



등록특허 10-2793825



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월11일  
(11) 등록번호 10-2793825  
(24) 등록일자 2025년04월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07D 487/04* (2006.01) *A61K 31/519* (2006.01)  
*A61P 35/02* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C07D 487/04* (2022.08)  
*A61K 31/519* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7039678(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2017년08월15일  
심사청구일자 2023년12월19일
- (85) 번역문제출일자 2023년11월20일
- (65) 공개번호 10-2023-0162137
- (43) 공개일자 2023년11월28일
- (62) 원출원 특허 10-2019-7007529  
원출원일자(국제) 2017년08월15일  
심사청구일자 2020년08월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2017/054955
- (87) 국제공개번호 WO 2018/033853  
국제공개일자 2018년02월22일
- (30) 우선권주장  
PCT/CN2016/095510 2016년08월16일 중국(CN)

## (56) 선행기술조사문헌

KR1020160002812 A\*  
WO2002050070 A2\*  
MINO R CAIRA, "CRYSTALLINE POLYMORPHISM OF ORGANIC COMPOUNDS", TOPICS IN CURRENT CHEMISTRY, vol. 198, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 163-208

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

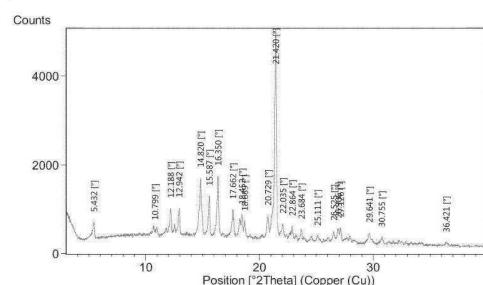
전체 청구항 수 : 총 30 항

심사관 : 정승두

(54) 발명의 명칭 (S)-7-(1-아크릴로일피페리딘-4-일)-2-(4-페녹시페닐)-4,5,6,7-테트라-하이드로파라졸로[1,5-A] 피리미딘-3-카르복스아미드의 제조 및 그 용도

**(57) 요약**

본 발명은 Btk를 억제하기 위한 (S)-7-(1-아크릴로일피페리딘-4-일)-2-(4-페녹시페닐)-4,5,6,7-테트라-하이드로파라졸로[1,5-A] 피리미딘-3-카르복스아미드의 결정형, 이의 제조 방법 및 억제 학적 조성물, 및 질병의 치료 또는 질환의 치료를 위한 의약의 제조에 있어서의 상기 형태의 용도에 관한 것이다.

**대 표 도**

(52) CPC특허분류

*A61P 35/02* (2018.01)

*C07B 2200/13* (2013.01)

---

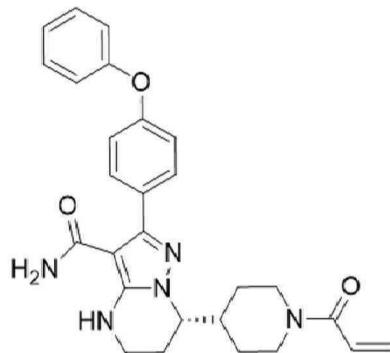
## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

치료가 필요한 대상체에게 화합물 1을 투여하되, 상기 대상체의 B-세포 증식성 질환 치료용 약학 조성물로서, 상기 B-세포 증식성 질환은 만성 림프구성 백혈병, 소형 림프구성 림프종, 외투세포 림프종, 왈덴스트룀 마크로글로불린혈증, 변연부 림프종 및 소포성 림프종으로 구성된 군에서 선택되고

상기 화합물 1은 160 mg의 용량으로 1일 2회(BID) 또는 320 mg의 용량으로 1일 1회(QD) 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물:



화합물 1.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화합물 1이 99.3% 이상의 순도를 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화합물 1이 99.5% 이상의 순도를 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 B-세포 증식성 질환이 외투세포 림프종인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 대상체가 적어도 하나의 종래 요법으로 치료를 받은 적이 있는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 6

제3항에 있어서, 상기 B-세포 증식성 질환이 왈덴스트룀 마크로글로불린혈증인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 7

제3항에 있어서, 상기 B-세포 증식성 질환이 변연부 림프종인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 대상체가 적어도 하나의 종래 요법으로 치료를 받은 적이 있는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 변연부 림프종이 재발성 또는 난치성 변연부 림프종인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 10

제3항에 있어서, 상기 B-세포 증식성 질환이 만성 림프구성 백혈병인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 11

제3항에 있어서, 상기 B-세포 증식성 질환이 소형 림프구성 림프종인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 12

제3항에 있어서, 상기 B-세포 증식성 질환이 소포성 림프종인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 13

제3항에 있어서, 상기 화합물 1의 비정질형 또는 결정형이 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 상기 화합물 1의 결정형이 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 결정형이  $14.8 \pm 0.2^\circ$ ,  $16.4 \pm 0.2^\circ$  및  $21.4 \pm 0.2^\circ$ 에서  $2\theta$  각도 값을 갖는 회절 피크를 포함하는 X선 분말 회절 패턴을 나타내는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 결정형이  $14.8 \pm 0.2^\circ$ ,  $15.6 \pm 0.2^\circ$ ,  $16.4 \pm 0.2^\circ$  및  $21.4 \pm 0.2^\circ$ 에서  $2\theta$  각도 값을 갖는 회절 피크를 포함하는 X선 분말 회절 패턴을 나타내는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, 상기 B-세포 증식성 질환이 외투세포 림프종이고, 상기 대상체가 적어도 하나의 종래 요법으로 치료 받은 적이 있는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 18

제16항에 있어서, 상기 B-세포 증식성 질환이 왈텐스트룀 마크로글로불린혈증인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 19

제16항에 있어서, 상기 B-세포 증식성 질환이 재발성 또는 난치성 변연부 림프종이고, 상기 대상체가 적어도 하나의 종래 요법으로 치료 받은 적이 있는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 20

제16항에 있어서, 상기 B-세포 증식성 질환이 만성 림프구성 백혈병 또는 소형 림프구성 림프종인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 21

제13항에 있어서, 상기 화합물 1의 비정질형이 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 22

제21항에 있어서, 상기 화합물 1의 비정질형은  $79.7^{\circ}\text{C}$ 의 유리 전이 온도의 중간 온도를 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 23

제22항에 있어서, 상기 비정질형은 97% 이상의 거울상 이성질체 초과 핍을 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 24

제23항에 있어서, 상기 B-세포 증식성 질환이 외투세포 림프종이고, 상기 대상체가 적어도 하나의 종래 요법으로 치료 받은 적이 있는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 25

제23항에 있어서, 상기 B-세포 증식성 질환이 왈텐스트룀 마크로글로불린혈증인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 26

제23항에 있어서, 상기 B-세포 증식성 질환이 재발성 또는 난치성 변연부 림프종이고, 상기 대상체가 적어도 하나의 종래 요법으로 치료 받은 적이 있는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

나의 종래 요법으로 치료 받은 적이 있는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 27

제23항에 있어서, 상기 B-세포 증식성 질환이 만성 림프구성 백혈병 또는 소형 림프구성 림프종인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 28

제3항에 있어서, 상기 화합물 1이 경구 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 29

제1항에 있어서, 상기 화합물 1이 160 mg의 용량으로 1일 2회(BID)의 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 30

제1항에 있어서, 상기 화합물 1이 320 mg의 용량으로 1일 1회(QD) 투여되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

#### 청구항 31

삭제

#### 청구항 32

삭제

#### 청구항 33

삭제

#### 청구항 34

삭제

#### 청구항 35

삭제

#### 청구항 36

삭제

#### 청구항 37

삭제

#### 청구항 38

삭제

#### 청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001]

본 발명은 (S)-7-(1-아크릴로일피페리딘-4-일)-2-(4-페녹시페닐)-4,5,6,7-테트라-하이드로페라졸로 [1,5-A] 피리미딘-3-카르복스아미드에 관한 것이다. 또한 본 발명은 결정형(crystalline form)을 제조하는 방법 및 Btk 억제제로서 결정형을 사용하는 방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0003]

브루톤(Brutan)의 티로신 키나아제(tyrosine kinase, Btk)는 Tec 티로신 키나아제 계열에 속한다 (Vetrie et al., *Nature* 361: 226-233, 1993; Bradshaw, *Cell Signal.* 22: 1175-84, 2010). Btk는 주로 B 세포, 비만 세포 및 대식 세포와 같은 대부분의 조혈 세포에서 발현되며 (Smith et al., *J. Immunol.*, 152 : 557-565, 1994) 골수(bone marrow), 비장(spleen) 및 림프절 조직(lymph node tissue)에 제한된다. Btk는 B 세포 발달, 분화에 관여하는 B 세포 수용체 (BCR) 및 FcR 신호 전달 경로에서 중요한 역할을 한다 (Khan, *Immunol. Res.* 23 : 147, 2001). Btk는 Src 계열 키나아제 업스트림에 의해 활성화된다. 일단 활성화되면 Btk는 PLC 감마를 인산화(phosphorylate)시켜 B 세포 기능과 생존에 영향을 준다 (Humphries et al., *J. Biol. Chem.* 279: 37651, 2004).

[0004]

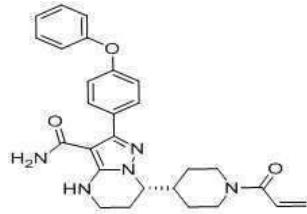
이러한 신호 경로(signaling pathways)는 정확하게 조절되어야 한다. Btk를 암호화하는 유전자의 돌연변이는 사람에서 X-관련성 무감마글로불린혈증(X-linked agammaglobulinemia, XLA)이라고 알려진 유전성 B 세포 특이적 면역 결핍증을 일으킨다 (Conley et al., *Annu. Rev. Immunol.* 27: 199-227, 2009). 불규칙한 BCR 매개 시그널링은 조절되지 않는 B 세포 활성화를 유발하여 자가면역 및 염증 질환을 유발할 수 있다. 전임상 연구에 따르면 Btk 결핍 마우스는 콜라겐 유발 관절염(collagen-induced arthritis)에 내성을 나타낸다. 또한 성숙 B 세포 (mature B-cells)를 고갈시키는 CD20 항체인 리툭산(Rituxan)에 대한 임상 연구 결과는 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 전신성 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus) 및 다발성 경화증(multiple sclerosis)과 같은 많은 염증성 질환에서 B 세포의 핵심 역할을 나타낸다 (Gurcan et al., *Int. Immunopharmacol.* 9: 10-25, 2009). 따라서, Btk 억제제는 자가면역 및/또는 염증성 질환을 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0005]

또한, Btk의 비정상적인 활성화(aberrant activation)는 Btk의 억제가 혈액학적 악성종양(hematological malignancies)의 치료에 유용하다는 것을 나타내는 B-세포 림프종(B-cell lymphomas)의 발병(pathogenesis)에 중요한 역할을 한다 (Davis et al., *Nature* 463: 88-92, 2010). 예비 임상 시험 결과는 Btk 억제제 PCI-32765가 여러 유형의 B 세포 림프종의 치료에 효과적이었음을 보여준다(예를 들어, 제54차 미국 혈액 학회(American Society of Hematology, ASH) 연례회의 학술회의 초록, 2012 12월: 686 Bruton의 티로신 키나제 억제제(Tyrosine Kinase (Btk) inhibitor) 억제제, 이브루티닙(Ibrutinib)(PCI-32765), 재발성/난치성(Recapsed/Refractory) De Novo 미만성 거대B세포 림프종(Diffuse Large B-Cell Lymphoma, DLBCL)의 ABC 아형에서 특혜 활동: 재발성/난용성(Recapsed/Refractory) 드 노보 미만성 거대B세포 림프종(De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma Diffuse Large B-Cell Lymphoma, DLBCL)의 ABC 아형(Subtype)에서 선택적 활성(Preferential Activity): 오픈 라벨(Open-Label), 임상 1상(Phase I)의 다기관 공동 중간 결과). Btk는 다중 신호 전달 경로의 매개체(mediator)로서 중심 역할을 하기 때문에 Btk의 억제제는 항염증제 및/또는 항암제로서

매우 중요하다 (Mohamed et al., *Immunol. Rev.* 228: 58-73, 2009; Pan, *Drug News perspect* 21: 357-362, 2008; Rokosz et al., *Expert Opin. Ther. Targets* 12: 883-903, 2008; Uckun et al., *Anti-cancer Agents Med. Chem.* 7: 624-632, 2007; Lou et al., *J. Med. Chem.* 55(10): 4539-4550, 2012; Mohamed et al., *Immunol. Rev.* 228: 58-73, 2009; Pan, *Drug News perspect* 21: 357-362, 2008; Rokosz et al., *Expert Opin. Ther. Targets* 12: 883-903, 2008; Uckun et al., *Anti-cancer Agents Med. Chem.* 7: 624-632, 2007; Lou et al., *J. Med. Chem.* 55(10): 4539-4550, 2012).

[0006] 국제 출원 WO 2014173289 A에는 Btk 억제제로서 일련의 융합 헤테로사이클릭 화합물이 개시되어 있다. 특히, WO 2014173289 A에는 (S)-7-(1-아크릴로일피페리딘-4-일)-2-(4-페녹시페닐)-4,5,6,7-테트라-하이드로파라졸로[1,5-a]파리미딘-3-카르복스아미드((S)-7-(1-acryloylpiperidin-4-yl)-2-(4-phenoxyphenyl)-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide) (이하, 화합물 1)



[0007]

화합물 1

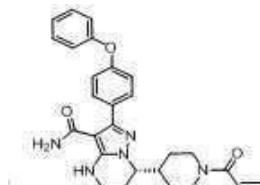
[0008] 화합물 1은 강력하고 특이하며 비가역적인 BTK 키나아제 억제제이다. 생화학적, 세포기반 및 동물 연구를 이용한 전임상 연구에서 생성된 데이터는 화합물 1이 B 세포 악성 종양(B-cell malignancies)의 종양 성장을 억제하는데 상당한 이점을 제공할 수 있다고 의미한다. 화합물 1은 BTK vs. EGFR, FGR, FRK, HER2, HER4, ITK, JAK3, LCK 및 TEC의 억제를 위해 이브루티닙(Ibrutinib) 보다 더 선택적인 것으로 나타났으므로, 진료소에서 이브루티닙 보다 부작용이 적을 것으로 기대된다. 또한 화합물 1은 약한 ITK 억제로 인해 유도된 리툭시맙(rituximab-induced)의 항원 의존성 세포 매개 세포 독성(antigen-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)이 이브루티닙 보다 유의하게 적게 나타므로, B 세포 악성 종양 치료에서 리툭시맙 또는 다른 ADCC 의존 항체와 병용했을 때 더 좋은 효능을 나타낼 수 있다.

[0009] [0010] 전임상 안전성 평가 결과 화합물 1은 래트 및 개에 단일 및 반복 투여 독성 연구에서 28 일까지 전체 내성 및 심각한 독성 관점에서 이브루티닙(Ibrutinib) 보다 안전하다는 것이 입증되었다. 또한, 화합물 1은 이브루티닙에서 관찰되는 축적물 이슈 없이 더 나은 생체이용률을 갖는다. 이러한 독특한 특성은 임상 연구에서 화합물 1의 추가 평가를 정당화한다.

[0011] 그러나, 화합물 1은 WO 2014173289 A에서 화합물 27의 제조 방법에 따라 비정질형(amorphous form)인 것으로 밝혀졌으며, 이는 도 7A의 X-선 분말 회절 패턴(X-Ray Powder Diffraction pattern)에 의해 추가로 확인되었다. 비정질형은 도 7B에 나타난 바와 같이 낮은 유리 전이 온도를 가지며, 이는 낮은 안정성 및 어려운 정제와 같이 비정질형 약물제제의 어려움을 나타낸다. 따라서 높은 녹는점 및 우수한 안정성과 같은 약물 제제에 알맞은 특성을 지닌 새로운 형태의 화합물 1의 개발이 필요하다.

### 발명의 내용

[0013] 본 발명은 일 관점에서 다음의 화합물 1의 결정형을 제공한다:



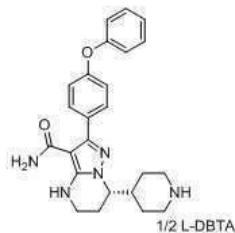
[0014]

화합물 1.

[0015] 본 발명의 다른 관점에서 화합물 1의 결정형은 결정성 무수화물 (이하, "결정형 A"을 제공한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 관점에서 실질적으로 도 11에 따른 X- 선 분말 회절 패턴을 갖는 화합물 BG-13의 결정형을

제공한다.



[0018]

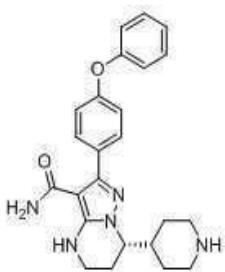
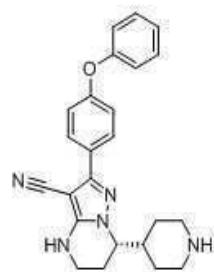
화학식 BG-13

[0020]

본 발명의 또 다른 관점에서 화합물1을 제조하는 방법을 제공한다.

[0021]

또한, 본 발명은 화합물 1을 제조하는데 사용된 화학식 Ie의 중간 화합물 또는 그의 염, 또는 화학식 If 또는 그의 염을 제공한다.



[0022]

화학식 Ie

화학식 If.

[0024]

본 발명은 또 다른 관점에서 결정형 A를 제조하는 방법을 제공한다.

[0025]

본 발명은 또 다른 관점에서 치료학적 유효량의 결정형 A를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0026]

본 발명은 또 다른 관점에서 결정형 A를 개체에 투여함으로써 개체에서 바람직하지 않은 Btk 활성과 관련된 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0027]

본 발명은 또 다른 관점에서 결정형 A를 개체에 투여함으로써 알레르기 질환, 자가면역질환, 염증성 질환, 암 또는 이들의 둘 이상의 조합으로부터 선택된 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0028]

본 발명은 또 다른 관점에서 결정형 A를 개체에 투여함으로써 B 세포 악성종양 또는 재발성/난치성 B 세포 악성 종양(relapsed/refractory B-cell malignancies)중에서 선택된 B 세포 증식성 질환(B-cell proliferative disease)을 치료하는 방법을 제공한다.

[0029]

본 발명의 일 양태에서 결정형 A를 개체에 투여함으로써 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic), 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma, NHL), 미만성 거대B세포 림프종(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL), 외투세포 림프종(mantle cell lymphoma, MCL), 소포성 림프종(follicular lymphoma, FL), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL), 소형 림프구성 림프종(small lymphocytic lymphoma, SLL), 왈덴스트룀 마크로글로불린혈증(Waldenstroms macroglobulinemia, WM), 변연부 림프종(m marginal zone lymphoma, MZL), 모양 세포성 백혈병(Hairy cell leukemia, HCL), 베킷-유사 백혈병 (Burkitt's-like leukemia, BL) 또는 이들의 둘 이상의 조합으로부터 선택되는 B 세포 증식성 질환(B-cell proliferative disease)을 치료하는 방법을 제공한다.

[0030]

본 발명은 또 다른 관점에서 개체에서 바람직하지 않은 Btk 활성과 관련된 적어도 하나의 질병을 치료하기 위한 약물을 제조하는데 있어서 결정형 A의 용도를 제공한다.

[0031]

본 발명은 또 다른 관점에서 알레르기 질환, 자가면역질환, 염증성 질환, 암 또는 이들의 둘 이상의 조합으로부터 선택된 질환을 치료하기 위한 약물을 제조하는데 있어서 결정형 A의 용도를 제공한다.

[0032]

본 발명은 또 다른 관점에서 B-세포 악성 종양 또는 재발성/난치성 B- 세포 악성 종양 중에서 선택된 B-세포 증식성 질환을 치료하기 위한 약제를 제조하는데 있어서 결정형 A의 용도를 제공한다.

[0033] 본 발명의 다른 양태에 있어서 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma, NHL), 미만성 거대B세포 림프종 (diffuse large B cell lymphoma, DLBCL), 외투세포 림프종(mantle cell lymphoma, MCL), 소포성 림프종 (follicular lymphoma, FL), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL), 소형 림프구성 림프종 (small lymphocytic lymphoma, SLL), 월덴스트룀 마크로글로불린혈증(Waldenstroms macroglobulinemia, WM), 변연부 림프종(m marginal zone lymphoma, MZL), 모양세포성백혈병 (Hairy cell leukemia, HCL), 베킷-유사 백혈병 (Burkitt's-like leukemia, BL) 또는 이들의 둘 이상의 조합으로부터 선택되는 B 세포 증식성 질환(B-cell proliferative disease)을 치료하기 위한 약제를 제조하는데 있어서 결정형 A의 용도에 관한 것이다.

[0034] 본 발명의 또 다른 관점에서 화합물 1의 결정형 A 제조하기 위한 방법으로서, 화합물 1의 비정질형을 다음의 용매 시스템과 혼합하여 투명한 용액을 형성하는 단계; 상기 용액을 실온 또는 열을 가하거나 교반하지 않고 일정 시간 동안 유지시켜 결정형 A를 침전시키는 단계로서, 상기 용매 시스템은 다음과 같다:

[0035] 에틸 아세테이트 : 헥산 = 1 : 0.6-0.7 (부피비);

[0036] 에틸 아세테이트 : 햅탄 = 1 : 0.6-0.7 (부피비);

[0037] 에틸 아세테이트 : 시클로 헥산 = 1 : 0.6-1.2 부피비;

[0038] 메틸 아세테이트 : 헥산 = 1 : 0.6 내지 1.2 (부피비);

[0039] 톨루엔 : 헥산 = 1.0 : 0.2 내지 0.4 부피비;

[0040] 톨루엔 : 시클로 헥산 = 1.0 : 0.1 내지 0.2 (체적비);

[0041] 메틸 아세테이트 : 시클로 헥산 = 0.6-0.8 : 1.0 (부피비);

[0042] IPAC : 시클로 헥산 = 1.0 : 부피비로 0.2-1.0; 또는

[0043] 이소 부틸 아세테이트 : 시클로 헥산 = 1.0 : 0.2-1.0 (부피비).

### 도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 결정형 A의 XRPD(X-ray 분말 회절, X-ray powder diffraction) 패턴을 나타낸 것이다.

도 2는 결정형 A의 DSC 곡선을 나타낸 것이다.

도 3은 결정형 A의 TGA 곡선을 나타낸 것이다.

도 4는 결정형 A의  $^1\text{H-NMR}$ 을 나타낸 것이다.

도 5는 결정형 A의  $^{13}\text{C-NMR}$ 을 나타낸 것이다.

도 6은 결정형 A의 DVS 플롯을 나타낸 것이다.

도 7a는 화합물 1의 비정질형의 XRPD 패턴을 나타낸 것이다.

도 7B는 비정질형의 유리 전이 온도가  $79.7^\circ\text{C}$ (중간 온도) 인 것을 보여주는 화합물 1의 비정질형의 mDSC 곡선을 나타낸 것이다.

도 8은 BG-13의 단결정의 절대 구조를 나타낸 것이다.

도 9는 BG-13의 단결정의 수소 결합을 나타낸 것이다.

도 10은 BG-13의 단결정의 결정 패킹을 나타낸 것이다.

도 11은 BG-13의 단결정의 XRPD 패턴을 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 본 발명의 다른 양태에서, 화합물 1의 비정질 형태는 ee 값이 90 % 이상이다.

[0047] 본 발명의 또 다른 실시 양태에서, 화합물 1의 비정질 형태는 97 %의 ee 값을 갖는다.

[0048] 본 발명은 예기치 않게  $25^\circ\text{C}/60\%\text{RH}$ 에서 24 개월 동안 보관하거나  $40^\circ\text{C}/75\%\text{RH}$  조건에서 6개월 동안 보관하더라도 높은 녹는점을 가지며 매우 안정한 프로파일을 나타내는 화합물 1의 결정형을 발견하였다.

- [0049] 본 발명에서 예상외로 결정형 A로 명명된 결정형 화합물 1이 출발 물질의 ee 값 및 보조 용매의 비율 등에 따라 특정 조건에서만 수득될 수 있다는 것을 발견하였다. 다형체 연구는 느린 증발, 항 용매 첨가, 느린 냉각, 증기 확산 및 중합체-유도 결정체(polymer-induced crystallization)의 방법을 통하여 수행되었다. 대부분의 실험은 결정형을 수득하지 못했으며, 이는 결정형 A의 수득이 쉽지 않음을 나타낸다.
- [0050] 추가 특성 규명 결과 결정형 A의 녹는점이  $139.4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (개시 온도)인 무수화물임을 확인하였다. 안정성을 평가하기 위하여 결정형 A의 샘플을  $80^{\circ}\text{C}$ 에서 2 일간,  $25^{\circ}\text{C}/60\%\text{RH}$ 에서 최대 24개월 동안 또는  $40^{\circ}\text{C}/75\%\text{RH}$  조건에서 6개월 동안 보관하였으며, 안정성 테스트 전, 중간 및 후에 XRPD을 특징으로 한다.
- [0051] 분석 결과는 결정형 A가  $80^{\circ}\text{C}$  또는  $25^{\circ}\text{C}/60\%\text{RH}$ 에서 24개월 및  $40^{\circ}\text{C}/75\%\text{RH}$  조건에서 6개월까지의 저장조건에서도 양호한 물리적 안정성을 가지는 것으로 나타나, 상기의 모든 기간 동안 결정형의 변화가 관찰되지 않았다.
- [0052] 본 발명은 결정형 A는 다음으로부터 독립적으로 선택된  $2\theta$  각도 값을 갖는 회절 피크를 포함하는 X-선 분말 회절 패턴을 갖는다:
- [0053] 약  $14.8 \pm 0.2^{\circ}$ ,  $16.4 \pm 0.2^{\circ}$  및  $21.4 \pm 0.2^{\circ}$ .
- [0054] 본 발명은 결정질 형태 A는 다음으로부터 독립적으로 선택된  $2\theta$  각도 값을 갖는 회절 피크를 포함하는 X-선 분말 회절 패턴을 갖는다:
- [0055] 약  $14.8 \pm 0.2^{\circ}$ ,  $15.6 \pm 0.2^{\circ}$ ,  $16.4 \pm 0.2^{\circ}$  and  $21.4 \pm 0.2^{\circ}$ .
- [0056] 본 발명은 결정질 형태 A는 다음으로부터 독립적으로 선택된  $2\theta$  각도 값을 갖는 회절 피크를 포함하는 X-선 분말 회절 패턴을 갖는다:
- [0057] 약  $12.2 \pm 0.2^{\circ}$ ,  $12.9 \pm 0.2^{\circ}$ ,  $14.8 \pm 0.2^{\circ}$ ,  $15.6 \pm 0.2^{\circ}$ ,  $16.4 \pm 0.2^{\circ}$  및  $21.4 \pm 0.2^{\circ}$ .
- [0058] 본 발명은 결정질 형태 A는 다음으로부터 독립적으로 선택된  $2\theta$  각도 값을 갖는 회절 피크를 포함하는 X-선 분말 회절 패턴을 갖는다:
- [0059] 약  $12.2 \pm 0.2^{\circ}$ ,  $12.9 \pm 0.2^{\circ}$ ,  $14.8 \pm 0.2^{\circ}$ ,  $15.6 \pm 0.2^{\circ}$ ,  $16.4 \pm 0.2^{\circ}$ ,  $17.7 \pm 0.2^{\circ}$ ,  $18.5 \pm 0.2^{\circ}$ ,  $20.7 \pm 0.2^{\circ}$  및  $21.4 \pm 0.2^{\circ}$  이다.
- [0060] 본 발명은 결정형 A는 실질적으로 도 1에 따른 X-선 분말 회절 패턴을 갖는다.
- [0061] 본 발명은 결정형 A는 표 1에 요약된 X-선 분말 회절 패턴을 갖는다.

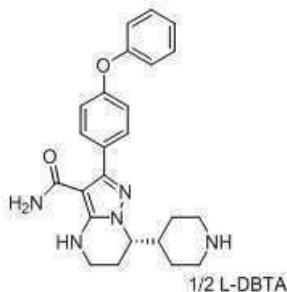
## 표 1

결정형 A의 X-선 회절 패턴

피크 번호	회절 각도 (Diffraction angle (2-theta))	거리 (Spacing)	관련 세기(Relative intensity)
1	5.432	16.26908	7.37
2	10.799	8.19295	2.40
3	12.188	7.26191	13.19
4	12.942	6.84040	13.51
5	14.820	5.97780	28.09
6	15.587	5.68534	19.63
7	16.350	5.42177	29.30
8	17.662	5.02158	13.62
9	18.452	4.80853	11.39
10	18.689	4.74791	8.26
11	20.729	4.28515	11.07
12	21.420	4.14847	100.00
13	22.035	4.03409	7.59
14	22.864	3.88958	6.70
15	23.684	3.75673	5.24
16	25.111	3.54646	2.43
17	26.525	3.36044	5.13
18	26.906	3.31381	6.41

19	27.126	3.28741	6.92
20	29.641	3.01393	4.61
21	30.755	2.90724	2.58
22	36.421	2.46692	1.29

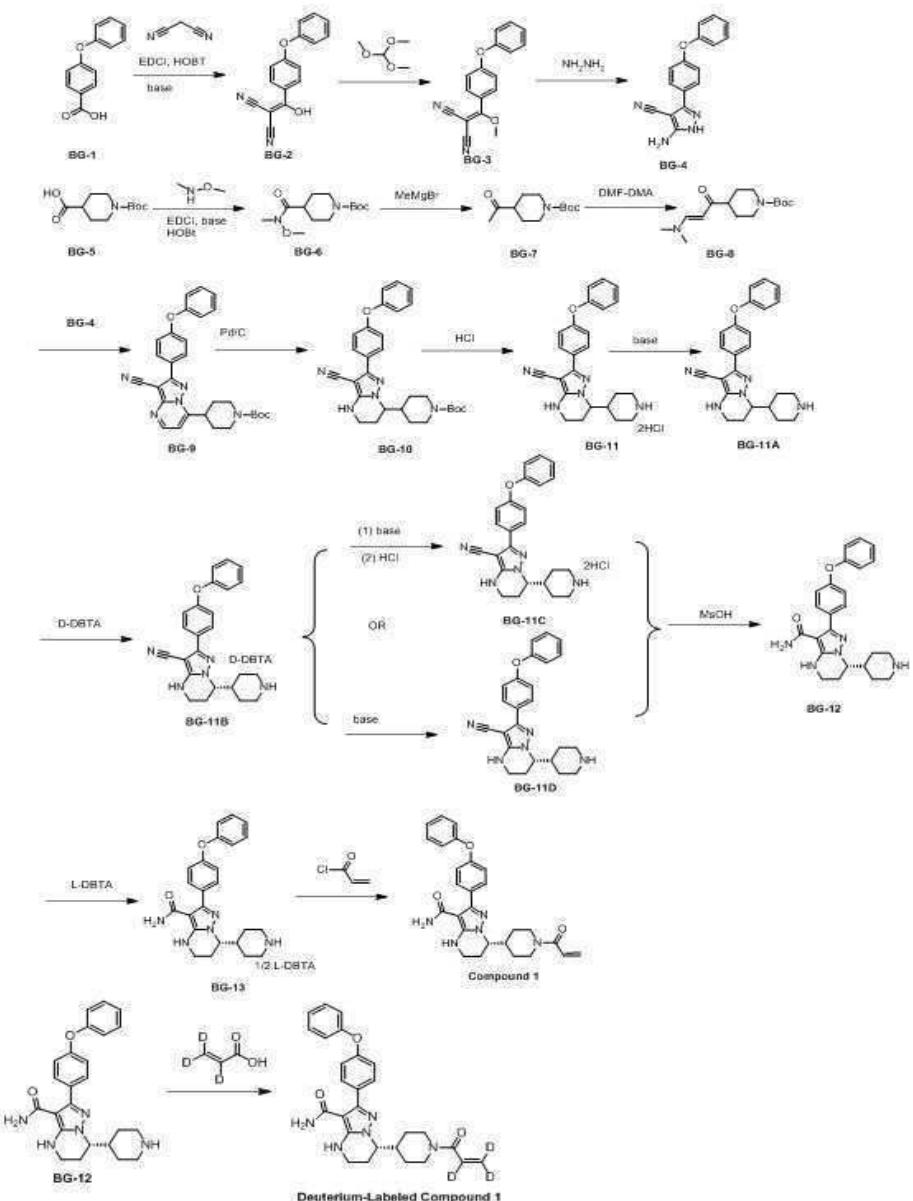
- [0064] 일부 바람직한 실시 양태에서, 결정형 A의 녹는점은  $139 \pm 2$  °C(개시 온도)이다. 일부 바람직한 실시 양태에서, 결정형 A는 실질적으로 도 2에 따른 DSC(Differential Scanning Calorimetry)를 갖는다.
- [0065] 일부 바람직한 실시 양태에서, 결정형 A는 실질적으로 도 3에 따른 TGA(Thermo-gravimetric Analysis)를 갖는다.
- [0066] 본 발명의 결정형 A는 약간 흡습성(hygroscopic)이다. 본 발명의 실시예에서 결정형 A는 비용매화 형태이다.
- [0067] 본 발명의 결정형 A는 40°C 및 75%RH 조건에서 6개월동안 저장 후 실질적으로 동일한 X-선 분말 회절(XRPD) 패턴을 갖는다. 본 발명의 결정형 A는 25°C 및 60%RH에서 24개월 동안 저장 후 실질적으로 동일한 X-선 분말 회절(XRPD) 패턴을 갖는다.
- [0068] 또한 본 발명의 화합물 BG-13의 결정형은 도 11과 같은 X-선 분말 회절(XRPD) 패턴을 갖는,



- [0069]
- [0070] 화합물 BG-13이다.
- [0071] 본 발명의 화합물 BG-13의 결정형은  $a=16.7939(4)$  Å,  $b=7.9871(2)$  Å,  $c=23.5438(5)$  Å,  $\alpha=90.00\text{deg.}$ ,  $\beta=108.0460(10)\text{deg.}$ ,  $\gamma=90.00\text{deg}$ 를 포함하는 단위 셀 크기를 갖는 단결정이다.
- [0072] 본 발명에서의 화합물 1의 절대 배위는 중간체 BG-13의 단결정 X 선 구조 분석으로부터 S로 밝혀졌다.
- [0073] 또한 본 발명은 반응식 1에 나타난 순서와 같이 화합물 1 및 듀테륨-표지된 화합물 1(deuterium-labeled Compound 1)의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0074] 본 발명의 결정형 A를 통한 화합물 1의 새로운 합성 방법 및 결정화/재결정화 단계는 >98 %의 광학 순도를 갖는 핵심 키랄 중간체의 제조, 화합물 1의 순도를 향상시켜 발명의 명세서 내 허용 기준에 이르며, 화합물 1의 불순물을 조절할 수 있는 특징이 있어 종래기술의 공정과 관련된 많은 문제점을 극복할 수 있어 기존의 공정보다 많은 이점을 제공한다. 특히, 본 발명의 방법은 화합물 1의 재생가능하고 상업적인 규모의 제조에 고품질 및 양호한 수율로 특히 적합하다.
- [0075] 대체 공정에서, 반응식 1의 BG-9 또는 그 유사체는 낮은 우수한 거울상 이성질체의 선택성(5 % ee 내지 95 % ee)으로 불균형하게 감소될 수 있다. 다른 단계의 과정은 반응식 1에 나열된 과정과 유사하다.

[0076]

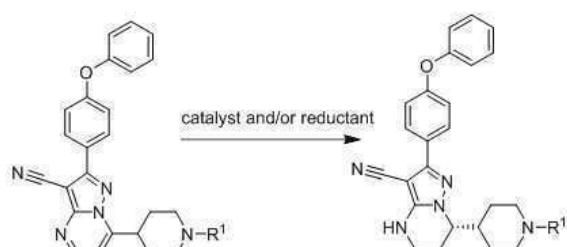
## 반응식 1: 화합물 1 및 둑테륨-표지된 화합물 1의 제조



[0077]

[0078]

또한 본 발명은 촉매 및/또는 환원제의 존재하에 화학식 I의 화합물을 비대칭적으로 환원된 화학식 Ia의 화합물을 제조하는 것을 포함하는, 화학식 Ia의 화합물의 제조 방법으로,



[0079]

[0080]

화학식 I

화학식 Ia

[0081]

R1<sup>o</sup>] 수소 또는 아미노 보호기이다.

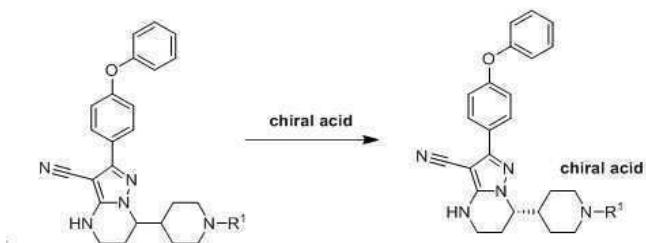
[0082]

본 발명의 아미노 보호기는 아세틸, 프로피오닐(propionyl), 부티릴(butyryl), 페닐아세틸(phenylacetyl, POA), 벤조일, 툴루일, 페녹시아세틸(phenoxyacetyl), 메톡시카르보닐(methoxycarbonyl), 에톡시카르보닐

(ethoxycarbonyl), 2,2,2-트리클로로에톡시카르보닐(2,2,2-trichloroethoxycarbonyl), 터트-부틸옥시카르보닐(tert-butyloxycarbonyl, BOC), 2-이오도에톡시카르보닐(2-iodoethoxycarbonyl, CBZ), 카르보벤족시(carbobenzoxy), 4-메톡시벤질옥시카르보닐(4-methoxybenzylloxycarbonyl), (플루오렌-9-일메톡시)카르보닐((Fluoren-9-ylmethoxy)carbonyl, Fmoc), 4-메톡시-2,3,6-트리메틸벤zenesulphonyl(4-methoxy-2,3,6-trimethylbenzenesulphonyl, Mtr), 벤질, 메틸 또는 4-메톡시벤질을 포함하지만 이에 한정된 것은 아니다.

촉매는 중성 촉매 시스템 또는 양이온 촉매 시스템이다. 본 발명의 실시예에서 촉매는,  $[Ir(COD)Cl]_2/(R$  또는  $S)-MeO-Biphep$ ,  $[Ir(COD)Cl]_2/(R$  또는  $S)-Binap$ ,  $[Ir(COD)Cl]_2/(R$  또는  $S)-Tol-Binap$ ,  $[Ir(COD)Cl]_2/(R$  또는  $S)-xyl-Binap$ ,  $[Ir(COD)Cl]_2/(S,S$  또는  $R,R)-Diop$ ,  $[Ir(COD)Cl]_2/(R$  또는  $S)-P-Phos$ ,  $[Ir(COD)Cl]_2/(R$  또는  $S)-Tol-P-Phos$ ,  $[Ir(COD)Cl]_2/(R$  또는  $S)-Xyl-P-Phos$ ,  $[Ir(COD)Cl]_2/(R,R$  또는  $S,S)-Me-DuPhos$ ,  $[Ir(COD)Cl]_2/(R$  또는  $S)-SegPhos$ ,  $[Ir(\mu-Cl)(cod)]_2/(R$  또는  $S)-Ship$ ,  $[Ir(\mu-Cl)(cod)]_2/(R$  또는  $S)-Siphos$ ,  $[Ir(\mu-Cl)(cod)]_2/(R$  또는  $S)-Siphos-PE$ ,  $[Ir(\mu-Cl)(cod)]_2/(R$  또는  $S)-MonoPhos$ ,  $[Ir(\mu-Cl)(cod)]_2/(R$  또는  $S)-tol-SDP$ ,  $[Ir(\mu-Cl)(cod)]_2/(S,S$  또는  $R,R)-Diop$ ,  $[Ir(\mu-Cl)(cod)]_2/(S,R$  또는  $R,S)-Josiphos$ ,  $[Ir(\mu-Cl)(cod)]_2/(R$  또는  $S)-Binap$ ,  $[Ir(\mu-Cl)(cod)]_2/(R$  또는  $S)-MeO-Biphep$ ,  $[Ir(\mu-Cl)(cod)]_2/(R$  또는  $S)-Synphos$ , 또는  $[Ir(\mu-Cl)(cod)]_2/(R$  또는  $S)-Difluorphosor [Ir(cod)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>X<sup>-</sup>$  (X: e.g.  $BF_4^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $OTf^-$ ,  $PF_6^-$ ,  $SbF_6^-$  및  $BarF$ )와 같은 리간드(Wen-Bo *et al.*, *J. AM. CHEM. SOC.* 125, 10536–10537 2003. Damien *et al.*, *J. Org. Chem.* 77, 4544–4556, 2012. Milos *et al.*, *Org. Process Res. Dev.* 16, 1293–1300, 2012.); 상기  $[Rh(COD)]_2BF_4$  와 같은 리간드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 로듐 촉매 시스템(Xiang-Ping et al., *Top Organomet. Chem.* 36, 313–354, 2011); 또는  $RuCl_2(R$  또는  $S)-BINAP/(R$  또는  $S)-DAIPEN$ ,  $RuCl_2(R$  또는  $S)-BINAP/(R,R$  또는  $S,S)-DPEN$ ,  $RuCl_2(S$  또는  $R)-BINAP$  ( $S,S$  또는  $R,R)-DACH$ ,  $RuCl_2[(R$  또는  $S)-Tol-BINAP][(S,S$  또는  $R,R)-DPEN]$ ,  $RuCl_2(R,R$  또는  $S,S)-Me-DuPHOS/(R,R$  또는  $S,S)-DPEN$ ,  $RuCl_2(R,R$  또는  $S,S)-Et-DuPHOS/(R,R$  또는  $S,S)-DPEN$ ,  $RuCl_2(R,R$  또는  $S,S)-Et-DuPHOS/(R,R$  또는  $S,S)-DACH$ ,  $RuCl_2(S,S$  또는  $R,R)-i-Pr-DuPHOS/(R,R$  또는  $S,S)-DPEN$ ,  $RuCl_2(R$  또는  $S)-HexaPHEMP/(R,R$  또는  $S,S)-DPEN$ ,  $RuCl_2(R$  또는  $S)-MeO-BIPHEP/(R,R$  또는  $S,S)-DPEN$ 를 포함하는 루테늄 촉매 시스템(ruthenium catalyst system)으로 이에 한정되지 않는다(Christopher et al., *Adv. Synth. Catal.* 345, 195–201, 2003. Julian *et al.*, *Adv. Synth. Catal.* 345, 300–307, 2003).

상기 방법은 특히 중성 또는 양이온 이리듐 촉매 시스템의 촉매를 사용하여 95 % ee까지 우수한 거울상 이성질체의 선택성(enantio selectivities)을 생성하는 것으로 확인되었다. 또한, 본 발명은 화학식 IIa의 라세미 화합물을 키랄산으로 처리하는 것을 포함하는, 화학식 IIa의 화합물을 분해하여 화학식 IIb의 화합물을 제조하거나, 또는 화학식 IIb의 화합물의 키랄 순도를 향상시키는 방법으로,



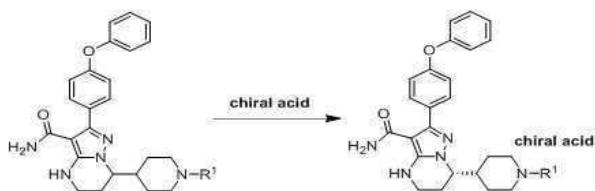
화학식 IIa

화학식 IIb

R1은 수소, 메틸, 베질, 4-메톡시베질 또는 기타 종래의 아미노 보호기이다.

본 발명의 키랄산은 L-말산(L-malic acid), D-말산(D-malic acid), L-만델산(L-Mandelic acid), D-만델산(D-Mandelic acid), L-캄포술폰산(L-camphorsulfonic acid), D-캄포르술폰산(D-camphorsulfonic acid), L-타르타르산(L-tartaric acid), D-타르타르산(D-tartaric acid), L-DBTA, D-DBTA, L-DTTA 또는 D-DTTA를 포함한다.

또한, 화학식 Ic의 라세믹 화합물을 키랄산으로 처리하는 것을 포함하는, 화학식 Ic의 화합물을 분해하여 화학식 Id의 화합물을 생성하거나 화학식 Id의 키랄 순도를 향상시키는 방법으로.



[0090]

화학식 Ic

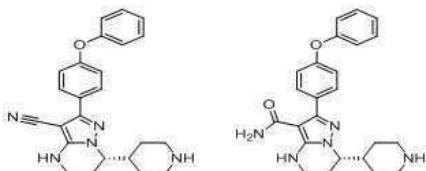
화학식 Id

R1은 수소, 메틸, 벤질, 4-메톡시벤질 또는 기타 종래의 아미노 보호기이다.

본 발명의 키랄산은 L-말산, D-말산, L-만델산, D-만델산, L-캄포솔폰산, D-캄포르솔폰산, L-타르타르산, D-타르타르산, L-DBTA, D-DBTA, L -DTTA 또는 D-DTTA를 포함한다.

[0094]

또한 본 발명의 화합물 1을 제조하는데 사용된 화학식 Ie의 화합물 또는 그의 염, 또는 화학식 또는 그의 염은 다음과 같다:



[0095]

화학식 Ie

화학식 If.

또한, 본 발명의 결정형 A의 제조 방법을 제공한다. 결정형은 본 발명에 개시된 화합물을 용매 시스템에서 과포화를 달성하기 위하여 자발적 침전(spontaneous precipitation(증발)), 냉각 및/ 또는 항-용매(개시된 화합물은 비교적 낮은 용해도를 가짐)의 방법에 의해 달성될 수 있는 적어도 하나의 용매를 포함하는 적합한 용매 시스템으로부터 본 발명에 개시된 화합물을 결정화함으로써 제조될 수 있다. 결정화는 또한 본 발명에 개시된 결정형을 적합한 결정화하기에 결정 시드(crystal seeds)를 사용하거나 사용하지 않음으로써 달성될 수 있다.

[0098]

본 발명에서 결정형 A를 제조하는 방법은 (S)-7-(1-acryloylpiperidin-4-yl)-2-(4-phenoxyphenyl)-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide(화학식 1)을 DCM에 용해시키고, 용매 EA로 교환하고, EA/MTBE로부터 재결정화시켜 타겟 결정형을 수득하는 단계를 포함한다.

[0099]

본 발명의 결정형 A를 제조하는 방법은 화합물 1을 EA에 용해시키고, 헥сан을 첨가하여 타겟 결정형을 수득하는 단계를 포함한다. 결정형 A의 제조 방법은 고형 화합물 1 또는 크루드형 A(crude Form A)의 용액에 고체를 용해시키기 위한 용매 중에서 항-용매를 첨가함으로써 달성되며, 항-용매는 H<sub>2</sub>O 및 n-헵탄을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 및 고체를 용해시키기 위한 용매는 DMAc, EtOAc, DCM, 톨루엔 및 2-MeTHF를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0100]

본 발명의 결정형 A의 제조 방법은 용매 중 고체 화합물 1 또는 크루드형 A의 용액을 항-용매에 첨가하고, 유기 증기가 밀봉된 반응기에서 용액과 상호 작용하기에 충분한 시간을 허용함으로써 달성되며, 용매는 아세톤, 및 에틸아세테이트(EtOAc)를 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 및 항-용매는 n-헵탄을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0101]

본 발명의 제약 조성물은 치료적 유효량의 결정형 A 및 제약상 허용되는 부형제(excipient)를 포함한다. 일부 실시 예에서, 약제학적 조성물은 경구 투여에 사용된다. 일부 바람직한 실시 예에서, 약제학적 조성물은 1 중량 % 내지 99 중량 %의 결정형 A를 포함한다. 본 발명의 보다 바람직한 실시 예에서, 약제학적 조성물은 1 중량 % 내지 70 중량 %의 결정형 A를 포함한다. 본 발명의 실시 예에서, 제약 조성물은 10 중량 % 내지 30 중량 %의 결정형 A를 포함한다.

[0102]

본 발명은 또한 개체에 결정형 A를 투여함으로써 개체에서 바람직하지 않은 Btk 활성과 관련된 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

[0103]

본 발명은 또한 개체에게 결정형 A를 투여함으로써 알레르기 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환, 암 또는 이들 중 둘 이상의 조합으로부터 선택된 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

- [0104] 본 발명은 또한 결정형 A를 개체에게 투여함으로써 개체에서 B-세포 증식성 질환(B-cell proliferative disease)을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.
- [0105] 본 발명의 B-세포 증식성 질환은 B-세포 악성 종양이고, 림프종(lymphoma), 비-호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma, NHL), 미만성 거대B세포 림프종(diffuse large B cell lymphoma, DLBCL), 외투세포 림프종(mantle cell lymphoma, MCL), 소포성 림프종(follicular lymphoma, FL), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL), 소형 림프구성 림프종(small lymphocytic lymphoma, SLL), 왈덴스트룀 마크로글로불린혈증(Waldenstroms macroglobulinemia, WM), 변연부 림프종(m marginal zone lymphoma, MZL), 모양세포성 백혈병(Hairy cell leukemia, HCL), 버킷-유사 백혈병(Burkitt's-like leukemia, BL)을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0106] 일부 실시 양태에서, B 세포 증식성 질환은 R/R MCL, R/R CLL, R/R SLL, R/R WM를 포함하지만 이에 한정되는 재발성/난치성(relapsed/refractory, R/R) B 세포 악성 종양이다.
- [0107] 본 발명의 결정형 A는 개체에서 바람직하지 않은 Btk 활성과 관련된 적어도 하나의 질병을 치료하기 위한 약제를 제조하는데 사용될 수 있다.
- [0108] 본 발명의 결정형 A는 개체에서 알레르기 질환, 자가면역 질환, 염증성 질환, 암 또는 이들 중 둘 이상의 조합으로부터 선택된 질환의 치료용 약제를 제조하는데 사용될 수 있다.
- [0109] 본 발명의 결정형 A는 개체에서 B-세포 악성 종양 또는 재발성/난치성 B-세포 악성 종양 중에서 선택된 B-세포 증식성 질환을 치료하기 위한 약제를 제조하는데 사용될 수 있다.
- [0110] 업데이트된 임상 시험은 화합물 1이 치료 나이브(treatment naive, TN) 및 재발성/난치성(R/R) B 세포 악성 종양에서 잘 견디고 있음을 증명하고 있으며, 예를 들어 WM에서 42 명의 평가 가능한 집단에서 40 % 이상의 매우 우수한 부분 응답(very good partial response, VGPR) 비율을 보였으며, 42 명의 유효 평가 가능한 개체에서 전체 반응률(overall response rate, ORR)의 90%(CLL/SLL)에서 유효성 평가를 위한 12.3 개월의 중간 추적 관찰 기간(median follow-up time) 동안 전체 반응률(94 %)이 높았으며, 및 효능 평가를 위한 10.5 개월의 중간 추적 관찰에서 매우 낮은 치료 중단률(3 %)을 나타내었다.
- [0111] 정의(Definitions)**
- [0112] 본 명세서의 다른 곳에서 구체적으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 다른 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다.
- [0113] 첨부 된 청구 범위를 포함하여 본원에서 사용 된 바와 같이, "a", "an" 및 "the"와 같은 단수 형태의 단어는 그 문맥이 다르게 지시하지 않는 한 그들의 대응하는 복수 참조를 포함한다.
- [0114] 따라서, 예를 들어 "결정형"에 대한 언급은 그러한 상이한 결정형 중 하나 이상을 포함하고, "방법"에 대한 언급은 본원에 기술 된 방법을 위해 변형되거나 대체 될 수 있는 당업자에게 공지된 균등한 단계 및 방법에 대한 언급을 포함한다.
- [0115] 본원에 개시된 바와 같이, 결정형은 대략 순수한 결정이다. 본원에서 사용되는 용어 "대략 순수한"은 본원에 개시된 결정형 A의 85 중량 % 이상, 바람직하게는 95 중량 % 이상, 더욱 바람직하게는 99 중량 % 이상을 의미한다.
- [0116] 본원에 개시된 결정형에 있어서, 메인 피크(즉, 가장 특징적인, 중요한, 유일한 및/또는 재현 가능한 피크)는 요약되며; 추가적인 피크는 통상적인 방법에 의해 회절 스펙트럼으로부터 얻어질 수 있다. 위에서 설명한 메인 피크는 오차 범위(마지막 소수점 자리에서 ± 2 또는 명시된 값에서 ± 0.2) 내에서 재현될 수 있다.
- [0117] 본 발명에 개시된 바와 같이, "실질적으로 도 1과 일치하는 X-선 분말 회절 패턴"은 도 1과 같이 주요 피크를 나타내는 X-선 분말 회절 패턴을 나타내며, 주요 피크는 도 1의 최고 피크(상대 강도가 100 %로 지정됨)에 비해 10 % 초과, 바람직하게는 20 % 초과의 상대 강도를 갖는 피크를 지칭한다.
- [0118] 본 발명 및 특히 청구 범위 전반에 걸쳐서, 문맥상 달리 요구되지 않는 한, 단어 "포함한다" 및 "포함하는" 및 "구성하는"과 같은 변형은 명시된 인테거(stated integer) 또는 단계 또는 인테거(integer)의 그룹 또는 단계를 함축하지만, 다른 인테거(integer) 또는 단계 또는 인테거(integer)의 그룹은 배제하지 않음을 의미하는 것으로 이해될 것이다. 본원에서 사용된 용어 "포함하는"은 용어 "포함하는" 또는 때로는 용어 "갖는"과 함께 사용될

때 대체될 수 있다.

- [0119] 본 발명에서 사용된 용어 "치료학적 유효량"은 질병, 또는 질병이나 장애의 임상 증상 중 적어도 하나를 치료하기 위해 환자에게 투여하는 경우, 질병, 장애, 또는 증상에 대한 이러한 치료에 영향을 미치기에 충분한 화합물의 양을 지칭한다. "치료학적 유효량"은 화합물, 질환, 장애 및/또는 질환 또는 장애의 증상장애의 증상, 치료 받을 개체의 연령, 및/또는 치료받을 개체의 체중에 따라 다양할 수 있다. 임의의 주어진 경우에서 적절한 양은 당업자에게 명백 할 수 있거나 통상적 인 실험에 의해 결정될 수 있다. 병용 요법의 경우, "치료학적 유효량"은 질환, 장애 또는 상태의 효과적인 치료를 위한 병용 대상의 총량을 의미한다.
- [0120] 본원에 개시된 화합물을 포함하는 약학 조성물은 이를 필요로 하는 대상에게 경구, 흡입(inhalation), 직장(rectal), 비경구(parenteral) 또는 국소 투여를 통해 투여될 수 있다.
- [0121] 경구 투여의 경우, 약제학적 조성물은 알약(tablets), 분말, 과립제, 캡슐 등과 같은 일정한 고형 제제, 물 또는 오일 혼탁액 또는 시럽, 용액, 혼탁액 등과 같은 액체 제제; 비경구 투여를 위해, 제약 조성물은 용액, 수용액, 오일 혼탁 농축 물, 감압 건조 분말 등일 수 있다. 바람직하게는, 약제학적 조성물의 제제는 알약, 코팅된 알약, 캡슐, 좌약(suppository), 비강 스프레이 또는 주사로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 보다 바람직하게는 알약 또는 캡슐에서 선택된다. 약제학적 조성물은 정확한 투여량을 갖는 단일 단위 투여 일 수 있다. 또한, 약제학적 조성물은 추가적인 활성 성분을 추가로 포함 할 수 있다.
- [0122] 본원에 개시된 제약 조성물의 모든 제형은 제약 분야의 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 활성 성분을 하나 이상의 부형제와 혼합하여 원하는 제형으로 제조할 수 있다. "약제학적으로 허용되는 부형제"는 목적하는 약학적 제형에 적합한 통상적인 약학적 담체를 의미하며, 예를 들어: 희석제, 물, 다양한 유기 용매 등의 비히클, 전분, 수크로즈 등의 필러, 셀룰로스 유도체, 알긴산 염, 젤라틴 및 폴리비닐피롤리돈(PVP)과 같은 결합제; 글리세롤과 같은 습윤제; 한천, 탄산 칼슘 및 중탄산 나트륨과 같은 붕해제(disintegrating agent); 4급 암모늄화합물(tertiary ammonium compound)과 같은 흡수 촉진제; 헥사데칸올(hexadecanol)과 같은 계면 활성제(surfactant); 카올린(Kaolin) 및 비누 클레이(soap clay)와 같은 흡수 담체(absorption carrier); 활석(talc), 칼슘 스테아레이트(calciun stearate), 마그네슘 스테아레이트(magnesium stearate), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol) 등과 같은 윤활제(lubricant)가 있다. 또한, 제약 조성물은 분산제(decentralized agent), 안정화제, 증점제(thickener), 착화제(complexing agent), 완충화제, 투과 촉진제, 종합체, 방향제, 감미제 및 염료와 같은 다른 약학 적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함한다.
- [0123] 용어 "질환"은 임의의 질환, 불편함(discomfort), 질병(illness), 증상 또는 징후를 지칭하며, 용어 "장애" 또는 "상태"와 상호 교환 가능할 수 있다.

[0124]

## 약어(Abbreviations)

BzON	아세트산(Acetic acid)
BS	비상반응(Observe excess)
BID	하루에 주입(Dose a day)
CLL	화성 릴프구(화학 치료학적 치료법)(Chemical lymphocyte therapy)
Cos.	농축액(Concentrated)
D-BHA	2-(3, 5)-디에토일-4-히드록시-1, 4-헵타enoic acid(2-(3, 5)-Dihydroxy-1, 4-heptenoic acid)
DIC	2-(3, 5)-디에토일-4-히드록시-1, 4-헵타enoic acid(2-(3, 5)-Dihydroxy-1, 4-heptenoic acid)
DCM	디클로로 메탄(Dichloromethane)
DIB	2-(3, 5)-디에토일-4-히드록시-1, 4-헵타enoic acid(2-(3, 5)-Dihydroxy-1, 4-heptenoic acid)
DIBCL	미량 질 거리에포 페놀(1, 4-dioxane, 1, 4-dihydroxy-1, 4-phenylene)
DIMC	2-(3, 5)-디에토일-4-히드록시-1, 4-헵타enoic acid(2-(3, 5)-Dihydroxy-1, 4-heptenoic acid)
DME	2-(3, 5)-디에토일-4-히드록시-1, 4-헵타enoic acid(2-(3, 5)-Dihydroxy-1, 4-heptenoic acid)
DME-DMA	2-(3, 5)-디에토일-4-히드록시-1, 4-헵타enoic acid(2-(3, 5)-Dihydroxy-1, 4-heptenoic acid)
DMSO	디에틸су리다이아이드(Dimethyl sulfoxide)
DSC	각자주식 면역체(Selective T-cell Immune Cellotherapy)
DVS	동적 물기흡수(Dynamic Water Sorption)
EI	에틸리제이트(Ethyl acetate, EtOAc)
EDCI	2-(3, 5)-디에토일-4-히드록시-1, 4-헵타enoic acid(2-(3, 5)-Dihydroxy-1, 4-heptenoic acid)
EDT	에탄올(Ethanol)
EL	소포질 링크족(Sophocularia Linkage)
GC	가스 크로마토그래피(Gas Chromatography)
GOMS	가스 크로마토그래피-질량분석기(Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
HAc	아세트산(Acetic acid)
HOEt	아세트아이소프로필아이드(Hydroxypropanoyletide)
HPLC	고정상 배열 크로마토그라피(High Performance Liquid Chromatography)
IPE	미소프로필-글루코신(Mannosyl glucose)
IPNC	미소프로필-아세테이트(Mannosyl acetate)
IPC	공정 국·제작(Production Control)
KF	란·카르(Kar·Kucher)
L-BHA	2-(3, 5)-디에토일-4-히드록시-1, 4-헵타enoic acid(2-(3, 5)-Dihydroxy-1, 4-heptenoic acid)
LGR	검증·국정(Limit of Quantification)
MCL	미루어포 링크족(Macrocyclic linkage)
NaOH	아세토니트릴(Acetonitrile)
NH	아민(Amine)
Nal-Br	비탄 대그리움 보호다이트(Bisethyl Naloxonium Bromide)
NoOH	비탄 환(Barbiturate)
O-HATB	3-비탄데 드란 아트로부린(3-Naloxylconhydrin)
NBEB	4-비탄-2-에트라노(4-Naloxyl-2-propanone)
NLOH	비탄 윤증(Barbituric acid)
NZBE	비탄 티트-부탄 에테르(3-Naloxyl-2-propyl ether)
NHL	비-호스팅(Nonsedating)
NLR	라이트(Low light)
NMF	1-비탄-2-피롤리온(3-Naloxyl-2-pyrrolidone)
NMR	핵 자기공명(Nuclear Magnetic Resonance)
NPA	고 비탄(High dose)
OPB	피와 헥사侵害(Hexanal damage)
Pd	풀다금(Palladium)
sH	수소 이온(Hydronium ion concentration)
POB	개복식화제원(Polyoxyacetyl)
QD	하루 1회(Dose a day)
RH	상대습도(Relative Humidity)
SLL	소재 링크족(Sophocularia Linkage System)
ZT	생존(Rate Survival)
ZB	트리에탄올아민(Triethylamine)
ZG	영 우수 물리(Excellent physical)
ZHE	데트란 히드로부린(Desmhydrin)
ZH	지포-나이트्र로(azotri-
ZGFR	세구 우수 물리 물질(Cryopreserved material)
AFB	A세 풍진 치료(Anti-Rabies Treatment)
UN	유엔스드류 디크로든 고통완경제(Uneanthesma macrolactisine)

[0125]

## 실시 예

[0126]

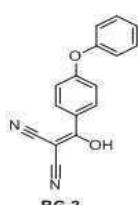
본 발명은 본 발명을 예시하는 다음의 실시 예에 의해 제한되지는 않지만 더 예시된다.

[0127]

실시 예 1 (S)-7-(1-아크릴로일파페리딘-4-일)-2-(4-페녹시페닐)-4, 5, 6, 7-테트라-하이드로파리졸로 [1,5-A] 페리미딘-3-카르복스아미드(화합물 1)의 제조 방법 및 이의 결정형 A

[0128]

1 단계 : BG-2의 합성

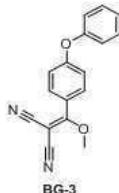


[0129]

질소 분위기에서, EA(5v), HOBT(1.2eq.), EDCI(1.2eq.), 4-페녹시벤조산(4-phenoxybenzoic acid)(BG-1, 80Kg, 1.0 당량) 및 말로노니트릴(malononitrile)(1.2 eq.)의 용액에 10°C에서 TEA(2.4 당량)를 첨가하였다. 이어서, 반응이 완료될 때까지 혼합물을 실온에서 교반하였다. 혼합물을 원심 분리하고 케이크(cake)를 EA로 세척하였다. 여과액을 수성 NaHCO<sub>3</sub>로 2회 세척하고 NH<sub>4</sub>Cl로 세척하였다. 유기상을 1.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 2 회 세척하고 교반하였다. 농축시켜, 메탄올에서 침전시키 후 물로 정제하였다. 고체를 원심 분리하여 수득 후 진공 건조시켰다. 79.9kg의 BG-2를 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.62 (d, J = 8.6Hz, 2H), 7.46-7.38 (m, 2H), 7.18

(t,  $J = 7.4\text{Hz}$ , 1H), 7.06 (d,  $J = 8.0\text{Hz}$ , 2H), 6.94 (d,  $J = 8.6\text{Hz}$ , 2H).

[0132]

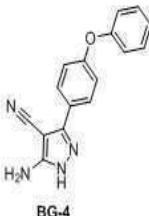
2 단계: BG-3의 합성

[0133]

[0134]

질소 분위기에서, MeCN(5.0 v)중 BG-2(79.9 kg, 1.0 eq.)의 용액을 85 °C에서 트리메톡시메탄(trimethoxymethane)(12.0 v)에 첨가 하였다. 생성된 혼합물을 반응이 완료될 때까지 교반하였다. HPLC 분석을 위하여 샘플링 되었다. 진공 상태에서 농축시켰다. 잔류물은 i-PrOH 및 헥산으로부터 침전시켰다. 혼합물을 원심 분리하여 케이크를 헥산으로 세척하고 진공 건조시켰다. 71.7Kg의 생성물을 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR ( $400\text{ MHz}$ , DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.70 (d,  $J = 8.4\text{ Hz}$ , 2H), 7.52–7.45 (m, 2H), 7.28 (t,  $J = 7.6\text{ Hz}$ , 1H), 7.22–7.06 (m, 4H), 3.93 (s, 3H).

[0135]

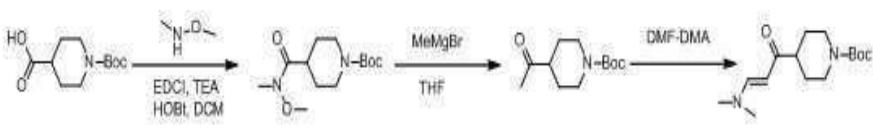
3 단계: BG-4의 합성

[0136]

[0137]

질소 분위기에서, 에탄올(0.6 v)중 히드라지늄 수산화물(1.0 eq.) 에탄올(2.5 v)중 BG-3(71.6 kg, 1.0 당량)의 용액을 15 °C 이하에서 반응기에 적가하였다(charged dropwise). 용액을 실온으로 가열하고 반응이 완료될 때까지 교반하였다. 물(4.0 v)을 반응기에 첨가하였다. 그런 다음 용액을 5 °C로 냉각시키고 원심 분리하여 케이크를 물(1.0 v)로 세척 하였다. 케이크를 진공 건조시켰다. 66.9 Kg의 생성물을 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  12.11 (br s, 1H), 7.80 (d,  $J = 8.8\text{ Hz}$ , 2H), 7.46–7.39 (m, 2H), 7.18 (t,  $J = 7.6\text{ Hz}$ , 1H), 7.12–7.04 (m, 4H), 6.43 (br s, 2H).

[0138]

4-6 단계: BG-8의 합성

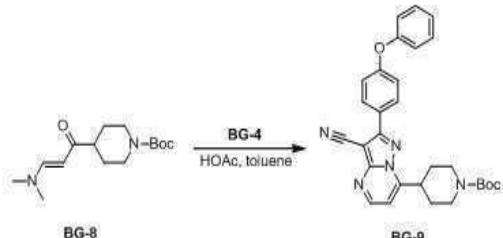
[0139]

[0140]

DCM(8.0 v), BG-5(80.0 Kg, 1.0 eq.), N,O-디메틸히드록실아민히드로 클로라이드(*N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride)(1.2 eq.), HOEt(1.2 eq.) 및 EDCl(1.2 eq.), TEA(2.6 eq.) 의 혼합물을 15 °C 이하에서 적가하였다. 반응이 완료 될 때까지 혼합물을 실온에서 교반하고, 원심 분리하여, 케이크를 DCM (1.0 v)으로 2 회 세척하였다. 여과액을 20 % 수성 NH<sub>4</sub>Cl(3 X 4.0 v)로 세척하였다. 여과액을 진공 조건에서 농축시켜 크루드 생성물 BG-6을 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용 하였다. 잔류 물을 틀루엔 (5.0 v) 및 THF (1.0 v)에 용해시키고, 10 °C로 냉각시킨 후, 10 °C에서 MeMgBr(1.4 eq.)으로 적가한 다음, 반응이 완결될 때까지 실온에서 교반하였다. 용액을 10 °C 이하로 냉각시켰다. 포화 수성 NH<sub>4</sub>Cl을 10 °C 이하에서 적가하였다. 혼합물을 원심 분리하고, 분리하여, 여과하고, 유기상을 수성 NaCl로 2 회 세척하였다. 유기상을 농축하여 크루드 생성물을 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용 하였다. DMF(2.5 v) 및 DMF-DMA(2.5 v)중 잔류물을 반응이 완료될 때까지 110 °C에서 교반하였다. 반응 혼합물을 냉각시키고, 농축시킨 다음 DCM을 첨가 하였다. 최종 혼합물을 포화 수성 NH<sub>4</sub>Cl로 세척 하였다. 유기층을 농축시키고 헥산을 충전하여 침전시켰다. 혼합물을 원심 분

리하여 케이크를 수득하였다. 케이크를 진공 건조시켰다. 82.2kg의 목적 생성물을 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  7.49 (d,  $J = 12.6$  Hz, 1H), 5.01 (d,  $J = 12.6$  Hz, 1H), 3.99-3.82 (m, 2H), 3.14-2.94 (m, 2H), 2.89-2.61 (m, 6H), 2.49-2.37 (m, 1H), 1.66-1.56 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.39-1.20 (m, 2H).

[0141]

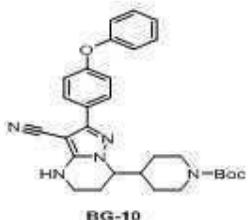
7 단계: BG-9의 합성

[0142]

[0143]

질소 분위기에서, 톨루엔(8.0 v), AcOH(0.5 v), BG-8(1.2 eq.) 및 BG-4 (66.9 kg 1.0 eq.)의 혼합물을 95 °C로 가열하고 반응이 완료될 때까지 교반 하였다. 혼합물을 냉각시키고, 농축시켜 메탄올로 침전시켰다. 혼합물을 원심 분리하고, 케이크를 메탄올로 세척하였다. 케이크를 진공 건조시켰다. 107.8 Kg의 생성물을 수득하였다.  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  8.78 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 8.15-8.07 (m, 2H), 7.51-7.41 (m, 2H), 7.34 (d,  $J = 4.6$  Hz, 1H), 7.27-7.19 (m, 3H), 7.17-7.10 (m, 2H), 4.24-4.02 (m, 2H), 3.81-3.69 (m, 1H), 3.12-3.82 (m, 2H), 2.15-2.04 (m, 2H), 1.76-1.60 (m, 2H), 1.43 (s, 9H).

[0144]

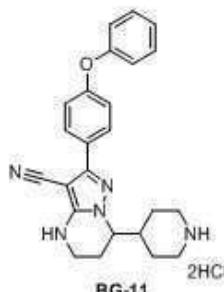
8 단계: BG-10의 합성

[0145]

[0146]

$\text{N}_2$  조건에서 THF(10.0 v), BG-9(13.0 kg, 1.0 eq.) 및 D-DBTA (1.0 eq.)의 혼합물에 Pd/C(10 % w/w)를 충전시키고, 수소 가스를 반응기에 공급하고, 수소 압력은 1.8 MPa로 유지시켰다. 반응기를 40 °C로 천천히 가열하고 반응이 완료될 때까지 교반하였다. 이어서, 혼합물을 냉각시키고, 여과 후, 케이크를 THF로 세척하였다. 여과액을 수득하고 진공 조건에서 농축시켰다. DCM을 첨가하였다. 잔류물을  $\text{NaHCO}_3$  수용액(aq.  $\text{NaHCO}_3$ )으로 농축시키고 MTBE 및 헥산으로 침전시킨 다음 원심 분리하였다. 케이크를 수득하고 진공 조건에서 건조시켜 목적 화합물을 수득하였다(수율 94.8 % 및 순도 98.5 %).  $^1\text{H}$ -NMR (DMSO- $\text{d}_6$ )  $\delta$  7.82-7.76 (m, 2H), 7.56-7.51 (m, 1H), 7.45-7.37 (m, 2H), 7.21-7.14 (m, 1H), 7.12-7.03 (m, 4H), 4.09-3.91 (m, 3H), 3.30-3.22 (m, 2H), 2.82-2.55 (m, 2H), 2.18-1.99 (m, 2H), 1.98-1.86 (m, 1H), 1.69-1.58 (m, 1H), 1.56-1.45 (m, 1H), 1.38 (s, 9H), 1.32-1.13 (m, 2H).

[0147]

9 단계: BG-11의 합성

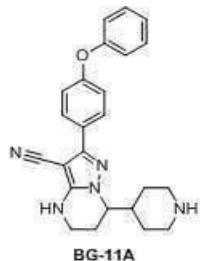
[0148]

[0149]

DCM (6.0 v) 중 BG-10(100.0 Kg 1.0 eq.)의 용액에 질소 대기 조건에서 EtOH 중  $\text{HCl}(20.9 \% \text{ w/w}, 2.0 \text{ v})$ 로 적

가하였다. 반응이 완료될 때까지 혼합물을 교반하였다. MTBE(4.0 v)를 용액에 첨가하고 냉각시켰다. 케이크를 원심 분리로 수득하고 헥산(2.0 V)으로 세척한 다음 케이크를 헥산(5 v)에서 슬러리화하고 다시 원심 분리하였다. 케이크를 헥산(2.0 V)으로 세척하고 진공 건조시켰다. 85.2 kg의 생성물을 수득하였다.  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  9.25–8.85 (m, 2H), 7.84–7.70 (m, 2H), 7.47–7.37 (m, 2H), 7.18 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.12–7.03 (m, 4H), 5.73 (br s, 2H), 4.12–4.03 (m, 1H), 3.25–3.19 (m, 4H), 2.90–2.73 (m, 2H), 2.28–2.12 (m, 1H), 2.10–2.00 (m, 1H), 1.99–1.86 (m, 1H), 1.84–1.52 (m, 4H).  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  9.25–8.85 (m, 2H), 7.84–7.70 (m, 2H), 7.47–7.37 (m, 2H), 7.18 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.12–7.03 (m, 4H), 5.73 (br s, 2H), 4.12–4.03 (m, 1H), 3.25–3.19 (m, 4H), 2.90–2.73 (m, 2H), 2.28–2.12 (m, 1H), 2.10–2.00 (m, 1H), 1.99–1.86 (m, 1H), 1.84–1.52 (m, 4H).

[0150] 10 단계: BG-11A의 합성



[0151]

물(6.0 v) 및 NaOH(3.0 eq.)중 BG-11(85.0 kg, 1.0 eq.)의 혼합물을 상온(RT)에서 반응이 완료될 때까지 교반하였다. 케이크를 모아 MTBE(6.0 v)에서 슬러리화하였다. 혼합물을 원심 분리하여 케이크를 수득하였다. 케이크를 진공 건조시켰다. 71.3 Kg의 생성물을 수득하였다.  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  7.82–7.74 (m, 2H), 7.54–7.49 (m, 1H), 7.45–7.38 (m, 2H), 7.21–7.14 (m, 1H), 7.12–7.04 (m, 4H), 4.03–3.95 (m, 1H), 3.29–3.21 (m, 2H), 3.00–2.87 (m, 2H), 2.46–2.31 (m, 2H), 2.11–1.83 (m, 3H), 1.58–1.12 (m, 4H).

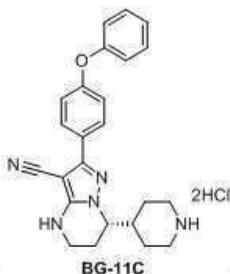
[0153] 11 단계: BG-11B의 합성



[0154]

반응기에 에탄올/물/아세트산 (7:3:1, 46 v) 및 BG-11A (30 kg, 1.0 eq.)의 혼합물을 질소 조건에서  $70 \pm 5^\circ\text{C}$ 로 가열한 다음, 에탄올/물/아세트산 (7 : 3 : 1, 4v)에서 D-DBTA(1.20 당량)의 용액을  $65^\circ\text{C}$  이상의 온도에서 적가 하였다. 생성된 용액을 16 시간 동안 60 내지  $65^\circ\text{C}$ 에서 교반한 다음 실온으로 냉각시켰다. 고체를 원심 분리하여 수득하고 에탄올(2.0 v)로 세척하였다. 케이크를  $55^\circ\text{C}$ 에서 16 시간 동안 에탄올/물/AcOH(7: 3: 1, 20 v)의 혼합 용매에서 슬러리화킨 후 실온으로 냉각시켰다. 고체를 원심 분리하여 수득하고 에탄올(2.0 v)로 세척하였다. 케이크를 진공 건조하였다(수율: 37.9 %).  $^1\text{H-NMR}$  (DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  8.76 (br s, 2H), 7.99–7.89 (m, 4H), 7.83–7.75 (m, 2H), 7.66–7.57 (m, 3H), 7.52–7.45 (m, 4H), 7.45–7.39 (m, 2H), 7.21–7.14 (m, 1H), 7.13–7.03 (m, 4H), 5.64 (s, 2H), 4.08–4.00 (m, 1H), 3.29–3.19 (m, 4H), 2.85–2.72 (m, 2H), 2.21–1.40 (m, 7H).

[0156]

12 단계: BG-11C의 합성

[0157]

[0158]

실온의 질소 대기 조건에서 디클로로메탄(15.0v) 및 20.0% 수성 KOH (3.0v)의 혼합물에 박크와이즈(bachwise) BG-11B (48.0kg, 1.0 당량)를 첨가하였다. 반응이 완료된 후, 유기층을 수득하고, 수층(water layer)을 디클로로메탄(5.0 v)으로 추출하였다. 유기층을 혼합하였다. 농축된 HCl(Con. HCl)(0.36 v)은 실온에서 상기 유기층에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 반응이 완료될 때까지 교반하였다. 고체를 원심 분리에 의해 수집하고 디클로로메탄(1.0 v)으로 세척하였다. 수득된 고체를 MTBE(6.0 v)로 슬러리화 하였다. 고체를 원심 분리하여 MTBE (1.0 v)로 세척한 다음, 진공 건조시켰다. 31.5 kg의 생성물을 수득하였다(수율 : 100 %).

[0159]

12 단계: BG-11D(중간 대체물, Alternative intermediate)의 합성

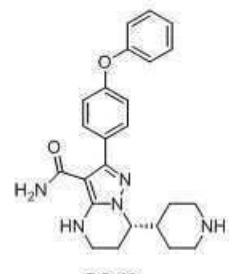
[0160]

연수(soft water)(10.0v), KOH(5.0 eq.)의 ACN(5.0v)을 반응기에 채우고 적어도 15분 동안 교반하였다. BG-11B (1.0 eq)는 부분적으로 반응기에 충진하였다. 반응이 완료 될 때까지 혼합물을 교반 하였다.

[0161]

케이크를 원심 분리하고, ACN(1.0 v) 및 연수(5.0 v)에서 슬러리 화하고, 진공 건조시켜 생성물을 수득하였다.

[0162]

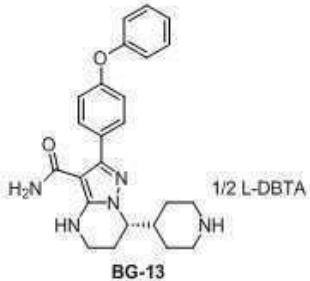
13 단계: BG-12의 합성

[0163]

[0164]

MsOH(2.5 v)중 BG-11C(15.0 Kg 1.0 eq.)의 용액을 반응이 완료될 때까지 85 °C의 질소 대기 조건에서 교반하였다. 다음 5 °C로 냉각시켰다. 정제수 (4.0v)를 시스템에 적가하고 온도를 35 °C 이하로 유지시켰다(명백하게 온도가 상승함). 생성된 용액을 30 °C에서 16 시간 동안 교반한 후, DCM(2 X 3.0 v)으로 세척하였다. 수성상(aqueous phase)을 수득하였다. DCM (6.0 v)을 수성상에 첨가하고, 혼합물을 5 °C로 냉각시켰다. 30 °C 이하의 온도에서 교반하면서 20 % 수산화 NaOH(명백하게 온도가 상승한)로 pH 값을 11-12로 조정 하였다. 유기상을 분리하고 수득하였다. 수성 물질을 DCM(3.0 v)로 추출하였다. 유기층을 혼합하고 농축시켰다. MTBE(4.0 v)를 잔류물에 첨가 하였다. 이어서, 혼합물을 농축시키고 n- 헵тан으로부터 침전시켰다. 고체를 원심 분리하여 모으고 진공 오븐에서 건조시켰다. 12.55kg의 생성물이 수득되었다 (수율: 94.9 %).  $^{1}\text{H}$ -NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.52-7.46 (m, 2H), 7.45-7.38 (m, 2H), 7.21-7.13 (m, 1H), 7.12-7.03 (m, 4H), 6.64 (s, 1H), 3.99-3.90 (m, 1H), 3.29-3.22 (m, 2H), 3.03-2.90 (m, 2H), 2.48-2.36 (m, 2H), 2.03 (dd, J = 13.9, 5.6 Hz, 2H), 2.14-1.99 (m, 1H), 1.97-1.85 (m, 1H), 1.65-1.15 (m, 3H).

[0165]

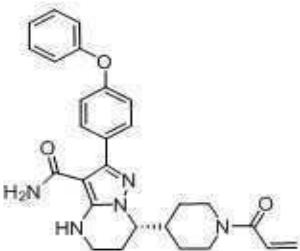
14 단계: BG-13의 합성

[0166]

[0167] 반응기에서 MeOH(13.5 v), 정제수(4.5 v) 및 BG-12 (8.5 Kg, 1.0 eq.)의 혼합물을 N<sub>2</sub> 대기에서 50 °C로 가열하였다. 상기 혼합물의 온도를 50 °C로 유지하면서 L-DBTA (0.7 eq.)의 MeOH/정제수 용액 (1.5 v / 0.5 v)을 적가하였다. 첨가 후, 혼합물을 50 °C에서 2 시간 이상 교반한 다음, 실온으로 냉각시키고 실온에서 16 시간 이상 교반하였다. 케이크를 원심 분리로 모으고, MeOH(2.0 v)로 세척하였다. 케이크를 진공 오븐에서 건조시켰다. 9.08 kg의 생성물을 수득하였다(수율 : 74.8 %, ee > 98 %).

[0168]

15 단계: (S)-7-(1-아크릴로일피페리딘-4-일)-2-(4-페녹시페닐)-4,5,6,7-테트라-하이드로피라졸로[1,5-a]피리미딘-3-카르복스아미드(화합물 1, (S)-7-(1-acryloylpiperidin-4-yl)-2-(4-phenoxyphenyl)-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide)의 합성



[0169]

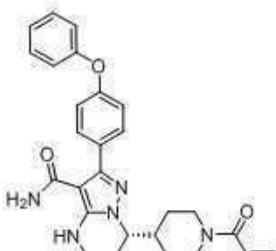
[0170] N<sub>2</sub> 분위기에서, ACN(12.0v), 물(12.5v), BG-13(8.0kg, 1.0 eq.) 및 NaHCO<sub>3</sub> (2.5 eq.)를 반응기에 첨가하였다. 그런 다음 혼합물을 -5~0 °C로 냉각시켰다. 혼합물에, MeCN(0.5 v) 중 아크릴로일 클로라이드(1.1 eq.)의 용액을 적가하고 반응이 완료될 때까지 교반하였다. EA(6.0 v)를 반응기에 첨가하고, 교반하였다. 유기상을 수득하였다. 수성층을 EA (3.0 v)로 추가로 추출하였다. 유기상을 혼합하고 소금물(brine)로 세척하였다. 유기층을 수득하고 농축시켰다.

[0171]

잔류물을 DCM중 3 %w/w 메탄올(21.0 v)로 용리되는 실리카겔(2 중량) 칼럼으로 정제하였다. 화합물 1 용액을 수득하고 진공 조건에서 농축시켰다. 잔류물을 EA/MTBE(2.0 v)로 침전시켰다. 케이크를 생성물로서 원심 분리하여 수득하였다.

[0172]

15 단계: (S)-7-(1-아크릴로일피페리딘-4-일)-2-(4-페녹시페닐)-4,5,6,7-테트라-하이드로피라졸로[1,5-a]피리미딘-3-카르복스아미드(화합물 1, (S)-7-(1-acryloylpiperidin-4-yl)-2-(4-phenoxyphenyl)-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide, 대체 방법



[0173]

[0174] CH<sub>3</sub>CN (10.0 v), 정제수(5.0 v), NaOH(1.5 eq.) 및 BG-13 (1.0 eq.)의 혼합물을 교반하여 맑은 용액을 얻었다. 이어서 EtOAc (6.0 v)를 반응물에 채우고 분리하였다. 유기상을 수집하고 15 % 염수 (3.0 v)로 2 회 세척 하였

다. 상기 제조된 유기상을 농축시키고, 용매를 CH<sub>3</sub>CN(잔류 부피: NMT 5.0v)과 교환하였다. CH<sub>3</sub>CN (7.5 v) 및 정제수 (12.5 V)를 넣고 15~20 °C로 냉각시켰다. L-(+)-타르타르산(L-(+)-tartaric acid)(0.5 eq.) 및 NaHCO<sub>3</sub> (2.5 eq.)를 반응 혼합물에 충진시켰다. CH<sub>3</sub>CN(0.5 v)의 아크릴로일 클로라이드(acryloyl chloride)(1.1 eq.)의 용액을 반응 혼합물에 적가하였다. 반응이 완료된 후, EtOAc(6.0 v)를 반응 혼합물에 채우고 유기층을 수득하였다. 수성상을 EA(3.0 v)로 추가 추출하였다. 유기층을 혼합하고 15 % 소금물(5.0 v)로 세척하고 농축시켰다. 용매를 DCM(잔류물의 부피: 1.5~2.0 v)으로 교체하고, 실리카 젤 컬럼(실리카겔: 100~200 mesh, 2.0 w/w, 용리액(eluent) : DCM의 3 % w/w MeOH(약 50 v))으로 정제하였다. 수득된 용액을 농축시키고 EtOAc(4.0 v)로 교체하였다. MTBE(6.4v)를 50 °C에서 잔류물에 적가하였다. 혼합물을 5 °C로 냉각시킨 후 케이크를 원심 분리로 수득하였다.

[0175] 16 단계: 화합물 1의 결정형 A의 제조(Preparation of Crystalline Form A of Compound 1)

화합물 1의 상기 케이크를 7.0 부피의 DCM에 용해시킨 다음, 용매 EA로 교체하였다. EA/MTBE로 재결정한 후, 케이크를 원심 분리 후 진공 건조시켰다. 4.44 kg의 생성물을 수득하였다(수율: 70.2 %).

[0177] 생성물은 다음과 같이 XRPD 파라미터를 갖는 파날리티칼 엠파린(PANalytical Empyrean) X-선 분말 회절계에서 생성된 X-선 분말 회절(XRPD) 패턴 방법에 의해 특성화되었다: X선 파장(wavelength)(Cu, k<sub>a</sub>, K<sub>a1</sub>(Å): 1.540598, K<sub>a2</sub>(Å): 1.544426, K<sub>a2</sub>/K<sub>a1</sub> 강도비(intensity ratio): 0.50); X 투브 설정(45 Kv, 40mA); 발산 슬릿(divergence slit)(자동); 스캔 모드(연속); 스캔 범위(° 2TH)(3 ° ~ 40 ° ); 스텝 사이즈(° 2TH)(0.0131); 스캔 속도(° )(약 10). XRPD 결과는 생성물을 도 1에 나타난 바와 같은 결정인 것으로 확인되었다.

[0178] 도 2와 같은 시차 주사 열량계(differential scanning calorimetry, DSC) 곡선은 TA 인스트러먼트(TA Instruments)의 TA Q2000 DSC에서 생성된다. 사용된 DSC 파라미터(parameters)에는 다음을 포함한다: 온도(25 °C~원하는 온도); 가열 속도(10 °C/분); 방법(램프(ramp)); 샘플 팬(알루미늄, 크립트(crimped)); 퍼지 가스(purge gas)(N<sub>2</sub>). DSC 결과는 139.4°C (개시 온도)에서 뚜렷한 녹는점을 나타내었다.

[0179] 도 3과 같은 열중량분석기(TGA) 곡선은 TA 인스트러먼트의 TA Q5000 TGA에서 생성된다. 사용된 TGA 파라미터는 다음을 포함한다: 온도(상온~ 원하는 온도); 가열 속도(10°C/분); 방법(램프(ramp)); 샘플 팬(백금(platinum), 개방형(open)); 퍼지 가스(purge gas)(N<sub>2</sub>). TGA 결과는 무수화물이며 110 °C까지 무게 손실이 없는 것으로 나타났다.

[0180] 도 4와 같은 양성자 핵 자기공명(proton nuclear magnetic resonance, <sup>1</sup>H-NMR)은 DMSO-d<sub>6</sub>의 브루커 400M NMR 분광기(Bruker 400M NMR Spectrometer)로 얻었다(collected). <sup>1</sup>H-NMR(DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.50 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.46~7.38 (m, 2H), 7.17 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.05 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.85~6.72 (m, 1H), 6.67 (s, 1H), 6.07 (dd, J = 16.8, 2.2 Hz, 1H), 5.64 (dd, J = 10.4 Hz, 2.2 Hz, 1H), 4.55~4.38 (m, 1H), 4.17~3.94 (m, 2H), 3.33~3.22 (m, 2H), 3.08~2.88 (m, 1H), 2.67~2.51 (m, 1H), 2.36~2.15 (m, 1H), 2.12~1.82 (m, 2H), 1.79~1.65 (m, 1H), 1.63~1.49 (m, 1H), 1.38~1.08 (m, 2H).

[0181] 도 5에 나타난 바와 같은 탄소 핵 자기공명(<sup>13</sup>C-NMR)은 DMSO-d<sub>6</sub>의 브루커 400M NMR 분광기에서 얻었다. 화합물 1의 결정형 A에 대한 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼.

[0183] **실시예 2 화합물1의 결정형 A의 제조**

[0184] (S)-7-(1-아크릴로일파이페리딘-4-일)-2-(4-페녹시페닐)-4,5,6,7-테트라-하이드로파라졸로 [1,5-A] 피리미딘-3-카르복스아미드(화합물 1, (S)-7-(1-acryloylpiperidin-4-yl)-2-(4-phenoxyphenyl)-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyrimidine-3-carboxamide)은 WO 2014173289 A에 공지된 방법으로 제조하고, 동결건조시켜 화합물 1의 비정질형을 수득한다. EA(8 mL)에 화합물 1(200 mg, ee > 97 %)의 용액을 50 °C로 가열한 다음, 상기 용액에 50 °C에서 헥산(8 mL)을 적가하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고 16시간 동안 교반한 후 여과하여 110 mg을 백색 고체로서 수득 하였다. 얻어진 고체는 XRPD에 의해 형 A(Form A)로 규정되었다.

[0186] **실시예 3 화합물 1의 결정형 A의 제조(항-용매 첨가물)**

[0187] 약 15 mg의 시료(결정형 A)를 20 mL 유리 바이알에 넣고 0.4~1.2 mL의 해당 용매(표 2 참조)를 첨가하여 모든 고체를 용해시켰다. 이어서, 혼합물을 800 rpm의 속도로 자성으로 교반하여 실온에서 투명한 용액을

수득하였다. 그 후, 상대 항-용매(표 2 참조)를 용액에 첨가하여 침전을 유도하거나 또는 항-용매의 총량이 15.0 mL에 이를 때까지 수행하였다. 침전이 발생하지 않으면, 용액을 실온에서 느린 증발로 변경하였다. 수득된 고체는 XRPD에 의해 A 형으로 규정되었다.

## 표 2

항-용매 첨가물 실험

실험번호	용매	항-용매
1	Acetone	H <sub>2</sub> O
2	DMAc	H <sub>2</sub> O
3	EtOAc	n-heptane
4	DCM	n-heptane
5	Toluene	n-heptane
6	2-MeTHF	n-heptane

[0188] **실시예 4 화합물 1의 결정형 A의 제조(용액 증기 확산)**

[0189] 약 15 mg의 샘플(결정형 A)을 0.5~1.5 mL에 상응하는 용매(아세톤 또는 EtOAc)를 용해시켜 3 mL 바이알에 투명한 용액을 얻었다. 이어서, 용액을 상대 항-용매(n-헵탄) 3 mL가 들어있는 20 mL 바이알에 넣었다. 20 mL 바이알을 뚜껑으로 밀봉하고 실온에서 보관하면서, 유기 증기가 용액과 상호 작용할 수 있는 충분한 시간을 주었다. 11 일 후, 맑은 용액을 실온에서 증발시켰다. 수득된 고체는 XRPD에 의해 A 형으로 규정되었다.

[0190] **실시예 5 화합물 1의 결정형 A의 안정성 테스트 및 화합물 1의 순도**

[0191] (1) 물리적 안정성 테스트

[0192] 화합물 1의 결정형 A는 열 안정성 테스트는 80 °C에서 2일 동안 수행되었고, 테스트 전후의 XRPD 패턴은 결정형 변화를 나타내지 않았다. 화합물 1의 결정형 A의 장기간 안정성 연구는 25°C/60%RH에서 24개월(%area: T0=99.2% and T12=99.2%)까지 및 40 °C/75%RH 조건에서 6 개월 (%area: T0=99.1% and T6=99.4%)까지 저장되어 있는 동안 유의한 화학적 순도 변화가 발생하지 않는 것으로 나타났다. 또한 25°C/60%RH에서 최대 24개월 및 40 °C/75%RH 조건에서 최대 6개월 동안 보관하면 결정형 및 광학 순도 변화가 관찰되지 않는 것으로 확인되었다.

[0193] (2) 흡습성 테스트(Hygroscopic Test)

[0194] 도 6에 나타난 바와 같이 동적 증기 흡착(Dynamic Vapor Sorption, DVS) 플롯(plot)은 SMS(표면 측정 시스템, Surface Measurement Systems) DVS Intrinsic으로 수집되었다. DVS 파라미터는 다음을 포함한다: 온도(25°C); dm/dt (0.002%/분); 최소(Min.) dm/dt 안정성 기간(10 분); 최대(Max.) 평형 시간(equilibrium time)(180분); RH 범위(0%RH~95%RH); RH 스텝 사이즈(step size) (0%RH에서 90%RH, 90%RH에서 95%RH까지 5%RH에서 10%RH). 도 6에 나타난 바와 같이, 80%RH에서 질량의 매우 작은 증가가 있으며, 이는 화합물 1의 결정형 A의 약 0.8 %이다.

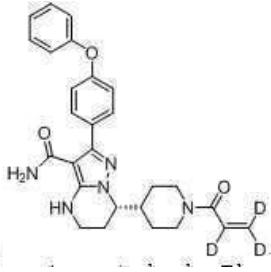
[0195] (3) 화합물 1의 순도를 향상시키기 위한 A 형을 통한 결정화/재결정화

[0196] A 형을 통한 결정화/재결정화는 화합물 1의 순도를 향상시키고 화합물 1의 불순물을 조절하는 효율적인 방법이다. 표 3에 표시된 예시가 참조되어 있다.

## 표 3

조건	화합물 1의 순도
실리카겔 크로마토그래피 정제후(After Silica Gel Chromatography Purification)	98.5% area
첫번째 재결정화 후(After First Recrystallization)	99.3% area
두번째 재결정화 후(After Second Recrystallization)	99.5% area

[0197] **실시예 6 듀테륨 표지된 (S)-7-(1-아크릴로일페리딘-4-일)-2-(4-페녹시페닐)-4,5,6,7-테트라-하이드로파라졸로 [1,5-A] 피리미딘-3-카르복스아미드(듀테륨 표지된 화합물 1(deuterium-labeled Compound 1)**



[0203]

[0204] DCM(20 mL)의 아크릴-2,3,3-디삼산(acrylic-2,3,3-d<sub>3</sub> acid)(50mg, 0.67 mmol) 및 DMF(1 방울)의 용액에 옥살릴 클로라이드(oxalyl chloride)(1.6 N, 40.9 mL, 65.5 mmol)를 0 내지 5 °C에서 적가한 다음 실온에서 2 시간 동안 교반하였다. 혼합물을 감압 농축시켜 크루드 아크릴로일-d<sub>3</sub> 클로라이드(crude acryloyl-d<sub>3</sub> chloride)를 수득하였다.

[0205]

DCM(20 mL) 및 액상의 NaHCO<sub>3</sub>(10 mL)의 (S)-7-(1-아크릴로일피페리딘-4-일)-2-(4-페녹시페닐)-4,5,6,7-테트라-하이드로페라졸로 [1,5-A] 피리미딘-3-카르복스아미드(BG-13으로부터 분리, 15 단계, 화합물 1, 대체 방법 참조; 278 mg, 0.67 mmol) 수용액에 상기 아크릴로일-d<sub>3</sub> 클로라이드(acryloyl-d<sub>3</sub> chloride)의 용액을 DCM (5 mL)에 0~5°C에서 적가하고 실온에서 2 시간 동안 교반하였다. 결합된 기 층을 무수 황산나트륨을 통하여 건조하고, 여과하여, 감압 농축시키고, prep-TLC로 정제하여 55mg(17.5 %)의 (S)-7-(1-아크릴로일피페리딘-4-일)-2-(4-페녹시페닐)-4,5,6,7-테트라-하이드로페라졸로 [1,5-A] 피리미딘-3-카르복스아미드를 회백색 고체를 수득하였다. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.50–7.44 (m, 2H), 7.42–7.35 (m, 2H), 7.17–7.10 (m, 1H), 7.09–6.99 (m, 4H), 6.64 (s, 1H), 4.52–4.40 (m, 1H), 4.10–3.95 (m, 2H), 2.29–3.25 (m, 2H), 3.04–2.86 (m, 1H), 2.63–2.50 (m, 1H), 2.32–2.13 (m, 1H), 2.06–1.81 (m, 2H), 1.75–1.45 (m, 2H), 1.35–1.08 (m, 2H). MS (ESI, m/e) [M+1]<sup>+</sup> 475.2.

#### 실시예 7 화합물 1의 다형태 연구(Polymorph Study)

##### (1) 비정질형의 다형태 연구-화합물 1의 비정질형으로부터의 A 형의 제조

[0209] (S)-7-(1-아크릴로일피페리딘-4-일)-2-(4-페녹시페닐)-4,5,6,7-테트라-하이드로페라졸로 [1,5-A] 피리미딘-3-카르복스아미드(화합물 1)은 WO 2014173289 A에 공지된 방법으로 제조하고, 동결 건조시켜 화합물 1의 비정질형을 수득한다.

[0210]

표 4a 내지 4k, 표 5a 내지 5e 및 표 6의 각각의 실험에 대해, 비정질 형으로서 약 20mg의 화합물 1을 유리 바이알에 무게를 측정한 다음 이에 상응하는 용매를 첨가하였다. 필요한 경우, 혼합물을 가열하여 투명한 용액을 수득하였다. 그 다음 맑은 용액에서 생성된 고체를 보기 위하여 혼합물을 1~2 일 동안 교반하지 않고 실온에서 보관하였다. 고체를 편광된 광학 현미경으로 모니터링하였다.

#### 표 4

출발 물질로서의 화합물 1(ee 값 = 90 %)(4a)

실험 번호	용매		상온(RT)	가열 (Heat)	결과 (1-2d)
	EA(mL)	헥산(mL)			
1-1	0.5	0.1	Y	----	No solid
1-2	0.5	0.2	Y	----	Little solid
1-3	0.5	0.3	N	Y	오일
1-4	0.5	0.4	N	Y	오일
1-5	1	0.2	Y	----	No solid
1-6	1	0.3	Y	----	No solid
1-7	1	0.4	Y	----	No solid
1-8	1	0.5	Y	----	No solid
1-9	1	0.6	Y	----	Little solid
1-10	1	0.7	Y	----	Little solid
1-11	1	0.8	N	Y	오일
1-12	1	0.9	N	Y	오일

(표 4b)

실험 번호	용매		상온(RT)	가열 (Heat)	결과 (1-2d)
	EA (mL)	헵탄 (mL)			
2-1	0.5	0.1	Y	----	No solid
2-2	0.5	0.2	Y	----	Little solid
2-3	0.5	0.3	N	Y	오일
2-4	0.5	0.4	N	N	오일
2-5	1	0.2	Y	----	No solid
2-6	1	0.3	Y	----	No solid
2-7	1	0.4	Y	----	No solid
2-8	1	0.5	Y	----	No solid
2-9	1	0.6	Y	----	Little solid
2-10	1	0.7	Y	----	Little solid
2-11	1	0.8	Y	----	오일
2-12	1	0.9	N	Y	오일

(표 4c)

실험 번호	용매		상온(RT)	가열 (Heat)	결과 (1-2d)
	EA (mL)	Cyclohexane (mL)			
3-1	0.5	0.2	Y	----	No solid
3-2	0.5	0.3	Y	----	Little solid
3-3	0.5	0.4	Y	----	오일
3-4	0.5	0.5	Y	----	오일
3-5	0.5	0.6	N	Y	오일
3-6	1	0.6	Y	----	Little solid
3-7	1	0.8	Y	----	Little solid
3-8	1	1.0	Y	----	Little solid
3-9	1	1.2	Y	----	Little solid
3-10	1	1.4	Y	----	오일

(표 4d)

실험 번호	용매		상온(RT)	가열 (Heat)	결과 (1-2d)
	DCM (mL)	헥산 (mL)			
4-1	0.5	0.4	Y	----	No solid
4-2	0.5	0.6	Y	----	No solid
4-3	0.5	0.8	Y	----	No solid
4-4	0.5	1.0	N	Y	오일
4-5	1.0	1.4	Y	----	No solid
4-6	1.0	1.6	Y	----	No solid
4-7	1.0	1.8	Y	----	No solid
4-8	1.0	2.0	N	Y	오일

[0212]

(표 4e)

실험 번호	용매		상온(RT)	가열 (Heat)	결과 (1-2d)
	1,2-디클로로에탄(1,2-Di chloroethane)(mL)	헥산 (mL)			
5-1	0.5	0.6	Y	----	No solid
5-2	0.5	0.8	Y	----	No solid
5-3	0.5	1.0	Y	----	No solid
5-4	0.5	1.1	N	Y	오일
5-5	1.0	1.4	Y	----	No solid
5-6	1.0	1.6	Y	----	No solid
5-7	1.0	1.8	Y	----	No solid
5-8	1.0	2.0	Y	----	No solid
5-9	1.0	2.2	N	Y	오일

(표 4f)

실험 번호	용매		상온(RT)	가열 (Heat)	결과 (1-2d)
	MeOAc (mL)	헥산 (mL)			
6-1	0.5	0.3	Y	----	Little solid
6-2	0.5	0.4	Y	----	오일
6-3	0.5	0.5	Y	----	오일
6-4	0.5	0.6	N	Y	오일
6-5	1.0	0.6	Y	----	Little solid
6-6	1.0	0.8	Y	----	Little solid
6-7	1.0	1.0	Y	----	Little solid
6-8	1.0	1.2	Y	----	Little solid
6-9	1.0	1.4	N	Y	오일

(표 4g)

실험 번호	용매		상온(RT)	가열 (Heat)	결과 (1-2d)
	톨루엔 (mL)	헥산(mL)			
7-1	1.0	0.2	Y	----	Little solid
7-2	1.0	0.3	Y	----	Little solid
7-3	1.0	0.4	Y	----	Little solid
7-4	1.0	0.5	N	Y	오일
7-5	1.0	0.6	N	Y	오일

(표 4h)

실험 번호	용매		상온(RT)	가열 (Heat)	결과 (1-2d)
	톨루엔 (mL)	사이클로헥산 (mL)			
8-1	1.0	0.1	Y	----	Little solid
8-2	1.0	0.2	Y	----	Little solid
8-3	1.0	0.3	Y	----	오일
8-4	1.0	0.4	N	Y	오일
8-5	1.0	0.5	N	Y	Little solid
8-6	1.5	0.4	Y	----	Little solid
8-7	1.5	0.5	Y	----	Little solid

(표 4i)

실험 번호	용매		상온(RT)	가열 (Heat)	결과 (1-2d)
	MeOAc (mL)	사이클로헥산 (mL)			
9-1	0.4	1.0	Y	----	Little solid
9-2	0.5	1.0	Y	----	Little solid
9-3	0.6	1.0	Y	----	Little solid
9-4	0.8	1.0	Y	----	Little solid
9-5	1.0	1.0	Y	----	Little solid

(표 4j)

실험 번호	용매		상온(RT)	가열 (Heat)	결과 (2-3d)
	IPAC (ml)	사이클로헥산 (ml)			
10-1	1.0	0.2	Y	----	Little solid
10-2	1.0	0.4	Y	----	Little solid
10-3	1.0	0.6	Y	----	Little solid
10-4	1.0	0.8	Y	----	Little solid
10-5	1.0	1.0	Y	----	Little solid
10-6	1.0	1.2	N	Y	오일

(표 4k)

실험 번호	용매		상온(RT)	가열 (Heat)	결과 (1-2d)
	이소부틸 아세테이트 (mL)	사이클로헥산 (mL)			
11-1	1.0	0.2	Y	----	Little solid
11-2	1.0	0.4	Y	----	Little solid
11-3	1.0	0.6	Y	----	Little solid
11-4	1.0	0.8	Y	----	Little solid
11-5	1.0	1.0	Y	----	Little solid
11-6	1.0	1.2	N	Y	오일

Y=Yes, 및 N=No.

[0213]

## 표 5

[0214]

### 출발 물질로서의 화합물 1 (ee 값 = 97 %)(5a)

실험 번호	용매		상온(RT)	가열 (Heat)	결과 (1-2d)
	EA (mL)	헥산 (mL)			
12-1	1	0.2	Y	----	No solid
12-2	1	0.3	Y	----	No solid
12-3	1	0.4	Y	----	No solid
12-4	1	0.5	Y	----	No solid
12-5	1	0.6	Y	----	Solid
12-6	1	0.7	Y	----	Solid
12-7	1	0.8	N	Y	오일
12-8	1	0.9	N	Y	오일

(표 5b)

실험 번호	용매		상온(RT)	가열(Heat)	결과(1-2d)
	EA (mL)	헥탄 (mL)			
13-1	1	0.2	Y	----	No solid
13-2	1	0.3	Y	----	No solid
13-3	1	0.4	Y	----	No solid
13-4	1	0.5	Y	----	No solid
13-5	1	0.6	Y	----	Solid
13-6	1	0.7	Y	----	Solid
13-7	1	0.8	Y	----	오일
13-8	1	0.9	N	Y	오일

(표 5c)

실험 번호	용매		상온(RT)	가열(Heat)	결과(1-2d)
	MBOAc (mL)	사이클로헥산 (mL)			
14-1	0.4	1.0	Y	----	No solid
14-2	0.5	1.0	Y	----	No solid
14-3	0.6	1.0	Y	----	Solid
14-4	0.8	1.0	Y	----	Solid
14-5	1.0	1.0	Y	----	No solid
14-6	1.0	1.5	Y	----	Solid
14-7	1.0	2.0	Y	----	Solid
14-8	1.0	2.2	N	Y	오일

(표 5d)

실험 번호	용매		상온(RT)	가열(Heat)	결과(1-2d)
	EA (mL)	사이클로헥산 (mL)			
15-1	0.5	0.2	Y	----	No solid
15-2	0.5	0.3	Y	----	Solid
15-3	0.5	0.4	Y	----	오일
15-4	0.5	0.5	Y	----	오일
15-5	0.5	0.6	N	Y	오일
15-6	1	0.6	Y	----	Solid
15-7	1	0.8	Y	----	Solid
15-8	1	1.0	Y	----	Solid
15-9	1	1.2	Y	----	Solid
15-10	1	1.4	Y	----	오일

(표 5e)

실험 번호	용매		상온(RT)	가열(Heat)	결과(1-2d)
	MBOAc (mL)	헥산 (mL)			
16-1	0.5	0.3	Y	----	Solid
16-2	0.5	0.4	Y	----	No solid
16-3	0.5	0.5	Y	----	No solid
16-4	0.5	0.6	N	Y	No solid
16-5	1.0	0.6	Y	----	Solid
16-6	1.0	0.8	Y	----	Solid
16-7	1.0	1.0	Y	----	Solid
16-8	1.0	1.2	Y	----	Solid
16-9	1.0	1.4	N	Y	오일

Y=Yes 및 N=No.

[0215]

표 4a 내지 4k 및 표 5a 내지 5e의 실험은 동일한 스케일(즉, 출발 물질 - 비정질형 화합물 1의 양은 약 20mg임)에서 수행되었다. 그러나, 출발 물질의 ee 값은 각 실험에서 형성될 고체의 양에 상당한 영향을 미치는 것으로 나타났다. 도 4a 내지 도 4k에 나타난 바와 같이, 비정질형 화합물 1의 90 % ee로부터 시작하여, 이렇게 형성된 고체는 적은 양(little amount)을 갖는다. 비정질형 화합물 1의 97 % ee에서 출발하는 표 5a 내지 5e의 실험은 현저히 많은 양의 고체(noticeable amount of solid)를 생성시켰다. 또한, 표 4a 내지 4k의 실험에서 수득된 고체는 90 % ee의 출발 물질로부터 결정화될 때 낮은 ee 값을 가지는 것으로 나타났다. 결정화 시스템으로서 EA/헥산(EA/Hexane)을 사용하는 표 4a 내지 4k의 한 고체 샘플은 45 % ee 값을 나타냈다.

[0218]

표 5a의 결과는 생성된 고체가 목적하는 결정형 (A 형)인 것으로 확인된 실시예2와 유사한 스케일 업 실험으로 추가적으로 확인되었다.

[0219]

상기 표 4a 내지 표 4k 및 표 5a 내지 표 5e에 나타낸 바와 같이, 결정 고체의 형성은 특정 용매, 용매의 비율 등에 따라 달라질 수 있다.

[0220]

표 6의 결과는 결정 고체의 형성이 용매의 특정 비율에 의존한다는 것을 추가로 확인한다.

표 6

용매-2 용매-1 (0.5 mL)	헥산(Hexane)		MTBE		헵탄(Heptane)		Cyclohexane		H <sub>2</sub> O		에테르 (Ether)	
	V/mL	결과	V /mL	결과	V /mL	결과	V /mL	결과	V /mL	결과	V /mL	결과
THF	0.4	Little solid	2.0	Little solid	0.4	Little solid	0.4	Little solid	----	----	2.0	No solid
Me-THF	0.4	Little solid	1.5	No solid	0.4	No solid	----	----	----	----	----	----
DME	0.6	Little solid	1.5	No solid	0.6	Little solid	0.8	Little solid	----	----	1.5	No solid
EtOH	2.0	No solid	5.0	No solid	2.5	오일	2.0	No solid	5.0	No solid	5.0	No solid
i-PrOH	1.5	No solid	2.5	No solid	----	----	2.0	No solid	2.0	Little solid	----	----
피리딘 (pyridine)	1.0	No solid	4.0	No solid	----	----	1.0	No solid	2.0	No solid	----	----
프로필아세테트(pyt e)	0.3	No solid	0.8	No solid	----	----	----	----	----	----	----	----
이소부틸아세테이트 (isobutyl acetate)	0.2	No solid	2.0	No solid	----	----	----	----	----	----	----	----
n-BuOH	0.5	No solid	2.0	No solid	----	----	----	----	0.5	No solid	----	----
1,2-디클로에탄(1,2-Dichloethane)	1.0	No solid	5.0	No solid	----	----	1.2	No solid	----	----	----	----
DCM	1.0	오일	5.0	No solid	----	----	1.2	No solid	----	----	----	----
톨루엔	0.2	오일 및 Little solid	0.5	No solid	0.2	No solid	0.2	오일 및 Little solid	----	----	0.5	No solid

## (2) 결정형에서 다형체 연구- 느린 증발 결정형으로 부터 A 형의 제조

약 15 mg의 시료(결정형 A)를 3 mL 유리 바이알에 칭량하여 넣고, 이에 상응하는 용매 또는 용매 혼합물(표 7 참조)을 첨가하여 맑은 용액을 얻었다. 이어서, 바이알을 3~4 개의 핀홀(pinholes)이 있는 파라필름으로 덮고, 실온에서 보관하여 용액을 천천히 증발시켰다. 고체를 XRPD 분석을 위해 분리 하였다. 그러나, 표 7에 요약된 바와 같이 결정형은 생성되지 않았다.

표 7

## 느린 증발 실험

실험 번호	용매 (v/v)	고체형(Solid Form )
1	MeOH	비정질(Amorphous )
2	EtOH	비정질(Amorphous )
3	IPA	비정질(Amorphous )
4	ACN	비정질(Amorphous )
5	Acetone	오일
6	EtOAc	오일
7	THF	오일

8	DCM	비정질(Amorphous )
9	Toluene	오일
10	Acetic acid	오일
11	EtOH/H <sub>2</sub> O (4:1)	비정질(Amorphous )
12	Acetone/H <sub>2</sub> O (4:1)	비정질(Amorphous )
13	THF/H <sub>2</sub> O (4:1)	비정질(Amorphous )
14	DCM/n-heptane (4:1)	비정질(Amorphous )
15	EtOH/n-heptane (4:1)	비정질(Amorphous )
16	EtOAc/n-heptane (6.5:1)	오일
17	ACN/MTBE (4:1)	오일

## [0227] 항-용매 첨가물

약 15 mg의 시료(결정질 형태 A)를 20 mL 유리 바이알에 청량하여 넣고 0.4-1.2 mL의 상응하는 용매를 첨가하였다(표 8 참조). 이어서, 혼합물을 800 rpm의 속도로 자성으로 교반하여 실온에서 투명한 용액을 수득하였다. 이어서, 상대 항-용매(표 8 참조)를 용액에 첨가하여 침전을 유도하거나 또는 항-용매의 총량이 15.0 mL에 이를 때까지 수행하였다. 침전이 발생하지 않으면, 용액을 실온에서 느린 증발로 변경하였다. 결과는 표 8에 요약되어 있다.

표 8

## 항-용매 첨가물 실험

실험 번호	항- 용매(Anti-Solvent)	용매	고체형 (Solid Form)
1	H <sub>2</sub> O	EtOH	오일
2	H <sub>2</sub> O	THF	오일
3	H <sub>2</sub> O	Acetic acid	오일
4	n-heptane	1,4-dioxane	오일
5	MTBE	ACN	오일
6	MTBE	NMP	N/A
7	MTBE	EtOH	오일
8	MTBE	DCM	오일

## [0230] N/A: 고체형 수득X느린 냉각

약 20 mg의 시료(결정형 A)는 3 mL 유리 바이알에서 이에 상응하는 용매(표 9 참조) 1.0 mL로 실온에서 혼탁시켰다. 혼탁액을 800 rpm의 속도로 마그네틱 교반기를 사용하여 50 °C에서 슬러리로 바꾸었다. 샘플을 50 °C에서 2 시간 동안 평형시키고 0.45 μm 나일론 맴브레인(Nylon membrane)을 사용하여 여과하였다. 그 후, 여과액을 0.1°C/분의 속도로 50°C에서 5°C로 천천히 냉각시켰다.

[0232] 수득된 고체는 XRPD 분석을 위해 분리되기 전 5 °C 등온으로 유지되었다. 표 9에 요약된 바와 같이 결정형은 수득되지 않았다.

표 9

## 느린 냉각 실험

실험 번호	용매 (v/v)	고체형(Solid Form)
1	IPA	N/A
2	MIBK	N/A
3	IPAc	N/A
4	Toluene	N/A
5	EtOH/H <sub>2</sub> O(1:2)	젤(Gel)
6	Acetone/H <sub>2</sub> O (1:2)	젤(Gel)
7	EtOAc/n-heptane (1:2)	비정질(Amorphous)
8	CHCl <sub>3</sub> /n-heptane (1:2)	N/A

9	THF/n-heptane (1:2)	오일*
10	ACN/MTBE (1:2)	오일*

[0234] N/A: 고체형 수득X

[0235] \*: 투명한 용액을 끓겨 실온에서 증발시킴

#### 용액 증기 확산

[0237] 약 15 mg의 시료(결정형 A)를 3 mL 바이알에서 0.5-1.5 mL의 상응하는 용매 (표 10 참조)에 용해시켜 투명한 용액을 얻었다. 이어서, 용액을 상대 항-용매 3 mL가 들어있는 20 mL 바이알에 넣었다. 20 mL 바이알을 뚜껑으로 밀봉하고 실온에서 보관하여 유기 증기가 용액과 상호 작용할 수 있는 충분한 시간을 주었다. 11 일 후, 맑은 용액을 실온에서 증발시켰다. 수득된 고체는 XRPD에 의해 특징 지어졌다. 결과는 표 10에 요약되어 있다.

**표 10**

#### 용액 증기 확산 실험

실험번호	용매	항-용매(Anti-solvent)	고체형(Solid Form)
1	EtOH	H <sub>2</sub> O	비정질(Amorphous)*
2	ACN	H <sub>2</sub> O	N/A
3	Acetone	H <sub>2</sub> O	비정질(Amorphous)*
4	THF	H <sub>2</sub> O	비정질(Amorphous)*
5	Acetic acid	H <sub>2</sub> O	오일
6	EtOH	n-heptane	N/A
7	THF	n-heptane	비정질(Amorphous)*
5	DCM	n-heptane	비정질(Amorphous)*
8	DMAc	MTBE	N/A
9	IPA	MTBE	N/A
10	1,4-Dioxane	MTBE	N/A
11	Toluene	MTBE	N/A
12	NMP	MTBE	N/A

[0239] N/A: 고체형 수득X\*: 느린 증발을 통해 고체가 생성

#### 고분자 유도 결정화 실험(Polymer-induced crystallization experiments)

[0241] 약 15 mg의 시료(결정질 형태 A)를 3 mL 바이알에 1.0 mL의 상응하는 용매 (표 11 참조)에 용해시켜 맑은 용액을 얻었다. 그 다음, 용액을 0.45 μm 나일론 맴브레인(Nylon membrane)을 사용하여 여과하였다. 약 2mg의 고분자 혼합물을 여과액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 교반하여 침전을 유도하였다. 고체를 XRPD 분석을 위해 분리하였다. 표 11에 요약된 바와 같이 결정형은 수득되지 않았다.

**표 11**

#### 고분자 유도 결정화 테스트(Polymer-induced crystallization Experiments)

실험번호	용매(v/v)	고분자 혼합물	고체형(Solid Form)
1	EtOH	A	비정질(Amorphous)
2	ACN	A	비정질(Amorphous)
3	Acetone	A	비정질(Amorphous)
4	THF	A	비정질(Amorphous)
5	DCM	A	비정질(Amorphous)
6	EtOAc	A	비정질(Amorphous)
7	EtOH	B	비정질(Amorphous)
8	ACN	B	비정질(Amorphous)
9	Acetone	B	비정질(Amorphous)

10	THF	B	비정질(Amorphous )
11	DCM	B	비정질(Amorphous )
12	EtOAc	B	비정질(Amorphous )

[0244] 고분자 혼합물A: 폴리비닐 피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone (PVP)), 폴리비닐 알코올(polyvinyl alcohol (PVA)), 폴리비닐 크롤라이드(polyvinyl chloride (PVC)), 폴리비닐 아세테이트(polyvinyl acetate (PVAC)), 하이프로멜로스(hypromellose (HPMC)) 및 메틸 셀루로스(methyl cellulose (MC))(중량비 1:1:1:1:1:1)고분자 혼합물 B: 폴리 카프로락톤(polycaprolactone (PCL)), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol (PEG)), 폴리 메틸 메타크릴레이트(poly(methyl methacrylate) (PMMA)), 알긴산 나트륨(sodium alginate (SA)), 및 하이드록 시에틸 셀룰로스(hydroxyethyl cellulose (HEC))(중량비 1:1:1:1:1).

[0245] 실시예 8 화합물 1의 절대배열(absolute configuration)의 결정

#### BG-13 단결정의 제조

[0246] 느린 냉각을 통해 6 개의 단결정 성장 실험(표 12 참조)이 수행되었다. BG-13의 적합한 단결정은 MeOH/H<sub>2</sub>O(1:1, v/v)에서 서서히 냉각시켜 수득되었다. 결정 데이터 및 구조 미세화(structure refinement)는 표 13에 나열되어 있다.

**표 12**

#### 단결정 성장 테스트

실험 번호	무게(mg)	용매 (1 mL, v/v)	방법	온도(°C)	용해 (Dissolved) (Y/N*)	의견(Observation)
1	5.6	IPA/H <sub>2</sub> O(3/1)	냉각(cooling)	60	N	블록 같은 결정 (Block-like crystal)
2	5.5	IPA/H <sub>2</sub> O(3/1)	냉각(cooling)	60	N	블록 같은 결정 (Block-like crystal)
3	5.4	IPA/H <sub>2</sub> O(3/1)	냉각(cooling)	60	N	블록 같은 결정 (Block-like crystal)
4	5.5	IPA/H <sub>2</sub> O (3/1)	냉각(cooling)	60	N	블록 같은 결정 (Block-like crystal)
5	4.7	MeOH/H <sub>2</sub> O (2/1)	냉각(cooling)	60	N	결정(Crystal )
6	5.5	MeOH/H <sub>2</sub> O (1/1)	냉각(cooling)	60	N	결정(Crystal )

## 표 13

BG-13의 단결정 데이터 및 구조 미세화

질량식 (empirical formula)	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	-
화학식 투자	598.65	-
온도	173.15	-
파장(wavelength)	1.54178 Å	-
결정 시스템, 스페이스 그룹(crystal system, space group)	monoclinic	C2
단위 층 면적	a=16.7959(4) Å b=7.9871(2) Å c=28.5458(5) Å	alpha = 90.00 deg. beta = 108.0460(10) deg. gamma = 90.00 deg.
밀도	5002.89(12) Å <sup>3</sup>	-
Z, 계산된 밀도	4	1.520 mg/mm <sup>3</sup>
흡수 계수 (absorption coefficient)	0.756 mm <sup>-1</sup>	
F(000)	1260.0	
결정 사이즈	0.6X0.21X0.05mm	
데이터 수집을 위한 세타 범위(theta range for data collection)	1.87 to 54.98 deg..	
한계 표시(limits indices)	-19<=h<=17, -7<=k<=9, -27<=l<=24	
반사 충전도/유니크 (reflection collect/unique)	5078/5758 [R(int)= 0.1082]	
완성도(completeness)	92.8%	
정제 방법(refinement method)	Full matrix least squares on F <sup>2</sup>	
제약/ 제약(restraints)/ 과제(restrains)	8758/1/898	
적합도(goodness-of-fit) F <sup>2</sup>	1.192	
마지막 R 지수(Final R indices) [D>2sigma(I)]	R1=0.0619	wR <sub>2</sub> =0.2294
환경 구조 품질(Absolute structure Flack)	0.0(8)	
가장 다른 피크 및 홀 (Largest diff. peak and hole)	0.60 및 -0.67 e.Å <sup>3</sup>	

[0251]

[0253] 단결정의 데이터는 CCD 검출기(Cu K $\alpha$ ,  $\lambda=1.54178\text{ \AA}$ , 173.15K)를 갖는 Bruker APEX DUO 단결정 회절계에서 생성되었다.

[0254]

BG-13은 (2R, 3R)-디벤조일 타르타르산((2R, 3R)-dibenzoyl tartaric acid)(L-DBTA)염으로 확인되었으며 L-DBTA에 대한 유리 염기(freebase)의 몰비는 2:1이다. L-DBTA에서 두 탄소(C32와 C32')의 구조는 R로 확인되었다. 도 8 내지 도10에 나타난 바와 같이, 유리 염기(freebase)에서의 C6의 배열(Configuration)은 S로 결정되었다. 또한 도 11에 나타난 바와 같이, 분말 X선 회절 패턴 방법은 단결정의 구조를 특성화하는데 사용하였다.

[0255]

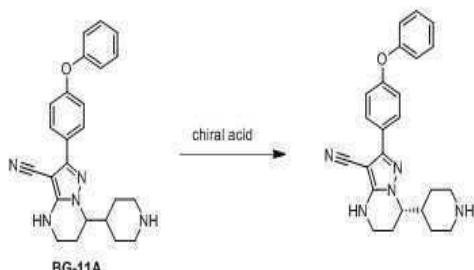
화합물 1의 절대적 배열(Absolute Configuration)

[0256]

화합물 1의 절대 배열은 중간체 BG-13의 단결정 X 선 구조 분석으로부터 S로 추론되었다.

[0258]

실시예 9 BG-11A의 키랄 분할(Chiral resolution)



[0259]

[0260]

일반적인 공정: 준비된 용매 시스템의 화합물 BG-11A 용액에 승온에서 키랄산을 첨가하였다. 승온에서 교반 후, 실온으로 냉각시키고, 실온에서 밤새 교반하였다. 고체를 여과하고 제조된 용매 시스템으로 세척하였다. ee 값은 관련 염 또는 그의 Boc 유도체로부터 직접 키랄 HPLC로 실험하였다(표 14 참조). 다른 키랄산 또는 용매 시스템은 ee 값, 낮은 ee 값 또는 목적하는 키랄 화합물을 제공하지 않는다.

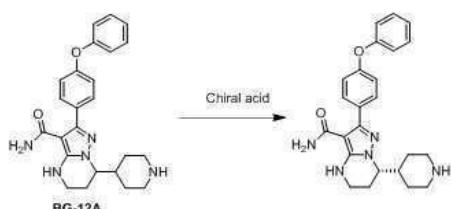
표 14

BG-11A의 키랄 분할

용매 시스템 (Solvent System)	11A의 양	키랄산	온도	ee 값(value)	수율
EtOH/H <sub>2</sub> O/AcOH 7/3/1 (1.9 L)	40.0 g	D-DBTA (0.5 eq.)	70 °C to RT	>85% ee	42.2%
i-PrOH/H <sub>2</sub> O/AcOH 7/3/1 (25 mL)	500 mg	D-DBTA (1.0 eq.)	70 °C to RT	77% ee	38.5%
i-PrOH/H <sub>2</sub> O/AcOH 7/3/1 (25 mL)	500 mg	D-DBTA (0.5 eq.)	70 °C to RT	85% ee	38.9%
EtOH/H <sub>2</sub> O/AcOH 7/3/1 (25 mL)	500 mg	D-DBTA (0.5 eq.)	70 °C to RT	86% ee	39.8%
MeOH/H <sub>2</sub> O/AcOH 7/3/1 (25 mL)	500 mg	D-DBTA (0.5 eq.)	70 °C to RT	82% ee	42.2%
AcOH/H <sub>2</sub> O 3/1 (40 mL)	1 g	D-DBTA (0.55 eq.)	60 °C to RT	83% ee	27.6%
1,4-dioxane/H <sub>2</sub> O 1/1 (2.5 mL)	25 mg	D-DBTA (2.0 eq.)	60 °C to RT	No Solid	No Solide
MeOH/H <sub>2</sub> O 1/1 (2.5 mL)	25 mg	D-DBTA (2.0 eq.)	60 °C to RT	36% ee	Not weigh
CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O 9/1 (2.5 mL)	25 mg	D-DBTA (2.0 eq.)	60 °C to RT	14% ee	Not weigh
CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O 6/1 (2.5 mL)	25 mg	D-DBTA (2.0 eq.)	60 °C to RT	89% ee	Not weigh
i-PrOH/H <sub>2</sub> O 1/1 (2.5 mL)	25 mg	D-DBTA (2.0 eq.)	60 °C to RT	79% ee	Not weigh
CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O 4/1 (1 mL)	50 mg	D-DBTA (1.0 eq.)	60 °C to RT	24% ee	46%
CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O 4/1 (1.5 mL)	50 mg	D-DBTA (1.0 eq.)	60 °C to RT	91% ee	33.7%

[0263]

실시예 10 BG-12A의 키랄 분할 및 키랄 순도 향상



[0264]

일반적인 공정: 준비된 용매 시스템의 화합물 BG-12A 용액에 승온에서 키랄 산을 첨가하였다. 승온에서 교반 후, 이를 실온으로 냉각시키고 실온에서 밤새 교반하였다. 고체를 여과하고 준비된 용매 시스템으로 세척하였다. 키랄성 순도는 관련 염 또는 유리 염기(free base)로부터 직접 키랄 HPLC로 실험하였다(표 15 참조). 다른 키랄 산 또는 용매 시스템은 ee 값, 낮은 ee 값 또는 목적하는 키랄 화합물을 제공하지 않는다.

[0265]

## 표 15

[0266]

용매 시스템 (Solvent System)	BG-12A의 양	키랄산	온도	ee 값(value)	수율
MeOH/H <sub>2</sub> O 3/1 (1500 mL)	50 g	L-DBTA (0.35 eq.)	50 °C to RT	85.6% ee	43.1%
EtOH/H <sub>2</sub> O 6/1 (250 mL)	14.4 g	L-DBTA (0.55 eq.)	78 °C to RT	79.1% ee	41.8%
n-BuOH/H <sub>2</sub> O 6/1 (20 mL)	1 g	L-DBTA (0.8 eq.)	80 °C to RT	95% ee	20%
MeOH (4 mL)	500 mg	L-DBTA (1.1 eq.)	Reflux to RT	No solid	-
EtOH (17 mL)	1.0 g	L-DBTA (1.1 eq.)	Reflux to RT	40%ee	Not weigh
EtOH (30 mL)	500 mg	L-DBTA (2.2 eq.)	Reflux to RT	No ee	Not weigh

[0268]

수득된 L-DBTA 염(31 g, 85.6 % ee)을 THF/H<sub>2</sub>O (1/1, 1034 mL)에 첨가하고, 혼탁액을 70 °C로 가온하고 모든 고체가 용해될 때까지 교반하였다. 그 다음, 517 mL의 물을 첨가하였다. 그 후 용액을 서서히 40 °C로 냉각시키고 시드 결정(seed crystal)(10mg)을 첨가하였다. 약 2 시간 동안 교반한 후, 용액을 주위 온도로 천천히 냉각시키고 2 일 동안 교반하였다. 여과하고, 고체를 THF/H<sub>2</sub>O = 1/1(20 mL)로 세척하고 감압 건조하여 백색 고체의 생성물을 수득하였다(22.5 g, 72 % 수율, > 98.5 ee 값). 얻어진 유리 염기(free base)(6.02 g, 79.1 % ee)를 (1 g / 15 mL)EtOH/H<sub>2</sub>O(6/1, 90 mL)에 용해시키고, 78 °C에서 교반하여 모든 출발 물질을 용해시켰다. 그 다음, EtOH/H<sub>2</sub>O(6/1, 7 mL)의 L-DBTA(2.84 g, 7.9 mmol, 0.55 eq.) 용액을 첨가하였다. 고체가 빠르게 형성되고, 혼합물을 상기 온도에서 1 시간 동안 교반한 후 가열 시스템을 제거하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시켰다. 여과하고, 고체를 EtOH/H<sub>2</sub>O(6/1, 10 mL)로 세척하였다. 수거된 고체를 NaOH 수용액 및 DCM를 사용하여 유리 염기로 전환시켜 백색 품의 생성물을(4.7 g, 수율 32.6 %, 93 % ee)을 수득하였다.

[0269]

CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O(1/1, 700 mL)에서 수득된 유리 염기(70.0 g, 90.5 % ee)의 혼탁액을 60 °C로 가열하여 투명한 용액을 수득하였다. 상기 용액에 L-DBTA(33g, 0.55 eq)를 첨가하였다. 60 °C에서 약 2 시간 동안 교반한 후, 혼합물을 서서히 실온으로 냉각시키고 밤새 교반하였다. 여과하고, 고체를 CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O(1/1, 50 mL)로 세척하고, 감압 건조하여 회백색 고체의 생성물을 수득하였다 (80 g, 수율: 80 % ee 값 > 98 %).

[0271]

## 실시예 11 효능 테스트

[0272]

(S)-7-(1-아크릴로일피페리딘-4-일)-2-(4-페녹시페닐)-4,5,6,7-테트라-하이드로파라졸로 [1,5-A] 피리미딘-3-카르복스아미드를 결정형 A를 사용하여 이하와 같이 실험하였다.

[0273]

테스트 1: 키나아제의 억제 및 선택성

[0274]

방법:

[0275]

## (1) BTK 키나아제 효소 분석법

[0276]

시간-결정 형광-공명 에너지 전달(time-resolved fluorescence-resonance energy transfer)(TR-FRET) 방법에 기초한 분석에서 화합물 1의 결정형 A를 BTK 키나아제(aa2-659, Carna Biosciences)의 저해에 대해 테스트하였다. BTK 키나아제, 5 μM ATP, 2 μM 웨타이드 기질 및 50 mM Tris pH 7.4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.005% Tween-20, 20 nM SEB 및 0.01 % BSA를 함유하는 완충액의 0-10 μM 화합물을 포함하는 반응 혼합물을 384-well 저용량 흡색 플레이트에서 분석을 수행하였다. 키나아제를 화합물과 함께 실온에서 60 분 동안 배양하고, ATP 및 웨타이드 기질을 첨가하여 반응을 개시시켰다. 실온에서 60분 동안 반응시킨 후, 같은 부피의 정지/검출 용액을 제조사의 방법(CisBio Bioassays)에 따라 첨가하였다. 정지/검출 용액은 50mM HEPES pH 7.0, 800mM KF, 20mM EDTA 및 0.1 % BSA를 함유하는 완충액의 Eu<sup>3+</sup> cryptate-컨쥬게이트 마우스 단일 클론 항체(PT66) 항-포스포티로신(anti-phosphotyrosine) 및 XL665-컨쥬게이트 스트렙타비딘(XL665-conjugated streptavidin)을 함유 하였다. 플레이트를 밀봉하고 실온에서 1 시간 동안 배양하고, TR-FRET 신호(337 nm 광장에서 여기와 함께 620 nm에서의 방출에 대한 665 nm에서의 형광 방출비를 PHERAstar FS 플레이트 리더(BMG Labtech)에 기록하였다. 웨타이드 기질의 인산화는 바이오-틸트화(biotinylated) 웨타이드 기질에 항-포스포 티

로신 항체(anti-phosphotyrosine antibody)의 결합을 유도하였고, 이는 수용자(acceptor)(Streptavidin-XL665)에 매우 근접하여 형광 공여자(fluorescent donor)(Eu<sup>3+</sup> cryptate)를 위치시킴으로써, 결과적으로 공여자 형광체(donor fluorophore (620 nm))로부터 수용자 형광 발색단(acceptor fluorophore (665 nm))으로 높은 수준의 형광 공명 에너지가 전달되었다. BTK 키나아제 활성의 억제는 TR-FRET 신호의 감소를 초래한다. 화합물 1에 대한 IC<sub>50</sub>은 그레프패드 프리즘 소프트웨어(Graphpad Prism software)에 의해 4-파라미터 로지스틱 방정식(four-parameter logistic equation)에 데이터를 적합하게 유도되었다.

#### [0277] (2) 생화학 키나아제 선택성

[0278] 결정형 A의 선택성을 Reaction Biology Corp.에서 1 mL로 342 개의 키나아제 패널(panel of 342 kinases)에 대하여 프로파일하였다. 결정형 A는 329개 키나아제에 비해 70 % 미만의 억제 및 BTK를 포함하는 13개 키나아제에 비하여 70 % 이상의 억제를 나타내었다. ITK, TEC, JAK3 및 EGFR 분석을 포함하는 결정형 A의 IC<sub>50</sub>은 TR-FRET 분석 및 상응하는 웹타이드를 기질로 사용하여 BeiGene내에서(in-house) 수행하였다(표 13 참조).

[0279] ITK의 IC<sub>50</sub> 측정: ITK 분석의 프로토콜은 다음 변형을 제외하고는 BTK 분석과 유사하다: 3 μM ATP 및 2 μM TK 기질이 키나아제 반응에 사용되었다.

[0280] TEC의 IC<sub>50</sub> 측정: Tec 분석의 프로토콜은 다음의 변형을 제외하고는 BTK 분석과 유사하다: 1) 280 μM ATP와 2nM Poly-GT 기질을 키나제 반응에 사용하였으며; 2) 반응 완충액에 SEB가 포함되어 있지 않다.

[0281] JAK3의 IC<sub>50</sub> 측정: JAK3 분석의 프로토콜은 다음의 변형을 제외하고는 BTK 분석과 유사하다: 1) 3.4 μM ATP 및 3 μM 웹티드 기질(B-EE-15, Biotin-EQEDEPEGDYFEWLE)을 키나아제 반응에 사용 하였으며; 2) 반응 완충액은 50mM 트리스 pH7.8, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT, 0.01 % 트리톤(Triton) X-100 및 0.01 % BSA를 함유한다.

[0282] EGFR의 IC<sub>50</sub> 측정: EGFR 분석의 프로토콜은 다음의 변형을 제외하고는 BTK 분석과 유사하다: 1) 키나아제 반응에 서 20 μM ATP, 1.44 μM TK 기질-비오틴(biotin)(티로신 키나아제를 위한 하나의 유니버설 기질(universal substrate)) 및 0-1000 nM 화합물(1 % DMSO의 최종 농도)을 사용 하였으며; 2) 반응 완충액은 50mM HEPES pH7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EGTA, 0.01 % Brij-35, 2.5mM DTT 및 0.1 % BSA를 함유하며; 3) 정지/검출 용액 완충액은 25mM HEPES pH7.5, 400mM KF, 50mM EDTA, 0.01 % Triton-X100 및 0.1 % BSA를 함유한다.

#### [0283] 결과:

[0284] BTK 키나아제에 대한 결정형 A의 IC<sub>50</sub>은 0.27nM이다. 결정형 A는 강력하고, 특이하며, 비가역적인 BTK 키나아제 억제제로 나타났다. 그것의 선택성의 관점에서, 결정형 A는 1 μM에서 342개의 인간 키나아제 패널에 대해 프로파일링을 한 경우, 70%이상의 13개의 다른 키나아제만을 억제하였다.

### 표 16

결정형 A의 효소 저해 활성

효소	IC <sub>50</sub> (nM)
BTK	0.27
ITK	53
TEC	1.9
JAK3	600
EGFR	3.6
BLK	1.13
BMX/ETK	0.62
BRK	33
ERBB4/HER4	1.58
FGR	155
FRK/PTK5	379
LCK	187
TXK	2.95

[0287] 참고: BTK, EGFR, ITK, TEC 및 JAK3 분석은 TR-FRET 분석 및 해당 웨티드를 기질로 사용하여 수행하였다. 결정형 A의 IC<sub>50</sub>은 5 개의 키나아제 및 1 시간 예비 배양과 함께 ATP의 KM에서 측정하였다. HER4, BMX, TXK, BLK FGR, LCK, FRK/PTK5 분석은 33P-ATP 및 필터 결합 분석을 사용하여 Reaction Biology Corp.에서 수행되었다. 결정형 A의 IC<sub>50</sub>은 1 μM ATP 및 1 시간 예비 배양하여 측정하였다.테스트 2: 결정형 A에 의한 BTKpY223 세포 분석(cellular assay)

[0288] 방법:

[0289] BTKpY223 세포 분석은 BTK Tyr223에서 BTK Tyr223에서 인산화의 내인성 수준(endogenous levels of phosphorylation)을 정량적으로 측정하기 위한 HTRF 기반의 분석법이다. 인산화된 Tyr223은 BTK의 완전 활성화에 필요하다. 시험은 BTKpY223 분석 키트 (63IDC000, Cisbio)를 사용하여 Ramos 세포(CRL-1596, ATCC)에서 수행하였다.

[0290] 간략하게, Ramos 세포를 0.5 % FBS 함유 RPMI1640에서 2 시간 동안 혈청 기아(serum starved)처리 하였다. 기아 처리한 다음(Following starvation), 세포를 1 시간 동안 CO<sub>2</sub> 배양기에서 다양한 농도로 검출할 수 있는 결정형 A와 함께 배양하였다. 배양 후, 세포를 1mM pervanadate (PV) 또는 Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (OV)로 20 분 동안 자극하였다. 그 다음, 세포를 회전시키고 10 분동안 실온에서 1X 용해 완충액(lysis buffer)(키트에 제공된 4x 용해 완충액)으로 용해시켰다. 배양되는 동안, 항-BTK-d2(anti-BTK-d2) 및 항-pBTK-K(anti-pBTK-K)를 검출 완충액(키트에서 공급 됨)을 회석하여 1x 항체 혼합물을 제조하였다. 1 μl/well 의 1 x 항체 혼합물을 OptiPlate-384 assay plate(6005620, Perkin Elmer)에 분배 하였다. 그 후, 18 μl의 세포 용 해물을 항체 용액이 미리 채워진 분석 플레이트에 옮겼다. 부드럽게 혼합하고 잠시 회전시킨 후, 플레이트를 밀봉하고 실온에서 18 시간 동안 어두운 곳에 보관 하였다. 형광 방출은 호환용 HTRF 판독기(compatible HTRF reader)(PHERAstar FS, BMG)에서 두 개의 다른 파장 (665 nm 및 620 nm)에서 측정되었다. 화합물 1의 효능은 665 nm 및 620 nm에서 신호 강도 사이의 비율의 억제에 기초하여 계산되었다. IC<sub>50</sub> 값은 S 자형 도스 응답 기능(dose response function)을 사용하여 GraphPad Prism 소프트웨어로 계산 하였다.

[0291] 결과:

[0292] 결정형 A는 B 세포 림프종 세포 라인(B cell lymphoma cell line)인 Ramos에서 BTK의 인산화를 1.8 ± 0.2 nM (n = 3)의 저농도로 저해시켰다.

[0293] 테스트 3: 결정형 A가 혈액 학적 암세포의 종양 세포 증식에 미치는 영향 (Rec-1, Mino, JEKO-1 및 TMD-8)

[0294] 방법:

[0295] 이 연구에서는 3 개의 MCL 세포주 (Rec-1, Mino 및 JEKO-1)와 ABC 유형의 미만성 거대B세포 림프종 세포주 (diffuse large B-cell lymphoma cell line, TMD8)를 사용하였다. 세포주를 10 % 소 태아 혈청(fetal bovine serum)/FBS(Thermo Scientific)가 첨가된 RPMI-1640에 유지시켰고; 100 units/ml 폐니실린(Gibco)과 0.1 mg/ml streptomycin(Gibco)에 넣고 공기 중 5 % CO<sub>2</sub>의 습윤 분위기에서 37°C로 유지하였다. 구입한 최초 세포에서 30 계대(passages) 이내로 저장한 동결 스타크(frozen stocks)에서 세포라인을 복원하였다.

[0296] Rec-1, Mino, JEKO-1 및 TMD-8 세포에서의 화합물의 성장 억제 활성을 CellTiter-Glo 발광 세포 생존능 분석 (luminescent cell viability assay)(Promega)을 사용하여 측정하였다. 96-well 플레이트의 well 당 시딩된 세포의 수는 6 일간의 치료 기간 동안 대수 성장하기 위해 각 세포라인에 최적화되었다. 세포를 10회 회석 시리즈 (10-point dilution series)로 3 번 처리 하였다. 혼합물을 6 일 노출 후, 각 well에 존재하는 세포 배양 배지의 부피와 동일한 양의 CellTiter-Glo 시약을 첨가하였다. 혼합물을 오비탈 쉐이커(ovital shaker)에서 2 분간 혼합하여 세포 용해시킨 후 상온에서 10 분간 배양하여, ATP의 양과 대사 활성 세포의 양에 상응하는 발광 시그널의 발생 및 안정화를 가능하게 하였다. 발광 신호는 PHERAstar FS리더(BMG Labtech)를 사용하여 측정 하였다. 세포 생존력에 대한 IC<sub>50</sub> 값은 GraphPad Prism 소프트웨어로 측정하였고, 3 가지 독립적인 분석의 평균이다.

[0297] 결과:

[0298] 화합물 1의 결정형 A는 3 개의 MCL 세포 라인 및 ABC 유형의 미만성 거대B세포 림프종 세포주 (diffuse large B-cell lymphoma cell line, TMD8)에서 세포 증식에 특이적이고 강력한 억제 효과를 나타내었다 (표 17).

## 표 17

[0299]

해마토크리트 종양 세포(hematic tumor cell) 증식에 대한 결정형 A의 억제

세포 라인(Cell line)	세포 타입(Cell Type)	IC <sub>50</sub> (nM) 효능	표준편차(Standard deviation)(nM)
Rec-1	MCL	0.36	0.03
Mino	MCL	3.8	1.8
JEKO-1	MCL	20.0	NA
TMD-8	DLBCL(ABC)	0.54	0.3

[0301]

테스트 4 : 마우스의 결정형 A의 약동학 연구(Pharmacokinetics study)방법:

[0302]

시간 경과에 따른 연구를 위해 마우스를 그룹당 4 마리의 마우스로 7 그룹으로 무작위 배정하였다. 마우스를 화합물 1의 결정형 A의 단일 투여량으로 투약 후 서로 다른 시점(30 분, 1, 2, 4, 12, 24 시간)에 이산화탄소를 사용하여 안락사시켰다. 용량 의존성 연구를 위해, 마우스를 그룹당 4 마리의 마우스로 9 그룹으로 무작위 배정하였다. 마우스를 화합물 1의 결정형 A의 서로 다른 투여량 수준으로 처리하고 투약 4 시간 후 이산화탄소를 사용하여 안락사시켰다. 처리는 경구 위관 영양법(oral gavage)(p.o.)에 의해 체중 kg 당 10 mL의 양으로 투여하였다. 투여 직전에 체중을 측정하고 이에 따라 투여량을 조정하였다.

[0303]

PK 샘플 준비: 시간 경과 연구를 위해, 투여 15 분 후 시점에 이소풀란(isoflurane)/산소 마취(oxygen anesthesia)(이 그룹의 마우스를 24 시간 시점(time point)으로 사용함) 또는 다른 시점에서 안락사 시킨 후(euthanization) 심장을 찌른(heart puncture) 조건하에서 혈액 샘플(마우스 당 50 μL)을 레트로-오비탈 시너스(retro-orbital sinus)에서 수집하였다. 용량 의존성 연구를 위해, 투약 30 분 후 이소풀란(isoflurane)/산소 마취(oxygen anesthesia)하에서 혈액 샘플을 레트로-오비탈 시너스(retro-orbital sinus)에서 채취하였다. 혈장을 3,000g에서 10 분간 원심 분리하여 수집하고 분석할 때까지 -80 °C에서 동결시켰다.

[0304]

PK 분석: 최대 혈장 농도(C<sub>max</sub>) 및 C<sub>max</sub>(T<sub>max</sub>)에 도달하는 시간은 혈장 농도 대 시간 프로파일(plasma concentration versus time profiles)로부터 직접 실시하였다.

[0305]

결과:

[0306]

결정형 A는 ICR 마우스에서 빠르게 흡수되어 제거되었다.

[0307]

테스트 5: TMD-8 이종 이식 모델(xenograft model)의 결정형 A의 효능 연구

[0308]

종양 주입 방법(Tumor implantation Methods):

[0309]

동물을 이를 동안 매일 1 일 1 회 시클로포스파미드(cyclophosphamide)(식염수 150 mg/kg 조제) 및 디슬피람(disulfiram)(0.8 % Tween 80 (식염수, 125 mg/kg 용량으로 시클로포스파미드(cyclophosphamide) 투여 1시간 후 제조)으로 전처리하였다. 이어서, 시클로포스파미드의 두 번째 투여 24 시간 후에 TMD-8 세포를 동물에게 접종하였다. 이식 당일 세포 배양 배지를 새로운 배지로 교체 하였다. 4 시간 후, 배지를 제거하고 상기 기재된 바와 같이 세포를 수집 하였다. 차가운(4 °C) PBS에 세포를 재현탁하고 같은 양의 마트리겔(matrigel)(BD, Cat # 356237)을 첨가하여 최종 농도 2.5 X 10<sup>7</sup> cells/ml를 얻었다. 재현탁 세포는 접종 전에 얼음에 놓아뒀다. 세포 접종 전에 75 % 에탄올로 각 마우스의 우측 겨드랑 부위를 세척하였다. 각 동물에게 26 게이지 바늘을 통해 오른쪽 앞 측면에 200 μl의 세포 혼탁액에 5 x 10<sup>6</sup> 세포를 피하 주사했다.

[0310]

생체내 유효성 연구를 위하여, 세포 접종 후 3일부터 시작하여, 그룹당 10 마리의 마우스를 갖는 원하는 수의 그룹으로 동물을 무작위로 할당하였다. 마우스를 비히클(0.5 % 카르복시메틸셀룰로스(carboxymethylcellulose, CMC) + 0.2 % Tween 80)으로 매일 2 회 처리하고, 화합물 1의 결정형 A의 서로 다른 투여 수준을 39 일 동안 처리하였다. 처리는 경구 위관 영양(oral gavage)(p.o.)에 의해 체중 kg 당 10 mL의 양으로 투여되었다. 투여 직전에 체중을 측정하고 이에 따라 투여량을 조정하였다. 종양 부피는 캘리퍼(calliper)(이 연구에서 접종 후 11일부터 측정 가능)를 사용하여 2 차원으로 매주 2회 측정하였다. 종양 부피는 다음 식을 사용하여 계산되었다.

V = 0.5 X (a X b<sup>2</sup>) 여기서 a와 b는 각각 종양의 긴 직경과 짧은 직경이다. 통계 분석은 학생 T-테스트를 사용하여 수행되었다. P < 0.05는 통계적으로 유의하다고 간주되었다. 한 개인이 전체 연구 기간 동안 종양 측정을 담당하였다. 체중도 매주 2 회 기록하였다. 마우스는 또한 연구 기간 동안 독성의 임상 징후를 매일 모니터링

하였다.

[0311] 결과:

[0312] 결정형 A의 생체 내(*In vivo*) 효능을 NOD/SCID 마우스에서 피하로(subcutaneously) 성장한 TMD-8 DLBCL 이종 이식(xenografts)에서 평가하였다. 1 일 2 회(BID)의 서로 다른 투여 레벨에서도 잘 견딜 수 있는 수준으로 매 일 경구 투여 후, 화합물 1의 결정형 A는 용량 의존성 항-종양 효과를 유도하였다. 가장 낮은 용량으로 화합물 1의 결정형 A는 이미 강력한 항-종양 활성을 나타내었다. 모든 치료 그룹은 연구 전반에 걸쳐 동물 체중에 유의한 영향을 미치지 않았다.

[0313] 테스트 6: 전신 REC-1 이종 이식 모델(xenograft model)에서의 결정형 A의 효능 연구

[0314] 종양 주입 방법(Tumor implantation Methods):

[0315] 동물을 이를 동안 매일 1 일 1 회 시클로포스파미드(cyclophosphamide)(식염수(saline)로 제조, 150 mpk i.p.) 및 디술피람(disulfiram)(0.8 % TW-80 식염수, 125 mpk p.o., 시클로포스파미드 투여 1 시간 후 제조)으로 전 처리 하였다. 이어서, 사이클로포스파미드의 두 번째 투여 후 24 시간 후에 REC-1 세포로 동물을 접종하였다. 주입 당일 세포 배양 배지를 새로운 배지로 교체하였다. 4 시간 후, 배지를 제거하고 상기 기재된 바와 같이 세포를 수집하였다. 차가운(4 °C) PBS에 세포를 재현탁하여  $1 \times 10^8$  cells/ml의 최종 농도가 되도록 하였다. 재현탁 세포는 주입하기 전에 열음에 두었다. 각 동물에게 100  $\mu$ l의 세포 혼탁액에  $1 \times 10^7$  세포를 꼬리 정맥을 통해 정맥내 주사하였다.

[0316] 세포 접종 후 8 일부터 시작하는 생체 내(*in vivo*) 효능 연구를 위해, 그룹당 10 마리의 마우스를 갖는 원하는 수의 그룹으로 동물을 무작위로 할당 하였다. 마우스를 비히클(0.5 % 카르복시메틸셀룰로즈(carboxymethylcellulose)(CMC) + 0.2 % Tween 80)으로 매일 2 회(BID) 처리하고, 화합물 1의 결정형 A의 서로 다른 수준을 71 일 동안 처리하였다. 모든 접종은 접종 후 78 일에 중지되었다. 처리는 경구 위관 영양(p.o.)에 의해 체중 kg 당 10 ml의 양으로 투여되었다. 투여 직전에 체중을 측정하고 이에 따라 투여 량을 조정 하였다. 체중은 매주 두 번 기록되었다 (33 일부터 주 3 회 변경). 마우스는 또한 연구 기간 동안 질병의 임상 징후가 있는지 매일 관찰하였다. 연구의 종점은 전반적인 생존율이다. 움직임의 상실과 같은 심각한 독성 효과의 경우, 마우스를 안락사 시키고 죽음으로 기록하였다.

[0317] 데이터 분석: 생존 분석은 Kaplan-Meier 방법으로 수행되었다. 생존 시간(survival time)은 종양 세포 접종일부터 동물 사망 또는 안락사 한 날까지의 시간으로 정의하였다. 각 그룹에 대해 평균 생존 시간(median survival time, MST), 95 % 신뢰 구간(confidence interval) 및 생존 기간(increase in life-span, ILS)을 갖는 생존 시간 범위(range of survival time, RST)를 계산하였다. 중간 생존율은 생쥐의 50 %가 사망한 때로 정의된다. ILS는 다음 공식을 사용하여 계산되었다:

$$\%ILS = (MST - MST_{(vehicle)}) / MST_{(vehicle)} \times 100$$

[0319] 통계 분석은 Gehan-Breslow-Wilcoxon Test를 사용하여 각 그룹간에 수행되었다. P <0.05는 통계적으로 유의하다고 간주되었다.

[0320] 결과:

[0321] 화합물 1의 결정형 A는 NOD/SCID 마우스에서 전신 REC-1 MCL 이식(systemic REC-1 MCL engrafts)에 대한 용량 의존성 항-종양 활성을 나타냈다. 화합물 1의 결정질 형태 A는 이종 이식 모델(xenograft model)에서 상당히 효과적이었다.

[0322] 테스트 7: 결정형 A의 독성(Toxicology of Crystalline Form A)

[0323] 쥐와 개에서 28 일간의 GLP 연구와 여러 조사 연구를 포함한 포괄적인 비 임상 독성 연구 프로그램(comprehensive nonclinical toxicity study program)은 서로 다른 투여량으로 화합물 1의 결정형 A의 전임상 안전성을 평가하기 위해 수행되었다. 이 연구는 항암제의 전임상 개발에 대한 규제 지침을 고려한 것이다. 이러한 연구에서, 화합물 1은 유리한 독성학 및 안전성 약리학적 특성을 나타내었다. 이 시험 기간 동안 모든 투여량 수준에서 관련 사망은 발생하지 않았다. 임상 화학적 또는 응고에 독성학적으로 유의한 변화는 연구 기간 동안 언급되지 않았다. 회복 단계 이후에는 이러한 변화가 전혀 나타나지 않았다.

[0324] 테스트 8: 결정형 A의 약동학(Pharmacokinetics of Crystalline Form A)

[0325] 완전 유효성 확인된(fully-validated) LC-MS/MS 방법은 일회 투여 및 다중 투여(single- and multiple-dose administrations) 후 스프라구-돌리 랫 및 비글 도그(Sprague-Dawley rats and beagle dogs)에서 화합물 1의 결정질 형태 A의 약물 동태학(PK) 시험에 잘 사용되었다. 화합물 1의 결정형 A는 래트(rat)에서 양호한 경구 생체 이용률을 갖는다. 신속하게 흡수되어 래트에서 높은 혈청 클리어런스(plasma clearance)(CL)를 나타내었다. 반응 속도는 암컷 래트에서 투여량 범위에 걸쳐 직선모양의 선형이였다. 수컷 래트의 선형성은 좋지 않았다. 암컷 래트와 수컷 래트의 복합적인 경구 투여 후 화합물 1의 통계적으로 유의한 축적물은 없었다. 화합물 1의 결정형 A는 투여량 범위에 걸쳐 적당한 PK(clearance)(CL), 적정한 생체 이용률(F %), 투여량 범위 이상의 선형 PK 및 도그에 다중 경구 투여후 화합물 1의 축적물을 없는 것으로 나타났다.

#### 테스트 9: 결정형 A의 ADME

[0327] 화합물 1은 다양한 조직에 널리 분포되었지만 뇌 조직에서는 낮아 약물이 혈액 뇌 장벽(blood-brain barrier)을 쉽게 통과하지 못함을 나타낸다.

[0328] 7 개의 주요 약물 대사 CYP 아이소자임(isozymes) (CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A)에 대한 화합물 1의 IC<sub>50</sub> 값을 인간 간 마이크로솜(human liver microsomes)에서 측정하고, 화합물 1의 주요 CYP 동질 효소에 대한 시간-의존성 저해 잠재성(time-dependent inhibition potential)도 평가하였다. 이는 CYP2C8(IC<sub>50</sub> = 4.03 μM), CYP2C9(IC<sub>50</sub> = 5.69 μM) 및 CYP2C19(IC<sub>50</sub> = 7.58 μM)에 대한 약한 저해(weak inhibition)를 보였으나, 다른 CYP 동종 효소에 대해서는 낮은 저해(lower inhibition)를 나타내었다. 화합물 1은 상기 7가지 주요 인간 CYPs의 시간-의존성 CYP 억제제가 될 것 같지 않다(unlikely). CYP3A는 인간의 간 마이크로솜(microsomes)에서 신뢰할 수 있는 물질 대사 담당하는 주요 CYP 이소폼(isoform)이다.

#### **실시예 12: 임상 실험(Clinical Trial Study)**

[0331] (1) 진행중인 임상 시험 1 단계 진행된 B 세포 악성 종양(advanced B cell malignancies) 환자에서 화합물 1에 대한 결과

[0332] 인간에서 최초의 다중 센터(first-in-human multi-center), 화합물 1의 공개 표지(open label) 임상 1상 시험은 호주와 뉴질랜드에서 실시되고 있으며, 25명을 포함하는 용량 증가 단계(dose-escalation phase) 및 용량 확장 단계(dose-expansion phase)의 두 부분으로 구성되며, 총 100명의 환자를 등록할 예정이다. 초기 용량 증가 구성(initial dose-escalation component)의 25 명과 진행중인 용량 확장 구성(ongoing dose-expansion component)의 14 명의 환자를 포함한 총 39 명의 환자가 등록되었다. 복용량 확장 단계(dose-escalation phase)에서 화합물 1의 약물동력학, 약력학, 안전성 및 효능에 근거하여, 진행중인 용량 확장 시험에서 320mg 1 일 1회(QD) 및 160mg 2 회 1 일 (BID)가 추가로 연구되고 있다.

[0333] 데이터 분석 마감일인 2015년 10월 19일, 3 개의 완전한 응답(complete responses, CR), 1 개의 매우 양호한 부분 응답(very good partial response, VGPR) 및 25 개의 부분 응답(partial responses, PR)을 포함한 29 개의 객관적인 응답이 관찰되었다. 조직학(histology)에 의한 응답은 표 18에 요약되어있다. 39 명의 환자 중 31 명은 무진행(free of progression), 객관적 응답을 한 모든 환자를 포함하여 치료 연구를 계속한다.

#### **표 18**

##### **환자의 조직학에 의한 반응**

	추적 관찰 중간값 (Follow-up Days Median)(Range)	베스트 반응(Best Response)				ORR(CR+PR)
		CR	PR	SD	PD	
만성 림프구성 백혈병(Chronic Lymphocytic Leukemia)	220 (83-329)	0/14 (0%)	13/14 <sup>1</sup> (93%)	1/14 (7%)	0 (0%)	13/14 (93%)
외투세포 림프종(mantle cell lymphoma)	148 (84-392)	2/10 (20%)	6/10 (60%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)	8/10 (80%)
왈덴스트룀 마크로글로불린혈증(Waldenstrom macroglobulinemia)	271 (11-398)	0/7 (0%)	6/7 <sup>2</sup> (86%)	0/7 (0%)	1/7 (14%)	6/7 (86%)

DLBCL	29 (20-236)	1/4 (25%)	0/4 (0%)	0/4 (0%)	3/4 (75%)	1/4 (25%)
무통의(Indolent) NHL	233(215-250)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)
모양세포성백혈병 (Hairy cell)leukemia	362	0/1 (0%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)
버킷-유사 백혈병 (Burkitt's-like )leukemia	84	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)

[0336] <sup>1</sup> 최근 평가시 림프구 증가증(lymphocytosis)이 있는 5 명의 환자를 포함; <sup>2</sup> VGPR 환자 1 명 포함참고: CR = 완전한 응답. PR = 부분 응답; SD = 안정된 질환; PD = 진행성 질환; ORR = 객관적인 응답률

[0337] 질병 진행으로 의한 6명, 그들의 기본 악성 종양과 관련된 부작용으로 2 명을 포함하여 8 명의 환자에 대하여 화합물 1을 중단 시켰다. 질병 진행 또는 질병 진행의 합병증으로 3 명의 환자가 연구 중에 사망하였다. 약물 관련 심각한 이상 반응(serious adverse events, SAEs)이 없었다. 치료와의 연관성에 관련없이 대부분의 이상 반응은 1 등급 또는 2 등급이었으며 치료 제한이 없었다. 19 개 ≥3 등급의 AE 중 4 개는 모두 자체 제한 호중구 감소증(self-limited neutropenia)으로 연구자에 의해 약물관련 가능성이 있다고 평가되었으며, 치료 중단(treatment discontinuation)이 필요하지 않았다. 주요 출혈의 하나의 예가 있으며, 등급 3 또는 그 이상의 출혈 사건(bleeding event grade 3) 또는 모든 등급의 두개강 내 출혈 사건(intracranial bleeding event)으로 정의된다: GI 트랙(GI tract)의 림프종 관련(lymphomatous involvement) 외투세포 림프종(mantle cell lymphoma, MCL) 환자의 GI 출혈(hemorrhage); 이 출혈 사건은 약물 보류(drug hold)중 발생하고 화합물 1 치료의 재개시 신속히 해결되므로 약물 관련된 것으로 간주되지 않는다. 6 명의 환자는 심방 세동/조동 atrial fibrillation/flutter, AF)의 기저 병력(baseline history)이 있었고 AF의 악화 또는 새로운 사건은 보고되지 않았다.

[0338] (2) 발덴스트롬 마크로글로불린혈(Waldenström Macroglobulinemia, WM) 환자에서 화합물 1에 대한 지속적인 임상 시험 1 단계 결과

[0339] 다중 센터, B-세포 악성종양(B-cell malignancies)에 대한 화합물1의 공개 표지(open label) 임상 1상 시험은 호주, 뉴질랜드, 한국 및 미국에서 실시되고 있으며, 치료 나이브(naive) 및 재발성/난치성 발덴스트롬 마크로글로불린혈(Waldenström Macroglobulinemia, R/R WM)을 포함하는 질병 특이적 코호트(disease-specific cohorts)에서 용량 증가 단계(dose-escalation phase)와 용량 확장 단계(dose-expansion phase)로 구성된다. 트레일(trail)의 용량 증가 구성(dose-escalation component)은 40mg-320mg 범위의 총 일일 투여량을 테스트하였으며, 진행중인 용량 확장 단계는 160mg 1 일 2 회(BID) 또는 320mg 1 일 1 회 (QD)의 용량을 테스트하였다. 2017년 3 월 31 일 현재 48 명의 WM 환자가 이 연구에 등록되었다. 응답은 WM (IWWM) 기준에 대한 수정된 제 6 회 국제 워크샵에 따라 결정되었다.

[0340] 화합물 1은 현재까지 화합물 1 관련 독성에 대한 중단 없이 양호한 약학내성을 나타내는 것으로 나타났다. 이상 반응(Adverse events, AEs)은 일반적으로 통증은 가벼우며 자기 제한적이었다. 안전성 평가가 가능한 48 명의 환자 중에서 가장 빈번한 AE (> 10 %)는 점상출혈/자반증/타박상(petechiae/purpura/contusion) (35%), 상부 호흡기 감염(upper respiratory tract infection)(31%), 변비(constipation)(25%), 설사(diarrhea)(19%), 코피(epistaxis)(19%), 구역질(nausea)(17%), 기침(cough)(15%), 빈혈증(anemia)(15%), 두통(headache)(15%), 호중구감소증(neutropenia)(13%), 및 발진(rash)(13%), 모두 3 등급 또는 4 등급의 빈혈증과 호중구감소증(8 %)과 3 등급 또는 4 등급의 설사와 두통(2 %)을 제외하고 모두 1 등급 또는 2 등급이었다. 5 가지 심각한 AE는 화합물 1과 관련이 있다고 평가되었다; 이들에는 혈흉(hemothorax), 심방 세동(atrial fibrillation), 대장염(colitis), 열성 호중구감소증(febrile neutropenia) 및 두통이 각각 하나의 케이스로 포함되어 있다. 특히 관심을 가지는 AEs 중에서 심방 섬유성 연축(모두 2 또는 2 등급), 및 3등급 또는 그 이상의 출혈로 정의되는 심각한 출혈(혈흉, hemothorax), 또는 모든 등급의 중추 신경계 출혈(nervous system hemorrhage)의 총 3가지 케이스가 있다. 세 가지 사건으로 인해 치료가 중단되었다: 각 기관지 확장증(bronchiectasis), 전립선 선암(prostate adenocarcinoma) 및 유문 선암(adenocarcinoma of pylorus) 각각 하나의 케이스가 있다.

[0341] 데이터 컷오프(data cutoff) 당시 42명의 환자가 반응을 평가할 수 있었다. 효능에 대해 평가할 수 없는 환자는

12주 미만의 추적 관찰 기간을 가진 2명의 환자, 기준선에서 IgM <500mg/dl의 환자 3명, 저온 단백질로 인한 기준선 IgM이 부정확한 환자 1명을 포함하였다. 12.3개월(4.4-30.5 개월)의 중간 추적 관찰(median follow-up)에서 ORR은 90%(38/42 환자) 이었고 주요 반응률은 76%(32/42 patients)로, 환자의 VGPR 43%와 환자의 부분 반응의 33% (14/42)에서 나타났다.

[0342] (3) 만성 림프구성 백혈병(Chronic Lymphocytic Leukemia) 및 소형 림프 림프구성(Small Lymphocytic Lymphoma)(CLL/SLL) 환자의 화합물 1에 대한 진행 임상 시험 1 단계 결과

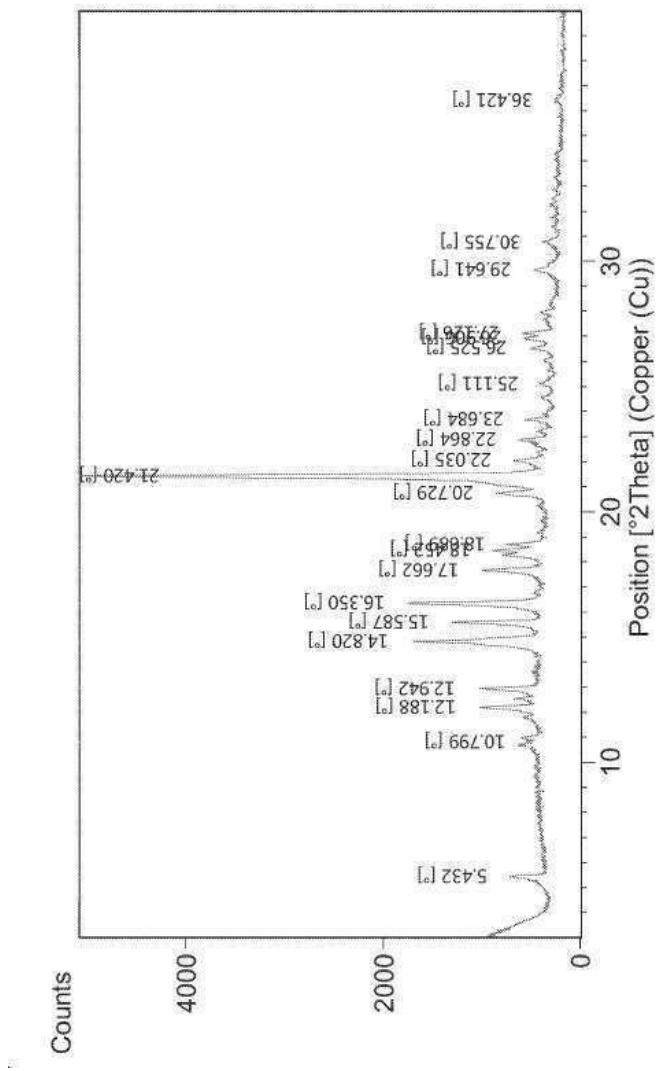
[0343] 다중 센터(multi-center), B-세포 악성종양(B-cell malignancies)에 대한 화합물1의 공개 표지(open label) 임상 1상(phase 1) 시험은 호주, 뉴질랜드, 한국 및 미국에서 실시되고 있으며, 치료 나이브(treatment naive, TN) 및 재발성/난치성(R/R) CLL/SLL을 포함하는 질병 특이적 코호트(disease-specific cohorts)에서 용량 확장 단계(dose-expansion phase)와 용량 증가 단계(dose-escalation phase)로 구성된다. 트레일(trail)의 용량 증가 구성(dose-escalation component)은 40mg과 320mg 사이의 총 일일 투여량을 테스트했으며 진행중인 용량 확장 구성은 160mg 1일 2회 (BID) 또는 320mg 1회 1회 (QD)의 용량을 테스트한다. 2017년 3월 31일 현재, CLL 또는 SLL (18 TN, 51 R/R) 환자 69명이 이 연구에 등록되어 있다.

[0344] 화합물 1은 CLL/SLL에서 잘 견디는 것으로 나타났다. 어떤 원인의 가장 빈번한 이상반응(AEs)( $\geq 10\%$ )은 점상출혈/ 자반증/ 타박상(petechiae/ purpura/ contusion)(46%), 마비(fatigue) (29%), 상부 호흡기 감염(upper respiratory tract infection)(28%), 기침(cough) (23%), 설사(diarrhea)(22%), 두통(headache) (19%), 혈뇨(hematuria)(15%), 구역질(nausea)(13%), 발진(rash)(13%), 관절통(arthralgia)(12%), 근육 경련(muscle spasm)(12%), 및 요로감염증(urinary tract infection)(12%); 이 모든 사건은 유일한 주요 출혈 사건인 3 등급 자반증(purpura)(피하 출혈, subcutaneous hemorrhage) 1 예를 제외하고는 1 등급 또는 2 등급이었다. 관심 있는 추가적인 이상반응(adverse events)으로는 각 2 등급 설사(diarrhea)와 2 등급 심방 세동(atrial fibrillation)이 각각 1건 있었다. 총 18 개의 심각한 AE(SAEs)가 13명의 환자에서 발생하였고, SA는 1명 이상의 환자에서 발생하지 않았다. AE(2 등급 흉막 삼출, pleural effusion)로 인하여 단 한명의 환자만 치료를 중단하였다.

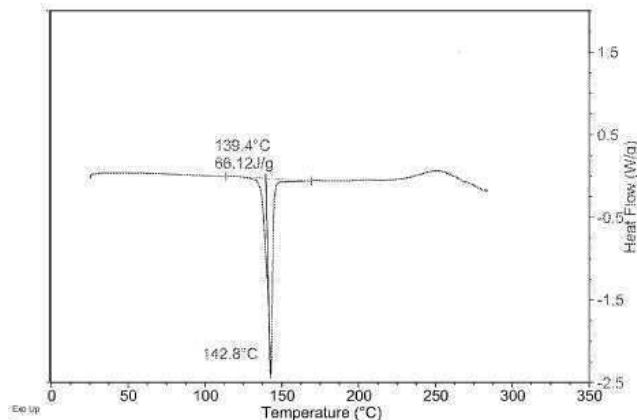
[0345] 데이터 컷오프 당시 66명의 환자(TN 16 명, R/R 50명)는 12주 이상의 추적 관찰 기간을 가지며 효능을 평가할 수 있었고, 다른 세 명의 환자는 12주 미만의 추적 관찰 기간을 가졌다. 10.5개월(2.2-26.8개월)의 중간 추적 관찰 후, 전체 반응율(ORR)은 94% (62/66), 완전 응답율(CRs) 3%(2/66), 82%(54/66)의 부분응답률(PRs), 및 환자의 9%(6/66)에 속하는 림프구 증가증(lymphocytosis, PR-Ls)를 가지는 PRs이다. 안정적인 질병 (SD)은 5%(3/66)의 환자에서 관찰되었다. 흉막 삼출(pleural effusion)을 가진 환자는 12주 이전에 치료를 중단했고 반응을 평가할 수 없었다. 호지킨의 변형(Hodgkin's transformation) 사례가 하나 있었다. TN CLL/SLL에서 평균 추적 관찰 기간 7.6개월(3.7-11.6개월)에서 ORR은 CRs 6% (1/16)에서 100%, PR은 81%(13/16), PR-Ld1 환자의 13%(2/16)이다. R/R CLL/SLL에서 평균 추적 관찰기간은 14.0개월(2.2-26.8개월)이었고, ORR은 CRs가 2%(1/50)에서 92%(46/50), PR은 82%(41/50), PR-L은 환자의 8%(4/50)이다. 안정한 질병은 6% (3/50) 환자에서 관찰되었다.

## 도면

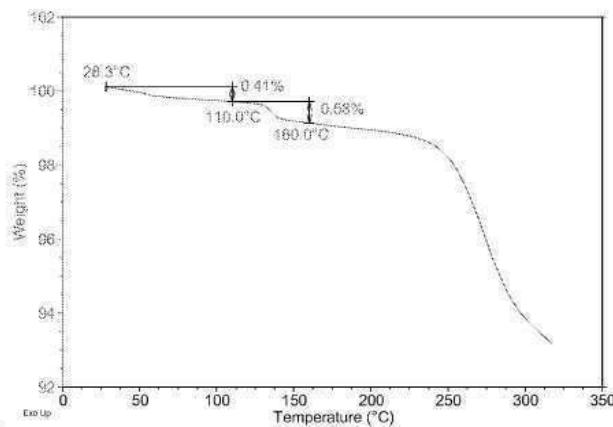
### 도면1



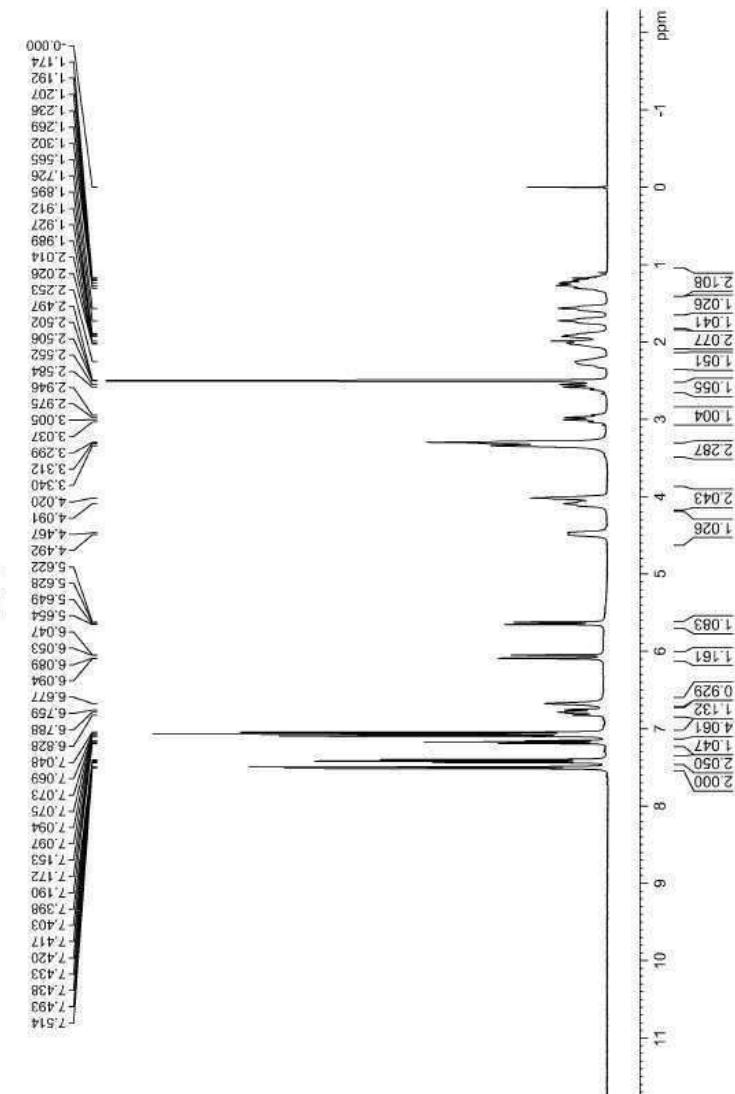
### 도면2



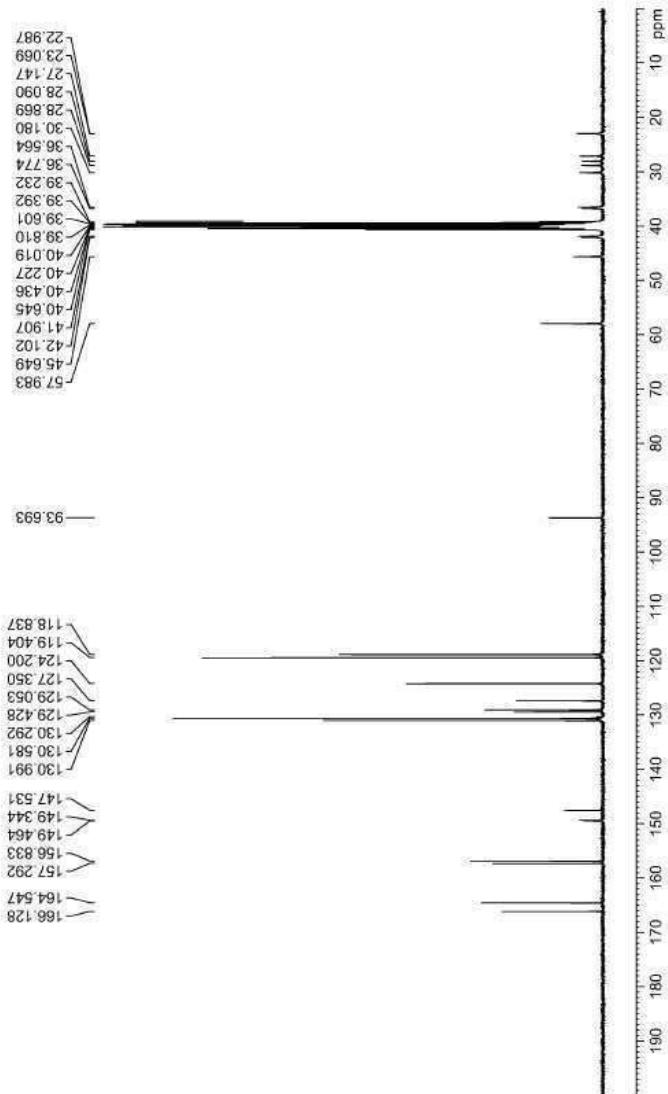
## 도면3



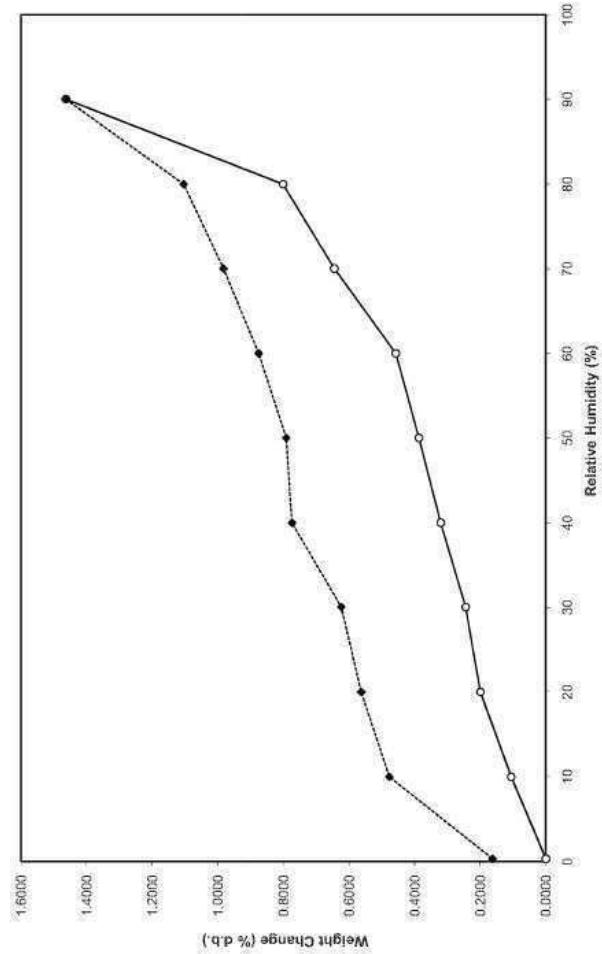
## 도면4



## 도면5

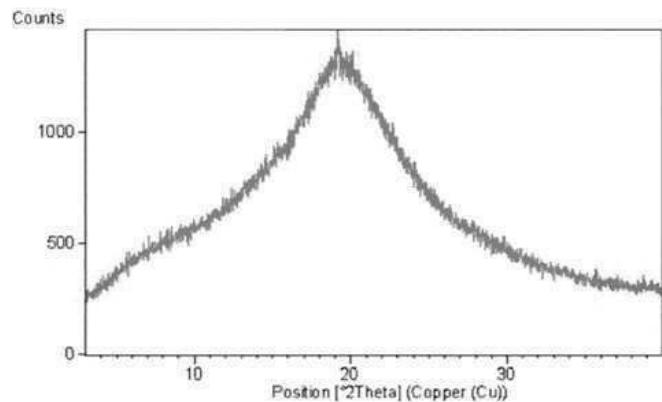


도면6

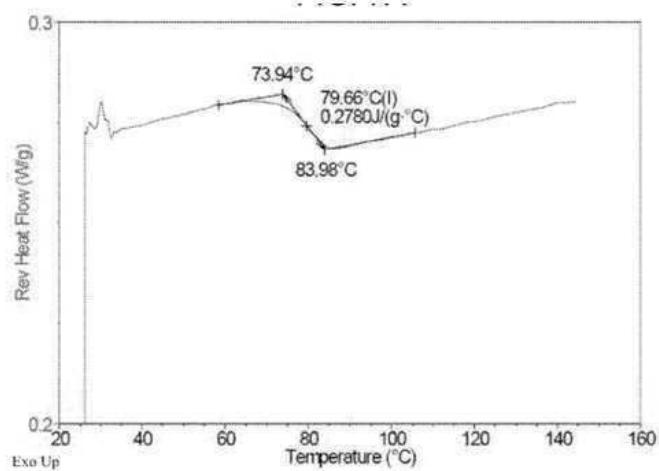


도면7

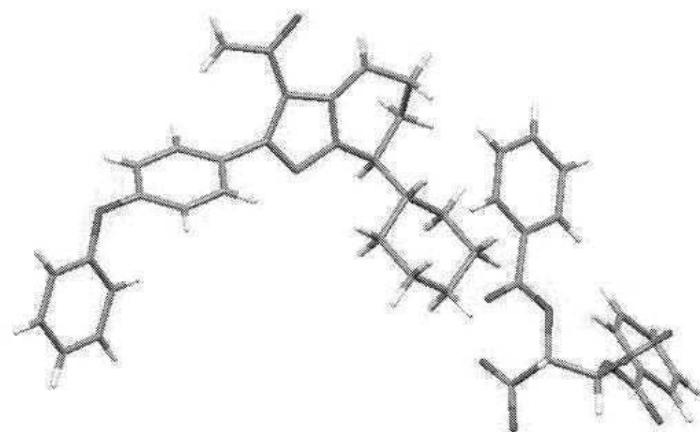
(7a)



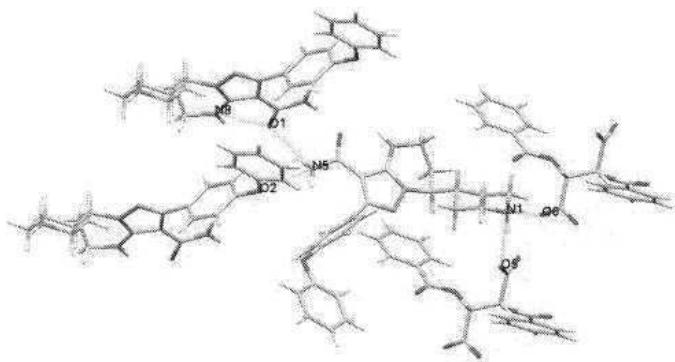
(7b)



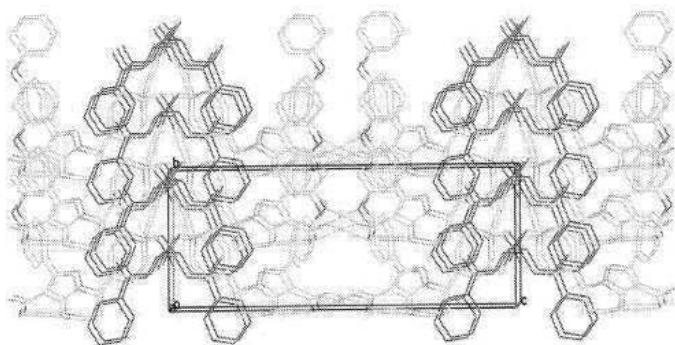
도면8



도면9



도면10



도면11

