(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0070323
(43) 공개일자 2020년06월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 487/04 (2006.01) *A61K 31/519* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 487/04 (2013.01)
A61K 31/519 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7013683
(22) 출원일자(국제) 2018년11월09일
심사청구일자 2020년05월13일
(85) 번역문제출일자 2020년05월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/060025
(87) 국제공개번호 WO 2019/099298
국제공개일자 2019년05월23일
(30) 우선권주장
17382778.3 2017년11월16일
유럽특허청(EPO)(EP)
(뒷면에 계속)

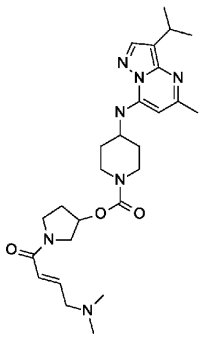
(71) 출원인
일라이 릴리 앤드 캄파니
미국 46285 인디애나주 인디애나폴리스 릴리 코포레이트 센터
(72) 발명자
코티스, 데이비드 앤드류
미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
몬테로, 카를로스
미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장덕순, 김영

전체 청구항 수 : 총 55 항

(54) 발명의 명칭 **CDK7을 억제하는데 유용한 화합물**

(57) 요 약

본 발명은 하기 (I) 또는 그의 제약상 허용되는 염의 신규 CDK7 억제제 및 그의 제약 조성물을 제공한다.



(I)

(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07B 2200/13 (2013.01)
(72) 발명자
파텔, 바르빈 쿠마르 라메샨드라
미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
레믹, 데이비드 마이클
미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내
야다브, 비핀
미국 46206-6288 인디애나주 인디애나폴리스 피. 오. 박스 6288 일라이 릴리 앤드 캄파니 내

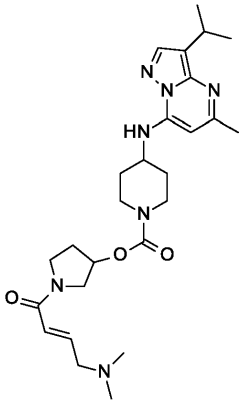
(30) 우선권주장
18382034.9 2018년01월23일
유럽특허청(EPO)(EP)
18382546.2 2018년07월20일
유럽특허청(EPO)(EP)

명 세 서

청구범위

청구항 1

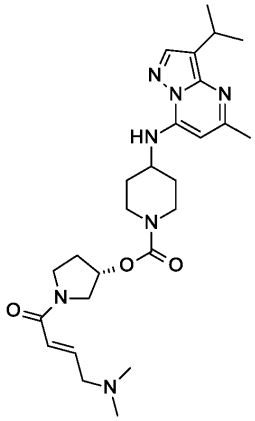
화학식 (I)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.



(I)

청구항 2

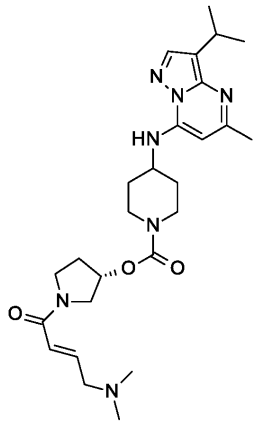
제1항에 있어서, 화학식 (II)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.



(II)

청구항 3

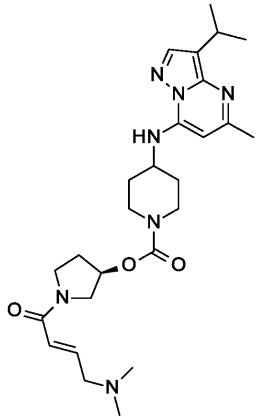
제2항에 있어서, 화학식 (II)의 화합물.



(II)

청구항 4

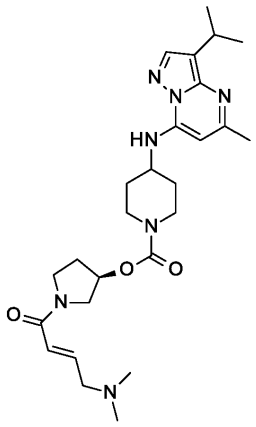
제1항에 있어서, 화학식 (III)의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염.



(III)

청구항 5

제4항에 있어서, 화학식 (III)의 화합물.



(III)

청구항 6

제2항에 있어서, [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 베실레이트인 화합물 또는 염.

청구항 7

제2항에 있어서, [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 헤미-에디실레이트 수화물인 화합물 또는 염.

청구항 8

제4항에 있어서, [(3R)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 베실레이트인 화합물 또는 염.

청구항 9

제4항에 있어서, [(3R)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 헤미-에디실레이트 수화물인 화합물 또는 염.

청구항 10

제2항 또는 제6항에 있어서, 결정질 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 베실레이트인 화합물 또는 염.

청구항 11

제10항에 있어서, CuKa 방사선을 사용하여 2Θ ± 0.2° 로, 12.4° , 17.3° 및 15.8° 로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 피크와 조합하여 21.5° 에서 발생하는 특징적인 피크를 갖는 X선 분말 회절 패턴을 특징으로 하는 결정질 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 베실레이트인 화합물 또는 염.

청구항 12

제2항 또는 제7항에 있어서, 결정질 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 헤미-에디실레이트 수화물인 화합물 또는 염.

청구항 13

제12항에 있어서, CuKa 방사선을 사용하여 2Θ ± 0.2° 로, 21.5° , 16.7° 및 15.2° 로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 피크와 조합하여 18.5° 에서 발생하는 특징적인 피크를 갖는 X선 분말 회절 패턴을 특징으로 하는 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 헤미-에디실레이트 수화물인 화합물 또는 염.

청구항 14

제4항 또는 제8항에 있어서, 결정질 [(3R)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 베실레이트인 화합물 또는 염.

청구항 15

제4항 또는 제9항에 있어서, 결정질 [(3R)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 헤미-에디실레이트 수화물인 화합물 또는 염.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 1종 이상의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 포함하는 제약 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 1종 이상의 다른 치료제를 포함하는 제약 조성물.

청구항 18

요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암 또는 신경교종의 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 단계를 포함하는, 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암 또는 신경교종을 치료하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 암이 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암 또는 위암인 방법.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 암이 유방암인 방법.

청구항 21

환자로부터의 생물학적 샘플에서 ARID1A, KMT2C, KMT2D 또는 RB1 유전자 내 적어도 1개의 기능 상실 돌연변이의 존재에 대해 시험하는 단계, 및 샘플이 기능 상실 돌연변이에 대해 양성인 것으로 시험된 경우에, 환자에게 치료 유효량의 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 혈액암, 육종, 피부암 또는 신경교종을 치료하는 방법.

청구항 22

환자로부터의 생물학적 샘플이 ARID1A, KMT2C, KMT2D 또는 RB1 유전자 내 적어도 1개의 기능 상실 돌연변이를 함유한다면, 환자에게 치료 유효량의 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 혈액암, 육종, 피부암 또는 신경교종을 치료하는 방법.

청구항 23

환자로부터의 생물학적 샘플이 ARID1A, KMT2C, KMT2D 또는 RB1 유전자 내 적어도 1개의 기능 상실 돌연변이에 대해 양성인 것으로 시험된 경우에 환자를 치료를 위해 선택한다면, 환자에게 치료 유효량의 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 혈액암, 육종, 피부암 또는 신경교종을 치료하는 방법.

청구항 24

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물 또는 염이 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일] 피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 또는 그의 제약상 허용되는 염인 방법.

청구항 25

제18항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물 또는 염이 [(3R)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일] 피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 또는 그의 제약상 허용되는 염인 방법.

청구항 26

제18항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 염이 베실레이트 염인 방법.

청구항 27

제18항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 염이 헤미-에디실레이트 수화물 염인 방법.

청구항 28

제21항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 생물학적 샘플이 종양 샘플이고, 샘플이 게놈/DNA 서열분석에 의해 검정되는 것인 방법.

청구항 29

제21항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 환자에 대한 화합물 또는 염의 제1 투여 전에 환자로부터 수득되는 것인 방법.

청구항 30

제21항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자가 ARID1A 유전자인 방법.

청구항 31

제21항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자가 KMT2C 유전자인 방법.

청구항 32

제21항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자가 KMT2D 유전자인 방법.

청구항 33

제21항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자가 RB1 유전자인 방법.

청구항 34

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 요법에 사용하기 위한 화합물 또는 그의 염.

청구항 35

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 혈액암, 육종, 피부암 또는 신경교종의 치료에 사용하기 위한 화합물 또는 그의 염.

청구항 36

제35항에 있어서, 암이 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암 또는 위암인 화합물 또는 염.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서, 암이 유방암인 화합물 또는 염.

청구항 38

제34항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 환자로부터의 생물학적 샘플을 사용하여 시험관내 검정을 수행하는 단계, ARID1A, KMT2C, KMT2D 및 RB1 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이의 존재를 결정하는 단계, 및 임의의 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이가 존재하는 경우에 환자에게 치료 유효량의 화합물 또는 그의 염을 투여하는 단계를 또한 포함하는 치료에 사용하기 위한 화합물 또는 그의 염.

청구항 39

제38항에 있어서, 생물학적 샘플이 종양 샘플이고, 샘플이 게놈/DNA 서열분석에 의해 검정되는 것인 화합물 또는 그의 염.

청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서, 샘플이 환자에 대한 화합물 또는 그의 염의 제1 투여 전에 환자로부터 수득되는 것인 화합물 또는 그의 염.

청구항 41

제34항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 ARID1A 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이를 갖는 것에 의해 치료를 위해 선택되는 것인 화합물 또는 그의 염.

청구항 42

제34항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 KMT2C 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이를 갖는 것에 의해 치료를 위해 선택되는 것인 화합물 또는 그의 염.

청구항 43

제34항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 KMT2D 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이를 갖는 것에 의해 치료를 위해 선택되는 것인 화합물 또는 그의 염.

청구항 44

제34항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 RB1 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이를 갖는 것에 의해 치료를 위해 선택되는 것인 화합물 또는 그의 염.

청구항 45

제34항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 환자에게 약 1 mg 내지 2 g의 용량으로 투여되는 화합물 또는 그의 염.

청구항 46

요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 혈액암, 육종, 피부암 또는 신경교종을 치료하기 위한 의약의 제조에서의 제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도.

청구항 47

제46항에 있어서, 암이 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암 또는 위암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 48

제46항 또는 제47항에 있어서, 환자로부터의 생물학적 샘플을 사용하여 시험관내 검정을 수행하는 단계, ARID1A, KMT2C, KMT2D 및 RB1 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이의 존재를 결정하는 단계, 및 임의의 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이가 존재하는 경우에 환자에게 치료 유효량의 화합물 또는 그의 염을 투여하는 단계를 또한 포함하는 치료용 의약의 제조에서의 용도.

청구항 49

제48항에 있어서, 생물학적 샘플이 종양 샘플이고, 샘플이 게놈/DNA 서열분석에 의해 검정되는 것인 용도.

청구항 50

제46항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 환자에 대한 화합물 또는 그의 염의 제1 투여 전에 환자로부터 수득되는 것인 용도.

청구항 51

제46항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 ARID1A 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이를 갖는 경우 선택되는 것인 용도.

청구항 52

제46항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 KMT2C 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이를 갖는 경우 선택되는 것인 용도.

청구항 53

제46항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 KMT2D 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이를 갖는 경우 선택되는 것인 용도.

청구항 54

제46항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 환자가 RB1 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이를 갖는 경우 선택되는 것인 용도.

청구항 55

제46항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물 또는 그의 염이 환자에게 약 1 mg 내지 2 g의 용량으로 투여되는 것인 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 시클린-의존성 키나제 7 (CDK7)을 억제하는데 유용한 화합물, 제약 조성물 및 CDK7 활성과 관련된 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

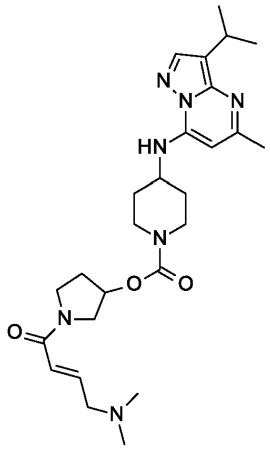
[0002] 시클린-의존성 키나제 (CDK)는 주요 부류의 키나제이고, 암 세포 증식 및 탈조절된 종양원성 전사에 중요하다. CDK7은 시클린 H 및 MATI에 결합하여 삼량체 시클린-활성화 키나제 (CAK)를 형성하며, 이는 세포 주기 제어에 관여하는 다른 CDK를 인산화함으로써 그의 기능을 수행한다. 이들 복합체는 세포 주기에서 2개의 후속 단계 사이의 특이적 전이를 제어한다. CDK7은 세포 주기의 시간적 제어와 전사 활성 둘 다에 연루된다. CDK7은 RNA 폴리머라제 II (RNAPII)의 Rbp1 서브유닛의 인산화에 의한 전사 개시 과정에 연루된다. 비제어된 세포 증식 및 탈조절된 전사는 암의 특징이다. CDK7을 선택적으로 표적화하는 것은 활성 전사 및 세포 주기 진행을 동시에 억제함으로써 이점을 제공할 수 있다. 따라서, CDK7은 암, 특히 공격성이고 치료하기 어려운 암의 치료를 위한 유망한 표적이다.

[0003] CDK7에 대한 소분자 억제제는 문헌에 보고되었다 (예를 들어, WO 2015/154022, WO 2016/142855, WO 2016/160617, WO 2016/193939 및 WO 2017/044858 참조). 세포 증식성 장애, 예컨대 암의 치료에 사용될 수 있는 CDK7 억제제를 제공할 필요성이 남아있다. 추가적으로, 다른 CDK와 비교하여 CDK7에 대해 선택적인 CDK7 억제제를 제공할 필요성이 존재한다.

[0004] 본 발명은 선택적 CDK7 억제제인 신규 화합물을 제공한다. 이러한 신규 화합물은 암, 특히 탈조절된 전사를 갖는 암의 강력하고 효과적인 치료에 대한 필요성을 다룰 수 있다. 본 발명은 또한 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 혈액암, 육종, 피부암 및/또는 신경교종의 강력하고 효과적인 치료에 대한 필요성을 다룰 수 있다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 하기 화학식의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다:



[0006]

[0007] 베실레이트 염이 특히 바람직하다. 헤미-에디실레이트 수화물 염이 또한 바람직하다.

[0008] 본 발명은 또한 암의 치료, 특히 탈조절된 전사를 갖는 암의 치료 방법을 제공한다. 바람직하게는, 암은 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 혈액암, 육종, 피부암 또는 신경교종이다. 보다 바람직하게는, 암은 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암 또는 위암이다. 가장 바람직하게는, 암은 유방암이다.

[0009] 본 발명은 또한 환자로부터의 생물학적 샘플에서 ARID1A, KMT2C, KMT2D 및/또는 RB1 유전자 내 적어도 1개의 기능 상실 돌연변이의 존재에 대해 시험하는 단계, 및 샘플이 ARID1A, KMT2C, KMT2D 및/또는 RB1 유전자 중 임의의 것 내 적어도 1개의 기능 상실 돌연변이에 대해 양성인 것으로 시험된 경우에, 환자에게 치료 유효량의 본 발명의 화합물 또는 염, 특히 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 혈액암, 육종, 피부암 또는 신경교종을 치료하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 염은 베실레이트 염 또는 헤미-에디실레이트 수화물 염이다. 보다 바람직하게는, 암은 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암 또는 위암이다. 가장 바람직하게는, 암은 유방암이다. 바람직하게는, 생물학적 샘플은 종양 샘플이고, 샘플은 게놈/DNA 서열분석에 의해 검정된다. 바람직하게는, 샘플은 환자에 대한 화합물 또는 그의 염, 바람직하게는 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 또는 그의 제약상 허용되는 염의 제1 투여 전에 환자로부터 수득된다. 바람직하게는, 염은 베실레이트 염 또는 헤미-에디실레이트 수화물 염이다. 바람직하게는, 유전자는 ARID1A 유전자이다. 바람직하게는, 유전자는 KMT2C 유전자이다. 바람직하게는, 유전자는 KMT2D 유전자이다. 바람직하게는, 유전자는 RB1 유전자이다.

[0010] 본 발명은 또한 환자로부터의 생물학적 샘플이 ARID1A, KMT2C, KMT2D 및/또는 RB1 유전자 내 적어도 1개의 기능 상실 돌연변이를 함유한다면, 환자에게 치료 유효량의 본 발명의 화합물 또는 염, 특히 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘

-1-카르복실레이트 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 혈액암, 육종, 피부암 또는 신경교종을 치료하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 염은 베실레이트 염 또는 헤미-에디실레이트 수화물 염이다. 보다 바람직하게는, 암은 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암 또는 위암이다. 가장 바람직하게는, 암은 유방암이다. 바람직하게는, 생물학적 샘플은 종양 샘플이고, 샘플은 게놈/DNA 서열분석에 의해 검정된다. 바람직하게는, 샘플은 환자에 대한 화합물 또는 그의 염, 바람직하게는 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 또는 그의 제약상 허용되는 염의 제1 투여 전에 환자로부터 수득된다. 바람직하게는, 염은 베실레이트 염 또는 헤미-에디실레이트 수화물 염이다. 바람직하게는, 유전자는 ARID1A 유전자이다. 바람직하게는, 유전자는 KMT2C 유전자이다. 바람직하게는, 유전자는 KMT2D 유전자이다. 바람직하게는, 유전자는 RB1 유전자이다.

[0011] 본 발명은 또한 환자로부터의 생물학적 샘플이 ARID1A, KMT2C, KMT2D 및/또는 RB1 유전자 내 적어도 1개의 기능 상실 돌연변이에 대해 양성인 것으로 시험된 경우에 환자를 치료를 위해 선택한다면, 환자에게 치료 유효량의 본 발명의 화합물 또는 염, 특히 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는 단계를 포함하는, 환자에서 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 혈액암, 육종, 피부암 또는 신경교종을 치료하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 염은 베실레이트 염 또는 헤미-에디실레이트 수화물 염이다. 보다 바람직하게는, 암은 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암 또는 위암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 가장 바람직하게는, 암은 유방암이다. 바람직하게는, 생물학적 샘플은 종양 샘플이고, 샘플은 게놈/DNA 서열분석에 의해 검정된다. 바람직하게는, 샘플은 환자에 대한 화합물 또는 그의 염, 바람직하게는 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 또는 그의 제약상 허용되는 염의 제1 투여 전에 환자로부터 수득된다. 바람직하게는, 염은 베실레이트 염 또는 헤미-에디실레이트 수화물 염이다. 바람직하게는, 유전자는 ARID1A 유전자이다. 바람직하게는, 유전자는 KMT2C 유전자이다. 바람직하게는, 유전자는 KMT2D 유전자이다. 바람직하게는, 유전자는 RB1 유전자이다.

[0012] 본 발명은 또한 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 1종 이상의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 추가 실시양태에서, 조성물은 1종 이상의 다른 치료제를 추가로 포함한다. 추가 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 1종 이상의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 포함하는, 암의 치료를 위한 제약 조성물을 제공한다. 추가 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 1종 이상의 제약상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 포함하는, 탈조절된 전사를 갖는 암의 치료를 위한 제약 조성물을 제공한다. 상기 실시양태에서, 암은 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 혈액암, 육종, 피부암 또는 신경교종이다.

[0013] 바람직한 실시양태에서, 암은 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암 또는 위암이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 암은 유방암이다.

[0014] 추가로, 본 발명은 또한 환자로부터의 생물학적 샘플을 사용하여 시험관내 검정을 수행하는 단계, ARID1A, KMT2C, KMT2D 및 RB1 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이의 존재를 결정하는 단계, 및 임의의 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이가 존재하는 경우에 환자에게 치료 유효량의 화합물 또는 그의 염을 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료에 사용하기 위한 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다. 상기 실시양태에서, 암은 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 혈액암, 육종, 피부암 또는 신경교종의 치료에 사용하기 위한 암이다. 바람직하게는, 생물학적 샘플은 종양 샘플이고, 샘플은 게놈/DNA 서열분석에 의해 검정된다. 바람직하게는, 화합물 또는 그의 염은 환자에게 약 1 mg 내지 2 g의 용량으로 투여된다. 바람직하게는, 샘플은 환자에 대한 화합물 또는 그의 염의 제1 투여 전에 환자로부터 수득된다. 바람직하게는, 환자는 ARID1A 유전자 내 불활성화 돌연변이를 갖는 경우 선택된다. 바람직하게는, 환자는 KMT2C 유전자 내 불활성화 돌연변이를 갖는 경우 선택된다. 바람직하게는, 환자는 KMT2D 유전자 내 불활성화 돌연변이를 갖는 경우 선택된다. 바람직하게는, 환자는 RB1 유전자 내 불활성화 돌연변이를 갖는 경우 선택된다.

[0015] 추가로, 본 발명은 요법에 사용하기 위한, 특히 탈조절된 전사를 갖는 암의 치료를 위한 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다. 추가 실시양태에서, 본 발명은 탈조절된 전사를 갖는 암 치료용 의약의 제조를 위한 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도를 제공한다. 상기 실시양태에서, 암은 요

로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 혈액암, 육종, 피부암 또는 신경교종이다. 바람직한 실시양태에서, 암은 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암 또는 위암으로부터 선택된다. 보다 바람직한 실시양태에서, 암은 유방암이다.

[0016] 추가 실시양태에서, 본 발명은 요법에 사용하기 위한, 특히 암의 치료를 위한 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제공한다. 추가 실시양태에서, 본 발명은 암 치료용 의약의 제조를 위한 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 용도를 제공한다. 상기 실시양태에서, 암은 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 혈액암, 육종, 피부암 또는 신경교종이다. 바람직한 실시양태에서, 암은 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암 또는 위암이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 암은 유방암이다. 추가로, 본 발명은 환자로부터의 생물학적 샘플을 사용하여 시험관내 검정을 수행하는 단계, ARID1A, KMT2C, KMT2D 및 RB1 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이의 존재를 결정하는 단계, 및 임의의 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이가 존재하는 경우에 환자에게 치료 유효량의 화합물 또는 그의 염을 투여하는 단계를 또한 포함하는, 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 혈액암, 육종, 피부암 또는 신경교종의 치료용 의약의 제조를 제공한다. 바람직하게는, 생물학적 샘플은 종양 샘플이고, 샘플은 게놈/DNA 서열분석에 의해 검정된다. 바람직하게는, 화합물 또는 그의 염은 환자에게 약 1 mg 내지 2 g의 용량으로 투여된다. 바람직하게는, 샘플은 환자에 대한 화합물 또는 그의 염의 제1 투여 전에 환자로부터 수득된다. 바람직하게는, 환자는 ARID1A 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이를 갖는 경우 선택된다. 바람직하게는, 환자는 KMT2C 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이를 갖는 경우 선택된다. 바람직하게는, 환자는 KMT2D 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이를 갖는 경우 선택된다. 바람직하게는, 환자는 RB1 유전자 내 적어도 1개의 불활성화 돌연변이를 갖는 경우 선택된다.

[0017] 본 발명은 결정질 염 형태의 본 발명의 화합물 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트를 제공한다. 본 발명은 또한 결정질 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 헤미-에디실레이트 수화물을 제공한다. 본 발명은 또한 CuKa 방사선을 사용하여 2Θ ± 0.2° 로, 21.5° , 16.7° 및 15.2° 로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 피크와 조합하여 18.5° 에서 발생하는 특징적인 피크를 갖는 X선 분말 회절 패턴을 특징으로 하는 결정질 형태의 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 헤미-에디실레이트 수화물을 제공한다. 본 발명은 또한 결정질 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 베실레이트를 제공한다. 본 발명은 또한 CuKa 방사선을 사용하여 2Θ ± 0.2° 로, 12.4° , 17.3° 및 15.8° 로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 피크와 조합하여 21.5° 에서 발생하는 특징적인 피크를 갖는 X선 분말 회절 패턴을 특징으로 하는 결정질 형태의 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 베실레이트를 제공한다. 본 발명은 또한 결정질 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 히드로클로라이드를 제공한다. 본 발명은 또한 CuKa 방사선을 사용하여 2Θ ± 0.2° 로, 5.5° , 15.5° 및 9.7° 로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 피크와 조합하여 18.9° 에서 발생하는 특징적인 피크를 갖는 X선 분말 회절 패턴을 특징으로 하는 결정질 형태의 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 히드로클로라이드를 제공한다.

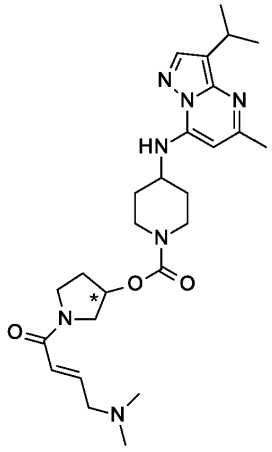
[0018] 본 발명은 또한 본 발명의 화합물의 합성에 유용한 중간체 및 방법을 포괄한다.

[0019] 본원에 사용된 용어 "치료하는" (또는 "치료하다" 또는 "치료")은 기존 증상, 상태 또는 장애의 진행 또는 중증도를 저지, 둔화, 정지 또는 역전시키는 것을 지칭한다.

[0020] 본원에 사용된 용어 "암" 및 "암성"은 전형적으로 비조절된 세포 증식을 특징으로 하는 환자에서의 생리학적 상태를 지칭하거나 또는 기재한다. 이 정의에는 양성 및 악성 암이 포함된다. "초기 암" 또는 "초기 종양"은 진행성 또는 전이성이 아닌 암을 의미하거나 또는 0, I 또는 II기 암으로 분류된다. 암의 예는 요로상피암, 자궁암, 결장직장암, 유방암, 폐암, 난소암, 위암, 간담도암, 췌장암, 자궁경부암, 전립선암, 혈액암, 육종, 피부암 또는 신경교종을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0021] 본 발명의 화합물은 반응하여 제약상 허용되는 염을 형성할 수 있다. 제약상 허용되는 염 및 그를 제조하는 통상의 방법론은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [P. Stahl, et al. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2nd Revised Edition (Wiley-VCH, 2011); S.M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, No. 1, January 1977] 참조).

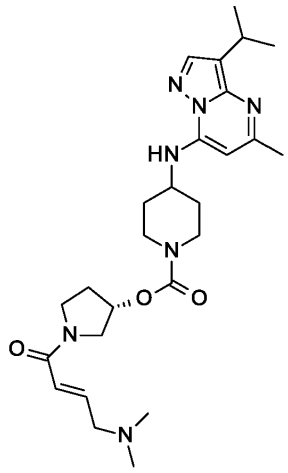
[0022] 통상의 기술자는 하기 (I)에 제시된 바와 같은 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염이 하기 *에 의해 나타내어지는 바와 같이 1개의 키랄 중심을 함유하는 코어로 구성된다는 것을 인지할 것이다:



(I)

[0023]

[0024] 비록 본 발명이 모든 개별 거울상이성질체 뿐만 아니라 라세미체를 포함한 상기 화합물의 거울상이성질체의 혼합물을 고려할지라도, 본 발명의 바람직한 화합물은 하기 (II) 또는 그의 제약상 허용되는 염에 의해 나타내어진다:



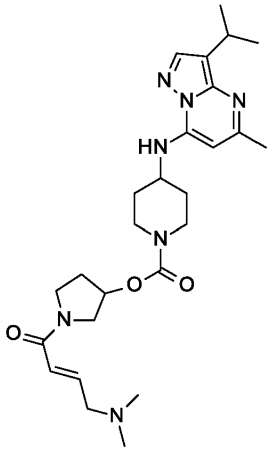
(II)

[0025]

[0026] 통상의 기술자는 또한 모든 키랄 중심에 대한 칸-인골드-프렐로그 (R) 또는 (S) 지정이 특정한 화합물의 치환 패턴에 따라 달라질 것임을 인지할 것이다. 단일 거울상이성질체는 키랄 시약을 사용하여 시작하거나 또는 입체선택적 또는 입체특이적인 합성 기술에 의해 제조될 수 있다. 대안적으로, 단일 거울상이성질체는 본 발명의 화합물의 합성 중 임의의 편리한 시점에서 표준 키랄 크로마토그래피 또는 결정화 기술에 의해 혼합물로부터 단리될 수 있다. 본 발명의 화합물의 단일 거울상이성질체는 본 발명의 바람직한 실시양태이다.

[0027] 본 발명의 화합물은 바람직하게는 다양한 경로에 의해 투여되는 제약 조성물로서 제제화된다. 이러한 제약 조성물 및 그의 제조 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro, et al., eds., 21st ed., Mack Publishing Co., 2005)] 참조). 하기 화학식의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 1종 이상의 제약상 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 제

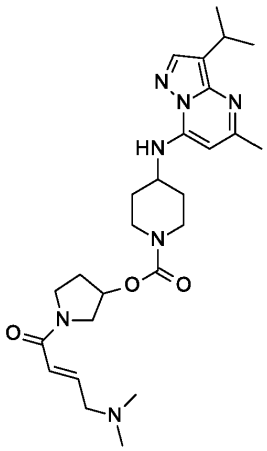
약 조성물이 특히 바람직하다:



(I)

[0028]

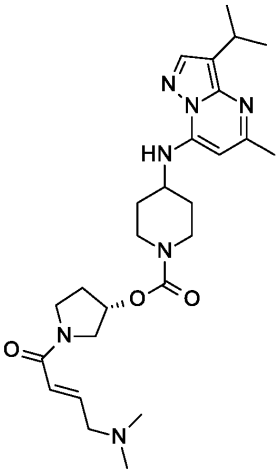
[0029] 본 발명의 바람직한 실시양태는 하기 또는 그의 제약상 허용되는 염이다:



(I)

[0030]

[0031] 본 발명의 특히 바람직한 실시양태는 화합물, (3S)-1-[(2E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일 4-{[5-메틸-3-(프로판-2-일)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일]아미노}피페리딘-1-카르복실레이트 또는 그의 제약상 허용되는 염에 관한 것이다:

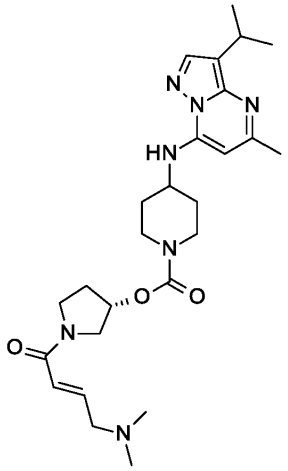


(II)

[0032]

[0033] 헤미-에디실레이트 수화물 염 또는 베실레이트 염이 특히 바람직하다.

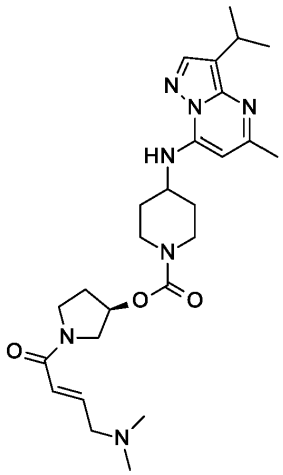
[0034] 본 발명의 또 다른 특히 바람직한 실시양태는 화합물, (3S)-1-[(2E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일 4-{[5-메틸-3-(프로판-2-일)피라졸로[1,5-A]피리미딘-7-일]아미노}피페리딘-1-카르복실레이트에 관한 것이다:



(II)

[0035]

[0036] 본 발명의 추가의 특히 바람직한 실시양태는 화합물, (3R)-1-[(2E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일 4-{[5-메틸-3-(프로판-2-일)피라졸로[1,5-A]피리미딘-7-일]아미노}피페리딘-1-카르복실레이트 (하기 (III)으로 제시됨) 또는 그의 제약상 허용되는 염에 관한 것이다:

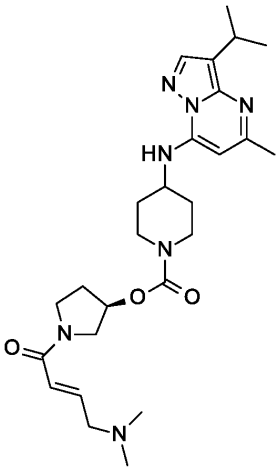


(III)

[0037]

[0038] 헤미-에디실레이트 수화물 염 또는 베실레이트 염이 특히 바람직하다.

[0039] 본 발명의 또 다른 특히 바람직한 실시양태는 화합물, (3R)-1-[(2E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일 4-{[5-메틸-3-(프로판-2-일)피라졸로[1,5-A]피리미딘-7-일]아미노}피페리딘-1-카르복실레이트에 관한 것이다:



(III)

[0040]

[0041] 본 발명의 화합물은 일반적으로 넓은 투여량 범위에 걸쳐 효과적이다. 예를 들어, 1일 투여량은 약 1 mg 내지 약 2 g의 범위 내에 속한다. 일부 경우에, 상기 범위의 하한치 미만의 투여량 수준이 매우 적합할 수 있는 한편, 다른 경우에는 보다 더 큰 용량이 유리한 이익/위험 프로파일을 유지하면서 사용될 수 있고, 따라서 상기 투여량 범위는 어떠한 방식으로든지 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 실제로 투여되는 화합물의 양은 치료될 상태, 선택된 투여 경로, 투여되는 실제 화합물 또는 화합물들, 개별 환자의 연령, 체중 및 반응, 및 환자 증상의 중증도를 포함한 관련 상황에 비추어 의사에 의해 결정될 것으로 이해될 것이다.

[0042] 개별 이성질체 및 거울상이성질체는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 본 발명의 화합물의 합성 중 임의의 편리한 시점에서 선택적 결정화 기술 또는 키랄 크로마토그래피와 같은 방법에 의해 분리되거나 분해될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981, 및 E.L. Eliel and S.H. Wilen," Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994] 참조).

[0043] 추가적으로, 본원에 기재된 특정 중간체는 1개 이상의 보호기를 함유할 수 있다. 가변 보호기는 수행될 특정한 반응 조건 및 특정한 변환에 따라 각 경우에서 동일하거나 상이할 수 있다. 보호 및 탈보호 조건은 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있고 문헌에 기재되어 있다 (예를 들어, 문헌 ["Greene's Protective Groups in Organic Synthesis", Fourth Edition, by Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007] 참조).

[0044] 특정 약어는 하기와 같이 정의된다: "^{1}H NMR"은 ^{1}H-핵 자기 공명을 지칭하고; "eq"는 당량을 지칭하고; "THF"는 테트라히드로푸란을 지칭하고; "DCM"은 디클로로메탄을 지칭하고; "MeCN" 또는 "ACN"은 아세토니트릴을 지칭하고; "DMSO"는 디메틸 술폭시드를 지칭하고; "MTBE"는 메틸 tert-부틸 에테르를 지칭하고; "TEA"는 트리메틸아민을 지칭하고; "HATU"는 I-[비스(디메틸아미노)메틸렌]-I 8-1,2,3-트리아졸로[4, 5-b]피리디늄 3-옥시드-헥사플루오로포스페이트를 지칭하고; "MeOH"는 메탄올을 지칭하고; "TLC"는 박층 크로마토그래피를 지칭하고; "UV"는 자외선을 지칭하고; "LC 칼럼"은 액체 크로마토그래피 칼럼을 지칭하고; "DMEA"는 디메틸메틸아민을 지칭하고; "EtOAc"는 에틸 아세테이트를 지칭하고; "DMF"는 디메틸포름아미드를 지칭하고; "SCX"는 강한 양이온 교환을 지칭하고; "ca."는 약 또는 대략을 지칭하고; "RBF"는 둥근 바닥 플라스크를 지칭하고; "ATP"는 아데노신 트리포스페이트를 지칭하고; "DTT"는 디티오트레이톨을 지칭하고; "HEPES"는 (4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산)을 지칭하고; "EDTA"는 에틸렌디아민테트라아세트산을 지칭하고; "ATCC"는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션을 지칭하고; "RT"는 실온을 지칭하고; "PBS"는 포스페이트-완충 염수를 지칭하고; "BSA"는 소 혈청 알부민을 지칭하고; "FBS"는 태아 소 혈청을 지칭하고; "RNAase"는 리보뉴클레아제를 지칭하고; "cDNA"는 상보적 DNA를 지칭하고; "GST"는 글루타티온 S-트랜스퍼라제를 지칭하고; "His"는 히스티딘을 지칭하고; "GSH"는 글루타티온을 지칭하고; "HBSS"는 행크 평형 염 용액을 지칭한다.

[0045] 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염은 관련 기술분야에 공지된 다양한 절차뿐만 아니라 하기 제조예 및 실시예에 의해서도 제조될 수 있다. 기재된 각각의 경로에 대한 구체적인 합성 단계는 본 발명의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제조하기 위해 상이한 방식으로 또는 상이한 반응식으로부터의 단계와 함께 조

합될 수 있다. 하기 반응식에서의 각각의 단계의 생성물은 추출, 증발, 침전, 크로마토그래피, 여과, 연화처리 및 결정화를 포함한 관련 기술분야에 널리 공지된 통상적인 방법에 의해 회수될 수 있다. 시약 및 출발 물질은 관련 기술분야의 통상의 기술자가 용이하게 입수가능하다.

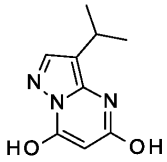
[0046] 하기 제조예 및 실시예는 추가로 본 발명을 예시하고 본 발명의 화합물의 전형적 합성을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 제조예 및 실시예

[0048] 제조예 1

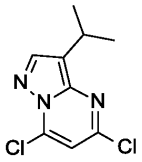
[0049] 3-이소프로필피라졸로[1,5-a]피리미딘-5,7-디올의 합성.

[0050] 

[0051] 23℃에서 소듐 에톡시드 (979 g, 14.4 mol, 3.0 당량) 및 디에틸 말로네이트 (998 g, 6.23 mol, 3.0 당량)를 에탄올 (4.2 L) 중 4-이소프로필-1H-피라졸-3-아민 (600 g, 4.79 mol)의 용액에 첨가하고, 혼합물을 15시간 동안 80℃ (내부 온도)로 가열하였다. 혼합물을 25℃로 냉각시키고, 1 M 수성 HCl (2.0 L) (최종 pH = 2.0)을 첨가하고, 여과하고, 고체를 물 (2.0 L)로 세척하고, 건조시켜 3-이소프로필피라졸로[1,5-a]피리미딘-5,7-디올 (600 g, 65%)을 백색 고체로서 수득하였다. ES/MS m/z 194 (M+H).

[0052] 제조예 2

[0053] 5,7-디클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘의 합성.

[0054] 

[0055] $POCl_3$ (2.00 L, 25.8 mol, 10 당량) 및 N,N-디메틸아닐린 (162 mL, 2.58 mol, 1.0 당량)을 50℃에서 MeCN (1.25 L) 중 3-이소프로필피라졸로[1,5-a]피리미딘-5,7-디올 (500 g, 2.58 mol)의 현탁액에 첨가하고, 혼합물을 36시간 동안 100℃로 가열하였다. 23℃로 냉각시키고, 1:1 얼음 / 포스페이트 완충제 (1 M, pH = 8, 10 L) 내로 적가식으로 붓고, 15시간 동안 교반하였다. 여과하고, 고체를 물 (5.0 L)로 세척하고, 건조시켜 5,7-디클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘 (375 g, 63%)을 갈색 고체로서 수득하였다. ES/MS m/z ($^{35}Cl/^{37}Cl$) 230/232 (M+H). ^1H NMR (d_6-DMSO) δ 1.32 (d, 6H), 3.19 (dq, 1H), 7.58 (s, 1H), 8.31 (s, 1H).

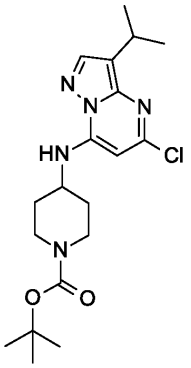
[0056] 5,7-디클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘의 대안적 합성.

[0057] 소듐 에톡시드 -에탄올 중 21%- (17.9 mL, 47.9 mmol)를 에탄올 (150 mL) 중 4-이소프로필-1H-피라졸-5-아민 (5 g, 39.9 mmol) 및 디에틸 말로네이트 (6.74 mL, 43.9 mmol)의 용액에 첨가하고, 실온에서 교반하였다. 5분 후, 90℃에서 가열하고 교반하였다. 18시간 후, 실온으로 냉각시키고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 물로 용해시키고, 1 N 염산을 pH=3까지 첨가하였다. 백색 침전물을 여과하고, 감압 하에 50℃에서 18시간 동안 건조시켰다. 생성된 고체, 3-이소프로필피라졸로[1,5-a]피리미딘-5,7-디올 (4.92 g, 25.5 mmol, 0.638)을 옥시염화인 (48 mL) 중에 현탁시키고, N,N-디메틸아닐린 (2.3 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 110℃에서 환류시켰다. 2시간 후, 실온으로 냉각시키고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 얼음/물 용액에 붓고, DCM (2회)으로 추출하였다. 유기 층을 합하고, 염수로 세척하고, 황산마그네슘 상에서 건조시켰다. 여과하고, 감압 하에 농축시켜 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 플래쉬 크로마토그래피 (실리카 겔)에 의해 에틸 헥산: 아세테이트로 용리시켜 정제하여 5,7-디클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘 (4.45 g, 19.3 mmol)을 갈색 고체로서 수득하였다. MS (m/z): 230,232(M+1). ^1H NMR (400.21 MHz, DMSO): 8.31 (s, 1 H), 7.58 (s, 1 H), 3.19 (m, 1 H),

1.32 (d, J= 7.0 Hz, 6H).

[0058] 제조예 3

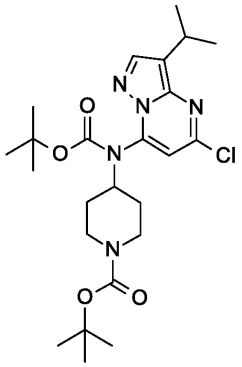
[0059] tert-부틸 4-[(5-클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트의 합성.

[0060] 

[0061] N,N-디이소프로필에틸아민 (189 mL, 140 g, 1080 mmol, 2 당량) 및 tert-부틸 4-아미노피페리딘-1-카르복실레이트 (114 g, 570 mmol, 1.05 당량)를 23℃에서 2-프로판올 (1.0 L) 중 5,7-디클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘 (130 g, 542 mmol)의 현탁액에 첨가하고, 혼합물을 18시간 동안 교반하고, 여과하고, 고체를 MTBE (200 mL)로 세척하고, 건조시켜 tert-부틸 4-[(5-클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (182 g, 85% 수율)를 황색 고체로서 수득하였다. ES/MS m/z (^{35}Cl/^{37}Cl) 394/396 (M+H). ^{1}H NMR (d_6-DMSO) δ 1.28 (d, 6H), 1.42 (s, 9H), 1.61 (m, 2H), 1.83 (m, 2H), 2.87 (m, 1H), 3.10 (dq, 1H), 3.32 (m, 1H), 3.85 (m, 1H), 3.98 (m, 2H), 6.34 (s, 1H), 8.01 (s, 1H), 8.07 (d, 1H).

[0062] 제조예 4

[0063] tert-부틸 4-[tert-부톡시카르보닐-(5-클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트의 합성.

[0064] 

[0065] N,N-디이소프로필에틸아민 (69.1 mL, 51.2 g, 396 mmol, 1 당량), 4-디메틸아미노피리딘 (4.84 g, 39.6 mmol, 0.1 당량) 및 디-tert-부틸 디카르보네이트 (200 mL, 190 g, 871 mmol, 2.2 당량)를 23℃에서 THF (936 mL) 중 tert-부틸 4-[(5-클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (156 g, 396 mmol)의 용액에 첨가하고, 혼합물을 50℃ (내부 온도)에서 21시간 동안 가열하였다. 23℃로 냉각시키고, 진공 하에 농축시켜 tert-부틸 4-[tert-부톡시카르보닐-(5-클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (195 g, 99%)를 오렌지색 고체로서 수득하였다. ES/MS m/z (^{35}Cl/^{37}Cl) 438/440 (M+H-56). ^{1}H NMR (d_6-DMSO) δ 1.20 (s, 9H), 1.31 (d, 6H), 1.35 (s, 9H), 1.46 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 2.75 (m, 1H), 3.19 (dq, 1H), 3.32 (m, 1H), 3.95 (m, 1H), 4.18 (m, 2H), 7.20 (s, 1H), 8.19 (s, 1H).

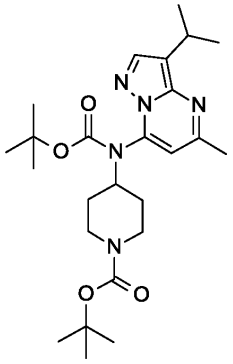
[0066] tert-부틸 4-[tert-부톡시카르보닐-(5-클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-

1-카르복실레이트의 대안적 합성.

[0067] tert-부틸 4-아미노피페리딘-1-카르복실레이트 (2.8 g, 14 mmol)를 에탄올 (32 mL) 중 5,7-디클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘 (3.1 g, 13 mmol)의 용액에 첨가하였다. 80℃에서 가열하였다. 18시간 후, 실온으로 냉각시키고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 플래쉬 크로마토그래피 (실리카 겔)에 의해 에틸 아세테이트:DCM으로 용리시켜 정제하여 tert-부틸 4-[tert-부톡시카르보닐-(5-클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트를 백색 고체로서 수득하였다. 질량 스펙트럼 (m/e): 394,396(M+1). tert-부톡시카르보닐 tert-부틸 카르보네이트 (1.14 g, 5.22 mmol)를 THF (7 mL) 중 tert-부틸 4-[(5-클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (940 mg, 2.386 mmol) 및 4-디메틸아미노피리딘 (290 mg, 2.33 mmol)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 60℃에서 가열하였다. 30분 후, 실온으로 냉각시키고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 플래쉬 크로마토그래피 (실리카 겔)에 의해 DCM으로 용리시켜 정제하여 tert-부틸 4-[tert-부톡시카르보닐-(5-클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (1.1 g)를 황색빛 오일로서 수득하였다. 질량 스펙트럼 (m/z): 438(M-t-Bu). ^{1}H NMR (400.13 MHz, d_6-DMSO): 8.19 (s, 1H), 7.20 (s, 1H), 5.76 (s, 1H), 4.17(m, 1H), 3.95 (m, 2 H), 3.19 (m, 1 H), 1.87 (m, 2 H), 1.47 (m, 2 H), 1.35 (s, 9 H), 1-31 (d, 6H), 1.19 (s, 9H).

[0068] 제조예 5

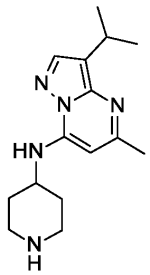
[0069] tert-부틸 4-[tert-부톡시카르보닐-(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트의 합성.

[0070] 

[0071] [1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센]디클로로팔라듐 (II) DCM 부가물 (15.7 g, 19.3 mmol, 0.05 당량), 삼염기성 인산칼륨 (245 g, 1160 mmol, 3 당량) 및 2,4,6-트리메틸-1,3,5,2,4,6-트리옥사트리보리난 (THF 중 50 질량%, 75.3 mL, 67.6 g, 270 mmol, 0.7 당량)을 90℃ (내부 온도)에서 1,4-디옥산 (1.5 L) 중 tert-부틸 4-[tert-부톡시카르보닐-(5-클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (190 g, 385 mmol)의 용액에 첨가하였다. 5일 후, 23℃로 냉각시키고, 규조토 패드를 통해 여과하고, 고체를 THF (3 x 250 mL)로 헹구었다. 합한 여과물을 23℃에서 실리아메트에스(SiliaMetS)® 티올 수지 (40-63 μm; 로딩 = 1.46 mmol/g; 320 g, 467 mmol)로 처리하고, 18시간 동안 65℃로 가열하였다. 23℃로 냉각시키고, 여과하고, 수지를 DCM (2 x 250 mL)으로 세척하였다. 합한 여과물을 진공 하에 농축시키고, 잔류물을 MTBE (1 mL) 중에 용해시키고, 물 (200 mL)로 세척하고, 건조시키고 ($MgSO_4$), 진공 하에 농축시켜 tert-부틸 4-[tert-부톡시카르보닐-(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (182 g, 100%)를 갈색 고체로서 수득하였다. ES/MS m/z 474 (M+H).

[0072] 제조예 6

[0073] 3-이소프로필-5-메틸-N-(4-피페리딜)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-아민 디히드로클로라이드의 합성.



2 HCl

[0074]

[0075] 2-프로판올 중 염산 (5.50 mol/L, 349 mL, 1920 mmol, 5 당량)을 23℃에서 2-프로판올 (1.4 L) 중 tert-부틸 4-[tert-부톡시카르보닐-(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (182 g, 384 mmol)의 현탁액에 첨가하고, 혼합물을 3시간 동안 70℃ (내부 온도)로 가열하였다. 23℃로 냉각시키고, 여과하고, 고체를 MTBE (2 x 200 mL)로 세척하고, 건조시켜 3-이소프로필-5-메틸-N-(4-피페리딜)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-아민 디히드로클로라이드 (95 g, 71% 수율)를 황색 고체로서 수득하였다. 모액을 합하고, MTBE (2 L)로 희석하고, 여과하고, 고체를 MTBE (2 x 50 mL)로 세척하고, 건조시켜 추가의 물질 (8.42 g, 15% 수율)을 수득하였다. ES/MS m/z 274 (M+H). ^{1}H NMR (d_6-DMSO) δ 1.28 (d, 6H), 2.04 (m, 4H), 2.61 (s, 3H), 3.00 (m, 2H), 3.40 (m, 3H), 4.16 (m, 2H), 6.68 (s, 1H), 8.30 (s, 1H), 8.80 (m, 1H), 9.21 (m, 1H), 9.86 (m, 1H).

[0076] 3-이소프로필-5-메틸-N-(4-피페리딜)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-아민 디히드로클로라이드의 대안적 합성.

[0077] 7-클로로-3-이소프로필-5-메틸피라졸로[1,5-a]피리미딘 (2.1 kg, 10.0 mol) 및 디이소프로필에틸아민 (4.18 L, 2.4 당량)을 이소프로판올 (16.8 L, 8 mL/g) 중에 용해시켰다. tert-부틸 4-아미노피페리딘-1-카르복실레이트 (2.6 kg, 1.3 당량)를 반응 혼합물에 충전시키고, 16시간 동안 75-80℃로 가열하였다. 반응 혼합물을 5-10℃로 냉각시키고, 이소프로판올 중 염산의 4 M 용액 (17.5 L, 7.0 당량)을 첨가하였다. 4시간 동안 40-45℃로 가열하였다. 25-30℃로 냉각시키고, 혼합물을 여과하여 표제 화합물 (2.25 kg, 72.7% 수율)을 수득하였다. 물질을 후속 단계에 추가 정제 없이 사용하였다. ^{1}H NMR (500 MHz,D_2O) δ 8.16 (s, 1H), 6.45 (s, 1H), 4.29-4.26 (m,1 H), 3.63 (d, J = 15.0 Hz, 2H), 3.26 - 3.12 (m, 3H), 2.64 (s, 3H), 2.40 (d, J = 15.0 Hz, 2H), 2.08 (dd, J =10.0, 25.0 Hz, 2H), 1.31 (d, J = 5.0 Hz, 6H).

[0078] 유리 염기로서의 3-이소프로필-5-메틸-N-(4-피페리딜)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-아민의 대안적 합성.

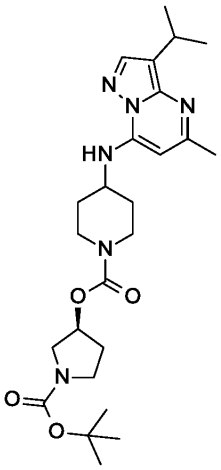
[0079] 1,4-디옥산 (15 mL)을 tert-부틸 4-[tert-부톡시카르보닐-(5-클로로-3-이소프로필-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (689 mg, 1.39 mmol), 2,4,6-트리메틸-1,3,5,2,4,6-트리옥사트리보리난 (350 mg, 2.79 mmol) 및 삼염기성 인산칼륨 (1.2 g, 5.5 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 5분 동안 용액 상에 N_2를 버블링하였다. [1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센]디클로로팔라듐(II) DCM 부가물 (60 mg, 0.072 mmol)을 첨가하였다. 110℃에서 가열하였다. 1.5시간 후, 추가의 [1,1-비스(디페닐포스피노)페로센]디클로로팔라듐(II) (60 mg, 0.072 mmol)을 첨가하고, 100℃에서 가열하였다. 18시간 후, 실온으로 냉각시키고, 혼합물을 필터 셀 패드를 통해 여과하고, 에틸 아세테이트로 헹구고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 플래쉬 크로마토그래피 (실리카 겔)에 의해 에틸 아세테이트 및 DCM으로 용리시켜 정제하여 tert-부틸 4-[tert-부톡시카르보닐-(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (537 mg, 1.077 mmol)를 오렌지빛 오일로서 수득하였다. 질량 스펙트럼 (m/z): 474(M+ 1).

[0080] 트리플루오로아세트산 (2.5 mL, 33 mmol)을 DCM (12 mL) 중 tert-부틸 4-[tert-부톡시카르보닐-(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (537 mg, 1.077 mmol)의 용액에 적가하였다. 실온에서 교반하였다. 2시간 후, 혼합물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 SCX-2 카트리지에 의해 10% DCM: MeOH에 이어서 MeOH (2 N NH_3)로 용리시켜 정제하였다. 염기성 분획을 감압 하에 농축시켜 3-이소프로필-5-메틸-N-(4-피페리딜)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-아민 (345 mg, 1.199 mmol)을 갈색빛 고체로서 수득하였다. 질량 스펙트럼 (m/z): 274(M+1). ^{1}H NMR (400.13 MHz, DMSO): 7.82 (s, 1 H), 7.23 (d, 1H), 6.08 (s, 1

H), 3.58 (m, 1 H), 3.12 (m, 1 H), 2.97 (m, 2 H), 2.58 (m, 2 H), 2.39 (s, 3 H), 2.10 (m, 2 H), 1.28 (d, 6 H).

[0081] 제조예 7

[0082] [(3S)-1-tert-부톡시카르보닐피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트의 합성



[0083]

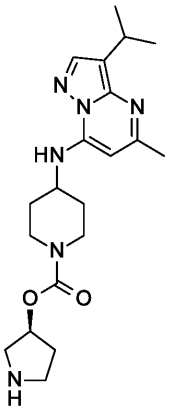
[0084] 1시간 동안 23℃에서 32% 수성 NH_4OH를 함유하는 스크러버 트랩 병에 연결된 3구 RBF에 놓인 THF (765 mL) 중 tert-부틸 (3S)-3-히드록시피롤리딘-1-카르복실레이트 (76.5 g, 409 mmol)의 용액에 포스겐 (톨루엔 중 20 질량%, 348 mL, 485 g, 981 mmol, 2.4 당량)을 첨가하였다. 30분 동안 혼합물을 통해 N_2를 버블링하고, 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 DCM (757 mL) 중에 용해시키고, 0℃ (내부 온도)로 냉각시키고, 사전에 트리에틸아민 (228 mL, 166 g, 1639 mmol, 6 당량)으로 처리한 DCM (756.8 mL) 중 3-이소프로필-5-메틸-N-(4-피페리딜)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-아민 디히드로클로라이드 (94.6 g, 273.2 mmol)의 현탁액을 첨가하였다 (7분에 걸쳐 서서히 첨가함). 첨가 후 냉각 조를 제거하고, 30분 후 반응물을 35% 수성 HCl (20 mL) 및 1 M 수성 HCl (300 mL)로 켄칭하였다 (최종 pH = 7). 유기 층을 분리하고, 물 (300 mL) 및 포화 수성 NaCl (300 mL)로 세척하고, 건조시키고 ($MgSO_4$), 진공 하에 농축시켰다. 잔류물 (약 180 g)을 DCM (1.5 L) 중에 용해시키고, 23℃에서 실리아메트에스® 티올 수지 (40-63 μm; 로딩 = 1.46 mmol/g; 10 g, 14.6 mmol, Pd 함량을 기준으로 140 당량)를 첨가하고, 이어서 혼합물을 2시간 동안 40℃로 가열하였다. 여과하고, 수지를 DCM (2 x 10 mL)으로 헹구고, 합한 여과물을 진공 하에 농축시켜 [(3S)-1-tert-부톡시카르보닐피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (129 g, 97%)를 황색 고체로서 수득하였다. ES/MS m/z: 487 (M+H). ^{1}H NMR (d_6-DMSO) δ 1.28 (d, 6H), 1.40 (s, 9H), 1.65 (m, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.96 (m, 1H), 2.07 (m, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.90 (m, 2H), 3.31 (m, 5H), 3.89 (m, 1H), 4.02 (m, 2H), 5.10 (m, 1H), 6.32 (s, 1H), 8.01 (s, 1H).

[0085] [(3S)-1-tert-부톡시카르보닐피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트의 대안적 합성

[0086] tert-부틸 (3S)-3-히드록시피롤리딘-1-카르복실레이트 (438 g, 1.3 당량)를 15-30℃에서 ACN (4.4 L, 10.0 mL/g) 중에 용해시켰다. 15-30℃에서 트리에틸아민 (595 mL, 4.5 당량)을 첨가하고 이어서 4-니트로페닐 클로로포르메이트 (490 g, 1.4 당량)를 첨가하였다. 35-40℃로 가열하고, 혼합물을 4시간 동안 교반하였다. 15-25℃로 냉각시키고, 3-이소프로필-5-메틸-N-(피페리딘-4-일)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-아민 (500 g, 1.8 mol)을 첨가하였다. 15-30℃에서 5시간 동안 교반하였다. 감압 하에 농축시켰다. 2-메틸테트라히드로푸란 (4.4 L, 10.0 mL/g)을 첨가하고, 교반하고, 여과하였다. 여과물을 2 M NaOH (1.1 L, 2.5 mL/g, 4회) 및 포화 수성 NaCl (4.4 L, 10.0 mL/g)로 순차적으로 세척하였다. Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 이소프로필 알콜 (2.2 L, 5 mL/g)을 첨가하여 표제 화합물의 용액 (660 g, 75.4% 수율)을 수득하였다.

[0087] 제조예 8

[0088] [(3S)-피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트의 합성.



[0089]

[0090] 2-프로판올 중 염산 (5.50 mol/L, 217 mL, 1190 mmol, 5 당량)을 23℃에서 2-프로판올 (755 mL) 중 [(3S)-1-tert-부톡시카르보닐피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (116 g, 239 mmol)의 현탁액에 첨가하고, 혼합물을 90분 동안 70℃로 가열하였다. 23℃로 냉각시키고, 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 DCM (1.5 L) 중에 현탁시키고, 1 M 수성 NaOH (400 mL) 및 50% 수성 NaOH (100 mL)를 첨가하였다. 15분 동안 교반하였다. 유기 상을 분리하고, 건조시키고 ($MgSO_4$), 진공 하에 농축시켰다. 잔류물 (약 131 g)을 MTBE / 헥산 (2:1, 900 mL) 중에 현탁시키고, 혼합물을 18시간 동안 교반하였다. 여과하고, 여과된 고체를 헥산 (2 x100 mL)으로 세척하고, 건조시켜 [(3S)-피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (82.7 g, 90% 수율)를 황색 고체로서 수득하였다. ES/MS m/z 387 (M+H). ^{1}H NMR (d_6-DMSO) δ 1.28 (d, 6H), 1.60 (m, 3H), 1.88 (m, 3H), 2.40 (s, 3H), 2.75 (m, 2H), 2.91 (m, 4H), 3.13 (dq, 1H), 3.78 (m, 1H), 4.02 (m, 2H), 5.10 (m, 1H), 6.14 (s, 1H), 7.41 (d, 1H), 7.87 (s, 1H).

[0091] [(3S)-피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트의 대안적 합성.

[0092] 이소프로필 알콜 중 5.5 M 염산 (8.4 L, 5.0 mL/g)을 20-30℃에서 (S)-1-(tert-부톡시카르보닐)피롤리딘-3-일 4-((3-이소프로필-5-메틸피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노)피페리딘-1-카르복실레이트 (819 g)를 함유하는 이소프로필 알콜 용액에 첨가하였다. 반응 혼합물을 5시간 동안 50-60℃로 가열하였다. 30-35℃로 냉각시키고, MTBE (8.2 L, 10 mL/g)를 첨가하고, 1시간 동안 교반하였다. 여과하고, 습윤 케이크를 0-5℃에서 수성 수산화나트륨 (3.0 당량)에 첨가하고, 30분 동안 교반하였다. 2-메틸테트라히드로푸란 (8.2 L, 10.0 mL/g)을 첨가하고, 교반하였다. 유기 상을 추출하고, 포화 수성 NaCl로 세척하였다. 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 1-2 부피로 농축시켰다. MTBE (2.46 L, 3 mL/g)를 첨가하고, 3시간 동안 교반하였다. 여과하여 표제 화합물 (550 g)을 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.82 (s, 1H), 6.12 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 5.78 (s, 1H), 5.27 - 5.13 (m, 1H), 4.26 - 4.01 (m, 2H), 3.74 - 3.59 (m, 1H), 3.36 - 3.23 (m, 1H), 3.14 - 2.98 (m, 5H), 2.90 (ddd, J = 11.1, 8.4, 5.4 Hz, 1H), 2.52 (s, 3H), 2.18 - 2.00 (m, 3H), 1.87 (dd, J = 12.6, 6.4 Hz, 1H), 1.76 (s, 1H), 1.66 - 1.52 (m, 2H), 1.34 (d, J = 6.9 Hz, 6H).

[0093] [(3S)-피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트의 대안적 합성.

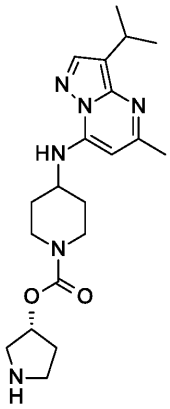
[0094] 포스겐 (1.14 mL, 톨루엔 중 20 질량%, 3.20 mmol)을 THF (13 mL) 중 tert-부틸 (3S)-3-히드록시피롤리딘-1-카르복실레이트 (500 mg, 2.67 mmol) 및 TEA (0.37 mL, 2.6 mmol)의 저온 (0℃) 용액에 첨가하였다. 냉각 조를 제거하고, 혼합물을 실온에서 교반하였다. 30분 후, 혼합물을 감압 하에 농축시키고, 잔류물을 DCM (11 mL) 중에 용해시켰다. 이 용액을 DCM (11 mL) 중 3-이소프로필-5-메틸-N-(4-피페리딜)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-아민 (C, 365 mg, 100 질량%, 0.365 g) 및 TEA (0.3 mL)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 교반하였다. 10분 후, 포화 수성 $NaHCO_3$ 용액을 첨가하고, 추가의 DCM으로 추출하였다. 유기 층을 합하고, 포화 수성 NaCl

로 세척하고, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 플래쉬 크로마토그래피 (실리카 겔)에 의해 DCM: MeOH로 용리시켜 정제하여 [(3S)-1-tert-부톡시카르보닐피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (671 mg)를 황색빛 오일로서 수득하였다. 질량 스펙트럼 (m/z): 487(M+1).

[0095] 트리플루오로아세트산 (2 mL, 26.45 mmol)을 DCM (12 mL) 중 [(3S)-1-tert-부톡시카르보닐피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (671 mg, 1.269 mmol)의 용액에 적가하였다. 실온에서 교반하였다. 18시간 후, 혼합물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 DCM 중에 용해시키고, 유기 상을 10% K_2CO_3 수용액으로 세척하였다. 유기 상을 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜 [(3S)-피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (274 mg, 0.6593 mmol)를 백색 발포체로서 수득하였다. 질량 스펙트럼 (m/z): 387(M+1). ^{1}H NMR (400.13 MHz, d_6-DMSO): 7.87 (s, 1H), 7.42 (d, J= 9.0 Hz, 1H), 6.13 (s, 1H), 5.00 (ddd, J= 9.0, 5.2, 2.5 Hz, 1H), 4.02 (m, 2H), 3.77 (m, 1 H), 3.13 (m, 1 H), 2.89 (m, 4 H), 2.72 (m, 2H), 2.40 (s, 3 H), 1.87 (dd, J= 6.8, 14.1 Hz, 2 H), 1.63 (m, 3 H), 1.28 (d, J= 6.8 Hz, 6 H).

[0096] 제조예 9

[0097] [(3R)-피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트의 합성

[0098] 

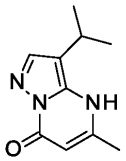
[0099] 포스겐 (1.14 mL, 톨루엔 중 20 질량%, 3.20 mmol)을 THF (13 mL) 중 tert-부틸 (3R)-3-히드록시피롤리딘-1-카르복실레이트 (500 mg, 2.67 mmol) 및 TEA (0.37 mL, 2.6 mmol)의 저온 (0℃) 용액에 첨가하였다. 냉각 조를 제거하고, 혼합물을 실온에서 교반하였다.

[0100] 30분 후, 혼합물을 감압 하에 농축시키고, 잔류물을 DCM (11 mL) 중에 용해시켰다. 이 용액을 DCM (11 mL) 중 3-이소프로필-5-메틸-N-(4-피페리딜)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-아민 (365 mg, 100 질량%, 0.365 g) 및 TEA (0.3 mL)의 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 교반하였다. 10분 후, 포화 수성 $NaHCO_3$ 용액을 첨가하고, 추가의 DCM으로 추출하였다. 유기 층을 합하고, 포화 수성 NaCl로 세척하고, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 플래쉬 크로마토그래피 (실리카 겔)에 의해 헥산: 에틸 아세테이트로 용리시켜 정제하여 [(3R)-1-tert-부톡시카르보닐피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (350 mg)를 황색빛 오일로서 수득하였다. 질량 스펙트럼 (m/z): 487(M+1).

[0101] 트리플루오로아세트산 (0.8 mL, 0.72 mmol)을 DCM (7 mL) 중 [(3R)-1-tert-부톡시카르보닐피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (350 mg, 0.72 mmol)의 용액에 적가하였다. 실온에서 교반하였다. 45분 후, 혼합물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 SCX-2 카트리지에 의해 10% DCM: MeOH에 이어서 MeOH (2 N NH_3)로 용리시켜 정제하였다. 염기성 분획을 감압 하에 농축시켜 [(3R)-피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (246 mg)를 갈색빛 고체로서 수득하였다. 질량 스펙트럼 (m/z): 387(M+1).

[0102] 제조예 10

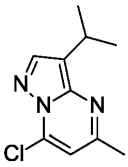
[0103] 3-이소프로필-5-메틸-4H-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-온의 합성

[0104] 

[0105] 4-이소프로필-1H-피라졸-5-아민 (2.2 kg, 17.6 mol) 및 에틸 아세토아세테이트 (2.86 kg, 1.25 당량)를 아세트산 (17.6 L, 8.0 mL/g) 중에 용해시켰다. 혼합물을 110-115℃로 가열한 다음, 35-40℃로 냉각시켰다. 헵탄 및 MTBE (44 L, 20 mL/g, 5/1 비)를 첨가하였다. 여과하고, 고체를 헵탄 (4.4 L, 2 mL/g)으로 헹구어 표제 화합물 (2.28 kg, 85.5% 수율)을 수득하였다. ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO) δ 11.81 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 5.50 (s, 1H), 3.08 - 3.05 (m, 1H), 2.31 (s, 3H), 1.22 (d, J = 5.0 Hz, 6H).

[0106] 제조예 11

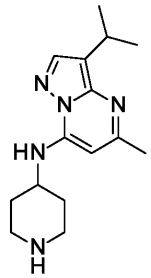
[0107] 7-클로로-3-이소프로필-5-메틸피라졸로[1,5-a]피리미딘의 합성

[0108] 

[0109] 3-이소프로필-5-메틸-4H-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-온 (2.1 kg, 11.0 mol) 및 N,N-디메틸아닐린 (0.86 kg, 0.65 당량)을 ACN (8.4 L, 4 mL/g) 중에 용해시켰다. 반응물을 50-55℃로 가열하고, $POCl_3$ (4.2 kg, 2.5 당량)을 적가하였다. 온도를 60-65℃로 조정하고, 혼합물을 9시간 동안 교반하였다. 혼합물을 25-30℃로 냉각시키고, 2M 인산칼륨 완충제 (pH=8.0, 42 L, 20 mL/g)에 부었다. MTBE (23.9 L, 11.4 mL/g)를 첨가하고, 유기 상을 추출하였다. 유기 상을 20% 시트르산 용액 (4.2 L, 2.0 mL/g)으로 2회, $NaHCO_3$의 10% 수용액 (10.5 L, 5.0 mL/g) 및 포화 수성 NaCl (10.5 L, 5.0 mL/g)로 순차적으로 세척하였다. 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜 표제 화합물 (1.8 kg, 78% 수율)을 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.02 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 3.27 - 3.25 (m, 1H), 2.58 (s, 3H), 1.42 (d, J = 8.0 Hz, 6H).

[0110] 제조예 12

[0111] 3-이소프로필-5-메틸-N-(4-피페리딜)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-아민

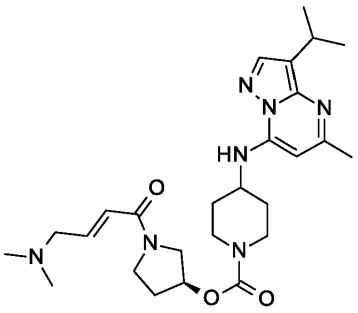
[0112] 

[0113] 3-이소프로필-5-메틸-N-(4-피페리딜)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-아민 디히드로클로라이드 (2.2 kg, 6.4 mol)를 10-15℃에서 수산화나트륨의 1 M 수용액 (19.2 L, 3.0 당량)에 첨가하였다. 반응 혼합물을 15-20분 동안 교반한 다음, 2-메틸테트라히드로푸란 (4.70 L, 10.0 당량)을 첨가하고, 20-25분 동안 교반하였다. 유기 상을 분리하고, 수성 상을 2-메틸테트라히드로푸란 (6.6 L, 3.0 mL/g, 3회)으로 세척하였다. 유기 용액을 합하고, 포화 수성 NaCl (11 L, 5.0 mL/g)로 세척하였다. 유기 상을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. MTBE (6.6 L, 3.0 mL/g)를 첨가하고, 25-30℃에서 40분 동안 교반하였다. 여과하여 표제 화합물 (1.5 kg, 85.7% 수율)을 수득하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.81 (s, 1H), 6.10 (d, J = 8.0 Hz 1H), 5.75

(s, 1H), 3.59-3.54 (m, 1 H), 3.32-3.28 (m, 1 H), 3.22-3.19 (m, 2 H), 2.77-2.73 (m, 2 H), 2.51 (s, 3H), 2.11 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 1.56-1.50 (m, 3 H), 1.34 (d, J =8.0 Hz, 6H).

[0114] 실시예 1

[0115] [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트의 합성.



(II)*

[0116]

[0117] [*본원 실시예 1에 제시된 바와 같이, 키랄 중심은 변화된 배향을 갖고, S 거울상이성질체 형태는 상기 실시예에서 구조 (II)에 제시된 것과 상이하게 나타내어진다는 것을 주목한다.] (E)-4-(디메틸아미노)부트-2-엔산 히드로클로라이드 (15.0 g, 90.3 mmol, 1.2 당량), N,N-디이소프로필에틸아민 (31.3 mL, 23.4 g, 181 mmol, 2.4 당량) 및 HATU (42.9 g, 113 mmol, 1.5 당량)를 23℃에서 THF (146 mL) 중 [(3S)-피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (29.1 g, 75.3 mmol)의 현탁액에 첨가하고, 혼합물을 90분 동안 교반하였다. 포스페이트 완충제 (0.5 M, pH = 9, 150 mL)로 희석하고, DCM (2 x 375 mL)으로 추출하고, 건조시키고 ($MgSO_4$), 진공 하에 농축시켰다. 생성된 잔류물 (약 95 g)을 크로마토그래피 (DCM 65 mL 중에 용해된 로드 잔류물; SiO_2 330 g; 용리액: MeOH 중 MTBE / 7N NH_3 0%에서 10%; TLC: MeOH 중 MTBE / 7N NH_3 5:1)에 의해 정제하였다. 물질 (약 40 g)을 DCM (400 mL) 중에 용해시키고, 1 M 수성 K_2HPO_4 (1 M, 80 mL)로 세척하고, 건조시키고 ($MgSO_4$), 진공 하에 농축시켰다. 잔류물 (약 38 g)을 크로마토그래피 (SiO_2 (50 g)에 흡수된 로드 잔류물; SiO_2 330 g; MeOH 중 MTBE / 7N NH_3 0%에서 10%)에 의해 정제하여 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일]
4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (28.1 g, 75%)를 백색 고체로서 수득하였다. ES/MS m/z 498 (M+H). ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1.33 (d, 6H), 1.64 (m, 2H), 2.10 (m, 2H), 2.18 (m, 1H), 2.26 (m, 1H), 2.29 (s, 6H), 2.50 (s, 3H), 3.11 (m, 2H), 3.18 (dd, 2H), 3.29 (dq, 1H), 3.70 (m, 3H), 3.87 (m, 2H), 4.14 (m, 2H), 5.31 (m, 1H), 6.12 (s, 1H), 6.47 (m, 1H), 6.86 (m, 1H), 7.88 (s, 1H). $[\alpha]_D^{20}$ = +49.9 ° (C=2.0, MeOH). 거울상이성질체 과잉률 (ee) = 97%. Rt (체류 시간) = 2.79분 (UV); LC 칼럼: 키랄팩(CHIRALPAK)® AS (4.6 x 150 mm, 5 μm); MeOH + 0.2% DMEA; 유량: 1.0 mL/분.

[0118] [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트의 대안적 합성.

[0119] N,N-디이소프로필에틸아민 (0.36 mL, 2.1 mmol)을 N,N-디메틸포름아미드 (4 mL) 중 [(3S)-피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (170 mg, 0.4091 mmol), (E)-4-(디메틸아미노)부트-2-엔산;히드로클로라이드 (135 mg, 0.81512 mmol) 및 HATU (317 mg, 0.8181 mmol)의 용액에 첨가하였다. 실온에서 교반하였다. 5분 후, 혼합물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 SCX-2 카트리지에 의해 10% DCM: MeOH에 이어서 MeOH (2N NH_3)로 용리시켜 정제하였다. 염기성 분획을 감압 하에 농축시키고, 잔류물을 ISCO™ 역상 클라리셉 C-시리즈를 통해 NH_4CO_3 pH 9/ACN으로 용리시켜 정제하여 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (129 mg, 0.255 mmol)를 백색 고체로서 수득하였다. 질량 스펙트럼 (m/z): 498 (M+1). ^{1}H NMR (400.13 MHz, MeOD): 7.88 (s, 1H), 6.85 (m, 1 H), 6.47 (m, 1 H), 6.12 (s, 1 H),

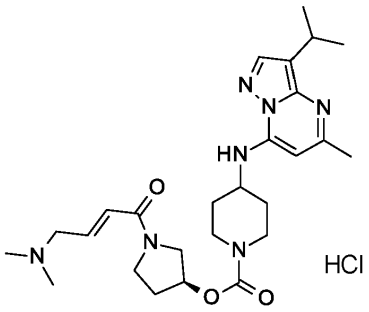
3.91-3.52 (m, 5 H), 3.13 (m, 1 H), 3.03 (m, 2 H), 2.94 (m, 1 H), 2.39 (s, 3 H), 2.15 (s, 6 H), 2.06 (m, 1 H), 1.88 (d, J= 11.5 Hz, 2 H), 1.66 (m, 2 H), 1.28 (d, J= 6.8 Hz, 6H).

[0120] [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트의 대안적 합성.

[0121] [(3S)-피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (550 g, 1.4 mol)를 15-30℃에서 THF (5.5 L, 10.0 mL/g) 중에 용해시켰다. (E)-4-(디메틸아미노)부트-2-엔산 히드로클로라이드 (278 g, 1.2 당량) 및 TEA (1.17 L, 6.0 당량)를 15-30℃에서 첨가하고, 40분 동안 교반하였다. EtOAc 중 50% 프로필포스폰산 무수물 (1.68 L, 1.2 당량)을 15-30℃에서 첨가하고, 12시간 동안 교반하였다. 여과하고, 여과물을 감압 하에 이소프로필 아세테이트로 용매 교환하였다. 2 M 수성 NaOH (2.75 L, 5 mL/g)를 첨가하고, 25-30℃에서 20분 동안 교반하였다. 유기 상을 추출하고, 포화 수성 NaCl (2.75 L, 5 mL/g)로 세척하였다. Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 헵탄 (3.85 L, 7 mL/g) 및 THF (16.5 L, 3 mL/g)를 15-30℃에서 첨가하였다. 1시간 동안 교반하고, 여과하여 표제 화합물 (440 g, 63.2% 수율)을 수득하였다. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.86 (s, 1H), 6.83 (d, J = 10.7 Hz, 1H), 6.43 (dd, J = 34.3, 14.9 Hz, 1H), 6.08 (s, 1H), 5.26 (d, J = 24.2 Hz, 1H), 4.85 (s, 2H), 4.22 - 4.01 (m, 2H), 3.90 - 3.76 (m, 2H), 3.61 - 3.47 (m, 1H), 3.36 - 3.21 (m, 2H), 3.17 - 3.11 (m, 2H), 3.12 - 2.98 (m, 2H), 2.47 (s, 3H), 2.28 - 2.21 (m, 7H), 2.16 - 2.00 (m, 3H), 1.68 - 1.48 (m, 2H), 1.30 (d, J = 6.2 Hz, 6H).

[0122] 실시예 2

[0123] [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 히드로클로라이드의 합성.



(II)*

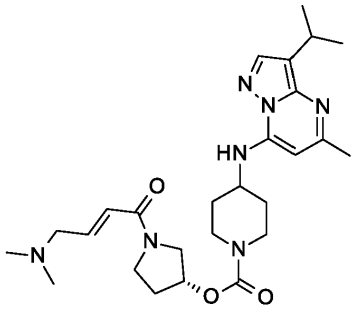
[0124]

[0125] [*본원 실시예 2에 제시된 바와 같이, 키랄 중심은 변화된 배향을 갖고, S 거울상이성질체 형태는 상기 실시예에서 구조 (II)에 제시된 것과 상이하게 나타내어진다는 것을 주목한다.] HCl (EtOAc 중 1 M (0.589 mL, 0.590 g, 0.589 mmol, 1.07 당량))을 23℃에서 아세톤 (5.5 mL) 중 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (0.283 g, 0.549 mmol)의 용액에 첨가하고, 혼합물을 5시간 동안 교반하였다. 진공 하에 농축시켜 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 히드로클로라이드 (0.244 g, 81%)를 백색 고체로서 수득하였다. ES/MS m/z 498 (M+H).

[0126] ^{1}H NMR (CD_3OD) δ 1.34 (d, 6H), 1.66 (m, 2H), 2.11 (m, 2H), 2.20 (m, 1H), 2.30 (m, 1H), 2.54 (s, 3H), 2.90 (s, 6H), 3.12 (m, 2H), 3.28 (dq, 1H), 3.74 (m, 4H), 3.95 (dd, 2H), 4.16 (m, 2H), 4.63 (m, 1H), 5.32 (m, 1H), 6.22 (s, 1H), 6.78 (m, 2H), 7.94 (s, 1H).

[0127] 실시예 3

[0128] [(3R)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트의 합성.



(III)*

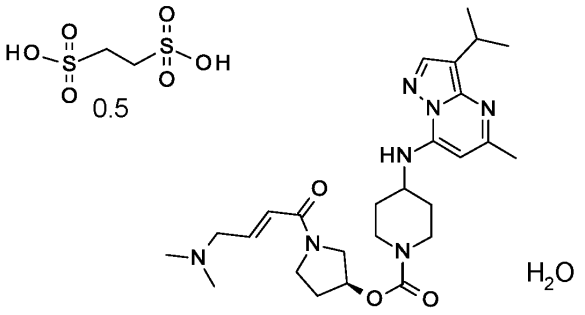
[0129]

[0130] [*본원 실시예 3에 제시된 바와 같이, 키랄 중심은 변화된 배향을 갖고, R 거울상이성질체 형태는 상기 실시예에서 구조 (III)에 제시된 것과 상이하게 나타내어진다는 것을 주목한다.] N,N-디이소프로필에틸아민 (0.4 mL, 2.0 mmol)을 DMF (4 mL) 중 [(3R)-피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (170 mg, 0.43 mmol), (E)-4-(디메틸아미노)부트-2-엔산;히드로클로라이드 (150 mg, 0.90 mmol) 및 HATU (343 mg, 0.87 mmol)의 용액에 첨가하였다. 실온에서 교반하였다. 5분 후, 혼합물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 SCX-2 카트리지에 의해 10% DCM: MeOH에 이어서 MeOH (2 N NH_3)로 용리시켜 정제하였다. 염기성 분획을 감압 하에 농축시키고, 잔류물을 ISCO 역상 클라리셉 C-시리즈를 통해 NH_4CO_3 pH 9/ACN으로 용리시켜 정제하여 [(3R)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (188 mg)를 백색 고체로서 수득하였다. 질량 스펙트럼 (m/z): 498 (M+1).

[0131] ^{1}H NMR (400.21 MHz, DMSO): 7.86 (s, 1 H), 7.41 (m, 1 H), 6.63 (m, 1 H), 6.37 (m, 1 H), 6.13 (s, 1 H), 5.16 (m, 1H), 4.09-3.92 (m, 2H), 3.78 (m, 2 H), 3.56 (m, 2 H), 3.13(m, 1 H), 3.03 (m, 2 H), 2.93 (m, 1 H), 2.39 (s, 3 H), 2.14 (s, 6 H), 2.06 (m, 1 H) 1.88 (m, 2 H), 1.60 (m, 2 H), 1.28 (d, J= 6.8 Hz, 6 H).

[0132] 실시예 4

[0133] 결정질 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 헤미-에디실레이트 수화물의 합성



(II)*

[0134]

[0135] [*본원 실시예 4에 제시된 바와 같이, 키랄 중심은 변화된 배향을 갖고, S 거울상이성질체 형태는 상기 실시예에서 구조 (II)에 제시된 것과 상이하게 나타내어진다는 것을 주목한다.] 실온에서 자기 교반하면서 2.0 g의 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트를 8 mL의 아세톤 중에 넣었다. 별도의 바이알에서, 505 mg의 1,2-에탄디술폰산 수화물을 6 mL의 아세톤 중에 용해시켰다. 산 용액을 유리염기 용액에 첨가하고, 실온에서 혼합하였다. 혼합이 철저하도록 샘플을 교반하고, 필요한 경우 추가의 용매를 첨가하여 슬러리를 묽게 하였다. 현탁액을 50℃에서 밤새 슬러리화하였다. 밤새 교반한 후, 나머지 백색 고체의 농후한 슬러리를 20℃로 냉각시켰다. 고체를 여과지 상에서의 진공 여과에 의해 단리하고, 생성된 백색 고체 케이크를 여과지 상에서 그대로 건조시켰다 (2.1 g, 88% 수율).

[0136] CuKa 공급원 λ = 1.54060 Å 및 반텍 검출기가 장착되어 있으며 35 kV 및 50 mA에서 작동하는 브루커 D4 인데버 X선 분말 회절계 상에서 결정질 고체의 XRD 패턴을 얻었다. 샘플을 4 내지 40° 2Θ에서, 0.008° 2Θ의 스텝 크기 및 0.5초/스텝의 스캔 속도로, 및 0.6 mm 발산, 5.28 고정 산란방지 및 9.5 mm 검출기 슬릿을 사용하여 스캔하였다. 건조 분말을 석영 샘플 홀더 상에 패킹하고, 유리 슬라이드를 사용하여 평활 표면을 얻었다. 실온 및 상대 습도에서 결정 형태 회절 패턴을 수집하였다. 임의의 주어진 결정 형태에서, 회절 피크의 상대 강도는 결정 형태 및 습성과 같은 인자로부터 기인하는 바람직한 배향으로 인해 달라질 수 있다는 것이 결정학 기술분야에 널리 공지되어 있다. 바람직한 배향의 효과가 존재하는 경우, 피크 강도는 변경되지만, 다형체의 특징적인 피크 위치는 불변한다. 예를 들어, 문헌 [The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, pages 1843-1844, 1995]을 참조한다. 추가로, 임의의 주어진 결정 형태에서, 각을 이룬 피크 위치가 약간 달라질 수 있다는 것이 결정학 기술분야에 또한 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 피크 위치는 샘플이 분석되는 온도 또는 습도, 샘플 변위, 또는 내부 표준의 존재 또는 부재의 변동으로 인해 이동할 수 있다. 본 경우에서, 2Θ에서 ± 0.2의 피크 위치 변동성은 나타낸 결정 형태의 명백한 확인을 방해하지 않으면서 이들 잠재적 변동을 감안할 것이다. 결정 형태의 확인은 전형적으로 보다 현저한 피크인 특징적인 피크 (° 2Θ의 단위)의 임의의 독특한 조합에 기초하여 이루어질 수 있다. 실온 및 상대 습도에서 수집된 결정 형태 회절 패턴을 8.853 및 26.774도 2-세타에서의 NIST 675 표준 피크에 기초하여 조정하였다.

[0137] 결정질 헤미-에디실레이트 수화물의 제조된 샘플은 CuKa 방사선을 사용하여 하기 표에 기재된 바와 같은 회절 피크 (2-세타 값)를 갖고, 특히 21.5°, 16.7° 및 15.2°로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 피크와 조합하여 18.5°에서의 피크를 갖는 XRD 패턴을 특징으로 하며; 여기서 회절각에 대한 허용오차는 0.2도이다.

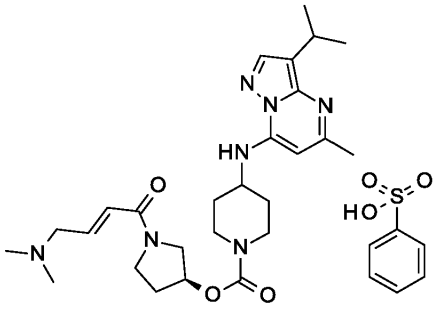
[0138] 결정질 헤미-에디실레이트 수화물의 X선 분말 회절 피크

	결정질 헤미-에디실레이트 수화물	
피크	각도 (°2-세타) +/- 0.2°	상대 강도 (가장 강한 피크 대비 %)
1	7.0	14.90%
2	10.3	36.50%
3	12.6	14.50%
4	15.2	47.70%
5	16.7	58.40%
6	18.5	100.00%
7	19.8	16.10%
8	21.5	63.20%
9	23.2	17.50%
10	24.3	10.90%

[0139]

[0140] 실시예 5

[0141] 결정질 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 베실레이트의 합성



(II)*

[0142]

[0143] [*본원 실시예 5에 제시된 바와 같이, 키랄 중심은 변화된 배향을 갖고, S 거울상이성질체 형태는 상기 실시예에서 구조 (II)에 제시된 것과 상이하게 나타내어진다는 것을 주목한다.] 1998 mg의 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트를 실온에서 1000 rpm으로 교반하면서 15 mL의 아세톤 중에 넣었다. 650 mg의 벤젠술폰산 (5 mL의 아세톤 중에 용해됨)을 첨가하였다. 샘플을 실온에서 1000 rpm으로 1시간 동안 교반하였으며, 일정 시간 후, 용액은 혼탁해지고 백색 고체의 농후한 슬러리가 생성되었다. 백색 고체를 여과지 상에서의 진공 여과에 의해 단리하였다. 샘플을 70℃에서 진공 오븐 내에서 1시간 동안 건조시켰다 (2.23 g, 85% 수율).

[0144] 결정질 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 베실레이트의 합성

[0145] [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 (440 g, 1.1 mol)를 15-30℃에서 EtOAc (1.4 L) 및 아세톤 (357 mL) 중에 용해시켰다. 50-55℃로 가열하였다. 벤젠술폰산 1수화물 (156 g, 0.89 당량)을 EtOAc (709 mL) 및 아세톤 (166 mL) 중에 용해시키고, 50-55℃에서 5-10 mL/분으로 반응 혼합물에 첨가하였다. 1시간 동안 교반하였다. 15-30℃로 냉각시키고, 12시간 동안 교반하였다. 여과하고, 질소 하에 습윤 케이크를 건조시켜 표제 화합물 (525 g의 72.9% 수율)을 수득하였다. ^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 7.89 (s, 1H), 7.85 - 7.79 (m, 2H), 7.43 - 7.39 (m, 3H), 6.82 - 6.66 (m, 2H), 6.15 (s, 1H), 5.27 (d, J = 21.5 Hz, 1H), 4.11 (d, J = 32.9 Hz, 2H), 3.94 - 3.79 (m, 4H), 3.33 - 3.18 (m, 2H), 3.10-2.97 (m, 2H), 2.84 (s, 6H), 2.49 (s, 3H), 2.25 - 1.94 (m, 5H), 1.68 - 1.51 (m, 2H), 1.31 (d, J = 6.8 Hz, 6H).

[0146] 본질적으로 실시예 4에 기재된 바와 같이 결정질 고체의 XRD 패턴을 수득하였다. 결정질 베실레이트의 제조된 샘플은 CuKa 방사선을 사용하여 하기 표에 기재된 바와 같은 회절 피크 (2-세타 값)를 갖고, 특히 12.4°, 17.3° 및 15.8°로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 피크와 조합하여 21.5°에서의 피크를 갖는 XRD 패턴을 특징으로 하며; 여기서 회절각에 대한 허용오차는 0.2도이다.

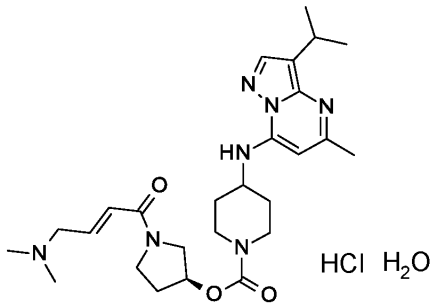
[0147] 결정질 베실레이트의 X선 분말 회절 피크

	결정질 베실레이트	
피크	각도 (°2-세타) +/- 0.2°	상대 강도 (가장 강한 피크 대비 %)
1	6.3	46.30%
2	9.5	26.30%
3	10.7	26.30%
4	12.4	98.70%
5	15.8	52.00%
6	16.5	45.20%
7	17.3	56.60%
8	21.5	100.00%
9	23.4	36.80%
10	24.9	32.10%

[0148]

[0149] 실시예 6

[0150] 결정질 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트 히드로클로라이드의 합성



(II)*

[0151]

[0152] [*본원 실시예 6에 제시된 바와 같이, 키랄 중심은 변화된 배향을 갖고, S 거울상이성질체 형태는 상기 실시예에서 구조 (II)에 제시된 것과 상이하게 나타내어진다는 것을 주목한다.] 557 mg의 [(3S)-1-[(E)-4-(디메틸아미노)부트-2-에노일]피롤리딘-3-일] 4-[(3-이소프로필-5-메틸-피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노]피페리딘-1-카르복실레이트를 실온에서 1000 rpm으로 교반하면서 4 mL의 아세톤 중에 넣었다. 1200 μL의 HCl (에틸 아세테이트 중 1M, 1.07 당량)을 첨가하였다. 샘플을 1000 rpm으로 밤새 교반하여 백색 고체의 농후한 슬러리를 수득하였다. 백색 고체를 여과지 상에서의 진공 여과에 의해 단리하였다. 생성된 백색 고체 케이크를 10분 동안 공기 스트림 하에 여과지 상에서 그대로 건조시켰다 (385 mg, 64% 수율).

[0153] 본질적으로 실시예 4에 기재된 바와 같이 결정질 고체의 XRD 패턴을 수득하였다. 결정질 히드로클로라이드 수화물의 제조된 샘플은 CuKa 방사선을 사용하여 하기 표에 기재된 바와 같은 회절 피크 (2-세타 값)를 갖고, 특히 5.5° , 15.5° 및 9.7° 로 이루어진 군으로부터 선택된 1개 이상의 피크와 조합하여 18.9° 에서의 피크를 갖는 XRD 패턴을 특징으로 하며; 여기서 회절각에 대한 허용오차는 0.2도이다.

[0154] 결정질 히드로클로라이드의 X선 분말 회절 피크

	결정질 히드로클로라이드	
피크	각도 (°2-세타) +/- 0.2°	상대 강도 (가장 강한 피크 대비 %)
1	5.5	79.40%
2	6.2	54.40%
3	9.2	31.50%
4	9.7	56.10%
5	11.1	26.70%
6	14.2	29.80%
7	15.5	61.70%
8	18.9	100.00%
9	19.5	30.80%
10	23.4	40.40%

[0155]

[0156] 생물학적 검정

[0157] 하기 검정은 본 발명의 화합물이 CDK7 활성의 억제제라는 것을 입증한다. 검정의 결과는 또한 본 발명의 화합물이 암 세포에서 CDK7 신호전달을 억제한다는 것을 제시한다. 추가적으로, 본 발명의 화합물은 암의 이종이식 종양 모델에서 암 세포주의 증식 및 종양 성장을 억제한다.

[0158] "IC_{50}"은 작용제에 대해 가능한 최대 억제 반응의 50%를 생성하는 작용제의 농도 또는 대안적으로 수용체에 대한 리간드 특이적 결합의 50% 대체를 생성하는 작용제의 농도를 지칭하고; 상대 IC_{50} 값은 형광 단위를 사용하여 온-플레이트 "MIN" 및 "MAX" 대조군에 대한 퍼센트 억제를 계산한 다음 10-포인트 용량 반응 데이터를 4-파라미터 로지스틱 방정식에 피팅함으로써 결정된다.

[0159] CDK7 및 CDK9 키나제 활성 검정

[0160] 본 검정의 목적은 CDK7/시클린H/Mat1 복합체 키나제 활성을 억제하는 본 발명의 화합물의 능력을 측정하는 것이다. 본 발명 내에 포함된 화합물이 CDK7, CDK7 및 CDK9에 대한 임의의 친화도를 나타내는지 여부를 입증하기 위해, 효소를 화합물과 함께 사전인큐베이션하지 않거나 또는 3시간 사전인큐베이션하여 생화학적 검정을 수행

하였다. 기능적 검정은 본 발명의 화합물이 CDK7 및 CDK9 키나제 활성을 억제하는 능력을 나타내는지 여부에 대한 지지를 제공하였다. 하기 검정에서 사용된 모든 리간드, 용매 및 시약은 상업적 공급원으로부터 용이하게 입수가능하거나 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 합성될 수 있다. CDK7 및 CDK9에 대한 IC_{50} 결정을 하기와 같이 결정하였다.

[0161] CDK7/시클린H/MAT1의 억제에 대한 생화학적 검정

[0162] 억제제의 IC_{50} 활성을 ATP//[^{33}P]ATP 및 펩티드 기질의 존재 하에 정제된 인간 재조합 효소를 사용하는 방사성표지 필터 결합 (FB) 검정을 사용하여 결정하였다. 선택된 ATP 농도는 ATP에 대한 효소 Km에 또는 그 근처에 있었다.

[0163] 96 웰 폴리스티렌 플레이트에서 웰당 25 μL의 최종 부피로 반응을 수행하였다. 20% DMSO 중 5 μL의 시험 화합물, 10 μL의 기질 용액 (ATP/33PATP 및 CDK7/9 tide) 및 10 μL의 효소 용액을 혼합하였다. 기질 용액을 4 mM $MgCl_2$, 0.01% 트리톤(TRITON)™ X-100, 2 mM DTT 및 20 mM HEPES의 키나제 완충제 중에 희석된 100 μM ATP/[^{33}P]ATP (NEN 10μCi/μL, 3000 Ci/mmol) 및 250 μM CDK7/9 펩티드 ((YSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSKKKK) (서열식별번호: 1))의 최종 농도를 얻도록 제조하였다. 효소 용액을 키나제 완충제 중에 희석된 1nM CDK7/시클린 H/Mat1 효소 [프로퀴나제(Proqinase) 0366-0360-4 로트 002)]의 최종 농도로 제조하였다. 시험 화합물을 20% DMSO 중에 1:3으로 연속 희석하여 20 μM의 출발 농도에서 10 포인트 곡선을 생성하였다. 시험 화합물이 없는 20% DMSO 완충제 단독을 고 대조군 (임의의 억제제의 부재 하에 완전 활성)으로 사용하고, 500 mM EDTA를 효소 활성의 부재 하에 배경 수준을 결정하는데 사용하였다 (저 대조군). 5 μL의 화합물을 10 μL의 효소 용액과 혼합한 후, 플레이트를 22℃에서 0 또는 180분 동안 인큐베이션하였다. 그 시간 후, 10 μL 기질 용액을 첨가하여 반응을 개시하고, 22℃에서 50분 동안 인큐베이션하였다. 80 μL의 저온 10% 오르토인산 용액을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 필터 플레이트 (불투명, 비-멸균 필터 플레이트)를 각각의 웰에 대해 10 μL의 10% 오르토인산 용액으로 사전세척하였다. 100 μL의 혼합물을 포스포셀룰로스 필터로 옮기고, 실온에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 필터 플레이트를 필터 플레이트 프로세서 상에서 200 μL 0.5% 오르토인산으로 3회 세척하였다. 80 μL의 마이크로신트(MICROSCINT)™를 각각의 웰에 첨가하여 33Pi의 혼입 ("cpm"으로 계수)을 결정하고, 1시간 후에 계수기 상에서 판독하였다. 진데이터 스크리너(GENEDATA SCREENER)® 도구를 통해 데이터를 처리하였다. 다음 4-파라미터 비선형 로지스틱 방정식 (4-파라미터 로지스틱 농도-반응 곡선)을 사용하여 데이터를 분석하였다: Y = 최하부 + [(최상부-최하부)/1+(x/ IC_{50})기울기], 여기서 Y = % 억제, X = y% 억제를 생성하는 농도, 최하부 = 곡선에 의해 달성된 y의 최소 값, 최상부 = 곡선에 의해 달성된 y의 최대 값 및 기울기 = IC_{50}에서의 곡선의 경사도. %억제 = [(중앙 Max - x/ 중앙 Max - 중앙 Min)] · 100

[0164] IC_{50}: 주어진 반응 (리간드 결합, 효소 반응)을 50%만큼 감소시키는 화합물의 농도.

[0165] 실시예 1 및 3에 기재된 화합물은 각각 사전인큐베이션 없이 CDK7에서 0.0173 μM 및 0.0487 μM의 IC_{50}을 나타냈다. CDK7 효소와 실시예 1 및 3의 3시간 사전인큐베이션 후, 이들은 각각 0.00237 μM 및 0.00506 μM의 IC_{50}을 나타냈다. 이들 데이터는 실시예 1 및 3 둘 다가 CDK7을 억제한다는 것을 제시한다.

[0166] CDK9/시클린T1 키나제 활성의 억제에 대한 검정:

[0167] ATP 및 펩티드 기질의 존재 하에 정제된 인간 재조합 효소를 사용하는 방사성표지 필터 결합 (FB) 검정을 사용하여 억제제의 IC_{50} 활성을 결정하였다. 선택된 ATP 농도는 ATP에 대한 효소 Km에 또는 그 근처에 있었다. 96 웰 폴리스티렌 플레이트에서 웰당 25 μL의 최종 부피로 반응을 수행하였다. 20% DMSO 중 5 μL의 시험 화합물, 10 μL의 기질 용액 (ATP//[^{33}P]ATP 및 CDK7/9 tide) 및 10 μL의 효소 용액을 혼합하였다. 기질 용액을 4 mM $MgCl_2$, 0.0025% 트리톤™ X-100, 1.58 mM DTT 및 15.80 mM HEPES의 키나제 완충제 중에 희석된 100 μM ATP/[^{33}P]ATP (NEN 10uCi/μL, 3000 Ci/mmol) 및 200 μM CDK7/9 펩티드 ((YSPTSPSYSPTSPSYSPTSPSKKKK) (서열식별번호: 1))의 최종 농도를 얻도록 제조하였다. 효소 용액을 키나제 완충제 중에 희석된 7.5 nM CDK9/시클린T1 효소 [프로퀴나제 0371-0345-1 (로트 004)]의 최종 농도로 제조하였다. 시험 화합물을 20% DMSO 중에 1:3으로 연속 희석하여 20 μM의 출발 농도에서 10 포인트 곡선을 생성하였다. 시험 화합물이 없는 20% DMSO 완충제 단독을 고 대조군 (임의의 억제제의 부재 하에 완전 활성)으로 사용하고, 500 mM EDTA를 효소 활성의 부재 하에 배경 수준을 결정하는데 사용하였다 (저 대조군). 5 μL의 화합물을 10 μL의 효소 용액과 혼합한 후,

플레이트를 22℃에서 0 또는 180분 동안 인큐베이션하였다. 그 시간 후, 10 μL 기질 용액을 첨가하여 반응을 개시하고, 22℃에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 80 μL의 저온 10% 오르토인산 용액을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 필터 플레이트 (불투명, 비-멸균 필터 플레이트)를 웰당 10 μL의 10% 오르토인산 용액으로 사전세척하였다. 100 μL의 혼합물을 포스포셀룰로스 필터로 옮기고, 실온에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 필터 플레이트를 필터 플레이트 프로세서 상에서 200 μL 0.5% 오르토인산으로 3회 세척하였다. 80 μL의 마이크로신트™를 각각의 웰에 첨가하고, 1시간 후에 섬광 계수기 상에서 판독하였다. 진데이터 스크리너® 도구를 통해 데이터를 처리하였다. 다음 4-파라미터 비선형 로지스틱 방정식 (4-파라미터 로지스틱 농도-반응 곡선)을 사용하여 데이터를 분석하였다: Y = 최하부 + [(최상부-최하부)/1+(x/ IC_{50})기울기], 여기서 Y = % 억제, X = y% 억제를 생성하는 농도, 최하부 = 곡선에 의해 달성된 y의 최소 값, 최상부 = 곡선에 의해 달성된 y의 최대 값 및 기울기 = IC_{50}에서의 곡선의 경사도. %억제 = [(중앙 Max- x/ 중앙 Max - 중앙 Min)] · 100. IC_{50}: 주어진 반응 (리간드 결합, 효소 반응)을 50%만큼 감소시키는 화합물의 농도. 상대 IC_{50}: 화합물의 최대 반응의 절반을 제공하는 농도.

[0168] 실시예 1 및 3에 기재된 화합물은 각각 CDK9 (3시간 사전인큐베이션)에 대해 5.93 μM 및 2.45 μM의 IC_{50}을 나타냈다. 이들 데이터는 실시예 1 및 3이 CDK9 활성을 강력하게 억제하지 않는다는 것을 제시한다.

[0169] 종합하면, 상기 검정으로부터의 데이터는 실시예 1 및 3의 화합물이 CDK9에 비해 CDK7을 선택적으로 억제한다는 것을 입증한다.

[0170] CDK7 및 CDK9 세포 기계론적 검정

[0171] 이들 검정의 목적은 시험관내 암 세포에서 CDK7 및 CDK9 신호전달을 억제하는 화합물의 능력을 측정하는 것이다.

[0172] 포스포-카르복실 말단 도메인 (Rbp2) (Ser2) p-CTD (S2) 세포 기반 아큐멘 검정

[0173] HCT116 세포 (ATCC CCL-247)를 10% FBS, 1% NaPyr 및 1% Pen/Strep이 보충된 맥코이 5A 배지 변형 배지에서 배양하고, 96-웰 편평-바닥 플레이트에 100 μL 부피로 웰당 5,000개 세포의 밀도로 플레이팅하였다 (70% 전면성장이 되기 전). 이어서 세포를 세포 배양 인큐베이터 (5% CO_2, 95% 상대 습도 (RH) 및 37℃)에서 밤새 인큐베이션하고, 플레이트에 부착되도록 하였다. 다음 날 아침, 세포에 화합물을 투여하였다. 화합물 억제제를 먼저 0.6% DMSO를 함유하는 배양 배지 중에 60 μM로 가용화시켰다. 후속적으로 화합물 연속 희석물 (1:3)을 60 μM 내지 0.003 μM 범위에 걸쳐 제조하였다. 세포에 연속 희석물 플레이트로부터의 50 μL를 첨가하여 투여하여, 20 내지 0.001 μM의 최종 화합물 농도 용량 범위를 갖는 0.2%의 최종 DMSO 농도를 생성하는 100 μL의 배지에 부착된 세포를 함유하는 플레이트를 검정하였다. max 포인트의 경우 0.2%의 DMSO를 함유하는 배지를 사용하고, min 포인트의 경우 0.2% DMSO를 함유하는 성장 배지 중 0.83 μM 최종 농도로 희석된 참조 화합물을 사용하였다. 화합물을 투여한 후, 세포 플레이트를 37℃ 및 5% CO_2에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 성장 배지를 조심스럽게 제거하고, 100 μL의 4% 파라-포름알데히드를 실온에서 30분 동안 첨가하여 세포를 고정시켰다. 세포를 PBS로 1회 세척하고, 100 μL의 저온 MeOH와 함께 세포 투과하도록 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 PBS로 2회 (100 μL/각각) 세척하고, 100 μL/웰의 1% BSA/PBS로 실온에서 30분 동안 차단하였다. 1% BSA/PBS 중 50 μL의 1:1000 1차 항체 (항-포스포 CTD Ser2 압캠(Abcam), cat# ab5095-100) 희석물을 웰마다 첨가하고, 플레이트를 밀봉하고, 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0174] 다음 날 세포를 PBS (100 μL/웰)로 3회 세척하고, PBS 중 50 μL/웰의 2차 항체 (1:2000 희석물, 염소 항-토끼 IgM 알렉사 플루오르(ALEXA FLUOR)™ 488)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBS (100 μL/웰)로 3X 세척한 후, PBS 중 100 μL의 50 μg/mL RNAase 및 1:1000 아이오딘화프로피듐 희석물을 웰마다 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, 벤치 상에서 실온에서 1시간 인큐베이션하였다 (빛으로부터 보존됨). 플레이트를 아큐멘 상에서 FL2 (평균 강도) 및 FL3 (총 강도)에서 분석하였다. 아큐멘 익스플로러(ACUMEN EXPLORER)™ [TTP 랩테크 리미티드(TTP LABTECH LTD)에 의해 제조된 레이저-스캐닝 형광 마이크로플레이트 세포 측정기]로 형광 플레이트를 스캐닝하여 세린 2에서의 항-포스포-카르복실 말단 도메인 (pCTD)을 측정하였다. 영상 분석은 양성 세포를 확인하기 위한 세포 형광 신호를 기초로 하였다. pCTD (S2) 양성 세포를 한계값 위 500-530에서의 평균 강도에 의해 확인하였다. 아이오딘화프로피듐/DNA로부터의 575-640에서의 총 강도를 사용하여 개별 세포를 확인하였다. 검정 출력값은 % pCTD 양성 세포였다.

[0175] IC_{50}은 진 데이터(GENE DATA)™를 사용하여 각각의 출력값에 대해 4 파라미터 로지스틱에 곡선 피팅함으로써 결

정하였다. 실시예 1 및 3에 기재된 화합물은 각각 포스포CTD (S2)에 대해 상대 IC_{50} >20 μM 및 3.52 μM을 나타냈다. 이들 데이터는 실시예 1 및 3 둘 다가 세포에서 CDK9를 강력하게 억제하지 않는다는 것을 제시한다.

[0176] 포스포-카르복실 말단 도메인 (Rbp2) (Ser5) p-CTD (S5) 세포 기반 아큐멘 검정

[0177] HCT116 세포 (ATCC CCL-247)를 10% FBS, 1% NaPyr 및 1% Pen/Strep이 보충된 맥코이 5A 배지 변형 배지에서 배양하고, 96-웰 편평-바닥 플레이트에 100 μL 부피로 웰당 5,000개 세포의 밀도로 플레이팅하였다 (70% 전면성장이 되기 전). 세포를 세포 배양 인큐베이터 (5% CO_2, 95% 상대 습도 (RH) 및 37℃)에서 밤새 인큐베이션하고, 플레이트에 부착되도록 하였다. 다음 날 아침, 세포에 화합물을 투여하였다. 화합물 억제제를 0.6% DMSO를 함유하는 배양 배지 중에 60 μM로 가용화시켰다. 후속적으로 화합물 연속 희석물 (1:3)을 60 μM 내지 0.003 μM 범위에 걸쳐 제조하였다. 세포에 연속 희석물 플레이트로부터의 50 μL를 첨가하여 투여하여, 20 내지 0.001 μM의 최종 화합물 농도 용량 범위를 갖는 0.2%의 최종 DMSO 농도를 생성하는 100 μL의 배지에 부착된 세포를 함유하는 플레이트를 검정하였다. max 포인트의 경우 0.2%의 DMSO를 함유하는 배지를 사용하고, min 포인트의 경우 0.2% DMSO를 함유하는 성장 배지 중 0.83 μM 최종 농도로 희석된 참조 화합물을 사용하였다. 화합물을 투여한 후, 세포 플레이트를 37℃ 및 5% CO_2에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 성장 배지를 조심스럽게 제거하고, 100 μL의 4% 파라-포름알데히드를 실온에서 30분 동안 첨가하여 세포를 고정시켰다. 세포를 PBS로 1회 세척하고, 100 μL의 저온 MeOH와 함께 세포 투과하도록 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 다시 세포를 PBS로 2회 (100 μL/각각) 세척하고, 100 μL/웰의 1% BSA/PBS로 실온에서 30분 동안 차단하였다. 1% BSA/PBS 중 50 μL의 1:1000 1차 항체 (항-포스포CTD Ser5 베틸 래보러토리즈(Bethyl Laboratories), cat# A300-655A) 희석물을 웰마다 첨가하고, 플레이트를 밀봉하고, 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0178] 다음 날 세포를 PBS (100 μL/웰)로 3회 세척하고, PBS 중 50 μL/웰의 2차 항체 (1:2000 희석물, 염소 항-토끼 IgM 알렉사 플루오르™ 488)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBS (100μL/웰)로 3X 세척한 후, PBS 중 100 μL의 50 μg/mL RNAase (시그마(Sigma)) 및 1:1000 아이오딘화프로피듐 희석물을 웰마다 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, 벤치 상에서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다 (빛으로부터 보존됨). 플레이트를 아큐멘 상에서 FL2 (평균 강도) 및 FL3 (총 강도)에서 분석하였다. 아큐멘 익스플로러™ [TTP 랩테크 리미티드에 의해 제조된 레이저-스캐닝 형광 마이크로플레이트 세포측정기]로 형광 플레이트를 스캐닝하여 세린 5에서의 항-포스포-카르복실 말단 도메인 (pCTD)을 측정하였다. 영상 분석은 양성 세포를 확인하기 위한 세포 형광 신호를 기초로 하였다. pCTD (S5) 양성 세포를 한계값 위 500-530에서의 평균 강도에 의해 확인하였다. 아이오딘화프로피듐/DNA로부터의 575-640에서의 총 강도를 사용하여 개별 세포를 확인하였다. 검정 출력값은 % pCTD 양성 세포였다. IC_{50}은 진 데이터™를 사용하여 각각의 출력값에 대해 4 파라미터 로지스틱에 곡선 피팅함으로써 결정하였다.

[0179] 실시예 1 및 3에 기재된 화합물은 각각 pCTD Ser5에 대해 0.148 μM 및 0.198 μM의 상대 IC_{50}을 나타냈다. 이들 데이터는 실시예 1 및 3 둘 다가 CDK7 세포 활성을 억제한다는 것을 제시한다.

[0180] cMyc 세포 기반 아큐멘 검정

[0181] HCT116 세포 (ATCC CCL-247)를 10% FBS, 1% NaPyr 및 1% Pen/Strep이 보충된 맥코이 5A 배지 변형 배지에서 배양하고, 96-웰 편평-바닥 플레이트에 100 μL 부피로 웰당 5,000개 세포의 밀도로 플레이팅하였다 (70% 전면성장이 되기 전). 이어서 세포를 세포 배양 인큐베이터 (5% CO_2, 95% 상대 습도 (RH) 및 37℃)에서 밤새 인큐베이션하고, 플레이트에 부착되도록 하였다. 다음 날 아침, 세포에 화합물을 투여하였다. 화합물 억제제를 0.6% DMSO를 함유하는 배양 배지 중에 60 μM로 가용화시켰다. 후속적으로 화합물 연속 희석물 (1:3)을 60 μM 내지 0.003 μM 범위에 걸쳐 제조하였다. 세포에 연속 희석물 플레이트로부터의 50 μL를 첨가하여 투여하여, 20 μM 내지 0.001 μM의 최종 화합물 농도 용량 범위를 갖는 0.2%의 최종 DMSO 농도를 생성하는 100 μL의 배지에 부착된 세포를 함유하는 플레이트를 검정하였다. max 포인트의 경우 0.2%의 DMSO를 함유하는 배지를 사용하고, min 포인트의 경우 0.2% DMSO를 함유하는 성장 배지 중 0.83μM 최종 농도로 희석된 참조 화합물을 사용하였다. 화합물을 투여한 후, 세포 플레이트를 37℃ 및 5% CO_2에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 성장 배지를 조심스럽게 제거하고, 100 μL의 4% 파라-포름알데히드를 실온에서 30분 동안 첨가하여 세포를 고정시켰다. 세포를 PBS로 1회 세척하고, 100 μL의 저온 MeOH와 함께 세포 투과하도록 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 다시 세포를 PBS로 2회 (100 μL/각각) 세척하고, 100 μL/웰의 1% BSA/PBS로 실온에서 30분 동안 차단하였다.

1% BSA/PBS 중 50 μL의 1:1000 1차 항체 (항-c-Myc 항체 [Y69] 압캠 cat# ab32072) 희석물을 웰마다 첨가하고, 플레이트를 밀봉하고, 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날 세포를 PBS (100 μL/웰)로 3회 세척하고, PBS 중 50 μL/웰의 2차 항체 (1:2000 희석물, 염소 항-토끼 IgM 알렉사 플루오르™ 488)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. PBS (100μL/웰)로 3X 세척한 후, PBS 중 100μL의 50 μg/mL RNAase 및 1:1000 아이오딘화프로피듐 (인비트로젠(Invitrogene)) 희석물을 웰마다 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고, 벤치 상에서 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다 (빛으로부터 보존됨). 플레이트를 아큐멘 상에서 FL2 (평균 강도) 및 FL3 (총 강도)에서 분석하였다. 아큐멘 익스플로러™ [TTP 랩테크 리미티드에 의해 제조된 레이저-스캐닝 형광 마이크로플레이트 세포측정기]로 형광 플레이트를 스캐닝하여 세린 5에서의 항-포스포-카르복실 말단 도메인 (pCTD)을 측정하였다. 영상 분석은 양성 세포를 확인하기 위한 세포 형광 신호를 기초로 하였다. pCTD (S5) 양성 세포를 한계값 위 500-530에서의 평균 강도에 의해 확인하였다. 아이오딘화프로피듐/DNA로부터의 575-640에서의 총 강도를 사용하여 개별 세포를 확인하였다. 검정 출력값은 % pCTD 양성 세포였다. IC_{50}은 진 데이터™를 사용하여 각각의 출력값에 대해 4 파라미터 로지스틱에 곡선 피팅함으로써 결정하였다.

[0182] 실시예 1 및 3에 기재된 화합물은 cMyc에 대해 0.0828 μM 및 0.0573 μM의 상대 IC_{50}을 나타냈다. 이들 데이터는 실시예 1 및 3 둘 다가 HCT116 세포에서 cMyc의 전사를 억제한다는 것을 제시한다.

[0183] 선택성 프로파일링 실험: 프로퀴나제 WT 프로파일러

[0184] 320종의 야생형 단백질 키나제 검정에서 단일실험으로 4가지 농도에서의 잔류 활성 값을 측정함으로써 화합물의 키나제 억제 프로파일을 결정하였다. 화합물을 단일실험으로 20 μM, 2 μM, 0.2 μM 및 0.02 μM에서 시험하였다. 모든 반응 칵테일 (고 대조군 및 저 대조군 포함)에서의 최종 DMSO 농도는 1%이었다.

[0185] 단백질 키나제 검정

[0186] 320종의 단백질 키나제의 키나제 활성을 측정하는데 방사측정 단백질 키나제 검정 (33팬퀴나제(PANQINASE)® 활성 검정, 프로퀴나제)을 사용하였다. 모든 키나제 검정을 96-웰 플래쉬플레이츠(FLASHPLATES)™에서 50 μL 반응 부피로 수행하였다. 반응 칵테일을 하기 순서의 4 단계로 피펫팅하였다:

[0187] 1. 10 μL의 비-방사성 ATP 용액 (H_2O 중)

[0188] 2. 25 μL의 검정 완충제/ [γ-33P]-ATP 혼합물

[0189] 3. 5 μL의 10% DMSO 중 시험 샘플

[0190] 4. 10 μL의 효소/기질 혼합물

[0191] 모든 단백질 키나제에 대한 검정은 70 mM HEPES-NaOH pH 7.5, 3 mM $MgCl_2$, 3 mM $MnCl_2$, 3 μM Na-오르토바나데이트, 1.2 mM DTT, ATP (각각의 키나제의 겉보기 ATP-Km에 상응하는 가변 양, 표 1 참조), [γ-33P]-ATP (대략 8 x 1005 cpm/웰), 단백질 키나제 (가변량; 표 1 참조), 및 기질 (가변량; 표 1 참조)을 함유하였다. 모든 PKC 검정 (PKC-mu 및 PKC-nu 검정 제외)은 추가적으로 1 mM $CaCl_2$,4 mM EDTA, 5 μg/mL 포스파티딜세린 및 1 μg/mL 1,2-디올레일-글리세롤을 함유하였다. CAMK1D, CAMK2A, CAMK2B, CAMK2D, CAMK2G, CAMK4, CAMKK1, CAMKK2, DAPK2, EEF2K, MYLK, MYLK2 및 MYLK3 검정은 추가적으로 1 μg/mL 칼모듈린 및 0.5 mM $CaCl_2$를 함유하였다. PRKG1 및 PRKG2 검정은 추가적으로 1 μM cGMP를 함유하였다. DNA-PK 검정은 추가적으로 2.5 μg/mL DNA를 함유하였다.

[0192] 단백질 키나제 반응 칵테일을 30℃에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 반응을 50 μL의 2% (v/v) H_3PO_4로 정지시키고, 플레이트를 흡인하고, 200 μL 0.9% (w/v) NaCl로 2회 세척하였다. 33Pi의 혼입 ("cpm"으로 계수)을 마이크로플레이트 섬광 계수기로 결정하였다. 모든 단백질 키나제 검정을 베크만 쿨터 바이오멕(BeckmanCoulter BIOMEK)® 2000/SL 로봇 시스템으로 수행하였다. 프로퀴나제에 의해 제공된 모든 단백질 키나제를 전장 또는 효소적 활성 단편으로서, Sf9 곤충 세포 또는 이. 콜라이에서 재조합 GST-융합 단백질 또는 His-태그부착 단백질로서 발현시켰다. 모든 키나제를 인간 cDNA로부터 생산하고, GSH-친화성 크로마토그래피 또는 고정화된 금속에 의해 정제하였다. 친화성 태그를 정제 동안 다수의 키나제로부터 제거하였다. SDS-PAGE/쿠마시 염색에 의해 단백질 키나제의 순도를 조사하고, 질량 분광분석법에 의해 정체를 점검하였다. 외부 판매업체 (CAR = 카르나 바이오사이언시스 인크.(Carna Biosciences Inc.); INV = 라이프 테크놀로지스(Life Technologies) (인비트로젠 코포레이션(Invitrogen Corporation)™); MIL = 머크-밀리포어(Merck-Millipore) (밀리포어 코포레이션

(Millipore Corporation)™, 표 1 참조)로부터의 키나제를 판매업체 지침서에 의해 발현, 정제 및 품질-관리하였다. 검정을 위한 효소 및 기질의 농도를 표 1에 제시하였다.

[0193] 미가공 데이터의 평가

[0194] 각각의 키나제에 대해, 3개 웰의 cpm의 중앙값을 "저 대조군"으로 정의하였다 (n=3). 이 값은 단백질 키나제의 부재 하에 그러나 기질의 존재 하에 플레이트에 대한 방사능의 비특이적 결합을 반영한다. 추가적으로, 각각의 키나제에 대해 3개의 다른 웰의 cpm의 중앙값을 "고 대조군", 즉 임의의 억제제의 부재 하의 완전 활성으로 취하였다 (n=3). 각각의 효소의 고 대조군과 저 대조군 사이의 차이를 100% 활성으로 취하였다. 데이터 평가의 일부로서, 각각의 키나제의 저 대조군을 고 대조군 값 뿐만 아니라 그의 상응하는 "화합물 값"으로부터 차감하였다. 각각의 화합물 웰에 대한 잔류 활성 (%)은 하기 식을 사용하여 계산하였다: 상대 활성 (%) = 100 X [(화합물의 신호 - 저 대조군) / (고 대조군 - 저 대조군)]. 비표준 IC_{50}을 XL피트 애드-인(XLFit Add-in)과 함께 맞춤형 엑셀 스프레드시트를 사용하여 계산하였다. 낮은 수의 데이터 포인트로 인해, (4) XL-피트는 3개의 파라미터가 고정된 값으로 잠기는 4 파라미터 방정식을 사용하여 비표준 IC_{50}을 계산하였다.

[0195] 방적식은 다음과 같다:

[0196] Y=B+((A-B))/[1+(x/C)]^D

[0197] A: 활성의 최소 값, 또한 최하부로 공지됨. 0으로 고정

[0198] B: 활성의 최대 값, 또한 최상부로 공지됨. 100으로 고정

[0199] C: 곡선의 변곡점

[0200] D: 힐 기울기. 1로 고정

[0201] Y: 종속 변수 (즉, 신호로서 측정하는 것)

[0202] X: 독립 변수 (즉, 예컨대 용량, 농도 등 제어하는 것)

[0203] 비표준 IC_{50}을 계산하는 방식은 C 파라미터에 무작위 값을 할당하고 이를 반복적으로 반복하는 것이다. 이어서 알고리즘은 잔차 제곱의 합계의 차이를 측정하고, 잔차의 변화가 수렴되는 연속적인 연속 반복을 찾을 것이다. 수렴 한계가 충족되면, 해답은 최적의 것으로 간주되고, 피팅 과정이 종료된다.

[0204] CDK12 및 CDK13 (프로퀴나제)을 본질적으로 상기와 같이 시험하되 반-로그 희석을 사용하여 10가지 농도 (2×10^{5} M 내지 6×10^{10} M)에서 개별적으로 시험하였다. 10개의 포인트에 대해, 쿼트로(QUATTRO)® 워크플로우(WORKFLOW)™ V3.1.1을 사용하여 각각의 농도에 대한 잔류 활성 및 화합물 IC_{50} 값의 분석을 계산하였다. IC_{50} 결정에 대한 피팅 모델은 "S자형 반응 (가변 기울기)"이었으며, 파라미터 "최상부"를 100%로 고정하고 "최하부"를 0%로 고정하였다. 사용된 피팅 방법은 최소 제곱 피트였다. 데이터를 하기 표 1에 제시하였다.

[0205] 표 1

키나제 명칭	키나제 패밀리	키나제 농도 nM	ATP 농도 μM	기질 명칭	기질 μg/50μL	IC_{50} μM
CDK7/CycH/MAT1	CMGC	3.3	3	RBER-CHKtide	2	0.0928
CDK9/CycT1	CMGC	2.2	1	RBER-CHKtide	2	6.32
CDK1/CycB1	CMGC	7	1	RBER-CHKtide	2	20.000
CDK2/CycE1	CMGC	1.5	1	RBER-CHKtide	1	20.000
CDK4/CycD1	CMGC	3.3	3	RBER-CHKtide	2	2.830
CDK6/CycD1	CMGC	3.2	3	RBER-CHKtide	2	8.079
CDK8/CycC	CMGC	8.3	1	RBER-IRStide	1	10.922
CDK16/CycY	CMGC	3.2	0.3	GSK3(14-27)	2	9.073
CDK19/CycC	CMGC	30.9	3	RBER-IRStide	2	7.414
CDK12/CycK	CMGC	14.7	0.3	RBER-IRStide	2	14.780
CDK13/CycK	CMGC	29.2	0.3	RBER-CDC25tide	1	20.000

[0206]

[0207] 이들 데이터는 실시예 1의 화합물이 키나제의 대표적인 패널로부터 CDK7에 대해 매우 선택적이라는 것을 제시한다.

[0208] 세포 증식 검정

[0209] 표 2의 데이터는 실시예 1의 화합물이 명시된 종양 세포주의 증식 및 생존율을 억제한다는 것을 제시한다. 세포주를 백색 96-웰 세포 배양 플레이트 내에 웰당 100 μL의 웰 성장 배지 중 웰당 5000개 세포의 밀도로 플레이팅하였다. 세포주 및 배양 배지 정보에 대해서는 표 2를 참조한다. 플레이트를 37℃ 및 5% CO_2에서 인큐베이션하였다. 다음 날, 시험 화합물을 10개의 포인트에 대해 DMSO 중에 1:3으로 희석함으로써 시험 화합물의 연속 희석물을 제조하였다. DMSO 플레이트는 1000X 최종 농도였다. CDK7 억제제 이외에, DMSO 단독 칼럼을 최대 성장 대조군으로서 포함시키고, 10 μM 스타우로스포린 최종 칼럼을 최대 성장 억제 대조군으로서 포함시켰다. 이어서 1000X DMSO 플레이트로부터의 웰당 2 μL를 웰당 198 μL의 OMEM (라이프 테크놀로지스, 캘리포니아주 칼스배드, cat#31985-070)에 첨가함으로써 10X 희석물 플레이트를 제조하였다. 10X OMEM 플레이트로부터의 웰당 11 μL를 1X 최종 농도가 되도록 웰당 100 μL의 성장 배지를 함유하는 세포 플레이트에 첨가함으로써 세포를 나타낸 화합물로 처리하였다. 플레이트를 37℃ 및 5% CO_2에서 인큐베이터 내로 다시 넣었다. 화합물 첨가 7일 후, 플레이트를 인큐베이터로부터 제거하고, 실온으로 평형화되도록 하였다. 셀 타이터 글로(CELL TITER GLO)® 시약을 실온에서 해동시킨 다음, 1개의 검정 완충제 바이알을 1개의 기질 바이알과 혼합하고 서서히 스월링하여 혼합함으로써 제조하였다. 이어서 셀 타이터 글로® 시약을 세포 플레이트에 웰당 100 μL 첨가하고, 실온에서 15분 동안 속도 설정 2로 타이터 플레이트 진탕기 상에 배치하였다. 진탕기 상에서 15분 인큐베이션 후, 왈락 빅터2(Wallac VICTOR2)™를 사용하여 웰당 1초 발광을 판독하였다. 그래프패드 프리즘 6 소프트웨어

로 비선형 회귀 및 S자형 용량-반응 곡선을 사용하여 절반 최대 억제 농도 (IC_{50})를 계산하였다.

[0210] 표 2

세포주	조직학	IC_{50} (μM)	카탈로그 번호	배지 정보
HCT116	결장직장암	0.04601	ATCC# CCL-247	맥코이 5A (깁코 16600) + 10% FBS (하이클론 SH30071.03)
MCF7	유방암	0.03201	ATCC# HTB-22	L-글루타민 (깁코 11875)+ 10% FBS (하이클론 SH30071.03) 함유 RPMI 1640
HCC1806	유방암	0.02553	ATCC# CRL-2335	HEPES & L-글루타민 (깁코 22400)+ 10% FBS (깁코 cat#10082) 함유 RPMI 1640
NCI-H460	폐암	0.0479	ATCC# HTB-177	HEPES & L-글루타민 (깁코 22400)+ 10% FBS (깁코 cat#10082) 함유 RPMI 1640
NCI-H446	폐암	0.01419	ATCC# HTB-171	HEPES & L-글루타민 (깁코 22400)+ 1mM 피루브산나트륨 (깁코 11360) + 10% FBS (하이클론 SH30071.03) 함유 RPMI 1640
A2780	난소암	0.02651	ATCC# CRL-2772	L-글루타민 (깁코 11875)+ 10% FBS (하이클론 SH30071.03) 함유 RPMI 1640
SNU-16	위암	0.02312	ATCC# CRL-5974	HEPES & L-글루타민 (깁코 22400)+ 1mM 피루브산나트륨 (깁코 11360) + 10% FBS (하이클론 SH30071.03) 함유 RPMI 1640

[0211]

[0212] 이들 데이터는 실시예 I의 화합물이 결장, 유방, 폐, 난소 및 위를 포함한 다양한 조직학으로부터의 암 세포주의 시험관내 성장을 용량 의존성 방식으로 억제한다는 것을 제시한다.

[0213] 이종이식 종양 모델

[0214] 본 검정의 목적은 실시예 1의 화합물에 반응한 종양 부피의 감소를 측정하는 것이다. 시험 화합물의 생체내 효능을 평가하기 위해, 다중 이종이식 종양 모델을 이용하였다. 간략하게, 1:1 마트리겔(MATRIGEL)® 혼합물 (0.2 mL 총 부피) 중 5-10 x 10^6개 종양 세포를 대다수의 이종이식 종양 모델에 대해 암컷 무흉선 누드 마우스 (엔비고(Envigo), 하를란 래보러토리즈(Harlan laboratories)) 내로 피하 주사하였다. 대안적인 마우스 균주를 이용하여 MDAMB468 (NOD SCID 감마, 잭슨 랩스(Jackson labs)), CT26 및 EMT6 (BALB/c, 엔비고, 하를란 래보러토리즈) 이종이식편을 확립하였다. 종양이 ~300-500 mm^3의 목적하는 크기에 도달하도록 한 후, 동물을 효능 연구를 위해 6-8개의 군으로 무작위화하였다. 시험 화합물을 나타낸 용량 및 요법으로 경구 위관영양 (PO)을 통해 투여하였다. 종양 성장 및 체중을 시간 경과에 따라 모니터링하여 효능 및 독성 징후를 평가하였다.

[0215] 시험 화합물을 정제수 (HEC) 중 5% N-메틸-2-피롤리돈 (NMP), 1% 히드록시에틸셀룰로스, 0.25% 폴리소르베이트 80, 0.05% 소포제 중에서 제제화하고, 표 4에 나타낸 용량으로 경구 위관영양 (최종 부피 0.2 mL)에 의해 투여하였다. 시험 화합물을 매주 기준으로 제제화하고, 4℃에서 저장하였다. 비히클을 용량당 0.2 mL의 부피를 사용하여 상기 사용된 스케줄에 따라 대조군에 투여하였다. 마우스를 경구 위관영양을 통해 투여하고, 종양 샘플을 종료시에 수집하고, -80℃에서 저장하였다.

[0216] 종양 크기 및 체중을 기록하고, 격주로 분석하였다. 투여 2시간 후 및 종료시에 DBS (건조 혈반) 카드를 사용하여 혈액을 수집하였다. 종양을 연구 종료시에 수집하고, 3개의 절편으로 절단하고, 노출 및 단백질 분석을

위해 순간 동결시키거나 또는 RNA 분석을 위해 RNA레이터(RNAlater)®에 배치하였다. 조직 샘플을 동결시키고, -80℃에서 저장하였다.

[0217] 실시예 1의 화합물은 인간 암 이종이식 모델에서 유의한 항종양 활성을 나타냈다 (표 3).

[0218] 표 3: 나타낸 바와 같은 상이한 용량 수준에서 시험된 다양한 이종이식 종양 모델에 걸친 실시예 1 생체내 단일 작용제 효능 (ΔT/C)의 요약.

모델	조직학	돌연변이	실시예 1 용량 (mg/kg)	스케줄	평균 ΔT/C
A2780	난소	ARID1A	20	QDx35	-41
COLO205	난소		20	QDx28	-4
CT26	결장직장		20	QDx24	52
EMT6	유방		20	QDx28	17
H441	폐		20	QDx35	0
H460	폐	ARID1A	20	QDx35	16
HCC1806	유방	KMT2C	20	QDx28	-87
HCT116	결장직장	KMT2C	25	QDx21	-17
MDAMB468	유방	ARID1A, RB1	20	QDx28	-91
MIAPACA2	췌장	ARID1A	20	QDx35	10
MKN45	위	KMT2C	20	QDx35	57
MDAMB231	유방		20	QDx35	-25

[0219]

[0220] 델타 T/C%는 처리군에서의 종점 종양 부피가 기준선 종양 부피에 있거나 또는 그 초과인 경우에 계산된다. 식은 100*(T-T0)/(C-C0)이다. 여기서, T 및 C는 각각 처리군 또는 대조군에서의 평균 종점 종양 부피이다. T0 및 C0은 이들 군에서의 평균 기준선 종양 부피이다. *: 유의성 ($p<0.05$)

[0221] 바이오마커 연구

[0222] 본 연구의 목적은 본 발명의 화합물에 대한 잠재적 예측 바이오마커를 평가하는 것이다.

[0223] 시험관내 시험 화합물의 항증식 활성을 평가하기 위해 암 세포주를 프로파일링하였다. 암 세포주에 걸친 ARID1A, KMT2C, KMT2D 및/또는 RB1 유전자의 돌연변이, 카피수 및 유전자 발현 정보는 COSMIC 데이터베이스 (cancer.sanger.ac.uk) 및 씨바이오포탈(cBioportal) (http://www.cbioportal.org/)로부터 입수하였다. 세포를 성장 배지에서 배양하고, 96-웰 플레이트에 100 μL/웰의 성장 배지 중 5000개 세포/웰로 플레이팅한 다음, 37℃, 5% CO_2에서 밤새 인큐베이션하였다. 관련 기술분야에 널리 공지된 공급업체 권장 배지 및 조건을 사용하여, 예를 들어 HEPES & L-글루타민 (써모(Thermo) SH30255.01) 및 1mM 피루브산나트륨 및 10% FBS (깁코(Gibco) cat#10082)를 함유하거나 함유하지 않는 RPMI 1640에서 세포를 배양하였다. DMSO 중 시험 샘플의 10 mM 작업 용액을 제조하고 10개의 포인트에 대해 DMSO 중에 1:3 희석을 수행함으로써 1000X 중간 희석물 플레이트를 제조하였다. 1000X 중간 희석물 플레이트로부터의 2 μL를 198 μL의 옵티멤(OPTIMEM)® + 10% FBS에 첨가하고 잘 혼합함으로써 10X 투여 플레이트를 제조하였다. 이어서 10X 투여 플레이트로부터의 11 μL를 1X 최종 농도가 되도록 100 μL/웰 세포 플레이트에 첨가함으로써 세포 플레이트를 처리하였다. 스타우로스포린을 5 μM의 최종 농도로 최대 성장 억제 대조군으로서 사용하였다. 세포 플레이트를 37 ℃, 5% CO_2에서 7일 동안 인큐베이션하였다. 처리 7일 후, 셀 타이터-글로® (프로메가(Promega) cat# G7571) 검정 완충제 및 기질을 -20 ℃로부터 제거하고, 실온으로 평형화되도록 하였다. 검정 완충제를 기질에 첨가하고, 서서히 스월링하여 혼합하였다. 셀 타이터-글로® 시약 (100 μL/웰)을 세포 플레이트에 첨가하고, 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 15분 후, 플레이트 판독기를 사용하여 발광을 판독하였다. 데이터를 엑셀로 분석하고, 그래프패드 프리즘으로 그래프 작성하였다. 그래프패드 프리즘을 사용하여 만-휘트니 비파라미터 t 검정을 사용하여 통계적 분석 및 p 값을 계산하였다.

[0224] 증식 데이터의 요약을 표 4에 제시하였다. 시험 화합물의 항증식 효과를 비감수성 (IC_{50} ≥ 1 μM), 세포증식억제성 (IC_{50} < 1 μM 및 % 억제 <70%) 또는 세포독성 (IC_{50} <1 μM 및 % 억제 ≥70%)으로 카테고리화하였다. ARID1A, KMT2C, KMT2D 또는 RB1 유전자 내에 불활성화 또는 기능 상실 (LOF) 돌연변이를 보유하는 세포주는 패널 내의 나머지 세포주와 비교하여 실시예 1에 대해 유의하게 더 큰 세포독성 반응을 나타냈다 (표 5). 대조적으로, 비-LOF 세포주는 실시예 1에 반응하여 더 높은 (%) 세포증식억제성 반응을 나타냈다.

[0225] 추가로, 이들 돌연변이를 보유하는 다수의 이종이식 종양 모델을 이용하여 단독요법으로서의 실시예 1의 효능을 평가하였다 (표 3).

[0226] 효능 연구 및 항종양 활성 (ΔT/C)의 요약을 표 3에 제시하였다. 실시예 1은 다양한 종양 모델에서 강력한 효능을 입증하였고, ARID1A, KMT2C 또는 RB1 유전자 내에 돌연변이를 보유하는 종양 모델에서 유의한 퇴행이 나타났다. 종합하면, 이들 발견은 ARID1A, KMT2C, KMT2D 또는 RB1 유전자 내 불활성화 돌연변이가 다수의 암 유형에 걸쳐 실시예 1을 사용한 치료에 대한 잠재적인 환자 선택 전략을 제시한다는 것을 나타낸다.

[0227] 표 4: 나타낸 바와 같은 다양한 암 세포주에 걸친 실시예 1 항증식성 log-GI_{50} (nM) 및 성장-억제 (%)의 요약. 세포주를 7일 동안 처리하고, 셀타이터-글로® 검정을 사용하여 분석하였다.

세포주	배지 정보	조직학	항증식 효과			*유전자(들) 내 LOF 돌연변이*			
			IC_{50} (μM)	**% 억제**	**결과**	***ARID1A***	***KMT2C***	***KMT2D***	***RB1***
22RV1	A	전립선	0.028	77	세포독성	예			
A2058	B	피부	0.030	97	세포독성				예
A2780	C	난소	0.052	74	세포독성	예			
A375	B	피부	0.055	86	세포독성				
A549	D	폐	0.139	64	세포증식 억제성				
A673	B	골	0.014	96	세포독성				
AN3CA	E	자궁내막	0.050	67	세포증식 억제성	예			
AZ521	F	위	0.036	76	세포독성				
BT20	B	유방	0.373	45	세포증식 억제성				
C33A	F	자궁내막	0.014	79	세포독성	예		예	
CACO2	B	장	0.189	60	세포증식 억제성				
CAOV3	B	난소	0.019	96	세포독성		예		예
CCRFCEM	C	혈액	0.040	96	세포독성				
COLO201	C	장	0.123	61	세포증식 억제성				
COLO320	C + 0.8 ug/mL 퓨로마이신	장	0.189	73	세포독성				
CORL311	C	폐	0.095	75	세포독성				
CORL88	C	폐	4.200	34	비감수성				예
COV318	C	난소	>10	40	비감수성				
CT26	C + 0.8 ug/mL 퓨로마이신	장	>10	-47	비감수성				
DMS114	C	폐	0.014	65	세포증식 억제성				
DMS273	G	폐	0.019	80	세포독성				예
DMS53	C	폐	0.118	66	세포증식 억제성				
DMS79	C + 0.8 ug/mL 퓨로마이신	폐	0.354	50	세포증식 억제성				예
DU145	F	전립선	0.036	74	세포독성		예		예
EBC1	C + 1 ug/mL 퓨로마이신	폐	0.047	83	세포독성				
EGL1	H		0.041	95	세포독성				
EVSAT	G + 2 ug/mL 퓨로마이신	유방	0.040	79	세포독성				예

[0228]

GL261	C	뇌	0.038	85	세포독성				
HCC1143	C	유방	>10	37	비감수성		예		
HCC1187	I	유방	0.027	73	세포독성				예
HCC1569	C	유방	0.067	45	세포증식 억제성				예
HCC1806	C	유방	0.014	99	세포독성		예		
HCC2218	C	유방	0.560	41	세포증식 억제성				예
HCC4006	C	폐	0.028	57	세포증식 억제성				
HCC44	C	폐	0.131	48	세포증식 억제성				
HCC70	I	유방	0.038	89	세포독성				예
HCC827	C	폐	0.055	69	세포증식 억제성				
HCT116	J	장	0.041	88	세포독성		예		
HCT8	C	장	0.981	3	세포증식 억제성				
HEC108	F	자궁내막	0.031	90	세포독성	예	예		
HEC1A	J	자궁내막	0.162	56	세포증식 억제성	예	예		
HEP3B217	F	간	0.033	66	세포증식 억제성				예
HEPG2	F	간	0.028	78	세포독성				
HEYA8	C	난소	0.112	89	세포독성	예	예	예	
HGC27	F	위	0.068	78	세포독성				
HL60	C	혈액	0.045	87	세포독성				
HLE	B	간	0.030	77	세포독성		예		예
HLF	B	간	0.017	100	세포독성		예		예
HOS	C	골	0.090	72	세포독성		예		
HS294T	K	피부	0.020	84	세포독성				
HS766T	L	췌장	0.062	72	세포독성	예			
HT	C	혈액	0.131	64	세포증식 억제성				
HT1197	E	요도	0.281	55	세포증식 억제성	예		예	
HUH1	M	간	0.128	72	세포독성	예			
HUH28	A	담도	2.896	32	비감수성	예			예
HUH7	N	간	0.175	64	세포증식 억제성				
IGROV1	C	난소	0.072	70	세포독성	예	예		
IMR32	O	CNS	0.002	100	세포독성	예			
JHH4	B	간	0.166	65	세포증식 억제성				
JHH7	C	간	0.027	88	세포독성				
JURKAT	P	혈액	0.061	98	세포독성	예	예		
K562	C	혈액	>10	-191	비감수성				

[0229]

Karpas1106	C	혈액	0.026	98	세포독성				
KARPAS299	C	혈액	0.069	78	세포독성				
KE97	C	혈액	0.158	58	세포증식억제성				
KELLY	C	CNS	0.058	80	세포독성				
KLE	Q	자궁내막	0.028	65	세포증식억제성		예		예
KP4	L	췌장	0.036	65	세포증식억제성				
KPL1	G + 2 ug/mL 퓨로마이신	유방	0.668	43	세포증식억제성				
KURAMOCHI	C	난소	0.052	88	세포독성				
KYSE150	R	식도	0.042	64	세포증식억제성				
KYSE180	C	식도	0.103	68	세포증식억제성				
KYSE270	R	식도	>10	-180	비감수성				예
KYSE30	S	식도	0.076	76	세포독성				
KYSE520	C	식도	>10	50	비감수성				
KYSE70	C	식도	0.126	70	세포독성	예			
LI7	M	간	0.132	76	세포독성				
LN18	T	CNS	0.015	91	세포독성		예		
LN229	T	CNS	0.036	63	세포증식억제성				
LNCAP	P	전립선	0.059	74	세포독성	예	예		
LS411N	C	장	1.000	45	비감수성	예	예		
M14	L	피부	0.032	85	세포독성	예			
MCF7	F	유방	0.155	58	세포증식억제성				
MDAMB157	P	유방	0.866	39	세포증식억제성				
MDAMB231	U	유방	2.816	23	비감수성				
MDAMB453	U	유방	0.039	56	세포증식억제성				
MDAMB468	B	유방	0.008	100	세포독성	예			예
MDAPCA2B	U	전립선	6.273	17	비감수성		예		
MDST8	B	장	0.049	88	세포독성				
MHCC97H	V	간	0.243	59	세포증식억제성				
MHCC97L	V	간	0.526	45	세포증식억제성				
MKN1	C	위	0.023	80	세포독성				
MKN45	C	위	0.056	79	세포독성	예			
MKN7	C	위	>10	39	비감수성			예	
MKN74	C	위	0.073	71	세포독성				예

[0230]

MOLT4	C	혈액	0.040	99	세포독성		예	예	
MX1	C	유방	0.045	72	세포독성				예
NCIH1048	W	폐	0.004	95	세포독성		예		예
NCIH1092	C	폐	0.683	42	세포증식 억제성				
NCIH1155	B	폐	0.043	51	세포증식 억제성				예
NCIH1299	A	폐	0.195	44	세포증식 억제성				
NCIH1436	C	폐	0.195	56	세포증식 억제성	예			
NCIH146	C + 0.8 ug/mL 퓨로마이신	폐	0.030	77	세포독성				예
NCIH1666	C	폐	0.161	59	세포증식 억제성				
NCIH1703	C	폐	0.040	92	세포독성				
NCIH1734	C	폐	0.024	76	세포독성				예
NCIH1975	C	폐	0.021	90	세포독성				예
NCIH2030	X	폐	5.374	9	비감수성				
NCIH2081	W	폐	0.442	44	세포증식 억제성			예	예
NCIH209	C + 0.8 ug/mL 퓨로마이신	폐	0.040	83	세포독성				
NCIH2122	C	폐	0.078	85	세포독성				
NCIH2196	C	폐	0.123	63	세포증식 억제성				예
NCIH2228	C	폐	0.276	57	세포증식 억제성				예
NCIH226	C	폐	1.197	43	비감수성				
NCIH2347	C + 0.8 ug/mL 퓨로마이신	폐	0.661	45	세포증식 억제성				
NCIH358	C	폐	0.042	93	세포독성				
NCIH441	C	폐	0.014	84	세포독성				
NCIH446	C	폐	0.013	95	세포독성			예	예
NCIH460	C	폐	0.047	97	세포독성	예			
NCIH520	C	폐	*0.082*	*77*	세포독성				
NCIH522	C	폐	0.107	50	세포증식 억제성				
NCIH524	C	폐	0.037	92	세포독성				예
NCIH526	C	폐	0.018	94	세포독성				
NCIH596	C	폐	0.922	46	세포증식 억제성				예
NCIH69	C	폐	0.173	68	세포증식 억제성				예
NCIH727	C	폐	0.117	56	세포증식 억제성				
NCIH82	C	폐	0.699	22	세포증식 억제성				예

[0231]

NIHOVCAR3	Y	난소	0.040	96	세포독성				
NUGC3	C	위	0.030	81	세포독성	예	예	예	
NUGC4	C	위	0.019	83	세포독성				
OAW42	Z	난소	0.136	88	세포독성	예			
OCUM1	N	위	0.027	82	세포독성	예			
OV90	C	난소	0.034	61	세포증식억제성				
OVCAR5	Y	난소	0.086	74	세포독성				
OVCAR8	C	난소	0.065	90	세포독성				예
OZ	AA	간	0.050	77	세포독성				
PANC1	L	췌장	0.071	47	세포증식억제성				
PATU8988T	C	췌장	0.201	55	세포증식억제성				
PLCPRF5	BB	간	>10	41	비감수성				
Raw264.7	C		0.355	62	세포증식억제성				
RKO	B	장	0.118	61	세포증식억제성	예			
RT112	P	요도	0.032	87	세포독성				
SAOS2	CC	골	0.028	66	세포증식억제성				예
SH10TC	C	위	0.147	58	세포증식억제성				예
SHSY5Y	DD	CNS	0.059	95	세포독성				
SiHa	F	자궁내막	0.105	58	세포증식억제성				
SJRH30	C	연부 조직	0.039	62	세포증식억제성				
SKHEP1	BB	간	0.118	71	세포독성				
SKMEL28	B	피부	0.098	61	세포증식억제성				
SKMES1	F	폐	0.028	80	세포독성			예	
SKOV3	J	난소	>10	27	비감수성	예			
SKUT1	E	연부 조직	0.041	89	세포독성	예			예
SNU1	C	위	0.105	68	세포증식억제성	예	예		
SNU1079	EE	담도	0.038	89	세포독성	예			
SNU1196	EE	담도	0.043	68	세포증식억제성				
SNU16	C	위	0.017	84	세포독성				예
SNU245	EE	담도	1.089	-5	비감수성				
SNU308	EE	담도	0.184	61	세포증식억제성				
SNU387	X	간	>10	12	비감수성				
SNU398	M	간	0.021	85	세포독성				
SNU423	M	간	>10	40	비감수성	예			
SNU449	C	간	1.521	8	비감수성	예			

[0232]

SNU475	M	간	*3.917*	*28*	비감수성				
SNU478	EE	담도	0.032	92	세포독성				예
SNU5	FF	위	0.039	79	세포독성	예			
SNU739	C	간	>10	47	비감수성				
SNU869	EE	담도	0.052	60	세포증식 억제성				
SW1271	U	폐	0.024	67	세포증식 억제성				
SW48	U	장	0.005	89	세포독성	예	예		
SW480	U	장	0.036	90	세포독성	예		예	
SW626	U		*1.105*	*39*	비감수성				
SW780	U	요도	0.074	68	세포증식 억제성				
SW837	U	장	0.068	55	세포증식 억제성				
SW900	U	폐	3.806	13	비감수성				
T47D	GG	유방	0.045	68	세포증식 억제성	예			
T84	HH	장	0.308	61	세포증식 억제성				예
T98G	O	CNS	1.371	44	비감수성				
TCCSUP	E	요도	0.040	61	세포증식 억제성	예			
TFK1	II	담도	0.040	87	세포독성				
TGW	O	뇌	0.070	63	세포증식 억제성				
THP1	C	혈액	0.042	81	세포독성				
TOV112D	JJ	난소	0.025	81	세포독성				
TOV21G	C	난소	0.061	73	세포독성	예	예		
TYKNU	O	난소	0.072	83	세포독성		예		
U118MG	B	CNS	1.170	42	비감수성				
U87MG	O	CNS	7.356	-5	비감수성				
UACC812	U	유방	0.076	58	세포증식 억제성	예			
UACC893	U	유방	4.150	-51	비감수성				예
UMUC3	E	요도	0.161	70	세포독성				
ZR751	C	유방	0.043	69	세포증식 억제성				

[0233]

[0234] 배지 정보:

[0235] A. RPMI 1640 (깁코 11835, 깁코 22400-089, 또는 하이클론 Cat # SH30027) + 10% FBS (깁코 cat#10082)

[0236] B. L-글루타민 (써모 cat#SH30022) + NaPyr + NEAA + HEPES + 10% FBS (깁코 cat#10082) 함유 DMEM

[0237] C. HEPES & L-글루타민 (깁코 22400) + 1mM Na 피루베이트 + 10% FBS (깁코 cat#10082) 함유 RPMI 1640

[0238] D. F-12K 배지 (Cat#30-2004) + 10% FBS (깁코 cat#10082)

[0239] E. EMEM (셀그로(CellGro) cat#17-305-CV) + L-글루타민 + Na 피루베이트 + Na 비카르보네이트 + 10% FBS (깁코 cat#10082)

[0240] F. EMEM (셀그로 cat#17-305-CV) + L-글루타민 + Na 피루베이트 + Na 비카르보네이트 + NEAA + 10% FBS (깁코 cat#10082)

[0241] G. DMEM (깁코 11995) + 1mM Na 피루베이트 + 10% FBS (깁코 cat#10082)

[0242] H. DMEM 고 글루코스 (하이클론 Cat # SH30022) + 10% HI FBS (깁코 Cat # 10082) + 1X NEAA (하이클론 SH30328)

[0243] I. ATCC 변형 RPMI 1640 (깁코 A1049101) + 1mM Na 피루베이트 + 10% FBS (깁코 cat#10082)

[0244] J. 맥코이 5A + 10% FBS (깁코 cat#10082)

[0245] K. DMEM (깁코 11965) + 10% FBS

[0246] L. 얼스 염 (깁코 11095-080) + 1% NEAA + 1% NaPyr + 10% FBS (깁코 cat#10082) 함유 MEM 이글

[0247] M. L-글루타민 및 HEPES + 10% 열 불활성화 FBS 함유 RPMI-1640

[0248] N. L-글루타민 (써모 cat#SH30022) + Na 피루베이트 + 10% FBS (깁코 cat#10082) 함유 DMEM

[0249] O. MEM (깁코 11095) + Na 피루베이트 + NEAA + 10% FBS (깁코 cat#10082)

[0250] P. HEPES & L-글루타민 (써모 SH30255.01 또는 깁코 11835) + 1mM 피루브산나트륨 + 10% FBS (깁코 cat#10082) 함유 RPMI 1640

[0251] Q. 2.5 mM L-글루타민, 15 mM HEPES + 0.5 mM NaPyruv + 10% FBS 함유 DMEM:F12

[0252] R. 49% RPMI 1640 + 49% 햄 F12 + 2% h.i. FBS

[0253] S. 45% RPMI 1640 + 45% 햄 F12 + 10% h.i. FBS

[0254] T. DMEM (깁코 11965) + 1mM Na 피루베이트 + 5% FBS (깁코 cat#10082)

[0255] U. 라이보비츠 L15 (깁코 cat#11415-064) + 10% FBS (깁코 cat#10082), No CO_2

[0256] V. 고 Glu & L-gln + 10% 열 불활성화 FBS + NaPyr + NEAA + HEPES 함유 DMEM

[0257] W. DMEM:F12 (1:1) + ITS + 10nM 히드로코르티손 + 10nM 베타-에스트라디올 + 4.5mM L-glut + 5% FBS (깁코 cat#10082)

[0258] X. L-글루타민 및 HEPES + 10% FBS 함유 RPMI-1640

[0259] Y. HEPES & L-글루타민 (깁코 22400) + 1mM Na 피루베이트 + NEAA + 20% FBS (깁코 cat#10082) 함유 RPMI 1640

[0260] Z. DMEM + 2mM 글루타민 + 1mM 피루브산나트륨 (NaP) + 20 IU/l 소 인슐린 + 10% FBS (깁코 cat#10082)

[0261] AA. 윌리암스 E 배지 (깁코 Cat # 12551) + 10% FBS

[0262] BB. MEM + 10% FBS + NaPyr + NEAA + HEPES + 1.5g/L $NaHCO_3$

[0263] CC. 맥코이 5A (깁코 16600) + 15% FBS (깁코 cat#10082)

[0264] DD. 1:1 MEM (11095): F12 (셀그로 10-080-CV) + 10% FBS (깁코 cat#10082)

[0265] EE. 글루타민 및 HEPES (하이클론 Cat # SH30255) + 10% FBS (깁코 Cat # 16000) + 1X NaPyr 함유 RPMI-1640

[0266] FF. L-글루타민, 25mM HEPES [깁코 12440-053]+20% FBS 함유 이스코브 변형 둘베코 배지

[0267] GG. HEPES & L-글루타민 (페놀-레드-무함유) + 1mM Na 피루베이트 + 10% FBS (깁코 cat#10082) 함유 RPMI 1640

[0268] HH. 1:1 햄스 F12: DMEM + L-글루타민 + 5% FBS (깁코 cat#10082)

[0269] II. RPMI-1640 (하이클론 Cat # SH30027) + 10% 열 불활성화 FBS (깁코 Cat # 10082)

[0270] JJ. 최종 농도 1.5 g/L의 중탄산나트륨을 함유하는 MCDB 105 배지와 최종 농도 2.2 g/L의 중탄산나트륨을 함유하는 배지 199의 1:1 혼합물 + 15% FBS

[0271] 표 5: LOF 돌연변이를 보유하는 암 세포주에 걸친 실시예 1의 항증식 효과의 분포 (%).

[0272]

	세포독성 (IC_{50}<1μM, %억제 ≥70)	세포증식억제성 (IC_{50}<1μM, %억제 <70)	비감수성 (IC_{50}≥1μM, %억제 <70)
ARID1A 돌연변이체	64%, n=25	23%, n=9	13%, n=5
KMT2D 돌연변이체	76%, n=19	12%, n=3	12%, n=3
KMT2C 돌연변이체	70%, n=7	20%, n=2	10%, n=1
RB1 돌연변이체	54%, n=22	37%, n=15	10%, n=4
기타	40%, n=41	44%, n=45	17%, n=17

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company

<120> Compounds Useful for Inhibiting CDK7

<130> X21687

<150> ES 17382778.3

<151> 2017-11-16

<150> ES 18382034.9

<151> 2018-01-23

<150> ES 18382546.2

<151> 2018-07-20

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 1

Tyr Ser Pro Thr Ser Pro Ser Tyr Ser Pro Thr Ser Pro Ser Tyr Ser

1 5 10 15

Pro Thr Ser Pro Ser Lys Lys Lys Lys

20 25