반응물을 하룻밤 환류 하에 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 0.1N HCl/메탄올 구배에 의해 용리시키는 역상 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 화합물 9·2HCl을 백색 고체로서 제공하였다. MS (m/z) M+H= 485.2

[0320] 화합물 8의 합성:



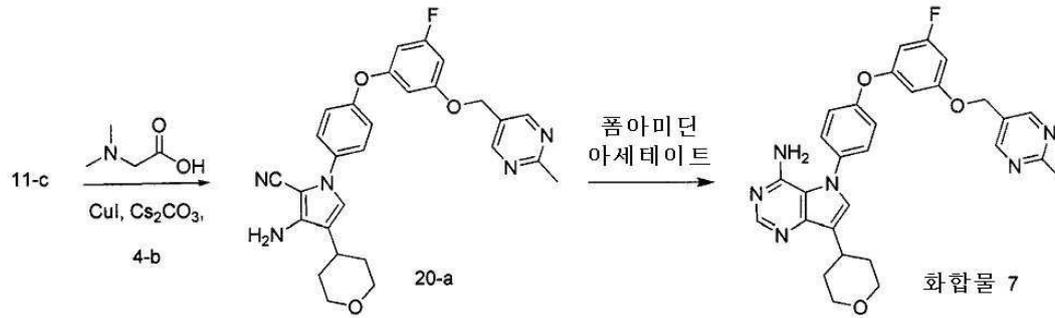
[0322] 단계 1: 중간체 19-a

[0323] 1,4-다이옥산(1.5ml) 중 중간체 9-c(300mg, 1.1 mmol)의 용액에 중간체 4-b(367mg, 1.2 mmol), N,N-다이메틸글리신(231mg, 2.2 mmol), 요오드화구리(I)(141mg, 0.7 mmol) 및 탄산세슘(1.5g, 4.5 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 110°C에서 하룻밤 가열하고, 이어서 실온까지 냉각시키고, 에틸 아세테이트로 희석시키고 나서, 셀라이트 상에서 여과시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 19-a를 베이지색 발포물로서 제공하였다.

[0324] 단계 2: 화합물 8

[0325] 메탄올(11.6ml) 중 중간체 19-a(564mg, 1.2 mmol)의 용액에 폼아미딘 아세테이트(1.2mg, 11.6 mmol)를 첨가하고, 이 반응물을 하룻밤 환류 하에 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 0.1N HCl/메탄올 구배에 의해 용리시키는 역상 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 화합물 8·2HCl을 백색 고체로서 제공하였다. MS (m/z) M+H= 511.2

[0326] 화합물 7의 합성:



반응식 20

[0327]

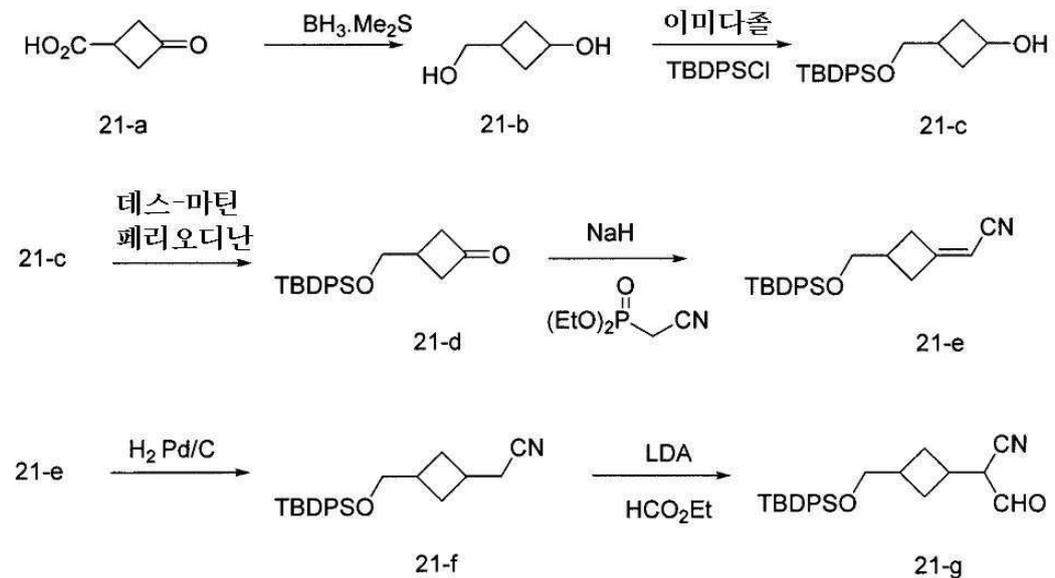
[0328] 단계 1: 중간체 20-a

[0329] 1,4-다이옥산(1.5ml) 중 중간체 11-c(300mg, 1.1 mmol)의 용액에 중간체 4-b(346mg, 1.2 mmol), N,N-다이메틸글리신(218mg, 2.2 mmol), 요오드화구리(I)(133mg, 0.7 mmol) 및 탄산세슘(1.4g, 4.2 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 110°C에서 하룻밤 가열하고, 이어서 실온까지 냉각시키고, 에틸 아세테이트로 희석시키고 나서, 셀라이트 상에서 여과시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 20-a를 베이지색 발포물로서 제공하였다.

[0330] 단계 2: 화합물 7

[0331] 메탄올(10.4ml) 중 중간체 20-a(520mg, 1.0 mmol)의 용액에 폼아미딘 아세테이트(1.1g, 10.4 mmol)를 첨가하고, 이 반응물을 하룻밤 환류 하에 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 0.1N HCl/메탄올 구배에 의해 용리시키는 역상 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 화합물 7·2HCl을 베이지색 고체로서 제공하였다. MS (m/z) M+H= 527.2

[0332] 중간체 21-g의 합성:



반응식 21

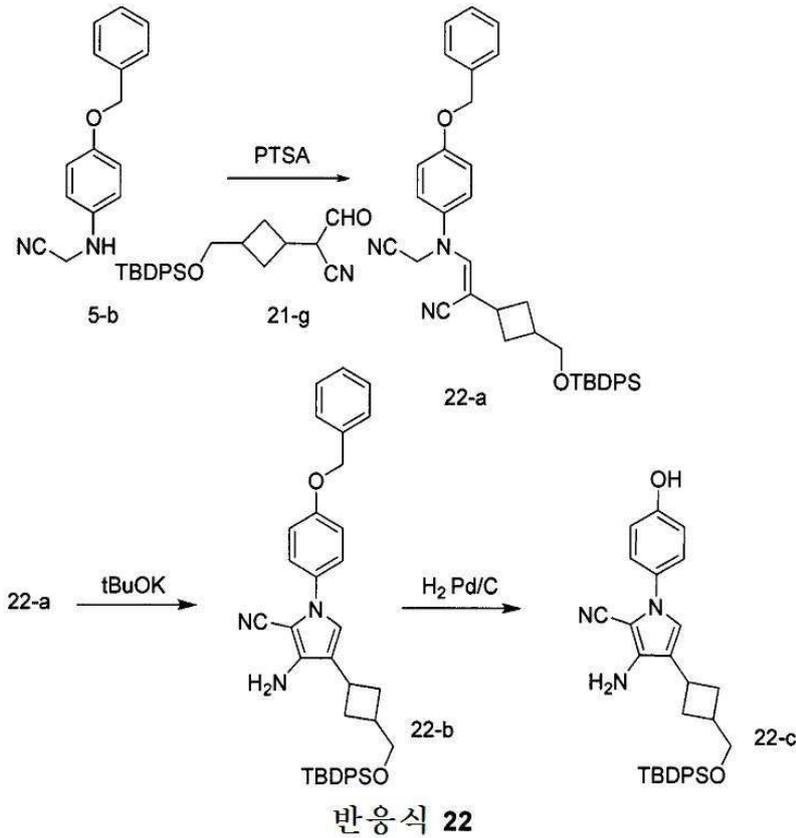
[0333]

[0334] 단계 1: 중간체 21-b

[0335] -15°C로 냉각된 THF(78ml) 중 3-옥소사이클로부탄카복실산 21-a(6.2g, 54.8 mmol)의 용액에 $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ (38.3ml, 77.0 mmol)를 서서히 첨가하고, 반응 혼합물을 실온으로 서서히 가온시키고, 하룻밤 교반하였다. 메탄올을 서서히 첨가하고 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 21-b를 무색 오일로서 제공하였다.

- [0336] **단계 2: 중간체 21-c**
- [0337] -10℃로 냉각된 THF(49.0ml) 중 중간체 21-b(1.0g, 9.8 mmol)의 용액에 이미다졸(633mg, 9.3 mmol) 및 tert-부틸 다이페닐실릴 클로라이드(1.4g, 9.3 mmol)를 순차 첨가하고, 이 반응물을 -10℃에서 30분 동안 교반하고 나서 실온에서 하룻밤 교반하였다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 21-c를 무색 오일로서 제공하였다.
- [0338] **단계 3: 중간체 21-d**
- [0339] 0℃로 냉각된 다이클로로메탄(229ml) 중 중간체 21-c(7.8g, 22.9 mmol)의 용액에 중탄산나트륨(19.3g, 229.0 mmol) 및 데스-마틴 페리오디난(Dess-Martin Periodinane)(14.6g, 34.4 mmol)을 순차 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온까지 가온시키고 2시간 동안 교반하였다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. NaHCO₃의 포화수용액 및 에틸 아세테이트를 잔사에 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후, 감압 하에 농축시켜 중간체 21-d를 황색 고체로서 제공하였다.
- [0340] **단계 4: 중간체 21-e**
- [0341] 0℃로 냉각된 다이에틸 에터(62ml) 중 NaH(480mg, 12.0 mmol)의 현탁액에 다이에틸 사이아노메틸포스포네이트(2.5g, 14.2 mmol)를 서서히 적가하고 나서 다이에틸 에터(62ml) 중 중간체 21-d(3.0g, 8.9 mmol)의 용액을 첨가하였다. 첨가 완료 후, 반응물을 실온까지 가온시키고, 하룻밤 교반하였다. 물 및 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후, 감압 하에 농축시켰다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 21-e를 무색 오일로서 제공하였다.
- [0342] **단계 5: 중간체 21-f**
- [0343] 질소 하에 교반된 에탄올 중 중간체 21-e(2.0g, 5.5 mmol)의 용액에 10% Pd/C(1.2g, 0.5 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 H₂로 퍼지시키고, 수소의 1기압 하에 하룻밤 교반하였다. 이 반응물을 이어서 셀라이트를 통해 여과시키고, 이 여과액을 진공 중 농축시켜, 중간체 21-f를 베이지색 오일로서 제공하였다.
- [0344] **단계 6: 중간체 21-g**
- [0345] -78℃로 냉각된 THF(1.7ml) 중 중간체 21-f(1.9g, 5.2 mmol)의 용액에 THF 중 LDA의 2.0M 용액(2.6ml, 5.2 mmol)을 적가 첨가하였다. 이 용액을 10분 동안 교반하고 나서 -78℃로 냉각된 THF(2.2ml) 중 에틸 폼에이트(406 mg, 5.5 mmol)의 용액에 첨가하였다. 이 반응물을 -78℃에서 30분 동안 교반하고 나서, 실온으로 서서히 가온시키고, 하룻밤 교반하였다. 이 반응물을 pH=3이 될 때까지 1N 수성 HCl의 첨가에 의해 반응 중지시키고 나서, 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기 추출물을 합하여 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후 감압 하에 농축시켜, 중간체 21-g를 황색 오일로서 제공하였다.

[0346] 중간체 22-c의 합성:



[0347]

[0348] 단계 1: 중간체 22-a

[0349] 톨루엔(20ml) 중 중간체 5-b(1.4g, 5.6 mmol)의 용액에 중간체 21-g(2.0g, 5.1 mmol) 및 PTSA(97mg, 0.5 mmol)를 첨가하였다. 이 반응물을 딥-스타크 장치를 이용해서 환류 하에 하룻밤 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. NaHCO₃의 포화수용액 및 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 수성층을 에틸 아세테이트로 2회 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후 감압 하에 농축시켰다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 22-a를 베이지색 고체로서 제공하였다.

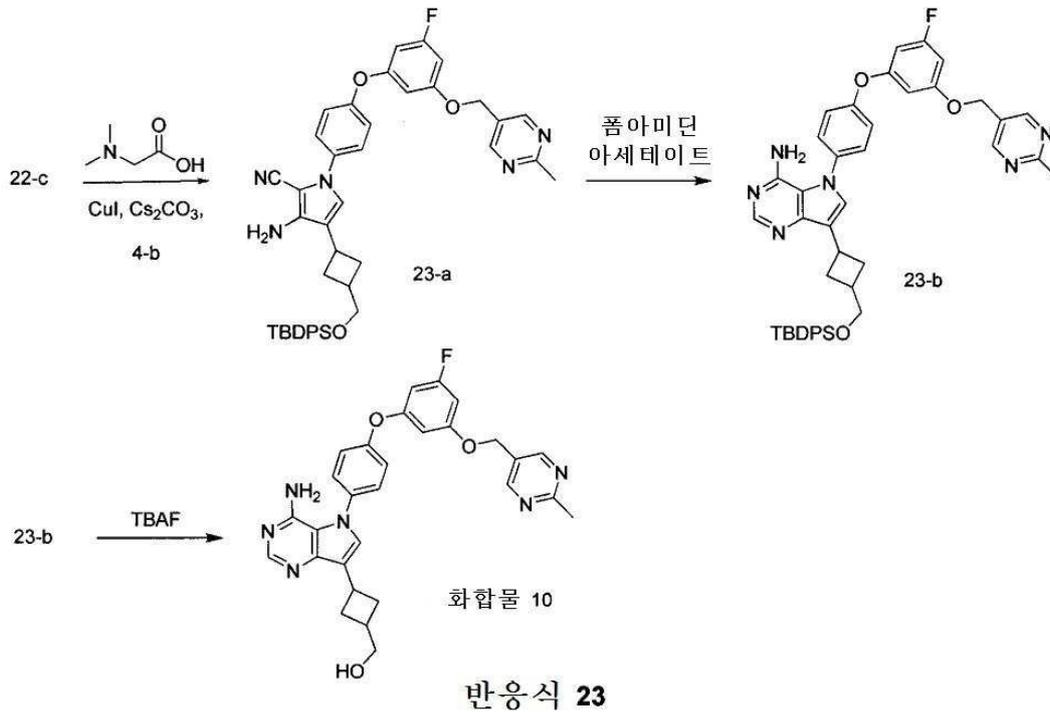
[0350] 단계 2: 중간체 22-b

[0351] tert-부탄올(5.0ml) 중 중간체 22-a(630mg, 1.0 mmol)의 용액에 tert-부탄올 중 칼륨 tert-부톡사이드의 1.0M 용액(1.1ml, 1.1 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 80℃에서 30분 동안 교반하고 나서 실온까지 냉각시키고 염화암모늄의 포화 수용액에 부었다. 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후 감압 하에 농축시켜, 중간체 22-b를 갈색 고체로서 제공하였다.

[0352] 단계 3: 중간체 22-c

[0353] 질소 하에 교반된 에틸 아세테이트 중 중간체 22-b(600mg, 1.0 mmol)의 용액에 10% Pd/C(209mg, 0.1 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 H₂로 퍼지시키고, 수소의 1기압 하에 3시간 동안 교반하였다. 이 반응물을 이어서 셀라이트를 통해 여과시키고, 여과액을 진공 중 농축시켰다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 22-c를 베이지색 고체로서 제공하였다.

[0354] 화합물 10의 합성:



[0355]

[0356] 단계 1: 중간체 23-a

[0357] 1,4-다이옥산(0.5ml) 중 중간체 22-c(188mg, 0.4 mmol)의 용액에 중간체 4-b(118mg, 0.4 mmol), N,N-다이메틸글리신(74mg, 0.7 mmol), 요오드화구리(I)(45mg, 0.2 mmol) 및 탄산세슘(470mg, 1.4 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 110°C에서 하룻밤 가열하고, 이어서 실온까지 냉각시키고, 에틸 아세테이트로 희석시키고 나서, 셀라이트 상에서 여과시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 23-a를 베이지색 발포물로서 제공하였다.

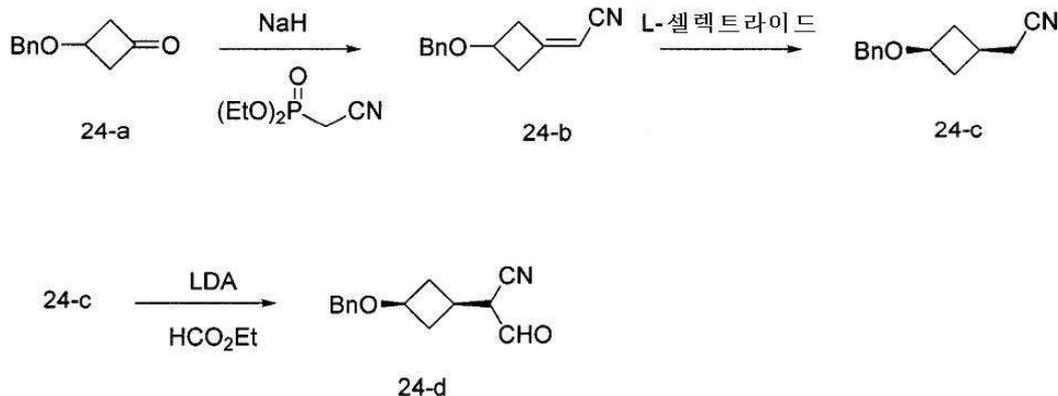
[0358] 단계 2: 중간체 23-b

[0359] 아이소프로판올(2.0ml) 중 중간체 23-a(222mg, 0.3 mmol)의 용액에 폼아미딘 아세테이트(1.0g, 9.6 mmol)를 첨가하고, 이 반응물을 하룻밤 환류 하에 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. 염화암모늄의 포화 수용액 및 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후 감압 하에 농축시켜, 중간체 23-b를 베이지색 발포물로서 제공하였다.

[0360] 단계 3: 화합물 10

[0361] THF(2ml) 중 중간체 23-b(110mg, 0.1 mmol)의 용액에 THF 중 TBAF의 1.0M 용액(0.4ml, 0.4 mmol)을 실온에서 첨가하고, 이 용액을 이어서 2일 동안 교반하였다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 0.1% 폼산/메탄올 구배로 용리시키는 역상 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 화합물 10(시스/트랜스 혼합물)을 백색 고체로서 제공하였다. MS (m/z) M+H= 527.2

[0362] 중간체 24-d의 합성:



[0363]

[0364] 단계 1: 중간체 24-b

[0365] 0°C로 냉각된 THF(16ml) 중 NaH(250mg, 6.2 mmol)의 현탁액에 다이에틸 사이아노메틸포스포네이트(0.3g, 7.4 mmol)를 적가 첨가하고 나서, THF(62ml) 중 중간체 24-a(1.0g, 5.7 mmol)의 용액을 첨가하였다. 첨가 완료 후, 이 반응물을 실온까지 가온시키고 하룻밤 교반하였다. 물 및 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후, 감압 하에 농축시켰다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 24-b를 무색 오일로서 제공하였다.

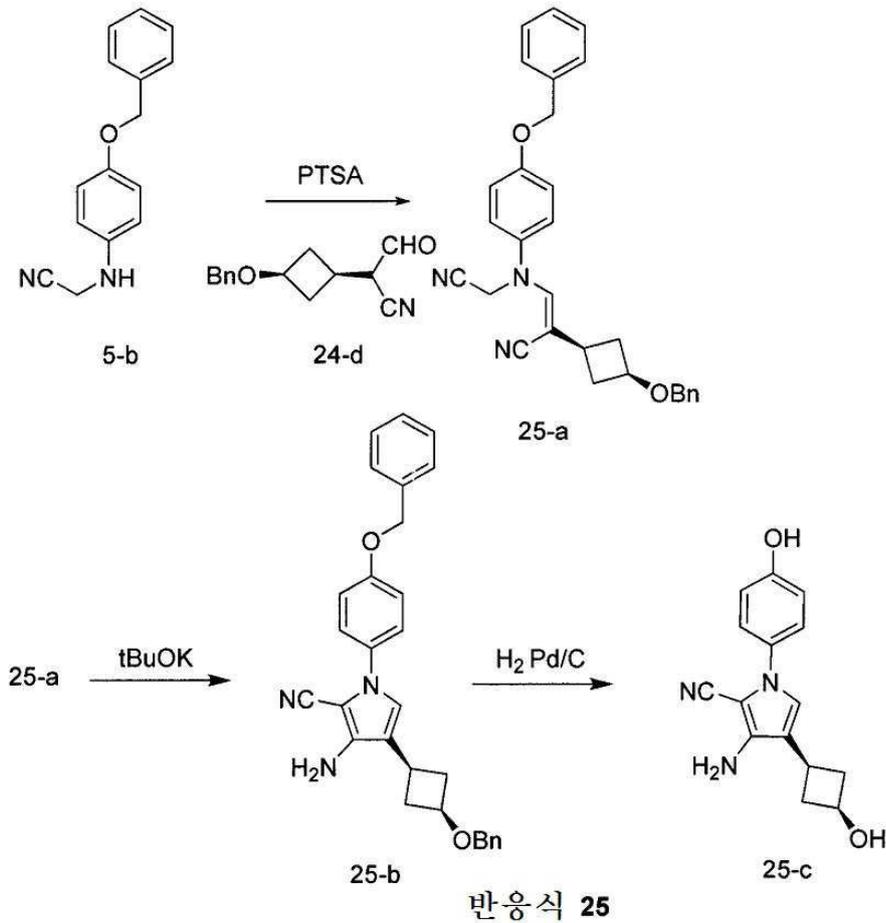
[0366] 단계 2: 중간체 24-c

[0367] -78°C로 냉각된 에탄올(23.5ml) 중 중간체 24-b(940mg, 4.7 mmol)의 용액에 THF 중 L-셀렉트라이드(L-Selectride)의 1.0M 용액(5.2ml, 5.2 mmol)을 첨가하고 나서, 반응이 완료될 때까지 -78°C에서 교반하였다. 염수(5.2ml), NaOH의 1.0M 수용액(5.2ml) 및 30% 수성 H₂O₂(2.2ml)를 연속하여 첨가하고, 이 혼합물을 실온에서 30 분 동안 교반하였다. Na₂SO₃를 이어서 첨가하고, 이 혼합물을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후 감압 하에 농축시켜, 중간체 24-c 베이지색 오일로서 제공하였다.

[0368] 단계 3: 중간체 24-d

[0369] -78°C로 냉각된 THF(19.0ml) 중 중간체 24-c(860mg, 4.3 mmol)의 용액에 THF 중 LDA의 2.0M 용액(2.1ml, 4.2 mmol)을 적가 첨가하였다. 이 용액을 10분 동안 교반하고 나서 -78°C로 냉각된 THF(2.3ml) 중 에틸 폼에이트(380 mg, 5.1 mmol)의 용액에 첨가하였다. 이 반응물을 -78°C에서 30분 동안 교반하고 나서, 실온으로 서서히 가온시키고, 하룻밤 교반하였다. 이 반응을 pH=3이 될 때까지 1N 수성 HCl의 첨가에 의해 중지시키고 나서, 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기 추출물을 합하여 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후 감압 하에 농축시켜, 중간체 24-d를 황색 오일로서 제공하였다.

[0370] 중간체 25-c의 합성:



[0371]

[0372] 단계 1: 중간체 25-a

[0373] 톨루엔(20ml) 중 중간체 5-b(391mg, 1.6 mmol)의 용액에 중간체 24-d(342mg, 1.5 mmol) 및 PTSA(28mg, 0.1 mmol)를 첨가하였다. 이 반응물을 단-스타크 장치를 이용해서 환류 하에 하룻밤 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. NaHCO₃의 포화수용액 및 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 수성층을 에틸 아세테이트로 2회 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후 감압 하에 농축시켰다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 25-a를 베이지색 고체로서 제공하였다.

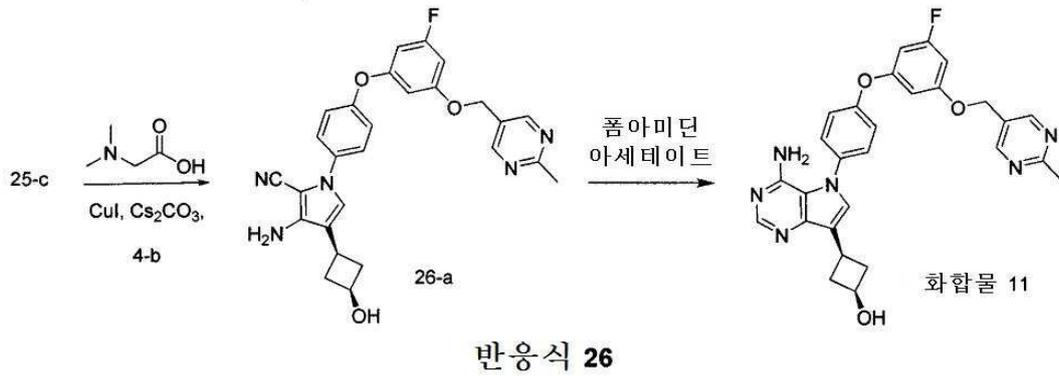
[0374] 단계 2: 중간체 25-b

[0375] tert-부탄올(2.6ml) 중 중간체 25-a(240mg, 0.5 mmol)의 용액에 tert-부탄올 중 칼륨 tert-부톡사이드의 1.0M 용액(590μl, 0.59 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 80℃에서 30분 동안 교반하고 나서 실온까지 냉각시키고 염화암모늄의 포화 수용액에 부었다. 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후, 감압 하에 농축시켰다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 25-b를 베이지색 고체로서 제공하였다.

[0376] 단계 3: 중간체 25-c

[0377] 37% 수성 HCl 2점적을 함유하는, 메탄올 중 중간체 25-b(115mg, 0.2 mmol)의 용액을 질소 하에 교반하고 10% Pd/C(54mg, 0.02 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 H₂로 퍼지시키고 수소의 1기압 하에 하룻밤 교반하였다. 이 반응물을 이어서 셀라이트를 통해 여과시키고, 여과액을 진공 중에서 농축시켜 중간체 25-c를 베이지색 고체로서 제공하였다.

[0378] 화합물 11의 합성:



[0379]

[0380] 단계 1: 중간체 26-a

[0381] 1,4-다이옥산(0.4ml) 및 NMP(0.1ml) 중 중간체 25-c(70mg, 0.3 mmol)의 용액에 중간체 4-b(93mg, 0.3 mmol), N,N-다이메틸글리신(54mg, 0.5 mmol), 요오드화구리(I)(33mg, 0.2 mmol) 및 탄산세슘(339mg, 1.0 mmol)을 첨가하였다. 이 반응물을 110°C에서 하룻밤 가열하고, 이어서 실온까지 냉각시키고, 에틸 아세테이트로 희석시키고 나서, 셀라이트 상에서 여과시켰다. 휘발물을 감압 하에 제거하였다. 실리카겔 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 중간체 26-a를 베이지색 발포물로서 제공하였다.

[0382] 단계 2: 화합물 11

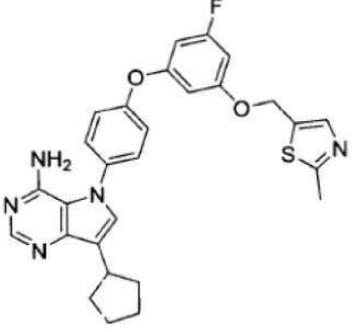
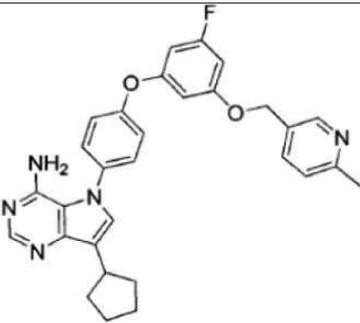
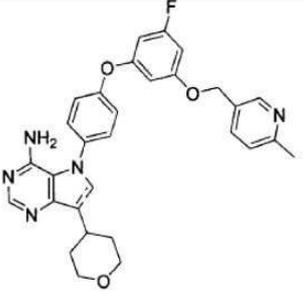
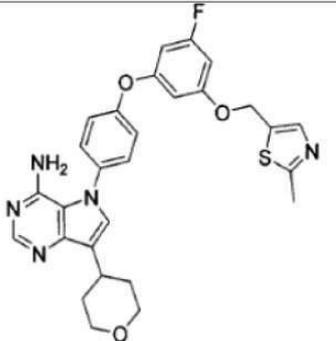
[0383] 아이소프로판올(2.0ml) 중 중간체 26-a(11mg, 0.02 mmol)의 용액에 폼아미딘 아세테이트(100mg, 0.9 mmol)를 첨가하고, 이 반응물을 하룻밤 환류 하에 교반하고, 이어서 실온까지 냉각시켰다. 염화암모늄의 포화 수용액 및 에틸 아세테이트를 첨가하여, 유기 층을 분액시키고 나서, 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과 후, 감압 하에 농축시켰다. 0.1% 폼산/메탄올 구배로 용리시키는 역상 크로마토그래피에 의한 정제에 의해 화합물 10(시스/트랜스 혼합물)을 백색 고체로서 제공하였다. MS (m/z) M+H= 513.2.

표 1

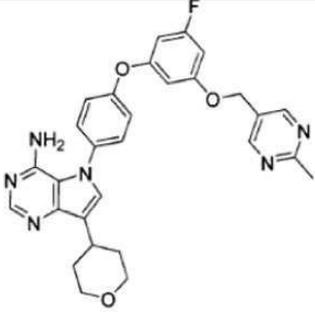
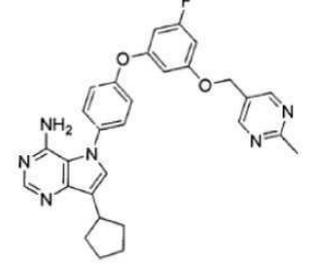
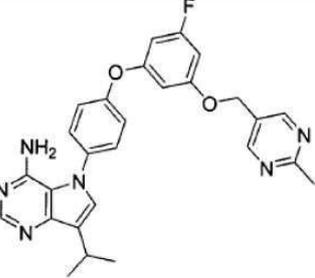
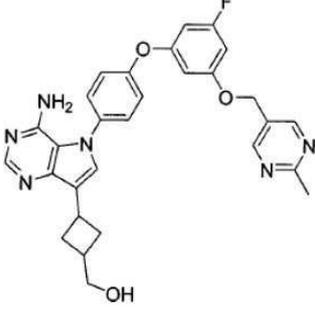
화학식 I의 화합물에

화합물	구조	MS (m/z)
1		[M-H] ⁺ = 484.2;
2		[M-H] ⁺ = 490.1;

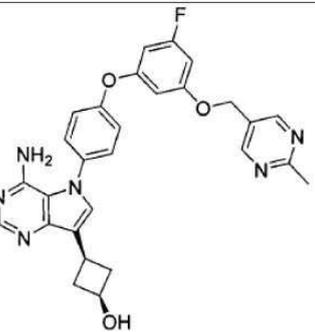
[0384]

<p>3</p>		<p>$[M-H]^+ = 516.2;$</p>
<p>4</p>		<p>$[M-H]^+ = 510.2;$</p>
<p>5</p>		<p>$[M-H]^+ = 526.2;$</p>
<p>6</p>		<p>$[M-H]^+ = 532.2;$</p>

[0385]

7		[M-H] ⁺ = 527.2;
8		[M-H] ⁺ = 511.2;
9		[M-H] ⁺ = 485.2;
10		[M-H] ⁺ = 527.2, 또는

[0386]

11		[M-H] ⁺ = 513.2.
----	---	-----------------------------

[0387]

[0388] 생물학적 검정

[0389] 키나제 활성을 결정하기 위한 검정은 첨부 실시예에서 더욱 상세히 설명된다.

[0390] 키나제 저해

[0391] Btk 키나제 저해 검정

[0392] 방법 A

[0393] 히스티딘 태그화 재조합 인간 전장 브루톤 무감마글로불린혈증 티로신 키나제(Bruton Agammaglobulinemia Tyrosine Kinase)(Btk) 및 밀리포어사(Millipore)(등록상표)로부터 공급받은 KinEASE(상표명) FP 플루오레세인 그린 검정(Fluorescein Green Assay)의 변형 프로토콜을 이용하여 384웰 플레이트 포맷에서 형광 편광 기반 키나제 검정을 수행하였다. 250 μM 기질, 10 μM ATP 및 가변 시험 물질 농도의 존재 하에 실온에서 60분 동안 키나제 반응을 수행하였다. 이 반응은 EDTA/키나제 검출 시약으로 중단시켰다. 기질 펩타이드의 인산화는 테칸(Tecan) 500 기기에서 측정된 형광 편광에 의해 검출하였다. 얻어진 용량-반응 곡선으로부터, 비선형 맞춤 곡선을 이용하여 그래프 패드 프리즘즈(Graph Pad Prisms)(등록상표)를 사용하여 IC₅₀을 계산하였다. 각각의 효소에 대한 ATP에 대한 Km을 실험적으로 결정하고, Ki 값을 쉹-프러스오프(Cheng-Prusoff) 방정식을 이용하여 계산하였다(문헌[Cheng Y, Prusoff WH. (1973) Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction". Biochem Pharmacol 22 (23): 3099-108) 참조].

[0394] k_i 값은 표 2a 및 표 2b에 기록되어 있다:

[표 2a]

Btk의 저해

화합물	Ki (nM)
1	a
2	a
5	a
6	a
7	a
9	a

[0396] a - Ki < 100 nM; b - 100 nM < Ki < 1000 nM, c - ki > 1000 nM

[0397] 방법 B

[0398] 선택된 화합물의 시험관내 역가는 유로핀즈 파마 디스커버리 서비스 유케이 리미티드(Eurofins Pharma Discovery Services UK Limited)에서 수행한 키나제프로파일러(KinaseProfiler) 방사선측정 단백질 키나제 검정을 이용해서 인간 BTK 키나제(hBTK)에 대해서 규정하였다.

[0399] hBTK 키나제는 완충액에 희석시키고, 모든 화합물을 100% DMSO 중 50x 최종 검정 농도로 제조하였다. 화합물의 이 가공 원액을 검정용 웰뿐만 아니라 반응에서의 제1 성분에 첨가하고 나서, 위에서 열거된 검정 프로토콜에서 상세히 기술된 바와 같은 나머지 성분에 첨가하였다. 반응은 MgATP 믹스의 첨가에 의해 개시되었다. 키나제 반응은 250 μM 기질, 10mM Mg아세테이트, [γ-33P-ATP](비방사능 대략 500 cpm/pmol, 필요에 따른 농도) 및 가변적 시험 물질 농도의 존재 하에 40분 동안 실온에서 수행되었다. 검정에서의 ATP 농도는 겉보기로 15 μM이었다. 반응은 3% 인산 용액의 첨가에 의해 정지시켰다. 10 μl의 반응물을 이어서 P30 필터매트 상에 스폿팅하고, 75mM 인산으로 5분 동안 3회, 메탄올에서 1회 세척하고 나서 건조 및 섬광 계수를 행하였다. 또한 양성 대조군 웰은, 관심 대상 화합물을 제외하고 반응의 모든 성분을 포함하지만; DMSO(2%의 최종 농도에서)는 용매 효과를 제어하기 위하여 이들 웰에 포함될 뿐만 아니라 블랭크 웰은 관심 대상 화합물을 기본 저해제로 대체한 상태에서 반응의 모든 성분을 포함한다. 이것은 키나제 활성을 파괴하고 기준선(0% 키나제 활성 잔존)을 확립한다. 각 화합물의 역가는 EC₅₀을 추정함으로써 기록되었다.

[0400] [표 2b]

Btk의 저해

화합물	EC ₅₀ (nM)
11	a

[0401] a - EC₅₀< 100 nM, b - 100 nM<EC₅₀<1000 nM, c- EC₅₀>1000 nM

[0402] 세포 검정

[0403] 비장 세포 증식 검정

[0404] 항-IgM에 대한 반응에서 비장세포의 증식은 Btk의 저해에 의해 차단될 수 있다. 비장세포를 6주령 수컷 CD1 마우스(찰스 리버 라보라토리즈사(Charles River Laboratories Inc.))로부터 얻었다. 마우스 비장을 PBS 중에서 수동으로 파괴하고 70 μ m 세포 스트레이너(strainer)를 사용하여 여과하고 이후 염화암모늄 적혈구 용해시켰다. 세포를 세척하고, 비장세포 배지(10% 열 불활화 FBS, 0.5X 비필수 아미노산, 10mM HEPES, 50 μ M 베타 머캅토에 탄올이 보충된 하이클론(HyClone) RPMI) 중에 재현탁하고 2시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 항온처리하여 유착 세포를 제거하였다. 현탁액 세포를 96웰 플레이트에서 웰당 50,000개 세포로 과중하고 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂에서 항온처리하였다. 비장세포를 화학식 I의 화합물의 10,000nM 곡선으로 1시간 동안 3회 예비 처리하고, 이후 72시간 동안 2.5 μ g/ml의 항-IgM F(ab')₂(잭슨 이뮤노 리서치사(Jackson Immuno Research))로 세포 증식을 자극하였다. 세포 증식을 세포 역가-글루 발광 검정(Cell Titer-Glo Luminescent Assay)(프로메가사(Promega))에 의해 측정하였다. 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 용량 반응 화합물 곡선으로부터 EC₅₀ 값(비히클 처리군과 비교하여 화합물의 존재에서 50% 증식)을 계산하였다.

[0405] EC₅₀ 값은 표 3에 기록되어 있다:

표 3

비장 세포 증식의 저해

화합물	EC ₅₀ (nM)
1	a
2	a
3	a
4	a
5	a
6	a
7	a
8	a
9	a
10	a
11	a

[0406] a - EC₅₀<100 nM; b- 100 nM<EC₅₀<1000 nM, c- EC₅₀>1000 nM