



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0113496
(43) 공개일자 2024년07월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 487/04 (2006.01) A61K 31/437 (2006.01)
A61K 31/443 (2006.01) A61K 31/4436 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01) C07D 471/04 (2006.01)
C07D 491/048 (2006.01) C07D 495/04 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07D 487/04 (2022.08)
A61K 31/437 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7018708
- (22) 출원일자(국제) 2022년12월02일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2024년06월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2022/051717
- (87) 국제공개번호 WO 2023/102228
국제공개일자 2023년06월08일
- (30) 우선권주장
63/285,833 2021년12월03일 미국(US)
63/348,557 2022년06월03일 미국(US)
- (71) 출원인
데시페라 파마슈티칼스, 엘엘씨.
미국 매사추세츠 (우편번호 02451) 왈담 스미스 스트리트 200
- (72) 발명자
안, 유 미
미국 02451 매사추세츠 월섬 스미스 스트리트 200
알-아니, 가다
미국 02451 매사추세츠 월섬 스미스 스트리트 200
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 김영

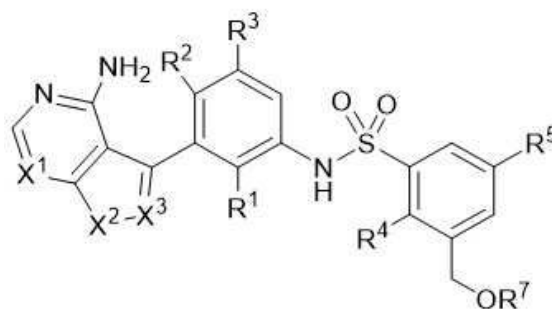
전체 청구항 수 : 총 133 항

(54) 발명의 명칭 GCN2 및 PERK 키나아제 억제제로서의 헥테로고리 화합물

(57) 요약

GCN2 키나아제 또는 PERK 키나아제의 억제제인 화학식 1-A의 화합물, 및 GCN2 키나아제 또는 PERK 키나아제와 연관된 질환을 포함하는 질환을 상기 화합물로 치료하는 방법이 본원에 기술된다.

대표도



화학식 I-A

(52) CPC특허분류

A61K 31/443 (2013.01)
A61K 31/4436 (2013.01)
A61K 31/519 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 35/02 (2018.01)
C07D 471/04 (2022.08)
C07D 491/048 (2013.01)
C07D 495/04 (2013.01)

(72) 발명자

플린, 다니엘 엘.

미국 02451 매사추세츠 월섬 스미스 스트리트 200

자베드, 살림

미국 02451 매사추세츠 월섬 스미스 스트리트 200

키어니, 패트릭

미국 02451 매사추세츠 월섬 스미스 스트리트 200

르 보도넥, 베르트랑

미국 02451 매사추세츠 월섬 스미스 스트리트 200

스톨츠, 크리스틴

미국 02451 매사추세츠 월섬 스미스 스트리트 200

즈위커, 제프리

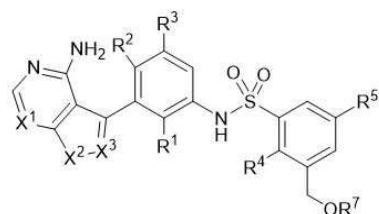
미국 02451 매사추세츠 월섬 스미스 스트리트 200

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I-A로 표시되는 화합물:



화학식 I-A

또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상 이성질체, 입체 이성질체, 또는 호변 이성질체로서, 식 중:

X^1 및 X^3 은 CH 및 N으로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

X^2 는 산소, NR^6 , O, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^1 , R^2 , 및 R^3 은 H, 할로젠, 시아노, 및 알콕시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

R^4 는 할로젠, 알콕시 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^5 는 H, 할로젠 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^6 은 H, 알킬, 알케닐, 알케닐알킬, 알키닐, 알키닐알킬, 시클로알킬, 시클로알킬알킬, 알콕시알킬, 시클로알케닐, 헤테로시클릴, 헤테로시클릴알킬, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로아릴알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^7 은 H, 알킬, 및 아실로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상 이성질체, 입체 이성질체, 또는 호변 이성질체.

청구항 2

제1항에 있어서, R^1 , R^2 , 및 R^3 중 적어도 하나는 할로젠인, 화합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, R^1 , R^2 , 및 R^3 중 적어도 하나는 플루오로인, 화합물.

청구항 4

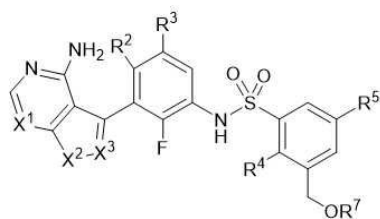
제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, R^1 은 플루오로인, 화합물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, X^1 은 N, 화합물.

청구항 6

하기 화학식 I-B로 표시되는 화합물:



화학식 I-B

또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상 이성질체, 입체 이성질체, 또는 호변 이성질체로서, 식 중:

X^1 및 X^3 은 CH 및 N으로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

X^2 는 산소, NR^6 , O, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^2 및 R^3 은 H, 할로젠, 시아노, 및 알콕시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

R^4 는 할로젠, 알콕시 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^5 는 H, 할로젠 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^6 은 H, 알킬, 알케닐, 알케닐알킬, 알키닐, 알키닐알킬, 시클로알킬, 시클로알킬알킬, 알콕시알킬, 시클로알케닐, 헤테로시클릴, 헤테로시클릴알킬, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로아릴알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

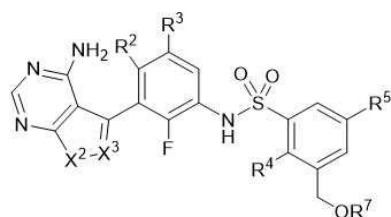
R^7 은 H, 알킬, 및 아실로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상 이성질체, 입체 이성질체, 또는 호변 이성질체.

청구항 7

제6항에 있어서, X^1 은 N인, 화합물.

청구항 8

하기 화학식 I-C로 표시되는 화합물:



화학식 I-C

또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상 이성질체, 입체 이성질체, 또는 호변 이성질체로서, 식 중:

X^2 는 산소, NR^6 , O, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되고;

X^3 은 CH 및 N으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^2 및 R^3 은 H, 할로젠, 시아노, 및 알콕시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

R^4 는 할로젠, 알콕시, 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^5 는 H, 할로젠, 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^6 은 H, 알킬, 알케닐, 알케닐알킬, 알키닐, 알키닐알킬, 시클로알킬, 시클로알킬알킬, 알콕시알킬, 시클로알케닐, 헤테로시클릴, 헤테로시클릴알킬, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로아릴알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

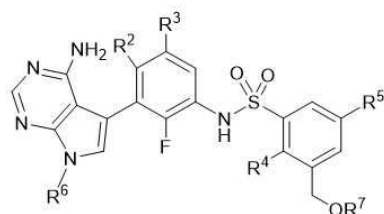
R^7 은 H, 알킬, 및 아실로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상 이성질체, 입체 이성질체, 또는 호변 이성질체.

청구항 9

제8항에 있어서, X^2 는 NR^6 인, 화합물.

청구항 10

하기 화학식 I-D로 표시되는 화합물:



화학식 I-D

또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상 이성질체, 입체 이성질체, 또는 호변 이성질체로서, 식 중:

R^2 및 R^3 은 H, 할로젠, 시아노, 및 알콕시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고;

R^4 는 할로젠, 알콕시 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^5 는 H, 할로젠 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^6 은 H, 알킬, 알케닐, 알케닐알킬, 알키닐, 알키닐알킬, 시클로알킬, 시클로알킬알킬, 알콕시알킬, 시클로알케닐, 헤테로시클릴, 헤테로시클릴알킬, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로아릴알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^7 은 H, 알킬, 및 아세테이트로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상 이성질체, 입체 이성질체, 또는 호변 이성질체.

청구항 11

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 는 H이고 R^3 은 H인, 화합물.

청구항 12

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 는 F이고 R^3 은 H인, 화합물.

청구항 13

제6항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, R^2 는 H이고 R^3 은 F인, 화합물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, R^6 은 (C_1-C_8) 알킬, (C_2-C_8) 알케닐, (C_2-C_8) 알케닐- (C_1-C_4) 알킬, (C_2-C_8) 알키닐, (C_2-C_8) 알키닐- (C_1-C_4) 알킬, (C_3-C_8) 시클로알킬, (C_3-C_8) 시클로알킬- (C_1-C_4) 알킬, (C_3-C_8) 알콕시- (C_1-C_4) 알킬, (C_3-C_8) 시클로알케닐, (C_3-C_8) 시클로알케닐- (C_1-C_4) 알킬, 헤테로시클릴, 헤테로시클릴- (C_1-C_4) 아릴, 헤테

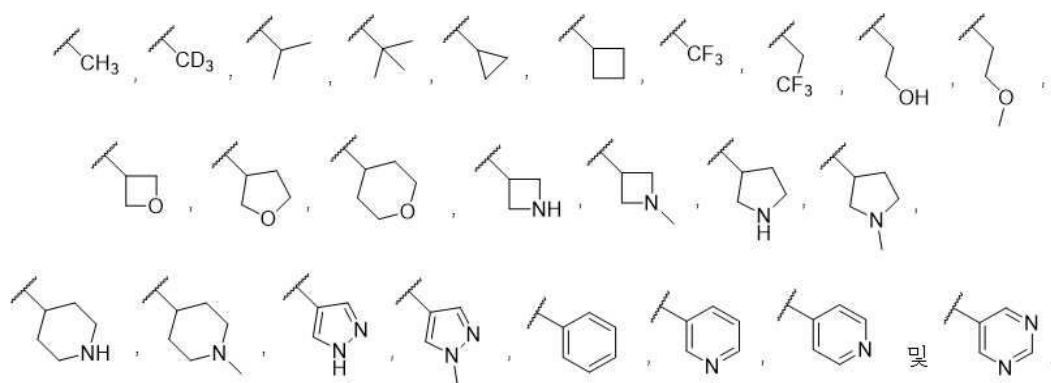
로아릴, 및 헤테로아릴-(C₁-C₄)알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, R⁶은 (C₁-C₈)알킬, (C₃-C₈)시클로알킬, (C₃-C₈)알콕시-(C₁-C₄)알킬, 헤테로시클릴, 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, R⁶은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물:



청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, R⁴는 할로젠, (C₁-C₆)알콕시 및 (C₁-C₆)알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, R⁴는 클로로, 플루오로, 메톡시, 및 메틸로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, R⁵는 H, 할로젠, 및 (C₁-C₆)알킬로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물.

청구항 20

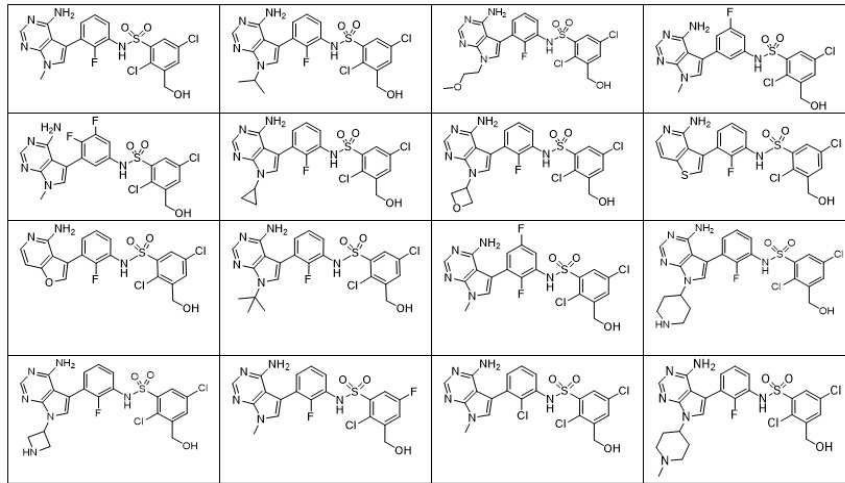
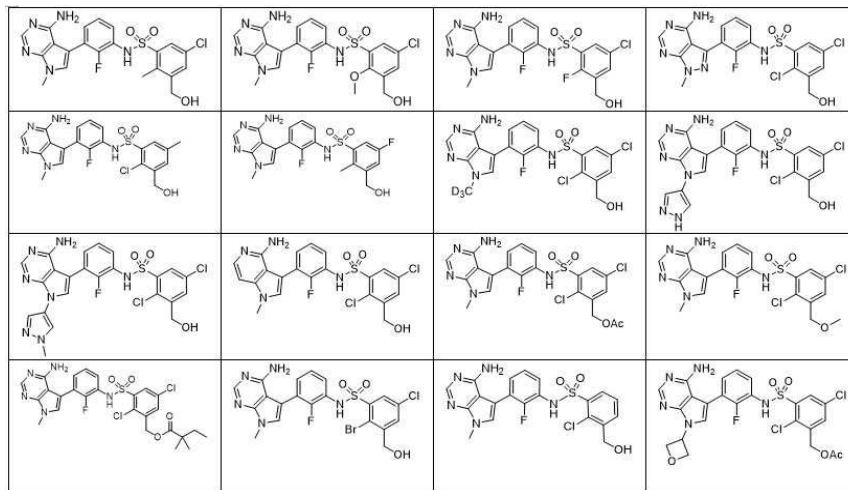
제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, R⁵는 클로로, 플루오로, 및 메틸로 이루어진 군으로부터 선택되는, 화합물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, R⁷은 H인, 화합물.

청구항 22

화합물로서:



로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물, 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상 이성질체, 입체 이성질체, 및 호변 이성질체.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 24

통합 스트레스 반응의 조절 장애에 의해 야기되는 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법으로, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 통합 스트레스 반응 및/또는 미접힘 단백질 반응의 조절 장애는 PERK 키나아제 및 GCN2 키나아제로 이루어진 군으로부터 선택된 키나아제에 의해 야기되는, 방법.

청구항 26

제24항 또는 제25항에 있어서, 통합 스트레스 반응 및/또는 미접힘 단백질 반응의 조절 장애는 GCN2 키나아제에 의해 야기되는, 방법.

청구항 27

제24항 또는 제25항에 있어서, 통합 스트레스 반응 및/또는 미접힘 단백질 반응의 조절 장애는 PERK 키나아제에 의해 야기되는, 방법.

청구항 28

GCN2 키나아제 활성 조절을 필요로 하는 환자에서 이를 조절하는 방법으로서, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 29

GCN2 키나아제의 활성화를 필요로 하는 환자에서 이를 활성화하는 방법으로서, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 30

PERK 키나아제 활성 조절을 필요로 하는 환자에서 이를 조절하는 방법으로서, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 31

PERK 키나아제의 활성화를 필요로 하는 환자에서 이를 활성화하는 방법으로서, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 32

GCN2 키나아제의 억제 및 PERK 키나아제의 억제를 필요로 하는 환자에서 이를 억제하는 방법으로서, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 33

GCN2 키나아제 활성의 억제를 필요로 하는 환자에서 이를 억제하는 방법으로서, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 34

PERK 키나아제 활성의 억제를 필요로 하는 환자에서 이를 억제하는 방법으로서, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 35

암 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 암은, 대장암, 폐암, 중피종, 췌장암, 인두암, 후두암, 식도암, 위암, 십이지장암, 소장암, 유방암, 난소암, 고환 종양, 전립선암, 간암, 갑상선암, 신장암, 자궁암, 임신성 용모암종, 뇌종양, 망막아종, 피부암, 흑색종, 육종, 섬유육종, 악성 골 종양, 방광암, 혈액암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, B-세포 림프종, 여포성 림프종, 외투 세포

림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, T-세포 림프종, 적백혈병, 조직구증 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 경쇄 아밀로이드증, 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 37

제36항 또는 제37항에 있어서, 암은 백혈병인, 방법.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 암은 급성 골수성 백혈병인, 방법.

청구항 39

제36항 또는 제37항에 있어서, 암은 급성 림프구성 백혈병인, 방법.

청구항 40

제36항 또는 제37항에 있어서, 암은 섬유육종인, 방법.

청구항 41

제36항 또는 제37항에 있어서, 암은 다발성 골수종인, 방법.

청구항 42

제36항 또는 제37항에 있어서, 암은 림프종인, 방법.

청구항 43

제127항 또는 제128항에 있어서, 암은 B 세포 림프종인, 방법.

청구항 44

제36항 또는 제37항에 있어서, 암은 T 세포 림프종인, 방법.

청구항 45

아밀로이드증의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 46

경쇄 아밀로이드증의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 47

GCN2 연관 질환 및 PERK 연관 질환으로부터 선택되는 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물의 치료적 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 질환은 GCN2 연관 질환인, 방법.

청구항 49

제47항에 있어서, 질환은 PERK 연관 질환인, 방법.

청구항 50

제47항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 질환은 암인, 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 암은, 대장암, 폐암, 중피종, 췌장암, 인두암, 후두암, 식도암, 위암, 십이지장암, 소장암, 유방암, 난소암, 고환 종양, 전립선암, 간암, 갑상선암, 신장암, 자궁암, 임신성 용모암종, 뇌종양, 망막아종, 피부암, 흑색종, 육종, 섬유육종, 악성 골 종양, 방광암, 혈액암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, B-세포 림프종, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, T-세포 림프종, 적백혈병, 조직구증 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 52

제50항 또는 제51항에 있어서, 암은 백혈병인, 방법.

청구항 53

제50항 또는 제51항에 있어서, 암은 급성 골수성 백혈병인, 방법.

청구항 54

제50항 또는 제51항에 있어서, 암은 급성 림프구성 백혈병인, 방법.

청구항 55

제50항 또는 제51항에 있어서, 암은 섬유육종인, 방법.

청구항 56

제50항 또는 제51항에 있어서, 암은 다발성 골수종인, 방법.

청구항 57

제50항 또는 제51항에 있어서, 암은 림프종인, 방법.

청구항 58

제50항 또는 제51항에 있어서, 암은 B 세포 림프종인, 방법.

청구항 59

제50항 또는 제51항에 있어서, 암은 T 세포 림프종인, 방법.

청구항 60

제47항에 있어서, 질환은 아밀로이드증인, 방법.

청구항 61

제47항에 있어서, 질환은 경쇄 아밀로이드증인, 방법.

청구항 62

GCN2 연관 질환 및 PERK 연관 질환으로부터 선택되는 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 치료적 유효량, 및 하나 이상의 치료적 제제의 치료적 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 질환은 GCN2 연관 질환인, 방법.

청구항 64

제62항에 있어서, 질환은 PERK 연관 질환인, 방법.

청구항 65

제62항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 질환은 암인, 방법.

청구항 66

제65항에 있어서, 암은, 대장암, 폐암, 중피종, 췌장암, 인두암, 후두암, 식도암, 위암, 십이지장암, 소장암, 유방암, 난소암, 고환 종양, 전립선암, 간암, 갑상선암, 신장암, 자궁암, 임신성 용모암종, 뇌종양, 망막아종, 피부암, 흑색종, 육종, 섬유육종, 악성 골 종양, 방광암, 혈액암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, B-세포 림프종, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, T-세포 림프종, 적백혈병, 조직구증 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈 증, 경쇄 아밀로이드증, 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 67

제65항 또는 제66항에 있어서, 암은 백혈병인, 방법.

청구항 68

제65항 또는 제66항에 있어서, 백혈병은 급성 골수성 백혈병인, 방법.

청구항 69

제65항 또는 제66항에 있어서, 백혈병은 급성 림프구성 백혈병인, 방법.

청구항 70

제65항 또는 제66항에 있어서, 암은 섬유육종인, 방법.

청구항 71

제65항 또는 제66항에 있어서, 암은 다발성 골수종인, 방법.

청구항 72

제65항 또는 제66항에 있어서, 암은 림프종인, 방법.

청구항 73

제65항 또는 제66항에 있어서, 암은 B 세포 림프종인, 방법.

청구항 74

제65항 또는 제66항에 있어서, 암은 T 세포 림프종인, 방법.

청구항 75

제62항에 있어서, 질환은 아밀로이드증인, 방법.

청구항 76

제62항에 있어서, 질환은 경쇄 아밀로이드증인, 방법.

청구항 77

제62항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 치료제는 IMiD 제제, 프로테아좀 억제제, 스테로이드, 항-CD38 제제, 항-CD20 제제, Bcl-2 억제제, PI3K 억제제, 이중특이적 항체, 뉴클레오시드 유사체, BTK 억제제, DNA 알킬화제, EZH2 억제제, 안트라사이클린, 국소이성화효소 억제제, 플라틴, 티로신 키나아제 억제제, HDAC 억제제, 핵 방출 억제제, 항-미세관 제제, L-아스파라기나아제, 페길화 아스파라기나아제, PERK 억제제, mTOR 억제제, 면역조절제, MAPK 경로 억제제, MEK 억제제, ERK 억제제, 및 Ras 억제제로 이루어진 군으로

부터 선택되는, 방법.

청구항 78

제62항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 치료제는 L-아스파라기나아제, 페가스파르가아제, 칼라스파르가아제 페글 - mnk1, 보르테조밍, 카르필조밍, 익사조밍, 탈리도마이드, 포말리도마이드, 레날리도마이드, 텍사메타손, 프레드니손, 다라투무맙, 다라투무맙/히알루로니다아제, 이사특시맙, 리특시맙, 오비누투주맙, 베네토클락스, 이텔라리십, 코판리십, 두벨리십, 움브랄리십, 켄시타빈, 시타라빈, 이브루티닙, 아칼라브루티닙, 자누브루티닙, 벤다무스틴, 시클로포스파미드, 타제메토스타트, 독소루비신, 다우노루비신, 에토포시드, 옥살로플라틴, 카르보플라틴, 시스플라틴, 보수티닙, 다사티닙, 이마티닙, 닐로티닙, 포나티닙, 파노비노스타트, 셀리넥서, 빈크리스틴, JZP-458, 에라스파아제, PF745(JZP-341), 아스파라기나아제 *에르비니아 크리스산테미(Erwinia chrysanthemi)*(크리스산타스파아제), 대장균 아스파라기나아제(콜라스파아제), 항-PD1 제제, 항-PDL1 제제, 및 항-CTLA4 제제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 79

통합 스트레스 반응 및/또는 미접힘 단백질 반응의 조절 장애에 의해 야기되는 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물.

청구항 80

제79항에 있어서, 통합 스트레스 반응 및/또는 미접힘 단백질 반응의 조절 장애는 PERK 키나아제 및 GCN2 키나아제로 이루어진 군으로부터 선택되는 키나아제에 의해 야기되는, 용도.

청구항 81

제79항 또는 제80항에 있어서, 통합 스트레스 반응 및/또는 미접힘 단백질 반응의 조절 장애는 GCN2 키나아제에 의해 야기되는, 용도.

청구항 82

제79항 또는 제80항에 있어서, 통합 스트레스 반응 및/또는 미접힘 단백질 반응의 조절 장애는 PERK 키나아제에 의해 야기되는, 용도.

청구항 83

GCN2 키나아제 활성의 조절을 필요로 하는 환자에서 이를 조절하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물.

청구항 84

GCN2 키나아제 활성화를 필요로 하는 환자에서 이를 활성화하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물.

청구항 85

PERK 키나아제 활성의 조절을 필요로 하는 환자에서 이를 조절하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물.

청구항 86

PERK 키나아제 활성화를 필요로 하는 환자에서 이를 활성화하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물.

청구항 87

GCN2 키나아제의 억제 및 PERK 키나아제의 억제를 필요로 하는 환자에서 이를 억제하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물.

청구항 88

GCN2 키나아제 활성의 조절을 필요로 하는 환자에서 이를 조절하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물.

청구항 89

PERK 키나아제 활성의 억제를 필요로 하는 환자에서 이를 억제하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물.

청구항 90

암의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물.

청구항 91

제89항에 있어서, 암은, 대장암, 폐암, 중피종, 췌장암, 인두암, 후두암, 식도암, 위암, 십이지장암, 소장암, 유방암, 난소암, 고환 종양, 전립선암, 간암, 갑상선암, 신장암, 자궁암, 임신성 용모암종, 뇌종양, 망막아종, 피부암, 흑색종, 육종, 섬유육종, 악성 골 종양, 방광암, 혈액암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, B-세포 림프종, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, T-세포 림프종, 적백혈병, 조직구증 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 용도.

청구항 92

제89항 또는 제90항에 있어서, 암은 백혈병인, 용도.

청구항 93

제89항 또는 제90항에 있어서, 암은 급성 골수성 백혈병인, 용도.

청구항 94

제89항 또는 제90항에 있어서, 암은 급성 림프구성 백혈병인, 용도.

청구항 95

제89항 또는 제90항에 있어서, 암은 섬유육종인, 용도.

청구항 96

제89항 또는 제90항에 있어서, 암은 다발성 골수종인, 용도.

청구항 97

제89항 또는 제90항에 있어서, 암은 림프종인, 용도.

청구항 98

제89항 또는 제90항에 있어서, 암은 B-세포 림프종인, 용도.

청구항 99

제89항 또는 제90항에 있어서, 암은 T 세포 림프종인, 용도.

청구항 100

아밀로이드증의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물.

청구항 101

경색 아밀로이드증의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물.

청구항 102

GCN2 연관 질환 및 PERK 연관 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물.

청구항 103

제101항에 있어서, 질환은 GCN2 연관 질환인, 용도.

청구항 104

제101항에 있어서, 질환은 PERK 연관 질환인, 용도.

청구항 105

제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 질환은 암인, 용도.

청구항 106

제104항에 있어서, 암은, 대장암, 폐암, 중피종, 췌장암, 인두암, 후두암, 식도암, 위암, 십이지장암, 소장암, 유방암, 난소암, 고환 종양, 전립선암, 간암, 갑상선암, 신장암, 자궁암, 임신성 용모암종, 뇌종양, 망막아종, 피부암, 흑색종, 육종, 섬유육종, 악성 골 종양, 방광암, 혈액암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, B-세포 림프종, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, T-세포 림프종, 적백혈병, 조직구증 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 용도.

청구항 107

제103항 또는 제104항에 있어서, 암은 백혈병인, 용도.

청구항 108

제103항 또는 제104항에 있어서, 암은 급성 골수성 백혈병인, 용도.

청구항 109

제103항 또는 제104항에 있어서, 암은 급성 림프구성 백혈병인, 용도.

청구항 110

제103항 또는 제104항에 있어서, 암은 섬유육종인, 용도.

청구항 111

제103항 또는 제104항에 있어서, 암은 다발성 골수종인, 방법.

청구항 112

제103항 또는 제104항에 있어서, 암은 림프종인, 방법.

청구항 113

제103항 또는 제104항에 있어서, 암은 B 세포 림프종인, 방법.

청구항 114

제103항 또는 제104항에 있어서, 암은 T 세포 림프종인, 방법.

청구항 115

제101항에 있어서, 질환은 아밀로이드증인, 용도.

청구항 116

제101항에 있어서, 질환은 경쇄 아밀로이드증인, 용도.

청구항 117

GCN2 연관 질환 및 PERK 연관 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 데 사용하기 위한, 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 제23항의 약학적 조성물.

청구항 118

제116항에 있어서, 질환은 GCN2 연관 질환인, 용도.

청구항 119

제116항에 있어서, 질환은 PERK 연관 질환인, 용도.

청구항 120

제116항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 질환은 암인, 용도.

청구항 121

제119항에 있어서, 암은, 대장암, 폐암, 중피종, 췌장암, 인두암, 후두암, 식도암, 위암, 십이지장암, 소장암, 유방암, 난소암, 고환 종양, 전립선암, 간암, 갑상선암, 신장암, 자궁암, 임신성 용모암종, 뇌종양, 망막아종, 피부암, 흑색종, 육종, 섬유육종, 악성 골 종양, 방광암, 혈액암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, B-세포 림프종, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, T-세포 림프종, 적백혈병, 조직구증 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 용도.

청구항 122

제119항 또는 제120항에 있어서, 암은 백혈병인, 용도.

청구항 123

제119항 또는 제120항에 있어서, 백혈병은 급성 골수성 백혈병인, 용도.

청구항 124

제119항 또는 제120항에 있어서, 백혈병은 급성 림프구성 백혈병인, 용도.

청구항 125

제119항 또는 제120항에 있어서, 암은 섬유육종인, 용도.

청구항 126

제119항 또는 제120항에 있어서, 암은 다발성 골수종인, 방법.

청구항 127

제119항 또는 제120항에 있어서, 암은 림프종인, 방법.

청구항 128

제119항 또는 제120항에 있어서, 암은 B 세포 림프종인, 방법.

청구항 129

제119항 또는 제120항에 있어서, 암은 T 세포 림프종인, 방법.

청구항 130

제116항에 있어서, 질환은 아밀로이드증인, 용도.

청구항 131

제116항에 있어서, 질환은 경쇄 아밀로이드증인, 방법.

청구항 132

제116항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 치료제는 IMiD 제제, 프로테아좀 억제제, 스테로이드, 항-CD38 제제, 항-CD20 제제, Bcl-2 억제제, PI3K 억제제, 이중특이적 항체, 뉴클레오시드 유사체, BTK 억제제, DNA 알킬화제, EZH2 억제제, 안트라사이클린, 국소이성화효소 억제제, 플라틴, 티로신 키나아제 억제제, HDAC 억제제, 핵 방출 억제제, 항-미세관 제제, L-아스파라기나아제, 폐길화 아스파라기나아제, PERK 억제제, mTOR 억제제, 면역조절제, MAPK 경로 억제제, MEK 억제제, ERK 억제제, 및 Ras 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 용도.

청구항 133

제116항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 치료제는 L-아스파라기나아제, 페가스파르가아제, 칼라스파르가아제 페골 - mnk1, 보르테조미, 카르필조미, 익사조미, 탈리도마이드, 포말리도마이드, 레날리도마이드, 텍사메타손, 프레드니손, 다라투무맙, 다라투무맙/히알루로니다아제, 이사톡시맙, 리톡시맙, 오비누투주맙, 베네토클락스, 이델라리십, 코판리십, 두벨리십, 움브랄리십, 켄시타빈, 시타라빈, 이브루티닙, 아칼라브루티닙, 자누브루티닙, 벤다무스틴, 시클로포스파미드, 타제메토스타트, 독소루비신, 다우노루비신, 에토포시드, 옥살로플라틴, 카르보플라틴, 시스플라틴, 보수티닙, 다사티닙, 이마티닙, 닐로티닙, 포나티닙, 파노비노스타트, 셀리넥서, 빈크리스틴, JZP-458, 에라스파아제, PF745(JZP-341), 아스파라기나아제 *에르비니아 크리산테미*(*Erwinia chrysanthemi*)(크리산타스파아제), 대장균 아스파라기나아제(콜라스파아제), 항-PD1 제제, 항-PDL1 제제, 및 항-CTLA4 제제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2021년 12월 3일에 출원된 미국 특허 가출원 제63/285,833호, 및 2022년 6월 3일에 출원된 미국 특허 가출원 제63/348,557호에 대한 우선권을 주장하며, 이들 각각의 내용은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

배경 기술

[0003] 암세포는 비정상적인 성장 및 신속한 분열을 유지하기 위해 지속적인 영양소 공급을 필요로 한다. 이러한 영양소의 일부로서, 아미노산은 종양 세포의 높은 대사 요구를 지원하는 데 필수적이다.

[0004] GCN2는 세린/트레오닌 단백질 키나아제로서, 통합된 스트레스 반응(ISR)에서의 마스터 조절자인 진핵생물 개시 인자 2α(eIF2α) 키나아제 중 하나이다. ISR은 광범위한 스트레스 인자 하에서 세포 항상성을 유지하는 데 필수적이며, 세포가 저산소증 및 아미노산 결핍과 같은 스트레스 조건에 처할 경우 활성화된다. ISR은 세포 항상성 장애에 대한 초기 반응자로서 작용하는 GCN2를 포함하는, eIF2α 키나아제의 인산화 및 활성화에 의해 조절된다. GCN2에 더하여, PKR-유사 ER 키나아제(PERK), 이중-가닥 RNA-의존성 단백질 키나아제(PKR), 및 헴(heme)-조절 eIF2α 키나아제(HRI)를 포함하는 3개의 다른 eIF2α 키나아제 계열이 존재한다. 4개의 eIF2α 키나아제 모두는 이들의 키나아제 촉매 도메인에서 광범위한 상동성을 공유하지만, 구별되는 조절 도메인을 갖는다. 각각의 IF2α 키나아제는 이의 고유 조절 메커니즘을 반영하는 구별되는 환경적 및 생리학적 스트레스에 반응한다. PERK 키나아제는 ATP 고갈 및 미접힘 단백질 반응을 포함하는 스트레스 조건 하에서 활성화되며, GCN2

와 마찬가지로, PERK 키나아제 활성화는 주요 ISR 전사 인자 ATF4의 상향 조절을 야기한다.

[0005] 필수 아미노산 제한 또는 다른 스트레스 인자(UV 조사, 산화환원 스트레스 또는 프로테아좀 억제)의 조건 하에서, GCN2는 eIF2 α 를 인산화하며, 이는 새로운 삼원 복합체의 형성을 억제하여 이에 따른 mRNA 번역 개시를 억제한다. 전역 mRNA 번역을 감소시키는 동시에, 종양 세포에서의 eIF2 α 인산화는 또한 ISR 전사 인자 ATF4의 번역을 증가시키며, 이는 종양 세포에 아미노산을 제공하는 데 전용인 유전자, 즉, 아미노산의 종양 세포 내로의 유입을 매개하는 아미노산 합성 효소 및 수송체를 포함하는 다수의 스트레스 반응 유전자의 발현을 증가시킨다. ATF4는 인간 고형 종양 및 액체 종양에서 과발현되며, 이는 종양 진행에 있어서 이의 중요한 기능을 시사한다.

[0006] 아스파라긴은 발암 및 종양 생물학에 유의한 영향을 미치는 여러 생체합성 경로에 관여하는 중요한 아미노산이다. 모든 세포는 단백질 합성 및 성장을 위해 아스파라긴을 필요로 한다. 정상 세포는 내부 합성을 통해 아스파라긴 요건의 대부분을 수득한다. 정상 세포와 비교하여, 암세포는 성장하고 증식하기 위해 증가된 양의 아스파라긴을 필요로 하고, 필요한 양을 스스로 생산할 수 없으며, 생존하기 위해서는 순환하는 아스파라긴에 의존해야 한다. 아스파라긴 합성효소(ASNS)는 아스파르테이트 및 글루타민으로부터의 아스파라긴의 합성을 촉매한다. L-아스파라기나아제(ASNase)는 순환하는 아스파라긴을 제거함으로써, 암세포로부터 주요 영양소를 강탈하고 이들을 사멸시킨다. 종양 특이적 대사 특징부를 표적화하는 항암 치료의 첫 번째 예인 L-아스파라기나아제의 사용은 소아 급성 림프구성 백혈병(ALL)에서 양호하게 확립된 치료이지만, 이의 독성은 해당 환자 모집단을 넘어서의 사용을 제한한다. 정상 세포와 비교하여, 다수의 ALL 세포주에서의 ASNS의 특히 낮은 수준의 발현은, 성장에 필요한 영양소로서 순환하는 혈청 아스파라긴에 대한 세포의 특이한 의존성에 기인하는 아스파라긴 고갈화를 효과적인 치료 방법으로 만든다. 아스파라기나아제에 대한 불량한 반응은 재발 위험 증가와 연관된다. 다른 혈액암 및 고형암은 ASNS를 낮은 수준으로 발현하므로, 아스파라긴 영양요구체 및 아스파라기나아제에 민감할 것이다. 반대로, 일부 암 유형에서 ASNS는 과발현되며, 세포 증식, 화학저항, 및 전이성 거동을 촉진한다. 아스파라기나아제 내성 암의 경우, 대신 L-아스파라기나아제를 통한 혈액 아스파라긴 고갈화의 효과는, 화학요법 약물의 효과를 효과적으로 무효화하는 것을 보상하기 위해 상당한 ASNS 과발현을 야기한다. 다수의 연구는 ASNS가 아미노산 결핍 및 다른 형태의 세포 스트레스에 대한 세포 반응의 중심에 있음을 밝혔다. 전사 조절을 통해, ASNS 유전자는 세포 생존을 보장하기 위한 두가지 신호 전달 경로의 표적이다. 아미노산 반응(Amino Acid Response, AAR)으로 명명된 제1 경로는 아미노산 가용성이 불균형한 조건 하에서 GCN2 키나아제에 의해 활성화된다. 미접힘 단백질 반응(Unfolded Protein Response, UPR)으로 명명된 제2 경로는 소포체 스트레스가 증가된 조건 하에서 PERK 키나아제에 의해 활성화된다. AAR 및 UPR 경로는 eIF2 α 의 인산화에 수렴되며, 이는 전역 단백질 합성의 약화를 유발하는 동시에, 전사 인자 ATF4를 포함하는 선택된 mRNA 집단의 우선적 번역을 유발한다. ATF4는 ASNS 유도의 주요 인자로서, ASNS 프로모터 내의 인핸서 요소에 대한 결합을 통해 트랜스-활성제로서 작용한다.

[0007] GCN2는 시험관 내 및 생체 내에서 ASNS의 낮은 기저 수준 발현을 갖는 암세포를 항백혈병제 L-아스파라기나아제에 민감화시킨다. GCN2 억제제를 사용하는 치료는 ASNS의 유도를 방지함으로써 급성 림프구성 백혈병 세포를 L-아스파라기나아제에 민감하게 만든다. GCN2 억제제는 ASNS-저/결핍 암에서 L-아스파라기나아제와 상승적인 항증식 효과를 나타낸다. 따라서, GCN2 억제제와 L-아스파라기나아제를 사용하는 병용 치료는 급성 림프구성 백혈병 및 다른 유형의 암에서 개선된 결과를 달성할 가능성을 나타낸다. 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 및 체장암 세포는 L-아스파라기나아제 및 GCN2 억제제의 병용 치료에 특히 민감하다. 이전에 보고된 연구는 단일 제제 L-아스파라기나아제 또는 GCN2 억제제 치료의 결과와 비교 시, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 및 체장암 세포에서 ASNase와 GCN2 억제제의 병용 치료의 강력한 항종양 활성을 입증하였다. 따라서, GCN2 억제제는 이들 종양을 치료하는 데 사용되는 L-아스파라기나아제에 대한 감작제를 대표할 수 있다. 요약하면, GCN2 억제는 기저 수준에서 ASNS 발현이 낮은 암세포에서 ASNS 유도를 방지함으로써 L-아스파라기나아제 치료에 대한 민감도를 향상시킨다.

[0008] GCN2의 억제는 또한 종양 세포의 트립토판 의존성 면역감시를 포함하여, 면역계를 포함하는 종양 미세환경을 표적화하기 위한 효과적인 전략일 수 있다.

[0009] 종양 미세환경(TME; 종양 세포를 둘러싸는 일련의 세포의 성분 및 기질 세포(내피 세포, 암 연관 섬유아세포, 종양 연관 대식세포, 종양 침윤 T 세포))은 산소 및 주요 영양소, 예컨대 포도당 및 아미노산의 결핍을 특징으로 하여, 전반적인 면역 억제 환경을 야기한다.

[0010] 많은 종양은 이들의 대사 유연성을 활용하고 자신의 이익을 위해 영양소를 재유도함으로써 면역 감시를 회피하도록 진화하였다. 종양 내의 기질 세포 및 골수 유래 억제 세포(MDSC)는 면역 기능을 억제하고 종양 성장을 지원하는 영양소가 부족한 환경을 생성한다.

[0011] 트립토판 대사에서의 주요 효소의 과발현에 의해 유도되는, 필수 아미노산 중 하나인 트립토판의 이화작용의 상승[인돌아민-2,3-디옥시게나아제(IDO) 및 트립토판-2,3-디옥시게나아제(TDO)]은 종양 미세환경의 세포에 의해 유도되어, 많은 유형의 암에서 면역억제 미세환경을 야기한다. 국소 트립토판 고갈화는 주요 T 세포 면역억제 메커니즘으로 간주된다. T 세포에서, GCN2 키나아제는 트립토판 강탈의 분자 센서로서 식별되었다. 트립토판 고갈화에 의한 GCN2 활성화는 세포자멸사를 유도하고 T 세포 증식을 완하시킨다. GCN2는 IDO/TDO에 대한 주요 효과기 신호전달 성분이며, 높은 트립토판 의존성 T 세포의 대사 관문으로 간주된다.

[0012] GCN2 경로는 종양 면역 탈출에 중요할 뿐만 아니라, 종양 미세환경의 다른 양태를 조절하는 데 중요한 역할을 한다. GCN2 녹다운은, 종양이 혈관 형성 증가를 통해 영양 공급을 향상시키는 데 사용하는 혈관 내피 성장 인자(VEGF)의 아미노산 결핍(AAD) 유도 발현을 방지하는 것으로 입증되었다. 따라서, GCN2/ATF4 경로의 활성화는 AAD 매개 VEGF 발현을 통해 종양 성장 및 혈관형성을 촉진한다. ATF4 또는 GCN2 발현의 제거는 생체 내에서 종양 성장을 유의하게 억제하였다.

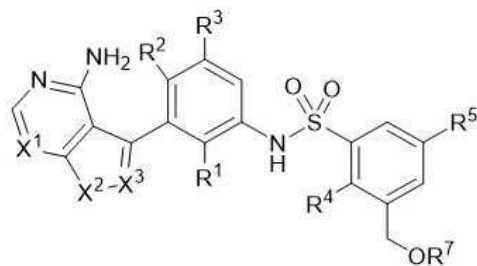
[0013] 따라서, GCN2의 선택적 억제는 면역계의 활성을 증가시키고 종양 미세환경에서 혈관신생을 감소시킬 수 있다. GCN2-eIF2a-ATF4 경로는 스트레스 조건 하에서의 종양 세포에서 대사 항상성을 유지하고 면역억제된 면역 세포 미세환경을 유지하는 데 중요하다. PERK-ATF4 경로는 또한 스트레스 조건 하에서 종양 세포의 항상성을 유지하는 데 매우 중요하다. GCN2의 억제가 PERK를 보상 메커니즘으로서 활성화시킬 수 있고, 그 반대의 경우 PERK의 억제가 GCN2를 보상 메커니즘으로서 활성화시킬 수 있도록, GCN2 및 PERK 신호전달 경로 둘 모두의 교차 대화 조절이 존재하는 것으로 보고되었다.

[0014] 종양 세포(종양 세포 자율) 및 종양 면역 세포 미세환경 둘 모두에서 GCN2 및/또는 PERK의 종양-유발 양태를 조절하는 GCN2 및/또는 PERK의 억제제에 대한 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0015] GCN2(일반 대조군 비억제성 2) 키나아제 및/또는 PERK(PKR-유사 ER 키나아제) 키나아제를 조절(예를 들어, 억제 또는 활성화)하는 화합물 및 GCN2 또는 PERK 연관 질환을 포함하는 장애의 치료를 위한 이의 사용 방법이 본원에 기술된다.

[0016] 일 구현예에서, 화학식 I-A로 표시되는 화합물:



화학식 I-A

[0017]

[0018] 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상 이성질체, 입체 이성질체, 또는 호변 이성질체가 본원에 기술되며, 식 중: X^1 및 X^3 은 CH 및 N으로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고; X^2 은 NR^6 , O, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^1 , R^2 , 및 R^3 은 H, 할로젠, 시아노, 및 알콕시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고; R^4 는 할로젠, 알콕시 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^5 는 H, 할로젠 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^6 은 H, 알킬, 알케닐, 알케닐알킬, 알키닐, 알키닐알킬, 시클로알킬, 시클로알킬알킬, 알콕시알킬, 시클로알케닐, 헤테로시클릴, 헤테로시클릴알킬, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로아릴알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^7 은 H, 알킬, 및 아실로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0019] 또 다른 구현예에서, 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 본원에 기술된 화학식 I-A, I-B, I-C, 및 I-D의 화합물) 및 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 기술된다.

[0020] 또 다른 구현예에서, 통합 스트레스 반응의 조절 장애에 의해 야기되는 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는

본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

- [0021] 또 다른 구현예에서, 통합 스트레스 반응 및/또는 미접힘 단백질 반응의 조절 장애에 의해 야기되는 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0022] 또 다른 구현예에서, GCN2 키나아제의 활성 조절을 필요로 하는 환자에서 이를 조절하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0023] 또 다른 구현예에서, GCN2 키나아제의 활성화를 필요로 하는 환자에서 이를 활성화시키는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0024] 또 다른 구현예에서, PERK 키나아제의 활성 조절을 필요로 하는 환자에서 이를 조절하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0025] 또 다른 구현예에서, PERK 키나아제의 활성화를 필요로 하는 환자에서 이를 활성화시키는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0026] 또 다른 구현예에서, GCN2 키나아제의 억제 및 PERK 키나아제의 억제를 필요로 하는 환자에서 이를 억제하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0027] 또 다른 구현예에서, GCN2 키나아제의 활성 조절을 필요로 하는 환자에서 이를 조절하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0028] 또 다른 구현예에서, PERK 키나아제의 활성 억제를 필요로 하는 환자에서 이를 억제하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0029] 또 다른 구현예에서, GCN2 연관 질환 및 PERK 연관 질환으로부터 선택되는 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0030] 또 다른 구현예에서, GCN2 연관 질환 및 PERK 연관 질환으로부터 선택되는 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 치료적 유효량, 및 하나 이상의 치료제의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0031] 또 다른 구현예에서, 암의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 본원에 기술된 화학식 I-A, I-B, I-C, 및 I-D의 화합물), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0032] 또 다른 구현예에서, 흑색종, 섬유육종, 갑상선암, 난소암, 결장암, 췌장암, 폐암, 방광암, 위장관 기질 종양, 고형 종양, 혈액 매개 암, 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL) 및 GCN2 신호전달 경로의 활성화에 의해 야기되는 다른 암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 장애의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 본원에 기술된 화학식 I-A, I-B, I-C, 및 I-D의 화합물), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1은 화합물 2의 농도 증가에 반응하는 UPR/ISR 마커 ATF4(검은 막대)의 예상치 못한 자극을 입증하는 그래프 표현이다.

도 2는 NanoBRET 검정에서 화합물 2에 의해 유도된 PERK 올리고머의 자극의 그래프를 나타낸다.

도 3은 H929 다발성 골수종 세포에서 PERK 하류 신호전달 단백질 ATF4 및 CHOP(부하 대조군으로서 액틴)의 자극을 나타낸다.

도 4는 H929 다발성 골수종 세포에서 화합물 2의 농도 증가에 반응하는 ATF4 표적 유전자의 자극을 입증하는 그래프 표현이다.

도 5는 H929 다발성 골수종 세포에서 세포자멸사 경로 관독에 대한 화합물 2의 효과를 도시한다.

도 6a, 6b, 6c, 및 6d는 RPMI8226 다발성 골수종 세포(도 6a), H929 다발성 골수종 세포(도 6b), GA-10 버킷 림프종 세포(도 6c), 및 여포성 림프종 세포(도 6d)에서 표준 치료와 조합된 화합물 2의 세포 증식 연구를 도시한다.

도 7a 및 7b는 생체 내 PK/PD 모델에서의, 아스파라기나아제와 조합된 화합물 2의, GCN2 활성을 측정하는, ATF4 수준에 미치는 효과를 나타낸다. 도 7a는 PK/PD 모델 연구로부터 수득된 결과의 데이터 플롯을 도시하며, 도 7b는 해당 결과를 표 형태로 나타낸다.

도 8은 MV-4-11 이종이식 모델에서의, 아스파라기나아제와 조합된 화합물 2의 종양 성장에 미치는 효과를 나타내는 플롯을 도시한다.

도 9a는 시험관 내에서 재조합 GCN2 효소의 활성을 측정하는, 재조합 GCN2 활성화 검정에서의 화합물 2의 효과를 나타낸다.

도 9b는 시험관 내에서 재조합 PERK 효소의 활성을 측정하는, 재조합 PERK 활성화 검정에서의 화합물 2의 효과를 나타낸다.

도 10a, 10b, 및 10c는 고형 종양 암(도 10a, H2030; 도 10b, H358; 도 10c, HT-1080) 세포주에서의 ISR 및 세포자멸사 경로에 대한 화합물 2의 효과를 나타낸다.

도 11a, 11b, 및 11c는 구상체 증식 검정에서의 화합물 2의 효과를 나타낸다. 도 11a는 단일 제제로서의 H2030 고형 종양 구상체에서의, 단일 제제로서의 화합물 2에 의한 H2030 고형 종양 구상체에서의 세포 퇴행을 도시한다. 도 11b 및 11c는 H358(도 11b) 및 HT-1080(도 11c) 고형 종양 구상체의 세포 증식에 대한 단일 제제로서의 화합물 2의 효과를 나타낸다.

도 12a, 12b, 및 12c는 구상체 성장의 억제에 대한, 표준 치료 제제와 조합된 화합물 2의 효과를 도시한다. 도 12a는 소토라십과 조합되거나 조합되지 않은 화합물 2 역가로 치료된 H2030 NSCLC 구상체의 세포 증식 실험을 나타낸다. 도 12b는 소토라십과 조합되거나 조합되지 않은 화합물 2 역가로 치료된 H2030 NSCLC 구상체의 세포 증식 실험을 나타낸다. 도 12c는 트라메티닙과 조합되거나 조합되지 않은 화합물 2 역가로 치료된 H2030 NSCLC 구상체의 세포 증식 실험을 나타낸다.

도 13a, 13b, 및 13c는 HT-1080 shRNA 녹다운 검정에서의 화합물 2의 효과를 나타낸다. 도 13a는 HT-1080 세포주에서의 shRNA 표적화를 사용한 GCN2 및 PERK 녹다운을 도시한다. 도 13b는 ATF4 신호의 웨스턴 블롯 정량화를 나타낸다. 도 13c는 구상체 성장 억제에 대한 화합물 2의 효과를 도시한다.

도 14a 및 14b는 HT-1080 섬유육종 이종이식편 PK/PD 모델에서의 화합물 2의 효과를 나타낸다. 도 14a는 상이한 투여량에서의 화합물 2에 의한 ATF4 수준의 상향조절을 나타낸다. 도 14b는 투여 후 다양한 시점에서의 화합물 2의 반응하는 혈장 수준을 나타낸다.

도 15a 및 15b는 HT-1080 이종이식편 효능 모델에서의 화합물 2의 효과를 도시한다. 도 15a는 LoVo 결장 이종이식편 모델에서의 종양 성장에 대한 화합물 2의 효과를 나타내고, 도 15b는 HT-1080 섬유육종 이종이식편 모델의 종양 성장에 대한 화합물 2의 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034]

본 개시의 특징 및 다른 세부 사항이 아래에서 보다 구체적으로 설명된다. 명세서, 실시예 및 청구 범위에서 사용되는 특정 용어들을 여기에 모았다. 이들 정의는 본 개시의 나머지 부분을 고려하여 당업자에 의해 이해되는 바와 같이 이해되어야 한다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

- [0035] 정의
- [0036] 본 출원에 제시된 정의는 본 출원 전체에 걸쳐 사용되는 용어를 명확히 하기 위한 것이다.
- [0037] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본원의 주제가 속하는 당업계의 숙련자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 달리 명시되지 않는 한, 다음의 용어는 본 개시의 이해를 용이하게 하기 위해 나타낸 의미를 갖는다.
- [0038] 치환기에 대한 결합이 고리에서 2개의 원자를 연결하는 결합을 교차하는 것으로 나타날 경우, 이러한 치환기는 고리 상의 임의의 원자에 결합될 수 있다. 치환기가, 이러한 치환기가 주어진 화학식의 화합물의 나머지 부분에 결합되는 원자를 나타내지 않고 열거되는 경우, 해당 치환기는 이러한 치환기의 임의의 원자를 통해 결합될 수 있다. 치환기, 치환기의 위치 및/또는 변수의 조합은, 이러한 조합이 안정적인 화합물을 생성하는 경우, 초래하는 경우 허용 가능하다.
- [0039] 본원에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태인 "하나", "한" 및 "일"은 문맥이 달리 명확하게 나타내지 않는 한, 복수의 참조를 포함한다.
- [0040] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "본원에서"는 본 출원 전체를 의미한다.
- [0041] 본원에서 사용되는 바와 같이, "중수소화된"은 적어도 하나의 수소 원자가 중수소로 대체되는 것을 의미한다. 중수소화된 화합물의 샘플 중 어느 하나에서, 해당 화합물의 일부 이산 분자는 특정 위치에서 중수소가 아닌 수소를 가질 가능성이 있다. 그러나, 특정 위치에서 중수소를 갖는 중수소화된 화합물의 분자의 백분율은 자연적으로 발생하는 것보다 훨씬 더 클 것이다. 중수소화된 위치에서의 중수소는 농축된다.
- [0042] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "선택적" 또는 "선택적으로"는 후속하여 설명되는 이벤트 또는 상황이 발생할 수 있거나 발생하지 않을 수 있으며, 해당 설명은 해당 이벤트 또는 해당 상황이 발생하는 경우뿐만 아니라 발생하지 않는 경우를 포함한다는 것을 의미한다. 예를 들어, "선택적으로 치환된 알킬"은 해당 알킬이 치환될 수 있을 뿐만 아니라 해당 알킬이 치환되지 않는 경우를 지칭한다.
- [0043] 개시된 화합물 상의 치환기 및 치환 패턴은 당업자에 의해 선택되어 당업계에 공지된 기술에 의해 용이하게 합성될 수 있는 화학적으로 안정한 화합물뿐만 아니라 아래에 제시된 방법을 용이하게 이용 가능한 출발 물질로부터 생성할 수 있는 것으로 이해된다. 치환기가 둘 이상의 기로 자체 치환되는 경우, 이들 다수의 기는 안정적인 구조가 발생하는 한 동일한 탄소 상에 또는 상이한 탄소 상에 있을 수 있는 것으로 이해된다.
- [0044] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "선택적으로 치환된"은 주어진 구조 내의 1 내지 6개의 수소 원자를 하이드록시, 하이드록시알킬, 알콕시, 할로젠, 알킬, 아릴, 시클로알킬, 헤테로시클릴, 아미노, 아미노알킬, 시아노, 할로알킬, 할로알콕시, $-OC(=O)-CH_2-O$ 알킬을 포함하나 이에 한정되지 않는 특정 치환기의 라디칼로 치환되는 것을 지칭한다. 바람직하게는, "선택적으로 치환된"은 주어진 구조에서 1 내지 4개의 수소 원자를 전술한 치환기로 치환하는 것을 지칭한다. 보다 바람직하게는, 1 내지 3개의 수소 원자는 전술한 바와 같은 치환기로 치환된다. 치환기는 추가로 치환될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0045] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치환된"은 해당 골격의 하나 이상의 탄소 상의 수소를 치환하는 치환기를 갖는 모이어티를 지칭한다. "치환" 또는 "~로 치환된"은 해당 치환이 치환된 원자 및 치환기의 허용된 원자에 따르고, 치환이, 예를 들어 재배열, 고리화, 제거 등에 의해 자발적으로 형질전환되지 않는 안정적인 화합물을 생성한다는 암시적 단서를 포함한다는 것을 이해할 것이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치환된"은 유기 화합물의 모든 허용 가능한 치환기를 포함하는 것으로 고려된다. 광범위한 양태에서, 허용 가능한 치환기는 유기 화합물의 비환형 및 환형, 분지형 및 비분지형, 탄소환형 및 헤테로환형, 방향족 및 비방향족 치환기를 포함한다. 허용 가능한 치환기는 적절한 유기 화합물에 대해 하나 이상일 수 있으며, 동일하거나 상이할 수 있다. 본 출원의 목적을 위해, 질소와 같은 헤테로원자는 수소 치환기 및/또는 헤테로원자의 원자를 충족시키는 본원에 기술된 유기 화합물의 임의의 허용 가능한 치환기를 가질 수 있다.
- [0046] 치환기는 본원에 기술된 임의의 치환기를 포함할 수 있으며, 예를 들어, 이러한 치환기는 달리 명시되지 않는 경우, 예를 들어 할로젠, 하이드록시, 카르보닐(예컨대 카복실, 알콕시카르보닐, 포르밀, 또는 아실), 알콕시, 아미노, 아미도, 이민, 시아노, 설폰, 헤테로시클릴, 아랄킬, 헤테로아랄킬, 또는 방향족 또는 헤테로방향족 모이어티를 포함할 수 있다. 당업자는 적절한 경우 치환기 자체가 치환될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, 치환된 알킬의 치환기는 아미노, 아미도, 설폰일뿐만 아니라 에테르, 카르보닐(카복실레이트 및 에

스테르 포함), $-CF_3$, $-CN$ 등의 치환 및 비치환된 형태를 포함할 수 있다. "비치환된"으로 구체적으로 언급되지 않는 한, 본원의 화학적 모이어티에 대한 언급은 치환된 변이체를 포함하는 것으로 이해된다. 예를 들어, "아릴"기 또는 모이어티에 대한 언급은 치환 및 비치환된 변이체 둘 모두를 암시적으로 포함한다.

[0047] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "알킬"은 완전히 포화된 직쇄 또는 분지형 비방향족 탄화수소를 의미한다. 통상적으로, 직쇄 또는 분지형 알킬기는 1 내지 약 20개의 탄소 원자, 바람직하게는 1 내지 약 10개의 탄소 원자를 가지며, 예를 들어 달리 정의되지 않는 한 C_1 - C_{10} 알킬 또는 예를 들어 C_1 - C_6 알킬일 수 있다. 직쇄 및 분지형 알킬기의 예는 메틸, 에틸, 1-프로필(n-프로필), 2-프로필, n-부틸, 이차-부틸, 삼차부틸, 1-펜틸, 2-펜틸, 3-펜틸, 네오-펜틸, 1-헥실, 2-헥실, 3-헥실, 1-헵틸, 2-헵틸, 3-헵틸, 4-헵틸, 1-옥틸, 2-옥틸, 3-옥틸 또는 4-옥틸 등을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 또한, 본 명세서, 실시예 및 청구범위 전체에 걸쳐 사용되는 용어 "알킬"은 "비치환된 알킬" 및 "치환된 알킬" 둘 모두를 포함하도록 의도되며, 이들 중 후자는 탄화수소 골격의 하나 이상의 탄소 상의 수소를 대체하는 치환기를 갖는 알킬 모이어티를 지칭한다. "알킬"기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0048] 용어 " C_x-C_y "는 아실, 아실옥시, 알킬, 알케닐, 알키닐, 또는 알콕시와 같은 화학적 모이어티와 함께 사용될 경우, 해당 사슬 내에 x개의 토이 탄소를 함유하는 기를 포함한다는 것을 의미한다. 예를 들어, 용어 " C_x-C_y "는 트리플루오로메틸 및 2,2,2-트리플루오로에틸 등과 같은 할로알킬기를 포함하여, 해당 사슬 내에 x개의 토이 탄소를 함유하는 직쇄 알킬기 및 분지쇄 알킬기를 포함하는, 치환 또는 비치환된 포화 탄화수소를 지칭한다. C_0 알킬은 해당 기가 말단 위치에 있는 수소, 내부인 경우 결합을 나타낸다.

[0049] 본원에서 사용되는 용어 "알케닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 불포화 직선형 또는 분지형 탄화수소를 지칭한다. 예시적인 알케닐기는 본원에서 C_2 - C_6 알케닐, 및 C_3 - C_4 알케닐로서 각각 지칭되는, 2 내지 6, 또는 3 또는 4개의 탄소 원자의 직선형 또는 분지형 기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 알케닐기는 비닐, 알릴, 부테닐, 펜테닐 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0050] 본원에서 사용되는 용어 "알키닐"은 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 불포화 직선형 또는 분지형 탄화수소를 지칭한다. 예시적인 알키닐기는 본원에서 C_2 - C_6 알키닐, 및 C_3 - C_6 알키닐로서 각각 지칭되는, 2 내지 6, 또는 3 내지 6개의 탄소 원자의 직선형 또는 분지형 기를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 알키닐기는 에티닐, 프로피닐, 부티닐, 펜티닐, 헥시닐, 메틸프로피닐 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0051] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "알콕시"는 코어 구조에 부착되는 산소 원자에 결합된 직선형 또는 분지형, 포화 지방족(알킬) 탄화수소 라디칼을 지칭한다. 바람직하게는, 알콕시기는 1 내지 6개의 탄소 원자를 가지며, 즉 C_1 - C_6 알콕시일 수 있다. 알콕시기의 예는 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 이소프로폭시, 부톡시, 이소부톡시, 삼차-부톡시, 펜톡시, 3-메틸 부톡시 등을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0052] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "알콕시알킬"은 알콕시기로 치환된 알킬기(전술한 바와 같음)를 지칭하며, 일반식 알킬-O-알킬로 나타낼 수 있다. 알콕시알킬기의 예는 메틸-O-에틸렌-, 에틸-O-에틸렌-을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0053] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "할로알킬"은 (전술한 바와 같은) 알킬기가 하나 이상의 할로젠으로 치환된 것을 지칭한다. 모노할로알킬 라디칼은, 예를 들어 염소, 브롬, 요오드 또는 불소 원자를 가질 수 있다. 디할로 및 폴리할로알킬 라디칼은 동일하거나 상이한 할로젠 원자 중 2개 이상을 가질 수 있다. 할로알킬의 예는 클로로메틸, 디클로로메틸, 트리클로로메틸, 디클로로에틸, 디클로로프로필, 플루오로메틸, 디플루오로메틸, 트리플루오로메틸, 펜타플루오로에틸, 헵타플루오로프로필, 디플루오로클로로메틸, 디클로로플루오로메틸, 디플루오로에틸, 디플루오로프로필 등을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0054] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "할로알콕시"는 알콕시기의 수소 원자 중 하나 이상이 하나 이상의 할로젠으로 치환된 라디칼을 지칭한다. "할로알콕시"기의 대표적인 예는 디플루오로메톡시($-OCHF_2$), 트리플루오로메톡시($-OCF_3$) 또는 트리플루오로에톡시($-OCH_2CF_3$)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

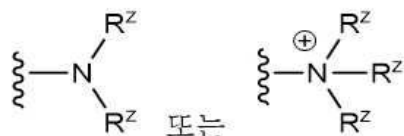
[0055] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아릴"은 해당 고리의 각각의 원자가 탄소인, 치환 또는 비치환된 단일 고리 방향족기를 포함한다. 바람직하게는, 고리는 5-원 내지 7-원 고리, 보다 바람직하게는 6-원 고리이다. 용어 "아릴"은 또한 2개 이상의 탄소가 2개의 인접한 고리(융합된 고리)에 공통인 2개 이상의 고리를 갖는 다환 고리

시스템을 포함하며, 여기에서 고리 중 적어도 하나는 방향족이며, 예를 들어, 다른 고리는 시클로알킬, 시클로알케닐, 시클로알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 및/또는 헤테로시클릴일 수 있다. 용어 "융합된"은 제2 고리가 제1 고리와 공통인 2개의 인접한 원자를 가짐으로써 부착되거나 형성되는 것을 의미한다. 용어 "융합된"은 용어 "응축된"과 동등하다. 아릴기의 예는 페닐, 나프틸, 페난트릴, 페놀, 아닐린, 인다닐, 디하이드로벤조푸라닐, 디하이드로이소벤조푸라닐, 인돌리닐, 이소인돌리닐 등을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 기술된 아릴기는 선택적으로 치환될 수 있다.

[0056] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "폴리시클릴", "폴리사이클", 및 "폴리시클릭"은 하나 이상의 원자가 2개의 인접한 고리에 공통인 2개 이상의 고리(예를 들어, 시클로알킬, 시클로알케닐, 시클로알키닐, 아릴, 헤테로아릴, 및/또는 헤테로시클릴)를 지칭하며, 예를 들어, 고리는 "융합된 고리"이다. 폴리사이클의 각각의 고리는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 특정 구현예에서, 폴리사이클의 각각의 고리는 고리 내에 3 내지 10 개의 원자, 바람직하게는 5 내지 7개의 원자를 함유한다.

[0057] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아실"은 $-C(=O)-R^w$ 기를 지칭하며, 여기에서 R^w 는 선택적으로 치환된 알킬이다. "아실"의 예는, R^w 가 C_1-C_{10} 알킬(C_1-C_{10} 아실) 또는 C_1-C_6 알킬(C_1-C_6 아실)인 경우를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 일부 구현예에서, 선택적으로 치환된 치환기의 각각의 경우는, H, OH, 알콕시, 시아노, F, 및 아미노로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다. "아실"의 추가적인 예는 $-C(=O)-CH_3$, $-C(=O)-CH_2-CH_3$, $-C(=O)-CH_2-CH_2-CH_3$, 또는 $-C(=O)-CH(CH_3)_2$ 를 포함한다.

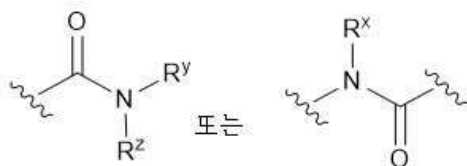
[0058] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아민" 및 "아미노"는 비치환 및 치환된 아민 및 이의 염, 예를 들어, 다음으로 나타낼 수 있는 모이어티 둘 모두를 지칭하며:



[0059]

[0060] 여기에서, 각각의 R^Z 는 독립적으로 수소 또는 하이드로카르빌기를 나타내거나, R^Z 기는 이들이 부착되는 N 원자와 함께 취해져 해당 고리 구조 내에 4 내지 8개의 원자를 갖는 헤테로고리를 완성한다.

[0061] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아미드" 및 "아미도"는 다음으로 나타낼 수 있는 기를 지칭하며:



[0062]

[0063] 여기에서, R^X , R^Y , 및 R^Z 는 각각 독립적으로 수소 또는 하이드로카르빌기를 나타내거나, R^Y 및 R^Z 는 이들이 부착되는 N 원자와 함께 취해져 해당 고리 구조 내에 4 내지 8개의 원자를 갖는 헤테로시클릴을 완성한다.

[0064] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아실아미노"는 아실기로 치환된, 전술한 바와 같은 아미노기를 지칭한다.

[0065] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아미노카르보닐"은 아미노기로 치환된 카르보닐기를 지칭한다.

[0066] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "알케닐알킬"은 알케닐기로 치환된 알킬기를 지칭한다.

[0067] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "알키닐알킬"은 알키닐기로 치환된 알킬기를 지칭한다.

[0068] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "알킬아미노"는 적어도 하나의 알킬기로 치환된, 전술한 바와 같은 아미노기를 지칭한다.

[0069] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아미노알킬"은 아미노기로 치환된 알킬기를 지칭한다.

[0070] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "아미도알킬"은 아미도기로 치환된 알킬기를 지칭한다.

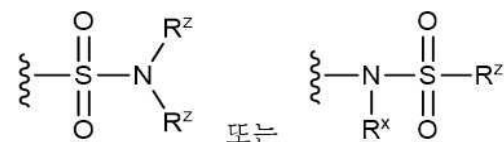
[0071] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "시아노알킬"은 시아노기로 치환된 알킬기를 지칭한다.

- [0072] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "시클로알콕시알킬"은 시클로알콕시기로 치환된 알킬기(전술한 바와 같음)를 지칭하며, 일반식 시클로알킬-O-알킬로 나타낼 수 있다. 시클로알콕시알킬기의 예는 시클로프로필-O-메틸렌-, 시클로프로필-O-에틸렌을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0073] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "시클로알킬알킬"은 시클로알킬기로 치환된 알킬기를 지칭한다.
- [0074] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "헤테로아릴알킬"은 헤테로아릴기로 치환된 알킬기를 지칭한다.
- [0075] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "헤테로시클릴알킬"은 헤테로시클릴기로 치환된 알킬기를 지칭한다.
- [0076] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "하이드록시알킬"은 하이드록시기로 치환된 알킬기를 지칭한다.
- [0077] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "시클로알킬"은 단독으로 또는 다른 용어(들)와 조합하여 완전히 포화된 환형 탄화수소를 지칭한다. "시클로알킬"은 단환, 이환, 및 삼환 고리를 포함한다. 일반적으로, 단환 시클로알킬기는 달리 정의되지 않는 한, 3 내지 약 10개의 탄소 원자, 보다 일반적으로는 3 내지 8개의 탄소 원자를 갖는다(예를 들어, C₃-C₁₀시클로알킬 또는 예를 들어, C₃-C₆시클로알킬). 단환 시클로알킬의 예는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸 등을 포함한다. 이환 시클로알킬의 제2 고리 또는 삼환 시클로알킬의 제2 또는 제3 고리는 포화, 불포화 및 방향족 고리로부터 선택될 수 있다. 시클로알킬은 1개, 2개 또는 3개 이상의 원자가 2개의 고리 사이에 공유되는 이환 및 삼환 분자를 포함한다. 시클로알킬은 알킬, 알케닐, 알콕시, 아미노알킬, 카르보닐-치환 알킬, -CF₃, -CN 등으로 추가로 치환될 수 있다.
- [0078] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "시클로알킬알킬"은 시클로알킬기로 치환된 알킬기를 지칭한다.
- [0079] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "시아노"는 -CN기를 지칭한다.
- [0080] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "하이드록시" 또는 "하이드록실"은 -OH기를 지칭한다.
- [0081] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "할로" 또는 "할로젠"은 단독으로 또는 다른 용어(들)와 조합하여 클로로, 플루오로, 브로모 및 요오드를 의미한다.
- [0082] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "헤테로원자"는 탄소 또는 수소 이외의 임의의 원소의 원자를 지칭한다. 예시적인 헤테로원자는 질소(N), 산소(O), 황(S), 및 실리콘(Si)이다.
- [0083] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "헤테로시클릴", "헤테로시클로알킬", "헤테로고리", 및 "헤테로시클릭"은 O, N, S, S(O), S(O)₂, NH 또는 C(O)로부터 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자 또는 헤테로기를 가지며 나머지 고리 원자는 탄소, 산소, 질소 및 황으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는, 3 내지 15원의 단환, 다환(예를 들어, 이환, 삼환) 가교되거나 융합된, 고리 시스템을 포함하는 비방향족, 포화 또는 부분적으로 포화된 고리 시스템을 지칭한다. "헤테로시클로알킬"의 예는 아제티디닐, 옥세타닐, 이미다졸리디닐, 피롤리디닐, 옥사졸리디닐, 티아졸리디닐, 피라졸리디닐, 테트라하이드로푸라닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 테트라하이드로피라닐, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 1,4-디옥사닐, 디옥시도티오모르폴리닐, 옥사피페라지닐, 옥사피페리디닐, 테트라하이드로푸릴, 테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로티오펜, 디하이드로피라닐, 인돌리닐, 인돌리닐메틸, 2-아자비시클로[2.2.2]옥탄일, 아조시닐, 크로마닐, 잔테닐 및 이의 N-산화물을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 헤테로시클로알킬 치환기의 부착은 탄소 원자 또는 헤테로원자를 통해 발생할 수 있다. 헤테로시클로알킬기는 하나 이상의 전술한 기에 의해 하나 이상의 적합한 기로 선택적으로 치환될 수 있다. 바람직하게는, "헤테로시클로알킬"은 아제티디닐, 옥세타닐, 이미다졸리디닐, 피롤리디닐, 옥사졸리디닐, 티아졸리디닐, 피라졸리디닐, 테트라하이드로푸라닐, 피페리디닐, 피페라지닐, 테트라하이드로피라닐, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 1,4-디옥사닐 및 이의 N-산화물로 이루어진 군으로부터 선택되는 5원 내지 6원 고리를 지칭한다. 보다 바람직하게는, "헤테로시클로알킬"은 아제티디닐, 피롤리디닐, 모르폴리닐 및 피페리디닐을 포함한다. 헤테로시클로알킬은 하나 이상의 전술한 기로 선택적으로 치환된다.
- [0084] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "헤테로아릴"은 치환 또는 비치환된 방향족 단일 고리 구조, 바람직하게는 5원 내지 7원 고리, 보다 바람직하게는 5원 내지 6원 고리를 지칭하며, 이의 고리 구조는 적어도 하나의 헤테로원자, 바람직하게는 1 내지 4개의 헤테로원자, 보다 바람직하게는 1 또는 2개의 헤테로원자를 포함한다. 용어 "헤테로아릴"은 또한 적어도 하나의 헤테로원자를 함유하고, 8 내지 20개의 고리 원자, 적절하게는 5 내지 10개의 고리 원자를 함유하는 2개 이상의 환형 고리(이환, 삼환, 또는 다환)를 갖는 치환 또는 비치환 방향족 또는 부분 방향족 고리 시스템을 의미하며, 이는 공유적으로 연결될 수 있거나, 2개 이상의 원자가 2개의 인접한 고리에 공통인 방식으로 융합될 수 있으며, 여기에서 고리 중 적어도 하나는 헤테로방향족이고, 예를 들어, 다

른 환형 고리는 시클로알킬, 시클로알케닐, 시클로알키닐, 아릴, 헤테로아릴 및/또는 헤테로시클릴일 수 있다. 고리는 N 또는 S 원자를 함유할 수 있으며, 여기에서 N 또는 S 원자는 선택적으로 산화되거나, N 원자는 선택적으로 사차화된다. 모든 헤테로아릴은 선택적으로 치환된다. 헤테로아릴 모이어티의 임의의 적절한 고리 위치는 정의된 화학 구조에 공유 결합될 수 있다. 헤테로아릴의 예는 푸라닐, 티에닐, 피롤릴, 피라졸릴, 이미다졸릴, 옥사졸릴, 신놀리닐, 이속사졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 1H-테트라졸릴, 옥사디아졸릴, 티아디아졸릴, 트리아졸릴, 피리디닐, 피리미디닐, 피라지닐, 피리다지닐, 트리아지닐, 벤조옥사졸릴, 벤즈이속사졸릴, 벤조티아졸릴, 벤조푸라닐, 벤조티에닐, 벤조트리아지닐, 프탈라지닐, 티안트렌, 디벤조푸라닐, 디벤조티에닐, 벤즈이미다졸릴, 인돌릴, 이소인돌릴, 인다졸릴, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 퀴나졸리닐, 퀴녹살리닐, 푸리닐, 프테리디닐, 9H-카르바졸릴, 알파-카르볼린, 인돌리지닐, 벤조이소티아졸릴, 벤조옥사졸릴, 피롤로피리디닐, 프로피리디닐, 푸리닐, 벤조티아디아졸릴, 벤조옥사디아졸릴, 벤조트리아졸릴, 벤조트리아디아졸릴, 카르바졸릴, 디벤조티에닐, 아크리디닐 등을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0085] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "하이드로카르빌"은 =O 또는 =S 치환기를 갖지 않고, 통상적으로 적어도 하나의 탄소-수소 결합 및 주로 탄소 골격을 갖지만 선택적으로 헤테로원자를 포함할 수 있는, 탄소 원자를 통해 결합되는 기를 지칭한다. 따라서, 메틸, 에톡시에틸, 2-피리디닐, 및 트리플루오로메틸과 같은 기는 본 출원의 목적에 있어서 하이드로카르빌인 것으로 간주되지만, 아세틸(연결 탄소 상에 =O 치환기를 가짐) 및 에톡시(탄소가 아닌 산소를 통해 연결됨)와 같은 치환기는 그렇지 않다. 하이드로카르빌기는 아릴, 헤테로아릴, 시클로알킬, 헤테로시클릴, 알킬, 알케닐, 알키닐, 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다.

[0086] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "설폰아미드"는 다음으로 표시되며:



[0087]

[0088] 여기에서, R^Z 는 각각의 경우, 독립적으로 수소, 알킬 또는 시클로알킬기를 나타내거나, 이들이 부착되는 N 원자와 함께 취해진 R^Z 기는 해당 고리 구조 내에 4 내지 8개의 원자를 갖는 헤테로고리를 완성한다.

[0089] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "설폰닐"은 $\text{-S(O)}_2\text{-R}^{6d}$ 기를 지칭하며, 여기에서 R^{6d} 는 알킬 또는 시클로알킬을 나타낸다.

[0090] "병용 요법"은 2개 이상의 치료제, 예를 들어 화합식 I의 화합물 및 효소아스파라기나아제(ASNase) 또는 이의 유도체를, 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 치료이다.

[0091] "질병", "장애", 및 "병태"는 본원에서 상호 교환적으로 사용된다.

[0092] "개체", "환자" 또는 "대상체"는 상호 교환적으로 사용되고, 포유 동물, 바람직하게는 마우스, 랫트, 기타 설치류, 토끼, 개, 고양이, 돼지, 소, 양, 말, 또는 영장류, 및 가장 바람직하게는 인간을 포함하는 임의의 동물을 포함한다. 본원에 기술된 화합물은 인간과 같은 포유동물에게 투여될 수 있지만, 수의학적 치료를 필요로 하는 동물과 같은 다른 포유동물, 예를 들어, 가축(예를 들어, 개, 고양이 등), 농장 동물(예를 들어, 젖소, 양, 돼지, 말 등), 및 실험실 동물(예를 들어, 랫트, 마우스, 기니 피그 등)에게 투여될 수 있다.

[0093] 본원에 기술된 화합물은 GCN2에 의해 유도되는 질환(본 명세서에서는 종종 "GCN2 연관 질환"으로 약칭됨). 예를 들어, 암[예를 들어, 대장암(예를 들어, 대장암, 직장암, 항문암, 가족성 대장암, 유전성 비폴립증 대장암, 위장관 기질 종양), 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 악성 중피종), 중피종, 췌장암(예를 들어, 췌장관암, 췌장 내분비 종양), 인두암, 후두암, 식도암, 위암(예를 들어, 유두상 선암종, 점액성 선암종, 암 용어 사전 평편상피 암종), 십이지장암, 소장암, 유방암(예를 들어, 침습성 관상 암종, 관상피내 암종, 염증성 유방암), 난소암(예를 들어, 난소 상피 암종, 성선 외 생식 세포 종양, 난소 생식 세포 종양, 난소 저 악성 잠재적 종양), 고환 종양, 전립선암(예를 들어, 호르몬 의존성 전립선암, 비-호르몬 의존성 전립선암, 거세 저항성 전립선암), 간암(예를 들어, 간종, 원발성 간암, 간외 담관암), 갑상선암(예를 들어, 갑상선 수질 암종), 신장암(예를 들어, 신장 세포 암종(예를 들어, 투명 세포 신장 세포 암종), 신우 및 요관의 이행 세포 암종), 자궁암(예를 들어, 자궁경부암, 자궁체암, 자궁 육종), 임신성 용모막 암종, 뇌 종양(예를 들어, 수모세포종, 신경교종, 송과체 성상세포종, 털모양 성상세포종, 미만성 성상세포종, 역형성 성상세포종, 뇌하수체 선종),

망막아중, 피부암(예를 들어, 기저 세포 암종, 악성 흑색종(흑색종)), 육종(예를 들어, 횡문근육종, 평활근육종, 연조직 육종, 방추 세포 육종, 골육종), 악성 골 종양, 방광암, 혈액암(예를 들어, 다발성 골수종, 백혈병(예를 들어, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병(만성 백혈병의 모세포 위기 포함)), 악성 림프종, 호지킨병, 만성 골수증식성 질환), 알려지지 않은 원발성 핵의 암]의 치료, 암 성장 억제제, 암 전이 억제제, 세포자멸사 프로모터, 및 전암성 병변(예를 들어, 골수 골수이형성 증후군)의 예방 또는 치료에 유용하다.

[0094] 본원에 기술된 화합물, 예를 들어, 본원에 정의된 바와 같은 화학식 I의 화합물은 본원에 기술된 암과 같은, 본원에 기술된 장애를 치료하기 위해 하나 이상의 추가 치료제와 조합하여 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 화합물은 호르몬 치료제, 화학요법제, 면역치료제, PERK 억제제 및 자가포식 억제제와 같은 세포 성장 인자 및 이의 수용체의 작용을 억제하는 약물, 효소 아스파라기나아제(ASNase) 등과 조합하여 사용될 수 있다.

[0095] "약학적으로 또는 약리학적으로 허용 가능한"은, 적절하게, 동물 또는 인간에게 투여될 경우, 유해하거나, 알레르기성이거나 다른 바람직하지 않은 반응을 생성하지 않는 분자 엔티티 및 조성물을 포함한다. 인간 투여의 경우, 제제는 FDA 생물의약품 표준 사무국(FDA Office of Biologics standards)에서 요구하는 무균성, 발열성, 일반 안전 및 순도 표준을 충족해야 한다.

[0096] 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체" 또는 "약학적으로 허용 가능한 부형제"는 약학적 투여와 양립할 수 있는 임의의 모든 용매, 분산액 배지, 코팅, 등장성 및 흡수 지연제 등을 지칭한다. 약학적으로 활성인 물질에 대한 이러한 매체 및 제제의 사용은 당업계에 공지되어 있다. 조성물은 또한 보충적, 추가적, 또는 향상된 치료 기능을 제공하는 다른 활성 화합물을 함유할 수 있다.

[0097] 본원에서 사용되는 용어 "약학적 조성물"은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 제형화된 본원에서 개시된 바와 같은 적어도 하나의 화합물을 포함하는 조성물을 지칭한다.

[0098] 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용 가능한 염(들)"은 조성물에 사용되는 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 지칭한다. 본 조성물에 포함된 본질적으로 염기성인 화합물은 다양한 무기산 및 유기산과 매우 다양한 염을 형성할 수 있다. 이러한 염기성 화합물의 약학적으로 허용 가능한 산 부가염을 제조하는데 사용될 수 있는 산은 비독성 산 부가염, 약리학적으로 허용 가능한 음이온을 함유하는 염을 형성하는 것들이며, 이들 염은 다음을 포함하되 이들로 한정되지는 않는다: 말산염, 옥살산염, 염화물, 브롬화물, 요오드화물, 질산염, 황산염, 중황산염, 인산염, 산 인산염, 이소니코틴산염, 아세트산염, 젖산염, 살리실산염, 구연산염, 타르타르산염, 올레산염, 탄닌산염, 판토텐산염, 중주석산염, 아스코르브산염, 숙신산염, 말레산염, 겐티스산염, 푸마르산염, 글루콘산염, 글루쿠론산염, 당산염, 포름산염, 벤조산염, 글루탐산염, 메탄설폰산염, 에탄설폰산염, 벤젠설폰산염, *p*-톨루엔설폰산염, 및 파모산염(즉, 1,1'-메틸렌-*H*/스-(2-히드록시-3-나프토에이트)). 자연에서 산성인 본 조성물에 포함된 화합물은 다양한 약학적으로 허용 가능한 양이온을 갖는 염기 염을 형성할 수 있다. 이러한 염의 예는 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염, 특히 칼슘, 마그네슘, 나트륨, 리튬, 아연, 칼륨, 및 철 염을 포함한다. 염기성 또는 산성 모이어티를 포함하는 본 조성물에 포함된 화합물은 또한 다양한 아미노산과 함께 약학적으로 허용 가능한 염을 형성할 수 있다. 본 개시의 화합물은 산성기 및 염기성기 둘 모두, 예를 들어, 하나의 아미노 및 하나의 카복시산기를 포함할 수 있다. 이러한 경우, 화합물은 산 부가염, 쌍성이온, 또는 염기 염으로서 존재할 수 있다.

[0099] 본 개시의 화합물은 하나 이상의 키랄 중심을 함유할 수 있으며, 따라서 입체이성질체로서 존재한다. 본원에서 사용될 경우, 용어 "입체이성질체"는 모든 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체로 구성된다. 이들 화합물은 입체 탄소 원자 주위의 치환기의 구성에 따라 기호 "*R*" 또는 "*S*"에 의해 지정될 수 있지만, 당업자는 해당 구조가 암시적으로 키랄 중심을 나타낼 수 있음을 인식할 것이다. 이들 화합물은 또한 이들의 광학 회전 특성에 기초하여 "(+)" 및 "(-)"로 지정될 수 있다. 본원에서 기술된 화합물은 이들 화합물 및 이의 혼합물의 다양한 입체이성질체를 포함한다. 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체의 혼합물은 명명법에서 기호 "(±)"로 지정될 수 있지만, 당업자는 구조가 암시적으로 키랄 중심을 나타낼 수 있음을 인식할 것이다.

[0100] 본 명세서에서, 용어 "치료적 유효량"은 연구원, 의사, 또는 다른 임상가가 추구하는 조직, 시스템, 또는 동물(예를 들어, 포유 동물 또는 인간)의 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하게 되는 대상 화합물의 양을 의미한다. 본원에 기술된 화합물은 장애를 치료하기 위한 치료적 유효량으로 투여된다.

[0101] "치료"는 병태, 질환, 장애 등의 개선을 초래하는 임의의 효과, 예를 들어, 경감, 감소, 조절, 또는 제거를 포

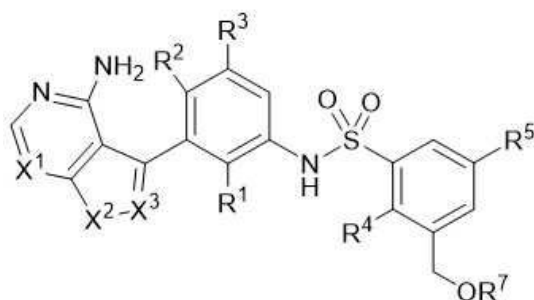
함한다.

[0102] 본 개시는 또한, 하나 이상의 원자가 자연에서 일반적으로 발견되는 원자량 또는 질량 수와 상이한 원자량 또는 질량 수를 갖는 원자로 대체된다는 점을 제외하고는, 본원에 인용된 것과 동일한 동위원소 표시된 화합물을 포함한다. 본 개시된 화합물에 혼입될 수 있는 동위원소의 예는, 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 황, 불소 및 염소의 동위원소, 예컨대, 각각 ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , 및 ^{36}Cl 를 포함한다. 예를 들어, 본 개시의 화합물은 중수소로 치환된 하나 이상의 H 원자를 가질 수 있다.

[0103] 본 개시된 화합물의 개별적인 거울상 이성질체 및 부분 입체 이성질체는 비대칭 또는 입체 중심을 함유하는 상업적으로 이용 가능한 출발 물질로부터 합성으로 제조되거나, 라세미 혼합물의 제조에 이어지는 당업자에게 공지된 분할 방법에 의해 제조될 수 있다. 이들 분할 방법은, (1) 거울상 이성질체 혼합물을 키랄 보조제에 부착, 재결정화 또는 크로마토그래피에 의한 부분 입체 이성질체 혼합물의 분리 및 보조제로부터 광학적으로 순수한 생성물의 유리, (2) 광학적으로 활성인 용해제를 사용하는 염 형성, (3) 키랄 액체 크로마토그래피 컬럼 상에서의 광학 거울상 이성질체의 혼합물 직접 분리, 또는 (4) 입체 선택성 화학 또는 효소 시약을 사용하는 동역학 분할로 예시된다. 또한, 라세미 혼합물은, 키랄 상 액체 크로마토그래피 또는 키랄 용매 중 화합물의 결정화와 같은 공지된 방법에 의해 이들의 성분 거울상 이성질체로 분할될 수 있다. 단일 반응물이 새로운 입체 중심의 생성 동안 또는 기존의 입체 중심을 변형하는 동안 입체 이성질체의 불균등한 혼합물을 형성하는 화학 또는 효소 반응인 입체 선택성 합성은 당업계에 공지되어 있다. 입체 선택성 합성은 거울상 및 부분 입체 선택성 형질 전환 둘 모두를 포함하며, 키랄 보조제의 사용을 포함할 수 있다. 예를 들어, Carreira 및 Kvaerno의 문헌 [*Classics in Stereoselective Synthesis*, Wiley-VCH: Weinheim, 2009] 참조.

[0104] 화합물

[0105] 일 구현예에서, 화학식 I-A로 표시되는 화합물:



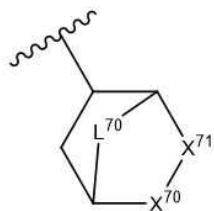
화학식 I-A

[0106]

[0107] 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상 이성질체, 입체 이성질체, 또는 호변 이성질체가 본원에 기술되며, 식 중: X¹ 및 X³은 CH 및 N으로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고; X²은 NR⁶, O, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되고; R¹, R², 및 R³은 H, 할로젠, 시아노, 및 알콕시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고; R⁴는 할로젠, 알콕시 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R⁵는 H, 할로젠 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R⁶은 H, 알킬, 알케닐, 알케닐알킬, 알키닐, 알키닐알킬, 시클로알킬, 시클로알킬알킬, 알콕시알킬, 시클로알케닐, 헤테로시클릴, 헤테로시클릴알킬, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로아릴알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R⁷은 H, 알킬, 및 아실로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0108] 일부 구현예에서, R¹, R², 및 R³ 중 적어도 하나는 할로젠이다. 일부 구현예에서, R¹, R², 및 R³ 중 적어도 하나는 플루오로이다. 일부 구현예에서, R¹은 플루오로이다. 일부 구현예에서, X¹은 N이다.

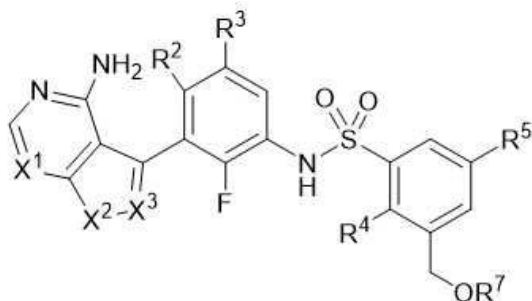
[0109] 일부 구현예에서, R^6 은 다음이 아니며:



[0110]

[0111] 여기에서, L^{70} 은 메틸렌 또는 에틸렌이고, X^{70} 및 X^{71} 중 하나는 CH_2 이고, 다른 하나는 $N-CO-R^{101}$ 이 되, R^{101} 은 C_{1-4} 알킬; C_{2-4} 알케닐; 또는 C_{2-4} 알키닐이며, 이들 각각은 치환되지 않거나 할로젠, 시아노, 하이드록시, 아미노, $NH(C_{1-4}$ 알킬), $N(C_{1-4}$ 알킬) $_2$, C_{3-10} 시클로알킬, 및 질소 및 산소로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 하나 또는 2개의 헤테로원자를 함유하는 C_{3-10} 헤테로시클로알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된다.

[0112] 다른 구현예에서, 화학식 I-B로 표시되는 화합물:



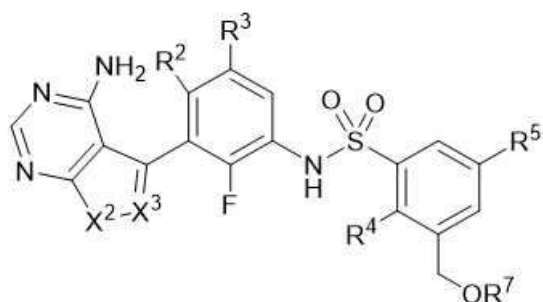
화학식 I-B

[0113]

[0114] 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상 이성질체, 입체 이성질체, 또는 호변 이성질체가 본원에 기술되며, 식 중: X^1 및 X^3 은 CH 및 N 으로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고; X^2 은 NR^6 , O , 및 S 로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^2 및 R^3 은 H , 할로젠, 시아노, 및 알콕시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고; R^4 는 할로젠, 알콕시 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^5 는 H , 할로젠 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^6 은 H , 알킬, 알케닐, 알케닐알킬, 알키닐, 알키닐알킬, 시클로알킬, 시클로알킬알킬, 알콕시알킬, 시클로알케닐, 헤테로시클릴, 헤테로시클릴알킬, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로아릴알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^7 은 H , 알킬, 및 아실로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0115] 일부 구현예에서, X^1 은 N 이다.

[0116] 일 구현예에서, 화학식 I-C로 표시되는 화합물:



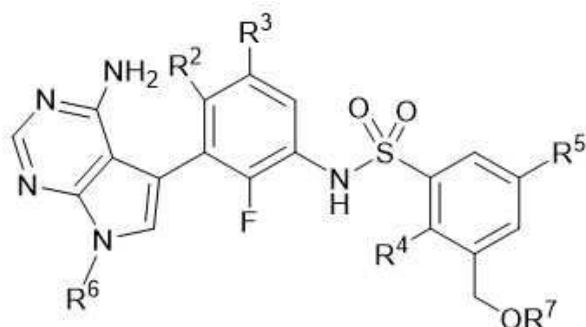
화학식 I-C

[0117]

[0118] 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상 이성질체, 입체 이성질체, 또는 호변 이성질체가 본원에 기술되며, 식 중: X^2 는 NR^6 , O, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되고; X^3 은 CH 및 N으로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^2 및 R^3 은 H, 할로젠, 시아노, 및 알콕시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고; R^4 는 할로젠, 알콕시 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^5 는 H, 할로젠 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^6 은 H, 알킬, 알케닐, 알케닐알킬, 알키닐, 알키닐알킬, 시클로알킬, 시클로알킬알킬, 알콕시알킬, 시클로알케닐, 헤테로시클릴, 헤테로시클릴알킬, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로아릴알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^7 은 H, 알킬, 및 아실로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0119] 일부 구현예에서, X^2 는 NR^6 이다.

[0120] 다른 구현예에서, 화학식 I-D로 표시되는 화합물:

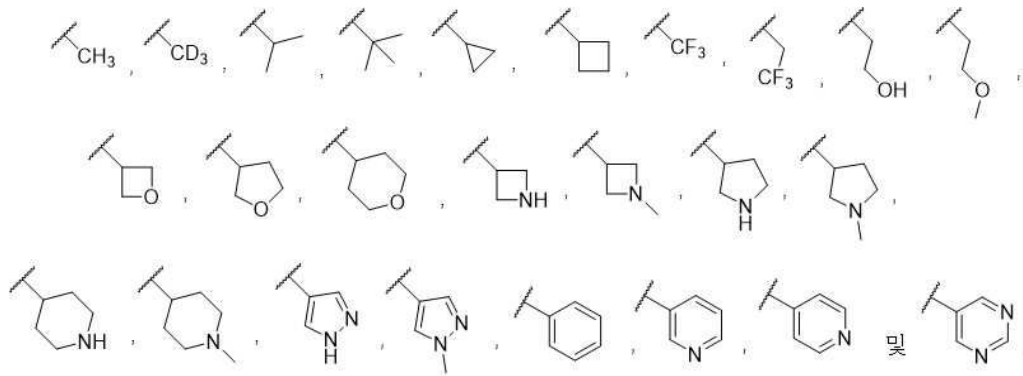


화학식 I-D

[0121]

[0122] 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상 이성질체, 입체 이성질체, 또는 호변 이성질체가 본원에 기술되며, 식 중: R^2 및 R^3 은 H, 할로젠, 시아노, 및 알콕시로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되고; R^4 는 할로젠, 알콕시 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^5 는 H, 할로젠 및 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^6 은 H, 알킬, 알케닐, 알케닐알킬, 알키닐, 알키닐알킬, 시클로알킬, 시클로알킬알킬, 알콕시알킬, 시클로알케닐, 헤테로시클릴, 헤테로시클릴알킬, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로아릴알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고; R^7 은 H, 알킬, 및 아세테이트로 이루어진 군으로부터 선택된다.

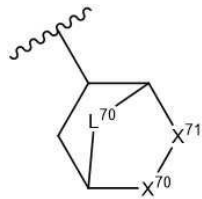
[0123] 일부 구현예에서, R^2 는 H이고 R^3 은 H이다. 일부 구현예에서, R^2 는 F이고 R^3 은 H이다. 일부 구현예에서, R^2 는 H이고 R^3 은 F이다. 일부 구현예에서, R^6 은 (C_1-C_8) 알킬, (C_2-C_8) 알케닐, (C_2-C_8) 알케닐- (C_1-C_4) 알킬, (C_2-C_8) 알키닐, (C_2-C_8) 알키닐- (C_1-C_4) 알킬, (C_3-C_8) 시클로알킬, (C_3-C_8) 시클로알킬- (C_1-C_4) 알킬, (C_3-C_8) 알콕시- (C_1-C_4) 알킬, (C_3-C_8) 시클로알케닐, (C_3-C_8) 시클로알케닐- (C_1-C_4) 알킬, 헤테로시클릴, 헤테로시클릴- (C_1-C_4) 알킬, 아릴, 헤테로아릴, 및 헤테로아릴- (C_1-C_4) 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, R^6 은 (C_1-C_8) 알킬, (C_3-C_8) 시클로알킬, (C_3-C_8) 알콕시- (C_1-C_4) 알킬, 헤테로시클릴, 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, R^6 은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:



[0124]

[0125]

일부 구현예에서, R^6 은 다음이 아니며:



[0126]

[0127]

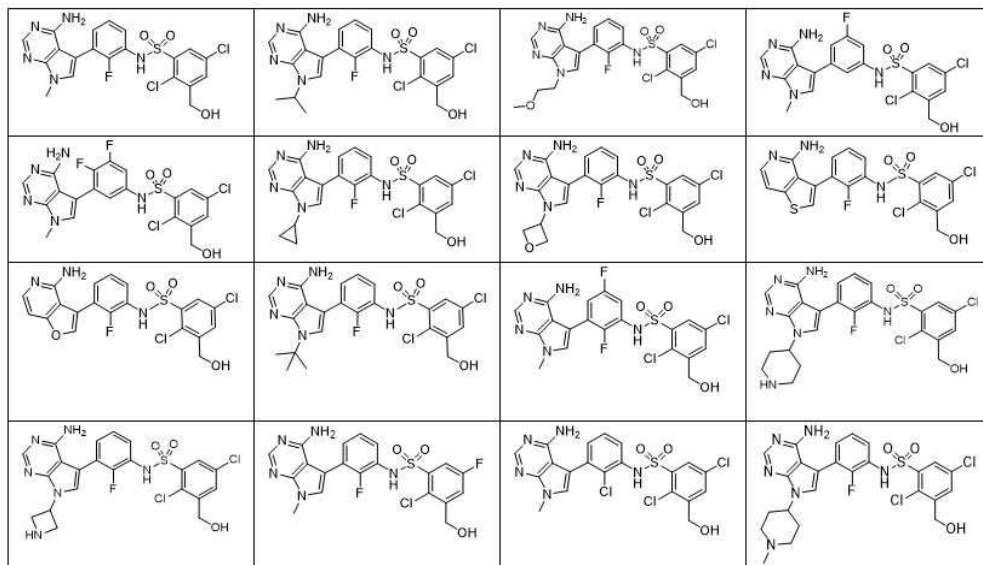
여기에서, L^{70} 은 메틸렌 또는 에틸렌이고, X^{70} 및 X^{71} 중 하나는 CH_2 이고, 다른 하나는 $N-CO-R^{101}$ 이되, R^{101} 은 C_{1-4} 알킬; C_{2-4} 알케닐; 또는 C_{2-4} 알킬닐이며, 이들 각각은 치환되지 않거나 할로젠, 시아노, 하이드록시, 아미노, $NH(C_{1-4}$ 알킬), $N(C_{1-4}$ 알킬) $_2$, C_{3-10} 시클로알킬, 및 질소 및 산소로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 하나 또는 2개의 헤테로원자를 함유하는 C_{3-10} 헤테로시클로알킬로 이루어진 군으로부터 각각 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기로 치환된다.

[0128]

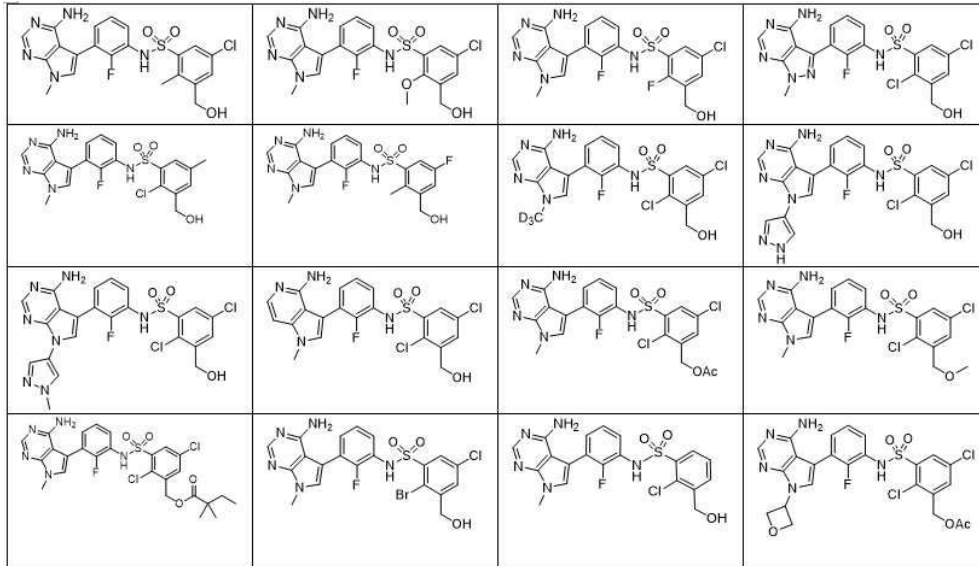
일부 구현예에서, R^4 는 할로젠, (C_1-C_6) 알콕시 및 (C_1-C_6) 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, R^4 는 클로로, 플루오로, 메톡시, 및 메틸로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, R^5 는 H, 할로젠, 및 (C_1-C_6) 알킬로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, R^5 는 클로로, 플루오로, 및 메틸로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, R^7 은 H이다.

[0129]

일 구현예에서, 본원에는:



[0130]



[0131]

[0132]

로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물, 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 거울상 이성질체, 입체 이성질체, 및 호변 이성질체가 기술된다.

[0133]

치료 방법

[0134]

본원에 기술된 화합물, 예를 들어 본원에 정의된 바와 같은 화학식 I의 화합물은 GCN2 또는 PERK 키나아제에 의해 유도되는 질환에 대한 치료제로서 작용할 수 있으며, 암과 같은 질환 및 장애의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 데 유용하다. 예시적인 암은 다음을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다: 대장암, 직장암, 항문암, 가족성 대장암, 유전성 비폴립증 대장암, 위장관 기질 종양, 폐암(예를 들어, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 악성 중피종), 중피종, 췌장암(예를 들어, 췌장관암, 췌장 내분비 종양), 인두암, 후두암, 식도암, 위암(예를 들어, 유두상 선암종, 점액성 선암종, 암 용어 사전 평편상피 암종), 십이지장암, 소장암, 유방암(예를 들어, 침습성 관상 암종, 관상피내 암종, 염증성 유방암), 난소암(예를 들어, 난소 상피 암종, 성선 외 생식 세포 종양, 난소 생식 세포 종양, 난소 저 악성 잠재적 종양), 고환 종양, 전립선암(예를 들어, 호르몬 의존성 전립선암, 비-호르몬 의존성 전립선암, 거세 저항성 전립선암), 간암(예를 들어, 간종, 원발성 간암, 간외담관암), 갑상선암(예를 들어, 갑상선 수질 암종), 신장암(예를 들어, 신장 세포 암종(예를 들어, 투명 세포 신장 세포 암종), 신우 및 요관의 이행 세포 암종), 자궁암(예를 들어, 자궁경부암, 자궁체암, 자궁 육종), 임신성 용모막 암종, 뇌 종양(예를 들어, 수모세포종, 신경교종, 송과체 성상세포종, 털모양 성상세포종, 미만성 성상세포종, 역형성 성상세포종, 뇌하수체 선종), 망막아종, 피부암(예를 들어, 기저 세포 암종, 악성 흑색종, 흑색종), 육종(예를 들어, 횡문근육종, 평활근육종, 연조직 육종, 방추 세포 육종, 골육종), 섬유육종, 악성 골종양, 방광암, 혈액암(예를 들어, 다발성 골수종, 백혈병, 급성 골수성 백혈병(AML), 급성 림프구성 백혈병(ALL)(만성 백혈병의 모세포 위기 포함), 악성 림프종, 호지킨병, 만성 골수증식성 질환), 알려지지 않은 원발성 혈액 암]의 치료, 암 성장 억제제, 암 전이 억제제, 세포자멸사 프로모터, 및 전암성 병변(예를 들어, 골수골수이형성 증후군).

[0135]

일 구현예에서, 통합 스트레스 반응의 조절 장애에 의해 야기되는 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법이 또한 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 본원에 기술된 화학식 I-A, I-B, I-C, 및 I-D의 화합물), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 통합 스트레스 반응 및/또는 미접힘 단백질 반응의 조절 장애는 GCN2 키나아제에 의해 야기된다. 일부 구현예에서, 통합 스트레스 반응 및/또는 미접힘 단백질 반응의 조절 장애는 PERK 키나아제에 의해 야기된다. 일부 구현예에서, 통합 스트레스 반응의 조절 장애는 GCN2 키나아제에 의해 야기된다. 일부 구현예에서, 미접힘 단백질 반응의 조절 장애는 PERK 키나아제에 의해 야기된다. 일부 구현예에서, 통합 스트레스 반응의 조절 장애는 PERK 키나아제 및 GCN2 키나아제로 이루어진 군으로부터 선택된 키나아제의 활성화에 의해 야기된다. 일부 구현예에서, 통합 스트레스 반응의 조절 장애는 GCN2 키나아제의 활성화에 의해 야기된다. 일부 구현예에서, 통합 스트레스 반응의 조절 장애는 PERK 키나아제의 활성화에 의해 야기된다.

[0136]

일 구현예에서, 통합 스트레스 반응 및/또는 미접힘 단백질 반응의 조절 장애에 의해 야기되는 질환의 치료를

필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법이 또한 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 본원에 기술된 화학식 I-A, I-B, I-C, 및 I-D의 화합물), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 통합 스트레스 반응 및/또는 미접힘 단백질 반응의 조절 장애는 PERK 키나아제 및 GCN2 키나아제로 이루어진 군으로부터 선택된 키나아제의 활성화에 의해 야기된다. 일부 구현예에서, 통합 스트레스 반응의 조절 장애는 GCN2 키나아제의 활성화에 의해 야기된다. 일부 구현예에서, 미접힘 단백질 반응의 조절 장애는 PERK 키나아제의 활성화에 의해 야기된다.

- [0137] 또 다른 구현예에서, GCN2 키나아제의 활성 조절을 필요로 하는 환자에서 이를 조절하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0138] 또 다른 구현예에서, GCN2 키나아제의 활성화를 필요로 하는 환자에서 이를 활성화시키는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0139] 또 다른 구현예에서, PERK 키나아제의 활성 조절을 필요로 하는 환자에서 이를 조절하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0140] 또 다른 구현예에서, PERK 키나아제의 활성화를 필요로 하는 환자에서 이를 활성화시키는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0141] 또 다른 구현예에서, GCN2 키나아제의 억제 및 PERK 키나아제의 억제를 필요로 하는 환자에서 이를 억제하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0142] 또 다른 구현예에서, GCN2 키나아제의 활성 조절을 필요로 하는 환자에서 이를 조절하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0143] 또 다른 구현예에서, PERK 키나아제의 활성 억제를 필요로 하는 환자에서 이를 억제하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.
- [0144] 또 다른 구현예에서, 암의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 본원에 기술된 화학식 I-A, I-B, I-C, 및 I-D의 화합물), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 암은, 대장암, 폐암, 중피종, 췌장암, 인두암, 후두암, 식도암, 위암, 십이지장암, 소장암, 유방암, 난소암, 고환 종양, 전립선암, 간암, 갑상선암, 신장암, 자궁암, 임신성 용모암종, 뇌종양, 망막아종, 피부암, 흑색종, 육종, 섬유육종, 악성 골 종양, 방광암, 혈액암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 암은, 대장암, 폐암, 중피종, 췌장암, 인두암, 후두암, 식도암, 위암, 십이지장암, 소장암, 유방암, 난소암, 고환 종양, 전립선암, 간암, 갑상선암, 신장암, 자궁암, 임신성 용모암종, 뇌종양, 망막아종, 피부암, 흑색종, 육종, 섬유육종, 악성 골 종양, 방광암, 혈액암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, B-세포 림프종, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, T-세포 림프종, 적백혈병, 조직구종 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 암은 백혈병이다. 일부 구현예에서, 암은 급성 골수성 백혈병이다. 일부 구현예에서, 암은 급성 림프구성 백혈병이다. 일부 구현예에서, 암은 섬유육종이다. 일부 구현예에서, 암은 다발성 골수종이다. 일부 구현예에서, 암은 림프종이다. 일부 구현예에서, 암은 B-세포 림프종이다. 일부 구현예에서, 암은 T 세포 림프종이다.
- [0145] 일 구현예에서, 아밀로이드증의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 경쇄 아밀로이드증의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하

는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0146] 또 다른 구현예에서, GCN2 연관 질환 및 PERK 연관 질환으로부터 선택되는 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 본원에 기술된 화학식 I-A, I-B, I-C, 및 I-D의 화합물), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 질환은 GCN2 연관 질환이다. 일부 구현예에서, 질환은 PERK 연관 질환이다. 일부 구현예에서, 질환은 암이다. 일부 구현예에서, 암은, 대장암, 폐암, 중피종, 췌장암, 인두암, 후두암, 식도암, 위암, 십이지장암, 소장암, 유방암, 난소암, 고환 종양, 전립선암, 간암, 갑상선암, 신장암, 자궁암, 임신성 용모암종, 뇌종양, 망막아종, 피부암, 흑색종, 육종, 섬유육종, 악성 골종양, 방광암, 혈액암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 암은, 대장암, 폐암, 중피종, 췌장암, 인두암, 후두암, 식도암, 위암, 십이지장암, 소장암, 유방암, 난소암, 고환 종양, 전립선암, 간암, 갑상선암, 신장암, 자궁암, 임신성 용모암종, 뇌종양, 망막아종, 피부암, 흑색종, 육종, 섬유육종, 악성 골종양, 방광암, 혈액암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, B-세포 림프종, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, T-세포 림프종, 적백혈병, 조직구증 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 암은 백혈병이다. 일부 구현예에서, 암은 급성 골수성 백혈병이다. 일부 구현예에서, 암은 급성 림프구성 백혈병이다. 일부 구현예에서, 암은 섬유육종이다. 일부 구현예에서, 암은 다발성 골수종이다. 일부 구현예에서, 암은 림프종이다. 일부 구현예에서, 암은 B-세포 림프종이다. 일부 구현예에서, 암은 T 세포 림프종이다. 일부 구현예에서, 질환은 아밀로이드증이다. 일부 구현예에서, 질환은 경색 아밀로이드증이다.

[0147] 또 다른 구현예에서, GCN2 연관 질환 및 PERK 연관 질환으로부터 선택되는 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 방법이 본원에 기술되며, 이는 본원에 기술된 화합물(예를 들어, 본원에 기술된 화학식 I-A, I-B, I-C, 및 I-D의 화합물), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 치료적 유효량, 및 하나 이상의 치료제의 치료적 유효량을 해당 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 질환은 GCN2 연관 질환이다. 일부 구현예에서, 질환은 PERK 연관 질환이다. 일부 구현예에서, 질환은 암이다. 일부 구현예에서, 암은, 대장암, 폐암, 중피종, 췌장암, 인두암, 후두암, 식도암, 위암, 십이지장암, 소장암, 유방암, 난소암, 고환 종양, 전립선암, 간암, 갑상선암, 신장암, 자궁암, 임신성 용모암종, 뇌종양, 망막아종, 피부암, 흑색종, 육종, 섬유육종, 악성 골종양, 방광암, 혈액암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 암은, 대장암, 폐암, 중피종, 췌장암, 인두암, 후두암, 식도암, 위암, 십이지장암, 소장암, 유방암, 난소암, 고환 종양, 전립선암, 간암, 갑상선암, 신장암, 자궁암, 임신성 용모암종, 뇌종양, 망막아종, 피부암, 흑색종, 육종, 섬유육종, 악성 골종양, 방광암, 혈액암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, B-세포 림프종, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, T-세포 림프종, 적백혈병, 조직구증 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 암은 백혈병이다. 일부 구현예에서, 백혈병은 급성 골수성 백혈병이다. 일부 구현예에서, 백혈병은 급성 림프구성 백혈병이다. 일부 구현예에서, 암은 섬유육종이다. 일부 구현예에서, 암은 다발성 골수종이다. 일부 구현예에서, 암은 림프종이다. 일부 구현예에서, 암은 B-세포 림프종이다. 일부 구현예에서, 암은 T 세포 림프종이다. 일부 구현예에서, 질환은 아밀로이드증이다. 일부 구현예에서, 질환은 경색 아밀로이드증이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 치료제는 L-아스파라기나아제, 페길화 아스파라기나아제, PERK 억제제, mTOR 억제제, 면역조절제, MAPK 경로 억제제, MEK 억제제, ERK 억제제, 및 Ras 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 치료제는 IMiD 제제, 프로테아좀 억제제, 스테로이드, 항-CD38 제제, 항-CD20 제제, Bcl-2 억제제, PI3K 억제제, 이중특이적 항체, 뉴클레오시드 유사체, BTK 억제제, DNA 알킬화제, EZH2 억제제, 안트라사이클린, 국소이성화효소 억제제, 플라틴, 티로신 키나아제 억제제, HDAC 억제제, 핵 방출 억제제, 항-미세관 제제, L-아스파라기나아제, 페길화 아스파라기나아제, PERK 억제제, mTOR 억제제, 면역조절제, MAPK 경로 억제제, MEK 억제제, ERK 억제제, 및 Ras 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 치료제는 L-아스파라기나아제, 페가스파르가아제, 칼라스파르가아제 페골 - mnk1, 보르테오미, 카르필조미, 익사조미, 탈리도마이드, 포말리도마이드, 레날리도마이드, 텍사메타손, 프레드니손, 다라투무맙, 다라투무맙/히알루로니다아제, 이사툽시맙, 리툽시맙, 오비누투주맙, 베네토클락스, 이텔라리십, 코판리십, 두벨리십, 움브라리십, 젬시타빈, 시타라빈, 이브루티닙, 아칼라브루티닙, 자누브루티닙, 벤다무스틴, 시클로포스파미드, 타제메토스타트, 독소루비신, 다우노루비신, 에토포시드, 옥살로플라틴, 카르보플라틴, 시스플라틴보

수티닙, 다사티닙, 이마티닙, 닐로티닙, 포나티닙, 파노비노스타트, 셀리넥서, 빈크리스틴, JZP-458, 에라스파아제, PF745(JZP-341), 아스파라기나아제 *에르비니아 크리산테미*(*Erwinia chrysanthemi*)(크리산타스파아제), 대장균 아스파라기나아제(콜라스파아제), 항-PD1 제제, 항-PDL1 제제, 및 항-CTLA4 제제로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0148] 일 구현예에서, 통합 스트레스 반응 및/또는 미접힘 단백질 반응의 조절 장애에 의해 야기되는 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 데 사용하기 위한, 본원에 기술된 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물이 본원에 기술된다. 일부 구현예에서, 통합 스트레스 반응 및/또는 미접힘 단백질 반응의 조절 이상은 PERK 키나아제 및 GCN2 키나아제로 이루어진 군으로부터 선택되는 키나아제에 의해 야기된다. 일부 구현예에서, 통합 스트레스 반응 및/또는 미접힘 단백질 반응의 조절 이상은 GCN2 키나아제에 의해 야기된다. 일부 구현예에서, 통합 스트레스 반응 및/또는 미접힘 단백질 반응의 조절 장애는 PERK 키나아제에 의해 야기된다. 일부 구현예에서, 통합 스트레스 반응의 조절 장애는 PERK 키나아제 및 GCN2 키나아제로 이루어진 군으로부터 선택된 키나아제의 활성화에 의해 야기된다. 일부 구현예에서, 통합 스트레스 반응의 조절 장애는 GCN2 키나아제의 활성화에 의해 야기된다. 일부 구현예에서, 미접힘 단백질 반응의 조절 장애는 PERK 키나아제에 의해 야기된다. 일부 구현예에서, 통합 스트레스 반응의 조절 장애는 PERK 키나아제 및 GCN2 키나아제로 이루어진 군으로부터 선택된 키나아제의 활성화에 의해 야기된다. 일 구현예에서, GCN2 키나아제의 활성 조절을 필요로 하는 환자에서 이를 조절하는 데 사용하기 위한, 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물이 본원에 기술된다. 일 구현예에서, GCN2 키나아제의 활성화를 필요로 하는 환자에서 이를 활성화하는 데 사용하기 위한, 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물이 본원에 기술된다. 일 구현예에서, PERK 키나아제의 활성 조절을 필요로 하는 환자에서 이를 조절하는 데 사용하기 위한, 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물이 본원에 기술된다. 일 구현예에서, PERK 키나아제의 활성화를 필요로 하는 환자에서 이를 활성화하는 데 사용하기 위한, 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물이 본원에 기술된다.

[0149] 일 구현예에서, GCN2 키나아제의 억제 및 PERK 키나아제의 억제를 필요로 하는 환자에서 이를 억제하는 데 사용하기 위한, 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물이 본원에 기술된다. 일 구현예에서, GCN2 키나아제의 활성 조절을 필요로 하는 환자에서 이를 조절하는 데 사용하기 위한, 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물이 본원에 기술된다. 또 다른 구현예에서, PERK 키나아제의 활성 억제를 필요로 하는 환자에서 이를 억제하는 데 사용하기 위한, 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물이 본원에 기술된다.

[0150] 일 구현예에서, 암의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 데 사용하기 위한, 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물이 본원에 기술된다. 일부 구현예에서, 암은, 대장암, 폐암, 중피종, 췌장암, 인두암, 후두암, 식도암, 위암, 십이지장암, 소장암, 유방암, 난소암, 고환 종양, 전립선암, 간암, 갑상선암, 신장암, 자궁암, 임신성 용모암종, 뇌종양, 망막아종, 피부암, 흑색종, 육종, 섬유육종, 악성 골 종양, 방광암, 혈액암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, B-세포 림프종, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, T-세포 림프종, 적백혈병, 조직구증 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 암은 백혈병이다. 일부 구현예에서, 암은 급성 골수성 백혈병이다. 일부 구현예에서, 암은 급성 림프구성 백혈병이다. 일부 구현예에서, 암은 섬유육종이다. 일부 구현예에서, 암은 다발성 골수종이다. 일부 구현예에서, 암은 림프종이다. 일부 구현예에서, 암은 B-세포 림프종이다. 일부 구현예에서, 암은 T 세포 림프종이다.

[0151] 일 구현예에서, 아밀로이드증의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 데 사용하기 위한, 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물이 본원에 기술된다. 일 구현예에서, 경계 아밀로이드증의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 데 사용하기 위한, 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물이 본원에 기술된다.

[0152] 일 구현예에서, GCN2 연관 질환 및 PERK 연관 질환으로부터 선택되는 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 데 사용하기 위한, 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물이 본원에 기술된다. 일부 구현예에서, 질환은 GCN2 연관 질환이다. 일부 구현예에서, 질환은 PERK 연관 질환이다. 일부 구현예에서, 질환은 암이다. 일부 구현예에서, 암은, 대장암, 폐암, 중피종, 췌장암,

인두암, 후두암, 식도암, 위암, 십이지장암, 소장암, 유방암, 난소암, 고환 종양, 전립선암, 간암, 갑상선암, 신장암, 자궁암, 임신성 용모암종, 뇌종양, 망막아종, 피부암, 흑색종, 육종, 섬유육종, 악성 골 종양, 방광암, 혈액암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, B-세포 림프종, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, T-세포 림프종, 적 백혈병, 조직구종 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 암은 백혈병이다. 일부 구현예에서, 암은 급성 골수성 백혈병이다. 일부 구현예에서, 암은 급성 림프구성 백혈병이다. 일부 구현예에서, 암은 섬유육종이다. 일부 구현예에서, 암은 다발성 골수종이다. 일부 구현예에서, 암은 림프종이다. 일부 구현예에서, 암은 B-세포 림프종이다. 일부 구현예에서, 암은 T 세포 림프종이다. 일부 구현예에서, 질환은 아밀로이드증이다. 일부 구현예에서, 질환은 경쇄 아밀로이드증이다.

[0153] 일부 구현예에서, GCN2 연관 질환 및 PERK 연관 질환으로부터 선택되는 질환의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하는 데 사용하기 위한, 본원에 기술된 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 본원에 기술된 약학적 조성물이 본원에 기술된다. 일부 구현예에서, 질환은 GCN2 연관 질환이다. 일부 구현예에서, 질환은 PERK 연관 질환이다. 일부 구현예에서, 질환은 암이다. 일부 구현예에서, 암은, 대장암, 폐암, 중피종, 췌장암, 인두암, 후두암, 식도암, 위암, 십이지장암, 소장암, 유방암, 난소암, 고환 종양, 전립선암, 간암, 갑상선암, 신장암, 자궁암, 임신성 용모암종, 뇌종양, 망막아종, 피부암, 흑색종, 육종, 섬유육종, 악성 골 종양, 방광암, 혈액암, 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, B-세포 림프종, 여포성 림프종, 외투 세포 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종, T-세포 림프종, 적 백혈병, 조직구종 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 및 악성 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 암은 백혈병이다. 일부 구현예에서, 백혈병은 급성 골수성 백혈병이다. 일부 구현예에서, 백혈병은 급성 림프구성 백혈병이다. 일부 구현예에서, 암은 섬유육종이다. 일부 구현예에서, 암은 다발성 골수종이다. 일부 구현예에서, 암은 림프종이다. 일부 구현예에서, 암은 B-세포 림프종이다. 일부 구현예에서, 암은 T 세포 림프종이다. 일부 구현예에서, 질환은 아밀로이드증이다. 일부 구현예에서, 질환은 경쇄 아밀로이드증이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 치료제는 IMiD 제제, 프로테아좀 억제제, 스테로이드, 항-CD38 제제, 항-CD20 제제, Bcl-2 억제제, PI3K 억제제, 이중특이적 항체, 뉴클레오사이드 유사체, BTK 억제제, DNA 알킬화제, EZH2 억제제, 안트라사이클린, 국소이성화효소 억제제, 플라틴, 티로신 키나아제 억제제, HDAC 억제제, 핵 방출 억제제, 항-미세관 제제, L-아스파라기나아제, 폐길화 아스파라기나아제, PERK 억제제, mTOR 억제제, 면역조절제, MAPK 경로 억제제, MEK 억제제, ERK 억제제, 및 Ras 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 치료제는 보르테오미드, 카르필조미드, 익사조미드, 탈리도마이드, 포말리도마이드, 레날리도마이드, 텍사메타손, 프레드니손, 다라투무맙, 다라투무맙/히알루로니다아제, 이사톡시맙, 리톡시맙, 오비누투주맙, 베네토클락스, 이렐라리십, 코판리십, 두벨리십, 움브랄리십, 켐시타빈, 시타라빈, 이브루티닙, 아칼라브루티닙, 자누브루티닙, 벤다무스틴, 시클로포스파미드, 타제메토스타트, 독소루비신, 다우노루비신, 에토포시드, 옥살로플라틴, 카르보플라틴, 시스플라틴보수티닙, 다사티닙, 이마티닙, 닐로티닙, 포나티닙, 파노비노스타트, 셀리넥서, 빈크리스틴, L-아스파라기나아제, 페가스파르가아제, 칼라스파르가아제 페글 - mnk1, JZP-458, 에라스파아제, PF745(JZP-341), 아스파라기나아제 *에르비니아 크리산테미(Erwinia chrysanthemi)*(크리산타스파아제), 대장균 아스파라기나아제(콜라스파아제), 항-PD1 제제, 항-PDL1 제제, 및 항-CTLA4 제제로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0154] 본원에 제공된 화합물은 최적의 약학적 효능을 제공할 투여량으로 이러한 치료를 필요로 하는 환자(동물 및 인간)에게 투여될 수 있다. 임의의 특정 적용에 사용하기 위해 필요한 투여량은 환자마다 상이할 것이고, 선택된 특정 화합물 또는 조성물에 의해서뿐만 아니라, 투여 경로, 치료되는 병태의 성질, 환자의 연령 및 상태, 이후 환자에게 이어지는 병용 약물 또는 특별 식단, 및 당업자가 인식하게 될 다른 인자에 따라 상이하며, 적절한 투여량은 궁극적으로 담당 의사의 재량에 따른다. 전술한 임상 병태 및 질환을 치료하기 위해, 본원에 제공된 화합물은 종래의 비독성인 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제 및 비히클을 함유하는 투여량 단위 제형으로, 경구, 피하, 국소, 비경구, 흡입 분무 또는 직장으로 투여될 수 있다. 비경구 투여는 피하 주사, 정맥 내 또는 근육 내 주사 또는 주입 기술을 포함할 수 있다.

[0155] 치료는 원하는 만큼의 장기간 또는 단기간 동안 계속될 수 있다. 조성물은, 예를 들어 일일 1회 내지 4회 또는 그 이상의 처방으로 투여될 수 있다. 적절한 치료 기간은, 예를 들어, 적어도 약 1주, 적어도 약 2주, 적어도 약 1개월, 적어도 약 6개월, 적어도 약 1년, 또는 무기한일 수 있다. 치료 기간은 목적하는 결과가 달성될 때 종료될 수 있다.

[0156] **병용 요법**

- [0157] 본원에 기술된 화합물, 예를 들어, 본원에 정의된 바와 같은 화학식 I의 화합물은 본원에 기술된 암과 같은, 본원에 기술된 장애를 치료하기 위해 하나 이상의 추가 치료제와 조합하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 개시에서는 본원에 기술된 화합물, 예를 들어, 본원에 정의된 바와 같은 화학식 I의 화합물, 하나 이상의 추가 치료제, 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 일부 구현예에서, 본원에 정의된 바와 같은 화학식 I의 화합물 및 하나의 추가 치료제가 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 정의된 바와 같은 화학식 I의 화합물 및 2개의 추가 치료제가 투여된다. 일부 구현예에서, 본원에 정의된 바와 같은 화학식 I의 화합물 및 3개의 추가 치료제가 투여된다. 병용 요법은 각각이 별도로 제형화되고 투여되는 둘 이상의 치료제를 투여함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 본원에 정의된 바와 같은 화학식 I의 화합물 및 추가 치료제는 별도로 제형화되고 투여될 수 있다. 병용 요법은 또한 2개 이상의 치료제를 단일 제형으로, 예를 들어, 화학식 I의 화합물을 하나의 치료제로서 포함하고, 화학요법제와 같은 하나 이상의 추가 치료제를 포함하는 약학적 조성물을 투여함으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 본원에 정의된 바와 같은 화학식 I의 화합물 및 추가 치료제는 단일 제형으로 투여될 수 있다. 다른 조합 또한 병용 요법에 포함된다. 병용 요법에서의 둘 이상의 제제는 동시에 투여될 수 있지만, 그럴 필요는 없다. 예를 들어, 제1 제제(또는 제제의 조합)의 투여는 제2 제제(또는 제제의 조합) 투여보다 몇 분, 몇 시간, 몇 일 또는 몇 주만큼 선행할 수 있다. 따라서, 2개 이상의 제제는 서로 몇 분 간격으로, 또는 서로 1, 2, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 또는 24시간 간격으로, 또는 서로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14 일 간격으로, 또는 서로 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9주 또는 그 이상의 간격으로 투여될 수 있다. 일부 경우에, 훨씬 긴 간격이 가능하다. 많은 경우 병용 요법에 사용되는 둘 이상의 제제는 환자의 신체 내에 동시에 존재하는 것이 바람직하지만, 그럴 필요는 없다.
- [0158] 병용 요법은 또한 구성 성분 제제를 다른 순서로 사용하는 조합에 사용되는 제제 중 하나 이상을 2회 이상 투여하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 제제 X 및 제제 Y가 조합으로 사용되는 경우, 이들은 임의의 조합으로 1회 이상 순차적으로, 예를 들어, X-Y-X, X-X-Y, Y-X-Y, Y--Y-X, X-X-Y-Y 등의 순서로 투여될 수 있다.
- [0159] 병용 요법은 또한 상이한 투여 경로를 사용하는 조합에 사용되는 제제 중 하나 이상을 2회 이상 투여하는 것을 포함할 수 있다. 하나 이상의 제제 각각은 독립적으로, 종래의 비독성인 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제 및 비히클을 함유하는 투여 단위 제형으로, 경구, 피하, 국소, 비경구, 흡입 분무에 의해, 또는 직장투여될 수 있다. 비경구 투여는 피하 주사, 정맥 내 또는 근육 내 주사 또는 주입 기술을 포함할 수 있다.
- [0160] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 화학식 I의 화합물은 아스파라기나아제(ASNase, L-아스파라기나아제) 또는 이의 유도체와 조합된다. 일부 구현예에서, 아스파라기나아제는 *에르비니아 크리스탄테미*(*Erwinia chrysanthemi*)로부터 수득되며, 크리스탄타스파아제 또는 아스파라기나아제 *에르비니아 크리스탄테미*로 알려져 있다. 아스파라기나아제 *에르비니아 크리스탄테미*는 Erwinaze® 또는 Erwinase® 상표로 판매된다. 일부 구현예에서, 아스파라기나아제는 대장균으로부터 수득되고, 콜라스파아제로 알려져 있다. 콜라스파아제는 Elspar®, Leunase®, Kidrolase®, 또는 Spectrila®(제조합 대장균 아파라기나아제) 상표로 판매된다. 콜라스파아제의 페길화 유도체는 Oncaspar® 상표로 판매되는 페그아스파르가아제, 및 Asparlas® 상표로 판매되는 칼라아스파르가아제 페골 - mnkl이다. 현재 전임상 또는 임상 개발 중인 다른 아스파라기나아제 제품은 JZP-458(제조합 에르비니아 아스파라기나아제), PF745(JZP-341), 에리아스파아제(GRASPA®), 및 Xoncane을 포함한다.
- [0161] 일부 구현예에서, 본원에서 정의된 바와 같은 화학식 I의 화합물은 면역조절제와 조합된다. 일부 구현예에서, 면역조절은 적응 면역 반응을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 면역조절은 항원 제시 세포의 활성을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 면역조절제는 대식세포를 포함하는 골수 세포의 항종양 활성을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 면역조절은 자연 살해 세포의 항-종양 활성을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 면역조절제는 세포독성 T 세포를 포함하는 효과기 T 세포의 활성을 향상시킨다.
- [0162] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 화합물과 조합하여 투여될 수 있는 하나 이상의 추가 치료제는 MAPK 경로 억제제일 수 있다. 이러한 MAPK 경로 억제제는, 예를 들어, MEK 억제제, ERK 억제제, 및 Ras 억제제를 포함한다.
- [0163] 예시적인 MEK 억제제는 트라메티닙, 셀루메티닙, 코비메티닙, 비니메티닙, 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 ERK 억제제는 울릭세르티닙, SCH772984, LY3214996, 라복세르티닙, VX-11e, ASN-007, GDC-0994, MK-8353, ASTX-029, LTT462, KO-947, 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 Ras 억제제는 AMG-510, MRTX849, ARS-1620, ARS-3248, LY3499446, 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0164] 일부 구현예에서, 추가 치료제는 펩트롤리주맵, 니볼루맵, 피딜리주맵, 세미플리맵, 아테졸리주맵, 두발루맵,

BMS-936559, 또는 아벨루맵을 포함하는 항-PD-1 또는 항-PDL-1 치료제를 포함하나 이에 한정되지 않는 면역조절제일 수 있다. 일부 구현예에서, 추가 치료제는 TSR-022 또는 MBG453을 포함하나 이에 한정되지 않는 항-TIM3(항-HAVcr2) 치료제, 텔라틀리맵, LAG525 또는 TSR-033을 포함하나 이에 한정되지 않는 항-LAG3 치료제, 항-4-1BB(항-CD37, 항-TNFRSF9), SGN-40, CP-870,893 또는 R07009789를 포함하나 이에 한정되지 않는 CD40 작용제 치료제, Hu5F9-G4를 포함하나 이에 한정되지 않는 항-CD47 치료제, 항-CD20 치료제, 항-CD38 치료제, ADU-S100을 포함하나 이에 한정되지 않는 STING 작용제, MK-1454, ASA404 또는 아미도벤즈이미다졸일 수 있다. 일부 구현예에서, 추가 치료제는 이필리무맵, 트레멜리무맵을 포함하는 항-CTLA4 제제일 수 있다. 일부 구현예에서, 추가 치료제는 아자시티딘 또는 데시타빈을 포함하나 이에 한정되지 않는 저메틸화제, 표피 성장 인자 억제제, 스타틴, 메트포르민, 안지오텐신 수용체 차단제, 탈리도마이드, 레날리도미드, 포말리도미드, 프레드니손, 또는 텍사메타손을 포함하나 이에 한정되지 않는 다른 면역조절 치료제일 수 있다. 일부 구현예에서, 추가 치료제는 표적 치료제, 암 백신, 및 CAR-T 세포 요법을 포함하는 면역 치료제일 수 있다.

[0165] 본원에 기술된 화학식 I의 화합물은 암을 치료하는 것으로 알려진 다른 치료제와 조합하여 투여될 수 있다. 이러한 다른 치료제는, 방사선 요법, 항-튜블린 제제, DNA 알킬화제, DNA 합성-억제제, DNA 삽입제, 항-에스트로겐 제제, 항-안드로겐, 스테로이드, 항-EGFR 제제, 키나아제 억제제, mTOR 억제제, PI3 키나아제 억제제, 시클린 의존성 키나아제 억제제, CD4/CD6 키나아제 억제제, 국소이성화효소 억제제, 히스톤 탈아세틸화효소(HDAC) 억제제, DNA 메틸화 억제제, 항-HER2 제제, 항-혈관형성제, 프로테아좀 억제제, PARP(폴리 ADP 리보오스 중합효소) 억제제, 키나아제 억제제를 조절하는 세포 주기, 탈리도마이드, 레날리도마이드, 포말리도마이드, 보르테오미드, 카르필조미드, 이사조미드, 다라투무맵, 다라투무맵/히알루로니다아제, 이사톡시맵, 텍사메타손, 및 항체-약물-접합체(ADC)를 포함한다.

[0166] 일 구현예에서, 추가 치료제는, 항-튜블린 제제(예를 들어, 파클리탁셀, nab-파클리탁셀을 포함하는 주사 가능 현탁액용 파클리탁셀 단백질 결합 입자, 에리布林, 도세탁셀, 익사베필론, 빈크리스틴, 아우리스타틴, 또는 메이탄시노이드), 비노렐빈, DNA-알킬화제(시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴, 시클로포스파미드, 이포스파마이드, 테모졸로마이드를 포함함), DNA 삽입제 또는 DNA 국소이성화효소 억제제(독소루비신, 폐결화된 리포좀 독소루비신, 다우노루비신, 이다루비신, 미톡산트론, 또는 에피루비신과 같은 안트라사이클린, 토포테칸, 이리노테칸, 또는 엑사테칸과 같은 캄토테신을 포함함), 5-플루오로우라실, 카페시타빈, 시타라빈, 데시타빈, 5-아자 시티딘, 젤시타빈 및 메토트렉세이트를 포함하는 화학요법제를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0167] 일부 구현예에서, 추가 치료제는 엘로티닙, 게피티닙, 네라티닙, 아파티닙, 오시머티닙, 라파타닙, 크리조티닙, 브리가티닙, 세리티닙, 알렉티닙, 로르타티닙, 에베롤리무스, 템시롤리무스, 아베마시클립, LEE011, 팔보시클립, 카보잔티닙, 리프레티닙, 수니티닙, 파조파닙, 소라페닙, 레고라페닙, 수니티닙, 엑시티닙, 다사티닙, 이마티닙, 닐로티닙, 이렐라리십, 이브루티닙, BLU-667, Loxo 292, 라로트렉티닙, 및 퀴자르티닙을 포함하나 이에 한정되지 않는 키나아제 억제제일 수 있다.

[0168] 일부 구현예에서, 추가 치료제는 타목시펜, 플베스트란트, 아나스트로졸, 레트로졸, 및 엑세메스탄을 포함하나 이에 한정되지 않는 항-에스트로겐 제제, 아비라테론 아세테이트, 엔잘루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 플루타미드, 시프로테론 아세테이트를 포함하나 이에 한정되지 않는 항-안드로겐 제제, 프레드니손 및 텍사메타손을 포함하나 이에 한정되지 않는 스테로이드 제제, 네라파립, 올라파립, 탈라조파립, 및 루카파립을 포함하나 이에 한정되지 않는 PARP 억제제, 이리노테칸, 캄토테신, 엑사테칸, 및 토포테칸을 포함하나 이에 한정되지 않는 국소이성화효소 I 억제제, 안트라사이클린, 에토포시드, 에토포시드 인산염, 및 미톡산트론을 포함하나 이에 한정되지 않는 국소이성화효소 II 억제제, 보리노스타트, 로미테신, 파노비노스타트, 발프로산, 및 벨리노스타트를 포함하나 이에 한정되지 않는 히스톤 탈아세틸화효소(HDAC) 억제제, DZNep 및 5-아자-2'-데옥시시티딘을 포함하나 이에 한정되지 않는 DNA 메틸화 억제제, 보르테오미드 및 카르필조미드를 포함하나 이에 한정되지 않는 프로테아좀 억제제, 트라스투주맵, 아도-트라스투주맵, 퍼투주맵, 세톡시맵, 및 파니투무맵을 포함하나 이에 한정되지 않는 생물학적 제제일 수 있다.

[0169] 일부 구현예에서, 추가 치료제는 베바시주맵, 애플리버셉트, 및 AMG386을 포함하는 항혈관형성제일 수 있다.

[0170] 일부 구현예에서, 추가 치료제는 DM1, DM4, MMAE, MMAF, 또는 캄토테신 페이로드를 포함하는 항체-약물-접합체(ADC), 브렌톡시맵 베도틴 및 트라스투주맵 엠탄신, 방사선요법, 시푸류셀-T를 포함하나 이에 한정되지 않는 치료 백신일 수 있다.

[0171] 일부 구현예에서, 추가 치료제는 ULK 억제제, VPS34 억제제, PIKfyve 억제제, PPT1 억제제, 또는 리소좀 차단제를 포함하는 자가포식 억제제일 수 있다. 일부 구현예에서, 추가 치료제는 DCC-3116, SAR405, SB02024, 하이드

록시클로로퀸, 클로로퀸, 아펠리모드, MRT403, 및 LYS05일 수 있다.

[0172] 일부 구현예에서, 추가 치료제는 고세렐린 및 루프롤리드를 포함하는 황체 형성 호르몬 방출 호르몬(LHRH) 유사체로부터 선택된다.

[0173] 일부 구현예에서, 추가적인 치료제는 에베롤리무스, 트라벡테딘, 아브락산, TLK 286, AV-299, DN-101, 파조파닙, GSK690693, RTA 744, ON 0910.Na, AZD 6244(ARRY-142886), AMN-107, TKI-258, GSK461364, AZD 1152, 엔자스타우린, 반데타닙, ARQ-197, MK-0457, MLN8054, PHA-739358, R-763, AT-9263, 페메트렉시드, 엘로티닙, 다사티닙, 닐로티닙, 데카타닙, 파니투무맙, 암루비신, 오레고보맙, Lep-etu, 놀라트렉시드, AZD 2171, 바타불린, 오파투무맙, 자놀리무맙, 에도테카린, 테트란트린, 루비테칸, 테스밀리펜, 오블리메르센, 티실리무맙, 이필리무맙, 고시폴, Bio 111, 131-I-TM-601, ALT-110, BIO 140, CC 8490, 실렌지타이드, 지마테칸, IL13-PE38QQR, INO 1001, IPdR₁ KRX-0402, 루칸톤, LY 317615, 뉴라디아, 비테스판, Rta 744, 알라노신 (Sdx 102), 탈람파넬, 아트라센탄, XR 311, 로미테핀, ADS-100380, 수니티닙, 5-플루오로우라실, 보리노스타트, 에토포시드, 켄시타빈, 독소루비신, 이리노테칸, 리포솜 독소루비신, 5'-데옥시-5-플루오로우리딘, 빈크리스틴, 데모졸로미드, ZK-304709, 셀리시클립; PD0325901, AZD-6244, 카페시타빈, L-글루탐산, N-[4-[2-(2-아미노-4,7-디하이드로-4-옥소-1H-피롤로[2,3-d]피리미딘-5-일)-에틸]벤조일]-, 이나트륨염, 질수화물, 캄프토테신, PEG-표지된 이리노테칸, 타목시펜, 토레미펜 구연산염, 아나스트라졸, 엑세메스탄, 레트로졸, DES(디에틸stil베스트롤), 에스트라디올, 에스트로겐, 접합된 에스트로겐, 베바시주맙, IMC-1C11, CHIR-258, 3-[5-(메틸sul포닐피페라딘메틸)-인돌릴-퀴놀린, 바탈라닙, AG-013736, AVE-0005, [D-Ser(tBu) 6, Azgly 10] (pyro-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-D-Ser(tBu)-Leu-Arg-Pro-Azgly-NH₂ 아세테이트 [C₅₉H₈₄N₁₈O₁₄-(C₂H₄O₂)_x, 식 중 x = 1 내지 2.4임]의 아세트산염, 고세렐린 아세테이트, 류프롤리드 아세테이트, 트립토텐린 파모에이트, 메드록시프로게스테론 아세테이트, 히드록시프로게스테론 카프로에이트, 메게스트롤 아세테이트, 알록시펜, 비칼루타미드, 플루타니드, 닐루타미드, 메게스트롤 아세테이트, CP-724714; TAK-165, HKI-272, 엘로티닙, 라파티닙, 카네르티닙, ABX-EGF 항체, 에르비투스, EKB-569, PKI-166, GW-572016, 이노나파닙, BMS-214662, 티니파닙; 아미포스틴, NVP-LAQ824, 수베로일 아날리드 히드록산산, 발프로산, 트리코스타틴 A, FK-228, SU11248, 소라페닙, KR951, 아미노글루테티미드, 아른사크린, 아나그렐리드, L-아사파라기나아제, 바실리우스 칼메트-게랑(Bacillus Calmette-Guerin, BCG) 백신, 블레오마이신, 부세렐린, 부솔판, 카보플라틴, 카르무스틴, 클로람부실, 시스플라틴, 클라드리빈, 클로드로네이트, 시프로테론, 시타라빈, 다카르바진, 닥티노마이신, 다우노루비신, 디에틸stil베스트롤, 에피루비신, 플루다라빈, 플루드로코르티손, 플루옥시메스테론, 플루타미드, 켄시타빈, 글리백, 히드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, 이마티닙, 류프롤리드, 레바미솔, 로무스틴, 메클로르에타민, 멜팔란, 6-메르캅토피린, 메스나, 메토타렉세이트, 미토마이신, 미토탄, 미톡산트론, 닐루타미드, 옥트레오티드, 옥살리플라틴, 파미드로네이트, 펜토스타틴, 플리카마이신, 포르피머, 프로카바진, 팔티트렉시드, 리톡시맙, 스트렙토조신, 테니포시드, 테스토스테론, 탈리도미드, 티오구아닌, 티오테파, 트레티노인, 빈데신, 13-시스-레티노산, 페닐알라닌 머스타드, 우라실 머스타드, 에스트라무스틴, 알트레타민, 플록수리딘, 5-데오옥시우리딘, 시토신 아라비노시드, 6-메르캅토피린, 데옥시코포르마이신, 칼시트리올, 발루비신, 미트라마이신, 빈플라스틴, 비노렐빈, 토포테칸, 라족신, 마리마스타트, COL-3, 네오바스타트, BMS-275291, 스쿠알라민, 엔도스타틴, SU5416, SU6668, EMD121974, 인터류킨-12, IM862, 안지오스타틴, 비탁신, 드롤록시펜, 이독시펜, 스피로놀락톤, 피나스테리드, 시미티딘, 트라스투주맙, 데닐류킨 디프티톡스, 제피티닙, 보르테지믹, 이리노테칸, 토포테칸, 독소루비신, 도세탁셀, 비노렐빈, 베바시주맙(단클론 항체)과 에르비투스, 크레모포르 비함유 파클리탁셀, 에피틸론 B, BMS-247550, BMS-310705, 드롤록시펜, 4-히드록시타목시펜, 피펜독시펜, ERA-923, 아르족시펜. 폴베스트란트, 아콜비펜, 라소폭시펜, 이독시펜, TSE-424, HMR-3339, ZK186619, PTK787/ZK 222584, VX-745, PD 184352, 라파마이신, 40-O-(2-히드록시에틸)-라파마이신, 템시롤리무스, AP-23573, RAD001, ABT-578, BC-210, LY294002, LY292223, LY292696, LY293684, LY293646, 보르트만닌, ZM336372, L-779450, PEG-필그라스탐, 다베포에틴, 에리트르포이에틴, 파립구 콜로니 자극 인자, 졸렌드로네이트, 프로드니손, 세톡시맙, 파립구 대식세포 콜로니 자극 인자, 히스트렐린, PEG-화 인터페론 알파-2a, 인터페론 알파-2a, PEG-화 인터페론 알파-2b, 인터페론 알파-2b, 아자시티딘, PEG-L-아스파라기나아제, 레날리도미드, 켄투주맙, 하이드로코르티손, 인터류킨-11, 텍스타족산, 알렘투주맙, 올-트랜스레티노산, 케토코나졸, 인터류킨-2, 메게스트롤, 면역 글로불린, 질소 머스타드, 메틸프레드니솔론, 이브리투모맙 티옥세탄, 안드로젠, 데시타빈, 헥사메틸멜라민, 백사로텐, 토시투모맙, 삼산화비소, 코르티손, 에디트로네이트, 미토탄, 시클로스포린, 리포솜 다우로루비신, 에드위나-아스파라기나아제, 스트론튬 89, 카소피탄트, 네투피탄트, NK-1 수용체 길항제, 팔로노세트론, 아프레피탄트, 디펜히드라민, 히드록시진, 메토클로프라미드, 로라제팜, 알프라졸람, 할로페리돌, 드로페리돌, 드로나비놀, 텍사메타손, 메틸

프레드니솔론, 프로클로로페라진, 그라니세트론, 온단세트론, 둘라세트론, 트로피세트론, 페그필그라스티姆, 에리트로포이에틴, 에포에틴 알파와 다베포에틴 알파, 이필리무맙, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0174] 약학적 조성물 및 키트

[0175] 본 개시의 다른 양태는 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 제형화된, 본원에 개시된 바와 같은 화합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 특히, 본 개시는 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 제형화된, 본원에 개시된 바와 같은 화합물을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 이러한 제형은 경구, 직장, 국소, 구강, 비경구(예를 들어, 피하, 근육 내, 피부 내, 또는 정맥 내), 직장, 질, 또는 에어로졸 투여에 적합한 것을 포함하지만, 임의의 주어진 경우에 가장 적합한 투여 형태는 치료되는 병태의 정도 및 중증도에 따라 달라질 것이고, 사용되는 특정 화합물의 성질에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 개시된 조성물은 단위 투여량으로서 제형화될 수 있고/있거나 경구 또는 피하 투여용으로 제형화될 수 있다.

[0176] 예시적인 약학적 조성물은, 예를 들어, 본원에 기술된 화합물 중 하나 이상을 활성 성분으로서 함유하는 고체, 반고체 또는 액체 형태로, 유기 또는 무기 담체 또는 외부, 장용 또는 비경구 적용에 적합한 부형제와 혼합된 약학적 제제의 형태로 사용될 수 있다. 활성 성분은, 예를 들어, 정제, 펠릿, 캡슐, 좌제, 용액, 유화액, 현탁액, 및 사용에 적합한 임의의 다른 형태에 대해 통상적인 비독성의 약학적으로 허용 가능한 담체와 화합될 수 있다. 활성 목적 화합물은 질환의 과정 또는 병태에 목적하는 효과를 생성하기에 충분한 양으로 약제학적 조성물에 포함된다.

[0177] 정제와 같은 고형 조성물을 제조하기 위해, 주요 활성 성분은 약학적 담체, 예를 들어, 옥수수 전분, 락토오스, 수크로오스, 소르비톨, 탈크, 스테아르산, 스테아르산 마그네슘, 인산 이칼슘 또는 겔, 및 다른 약학적 희석제, 예를 들어, 물과 혼합되어, 본원에 제공된 화합물, 또는 이의 무독성인 약학적으로 허용 가능한 염의 균질한 혼합물을 함유하는 고형 예비제형 조성물을 형성할 수 있다. 이들 예비제형 조성물을 균질한 것으로 지칭할 경우, 활성 성분은 조성물 전체에 균일하게 분산되어 조성물이 정제, 알약 및 캡슐과 같은 동일하게 효과적인 단위 투여 형태로 용이하게 세분될 수 있음을 의미한다.

[0178] 경구 투여용 고형 제형(캡슐, 정제, 알약, 드라제(dragee), 분말, 과립 등) 내에서, 대상 조성물은, 구연산나트륨 또는 인산이칼슘 및/또는, (1) 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨 및/또는 규산과 같은 충전제 또는 증량제; (2) 예를 들어 카복시메틸셀룰로오스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐 피롤리돈, 수크로스 및/또는 아카시아와 같은 결합제; (3) 글리세롤과 같은 보습제; (4) 한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염 및 탄산나트륨과 같은 붕해제; (5) 파라핀과 같은 용액 지연제; (6) 4차 암모늄 화합물과 같은 흡수 촉진제; (7) 예를 들어 아세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트와 같은 습윤제; (8) 카올린 및 벤토나이트 점토와 같은 흡수제; (9) 활석, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨라우릴 설페이트, 및 이들의 혼합물과 같은 윤활제; 및 (10) 착색제 중 어느 하나와 같은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체와 혼합된다. 캡슐, 정제 및 알약의 경우, 조성물은 또한 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고형 조성물은 또한 락토오스 또는 우유당과 같은 부형제뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 사용하는 연질 및 경질 충전 젤라틴 캡슐의 충전제로서 사용될 수 있다.

[0179] 정제는 선택적으로 하나 이상의 부속 성분을 사용하여 압축 또는 성형에 의해 제조될 수 있다. 압축된 정제는 결합제(예를 들어, 젤라틴 또는 히드록시프로필메틸 셀룰로오스), 윤활제, 불활성 희석제, 보존제, 붕해제(예를 들어, 전분 글리콜산 나트륨 또는 가교된 카복시메틸 셀룰로오스 나트륨), 표면 활성제 또는 분산제를 사용하여 제조될 수 있다. 성형된 정제는 불활성 액체 희석제로 습윤된 대상 조성물의 혼합물을 적절한 기계에서 성형함으로써 제조될 수 있다. 정제, 및 다른 고형 투여 형태, 예를 들어, 드라제, 캡슐, 알약 및 과립은 선택적으로 코팅 및 셀, 예컨대 장용 코팅 및 약학적 제형화 분야에 잘 알려진 다른 코팅으로 스코어링되거나 제조될 수 있다.

[0180] 흡입 또는 취입용 조성물은 약학적으로 허용 가능한 수성 또는 유기 용매, 또는 이들의 혼합물 중의 용액 및 현탁액, 그리고 분말을 포함한다. 경구 투여용 액체 투여 형태는 약학적으로 허용 가능한 유화액, 마이크로유화액, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭서를 포함한다. 대상 조성물에 추가하여, 액체 투여 형태는, 예를 들어, 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 오일(특히, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 배아, 올리브, 피마자 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로푸틸 알코올, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비톨의 지방산 에스테르, 시클로덱스트린 및 이들의 혼합물과 같은 당업계에서 통상적으로 사용되는 불활성

희석제를 함유할 수 있다.

- [0181] 현탁액은, 대상 조성물에 추가하여, 예를 들어, 에톡실화된 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미정질 셀룰로오스, 알루미늄 메타수산화물, 벤토나이트, 한천 및 트라가칸스, 및 이들의 혼합물과 같은 현탁제를 함유할 수 있다.
- [0182] 직장 또는 질 투여용 제형은, 예를 들어, 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 좌제 왁스 또는 살리실레이트를 포함하는 하나 이상의 적합한 비자극성 부형제 또는 담체와 대상 조성물을 혼합함으로써 제조될 수 있고, 이는 실온에서는 고형이지만, 체온에서는 액체이며, 따라서 체강 내에서 용융되고 활성제를 방출할 것이다.
- [0183] 대상 조성물의 경피 투여용 투여 형태는 분말, 분무제, 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 용액, 패치 및 흡입제를 포함한다. 활성 성분은 무균 조건 하에서 약학적으로 허용 가능한 담체, 및 요구될 수 있는 임의의 보존제, 완충제, 또는 추진제와 혼합될 수 있다.
- [0184] 연고, 페이스트, 크림 및 젤은, 대상 조성물에 추가하여, 동물 및 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 탈크 및 산화아연, 또는 이들의 혼합물과 같은 부형제를 함유할 수 있다.
- [0185] 분말 및 분무제는, 대상 조성물에 추가하여, 락토오스, 탈크, 규산, 수산화알루미늄, 칼슘 실리케이트 및 폴리아미드 분말, 또는 이들 물질의 혼합물과 같은 부형제를 함유할 수 있다. 분무제는 클로로플루오로하이드로카본 및 부탄과 프로판 같은 휘발성 비치환 탄화수소와 같은 통상적인 추진제를 추가로 함유할 수 있다.
- [0186] 본 개시의 조성물 및 화합물은 대안적으로 에어로졸에 의해 투여될 수 있다. 이는 화합물을 함유하는 수성 에어로졸, 리포솜 제제 또는 고형 입자를 제조함으로써 달성된다. 비수성(예를 들어, 플루오로탄소 추진제) 현탁액이 사용될 수 있다. 음과 분무기가 사용될 수 있으며, 그 이유는 대상 조성물에 함유된 화합물의 분해를 초래할 수 있는 전단에 대한 제제의 노출을 최소화하기 때문이다. 통상적으로, 수성 에어로졸은 종래의 약학적으로 허용 가능한 담체 및 안정화제와 함께 대상 조성물의 수용액 또는 현탁액을 제형화함으로써 제조된다. 담체 및 안정화제는 특정 대상 조성물의 요건에 따라 다양하지만, 일반적으로 비이온성 계면활성제(Tweens, Pluronic, 또는 폴리에틸렌 글리콜), 혈청 알부민과 같은 무해한 단백질, 소르비탄 에스테르, 올레산, 레시틴, 아미노산, 예컨대 글리신, 완충액, 염, 당류 또는 알코올을 포함한다. 에어로졸은 일반적으로 등장성 용액으로부터 제조된다.
- [0187] 비경구 투여에 적합한 본 개시의 약학적 조성물은 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 멸균 등장성 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액 또는 유화액, 사용 직전에 멸균 주사 용액 또는 분산액으로 재구성될 수 있고 산화방지제를 함유하고 있을 수 있는 멸균 분말, 완충제, 박테리오타트, 제형을 의도된 수용자의 혈액과 등장성으로 만드는 용질 또는 현탁제 또는 증점제와 조합된 대상 조성물을 포함한다.
- [0188] 본원에서 제공된 약학적 조성물에 사용될 수 있는 적절한 수성 및 비수성 담체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적절한 혼합물, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 및 에틸 올레에이트 및 시클로헥실테린과 같은 주사 가능한 유기 에스테르를 포함한다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅 물질의 사용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- [0189] 또 다른 구현예에서, 개시된 화합물 및 장용 물질을 포함하는 장내 약학적 제형; 및 이의 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제가 제공된다. 장용 물질은 위의 산성 환경에서 실질적으로 불용성이고, 특정 pH에서 장액 내에서 주로 가용성인 중합체를 지칭한다. 소장은 위장과 대장 사이의 위장관(장)의 일부이며, 십이지장, 공장 및 회장을 포함한다. 십이지장의 pH는 약 5.5이고, 공장의 pH는 약 6.5이고, 원위 회장의 pH는 약 7.5이다.
- [0190] 따라서, 장용 물질은, 예를 들어, 약 5.0, 약 5.2, 약 5.4, 약 5.6, 약 5.8, 약 6.0, 약 6.2, 약 6.4, 약 6.6, 약 6.8, 약 7.0, 약 7.2, 약 7.4, 약 7.6, 약 7.8, 약 8.0, 약 8.2, 약 8.4, 약 8.6, 약 8.8, 약 9.0, 약 9.2, 약 9.4, 약 9.6, 약 9.8, 또는 약 10.0의 pH까지 불용성이다. 예시적인 장용 물질은, 셀룰로오스 아세테이트 프탈레이트(CAP), 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스 프탈레이트(HPMCP), 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트(PVAP), 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스 아세테이트 숙신산염(HPMCAS), 셀룰로오스 아세테이트 트리멜레이트, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 숙신산염, 셀룰로오스 아세테이트 숙신산염, 셀룰로오스 아세테이트 헥사하이드로프탈레이트, 셀룰로오스 프로피온산 프탈레이트, 셀룰로오스 아세테이트 말레산염, 셀룰로오스 아세테이트 부티레이트, 셀룰로오스 아세테이트 프로피오네이트, 메틸메타크릴산 및 메틸 메타크릴레이트의 공중합체, 메틸 아크릴레이트의 공중합체, 메틸메타크릴레이트 및 메타크릴산, 메틸비닐 에테르 및 말레산 무수물(Gantrez ES 시리

즈)의 공중합체, 에틸 메틸아크릴레이트-메틸메타시크릴레이트-클로로트리메틸암모늄 에틸 아크릴레이트 공중합체, 제인(zein), 셀락 및 코팔 콜로포름과 같은 천연 레진, 및 몇몇 상업적으로 이용 가능한 장용 분산액 시스템(예를 들어, Eudragit L30D55, Eudragit FS30D, Eudragit L100, Eudragit S100, Kollicoat EMM30D, Estacryl 30D, Coateric, 및 Aquateric)을 포함한다. 전술한 물질의 각각의 용해도는 알려져 있거나 시험관 내에서 쉽게 결정될 수 있다. 전술한 내용은 가능한 물질의 목록이지만, 본 개시의 이점을 갖는 당업자는 본 개시가 포괄적이지 않으며, 본원에 기술된 목적을 충족할 수 있는 다른 장용 물질이 있음을 인식할 것이다.

[0191]

유리하게는, 예를 들어, 암의 치료를 필요로 하는 소비자에게 사용하기 위한 키트가 본원에 제공된다. 이러한 키트는 전술한 것과 같은 적절한 투여 형태 및 염증을 매개, 감소 또는 예방하기 위해 이러한 투여 형태를 사용하는 방법을 설명하는 지침을 포함한다. 지침은 소비자 또는 의료진이 당업자에게 공지된 투여 모드에 따라 투여 형태를 투여하도록 유도할 것이다. 이러한 키트는 유리하게는 단일 또는 다수의 키트 유닛으로 포장되고 판매될 수 있다. 이러한 키트의 예는 소위 블리스터 팩이다. 블리스터 팩은 포장 업계에 잘 알려져 있고, 약학적 단위 투여 형태(정제, 캡슐 등)의 포장에 널리 사용되고 있다. 블리스터 팩은 일반적으로 바람직하게는 투명한 플라스틱 재료의 호일로 덮인 비교적 강성인 재료의 시트로 구성된다. 포장 공정 동안, 플라스틱 호일 내에 오목부가 형성된다. 오목부는 포장될 정제 또는 캡슐의 크기 및 형상을 갖는다. 다음으로, 정제 또는 캡슐을 오목부 내에 배치하고, 비교적 강성인 물질의 시트는 오목부가 형성된 방향과 반대인 호일의 면에 있는 플라스틱 호일을 밀봉한다. 결과적으로, 정제 또는 캡슐은 플라스틱 호일과 시트 사이의 오목부에서 밀봉된다. 바람직하게는, 시트의 강도는, 오목부 상에 수동으로 압력을 가함으로써 정제 또는 캡슐이 블리스터 팩으로부터 제거될 수 있고, 그에 의해 오목부의 위치에서 시트 내에 개구가 형성되도록 한다. 이어서, 정제 또는 캡슐은 전술한 개구를 통해 제거될 수 있다.

[0192]

키트 상에, 예를 들어, 정제 또는 캡슐 옆에 있는 번호의 형태로 보조 메모리를 제공하는 것이 바람직할 수 있고, 이에 의해 번호는 그렇게 명시된 정제 또는 캡슐이 섭취되어야 하는 처방의 일수에 상응한다. 이러한 보조 메모리의 또 다른 예는, 예를 들어, 다음과 같이, 카드에 인쇄된 달력이다: "첫째 주, 월요일, 화요일, 쯔 등썤, 둘째 주, 월요일, 화요일, 쯔" 등. 보조 메모리의 다른 변형이 용이하게 명백할 것이다. "일일 투여량"은 주어진 날에 복용해야 할 단일 정제 또는 캡슐, 또는 여러 개의 알약 또는 캡슐일 수 있다. 또한, 제1 화합물의 일일 투여량은 하나의 정제 또는 캡슐로 이루어질 수 있는 반면, 제2 화합물의 일일 투여량은 여러 개의 정제 또는 캡슐로 이루어질 수 있고, 그 반대일 수 있다. 보조 메모리는 이를 반영해야 한다.

[0193]

실시예

[0194]

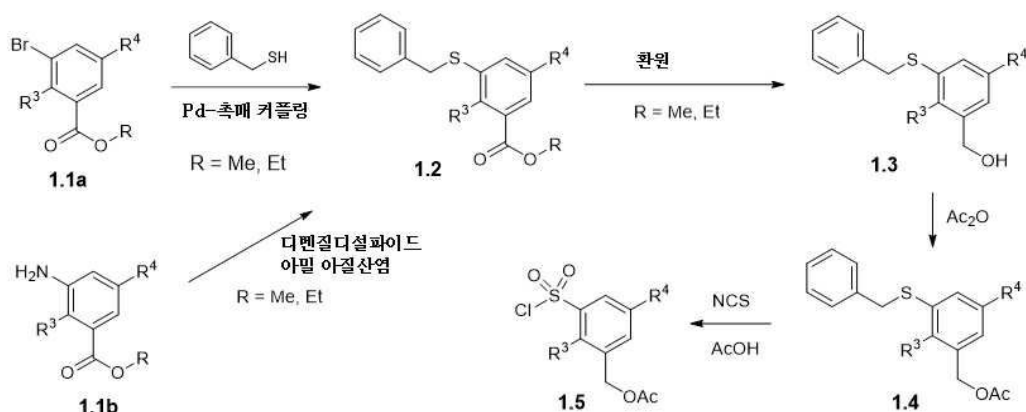
본원에 기술된 화합물은 본원에 포함된 교시 및 당업계의 합성 절차의 개시에 기초하여 다수의 방식으로 제조될 수 있다. 아래에 기술된 합성 방법의 기술에서, 용매의 선택, 반응 분위기, 반응 온도, 실험 기간 및 후처리 절차를 포함하는 제안된 모든 반응 조건은 달리 명시되지 않는 한, 해당 반응에 대한 조건 표준으로 선택될 수 있음을 이해해야 한다. 유기 합성 분야의 숙련자는 분자의 다양한 부분에 존재하는 작용기가 제안된 시약 및 반응과 상응할 수 있어야 한다는 것을 이해해야 한다. 반응 조건과 상응할 수 없는 치환기는 당업자에게 명백할 것이며, 따라서 대안적인 방법이 제시된다. 실시예를 위한 출발 물질은 상업적으로 이용 가능하거나 공지된 물질로부터 표준 방법에 의해 용이하게 제조된다.

[0195]

다음의 약어가 본 개시에서 사용되고 다음의 정의를 갖는다: "AcOH"는 아세트산이고, "ADP"는 아데노신 이인산 염이고, "Ar"는 아르곤 가스이고, "ASNase"는 아스파라기나아제이고, "Boc"는 *t*-부틸카르보네이트이고, "conc." (농축)은 '농축된'이고, "Cs₂CO₃"은 탄산세슘이고, "DCM"은 디클로로메탄이고, "DIAD"는 디이소프로필 아조디카르복실레이트이고, "DIEA"는 *N,N*-디이소프로필에틸아민이고, "DMF"는 *N,N*-디메틸포름아미드이고, "dppf"는 1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센이고, "DMSO"는 디메틸설폭사이드이고, "EDTA"는 에틸렌디아민테트라아세트산이고, "ESI"는 전기분무 이온화이고, "EtOAc"는 아세트산에틸이고, "EtOH"는 에탄올이고, "GST"는 글루타티온 S-전이효소이고, "h"는 시간이고, "HCl"은 염산이고, "Hex(헥스)"는 헥산이고, "H₂O"는 물이고, "IC₅₀"은 반수 최대 억제 농도이고, "K₂CO₃"은 탄산칼륨이고, "KOAc"는 아세트산칼륨이고, "NaBH₄"는 수소화붕소 나트륨이고, "LAH"는 리튬 알루미늄 수소화물이고, "CH₃CN"은 아세토니트릴이고, "mCPBA"는 4-클로로퍼벤조산이고, "MeOH"는 메탄올이고, "MHz"는 메가헤르츠이고, "min"은 분이고, "MS"는 질량 분광분석법이고, "NADH"는 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드이고, "NaH"는 수소화 나트륨이고, "NaHCO₃"은 중탄산나트륨이고, "NaNO₂"는 아질산나트륨이고, "NaOMe"는 나트륨 메톡사이드이고, "Na₂SO₄"는 황산나트륨이고, "NBS"는 *N*-브로모숙신이미드이고, "NCS"는 *N*-클로로숙신이미드이고, "NH₄Cl"은 염화암모늄이고, "NIS"는 *N*-요오드숙신이미드이고, "NMR"은 핵 자기

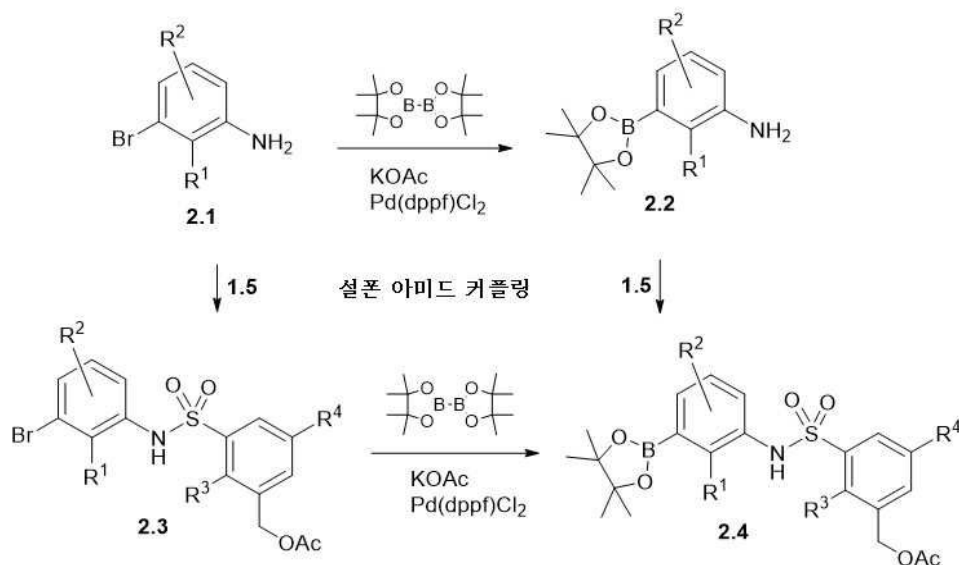
공명이고, "PBS"는 인산염 완충 식염수이고, " $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ "은 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐(0)이고, " $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$ "는 1,1-비스(디페닐포스피노)페로센-팔라듐(II)디클로라이드이고, " Ph_3P "는 트리페닐포스핀이고, "PMB"는 파라메톡시벤질이고, " POCl_3 "은 옥시염화인이고, "rt(실온)"는 "주변 온도"로도 알려진, 15-25°C 범위의 정상 실험실 온도 범위로 이루어지는 것으로 이해되는 실내 온도이고, "sat'd.(포화)"는 '포화된'이고, "SDS"는 도데실 황산나트륨이고, " SOCl_2 "는 염화티오닐이고, "TEA"는 트리에틸아민이고, "TFA"는 트리플루오로아세트산이고, "THF"는 테트라하이드로퓨란이고, "Xantphos"는 4,5-비스(디페닐포스피노)-9,9-디메틸크산텐이다.

반응식 1



반응식 1은 설포닐 염화물(1.5)의 예시적인 제조법을 도시한다. 브롬화물(1.1a)(상업적으로 이용 가능하거나 당업자에 의해 합성됨)은 (예를 들어, 톨루엔과 같은 용매 중 DIEA와 같은, 염기의 존재 하에, 그리고 상승된 온도에서, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, XantPhos, 페닐메탄티올을 사용하는) Pd 촉매 커플링 반응에 의해 티오-에테르(1.2)로 변환된다. 대안적으로, 화합물(1.2)은 고온에서 CH_3CN 중 디벤질디설파이드 및 아밀 아질산염을 사용하는 디아조타화에 의해 아닐린(1.1b)(상업적으로 이용 가능하거나 당업자에 의해 합성됨)로부터 제조될 수 있다. 환원제(LAH 또는 NaBH_4)로 에스테르(1.2)($\text{R} = \text{Me}, \text{Et}$)를 환원시켜 일차 알코올(1.3)을 수득한다. 알코올(1.3)은 DIEA와 같은 염기의 존재 하에 무수 아세트산과의 반응에 의해 1.4로 변환될 수 있다. 마지막으로, NCS 및 AcOH의 조합에 의한 티오-에테르(1.4)의 원활한 산화는 문헌[*Synthesis*, 2006, 24, 4131-4134 및 *Bioorg. Med. Chem.*, 2017, 25, 3447-3460]에 보고된 일반 반응 조건에 따라 이에 해당하는 설포닐 염화물(1.5)을 제공한다.

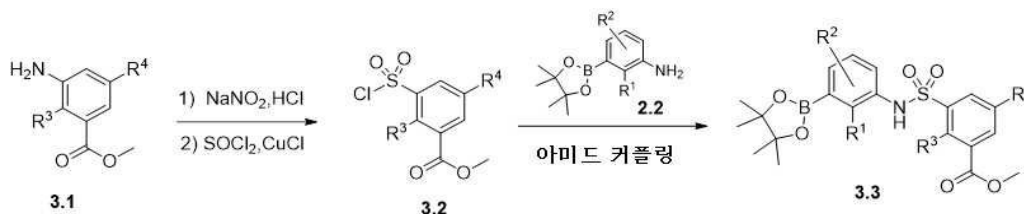
반응식 2



반응식 2는 보로네이트(2.4)의 예시적인 제조법을 도시한다. 화합물(2.1)(상업적으로 이용 가능하며,

W02013134298에 기술된 바와 같이 합성되거나 당업자에 의해 합성됨)은 당업자에게 공지된 보릴화 반응(상승된 온도에서, 1,4-디옥산과 같은 적합한 용매 중 Pd(dppf)Cl₂와 같은 팔라듐 촉매, KOAc와 같은 적합한 염기를 사용하여 수행되는 팔라듐 매개 반응)에 의해 비스(피나콜라토)디보론과 반응하여 화합물(2.2)을 제공하고, 이는 설포닐 염화물(1.5)과 반응하여(반응식 1 참조) 화합물(2.4)을 제공한다. 대안적으로, 화합물(2.1)은 설포닐 염화물(1.5)과 반응하여 설포나미드(2.3)를 제공하고, 이는 당업자에게 공지된 보릴화 반응 조건 하에서 보로네이트(2.4)로 변환된다.

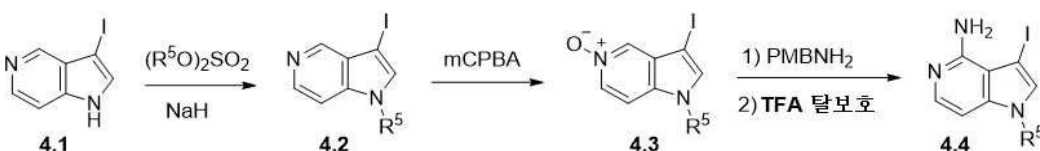
[0202] 반응식 3



[0203]

[0204] 반응식 3은 보로네이트(3.3)의 예시적인 제조법을 도시한다. 화합물(3.2)는 (문헌[*Org. Proc. Res. Dev.*, 2009, 5, 875-879]에 보고된 일반 반응 조건에 따라) 아닐린(3.1)(상업적으로 이용 가능하거나 당업자에 의해 합성됨)으로부터 디아조타화에 의해, 그리고 이에 이어서 생성된 중간체의 Cu 매개 염소화에 의해 제조될 수 있다. 설포닐 염화물(3.2)은 설포나미드 커플링 하에 아민(2.2)과 반응하여 설포나미드(3.3)를 제공한다.

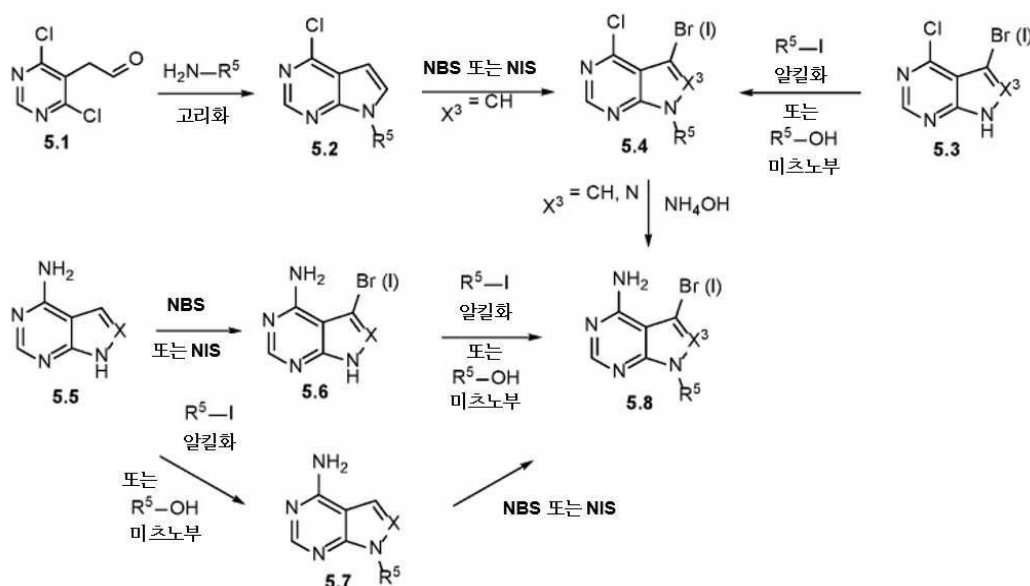
[0205] 반응식 4



[0206]

[0207] 반응식 4는 중간체(4.4)의 예시적인 제조법을 도시한다. NaH와 같은 염기의 존재 하에서의, 3-요오드-1H-피롤로 [3,2-c]피리딘(4.1)의 알킬화 시약 (R⁵O)₂SO₂와의 N-알킬화는 4.2를 제공한다. 화합물(4.2)는 DCM 중 mCPBA와 같은 당업계에 공지된 산화에 의해 활성화되어 N-산화물(4.3)을 제공할 수 있다. PMBNH₂ 및 p-톨루엔설포닐 염화물의 혼합물을 사용한 후, TFA로 인 시츄 탈보호를 수행하여, 피리딘 N-옥사이드(4.3)을 아미노피롤로피리딘(4.4)로 변환한다.

[0208] 반응식 5



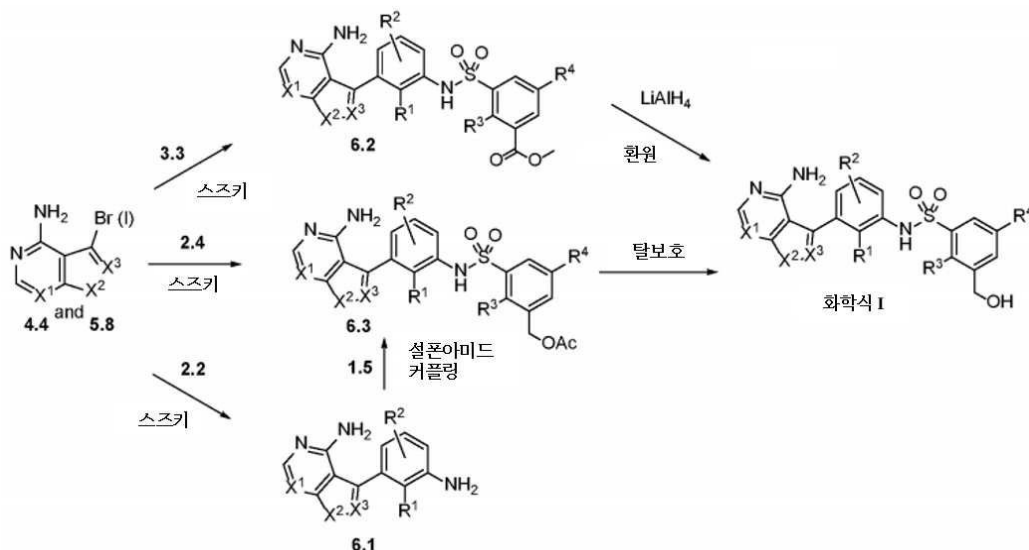
[0209]

[0210] 반응식 5는 중간체(5.8)의 예시적인 제조법을 도시한다. 상승된 온도에서, EtOH와 같은 프로톤 용매 중 TEA와

같은 염기의 존재 하에서 다양한 아민(R^5-NH_2)과 2-(4,6-디클로로피리미딘-5-일)아세트알데히드(5.1)의 고리화는 화합물(5.2)을 제공한다. NBS(또는 NIS)와의 5.2의 브롬화(또는 요오드화)는 화합물(5.4)을 제공한다($X = CH$). 화합물(5.5)을 NBS(또는 NIS)와 반응시켜 5.6을 수득한다. 화합물(5.3, 5.5 및 5.6)의 알킬화 시약(R^5-I)과의 알킬화는 각각 5.4, 5.7 및 5.8을 제공한다. 대안적으로, 화합물(5.3, 5.5 및 5.6)은 표준 미즈노부(Mitsunobu) 조건(예를 들어, Ph_3P 및 DIAD의 존재 하에 수행됨) 하에서 알코올(R^5-OH)과 반응하여 각각 5.4, 5.7 및 5.8을 생성한다. 다른 구현예에서, 중간체(5.8)는 또한 수산화암모늄과의 치환 반응에 의해 5.4로부터 제조될 수 있고, NBS(또는 NIS)와의 브롬화(또는 요오드화)에 의해 5.7로부터 제조될 수 있다.

[0211]

반응식 6



[0212]

[0213]

반응식 6은 화학식 I의 예시적인 제조법을 도시한다. 브롬화물(또는 요오드화물)(4.4 및 5.8)은 팔라듐 촉매 존재 하(스즈키 조건)에 보로네이트(2.2)와 반응하여 아닐린(6.1)을 제공한다. 아닐린(6.1)과 설포닐 염화물(1.5)의 설포나미드 커플링 반응은 설포나미드(6.3)를 제공한다. 대안적으로, 6.3은 스즈키 조건 하에서 보로네이트(2.4)를 사용하여 브롬화물(또는 요오드화물)(4.4 및 5.8)로부터 제조될 수 있다. 실온에서 MeOH와 같은 프로톤 용매 중 K_2CO_3 을 사용하는 설포나미드(6.3)의 탈보호는 화학식 I을 제공한다. 다른 구현예에서, 브롬화물(또는 요오드화물)(4.4 및 5.8)은 팔라듐 촉매 존재 하(스즈키 조건)에 보로네이트(3.3)와 반응하여 6.2를 제공한다. $LiAlH_4$ 하에서의 6.2의 환원은 일차 알코올, 화학식 I을 제공한다.

[0214]

중간체 및 최종 화합물의 제조.

[0215]

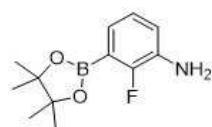
본원에 기술된 합성 절차와 방법 및 당업자에게 공지된 방법을 사용하여, 다음의 화합물을 제조하였다.

[0216]

일반 방법 A: 보릴화

[0217]

실시예 A1: 2-플루오로-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)아닐린



[0218]

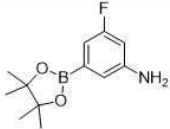
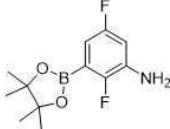
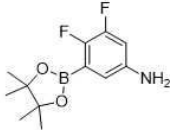
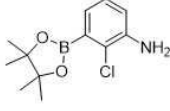
[0219]

1,4-디옥산(30 mL) 중 KOAc(4.6 g, 47.4 mmol), 3-브로모-2-플루오로아닐린(3.0 g, 15.8 mmol), 및 4,4,4',4',5,5,5',5'-옥타메틸-2,2'-비(1,3,2-디옥사보롤란)(4.8 g, 18.9 mmol)의 혼합물을 Ar로 10분 동안 탈기하였다. $PdCl_2(dppf)$ DCM 부가물(1.3 g, 1.6 mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물을 $110^\circ C$ 에서 6시간 동안 가열하였다. 반응물을 실온으로 냉각시키고 셀라이트 패드를 통해 여과하였다. 여액을 감압 하에 제거하고, 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(0 내지 50% EtOAc/헥스)로 정제하여 2-플루오로-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)아닐린(2.7 g, 72%)을 황갈색 고형분으로서 수득하였다. ^1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$):

δ 6.86 (m, 2H), 6.76 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 1.28 (s, 12H); MS (ESI) m/z : 238.2 ($M+H^+$).

[0220] 전술한 일반 방법 A를 사용하여, 다음의 표 A의 중간체를 제조하였다.

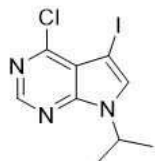
[표 A]

실시예 번호	생성물	수율 (%)	^1H NMR (400 or 500 MHz, DMSO- d_6): δ	MS (m/z : $M+H^+$)
A2		88	6.77 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.42 (m, 2H), 5.42 (s, 2H), 1.27 (s, 12H).	238.2
A3		미정제	데이터 없음	256.2
A4		36	6.59 (m, 2H), 5.20 (br s, 2H), 1.28 (s, 12H).	256.1
A5		43	6.99 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 5.25 (br s, 2H), 1.28 (s, 12H).	254.1

[0221]

[0222] 일반 방법 B: 알킬화

[0223] 실시예 B1: 4-클로로-5-요오드-7-이소프로필-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘

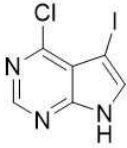
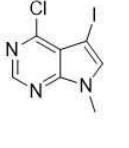
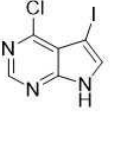
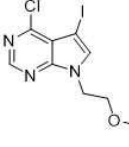
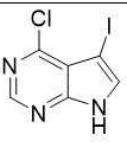
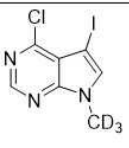
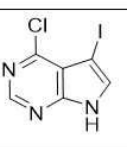
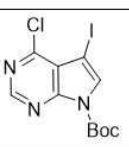


[0224]

[0225] DMF(18 mL) 중 4-클로로-5-요오드-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘(2.0 g, 7.2 mmol)의 용액을 Cs_2CO_3 (4.7 g, 14 mmol)으로 처리하였다. 2-요오드프로판(1.2 g, 7.2 mmol)을 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반하였다. 반응물을 물(100 mL)에 붓고 진공 여과를 통해 고형분을 수집하여 4-클로로-5-요오드-7-이소프로필-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘(1.8 g, 78%)을 황색 플러피 고형분으로서 수득하였다. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.63 (s, 1H), 8.18 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 5.04 (m, 1H), 1.47 (d, J = 6.8 Hz, 6H); MS (ESI) m/z : 322.0 ($M+H^+$).

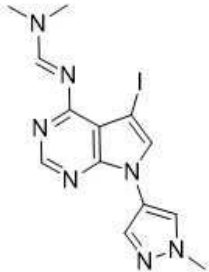
[0226] 전술한 일반 방법 B를 사용하여, 다음의 표 B의 중간체를 제조하였다.

[표 B]

실시예 번호	SM	생성물	수율 (%)	¹ H NMR (400 or 500 MHz, DMSO-d ₆): δ	MS (m/z: M+H ⁺)
B2			68	8.64 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 3.82 (s, 3H).	294.01
B3			74	8.64 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.99 (t, J = 1.5 Hz, 1H), 4.43 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.71 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 3.22 (s, 3H).	338.0
B4			미정제	8.65 (s, 1H), 7.98 (s, 1H).	데이터 없음
B5			74	8.81 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 1.61 (s, 9H).	379.8

[0227]

[0228] B6의 제조: (E)-N'-(5-요오드-7-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-N,N-디메틸포름아미드

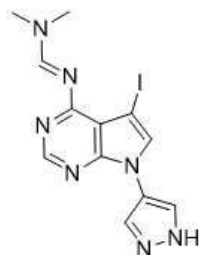


[0229]

[0230] DMF(50 mL) 중 5-요오드-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-아민(5.0 g, 19 mmol)의 용액을 N,N-디메틸포름아미드 디메틸 아세트알(3.43 g, 28 mmol)로 처리하였다. 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축시키고, 잔류물을 DCM(150 mL)으로 희석하고, 염수(2x) 용액으로 세척하였다. 유기층을 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 농축시켰다. 미정제 물질을 디에틸 에테르(100 mL)로 분쇄하고 고형분을 여과하여 목적하는 (E)-N'-(5-요오드-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-N,N-디메틸포름아미다미드를 수득하였다 (5.0 g, 85%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 11.9 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 7.41 (d, J = 2.0, 1H), 3.21 (s, 3H), 3.17 (s, 3H); MS (ESI) m/z: 315.8 (M+H⁺).

[0231] 산소 분위기 하의 DMF(30 mL) 중 (E)-N'-(5-요오드-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-N,N-디메틸포름아미다아미드(2.0 g, 6.3 mmol) 및 1-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸(1.6 g, 7.6 mol)의 용액을 NaHCO₃(1.3 g, 12.6 mmol), 2,2-비피리딘(1.1 g, 6.9 mmol) 및 Cu(OAc)₂(1.3 g, 6.9 mol)로 실온에서 처리하였다. 반응 혼합물을 실온에서 4일 동안 교반하고 감압 하에 농축시켰다. 미정제 물질을 디에틸 에테르(60 mL)로 분쇄하고 고형분을 여과하여 목적하는 (E)-N'-(5-요오드-7-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-N,N-디메틸포름아미다미드(3.0 g, 미정제)를 수득하고, 이를 추가 정제 없이 다음 반응에 사용하였다. MS (ESI) m/z: 395.8 (M+H⁺).

[0232] 실시예 B7: (E)-N'-(5-요오드-7-(1H-피라졸-4-일)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-N,N-디메틸포름이미다미드

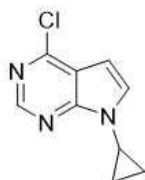


[0233]

[0234] (E)-N'-(5-요오드-7-(1H-피라졸-4-일)-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-N,N-디메틸포름이미다미드를 (E)-N'-(5-요오드-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-일)-N,N-디메틸포름이미다미드(0.69 g, 2.2 mmol) 및 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸피라졸(0.5 g, 2.6 mol)로부터 실시예 B6과 같이 제조하였다. MS (ESI) m/z : 381.8 ($M+H^+$).

[0235] 일반 방법 C: 교리화

[0236] 실시예 C1: 4-클로로-7-시클로프로필-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘

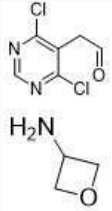
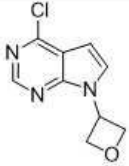
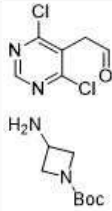
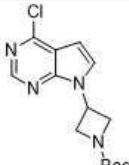
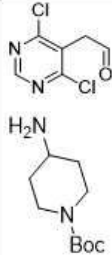
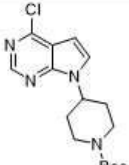
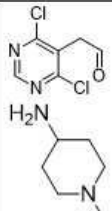
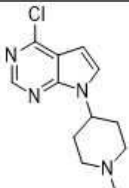


[0237]

[0238] EtOH(18 mL) 중 2-(4,6-디클로로피리미딘-5-일)아세트알데히드(2.0 g, 10.5 mmol)의 용액을 Et_3N (2.9 mL, 21 mmol)으로 처리하였다. 반응 혼합물을 실온에서 10분 동안 교반한 다음, 클로로프로판아미드(0.6 mL, 9.4 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 140℃에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시킨 다음, 감압 하에 농축시켰다. 미정제물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(0 내지 100% EtOAc/헥스)로 정제하여 4-클로로-7-시클로프로필-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘(1.6 g, 79%)을 연황색 고형분으로서 수득하였다. ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 8.59 (s, 1H), 7.65 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 6.54 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 3.59 (m, 1H), 1.01-1.03 (m, 4H); MS (ESI) m/z : 194.0 ($M+H^+$).

[0239] 진술한 일반 방법 C를 사용하여, 다음의 표 C의 중간체를 제조하였다.

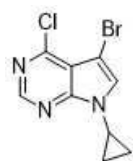
[표 C]

실시예 번호	SM	생성물	수율 (%)	¹ H NMR (400 or 500 MHz, DMSO- d ₆): δ	MS (m/z: M+H ⁺)
C2			73	8.67 (s, 1H), 8.18 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 5.98 (m, 1H), 5.02 (dd, J = 7.2, 1.6 Hz, 4H).	210.0
C3			38	데이터 없음	309.2
C4			74	데이터 없음	337.2
C5			91	8.66 (s, 1H), 7.84 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 4.88 (m, 1H), 3.34 (m, 2H), 2.94 (br m, 2H), 2.64 (s, 3H), 2.40 (m, 2H), 2.10 (m, 2H).	251.0

[0240]

[0241] 일반 방법 D: 브롬화 또는 요오드화

[0242] 실시예 D1: 5-브로모-4-클로로-7-시클로프로필-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘

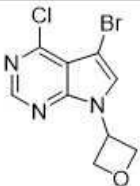
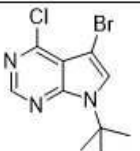
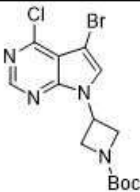
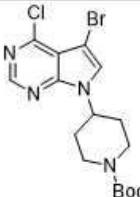
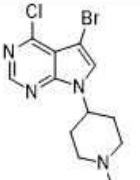


[0243]

[0244] DCM(15 mL) 중 4-클로로-7-시클로프로필-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘(C1, 0.67 g, 3.5 mmol)의 용액을 NBS(0.74 g, 4.2 mmol)로 처리하고, 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축시키고, 잔류물을 물(5 mL)에 현탁시켰다. 고형분을 여과하고 물(2 mL)로 세척하고, 진공 하에 건조시켜 5-브로모-4-클로로-7-시클로프로필-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘(0.6 g, 64%)을 백색 고형분으로서 수득하였다. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8.69 (s, 1H), 8.00 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 3.66 (m, 1H), 1.10 (m, 4H); MS (ESI) m/z: 272.0 (M+H⁺) 및 274.

[0245] 전술한 일반 방법 D를 사용하여, 다음의 표 D의 중간체를 제조하였다.

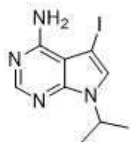
[표 D]

실시예 번호	SM	생성물	수율 (%)	¹ H NMR (400 or 500 MHz, DMSO-d ₆): δ	MS (m/z: M+H ⁺)
D2	C2		86	8.70 (s, 1H), 8.46 (s, 1H), 5.95 (m, 1H), 4.90-5.11 (m, 4H)	288.0 290.0
D3			65	데이터 없음	288.0 290.0
D4	C3		87	8.68 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 5.58 (m, 1H), 4.33 (m, 4H), 1.43 (s, 9H)	387.0 389.0
D5	C4		93	8.67 (s, 1H), 8.23 (s, 1H), 4.90 (m, 1H), 4.12 (br m, 2H), 2.95 (br m, 2H), 1.85-2.10 (m, 4H), 1.44 (s, 9H)	415.0 417.0
D6	C5		76	데이터 없음	329.0 331.0

[0246]

[0247] 일반 방법 E: 치환

[0248] 실시예 E1: 5-요오드-7-이소프로필-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-아민

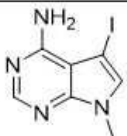
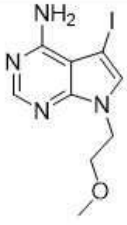
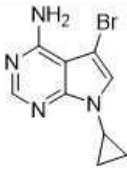
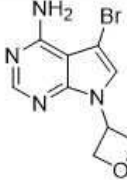
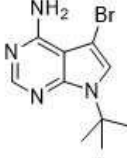
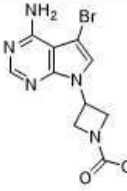


[0249]

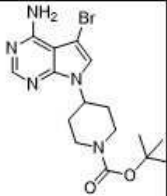
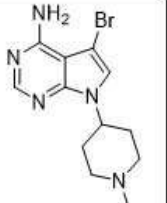
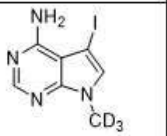
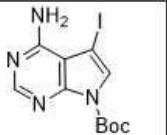
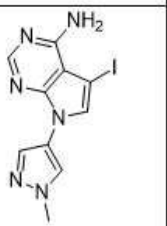
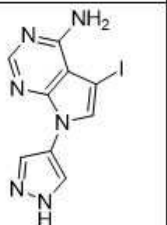
[0250] 1,4-디옥산(5.5 mL) 중 4-클로로-5-요오드-7-이소프로필-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘(B1, 1.78 g, 5.5 mmol)의 현탁액을 NH₄OH(물 중 30%, 1.7 mL, 13 mmol)로 처리하고, 반응물을 95℃로 밤새 가열하였다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 냉수로 희석시켰다. 혼합물을 0℃에서 30분 동안 교반한 다음, 진공 여과를 통해 고형분을 수집하여 목적하는 생성물 5-요오드-7-이소프로필-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-아민(0.80 g, 48%)을 백색 고형분으로서 수득하였다. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 8.09 (s, 1H), 7.59 (s, 1H), 6.59 (s, 2H), 4.89 (m, 1H), 1.40 (d, J = 6.8 Hz, 6H); MS (ESI) m/z: 303.0 (M+H⁺).

[0251] 전술한 일반 방법 E를 사용하여, 다음의 표 E의 중간체를 제조하였다.

[표 E]

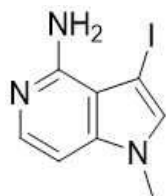
실시예 번호	SM	생성물	수율 (%)	¹ H NMR (400 or 500 MHz, DMSO-d ₆): δ	MS (m/z: M+H ⁺)
E2	B2		56	8.09 (s, 1H), 7.41 (s, 1H), 6.57 (br s, 2H), 3.66 (s, 3H).	274.78
E3	B3		71	8.10 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 6.61 (s, 2H), 4.26 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.64 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.22 (s, 3H).	319.0
E4	D1		97	8.17 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.78 (s, 2H), 3.56 (m, 1H), 1.05 (d, J = 6.7 Hz, 4H).	253.0 255.0
E5	D2		62	데이터 없음	269.0 271.0
E6	D3		71	데이터 없음	269.0 271.0
E7	D4		80	8.10 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 6.70 (br s, 2H), 5.43 (m, 1H), 4.16-4.38 (m, 4H), 1.42 (s, 9H).	368.2 370.2

[0252]

E8	D5		87	8.10 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 6.72 (br s, 2H), 4.68 (m, 1H), 4.10 (br m, 2H), 2.91 (br m, 2H), 1.70-1.99 (m, 4H), 1.43 (s, 9H).	396.2 398.2
E9	D6		42	8.02 (s, 1H), 7.49 (s, 1H), 6.63 (s, 2H), 4.40 (m, 1H), 2.81 (m, 2H), 2.14 (s, 3H), 1.89-2.01 (m, 4H), 1.65-1.82 (m, 2H).	310.0 312.0
E10	B4		90	8.10 (s, 1H), 7.40 (s, 1H), 6.62 (br s, 2H).	278.0
E11	B5		58	8.23 (s, 1H), 7.69 (s, 1H), 6.86 (br s, 2H), 1.60 (s, 9H).	360.8
E13	B6		23	8.32 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 6.74 (br s, 2H), 3.89 (s, 3H).	340.8
E14	B7		10	11.41 (br s, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.04 (dd, J = 3.2, 2.4 Hz, 1H), 6.84 (br m, 3H), 7.04 (dd, J = 3.6, 2.0 Hz, 1H).	326.8

[0253]

[0254] 실시예 E12: 3-요오드-1-메틸-1H-피롤로[3,2-c]피리딘-4-아민의 제조



[0255]

[0256] DCM(20 mL) 중 3-요오드-1-메틸-1H-피롤로[3,2-c]피리딘(0.90 g, 3.5 mmol)의 교반 현탁액을 실온에서 3-클로로피옥시벤조산(0.90 g, 5.2 mmol)으로 처리하였다. 반응 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 포화 NaHCO₃ 용액으로 퀀칭시킨 다음, DCM(2x)으로 추출하였다. 합쳐진 유기층을 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜 미정제 3-요오드-1-메틸-1H-피롤로[3,2-c]피리딘 5-옥사이드(0.6 g, 65%)를 회백색 고형분으로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 8.12 (s, 1H), 8.00 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.59 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H); MS (ESI) m/z: 275.0 (M+H⁺).

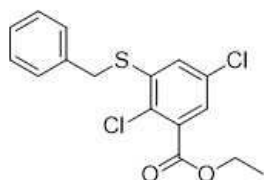
[0257] 클로로포름(20 mL) 중 3-요오드-1-메틸-1H-피롤로[3,2-c]피리딘 5-옥사이드(0.6 g, 2.1 mmol)의 용액을 (4-메톡시페닐)메탄아민(1.3 g, 9.8 mmol)으로 처리하고 실온에서 약 30분 동안 교반하였다. 혼합물을 0℃로 냉각시

킨 다음, *p*-톨루엔 설포닐 염화물(0.92 g, 4.8 mmol)를 나누어 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 2.5시간 동안 교반하였다. 혼합물을 DCM(50 mL)으로 희석하고 포화 NaHCO₃ 용액으로 세척하였다. 유기층을 분리하고, 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고 감압 하에 농축시켰다. 미정제물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(70% EtOAc/헥스)로 정제하여 3-요오드-N-(4-메톡시벤질)-1-메틸-1H-피롤로[3,2-c]피리딘-4-아민(0.2 g, 23%)을 담황색 고형분으로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.68 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.31 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 6.89 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 6.81 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 6.14 (br m, 1H), 4.64 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.69 (s, 3H); MS (ESI) m/z: 394.2(M+H⁺).

[0258] DCM(10 mL) 중 3-iodo-N-(4-메톡시벤질)-1-메틸-1H-피롤로[3,2-c]피리딘-4-아민(0.2 g, 0.508 mmol)의 현탁액을 얼음 수조 하에 교반하였다. TFA(1 mL)를 적가한 다음, 반응 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축시키고 잔류물을 포화 NaHCO₃ 용액으로 처리하였다. 혼합물을 10분 동안 교반하고, 수성층을 10% MeOH/DCM(2x)으로 추가로 추출하였다. 합쳐진 유기 추출물을 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 미정제물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(3 내지 5% MeOH/DCM)로 정제하여 3-요오드-1-메틸-1H-피롤로[3,2-c]피리딘-4-아민(0.05 g, 36%)을 회백색 고형분으로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.63, d, J = 6.4 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 6.94 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 6.35 (br s, 2H), 3.72 (s, 3H); MS (ESI) m/z: 273.9(M+H⁺).

[0259] **일반 방법 F:** 아민으로부터의 티오-에테르의 제조

[0260] 실시예 F1: 에틸 3-(벤질티오)-2,5-디클로로벤조에이트

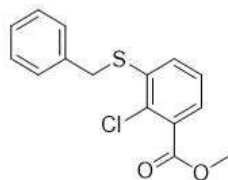


[0261]

[0262] CH₃CN(250 mL) 중 에틸 3-아미노-2,5-디클로로벤조에이트(12.0 g, 51.0 mmol)의 용액을 아밀 아질산염(9.64 mL, 81.0 mmol)으로 처리하였다. 디벤질 디설파이드(12.6 g, 51.0 mmol)를 실온에서 첨가하고, 반응 혼합물을 70℃에서 3시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 얼음물(100 mL)로 퀀칭시키고 EtOAc(3x)로 추출하였다. 합쳐진 유기물을 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고 감압 하에 농축시켰다. 미정제물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(10 내지 20% EtOAc/헥스)로 정제하여 에틸 3-(벤질티오)-2,5-디클로로벤조에이트(10.0 g, 58%)를 회백색 고형분으로서 수득하였다. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 7.63 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.35 (t, J = 7.6 Hz, 2H) 7.28 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 4.42 (s, 2H), 4.33 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 1.29 (t, J = 6.8 Hz, 3H).

[0263] **일반 방법 G:** 브롬으로부터의 티오-에테르의 제조

[0264] 실시예 F2: 에틸 3-(벤질티오)-2-클로로벤조에이트



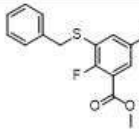
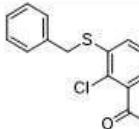
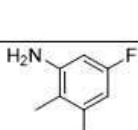
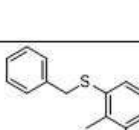
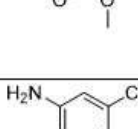
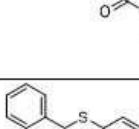
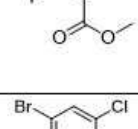
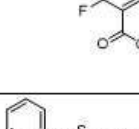
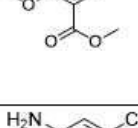
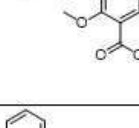
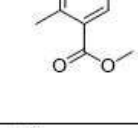
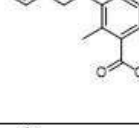
[0265]

[0266] 톨루엔(30 mL) 중 메틸 3-브로모-2-클로로벤조에이트(3.0 g, 12 mmol), 페닐메탄티올(1.6 g, 13 mmol)의 용액을 DIEA(4.2 mL, 24 mmol)로 처리하였다. 반응 혼합물을 Ar로 5분 동안 퍼징한 다음, XantPhos(0.67 g, 1.2 mmol) 및 Pd₂(dba)₃(0.55 g, 0.60 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 Ar로 5분 동안 퍼징하고 90℃로 밤새 가열하였다. 반응물을 실온으로 냉각시키고, 실리카 겔을 통해 여과하고, EtOAc:헥스(1:1)로 세척하였다. 여액을 감압 하에 농축시키고, 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(0 내지 100% EtOAc:헥스)로 정제하여 메틸 3-(벤질티오)-2-클로로벤조에이트(2.8 g, 80%)를 주황색 오일로서 수득하였다. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 7.60 (dd, J = 8.0, 1.5 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H), 7.37-7.46 (m, 2H), 7.31-7.37 (m, 2H), 7.23-

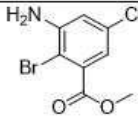
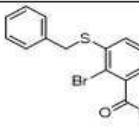
7.31 (m, 2H), 4.34 (s, 2H), 3.85 (s, 3H).

[0267] 전술한 일반 방법 F 및 G를 사용하여, 다음의 표 F의 중간체를 제조하였다.

[표 F]

실시예 번호	SM	생성물	수율 (%)	¹ H NMR (400 또는 500 MHz, DMSO- d ₆): δ
F3			41	7.59-7.72 (m, 1H), 7.48 (m, 1H), 7.38-7.44 (m, 2H), 7.20-7.26 (m, 2H), 7.15 (m, 1H), 4.03 (s, 2H), 3.77 (s, 3H).
F4			45	7.46-7.52 (m, 3H), 7.29-7.44 (m, 4H), 4.39 (s, 2H), 3.85 (s, 3H).
F5			24	7.39 (m, 3H), 7.24-7.34 (m, 4H), 4.32 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.32 (s, 3H).
F6			50	7.72 (m, 1H), 7.63 (m, 1H), 7.36 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.33 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 7.26 (m, 1H), 4.37 (s, 2H), 3.85 (s, 3H).
F7			74	7.55 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.41 (m, 2H), 7.33 (t, J = 7.1 Hz, 2H), 7.24 (m, 1H), 4.14 (s, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.70 (s, 3H).
F8			42	7.54 (m, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.39 (m, 2H), 7.32 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 7.26 (m, 1H), 4.32 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 2.35 (s, 3H).
F9			71	7.43 (m, 3H), 7.35 (m, 3H), 7.21 (m, 1H), 4.32 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.30 (s, 3H).

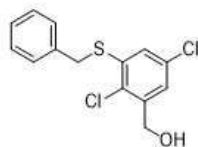
[0268]

F10			60	7.53 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.26-7.45 (m, 5H), 4.41 (s, 2H), 3.89 (s, 3H).
-----	---	---	----	--

[0269]

[0270] 일반 방법 H: 환원

[0271] 실시예 G1: (3-(벤질티오)-2,5-디클로로페닐)메탄올

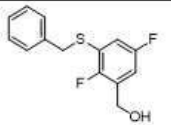
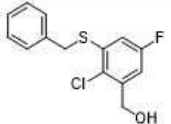
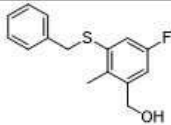
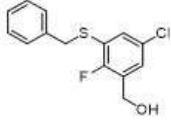
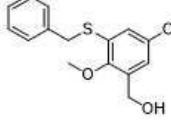
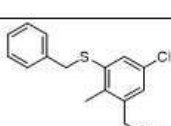
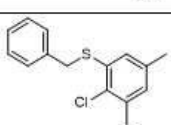
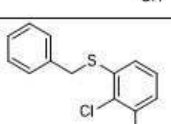


[0272]

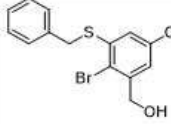
[0273] EtOH(200 mL) 중 CaCl_2 (0.45 g, 0.92 mmol) 및 NaBH_4 (6.20 g, 37 mmol)의 혼합물을 0℃에서 교반하였다. THF(200 mL) 중 에틸 3-(벤질티오)-2,5-디클로로벤조에이트(**F1**, 14.0 g, 9.2 mmol)의 차가운 용액을 0℃에서 적가 방식으로 첨가하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 교반하고, 실온으로 서서히 가온시킨 다음, 60℃에서 5시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 포화 NH_4Cl 용액(50 mL)으로 킨칭시킨 다음, EtOAc(3x)로 추출하였다. 합쳐진 유기 추출물을 무수 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 미정제물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(1 내지 10% EtOAc/헥스)로 정제하여 (3-(벤질티오)-2,5-디클로로페닐)메탄올(8.0 g, 66%)을 갈색 고형분으로서 수득하였다. ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 7.44 (m, 2H), 7.35 (m, 3H), 7.25–7.32 (m, 2H), 5.57 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.51 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.36 (s, 2H).

[0274] 전술한 일반 방법 H를 사용하여, 다음의 표 G의 중간체를 제조하였다.

[표 G]

실시예 번호	SM	생성물	수율 (%)	¹ H NMR (400 또는 500 MHz, DMSO-d ₆): δ
G2	F3		61	7.37 (m, 2H), 7.31 (m, 2H), 7.23 (m, 1H), 7.12 (m, 1H), 7.03 (m, 1H), 5.41 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.50 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.29 (s, 2H)
G3	F4		69	7.44 (m, 2H), 7.34-7.39 (m, 2H), 7.27 (m, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.09 (m, 1H), 5.57 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.50 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.34 (s, 2H)
G4	F5		69	7.40 (m, 2H), 7.32 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.27 (m, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.00 (m, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.27 (s, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.07 (s, 3H)
G5	F6		76	7.36 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.23-7.29 (m, 3H), 5.15 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.50 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.30 (s, 2H)
G6	F7		98	7.36 (m, 2H), 7.32 (m, 2H), 7.26 (m, 3H), 5.28 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 4.23 (s, 2H), 2.12 (s, 3H)
G7	F8		87	7.36 (m, 2H), 7.32 (m, 2H), 7.26 (m, 3H), 5.28 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.46 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 4.23 (s, 2H), 2.12 (s, 3H)
G8	F9		97	7.40 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.32 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.25 (m, 1H), 7.16 (s, 2H), 5.36 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.49 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.26 (s, 3H), 2.28 (s, 3H)
G9	F2		미정제	데이터 없음

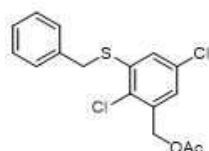
[0275]

G10	F10		50	7.34-7.38 (m, 5H), 7.21 (br s, 1H), 7.14 (br s, 1H), 5.33 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4.44 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 4.29 (s, 2H)
-----	-----	---	----	---

[0276]

[0277] 일반 방법 I: 아세틸화

[0278] 실시예 H1: 3-(벤질티오)-2,5-디클로로벤질 아세테이트

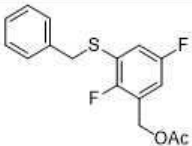
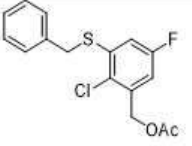
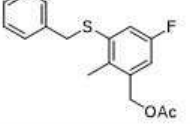
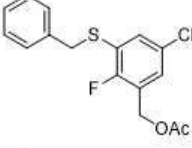
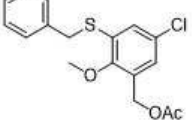
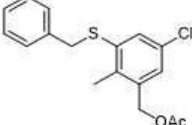
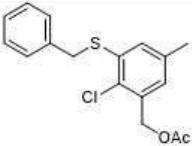


[0279]

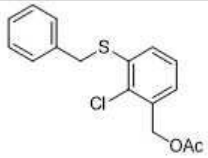
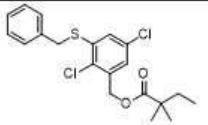
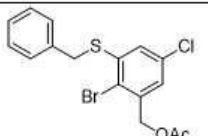
[0280] THF(10 mL) 중 3-(벤질티오)-2,5-디클로로페닐)메탄올(**G1**, 0.82 g, 2.7 mmol)의 용액을 실온에서 아세트산 무수물(0.31 mL, 3.3 mmol)로 처리하였다. 반응 혼합물을 Ar 하 50 °C에서 2시간 동안 교반하고, 물로 희석시켰다. 용액을 EtOAc(3x)로 추출하고, 합쳐진 유기층을 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜 3-(벤질티오)-2,5-디클로로벤질 아세테이트(0.92 g, 98%)를 백색 고형분으로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.51 (m, 3H), 7.41 (m, 3H), 7.35 (m, 1H), 5.16 (s, 2H), 4.45 (s, 2H), 2.16 (s, 3H).

[0281] 전술한 일반 방법 I를 사용하여, 다음의 표 H의 중간체를 제조하였다.

[표 H]

실시예 번호	SM	생성물	수율 (%)	¹ H NMR (400 또는 500 MHz, DMSO-d ₆): δ
H2	G2		46	7.39 (m, 2H), 7.31 (m, 3H), 7.26 (m, 1H), 7.12 (m, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.32 (s, 2H), 2.06 (s, 3H).
H3	G3		55	7.42 (m, 2H), 7.27-7.35 (m, 4H), 7.13 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.36 (s, 2H), 2.10 (s, 3H).
H4	G4		63	7.33-7.39 (m, 2H), 7.25-7.32 (m, 2H), 7.17-7.22 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 7.00 (m, 1H), 5.06 (s, 2H), 4.27 (s, 2H), 2.15 (s, 3H), 2.07 (s, 3H).
H5	G5		70	7.48 (dd, J = 2.4 & 5.6 Hz, 1H), 7.38-7.29 (m, 5H), 7.27 (m, 1H), 5.05 (s, 2H), 4.33 (s, 2H), 2.06 (s, 3H).
H6	G6		99	7.40 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.32 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.25 (m, 1H), 7.21 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 4.29 (s, 2H), 3.71 (s, 3H), 2.00 (s, 3H).
H7	G7		94	7.38 (m, 3H), 7.31 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 7.27 (m, 1H), 7.21 (m, 1H), 5.06 (d, J = 4.4 Hz, 2H), 4.27 (s, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.06 (s, 3H).
H8	G8		98	7.42 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.35 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.27 (m, 2H), 7.22 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 4.29 (s, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.05 (s, 3H).

[0282]

H9	G9		94	데이터 없음
H10	G1		75	7.30-7.46 (m, 7H), 5.10 (s, 2H), 4.38 (s, 2H), 1.49 (m, 2H), 1.08 (s, 6H), 0.77 (t, J = 5.2 Hz, 3H).
H11	G10		90	7.33-7.41 (m, 5H), 7.16-7.30 (m, 2H), 5.08 (s, 2H), 4.38 (s, 2H), 2.10 (s, 3H).

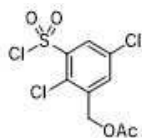
[0283]

[0284]

일반 방법 J: 설폰일 염화물의 제조

[0285]

실시예 I1: 2,5-디클로로-3-(클로로설폰일)벤질 아세테이트



[0286]

[0287]

THF/H₂O(1:1, 3 mL) 중 3-(벤질티오)-2,5-디클로로벤질 아세테이트(**H1**, 0.92 g, 2.7 mmol) 및 1-클로로피롤리딘-2,5-디온(1.8 g, 13 mmol)의 용액을 0°C에서 아세트산(7 mL)으로 처리하였다. 반응 혼합물을 실온으로 서서히 가온한 다음 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 포화 NaHCO₃ 용액(100 mL)으로 퀀칭시키고 EtOAc(3x)로 추출하였다. 합쳐진 유기물을 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고 감압 하에 농축시켰다. 미정제물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(0 내지 100% EtOAc/헥스)로 정제하여 2,5-디클로로-3-(클로로설폰일)벤질 아세테이트(0.45 g, 53%)를 백색 고형분으로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.84 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 2.11 (s, 3H).

[0288] 전술한 일반 방법 J를 사용하여, 다음의 표 I의 중간체를 제조하였다.

[표 I]

실시예 번호	SM	생성물	수율 (%)	¹ H NMR (400 또는 500 MHz, DMSO-d ₆): δ
I2			53	7.99 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 3.87 (s, 4H).
I3	H2		59	7.35 (m, 1H), 7.27 (m, 1H), 5.08 (s, 2H), 2.08 (s, 3H).
I4	H3		57	7.61 (dd, J = 8.4, 3.2 Hz, 1H), 7.32 (dd, J = 8.8, 3.2 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 2.12 (s, 3H).
I5	H4		72	7.49 (dd, J = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 7.14 (dd, J = 9.2, 2.8 Hz, 1H), 5.07 (s, 2H), 2.44 (s, 3H), 2.08 (s, 3H).
I6	H5		84	7.60 (dd, J = 5.6, 2.8 Hz, 1H), 7.50 (dd, J = 5.6, 2.8 Hz, 1H), 5.08 (s, 2H), 2.07 (s, 3H).
I7	H6		47	데이터 없음
I8	H7		41	7.74 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.07 (s, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.07 (s, 3H).

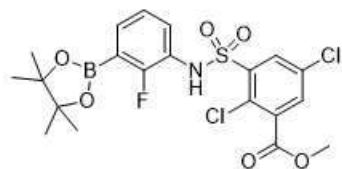
[0289]

I9	H8		37	7.70 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 5.10 (s, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.08 (s, 3H).
I10	H9		92	7.88 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.29 (m, 1H), 7.43 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 5.15 (s, 2H), 2.09 (s, 3H).
I11	H10		80	7.85 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 1.46 (m, 2H), 1.05 (s, 6H), 0.83 (t, J = 5.2 Hz, 3H).
I12	H11		32	7.88 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 2.14 (s, 3H).

[0290]

[0291] 일반 방법 K: 설폰아미드 커플링

[0292] 실시예 J1: 메틸 2,5-디클로로-3-(N-(2-플루오로-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페닐)설폰아미드)벤조에이트



[0293]

[0294]

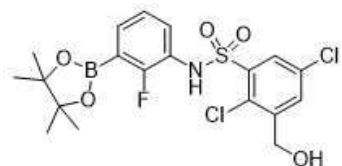
DCM(30 mL) 중 2-플루오로-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)아닐린(**A1**, 2.2 g, 9.3 mmol)의 용액을 피리딘(2.2 mL, 28 mmol)으로 처리하였다. 반응 혼합물을 0℃로 냉각시키고, DCM(10 mL) 중 메틸 2,5-디클로로-3-(클로로설포닐)벤조에이트(**I2**, 2.8 g, 9.3 mmol)의 용액을 적가하였다. 반응 혼합물을 실온까지 서서히 가온시키고 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축시키고, 미정제물을 DCM(50 mL)에 용해시켰다. 용액을 1.0 M HCl(2x), 수성 NaHCO₃(3x), 및 염수(1x)로 세척하였다. 유기층을 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 헥스 중 현탁시키고, 진공 여과를 통해 고형분을 수집하여 메틸 2,5-디클로로-3-(N-(2-플루오로-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페닐)설포닐)벤조에이트(4.2 g, 90%)를 갈색 고형분으로서 수득하였다. ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆): δ 10.71 (s, 1H), 8.13 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.46 (m, 1H), 7.38 (td, J = 7.9, 1.8 Hz, 1H), 7.16 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 1.28 (s, 12H); MS (ESI) m/z 526.0 (M+Na+H⁺).

[0295]

일반 방법 L: 환원

[0296]

실시예 **J2**: 2,5-디클로로-N-(2-플루오로-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페닐)-3-(하이드록시메틸)벤젠설포나미드의 제조



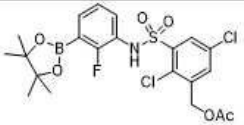
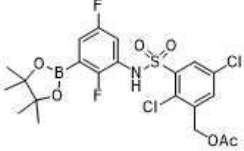
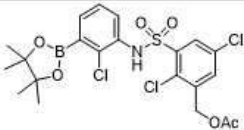
[0297]

[0298]

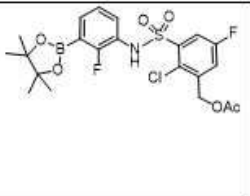
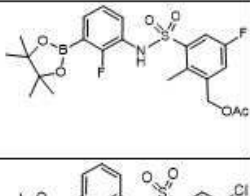
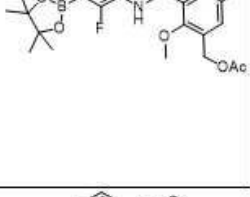
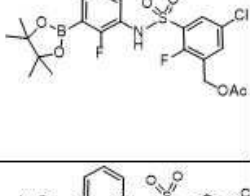
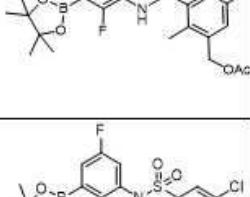
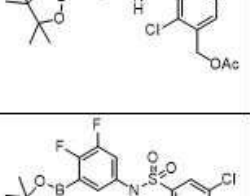
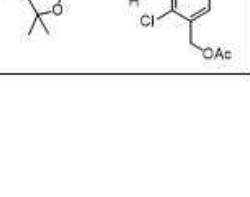
THF(5 mL) 중 메틸 2,5-디클로로-3-(N-(2-플루오로-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페닐)설포닐)벤조에이트(**J1**, 0.5 g, 0.99 mmol)의 용액을 0℃에서 LAH(0.11 g, 30 mmol)를 나누어 첨가하여 처리한 다음, 0℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 디에틸 에테르로 희석시킨 다음, 물(0.2 mL), 15% 수성 NaOH(0.2 mL) 및 물(0.4 mL)로 퀀칭시켰다. 혼합물을 4시간 동안 교반한 다음, 셀라이트 패드를 통해 여과하였다. 여액을 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고 감압 하에 농축시켜 2,5-디클로로-N-(2-플루오로-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페닐)-3-(하이드록시메틸)벤젠설포나미드(0.26 g, 55%)를 무색 고형분으로서 수득하였으며, 이를 추가 정제 없이 다음 반응에 사용하였다. MS (ESI) m/z 498.0 (M+Na+H⁺).

[0299] 전술한 일반 방법 K 및 L을 사용하여, 다음의 표 J의 중간체를 제조하였다.

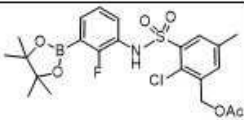
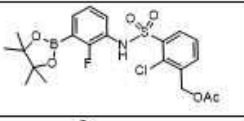
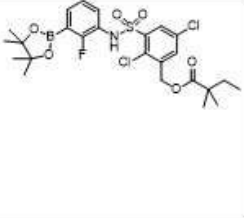
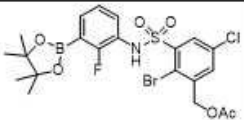
[표 J]

실시예 번호	SM	생성물	수율 (%)	¹ H NMR (400 or 500 MHz, DMSO-d ₆): δ	MS (m/z: M+H ⁺)
J3	A1 I1		77	10.64 (br s, 1H), 7.85 (m, 2H), 7.41 (m, 1H), 7.35 (m, 1H), 7.12 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 2.12 (s, 3H), 1.26 (s, 12H).	516.0(음성)
J4	A3I1		미정제	데이터 없음	452(음성) 보론산 질량
J5	A5 I1		미정제	10.50 (br s, 1H), 7.87 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.52 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.47 (dd, J = 6.4, 2.8 Hz, 1H), 5.22 (s, 2H), 2.12 (s, 3H).	데이터 없음

[0300]

J6	A1 I4		86	10.61 (br s, 1H), 7.70 (m, 1H), 7.55 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.43 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.35 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.13 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 5.21 (s, 2H), 2.13 (s, 3H), 1.22 (s, 12H)	
J7	A1 I5		미정제	데이터 없음	데이터 없음
J8	A1 I7		98	10.15 (br s, 1H), 7.74 (m, 1H), 7.64 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.41 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 7.33 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.11 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.27 (s, 12H)	512.2
J9	A1I6		60	7.88 (m, 1H), 7.66 (m, 1H), 7.45-7.51 (m, 1H), 7.38 (m, 1H), 7.15 (m, 1H), 5.14 (s, 2H), 2.07 (s, 3H), 1.26 (s, 12H). NH 누락	데이터 없음
J10	A1 I8		미정제	10.49 (br s, 1H), 7.71 (m, 2H), 7.33-7.42 (m, 2H), 7.13 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 2.53 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.26 (s, 12H).	
J11	A2 I1		미정제	데이터 없음	434.2 보론산
J12	A4 I1		미정제	데이터 없음	452.2 보론산

[0301]

J13	A1 I9		미정제	데이터 없음	414.0 보론산
J14	A1 I10		미정제	데이터 없음	424.0 보론산+Na
J15	A1 I11		50	10.15 (br s, 1H), 7.88 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.78 (m, 1H), 7.07-7.11 (br m, 1H), 6.73-6.76 (br m, 1H), 5.19 (s, 2H), 1.53 (m, 2H), 1.27 (s, 12H), 1.13 (s, 6H), 0.76 (t, J = 4.4 Hz, 3H).	572.0(음성)
J16	A1 I12		60	10.59 (br s, 1H), 8.82 (m, 2H), 8.32 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.82-8.03 (m, 2H), 5.12 (s, 2H), 2.13 (s, 3H), 1.27 (s, 12H).	561.9

[0302]

[0303]

일반 방법 M: 스즈키 반응

[0304]

실시예 1: 3-(N-(3-(4-아미노-7-메틸-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-5-일)-2-플루오로페닐)설펜아세테이트)-2,5-디클로로벤질아세테이트



[0305]

[0306]

1,4-디옥산 및 물(4:1, 100 mL) 중 5-요오드-7-메틸-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-4-아민(1.7 g, 6.3 mmol)의 용액을 Ar 하에서 교반하였다. 2,5-디클로로-3-(N-(2-플루오로-3-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)페닐)설펜아세테이트)벤질 아세테이트(3.6 g, 6.9 mmol) 및 Cs₂CO₃(5.1 g, 15.7 mmol)을 실온에서 첨가하고, 반응 혼합물을 Ar로 5분 동안 탈기하였다. Pd(dppf)Cl₂.DCM(0.25 g, 0.31 mmol)을 첨가하고, 생성된 혼합물을 90℃에서 1.5시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고 셀라이트 패드를 통해 여과하고 EtOAc로 세척하였다. 여액을 포화 NaHCO₃(2x)에 이어서 물(2x)로 세척하였다. 유기층을 무수 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고 감압 하에 농축시켜 미정제 물질을 수득하였다. 미정제 물질을 CH₃CN(300 mL) 중에서 실온에서 2시간 동안 추가로 교반하였다. 고형분을 여과하고 진공 하에 건조시켜 3-(N-(3-(4-아미노-7-메틸-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-5-일)-2-플루오로페닐)설펜아세테이트)-2,5-디클로로벤질 아세테이트(2.5 g, 91%)를 연갈색 고형분으로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 10.76 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.93 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.84 (m, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.19 (m, 3H), 6.02 (br s, 2H), 5.20 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.56 (s, 3H); MS (ESI) m/z 538.0 (M+H⁺).

[0307]

일반 방법 N: 탈보호

[0308]

실시예 2: N-(3-(4-아미노-7-메틸-7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-5-일)-2-플루오로페닐)-2,5-디클로로-3-(하이드록시메틸)벤젠설펜아미드

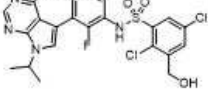
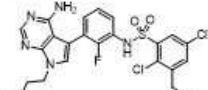
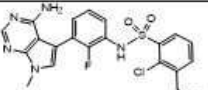
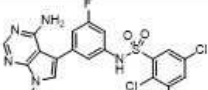


[0309]

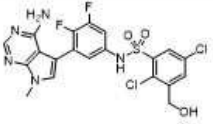
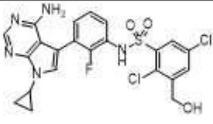
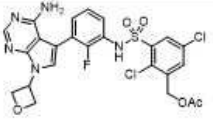
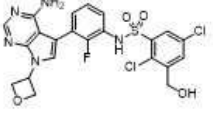
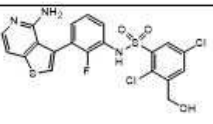
[0310] MeOH(40 mL) 중 3-(N-(3-(4-아미노-7-메틸-7H-피콜로[2,3-d]피리미딘-5-일)-2-플루오로페닐)설퍼모일)-2,5-디클로로벤질 아세테이트(1, 2.3 g, 4.2 mmol)의 용액을 실온에서 K₂CO₃(2.3 g, 17 mmol)으로 처리하였다. 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반한 다음, 용매를 감압 하에 증발시켰다. 미정제 물질을 10% 구연산 용액(pH~5)으로 산성화시킨 다음, 고형분을 여과하고 물로 철저히 세척하였다. 고형분을 실온에서 CH₃CN(5 mL)과 DCM(5 mL)의 혼합물로 2시간 동안 처리하였다. 침전물을 여과하고 건조시켜, N-(3-(4-아미노-7-메틸-7H-피콜로[2,3-d]피리미딘-5-일)-2-플루오로페닐)-2,5-디클로로-3-(하이드록시메틸)벤젠설폰아미드(1.6 g, 76%)를 희백색 고형분으로서 수득하였다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 10.69 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.84 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.78 (br m, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.15-7.25 (br m, 3H), 5.99 (br s, 2H), 5.72 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H). MS (ESI) m/z 496.27 (M+H⁺).

[0311] 전술한 일반 방법 L, M 및 N을 사용하여, 다음의 표 K의 중간체를 제조하였다.

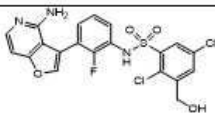
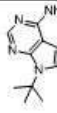
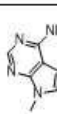
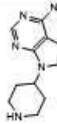
[표 K]

실시예 번호	SM	생성물	방법	수율 (%)	¹ H NMR (400 or 500 MHz, DMSO-d ₆): δ	MS (m/z: M+H ⁺)
3	E1 J2		M	13	10.73 (s, 1H), 8.13 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.14-7.27 (m, 3H), 6.00 (s, 2H), 5.75 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 4.95 (m, 1H), 4.61 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 1.44 (d, J = 6.7 Hz, 6H).	524.0
4	E3 J1		M 및 L	15	10.75 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.87 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.21 (m, 3H), 6.06 (s, 2H), 5.76 (t, J = 6.3 Hz, 1H), 4.62 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.33 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.69 (t, J = 5.4 Hz, 2H), 3.24 (s, 3H).	540.0
5	E2 J14		M 및 N	6	¹ H NMR (500 MHz, DMSO) ? 10.60 (s, 1H), 8.13 (s, 1H), 7.88 (dd, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 7.74 - 7.62 (m, 1H), 7.49 - 7.39 (m, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.13 - 7.09 (m, 1H), 7.05 - 6.92 (m, 2H), 5.99 (br s, 2H), 5.52 (s, 1H), 4.59 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H).	462.0
6	E2 J11		M 및 N	10	11.26 (s, 1H), 8.36 (s, 1H), 8.05 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.20-7.43 (br s, 2H), 6.98 (s, 1H), 6.94 (br d, J = 9.6, 1H), 6.88 (br d, J = 10.9 Hz, 1H), 5.72 (br s, 1H), 4.58 (s, 2H), 3.79 (s, 3H).	496.2

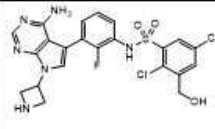
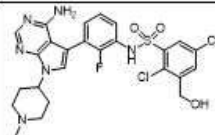
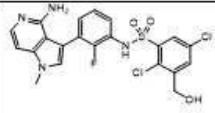
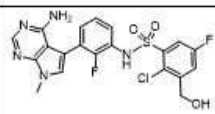
[0312]

7	E2 J12		M 및 N	10	10.77 (br s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.95 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.24 (s, 1H), 7.05 (m, 1H), 6.92 (br m, 1H), 5.90 (br s, 2H), 5.48 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 4.61 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H). 고온	514.1
8	E4 J1		M 및 L	14	10.64 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.78 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.76 (m, 1H), 7.13 (d, J = 2.8 Hz, 4H), 5.92 (s, 2H), 5.67 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.54 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.50 (m, 1H), 1.0 (m, 4H).	522.0
9	E5 J3		M	21	10.80 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.96 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.87 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.30 (td, J = 6.3, 3.5 Hz, 1H), 7.23 (m, 2H), 6.10 (s, 2H), 5.86 (p, J = 7.2 Hz, 1H), 5.21 (s, 2H), 4.99 (m, 4H), 2.09 (s, 3H).	580.0
10	9		N	20	10.75 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.87 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.30 (m, 1H), 7.23 (m, 2H), 6.11 (s, 2H), 5.86 (tt, J = 7.7, 6.7 Hz, 1H), 5.75 (m, 1H), 4.99 (p, J = 6.9 Hz, 4H), 4.62 (d, J = 5.5 Hz, 2H).	538.0
11	 J1		M 및 L	22	10.86 (s, 1H), 7.86 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.78 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.38 – 7.33 (m, 1H), 7.29 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.27 – 7.24 (m, 2H), 5.72 (t, J	499.0

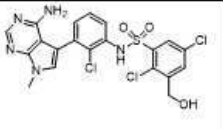
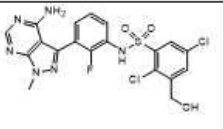
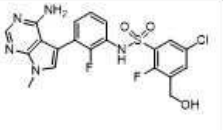
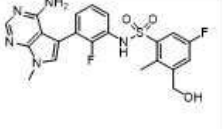
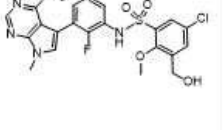
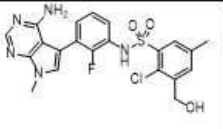
[0313]

					= 5.8 Hz, 1H), 5.24 (s, 2H), 4.60 (d, J = 4.8 Hz, 2H).	
12	 J1		M 및 L	32	10.84 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.91 – 7.83 (m, 2H), 7.78 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.36 – 7.21 (m, 3H), 6.96 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 5.72 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 5.45 (s, 2H), 4.61 (d, J = 5.4 Hz, 2H).	483.0
13	E6 J1		M 및 L	15	10.62 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 7.78 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.13 (m, 4H), 5.85 (s, 2H), 5.66 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.54 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 1.65 (s, 9H).	538.0
14	E2 J4		M 및 N	10	11.03 (br s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.91 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 6.98-7.07 (m, 2H), 6.21 (br s, 2H), 5.72 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H).	514.2
15	E8 J3		M 및 N	23	8.62 (s, 2H), 8.06 (s, 1H), 7.78 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 6.99 (m, 2H), 6.85 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.57 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 5.94 (s, 2H), 5.53 (s, 1H), 4.80 (tt, J = 11.9, 4.2 Hz, 1H), 4.50 (s, 2H), 3.36 (m, 2H), 3.05 (td, J = 12.9, 3.1 Hz, 2H), 2.11 (tt, J = 12.8, 6.6 Hz, 2H), 2.03 (dd, J = 13.5, 3.6 Hz, 2H).	565.0

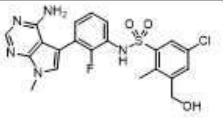
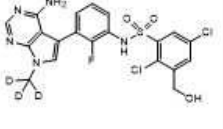
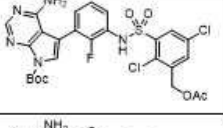
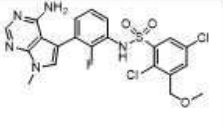
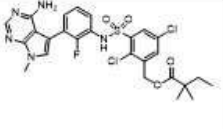
[0314]

16	E7 J3		M 맞 N	9	8.10 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.80 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 2.7 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.03 (td, J = 8.1, 1.7 Hz, 1H), 6.88 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.66 (s, 1H), 5.54 (p, J = 7.9 Hz, 1H), 4.46-4.53 (m, 5H), 4.32 (m, 2H). 3H 누락	537.0
17	E9 J3		M 맞 N	25	8.14 (s, 1H), 7.87 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 7.15 (td, J = 7.8, 1.8 Hz, 1H), 7.08 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.00 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 6.01 (s, 2H), 5.69 (s, 1H), 4.64 (m, 1H), 4.61 (s, 2H), 3.11 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.43-2.50 (m, 3H), 2.15 (m, 2H), 1.94-2.04 (m, 2H).	580.0
18	E12 J3		M 맞 N	14	10.5 (br s, 1H), 7.86 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.67 (m, 2H), 7.33 (s, 1H), 7.16 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.04 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 6.91 (br m, 1H), 5.81 (br s, 2H), 5.65 (t, J = 5.9 Hz, 1H), 4.58 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H)	495.3
19	E2 J6		M 맞 N	35	10.7 (br s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.68 (dd, J = 8.0, 3.2 Hz, 1H), 7.60 (dd, J = 8.8, 2.8 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.18-7.20 (m, 3H), 6.00 (br s, 2H), 5.73 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.61 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H).	480.3

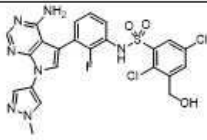
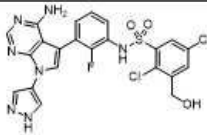
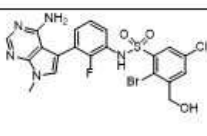
[0315]

20	E2 J5		M 및 N	8	10.5 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.79 (br m, 2H), 7.35 (t, J = 8.4 Hz, 1H), 7.28 (m, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.22 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 5.84 (br s, 2H), 5.72 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.61 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H).	512.3
21	J3		M 및 N	25	10.74 (m, 1H), 8.25 (s, 1H), 7.87 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.29 (m, 1H), 7.19 (s, 2H), 5.68 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H). 2H 누락	497.0
22	E2 J9		M 및 N	25	10.72 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.75 (br m, 1H), 7.61-7.67 (m, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.18-7.25 (br m, 3H), 5.98 (br s, 2H), 5.93 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H).	480.0
23	E2 J7		M 및 N	9	10.51 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.44-7.52 (br m, 2H), 7.25 (s, 1H), 7.16 (br m, 3H), 5.97 (br s, 2H), 5.48 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.55 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.45 (s, 3H).	460.0
24	E2 J8		M 및 N	54	10.24 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.69 (br s, 1H), 7.63 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.10-7.24 (m, 3H), 5.99 (br s, 2H), 5.51 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.57 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.73 (s, 3H).	492.1
25	E2 J13		M 및 N	78	10.40 (s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.71 (br s, 1H), 7.60 (br s, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.18 (br m, 3H), 5.96 (br s, 2H), 5.54 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.58	476.2

[0316]

					(d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.34 (s, 3H)	
26	E2 J10		M 및 N	36	10.52 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.72 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.68 (br d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.19 (br m, 3H), 5.97 (br s, 2H), 5.48 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 4.56 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 3.72 (s, 3H). 3H는 용매 하임	476.3
27	E10 J3		M 및 N	19	10.68 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.86 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.12-7.21 (m, 3H), 5.99 (s, 2H), 5.71 (t, J = 5.8 Hz, 1H), 4.61 (d, J = 5.5 Hz, 2H).	499.0
28	A1E 11 후 n I1		M 및 K	미정제	데이터 없음	623.9
29	2		POCl ₃ NaOMe	45	10.72 (br s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.88 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.20 (m, 3H), 6.00 (br s, 2H), 4.55 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.38 (s, 3H).	510.0
30	E2 J15		M	26	10.74 (br s, 1H), 8.14 (s, 1H), 7.93 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.19 (m, 3H), 5.99 (br s, 2H), 5.19 (s, 2H), 3.72 (s, 3H), 1.45 (q, J = 7.6 Hz, 2H), 1.06 (s, 6H), 0.70 (t, J = 7.6 Hz, 3H).	594.1

[0317]

31	E13 J3		M 및 N	26	10.74 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.22 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.87 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.77 (br s, 1H), 7.64 (s, 1H), 7.22 (br m, 3H), 6.12 (br s, 2H), 5.72 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H).	562.2
32	E14 J3		M 및 N	8	13.06 (br s, 1H), 10.74 (br s, 1H), 8.35 (br m, 1H), 8.22 (s, 1H), 8.09 (br m, 1H), 7.87 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.76 (br s, 1H), 7.65 (s, 1H), 7.22 (br m, 3H), 6.11 (br s, 2H), 5.71 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.60 (d, J = 5.6 Hz, 2H).	548.1
33	E2 J16		M 및 N	12	10.65 (br s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.88 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.74 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.17-7.22 (m, 3H), 6.01 (br s, 2H), 5.77 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 4.56 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 3.73 (s, 3H).	540.2

실시예 30. GCN2에 대한 생화학적 분석

TR-FRET 키나아제 활성 검정(예를 들어, Riddle 등의 문헌[Analytical Biochemistry (2006) 356(1) 108-116])을 사용하여 GCN2 키나아제의 활성을 결정하였다. 2 nM GCN2(Carna Biosciences), 130 nM GFP-Elf2α (Invitrogen), 0.2 mg/mL 대장균 tRNA(sigma), 및 키나아제 완충액(Invitrogen) 중 1 mM ATP를 사용하여 384-웰 플레이트(13 μL 검정 부피)에서 검정을 수행하였다. 연속 희석 시험 화합물(0.5% DMSO의 최종 검정 농도)을 첨가하여 GCN2의 억제력을 측정하고 3시간 동안 인큐베이션하였다. EDTA(20 mM의 최종 검정 농도)를 함유하는 키나아제 완충액 중 Tb-peIF2α(pSer52) 항체(Invitrogen)(2 nM 최종 검정 농도)를 첨가하였다. 실온에서 60분 동안 인큐베이션한 후, 340 nm의 여기 파장 및 490 nm 및 520 nm의 방출 파장을 사용하여 TR-FRET를 모니터링하였다. 각각의 화합물 농도에서의 방출률(520/490)을 대조군을 사용해 억제율로 변환하고(즉, 시험 화합물이 없을 때의 반응 및 공지된 억제제와의 반응), Prism(GraphPad 소프트웨어)을 사용해 4-파라미터의 S자 곡선을 데이터에 피팅함으로써 IC₅₀ 값을 계산하였다.

서열번호 1 - GCN2 단백질 서열(잔기 1-1649; N-말단 GST-태그를 갖는 G556E)

MAPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEELHYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDKLTQSMATIRYIADKHNMLGGCPKERAETSMLEGAVLDI
RYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQ
GWQATFGGGDHPKSDLEVLQFQPLGAMSGIQRPTSTSSVMAGGRGAPGRGRDEPPESYPQRQDHELQALEAIYGADFQDLRPDACPVPKEPPEINLVLY
PQGLTGEEVYVVDLRVKCPPTYPDVVPEIELKNAKGLSNESVNLKSRLEELAKKHCGEVMIFELAYHVQSFLSEHNKPPPKSFHEEMLERRAQEEQQRL
EAKRKEEQEQLIHEIQRRKEEIKKEKKRKEMAKQERLEIASLSNQDHTSKKDPGGHRTAAILHGGSPDFVGNGKHRANSSGRSRERQYSVCNSEDSPGS
CEILYFNMGSPDQLMVHKGKIGDEQLGKLVYNALETATGGFVLLYEWVLQWQKMGPFLLTSQEKEKIDKCKKQIQGTETEFNSLVKLSHPNVVRYLAMNLK
EQDSDIVVDILVEHISGVSLAHLSHSGPIPVHQLRRYTAQLLSGLDYLHSNVVHKVLSASNVLVDAEGTVKITDYSISKRLADICKEDVFEQTRVRVFSND
ALPYKTGKKGDVWRLGLLLLSLSQGECEGPVPTIPSDLPADFQDLKKCVCLDDKERWSPQQLKHSFINPQPKMPLVEQSPEDSGGQDYVETVIPSRLP
SAAFFSETQRQFSRYIFEEELQLLGKGAFGAVIKVQNKLDGCCYAVKRIPINPASRQFRRIKGEVTLLSRLHENIVRYNAWIERHERPAGPGTPPPDSG
PLAKDDRAARGQPASDTDGLDSVEAAAPPPILSSSVWSTSGERSASARFPATGPGSSDDEDDDEHGGVFSQSFLPASDSESDIIFDNEDENSKSQNQDE
DCNEKNGCHESEPSVTTEAVHYLYIQMEYCEKSTLRDITDQGLYRDTVRLWRLFREILDGLAYIHEKGMHRDLKPVNIFLSDDHVKIGDFGLATDHLAFS
ADSKQDDQTGDLIKSDPSGHLTGMVGTALYVSPEVQGSTKSAYNQKVDLFLSLGIIFFEMSYHPMTASERIFVLNQLRDPSTPKFPEDFDDGEHAKQKSVIS
WLLNHPAKRPTATELLKSELLPPPMEESELHEVLHHTLTNVGKAYRTMAQIFSQRISPAIDYTYDSIDILKGNFSIRTAQMQQHVCETIIRIFKRHGAV
QLCTPLLLPRNRQIYEHNEAALFMDHSGMLVLPFDLRIPFARYVARNNILNLKRYCIERVFRPRKLRDFHPKELLECAFDIVTSTNSFLPTAEIITYIYE
IIQEFPALQERNYSIYLNHTMLLKAILLHCGIPEDKLSQVYIILYDAVTEKLTREVEAKFCNLSLSSNLCRLYKFIQKGDQLDMPTINSLIKQKTGIA
QLVKYGLKDLLEVVGLLKKLGIKLQVLINLGLVYKQQHNGIIFQFVAFIKRRQRAVPEILAAGGRYDLLIPQFRGPQALGPVPTAIGVSIADKIISAAVLN

MEESVTISSCDLLVSVGQMSMSRAINLTQKLWTAGITAEIMYDWSQSQEELQEYCRHHEITYVALVSDKEGSHVKVKSFEKERQTEKRVLETETLDHVLQK
LRTKVTDERNGREASDNLAVQNLKGSFSNASGLFEIHGATVVPISVLAPEKLSASTRRRYETQVQTRLQTSANLHQKSSEIEILAVDLPKETILQFLSLE
WDADEQAFNTTVKQLLSRLPKQRYLKLVCDEIYNIKVEKKVSVLFLYSYRDDYYRILF

[0323] 실시예 31. PERK에 대한 생화학적 분석

[0324] PERK의 활성을 NADH의 ATP 가수분해 의존성 산화를 연속적으로 관찰하는 커플링된 피루브산 키나아제/젖산 탈수소효소 검정을 사용하여 광학적으로 측정하였다(예를 들어, Schindler 등의 문헌[Science (2000) 289: 1938-1942]). 검정은 분석 완충액(100 mM Tris, pH 7.5, 15 mM MgCl₂, 0.5 mM DTT, 0.004%(w/v) BSA, 및 0.004% Triton X-100) 중 10 nM PERK(Beryllium 유래), 0.25 mg/mL Myelin Basic Protein 기질, 1.5 단위 피루브산 키나아제, 2.1 단위 젖산 탈수소효소, 1 mM 포스페놀 피루브산염, 0.28 mM NADH 및 1 mM ATP를 사용하여 384-웰 플레이트(최종 부피 100 µL)에서 수행하였다. 연속 희석 시험 화합물을 첨가하여 PERK의 억제를 측정하였다(1% DMSO의 최종 분석 농도). 340 nm에서의 흡광도 감소를 다중 모드 마이크로플레이트 판독기(BioTek)을 이용해 30 °C에서 6시간 동안 연속적으로 모니터링하였다. 반응 속도는 2 내지 3시간의 시간 구간을 사용하여 계산하였다. 화합물의 각 농도에서의 반응 속도를 대조군을 사용해 억제율로 변환하고(즉, 시험 화합물이 없을 때의 반응 및 공지된 억제제와의 반응), Prism(GraphPad 소프트웨어)의 소프트웨어 루틴을 사용하여 IC₅₀ 값을 계산하였다.

[0325] 서열번호 2 - PERK 단백질 서열 (잔기 563-1115; 서열 ID: NM 004836)

[0326] MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPYYIDGDVKLTQSMATIRYIADKHNMLGGCPKERAETSMLEGAVLDI
RYGVSRIAYSKDFETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLDAFPKLVCFKKRIEAI PQIDKYLKSSKYIAWPLQ
GWQATFGGGDHPKSDLVPRGSKYDSVSGEANDSSWNDIKNSGYISRYLTD FEP IQCLGRGGFGVVFEAKNKVDDCNIAIKRIRLPNRELAREKVMREVKAL
AKLEHPGIVRYFNAWLEAPPEKWQEKMDIEWLKDESTDWPLSSPSMDAPSVKIRRMDPFSTKEHIEI IAPSPQRSRSFSVGI SCDQTSSSESQFSPLFSG
MDHEDISESVDAAYNLQDSCLTDCDVEDGTMDGNDEGHSFELCPSEASPYVRSRERTSSSIVFEDSGCDNASSKEPKTNRLHIGNHCANKLTAFKPTSSKS
SSEATLSISPPRPTTSLDLTKNTTEKLQPSSPKVYLYIQMQLCRKENLKDWMNGRCTIEERERSVCLHIFLQIAEAVEFLHSKGLMHRDLKPSNIFFTMDD
VVKVGDFGLVTAMDQDEEEQTVLTPMPAYARHTGQVGTKLYMSPEQIHGNSYSHKVDIFSLGLILFELLYPFSTQMERVRTLTDVRNLKFPPLFTQKYPCEY
VMVQDMLSPSPMERPEAINI IENAVFEDLDFPGKTVLRQRSRLSSSGTKHSRQSNNSHSPLPSN

[표 1] 예시적인 화합물에 의한 GCN2 및 PERK 키나아제의 생화학적 활성의 억제.

실시예 번호	GCN2 IC ₅₀ (nM)	PERK IC ₅₀ (nM)
1	++++	+
2	+	+
3	+	+
4	+	+
5	++++	+
6	++	+
7	++	+
8	+	+
9	++++	+
10	+	+
11	++	+
12	++	+
13	++	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
17	+	+
18	++++	+
19	++	+
20	++	+
21	+	+
22	++	+
23	++	+
24	++++	+
25	++	+
26	+	+
27	+	+
29	++	+
30	++++	++++
31	+	+
32	+	+
33	+	+

표 1의 경우, "+"는 100 nM 이하의 IC₅₀을 나타내고; "++"는 100 nM 초과 및 500 nM 이하의 IC₅₀을 나타내고; "+++"는 500 nM 초과 및 1000 nM 이하의 IC₅₀을 나타내고; "++++"는 1000 nM 초과 및 10000 nM 이하의 IC₅₀을 나타낸다.

아래에 제공된 실시예 및 도면에서, "화합물 2"는 본원에 기술된 바와 같은 실시예 2의 화합물을 지칭한다.

실시예 32. CCRF-CEM ASNase 세포 증식 검정, GCN2의 세포 억제에 대한 표현형 검정.

CCRF-CEM 백혈병 세포(카탈로그 #CCL-116)는 American Type Culture Collect(ATTC, Manassas, VA)으로부터 획득하였다. 37°C, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 10% 열-불활성화 소태아 혈청(Invitrogen, Carlsbad, CA) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민이 보충된 RPMI-1640 배지에서 세포를 성장시켰다. mL 당 백만 개의 세포에 도달할 때까지 세포를 증식시키고, 해당 시점에서 계대배양하거나 검정 용도를 위해 수확하였다. 10% 열-불활성화 소태아 혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 200 μ L RPMI-1640 중 웰 당 10,000개의 세포를 96-웰 흑색 투명 바닥 플레이트에 분배하였다. 시험 화합물 및 1 mU/mL ASNase의 연속 희석물을 3회 첨가하고, 플레이트를 37°C, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션의 종료 시, PBS 중 40 μ L의 440 mM 레자주린 용액(Sigma, St. Louis, MO)을 플레이트의 각각의 웰에 첨가하고, 37°C, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 플레이트를 6시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. 플레이트를 540 nm의 여기 및 600 nm의 방출을 사용하여 Synergy2 또는 등등한 판독기(Biotek, Winooski VT)에서 판독하였다. IC₅₀ 값을 계산하기 위해 GraphPad Prism 소프트웨어(GraphPad, San Diego, CA)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

실시예 33. HCT116 아미노산 결핍(-AA) 포스포-GCN2 및 ATF4 검정

HCT116 대장암 세포(카탈로그 #CCL-247)는 American Type Culture Collect(ATTC, Manassas, VA)으로부터 획득하였다. 요약하면, 37°C, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 10% 열 불활성화 소태아 혈청(Invitrogen, Carlsbad, CA) 및

1% 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민이 보충된 RPMI-1640 배지에서 세포를 성장시켰다. 70-95% 컨플루언시에 도달할 때까지 세포를 증식시키고, 해당 시점에 세포를 계대배양하거나 분석용으로 수확하였다. 세포를 12-웰 배양 플레이트에 1 mL의 완전 성장 배지 중 웰 당 500,000개의 세포로 시딩하고, 37°C, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날, 각각의 웰을 10%의 투석된 소태아 혈청, 5.5 mM 포도당, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 1% 비타민 용액(thermo #11120052)이 보충된 1mL의 Earle 평형 염 용액(Earle's Balanced Salt Solution)(EBSS, Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 교체하였다. 시험 화합물의 연속 희석물을 웰에 분배하였다. 플레이트를 37°C, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 종료 시, 세포를 1X Halt 프로테아제 억제제, 1X Halt 포스파타아제 억제제, 1X Sigma 포스파타아제 억제제 콕테일 2 및 1X EDTA가 보충된 PBS로 세척한 다음, 전술한 바와 같이 3X의 억제제 혼합물이 보충된 M-PER 포유류 단백질 추출 시약(M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent)으로 용해시켰다. 세포 용해물을 수조 초음파기(Qsonica, Newtown, CT)로 초음파 처리하고, SDS 완충액 및 환원제와 함께 상청액을 끓였다. 각각의 용해물에 대해 웨스턴 블롯을 수행하여 포스포-GCN2(Thr899), 총 GCN2, ATF4 및 베타-액틴을 정량화하였다. 막을 LI-COR Odyssey CLx Imaging System(LI-COR, Lincoln, NE)으로 이미지화하였다. IC₅₀ 값을 계산하기 위해, GraphPad Prism 소프트웨어(GraphPad, San Diego, CA)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0334] **실시예 34. CCRF-CEM TG ATF4 ELISA, 탐시가르긴(TG)에 의해 사전 활성화된 PERK의 세포 억제에 대한 표현형 검정**

[0335] CCRF-CEM 백혈병 세포(카탈로그 #CCL-116)는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)으로부터 수득하였다. 요약하면, 37°C, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 10% 열-불활성화 소태아 혈청(Invitrogen, Carlsbad, CA) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민이 보충된 RPMI-1640 배지에서 세포를 성장시켰다. mL 당 백만 개의 세포에 도달할 때까지 세포를 증식시키고 해당 시점에서 계대배양하거나 검정 용도를 위해 수확하였다. 1 mL의 완전 성장 배지 중 웰 당 150만개의 세포를 12-웰 플레이트에 분배하고 밤새 인큐베이션하였다. 시험 화합물의 연속 희석물을 첨가하고, 37°C, 5% CO₂, 및 95%에서 세포를 3시간 동안 인큐베이션한 다음, 1 μM의 탐시가르긴을 첨가하고, 37°C, 5% CO₂, 및 95%에서 세포를 1시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. 세포를 용해시킨 다음, ELISA 검정(Proteintech, Rosemont, IL)을 사용하여 ATF4 수준을 측정하였다. Synergy2 또는 동등한 판독기(Biotek, Winooski VT)를 사용하여 450 nM 및 544 nM에서 흡광도를 측정하였다. IC₅₀ 값을 계산하기 위해 Prism 소프트웨어(Graphpad, San Diego, CA)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[표 2] 예시적인 화합물에 의한, 탐시가르긴 자극 CCRF-CEM 세포 중 아미노산 결핍 HCT116 및 ATF4에서의 ASNase 처리 CCRF-CEM 세포, 포스포-GCN2 및 ATF4의 증식 억제.

실시예 번호	CCRF-CEM ASNase 세포 증식	HCT116 -AA pGCN2 웨스턴 블롯	HCT116 -AA ATF4 웨스턴 블롯	CCRF-CEM 탐시가르긴 ATF4 ELISA
1	++			++
2	+	+	+	+
3	+	+	+	+
4	+			+
5	++++			++
6	+++			++
7	+++			++
8	+			+
9	++			+
10	+			+
11	+++			++++
12	++++			++++
13	++			++
14	++			++
15	++			+++
16	+++			++
17	+			+
18	++++			++++
19	++			+
20	++			++
21	++			++
22	++++			++
23	+++			++
24	++++			++
25	++			+
26	++			+
27	+			+
29	++++			++
30	++++			+++
31	+			+
32	+			++
33	+			+

[0336]

[0337]

표 2의 경우, "+"는 100 nM 이하의 IC₅₀을 나타내고; "++"는 100 nM 초과 및 500 nM 이하의 IC₅₀을 나타내고; "+++"는 500 nM 초과 및 1000 nM 이하의 IC₅₀을 나타내고; "++++"는 1000 nM 초과 및 10000 nM 이하의 IC₅₀을 나타낸다.

[0338]

실시예 35. H929 ATF4 ELISA 검정

[0339]

H929 다발성 골수종 세포(카탈로그 #CRL-9068)는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)으로부터 획득하였다. 요약하면, 37°C, 5% CO₂, 및 95% 습도에서, 20% 열-불활성화 소 태아 혈청(카탈로그 #A3840002, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 1% 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민(카탈로그 #10378016, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 및 0.05 mM 2-메르캅토에탄올(카탈로그 #21985-023, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)이 보충된 RPMI-1640 배지에서 세포를 성장시켰다. mL 당 150만 개의 세포에 도달할 때까지 세포를 증식시키고 해당 시점에서 계대배양하거나 검정 용도를 위해 수확하였다. 1 mL의 완전 성장 배지 중 웰 당 150만개의 세포를 12-웰 플레이트에 분배하고 밤새 인큐베이션하였다. 시험 화합물의 연속 희석물을 첨가하고, 37°C, 5% CO₂, 및 95%에서 세포를 4시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 용해시킨 다음, ELISA 검정(Proteintech, Rosemont, IL)을 사용하여 ATF4 수준을 측정하였다. Synergy2 또는 동등한 판독기(Biotek, Winooski VT)를 사용하여, 450 nM 및 544 nM에서 흡광도를 측정하였다. PRISM 소프트웨어(Graphpad, San Diego, CA)를 사용하여 데이터를 분석하여 비히클 치료 대조군 대비 세포 ATF4의 배수 자극을

계산하였다.

[표 3] 예시적인 화합물에 의한 H929 다발성 골수종 세포에서의 ATF4의 자극.

실시예 번호	H929 NS ATF4 ELISA
1	++++
2	+++
3	++++
4	+++
5	++
8	+++
9	++++
10	+++
14	++
17	+++
21	++
24	++
25	+++
26	+++

[0340]

[0341]

표 3의 경우, "+"는 5배 이하의 ATF4 자극을 나타내고; "++"는 5배 초과 및 10배 이하의 ATF4 자극을 나타내고; "+++"는 10배 초과 및 20배 이하의 ATF4 자극을 나타낸다.

[0342]

도 1은 화합물 2의 농도 증가에 반응하는 UPR/ISR 마커 ATF4(검은 막대)의 예상치 못한 자극을 입증하는 그래프 표현이다. 자극은 종(bell)-형상 방식으로 발생하였으며, 여기에서 ATF4 수준은 4 내지 123 nM 범위의 농도(해당 농도 범위에서는 50% 이하의 PERK 분자가 화합물 2에 의해 점유됨)에서 최고인 것으로 나타났으며, 이어서 억제 단계가 이어졌고, 여기에서 ATF4 발현은 370 nM 이상의 화합물 2의 농도에서 기저 수준으로 복귀하였다. ATF4 신호에서의 최대 자극은 13배였으며, 이는 약 41 nM 부근의 화합물 2에서 발생하였다.

[0343]

실시예 36. NanoBRET을 사용한 PERK 올리고머화의 검출

[0344]

NanoBRET™ Flexi® PPI Starter System(Promega, Madison, WI)을 사용하여 BRET를 위한 작제물을 구축하였다. 전장 PERK ORF는 Genscript(Piscataway, NJ)로부터 입수하였다. HEK-293 세포(카탈로그 #CRL-1573)는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)으로부터 획득하였다. 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 10% 열-불활성화 소태아 혈청(Invitrogen, Carlsbad, CA) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민이 보충된 MEM 배지에서 세포를 성장시켰다. BRET 검정을 위해, 세포를 6-웰 플레이트의 배양 배지에 40,000 세포/mL의 밀도로 시딩하고, 부착하고 회수하였다. 세포를 Lipofectamine LTX(Thermo, Waltham, MA)를 사용하여 C-말단에 태그된 PERK-NLuc 및 C-말단에 태그된 PERK-Halo로 형질감염시키고, 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 단백질을 발현시켰다. 이어서, 0.05% 트립신-EDTA를 사용하여 배양 접시로부터 세포를 분리하고, 수집하고, 4% FBS(Thermo)가 보충된 Opti-MEM® I 환원 혈청 배지로 이루어진 검정 배지에서 22,000 세포/mL로 희석하였다. 세포를 96-웰 세포 배양 플레이트에 분배하고, HaloTag® NanoBRET™ 618 리간드(Promega)를 100 nM의 최종 농도로 첨가하였다. 화합물 또는 DMSO를 세포에 첨가하고, 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 플레이트를 4시간 동안 인큐베이션하였다. NanoBRET™ Nano-Glo® 기질을 세포에 첨가하고, 세포를 30초 동안 진탕하였다. 기질 첨가 후 10분 이내에 Synergy Neo2 Multi-Mode Reader(BioTek, Winooski, VT) 상에서 공여자(460 nm) 및 수용자(618) 방출을 측정하였다. 데이터를 BRET 비율(수용자/공여자)로 기록하였다.

[0345]

화합물 2는 1.6 nM의 EC₅₀으로, PERK 올리고머의 형성을 예기치 않게 자극하였다. 도 2는 화합물 2에 의해 유도된 자극 PERK 올리고머의 그래프를 나타낸다.

[0346]

실시예 37. 다발성 골수종 UPR/ISR 신호전달 경로 단백질 ATF4 및 CHOP의 자극

[0347]

H929 다발성 골수종 세포(카탈로그 #CRL-9068)를 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)으로부터 획득하고, 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서, 20% 열 불활성화 소태아 혈청(Invitrogen, Carlsbad, CA), 1% 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민 및 0.05 mM 2-메르캅토에탄올이 보충된 RPMI 1640에서 성장시키고, mL 당

100만~200만개 세포로 유지하였다. 2 mL 완전 성장 배지 중 웰 당 400만 개의 세포로 6 웰 플레이트에 세포를 시딩하고, 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 4시간 동안 시험 화합물의 연속 희석으로 처리하였다. 인큐베이션 종료 시, 세포를 1X Halt 프로테아제 억제제, 1X Halt 포스파타아제 억제제, 1X Sigma 포스파타아제 억제제 각테일 2 및 1X EDTA가 보충된 PBS로 세척한 다음, 전술한 바와 같이 3X의 억제제 혼합물이 보충된 M-PER 포유류 단백질을 추출 시약으로 용해시켰다. 세포 용해물을 수조 초음파기(Qsonica, Newtown, CT)로 초음파 처리하고, SDS 완충액 및 환원제와 함께 상청액을 끓였다. 웨스턴 블롯을 수행하여 ATF4, CHOP 및 베타-액틴(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)을 정량화하였다. 막을 LI-COR Odyssey CLx Imaging System(LI-COR, Lincoln, NE)으로 이미지화하였다.

[0348] 화합물 2는 H929 다발성 골수종 세포에서 UPR/ISR 경로의 자극을 예기치 않게 나타냈다. 도 3은 자극 PERK 하류 신호전달 단백질 ATF4 및 CHOP(로딩 대조군으로서 액틴)의 도면을 나타낸다. ATF4는 4.5 nM 내지 123 nM의 농도 범위에 걸쳐 자극된다. CHOP는 4.5 nM 내지 41 nM의 농도 범위에 걸쳐 자극된다.

[0349] **실시예 38. 정량적 RT-PCR을 사용한 다발성 골수종 UPR/ISR 표적 유전자의 자극**

[0350] H929 다발성 골수종 세포(카탈로그 #CRL-9068) 다발성 골수종 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)으로부터 획득하였다. 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서, 20% 열-불활성화 소 태아 혈청(카탈로그 #A3840002, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 1% 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민(카탈로그 #10378016, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 및 0.05 mM 2-메르캅토에탄올(카탈로그 #21985-023, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)이 보충된 RPMI-1640 배지에서 세포를 성장시켰다. 70-95% 컨플루언스에 도달할 때까지 세포를 증식시키고, 해당 시점에 세포를 계대배양하거나 분석용으로 수확하였다. 세포를 2 mL 완전 성장 배지 중 웰 당 3.0 x 10⁶ 개의 세포로 6-웰 배양 플레이트에 시딩하고, 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에 서 표시된 농도의 화합물 2와 함께 4시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 종료 시, 세포를 PBS(Sigma)로 세척하고, RNeasy[®] Plus Kits(Qiagen, Germantown, MD)를 사용하여 RNA를 추출하였다. cDNA를 High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosciences, Beverly Hills, CA)를 사용하여 합성하고, 제조사의 사양에 따라 TaqMan Assays(표 1, Thermo) 및 TaqMan Fast Advanced Master Mix(Thermo)를 사용하여 QuantStudio 3(Applied Biosciences) 상에서 정량적 PCR을 수행하였다.

[표: TaqMan 프로브]	
관심 유전자	검정 ID
ATF4	Hs00909569_g1
DDIT3(CHOP)	Hs00358796_g1
GPT2	Hs00370287_m1
GUSB(내인성 대조군)	Hs00939627_m1
PPP1R15A(GADD34)	Hs00169585_m1
VEGFA	Hs00900055_m1

[0351]

[0352] 화합물 2는 H929 다발성 골수종 세포에서 UPR/ISR 표적 유전자의 발현을 예기치 않게 유도하였다. 데이터는 비히클 대조군(DMSO) 치료 샘플에 대한 배수 변화로서 기록된다. 도 4는 화합물 2의 농도 증가에 반응하는, ATF4 표적 유전자의 자극을 입증하는 그래프 표현이다(DMSO 흑색 막대, 1.5 nM 짙은 회색 막대, 14 nM 체크 문양 막대, 41 nM 빗금 문양 막대, 123 nM 밝은 회색 막대 및 370 nM 점 문양 막대). ATF4 표적 유전자의 전사 활성화는 종-형상 방식으로 발생하였다. 4시간 시점에서의 ATF4에 대한 최대 자극은 약 3배였고; 4시간 시점에서의 CHOP에 대한 최대 자극은 약 10배였고; 4시간 시점에서의 GADD34에 대한 최대 자극은 약 3배였고; 4시간 시점에서의 GPT2에 대한 최대 자극은 약 3배였으며; 4시간 시점에 VEGFA에 대한 최대 자극은 약 2배였다. ATF4 표적 유전자의 자극은 종(bell)-형상 방식으로 발생하였으며, 여기에서 수준은 14 내지 123 nM 범위의 농도(해당 농도 범위에서는 50% 이하의 PERK 분자가 화합물 2에 의해 점유됨)에서 최고인 것으로 나타났으며, 이어서 억제 단계가 이어졌고, 여기에서 발현은 370 nM 이상의 화합물 2의 농도에서 기저 수준으로 복귀하였다.

[0353] **실시예 39. 다발성 골수종 세포자멸사 신호전달 경로의 자극**

[0354] H929 다발성 골수종 세포(카탈로그 #CRL-9068)를 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)으로부터 획득하고, 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서, 20% 열 불활성화 소태아 혈청(Invitrogen, Carlsbad, CA), 1% 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민 및 0.05 mM 2-메르캅토에탄올이 보충된 RPMI 1640에서 성장시키고, mL 당 100만~200만개 세포로 유지하였다. 2 mL 완전 성장 배지 중 웰 당 400만 개의 세포로 6 웰 플레이트에 세포를

시딩하고, 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 24시간 동안 시험 화합물의 연속 희석으로 처리하였다. 인큐베이션 종료 시, 세포를 1X Halt 프로테아제 억제제, 1X Halt 포스파타아제 억제제, 1X Sigma 포스파타아제 억제제 각 테일 2 및 1X EDTA가 보충된 PBS로 세척한 다음, 전술한 바와 같이 3X의 억제제 혼합물이 보충된 M-PER 포유류 단백질 추출 시약으로 용해시켰다. 세포 용해물을 수조 초음파기(Qsonica, Newtown, CT)로 초음파 처리하고, SDS 완충액 및 환원제와 함께 상청액을 끓였다. 웨스턴 블롯을 수행하여 절단된 카스파아제(Caspase) 3, 절단된 카스파아제 7, PARP, 및 베타-액틴(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)을 정량화하였다. 막을 LI-COR Odyssey CLx Imaging System(LI-COR, Lincoln, NE)으로 이미지화하였다.

[0355] 화합물 2는 H929 다발성 골수종 세포에서 전-세포자멸사 단백질의 발현을 예기치 않게 유도하였다. 화합물 2로 세포를 치료한 결과, 절단된 PARP, 절단된 카스파아제-7 및 절단된 카스파아제-3의 수준이 증가하였다. 이들 세포자멸사 관독의 자극은 종-형상 방식으로 발생하였으며, 4.5 nM 내지 41 nM 범위의 농도에서 최대를 나타냈다.

[0356] **실시예 40. 다발성 골수종 및 B 세포 림프종 세포 증식의 억제**

[0357] H929, RPMI8226, GA-10 및 DoHH-2 세포(카탈로그 #CRL-9068)는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)으로부터 획득하였다. 20% 열-불활성화 소 태아 혈청(카탈로그 #A3840002, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 1% 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민(카탈로그 #10378016, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), 및 0.05 mM 2-메르캅토에탄올(카탈로그 #21985-023, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)이 보충된 RPMI-1640 배지에서 H929 세포를 유지시켰다. 10% 열-불활성화 소 태아 혈청(카탈로그 #A3840002, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민(카탈로그 #10378016, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)이 보충된 RPMI-1640 배지에서 RPMI8226, GA-10, DoHH-2를 유지시켰다. 모든 세포를 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 성장시켰다. mL 당 150만 개의 세포에 도달할 때까지 세포를 증식시키고 해당 시점에서 계대배양하거나 검정 용도를 위해 수확하였다.

[0358] 세포 증식 검정을 위해, 적절한 수의 세포(H929에 대해 40,000개의 세포, RPMI8226 및 GA-10에 대해 20,000개의 세포, DoHH-2에 대해 8,000개의 세포)를 각각의 배지에서 200 µL로 웰 당 시딩하고, 96-웰 흑색 투명 바닥 플레이트에 분배하였다. 시험 화합물의 연속 희석물을 3회 첨가하고, 플레이트를 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 72 또는 120시간 동안 인큐베이션하였다. 병용 연구를 위해 여러 표준 치료 제제를 사용하였다(레날리도미드(카탈로그 #S1029, Selleckchem, Houston, TX), 보르테조미(카탈로그 #S1013, Selleckchem, Houston, TX), 텍사메타손(카탈로그 #S1322, Selleckchem, Houston, TX), 이부루티닙(Pharmacocyclics, Sunnyvale, CA)). H929, RPMI8226 및 GA-10에 대한 인큐베이션의 종료 시, PBS 중 40 µL의 440 mM 레자주린 용액(Sigma, St. Louis, MO)을 플레이트의 각각의 웰에 첨가하고, 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 플레이트를 7시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. 플레이트를 540 nm의 여기 및 600 nm의 방출을 사용하여 Synergy2 또는 등등한 관독기(Biotek, Winooski VT)에서 관독하였다. DoHH-2의 인큐베이션 종료 시, CellTiter-Glo® 검정(Promega, Madison, WI)을 사용하여 세포 생존력을 결정하였다. EnVision MultiLabel Reader(PerkinElmer, Waltham, MA)를 사용하여 발광을 측정하였다. IC₅₀ 값을 계산하기 위해 GraphPad Prism 소프트웨어(GraphPad, San Diego, CA)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0359] 화합물 2는 다발성 골수종 또는 B 세포 림프종을 치료하는 표준 치료(SOC) 제제와 조합되어, 세포 증식 억제에 대한 부가 효과 또는 상승 효과를 나타낸다. 도 6a, 6b, 6c 및 6d는 대표적인 그래프를 나타낸다. 도 6a는 333 nM 텍사메타손이 있거나(회색 다이아몬드) 없는(흑색 원) 화합물 2 역가로 96시간 동안 치료된 RPMI8226 다발성 골수종 세포의 세포 증식 실험을 나타낸다. 병용 치료는 7 nM의 IC₅₀으로 세포 증식을 억제하였다. 도 6b는 3 nM 보르테조미가 있거나(회색 사각형) 없는(흑색 원) 화합물 2 역가로 96시간 동안 치료된 H929 다발성 골수종 세포의 세포 증식 실험을 나타낸다. 병용 치료는 6 nM의 IC₅₀으로 세포 증식을 억제하였다. 도 6c는 50 nM 텍사메타손이 있거나(회색 삼각형) 없는(흑색 원) 화합물 2 역가로 96시간 동안 치료된 GA-10 버킷 림프종 세포의 세포 증식 실험을 나타낸다. 병용 치료는 4 nM의 IC₅₀으로 세포 증식을 억제하였다. 도 6d는 41 nM 이부루티닙이 있거나(회색 별형) 없는(흑색 원) 화합물 2 역가로 96시간 동안 치료된 여포성 림프종 세포의 세포 증식 실험을 나타낸다. 병용 치료는 4 nM의 IC₅₀으로 세포 증식을 억제하였다.

[0360] **실시예 41. CCRF-CEM 이중이식편 약동학/약력학(PK/PD) 모델**

[0361] CCRF-CEM 이중이식편 모델은 AAALAC 인가 시설인 Labcorp(Ann Arbor, MI)의 동물실험 윤리위원회(Animal Care

and Use Committee)의 승인 하에, 국립 보건원(NIH)의 모든 법률, 규정 및 가이드라인에 따라 수행하였다. 음식과 물을 자유롭게 제공하였다. 모든 마우스의 임상 징후를 적어도 1일 1회 관찰하였다. Dulbecco 인산염 완충 식염수(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 중의 세포 천만 개를, 27게이지의 바늘과 주사기를 사용하여, 암컷 Envigo C.B-17 SCID(6-7주령)의 앞다리 오른쪽 겨드랑이 바로 아래에 피하 접종하였다. 22일차에 평균적으로 종양 부담(tumor burden)이 200 mm^3 에 달했을 때, 모든 그룹에 대한 평균 종양 부담이 연구 모집단에 대한 전체 평균 종양 부담의 10% 이내가 되도록 마우스를 여러 개의 군으로 무작위 배정하였다. 23-24일차에 다음과 같이 군을 치료하였다: 23일차에 비히클 대조군(경구 투여 및 병용 군을 모방하기 위한 IP)(n=9); 1000 U/kg/일로 ASNase(Abcam, Cambridge, UK) IP 투여(n=9). 24일차에, 비히클 대조군(경구 투여 및 병용 군을 모방하기 위한 IP)(n=9); 50 mg/kg/일의 화합물 2로 화합물 2의 경구 투여(n=9) 및 샘플 채취 2시간 전 1000 U/kg/일로 ASNase(Abcam, Cambridge, UK) IP 투여(n=9); 25 mg/kg/일의 화합물 2로 화합물 2의 경구 투여(n=9) 및 화합물 2 투여 후 샘플 채취 2, 6, 및 10시간의 2시간 전, 1000 U/kg/일로 ASNase(Abcam, Cambridge, UK) IP 투여(n=9). 혈액 샘플을 K2EDTA 튜브에 수집하고, 혈장으로 처리하고, 액체 질소에서 급속 냉동시킨 다음, -80°C 에서 보관하였다. 탠덤 질량 분광분석과 커플링된 액체 크로마토그래피(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)를 사용하여 혈장 샘플에 대해 약동학 분석을 수행하였다. 종양 및 췌장 조직을 수확하고, 공변량 백에서 액체 질소를 이용해 분말화하고, -80°C 에서 보관하였다. 대략 30 mg의 종양 또는 췌장 조직을 처리하는 조직 샘플을 얼음 상에서 3X Halt 프로테아제 억제제, 3X Halt 포스파타아제 억제제, 3X Sigma 포스파타아제 억제제 각테일 2 및 3X EDTA가 보충된 mPER 용해 완충액(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)에 용해시킨 다음, Bead Ruptor 96(Omni, Kennesaw, GA)을 사용하여 균질화시켰다. 이어서, 샘플을 4°C 에서 21,000 g로 10분 동안 원심분리하였다. 이어서, 깨끗해진 용해물을 얼음-냉각된 원뿔형 바닥 96-웰 플레이트로 옮기고, 밀봉한 다음 -80°C 에서 보관하였다. 다음 날, 샘플을 얼음 상에서 해동한 다음 3739 g에서 4°C 에서 10분 동안 원심분리하였다. 그런 다음, 제거된 용해물을 얼음처럼 냉각된 둥근 바닥 96-웰 플레이트로 옮겼다. BCA 단백질 검정 키트(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 단백질 농도를 결정하였다. 용해물을 4X SDS-샘플 완충액 및 환원제 중에서 끓이기 전, $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 정규화하였다. SDS-PAGE를 사용하여 샘플을 분해한 다음, 웨스턴 블롯을 사용하여 분석하여, 포스포-GCN2(Thr899)(Abcam, Cambridge, UK), 총 GCN2, ATF4 및 베타-액틴(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)을 정량화하였다. 막을 LI-COR Odyssey CLx Imaging System(LI-COR, Lincoln, NE)으로 이미지화하였다. 억제(%)를 계산하기 위해, GraphPad Prism 소프트웨어(GraphPad, San Diego, CA)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0362] 화합물 2는 ASNase와 조합되어, CCRF-CEM 백혈병 이종이식편 모델에서 GCN2-매개 ATF4 수준을 억제한다. 도 7에 나타난 바와 같이, 화합물 2는 50 mg/kg으로 경구 투여 시 비히클 대조군과 비교하여, 87 내지 91%만큼 ATF4 수준을 억제하였으며, 25 mg/kg으로 경구 투여 시 비히클 대조군과 비교하여 57% 내지 93%만큼 ATF4 수준을 억제하였다. 투여 후 2, 6, 및 10시간에서의 PD 시점에서 화합물 2의 상응하는 혈장 수준을 결정하였다.

[0363] 실시예 42. MV-4-11 이종이식편 효능 모델

[0364] MV-4-11 이종이식편 모델은 AAALAC 인가 시설인 Crown Bioscience(Taicang, China)의 동물실험 윤리위원회(Animal Care and Use Committee)의 승인 하에, 국립 보건원(NIH)의 모든 법률, 규정 및 가이드라인에 따라 수행하였다. 음식과 물을 자유롭게 제공하였다. 모든 마우스의 임상 징후를 적어도 1일 1회 관찰하였다. Dulbecco 인산염 완충 식염수(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline):Matrigel(1:1) 중의 세포 500만 개를, 27게이지의 바늘과 주사기를 사용하여, 암컷 NOD/SCID(6-9주령; Vital River Laboratories Research Models and Services(Beijing, China))의 앞다리 오른쪽 겨드랑이 바로 아래에 피하 접종하였다. 7일차에 평균적으로 종양 부담(tumor burden)이 150 mm^3 에 달했을 때, 모든 그룹에 대한 평균 종양 부담이 연구 모집단에 대한 전체 평균 종양 부담의 10% 이내가 되도록 마우스를 여러 개의 그룹으로 무작위 배정하였다. 7-21일차에, 다음과 같이 군을 치료하였다: 비히클 대조군(경구 투여 및 병용 군을 모방하기 위한 IP)(n=10); 50 mg/kg/일의 화합물 2로 화합물 2의 경구 투여(n=10); 1000 U/kg/일로 리나아제(Leunase)(Kyowa Kirin, Japan) IP 투여(n=10); 1000 U/kg/일로 리나아제(Kyowa Kirin, Japan) IP 투여(n=10) 및 50 mg/kg/일의 화합물 2로 화합물 2의 경구 투여(n=10). 종양 부피 및 체중을 주 3회 측정하였다. 종양 부담(mg)은 다음 공식에 의해 캘리퍼 측정치로 추정하였다: 종양 부담 ($\text{mg}=\text{mm}^3$) = (길이 x 폭²)/2.

[0365] 화합물 2는, ASNase와 조합되어, 경구 투여될 경우 MV-4-11 종양 성장을 억제한다. 도 8에 나타난 바와 같이, 50 mg/kg/일의 화합물 2를 단일 제제로서 14일 동안 투여한 후, 종양 성장에 대한 유의한 효과는 관찰되지 않았다. 50 mg/kg/일의 화합물 2를 리나아제와 조합했을 경우, 14일 투여 후 평균 종양 성장 억제는 54%였다.

[0366] **실시예 43. 재조합 GCN2 활성화 검증**

[0367] 재조합 GCN2(EIF2AK4)(Carna Biosciences, Japan)를 1X 포스파타아제 1X 반응 완충액 중 30℃에서 3시간 동안 16,000 단위의 람다 포스파타아제(New England Biolabs, Ipswich, MA)로 인큐베이션하여 탈인산화하였다. 화합물 2-매개 GCN2 조절을 측정하기 위해, 키나아제 완충액(Invitrogen, Carlsbad, CA) 중에 희석된 12.5 nM 탈인산화 GCN2를 화합물 2 역가와 함께 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 130 nM 기질(GFP-eIF2a)(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) 및 0.05 mM ATP를 혼합물에 첨가하고 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 10 mM EDTA를 첨가하여 반응을 중단시키고, 2 nM LanthaScreen Tb-anti-peIF2a(pSer52) 항체(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 인산화된 eIF2a 기질을 검출한 다음, 어두운 곳에서 인큐베이션하였다. 실온에서 60분 동안 인큐베이션한 후, 340 nm의 여기 파장 및 490 nm 및 520 nm의 방출 파장을 사용하여 TR-FRET를 모니터링하였다.

[0368] 도 9a에서, 0.05-3 nM 범위의 농도에서 화합물 2는 대조군의 최대 250%까지 예상 외로 GCN2 효소를 활성화시켰다. 10 nM을 초과하는 농도에서, 화합물 2는 시험관 내에서 재조합 GCN2 효소의 활성을 억제하였다.

[0369] **실시예 44. 재조합 PERK 활성화 검증**

[0370] 화합물 2-매개 PERK 조절을 측정하기 위해, 200 nM PERK 효소(Enzo, Farmingdale, NY)를 화합물 2 역가와 함께 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 200 nM 기질(GFP-eIF2a)(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) 및 1 mM ATP를 혼합물에 첨가하고 실온에서 60분 동안 인큐베이션하였다. 10 mM EDTA를 첨가하여 반응을 중단시키고, 2 nM LanthaScreen Tb-anti-peIF2a(pSer52) 항체(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 인산화된 eIF2a 기질을 검출한 다음, 어두운 곳에서 인큐베이션하였다. 실온에서 60분 동안 인큐베이션한 후, 340 nm의 여기 파장 및 490 nm 및 520 nm의 방출 파장을 사용하여 TR-FRET를 모니터링하였다.

[0371] 도 9b에서, 0.05-6 nM 범위의 농도에서 화합물 2는 대조군의 최대 250%까지 예상 외로 PERK 효소를 활성화시켰다. 3 nM을 초과하는 농도에서, 화합물 2는 시험관 내에서 재조합 PERK 효소의 활성을 억제하였다.

[0372] **실시예 45. 구상체 웨스턴 블롯 검증**

[0373] NSCLC 세포주 H358(카탈로그 # CRL-5807) 및 H2030(카탈로그 # CRL-5914), 및 섬유육종 세포주 HT-1080(카탈로그 # CRL-5807)을 American Type Culture Collect(ATCC, Manassas, VA)로부터 획득하였다. 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 10% 열-불활성화 소태아 혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민(Invitrogen, Carlsbad, CA)이 보충된 RPMI-1640 배지에서 세포를 성장시키고 사용 시까지 50-80% 컨플루언스로 유지하였다. 1 mL/웰의 완전 성장 배지로 24-웰 Elplasia 플레이트(Corning, Glendale, AZ) 중 500,000 세포/웰로 세포를 도말하고, 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 밤새 인큐베이션하여 구상체를 형성하였다. 다음 날, 시험 화합물의 연속 희석물을 완전 성장 배지에서 제조하고, 500 μL의 기존 배지를 각 웰로부터 제거하고 화합물 역가를 함유하는 신선한 배지로 교체하였다. 이어서, 구상체를 동일한 조건 하에서 4시간 또는 24시간 동안 시험 화합물과 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션 종료 시, 구상체를 1X Halt 프로테아제 억제제, 1X Halt 포스파타아제 억제제(Invitrogen, Carlsbad, CA), 1X Sigma 포스파타아제 억제제 콕테일 2(Sigma, St. Louis, MO) 및 1X EDTA(Invitrogen, Carlsbad, CA)가 보충된 PBS로 세척한 다음, 전술한 바와 같이 3X의 억제제 혼합물이 보충된 M-PER 포유류 단백질 추출 시약(M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent)(Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 용해시켰다. 세포 용해물을 수조 초음파기(Qsonica, Newtown, CT)로 초음파 처리하고, SDS 완충액 및 환원제와 함께 상청액을 끓였다. 웨스턴 블롯을 수행하여 포스포-GCN2(R&D Systems, Minneapolis, MN), ATF4, CHOP, 절단된 PARP, 절단된 카스파아제 3 및 7, 및 베타-액틴(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)을 정량화하였다. 막을 LI-COR Odyssey CLx Imaging System(LI-COR, Lincoln, NE)으로 이미지화하였다.

[0374] 도 10a, 10b, 및 10c에서, 화합물 2는 예기치 않게 고형 종양 암(도 10a, H2030; 도 10b, H358; 도 10c, HT-1080) 세포주에서의 ISR 및 세포자멸사 경로의 자극을 나타냈다. 도 10a, 10b, 및 10c는 상향조절된 GCN2 인산화(pGCN2) 및 하류 신호전달 단백질 ATF4 및 세포자멸-유도 경로 마커(절단된-PARP1, 절단된-카스파아제 3/7)(로딩 대조군으로서 액틴)의 웨스턴 블롯 이미지를 나타낸다. pGCN2의 수준은 H2030 및 H358 세포주에서 상향조절되었고, ATF4, c-PARP 및 c-카스파아제7은 4.6 nM 내지 최대 300 nM의 농도 범위에 걸쳐 상향조절되었다. ATF4 신호의 웨스턴 블롯 정량화는 막대 그래프 포맷으로 표시된다. 화합물 2는 H2030 구상체에서 최대 20배, H358 구상체에서 12배, 및 HT-1080 구상체에서 15배까지 ATF4를 상향조절하였다.

[0375] **실시예 46. 구상체 증식 검증**

- [0376] 비소세포 폐암(NSCLC) 세포주 H358(카탈로그 # CRL-5807) 및 H2030(카탈로그 # CRL-5914), 및 섬유육종 주 HT-1080(카탈로그 # CRL-5807)을 American Type Culture Collect(ATCC, Manassas, VA)로부터 수득하였다. 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 10% 열-불활성화 소태아 혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민(Invitrogen, Carlsbad, CA)이 보충된 RPMI-1640 배지에서 세포를 성장시키고 사용 시까지 50-80% 컨플루언스로 유지하였다. 80 μL/웰의 완전 성장 배지로 96-웰 울트라-로우 부착 플레이트(Corning, Glendale, AZ) 중 500-1000개 세포를 도말하고, 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 밤새 인큐베이션하여 구상체를 형성하였다. 다음 날, 시험 화합물의 연속 희석물을 완전 성장 배지에서 제조하고 화합물 역가를 함유하는 20 μL/웰 배지를 구상체에 3회 첨가하였다. 이어서, 구상체를 동일한 조건 하에서 5일 동안 시험 화합물과 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션 종료 시, 구상체를 100 μL/웰 CellTiter-Glo 3D Viability Assay(Promega, Madison, WI)으로 용해시키고, Synergy2 또는 동등한 판독기(Biotek, Winooski, VT)를 사용하여 발광을 검출하였다. IC₅₀ 값을 계산하기 위해 GraphPad Prism 소프트웨어(GraphPad, San Diego, CA)를 사용하여 데이터를 분석하였다.
- [0377] 도 11a, 11b, 및 11c에서, 화합물 2는 단일 제제로서 H2030 고형 종양 구상체에서 50% 세포 퇴행을 유도하였다(도 11a). 화합물 2는 단일 제제로서 H358(IC₅₀ 10 nM, 도 11b) 및 HT-1080(IC₅₀ 12 nM, 도 11c) 고형 종양 구상체의 세포 증식을 억제하였다.
- [0378] 도 12a, 12b, 및 12c에서, 화합물 2는, 표준 치료(SOC) 제제와 조합되어, 구상체 성장의 억제에 대한 부가 효과 또는 상승 효과를 나타냈다. 도 12a, 12b, 및 12c는 대표적인 그래프를 나타낸다. 도 12a는 3.3 nM 소토라십과 조합되거나(다이아몬드) 소토라십과 조합되지 않은(원) 화합물 2 역가로 96시간 동안 치료된 H2030 NSCLC 구상체의 세포 증식 실험을 나타낸다. 도 12b는 3.3 nM 소토라십과 조합되거나(다이아몬드) 소토라십과 조합되지 않은(원) 화합물 2 역가로 96시간 동안 치료된 H358 NSCLC 구상체의 세포 증식 실험을 나타낸다. 도 12c는 3.7 nM 트라메티닙과 조합되거나(삼각형) 타라메티닙과 조합되지 않은(원) 화합물 2 역가로 96시간 동안 치료된 H2030 NSCLC 구상체의 세포 증식 실험을 나타낸다. 3개의 실험 모두에서, 병용 치료는 단일 제제 중 어느 하나에 비해 보다 큰 구상체 퇴행을 초래하였다.
- [0379] **실시예 47. HT-1080 shRNA 녹다운 검증**
- [0380] 섬유육종 세포주 HT-1080(카탈로그 # CRL-5807)은 American Type Culture Collect(ATCC, Manassas, VA)로부터 수득하였다. 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 10% 열-불활성화 소태아 혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민(Invitrogen, Carlsbad, CA)이 보충된 RPMI-1640 배지에서 세포를 성장시키고 사용 시까지 50-80% 컨플루언스로 유지하였다. PERK, GCN2 또는 스크램블 대조군을 표적화하는 shRNA-발현 작제물을 MISSION(Sigma, St. Louis, MO)으로부터 수득하고, 각각의 작제물을 함유하는 렌티바이러스를 자체 생산하였다. 세포를 완전 성장 배지와 함께 6-웰 조직 배양 플레이트(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA)에 400,000 세포/웰로 도말하고, 37℃, 5% CO₂, 및 95% 습도에서 밤새 인큐베이션하여 부착하였다. 다음 날, 기존 배지를 각각의 웰로부터 제거하고, 5 μg/mL 폴리브렌(VectorBuilder, Chicago, IL)을 함유하는 1 mL/웰의 신선한 배지로 보충하였다. 웨스턴 블롯 및 세포 증식 검정을 위한 처리 전, 200 μL/웰의 상응하는 렌티바이러스로 세포를 24시간 동안 형질도입하였다.
- [0381] 도 13a에서, 총 GCN2는 HT-1080 세포주에서 표적화 shRNA를 사용하여 57%만큼 녹다운되었다. PERK는 HT-1080 세포주에서 표적화 shRNA를 사용하여 65%만큼 녹다운되었다. ISR 마커(ATF4, pEIF2α 및 CHOP)의 화합물-2 매개 상향조절은 GCN2 또는 PERK의 녹다운 시 하향조절되었다. 도 13b는 ATF4 신호의 웨스턴 블롯 정량화를 나타낸다. ATF4의 화합물 2 매개 상향조절은 GCN2의 녹다운 시 75%만큼 감소하였다. ATF4의 화합물 2 매개 상향조절은 PERK의 녹다운 시 50%만큼 감소하였다. 도 13c에서, 화합물 2-매개 구상체 성장 억제는 GCN2의 녹다운 시 약화되었지만, 이러한 고형 종양 세포주에서는 PERK가 약화되지 않았다.
- [0382] **실시예 48. HT-1080 섬유육종 이종이식편 약동학/약력학(PK/PD) 모델**
- [0383] HT-1080 이종이식 모델은 AAALAC 인가 시설인 Labcorp(Ann Arbor, MI)의 동물실험 윤리위원회(Animal Care and Use Committee)의 승인 하에, 국립 보건원(NIH)의 모든 법률, 규정 및 가이드라인에 따라 수행하였다. 음식과 물을 자유롭게 제공하였다. 모든 마우스의 임상 징후를 적어도 1일 1회 관찰하였다. Dulbecco 인산염 완충 식염수(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 중의 세포 200만 개를, 27게이지의 바늘과 주사기를 사용하여, 암컷 누드 마우스(6-7주령)의 앞다리 오른쪽 겨드랑이 바로 아래에 피하 접종하였다. 6일차에 평균적으로 종양 부담(tumor burden)이 150 mm³에 달했을 때, 모든 그룹에 대한 평균 종양 부담이 연구 모집단에 대한 전체 평균

종양 부담의 10% 이내가 되도록 마우스를 여러 개의 그룹으로 무작위 배정하였다. 6-11일차에 다음과 같이 군을 치료하였다: 비히클 대조군(경구 투여)(n=9); 화합물 2를 10 mg/kg BID로 경구 투여(n=9); 화합물 2를 5 mg/kg BID로 경구 투여; 11일차 투여 후 2, 6 및 10시간차에 샘플을 채취하기 전, 화합물 2를 1 mg/kg BID로 경구 투여(n=9). 혈액 샘플을 K2EDTA 튜브에 수집하고, 혈장으로 처리하고, 액체 질소에서 급속 냉동시킨 다음, -80℃에서 보관하였다. 탠덤 질량 분광분석과 커플링된 액체 크로마토그래피(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)를 사용하여 혈장 샘플에 대해 약동학 분석을 수행하였다. 종양을 수확하고, 공변량 백에서 액체 질소를 이용해 분말화하고, -80℃에서 보관하였다. 대략 30 mg의 종양 조직을 처리하는 조직 샘플을 얼음 상에서 3X Halt 프로테아제 억제제, 3X Halt 포스파타아제 억제제, 3X Sigma 포스파타아제 억제제 각테일 2 및 3X EDTA가 보충된 MPER 용해 완충액(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)에 용해시킨 다음, Bead Ruptor 96(Omni, Kennesaw, GA)을 사용하여 균질화시켰다. 이어서, 샘플을 4℃에서 21,000 g로 10분 동안 원심분리하였다. 이어서, 깨끗해진 용해물을 얼음-냉각된 원뿔형 바닥 96-웰 플레이트로 옮기고, 밀봉한 다음 -80℃에서 보관하였다. 다음 날, 샘플을 얼음 상에서 해동한 다음, 4℃에서 3739 g로 10분 동안 원심분리하였다. 이어서, 깨끗해진 용해물을 얼음-냉각된 둥근 바닥 96-웰 플레이트로 옮겼다. BCA 단백질 검정 키트(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)를 사용하여 단백질 농도를 결정하였다. 용해물을 4X SDS-샘플 완충액 및 환원제 중에서 끓이기 전, 10 µg/µL로 정규화하였다. SDS-PAGE를 사용하여 샘플을 분해한 다음, 웨스턴 블롯을 사용하여 분석하여, ATF4 및 베타-액틴(Cell Signaling Technology, Danvers, MA)을 정량화하였다. 막을 LI-COR Odyssey CLx Imaging System(LI-COR, Lincoln, NE)으로 이미지화하였다. 억제(%)를 계산하기 위해 GraphPad Prism 소프트웨어(GraphPad, San Diego, CA)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

[0384] 도 14 및 14b에서, 화합물 2는 HT-1080 섬유육종 PK/PD 이중이식편 모델에서 ATF4 수준을 상향조절하였다. 도 14a에 나타낸 바와 같이, 화합물 2는 10 mg/kg BID로 경구 투여 시 비히클 대조군과 비교하여, 4.5배만큼 ATF4 수준을 상향조절하였고, 5 mg/kg BID로 경구 투여 시 비히클 대조군과 비교하여, 3.5배만큼 ATF4 수준을 상향조절하였으며, 1 mg/kg BID로 경구 투여 시 비히클 대조군과 비교하여, 3배만큼 ATF4 수준을 상향조절하였다. 투여 후 2, 6, 및 10시간에서의 PD 시점에서 화합물 2의 상응하는 혈장 수준을 결정하였다(도 14b).

[0385] **실시예 49. LoVo 이중이식편 효능 모델**

[0386] LoVo 이중이식편 모델은 AAALAC 인가 시설인 Crown Bioscience(Taicang, China)의 동물실험 윤리위원회(Animal Care and Use Committee)의 승인 하에, 국립 보건원(NIH)의 모든 법률, 규정 및 가이드라인에 따라 수행하였다. 음식과 물을 자유롭게 제공하였다. 모든 마우스의 임상 징후를 적어도 1일 1회 관찰하였다. Dulbecco 인산염 완충 식염수(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 중의 세포 천만 개를, 27게이지의 바늘과 주사기를 사용하여, 암컷 Balb/c 누드 마우스(5-9주령)의 앞다리 오른쪽 겨드랑이 바로 아래에 피하 접종하였다. 6일차에 평균적으로 종양 부담(tumor burden)이 100 mm³에 달했을 때, 모든 그룹에 대한 평균 종양 부담이 연구 모집단에 대한 전체 평균 종양 부담의 10% 이내가 되도록 마우스를 여러 개의 그룹으로 무작위 배정하였다. 6-27일차에 다음과 같이 군을 치료하였다: 비히클 대조군(경구 투여)(n=9); 화합물 2를 5 mg/kg BID로 경구 투여(n=9); 화합물 2를 1 mg/kg BID로 경구 투여. 종양 부피와 체중을 주 3회 측정하였다. 종양 부담(mg)은 다음 공식에 의해 캘리퍼 측정치로 추정하였다: 종양 부담 (mg=mm³) = (길이 x 폭²)/2.

[0387] **실시예 50. HT-1080 이중이식 효능 모델**

[0388] HT-1080 이중이식 모델은 AAALAC 인가 시설인 Labcorp(Ann Arbor, MI)의 동물실험 윤리위원회(Animal Care and Use Committee)의 승인 하에, 국립 보건원(NIH)의 모든 법률, 규정 및 가이드라인에 따라 수행하였다. 음식과 물을 자유롭게 제공하였다. 모든 마우스의 임상 징후를 적어도 1일 1회 관찰하였다. Dulbecco 인산염 완충 식염수(Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) 중의 세포 200만 개를, 27게이지의 바늘과 주사기를 사용하여, 암컷 누드 마우스(6-7주령)의 앞다리 오른쪽 겨드랑이 바로 아래에 피하 접종하였다. 6일차에 평균적으로 종양 부담(tumor burden)이 100 mm³에 달했을 때, 모든 그룹에 대한 평균 종양 부담이 연구 모집단에 대한 전체 평균 종양 부담의 10% 이내가 되도록 마우스를 여러 개의 그룹으로 무작위 배정하였다. 6-14일차에 다음과 같이 군을 치료하였다: 비히클 대조군(경구 투여)(n=9); 화합물 2를 10 mg/kg BID로 경구 투여(n=9); 화합물 2를 5 mg/kg BID로 경구 투여. 종양 부피 및 체중을 주 3회 측정하였다. 종양 부담(mg)은 다음 공식에 의해 캘리퍼 측정치로 추정하였다: 종양 부담 (mg=mm³) = (길이 x 폭²)/2.

[0389] 도 15a에 나타낸 바와 같이, 화합물 2는 LoVo 결장 이중이식편 모델에서 종양 성장을 억제하였다. 화합물 2를 5 mg/kg BID로 투여한 후 22일차에, 평균 종양 성장 억제는 69%였다. 도 15b에서, 화합물 2는 HT-1080 섬유육종

이종이식편 모델의 종양 성장을 억제하였다. 화합물 2를 10 mg/kg BID로 투여한 후 14일차에, 평균 종양 성장 억제는 50%였다.

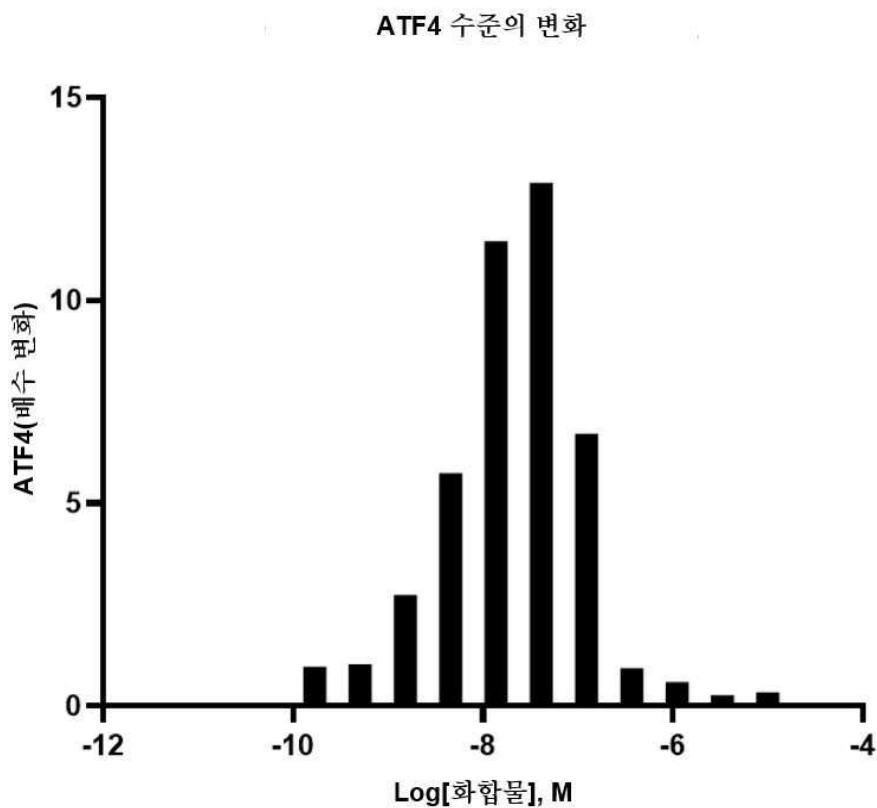
[0390] **균등물**

[0391] 특정 구현예가 논의되었지만, 전술한 명세서는 예시적인 것이며 제한적이지 않다. 본 명세서의 검토 시, 본 실시예의 많은 변형이 당업자에게 명백해질 것이다. 개시된 것의 전체 범위는, 균등물의 전체 범위와 함께 청구범위 및 이러한 변형과 함께 명세서를 참조하여 결정되어야 한다.

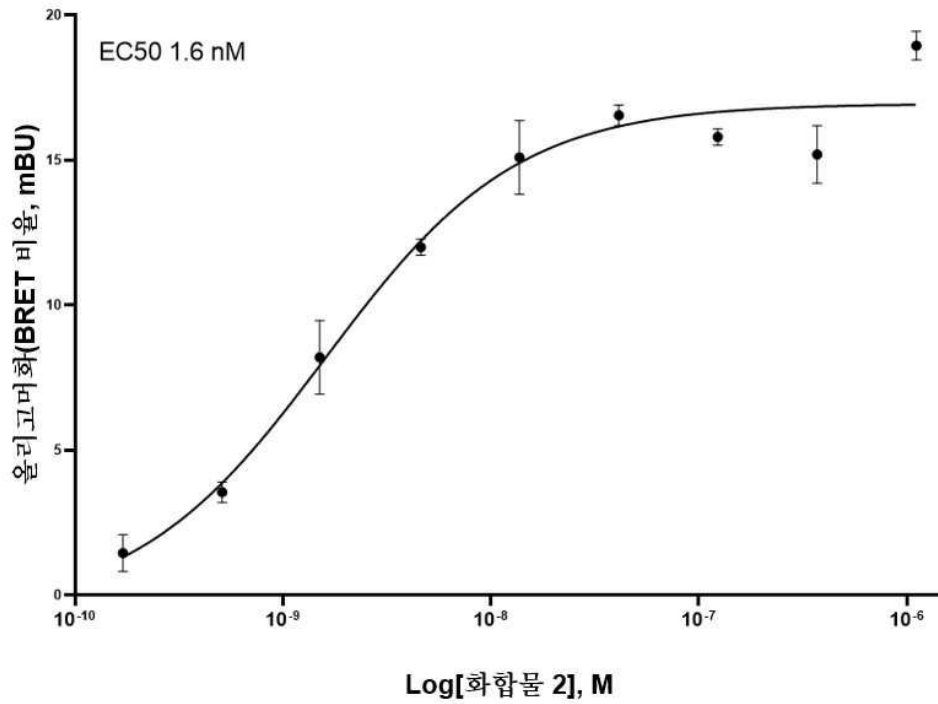
[0392] 달리 명시되지 않는 한, 본 명세서 및 청구항에 사용된 성분, 반응 조건 등의 양을 표현하는 모든 숫자는, 모든 경우에 대해 용어 "약"에 의해 변형된 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 반대로 명시되지 않는 한, 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 기재된 수치 파라미터는 얻고자 하는 목적하는 특성에 따라 달라질 수 있는 근사치이다.

도면

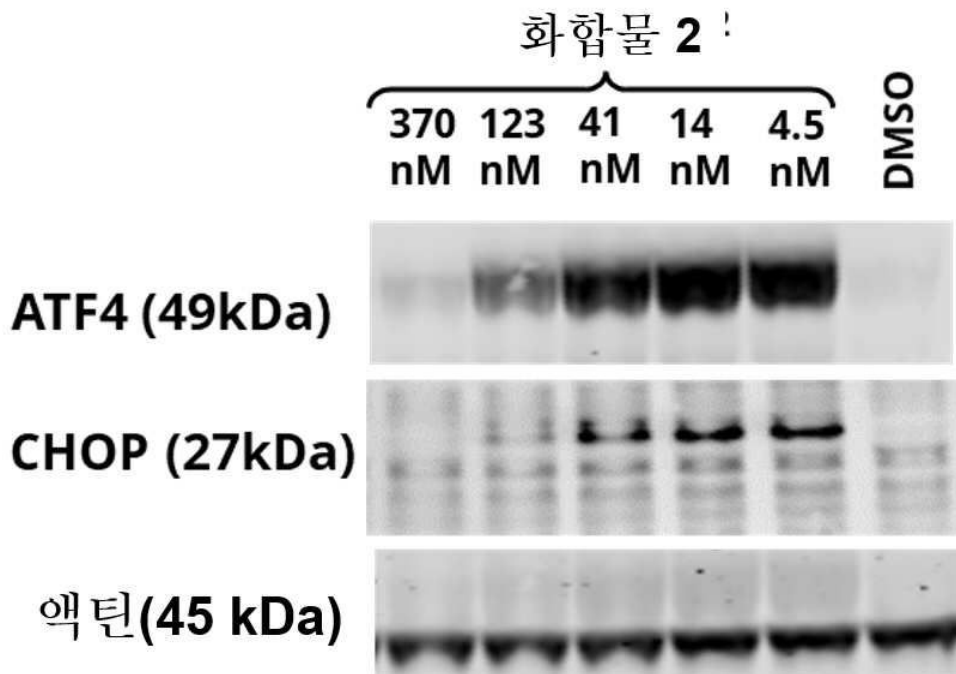
도면1



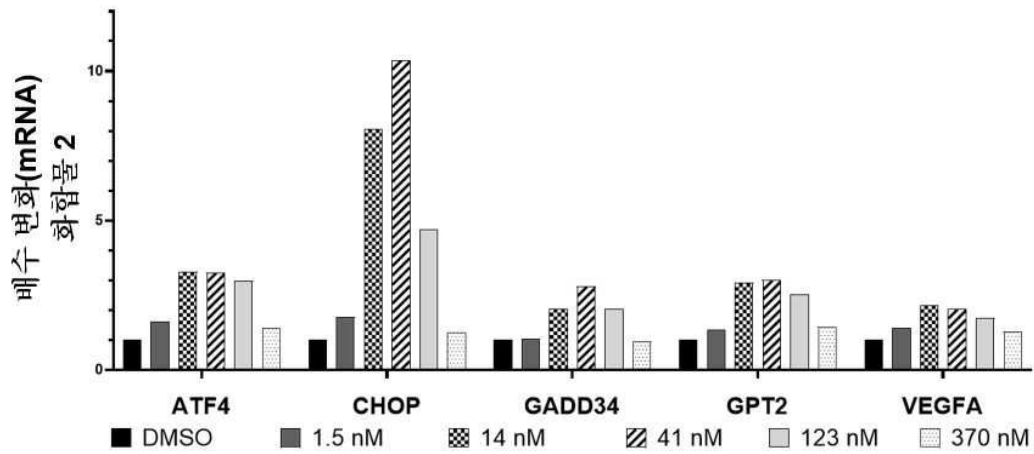
도면2



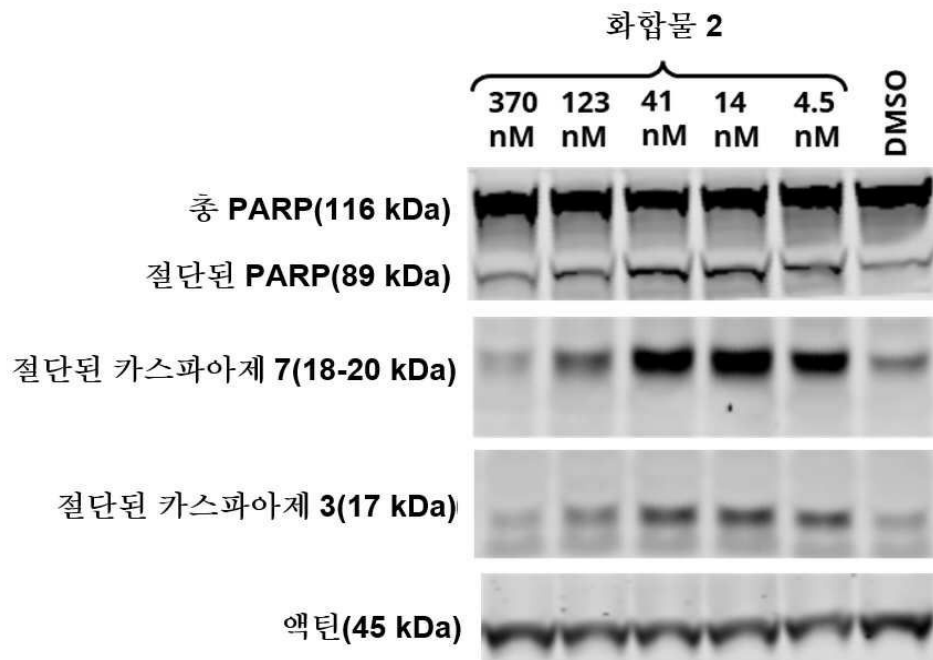
도면3



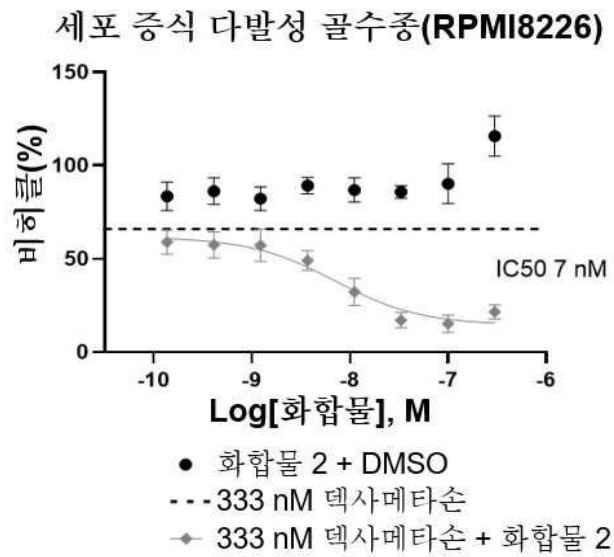
도면4



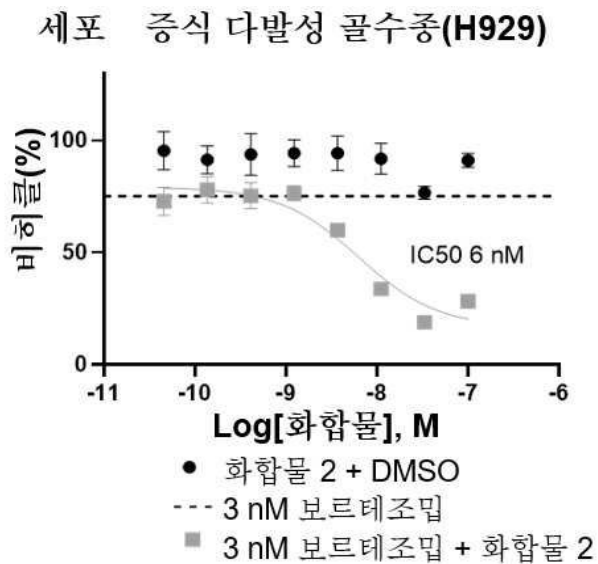
도면5



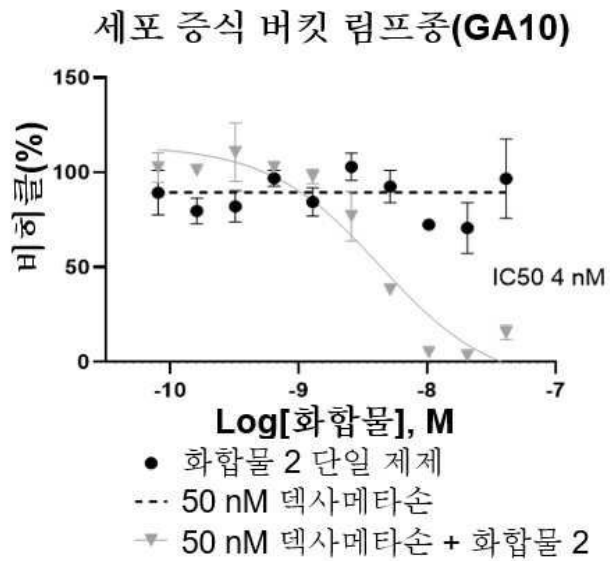
도면6a



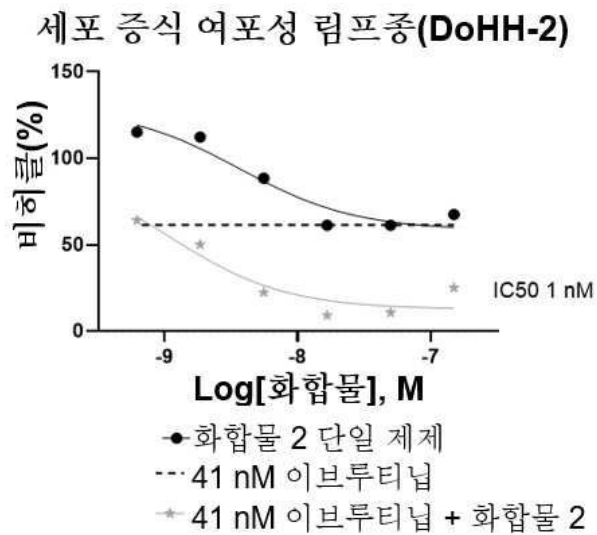
도면6b



도면6c

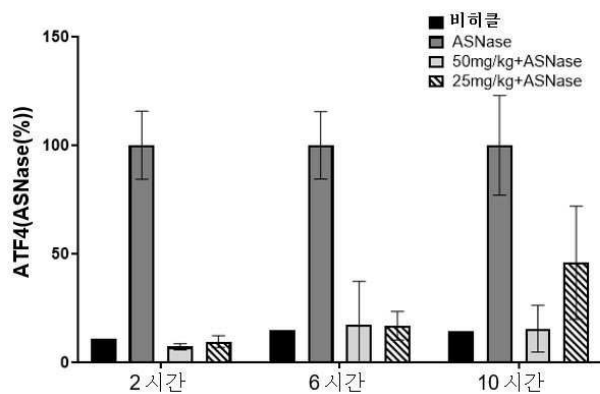


도면6d



도면7a

화합물 2 는 생체 내에서 ATF4 를 차단함(PK/PD 모델)

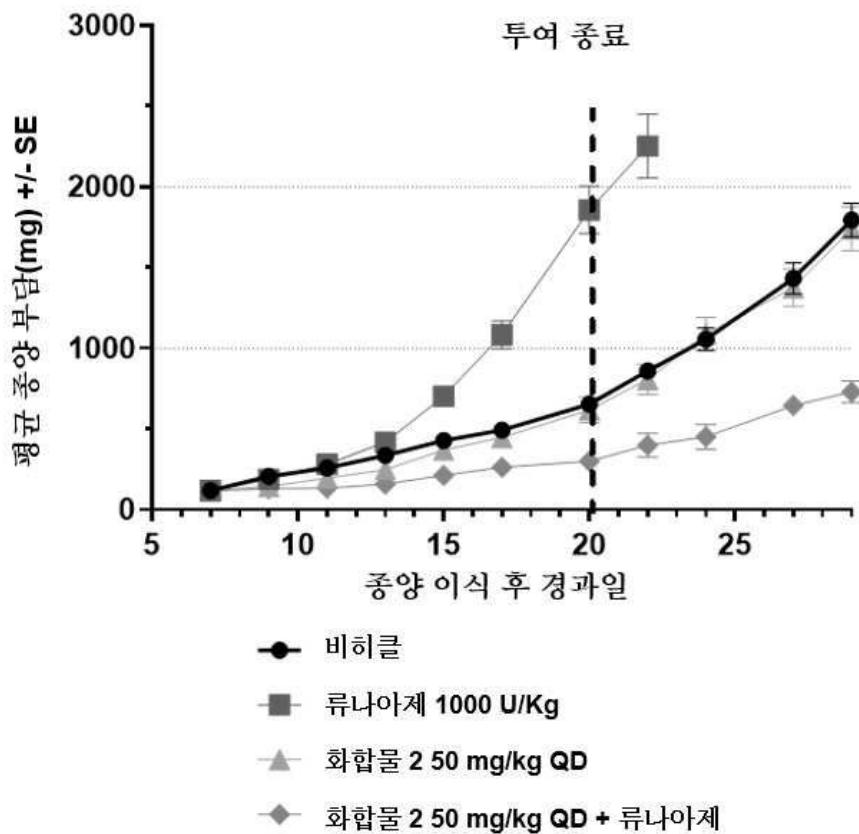


도면7b

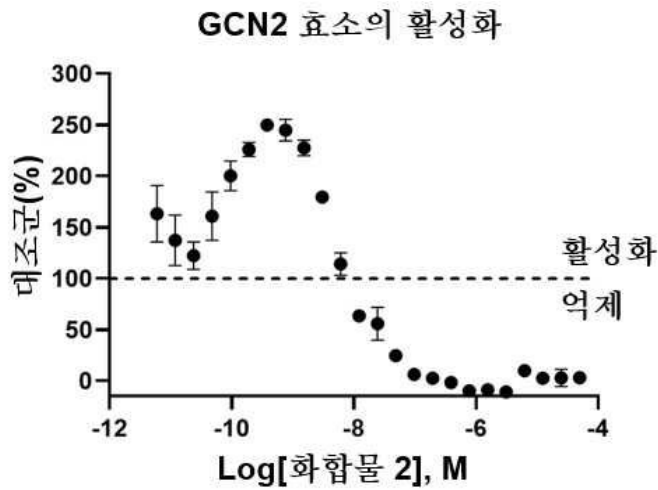
투여량 (mg/kg)	시점 (시간)	혈장 내 약물 수준(ng/ml)	ATF4 억제(%)
50	2	32603	88
50	6	28141	91
50	10	27880	87
25	2	11443	79
25	6	24759	93
25	10	2210	57

도면8

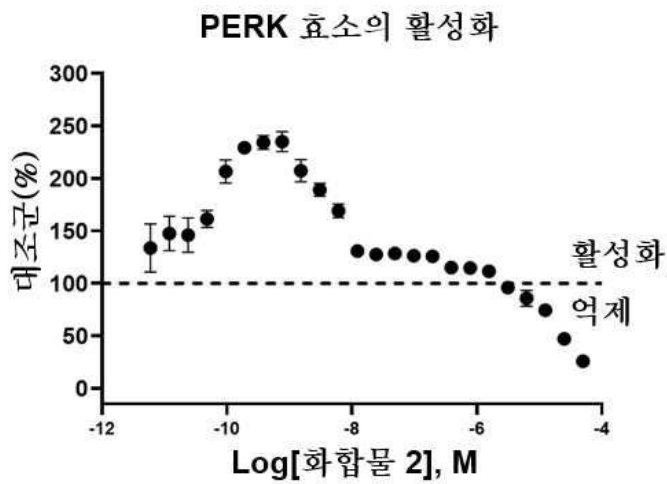
MV-4-11 종양 성장



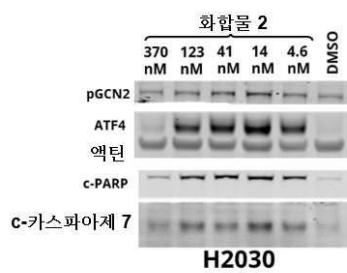
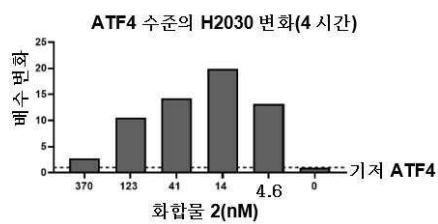
도면9a



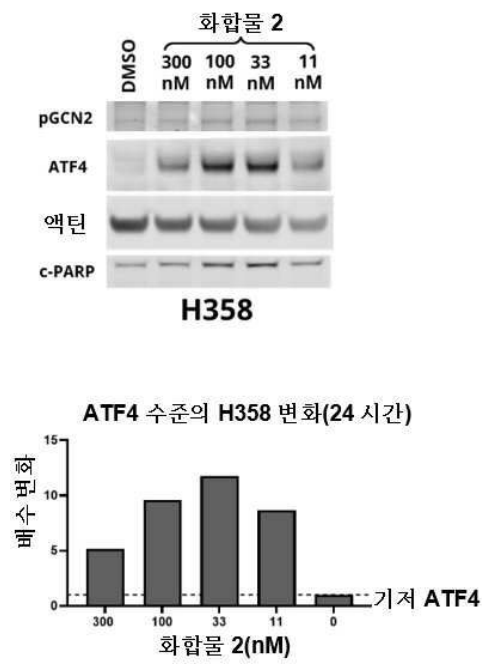
도면9b



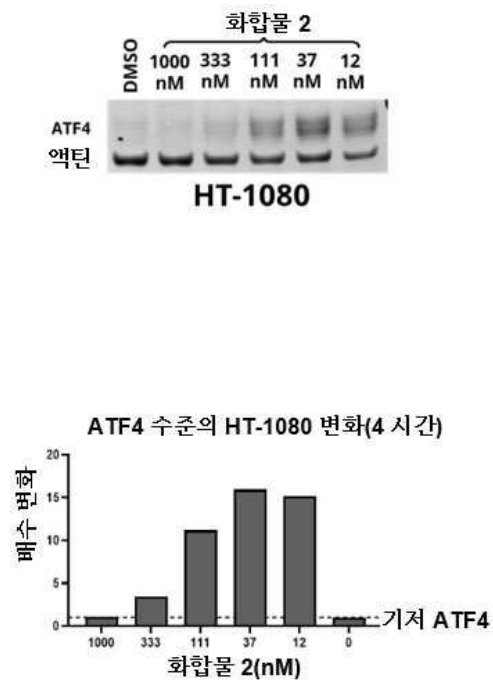
도면10a



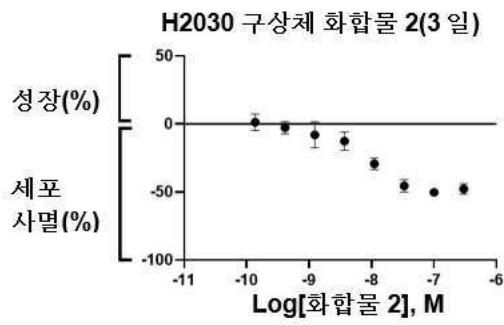
도면10b



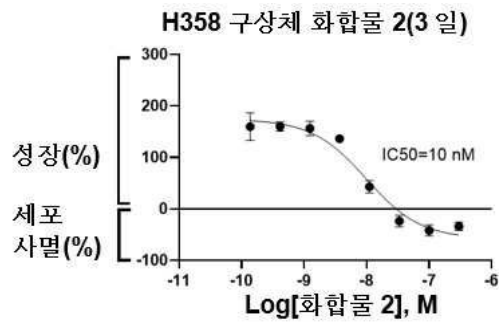
도면10c



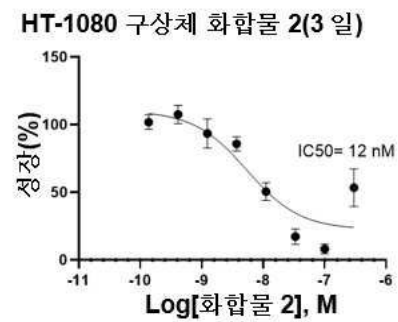
도면11a



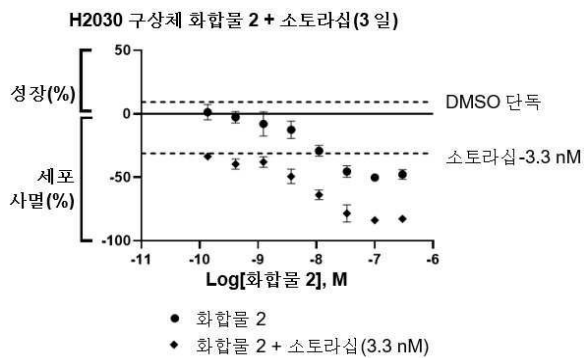
도면11b



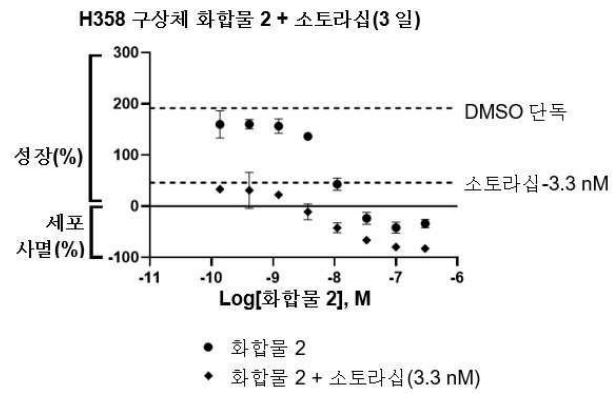
도면11c



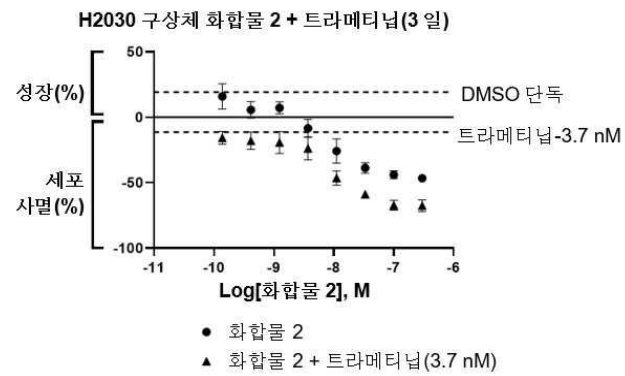
도면12a



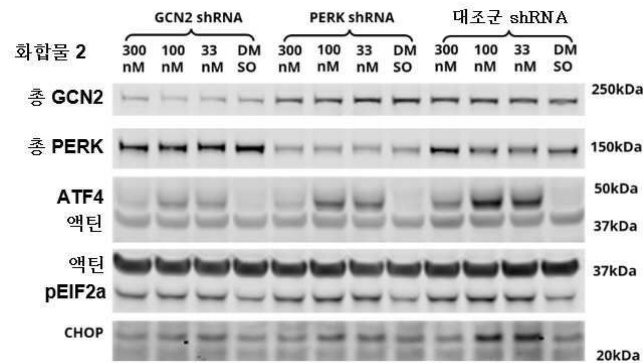
도면12b



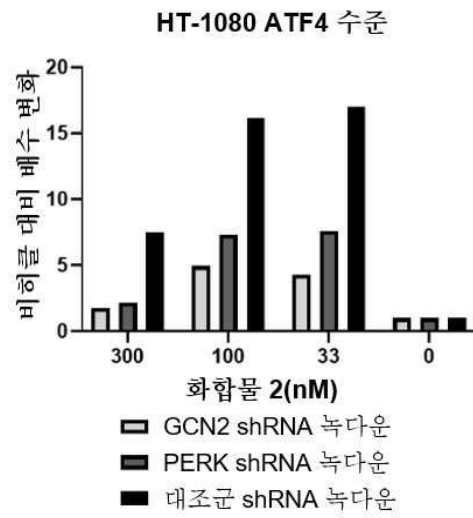
도면12c



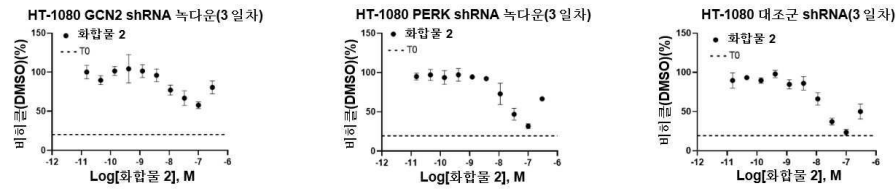
도면13a



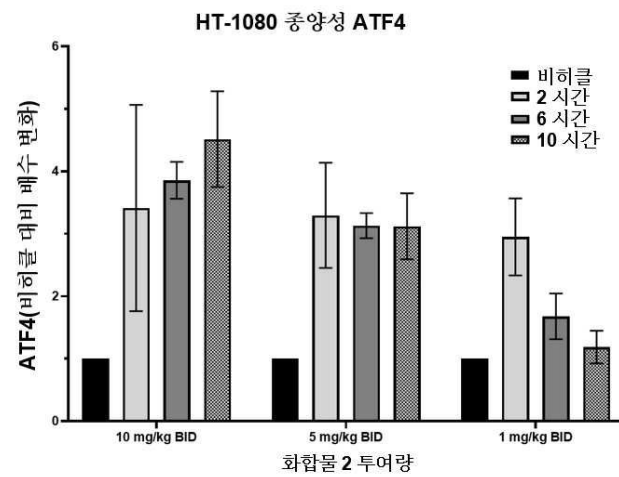
도면13b



도면13c



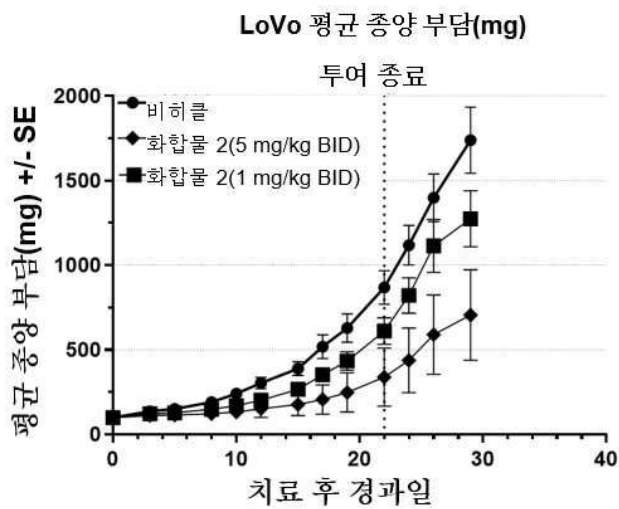
도면14a



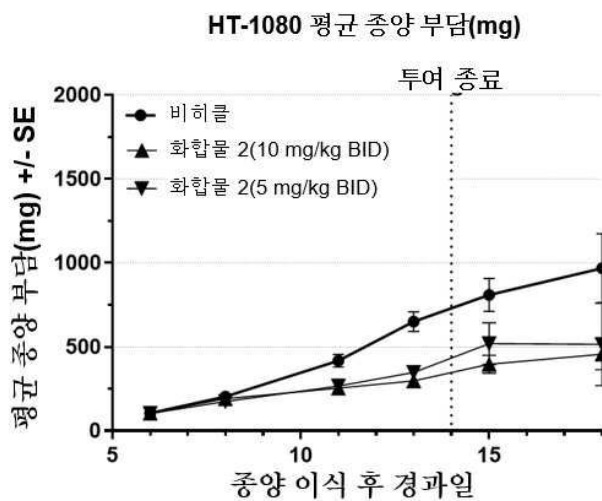
도면14b

투여량 (mg/kg)	시점(시간)	화합물 2 혈장 수준 (ng/ml)
10	2	12041
10	6	4797
10	10	2759
5	2	9497
5	6	842
5	10	470
1	2	812
1	6	362
1	10	199

도면15a



도면15b



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.