(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0142776
(43) 공개일자 2019년12월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C07D 487/04* (2006.01) *A61K 31/4375* (2006.01)
*A61K 31/47* (2006.01) *A61K 31/506* (2006.01)
*A61K 31/519* (2006.01) *A61K 35/30* (2015.01)
*A61K 9/00* (2006.01) *A61P 17/02* (2006.01)
*C12N 15/52* (2006.01) *C12N 15/864* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C07D 487/04* (2013.01)
*A61K 31/4375* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7034688
(22) 출원일자(국제) 2018년04월26일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년11월25일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2018/052919
(87) 국제공개번호 WO 2018/198077
국제공개일자 2018년11월01일
(30) 우선권주장
62/491,475 2017년04월28일 미국(US)
*(뒷면에 계속)*

(71) 출원인
**노파르티스 아게**
스위스 4002 바젤
(72) 발명자
**벤케, 디르크**
스위스 4002 바젤 포스트파호 노파르티스 파마 아게
**베렌슈테인, 프라다**
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 매사추세츠 애비뉴 250 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼 리서치, 인크.
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**양영준, 이상영**

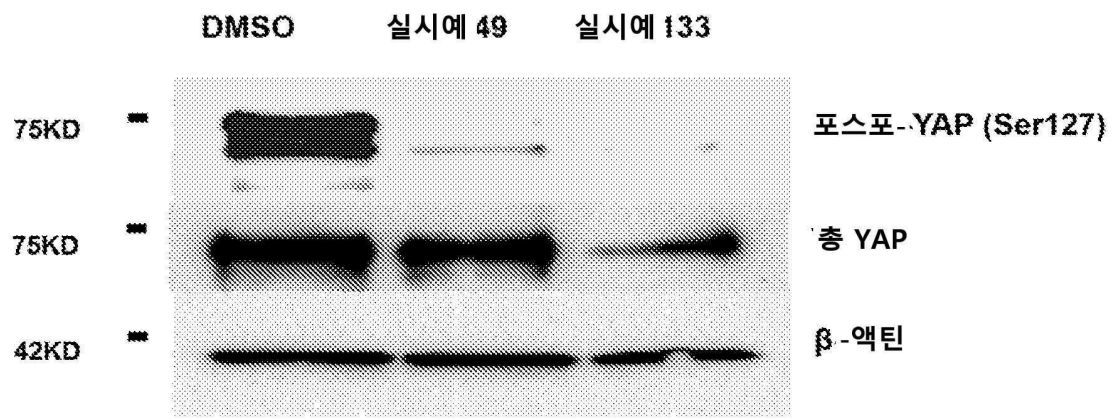
전체 청구항 수 : 총 314 항

(54) 발명의 명칭 **6-6 융합 바이사이클릭 헤테로아릴 화합물 및 LATS 억제제로서의 이의 용도**

## *(57) 요 약*

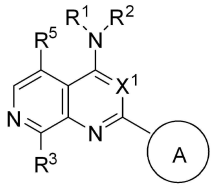
본 발명은 화학식 A2 또는 A1의 6-6 융합 바이사이클릭 헤테로아릴 화합물, 및 LATS 억제제로서의 이의 용도, 또
(뒷면에 계속)

*대 표 도* - 도1

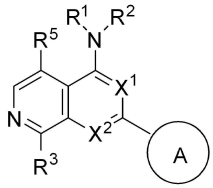


는 이의 염, 입체이성질체 또는 약학 조성물에 관한 것이며; 여기서 변수는 본원에 정의된 바와 같다.

[화학식 A2]



[화학식 A1]



본 발명은 추가로 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 염, 입체이성질체 또는 약학 조성물을 사용하는 세포 집단에서의 LATS 억제 방법에 관한 것이다. 본 발명은 본 발명의 화합물을 제조하는 방법, 및 이의 치료적 용도를 추가로 제공한다. 본 발명은 이의 제조에 대한 방법, 이의 의학적 사용에 대한 방법, 질병 또는 장애의 치료 및 관리에서 이의 용도를 추가로 제공한다.

(52) CPC특허분류
***A61K 31/47*** (2013.01)
***A61K 31/506*** (2013.01)
***A61K 31/519*** (2013.01)
***A61K 35/30*** (2013.01)
***A61K 9/0048*** (2013.01)
***A61P 17/02*** (2018.01)
***C12N 15/52*** (2013.01)
***C12N 15/8645*** (2013.01)
*C12N 2310/20* (2017.05)

(72) 발명자
**하오, 쉐시**
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 존 제이 홉킨스 드라이브 10675 노바티스 인스티튜트 포 평셔날 지노믹스, 인크.
**호프만, 티모시**
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 존 제이 홉킨스 드라이브 10675 노바티스 인스티튜트 포 평셔날 지노믹스, 인크.
**진, 치후이**
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 존 제이 홉킨스 드라이브 10675 노바티스 인스티튜트 포 평셔날 지노믹스, 인크.
**라코스테, 아르노**
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 매사추세츠 애비뉴 250 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼 리서치, 인크.
**리, 카메론**
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 매사추세츠 애비뉴 250 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼 리서치, 인크.
**리우, 준**
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 존 제이 홉킨스 드라이브 10675 노바티스 인스티튜트 포 평셔날 지노믹스, 인크.
**리우, 야후**
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 존 제이 홉킨스 드라이브 10675 노바티스 인스티튜트 포 평셔날 지노믹스, 인크.
**마이바움, 위르겐 클라우스**
스위스 4002 바젤 포스트파흐 노파르티스 파마 아게
**모, 팅팅**
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 존 제이 홉킨스 드라이브 10675 노바티스 인스티튜트 포 평셔날 지노믹스, 인크.
**판, 젠펑**
미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 존 제이 홉킨스 드라이브 10675 노바티스 인스티튜트 포 평셔날 지노믹스, 인크.
**취, 신**
미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 매사추세츠 애비뉴 250 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼 리서치, 인크.
**트호시, 얀**
스위스 4002 바젤 포스트파흐 노파르티스 파마 아게
**셰, 윈 펑**

(30) 우선권주장
62/491,484 2017년04월28일 미국(US)
62/491,526 2017년04월28일 미국(US)
62/491,573 2017년04월28일 미국(US)
62/650,232 2018년03월29일 미국(US)

미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 존 제이 홉킨스 드라이브 10675 노바티스 인스티튜트 포 펑셔날 지노믹스, 인크.

**옌, 산산**

미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 존 제이 홉킨스 드라이브 10675 노바티스 인스티튜트 포 펑셔날 지노믹스, 인크.

**저우, 예펀**

미국 92121 캘리포니아주 샌디에고 존 제이 홉킨스 드라이브 10675 노바티스 인스티튜트 포 펑셔날 지노믹스, 인크.

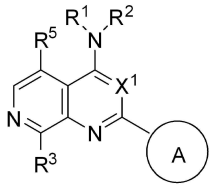
# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염, 또는 입체이성질체:

[화학식 A2]

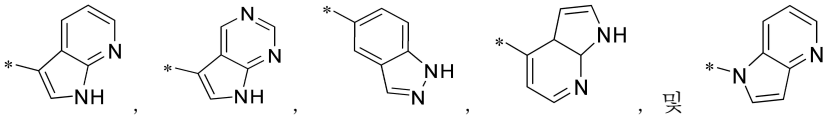


(식 중,

$X^1$은 CH 또는 N이며;

고리 A는

(a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

(b)  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

"*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고,

고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

$R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

$R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

$R^2$는

(a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

(i) 할로겐;

(ii) 시아노;

(iii) 옥소;

(iv) $C_2$알케닐;

(v) $C_2$알키닐;

(vi) $C_{1-6}$할로알킬;

(vii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

(viii) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

(ix) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

(x) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

(xi) 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

(xii) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

(xiii) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

(xiv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

(xv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

(b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

(c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

(d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

(e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

로부터 선택되거나;

단 $X^1$이 CH인 경우, $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

$R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

$R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환

되고;

단,

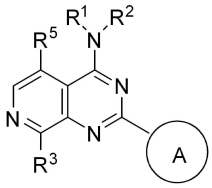
(1) $X^1$이 N이고, 고리 A가 4-피리미디닐 또는 3-플루오로-4-피리미디닐이고, $R^1$이 H 또는 메틸이고, $R^3$이 H 또는 Cl이고 $R^5$가 H인 경우; $R^2$는 $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노 또는 *t*-부틸-카바모일-아미노로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되며 선택적으로 비치환 페닐로 추가 치환되는 $C_{2-4}$알킬이 아니고;

(2) $X^1$이 N이고, 고리 A가 인다졸-5-일이고, $R^1$, $R^3$ 및 $R^5$가 H인 경우; $R^2$는 $-NH_2$로 치환되는 $C_4$알킬이 아니다).

**청구항 2**

제1항에 있어서, 화학식 I인 화합물:

[화학식 I]

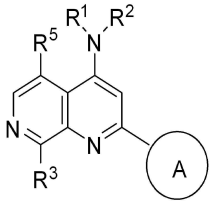


.

**청구항 3**

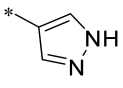
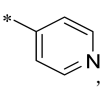
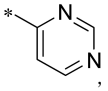
제1항에 있어서, 화학식 II인 화합물:

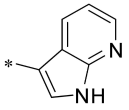
[화학식 II]



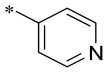
.

**청구항 4**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 고리 A가 각각 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $-NH_2$로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되는  , ,  ,  , 및 로부터 선택되거나;

비치환되거나 $C_{1-6}$알킬에 의해 치환된  인 화합물.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 고리 A가  인 화합물.

**청구항 6**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

$R^2$가

(a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 A1 내지 A3 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

(i) 시아노;

(ii) $C_2$알키닐;

(iii) $C_{1-6}$할로알킬;

(iv) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

(v) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

(vi) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$인 $-C(O)R^8$;

(vii) $-S(O)_2C_{1-4}$알킬;

(viii) 비치환되거나 C1-6알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬;

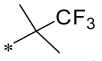
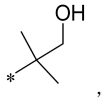
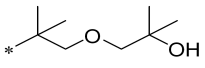
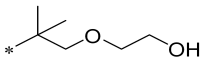
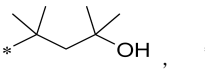
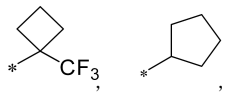
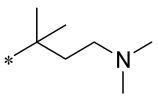
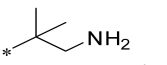
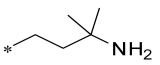
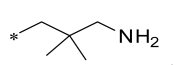
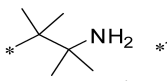
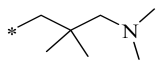
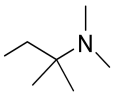
(ix) 고리 구성원으로서 N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하고 비치환되거나 C1-6알킬에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

(x) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐; 및

(b) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬

로부터 선택되는 화합물.

**청구항 7**

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, $R^2$가 n-프로필, 이소프로필, *t*-부틸, ,  ,  ,  ,  ,  , , ,  , , ,  ,  ,  ,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 화합물.

**청구항 8**

제1항 및 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

$X^1$이 CH이며;

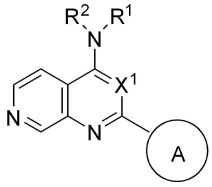
$R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N 및 O로부터 선택되는 추가적인 헤테로원자가

포함될 수 있는 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성하고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 하이드록실, $C_{1-6}$알킬 및 $C_{1-6}$할로알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3 개의 치환기에 의해 치환되는 화합물.

**청구항 9**

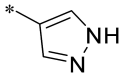
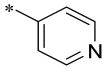
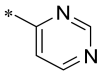
제1항에 있어서, 화학식 A3의 화합물:

[화학식 A3]



(식 중,

$X^1$은 CH 또는 N이며;

고리 A는  ,  또는  이고, 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $-NH_2$로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되고;

$R^1$은 수소 또는 비치환 $C_{1-6}$알킬이고;

$R^2$는

(a) 비치환되거나 하기로부터 선택되는 1개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬이거나

(i) $C_{1-4}$할로알킬; 및

(ii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소 및 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

(b) 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬 또는 $C_{1-6}$할로알킬 및 $R^0$에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬이다).

**청구항 10**

제1항에 있어서, N-(2-사이클로프로필프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N,N-디에틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-에틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메톡시-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-메톡시-2-메틸부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-부틸-N-메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-에틸-N-메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)에탄-1-올; 2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올; N-에틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-사이클로헥실프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(3-메틸옥세탄-3-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-2-올; N-부틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸-4-펜닐부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-사이클로프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-메탄설포닐-2-메틸부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피

리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1,3-디올; 3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-2-올; 2-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)아세트산; (1R,2S)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜탄-1-올; 4,4,4-트리플루오로-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-1-올; N-(1-메탄설포닐-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (2S)-3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판산; 2-[(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로필)아미노]아세트산; (2R)-3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판산; 메틸 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로파노에이트; (1S,2S)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜탄-1-올; 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판산; 2-(2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}에톡시)에탄-1-올; 2-(하이드록시메틸)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1,3-디올; 3-메틸-3-(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄아미도)부탄산; 2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-3-페닐프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-{[4-(디메틸아미노)옥산-4-일]메틸}-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄산; N-(2-메탄설포닐에틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-[2-(아다만탄-1-일)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-N-[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]프로판아미드; 4,4,4-트리플루오로-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄산; N-[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]프로판-2-설폰아미드; 2-(피리딘-4-일)-N-[3-(1H-1,2,3,4-테트라졸-5-일)프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2R)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2,4-디메틸-4-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올; 4,4,4-트리플루오로-2,3-디메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-2-올; (1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜틸)메탄올; N-(3-메톡시사이클로부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (1R,2R)-1-N,2-N-디메틸-1-N-[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]사이클로헥산-1,2-디아민; 메틸 (1s,3s)-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-카복실레이트; 에틸 1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-카복실레이트; 1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-카복실산; (1s,3s)-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-카복실산; 2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-1-올; 2-(피리딘-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로부틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(피리딘-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-사이클로펜틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1-올; 3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1-올; N-(부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸부트-3-인-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (1r,3s)-3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-올; 2,3-디메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-2-올; 2-(피리딘-4-일)-N-(2,4,4-트리메틸펜탄-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(펜탄-3-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-[2-메틸-1-(모르폴린-4-일)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-[1-(tert-부톡시)-2-메틸프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4,4,4-트리플루오로-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-1-올; N-펜틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-1-올; N-[1-(1H-인돌-3-일)-2-메틸프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-[1-(4-플루오로페닐)-2-메틸프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-페닐프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-플루오로페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-[2-(4-플루오로페닐)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판산; 2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}에탄-1-올; N-메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 1-({[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}메틸)사이클로펜탄-1-올; N,N-디메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-메틸페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도

[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-메톡시페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-페닐-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(3-메틸페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 6-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}헥산산; N-(3-플루오로페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-플루오로페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄산; N-(1-페닐에틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; tert-부틸 N-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로필)카바메이트;

(1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부틸)메탄올; 메틸 2-(1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로프로필)아세테이트; N-(2-메틸프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄니트릴; N-(6-아미노헥실)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-아미노부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판니트릴; N-[2-메틸-1-(2-메틸피페리딘-1-일)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 디메틸(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부틸)아민; N-(1-아미노-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-사이클로펜틸-2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-[4-(tert-부틸아미노)피리도[3,4-d]피리미딘-2-일]피리딘-2-아민; 2-[1-(벤젠설포닐)-2-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일]-N-tert-부틸피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-{2-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(3-클로로피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(3-메틸피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(2-메틸부탄-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2,4-디메틸-4-({2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-일}아미노)펜탄-2-올; N-에틸-2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-(프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-1-[2-메틸-2-({2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-일}아미노)프로폭시]프로판-2-올; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-메틸-N-(프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-에틸-2-(3-메틸피리딘-4-일)-N-(프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(1-메톡시-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{[2-(3-클로로피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}-2,4-디메틸펜탄-2-올; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-사이클로펜틸피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 1-(2-{[2-(3-클로로피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}-2-메틸프로폭시)-2-메틸프로판-2-올; N-메틸-2-(3-메틸피리딘-4-일)-N-(프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(4-메탄설포닐-2-메틸부탄-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-[3-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-[2-클로로-5-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-[3-(1H-1,2,3,4-테트라졸-5-일)프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-메틸-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-메틸-N-[(2R)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{4-[(1-메틸사이클로프로필)아미노]피리도[3,4-d]피리미딘-2-일}피리딘-2-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2,4-디메틸-4-{[2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올; 4-{4-[(1-메틸사이클로프로필)아미노]피리도[3,4-d]피리미딘-2-일}피리딘-3-카보니트릴; 2-{2-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1H-인다졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3,5-디메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)-2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{4-[(4-하이드록시-2,4-디메틸펜탄-2-일)아미노]피리도[3,4-d]피리미딘-2-일}피리딘-3-카보니트릴; 2-(3,5-디플루오로피리딘-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(2,3-디플루오로피리딘-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1,3-티아졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-[2-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{4-[(1-메틸사이클로프로필)아미노]피리도[3,4-d]피리미딘-2-일}피리딘-2-카보니트릴; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1,2-옥사졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(디메틸-1,2-옥사졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-{1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-

프로필-2-{1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-{1H-피롤로[3,2-b]피리딘-1-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로부틸)-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리미딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{[2-(3,5-디메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}-2,4-디메틸펜탄-2-올; N-프로필-2-{7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-5-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-사이클로프로필-1H-피라졸-4-일)-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸피리딘-4-일)-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-{1-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2,4-디메틸-4-{[2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올; N-[(1R)-1-페닐에틸]-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(5-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-[(1R)-1-페닐에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-[(1R)-1-페닐에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-에틸-1H-피라졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리다진-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1,3-옥사졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1H-피라졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1H-이미다졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-메틸-1H-이미다졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-{1H-피롤로[3,2-b]피리딘-1-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1H-1,2,3-트리아졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸-1,2-옥사졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(2H-1,2,3,4-테트라졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1H-피라졸-4-일)-N-[1-(피리딘-4-일)에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (1-{[2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부틸)메탄올; 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로부틸)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (1-{[2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부틸)메탄올; 2-(1H-피라졸-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-[1-(피리딘-4-일)에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (1-{[2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부틸)메탄올; (1-{[2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로프로필)메탄올; 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-[1-(피리딘-4-일)에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-에틸-1H-피라졸-4-일)-N-(2-메틸프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-아미노-2-메틸프로판-2-일)-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 8-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 8-메틸-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-5-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 5-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(2-{[4-(tert-부틸아미노)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-5-일]아미노}에톡시)에탄-1-올; N-(4-메톡시-2-메틸부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-[2-메틸-1-(프로판-2-일옥시)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-[(2S)-부탄-2-일]-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-[(2R)-부탄-2-일]-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-(1-메톡시-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-메틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}부탄-1-올; N-tert-부틸-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2,2-디메틸-1-[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]피페리딘-4-올; 2,4-디메틸-4-{[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}펜탄-2-올; N-사이클로펜틸-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 디메틸(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}부틸)아민; N,N-디에틸-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올; N-프로필-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(2-아미노피리미딘-4-일)-N-tert-부틸-1,7-나프티리딘-4-아민; N-tert-부틸-2-{1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일}-1,7-나프티리딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(피리다진-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(2-아미노피리딘-4-일)-N-tert-부틸-1,7-나프티리딘-4-아민; N,N-디에틸-2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; (3-{[2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}-3-메틸부틸)디메

틸아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-메틸-N-(프로판-2-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-4-(피페리딘-1-일)-1,7-나프티리딘; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-4-(모르폴린-4-일)-1,7-나프티리딘; N-tert-부틸-2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-(2-메틸부탄-2-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-{[2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}-2-메틸프로판-1-올; 1-[2-(3-클로로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]-2,2-디메틸피페리딘-4-올; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-[2-메틸-1-(모르폴린-4-일)프로판-2-일]-1,7-나프티리딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(3-클로로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-((1R,2S)-2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (S)-N-(sec-부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-((1S,2R)-2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

(R)-N-(sec-부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-((1S,2S)-2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-((1R,2R)-2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-(4-메틸피페라진-1-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘; 4-(피페라진-1-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘; 4-(2-메틸피페리딘-1-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘; 2-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로부틸)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-메틸-N1-(2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)프로판-1,2-디아민; N-(옥세탄-3-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 4-(3,3-디메틸피페라진-1-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘; 2,2-디메틸-4-(2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)모르폴린; N-(1-메틸사이클로부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2,2-디메틸-N1-(2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)프로판-1,3-디아민; $N^2$,$N^2$,2-트리메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)프로판-1,2-디아민; 4-(2-메틸피페라진-1-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘; 2-메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)프로판-1,3-디아민; (*R*)-2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)-1,7-나프티리딘; N-(tert-부틸)-N-메틸-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; *N*-(1-메틸사이클로부틸)-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(피리미딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민;

$N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민; *tert*-부틸 (2-메틸-1-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로판-2-일)카바메이트; *tert*-부틸 (2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)에틸)카바메이트; 2-메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,2-디아민; $N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)에탄-1,2-디아민; *N*,*N*,2-트리메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로판아미드; $N^1$,3-디메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민; *tert*-부틸 (2,2-디메틸-3-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로필)카바메이트; 2,2-디메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민; 3-메틸-3-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)부탄아미드; (*R*)-2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘; 2,3-디메틸-$N^2$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-2,3-디아민; (*S*)-2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘; 에틸 2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로파노에이트; $N^1$,$N^1$,2,2-테트라메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민; 4-(4-(tert-부틸아미노)피리도[3,4-*d*]피리미딘-2-일)-1,2,5-옥사디아졸-3-아민; $N^2$,$N^2$,2-트리메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,2-디아민; 2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로판아미드; (*S*)-1,1,1-트리플루오로-2-메틸-3-((2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)아미노)프로판-2-올; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N,N-디에틸-1,7-나프티리딘-4-아민; N-프로필-2-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; *tert*-부틸 (3-메틸-3-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)부틸)카바메이트; $N^1$,$N^1$,$N^3$,2,2-펜타메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민; $N^1$,$N^1$-디에틸-3-메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민;

$N^3$-(2-(2-플루오로피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)-$N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민; $N^3$-(2-(3,5-디메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)-$N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민; $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민;

$N^3$-(2-(2-아미노피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)-$N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민; 및 3-메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민으로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

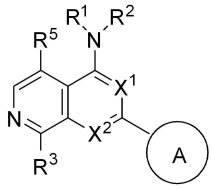
**청구항 11**

활성 성분으로 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 화합물 및 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 12**

화학식 A1의 화합물 또는 이의 염을 사용하는 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단에서의 LATS 억제 방법:

[화학식 A1]

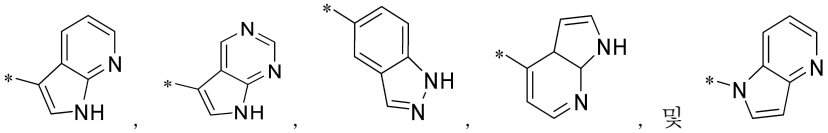


(식 중,

$X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

고리 A는

(a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

(b)  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

"*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

$R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

$R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

$R^2$는

(a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

(i) 할로겐;

(ii) 시아노;

(iii) 옥소;

(iv) $C_2$알케닐;

(v) $C_2$알키닐;

(vi) $C_{1-6}$할로알킬;

(vii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

(viii) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

(ix) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

(x) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

(xi) 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

(xii) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

(xiii) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

(xiv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

(xv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

(b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

(c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

(d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

(e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

로부터 선택되거나;

$R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

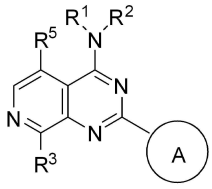
$R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

$R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

**청구항 13**

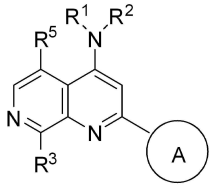
제12항에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 LATS 억제 방법:

[화학식 I]



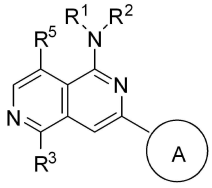
,

[화학식 II]



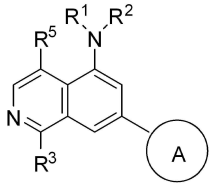
,

[화학식 III]



, 및

[화학식 IV]



.

**청구항 14**

제12항 또는 제13항에 있어서, 화합물 또는 이의 염이 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘; N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는, 세포 집단에서의 LATS 억제 방법.

**청구항 15**

제12항에 있어서, 화합물 또는 이의 염이 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따르는 LATS 억제 방법.

**청구항 16**

LATS 억제제의 존재 하에 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단을 배양하는 단계를 포함하는 세포를 배양하는 방법.

**청구항 17**

제16항에 있어서, LATS 억제제가 제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인, 세포를 배양하는 방법.

**청구항 18**

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염의 존재 하에 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단을 배양하는 단계를 포함하는 세포를 배양하는 방법.

**청구항 19**

LATS 억제제의 존재 하에 각막 내피 세포를 포함하는 접종 세포 집단을 배양하여 각막 내피 세포를 포함하는 증식된 세포 집단을 생성하는 단계 a)를 포함하는 세포 집단의 증식 방법.

**청구항 20**

제19항에 있어서, LATS 억제제가 제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인, 세포 집단의 증식 방법.

**청구항 21**

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염의 존재 하에 각막 내피 세포를 포함하는 접종 세포 집단을 배양하여 각막 내피 세포를 포함하는 증식된 세포 집단을 생성하는 단계 a)를 포함하는, 세포 집단의 증식 방법.

**청구항 22**

제12항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물이 0.5 내지 100마이크로몰 농도, 바람직하게는 0.5 내지 25마이크로몰 농도, 보다 바람직하게는 1 내지 20마이크로몰 농도, 특히 바람직하게는 약 3 내지 10마이크로몰 농도로 존재하는 방법.

**청구항 23**

제12항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 단계 a)에서 화합물이 1 내지 2주 동안 존재하며 이후 세포가 상기 화합물의 보충 없이 성장 배지에서 일정 기간 동안 배양되는 단계 b)가 수행되며, 바람직하게는 이 기간은 1 내지 2주인 방법.

**청구항 24**

제19항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 접종 세포량의 10배 초과 증식을 생성하는 방법.

**청구항 25**

제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 접종 세포량의 15배 내지 600배, 바람직하게는 20배 내지 550배 증식을 생성하는 방법.

**청구항 26**

제12항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, LATS 억제제가 LATS1 및 LATS2를 억제하는 방법.

**청구항 27**

제12항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 각막 내피 세포를 유전적으로 변형하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 상기 유전적 변형이 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자의 발현 및/또는 기능

을 감소시키거나 제거하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 29**

제27항 또는 제28항에 있어서, 상기 유전적 변형이 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자를 특이적으로 표적화하는 유전자 편집 시스템을 상기 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 상기 유전자 편집 시스템이 CRISPR 유전자 편집 시스템, TALEN 유전자 편집 시스템, 아연 핑거 뉴클레아제 유전자 편집 시스템, 메가뉴클레아제 유전자 편집 시스템, AAV 벡터 유도 상동성 재조합 및 렌티바이러스 벡터-기반 게놈 편집 기술로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 31**

제28항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자가 B2M, HLA-A, HLA-B 및 HLA-C로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 32**

제12항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 증식된 세포 집단의 생성 후 이들 세포를 헹구어 화합물을 실질적으로 제거하는 추가 단계를 포함하는 방법.

**청구항 33**

제12항 내지 제32항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득 가능한 세포 집단.

**청구항 34**

제12항 내지 제32항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득되는 세포 집단.

**청구항 35**

각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단 또는 제33항 또는 제34항의 세포 집단으로서, 하나 이상의 상기 세포가 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자의 하나 이상의 핵산 잔기의 비-자연 발생 삽입 또는 결실을 포함하고, 삽입 및/또는 결실은 상기 유전자의 발현 또는 기능의 감소 또는 제거를 일으키는 세포 집단.

**청구항 36**

제35항에 있어서, 상기 유전자가 B2M, HLA-A, HLA-B 및 HLA-C로 구성되는 군으로부터 선택되는 세포 집단.

**청구항 37**

제35항 또는 제36항에 있어서, 상기 유전자가 B2M인 세포 집단.

**청구항 38**

LATS 억제제를 포함하는 각막 내피 세포의 성장 촉진제.

**청구항 39**

제38항에 있어서, LATS 억제제가 제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인, 각막 내피 세포의 성장 촉진제.

**청구항 40**

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염을 포함하는 각막 내피 세포의 성장 촉진제.

**청구항 41**

LATS 억제제 및 성장 배지를 포함하는 세포 증식 배지.

**청구항 42**

제41항에 있어서, LATS 억제제가 제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인 세포 증식 배지.

**청구항 43**

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염 및 성장 배지를 포함하는 세포 증식 배지.

**청구항 44**

제41항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 성장 배지가 우태 혈청이 보충된 둘베코 변형 이글 배지, 인간 혈청이 보충된 인간 내피 무혈청 배지, X-VIVO15 배지 및 중간엽 줄기 세포-컨디셔닝된 배지로 구성되는 군으로부터 선택되며; 바람직하게는 X-VIVO15 배지인, 세포 증식 배지.

**청구항 45**

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 각막 내피 세포를 추가로 포함하는 세포 증식 배지.

**청구항 46**

LATS 억제제 및 각막 내피 세포를 포함하는 세포 제조물.

**청구항 47**

제46항에 있어서, LATS 억제제가 제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인, 세포 제조물.

**청구항 48**

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염 및 각막 내피 세포를 포함하는 세포 제조물.

**청구항 49**

제46항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 성장 배지를 추가로 포함하며, 성장 배지는 우태 혈청이 보충된 둘베코 변형 이글 배지, 인간 혈청이 보충된 인간 내피 무혈청 배지, X-VIVO15 배지 및 중간엽 줄기 세포-컨디셔닝된 배지로 구성되는 군으로부터 선택되며; 바람직하게는 X-VIVO15 배지인, 세포 제조물.

**청구항 50**

제11항 또는 제46항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 보존 또는 냉동보존 용액을 추가로 포함하는 약학 조성물 또는 세포 제조물.

**청구항 51**

제50항에 있어서, 보존 또는 냉동보존 용액이 Optisol 또는 PBS인 용액을 포함하며 냉동보존 용액이 글리세롤, 디메틸 설폭시드, 프로필렌 글리콜 또는 아세트아미드를 추가로 포함하는 약학 조성물 또는 세포 제조물.

**청구항 52**

눈 전달에 적합한 조성물 및 LATS 억제제를 포함하는 키트.

**청구항 53**

제52항에 있어서, LATS 억제제가 제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인 키트.

**청구항 54**

눈 전달에 적합한 조성물 및 제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염을 포함하는 키트.

**청구항 55**

제52항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 전달에 적합한 조성물이 국소화 제제 또는 국소 점안제인 키트.

**청구항 56**

제52항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 각막 내피 세포를 추가로 포함하는 키트.

**청구항 57**

제33항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단 또는 제46항 내지 제51항 중 어느 한 항에 따른 세포 제조물 및 국소화 제제인 눈 전달에 적합한 조성물을 포함하는 세포 전달 제조물.

**청구항 58**

제52항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 전달에 적합한 조성물이 바이오매트릭스인 국소화 제제인 키트 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 59**

제52항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 전달에 적합한 조성물이 피브린, 콜라겐, 젤라틴, 셀룰로스, 양막, 피브린 아교, 폴리에틸렌(글리콜) 디아크릴레이트(PEGDA), GelMA, 히알루론산, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 옥시드, 폴리프로필렌 옥시드, 폴록사머, 폴리비닐 알코올, 폴리아크릴산, 폴리메타크릴산, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리(락티드-코-글리콜리드), 알기네이트, 젤라틴, 콜라겐, 피브리노겐, 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 하이드록시에틸셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 하이드록시프로필-구아, 겔란 검, 구아 검, 잔탄 검 및 카복시메틸셀룰로스뿐만 아니라 이의 유도체, 이의 공중합체, 및 이의 조합 중 하나 이상을 포함하는 중합체, 가교-중합체, 또는 하이드로겔을 포함하는 국소화 제제로 구성되는 군으로부터 선택되는 국소화 제제인 키트 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 60**

제52항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 전달에 적합한 조성물이 GelMa인 국소화 제제인 키트 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 61**

제52항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 각막 내피 세포가 국소화 제제와의 조합으로 존재하며 각막 내피 세포가 단층으로 존재하는 키트 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 62**

제52항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 각막 내피 세포가 국소화 제제와의 조합으로 ㎟(면적) 당 500개 초과 세포의 밀도로 존재하는 키트 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 63**

제54항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 각막 내피 세포가 국소화 제제와의 조합으로 1,000 내지 3,500 세포/㎟(면적), 바람직하게는 2,000 내지 약 3,000 세포/㎟(면적)의 밀도로 존재하는 키트 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 64**

제11항 또는 제38항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 0.5 내지 100마이크로몰 농도, 바람직하게는 0.5 내지 25마이크로몰 농도, 보다 바람직하게는 1 내지 20마이크로몰 농도, 특히 바람직하게는 약 3 내지 10마이크로몰 농도로 존재하는 약학 조성물, 성장 촉진제, 세포 증식 배지, 세포 제조물 또는 키트.

**청구항 65**

제33항 내지 제37항, 제46항 내지 제51항, 또는 제57항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 단지 미량 수준으로 존재하는 세포 집단 또는 세포 제조물, 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 66**

제38항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, LATS 억제제가 LATS1 및 LATS2를 억제하는 성장 촉진제, 세포 증식 배지, 세포 제조물, 또는 세포 전달 제조물 또는 키트.

**청구항 67**

제41항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서 각막 내피 세포가 존재하고 현탁액 중에 있는 세포 증식 배지, 세포 제조물, 세포 전달 제조물 또는 키트.

**청구항 68**

대상체의 각막 상으로 각막 내피 세포 집단을 이식하는 방법으로서, 제33항 내지 제37항 또는 제65항 중 어느 한 항의 세포 집단 또는 제57항 내지 제63항 또는 제65항 중 어느 한 항의 세포 전달 제조물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 69**

대상체의 각막 상으로 각막 내피 세포 집단을 이식하는 방법으로서, 상기 집단을 제41항 내지 제44항, 제65항 또는 제66항 중 어느 한 항에 따른 세포 증식 배지로 배양하여 각막 내피 세포 집단을 증식시키는 단계, 증식된 세포 집단을 헹구어 LATS 억제제를 실질적으로 제거하는 단계, 및 상기 세포를 상기 대상체의 각막 상으로 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 70**

제69항에 있어서, 단리된 상기 각막 내피 세포가 상기 투여 전에 바이오매트릭스와 조합되는 방법.

**청구항 71**

제70항에 있어서, 상기 단리된 각막 내피 세포가 상기 투여 전에 GelMA인 바이오매트릭스와 조합되는 방법.

**청구항 72**

LATS 억제제를 포함하는 세포 증식 배지에서 각막 내피 세포 집단을 배양하는 단계, 각막 내피 세포를 바이오매트릭스와 조합하여 세포/바이오매트릭스 혼합물을 형성하는 단계, 혼합물을 대상체의 눈 내로 주사하는 단계, 및 광원을 사용하여 각막 상으로 세포를 가이드하고 고정함으로써 눈 내에 세포를 바이오프린트하는 단계를 포함하는, 대상체의 눈에 각막 내피 세포 집단을 이식하는 방법.

**청구항 73**

제70항 또는 제71항에 있어서, 상기 단리된 각막 내피 세포가 GelMA인 바이오매트릭스와 조합되고 광 유발 반응에 의해 GelMA를 중합하여 눈 표면 상에 바이오프린트되는 방법.

**청구항 74**

LATS 억제제를 사용하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 75**

제74항에 있어서, LATS 억제제가 제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인 방법.

**청구항 76**

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에

서 정의되는 화합물 또는 이의 염을 사용하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 77**

제74항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단에서의 LATS 억제 방법 또는 제19항 내지 제32항 중 어느 한 항의 세포 집단의 증식 방법을 포함하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 78**

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단 또는 제57항 내지 제63항 또는 제65항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 세포 전달 제조물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 79**

제74항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 질병 또는 장애가 감소된 각막 내피 세포 밀도와 연관되는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 80**

제74항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 질병 또는 장애가 각막 내피 기능이상인 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 81**

제74항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 질병 또는 장애가 폭스 내피 각막 이영양증, 물집 각막병증(인공수정체 물집 각막병증 및 무수정체 물집 각막병증 포함), 각막 이식 실패, 후방 다형 각막 이영양증, 선천 유전 내피 이영양증, X-연관 내피 각막 이영양증, 무홍채증, 및 각막 내피염증으로 구성되는 군으로부터 선택되는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 82**

제74항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 질병 또는 장애가 폭스 내피 각막 이영양증, 물집 각막병증(인공수정체 물집 각막병증 및 무수정체 물집 각막병증 포함) 및 각막 이식 실패로 구성되는 군으로부터 선택되는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 83**

제74항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 제68항 내지 제73항 중 어느 한 항의 방법 단계를 포함하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 84**

제74항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 제33항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단 또는 제57항 내지 제63항, 제65항 또는 제66항 중 어느 한 항에 따른 세포 전달 제조물이 덱사메타손, 사이클로스포린, 토브라마이신, 및 세파졸린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 제제(들)와 동시적으로 또는 순차적으로 투여되는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 85**

치료법에서 또는 약제로서 사용하기 위한 제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염.

**청구항 86**

눈 질병 또는 장애에서 사용하기 위한 제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1에 따른 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염.

**청구항 87**

눈 질병 또는 장애에서 사용하기 위한 LATS 억제제로서, 화합물인 LATS 억제제.

**청구항 88**

약제의 제조를 위한 제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염의 용도.

**청구항 89**

눈 질병 또는 장애를 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1에서 정의되는 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염의 용도.

**청구항 90**

제85항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단에서의 LATS 억제 방법 또는 제19항 내지 제32항 중 어느 한 항의 세포 집단의 증식 방법을 포함하는, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 91**

제85항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 제33항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단 또는 제57항 내지 제63항 또는 제65항 내지 제67항 중 어느 한 항의 세포 전달 제조물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 92**

제85항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 질병 또는 장애가 감소된 각막 내피 세포 밀도와 연관되는, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 93**

제85항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 질병 또는 장애가 각막 내피 기능이상인, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 94**

제85항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 질병 또는 장애가 폭스 내피 각막 이영양증, 물집 각막병증(인공수정체 물집 각막병증 및 무수정체 물집 각막병증 포함), 각막 이식 실패, 후방 다형 각막 이영양증, 선천 유전 내피 이영양증, X-연관 내피 각막 이영양증, 무홍채증, 및 각막 내피염증으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 95**

제85항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 질병 또는 장애가 폭스 내피 각막 이영양증, 물집 각막병증(인공수정체 물집 각막병증 및 무수정체 물집 각막병증 포함) 및 각막 이식 실패로 구성되는 군으로부터 선택되는, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 96**

제85항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 제68항 내지 제73항 중 어느 한 항의 방법 단계를 포함하는, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 97**

제85항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 제33항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단 또는 제57항 내지 제63항, 제65항 또는 제67항 중 어느 한 항에 따른 세포 전달 제조물이 덱사메타손, 사이클로스포린, 토브라마이신, 및 세파졸린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 제제(들)와 동시적으로 또는 순차적으로 투여되는, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 98**

제33항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단 또는 제57항 내지 제63항 또는 제65항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 세포 전달 제조물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 각막 상으로 각막 내피 세포 집단을 이식하는 방법에서 사용하기 위한 YAP 조절제.

**청구항 99**

제33항 내지 제37항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단 또는 제57항 내지 제63항 또는 제65항 내지 제67항 중 어느 한 항에 따른 세포 전달 제조물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 각막 내피 기능이상을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 YAP 조절제.

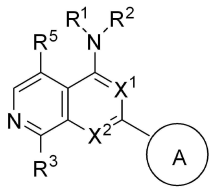
**청구항 100**

제98항 또는 제99항에 있어서, LATS 억제제인 YAP 조절제.

**청구항 101**

화학식 A1의 화합물 또는 이의 염을 사용하는 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단에서의 LATS 억제 방법:

[화학식 A1]

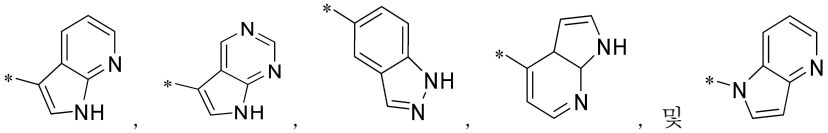


(식 중,

$X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

고리 A는

(a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

(b)  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

"*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

$R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

$R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

$R^2$는

(a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

(i) 할로겐;

(ii) 시아노;

(iii) 옥소;

(iv) $C_2$알케닐;

(v) $C_2$알키닐;

(vi) $C_{1-6}$할로알킬;

(vii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

(viii) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

(ix) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

(x) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

(xi) 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

(xii) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

(xiii) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

(xiv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

(xv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

(b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

(c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

(d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

(e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

로부터 선택되거나;

$R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소

원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

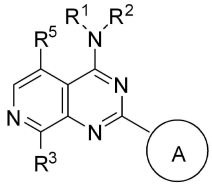
$R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

$R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

**청구항 102**

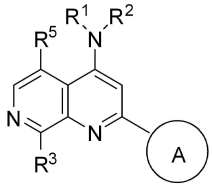
제101항에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 LATS 억제 방법:

[화학식 I]



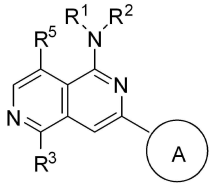
,

[화학식 II]



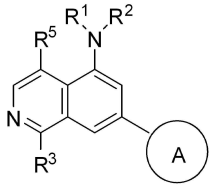
,

[화학식 III]



, 및

[화학식 IV]



.

**청구항 103**

제101항 또는 제102항에 있어서, 화합물 또는 이의 염이 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘; N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는, LATS 억제 방법.

**청구항 104**

제101항에 있어서, 화합물 또는 이의 염이 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따르는 LATS 억제 방법.

**청구항 105**

LATS 억제제의 존재 하에 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 배양하는 단계를 포함하는 세포를 배양하는 방법.

**청구항 106**

제105항에 있어서, LATS 억제제가 제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인, 세포를 배양하는 방법.

**청구항 107**

제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염의 존재 하에 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 배양하는 단계를 포함하는 세포를 배양하는 방법.

**청구항 108**

LATS 억제제의 존재 하에 윤부 줄기 세포를 포함하는 접종 세포 집단을 배양하여 윤부 줄기 세포를 포함하는 증식된 세포 집단을 생성하는 단계 a)를 포함하는 세포 집단의 증식 방법.

**청구항 109**

제108항에 있어서, LATS 억제제가 제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인, 세포 집단의 증식 방법.

**청구항 110**

제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염의 존재 하에 윤부 줄기 세포를 포함하는 접종 세포 집단을 배양하여 윤부 줄기 세포를 포함하는 증식된 세포 집단을 생성하는 단계 a)를 포함하는, 세포 집단의 증식 방법.

**청구항 111**

제101항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물이 0.5 내지 100마이크로몰 농도, 바람직하게는 0.5 내지 25마이크로몰 농도, 보다 바람직하게는 1 내지 20마이크로몰 농도, 특히 바람직하게는 약 3 내지 10마이크로몰 농도로 존재하는 방법.

**청구항 112**

제101항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 12 내지 16일 동안 존재하며, 바람직하게는 화합물이 14일 동안 존재하는 방법.

**청구항 113**

제109항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 접종 세포량의 30배 초과 증식을 생성하는 방법.

**청구항 114**

제109항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 접종 세포량의 100배 내지 2200배, 바람직하게는 600배 내지 2200배 증식을 생성하는 방법.

**청구항 115**

제109항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 20% 초과 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 생성하며, 바람직하게는 50% 초과 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 생성하는 방법.

**청구항 116**

제109항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서, 20% 초과의 p63알파 발현을 갖는 세포 집단을 생성하며, 바람직하게는 50% 초과의 p63알파 발현을 갖는 세포 집단을 생성하는 방법.

**청구항 117**

제101항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, LATS 억제제가 LATS1 및 LATS2를 억제하는 방법.

**청구항 118**

제101항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 윤부 줄기 세포를 유전적으로 변형하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 119**

제118항에 있어서, 유전적 변형이 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자의 발현 및/또는 기능을 감소시키거나 제거하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 120**

제118항 또는 제119항에 있어서, 상기 유전적 변형이 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자를 특이적으로 표적화하는 유전자 편집 시스템을 상기 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 121**

제120항에 있어서, 상기 유전자 편집 시스템이 CRISPR 유전자 편집 시스템, TALEN 유전자 편집 시스템, 아연 핑거 뉴클레아제 유전자 편집 시스템, 메가뉴클레아제 유전자 편집 시스템, AAV 벡터 유도 상동성 재조합 및 렌티바이러스 벡터-기반 게놈 편집 기술로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 122**

제119항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자가 B2M, HLA-A, HLA-B 및 HLA-C로 구성되는 군으로부터 선택되며, 바람직하게는 B2M인 방법.

**청구항 123**

제108항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 증식된 세포 집단을 헹구어 본 발명에 따른 화합물을 실질적으로 제거하는 단계 b)를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 124**

제101항 내지 제123항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득 가능한 세포 집단.

**청구항 125**

제101항 내지 제123항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득되는 세포 집단.

**청구항 126**

20% 초과 세포가 윤부 줄기 세포이며, 바람직하게는 50% 초과가 윤부 줄기 세포인 단리된 세포 집단.

**청구항 127**

70% 초과 세포가 윤부 줄기 세포이며, 바람직하게는 90% 초과가 윤부 줄기 세포인 단리된 세포 집단.

**청구항 128**

20% 초과 세포가 p63알파 양성이며, 바람직하게는 50% 초과가 p63알파 양성인 단리된 세포 집단.

**청구항 129**

70% 초과 세포가 p63알파 양성이며, 바람직하게는 90% 초과가 p63알파 양성인 단리된 세포 집단.

**청구항 130**

윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단 또는 제124항 내지 제129항 중 어느 한 항의 세포 집단으로서, 하나 이상의 상기 세포가 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자의 하나 이상의 핵산 잔기의 비-자연 발생 삽입 또는 결실을 포함하고, 삽입 및/또는 결실은 상기 유전자의 발현 또는 기능의 감소 또는 제거를 일으키는 세포 집단.

**청구항 131**

제130항에 있어서, 상기 유전자가 B2M, HLA-A, HLA-B 및 HLA-C로 구성되는 군으로부터 선택되는 세포 집단.

**청구항 132**

제130항 또는 제131항에 있어서, 상기 유전자가 B2M인 세포 집단.

**청구항 133**

LATS 억제제를 포함하는 윤부 줄기 세포의 성장 촉진제.

**청구항 134**

제133항에 있어서, LATS 억제제가 제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인, 윤부 줄기 세포의 성장 촉진제.

**청구항 135**

제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염을 포함하는 윤부 줄기 세포의 성장 촉진제.

**청구항 136**

LATS 억제제 및 성장 배지를 포함하는 세포 증식 배지.

**청구항 137**

제136항에 있어서, LATS 억제제가 제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인, 세포 증식 배지.

**청구항 138**

제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염 및 성장 배지를 포함하는 세포 증식 배지.

**청구항 139**

제136항 내지 제138항 중 어느 한 항에 있어서, 성장 배지가 우태 혈청이 보충된 둘베코 변형 이글 배지, 인간 혈청이 보충된 인간 내피 무혈청 배지, X-VIVO15 배지 및 선택적으로 염화칼슘이 보충된 DMEM/F12로 구성되는 군으로부터 선택되며; 바람직하게는 X-VIVO15 배지인, 세포 증식 배지.

**청구항 140**

제136항 내지 제139항 중 어느 한 항에 있어서, 윤부 줄기 세포를 추가로 포함하는 세포 증식 배지.

**청구항 141**

LATS 억제제 및 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 제조물.

**청구항 142**

제141항에 있어서, LATS 억제제가 제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인, 세포 제조물.

**청구항 143**

제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염 및 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 제조물.

**청구항 144**

제141항 내지 제143항 중 어느 한 항에 있어서, 성장 배지를 추가로 포함하며, 성장 배지가 우태 혈청이 보충된 둘베코 변형 이글 배지, 인간 혈청이 보충된 인간 내피 무혈청 배지, X-VIVO15 배지 및 선택적으로 염화칼슘이 보충된 DMEM/F12로 구성되는 군으로부터 선택되며; 바람직하게는 X-VIVO15 배지인, 세포 제조물.

**청구항 145**

제11항 또는 제141항 내지 제144항 중 어느 한 항에 있어서, 보존 또는 냉동보존 용액을 추가로 포함하는 약학 조성물 또는 세포 제조물.

**청구항 146**

제145항에 있어서, 보존 또는 냉동보존 용액이 Optisol 또는 PBS인 용액을 포함하며 냉동보존 용액이 글리세롤, 디메틸 설폭시드, 프로필렌 글리콜 또는 아세트아미드를 추가로 포함하는 약학 조성물 또는 세포 제조물.

**청구항 147**

눈 전달에 적합한 조성물 및 LATS 억제제를 포함하는 키트.

**청구항 148**

제147항에 있어서, LATS 억제제가 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인 키트.

**청구항 149**

눈 전달에 적합한 조성물 및 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염을 포함하는 키트.

**청구항 150**

제147항 내지 제149항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 전달에 적합한 조성물이 국소화 제제 또는 국소 점안제인 키트.

**청구항 151**

제147항 내지 제150항 중 어느 한 항에 있어서, 윤부 줄기 세포를 추가로 포함하는 키트.

**청구항 152**

제124항 내지 제131항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단 또는 제141항 내지 제146항 중 어느 한 항에 따른 세포 제조물 및 국소화 제제인 눈 전달에 적합한 조성물을 포함하는 세포 전달 제조물.

**청구항 153**

제147항 내지 제152항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 전달에 적합한 조성물이 바이오매트릭스인 국소화 제제인 키트 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 154**

제147항 내지 제153항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 전달에 적합한 조성물이 피브린, 콜라겐, 젤라틴, 셀룰로스, 양막, 피브린 아교, 폴리에틸렌(글리콜) 디아크릴레이트(PEGDA), GelMA, 히알루론산, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 옥시드, 폴리프로필렌 옥시드, 폴록사머, 폴리비닐 알코올, 폴리아크릴산, 폴리메타크릴산, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리(락티드-코-글리콜리드), 알기네이트, 젤라틴, 콜라겐, 피브리노겐, 셀룰로

스, 메틸셀룰로스, 하이드록시에틸셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 하이드록시프로필-구아, 겔란 검, 구아 검, 잔탄 검 및 카복시메틸셀룰로스뿐만 아니라 이의 유도체, 이의 공중합체, 및 이의 조합 중 하나 이상을 포함하는 중합체, 가교-중합체, 또는 하이드로겔을 포함하는 국소화 제제로 구성되는 군으로부터 선택되는 국소화 제제인 키트 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 155**

제147항 내지 제154항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 전달에 적합한 조성물이 GelMa인 국소화 제제인 키트 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 156**

제147항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 20% 초과 세포가 윤부 줄기 세포인 키트 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 157**

제147항 내지 제155항 중 어느 한 항에 있어서, 20% 초과 세포가 p63알파 양성인 키트 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 158**

제147항 내지 제157항 중 어느 한 항에 있어서, 70% 초과 세포가 p63알파 양성인 키트 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 159**

제11항 또는 제133항 내지 제158항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 0.5 내지 100마이크로몰 농도, 바람직하게는 0.5 내지 25마이크로몰 농도, 보다 바람직하게는 1 내지 20마이크로몰 농도, 특히 바람직하게는 약 3 내지 10마이크로몰 농도로 존재하는 약학 조성물, 성장 촉진제, 세포 증식 배지, 세포 제조물 또는 키트.

**청구항 160**

제124항 내지 제131항, 제141항 내지 제146항, 또는 제152항 내지 제158항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 단지 미량 수준으로 존재하는 세포 집단 또는 세포 제조물, 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 161**

제133항 내지 제160항 중 어느 한 항에 있어서, LATS 억제제가 LATS1 및 LATS2를 억제하는 성장 촉진제, 세포 증식 배지, 세포 제조물, 또는 세포 전달 제조물 또는 키트.

**청구항 162**

제136항 내지 제161항 중 어느 한 항에 있어서, 윤부 줄기 세포가 존재하고 현탁액 중에 있는 세포 증식 배지, 세포 제조물, 세포 전달 제조물 또는 키트.

**청구항 163**

대상체의 각막 상으로 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 이식하는 방법으로서, 제124항 내지 제131항 또는 제160항 중 어느 한 항의 세포 집단 또는 제152항 내지 제158항 또는 제160항 중 어느 한 항의 세포 전달 제조물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 164**

대상체의 각막 상으로 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 이식하는 방법으로서, 상기 집단을 제136항 내지 제139항, 제159항 또는 제161항 중 어느 한 항에 따른 세포 증식 배지로 배양하여 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 증식시키는 단계, 바람직하게는 증식된 세포 집단을 헹구어 LATS 억제제를 실질적으로 제거하는 단계, 및 윤부 줄기 세포를 포함하는 상기 세포 집단을 상기 대상체의 각막 상으로 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 165**

제164항에 있어서, 윤부 줄기 세포를 포함하는 상기 세포 집단이 상기 투여 전에 국소화 제제와 조합되는 방법.

**청구항 166**

제165항에 있어서, 윤부 줄기 세포를 포함하는 상기 세포 집단이 상기 투여 전에 피브린 아교인 국소화 제제 또는 GelMA인 바이오매트릭스인 국소화 제제와 조합되는 방법.

**청구항 167**

제164항 내지 제166항 중 어느 한 항에 있어서, 윤부 줄기 세포를 포함하는 상기 세포 집단이 콘택트 렌즈인 담체와 조합되는 방법.

**청구항 168**

제164항 내지 제167항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단이 GelMA인 바이오매트릭스와 조합되며 GelMA가 콘택트 렌즈인 담체 상에 중합되는 방법.

**청구항 169**

LATS 억제제를 사용하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 170**

제169항에 있어서, LATS 억제제가 제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인 방법.

**청구항 171**

제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염을 사용하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 172**

제169항 내지 제171항 중 어느 한 항에 있어서, 제101항 내지 제104항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단에서의 LATS 억제 방법 또는 제108항 내지 제123항 중 어느 한 항의 세포 집단의 증식 방법을 포함하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 173**

제124항 내지 제131항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단 또는 제152항 내지 제162항 중 어느 한 항에 따른 세포 전달 제조물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 174**

제169항 내지 제173항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 질병 또는 장애가 윤부 줄기 세포 결핍인 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 175**

제169항 내지 제174항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 질병 또는 장애가 화학적 화상, 열적 화상, 방사선 부상, 무홍채증, 공막화각막, 다발 내분비샘 종양, 스티븐 존슨 증후군, 눈 흉터 유사물집증, 콜라겐 혈관 질병, 콘택트 렌즈 사용으로 발생하는 만성 비-자가-면역 염증성 장애, 건성안 질병, 장미증, 포도상구균 가장자리, 각막염(박테리아, 진균 & 바이러스 각막염 포함), 익상편 또는 종양, 다회 눈 수술, 익상편 또는 종양 절제 또는 냉동치료법 후 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍; 및 보존제(티메로살, 벤잘코늄), 국소 마취제, 필로카르핀, 베타 차단제, 미토마이신, 5-플루오로우라실, 질산은, 및 스티븐 존슨 증후군을 유도하는 경구 투약으로 구성되는 군으로부터 선택되는 투약으로부터의 투약 독성 결과 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍으로 구성되는 군으로부터 선택되는 부상 또는 질병 또는 장애로 인해 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍인, 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 176**

제169항 내지 제175항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 질병 또는 장애가 화학적 화상, 무홍채증, 스티븐 존슨 증후군 및 콘택트 렌즈 사용으로 구성되는 군으로부터 선택되는 부상 또는 장애로 인해 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍인, 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 177**

제169항 내지 제176항 중 어느 한 항에 있어서, 제163항 내지 제168항 중 어느 한 항의 방법 단계를 포함하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 178**

제169항 내지 제177항 중 어느 한 항에 있어서, 제124항 내지 제131항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단 또는 제152항 내지 제158항 또는 제160항 내지 제162항 중 어느 한 항에 따른 세포 전달 제조물이 덱사메타손, 사이클로스포린, 토브라마이신, 및 세파졸린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 제제(들)와 동시적으로 또는 순차적으로 투여되는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 179**

치료법에서 또는 약제로서 사용하기 위한 제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염.

**청구항 180**

눈 질병 또는 장애에서 사용하기 위한 제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1에 따른 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염.

**청구항 181**

눈 질병 또는 장애에서 사용하기 위한 LATS 억제제로서, 화합물인 LATS 억제제.

**청구항 182**

약제의 제조에서 제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1에 따른 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염의 용도.

**청구항 183**

눈 질병 또는 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에서 제101항 내지 제103항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1에 따른 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염의 용도.

**청구항 184**

제179항 내지 제183항 중 어느 한 항에 있어서, 제101항 내지 제104항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단에서의 LATS 억제 방법 또는 제108항 내지 제123항 중 어느 한 항의 세포 집단의 증식 방법을 포함하는, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 185**

제179항 내지 제184항 중 어느 한 항에 있어서, 제124항 내지 제131항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단 또는 제152항 내지 제162항 중 어느 한 항의 세포 전달 제조물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 186**

제180항, 제181항 또는 제183항 내지 제185항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 질병 또는 장애가 윤부 줄기 세포 결핍인, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 187**

제180항, 제181항, 제183항 내지 제186항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 질병 또는 장애가 화학적 화상, 열적 화상, 방사선 부상, 무홍채증, 공막화각막, 다발 내분비샘 종양, 스티븐 존슨 증후군, 눈 흉터 유사물집증, 콜라겐 혈관 질병; 콘택트 렌즈 사용으로 발생하는 만성 비-자가-면역 염증성 장애, 건성안 질병, 장미증, 포도상구균 가장자리, 각막염(박테리아, 진균 & 바이러스 각막염 포함), 익상편 또는 종양, 다회 눈 수술, 익상편 또는 종양 절제 또는 냉동치료법 후 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍; 및 보존제(티메로살, 벤잘코늄), 국소 마취제, 필로카르핀, 베타 차단제, 미토마이신, 5-플루오로우라실, 질산은, 및 스티븐 존슨 증후군을 유도하는 경구 투약으로 구성되는 군으로부터 선택되는 투약으로부터의 투약 독성 결과 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍으로 구성되는 군으로부터 선택되는 부상 또는 장애로 인해 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍인, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 188**

제180항, 제181항, 제183항 내지 제187항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 질병 또는 장애가 화학적 화상, 무홍채증, 스티븐 존슨 증후군 및 콘택트 렌즈 사용으로 구성되는 군으로부터 선택되는 부상 또는 장애로 인해 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍인, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 189**

제180항, 제181항, 제183항 내지 제188항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 제163항 내지 제168항 중 어느 한 항의 방법 단계를 포함하는, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 190**

제180항, 제181항, 제183항 내지 제189항 중 어느 한 항에 있어서, 제124항 내지 제131항 중 어느 한 항의 세포 집단 또는 제152항 내지 제162항 중 어느 한 항의 세포 전달 제조물이 덱사메타손, 사이클로스포린, 토브라마이신 및 세파졸린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 제제(들)와 동시적으로 또는 순차적으로 투여되는, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 191**

제124항 내지 제131항 중 어느 한 항의 세포 집단 또는 제152항 내지 제162항 중 어느 한 항의 세포 전달 제조물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 각막 상으로 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 이식하는 방법에서 사용하기 위한 YAP 조절제.

**청구항 192**

제124항 내지 제131항 중 어느 한 항의 세포 집단 또는 제152항 내지 제162항 중 어느 한 항의 세포 전달 제조물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 윤부 줄기 세포 결핍을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 YAP 조절제.

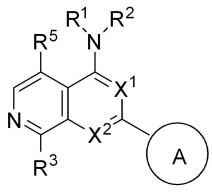
**청구항 193**

제191항 또는 제192항에 있어서, LATS 억제제인 YAP 조절제.

**청구항 194**

치료 유효량의 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 간 재생 및 간 재성장을 촉진하는 방법:

[화학식 A1]

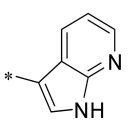
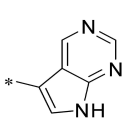
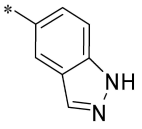
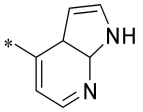
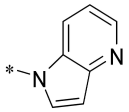



(식 중,

$X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

고리 A는

(a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

(b)  ,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

"*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

$R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

$R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

$R^2$는

(a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

(i) 할로겐;

(ii) 시아노;

(iii) 옥소;

(iv) $C_2$알케닐;

(v) $C_2$알키닐;

(vi) $C_{1-6}$할로알킬;

(vii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

(viii) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

(ix) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

(x) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

(xi) 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

(xii) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2

개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

(xiii) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

(xiv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

(xv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

(b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

(c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

(d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

(e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

로부터 선택되거나;

$R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

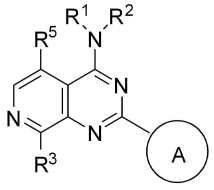
$R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

$R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

**청구항 195**

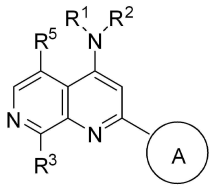
제194항에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 방법:

[화학식 I]



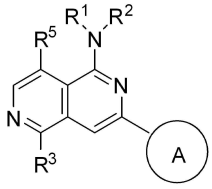
,

[화학식 II]



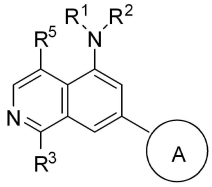
,

[화학식 III]



, 및

[화학식 IV]



.

**청구항 196**

제194항에 있어서, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이

2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올;

디메틸(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부틸)아민;

N-(1-아미노-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

8-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

8-메틸-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

N-(tert-부틸)-5-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

5-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민;

N-tert-부틸-2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민;

N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민;

2-(2-아미노피리미딘-4-일)-N-tert-부틸-1,7-나프티리딘-4-아민;

$N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민;

$N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민;

2,2-디메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민;

2,3-디메틸-$N^2$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-2,3-디아민;

$N^1$,$N^1$,2,2-테트라메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민;

4-(4-(tert-부틸아미노)피리도[3,4-*d*]피리미딘-2-일)-1,2,5-옥사디아졸-3-아민; 및

$N^2$,$N^2$,2-트리메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,2-디아민으로부터 선택되는 방법.

**청구항 197**

제194항에 있어서, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따르는 방법.

**청구항 198**

제194항 내지 제197항 중 어느 한 항에 있어서, 간 재생 및 간 재성장의 촉진이 경계 이식편의 이식 후 불충분한 간 재성장의 치료; 광범위 간절제술 후 잔류 간 물질의 증강된 재성장 지지; 바이러스 간염, 약물-유도 간 부상, 자가면역 간염, 허혈성 및 울혈성 간 질병으로부터의 급성 간 부전 후 환자 간의 재생; 및 비-알코올성 지방간염, 알코올성 지방간염, 만성 B형 및 C형 바이러스 간염, 혈색소증, 알파-1 항-트립신 결핍, 윌슨 질병 및 약물-유도 간 섬유증으로부터의 만성 간 부상 및 기저 간 섬유증의 치료를 포함하는 방법.

**청구항 199**

LATS 키나제의 활성을 억제할 수 있는 치료 유효량의 제제를 필요로 하는 대상체에 이를 투여함으로써; YAP 전위를 유도하고 세포 증식을 위한 하류 유전자 발현을 유도하는 단계를 포함하는 간 재생 및 간 재성장을 촉진하는 방법.

**청구항 200**

제199항에 있어서, 제제가 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물인 방법.

**청구항 201**

간 세포를 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 생체외 간 세포 집단을 증식시키는 방법.

**청구항 202**

제201항에 있어서, 상기 간 세포를 유전자 편집하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 203**

제201항 또는 제202항에 있어서, 간 세포가 간 선조 세포인 방법.

**청구항 204**

제201항 또는 제202항에 따른 방법에 의해 수득되는 간 세포.

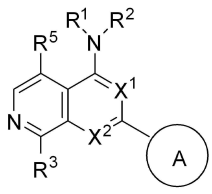
**청구항 205**

제204항에 있어서, 간 선조 세포인 간 세포.

**청구항 206**

치료 유효량의 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 상처 치유를 촉진하는 방법:

[화학식 A1]

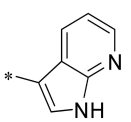
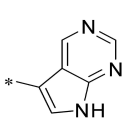
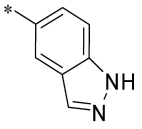
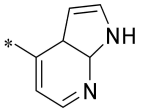
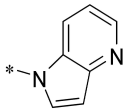



(식 중,

$X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

고리 A는

(a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

(b)  ,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

"*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

$R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

$R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

$R^2$는

(a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

(i) 할로겐;

(ii) 시아노;

(iii) 옥소;

(iv) $C_2$알케닐;

(v) $C_2$알키닐;

(vi) $C_{1-6}$할로알킬;

(vii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

(viii) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

(ix) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

(x) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

(xi) 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

(xii) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2

개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

(xiii) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

(xiv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

(xv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

(b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

(c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

(d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

(e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

로부터 선택되거나;

$R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

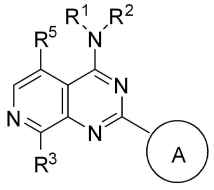
$R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

$R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

**청구항 207**

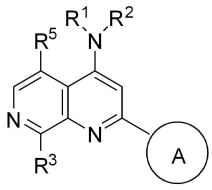
제206항에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 방법:

[화학식 I]



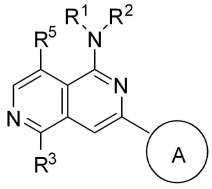
,

[화학식 II]



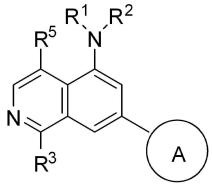
,

[화학식 III]



, 및

[화학식 IV]



.

**청구항 208**

제206항에 있어서, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 2-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)에탄-1-올, 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘; N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는 방법.

**청구항 209**

제206항에 있어서, 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따르는 방법.

**청구항 210**

제206항 내지 제209항 중 어느 한 항에 있어서, 상처 치유의 촉진이 화상, 급성 피부 궤양 및 만성 피부 궤양의 총체적 증상을 치료하거나 완화하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 211**

제210항에 있어서, 만성 피부 궤양이 당뇨병성 궤양, 압력 궤양 및 혈관 궤양으로부터 선택되는 방법.

**청구항 212**

제210항에 있어서, 만성 피부 궤양이 정맥성 다리 궤양, 당뇨병성 족부 궤양 및 욕창으로부터 선택되는 방법.

**청구항 213**

LATS 키나제의 활성을 억제할 수 있는 치료 유효량의 제제를 필요로 하는 대상체에 이를 투여함으로써; YAP 전위를 유도하고 세포 증식을 위한 하류 유전자 발현을 유도하는 단계를 포함하는 상처 치유를 촉진하는 방법.

**청구항 214**

제213항에 있어서, 제제가 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물인 방법.

**청구항 215**

유전자 편집된 세포를 포함하는 세포 집단으로서, 유전자 편집된 세포가 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물을 포함하는 배지에서 배양된 세포 집단.

**청구항 216**

제215항에 있어서, 편집된 유전자가 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자이며, 유전자 편집이 상기 유전자의 발현 또는 기능 감소 또는 제거를 일으키는 세포 집단.

**청구항 217**

제216항에 있어서, 상기 유전자가 B2M, HLA-A, HLA-B 및 HLA-C로 구성되는 군으로부터 선택되는 세포 집단.

**청구항 218**

제216항 또는 제217항에 있어서, 상기 유전자가 B2M인 세포 집단.

**청구항 219**

제215항 내지 제218항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 편집된 세포가 윤부 줄기 세포 또는 각막 내피 세포인 세포 집단.

**청구항 220**

세포를 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 생체외 세포 집단을 증식시키는 방법.

**청구항 221**

제220항에 있어서, 상기 세포를 유전자 편집하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 222**

제220항 또는 제221항에 있어서, 세포가 눈 세포, 상피 세포, 신경 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 폐의 기저 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포 또는 간 세포인 방법.

**청구항 223**

제220항 내지 제222항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 눈 세포, 간 세포 또는 상피 피부 세포인 방법.

**청구항 224**

제220항 내지 제223항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 눈 세포, 바람직하게는 각막 내피 세포 또는 윤부 줄기 세포인 방법.

**청구항 225**

제220항 내지 제224항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득되는 세포.

**청구항 226**

세포를 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따른 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 생체외 세포 치료법을 위한 방법.

**청구항 227**

제226항에 있어서, 세포가 유전자 편집된, 생체외 세포 치료법을 위한 방법.

**청구항 228**

제226항 또는 제227항에 있어서, 세포 치료법이 줄기 세포 이식, 조직 재생, 세포 면역치료법 및 유전자 치료법

으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 생체외 세포 치료법을 위한 방법.

**청구항 229**

제226항 내지 제228항 중 어느 한 항에 있어서, 줄기 세포 이식이 조혈 줄기 세포 이식, 자가 줄기 세포 이식, 제대혈 줄기 세포 이식 및 윤부 줄기 세포 이식으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 생체외 세포 치료법을 위한 방법.

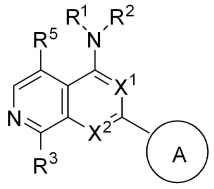
**청구항 230**

제228항 또는 제229항에 있어서, 줄기 세포 이식이 윤부 줄기 세포 이식인, 생체외 세포 치료법을 위한 방법.

**청구항 231**

화학식 A1의 화합물 또는 이의 염을 사용하는 세포 집단에서의 LATS 억제 방법:

[화학식 A1]

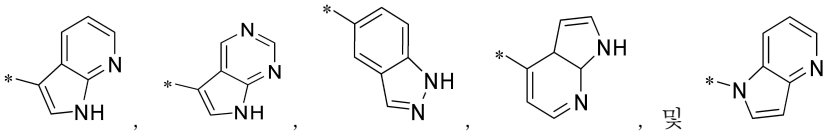


(식 중,

$X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

고리 A는

(a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

(b)  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

"*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

$R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

$R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

$R^2$는

(f) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

(xvi) 할로겐;

(xvii) 시아노;

(xviii) 옥소;

(xix) $C_2$알케닐;

(xx) $C_2$알키닐;

(xxi) $C_{1-6}$할로알킬;

(xxii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

(xxiii) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

(xxiv) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

(xxv) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

(xxvi) 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

(xxvii) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

(xxviii) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

(xxix) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

(xxx) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

(g) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

(h) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

(i) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

(j) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

로부터 선택되거나;

$R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

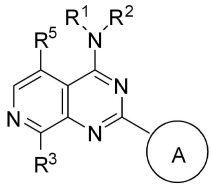
$R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

$R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

**청구항 232**

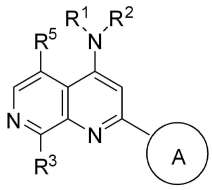
제231항에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 LATS 억제 방법:

[화학식 I]



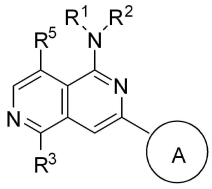

,

[화학식 II]



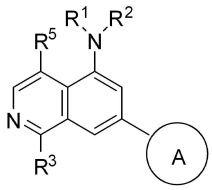

,

[화학식 III]




, 및

[화학식 IV]




.

**청구항 233**

제231항 또는 제232항에 있어서, 화합물 또는 이의 염이 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘; N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는, 세포 집단에서의 LATS 억제 방법.

**청구항 234**

제231항에 있어서, 화합물 또는 이의 염이 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 따르는 LATS 억제 방법.

**청구항 235**

LATS 억제제의 존재 하에 눈 세포를 포함하는 세포 집단을 배양하는 단계를 포함하는 세포를 배양하는 방법.

**청구항 236**

제235항에 있어서, LATS 억제제가 제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인, 세포를 배양하는 방법.

**청구항 237**

제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염의 존재 하에 눈 세포를 포함하는 세포 집단을 배양하는 단계를 포함하는 세포를 배양하는 방법.

**청구항 238**

LATS 억제제의 존재 하에 눈 세포를 포함하는 접종 세포 집단을 배양하여 눈 세포를 포함하는 증식된 세포 집단을 생성하는 단계 a)를 포함하는 세포 집단의 증식 방법.

**청구항 239**

제238항에 있어서, LATS 억제제가 제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인, 세포 집단의 증식 방법.

**청구항 240**

제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염의 존재 하에 눈 세포를 포함하는 접종 세포 집단을 배양하여 눈 세포를 포함하는 증식된 세포 집단을 생성하는 단계 a)를 포함하는, 세포 집단의 증식 방법.

**청구항 241**

제231항 내지 제240항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물이 0.5 내지 100마이크로몰 농도, 바람직하게는 0.5 내지 25마이크로몰 농도, 보다 바람직하게는 1 내지 20마이크로몰 농도, 특히 바람직하게는 약 3 내지 10마이크로몰 농도로 존재하는 방법.

**청구항 242**

제231항 내지 제241항 중 어느 한 항에 있어서, LATS 억제제가 LATS1 및 LATS2를 억제하는 방법.

**청구항 243**

제231항 내지 제242항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 눈 세포를 유전적으로 변형하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

**청구항 244**

제243항에 있어서, 상기 유전적 변형이 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자의 발현 및/또는 기능을 감소시키거나 제거하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 245**

제243항 또는 제244항에 있어서, 상기 유전적 변형이 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자를 특이적으로 표적화하는 유전자 편집 시스템을 상기 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 246**

제245항에 있어서, 상기 유전자 편집 시스템이 CRISPR 유전자 편집 시스템, TALEN 유전자 편집 시스템, 아연 핑거 뉴클레아제 유전자 편집 시스템, 메가뉴클레아제 유전자 편집 시스템, AAV 벡터 유도 상동성 재조합 및 렌티바이러스 벡터-기반 게놈 편집 기술로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 247**

제244항 내지 제246항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자가 B2M, HLA-A, HLA-B 및 HLA-C로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법.

**청구항 248**

제231항 내지 제247항 중 어느 한 항에 있어서, 증식된 세포 집단의 생성 후 이들 세포를 헹구어 화합물을 실질적으로 제거하는 추가 단계를 포함하는 방법.

**청구항 249**

제231항 내지 제248항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득 가능한 세포 집단.

**청구항 250**

제231항 내지 제248항 중 어느 한 항의 방법에 의해 수득되는 세포 집단.

**청구항 251**

눈 세포를 포함하는 세포 집단 또는 제249항 또는 제250항의 세포 집단으로서, 하나 이상의 상기 세포가 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자의 하나 이상의 핵산 잔기의 비-자연 발생 삽입 또는 결실을 포함하고, 삽입 및/또는 결실은 상기 유전자의 발현 또는 기능의 감소 또는 제거를 일으키는 세포 집단.

**청구항 252**

제251항에 있어서, 상기 유전자가 B2M, HLA-A, HLA-B 및 HLA-C로 구성되는 군으로부터 선택되는 세포 집단.

**청구항 253**

제251항 또는 제252항에 있어서, 상기 유전자가 B2M인 세포 집단.

**청구항 254**

LATS 억제제를 포함하는 눈 세포의 성장 촉진제.

**청구항 255**

제254항에 있어서, LATS 억제제가 제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인, 눈 세포의 성장 촉진제.

**청구항 256**

제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염을 포함하는 눈 세포의 성장 촉진제.

**청구항 257**

LATS 억제제 및 성장 배지를 포함하는 세포 증식 배지.

**청구항 258**

제257항에 있어서, LATS 억제제가 제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인, 세포 증식 배지.

**청구항 259**

제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염 및 성장 배지를 포함하는 세포 증식 배지.

**청구항 260**

제257항 내지 제259항 중 어느 한 항에 있어서, 성장 배지가 우태 혈청이 보충된 둘베코 변형 이글 배지, 인간 혈청이 보충된 인간 내피 무혈청 배지, X-VIVO15 배지, 또는 중간엽 줄기 세포-컨디셔닝된 배지로 구성되는 군으로부터 선택되며; 바람직하게는 X-VIVO15 배지인, 세포 증식 배지.

**청구항 261**

제257항 내지 제260항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 세포를 추가로 포함하는 세포 증식 배지.

**청구항 262**

LATS 억제제 및 눈 세포를 포함하는 세포 제조물.

**청구항 263**

제262항에 있어서, LATS 억제제가 제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인, 세포 제조물.

**청구항 264**

제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염 및 눈 세포를 포함하는 세포 제조물.

**청구항 265**

제262항 내지 제264항 중 어느 한 항에 있어서, 우태 혈청이 보충된 둘베코 변형 이글 배지, 인간 혈청이 보충된 인간 내피 무혈청 배지, X-VIVO15 배지 및 중간엽 줄기 세포-컨디셔닝된 배지로 구성되는 군으로부터 선택되며; 바람직하게는 X-VIVO15 배지인 성장 배지를 추가로 포함하는 세포 제조물.

**청구항 266**

제11항 또는 제262항 내지 제265항 중 어느 한 항에 있어서, 보존 또는 냉동보존 용액을 추가로 포함하는 약학 조성물 또는 세포 제조물.

**청구항 267**

제266항에 있어서, 보존 또는 냉동보존 용액이 Optisol 또는 PBS인 용액을 포함하며 냉동보존 용액이 글리세롤, 디메틸 설폭시드, 프로필렌 글리콜 또는 아세트아미드를 추가로 포함하는 약학 조성물 또는 세포 제조물.

**청구항 268**

눈 전달에 적합한 조성물 및 LATS 억제제를 포함하는 키트.

**청구항 269**

제268항에 있어서, LATS 억제제가 제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인, 키트.

**청구항 270**

눈 전달에 적합한 조성물 및 제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염을 포함하는 키트.

**청구항 271**

제268항 내지 제270항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 전달에 적합한 조성물이 국소화 제제 또는 국소 점안제인 키트.

**청구항 272**

제268항 내지 제271항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 세포를 추가로 포함하는 키트.

**청구항 273**

제249항 내지 제253항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단 또는 제262항 내지 제267항 중 어느 한 항에 따른 세포 제조물 및 국소화 제제인 눈 전달에 적합한 조성물을 포함하는 세포 전달 제조물.

**청구항 274**

제268항 내지 제273항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 전달에 적합한 조성물이 바이오매트릭스인 국소화 제제인 키트 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 275**

제268항 내지 제274항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 전달에 적합한 조성물이 피브린, 콜라겐, 젤라틴, 셀룰로스, 양막, 피브린 아교, 폴리에틸렌(글리콜) 디아크릴레이트(PEGDA), GelMA, 히알루론산, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 옥시드, 폴리프로필렌 옥시드, 폴록사머, 폴리비닐 알코올, 폴리아크릴산, 폴리메타크릴산, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리(락티드-코-글리콜리드), 알기네이트, 젤라틴, 콜라겐, 피브리노겐, 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 하이드록시에틸셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 하이드록시프로필-구아, 겔란 검, 구아 검, 잔탄 검 및 카복시메틸셀룰로스뿐만 아니라 이의 유도체, 이의 공중합체, 및 이의 조합 중 하나 이상을 포함하는 중합체, 가교-중합체, 또는 하이드로겔을 포함하는 국소화 제제로 구성되는 군으로부터 선택되는 국소화 제제인 키트 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 276**

제268항 내지 제275항 중 어느 한 항에 있어서, 눈 전달에 적합한 조성물이 GelMa인 국소화 제제인 키트 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 277**

제11항 또는 제254항 내지 제276항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 0.5 내지 100마이크로몰 농도, 바람직하게는 0.5 내지 25마이크로몰 농도, 보다 바람직하게는 1 내지 20마이크로몰 농도, 특히 바람직하게는 약 3 내지 10마이크로몰 농도로 존재하는 약학 조성물, 성장 촉진제, 세포 증식 배지, 세포 제조물 또는 키트.

**청구항 278**

제249항 내지 제253항, 제262항 내지 제267항, 또는 제273항 내지 제276항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 단지 미량 수준으로 존재하는 세포 집단 또는 세포 제조물, 또는 세포 전달 제조물.

**청구항 279**

제254항 내지 제278항 중 어느 한 항에 있어서, LATS 억제제가 LATS1 및 LATS2를 억제하는 성장 촉진제, 세포 증식 배지, 세포 제조물, 또는 세포 전달 제조물 또는 키트.

**청구항 280**

제257항 내지 제276항 중 어느 한 항에 있어서 눈 세포가 존재하고 현탁액 중에 있는 세포 증식 배지, 세포 제조물, 세포 전달 제조물 또는 키트.

**청구항 281**

대상체의 각막 상으로 각막 내피 세포 집단을 이식하는 방법으로서, 제33항 내지 제37항 또는 제65항 중 어느 한 항의 세포 집단 또는 제57항 내지 제63항 또는 제65항 중 어느 한 항의 세포 전달 제조물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 282**

대상체에 눈 세포 집단을 이식하는 방법으로서, 상기 집단을 제257항 내지 제260항, 제278항 또는 제279항 중 어느 한 항에 따른 세포 증식 배지로 배양하여 눈 세포 집단을 증식시키는 단계, 증식된 세포 집단을 헹구어 LATS 억제제를 실질적으로 제거하는 단계, 및 상기 세포를 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 283**

제282항에 있어서, 단리된 상기 눈 세포가 상기 투여 전에 바이오매트릭스와 조합되는 방법.

**청구항 284**

제283항에 있어서, 상기 단리된 눈 세포가 상기 투여 전에 GelMA인 바이오매트릭스와 조합되는 방법.

**청구항 285**

대상체의 눈으로 눈 세포 집단을 이식하는 방법으로서, LATS 억제제를 포함하는 세포 증식 배지에서 눈 세포 집단을 배양하는 단계, 눈 세포를 바이오매트릭스와 조합하여 세포/바이오매트릭스 혼합물을 형성하는 단계, 혼합물을 대상체의 눈 내로 주사하는 단계, 및 광원을 사용하여 각막 상으로 세포를 가이드하고 고정함으로써 눈 내에 세포를 바이오프린트하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 286**

제283항 또는 제284항에 있어서, 상기 단리된 눈 세포가 GelMA인 바이오매트릭스와 조합되고 광 유발 반응에 의해 GelMA를 중합하여 눈 표면 상에 바이오프린트되는 방법.

**청구항 287**

LATS 억제제를 사용하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 288**

제287항에 있어서, LATS 억제제가 제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염인 방법.

**청구항 289**

제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염을 사용하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 290**

제287항 내지 제289항 중 어느 한 항에 있어서, 제231항 내지 제234항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단에서의 LATS 억제 방법 또는 제238항 내지 제248항 중 어느 한 항의 세포 집단의 증식 방법을 포함하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 291**

제231항 내지 제234항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단 또는 제273항 내지 제276항 또는 제278항 내지 제280항 중 어느 한 항에 따른 세포 전달 제조물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 292**

제287항 내지 제291항 중 어느 한 항에 있어서, 제281항 내지 제286항 중 어느 한 항의 방법 단계를 포함하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 293**

제287항 내지 제291항 중 어느 한 항에 있어서, 제249항 내지 제253항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단 또는 제273항 내지 제276항, 제278항 또는 제279항 중 어느 한 항에 따른 세포 전달 제조물이 덱사메타손, 사이클로스포린, 토브라마이신, 및 세파졸린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 제제(들)와 동시적으로 또는 순차적으로 투여되는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법.

**청구항 294**

치료법에서 또는 약제로서 사용하기 위한 제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합

물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염.

**청구항 295**

눈 질병 또는 장애에서 사용하기 위한 제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1에 따른 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염.

**청구항 296**

눈 질병 또는 장애에서 사용하기 위한 LATS 억제제로서, 화합물인 LATS 억제제.

**청구항 297**

약제의 제조를 위한 제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염의 용도.

**청구항 298**

눈 질병 또는 장애를 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 제231항 내지 제233항 중 어느 한 항에서 정의되는 화학식 A1의 화합물 또는 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에서 정의되는 화합물 또는 이의 염의 용도.

**청구항 299**

제294항 내지 제298항 중 어느 한 항에 있어서, 제231항 내지 제235항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단에서의 LATS 억제 방법 또는 제238항 내지 제248항 중 어느 한 항의 세포 집단의 증식 방법을 포함하는, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 300**

제294항, 제295항 또는 제297항 내지 제299항 중 어느 한 항에 있어서, 제249항 내지 제253항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단 또는 제273항 내지 제276항 또는 제278항 내지 제280항 중 어느 한 항의 세포 전달 제조물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 301**

제294항 내지 제300항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 제281항 내지 제286항 중 어느 한 항의 방법 단계를 포함하는, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 302**

제294항 내지 제301항 중 어느 한 항에 있어서, 제249항 내지 제253항 중 어느 한 항에 따른 세포 집단 또는 제273항 내지 제276항, 또는 제278항 내지 제280항 중 어느 한 항에 따른 세포 전달 제조물이 덱사메타손, 사이클로스포린, 토브라마이신 및 세파졸린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 제제(들)와 동시적으로 또는 순차적으로 투여되는, 사용하기 위한 화합물 또는 사용하기 위한 LATS 억제제, 또는 용도.

**청구항 303**

단리된 세포를 바이오매트릭스와 조합하여 세포/바이오매트릭스 혼합물을 형성하는 단계, 혼합물을 대상체의 눈 내로 주사하는 단계, 및 광원을 사용하여 눈에서 세포를 가이드하고 고정함으로써, 눈에서 세포를 바이오프린트하는 단계를 포함하는, 대상체의 눈에 단리된 세포 집단을 이식하는 방법.

**청구항 304**

제303항에 있어서, 단리된 세포가 GelMA인 바이오매트릭스와 조합되고 광 유발 반응에 의한 GelMA의 중합에 의해 각막 상에 바이오프린트되는 방법.

**청구항 305**

제303항 또는 제304항에 있어서, 광원이 350 nm 내지 700 nm 범위의 파장을 갖는 빛을 생성하는 방법.

**청구항 306**

제303항 내지 제305항 중 어느 한 항에 있어서, 파장이 350 nm 내지 420 nm인 방법.

**청구항 307**

제303항 내지 제306항 중 어느 한 항에 있어서, 파장이 365 nm인 방법.

**청구항 308**

제303항 내지 제307항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 세포가 각막 내피 세포인 방법.

**청구항 309**

단리된 세포를 바이오매트릭스와 조합하여 세포/바이오매트릭스 혼합물을 형성하는 단계, 혼합물을 대상체의 눈 상에 적용하는 단계, 및 광원을 사용하여 눈 상에 세포를 가이드하고 고정함으로써, 눈 상에 세포를 바이오프린트하는 단계를 포함하는, 대상체의 눈에 단리된 세포 집단을 이식하는 방법.

**청구항 310**

제309항에 있어서, 단리된 세포가 GelMA인 바이오매트릭스와 조합되고 광 유발 반응에 의한 GelMA의 중합에 의해 눈 표면 상에 바이오프린트되는 방법.

**청구항 311**

제309항 또는 제310항에 있어서, 광원이 350 nm 내지 700 nm 범위의 파장을 갖는 빛을 생성하는 방법.

**청구항 312**

제309항 내지 제311항 중 어느 한 항에 있어서, 파장이 350 nm 내지 420 nm인 방법.

**청구항 313**

제309항 내지 제312항 중 어느 한 항에 있어서, 파장이 365 nm인 방법.

**청구항 314**

제309항 내지 제313항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 세포가 윤부 줄기 세포인 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 서열 목록

[0002] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자 제출된 서열 목록을 포함하며, 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 2018년 4월 23일자로 생성된 상기 ASCII 사본은 파일명이 PAT057699-WO-PCT_SL.txt이며, 크기가 35,778 바이트이다.

[0003] 서문

[0004] 본 발명은 LATS(대형 종양 억제인자 키나제) 억제제에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 6-6 융합 바이사이클릭 헤테로아릴 화합물 및 이러한 화합물을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0005] 본 발명은 또한 세포 치료법/이식을 위한 세포 물질을 제조하기 위한 이러한 화합물의 생체-외 용도에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 LATS 억제제의 사용이 관여되는 증식된 세포 집단, 예컨대 윤부 줄기 세포(LSC) 또는 각막 내피 세포(CEC)를 포함하는 증식된 눈 세포 집단을 생성하는 방법뿐만 아니라 세포, 예컨대 윤부 줄기 세포(LSC) 또는 각막 내피 세포(CEC)를 포함하는 눈 세포 집단 및 상기 세포를 포함하는 제조물, 용도 및 치료법 방법에 관한 것이다.

[0006] 본 발명은 또한 6-6 융합 바이사이클릭 헤테로아릴 화합물, 이러한 화합물을 포함하는 조성물, 및 상처 치유의 촉진에서의, 특히 화상, 혈관, 당뇨병성 및 압력 궤양, 예컨대 정맥성 다리 궤양, 당뇨병성 족부 궤양, 압력 궤양을 포함하는 급성 및 만성 피부 궤양의 치료를 위한 이의 용도에 관한 것이다.

[0007] 본 발명은 추가적으로 6-6 융합 바이사이클릭 헤테로아릴 화합물, 이러한 화합물을 포함하는 조성물, 및 간 재생 및 간 재성장에서뿐만 아니라 관류 장치를 포함하거나 포함하지 않고, 생체-외 기관 기능의 손상 방지에서의 그리고 유지 또는 개선에서의 이의 용도에 관한 것이다.

## *배 경 기 술*

[0008] 기관 재생 및/또는 치유는 여러 심각한 건강 문제를 치료하는 데 중추적인 문제이다.

[0009] 예를 들어 눈에서, 각막 실명은 세계적으로 실명의 세 번째로 많은 원인인 것으로 알려져 있다. 세계적으로 모든 각막 이식체의 대략 절반은 각막 내피 기능이상의 치료를 위해 수행된다.

[0010] 각막은 상이한 층: 각막 상피, 보우만막, 간질, 데스메막 및 내피를 포함하는 투명한 조직이다. 각막 내피는 또한 단층의 인간 각막 내피 세포를 포함하며 장벽 및 이온 펌프 기능을 통해 각막 투명성을 유지하는 것을 돕는다. 이는 각막 간질 및 방수 간 유체, 영양소 및 염의 균형 유지에서 중추적 역할을 담당한다. 투명성을 유지하기 위해, 내피 세포 밀도가 유지되어야 하지만, 내피 세포 밀도는 외상, 질병 또는 내피 이영양증의 결과 크게 감소될 수 있다. 세포 밀도는 또한 노화와 함께 감소된다. 인간 각막 내피는 생체내 증식하는 성향이 제한되어 있다. 세포 밀도가 너무 크게 줄면, 장벽 기능이 손상될 수 있다. 내피 장벽 기능의 손실은 각막 부종 및 시력 손실을 일으킨다. 물집 각막병증의 임상 질환은 합병증을 일으키는 것일 수 있다.

[0011] 각막 내피 기능이상에 의해 유도되는 실명에 대한 현재 유일한 치료는 각막 이식이다. 각막 이식은 기관 이식의 가장 일반적인 형태 중 하나지만, 요구되는 공여자 각막의 이용 가능성이 매우 제한되어 있다. 2012~2013 전세계 조사는 필요한 70건 당 1개의 각막만 이용 가능함을 발견하며, 각막 이식편 조직의 상당한 부족을 정량하였다(Gain at el., (2016) Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. JAMA Ophthalmol. 134:167-173).

[0012] 따라서 각막 내피 기능이상의 치료를 위해 각막 내피 세포를 공급하는 새로운 치료적 접근이 매우 요구된다.

[0013] 각막 상피도 눈에서 유지되어야 한다. 각막 상피는 한 층의 기저 세포 및 다층의 비-케라틴화, 중층, 편평 상피로 이루어진다. 이는 각막의 투명도 및 규칙적 굴절 표면을 유지하는 데 필수적이다. 이는 각막 간질 상에서 투명하고 재생 가능한 보호층으로 작용하며, 윤부에 위치하는 줄기 세포 집단에 의해 보충된다. 윤부 줄기 세포에 질병이 있거나 이것이 부재하는 질환인 윤부 줄기 세포 결핍에서, 건강한 윤부 줄기 세포의 수 감소는 각막 상피 재생능의 감소를 일으킨다.

[0014] 윤부 줄기 세포 결핍은 화학적 또는 열적 화상, 자외선 및 이온화 방사선으로부터의 부상의 결과로서, 또는 심지어 콘택트 렌즈 착용; 유전 장애, 예컨대 무홍채증, 및 면역 장애, 예컨대 스티븐 존슨 증후군 및 눈 흉터 유사물집증의 결과로서 발생할 수 있다. 윤부 줄기 세포의 손실은 부분적이거나 전체적일 수 있고; 단측 또는 양측일 수 있다. 윤부 줄기 세포 결핍의 증상에는 통증, 눈부심, 치유되지 않는 고통스러운 각막 상피 결함, 각막 신혈관형성, 결막 상피에 의한 각막 상피의 대체, 각막 투명성의 손실 및 결과적으로 실명을 야기할 수 있는 시력 감소가 포함된다.

[0015] 윤부 줄기 세포 결핍의 치료에서 사용하기 위한 제품은 2015년에 유럽 연합에서 조건부 판매 승인을 받아(명칭 Holoclar® 하에), 유럽에서 줄기 세포를 함유하는 최초 선진 치료 의약품(ATMP)이 되었다. Holoclar는 줄기 세포를 함유하는 자가 인간 각막 상피 세포의 생체외 증식 제조물이다. 건강한 윤부 조직의 생검이 환자로부터 채취되고, 생체외 증식되고, 수술 전까지 냉동된다. 환자에 투여하기 위해, 해동된 세포는 피브린을 포함하는 막 상에서 성장된 후 환자의 눈 상에 수술로 임플란트된다. 치료법은 물리적 또는 화학적 눈 화상으로 인해 중등도 내지 중증 윤부 줄기 세포 결핍을 갖는 성인에서 사용하기 위한 것이다(Rama P, Matuska S, Paganoni G, Spinelli A, De Luca M, Pellegrini G. (2010) Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. N Engl J Med. 363:147-155). 그러나 이 방법은 오직 자가 사용을 위한 것이며 최소 1~2 제곱밀리미터의 손상되지 않은 조직이 환자로부터 추출될 수 있도록 한 눈에 충분한 생존 윤부가 존재해야 한다는 점에서 제한된다. 또한 각각의 특정 환자에 있어서 자신의 세포 배양이 성공적이지 않을 수 있고 환자가 상기 치료를 수여받을 수 없는 위험이 존재한다. 추가로 또한 쥣과 기원의 영양 세포가 Holoclar 세포 제조물을 제조하기 위해 사용되며, 이는 인간에서 사용하기 위한 제조물에 질병 전파 및 잠재적 면역원성의 위험으로 인해 잠재적인 안전성 우려사항을 도입한다. 또한, Holoclar 세포 제조물은 p63알파 염색에 의해 확인되는 바와 같이, 대략 5%의 윤부 줄기 세포만을 함유한다.

[0016] 따라서 윤부 줄기 세포 결핍의 치료를 위해 윤부 줄기 세포를 공급하는 새로운 치료적 접근이 매우 요구된다.

[0017] 항상성 동안 및 질병 상태에서의 기능적 간 재생은 필수적인 생리적 공정의 유지를 위해 중추적이다. 간의 현저한 재생력에도 불구하고, 상기 공정은 중증 급성 또는 만성 간 부상 후 손상될 수 있다. 간 손상 및 손상된 간 재생은 종종 심각한 유병률 및 사망률을 야기하며 이에 따라 생명을 구하는 간 이식을 필요로 한다. 불행하게도, 간 이식체에 대한 수요는 현재 이용 가능한 공여자 기관의 공급을 크게 웃돈다. 결과적으로, 여러 환자가 생명을 구하는 이식체를 기다리다가 사망하고 있다. 사망 공여자로부터의 분할-간 이식체 또는 생존 공여자로부터의 부분-간 이식체의 사용은 이식편 크기 제약에 의해 제한된다. 부적절한 이식편-대-수신자 체중비(GRWR)를 갖는 부분 간 이식은 이식편 기능이상 및 실패의 발생률을 증가시킨다. 간 재성장을 증가시키는 치료법은, 크기에 기반하여 이식에 부적절한 것으로 간주되었을 부분 간 이식을 허용할 수 있다. 대안적으로, 간 세포사의 억제, 간 기능의 개선, 및 이상 간 구조의 복구에 의한 간 재생은 간 기능을 정상화하여 이식에 대한 필요성을 방지할 수 있다(Forbes SJ and Newsome PN (2016) Liver regeneration - mechanisms and models to clinical application. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 13(8):473-485; Dutkowski P, Linecker M, DeOliveira ML, MÜllhaupt B, Clavien PA (2015) Challenges to Liver Transplantation and Strategies to Improve Outcomes. Gastroenterology, 148(2):307-323).

[0018] 따라서, 간 재성장을 촉진하기 위한 보다 효과적인 치료제에 대한 긴급한 필요성이 남아있다.

[0019] 혈관, 당뇨병성 및 압력 궤양을 포함하는 만성 피부 궤양은 주요한 공중 보건 문제를 이룬다. 상처 치유에 대한 증가된 요구는 상처와 공동이환, 증가된 사망률 및 환자의 삶의 질과 연관되어 반영된다(Demidova-Rice TN, Hamblin MR, & Herman IM (2012) Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 1: normal and chronic wounds: biology, causes, and approaches to care. Advances in skin & wound care 25(7):304-314; Demidova-Rice TN, Hamblin MR, & Herman IM (2012) Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. Advances in skin & wound care 25(8):349-370). 만성 상처를 갖는 환자의 헬스 케어 비용은 미국에서만 매년 약 250억 달러이다. 제한된 효능을 갖는, 1997년 Regranex(PDGF)의 승인 이래, FDA에 의해 새로운 화학적 물질은 승인되지 않았다(Eaglstein WH, Kirsner RS, & Robson MC (2012) Food and Drug Administration (FDA) drug approval end points for chronic cutaneous ulcer studies. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society 20(6):793-796). 내재적으로, 성장 인자는 상처층의 단백분해 환경에서 안정하지 않다. 성장 인자 치료법은 또한 임상 환자 샘플에서 실증된 바와 같이, 상처에서 그 대응 수용체의 낮은 발현을 겪을 수 있었다(Demidova-Rice TN, Hamblin MR, & Herman IM (2012) Acute and impaired wound healing: pathophysiology and current methods for drug delivery, part 2: role of growth factors in normal and pathological wound healing: therapeutic potential and methods of delivery. Advances in skin & wound care 25(8):349-370).

[0020] 따라서, 만성 상처를 갖는 환자에서 상처 치유를 촉진하기 위한 보다 효과적인 치료제에 대한 긴급한 필요성이 남아있다.

[0021] 따라서 눈, 간 및 피부와 같은 신체의 다양한 기관에 영향을 미치는 질환에 대해 세포 증식을 촉진하기 위한 새로운 치료적 접근이 매우 요구된다.

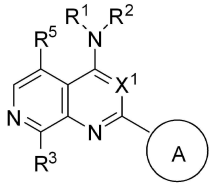
## *발명의 내용*

[0022] 본 발명은 화합물, 이의 염, 및 이의 조성물에 관한 것이며, 화합물은 LATS(대형 종양 억제인자 키나제) 억제제이다. 이들 화합물은 상기에 상세히 나타낸 질환 및 목적을 위한 치료법에서 용도를 갖는다.

[0023] 본 발명의 다양한 양태가 본원에 기재된다.

[0024] 본 발명은 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 염, 또는 입체이성질체에 관한 것이다:

[0025] [화학식 A2]

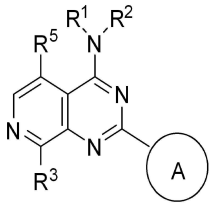


[0026]

[0027] 식 중, $X^1$, 고리 A, $R^1$, $R^2$, $R^3$, 및 $R^5$는 아래에서 상세한 설명에 정의된 바와 같다.

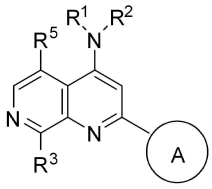
[0028] 바람직한 구현예에서, 화합물은 화학식 I 또는 화학식 II, 또는 이의 하위 화학식, 또는 이의 염에 따른 것이다:

[0029] [화학식 I]



[0030] 또는

[0031] [화학식 II]



[0032] .

[0033] 식 중, 고리 A, $R^1$, $R^2$, $R^3$, 및 $R^5$는 아래에서 상세한 설명에 정의된 바와 같다.

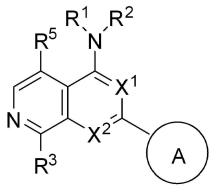
[0034] 다른 양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 정의에 따른 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 하위 화학식 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[0035] 다른 양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 정의에 따른 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 하나 이상의 치료 활성제를 포함하는 조합, 특히 약학 조합에 관한 것이다.

[0036] 다른 양태에서, 본 발명은 치료법에서 사용될 수 있는 화합물 및 조성물에 관한 것이다.

[0037] 하나의 구현예에서, 본 발명은 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물 또는 이의 염, 또는 이의 입체이성질체를 사용하는 세포 또는 세포 집단에서의 LATS 억제 방법에 관한 것이다:

[0038] [화학식 A1]



[0039]

[0040] 식 중, $X^1$, $X^2$, 고리 A, $R^1$, $R^2$, $R^3$, 및 $R^5$는 아래에서 상세한 설명에 정의된 바와 같다. 바람직하게는 염은 약학적으로 허용 가능한 염이다. 본 발명에 따른 세포 집단에서의 LATS 억제 방법의 특정 구현예에서, 화합물, 또는 이의 염은 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘으로부터 선택된다. 본 발명에 따른 세포 집단에서의 LATS 억제 방법의 다른 특정 구현예에서,

화합물, 또는 이의 염은 N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택된다.

[0041] 다른 구현예에서, 본 발명은 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물 또는 이의 염, 또는 이의 입체이성질체를 사용하는 눈 세포 집단에서의 LATS 억제 방법에 관한 것이다. 다른 구현예에서, 본 발명은 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물 또는 이의 염, 또는 이의 입체이성질체를 사용하는 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단에서의 LATS 억제 방법에 관한 것이다. 다른 구현예에서, 본 발명은 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물 또는 이의 염, 또는 이의 입체이성질체를 사용하는 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단에서의 LATS 억제 방법에 관한 것이다.

[0042] 또한 바람직하게는 세포 집단에서의 LATS 억제 방법은 생체외 수행된다. 다른 바람직한 구현예에서, 상기 화합물은 0.5 내지 100마이크로몰 농도, 바람직하게는 0.5 내지 25마이크로몰 농도, 보다 바람직하게는 1 내지 20마이크로몰 농도, 특히 바람직하게는 약 3 내지 10마이크로몰 농도로 존재한다. 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단에서의 LATS 억제 방법의 하나의 바람직한 구현예에서, 화합물은 12 내지 16일 동안 존재하며, 특히 바람직하게는 화합물은 14일 동안 존재한다. 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단에서의 LATS 억제 방법의 다른 구현예에서, 화합물은 1 내지 2주 동안 존재하며 이후 세포는 상기 화합물의 보충 없이 성장 배지에서 일정 기간 동안 배양되고, 바람직하게는 이 기간은 1 내지 2주이다. 세포 집단에서의 LATS 억제 방법의 본 발명의 하나의 구현예에서, LATS 억제제는 LATS1 또는 LATS2, 또는 LATS1 및 LATS2를 억제한다. 보다 바람직한 구현예에서, LATS 억제제는 LATS1 및 LATS2를 억제한다. 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단에서의 LATS 억제 방법의 다른 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 상기 윤부 줄기 세포를 유전적으로 변형하는 단계를 추가로 포함한다. 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단에서의 LATS 억제 방법의 다른 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 상기 각막 내피 세포를 유전적으로 변형하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직하게는 상기 유전적 변형은 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자를 특이적으로 표적화하는 유전자 편집 시스템을 상기 세포 내로 도입하는 단계를 포함한다. 세포 집단에서의 LATS 억제 방법의 다른 바람직한 구현예에서, 방법은 증식된 세포 집단의 생성 후 이들 세포를 헹구어 본 발명에 따른 화합물을 실질적으로 제거하는 추가 단계를 포함한다. 하나의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단에서의 LATS 억제 방법에 의해 수득 가능한 윤부 줄기 세포를 포함하는 증식된 세포 집단에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단에서의 LATS 억제 방법에 의해 수득되는 윤부 줄기 세포를 포함하는 증식된 세포 집단에 관한 것이다. 하나의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단에서의 LATS 억제 방법에 의해 수득 가능한 각막 내피 세포 집단에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 LATS 억제 방법에 의해 수득되는 각막 내피 세포 집단에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 LATS 억제 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 세포 집단 및 국소화 제제인 눈 전달에 적합한 조성물을 포함하는 눈 세포 전달 제조물에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 국소화 제제는 GelMa이다(이는 메타크릴아미드 변형 젤라틴이며, 젤라틴 메타크릴레이트로도 알려져 있음). 다른 특정 구현예에서, 국소화 제제는 피브린 또는 피브린 아교이다. 바람직하게는 윤부 줄기 세포의 세포 전달 제조물은 20% 초과의 윤부 줄기 세포를 갖는다. 또한 바람직하게는 윤부 줄기 세포의 세포 전달 제조물은 20% 초과의 p63알파 양성 세포를 갖는다. 바람직한 소정 양태에서, 본 발명에 따른 LATS 억제 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 세포 집단 또는 본 발명에 따른 세포 전달 제조물은 단지 미량 수준의 본 발명에 따른 화합물을 갖는다. 바람직하게는, 각막 내피 세포의 세포 전달 제조물에서, 각막 내피 세포는 ㎟(면적) 당 500개 초과의 세포 밀도로 세포 전달 제조물에 존재한다. 바람직한 소정 양태에서, 본 발명에 따른 LATS 억제 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 세포 집단 또는 본 발명에 따른 세포 전달 제조물은 단지 미량 수준의 본 발명에 따른 화합물을 갖는다.

[0043] 다른 양태에서, 본 발명은 LATS 억제제의 존재 하에 세포 집단을 배양하는 단계를 포함하는 세포를 배양하는 방법에 관한 것이다. 세포는 본원에 기재된 바와 같은 및/또는 제공된 바와 같은 세포 집단일 수 있다. 바람직하게는 세포는 눈 세포 또는 간 세포이다. 바람직한 구현예에서, 세포는 눈 세포이다. 추가 양태에서, 본 발명은 LATS 억제제의 존재 하에 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 배양하는 단계를 포함하는 세포를 배양하는 방법에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 LATS 억제제의 존재 하에 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단을 배양하는 단계를 포함하는 세포를 배양하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, 본 발명은 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 배양하는 단계를 포함하는 세포를 배양하는 방법에 관한 것이며, LATS 억제제는 본 발명에 따른 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물 또는 이의 염이다. 다른 바람직한 구현예에서, 본 발명은 각막 내피 세포를 포함하는 집단을 배양하는 단계를 포함하는 세포를 배양하는 방법에 관한 것이며, LATS 억제제는 본 발명에 따른 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물 또는 이의 염이다. 바람직하게는 염은 약학적으로 허용 가능한 염이다. 바람직한 구현예에서, 상기 화합물은 0.5 내지 100마이크로몰 농도, 바람직

하게는 0.5 내지 25마이크로몰 농도, 보다 바람직하게는 1 내지 20마이크로몰 농도, 특히 바람직하게는 약 3 내지 10마이크로몰 농도로 존재한다. 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 배양하는 단계를 포함하는 세포를 배양하는 방법의 하나의 바람직한 구현예에서, 화합물은 12 내지 16일 동안 존재하며, 특히 바람직하게는 화합물은 14일 동안 존재한다. 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단을 배양하는 단계를 포함하는 세포를 배양하는 방법의 다른 바람직한 구현예에서, 화합물은 1 내지 2주 동안 존재하며 이후 세포는 상기 화합물의 보충 없이 성장 배지에서 일정 기간 동안 배양되고, 바람직하게는 이 기간은 1 내지 2주이다. 본 발명의 하나의 구현예에서, LATS 억제제는 LATS1 또는 LATS2, 또는 LATS1 및 LATS2를 억제한다. 보다 바람직한 구현예에서, LATS 억제제는 LATS1 및 LATS2를 억제한다. 하나의 구현예에서, 상기 방법은 세포를 유전적으로 변형하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직하게는 상기 유전적 변형은 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자를 특이적으로 표적화하는 유전자 편집 시스템을 상기 세포 내로 도입하는 단계를 포함한다. 바람직하게는 세포는 눈 세포이다. 하나의 구현예에서, 상기 방법은 윤부 줄기 세포를 유전적으로 변형하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 각막 내피 세포를 유전적으로 변형하는 단계를 추가로 포함한다. 다른 바람직한 구현예에서, 세포를 배양하는 방법은 증식된 세포 집단의 생성 후 이들 세포를 헹구어 본 발명에 따른 화합물을 실질적으로 제거하는 추가 단계를 포함한다. 하나의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포를 배양하는 방법에 의해 수득 가능한 증식된 세포 집단에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포를 배양하는 방법에 의해 수득되는 증식된 세포 집단에 관한 것이다. 바람직하게는 세포는 눈 세포이다.

[0044] 하나의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포를 배양하는 방법에 의해 수득 가능한 윤부 줄기 세포를 포함하는 증식된 세포 집단에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포를 배양하는 방법에 의해 수득되는 윤부 줄기 세포를 포함하는 증식된 세포 집단에 관한 것이다. 하나의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 각막 내피 세포를 포함하는 세포를 배양하는 방법에 의해 수득 가능한 각막 내피 세포 집단에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 각막 내피 세포를 포함하는 세포를 배양하는 방법에 의해 수득되는 각막 내피 세포 집단에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포를 배양하는 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 세포 집단 및 국소화 제제인 눈 전달에 적합한 조성물을 포함하는 눈 세포 전달 제조물에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 국소화 제제는 GelMa이다. 다른 특정 구현예에서, 국소화 제제는 피브린 또는 피브린 아교이다. 바람직하게는 윤부 줄기 세포의 세포 전달 제조물은 20% 초과의 윤부 줄기 세포를 갖는다. 또한 바람직하게는 윤부 줄기 세포의 세포 전달 제조물은 20% 초과의 p63알파 양성 세포를 갖는다. 바람직하게는 각막 내피 세포는 ㎟(면적) 당 500개 초과의 세포 밀도로 각막 내피 세포의 세포 전달 제조물에 존재한다. 바람직한 소정 양태에서, 본 발명에 따른 세포를 배양하는 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 세포 집단 또는 본 발명에 따른 세포 전달 제조물은 단지 미량 수준의 본 발명에 따른 화합물을 갖는다.

[0045] 다른 양태에서, 본 발명은 LATS 억제제의 존재 하에 접종 세포 집단을 배양하여 증식된 세포 집단을 생성하는 단계 a)를 포함하는 세포 집단의 증식 방법에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, 세포 집단의 증식 방법은 생체외 수행된다. 바람직하게는 세포는 눈 세포 또는 간 세포이다. 바람직한 구현예에서, 세포는 눈 세포이다. 다른 양태에서, 본 발명은 LATS 억제제의 존재 하에 윤부 줄기 세포를 포함하는 접종 세포 집단을 배양하여 윤부 줄기 세포를 포함하는 증식된 세포 집단을 생성하는 단계 a)를 포함하는 세포 집단의 증식 방법에 관한 것이다. 바람직하게는 LATS 억제제는 본 발명에 따른 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물 또는 이의 염이다. 추가 양태에서, 본 발명은 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 염의 존재 하에 윤부 줄기 세포를 포함하는 접종 세포 집단을 배양하여 윤부 줄기 세포를 포함하는 증식된 세포 집단을 생성하는 단계 a)를 포함하는 세포 집단의 증식 방법에 관한 것이다. 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 화합물은 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식 또는 이의 염으로부터 선택된다. 다른 양태에서, 본 발명은 LATS 억제제의 존재 하에 각막 내피 세포를 포함하는 접종 세포 집단을 배양하여 각막 내피 세포를 포함하는 증식된 세포 집단을 생성하는 단계 a)를 포함하는 세포 집단의 증식 방법에 관한 것이다. 바람직하게는 LATS 억제제는 본 발명에 따른 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물 또는 이의 염이다. 추가 양태에서, 본 발명은 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 존재 하에 각막 내피 세포를 포함하는 접종 세포 집단을 배양하여 각막 내피 세포를 포함하는 증식된 세포 집단을 생성하는 단계 a)를 포함하는 세포 집단의 증식 방법에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 화합물은 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식으로부터 선택된다. 또한 바람직하게는 염은 약학적으로 허용 가능한 염이다. 바람직하게는 상기 화합물은 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-1-(2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)아미노)프로폭시)프로판-2-올; 2,4-디메틸-4-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)아미노)펜탄-2-올; N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사

이클로부틸)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-이소프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; 2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)아미노)프로판-1-올; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘; N-사이클로펜틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)아미노)프로폭시)에탄-1-올; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; 및 2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로 구성되는 화합물 군으로부터 선택된다.

[0046] 또한 바람직하게는 상기 화합물 또는 이의 염은 N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민 및 (S)-N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택된다.

[0047] 세포 집단의 증식 방법의 바람직한 구현예에서, 상기 화합물은 0.5 내지 100마이크로몰 농도, 바람직하게는 0.5 내지 25마이크로몰 농도, 보다 바람직하게는 1 내지 20마이크로몰 농도, 특히 바람직하게는 약 3 내지 10마이크로몰 농도로 존재한다. 단계 a)에서 윤부 줄기 세포에 관련된 세포 집단의 증식 방법의 하나의 바람직한 구현예에서, 화합물은 12 내지 16일 동안 존재하며, 특히 바람직하게는 화합물은 14일 동안 존재한다. 단계 a)에서 각막 내피 세포에 관련된 세포 집단의 증식 방법의 다른 바람직한 구현예에서, 화합물은 1 내지 2주 동안 존재하며 이후 세포가 상기 화합물의 보충 없이 성장 배지에서 일정 기간 동안 배양되는 단계 b)가 수행되며, 바람직하게는 이 기간은 1 내지 2주이다. 윤부 줄기 세포에 관련된 세포 집단의 증식 방법의 특정 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물은 접종된 양의 세포의 30배 초과 증식을 생성한다. 윤부 줄기 세포에 관련된 세포 집단의 증식 방법의 다른 특정 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물은 접종된 양의 세포의 100배 내지 2200배, 바람직하게는 600배 내지 2200배 증식을 생성한다. 윤부 줄기 세포에 관련된 세포 집단의 증식 방법의 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 방법은 20% 초과 윤부 줄기 세포를 갖는 세포 집단을 생성한다. 윤부 줄기 세포에 관련된 세포 집단의 증식 방법의 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 방법은 50% 초과 윤부 줄기 세포를 갖는 세포 집단을 생성한다. 다른 양태에서, 본 발명에 따른 윤부 줄기 세포에 관련된 세포 집단의 증식 방법은 20% 초과의 p63알파를 발현하는 세포 집단을 생성한다. 다른 양태에서, 본 발명에 따른 윤부 줄기 세포에 관련된 세포 집단의 증식 방법은 50% 초과의 p63알파를 발현하는 세포 집단을 생성한다. 각막 내피 세포에 관련된 세포 집단의 증식 방법의 특정 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물은 접종된 양의 세포의 10배 초과 증식을 생성한다. 각막 내피 세포에 관련된 세포 집단의 증식 방법의 다른 특정 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물은 접종된 양의 세포의 15배 내지 600배, 바람직하게는 20배 내지 550배 증식을 생성한다. 본 발명의 하나의 구현예에서, LATS 억제제는 LATS1 또는 LATS2, 또는 LATS1 및 LATS2를 억제한다. 보다 바람직한 구현예에서, LATS 억제제는 LATS1 및 LATS2를 억제한다. 다른 바람직한 구현예에서, 상기 세포 집단의 증식 방법은 유전자 편집 시스템의 사용을 추가로 포함한다. 바람직하게는 상기 방법은 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자를 특이적으로 표적화하는 유전자 편집 시스템의 사용을 포함한다. 또한 바람직하게는 세포는 눈 세포 또는 간 세포이다. 바람직한 구현예에서, 세포는 눈 세포이다. 다른 바람직한 구현예에서, 상기 세포 집단의 증식 방법은 윤부 줄기 세포를 유전적으로 변형하는 단계를 추가로 포함하며, 바람직하게는 상기 유전적 변형은 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자를 특이적으로 표적화하는 유전자 편집 시스템을 상기 세포 내로 도입하는 단계를 포함한다. 다른 바람직한 구현예에서, 상기 방법은 각막 내피 세포를 유전적으로 변형하는 단계를 추가로 포함하며, 바람직하게는 상기 유전적 변형은 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자를 특이적으로 표적화하는 유전자 편집 시스템을 상기 세포 내로 도입하는 단계를 포함한다. 다른 바람직한 구현예에서, 세포 집단의 증식 방법은 증식된 세포 집단을 헹구어 본 발명에 따른 화합물을 실질적으로 제거하는 단계 c)를 추가로 포함한다.

[0048] 하나의 양태에서, 본 발명은 LATS 억제제, 성장 배지 및 세포 집단 증식을 위한 지침을 포함하는 키트에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능한 세포 집단에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득되는 세포 집단에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능한 눈 세포 집단에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득되는 눈 세포 집단에 관한 것이다. 하나의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 윤부 줄기 세포에 관한 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능한 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 윤부 줄기 세포에 관한 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득되는 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단

에 관한 것이다. 하나의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 각막 내피 세포에 관한 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능한 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 각막 내피 세포에 관한 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득되는 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 세포 집단 및 국소화 제제인 눈 전달에 적합한 조성물을 포함하는, 눈 세포 전달 제조물에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 국소화 제제는 GelMa이다. 다른 특정 구현예에서, 국소화 제제는 피브린 또는 피브린 아교이다. 바람직하게는 윤부 줄기 세포의 세포 전달 제조물은 20% 초과의 윤부 줄기 세포를 갖는다. 또한 바람직하게는 윤부 줄기 세포의 세포 전달 제조물은 20% 초과의 p63알파 양성 세포를 갖는다. 바람직하게는 각막 내피 세포는 ㎟(면적) 당 500개 초과의 세포 밀도로 각막 내피 세포의 세포 전달 제조물에 존재한다. 바람직한 소정 양태에서, 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 세포 집단 또는 본 발명에 따른 세포 전달 제조물은 단지 미량 수준의 본 발명에 따른 화합물을 갖는다.

[0049] 세포 집단의 증식 방법의 일부 양태에서, 방법은 유전자 편집 시스템의 사용을 추가로 포함한다. 바람직하게는 유전자 편집 시스템은 세포를 유전적으로 변형하기 위해 사용된다. 본 발명에 따른 방법의 구현예들에서, 유전적 변형은 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자의 발현 및/또는 기능을 감소시키거나 제거하는 단계를 포함한다. 또한 바람직하게는 유전자 편집 시스템은 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자를 특이적으로 표적화한다. 바람직하게는 상기 유전자 편집 시스템은 CRISPR 유전자 편집 시스템, TALEN 유전자 편집 시스템, 아연 핑거 뉴클레아제 유전자 편집 시스템, 메가뉴클레아제 유전자 편집 시스템, AAV 벡터 유도 상동성 재조합 및 렌티바이러스 벡터-기반 게놈 편집 기술로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0050] 하나의 양태에서, 본 발명은 단리된 세포 집단에 관한 것이며, 세포의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 초과가 윤부 줄기 세포이다. 바람직하게는 20% 초과가 윤부 줄기 세포이다. 보다 바람직하게는 50% 초과가 윤부 줄기 세포이다. 다른 바람직한 구현예에서, 70% 초과가 윤부 줄기 세포이다. 특히 바람직하게는 90% 초과가 윤부 줄기 세포이다. 하나의 구현예에서, 세포는 유전자 편집되었다.

[0051] 다른 양태에서, 본 발명은 단리된 세포 집단에 관한 것이며, 세포의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 초과가 p63알파 발현 세포이다. 바람직하게는 20% 초과가 p63알파 양성이다. 보다 바람직하게는 50% 초과가 p63알파 양성이다. 다른 바람직한 구현예에서, 70% 초과가 p63알파 양성이다. 특히 바람직하게는 90% 초과가 p63알파 양성이다. 하나의 구현예에서, 세포는 유전자 편집되었다.

[0052] 추가 양태에서, 본 발명은 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단 또는 본 발명에 따른 세포 집단에 관한 것이며, 하나 이상의 상기 세포는 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자의 하나 이상의 핵산 잔기의 비-자연 발생 삽입 또는 결실을 포함하고, 삽입 및/또는 결실은 상기 유전자의 발현 또는 기능의 감소 또는 제거를 일으킨다. 바람직한 구현예에서, 상기 유전자는 B2M, HLA-A, HLA-B 및 HLA-C로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 세포는 유전적으로 변형된 수준의 B2M 발현을 갖는다.

[0053] 추가 양태에서, 본 발명은 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단 또는 본 발명에 따른 세포 집단에 관한 것이며, 하나 이상의 상기 세포는 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자의 하나 이상의 핵산 잔기의 비-자연 발생 삽입 또는 결실을 포함하고, 삽입 및/또는 결실은 상기 유전자의 발현 또는 기능의 감소 또는 제거를 일으킨다. 바람직한 구현예에서, 상기 유전자는 B2M, HLA-A, HLA-B 및 HLA-C로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 세포는 유전적으로 변형된 수준의 B2M 발현을 갖는다.

[0054] 추가 양태에서, 본 발명은 유전자 편집된 윤부 줄기 세포 또는 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단에 관한 것이다. 추가 양태에서, 본 발명은 유전자 편집된 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단에 관한 것이다. 바람직하게는 유전자 편집은 CRISPR에 의해 수행되었다. 바람직하게는 또한 B2M 유전자가 편집되었다.

[0055] 하나의 양태에서, 본 발명은 LATS 억제제를 포함하는 세포의 성장 촉진제에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 본 발명은 LATS 억제제를 포함하는 눈 세포의 성장 촉진제에 관한 것이다. 하나의 양태에서, 본 발명은 LATS 억제제를 포함하는 윤부 줄기 세포의 성장 촉진제에 관한 것이다. 바람직하게는 LATS 억제제는 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물 또는 이의 염이다. 다른 양태에서, 본 발명은 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물 또는 이의 염을 포함하는 윤부 줄기 세포의 성장 촉진제에 관한 것이다. 하나의 양태에서, 본 발명은 LATS 억제제를 포함하는 각막 내피 세포의 성장 촉진제에 관한 것이다. 바람직하게는 LATS 억제제는 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물 또는 이의 염이다. 다른 양태에서, 본 발명은 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물 또는 이의 염을 포함하는 각막 내피 세포의 성장 촉진제에 관한 것이다.

[0056] 하나의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체 및 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 바람직하게는 조성물은 보존 또는 냉동보존 용액을 추가로 포함한다.

[0057] 다른 양태에서, 본 발명은 LATS 억제제 및 성장 배지를 포함하는 세포 증식 배지에 관한 것이다. 바람직하게는 LATS 억제제는 본 발명에 따른 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물이다. 하나의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물 및 성장 배지를 포함하는 세포 증식 배지에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 세포 증식 배지는 본원에 제공된 바와 같은 세포를 추가로 포함한다. 바람직하게는 세포 증식 배지는 눈 세포를 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, 세포 증식 배지는 윤부 줄기 세포를 추가로 포함한다. 바람직하게는 윤부 줄기 세포는 현탁액 중에 있다. 다른 구현예에서, 세포 증식 배지는 각막 내피 세포를 포함한다. 바람직하게는 각막 내피 세포는 현탁액 중에 있다.

[0058] 하나의 양태에서, 본 발명은 LATS 억제제 및 본원에 기재된 및/또는 제공된 세포 집단의 세포를 포함하는 세포 제조물에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 LATS 억제제 및 눈 세포를 포함하는 세포 제조물에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 LATS 억제제 및 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 제조물에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 LATS 억제제 및 각막 내피 세포를 포함하는 세포 제조물에 관한 것이다. 바람직하게는 LATS 억제제는 본 발명에 따른 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물이다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 화학식 A1의 화합물 및 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 제조물에 관한 것이다. 대안적인 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 화학식 A1의 화합물 및 각막 내피 세포를 포함하는 세포 제조물에 관한 것이다. 바람직하게는 세포 제조물은 성장 배지를 추가로 포함한다. 특히 바람직하게는 세포 제조물은 보존 또는 냉동보존 용액을 추가로 포함한다.

[0059] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 제조물 및 국소화 제제인 눈 전달에 적합한 조성물을 포함하는, 눈 세포 전달 제조물에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 국소화 제제는 GelMa이다. 다른 특정 구현예에서, 국소화 제제는 피브린 또는 피브린 아교이다. 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 제조물 및 국소화 제제인 눈 전달에 적합한 조성물을 포함하는, 눈 세포 전달 제조물에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 국소화 제제는 GelMa이다. 다른 특정 구현예에서, 국소화 제제는 피브린 또는 피브린 아교이다. 바람직한 소정 양태에서, 본 발명에 따른 세포 제조물은 단지 미량 수준의 본 발명에 따른 화합물을 갖는다. 다른 특정 구현예에서, 세포 전달 제조물에서 세포의 20% 초과가 윤부 줄기 세포이다. 추가 특정 구현예에서, 세포 전달 제조물에서 세포의 20% 초과가 p63알파 발현 세포이다.

[0060] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 제조물 및 국소화 제제인 눈 전달에 적합한 조성물을 포함하는, 눈 세포 전달 제조물에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 국소화 제제는 GelMa이다. 바람직하게는 각막 내피 세포는 현탁액 중에 있다. 대안적인 구현예에서, 각막 내피 세포는 ㎟(면적) 당 500개 초과의 세포 밀도로 세포 전달 제조물에 존재한다. 특히 바람직하게는 각막 내피 세포는 1000개 내지 3500개 세포/㎟(면적), 보다 바람직하게는 2000개 내지 약 3000개 세포/㎟(면적)의 밀도로 존재한다. 바람직한 소정 양태에서, 본 발명에 따른 세포 제조물은 단지 미량 수준의 본 발명에 따른 화합물을 갖는다.

[0061] 바람직하게는 본 발명에 따른 방법 또는 세포 제조물에서의 성장 배지는 우태 혈청(FBS)이 보충된 DMEM(둘베코 변형 이글 배지), 인간 혈청을 함유하는 인간 내피 혈청 비함유(SF) 배지, X-VIVO15 배지 및 선택적으로 염화칼슘이 보충되는 DMEM/F12로 구성되는 군으로부터 선택되며; 바람직하게는 X-VIVO15 배지이다.

[0062] 바람직하게는 본 발명에 따른 보존 또는 냉동보존 용액은 Optisol 또는 PBS(인산염 완충 식염수)인 용액을 포함하며, 냉동보존 용액은 글리세롤, 디메틸 설폭시드, 프로필렌 글리콜 또는 아세트아미드를 추가로 포함한다.

[0063] 다른 양태에서, 본 발명은 눈 전달에 적합한 조성물 및 LATS 억제제를 포함하는 키트에 관한 것이다. 바람직하게는 LATS 억제제는 본 발명에 따른 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물이다. 다른 양태에서, 본 발명은 눈 전달에 적합한 조성물 및 본 발명에 따른 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물을 포함하는 키트에 관한 것이다. 바람직하게는 키트는 사용 지침을 갖는다. 하나의 구현예에서, 눈 전달에 적합한 조성물은 국소화 제제 또는 국소 점안제이다. 바람직하게는 눈 전달에 적합한 조성물은 국소화 제제이다. 특정 구현예에서, 키트는 윤부 줄기 세포를 추가로 포함한다. 키트의 다른 특정 구현예에서, 눈 전달에 적합한 조성물은 GelMa인 국소화 제제이다. 키트의 대안적인 특정 구현예에서, 눈 전달에 적합한 조성물은 피브린 또는 피브린 아교인 국소화 제제이다. 다른 특정 구현예에서, 키트에서 세포의 20% 초과가 윤부 줄기 세포이다. 추가 특정 구현예에서, 키트에서 세포의 20% 초과가 p63알파 발현 세포이다. 대안적인 특정 구현예에서, 키트는 각막 내피 세포를 포함한다. 다른 특정 구현예에서, 각막 내피 세포의 눈 전달에 적합한 조성물은 GelM인 국소화 제제이다. 다른 특정

구현예에서, 각막 내피 세포는 단층으로 존재한다. 바람직하게는 각막 내피 세포는 ㎟(면적) 당 500개 초과의 세포 밀도로 존재한다. 특히 바람직하게는 각막 내피 세포는 1000개 내지 3500개 세포/㎟(면적), 보다 바람직하게는 2000개 내지 약 3000개 세포/㎟(면적)의 밀도로 존재한다.

[0064] 본 발명에 따른 바람직한 구현예에서, 눈 전달에 적합한 조성물은 바이오매트릭스인 국소화 제제이다. 바람직하게는 본 발명에 따른 눈 전달에 적합한 조성물은 피브린, 콜라겐, 젤라틴, 셀룰로스, 양막, 피브린 아교, 폴리에틸렌(글리콜) 디아크릴레이트(PEGDA), GelMA, 히알루론산, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 옥시드, 폴리프로필렌 옥시드, 폴록사머, 폴리비닐 알코올, 폴리아크릴산, 폴리메타크릴산, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리(락티드-코-글리콜리드), 알기네이트, 젤라틴, 콜라겐, 피브리노겐, 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 하이드록시에틸셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 하이드록시프로필-구아, 겔란 검, 구아 검, 잔탄 검 및 카복시메틸셀룰로스뿐만 아니라 이의 유도체, 이의 공중합체, 및 이의 조합 중 하나 이상을 포함하는 중합체, 가교-중합체, 또는 하이드로겔을 포함하는 국소화 제제로 구성되는 군으로부터 선택되는 국소화 제제이다. 본 발명에 따른 바람직한 구현예에서, 눈 전달에 적합한 조성물은 GelMa, 피브린 또는 피브린 아교인 국소화 제제이다. 본 발명에 따른 특정 구현예에서, 눈 전달에 적합한 조성물은 GelMa인 국소화 제제이다. 본 발명에 따른 다른 특정 구현예에서, 눈 전달에 적합한 조성물은 피브린 또는 피브린 아교인 국소화 제제이다. 바람직하게는 국소화 제제는 피브린 아교이다. 예를 들어, TISSEEL VH 피브린 실란트(Baxter AG, Vienna, Austria)를 포함하는 피브린 아교가 당분야에 알려져 있다(Panda et al., 2009, Indian J Ophthalmol. Sep-Oct; 57(5): 371-379]). 하나의 구현예에서, 피브린 아교가 윤부 전달 세포의 전달을 위해 사용된다. 다른 구현예에서, GelMa가 각막 내피 세포의 전달을 위해 사용된다.

[0065] 윤부 줄기 세포가 국소화 제제와의 조합으로 존재하는 본 발명에 따른 보다 바람직한 구현예에서, 세포의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 초과는 윤부 줄기 세포이다. 바람직하게는 20% 초과가 윤부 줄기 세포이다. 보다 바람직하게는 50% 초과가 윤부 줄기 세포이다. 다른 바람직한 구현예에서, 70% 초과가 윤부 줄기 세포이다. 특히 바람직하게는 90% 초과가 윤부 줄기 세포이다.

[0066] 세포가 국소화 제제와의 조합으로 존재하는 본 발명에 따른 추가로 바람직한 구현예에서, 세포의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 초과는 p63알파 발현 세포이다. 바람직하게는 20% 초과가 p63알파 양성 세포이다. 보다 바람직하게는 50% 초과가 p63알파 양성 세포이다. 다른 바람직한 구현예에서, 70% 초과가 p63알파 양성 세포이다. 특히 바람직하게는 90% 초과가 p63알파 양성 세포이다.

[0067] 본 발명에 따른 보다 바람직한 구현예에서, 각막 내피 세포는 국소화 제제와의 조합으로 존재한다. 바람직하게는 각막 내피 세포는 단층으로 존재한다. 보다 바람직하게는 각막 내피 세포는 ㎟(면적) 당 500개 초과의 세포 밀도로 존재한다. 특히 바람직하게는 각막 내피 세포는 1000개 내지 3500개 세포/㎟(면적), 보다 구체적으로 바람직하게는 2000개 내지 약 3000개 세포/㎟(면적)의 밀도로 존재한다.

[0068] 본 발명의 추가로 특히 바람직한 구현예에서, LATS 억제제는 LATS1 또는 LATS2, 또는 LATS1 및 LATS2를 억제한다. 본 발명에 따른 특히 더 바람직한 구현예에서, LATS 억제제는 LATS1 및 LATS2를 억제한다.

[0069] 본 발명에 따른 바람직한 구현예에서, 화합물은 2-메틸-1-(2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)아미노)프로폭시)프로판-2-올; N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (S)-N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2,4-디메틸-4-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)아미노)펜탄-2-올; N-이소프로필-N-메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로부틸)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;
N-이소프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; 2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)아미노)프로판-1-올;
2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘; N-사이클로펜틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; 2-(2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)아미노)프로폭시)에탄-1-올; 및 (R)-N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로 구성되는 군으로부터 선택된

다.

[0070] 또한 바람직하게는 상기 화합물 또는 이의 염은 N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민 및 (S)-N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택된다. 바람직하게는 상기 화합물 또는 이의 염은 N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민이다.

[0071] 본 발명에 따른 특히 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 화합물은 0.5 내지 100마이크로몰 농도, 바람직하게는 0.5 내지 25마이크로몰 농도, 보다 바람직하게는 1 내지 20마이크로몰 농도, 특히 바람직하게는 약 3 내지 10마이크로몰 농도로 존재한다.

[0072] 본 발명은 하나의 양태에서, 대상체에 세포 집단을 이식하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 세포 집단의 증식 방법 또는 세포를 배양하는 방법 또는 본 발명에 따른 LATS 억제 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 세포 집단을 투여하는 단계를 포함한다.

[0073] 본 발명은 추가로 대상체의 눈 상에 눈 세포 집단을 이식하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법 또는 세포를 배양하는 방법 또는 LATS 억제 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 세포 집단을 투여하는 단계를 포함하고, 세포는 눈 세포이다. 바람직하게는 눈 세포는 윤부 줄기 세포 또는 각막 내피 세포이다. 본 발명은 다른 양태에서, 대상체의 각막 상으로 눈 세포 집단을 이식하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 본 발명에 따른 세포 전달 제조물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0074] 본 발명은 다른 양태에서, 대상체의 각막 상으로 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 이식하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법 또는 세포를 배양하는 방법 또는 LATS 억제 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명은 다른 양태에서, 대상체의 각막 상으로 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 이식하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 본 발명에 따른 세포 전달 제조물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0075] 본 발명은 다른 양태에서, 대상체의 각막 상으로 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 이식하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 본 발명에 따른 LATS 억제제를 포함하는 세포 증식 배지로 배양하여 상기 집단을 증식시키는 단계, 바람직하게는 증식된 세포 집단을 헹구어 LATS 억제제를 실질적으로 제거하는 단계, 및 상기 세포를 상기 대상체의 각막 상으로 투여하는 단계를 포함한다. 바람직하게는 상기 세포 집단은 상기 투여 전에 바이오매트릭스와 조합된다. 특정 구현예에서, 상기 세포 집단은 상기 투여 전에 GelMA인 바이오매트릭스와 조합된다. 다른 특정 구현예에서, 상기 세포 집단은 상기 투여 전에 피브린 아교와 조합된다. 하나의 구현예에서, 상기 세포 집단은 콘택트 렌즈인 담체와 조합된다. 특정 구현예에서, 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단은 GelMA인 바이오매트릭스와 조합되며 GelMA는 콘택트 렌즈인 담체 상에 중합된다. 다른 특정 구현예에서, 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단은 피브린 아교 및 콘택트 렌즈와 조합된다.

[0076] 본 발명은 하나의 양태에서, 대상체의 각막 상으로 각막 내피 세포 집단을 이식하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법 또는 세포를 배양하는 방법 또는 LATS 억제 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 각막 내피 세포 집단을 투여하는 단계를 포함한다. 본 발명은 다른 양태에서, 대상체의 각막 상으로 각막 내피 세포 집단을 이식하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 본 발명에 따른 세포 전달 제조물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0077] 본 발명은 다른 양태에서, 대상체의 각막 상으로 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단을 이식하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단을 본 발명에 따른 LATS 억제제를 포함하는 세포 증식 배지로 배양하여 상기 집단을 증식시키는 단계, 증식된 세포 집단을 헹구어 LATS 억제제를 실질적으로 제거하는 단계, 및 상기 세포를 상기 대상체의 각막 상으로 투여하는 단계를 포함한다. 바람직하게는 상기 세포는 상기 투여 전에 바이오매트릭스와 조합된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 상기 투여 전에 GelMA인 바이오매트릭스와 조합된다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 각막 내피 세포는 눈 표면 상에 바이오프린트되는 바이오매트릭스와 조합된다. 특히 바람직하게는 상기 각막 내피 세포는 GelMA이며 광 유발 반응에 의해 GelMA의 중합에 의해 눈 표면 상으로 바이오프린트되는 바이오매트릭스와 조합된다.

[0078] 본 발명은 다른 양태에서, 세포를 바이오매트릭스와 조합하여 세포/바이오매트릭스 혼합물을 형성하는 단계, 혼합물을 대상체의 눈 내로 주사하거나 혼합물을 대상체의 눈 표면 상으로 적용하는 단계, 및 광원, 예컨대 자외선 A 또는 백색 광원을 사용하여, 예컨대 각막 상으로 세포를 가이드하고 고정함으로써 눈 내 또는 눈 상에 세포를 바이오프린트하는 단계를 포함하는, 대상체의 눈에 세포 집단을 이식하는 방법에 관한 것이다. 소정 구현예에서, 광원은 적어도 350 nm인 파장의 빛을 생성한다. 소정 구현예에서, 광원은 350 nm 내지 420 nm 범위의

빛을 생성한다. 예를 들어, LED 광원이 365 nm 또는 405 nm 파장, 또는 350 nm 초과의 임의의 다른 파장의 빛을 생성하기 위해 사용될 수 있고, 또는 350 nm 내지 700 nm의 파장, 예를 들어 365 nm 또는 405 nm의 파장을 갖는 빛을 생성하기 위해 대역 필터를 갖는 수은 램프가 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 광원은, 예를 들어 400 nm 내지 700 nm 범위의 파장을 갖는 가시, 백색 빛을 생성한다. 소정 구현예에서, 세포는 눈 세포, 예컨대 각막 세포, 예를 들어 각막 내피 세포이다.

[0079] 본 발명은 다른 양태에서, LATS 억제제를 포함하는 세포 증식 배지에서 각막 내피 세포 집단을 배양하는 단계, 각막 내피 세포를 바이오매트릭스와 조합하여 세포/바이오매트릭스 혼합물을 형성하는 단계, 혼합물을 대상체의 눈 내로 주사하는 단계, 및 광원, 예컨대 UVA 또는 LED 또는 가시 광원을 사용하여 각막 상으로 세포를 가이드하고 고정함으로써 눈 내에 세포를 바이오프린트하는 단계를 포함하는, 대상체의 눈에 각막 내피 세포 집단을 이식하는 방법에 관한 것이다.

[0080] 본 발명은 추가 양태에서, LATS 억제제를 사용하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다. 바람직하게는 LATS 억제제는 본 발명에 따른 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물이다. 본 발명은 추가 양태에서, 본 발명에 따른 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물을 사용하는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다. 바람직한 특정 구현예에서, 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법은 본 발명에 따른 세포 집단에서의 LATS 억제 방법 또는 세포 집단의 증식 방법을 추가로 포함하며, 상기 세포는 눈 세포이다. 바람직하게는 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 치료 유효량의 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하며, 상기 세포는 눈 세포이다. 다른 바람직한 구현예에서, 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법은 본 발명에 따른 치료 유효량의 세포 전달 제조물을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하며, 상기 세포는 눈 세포이다. 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법의 다른 바람직한 구현예에서, 방법은 본 발명에 따른 대상체의 눈으로 눈 세포를 포함하는 세포 집단을 이식하는 방법 단계를 포함한다. 바람직하게는 눈 세포는 윤부 줄기 세포 또는 각막 내피 세포이다. 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법의 다른 바람직한 구현예에서, 방법은 본 발명에 따른 대상체의 각막 상으로 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 이식하는 방법 단계를 포함한다. 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법의 대안적으로 바람직한 구현예에서, 방법은 본 발명에 따른 대상체의 각막 상으로 각막 내피 세포 집단을 이식하는 방법 단계를 포함한다. 본 발명에 따른 눈 질병 또는 장애의 예방 또는 치료 방법의 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 세포 집단 또는 본 발명에 따른 세포 전달 제조물은 덱사메타손, 사이클로스포린, 토브라마이신, 및 세파졸린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 제제(들)와 동시적으로 또는 순차적으로 투여된다.

[0081] 하나의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 세포 집단 또는 본 발명에 따른 세포 전달 제조물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에 세포 집단을 이식하는 방법에서 사용하기 위한 YAP(yes 연관 단백질) 조절제에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 YAP 조절제는 LATS 억제제이다. 바람직하게는 세포는 눈 세포이다.

[0082] 하나의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 세포 집단 또는 본 발명에 따른 세포 전달 제조물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 각막 상으로 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 이식하는 방법에서 사용하기 위한 YAP(yes 연관 단백질) 조절제에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 YAP 조절제는 LATS 억제제이다.

[0083] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 세포 집단 또는 본 발명에 따른 세포 전달 제조물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 윤부 줄기 세포 결핍을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 YAP 조절제에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 YAP 조절제는 LATS 억제제이다.

[0084] 하나의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 세포 집단 또는 본 발명에 따른 세포 전달 제조물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 각막 상으로 각막 내피 세포 집단을 이식하는 방법에서 사용하기 위한 YAP(yes 연관 단백질) 조절제에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 YAP 조절제는 LATS 억제제이다.

[0085] 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 세포 집단 또는 본 발명에 따른 세포 전달 제조물의 치료 유효량을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 각막 내피 기능이상을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 YAP 조절제에 관한 것이다. 바람직하게는 상기 YAP 조절제는 LATS 억제제이다.

[0086] 다른 구현예에서, 본 발명은 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는 질병 또는 장애의 치료 방법에 관한 것이며, 집단은 LATS1 및 LATS2 키나제의 활성을 억제할 수 있는 제제의 존재 하에 성장되었고; 이에 의해 YAP 전위를 유도하고 세포 증식을 위한 하류 유전자 발현을 유도하였다. 추가 구현예에서, 제제는 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다. 바람직하게는 세포는 눈 세포이다.

[0087] 하나의 양태에서, 본 발명은 치료법에서 또는 약제로서 사용하기 위한 본 발명에 따른 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이다. 바람직하게는 화합물은 눈 질병 또는 장애에서 사용하기 위한 것이다.

[0088] 다른 양태에서, 본 발명은 눈 질병 또는 장애에서 사용하기 위한 LATS 억제제에 관한 것이며, 바람직하게는 LATS 억제제는 화합물이다. 바람직하게는 화합물은 본 발명에 따른 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다.

[0089] 다른 양태에서, 본 발명은 약제의 제조에서 본 발명에 따른 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도에 관한 것이다. 추가 양태에서, 본 발명은 눈 질병 또는 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에서 본 발명에 따른 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도에 관한 것이다.

[0090] 본 발명에 따른 사용을 위한 화합물 또는 본 발명에 따른 사용을 위한 LATS 억제제 또는 본 발명에 따른 약제의 제조에서의 화합물의 용도의 바람직한 특정 구현예에서, 이 용도는 본 발명에 따른 세포 집단에서의 LATS 억제 방법 또는 세포 집단의 증식 방법을 추가로 포함한다.

[0091] 본 발명에 따른 사용을 위한 화합물 또는 본 발명에 따른 사용을 위한 LATS 억제제 또는 본 발명에 따른 약제의 제조에서의 화합물의 용도의 추가의 바람직한 특정 구현예에서, 이 용도는 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 치료 유효량의 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 것을 포함한다. 본 발명에 따른 사용을 위한 화합물 또는 본 발명에 따른 사용을 위한 LATS 억제제 또는 본 발명에 따른 약제의 제조에서의 화합물의 용도의 추가의 바람직한 구현예에서, 이 용도는 본 발명에 따른 치료 유효량의 세포 전달 제조물을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 것을 포함한다. 본 발명에 따른 사용을 위한 화합물 또는 본 발명에 따른 사용을 위한 LATS 억제제 또는 본 발명에 따른 약제의 제조에서의 화합물의 용도의 하나의 바람직한 구현예에서, 이 용도는 본 발명에 따른 대상체의 각막 상으로 눈 세포를 포함하는 세포 집단을 이식하는 방법 단계를 포함한다. 본 발명에 따른 사용을 위한 화합물 또는 본 발명에 따른 사용을 위한 LATS 억제제 또는 본 발명에 따른 약제의 제조에서의 화합물의 용도의 다른 보다 바람직한 구현예에서, 이 용도는 본 발명에 따른 대상체의 각막 상으로 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 이식하는 방법 단계를 포함한다. 본 발명에 따른 사용을 위한 화합물 또는 본 발명에 따른 사용을 위한 LATS 억제제 또는 본 발명에 따른 약제의 제조에서의 화합물의 용도의 다른 보다 바람직한 구현예에서, 이 용도는 본 발명에 따른 대상체의 각막 상으로 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단을 이식하는 방법 단계를 포함한다. 본 발명에 따른 사용을 위한 화합물 또는 본 발명에 따른 사용을 위한 LATS 억제제 또는 본 발명에 따른 약제의 제조에서의 화합물의 용도의 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 세포 집단 또는 본 발명에 따른 세포 전달 제조물은 덱사메타손, 사이클로스포린, 토브라마이신, 및 세파졸린으로 구성되는 군으로부터 선택되는 제제(들)와 동시적으로 또는 순차적으로 투여된다.

[0092] 본 발명에 따른 바람직한 구현예에서, 눈 질병 또는 장애는 윤부 줄기 세포 결핍과 연관된다. 보다 바람직한 구현예에서, 눈 질병 또는 장애는 윤부 줄기 세포 결핍이다. 보다 바람직하게는 눈 질병 또는 장애는 화학적 화상, 열적 화상, 방사선 부상, 무홍채증, 공막화각막, 다발 내분비샘 종양, 스티븐 존슨 증후군, 눈 흉터 유사 물집증, 콜라겐 혈관 질병; 콘택트 렌즈 사용으로 발생하는 만성 비-자가-면역 염증성 장애, 건성안 질병, 장미증, 포도상구균 가장자리(staph marginal), 각막염(박테리아, 진균 & 바이러스 각막염), 익상편 또는 종양, 다회 눈 수술, 익상편 또는 종양 절제 또는 냉동치료법 후 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍; 및 보존제(티메로살, 벤잘코늄), 국소 마취제, 필로카르핀, 베타 차단제, 미토마이신, 5-플루오로우라실, 질산은, 및 스티븐 존슨 증후군을 유도하는 경구 투약으로 구성되는 군으로부터 선택되는 투약으로부터의 투약 독성 결과 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍으로 구성되는 군으로부터 선택되는 부상 또는 장애로 인해 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍이다. 특히 바람직하게는 눈 질병 또는 장애는 화학적 화상, 무홍채증, 스티븐 존슨 증후군 및 콘택트 렌즈 사용으로 구성되는 군으로부터 선택되는 부상 또는 장애로 인해 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍이다.

[0093] 본 발명에 따른 바람직한 구현예에서, 눈 질병 또는 장애는 감소된 각막 내피 세포 밀도와 연관된다. 보다 바람

직한 구현예에서, 눈 질병 또는 장애는 각막 내피 기능이상이다. 보다 바람직하게는 눈 질병 또는 장애는 푹스(Fuchs) 내피 각막 이영양증, 물집 각막병증(인공수정체 물집 각막병증 및 무수정체 물집 각막병증 포함), 각막 이식 실패, 후방 다형 각막 이영양증, 선천 유전 내피 이영양증, X-연관 내피 각막 이영양증, 무홍채증, 및 각막 내피염증으로 구성되는 군으로부터 선택되는 각막 내피 기능이상이다. 특정 구현예에서, 눈 질병 또는 장애는 푹스 내피 각막 이영양증, 물집 각막병증(인공수정체 물집 각막병증 및 무수정체 물집 각막병증 포함) 및 각막 이식 실패로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0094] 본 발명은 추가로 유효량의 LATS 억제제를 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 특히 화상, 급성 및 만성 피부 궤양 증상을 치료하거나 완화하기 위한, 상처 치유를 촉진하는 방법에 관한 것이다.

[0095] 다른 소정 양태 내에서, 본 발명은 치료 유효량의 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 입체이성질체를 투여하는 단계를 포함하는, 상처 치유를 촉진하는 방법에 관한 것이다.

[0096] 다른 양태에서, 본 발명은 상처 치유의 촉진에 사용될 수 있는 화합물 및 조성물에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 상처 치유를 촉진하기 위한 약제의 제조에 사용될 수 있는 화합물 및 조성물에 관한 것이다.

[0097] 본 발명은 또한 치료 유효량의 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물을 필요로 하는 대상체에 이를 선택적으로 본 발명의 다른 화합물 또는 다른 유형의 치료제인 제2 치료제와 함께 투여하는 단계를 포함하는, 특히 화상, 급성 피부 궤양, 및 만성 피부 궤양 증상을 치료하거나 완화하기 위한, 상처 치유를 촉진하는 방법에 관한 것이다.

[0098] 본 발명은 또한 치료 유효량의 본 발명의 화합물을 대상체의 눈에 투여하는 단계를 포함하는 눈 상처 치유를 촉진하는 방법에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 눈 상처는 각막 상처이다. 다른 구현예에서, 눈 상처는 부상 또는 수술 상처이다.

[0099] 다른 양태에서, 본 발명은 간 재생 및 간 재성장에 사용될 수 있는 화합물 및 조성물에 관한 것이다. 다른 소정 양태 내에서, 본 발명은 치료 유효량의 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체를 투여하는 단계를 포함하는, 간 재생 및 간 재성장을 촉진하는 방법에 관한 것이다. 다른 양태에서, 본 발명은 간 재생 및 간 재성장을 위한 약제의 제조에 사용될 수 있는 화합물 및 조성물에 관한 것이다.

[0100] 본 발명은 또한 치료 유효량의 본 발명의 화합물을 필요로 하는 대상체에 이를 선택적으로 본 발명의 다른 화합물 또는 다른 유형의 치료제인 제2 치료제와 함께 투여하는 단계를 포함하는, 재생능을 증강시키면서 섬유증 해소를 가속화하기 위해, 특히 경계 이식편의 이식 후 불충분한 간 재성장의 치료를 위한; 광범위 간절제술 후 잔류 간 물질의 증강된 재성장을 뒷받침하기 위한; 바이러스 간염, 약물-유도 간 부상, 자가면역 간염, 허혈성 및 울혈성 간 질병으로부터의 급성 간 부전 후 환자 간의 재생을 위한; 및 비-알코올성 지방간염, 알코올성 지방간염, 만성 B형 및 C형 바이러스 간염, 혈색소증, 알파-1 항-트립신 결핍, 윌슨 질병 및 약물-유도 간 섬유증으로부터의 만성 간 부상 및 기저 간 섬유증을 갖는 환자의 치료를 위한, 간 재생 및 간 재성장을 위한 방법에 관한 것이다.

[0101] 소정 구현예에서, 본 발명은 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체의 생체외 사용을 포함하는 세포 치료법 및/또는 이식을 위한 세포성 물질을 생성하는 방법에 관한 것이다. 세포성 물질은 눈, 간 또는 피부 세포를 포함할 수 있다.

[0102] 추가로 소정 구현예에서, 본 발명은 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체의 생체외 사용을 포함하는, 간 재생 및 간 재성장을 촉진하는 방법에 관한 것이다.

[0103] 본 발명은 또한 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체의 사용을 포함하는, 간 세포 집단 증식을 위한 생체외 방법에 관한 것이다.

[0104] 본 발명의 기타 특징 및 장점은 하기 상세한 설명 및 청구범위로부터 명백할 것이다.

## *도면의 간단한 설명*

[0105] **도 1:** LATS 억제제(화합물 실시예 49 및 실시예 133)는 웨스턴 블롯에 의해 나타낸 바와 같이 처리 1시간 내에

LSC의 YAP 탈인산화를 유도한다.

**도 2:** 윤부 줄기 세포 배양에서 p63-알파의 면역표지화는 LSC 집단이 LATS 억제제(화합물 실시예 49 및 실시예 133)를 포함하는 배지 중에 유지되는 경우 증식될 수 있음을 시사한다. **A:** 성장 배지 및 DMSO의 존재 하에, 소수의 단리된 세포만 배양 디쉬에 부착하고 최대 6일까지 생존한다. 대부분의 세포가 인간 핵 마커를 발현했지만, p63알파는 거의 발현하지 않았다. **B 및 C:** 대조적으로, LATS 억제제: 화합물 실시예 번호 49 및 실시예 번호 133의 존재 하에, 세포는 콜로니를 형성하고 p63알파를 발현하였다. 상기 결과는 LATS 억제제가 p63알파-양성 표현형을 갖는 세포 집단의 증식을 촉진함을 시사하였다. **D:** 세포의 계대 및 2주 동안 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 49의 존재 하에서의 이의 배양은 세포 집단 증식 및 p63알파를 발현하는 융합성 배양의 형성을 구현하였다.

**도 3:** siRNA에 의한 LATS1 및 LATS2 녹다운은 EdU 양성 세포 백분율로 나타낸 바와 같이 배양에서 LSC 증식을 활성화한다.

**도 4:** LSC 마커 델타N-p63 알파/베타/감마, ABCG2 및 C/EBP 델타의 면역표지화는 LATS 억제제(화합물 실시예 49 및 실시예 133)를 함유하는 배양 배지에서 유지된 LSC가 LSC의 전형적 마커를 발현함을 시사한다. 결과는 DMSO에서 배양된 세포가 보통 LSC에 의해 발현되는 마커, 예컨대 델타N-p63 알파/베타/감마, ABCG2 및 C/EBP 델타를 전형적으로 발현하지 않음을 시사한다. 대조적으로, LATS 억제제의 존재 하에 배양된 세포는 보통 LSC에 의해 발현되는 마커, 예컨대 델타N-p63 알파/베타/감마, ABCG2 및 C/EBP 델타를 발현한다.

**도 5:** 미분화 LSC 마커 p63알파 및 각막 상피 세포 마커 케라틴 12의 면역표지화는 분화를 구현하는 조건으로 전달되는 경우, LATS 억제제(**A:** 화합물 실시예 49, **B:** 화합물 실시예 47, **C:** 화합물 실시예 12, **D:** 화합물 실시예 261)를 포함하는 배양 배지를 사용하여 증식된 LSC 집단이 각막 상피 세포로 분화될 수 있음을 나타낸다. p63알파-양성 세포 정체성에서 케라틴-12 정체성으로의 전이가 발생하고 있는 것을 볼 수 있다.

**도 6:** GelMA 중합을 사용하여 콘택트 렌즈에 부착된 LSC가 생체외 토끼 눈의 표면으로 전달될 수 있음을 확인하기 위해 LSC가 형광 단백질을 사용해서 표지되었다. 화살표는 LSC의 부착 부위를 나타낸다.

**도 7:** **A:** 이식된 눈, 케라틴-12 염색; **B:** 이식된 눈, 케라틴-19 염색; **C:** 이식되지 않은 대조군 눈, 케라틴-12 염색; **D:** 이식되지 않은 대조군 눈, 케라틴-19 염색. 이들 도면은 윤부 줄기 세포 결핍의 토끼 모델에서, GelMA와 조합되고 토끼의 각막 표면으로 생체내 콘택트 렌즈를 통해 전달된, 화합물 실시예 번호 12를 포함하는 배지에서 증식된 LSC 집단이 케라틴-12-양성 각막 상피의 재생을 야기하며(**A**) 이식된 눈에서 케라틴-19-양성 결막 세포에 의한 결막화를 방지하였음을 나타낸다. **B:** 화살표는 케라틴 19 염색의 부재를 가리키고 있다. 대조적으로, 이식되지 않은 토끼 눈은 케라틴-12-양성 각막 상피 복원의 부재를 나타내었다. **C:** 화살표는 케라틴-12 염색의 부재를 가리키고 있다. 대신, 케라틴-19 염색의 존재에 의해 나타낸 바와 같이, 결막화 징후가 관찰되었다. **D:** 화살표는 양성 케라틴-19 염색 영역을 가리키고 있다.

**도 8:** **A:** 인간 LSC가 이식된 토끼 눈; **B:** 인간 LSC가 이식되지 않은 대조군 토끼 눈. 이들 도면은 인간 미토콘드리아 단백질의 존재에 의해 실증된 바와 같이(화살표는 인간 미토콘드리아 마커가 존재함을 나타냄), 이식된 눈의 각막 상피를 복원한 세포가 인간 세포였음을 나타낸다(**A**). 대조적으로, 이식되지 않은 눈의 눈 표면은 인간 미토콘드리아 단백질 염색을 나타내지 않았다(**B:** 인간 미토콘드리아 마커가 부재함).

**도 9:** 콜라겐 코팅된 24웰 플레이트에 TISSEEL을 통해 전달된 LSC의 현미경 이미지는 2주 내 배양 표면을 커버하는 세포 재증식을 나타낸다.

**도 10:** CellTracker Green CMFDA 표지된 LSC를 생체외 인간 각막에 전달하고 보호 콘택트 렌즈로 커버하였다.

**도 11:** 빨간색 및 녹색 염료 표지된 HEK-293 세포를 생체외 토끼 각막의 상부에서 음양 패턴으로 바이오프린트하였다(진회색 및 연회색 패턴으로 나타냄).

**도 12:** LSC에서 베타-2-마이크로글로불린(B2M) 유전자의 CRISPR/Cas9-매개된 결실에 의한 면역 거부 감소: FACS 분석은 B2M의 CRISPR-매개된 결실 및 HLA A, B 및 C의 후속 제거가 LSC의 21%에서 일어났음을 나타낸다.

**도 13:** B2M-음성/HLA A,B,C-음성 LSC 집단이 화합물 실시예 번호 48a를 사용하여 증식되어 세포의 97%가 HLA A, B, C를 발현하지 않는 세포 제조물을 생성하였다.

**도 14:** LATS 억제제(화합물 실시예 133 및 실시예 49)는 각막 내피 세포(CEC)에서 핵 내로의 YAP의 전위를 유도한다.

**도 15:** LATS 억제제(화합물 실시예 133 및 실시예 49)는 처리 1시간 내에 CEC의 YAP 탈인산화를 유도한다. 웨스턴 블롯에 의해 도 15a에 나타낸 바와 같음; 도 15b: 베타-액틴에 대해 정상화된 인산화 YAP 수준을 나타내는 그래프; 및 도 15c: 총 YAP에 대해 정상화된 인산화 YAP 수준을 나타내는 그래프.

**도 16:** LATS 억제제의 존재 또는 부재 하에 성장시킨 CEC. Incucyte 시스템(Essen Biosciences)이 시간 경과에 걸쳐 실시간 정량적 생존-세포 분석에 의해 CEC 융합성을 측정하기 위해 사용되었다. 화합물 실시예 49(검은색 사각형) 및 실시예 133(연회색 사각형)은 강력한 CEC 증식을 유도하였다; 반면 CEC 증식은 비히클(DMSO, 진회색 사각형)에서 최소였다.

**도 17:** siRNA에 의한 LATS1 및 LATS2 녹다운은 EdU 양성 세포 백분율로 나타낸 바와 같이 배양에서 각막 내피 세포 증식을 활성화한다.

**도 18:** Zonula Occludens-1(ZO-1) 면역표지화는 LATS 억제제, 화합물 실시예 49(도 18b)의 존재 하에 증식된 CEC가 치밀 이음부, 내피 구조를 형성하며 기능적 CEC에 특징적인 정상 세포 크기 및 형태를 보유함을 시사한다. 비히클 단독(DMSO) 존재 하에 증식된 CEC는 기능이상 CEC에 특징적인 다면성 징후를 나타낸다(도 18a).

**도 19:** 정량적 RT-PCR 분석은 LATS 억제제, 화합물 실시예 49와 함께 증식된 각막 내피 세포 집단이 콜라겐 8a2, AQP1, SLc4A11을 포함하여, 보통 생체내 각막 내피 세포에 의해 발현되는 유전자를 발현함을 시사한다. 세포는 RPE65(망막 색소 상피 마커) 및 CD31(혈관 상피 마커)을 포함하여, 눈에 존재하는 다른 상피 마커를 발현하지 않는다.

**도 20:** 면역조직화학 분석은 LATS 억제제, 화합물 실시예 49와 함께 증식된 각막 내피 세포 집단이 Na/K ATPase(도 20a) 및 콜라겐 8a2(도 20b)를 포함하여, 보통 생체내 각막 내피 세포에 의해 발현되는 유전자를 발현함을 시사한다.

**도 21:** LATS 억제제, 화합물 실시예 47의 존재 하에 증식된 각막 내피 세포 집단, 및 LATS 억제제의 부재 하에 배양된 CEC의 FACS 분석. LATS 억제제의 존재 하에 증식된 세포 집단은 저수준의 CD73(도 21a, 회색선), CD44(도 21b, 회색선), CD166(도 21c, 회색선) 및 CD105(도 21d, 회색선)를 발현하는 반면; LATS 억제제 없이 배양된 세포 집단은 고수준의 CD44, CD73, CD105 및 CD166(검은선)을 발현한다.

**도 22:** 바이오매트릭스가 본 발명에 따른 세포 제조물을 전달하기 위해 눈에 적용되는 "바이오프린팅 섹션" 하에 추가 기재된 바와 같은 방법 1을 도시하는 버블 부각(depression) 방법. **도 22a.** 바이오매트릭스 볼루스를 주사; **도 22b** 각막 상에 퍼트리기 위해 바이오매트릭스 아래에 버블을 주사; **도 22c** 바이오매트릭스를 UV 또는 청색 광원으로 경화; **도 22d** 버블을 제거하고 균형 염 용액으로 대체.

**도 23:** 바이오매트릭스가 본 발명에 따른 세포 제조물을 전달하기 위해 눈에 적용되는 "바이오프린팅 섹션" 하에 추가 기재된 바와 같은 방법 2을 도시하는, 펨토초(FS) 레이저를 사용하는 감산 방법. **도 23a** 기능이상 내피를 FS로 제거; **도 23b** 전방 챔버에 바이오매트릭스 주사; **도 23c** 바이오매트릭스를 UV 또는 청색 광원으로 경화; **도 23d** 원치않는 바이오매트릭스를 FS로 탈착; **도 23e** 탈착된 바이오매트릭스를 핀셋으로 제거.

**도 24:** 바이오매트릭스가 본 발명에 따른 세포 제조물을 전달하기 위해 눈에 적용되는 "바이오프린팅 섹션" 하에 추가 기재된 바와 같은 방법 3을 도시하는 염료 마스크 방법. **도 24a** 내피를 염료(예컨대 트리판 블루(Trypan Blue))로 염색; **도 24b** 기능이상 내피를 박리; **도 24c** 염색된 바이오매트릭스를 주사; **도 24d** 바이오매트릭스를 UV 또는 청색 광원으로 경화; **도 24e** 경화되지 않은 바이오매트릭스를 플러싱.

**도 25:** 바이오매트릭스가 본 발명에 따른 세포 제조물을 전달하기 위해 눈에 적용되는 "바이오프린팅 섹션" 하에 추가 기재된 바와 같은 방법 4를 도시하는 건조 분배 방법. **도 25a** 전방 챔버 배액; **도 25b** 소프트 팁/브러시 캐뉼라로 바이오매트릭스를 후방 각막으로 분배; **도 25c** 바이오매트릭스를 UV 또는 청색 광원으로 경화; **도 25d** 눈을 균형 염 용액으로 재충전.

**도 26** 실시예 C11에 추가 기재된 바와 같은 바이오프린팅 장치를 나타내는 모식도.

**도 27** 각막을 통해 365 nm UVA 광을 투사하는 휴대용 장치를 사용하여 각막의 후방 측면 상에 세포가 바이오프린트될 수 있음을 나타내는 결과. 중합되지 않고 부착되지 않은 물질을 헹군 후, 원형 패턴의 형광 단백질-표지된 세포가 각막의 후방 측면 상에 보유되었다.

**도 28** 각막의 후방 측면 상에 바이오프린트된 CEC가 각막 내피 이영양증의 토끼 모델에서 각막 내피를 재구축할

수 있다. 결과는 실험 토끼에서, 각막 내피 구조가 ZO-1 면역조직화학을 사용하여 검출될 수 있음을 시사하였다(A). 각막 내피가 수술로 제거되고 CEC가 바이오프린트되지 않은 토끼의 오른쪽 눈에서 ZO-1 염색이 부재하여, 정상 각막 내피 구조의 부재를 시사하였다(B). 각막 내피가 수술로 제거되고 CEC가 바이오프린트된 토끼의 오른쪽 눈에서 ZO-1 염색이 존재하여, 각막 내피 구조가 재구축되었음을 시사하였다(C). D 및 E는 인간 핵 항원 면역염색이 임의의 인간 CEC를 수여받지 않은 눈에 부재함을 나타낸다. 대조적으로, 인간 핵 항원-양성 세포는 인간 CEC가 바이오프린트된 눈에서 이미지화된 필드를 커버하여(F), C에 나타낸 ZO-1-표지된 각막 내피 구조가 토끼 각막의 후방 측면 상에 바이오프린트된 인간 CEC로 이루어짐을 시사하였다.

**도 29:** 빨간색-형광-단백질 표지된 HEK-293 세포가 생체외 인간 각막의 후방 측면 상에서 상이한 문자 구조로 바이오프린트되었다.

**도 30:** 벡터 맵은 LSC 및 CEC에서 CRISPR 시스템을 발현하기 위해 사용된 AAV2 벡터 설계를 나타낸다(도 30은 SEQ ID NO: 28을 개시함).

**도 31:** CRISPR 시스템의 AAV-매개 발현의 FACS 분석은 LSC에서 B2M의 결실 및 후속적인 HLA A, B 및 C의 제거를 구현하였다.

**도 32:** CRISPR 시스템의 AAV-매개 발현의 FACS 분석은 CEC에서 B2M의 결실 및 후속적인 HLA A, B 및 C의 제거를 구현하였다.

**도 33a:** 도 33a는 MST1/2 또는 LATS1/2에 대한 40 pM의 각각의 siRNA에 의해 처리되지 않은 또는 처리된 인간 HaCaT 세포의 용해액에서 pYAP의 웨스턴 블롯이다; 액틴이 대조군으로 사용되었다.

**도 33b:** 도 33b는 9 μM의 실시예 133에 의해 처리되지 않은 또는 처리된 인간 HaCaT 세포의 용해액에서 pYAP의 웨스턴 블롯이다; 액틴이 대조군으로 사용되었다.

**도 33c:** 도 33c는 LATS1 대 약 $10^{-4}$ 내지 1 ㎛ 범위의 실시예 133의 농도에 대한 상대 억제 활성 그래프이다. LATS1 대비 실시예 133의 계산된 $IC_{50}$은 1.3 nM이었다.

**도 34:** 상대 *Cyr61*/*Gapdh* 발현 수준 대 0, 0.2 및 2 ㎎/㎖의 실시예 133의 농도의 막대 그래프이다.

**도 35a:** 도 35a는 비히클 또는 실시예 133으로 국소 처리된 마우스 피부의 현미경사진을 나타낸다.

**도 35b:** 도 35b는 비히클 또는 실시예 133으로 처리된 마우스 피부에서 Ki67+ 세포 백분율을 비교하는 산란도이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0106] LATS

[0107] LATS는 대형 종양 억제인자 키나제의 약칭이다. 본원에서 사용되는 LATS는 LATS1 및/또는 LATS2를 나타낸다. 본원에서 사용되는 LATS1은 대형 종양 억제인자 키나제 1을 나타내며 LATS2는 대형 종양 억제인자 키나제 2를 나타낸다. LATS1 및 LATS2는 둘 다 세린/트레오닌 단백질 키나제 활성을 갖는다. LATS1 및 LATS2에는 각각 인간 게놈 기구(HUGO) 유전자 명명 위원회 식별자: HGNC ID 6514 및 HGNC ID 6515가 주어졌다. LATS1은 때때로 당분야에서 WARTS 또는 wts로 나타내며, LATS2는 때때로 당분야에서 KPM으로 나타낸다. 대표 LATS 서열에는 비제한적으로 아래에 나타낸 접근 번호 NP_004681.1(LATS1) 및 NP_001257448.1(LATS1) 및 NP_055387.2(LATS 2)를 갖는 국립 생물공학 정보 센터 단백질 데이터베이스에서 이용 가능한 단백질 서열이 포함된다.

[0108] LATS1: NP_004681.1(세린/트레오닌-단백질 키나제 LATS1 이소형 1, 호모 사피엔스)(SEQ ID NO: 1:)

1 mkrsekpegy rqmrpktfpa snytvssrqm lqeireslrn lskpsdaaka ehnmskmste
61 dprqvrnppk fgthhkalqe irnsllpfan etnssrstse vnpqmlqdlq aagfdedmvi
121 qalqktnnrs ieaaiefisk msyqdprreq maaaaarpin asmkpgnvqq svnrkqswkg
181 skeslvpqrh gpplgesvay hsespnsqtd vgrplsgsgi safvqahpsn gqrvnppppp
241 qvrsvtpppp prgqtppprg ttppppswep nsqtkrysgn meyvisrisp vppgawqegy
301 pppplntspm nppnqgqrgi ssvpvgrqpi imqssskfnf psgrpgmqng tgqtdfmihq
361 nvvpagtvnr qppppyplta angqspsalq tggsaapssy tngsipqsmm vpnrnshnme
421 lynisvpglq tnwpqsssap aqsspssghe iptwqpnipv rsnsfnnplg nrashsansq
481 psattvtait papiqqpvks mrvlkpelqt alapthpswi pqpiqtvqps pfpegtasnv
541 tvmppvaeap nyqgppppyp khllhqnpsv ppyesiskps kedqpslpke deseksyenv
601 dsgdkekkqi ttspitvrkn kkdeerresr iqsyspqafk ffmeqhvenv lkshqqrlhr
661 kkqlenemmr vglsqdaqdq mrkmlcqkes nyirlkrakm dksmfvkikt lgigafgevc
721 larkvdtkal yatktlrkkd vllrnqvahv kaerdilaea dnewvvrlyy sfqdkdnlyf
781 vmdyipggdm msllirmgif peslarfyia eltcavesvh kmgfihrdik pdnilidrdg
841 hikltdfglc tgfrwthdsk yyqsgdhprq dsmdfsnewg dpsscrcgdr lkplerraar
901 qhqrclahsl vgtpnyiape vllrtgytql cdwwsvgvil femlvgqppf laqtpletqm
961 kvinwqtslh ippqaklspe asdliiklcr gpedrlgkng adeikahpff ktidfssdlr
1021 qqsasyipki thptdtsnfd pvdpdklwsd dneeenvndt lngwykngkh pehafyeftf
1081 rrffddngyp ynypkpieye yinsqgseqq sdeddqntgs eiknrdlvyv

[0109]

[0110] LATS1 : 세린/트레오닌-단백질 키나제 LATS1 이소형 2[호모 사피엔스]

[0111] NCBI 참조 서열: NP_001257448.1(SEQ ID NO: 2:)

1 mkrsekpegy rqmrpktfpa snytvssrqm lqeireslrn lskpsdaaka ehnmskmste
61 dprqvrnppk fgthhkalqe irnsllpfan etnssrstse vnpqmlqdlq aagfdedmvi
121 qalqktnnrs ieaaiefisk msyqdprreq maaaaarpin asmkpgnvqq svnrkqswkg
181 skeslvpqrh gpplgesvay hsespnsqtd vgrplsgsgi safvqahpsn gqrvnppppp
241 qvrsvtpppp prgqtppprg ttppppswep nsqtkrysgn meyvisrisp vppgawqegy
301 pppplntspm nppnqgqrgi ssvpvgrqpi imqssskfnf psgrpgmqng tgqtdfmihq

[0112]

361 nvvpagtvnr qppppyplta angqspsalq tggsaapssy tngsipqsmm vpnrnshnme
421 lynisvpglq tnwpqsssap aqsspssghe iptwqpnipv rsnsfnnplg nrashsansq
481 psattvtait papiqqpvks mrvlkpelqt alapthpswi pqpiqtvqps pfpegtasnv
541 tvmppvaeap nyqgppppyp khllhqnpsv ppyesiskps kedqpslpke deseksyenv
601 dsgdkekkqi ttspitvrkn kkdeerresr iqsyspqafk ffmeqhvenv lkshqqrlhr
661 kkqlenemmr vkpfkmsifi lnhlfawclf

[0113]

[0114] LATS 2: NP_055387.2 세린/트레오닌-단백질 키나제 LATS2[호모 사피엔스]. ((SEQ ID NO: 3:)

1 mrpktfpatt ysgnsrqrlq eireglkqps kssvqglpag pnsdtsldak vlgskdatrq
61 qqqmratpkf gpyqkalrei rysllpfane sgtsaaaevn rqmlqelvna gcdqemagra
121 lkqtgsrsie aaleyiskmg yldprneqiv rvikqtspgk glmptpvtrr psfegtgdsf
181 asyhqlsgtp yegpsfgadg ptaleemprp yvdylfpgvg phgpghqhqh ppkgygasve
241 aagahfplqg ahygrphllv pgeplgygvq rspsfqsktp petggyaslp tkgqgggppga
301 glafpppaag lyvphphhkq agpaahqlhv lgsrsqvfas dsppqslltp srnslnvdly
361 elgstsvqqw paatlarrds lqkpgleapp rahvafrpdc pvpsrtnsfn shqprpgppg
421 kaepslpapn tvtavtaahi lhpvksvrvl rpepqtavgp shpawvpapa papapapapa
481 aegldakeeh alalggagaf pldveyggpd rrcpppppypk hlllrskseq ydldslcagm
541 eqslragpne peggdksrks akgdkggkdk kqiqtspvpv rknsrdeekr esriksyspy
601 afkffmeqhv enviktyqqk vnrrlqleqe makaglceae qeqmrkilyq kesnynrlkr
661 akmdksmfvk iktlgigafg evclackvdt halyamktlr kkdvlnrnqv ahvkaerdil
721 aeadnewvvk lyysfqdkds lyfvmdyipg gdmmsllirm evfpehlarf yiaeltlaie
781 svhkmgfihr dikpdnilid ldghiklrdf glctgfrwth nskyyqkgsh vrqdsmepsd
841 lwddvsncrc gdrlktleqr arkqhqrcla hslvgtpnyi apevllrkgy tqlcdwwsvg
901 vilfemlvgq ppflaptpte tqlkvinwen tlhipaqvkl speardlitk lccsadhrlg
961 rngaddlkah pffsaidfss dirkqpapyv ptishpmdts nfdpvdeesp wndasegstk
1021 awdtltspnn khpehafyef tfrrffddng ypfrcpkpsg aeasqaessd lessdlvdqt
1081 egcqpvyv

[0115]

[0116] LATS는 YAP1 활성을 음성적으로 조절하는 것으로 여겨진다. "YAP1"은 YAP 또는 YAP65로도 알려진 yes-연관 단백질 1을 나타내며, 이는 세포 증식에 관여되는 유전자의 전사 조절인자로서 작용하는 단백질이다. LATS 키나제는 세포질 잔류 및 불활성화를 일으키는 YAP을 직접 인산화하는 것으로 나타난 세린/트레오닌 단백질 키나제이다. LATS에 의한 인산화 없이, YAP은 핵 내로 전위하여 DNA 결합 단백질, TEAD를 형성하고, 하류 유전자 발현을 일으킨다(Barry ER & Camargo FD (2013) The Hippo superhighway: signaling crossroads converging on the Hippo/Yap pathway in stem cells and development. Current opinion in cell biology 25(2):247-253.; Mo JS, Park HW, & Guan KL (2014) The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. EMBO reports 15(6):642-656; Pan D (2010) The hippo signaling pathway in development and cancer. Developmental cell 19(4):491-505).

[0117] Hippo/YAP 경로는 다양한 암을 포함하는 포유류 시스템에서 여러 세포 유형 및 조직에 관여된다. 특히, Hippo 경로는 내장, 위 및 식도, 췌장, 침샘, 피부, 젖샘, 난소, 전립샘, 뇌 및 신경계, 뼈, 연골세포, 지방 세포, 근세포, T 림프구, B 림프구, 골수구 세포, 신장, 및 폐에 명백히 관여된다. 문헌[Nishio et al., 2017, *Genes to Cells* 22:6-31]을 참고한다.

[0118] LATS1 및 LATS2 억제

[0119] 유리 형태 또는 염 형태의, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물은 LATS1 및/또는 LATS2의 강력한 억제제이다.

[0120] 바람직한 구현예에서, 유리 형태 또는 염 형태의, 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물은 LATS1 및 LATS2의 강력한 억제제이다.

[0121] LATS1에 대한 화합물의 억제 효능은 아래에서 실시예 A1에 기재된 바와 같이 LATS1 생화학 HTRF 검정에 의해 검정되었다. 상기 검정에서 LATS1에 대한 본 발명의 화합물의 억제 효능(마이크로몰 농도의 LATS1 $IC_{50}$)은 표 1A에 보고된다. 1마이크로몰 농도 초과의 $IC_{50}$을 갖는 화합물은 상기 검정에서 불활성인 것으로 고려됨이 주지되어야 한다.

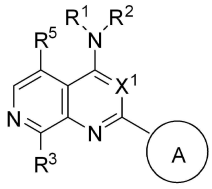
[0122] LATS2에 대한 선택된 화합물의 억제 효능은 아래에서 실시예 A3에 기재된 바와 같이 LATS2 생화학 캘리퍼 검정에 의해 검정되었다. 상기 검정에서 LATS2에 대한 본 발명의 화합물의 억제 효능(마이크로몰 농도의 LATS2 $IC_5$

$_0$)이 또한 표 1A에 보고된다. 1마이크로몰 농도 초과의 $IC_{50}$을 갖는 화합물은 상기 검정에서 불활성인 것으로 고려됨이 주지되어야 한다.

[0123] **LATS 억제제**

[0124] 따라서 본 발명은 화학식 A2의 화합물 또는 이의 염, 또는 입체이성질체에 관한 것이다:

[0125] [화학식 A2]

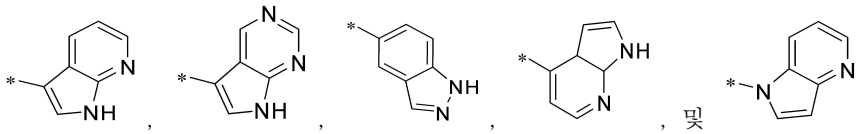
[0126] 

[0127] 식 중,

[0128] $X^1$은 CH 또는 N이고;

[0129] 고리 A는

[0130] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[0131]  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

[0132] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고,

[0133] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[0134] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[0135] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[0136] $R^2$는

[0137] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0138] (i) 할로겐;

[0139] (ii) 시아노;

[0140] (iii) 옥소;

[0141] (iv) $C_2$알케닐;

[0142] (v) $C_2$알키닐;

[0143] (vi) $C_{1-6}$할로알킬;

[0144] (vii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0145] (viii) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^{0}$, 비치환되거나 $-C(O)R^{0}$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0146] (ix) $-C(O)R^{8}$로서, $R^{8}$은 $R^{0}$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^{0}$인 $-C(O)R^{8}$;

[0147] (x) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0148] (xi) 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^{0}$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[0149] (xii) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[0150] (xiii) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0151] (xiv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[0152] (xv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[0153] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0154] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^{0}$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[0155] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^{0}$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^{0}$, 및 비치환되거나 $R^{0}$ 또는 $-C(O)R^{0}$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0156] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^{0}$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^{0}$, 및 비치환되거나 $R^{0}$ 또는 $-C(O)R^{0}$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0157] 로부터 선택되거나;

[0158] 단 $X^{1}$이 CH인 경우, $R^{1}$ 및 $R^{2}$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^{1}$ 및 $R^{2}$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^{0}$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

[0159] $R^{3}$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

[0160] $R^{5}$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^{0}$에 의해 치환되고;

[0161] 단,

[0162] (1) $X^1$이 N이고, 고리 A가 4-피리미디닐 또는 3-플루오로-4-피리미디닐이고, $R^1$이 H 또는 메틸이고, $R^3$이 H 또는 Cl이고 $R^5$가 H인 경우; $R^2$는 $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노 또는 *t*-부틸-카바모일-아미노로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되며 선택적으로 비치환 페닐로 추가 치환되는 $C_{2-4}$알킬이 아니고;

[0163] (2) $X^1$이 N이고, 고리 A가 인다졸-5-일이고, $R^1$, $R^3$ 및 $R^5$가 H인 경우; $R^2$는 $-NH_2$로 치환되는 $C_4$알킬이 아니다.

[0164] 달리 명시되지 않는 한, 용어 "본 발명의 화합물"은 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 염뿐만 아니라, 모든 입체이성질체(부분입체이성질체 및 거울상 이성질체를 포함함), 회전 이성질체, 호변이체 및 동위원소 표지 화합물(중수소 치환을 포함함)뿐만 아니라 내재적으로 형성된 모이어티를 나타낸다.

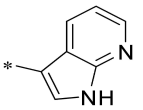
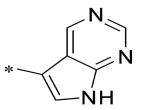
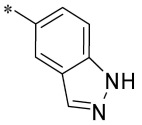
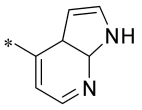
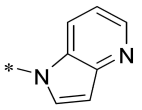
[0165] 본 발명의 다양한(열거된) 구현예가 본원에 기재된다. 각각의 구현예에 명시된 특징은 다른 명시된 특징과 조합되어 본 발명의 추가 구현예를 제공할 수 있음이 인식될 것이다. 구현예가 이전 구현예에 "있어서"로 기재되는 경우, 예를 들어 구현예 20이 구현예 1 내지 19에 "있어서"로 기재되는 경우, 구현예 1 내지 19에 구현예 19 및 19A가 포함되도록 이전 구현예에는 이의 하위-구현예가 포함된다.

[0166] 구현예 1. 상술된 바와 같은 화학식 A2의 화합물 또는 이의 염.

[0167] 구현예 2. 구현예 1에 있어서,

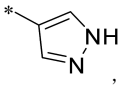
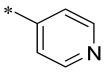
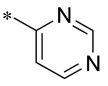
[0168] 고리 A가

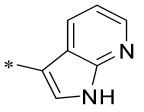
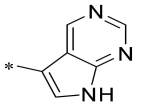
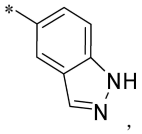
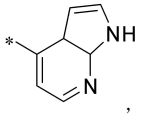
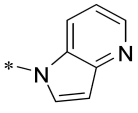
[0169] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N으로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 질소 원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[0170] (b)  ,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

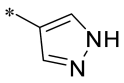
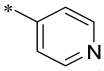
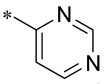
[0171] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고,

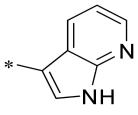
[0172] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$ 및 $C_{3-6}$사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

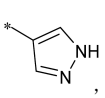
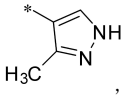
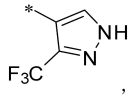
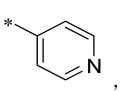
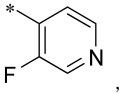
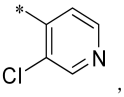
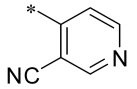
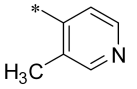
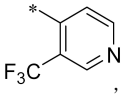
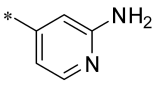
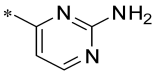
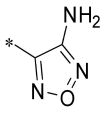
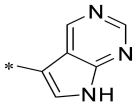
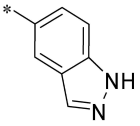
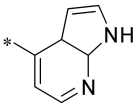
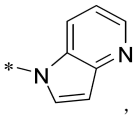
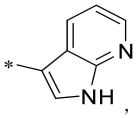
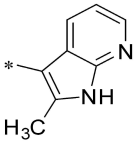
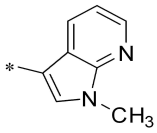
[0173] 구현예 3. 구현예 1에 있어서, 고리 A가 각각 비치환되거나 시아노, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $NH_2$, 및 $C_{3-6}$사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는  , ,  ,  , 및 로부터 형성되거나;

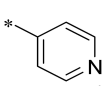
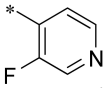
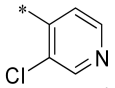
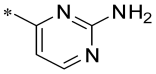
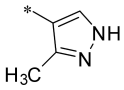
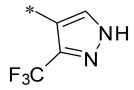
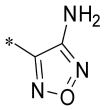
[0174] 각각 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬에 의해 치환되는  ,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

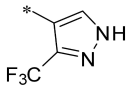
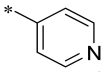
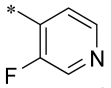
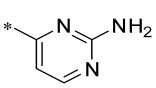
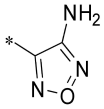
[0175] 구현예 4. 구현예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가 각각 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$

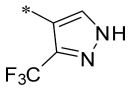
할로알킬, 및 -$NH_2$로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되는  , ,  ,  , 및 로부터 선택되거나;

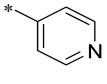
[0176] 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬에 의해 치환되는,  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

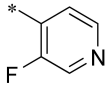
[0177] 구현예 5. 구현예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0178] 구현예 6. 구현예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  ,  ,  ,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

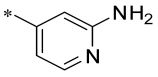
[0179] 구현예 7. 구현예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  ,  ,  ,  및  로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

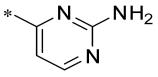
[0180] 구현예 8. 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

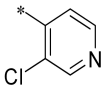
[0181] 구현예 9. 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

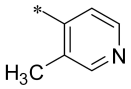
[0182] 구현예 10. 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의

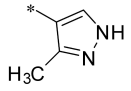
염.

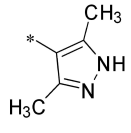
[0183] 구현예 11. 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0184] 구현예 12. 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

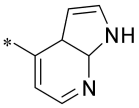
[0185] 구현예 13. 구현예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

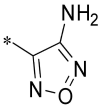
[0186] 구현예 14. 구현예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

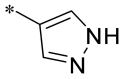
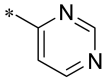
[0187] 구현예 15. 구현예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

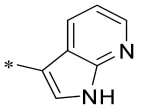
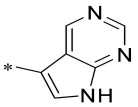
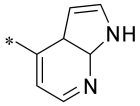
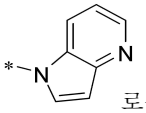
[0188] 구현예 16. 구현예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0189] 구현예 17. 구현예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가 인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0190] 구현예 18. 구현예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0191] 구현예 18A. 구현예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0192] 구현예 19. 구현예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가 각각 비치환되거나 시아노, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $NH_2$, 및 $C_{3-6}$사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는  , , 및  로부터 선택되거나;

[0193] 각각 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬에 의해 치환되는  ,  ,  , 및  로부

터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0194] 구현예 20. 구현예 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, $R^1$이 수소, 메틸 및 에틸로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0195] 구현예 21. 구현예 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, $R^1$이 메틸인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0196] 구현예 22. 구현예 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, $R^1$이 수소인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0197] 구현예 23. 구현예 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서,

[0198] $R^2$가

[0199] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0200] (i) 시아노;

[0201] (ii) $C_2$알키닐;

[0202] (iii) $C_{1-6}$할로알킬;

[0203] (iv) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0204] (v) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0205] (vi) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$인 $-C(O)R^8$;

[0206] (vii) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0207] (viii) 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬;

[0208] (ix) 고리 구성원으로서 N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하고 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬; 및

[0209] (x) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0210] (b) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0211] (c) 고리 구성원으로서 N 및 O로부터 선택되는 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0212] 로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0213] 구현예 24. 구현예 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서,

[0214] $R^2$가

[0215] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬로서,

[0216] (i) 시아노;

[0217] (ii) $C_2$알키닐;

[0218] (iii) $C_{1-6}$할로알킬;

[0219] (iv) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0220] (v) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0221] (vi) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$인 $-C(O)R^8$;

[0222] (vii) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0223] (viii) 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬;

[0224] (ix) 고리 구성원으로서 N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하고 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬; 및

[0225] (x) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0226] 비치환되거나 분자의 나머지에 대한 $R^2$의 부착 지점인 1 내지 3개의 치환기 (i) 내지 (x)에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬의 C 원자가 $-CH_2-$기가 아닌 $C_{1-8}$알킬;

[0227] (b) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0228] (c) 고리 구성원으로서 N 및 O로부터 선택되는 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0229] 로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0230] 구현예 25. 구현예 1 내지 23 중 어느 하나에 있어서,

[0231] $R^2$가

[0232] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0233] (i) 시아노;

[0234] (ii) $C_2$알키닐;

[0235] (iii) $C_{1-6}$할로알킬;

[0236] (iv) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 하이드록실 또는 $-C(O)H$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0237] (v) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)C_{1-6}$알콕시, 및 비치환되거나 $-C(O)OH$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0238] (vi) 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0239] (b) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 비치환되거나 하이드록실 또는 -C(O)-$C_{1-6}$알콕시에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬

[0240] 로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0241] 구현예 26. 구현예 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서,

[0242] $R^2$가

[0243] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0244] (i) $C_{1-6}$할로알킬;

[0245] (ii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 및 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$; 및

[0246] (iii) 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0247] (b) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬

[0248] 로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0249] 구현예 27. 구현예 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬 및 $-OR^6$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬이고, $R^6$은 수소, 및 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0250] 구현예 28. 구현예 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

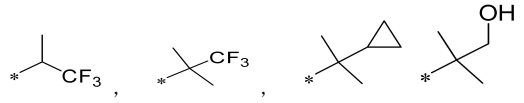
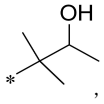
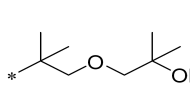
[0251] 구현예 29. 구현예 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

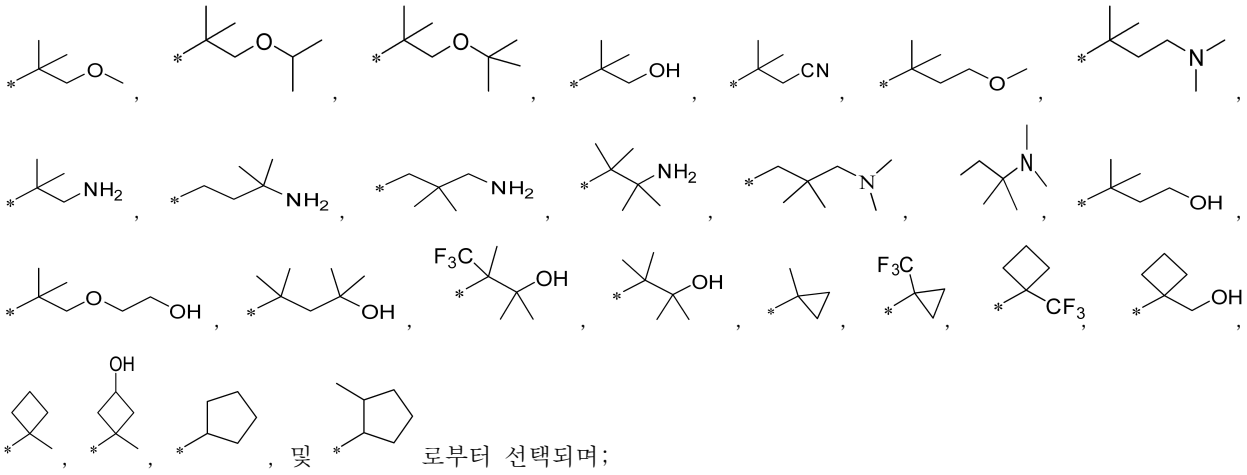
[0252] 구현예 30. 구현예 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환되거나 -O-$C_{1-6}$알킬-OH에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0253] 구현예 31. 구현예 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, $R^0$, 및 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0254] 구현예 32. 구현예 1 내지 26 및 31 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환 $C_{3-6}$사이클로알킬인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

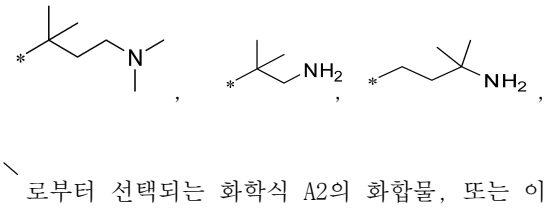
[0255] 구현예 33. 구현예 1 내지 26 및 31 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 $C_{1-6}$알킬 또는 $C_{1-6}$할로알킬에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

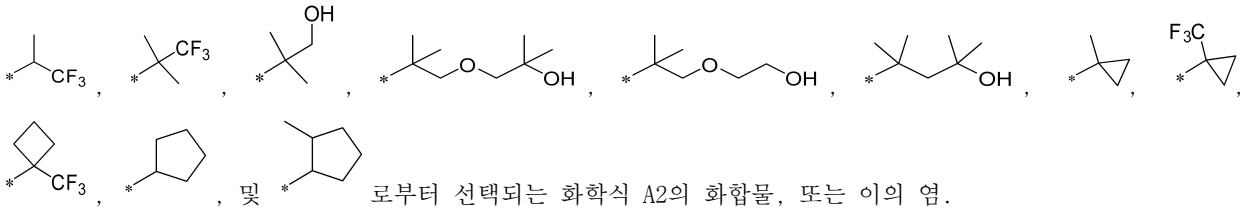
[0256] 구현예 34. 구현예 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 이소프로필, *s*-부틸, *t*-부틸, 2-메틸-부트-2-일, 2,4,4-트리메틸펜탄-2-일,  , , ,  ,  ,

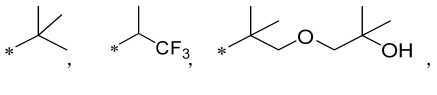


로부터 선택되며;

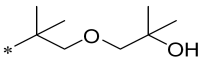
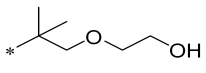
[0257] "*"은 분자의 나머지에 대한 $R^2$의 부착 지점을 나타내는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

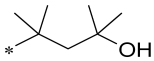
[0258] 구현예 34A. 구현예 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가  로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

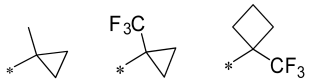
[0259] 구현예 35. 구현예 1 내지 23 및 25 내지 27 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 n-프로필, 이소프로필, *t*-부틸,  로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0260] 구현예 36. 구현예 1 내지 27, 34 및 35 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가  로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0261] 구현예 37. 구현예 1 내지 27, 29, 및 34 내지 36 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0262] 구현예 38. 구현예 1 내지 27, 30, 및 34 내지 36 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가  또는  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

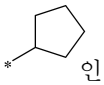
[0263] 구현예 39. 구현예 1 내지 27, 31, 및 34 내지 36 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0264] 구현예 40. 구현예 1 내지 26, 31, 34 및 35 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 

, 및 로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0265] 구현예 41. 구현예 1 내지 26, 31, 33 내지 35 및 40 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 또는 로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0266] 구현예 42. 구현예 1 내지 26, 31, 33 내지 35 및 40 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 또는 인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0267] 구현예 43. 구현예 1 내지 26, 31, 32, 34, 35 및 40 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0268] 구현예 44. 구현예 1 내지 23, 25 내지 30, 및 35 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 n-프로필, 이소프로필 및 *t*-부틸로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0269] 구현예 45. 구현예 1 내지 23, 25 내지 30, 35, 및 44 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 n-프로필인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0270] 구현예 46. 구현예 1 내지 30, 35, 및 44 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 이소프로필인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0271] 구현예 47. 구현예 1 내지 30, 35, 및 44 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 *t*-부틸인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0272] 구현예 48. 구현예 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서,

[0273] $X^1$이 CH이며;

[0274] $R^1$ 및 $R^2$가 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성하고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0275] 구현예 49. 구현예 1 내지 19 및 48 중 어느 하나에 있어서,

[0276] $X^1$이 CH이며;

[0277] $R^1$ 및 $R^2$가 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 5- 또는 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성하고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 5- 또는 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 하이드록실, $C_{1-4}$알킬 및 $C_{1-4}$할로알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0278] 구현예 50. 구현예 1 내지 19, 48 및 49 중 어느 하나에 있어서,

[0279] $X^1$이 CH이며;

[0280] $R^1$ 및 $R^2$가 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N 및 O로부터 선택되는 추가적인 헤테로원자가

포함될 수 있는 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성하고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 하이드록실, $C_{1-6}$알킬 및 $C_{1-6}$할로알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0281] 구현예 51. 구현예 1 내지 19, 48 내지 50 중 어느 하나에 있어서,

[0282] $X^1$이 CH이며;

[0283] $R^1$ 및 $R^2$가 이들이 결합되는 질소 원자와 함께 피페리디닐, 피페라지닐 및 모르폴리닐로부터 선택되는 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성하고, 피페리디닐, 피페라지닐 또는 모르폴리닐은 비치환되거나 하이드록실 및 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0284] 구현예 52. 구현예 1 내지 51 중 어느 하나에 있어서, $R^3$이 수소, 클로로 및 메틸로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0285] 구현예 53. 구현예 1 내지 52 중 어느 하나에 있어서, $R^3$이 수소인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0286] 구현예 53A. 구현예 1 내지 52 중 어느 하나에 있어서, $R^3$이 클로로인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

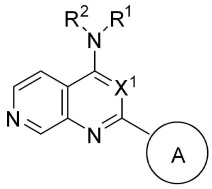
[0287] 구현예 53B. 구현예 1 내지 52 중 어느 하나에 있어서, $R^3$이 메틸인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0288] 구현예 54. 구현예 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서, $R^5$가 수소 및 클로로로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0289] 구현예 55. 구현예 1 내지 54 중 어느 하나에 있어서, $R^5$가 수소인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

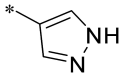
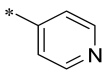
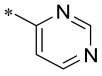
[0290] 구현예 56. 구현예 1에 있어서, 화합물이 화학식 A3의 화합물인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염:

[0291] [화학식 A3]

[0292] 

[0293] (식 중,

[0294] $X^1$은 CH 또는 N이며;

[0295] 고리 A는  ,  또는  이고, 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $-NH_2$로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되고;

[0296] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

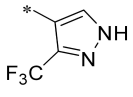
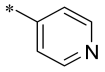
[0297] $R^2$는

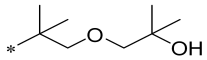
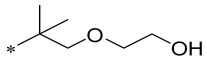
[0298] (a) 비치환되거나 하기로부터 선택되는 1개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬:

[0299] (i) $C_{1-4}$할로알킬 및

[0300] (ii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소 및 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$; 또는

[0301] (b) 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬 또는 $C_{1-6}$할로알킬에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬이다).

[0302] 구현예 57. 구현예 56에 있어서, 고리 A가  또는  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0303] 구현예 58. 구현예 56 또는 구현예 57에 있어서, $R^2$가  또는  인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0304] 구현예 59. 구현예 56 또는 구현예 57에 있어서, $R^2$가 비치환되거나 트리플루오로메틸에 의해 치환되는 tert-부틸 또는 n-프로필인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0305] 구현예 60. 구현예 1에 있어서, N-(2-사이클로프로필프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N,N-디에틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-에틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메톡시-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-메톡시-2-메틸부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-부틸-N-메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-에틸-N-메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)에탄-1-올; 2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올; N-에틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-사이클로헥실프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(3-메틸옥세탄-3-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-2-올; N-부틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸-4-페닐부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-사이클로프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-메탄설포닐-2-메틸부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1,3-디올; 3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-2-올; 2-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)아세트산; (1R,2S)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜탄-1-올; 4,4,4-트리플루오로-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-1-올; N-(1-메탄설포닐-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (2S)-3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판산; 2-[(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로필)아미노]아세트산; (2R)-3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판산; 메틸 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로파노에이트; (1S,2S)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜탄-1-올; 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판산; 2-(2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}에톡시)에탄-1-올; 2-(하이드록시메틸)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1,3-디올; 3-메틸-3-(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄아미도)부탄산; 2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-3-페닐프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-{[4-(디메틸아미노)옥산-4-일]메틸}-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄산; N-(2-메탄설포닐에틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-[2-(아다만탄-1-일)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-N-[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]프로판아미드; 4,4,4-트리플루오로-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄산; N-[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]프로판-2-설폰아미드; 2-(피리딘-4-일)-N-[3-(1H-1,2,3,4-테트라졸-5-일)프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2R)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2,4-디메틸-4-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올; 4,4,4-트리플루오로-2,3-디메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-2-올; (1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜틸)메탄올; N-(3-메톡시사이클로부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피

리미딘-4-아민; (1R,2R)-1-N,2-N-디메틸-1-N-[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]사이클로헥산-1,2-디아민; 메틸 (1s,3s)-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-카복실레이트; 에틸 1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-카복실레이트; 1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-카복실산; (1s,3s)-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-카복실산; 2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-1-올; 2-(피리딘-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로부틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(피리딘-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-사이클로펜틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1-올; 3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1-올; N-(부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸부트-3-인-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (1r,3s)-3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-올; 2,3-디메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-2-올; 2-(피리딘-4-일)-N-(2,4,4-트리메틸펜탄-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(펜탄-3-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-[2-메틸-1-(모르폴린-4-일)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-[1-(tert-부톡시)-2-메틸프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4,4,4-트리플루오로-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-1-올; N-펜틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-1-올; N-[1-(1H-인돌-3-일)-2-메틸프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-[1-(4-플루오로페닐)-2-메틸프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-페닐프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-플루오로페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-[2-(4-플루오로페닐)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판산; 2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}에탄-1-올; N-메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 1-({[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}메틸)사이클로펜탄-1-올; N,N-디메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-메틸페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-메톡시페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-페닐-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(3-메틸페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 6-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}헥산산; N-(3-플루오로페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-플루오로페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄산; N-(1-페닐에틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; tert-부틸 N-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로필)카바메이트; (1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부틸)메탄올; 메틸 2-(1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로프로필)아세테이트; N-(2-메틸프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄니트릴; N-(6-아미노헥실)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-아미노부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판니트릴; N-[2-메틸-1-(2-메틸피페리딘-1-일)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 디메틸(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부틸)아민; N-(1-아미노-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-사이클로펜틸-2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-[4-(tert-부틸아미노)피리도[3,4-d]피리미딘-2-일]피리딘-2-아민; 2-[1-(벤젠설포닐)-2-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일]-N-tert-부틸피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-{2-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(3-클로로피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(3-메틸피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(2-메틸부탄-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2,4-디메틸-4-({2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-일}아미노)펜탄-2-올; N-에틸-2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-(프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-1-[2-메틸-2-({2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-일}아미노)프로폭시]프로판-2-올; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-메틸-N-(프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-에틸-2-(3-메틸피리딘-4-일)-N-(프로

판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(1-메톡시-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{[2-(3-클로로피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}-2,4-디메틸펜탄-2-올; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-사이클로펜틸피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 1-(2-{[2-(3-클로로피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}-2-메틸프로폭시)-2-메틸프로판-2-올; N-메틸-2-(3-메틸피리딘-4-일)-N-(프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(4-메탄설포닐-2-메틸부탄-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-[3-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-[2-클로로-5-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-[3-(1H-1,2,3,4-테트라졸-5-일)프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-메틸-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-메틸-N-[(2R)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{4-[(1-메틸사이클로프로필)아미노]피리도[3,4-d]피리미딘-2-일}피리딘-2-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2,4-디메틸-4-{[2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올; 4-{4-[(1-메틸사이클로프로필)아미노]피리도[3,4-d]피리미딘-2-일}피리딘-3-카보니트릴; 2-{2-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1H-인다졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3,5-디메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)-2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{4-[(4-하이드록시-2,4-디메틸펜탄-2-일)아미노]피리도[3,4-d]피리미딘-2-일}피리딘-3-카보니트릴; 2-(3,5-디플루오로피리딘-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(2,3-디플루오로피리딘-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1,3-티아졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-[2-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{4-[(1-메틸사이클로프로필)아미노]피리도[3,4-d]피리미딘-2-일}피리딘-2-카보니트릴; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1,2-옥사졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(디메틸-1,2-옥사졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-{1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-{1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-{1H-피롤로[3,2-b]피리딘-1-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로부틸)-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리미딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{[2-(3,5-디메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}-2,4-디메틸펜탄-2-올; N-프로필-2-{7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-5-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-사이클로프로필-1H-피라졸-4-일)-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸피리딘-4-일)-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-{1-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2,4-디메틸-4-{[2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올; N-[(1R)-1-페닐에틸]-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(5-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-[(1R)-1-페닐에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-[(1R)-1-페닐에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-에틸-1H-피라졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리다진-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1,3-옥사졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1H-피라졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1H-이미다졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-메틸-1H-이미다졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-{1H-피롤로[3,2-b]피리딘-1-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1H-1,2,3-트리아졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸-1,2-옥사졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(2H-1,2,3,4-테트라졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1H-피라졸-4-일)-N-[1-(피리딘-4-일)에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (1-{[2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부틸)메탄올; 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로부틸)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (1-{[2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)피리도

[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부틸)메탄올; 2-(1H-피라졸-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-[1-(피리딘-4-일)에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (1-{[2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부틸)메탄올; (1-{[2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로프로필)메탄올; 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-[1-(피리딘-4-일)에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-에틸-1H-피라졸-4-일)-N-(2-메틸프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-아미노-2-메틸프로판-2-일)-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 8-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 8-메틸-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-5-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 5-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(2-{[4-(tert-부틸아미노)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-5-일]아미노}에톡시)에탄-1-올; N-(4-메톡시-2-메틸부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-[2-메틸-1-(프로판-2-일옥시)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-[(2S)-부탄-2-일]-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-[(2R)-부탄-2-일]-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-(1-메톡시-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-메틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}부탄-1-올; N-tert-부틸-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2,2-디메틸-1-[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]피페리딘-4-올; 2,4-디메틸-4-{[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}펜탄-2-올; N-사이클로펜틸-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 디메틸(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}부틸)아민; N,N-디에틸-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올; N-프로필-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(2-아미노피리미딘-4-일)-N-tert-부틸-1,7-나프티리딘-4-아민; N-tert-부틸-2-{1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일}-1,7-나프티리딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(피리다진-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(2-아미노피리딘-4-일)-N-tert-부틸-1,7-나프티리딘-4-아민; N,N-디에틸-2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; (3-{[2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}-3-메틸부틸)디메틸아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-메틸-N-(프로판-2-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-4-(피페리딘-1-일)-1,7-나프티리딘; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-4-(모르폴린-4-일)-1,7-나프티리딘; N-tert-부틸-2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-(2-메틸부탄-2-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-{[2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}-2-메틸프로판-1-올; 1-[2-(3-클로로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]-2,2-디메틸피페리딘-4-올; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-[2-메틸-1-(모르폴린-4-일)프로판-2-일]-1,7-나프티리딘-4-아민; 4-(4-메틸피페라진-1-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘; 4-(피페라진-1-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘; 4-(2-메틸피페리딘-1-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘; 2-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로부틸)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-메틸-N1-(2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)프로판-1,2-디아민; N-(옥세탄-3-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 4-(3,3-디메틸피페라진-1-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘; 2,2-디메틸-4-(2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)모르폴린; N-(1-메틸사이클로부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2,2-디메틸-N1-(2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)프로판-1,3-디아민; $N^2$,$N^2$,2-트리메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)프로판-1,2-디아민; 4-(2-메틸피페라진-1-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘; 2-메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)프로판-1,3-디아민; (*R*)-2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)-1,7-나프티리딘; N-(tert-부틸)-N-메틸-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; *N*-(1-메틸사이클로부틸)-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(피리미딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민;

$N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민; *tert*-부틸 (2-메틸-1-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로판-2-일)카바메이트; *tert*-부틸 (2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)에틸)카바메이트; 2-메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,2-디아민; $N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)에탄-1,2-디아민; *N*,*N*,2-트리메틸

-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로판아미드; $N^1$,3-디메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민; *tert*-부틸 (2,2-디메틸-3-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로필)카바메이트; 2,2-디메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민; 3-메틸-3-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)부탄아미드; (*R*)-2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘; 2,3-디메틸-$N^2$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-2,3-디아민; (*S*)-2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘; 에틸 2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로파노에이트; $N^1$,$N^1$,2,2-테트라메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민; 4-(4-(tert-부틸아미노)피리도[3,4-*d*]피리미딘-2-일)-1,2,5-옥사디아졸-3-아민; $N^2$,$N^2$,2-트리메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,2-디아민; 2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로판아미드; (*S*)-1,1,1-트리플루오로-2-메틸-3-((2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)아미노)프로판-2-올; N-tert-부틸-2-(3-클로로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N,N-디에틸-1,7-나프티리딘-4-아민; N-((1R,2S)-2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (S)-N-(sec-부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-((1S,2R)-2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (R)-N-(sec-부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-((1S,2S)-2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-((1R,2R)-2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-프로필-2-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; *tert*-부틸 (3-메틸-3-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)부틸)카바메이트; $N^1$,$N^1$,$N^3$,2,2-펜타메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민; $N^1$,$N^1$-디에틸-3-메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민; $N^3$-(2-(2-플루오로피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)-$N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민;

$N^3$-(2-(3,5-디메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)-$N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민; $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민; $N^3$-(2-(2-아미노피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)-$N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민; 및 3-메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민으로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0306] 구현예 60A. 구현예 1에 있어서, N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올; 2,4-디메틸-4-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올;
N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민;
2-(피리딘-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로부틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; 2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1-올; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘; N-사이클로펜틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; *N*-프로필-2-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)에탄-1-올; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; (1S,2S)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜탄-1-올; N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2R)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

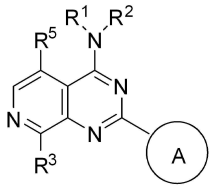
[0307] 구현예 60B. 구현예 1에 있어서, N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는 화학식 A2의

화합물, 또는 이의 염.

[0308] 구현예 60C. 구현예 1에 있어서, 화합물이 N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민인 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0309] 구현예 61. 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염:

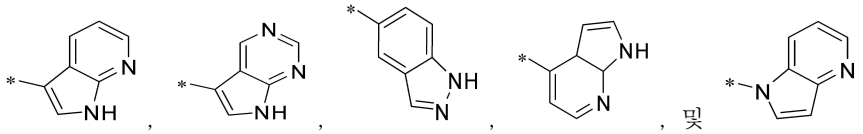
[0310] [화학식 I]

[0311] 

[0312] (식 중,

[0313] 고리 A는

[0314] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[0315] (b)  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이며,

[0316] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[0317] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[0318] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[0319] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[0320] $R^2$는

[0321] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0322] (i) 할로겐;

[0323] (ii) 시아노;

[0324] (iii) 옥소;

[0325] (iv) $C_2$알케닐;

[0326] (v) $C_2$알키닐;

[0327] (vi) $C_{1-6}$할로알킬;

[0328] (vii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0329] (viii) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는

$C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0330] (ix) $-C(O)R^{8}$로서, $R^{8}$은 $R^{0}$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^{0}$인 $-C(O)R^{8}$;

[0331] (x) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0332] (xi) 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^{0}$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[0333] (xii) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[0334] (xiii) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0335] (xiv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[0336] (xv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[0337] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0338] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^{0}$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[0339] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^{0}$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^{0}$, 및 비치환되거나 $R^{0}$ 또는 $-C(O)R^{0}$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0340] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^{0}$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^{0}$, 및 비치환되거나 $R^{0}$ 또는 $-C(O)R^{0}$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0341] 로부터 선택되고;

[0342] $R^{3}$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

[0343] $R^{5}$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^{0}$에 의해 치환되고;

[0344] 단,

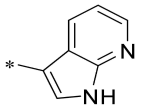
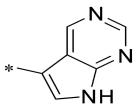
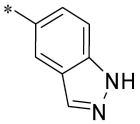
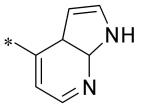
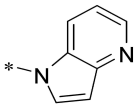
[0345] (1) 고리 A가 4-피리미디닐 또는 3-플루오로-4-피리미디닐이고, $R^{1}$이 H 또는 메틸이고, $R^{3}$이 H 또는 Cl이고 $R^{5}$가 H인 경우; $R^{2}$는 $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노 또는 *t*-부틸-카바모일-아미노로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되며 선택적으로 비치환 페닐로 추가 치환되는 $C_{2-4}$알킬이 아니고;

[0346] (2) 고리 A가 인다졸-5-일이고, $R^{1}$, $R^{3}$ 및 $R^{5}$가 H인 경우; $R^{2}$는 $-NH_2$로 치환되는 $C_4$알킬이 아니다).

[0347] 구현예 62. 구현예 61에 있어서,

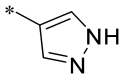
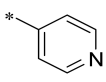
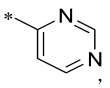
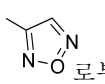
[0348] 고리 A가

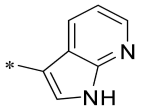
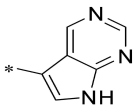
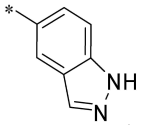
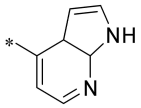
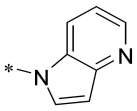
[0349] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N으로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 질소 원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 5-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[0350] (b)  ,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이며,

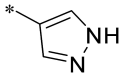
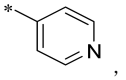
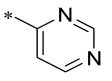
[0351] "*"는 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고, 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$ 및 $C_{3-6}$사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

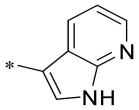
[0352] 구현예 63. 구현예 61 또는 구현예 62에 있어서, 고리 A가

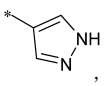
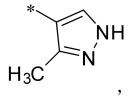
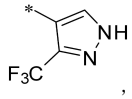
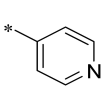
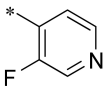
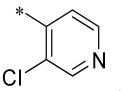
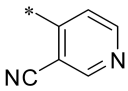
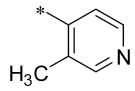
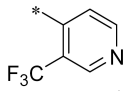
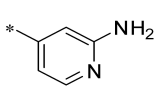
[0353] 각각 비치환되거나 시아노, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $NH_2$, 및 $C_{3-6}$사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는  , ,  ,  , 및  로부터 선택되거나;

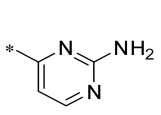
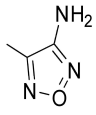
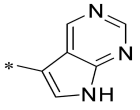
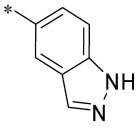
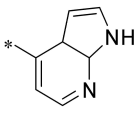
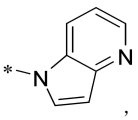
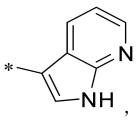
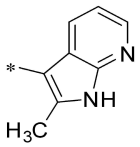
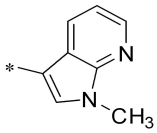
[0354] 각각 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬에 의해 치환되는  ,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

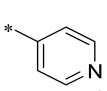
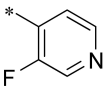
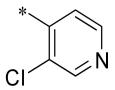
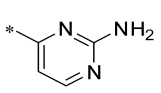
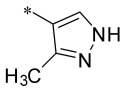
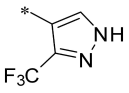
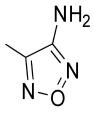
[0355] 구현예 64. 구현예 61 내지 63 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가

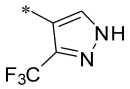
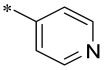
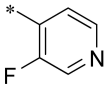
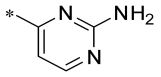
[0356] 각각 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $-NH_2$로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되는  , ,  ,  , 및 로부터 선택되거나;

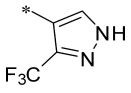
[0357] 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬에 의해 치환되는  인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

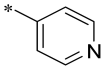
[0358] 구현예 65. 구현예 61 내지 63 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,

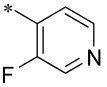

,

,

,

,

,

,

,

, 및

로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

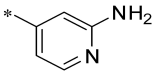
[0359] 구현예 66. 구현예 61 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가

,

,

,

,

,

, 및

로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

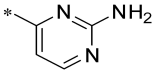
[0360] 구현예 67. 구현예 61 내지 66 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가

,

,

, 및

로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

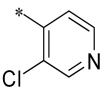
[0361] 구현예 68. 구현예 61 내지 67 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가

인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

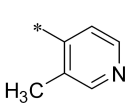
[0362] 구현예 69. 구현예 61 내지 67 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가

인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0363] 구현예 70. 구현예 61 내지 67 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가

인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

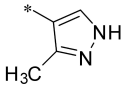
[0364] 구현예 71. 구현예 61 내지 67 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가

인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

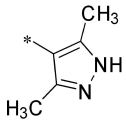
[0365] 구현예 72. 구현예 61 내지 67 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가

인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

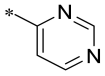
[0366] 구현예 73. 구현예 61 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가

인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

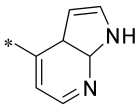
[0367] 구현예 74. 구현예 61 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가

인 화학식 I의 화합물, 또는 이의

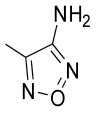
염.

[0368] 구현예 75. 구현예 61 내지 66 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

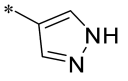
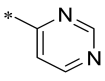
[0369] 구현예 76. 구현예 61 내지 63 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

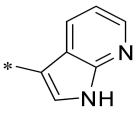
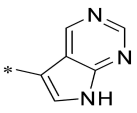
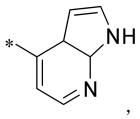
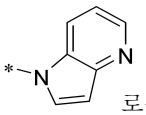
[0370] 구현예 77. 구현예 61 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0371] 구현예 78. 구현예 61 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0372] 구현예 78A. 구현예 61 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0373] 구현예 79. 구현예 61 내지 63 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가

[0374] 각각 비치환되거나 시아노, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $NH_2$, 및 $C_{3-6}$사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는  , , 및  로부터 선택되거나;

[0375] 각각 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬에 의해 치환되는  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0376] 구현예 80. 구현예 61 내지 79 중 어느 하나에 있어서, $R^1$이 수소, 메틸 및 에틸로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0377] 구현예 81. 구현예 61 내지 80 중 어느 하나에 있어서, $R^1$이 메틸인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0378] 구현예 82. 구현예 61 내지 80 중 어느 하나에 있어서, $R^1$이 수소인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0379] 구현예 83. 구현예 61 내지 82 중 어느 하나에 있어서,

[0380] $R^2$가

[0381] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0382] (i) 시아노;

[0383] (ii) $C_2$알키닐;

[0384] (iii) $C_{1-6}$할로알킬;

[0385] (iv) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0386] (v) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0387] (vi) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$인 $-C(O)R^8$;

[0388] (vii) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0389] (viii) 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬;

[0390] (ix) 고리 구성원으로서 N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하고 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬; 및

[0391] (x) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0392] (b) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0393] (c) 고리 구성원으로서 N 및 O로부터 선택되는 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0394] 로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0395] 구현예 84. 구현예 61 내지 82 중 어느 하나에 있어서,

[0396] $R^2$가

[0397] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬로서,

[0398] (i) 시아노;

[0399] (ii) $C_2$알키닐;

[0400] (iii) $C_{1-6}$할로알킬;

[0401] (iv) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0402] (v) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0403] (vi) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$인 $-C(O)R^8$;

[0404] (vii) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0405] (viii) 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬;

[0406] (ix) 고리 구성원으로서 N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하고 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬; 및

[0407] (x) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0408] 비치환되거나 분자의 나머지에 대한 $R^2$의 부착 지점인 1 내지 3개의 치환기 (i) 내지 (x)에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬의 C 원자가 $-CH_2-$기가 아닌 $C_{1-8}$알킬,

[0409] (b) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0410] (c) 고리 구성원으로서 N 및 O로부터 선택되는 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0411] 로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0412] 구현예 85. 구현예 61 내지 83 중 어느 하나에 있어서,

[0413] $R^2$가

[0414] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0415] (i) 시아노;

[0416] (ii) $C_2$알키닐;

[0417] (iii) $C_{1-6}$할로알킬;

[0418] (iv) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 하이드록실 또는 $-C(O)H$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0419] (v) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)C_{1-6}$알콕시, 및 비치환되거나 $-C(O)OH$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0420] (vi) 비치환되거나 1개의 하이드록실에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0421] (b) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 비치환되거나 하이드록실 또는 $-C(O)-C_{1-6}$알콕시에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬

[0422] 로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0423] 구현예 86. 구현예 61 내지 85 중 어느 하나에 있어서,

[0424] $R^2$가

[0425] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0426] (i) $C_{1-6}$할로알킬;

[0427] (ii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 및 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$; 및

[0428] (iii) 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0429] (b) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬

[0430] 로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0431] 구현예 87. 구현예 61 내지 86 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬 및 $-OR^6$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^6$은 수소, 및 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0432] 구현예 88. 구현예 61 내지 87 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

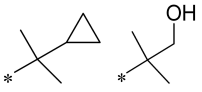
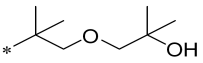
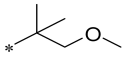
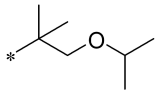
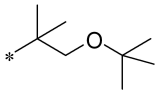
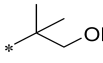
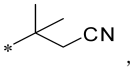
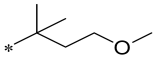
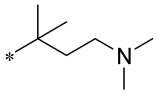
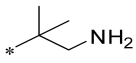
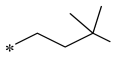
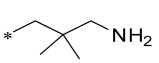
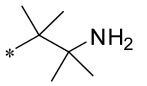
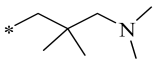
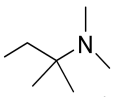
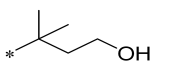
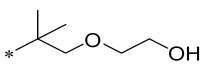
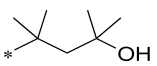
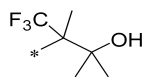
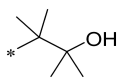
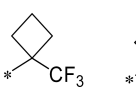
[0433] 구현예 89. 구현예 61 내지 87 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

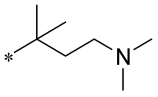
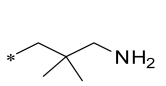
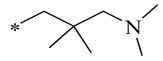
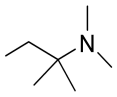
[0434] 구현예 90. 구현예 61 내지 87 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환되거나 $-O-C_{1-6}$알킬-OH에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

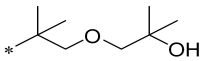
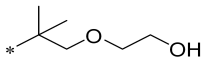
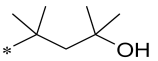
[0435] 구현예 91. 구현예 61 내지 86 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, $R^0$, 및 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

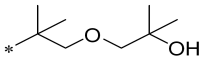
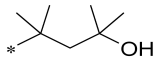
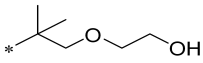
[0436] 구현예 92. 구현예 61 내지 86 및 91 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환 $C_{3-6}$사이클로알킬인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

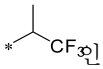
[0437] 구현예 93. 구현예 61 내지 86 및 91 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 $C_{1-6}$알킬 또는 $C_{1-6}$할로알킬에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

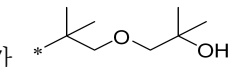
[0438] 구현예 94. 구현예 61 내지 85 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 n-프로필, 이소프로필, *s*-부틸, *t*-부틸, 2-메틸-부트-2-일, 2,4,4-트리메틸펜탄-2-일, , ,  , ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , , ,  , , , , , , 및 로부터 선택되며; "*"은 분자의 나머지에 대한 $R^2$의 부착 지점을 나타내는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

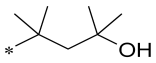
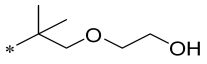
[0439] 구현예 94A. 구현예 61 내지 85 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가  , , ,  , ,  , 및  로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0440] 구현예 95. 구현예 61 내지 83 및 85 내지 87 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 n-프로필, 이소프로필, *t*-부틸, , , ,  ,  ,  , , , , , 및 로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

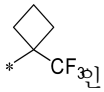
[0441] 구현예 96. 구현예 61 내지 87, 94 및 95 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 , ,  ,  , 및  로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0442] 구현예 97. 구현예 61 내지 87, 89, 및 94 내지 96 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가  인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0443] 구현예 98. 구현예 61 내지 87, 90, 및 94 내지 96 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가  인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0444] 구현예 99. 구현예 61 내지 87, 91, 및 94 내지 96 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가  또는  인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0445] 구현예 100. 구현예 61 내지 86, 91, 94 및 95 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 , , , , 및 로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0446] 구현예 101. 구현예 61 내지 86, 91, 93 내지 95 및 100 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 또는  인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0447] 구현예 102. 구현예 61 내지 86, 91, 93 내지 95 및 100 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 또는 인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0448] 구현예 103. 구현예 61 내지 86, 91 내지 95, 100 및 102 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 인 화학식 I의

화합물, 또는 이의 염.

[0449] 구현예 104. 구현예 61 내지 83, 85 내지 90, 및 95 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 n-프로필, 이소프로필 및 *t*-부틸로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0450] 구현예 105. 구현예 61 내지 83, 85 내지 90, 95, 및 104 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 n-프로필인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0451] 구현예 106. 구현예 61 내지 90, 95, 및 104 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 이소프로필인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0452] 구현예 107. 구현예 61 내지 90, 95, 및 104 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 *t*-부틸인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0453] 구현예 108. 구현예 61 내지 107 중 어느 하나에 있어서, $R^3$이 수소, 클로로 및 메틸로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0454] 구현예 109. 구현예 61 내지 108 중 어느 하나에 있어서, $R^3$이 수소인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0455] 구현예 109A. 구현예 61 내지 108 중 어느 하나에 있어서, $R^3$이 클로로인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

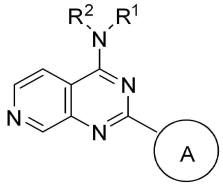
[0456] 구현예 109B. 구현예 61 내지 108 중 어느 하나에 있어서, $R^3$이 메틸인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0457] 구현예 110. 구현예 61 내지 109 중 어느 하나에 있어서, $R^5$가 수소 및 클로로로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

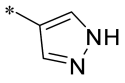
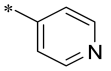
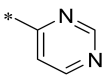
[0458] 구현예 111. 구현예 61 내지 110 중 어느 하나에 있어서, $R^5$가 수소인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0459] 구현예 112. 구현예 61에 있어서, 화합물이 화학식 V의 화합물인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염:

[0460] [화학식 V]

[0461] 

[0462] (식 중,

[0463] 고리 A는,  ,  또는  이고, 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $-NH_2$로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되고;

[0464] $R^1$은 수소 또는 비치환 $C_{1-6}$알킬이고;

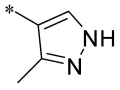
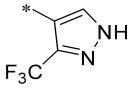
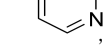
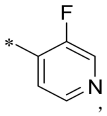
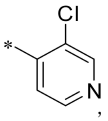
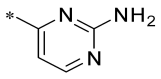
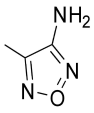
[0465] $R^2$는

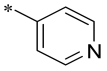
[0466] (a) 비치환되거나 하기로부터 선택되는 1개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

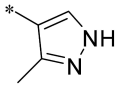
[0467] (i) $C_{1-4}$할로알킬 또는

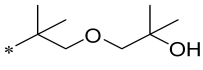
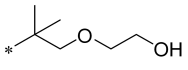
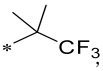
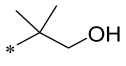
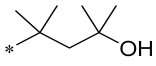
[0468] (ii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소 및 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$; 또는

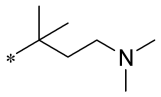
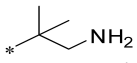
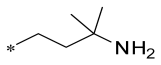
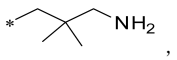
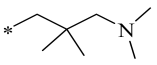
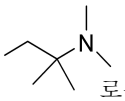
[0469] (b) 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬 또는 $C_{1-6}$할로알킬에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬이다).

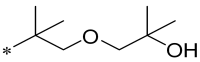
[0470] 구현예 113. 구현예 112에 있어서, 고리 A가  ,  ,  ,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

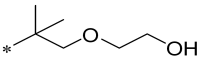
[0471] 구현예 114. 구현예 112 또는 구현예 113에 있어서, 고리 A가  인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

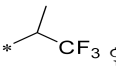
[0472] 구현예 115. 구현예 112 또는 구현예 113에 있어서, 고리 A가  인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0473] 구현예 116. 구현예 112 내지 115 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 , , , , ,  ,  , , , , ,  ,  , 및  로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0474] 구현예 116A. 구현예 112 내지 및 115 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가  ,  ,  ,  , ,  , 및  로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0475] 구현예 117. 구현예 112 내지 116 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가  인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0476] 구현예 118. 구현예 112 내지 116 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가  인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0477] 구현예 119. 구현예 112 내지 116 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가  인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0478] 구현예 120. 구현예 61에 있어서, N-(2-사이클로프로필프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N,N-디에틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-에틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메톡시-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-메톡시-2-메틸부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-부틸-N-메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-에틸-N-메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)에탄-1-올; 2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올; N-에틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-사이클로헥실프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(3-메틸옥세탄-3-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리

미딘-4-아민; N-(2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-2-올; N-부틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸-4-페닐부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-사이클로프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

N-(4-메탄설포닐-2-메틸부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1,3-디올; 3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-2-올; 2-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)아세트산; (1R,2S)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜탄-1-올; 4,4,4-트리플루오로-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-1-올; N-(1-메탄설포닐-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (2S)-3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판산; 2-[(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로필)아미노]아세트산; (2R)-3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판산; 메틸 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로파노에이트; (1S,2S)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜탄-1-올; 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판산; 2-(2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}에톡시)에탄-1-올; 2-(하이드록시메틸)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1,3-디올; 3-메틸-3-(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄아미도)부탄산; 2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-3-페닐프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-{[4-(디메틸아미노)옥산-4-일]메틸}-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄산; N-(2-메탄설포닐에틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-[2-(아다만탄-1-일)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-N-[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]프로판아미드; 4,4,4-트리플루오로-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄산; N-[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]프로판-2-설폰아미드; 2-(피리딘-4-일)-N-[3-(1H-1,2,3,4-테트라졸-5-일)프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2R)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2,4-디메틸-4-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올; 4,4,4-트리플루오로-2,3-디메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-2-올; (1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜틸)메탄올; N-(3-메톡시사이클로부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (1R,2R)-1-N,2-N-디메틸-1-N-[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]사이클로헥산-1,2-디아민; 메틸 (1s,3s)-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-카복실레이트; 에틸 1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-카복실레이트; 1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-카복실산; (1s,3s)-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-카복실산; 2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-1-올; 2-(피리딘-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로부틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(피리딘-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-사이클로펜틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1-올; 3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1-올; N-(부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸부트-3-인-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (1r,3s)-3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-올; 2,3-디메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-2-올; 2-(피리딘-4-일)-N-(2,4,4-트리메틸펜탄-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(펜탄-3-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-[2-메틸-1-(모르폴린-4-일)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-[1-(tert-부톡시)-2-메틸프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4,4,4-트리플루오로-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-1-올; N-펜틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-1-올; N-[1-(1H-인돌-3-일)-2-메틸프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-[1-(4-플루오로페닐)-2-메틸프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-페닐프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-플루오

로페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-[2-(4-플루오로페닐)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판산; 2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}에탄-1-올; N-메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 1-({[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}메틸)사이클로펜탄-1-올; N,N-디메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-메틸페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-메톡시페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-페닐-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(3-메틸페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 6-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}헥산산; N-(3-플루오로페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-플루오로페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄산; N-(1-페닐에틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; tert-부틸 N-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로필)카바메이트; (1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부틸)메탄올; 메틸 2-(1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로프로필)아세테이트; N-(2-메틸프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄니트릴; N-(6-아미노헥실)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(4-아미노부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판니트릴; N-[2-메틸-1-(2-메틸피페리딘-1-일)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 디메틸(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부틸)아민; N-(1-아미노-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

N-사이클로펜틸-2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-[4-(tert-부틸아미노)피리도[3,4-d]피리미딘-2-일]피리딘-2-아민; 2-[1-(벤젠설포닐)-2-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일]-N-tert-부틸피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-{2-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(3-클로로피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(3-메틸피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(2-메틸부탄-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2,4-디메틸-4-({2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-일}아미노)펜탄-2-올; N-에틸-2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-(프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-1-[2-메틸-2-({2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-일}아미노)프로폭시]프로판-2-올; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-메틸-N-(프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-에틸-2-(3-메틸피리딘-4-일)-N-(프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(1-메톡시-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{[2-(3-클로로피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}-2,4-디메틸펜탄-2-올; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-사이클로펜틸피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 1-(2-{[2-(3-클로로피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}-2-메틸프로폭시)-2-메틸프로판-2-올; N-메틸-2-(3-메틸피리딘-4-일)-N-(프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(4-메탄설포닐-2-메틸부탄-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-[3-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-[2-클로로-5-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-[3-(1H-1,2,3,4-테트라졸-5-일)프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-메틸-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-메틸-N-[(2R)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{4-[(1-메틸사이클로프로필)아미노]피리도[3,4-d]피리미딘-2-일}피리딘-2-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2,4-디메틸-4-{[2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올; 4-{4-[(1-메틸사이클로프로필)아미노]피리도[3,4-d]피리미딘-2-일}피리딘-3-카보니트릴; 2-{2-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1H-인다졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3,5-디메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)-2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{4-[(4-하이드록시-2,4-디메틸펜탄-2-일)아미노]피리도[3,4-d]피리미딘-2-일}피리딘-3-카보니트릴; 2-(3,5-디플루오로피리딘-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(2,3-디플루오로피리

딘-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1,3-티아졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-[2-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{4-[(1-메틸사이클로프로필)아미노]피리도[3,4-d]피리미딘-2-일}피리딘-2-카보니트릴; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1,2-옥사졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(디메틸-1,2-옥사졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-{1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

N-프로필-2-{1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-{1H-피롤로[3,2-b]피리딘-1-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로부틸)-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리미딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 4-{[2-(3,5-디메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}-2,4-디메틸펜탄-2-올; N-프로필-2-{7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-5-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-사이클로프로필-1H-피라졸-4-일)-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸피리딘-4-일)-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-{1-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2,4-디메틸-4-{[2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올; N-[(1R)-1-페닐에틸]-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(5-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-[(1R)-1-페닐에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-[(1R)-1-페닐에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-에틸-1H-피라졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리다진-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1,3-옥사졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1H-피라졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1H-이미다졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-메틸-1H-이미다졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-{1H-피롤로[3,2-b]피리딘-1-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1H-1,2,3-트리아졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸-1,2-옥사졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(2H-1,2,3,4-테트라졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1H-피라졸-4-일)-N-[1-(피리딘-4-일)에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (1-{[2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부틸)메탄올; 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로부틸)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (1-{[2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부틸)메탄올; 2-(1H-피라졸-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-[1-(피리딘-4-일)에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (1-{[2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부틸)메탄올; (1-{[2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로프로필)메탄올;

2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-[1-(피리딘-4-일)에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-에틸-1H-피라졸-4-일)-N-(2-메틸프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(1-아미노-2-메틸프로판-2-일)-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 8-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 8-메틸-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-5-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(피리미딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민; $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민; *tert*-부틸 (2-메틸-1-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로판-2-일)카바메이트; *tert*-부틸 (2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)에틸)카바메이트; 2-메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,2-디아민; $N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)에탄-1,2-디아민; *N,N*,2-트리메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로판아미드; $N^1$,3-디메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민; *tert*-부틸 (2,2-디메틸-3-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로필)카바메이트; 2,2-디메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민; 3-메틸-3-((2-(피리딘-

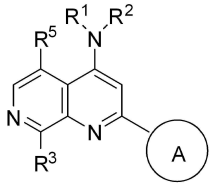
4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)부탄아미드; (*R*)-2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘; 2,3-디메틸-$N^2$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-2,3-디아민; (*S*)-2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘; 에틸 2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로파노에이트; $N^1$,$N^1$,2,2-테트라메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민; 4-(4-(tert-부틸아미노)피리도[3,4-*d*]피리미딘-2-일)-1,2,5-옥사디아졸-3-아민; $N^2$,$N^2$,2-트리메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,2-디아민; 2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로판아미드; (*S*)-1,1,1-트리플루오로-2-메틸-3-((2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)아미노)프로판-2-올; 5-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(2-{[4-(tert-부틸아미노)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-5-일]아미노}에톡시)에탄-1-올; N-((1R,2S)-2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (S)-N-(sec-부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-((1S,2R)-2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; (R)-N-(sec-부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-((1S,2S)-2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-((1R,2R)-2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; *tert*-부틸 (3-메틸-3-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)부틸)카바메이트; $N^1$,$N^1$,$N^3$,2,2-펜타메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민; $N^1$,$N^1$-디에틸-3-메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민; $N^3$-(2-(2-플루오로피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)-$N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민; $N^3$-(2-(3,5-디메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)-$N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민; $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민; $N^3$-(2-(2-아미노피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)-$N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민; 및 3-메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민으로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0479] 구현예 120A. 구현예 61에 있어서, N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올; 2,4-디메틸-4-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올; 2-(피리딘-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로부틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1-올; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘; N-사이클로펜틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; *N*-프로필-2-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)에탄-1-올; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; (1S,2S)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜탄-1-올; N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2R)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0480] 구현예 120B. 구현예 61에 있어서, 화합물이 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민인 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염.

[0481] 구현예 121. 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염:

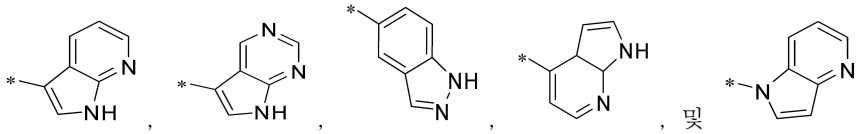
[0482] [화학식 II]

[0483] 

[0484] (식 중,

[0485] 고리 A는

[0486] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[0487] (b)  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이며,

[0488] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[0489] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[0490] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[0491] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[0492] $R^2$는

[0493] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0494] (i) 할로겐;

[0495] (ii) 시아노;

[0496] (iii) 옥소;

[0497] (iv) $C_2$알케닐;

[0498] (v) $C_2$알키닐;

[0499] (vi) $C_{1-6}$할로알킬;

[0500] (vii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0501] (viii) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0502] (ix) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

[0503] (x) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0504] (xi) 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[0505] (xii) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[0506] (xiii) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0507] (xiv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[0508] (xv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[0509] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0510] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[0511] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0512] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0513] 로부터 선택되거나;

[0514] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

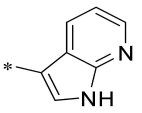
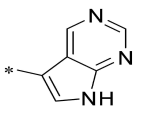
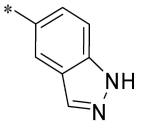
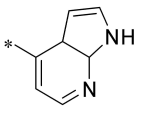
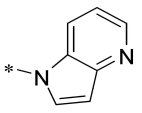
[0515] $R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

[0516] $R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

[0517] 구현예 122. 구현예 121에 있어서,

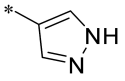
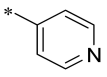
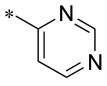
[0518] 고리 A가

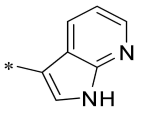
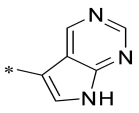
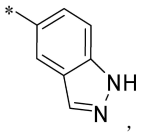
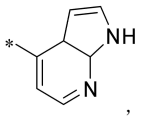
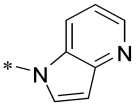
[0519] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N으로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 질소 원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[0520] (b)  ,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이며,

[0521] "*"는 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고, 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$ 및 $C_{3-6}$사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

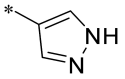
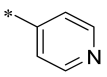
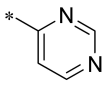
[0522] 구현예 123. 구현예 121 또는 구현예 122에 있어서, 고리 A가 각각 비치환되거나 시아노, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $NH_2$, 및 $C_{3-6}$사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는

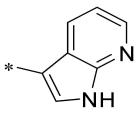
 , ,  , 및  로부터 선택되거나;

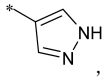
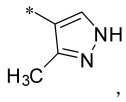
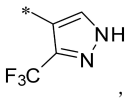
[0523] 각각 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬에 의해 치환되는  ,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

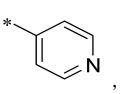
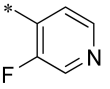
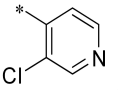
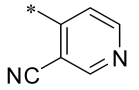
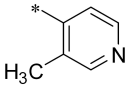
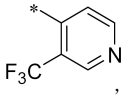
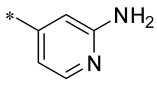
[0524] 구현예 124. 구현예 121 내지 123 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가

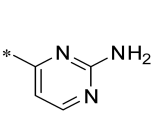
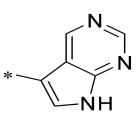
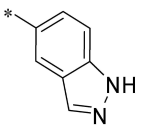
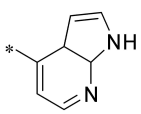
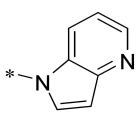
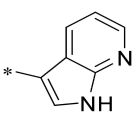
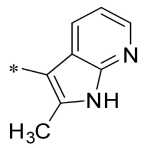
[0525] 각각 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $-NH_2$로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되는

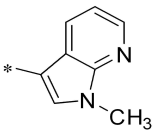
 , ,  , 및  로부터 선택되거나;

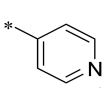
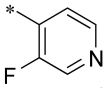
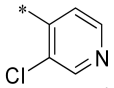
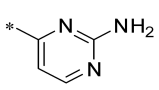
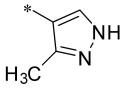
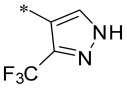
[0526] 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬에 의해 치환되는,  인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

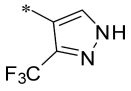
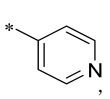
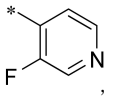
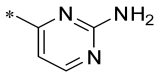
[0527] 구현예 125. 구현예 121 내지 123 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  ,  ,  ,

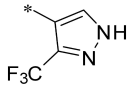
 ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,

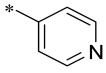
 ,  ,  ,  ,  ,  ,  , 및

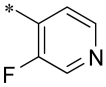
 로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

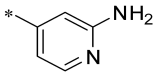
[0528] 구현예 126. 구현예 121 내지 125 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  ,  ,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

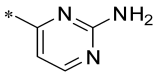
[0529] 구현예 127. 구현예 121 내지 126 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

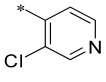
[0530] 구현예 128. 구현예 121 내지 127 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

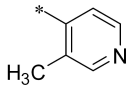
[0531] 구현예 129. 구현예 121 내지 127 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

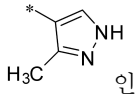
[0532] 구현예 130. 구현예 121 내지 127 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

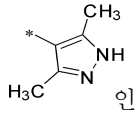
[0533] 구현예 131. 구현예 121 내지 127 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0534] 구현예 132. 구현예 121 내지 127 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0535] 구현예 133. 구현예 121 내지 125 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

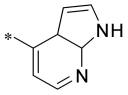
[0536] 구현예 134. 구현예 121 내지 125 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

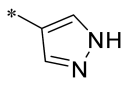
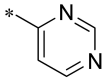
[0537] 구현예 135. 구현예 121 내지 126 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

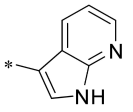
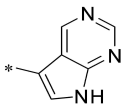
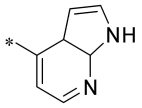
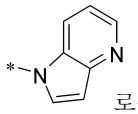
[0538] 구현예 136. 구현예 121 내지 123 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 II의 화합물, 또는

이의 염.

[0539] 구현예 137. 구현예 121 내지 124 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가 인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0540] 구현예 138. 구현예 121 내지 125 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가  인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0541] 구현예 139. 구현예 121 내지 123 중 어느 하나에 있어서, 고리 A가 각각 비치환되거나 시아노, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $NH_2$, 및 $C_{3-6}$사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는  , , 및  로부터 선택되거나;

[0542] 각각 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬에 의해 치환되는  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 화학식 A2의 화합물, 또는 이의 염.

[0543] 구현예 140. 구현예 121 내지 139 중 어느 하나에 있어서, $R^1$이 수소, 메틸 및 에틸로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0544] 구현예 141. 구현예 121 내지 140 중 어느 하나에 있어서, $R^1$이 메틸인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0545] 구현예 142. 구현예 121 내지 140 중 어느 하나에 있어서, $R^1$이 수소인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0546] 구현예 143. 구현예 121 내지 142 중 어느 하나에 있어서,

[0547] $R^2$가

[0548] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0549] (i) 시아노;

[0550] (ii) $C_2$알키닐;

[0551] (iii) $C_{1-6}$할로알킬;

[0552] (iv) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0553] (v) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0554] (vi) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$인 $-C(O)R^8$;

[0555] (vii) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0556] (viii) 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬;

[0557] (ix) 고리 구성원으로서 N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하고 비치환되거나 $C_{1-}$

$_{6}$알킬에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬; 및

[0558] (x) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0559] (b) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0560] (c) 고리 구성원으로서 N 및 O로부터 선택되는 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0561] 로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0562] 구현예 144. 구현예 121 내지 142 중 어느 하나에 있어서,

[0563] $R^2$가

[0564] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$ 알킬로서,

[0565] (i) 시아노;

[0566] (ii) $C_2$알키닐;

[0567] (iii) $C_{1-6}$할로알킬;

[0568] (iv) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0569] (v) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0570] (vi) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$인 $-C(O)R^8$;

[0571] (vii) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0572] (viii) 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬;

[0573] (ix) 고리 구성원으로서 N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하고 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬; 및

[0574] (x) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0575] 비치환되거나 분자의 나머지에 대한 $R^2$의 부착 지점인 1 내지 3개의 치환기 (i) 내지 (x)에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬의 C 원자가 $-CH_2-$기가 아닌 $C_{1-8}$알킬;

[0576] (b) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0577] (c) 고리 구성원으로서 N 및 O로부터 선택되는 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0578] 로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0579] 구현예 145. 구현예 121 내지 143 중 어느 하나에 있어서,

[0580] $R^2$가

[0581] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0582] (i) 시아노;

[0583] (ii) $C_2$알키닐;

[0584] (iii) $C_{1-6}$할로알킬;

[0585] (iv) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 하이드록실 또는 -C(O)H에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0586] (v) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)C_{1-6}$알콕시, 및 비치환되거나 -C(O)OH에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0587] (vi) 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0588] (b) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 비치환되거나 하이드록실 또는 $-C(O)-C_{1-6}$알콕시에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬

[0589] 로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0590] 구현예 146. 구현예 121 내지 145 중 어느 하나에 있어서,

[0591] $R^2$가

[0592] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬:

[0593] (i) $C_{1-6}$할로알킬;

[0594] (ii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 및 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$; 및

[0595] (iii) 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0596] (b) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬

[0597] 로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0598] 구현예 147. 구현예 121 내지 146 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬 및 $-OR^6$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^6$은 수소, 및 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0599] 구현예 148. 구현예 121 내지 147 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

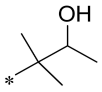
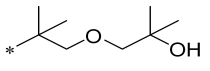
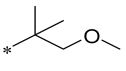
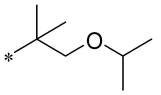
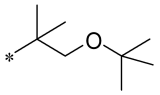
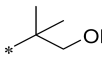
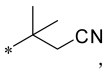
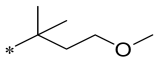
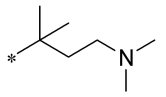
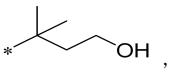
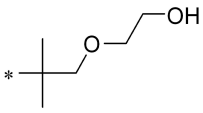
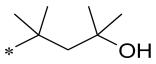
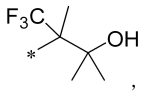
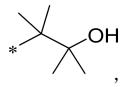
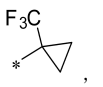
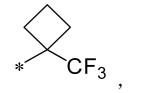
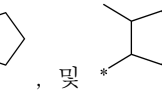
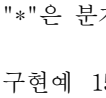
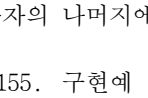
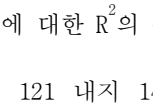
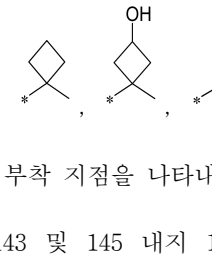
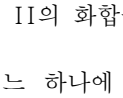
[0600] 구현예 149. 구현예 121 내지 147 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0601] 구현예 150. 구현예 121 내지 147 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환되거나 -O-$C_{1-6}$알킬-OH에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

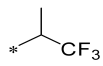
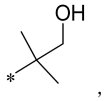
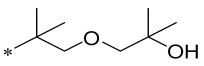
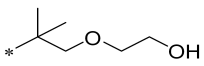
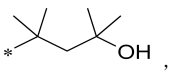
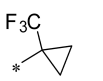
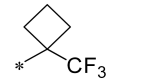
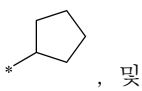
[0602] 구현예 151. 구현예 121 내지 146 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, $R^0$, 및 비치환되거나 하이드록실에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0603] 구현예 152. 구현예 121 내지 146 및 151 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 비치환 $C_{3-6}$사이클로알킬인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

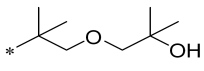
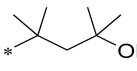
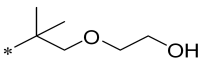
[0604] 구현예 153. 구현예 121 내지 146 및 151 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 $C_{1-6}$알킬 또는 $C_{1-6}$할로알킬에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

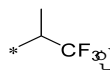
[0605] 구현예 154. 구현예 121 내지 145 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 n-프로필, 이소프로필, *s*-부틸, *t*-부틸, 2-메틸-부트-2-일, 2,4,4-트리메틸펜탄-2-일, , , , ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , ,  ,  , ,  , , , ,  ,  ,  ,  , , , 및  로부터 선택되며,

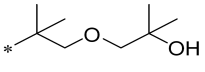
[0606] "*"은 분자의 나머지에 대한 $R^2$의 부착 지점을 나타내는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

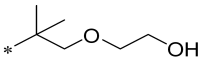
[0607] 구현예 155. 구현예 121 내지 143 및 145 내지 147 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 n-프로필, 이소프로필, *t*-부틸,  , ,  ,  ,  ,  , ,  ,  ,  , 및 로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

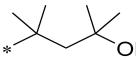
[0608] 구현예 156. 구현예 121 내지 147, 154 및 155 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가

[0609] , ,  ,  , 및  로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0610] 구현예 157. 구현예 121 내지 147, 149, 및 154 내지 156 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가  인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0611] 구현예 158. 구현예 121 내지 147, 150, 및 154 내지 156 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가  또

는  인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0612] 구현예 159. 구현예 121 내지 147, 151, 및 154 내지 156 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가  인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0613] 구현예 160. 구현예 121 내지 146, 151, 154 및 155 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 , , , , 및 로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0614] 구현예 161. 구현예 121 내지 146, 151, 153 내지 155 및 160 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 또는 인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0615] 구현예 162. 구현예 121 내지 136, 151, 153 내지 155 및 160 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 또는 인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0616] 구현예 163. 구현예 121 내지 136, 151, 152, 154, 155 및 160 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0617] 구현예 164. 구현예 121 내지 133, 135 내지 150, 및 155 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 n-프로필, 이소프로필 및 *t*-부틸로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0618] 구현예 165. 구현예 121 내지 143, 145 내지 150, 155, 및 164 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 n-프로필인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0619] 구현예 166. 구현예 121 내지 150, 155 및 164 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 이소프로필인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0620] 구현예 167. 구현예 121 내지 150, 155, 및 164 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 *t*-부틸인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0621] 구현예 168. 구현예 121 내지 139 중 어느 하나에 있어서, $R^1$ 및 $R^2$가 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성하고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0622] 구현예 169. 구현예 121 내지 139 및 168 중 어느 하나에 있어서, $R^1$ 및 $R^2$가 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 5- 또는 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성하고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 5- 또는 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 하이드록실, $C_{1-4}$알킬 및 $C_{1-4}$할로알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환

기에 의해 치환되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0623] 구현예 170. 구현예 121 내지 139, 168, 및 169 중 어느 하나에 있어서, $R^1$ 및 $R^2$가 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N 및 O로부터 선택되는 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성하고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 하이드록실, $C_{1-6}$알킬 및 $C_{1-6}$할로알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0624] 구현예 171. 구현예 121 내지 139, 및 168 내지 170 중 어느 하나에 있어서, $R^1$ 및 $R^2$가 이들이 결합되는 질소 원자와 함께 피페리디닐, 피페라지닐 및 모르폴리닐로부터 선택되는 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성하고, 피페리디닐, 피페라지닐 또는 모르폴리닐은 비치환되거나 하이드록실 및 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0625] 구현예 172. 구현예 121 내지 171 중 어느 하나에 있어서, $R^3$이 수소, 클로로 및 메틸로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

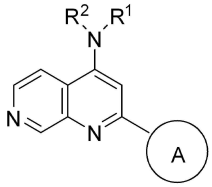
[0626] 구현예 173. 구현예 121 내지 172 중 어느 하나에 있어서, $R^3$이 수소인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0627] 구현예 174. 구현예 121 내지 173 중 어느 하나에 있어서, $R^5$가 수소, 및 클로로로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

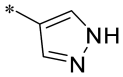
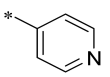
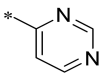
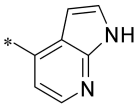
[0628] 구현예 175. 구현예 121 내지 174 중 어느 하나에 있어서, $R^5$가 수소인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0629] 구현예 176. 구현예 121에 있어서, 화합물이 화학식 VI의 화합물인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염:

[0630] [화학식 VI]

[0631] 

[0632] (식 중,

[0633] 고리 A는  ,  ,  , 및  이고, 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $-NH_2$로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되고;

[0634] $R^1$은 수소 또는 비치환 $C_{1-6}$알킬이고;

[0635] $R^2$는

[0636] (a) 비치환되거나 하기로부터 선택되는 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0637] (i) 디-$C_{1-6}$알킬아미노;

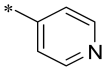
[0638] (ii) $C_{1-6}$할로알킬;

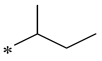
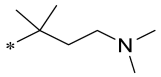
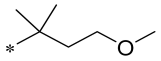
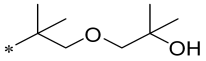
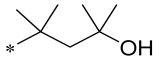
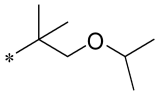
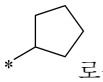
[0639] (iii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$; 또는

[0640] (b) 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬 또는 $C_{1-6}$할로알킬에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬

[0641] 이거나;

[0642] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합되는 질소와 함께, 비치환되거나 $C_{1-6}$알킬 및 하이드록실로부터 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있다).

[0643] 구현예 177. 구현예 176에 있어서, 고리 A가  인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0644] 구현예 178. 구현예 176 또는 구현예 177에 있어서, $R^2$가 에틸,  , ,  ,  ,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

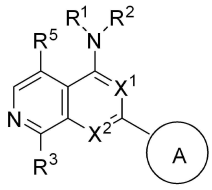
[0645] 구현예 179. 구현예 176 내지 178 중 어느 하나에 있어서, $R^2$가 tert-부틸인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0646] 구현예 180. 구현예 121에 있어서, N-(4-메톡시-2-메틸부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-[2-메틸-1-(프로판-2-일옥시)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-[(2S)-부탄-2-일]-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-[(2R)-부탄-2-일]-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-(1-메톡시-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-메틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}부탄-1-올; N-tert-부틸-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2,2-디메틸-1-[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]피페리딘-4-올; 2,4-디메틸-4-{[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}펜탄-2-올; N-사이클로펜틸-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 디메틸(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}부틸)아민; N,N-디에틸-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올; N-프로필-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(2-아미노피리미딘-4-일)-N-tert-부틸-1,7-나프티리딘-4-아민; N-tert-부틸-2-{1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일}-1,7-나프티리딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(피리다진-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(2-아미노피리딘-4-일)-N-tert-부틸-1,7-나프티리딘-4-아민; N,N-디에틸-2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; (3-{[2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}-3-메틸부틸)디메틸아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-메틸-N-(프로판-2-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-4-(피페리딘-1-일)-1,7-나프티리딘; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-4-(모르폴린-4-일)-1,7-나프티리딘; N-tert-부틸-2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-(2-메틸부탄-2-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-{[2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}-2-메틸프로판-1-올; 1-[2-(3-클로로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]-2,2-디메틸피페리딘-4-올; 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-[2-메틸-1-(모르폴린-4-일)프로판-2-일]-1,7-나프티리딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(피리딘-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로부틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-tert-부틸-2-(3-클로로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 및 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N,N-디에틸-1,7-나프티리딘-4-아민으로부터 선택되는 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0647] 구현예 180a. 구현예 121에 있어서, 화합물이 N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민인 화학식 II의 화합물, 또는 이의 염.

[0648] 구현예 181. 눈 질병 또는 장애에서 사용하기 위한, 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 염:

[0649] [화학식 A1]

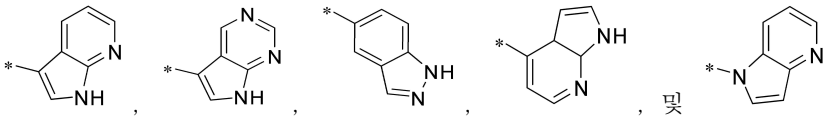
[0650] 

[0651] (식 중,

[0652] $X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

[0653] 고리 A는

[0654] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[0655] (b)  , 로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

[0656] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[0657] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[0658] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[0659] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[0660] $R^2$는

[0661] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0662] (i) 할로겐;

[0663] (ii) 시아노;

[0664] (iii) 옥소;

[0665] (iv) $C_2$알케닐;

[0666] (v) $C_2$알키닐;

[0667] (vi) $C_{1-6}$할로알킬;

[0668] (vii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0669] (viii) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0670] (ix) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

[0671] (x) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0672] (xi) 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[0673] (xii) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[0674] (xiii) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0675] (xiv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[0676] (xv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[0677] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0678] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[0679] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0680] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0681] 로부터 선택되거나;

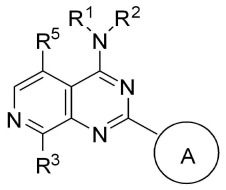
[0682] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

[0683] $R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

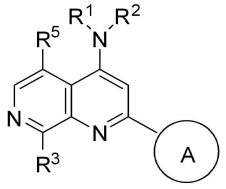
[0684] $R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

[0685] 구현예 182. 구현예 181에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 눈 질병 또는 장애에서 사용하기 위한 화학식 A1의 화합물 또는 이의 염:

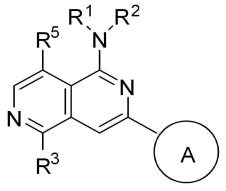
[0686] [화학식 I]

[0687]  ,

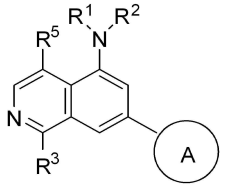
[0688] [화학식 II]

[0689]  ,

[0690] [화학식 III]

[0691]  , 및

[0692] [화학식 IV]

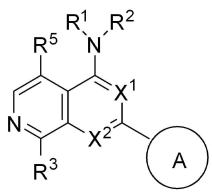
[0693]  .

[0694] 구현예 183. 구현예 181에 있어서, 화합물이 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘; N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는 눈 질병 또는 장애에서 사용하기 위한 화학식 A1의 화합물 또는 이의 염.

[0695] 구현예 184. 구현예 181에 있어서, 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 눈 질병 또는 장애에서 사용하기 위한 화학식 A1의 화합물 또는 이의 염.

[0696] 구현예 185. 바람직하게는 생체외, 증식된 윤부 줄기 세포 집단을 생성하는 방법에서 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 염의 용도:

[0697] [화학식 A1]

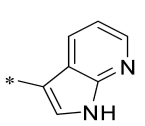
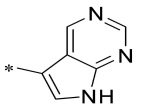
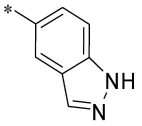
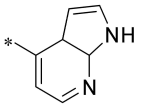
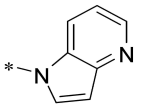
[0698] 

[0699] (식 중,

[0700] $X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

[0701] 고리 A는

[0702] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[0703] (b)  ,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

[0704] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[0705] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[0706] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[0707] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[0708] $R^2$는

[0709] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬:

[0710] (i) 할로겐;

[0711] (ii) 시아노;

[0712] (iii) 옥소;

[0713] (iv) $C_2$알케닐;

[0714] (v) $C_2$알키닐;

[0715] (vi) $C_{1-6}$할로알킬;

[0716] (vii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0717] (viii) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0718] (ix) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

[0719] (x) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0720] (xi) 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[0721] (xii) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[0722] (xiii) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0723] (xiv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[0724] (xv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[0725] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0726] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[0727] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0728] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0729] 로부터 선택되거나;

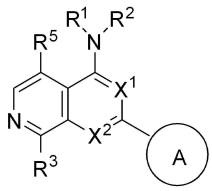
[0730] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

[0731] $R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

[0732] $R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

[0733] 구현예 186. 바람직하게는 생체외, 증식된 각막 내피 세포 집단을 생성하는 방법에서 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 염의 용도:

[0734] [화학식 A1]

[0735] 

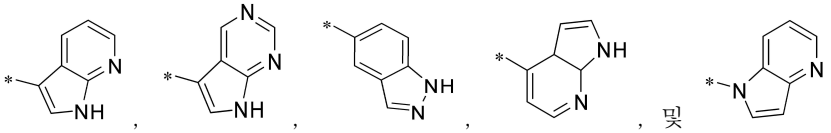

[0736] (식 중,

[0737] $X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

[0738] 고리 A는

[0739] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파

라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[0740] (b)  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

[0741] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[0742] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[0743] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[0744] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[0745] $R^2$는

[0746] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0747] (i) 할로겐;

[0748] (ii) 시아노;

[0749] (iii) 옥소;

[0750] (iv) $C_2$알케닐;

[0751] (v) $C_2$알키닐;

[0752] (vi) $C_{1-6}$할로알킬;

[0753] (vii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0754] (viii) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0755] (ix) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

[0756] (x) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0757] (xi) 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[0758] (xii) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[0759] (xiii) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0760] (xiv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[0761] (xv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-

원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[0762] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0763] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[0764] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0765] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0766] 로부터 선택되거나;

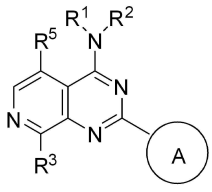
[0767] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

[0768] $R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

[0769] $R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

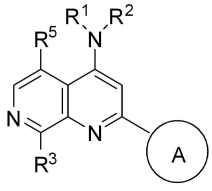
[0770] 구현예 187. 구현예 185 또는 186에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 화학식 A1의 화합물 또는 이의 염의 용도:

[0771] [화학식 I]

[0772] 

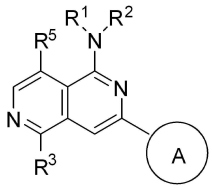
,

[0773] [화학식 II]

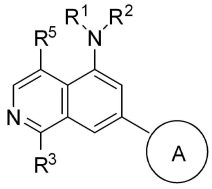
[0774] 

,

[0775] [화학식 III]

[0776]  , 및

[0777] [화학식 IV]

[0778]  .

[0779] 구현예 188. 구현예 185 또는 186에 있어서, 화합물이 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘으로부터 선택되는 화학식 A1의 화합물 또는 이의 염의 용도.

[0780] 구현예 188A. 구현예 185 또는 186에 있어서, 화합물이 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올; 2,4-디메틸-4-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올; N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(피리딘-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로부틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; 2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1-올; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘; N-사이클로펜틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; *N*-프로필-2-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;
2-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)에탄-1-올; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; (1S,2S)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜탄-1-올;
N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2R)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는 화학식 A1의 화합물 또는 이의 염의 용도.

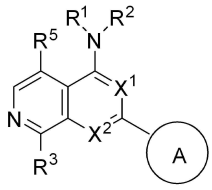
[0781] 구현예 188B. 구현예 185 또는 186에 있어서, 화합물이 N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 염의 용도.

[0782] 구현예 188C. 구현예 185 또는 185에 있어서, 화합물이 N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민인 화학식 화합물 A1의 화합물, 또는 이의 염의 용도.

[0783] 구현예 189. 구현예 185 또는 186에 있어서, 화합물이 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 화학식 A1의 화합물 또는 이의 염의 용도.

[0784] 구현예 190. 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는 눈 질병 또는 장애의 치료 방법으로서, 세포 집단을 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 염의 존재 하에 성장시킨 방법:

[0785] [화학식 A1]

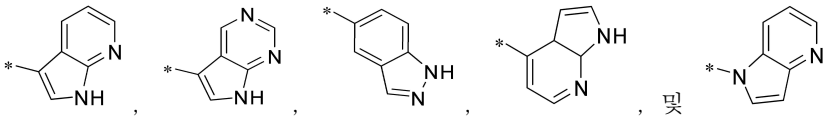
[0786] 

[0787] (식 중,

[0788] $X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

[0789] 고리 A는

[0790] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[0791] (b)  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

[0792] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[0793] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[0794] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[0795] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[0796] $R^2$는

[0797] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0798] (i) 할로겐;

[0799] (ii) 시아노;

[0800] (iii) 옥소;

[0801] (iv) $C_2$알케닐;

[0802] (v) $C_2$알키닐;

[0803] (vi) $C_{1-6}$할로알킬;

[0804] (vii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0805] (viii) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0806] (ix) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

[0807] (x) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0808] (xi) 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[0809] (xii) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[0810] (xiii) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0811] (xiv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[0812] (xv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[0813] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0814] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[0815] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0816] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0817] 로부터 선택되거나;

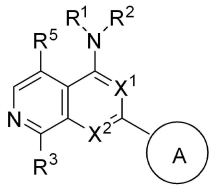
[0818] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

[0819] $R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

[0820] $R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

[0821] 구현예 190A. 윤부 줄기 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는 눈 질병 또는 장애의 치료 방법으로서, 상기 집단을 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 염의 존재 하에 성장시킨 방법:

[0822] [화학식 A1]

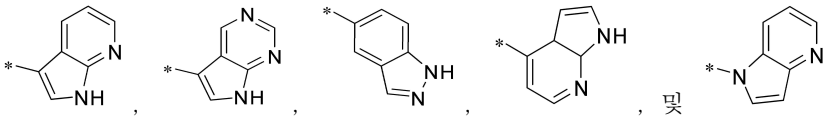
[0823] 

[0824] (식 중,

[0825] $X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

[0826] 고리 A는

[0827] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[0828] (b)  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

[0829] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[0830] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[0831] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[0832] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[0833] $R^2$는

[0834] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0835] (i) 할로겐;

[0836] (ii) 시아노;

[0837] (iii) 옥소;

[0838] (iv) $C_2$알케닐;

[0839] (v) $C_2$알키닐;

[0840] (vi) $C_{1-6}$할로알킬;

[0841] (vii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0842] (viii) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0843] (ix) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

[0844] (x) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0845] (xi) 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[0846] (xii) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[0847] (xiii) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0848] (xiv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[0849] (xv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[0850] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0851] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[0852] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0853] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0854] 로부터 선택되거나;

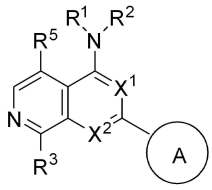
[0855] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

[0856] $R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

[0857] $R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

[0858] 구현예 191. 각막 내피 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는 눈 질병 또는 장애의 치료 방법으로서, 집단을 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 염의 존재 하에 성장시킨 방법:

[0859] [화학식 A1]

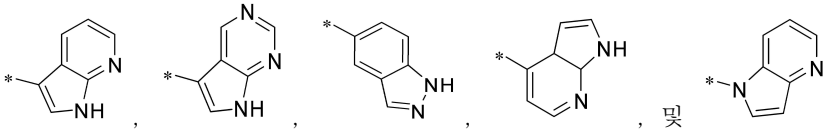
[0860] 

[0861] (식 중,

[0862] $X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

[0863] 고리 A는

[0864] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[0865] (b)  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

[0866] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[0867] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[0868] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[0869] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[0870] $R^2$는

[0871] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0872] (i) 할로겐;

[0873] (ii) 시아노;

[0874] (iii) 옥소;

[0875] (iv) $C_2$알케닐;

[0876] (v) $C_2$알키닐;

[0877] (vi) $C_{1-6}$할로알킬;

[0878] (vii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0879] (viii) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0880] (ix) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

[0881] (x) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0882] (xi) 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[0883] (xii) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[0884] (xiii) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0885] (xiv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[0886] (xv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[0887] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0888] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[0889] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0890] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0891] 로부터 선택되거나;

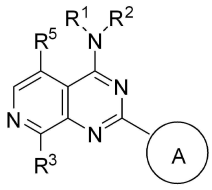
[0892] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

[0893] $R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

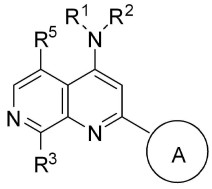
[0894] $R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

[0895] 구현예 192. 구현예 190 또는 191에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 눈 질병 또는 장애의 치료 방법:

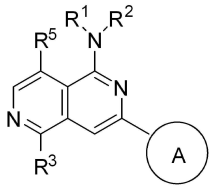
[0896] [화학식 I]

[0897]  ,

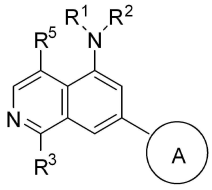
[0898] [화학식 II]

[0899]  ,

[0900] [화학식 III]

[0901]  , 및

[0902] [화학식 IV]

[0903]  .

[0904] 구현예 193. 구현예 190 또는 191에 있어서, 화합물이 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘; N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는 눈 질병 또는 장애의 치료 방법.

[0905] 구현예 193A. 구현예 190 또는 191에 있어서, 화합물이 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올; 2,4-디메틸-4-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올; N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(피리딘-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로부틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; 2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1-올; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘; N-사이클로펜틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; *N*-프로필-2-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;
2-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)에탄-1-올; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; (1S,2S)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜탄-1-올;
N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피

리미딘-4-아민; 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2R)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는 눈 질병 또는 장애의 치료 방법.

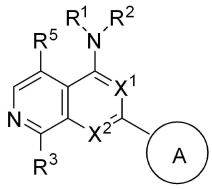
[0906] 구현예 193B. 구현예 190 또는 191에 있어서, 화합물이 N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는 눈 질병 또는 장애의 치료 방법.

[0907] 구현예 193C. 구현예 190 또는 191에 있어서, 화합물이 N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민인 눈 질병 또는 장애의 치료 방법.

[0908] 구현예 194. 구현예 190 또는 191에 있어서, 화합물이 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 세포 증식을 촉진하는 방법.

[0909] 구현예 195. 눈 질병 또는 장애를 위한 약제의 제조에서 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 염의 용도:

[0910] [화학식 A1]

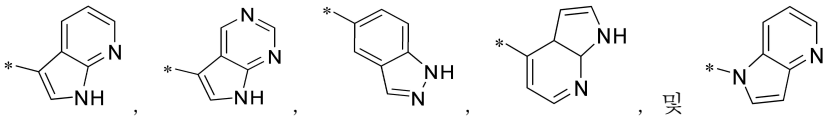
[0911] 

[0912] (식 중,

[0913] $X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

[0914] 고리 A는

[0915] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[0916] (b)  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

[0917] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[0918] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[0919] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[0920] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[0921] $R^2$는

[0922] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0923] (i) 할로겐;

[0924] (ii) 시아노;

[0925] (iii) 옥소;

[0926] (iv) $C_2$알케닐;

[0927] (v) $C_2$알키닐;

[0928] (vi) $C_{1-6}$할로알킬;

[0929] (vii) $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0930] (viii) $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0931] (ix) $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

[0932] (x) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0933] (xi) 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[0934] (xii) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[0935] (xiii) 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0936] (xiv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[0937] (xv) 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[0938] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0939] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[0940] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0941] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0942] 로부터 선택되거나;

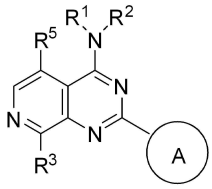
[0943] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

[0944] $R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

[0945] $R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

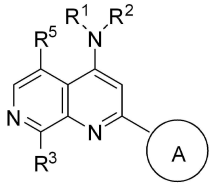
[0946] 구현예 196. 구현예 195에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 눈 질병 또는 장애를 위한 약제의 제조에서 화학식 A1의 화합물 또는 이의 염의 용도:

[0947] [화학식 I]

[0948] 

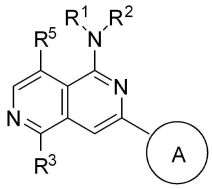
,

[0949] [화학식 II]

[0950] 

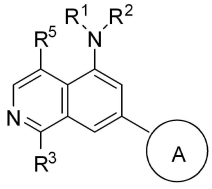
,

[0951] [화학식 III]

[0952] 

, 및

[0953] [화학식 IV]

[0954] 

.

[0955] 구현예 197. 구현예 195에 있어서, 화합물이 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; 및 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘으로부터 선택되는 눈 질병 또는 장애를 위한 약제의 제조에서 화학식 A1의 화합물 또는 이의 염의 용도.

[0956] 구현예 197A. 구현예 195에 있어서, 화합물이 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;
2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올; 2,4-디메틸-4-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올; N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 2-(피리딘-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로부틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; 2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리

미딘-4-일]아미노}프로판-1-올;
2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘; N-사이클로펜틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; *N*-프로필-2-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 2-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)에탄-1-올; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; (1S,2S)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜탄-1-올; N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-메틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민; 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2R)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는 눈 질병 또는 장애를 위한 약제의 제조에서 화학식 A1의 화합물 또는 이의 염의 용도.

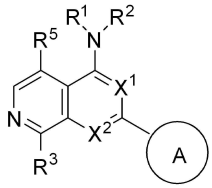
[0957] 구현예 197B. 구현예 195에 있어서, 화합물이 N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는 눈 질병 또는 장애를 위한 약제의 제조에서 화학식 A1의 화합물 또는 이의 염의 용도.

[0958] 구현예 197C. 구현예 195에 있어서, 화합물이 N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민인 눈 질병 또는 장애를 위한 약제의 제조에서 화학식 A1의 화합물 또는 이의 염의 용도.

[0959] 구현예 198. 구현예 195에 있어서, 화합물이 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 눈 질병 또는 장애를 위한 약제의 제조에서 화학식 A1의 화합물 또는 이의 염의 용도.

[0960] 구현예 199. 간 재생 및 간 재성장의 촉진에서 사용하기 위한 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염;

[0961] [화학식 A1]

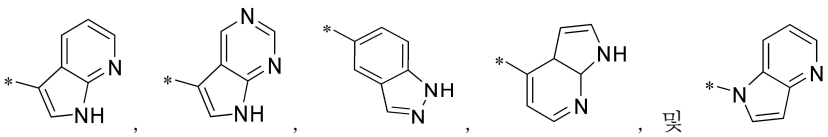
[0962] 

[0963] (식 중,

[0964] $X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

[0965] 고리 A는

[0966] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[0967] (b)  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

[0968] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[0969] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[0970] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[0971] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[0972] $R^2$는

[0973] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[0974] 할로겐;

[0975] 시아노;

[0976] 옥소;

[0977] $C_2$알케닐;

[0978] $C_2$알키닐;

[0979] $C_{1-6}$할로알킬;

[0980] $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[0981] $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[0982] $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

[0983] $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0984] 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[0985] 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[0986] 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[0987] 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[0988] 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[0989] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[0990] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[0991] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[0992] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$

알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[0993] 로부터 선택되거나;

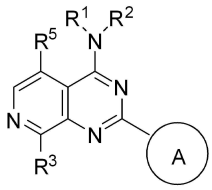
[0994] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

[0995] $R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

[0996] $R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

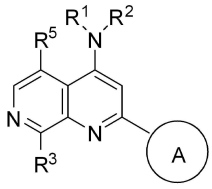
[0997] 구현예 200. 구현예 199에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 간 재생 및 간 재성장의 촉진에서 사용하기 위한 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

[0998] [화학식 I]

[0999] 

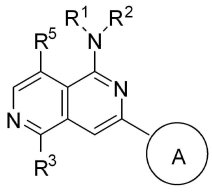
,

[1000] [화학식 II]

[1001] 

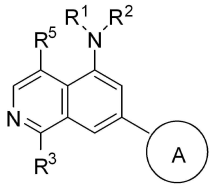
,

[1002] [화학식 III]

[1003] 

, 및

[1004] [화학식 IV]

[1005] 

.

[1006] 구현예 201. 구현예 199에 있어서, 화합물이

[1007] 2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올;

[1008] 디메틸(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부틸)아민;

[1009] N-(1-아미노-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1010] 8-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1011] 8-메틸-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1012] N-(tert-부틸)-5-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1013] 5-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1014] N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민;

[1015] N-tert-부틸-2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민;

[1016] N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민;

[1017] 2-(2-아미노피리미딘-4-일)-N-tert-부틸-1,7-나프티리딘-4-아민;

[1018] $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민;

[1019] $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민;

[1020] 2,2-디메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민;

[1021] 2,3-디메틸-$N^2$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-2,3-디아민;

[1022] $N^1$,$N^1$,2,2-테트라메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민;

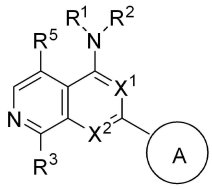
[1023] 4-(4-(tert-부틸아미노)피리도[3,4-*d*]피리미딘-2-일)-1,2,5-옥사디아졸-3-아민; 및

[1024] $N^2$,$N^2$,2-트리메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,2-디아민으로부터 선택되는 간 재생 및 간 재성장의 촉진에서 사용하기 위한 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

[1025] 구현예 202. 구현예 199에 있어서, 화합물이 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 간 재생 및 간 재성장의 촉진에서 사용하기 위한 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

[1026] 구현예 203. 간 재생 및 간 재성장의 촉진을 위한 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도:

[1027] [화학식 A1]

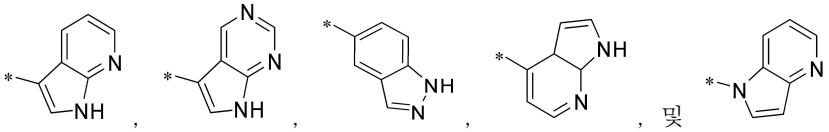
[1028] 


[1029] (식 중,

[1030] $X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

[1031] 고리 A는

[1032] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[1033] (b) 
로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

[1034] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[1035] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[1036] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[1037] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[1038] $R^2$는

[1039] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[1040] 할로겐;

[1041] 시아노;

[1042] 옥소;

[1043] $C_2$알케닐;

[1044] $C_2$알키닐;

[1045] $C_{1-6}$할로알킬;

[1046] $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[1047] $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[1048] $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

[1049] $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[1050] 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[1051] 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[1052] 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[1053] 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[1054] 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[1055] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[1056] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[1057] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[1058] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[1059] 로부터 선택되거나;

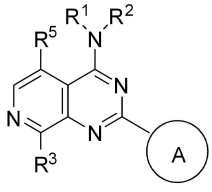
[1060] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

[1061] $R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

[1062] $R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

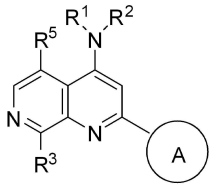
[1063] 구현예 204. 구현예 203에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 간 재생 및 간 재성장의 촉진을 위한 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도:

[1064] [화학식 I]

[1065] 

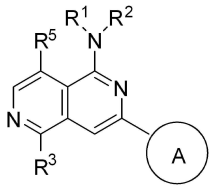
,

[1066] [화학식 II]

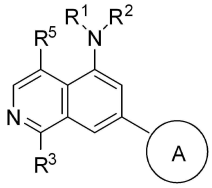
[1067] 

,

[1068] [화학식 III]

[1069]  , 및

[1070] [화학식 IV]

[1071]  .

[1072] 구현예 205. 구현예 203에 있어서, 화합물이

[1073] 2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올;

[1074] 디메틸(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부틸)아민;

[1075] N-(1-아미노-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1076] 8-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1077] 8-메틸-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1078] N-(tert-부틸)-5-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1079] 5-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1080] N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민;

[1081] N-tert-부틸-2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민;

[1082] N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민;

[1083] 2-(2-아미노피리미딘-4-일)-N-tert-부틸-1,7-나프티리딘-4-아민;

[1084] $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민;

[1085] $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민;

[1086] 2,2-디메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민;

[1087] 2,3-디메틸-$N^2$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-2,3-디아민;

[1088] $N^1$,$N^1$,2,2-테트라메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민;

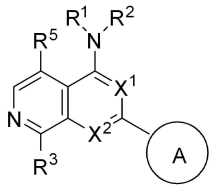
[1089] 4-(4-(tert-부틸아미노)피리도[3,4-*d*]피리미딘-2-일)-1,2,5-옥사디아졸-3-아민; 및

[1090] $N^2$,$N^2$,2-트리메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,2-디아민으로부터 선택되는 간 재생 및 간 재성장의 촉진을 위한 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도.

[1091] 구현예 206. 구현예 203에 있어서, 화합물이 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 간 재생 및 간 재성장의 촉진을 위한 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도.

[1092] 구현예 207. 치료 유효량의 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 간 재생 및 간 재성장을 촉진하는 방법:

[1093] [화학식 A1]

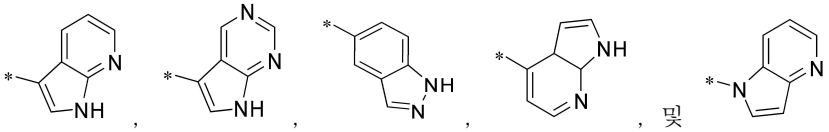
[1094] 

[1095] (식 중,

[1096] $X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

[1097] 고리 A는

[1098] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[1099] (b)  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

[1100] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[1101] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[1102] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[1103] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[1104] $R^2$는

[1105] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[1106] 할로겐;

[1107] 시아노;

[1108] 옥소;

[1109] $C_2$알케닐;

[1110] $C_2$알키닐;

[1111] $C_{1-6}$할로알킬;

[1112] $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[1113] $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[1114] $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

[1115] $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[1116] 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[1117] 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[1118] 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[1119] 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[1120] 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[1121] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[1122] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[1123] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[1124] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[1125] 로부터 선택되거나;

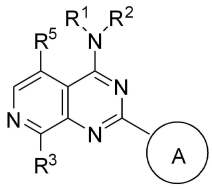
[1126] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

[1127] $R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

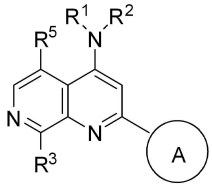
[1128] $R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

[1129] 구현예 208. 구현예 207에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 간 재생 및 간 재성장을 촉진하는 방법:

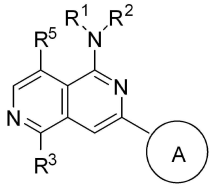
[1130] [화학식 I]

[1131]  ,

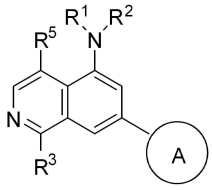
[1132] [화학식 II]

[1133]  ,

[1134] [화학식 III]

[1135]  , 및

[1136] [화학식 IV]

[1137]  .

[1138] 구현예 209. 구현예 207에 있어서, 화합물이

[1139] 2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올;

[1140] 디메틸(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부틸)아민;

[1141] N-(1-아미노-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1142] 8-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1143] 8-메틸-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1144] N-(tert-부틸)-5-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1145] 5-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1146] N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민;

[1147] N-tert-부틸-2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민;

[1148] N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민;

[1149] 2-(2-아미노피리미딘-4-일)-N-tert-부틸-1,7-나프티리딘-4-아민;

[1150] $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민;

[1151] $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민;

[1152] 2,2-디메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민;

[1153] 2,3-디메틸-$N^2$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-2,3-디아민;

[1154] $N^1$,$N^1$,2,2-테트라메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민;

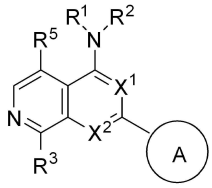
[1155] 4-(4-(tert-부틸아미노)피리도[3,4-*d*]피리미딘-2-일)-1,2,5-옥사디아졸-3-아민; 및

[1156] $N^2$,$N^2$,2-트리메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,2-디아민으로부터 선택되는 간 재생 및 간 재성장을 촉진하는 방법.

[1157] 구현예 210. 구현예 207에 있어서, 화합물이 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 간 재생 및 간 재성장을 촉진하는 방법.

[1158] 구현예 211. 간 재생 및 간 재성장을 촉진하기 위한 약제의 제조에서 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도:

[1159] [화학식 A1]

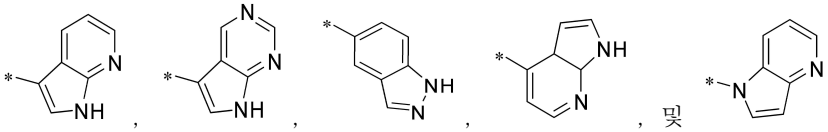
[1160] 

[1161] (식 중,

[1162] $X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

[1163] 고리 A는

[1164] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[1165] (b)  , 및 로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

[1166] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[1167] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[1168] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[1169] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[1170] $R^2$는

[1171] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[1172] 할로겐;

[1173] 시아노;

[1174] 옥소;

[1175] $C_2$알케닐;

[1176] $C_2$알키닐;

[1177] $C_{1-6}$할로알킬;

[1178] $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[1179] $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[1180] $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

[1181] $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[1182] 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[1183] 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[1184] 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[1185] 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[1186] 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[1187] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[1188] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[1189] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[1190] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[1191] 로부터 선택되거나;

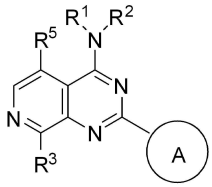
[1192] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

[1193] $R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

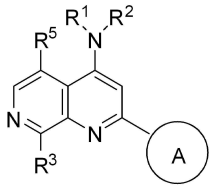
[1194] $R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

[1195] 구현예 212. 구현예 211에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 간 재생 및 간 재성장을 촉진하기 위한 약제의 제조에서, 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도:

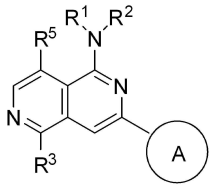
[1196] [화학식 I]

[1197] 
,

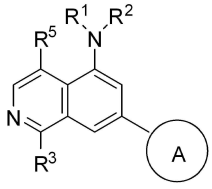
[1198] [화학식 II]

[1199] 
,

[1200] [화학식 III]

[1201] 
, 및

[1202] [화학식 IV]

[1203] 
.

[1204] 구현예 213. 구현예 211에 있어서, 화합물이

[1205] 2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올;

[1206] 디메틸(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부틸)아민;

[1207] N-(1-아미노-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1208] 8-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1209] 8-메틸-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1210] N-(tert-부틸)-5-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1211] 5-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민;

[1212] N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민;

[1213] N-tert-부틸-2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민;

[1214] N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민;

[1215] 2-(2-아미노피리미딘-4-일)-N-tert-부틸-1,7-나프티리딘-4-아민;

[1216] $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민;

[1217] $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민;

[1218] 2,2-디메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민;

[1219] 2,3-디메틸-$N^2$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-2,3-디아민;

[1220] $N^1$,$N^1$,2,2-테트라메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민;

[1221] 4-(4-(tert-부틸아미노)피리도[3,4-*d*]피리미딘-2-일)-1,2,5-옥사디아졸-3-아민; 및

[1222] $N^2$,$N^2$,2-트리메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,2-디아민으로부터 선택되는 간 재생 및 간 재성장을 촉진하기 위한 약제의 제조에서, 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도.

[1223] 구현예 214. 구현예 211에 있어서, 화합물이 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 간 재생 및 간 재성장을 촉진하기 위한 약제의 제조에서, 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도.

[1224] 다른 구현예에서, 본 발명은 적어도 하나의 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[1225] 다른 구현예에서, 본 발명은 적어도 하나의 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 적어도 하나 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[1226] 다른 구현예에서, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한 본 발명의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 약학 조성물에 관한 것이다.

[1227] 다른 구현예에서, 본 발명은 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 간 재생 및 간 재성장의 촉진에서 사용하기 위한 약학 조성물에 관한 것이다.

[1228] 다른 구현예에서, 본 발명은 또한 단독으로, 또는 선택적으로 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 다른 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및/또는 적어도 하나의 다른 유형의 치료제와의 조합으로 간 재생 및 간 재성장을 촉진하게 위한 약제의 제조를 위한 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도에 관한 것이다.

[1229] 다른 구현예에서, 본 발명은 치료 유효량의 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 간 재생 및 간 재성장을 촉진하는 방법에 관한 것이다.

[1230] 다른 구현예에서, 본 발명은 재생능을 증강시키면서 섬유증 해소를 가속화하기 위해, 특히 경계 이식편의 이식 후 불충분한 간 재성장의 치료를 위한; 광범위 간절제술 후 잔류 간 물질의 증강된 재성장을 뒷받침하기 위한; 바이러스 간염, 약물-유도 간 부상, 자가면역 간염, 허혈성 및 울혈성 간 질병으로부터의 급성 간 부전 후 환자 간의 재생을 위한; 및 비-알코올성 지방간염, 알코올성 지방간염, 만성 B형 및 C형 바이러스 간염, 혈색소증, 알파-1 항-트립신 결핍, 윌슨 질병 및 약물-유도 간 섬유증으로부터의 만성 간 부상 및 기저 간 섬유증을 갖는 환자의 치료를 위한, 간 재생 및 간 재성장을 촉진하는 방법에 관한 것이다.

[1231] 다른 구현예에서, 본 발명은 LATS1 및 LATS2 키나제의 활성을 억제할 수 있는 치료 유효량의 제제를 필요로 하는 대상체에 이를 투여함으로써; YAP 전위를 유도하고 세포 증식을 위한 하류 유전자 발현을 유도하는 단계를 포함하는 간 재생 및 간 재성장을 촉진하는 방법에 관한 것이다. 추가 구현예에서, 제제는 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다.

[1232] 다른 구현예에서, 본 발명은 LATS1 키나제의 활성을 억제할 수 있는 치료 유효량의 제제를 필요로 하는 대상체에 이를 투여함으로써; YAP 전위를 유도하고 세포 증식을 위한 하류 유전자 발현을 유도하는 단계를 포함하는 간 재생 및 간 재성장을 촉진하는 방법에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, 제제는 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 화합물이다.

[1233] 다른 구현예에서, 본 발명은 세포를 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 생체외 간 세포 집단을 증식시키는 방법에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, 방법은 상기 간 세포를 유전자 편집하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직하게는 상기 유전자 편집은 숙주 대 이식편 면역 반응에 관여되는 유전자를 표적화한다.

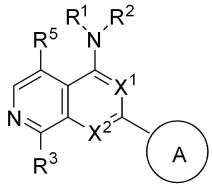
[1234] 다른 구현예에서, 본 발명은 간 선조 세포를 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 생체외 간 선조 세포 집단을 증식시키는 방법에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, 방법은 상기 간 선조 세포를 유전자 편집하는 단계를 추가로 포함한다. 바람직하게는 상기 유전자 편집은 숙주 대 이식편 면역 반응에 관여되는 유전자를 표적화한다.

[1235] 다른 구현예에서, 본 발명은 간 세포를 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 화합물과 접촉시켜 수득되는 간 세포 집단에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, 간 세포를 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 화합물과 접촉시켜 수득되는 간 세포는 유전자 편집되었다. 바람직하게는 상기 유전자 편집은 숙주 대 이식편 면역 반응에 관여되는 유전자를 표적화한다.

[1236] 다른 구현예에서, 본 발명은 간 선조 세포를 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 화합물과 접촉시키는 단계에 의해 수득되는 간 선조 세포 집단에 관한 것이다. 바람직한 구현예에서, 간 선조 세포를 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 화합물과 접촉시켜 수득되는 간 선조 세포는 유전자 편집되었다. 바람직하게는 상기 유전자 편집은 숙주 대 이식편 면역 반응에 관여되는 유전자를 표적화한다.

[1237] 구현예 215. 상처 치유의 촉진에서 사용하기 위한 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염;

[1238] [화학식 A1]

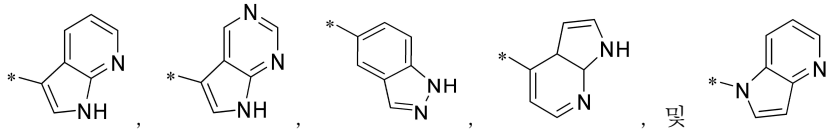
[1239] 

[1240] (식 중,

[1241] $X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

[1242] 고리 A는

[1243] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[1244] (b)  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

[1245] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[1246] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[1247] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[1248] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[1249] $R^2$는

[1250] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[1251] 할로겐;

[1252] 시아노;

[1253] 옥소;

[1254] $C_2$알케닐;

[1255] $C_2$알키닐;

[1256] $C_{1-6}$할로알킬;

[1257] $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[1258] $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[1259] $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

[1260] $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[1261] 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[1262] 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[1263] 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[1264] 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[1265] 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[1266] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[1267] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[1268] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[1269] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[1270] 로부터 선택되거나;

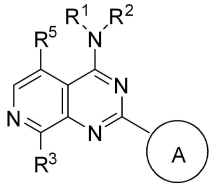
[1271] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

[1272] $R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

[1273] $R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

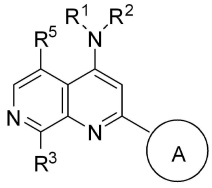
[1274] 구현예 216. 구현예 215에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 상처 치유의 촉진에서 사용하기 위한 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

[1275] [화학식 I]

[1276] 

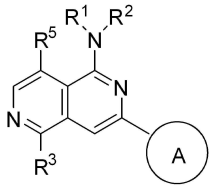
,

[1277] [화학식 II]

[1278] 

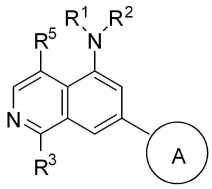
,

[1279] [화학식 III]

[1280] 

, 및

[1281] [화학식 IV]

[1282] 

.

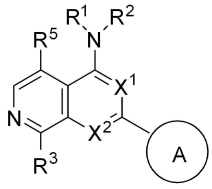
[1283] 구현예 217. 구현예 215에 있어서, 화합물이 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나

프티리딘-1-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘; N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는 상처 치유의 촉진에서 사용하기 위한 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

[1284] 구현예 218. 구현예 215에 있어서, 화합물이 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 화합물인 상처 치유의 촉진에서 사용하기 위한 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

[1285] 구현예 219. 상처 치유의 촉진을 위한 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도:

[1286] [화학식 A1]

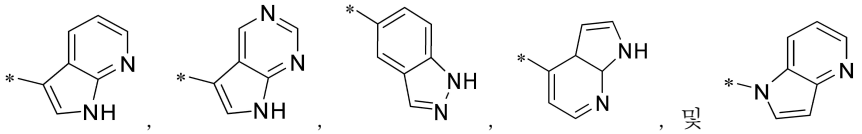
[1287] 

[1288] (식 중,

[1289] $X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

[1290] 고리 A는

[1291] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[1292] (b)  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

[1293] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[1294] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[1295] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[1296] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[1297] $R^2$는

[1298] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[1299] 할로겐;

[1300] 시아노;

[1301] 옥소;

[1302] $C_2$알케닐;

[1303] $C_2$알키닐;

[1304] $C_{1-6}$할로알킬;

[1305] $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[1306] $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[1307] $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

[1308] $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[1309] 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[1310] 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[1311] 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[1312] 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[1313] 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[1314] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[1315] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[1316] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[1317] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[1318] 로부터 선택되거나;

[1319] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

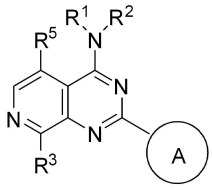
[1320] $R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

[1321] $R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내

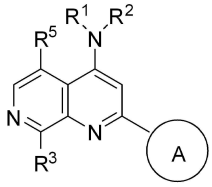
지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

[1322] 구현예 220. 구현예 219에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 상처 치유를 촉진하기 위한 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도:

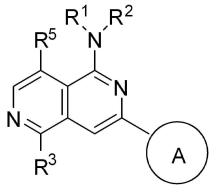
[1323] [화학식 I]

[1324]  ,

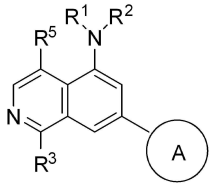
[1325] [화학식 II]

[1326]  ,

[1327] [화학식 III]

[1328]  , 및

[1329] [화학식 IV]

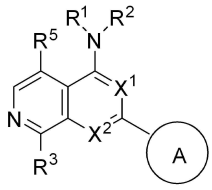
[1330]  .

[1331] 구현예 221. 구현예 219에 있어서, 화합물이 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘으로부터 선택되는 상처 치유를 촉진하기 위한 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도.

[1332] 구현예 222. 구현예 219에 있어서, 화합물이 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 상처 치유를 촉진하기 위한 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도.

[1333] 구현예 223. 치료 유효량의 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 상처 치유를 촉진하는 방법:

[1334] [화학식 A1]

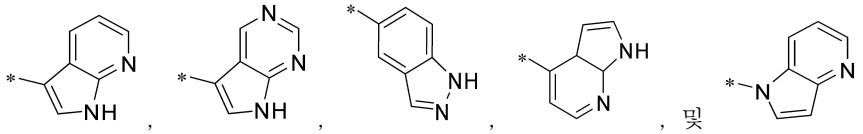
[1335] 

[1336] (식 중,

[1337] $X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

[1338] 고리 A는

[1339] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[1340] (b)  로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

[1341] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[1342] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[1343] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[1344] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[1345] $R^2$는

[1346] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[1347] 할로겐;

[1348] 시아노;

[1349] 옥소;

[1350] $C_2$알케닐;

[1351] $C_2$알키닐;

[1352] $C_{1-6}$할로알킬;

[1353] $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[1354] $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[1355] $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

[1356] $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[1357] 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[1358] 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[1359] 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[1360] 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴; 및

[1361] 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[1362] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[1363] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[1364] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[1365] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[1366] 로부터 선택되거나;

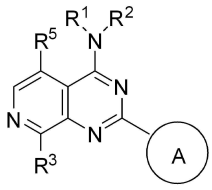
[1367] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

[1368] $R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

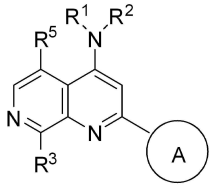
[1369] $R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

[1370] 구현예 224. 구현예 223에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 상처 치유를 촉진하는 방법:

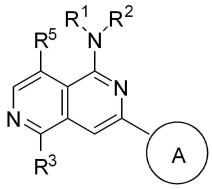
[1371] [화학식 I]

[1372]  ,

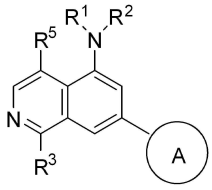
[1373] [화학식 II]

[1374]  ,

[1375] [화학식 III]

[1376]  , 및

[1377] [화학식 IV]

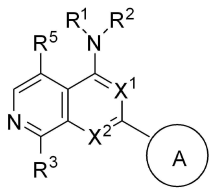
[1378]  .

[1379] 구현예 225. 구현예 223에 있어서, 화합물이 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘; N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민; 및 N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민으로부터 선택되는 상처 치유를 촉진하는 방법.

[1380] 구현예 226. 구현예 223에 있어서, 화합물이 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 상처 치유를 촉진하는 방법.

[1381] 구현예 227. 상처 치유를 촉진하기 위한 약제의 제조에서 화학식 A1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도:

[1382] [화학식 A1]

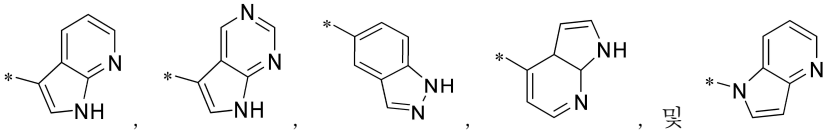
[1383] 

[1384] (식 중,

[1385] $X^1$ 및 $X^2$는 각각 독립적으로 CH 또는 N이며;

[1386] 고리 A는

[1387] (a) 탄소 고리 구성원을 통해 분자의 나머지에 연결되며 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴로서, 단 적어도 하나의 헤테로원자 고리 구성원은 5-원 헤테로아릴의 연결 탄소 고리 구성원 대비 3- 또는 4-위치 또는 6-원 헤테로아릴의 파라 고리 위치에 배치된 비치환 질소(-N=)인 5- 또는 6-원 모노사이클릭 헤테로아릴이거나;

[1388] (b) 
로부터 선택되는 9-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴이고,

[1389] "*"은 분자의 나머지에 대한 고리 A의 부착 지점을 나타내고;

[1390] 고리 A는 비치환되거나 할로겐, 시아노, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $C_{3-6}$사이클로알킬, 및 페닐설포닐로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되고;

[1391] $R^0$은 하이드록실 또는 $C_{1-6}$알콕시이고;

[1392] $R^1$은 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고;

[1393] $R^2$는

[1394] (a) 비치환되거나 하기로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{1-8}$알킬

[1395] 할로겐;

[1396] 시아노;

[1397] 옥소;

[1398] $C_2$알케닐;

[1399] $C_2$알키닐;

[1400] $C_{1-6}$할로알킬;

[1401] $-OR^6$으로서, $R^6$은 수소, 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-OR^6$;

[1402] $-NR^{7a}R^{7b}$로서, $R^{7a}$는 수소 또는 $C_{1-6}$알킬이고, $R^{7b}$는 수소, $-C(O)R^0$, 비치환되거나 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되는 $-NR^{7a}R^{7b}$;

[1403] $-C(O)R^8$로서, $R^8$은 $R^0$ 또는 $-NH-C_{1-6}$알킬$-C(O)R^0$인 $-C(O)R^8$;

[1404] $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[1405] 각각 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, 하이드록시$C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $-NH_2$, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 모노사이클릭 $C_{3-6}$사이클로알킬 또는 폴리사이클릭 $C_{7-10}$사이클로알킬;

[1406] 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개 헤테로원자를 포함하며, 비치환되거나 하이드록실, 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$알킬아미노, 및 디-($C_{1-6}$알킬)아미노로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 6-원 헤테로사이클로알킬;

[1407] 비치환되거나 할로겐에 의해 치환되는 페닐;

[1408] 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 5- 또는 6-원 모노

사이클릭 헤테로아릴; 및

[1409] 고리 구성원으로서, N 및 O로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하는 9- 또는 10-원 융합 바이사이클릭 헤테로아릴;

[1410] (b) $-S(O)_2C_{1-6}$알킬;

[1411] (c) 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 페닐;

[1412] (d) 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 $C_{3-6}$사이클로알킬; 및

[1413] (e) 고리 구성원으로서 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 2개의 헤테로원자를 포함하고, 비치환되거나 $C_{1-6}$할로알킬, $R^0$, $C_{1-6}$알킬아미노, 디-($C_{1-6}$알킬)아미노, $-C(O)R^0$, 및 비치환되거나 $R^0$ 또는 $-C(O)R^0$에 의해 치환되는 $C_{1-6}$알킬로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 치환기에 의해 치환되는 4-원 헤테로사이클로알킬

[1414] 로부터 선택되거나;

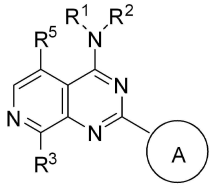
[1415] $R^1$ 및 $R^2$는 이들이 결합된 질소 원자와 함께, 고리 구성원으로서 N, O, 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 2개의 추가적인 헤테로원자가 포함될 수 있는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬을 형성할 수 있고, 결합된 질소 원자와 함께 $R^1$ 및 $R^2$에 의해 형성되는 4- 내지 6-원 헤테로사이클로알킬은 비치환되거나 할로겐, $C_{1-6}$알킬, $C_{1-6}$할로알킬, 및 $R^0$으로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 3개의 치환기에 의해 치환되고;

[1416] $R^3$은 수소, 할로겐 및 $C_{1-6}$알킬로부터 선택되고;

[1417] $R^5$는 수소, 할로겐 및 -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)로부터 선택되고, -NH-(3- 내지 8-원 헤테로알킬)의 3- 내지 8-원 헤테로$C_{3-8}$알킬은 사슬 구성원으로서 1 내지 2개의 산소 원자를 포함하고, 비치환되거나 $R^0$에 의해 치환된다).

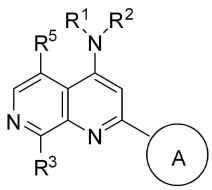
[1418] 구현예 228. 구현예 227에 있어서, 화합물이 화학식 I 내지 IV로부터 선택되는 화학식의 화합물인 상처 치유를 촉진하기 위한 약제의 제조에서 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도:

[1419] [화학식 I]

[1420] 

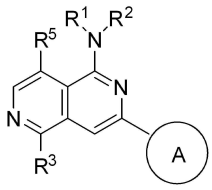
,

[1421] [화학식 II]

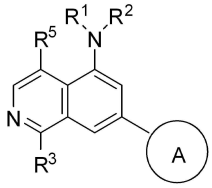
[1422] 

,

[1423] [화학식 III]

[1424]  , 및

[1425] [화학식 IV]

[1426]  .

[1427] 구현예 229. 구현예 227에 있어서, 화합물이 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민; N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민; 및 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘으로부터 선택되는 상처 치유를 촉진하기 위한 약제의 제조에서 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도.

[1428] 구현예 230. 구현예 227에 있어서, 화합물이 구현예 1 내지 180 중 어느 하나에 따른 상처 치유를 촉진하기 위한 약제의 제조에서 화학식 A1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도.

[1429] 다른 구현예에서, 본 발명은 적어도 하나의 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[1430] 다른 구현예에서, 본 발명은 적어도 하나의 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 적어도 하나 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

[1431] 다른 구현예에서, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 약학 조성물에 관한 것이다.

[1432] 다른 구현예에서, 본 발명은 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 간 재생 및 간 재성장의 촉진에서 사용하기 위한 약학 조성물에 관한 것이다.

[1433] 다른 구현예에서, 본 발명은 또한 단독으로, 또는 선택적으로 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 다른 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및/또는 적어도 하나의 다른 유형의 치료제와의 조합으로 간 재생 및 간 재성장을 촉진하게 위한 약제의 제조를 위한 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도에 관한 것이다.

[1434] 다른 구현예에서, 본 발명은 치료 유효량의 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는, 간 재생 및 간 재성장을 촉진하는 방법에 관한 것이다.

[1435] 다른 구현예에서, 본 발명은 재생능을 증강시키면서 섬유증 해소를 가속화하기 위해, 특히 경계 이식편의 이식 후 불충분한 간 재성장의 치료를 위한; 광범위 간절제술 후 잔류 간 물질의 증강된 재성장을 뒷받침하기 위한; 바이러스 간염, 약물-유도 간 부상, 자가면역 간염, 허혈성 및 울혈성 간 질병으로부터의 급성 간 부전 후 환자 간의 재생을 위한; 및 비-알코올성 지방간염, 알코올성 지방간염, 만성 B형 및 C형 바이러스 간염, 혈색소증, 알파-1 항-트립신 결핍, 윌슨 질병 및 약물-유도 간 섬유증으로부터의 만성 간 부상 및 기저 간 섬유증을 갖는 환자의 치료를 위한, 간 재생 및 간 재성장을 촉진하는 방법에 관한 것이다.

[1436] 다른 구현예에서, 본 발명은 LATS1 및 LATS2 키나제의 활성을 억제할 수 있는 치료 유효량의 제제를 필요로 하는 대상체에 이를 투여함으로써; YAP 전위를 유도하고 세포 증식을 위한 하류 유전자 발현을 유도하는 단계를 포함하는 간 재생 및 간 재성장을 촉진하는 방법에 관한 것이었다. 추가 구현예에서, 제제는 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다.

[1437] 다른 구현예에서, 본 발명은 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염

을 포함하는, 상처 치유의 촉진에서 사용하기 위한 약학 조성물에 관한 것이다.

[1438] 다른 구현예에서, 본 발명은 또한 단독으로, 또는 선택적으로 다른 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및/또는 적어도 하나의 다른 유형의 치료제와의 조합으로 상처 치유를 촉진하게 위한 약제의 제조를 위한 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도에 관한 것이다.

[1439] 다른 구현예에서, 본 발명은 치료 유효량의 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는 상처 치유를 촉진하는 방법에 관한 것이다.

[1440] 다른 구현예에서, 본 발명은 화상, 급성 및 만성 피부 궤양의 총체적 증상을 치료하는 단계 또는 완화하는 단계를 포함하는 상처 치유를 촉진하는 방법에 관한 것이며, 피부 궤양에는 비제한적으로 혈관 궤양, 당뇨병성 궤양, 및 압력 궤양이 포함된다.

[1441] 다른 구현예에서, 본 발명은 LATS1 및 LATS2 키나제의 활성을 억제할 수 있는 치료 유효량의 제제를 필요로 하는 대상체에 이를 투여함으로써; YAP 전위를 유도하고 세포 증식을 위한 하류 유전자 발현을 유도하는 단계를 포함하는 상처 치유 촉진하는 방법에 관한 것이었다. 추가 구현예에서, 제제는 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다.

[1442] 다른 구현예에서, 본 발명은 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는 눈 질병 또는 장애의 치료 방법에 관한 것이며, 집단은 LATS1 및 LATS2 키나제의 활성을 억제할 수 있는 제제의 존재 하에 성장되었고; 이에 의해 YAP 전위를 유도하고 세포 증식을 위한 하류 유전자 발현을 유도하였다. 추가 구현예에서, 제제는 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 염이다.

[1443] 다른 구현예에서, 본 발명은 윤부 줄기 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는 눈 질병 또는 장애의 치료 방법에 관한 것이며, 집단은 LATS1 및 LATS2 키나제의 활성을 억제할 수 있는 제제의 존재 하에 성장되었고; 이에 의해 YAP 전위를 유도하고 세포 증식을 위한 하류 유전자 발현을 유도하였다. 추가 구현예에서, 제제는 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 염이다.

[1444] 다른 구현예에서, 본 발명은 각막 내피 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는 눈 질병 또는 장애의 치료 방법에 관한 것이며, 집단은 LATS1 및 LATS2 키나제의 활성을 억제할 수 있는 제제의 존재 하에 성장되었고; 이에 의해 YAP 전위를 유도하고 세포 증식을 위한 하류 유전자 발현을 유도하였다. 추가 구현예에서, 제제는 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염이다.

[1445] 다른 구현예에서, 본 발명은 또한 치료 유효량의 본 발명의 화합물을 대상체의 눈에 투여하는 단계를 포함하는 눈 상처 치유를 촉진하는 방법에 관한 것이다. 하나의 구현예에서, 눈 상처는 각막 상처이다. 다른 구현예에서, 눈 상처는 부상 또는 수술 상처이다.

[1446] **정의**

[1447] 이상에서 및 이하에서 사용되는 일반적인 용어는, 달리 지시되지 않는 한, 바람직하게는 본 발명의 맥락 내에서 하기 의미를 가지며, 더욱 일반적인 용어가 사용되는 경우에는 어디에서든 서로 독립적으로 더욱 구체적인 정의에 의해 대체되거나 또는 유지될 수 있으며, 이에 따라 본 발명의 더욱 상세한 구현예를 정의할 수 있다.

[1448] 본원에 기재된 모든 방법은 본원에서 달리 지시되지 않는 한 또는 맥락에 의해 명백하게 달리 모순되지 않는 한, 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 모든 예, 또는 예시적인 언어(예컨대, "~와 같은")의 사용은 단지 본 발명을 더 잘 예시하고자 한 것으로, 달리 청구된 본 발명의 범위를 제한하지 않는다.

[1449] 본 발명의 맥락에서 (특히, 청구범위의 맥락에서) 사용되는 단수형 용어("a", "an", "the") 및 비슷한 용어는 본원에서 달리 지시되지 않는 한, 또는 맥락에 의해 명백하게 모순되지 않는 한, 단수형과 복수형 둘 다를 포함시키는 것으로 해석되어야 한다.

[1450] 본원에서 사용되는 용어 "$C_{1-8}$알킬"은 탄소 및 수소 원자만으로 구성되고, 불포화부는 함유하지 않으며, 1개 내지 8개의 탄소 원자를 갖고, 단일 결합에 의해 분자의 나머지에 부착되는 선형 또는 분기형 탄화수소쇄 라디칼을 나타낸다. 용어 "$C_{1-4}$알킬"은 그에 따라 해석되어야 한다. 본원에서 사용되는 용어 "*n*-알킬"은 본원에서 정의된 바와 같은 직쇄(비-분기형) 알킬 라디칼을 나타낸다. $C_{1-8}$알킬의 예에는 비제한적으로 메틸, 에틸, *n*-프로필,

1-메틸에틸(이소-프로필), *n*-부틸, *n*-펜틸, 1,1-디메틸에틸(*t*-부틸), $-C(CH_3)_2CH_2CH(CH_3)_2$ 및 $-C(CH_3)_2CH_2CH_3$이 포함된다.

[1451] 본원에서 사용되는 용어 "$C_{2-6}$알케닐"은 탄소 및 수소 원자만으로 구성되며, 적어도 하나 이상의 이중 결합을 함유하고, 2 내지 6개의 탄소 원자를 갖고, 단일 결합에 의해 분자의 나머지에 부착되는, 선형 또는 분기형 탄화수소쇄 라디칼기를 나타낸다. 용어 "$C_{2-4}$알케닐"은 그에 따라 해석되어야 한다. $C_{2-6}$알케닐의 예에는 비제한적으로 에테닐, 프로프-1-에닐, 부트-1-에닐, 펜트-1-에닐, 펜트-4-에닐 및 펜타-1,4-디에닐이 포함된다.

[1452] 용어 "알킬렌"은 이가 알킬기를 나타낸다. 예를 들어, 용어 "$C_{1-6}$알킬렌" 또는 "$C_1$ 내지 $C_6$ 알킬렌"은 1 내지 6개 탄소 원자를 함유하는 이가, 선형 또는 분기형 지방족 기를 나타낸다. 알킬렌의 예에는 비제한적으로 메틸렌(-$CH_2$-), 에틸렌(-$CH_2CH_2$-), n-프로필렌(-$CH_2CH_2CH_2$-), 이소-프로필렌(-$CH(CH_3)CH_2$-), n-부틸렌, sec-부틸렌, 이소-부틸렌, tert-부틸렌, n-펜틸렌, 이소펜틸렌, 네오펜틸렌 및 n-헥실렌이 포함된다.

[1453] 본원에서 사용되는 용어 "$C_{2-6}$알키닐"은 탄소 및 수소 원자만으로 이루어지며, 적어도 하나 이상의 삼중 결합을 함유하고, 2 내지 6개의 탄소 원자를 갖고, 단일 결합에 의해 분자 나머지에 부착된, 선형 또는 분기형 라디칼기를 나타낸다. 용어 "$C_{2-4}$알키닐"은 그에 따라 해석되어야 한다. $C_{2-6}$알키닐의 예에는 비제한적으로 에티닐, 프로프-1-이닐, 부트-1-이닐, 펜트-1-이닐, 펜트-4-이닐 및 펜타-1,4-디이닐이 포함된다.

[1454] 본원에서 사용되는 용어 "$C_{1-6}$알콕시"는 화학식 $-OR_a$의 라디칼을 나타내며, $R_a$는 일반적으로 상기 정의된 바와 같은 $C_{1-6}$알킬 라디칼이다. "$C_{1-6}$ 알콕시" 또는 "$C_1$ 내지 $C_6$ 알콕시"는 $C_1$, $C_2$, $C_3$, $C_4$, $C_5$, 및 $C_6$ 알콕시기(즉, 알킬쇄에 1 내지 6개 탄소)를 포함하는 것이다. $C_{1-6}$알콕시의 예에는 비제한적으로 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 이소프로폭시, 부톡시, 이소부톡시, 펜톡시 및 헥속시가 포함된다.

[1455] 본원에서 사용되는 용어 "$C_{1-6}$알킬아미노"는 화학식 $-NH-R_a$의 라디칼을 나타내며, $R_a$는 상기 정의된 바와 같은 $C_{1-4}$알킬 라디칼이다.

[1456] 본원에서 사용되는 용어 "디-($C_{1-6}$알킬)아미노"는 화학식 $-N(R_a)-R_a$의 라디칼을 나타내며, 각각의 $R_a$는 상기 정의된 바와 같이 동일하거나 상이할 수 있는, $C_{1-4}$알킬 라디칼이다.

[1457] 본원에서 사용되는 용어 "시아노"는 라디칼 $*-C\equiv N$ 을 의미한다.

[1458] 용어 "사이클로알킬"은 모노-, 바이- 또는 폴리-사이클릭 고리 시스템을 포함하는, 완전 수소화된 고리인 비방향족 카보사이클릭 고리를 나타낸다. "$C_{3-10}$사이클로알킬" 또는 "$C_3$ 내지 $C_{10}$ 사이클로알킬"은 $C_3$, $C_4$, $C_5$, $C_6$, $C_7$, $C_8$, $C_9$ 및 $C_{10}$ 사이클로알킬기를 포함하는 것이다(즉, 3 내지 10개 탄소 고리 구성원). 사이클로알킬기의 예에는 비제한적으로 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실 및 노르보르닐이 포함된다.

[1459] 본원에서 사용되는 "융합 고리"는 다중-고리 어셈블리를 나타내며, 고리 어셈블리를 이루는 고리는 2개 고리에 공통인 고리 원자가 서로에 직접 결합되도록 연결된다. 융합 고리 어셈블리는 포화, 부분 포화, 방향족, 카보사이클릭, 헤테로사이클릭 등일 수 있다. 공통 융합 고리의 비-제한적인 예에는 데칼린, 나프탈렌, 안트라센, 펜안트렌, 인돌, 벤조푸란, 푸린, 퀴놀린 등이 포함된다.

[1460] "할로겐"은 브로모, 클로로, 플루오로 또는 요오도; 바람직하게는 플루오로, 클로로 또는 브로모를 나타낸다.

[1461] 본원에서 사용되는 용어 "할로알킬"은 하나 이상의 할로겐으로 치환된, 특정된 수의 탄소 원자를 갖는 상기 정의된 바와 같은 분기쇄 및 직쇄 포화 알킬기를 모두 포함하는 것이다. 예를 들어, "$C_{1-6}$할로알킬" 또는 "$C_1$ 내지 $C_6$ 할로알킬"은 $C_1$, $C_2$, $C_3$, $C_4$, $C_5$, 및 $C_6$ 알킬쇄를 포함하는 것이다. 할로알킬의 예에는 비제한적으로 플루오로메틸, 디플루오로메틸, 트리플루오로메틸, 트리클로로메틸, 펜타플루오로에틸, 펜타클로로에틸, 2,2,2-트리플루오로에틸, 1,3-디브로모프로판-2-일, 3-브로모-2-플루오로프로필 및 1,4,4-트리플루오로부탄-2-일, 헵타플루오로프로필, 및 헵타클로로프로필이 포함된다.

[1462] 본원에서 사용되는 "헤테로알킬"은 본원에서 정의된 바와 같은 알킬을 나타내며, 알킬쇄 내의 하나 이상의 탄소 원자는 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 헤테로원자에 의해 대체된다. 본원에서 사용되는 $C_{X-Y}$헤테레오알킬

또는 x- 내지 y-원 헤테로알킬에서, x-y는 헤테로알킬 상에서 탄소 원자(탄소 및 헤테로원자)의 수를 기재한다. 예를 들어 $C_{3-8}$헤테로알킬은 3 내지 8개 탄소를 갖는 알킬쇄를 나타낸다. 추가로, 본원에 정의된 바와 같은 헤테로알킬에서 분자의 나머지에 라디칼을 연결하는 원자는 탄소여야 한다. 3- 내지 8-원 헤테로알킬의 대표예에는 비제한적으로 $-(CH_2)OCH_3$, $-(CH_2)_2OCH(CH_3)_2$, $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-OH$ 및 $-(CH_2)_2-(O-(CH_2)_2)_2-OH$가 포함된다.

[1463] 용어 "헤테로아릴"은 5- 내지 10-원 방향족 고리 시스템 내에 적어도 하나 헤테로원자(예컨대, 산소, 황, 질소 또는 이의 조합)를 함유하는 방향족 모이어티를 나타내며 헤테로아릴의 예에는 비제한적으로 피롤릴, 피리딜, 피라졸릴, 인돌릴, 인다졸릴, 티에닐, 푸라닐, 벤조푸라닐, 옥사졸릴, 이속사졸릴, 이미다졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 트리아지닐, 피리미디닐, 피라지닐, 티아졸릴, 푸리닐, 벤즈이미다졸릴, 퀴놀리닐, 이소퀴놀리닐, 퀴녹살리닐, 벤조피라닐, 벤조티오페닐, 벤조이미다졸릴, 벤족사졸릴 및 1H-벤조[d][1,2,3]트리아졸릴이 포함된다. 헤테로방향족 모이어티는 단일 또는 융합 고리 시스템으로 구성될 수 있다. 전형적인 단일 헤테로아릴 고리는 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개 헤테로원자를 함유하는 5- 내지 6-원 고리이며 전형적인 융합 헤테로아릴 고리 시스템은 N, O 및 S로부터 독립적으로 선택되는 1 내지 4개 헤테로원자를 함유하는 9- 내지 10-원 고리 시스템이다. 융합 헤테로아릴 고리 시스템은 함께 융합된 2개의 헤테로아릴 고리 또는 아릴(예컨대, 페닐)에 융합된 헤테로아릴로 구성될 수 있다.

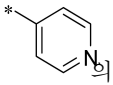
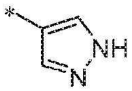
[1464] 본원에서 사용되는 용어 "헤테로원자"는 질소(N), 산소(O) 또는 황(S) 원자를 나타낸다. 달리 지시되지 않는 한, 충족되지 않은 원자가를 갖는 임의의 헤테로원자는 원자가를 충족시키기 충분한 수소 원자를 갖는 것으로 가정되며, 헤테로원자가 황인 경우, 이는 산화되지 않거나(S) S(O) 또는 $S(O)_2$로 산화될 수 있다.

[1465] 본원에서 사용되는 용어 "하이드록실" 또는 "하이드록시"는 라디칼 -OH를 나타낸다.

[1466] "헤테로사이클로알킬"은 본 출원에 정의된 바와 같은 사이클로알킬을 의미하며, 단 나타내는 하나 이상의 고리 탄소는 -O-, -N=, -NH-, -S-, -S(O)- 및 $-S(O)_2-$로부터 선택되는 모이어티에 의해 대체되고, 3 내지 8 원 헤테로사이클로알킬의 예에는 비제한적으로 옥시라닐, 아지리디닐, 아제티디닐, 이미다졸리디닐, 피라졸리디닐, 테트라하이드로푸라닐, 테트라하이드로티에닐, 테트라하이드로티에닐 1,1-디옥시드, 옥사졸리디닐, 티아졸리디닐, 피롤리디닐, 피롤리디닐-2-온, 모르폴리닐, 피페라지닐, 피페리디닐, 피라졸리디닐, 헥사하이드로피리미디닐, 1,4-디옥사-8-아자-스피로[4.5]데스-8-일, 티오모르폴리닐, 설파노모르폴리닐, 설포노모르폴리닐 및 옥타하이드로피롤로[3,2-b]피롤릴이 포함된다.

[1467] 본원에서 사용되는 "옥소"는 이가 라디칼 =O를 나타낸다.

[1468] 본원에서 나타내는 용어 "치환"은 적어도 하나의 수소 원자가 비-수소기로 대체됨을 의미하며, 단 정상 원자가가 유지되고, 치환은 안정한 화합물을 생성한다. 치환기가 옥소(즉, =O)인 경우, 원자 상의 2개 수소가 대체된다. 본 발명의 화합물에 질소 원자(예컨대, 아민)가 존재하는 경우, 이들은 산화제(예컨대, mCPBA 및/또는 과산화수소)로의 처리에 의해 N-옥시드로 전환되어 본 발명의 다른 화합물을 산출할 수 있다.

[1469] 본원에서 사용되는 용어 "비치환 질소"는 이중 결합 및 단일 결합에 의한 그 인접한 고리 원자에 대한 그 결합으로 인해 치환능을 갖지 않는 질소 고리 원자(-N=)를 나타낸다. 예를 들어, 4-피리딜  의 파라 위치에서의 질소는 "비치환" 질소이며, 1H-피라졸-4-일  의 연결 C-고리 원자에 대해 4-위치의 질소는 "비치환" 질소이다.

[1470] 당업자가 이해할 수 있듯이, 예를 들어 분자 내 케톤(-CH-C(=O)-)기는 그 엔올 형태(-C=C(OH)-)로 호변이성화할 수 있다. 따라서, 구조가 이들 중 하나만 표시하는 경우라도 본 발명은 모든 가능한 호변이체를 커버하는 것이다.

[1471] 본원에서 사용되는 "$x^{-*}$" 및 "$x^{-\frac{1}{2}}$"는 분자의 나머지 부분에 대한 X의 부착 지점을 표시하는 기호이다.

[1472] 화합물에 대한 임의의 구성성분 또는 화학식에 1회를 초과하는 임의의 변수가 발생하는 경우, 각 경우에서의 그 정의는 모든 다른 경우에서의 그 정의와 무관하다. 따라서 예를 들어, 하나의 기가 0~3개의 R기로 치환되는 것으로 나타나는 경우, 상기 기는 비치환되거나 최대 3개의 R기로 치환될 수 있고, 각 경우에서 R은 R의 정의로부

터 독립적으로 선택된다.

[1473] 달리 명시되지 않는 한, 용어 "본 발명의 화합물" 또는 "본 발명의 화합물들"은 화학식 A2 및 이의 하위 화학식의 화합물뿐만 아니라 이성질체, 예컨대 입체이성질체(부분입체이성질체, 거울상 이성질체 및 라세미체를 포함함), 기하 이성질체, 입체형태 이성질체(회전 이성질체 및 회전 장애 이성질체를 포함함), 호변이체, 동위원소 표지된 화합물(중수소 치환을 포함함), 및 고유 형성된 모이어티(예를 들어, 다형체, 용매화물 및/또는 수화물)를 나타낸다. 염을 형성할 수 있는 모이어티가 존재하는 경우, 염, 특히 약학적으로 허용 가능한 염이 또한 포함된다.

[1474] 당업자는 본 발명의 화합물이 키랄 중심을 함유할 수 있으며, 따라서 상이한 이성질체 형태로 존재할 수 있음을 인지할 것이다. 본원에서 사용되는 용어 "이성질체"는 동일한 분자식을 갖지만 원자의 배치 및 배열이 상이한, 상이한 화합물을 나타낸다.

[1475] "거울상 이성질체"는 서로 중첩되지 않는 거울상인 한 쌍의 입체이성질체이다. 한 쌍의 거울상 이성질체의 1:1 혼합물은 "라세미" 혼합물이다. 이 용어는 적절한 경우 라세미 혼합물을 지정하는데 사용된다. 본 발명의 화합물에 대한 입체화학을 지정할 때, 2개의 키랄 중심의 알려진 상대 및 절대 배열을 갖는 단일 입체이성질체는 종래의 RS 시스템(예를 들어, (1S,2S))을 사용하여 지정되며; 알려진 상대 배열을 갖지만, 공지되지 않은 절대 배열을 갖는 단일 입체이성질체는 별과 함께 지정되며(예를 들어, (1R*,2R*)); 라세미체는 두 글자로 지정된다(예를 들어, (1R,2R) 및 (1S,2S)의 라세미 혼합물로서 (1RS,2RS); (1R,2S) 및 (1S,2R)의 라세미 혼합물로서 (1RS,2SR)). "부분입체 이성질체"는, 적어도 2개의 비대칭 원자를 갖지만, 서로 거울상이 아닌 입체이성질체이다. 절대 입체화학은 Cahn-Ingold-Prelog R-S 시스템에 따라 특정된다. 화합물이 순수한 거울상이성질체일 때, 각각의 키랄 탄소에서의 입체화학은 R 또는 S에 의해 특정될 수 있다. 절대 배열이 공지되지 않은 분해된 화합물은 (우선 또는 좌선) 방향에 따라 (+) 또는 (-)로 지정될 수 있으며, 이들은 나트륨 D 선의 파장에서 평면 편광을 회전시킨다. 대안적으로, 분해된 화합물은 키랄 HPLC를 통해 상응하는 거울상 이성질체/부분입체이성질체에 대한 각각의 체류 시간에 의해 정의될 수 있다.

[1476] 본원에 기재된 소정 화합물은 하나 이상의 비대칭 중심 또는 축을 포함하고, 따라서 절대 입체화학의 관점에서 (*R*)- 또는 (*S*)-로 정의될 수 있는 거울상 이성질체, 부분입체이성질체 및 다른 입체이성질체 형태를 생성할 수 있다.

[1477] 기하 이성질체는 화합물이 이중 결합 또는 분자에 소정량의 구조 강성도를 제공하는 일부 다른 특징을 포함하는 경우 일어날 수 있다. 화합물이 이중 결합을 포함하는 경우, 치환기는 E 또는 Z 배열일 수 있다. 화합물이 이치환된 사이클로알킬을 포함하는 경우, 이 사이클로알킬 치환기는 시스- 또는 트랜스-배열을 가질 수 있다.

[1478] 입체형태 이성질체(또는 입체이성체)는 하나 이상의 결합에 대한 회전에 의해 상이할 수 있는 이성질체이다. 회전 이성질체는 단 하나의 결합에 대한 회전에 의해 상이한 입체이성체이다.

[1479] 용어 "회전 장애 이성질체"는 분자에서 제한된 회전으로 생성되는 축 또는 면 키랄성에 기반하는 구조 이성질체를 나타낸다.

[1480] 달리 특정되지 않는 한, 본 발명의 화합물은 라세미 혼합물, 광학적으로 순수한 형태 및 중간체 혼합물을 포함한 모든 가능한 이성질체를 포함하는 것을 의미한다. 광학 활성 (*R*)- 및 (*S*)-이성질체는 키랄 합성물 또는 키랄 시약을 사용하여 제조되거나, 통상적인 기법(예를 들어, 양호한 분리를 달성하기 위해 키랄 SFC 또는 HPLC 크로마토그래피 칼럼, 예컨대 DAICEL Corp.에서 입수가능한 CHIRALPAK® 및 CHIRALCEL® 상에서, 적당한 용매 또는 용매들의 혼합물을 사용하여 분리됨)을 사용하여 분해될 수 있다.

[1481] 본 발명의 화합물은 광학 활성 또는 라세미 형태로 단리될 수 있다. 광학 활성 형태는 라세미 형태의 분해에 의해 또는 광학 활성 출발 물질로부터의 합성에 의해 제조될 수 있다. 본 발명의 화합물 및 여기에서 제조되는 중간체를 제조하기 위해 사용되는 모든 공정은 본 발명의 일부로 간주된다. 거울상 이성질체 또는 부분 이성질체 산물이 제조되는 경우, 이들은 통상적인 방법에 의해, 예를 들어 크로마토그래피 또는 분별 결정화에 의해 분리될 수 있다.

[1482] 본원에서 사용되는 용어 "LATS"는 대형 종양 억제인자 단백질 키나제의 약칭이다. 본원에서 사용되는 LATS는 LATS1 및/또는 LATS2를 나타낸다. 본원에서 사용되는 LATS1은 대형 종양 억제인자 키나제 1을 나타내며 LATS2는 대형 종양 억제인자 키나제 2를 나타낸다. LATS1 및 LATS2는 둘 다 세린/트레오닌 단백질 키나제 활성을 갖는다.

[1483] 본원에서 사용되는 용어 "YAP1"은 YAP 또는 YAP65로도 알려진 yes-연관 단백질 1을 나타내며, 이는 세포 증식에 관여되는 유전자의 전사 조절인자로서 작용하는 단백질이다.

[1484] 본원에서 사용되는 용어 "MST1/2"는 포유류 sterile 20-유사 키나제-1 및 -2를 나타낸다.

[1485] 본원에서 사용되는 용어 "약학 조성물"은 적어도 하나 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 본 발명의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 나타낸다. 하나의 구현예에서, 약학 조성물은 국소, 비경구 또는 주사제 투여에 적합한 형태이다.

[1486] 본 발명의 화합물의 "치료 유효량"이란 용어는 대상체의 생물학적 또는 의학적 반응, 예를 들어 효소 또는 단백질 활성의 감소 또는 억제를 유도하거나, 증상을 완화하거나, 질환을 경감시키거나, 질병의 진행을 늦추거나 지연시키거나, 질병을 예방하는 등의 본 발명의 화합물의 양을 나타낸다. 하나의 비-제한적 구현예에서, 용어 "치료 유효량"은 대상체에 투여될 때 (1) (i) LATS에 의해 매개되는, 또는 (ii) LATS 활성(정상 또는 비정상)을 특징으로 하는 질환 또는 장애, 또는 질병을 적어도 부분적으로 경감, 억제, 예방 및/또는 완화하거나; 또는 (2) LATS의 활성을 감소 또는 억제하거나; 또는 (3) LATS의 발현을 감소 또는 억제하는 데 효과적인 본 발명의 화합물의 양을 나타낸다. 다른 비-제한적인 구현예에서, 용어 "치료 유효량"은 세포, 또는 조직, 또는 비-세포 생물학적 물질 또는 배지에 투여될 때, LATS의 활성을 적어도 부분적으로 감소시키거나 억제하거나; LATS의 발현을 적어도 부분적으로 감소시키거나 억제하는 데 효과적인 본 발명의 화합물의 양을 나타낸다.

[1487] 용어 "대상체"에는 인간 및 비-인간 동물이 포함된다. 비-인간 동물에는 척추동물, 예를 들어 포유류 및 비-포유류, 예컨대 비-인간 영장류, 양, 고양이, 말, 소, 닭, 개, 마우스, 래트, 염소, 토끼, 및 돼지가 포함된다. 바람직하게는, 대상체는 인간이다. 언급된 경우를 제외하고, 용어 "환자" 또는 "대상체"는 본원에서 상호 교환적으로 사용된다.

[1488] 본원에서 사용되는 용어 "$IC_{50}$"은 50% 억제 효과를 생성하는 억제제의 몰 농도를 나타낸다.

[1489] 본원에서 사용되는 바와 같이, 임의의 질병 또는 장애를 "치료하다", "치료하는 것" 또는 "치료"라는 용어는 질환 또는 장애를 경감시키거나 완화하는 것(즉, 질환 또는 이의 임상 증상의 적어도 하나의 발생을 지연 또는 저지하는 것); 또는 환자가 인식할 수 없는 것을 포함하여, 질병 또는 장애와 연관된 적어도 하나의 신체적 파라미터 또는 바이오마커를 경감시키거나 완화하는 것을 나타낸다.

[1490] 본원에서 사용되는 바와 같이, 임의의 질병 또는 장애를 "예방하다", "예방하는 것" 또는 "예방"이라는 용어는 질병 또는 장애의 예방적 처치; 또는 질병 또는 장애의 개시작 또는 진행을 지연시키는 것을 나타낸다.

[1491] 본원에서 사용되는 대상체는 이러한 대상체가 치료로부터 생물학적으로, 의학적으로 또는 삶의 질에서 이익을 얻을 경우 이러한 치료를 "필요로 한다".

[1492] 공정 조건에 따라 본 발명의 화합물은 중성(유리) 또는 염 형태로 수득된다. 이들 화합물의 유리 형태 및 염 형태 모두, 특히 "약학적으로 허용 가능한 염"은 본 발명의 범위 내이다.

[1493] 본원에서 사용되는 용어 "염" 또는 "염들"은 본 발명의 화합물의 산 부가염 또는 염기 부가염을 나타낸다. "염"에는 특히 "약학적으로 허용 가능한 염"이 포함된다. 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 본 발명의 화합물의 생물학적 효과 및 특성(전형적으로 생물학적으로나 달리 바람직하지 않은 것이 아님)을 보유하는 염을 나타낸다. 많은 경우, 본 발명의 화합물은 아미노기 및/또는 카복실기 또는 이와 유사한 기의 존재로 인해 산 및/또는 염기 염을 형성할 수 있다.

[1494] 약학적으로 허용 가능한 산 부가염은 무기 산 및 유기 산으로 형성될 수 있다.

[1495] 염이 유도될 수 있는 무기 산에는, 예를 들어 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등이 포함된다.

[1496] 염이 유도될 수 있는 유기 산에는 예를 들어, 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 옥살산, 말레산, 말론산, 숙신산, 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 만델산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 톨루엔설폰산, 설포살리실산 등이 포함된다.

[1497] 약학적으로 허용 가능한 염기 부가염은 무기 및 유기 염기로 형성될 수 있다.

[1498] 염이 유도될 수 있는 무기 염기에는 예를 들어, 암모늄 염 및 주기율표의 I 내지 XII열의 금속이 포함된다. 소정 구현예에서, 염은 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 마그네슘, 철, 은, 아연, 및 구리로부터 유도되고; 특히 적합한 염에는 암모늄, 칼륨, 나트륨, 칼슘 및 마그네슘 염이 포함된다.

[1499] 염이 유도될 수 있는 유기 염기에는, 예를 들어 1차, 2차, 및 3차 아민, 자연 발생 치환 아민을 포함하는 치환 아민, 사이클릭 아민, 염기성 이온 교환 수지 등이 포함된다. 소정 유기 아민에는 이소프로필아민, 벤자틴, 콜리네이트, 디에탄올아민, 디에틸아민, 라이신, 메글루민, 피페라진 및 트로메타민이 포함된다.

[1500] 다른 양태에서, 본 발명은 아세테이트, 아스코르베이트, 아디페이트, 아스파테이트, 벤조에이트, 베실레이트, 브로마이드/하이드로브로마이드, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 캄포르설포네이트, 카프레이트, 클로라이드/하이드로클로라이드, 클로르테오필로네이트, 시트레이트, 에탄디설포네이트, 푸마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루쿠로네이트, 글루타메이트, 글루타레이트, 글리콜레이트, 히푸레이트, 하이드로요오다이드/요오다이드, 이세티오네이트, 락테이트, 락토비오네이트, 라우릴설페이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 만델레이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 뮤케이트, 나프토에이트, 나프실레이트, 니코티네이트, 니트레이트, 옥타데카노에이트, 올리에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/하이드로겐 포스페이트/디하이드로겐 포스페이트, 폴리갈락투로네이트, 프로피오네이트, 세바케이트, 스테아레이트, 숙시네이트, 설포살리실레이트, 설페이트, 타르트레이트, 토실레이트 트리페나테이트, 트리플루오로아세테이트 또는 크시나포에이트 염 형태의 화학식 A2의 화합물을 제공한다.

[1501] 본원에 주어진 임의의 화학식은 또한 비표지 형태뿐만 아니라 동위원소 표지된 형태의 화합물을 나타내고자 한다. 동위원소 표지된 화합물은 하나 이상의 원자가 선택된 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자로 대체된 것을 제외하고는 본원에 주어진 화학식으로 나타낸 구조를 갖는다. 본 발명의 화합물에 포함될 수 있는 동위원소에는, 예를 들어, 수소의 동위원소가 포함된다.

[1502] 추가로, 소정 동위원소, 특히 중수소(즉, 2H 또는 D)의 도입은 더 큰 대사 안정성으로부터 야기되는 소정 치료적 장점, 예를 들어, 증가된 생체내 반감기 또는 감소된 투여량 요건 또는 치료 지수 또는 관용성의 개선을 제공할 수 있다. 상기 맥락에서 중수소는 화학식 A1 또는 이의 하위-화학식의 화합물의 치환기로 간주됨이 이해된다. 중수소의 농도는 동위원소 농축 인자에 의해 정의될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "동위원소 농축 인자(isotopic enrichment factor)"는 특정된 동위원소의 동위원소 존재율과 천연 존재율 사이의 비율을 의미한다. 본 발명의 화합물에서 치환기가 중수소인 것으로 표시되는 경우, 이러한 화합물은 각각의 지정된 중수소 원자에 대하여 적어도 3500(각각의 지정된 중수소 원자에서 52.5% 중수소 포함), 적어도 4000(60% 중수소 포함), 적어도 4500(67.5% 중수소 포함), 적어도 5000(75% 중수소 포함), 적어도 5500(82.5% 중수소 포함), 적어도 6000(90% 중수소 포함), 적어도 6333.3(95% 중수소 포함), 적어도 6466.7(97% 중수소 포함), 적어도 6600(99% 중수소 포함), 또는 적어도 6633.3(99.5% 중수소 포함)의 동위원소 농축 인자를 갖는다. 용어 "동위원소 농축 인자"는 중수소에 대하여 기재된 것과 동일한 방식으로 임의의 동위원소에 적용될 수 있다는 것이 이해되어야 한다.

[1503] 본 발명의 화합물로 도입될 수 있는 동위원소의 다른 예는 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 불소, 및 염소의 동위원소, 예컨대, 각각 $^{3}H$, $^{11}C$, $^{13}C$, $^{14}C$, $^{15}N$, $^{18}F$ $^{31}P$, $^{32}P$, $^{35}S$, $^{36}Cl$, $^{123}I$, $^{124}I$, $^{125}I$가 포함된다. 따라서 본 발명에는, 예컨대, $^{3}H$ 및 $^{14}C$와 같은 방사성 동위원소를 포함하는 하나 이상의 임의의 전술된 동위원소를 도입하는 화합물, 또는 $^{2}H$ 및 $^{13}C$와 같은 비-방사성 동위원소가 존재하는 것들이 포함되는 것으로 이해되어야 한다. 이러한 동위원소 표지 화합물은 대사 연구($^{14}C$ 사용), 반응 동역학 연구(예를 들어, $^{2}H$ 또는 $^{3}H$ 사용), 약물 또는 기질 조직 분포 검정을 포함하는 검출 또는 이미징 기법, 예컨대 양전자 방출 단층촬영(PET) 또는 단일-광자 방출 컴퓨터 단층촬영(SPECT), 또는 환자의 방사선 치료에 유용하다. 특히, $^{18}F$ 또는 표지 화합물은 PET 또는 SPECT 연구에 특히 바람직할 수 있다. 동위원소-표지된 화학식 A2의 화합물은 일반적으로 당업자에게 알려진 통상의 기법에 의하거나 첨부된 실시예 및 제조에 기재된 것과 유사한 공정에 의해 적절한 동위원소-표지 시약을 이전에 이용된 비-표지 시약 대신 사용하여 제조될 수 있다.

[1504] 본 발명의 화합물(들)의 임의의 비대칭 원자(예를 들어, 탄소 등)는 라세미체로 또는 거울상 이성질체가 풍부하게, 예를 들어, (*R*)-, (*S*)- 또는 (*R,S*)-배열로 존재할 수 있다. 소정 구현예에서, 각각의 비대칭 원자는 적어도 50% 거울상 이성질체 과잉, 적어도 60% 거울상 이성질체 과잉, 적어도 70% 거울상 이성질체 과잉, 적어도 80% 거울상 이성질체 과잉, 적어도 90% 거울상 이성질체 과잉, 적어도 95% 거울상 이성질체 과잉, 또는 적어도 99% 거울상 이성질체 과잉의 (*R*)- 또는 (*S*)- 배열을 갖는다. 불포화 이중 결합을 갖는 원자에서의 치환기는, 가능할 경우, *시스*- (*Z*)- 또는 *트랜스*- (*E*)- 형태로 존재할 수 있다.

[1505] 따라서, 본원에 사용되는 바와 같이, 본 발명의 화합물은 가능한 입체이성질체, 회전 이성질체, 회전장애 이성

질체, 호변이체 또는 이의 혼합물 중 하나의 형태로, 예를 들어, 실질적으로 순수한 기하(시스 또는 트랜스) 입체이성질체, 부분입체이성질체, 광학 이성질체(대장체), 라세미체 또는 이의 혼합물로서 존재할 수 있다.

[1506] 입체이성질체의 임의의 생성된 혼합물은 구성성분의 물리화학적 차이에 근거하여, 예를 들어, 크로마토그래피 및/또는 분별 결정화에 의해, 순수하거나 실질적으로 순수한 기하 또는 광학 이성질체, 부분입체이성질체, 라세미체로 분리될 수 있다.

[1507] 생성된 임의의 최종 화합물 또는 중간체의 라세미체는 알려진 방법에 의해, 예를 들어, 광학 활성 산 또는 염기에 의해 수득한 이의 부분입체이성질체 염을 분리하고, 광학 활성 산성 또는 염기성 화합물을 유리시킴으로써 광학 대장체로 분해될 수 있다. 특히, 염기성 모이어티는 그에 따라 예를 들어, 광학 활성 산, 예를 들어, 타르타르산, 디벤조일 타르타르산, 디아세틸 타르타르산, 디-*O,O'*-*p*-톨루오일 타르타르산, 만델산, 말산 또는 캄포르-10-설폰산에 의해 형성된 염의 분별 결정화에 의해 본 발명의 화합물을 이의 광학 대장체로 분해하는데 이용될 수 있다. 라세미 산물은 또한 키랄 크로마토그래피, 예를 들어 키랄 흡착제를 사용하는 고압 액체 크로마토그래피(HPLC)에 의해 분해될 수 있다.

[1508] "서열 동일성 백분율"은 비교 윈도우에 걸쳐 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교하여 결정되며, 비교 윈도우에서 폴리뉴클레오티드 서열의 일부는 2개 서열의 최적 정렬을 위해, 부가 또는 결실을 포함하지 않는 참조 서열(예컨대, 본 발명의 폴리펩타이드)에 비해 부가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 백분율은 두 서열에서 모두 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 발생하는 위치의 수를 결정하여 매칭되는 위치의 수를 산출하고, 매칭되는 위치의 수를 비교 윈도우에서 위치의 총 수로 나누고, 결과에 100을 곱해서 서열 동일성 백분율을 산출함으로써 계산된다.

[1509] 용어 "동일한" 또는 "동일성" 퍼센트는 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열의 맥락에서, 동일한 서열인 2개 이상의 서열 또는 하위서열을 나타낸다. 하기 서열 비교 알고리즘 중 하나를 사용하여 또는 수동 정렬 및 육안 검사에 의해 측정하였을 때, 비교 윈도우 또는 지정된 영역에 걸친 최대 상응성에 대해 비교 및 정렬된 경우, 2개의 서열에 특정된 백분율의 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드(즉, 특정된 영역에 걸쳐, 또는 특정되지 않은 경우, 참조 서열의 전체 서열에 걸쳐, 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성)가 있으면 2개의 서열은 "실질적으로 동일"하다. 본 발명은 본원에서 예시되는 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오티드와 각각 실질적으로 동일한 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[1510] 용어 "단리된"은 천연 상태로부터 변경되거나 제거된 것을 의미한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 핵산 또는 펩타이드 또는 세포는 "단리된" 것이 아니지만, 그것의 천연 상태의 공존하는 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩타이드 또는 세포는 "단리된" 것이다.

[1511] 용어 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드"는 단일- 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA) 및 이의 중합체를 나타낸다. 구체적으로 제한되지 않는 한, 이 용어는 참조 핵산과 유사한 결합 특성을 갖고 자연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 알려져 있는 유사체를 함유하는 핵산을 포괄한다. 달리 나타내지 않는 한, 특정한 핵산 서열은 또한 명시적으로 나타낸 서열 뿐만 아니라 이의 보존적으로 변형된 변이체(예를 들어 축중성 코돈 치환), 대립유전자, 오르소로그, SNP, 및 상보성 서열을 묵시적으로 포괄한다. 구체적으로, 축중성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다(Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); 및 Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)).

[1512] 본원에서 사용되는 "세포 집단" 또는 "세포의 집단"은 생체내 또는 생체외 LATS1 및/또는 LATS2 억제제의 존재하에 증식하는 세포를 포함한다. 이러한 세포에서, Hippo 신호전달은 전형적으로 세포 성장을 억제하지만, 이 경로가 LATS 억제에 의해 손상되는 경우 증식할 것이다. 소정 구현예에서, 본 발명의 방법, 제조물, 배지, 제제, 또는 키트에서 유용한 세포 집단은 상술된 조직으로부터의 세포 또는 본원에서 기재되거나 제공되는 세포를 포함한다. 이러한 세포에는 비제한적으로 눈 세포(예컨대, 윤부 줄기 세포, 각막 내피 세포), 상피 세포(예컨대, 피부 유래), 신경 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 폐의 기저 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포 및 간 선조 세포가 포함된다.

[1513] 약리학 및 유용성

[1514] 하나의 구현예에서, 본 발명은 세포 증식이 생체내 및/또는 생체외에서 바람직할 모든 적응증에 대한 소분자 LATS 키나제 억제제에 관한 것이다.

[1515] 생체외 세포 치료법에는 일반적으로 증식된 세포의 일시적이거나 안정한 이식편을 확립하기 위해 환자에 이식될 환자 또는 건강한 공여자로부터 단리된 세포 집단의 증식이 관여된다. 생체외 세포 치료법은 환자에 유전자 또는 생체치료 분자를 전달하기 위해 사용될 수 있고, 생체치료 분자의 유전자 전달 또는 발현은 단리된 세포에서 달성된다. 생체외 세포 치료법의 비제한적 예에는 비제한적으로 줄기 세포 이식(예컨대, 조혈 줄기 세포 이식, 자가 줄기 세포 이식, 또는 제대혈 줄기 세포 이식), 조직 재생, 세포성 면역치료법, 및 유전자 치료법이 포함된다. 예를 들어, 문헌[Naldini, 2011, Nature Reviews Genetics volume 12, pages 301-315]을 참고한다.

[1516] 하나의 특정 양태에서, 본 발명은 소분자 LATS 억제제에 관한 것이며, 이는 피부 세포 증식을 촉진하도록 YAP 경로를 활성화할 수 있고, 이에 따라 상처 치유의 촉진에서 유용하다.

[1517] 본 발명의 화합물의 용도의 추가 예는 특히 다음과 같다:

[1518] 1) 경계 이식편(비제한적으로 지방 함량이 과도하고, 신체 크기에 비해 작으며, 공여자의 연령이 고령이라는 점을 포함하는 사유로 부적절하게 여겨지고 이에 따라 빈번하게 폐기되는 기관)의 이식 후 불충분한 간 재성장의 치료에서;

[1519] 2) 예를 들어, 간의 원발성 및 전이성 종양 환경, 외상성 간 부상, 및 간의 병소를 점유하는 다른 공간, 예컨대 혈관 기형 및 간 농양의 절제에서, 광범위한 간절제술 후 잔류 간 물질의 증강된 재성장을 뒷받침하기 위해;

[1520] 3) 배양(생체외 증식) 및 가능한 후속 이식에서 간 세포(예컨대 간 선조 세포(HPC))의 성장을 촉진하기 위해;

[1521] 4) 바이러스성 간염, 약물-유도 간 부상, 자가면역 간염, 허혈성 및 울혈성 간 질병을 갖는 환자에서 간을 재생시키기 위해;

[1522] 5) 비-알코올성 지방간염, 알코올성 지방간염, 만성 B형 및 C형 바이러스 간염, 혈색소증, 알파-1 항-트립신 결핍, 윌슨 질병 및 약물-유도 간 섬유증으로부터의 만성 간 부상 및 기저 간 섬유증을 갖는 환자의 치료를 뒷받침하여 재생능을 증강시키면서 섬유증 해소를 가속화하기 위해; 또는

[1523] 6) 관류 장치를 포함하거나 포함하지 않고, 생체외 기관의 손상을 방지하고 그 기능을 유지하거나 개선하기 위해.

[1524] YAP/Hippo 경로는 피부 및 다른 조직에서 조직 성장 및 재생을 조절한다. LATS가 말단 키나제인, Hippo(MST) 키나제 캐스케이드는 YAP 활성을 음성적으로 조절한다. LATS 키나제는 세포질 체류 및 불활성화를 일으키는 YAP을 직접 인산화하는 것으로 나타난 세린/트레오닌 단백질 키나제이다. LATS에 의한 인산화 없이, YAP은 핵으로 전위하여, TEAD와의 복합체를 형성하고, 세포 증식 및 생존을 위한 하류 유전자 발현을 유도한다.

[1525] 본 발명에 따른 화합물의 활성은 하기 시험관내 및 생체내 방법에 의해 평가될 수 있다.

[1526] LATS1 및 LATS2 억제

[1527] 유리 형태 또는 약학적으로 허용 가능한 염 형태의, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물은 LATS1 및/또는 LATS2의 강력한 억제제이다.

[1528] LATS1에 대한 화합물의 억제 효능은 실시예 섹션 A에 기재된 바와 같이 LATS1 생화학 HTRF 검정에 의해 검정되었다. LATS1에 대한 본 발명의 화합물의 억제 효능(LATS1 $IC_{50}$(μM))이 표 1A에 보고된다.

[1529] 화합물의 LATS1 $IC_{50}$은 10 μM 초과 내지 1 nM 미만 범위였고, 대부분의 화합물은 1 μM 미만의 $IC_{50}$을 갖는다. 1 μM 초과의 $IC_{50}$을 갖는 화합물은 상기 검정에서 불활성으로 간주됨이 주지되어야 한다.

[1530] LATS2에 대한 선택된 화합물의 억제 효능이 실시예 섹션 A에 기재된 바와 같이 LATS2 생화학 캘리퍼 검정에 의해 검정되었다. LATS2에 대한 본 발명의 화합물의 억제 효능(LATS2 $IC_{50}$(μM))이 또한 표 1a에 보고된다.

[1531] pYAP 억제(HaCaT 세포)

[1532] LATS1 및 LATS2 키나제의 억제에 의해, 화학식 A1의 화합물은 YAP의 인산화를 억제한다. 인간 HaCaT 세포(각질세포 세포주)에서 YAP의 인산화를 감소시키는 화합물의 능력이 실시예에 기재된 바와 같이 pYAP HTRF 검정에 의해 측정되었다. 검정 결과가 표 1c에 보고된다. 데이터는 화학식 A1의 화합물에 의한 처리가 YAP의 인산화를 감소시킴을 실증하였다.

[1533] 화학식 A1의 화합물의 YAP의 인산화 감소에서의 능력이 JHH-5 세포에서 유사한 방식으로 실증될 수 있다(Fujise

et al., Hepatogastroenterology. Development, 1990 Oct;37(5):457-60).

[1534] YAP 핵 전위(HaCaT 세포)

[1535] LATS에 의한 인산화 없이, YAP은 핵으로 전위된다. 인간 HaCaT 세포에서 YAP 전위에 대한 화학식 A1, 또는 이의 하위 화학식의 화합물의 효과는 실시예 섹션 A에 기재된 바와 같이 YAP 핵 전위 검정에 의해 평가되었다. 생성된 $EC_{50}$ 값이 표 1c에 보고된다. 핵 전위 $EC_{50}$은 20 μM 초과 내지 0.3 μM 범위였고, $EC_{50}$ 값이 약 1 μM 이하인 화합물을 선택하였다. 데이터는 선택된 화학식 A1의 화합물에 의한 처리가 세포질로부터 핵으로의 YAP의 전위를 활성화함을 뒷받침한다.

[1536] YAP 전위에 대한 화학식 A1, 또는 이의 하위 화학식의 화합물의 효과는 JHH-5 세포에서 유사한 방식으로 실증될 수 있다(Fujise et al., Hepatogastroenterology. Development, 1990 Oct;37(5):457-60).

[1537] 표적 확인

[1538] 화학식 A1, 또는 이의 하위 화학식의 화합물은 MST1/2 키나제 대비 LATS1/2를 선택적으로 표적화한다. YAP 전위 검정 스크리닝으로부터 히트(hit) 표적을 확인하기 위해, 실시예 섹션 A에 기재된 바와 같이 표적 확인 검정이 수행되었다. 검정 결과가 도 33a 내지 33c에 기재된다.

[1539] 도 33a는 비히클로 처리되거나 MST1/2 또는 LATS1/2에 대한 40 pM의 siRNA로 전달감염된 인간 HaCaT 세포의 용해액에서 pYAP(Ser127)에 대한 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. LATS1/2에 대한 siRNA는 pYAP 신호를 제거한 반면, MST1/2에 대한 siRNA는 최소 영향을 가졌다. 이는 LATS가 YAP 인산화에 관여된다는 당분야의 의견과 일치한다.

[1540] 도 33b는 0.5 μM 오카다산(Okadaic acid)의 존재 하에 처리되지 않거나 1시간 동안 9 μM의 실시예 133으로 처리된 인간 HaCaT 세포의 세포 용해액의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸다. pYAP은 극적으로 억제되었다. 결과는 실시예 133이 LATS 키나제를 표적으로 함을 제시하는, LATS 및 MSTS에 대한 siRNA의 연구(도 33a)와 유사하다.

[1541] 도 33c는 약 $10^{-4}$ 내지 1 μM 범위의 실시예 133의 농도에 반응하는 LATS1 활성의 억제(DMSO 대조군 대비)를 나타낸다. 데이터는 실시예 133이 상기 검정에서 1.3 nM의 $IC_{50}$으로 LATS1을 강력히 억제하였음을 나타낸다. 결과는 본 발명의 화합물이 LATS 키나제의 강력한 억제제임을 추가로 확인시켜 주었다.

[1542] 마우스 생체내 약력학(PD): 상처 치유에서의 용도

[1543] 본 발명의 화합물은 또한 생체내 YAP 경로를 활성화한다. YAP 경로 표적 유전자 발현의 연구를 실시예 섹션 A에서 생체내 PD 검정에 기재된 바와 같이 생체내 마우스 모델에서 수행하였다. 마취된 마우스의 등에 2개의 전체-두께 절개 상처를 비히클, 또는 0.2 및 2 mg/mℓ의 실시예 133으로 국소 처리하였다. 2개의 일일 용량 후, 상처 테두리 주변 피부 샘플이 수집되고 *Cyr61* 및 *Gapdh* 프로브를 사용해서 Taqman 분석을 수행하였다. 표적 유전자에 대한 mRNA 발현 수준을 Gapdh mRNA 수준에 대해 정상화하고 도 34에서 실시예 133의 농도에 대해 그래프화하였다. 데이터는 실시예 133이 비히클과 비교되는 경우, 용량 의존적 방식으로 YAP 표적 유전자 Cyr61을 유의미하게 상향-조절하였음을 나타낸다. 결과는 YAP 경로의 활성화에 대해 알려진 LATS 생물학과 일치한다.

[1544] 생체내 피부 세포 증식

[1545] 또한, 본 발명의 화합물은 국소 적용되는 경우, 생체내 피부 세포 증식을 증가시킨다. 연구를 실시예 섹션 A에 "생체내 조직학 및 Ki67 염색 검정"에 기재된 바와 같이 수행하였다. 실시예 133 또는 비히클을 온전한 마우스 등 피부에 적용하였다. 1일 2회 투여 3일 후, 피부 샘플을 수집하고 Ki67에 대한 면역조직학 염색을 거쳤다. 섹션을 세포 증식 및 Ki67 양성 세포의 존재율에 대해 시각적으로 평가하였다. 연구 결과가 도 35a 및 도 35b에 보고된다.

[1546] 도 35a는 비히클 또는 실시예 133으로 처리된 Ki67 염색 마우스 피부의 대표적 현미경사진을 나타낸다. 실시예 133에 의해 처리된 마우스 피부는 비히클 대비 기저 세포 증식 및 표피 두께에서 유의미한 증가를 나타낸다. 도 35b는 처리되지 않은 및 처리된 마우스 피부에서 Ki67 양성 세포의 존재율을 비교한다. 데이터는 실시예 133에 의해 처리된 피부에서 Ki67 양성 세포의 10% 더 높은 존재율을 나타내며, 이는 Ki67 양성 세포의 통계적으로 유의미한 유도를 시사한다. 따라서, 실시예 133은 생체내 마우스에서 피부 세포 증식을 유의미하게 증가시켰다. 요약하면, 하이-콘텐츠 이미지화-기반 표현형 HTS로부터, 본 발명의 화합물은 강력한 LATS 억제제인 것으로 나타났으며, 이는 세포성 및 생화학 LATS 검정 둘 다에 의해 확인되었다. 또한, LATS1 및 LATS2 둘 다를 녹다운시

키기 위한 siRNA를 사용하여, YAP 경로의 음성 조절인자로서의 LATS가 또한 검증되었다.

[1547] 또한, 시험관내, 실시예 133이 YAP 경로를 활성화하고, 인간 각질세포(HaCaT)에서 세포 증식을 촉진함을 나타내었다. LATS 억제제는 상처입은 마우스 PD 모델에서 YAP 표적 유전자 발현을 유도하였다. 마우스에서 실시예 133의 국소 처리는 YAP 표적 유전자 발현을 유도하였고 Ki67 염색에 의해 입증된 바와 같이 기저층 피부 세포 성장을 증가시켰다. 따라서, 실시예 133은 피부 재생을 촉진하는 데 유용하였다.

[1548] 따라서, 유리 형태 또는 약학적으로 허용 가능한 염 형태의 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물은 본원에 기재된 바와 같이 세포 증식으로부터 이익을 얻을 수 있는 질병 또는 질환에 대한 치료법으로서 유용할 수 있다. 예를 들어, 비제한적으로 피부, 간 및 각막을 포함하여, 부상입은 또는 이환 조직 및 기관의 재생이 대상체에 이익을 줄 경우에 그러하다. 또한, 화학식 A2, 또는 이의 하위 화학식의 화합물은 또한 연구 화학물질로서, 예컨대 도구 화합물로서 사용될 수 있다.

[1549] 따라서, 추가 양태로서, 본 발명은 치료법에서 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체의 용도를 제공한다.

[1550] 하나의 구현예에서, 본 발명은 화상, 급성 피부 궤양 및 만성 피부 궤양의 총체적 증상의 치료 및 완화를 위한, 화학식 A1, 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체의 용도를 제공한다. 하나의 구현예에서, 만성 피부 궤양은 혈관, 당뇨병성 및 압력 궤양으로부터 선택된다. 추가 구현예에서, 만성 피부 궤양은 정맥성 다리 궤양, 당뇨병성 족부 궤양, 및 욕창으로부터 선택된다.

[1551] 다른 구현예에서, 본 발명은 치료적으로 허용 가능한 양의 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체의 투여를 포함하는, LATS 키나제의 억제에 의해 치료되는 질병 또는 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[1552] 하나의 구현예에서, 질병 또는 질환은 화상, 급성 피부 궤양 또는 만성 피부 궤양으로부터 선택된다. 추가 구현예에서, 만성 피부 궤양은 혈관, 당뇨병성, 및 압력 궤양으로부터 선택된다. 추가 구현예에서, 만성 피부 궤양은 정맥성 다리 궤양, 당뇨병성 족부 궤양, 및 욕창으로부터 선택된다.

[1553] 따라서, 추가 양태로서, 본 발명은 약제의 제조를 위한, 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체의 용도를 제공한다.

[1554] 추가 구현예에서, 본 발명은 상처 치유를 촉진하기 위한 또는 LATS 키나제의 억제에 의해 치료받을 수 있는 질병의 치료를 위한 약제의 제조를 위한, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체의 용도를 제공한다. 다른 구현예에서, 질병은 화상, 급성 또는 만성 피부 궤양이다. 다른 구현예에서, 만성 피부 궤양은 당뇨병성 궤양, 압력 궤양 및 혈관 궤양으로부터 선택된다. 다른 구현예에서, 만성 피부 궤양은 정맥성 다리 궤양, 당뇨병성 족부 궤양 및 욕창으로부터 선택된다.

[1555] 따라서, 추가 양태로서, 본 발명은 약제로서의 용도를 위한, 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체를 제공한다.

[1556] 추가 구현예에서, 본 발명은 상처 치유를 촉진하기 위한 또는 LATS 키나제의 억제에 의해 치료받을 수 있는 질병의 치료를 위한 약제로서 사용하기 위한, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체를 제공한다. 다른 구현예에서, 질병은 화상, 급성 피부 궤양 또는 만성 피부 궤양이다. 다른 구현예에서, 만성 피부 궤양은 당뇨병성 궤양, 압력 궤양 및 혈관 궤양으로부터 선택된다. 다른 구현예에서, 만성 피부 궤양은 정맥성 다리 궤양, 당뇨병성 족부 궤양 및 욕창으로부터 선택된다.

[1557] 마우스의 생체내 치료: 간에서의 용도

[1558] 아래에서 생물학 검정 섹션에 기재된 바와 같은 생체내 검정에 기재된 바와 같이 화합물로 마우스를 처리하여 화학식 A1의 화합물이 간 재생 및 간 재성장을 유도하는 능력을 측정하였다. 검정 결과가 표 1c에 보고된다. 결과는 평가된 화합물이 비히클 대조군 처리 마우스와 비교되는 경우 마우스 간에서 pYAP 수준을 감소시킴을 나타내어, 투여 2시간 후 간에서 생체내 LATS 키나제 억제를 시사한다. YAP 표적 유전자 Cyr61 및 Ctgf의 증가된 mRNA 발현은 투여 2시간 후 YAP 신호전달의 활성화를 시사한다. 증식 마커 Ki67에 대한 면역조직화학 염색은 투여 24시간 후 증가된 간 세포 증식을 추가로 시사한다.

[1559] 따라서, 추가 양태로서, 본 발명은 치료법에서 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체의 용도를 제공한다.

[1560] 하나의 구현예에서, 본 발명은 재생능을 증강시키면서 섬유증 해소를 가속화하기 위해, 특히 경계 이식편의 이식 후 불충분한 간 재성장의 치료를 위한; 광범위 간절제술 후 잔류 간 물질의 증강된 재성장을 뒷받침하기 위한; 바이러스 간염, 약물-유도 간 부상, 자가면역 간염, 허혈성 및 울혈성 간 질병으로부터의 급성 간 부전 후 환자 간의 재생을 위한; 및 비-알코올성 지방간염, 알코올성 지방간염, 만성 B형 및 C형 바이러스 간염, 혈색소증, 알파-1 항-트립신 결핍, 윌슨 질병 및 약물-유도 간 섬유증으로부터의 만성 간 부상 및 기저 간 섬유증을 갖는 환자의 치료를 위한, 간 재생 및 간 재성장을 촉진하기 위한 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체의 용도를 제공한다.

[1561] 다른 양태에서, 본 발명은 치료적으로 허용 가능한 양의 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체의 투여를 포함하는, LATS 키나제의 억제에 의해 치료되는 질병을 치료하는 방법을 제공한다.

[1562] 추가 구현예에서, 본 발명은 치료적으로 허용 가능한 양의 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체의 투여를 포함하는, 재생능을 증강시키면서 섬유증 해소를 가속화하기 위해, 특히 경계 이식편의 이식 후 불충분한 간 재성장의 치료를 위한; 광범위 간절제술 후 잔류 간 물질의 증강된 재성장을 뒷받침하기 위한; 바이러스 간염, 약물-유도 간 부상, 자가면역 간염, 허혈성 및 울혈성 간 질병으로부터의 급성 간 부전 후 환자 간의 재생을 위한; 및 비-알코올성 지방간염, 알코올성 지방간염, 만성 B형 및 C형 바이러스 간염, 혈색소증, 알파-1 항-트립신 결핍, 윌슨 질병 및 약물-유도 간 섬유증으로부터의 만성 간 부상 및 기저 간 섬유증을 갖는 환자의 치료를 위한, 간 재생 및 간 재성장을 촉진하는 방법을 제공한다.

[1563] 따라서, 추가 양태로서, 본 발명은 약제의 제조를 위한, 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체의 용도를 제공한다.

[1564] 추가 구현예에서, 약제는 재생능을 증강시키면서 섬유증 해소를 가속화하기 위해, 특히 경계 이식편의 이식 후 불충분한 간 재성장의 치료를 위한; 광범위 간절제술 후 잔류 간 물질의 증강된 재성장을 뒷받침하기 위한; 바이러스 간염, 약물-유도 간 부상, 자가면역 간염, 허혈성 및 울혈성 간 질병으로부터의 급성 간 부전 후 환자 간의 재생을 위한; 및 비-알코올성 지방간염, 알코올성 지방간염, 만성 B형 및 C형 바이러스 간염, 혈색소증, 알파-1 항-트립신 결핍, 윌슨 질병 및 약물-유도 간 섬유증으로부터의 만성 간 부상 및 기저 간 섬유증을 갖는 환자의 치료를 위한, 간 재생 및 간 재성장을 촉진하기 위한 것이다.

[1565] 따라서, 추가 양태로서, 본 발명은 약제로서 사용하기 위한, 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 또는 이의 입체이성질체를 제공한다. 추가 구현예에서, 약제는 재생능을 증강시키면서 섬유증 해소를 가속화하기 위해, 특히 경계 이식편의 이식 후 불충분한 간 재성장의 치료를 위한; 광범위 간절제술 후 잔류 간 물질의 증강된 재성장을 뒷받침하기 위한; 바이러스 간염, 약물-유도 간 부상, 자가면역 간염, 허혈성 및 울혈성 간 질병으로부터의 급성 간 부전 후 환자 간의 재생을 위한; 및 비-알코올성 지방간염, 알코올성 지방간염, 만성 B형 및 C형 바이러스 간염, 혈색소증, 알파-1 항-트립신 결핍, 윌슨 질병 및 약물-유도 간 섬유증으로부터의 만성 간 부상 및 기저 간 섬유증을 갖는 환자의 치료를 위한, 간 재생 및 간 재성장을 촉진하기 위한 것이다.

[1566] 다른 양태에서, 본 발명은 공여자 외부 배양(생체외 증식)에서 간 세포의 성장을 촉진하기 위한 또는 생체외 간 재생의 유도를 위한, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 염, 또는 이의 입체이성질체의 용도를 제공한다.

[1567] 다른 양태에서, 본 발명은 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물, 또는 이의 염, 또는 이의 입체이성질체를 사용하여 공여자 외부 배양(생체외 증식)에서 간 세포의 성장을 촉진하는 방법 또는 생체외 간 재생의 유도 방법을 제공한다.

[1568] 약학 조성물 및 투여

[1569] 다른 양태에서, 생체내 사용에 관한 본 발명의 구현예에서, 본 발명은 본 발명의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 약학적으로 허용 가능한 담체을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 추가의 구현예에서, 조성물은 본원에 기재되는 것과 같은 적어도 2개의 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 본 발명의 화합물의 국소 사용에 관한 본 발명의 구현예에서, 약학 조성물은 활성 성분을 당업자에게 알려져 있는 하나 이상의 가용화제, 안정화제, 긴장성 증강제, 완충제 및 보존제와 함께 포함하는, 예컨대 에어로졸 등에 의한 전달을 위한, 국소 투여에 적합한 방식으로, 예컨새 수용액, 현탁액, 연고, 크림, 겔 또는 분무 가능한 제형물로 제형화된다.

[1570] 생체내 사용에 관한 본 발명의 구현예에서, 본 발명의 화합물은 전형적으로 약학 투여형으로 제형화되어, 약물의 용이하게 제어 가능한 투여량을 제공하고, 환자에게 명쾌하고 용이하게 취급 가능한 제품을 제공한다. 본 발명의 화합물에 대한 투여량 요법은, 물론, 알려진 인자, 예컨대 특정한 제제의 약력학적 특징 및 그의 투여 방식 및 경로; 수신자의 종, 연령, 성별, 건강, 의학적 상태 및 체중; 증상의 성질 및 정도; 병행 치료의 종류; 치료 빈도; 투여 경로, 환자의 신장 및 간 기능 및 요망되는 효과에 따라 달라질 것이다. 생체내 사용에 관한 본 발명의 구현예에서, 본 발명의 화합물이 단일한 1일 용량으로 투여될 수 있거나, 전체 1일 투여량이 1일 2, 3, 또는 4회의 분할된 용량으로 투여될 수 있다.

[1571] 생체내 사용에 관한 본 발명의 구현예에서, 본 발명의 약학 조성물 또는 조합은 약 50 내지 70 ㎏의 대상체에 대해 약 1 내지 1000 ㎎의 활성 성분(들)의 단위 투여량일 수 있다. 화합물, 약학 조성물 또는 이의 조합의 치료적 유효 투여량은 치료받는 대상체의 종, 체중, 연령 및 개체 상태, 치료받는 장애 또는 질병 또는 이의 중증도에 의존한다. 통상의 지식을 가진 의사, 임상의 또는 수의사는 장애 또는 질병의 예방, 치료 또는 이의 진행의 억제에 필요한 각각의 활성 성분의 유효량을 용이하게 결정할 수 있다.

[1572] 본 발명의 화합물은, 예컨대 에어로졸 등에 의한 전달을 위한, 수용액, 현탁액, 연고, 크림, 로션, 겔 또는 분무 가능한 제형물 형태로 국소 적용될 수 있다. 투여량은 약 $10^{-3}$몰 농도 내지 $10^{-9}$몰 농도의 범위일 수 있다. 생체내에서의 치료 유효량은 투여 경로에 따라 약 1 내지 100 ㎎/㎏의 범위일 수 있다.

[1573] 소정 경우에서, 본 발명의 화합물을 적어도 하나의 추가 약학(또는 치료) 제제, 예컨대 진통제, 및 이의 조합과의 조합으로 투여하는 것이 유리할 수 있다. 특히, 조성물은 조합 치료제로서 함께 제형화되거나 별도로 투여될 것이다.

[1574] 소정 경우에서, 본 발명의 화합물을 적어도 하나의 추가 약학(또는 치료) 제제, 예컨대 면역억제제, 예를 들어 코르티코스테로이드, 사이클로스포린, 타크롤리무스, 및 면역억제제의 조합과의 조합으로 투여하는 것이 유리할 수 있다. 특히, 조성물은 조합 치료제로서 함께 제형화되거나 별도로 투여될 것이다.

[1575] 본 발명의 화합물은 하나 이상의 다른 치료제와 동시에, 또는 이전이나 이후에 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 다른 작용제와 동일하거나 상이한 투여 경로에 의해 별도로, 또는 다른 작용제와 동일한 약학 조성물 내에서 함께 투여될 수 있다. 치료제는, 예를 들어, 화학적 화합물, 펩타이드, 항체, 항체 단편 또는 핵산으로, 본 발명의 화합물과 조합으로 환자에 투여되는 경우 치료적으로 활성이거나 치료적 활성을 증강시킨다.

[1576] 하나의 구현예에서, 본 발명은 치료법에서 동시, 별도 또는 순차적 사용을 위한 조합된 제조물로서 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물 및 적어도 하나의 다른 치료제를 포함하는 산물을 제공한다. 하나의 구현예에서, 치료법은 LATS1/2에 의해 매개되는 질병 또는 질환의 치료이다. 조합된 제조물로 제공되는 산물에는 화학식 A1의 화합물 및 다른 치료제(들)를 동일한 약학 조성물에서 함께, 또는 화학식 A1의 화합물 및 다른 치료제(들)를 별도의 형태, 예를 들어 키트의 형태로 포함하는 조성물이 포함된다.

[1577] 하나의 구현예에서, 본 발명은 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물 및 다른 치료제(들)를 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 선택적으로, 약학 조성물은, 상기에 기재된 바와 같이, 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다.

[1578] 생체내 사용에 관한 하나의 구현예에서, 본 발명은 그 중 적어도 하나가 화학식 A2 또는 이의 하위 화학식의 화합물을 함유하는, 2개 이상의 별도 약학 조성물을 포함하는 키트를 제공한다. 하나의 구현예에서, 키트는 상기 조성물들을 별도 보유하는 수단, 예컨대 컨테이너, 분할 병, 분할 튜브, 또는 분할 포일 패킷을 포함한다. 이러한 키트의 예는 전형적으로 겔 또는 연고 등을 전달하기 위해 사용되는 바와 같은, 포일 패킷이다.

[1579] 본 발명의 하나의 구현예의 키트는 활성 제제의 상이한 투여 형태, 예를 들어, 경구 및 국소 투여 형태를 투여하기 위해, 상이한 투여량 간격으로 별도 조성물을 투여하기 위해, 또는 서로에 대해 별도 조성물을 적정하기 위해 사용될 수 있다. 순응도를 돕기 위해, 본 발명의 키트는 전형적으로 투여 지시를 포함한다.

[1580] 본 발명의 조합 치료법에서, 본 발명의 화합물 및 다른 치료제는 동일하거나 상이한 제조자에 의해 제조 및/또는 제형화될 수 있다. 나아가, 생체내 사용에 관한 본 발명의 구현예에 있어서, 본 발명의 화합물 및 다른 치료제는 (i) 의사에게 조합 제품을 배포하기 이전에(예를 들어 본 발명의 화합물 및 다른 치료제를 포함하는 키트의 경우에); (ii) 투여 직전에 의사 자신에 의해(또는 의사의 지도 하에); (iii) 환자 자신에 의해, 예를 들어 본 발명의 화합물 및 다른 치료제를 순차적으로 투여하는 동안, 조합 치료법으로 합해질 수 있다.

[1581] 따라서, 본 발명은 LATS의 억제에 의해 매개되는 질병 또는 질환을 치료하기 위한 화학식 A1 또는 이의 하위 화

학식의 화합물의 용도에 관한 것이며, 약제는 다른 치료제와의 투여를 위해 제조된다. 본 발명은 또한 LATS의 억제에 의해 매개되는 질병 또는 질환을 치료하기 위한 다른 치료제의 용도에 관한 것이며, 약제는 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물과 함께 투여된다.

[1582] 본 발명은 또한 LATS의 억제에 의해 매개되는 질병 또는 질환을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물에 관한 것이며, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물은 다른 치료제와 함께 투여하기 위해 제조된다. 본 발명은 또한 LATS의 억제에 의해 매개되는 질병 또는 질환을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 다른 치료제에 관한 것이며, 다른 치료제는 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물과 함께 투여하기 위해 제조된다.

[1583] 본 발명은 또한 LATS의 억제에 의해 매개되는 질병 또는 질환을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물에 관한 것이며, 화합물은 다른 치료제와 함께 투여된다. 본 발명은 또한 LATS의 억제에 의해 매개되는 질병 또는 질환을 치료하는 방법에서 사용하기 위한 다른 치료제를 제공하며, 다른 치료제는 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물과 함께 투여된다.

[1584] 본 발명은 또한 LATS1/2에 의해 매개되는 질병 또는 질환을 치료하기 위한 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물의 용도에 관한 것이며, 환자는 이전에(예를 들어, 24시간 내에) 다른 치료제와 함께 치료받았다. 본 발명은 또한, LATS에 의해 매개되는 질병 또는 질환을 치료하기 위한 다른 치료제의 용도를 제공하며, 환자는 이전에(예를 들어, 24시간 이내에) 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식의 화합물로 치료받았다.

[1585] **화합물의 제조**

[1586] 본 발명의 화합물은 본원에서 제공되는 방법, 반응식 및 실시예의 관점에서 유기 합성의 당업자에게 알려진 여러 방식으로 제조될 수 있다. 본 발명의 화합물은 합성 유기 화학 분야에 알려진 합성 방법과 함께, 또는 당업자에게 이해되는 바와 같은 이의 변이에 의해, 후술되는 방법을 사용되어 합성될 수 있다. 바람직한 방법에는 비제한적으로 후술되는 것들이 포함된다. 반응은 이용되는 시약 및 물질에 적절하고 행해지고 있는 변환에 적합한 용매 또는 용매 혼합물에서 수행된다. 유기 화학 분야의 당업자는 분자 상에 존재하는 작용부가 제안된 변환과 일치해야 함을 이해할 것이다. 이것은 때때로, 본 발명의 요망되는 화합물을 수득하기 위하여 다른 것들 중 하나의 특정 공정 반응식을 선택하거나 합성 단계의 순서를 변형하는 판단을 요구할 것이다.

[1587] 출발 물질은 일반적으로 Aldrich Chemicals(Milwaukee, Wis.)와 같은 상업적 공급처로부터 입수 가능하거나 당업자에게 알려진 방법을 사용하여 용이하게 제조된다(예를 들어, 문헌[Louis F. Fieser and Mary Fieser, Reagents for Organic Synthesis, v. 1-19, Wiley, New York (1967-1999 ed.), Larock, R.C., Comprehensive Organic Transformations, 2nd-ed., Wiley-VCH Weinheim, Germany (1999), 또는 Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, 4, Aufl. ed. Springer-Verlag, Berlin]에 일반적으로 기재된 방법에 의해 제조됨, 증보판 포함)(Beilstein 온라인 데이터베이스를 통해서도 이용 가능함).

[1588] 예시의 목적으로, 아래 도시된 반응식은 본 발명의 화합물뿐만 아니라 주요 중간체를 합성하기 위한 잠재적 경로를 제공한다. 개별 반응 단계에 대한 보다 상세한 설명에 대해서는, 하기 실시예 섹션을 참고한다. 당업자는 다른 합성 경로가 본 발명의 화합물을 합성하기 위해 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 특정 출발 물질 및 시약이 반응식에 도시되어 있고 하기에서 논의되지만, 다양한 유도체 및/또는 반응 조건을 제공하기 위해 다른 출발 물질 및 시약이 쉽게 치환될 수 있다. 또한, 하기 기재된 방법에 의해 제조된 다수의 화합물은 당업자에게 잘 알려진 통상적인 화학을 사용하여 본 개시에 비추어 추가로 변형될 수 있다.

[1589] 본 발명의 화합물의 제조에서, 중간체의 원격 작용부의 보호가 필요할 수 있다. 이러한 보호에 대한 필요성은 원격 작용부의 성질 및 제조 방법의 조건에 따라 변할 것이다. 이러한 보호에 대한 필요성은 당업자에 의해 쉽게 결정된다. 보호기 및 이의 사용의 일반 설명에 대해서는, 문헌[Greene, T.W. et al., *Protecting Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., Wiley (2007)]을 참고한다. 본 발명의 화합물의 제조에 포함되는 보호기, 예컨대 트리틸 보호기는 하나의 위치이성질체로서 나타낼 수 있으나 또한 위치이성질체의 혼합물로서 존재할 수 있다.

[1590] **약어**

[1591] 본원에서 사용되는 약어는 하기와 같이 정의된다: "1x"는 1회, "2x"는 2회, "3x"는 3회, "℃"는 섭씨 온도, "aq"는 수성, "Col"은 칼럼, "eq"는 당량, "g"는 그램, "mg"는 밀리그램, "nm"는 나노미터, "ℓ"는 리터, "mℓ"는 밀리리터, "ul", "uL", "㎕", 또는 "μL"는 마이크로리터, "nL" 또는 "nl"는 나노리터, "N"은 노르말 농도, "M"은 몰 농도, "uM" 또는 "μM"은 마이크로몰 농도, "nM"은 나노몰 농도, "mol"은 몰, "mmol"은 밀리몰, "min"은 분, "h" 또는 "hr"은 시간, "RT"는 실온, "ON"은 하룻밤, "atm"은 대기압, "psi"는 제곱 인치

당 파운드, "conc."는 농축, "aq"는 수성, "sat" 또는 "sat'd"는 포화, "MW"는 분자량, "mw" 또는 "μwave"는 마이크로파, "mp"는 녹는점, "Wt"는 중량, "MS" 또는 "Mass Spec"은 질량 분광분석법, "ESI"는 전기분무 이온화 질량 분광분석법, "HR"은 고분해능, "HRMS"는 고분해능 질량 분광분석법, "LC-MS"는 액체 크로마토그래피 질량 분광분석법, "HPLC"는 고압 액체 크로마토그래피, "RP HPLC"는 역상 HPLC, "TLC" 또는 "tlc"는 박층 크로마토그래피, "NMR"은 핵 자기 공명 분광분석법, "nOe"는 핵 오버하우저 효과 분광분석법, "1H"는 양성자, "δ"는 델타, "s"는 단일선, "d"는 이중선, "t"는 삼중선, "q"는 사중선, "m"은 다중선, "br"은 광범위, "Hz"는 헤르쯔, "ee"는 "거울상이성질체 과잉", 그리고 "α", "β", "R", "r", "S", "s", "E" 및 "Z"는 당업자에게 친숙한 입체화학 지정이다.

[1592] 아래에 본원에서 사용되는 하기 약어는 해당 의미를 갖는다:

| | | |
|---|---|---|
| [1593] | AC | 활성 대조군 |
| [1594] | AIBN | 아조비스이소부티로니트릴 |
| [1595] | ATP | 아데닌 트리포스페이트 |
| [1596] | Bn | 벤질 |
| [1597] | Boc | *tert*-부톡시 카보닐 |
| [1598] | $Boc_2O$ | 디-*tert*-부틸 디카보네이트 |
| [1599] | BSA | 소 혈청 알부민 |
| [1600] | Bu | 부틸 |
| [1601] | $Cs_2CO_3$ | 세슘 카보네이트 무수물 |
| [1602] | $CHCl_3$ | 클로로포름 |
| [1603] | DAST | 디에틸아미노설퍼트리플루오라이드 |
| [1604] | DBU | 2,3,4,6,7,8,9,10-옥타하이드로피리미도[1,2-a]아제핀 |
| [1605] | DCM | 디클로로메탄 |
| [1606] | DMAP | 4-디메틸아미노피리딘 |
| [1607] | DMEM | 둘베코(Dulbecco) 변형 이글 배지 |
| [1608] | DMF | 디메틸포름아미드 |
| [1609] | DMSO | 디메틸설폭시드 |
| [1610] | DPPA | 디페닐포스포릴 아지드 |
| [1611] | DTT | 디티올트레이톨 |
| [1612] | EA | 에틸 아세테이트 |
| [1613] | EDTA | 에틸렌디아민테트라아세트산 |
| [1614] | Equiv. | 동등물 |
| [1615] | Et | 에틸 |
| [1616] | $Et_2O$ | 디에틸 에테르 |
| [1617] | EtOH | 에탄올 |
| [1618] | EtOAc | 에틸 아세테이트 |
| [1619] | FBS | 우태 혈청 |
| [1620] | HATU | 2-(7-아자-1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우로늄 헥사플루오로포스페이트 |

[1621] HCl 염산

[1622] HEPES (4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설폰산

[1623] HPMC (하이드록시프로필)메틸 셀룰로스

[1624] HTRF 균일 시간 분해 형광

[1625] *i*-Bu 이소부틸

[1626] *i*-Pr 이소프로필

[1627] KOAc 아세트산칼륨

[1628] $LiAlH_4$ 리튬 알루미늄 하이드라이드

[1629] Me 메틸

[1630] mCPBA 3-클로로퍼옥시벤조산

[1631] MeCN 아세토니트릴

[1632] $MnO_2$ 이산화망간

[1633] $N_2$ 질소

[1634] $NaBH_4$ 나트륨 보로하이드리드

[1635] $NaHCO_3$ 중탄산나트륨

[1636] $Na_2SO_4$ 황산나트륨

[1637] NBS *N*-브로모숙신이미드

[1638] NC 중성 대조군

[1639] PBS 인산염 완충 식염수

[1640] PFA 파라포름알데하이드

[1641] Ph 페닐

[1642] $PPh_3$ 트리페닐포스핀

[1643] $Ph_3P=O$ 트리페닐포스핀 옥시드

[1644] pYAP 포스포-YAP

[1645] $R_f$ 체류 인자

[1646] RT 실온(℃)

[1647] Ser 세린

[1648] *t*-Bu 또는 $Bu^t$ *tert*-부틸

[1649] T3P® 프로판 포스폰산 무수물

[1650] TEA 트리에틸아민

[1651] TFA 트리플루오로아세트산

[1652] THF 테트라하이드로푸란

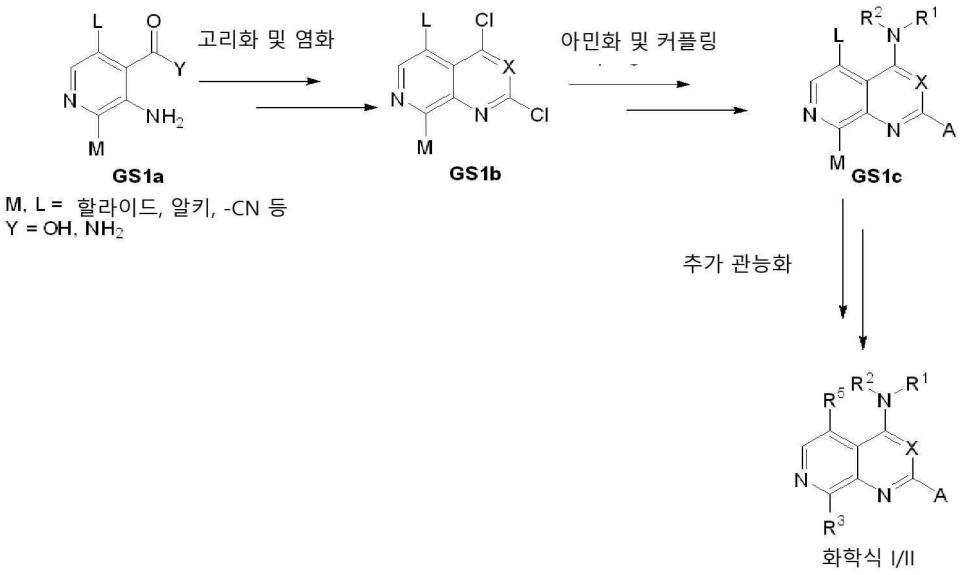
[1653] UVA 자외선 A

[1654] YAP Yes 연관 단백질(NCBI 유전자 ID: 10413; 공식 기호: (YAP1)

[1655] **I. 일반 합성 경로**

[1656] 화학식 I 내지 VI의 화합물은 일반 반응식 I 내지 III에 그리고 아래에서 반응식 1 내지 6에 더 상세히 예시된 바와 같이 제조할 수 있다. 중간체 및 예시된 화합물의 합성을 위한 상세한 설명이 또한 아래에서 개시된다.

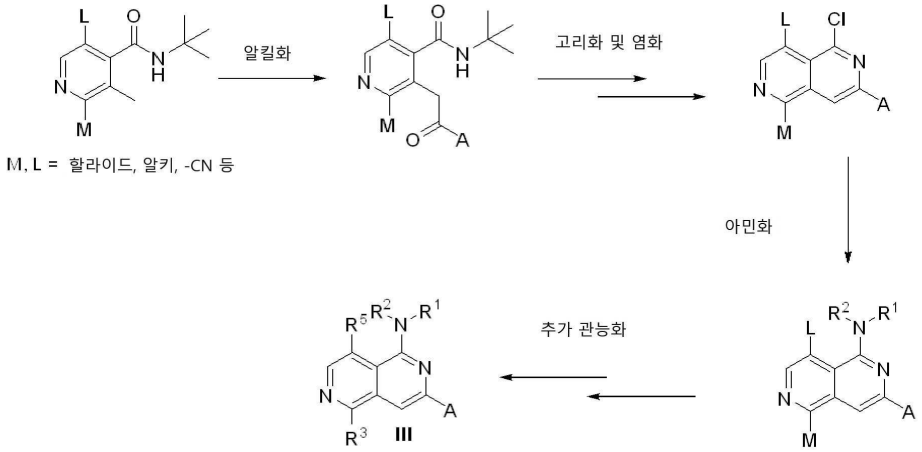
[1657] ***화학식 I 또는 II의 화합물의 제조를 위한 일반 반응식 I***




[1658]

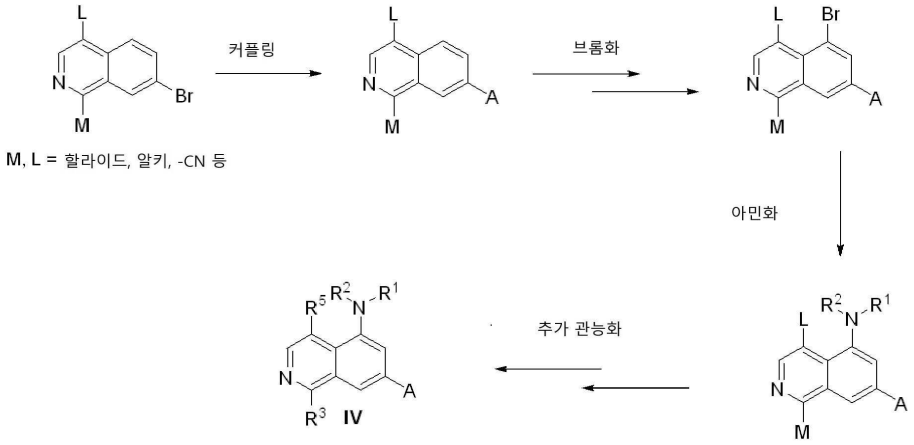
[1659] X = C인 경우, 바이사이클릭 디클로라이드(GS1b)는 상업적으로 이용 가능할 수 있거나 고리화 및 염소화를 통해 아미노이소니코틴산/아미드(GS1a)로부터 제조할 수 있다. 디클로라이드(GS1b)는 아민화되고 적절한 제제와 커플링되어 (GS1c)을 형성할 수 있고, 이는 추가로 관능화되어 임의의 필요한 관능화, 예컨대 비제한적으로 보호 및 탈보호 단계, 환원, 가수분해, 알킬화, 아민화, 커플링 등을 통해 화학식 I 또는 화학식 II를 산출할 수 있다.

[1660] ***화학식 III의 화합물의 제조를 위한 일반 반응식 II***




[1661]

[1662] *화학식 IV의 화합물의 제조를 위한 일반 반응식 III*

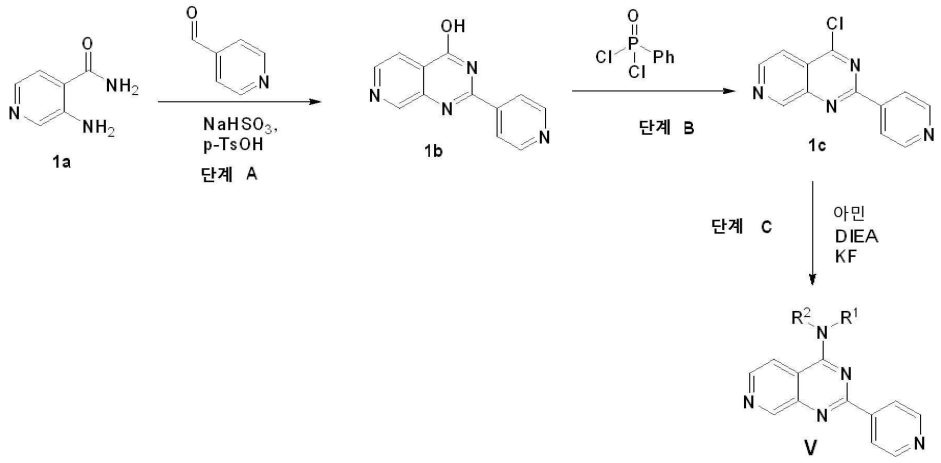



[1663]

[1664] <u>반응식 1.</u>

[1665] 화학식 V의 화합물은 아래에서 반응식 1에 예시된 바와 같이 제조할 수 있다. 단계 C에는 아민화 및 임의의 필요한 관능화, 예컨대 비제한적으로 보호 및 탈보호 단계, 환원, 가수분해, 알킬화 등이 포함될 수 있다.

[1666] *반응식 1*

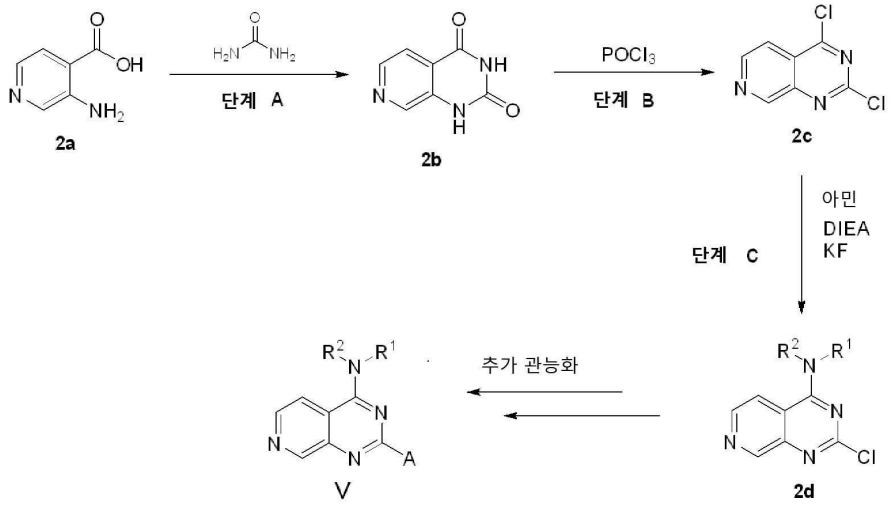



[1667]

[1668] <u>반응식 2.</u>

[1669] 대안적으로, 화학식 V의 화합물은 반응식 2에 예시된 바와 같이 제조할 수 있다. 단계 C에는 아민화 및 임의의 필요한 관능화, 예컨대 비제한적으로 보호 및 탈보호 단계, 환원, 가수분해, 알킬화 등이 포함될 수 있다. 비제한적으로 금속 매개된 커플링, 아민화, 알킬화 등과 필요한 보호 및 탈보호 단계에 의한 모노-클로라이드 중간체(2d)의 추가 관능화로 화학식 V의 화합물을 생성한다.

[1670] *반응식 2*

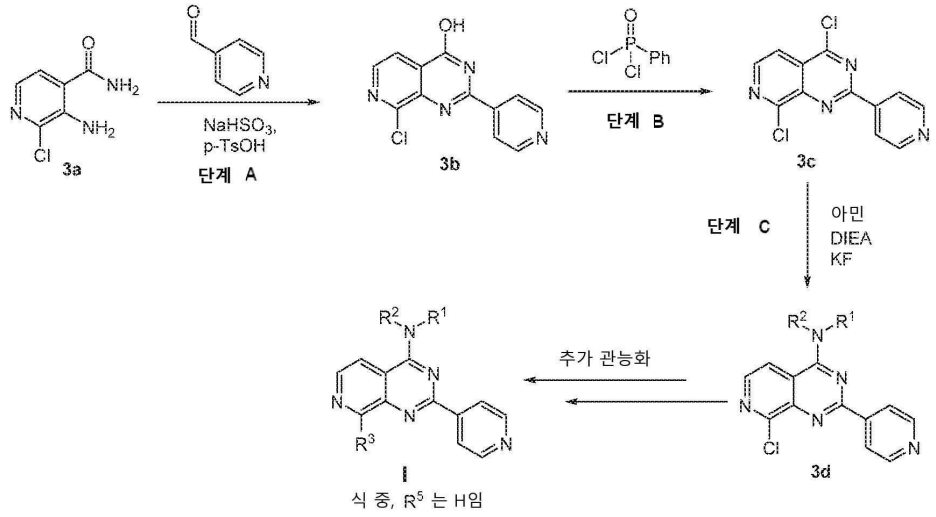



[1671]

[1672] **반응식 3.**

[1673] $R^5$가 수소인 화학식 I의 화합물은 반응식 3에 예시된 바와 같이 제조할 수 있다. 단계 C에는 아민화 및 임의의 필요한 관능화, 예컨대 비제한적으로 보호 및 탈보호 단계, 환원, 가수분해, 알킬화 등이 포함될 수 있다. 비제한적으로 금속 매개된 커플링, 아민화, 알킬화 등과 필요한 보호 및 탈보호 단계에 의한 모노-클로라이드 중간체(3d)의 추가 관능화로 $R^5$가 수소인 화학식 I의 화합물을 생성한다.

[1674] *반응식 3*

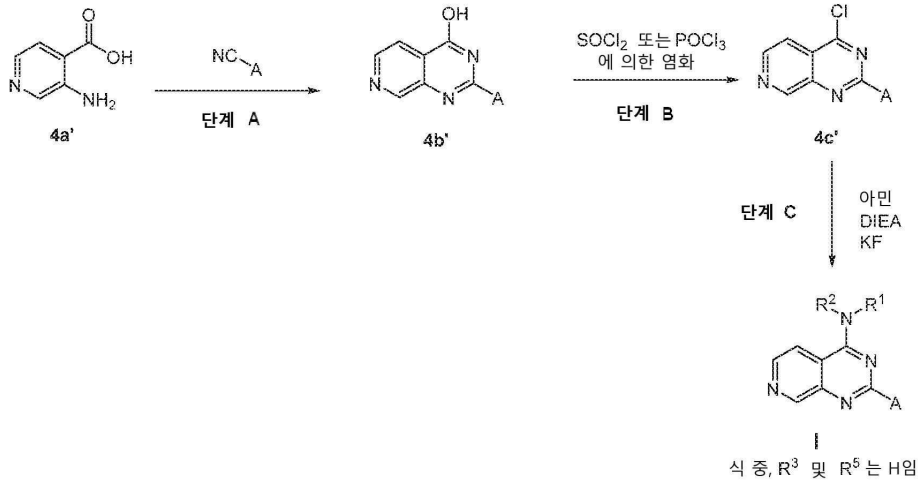



[1675]

[1676] **반응식 4.**

[1677] $R^3$ 및 $R^5$가 둘 다 수소인 화학식 I의 화합물은 반응식 4에 예시된 바와 같이 제조할 수 있다. 단계 C에는 아민화 및 임의의 필요한 관능화, 예컨대 비제한적으로 보호 및 탈보호 단계, 환원, 가수분해, 알킬화 등이 포함될 수 있고 $R^3$ 및 $R^5$가 둘 다 수소인 화학식 I의 화합물을 생성한다.

[1678] *반응식 4*

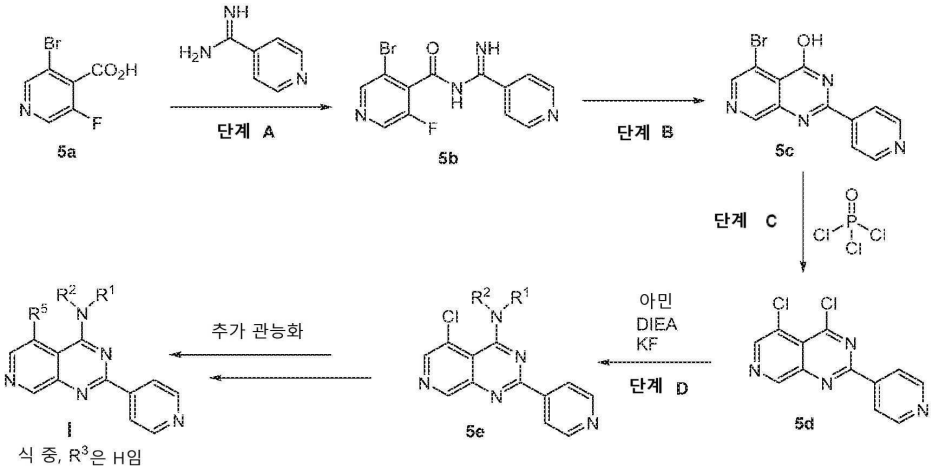



[1679]

[1680] **반응식 5.**

[1681] $R^3$이 수소인 화학식 I의 화합물은 반응식 5에 예시된 바와 같이 제조할 수 있다. 단계 D에는 아민화 및 임의의 필요한 관능화, 예컨대 비제한적으로 보호 및 탈보호 단계, 환원, 가수분해, 알킬화 등이 포함될 수 있다. 비제한적으로 금속 매개된 커플링, 아민화, 알킬화 등과 필요한 보호 및 탈보호 단계에 의한 모노-클로라이드 중간체(5d)의 추가 관능화로 $R^3$이 수소인 화학식 I의 화합물을 생성한다.

[1682] *반응식 5*

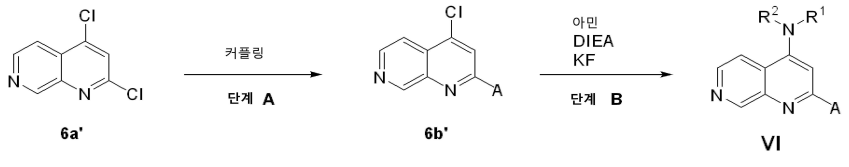



[1683]

[1684] **반응식 6.**

[1685] 화학식 VI의 화합물은 반응식 6에 예시된 바와 같이 상업적으로 이용 가능한 디클로라이드(6a')(2,4-디클로로-1,7-나프티리딘, Aquila Pharmatech)로부터 제조할 수 있다. 단계 A에는 금속 매개된 커플링 및 임의의 필요한 관능화, 예컨대 비제한적으로 보호 및 탈보호 단계, 고리화, 환원, 가수분해, 알킬화 등이 포함될 수 있다. 단계 B에는 아민화 및 임의의 필요한 관능화, 예컨대 비제한적으로 보호 및 탈보호 단계, 환원, 가수분해, 알킬화 등이 포함될 수 있다.

[1686] *반응식 6*




[1687]

[1688] **예시된 실시예의 제조**

[1689] 하기 실시예가 본원에 개시된 방법을 사용하여 제조, 단리 및 특성규명되었다. 하기 실시예는 본 발명의 부분적 범위를 실증하며 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니다.

[1690] 달리 명시되지 않는 한, 출발 물질은 일반적으로 비-배타적인 상업적 공급처, 예컨대 TCI Fine Chemicals(Japan), Shanghai Chemhere Co., Ltd.(Shanghai, China), Aurora Fine Chemicals LLC(San Diego, CA), FCH Group(Ukraine), Aldrich Chemicals Co.(Milwaukee, Wis.), Lancaster Synthesis, Inc.(Windham, N.H.), Acros Organics(Fairlawn, N.J.), Maybridge Chemical Company, Ltd.(Cornwall, England), Tyger Scientific(Princeton, N.J.), AstraZeneca Pharmaceuticals(London, England), Chembridge Corporation(USA), Matrix Scientific(USA), Conier Chem & Pharm Co., Ltd(China), Enamine Ltd(Ukraine), Combi-Blocks, Inc.(San Diego, USA), Oakwood Products, Inc.(USA), Apollo Scientific Ltd.(UK), Allichem LLC.(USA) 및 Ukrorgsyntez Ltd(Latvia)로부터 이용 가능하다.

[1691] **실시예 1~290의 특성규명에 이용된 LCMS 방법**

[1692] 분석용 LC/MS는 ChemStation 소프트웨어를 사용하여 Agilent 시스템 상에서 수행한다. 시스템은 다음으로 구성된다:

[1693] · Agilent G1312 이원 펌프

[1694] · Agilent G1367 웰 플레이트 자동수집장치

[1695] · Agilent G1316 온도조절 칼럼 구획

[1696] · Agilent G1315 다이오드 어레이 검출기

[1697] · Agilent 6140/6150 질량 분광분석기

[1698] · SOFTA 증발 광 산란 검출기

[1699] 전형적인 방법 조건은 하기와 같다:

[1700] · 유속: 0.9 mℓ/분

[1701] · 칼럼: 1.8 ㎛ 2.1×50 mm Waters Acquity HSS T3 C18 칼럼

[1702] · 이동상 A: 물+0.05% TFA

[1703] · 이동상 B: 아세토니트릴+0.035% TFA

[1704] · 실행 시간: 2.25분

[1705] · 시스템을 1.35분 동안 10% B부터 90% B까지의 구배로 구동한다. 구배에 이어 100% B로 0.6분 세척한다. 방법의 나머지 기간에는 시스템이 초기 조건으로 돌아간다.

[1706] · 전형적인 질량 분광분석기 스캔 범위는 100 내지 1000 amu이다.

[1707] **실시예 291~335의 특성규명에 이용된 LCMS 방법**

[1708] LC-MS(방법 1):

[1709] 시스템: Waters SQ 검출기를 포함하는 Waters Acquity UPLC.

[1710] 칼럼: Acquity HSS T3 1.8 ㎛ 2.1×50mm.

[1711] 유속: 1.0 mℓ/분. 칼럼 온도: 60℃

[1712] 구배: 1.4분 동안 5%부터 98%까지의 B, A = 물 + 0.05% 포름산 + 3.75 mM 아세트산암모늄, B = 아세토니트릴 + 0.04% 포름산.

[1713] LC-MS(방법 2):

[1714] 시스템: Waters SQ 검출기를 포함하는 Waters Acquity H-Class UPLC.

[1715] 칼럼: BEH C18 1.7 ㎛ 2.1×50 mm

[1716] 유속: 3.0 ㎖/분. 칼럼 온도: 30℃

[1717] 구배: 2.7분 동안 2%부터 100%까지의 B, A = 2 mM 아세트산암모늄/물 + 0.1% 포름산, B = 아세토니트릴 + 0.1% 포름산.

[1718] **실시예 1~290의 특성규명에 이용된 NMR**

[1719] 달리 주지되지 않는 한, 5 ㎜ QNP Cryoprobe를 포함하는 Bruker AVANCE II 400 MHz 또는 5 ㎜ QNP 프로브를 포함하는 Bruker AVANCE III 500 MHz 상에서 양성자 스펙트럼을 기록한다. 디메틸 설폭시드(δ 2.50), 클로로포름(δ 7.26), 메탄올(δ 3.34), 또는 디클로로메탄(δ 5.32) 대비 화학적 이동을 ppm 단위로 보고한다. 소량의 건조 샘플(2~5 ㎎)을 적절한 중수소화 용매(1 ㎖) 중에 용해시킨다.

[1720] 실시예 291~335의 특성규명에 이용된 NMR

[1721] cryo 프로브가 장착된 Bruker Avance 400 NMR 분광분석기(400 MHz) 또는 cryo 프로브가 장착된 Bruker Avance 600 NMR 분광분석기(600 MHz) 상에 양성자 스펙트럼을 기록한다. 화학적 이동(δ-값)은 테트라메틸실란으로부터 다운필드로 ppm 단위로 보고되며, 스펙트럼 분할 패턴은 단일선(s), 이중선(d), 삼중선(t), 사중선(q), 오중선(p) 다중선, 미분해 또는 더 많은 중첩 신호(m), 광범위 신호(bs)로 지정된다. 용매는 괄호 안에 표시된다.

[1722] **시약 및 물질**

[1723] 용매 및 시약을 공급업체에서 구매하여 임의의 추가 정제 없이 사용하였다. 염기성 이온 교환 수지 카트리지 PoraPakTM Rxn CX 20 cc(2 g)를 Waters에서 구매하였다. 상 분리장치 카트리지(Isolute 상 분리장치)를 Biotage에서 구매하였다. Isolute 흡착제(Isolute HM-N)를 Biotage에서 구매하였다.

[1724] **실시예의 정제에서 이용된 ISCO 방법**

[1725] 사전 패킹된 실리카 RediSep® 칼럼을 포함하는 Teledyne COMBIFLASH® 시스템 상에서 ISCO 플래시 크로마토그래피를 수행한다.

[1726] **실시예의 정제에서 이용된 분취용 HPLC 방법**

[1727] MassLynx 및 FractionLynx 소프트웨어를 사용하여 Waters Autoprep 시스템 상에서 분취용 HPLC를 수행한다. 시스템은 다음으로 구성된다:

[1728] · Waters 2767 자동수집장치/분획 수집기

[1729] · Waters 2525 이원 펌프

[1730] · Waters 515 메이크업 펌프

[1731] · Waters 2487 이중 파장 UV 검출기

[1732] · Waters ZQ 질량 분광분석기

[1733] 전형적인 방법 조건은 하기와 같다:

[1734] · 유속: 100 ㎖/분

[1735] · 칼럼: 10 ㎛ 19×50 ㎜ Waters Atlantis T3 C18 칼럼

[1736] · 주사 용량: 0~1000 ㎕

[1737] · 이동상 A: 물+0.05% TFA

[1738] · 이동상 B: 아세토니트릴+0.035% TFA

[1739] · 구동 시간: 4.25분

[1740] 초기 조건에서 0.25분 유지 후 시스템을 3분 내에 실시예에 있어서 적절한 바에 따라 x% B부터 y% B까지의 구배로 구동한다. 구배에 이어 100% B에서 0.5분 세척한다. 방법의 나머지 기간에는 시스템이 초기 조건으로 돌아간다.

[1741] FractionLynx 소프트웨어를 통한 질량 검출에 의해 분별 수집을 유발한다.

[1742] **실시예의 정제에서 이용된 키랄 분취용 HPLC 방법**

[1743] Waters ZQ 질량 분광분석기에 커플링된 Thar Instruments Prep Investigator 시스템 상에서 SFC 키랄 스크리닝을 수행한다. Thar Prep Investigator 시스템은 다음으로 구성된다:

[1744] · Leap HTC PAL 자동수집장치

[1745] · Thar 유체 전달 모듈(0 내지 10 mℓ/분)

[1746] · Thar SFC 10 위치 칼럼 오븐

[1747] · Waters 2996 PDA

[1748] · Jasco CD-2095 키랄 검출기

[1749] · Thar 자동화 배압 조절장치.

[1750] 모든 Thar 성분은 SuperPure Discovery 시리즈 라인의 일부이다.

[1751] 시스템을 2 mℓ/분(WhelkO-1 칼럼에 있어서 4 mℓ/분)으로 흘리고 30℃에서 유지한다. 시스템 배압은 125 bar로 설정한다. 각각의 샘플을 6개의 3 ㎛ 칼럼 배터리를 통해 스크리닝한다:

[1752] · 3 ㎛ 4.6×50 mm ChiralPak AD

[1753] · 3 ㎛ 4.6×50 mm ChiralCel OD

[1754] · 3 ㎛ 4.6×50 mm ChiralCel OJ

[1755] · 3 ㎛ 4.6×250 mm Whelk O-1

[1756] · 3 ㎛ 4.6×50 mm ChiralPak AS

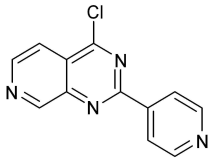
[1757] · 3 ㎛ 4.6×50 mm Lux-셀룰로스-2

[1758] 시스템을 5분 내에 5% 공-용매부터 50% 공-용매까지의 구배로 구동한 후, 50% 공-용매에서 0.5분 유지하고, 다시 5% 공-용매로 되돌려서 초기 조건에서 0.25분 유지한다. 각각의 구배 사이에, 스크리닝될 다음 칼럼을 통해 5% 공-용매를 흘리는 4분 평형화 방법을 둔다. 스크리닝되는 전형적인 용매는 MeOH, MeOH+20 mM $NH_3$, MeOH+0.5% DEA, IPA, 및 IPA+20 mM $NH_3$이다.

[1759] 구배 방법 중 하나를 사용하여 분리가 검출되면, 동용매 방법이 전개될 것이고, 필요한 경우 Thar Prep80 시스템 상의 정제를 위해 스케일 업될 것이다

[1760] ***중간체의 합성***

[1761] **중간체(1c)(반응식 1): 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘**

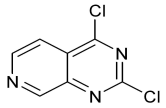
[1762] 

[1763] **단계 A:** 20 mℓ 마이크로파 바이알에 DMA(용량: 5 mℓ) 중 3-아미노이소니코틴아미드(**1a**, 2 g, 14.58 mmol), 이소니코틴알데하이드(1.521 mℓ, 16.04 mmol), 나트륨 바이설파이트(1.821 g, 17.50 mmol) 및 4-메틸벤젠설폰산 수화물(0.277 g, 1.458 mmol)을 첨가하여 오렌지색 현탁액을 얻었다. 반응물을 잘 교반하고 12분 동안 160℃에서 마이크로파로 가열하였다. 반응 혼합물을 물로 희석하고 여과하였다. 고체를 물, MeOH 및 에테르로 세척하여 2.03 g 회백색 고체를 산물(**1b**)로서 얻었다(59%). 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.88 - 8.78 (m, 2H), 8.73 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.16 - 8.08 (m, 2H), 8.03 (dd, J = 5.2, 0.9 Hz, 1H).

[1764] **단계 B:** 5 mℓ 마이크로파 반응기에서 2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-올(**1b,** 500 mg, 2.230 mmol) 및 페닐포스폰산 디클로라이드(1564 ㎕, 11.15 mmol)로 갈색 현탁액을 얻었다. 반응 혼합물을 30분 동안 170℃에서 교반하였고 이 때 LCMS는 완전 전환을 시사하였다. 반응 혼합물을 얼음/물로 켄칭하고 포화 $Na_2CO_3$로 중화시킨 후, DCMx3으로 추출하여 산물(**1c**)을 얻었다(74%). 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.65 (d, J = 1.0 Hz, 1H),

8.96 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.87 (s, 2H), 8.47 - 8.30 (m, 2H), 8.18 (dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 243.1.

[1765] **중간체(2c)(반응식 2): 2,4-디클로로피리도[3,4-d]피리미딘**

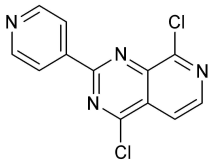
[1766] 

[1767] **단계 A:** 요소(40.00 g, 666.00 mmol) 및 3-아미노이소니코틴산(**2a**, 18.40 g, 133.20 mmol)의 혼합물을 1 hr 동안 210℃에서 가열하였다(주: 용매는 사용하지 않았다). NaOH(2 N, 320 ㎖)를 첨가하고, 혼합물을 1 h 동안 90℃에서 교반하였다. 고체를 여과에 의해 수집하고, 물로 세척하였다. 이렇게 수득한 미정제 산물을 HOAc(400 ㎖) 중에 현탁하고, 1 h 동안 100℃에서 교반하였다. 혼합물을 RT로 냉각하고, 여과하고, 고체를 다량의 물로 세척한 후, 진공 하에 건조하여 피리도[3,4-d]피리미딘-2,4(1H,3H)-디온(**2b**, 17.00 g, 78% 수율)을 추가 정제 없이 얻었다. LCMS (m/z $[M+H]^+$): 164.0.

[1768] **단계 B:** 톨루엔(200 ㎖) 중 피리도[3,4-d]피리미딘-2,4(1H,3H)-디온(**2b**, 20.00 g, 122.60 mmol) 및 $POCl_3$(328.03 g, 2.14 mol)의 혼합물에 DIEA(31.69 g, 245.20 mmol)를 적가하고 상기 반응 혼합물을 하룻밤(18 hr) 동안 25℃에서 교반하여 현탁액을 얻었다.

[1769] 용매 및 $POCl_3$을 진공 하에 제거하고, DCM(50 ㎖)으로 희석하고, -20℃에서 pH=7까지 DIEA로 중화하고, 다시 농축하고, 잔류물을 칼럼(20~50% EA/PE)에 의해 정제하여 산물(**2c**, 20.00 g, 99.99 mmol, 82% 수율)을 노란색 고체로 얻었다. 1H NMR (400 MHz, 클로로포름-*d*) δ 9.52 (s, 1 H), 8.92 (d, *J*=5.6 Hz, 1 H), 8.04 (d, *J*=5.6 Hz, 1 H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 200.0.

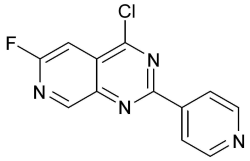
[1770] **중간체(3c)(반응식 3): 4,8-디클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘**

[1771] 

[1772] **단계 A:** 20 ㎖ 마이크로파 반응기에 DMA(용량: 10 ㎖) 중 3-아미노이소니코틴아미드(**3a**, 650 mg, 3.79 mmol), 및 이소니코틴알데하이드(487 mg, 4.55 mmol), 나트륨 바이설파이트(788 mg, 7.58 mmol)를 첨가하여 노란색 현탁액을 얻었다. 반응 혼합물을 10분 동안 160℃에서 마이크로파 하에 교반하였다. 반응 혼합물을 물로 희석하고, 여과하고, MeOH 및 에테르로 세척하였다. 고체를 수집하여 산물(**3b**)(8-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-올, 300 mg, 29%)을 얻었다. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.86 - 8.80 (m, 2H), 8.45 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.18 - 8.12 (m, 2H), 8.00 (d, J = 5.1 Hz, 1H).

[1773] **단계 B:** 20 ㎖ 마이크로파 반응기에서 (8-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-올(**3b**, 300 mg, 1.160 mmol), 및 페닐포스폰산 디클로라이드(1 ㎖, 7.13 mmol)를 혼합하여 노란색 현탁액을 얻었다. 반응 혼합물을 60분 동안 170℃에서 마이크로파 하에 교반하였다. 반응 혼합물을 물로 희석하고 여과하였다. 고체를 물, MeOH 및 에테르로 세척하여 표제 화합물(**3c**)을 얻었다(78%). 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.05 - 8.96 (m, 2H), 8.52 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 8.46 - 8.38 (m, 2H), 8.05 (d, J = 5.1 Hz, 1H). (NMR 샘플에 1방울의 TFA를 첨가하였고, 다르게는, 2세트의 피크가 관찰되었다). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 277.0.

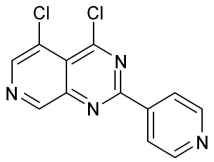
[1774] **중간체 4c(반응식 4, 중간체 4c, 식 중 X는 F이고 A는 4-피리디닐임): 4-클로로-6-플루오로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘**

[1775] 

[1776] **단계 A:** MeOH(30 ㎖) 중 이소니코티노니트릴(800 mg, 7.69 mmol)의 용액을 1 hr 동안 r.t에서 나트륨 메톡시드(0.474 ㎖, 5.4 M, 2.56 mmol)로 처리하였다. 이어서 5-아미노-2-플루오로이소니코틴산(1.0 g, 6.41 mmol)을 첨가하고 생성 혼합물을 24시간 동안 환류하였다. r.t로 냉각 후, 고체 산물을 여과에 의해 수집하였다. 이를 EtOAc로 세척한 후 진공 하에 건조하여 6-플루오로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-올(**4b**, 756 mg, 48.7%)을 산출하였다. 1H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ 8.89 (s, 1H), 8.81 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 8.14 - 8.06 (m, 2H), 7.74 (d, J = 2.3 Hz, 1H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 243.10.

[1777] **단계 B:** DCE(40 ㎖) 중 6-플루오로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-올(**4b**, 750 mg, 3.1 mmol)의 혼합물에 티오닐 클로라이드(1.81 ㎖, 24.8 mmol) 및 DMF(0.1 ㎖)를 첨가하였다. 이어서 혼합물을 85℃에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축하고 하룻밤 동안 진공 하에 건조하였다. 미정제 산물(950 mg)을 추가 워크업 또는 정제 없이 다음 단계 반응에 사용하였다. LCMS (m/z $[M+H]^+$): 261.10.

[1778] **중간체(5d)(반응식 5): 4,5-디클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘**

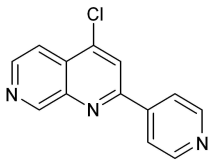
[1779] 

[1780] **단계 A:** DMF(30 ㎖) 중 3-브로모-5-플루오로이소니코틴산(**5a**, 1.87 g, 8.5 mmol) 및 HATU(4.85 g, 12.75 mmol)의 혼합물에 DIEA(4.5 ㎖)를 첨가하고, 혼합물을 20분 동안 r.t.에서 교반한 후, 이소니코틴이미드아미드(1.236 g, 10.2 mmol)를 첨가하였다. 교반을 r.t에서 추가 15시간 동안 계속하였다. 반응 혼합물을 감압 하에서 농축하였다. 이어서 담갈색 시럽 미정제 혼합물을 DCM 중에 용해시키고 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하고(0~10% MeOH/용매 A로 용출하였고, 용매 A는 4리터 DCM 및 8 ㎖의 MeOH 중 7 N 암모니아 용액의 혼합물임), 분획 66~80을 풀링하고 농축하여 요망되는 산물 3-브로모-5-플루오로-N-(이미노(피리딘-4-일)메틸)이소니코틴아미드(**5b**)를 산출하였다(566 mg, 20.6%). 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 10.27 (s, 1H), 10.09 (s, 1H), 8.79 - 8.73 (m, 2H), 8.71 (s, 2H), 7.95 - 7.89 (m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 323.0.

[1781] **단계 B:** 20 ㎖ 마이크로파 반응 용기에서 DMA(8 ㎖) 중 3-브로모-5-플루오로-N-(이미노(피리딘-4-일)메틸)이소니코틴아미드(**5b**, 600 mg, 1.857 mmol), DIEA(0.33 ㎖, 1.857 mmol), 탄산칼륨(257 mg, 1.857 mmol) 및 DBU(0.28 ㎖, 1.857 mmol)의 혼합물을 45분 동안 150℃에서 가열하였다(마이크로파 조사). 반응 혼합물을 물(20 ㎖)로 희석하고, EtOAc(3x60 ㎖)로 추출하고, 요망되는 산물은 수상에 남아있었다. 이어서 수상을 역상 ISCO(10~50% CH3CN/물)에 의해 정제하여 요망되는 산물 5-브로모-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-올(**5c**)을 산출하였다(520 mg, 80% 순도, 74%). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 303.0.

[1782] **단계 C:** 5-브로모-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-올(**5c**, 150 mg, 0.495 mmol)을 무수 $CH_3CN$(2 ㎖) 중에 용해시킨 후 $POCl_3$(759 mg, 4.95 mmol)을 첨가하였다. 이어서 반응 혼합물을 16 hr 동안 100℃에서 가열하였다. LCMS는 반응이 완료됨을 나타내었다. 반응을 rt로 냉각하고 용매를 증발시켰다. 잔류물을 빙수(40 ㎖)로 희석한 후, EtOAc(3x40 ㎖)로 추출하였다. 조합한 유기층을 $Na_2SO_4$ 상에서 건조하고, 여과하고, 증발 건조시켜 요망되는 산물 4,5-디클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**5d**)을 산출하고(86%) 산물을 추가 정제 없이 다음 단계에 직접 사용하였다. 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.05 (s, 1H), 8.87 (s, 2H), 8.68 (s, 1H), 8.16 (d, $J$ = 4.9 Hz, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 277.0.

[1783] **중간체 6b(반응식 6, 중간체 6b', 식 중 A는 4-피리디닐임): 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘**

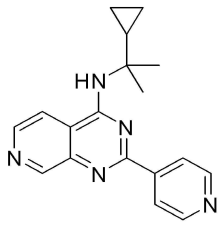
[1784] 

[1785] **단계 A:** 20 ㎖ 마이크로파 반응기에 아세토니트릴(2 ㎖) 중 팔라듐테트라키스(58.1 mg, 0.050 mmol), 탄산칼륨

(1.256 ㎖, 2.51 mmol), 및 2,4-디클로로-1,7-나프티리딘(**6a**, 200 mg, 1.005 mmol) 및 피리딘-4-일보론산(130 mg, 1.055 mmol)을 첨가하여 오렌지색 현탁액을 얻었다. 반응 혼합물을 마이크로파 하에 60분 동안 120℃에서 교반하였다. 미정제 혼합물을 DCM, $H_2O$로 희석하고, 분리하고, DCMx3으로 추출하였다. 유기층을 조합하고, $Na_2SO_4$로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 잔류물을 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물을 얻었다(62%). 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.58 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.85 - 8.78 (m, 4H), 8.32 - 8.29 (m, 2H), 8.11 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 242.1.

[1786] ***화학식 A1의 화합물의 합성***

[1787] **실시예 1: N-(2-사이클로프로필프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민(화합물 1)**

[1788] 

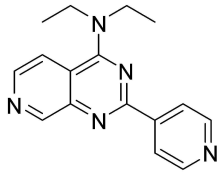
[1789] 표제 화합물을 **반응식 1**에서와 같이 **단계 C**를 사용하여 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(중간체 **1c**)으로부터 제조하였다.

[1790] **단계 C:** 20 ㎖ 바이알에서 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(30 mg, 0.12 mmol)을 실온에서 DMF(0.7 ㎖) 중에 교반하고 $N_2$로 탈기하였다. TEA(19 ㎕, 0.14 mmol)를 첨가하고 5분 동안 교반한 후 KF(7 mg, 0.12 mmol)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 15분 동안 실온에서 교반한 후 2-사이클로프로필프로판-2-아민(0.013 ㎖, 0.12 mmol)을 첨가하고 탈기한 후 2시간 동안 80℃에서 교반하였다. 이어서 반응을 농축하고 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 N-(2-사이클로프로필프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민을 산출하였다(50%). 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.80(d, J = 6.1 Hz, 2H), 8.64(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.40(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 8.29(m, 2H), 7.74(s, 1H), 1.94(m, 1H), 1.52(s, 6H), 0.49(m, 4H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 306.2.

[1791] **실시예 2~110:**

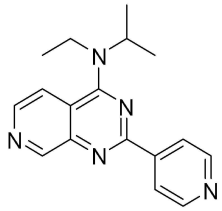
[1792] 아래에 기재되는 **실시예 2~110**을, 특별히 언급된 것을 제외하고, 각각 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(중간체 **1c**) 및 다양한 아민을 사용하여 **실시예 1**에 기재된 프로토콜에 따라 합성하였다.

[1793] **실시예 2: N-(2-사이클로프로필프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[1794] 

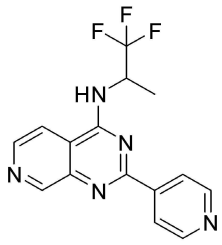
[1795] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.21(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.78(m, 2H), 8.58(d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.31(m, 2H), 7.89(dd, J = 5.9, 0.9 Hz, 1H), 3.90(q, J = 7.0 Hz, 4H), 1.40(t, J = 7.0 Hz, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 280.1.

[1796] 실시예 3: N-에틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[1797] 

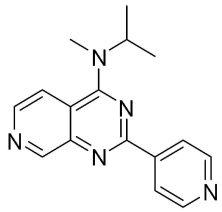
[1798] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.22(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.78(m, 2H), 8.58(d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.30(m, 2H), 7.88(dd, J = 5.8, 0.8 Hz, 1H), 4.95-4.90(m, 1H), 3.81(q, J = 6.9 Hz, 2H), 1.40(s, 3H), 1.38(s, 3H), 1.35(m, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 294.2.

[1799] 실시예 4: 2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[1800] 

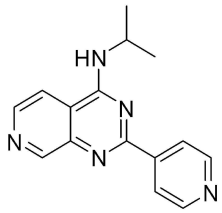
[1801] 1H NMR (400MHz, CDCl3) δ 9.45(d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.83(m, 2H), 8.78(d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.70-8.60(m, 2H), 7.63(s, 1H), 5.98-5.92(m, 1H), 5.80-5.75(m, 1H), 1.81(d, J = 7.0 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 320.1.

[1802] 실시예 5: N-메틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[1803] 

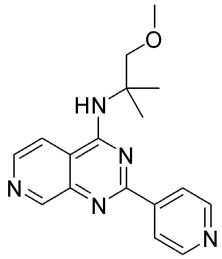
[1804] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.20(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.78(m, 2H), 8.55(d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.31(m, 2H), 8.03(dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 5.15-5.10(m, 1H), 3.34(s, 3H), 1.35(d, J = 6.6 Hz, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 280.2.

[1805] 실시예 6: N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[1806] 

[1807] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.18(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.76(m, 2H), 8.64(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.50(d, J = 7.5 Hz, 1H), 8.32(m, 2H), 8.28(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 4.74-4.67(d, J = 6.7 Hz, 1H), 1.36(d, J = 6.6 Hz, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 266.1.

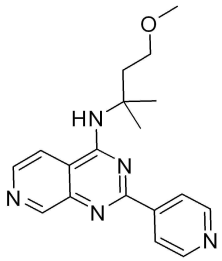
[1808] 실시예 7: N-(1-메톡시-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[1809]

[1810] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.80(m, 2H), 8.64(d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.40(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 8.29(m, 2H), 7.74(s, 1H), 3.85(s, 2H), 3.28(s, 3H), 1.60(s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 310.2.

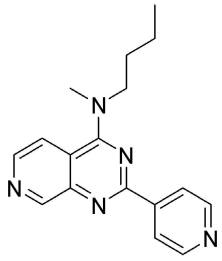
[1811] 실시예 8: N-(4-메톡시-2-메틸부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[1812]

[1813] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19(d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.80(m, 2H), 8.65(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.30(m, 2H), 8.28(m, 1H), 7.85(s, 1H), 3.48(t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.20(s, 3H), 2.35(t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.64(s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 324.2.

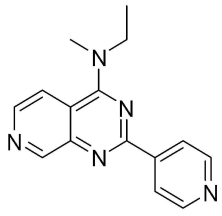
[1814] 실시예 9: N-부틸-N-메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[1815]

[1816] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.21(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.77(m, 2H), 8.55(d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.31(m, 2H), 8.08(dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 3.92(m, 2H), 3.54(s, 3H), 1.82-1.75(m, 2H), 1.48-1.36(m, 2H), 0.98(t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 294.2.

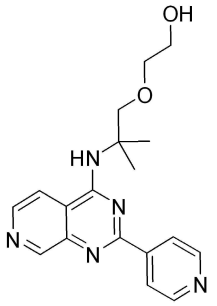
[1817] 실시예 10: N-에틸-N-메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



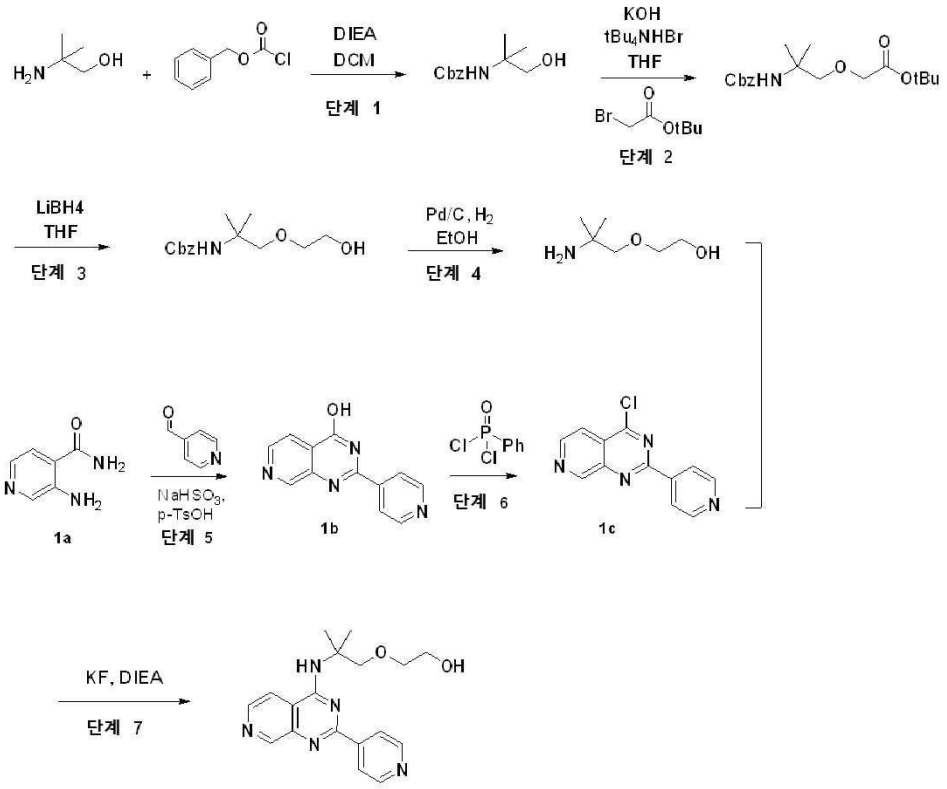
[1818]

[1819] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.21(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.78(m, 2H), 8.55(d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.31(m, 2H), 8.05(dd, J = 5.9, 0.9 Hz, 1H), 3.94(q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.50(s, 3H), 1.39(t, J = 7.0 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 266.1.

[1820] 실시예 11: 2-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)에탄-1-올



[1821]




[1822]

[1823] **단계 1:** 0℃에서 40 ㎖ 바이알에 8 ㎖의 건조 DCM 중 2-아미노-2-메틸프로판-1-올(1.5 g, 16.8 mmol)을 첨가하였다. DIEA(3.2 ㎖, 18.5 mmol)에 이어 벤질 카보노클로리데이트(2.37 ㎖, 16.8 mmol)를 일부씩 첨가하였다. 반응 혼합물을 2시간 동안 교반하며 실온까지 느리게 가온하였다. 용매를 기류 하에 증발시켰다. 잔류물을 0~50% EtOAc/헥산을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 벤질-(1-하이드록시-2-메틸프로판-2-일)카바메이트를 산출하였다(90%). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 224.3.

[1824] **단계 2:** 20 ㎖ 바이알에 5 ㎖의 건조 THF 중 벤질-(1-하이드록시-2-메틸프로판-2-일)카바메이트(0.63 g, 2.8 mmol)를 첨가하였다. 0.5 ㎖의 $H_2O$ 중 수산화칼륨(0.16 g, 2.8 mmol), 이어서 tert-부틸 2-브로모아세테이트(0.62 ㎖, 4.2 mmol) 및 테트라부틸암모늄 브로마이드(90 mg, 0.28 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 30℃에서 하룻밤 동안 교반하였다. 용매를 기류 하에 증발시켰다. 잔류물을 0~40% EtOAc/헥산을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 tert-부틸 2-(2-(((벤질옥시)카보닐)아미노)-2-메틸프로폭시)아세테이트를 산출하였다(35%). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 338.4.

[1825] **단계 3:** 0℃에서 20 ㎖ 바이알에 1 ㎖의 건조 DMF 중 tert-부틸 2-(2-(((벤질옥시)카보닐)아미노)-2-메틸프로폭시)아세테이트(0.14 g, 0.17 mmol)를 첨가하였다. 리튬 보로하이드리드(0.45 ㎖, 0.91 mmol)를 일부씩 첨가하고 실온에서 4 hr 동안 교반한 후 물로 켄칭하였다. DCM을 추출을 위해 사용하고 용매를 기류 하에 증발시켰다. 잔류물을 0~70% EtOAc/헥산을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 벤질-(1-(2-하이드록시에톡시)-2-메틸프로판-2-일)카바메이트를 산출하였다(35%). LCMS (m/z $[M+H]^+$):

268.3.

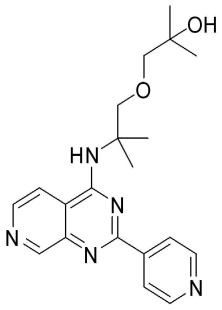
[1826] **단계 4:** 20 mℓ 격벽 밀봉 바이알에 1.2 mℓ의 EtOH 중 벤질-(1-(2-하이드록시에톡시)-2-메틸프로판-2-일)카바메이트(0.03 g, 0.11 mmol)를 첨가하였다. 바이알을 실온에서 $N_2$로 강력히 퍼징하였다. 적게 떠낸 Pd/C(30%, 촉매량)를 조심스럽게 첨가하고 반응을 $N_2$ 하에 유지하였다. 이어서 $H_2$ 풍선을 사용하여 반응 용기를 철저히 플러싱한 후 4 hr 동안 $H_2$ 압력 하에 교반하였다. $H_2$를 반응으로부터 제거한 후 용기를 $N_2$로 퍼징하였다. 이어서 물질을 $Na_2SO_4$ 및 셀라이트를 통해 여과하고 용매를 기류 하에 증발시켰다. 잔류물의 추가 정제는 필요하지 않았다. 2-(2-아미노-2-메틸프로폭시)에탄올(95%). 1H NMR (500 MHz, 클로로포름-d) δ 3.76 - 3.73 (m, 2H), 3.62 - 3.59 (m, 2H), 3.26 (s, 2H), 1.27 (s, 2H), 1.20 (d, J = 4.6 Hz, 1H), 1.11 (s, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 134.2.

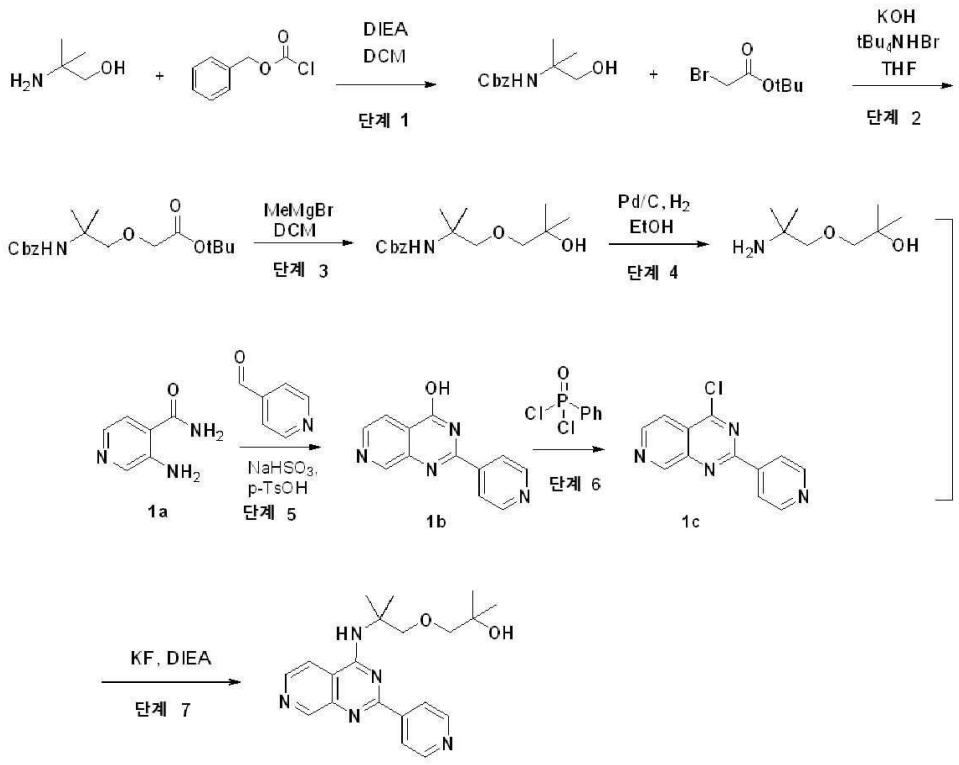
[1827] **단계 5:** 20 mℓ 마이크로파 바이알에 DMA(용량: 5 mℓ) 중 3-아미노이소니코틴아미드(**1a**, 2 g, 14.58 mmol), 이소니코틴알데하이드(1.521 mℓ, 16.04 mmol), 나트륨 바이설파이트(1.821 g, 17.50 mmol) 및 4-메틸벤젠설폰산 수화물(0.277 g, 1.458 mmol)을 첨가하여 오렌지색 현탁액을 얻었다. 반응물을 잘 교반하고 12분 동안 160℃에서 마이크로파로 가열하였다. 반응 혼합물을 물로 희석하고 여과하였다. 고체를 물, MeOH 및 에테르로 세척하여 2.03 g 회백색 고체를 산물(**1b**)로서 얻었다(59%). 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.88 - 8.78 (m, 2H), 8.73 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.16 - 8.08 (m, 2H), 8.03 (dd, J = 5.2, 0.9 Hz, 1H).

[1828] **단계 6:** 5 mℓ 마이크로파 반응기에서 2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-올(**1b,** 500 mg, 2.230 mmol) 및 페닐포스폰산 디클로라이드(1564 ㎕, 11.15 mmol)로 갈색 현탁액을 얻었다. 반응 혼합물을 30분 동안 170℃에서 교반하였고 이 때 LCMS는 완전 전환을 시사하였다. 반응 혼합물을 얼음/물로 켄칭하고 포화 $Na_2CO_3$로 중화시킨 후, DCMx3으로 추출하여 산물(**1c**)을 얻었다(74%). 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.65 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 8.96 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.87 (s, 2H), 8.47 - 8.30 (m, 2H), 8.18 (dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 243.1.

[1829] **단계 7:** 20 mℓ 바이알에서 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**)(150 mg, 0.618 mmol)을 실온에서 DMSO(1.5 mℓ) 중에 교반하고 $N_2$로 탈기하였다. DIEA(324 ㎕, 1.85 mmol)를 첨가하고 5분 동안 교반한 후 KF(36 mg, 0.618 mmol)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 15분 동안 실온에서 교반한 후, 2-(2-아미노-2-메틸프로폭시)에탄올(99 mg, 0.74 mmol)을 첨가하고 탈기한 후 30분 동안 60℃에서 교반하였다. 이어서 반응을 농축하고 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물을 산출하였다(25%). 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.80(m, 2H), 8.64(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.35(m, 1H), 8.29(m, 2H), 7.76(s, 1H), 4.64-4.59(m, 1H), 3.90(s, 2H), 3.50-3.44(m, 4H), 1.61(s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 340.2

[1830] **실시예 12: 2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올**

[1831] 




[1832]

[1833] **단계 1:** 0℃에서 40 mℓ 바이알에 8 mℓ의 건조 DCM 중 2-아미노-2-메틸프로판-1-올(1.5 g, 16.8 mmol)을 첨가하였다. DIEA(3.2 mℓ, 18.5 mmol)에 이어 벤질 카보노클로리데이트(2.37 mℓ, 16.8 mmol)를 일부씩 첨가하였다. 반응 혼합물을 2시간 동안 교반하며 실온까지 느리게 가온하였다. 용매를 기류 하에 증발시켰다. 잔류물을 0~50% EtOAc/헥산을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 벤질-(1-하이드록시-2-메틸프로판-2-일)카바메이트를 산출하였다(90%). 1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 7.41 - 7.29 (m, 5H), 5.06 (s, 2H), 4.97 - 4.83 (m, 1H), 4.70 (s, 1H), 3.62 (s, 2H), 1.34 - 1.19 (m, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 224.3.

[1834] **단계 2:** 20 mℓ 바이알에 5 mℓ의 건조 THF 중 벤질-(1-하이드록시-2-메틸프로판-2-일)카바메이트(0.63 g, 2.8 mmol)를 첨가하였다. 0.5 mℓ의 $H_2O$ 중 수산화칼륨(0.16 g, 2.8 mmol), 이어서 tert-부틸 2-브로모아세테이트(0.62 mℓ, 4.2 mmol) 및 테트라부틸암모늄 브로마이드(90 mg, 0.28 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 30℃에서 하룻밤 동안 교반하였다. 용매를 기류 하에 증발시켰다. 잔류물을 0~40% EtOAc/헥산을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 tert-부틸 2-(2-(((벤질옥시)카보닐)아미노)-2-메틸프로폭시)아세테이트를 산출하였다(35%). 1H NMR (500 MHz, 클로로포름-d) δ 7.39 - 7.28 (m, 5H), 5.52 (s, 1H), 5.06 (s, 2H), 3.96 (s, 2H), 3.45 (s, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.36 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 338.4.

[1835] **단계 3:** tert-부틸 2-(2-(((벤질옥시)카보닐)아미노)-2-메틸프로폭시)아세테이트(700 mg, 4.15 mmol)를 10분 동안 얼음조에서 DCM(5 mℓ) 중에 교반하였다. 메틸 마그네슘 브로마이드(30 mℓ, 42 mmol)를 일부씩 느리게 첨가한 후 2 hr에 걸쳐 실온으로 가온하면서 교반하였다. 반응을 물로 켄칭한 후 DCM으로 3회 추출하였다. 유기층을 조합하고, 농축하고, 0~50% EtOAc/헥산을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 벤질 (1-(2-하이드록시-2 메틸프로폭시)-2-메틸프로판-2-일)카바메이트를 산출하였다(55%). LCMS [M+H] = 296.4.

[1836] **단계 4:** 20 mℓ 격벽 밀봉 바이알에 1.2 mℓ의 EtOH 중 벤질 (1-(2-하이드록시-2-메틸프로폭시)-2-메틸프로판-2-일)카바메이트(0.03 g, 0.11 mmol)를 첨가하였다. 바이알을 실온에서 $N_2$로 강력히 퍼징하였다. 적게 떠낸 Pd/C(30%, 촉매량)를 조심스럽게 첨가하고 반응을 $N_2$ 하에 유지하였다. 이어서 $H_2$ 풍선을 사용하여 반응 용기를 철저히 플러싱한 후 4 hr 동안 $H_2$ 압력 하에 교반하였다. $H_2$를 반응으로부터 제거한 후 용기를 $N_2$로 퍼징하였다.

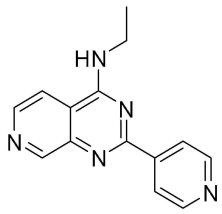
이어서 물질을 $Na_2SO_4$ 및 셀라이트를 통해 여과하고 용매를 기류 하에 증발시켰다. (1-(2-아미노-2-메틸프로폭시)-2-메틸프로판-2-올)(95%)을 산출하기 위해 잔류물의 추가 정제는 필요하지 않았다. 1H NMR (500 MHz, 클로로포름-d) δ 3.32 (s, 2H), 3.26 (s, 2H), 1.22 (s, 6H), 1.12 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 162.2.

[1837] **단계 5:** 20 mℓ 마이크로파 바이알에 DMA(용량: 5 mℓ) 중 3-아미노이소니코틴아미드(**1a**, 2 g, 14.58 mmol), 이소니코틴알데하이드(1.521 mℓ, 16.04 mmol), 나트륨 바이설파이트(1.821 g, 17.50 mmol) 및 4-메틸벤젠설폰산 수화물(0.277 g, 1.458 mmol)을 첨가하여 오렌지색 현탁액을 얻었다. 반응물을 잘 교반하고 12분 동안 160℃에서 마이크로파로 가열하였다. 반응 혼합물을 물로 희석하고 여과하였다. 고체를 물, MeOH 및 에테르로 세척하여 2.03 g 회백색 고체를 산물(**1b**)로서 얻었다(59%). 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.88 - 8.78 (m, 2H), 8.73 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.16 - 8.08 (m, 2H), 8.03 (dd, J = 5.2, 0.9 Hz, 1H).

[1838] **단계 6:** 5 mℓ 마이크로파 반응기에서 2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-올(**1b**, 500 mg, 2.230 mmol) 및 페닐포스폰산 디클로라이드(1564 ㎕, 11.15 mmol)로 갈색 현탁액을 얻었다. 반응 혼합물을 30분 동안 170℃에서 교반하였고 이 때 LCMS는 완전 전환을 시사하였다. 반응 혼합물을 얼음/물로 켄칭하고 포화 $Na_2CO_3$로 중화시킨 후, DCMx3으로 추출하여 산물(**1c**)을 얻었다(74%). 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.65 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 8.96 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.87 (s, 2H), 8.47 - 8.30 (m, 2H), 8.18 (dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 243.1.

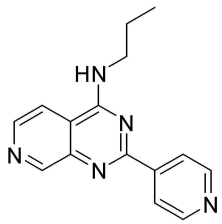
[1839] **단계 7:** 20 mℓ 바이알에서 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(중간체 **1c**)(25 mg, 0.10 mmol)을 실온에서 DMSO(0.7mℓ) 중에 교반하고 $N_2$로 탈기하였다. DIEA(43 ㎕, 0.25 mmol)를 첨가하고 5분 동안 교반한 후 KF(6 mg, 0.10 mmol)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 15분 동안 실온에서 교반한 후, 2(1-(2-아미노-2-메틸프로폭시)-2-메틸프로판-2-올)(0.013 mℓ, 0.12 mmol)을 첨가하고 탈기한 후 30분 동안 60℃에서 교반하였다. 이어서 반응을 농축하고 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물을 산출하였다(50%). 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.79 (m, 2H), 8.64 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.37 (dd, 5.7, 0.9 Hz, 1H), 8.30 (m, 2H), 7.80 (s, 1H), 4.40 (s, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.17 (s, 2H), 1.61 (s, 6H), 0.99 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 368.2.

[1840] **실시예 13: N-에틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[1841] 

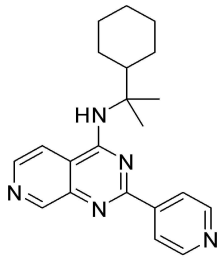
[1842] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19(d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.84(m, 1H), 8.76(m, 2H), 8.65(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.34(m, 2H), 8.18(dd, J = 5.6, 0.9 Hz, 1H), 3.77-3.69(qd, J = 7.2, 5.4 Hz, 2H), 1.31(t, J = 7.2 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 252.1.

[1843] **실시예 14: N-프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[1844] 

[1845] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.82(t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.78(m, 2H), 8.64(d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.33(m, 2H), 8.19(dd, J = 5.6, 0.9 Hz, 1H), 3.70-3.62(td, J = 7.0, 5.7 Hz, 2H), 1.80-1.70(m, 2H), 1.00(t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 266.1.

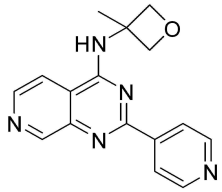
[1846] 실시예 15: N-(2-사이클로헥실프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[1847]

[1848] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.16(d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.80(m, 2H), 8.62(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.40(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 8.28(m, 2H), 7.62(s, 1H), 1.76-1.70(m, 4H), 1.62-1.59(m, 1H), 1.52(s, 6H), 1.18-1.04(q, J = 11.8, 10.9 Hz, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 348.2.

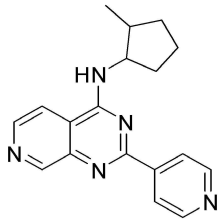
[1849] 실시예 16: N-(3-메틸옥세탄-3-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[1850]

[1851] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.21(d, J = 0.9 Hz, 1H), 9.14(s, 1H), 8.76(m, 2H), 8.68(d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.25(m, 2H), 8.16(dd, J = 5.6 Hz, 1H), 4.90(d, J = 6.3 Hz, 2H), 4.64(d, J = 6.5 Hz, 2H), 1.82(s, 3H)). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 294.1.

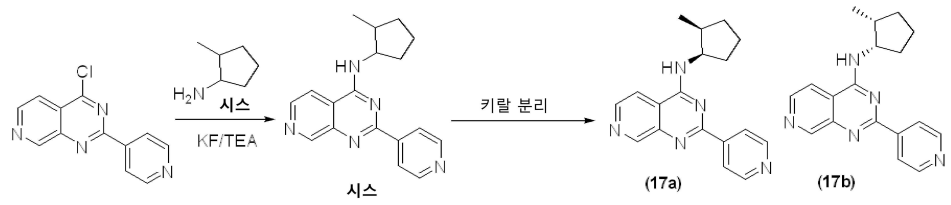
[1852] 실시예 17: N-(2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[1853]

[1854] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19(d, J = 1.0 Hz, 1H), 8.78(m, 2H), 8,66(m, 1H), 8.33(m, 2H), 8.32(m, 1H), 7.91(m, 1H), 4.45-4.42(m, 1H), 2.20-2.14(m, 1H), 1.98-1.82(m, 2H), 1.80-1.72(m, 2H), 1.70-1.62(m, 1H), 1.50-1.42(m, 1H), 0.91(d, J = 7.0 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 306.2.

[1855] 실시예 17b: N-((1R,2S)-2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민(17a) 및 N-((1S,2R)-2-메틸사이클로펜틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민(17b)




[1856]

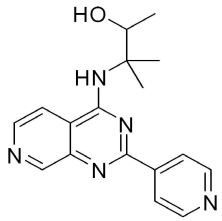
[1857] DMF(10 ㎖) 중 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(130 ㎎, 0.536 mmol)의 용액에 TEA(0.23 ㎖, 1.61 mmol) 및 KF(32.7 ㎎, 0.56 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 5분 동안 교반한 후 시스-2-메틸사이클로펜탄아민 하이드로클로라이드(72.7 ㎎, 0.536 mmol)를 첨가하였다. 이어서 생성된 혼합물을 50℃에서 2시간 동안 교반하였다. 그 후, 미정제 혼합물을 실리카 겔 크로마토그래피에 의해 정제하여 109 ㎎ 산물을 산출하였다. 100 ㎎의 상기 물질로 키랄 분리를 거쳐 2개의 시스 이성질체, 피크 1($T_R$ = 1.46분) 이성질체 35 ㎎, 피크 2($T_R$ =1.95

분) 이성질체 46 mg을 산출하였다. 키랄 중심 할당은 임시적인 키랄 분리 조건: 용매 A $CO_2$(80%), 용매 B MeOH+0.1% $NH_4Cl$(20%), 유속 2 mℓ/분, 칼럼 21×250 mm AD-H, 구동 시간 6분 스태킹 주사, 10분 용출 시간이다.

[1858] 피크 1($T_R$ =1.46분) 이성질체: 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.19 (s, 1H), 8.77 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 8.66 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.40 (dd, J = 5.7, 0.8 Hz, 1H), 8.36 - 8.29 (m, 3H), 4.86 (p, J = 7.5 Hz, 1H), 2.09 (dtd, J = 11.7, 8.1, 3.4 Hz, 1H), 1.89 (dddq, J = 29.7, 12.7, 8.4, 3.8 Hz, 3H), 1.66 - 1.53 (m, 1H), 1.51 - 1.41 (m, 1H), 0.83 (d, J = 7.1 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 306.2.

[1859] 피크 2($T_R$ =1.95분) 이성질체: 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.19 (d, J = 0.7 Hz, 1H), 8.80 - 8.74 (m, 2H), 8.66 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.40 (dd, J = 5.7, 0.8 Hz, 1H), 8.36 - 8.29 (m, 3H), 4.86 (p, J = 7.6 Hz, 1H), 2.09 (dp, J = 12.4, 4.6, 4.2 Hz, 1H), 1.98 - 1.79 (m, 3H), 1.66 - 1.54 (m, 1H), 1.50 - 1.41 (m, 1H), 0.83 (d, J = 7.1 Hz, 3H). ). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 306.2.

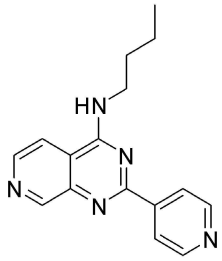
[1860] **실시예 18: 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-2-올**



[1861]

[1862] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.17(d, J = 5.4 Hz, 1H), 8.79(m, 2H), 8.63(m, 1H), 8.33(m, 1H), 8.28(dd, J = 5.4, 0.8 Hz, 2H), 7.58(s, 1H), 5.00(d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.30-4.26(m, 1H), 1.29(s, 3H), 1.27(s, 3H), 1.05(d, J = 6.7 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 310.2.

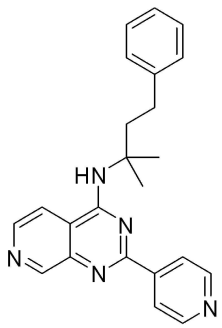
[1863] **실시예 19: N-부틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[1864]

[1865] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19(d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.82(m, 1H), 8.78(m, 2H), 8.65(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.34(m, 2H), 8.20(dd, J = 5.6, 0.9 Hz, 1H), 3.75-3.68(td, 7.2, 5.6 Hz, 2H), 1.78-1.69(m, 2H), 1.50-1.40(m, 2H), 0.98(t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 280.2.

[1866] **실시예 20: N-(2-메틸-4-페닐부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

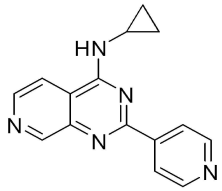


[1867]

[1868] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.78(m, 2H), 8.63(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.40(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 8.30(m, 2H), 7.79(s, 1H), 7.13-7.04(m, 5H), 2.61-2.56(dd, J = 10.7, 6.0 Hz, 2H),

2.48-2.43(m, 2H), 1.65(s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 370.2.

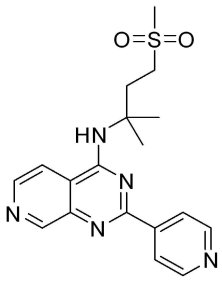
[1869] **실시예 21:** N-사이클로프로필-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[1870]

[1871] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.21(d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.83(m, 1H), 8.78(m, 2H), 8.64(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.40(m, 2H), 8.18(dd, J = 5.6 1.0 Hz, 1H), 3.30-3.22(m, 1H), 0.98-0.94(m, 2H), 0.80-0.76(m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 264.1.

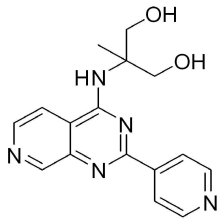
[1872] **실시예 22:** N-(4-메탄설포닐-2-메틸부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[1873]

[1874] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.20(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.79(m, 2H), 8.65(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.39(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 8.30(m, 2H), 7.76(s, 1H), 3.15-3.10(m, 2H), 2.90(s, 3H), 2.65-2.60(m, 2H), 1.61(s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 372.1.

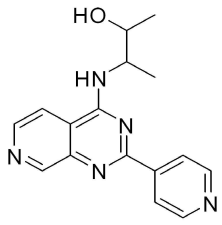
[1875] **실시예 23:** 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1,3-디올



[1876]

[1877] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.18(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.79(m, 2H), 8.63(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.32(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 8.29(m, 2H), 7.38(s, 1H), 4.81(t, J = 6.0 Hz, 2H), 3.97-3.94(dd, J = 10.8, 6.0 Hz, 2H), 3.90-3.82(dd, J = 10.9, 6.2 Hz, 2H), 1.52(s, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 312.1.

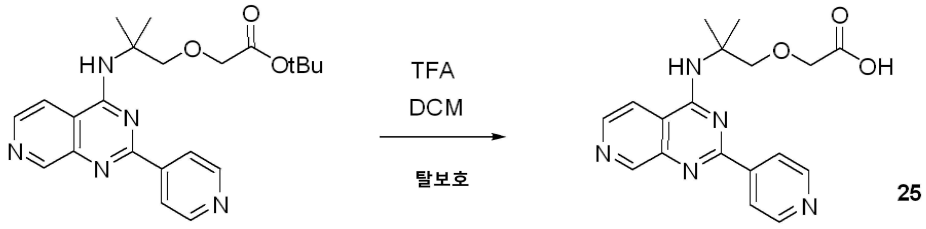
[1878] **실시예 24:** 3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-2-올



[1879]

[1880] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.18(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.77(m, 2H), 8.64(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.38(m, 1H), 8.32(m, 2H), 8.30(s, 1H), 4.80(d, J = 5.5 Hz, 1H), 4.76-4.72(m, 1H), 3.93-3.88(m, 1H), 1.31(d, J = 6.7 Hz, 3H), 1.19(d, J = 6.3 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 296.2.

[1881] **실시예 25:** 2-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로폭시)아세트산

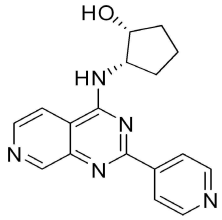



[1882]

[1883] 표제 화합물을 **단계 C**, **실시예 1**에 기재된 바와 같이 tert-부틸 2-(2-아미노-2-메틸프로폭시)아세테이트 및 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘으로부터 제조한 후 tert-부틸 에스테르를 탈보호하였다.

[1884] **탈보호:** tert-부틸 2-(2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)아미노)프로폭시)일)아미노)프로폭시)아세테이트(25 mg, 0.061 mmol)를 2시간 동안 실온에서 DCM 중 TFA의 40% 혼합물 중에 교반하였다. TLC 또는 LCMS에 의해서는 출발 물질이 관찰되지 않았다. 반응을 DCM으로 희석하고 $N_2$ 및 온건한 열로 농축한 후 3회 반복하고, 하룻밤 동안 고진공 하에 두었다. 이들 조건 하의 중간체를 전형적으로 추가 정제 없이 사용하였다. 이어서 이들 조건 하의 표제 화합물을 또한 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.20(d, 0.8 Hz, 1H), 8.80(m, 2H), 8.63(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.33(ddd, J = 10.8, 5.1, 1.2 Hz, 2H), 8.30(m, 1H), 8.19(s, 1H), 4.14(s, 2H), 3.80(s, 2H), 3.16(s, 1H), 1.62(s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 354.2.

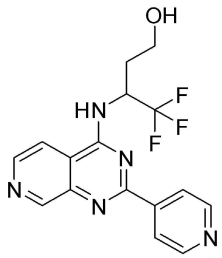
[1885] **실시예 26:** (1R,2S)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜탄-1-올




[1886]

[1887] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.78(m, 1H), 8.65(m, 1H), 8.40(m, 1H), 8.37(m, 1H), 8.32(m, 2H), 4.72(d, J = 3.7 Hz, 1H), 4.60-4.52(ddd, J = 15.9, 9.2, 4.4 Hz, 1H), 4.44-4.40(m, 1H), 2.04-1.98(m, 3H), 1.90-1.82(m, 1H), 1.74-1.56(m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 308.1.

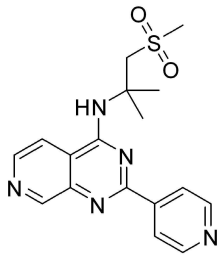
[1888] **실시예 27:** 4,4,4-트리플루오로-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-1-올




[1889]

[1890] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.30(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.85(m, 1H), 8.80(m, 2H), 8.74(m, 1H), 8.39(d, J = 4.3 Hz, 1H), 8.33(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 2H), 5.76-5.70(m, 1H), 4.77-4.70(m, 1H), 3.61-3.55(m, 2H), 2.11-2.08(m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 350.1.

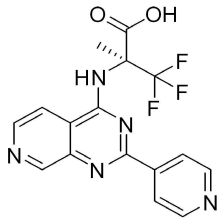
[1891] 실시예 28: N-(1-메탄설포닐-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[1892]

[1893] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.20(d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.79(m, 2H), 8.67(dd, J = 5.9, 4.7 Hz, 1H), 8.40(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 8.30(m, 2H), 8.08(s, 1H), 4.13(s, 2H), 2.90(s, 3H), 1.80(s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 358.1.

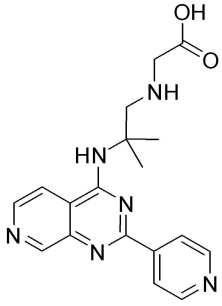
[1894] 실시예 29: (2S)-3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판산



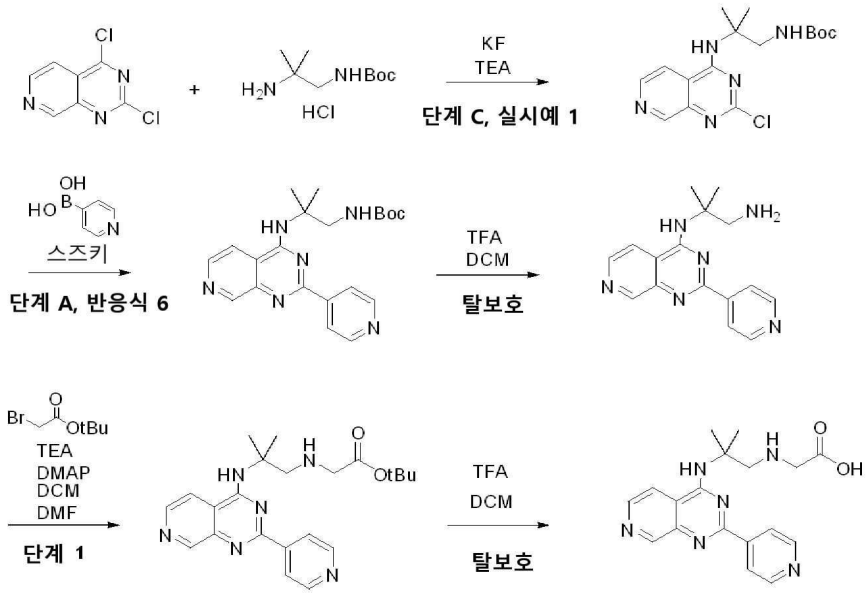
[1895]

[1896] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.23(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.79(m, 2H), 8.76(m, 1H), 8.70(m, 1H), 8.30(dd, J = 5.6, 0.8 Hz, 2H), 7.81(s, 1H), 2.02(s, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 364.1.

[1897] 실시예 30: 2-[(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로필)아미노]아세트산



[1898]

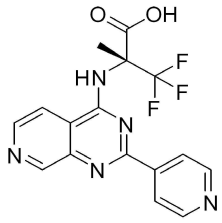



[1899]

[1900] 상기 반응식에 기재된 바와 같이 tert-부틸 2-((2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)아미노)프로필)아미노)아세테이트를 사용하여 표제 화합물을 제조하였다. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.25(m, 1H), 8.82(m, 2H), 8.70(m, 1H), 8.40(m, 1H), 8.35(m, 2H), 7.84(d, J = 9.4 Hz, 1H), 3.89-3.80(d, J = 6.2 Hz, 1H), 3.60-3.56(d, J = 11.0 Hz, 4H), 1.70(s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 353.2.

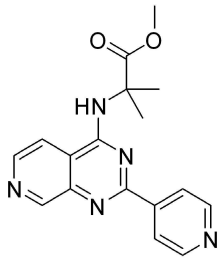
[1901] **단계 1:** 2-메틸-N2-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)프로판-1,2-디아민(20 mg, 0.068 mmol)을 실온에서 DCM/DMF 중에 교반하였다. 21 ㎕의 TEA(21 ㎕, 0.149 mmol)를 첨가하고 3분 동안 교반하였다. 이어서 tert-부틸 2-브로모아세테이트(11 ㎕, 0.071 mmol) 및 촉매량의 DMAP를 첨가하고 4 hr 동안 실온에서 교반하였다. 이어서 반응을 농축하고 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 tert-부틸 2-((2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)아미노)프로필)아미노)아세테이트를 산출하였다(35%). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 409.5.

[1902] **실시예 31: (2R)-3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판산**

[1903] 

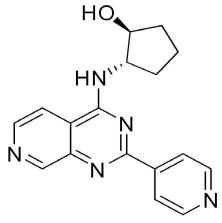
[1904] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.23(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.79(m, 2H), 8.77(m, 1H), 8.70(m, 1H), 8.30(m, 2H), 7.83(s, 1H), 2.02(s, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 364.1.

[1905] **실시예 32: 메틸 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로파노에이트**

[1906] 

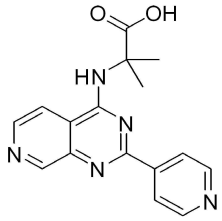
[1907] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.24(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.85(s, 1H), 8.79(m, 2H), 8.70(d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.39(dd, J = 5.7, 1.0 Hz, 1H), 8.25(m, 2H), 3.51(s, 3H), 1.69(s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 324.1.

[1908] **실시예 33: (1S,2S)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜탄-1-올**

[1909] 

[1910] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.78(m, 2H), 8.65(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.51(d, J = 7.0 Hz, 1H), 8.38(m, 1H), 8.36(m, 1H), 8.31(dd, J = 5.6, 0.9, Hz, 1H), 4.92(d, J = 4.6 Hz, 1H), 4.60-4.54(d, J = 7.0 Hz, 1H), 4.26-4.20(m, 1H), 2.32-2.22(ddt, J = 13.2, 8.2, 4.3 Hz, 1H), 2.00-1.92(m, 1H), 1.85-1.72(m, 2H), 1.70-1.56(m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 308.1.

[1911] **실시예 34:** 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판산

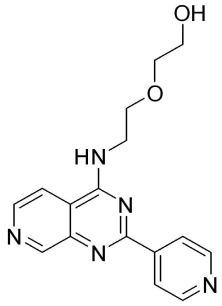


[1912]

[1913] 표제 화합물을 **단계 A, 실시예 25**에 기재된 바와 같이 메틸 2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)아미노)프로파노에이트의 탈보호로부터 제조하였다.

[1914] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.61(s, 1H), 9.20(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.86-8.80(s, 1H), 8.75(m, 2H), 8.67(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.30(m, 2H), 8.28(m, 1H), 1.66(s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 310.1.

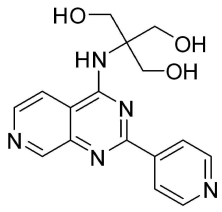
[1915] **실시예 35:** 2-(2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}에톡시)에탄-1-올



[1916]

[1917] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.20(d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.89(t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.76(m, 2H), 8.65(d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.32(m, 2H), 8.20(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 4.60-4.57(m, 1H), 3.89(q, J = 5.7 Hz, 2H), 3.78(t, J = 5.8 Hz, 2H), 3.51-3.48(d, J = 2.9 Hz, 4H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 312.1.

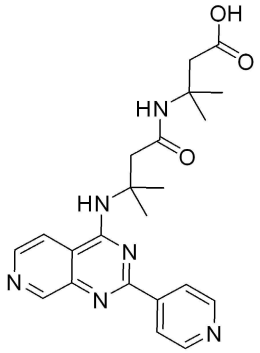
[1918] **실시예 36:** 2-(하이드록시메틸)-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1,3-디올



[1919]

[1920] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.20(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.80(m, 2H), 8.65(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.30(ddd, J = 19.4, 5.1, 1.3 Hz, 1H), 8.26(m, 2H), 7.19(s, 1H), 4.72(t, J = 6.0 Hz, 3H), 4.00(d, J = 6.0 Hz, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 328.1.

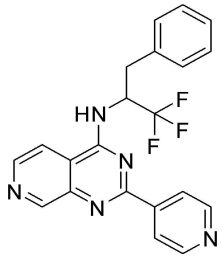
[1921] **실시예 37:** 3-메틸-3-(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄아미도)부탄산



[1922]

[1923] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.20(d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.80(dt, J = 4.5, 1.1 Hz, 2H), 8.64(m, 1H), 8.33(m, 2H), 8.30(m, 1H), 7.90(s, 1H), 1.72(s, 6H), 1.70(s, 2H), 1.30(s, 2H), 1.00(s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 423.2.

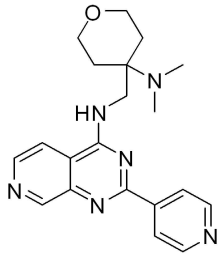
[1924] 실시예 38: 2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-3-페닐프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[1925]

[1926] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.21(d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.99(d, J = 9.0 Hz, 1H), 8.75(m, 2H), 8.71(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.33(m, 1H), 8.30(m, 2H), 7.41(m, 2H), 7.11(m, 2H), 7.02(m, 1H), 5.95-5.86(t, J = 8.2 Hz, 1H), 3.38-3.34(m, 1H), 3.24-3.17(ddt, J = 13.8, 11.7, 0.7 Hz, 1H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 396.1.

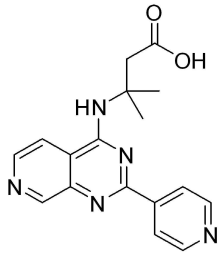
[1927] 실시예 39: N-{[4-(디메틸아미노)옥산-4-일]메틸}-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[1928]

[1929] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.20(s, 1H), 8.78(m, 2H), 8,67(d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.52(s, 1H), 8.33(m, 2H), 8.28(m, 1H), 3.62(t, J = 10.6 Hz, 2H), 3.53(d, J = 10.7 Hz, 2H), 3.27(d, J = 5.3 Hz, 2H), 2.41(s, 6H), 1.80(d, J = 14.1 Hz, 2H), 1.63(t, J = 11.5 Hz, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 365.2.

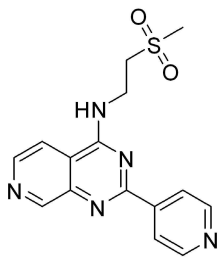
[1930] 실시예 40: 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄산



[1931]

[1932] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.02(s, 1H), 9.20(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.80(m, 2H), 8.66(m, 1H), 8.40(m, 1H), 8.30(m, 2H), 7.99(m, 1H), 3.12-3.08(q, J = 7.3 Hz, 2H), 1.70(s, 6H. LCMS (m/z $[M+H]^+$): 324.1.

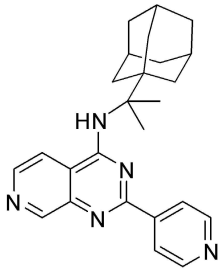
[1933] 실시예 41: N-(2-메탄설포닐에틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[1934]

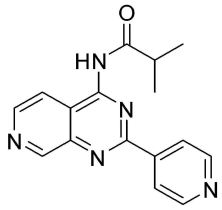
[1935] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.23(s, 1H), 9.10(t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.78(m, 2H), 8.69(d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.39(m, 2H), 8.14(d, J = 5.7 Hz, 1H), 4.13-4.09(q, J = 6.4 Hz, 2H), 3.62(t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.09(s, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 330.1.

[1936] **실시예 42: N-[2-(아다만탄-1-일)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[1937] 

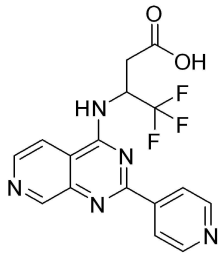
[1938] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.16(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.78(m, 2H), 8.63(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.45(m, 1H), 8.25(m, 2H), 7.06(s, 1H), 1.99-1.96(d, J = 7.5 Hz, 3H), 1.80-1.76(m, 6H), 1.67-1.64(m, 6H), 1.64-1.60(m, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 400.2.

[1939] **실시예 43: 2-메틸-N-[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]프로판아미드**

[1940] 

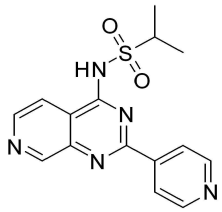
[1941] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 11.08(s, 1H), 9.49(m, 1H), 8.84(m, 2H), 8.80(m, 1H), 8.40(m, 2H), 8.25(dd, J = 5.8, 1.0 Hz, 1H), 3.29-3.18(m, 1H), 1.26(d, J = 6.8 Hz, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 294.1.

[1942] **실시예 44: 4,4,4-트리플루오로-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄산**

[1943] 

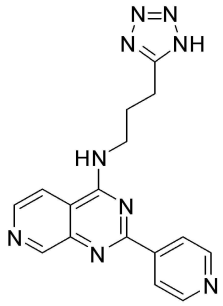
[1944] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.29(d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.80(m, 2H), 8.71(t, J = 4.9 Hz, 1H), 8.34(m, 2H), 8.23(d, J = 5.7 Hz, 1H), 5.84-5.79(m, 1H), 3.65-3.55(d, J = 4.8 Hz, 1H), 2.45-2.41(d, J = 4.7 Hz, 1H), 2.32-2.26(m, 1H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 364.1.

[1945] **실시예 45: N-[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]프로판-2-설폰아미드**

[1946] 

[1947] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.38(s, 1H), 8.88(m, 2H), 8.76(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.40-8.30(m, 3H), 4.20-4.10(q, J = 7.1 Hz, 1H), 1.40(d, J = 6.9 Hz, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 330.1.

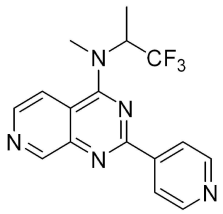
[1948] **실시예 46:** 2-(피리딘-4-일)-N-[3-(1H-1,2,3,4-테트라졸-5-일)프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



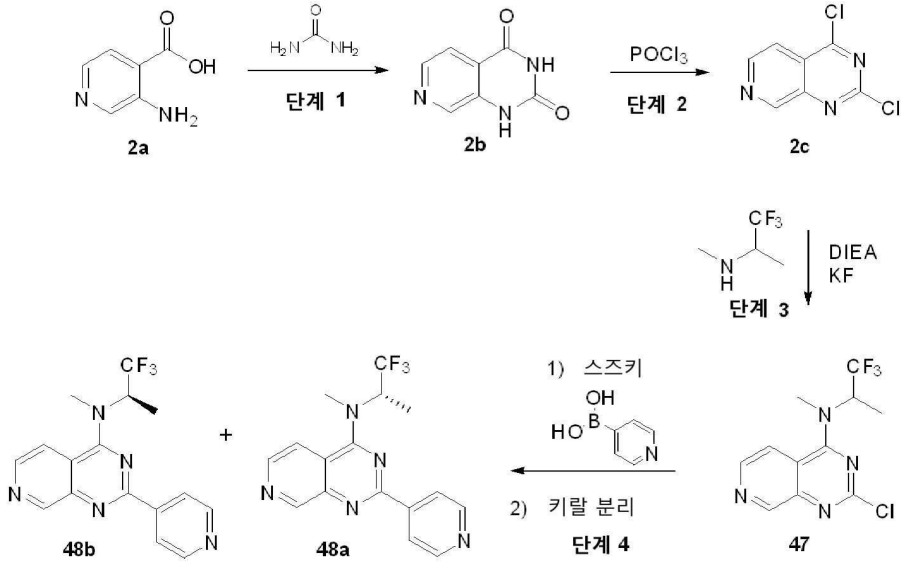
[1949]

[1950] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.21(m, 1H), 9.18(s, 1H), 8.75(m, 2H), 8.64(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.30(m, 2H), 8.21(dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H), 3.81-3.75(td, J = 6.9, 5.3 Hz, 2H), 2.95(t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.18-2.10(m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 334.2.

[1951] **실시예 47:** N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[1952]




[1953]

[1954] **단계 1:** 요소(40.00 g, 666.00 mmol) 및 3-아미노이소니코틴산(**2a**, 18.40 g, 133.20 mmol)의 혼합물을 1 hr 동안 210℃에서 가열하였다(주: 용매는 사용하지 않았다). NaOH(2 N, 320 ㎖)를 첨가하고, 혼합물을 1 h 동안 90℃에서 교반하였다. 고체를 여과에 의해 수집하고, 물로 세척하였다. 이렇게 수득한 미정제 산물을 HOAc(400 ㎖) 중에 현탁하고, 1 h 동안 100℃에서 교반하였다. 혼합물을 RT로 냉각하고, 여과하고, 고체를 다량의 물로 세척한 후, 진공 하에 건조하여 피리도[3,4-d]피리미딘-2,4(1H,3H)-디온(**2b**, 17.00 g, 78% 수율)을 추가 정제 없이 얻었다. LCMS (m/z $[M+H]^+$): 164.0.

[1955] **단계 2:** 톨루엔(200 ㎖) 중 피리도[3,4-d]피리미딘-2,4(1H,3H)-디온(**2b**, 20.00 g, 122.60 mmol) 및 $POCl_3$(328.03 g, 2.14 mol)의 혼합물에 DIEA(31.69 g, 245.20 mmol)를 적가하고 상기 반응 혼합물을 하룻밤(18 hr) 동안 25℃에서 교반하여 현탁액을 얻었다.

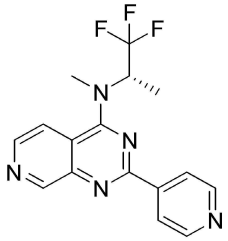
[1956] 용매 및 $POCl_3$을 진공 하에 제거하고, DCM(50 ㎖)으로 희석하고, -20℃에서 pH=7까지 DIEA로 중화하고, 다시 농

축하고, 잔류물을 칼럼(20~50% EA/PE)에 의해 정제하여 2,4-디클로로피리도[3,4-d]피리미딘(**2c**, 20.00 g, 99.99 mmol, 82% 수율)을 노란색 고체로 얻었다. 1H NMR (400 MHz, 클로로포름-*d*) δ 9.52 (s, 1 H), 8.92 (d, *J*=5.6 Hz, 1 H), 8.04 (d, *J*=5.6 Hz, 1 H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 200.0.

[1957] **단계 3:** 20 mℓ 바이알에서 2,4-디클로로피리도[3,4-d]피리미딘(600 mg, 3.0 mmol)을 실온에서 DMSO(0.7 mℓ) 중에 교반하고 $N_2$로 탈기하였다. DIEA(1 mℓ, 6 mmol)를 첨가하고 5분 동안 교반한 후 KF(174 mg, 3 mmol)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 15분 동안 실온에서 교반한 후, 라세미 1,1,1-트리플루오로-N-메틸프로판-2-아민(419 mg, 3.3 mmol)을 첨가하고 탈기한 후 4시간 동안 60℃에서 교반하였다. 이어서 반응을 농축하고 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 2-클로로-N-메틸-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민을 산출하였다(680 mg, 74%). 1H NMR (500 MHz, 아세톤-d6) δ 9.09 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.59 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.22 (dd, J = 5.9, 0.9 Hz, 1H), 5.93 (dddd, J = 15.3, 8.3, 7.0, 1.2 Hz, 1H), 3.61 (q, J = 1.0 Hz, 3H), 1.63 (d, J = 7.0 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 291.7.

[1958] **단계 4:** 20 mℓ 마이크로파 반응기에 아세토니트릴(8 mℓ) 중 팔라듐테트라키스(99 mg, 0.086 mmol), 탄산칼륨(2.15 mℓ, 4.3 mmol), 및 2클로로-N-메틸-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민(500 mg, 1.72 mmol) 및 피리딘-4-일보론산(233 mg, 1.89 mmol)을 첨가하여 노란색 현탁액을 얻었다. 반응 혼합물을 마이크로파 하에 30분 동안 130℃에서 교반하였다. 미정제 혼합물을 DCM, $H_2O$로 희석하고, 분리하고, DCMx3으로 추출하였다. 유기층을 조합하고, $Na_2SO_4$로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 잔류물을 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 **실시예 47**, 라세미 산물을 얻은 후, 키랄 HPLC(상 A로서 85% $CO_2$ 및 상 B로서 5% MeOH를 갖는 21×250 mm OJ-H 칼럼, 유속 2 mℓ/분, 30℃, 3.5분 용출 시간)에 의해 거울상이성질체를 분리하여 **실시예 4ba 및 48b**를 산출하였다.

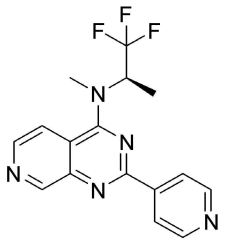
[1959] **실시예 48a: N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[1960]

[1961] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.33 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.86 - 8.75 (m, 2H), 8.63 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.38 - 8.30 (m, 2H), 8.20 (dd, J = 6.0, 0.9 Hz, 1H), 6.11 (qt, J = 8.5, 7.4 Hz, 1H), 3.50 (d, J = 1.1 Hz, 3H), 1.61 (d, J = 7.0 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 334.1. 키랄 HPLC $T_R$ = 1.73분. 절대 입체화학을 X-선 결정 구조에 의해 확인하였다.

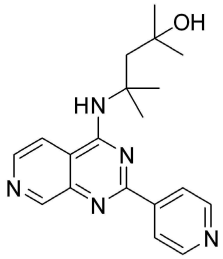
[1962] **실시예 48b: N-메틸-2-(피리딘-4-일)-N-[(2R)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[1963]

[1964] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.33 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.86 - 8.75 (m, 2H), 8.63 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.38 - 8.30 (m, 2H), 8.20 (dd, J = 6.0, 0.9 Hz, 1H), 6.11 (qt, J = 8.5, 7.4 Hz, 1H), 3.50 (d, J = 1.1 Hz, 3H), 1.61 (d, J = 7.0 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 334.1. 키랄 HPLC $T_R$ = 1.25분. 절대 입체화학을 X-선 결정 구조에 의해 확인하였다.

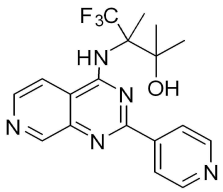
[1965] **실시예 49:** 2,4-디메틸-4-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올



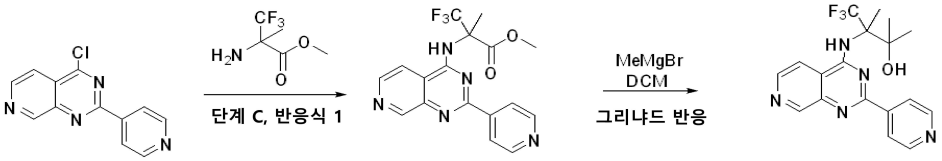
[1966]

[1967] 1H NMR (400 MHz, 아세톤-d6) δ 9.57 (s, 1H), 9.15 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.82 - 8.72 (m, 2H), 8.56 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.44 - 8.37 (m, 2H), 7.69 (dd, J = 5.6, 0.9 Hz, 1H), 2.08 (s, 2H), 1.87 (s, 6H), 1.48 (d, J = 0.8 Hz, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 338.2.

[1968] **실시예 50:** 4,4,4-트리플루오로-2,3-디메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-2-올



[1969]

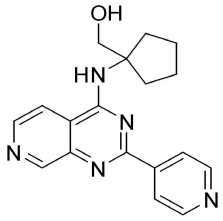



[1970]

[1971] 표제 화합물을 **단계 C**, **실시예 1**에 기재된 바와 같이 메틸 2-아미노-3,3,3-트리플루오로-2-메틸프로파노에이트 하이드로클로라이드 및 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘으로부터 제조한 후, 메틸마그네슘 브로마이드로 그리냐드 반응을 거쳤다.

[1972] 그리냐드 반응: 메틸 3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)아미노)프로파노에이트(7 mg, 0.019 mmol)를 1시간 동안 0℃에서 DCM 중 메틸마그네슘 브로마이드(헥산 중 1.4 M, 0.133 mℓ)와 함께 교반하였다. TLC 또는 LCMS에 의해서는 출발 물질이 관찰되지 않았다. 반응을 MeOH에 의해 켄칭하고 농축하였다. 잔류물을 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물을 얻었다(66%). 1H NMR (500 MHz, 메탄올-d4) δ 9.28 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.77 - 8.71 (m, 2H), 8.67 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.44 - 8.38 (m, 2H), 7.85 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 2.09 (d, J = 1.4 Hz, 3H), 1.55 (t, J = 2.2 Hz, 3H), 1.37 (s, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 378.2.

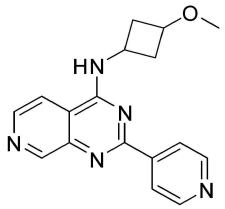
[1973] **실시예 51:** (1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로펜틸)메탄올



[1974]

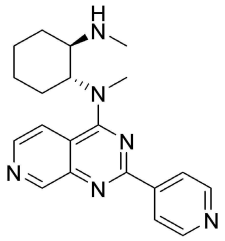
[1975] 1H NMR (500 MHz, 클로로포름-d) δ 9.35 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.82 - 8.75 (m, 2H), 8.65 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.30 - 8.24 (m, 2H), 7.49 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 3.99 (d, J = 4.0 Hz, 2H), 2.19 (td, J = 7.3, 6.7, 2.5 Hz, 4H), 1.94 - 1.78 (m, 4H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 322.2.

[1976] 실시예 52: N-(3-메톡시사이클로부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[1977] 

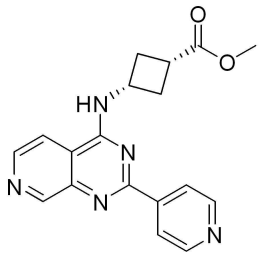
[1978] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.19 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.87 (d, J = 6.4 Hz, 1H), 8.80 - 8.72 (m, 2H), 8.66 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.37 - 8.32 (m, 2H), 8.25 (dd, J = 5.6, 0.9 Hz, 1H), 4.53 - 4.42 (m, 1H), 3.84 - 3.74 (m, 1H), 3.20 (s, 3H), 2.89 - 2.79 (m, 2H), 2.11 (tdd, J = 9.0, 7.5, 2.8 Hz, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 308.1.

[1979] 실시예 53: (1R,2R)-1-N,2-N-디메틸-1-N-[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]사이클로헥산-1,2-디아민

[1980] 

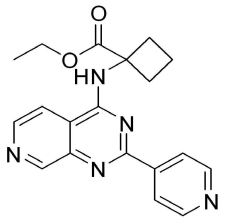
[1981] 1H NMR (500 MHz, 메탄올-d4) δ 9.23 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.73 - 8.68 (m, 2H), 8.53 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.46 - 8.41 (m, 2H), 8.22 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 3.47 (s, 3H), 2.91 (dd, J = 13.0, 9.0 Hz, 1H), 2.39 (s, 3H), 2.30 (dtt, J = 12.6, 5.1, 2.5 Hz, 1H), 2.04 (dp, J = 12.4, 3.1 Hz, 1H), 1.90 (dddd, J = 23.1, 13.0, 5.6, 3.0 Hz, 2H), 1.84 - 1.74 (m, 1H), 1.58 (qt, J = 12.7, 3.5 Hz, 1H), 1.42 (qt, J = 13.2, 3.3 Hz, 1H), 1.33 - 1.23 (m, 1H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 349.2.

[1982] 실시예 54: 메틸 (1s,3s)-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-카복실레이트

[1983] 

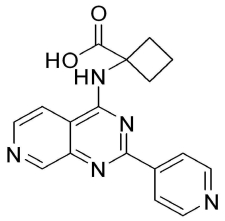
[1984] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.20 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.95 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 8.82 - 8.72 (m, 2H), 8.67 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.34 - 8.28 (m, 2H), 8.25 (dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H), 4.95 (h, J = 7.3 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.27 - 3.21 (m, 1H), 2.72 (dddd, J = 10.7, 8.2, 4.3, 2.5 Hz, 2H), 2.62 - 2.51 (m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 336.1.

[1985] 실시예 55: 에틸 1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-카복실레이트

[1986] 

[1987] 1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 9.27 (dd, J = 12.0, 4.4 Hz, 1H), 8.83 - 8.74 (m, 2H), 8.54 - 8.40 (m, 1H), 8.40 - 8.31 (m, 2H), 7.56 - 7.49 (m, 1H), 4.32 - 4.16 (m, 2H), 3.03 - 2.85 (m, 2H), 2.49 (dddd, J = 11.8, 9.4, 7.1, 2.3 Hz, 2H), 2.31 - 2.11 (m, 2H), 1.22 (dtd, J = 9.6, 7.5, 7.0, 1.8 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 350.2.

[1988] **실시예 56:** 1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-카복실산

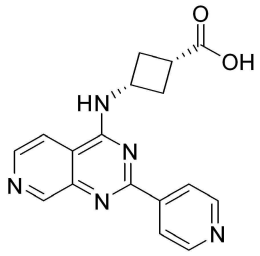


[1989]

[1990] 표제 화합물을 **실시예 55**의 에틸 에스테르의 가수분해에 의해 제조하였다.

[1991] 가수분해: LCMS가 출발 물질이 남아있지 않음을 시사할 때까지 MeOH(2 ㎖) 중 실시예 55(27 mg, 0.077 mmol) 및 리튬 하이드록시드(0.077 ㎖, 0.077 mmol)의 현탁액을 3 hr 동안 90℃에서 교반하였다. 반응 혼합물을 2 ㎖ 1 M HCl로 중화하였다. 수성층을 다시 DCMx5로 추출하였다. 조합한 유기층을 염수로 세척하고, 건조하고, 농축하였다. 잔류물을 DCM/에테르로 세척하여 표제 화합물을 얻었다(92%). 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 12.49 (s, 1H), 9.35 (s, 1H), 9.23 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.80 - 8.72 (m, 2H), 8.70 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.34 (dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H), 8.32 - 8.21 (m, 2H), 2.82 (ddd, J = 13.3, 8.8, 4.9 Hz, 2H), 2.49 - 2.43 (m, 2H), 2.12 - 1.96 (m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 322.1.

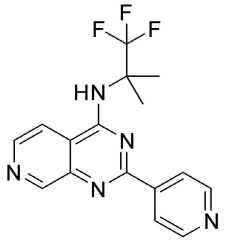
[1992] **실시예 57:** (1s,3s)-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-카복실산



[1993]

[1994] 표제 화합물을 **실시예 56**에 기재된 바와 같은 절차를 사용하여 **실시예 54**의 에틸 에스테르의 가수분해에 의해 제조하였다. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.26 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 9.21 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 9.02 - 8.93 (m, 2H), 8.73 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.66 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 8.38 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 4.92 (q, J = 7.4 Hz, 1H), 3.19 - 3.11 (m, 1H), 2.76 - 2.68 (m, 2H), 2.56 (ddd, J = 12.9, 6.5, 2.7 Hz, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 322.1.

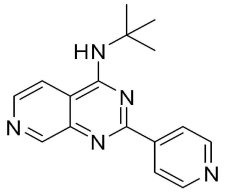
[1995] **실시예 58:** 2-(피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[1996]

[1997] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.27 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.84 - 8.77 (m, 2H), 8.72 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.51 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 8.30 - 8.24 (m, 2H), 7.98 (s, 1H), 1.91 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 334.1.

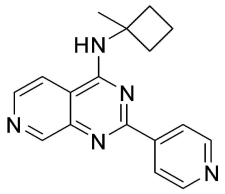
[1998] 실시예 59: N-tert-부틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[1999]

[2000] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.82 - 8.77 (m, 2H), 8.64 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.39 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 8.34 - 8.29 (m, 2H), 7.88 (s, 1H), 1.66 (s, 9H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 280.2.

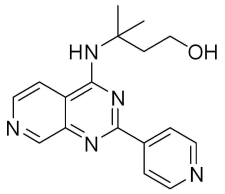
[2001] 실시예 60: N-(1-메틸사이클로부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2002]

[2003] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.17 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.77 (dd, J = 6.3, 1.9 Hz, 2H), 8.63 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.33 - 8.29 (m, 2H), 8.27 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 2.70 - 2.64 (m, 1H), 2.58 - 2.53 (m, 1H), 2.35 - 2.26 (m, 2H), 2.04 - 1.81 (m, 2H), 1.71 (s, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 292.2.

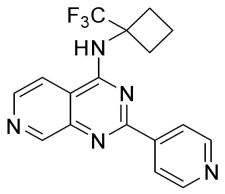
[2004] 실시예 61: 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-1-올



[2005]

[2006] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.19 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.83 - 8.77 (m, 2H), 8.65 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.34 - 8.29 (m, 2H), 8.17 (s, 1H), 8.12 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 4.86 (s, 1H), 3.68 - 3.61 (m, 2H), 2.19 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 1.66 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 310.2.

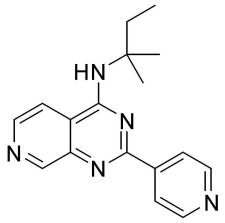
[2007] 실시예 62: 2-(피리딘-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로부틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2008]

[2009] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.26 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.81 - 8.76 (m, 2H), 8.71 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.39 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 8.30 - 8.25 (m, 2H), 2.91 - 2.76 (m, 4H), 2.11 - 1.96 (m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 346.1.

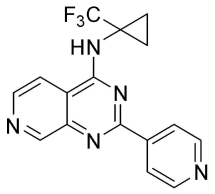
[2010] 실시예 63: N-(2-메틸부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2011]

[2012] 1H NMR (500 MHz, 메탄올-d4) δ 9.19 - 9.12 (m, 1H), 8.72 (ddt, J = 6.3, 4.7, 1.6 Hz, 2H), 8.57 (dd, J = 5.8, 2.6 Hz, 1H), 8.43 (tt, J = 7.3, 3.4 Hz, 2H), 8.24 - 8.17 (m, 1H), 2.23 (qd, J = 6.7, 6.0, 2.6 Hz, 2H), 1.66 (s, 6H), 0.94 (td, J = 7.4, 1.6 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 294.2.

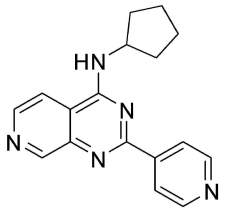
[2013] 실시예 64: 2-(피리딘-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2014]

[2015] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.40 (s, 1H), 9.29 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.83 - 8.78 (m, 2H), 8.71 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.40 - 8.35 (m, 2H), 8.27 (dd, J = 5.7, 1.0 Hz, 1H), 1.65 - 1.55 (m, 2H), 1.41 - 1.37 (m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 332.1.

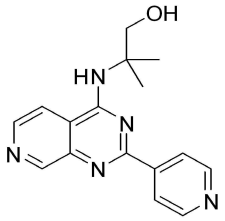
[2016] 실시예 65: N-사이클로펜틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2017]

[2018] 20 ㎖ 바이알에서 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**)(200 mg, 0.82 mmol)을 실온에서 DCM(5 ㎖) 중에 교반하고 $N_2$로 탈기하였다. DIEA(324 ㎕, 1.85 mmol)를 첨가하고 5분 동안 교반한 후 KF(48 mg, 0.82 mmol)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 15분 동안 실온에서 교반한 후, 사이클로펜탄아민(84 mg, 0.99 mmol)을 첨가하고 탈기한 후 16시간 동안 25℃에서 교반하였다. 이어서 반응을 농축하고 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물을 산출하였다(51%). 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) 9.20(s, 1H), 8.78(d, 2H), 8.55(d, 1H), 8.31(d, 2H), 8.03(d, 1H), 5.15-5.10(m, 1H), 3.34(s, 3H), 1.35(s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 292.2.

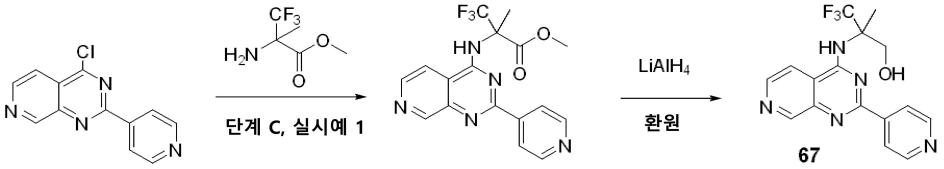
[2019] 실시예 66: 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1-올



[2020]

[2021] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.82 - 8.77 (m, 2H), 8.64 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.38 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 8.30 (dt, J = 4.5, 1.7 Hz, 2H), 7.62 (s, 1H), 4.95 - 4.89 (m, 1H), 3.86 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 1.57 (s, 5H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 296.1.

[2022] **실시예 67: 3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판-1-올**



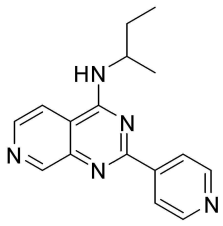

[2023]

[2024] 표제 화합물을 **단계 C**, **실시예 1**에 기재된 바와 같이 메틸 2-아미노-3,3,3-트리플루오로-2-메틸프로파노에이트 하이드로클로라이드 및 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘으로부터 제조한 후, 리튬 알루미늄 하이드리드로 메틸 에스테르를 알코올로 환원시켰다.

[2025] 환원: 메틸 3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)아미노)프로파노에이트(12 mg, 0.032 mmol)를 25시간 동안 0℃에서 THF 중 리튬 알루미늄 하이드리드(4.8 mg, 0.127 mmol)와 함께 교반하였다. TLC 또는 LCMS에 의해서는 출발 물질이 관찰되지 않았다. 반응 혼합물을 DCM/MeOH로 희석하고, $H_2O$ 및 염수로 세척한 후 농축하였다. 잔류물을 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물을 얻었다(17%).

[2026] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 8.37 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 7.86 - 7.81 (m, 2H), 7.74 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.54 - 7.49 (m, 2H), 7.32 (dt, J = 5.7, 1.3 Hz, 1H), 3.77 (d, J = 11.6 Hz, 1H), 3.19 - 3.12 (m, 1H), 1.02 (d, J = 1.2 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 350.1.

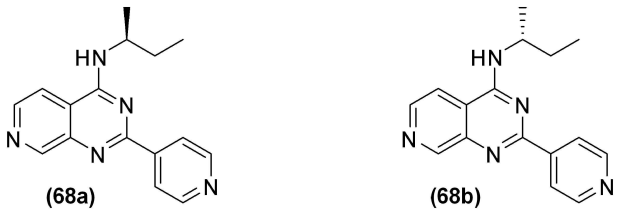
[2027] **실시예 68: N-(부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**




[2028]

[2029] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.80 - 8.74 (m, 2H), 8.65 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.43 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.36 - 8.27 (m, 3H), 4.56 (hept, J = 6.4 Hz, 1H), 1.83 - 1.63 (m, 2H), 1.33 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.97 (t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 280.2.

[2030] **실시예 68a: (S)-N-(sec-부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민(68a) 및 (R)-N-(sec-부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민(68b)**



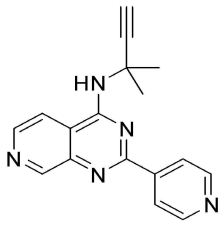

[2031]

[2032] 화합물 N-(부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민(26.7 mg)(실시예 68)으로 키랄 분리를 거쳐 2개의 거울상이성질체, 피크 1($T_R$ =1.44분) 이성질체(11.7 mg) 및 피크 2($T_R$ =1.94분) 이성질체 11.6 mg을 얻었다. 키랄 중심은 임시적이다. 키랄 분리 조건: 용매 A $CO_2$(85%), 용매 B MeOH(15%), 유속 2 mℓ/분, 온도 30℃, 칼럼 21×250 mm AD-H, 구동 시간 3.5분 스태킹 주사, 7분 용출 시간.

[2033] 피크 1($T_R$ = 1.44분) 이성질체: 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (s, 1H), 8.77 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 8.65 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.43 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.36 - 8.31 (m, 2H), 8.29 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.56 (p, J = 7.2 Hz, 1H), 1.85 - 1.62 (m, 2H), 1.33 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.97 (t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 280.2.

[2034] 피크 2($T_R$ =1.94분) 이성질체: 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (s, 1H), 8.80 - 8.72 (m, 2H), 8.65 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.43 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 8.35 - 8.31 (m, 2H), 8.30 (dd, J = 5.6, 0.8 Hz, 1H), 4.57 (hept, J = 6.7 Hz, 1H), 1.82 - 1.63 (m, 2H), 1.33 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.97 (t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 280.2.

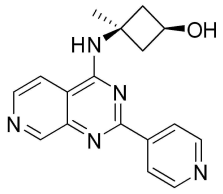
[2035] **실시예 69: N-(2-메틸부트-3-인-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[2036]

[2037] 1H NMR (500 MHz, 메탄올-d4) δ 9.25 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.77 - 8.71 (m, 2H), 8.64 - 8.58 (m, 3H), 8.23 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 2.81 (s, 1H), 1.93 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 290.1.

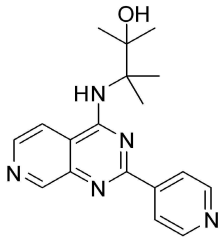
[2038] **실시예 70: (1r,3s)-3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부탄-1-올**



[2039]

[2040] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) 9.21(s, 1H), 8.78(d, 2H), 8.55(d, 1H), 8.31(d, 2H), 8.05(d, 1H), 3.94(q, 2H), 3.50(s, 3H), 1.39(t, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 308.1.

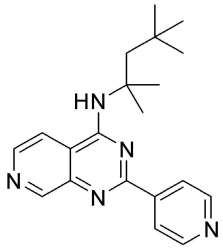
[2041] **실시예 71: 2,3-디메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-2-올**



[2042]

[2043] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.20 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.82 - 8.77 (m, 2H), 8.67 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.28 - 8.23 (m, 2H), 8.07 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 1.64 (s, 6H), 1.27 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 324.2.

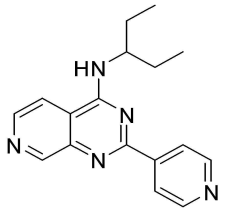
[2044] **실시예 72: 2-(피리딘-4-일)-N-(2,4,4-트리메틸펜탄-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[2045]

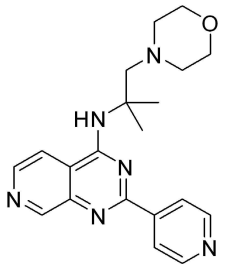
[2046] 1H NMR (500 MHz, 메탄올-d4) δ 9.19 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.78 - 8.72 (m, 2H), 8.58 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.50 - 8.45 (m, 2H), 8.22 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 2.33 (d, J = 1.2 Hz, 2H), 1.77 (s, 6H), 1.01 (s, 9H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 336.2.

[2047] 실시예 73: N-(펜탄-3-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2048] 

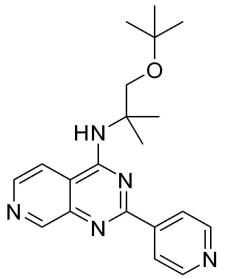
[2049] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.79 - 8.74 (m, 2H), 8.65 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.37 - 8.30 (m, 4H), 4.47 (dtd, J = 13.2, 8.2, 5.1 Hz, 1H), 1.83 - 1.63 (m, 4H), 0.95 (t, J = 7.4 Hz, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 294.2.

[2050] 실시예 74: (N-[2-메틸-1-(모르폴린-4-일)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2051] 

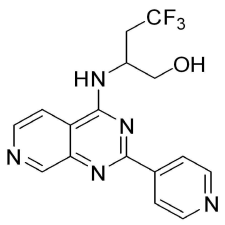
[2052] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.83 - 8.77 (m, 2H), 8.65 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.35 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 8.32 - 8.28 (m, 2H), 7.79 (s, 1H), 3.55 - 3.49 (m, 4H), 2.99 (s, 2H), 2.51 - 2.45 (m, 4H), 1.62 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 365.2.

[2053] 실시예 75: N-[1-(tert-부톡시)-2-메틸프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2054] 

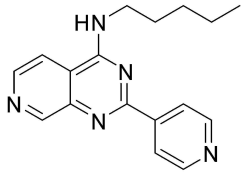
[2055] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.82 - 8.77 (m, 2H), 8.65 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.38 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 8.33 - 8.28 (m, 2H), 7.66 (s, 1H), 3.84 (s, 2H), 1.60 (s, 6H), 1.05 (s, 9H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 352.2.

[2056] 실시예 76: 4,4,4-트리플루오로-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-1-올

[2057] 

[2058] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.23 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.81 - 8.76 (m, 2H), 8.70 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.62 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 8.36 - 8.31 (m, 2H), 8.22 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 5.19 (dd, J = 6.3, 5.4 Hz, 1H), 4.98 (tq, J = 9.6, 5.9 Hz, 1H), 3.72 (dt, J = 10.9, 5.5 Hz, 1H), 3.61 (dt, J = 11.0, 6.3 Hz, 1H), 2.87 - 2.71 (m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 350.1.

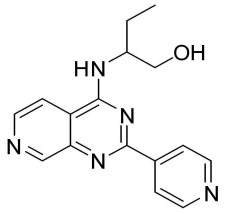
[2059] 실시예 77: N-펜틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2060]

[2061] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.83 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.79 - 8.73 (m, 2H), 8.64 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.36 - 8.29 (m, 2H), 8.18 (dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H), 3.70 (td, J = 7.2, 5.6 Hz, 2H), 1.81 - 1.68 (m, 2H), 1.47 - 1.30 (m, 4H), 0.93 - 0.86 (m, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 294.2.

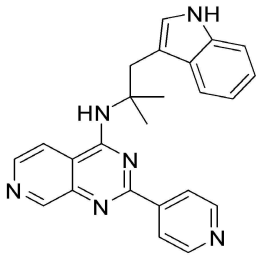
[2062] 실시예 78: 2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄-1-올



[2063]

[2064] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.80 - 8.74 (m, 2H), 8.65 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.40 - 8.30 (m, 4H), 4.83 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 4.54 (td, J = 8.4, 4.9 Hz, 1H), 3.72 - 3.56 (m, 2H), 1.84 (ddd, J = 14.0, 7.4, 5.1 Hz, 1H), 1.68 (ddd, J = 13.8, 8.8, 7.3 Hz, 1H), 0.96 (t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 296.1.

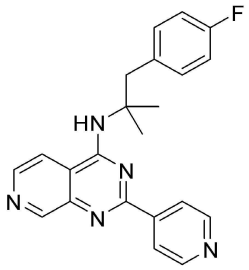
[2065] 실시예 79: N-[1-(1H-인돌-3-일)-2-메틸프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2066]

[2067] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 10.78 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 9.21 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.86 - 8.78 (m, 2H), 8.60 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.42 - 8.36 (m, 2H), 8.30 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.47 - 7.40 (m, 1H), 7.29 (dt, J = 8.2, 0.9 Hz, 1H), 7.00 (ddd, J = 8.1, 7.0, 1.1 Hz, 1H), 6.91 - 6.82 (m, 2H), 3.59 (s, 2H), 1.66 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 395.2.

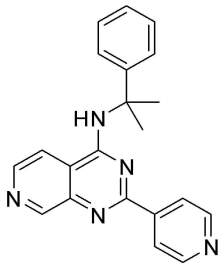
[2068] 실시예 80: N-[1-(4-플루오로페닐)-2-메틸프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2069]

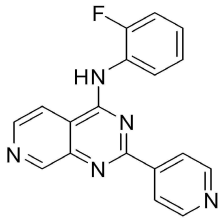
[2070] 1H NMR (500 MHz, 메탄올-d4) δ 9.23 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.80 - 8.75 (m, 2H), 8.58 - 8.51 (m, 3H), 8.13 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 7.11 - 7.04 (m, 2H), 6.95 - 6.87 (m, 2H), 3.56 (s, 2H), 1.69 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 374.2.

[2071] 실시예 81: N-(2-페닐프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2072] 

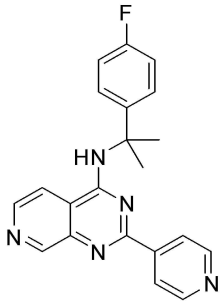
[2073] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.16 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.69 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.66 (s, 1H), 8.61 - 8.56 (m, 2H), 8.53 (dd, J = 5.6, 0.9 Hz, 1H), 7.80 - 7.75 (m, 2H), 7.55 - 7.48 (m, 2H), 7.35 - 7.28 (m, 2H), 7.20 - 7.12 (m, 1H), 1.89 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 342.2.

[2074] 실시예 82: N-(2-플루오로페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2075] 

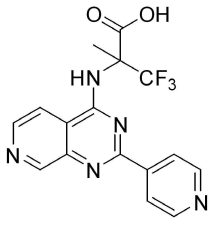
[2076] 1H NMR (500 MHz, 메탄올-d4) δ 9.33 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 8.71 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.68 - 8.64 (m, 2H), 8.32 (ddd, J = 9.5, 5.1, 1.3 Hz, 3H), 7.81 (td, J = 8.0, 2.0 Hz, 1H), 7.41 (d, J = 1.1 Hz, 1H), 7.38 - 7.31 (m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 318.1.

[2077] 실시예 83: N-[2-(4-플루오로페닐)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2078] 

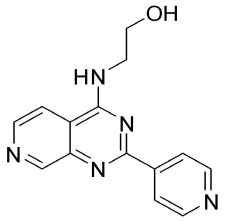
[2079] 1H NMR (500 MHz, 메탄올-d4) δ 9.18 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.63 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.59 - 8.53 (m, 2H), 8.36 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 7.97 - 7.92 (m, 2H), 7.61 - 7.53 (m, 2H), 7.11 - 7.02 (m, 2H), 1.96 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 360.2.

[2080] 실시예 84: 3,3,3-트리플루오로-2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판산

[2081] 

[2082] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.38 (s, 1H), 9.24 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.81 - 8.75 (m, 2H), 8.71 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.34 - 8.29 (m, 2H), 7.84 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 7.07 (s, 1H), 2.03 (s, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 364.1.

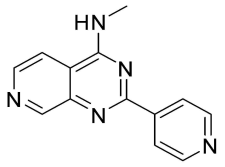
[2083] 실시예 85: 2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}에탄-1-올



[2084]

[2085] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.20 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.88 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 8.82 - 8.73 (m, 2H), 8.65 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.38 - 8.31 (m, 2H), 8.21 (dd, J = 5.6, 0.9 Hz, 1H), 4.90 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 3.76 (ttd, J = 7.9, 5.5, 2.5 Hz, 4H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 268.1.

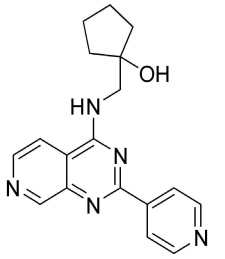
[2086] 실시예 86: N-메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2087]

[2088] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.88 (q, J = 4.4 Hz, 1H), 8.80 - 8.73 (m, 2H), 8.65 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.40 - 8.33 (m, 2H), 8.12 (dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H), 3.18 (d, J = 4.5 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 238.1.

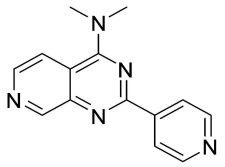
[2089] 실시예 87: 1-({[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}메틸)사이클로펜탄-1-올



[2090]

[2091] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.81 - 8.74 (m, 2H), 8.67 (dd, J = 11.8, 5.8 Hz, 2H), 8.37 - 8.33 (m, 2H), 8.30 (dd, J = 5.6, 0.9 Hz, 1H), 4.70 (s, 1H), 3.89 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 1.78 - 1.50 (m, 8H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 322.2.

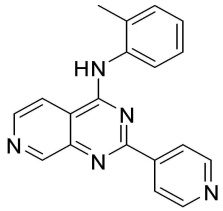
[2092] 실시예 88: N,N-디메틸-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2093]

[2094] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.22 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.80 - 8.73 (m, 2H), 8.57 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.38 - 8.31 (m, 2H), 8.15 (dd, J = 5.8, 0.8 Hz, 1H), 3.53 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 252.1.

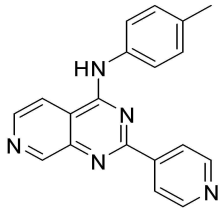
[2095] 실시예 89: N-(2-메틸페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2096]

[2097] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 10.22 (s, 1H), 9.29 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.76 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.72 - 8.67 (m, 2H), 8.42 (dd, J = 5.7, 1.0 Hz, 1H), 8.09 - 8.04 (m, 2H), 7.50 (dd, J = 7.7, 1.5 Hz, 1H), 7.43 (dd, J = 7.1, 1.8 Hz, 1H), 7.40 - 7.29 (m, 2H), 2.27 (s, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 314.1..

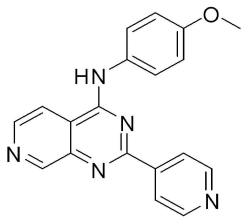
[2098] 실시예 90: N-(4-메틸페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2099]

[2100] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 10.25 (s, 1H), 9.29 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.81 - 8.73 (m, 3H), 8.49 (dd, J = 5.7, 1.0 Hz, 1H), 8.30 - 8.25 (m, 2H), 7.87 - 7.80 (m, 2H), 7.36 - 7.30 (m, 2H), 2.38 (s, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 314.1.

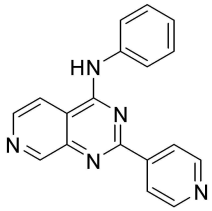
[2101] 실시예 91: N-(4-메톡시페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2102]

[2103] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 10.24 (s, 1H), 9.27 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.80 - 8.72 (m, 3H), 8.46 (dd, J = 5.8, 1.0 Hz, 1H), 8.29 - 8.23 (m, 2H), 7.88 - 7.79 (m, 2H), 7.14 - 7.05 (m, 2H), 3.83 (s, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 330.1.

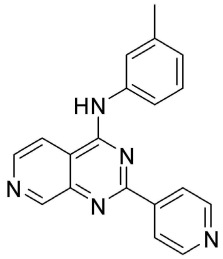
[2104] 실시예 92: N-페닐-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2105]

[2106] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 10.31 (s, 1H), 9.30 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.82 - 8.74 (m, 3H), 8.51 (dd, J = 5.8, 1.0 Hz, 1H), 8.31 - 8.24 (m, 2H), 8.00 - 7.92 (m, 2H), 7.58 - 7.48 (m, 2H), 7.26 (tt, J = 7.3, 1.2 Hz, 1H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 300.1.

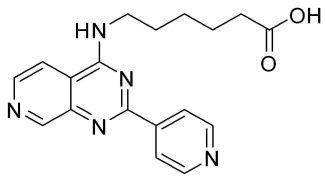
[2107] 실시예 93: N-(3-메틸페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2108]

[2109] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 10.24 (s, 1H), 9.30 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.82 - 8.75 (m, 3H), 8.51 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 8.31 - 8.26 (m, 2H), 7.83 - 7.76 (m, 2H), 7.41 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.08 (ddt, J = 7.6, 1.7, 0.9 Hz, 1H), 2.43 (s, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 314.1.

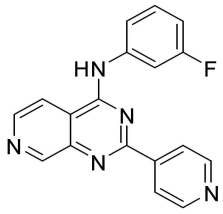
[2110] 실시예 94: 6-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}헥산산



[2111]

[2112] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.02 (s, 1H), 9.19 (s, 1H), 8.84 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.80 - 8.73 (m, 2H), 8.65 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.37 - 8.31 (m, 2H), 8.18 (dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H), 3.76 - 3.66 (m, 2H), 2.23 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 1.81 - 1.69 (m, 2H), 1.61 (p, J = 7.3 Hz, 2H), 1.43 (tt, J = 9.6, 6.1 Hz, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 338.2.

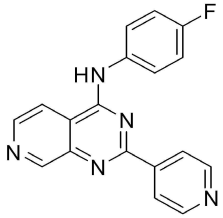
[2113] 실시예 95: N-(3-플루오로페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2114]

[2115] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 10.39 (s, 1H), 9.34 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.84 - 8.78 (m, 3H), 8.51 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 8.31 - 8.26 (m, 2H), 7.96 (dt, J = 11.7, 2.3 Hz, 1H), 7.81 (ddd, J = 8.2, 2.0, 0.9 Hz, 1H), 7.56 (td, J = 8.2, 6.8 Hz, 1H), 7.08 (tdd, J = 8.5, 2.6, 0.9 Hz, 1H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 318.1.

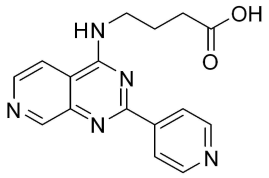
[2116] 실시예 96: N-(4-플루오로페닐)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2117]

[2118] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 10.34 (s, 1H), 9.31 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.81 - 8.75 (m, 3H), 8.47 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 8.31 - 8.24 (m, 2H), 7.99 - 7.92 (m, 2H), 7.41 - 7.33 (m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 318.1.

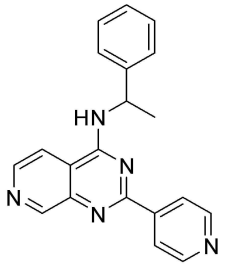
[2119] **실시예 97:** 4-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄산



[2120]

[2121] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 10.43 (s, 1H), 9.16 (s, 1H), 8.79 - 8.72 (m, 2H), 8.62 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.39 - 8.32 (m, 2H), 8.19 (dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H), 3.67 (q, J = 6.0 Hz, 2H), 2.33 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.94 (p, J = 6.6 Hz, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 365.2.

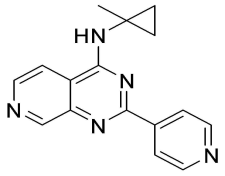
[2122] **실시예 98:** N-(1-페닐에틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2123]

[2124] 1H NMR (DMSO-d6) d 1.67 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 5.73 (m, 1H), 7.22 (m, 1H), 7.47 (m, 2H), 7.55 (m, 2H), 8.26 (d, J = 5 Hz, 2H), 8.41 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.69 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.74 (d, J = 5 Hz, 1H), 9.08 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 9.19 (s, 1H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 328.2.

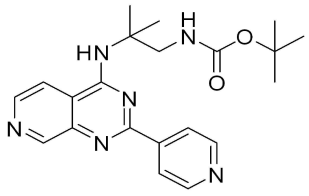
[2125] **실시예 99:** N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2126]

[2127] 1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 9.19 (s, 1H), 8.73 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 8.55 (m, 3H), 8.01 (dd, J = 5.7, 0.7 Hz, 1H), 1.64 (s, 3H), 0.99 (m, 2H), 0.93 (m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 278.1.

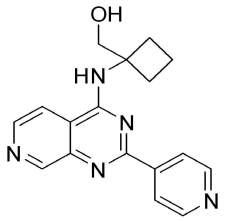
[2128] **실시예 100:** Tert-부틸 N-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로필)카바메이트



[2129]

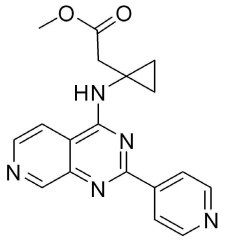
[2130] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.21 (s, 1H), 8.87 (s, 2H), 8.67 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.49 (d, J = 4.6 Hz, 2H), 8.24 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.03 (s, 1H), 7.33 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 3.54 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 1.57 (s, 6H), 1.36 (s, 9H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 395.2.

[2131] 실시예 101: (1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부틸)메탄올

[2132] 

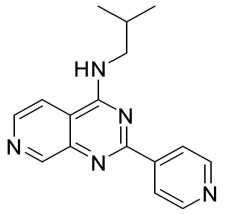
[2133] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.16 (s, 1H), 8.78 - 8.72 (m, 2H), 8.68 (s, 1H), 8.62 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.36 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.31 - 8.20 (m, 2H), 4.94 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 3.96 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 2.41 (dt, J = 12.5, 7.2 Hz, 4H), 1.89 (p, J = 8.0 Hz, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 308.1.

[2134] 실시예 102: 메틸 2-(1-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로프로필)아세테이트

[2135] 

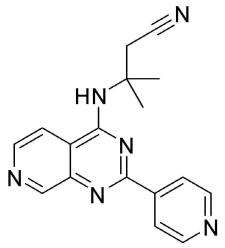
[2136] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) 9.25(s, 1H), 9.05(t, 1H), 8.90(d, 2H), 8.70(d, 1H), 8.60(d, 2H), 8.24(d, 1H), 3.90(m, 2H), 3.79(t, 2H), 3.59(m, 2H), 3.55-3.49(m, 4H), 3.45(m, 2H), 3.41(m, 2H), 2.40(t, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 336.1.

[2137] 실시예 103: N-(2-메틸프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2138] 

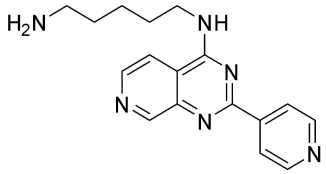
[2139] 1HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) d 9.35 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.79 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 8.64 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.39 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 7.52 (dd, J = 5.6, 0.8 Hz, 1H), 6.00 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 3.66 (dd, J = 6.8, 6.0 Hz, 2H), 2.09 (9중선, J = 6.8 Hz, 1H), 1.12 (d, J = 6.8 Hz, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 280.1.

[2140] 실시예 104: 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부탄니트릴

[2141] 

[2142] 1H NMR (500 MHz, 아세톤-d6) δ 9.23 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.82 - 8.75 (m, 2H), 8.63 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.42 - 8.33 (m, 2H), 8.17 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 3.64 (s, 2H), 1.83 (s, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 305.1.

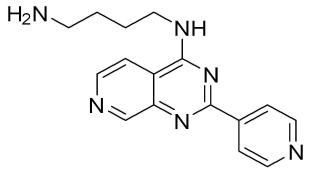
[2143] 실시예 105: N-(6-아미노헥실)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2144]

[2145] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19 (s, 1H), 8.88 - 8.80 (m, 1H), 8.82 - 8.73 (m, 2H), 8.68 - 8.61 (m, 1H), 8.37 - 8.31 (m, 2H), 8.19 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 3.71 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 2.53 (d, J = 1.6 Hz, 2H), 1.75 (dt, J = 14.2, 7.1 Hz, 2H), 1.47 - 1.32 (m, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 323.2.

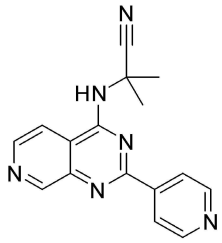
[2146] 실시예 106: N-(4-아미노부틸)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2147]

[2148] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.23 (s, 1H), 8.96 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.88 - 8.82 (m, 2H), 8.70 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.51 - 8.44 (m, 2H), 8.20 (dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H), 7.65 (s, 2H), 3.80 - 3.72 (m, 2H), 2.86 (td, J = 7.5, 5.5 Hz, 2H), 1.85 - 1.73 (m, 2H), 1.67 (ddt, J = 12.8, 9.9, 5.8 Hz, 2H). LCMS (M/Z [M+H]+): 295.2.

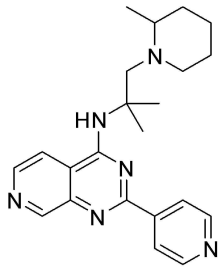
[2149] 실시예 107: 2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}프로판니트릴



[2150]

[2151] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.31 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.85 - 8.80 (m, 2H), 8.78 - 8.72 (m, 2H), 8.45 - 8.40 (m, 2H), 8.37 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 1.93 (s, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 291.1.

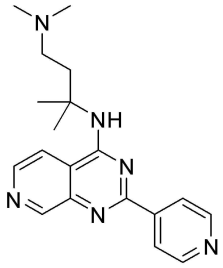
[2152] 실시예 108: N-[2-메틸-1-(2-메틸피페리딘-1-일)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2153]

[2154] 1H NMR (500 MHz, 메탄올-d4) δ 9.08 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.65 - 8.58 (m, 2H), 8.50 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.37 - 8.29 (m, 2H), 7.94 (dd, J = 5.8, 1.0 Hz, 1H), 3.18 (d, J = 14.7 Hz, 1H), 3.00 - 2.92 (m, 2H), 2.66 (s, 1H), 2.44 (dq, J = 12.3, 5.9, 5.1 Hz, 1H), 1.86 (s, 1H), 1.69 - 1.43 (m, 10H), 1.38 - 1.25 (m, 2H), 0.97 (d, J = 6.4 Hz, 3H). LCMS (M/Z [M+H]+): 377.2.

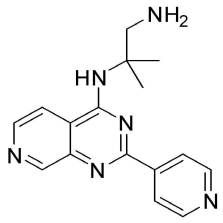
[2155] 실시예 109: 디메틸(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}부틸)아민



[2156]

[2157] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.23 (s, 1H), 8.96 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.88 - 8.82 (m, 2H), 8.70 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.51 - 8.44 (m, 2H), 8.20 (dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H), 7.65 (s, 2H), 3.80 - 3.72 (m, 2H), 2.86 (td, J = 7.5, 5.5 Hz, 2H), 1.85 - 1.73 (m, 2H), 1.67 (ddt, J = 12.8, 9.9, 5.8 Hz, 2H). LCMS (M/Z [M+H]+): 295.2.

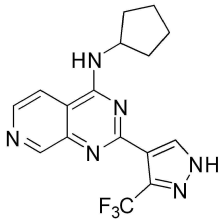
[2158] 실시예 110: N-(1-아미노-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



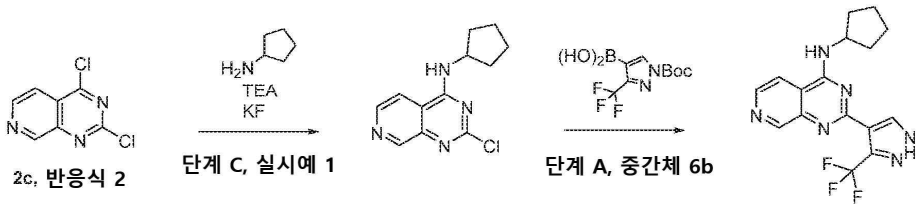
[2159]

[2160] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.25 (s, 1H), 8.88 (s, 2H), 8.72 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.45 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.39 (d, J = 4.9 Hz, 2H), 7.87 (s, 1H), 7.79 (s, 2H), 3.67 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 1.64 (s, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 295.2.

[2161] 실시예 111: N-사이클로펜틸-2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2162]



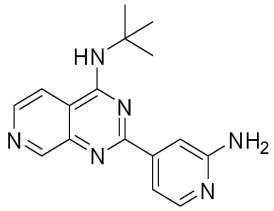

[2163]

[2164] 표제 화합물을 실시예 1에 대해 **단계 C** 및 **중간체 6b**에 대해 **단계 A**를 사용하여 **반응식 2**에서와 같이 2,4-디클로로피리도[3,4-d]피리미딘(중간체 2c)으로부터 제조하였다. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.60(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.36(dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 8.09(dd, J = 5.3, 0.8 Hz, 1H), 7.77(s, 1H), 7.50(dd, J = 1.5, 0.8 Hz, 1H), 7.42(dd, J = 5.3, 1.5 Hz, 1H), 6.10(s, 2H), 1.60(s, 9H). LCMS (m/z [M+H]+): 349.1.

[2165] 실시예 112~197:

[2166] 이들 화합물을 특별히 언급된 경우를 제외하고, 각각 2,4-디클로로피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 2c**) 및 다양한 아민 그리고 커플링 파트너를 사용하여 상술된 프로토콜에 따라 합성하였다.

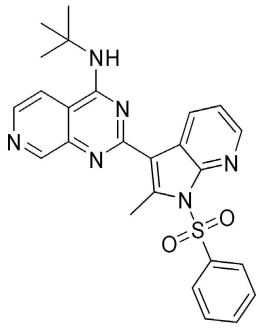
[2167] **실시예 112:** 4-[4-(tert-부틸아미노)피리도[3,4-d]피리미딘-2-일]피리딘-2-아민



[2168]

[2169] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.10(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.60(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.36(dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 8.09(dd, J = 5.3, 0.8 Hz, 1H), 7.77(s, 1H), 7.50(dd, J = 1.5, 0.8 Hz, 1H), 7.42(dd, J = 5.3, 1.5 Hz, 1H), 6.10(s, 2H), 1.60(s, 9H). LCMS (m/z [M+H]+): 295.2

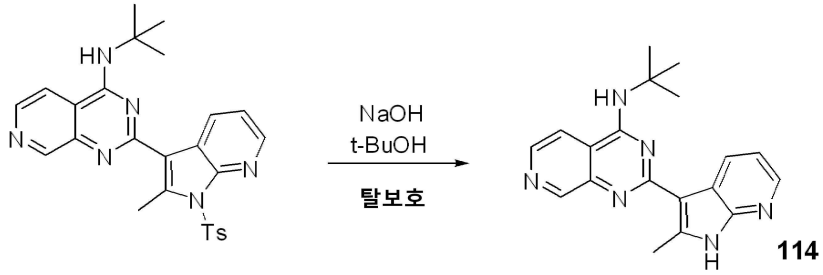
[2170] **실시예 113:** 2-[1-(벤젠설포닐)-2-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일]-N-tert-부틸피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2171]

[2172] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.12(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.70(dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 8.58(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.20(m, 2H), 7.71(m, 1H), 7.66-7.59(m, 5H), 7.35(dd, J = 7.9, 4.7 Hz, 1H), 3.24(s, 3H), 1.59(s, 9H). LCMS (m/z [M+H]+): 473.2.

[2173] **실시예 114:** N-tert-부틸-2-{2-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



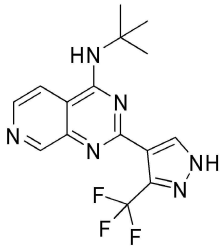

[2174]

[2175] 표제 화합물을 실시예 **113**의 토실기의 탈보호에 의해 제조하였다.

[2176] 탈보호: N-(tert-부틸)-2-(2-메틸-1-(페닐설포닐)-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민(32 mg, 0.068 mmol)을 실온에서 1 mℓ의 t-부탄올 중에 교반하였다. 이어서 수산화나트륨(270 μℓ(5 M), 1.35 mmol)을 첨가하고 반응을 2시간 동안 실온에서 교반하였고 이 때 모든 출발 물질이 소비되었다. 물질을 회백색 오일로 농축하고 0~20% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 산물 N-tert-부틸-2-{2-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민을 산출하였다(55%).

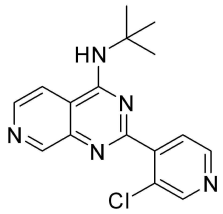
[2177] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.01(s, 1H), 9.05(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.97(dd, J = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 8.45(d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.25(ddd, J = 23.7, 5.2, 1.3 Hz, 1H), 8.19(m, 1H), 7.42(s, 1H), 7.15(dd, J = 7.9, 4.7 Hz, 1H), 2.96(s, 3H), 1.63(s, 9H). LCMS (m/z [M+H]+): 333.2.

[2178] 실시예 115: N-tert-부틸-2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2179] 

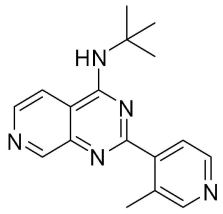
[2180] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.95(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.54(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.46(s, 1H), 8.30(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 7.62(s, 1H), 1.58(s, 9H). LCMS (m/z [M+H]+): 337.1.

[2181] 실시예 116: N-tert-부틸-2-(3-클로로피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2182] 

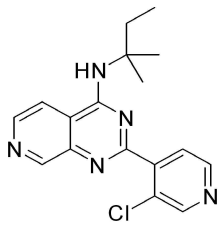
[2183] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.12(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.79(d, J = 0.5 Hz, 1H), 8.68(m, 2H), 8.41(dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 7.92(s, 1H), 7.77(dd, J = 4.9, 0.6 Hz, 1H), 1.55(s, 9H). LCMS (m/z [M+H]+): 314.1.

[2184] 실시예 117: N-tert-부틸-2-(3-메틸피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2185] 

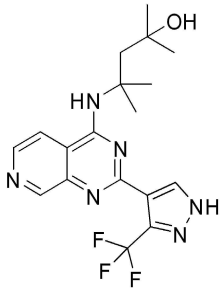
[2186] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.11(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.63(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.55(m, 2H), 8.39(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 7.79(m, 1H), 7.76(m, 1H), 2.59(s, 3H), 1.58(s, 9H). LCMS (m/z [M+H]+): 294.2.

[2187] 실시예 118: 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(2-메틸부탄-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2188] 

[2189] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.12(d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.78(d, J = 0.6 Hz, 1H), 8.68(dd, J = 5.3, 2.2 Hz, 1H), 8,66(m, 2H), 8.41(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 7.74(m, 1H), 2.00(q, J = 7.3 Hz, 2H), 1.49(s, 6H), 0.80(t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 328.1.

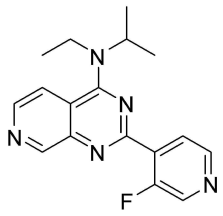
[2190] 실시예 119: 2,4-디메틸-4-({2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-일}아미노)펜탄-2-올



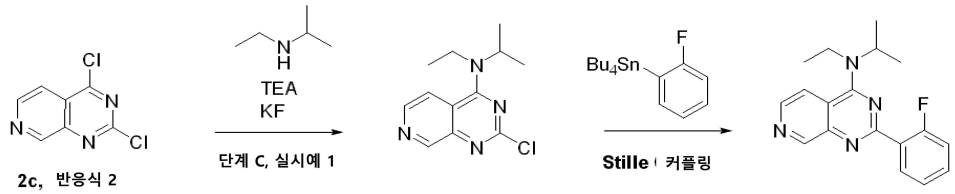
[2191]

[2192] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.29(s, 1H), 8.99(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.55(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.49(s, 1H), 7.73(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 5.61(s, 1H), 1.97(s, 2H), 1.70(s, 6H), 1.30(s, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 395.2.

[2193] **실시예 120: N-에틸-2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-(프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[2194]

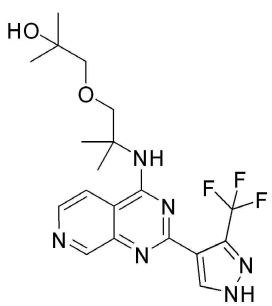



[2195]

[2196] 표제 화합물을 두 번째 단계로서 Stille 커플링을 사용한 것을 제외하고, 실시예 111에 기재된 바와 유사하게 2,4-디클로로피리도[3,4-d]피리미딘(중간체 2c)으로부터 제조하였다.

[2197] Stille 커플링: 2-클로로-N-에틸-N-이소프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민(30 mg, 0.12 mmol)을 실온에서 건조 DMF(1 mℓ) 중에 교반하였다. 3-플루오로-4-(트리부틸스타닐)피리딘(50.8 mg, 0.13 mmol), 이어서 PdCl2(dppf).CH2Cl2 부가물(9.8 mg, 0.012 mmol) 및 CuI(2.3 mg, 0.012 mmol)를 첨가하였다. 반응을 130℃에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 반응을 농축하고 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물을 산출하였다. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.20(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.72(d, J = 2.9 Hz, 1H), 8.61(m, 1H), 8.59(m, 1H), 8.08(dd, J = 6.7, 4.9 Hz, 1H), 7.90(m, 1H), 4.92-4.88(m, 1H), 3.79(q, J = 7.0 Hz, 2H), 1.37(m, 6H), 1.32(dd, J = 23.7, 6.8 Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 312.2.

[2198] **실시예 121: 2-메틸-1-[2-메틸-2-({2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-일}아미노)프로폭시]프로판-2-올**



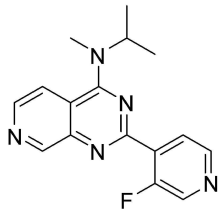
[2199]

[2200] 표제 화합물을 실시예 111에 기재된 절차 및 실시예 12에 기재된 아민을 사용하여 제조하였다.

[2201] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 13.80(s, 1H), 8.99(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.55(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.44(s,

1H), 8.25(dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 7.53(s, 1H), 4.35(s, 1H), 3.82(s, 2H), 3.17(s, 2H), 1.54(s, 6H), 1.00(s, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 425.2.

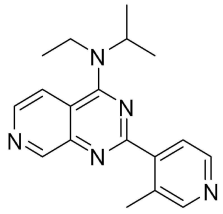
[2202] **실시예 122: 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-메틸-N-(프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[2203] 

[2204] 표제 화합물을 실시예 120에 기재된 절차를 사용하여 제조하였다.

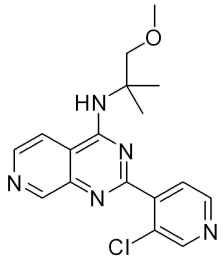
[2205] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.21(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.74(d, J = 2.9 Hz, 1H), 8.60(m, 2H), 8.11(m, 1H), 8.09(m, 1H), 5.11-5.06(d, J = 6.6 Hz, 1H), 3.37(s, 3H), 1.34(d, J = 6.7 Hz, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 298.1.

[2206] **실시예 123: N-에틸-2-(3-메틸피리딘-4-일)-N-(프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[2207] 

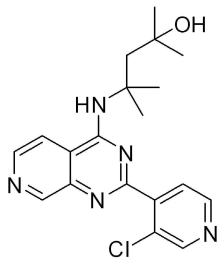
[2208] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.20(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.59(m, 1H), 8.56(m, 1H), 8.54(m, 1H), 7.89(m, 1H), 7.85(m, 1H), 4.95-4.90(d, J = 6.6 Hz, 1H), 3.79(q, J = 7.0 Hz, 2H), 2.60(s, 3H), 1.36(d, J = 6.6 Hz, 6H), 1.30(t, J = 7.0 Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 308.2.

[2209] **실시예 124: 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(1-메톡시-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[2210] 

[2211] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.12(s, 1H), 8.79(s, 1H), 8.69(dd, J = 5.2, 1.8 Hz, 2H), 8.40(dd, J = 5.8, 1.0 Hz, 1H), 7.78(s, 1H), 7.75(m, 1H), 3.73(s, 2H), 3.22(s, 3H), 1.50(s, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 344.1.

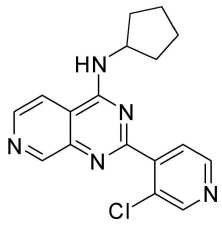
[2212] **실시예 125: 4-{[2-(3-클로로피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}-2,4-디메틸펜탄-2-올**

[2213] 

[2214] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.45(s, 1H), 9.13(d, J = 0.7 Hz, 1H), 8.79(s, 1H), 8.68(dd, J = 5.3, 3.4 z, 1H), 8.66(m, 1H), 7.83(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 7.77(dd, J = 4.9, 0.6 Hz, 1H), 5.57(s, 1H),

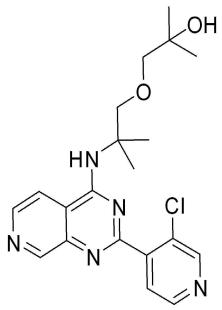
1.96(s, 2H), 1.65(s, 6H), 1.29(s, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 372.2.

[2215] **실시예 126: 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-사이클로펜틸피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[2216] 

[2217] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.14(d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.78(d, J = 0.6 Hz, 1H), 8.69(dd, J = 9.4, 5.2 Hz, 1H), 8.67(d, J = 6.9 Hz, 1H), 8.61(d, J = 6.8 Hz, 1H), 8.32(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 7.81(m, 1H), 4.61-4.57(m, 1H), 2.10-2.01(m, 2H), 1.80-1.54(m, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 326.1.

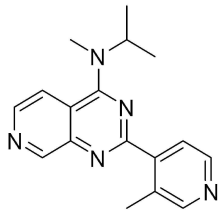
[2218] **실시예 127: 1-(2-{[2-(3-클로로피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}-2-메틸프로폭시)-2-메틸프로판-2-올**

[2219] 

[2220] 표제 화합물을 실시예 111에 기재된 절차 및 실시예 12에 기재된 아민을 사용하여 제조하였다.

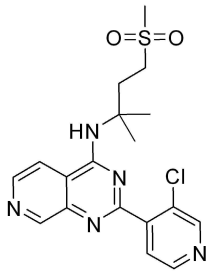
[2221] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.13(m, 1H), 8.80(d, J = 0.6 Hz, 1H), 8.69(m, 2H), 8.40(dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 7.83(dd, J = 4.9, 0.6 Hz, 1H), 7.76(dd, J = 4.9, 0.6 Hz, 1H), 4.38(s, 1H), 3.80(s, 2H), 3.16(s, 2H), 1.51(s, 6H), 1.00(s, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 402.2.

[2222] **실시예 128: N-메틸-2-(3-메틸피리딘-4-일)-N-(프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[2223] 

[2224] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.58(m, 2H), 8.53(m, 1H), 8.03(dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 7.87(d, J = 5.0 Hz, 1H), 5.09-5.00(m, 1H), 3.29(s, 3H), 2.60(s, 3H), 1.31(d, J = 6.7 Hz, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 294.2.

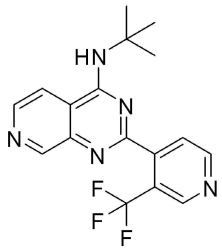
[2225] **실시예 129: 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(4-메탄설포닐-2-메틸부탄-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[2226] 

[2227] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.15(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.79(d, J = 0.6 Hz, 1H), 8.69(dd, J = 21.3, 5.3

Hz, 1H), 8,65(m, 1H), 8.40(dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 7.80(m, 1H), 7.78(m, 1H), 3.12-3.08(m, 2H), 2.87(s, 3H), 2.49-2.46(m, 2H), 1.53(s, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 406.1.

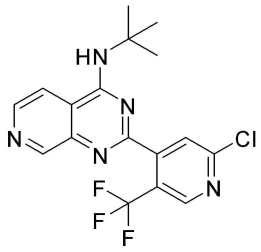
[2228] 실시예 130: N-tert-부틸-2-[3-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2229]

[2230] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.92(m, 1H), 8.89(m, 1H), 8.08(d, J = 4.9 Hz, 1H), 7.76(d, J = 0.8 Hz, 1H), 7.70(m, 1H), 7.67(m, 1H), 7.56(dd, J = 5.0, 0.8 Hz, 1H), 1.49(s, 9H). LCMS (m/z [M+H]+): 348.1.

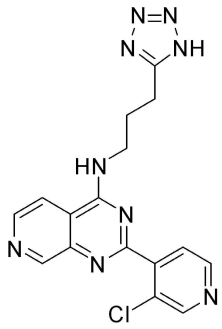
[2231] 실시예 131: N-tert-부틸-2-[2-클로로-5-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2232]

[2233] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.08(d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.87(s, 1H), 8.61(d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.22(dd, J = 5.8, 1.0 Hz, 1H), 7.83(s, 1H), 1.20(s, 9H). LCMS (m/z [M+H]+): 382.1.

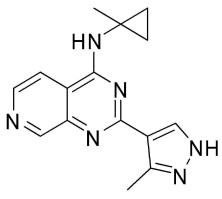
[2234] 실시예 132: 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-[3-(1H-1,2,3,4-테트라졸-5-일)프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2235]

[2236] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.30(s, 1H), 9.15(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.77(s, 1H), 8.70(dd, J = 18.4, 5.2 Hz, 1H), 8.65(m, 1H), 8.25(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 7.81(d, J = 4.9 Hz, 1H), 3.70-3.65(td, J = 6.8, 5.1 Hz, 2H), 2.90(t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.12-2.07(m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 368.1.

[2237] 실시예 133: 2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

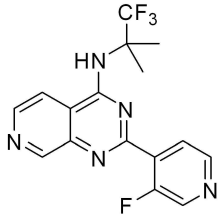


[2238]

[2239] 1H NMR (500 MHz, 메탄올-d4) δ 9.01 (s, 1H), 8.41 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 7.91 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 2.83 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 1.05 - 0.94 (m, 2H), 0.91 - 0.82 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 281.1.

[2240] 실시예 134: 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아

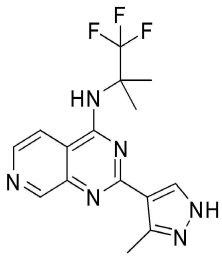
민

[2241] 

[2242] 표제 화합물을 사용하여 실시예 120에 기재된 절차를 제조하였다.

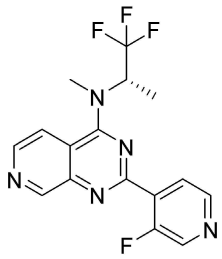
[2243] 1H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ 9.24 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.77 - 8.73 (m, 2H), 8.62 (dd, J = 4.9, 0.8 Hz, 1H), 8.52 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 8.04 (dd, J = 6.7, 4.9 Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 1.86 (s, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 352.1.

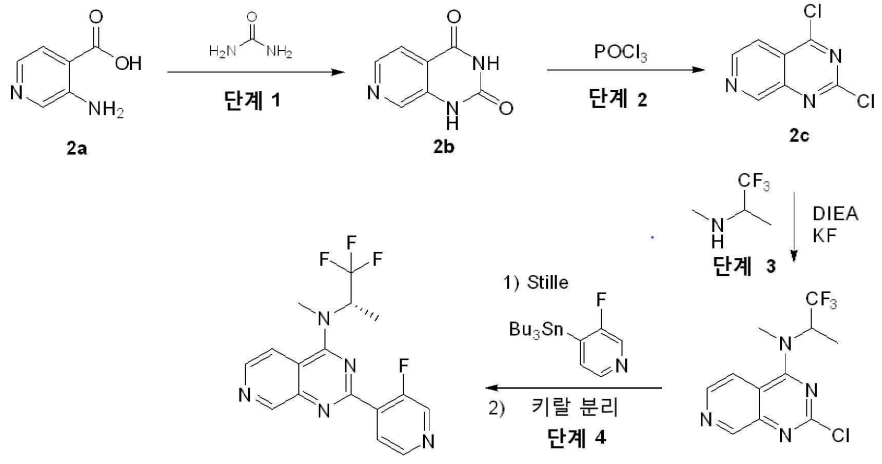
[2244] **실시예 135: 2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[2245] 

[2246] 1H NMR (600 MHz, 메탄올-d4) δ 9.06 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.47 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.16 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 8.11 (s, 1H), 2.74 (d, J = 34.7 Hz, 3H), 1.92 (s, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 337.1.

[2247] **실시예 136: 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-메틸-N-[(2S)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[2248] 




[2249]

[2250] **단계 1:** 요소(40.00 g, 666.00 mmol) 및 3-아미노이소니코틴산(**2a**, 18.40 g, 133.20 mmol)의 혼합물을 1 hr 동

안 210℃에서 가열하였다(주: 용매는 사용하지 않았다). NaOH(2 N, 320 ㎖)를 첨가하고, 혼합물을 1 h 동안 90℃에서 교반하였다. 고체를 여과에 의해 수집하고, 물로 세척하였다. 이렇게 수득한 미정제 산물을 HOAc(400 ㎖) 중에 현탁하고, 1 h 동안 100℃에서 교반하였다. 혼합물을 RT로 냉각하고, 여과하고, 고체를 다량의 물로 세척한 후, 진공 하에 건조하여 피리도[3,4-d]피리미딘-2,4(1H,3H)-디온(**2b**, 17.00 g, 78% 수율)을 추가 정제 없이 얻었다. LCMS (m/z $[M+H]^+$): 164.0.

[2251] **단계 2:** 톨루엔(200 ㎖) 중 피리도[3,4-d]피리미딘-2,4(1H,3H)-디온(**2b**, 20.00 g, 122.60 mmol) 및 $POCl_3$(328.03 g, 2.14 mol)의 혼합물에 DIEA(31.69 g, 245.20 mmol)를 적가하고 상기 반응 혼합물을 하룻밤(18 hr) 동안 25℃에서 교반하여 현탁액을 얻었다.

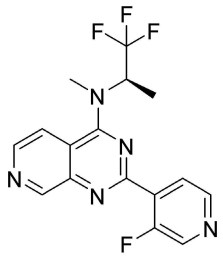
[2252] 용매 및 $POCl_3$을 진공 하에 제거하고, DCM(50 ㎖)으로 희석하고, -20℃에서 pH=7까지 DIEA로 중화하고, 다시 농축하고, 잔류물을 칼럼(20~50% EA/PE)에 의해 정제하여 2,4-디클로로피리도[3,4-d]피리미딘(**2c**, 20.00 g, 99.99 mmol, 82% 수율)을 노란색 고체로 얻었다. 1H NMR (400 MHz, 클로로포름-*d*) δ 9.52 (s, 1 H), 8.92 (d, *J*=5.6 Hz, 1 H), 8.04 (d, *J*=5.6 Hz, 1 H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 200.0.

[2253] **단계 3:** 20 ㎖ 바이알에서 2,4-디클로로피리도[3,4-d]피리미딘(600 mg, 3.0 mmol)을 실온에서 DMSO(0.7 ㎖) 중에 교반하고 $N_2$로 탈기하였다. DIEA(1 ㎖, 6 mmol)를 첨가하고 5분 동안 교반한 후 KF(174 mg, 3 mmol)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 15분 동안 실온에서 교반한 후, 라세미 1,1,1-트리플루오로-N-메틸프로판-2-아민(419 mg, 3.3 mmol)을 첨가하고 탈기한 후 4시간 동안 60℃에서 교반하였다. 이어서 반응을 농축하고 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 2-클로로-N-메틸-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민을 산출하였다(680 mg, 74%). 1H NMR (500 MHz, 아세톤-d6) δ 9.09 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.59 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.22 (dd, J = 5.9, 0.9 Hz, 1H), 5.93 (dddd, J = 15.3, 8.3, 7.0, 1.2 Hz, 1H), 3.61 (q, J = 1.0 Hz, 3H), 1.63 (d, J = 7.0 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 291.7.

[2254] **단계 4: :** 20 ㎖ 바이알에서 2-클로로-N-메틸-N-(1,1,1-트리플루오로프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민(100 mg, 0.34 mmol)을 실온에서 건조 DMF(1 ㎖) 중에 교반하였다. 3-플루오로-4-(트리부틸스타닐)피리딘(133 mg, 0.34 mmol)에 이어 $PdCl_2(dppf).CH_2Cl_2$ 부가물(28.1 mg, 0.034mmol) 및 CuI(6.55 mg, 0.034 mmol)를 첨가하였다. 반응을 130℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 DCM, $H_2O$로 희석하고, 분리하고, DCMx3으로 추출하였다. 유기층을 조합하고, $Na_2SO_4$로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 잔류물을 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 라세미 산물을 얻은 후, 키랄 HPLC(상 A로서 85% $CO_2$ 및 상 B로서 5% MeOH를 갖는 21×250 mm OJ-H 칼럼, 유속 2 ㎖/분, 30℃, 2.75분 용출 시간)에 의해 거울상이성질체를 분리하여 **실시예 136** 및 **137**을 산출하였다.

[2255] **실시예 136:** 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.30 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.75 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 8.66 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.62 (dd, J = 4.9, 0.8 Hz, 1H), 8.24 (dd, J = 5.9, 0.9 Hz, 1H), 8.15 (dd, J = 6.8, 4.9 Hz, 1H), 6.12 - 5.98 (m, 1H), 3.51 (d, J = 1.1 Hz, 3H), 1.57 (d, J = 7.0 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 352.1. 키랄 HPLC $T_R$ = 0.88분.

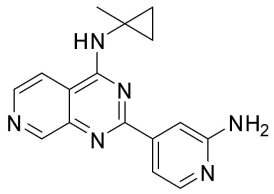
[2256] **실시예 137: 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-메틸-N-[(2R)-1,1,1-트리플루오로프로판-2-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[2257] 

[2258] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.30 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.75 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 8.66 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.62 (dd, J = 4.9, 0.8 Hz, 1H), 8.24 (dd, J = 5.9, 0.9 Hz, 1H), 8.15 (dd, J = 6.8, 4.9 Hz, 1H),

6.12 - 5.98 (m, 1H), 3.51 (d, J = 1.1 Hz, 3H), 1.57 (d, J = 7.0 Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 352.1. 키랄 HPLC TR = 0.70분

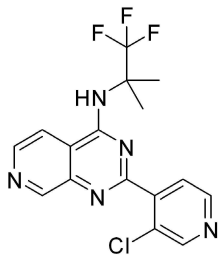
[2259] **실시예 138:** 4-{4-[(1-메틸사이클로프로필)아미노]피리도[3,4-d]피리미딘-2-일}피리딘-2-아민



[2260]

[2261] 1H NMR (400 MHz, 아세톤-d6) δ 9.15 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.55 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.17 - 8.09 (m, 2H), 7.98 (dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H), 7.81 - 7.70 (m, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.00 - 0.94 (m, 2H), 0.91 - 0.84 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 293.1.

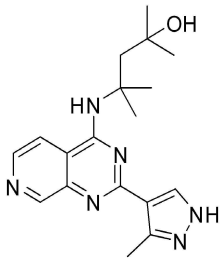
[2262] **실시예 139:** 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2263]

[2264] 1H NMR (500 MHz, 메탄올-d4) δ 9.20 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.68 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.63 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 8.33 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 1.88 (d, J = 1.0 Hz, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 368.1.

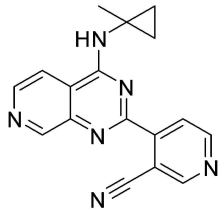
[2265] **실시예 140:** 2,4-디메틸-4-{[2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올



[2266]

[2267] 1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 9.14 (s, 1H), 8.80 (s, 1H), 8.37 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 7.50 - 7.38 (m, 1H), 2.81 (s, 3H), 1.99 (s, 2H), 1.81 (s, 6H), 1.49 (s, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 341.2.

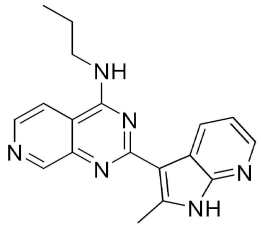
[2268] **실시예 141:** 4-{4-[(1-메틸사이클로프로필)아미노]피리도[3,4-d]피리미딘-2-일}피리딘-3-카보니트릴



[2269]

[2270] 1H NMR (400 MHz, 아세톤-d6) δ 9.23 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 9.09 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.99 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.65 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.59 - 8.53 (m, 1H), 8.42 (s, 1H), 8.07 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 1.62 (s, 3H), 1.04 - 0.97 (m, 2H), 0.90 - 0.81 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 303.1.

[2271] **실시예 142: 2-{2-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

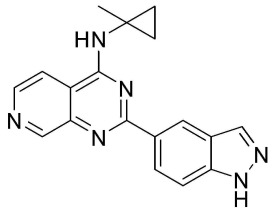


[2272]

[2273] 표제 화합물을 실시예 **114**에 기재된 절차를 사용하여 제조하였다.

[2274] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.02 (s, 1H), 9.06 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.98 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 8.50 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.46 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.19 (dd, J = 4.7, 1.7 Hz, 1H), 8.06 (dd, J = 5.6, 0.9 Hz, 1H), 7.16 (dd, J = 7.9, 4.7 Hz, 1H), 3.62 (dt, J = 8.1, 6.0 Hz, 2H), 2.96 (s, 3H), 1.90 - 1.69 (m, 2H), 1.00 (t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 319.2.

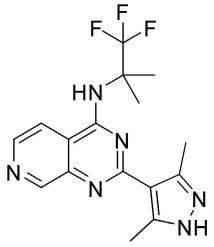
[2275] **실시예 143: 2-(1H-인다졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[2276]

[2277] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.12 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 9.00 (dd, J = 1.5, 0.8 Hz, 1H), 8.85 (s, 1H), 8.61 (dd, J = 8.9, 1.5 Hz, 1H), 8.52 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.11 (dd, J = 5.6, 0.9 Hz, 1H), 7.65 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 1.62 (s, 3H), 0.97 - 0.81 (m, 4H). LCMS (m/z [M+H]+): 317.1.

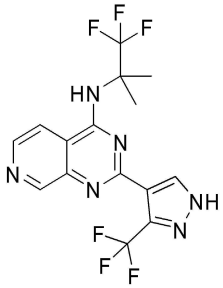
[2278] **실시예 144: 2-(3,5-디메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[2279]

[2280] 1H NMR (500 MHz, 메탄올-d4) δ 9.06 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.50 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.17 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 2.58 (s, 6H), 1.91 (d, J = 1.1 Hz, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 3511.

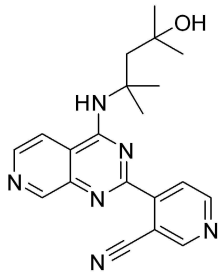
[2281] **실시예 145: N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)-2-[3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[2282]

[2283] 1H NMR (600 MHz, 메탄올-d4) δ 9.06 (d, J = 1.0 Hz, 1H), 8.54 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.38 - 8.36 (m, 1H), 8.20 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 1.90 (d, J = 1.1 Hz, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 391.1.

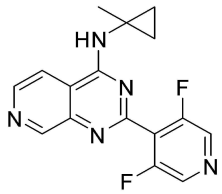
[2284] 실시예 146: 4-{4-[(4-하이드록시-2,4-디메틸펜탄-2-일)아미노]피리도[3,4-d]피리미딘-2-일}피리딘-3-카보니트릴



[2285]

[2286] 1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 9.55 (s, 1H), 9.38 (s, 1H), 9.07 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.95 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.62 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.27 (dd, J = 5.2, 0.8 Hz, 1H), 7.86 - 7.80 (m, 1H), 2.02 (s, 2H), 1.84 (s, 6H), 1.53 (s, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 363.2.

[2287] 실시예 147: 2-(3,5-디플루오로피리딘-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

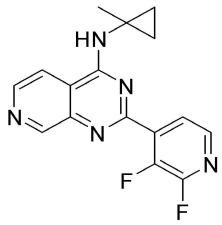


[2288]

[2289] 표제 화합물을 실시예 120에 기재된 절차를 사용하여 제조하였다.

[2290] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.16 (s, 1H), 9.14 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.71 (s, 2H), 8.68 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.19 (dd, J = 5.7, 1.0 Hz, 1H), 1.45 (s, 3H), 0.87 - 0.77 (m, 2H), 0.75 - 0.64 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 314.1.

[2291] 실시예 148: 2-(2,3-디플루오로피리딘-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

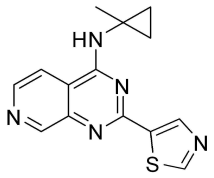


[2292]

[2293] 표제 화합물을 실시예 120에 기재된 절차를 사용하여 제조하였다.

[2294] 1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 9.36 (s, 1H), 8.90 (dd, J = 5.0, 0.9 Hz, 1H), 8.85 (dd, J = 1.6, 0.9 Hz, 1H), 8.69 (dd, J = 5.1, 1.6 Hz, 1H), 8.66 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.64 - 7.52 (m, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.04 - 0.94 (m, 4H). LCMS (m/z [M+H]+): 314.1.

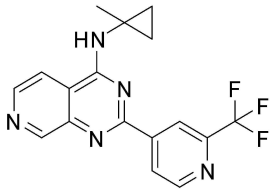
[2295] 실시예 149: N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1,3-티아졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2296]

[2297] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.22 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 9.08 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 9.01 (s, 1H), 8.69 - 8.62 (m, 1H), 8.56 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.10 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 1.55 (s, 3H), 0.92 - 0.86 (m, 2H), 0.86 - 0.76 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 284.1.

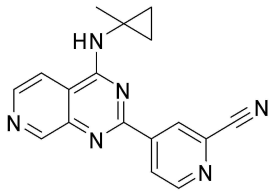
[2298] 실시예 150: N-(1-메틸사이클로프로필)-2-[2-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2299]

[2300] 1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 9.41 (s, 1H), 8.97 - 8.89 (m, 1H), 8.88 (dd, J = 1.5, 0.8 Hz, 1H), 8.70 - 8.66 (m, 1H), 8.66 - 8.61 (m, 1H), 7.89 - 7.77 (m, 1H), 6.95 - 6.80 (m, 1H), 1.65 (s, 3H), 1.07 - 1.01 (m, 2H), 1.01 - 0.92 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 346.1.

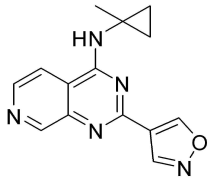
[2301] 실시예 151: 4-{4-[(1-메틸사이클로프로필)아미노]피리도[3,4-d]피리미딘-2-일}피리딘-2-카보니트릴



[2302]

[2303] 1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 9.36 (s, 1H), 8.90 (dd, J = 5.0, 0.9 Hz, 1H), 8.85 (dd, J = 1.6, 0.9 Hz, 1H), 8.69 (dd, J = 5.1, 1.6 Hz, 1H), 8.66 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.64 - 7.52 (m, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.04 - 0.94 (m, 4H). LCMS (m/z [M+H]+): 303.1.

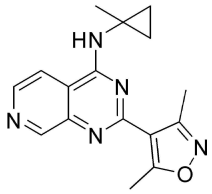
[2304] 실시예 152: N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1,2-옥사졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2305]

[2306] 1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 9.25 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.54 (dd, J = 6.0, 0.7 Hz, 1H), 7.94 - 7.88 (br s, 1H), 7.32 - 7.27 (br s, 1H), 6.61 (dd, J = 6.0, 0.7 Hz, 1H), 0.91 (s, 3H), 0.85 - 0.73 (m, 4H). LCMS (m/z [M+H]+): 268.1.

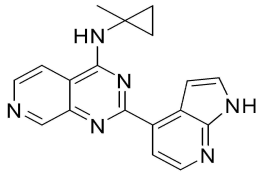
[2307] 실시예 153: 2-(디메틸-1,2-옥사졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2308]

[2309] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.05 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.89 (s, 1H), 8.54 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.10 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 2.90 (s, 3H), 2.65 (s, 3H), 1.51 (s, 3H), 0.96 - 0.84 (m, 2H), 0.83 - 0.71 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 296.1.

[2310] 실시예 154: N-(1-메틸사이클로프로필)-2-{1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

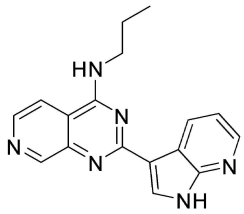


[2311]

[2312] 1H NMR (600 MHz, DMSO-d6) δ 11.77 (s, 1H), 9.23 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.59 (d, J = 5.5

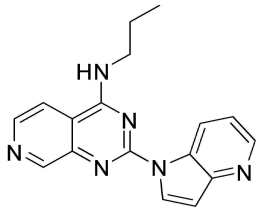
Hz, 1H), 8.38 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 8.16 (dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 3.4, 2.0 Hz, 1H), 7.61 (t, J = 2.9 Hz, 1H), 1.61 (s, 3H), 0.99 - 0.94 (m, 2H), 0.92 - 0.87 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 317.1.

[2313] **실시예 155: N-프로필-2-{1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[2314] 

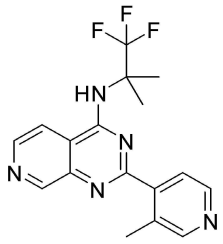
[2315] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.18 (s, 1H), 9.07 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.96 (dd, J = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 8.51 (dd, J = 16.1, 5.5 Hz, 2H), 8.35 - 8.27 (m, 2H), 8.09 (dd, J = 5.7, 1.0 Hz, 1H), 7.25 (dd, J = 7.9, 4.6 Hz, 1H), 3.67 (dt, J = 7.7, 5.9 Hz, 2H), 1.78 (h, J = 7.4 Hz, 2H), 1.03 (t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 305.1.

[2316] **실시예 156: N-프로필-2-{1H-피롤로[3,2-b]피리딘-1-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[2317] 

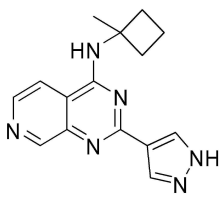
[2318] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.19 (ddd, J = 8.4, 1.5, 0.8 Hz, 1H), 9.13 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 9.02 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.65 (d, J = 3.7 Hz, 1H), 8.55 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.48 (dd, J = 4.6, 1.5 Hz, 1H), 8.16 (dd, J = 5.5, 0.9 Hz, 1H), 7.35 (dd, J = 8.4, 4.6 Hz, 1H), 6.88 (dd, J = 3.8, 0.8 Hz, 1H), 3.71 - 3.63 (m, 2H), 1.85 - 1.74 (m, 2H), 1.04 (t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 305.1.

[2319] **실시예 157: 2-(3-메틸피리딘-4-일)-N-(1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[2320] 

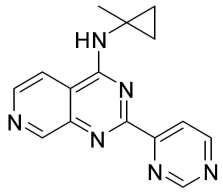
[2321] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.22 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.73 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.58 (d, J = 5.8 Hz, 2H), 8.52 (dd, J = 5.8, 1.0 Hz, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.75 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 2.59 (s, 3H), 1.85 (s, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 348.1.

[2322] **실시예 158: N-(1-메틸사이클로부틸)-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**

[2323] 

[2324] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 13.11 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.47 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.38 (s, 1H), 8.27 (s, 1H), 8.14 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.07 (s, 1H), 2.48 - 2.41 (m, 2H), 2.25 (td, J = 9.0, 4.3 Hz, 2H), 1.99 - 1.81 (m, 2H), 1.67 (s, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 281.1.

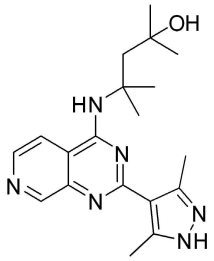
[2325] 실시예 159: N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리미딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2326] 

[2327] 표제 화합물을 실시예 120에 기재된 절차를 사용하여 제조하였다.

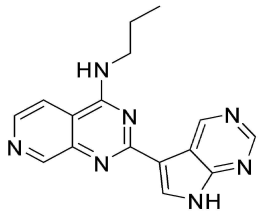
[2328] 1H NMR (400 MHz, 아세톤-d6) δ 9.15 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.55 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.17 - 8.09 (m, 2H), 7.98 (dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H), 7.81 - 7.70 (m, 2H), 1.61 (s, 3H), 1.00 - 0.94 (m, 2H), 0.91 - 0.84 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 279.1.

[2329] 실시예 160: 4-{[2-(3,5-디메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}-2,4-디메틸펜탄-2-올

[2330] 

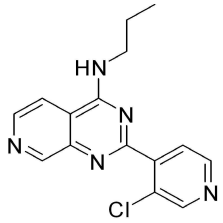
[2331] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 12.43 (s, 1H), 9.15 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.46 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 7.69 (dd, J = 5.7, 1.0 Hz, 1H), 5.61 (s, 1H), 2.61 (s, 3H), 2.55 (s, 3H), 1.95 (s, 2H), 1.70 (s, 6H), 1.32 (s, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 355.2.

[2332] 실시예 161: 4N-프로필-2-{7H-피롤로[2,3-d]피리미딘-5-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2333] 

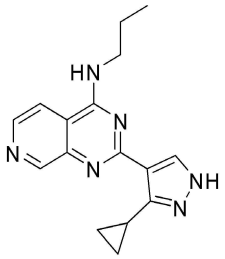
[2334] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 12.59 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 9.87 (s, 1H), 9.12 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.60 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.53 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.36 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.11 (dd, J = 5.6, 0.9 Hz, 1H), 3.72 - 3.64 (m, 2H), 1.85 - 1.72 (m, 2H), 1.03 (t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 306.1.

[2335] 실시예 162: 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2336] 

[2337] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.15 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.89 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 8.78 (d, J = 0.6 Hz, 1H), 8.68 (dd, J = 12.2, 5.2 Hz, 2H), 8.22 (dd, J = 5.6, 0.9 Hz, 1H), 7.82 (dd, J = 4.9, 0.6 Hz, 1H), 3.60 - 3.52 (m, 2H), 1.76 - 1.65 (m, 2H), 0.95 (t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 300.1.

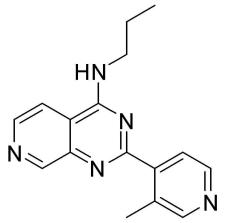
[2338] 실시예 163: 2-(3-사이클로프로필-1H-피라졸-4-일)-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2339]

[2340] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.47 (s, 1H), 8.98 (s, 1H), 8.54 (t, J = 5.4 Hz, 1H), 8.48 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.06 (dd, J = 5.6, 0.9 Hz, 1H), 3.55 (dt, J = 7.8, 5.9 Hz, 2H), 3.24 (t, J = 7.1 Hz, 1H), 3.17 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 1.77 - 1.63 (m, 2H), 0.93 (m, 7H). LCMS (m/z [M+H]+): 295.2.

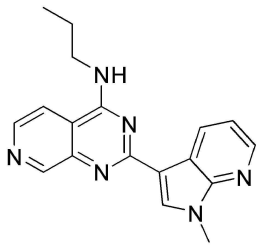
[2341] 실시예 164: 2-(3-메틸피리딘-4-일)-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2342]

[2343] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.14 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.79 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.65 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.58 - 8.52 (m, 2H), 8.20 (dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 3.62 - 3.54 (m, 2H), 2.60 (s, 3H), 1.77 - 1.66 (m, 2H), 0.97 (t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 280.2.

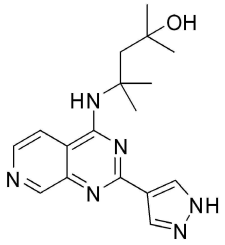
[2344] 실시예 165: 2-{1-메틸-1H-피롤로[2,3-b]피리딘-3-일}-N-프로필피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2345]

[2346] 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 9.06 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.97 (dd, J = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 8.48 (d, J = 5.5 Hz, 2H), 8.44 (s, 1H), 8.36 (dd, J = 4.7, 1.7 Hz, 1H), 8.09 (dd, J = 5.7, 1.0 Hz, 1H), 7.29 (dd, J = 7.9, 4.6 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.72 - 3.64 (m, 2H), 1.85 - 1.73 (m, 2H), 1.04 (t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 319.2.

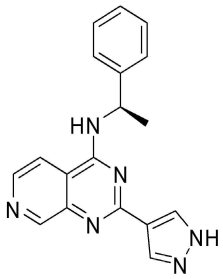
[2347] 실시예 166: 2,4-디메틸-4-{[2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}펜탄-2-올



[2348]

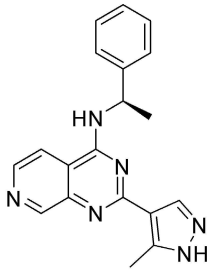
[2349] 1H NMR (DMSO-d6) d 1.29 (s, 6H), 1.72 (s, 6H), 1.98 (s, 2H), 5.5 (s, 1H, NH), 7.69 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 8.09 (s, 1H) 8.30 (s, 1H), 8.48 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 8.99 (s, 1H), 9.13 (s, 1H). LCMS (m/z [M+H]+): 327.2.

[2350] 실시예 167: N-[(1R)-1-페닐에틸]-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2351] 

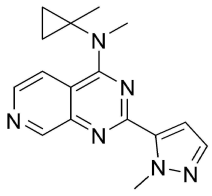
[2352] 1H NMR (MeOH-d4) d 1.70 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 5.63 (m, 1H), 7.21 (m, 1H), 7.32 (m, 2H), 7.49 (m, 2H), 8.17 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.20-8.23 (2H), 8.48 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 9.00 (s, 1H). LCMS (m/z [M+H]+): 317.2.

[2353] 실시예 168: 2-(5-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-[(1R)-1-페닐에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2354] 

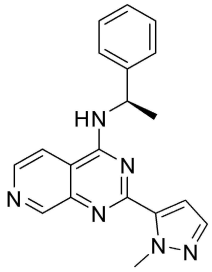
[2355] 1H NMR (MeOH-d4) d1.70 (d, J = 6.8 Hz, 3H), 2.54 (s, 3H), 5.65 (m, 1H), 7.20 (m, 1H), 7.32 (m, 2H), 7.44(m, 2H), 8.14-8.18 (2H), 8.46 (s, 1H), 9.00 (s, 1H). LCMS (m/z [M+H]+): 331.2.

[2356] 실시예 169: N-메틸-2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2357] 

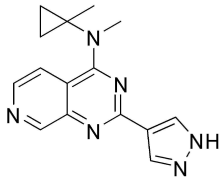
[2358] 1H NMR (DMSO-d6) d 0.95 (s, 4H), 1.70 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 4.35 (s, 3H), 7.04 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.16 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.56 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 9.16 (s, 1H). LCMS (m/z [M+H]+): 295.2.

[2359] 실시예 170: 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-[(1R)-1-페닐에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2360] 

[2361] 1H NMR (MeOH-d4) d 1.60 (d, J = 7.2 Hz, 3H), 4.02 (s, 3H), 5.46 (m, 1H), 6.86 (d, J = 2 Hz, 1H), 7.10 (m, 1H), 7.22 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 8.11 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.44 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.96 (s, 1H). LCMS (m/z [M+H]+): 331.2.

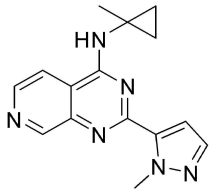
[2362] **실시예 171: N-메틸-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[2363]

[2364] 1H NMR (DMSO-d6) d 0.92 (s, 4H), 1.68 (s, 3H), 3.37(s, 3H), 8.10 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.13 (s, 1H), 8.35 (s, 1H), 8.45 (m, 1H), 9.05 (s, 1H). LCMS (m/z [M+H]+): 281.1.

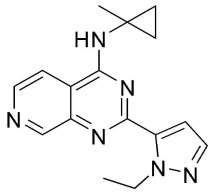
[2365] **실시예 172: 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[2366]

[2367] 1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 8.99 (s, 1H), 8.43 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.87 (dd, J = 5.7, 0.8 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.08 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.42 (s, 3H), 1.55 (s, 3H), 0.98 - 0.93 (m, 2H), 0.85 - 0.80 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 281.1.

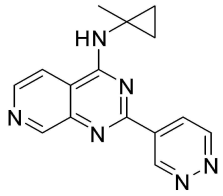
[2368] **실시예 173: 2-(1-에틸-1H-피라졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[2369]

[2370] 1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 9.10 (s, 1H), 8.52 (s, 1H), 7.98 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 5.07 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.59 (s, 3H), 1.49 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.04 - 0.95 (m, 2H), 0.93 - 0.76 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 295.2.

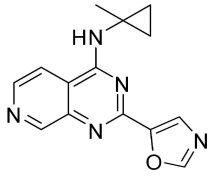
[2371] **실시예 174: N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리다진-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[2372]

[2373] 1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 10.19 (dd, J = 2.1, 1.3 Hz, 1H), 9.39 (dd, J = 5.3, 1.2 Hz, 1H), 9.20 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.70 (dd, J = 5.3, 2.2 Hz, 1H), 8.57 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.01 (dd, J = 5.7, 0.8 Hz, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.04 - 0.98 (m, 2H), 0.97 - 0.91 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 279.1.

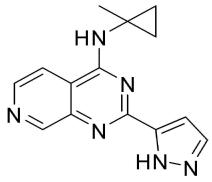
[2374] **실시예 175: N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1,3-옥사졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[2375]

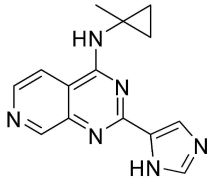
[2376] 1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 9.12 (s, 1H), 8.53 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.99 - 7.95 (m, 1H), 7.95 (s, 1H), 1.60 (s, 3H), 0.96 (m, 2H), 0.88 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 268.1.

[2377] 실시예 176: N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1H-피라졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2378] 

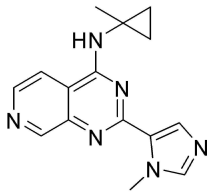
[2379] 1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 9.09 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.44 (s, 1H), 7.94 (dd, J = 5.7, 0.8 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 7.11 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 1.60 (s, 3H), 0.94 (m, 2H), 0.90 - 0.84 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 267.1.

[2380] 실시예 177: 2-(1H-이미다졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2381] 

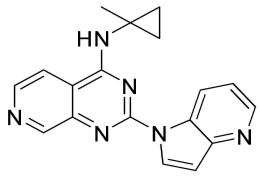
[2382] 1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 9.06 (s, 1H), 8.44 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.98 - 7.90 (m, 2H), 1.60 (s, 3H), 0.95 (m, 2H), 0.92 - 0.84 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 267.1.

[2383] 실시예 178: 2-(1-메틸-1H-이미다졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2384] 

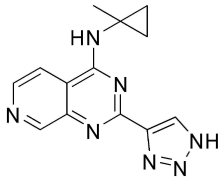
[2385] 1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 9.03 (s, 1H), 8.41 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.90 (dd, J = 5.7, 0.8 Hz, 1H), 7.70 (d, J = 0.8 Hz, 2H), 4.25 (s, 3H), 1.57 (s, 3H), 0.99 - 0.94 (m, 2H), 0.85 - 0.79 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 281.1.

[2386] 실시예 179: N-(1-메틸사이클로프로필)-2-{1H-피롤로[3,2-b]피리딘-1-일}피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2387] 

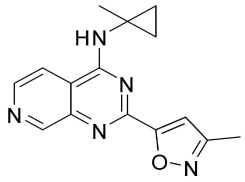
[2388] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.69 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 9.39 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 8.88 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.18 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 7.71 (s, 1H), 7.10 - 7.02 (m, 1H), 1.59 (s, 3H), 0.99 (m, 2H), 0.98 - 0.95 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 317.1.

[2389] 실시예 180: N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1H-1,2,3-트리아졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2390] 

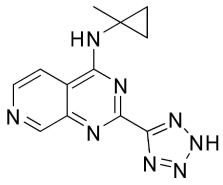
[2391] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19 (s, 1H), 8.64 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.16 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 1.55 (s, 3H), 0.90 (m, 2H), 0.87 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 268.1.

[2392] 실시예 181: 2-(3-메틸-1,2-옥사졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2393] 

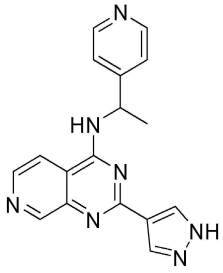
[2394] 1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 9.41 (s, 1H), 8.63 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 6.98 (s, 1H), 2.44 (s, 3H), 1.60 (s, 3H), 0.99 - 0.93 (m, 2H), 0.93 - 0.85 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 282.1.

[2395] 실시예 182: N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(2H-1,2,3,4-테트라졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2396] 

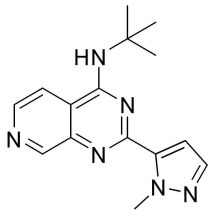
[2397] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.21 (s, 2H), 8.69 (s, 1H), 8.21 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 1.57 (s, 3H), 0.89 (m, 2H), 0.85 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 269.1.

[2398] 실시예 183: 2-(1H-피라졸-4-일)-N-[1-(피리딘-4-일)에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2399] 

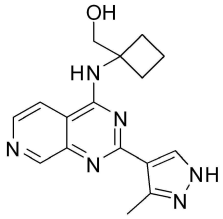
[2400] 1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 9.17 (s, 1H), 8.75 (d, J = 5.6 Hz, 3H), 8.37 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 8.32 (d, J = 1.6 Hz, 2H), 8.14 - 8.09 (m, 2H), 5.89 (q, J = 7.3 Hz, 1H), 1.84 (d, J = 7.2 Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 318.1.

[2401] 실시예 184: N-tert-부틸-2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민

[2402] 

[2403] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.13 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.61 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.38 (t, J = 5.2 Hz, 1H), 7.85 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.53 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 6.97 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 4.37 (s, 3H), 1.59 (s, 9H). LCMS (m/z [M+H]+): 283.1.

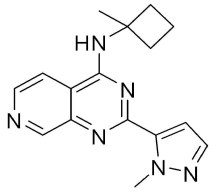
[2404] 실시예 185: (1-{[2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부틸)메탄올



[2405]

[2406] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.07 (s, 1H), 8.62 (s, 1H), 8.38 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.25 - 8.12 (m, 1H), 3.93 (s, 2H), 2.62 (s, 3H), 2.39 (t, J = 7.8 Hz, 4H), 1.85 (dq, J = 12.0, 8.4 Hz, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 311.2.

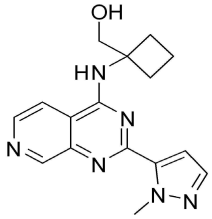
[2407] 실시예 186: 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-(1-메틸사이클로부틸)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2408]

[2409] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.12 (s, 1H), 8.78 (s, 1H), 8.62 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.31 - 8.24 (m, 1H), 7.53 - 7.46 (m, 1H), 6.97 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 4.38 - 4.31 (m, 3H), 2.48 - 2.41 (m, 2H), 2.22 (tt, J = 8.4, 3.2 Hz, 2H), 1.98 - 1.78 (m, 2H), 1.65 (s, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 295.2.

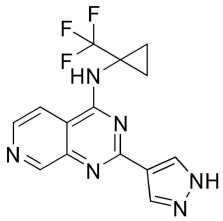
[2410] 실시예 187: (1-{[2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부틸)메탄올



[2411]

[2412] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19 - 9.11 (m, 1H), 8.76 (s, 1H), 8.63 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.40 (dd, J = 5.7, 0.7 Hz, 1H), 7.54 - 7.47 (m, 1H), 6.95 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 4.32 (s, 3H), 3.90 (s, 2H), 2.35 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 1.92 - 1.76 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 311.2.

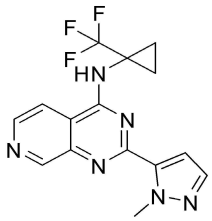
[2413] 실시예 188: 2-(1H-피라졸-4-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2414]

[2415] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.21 (s, 1H), 9.10 (s, 1H), 8.56 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.27 (s, 2H), 8.16 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 1.61 - 1.53 (m, 2H), 1.33 (d, J = 6.0 Hz, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 321.1.

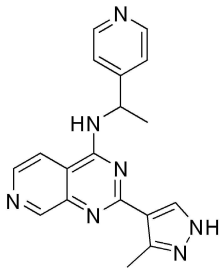
[2416] 실시예 189: 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-[1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2417]

[2418] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.32 (s, 1H), 9.19 (d, J = 0.7 Hz, 1H), 8.65 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.23 (dd, J = 5.7, 0.8 Hz, 1H), 7.58 - 7.47 (m, 1H), 7.07 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 4.37 (s, 3H), 1.64 - 1.49 (m, 2H), 1.37 (d, J = 5.8 Hz, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 335.1.

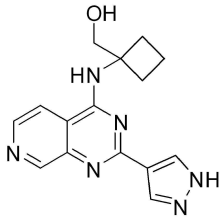
[2419] 실시예 190: 2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-[1-(피리딘-4-일)에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2420]

[2421] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.00 (d, J = 0.7 Hz, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.54 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.51 - 8.47 (m, 2H), 8.30 (dd, J = 5.6, 0.8 Hz, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.50 - 7.40 (m, 2H), 5.54 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 2.48 (s, 3H), 1.63 (d, J = 7.1 Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 332.2.

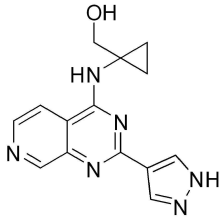
[2422] 실시예 191: (1-{[2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로부틸)메탄올



[2423]

[2424] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ9.11(m, 2H), 8.69(m, 2H), 8.39 (s, 2H), 3.92 (s, 2H), 2.39 (t, J = 7.3 Hz, 4H), 1.87 (p, J = 7.7, 6.6 Hz, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 297.1.

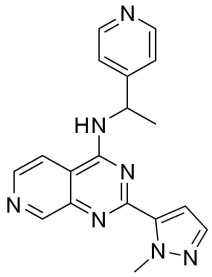
[2425] 실시예 192: (1-{[2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일]아미노}사이클로프로필)메탄올



[2426]

[2427] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ9.65(s, 1H), 9.12 (s, 1H), 8.65 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 8.41 (s, 2H), 8.26 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 3.73 (m, 2H), 1.06 - 0.96 (m, 2H), 0.94 - 0.77 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 283.1.

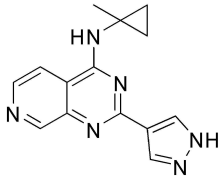
[2428] 실시예 193: 2-(1-메틸-1H-피라졸-5-일)-N-[1-(피리딘-4-일)에틸]피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2429]

[2430] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.37 (s, 1H), 7.93 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 7.85 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.31 (d, J = 6.6 Hz, 2H), 6.63 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.01 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 4.89 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 3.43 (s, 3H), 1.00 (d, J = 7.2 Hz, 3H). LCMS (m/z [M+H]+): 332.2.

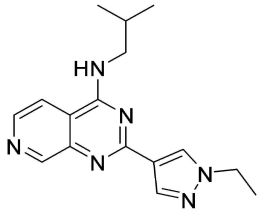
[2431] 실시예 194: N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2432]

[2433] 1HNMR (400 MHz, CD3OD) d 9.03 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.43 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.24 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.93 (dd, J = 5.6, 0.8 Hz, 1H), 1.61 (s, 3H), 0.99-0.95 (m, 2H), 0.90-0.85 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 267.1.

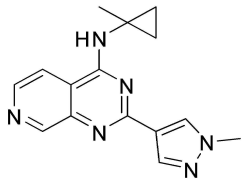
[2434] 실시예 195: 2-(1-에틸-1H-피라졸-4-일)-N-(2-메틸프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2435]

[2436] 1HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) d 9.20 (s, 1H), 8.50 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.24 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 7.43 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 5.87 (br s, 1H), 4.25 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.58 (dd, J = 6.8, 6.0 Hz, 2H), 2.11 (9중선, J = 6.8 Hz, 1H), 1.56 (t, J = 7.2 Hz, 3H), 1.06 (d, J = 6.8 Hz, 6H). LCMS (m/z [M+H]+): 297.2.

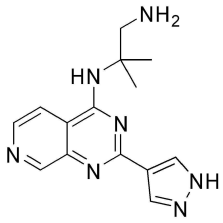
[2437] 실시예 196: 2-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-N-(1-메틸사이클로프로필)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2438]

[2439] 1HNMR (400 MHz, DMSO-d6) d 8.99 (s, 1H), 8.72 (s, 1H), 8.46 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 8.05 (s, 1H), 8.03 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 1.54 (s, 3H), 0.90-0.80 (m, 4H). LCMS (m/z [M+H]+): 281.1.

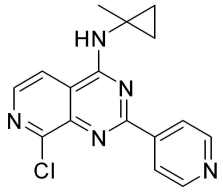
[2440] 실시예 197: N-(1-아미노-2-메틸프로판-2-일)-2-(1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2441]

[2442] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.05 (s, 1H), 8.56 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 8.32 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.28 (m, 1H), 7.76 (m, 3H),3.63 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 1.59 (s, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 284.2.

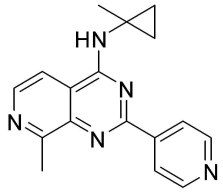
[2443] 실시예 198: 8-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2444]

[2445] 표제 화합물을 1-메틸사이클로프로판아민과 함께 실시예 1에서의 절차를 사용하여 반응식 3에서와 같이 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(중간체 3c)으로부터 제조하였다. 1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 8.78 - 8.66 (m, 2H), 8.61 - 8.49 (m, 2H), 8.30 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.94 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 1.63 (s, 3H), 1.04 - 0.96 (m, 2H), 0.95 - 0.86 (m, 2H). LCMS (m/z [M+H]+): 312.1.

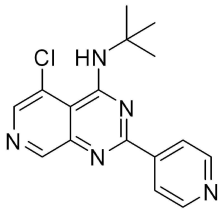
[2446] 실시예 199: 8-메틸-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2447]

[2448] 표제 화합물을 4-피리딘 보론산 대신 2,4,6-트리메틸-1,3,5,2,4,6-트리옥사트리보리난과 함께 중간체 6b에 대한 절차를 사용하여 실시예 198로부터 제조하였다. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 8.79 (d, J = 5.1 Hz, 2H), 8.44 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.41 (d, J = 5.0 Hz, 2H), 7.98 (dd, J = 5.8, 0.8 Hz, 1H), 2.91 (s, 3H), 1.57 (s, 3H), 0.97 - 0.75 (m, 4H). LCMS (m/z [M+H]+): 292.2.

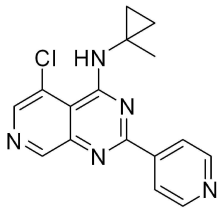
[2449] 실시예 251: N-(tert-부틸)-5-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민



[2450]

[2451] 표제 화합물을 tert-부틸 아민과 함께 실시예 1의 단계 C를 사용하여 반응식 5에서와 같이 4,5-디클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(중간체 5d)으로부터 제조하였다. 1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 9.07 (s, 1H), 8.73 (s, 2H), 8.55 (s, 1H), 8.46 - 8.39 (m, 2H), 1.72 (s, 9H). LCMS (M/Z [M+H]+): 314.1.

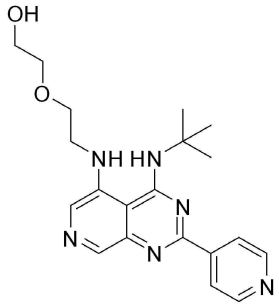
[2452] **실시예 252: 5-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[2453]

[2454] 표제 화합물을 4,5-디클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(중간체 5d) 및 1-메틸사이클로프로판-1-아민을 사용하여 실시예 **251**에서와 같이 제조하였다. 1HNMR (400 MHz, $CDCl_3$) d 9.18 (s, 1H), 8.81 (br s, 2H), 8.50 (s, 1H), 8.42 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 8.00 (br s, 1H), 1.64 (s, 3H), 1.00-0.90 (m, 4H). LCMS (M/Z [M+H]+): 312.1.

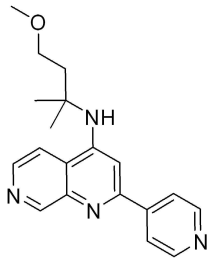
[2455] **실시예 253: 5-클로로-N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[2456]

[2457] N-(tert-부틸)-5-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민(실시예 **251**, 10 mg, 0.032 mmol) 및 2-(2-아미노에톡시)에탄올(670 mg, 6.37 mmol)을 2 mℓ 마이크로파 반응기에서 NMP(1 mℓ) 중에 용해시켰다. 반응을 1 hr 동안 160℃에서 가열하였다(마이크로파 조사). 반응을 rt로 냉각하고 물(20 mℓ)로 희석하고, EtOAc(3x20 mℓ)로 추출하였다. 조합한 유기층을 $Na_2SO_4$로 건조하고, 여과하고, 증발시켰다. 잔류물을 질량-유발 HPLC에 의해 정제하여 표제 화합물을 산출하였다(40%). 1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 8.63 (s, 1H), 8.23 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 8.18 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 8.08 (s, 1H), 3.4-3.8 (m, 8H), 1.72 (s, 9H). LCMS (M/Z [M+H]+): 383.2.

[2458] **실시예 254: N-(4-메톡시-2-메틸부탄-2-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민**



[2459]

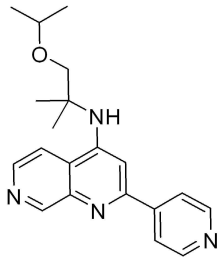
[2460] 표제 화합물을 **반응식 6**에서와 같이 **단계 B**를 사용하여 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(중간체 **6b**)으로부터 제조하였다.

[2461] **단계 B**: 20 mℓ 바이알에서 DMSO(1 mℓ) 중 트리에틸아민(0.044 mℓ, 0.25 mmol), 불화칼륨(7.2 mg, 0.124 mmol), 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(중간체 **6b**, 30 mg, 0.124 mmol), 및 4-메톡시-2-메틸부탄-2-아민(16 mg, 0.137 mmol)을 첨가하여 노란색 현탁액을 얻었다. 반응 혼합물을 24 hr 동안 130℃에서 교반하였다. 용매를 기류 하에 증발시켰다. 잔류물을 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물을 얻었다(21%). 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.20(d, J = 0.7 Hz, 1H), 8.71(m, 2H), 8.48(d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.09(ddd, J = 12.9, 5.2, 1.3 Hz, 2H), 8.05(m, 1H), 7.26(s, 1H), 6.81(s, 1H), 3.50(t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.22(s, 3H), 2.11(t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.52(s, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 323.2.

[2462] 실시예 255~268:

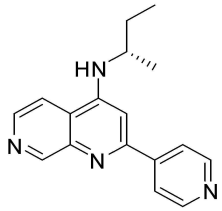
[2463] 특별히 언급된 경우를 제외하고 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(중간체 6b) 및 다양한 아민을 사용하여 실시예 1에 기재된 프로토콜에 따라 이들 화합물을 합성하였다.

[2464] 실시예 255: N-[2-메틸-1-(프로판-2-일옥시)프로판-2-일]-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민

[2465] 

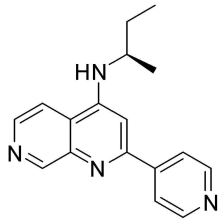
[2466] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.18(dd, J = 7.4, 0.9 Hz, 1H), 8.80(m, 2H), 8.64(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.39(dd, J = 5.7, 0.9 Hz, 1H), 8.29(d, J = 6.1 Hz, 2H), 7.70(s, 1H), 3.90(s, 2H), 3.55-3.50(m, 1H), 1.61(s, 6H), 1.00(s, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 337.2.

[2467] 실시예 256: N-[(2S)-부탄-2-일]-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민

[2468] 

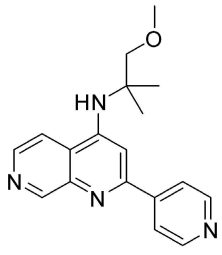
[2469] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.21(d, J = 7.4, 0.9 Hz, 1H), 8.73(m, 2H), 8.49(m, 1H), 8.29(d, J = 6.1 Hz, 1H), 8.20(m, 2H), 7.24(s, 1H), 7.19(d, J = 0.9 Hz, 1H), 4.02-3.99(m, 1H), 1.79-1.75(m, 1H), 1.69-1.65(m, 1H), 1.29(m, 3H), 0.09(t, J = 4.9 Hz,3H). LCMS (M/Z [M+H]+): 279.1.

[2470] 실시예 257: N-[(2R)-부탄-2-일]-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민

[2471] 

[2472] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.21(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.73(m, 2H), 8.49(d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.29(dd, J = 5.9, 0.9 Hz, 1H), 8.20(m, 2H), 7.24(s, 1H), 7.19(d, J = 8.3 Hz, 1H), 4.02-3.99(dt, J = 13.6, 6.5 Hz, 1H), 1.79-1.75(dq, J = 14.4, 7.2 Hz, 1H), 1.69-1.65(m, 1H), 1.29(d, J = 6.4 Hz, 3H), 0.09(t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (M/Z [M+H]+): 279.3.

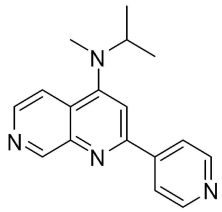
[2473] 실시예 258: N-(1-메톡시-2-메틸프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민

[2474] 

[2475] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.25(dd, J = 6.6, 0.8 Hz, 1H), 8.77(m, 2H), 8.75(s, 1H), 8.24(dt, J = 4.5, 1.9 Hz, 2H), 8.21(s, 1H), 8.11(m, 1H), 7.52(s, 1H), 3.62(s, 2H), 3.34(s, 3H), 1.52(s, 6H). LCMS

(M/Z [M+H]+): 309.4.

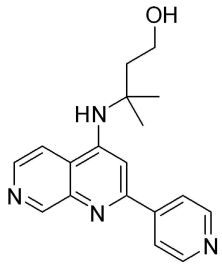
[2476] **실시예 259:** N-메틸-N-(프로판-2-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민



[2477]

[2478] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.34(dd, J = 5.2, 0.9 Hz, 1H), 8.77(ddd, J = 6.2, 4.4, 1.7 Hz, 2H), 8.50(dd, J = 6.5, 5.8 Hz, 1H), 8.20(m, 2H), 7.80(s, 1H), 7.58(s, 1H), 4.20-4.14(m, 1H), 2.97(s, 3H), 1.25(s, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 279.4.

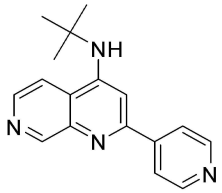
[2479] **실시예 260:** 3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}부탄-1-올



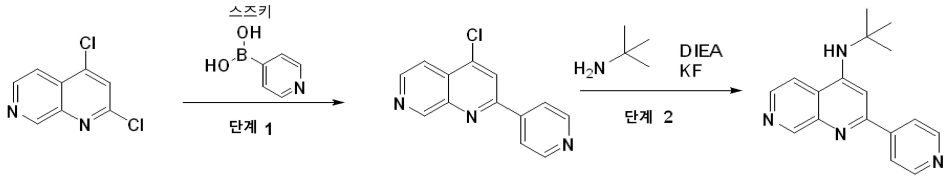
[2480]

[2481] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.40(d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.79(m, 2H), 8.60(d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.26(m, 2H), 7.95(dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H), 7.89(s, 1H), 4.55(t, J = 6.8 Hz, 2H), 4.08-4.04(q, J = 5.2 Hz, 1H), 1.95(t, J = 6.9 Hz, 2H), 1.14(s, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 309.3.

[2482] **실시예 261:** N-(tert-부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민



[2483]



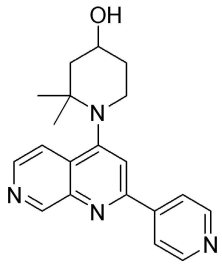

[2484]

[2485] **단계 1:** 20 mℓ 마이크로파 반응기에 아세토니트릴(2 mℓ) 중 팔라듐테트라키스(58.1 mg, 0.050 mmol), 탄산칼륨(1.256 mℓ, 2.51 mmol), 및 2,4-디클로로-1,7-나프티리딘(200 mg, 1.005 mmol) 및 피리딘-4-일보론산(130 mg, 1.055 mmol)을 첨가하여 오렌지색 현탁액을 얻었다. 반응 혼합물을 마이크로파 하에 60분 동안 120℃에서 교반하였다. 미정제 혼합물을 DCM, $H_2O$로 희석하고, 분리하고, DCMx3으로 추출하였다. 유기층을 조합하고, $Na_2SO_4$로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 잔류물을 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물을 얻었다(62%). 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.58 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.85 - 8.78 (m, 4H), 8.32 - 8.29 (m, 2H), 8.11 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H). LCMS [M+H] = 242.

[2486] **단계 2:** 40 mℓ 바이알에 DMSO(용량: 2 mℓ) 중 불화칼륨(11.54 mg, 0.199 mmol), 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(40 mg, 0.166 mmol), 및 2-메틸프로판-2-아민(0.035 mℓ, 0.331 mmol)을 첨가하여 노란색 현탁액을 얻었다. 반응 혼합물을 24 hr 동안 130℃에서 교반하였다. 용매를 기류 하에 증발시켰다. 잔류물을 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물을 얻었다

(82%). 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.22 (d, J = 0.7 Hz, 1H), 8.78 - 8.72 (m, 2H), 8.48 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.30 (dd, J = 6.0, 0.9 Hz, 1H), 8.15 - 8.06 (m, 2H), 7.28 (s, 1H), 6.73 (s, 1H), 1.56 (s, 9H). LCMS [M+H] = 279.2.

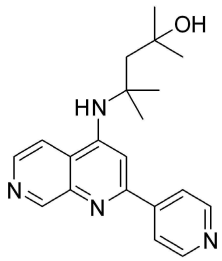
[2487] **실시예 262: 2,2-디메틸-1-[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]피페리딘-4-올**



[2488]

[2489] 1H NMR (400 MHz, 아세톤-d6) δ 9.41 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.80 - 8.75 (m, 2H), 8.60 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.23 - 8.20 (m, 2H), 8.18 - 8.14 (m, 1H), 8.11 (s, 1H), 4.15 - 3.99 (m, 1H), 3.52 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 3.16 (s, 1H), 1.86 - 1.68 (m, 2H), 1.46 (d, J = 16.0 Hz, 3H), 1.16 - 1.00 (m, 3H), 0.87 (d, J = 6.8 Hz, 2H). LCMS (M/Z [M+H]+): 335.2.

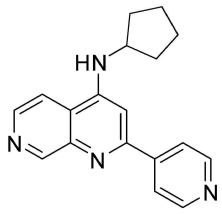
[2490] **실시예 263: 2,4-디메틸-4-{[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}펜탄-2-올**



[2491]

[2492] 1H NMR (400 MHz, 아세톤-d6) δ 9.22 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.78 - 8.67 (m, 2H), 8.63 (s, 1H), 8.40 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.19 - 8.09 (m, 2H), 7.81 (dd, J = 5.9, 0.9 Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 2.08 (s, 2H), 1.75 (s, 6H), 1.47 (d, J = 0.7 Hz, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 337.2.

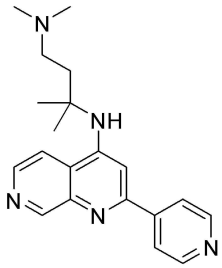
[2493] **실시예 264: N-사이클로펜틸-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민**



[2494]

[2495] 1H NMR (400 MHz, 아세톤-d6) δ 9.26 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.77 - 8.66 (m, 2H), 8.44 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.23 - 8.15 (m, 2H), 8.06 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 7.34 (s, 1H), 6.70 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 4.40 - 4.25 (m, 1H), 2.29 - 2.19 (m, 2H), 1.86 - 1.68 (m, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 279.1.

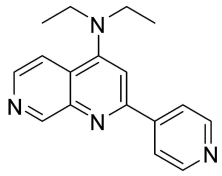
[2496] **실시예 265: 디메틸(3-메틸-3-{[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}부틸)아민**



[2497]

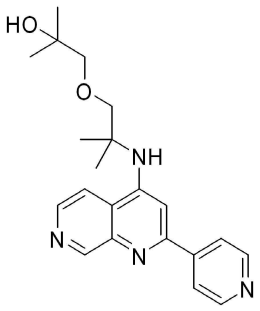
[2498] 1H NMR (500 MHz, 메탄올-d4) δ 9.40 (s, 1H), 8.91 (s, 2H), 8.62 (d, J = 3.5 Hz, 1H), 8.48 (s, 2H), 8.40 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 3.28 - 3.23 (m, 2H), 2.92 - 2.81 (m, 6H), 2.48 (dd, J = 8.3, 5.1 Hz, 2H), 1.71 (d, J = 2.7 Hz, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 336.2.

[2499] **실시예 266: N,N-디에틸-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민**

[2500] 

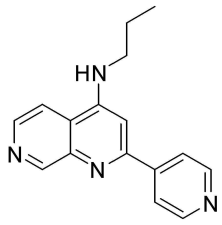
[2501] 1H NMR (400 MHz, 아세톤-d6) δ 9.35 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.78 - 8.74 (m, 2H), 8.51 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.23 - 8.19 (m, 2H), 7.90 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 3.62 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 279.2.

[2502] **실시예 267: 2-메틸-1-(2-메틸-2-{[2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}프로폭시)프로판-2-올**

[2503] 

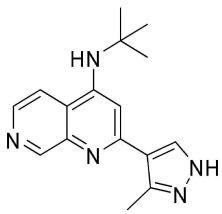
[2504] 1H NMR (500 MHz, 메탄올-d4) δ 9.25 (s, 1H), 8.73 (d, J = 5.2 Hz, 2H), 8.45 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.14 - 8.08 (m, 3H), 7.40 (s, 1H), 3.73 (s, 2H), 3.39 (s, 2H), 1.63 (s, 6H), 1.18 (s, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 367.2.

[2505] **실시예 268: N-프로필-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민**

[2506] 

[2507] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.22 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.77 - 8.70 (m, 2H), 8.48 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.22 - 8.16 (m, 3H), 7.60 (t, J = 5.5 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 3.43 (ddd, J = 7.6, 6.6, 5.5 Hz, 2H), 1.79 - 1.67 (m, 2H), 1.01 (t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (M/Z [M+H]+): 265.1.

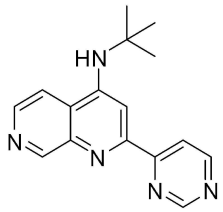
[2508] **실시예 269: N-tert-부틸-2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민**

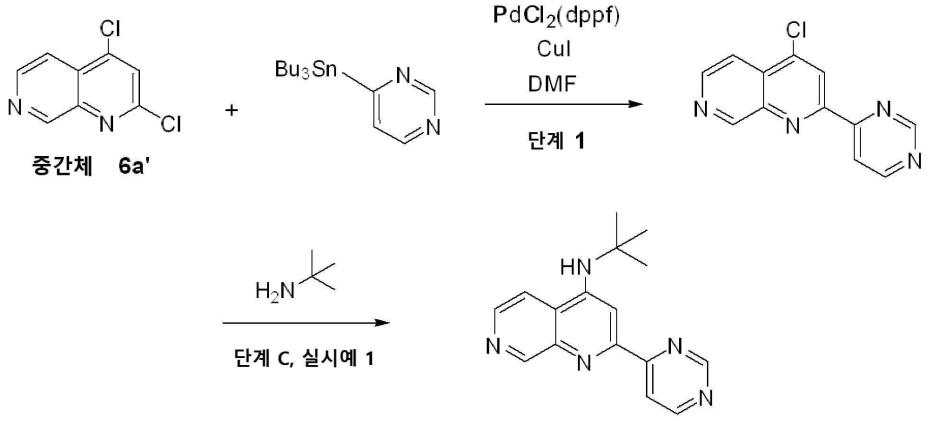
[2509] 

[2510] 표제 화합물을 tert-부틸 3-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보로란-2-일)-1H-피라졸-1-카복실레이트 및 tert-부틸 아민을 사용하여 **반응식 6**에서와 같이 2,4-디클로로-1,7-나프티리딘(중간체 **6a'**)으로부터 제조하였다. 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) 12.81(s, 1H), 9.00(d, J = 0.7 Hz, 1H), 8.31(d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.14(dd, J = 5.9, 0.8 Hz, 1H), 8.00(s, 1H), 6.97(s, 1H), 6.36(s, 1H), 2.65(s, 3H), 1.51(s, 9H). LCMS

(M/Z [M+H]+): 282.4.

[2511] **실시예 270:** N-tert-부틸-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민

[2512] 



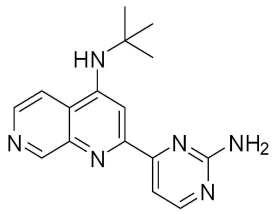

[2513]

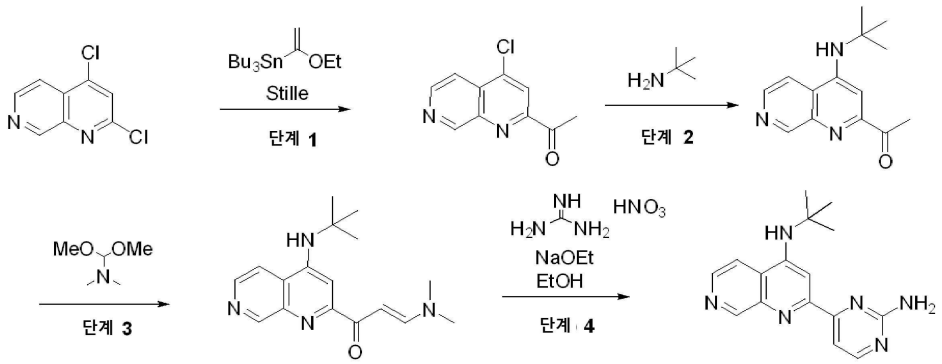
[2514] 단계 1: 2,4-디클로로-1,7-나프티리딘(6a, 100 mg, 0.502 mmol)을 실온에서 건조 DMF 중에 교반하였다. 4-(트리부틸스타닐)피리미딘(165 ㎕, 0.502 mmol), 이어서 41 mg의 $PdCl_2(dppf).CH_2Cl_2$ 부가물(41 mg, 0.05 mmol, 오렌지색 고체) 및 최종적으로 CuI(10 mg, 0.05 mmol, 베이지색 고체)를 첨가하였다. 반응을 130℃에서 1시간 동안 교반하였다. 이어서 반응을 농축하고 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 4-클로로-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘을 산출하였다(30%). LCMS (m/z [M+H]+): 243.6.

[2515] 표제 화합물: 이어서 **단계 C**, **실시예 1**에 상세히 기재된 절차를 사용해서 4-클로로-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘으로 제조하였다.

[2516] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.48(d, J = 1.4 Hz, 1H), 9.25(d, J = 0.8 Hz, 1H), 9.00(d, J = 5.3 Hz, 1H), 8.54(m, 1H), 8.50(m, 1H), 8.31(dd, J = 6.1, 0.9 Hz, 1H), 8.01(s, 1H), 6.80(s, 1H), 1.56(s, 9H). LCMS (M/Z [M+H]+): 280.3.

[2517] **실시예 271:** 2-(2-아미노피리미딘-4-일)-N-tert-부틸-1,7-나프티리딘-4-아민

[2518] 




[2519]

[2520] **단계 1:** 2,4-디클로로-1,7-나프티리딘(**6a'**, 400 mg, 2 mmol), Pd2(dba)3(58 mg, 0.1 mmol) 및 $PPh_3$(53 mg, 0.2 mmol)을 15분 동안 실온에서 3 mℓ의 톨루엔 중에 교반하였다. 이어서 1.5 mℓ의 톨루엔 중 680 ㎕의 트리부틸(1-에톡시비닐)스탄난(680 ㎕, 2 mmol)을 첨가하고, 반응을 1시간 동안 110℃에서 교반하였다. 반응을 실온으로 냉각하였다. 4 mℓ의 1 N HCl을 첨가하고 혼합물을 하룻밤 동안 교반하였다. 이어서 반응을 NaOH로 중화하고 에테르로 추출하였다. 이어서 미정제물 잔류물을 0~70% EtOAc/헥산을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 1-(4-클로로-1,7-나프티리딘-2-일)에탄온을 산출하였다(40%). LCMS (m/z [M+H]+): 207.5.

[2521] **단계 2:** 1-(4-클로로-1,7-나프티리딘-2-일)에탄온(38 mg, 0.18 mmol)을 실온에서 DMF(2 mℓ) 중에 교반하고 $N_2$로 탈기하였다. TEA(37 ㎕, 0.27 mmol)를 첨가하고 5분 동안 교반한 후 14 mg의 KF(14 mg, 0.27 mmol)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 15분 동안 실온에서 교반한 후 2-메틸프로판-2-아민(28 ㎕, 0.27 mmol)을 첨가하고 탈기한 후 2 hr 동안 80℃에서 교반하였다. 이어서 반응을 농축하고 0~100% MeOH/헥산을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 1-(4-(tert-부틸아미노)-1,7-나프티리딘-2-일)에탄온을 산출하였다(60%). LCMS (m/z [M+H]+): 244.3.

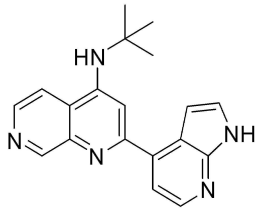
[2522] **단계 3:** 1-(4-(tert-부틸아미노)-1,7-나프티리딘-2-일)에탄온(25 mg, 0.1 mmol)을 6 hr 동안 110℃에서 0.8 mℓ의 DMF/DMA 중에 교반하였다. 이어서 반응을 농축하고 0~100% MeOH/헥산을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 (E)-1-(4-(tert-부틸아미노)-1,7-나프티리딘-2-일)-3-(디메틸아미노)프로프-2-엔-1-온을 산출하였다(30%). LCMS (m/z [M+H]+): 299.4.

[2523] **단계 4:** (E)-1-(4-(tert-부틸아미노)-1,7-나프티리딘-2-일)-3-(디메틸아미노)프로프-2-엔-1-온(8 mg, 0.027 mmol)을 실온에서 EtOH(0.7 mℓ) 중에 교반하였다. 질산구아니딘(4 mg, 0.034 mmol)을 첨가하고 반응을 120분 동안 100℃에서 교반하였다. 이어서 나트륨 에톡시드(EtOH 중, 20 ㎕, 0.054 mmol)를 첨가하고 하룻밤 동안 환류 교반하였다. 이어서 반응을 농축하고 0~20% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물을 산출하였다(30%). 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.20(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.48(m, 1H), 8.41(m, 1H), 8.29(dd, J = 6.0, 0.9 Hz, 1H), 7.91(s, 1H), 7.62(d, J = 5.0 Hz, 1H), 6.74(s, 2H), 6.65(s, 1H), 1.56(s, 9H). LCMS (M/Z [M+H]+): 295.4.

[2524] **실시예 272~274:**

[2525] 이들 화합물을 각각 2,4-디클로로-1,7-나프티리딘(**6a'**) 및 다양한 보론산 또는 에스테르로 **실시예 269**의 제조를 위해 사용된 프로토콜에 따라 합성하였다.

[2526] **실시예 272: N-tert-부틸-2-{1H-피롤로[2,3-b]피리딘-4-일}-1,7-나프티리딘-4-아민**

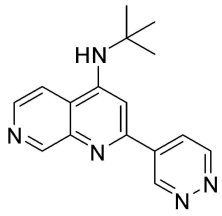



[2527]

[2528] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) 11.86(s, 1H), 9.23(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.50(d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.39(d, J =

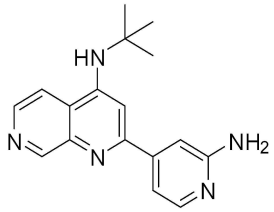
4.9 Hz, 1H), 8.30(m, 1H), 7.63(m, 1H), 7.61(m, 1H), 7.32(s, 1H), 6.96(dd, J = 3.4, 1.9 Hz, 1H), 6.67(s, 1H), 1.56(s, 9H). LCMS (M/Z [M+H]+): 318.4.

[2529] **실시예 273: N-tert-부틸-2-(피리다진-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민**

[2530] 

[2531] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.97(s, 1H), 9.40(d, J = 0.8 Hz, 1H), 9.24(s, 1H), 8.50(d, J = 4.6 Hz, 1H), 8.36(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.31(m, 1H), 7.35(s, 1H), 6.80(s, 1H), 1.58(s, 9H). LCMS (M/Z [M+H]+): 280.3.

[2532] **실시예 274: 2-(2-아미노피리딘-4-일)-N-tert-부틸-1,7-나프티리딘-4-아민**

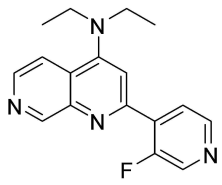
[2533] 

[2534] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.18(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.45(d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.26(m, 1H), 8.05(dd, J = 5.3 0.7 Hz, 1H), 7.20(m, 1H), 7.17(m, 1H), 7.14(m, 1H), 6.63(s, 1H), 6.09(s, 2H), 1.55(s, 9H). LCMS (M/Z [M+H]+): 294.4.

[2535] **실시예 275~286:**

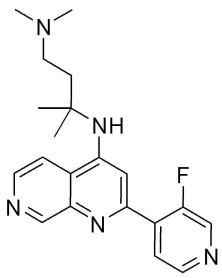
[2536] 이들 화합물을 각각 2,4-디클로로-1,7-나프티리딘(**중간체 6a'**, **반응식 6**) 및 다양한 유기주석 시약 및 아민으로 **실시예 270**의 제조를 위해 사용된 프로토콜에 따라 합성하였다.

[2537] **실시예 275: N,N-디에틸-2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민**

[2538] 

[2539] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.33(d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.78(d, J = 2.7 Hz, 1H), 8.62(dd, J = 4.9, 1.1 Hz, 1H), 8.55(d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.02(dd, J = 6.8, 4.9 Hz, 1H), 7.88(dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 7.42(d, J = 1.5 Hz, 1H), 3.50(q, J = 7.0 Hz, 4H), 1.21(t, J = 7.0 Hz, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 297.1.

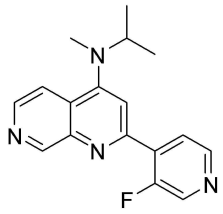
[2540] **실시예 276: (3-{[2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}-3-메틸부틸)디메틸아민**

[2541] 

[2542] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.20(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.74(d, J = 2.8 Hz, 1H), 8.60(dd, J = 4.9, 1.1 Hz, 1H), 8.53(d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.04(dd, J = 6.9, 4.9 Hz, 1H), 7.91-7.83(s, 1H), 7.25(d, J = 1.4 Hz,

1H), 2.60-2.54(m, 2H), 2.33-2.24(m, 6H), 1.96-1.88(m, 2H), 1.51(s, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 354.2.

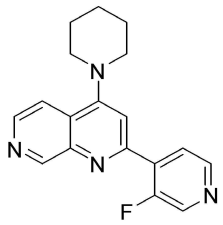
[2543] 실시예 277: 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-메틸-N-(프로판-2-일)-1,7-나프티리딘-4-아민



[2544]

[2545] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.33(m, 1H), 8.78(d, J = 2.7 Hz, 1H), 8.61(dd, J = 4.9, 1.1 Hz, 1H), 8.55(dd, J = 5.9, 2.5 Hz, 1H), 8.05-8.01(dd, J = 6.8, 4.9 Hz, 1H), 7.85(dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 7.41(d, J = 1.4 Hz, 1H), 4.20-4.14(m, 1H), 2.93(s, 3H), 1.28(m, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 297.1.

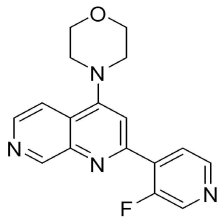
[2546] 실시예 278: 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-4-(피페리딘-1-일)-1,7-나프티리딘



[2547]

[2548] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.39(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.78(d, J = 2.7 Hz, 1H), 8.63(m, 1H), 8.60(m, 1H), 8.03(dd, J = 6.8, 4.9 Hz, 1H), 7.85(dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 7.50(d, J = 1.5 Hz, 1H), 3.32-3.28(m, 4H), 1.87-1.79(m, 4H), 1.72-1.65(m, 2H). LCMS (M/Z [M+H]+): 309.4.

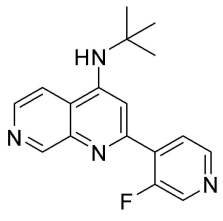
[2549] 실시예 279: 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-4-(모르폴린-4-일)-1,7-나프티리딘



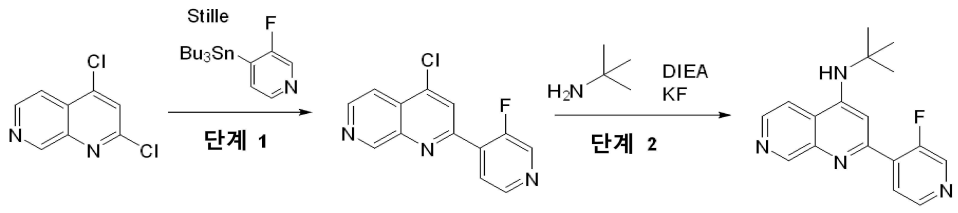
[2550]

[2551] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.40(d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.79(d, J = 2.6 Hz, 1H), 8.62(m, 1H), 8.60(m, 1H), 8.03(dd, J = 6.8, 4.9 Hz, 1H), 7.95(dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 7.54(d, J = 1.4 Hz, 1H), 3.91-3.86(m, 4H), 3.36-3.33(m, 4H). LCMS (M/Z [M+H]+): 311.1.

[2552] 실시예 280: N-tert-부틸-2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민



[2553]

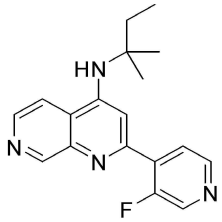



[2554]

[2555] **단계 1:** 20 ㎖ 마이크로파 반응기에서 2,4-디클로로-1,7-나프티리딘(**6a**, 100 ㎎, 0.502 mmol)을 실온에서 건조 DMF(1 ㎖) 중에 교반하였다. 3-플루오로-4-(트리부틸스타닐)피리딘(194 ㎎, 0.502 mmol)에 이어 $PdCl_2(dppf).CH_2Cl_2$ 부가물(41.0 ㎎, 0.050 mmol) 및 CuI(9.6 ㎎, 0.050 mmol)를 첨가하였다. 반응을 130℃에서 0.5시간 동안 교반하였다. 미정제 혼합물을 DCM, $H_2O$로 희석하고, 분리하고, DCMx3으로 추출하였다. 유기층을 조합하고, $Na_2SO_4$로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 잔류물을 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물 4-클로로-2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘을 얻었다(71%). 1H NMR (400 MHz, 아세톤-d6) δ 9.56 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.83 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.74 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 8.67 (dd, J = 5.0, 1.2 Hz, 1H), 8.44 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 8.18 (dd, J = 6.7, 4.9 Hz, 1H), 8.14 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H). LCMS [M+H] = 260.

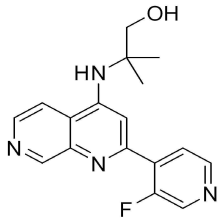
[2556] **단계 2:** 40 ㎖ 바이알에 DMSO(용량: 1 ㎖) 중 불화칼륨(7 ㎎, 0.12 mmol), 4-클로로-2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(26 ㎎, 0.10 mmol), 및 2-메틸프로판-2-아민(0.035 ㎖, 0.331 mmol)을 첨가하여 노란색 현탁액을 얻었다. 반응 혼합물을 24 hr 동안 130℃에서 교반하였다. 용매를 기류 하에 증발시켰다. 잔류물을 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 산물을 얻었다(42%). 1H NMR (400 MHz, 아세톤-d6) δ 9.24 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.65 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 8.59 (dd, J = 4.9, 1.2 Hz, 1H), 8.46 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.15 (dd, J = 6.8, 4.9 Hz, 1H), 8.06 (dd, J = 5.9, 0.9 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 6.30 (s, 1H), 1.61 (s, 9H). LCMS (M/Z $[M+H]^+$): 297.1.

[2557] **실시예 281: 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-(2-메틸부탄-2-일)-1,7-나프티리딘-4-아민**

[2558] 

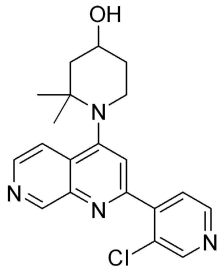
[2559] 1H NMR (500 MHz, 아세톤-d6) δ 9.24 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.64 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 8.58 (dd, J = 4.9, 1.2 Hz, 1H), 8.47 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.15 (dd, J = 6.8, 4.9 Hz, 1H), 8.07 (dd, J = 5.9, 0.9 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 6.12 (s, 1H), 2.03 - 1.98 (m, 2H), 1.56 (s, 6H), 0.94 (t, J = 7.5 Hz, 3H). LCMS (M/Z [M+H]+): 311.2.

[2560] **실시예 282: 2-{[2-(3-플루오로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]아미노}-2-메틸프로판-1-올**

[2561] 

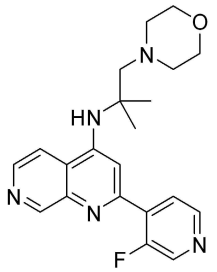
[2562] 1H NMR (400 MHz, 아세톤-d6) δ 9.24 (d, J = 0.8 Hz, 1H), 8.59 (dd, J = 4.9, 1.2 Hz, 1H), 8.49 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.15 (dd, J = 6.8, 4.9 Hz, 1H), 7.97 (dt, J = 5.8, 1.3 Hz, 1H), 7.50 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 6.29 (s, 1H), 3.78 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 1.56 (s, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 313.1.

[2563] 실시예 283: 1-[2-(3-클로로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일]-2,2-디메틸피페리딘-4-올

[2564] 

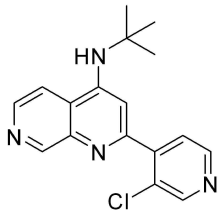
[2565] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.40(s, 1H), 8.79(d, 1H), 8.62(d, 1H), 8.60(d, 1H), 8.03(dd, 1H), 7.95(d, 1H), 7.54(s, 1H), 3.91-3.86(m, 4H), 3.36-3.33(m, 4H). LCMS (M/Z [M+H]+): 311.3.

[2566] 실시예 284: 2-(3-플루오로피리딘-4-일)-N-[2-메틸-1-(모르폴린-4-일)프로판-2-일]-1,7-나프티리딘-4-아민

[2567] 

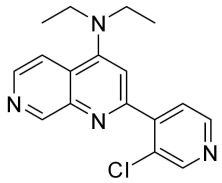
[2568] 1H NMR (500 MHz, 아세톤-d6) δ 9.25 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.64 (d, J = 3.0 Hz, 1H), 8.59 (dd, J = 4.9, 1.2 Hz, 1H), 8.52 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.15 (dd, J = 6.8, 4.9 Hz, 1H), 7.89 (dd, J = 5.9, 0.8 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 1.4 Hz, 1H), 6.77 (s, 1H), 3.70 - 3.64 (m, 4H), 2.75 (s, 2H), 2.69 - 2.62 (m, 4H), 1.60 (s, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 382.2.

[2569] 실시예 285: N-tert-부틸-2-(3-클로로피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민

[2570] 

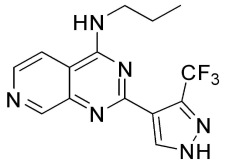
[2571] 1H NMR (400 MHz, 아세톤-d6) δ 9.20 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.78 - 8.69 (m, 1H), 8.65 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 8.47 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.06 (dt, J = 5.9, 1.0 Hz, 1H), 7.79 - 7.70 (m, 1H), 7.25 (s, 1H), 1.60 (s, 9H). LCMS (M/Z [M+H]+): 313.1.

[2572] 실시예 286: 2-(3-클로로피리딘-4-일)-N,N-디에틸-1,7-나프티리딘-4-아민

[2573] 

[2574] 1H NMR (400 MHz, 아세톤-d6) δ 9.31 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.75 (d, J = 0.6 Hz, 1H), 8.67 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 8.54 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 7.93 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 7.76 (dd, J = 4.9, 0.6 Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 3.58 (q, J = 7.1 Hz, 4H), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 6H). LCMS (M/Z [M+H]+): 313.1.

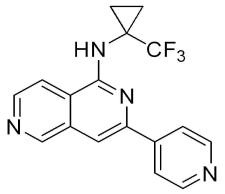
[2575] **실시예 287: *N*-프로필-2-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-아민**



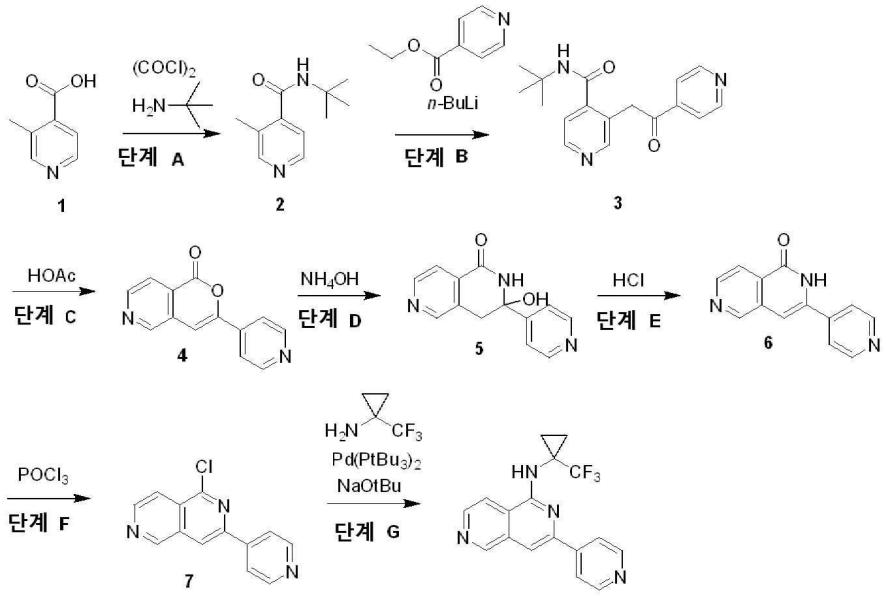
[2576]

[2577] 2,4-디클로로피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 2c**) 및 프로판-1-아민 및 tert-부틸 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보로란-2-일)-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-1-카복실레이트를 사용하여 실시예 **111**에 기재된 프로토콜에 따라 표제 화합물을 합성하였다. 1H NMR (500 MHz, DMSO-d6) δ 13.81 (s, 1H), 9.01 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.64 (t, J = 5.7 Hz, 1H), 8.61 - 8.57 (m, 1H), 8.55 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.11 (dd, J = 5.6, 1.0 Hz, 1H), 3.64 - 3.56 (m, 2H), 1.73 - 1.62 (m, 2H), 0.96 (t, J = 7.4 Hz, 3H). LCMS (M/Z $[M+H]^+$): 323.1.

[2578] **실시예 288: 3-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로프로필)-2,6-나프티리딘-1-아민**



[2579]




[2580]

[2581] **단계 A:** 디클로로메탄(200 ㎖) 중 3-메틸이소니코틴산(**1**)(10 g, 72.9 mmol)의 현탁액에 0℃에서 DMF(200 ㎖)를 첨가하였다. 에틸 클로로포르메이트(8.6 ㎖, 12.5 g, 98.4 mmol)를 0℃에서 10분에 걸쳐 적가하여 혼합물을 생성하고 이를 15분 동안 0℃에서 교반하였다. *tert*-부틸아민(35.0 ㎖, 24.2 g, 330.0 mmol)을 0℃에서 반응 혼합물에 15분에 걸쳐 적가하여, 반응 혼합물을 감압 하에 농축하여 잔류물을 생성하고 크로마토그래피(헥산:EtOAc)를 거쳐 **2**를 얻었다(11.6 g, 83%). $^1$H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 8.46 (s, 1 H), 8.43 (d, $J$ = 5.0 Hz, 1 H), 7.20 (d, $J$ = 5.0 Hz, 1 H), 2.29 (s, 3H), 1.37 (s, 9H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 193.

[2582] **단계 B:** THF(440 ㎖) 중 **2**의 용액(11.6 g, 60.3 mmol)에 *n*-BuLi의 용액(58.0 ㎖, 145.0 mmol, 헥산 중 2.5 M)을 $N_2$ 하에 -45℃에서 15분에 걸쳐 적가하여 혼합물을 생성하고 이를 -45℃에서 45분에 걸쳐 교반하였다. 이어서 THF(20 ㎖) 중 에틸 이소니코티네이트(10.0 g, 66.3 mol)의 용액을 -45℃에서 15분에 걸쳐 적가하였다. 반응 혼합물을 2 h에 걸쳐 실온으로 가온하도록 두고, 포화 수성 $NH_4Cl$ 용액(1000 ㎖) 내로 부었다. 유기층을 분리하고, 수층을 EtOAc(3×400 ㎖)로 추출하였다. 조합한 유기층을 포화 수성 NaCl 용액(100 ㎖)으로 세척하고,

$MgSO_4$ 상에서 건조하고, 감압 하에 증발시켜 미정제물(**3**)을 얻었다. LCMS (m/z $[M+H]^+$): 298. 미정제 산물을 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다.

[2583] **단계 C:** 아세트산(200 mℓ) 중 단계 B의 미정제물(**3**)의 용액을 16 h 동안 100℃에서 가열하고, 실온으로 냉각하고, 감압 하에 약 80 mℓ로 농축하였다. 물(120 mℓ)을 첨가하고, 혼합물을 여과하여 흰색 침전물을 얻고, 이를 물(2x50 mℓ)로 세척하고, 감압 하에 건조하여 미정제물(**4**)을 산출하였다(8.08 g). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 225. 미정제 산물을 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다.

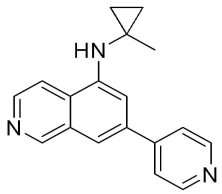
[2584] **단계 D:** EtOH(100 mℓ) 중 미정제물(**4**)(8.08 g)의 현탁액에 실온에서 수성 $NH_4OH$ 용액(80 mℓ, 28.5%)을 첨가하여 혼합물을 생성하고, 이를 2.5 h 동안 교반하고, 증발시켜 미정제물(**5**)을 산출하였다. LCMS (m/z $[M+H]^+$): 242. 미정제 산물을 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다.

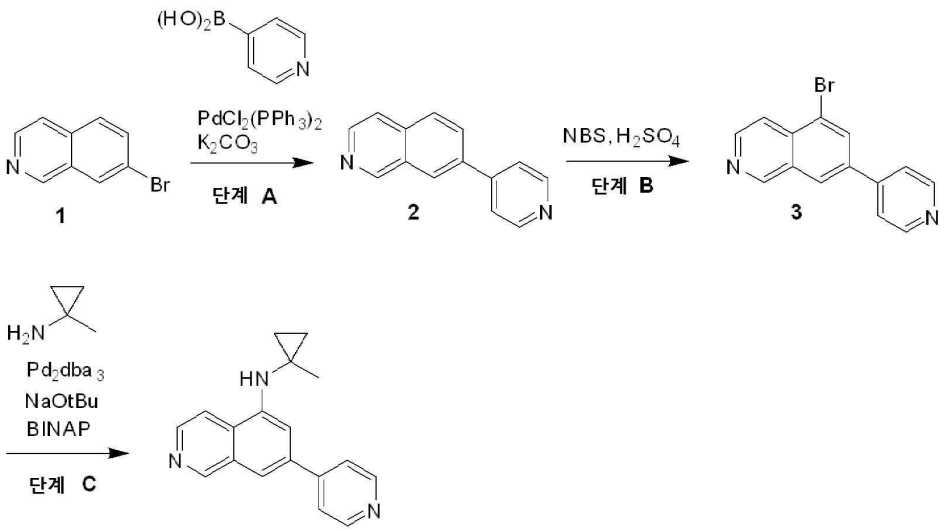
[2585] **단계 E:** EtOH(100 mℓ) 중 단계 D의 미정제물(**5**)의 현탁액에 물(20 mℓ), 이어서 수성 HCl 용액(12 M, 25 mℓ)을 0℃에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 19 h 동안 교반하고, 여과하여 흰색 고체를 얻고, 이를 감압 하에 건조하여 미정제물(**6**)을 산출하였다(10.2 g). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 224. 미정제 산물을 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다.

[2586] **단계 F:** 개방 ChemGlass 후벽 둥근 바닥 압력 용기(350 mℓ)에서 $POCl_3$(75 mℓ) 중 미정제물(**6**)(10.2 g)의 현탁액을 온도가 100℃에 도달할 때까지 매우 느리게 가열하고, 30분 동안 100℃에서 교반하였다. 이어서 압력 용기를 밀봉하고, 반응 혼합물을 14 h 동안 135℃에서 가열하였다. $POCl_3$을 감압 하에 제거하고, 잔류물을 빙수(50 g의 얼음 및 50 mℓ의 물)와 혼합하였다. 혼합물의 pH를 수성 NaOH 용액(1 M)으로 약 7로 조정한 후, 포화 수성 $Na_2CO_3$ 용액으로 약 10으로 조정하였다. 혼합물의 여과로 흰색 고체를 얻고 이를 감압 하에 건조하여 (**7**)을 산출하였다(7.1 g, (**2**)로부터 5단계에 있어서 수율 49%). $^1H$ NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.59 (s, 1H), 8.94 (s, 1H), 8.89 (d, $J$ = 5.6 Hz, 1H), 8.78 (d, $J$ = 4.8 Hz, 2H), 8.15 (d, $J$ = 4.8 Hz, 2H), 8.14 (d, $J$ = 5.6 Hz, 1H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 242.

[2587] **단계 G:** 디옥산(1.0 mℓ) 중 중간체(**7**)(60.0 mg, 0.25 mmol) 및 1-(트리플루오로메틸)사이클로프로판-1-아민(93.0 mg, 0.74 mmol)의 용액에 비스(트리-tert-부틸포스핀)팔라듐(13.0 mg, 0.2마이크로몰) 및 나트륨 *tert*-부톡시드(71.0 mg, 0.74 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 하룻밤 동안 130℃에서 $N_2$ 하에 가열하고, 농축하여 잔류물을 생성하고, 크로마토그래피(MeOH/DCM)를 거쳐 표제 화합물을 산출하였다. $^1H$ NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.35 (s, 1H), 8.95 (d, $J$ = 8.0 Hz, 2H), 8.75 (d, $J$ = 4.0 Hz, 1H), 8.71 (s, 1H), 8.57 (d, $J$ = 8.0 Hz, 2H), 8.34 (s, 1H), 8.31 d, $J$ = 4.0 Hz, 1H), 1.57 (m, 2H), 1.31 (m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 331.

[2588] **실시예 289: N-(1-메틸사이클로프로필)-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린-5-아민**

[2589] 



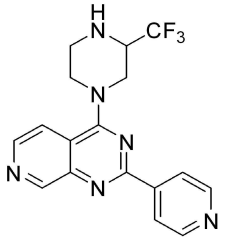

[2590]

[2591] **단계 A:** DMF(7 mℓ) 중 7-브로모이소퀴놀린(**1**)(300 mg, 1.44 mmol), 피리딘-4-일보론산(213 mg, 1.73 mmol), 비스(트리페닐포스핀)팔라듐(II) 디클로라이드($PdCl_2(PPh_3)_2$, 98 mg, 0.14 mmol) 및 탄산칼륨(2 N, 4.3 mℓ)의 현탁액을 교반하고 3시간 동안 100℃에서 가열하였다. 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과하였다. 용액을 물로 희석하고 EtOAx3으로 추출하였다. 조합한 유기층을 포화 수성 NaCl 용액으로 세척하고, $MgSO_4$ 상에서 건조하고, 감압 하에 증발시켰다. 생성된 미정제물을 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린(**2**, 282 mg)을 담갈색 오일로 산출하였다. LCMS (m/z $[M+H]^+$): 207.

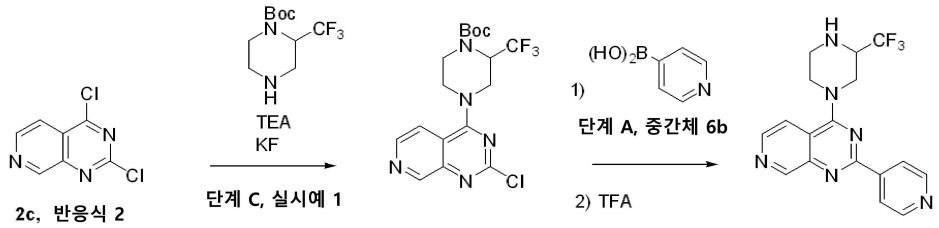
[2592] **단계 B:** 농축 $H_2SO_4$(3 mℓ) 중 7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린(**2**)(282 mg, 1.37 mmol)의 용액에 0℃에서 N-브로모숙신이미드(NBS, 488 mg, 2.74 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 2 h에 걸쳐 실온으로 가온되도록 두고, 빙수(20 mℓ) 내로 붓고, pH 약 8까지 포화 수성 $NaHCO_3$ 용액을 첨가하였다. 수층을 EtOAx3으로 추출하였다. 조합한 유기층을 포화 수성 NaCl 용액으로 세척하고, $MgSO_4$ 상에서 건조하고, 감압 하에 증발시켰다. 생성된 미정제물을 0~10% MeOH/DCM을 사용하여 COMBIFLASH® 시스템(ISCO) 상에서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 5-브로모-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린(**3**, 110 mg)을 산출하였다. LCMS (m/z $[M+H]^+$): 285/287.

[2593] **단계 C:** 톨루엔(1.5 mℓ) 중 5-브로모-7-(피리딘-4-일)이소퀴놀린(**3**)(30 mg, 0.105 mmol), 1-메틸사이클로프로판-1-아민 하이드로클로라이드(28.3 mg, 0.263 mmol), 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐(0)($Pd_2dba_3$, 9.7 mg, 0.0105 mmol), 2,2'-비스(디페닐포스피노)-1,1'-바이나프틸(BINAP, 6.5 mg, 0.0105 mmol) 및 나트륨 *tert*-부톡시드(44.3 mg, 0.462)의 현탁액을 16 h 동안 90℃에서 $N_2$ 하에 가열하고, 실온으로 냉각하고, 농축하였다. 잔류물을 MeOH로 희석하고 여과한 후, 10~90% 아세토니트릴/물을 사용하여 질량-유발 분취용 역상 HPLC에 의해 정제하여 표제 화합물을 산출하였다(6 mg). 1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 9.24 (s, 1H), 8.74 (s, 2H), 8.49 (s, 1H), 7.69 - 7.60 (m, 2H), 7.59 - 7.56 (m, 1H), 7.52 - 7.46 (m, 1H), 7.39 - 7.36 (m, 1H), 1.52 (s, 3H), 0.98 - 0.92 (m, 2H), 0.88 - 0.81 (m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 276.

[2594] **실시예 290: 2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-d]피리미딘**




[2595]



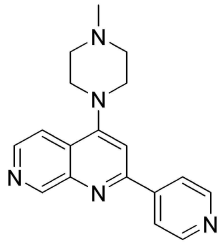

2c, 반응식 2

[2596]

[2597] 실시예 111에 기재된 프로토콜에 따라 2,4-디클로로피리도[3,4-d]피리미딘(중간체 2c)과 tert-부틸 2-(트리플루오로메틸)피페라진-1-카복실레이트 및 피리딘-4-일보론산을 사용한 후 TFA로 N-Boc 기를 탈보호하여 표제 화합물을 합성하였다.

[2598] 1H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ 9.46 (d, J = 0.9 Hz, 1H), 8.83 - 8.78 (m, 2H), 8.63 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.35 - 8.30 (m, 2H), 7.74 (dd, J = 5.8, 0.9 Hz, 1H), 5.80 - 5.67 (m, 1H), 4.07 (dt, J = 24.3, 12.4 Hz, 2H), 3.65 (d, J = 14.2 Hz, 1H), 3.34 (d, J = 14.6 Hz, 1H), 3.18 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 2.89 (t, J = 11.0 Hz, 1H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 361.1.

[2599] **실시예 291: 4-(4-메틸피페라진-1-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘**



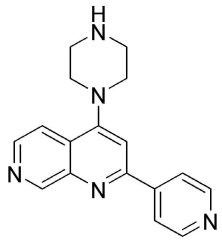
[2600]

[2601] 표제 화합물을 하기와 같이 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**) 및 1-메틸피페라진으로부터 합성하였다:

[2602] 디옥산(2 ㎖) 중 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**, 30 mg, 0.124 mmol), 1-메틸피페라진(50 mg, 0.499 mmol), 인산칼륨(132 mg, 0.621 mmol), RuPhos Pd G3(16 mg, 0.019 mmol) 및 RuPhos(13 mg, 0.028 mmol)의 용액을 10분 동안 130℃에서 마이크로파 바이알에서 아르곤 하에 가열하였다. 용매를 감압 하에 증발시켰다. 잔류물을 20~100% 에틸 아세테이트/사이클로헥산에 이어 2~30% 메탄올/디클로로메탄을 사용해서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물(21%)을 얻었다.

[2603] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.38 (s, 1H), 8.76 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 8.55 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.23 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 7.85 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 3.37 (s, 4H), 2.63 (s, 4H), 2.30 (s, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 306.3, $Rt_1$=0.38 분

[2604] **실시예 292: 4-(피페라진-1-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘**



[2605]

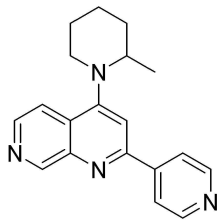
[2606] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**) 및 tert-부틸 피페라진-1-카복실레이트(단계 1) 및 디에틸에테르 중 HCl을 사용하는 Boc-탈보호(단계 2)로부터 2단계로 **실시예 291**과 유사하게 합성하였다.

[2607] **단계 2**(Boc-탈보호):

[2608] 디클로로메탄(5 ㎖) 중 tert-부틸 4-(2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)피페라진-1-카복실레이트(24 ㎎, 0.061 mmol)의 용액에 디에틸 에테르(2 ㎖, 12 mmol) 중 6 M HCl을 첨가하였다. 생성된 노란색 현탁액을 1 h 동안 r.t.에서 교반하였다. 노란색 침전을 여과 제거하고 디클로로메탄으로 세척하였다. 하이드로클로라이드 염을 MeOH 중에 용해시키고 용액을 PoraPak Rxn CX 20cc(2 g) 카트리지 상에 넣었다. 이어서 카트리지를 5 ㎖ MeOH로 2회 세척하였다. 마지막으로, 화합물을 MeOH 중 7 N $NH_3$로 용출하였다. 여액을 감압 하에 증발시켜 표제 화합물을 얻었다(76%).

[2609] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.37 (s, 1H), 8.76 (d, J = 4.7 Hz, 2H), 8.55 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.22 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 7.86 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 3.28 (s, 4H), 2.99 (s, 4H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 292.3, $Rt_1$=0.38 분

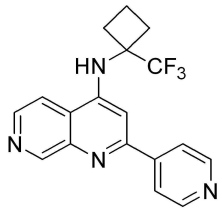
[2610] **실시예 293: 4-(2-메틸피페리딘-1-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘**

[2611] 

[2612] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**) 및 2-메틸피페리딘으로부터 **실시예 291**과 유사하게 합성하였다.

[2613] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.48 - 9.32 (m, 1H), 8.86 - 8.74 (m, 2H), 8.56 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.30 - 8.16 (m, 2H), 7.86 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 7.72 (s, 1H), 4.10 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 3.53 - 3.41 (m, 1H), 3.21 (d, J = 12.4 Hz, 1H), 2.05 (s, 1H), 1.86 - 1.74 (m, 3H), 1.62 (s, 2H), 1.06 (d, J = 6.5 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 305.3, $Rt_1$=0.98 분

[2614] **실시예 294: 2-(피리딘-4-일)-N-(1-(트리플루오로메틸)사이클로부틸)-1,7-나프티리딘-4-아민**

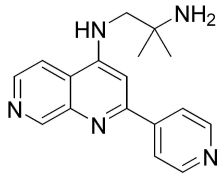
[2615] 

[2616] 표제 화합물을 하기와 같이 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**) 및 1-(트리플루오로메틸)사이클로부탄-1-아민으로부터 합성하였다:

[2617] 디옥산(5 ㎖) 중 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(중간체 **6b**, 100 ㎎, 0.414 mmol), 1-(트리플루오로메틸)사이클로부탄-1-아민(115 ㎎, 0.828 mmol), 칼륨 tert-부틸레이트(139 ㎎, 1.241 mmol), $Pd_2(dba)_3$×$CHCl_3$(43 ㎎, 0.042 mmol) 및 PhCPhos(36 ㎎, 0.085 mmol)의 용액을 30분 동안 100℃에서 마이크로파 바이알에서 아르곤 하에 가열하였다. 용매를 감압 하에 증발시켰다. 잔류물을 20~100% 에틸 아세테이트/사이클로헥산에 이어 2~10% 메탄올/디클로로메탄을 사용해서 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물(9%)을 얻었다.

[2618] 1H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.30 (s, 1H), 8.78 - 8.74 (m, 2H), 8.57 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.40 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.08 - 8.04 (m, 2H), 7.89 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 2.85 - 2.78 (m, 2H), 2.74 (d, J = 11.6 Hz, 2H), 2.04 (dd, J = 18.6, 9.7 Hz, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 345.3, $Rt_1$=0.84 분

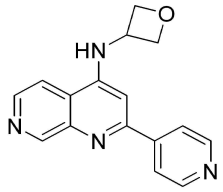
[2619] **실시예 295: 2-메틸-N1-(2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)프로판-1,2-디아민**

[2620] 

[2621] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**) 및 tert-부틸(1-아미노-2-메틸프로판-2-일)카바메이트(단계 1) 및 디에틸에테르 중 HCl을 사용하는 Boc-탈보호(단계 2, **실시예 292**에 기재됨)로부터 2단계로 **실시예 254**와 유사하게 합성하였다.

[2622] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.24 (s, 1H), 8.75 (d, *J*=5.14 Hz, 2H), 8.51 (d, *J*=5.75 Hz, 1H), 8.26 (d, *J*=5.75 Hz, 1H), 8.21 (d, *J*=5.26 Hz, 2H), 7.40 (s, 1H), 7.29 (br s, 1H), 3.38 (br s, 2H), 1.63-2.22 (m, 2H), 1.16 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 294.4, $Rt_1$=0.37 분

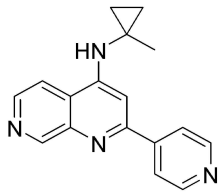
[2623] **실시예 296: N-(옥세탄-3-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민**

[2624] 

[2625] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**) 및 옥세탄-3-아민으로부터 **실시예 254**와 유사하게 합성하였다.

[2626] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.28 (s, 1H), 8.76 (d, *J*=5.99 Hz, 2H), 8.57 (d, *J*=5.75 Hz, 1H), 8.29 (d, *J*=5.75 Hz, 1H), 8.21 (d, *J*=5.99 Hz, 2H), 8.11 (br d, *J*=5.75 Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 4.99-5.17 (m, 3H), 4.73 (t, *J*=5.93 Hz, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 279.3, $Rt_1$=0.49 분

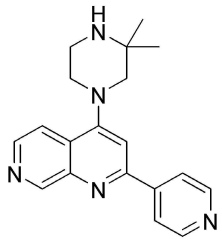
[2627] **실시예 297: N-(1-메틸사이클로프로필)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민**

[2628] 

[2629] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**) 및 1-메틸사이클로프로판-1-아민으로부터 **실시예 254**와 유사하게 합성하였다.

[2630] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.34 (s, 1H), 8.78 (d, *J*=5.75 Hz, 2H), 8.48 (d, *J*=5.87 Hz, 1H), 8.20 (d, *J*=5.87 Hz, 2H), 8.07 (d, *J*=5.87 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 3.29 (s, 3H), 3.14-3.20 (m, 1H), 0.89-0.97 (m, 2H), 0.52-0.61 (m, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 277.3, $Rt_1$=0.73 분

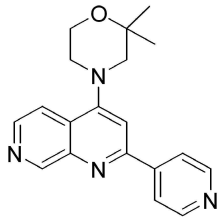
[2631] **실시예 298: 4-(3,3-디메틸피페라진-1-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘**

[2632] 

[2633] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**) 및 tert-부틸 2,2-디메틸피페라진-1-카복실레이트(단계 1) 및 디에틸에테르 중 HCl을 사용하는 Boc-탈보호(단계 2, **실시예 292**에 기재됨)로부터 2단계로 **실시예 291**과 유사하게 합성하였다.

[2634] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.41 (s, 1H), 8.79 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 8.59 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.26 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.90 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 7.70 (s, 1H), 3.31 (s, 1H), 3.25 (d, J = 4.9 Hz, 2H), 3.10 (s, 4H), 1.26 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 320.3, $Rt_1$=0.45 분

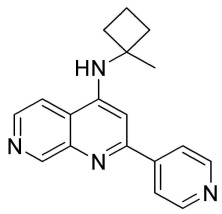
[2635] **실시예 299: 2,2-디메틸-4-(2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)모르폴린**

[2636] 

[2637] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**) 및 2,2-디메틸모르폴린으로부터 **실시예 291**과 유사하게 합성하였다.

[2638] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.43 (s, 1H), 8.80 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 8.61 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.27 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 7.93 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 7.75 (s, 1H), 4.01 - 3.94 (m, 2H), 3.31 (s, 2H), 3.21 (s, 2H),1.39 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 321.3, $Rt_1$=0.81 분

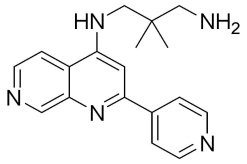
[2639] **실시예 300: N-(1-메틸사이클로부틸)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민**

[2640] 

[2641] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**) 및 1-메틸사이클로부탄-1-아민으로부터 **실시예 254**와 유사하게 합성하였다.

[2642] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.23 (s, 1H), 8.75 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 8.49 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.26 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.08 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 7.64 (s, 1H), 6.83 (s, 1H), 2.45 (t, J = 10.4 Hz, 2H), 2.32 (t, J= 9.2 Hz, 2H), 1.97 (ddd, J = 25.6, 20.0, 9.7 Hz, 2H), 1.62 (s, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 291.3, $Rt_1$=0.70 분

[2643] **실시예 301: 2,2-디메틸-N1-(2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)프로판-1,3-디아민**

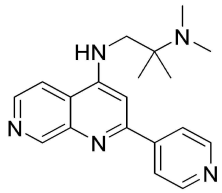


[2644]

[2645] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**) 및 tert-부틸 (3-아미노-2,2-디메틸프로필)카바메이트(단계 1) 및 디에틸에테르 중 HCl을 사용하는 Boc-탈보호(단계 2, **실시예 292**에 기재됨)로부터 2단계로 **실시예 254**와 유사하게 합성하였다.

[2646] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.20 (s, 1H), 8.72 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 8.47 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.17 (d, J = 6.0 Hz, 2H), 8.01 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 7.31 (s, 1H), 3.36 (s, 2H), 3.27 (s, 2H), 2.60 (s, 2H), 0.97 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 308.3, $Rt_1$=0.41 분

[2647] **실시예 302: $N^2$,$N^2$,2-트리메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)프로판-1,2-디아민**

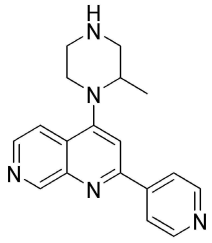


[2648]

[2649] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**) 및 $N^2$,$N^2$,2-트리메틸프로판-1,2-디아민으로부터 **실시예 254**와 유사하게 합성하였다.

[2650] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.27 (s, 1H), 8.76 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 8.54 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.23 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 8.05 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 3.42 (s, 2H), 2.29 (d, J = 15.6 Hz, 6H), 1.16 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 322.3, $Rt_1$=0.39 분

[2651] **실시예 303: 4-(2-메틸피페라진-1-일)-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘**

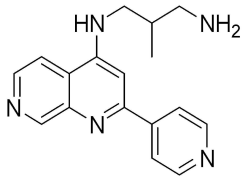


[2652]

[2653] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**) 및 tert-부틸 3-메틸피페라진-1-카복실레이트(단계 1) 및 디에틸 에테르 중 HCl을 사용하는 Boc-탈보호(단계 2, **실시예 292**에 기재됨)로부터 2단계로 **실시예 291**과 유사하게 합성하였다.

[2654] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.44 (s, 1H), 8.80 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 8.60 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.28 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 7.98 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 7.84 (s, 1H), 4.08 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 3.60 (t, J = 9.6 Hz, 1H), 3.42 (dd, J = 12.3, 2.9 Hz, 1H), 3.29 - 3.17 (m, 2H), 3.12 (t, J = 9.3 Hz, 1H), 2.98 (dd, J = 12.3, 4.1 Hz, 1H), 1.10 (d, J = 6.5 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 306.3, $Rt_1$=0.43 분

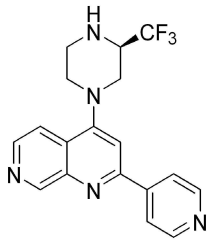
[2655] **실시예 304: 2-메틸-*N*$^1$-(2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)프로판-1,3-디아민**

[2656] 

[2657] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**) 및 tert-부틸 (3-아미노-2-메틸프로필)카바메이트(단계 1) 및 디에틸에테르 중 HCl을 사용하는 Boc-탈보호(단계 2, **실시예 292**에 기재됨)로부터 2단계로 **실시예 254**와 유사하게 합성하였다.

[2658] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.25 (s, 1H), 8.76 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 8.51 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.24 - 8.16 (m, 3H), 7.96 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 5.14 (s, 2H), 3.50 (dd, J = 13.4, 6.8 Hz, 1H), 3.40 (dd, J = 13.8, 6.8 Hz, 1H), 2.80 (dd, J = 12.6, 6.0 Hz, 1H), 2.70 (dd, J = 12.5, 6.4 Hz, 1H), 2.11 (dq, J = 13.2, 6.6 Hz, 1H), 1.04 (d, J = 6.7 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 294.3, $Rt_1$=0.37 분

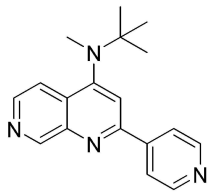
[2659] **실시예 305: (*R*)-2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)-1,7-나프티리딘**

[2660] 

[2661] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**) 및 (*R*)-2-(트리플루오로메틸)피페라진으로부터 **실시예 291**과 유사하게 합성하였다.

[2662] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.40 (s, 1H), 8.84 - 8.71 (m, 2H), 8.58 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.35 - 8.18 (m, 2H), 7.88 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 7.79 (s, 1H), 3.79 (s, 1H), 3.66 (d, J = 11.9 Hz, 1H), 3.53 (d, J = 10.3 Hz, 1H), 3.23 - 2.94 (m, 5H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 360.3, $Rt_1$=0.71 분

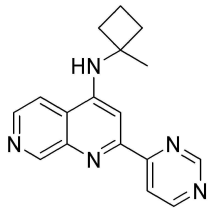
[2663] **실시예 306: N-(tert-부틸)-N-메틸-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민**

[2664] 

[2665] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘(**중간체 6b**) 및 N,2-디메틸프로판-2-아민으로부터 **실시예 254**와 유사하게 합성하였다.

[2666] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.43 (s, 1H), 8.81 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 8.61 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.24 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 8.13 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 2.97 (s, 3H), 1.30 (s, 9H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 293.3, $Rt_1$=1.01 분

[2667] 실시예 307: *N*-(1-메틸사이클로부틸)-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-아민

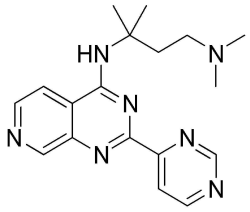


[2668]

[2669] 표제 화합물을 2,4-디클로로-1,7-나프티리딘(**중간체 6a'**) 및 4-(트리부틸스타닐)피리미딘으로부터(단계 1) 및 4-클로로-2-(피리미딘-4-일)-1,7-나프티리딘 및 1-메틸사이클로부탄-1-아민으로부터(단계 2) 2단계로 **실시예 270**과 유사하게 합성하였다.

[2670] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.37 (s, 1H), 9.27 (s, 1H), 9.01 (dd, J = 5.2, 1.5 Hz, 1H), 8.59 - 8.48 (m, 2H), 8.29 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.58 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 2.46 (s, 2H), 2.27 (dd, J=0.6, 9.8 Hz, 2H), 1.98 (dd, J=10.6, 10.2 Hz, 2H), 1.62 (s, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 292.4, $Rt_1$=0.82 분

[2671] 실시예 308: $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(피리미딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민

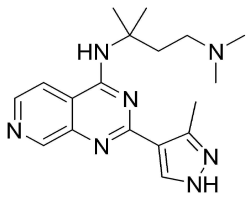


[2672]

[2673] 표제 화합물을 2,4-디클로로피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 2c**) 및 $N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민으로부터(단계 1) 및 $N^3$-(2-클로로피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)-$N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민 및 4-(트리부틸스타닐)피리미딘으로부터(단계 2) 2단계로 **실시예 159**와 유사하게 합성하였다.

[2674] $^1$H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ ppm 9.29 - 9.48 (m, 2 H), 9.22 (s, 1 H), 9.05 (br d, *J*=5.01 Hz, 1 H), 8.70 (br d, *J*=5.50 Hz, 1 H), 8.38 (br d, *J*=5.01 Hz, 1 H), 7.91 (br d, *J*=4.89 Hz, 1 H), 2.21 - 2.43 (m, 8 H), 2.05 (br s, 2 H), 1.66 (s, 6 H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 338.3, $Rt_1$=0.47 분

[2675] 실시예 309: $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민



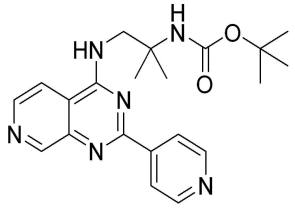
[2676]

[2677] 표제 화합물을 2,4-디클로로피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 2c**) 및 $N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민으로부터(단계 1) 및 $N^3$-(2-클로로피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)-$N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민 및 *tert*-부틸 3-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보로란-2-일)-1H-피라졸-1-카복실레이트로부터(CAS no.1009071-34-4, 단계 2) 2단계로 **실시예 111**과 유사하게 합성하였다.

[2678] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ ppm 12.57 - 12.95 (m, 1 H), 8.89 - 9.00 (m, 2 H), 8.48 (d, *J*=5.50 Hz, 1 H), 7.93 - 8.29 (m, 1 H), 7.75 (br d, *J*=5.38 Hz, 1 H), 2.55 - 2.84 (m, 5 H), 2.25 (s, 6 H), 1.99 (br s, 2 H), 1.61 (s, 6 H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 340.3, $Rt_1$=0.48 분

[2679] 실시예 310: *tert*-부틸 (2-메틸-1-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로판-2-일)카바메이

트

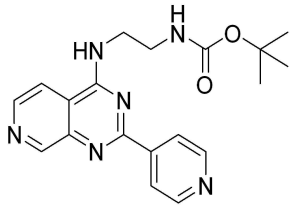


[2680]

[2681] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**) 및 tert-부틸 (1-아미노-2-메틸프로판-2-일)카바메이트로부터 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2682] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.21 (s, 1H), 8.78 (dd, J = 8.9, 4.9 Hz, 3H), 8.68 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.44 - 8.34 (m, 2H), 8.22 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 6.88 (s, 1H), 3.90 (d, J = 6.1 Hz, 2H),1.35 (s, 6H), 1.27 (d, J = 6.1 Hz, 9H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 395.2, $Rt_1$=0.97 분

[2683] **실시예 311: *tert*-부틸 (2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)에틸)카바메이트**

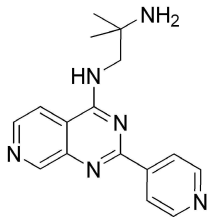


[2684]

[2685] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**) 및 tert-부틸 (2-아미노에틸)카바메이트로부터 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2686] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.19 (s, 1H), 8.93 - 8.81 (m, 1H), 8.79 - 8.68 (m, 2H), 8.64 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.39 (d, J = 5.1 Hz, 2H), 8.13 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.03 (t, J = 6.0 Hz, 1H),3.73 (q, J = 6.2 Hz, 2H), 3.40 - 3.32 (m, 2H), 1.33 (s, 9H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 367.2, $Rt_1$=0.78 분

[2687] **실시예 312: 2-메틸-*N*$^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,2-디아민**

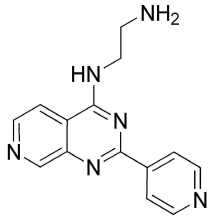


[2688]

[2689] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**) 및 tert-부틸(1-아미노-2-메틸프로판-2-일)카바메이트(단계 1) 및 TFA를 사용하는 Boc-탈보호(단계 2)로부터 2단계로 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2690] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.18 (s, 1H), 8.83 - 8.74 (m, 2H), 8.65 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.38 - 8.33 (m, 2H), 8.31 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 3.70 (s, 2H), 1.13 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 295.2, $Rt_1$=0.41 분

[2691] **실시예 313:** $N^1$**-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)에탄-1,2-디아민**

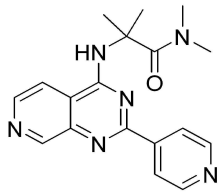


[2692]

[2693] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**) 및 tert-부틸 (2-아미노에틸)카바메이트(단계 1) 및 TFA를 사용하는 Boc-탈보호(단계 2)로부터 2단계로 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2694] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.18 (s, 1H), 8.81 - 8.71 (m, 2H), 8.64 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.43 - 8.30 (m, 2H), 8.20 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 3.73 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.94 (t, J = 6.4 Hz, 2H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 267.2, $Rt_1$=0.38 분

[2695] **실시예 314:** ***N,N*,2-트리메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로판아미드**

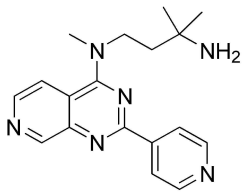


[2696]

[2697] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**) 및 2-아미노-N,N,2-트리메틸프로판아미드로부터 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2698] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.22 (s, 1H), 8.74 (dd, J = 6.9, 2.4 Hz, 3H), 8.68 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.38 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.36 - 8.31 (m, 2H), 2.95 - 2.69 (m, 6H), 1.6(s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 337.2, $Rt_1$=0.58 분

[2699] **실시예 315:** $N^1$**,3-디메틸-**$N^1$**-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민**

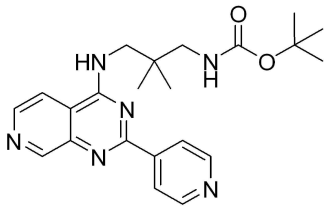


[2700]

[2701] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**) 및 $N^1$,3-디메틸부탄-1,3-디아민으로부터 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2702] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.20 (s, 1H), 8.83 - 8.69 (m, 2H), 8.55 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.40 - 8.29 (m, 2H), 8.12 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 4.04 - 3.92 (m, 2H), 3.52 (s, 3H), 1.87 - 1.74 (m, 2H), 1.56 (s, 2H), 1.15 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 323.2, $Rt_1$=0.49 분

[2703] **실시예 316:** *tert*-부틸 (2,2-디메틸-3-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로필)카바메이트

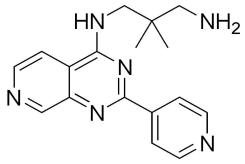


[2704]

[2705] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**) 및 *tert*-부틸 (3-아미노-2,2-디메틸프로필)카바메이트로부터 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2706] 1H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.20 (s, 1H), 8.77 (d, J = 4.9 Hz, 2H), 8.68 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 8.61 (t, J = 6.4 Hz, 1H), 8.43 - 8.30 (m, 2H), 8.17 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 7.01 (t,J = 6.6 Hz, 1H), 3.62 (d, J = 6.2 Hz, 2H), 2.93 (d, J = 6.3 Hz, 2H), 1.38 (s, 9H), 0.92 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 409.3, $Rt_1$=1.06 분

[2707] **실시예 317:** 2,2-디메틸-*N*$^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민

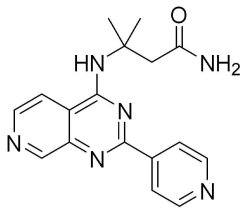


[2708]

[2709] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**) 및 tert-부틸 (3-아미노-2,2-디메틸프로필)카바메이트(단계 1) 및 TFA를 사용하는 Boc-탈보호(단계 2)로부터 2단계로 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2710] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.18 (s, 1H), 8.81 - 8.71 (m, 2H), 8.65 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.39 - 8.29 (m, 2H), 8.16 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 3.67 (s, 2H), 0.95 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 309.2, $Rt_1$=0.43 분

[2711] **실시예 318:** 3-메틸-3-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)부탄아미드

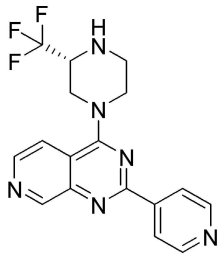


[2712]

[2713] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**) 및 3-아미노-3-메틸부탄아미드로부터 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2714] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.21 (s, 1H), 8.94 - 8.80 (m, 2H), 8.77 - 8.60 (m, 2H), 8.48 - 8.35 (m, 2H), 8.10 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 2.76 (s, 2H), 1.71 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 323.3, $Rt_1$=0.57 분

[2715] **실시예 319: (*R*)-2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘**

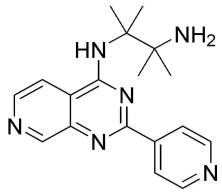


[2716]

[2717] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**) 및 (*R*)-2-(트리플루오로메틸)피페라진으로부터 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2718] 1H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.31 (s, 1H), 8.79 (d, J = 5.3 Hz, 2H), 8.63 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.31 (d, J = 4.9 Hz, 2H), 7.97 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 4.60 - 4.49 (m, 1H), 4.28 - 4.21 (m, 1H), 3.82 - 3.74 (m, 1H), 3.71 - 3.64 (m, 1H), 3.63 - 3.56 (m, 1H), 3.20 - 3.12 (m, 1H), 3.12 - 3.04 (m, 1H), 2.96 - 2.87 (m, 1H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 361.1, $Rt_1$=0.72 분

[2719] **실시예 320: 2,3-디메틸-*N*$^2$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-2,3-디아민**

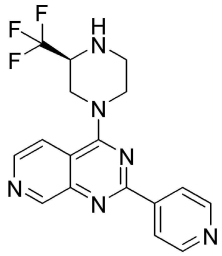


[2720]

[2721] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**) 및 2,3-디메틸부탄-2,3-디아민으로부터 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2722] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.18 (s, 1H), 8.88 - 8.74 (m, 2H), 8.66 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.40 - 8.19 (m, 2H), 7.74 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 1.63 (s, 6H), 1.21 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 323.2, $Rt_1$=0.48 분

[2723] **실시예 321: (*S*)-2-(피리딘-4-일)-4-(3-(트리플루오로메틸)피페라진-1-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘**

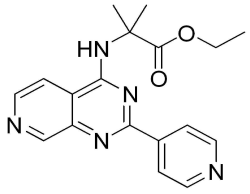


[2724]

[2725] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**) 및 (*S*)-2-(트리플루오로메틸)피페라진으로부터 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2726] 1H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.31 (s, 1H), 8.81 (s, 1H), 8.77 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 8.63 - 7.56 (m, 2H), 7.36 - 5.7 (m, 1H), 8.34 - 8.29 (m, 2H), 7.97 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 4.57 - 4.52 (m, 1H), 4.28 - 4.21 (m, 1H), 3.83 - 3.74 (m, 1H), 3.71 - 3.65 (m, 1H), 3.63 (s, 1H), 3.20 - 3.14 (m, 1H), 3.11 - 3.05 (m, 1H), 2.95 - 2.88 (m, 1H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 361.1, $Rt_1$=0.72 분

[2727] **실시예 322: 에틸 2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로파노에이트**

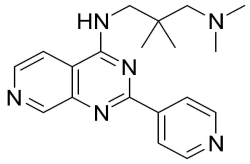


[2728]

[2729] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**) 및 에틸 2-아미노-2-메틸프로파노에이트로부터 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2730] 1H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.23 (s, 1H), 8.83 (s, 1H), 8.80 - 8.74 (m, 2H), 8.69 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.39 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.28 - 8.23 (m, 2H), 3.99 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.69 (s,6H), 0.91 (t, J = 7.1 Hz, 3H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 338.2, $Rt_1$=0.78 분

[2731] **실시예 323: $N^1$,$N^1$,2,2-테트라메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민**

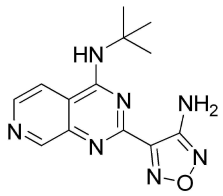


[2732]

[2733] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**), 및 $N^1$,$N^1$,2,2-테트라메틸프로판-1,3-디아민으로부터 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

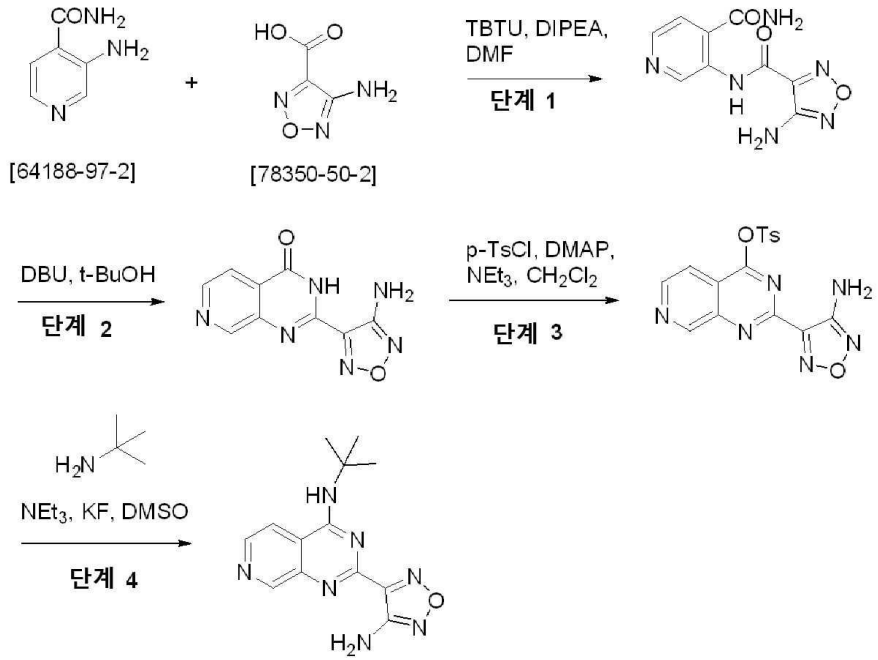
[2734] 1H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$) δ 9.20 - 9.17 (m, 1H), 9.04 (t, J = 5.6 Hz, 1H), 8.80 - 8.74 (m, 2H), 8.68 - 8.63 (m, 1H), 8.38 - 8.31 (m, 2H), 8.13 - 8.08 (m, 1H), 3.72 - 3.65 (m, 2H), 2.36 - 2.28 (m, 8H), 0.99 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 337.2, $Rt_1$=0.46 분

[2735] **실시예 324: 4-(4-(tert-부틸아미노)피리도[3,4-*d*]피리미딘-2-일)-1,2,5-옥사디아졸-3-아민**



[2736]

[2737] 표제 화합물을 3-아미노이소니코틴아미드 및 4-아미노-1,2,5-옥사디아졸-3-카복실산으로부터 아래 반응식에 따라 합성하였다.




[2738]

[2739] 단계 1: 4-아미노-N-(4-카바모일피리딘-3-일)-1,2,5-옥사디아졸-3-카복사미드

[2740] 온도계 포켓 및 질소 입구가 장착된 2목 R.B. 플라스크에, TBTU(4.75 g, 14.8 mmol) 및 *N,N*-디이소프로필에틸아민(2.6 ㎖, 14.8 mmol)을 DMF(40 ㎖) 중 3-아미노이소니코틴아미드(1.7 g, 12.4 mmol) 및 4-아미노-1,2,5-옥사디아졸-3-카복실산(1.92 g, 14.8 mmol)의 교반 용액에 25~30℃에서 첨가하였다. 생성된 반응 혼합물을 25~30℃에서 72 h 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물(200 ㎖)에 붓고 침전된 고체를 여과에 의해 수집하였다. 물(100 ㎖)로 세척하였다. 정제를 n-헥산 중 20% 에틸 아세테이트를 사용하는 분쇄에 의해 수행하여 4-아미노-N-(4-카바모일피리딘-3-일)-1,2,5-옥사디아졸-3-카복사미드(0.84 g, 27.45%)를 회백색 고체로 얻었다.

[2741] $^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$): δ 12.60 (s, 1H, $D_2O$로 교환 가능함), 9.70 (s, 1H), 8.64 (s, 1H, $D_2O$로 교환 가능함), 8.52 (d, *J* = 4.4Hz, 1H), 8.81 (s, 1H, $D_2O$로 교환 가능함), 7.80 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 6.25 (s, 2H, $D_2O$로 교환 가능함). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 249.1, $Rt_2$=1.312 분

[2742] 단계 2: 2-(4-아미노-1,2,5-옥사디아졸-3-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4(3H)-온

[2743] 밀봉된 튜브에, DBU(0.98 g, 6.45 mmol)를 *tert*-부탄올(8.0 ㎖) 중 4-아미노-*N*-(4-카바모일피리딘-3-일)-1,2,5-옥사디아졸-3-카복사미드(0.8 g, 3.22 mmol)의 교반 현탁액에 첨가하였다. 마개를 밀봉하고 반응 혼합물을 16 h 동안 100℃로 가열하였다. 용매를 증발시키고, 생성된 잔류물 물(20 ㎖)로 희석하고 25~30℃에서 0.5 h 동안 교반하였다. 침전된 고체를 여과에 의해 수집하고, 고체를 물(2x10 ㎖) 및 *n*-헥산(10 ㎖)으로 세척하였다. 수득된 고체를 55℃에서 회전 플라스크에서 건조하여 (0.421 g, 56.73 %)의 2-(4-아미노-1,2,5-옥사디아졸-3-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4(3*H*)-온을 회백색 고체로 수득하였다.

[2744] $^1$H-NMR(400 MHz, DMSO-$d_6$): δ 13.31 (s, 1H, $D_2O$로 교환 가능함), 9.36(s, 1H), 8.74 (d, *J* = 5.2Hz, 1H), 8.01 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 6.95 (s, 2H, $D_2O$로 교환 가능함). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 231.2, $Rt_2$=1.279 분

[2745] 단계 3: 2-(4-아미노-1,2,5-옥사디아졸-3-일)피리도[3,4-d]피리미딘-4-일 4-메틸벤젠설포네이트

[2746] 온도계 포켓 및 질소 입구가 장착된 2목 R.B. 플라스크에, DMAP(0.015 g, 0.116 mmol)을 디클로로메탄(10 ㎖) 중 2-(4-아미노-1,2,5-옥사디아졸-3-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4(3*H*)-온(0.27 g, 1.168 mmol) 및 트리에틸아민(0.245 ㎖, 1.752 mmol)의 교반 용액에 0℃에서 첨가하였다. *p*-TsCl(0.245 g, 1.168 mmol)을 첨가하고 0.5 h 동안 생성된 반응 혼합물을 교반하였다. 얼음조를 제거하여 반응 혼합물이 25~30℃로 가온되도록 두고 1.5 h 동안 25~30℃에서 교반하였다. 혼합물을 DCM(20 ㎖)으로 희석하고, 물(2x20 ㎖) 및 염수(20 ㎖)로 세척하였다. 무수 황산나트륨 상에서 유기층을 건조하고 여과하였다. 여액을 회전증발기 상에서 농축하여 2-(4-아미노-

1,2,5-옥사디아졸-3-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일 4-메틸벤젠설포네이트(0.285 g, 63.21%)를 미정제물로 얻었다. 미정제물을 정제 없이 다음 단계에 사용하였다. LCMS (m/z $[M+H]^+$): 385.1, $Rt_2$=1.779분

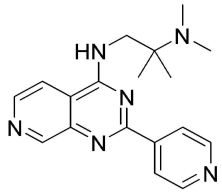
[2747] 단계 4: 4-(4-(tert-부틸아미노)피리도[3,4-d]피리미딘-2-일)-1,2,5-옥사디아졸-3-아민

[2748] 온도계 포켓 및 질소 입구가 장착된 2목 R.B. 플라스크에, *tert*-부틸 아민(0.0714 g, 0.976 mmol)을 DMSO(2.5 ㎖) 중 2-(4-아미노-1,2,5-옥사디아졸-3-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일 4-메틸벤젠설포네이트(0.25 g, 0.651 mmol)의 교반 용액에 첨가한 후 KF(0.0566 g, 0.976 mmol) 및 트리에틸아민(0.18 ㎖, 1.304 mmol)을 25~30℃에서 첨가하였다. 45분 동안 rt에서 교반한 후, 반응 혼합물을 물(25 ㎖)에 부었다. 침전된 고체를 여과에 의해 수집하였다. 고체를 물(25 ㎖) 및 n-헥산(10 ㎖)으로 세척하였다. n-헥산:디에틸 에테르

[2749] ; 1:1(5 ㎖) 중 분쇄에 의해 정제를 수행하여 4-(4-(tert-부틸아미노)피리도[3,4-*d*]피리미딘-2-일)-1,2,5-옥사디아졸-3-아민(0.135 g, 72.75%)을 회백색 고체로 얻었다.

[2750] $^1$H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ ppm 9.30 (s, 1 H), 8.67 (d, *J*=5.57 Hz, 1 H), 8.39 (d, *J*=5.58 Hz, 1 H), 8.00 (s, 1 H), 6.89 (s, 2 H), 1.60 (s, 9 H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 286.1, $Rt_1$=0.92분

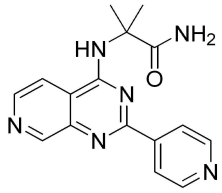
[2751] **실시예 325: $N^2$,$N^2$,2-트리메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,2-디아민**

[2752] 

[2753] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**), 및 $N^2$,$N^2$,2-트리메틸프로판-1,2-디아민으로부터 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2754] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.19 (s, 1H), 8.85 - 8.72 (m, 2H), 8.65 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.36 - 8.31 (m, 2H), 8.27 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.79 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 2.27 (s, 6H), 1.09 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 323.2, $Rt_1$=0.44분

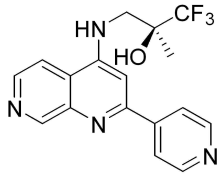
[2755] **실시예 326: 2-메틸-2-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)프로판아미드**

[2756] 

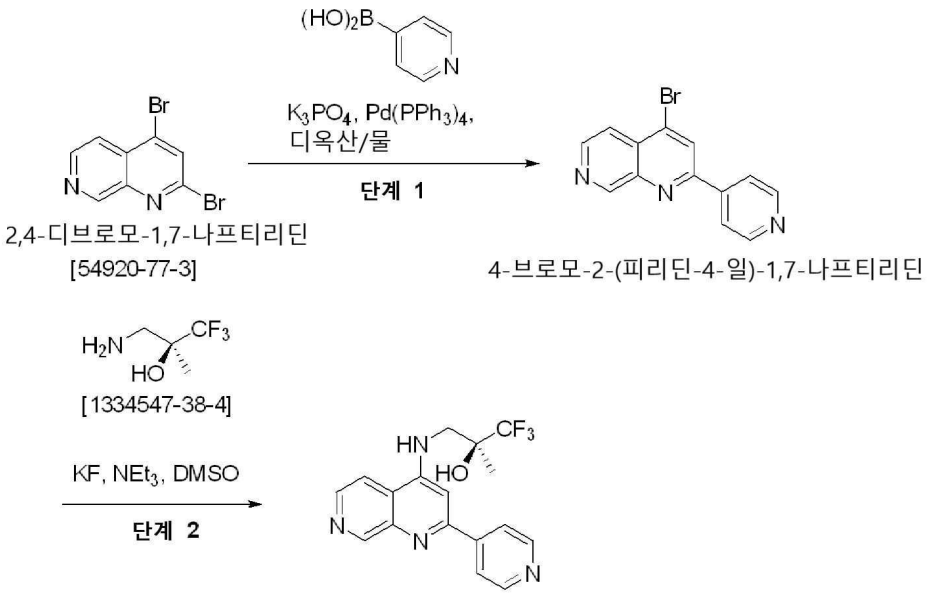
[2757] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**), 및 2-아미노-2-메틸프로판아미드로부터 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2758] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.20 (s, 1H), 8.77 - 8.71 (m, 2H), 8.67 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.49 (s, 1H), 8.39 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.36 - 8.30 (m, 2H), 7.29 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 1.63 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 309.2, $Rt_1$=0.50분

[2759] **실시예 327: (*S*)-1,1,1-트리플루오로-2-메틸-3-((2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘-4-일)아미노)프로판-2-올**

[2760] 

[2761] 표제 화합물을 2,4-디브로모-1,7-나프티리딘으로부터 아래 반응식에 따라 합성하였다.



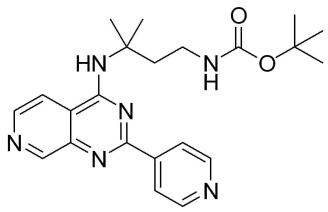

[2762]

[2763] 단계 1: 디옥산(6 mℓ)/물(1.5 mℓ) 중 2,4-디브로모-1,7-나프티리딘(350 mg, 1.22 mmol), 4-피리디닐보론산(194 mg, 1.58 mmol), 인산칼륨(1032 mg, 4.86 mmol) 및 $Pd(PPh_3)_4$(140 mg, 0.122 mmol)의 용액을 마이크로파 바이알에서 아르곤 하에 60분 동안 110℃에서 가열하였다. 물을 r.t.에서 첨가하고 반응 혼합물을 디클로로메탄으로 3회 추출하였다. 조합한 유기상을 염수로 세척하고, 황산나트륨으로 건조하고 용매를 감압 하에 증발시켰다. 잔류물을 0~100% 에틸 아세테이트/사이클로헥산을 사용하여 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 4-브로모-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘을 얻었다(44%). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 286.0/288.0, $Rt_1$=0.83분

[2764] 단계 2: 표제 화합물을 4-브로모-2-(피리딘-4-일)-1,7-나프티리딘 및 (*S*)-3-아미노-1,1,1-트리플루오로-2-메틸프로판-2-올[1334547-38-4]로부터 **실시예 254**와 유사하게 합성하였다.

[2765] $^1$H NMR (600 MHz, DMSO-$d_6$) δ ppm 9.26 (s, 1 H), 8.77 (d, *J*=5.69 Hz, 2 H), 8.53 (d, *J*=5.87 Hz, 1 H), 8.20 (d, *J*=5.69 Hz, 1 H), 8.14 - 8.18 (m, 2 H), 7.48 - 7.55 (m, 2 H), 6.34 (s, 1 H), 3.82 (dd, *J*=14.58, 6.33 Hz, 1 H), 3.69 - 3.76 (m, 1 H), 1.40 (s, 3 H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 349.3, Rt=0.62분

[2766] **실시예 328: *tert*-부틸 (3-메틸-3-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)부틸)카바메이트**

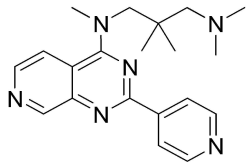


[2767]

[2768] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘(**중간체 1c**) 및 *tert*-부틸 (3-아미노-3-메틸부틸)카바메이트로부터 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2769] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (s, 1H), 8.88 - 8.73 (m, 2H), 8.64 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.37 (d, J = 5.7 Hz, 1H), 8.33 - 8.25 (m, 2H), 7.73 (s, 1H), 6.75 (s, 1H), 2.97 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 2.31 - 2.19 (m, 2H), 1.60 (s, 6H), 1.25 (s, 9H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 409.2, $Rt_1$=0.96분

[2770] **실시예 329:** $N^1,N^1,N^3$,2,2-펜타메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)프로판-1,3-디아민

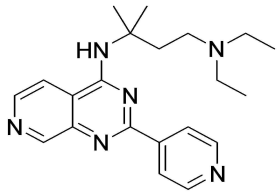


[2771]

[2772] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**), 및 $N^1,N^1,N^3$,2,2-펜타메틸프로판-1,3-디아민으로부터 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

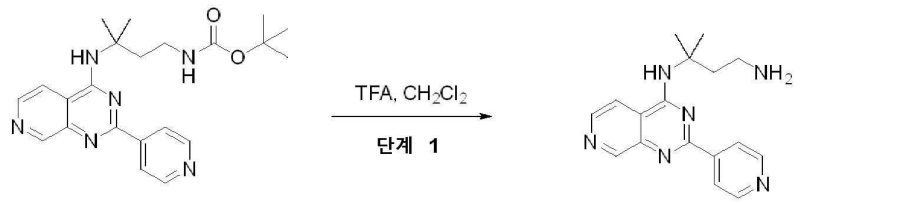
[2773] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (s, 1H), 8.76 (d, 2H), 8.54 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 8.34 (d, 2H), 8.23 (d, J = 5.9 Hz, 1H), 4.11 (s, 2H), 3.66 (s, 3H), 2.30 (s, 6H), 2.23 (s, 2H), 0.96 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 351.2, $Rt_1$=0.50분

[2774] **실시예 330:** $N^1,N^1$-디에틸-3-메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민



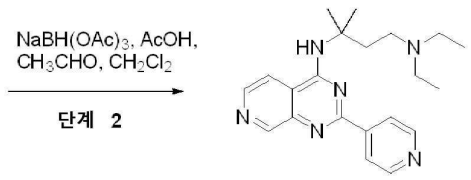
[2775]

[2776] 표제 화합물을 **실시예 328**(*tert*-부틸 (3-메틸-3-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)부틸)카바메이트)로부터 아래 반응식에 따라 합성하였다.




실시예 328

3-메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]-피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민




[2777]

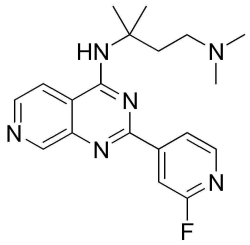
[2778] 단계 1: 디클로로메탄(2 mℓ) 중 *tert*-부틸 (3-메틸-3-((2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)아미노)부틸)카바메이트(80 mg, 0.196 mmol)의 용액에 TFA(0.377 mℓ, 4.90 mmol)를 첨가하고 생성된 노란색 용액을 2 h 동안 r.t.에서 교반하였다. 이어서 용액을 증발 건조시켰다. 잔류물을 MeOH 중에 용해시키고 용액을 PoraPak Rxn CX 20cc(2 g) 카트리지 상에 넣었다. 이어서 카트리지를 5 mℓ MeOH로 2회 세척하였다. 마지막으로, 화합물을 MeOH 중 7 N $NH_3$로 용출하였다. 여액을 감압 하에 증발시켜 3-메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민을 얻었다(66%). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 309.1, $Rt_1$=0.53분

[2779] 단계 2: 디클로로메탄(5 mℓ) 중 3-메틸-$N^3$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민(40 mg, 0.130 mmol), 아세트산(0.037 mℓ, 0.649 mmol) 및 아세트알데하이드(57 mg, 1.297 mmol)의 용액을 1 h 동안 r.t. 에서 교반하였다. 이어서 $NaBH(OAc)_3$(137 mg, 0.649 mmol)를 첨가하여 혼합물을 r.t.에서 추가 1 h 동

안 교반하였다. 포화 $NaHCO_3$-용액을 첨가하고 수상을 디클로로메탄으로 3회 추출하였다(3x20 ㎖). 조합한 유기상을 염수로 세척하고, 황산나트륨으로 건조하고 용매를 감압 하에 증발시켰다. 잔류물을 12~100% 에틸 아세테이트/사이클로헥산 구배에 이어 2~30% 메탄올(+메탄올 중 10% 7N $NH_3$)/디클로로메탄의 구배를 사용하여 플래시 크로마토그래피에 의해 정제하여 노란색 오일을 얻었다. 오일을 디클로로메탄(2 ㎖)에 취하고 디옥산 중 4 N HCL(0.2 ㎖)을 첨가하였다. 침전을 여과 제거하고 펜탄으로 세척하여 표제 화합물을 HCL 염으로 얻었다(17%).

[2780] 1H NMR (400 MHz, 메탄올-d4) δ 9.52 (s, 1H), 9.22 - 9.02 (m, 4H), 8.82 (d, J = 6.2 Hz, 1H), 8.74 (dd, J = 6.2, 0.9 Hz, 1H), 3.27 (dd, J = 8.4, 4.7 Hz, 2H), 3.21 (q, J = 7.3 Hz, 4H), 2.84 -2.70 (m, 2H), 1.79 (s, 6H), 1.23 (t, J = 7.3 Hz, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 365.2, $Rt_1$=0.59분

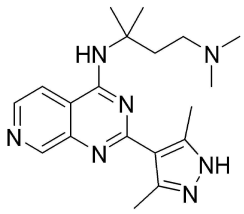
[2781] **실시예 331: $N^3$-(2-(2-플루오로피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)-$N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민**

[2782] 

[2783] 표제 화합물을 2,4-디클로로피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 2c**) 및 $N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민으로부터(단계 1) 및 $N^3$-(2-클로로피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)-$N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민 및 (2-플루오로피리딘-4-일)보론산(CAS no. 401815-98-3, 단계 2)으로부터 2단계로 **실시예 111**와 유사하게 합성하였다.

[2784] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.53 (s, 1H), 9.18 (s, 1H), 8.69 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.46 (d, J = 5.2 Hz, 1H), 8.26 (dd, J = 4.7, 2.0 Hz, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.85 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 2.26 (s, 6H), 2.00 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 1.66 (s, 6H), 주의: 하나의 CH2 신호는 DMSO 신호와 중복된다. LCMS (m/z $[M+H]^+$): 355.2, $Rt_1$=0.67분

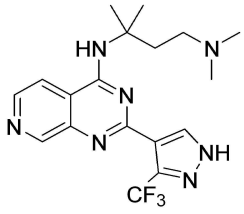
[2785] **실시예 332: $N^3$-(2-(3,5-디메틸-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)-$N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민**

[2786] 

[2787] 표제 화합물을 2,4-디클로로피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 2c**) 및 $N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민으로부터(단계 1) 및 $N^3$-(2-클로로피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)-$N^1$,$N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민 및 *tert*-부틸 3,5-디메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보로란-2-일)-1H-피라졸-1-카복실레이트로부터(CAS no. 1073354-70-7, 단계 2) 2단계로 **실시예 111**과 유사하게 합성하였다.

[2788] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 12.41 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 8.49 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 2.56 (s, 6H), 2.27 (s, 6H), 1.92 (t, J = 6.1 Hz, 2H), 1.61 (s, 6H). 주의: 하나의 CH2 신호는 DMSO 신호와 중복된다. LCMS (m/z $[M+H]^+$): 354.2, $Rt_1$=0.50분

[2789] **실시예 333: $N^1$,$N^1$,3-트리메틸-$N^3$-(2-(3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민**

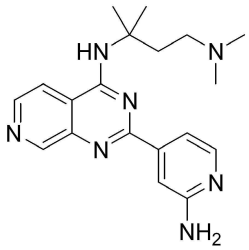


[2790]

[2791] 표제 화합물을 2,4-디클로로피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 2c**) 및 $N^1,N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민으로부터(단계 1) 및 $N^3$-(2-클로로피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)-$N^1,N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민 및 4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보로란-2-일)-3-(트리플루오로메틸)-1H-피라졸로부터(CAS no. 1218790-40-9, 단계 2) 2단계로 **실시예 111**과 유사하게 합성하였다.

[2792] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 13.80 (s, 1H), 9.25 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.57 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.46 (s, 1H), 7.75 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 2.25 (s, 6H), 1.93 (t, J = 6.3 Hz, 2H), 1.60 (s, 6H). 주의: 하나의 CH2 신호는 DMSO 신호와 중복된다. LCMS (m/z $[M+H]^+$): 394.3, $Rt_1$=0.62분

[2793] **실시예 334: $N^3$-(2-(2-아미노피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)-$N^1,N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민**

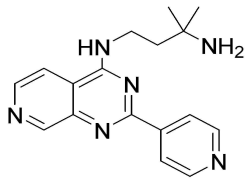


[2794]

[2795] 표제 화합물을 2,4-디클로로피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 2c**) 및 $N^1,N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민으로부터(단계 1) 및 $N^3$-(2-클로로피리도[3,4-d]피리미딘-4-일)-$N^1,N^1$,3-트리메틸부탄-1,3-디아민 및 *tert*-부틸 (4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보로란-2-일)피리딘-2-일) 카바메이트 CAS no. 1095708-32-9(단계 2) 및 TFA를 사용하는 Boc-탈보호(단계 3)로부터 3단계로 **실시예 111**과 유사하게 합성하였다.

[2796] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.30 (s, 1H), 9.11 (s, 1H), 8.62 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 8.07 (d, J = 5.3 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 5.6 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.43 (dd, J = 5.3, 1.4 Hz, 1H), 6.11 (s, 2H), 2.47 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 2.24 (s, 6H), 1.99 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 1.66 (s, 6H). LCMS (m/z $[M+H]^+$): 352.2, $Rt_1$=0.48분

[2797] **실시예 335: 3-메틸-$N^1$-(2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-*d*]피리미딘-4-일)부탄-1,3-디아민**



[2798]

[2799] 표제 화합물을 4-클로로-2-(피리딘-4-일)피리도[3,4-d]피리미딘(**중간체 1c**) 및 *tert*-부틸 (4-아미노-2-메틸부탄-2-일)카바메이트(단계 1) 및 TFA를 사용하는 Boc-탈보호(단계 2)로부터 2단계로 **실시예 1**과 유사하게 합성하였다.

[2800] 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 9.18 (s, 1H), 8.80 - 8.71 (m, 2H), 8.63 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 8.37 - 8.31 (m, 2H), 8.07 (d, J = 5.5 Hz, 1H), 3.83 - 3.73 (m, 2H), 1.80 - 1.68 (m, 2H), 1.15 (s, 6H), 3개의 교환 가능한 양성자. LCMS (m/z $[M+H]^+$): 309.2, $Rt_1$=0.45분

[2801] **생체외 세포 집단 증식 및 치료법에서의 사용**

[2802] **증식된 세포 집단을 제조하기 위한 출발 물질:**

[2803] 자가 방법

[2804] 증식된 세포 집단을 수득하기 위해 세포 집단의 증식 방법에서 사용하기 위한 세포의 접종 집단은 수신자 본인으로부터 수득할 수 있다. 조직, 기관, 또는 세포 결핍이 부분적인, 예를 들어 건강한 세포가 존재하는 환자에서, 세포의 접종 집단은 비-이환 조직 또는 기관 또는 세포 원천으로부터 수득할 수 있다. 예를 들어, 한쪽 눈 세포 결핍의 경우, 접종 집단은 비-이환 눈의 생검으로부터 수득할 수 있다. 이는 또한 부분적으로 손상된 기관에 남아있는 건강한 조직으로부터 수득할 수 있다.

[2805] 동종이형 방법

[2806] 바람직한 구현예에서, 증식된 세포 집단을 수득하기 위해 세포 집단의 증식 방법에서 사용하기 위한 세포의 접종 집단은 공여자 조직(예컨대 인간, 토끼, 원숭이 등, 바람직하게는 인간)으로부터 원래 유래된 세포로부터 수득할 수 있다. 예를 들어 인간 조직의 원천은 시체 공여자 또는 생존 친척을 포함하는 생존 공여자로부터의 조직에서 유래된다.

[2807] 신체로부터 제거된 자가 및 동종이형 방법 하에 상술된 바와 같이 유도된 자가 또는 동종이형 조직으로부터, 세포는, 예를 들어, 하기와 같이 추출되고 제조할 수 있다: 원하는 면적은, 예를 들어, 메스를 사용해서 절제할 수 있고, 이어서 세포 탈착이 45분 내지 3시간 현미경 관찰에 의해(예컨대 Zeiss Axiovert 도립 현미경 사용) 뚜렷해질 때까지 세포를 해리한다(예컨대 콜라게나제, 디스파제, 트립신, 아큐타제 또는 TripLE; 예를 들어 37 ℃에서 1 ㎎/㎖ 콜라게나제를 사용하여).

[2808] 이어서 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에서 사용하기 위해, 단리된 세포는, 예를 들어, 섹션 "세포 집단 증식"에서 후술된 바와 같이 피펫팅에 의해 배지에 첨가된다.

[2809] 본 발명에 따른 바람직한 구현예에서, 공여자로부터 수확된 세포성 물질의 품질 평가를 수행한다. 예를 들어, 세포 수확 및 배지(후술된 바와 같이, 성장 또는 세포 증식 배지) 중 배양 시작 후 대략 24시간에, 존재하는 부유 세포(죽은 세포의 표지자로서)를 살피기 위한 명시야 현미경 하의 시각적 평가를 수행할 수 있다. 이상적으로 상기 평가는 본 발명에 따른 증식된 세포 집단을 생성하기 위해 사용하는 데 적합한 물질에 대해 부유 세포로서 대략 10% 미만이 존재함을 나타내기 위한 것이다.

[2810] 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에서 사용ㅎ아기 적합한 세포의 수는 제한되지 않지만, 예시적 목적을 위한 예로서, 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에서 사용하기 적합한 접종 세포 집단은 대략 1000개 세포를 포함할 수 있다.

[2811] 접종 세포 지단에서 세포수를 측정하는 것이 요망되는 경우, 이는, 예를 들어 당분야에 널리 알려진 표준 프로토콜에 따라 광학 현미경, 면역조직화학 또는 FACS를 사용하여 수동 또는 자동 세포 계수에 의해 수행할 수 있다.

[2812] **생체외 눈 세포 집단 증식 및 치료법에서의 사용**

[2813] 구체 예로 윤부 줄기 세포 및 각막 내피 세포인 눈 세포에 적용되는 눈 세포 집단의 증식에 관한 방법론(출발 물질의 제조에 이어, 세포 집단 증식기, 세포 보관)의 설명이 아래에서 보다 상세히 기재된다.

[2814] **증식된 윤부 줄기 세포 집단을 제조하기 위한 출발 물질: 각막 상피 및 윤부 세포**

[2815] 자가 방법

[2816] 증식된 윤부 줄기 세포 집단을 수득하기 위해 세포 집단의 증식 방법에서 사용하기 위한 세포의 접종 집단은 수신자 자신으로부터 수득할 수 있다. 윤부 줄기 세포 결핍이 부분적인 환자에서, 접종 세포 집단은 윤부의 비-이환 부분으로부터 수득할 수 있다. 예를 들어, 한쪽 윤부 줄기 세포 결핍의 경우, 접종 집단은 비-이환 눈에서 생검으로부터 수득할 수 있다. 이는 또한 부분적으로 손상된 윤부에 남아있는 건강한 조직으로부터 수득할 수 있다.

[2817] 동종이형 방법

[2818] 바람직한 구현예에서, 증식된 윤부 줄기 세포 집단을 수득하기 위해 세포 집단의 증식 방법에서 사용하기 위한

세포의 접종 집단은 공여자 포유류 각막 조직(예컨대 인간, 토끼, 원숭이 등, 바람직하게는 인간)으로부터 원래 유래된 세포로부터 수득될 수 있다.

[2819] 예를 들어 인간 각막 조직의 원천은 시체 공여자(예를 들어 눈 은행에서 입수됨) 또는 생존 친척을 포함하는 생존 공여자로부터의 조직에서 유래된다. 일정 범위의 공여자 윤부 조직이 본 발명에 따른 사용을 위해 적합하다. 바람직한 구현예에서, 윤부 조직은 생존 친척 또는 적합성 HLA 프로필을 갖는 공여자로부터 수득한다.

[2820] LSC를 수득하기 위해 사용되는 조직은, 예를 들어, 대략 4 ㎜ 폭 및 1 ㎜ 높이의 윤부 조직의 고리일 수 있다.

[2821] 신체로부터 제거된 자가 및 동종이형 방법 하에 상술된 바와 같은 각막 조직으로부터, LSC는, 예를 들어 하기와 같이 추출하고 제조할 수 있다: 윤부 상피 영역은, 예를 들어, 메스를 사용해서 절제할 수 있고, 이어서 세포 탈착이 45분 내지 3시간 현미경 관찰에 의해(예컨대 Zeiss Axiovert 도립 현미경 사용) 뚜렷해질 때까지 세포를 해리시킨다(예컨대 콜라게나제, 디스파제, 트립신, 아큐타제 또는 TripLE; 예를 들어 37℃에서 1 ㎎/㎖ 콜라게나제를 사용하여).

[2822] 이어서 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에서 사용하기 위해, 단리된 세포는, 예를 들어, "세포 집단 증식" 섹션에서 후술된 바와 같이 피펫팅에 의해 배지에 첨가된다.

[2823] 본 발명에 따른 바람직한 구현예에서, 공여자 각막으로부터 수확된 세포성 물질의 품질 평가를 수행한다. 예를 들어, 세포 수확 및 배지(후술된 바와 같이, 성장 또는 세포 증식 배지) 중 배양 시작 대략 24시간 후, 존재하는 부유 세포(죽은 세포의 표시인자로서)를 살피기 위한 명시야 현미경 하의 시각적 평가를 수행할 수 있다. 이상적으로 상기 평가는 본 발명에 따른 증식된 세포 집단을 생성하기 위해 사용하는 데 적합한 물질에 있어서 대략 10% 미만이 부유 세포로서 존재함을 나타내기 위한 것이다.

[2824] 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에서 사용하기 적합한 세포의 수는 제한되지 않지만, 예시적 목적을 위한 예로서, 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에서 사용하기 적합한 접종 세포 집단은 대략 1,000개의 윤부 줄기 세포를 포함할 수 있다.

[2825] 접종 세포 집단에서 세포수를 측정하는 것이 요망되는 경우, 이는, 예를 들어 당분야에 널리 알려진 표준 프로토콜에 따라 광학 현미경, 면역조직화학 또는 FACS를 사용하여 수동 또는 자동 세포 계수에 의해 수행할 수 있다.

[2826] **<u>증식된 각막 내피 세포 집단을 제조하기 위한 출발 물질</u>**

[2827] 세포 집단의 증식 방법에서 사용하기 위한 각막 내피 세포(CEC)의 접종 집단은 포유류 각막 조직(예컨대 인간, 토끼, 원숭이 등, 바람직하게는 인간)으로부터 원래 유래된 세포로부터 수득할 수 있다. 예를 들어, 인간 각막 조직의 원천은 시체 인간 공여자로부터 유래된다(눈 은행으로 통해 입수할 수 있음).

[2828] 공여자의 연령은, 예를 들어, 유아기 내지 70세 범위일 수 있다. 바람직하게는 또한 적합한 공여자는 각막 질병 또는 외상 이력이 없는 자들이다. 본 발명에 따른 하나의 구현예에서, 바람직한 공여자 각막은 각막 내피 세포수가 2,000 세포/㎟(면적) 초과인 자들이다. 본 발명에 따른 보다 바람직한 구현예에서, 각막 내피 세포수는 2,000 내지 3,500 세포/㎟(면적)이다. 이는, 예를 들어, 환자에 대한 이식 전 공여자 조직의 평가를 위해 당분야에 알려진 표준 눈 은행 기법에 따라 직접 광학 현미경 또는 거울 현미경 하에 공여자 물질의 각막을 검사함으로써 측정된다(본원에 참조로 포함되는, 문헌[Tran et al (2016) Comparison of Endothelial Cell Measurements by Two Eye Bank Specular Micorscopes; International Journal of Eye Banking; vol 4., no 2; 1-8] 참고).

[2829] CEC를 수득하기 위해 사용되는 각막의 표면은 비제한적으로, 예를 들어, 대략 8~10 ㎜ 지름 면적일 수 있다.

[2830] CEC는, 예를 들어, 공여자 각막 조직으로부터 하기와 같이 추출하고 제조할 수 있다: 각막 내피 세포층 및 데스메막(DM)은, 예를 들어 수술-등급 리버스 Sinsky 내피 박리장치로 스코어링한다. DM-내피 세포층에서 각막 간질을 박리해내고 세포를, 예를 들어, 세포 탈착이 현미경 관찰에 의해 뚜렷해질 때까지(예컨대 Zeiss Axiovert 도립 현미경을 사용하여) 37℃에서 1 ㎎/㎖ 콜라게나제를 사용하여 DM으로부터 해리한다(45분 내지 3시간). DM만 각막에서 각막 내피 세포를 운반하므로, 상기 방식으로 단리된 세포 집단은 본 발명에 따른 접종 세포 집단으로서 사용하기 적합한 CEC 집단이다.

[2831] 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에서 사용하기 위해, 단리된 각막 내피 세포는 "세포 집단 증식" 섹션에서 후술된 바와 같이 배지에 첨가할 수 있다.

[2832] 본 발명에 따른 바람직한 구현예에서, 각막 공여자로부터 수확된 세포성 물질의 품질 평가를 수행한다. 예를 들어, 세포 수확 및 배지(후술된 바와 같이, 성장 또는 세포 증식 배지) 중 배양 시작 대략 24시간 후, 존재하는 부유 세포(죽은 세포의 표시인자로서)를 살피기 위한 명시야 현미경 하의 시각적 평가를 수행할 수 있다. 이상적으로 상기 평가는 본 발명에 따른 증식된 세포 집단을 생성하기 위해 사용하는 데 적합한 물질에 있어서 대략 10% 미만이 부유 세포로서 존재함을 나타내기 위한 것이다.

[2833] 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에서 사용하기 적합한 세포의 출발 수는 제한되지 않지만, 예시적 목적을 위한 예로서, 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에서 사용하기 적합한 각막 내피 세포 접종 세포 집단은 100,000 내지 275,000개 세포일 수 있다.

[2834] 접종 세포 집단에서 세포수를 측정하는 것이 요망되는 경우, 이는, 예를 들어 분취량을 취하고 면역세포화학을 수행하여(예컨대 Sytox Orange로 염색된 핵을 계수하기 위해) 또는 세포수를 계수하기 위한 명시야 현미경 하에 살아있는 세포 이미지화에 의해 수행할 수 있다.

[2835] Sytox Orange 검정은 당분야에 알려진 표준 프로토콜에 따라 수행할 수 있다. 간략하게, 세포가 세포 배양 디쉬에 부착한 후(전형적으로 세포 플레이팅 24 h 후), 세포를 파라포름알데하이드로 고정한다. 이어서 세포를 투과화한 후(예컨대 0.3% Triton X-100 용액 사용) 이들을 Sytox Orange로 표지화한다(예컨대 PBS 중 0.5마이크로몰 농도의 Sytox Orange를 사용함). 이어서 표면적 당 Sytox Orange로 염색된 핵의 수를 Zeiss 에피형광 현미경 하에 계수한다.

[2836] **세포 집단 증식**

[2837] 본 발명의 하나의 구현예에서, 환자 또는 공여자로부터의 세포를 포함하는 세포 집단은 당분야에 알려진 배양 용기, 예컨대 플레이트, 멀티-웰 플레이트, 및 세포 배양 플라스크에서 배지 중에 성장시킬 수 있다. 예를 들어, 코팅되지 않거나 콜라겐, 신티맥스, 젤라틴 또는 파이브로넥틴으로 코팅된 배양 디쉬를 사용할 수 있다. 적합한 배양 용기의 바람직한 예는 코팅되지 않은 플레이트이다. 표준 배양 용기 및 설비, 예컨대 산업적 용도를 위해 당분야에 알려진 바이오리액터를 또한 사용할 수 있다.

[2838] 사용되는 배지는 성장 배지 또는 세포 증식 배지일 수 있다. 일반적으로, 성장 배지는 세포 집단의 성장 및 유지를 뒷받침하는 배양 배지이다. 당업자는 특정 유형의 세포 집단에 적절한 성장 배지를 쉽게 결정할 수 있다. 줄기 세포 배양 또는 상피 세포 배양을 위해 당분야에 알려져 있는 적합한 성장 배지는, 예를 들어 FBS(우태 혈청)가 보충된 DMEM(둘베코 변형 이글 배지)(Invitrogen), 인간 혈청이 보충된 인간 내피 SF(무혈청) 배지(Invitrogen), X-VIVO15 배지(Lonza), 또는 DMEM/F12(Thermo Fischer Scientific)(선택적으로 염화칼슘이 보충됨)이다. 이들에 성장 인자(예컨대 bFGF), 및/또는 항생제, 예컨대 페니실린 및 스트렙토마이신이 추가 보충될 수 있다.

[2839] 대안적으로, 단리된 세포를 본 발명에 따른 세포 증식 배지에 먼저 첨가할 수 있다. 본원에서 정의되는 세포 증식 배지는 성장 배지 및 본 발명에 따른 LATS 억제제를 포함한다.

[2840] 소정 구현예에서, 본 발명의 세포 증식 배지는 성장 배지 및 본 발명에 따른 LATS 억제제를 포함한다. LATS 억제제는 바람직하게는 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따르며 "LATS 억제제" 섹션 하에 추가 기재된 바와 같은 화합물을 포함하는 군으로부터 선택된다.

[2841] 바람직한 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 LATS 억제제는 약 0.5 내지 100마이크로몰 농도, 바람직하게는 약 0.5 내지 25마이크로몰 농도, 보다 바람직하게는 약 1 내지 20마이크로몰 농도로 첨가된다. 특정 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 LATS 억제제는 약 3 내지 10마이크로몰 농도로 첨가된다.

[2842] 하나의 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물의 스톡 용액은 DMSO 중 10 mM의 스톡 농도로 화합물 분말을 용해시킴으로써 제조할 수 있다.

[2843] 본 발명의 하나의 양태에서, 본 발명에 따른 LATS 억제제는 세포 집단에서 LATS1 및/또는 LATS2 활성을 억제한다. 바람직한 구현예에서, LATS 억제제는 LATS1 및 LATS2를 억제한다.

[2844] 세포는 신선 성장 배지 및/또는 세포 증식 배지의 첨가 회(들)를 거칠 수 있다. 신선 배지를 첨가하기 위해 세포를 계대할 필요는 없지만, 세포 계대는 또한 신선 배지를 첨가하는 하나의 방식이다.

[2845] 다양한 순서 조합으로, 일련의 배지: 예를 들어 세포 증식 배지, 이어서 성장 배지(본 발명에 따른 LATS 억제제

가 보충되지 않으며, 세포 증식 배지에 대한 기재로서 사용되는 성장 배지와 상이할 수 있음)를 또한 사용할 수 있다.

[2846] 본 발명에 따른 세포 집단 증식기는 세포가 세포 증식 배지에 노출되는 기간 동안 일어난다.

[2847] 세포를 배양하기 위해 당분야에 알려진 표준 온도 조건, 예를 들어 바람직하게는 약 30℃ 내지 40℃를 사용할 수 있다. 특히 바람직하게는 세포 성장기뿐만 아니라 세포 집단 증식기가 약 37℃에서 수행된다. 5~10% $CO_2$ 수준을 갖는 통상적인 세포 인큐베이터를 사용할 수 있다. 바람직하게는 세포는 5% $CO_2$로 노출된다.

[2848] 세포는 필요에 따라 성장 또는 세포 증식 배지에서 배양 동안 계대할 수 있다. 세포는 이들이 융합성-미만 또는 융합성인 경우 계대할 수 있다. 더 낮은 백분율의 융합성 수준도 수행될 수 있으나, 바람직하게는 세포는 대략 90%~100% 융합성에 도달할 때 계대한다. 세포의 계대는 당분야에 알려진 표준 프로토콜에 따라 수행한다. 예를 들어, 간략하게 배양을 아큐타제로 처리하고(예컨대 10분 동안), 세포 현탁액을 원심분리에 의해 헹구고, 세포를 신선 성장 배지 또는 요망되는 세포 증식 배지에 플레이팅하여 세포를 계대한다. 세포 분할 비는, 예를 들어, 1:2 내지 1:5 범위이다.

[2849] 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법의 세포 집단 증식기에 있어서, 세포 증식 배지에서 접종 세포 집단의 증식은 요구되는 양의 세포성 물질이 수득될 때까지 수행할 수 있다.

[2850] 세포는 세포 집단을 증식시키기 위한 시기 범위 동안 세포 증식 배지에 노출시킬 수 있다.

[2851] 바람직한 구현예에서, 접종 세포 집단은 환자 또는 공여자 조직으로부터의 세포 단리 직후 본 발명에 따른 LATS 억제제(예컨대 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물)에 노출시키고 세포 증식이 요구되는 전체 시간, 예를 들어 12 내지 16일 동안 유지한다.

[2852] 본 발명에 따른 하나의 구현예에서, 유전자 편집 기법은 선택적으로 세포를 유전적으로 변형하고/하거나 생체치료 화합물을 발현하기 위해 수행할 수 있다. 예를 들어, 세포는 다르게는 세포 집단이 환자에게 전달되는 경우 면역 거부에 기여할 수 있는, 면역 반응 매개 유전자의 발현 및/또는 기능을 감소시키거나 제거하도록 변형될 수 있다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에서 유전자 편집 기법의 적용은 선택적이며, 환자에 이식된 물질의 면역거부 문제를 경감시키기 위해 요망되는 경우 국소 면역억제제 및/또는 소염제(면역억제제 및 소염제 섹션 하에 추가 기재됨)의 환자에 대한 투여가 대신 사용될 수 있다.

[2853] 본 발명의 하나의 양태에 따르면, 유전적 변형은 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자의 발현 및/또는 기능을 감소시키거나 제거하는 단계를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 유전적 변형은 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자를 특이적으로 표적화하는 유전자 편집 시스템을 단리된 줄기 세포 또는 줄기 세포 집단 내로 도입하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 유전자 편집 시스템은 CRISPR(CRISPR: CRISPR/Cas 시스템으로도 알려져 있는 클러스터링된 정규 산재 단형 회문나선 반복), ZFN(아연-핑거 뉴클레아제), TALEN(전사 활성화제-유사 효과기 기반 뉴클레아제), 조작된 메가뉴클레아제(예컨대 ARCUS 뉴클레아제, 예컨대 ARC 뉴클레아제), AAV 벡터(아데노-연관 바이러스) 및 렌티바이러스 벡터-기반 게놈 편집 기술로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[2854] 사용되어야 하는 경우, 유전자 편집 기법은 상이한 지점에, 예컨대 (1) 조직 상에서, 세포 단리 전에 또는 (2) 세포 단리 시에 또는 (3) 시험관내 세포 집단 증식기 동안(세포가 시험관내에서 본 발명에 따른 LATS 억제제에 노출되는 경우) 또는 (4) 세포 집단 증식기 말기에 시험관내에서(세포가 시험관내에서 본 발명에 따른 LATS 억제제에 노출된 후) 수행할 수 있다. 특정 구현예에서, CRISPR은 본 발명에 따른 LATS 억제제의 존재 하에 세포 집단의 2주 시험관내 증식 후 사용된다.

[2855] 세포 집단의 증식 방법에서 사용하기 적합한 유전자 편집 기법은 "면역거부의 감소" 섹션 하에 추가 기재된다.

[2856] 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에서, 바람직하게는 화합물인 LATS 억제제는 접종된 세포 집단의 2배 초과 증식을 생성한다.

[2857] 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법의 하나의 양태에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물은 단리된 세포(즉, 환자 또는 공여자로부터 수득되는 세포)의 접종된 집단의 30배 초과 증식을 생성한다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법의 특정 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 LATS 억제제는 단리된 세포의 접종된 집단의 100배 내지 2200배 증식을 생성한다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법의 보다 구체적인 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 LATS 억제제는 단리된 세포의 접종된 집단의

600배 내지 2200배 증식을 생성한다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 달성되는 배율 증식 인자는 세포의 하나 이상의 계대에서 달성될 수 있다. 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 달성되는 배율 증식 인자는 약 12 내지 16일, 바람직하게는 약 14일 동안 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물의 노출 후 달성될 수 있다.

[2858] 세포 집단의 세포수 또는 증식을 측정하는 것이 요망되는 경우, 이는, 예를 들어 분취량을 취하고 면역세포화학을 수행하여(예컨대 Sytox Orange로 염색된 핵을 계수하기 위해) 또는 세포수를 계수하기 위한 명시야 현미경하의 살아있는 세포 이미지화에 의해 또는 본 발명에 따른 방법의 세포 집단 증식기 동안 다양한 시점에 세포 융합성의 정량적인 실시간 살아있는-세포 분석을 수행하여 수행할 수 있다.

[2859] Sytox Orange 검정은 당분야에 알려진 표준 프로토콜에 따라 수행할 수 있다. 간략하게, 세포가 세포 배양 디쉬에 부착한 후(전형적으로 세포 플레이팅 24 h 후), 세포를 파라포름알데하이드로 고정한다. 이어서 세포를 투과화한 후(예컨대 0.3% Triton X-100 용액 사용) 이들을 Sytox Orange로 표지화한다(예컨대 PBS 중 0.5마이크로몰 농도의 Sytox Orange를 사용함). 이어서 표면적 당 Sytox Orange로 염색된 핵의 수를 Zeiss 에피형광 현미경하에 계수한다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 증식된 세포 집단을 용액에 첨가한 후, 예를 들어 보존 또는 냉동보존 용액(예컨대 후술되는 것들)에 보관할 수 있거나, 환자에 대한 전달에 적합한 조성물에 직접 첨가할 수 있다. 눈 전달에 적합한 보존, 냉동보존 용액 또는 조성물은 선택적으로 본 발명에 따른 LATS 억제제를 포함할 수 있다.

[2860] 본 발명에 따른 보다 바람직한 구현예에서, 환자에 전달되는 세포 집단 제조물은 매우 낮은 내지 무시할 만한 수준의 LATS 억제제 화합물을 포함한다. 따라서 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법은 헹구어 본 발명에 따른 화합물(예컨대 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물)을 실질적으로 제거하는 추가 단계를 포함한다. 여기에는 본 발명에 따른 세포 집단 증식기 후 세포를 헹구는 단계가 관여될 수 있다. 세포를 헹구기 위해, 세포를 배양 디쉬에서 탈착시키고(예컨대 아큐타제로 처리하여), 이어서 탈착된 세포를 원심분리하고, PBS 또는 본 발명에 따른 성장 배지 중 세포 현탁액을 제조한다. 상기 단계는 다회, 예컨대 1 내지 10회, 세포를 헹궈내기 위해 수행할 수 있다. 마지막으로, 세포는 요망되는 바에 따라 보존 용액, 냉동보존 용액, 눈 전달에 적합한 조성물, 성장 배지 또는 이의 조합 중에 재현탁할 수 있다.

[2861] 세포 집단의 증식 방법에 의해 제조되고 본 발명에 따른 LATS 억제제를 포함하는 세포 증식 배지를 헹궈낸 증식된 세포 집단은 환자에 대한 전달에 적합한 조성물, 예컨대 국소화 제제로 전달할 수 있다. 선택적으로 세포 집단을 환자에 대한 전달에 적합한 국소화 제제에 대한 첨가 전 기간 동안 보관한다. 바람직한 구현예에서, 증식된 세포 집단은 보존 또는 냉동보존에 적합한 용액에 먼저 첨가할 수 있고, 이는 바람직하게는 환자에 대한 전달에 적합한 국소화 제제의 첨가 전에 LATS 억제제, 및 보관된 세포 집단(선택적으로 냉동 포함)을 포함하지 않고, 또한 바람직하게는 LATS 억제제를 포함하지 않는다.

[2862] 냉동보존에 적합한 전형적인 용액, 글리세롤, 디메틸 설폭시드, 프로필렌 글리콜 또는 아세트아미드를 본 발명의 냉동보존 용액에서 사용할 수 있다. 세포의 냉동보존된 제조물은 전형적으로 -20℃ 또는 -80℃에서 유지한다.

[2863] **세포 집단 증식: 증식된 윤부 줄기 세포 집단을 제조하기 위해**

[2864] 본 발명의 하나의 구현예에서, 예를 들어 "증식된 윤부 줄기 세포 집단을 제조하기 위한 출발 물질: 각막 상피 및 윤부 세포" 섹션에 기재된 바와 같이 수득되는 윤부 줄기 세포를 포함하는, 각막 상피 및 윤부 세포를 포함하는 세포 집단은 당분야에 알려진 배양 용기, 예컨대 플레이트, 멀티-웰 플레이트, 및 세포 배양 플라스크에서 배지 중에 성장시킬 수 있다. 예를 들어, 코팅되지 않거나 콜라겐, 신티맥스, 젤라틴 또는 파이브로넥틴으로 코팅된 배양 디쉬를 사용할 수 있다. 적합한 배양 용기의 바람직한 예는 코팅되지 않은 플레이트이다. 표준 배양 용기 및 설비, 예컨대 산업적 용도를 위해 당분야에 알려진 바이오리액터를 또한 사용할 수 있다.

[2865] 사용되는 배지는 성장 배지 또는 세포 증식 배지일 수 있다. 성장 배지는 세포 집단의 성장 및 유지를 뒷받침하는 배양 배지로서 본원에서 정의된다. 줄기 세포 배양 또는 상피 세포 배양을 위해 당분야에 알려져 있는 적합한 성장 배지는, 예를 들어 FBS(우태 혈청)가 보충된 DMEM(둘베코 변형 이글 배지)(Invitrogen), 인간 혈청이 보충된 인간 내피 SF(무혈청) 배지(Invitrogen), X-VIVO15 배지(Lonza), 또는 DMEM/F12(Thermo Fischer Scientific)(선택적으로 염화칼슘이 보충됨)이다. 이들에 성장 인자(예컨대 bFGF), 및/또는 항생제, 예컨대 페니실린 및 스트렙토마이신이 추가 보충될 수 있다. 본 발명에 따라 바람직한 성장 배지는 X-VIVO15 배지이다(여기에는 성장 인자가 추가로 보충되지 않음).

[2866] 대안적으로, 단리된 세포를 본 발명에 따른 세포 증식 배지에 먼저 첨가할 수 있다. 본원에서 정의되는 세포 증식 배지는 성장 배지 및 본 발명에 따른 LATS 억제제를 포함한다. 본 발명에 따른 세포 증식 배지에서, 성장 배지 성분은 FBS(우태 혈청)가 보충된 DMEM(둘베코 변형 이글 배지)(Invitrogen), 인간 혈청이 보충된 인간 내피 SF(무혈청) 배지(Invitrogen), X-VIVO15 배지(Lonza), 또는 DMEM/F12(Thermo Fischer Scientific)(선택적으로 염화칼슘이 보충됨)로 구성되는 군으로부터 선택된다. 이들에 성장 인자(예컨대 bFGF), 및/또는 항생제, 예컨대 페니실린 및 스트렙토마이신이 추가 보충될 수 있다.

[2867] 본 발명에 따른 바람직한 세포 증식 배지는 본 발명에 따른 LATS 억제제를 함유하는 X-VIVO15 배지(Lonza)이다. 상기 세포 증식 배지는 이것이 LSC의 증식을 촉진하기 위해 추가 성장 인자 또는 영양 세포를 필요로 하지 않는다는 장점을 갖는다. X-VIVO 배지는 특히 약학 등급 인간 알부민, 재조합 인간 인슐린, 및 파스퇴르화된 인간 트랜스페린을 포함한다. 선택적으로 항생제가 X-VIVO15 배지에 첨가될 수 있다. 바람직한 구현예에서, X-VIVO15 배지는 항생제의 첨가 없이 사용된다.

[2868] 세포 증식 배지는 성장 배지 및 본 발명에 따른 LATS 억제제를 포함한다. LATS 억제제는 바람직하게는 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따르며 "LATS 억제제" 섹션 하에 추가 기재된 바와 같은 화합물을 포함하는 군으로부터 선택된다.

[2869] 바람직한 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 LATS 억제제는 약 0.5 내지 100마이크로몰 농도, 바람직하게는 약 0.5 내지 25마이크로몰 농도, 보다 바람직하게는 약 1 내지 20마이크로몰 농도로 첨가된다. 특정 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 LATS 억제제는 약 3 내지 10마이크로몰 농도로 첨가된다.

[2870] 하나의 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물의 스톡 용액은 DMSO 중 10 mM의 스톡 농도로 화합물 분말을 용해시킴으로써 제조할 수 있다.

[2871] 본 발명의 하나의 양태에서, 본 발명에 따른 LATS 억제제는 윤부 세포에서 LATS1 및/또는 LATS2 활성을 억제한다. 바람직한 구현예에서, LATS 억제제는 LATS1 및 LATS2를 억제한다.

[2872] 세포는 신선 성장 배지 및/또는 세포 증식 배지의 첨가 회(들)를 거칠 수 있다. 신선 배지를 첨가하기 위해 세포를 계대할 필요는 없지만, 세포 계대는 또한 신선 배지를 첨가하는 하나의 방식이다.

[2873] 다양한 순서 조합으로, 일련의 배지: 예를 들어 세포 증식 배지, 이어서 성장 배지(본 발명에 따른 LATS 억제제가 보충되지 않으며, 세포 증식 배지에 대한 기재로서 사용되는 성장 배지와 상이할 수 있음)의 첨가를 또한 사용할 수 있다.

[2874] 본 발명에 따른 세포 집단 증식기는 세포가 세포 증식 배지에 노출되는 기간 동안 일어난다.

[2875] 세포를 배양하기 위해 당분야에 알려진 표준 온도 조건, 예를 들어 바람직하게는 약 30℃ 내지 40℃를 사용할 수 있다. 특히 바람직하게는 세포 성장기뿐만 아니라 세포 집단 증식기가 약 37℃에서 수행된다. 5~10% $CO_2$ 수준을 갖는 통상적인 세포 인큐베이터를 사용할 수 있다. 바람직하게는 세포는 5% $CO_2$로 노출된다.

[2876] 세포는 필요에 따라 성장 또는 세포 증식 배지에서 배양 동안 계대할 수 있다. 세포는 이들이 융합성-미만 또는 융합성인 경우 계대할 수 있다. 더 낮은 백분율의 융합성 수준도 수행될 수 있으나, 바람직하게는 세포는 이들이 대략 90%~100% 융합성에 도달할 때 계대한다. 세포의 계대는 당분야에 알려진 표준 프로토콜에 따라 수행한다. 예를 들어, 간략하게 세포는 배양을 아큐타제로 처리하고(예컨대 10분 동안), 세포 현탁액을 원심분리에 의해 헹구고, 세포를 요망되는 신선 성장 배지 또는 세조 증식 배지에 플레이팅하여 계대한다. 세포 분할 비는, 예를 들어, 1:2 내지 1:5 범위이다.

[2877] 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법의 세포 집단 증식기에 있어서, 세포 증식 배지에서 접종 세포 집단의 증식은 요구되는 양의 세포성 물질이 수득될 때까지 수행할 수 있다.

[2878] 세포는 세포 집단을 증식시키기 위한 시기 범위 동안 세포 증식 배지에 노출시킬 수 있다. 예를 들어 여기에는 LSC가 배양 중에 유지되는 전체 시간, 또는 LSC 단리 후 1주 동안 또는 각막으로부터의 윤부 절제 후 24시간 동안이 포함될 수 있다.

[2879] 바람직한 구현예에서, 접종 세포 집단은 각막으로부터의 세포 단리 직후 본 발명에 따른 LATS 억제제(예컨대 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물)에 노출시키고 LSC 증식이 요구되는 전체 시간, 예를 들어 12 내

지 16일 동안 유지한다.

[2880] 본 발명에 따른 하나의 구현예에서, 유전자 편집 기법은 선택적으로 세포를 유전적으로 변형하기 위해, 다르게는 세포 집단이 환자에게 전달되는 경우 면역 거부에 기여할 수 있는, 면역 반응 매개 유전자의 발현 및/또는 기능을 감소시키거나 제거하기 위해 수행할 수 있다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에서 유전자 편집 기법의 적용은 선택적이며, 환자에 이식된 물질의 면역거부 문제를 경감시키기 위해 요망되는 경우 국소 면역억제제 및/또는 소염제(면역억제제 및 소염제 섹션 하에 추가 기재됨)의 환자에 대한 투여가 대신 사용될 수 있다.

[2881] 본 발명의 하나의 양태에 따르면, 유전적 변형은 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자의 발현 및/또는 기능을 감소시키거나 제거하는 단계를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 유전적 변형은 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자를 특이적으로 표적화하는 유전자 편집 시스템을 윤부 줄기 세포 내로 도입하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 유전자 편집 시스템은 CRISPR(CRISPR: CRISPR/Cas 시스템으로도 알려져 있는 클러스터링된 정규 산재 단형 회문나선 반복), ZFN(아연-핑거 뉴클레아제), TALEN(전사 활성화제-유사 효과기 기반 뉴클레아제), 조작된 메가뉴클레아제(예컨대 ARCUS 뉴클레아제, 예컨대 ARC 뉴클레아제), AAV 벡터(아데노-연관 바이러스) 유전자 편집(예컨대, AAV 벡터 유도 상동성 재조합) 및 렌티바이러스 벡터-기반 게놈 편집 기술로 구성되는 군으로부터 선택된다. AAV 벡터 유도 유전자 전달, 예컨대 상동성 재조합에 의한 유도는 AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, 또는 이의 유도체로 구성되는 군으로부터 선택되는 AAV에 의해 달성될 수 있다.

[2882] 사용되어야 하는 경우, 유전자 편집 기법은 상이한 지점, 예컨대 (1) 윤부 상피 조직 상에서, LSC 단리 전에 또는 (2) 세포 단리 시에 또는 (3) 시험관내 세포 집단 증식기 동안(세포가 시험관내에서 본 발명에 따른 LATS 억제제에 노출되는 경우) 또는 (4) 세포 집단 증식기 말기에 시험관내에서(세포가 시험관내에서 본 발명에 따른 LATS 억제제에 노출된 후)에 수행할 수 있다. 특정 구현예에서, CRISPR은 본 발명에 따른 LATS 억제제의 존재하에 세포 집단의 시험관내 증식 2주 후 사용된다.

[2883] 세포 집단의 증식 방법에서 사용하기 적합한 유전자 편집 기법은 "면역거부의 감소" 섹션 하에 추가 기재된다.

[2884] 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에서, 바람직하게는 화합물인 LATS 억제제는 접종된 세포 집단의 2배 초과 증식을 생성한다.

[2885] 본 발명에 따른 세포 집단 증식 방법의 하나의 양태에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물은 접종된 윤부 세포 집단의 30배 초과 증식을 생성한다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법의 특정 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 LATS 억제제는 윤부 세포의 접종된 집단의 100배 내지 2200배 증식을 생성한다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법의 보다 구체적인 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 LATS 억제제는 윤부 세포의 접종된 집단의 600배 내지 2200배 증식을 생성한다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 달성되는 배율 증식 인자는 세포의 하나 이상의 계대에서 달성될 수 있다. 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 달성되는 배율 증식 인자는 약 12 내지 16일, 바람직하게는 약 14일 동안 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물의 노출 후 달성될 수 있다.

[2886] 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법의 하나의 양태에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 LATS 억제제는 세포의 총량 대비 6% 초과의 p63알파 양성 세포를 포함하는 세포 집단을 생성한다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법의 특정 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 LATS 억제제는 세포 총량 대비 20% 초과의 p63알파 양성 세포를 포함하는 세포 집단을 생성한다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법의 다른 특정 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 LATS 억제제는 세포 총량 대비 70% 초과의 p63알파 양성 세포를 포함하는 세포 집단을 생성한다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법의 다른 특정 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 LATS 억제제는 세포의 총량 대비 95% 초과의 p63알파 양성 세포를 포함하는 세포 집단을 생성한다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 달성되는 p63알파 양성 세포의 백분율 증가는 세포의 하나 이상의 계대에서 달성될 수 있다. 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 달성되는 p63알파 양성 세포의 백분율 증가는 약 12 내지 16일, 바람직하게는 약 14일 동안 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물의 노출 후 달성될 수 있다.

[2887] 세포 집단의 세포수 또는 증식을 측정하는 것이 요망되는 경우, 이는, 예를 들어 분취량을 취하고 면역세포화학을 수행하여(예컨대 Sytox Orange로 염색된 핵을 계수하기 위해) 또는 세포수를 계수하기 위한 명시야 현미경하의 살아있는 세포 이미지화에 의해 또는 본 발명에 따른 방법의 세포 집단 증식기 동안 다양한 시점에 세포

융합성의 정량적인 실시간 살아있는-세포 분석을 수행하여 수행할 수 있다.

[2888] Sytox Orange 검정은 당분야에 알려진 표준 프로토콜에 따라 수행할 수 있다. 간략하게, 세포가 세포 배양 디쉬에 부착한 후(전형적으로 세포 플레이팅 24 h 후), 세포를 파라포름알데하이드로 고정한다. 이어서 세포를 투과화한 후(예컨대 0.3% Triton X-100 용액 사용) 이들을 Sytox Orange 용액 중에 표지화한다(예컨대 PBS 중 0.5 마이크로몰 농도의 Sytox Orange를 사용함). 이어서 표면적 당 Sytox Orange로 염색된 핵의 수를 Zeiss 에피형광 현미경 하에 계수한다. 본 발명에 따른 하나의 양태에서, 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 LSC 집단은 바람직하게는 적어도 하나의 하기 특징을 나타낸다. 보다 바람직하게는 2개 이상의, 보다 바람직하게는 모든 하기 특징을 나타낸다.

[2889] (1) 세포 제조물이 p63알파 세포에 대해 양성이다. p63알파의 발현은 당분야에 알려진 표준 기법, 예를 들어 면역조직화학 및 정량적 RT-PCR에 의해 추정될 수 있다.

[2890] (2) 세포 제조물이 6% 초과의 p63알파 양성 세포를 포함한다. 바람직하게는 세포 제조물이 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 초과의 p63알파 양성 세포를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 세포 제조물은 95% 초과의 p63알파 양성 세포를 포함한다. p63알파 세포의 백분율은 면역조직화학 또는 FACS에 의해 측정될 수 있다.

[2891] (3) 세포가 ABCB5, ABCG2, 및 C/EBPδ 중 하나 이상을 발현한다. ABCB5, ABCG2, 및 C/EBPδ의 발현은 당분야에 알려진 표준 기법, 예를 들어 면역조직화학 및 정량적 RT-PCR에 의해 추정될 수 있다.

[2892] (4) 세포가 케라틴-12 발현에 의해 관찰되는 바와 같이 각막 상피 세포로 분화될 수 있다. 이들 특징은 면역조직화학 또는 FACS에 의해 관찰될 수 있다.

[2893] 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 증식된 세포 집단을 용액에 첨가한 후, 예를 들어 보존 또는 냉동보존 용액(예컨대 후술되는 것들)에 보관할 수 있거나, 눈 전달에 적합한 조성물에 직접 첨가할 수 있다. 눈 전달에 적합한 보존, 냉동보존 용액 또는 조성물은 선택적으로 본 발명에 따른 LATS 억제제를 포함할 수 있다.

[2894] 본 발명에 따른 보다 바람직한 구현예에서, 눈에 전달되는 세포 집단 제조물은 매우 낮은 내지 무시할 만한 수준의 LATS 억제제 화합물을 포함한다. 따라서 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법은 헹구어 본 발명에 따른 화합물(예컨대 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물)을 실질적으로 제거하는 추가 단계를 포함한다. 여기에는 본 발명에 따른 세포 집단 증식기 후 세포를 헹구는 단계가 관여될 수 있다. 세포를 헹구기 위해, 세포를 배양 디쉬에서 탈착시키고(예컨대 아큐타제로 처리하여), 이어서 탈착된 세포를 원심분리하고, PBS 또는 본 발명에 따른 성장 배지 중 세포 현탁액을 제조한다. 상기 단계는 다회, 예컨대 1 내지 10회, 세포를 헹궈내기 위해 수행할 수 있다. 마지막으로, 세포는 요망되는 바에 따라 보존 용액, 냉동보존 용액, 눈 전달에 적합한 조성물, 성장 배지 또는 이의 조합 중에 재현탁할 수 있다.

[2895] 세포 집단의 증식 방법에 의해 제조되고 본 발명에 따른 LATS 억제제를 포함하는 세포 증식 배지를 헹궈낸 증식된 세포 집단은 눈 전달에 적합한 조성물, 예컨대 국소화 제제로 전달할 수 있다. 선택적으로 세포 집단을 눈 전달에 적합한 국소화 제제에 대한 첨가 전 기간 동안 보관한다. 바람직한 구현예에서, 증식된 세포 집단은 보존 또는 냉동보존에 적합한 용액에 먼저 첨가할 수 있고, 이는 바람직하게는, 또한 바람직하게는 LATS 억제제를 포함하지 않는 눈 전달에 적합한 국소화 제제의 첨가 전에 LATS 억제제, 및 보관된 세포 집단(선택적으로 냉동 포함)을 포함하지 않는다.

[2896] LSC의 보존에 적합한 전형적인 용액은 Optisol 또는 PBS, 바람직하게는 Optisol이다. Optisol은 보관 동안 각막 탈수를 증강시키기 위해 콘드로이틴 설페이트 및 덱스트란을 포함하는 각막 보관 배지이다(예를 들어 문헌 [Kaufman et al., (1991) Optisol corneal storage medium; Arch Ophthalmol Jun; 109(6): 864-8] 참고). 냉동보존을 위해, 글리세롤, 디메틸 설폭시드, 프로필렌 글리콜 또는 아세트아미드가 본 발명의 냉동보존 용액에서 사용될 수 있다. 세포의 냉동보존된 제조물은 전형적으로 -20℃ 또는 -80℃에서 유지된다.

[2897] 하나의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능한 윤부 줄기 세포의 보존된 또는 냉동보존된 제조물에 관한 것이다. 대안적인 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능한 윤부 줄기 세포가 PBS 및/또는 성장 배지에서 현탁액 중에 있거나 국소화 제제와 조합된 신선 세포 제조물에 관한 것이다. 신선 세포 제조물은 전형적으로 약 15 내지 37℃에서 유지된다. 당분야에 알려진 표준 세포 배양 용기, 예컨대 바이알 또는 플라스크가 세포를 보관하기 위해 사용될 수 있다.

[2898] 본 발명에 따른 바람직한 구현예에서, 눈에서의 사용 전에, 세포의 냉동보존된 제조물이 해동된다(예를 들어 인

큐베이터 또는 수조에서 약 37℃ 온도에서의 인큐베이션에 의해). 바람직하게는 10배 용량의 PBS 또는 성장 배지가 냉동보존제 용액으로부터 세포를 헹궈내기 위해 첨가될 수 있다. 이어서 세포가 원심분리에 의해 헹궈질 수 있고, 세포 현탁액은 또한 바람직하게는 LATS 억제제를 포함하지 않는 눈 전달용 국소화 제제와의 조합 전에, PBS 및/또는 성장 배지 중에 제조될 수 있다.

[2899] 본 발명의 하나의 양태에서, 세포 집단의 증식 방법에 의해 제조되는 증식된 세포 집단은 현탁액으로서(예를 들어 PBS 및/또는 성장 배지, 예컨대 X-VIVO 배지 중) 전달되고 눈 전달에 적합한 국소화 제제(예컨대 GelMA와 같은 바이오매트릭스)와 조합된다. 본 발명에 따른 치료 방법의 특정 구현예에서, 세포, PBS 및/또는 성장 배지, 및 바이오매트릭스의 상기 조합이 담체(예컨대 콘택트 렌즈)를 통해 눈으로 전달된다. 다른 특정 구현예에서, 세포, PBS 및/또는 성장 배지, 및 바이오매트릭스의 상기 조합은 기껏해야 단지 미량 수준의 LATS 억제제를 포함한다.

[2900] 본원에서 사용되는 용어 "미량 수준"은 5% w/v 미만(예컨대, 5% w/v, 4% w/v, 3% w/v, 2% w/v, 또는 1% w/v 이하), 바람직하게는 0.01% w/v 미만(예컨대, 0.01% w/v, 0.009% w/v, 0.008% w/v, 0.007% w/v, 0.006% w/v, 0.005% w/v, 0.004% w/v, 0.003% w/v, 0.002% w/v, 또는 0.001% w/v 이하)을 의미하며, 이는, 예를 들어 본원에서 실시예에 기재된 바와 같은 고-분해능 크로마토그래피를 사용하여 측정될 수 있다. 소정 구현예에서, 미량 수준의 본 발명의 LATS 억제제 화합물은 하나 이상의 세척 단계 후 존재하는 잔여 화합물 수준이며, 이는 종합적으로 이러한 화합물의 세포 역가 미만이고, 이에 따라 생체내 생물학적 효과를 유도하지 않는다. 따라서, 화합물의 잔여 수준은 세포 배양에서 또는 대상체에서(예컨대, 대상체에 대한 증식된 세포 집단의 이식 후) 세포 집단 증식에 대한 생물학적 효과를 가질 것으로 예상되는 양 미만이다. 미량 수준은, 예를 들어, 하기와 같이 계산될 수 있는 세척-제거 효율로서 측정될 수 있다: 세척-제거 효율 = 100 - (세척-후 펠렛에서의 평균 농도 × 펠렛 용량 × 분자량)/(화합물 농도 × 배양 배지 용량 × 분자량). 본원에서 사용되는 세포로부터 본 발명의 LATS 억제제 화합물을 "헹구어 실질적으로 제거하는"이란 미량 수준의 LATS 억제제 화합물을 확립하는 단계를 나타낸다.

[2901] 대안적으로, 세포가 배양될 수 있고 세포 집단 증식기가 눈 표면으로의 세포 전달에 적합한 국소화 제제(예를 들어 피브린, 콜라겐) 상에서 세포 증식 배지에서 일어날 수 있다.

[2902] **세포 집단 증식: 증식된 각막 내피 세포 집단을 제조하기 위해**

[2903] 본 발명의 바람직한 구현예에서, 예를 들어 "증식된 각막 내피 세포 집단을 제조하기 위한 출발 물질" 섹션에 기재된 바와 같이 단리되고 수득 가능한 각막 내피 세포는 당분야에 알려진 배양 용기, 예컨대 플레이트, 멀티-웰 플레이트, 및 세포 배양 플라스크에서 배지 중에 성장시킬 수 있다. 예를 들어, 코팅되지 않거나 콜라겐, 신티맥스, 젤라틴 또는 파이브로넥틴으로 코팅된 배양 디쉬를 사용할 수 있다. 적합한 배양 용기의 바람직한 예는 코팅되지 않은 플레이트이다. 표준 배양 용기 및 설비, 예컨대 산업적 용도를 위해 당분야에 알려진 바이오리액터를 또한 사용할 수 있다.

[2904] 사용되는 배지는 성장 배지 또는 세포 증식 배지일 수 있다. 성장 배지는 세포 집단의 성장 및 유지를 뒷받침하는 배양 배지로서 본원에서 정의된다. 각막 상피 세포 배양을 위해 당분야에 알려져 있는 적합한 성장 배지는, 예를 들어 FBS(우태 혈청)가 보충된 DMEM(둘베코 변형 이글 배지)(Invitrogen), 인간 혈청이 보충된 인간 내피 SF(무혈청) 배지(Invitrogen), X-VIVO15 배지(Lonza), 또는 중간엽 줄기 세포-컨디셔닝된 배지이다. 이들에 성장 인자(예컨대 bFGF), 및/또는 항생제, 예컨대 페니실린 및 스트렙토마이신이 추가 보충될 수 있다. 본 발명에 따라 바람직한 성장 배지는 X-VIVO15 배지이다(여기에는 성장 인자가 추가로 보충되지 않음).

[2905] 대안적으로, 단리된 세포를 본 발명에 따른 세포 증식 배지에 먼저 첨가할 수 있다. 본원에서 정의되는 세포 증식 배지는 성장 배지 및 본 발명에 따른 LATS 억제제를 포함한다. 본 발명에 따른 세포 증식 배지에서, 성장 배지 성분은 FBS(우태 혈청)가 보충된 DMEM(둘베코 변형 이글 배지)(Invitrogen), 인간 혈청이 보충된 인간 내피 SF(무혈청) 배지(Invitrogen), X-VIVO15 배지(Lonza), 또는 중간엽 줄기 세포-컨디셔닝된 배지로 구성되는 군으로부터 선택된다. 이들에 성장 인자(예컨대 bFGF), 및/또는 항생제, 예컨대 페니실린 및 스트렙토마이신이 추가 보충될 수 있다.

[2906] 본 발명에 따른 바람직한 세포 증식 배지는 본 발명에 따른 LATS 억제제를 함유하는 X-VIVO15 배지(Lonza)이다. 상기 세포 증식 배지는 이것이 CEC의 증식을 촉진하기 위해 추가 성장 인자 또는 영양 세포를 필요로 하지 않는다는 장점을 갖는다. X-VIVO 배지는 특히 약학 등급 인간 알부민, 재조합 인간 인슐린, 및 파스퇴르화된 인간 트랜스페린을 포함한다. 선택적으로 항생제가 X-VIVO15 배지에 첨가될 수 있다. 바람직한 구현예에서, X-VIVO15

배지는 항생제의 첨가 없이 사용된다.

[2907] 세포 증식 배지는 성장 배지 및 본 발명에 따른 LATS 억제제를 포함한다. LATS 억제제는 바람직하게는 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따르며 "LATS 억제제" 섹션 하에 추가 기재된 바와 같은 화합물을 포함하는 군으로부터 선택된다.

[2908] 바람직한 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 LATS 억제제는 약 0.5 내지 100마이크로몰 농도, 바람직하게는 약 0.5 내지 25마이크로몰 농도, 보다 바람직하게는 약 1 내지 20마이크로몰 농도로 첨가된다. 특정 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 LATS 억제제는 약 3 내지 10마이크로몰 농도로 첨가된다.

[2909] 하나의 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물의 스톡 용액은 DMSO 중 10 mM의 스톡 농도로 화합물 분말을 용해시킴으로써 제조할 수 있다.

[2910] 본 발명의 하나의 양태에서, 본 발명에 따른 LATS 억제제는 각막 내피 세포에서 LATS1 및/또는 LATS2 활성을 억제한다. 바람직한 구현예에서, LATS 억제제는 LATS1 및 LATS2를 억제한다.

[2911] 세포는 신선 성장 배지 및/또는 세포 증식 배지의 첨가 회(들)를 거칠 수 있다. 신선 배지를 첨가하기 위해 세포를 계대할 필요는 없지만, 세포 계대는 또한 신선 배지를 첨가하는 하나의 방식이다.

[2912] 다양한 순서 조합으로, 일련의 배지: 예를 들어 세포 증식 배지, 이어서 성장 배지(본 발명에 따른 LATS 억제제가 보충되지 않으며, 세포 증식 배지에 대한 기재로서 사용되는 성장 배지와 상이할 수 있음)의 첨가를 또한 사용할 수 있다.

[2913] 본 발명에 따른 세포 집단 증식기는 세포가 세포 증식 배지에 노출되는 기간 동안 일어난다.

[2914] 세포를 배양하기 위해 당분야에 알려진 표준 온도 조건, 예를 들어 바람직하게는 약 30℃ 내지 40℃를 사용할 수 있다. 특히 바람직하게는 세포 성장기뿐만 아니라 세포 집단 증식기가 약 37℃에서 수행된다. 5~10% $CO_2$ 수준을 갖는 통상적인 세포 인큐베이터를 사용할 수 있다. 바람직하게는 세포는 5% $CO_2$로 노출된다.

[2915] 세포는 필요에 따라 성장 또는 세포 증식 배지에서 배양 동안 계대할 수 있다. 세포는 이들이 융합성-미만 또는 융합성인 경우 계대할 수 있다. 더 낮은 백분율의 융합성 수준도 수행될 수 있으나, 바람직하게는 세포는 대략 90%~100% 융합성에 도달할 때 계대한다. 세포의 계대는 당분야에 알려진 표준 프로토콜에 따라 수행한다. 예를 들어, 간략하게 세포는 배양 용기로부터, 예를 들어 콜라게나제를 사용하여 탈착한다. 이어서 세포를 원심분리하고 PBS 또는 본 발명에 따른 세포 성장 배지 중에 헹구고 요망되는 희석도로, 예를 들어 1:2 내지 1:4로 신선 성장 또는 세포 증식 배지에 플레이팅한다.

[2916] 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법의 세포 집단 증식기에 있어서, 세포 증식 배지에서 접종 세포 집단의 증식은 요구되는 양의 세포성 물질이 수득될 때까지 수행할 수 있다.

[2917] 세포는 세포 집단을 증식시키기 위한 시기 범위 동안 세포 증식 배지에 노출시킬 수 있다. 예를 들어 여기에는 CEC가 배양 중에 유지되는 전체 시간, 또는 CEC 단리 후 처음 1주 내지 2주 동안만 또는 각막의 절제 후 24시간 동안만 포함될 수 있다.

[2918] 바람직한 구현예에서, 각막 내피 세포는 각막으로부터의 세포 단리 직후 본 발명에 따른 LATS 억제제(예컨대 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물)에 노출시키고 CEC 증식이 요구되는 전체 시간, 예를 들어 1 내지 2주 동안 유지한다.

[2919] 본 발명의 보다 바람직한 구현예에서, 시험관내 세포 집단 증식기 후(즉, 세포가 세포 집단을 증식시키기 위한 시기 동안 본 발명에 따른 LATS 억제제에 노출된 후), 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법은 세포가 성숙 각막 내피가 형성될 수 있도록 하는 LATS 억제제의 보충 없이 성장 배지에서 일정 시기(예컨대 2주) 동안 성장할 수 있는 추가 단계를 포함한다. 성숙 각막 내피는 본원에서 육각형 형태, ZO-1-양성 치밀 이음부 및 Na/K ATP아제의 발현을 갖는 단층 CEC로 정의된다. 바람직한 구현예에서, 성숙 각막 내피가 형성되는 동안 세포는 계대하지 않는다.

[2920] 본 발명에 따른 하나의 구현예에서, 유전자 편집 기법은 선택적으로 세포를 유전적으로 변형하기 위해, 다르게는 세포 집단이 환자에게 전달되는 경우 면역 거부에 기여할 수 있는, 면역 반응 매개 유전자의 발현 및/또는 기능을 감소시키거나 제거하기 위해 수행할 수 있다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에서 유전자 편집

기법의 적용은 선택적이며, 환자에 이식된 물질의 면역거부 문제를 경감시키기 위해 요망되는 경우 국소 면역억제제 및/또는 소염제(면역억제제 및 소염제 섹션 하에 추가 기재됨)의 환자에 대한 투여가 대신 사용될 수 있다.

[2921] 본 발명의 하나의 양태에 따르면, 유전자 편집 기법이 사용되는 시나리오에 있어서, 유전적 변형은 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자의 발현 및/또는 기능을 감소시키거나 제거하는 단계를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 유전적 변형은 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자를 특이적으로 표적화하는 유전자 편집 시스템을 각막 내피 세포 내로 도입하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 유전자 편집 시스템은 CRISPR(CRISPR: CRISPR/Cas 시스템으로도 알려져 있는 클러스터링된 정규 산재 단형 회문나선 반복), ZFN(아연-핑거 뉴클레아제), TALEN(전사 활성화제-유사 효과기 기반 뉴클레아제), 조작된 메가뉴클레아제(예컨대 ARCUS 뉴클레아제, 예컨대 ARC 뉴클레아제), AAV 벡터(아데노-연관 바이러스) 유전자 편집(예컨대, AAV 벡터 유도 상동성 재조합) 및 렌티바이러스 벡터-기반 게놈 편집 기술로 구성되는 군으로부터 선택된다. AAV 벡터 유도 유전자 전달, 예컨대 상동성 재조합에 의한 유도는 AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, 또는 이의 유도체로 구성되는 군으로부터 선택되는 AAV에 의해 달성될 수 있다.

[2922] 사용되어야 하는 경우, 유전자 편집 기법은 상이한 지점에서, 예컨대 (1) 조직 상에서, 세포 단리 전에 또는 (2) 세포 단리 시에 또는 (3) 시험관내 세포 집단 증식기 동안(세포가 시험관내에서 본 발명에 따른 LATS 억제제에 노출되는 경우) 또는 (4) 세포 집단 증식기 말기에 시험관내에서(세포가 시험관내에서 본 발명에 따른 LATS 억제제에 노출된 후) 수행할 수 있다.

[2923] 세포 집단의 증식 방법에서 사용하기 적합한 유전자 편집 기법은 "면역거부의 감소" 섹션 하에 추가 기재된다.

[2924] 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에서, 바람직하게는 화합물인 LATS 억제제는 접종된 세포 집단의 2배 초과 증식을 생성한다.

[2925] 본 발명에 따른 세포 증식 방법의 하나의 양태에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물은 접종된 각막 내피 세포 집단의 10배 초과 증식을 생성한다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법의 특정 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 LATS 억제제는 각막 내피 세포의 접종된 집단의 15배 내지 600배 증식을 생성한다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법의 보다 구체적인 구현예에서, 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 LATS 억제제는 각막 내피 세포의 접종된 집단의 20배 내지 550배 증식을 생성한다. 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 달성되는 배율 증식 인자는 세포의 하나 이상의 계대에서 달성될 수 있다. 본 발명의 다른 양태에서, 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 달성되는 배율 증식 인자는 약 1 내지 2주 동안, 바람직하게는 약 10일 후 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물의 노출 후 달성될 수 있다.

[2926] 세포 집단의 세포수 또는 증식을 측정하는 것이 요망되는 경우, 이는, 예를 들어 분취량을 취하고 면역세포화학을 수행하여(예컨대 Sytox Orange로 염색된 핵을 계수하기 위해) 또는 세포수를 계수하기 위한 명시야 현미경하의 살아있는 세포 이미지화에 의해 또는 본 발명에 따른 방법의 세포 집단 증식기 동안 다양한 시점에 세포 융합성의 정량적인 실시간 살아있는-세포 분석을 수행하여 수행할 수 있다.

[2927] 본 발명에 따른 하나의 양태에서, 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능하거나 수득되는 CEC 집단은 바람직하게는 적어도 하나의 하기 특징을 나타낸다. 보다 바람직하게는 2개 이상의, 특히 바람직하게는 모든 하기 특징을 나타낸다.

[2928] (1) 세포가 Na/K ATP아제를 발현한다. Na/K ATP아제의 발현은 당분야에 알려진 표준 기법, 예를 들어 면역조직화학, 정량적 RT-PCR 또는 FACS에 의해 추정될 수 있다.

[2929] (2) 세포가 콜라겐 8a2, AQP1(aquaporin 1) 및 SLC4A11(Solute Carrier 패밀리 4 구성원 11) 중 하나 이상을 발현한다. 바람직하게는 상대 발현 수준은 전형적으로 콜라겐 8a2, AQP1 및 SLC4A11을 발현하지 않는 세포, 예컨대 피부 섬유아세포에서보다 높다. 콜라겐 8a2, AQP1 또는 SLC4A11의 발현은 당분야에 알려진 표준 기법, 예를 들어 면역조직화학, 정량적 RT-PCR 또는 FACS에 의해 추정될 수 있다.

[2930] (3) 세포가 RPE65(망막 색소 상피 마커) 및/또는 CD31(혈관 내피 마커)을 발현하지 않는다(혹은 기껏해야 상대적으로 저수준으로 발현한다). 상대 발현 수준은 전형적으로 RPE65, CD31을 발현하지 않는 세포, 예컨대 피부 섬유아세포에서와 유사하다. RPE65 및 CD31의 발현은 당분야에 알려진 표준 기법, 예를 들어 정량적 RT-PCR, 면역조직화학 또는 FACS에 의해 추정될 수 있다.

[2931] (4) 세포가 상대적으로 저수준의 CD73을 발현한다. 상대 발현 수준은 내피가 중간엽 전이를 거친 세포에서보다

낮다. CD73의 발현은 당분야에 알려진 표준 기법, 예컨대 FACS 분석 또는 면역조직화학에 의해 추정될 수 있다.

[2932] 본 발명에 따른 다른 양태에서, 한 층 내에 있는 경우, 예를 들어 플레이트 상에서 배양되는 경우, 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능한 CEC 집단은 바람직하게는 적어도 하나의 하기 특징을 나타낸다. 보다 바람직하게는 2개 이상의, 특히 바람직하게는 모든 하기 특징을 나타낸다:

[2933] (1) 세포가 단층 구조를 형성할 수 있다. 이는 체내 각막 내피 세포층의 특징 중 하나이다. 이는 핵 염색(예컨대 핵 염료, 예컨대 Sytox, Hoechst 이용)에 이어 현미경에 의한 검사로 관찰될 수 있다.

[2934] (2) 세포가 치밀 이음부를 형성할 수 있다. 이는 당분야에 알려진 표준 기법, 치밀-이음부 마커 Zonula Occludens-1(ZO-1)의 면역형광 염색에 의해 확인될 수 있다.

[2935] (3) 세포가 세포층에서 규칙적으로 배열될 수 있다. 이는 당분야에 알려진 표준 기법, 치밀-이음부 마커 Zonula Occludens-1(ZO-1)의 면역형광 염색에 의해 확인될 수 있다. 체내 건강한 각막 내피 세포층에서, 층을 이루는 규칙적으로 배열되며, 이로 인해 세포는 각막 내피 세포가 정상 기능 및 고투명도를 유지하는 것으로 여겨지고 각막이 물 제어 기능을 적절히 나타내는 것으로 여겨진다.

[2936] 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 증식된 세포 집단을 용액에 첨가한 후, 예를 들어 보존 또는 냉동보존 용액(예컨대 후술되는 것들)에 보관할 수 있거나, 눈 전달에 적합한 조성물에 직접 첨가할 수 있다. 눈 전달에 적합한 보존, 냉동보존 용액 또는 조성물은 선택적으로 본 발명에 따른 LATS 억제제를 포함할 수 있다.

[2937] 본 발명에 따른 보다 바람직한 구현예에서, 눈에 전달되는 세포 집단 제조물은 매우 낮은 내지 무시할 만한 수준의 LATS 억제제 화합물을 포함한다. 따라서 특정 구현예에서, 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법은 헹구어 본 발명에 따른 화합물(예컨대 화학식 A1 또는 이의 하위 화학식에 따른 화합물)을 실질적으로 제거하는 추가 단계를 포함한다. 여기에는 본 발명에 따른 세포 집단 증식기 후(세포 집단 증식기 직후 및/또는 세포가 배양되어 LATS 억제제가 보충되지 않은 성장 배지에서 성숙 각막 내피를 형성한 후) 세포를 헹구는 단계가 관여될 수 있다. 세포를 헹구기 위해, 세포를 원심분리하고, 세포 현탁액을 PBS 또는 본 발명에 따른 성장 배지에서 제조한다. 상기 단계는 다회, 예컨대 1 내지 10회, 세포를 헹궈내기 위해 수행할 수 있다. 마지막으로, 세포는 요망되는 바에 따라 보존 용액, 냉동보존 용액, 눈 전달에 적합한 조성물, 성장 배지 또는 이의 조합 중에 재현탁할 수 있다.

[2938] 세포 집단의 증식 방법에 의해 제조되고 본 발명에 따른 LATS 억제제를 포함하는 세포 증식 배지를 헹궈낸 증식된 세포 집단은 눈 전달에 적합한 조성물, 예컨대 국소화 제제로 전달할 수 있다. 선택적으로 세포 집단을 눈 전달에 적합한 국소화 제제에 대한 첨가 전 기간 동안 보관한다. 바람직한 구현예에서, 증식된 세포 집단은 보존 또는 냉동보존에 적합한 용액에 먼저 첨가할 수 있고, 이는 바람직하게는, 또한 바람직하게는 LATS 억제제를 포함하지 않는 눈 전달에 적합한 국소화 제제의 첨가 전에 LATS 억제제, 및 보관된 세포 집단(선택적으로 냉동 포함)을 포함하지 않는다.

[2939] CEC의 보존에 적합한 전형적인 용액은 Optisol 또는 PBS, 바람직하게는 Optisol이다. Optisol은 보관 동안 각막 탈수를 증강시키기 위해 콘드로이틴 설페이트 및 덱스트란을 포함하는 각막 보관 배지이다(예를 들어 문헌 [Kaufman et al., (1991) Optisol corneal storage medium; Arch Ophthalmol Jun; 109(6): 864-8] 참고). 냉동보존을 위해, 글리세롤, 디메틸 설폭시드, 프로필렌 글리콜 또는 아세트아미드가 본 발명의 냉동보존 용액에서 사용될 수 있다. 세포의 냉동보존된 제조물은 전형적으로 -20℃ 또는 -80℃에서 유지한다.

[2940] 하나의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능한 각막 내피 세포의 보존된 또는 냉동보존된 제조물에 관한 것이다. 대안적인 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능한 각막 내피 세포가 PBS 및/또는 성장 배지에서 현탁액 중에 있거나 국소화 제제와 조합되는 신선 세포 제조물에 관한 것이다. 신선 세포 제조물은 전형적으로 약 37℃에서 유지된다. 당분야에 알려진 표준 세포 배양 용기, 예컨대 바이알 또는 플라스크가 세포를 보관하기 위해 사용될 수 있다.

[2941] 본 발명에 따른 바람직한 구현예에서, 눈에서의 사용 전에, 세포의 냉동보존된 제조물이 해동된다(예를 들어 인큐베이터 또는 수조에서 약 37℃ 온도에서의 인큐베이션에 의해). 바람직하게는 10배 용량의 PBS 또는 성장 배지가 냉동보존제 용액으로부터 세포를 헹궈내기 위해 첨가될 수 있다. 이어서 세포가 원심분리에 의해 헹궈질 수 있고, 세포 현탁액은 또한 바람직하게는 LATS 억제제를 포함하지 않는 눈 전달용 국소화 제제와의 조합 전에, PBS 및/또는 성장 배지 중에 제조될 수 있다.

[2942] 본 발명의 하나의 양태에서, 세포 집단의 증식 방법(바람직하게는 또한 성숙 각막 내피를 형성하기 위한 LATS

억제제의 보충을 포함하지 않는 배지에서의 성장 단계 포함)에 의해 제조되는 증식된 세포 집단은 현탁액으로서(예를 들어 PBS 및/또는 성장 배지, 예컨대 X-VIVO 배지 중) 눈 전달에 적합한 국소화 제제(예컨대 GelMA와 같은 바이오매트릭스)와 조합되어 제조된다. 본 발명에 따른 치료 방법의 특정 구현예에서, 세포, PBS 및/또는 성장 배지, 및 바이오매트릭스의 상기 조합이 현탁액으로서 눈으로 전달된다. 다른 특정 구현예에서, 세포, PBS 및/또는 성장 배지, 및 바이오매트릭스의 상기 조합은 기껏해야 단지 미량 수준의 LATS 억제제를 포함한다.

[2943] 대안적으로, 세포가 배양될 수 있고 세포 집단 증식기가 눈 표면으로의 세포 전달에 적합한 국소화 제제 상에서 세포 증식 배지에서 일어날 수 있다.

[2944] 본 발명의 하나의 구현예에서, 본 발명에 따라 증식된 세포 집단은 당분야에 알려진 방법(예를 들어, 문헌[Kim et al, *JSM Biotechnol. Bioeng.*, 2016, p.1047] 참고)을 사용하여, 각막에 대한 전달을 위한 인접 세포 시트로서 단리될 수 있다. 세포 시트는 각막으로의 전달을 위한 물질(들) 상에서 기계적으로 지지될 수 있다.

[2945] 면역거부의 감소

[2946] 이식 시, 동종이형 윤부 줄기 세포는 수신자의 면역계에 의한 거부의 위험을 갖는다. 이식된 세포, 예컨대 LSC의 면역거부 위험을 감소시키기 위해 면역억제 요법을 사용할 수 있다.

[2947] 동종이형 LSC의 수신자에서 사용되는 적합한 전신 면역억제제에는 타크롤리무스, 미코페놀레이트 모페틸, 프레드니손 및 예방용 발갱시클로비어 및 트리메토프림/설파메톡사졸이 포함된다(문헌[Holland EJ, Mogilishetty G, Skeens HM, Hair DB, Neff KD, Biber JM, Chan CC (2012) Systemic immunosuppression in ocular surface stem cell transplantation: results of a 10-year experience. Cornea. 2012 Jun;31(6):655-61] 참고).

[2948] 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법은 고증식능 세포 집단을 제공하므로, 면역거부 유발인자를 제거하기 위해 또는 수신자의 면역 반응을 감소시키는 유전자를 부가하기 위해 선택적으로 유전자-편집 기술을 사용할 수 있다.

[2949] 본 발명의 하나의 양태에서, 유전자 편집은 "생체외" 세포 집단 상에서 수행된다. 본 발명의 다른 양태에서, 숙주 대 이식편 면역 반응의 촉진과 연관된 유전자의 발현을 감소시키거나 제거하기 위해 유전자-편집 기술을 선택적으로 사용할 수 있다. 바람직한 구현예에서, 유전자는 B2M, HLA-A, HLA-B 및 HLA-C로 구성되는 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 유전자는 B2M이다. B2M은 베타 2 마이크로글로불린이며 클래스 I 주조직 적합성 복합체(MHC)의 성분이다. 이는 HUGO 유전자 명명 위원회(HGNC) 식별자 914를 갖는다. HLA-A는 주조직 적합성 복합체, 클래스 I, A(HGNC ID 4931)이다. HLA-B는 주조직 적합성 복합체, 클래스 I, B(HGNC ID 4932)이다. HLA-C는 주조직 적합성 복합체, 클래스 I, C(HGNC ID 4933)이다.

[2950] 비제한적으로 CRISPR(CRISPR: CRISPR/Cas 시스템으로도 알려져 있는 클러스터링된 정규 산재 단형 회문나선 반복), ZFN(아연-핑거 뉴클레아제), TALEN(전사 활성화제-유사 효과기 기반 뉴클레아제), 조작된 메가뉴클레아제(예컨대 ARCUS 뉴클레아제, 예컨대 ARC 뉴클레아제), AAV 벡터(아데노-연관 바이러스) 유전자 전달(예컨대, AAV 벡터 유도 상동성 재조합) 및 렌티바이러스 벡터-기반 게놈 편집 기술로 구성되는 군으로부터 선택되는 방법을 포함하는 몇몇 유전자 편집 방법을 사용할 수 있다. AAV 벡터 유도 유전자 전달, 예컨대 상동성 재조합에 의한 유도는 AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, 또는 이의 유도체로 구성되는 군으로부터 선택되는 AAV에 의해 달성될 수 있다. 본 발명의 하나의 양태에서, 유전자 편집은 "생체외" 세포 집단 상에서 수행된다.

[2951] 유전자 편집 시스템

[2952] 본원에서 사용되는 용어 "유전자 편집 시스템"은 하나 이상의 DNA-결합 도메인 또는 성분 및 하나 이상의 DNA-변형 도메인 또는 성분, 또는 단리된 핵산, 예컨대 상기 DNA-결합 및 DNA-변형 도메인 또는 성분을 인코딩하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 시스템을 나타낸다. 표적 유전자의 핵산을 변형하기 위해 및/또는 표적 유전자의 발현을 조절하기 위해 유전자 편집 시스템을 사용한다. 예를 들어 알려진 유전자 편집 시스템에서, 하나 이상의 DNA-결합 도메인 또는 성분은 하나 이상의 DNA-결합 도메인이 하나 이상의 DNA-변형 도메인 또는 성분을 특정 핵산 부위로 표적화하도록 하나 이상의 DNA-변형 도메인 또는 성분과 연합된다. 본원에서 기재되는 유전자 편집은 생체외 수행할 수 있다.

[2953] AAV 유전자 편집 시스템

[2954] 시험관내 및 생체내 유전자를 전달하기 위해 AAV로부터 유래되는 벡터의 사용이 당분야에 널리 알려져 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 9,707,304 참고). 세포에서 유전자를 편집하기 위한 바이러스 벡터의 사용은, 예를 들어 문헌[Chen et al., 2016, Molecular Therapy, 24:447-457; Gornalusse et al., Nature Biotechnology,

2017, 35(8):765-772]; 및 WO2017087961에 기재되었다.

[2955] AAV 벡터는 당분야에 알려진 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 이러한 방법은, 예를 들어, 문헌[Flotte T R. Adeno-associated virus-based gene therapy for inherited disorders. Pediatr Res. 2005 December; 58(6):1143-7; Goncalves M A. Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector, Virol J. 2005 May 6; 2:43; Surace E M, Auricchio A. Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer. Prog Retin Eye Res. 2003 November; 22(6):705-19; Mandel R J, Manfredsson F P, Foust K D, Rising A, Reimsnider S, Nash K, Burger C. Recombinant adeno-associated viral vectors as therapeutic agents to treat neurological disorders. Mol Ther. 2006 March; 13(3):463-83]에 기재되어 있다.

[2956] CRISPR 유전자 편집 시스템

[2957] 본원에 사용된 "CRISPR"은 클러스터링된 정규 산재 단형 회문나선 반복 세트, 또는 이러한 반복 세트를 포함하는 시스템을 나타낸다. 본원에 사용된 "Cas"는 CRISPR-연관 단백질을 나타낸다. 다양한 CRISPR-Cas 시스템은 이의 효과기 모듈 배열에 따라 2개 클래스로 구분될 수 있다: 클래스 1 CRISPR 시스템은 효과기 복합체를 형성하기 위해 몇몇 Cas 단백질 및 crRNA를 이용하는 반면, 클래스 2 CRISPR 시스템은 간섭을 매개하기 위해 crRNA와 함께 대형 단일-성분 Cas 단백질을 이용한다. 클래스 2 CRISPR-Cas 시스템의 일례는 Cpf1(Prevotella and Francisella 1로부터의 CRISPR)을 이용한다. 예컨대, 그 내용의 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌[Zetsche et al., Cell 163:759-771 (2015)]을 참고한다. 본원에서 사용되는 용어 "Cpf1"에는 CRISPR 시스템에서 사용될 수 있는 모든 오르소로그 및 변이체가 포함된다.

[2958] 자연-발생 CRISPR 시스템은 시퀀싱된 유박테리아 게놈의 대략 40% 및 시퀀싱된 고세균의 90%에서 발견된다(Grissa *et al.* (2007) *BMC Bioinformatics* 8: 172). 이러한 시스템은 외래 유전 요소, 예컨대 플라스미드 및 파지에 내성을 부여하는 원핵 면역계의 한 유형이고, 후천성 면역성의 한 형태를 제공한다(Barrangou *et al.* (2007) *Science* 315: 1709-1712; Marragini *et al.* (2008) *Science* 322: 1843-1845).

[2959] CRISPR 시스템은 진핵생물, 예컨대 마우스, 영장류 또는 인간에서의 유전자 편집(특정 유전자를 침묵화, 증강 또는 변화시키는 것)에 사용하기 위해 변형되었다(Wiedenheft *et al.* (2012) *Nature* 482: 331-8). 이는, 예를 들어 진핵 세포 내로 특이적으로 조작된 가이드 RNA(gRNA)를 인코딩하는 하나 이상의 벡터(예컨대, 진핵 게놈 서열과 상보적인 서열을 포함하는 gRNA) 및 하나 이상의 적절한 RNA-가이드된 뉴클레아제, 예컨대 Cas 단백질을 도입하여 달성된다. RNA 가이드된 뉴클레아제는 진핵 게놈의 상보적 서열에 대한 gRNA 서열의 혼성화에 의해 표적 DNA 부위로 보내지는 gRNA와의 복합체를 형성하며, 이어서 RNA-가이드된 뉴클레아제는 DNA에서 이중쇄 또는 단일쇄 파단을 유도한다. 가닥 파단 부위 또는 근처에서의 뉴클레오티드의 삽입 또는 결실은 변형된 게놈을 생성한다.

[2960] 이들은 많은 상이한 유형의 박테리아에서 자연 발생하기 때문에, CRISPR의 정확한 배열 및 Cas 유전자의 구조, 기능, 및 수, 그리고 이의 산물은 종마다 다소 상이하다(Haft *et al.* (2005) *PLoS Comput. Biol.* 1: e60; Kunin *et al.* (2007) *Genome Biol.* 8: R61; Mojica *et al.* (2005) *J. Mol. Evol.* 60: 174-182; Bolotin *et al.* (2005) *Microbiol.* 151: 2551-2561; Pourcel et al. (2005) *Microbiol.* 151: 653-663; 및 Stern *et al.* (2010) *Trends. Genet.* 28: 335-340). 예를 들어 Cse(Cas 하위유형, 대장균) 단백질(예를 들어 CasA)은 CRISPR RNA 전사체를 Cascade가 보유하는 스페이서-반복 단위로 가공하는 기능적 복합체인 Cascade를 형성한다(Brouns et al. (2008) Science 321: 960-964). 다른 원핵생물에서, Cas6은 CRISPR 전사체를 가공한다. 대장균에서의 CRISPR-기반 파지 불활성화는 Cascade 및 Cas3을 필요로 하지만, Cas1 또는 Cas2는 필요로 하지 않는다. 피로코쿠스 푸리오수스(Pyrococcus furiosus) 및 다른 원핵생물에서 Cmr(Cas RAMP 모듈) 단백질은 상보성 표적 RNA를 인식하고 절단하는 소형 CRISPR RNA와 기능적 복합체를 형성한다.

[2961] 더 단순한 CRISPR 시스템은 이중 나선의 각각의 나선에 대해 1개씩, 2개의 활성 절단 부위를 갖는 뉴클레아제인 단백질 Cas9에 의존한다. Cas9 및 변형된 CRISPR 유전자위 RNA의 조합이 유전자 편집을 위해 시스템에서 사용될 수 있다(Pennisi (2013) *Science* 341: 833-836).

[2962] 일부 구현예에서, RNA-가이드된 뉴클레아제는 Cas 분자, 예컨대 Cas9 분자이다. "Cas9 분자"는 gRNA 분자(예컨대, tracrRNA 또는 트랜스 활성화 CRISPR RNA로도 알려진, tracr 도메인 서열)와 상호작용할 수 있고, gRNA 분자와 함께, 표적 서열 및 PAM(프로토스페이서 인접 모티프) 서열을 포함하는 부위로 편재화된다(예컨대, 표적화하거나 귀소한다).

[2963] 본 발명에 따르면, 다양한 종 Cas9 단백질의, 이로부터 유도되는, 또는 이에 기반하는 Cas9 분자를 본원에서 기

재되는 방법 및 조성물에서 사용할 수 있다. 예를 들어, S. 피오게네스(pyogenes), S. 써모필러스(thermophilus), 스타필로코커스 아우레우스(Staphylococcus aureus) 및/또는 나이세리아 메닌지티디스(Neisseria meningitidis) Cas9 분자의, 이로부터 유도되는, 또는 이에 기반하는 Cas9 분자를 본원에서 기재되는 시스템, 방법 및 조성물에서 사용할 수 있다. 추가적인 Cas9 종에는 애시도보락스 아베내(Acidovorax avenae), 액티노바실러스 플레우로뉴모니애(Actinobacillus pleuropneumoniae), 액티노바실러스 숙시노게네스(Actinobacillus succinogenes), 액티노바실러스 수이스(Actinobacillus suis), 액티노마이세스(Actinomyces) sp., 사이클리필러스 데니트리피칸스(cycliphilus denitrificans), 아미노모나스 파우시보란스(Aminomonas paucivorans), 바실러스 세레우스(Bacillus cereus), 바실러스 스미티이(Bacillus smithii), 바실러스 튜링기엔시스(Bacillus thuringiensis), 박테로이데스(Bacteroides) sp., 블라스토피렐룰라 마리나(Blastopirellula marina), 브래디리즈 오비움(Bradyrhiz' obium) sp., 브레비바실러스 라템스포러스(Brevibacillus latemsporus), 캄필로박터 콜리(Campylobacter coli), 캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni), 캄필로박터 라드(Campylobacter lad), 칸디다투스 푸니세이스피릴룸(Candidatus Puniceispirillum), 클로스트리듀 셀룰로라이티컴(Clostridiu cellulolyticum), 클로스트리듐 퍼프링겐스(Clostridium perfringens), 코리네박테리움 악콜렌스(Corynebacterium accolens), 코리네박테리움 디프테리아(Corynebacterium diphtheria), 코리네박테리움 마트루초티이(Corynebacterium matruchotii), 디노로세오박터 슬리배(Dinoroseobacter sliibae), 유박테리움 돌리쿰(Eubacterium dolichum), 감마 프로테오박테리움(Gamma proteobacterium), 글루콘아세토바클레르 디아조트로피쿠스(Gluconacetobacler diazotrophicus), 해모필러스 파라인플루엔재(Haemophilus parainfluenzae), 해모필러스 스푸토룸(Haemophilus sputorum), 헬리코박터 카나덴시스(Helicobacter canadensis), 헬리코박터 시내디(Helicobacter cinaedi), 헬리코박터 머스텔래(Helicobacter mustelae), 일리오바클러 폴리트로푸스(Ilyobacler polytropus), 킹겔라 킹개(Kingella kingae), 락토바실러스 크리스파투스(Lactobacillus crispatus), 리스테리아 이바노비이(Listeria ivanovii), 리스테리아 모노사이토게네스(Listeria monocytogenes), 리스테리아세애 박테리움(Listeriaceae bacterium), 메틸로시스티스(Methylocystis) sp., 메틸로시너스 트리코스포리움(Methylosinus trichosporium), 모빌룬커스 물리에리스(Mobiluncus mulieris), 나이세리아 바실리포르미스(Neisseria bacilliformis), 나이세리아 시네레아(Neisseria cinerea), 나이세리아 플라베센스(Neisseria flavescens), 나이세리아 락타미카(Neisseria lactamica). 나이세리아(Neisseria) sp., 나이세리아 와즈워티이(Neisseria wadsworthii), 니트로소모나스(Nitrosomonas) sp., 파르비바쿨럼 라바멘티보란스(Parvibaculum lavamentivorans), 파스퇴렐라 멀토시다(Pasteurella multocida), 파스콜아크토박테리움 숙시나투텐스(Phascolarctobacterium succinatutens), 랄스토니아 시지기이(Ralstonia syzygii), 로도슈도모나스 팔루스트리스(Rhodopseudomonas palustris), 로도불럼(Rhodovulum) sp., 시몬시엘라 무엘레리(Simonsiella muelleri), 스핑고모나스(Sphingomonas) sp., 스포로락토바실러스 비네애(Sporolactobacillus vineae), 스타필로코커스 러그더넨시스(Staphylococcus lugdunensis), 스트렙토코커스(Streptococcus) sp., 서브돌리그라눌럼(Subdoligranulum) sp., 티슬렐라 모빌리스(Tislrella mobilis), 트레포네마(Treponema) sp., 또는 베르미네프로박터 아이세니애(Verminephrobacter eiseniae)가 포함된다.

[2964] 일부 구현예에서, 활성 Cas9 분자가 표적 핵산과 상호작용하고 이를 절단하는 능력은 PAM 서열 의존적이다. PAM(프로토스페이서 인접 모티프) 서열은 표적 핵산에서의 서열이다. 이는 전형적으로 짧은, 예를 들어 2 내지 7개 염기쌍 길이이다. 하나의 구현예에서, 표적 핵산의 절단은 PAM 서열로부터 상류에서 일어난다. 상이한 박테리아 종으로부터의 활성 Cas9 분자는 상이한 서열 모티프(예컨대, PAM 서열)를 인식할 수 있다. 하나의 구현예에서, S. 피오게네스(pyogenes)의 활성 Cas9 분자는 서열 모티프 NGG를 인식하고 그 서열로부터 1 내지 10개, 예컨대 3 내지 5개 염기쌍 상류의 표적 핵산 서열의 절단을 지시한다. 예컨대, 문헌[Mali el al, SCIENCE 2013; 339(6121): 823-826]을 참고한다. 하나의 구현예에서, S. 써모필러스(thermophilus)의 활성 Cas9 분자는 서열 모티프 NGGNG(SEQ ID NO: 4) 및 NNAG AAW(SEQ ID NO: 5)(W = A 또는 T이고 N은 임의의 뉴클레오염기임)를 인식하고 이들 서열로부터 1 내지 10개, 예컨대 3 내지 5개 염기쌍 상류의 코어 표적 핵산 서열의 절단을 지시한다. 예컨대, 문헌[Horvath et al., SCIENCE 2010; 327(5962): 167- 170, 및 Deveau et al, J BACTERIOL 2008; 190(4): 1390-1400]을 참고한다. 하나의 구현예에서, S. 뮤탄스(mutans)의 활성 Cas9 분자는 서열 모티프 NGG 또는 NAAR(R - A 또는 G)을 인식하고 상기 서열로부터 1 내지 10개, 예컨대 3 내지 5개 염기쌍 상류의 코어 표적 핵산 서열의 절단을 지시한다. 예컨대, 문헌[Deveau et al., J BACTERIOL 2008; 190(4): 1390-1400]을 참고한다.

[2965] 하나의 구현예에서, S. 아우레우스(aureus)의 활성 Cas9 분자는 서열 모티프 NNGRR(SEQ ID NO: 6)(R = A 또는 G)을 인식하고 그 서열로부터 1 내지 10개, 예컨대 3 내지 5개 염기쌍 상류의 표적 핵산 서열의 절단을 지시한

다. 예컨대, 문헌[Ran F. et al., NATURE, vol. 520, 2015, pp. 186-191]을 참고한다. 하나의 구현예에서, N. 메닌지티디스(meningitidis)의 활성 Cas9 분자는 서열 모티프 NNNNGATT(SEQ ID NO: 7)를 인식하고 그 서열로부터 1 내지 10개, 예컨대 3 내지 5개 염기쌍 상류의 표적 핵산 서열의 절단을 지시한다. 예컨대, 문헌[Hou et al., PNAS EARLY EDITION 2013, 1-6]을 참고한다. Cas9 분자가 PAM 서열을 인식하는 능력은, 예컨대 문헌[Jinek et al, SCIENCE 2012, 337:816]에 기재된 형질전환 검정을 사용하여 결정할 수 있다.

[2966] 예시적인 자연 발생 Cas9 분자는 문헌[Chylinski et al, RNA Biology 2013; 10:5, 727-737]에 기재되어 있다. 이러한 Cas9 분자에는 클러스터 1 박테리아 패밀리, 클러스터 2 박테리아 패밀리, 클러스터 3 박테리아 패밀리, 클러스터 4 박테리아 패밀리, 클러스터 5 박테리아 패밀리, 클러스터 6 박테리아 패밀리, 클러스터 7 박테리아 패밀리, 클러스터 8 박테리아 패밀리, 클러스터 9 박테리아 패밀리, 클러스터 10 박테리아 패밀리, 클러스터 11 박테리아 패밀리, 클러스터 12 박테리아 패밀리, 클러스터 13 박테리아 패밀리, 클러스터 14 박테리아 패밀리, 클러스터 15 박테리아 패밀리, 클러스터 16 박테리아 패밀리, 클러스터 17 박테리아 패밀리, 클러스터 18 박테리아 패밀리, 클러스터 19 박테리아 패밀리, 클러스터 20 박테리아 패밀리, 클러스터 21 박테리아 패밀리, 클러스터 22 박테리아 패밀리, 클러스터 23 박테리아 패밀리, 클러스터 24 박테리아 패밀리, 클러스터 25 박테리아 패밀리, 클러스터 26 박테리아 패밀리, 클러스터 27 박테리아 패밀리, 클러스터 28 박테리아 패밀리, 클러스터 29 박테리아 패밀리, 클러스터 30 박테리아 패밀리, 클러스터 31 박테리아 패밀리, 클러스터 32 박테리아 패밀리, 클러스터 33 박테리아 패밀리, 클러스터 34 박테리아 패밀리, 클러스터 35 박테리아 패밀리, 클러스터 36 박테리아 패밀리, 클러스터 37 박테리아 패밀리, 클러스터 38 박테리아 패밀리, 클러스터 39 박테리아 패밀리, 클러스터 40 박테리아 패밀리, 클러스터 41 박테리아 패밀리, 클러스터 42 박테리아 패밀리, 클러스터 43 박테리아 패밀리, 클러스터 44 박테리아 패밀리, 클러스터 45 박테리아 패밀리, 클러스터 46 박테리아 패밀리, 클러스터 47 박테리아 패밀리, 클러스터 48 박테리아 패밀리,. 클러스터 49 박테리아 패밀리, 클러스터 50 박테리아 패밀리, 클러스터 51 박테리아 패밀리, 클러스터 52 박테리아 패밀리, 클러스터 53 박테리아 패밀리, 클러스터 54 박테리아 패밀리, 클러스터 55 박테리아 패밀리, 클러스터 56 박테리아 패밀리, 클러스터 57 박테리아 패밀리, 클러스터 58 박테리아 패밀리, 클러스터 59 박테리아 패밀리, 클러스터 60 박테리아 패밀리, 클러스터 61 박테리아 패밀리, 클러스터 62 박테리아 패밀리, 클러스터 63 박테리아 패밀리, 클러스터 64 박테리아 패밀리, 클러스터 65 박테리아 패밀리, 클러스터 66 박테리아 패밀리, 클러스터 67 박테리아 패밀리, 클러스터 68 박테리아 패밀리, 클러스터 69 박테리아 패밀리, 클러스터 70 박테리아 패밀리, 클러스터 71 박테리아 패밀리, 클러스터 72 박테리아 패밀리, 클러스터 73 박테리아 패밀리, 클러스터 74 박테리아 패밀리, 클러스터 75 박테리아 패밀리, 클러스터 76 박테리아 패밀리, 클러스터 77 박테리아 패밀리, 또는 클러스터 78 박테리아 패밀리의 Cas9 분자가 포함된다.

[2967] 예시적인 자연 발생 Cas9 분자에는 클러스터 1 박테리아 패밀리의 Cas9 분자가 포함된다. 예에는 S. 피오게네스(예컨대, 균주 SF370, MGAS 10270, MGAS 10750, MGAS2096, MGAS315, MGAS5005, MGAS6180, MGAS9429, NZ131 및 SSI- 1), S. 써모필러스(예컨대, 균주 LMD-9), S. 슈도포르시누스(예컨대, 균주 SPIN 20026), S. 뮤탄스(예컨대, 균주 UA 159, NN2025), S. 마카캐(macacae)(예컨대, 균주 NCTC1 1558), S. 갈로라일리쿠스(gallolylicus)(예컨대, 균주 UCN34, ATCC BAA-2069), S. 에퀴네스(equines)(예컨대, 균주 ATCC 9812, MGCS 124), S. 디스달락티애(dysdalactiae)(예컨대, 균주 GGS 124), S. 보비스(bovis)(예컨대, 균주 ATCC 700338), S. 심기노수스(cmginosus)(예컨대; 균주 F0211), S. 아갈락티아(agalactia)*(예컨대, 균주 NEM316, A909), 리스테리아 모노사이토게네스(Listeria monocytogenes)(예컨대, 균주 F6854), 리스테리아 인노쿠아(Listeria innocua)(L. 인노쿠아, 예컨대, 균주 Clip l1262), 에트우에로코커스 이탈리쿠스(EtUerococcus italicus)(예컨대, 균주 DSM 15952), 또는 엔테로코커스 패시움(Enterococcus faecium)(예컨대, 균주 1,23,408)의 Cas9 분자가 포함된다. 추가의 예시적인 Cas9 분자는 나이세리아 메닌지티디스의 Cas9 분자(Hou et al. PNAS Early Edition 2013, 1-6) 및 S. 아우레우스 Cas9 분자이다.

[2968] 하나의 구현예에서, Cas9 분자, 예컨대, 활성 Cas9 분자는 본원에서 기재되는 임의의 Cas9 분자 서열 또는 자연 발생 Cas9 분자 서열, 예컨대, 본원에서 기재되는 종으로부터의 또는 문헌[Chylinski et al. , RNA Biology 2013, 10:5, 121-T ,1 Hou et al. PNAS Early Edition 2013, 1-6]에 기재되는 Cas9 분자와 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성을 갖는; 이와 비교되는 경우 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 또는 40% 이하의 아미노산 잔기가 상이한; 이로부터 적어도 1, 2, 5, 10 또는 20개 아미노산만큼 그러나 100, 80, 70, 60, 50, 40 또는 30개 이하의 아미노산만큼 상이한; 또는 이와 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[2969] 하나의 구현예에서, Cas9 분자는 S. 피오게네스 Cas9(UniProt Q99ZW2)와 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 상동성을 갖는; 이와 비교되는 경우, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 또는 40% 이하의 아미노산 잔기가 상이한; 이로부터 적어도 1, 2, 5, 10 또는 20개 아미노산만큼 그러나 100, 80, 70, 60, 50, 40 또는 30개 이하의 아미노산만큼 상이한; 또는 이와 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 구현예들에서, Cas9 분자는 S. 피오게네스 Cas9 변이체, 예컨대 그 내용의 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌[Slaymaker et al., *Science Express*, available online December 1, 2015 at Science DOI: 10.1126/science.aad5227; Kleinstiver et al., *Nature*, 529, 2016, pp. 490-495, available online January 6, 2016 at doi:10.1038/nature16526]; 또는 US2016/0102324에 기재된 변이체이다.

[2970] 일부 구현예에서, Cas9 분자, 예컨대, S. 피오게네스의 Cas9는 추가적으로 추가 활성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, Cas9 분자는 하나 이상의 핵 국소화 서열(NLS), 예컨대 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 NLS를 포함할 수 있다. 전형적으로, NLS는 단백질 표면 상에 노출된 양으로 하전된 라이신 또는 아르기닌의 하나 이상의 짧은 서열로 구성되지만, 다른 유형의 NLS가 알려져 있다. NLS의 비제한적 예에는 아미노산 서열 PKKKRKV(SEQ ID NO: 8)를 갖는, SV40 바이러스 대형 T-항원의 NLS를 포함하거나 이로부터 유래되는 NLS 서열이 포함된다. 다른 적합한 NLS 서열은 당분야에 알려져 있다(예컨대, Sorokin, Biochemistry (Moscow) (2007) 72:13, 1439-1457; Lange J Biol Chem. 2007; 282(8):5101-5). 임의의 상기 언급된 구현예에서, Cas9 분자는 추가적으로(또는 대안적으로) 태그, 예컨대, His 태그, 예컨대, His(6) 태그(SEQ ID NO: 25) 또는 His(8) 태그(SEQ ID NO: 26)를, 예컨대, N 말단 또는 C 말단에 포함할 수 있다.

[2971] 따라서, 예컨대 진핵 세포에서 유전자 편집을 위한, 조작된 CRISPR 유전자 편집 시스템에는 전형적으로 (1) 표적화 도메인(게놈 DNA 표적 서열과 혼성화할 수 있음), 및 Cas, 예컨대, Cas9 효소에 결합할 수 있는 서열을 포함하는 가이드 RNA 분자(gRNA), 및 (2) Cas, 예컨대, Cas9, 단백질이 관여된다. Cas 단백질에 결합할 수 있는 서열은 tracr 도메인 또는 tracrRNA로 언급되는 도메인을 포함할 수 있다. 표적화 도메인 및 Cas, 예컨대, Cas9 효소에 결합할 수 있는 서열은 동일한(때때로 단일 gRNA, 키메라 gRNA 또는 sgRNA로 언급됨) 또는 상이한 분자(때때로 이중 gRNA 또는 dgRNA로 언급됨) 상에 배치될 수 있다. 상이한 분자 상에 배치되는 경우, 각각에는 분자가, 예컨대 혼성화를 통해 연합하도록 하는 혼성화 도메인이 포함된다.

[2972] gRNA 분자 형식은 당분야에 알려져 있다. 본원에서 개시되는 예시적인 gRNA 분자, 예컨대, dgRNA 분자는 서열: 5'nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG 3'(SEQ ID NO: 9)을 갖는 제1 핵산으로서, 식 중 "n"은, 예컨대 본원에서 기재된 바와 같은 표적화 도메인의 잔기를 나타내며, 15~25개 뉴클레오티드로 구성될 수 있고, 예컨대, 20개 뉴클레오티드로 구성되는 제1 핵산; 및 예시적 서열: 5'AACUUACCAAGGAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC 3'을 갖는 제2 핵산 서열로서, 선택적으로 3' 말단에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개(예컨대, 4개 또는 7개, 예컨대, 7개)의 추가적인 U 뉴클레오티드를 갖는 제2 핵산 서열(SEQ ID NO: 10)을 포함하며, 예컨대 이로 구성된다.

[2973] 제2 핵산 분자는 대안적으로 상기 서열의 단편으로 구성될 수 있고, 이러한 단편은 제1 핵산과 혼성화할 수 있다. 이러한 제2 핵산 분자의 예는 5'AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC 3'으로서, 선택적으로 3' 말단에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개(예컨대, 4개 또는 7개, 예컨대, 7개)의 추가적인 U 뉴클레오티드를 갖는다(SEQ ID NO:11).

[2974] 다른 예시적인 gRNA 분자, 예컨대, 본원에서 개시된 바와 같은 sgRNA 분자는, 예컨대 서열: 5'nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC 3'(SEQ ID NO:12)을 갖는 제1 핵산으로서, 식 중 "n"은, 예컨대, 본원에서 기재된 바와 같은 표적화 도메인의 잔기를 나타내고, 15~25개 뉴클레오티드로 구성될 수 있고, 예컨대, 20개 뉴클레오티드로 구성될 수 있고, 선택적으로 3' 말단에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개(예컨대, 4개 또는 7개, 예컨대, 4개)의 추가적인 U 뉴클레오티드를 갖는 제1 핵산을 포함한다, 예컨대 이로 구성된다.

[2975] 당분야에 알려진 CRISPR 유전자 편집 시스템의 추가 성분 및/또는 요소는, 예컨대 그 내용의 전문이 본원에 참조로 포함되는 U.S. 공개 번호 2014/0068797, WO2015/048577, 및 문헌[Cong (2013) Science 339: 819-823]에 기재되어 있다. 예를 들어, 표적 유전자 서열과 혼성화하는 표적화 도메인을 포함하는 gRNA 분자를 포함하도록 CRISPR 유전자 편집 시스템을 조작하여, 표적 유전자를 억제하는 이러한 시스템을 생성할 수 있다. 구현예들에서, gRNA는 표적 유전자의 15~25개 뉴클레오티드, 예컨대, 20개 뉴클레오티드와 완전 상보성인 표적화 도메인을 포함한다. 구현예들에서, 표적 유전자의 15~25개 뉴클레오티드, 예컨대 20개 뉴클레오티드는 CRISPR 유전자 편

집 시스템의 RNA-가이드된 뉴클레아제, 예컨대, Cas 단백질에 의해 인식되는 프로토스페이서 인접 모티프(PAM) 서열의 5'에 바로 인접해서 배치된다(예컨대, 시스템이 S. 피오게네스 Cas9 단백질을 포함하는 경우, PAM 서열은 NGG를 포함하며, 식 중 N은 A, T, G 또는 C 중 임의의 것일 수 있다).

[2976] 일부 구현예에서, CRISPR 유전자 편집 시스템의 gRNA 분자 및 RNA-가이드된 뉴클레아제, 예컨대, Cas 단백질은 복합체화되어 RNP(리보뉴클레오단백질) 복합체를 형성할 수 있다. 이러한 RNP 복합체는 본원에서 기재되는 방법에서 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, CRISPR 유전자 편집 시스템의 하나 이상의 성분을 인코딩하는 핵산이 본원에서 기재되는 방법에서 사용될 수 있다.

[2977] 일부 구현예에서, 외래 DNA는 CRISPR 유전자 편집 시스템, 예컨대 표적 세포 유형에서 활성이 있는 프로모터를 포함하고 또는 포함하지 않고, 요망되는 트랜스유전자를 인코딩하는 DNA와 함께, 세포 내로 도입될 수 있다. 외래 DNA의 서열 및 게놈의 표적 서열에 따라, 상기 공정은 CRISPR 유전자 편집 시스템에 의해 표적화되는 부위에서 또는 그 근처에서 외래 DNA를 게놈 내로 통합하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 트랜스유전자 측면에 있는 3' 및 5' 서열은 유전자 편집 시스템에 의해 절단되는 게놈 내 부위의 3' 및 5' 유전자 서열(각각)과 상동성인 외래 DNA에 포함될 수 있다. 이러한 외래 DNA 분자는 "주형 DNA"로 언급될 수 있다.

[2978] 하나의 구현예에서, 본 발명의 CRISPR 유전자 편집 시스템은 Cas9, 예컨대, S. 피오게네스 Cas9, 및 관심 유전자 서열과 혼성화하는 표적화 도메인을 포함하는 gRNA를 포함한다. 하나의 구현예에서, gRNA 및 Cas9는 복합체화되어 RNP(리보뉴클레오단백질)를 형성한다. 하나의 구현예에서, CRISPR 유전자 편집 시스템은 gRNA를 인코딩하는 핵산 및 Cas 단백질, 예컨대, Cas9, 예컨대, S. 피오게네스 Cas9를 인코딩하는 핵산을 포함한다. 하나의 구현예에서, CRISPR 유전자 편집 시스템은 gRNA 및 Cas 단백질, 예컨대, Cas9, 예컨대, S. 피오게네스 Cas9를 인코딩하는 핵산을 포함한다.

[2979] 일부 구현예에서, Cas9에 걸친 유도성 제어인, sgRNA 발현은 표적을 벗어난 효과의 빈도를 감소시킴으로써 안전성을 증가시키면서 효율을 최적화하기 위해 이용될 수 있다. 예에는 비제한적으로 하기와 같이 기재된 전사 및 전사-후 스위치가 포함된다; 독시사이클린 유도성 전사(Loew et al. (2010) BMC Biotechnol. 10:81), Shield1 유도성 단백질 안정화(Banaszynski et al. 2016 Cell 126: 995-1004), 타목시펜 유도된 단백질 활성화(Davis et al. (2015) Nat. Chem. Biol. 11: 316-318), 분할 Cas9의 라파마이신 또는 광유전학 유도된 활성화 또는 이량체화(Zetsche (2015) Nature Biotechnol. 33(2): 139-142, Nihongaki et al. (2015) Nature Biotechnol. 33(7): 755-760, Polstein and Gersbach (2015) Nat. Chem. Biol. 11: 198-200), 및 SMASh 태그 약물 유도성 분해(Chung et al. (2015) Nat. Chem. Biol. 11: 713-720).

[2980] 일반적으로, CRISPR-Cas 또는 CRISPR 시스템은 Cas 유전자를 인코딩하는 서열, tracr(트랜스-활성화 CRISPR) 서열(예컨대 tracrRNA 또는 활성 부분 tracrRNA), tracr-메이트 서열("직접 반복체" 및 내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서의 tracrRNA-가공된 부분 직접 반복체를 포괄함), 가이드 서열(내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 "스페이서"로도 언급됨)을 포함하는, CRISPR-연관("Cas") 유전자의 발현 또는 활성 유도에 관여되는 전사체 및 다른 요소, 또는 그 용어가 본원에서 사용되는 "RNA(들)"(예컨대, Cas9를 가이드하는 RNA(들), 예컨대 CRISPR RNA 및 트랜스활성화(tracr) RNA 또는 단일 가이드 RNA(sgRNA)(키메라성 RNA)) 또는 CRISPR 유전자위로부터의 다른 서열 및 전사체를 총칭한다. 일반적으로, CRISPR 시스템은 표적 서열 부위에서 CRISPR 복합체의 형성을 촉진하는 요소를 특징으로 한다(또한 내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 프로토스페이서로 언급됨). CRISPR 복합체 형성의 맥락에서, "표적 서열"은 가이드 서열이 그에 대해 상보성을 갖도록 설계되는 서열을 나타내며, 표적 서열 및 가이드 서열 간 혼성화는 CRISPR 복합체의 형성을 촉진한다. 표적 서열은 임의의 폴리뉴클레오티드, 예컨대 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 세포의 핵 또는 세포질에 위치한다. 일부 구현예에서, CRISPR 복합체에서는 tracr 서열이 하나 이상의 헤어핀을 가지며 30개 이상의 뉴클레오티드 길이, 40개 이상의 뉴클레오티드 길이, 또는 50개 이상의 뉴클레오티드 길이이고; 가이드 서열이 10개 내지 30개 뉴클레오티드 길이이고, CRISPR/Cas 효소가 II형 Cas9 효소인 것이 바람직할 수 있다. 본 발명의 구현예에서, 용어 가이드 서열 및 가이드 RNA는 상호 교환적으로 사용된다. 일반적으로, 가이드 서열은 표적 서열과 혼성화하고 CRISPR 복합체의 표적 서열에 대한 서열-특이적 결합을 유도하기 충분한 표적 폴리뉴클레오티드 서열과의 상보성을 갖는 임의의 폴리뉴클레오티드 서열이다. 일부 구현예에서, 적합한 정렬 알고리즘을 사용하여 최적 정렬되는 경우, 가이드 서열 및 그 대응하는 표적 서열 간 상보성 정도는 약 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, 99% 이상이다. 최적 정렬은 서열을 정렬하기 위한 임의의 적합한 알고리즘의 사용으로 결정될 수 있고, 그 비제한적 예에는 Smith-Waterman 알고리즘, Needleman-Wunsch 알고리즘, Burrows-Wheeler 변환에 기반하는 알고리즘(예컨대 the Burrows Wheeler Aligner), ClustalW, Clustal X, BLAT, Novoalign(Novocraft Technologies); ELAND(Illumina, San Diego, CA), 및 SOAP가 포함된다. 일부 구현예에서, 가이드 서열은 약 5,

10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75개 이상의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 가이드 서열은 약 75, 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 12개 이하의 뉴클레오티드 길이이다. 바람직하게는 가이드 서열은 10~30개 뉴클레오티드 길이이다. 가이드 서열이 CRISPR 복합체의 표적 서열에 대한 서열 특이적 결합을 유도하는 능력은 임의의 적합한 검정에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 평가될 가이드 서열을 포함하여, CRISPR 복합체를 형성하기 충분한 CRISPR 시스템의 성분이, 예컨대 CRISPR 서열의 성분을 인코딩하는 벡터의 전달감염에 의해 대응하는 표적 서열을 갖는 숙주 세포에 제공될 수 있고, 이어서 예컨대 Surveyor 검정에 의한 표적 서열 내 우선적 절단이 평가될 수 있다. 유사하게, 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 절단은 평가될 가이드 서열 및 평가 가이드 서열과 상이한 대조군 가이드 서열을 포함하는, CRISPR 복합체의 성분을 표적 서열에 제공하고, 평가 및 대조군 가이드 서열 반응 간 표적 서열에서의 결합 또는 절단율을 비교하여 시험관에서 평가될 수 있다. 다른 검정이 가능하며, 당업자에게 일어날 것이다. 가이드 서열은 임의의 표적 서열을 표적화하도록 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 세포의 게놈 내 서열이다. 예시적인 표적 서열에는 표적 게놈에서 고유한 것들이 포함된다. 예를 들어, S. 피오게네스 Cas9에 있어서, 게놈 내 고유한 표적 서열에는 형식 MM M MMMNNNNNNNNNNNNXGG(SEQ ID NO: 13)의 Cas9 표적 부위가 포함될 수 있으며, 식 중 NNN NNN NN XGG(N은 A, G, T, 또는 C이며; X는 임의의 것일 수 있음)는 게놈에서 1회 발생한다. 게놈 내 고유한 표적 서열에는 형식 MMM MMMMMNNNNNNNNNNNXGG (SEQ ID NO: 14)의 S. 피오게네스 Cas9 표적 부위가 포함될 수 있으며, 식 중 N N N N XGG(N은 A, G, T, 또는 C이며; X는 임의의 것일 수 있음)는 게놈에서 1회 발생한다. S. 써모필러스 CRISPRI Cas9에 있어서, 게놈 내 고유한 표적 서열에는 형식 MMMMMMMMNN N N NN XXAGAAW(SEQ ID NO: 15)의 Cas9 표적 부위가 포함될 수 있으며, 식 중 NNN NN N XXAGAAW(SEQ ID NO: 29)(N은 A, G, T, 또는 C이며; X는 임의의 것일 수 있고; W는 A 또는 T임)는 게놈에서 1회 발생한다. 게놈 내 고유한 표적 서열에는 형식 MMMMMM MN N NNN NNXXAGAAW(SEQ ID NO: 16)의 S. 써모필러스 CRISPRI Cas9 표적 부위가 포함될 수 있으며, 식 중 NNNNNNNNNNNXXAGAAW(SEQ ID NO: 30)(N은 A, G, T, 또는 C이며; X는 임의의 것일 수 있고; W는 A 또는 T임)는 게놈에서 1회 발생한다. S. 피오게네스 Cas9에 있어서, 게놈 내 고유한 표적 서열에는 형식 MM MMMMMMMNNNN NNNNNNXGGXG(SEQ ID NO: 17)의 Cas9 표적 부위가 포함될 수 있으며, 식 중 NNNNNNNNNNNNXGGXG(N은 A, G, T, 또는 C이며; X는 임의의 것일 수 있음)는 게놈에서 1회 발생한다. 게놈 내 고유한 표적 서열에는 형식 MMMMMMMMMNNNNNNNNNNNXGGXG(SEQ ID NO: 31)의 S. 피오게네스 Cas9 표적 부위가 포함되며, 식 중 NNNNNNNNNNNXGGXG(SEQ ID NO: 18)(N은 A, G, T, 또는 C이며; X는 임의의 것일 수 있음)는 게놈에서 1회 발생한다. 각각의 이들 서열에서, N은 임의의 뉴클레오염기이며 "M "은 A, G, T, 또는 C일 수 있고, 서열 확인에서 고유한 것으로 간주될 필요는 없다. 일부 구현예에서, 가이드 서열은 가이드 서열 내의 이차 구조 정도를 감소시키도록 선택된다. 일부 구현예에서, 가이드 서열의 약 75%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 1% 이하의 뉴클레오티드는 최적으로 폴딩되는 경우, 자가-상보성 염기 페어링에 참여한다. 최적 폴딩은 임의의 적합한 폴리뉴클레오티드 폴딩 알고리즘에 의해 결정될 수 있다. 일부 프로그램은 최소 깁스 자유 에너지의 계산에 기반한다. 하나의 이러한 알고리즘의 예는 문헌[Zuker and Stiegler (Nucleic Acids Res. 9 (1981), 133-148)]에 의해 기재된 바와 같은 mFold이다. 폴딩 알고리즘의 다른 예는 중심 구조 예측 알고리즘을 사용하는, 이론 화학 연구소(Institute for Theoretical Chemistry at the University of Vienna)에서 개발된 온라인 웹서버 RNAfold이다(예컨대 문헌[A.R. Gruber et al., 2008, Cell 106(1): 23-24; 및 PA Carr and GM Church, 2009, Nature Biotechnology 27(12): 1; 151-62] 참고).

[2981] gRNA 분자의 설계 방법

[2982] 본원에 기재되는 gRNA에서 사용하기 위한 표적화 도메인을 선택하고, 설계하고, 검증하는 방법이 제공된다. gRNA 내로의 도입을 위한 예시적인 표적화 도메인이 또한 본원에 제공된다.

[2983] 표적 서열의 선택 및 검증 방법뿐만 아니라 표적을 벗어난 분석이 기재되었다(예컨대, 문헌[Mali 2013; Hsu 2013; Fu 2014; Heigwer 2014; Bae 2014; 및 Xiao 2014] 참고). 예를 들어, 표적 서열은 Cas9 분자에 대한 PAM 서열(예를 들어, 관련 PAM, 예컨대, S. 피오게네스에 있어서 NGG PAM, N. 메닌지티디스에 대해 NNNNGATT(SEQ ID NO: 19), 또는 NNNNGCTT PAM(SEQ ID NO: 20), 및 S. 아우레우스에 대해 NNGRRT(SEQ ID NO: 21), 또는 NNGRRV PAM(SEQ ID NO: 22))을 확인하고, 그 Cas9 분자를 사용해서 CRISPR 시스템에 대한 표적 서열로서 인접 서열을 확인하여 선택될 수 있다. 사용자의 표적 서열에 대응하는 잠재적인 표적화 도메인의 선택을 추가 정련하기 위해, 예컨대 게놈에 걸쳐 표적을 벗어난 전체 활성을 최소화하기 위해 소프트웨어 툴이 사용될 수 있다. 후보 표적화 도메인 및 이들 표적화 도메인을 포함하는 gRNA는 당분야에 알려진/알려지거나 본원에 나타내는 방법을 사용하여 기능적으로 평가될 수 있다.

[2984] 비제한적 예로서, S. 피오게네스, N. 메닌지티디스 및 S. 아우레우스 Cas9와 함께 사용하기 위한 gRNA에서 사용

하기 위한 표적화 도메인은 DNA 서열 검색 알고리즘을 사용해서 확인된다. 17-머, 18-머, 19-머, 20-머, 21-머, 22-머, 23-머, 및/또는 24-머 표적화 도메인이 각각의 Cas9에 대해 설계된다. S. 피오게네스 Cas9에 대해, 바람직하게는 표적화 도메인은 20-머이다. gRNA 설계는 공개 툴 cas-offinder(Bae 2014)에 기반하는 사제 gRNA 설계 소프트웨어를 사용해서 수행된다. 상기 소프트웨어는 이의 게놈에 걸쳐 표적을 벗어난 경향성의 계산 후 가이드를 스코어링한다.

[2985] 후보 분자의 기능적 분석

[2986] 후보 Cas9 분자, 후보 gRNA 분자, 후보 Cas9 분자/gRNA 분자 복합체는 당분야에 알려진 방법에 의해 또는 본원에 기재된 바와 같이 평가될 수 있다. 예를 들어, Cas9 분자의 엔도뉴클레아제 활성을 평가하기 위한 예시적인 방법이 전술되었다(Jinek 2012). 본원에 기재되는 각각의 기법은 단독으로 또는 후보 분자를 평가하기 위한 하나 이상의 기법과 조합되어 사용될 수 있다. 본원에 개시되는 기법은 비제한적으로 Cas9 분자/gRNA 분자 복합체의 안정성을 결정하는 방법, 안정한 Cas9 분자/gRNA 분자 복합체를 촉진하는 조건을 결정하는 방법, 안정한 Cas9 분자/gRNA 분자 복합체를 스크리닝하는 방법, 안정한 Cas9 분자/gRNA 분자 복합체를 형성하기 위한 최적 gRNA를 확인하는 방법, 및 대상체에 투여하기 위한 Cas9 분자/gRNA 복합체를 선택하는 방법을 포함하는 다양한 방법을 위해 사용될 수 있다.

[2987] 결합 및 절단 검정: Cas9 분자의 엔도뉴클레아제 활성의 평가. Cas9 분자/gRNA 분자 복합체가 표적 핵산에 결합하고 이를 절단하는 능력은 플라스미드 절단 검정에서 평가될 수 있다. 상기 검정에서, 합성 또는 시험관내-전사된 gRNA 분자는 95℃로의 가열 및 실온으로의 느린 냉각에 의해 반응 전에 사전-어닐링된다. 원상태 또는 제한효소 소화-선형화 플라스미드 DNA(300 ng(약 8 nM))를 10 mM MgCl2를 포함하거나 포함하지 않는 Cas9 플라스미드 절단 완충액(20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA) 중 정제된 Cas9 단백질 분자(50~500 nM) 및 gRNA(50~500 nM, 1:1)와 함께 37℃에서 60분 동안 인큐베이션한다. 반응을 5X DNA 로딩 완충액(30% 글리세롤, 1.2% SDS, 250 mM EDTA)으로 정지시키고, 0.8 또는 1% 아가로스 겔 전기영동에 의해 분해하고, 에티듐 브로마이드 염색에 의해 가시화한다. 생성된 절단 산물은 Cas9 분자가 2개의 DNA 가닥을 모두 절단하는지 아니면 2개 가닥 중 하나만을 절단하는지를 시사한다. 예를 들어, 선형 DNA 산물은 2개의 DNA 가닥 모두의 절단을 시사한다. 니킹된 개방 원형 산물은 2개 가닥 중 하나만 절단됨을 시사한다.

[2988] 대안적으로, Cas9 분자/gRNA 분자 복합체가 표적 핵산에 결합하고 이를 절단하는 능력은 올리고뉴클레오티드 DNA 절단 검정에서 평가될 수 있다. 상기 검정에서, DNA 올리고뉴클레오티드(10 pmol)는 50 ㎕ 반응에서, 30분 동안 37℃에서 1X T4 폴리뉴클레오티드 키나제 반응 완충액 중 5 unit T4 폴리뉴클레오티드 키나제 및 약 3~6 pmol(약 20~40 mCi)[γ-32P]-ATP와 함께 인큐베이션하여 방사선표지된다. 열 불활성화(20분 동안 65℃) 후, 반응은 도입되지 않은 표지를 제거하기 위해 칼럼을 통해 정제된다. 듀플렉스 국소화 제제(100 nM)는 3분 동안 95℃에서 표지된 올리고뉴클레오티드를 등몰량의 표지되지 않은 상보적 올리고뉴클레오티드와 어닐링한 후 실온으로 느리게 냉각하여 생성된다. 절단 검정에 있어서, gRNA 분자는 30 s 동안 95℃로 가열한 후 실온으로 느리게 냉각하여 어닐링된다. Cas9(500 nM 최종 농도)는 총 용량 9 ㎕에서 절단 검정 완충액(20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl2, 1 mM DTT, 5% 글리세롤) 중 어닐링된 gRNA 분자(500 nM)와 사전-인큐베이션된다. 반응을 1 ㎕ 표적 DNA(10 nM)의 첨가에 의해 개시하고 37℃ 에서 1 h 동안 인큐베이션한다. 반응을 20 ㎕의 로딩 염료(5 mM EDTA, 0.025% SDS, 포름아미드 중 5% 글리세롤)의 첨가에 의해 켄칭하고 5분 동안 95℃로 가열한다. 절단 산물을 7 M 요소를 함유하는 12% 변성 폴리아크릴아미드 겔 상에 분해하고 인광조영에 의해 가시화한다. 생성된 절단 산물은 상보쇄, 비-상보쇄, 또는 둘 다가 절단되는지 여부를 시사한다.

[2989] 이들 검정 중 하나 또는 둘 다를 사용해서 후보 gRNA 분자 또는 후보 Cas9 분자의 적합성을 평가할 수 있다.

[2990] 삽입결실(Indel) 검출 및 확인. 표적화된 게놈 변형은 또한 생거 또는 심층 서열분석에 의해 검출될 수 있다. 전자에 있어서, 변형된 영역으로부터의 게놈 DNA를 gRNA의 표적 서열 측면에 있는 프라이머로 증폭할 수 있다. 앰플리콘은 형질전환용 플라스미드, 예컨대 pUC19 내로 서브클로닝할 수 있고, 개별 콜로니를 서열분석하여 클론 유전형을 드러낸다.

[2991] 대안적으로, 심층 서열분석은 다수의 샘플 또는 표적 부위의 샘플링에 적합하다. NGS 프라이머는 더 짧은 앰플리콘, 전형적으로 100~200-bp 크기 범위에 대해 설계된다. 삽입결실의 검출을 위해, 더 긴 삽입결실의 검출을 허용하기 위해 Cas9 표적 부위로부터 적어도 50 bp 떨어져 위치하는 프라이머를 설계하는 것이 중요하다. 앰플리콘은 상업적으로 이용 가능한 기기, 예를 들어, Illumina 시스템을 사용해서 평가될 수 있다. NGS 최적화 및 문제해결의 상세한 설명은 Illumina 사용자 매뉴얼에서 확인할 수 있다.

[2992] TALEN 유전자 편집 시스템

[2993] TALEN은 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인을 DNA 절단 도메인에 융합시킴으로써 인공적으로 생성된다. 전사 활성화제-유사 효과(TALE)는 임의의 요망되는 DNA 서열, 예컨대 표적 유전자에 결합하도록 조작될 수 있다. 조작된 TALE를 DNA 절단 도메인과 조합함으로써, 임의의 요망되는 DNA 서열에 특이적인 제한 효소가 생성될 수 있다. 이어서, 이들은 세포 내로 도입될 수 있고, 이들은 게놈 편집을 위해 사용될 수 있다(Boch (2011) *Nature Biotech.* 29: 135-6; 및 Boch et al. (2009) *Science* 326: 1509-12; Moscou et al. (2009) *Science* 326: 3501).

[2994] TALE는 크산토모나스(Xanthomonas) 박테리아에 의해 분비되는 단백질이다. DNA 결합 도메인은 제12 및 제13 아미노산을 제외하고, 반복된, 고도로 보존된 33~34개 아미노산 서열을 함유한다. 이들 2개의 위치는 매우 가변적으로, 특정 뉴클레오티드 인식과의 강한 상관관계를 보여준다. 따라서, 이들은 요망되는 DNA 서열에 결합하도록 조작될 수 있다.

[2995] TALEN을 생성하기 위해, TALE 단백질은, 예를 들어 야생형 또는 돌연변이된 FokI 엔도뉴클레아제인 뉴클레아제(N)에 융합된다. TALEN에서의 사용을 위해 FokI에 대한 몇몇의 돌연변이가 제조된 바 있다; 이들은, 예를 들어 절단 특이성 또는 활성을 개선한다(Cermak et al. (2011) *Nucl. Acids Res.* 39: e82; Miller et al. (2011) *Nature Biotech.* 29: 143-8; Hockemeyer et al. (2011) *Nature Biotech.* 29: 731-734; Wood et al. (2011) *Science* 333: 307; Doyon et al. (2010) *Nature Methods* 8: 74-79; Szczepek et al. (2007) *Nature Biotech.* 25: 786-793; 및 Guo et al. (2010) *J. Mol. Biol.* 200: 96).

[2996] FokI 도메인은 이량체로서 기능하고, 적절한 배향 및 간격으로 표적 게놈 내 부위에 대해 고유한 DNA 결합 도메인을 갖는 2개의 작제물을 필요로 한다. TALE DNA 결합 도메인과 FokI 절단 도메인 사이의 아미노산 잔기의 수 및 2개의 개별 TALEN 결합 부위 사이의 염기의 수는 모두 높은 활성 수준의 달성을 위해 중요한 파라미터인 것으로 보인다(Miller et al. (2011) *Nature Biotech.* 29: 143-8).

[2997] TALEN(또는 TALEN 페어)은 이중-가닥 파단(DSB)을 생성하기 위해 세포 내부에서 사용될 수 있다. 복구 메커니즘이 비-상동 말단 연결을 통해 파단을 부적절하게 복구하는 경우에 돌연변이가 파단 부위에 도입될 수 있다. 예를 들어 부적절한 복구는 프레임 이동 돌연변이를 도입할 수 있다. 대안적으로, 외래 DNA는 TALEN, 예컨대 트랜스유전자를 인코딩하는 DNA와 함께, 외래 DNA 서열 및 염색체 서열에 따라 세포 내로 도입될 수 있고, 상기 공정은 TALEN에 의해 표적화되는 부위에서 또는 그 근처에서 트랜스유전자를 통합하기 위해 사용될 수 있다. 표적 서열에 특이적인 TALEN은 모듈 성분을 사용하는 다양한 방식을 비롯하여 당분야에 알려진 임의의 방법을 사용하여 작제될 수 있다(그 내용의 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌[Zhang et al. 2011 Nature Biotech. 29: 149-53; Geibler et al. (2011) PLoS ONE 6: e19509]; US 8,420,782 ; US 8,470,973).

[2998] 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN) 유전자 편집 시스템

[2999] "ZFN" 또는 "아연 핑거 뉴클레아제"는 요망되는 핵산 서열의 하나 이상의 핵산을 변형하기 위해, 예컨대 결실시키기 위해 사용될 수 있는 인공 뉴클레아제인 아연 핑거 뉴클레아제를 나타낸다.

[3000] TALEN처럼, ZFN은 DNA-결합 도메인에 융합된 FokI 뉴클레아제 도메인(또는 그의 유도체)을 포함한다. ZFN의 경우에, DNA-결합 도메인은 하나 이상의 아연 핑거를 포함한다(Carroll et al. (2011) *Genetics Society of America* 188: 773-782; 및 Kim et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1156-1160).

[3001] 아연 핑거는 하나 이상의 아연 이온에 의해 안정화된 소형 단백질 구조 모티프이다. 아연 핑거는 예를 들어 Cys2His2를 포함할 수 있고, 대략 3-bp 서열을 인식할 수 있다. 특이성이 알려진 다양한 아연 핑거를 조합하여 약 6, 9, 12, 15 또는 18-bp 서열을 인식하는 다중-핑거 폴리펩타이드를 생성할 수 있다. 파지 디스플레이, 효모 1-하이브리드 시스템, 박테리아 1-하이브리드 및 2-하이브리드 시스템, 및 포유류 세포를 포함하여, 특정 서열을 인식하는 아연 핑거(및 이의 조합)를 생성하기 위한 다양한 선택 및 모듈 어셈블리 기법이 이용 가능하다.

[3002] TALEN처럼, ZFN은 DNA를 절단하기 위해 이량체화되어야 한다. 따라서, 한 쌍의 ZFN이 비-회문식 DNA 부위를 표적화하기 위해 필요하다. 2개의 개별 ZFN은 DNA의 대향하는 가닥에 결합해야 하고, 이의 뉴클레아제는 적절하게 이격된다(Bitinaite et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10570-5).

[3003] 또한, TALEN처럼, ZFN은 DNA에 이중-가닥 파단을 생성할 수 있고, 이것은 부적절하게 복구되는 경우에 프레임-시프트 돌연변이를 생성할 수 있고, 이는 세포 내 표적 유전자의 발현 및 양의 감소로 이어질 수 있다. ZFN은 또한 표적 유전자 또는 유전자위를 돌연변이시키기 위해 또는 표적화된 서열 또는 그 근처 부위에 요망되는 트랜스유전자를 인코딩하는 핵산을 도입하기 위해 상동성 재조합과 함께 사용될 수 있다.

[3004] 표적 유전자 내의 서열에 특이적인 ZFN은 당분야에 알려진 임의의 방법을 사용하여 작제될 수 있다. 예컨대, 그 내용의 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌[Provasi (2011) Nature Med. 18: 807-815; Torikai (2013) Blood 122: 1341-1349; Cathomen et al. (2008) Mol. Ther. 16: 1200-7; 및 Guo et al. (2010) J. Mol. Biol. 400: 96]; 미국 특허 공개 2011/0158957; 및 미국 특허 공개 2012/0060230을 참고한다. 구현예들에서, ZFN 유전자 편집 시스템은 또한 ZFN 유전자 편집 시스템의 하나 이상의 성분을 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다.

[3005] 메가뉴클레아제 유전자 편집 시스템

[3006] "메가뉴클레아제"는 표적 유전자를 편집하기 위해 사용될 수 있는 인공 뉴클레아제인 메가뉴클레아제를 나타낸다.

[3007] 메가뉴클레아제는 15~40 염기쌍 절단 부위를 인식하는 뉴클레아제 그룹으로부터 유래된다. 메가뉴클레아제는 뉴클레아제 활성 및/또는 DNA 인식에 영향을 미치는 이의 구조 모티프에 기반하여 패밀리로 그룹화된다. LAGLIDADG(SEQ ID NO: 23) 패밀리의 구성원은 보존된 LAGLIDADG 모티프(SEQ ID NO: 23)의 1개 또는 2개 사본을 갖는 것을 특징으로 한다(문헌[Chevalier et al. (2001) Nucleic Acids Res. 29(18): 3757-3774] 참고). LAGLIDADG 모티프(SEQ ID NO: 23)의 1개 사본을 갖는 LAGLIDADG(SEQ ID NO: 23) 메가뉴클레아제는 동종이량체를 형성하는 반면, LAGLIDADG 모티프(SEQ ID NO: 23)의 2개 사본을 갖는 구성원은 단량체로서 확인된다. GIY-YIG 패밀리 구성원은 GIY-YIG 모듈을 가지며, 이는 70~100개 잔기 길이이고 4개의 불변 잔기를 갖는 4 내지 5개의 보존된 서열 모티프가 포함되며, 이중 2개가 활성을 위해 요구된다(문헌[Van Roey et al. (2002), Nature Struct. Biol. 9: 806-811] 참고). His-Cys 박스 메가뉴클레아제는 수백 개 아미노산 잔기를 포괄하는 영역에 걸쳐 고도로 보존된 히스티딘 및 시스테인 시리즈를 특징으로 한다(문헌[Chevalier et al. (2001) Nucleic Acids Res. 29(18): 3757-3774] 참고). NHN 패밀리의 구성원은 아스파라긴 잔기에 의해 둘러싸인 두 쌍의 보존된 히스티딘을 함유하는 모티프에 의해 정의된다(문헌[Chevalier et al. (2001) Nucleic Acids Res. 29(18): 3757-3774] 참고).

[3008] 예컨대, 소정 핵산 서열에 결합하는, 변경된 DNA-결합 특이성을 갖는 메가뉴클레아제를 조작하기 위한 전략은 당분야에 알려져 있다(예컨대, 문헌[Chevalier et al. (2002), Mol. Cell., 10:895-905; Epinat et al. (2003) Nucleic Acids Res 31: 2952-62; Silva et al. (2006) J Mol Biol 361: 744-54; Seligman et al. (2002) Nucleic Acids Res 30: 3870-9; Sussman et al. (2004) J Mol Biol 342: 31-41; Rosen et al. (2006) Nucleic Acids Res; Doyon et al. (2006) J. Am Chem Soc 128: 2477-84; Chen et al. (2009) Protein Eng Des Sel 22: 249-56; Arnould S (2006) J Mol Biol. 355: 443-58; Smith (2006) Nucleic Acids Res. 363(2): 283-94]).

[3009] 메가뉴클레아제는 DNA에 이중-가닥 파단을 생성할 수 있고, 이것은, 예컨대 비-상동성 말단 연결을 통해, 부적절하게 복구되는 경우, 프레임-시프트 돌연변이를 생성할 수 있고, 이는 세포 내 표적 유전자의 발현 감소로 이어질 수 있다. 대안적으로, 외래 DNA가 메가뉴클레아제와 함께 세포 내로 도입될 수 있다; 외래 DNA 서열 및 염색체 서열에 따라, 상기 공정은 표적 유전자를 변형하기 위해, 예컨대 표적 유전자에서의 결함을 교정하기 위해 사용되어, 복구된 표적 유전자의 발현을 유도하거나, 예컨대 문헌[Silva et al. (2011) Current Gene Therapy 11:11-27]에 기재된 바와 같이, 예컨대 이러한 결함을 wt 유전자 내로 도입하여 표적 유전자의 발현을 감소시킬 수 있다.

[3010] **증식된 세포 집단의 눈 투여**

[3011] 본 발명의 하나의 양태에서, 상술된 바와 같이 본 발명에 따른 방법에 의해 수득 가능한 증식된 세포 집단은 눈으로 전달된다. 전달은 무균 조건 하에 수행된다.

[3012] 윤부 줄기 세포 치료법에 대한 사용에 관한 하나의 구현예에서, 360° 윤부 결막절개술 후 섬유혈관 각막 파누스는 표면으로부터 조심스럽게 제거될 수 있다.

[3013] 본 발명의 하나의 양태에서, 세포 집단은 눈 전달에 적합한 국소화 제제(아래에서 추가 기재됨)와 조합되고 눈으로 전달된다. 바람직한 구현예에서, 세포 및 눈 전달에 적합한 국소화 제제가 조합되고 담체, 예컨대 치료용 콘택트 렌즈 또는 양막을 통해 눈으로 투여된다. 대안적인 구현예에서, 세포 및 눈에서의 사용에 적합한 국소화 제제, 예컨대 GelMA와 같은 광 경화성 바이오매트릭스는 바이오프린팅을 통해 눈으로 전달된다.

[3014] 하나의 구현예에서, 본 발명은 대상체의 각막 상으로 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단을 이식하는 방법에 관한 것이며, 방법은 상기 집단을 본 발명에 따른 LATS 억제제를 포함하는 세포 증식 배지로 배양하여 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단을 증식시키는 단계, 증식된 세포 집단을 헹구어 LATS 억제제를 실질적으로 제거

하는 단계, 및 상기 세포를 상기 대상체의 각막 상으로 투여하는 단계를 포함한다. 바람직하게는 상기 세포는 상기 투여 전에 바이오매트릭스와 조합된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 상기 투여 전에 GelMA인 바이오매트릭스와 조합된다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 각막 내피 세포는 눈 표면 상에 바이오프린트되는 바이오매트릭스와 조합된다. 특히 바람직하게는 상기 각막 내피 세포는 GelMA인 바이오매트릭스와 조합되며 광 유발 반응에 의한 GelMa의 중합에 의해 눈 표면 상으로 바이오프린트된다.

[3015] 다른 구현예에서, 본 발명은 세포를 바이오매트릭스와 조합하여 세포/바이오매트릭스 혼합물을 형성하는 단계, 혼합물을 대상체의 눈 내로 주사하거나 혼합물을 대상체의 눈 표면 상으로 적용하는 단계, 및 광원, 예컨대 자외선 A 또는 백색 광원을 사용하여, 예컨대 각막 상으로 세포를 가이드하고 고정함으로써 눈 내 또는 눈 상에 세포를 바이오프린트하는 단계를 포함하는, 대상체의 눈에 세포 집단을 이식하는 방법을 제공한다. 소정 구현예에서, 광원은 적어도 350 nm인 파장의 빛을 생성한다. 소정 구현예에서, 광원은 350 nm 내지 420 nm 범위의 빛을 생성한다. 예를 들어, LED 광원은 365 nm 또는 405 nm 파장, 또는 350 nm 초과의 임의의 다른 파장의 빛을 생성하기 위해 사용될 수 있고, 또는 365 nm의 파장을 갖는 빛을 생성하기 위해 대역 필터를 갖는 수은 램프가 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 광원은, 예를 들어 400 nm 내지 700 nm 범위의 파장을 갖는 가시, 백색 빛을 생성한다. 소정 구현예에서, 세포는 눈 세포, 예컨대 각막 세포(예컨대, 각막 내피 세포), 수정체 세포, 잔기둥 그물 세포, 또는 전방 챔버에서 확인되는 세포이다. 특정 구현예에서, 세포는 각막 내피 세포이다. 이러한 방법의 소정 구현예에는 다음이 포함된다:

[3016] 구현예 x1. 세포를 바이오매트릭스와 조합하여 세포/바이오매트릭스 혼합물을 형성하는 단계, 혼합물을 대상체의 눈 내로(예컨대, 전방 챔버 내로) 주사하는 단계, 및 광원을 사용하여 눈 내에 세포를 가이드하고 고정하여, 눈 내에 세포를 바이오프린트하는 단계를 포함하는, 대상체의 눈에 단리된 세포 집단을 이식하는 방법.

[3017] 구현예 x2. 구현예 x1에 있어서, 단리된 세포가 GelMA인 바이오매트릭스와 조합되고 광 유발 반응에 의한 GelMA의 중합에 의해 각막 상으로 바이오프린트되는 방법.

[3018] 구현예 x3. 구현예 x1 또는 구현예 x2에 있어서, 광원이 350 nm 내지 700 nm 범위의 파장을 갖는 빛을 생성하는 방법.

[3019] 구현예 x4. 구현예 x1 내지 x3 중 어느 하나에 있어서, 파장이 350 nm 내지 420 nm인 방법.

[3020] 구현예 x5. 구현예 x1 내지 x4 중 어느 하나에 있어서, 파장이 365 nm인 방법.

[3021] 구현예 x6. 구현예 x1 내지 x5 중 어느 하나에 있어서, 단리된 세포가 각막 내피 세포인 방법.

[3022] 구현예 x7. 세포를 바이오매트릭스와 조합하여 세포/바이오매트릭스 혼합물을 형성하는 단계, 혼합물을 대상체의 눈 상에 적용하는 단계, 및 광원을 사용하여 눈 상에 세포를 가이드하고 고정하여, 눈 상에 세포를 바이오프린트하는 단계를 포함하는, 대상체의 눈에 단리된 세포 집단을 이식하는 방법.

[3023] 구현예 x8. 구현예 x7에 있어서, 단리된 세포가 GelMA인 바이오매트릭스와 조합되고 광 유발 반응에 의한 GelMa의 중합에 의해 눈 표면 상에 바이오프린트되는 방법.

[3024] 구현예 x9. 구현예 x7 또는 구현예 x8에 있어서, 광원이 350 nm 내지 700 nm 범위의 파장을 갖는 빛을 생성하는 방법.

[3025] 구현예 x10. 구현예 x7 내지 x9 중 어느 하나에 있어서, 파장이 350 nm 내지 420 nm인 방법.

[3026] 구현예 x11. 구현예 x7 내지 x10 중 어느 하나에 있어서, 파장이 365 nm인 방법.

[3027] 구현예 x12. 구현예 x7 내지 x11 중 어느 하나에 있어서, 단리된 세포가 윤부 줄기 세포인 방법.

[3028] 대안적인 구현예에서, 상술된 바와 같은 본 발명에 따른 방법에 의해 수득 가능한 증식된 세포 집단은 눈 전달에 적합한 국소화 제제(예컨대 GelMA)의 사용 없이, 눈으로 치료용 콘택트 렌즈를 통해 직접 전달될 수 있다.

[3029] 눈 전달에 적합한 국소화 제제

[3030] 본 발명의 하나의 구현예에서, 세포 제조물은 눈 사용에 적합한 국소화 제제를 통해 눈으로 전달될 수 있다. 세포는 국소화 제제 내로 포매되거나 국소화 제제의 표면으로 부착되거나 또는 둘 다일 수 있다.

[3031] 국소화 제제의 유형은 이것이 LSC 또는 CEC를 운반할 수 있고 눈에서 사용하기 적합한 한 제한되지 않는다. 바람직한 구현예에서, 국소화 제제는 분해 가능하고 생체적합성이다. CEC가 전달되는 경우, 바람직하게는 국소화

제제는 눈의 표면으로의 수술적 전달 후 각막에 대한 CEC 부착을 촉진할 수 있다.

[3032] 바람직한 구현예에서, 세포는 세포 집단 증식 후에만 국소화 제제와 조합된다. 특히 바람직한 구현예에서, 증식된 세포 집단은 세포 집단을 헹구어 본 발명에 따른 LAT 억제제의 존재를 실질적으로 제거한 후 눈 전달에 적합한 국소화 제제와 조합된다. 하나의 구현예에서, LSC 또는 CEC 및 국소화 제제는 눈 사용에 적합한 형태로 조합되고 보관된다. 다른 구현예에서, LSC 또는 CEC 및 국소화 제제는 별도로 보관되고 눈 사용 직전에 조합된다.

[3033] 국소화 제제는 바람직하게는 피브린, 콜라겐, 젤라틴, 셀룰로스, 양막, 피브린 아교, 폴리에틸렌(글리콜) 디아크릴레이트(PEGDA), GelMA(메타크릴아미드 변형 젤라틴이며, 젤라틴 메타크릴레이트로도 알려져 있음), 히알루론산, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 옥시드, 폴리프로필렌 옥시드, 폴록사머, 폴리비닐 알코올, 폴리아크릴산, 폴리메타크릴산, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리(락티드-코-글리콜리드), 알기네이트, 젤라틴, 콜라겐, 피브리노겐, 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 하이드록시에틸셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필메틸셀룰로스, 하이드록시프로필-구아, 겔란 검, 구아 검, 잔탄 검 및 카복시메틸셀룰로스뿐만 아니라 이의 유도체, 이의 공중합체, 및 이의 조합 중 하나 이상을 포함하는 중합체, 가교-중합체, 또는 하이드로겔을 포함하는 국소화 제제로 구성되는 목록으로부터 선택된다.

[3034] 보다 바람직한 구현예에서, 국소화 제제는 피브린, 콜라겐, 젤라틴, 양막, 피브린 아교, 폴리에틸렌 (글리콜) 디아크릴레이트(PEGDA), GelMA, 히알루론산, 폴리에틸렌 글리콜, poly프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 옥시드, 폴리프로필렌 옥시드, 폴록사머, 폴리아크릴산, 폴리(락티드-코-글리콜리드), 알기네이트, 젤라틴, 콜라겐, 피브리노겐, 하이드록시프로필메틸셀룰로스 및 하이드록시프로필-구아뿐만 아니라 이의 유도체, 이의 공중합체, 및 이의 조합 중 하나 이상을 포함하는 중합체, 가교-중합체, 또는 하이드로겔을 포함하는 국소화 제제로 구성되는 목록으로부터 선택된다.

[3035] 바람직한 구현예에서, 본 발명에 따른 증식된 세포 집단은 바이오매트릭스인 국소화 제제를 통해 수신자에 전달될 수 있다. 보다 바람직한 구현예에서, 국소화 제제는 광 경화성, 분해성 바이오매트릭스이다. 바람직하게는 이는 눈 내로 주사될 수 있다. 바이오매트릭스의 구체예는 메타크릴아미드 변형 젤라틴이며 젤라틴 메타크릴레이트로도 알려져 있는 GelMA이다.

[3036] GelMA는 당분야에 알려진 표준 프로토콜에 따라 제조될 수 있다(Van Den Bulcke et al., *Biomacromolecules*, 2000, p.31-38; Yue et al., *Biomaterials*, 2015, p.254-271). 예를 들어, 돼지 피부로부터의 젤라틴(겔 강도 300 g Bloom, A형)을 칼슘 및 마그네슘 비함유 PBS(Dulbeccos PBS) 중에 용해시키고, 원하는 농도(예컨대 8%(vol/vol))에 도달하도록 젤라틴 용액 내로 강력 진탕하며 메타크릴산 무수물을 첨가할 수 있다. 혼합물을 추가 DPBS의 첨가 전 및 후에 교반할 수 있다. 희석된 혼합물을 투석 관을 사용하여 Milli-Q수에 대한 투석을 통해 정제하여 메타크릴산을 제거할 수 있다. 정제된 샘플은 선택적으로 동결건조할 수 있고 고체는 추가 사용 전까지 -80℃, -20℃, 또는 4℃에 보관할 수 있다.

[3037] 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 눈 사용에 적합한 제형물에 동결건조된 GelMA를 용해시켜 GelMA 스톡 용액을 제조한다. GelMA 스톡 용액을 제조하기 위해, 동결건조된 GelMA를 DPBS 중에 용해시킬 수 있다. GelMA가 완전 용해된 후, 광개시제(예를 들어 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트)를 GelMA 용액 내로 도입할 수 있다. pH를 중성으로 조정하기 위해, 0.22 ㎛ 멸균 막을 사용하여 여과 전에 NaOH를 용액에 첨가할 수 있다. 최종 여액은 추가 사용 전까지 분취물로 분리하여 4℃에 보관할 수 있다.

[3038] 본 발명에 따른 하나의 양태에서, 바람직하게는 GelMa인 바이오매트릭스를 중합하기 위해 광개시제를 사용하여, 바이오매트릭스 내에 세포를 캡슐화한다. 적합한 광개시제는 Irgacure 2959, 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트, 나트륨 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트, 리튬 비스(2,4,6-트리메틸벤조일)포스피네이트, 나트륨 비스(2,4,6-트리메틸벤조일)포스피네이트, 디페닐(2,4,6-트리메틸벤조일)포스핀 옥시드, 에오신 Y, 리보플라빈 포스페이트, 캄포르퀴논, Quantacure BPQ, Irgacure 819, Irgacure 1850, 및 Darocure 1173이다. 바람직한 구현예에서, 광개시제는 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트, 나트륨 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트, 리보플라빈 포스페이트이다. 다른 구현예에서, 광개시제는 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트이다.

[3039] 중합 전, 광 경화성 바이오매트릭스는 당분야에 알려진 적합한 용기, 예컨대 바이알에서 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 눈 사용에 적합한 제형물에서 적합한 광개시제와 조합된다. 광개시제는 세포와의 혼합 전에 바이오매트릭스와 조합될 수 있으며; 대안적으로 광개시제는 세포와의 혼합 후에 바이오매트릭스와 조합될 수 있고; 대안적으로 광 개시제는 세포에 먼저 첨가된 후, 바이오매트릭스와 조합될 수 있다. 바이오매트릭스

및 광개시제의 농도는 사용되는 특정 바이오매트릭스 및 특정 광개시제에 의존하지만, 편리한 광 노출 기간, 전형적으로 약 5분 미만; 바람직하게는 약 2분 미만; 보다 바람직하게는 약 1분 미만 내에 중합을 제공하도록 선택된다. 하나의 구현예에서, 광개시제는 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트이며 눈으로의 세포 전달을 위한 제형물에서의 그 농도는 약 0.01% w/v 내지 약 0.15% w/v이다. 다른 양태에서, 눈으로의 세포 전달을 위한 제형물에서 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트 농도는 약 0.05% w/v 또는 약 0.075% w/v이다. LAP는 공개 절차(Biomaterials 2009, 30, 6702-6707)를 사용해서 합성할 수 있고 TCI(Prod. # L0290) 및 Biobots(BioKey)에서도 이용 가능하다.

[3040] 세포는 당분야에 알려진 적합한 용기, 예컨대 바이알 또는 튜브에서 GelMA에 첨가될 수 있다. 세포는, 예를 들어 GelMa 내로 피펫팅하고 위아래 온화한 피펫팅에 의해 혼합하여 첨가될 수 있다. 하나의 구현예에서, 눈 전달에 적합한 조성물에서의 GelMA 농도는 약 10 내지 약 200 ㎎/㎖, 또는 약 25 내지 약 150 ㎎/㎖, 또는 약 25 내지 약 75 ㎎/㎖이다. 바람직한 구현예에서, 눈 전달에 적합한 조성물에서의 GelMA 농도는 약 25 ㎎/㎖, 약 50 ㎎/㎖ 또는 약 75 ㎎/㎖이다.

[3041] 광 경화성 바이오매트릭스를 중합하기 위해, 바이오매트릭스, 광개시제, 및 세포를 상술된 바와 같이 바람직한 기간 동안 광원에 노출시킨다. 중합을 위해 사용되는 광 파장은 사용되는 특정 광개시제의 광화학적 특성에 의존할 것이다. 예를 들어, Irgacure 2959에 대한 중합의 광개시는 300~370 nm 파장의 빛으로 일어날 것이며; 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트에 대한 중합의 광개시는 300~420 nm 파장의 빛으로 일어날 것이고; 리보플라빈-5'-포스페이트에 대한 중합의 광 개시는 300~500 nm 파장의 빛으로 일어날 것이다. 사용되는 광원은 백열 램프, 기체 방전 램프, 또는 금속 증기 램프로 달성되는 것과 같은 파장 범위를 방출할 수 있고; 대안적으로, 사용되는 광원은 광학 필터로 또는 발광 다이오드(LED)로 달성되는 것과 같은 좁은 파장 범위를 방출할 수 있다. 바람직하게는, 사용되는 광원은 세포 상 UV 조사의 손상 효과를 회피하기 위해 315 nm 미만의 파장을 갖는 빛을 방출하지 않는다. 하나의 구현예에서, 광원은 415~700 nm의 스펙트럼 범위를 갖는 백색 광원이다. 다른 구현예에서, 광원은 약 365±5 nm, 약 375±5 nm, 약 385±5 nm, 약 395±5 nm, 약 405±5 nm, 약 415±5 nm, 약 425±5 nm, 약 435±5 nm, 약 445±5 nm, 약 455±5 nm, 또는 약 465±5 nm의 스펙트럼 범위를 갖는 LED 광원이다. 빛의 세기는 광독성을 최소화하고 편리한 광 노출 기간, 전형적으로 약 5분 미만; 바람직하게는 약 2분 미만; 보다 바람직하게는 약 1분 미만 내에 중합을 제공하도록 선택된다. 중합의 하나의 표시는 용액 점도의 증가이다. 중합의 다른 표시는 겔화의 개시이다.

[3042] 바이오매트릭스의 중합은 바이오프린팅 기법을 통해 눈 표면 상에서, 또는 대안적으로 이후 눈 표면에 이식되는 담체 상에서 일어날 수 있다. 선택적으로 바이오매트릭스의 중합은 전방 챔버에서의 각막 표면 상에서, 또는 대안적으로 이후 전방 챔버에서의 각막 표면으로 이식되는 담체 상에서 일어날 수 있다.

[3043] 담체

[3044] 세포 및 눈 전달에 적합한 국소화 제제는 바람직하게는 담체, 예컨대 콘택트 렌즈 또는 양막을 통해 전달된다.

[3045] 본 발명에 따른 사용에 적합한 콘택트 렌즈는 바람직하게는 환자의 각막 곡률에 부합하고 몇일 동안 밴드 콘택트 렌즈로서 연속 사용을 위한 임상 실시에서 환자에 의해 잘 관용될 수 있는 것들이다.

[3046] 본 발명에 따른 콘택트 렌즈의 적합한 유형의 예는 보스톤(Boston) 인공각막이식 1형 윤부 줄기 세포 결핍을 갖는 환자에서 사용될 수 있음)과 함께 장기 밴드 콘택트 렌즈에 대한 임상적 사용에서 광범위하게 검증되었고 문헌[Thomas, Merina M.D.; Shorter, Ellen O.D.; Joslin, Charlotte E. O.D., Ph.D.; McMahon, Timothy J. O.D.; Cortina, M. Soledad M.D. Contact Lens Use in Patients With Boston Keratoprosthesis Type 1: Fitting, Management, and Complications. Eye Contact Lens. 2015 Nov;41(6):334-40]에 기재된 것과 일치한다.

[3047] 콘택트 렌즈는 당분야에 알려져 있거나 이후 개발되는 임의의 적절한 물질일 수 있고, 소프트 렌즈, 하드 렌즈, 또는 하이브리드 렌즈, 바람직하게는 소프트 렌즈, 보다 바람직하게는 통상적인 하이드로겔 콘택트 렌즈 또는 실리콘 하이드로겔(SiHy) 콘택트 렌즈일 수 있다.

[3048] "통상적인 하이드로겔 콘택트 렌즈"는 수불용성, 가교 중합체성 물질이며, 이론적으로 실리콘이 없고, 완전 수화되는 경우 그 중합체 매트릭스 내에 적어도 10중량%의 물을 함유할 수 있는 하이드로겔 벌크(코어) 물질을 포함하는 콘택트 렌즈를 나타낸다. 통상적인 하이드로겔 콘택트 렌즈는 전형적으로 당업자에게 알려진 실리콘-비함유, 친수성 중합 가능 성분을 포함하는 통상적인 하이드로겔 렌즈 제형물(즉, 중합 가능한 조성물)의 공중합에 의해 수득된다.

[3049] 상업적 하이드로겔 콘택트 렌즈를 제조하기 위한 통상적인 하이드로겔 렌즈 제형물의 예에는 비제한적으로 알파필콘 A, 아코필콘 A, 델타필콘 A, 에타필콘 A, 포코필콘 A, 헬필콘 A, 헬필콘 B, 힐라필콘 B, 히옥시필콘 A, 히옥시필콘 B, 히옥시필콘 D, 메타필콘 A, 메타필콘 B, 넬필콘 A, 네소필콘 A, 오쿠필콘 A, 오쿠필콘 B, 오쿠필콘 C, 오쿠필콘 D, 오마필콘 A, 펨필콘 A, 폴리마콘, 삼필콘 A, 텔필콘 A, 테트라필콘 A, 및 비필콘 A가 포함된다.

[3050] "SiHy 콘택트 렌즈"는 수불용성, 가교 중합체성 물질이며, 실리콘을 함유하고, 완전 수화되는 경우 그 중합체 매트릭스 내에 적어도 10중량%의 물을 함유할 수 있는 실리콘 하이드로겔 벌크(코어) 물질을 포함하는 콘택트 렌즈를 나타낸다. 실리콘 하이드로겔 콘택트 렌즈는 전형적으로 적어도 실리콘-함유 중합 가능 성분 및 당업자에게 알려져 있는 친수성 중합 가능 성분을 포함하는 실리콘 하이드로겔 렌즈 제형물의 공중합에 의해 수득된다.

[3051] 상업적 SiHy 콘택트 렌즈를 제조하기 위한 SiHy 렌즈 제형물의 예에는 비제한적으로 아스모필콘 A, 발라필콘 A, 콤필콘 A, 델레필콘 A, 에프로필콘 A, 엔필콘 A, 판필콘 A, 갈리필콘 A, 로트라필콘 A, 로트라필콘 B, 나라필콘 A, 나라필콘 B, 세노필콘 A, 세노필콘 B, 세노필콘 C, 스마필콘 A, 소모필콘 A, 및 스텐필콘 A가 포함된다.

[3052] 바람직한 구현예에서, 담체는 발라필콘 A, 로트라필콘 A, 로트라필콘 B, 세노필콘 A 및 메타필콘 A로 구성되는 군으로부터 선택되는 콘택트 렌즈이다.

[3053] 특히 바람직한 구현예에서, 담체는 로트라필콘 B인, 콘택트 렌즈이다.

[3054] 담체는 눈 운동이 작제물을 제거하는 것을 방지하기 위해 피브린 아교 또는 중합을 사용해서 눈 표면에서 제 위치에 유지될 수 있다.

[3055] 바이오매트릭스 및 세포와 조합된 담체는 세포를 전달하기 위한 시간 범위, 예를 들어, 수 일 내지 1주, 바람직하게는 1주 동안 눈 상에 놓일 수 있다.

[3056] 다른 전달 방법:

[3057] 대안적 구현예에서, LSC는 눈 표면으로 세포 현탁액으로서 전달될 수 있다(국소화 제제, 예컨대 바이오매트릭스 없이 그리고 담체, 예컨대 콘택트 렌즈를 포함하고/포함하지 않고). 조직 부착을 개선하기 위해 당분야에 알려진 화합물 및 부형제, 예컨대 점막접착제, 점도 증강제, 또는 역상 열 젤화제가 제형물에 포함될 수 있다.

[3058] 바이오프린팅 단계

[3059] 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 따라 수득 가능한 눈 세포, 예컨대 각막 내피 세포 집단은 대상체의 눈으로, 예컨대 대상체의 각막으로 이식될 수 있다.

[3060] 본 발명에 따른 세포 집단은 광 경화성, 분해 가능 바이오매트릭스, 예컨대 GelMA인, 눈 사용에 적합한 국소화 제제를 통해 전달될 수 있다. 하기 방법은 각막의 내벽으로의 전달을 제어하기 위한 절차를 기재한다.

[3061] 방법 1 버블 부각 방법(도 22에 나타냄)

[3062] 먼저 박리/스크레이핑에 의해 또는 펨토초 레이저로의 광손상을 사용하는 제어되는 방식으로 각막의 내벽으로부터 기능이상 내피 세포를 탈착시킬 수 있다. 이어서 세포가 실린 바이오매트릭스의 소형 볼루스를 각막의 내부 표면 근처에 주사한다. 이는 표준 주사기 또는 맞춤 적용장치를 사용해서 수동으로 수행할 수 있다. 또한 수술 시스템(예컨대 콘스텔레이션(constellation)) 또는 주사기 펌프를 통해 제어할 수 있다. 이어서 볼루스 아래에 기포를 주사한다. 기포는 볼루스를 후방 각막을 향해 압착하여, 얇은 코팅을 생성한다. 이어서 전체 겔을 UV 또는 근UV 광원, 또는 바이오매트릭스를 경화하기 위해 요구되는 임의의 다른 스펙트럼 대역을 사용해서 경화시킨다. 대안적으로, 기능이상 조직을 놔둘 수 있고, 그 상부에 걸쳐 바이오매트릭스를 경화시킬 수 있다. 광원은 경화 영역을 제어하기 위한 다른 광학 포커싱 방법을 사용해서 상이한 크기로 포커싱할 수 있다. 나머지 경화되지 않은 영역은 관개/흡입 캐뉼라를 사용해서 플러싱할 수 있다.

[3063] 방법 2. 펨토초 레이저를 사용하는 제거 방법(도 23에 나타냄)

[3064] 먼저 박리/스크레이핑에 의해 또는 펨토초 레이저로의 광손상을 사용하는 제어되는 방식으로 각막의 내벽으로부터 기능이상 내피 세포를 탈착시킬 수 있다. 대안적으로, 이들을 그 자리에 놔둘 수 있다. 이어서 세포가 실린 바이오매트릭스를 조직이 제거된 또는 기능이상 조직 위에 있는 공극을 커버하는 각막의 내부 표면 상에 주사한다. 이는 표준 주사기 또는 맞춤 적용장치를 사용해서 수동으로 수행할 수 있다. 또한 수술 시스템(예컨대 콘스텔레이션(constellation)) 또는 주사기 펌프를 통해 제어할 수 있다. 이어서 바이오매트릭스를 UV 또는 근UV 광

원, 또는 바이오매트릭스를 경화하기 위해 요구되는 임의의 다른 스펙트럼 대역을 사용해서 경화시킨다. 그 후 펨토초 레이저를 사용하여 과량의 물질을 탈착시켜서, 원하는 분포로 두께 및 면적을 제어한다. 이어서 과량의 물질을 각막 절개를 통해 핀셋으로 제거한다.

[3065] 방법 3. 염색 마스크 및 흡착 기반 두께 제어(도 24에 나타냄)

[3066] 먼저 생체적합성 염색(트립판 블루, 브릴리언트 블루 등)을 사용해서 각막의 내부 표면을 염색한다. 이어서 기능이상 내피 세포를 박리/스크레이핑에 의해 각막의 내벽으로부터 탈착시킨다. 그 후 생체적합성 염색을 함유하는 세포가 실린 바이오매트릭스를 조직이 제거된 공극을 커버하는 각막의 내부 표면 상에 주사한다. 이어서 바이오매트릭스를 UV 또는 근UV 광원, 또는 바이오매트릭스를 경화하기 위해 요구되는 임의의 다른 스펙트럼 대역을 사용해서 경화시킨다. 각막 조직에서의 염색은 광 흡수를 증가시켜서 경화된 바이오매트릭스의 면적을 제어하는 마스크로서 작용한다. 유사하게, 바이오매트릭스에서의 염색은 광 흡수를 증가시킴으로써 경화된 물질의 깊이/두께를 제어한다. 이어서 경화되지 않은 겔 물질을 관개/흡입 캐뉼라를 사용해서 전방 챔버로부터 플러싱한다.

[3067] 방법 4. 건조 후방 챔버 적용(도 25에 나타냄)

[3068] 먼저 박리/스크레이핑에 의해 또는 펨토초 레이저로의 광손상을 사용하는 제어되는 방식으로 각막의 내벽으로부터 기능이상 내피 세포를 탈착시킬 수 있다. 대안적으로, 이를 그 자리에 놔둘 수 있다. 이어서 전방 구획의 전방 챔버에서 수성물을 배액하고 기체(예컨대 공기)로 대체한다. 그 후, 세포가 실린 바이오매트릭스를 소형 제어 액적으로(액적을 분산시키기 위한 표면 장력을 허용) 각막의 내부 표면으로 적용하거나, 브러쉬 또는 소프트 팁 캐뉼라를 사용해서 페인팅한다. 히알루론산이 그 점성 특성을 변경하고 분배/적용에 대한 더 우수한 제어를 구현하기 위해 바이오매트릭스에 적용될 수 있다. 이어서 전체 바이오매트릭스를 UV 또는 근UV 광원, 또는 바이오매트릭스를 경화하기 위해 요구되는 임의의 다른 스펙트럼 대역을 사용해서 경화시킨다. 이후 마지막으로, 전방 챔버를 균형 염 용액으로 다시 충전한다.

[3069] 방법 5. 자연 부유 제형물

[3070] 먼저 박리/스크레이핑에 의해 또는 펨토초 레이저로의 광손상을 사용하는 제어되는 방식으로 각막의 내벽으로부터 기능이상 내피 세포를 탈착시킬 수 있다. 이어서 세포가 실린 바이오매트릭스의 소형 볼루스를 각막의 내부 표면 근처에 주사한다. 바이오매트릭스를 방수 대비 천연 부유제로 제형화하거나 통기시켜 동일한 효과를 달성한다. 이는 바이오매트릭스가 후방 각막으로 자연 상승하도록 유도하여, 얇은 코팅을 생성한다. 이어서 전체 바이오매트릭스를 UV 또는 근UV 광원, 또는 바이오매트릭스를 경화하기 위해 요구되는 임의의 다른 스펙트럼 대역을 사용해서 경화시킨다. 대안적으로, 기능이상 조직을 놔둘 수 있고, 그 상부에 걸쳐 바이오매트릭스를 경화시킬 수 있다. UV 광원은 경화 영역을 제어하기 위한 광학 포커싱 방법을 사용해서 상이한 크기로 포커싱할 수 있다. 나머지 경화되지 않은 영역은 흡입 캐뉼라를 사용해서 플러싱할 수 있다.

[3071] 다른 전달 방법

[3072] 대안적 구현예에서 증식된 세포 집단, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 CEC는 세포 현탁액으로서(국소화 제제, 예컨대 광 경화성, 분해 가능 바이오매트릭스 비함유) 전달되고, 3시간 동안 환자가 아래를 보도록 하여 중력에 의해 부착되도록 방치할 수 있다. 조직 부착을 개선하기 위해 당분야에 알려진 화합물 및 부형제, 예컨대 접착제, 점도 증강제, 또는 역상 열 젤화제가 제형물에 포함될 수 있다.

[3073] 다른 대안적 구현예에서, 증식된 세포 집단, 예컨대 본원에 기재된 바와 같은 CEC는 또한 자기 비드를 사용하여 전달될 수 있다. 눈 전달에 적합한 배지에서 CEC/비드의 현탁액을 제조한 후 이를 눈 내로 주사한다. 세포 부착은 눈에 적용되는 자석에 의해 촉진된다(Magnetic field-guided cell delivery with nanoparticle-loaded human corneal endothelial cells. Moysidis SN, Alvarez-Delfin K, Peschansky VJ, Salero E, Weisman AD, Bartakova A, Raffa GA, Merkhofer RM Jr, Kador KE, Kunzevitzky NJ, Goldberg JL. Nanomedicine. 2015 Apr;11(3):499-509. doi: 10.1016/j.nano.2014.12.002.).

[3074] 본 발명에 따른 LATS 억제제 사용의 다른 방법

[3075] 본 발명에 따른 하나의 양태에서, 세포 집단 증식을 달성하기 위해 눈 표면에 직접 본 발명에 따른 LATS 억제제를 직접 첨가할 수 있다. 예를 들어 이는 세포 손실이 전체가 아니고 증식될 잔여 접종 세포 집단이 존재하는 경우 수행될 수 있다. 예를 들어 환자의 눈에 잔여 윤부 줄기 세포가 존재하는 경우 또는 환자의 각막에 잔여 각막 내피 세포가 존재하는 경우 수행될 수 있다. 예를 들어, 이는 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는

눈 사용에 적합한 제형물에서 본원에 개시된 바와 같은 화합물을 제조하고 눈에 점안제에 의해 적용하여 달성될 수 있다. 대안적으로, 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 눈 사용에 적합한 제형물에서 본원에 개시된 바와 같은 화합물은 눈 내로, 예를 들어 앞방내로 적용될 수 있다.

[3076] 약학적으로 허용 가능한 부형제는 조성물을 증강시키거나 안정화시키거나, 조성물의 제조를 촉진한다. 약학적으로 허용 가능한 부형제에는 생리학적으로 상용성인 용매, 분산 매질, 코팅제, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제 등이 포함된다.

[3077] 본 발명에 따른 LATS 억제제는 안과적으로 허용 가능한 보존제, 공-용매, 계면활성제, 점도 증강제, 투과 증강제, 완충액, 염화나트륨, 또는 물과 조합되어 수성 안과 현탁액 또는 용액을 형성할 수 있다. 국소 안과 제품은, 예를 들어, 다용량 형태로 패키지화될 수 있다. 따라서 사용 동안 미생물 오염을 방지하기 위해 보존제가 요구될 수 있다. 적합한 보존제에는 클로로부탄올, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 페닐에틸 알코올, 에데테이트 디나트륨, 소르브산, 폴리쿼터늄-1, 또는 당업자에게 알려진 다른 제제가 포함된다. 이러한 보존제는 전형적으로 0.001 내지 1.0% w/v의 수준으로 이용된다.

[3078] 본 발명의 하나의 구현예에서, 본 발명에 따른 LATS 억제제는 이식 전까지 세포, 예컨대 각막 상피 및 윤부 세포를 보존하기 위해 사용될 수 있다. 눈-은행 전문자에 의한 사후 절제 후, 이식 전까지 배지, 예컨대 Optisol 또는 PBS에서 각막이 보존된다. 본 발명의 특정 구현예에서, LATS 억제제는 일반적으로 각막 이식을 위해 사용되는 용액, 예컨대 Optisol 또는 PBS에 첨가될 수 있다. 바람직하게는 보존 용액 중 LATS 억제제의 농도는 0.5 내지 100마이크로몰 농도, 보다 바람직하게는 0.5 내지 25마이크로몰 농도, 특히 바람직하게는 1 내지 20마이크로몰 농도이다. 특정 구현예에서, 화학식 I에 따른 LATS 억제제는 약 3 내지 10마이크로몰 농도로 첨가된다.

[3079] 면역억제제, 소염제 및 항생제

[3080] 환자에 이식된 세포의 면역 거부 위험을 경감시키기 위한, 윤부 줄기 세포 또는 각막 내피 세포에 대해 기재된 바와 같은 세포 집단 상에서 시험관내 수행되는 유전자 편집 기법의 사용에 부가하여 또는 이에 대한 대안으로서, 본 발명에 따른 세포 집단은 면역억제제 및/또는 소염제(들)와 동시적으로 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 비제한적으로 텍사메타손 또는 사이클로스포린을 포함하는, 면역억제를 위한 표준 제제 또는 소염제(들)가 사용될 수 있다.

[3081] 항생제, 예컨대 항생제 세파졸린 및 토브라마이신이 또한 증식된 세포 집단(예컨대 본원에 기재된 바와 같은 윤부 줄기 세포 또는 각막 내피 세포)과 함께 환자에게 투여될 수 있다.

[3082] 본 발명의 세포 집단이 다른 제제(들)와 함께 투여되는 경우, 세포 집단 및 제제(들)는 임의의 순서로 순차적으로 또는 동시적으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 증식된 세포 집단은 수술 치료와 함께 투여된다. 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 윤부 줄기 세포 집단은 수술 치료와 함께 투여된다. 다른 구현예에서, 본 발명에 따른 각막 내피 세포 집단은 수술 치료와 함께 투여된다.

[3083] **치료적 용도**

[3084] 본 발명에 따른 눈 세포 집단은 치료 유효량의 눈 세포를 포함하는 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는 눈 질병 또는 장애의 치료 또는 예방 방법에서 사용될 수 있다.

[3085] 본 발명에 따른 윤부 줄기 세포 집단은 치료 유효량의 윤부 줄기 세포를 포함하는 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는 눈 질병 또는 장애의 치료 또는 예방 방법에서 사용될 수 있다. 바람직하게는 눈 질병 또는 장애는 윤부 줄기 세포 결핍과 연관된다.

[3086] 윤부 줄기 세포 결핍은 비제한적으로 다음을 포함하는 몇몇 다양한 질환 결과로 발생할 수 있다:

[3087] - 화학적 또는 열적 화상 또는 방사선 부상으로부터의 직접적 줄기 세포 손상;

[3088] - 선천성 질환, 예컨대 무홍채증, 공막화각막, 다발 내분비샘 종양;

[3089] - 자가면역 장애, 예컨대 스티븐 존슨 증후군 또는 눈 흉터 유사물집증 또는 콜라겐 혈관 질병;

[3090] - 만성 비-자가-면역 염증성 장애, 예컨대 콘택트 렌즈 사용, 건성안 질병, 장미증, 포도상구균 가장자리, 각막염(박테리아, 진균 & 바이러스 각막염), 익상편 또는 종양;

[3091] - 의인성, 예컨대 다회 눈 수술 후, 익상편 또는 종양 절제, 냉동치료법;

[3092] - 투약 독성 결과, 예컨대 보존제(티메로살, 벤잘코늄), 국소 마취제, 필로카르핀, 베타 차단제, 미토마이신,

5-플루오로우라실, 질산은, 및 스티븐 존슨 증후군을 유도하는 경구 투약(문헌[Dry Eye: a practical guide to ocular surface disorders and stem cell surgery. SLACK 2006 - Rzany B, Mockenhaupt M, Baur S et al. J. Clin. Epidemiol. 49, 769-773 (1996)] 참고).

[3093] 임상 실시에서 윤부 줄기 세포 결핍의 가장 일반적으로 직면하는 원인은 화학적 화상, 무홍채증, 스티븐 존슨 증후군 및 콘택트 렌즈 사용이다.

[3094] 보다 바람직하게는 눈 질병 또는 장애는 화학적 화상, 열적 화상, 방사선 부상, 무홍채증, 공막화각막, 다발 내분비샘 종양, 스티븐 존슨 증후군, 눈 흉터 유사물집증, 콜라겐 혈관 질병, 콘택트 렌즈 사용으로 발생하는 만성 비-자가-면역 염증성 장애, 건성안 질병, 장미증, 포도상구균 가장자리, 각막염(박테리아, 진균 & 바이러스 각막염 포함), 익상편 또는 종양으로 구성되는 군으로부터 선택되는 부상 또는 질병 또는 장애로 인해 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍, 다회 눈 수술 또는 익상편 또는 종양 절제 또는 냉동치료법 후 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍; 및 보존제(티메로살, 벤잘코늄), 국소 마취제, 필로카르핀, 베타 차단제, 미토마이신, 5-플루오로우라실, 질산은, 및 스티븐 존슨 증후군을 유도하는 경구 투약으로 구성되는 군으로부터 선택되는 투약으로부터의 투약 독성 결과 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍이다.

[3095] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능한 유효량의 윤부 줄기 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계에 의해 윤부 줄기 세포 결핍을 치료하는 방법을 제공한다.

[3096] 보다 구체적인 구현예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능한 치료 유효량의 윤부 줄기 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계에 의해, 화학적 화상, 열적 화상, 방사선 부상, 무홍채증, 공막화각막, 다발 내분비샘 종양, 스티븐 존슨 증후군, 눈 흉터 유사물집증, 콜라겐 혈관 질병, 콘택트 렌즈 사용으로 발생하는 만성 비-자가-면역 염증성 장애, 건성안 질병, 장미증, 포도상구균 가장자리, 각막염(박테리아, 진균 & 바이러스 각막염 포함), 익상편 또는 종양으로 구성되는 군으로부터의 부상 또는 장애로 인해 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍, 다회 눈 수술, 또는 익상편 또는 종양 절제 또는 냉동치료법 후 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍; 및 보존제(티메로살, 벤잘코늄), 국소 마취제, 필로카르핀, 베타 차단제, 미토마이신, 5-플루오로우라실, 질산은, 및 스티븐 존슨 증후군을 유도하는 경구 투약으로 구성되는 군으로부터 선택되는 투약으로부터의 투약 독성 결과 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍을 치료하는 방법을 제공한다.

[3097] 다른 보다 구체적인 구현예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능한 치료 유효량의 윤부 줄기 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계에 의해, 화학적 화상, 무홍채증, 스티븐 존슨 증후군 및 콘택트 렌즈 사용으로 구성되는 군으로부터 선택되는 부상 또는 질병 또는 장애로 인해 발생하는 윤부 줄기 세포 결핍을 치료하는 방법을 제공한다.

[3098] 성체가 수신자(이식 수신자)인 경우, 바람직하게는 1,000개 초과의 p63알파 발현 세포가 본 발명에 따른 치료 방법에서 환자에게 투여될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 1,000 내지 100,000개의 p63알파 발현 세포가 본 발명에 따른 치료 방법에서 환자에게 투여될 수 있다.

[3099] 본 발명에 따른 각막 내피 세포 집단은 치료 유효량의 각막 내피 세포를 포함하는 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계를 포함하는 눈 질병 또는 장애의 치료 또는 예방 방법에서 사용될 수 있다. 바람직하게는 눈 질병 또는 장애는 감소된 각막 내피 세포 밀도와 연관된다. 바람직한 구현예에서, 눈 질병 또는 장애는 각막 내피 기능이상이다.

[3100] 보다 바람직하게는 눈 질병 또는 장애는 푹스(Fuchs) 내피 각막 이영양증, 물집 각막병증(인공수정체 물집 각막병증 및 무수정체 물집 각막병증 포함), 각막 이식 실패, 후방 다형 각막 이영양증, 선천 유전 내피 이영양증, X-연관 내피 각막 이영양증, 무홍채증, 및 각막 내피염증으로 구성되는 군으로부터 선택되는 각막 내피 기능이상이다. 특정 구현예에서, 눈 질병 또는 장애는 푹스 내피 각막 이영양증, 물집 각막병증(인공수정체 물집 각막병증 및 무수정체 물집 각막병증 포함) 및 각막 이식 실패로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[3101] 특정 구현예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능한 유효량의 각막 내피 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계에 의해 각막 내피 기능이상을 치료하는 방법을 제공한다.

[3102] 보다 구체적인 구현예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능한 유효량의 각막 내피 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계에 의해, 푹스 내피 각막 이영양증, 물집 각막병증(인공수정체 물집 각막병증 및 무수정체 물집 각막병증 포함), 각막 이식 실패, 후방 다형 각막 이영양증, 선천 유전 내피 이영양증, X-연관 내피 각막 이영양증, 무홍채증, 및 각막 내피염증으로 구성되는 군으로부터 선

택되는 각막 내피 기능이상을 치료하는 방법을 제공한다.

[3103] 보다 구체적인 구현예에서, 본 발명은 본 발명에 따른 세포 집단의 증식 방법에 의해 수득 가능한 유효량의 각막 내피 세포 집단을 필요로 하는 대상체에 이를 투여하는 단계에 의해, 폭스 내피 각막 이영양증, 물집 각막병증(인공수정체 물집 각막병증 및 무수정체 물집 각막병증 포함), 각막 이식 실패로 구성되는 군으로부터 선택되는 각막 내피 기능이상을 치료하는 방법을 제공한다.

[3104] 성체가 수신자(이식 수신자)인 경우, 본 발명에 따른 치료 방법에서 사용하기 위한 각막 내피 세포층은 바람직하게는 적어도 약 500 세포/㎟(면적), 바람직하게는 1,000 내지 3,500 세포/㎟(면적), 보다 바람직하게는 2,000 내지 약 4,000 세포/㎟(면적)의 눈에서의 최종 세포 밀도를 갖는다.

[3105] **실시예 섹션 A~C**

[3106] 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하지 않으면서 본 발명을 더 예시하기 위해 제공된다. 본 발명의 다른 변화는 당업자에게 매우 자명할 것이고, 첨부된 청구범위에 포괄된다.

[3107] 다르게 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 기술적 및 과학적 용어들은 본 개시내용이 속한 분야에 친숙한 전문가가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다.

[3108] **실시예 A1: LATS1 생화학 검정: 균일 시간 분해 형광(HTRF) 검정(화합물 실시예 1~290)**

[3109] 제조업체의 지침에 따라 HTRF KinEASE-STK S1 키트(CisBio, 카탈로그 번호 62ST1PEC)를 사용해서 LATS1 생화학 HTRF 검정을 수행하였다. 아미노산 589~1130의 촉매성 도메인을 보유하는 인간 LATS1 키나제 도메인 단백질을 Carnabio(카탈로그 번호 01-123)에서 구매하였고, 인간 His-태그화된 MOBKL1A(NP_775-739)로 공동-정제하였다. 화합물을 ECHO 액체 취급장치(Labcyte)에 의해 384-웰 플레이트 내로 첨가하였다. 이어서 5 ㎕의 하기 용액(50 mM HEPES, 0.01% BSA, 100 nM 오르타오바나데이트, 1 mM MgCl2, 1 mM DTT, 0.6 ng/㎕ LATS1 효소(Carnabio, 01-123), 2마이크로몰 농도 STK1 국소화 보조제(CisBio)), 이어서 키나제 완충액(50 mM HEPES, 0.01% BSA, 100 nM 오르타오바나데이트, 1 mM MgCl2, 1 mM DTT) 중 5 ㎕의 2 mM ATP를 웰 내로 첨가하고, 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 10 ㎕의 검출 혼합물(50 mM HEPES, 0.01% BSA, 100 nM 오르타오바나데이트, 1 mM MgCl2, 1 mM DTT, STK 항체-크립테이트(CisBio), 스트렙타비딘-XL665(CisBio), 500마이크로몰 농도 불화칼륨, 50 nM EDTA)을 각 웰로 첨가하고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 HTRF에 대해 Pherastar(BMG, Labtech) 상에서 판독하였다(665 nm/620 nm). 화합물의 효과가 HTRF 신호를 50% 만큼 감소시킬 때 $IC_{50}$를 측정한다. 예시된 화합물에 대한 LATS1 $IC_{50}$ 값을 표 1A에 나타낸다.

[3110] **실시예 A2: LATS1 생화학 캘리퍼 검정**

[3111] 아미노산 589~1130의 촉매성 도메인을 보유하는 인간 LATS1 키나제 도메인 단백질을 Carnabio(카탈로그 번호 01-123)에서 구매하였고, 인간 His-태그화된 MOBKL1A(NP_775-739)로 공동-정제하였다. 5 ㎕의 효소 완충액, 100 nL의 화합물 및 5 ㎕의 국소화 보조제 완충액을 384-웰 플레이트 내로 첨가하였다. 최종 검정 반응 혼합물은 100 mM HEPES, pH7.5, 0.1% BSA, 0.01% Triton X-100, 1 mM DTT, 10 mM MgCl2, 10마이크로몰 농도의 나트륨 오르소바나데이트, 10마이크로몰 농도의 베타-글리세로포스페이트, 400마이크로몰 농도의 ATP, 1% DMSO, 1.1 nM LATS1 효소(Carnabio, 01-123), 1마이크로몰 농도의 국소화 보조제 FAM-KKLRRTLSVA-COOH(SEQ ID NO: 24)(NanoSyn)를 함유한다. 플레이트를 3시간 동안 25℃에서 인큐베이션하였다. 25 mM EDTA를 함유하는 40 ㎕의 정지 완충액(NanoSyn)을 각 웰에 첨가하여 반응을 종료시켰다. 미세유체-기반 캘리퍼 Labchip 3000 약물 탐색 시스템(Caliper Life Sciences)을 사용해서 국소화 보조제 및 산물을 전기영동으로 분리하였다. 파란색 레이저 여기 및 녹색 형광 검출을 사용해서 플레이트를 판독하고, 형광 세기에 의해 정량하였다. 화합물의 효과가 산물 형광 신호를 50% 만큼 감소시킬 때 $IC_{50}$를 측정한다. 상기 검정에 따라 하기 화합물에 대한 LATS1 $IC_{50}$ 값의 마이크로몰 농도는 다음과 같다:

[3112] 실시예 49: 0.012, 실시예 14: 0.034, 실시예 65: 0.022, 실시예 139: 0.028, 실시예 133: 0.004.

[3113] **실시예 A3: LATS2 생화학 캘리퍼 검정(화합물 실시예 1~290)**

[3114] 아미노산 553~1088의 촉매성 도메인을 보유하는 인간 LATS2 키나제 도메인 단백질을 Carnabio(카탈로그 번호 01-124)에서 구매하였고, 인간 His-태그화된 MOBKL1A(NP_775-739)로 공동-정제하였다. 5 ㎕의 효소 완충액, 100 nL의 화합물 및 5 ㎕의 국소화 보조제 완충액을 384-웰 플레이트 내로 첨가하였다. 최종 검정 반응 혼합물은 100 mM HEPES, pH7.5, 0.1% BSA, 0.01% Triton X-100, 1 mM DTT, 10 mM MgCl2, 10마이크로몰 농도의 나트륨

오르소바나데이트, 10마이크로몰 농도의 베타-글리세로포스페이트, 400마이크로몰 농도의 ATP, 1% DMSO, 1.1 nM LATS2 효소(Carnabio, 01-124), 1마이크로몰 농도의 국소화 보조제 FAM-KKLRRTLSVA-COOH(SEQ ID NO: 24)(NanoSyn)를 함유한다. 플레이트를 3시간 동안 25℃에서 인큐베이션하였다. 25 mM EDTA를 함유하는 40 ㎕의 정지 완충액(NanoSyn)을 각 웰에 첨가하여 반응을 종료시켰다. 미세유체-기반 캘리퍼 Labchip 3000 약물 탐색 시스템(Caliper Life Sciences)을 사용해서 국소화 보조제 및 산물을 전기영동으로 분리하였다. 파란색 레이저 여기 및 녹색 형광 검출을 사용해서 플레이트를 판독하고, 형광 세기에 의해 정량하였다. 화합물의 효과가 산물 형광 신호를 50% 만큼 감소시킬 때 $IC_{50}$를 측정한다. 예시된 화합물 1~290에 대한 LATS2 $IC_{50}$ 값을 표 1A에 나타낸다.

[3115] [표 1A]

LATS1 및 LATS2에 대한 억제 활성

| 실시예 번호 | LATS1 $IC_{50}$ (μM) | LATS2 $IC_{50}$ (μM) | | 실시예 번호 | LATS1 $IC_{50}$ (μM) | LATS2 $IC_{50}$ (μM) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.001 | n.d. | | 117 | 0.004 | n.d. |
| 2 | 0.001 | n.d. | | 118 | 0.005 | n.d. |
| 3 | 0.001 | n.d. | | 119 | 0.009 | n.d. |
| 4 | 0.001 | 0.001 | | 120 | 0.01 | n.d. |
| 5 | 0.002 | n.d. | | 121 | 0.014 | n.d. |
| 6 | 0.001 | 0.008 | | 122 | 0.015 | n.d. |
| 7 | 0.002 | n.d. | | 123 | 0.018 | n.d. |
| 8 | 0.003 | n.d. | | 124 | 0.022 | n.d. |
| 9 | 0.003 | n.d. | | 125 | 0.023 | n.d. |
| 10 | 0.003 | n.d. | | 126 | 0.053 | n.d. |
| 11 | 0.003 | 0.012 | | 127 | 0.055 | n.d. |
| 12 | 0.004 | 0.015 | | 128 | 0.077 | n.d. |
| 13 | 0.004 | n.d. | | 129 | 0.187 | n.d. |
| 14 | 0.002 | 0.05 | | 130 | 1.153 | n.d. |
| 15 | 0.004 | n.d. | | 131 | >0.833 | n.d. |
| 16 | 0.005 | n.d. | | 132 | >2.5 | n.d. |
| 17 | 0.005 | n.d. | | 133 | 0.002 | 0.004 |

[3116]

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 17a | 0.003 | n.d. | | 134 | 0.001 | n.d. |
| 17b | 0.0009 | n.d. | | 135 | 0.002 | n.d. |
| 17c | 0.003 | n.d. | | 136 | 0.002 | n.d. |
| 17d | 0.001 | n.d. | | 137 | 0.022 | n.d. |
| 18 | 0.006 | n.d. | | 138 | 0.002 | n.d. |
| 19 | 0.006 | n.d. | | 139 | 0.003 | 0.02 |
| 20 | 0.006 | n.d. | | 140 | 0.004 | n.d. |
| 21 | 0.007 | n.d. | | 141 | 0.004 | n.d. |
| 22 | 0.007 | n.d. | | 142 | 0.006 | n.d. |
| 23 | 0.01 | n.d. | | 143 | 0.007 | n.d. |
| 24 | 0.017 | n.d. | | 144 | 0.01 | n.d. |
| 25 | 0.03 | n.d. | | 145 | 0.012 | n.d. |
| 26 | 0.031 | n.d. | | 146 | 0.033 | n.d. |
| 27 | 0.035 | n.d. | | 147 | 0.069 | n.d. |
| 28 | 0.036 | n.d. | | 148 | 0.168 | n.d. |
| 29 | 0.036 | n.d. | | 149 | 0.171 | n.d. |
| 30 | 0.039 | n.d. | | 150 | 4.27 | n.d. |
| 31 | 0.041 | n.d. | | 151 | >10 | n.d. |
| 32 | 0.047 | n.d. | | 152 | >2.5 | n.d. |
| 33 | 0.071 | n.d. | | 153 | >5 | n.d. |
| 34 | 0.095 | n.d. | | 154 | 0.0 | n.d. |
| 35 | 0.118 | n.d. | | 155 | 0.001 | n.d. |
| 36 | 0.199 | n.d. | | 156 | 0.006 | n.d. |
| 37 | 0.233 | n.d. | | 157 | 0.006 | n.d. |
| 38 | 0.24 | n.d. | | 158 | 0.008 | n.d. |
| 39 | 0.244 | n.d. | | 159 | 0.016 | n.d. |
| 40 | 0.328 | n.d. | | 160 | 0.024 | n.d. |
| 41 | 0.708 | n.d. | | 161 | 0.025 | n.d. |
| 42 | 0.711 | n.d. | | 162 | 0.049 | n.d. |
| 43 | >1.97 | n.d. | | 163 | 0.051 | n.d. |
| 44 | >2.5 | n.d. | | 164 | 0.159 | n.d. |
| 45 | >2.5 | n.d. | | 165 | >2.5 | n.d. |
| 46 | >2.5 | n.d. | | 166 | 0.014 | n.d. |

[3117]

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 47 | 0.002 | 0.006 | | 167 | 0.143 | n.d. |
| 48a | 0.002 | 0.002 | | 168 | 0.028 | n.d. |
| 48b | 0.006 | 0.018 | | 169 | 0.098 | n.d. |
| 49 | 0.001 | 0.021 | | 170 | 1.28 | n.d. |
| 50 | 0.005 | n.d. | | 171 | 0.054 | n.d. |
| 51 | 0.006 | n.d. | | 172 | 0.017 | n.d. |
| 52 | 0.012 | n.d. | | 173 | 0.061 | n.d. |
| 53 | 0.04 | n.d. | | 174 | 0.197 | n.d. |
| 54 | 0.078 | n.d. | | 175 | 0.324 | n.d. |
| 55 | 0.46 | n.d. | | 176 | >2.5 | n.d. |
| 56 | 1.16 | n.d. | | 177 | >2.5 | n.d. |
| 57 | 1.44 | n.d. | | 178 | >2.5 | n.d. |
| 58 | 0.001 | 0.17 | | 179 | 0.002 | n.d. |
| 59 | 0.001 | 0.004 | | 180 | 0.322 | n.d. |
| 60 | 0.001 | n.d. | | 181 | 9.0 | n.d. |
| 61 | 0.001 | n.d. | | 182 | >10 | n.d. |
| 62 | 0.001 | 0.002 | | 183 | 0.797 | n.d. |
| 63 | 0.001 | n.d. | | 184 | 0.004 | n.d. |
| 64 | 0.001 | n.d. | | 185 | 0.009 | n.d. |
| 65 | 0.002 | 0.03 | | 186 | 0.009 | 0.05 |
| 66 | 0.002 | 0.011 | | 187 | 0.016 | n.d. |
| 67 | 0.002 | n.d. | | 188 | 0.017 | n.d. |
| 68 | 0.002 | n.d. | | 189 | 0.083 | n.d. |
| 68a | 0.001 | n.d. | | 190 | 0.099 | n.d. |
| 68b | 0.002 | n.d. | | 191 | 0.189 | n.d. |
| 69 | 0.003 | n.d. | | 192 | 0.201 | n.d. |
| 70 | 0.003 | n.d. | | 193 | >10 | n.d. |
| 71 | 0.004 | n.d. | | 194 | 0.005 | n.d. |
| 72 | 0.004 | n.d. | | 195 | >10 | n.d. |
| 73 | 0.006 | n.d. | | 196 | >2.5 | n.d. |
| 74 | 0.006 | n.d. | | 197 | 0.023 | n.d. |
| 75 | 0.008 | n.d. | | 198 | 0.001 | n.d. |
| 76 | 0.009 | n.d. | | 199 | 0.001 | n.d. |

[3118]

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 77 | 0.009 | n.d. | | 251 | 0.004 | n.d. |
| 78 | 0.011 | n.d. | | 252 | 0.002 | n.d. |
| 79 | 0.011 | n.d. | | 253 | 0.085 | n.d. |
| 80 | 0.011 | n.d. | | 254 | 0.005 | n.d. |
| 81 | 0.011 | n.d. | | 255 | 0.008 | n.d. |
| 82 | 0.013 | n.d. | | 256 | 0.008 | n.d. |
| 83 | 0.017 | n.d. | | 257 | 0.022 | n.d. |
| 84 | 0.021 | n.d. | | 258 | 0.023 | n.d. |
| 85 | 0.025 | n.d. | | 259 | 0.061 | n.d. |
| 86 | 0.026 | n.d. | | 260 | 0.459 | n.d. |
| 87 | 0.03 | n.d. | | 261 | 0.001 | 0.004 |
| 88 | 0.037 | n.d. | | 262 | 0.003 | n.d. |
| 89 | 0.044 | n.d. | | 263 | 0.007 | n.d. |
| 90 | 0.126 | n.d. | | 264 | 0.007 | n.d. |
| 91 | 0.148 | n.d. | | 265 | 0.008 | n.d. |
| 92 | 0.304 | n.d. | | 266 | 0.009 | n.d. |
| 93 | 0.809 | n.d. | | 267 | 0.013 | n.d. |
| 94 | 1.15 | n.d. | | 268 | 0.018 | n.d. |
| 95 | >1.44 | n.d. | | 269 | 0.001 | n.d. |
| 96 | >1.70 | n.d. | | 270 | 0.002 | n.d. |
| 97 | >2.5 | n.d. | | 271 | 0.002 | n.d. |
| 98 | 1.35 | n.d. | | 272 | 0.002 | n.d. |
| 99 | 0.001 | n.d. | | 273 | 0.463 | n.d. |
| 100 | 0.004 | n.d. | | 274 | 0.013 | n.d. |
| 101 | 0.005 | 0.03 | | 275 | 0.011 | n.d. |
| 102 | 0.126 | n.d. | | 276 | 0.017 | n.d. |
| 103 | 0.002 | n.d. | | 277 | 0.065 | n.d. |
| 104 | 0.005 | n.d. | | 278 | 0.09 | n.d. |
| 105 | 0.001 | n.d. | | 279 | >2.5 | n.d. |
| 106 | 0.003 | n.d. | | 280 | 0.003 | n.d. |
| 107 | 0.008 | n.d. | | 281 | 0.004 | n.d. |
| 108 | 0.027 | n.d. | | 282 | 0.01 | n.d. |
| 109 | 0.001 | n.d. | | 283 | 0.02 | n.d. |

[3119]

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 110 | 0.002 | n.d. | | 284 | 0.03 | n.d. |
| 111 | 0.001 | n.d. | | 285 | 0.19 | n.d. |
| 112 | 0.002 | n.d. | | 286 | 0.56 | n.d. |
| 113 | 0.235 | n.d. | | 287 | 0.002 | 0.015 |
| 114 | 0.002 | n.d. | | 288 | 0.004 | 0.034 |
| 115 | 0.002 | n.d. | | 289 | 0.004 | n.d. |
| 116 | 0.003 | n.d. | | 290 | 0.004 | 0.008 |

[3120]

[3121] n.d.는 결정되지 않음을 의미함

[3122] **실시예 A4: LATS1 생화학 캘리퍼 검정(화합물 실시예 291~335)**

[3123] LATS1 생화학 캘리퍼 검정을 하기와 같이 수행하였다.

[3124] 인간 LATS1 키나제 도메인 단백질을 Carnabio(카탈로그 번호 01-123; lot 15CBS-0098D)에서 구매하였다. 인간 LATS1, 촉매성 도메인[접근 번호 NP_004681.1의 589~1130(말단) 아미노산]을 배큘로바이러스 발현 시스템을 사용하여 인간 His-태그화된 MOBKL1A[접근 번호 NP_775739.1의 1~216(말단) 아미노산]을 포함하는 N-말단 GST-융합 단백질(90 kDa)로서 공동-발현하였다. GST-LATS1을 글루타치온 세파로스 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 기질(Fluo-SGKtide; LATS1에 대한 펩타이드; lot BS-41067)은 하기 서열: 5-Fluo-Nva-KKRNRRLSVA-아미드(SEQ ID NO: 27) x TFA를 가지며 Biosyntan에서 구매하였다.

[3125] 반응을 50 mM Hepes pH 7,5; 0.02% Tween20; 0.02% BSA; 1 mM DTT; 10 uM $Na_3VO_4$ 및 10 mM 베타-글리세롤포스페이트를 함유하는 반응 완충액에서 수행하고 1 mM MgC12 및 qsp $H_2O$를 신선 첨가하였다.

[3126] 반응 완충액 중 기질 용액(2 x conc.)은 300 μM ATP 및 4 μM Fluo-SGKtide를 함유한다.

[3127] 반응 완충액 중 키나제 용액(2 x conc.)은 20 nM LATS1 키나제를 함유한다.

[3128] 4.5 ㎕의 2x conc. 키나제 용액, 50 nL의 1.8 mM 화합물 및 4.5 ㎕의 기질 용액을 384-웰 플레이트(검은색 소용량, Greiner) 내로 첨가하고 1시간 동안 32℃에서 인큐베이션하였다. 100 mM Hepes pH 7.5; 5% DMSO; 0.1% 코팅 시약; 10 mM EDTA 및 0.02% Brij35 및 qsp $H_2O$를 함유하는 15 ㎕의 정지 완충액을 각각의 웰에 첨가하여 반응을 종료시켰다.

[3129] 12 빨대 칩(cat 760404)을 사용하는 미세유체-기반 캘리퍼 EZ 판독장치 시스템(Caliper Life Sciences)을 사용해서 기질 및 산물을 전기영동으로 분리하였다. 0.1% 코팅 시약 CR3 및 0.5% 코팅 시약 CR8(Perkin Elmer)을 함유하는 코팅 완충액(전술한 정지 완충액)에서 분리가 일어난다.

[3130] 488 nm에서 여기 및 520 nm에서 검출을 갖는 LED를 사용해서 플레이트를 판독하여 형광 세기를 정량하였다. 화합물의 효과가 산물 형광 신호를 50% 만큼 감소시킬 때 $IC_{50}$를 측정한다. 예시된 화합물 291~335에 대한 LATS1 $IC_{50}$ 값을 1B에 나타낸다.

[3131] [표 1B]

LATS1에 대한 억제 활성

| 실시예 번호 | LATS1 $IC_{50}$ (μM) |
|---|---|
| **291** | 0.4570 |
| **292** | 0.0433 |
| **293** | 0.0160 |
| **294** | 0.0045 |
| **295** | 0.0100 |
| **296** | 0.2089 |
| **297** | 0.0075 |
| **298** | 0.0590 |
| **299** | 0.0971 |
| **300** | 0.0012 |
| **301** | 0.0052 |
| **302** | 0.0595 |
| **303** | 0.0102 |
| **304** | 0.0096 |
| **305** | 0.6629 |
| **306** | 0.0012 |
| **307** | 0.0019 |
| **308** | 0.0687 |
| **309** | 0.0008 |
| **310** | 0.1639 |
| **311** | 1.0336 |
| **312** | 0.0024 |

[3132]

| | |
|---|---|
| **313** | 0.0038 |
| **314** | 0.4667 |
| **315** | 0.0050 |
| **316** | 0.0425 |
| **317** | 0.0008 |
| **318** | 0.0018 |
| **319** | 0.0581 |
| **320** | 0.0007 |
| **321** | 0.0038 |
| **322** | 0.0292 |
| **323** | 0.0045 |
| **324** | 0.0104 |
| **325** | 0.0037 |
| **326** | 0.0572 |
| **327** | 0.1251 |
| **328** | 0.0189 |
| **329** | 0.0030 |
| **330** | 0.0031 |
| **331** | 0.0105 |
| **332** | 0.0076 |
| **333** | 0.0023 |
| **334** | 0.0061 |
| **335** | n.t. |

[3133]

[3134] n.t.: 평가되지 않음

[3135] **실시예 A5: 마우스 간 선조 세포 증식 검정**

[3136] 증식 검정은 하이 콘텐츠 이미지화 방법에 의해 간 선조 세포(HPC)의 소형 기관모양체로의 화합물 유도된 3차원 성장 측정으로 구성된다. 선조 세포를 C57Bl/6 야생형으로부터 단리하고 기재된 바와 같이 증식시켰다(Lu, W. Y. *et al.*, Nat. Cell Biol. 17, 971-983 (2015)). 세포를 액체 질소에 스톡 보관하고, 필요 시 해동하고, 하기 프로토콜을 사용해서 평가하였다:

[3137] HPC를 콜라겐 I 코팅된 배양 용기(Corning; cat. Number 354487)로부터 수확하고, 계수하고, CEDEX 세포 계수 장치(Roche)를 사용해서 생활성에 대해 평가하였다. 원심분리 후, 1,200만 개 세포를 10% 우태 혈청(Amimed; cat. Number 2-01F10-1); 1% 페니실린/스트렙토마이신(Sigma; cat. Number 15140-122); 17.6 mM의 NaHCO3(Sigma; cat. Number S8761); 20 mM HEPES(Gibco; cat. Number H3375); 10 mM 니코틴아미드(Sigma; cat. Number N0636-100); 14 mM 글루코스(Sigma; cat. Number G7021); 1 mM 피루브산나트륨(Sigma; cat. Number TMS-005); 스톡 용액으로부터 100배 희석된 인슐린 트랜스페린 셀레늄(ITS)(Sigma; cat. Number I3148); 100 nM 덱사메타손(Sigma; cat. Number D4902); 0.2 mM 아스코르브산(Sigma; cat. Number A7506-100G); 10 ng/㎖ 재조합 인간 IL-6(Preprotech; cat. Number 200-06); 10 ng/㎖ 쥣과 HGF(Preprotech; cat. Number 315-23; Lot. 0711S527); 10 ng/㎖ 쥣과 EGF(Preprotech; cat. Number 315-09; Lot. 0217179-1])가 보충된 2 ㎖ 윌리엄(William's) E 배지(Life Technologies; cat. Number 22551089) 중에 재현탁한다. 6 ㎖의 매트리겔(Corning; cat. Number 354277; Lot: 5187006)을 세포/배지 용액에 첨가하고, 이에 따라 최종 세포 농도는 25% 배양 배지 및 75% 매트리겔 중 1 ㎖ 당 150만 개 HPC이다. 5 ㎕(㎕)의 세포/매트리겔 현탁액을 Star 디스펜서(Hamilton)를 사용해서 투명 바닥 96웰 검정 플레이트(Corning; cat. Number 356649)의 각 웰로 옮긴다. 37℃ 및 5% $CO_2$에서 20분 인큐베이션하여 매트리겔 중합을 허용한 후, 45 ㎕의 세포 배양 배지를 상부에 분배한

다.

[3138] 화합물원 플레이트에, 300 ㎕의 세포 배양 배지를 90% DMSO 중 용해된 1.2 ㎕의 화합물 상에 분배한다. 적절한 혼합 후, 50 ㎕의 화합물 용액을 CyBi 웰(CyBio)을 사용하여 검정 플레이트로 옮긴다. 각 농도 간에 3.16의 희석 인자를 갖는 8-지점 농도 곡선에서 각각의 화합물을 평가한다. 평가된 최대 화합물 농도는 20 μM이고 최저 농도는 9 nM이다. 검정 플레이트를 37℃ 및 5% $CO_2$에서 4일 동안 인큐베이션한다.

[3139] 인큐베이션 후, 기관유사체를 4% 파라포름알데하이드(Electron Microscopy Sciences; cat. Number 15714-S)를 함유하는 인산염 완충 식염수(PBS)(Gibco; cat. Number 10010-015)로 고정하고 스톡 용액의 1/5000로 희석된 Hoechst 33342(Life Technologies; cat. Number H3570)로 핵을 염색한다. 플레이트를 실온에서 90분 인큐베이션하고 1% 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 300 ㎕ PBS로 1회 세척한다.

[3140] 명(bright) 시야 램프(램프 파워: 10%; 노출 시간: 20 ms) 및 405나노미터 레이저(레이저 파워: 100%; 노출 시간 200 ms)를 사용해서 10배 확대하여 CV7000 이미지화 장치(Yokogawa)로 플레이트를 이미지화한다. 웰 당 4개의 상이한 이미지를 입수해서 Yokogawa 이미지 분석 소프트웨어(YAS)로 분석하였다. 기관유사체 크기를 결정하기 위해 사용된 출력 속성은 웰 당 평균을 낸, 기관유사체 당 평균 핵 수이다. 하기 계산식을 사용해서, 기관유사체 당 평균 핵 수(x)를 중성 대조군 처리(DMSO)에 대해 정상화한다: [xn = +100 (x - NC) / NC]. 중성 대조군-정상화 데이터를 자동화 곡선 피팅을 위해 사용하여 EC50 값을 포함하는 화합물 당 곡선 파라미터를 유도한다.

[3141] 마우스 간 선조 세포 증식 검정은 화합물이 간 선조 세포 증식의 유도에서 효과적인지 여부를 평가하기 위해 쉽게 사용될 수 있다. 본 발명의 소정 화합물을 마우스 간 선조 세포 증식 검정에서 평가하였고, 20 μM 미만의 $EC_{50}$ 값을 가짐을 확인하였고, 예컨대 실시예 48a 및 58은 각각 0.26 및 0.84 μM의 $EC_{50}$ 값을 갖는 것으로 확인되었다. 본 발명의 다른 소정 화합물을 마우스 간 선조 세포 증식 검정에서 평가하였고, 20 μM 초과의 $EC_{50}$ 값을 가짐을, 예컨대 실시예 303에서 확인하였다.

[3142] **실시예 A6 : pYAP HTRF 검정(HaCaT 세포)**

[3143] 제조업체의 지침에 따라 포스포-YAP(SER127) 10000 평가 키트(CisBio, 카탈로그 번호 64YAPPEH)를 사용해서 pYAP HTRF 검정을 수행하였다. 간략하게, HaCaT 세포를 페니실린-스트렙토마이신-글루타민과 함께 DMEM(페놀 레드 비함유) + 10% FBS 중 $1.1\times10^6$ 세포/㎖로 현탁하였다. 5 ㎕의 세포를 1536웰 불투명 흰색 바닥, 조직 배양 처리 플레이트 내로 분배하고(5500 세포/웰), 37℃에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. 50 nL 평가 화합물을 Pintool(GNF)을 사용하여 HaCaT 세포 함유 검정 플레이트 내로 옮기고 2시간 동안 인큐베이션하였다. 용해 완충액(CisBio)을 검정 웰로 첨가하고 실온에서 5분 동안 인큐베이션한 후, 2 ㎕ 검출 항체(각각 pYAP d2 ab 및 pYAP 크립테이트 항체 스톡의 1:40 희석물)를 첨가하였다. 플레이트를 금속 뚜껑으로 덮어 실온에서 하룻밤 동안(20 hr) 인큐베이션하였다. 플레이트를 HTRF에 대해 Pherastar(BMG Labtech) 상에서 판독하였다(665 nm/620 nm). 화합물의 효과가 HTRF 신호를 50% 만큼 감소시킬 때 $IC_{50}$를 측정한다. 결과를 표 1C에 나타낸다.

[3144] **실시예 A7: YAP 전위 검정(HaCaT 세포)**

[3145] 페니실린-스트렙토마이신-글루타민과 함께 DMEM+10% FBS 중에 HaCaT 세포를 0.4×106 세포/㎖로 현탁하였다. 50 ㎕의 세포를 384웰 투명 바닥 검정 플레이트 내로 분배하고(20,000 세포/웰), 37℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 100 nL 평가 화합물을 ECHO(Labcyte)를 사용하여 HaCaT 세포 함유 검정 플레이트 내로 옮겼다. 37℃에서 24시간 인큐베이션 후, 7 ㎕의 32% PFA를 각 웰 내로 분배하고 실온에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS로 3회 세척하고, 웰 당 20 ㎕의 PBS를 남긴 후, PBS 중 0.1% Triton 및 1.5% BSA로 실온에서 45분 동안 처리하였다. 플레이트를 PBS로 5회 세척하고, 웰 당 20 ㎕의 PBS를 남겼다. 20 ㎕의 1:1000 일차 YAP ab(Santa Cruz Biotechnology, 카탈로그 번호 63.7) 및 1.5% BSA 함유 PBS 중 1:1500 Draq5를 각 웰에 첨가하고 실온에서 4 hr 동안 인큐베이션하였다. 3회 PBS 세척 후, 웰 당 20 ㎕의 PBS를 남기고, 각 웰을 실온에서 4 hr 동안 20 ㎕의 1:2000 AlexaFluor 488_A21202 이차 항체(Molecular Probes)와 인큐베이션하였다. 플레이트를 PBS로 3회 더 세척하고, 밀봉하고, 하이-콘텐츠 Opera 이미지화 시스템(PerkinElmer) 상에 이미지화하였다. 결과를 표 1C에 나타낸다.

[3146] [표 1C]

YAP 인산화 및 YAP 핵 전위의 억제제

| 실시예 번호 | HaCaT pYAP $IC_{50}$ (μM) | HaCaT 핵 전위 $EC_{50}$ (μM) | | 실시예 번호 | HaCaT pYAP $IC_{50}$ (μM) | HaCaT 핵 전위 $EC_{50}$ (μM) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0.019 | 0.326 | | 117 | 2.31 | 4.47 |
| 2 | 0.067 | 0.584 | | 118 | 2.05 | 5.01 |
| 3 | 0.853 | 0.641 | | 119 | n.d. | 5.18 |
| 4 | 1.15 | 2.53 | | 120 | 2.14 | 2.93 |
| 5 | 2.19 | 2.48 | | 121 | n.d. | 8.17 |
| 6 | 1.24 | 1.70 | | 122 | 7.4 | 5.8 |
| 7 | 0.165 | 0.733 | | 123 | 9.45 | 9.2 |
| 8 | 0.198 | 1.20 | | 124 | 8.01 | 12.0 |
| 9 | 2.10 | 2.42 | | 125 | n.d. | 8 |
| 10 | 2.96 | 3.55 | | 126 | n.d. | >20 |
| 11 | 0.646 | 1.43 | | 127 | n.d. | >20 |
| 12 | 1.15 | 1.75 | | 128 | n.d. | >20 |
| 13 | 13.45 | 8.51 | | 129 | n.d. | >20 |

[3147]

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 14 | 7.31 | 4.25 | | 130 | n.d. | >20 |
| 15 | 0.66 | 3.48 | | 131 | n.d. | >20 |
| 16 | 9.79 | 15.8 | | 132 | n.d. | >20 |
| 17 | 0.606 | 2.63 | | 133 | 0.414 | 1.67 |
| 17a | 4.95 | 4.1 | | 134 | 0.539 | 1.19 |
| 17b | 0.765 | 1.22 | | 135 | 0.488 | 0.85 |
| 17c | 4.28 | 4.68 | | 136 | 1.14 | 2.96 |
| 17d | 0.402 | 1.72 | | 137 | 35.5 | >17.8 |
| 18 | 1.52 | 3.46 | | 138 | 3.37 | 9.07 |
| 19 | 24.8 | 17.6 | | 139 | 0.38 | 2.66 |
| 20 | 1.77 | 5.18 | | 140 | 1.24 | 2.26 |
| 21 | 19.2 | 8.81 | | 141 | 13.56 | >10 |
| 22 | 11.4 | 13.0 | | 142 | >100 | >28.02 |
| 23 | 9.58 | 11.8 | | 143 | >10 | >20 |
| 24 | 34.7 | 33.1 | | 144 | 0.606 | 4.44 |
| 25 | n.d. | >20 | | 145 | >100 | 9.31 |
| 26 | 54.6 | >100 | | 146 | n.d. | >20 |
| 27 | n.d. | >14.4 | | 147 | >10 | >20 |
| 28 | n.d. | >20 | | 148 | n.d. | >20 |
| 29 | n.d. | >20 | | 149 | >10 | >20 |
| 30 | n.d. | >20 | | 150 | n.d. | n.d. |
| 31 | n.d. | >20 | | 151 | n.d. | n.d. |
| 32 | >10 | >20 | | 152 | n.d. | >20 |
| 33 | >20 | >20 | | 153 | >10 | >20 |
| 34 | n.d. | >20 | | 154 | 2.53 | 1.06 |
| 35 | n.d. | >20 | | 155 | 1.58 | 1.05 |
| 36 | n.d. | >20 | | 156 | >100 | 90.1 |
| 37 | n.d. | >6.67 | | 157 | 4.05 | 3.78 |
| 38 | >10 | >20 | | 158 | 11.2 | 6.29 |
| 39 | n.d. | >11.6 | | 159 | >10 | >20 |
| 40 | >10 | >20 | | 160 | 6.8 | >20 |
| 41 | >10 | >20 | | 161 | >100 | >20 |
| 42 | n.d. | 11.6 | | 162 | n.d. | >20 |

[3148]

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 43 | n.d. | >20 | | 163 | n.d. | >20 |
| 44 | >10 | >20 | | 164 | n.d. | >20 |
| 45 | n.d. | >20 | | 165 | n.d. | >20 |
| 46 | n.d. | >20 | | 166 | n.d. | 8.45 |
| 47 | 0.55 | 1.31 | | 167 | n.d. | >20 |
| 48a | 0.37 | 0.80 | | 168 | 26.5 | 11.6 |
| 48b | 7.25 | 7.22 | | 169 | n.d. | n.d. |
| 49 | 0.607 | 1.17 | | 170 | >10 | >20 |
| 50 | 17.0 | 3.81 | | 171 | n.d. | 17.2 |
| 51 | 57.8 | 4.39 | | 172 | >10 | >20 |
| 52 | 11.3 | >20 | | 173 | n.d. | >20 |
| 53 | n.d. | >20 | | 174 | >10 | >20 |
| 54 | n.d. | >20 | | 175 | >10 | >20 |
| 55 | >10 | >20 | | 176 | n.d. | >20 |
| 56 | >10 | >20 | | 177 | n.d. | >20 |
| 57 | n.d. | >20 | | 178 | n.d. | >20 |
| 58 | 0.185 | 0.302 | | 179 | >10 | >20 |
| 59 | 0.019 | 0.341 | | 180 | >10 | >20 |
| 60 | n.d. | 0.44 | | 181 | n.d. | >10 |
| 61 | 0.141 | 0.517 | | 182 | n.d. | >20 |
| 62 | 0.040 | 0.538 | | 183 | n.d. | >20 |
| 63 | 0.131 | 0.338 | | 184 | 2.51 | 2.81 |
| 64 | 0.063 | 0.479 | | 185 | n.d. | 11.5 |
| 65 | 0.895 | 1.99 | | 186 | n.d. | >20 |
| 66 | 0.534 | 1.01 | | 187 | >100 | >20 |
| 67 | n.d. | 0.685 | | 188 | >100 | 12.0 |
| 68 | 1.23 | 3.39 | | 189 | n.d. | >10 |
| 68a | 1.43 | 1.68 | | 190 | n.d. | >20 |
| 68b | 4.27 | 2.92 | | 191 | n.d. | n.d. |
| 69 | 4.72 | 11.5 | | 192 | >10 | >20 |
| 70 | 0.422 | 1.68 | | 193 | n.d. | n.d. |
| 71 | 0.026 | 1.57 | | 194 | 11.3 | 4.24 |
| 72 | 1.17 | 3.65 | | 195 | n.d. | n.d. |

[3149]

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 73 | 9.07 | 8.26 | | 196 | >10 | >20 |
| 74 | 3.4 | 12.7 | | 197 | n.d. | n.d. |
| 75 | 3.8 | 6.91 | | 198 | 2.18 | 3.23 |
| 76 | 6.42 | 9.41 | | 199 | n.d. | 9.1 |
| 77 | >100 | 13.4 | | 251 | 1.96 | 10.87 |
| 78 | 12.1 | 14.3 | | 252 | 6.98 | >10 |
| 79 | 0.765 | 3.87 | | 253 | 16.67 | >20 |
| 80 | 21.6 | 12.9 | | 254 | 2.91 | 4.63 |
| 81 | 42.8 | 17.0 | | 255 | 3.18 | 5.39 |
| 82 | >100 | >20 | | 256 | 11.07 | 15.6 |
| 83 | 42.1 | 28.2 | | 257 | n.d. | >20 |
| 84 | 65.2 | >20 | | 258 | n.d. | 9.92 |
| 85 | 31.0 | 9.81 | | 259 | n.d. | 17.31 |
| 86 | 56.0 | >20 | | 260 | n.d. | >20 |
| 87 | 51.6 | >20 | | 261 | 0.202 | 1.22 |
| 88 | 69.8 | 29.3 | | 262 | n.d. | 0.311 |
| 89 | >100 | >100 | | 263 | 3.22 | 5.99 |
| 90 | n.d. | >20 | | 264 | 14.8 | 11.2 |
| 91 | >10 | >20 | | 265 | 22.3 | >20 |
| 92 | n.d. | >20 | | 266 | n.d. | 5.35 |
| 93 | n.d. | >20 | | 267 | 7.19 | 9.75 |
| 94 | n.d. | >20 | | 268 | n.d. | >20 |
| 95 | >10 | >20 | | 269 | 0.294 | 0.438 |
| 96 | n.d. | >20 | | 270 | 0.423 | 0.873 |
| 97 | n.d. | >20 | | 271 | 0.187 | 1.07 |
| 98 | n.d. | n.d. | | 272 | 3.51 | 5.97 |
| 99 | 0.113 | 0.606 | | 273 | >100 | >20 |
| 100 | 11.6 | 4.83 | | 274 | n.d. | 17.3 |
| 101 | 5.4 | >20 | | 275 | n.d. | 15.1 |
| 102 | n.d. | n.d. | | 276 | n.d. | >20 |
| 103 | 2.64 | 2.27 | | 277 | n.d. | >20 |
| 104 | 2.6 | 5.19 | | 278 | n.d. | >20 |
| 105 | 19.9 | >20 | | 279 | n.d. | >20 |

[3150]

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 106 | 14.2 | >20 | | 280 | 0.476 | 2.73 |
| 107 | 31.2 | 20.0 | | 281 | 0.656 | 2.89 |
| 108 | 11.8 | >19.3 | | 282 | 8.27 | 11.32 |
| 109 | 0.977 | 4.71 | | 283 | 8.25 | 14.19 |
| 110 | 2.97 | 15.29 | | 284 | 46.46 | >41.19 |
| 111 | 0.33 | 2.70 | | 285 | n.d. | >20 |
| 112 | 1.21 | 3.52 | | 286 | n.d. | >20 |
| 113 | n.d. | >20 | | 287 | 2.99 | 3.88 |
| 114 | 0.565 | 1.33 | | 288 | 18.3 | 7.42 |
| 115 | 1.05 | 1.66 | | 289 | 34.1 | 6.50 |
| 116 | 0.782 | 2.18 | | 290 | n.d. | 1.39 |

[3151]

[3152] n.d.는 결정되지 않음을 의미함

[3153] **실시예 A8:** 표적 확인

[3154] MST1/2 또는 LATS1/2에 대한 siRNA를 인간 HaCaT 세포 내로 전달감염시켰다. 48시간 후, 세포를 2시간 동안 1 μM 오카다산으로 처리하여 pYAP 신호를 증강시켰다. 세포 용해액으로 후술되는 pYAP(Ser127)에 대한 웨스턴 블롯 분석을 거쳤다. 실험 결과를 도 33a 내지 33c에 보고한다.

[3155] 웨스턴 블롯 분석

[3156] 세포 용해액(레인 당 25 ㎍)을 XT 샘플 완충액 및 환원제(Bio-Rad)와 혼합하고, 4~12% 구배 SDS 등급 프리캐스트 겔(Bio-Rad)에 의해 분리하고, 니트로셀룰로스 막(Bio-Rad)으로 옮겼다. 증강 화학발광 키트(ThermoFisher)를 사용하여 일차 항체 및 홀스래디쉬 퍼옥시다제-콘주게이션된 이차 항체로 단백질을 검출하였다. 사용된 일차 항체는 항-pYAP 항체(Cell Signaling, 카탈로그 번호 13008S) 및 항 액틴 항체(Abcam, 카탈로그 번호 ab8227)였다.

[3157] **실시예 A9:** 생체내 약력학(PD)

[3158] 8~10주령 수컷 C57BL6 마우스(Envigo)를 생체내 PD 연구를 위해 사용하였다. 멸균 수술용 6 ㎜ 펀치 생검 툴을 사용해서 마취된 마우스의 등에 2개의 전체-두께 절개 상처를 만들었다. LATS 억제제를 49.5% 프로필렌 글리콜/0.5% Tween80/49% PBS/1% HPMC 중에 제형화하고, 3 ㎕의 투여 용량으로 국소 투여하였다. 상처 영역을 접착 드레싱(Tegaderm)으로 커버했다. 이어서 동물을 자가-접착성 밴드로 랩핑했다. 2회의 1일 용량 후, 최종 투여 7시간 후 상처 테두리 주변의 피부 샘플(2 ㎜ 고리-형상 샘플)을 가위를 사용해서 수집하였다.

[3159] 제조업체의 지침에 따라, RNeasy 키트(Qiagen)를 사용해서 수확된 샘플로 RNA 추출을 거쳤다. PTC-200 peltier 열 사이클러(MJ Research) 및 ABI PRISM 7900HT 서열 검출 시스템(Applied Biosystems) 상에서 2-단계 TaqMan RT-PCR 분석을 수행하였다. 제조업체의 지침에 따라 High-Capacity cDNA Archive 키트(Applied Biosystems)를 사용해서 cDNA를 합성하였다. 제조업체의 지침에 따라 TaqMan Universal Master 혼합물(Applied Biosystems) 및 *Cyr61* 및 *Gapdh* 프로브(Applied Biosystems)를 사용하여 TaqMan 분석을 수행하였다. 표적 유전자에 대한 mRNA 발현 수준을 *Gapdh* mRNA 수준에 대해 정상화하고 SDS 2.0 소프트웨어(Applied Biosystems)를 사용해서 데이터를 분석하여 상대 RNA 양을 계산하였다.

[3160] 모든 동물 연구는 GNF(the Genomics Institute of the Novartis Research Foundation)에서 수행하였다. 실험 프로토콜은 동물 복지 규제를 준수하였고 GNF의 기관 동물 케어 및 사용 위원회의 승인을 받았다.

[3161] 평가 화합물 농도 대비 생성된 상대 *Cyr61*/*Gapdh* 발현 수준을 도 34에서 막대 그래프로 도식화하였다.

[3162] **실시예 A10: 생체내 조직학 및 Ki67 염색**

[3163] 7주령 수컷 C57BL6 마우스를 생체내 조직학 연구를 위해 사용하였다. LATS 억제제를 70% PG/30% EtOH 중에 제형화하고, 면도한 등 표면에 25 ㎕의 투여 용량(투여량 당 250 ㎍)으로 국소 투여하였다. 1일 2회 투여 3일 후, 피부 샘플을 수집하고, Ki67에 대한 면역-조직학 염색(ThermoFisher Scientific, 카탈로그 번호 RM-9106)을 거쳤다. 섹션을 시각적으로 관찰하고, Ki67 양성 세포를 사내 이미지화 알고리즘에 의해 계수하였다. Ki67 염색의 대표 현미경 사진을 도 35a에 나타낸다. 미처리 및 처리 마우스 피부 세포에서 Ki67 양성 세포의 존재율을 도 35b에서 산란도로 도식화하였다.

[3164] **실시예 A11: pYAP HTRF 검정(JHH-5 세포)**

[3165] 제조업체의 지침에 따라 포스포-YAP(Ser127) 50000 평가 키트(CisBio 카탈로그 번호 64YAPPEI)로 분석되는 화합물-처리 JHH-5 세포(Fujise et al., Hepatogastroenterology. 1990 Oct;37(5):457-60)를 사용하여 pYAP HTRF 검정을 수행한다. 간략하게, 10%(v/v) 열-불활성화 우태 혈청(Thermo Fisher Scientific Gibco 카탈로그 번호 16140071) 및 각각 100 U/㎖ 페니실린-스트렙토마이신(Thermo Fisher Scientific Gibco 카탈로그 번호 15140122)이 보충된 페놀-레드 비함유 윌리엄 E 배지(Thermo Fisher Scientific Gibco 카탈로그 번호 A1217601) 중에 JHH-5 세포를 0.48×10^6 세포/㎖로 현탁한다. 세포를 384웰 투명 바닥 배양 플레이트(50 ㎕/웰, 웰 당 24000개 세포, Greiner 카탈로그 번호 781091) 내로 분배하고, 37℃에서 세포 배양 인큐베이터에서 24시간 동안 인큐베이션한다. 평가 화합물을 Echo550(Labcyte) 어쿠스틱 분배장치(50 nl/웰)를 사용하여 JHH-5 세포 함유 배양 플레이트 내로 옮긴 후 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션한다. 용해 완충액(CisBio 키트 카탈로그 번호 64YAPPEI의 일부)을 4-배 농축액으로(16 ㎕/웰에 대응함) 검정 플레이트에 첨가하고 진탕하며 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 용해액을 배양 플레이트에서 흰색 저용량 384웰 검정 플레이트(12 ㎕/웰, Greiner 카탈로그 번호 784075) 내로 옮긴 후, 3 ㎕/웰의 검출 항체(CisBio 키트 카탈로그 번호 64YAPPEI의 일부: 각각의 pYAP d2 항체 및 pYAP 크립테이트 항체 스톡의 1:40 희석물)를 첨가한다. 플레이트를 밀봉하고 실온

에서 하룻밤 동안(18시간) 차광하며 인큐베이션한다. 플레이트를 665 nm 및 620 nm의 방출 파장에서 EnVision 플레이트 판독장치(Perkin Elmer) 상에서 판독한다. 웰 당 HTRF 신호 비율 x는 제조업체의 프로토콜에 명시된 바와 같이 [x=신호(665 nm)/신호(620 nm)×10000]으로 계산된다. 웰 당 신호 비율 x를 활성 대조군 및 중성 대조군 처리(DMSO)에 대해 정상화하고, 중앙값 NC를 0%로 및 중앙값 AC를 -100%로 스코어링하여 웰 당 정상화된 신호 비율 xn을 [xn = ±100 (x - NC) / (AC - NC)]로 계산한다. 대조군-정상화된 데이터를 자동화 곡선 피팅을 위해 사용하여, $IC_{50}$을 포함하는 화합물 당 곡선 파라미터를 유도한다. 예시된 화합물에 대해 JHH-5 세포에서의 pYAP $IC_{50}$ 값을 표 1D에 나타낸다.

[3166] [표 1D]

**JHH5 세포에서 YAP의 인산화 억제**

| 실시예 번호 | JHH-5 pYAP $IC_{50}$ (μM) | 실시예 번호 | JHH-5 pYAP $IC_{50}$ (μM) |
|---|---|---|---|
| 1 | | 150 | n.d. |
| 2 | > 10 | 151 | n.d. |
| 3 | 1.0 | 152 | n.d. |
| 4 | > 10 | 153 | n.d. |
| 5 | 2.3 | 154 | n.d. |
| 6 | 2.6 | 155 | 2.6 |
| 7 | 1.6 | 156 | n.d. |
| 8 | 1.9 | 157 | 9.2 |
| 9 | n.d. | 158 | n.d. |
| 10 | 8.7 | 159 | n.d. |
| 11 | n.d. | 160 | n.d. |
| 12 | 2.9 | 161 | n.d. |
| 13 | n.d. | 162 | n.d. |
| 14 | > 10 | 163 | n.d. |
| 15 | 4.1 | 164 | n.d. |
| 16 | n.d. | 165 | n.d. |
| 17 | n.d. | 166 | n.d. |
| 18 | n.d. | 167 | n.d. |
| 19 | n.d. | 168 | n.d. |
| 20 | n.d. | 169 | n.d. |
| 21 | n.d. | 170 | n.d. |
| 22 | n.d. | 171 | n.d. |
| 23 | n.d. | 172 | n.d. |
| 24 | n.d. | 173 | n.d. |
| 25 | n.d. | 174 | n.d. |
| 26 | n.d. | 175 | n.d. |
| 27 | n.d. | 176 | n.d. |
| 28 | n.d. | 177 | n.d. |
| 29 | n.d. | 178 | n.d. |
| 30 | > 10 | 179 | n.d. |
| 31 | n.d. | 180 | n.d. |

[3167]

| | | | |
|---|---|---|---|
| **32** | n.d. | **181** | n.d. |
| **33** | n.d. | **182** | n.d. |
| **34** | n.d. | **183** | n.d. |
| **35** | n.d. | **184** | 6.5 |
| **36** | n.d. | **185** | n.d. |
| **37** | n.d. | **186** | n.d. |
| **38** | n.d. | **187** | n.d. |
| **39** | n.d. | **188** | n.d. |
| **40** | > 10 | **189** | n.d. |
| **41** | n.d. | **190** | n.d. |
| **42** | n.d. | **191** | n.d. |
| **43** | n.d. | **192** | n.d. |
| **44** | n.d. | **193** | n.d. |
| **45** | n.d. | **194** | n.d. |
| **46** | n.d. | **195** | n.d. |
| **47** | n.d. | **196** | n.d. |
| **48a** | 0.6 | **197** | n.d. |
| **48b** | n.d. | **198** | 1.3 |
| **49** | 1.6 | **199** | 3.2 |
| **50** | > 10 | **251** | 1.5 |
| **51** | n.d. | **252** | n.d. |
| **52** | n.d. | **253** | n.d. |
| **53** | n.d. | **254** | 1.3 |
| **54** | n.d. | **255** | 7.1 |
| **55** | n.d. | **256** | > 10 |
| **56** | n.d. | **257** | > 10 |
| **57** | n.d. | **258** | > 10 |
| **58** | 0.6 | **259** | n.d. |
| **59** | 1.1 | **260** | n.d. |
| **60** | n.d. | **261** | 0.6 |
| **61** | 1.4 | **262** | n.d. |
| **62** | 0.6 | **263** | > 10 |
| **63** | n.d. | **264** | > 10 |

[3168]

| | | | |
|---|---|---|---|
| **64** | 2.1 | **265** | > 10 |
| **65** | 5.8 | **266** | n.d. |
| **66** | 6.2 | **267** | 5.9 |
| **67** | n.d. | **268** | > 10 |
| **68** | 3.5 | **269** | 0.8 |
| **69** | n.d. | **270** | 0.8 |
| **70** | 4.0 | **271** | 0.8 |
| **71** | > 10 | **272** | 8.1 |
| **72** | 4.6 | **273** | > 10 |
| **73** | n.d. | **274** | > 10 |
| **74** | n.d. | **275** | > 10 |
| **75** | n.d. | **276** | > 10 |
| **76** | n.d. | **277** | n.d. |
| **77** | n.d. | **278** | n.d. |
| **78** | n.d. | **279** | n.d. |
| **79** | 2.1 | **280** | 3.8 |
| **80** | n.d. | **281** | 5.9 |
| **81** | n.d. | **282** | n.d. |
| **82** | n.d. | **283** | > 10 |
| **83** | n.d. | **284** | n.d. |
| **84** | > 10 | **285** | n.d. |
| **85** | > 10 | **286** | n.d. |
| **86** | n.d. | **287** | 9.0 |
| **87** | n.d. | **288** | n.d. |
| **88** | n.d. | **289** | n.d. |
| **89** | n.d. | **290** | 3.0 |
| **90** | n.d. | **291** | n.d. |
| **91** | n.d. | **292** | n.d. |
| **92** | n.d. | **293** | n.d. |
| **93** | n.d. | **294** | 1.1 |
| **94** | n.d. | **295** | > 10 |
| **95** | n.d. | **296** | n.d. |
| **96** | n.d. | **297** | > 10 |

[3169]

| | | | |
|---|---|---|---|
| **97** | n.d. | **298** | n.d. |
| **98** | n.d. | **299** | n.d. |
| **99** | 5.7 | **300** | 0.9 |
| **100** | n.d. | **301** | > 10 |
| **101** | 3.3 | **302** | n.d. |
| **102** | n.d. | **303** | > 10 |
| **103** | n.d. | **304** | > 10 |
| **104** | n.d. | **305** | n.d. |
| **105** | n.d. | **306** | 1.0 |
| **106** | n.d. | **307** | 1.3 |
| **107** | n.d. | **308** | > 10 |
| **108** | n.d. | **309** | 2.0 |
| **109** | 1.5 | **310** | n.d. |
| **110** | 1.5 | **311** | n.d. |
| **111** | 2.4 | **312** | 7.7 |
| **112** | 3.2 | **313** | 7.8 |
| **113** | n.d. | **314** | n.d. |
| **114** | n.d. | **315** | 5.7 |
| **115** | 3.4 | **316** | n.d. |
| **116** | 2.2 | **317** | 3.2 |
| **117** | > 10 | **318** | 3.1 |
| **118** | 4.0 | **319** | > 10 |
| **119** | n.d. | **320** | 1.0 |
| **120** | n.d. | **321** | n.d. |
| **121** | n.d. | **322** | n.d. |
| **122** | 8.0 | **323** | n.d. |
| **123** | n.d. | **324** | n.d. |
| **124** | n.d. | **325** | n.d. |
| **125** | n.d. | **326** | n.d. |
| **126** | n.d. | **327** | n.d. |
| **127** | n.d. | **328** | n.d. |
| **128** | n.d. | **329** | n.d. |
| **129** | n.d. | **330** | n.d. |

[3170]

| | | | |
|---|---|---|---|
| **130** | n.d. | **331** | n.d. |
| **131** | n.d. | **332** | n.d. |
| **132** | n.d. | **333** | n.d. |
| **133** | 1.7 | **334** | n.d. |
| **134** | 1.0 | **335** | n.d. |
| **135** | n.d. | | |
| **136** | 1.3 | | |
| **137** | n.d. | | |
| **138** | n.d. | | |
| **139** | 1.7 | | |
| **140** | 2.2 | | |
| **141** | n.d. | | |
| **142** | n.d. | | |
| **143** | n.d. | | |
| **144** | n.d. | | |
| **145** | n.d. | | |
| **146** | n.d. | | |
| **147** | n.d. | | |
| **148** | n.d. | | |
| **149** | n.d. | | |

[3171]

[3172] n.d. 결정되지 않음을 의미함

[3173] **실시예 A12: YAP 핵 전위 검정(JHH-5 세포)**

[3174] 항-YAP1 항체 염색에 이어 하이-콘텐츠 이미지화로 분석되는 화합물-처리 JHH-5 세포를 사용하여 YAP 핵 전위 검정을 수행한다(Fujise et al., Hepatogastroenterology. 1990 Oct;37(5):457-60). 간략하게, 10%(v/v) 열-불활성화 우태 혈청(Thermo Fisher Scientific Gibco 카탈로그 번호 16140071) 및 각각 100 U/㎖ 페니실린-스트렙토마이신(Thermo Fisher Scientific Gibco 카탈로그 번호 15140122)이 보충된 페놀-레드 비함유 윌리엄 E 배지(Thermo Fisher Scientific Gibco 카탈로그 번호 A1217601) 중에 JHH-5 세포를 0.48×10^6 세포/㎖로 현탁한다. 세포를 384웰 투명 바닥 배양 플레이트(50 ㎕/웰, 웰 당 24000개 세포, Greiner 카탈로그 번호 781091) 내로 분배하고, 37℃에서 세포 배양 인큐베이터에서 24시간 동안 인큐베이션한다. 평가 화합물을 Echo550(Labcyte) 어쿠스틱 분배장치(50 nl/웰)를 사용하여 JHH-5 세포 함유 배양 플레이트 내로 옮긴다. 37℃에서 4시간 인큐베이션 후, 12.5 ㎕의 20% PFA 스톡 용액(Electron Microscopy Sciences 카탈로그 번호 15713S)을 4%(v/v)의 최종 농도로 각 웰 내로 분배하고 실온에서 20분 동안 인큐베이션한다. 플레이트를 TBS(10-배 농축물로부터 제조, Sigma Aldrich 카탈로그 번호 T5912)로 세척한 후 DPBS 중 0.1%(v/v) Triton X-100 용액(Sigma Aldrich 카탈로그 번호 93443)으로 실온에서 15분 동안 투과화한다. 플레이트를 TBS로 다시 세척한 후 항-YAP1 항체(Novus Biologicals 카탈로그 번호 NB110-58358)를 각각의 웰에 DPBS 중 3%(w/v) BSA(35% 스톡 용액, Sigma Aldrich 카탈로그 번호 A7979로부터 제조)에서 1:500의 희석도로 첨가하고 4℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션한다. 일차 항체 용액의 제거 및 TBS로의 세척 후, 각 웰을 1:10000의 희석도로 Hoechst 33342 용액(Thermo Fisher Scientific 카탈로그 번호 3570)이 보충된 DPBS 중 3%(w/v) BSA(35% 스톡 용액, Sigma Aldrich 카탈로그 번호 A7979로부터 제조)에서 Alexa Fluor 647에 콘주게이션된 염소 항-토끼 이차 항체(Thermo Fisher Scientific 카탈로그 번호 A-21244)의 1:1000 희석물과 함께 실온에서 2시간 동안 인큐베이션한다. 플레이트를 TBS로 다시 세척한 후 밀봉하고 IN Cell Analyzer 하이-콘텐츠 분석 시스템(GE Healthcare Life Sciences) 상에서 이미지화한다. CellProfiler 이미지 분석 소프트웨어(Carpenter et al., Genome Biol. 2006;7(10):R100)를 사용해서 Hoechst 핵 염색 대 총 세포내 YAP Alexa Flour 647 염색을 비교하여, 핵 YAP에 대응하는 신호를 유도한다. 핵 YAP 신호 x를 활성 대조군 및 중성 대조군 처리(DMSO)에 대해 정상화하고, 중앙값 NC를 0%로 및 중앙값 AC를 +100%로 스코어링하여 웰 당 정상화된 핵 YAP 신호 xn을 [xn = ±100 (x - NC) / (AC - NC)]로 계산한다. 대조군-정상화 데이터를 자동화 곡선 피팅을 위해 사용하여 $EC_{50}$ 값을 포함하는 화합물 당 곡선 파라미터를 유도하였다.

[3175] **실시예 A13: 마우스의 생체내 처리**

[3176] 모든 동물 연구를 연구 실험실 동물의 사용을 규제하는 연방, 주, 현지 및 기관 가이드라인에 따라 수행하였다.

수컷 C57BL/6J 마우스(8~10주령)를 Jackson Labs(Bar Harbor, ME)에서 구매하였다. 실시예 46을 3 mg/㎖로 경구 투여를 위해 제형화하였고, 실시예 261을 메틸셀룰로스:Tween80:물(0.5:0.5:99)의 현탁액 중 1 mg/㎖로 제형화하였다. 어느 한 화합물의 단회 경구 용량은 10 ㎖/체중kg이었다. 혈액 및 간 조직을 투여 2 h 후(mRNA 분석을 위해) 또는 투여 24 h 후(면역조직화학을 위해) 심층 마취(이소플루란) 하에 수집하였다.

[3177] 간 조직에서의 포스포-YAP(pYAP) HTRF

[3178] 냉동 간 조직을 Phosphosafe 추출 완충액(Novagen, cat# 71296-3) 중 프로테아제 억제제(Sigma-Aldrich, cat# P8340)의 1:50 용액을 함유하는 용해 매트릭스 튜브(MP, cat# 6913-500) 내로 옮기고 FastPrep-24(MP biomedicals)를 사용하여 균질화하였다. 혼합물을 20분 동안 얼음 상에 유지한 후 20분 동안 14000 rpm에서 원심분리하였다. 상청액을 새 튜브로 옮겼다. 단백질 농도를 제조업체의 프로토콜에 따라 BCA 단백질 검정 키트(Pierce cat. 23227)를 사용하여 측정하였다. 모든 샘플을 총 용량 180 ㎕의 Phosphosafe 중 5 ㎍/㎕의 최종 농도로 정상화하고 HTRF 검정을 위해 96웰 플레이트에 플레이팅하였다. 포스포-YAP(SER127) 50000 평가 키트(Cisbio, 카탈로그 번호 64YAPPEI)를 사용해서 HTRF에 의해 pYAP을 검정하였다. 추출 완충액 단독(Phosphosafe) 또는 Phosphosafe와 HTRF 용해 완충액(Cisbio)의 1:1 혼합물 중 마우스 간 용해액을 384-웰 검정 플레이트의 2개씩의 웰에서 검정하였다(12 ㎕/웰). 총 단백질 함량(웰 당 샘플 당 30~60 ㎍)을 기준으로, 각 샘플에 대해 동일한 입력량을 사용하였다. 플레이트를 밀봉하고 차광하며 실온에서 하룻밤(18 hr) 동안 인큐베이션한 후, 검출 완충액(Cisbio) 중 각각 1:40으로 희석된 검출 항체 포스포-YAP d2 및 포스포-YAP 크립테이트를 첨가하였다(3 ㎕/웰, 각각의 항체에 있어서 최종 희석도 1:200). 플레이트를 665 nm & 620 nm의 방출 파장으로 EnVision(PerkinElmer) 상에서 판독하였다. HTRF 신호 비율을 제조업체의 프로토콜에 명시된 바와 같이 신호(665 nm)/신호(620 nm)) × 10000으로 계산하였다. 하나의 HTRF 신호 값(2개 웰의 평균)을 치료군 그래프에서 각각의 용해액 샘플에 대해 사용하였다.

[3179] 정량적 RT-PCR

[3180] 제조업체의 지침에 따라 TRIzol 방법(Life Technologies)을 사용해서 RNAlater 시약(Qiagen)에서 보관 후 조직으로부터 총 간 RNA를 단리하였다. 표준 프로토콜에 따라 TaqMan 유전자 발현 검정 및 시약(Applied Biosystems)을 사용해서 정량적 RT-PCR에 의해 상대 mRNA 존재율을 측정하였다. YAP 표적 유전자에 대한 마우스 프로브는 CTGF(Mm01192933_g1) 및 Cyr61(Mm00487498_m1)이었다. 마우스 GAPDH를 내부 대조군으로 사용하였다(프로브 4351309). mRNA의 상대 변화를 ΔΔCt 방법에 의해 계산하였다. 화합물 처리로의 유전자 발현 변화를 비히클군 대비 배율-변화로 표현한다.

[3181] Ki67에 대한 면역조직화학(IHC)

[3182] 24~48 h 동안 간 조직을 10% 중성 완충 포르말린에서 고정하였다. 파라핀 중 가공 및 포매는 표준 절차에 의해 수행하였다. 절편을 5마이크론 두께로 절단하고 Ventana 자동화 시스템을 사용하여 염색하였다. 마우스 Ki67에 대한 일차 항체는 토끼 IgG(Bethyl Labs)였다. HALO 플랫폼을 사용하는 이미지 분석에 의해 Ki67-양성 간세포를 정량하였다. 내엽 중간으로부터, 동물 당 적어도 3개의 절편을 분석하였다.

[3183] [표 1E]

마우스에서 화합물 처리 결과

[3184]

| | pYAP (대조군%) | CTGF mRNA (배율-변화) | Cyr61 mRNA (배율-변화) | Ki67 IHC (배율-변화) |
|---|---|---|---|---|
| 실시예 46 30 mg/kg | 64 | 2.1 (+/- 0.4) | 3.5 (+/- 0.5) | 3.3 (+/- 0.2) |
| 실시예 261 10 mg/kg | 60 | 2.5 (+/- 0.2) | 3.9 (+/- 0.6) | 3.1 (+/- 0.5) |

[3185] YAP 표적 유전자 CTGF 및 Cyr61에 대한 mRNA는 LATS 키나제 억제제의 단회 경구 투여 2 h 후에 증가되었고 Ki67 면역조직화학(IHC)으로 시사되는 증식은 24 h 후 증가되었다. 값은 (평균 +/- SEM)으로 비히클군 대비 배율-변화로 표현된다.

[3186] **실시예 B1: 인간 윤부 상피 세포 단리**

[3187] 연구-동의를 받은 사체 인간 각막을 눈 은행으로부터 수득하였다. 윤부 테를 절제하고 37℃에서 2시간 동안 1.2 mg/㎖ 디스파제 용액 중에, 이어서 TrypLE(Life Technologies)에서 10분 동안 부분 해리하였다. 이어서 윤부 움

조각을 부분 해리된 윤부 테로부터 조심스럽게 절단해내고 원심분리에 의해 헹구었다). 상기 방식으로 수득된 세포를 아래에서 실시예 B2~B11에서 사용하였다.

[3188] **실시예 B2: LATS 억제제에 대한 세포 노출 및 세포내 YAP 분포의 측정**

[3189] 실시예 B1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 10마이크로몰 농도로 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 133 또는 49가 보충된 또는 음성 대조군으로서 DMSO가 보충된 윤부 상피 세포 배양 배지(10% 인간 혈청 및 1.3 mM 염화칼슘이 보충된 DMEM F12) 중 유리-바닥 검은색 벽 24-웰 디쉬에 플레이팅하였다. 세포를 5% CO2에서 37℃에서 24시간 동안 이들 조건 하에 배양하였다.

[3190] 하류 표적 YAP에 대한 LATS 억제제의 효과를 측정하기 위해, 세포내 YAP 분포를 면역조직화학에 의해 분석하였다. 세포 배양을 20분 동안 4% PFA로 고정하고, 투과화하고, 30분 동안 PBS 중 0.3% Triton X-100(Sigma-Aldrich) 및 3% 당나귀 혈청의 차단 용액에서 차단하였다. 이어서 세포를 4℃에서 12시간 동안 차단 용액 중 일차 항체로 표지하였다. 사용된 일차 항체는 Santa Cruz Biotechnology의 항-YAP이었다. 샘플을 PBS 중에 3회 세척하고, 1:500 희석도의 당나귀-유도 이차 항체 Alexa Fluor 488(Molecular Probes)을 실온에서 30분 동안 적용하였다. 음성 대조군에서는 일차 항체를 생략하였다(데이터는 나타내지 않음). Zeiss LSM 880 공초점 현미경을 사용하여 형광을 관찰하였다.

[3191] LATS 억제제 없이(DMSO 대조군) 배양된 LSC의 핵에서는 약한 YAP 면역염색만 관찰되었다. YAP 면역염색은 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 133 또는 49에 노출된 LSC의 핵에서 더 강력하였다(데이터는 나타내지 않음).

[3192] **실시예 B3: LATS 억제제에 대한 세포 노출 및 YAP 인산화의 측정**

[3193] 실시예 B1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 37℃에서 10분 동안 아큐타제로 배양 디쉬에서 탈착시키고, 세포 현탁액을 원심분리에 의해 헹구고 6-웰 플레이트(Corning)에서 10% 인간 혈청 및 1.3 mM 염화칼슘이 보충된 DMEM F12 중에 플레이팅하고 2~4일 동안 LATS 억제제 화합물 없이 배양하였다.

[3194] 이어서 배지를 10마이크로몰 농도로 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 133 또는 49가 보충된 또는 음성 대조군으로서 DMSO가 보충된 신선 윤부 상피 세포 배양 배지(10% 인간 혈청 및 1.3 mM 염화칼슘이 보충된 DMEM F12)로 대체하였다. 세포를 5% CO2에서 37℃에서 1시간 동안 이들 조건 하에 배양하였다.

[3195] 하류 표적 YAP에 대한 LATS 억제제의 효과를 측정하기 위해, YAP 인산화 수준을 하기와 같이 웨스턴 블롯에 의해 측정하였다. 세포 펠렛을 트립신 해리 및 원심분리에 의해 수득하고 PBS로 세척하였다. 펠렛을 10분마다 볼텍싱하며, 30분 동안 프로테아제 억제제 칵테일을 함유하는 30 ㎕의 RIPA 용해 완충액(Life Technologies)으로 용해시켰다. 이어서 세포 파편을 14k rpm에서 15분 동안 4℃에서 펠렛화하고 단백질 용해액을 수집하였다. 마이크로 BCA 키트(Pierce)를 사용해서 단백질 농도를 정량하였다. 15 ㎍의 총 단백질을 4~20% TGX 겔(BioRad)의 각 웰로 로딩하고, 제조업체의 지침에 따라 웨스턴 블로팅을 수행하였다. 막을 포스포-YAP(ser127)(CST, 1:500) 또는 총 Yap(Abnova, 1:500) 항체를 프로브로 하고 로딩 대조군으로 액틴(Abcam) 표지화를 사용하였다. 제조업체의 지침에 따라 막을 HRP-콘주게이션된 이차 항체로 염색하고, 헹구고, ChemiDoc 시스템(Biorad)을 사용하여 이미지화하였다.

[3196] 웨스턴 블롯 분석(도 1 참고)은 화합물 실시예 번호 133 및 49가 둘 다 인간 LSC에서 YAP 인산화 수준에 감소를 유도함을 나타내었다. 이들 결과는 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 133 및 49가 인간 LSC에서 YAP 신호전달을 활성화할 수 있음을 제시한다.

[3197] **실시예 B4: 인간 윤부 줄기 세포 집단 증식 및 세포 표현형의 면역조직화학적 관찰**

[3198] 실시예 B1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 10마이크로몰 농도로 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 133 또는 49가 보충된 또는 음성 대조군으로서 DMSO가 보충된 윤부 상피 세포 배양 배지(10% 인간 혈청 및 1.3 mM 염화칼슘이 보충된 DMEM F12) 중 24-웰 플레이트(Corning)에 플레이팅하였다. 세포를 먼저 6일 동안 5% CO2에서 37℃에서 인큐베이션한 후 계대하지 않고 단리하였다(도 2A, 2B 및 2C).

[3199] 2회 계대 후 LSC 증식을 구현하는 화합물의 능력을 평가하기 위해, LSC를 계대하고 화합물 실시예 49의 존재 하에 2주 동안 배양하여 증식을 구현하였다(도 2D). 배양을 37℃에서 10분 동안 아큐타제로 처리하여 윤부 줄기 세포(LSC)를 계대하고, 원심분리에 의해 세포 현탁액을 헹구고, LATS 억제제 화합물 실시예 49가 보충된 신선 LSC 배양 배지에 세포를 플레이팅하였다.

[3200] 증식된 세포 집단이 p63알파를 발현하였음을 관찰하기 위해, 이를 하기와 같이 면역조직화학에 의해

측정하였다. 세포 배양을 20분 동안 4% PFA로 고정하고, 투과화하고, 30분 동안 PBS 중 0.3% Triton X-100(Sigma-Aldrich) 및 3% 당나귀 혈청의 차단 용액에서 차단하였다. 이어서 세포를 4℃에서 12시간 동안 차단 용액 중 일차 항체로 표지하였다. 사용된 일차 항체는 Cell Signalling의 p63알파였다. 샘플을 PBS 중에 3회 세척하고, 1:500 희석도의 당나귀-유도 이차 항체 Alexa Fluor 488(Molecular Probes)을 실온에서 30분 동안 적용하였다. 배양 중 모든 세포를 표지하고 이의 인간 정체성을 확인하기 위해, 세포를 1:500 희석도로 인간 핵 항원 항체(Millipore)로 카운터-염색하였다. 음성 대조군에서는 일차 항체를 생략하였다(데이터는 나타내지 않음). Zeiss LSM 880 공초점 현미경을 사용하여 형광을 관찰하였다.

[3201] 도 2A는 성장 배지 및 DMSO의 존재 하에, 소수의 단리된 세포만 배양 디쉬에 부착하고 최대 6일까지 생존함을 나타낸다. 대부분의 세포가 인간 핵 마커를 발현했지만, p63알파는 거의 발현하지 않았다. 대조적으로, LATS 억제제 화합물 실시예 번호 133(도 2B) 및 화합물 실시예 번호 49(도 2C)의 존재 하에, 세포는 콜로니를 형성하고 p63알파를 발현하였다. 상기 결과는 LATS 억제제가 p63알파-양성 표현형을 갖는 세포 집단의 증식을 촉진함을 시사하였다. 도 2D: 세포의 계대 및 2주 동안 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 49의 존재 하에서의 이의 배양은 세포 집단 증식 및 p63알파를 발현하는 융합성 배양의 형성을 구현하였다.

[3202] **실시예 B5: 인간 윤부 줄기 세포 집단 증식 및 이의 측정**

[3203] 실시예 B1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 10마이크로몰 농도로 LATS 억제제(아래에서 표 2 및 3에 기재됨)가 보충된 또는 음성 대조군으로 DMSO 중 보충된 XVIVO15 배지(Lonza) 중에 48-웰 플레이트(Corning)에 플레이팅하였다. 세포를 5% CO2에서 37℃에서 배양하였다.

[3204] 각각의 화합물에 있어서, 2개 세트의 배양을 생성하였다. 각막에서 단리된 세포가 세포 배양 디쉬에 부착된 후(전형적으로 세포 플레이팅 24 h 후) 첫 번째 세트의 배양을 실온에서 20분 동안 4% FPA에서 고정하였다. 2회 계대 배양된 후 두 번째 세트의 배양을 실온에서 20분 동안 4% PFA에서 고정하였다. 세포가 90~100% 융합성에 도달했을 때 이들을 계대하였다.

[3205] 증식된 세포 집단이 p63알파를 발현하였음을 관찰하기 위해, 이를 하기와 같이 면역조직화학에 의해 측정하였다. 고정된 세포 배양을 투과화하고, 30분 동안 PBS 중 0.3% Triton X-100(Sigma-Aldrich) 및 3% 당나귀 혈청의 차단 용액에서 차단하였다. 이어서 세포를 4℃에서 12시간 동안 차단 용액 중 일차 항체로 표지하였다. 사용된 일차 항체는 Cell Signalling의 p63알파였다. 샘플을 PBS 중에 3회 세척하고, 1:500 희석도의 당나귀-유도 이차 항체 Alexa Fluor 488(Molecular Probes)을 실온에서 30분 동안 적용하였다. 이어서 세포 핵을 실온에서 5분 동안 PBS 중 0.5마이크로몰 농도의 Sytox Orange 용액(ThermoFisher) 중에 표지화하였다.

[3206] p63알파-양성 세포의 백분율을 평가하기 위해, 항-p63알파 항체에 의해 표지된 세포 수를 계수하고 Sytox Orange에 의해 염색된 핵의 수를 계수하여 세포의 총 수를 결정하였다. 이어서 p63알파를 또한 발현하는 Sytox-orange-양성 핵의 백분율을 계산하여 p63알파-양성 세포의 비를 결정하였다.

[3207] 세포 증식 비율을 평가하기 위해, Zeiss LSM 880 공초점 현미경을 사용해서 핵을 계수하였다. 그 후 증식된 세포 집단 대 접종된 세포 집단의 비율을 계산하여 증식 인자를 결정하였다.

[3208] 아래에서 표의 결과는 LATS 억제제가 세포 집단 증식을 구현하였음을 시사한다. LATS 억제제의 존재 하에, 57 내지 97%의 세포가 p63알파-양성 표현형을 발현한다.

*표 2*

[3209]

| 화합물 실시예 번호 | 증식 인자 | 화합물 실시예 번호 | 증식 인자 |
|---|---|---|---|
| 실시예 47 | 2137 | 실시예 290 | 1051 |
| 실시예 12 | 2087 | 실시예 65 | 1048 |
| 실시예 49 | 2029 | 실시예 287 | 991 |
| 실시예 261 | 1717 | 실시예 17 | 976 |
| 실시예 62 | 1712 | 실시예 139 | 961 |
| 실시예 14 | 1423 | 실시예 11 | 705 |
| 실시예 6 | 1275 | 실시예 289 | 681 |
| 실시예 288 | 1241 | 실시예 33 | 39 |
| 실시예 133 | 1205 | DMSO | 35 |
| 실시예 66 | 1160 | | |

표 3

[3210]

| 화합물 실시예 번호 | p63a-양성 세포의 백분율 | 화합물 실시예 번호 | p63a-양성 세포의 백분율 |
|---|---|---|---|
| 실시예 47 | 97 | 실시예 290 | 90 |
| 실시예 12 | 95 | 실시예 65 | 87 |
| 실시예 49 | 92 | 실시예 287 | 86 |
| 실시예 261 | 93 | 실시예 17 | 86 |
| 실시예 62 | 95 | 실시예 139 | 87 |
| 실시예 14 | 93 | 실시예 11 | 86 |
| 실시예 6 | 93 | 실시예 289 | 80 |
| 실시예 288 | 95 | 실시예 33 | 6 |
| 실시예 133 | 89 | DMSO | 3 |
| 실시예 66 | 89 | | |

[3211] **실시예 B6: 인간 윤부 세포에서 LATS1 및 LATS2의 siRNA 녹다운**

[3212] 실시예 B1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 XVIVO15 배지(Lonza) 중 24-웰 플레이트(Corning)에 플레이팅하였다. 세포를 5% CO2에서 37℃에서 배양하였다. LATS1 및 LATS2를 전달감염(리포펙션, RNAiMax, Thermofisher 사용)에 의해 녹다운하였다. 세포 배양 플레이트의 각 웰을 각각의 유전자를 표적화하는 4개 siRNA의 0.5 ㎍의 풀로 전달감염시켰다. 상기 연구에서 사용된 siRNA는 Qiagen의 LATS1 siRNA SI00067172 및 LATS2 siRNA SI00106925였다. 스크램블된 siRNA를 제조업체의 프로토콜(Qiagen)에 따라 음성 대조군으로 사용하였다.

[3213] 세포 증식을 측정하기 위해, LATS1 및 LATS2 siRNA 또는 스크램블된 siRNA 대조군으로의 전달감염 48시간 후 제조업체의 지침에 따라 EdU 염색을 수행하였다(Life Technologies). 세포 핵을 Sytox Orange로 표지하였다. EdU-양성 세포 핵의 백분율을 측정하기 위해 Zeiss LSM 880 공초점 현미경을 사용해서 EdU 및 Sytox Orange 형광을 관찰하였다.

[3214] 도 3은 EdU-양성 세포의 백분율이 LATS1 및 LATS2 녹다운 시 증가되었음을 나타내어 LATS의 녹다운이 세포 증식을 야기함을 나타낸다.

[3215] **실시예 B7: 인간 윤부 줄기 세포 집단 증식 및 마커 델타N-p63 알파/베타/감마, ABCG2 및 C/EBP 델타의 면역조직화학적 관찰**

[3216] 실시예 B1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 10마이크로몰 농도로 LATS 억제제(화합물 실시예 49 및 화합물 실시예 133)가 보충된 또는 음성 대조군으로 DMSO 중 보충된 XVIVO15 배지(Lonza) 중에 48-웰 플레이트(Corning)에 플레이팅하였다. 세포를 8일 내지 10일 동안 5% CO2에서 37℃에서 배양하였다.

[3217] 증식된 세포 집단이 윤부 줄기 세포에 의해 보통 발현되는 마커를 발현함을 관찰하기 위해, 세포가 델타N-p63 알파/베타/감마, ABCG2 및 C/EBP 델타를 발현하는 능력을 하기와 같이 면역조직화학에 의해 측정하였다. 세포 배양을 20분 동안 4% PFA로 고정하고, 투과화하고, 30분 동안 PBS 중 0.3% Triton X-100(Sigma-Aldrich) 및 3% 당나귀 혈청의 차단 용액 중 차단하였다. 이어서 세포를 4℃에서 12시간 동안 차단 용액 중 일차 항체로 표지하였다. 사용된 일차 항체는 p63α(Cell Signaling Technology), ABCG2(EMD Millipore), 및 C/EBPδ(Abcam), 사이토케라틴 15, 사이토케라틴 12(Abcam)였다. 샘플을 PBS 중에 3회 세척하고, 1:500 희석도의 당나귀-유도 이차 항체 Alexa Fluor 488(Molecular Probes)을 실온에서 30분 동안 적용하였다. 이어서 세포 핵을 실온에서 5분 동안 PBS 중 0.5마이크로몰 농도의 Sytox Orange 용액(ThermoFisher) 중에 표지화하였다. 이어서 Zeiss LSM 880 공초점 현미경을 사용하여 샘플을 관찰하였다.

[3218] 결과는 DMSO가 단독(LATS 억제제 화합물 비함유) 보충된 XVIVO 배지에서 배양된 세포가 LSC에 의해 보통 발현되는 마커를 전형적으로 발현하지 않음을 시사하였다(도 4 참고). 대조적으로, LATS 억제제의 존재 하에 배양된 세포는 LSC에 의해 보통 발현되는 마커를 발현한다.

[3219] **실시예 B8: 각막 상피 세포로의 인간 윤부 줄기 세포 분화**

[3220] 실시예 B1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 10마이크로몰 농도로 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 49, 47, 12 또는 261이 보충된 또는 음성 대조군으로 DMSO 중 보충된 XVIVO15 배지 중에 48-웰 플레이트(Corning)에 플레이

팅하였다. 세포를 8일 내지 10일 동안 5% CO2에서 37℃에서 배양하였다.

[3221] 이어서 LATS 억제제의 존재 하에 증식된 p63알파-양성 LSC 집단이 LSC 이식을 수여받는 환자에서 각막 투명성이 복원되기 위해 요구되는, 케라틴-12-양성 각막 상피 세포로 분화하는 능력을 보유하는지 여부를 결정하기 위해 분석을 수행하였다.

[3222] LSC의 각막 상피 세포로의 분화를 촉진하기 위해, 배양 배지를 혈청 또는 LATS 억제제 비함유 DMEM(Invitrogen)으로 바꾸고 4~8일 동안 세포를 배양하였다. LSC의 각막 상피 세포로의 분화를 관찰하기 위해, 세포 배양을 20분 동안 4% PFA로 고정하고, 투과화하고, 30분 동안 PBS 중 0.3% Triton X-100(Sigma-Aldrich) 및 3% 당나귀 혈청의 차단 용액 중 차단하였다. 이어서 세포를 4℃에서 12시간 동안 차단 용액 중 일차 항체로 표지하였다. 사용된 일차 항체는 p63α(Cell Signaling Technology), 및 사이토케라틴 12(Abcam)였다. 샘플을 PBS 중에 3회 세척하고, 1:500 희석도의 Alexa Fluor 488 또는 Alexa Fluor 647(Molecular Probes)에 콘주게이션된 당나귀-유도 이차 항체를 실온에서 30분 동안 적용하였다. 이어서 Zeiss LSM 880 공초점 현미경을 사용하여 샘플을 관찰하였다.

[3223] 결과는 LATS 억제제의 존재 하에 유지된 후 분화하도록 유도된 배양이 p63알파-양성 세포 클러스터가 p63알파-음성이지만 케라틴-12-양성인 세포 클러스터에 인접한 영역을 함유함을 시사하였다(도 5). 따라서 LATS 억제제의 존재 하에 증식된 윤부 세포는 적절한 조건 하에 있는 경우 케라틴-12-양성 세포로 분화될 수 있다.

[3224] **실시예 B9: LSC-바이오매트릭스 제조물의 토끼 눈으로의 전달**

[3225] 윤부 줄기 세포 결핍의 토끼 모델

[3226] 상피 세포의 죽은조직제거술 및 1 M 수산화나트륨 용액이 침지된 Whatman 페이퍼를 이용한 윤부 줄기 세포(LSC)의 절제에 의해 NZA 토끼의 오른쪽 눈 한쪽에 윤부 줄기 세포 결핍(LSCD)이 생성되었다. 윤부 결막을 미토마이신 C로 처리하여 각막 신혈관형성을 감소시켰다. 왼쪽 눈은 온전히 두었다. LATS 억제제 화합물 실시예 번호 12 중에 증식된 세포 집단을 후술되는 바와 같이 전달하였다. 세포 전달 후, 토끼는 진통제 치료(처음 2주 트라마돌(Tramadol) 10 mg/kg PO BID, 처음 2주 또는 동물이 눈 불편 징후를 나타내는 동안 멜록시캄(Meloxicam) 0.3 mg/kg PO SID), 소염제 치료(Ancef®(세파졸린) 50 mg, 시술 직후 서브-테논(Tenon), Tobrex® 안과용 용액 1주차에 t.i.d 및 이후 b.i.d, 첫 주 동안 앰피실린 80 mg/kg/일(40 mg, BID)) 및 면역억제제(사이클로스포린 A(0.5%) 최상급 oc. 1주차에 t.i.d 및 이후 b.i.d., Gentocin®-durafilm®(젠타마이신 설페이트 및 베타메타손, MERCK) 최상급 oc. 1주차에 t.i.d 및 이후 b.i.d., 사이클로스포린 A(5 mg/kg/일) 1주차에 SQ 및 이후 ½ 투여량)를 수여받았다.

[3227] 바이오매트릭스 제조.

[3228] 젤라틴 메타크릴레이트(GelMA)를 이전에 공개된 프로토콜에 따라 합성하였다(Nichol, J. W. et al. Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. Biomaterials 31, 5536-5544, doi:10.1016/j.biomaterials.2010.03.064 (2010). 간략하게, 20 g의 돼지 유래 젤라틴(Cat# G2500, Sigma)을 200 mℓ의 칼슘 및 마그네슘 비함유 PBS(DPBS, Cat# 21-031, Corning) 중에 50℃에서 하룻밤 동안 용해시켰다. 강력 진탕하며, 메타크릴산 무수물(Cat# 276685, Sigma)을 젤라틴 용액 내로 적가하여(대략 1 mℓ/분) 8%(vol/vol) 농도에 도달하도록 했다. 혼합물을 3시간 동안 오일조에서 60℃에서 교반한 후 200 mℓ의 DPBS를 첨가하고 이어서 추가 15분 동안 철저히 혼합하였다. 희석된 혼합물을 45℃에서 1주 동안 투석 관(15kDa MWCO, Spetrua/Por)을 사용하여 Milli-Q 수에 대해 투석을 통해 정제하여 메타크릴산을 제거하였다. 정제된 샘플을 동결건조하고 추가 사용 전까지 -80℃에서 보관하였다.

[3229] 15% GelMA 스톡 용액을 제조하기 위해, 1.5 g의 냉동-건조된 GelMA 폼을 37℃에서 10 mℓ의 사전-가온된 DPBS 중에 용해시켰다. GelMA 폼이 완전 용해된 후, GelMA 용액 내로 15 mg의 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트(LAP)를 첨가하여 광개시제를 도입하였다. 500 μℓ의 1N NaOH(Cat# BDH-7222-1, VWR)를 용액에 첨가하여 pH를 중성으로 조정한 후 용액을 0.22 μm 멸균 막(Millipore)을 사용하여 여과하였다. 최종 여액을 500 μℓ 분취물로 분리하고 추가 사용 전까지 4℃에서 보관하였다.

[3230] 생체내 LSC 이식.

[3231] 실시예 B1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 10마이크로몰 농도로 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 12가 보충된 XVIVO15 배지 중에 6-웰 플레이트(Corning)에 플레이팅하였다. 세포를 2회 계대를 위해(2주 동안) 5% CO2에서 37℃에서 배양하였다.

[3232] 이식을 위한 세포 현탁액을 하기와 같이 제조하였다. 세포를 37℃에서 10분 동안 아큐타제로 배양 디쉬로부터 탈착시켰다. 이어서 세포를 원심분리에 의해 헹구고 16 ㎕의 LATS 억제제 비함유 XVIVO15 배지 중에 재현탁하였다.

[3233] 16 ㎕의 LSC 현탁액 또는 식염수 대조군을 8 ㎕의 15% GelMA 스톡 용액과 혼합하여 5% GelMA 용액을 제조한 후 모든 혼합물을 지지 유리 슬라이드 상에서 치료용 콘택트 렌즈(로트라필콘(Lotrafilcon) B, Alcon)에 첨가하였다. 최종 용액은 300,000개의 세포 및 5% GelMA를 함유하였다. UV LED 광원(365 nm, Hamamatsu)의 파워를 30 mW/cm2의 UV 세기 판독으로 15%로 조정하였다. 25초의 짧은 UVA 노출을 광중합 공정을 위해 사용하여 인간 LSC를 콘택트 렌즈의 내부 표면으로 바이오프린트하였다. 중합 공정 후, LSC가 로딩된 콘택트 렌즈를 생체외 절제된 토끼 눈으로 또는 생체내 토끼 눈으로 적용하였다.

[3234] LSC-로딩된 콘택트 렌즈가 생체외 적용되는 실험에 있어서, 샘플을 2시간 내에 Zeiss 에피형광 현미경 하에 관찰하였다.

[3235] 생체내 실험에 있어서, LSC-로딩된 콘택트 렌즈를 상술된 LSCD의 토끼 모델의 오른쪽 눈으로 적용하고 1주 동안 눈 표면 상에 콘택트 렌즈를 유지하기 위해 눈꺼풀봉합술을 수행하였다. 1주 후, 콘택트 렌즈를 제거하고, 추가 4주 동안 토끼를 살아있는 채로 유지했다.

[3236] 토끼를 세포 전달 5주 후 희생시키고, 각막을 절제하고 4% PFA 중에 고정하였다. 샘플을 파라핀 중 포매하고 절편화하였다. 면역조직화학을 수행하여 각막 상피 세포의 마커인 케라틴-12 및 결막 세포의 마커인 케라틴-19의 존재를 검출하였다. 항-케라틴 12 및 19 일차 항체는 Abcam에서 입수하였다. 인간 미토콘드리아 단백질을 사용하여 인간 기원 세포를 확인하였다. 항-인간 미토콘드리아 단백질 일차 항체는 Novus에서 입수하였다. 이어서 샘플을 HRP-콘주게이션된 이차 항체(ThermoFisher)로 염색하고 Zeiss 현미경 하에 관찰하였다.

[3237] 결과는 GelMA 중합을 사용하여 콘택트 렌즈에 부착된 LSC가 생체외 토끼 눈의 표면으로 전달될 수 있음을 시사하였다(도 6).

[3238] 도 7은 윤부 줄기 세포 결핍의 토끼 모델에서, LATS 억제제(화합물 실시예 12)의 존재 하에 증식되고, GelMA 중합을 사용해서 콘택트 렌즈에 부착되고 토끼의 각막 표면으로 생체내 전달된 LSC 집단이 케라틴-12-양성 각막 상피의 재생을 야기하였으며 이식된 눈에서 케라틴-19-양성 결막 세포의 결막화를 방지하였음을 나타낸다(각각 도 7A 및 B). 대조적으로, 이식되지 않은 토끼 눈은 케라틴-12-양성 각막 상피 복원의 부재를 나타내었다. 대신, 케라틴-19 염색의 존재에 의해 나타낸 바와 같이, 결막화 징후가 관찰되었다(각각 도 7C 및 D).

[3239] 도 8은 인간 미토콘드리아 단백질의 존재에 의해 실증된 바와 같이, 이식된 눈의 각막 상피를 복원한 세포가 인간 세포였음을 나타낸다(도 8a). 대조적으로, 이식되지 않은 눈의 눈 표면은 인간 미토콘드리아 단백질 염색을 나타내지 않았다(도 8b).

[3240] **실시예 B10: TISSEEL을 사용하는 생체외 LSC 전달**

[3241] TISSEEL(Baxter, cat# NDC 0944-4301-02) 작업 용액을 제조하기 위해, 제조업체의 지침에 따라 공급 성분을 재구성하였다. 요망되는 피브리노겐 농도에 도달하도록 멸균수를 첨가하여 재구성된 피브리노겐 용액의 추가 희석을 수행할 수 있다. 트롬빈 작업 용액을 둘베코 인산염 완충 식염수(DPBS, GIBCO, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)로 500배 희석하여 1 unit/㎖ 용액을 얻었다.

[3242] *시험관내 배양 표면으로의 LSC 전달.*

[3243] 실시예 B1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 10마이크로몰 농도로 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 12가 보충된 XVIVO15 배지 중에 6-웰 플레이트(Corning)에 플레이팅하였다. 세포를 2회 계대를 위해(2주 동안) 5% $CO_2$에서 37℃에서 배양하였다.

[3244] 이식을 위한 세포 현탁액을 하기와 같이 제조하였다. 세포를 37℃에서 10분 동안 아큐타제로 배양 디쉬로부터 탈착시켰다. 이어서 세포를 원심분리에 의해 헹구고 상기 언급된 트롬빈 작업 용액 중에 재현탁하고 최종 세포 밀도를 연속 희석에 의해 1 ㎖ 당 100,000개 내지 1 ㎖ 당 30,000,000개로 조정하였다.

[3245] 세포 현탁액을 피브리노겐 용액과 혼합한 직후, 10 ㎕의 혼합물을 콜라겐 코팅된 24웰 플레이트 중앙에 플레이팅하고 5분 동안 실온에서 인큐베이션하여 피브린을 고화시켰다. 각각의 웰에 LATS 억제제 비함유 XVIVO15 배지를 재보충한 후, 모든 샘플을 피브린 분해 및 세포 재증식에 대해 2주 동안 모니터링하였다. 결과(도 9)는 TISSEEL이 LSC를 전달하기 위해 성공적으로 사용됨을 제시하였으며, 인간 각막과 유사한 크기의 배양 영역은

100k 및 300k LSC가 최초 전달된 샘플에서 1주 내지 2주에 커버될 수 있다.

[3246] *생체외 인간 각막에 대한 LSC 전달.*

[3247] 실시예 B1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 10마이크로몰 농도로 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 12가 보충된 XVIVO15 배지 중에 6-웰 플레이트(Corning)에 플레이팅하였다. 세포를 2회 계대를 위해(2주 동안) 5% $CO_2$에서 37℃에서 배양하였다. 전달 실험 1일 전, 세포를 제조업체의 프로토콜에 따라 CellTracker green CMFDA 염료(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)로 표지하였다.

[3248] 이식을 위한 세포 현탁액을 하기와 같이 제조하였다. 세포를 37℃에서 10분 동안 아큐타제로 배양 디쉬로부터 탈착시켰다. 이어서 세포를 원심분리에 의해 헹구고 1 ㎖ 당 30,000,000개의 최종 세포 밀도에 도달하도록 상기 언급된 트롬빈 작업 용액 중에 재현탁하였다.

[3249] 세포 현탁액을 피브리노겐 용액과 혼합한 직후, 10 ㎕의 혼합물을 인간 각막 중앙에 플레이팅하고 5분 동안 실온에서 인큐베이션하여 피브린을 고화시켰다. LotraB 콘택트 렌즈(Air Optix Night and Day, Alcon)를 사용해서 실제 임상 절차를 모방하도록 인간 각막 상의 LSC-피브린 작제물을 커버하였다. Nikon 형광 스테레오현미경으로 형광 이미지를 찍었다. 데이터(도 10)는 TISSEEL이 생체외 각막 표면 상으로 다수의 LSC를 전달하기 위해 성공적으로 사용됨을 실증하였고, LSC-피브린 작제물은 추가 조작, 예컨대 보호 콘택트 렌의 적용을 관용할 만큼 강력한 것으로 나타난다.

[3250] **실시예 B11: 다중 세포 집단의 눈 표면으로의 바이오프린팅을 통한 지정된 패턴으로의 전달**

[3251] 맞춤 바이오프린터를 문헌[Advanced Materials (2015, DOI: 10.1002/adma.201202024)]에 공개된 바와 같은 DOPsL 기술에 기반하여 구축하였다.

[3252] 바이오프린팅용 세포 현탁액을 하기와 같이 제조하였다. 수확 전에 HEK-293 세포를 Celltracker 녹색 CMFDA 염료 또는 빨간색 CMTPX 염료(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)로 사전-표지화하였다. 25 ㎕의 세포 현탁액을 최종 세포 밀도 200,000,000 세포/㎖에 도달하도록 25 ㎕의 15% GelMA 스톡 용액과 혼합하였다.

[3253] 토끼 안구를 1% 저융점 아가로스가 충전된 페트리 디쉬 상에 배치하고, 바이오프린팅 공정 직전에 수술용 메스로 상피에서 죽은조직을 조심스럽게 제거하였다. 이어서 세포-GelMA 혼합물을 윤부 상에 배치된 폴리디메틸실록산(PDMS) o-링(Specialty Silicone Products, Inc., Ballston Spa, NY)과 함께 각막 상부에 적용하여 곡선형 눈 표면에서 세포-GelMA 혼합물이 떨어지는 것을 방지하였다.

[3254] 맞춤화된 광 패턴(즉, 절반 음-양 패턴)을 4초 동안 토끼 눈 상부의 세포(녹색)-GelMA 혼합물로 투사한 후 중합되지 않은 혼합물을 헹궈내었다. 다른 광 패턴(즉, 나머지 절반 음-양 패턴)을 4초 동안 샘플에 투사한 후 새로운 세포(빨간색)-GelMA 혼합물을 동일한 토끼 각막 상부에 적용하였다. PBS로의 수회 헹굼을 수행한 후 이미지화하였다. 도 11을 참고한다.

[3255] **실시예 B12: LSC에서 베타-2-마이크로글로불린 유전자의 CRISPR/Cas9-매개된 결실에 의한 면역 거부 감소**

[3256] 아래의 실시예에서, 베타-2-마이크로글로불린 유전자의 CRISPR-매개된 결실에 의해 LSC 표면으로부터 HLA 클래스 I 발현을 제거하였다.

[3257] 세포 전달감염: 실시예 B1에 기재된 바와 같이 수득된 LSC를 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 48a가 보충된 X-VIVO15 배지 중에서 LSC 단리 8일 후 35 ㎜ 페트리 디쉬에서 50~60% 융합성으로 배양하였다. LSC를 tracrRNA-crRNA-Cas9 mRNA의 혼합물로 전달감염시켰다. 35 ㎜ 페트리 디쉬 크기에 대한 혼합물을 수득하기 위해, 12.5 ㎕의 10마이크로몰 농도 tracrRNA(Dharmacon, Cat # U-002000-20), 12.5 ㎕의 10마이크로몰 농도 crRNA 표적화 인간 B2M(Dharmacon, Cat #CR-004366-01), 50 ㎕의 0.1 ㎍/㎕ Cas9 mRNA(Dharmacon, Cat #CAS11195), 및 15 ㎕의 DharmaFECT Duo 전달감염 시약(Dharmacon, Cat #T-2010-02)을 조합하고 실온에서 20분 동안 인큐베이션하였다. 혼합물을 2.5 ㎖ 배지(LATS 억제제 화합물 실시예 번호 48a가 보충된 XVIVO15)(항생제 비함유) 중 배양 디쉬에 적가하였다. mRNA 세포독성을 감소시키기 위해, 0.2 ㎍/㎖ B18R(eBioscience, Cat #34-8185-81)을 배지에 첨가하였다. 전달감염 시약 단독은 전달감염 음성 대조군을 나타낸다.

[3258] 37℃에서 5% $CO_2$에서의 6 h 인큐베이션 후, 배지를 화합물 및 B18R을 포함하는 화합물 실시예 번호 48a가 보충된 신선 X-VIVO15 배지(항생제 비함유)로 대체하였다. 5% CO2 인큐베이터에서 72 h 후, 세포를 1:2로 계대하고 synthemax 코팅된 페트리 디쉬 상에서 화합물 및 B18R을 포함하는 LSC 배지(항생제 비함유) 중 추가 72 h 동안 증식시켜 FACS 정렬을 위해 더 많은 세포를 수득하였다.

[3259] FACS 분석: LSC를 37℃에서 5% CO2에서 20분 동안 아큐타제(ThermoFisher, Cat # A1110501)로 처리하였다. 세포를 스크레이핑 후, 10% 혈청을 함유하는 세포 배양 배지를 사용해서 반응을 정지시키고 원심분리 단계(1000 rpm, 5분)를 위해 팔콘(falcon) 튜브로 옮겼다. 배지를 흡입한 후, 세포를 200 ㎕ FACS 완충액(PBS/10% FBS) 중 재현탁하였다.

[3260] B2M 및 HLA-ABC의 발현을 분석하기 위해, 5 ㎕ APC 마우스 항-인간 β2-마이크로글로불린 항체(Biolegend, Cat #316312) 및 20 ㎕ PE 마우스 항-인간 HLA-ABC 항체(BD Bioscience, Cat # 560168)를 세포 현탁액에 첨가하고 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. FACS 완충액으로의 항체 표지 후 세포를 3회 세척하고 FACS 완충액 500 ㎕ 중 재현탁하였다. FACS 정렬 전, 세포를 70 ㎛ 필터를 통해 여과하고 정렬 전까지 얼음 상에 보관하였다.

[3261] 벽으로의 세포 부착을 방지하기 위해, 수집 튜브를 30분 동안 혈청으로 충전한 후 정렬하였다. 화합물 및 B18R을 포함하는 인간 혈청 농축 LSC 배지를 사용해서, 세포를 BD FACSAria II 기기 상에서 제조된 수집 튜브 내로 정렬하였다. BD FACSDiva 소프트웨어를 사용하여 FACS 데이터를 분석하였다.

[3262] 도 12에 나타낸 결과는 B2M의 CRISPR-매개된 결실 및 HLA A, B 및 C의 후속 제거가 LSC의 21%에서 일어났음을 나타낸다. LATS 억제제 화합물 실시예 번호 48a가 보충된 XVIVO15 배지가 LSC의 효율적 증식을 구현하므로, 이어서 LSC의 21%의 B2M-음성/HLA A,B,C-음성 집단을 증식시켜 97%의 세포가 면역 거부 HLA 클래스-I 유도인자를 발현하지 않는 세포 제조물을 생성할 수 있었다(도 13).

[3263] **실시예 B13: 잔여 화합물 추정 연구**

[3264] 표준 곡선 제조

[3265] 스톡 표준물질의 희석 시리즈를 100마이크로몰 농도, 10마이크로몰 농도, 1마이크로몰 농도, 500 nM, 100 nM, 및 0마이크로몰 농도로 제조하였다. 화합물 실시예 번호 48a(DMSO 중 10 mM) 스톡을 50% 아세토니트릴 50% 물 내로 스파이크 처리하여 스파이크 표준물질을 제조하였다. 스파이킹 표준물질을 사용하여 블랭크 배지 샘플을 스파이크 처리하였다. 10 ㎕의 스파이킹 표준물질을 90 ㎕의 배지에 첨가하여 스파이크 처리된 배지 표준물질을 생성하였다. 10,000 nM, 1000 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 및 0 nM 배지 표준물질을 사용해서 화합물 실시예 번호 48a 표준물질 곡선을 생성하였다.

[3266] 50 ㎕의 각각의 배지 샘플을 400 ㎕의 추출 용액으로 처리하였다. 추출 용액은 아세토니트릴/메탄올(3:1)로 구성된다. 표준물질 곡선 샘플을 알려지지 않은 배지 샘플과 동일한 용량 및 조건을 사용해서 추출하였다. 추출된 샘플을 5분 동안 10,000 rpm에서 원심분리하였다. 원심분리 후, 200 ㎕의 각 샘플 상청액을 투명 96-웰 플레이트로 옮겼다. 추출된 샘플을 고분해능 LC-MS에 의해 분석하였다. Thermo Xcalibur 소프트웨어 및 Quan 브라우저를 사용하여 표준 곡선을 생성하고 농도 값을 계산하였다. 외부 적정 방법을 사용하여 배양 배지 샘플에서 화합물 실시예 번호 48a의 농도를 계산하였다.

[3267] LC-MS 분석

[3268] Thermo Ultimate UPLC 및 Kinetex 2.1 × 50 mM C18 RP 칼럼(2.6마이크론 입자)을 사용하여 고분해능 크로마토그래피를 수행하였다. 이동상은 완충액 A에 대해 H2O 중 5 mM 암모늄 아세테이트, 및 완충액 B에 대해 아세토니트릴 중 0.1% 포름산으로 구성되었다. 역상 크로마토그래피를 위해 표준 이원 선형 구배를 사용하였다. 상기 연구에서는 Thermo Q Exactive 질량 분광분석기를 사용하였다. UPLC 유출액을 ESI 이온원이 구비된 Q Exactive 질량 분광분석기 내로 보냈다. 질량 분광분석기를 프로그래밍하여 고분해능 전체 스캔 모드 및 MS2 모드로 프로그래밍하였다.

[3269] 평가 시스템

[3270] LSC 세척제거용 세포 제조물: 세척제거 실험을 3개씩 수행하였고, 각 샘플은 500,000개 세포를 함유하였다. 모든 샘플(배지 단독, 화합물 실시예 번호 48a가 보충된 세포 함유 배지, 및 화합물 실시예 번호 48a가 보충된 배지 중 세포)을 실험 기간 동안 37도 인큐베이터에서 배양하였다. 실험에 사용된 배지는 X-VIVO 15였다.

[3271] 세포를 3마이크로몰 농도 화합물 실시예 번호 48a가 보충된 X-VIVO-15 배지 중에 계대 2까지 배양하였다. 배양이 70% 융합성에 도달하면, 배지를 흡입에 의해 제거하고 3마이크로몰 농도 화합물 실시예 번호 48a가 보충된 신선 배지로 대체하였다; 세포를 추가 6일 동안 배양하였다. 7일차에, 하기 샘플을 생성하였다:

[3272] 1. 2 ㎖의 "블랭크" 배지(화합물이 보충되지 않음)

[3273] 2. 화합물의 존재 하에 배양된 2 ㎖의 배지(세척-전)

[3274] 3. 각각의 세척 샘플 1~10에 대한 2 ㎖의 배지

[3275] 4. 세포 펠렛(세척-후)

[3276] 세포를 셀 리프팅장치(sell lifter)(Costar, cat# 3008)를 사용하여 수집하였다.

[3277] 배지 및 세포 펠렛 샘플을 분석하고 고분해능 LC-MS를 사용하여 정량하였다.

[3278] 화합물 실시예 번호 48a의 잔여 수준을 추정하기 위해, 세포 펠렛 및 상청액을 수집하였다. 화합물 실시예 번호 48a의 양을 LC-MS에 의해 결정하였다. 세척-전 배지, 세척 배지(표 4) 및 세포 펠렛에서 화합물 실시예 번호 48a 농도의 추정을 요약한다(표 5). 세척-전 배지 샘플이 가장 높은 수준의 화합물 실시예 번호 48a를 갖는다(대략 9,830 nM 내지 10,837 nM 범위). 세척-후 펠렛 수준은 낮지만, 검출 가능한 수준의 화합물 실시예 번호 48a를 갖는다(나노몰 농도).

*표 4*

[3279] *세척-전 배지 및 세척 배지 중 화합물 실시예 번호 48a의 농도 추정*

| 샘플 | 용량(㎖) | 화합물 실시예 번호 48a(nM) 3개 샘플 중 #1 | 화합물 실시예 번호 48a(nM) 3개 샘플 중 #2 | 화합물 실시예 번호 48a(nM) 3개 샘플 중 #3 |
|---|---|---|---|---|
| 세척-전 배지 | 2 | 9829.547 | 10374.463 | 10837.706 |
| 세척 배지 1 | 2 | 461.271 | 401.058 | 354.547 |
| 세척 배지 2 | 2 | 31.933 | 38.721 | 18.400 |
| 세척 배지 3 | 2 | BLQ | BLQ | BLQ |
| 세척 배지 4 | 2 | BLQ | BLQ | BLQ |
| 세척 배지 5 | 2 | BLQ | BLQ | BLQ |
| 세척 배지 6 | 2 | BLQ | BLQ | BLQ |
| 세척 배지 7 | 2 | BLQ | BLQ | BLQ |
| 세척 배지 8 | 2 | BLQ | BLQ | BLQ |
| 세척 배지 9 | 2 | BLQ | BLQ | BLQ |
| 세척 배지 10 | 2 | BLQ | BLQ | BLQ |

[3280] BLQ = **정량 한계 미만(Beneath Limit of Quantification)**

*표 5*

[3281] *세포 펠렛에서 **화합물 실시예 번호 48a**의 농도 추정*

| 샘플 | 화합물 실시예 번호 48a(nM) | 화합물 실시예 번호 48a(pg/세포) | 화합물 실시예 번호 48a의 평균(pg/세포) | 펠렛 중 세포의 # | 총 화합물 실시예 번호 48a(pg) |
|---|---|---|---|---|---|
| 세척 후_펠렛 1 | 20.342 | 0.00068 | 0.00068 | $0.5 \times 10^6$ | 340 |
| 세척 후_펠렛 2 | 19.908 | 0.00066 | | | |
| 세척 후_펠렛 3 | 20.787 | 0.00069 | | | |

[3282] 3개의 인큐베이션으로부터 세척-전 배지 중 화합물 실시예 번호 48a의 양은 9,830~10,838 nM 범위이다. 세척-후 세포 펠렛에서 화합물 실시예 번호 48a의 농도는 19.9~20.8 nM 범위였다.

[3283] 세척-제거 후 다른 화합물 실시예의 잔여량

[3284] 화합물 실시예 번호 12, 261, 및 5에 있어서, 증식된 LSC 중 잔여량을 화합물 실시예 번호 48a에 대한 것과 동일한 방법을 사용하여 측정하였다.

*표 6*

[3285] *세포 펠렛에서 화합물 실시예 12에 대한 농도 추정*

| 샘플 | 화합물 실시예 12(nM) | 화합물 실시예 12(pg/세포) | 화합물 실시예 12의 평균(pg/세포) | 펠렛 중 세포의 # | 총 화합물 실시예 12(pg) |
|---|---|---|---|---|---|
| 세척 후_펠렛 1 | 7.370 | 0.000136 | 0.000178 | $1 \times 10^6$ | 178 |
| 세척 후_펠렛 2 | 14.443 | 0.000264 | | | |
| 세척 후_펠렛 3 | 7.319 | 0.000134 | | | |

**표 7**

[3286] *세포 펠렛에서 화합물 실시예 번호 261의 농도 추정*

| 샘플 | 화합물 실시예 번호 261(nM) | 화합물 실시예 번호 261(pg/세포) | 화합물 실시예 번호 261의 평균(pg/세포) | 펠렛 중 세포의 # | 총 화합물 실시예 번호 261(pg) |
|---|---|---|---|---|---|
| 세척 후_펠렛 1 | 0.315 | 0.0000043 | 0.000083 | $1 \times 10^6$ | 83 |
| 세척 후_펠렛 2 | 6.941 | 0.000095 | | | |
| 세척 후_펠렛 3 | 11.008 | 0.00015 | | | |

**표 8**

[3287] *세포 펠렛에서 화합물 실시예 번호 5의 농도 추정*

| 샘플 | 화합물 실시예 번호 5(nM) | 화합물 실시예 번호 5(pg/세포) | 화합물 실시예 번호 5의 평균(pg/세포) | 펠렛 중 세포의 # | 총 화합물 실시예 번호 5(pg) |
|---|---|---|---|---|---|
| 세척 후_펠렛 1 | 21.733 | 0.00061 | 0.00083 | $0.5 \times 10^6$ | 415 |
| 세척 후_펠렛 2 | 13.454 | 0.00038 | | | |
| 세척 후_펠렛 3 | 46.529 | 0.0015 | | | |

[3288] **실시예 C1: 인간 각막 내피 세포 단리**

[3289] 연구-동의를 받은 사체 인간 각막을 눈 은행으로부터 수득하였다. 각막 내피 세포(CEC)층 및 데스메막(DM)을 수술-등급 리버스 Sinsky 내피 박리장치로 스코어링하였다. DM-내피 세포층을 조심스럽게 박리하고 세포 탈착이 현미경 관찰에 의해 뚜렷해질 때까지(45분 내지 3시간) 37℃에서 1 mg/㎖ 콜라게나제를 사용하여 각막 간질 및 세포를 DM으로부터 해리하였다. 상기 방식으로 수득된 세포를 아래에서 실시예 C1~C17에서 사용하였다.

[3290] **실시예 C2: LATS 억제제에 대한 세포 노출 및 세포내 YAP 분포의 측정**

[3291] 실시예 C1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 10마이크로몰 농도의 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 133 또는 화합물 실시예 번호 49가 보충된 또는 음성 대조군으로서 DMSO가 보충된 각막 내피 세포 배양 배지(인간 혈청 함유 인간 내피 SF(무혈청) 배지(Invitrogen)) 중 유리-바닥 검은색 벽 24-웰 디쉬에 플레이팅하였다. 세포를 5% CO2에서 37℃에서 24시간 동안 이들 조건 하에 배양하였다.

[3292] 하류 표적 YAP에 대한 LATS 억제제의 효과를 측정하기 위해, 세포내 YAP 분포를 면역조직화학에 의해 분석하였다. 세포 배양을 20분 동안 4% PFA로 고정하고, 투과화하고, 30분 동안 PBS 중 0.3% Triton X-100(Sigma-Aldrich) 및 3% 당나귀 혈청의 차단 용액 중 차단하였다. 이어서 세포를 4℃에서 12시간 동안 차단 용액 중 일차 항체로 표지하였다. 사용된 일차 항체는 Santa Cruz Biotechnology의 항-YAP이었다. 샘플을 PBS 중에 3회 세척하고, 1:500 희석도의 당나귀-유도 이차 항체 Alexa Fluor 488(Molecular Probes)을 실온에서 30분 동안 적용하였다. 음성 대조군에서는 일차 항체를 생략하였다(데이터는 나타내지 않음). Zeiss LSM 880 공초점 현미경을 사용하여 형광을 관찰하였다.

[3293] 도 14에 나타낸 바와 같이 YAP의 면역형광 염색에 의해 시사되는 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 133 또는 실시예 49 함유 세포 증식 배지에 노출된 CEC에서 YAP 면역염색이 더 진하다. 따라서 이들 화합물은 하류 표적 YAP의 세포내 국소화에 대해 효과를 가졌다.

[3294] **실시예 C3: LATS 억제제에 대한 세포 노출 및 YAP 인산화의 측정**

[3295] 실시예 C1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 37℃에서 15분 동안 1 ㎎/㎖ 콜라게나제로 배양 디쉬에서 탈착시키고, 세포 현탁액을 원심분리에 의해 헹구고 6-웰 플레이트(Corning)에서 각막 내피 세포 배양 배지(인간 혈청 함유 인간 내피 SF 배지(Invitrogen)) 중에 플레이팅하고 2~4일 동안 배양하였다. 이어서 배지를 10마이크로몰 농도로 LATS 억제제, 화합물 실시예 번호 133 또는 실시예 번호 49(DMSO 중 희석됨) 또는 화합물 없이 음성 대조군으로서 DMSO가 단독 보충된 신선 각막 내피 세포 배양 배지(인간 혈청 함유 인간 내피 SF 배지(Invitrogen))로 대체하였다. 세포를 5% CO2에서 37℃에서 1시간 동안 이들 조건 하에 배양하였다.

[3296] 세포 펠렛을 트립신 해리 및 원심분리에 의해 수득하고 PBS로 세척하였다. 펠렛을 10분마다 볼텍싱하며, 30분 동안 프로테아제 억제제 칵테일을 함유하는 30 마이크로몰 농도의 RIPA 용해 완충액(Life Technologies)으로 용해시켰다. 이어서 세포 파편을 14k rpm으로 15분 동안 4℃에서 펠렛화하고 단백질 용해액을 수집하였다. 마이크로 BCA 키트(Pierce)를 사용해서 단백질 농도를 정량하였다. 15 ㎍의 총 단백질을 4~20% TGX 겔(BioRad)의 각 웰로 로딩하고, 제조업체의 지침에 따라 웨스턴 블로팅을 수행하였다. 막을 포스포-YAP(ser127)(CST, 1:500) 또는 총 Yap(Abnova, 1:500) 항체를 프로브로 하고 로딩 대조군으로 액틴(Abcam) 표지화를 사용하였다. 제조업체의 지침에 따라 막을 HRP-콘주게이션된 이차 항체로 염색하고, 헹구고, ChemiDoc 시스템(Biorad)을 사용하여 이미지화하였다.

[3297] 웨스턴 블롯 분석은 화합물 실시예 번호 133 및 실시예 번호 49가 모두 인간 CEC에서 YAP 인산화 수준 감소를 유도함을 나타내었다. 도 15a에서 웨스턴 블롯으로 나타낸 바와 같이, 인간 CEC에서 화합물 실시예 번호 133 및 실시예 번호 49로의 1시간 처리 후 현저한 차이가 관찰되었다. 도 15b는 베타-액틴에 대해 정상화된 포스포릴화 YAP 수준을 그래프 표시로 나타내며, 도 15c는 총 YAP에 대해 정상화된 포스포릴화 YAP 수준을 나타낸다.

[3298] 이들 결과는 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 133 및 실시예 번호 49가 인간 CEC에서 YAP 신호전달을 활성화할 수 있음을 제시한다.

[3299] **실시예 C4: 인간 각막 내피 세포 집단 증식 및 세포 밀도의 측정**

[3300] 실시예 C1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 37℃에서 10분 동안 100 ㎕ 아큐타제(ThermoFisher)로 배양 디쉬에서 탈착시키고, 세포 현탁액을 원심분리에 의해 헹구고, 10마이크로몰 농도로 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 133 또는 실시예 번호 49(DMSO 중 희석됨) 또는 화합물 없이 음성 대조군 DMSO가 단독 보충된 6-웰 플레이트(Corning)에서 각막 내피 세포 배양 배지(인간 혈청 함유 인간 내피 SF 배지(Invitrogen)) 중에 플레이팅하였다. 세포를 5% CO2에서 37℃에서 배양하였다.

[3301] 세포 증식을 측정하고, Incucyte 기기(Essen Biosciences)를 제조업체의 지침에 따라 사용하여 10일 동안 3시간마다 세포 융합성의 정량적인 실시간 살아있는-세포 분석을 수행하였다.

[3302] 도 16은 LATS 억제제 또는 DMSO 단독에 대한 노출 후 경시적인 세포 집단의 융합성 백분율을 나타낸다. 인간 CEC는 보통 비-증식성이지만, 결과는 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 133 및 실시예 번호 49가 모두 이들 세포에서 증식을 활성화할 수 있었음을 나타낸다.

[3303] **실시예 C5: 인간 각막 내피 세포 집단 증식 및 세포 밀도의 측정**

[3304] 실시예 C1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 10마이크로몰 농도로 표 10에 기재된 LATS 억제제(DMSO 중 희석됨) 또는 화합물 없이 음성 대조군으로 DMSO가 단독 보충된 X-VIVO15 배지 중에 48-웰 플레이트(Corning)에 플레이팅하였다. 세포를 5% CO2에서 37℃에서 배양하였다.

[3305] 각각의 화합물에 있어서, 2개 세트의 배양을 생성하였다. 각막에서 단리된 세포가 세포 배양 디쉬에 부착된 후(전형적으로 세포 플레이팅 24 h 후) 첫 번째 세트의 배양을 실온에서 20분 동안 4% PFA에서 고정하였다. 1세트 배양 10일 후 2세트 배양을 실온에서 20분 동안 4% PFA에서 고정하였다.

[3306] 모든 고정된 배양에서 세포 밀도를 측정하기 위해, Sytox Orange(ThermoFisher)로 염색된 핵의 수를 하기와 같이 표면적 당 계수하였다: 고정된 세포 배양을 0.3% Triton X-100(Sigma-Aldrich)의 용액 중에서 투과화하였다. 이어서 세포를 실온에서 5분 동안 PBS 중 0.5마이크로몰 농도의 Sytox Orange 용액 중에 표지화하였다. 핵을 Zeiss 에피형광 현미경 하에 계수하였다. 그 후 증식된 세포 집단 대 접종된 세포 집단의 비율을 계산하여 증식 인자를 결정하였다.

[3307] 평가된 화합물로 달성된 세포 집단 증식을 아래에서 표 9 및 10에 나타낸다.

표 9

[3308] 세포 증식 배율

| 화합물 실시예 번호 | 증식 인자 | 화합물 실시예 번호 | 증식 인자 |
|---|---|---|---|
| 실시예 12 | 521 | 실시예 133 | 273 |
| 실시예 261 | 461 | 실시예 287 | 237 |
| 실시예 47 | 449 | 실시예 290 | 221 |
| 실시예 48a | 446 | 실시예 65 | 203 |
| 실시예 49 | 426 | 실시예 17 | 187 |
| 실시예 5 | 408 | 실시예 139 | 107 |
| 실시예 62 | 402 | 실시예 289 | 84 |
| 실시예 6 | 391 | 실시예 11 | 79 |
| 실시예 14 | 337 | 실시예 48b | 21 |
| 실시예 288 | 302 | 실시예 33 | 12 |
| 실시예 66 | 280 | DMSO | 7 |

표 10

[3309] 시험관내 내피 세포 밀도(세포/면적㎟)

| 화합물 실시예 번호 | 세포 밀도: 세포/㎟ | 화합물 실시예 번호 | 세포 밀도: 세포/㎟ |
|---|---|---|---|
| 실시예 12 | 4226 | 실시예 133 | 2028 |
| 실시예 261 | 4308 | 실시예 287 | 1893 |
| 실시예 47 | 4294 | 실시예 290 | 2071 |
| 실시예 48a | 4021 | 실시예 65 | 1702 |
| 실시예 49 | 3873 | 실시예 17 | 1628 |
| 실시예 5 | 3911 | 실시예 139 | 1179 |
| 실시예 62 | 3301 | 실시예 289 | 1421 |
| 실시예 6 | 3378 | 실시예 11 | 1121 |
| 실시예 14 | 3271 | 실시예 48b | 869 |
| 실시예 288 | 2779 | 실시예 33 | 25 |
| 실시예 66 | 2503 | DMSO | 13 |

[3310] **실시예 C6: 인간 각막 내피 세포에서 LATS1 및 LATS2의 siRNA 녹다운**

[3311] 실시예 C1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 X-VIVO15 배지(Lonza) 중 24-웰 플레이트(Corning)에 플레이팅하였다. 세포를 5% CO2에서 37℃에서 배양하였다. LATS1 및 LATS2를 전달감염(리포펙션, RNAiMax, Thermofisher 사용)에 의해 녹다운하였다. 세포 배양 플레이트의 각 웰을 각 유전자를 표적화하는 4개 siRNA의 0.5 ㎍의 풀로 전달감염시켰다. 상기 연구에서 사용된 siRNA는 Qiagen의 LATS1 siRNA SI00067172 및 LATS2 siRNA SI00106925였다. 스크램블된 siRNA를 제조업체의 프로토콜(Qiagen)에 따라 음성 대조군으로 사용하였다.

[3312] 세포 증식을 측정하기 위해, 제조업체의 지침에 따라 LATS1 및 LATS2 siRNA 또는 스크램블된 siRNA 대조군(Life Technologies)으로의 전달감염 48시간 후 EdU 염색을 수행하였다. 세포 핵을 Sytox Orange로 표지하였다. EdU-양성 세포 핵의 백분율을 측정하기 위해 Zeiss LSM 880 공초점 현미경을 사용해서 EdU 및 Sytox Orange 형광을 관찰하였다.

[3313] 도 17은 EdU-양성 CEC의 백분율이 LATS1 및 LATS2 녹다운 시 증가되었음을 나타내어 LATS의 녹다운이 CEC 증식을 야기함을 나타낸다.

[3314] **실시예 C7: 인간 각막 내피 세포 집단 증식 및 세포 형태의 면역조직화학적 관찰**

[3315] 실시예 C1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 10마이크로몰 농도로 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 49(DMSO 중 희석됨)가 보충된 또는 화합물 없이 음성 대조군으로서 DMSO가 단독 보충된 각막 내피 세포 배양 배지(인간 혈청 함유 인간 내피 SF 배지(Invitrogen)) 중 24-웰 플레이트(Corning)에 플레이팅하였다. 세포를 10일 동안 5%

CO2에서 37℃에서 배양하였다.

[3316] 증식된 세포 집단이 생체내 사용을 위해 요구되는 세포 형태를 가짐을 관찰하기 위해, 세포가 치밀 이음부를 형성하는 능력을 하기와 같이 면역조직화학에 의해 측정하였다. 세포 배양을 20분 동안 4% PFA로 고정하고, 투과화하고, 30분 동안 PBS 중 0.3% Triton X-100(Sigma-Aldrich) 및 3% 당나귀 혈청의 차단 용액 중 차단하였다. 이어서 세포를 4℃에서 12시간 동안 차단 용액 중 일차 항체로 표지하였다. 사용된 일차 항체는 Invitrogen의 ZO-1이었다. 샘플을 PBS 중에 3회 세척하고, 1:500 희석도의 당나귀-유도 이차 항체 Alexa Fluor 488(Molecular Probes)을 실온에서 30분 동안 적용하였다. 세포를 PBS에서 3회 세척하고 핵(DNA)을 Sytox Orange(567 nm, Life Technologies)로 염색하였다. 음성 대조군에서는 일차 항체를 생략하였다(데이터는 나타내지 않음). Zeiss LSM 880 공초점 현미경을 사용하여 형광을 관찰하였다.

[3317] 배지 및 DMSO 대조군의 존재 하에 증식된 CEC는 기능이상 CEC에 특징적인 다면성 징후를 나타낸다(도 18a). LATS 억제제 실시예 번호 49를 함유하는 세포 증식 배지에 노출된 CEC는 정상 각막 내피 세포 형태 및 도 18b에 나타낸 바와 같이 치밀-이음부 마커 Zonula Occludens-1(ZO-1)의 면역형광 염색에 의해 시사되는 치밀 이음부를 형성하는 능력을 보유하였다. 정상 각막 내피 세포 형태 및 치밀 이음부를 형성하는 능력이 모두 각막 내피 기능의 유지를 위해 중추적이다.

[3318] **실시예 C8: 인간 각막 내피 세포 집단 증식 및 마커 콜라겐 8a2, AQP1, SLC4A11, RPE65, CD31, 및 Na/K ATP아제의 측정.**

[3319] 증식된 세포 집단이 생체내 각막 내피 세포에 의해 보통 발현되는 유전자를 발현함을 확인하기 위해, 세포를 배양한 후 RT-PCR 분석을 수행하여 콜라겐 8a2, AQP1, SLC4A11, RPE65 및 CD31의 발현 수준을 측정하였다. 또한 면역조직화학적 분석을 수행하여 하기와 같이 Na/K ATP아제 및 콜라겐 8a2의 수준을 분석하였다.

[3320] 실시예 C1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 10마이크로몰 농도로 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 49(DMSO 중 희석됨)가 보충된 또는 화합물 없이 DMSO 음성 대조군이 단독 보충된 각막 내피 세포 배양 배지(인간 혈청 함유 인간 내피 SF 배지(Invitrogen)) 중 24-웰 플레이트(Corning)에 플레이팅하였다. 세포를 10일 동안 5% CO2에서 37℃에서 배양하였다. 음성 대조군에 있어서, 피부 섬유아세포(Lonza)를 LATS 억제제를 함유하지 않는 DMEM-F12(LifeTechnologies) 중에 배양하였다.

[3321] RT-PCR 분석을 수행하기 위해, 제조업체의 프로토콜에 따라 Trizol(Invitrogen), RNeasy Mini 및 QIA Shredder(Qiagen)를 사용해서 총 RNA를 추출하였다. Nanodrop 100(Thermo-Fisher Scientific) 및 Bioanalyzer 2100(Agilent Technologies)을 사용해서 RNA 품질 및 양을 측정하였다. 역전사에 의해 cDNA를 제조하고 7900HT 시스템(Applied Biosystems)을 사용하는 정량적 RT-PCR에 의해 상대 mRNA 발현을 평가하였다. 하기 사이클링 파라미터를 사용하였다:

[3322] 1) 50℃에서 2분 동안; 2) 95℃에서 10분 동안; 3) 95℃에서 15초 동안 4) 60℃에서 1분 동안. 단계 3~4를 40회 반복하였다.

[3323] 액틴 mRNA 수준을 측정하고 내인성 대조군으로 사용하여 유전자 발현 수준을 정상화하고 공식 dCt = 관심 유전자에 대한 Ct - 내인성 대조군에 대한 Ct에 따라 델타 Ct 값을 계산하였다. 프라이머는 Applied Biosystems에서 입수하였다.

[3324] 도 19에 나타낸 바와 같은 RT-PCR 분석은 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 49와 함께 증식된 각막 내피 세포 집단이 콜라겐 8a2, AQP1, SLC4A11을 포함하여, 보통 생체내 각막 내피 세포에 의해 발현되는 유전자를 발현함을 시사한다. 세포는 RPE65(망막 색소 상피 마커) 및 CD31(혈관 상피 마커)을 포함하여, 눈에 존재하는 다른 상피 마커를 발현하지 않는다.

[3325] 면역조직화학에 의해 Na/K ATP아제 및 콜라겐 8a2의 발현을 확인하기 위해, 세포 배양을 20분 동안 4% PFA로 고정하고, 투과화하고, 30분 동안 0.3% Triton X-100(Sigma-Aldrich) 및 3% 당나귀 혈청의 차단 용액 중 차단하였다. 이어서 세포를 4℃에서 12시간 동안 차단 용액 중 일차 항체로 표지하였다. 사용된 일차 항체는 Na/K ATP아제 및 콜라겐 8a2(Santa Cruz Biotechnology)였다. 샘플을 PBS 중에 3회 세척하고, 1:500 희석도의 당나귀-유도 이차 항체 Alexa Fluor 488 또는 647(Molecular Probes)을 실온에서 30분 동안 적용하였다. 세포를 PBS에서 3회 세척하고 핵(DNA)을 Sytox Orange(567nm, Life Technologies)로 염색하였다. 음성 대조군에서는 일차 항체 또는 이소형 대조군 항체를 생략하였다(데이터는 나타내지 않음). Zeiss LSM 880 공초점 현미경을 사용하여 형광을 관찰하였다.

[3326] 도 20에 나타낸 바와 같은 면역조직화학 분석은 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 49와 함께 증식된 각막 내피 세포 집단이 Na/K ATP아제(도 20a) 및 콜라겐 8a2(도 20b)를 포함하여, 보통 생체내 각막 내피 세포에 의해 발현되는 유전자를 발현함을 시사한다.

[3327] **실시예 C9: 인간 각막 내피 세포 집단 증식 및 마커 CD44, CD105, CD166 및 CD73의 측정**

[3328] 증식된 세포 집단이 내피에서 중간엽으로의 전이를 거치지 않음을 확인하기 위해, CEC를 하기와 같이 배양한 후 FACS 분석을 수행하여 CD44, CD105, CD166 및 CD73 수준을 분석하였다.

[3329] 성숙 CEC 배양을 생성하기 위해, 실시예 C1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 3마이크로몰 농도로 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 48a(DMSO 중 희석됨)가 보충된 X-VIVO15에 플레이팅하였다. 세포를 2주 동안 5% CO2에서 37℃에서 48웰 플레이트(corning)에서 배양하였다. 세포를 37℃에서 15분 동안 1 mg/㎖ 콜라게나제로 탈착시키고, 원심분리에 의해 세포 현탁액을 헹구고, 신선 배지에서 플레이팅하여 세포를 이 시간 동안 2회 계대하였다. 이어서 이들 세포를 추가 2주 동안 LATS 억제제 비함유 XVIVO 배지에서 성장시켰다.

[3330] FACS에 의해 CD44, CD105, CD166 및 CD73 수준을 측정하기 위해, CEC를 37℃에서 5% CO2에서 20분 동안 아큐타제(ThermoFisher, Cat # A1110501)로 처리하였다. 10% 혈청을 함유하는 세포 배양 배지를 사용해서 반응을 정지시키고 원심분리 단계(1000 rpm, 5분)를 위해 팔콘(falcon) 튜브로 옮겼다. 배지를 흡입한 후, 세포를 200 ㎕ FACS 완충액(PBS/10% FBS) 중 재현탁하였다.

[3331] CD44, CD105, CD166 및 CD73에 대한 항체(BD Biosciences)를 세포 현탁액에 첨가하고 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. FACS 완충액으로의 항체 표지 후 세포를 3회 세척하고 FACS 완충액 중 500 ㎕ 중에 재현탁하였다. FACS 정렬 전, 세포를 70 ㎛ 필터를 통해 여과하고 정렬 전까지 얼음 상에 보관하였다. 세포를 BD FACSAria II 기기 상에서 정렬하였다. BD FACSDiva 소프트웨어를 사용하여 FACS 데이터를 분석하였다.

[3332] 도 21에 나타낸 바와 같은 FACS 분석은 LATS 억제제의 존재 하에 증식된 세포 집단의 FACS 마커 발현 프로필이 내피에서 중간엽으로의 전이를 거친 세포의 FACS 마커 발현 프로필과 상이함을 시사한다. 구체적으로, LATS 억제제의 존재 하에 배양된 세포는 LATS 억제제의 부재 하에 성장시킨 세포에 비해 더 낮은 수준의 CD44, CD73, CD105 및 CD166을 발현한다. 중요하게는, CD73은 내피에서 중간엽으로의 전이의 마커이며, 이에 따라 이들 결과는 LATS 억제제의 존재 하에 배양된 CEC가 내피에서 중간엽으로의 전이를 거치지 않음을 시사한다.

[3333] **실시예 C10: 세포 바이오프린팅: GelMA 제조물**

[3334] GelMA의 합성

[3335] 대략 100%의 Lys 잔기가 메타크릴레이트화된 젤라틴 메타크릴레이트(GelMA)를 이전에 공개된 프로토콜에 따라 합성하였다(Nichol, J. W. et al. *Biomaterials*, **2010**, p.5536-5544). 20 g의 돼지 유래 젤라틴(Cat# G2500, Sigma)을 200 ㎖의 칼슘 및 마그네슘 비함유 PBS(DPBS, Cat# 21-031, Corning) 중에 50℃에서 하룻밤 동안 용해시켰다. 강력 진탕하며, 메타크릴산 무수물(Cat# 276685, Sigma)을 젤라틴 용액 내로 적가하여(대략 1 ㎖/분) 8%(vol/vol) 농도에 도달하도록 했다. 혼합물을 3시간 동안 오일조에서 60℃에서 교반한 후 200 ㎖의 DPBS를 첨가한 후 추가 15분 동안 철저히 혼합하였다. 희석된 혼합물을 45℃에서 1주 동안 Milli-Q 수에 대해 투석을 통해 정제하여(15 kDa MWCO, Spetrua/Por 투석 튜브 사용) 메타크릴산을 제거하였다. 정제된 샘플을 동결건조하고 추가 사용 전까지 -80℃에서 보관하였다.

[3336] $^{1}$H NMR(400 MHz, $D_2O$, 35℃)을 사용하여 15 mg/㎖ GelMA 용액에 대한 메타크릴화 정도를 결정하였다. 7.25~7.50 ppm에서 다중선의 면적(Phe 양성자로 가정, GelMA에서 Phe 당 5H) 대 5.47 ppm, 5.51 ppm, 5.71 ppm, 및 5.76 ppm에서의 4개 단일선 면적의 합(비닐 양성자로 가정, GelMA에서 메타크릴아미드 당 2H)을 비교하여 Phe 대 메타크릴아미드의 피크 면적 비율은 1.00:0.82로 확인되었다. 상기 반응에서 사용된 젤라틴 중 Phe:Lys 몰 농도 비율은 아미노산 분석에 의해 1.00:2.06으로 결정되었다. 따라서, GelMA에서 Phe:Lys:메타크릴아미드의 몰 농도 비율은 1.00:2.06:2.05이다. 젤라틴 메타크릴화의 일차 부위는 Lys 잔기 위치라고 가정하면, 1H NMR 분석은 메타크릴화 정도가 약 100%임을 시사한다(2.05/2.06×100% = 99.5%).

[3337] GelMA 및 LAP의 스톡 용액을 DPBS 중 제조하고, pH-조정하고, 멸균 여과하고, 후술된 바와 같이 추가 사용 전까지 4℃에서 보관하였다. 하기 프로토콜은 15% w/v GelMA 및 0.15% w/v LAP 스톡 제조물을 예시하지만, 동일한 절차를 따라 다른 강도가 제조되었다. 15% w/v GelMA 스톡 용액을 제조하기 위해, 1.5 g의 상술된 바와 같이 제조된 냉동-건조된 GelMA를 37℃에서 10 ㎖의 사전-가온된 DPBS 중에 용해시켰다. GelMA가 완전 용해된 후,

GelMA 용액 내로 15 mg의 리튬 페닐-2,4,6-트리메틸벤조일포스피네이트(LAP)를 첨가하여 광개시제를 도입함으로써, 15% w/v GelMA 및 0.15% w/v LAP을 함유하는 스톡 용액을 생성하였다. LAP을 공개된 절차를 사용해서 합성하였다(Biomaterials 2009, 30, 6702-6707). 500 ㎕의 1 N NaOH(Cat# BDH-7222-1, VWR)를 용액에 첨가하여 pH를 중성으로 조정한 후 용액을 0.22 ㎛ 멸균 막(Millipore)을 사용하여 여과하였다. 최종 여액을 500 ㎕ 분취물로 분리하고 추가 사용 전까지 4℃에서 보관하였다.

[3338] **실시예 C11: 바이오프린터: 설계 및 작동**

[3339] 세포 전달 위치가 정밀 제어되는 세포 치료법을 개발하기 위해, 바이오프린팅 기술을 사용해서 각막의 후방 측면 상에 CEC를 정확히 배치한다.

[3340] HEK293 세포를 사용하여 유리 커버슬립 상에서 바이오프린팅 실험을 수행하였다. 빨간색-형광 단백질-표지된 HEK293 세포를 5% 우태 혈청 함유 DMEM-F12 중 6-웰 배양 플레이트에서 융합성까지 배양하였다. 이어서 세포를 37℃에서 10분 동안 100 ㎕의 TripLE(Invitrogen) 함유 배양 디쉬로부터 탈착시키고, 세포 현탁액을 원심분리에 의해 헹구고, ㎖ 당 80,000,000개 세포 농도로 DMEM-F12 중에 재현탁하였다.

[3341] 최초 바이오프린터를 다이내믹 광 투사(DLP) 기술에 기반하여 설계하였고, 시스템의 모식도를 도 26에 예시한다. 시스템은 5개 주성분으로 구성된다: 1. UVA 광원(365 nm, S2000, EXPO); 2. 광 패턴을 생성하기 위해 빛을 조절하는 디지털 마이크로미러 어레이 장치(DMD, DLP-07 XGA; Texas Instruments); 3. 샘플을 향해 광 패턴을 투사하기 위한 광학 시스템; 4. DMD에 의해 생성된 대응 광 패턴과 동기화된 방식으로 모든 3개 축으로 이동하는 자동화된 스테이지; 5. DMD 칩 이미지 플로우를 공급하고 모든 성분을 제어하는 컴퓨터.

[3342] 바이오프린팅을 위해, 1 ㎖ 당 40,000,000개 최종 세포 밀도에 도달하도록 0.15% LAP를 함유하는 50 ㎕의 15% GelMA 스톡 용액과 동일 부피의 HEK293 세포 현탁액을 혼합하여 HEK293 세포/바이오매트릭스 혼합물을 제조하였다. 이어서 세포/GelMA 혼합물을 유리 커버슬립 중앙에 첨가하고 30초 동안 365 nm UVA 광 마스크를 적용하여 문자 "e" 형태로 중합시켰다. 이어서 Zeiss LSM 880 공초점 현미경을 사용하여 이미지를 입수하였다.

[3343] 결과는 세포가 실린 작제물이 문자 "e" 형태로 정밀 바이오프린트될 수 있음을 나타내었다(실제 결과를 도 26의 하부 왼쪽 측면: "e"에 나타낸다). 이는 바이오프린팅 기술이 세포 전달 위치의 정밀 제어를 구현할 수 있음을 시사하였다.

[3344] 생체내 동물 작업을 촉진하기 위해, 상술된 바이오프린터의 핵심 기술을 하기와 같이 소형 포터블 휴대용 디자인으로 전환시켰다. 발광 헤드는 하이 파워 LED 방출장치(365 nm, LED Engin) 및 비구형 렌즈로 이루어져서 평행 광선을 제공하였다. 발광 헤드는 더 우수한 열 발산을 위해 맞춤화된 알루미늄 케이스에 구축되었다. 재충전형 전지, 파워 스위치 및 다른 전자부품이 3D 인쇄된 플라스틱 핸들에 수용되었고, 이는 피봇을 통해 발광 헤드와 함께 조립되어 헤드 회전에 있어서 더 큰 자유도를 구현하였다. 3D 인쇄된 어댑터는 조명 영역의 크기를 제어하기 위해 상이한 치수의 헤드 광 가이드에 부착될 수 있도록 했다. DMD 기반 시스템에 의해 영감을 받아, 상기 휴대용 장치는 헤드 전방에 부착된 투명 시트 상에 프린트된 마스크를 사용하여 맞춤화된 광 패턴을 생성함으로써 광중합을 제어할 수 있다.

[3345] **실시예 C12: 생체외 인간 각막의 후방 측면 상에서 세포가 실린 작제물의 바이오프린팅**

[3346] 포터블 휴대용 바이오프린팅 장치가 인간 각막 후방 측면 상에 세포의 정밀 배치를 구현할 것인지를 결정하기 위해, HEK293 세포 및 눈 은행으로부터 수득된 인간 각막을 사용하여 생체외 바이오프린팅 실험을 수행하였다. 빨간색-형광 단백질-표지된 HEK293 세포를 5% 우태 혈청 함유 DMEM-F12 중 6-웰 배양 플레이트에서 융합성까지 배양하였다. 이어서 세포를 37℃에서 10분 동안 100 ㎕의 TripLE(Invitrogen) 함유 배양 디쉬로부터 탈착시키고, 세포 현탁액을 원심분리에 의해 헹구고, 1 ㎖ 당 80,000,000개 세포 농도로 DMEM-F12 중에 재현탁하였다.

[3347] 바이오프린팅을 위해, 1 ㎖ 당 40,000,000개 최종 세포 밀도에 도달하도록 0.15% LAP를 함유하는 50 ㎕의 15% GelMA 스톡 용액과 동일 용량의 HEK293 세포 현탁액을 혼합하여 HEK293 세포/바이오매트릭스 혼합물을 제조하였다.

[3348] 이어서 세포/GelMA 혼합물을 유리 커버슬립 중앙에 첨가하고 30초 동안 365 nm UVA 광 마스크를 적용하여 문자 "e" 형태로 중합시켰다. 이어서 Zeiss LSM 880 공초점 현미경을 사용하여 이미지를 입수하였다.

[3349] 눈 은행에서 수득한 인간 공여자 각막을 이의 보관 용액(Optisol)에서 꺼내 DPBS로 짧게 헹궜다. 절제 현미경하에, 각막을 DPBS로 추가로 헹구기 전에 Descement 막을 조심스럽게 스크레이핑했다. 이어서 하나의 각막을 내

부 표면이 위를 보도록 하여 35 ㎜ 페트리 디쉬의 플라스틱 뚜껑 상에 배치하였다. 1 ㎖ 당 40,000,000개 최종 세포 밀도에 도달하도록 0.15% LAP를 함유하는 50 ㎕의 15% GelMA 스톡 용액과 동일 용량의 HEK-293-RFP 세포 현탁액을 혼합하여 세포/바이오매트릭스 혼합물을 신선 제조하였다. 이어서 세포/GelMA 혼합물을 각막의 중앙에 첨가한 후 볼록형 플라스틱 홀더를 적용하여 눈의 전방 챔버를 모사하는 폐쇄된 챔버를 형성하였다. 그 후 전체 작제물을 조심스럽게 뒤집어 휴대용 바이오프린팅 장치를 사용하여 30초 동안 각막을 통해 365 nm UVA 광의 5.5-㎜ 지름 원형 패턴을 투사하였다. 상기 UV 광 패턴은 각막의 후방 측면에 부착된 디스크 형태로 세포/GelMA 혼합물을 중합시킬 것으로 예상되었다. 이것이 일어났는지를 결정하기 위해, 본 발명자들은 눈꺼풀에서 각막을 분리하고, 각막의 후방 측면 상에 DPBS를 피펫팅하여 임의의 중합되지 않고 부착되지 않은 물질을 헹구고, Zeiss LSM 880 공초점 현미경을 사용하여 이미지를 입수하였다.

[3350] 결과는 중합되지 않고 부착되지 않은 물질을 헹군 후, 원형 패턴의 빨간색-형광 단백질-표지된 세포가 각막의 후방 측면 상에 보유되었음을 나타내었다(도 27). 이는 각막을 통해 365 nm UVA 광을 투사하는 휴대용 장치를 사용하여 각막의 후방 측면 상에 세포가 바이오프린트될 수 있음을 확인시켜주었다.

[3351] **실시예 C13: 생체내 토끼 각막의 후방 측면 상에서 세포가 실린 작제물의 바이오프린팅**

[3352] CEC 제조

[3353] 실시예 C1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 37℃에서 10분 동안 100 ㎕ 아큐타제(ThermoFisher)로 배양 디쉬에서 탈착시키고, 세포 현탁액을 원심분리에 의해 헹구고, 3마이크로몰 농도로 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 48a(DMSO 중 희석됨)가 보충된 X-VIVO15 중에 플레이팅하였다. 세포를 2주 동안 5% CO2에서 37℃에서 6 웰 플레이트(corning)에서 배양하였다. 세포를 37℃에서 15분 동안 1 mg/㎖ 콜라게나제로 탈착시키고, 원심분리에 의해 세포 현탁액을 헹구고, 신선 배지에서 플레이팅하여 세포를 이 시간 동안 2회 계대하였다. 이어서 이들 세포를 추가 2주 동안 LATS 억제제 비함유 XVIVO 배지에서 성장시켜 성숙 CEC를 생성하였다.

[3354] 토끼 눈 내부의 바이오프린팅을 위한 CEC를 제조하기 위해, 1 ㎖ 당 625,000개 내지 1 ㎖ 당 25,000,000개의 최종 세포 밀도에 도달하도록 0.15% LAP를 함유하는 15 ㎕의 15% GelMA 스톡 용액과 30 ㎕의 CEC 현탁액을 혼합하여 세포/바이오매트릭스 혼합물을 생성하였다. 이어서 세포/GelMA 혼합물을 각막의 중앙에 첨가하였다.

[3355] 각막 내피 세포 결핍의 토끼 모델

[3356] 실리콘 팁 바늘을 사용해서 전체 각막 내피를 스크레이핑하여 NZA 토끼의 오른쪽 눈의 한쪽에 각막 내피 세포 결핍이 생성되었다. 부유 파편을 제거하기 위해 흡입 캐뉼라를 사용하여 전방 챔버를 헹궜다. 40 ㎕의 신선 제조된 세포/GelMA 혼합물을 전방 챔버 내로 주사한 후, 눈 표면에서 약 1 ㎝ 떨어진 3 ㎜ 광 가이드가 장착된 휴대용 바이오프린터를 사용해서 30초 동안 365 nm UVA 노출을 거쳤다. 소형 캐뉼라를 사용하여 온화하게 헹궈서 균형 염 용액이 보충된 500 ㎕의 헤파린을 주사하여 중합되지 않은 물질 및 부유 세포를 제거하였다. 각 토끼의 왼쪽 눈을 온전히 두고 대조군으로 사용하였다. 세포 전달 후, 토끼는 진통제 치료(처음 2주 트라마돌(Tramadol) 10 mg/kg PO BID, 처음 2주 또는 동물이 눈 불편 징후를 나타내는 동안 멜록시캄(Meloxicam) 0.3 mg/kg PO SID), 소염제 치료(Ancef®(세파졸린) 50 mg, 시술 직후 서브-테논(Tenon), Tobrex® 안과용 용액 1주차에 t.i.d 및 이후 b.i.d, 첫 주 동안 앰피실린 80 mg/kg/일(40 mg, BID) SQ) 및 면역억제제(사이클로스포린 A(0.5%) 최상급 oc. 1주차에 t.i.d 및 이후 b.i.d., Gentocin®-durafilm®(젠타마이신 설페이트 및 베타메손, MERCK) 최상급 oc. 1주차에 t.i.d 및 이후 b.i.d., 사이클로스포린 A(5 mg/kg/일) 1주차에 SQ 및 이후 ½ 투여량)를 수여받았다.

[3357] 토끼를 세포 전달 3주 후 희생시키고, 각막을 절제하고 4% PFA 중에 고정하였다. 인간 핵 항원(Millipore)의 존재를 검출하기 위해 면역조직화학을 수행하여 인간 세포 및 ZO-1(Invitrogen)의 존재를 확인함으로써 바이오프린트된 CEC가 정상 각막 내피에서 관찰되는 치밀 이음부를 형성할 수 있는지를 결정하였다. 이어서 Zeiss LSM 880 공초점 현미경을 사용하여 이미지를 입수하였다.

[3358] 결과는 실험 토끼에서, 각막 내피 구조가 ZO-1 면역조직화학을 사용하여 검출될 수 있음을 시사하였다(도 28, 패널 A). 각막 내피가 수술적으로 제거되고 CEC가 바이오프린트되지 않은 토끼의 오른쪽 눈에는 ZO-1 염색이 부재하여, 정상 각막 내피 구조의 부재를 시사하였다(도 28, 패널 B). 각막 내피가 수술적으로 제거되고 CEC가 바이오프린트된 토끼의 오른쪽 눈에는 ZO-1 염색이 존재하여, 각막 내피 구조가 재구축되었음을 시사하였다(도 28, 패널 C).

[3359] 인간 핵 항원 염색을 사용하여, 도 28, 패널 C에서 각막 내피를 재구축한 세포가 바이오프린팅에 의해 전달된 인간 CEC임을 확인하였다. 도 28, 패널 D 및 E는 임의의 인간 CEC를 수여받지 않은 눈에서 인간 핵 항원 면역염

색이 부재함을 나타낸다. 대조적으로, 인간 핵 항원-양성 세포는 인간 CEC가 바이오프린트된 눈에서 이미지화된 필드를 커버하여(도 28, 패널 F), 도 28, 패널 C에 나타낸 ZO-1-표지된 각막 내피 구조가 토끼 각막의 후방 측면 상에 바이오프린트된 인간 CEC로 이루어짐을 시사한다.

[3360] **실시예 C14: 생체외 인간 각막의 후방 측면 상에서 고도 맞춤화된 형태의 세포가 실린 작제물의 바이오프린팅**

[3361] 눈 은행에서 수득한 인간 공여자 각막을 이의 보관 용액(Optisol)에서 꺼내 DPBS로 짧게 헹궜다. 절제 현미경하에, 각막을 DPBS로 추가로 헹구기 전에 Descement 막을 조심스럽게 스크레이핑했다. 이어서 하나의 각막을 내부 표면이 위를 보도록 하며 35 mm 페트리 디쉬의 플라스틱 뚜껑 상에 배치하였다.

[3362] 1 mℓ 당 40,000,000개 최종 세포 밀도에 도달하도록 0.15% LAP를 함유하는 50 ㎕의 15% GelMA 스톡 용액과 동일 용량의 HEK-293-RFP 세포 현탁액을 혼합하여 세포/바이오매트릭스 혼합물을 신선 제조하였다. 이어서 세포/GelMA 혼합물을 각막의 중앙에 첨가한 후 볼록형 플라스틱 홀더를 적용하여 눈의 전방 챔버를 모사하는 폐쇄된 챔버를 형성하였다. 그 후 전체 작제물을 조심스럽게 뒤집고 실시예 11에서 언급된 DLP 바이오프린팅 장치를 사용하여 7.5초 동안 각막을 통해 365 nm UVA 광의 맞춤형 패턴을 투사하였다. 이어서 임의의 중합되지 않고 부착되지 않은 물질을 각막의 후방 측면 상에서 DPBS에 의해 헹구고 Zeiss 형광 스테레오현미경을 사용해서 이미지를 입수하였다.

[3363] 본 발명의 바이오프린팅 기술의 재현 가능성 및 맞춤 가능성을 실증하기 위해, 쉽게 인식될 수 있는 상이한 문자 디자인의 광 패턴을 샘플에 투사하였다. 결과(도 29)는 고정밀도로 세포가 실린 맞춤형 작제물이 각막을 통한 광 패턴에 의해 결정되는 각막의 후방 측면으로 바이오프린트될 수 있음을 나타낸다.

[3364] **실시예 C15: 잔여 화합물 추정 연구**

[3365] 표준 곡선 제조

[3366] 스톡 표준물질의 희석 시리즈를 30마이크로몰 농도, 3마이크로몰 농도, 300 nM, 30 nM, 3 nM, 0.3 nM 및 0마이크로몰 농도로 제조하였다. 화합물 실시예 48a(DMSO 중 10 mM) 스톡을 50% 아세토니트릴 50% 물 내로 스파이크 처리하여 스파이크 표준물질을 제조하였다. 스파이킹 표준물질을 사용하여 블랭크 배지 샘플을 스파이크 처리하였다. 10 ㎕의 스파이킹 표준물질을 90 ㎕의 배지에 첨가하여 스파이크 처리된 배지 표준물질을 생성하였다. 3000 nM, 300 nM, 30 nM, 3 nM, 300 pM, 30 pM, 및 0 nM 배지 표준물질을 사용해서 화합물 실시예 번호 48a 표준물질 곡선을 생성하였다.

[3367] 50 ㎕의 각각의 배지 샘플을 300 ㎕의의 추출 용액으로 처리하였다. 추출 용액은 아세토니트릴/메탄올(3:1)로 구성된다. 표준물질 곡선 샘플을 알려지지 않은 배지 샘플과 동일한 용량 및 조건을 사용해서 추출하였다. 추출된 샘플을 5분 동안 10,000 rpm에서 원심분리하였다. 원심분리 후, 200 ㎕의 각 샘플 상청액을 투명 96-웰 플레이트로 옮겼다. 추출된 샘플을 고분해능 LC-MS에 의해 분석하였다. Thermo Xcalibur 소프트웨어 및 Quan 브라우저를 사용하여 표준 곡선을 생성하고 농도 값을 계산하였다. 선형 로그-로그 스케일링을 사용하는 외부 적정 방법을 사용하여 배양 배지 샘플에서 화합물 실시예 번호 48a의 농도를 계산하였다.

[3368] LC-MS 분석

[3369] Thermo Ultimate UPLC 및 Kinetex 2.1 × 50 mM C18 RP 칼럼(2.6마이크론 입자)을 사용하여 고분해능 크로마토그래피를 수행하였다. 이동상은 완충액 A에 대해 $H_2O$ 중 5 mM 암모늄 아세테이트, 및 완충액 B에 대해 아세토니트릴 중 0.1% 포름산으로 구성되었다. 역상 크로마토그래피를 위해 표준 이원 선형 구배를 사용하였다. 상기 연구에서는 Thermo Q Exactive 질량 분광분석기를 사용하였다. UPLC 유출액을 ESI 이온원이 구비된 Q Exactive 질량 분광분석기 내로 보냈다. 질량 분광분석기를 프로그래밍하여 고분해능 전체 스캔 모드로 프로그래밍하였다. 추출된 이온 크로마토그램을 크로마토그래피 통합을 위해 사용하였다.

[3370] 평가 시스템

[3371] CEC 세척제거용 세포 제조: 세척제거 실험을 3개씩 수행하고, 각 샘플은 500,000개 세포를 함유하였다. 모든 샘플(배지 단독, 화합물 실시예 번호 48a가 보충된 세포 함유 배지, 및 화합물 실시예 번호 48a가 보충된 배지 중 세포)을 실험 기간 동안 37도 인큐베이터에서 배양하였다. 실험에 사용된 배지는 X-VIVO 15(Lonza, cat no. 04-744Q)였다.

[3372] 세포를 3마이크로몰 농도 화합물 실시예 번호 48a가 보충된 X-VIVO-15 배지 중에 계대 2까지 배양하였다. 융합성에 도달 시, 배지를 흡입에 의해 제거하고 화합물 실시예 번호 48a가 보충되지 않은 신선 배지로 대체하였다.

세포를 화합물 실시예 번호 48a의 부재 하에 추가 1주 동안 배양하였다. 화합물의 부재 하에 1주 배양 후, 배지를 흡입에 의해 제거하고, 화합물 비함유 배지로 리프레싱하고, 추가 6일 동안 화합물의 부재 하에 세포 배양을 계속하였다. 7일차에, 하기 샘플을 생성하였다:

[3373] 5. 2 ㎖의 "블랭크" 배지(화합물이 보충되지 않음)

[3374] 6. 화합물의 존재 하에 배양된 2 ㎖의 배지(세척-전)

[3375] 7. 각각의 세척 샘플 1~10에 대한 2 ㎖의 배지

[3376] 8. 세포 펠렛(세척-후)

[3377] 세포를 세포 리프팅장치(Costar, cat# 3008)를 사용하여 수집하였다.

[3378] 배지 및 세포 펠렛 샘플을 분석하고 고분해능 LC-MS를 사용하여 정량하였다.

[3379] 화합물 실시예 번호 48a의 잔여 수준을 추정하기 위해, 세포 펠렛 및 상청액을 수집하였다. 화합물 실시예 번호 48a의 양을 LC-MS에 의해 결정하였다. 세척-전 배지, 세척 배지(표 11) 및 세포 펠렛에서 화합물 실시예 번호 48a 농도의 추정을 요약한다(표 12). 세척-전 배지 샘플이 가장 높은 수준의 화합물 실시예 번호 48a를 갖는다(대략 35 nM 내지 122 nM 범위). 세척-후 펠렛은 낮지만, 검출 가능한 수준의 화합물 실시예 번호 48a를 갖는다(피코몰 농도).

*표 11*

[3380] *세척-전 배지 및 세척 배지 중 화합물 실시예 번호 48a의 농도 추정*

| 샘플 | 용량(㎖) | 화합물 실시예 번호 48a(nM) 3개 샘플 중 #1 | 화합물 실시예 번호 48a(nM) 3개 샘플 중 #2 | 화합물 실시예 번호 48a(nM) 3개 샘플 중 #3 |
|---|---|---|---|---|
| 세척-전 배지 | 2 | 35.344 | 66.248 | 121.863 |
| 세척 배지 1 | 2 | 0.408 | 0.614 | 0.712 |
| 세척 배지 2 | 2 | BLQ | 0.003 | 0.002 |
| 세척 배지 3 | 2 | BLQ | BLQ | BLQ |
| 세척 배지 4 | 2 | BLQ | BLQ | BLQ |
| 세척 배지 5 | 2 | BLQ | BLQ | BLQ |
| 세척 배지 6 | 2 | BLQ | BLQ | BLQ |
| 세척 배지 7 | 2 | BLQ | BLQ | BLQ |
| 세척 배지 8 | 2 | BLQ | BLQ | BLQ |
| 세척 배지 9 | 2 | BLQ | BLQ | BLQ |
| 세척 배지 10 | 2 | BLQ | BLQ | BLQ |

*표 12*

[3381] *세포 펠렛에서 화합물 실시예 번호 48a의 농도 추정*

| 샘플 | 화합물 실시예 번호 48a(nM) | 화합물 실시예 번호 48a(pg/세포) | 화합물 실시예 번호 48a의 평균(pg/세포) | 펠렛 중 세포의 # | 총 화합물 실시예 번호 48a(pg) |
|---|---|---|---|---|---|
| 세척 후_펠렛 1 | 0.004 | $0.13 \times 10^{-6}$ | $1.5 \times 10^{-6}$ | $0.5 \times 10^{6}$ | 0.75 |
| 세척 후_펠렛 2 | 0.071 | $2.3 \times 10^{-6}$ | | | |
| 세척 후_펠렛 3 | 0.065 | $2.1 \times 10^{-6}$ | | | |

[3382] 3개의 인큐베이션으로부터 세척-전 배지 중 화합물 실시예 번호 48a의 양은 35.344~121.863 nM 범위이다. 세포 펠렛에서 화합물 실시예 번호 48a의 평균 양은 500,000개 세포에 대해 0.75피코그램이었다.

[3383] **실시예 C16: LSC에서 베타-2-마이크로글로불린 유전자의 AAV-매개된 결실에 의한 면역 거부 감소**

[3384] **AAV 벡터 설계:**

[3385] 도 30에 나타낸 벡터 맵은 LSC에서 CRISPR 시스템을 발현하기 위해 사용된 AAV 벡터의 설계를 제공한다. 벡터는 스타필로코커스 아우레우스 Cas9(Ran et al, Nature. 2015 Apr 9;520(7546):186-191) 및 Aar I 제한효소 부위에 삽입된 B2M-특이적 가이드 RNA를 발현하였다.

[3386] **세포 형질도입:** 실시예 B1에 기재된 바와 같이 수득된 LSC를 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 48a가 보충된 X-VIVO15 배지 중에 배양하였다. LSC를 인간 각막으로부터의 단리 직후 또는 LATS 억제제 화합물 중 단리, 부착 및 LSC 단리 8일 후 35 ㎜ 페트리 디쉬에서 50~60% 융합성까지의 증식 후 현탁액 중 형질도입하였다. LSC를 10K, 50K, 100K 또는 200K의 MOI로 형질도입하였다. 벡터 입자를 1×PBS + 0.001% Pluronic으로 이루어진 완충액 중에 희석하고 배양 디쉬 내로 피펫팅하였다. 바이러스 입자 보관 완충액 단독은 형질도입 음성 대조군을 나타내었다. 세포를 5% $CO_2$ 인큐베이터에서 72시간 동안 배양한 후 FACS 분석 및 정렬을 수행하였다.

[3387] **FACS 분석:**

[3388] LSC를 37℃에서 5% $CO_2$에서 20분 동안 아큐타제(ThermoFisher, Cat # A1110501)로 처리하였다. 세포를 스크레이핑 후, 10% 혈청을 함유하는 세포 배양 배지를 사용해서 반응 5를 정지시키고 원심분리 단계(1000 rpm, 5분)를 위해 팔콘(falcon) 튜브로 옮겼다. 배지를 흡입한 후, 세포를 200 ㎕ FACS 완충액(PBS/10% FBS) 중 재현탁하였다.

[3389] B2M 및 HLA-ABC의 발현을 분석하기 위해, 5 ㎕ APC 마우스 항-인간 베타2-마이크로글로불린 항체(Biolegend, Cat #316312) 및 20 ㎕ PE 마우스 항-인간 HLA-ABC 항체(BD Bioscience, Cat # 560168)를 세포 현탁액에 첨가하고 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. FACS 완충액으로의 항체 표지 후 세포를 3회 세척하고 500 ㎕ FACS 완충액 중 재현탁하였다.

[3390] FACS 정렬 전, 세포를 70 ㎛ 필터를 통해 여과하고 정렬 전까지 얼음 상에 보관하였다. 벽으로의 세포 접착을 방지하기 위해, 수집 튜브를 30분 동안 혈청으로 충전한 후 정렬하였다. 세포를 인간 혈청 농축 LSC 배지를 사용해서, BD FACSAria II 기기 상에서 20개의 제조된 수집 튜브 내로 정렬하였다. BD FACSDiva 소프트웨어를 사용하여 FACS 데이터를 분석하였다.

[3391] 도 31에 나타낸 **결과**는 200K의 MOI에서, CRISPR 시스템의 AAV-매개 발현이 B2M의 결실을 구현하였으며, 부착된 세포가 전달감염된 경우 24.9%의 LSC에서 그리고 현탁액 중 세포가 형질도입되는 경우 LSC의 20.0%에서 HLA A, B 및 C의 후속 제거가 일어났음을 나타낸다.

[3392] **실시예 C17: CEC에서 베타-2-마이크로글로불린 유전자의 AAV-매개된 결실에 의한 면역 거부 감소**

[3393] **AAV 벡터 설계:**

[3394] 도 30에 나타낸 벡터 맵은 CEC에서 CRISPR 시스템을 발현하기 위해 사용된 AAV 벡터의 설계를 제공한다. 벡터는 스타필로코커스 아우레우스 Cas9(Ran et al, Nature. 2015 Apr 9;520(7546):186-191) 및 Aar I 제한효소 부위에 삽입된 B2M-특이적 가이드 RNA를 발현하였다.

[3395] **세포 형질도입:**

[3396] 실시예 C1에 기재된 바와 같이 수득된 세포를 37℃에서 10분 동안 100 ㎕ 아큐타제(ThermoFisher)로 배양 디쉬에서 탈착시키고, 세포 현탁액을 원심분리에 의해 헹구고, 10마이크로몰 농도로 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 133 또는 실시예 번호 49(DMSO 중 희석됨) 또는 화합물 없이 음성 대조군 DMSO가 단독 보충된 6-웰 플레이트(Corning)에서 각막 내피 세포 배양 배지(인간 혈청 함유 인간 내피 SF 배지(Invitrogen)) 중에 플레이팅하였다. 세포를 5% $CO_2$에서 37℃에서 배양하였다.

[3397] CEC를 10마이크로몰 농도로 LATS 억제제 화합물 실시예 번호 133 또는 실시예 번호 49(DMSO 중 희석됨)가 보충된 6웰 플레이트(Corning)에서 각막 내피 세포 배양 배지(인간 혈청 함유 인간 내피 SF 배지(Invitrogen)) 중 배양하였다. CEC를 단리, 부착 및 CEC 단리 8일 후 6-웰 플레이트에서 50~60% 융합성까지 LATS 억제제 화합물 중 증식 후 형질도입하였다. CEC를 0.1K, 1K, 5K, 10K, 20K 또는 40K의 MOI로 형질도입하였다. 벡터 입자를 1×PBS + 0.001% Pluronic으로 이루어진 완충액 중 희석하고 배양 디쉬 내로 피펫팅하였다. 바이러스 입자 보관 완충액 단독은 형질도입 음성 대조군을 나타내었다. 세포를 5% $CO_2$ 인큐베이터에서 72시간 동안 배양한 후 FACS 분석 및 정렬을 수행하였다.

[3398] **FACS 분석:**

[3399] CEC를 37℃에서 5% $CO_2$에서 20분 동안 아큐타제(ThermoFisher, Cat # A1110501)로 처리하였다. 세포를 스크레이핑 후, 10% 혈청을 함유하는 세포 배양 배지를 사용해서 반응 5를 정지시키고 원심분리 단계(1000 rpm, 5분)를 위해 팔콘(falcon) 튜브로 옮겼다. 배지를 흡입한 후, 세포를 200 ㎕ FACS 완충액(PBS/10% FBS) 중 재현탁하였다.

[3400] B2M 및 HLA-ABC의 발현을 분석하기 위해, 5 ㎕ APC 마우스 항-인간 베타2-마이크로글로불린 항체(Biolegend, Cat #316312) 및 20 ㎕ PE 마우스 항-인간 HLA-ABC 항체(BD Bioscience, Cat # 560168)를 세포 현탁액에 첨가하고 얼음 상에서 30분 동안 인큐베이션하였다. FACS 완충액으로의 항체 표지 후 세포를 3회 세척하고 500 ㎕ FACS 완충액 중 재현탁하였다.

[3401] FACS 정렬 전, 세포를 70 ㎛ 필터를 통해 여과하고 정렬 전까지 얼음 상에 보관하였다. 벽으로의 세포 접착을 방지하기 위해, 수집 튜브를 30분 동안 혈청으로 충전한 후 정렬하였다. 세포를 인간 혈청 농축 CEC 배양 배지를 사용해서, BD FACSAria II 기기 상에서 20개의 제조된 수집 튜브 내로 정렬하였다. BD FACSDiva 소프트웨어를 사용하여 FACS 데이터를 분석하였다.

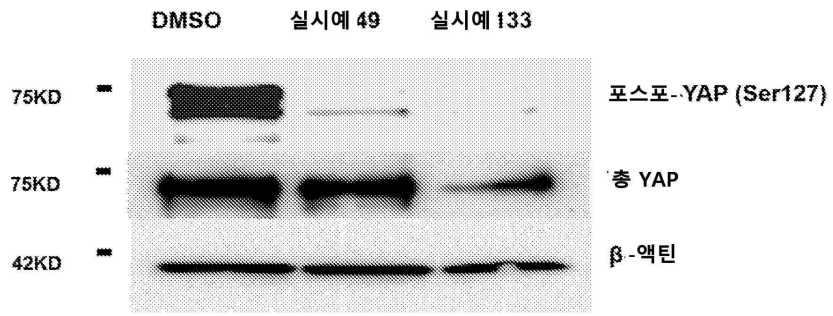
[3402] 도 32에 나타낸 결과는 CRISPR 시스템의 AAV-매개 발현이 B2M의 결실 및 HLA A, B 및 C의 후속 제거를 구현하였음을 나타낸다. 40K의 MOI에서, B2M 결실은 CEC의 17%에서 일어났다.

[3403] 다르게 지시되지 않는 한, 상세히 구체적으로 기재되지 않은 모든 방법, 단계, 기법 및 조작이 수행될 수 있고, 당업자에게 명확할 바와 같이 자체 알려진 방식대로 수행되어 왔다. 예를 들어 표준 핸드북 및 본원에 언급된 일반적인 배경기술, 및 그에 인용된 추가의 참고문헌을 또한 참조한다. 달리 나타내지 않는 한, 본원에 인용된 참고문헌은 각각 그 전문이 참조로 포함된다.

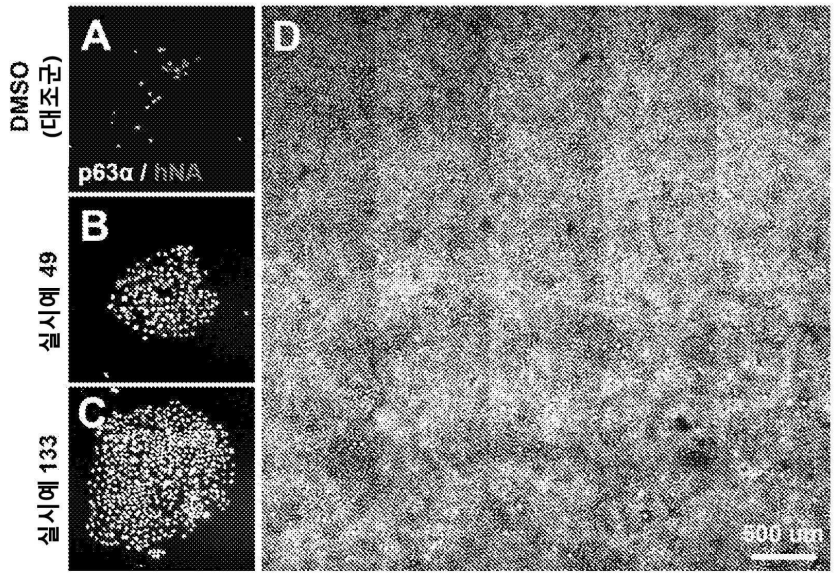
[3404] 본 발명의 청구범위는 비제한적이고 하기에 제공된다. 특정한 구현예 및 청구범위가 본원에 상세히 개시되어 있을지라도, 이는 단지 예시의 목적으로 예로서 행해진 것이며, 첨부된 청구범위의 범위, 또는 임의의 상응하는 추후 출원의 청구범위의 대상의 범위와 관련하여 제한하려는 의도가 아니다. 특히, 본 발명자들은 청구범위에 의해 정의된 바와 같은 본 개시의 취지 및 범위를 벗어나지 않으면서, 본 개시에 다양한 치환, 변경 및 변형이 이루어질 수 있음을 고려한다. 핵산 출발 물질, 관심 클론, 또는 라이브러리 유형의 선택은 본원에 기재된 구현예의 지식을 가진 당업자에게는 일상적인 문제인 것으로 여겨진다. 다른 구현예, 장점 및 변형이 하기 청구범위의 범위 내에 있는 것으로 간주된다. 당업자는 일상적인 실험 범위를 넘지 않고 이를 사용하여 본원에 기재된 발명의 구체적 구현예의 다수의 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다.

## 도면

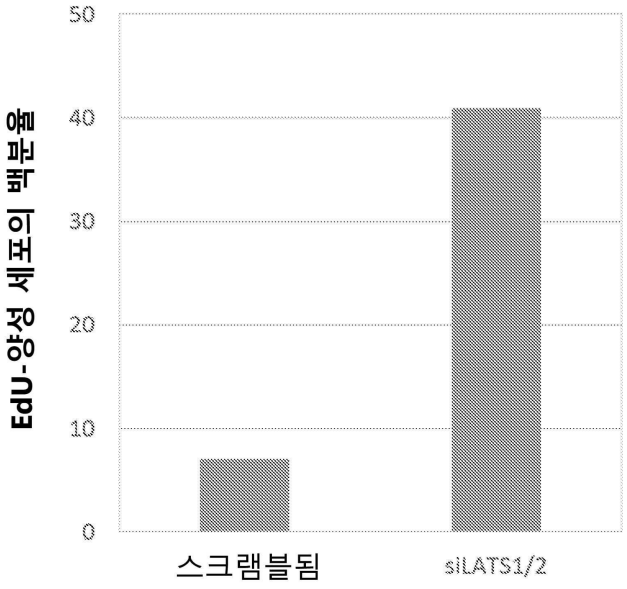
### 도면1



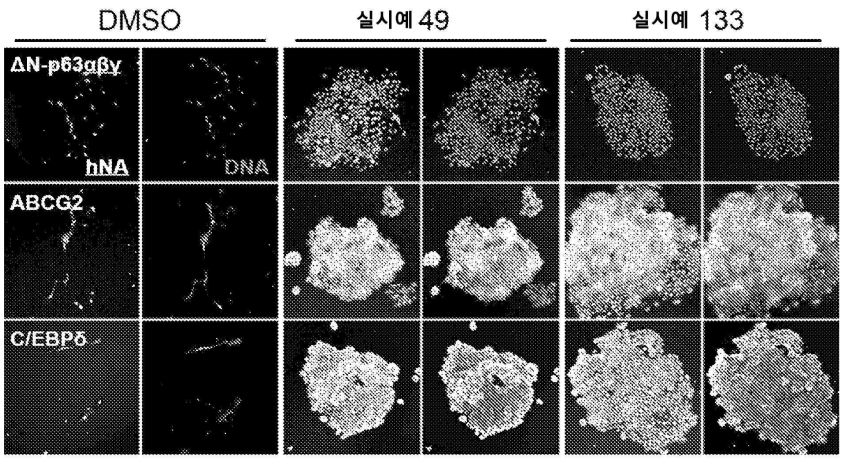
도면2


DMSO
(대조군)
실시예 49
실시예 133
A
B
C
D
p63α / hNA
500 μm

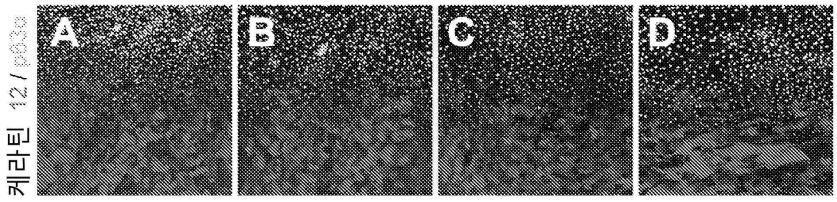
도면3


EdU-양성 세포의 백분율
50
40
30
20
10
0
스크램블됨
siLATS1/2

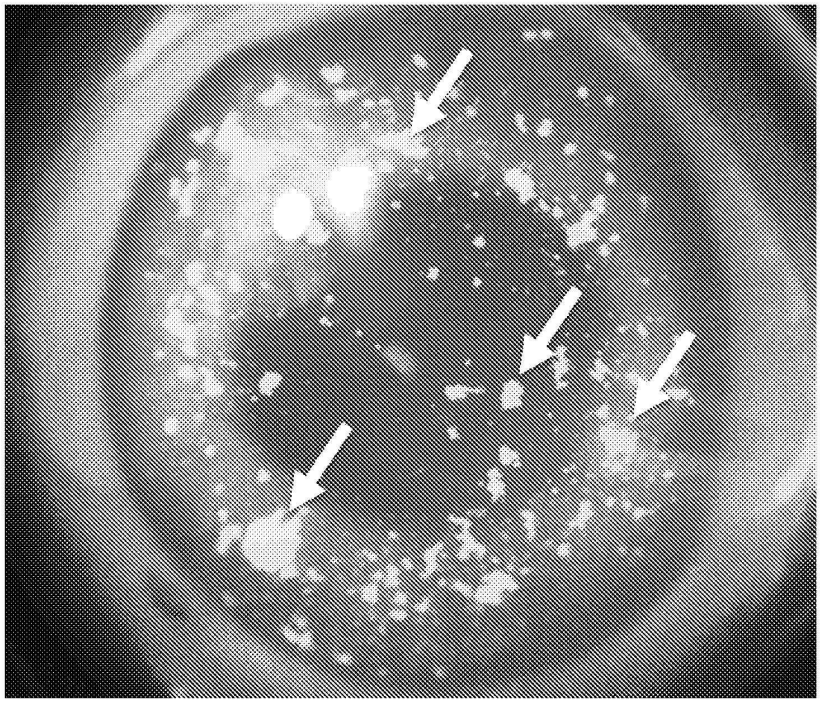
도면4


DMSO
실시예 49
실시예 133
ΔN-p63αβγ
hNA
DNA
ABCG2
C/EBPδ

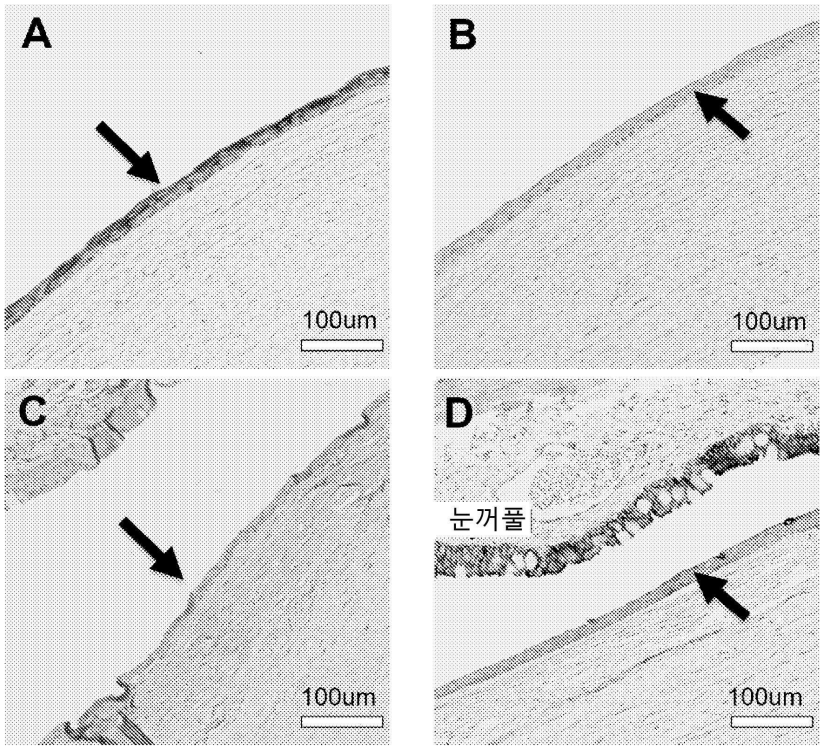
도면5


케라틴 12 / p63α
A
B
C
D

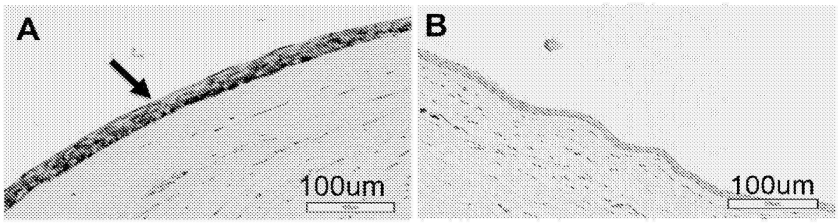
도면6



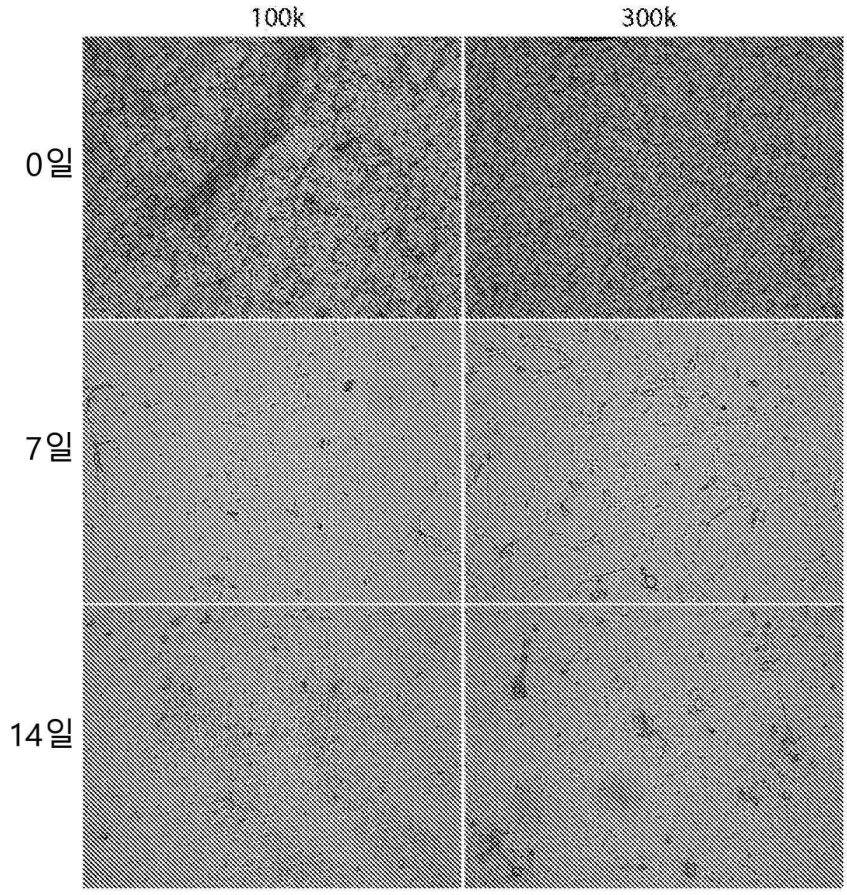
도면7



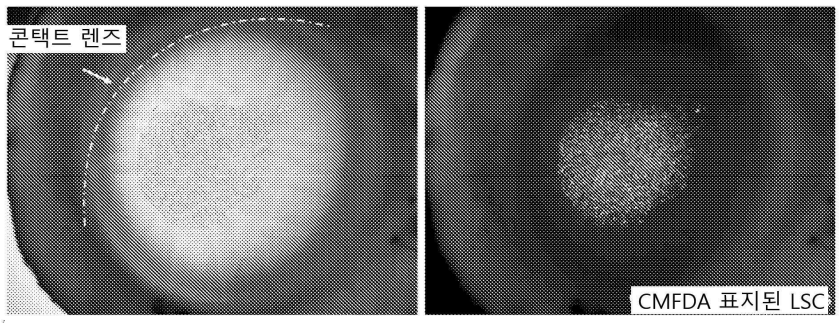

도면8



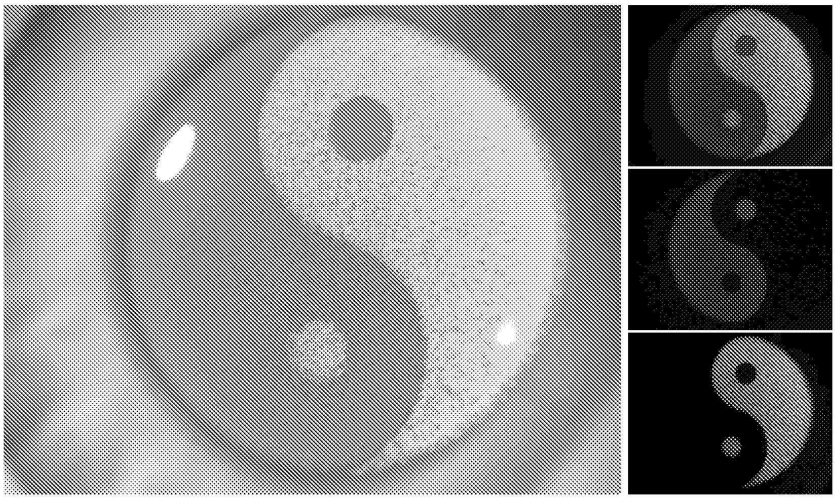
도면9



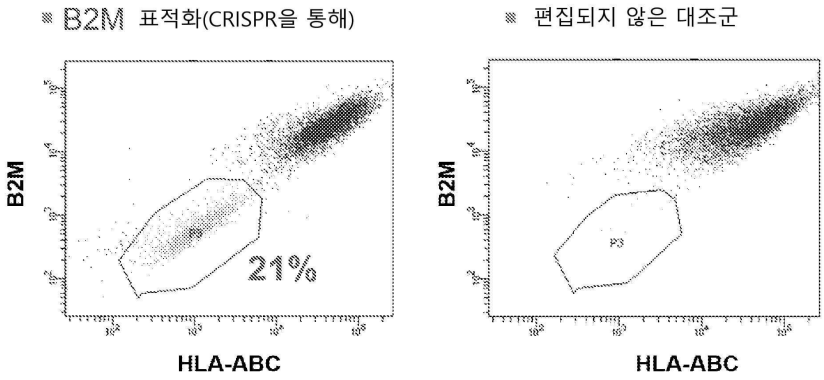

도면10



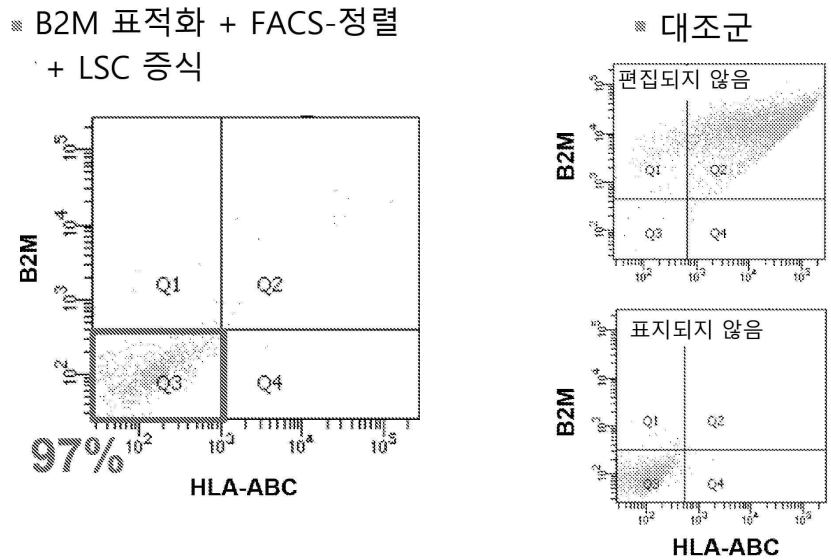
도면11



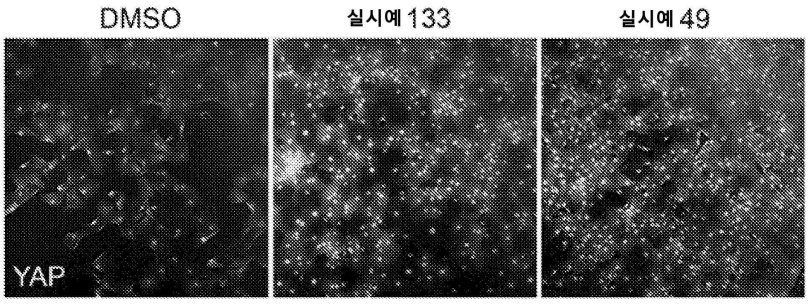
도면12



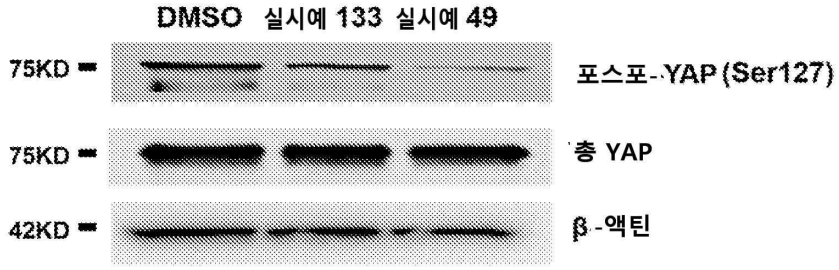

도면13



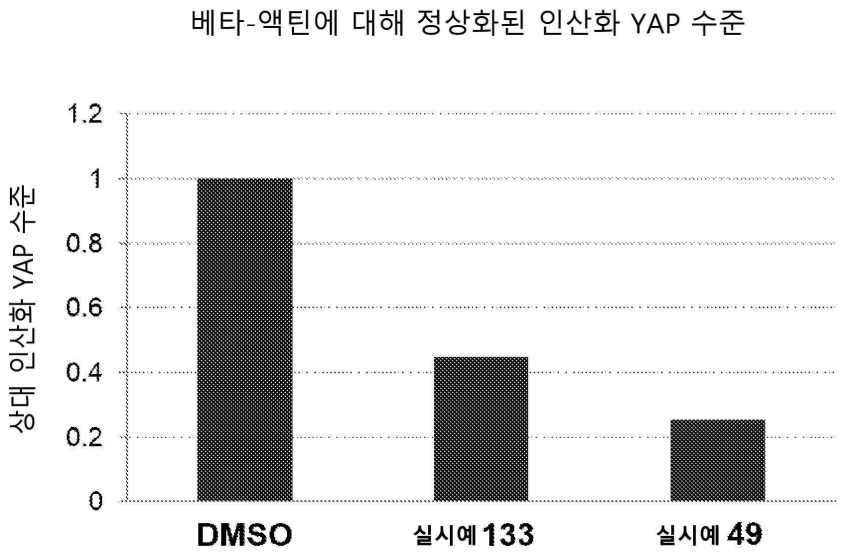
도면14



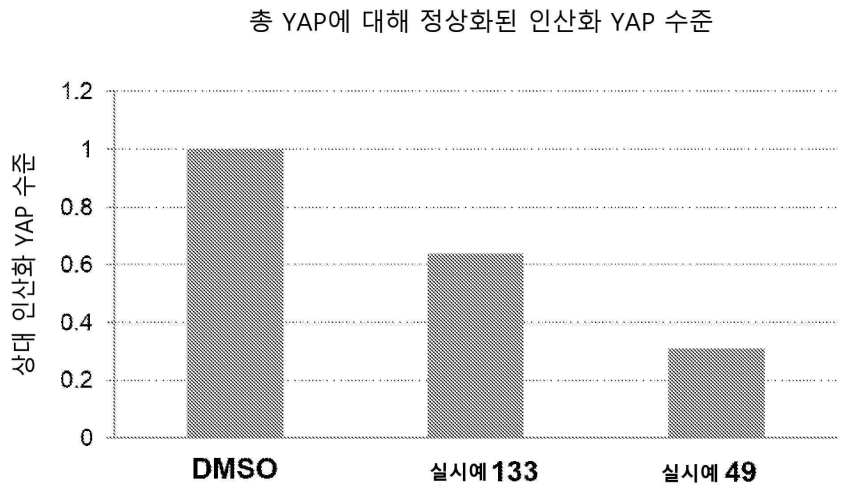

도면15a



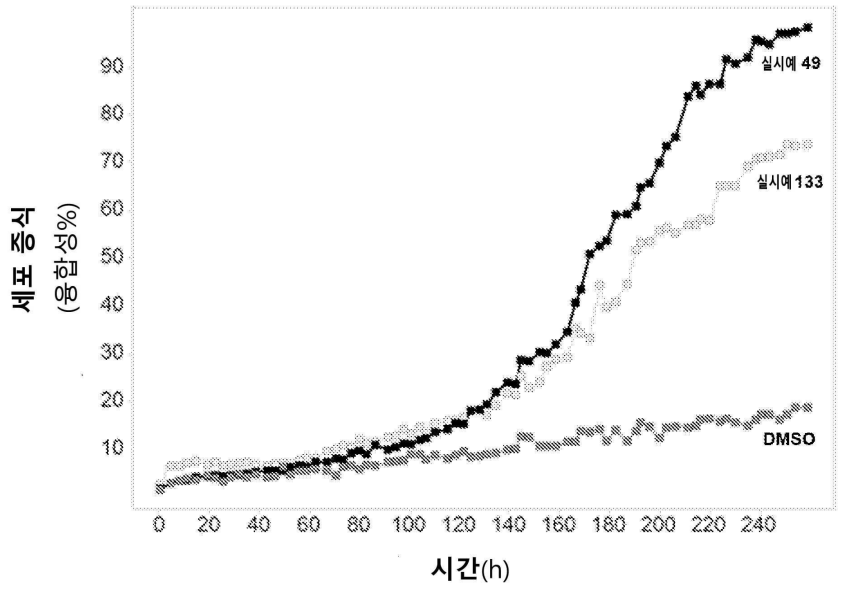

도면15b



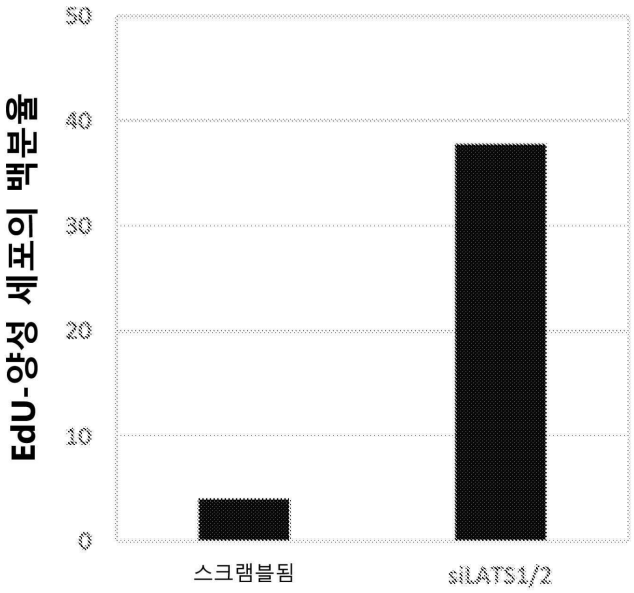
도면15c


총 YAP에 대해 정상화된 인산화 YAP 수준
상대 인산화 YAP 수준
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
DMSO
실시예 133
실시예 49

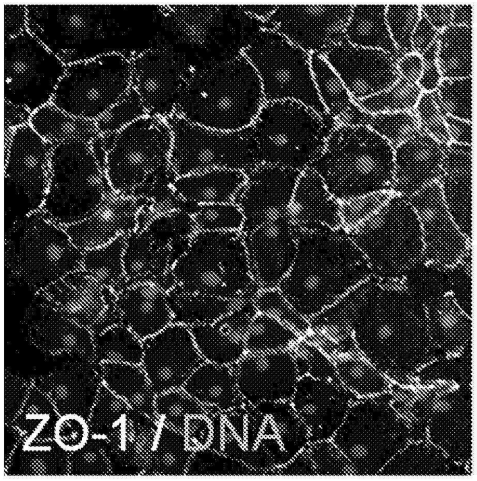
도면16


세포 증식
(융합성%)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
실시예 49
실시예 133
DMSO
0 20 40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240
시간(h)

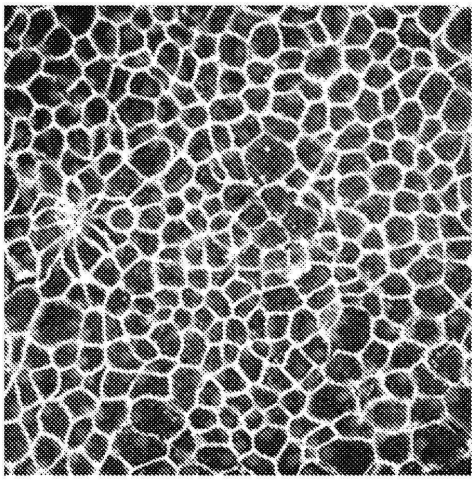
도면17



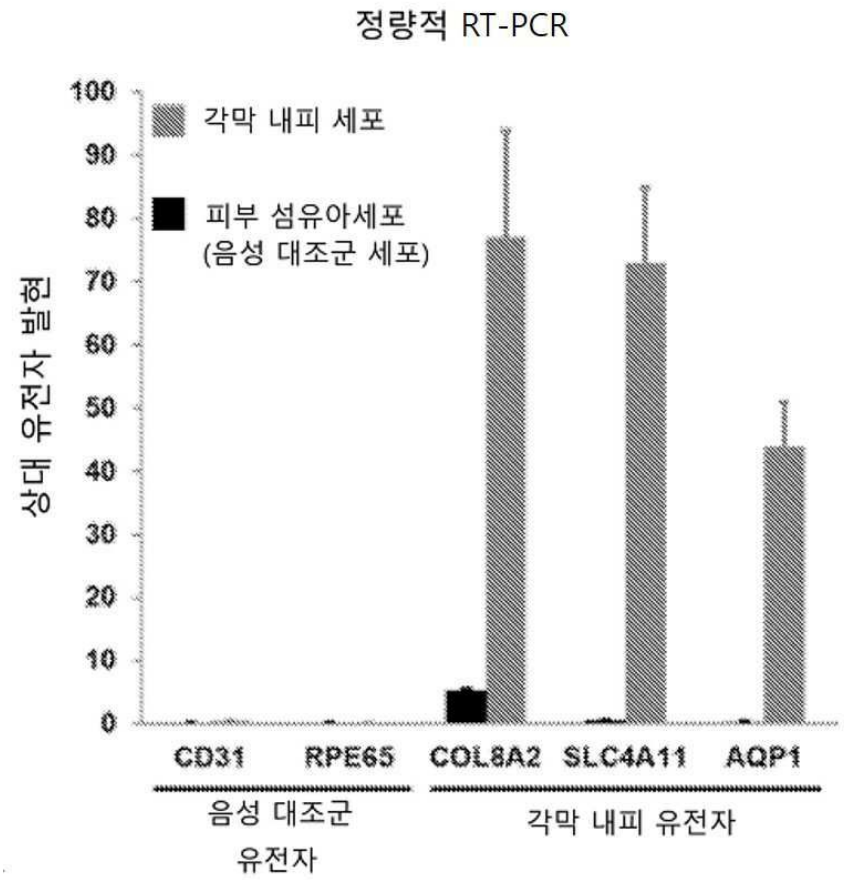

도면18a



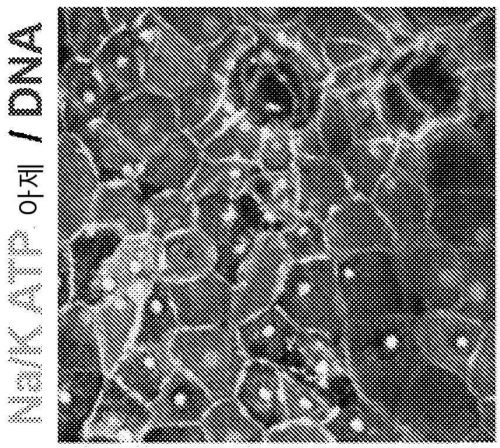

도면18b



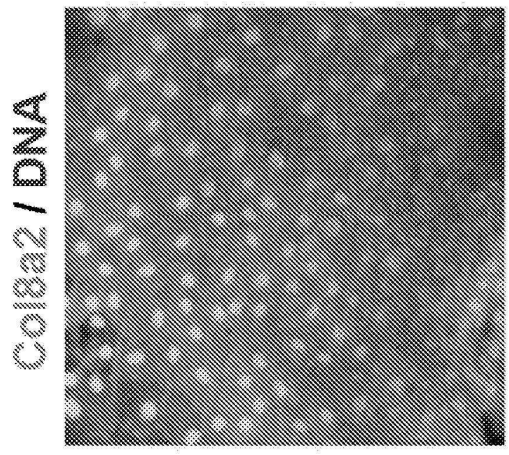
도면19


정량적 RT-PCR
각막 내피 세포
피부 섬유아세포
(음성 대조군 세포)
상대 유전자 발현
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
CD31
RPE65
COL8A2
SLC4A11
AQP1
음성 대조군
유전자
각막 내피 유전자

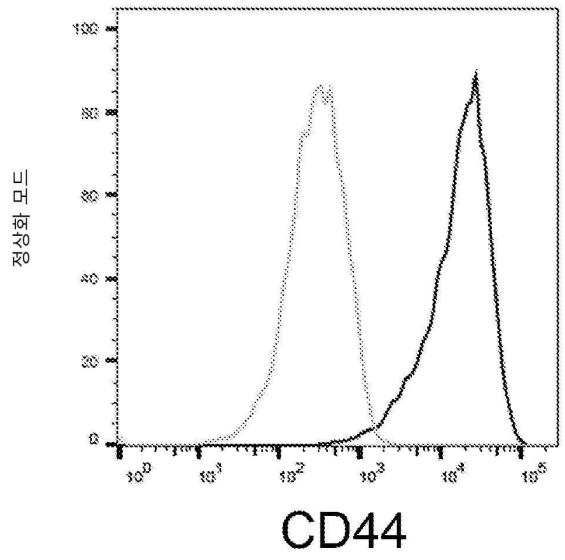
도면20a


Na/K ATP 아제 / DNA

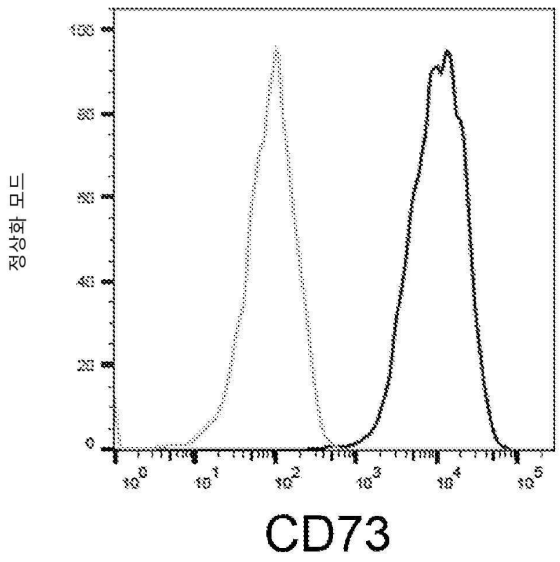
도면20b



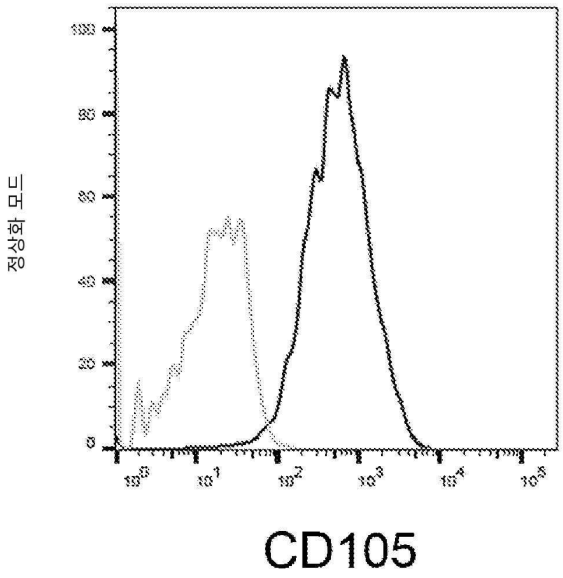

도면21a



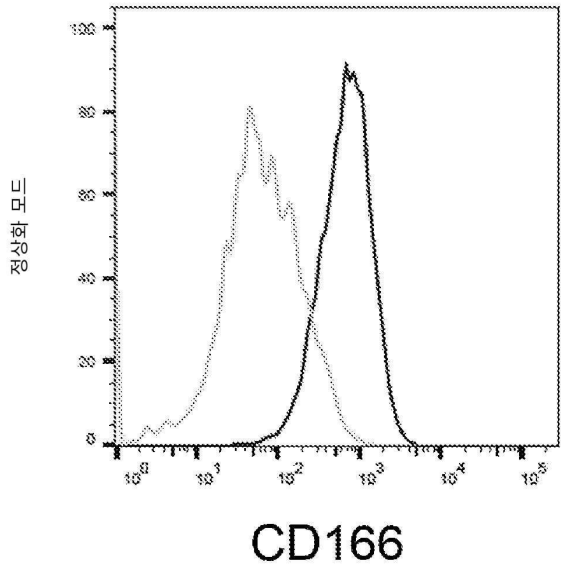
도면21b



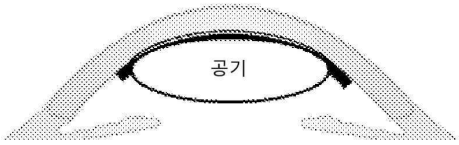

도면21c



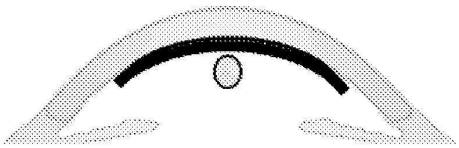
도면21d



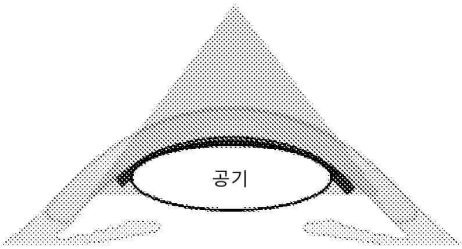

도면22a



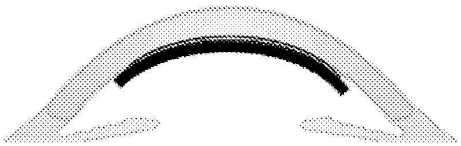

도면22b



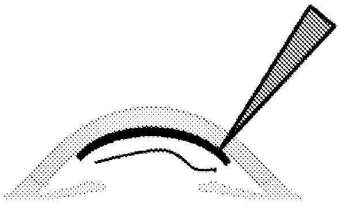
도면22c



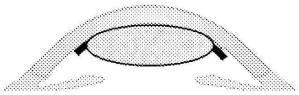
도면22d



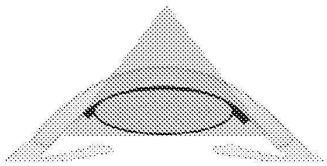
도면23a



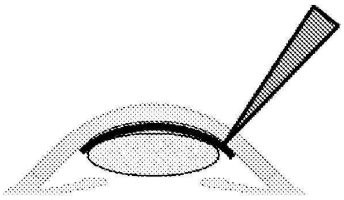
도면23b



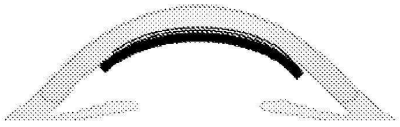
도면23c



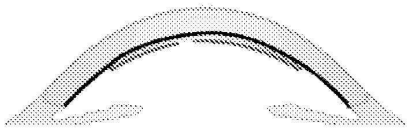
도면23d



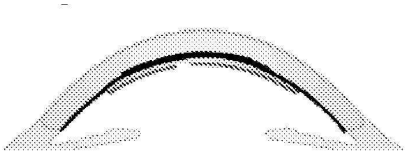
도면23e



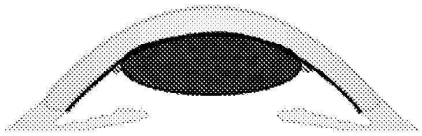
도면24a



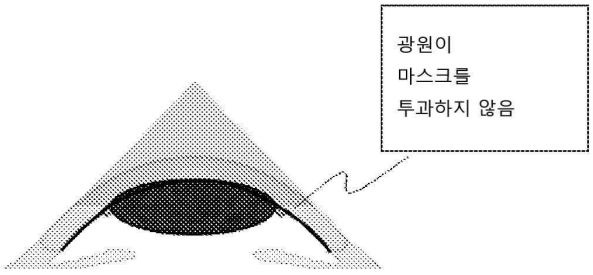
도면24b



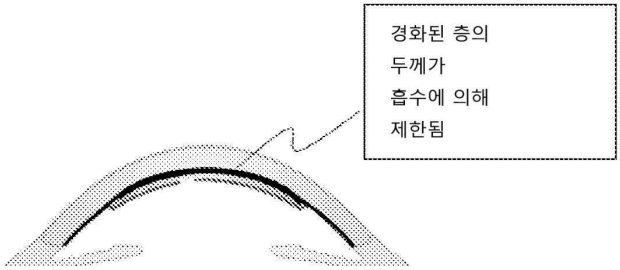
도면24c



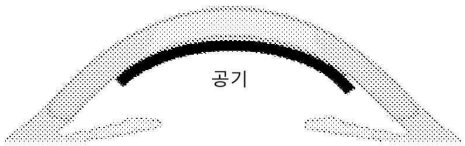
도면24d




도면24e

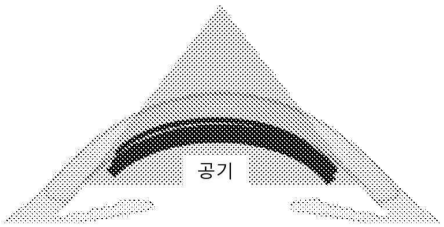


도면25a

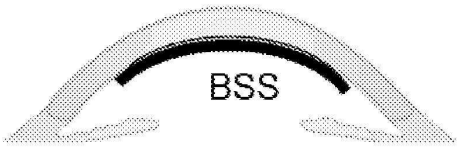



도면25b

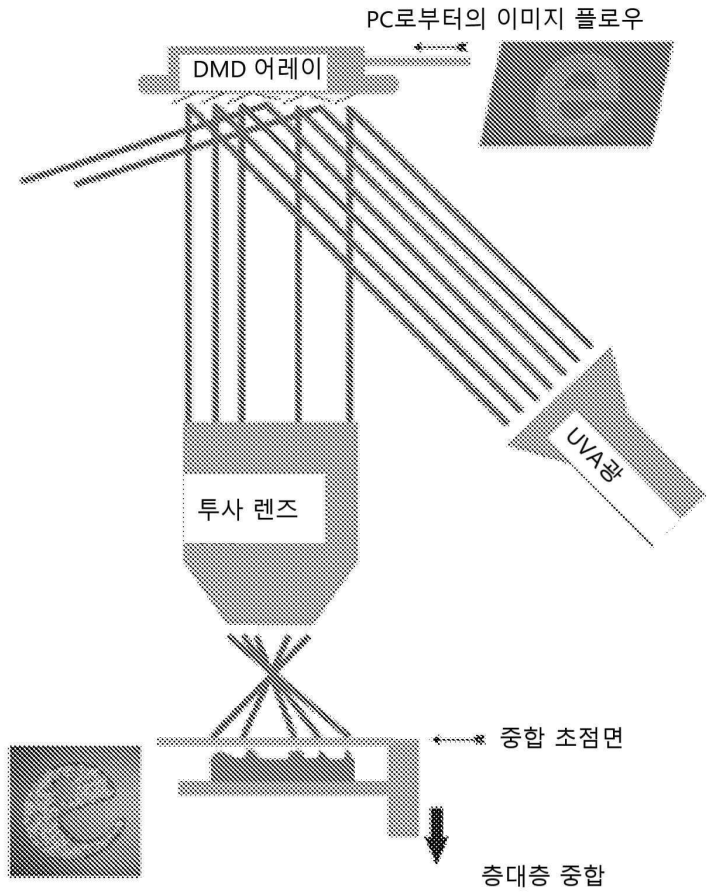
도면25c



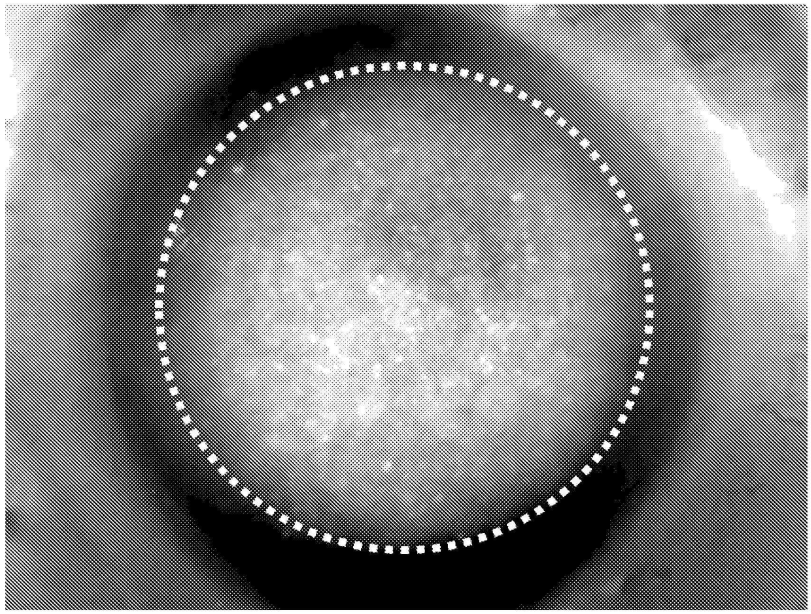

도면25d



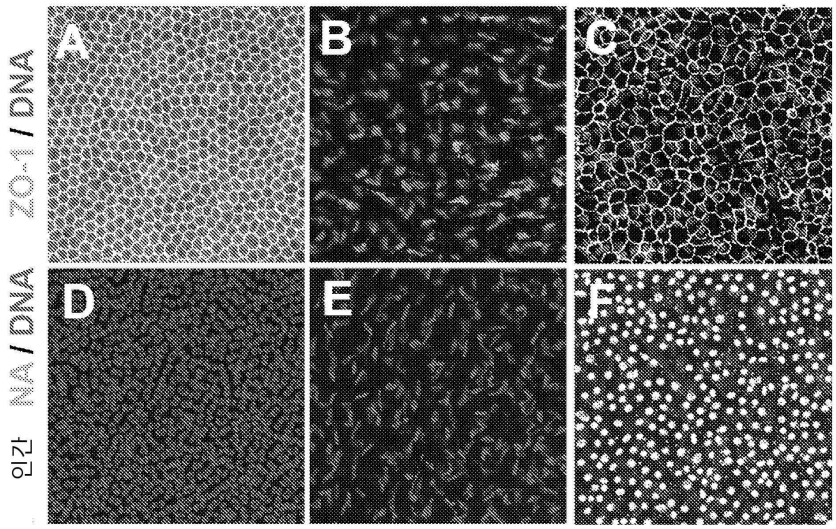
도면26



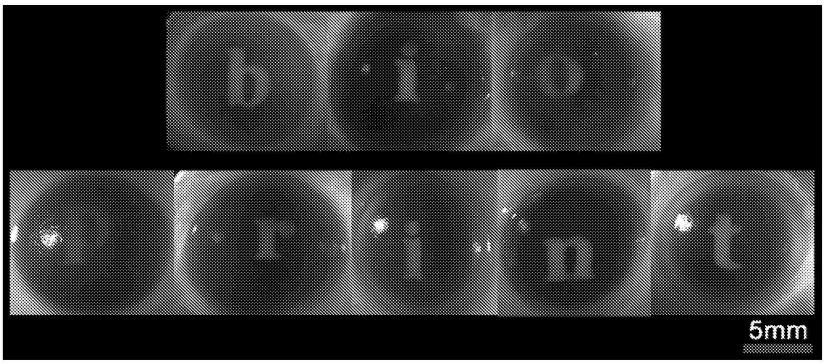

도면27



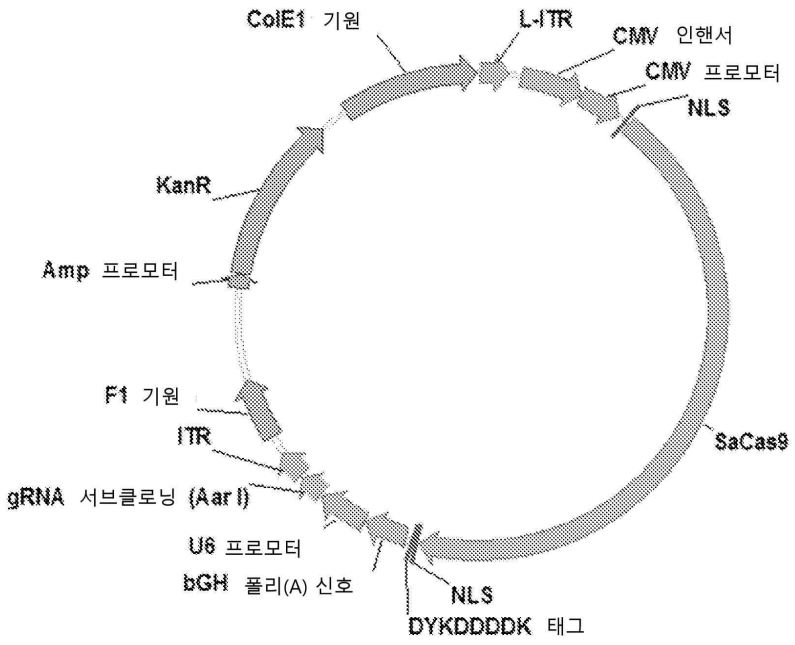
도면28



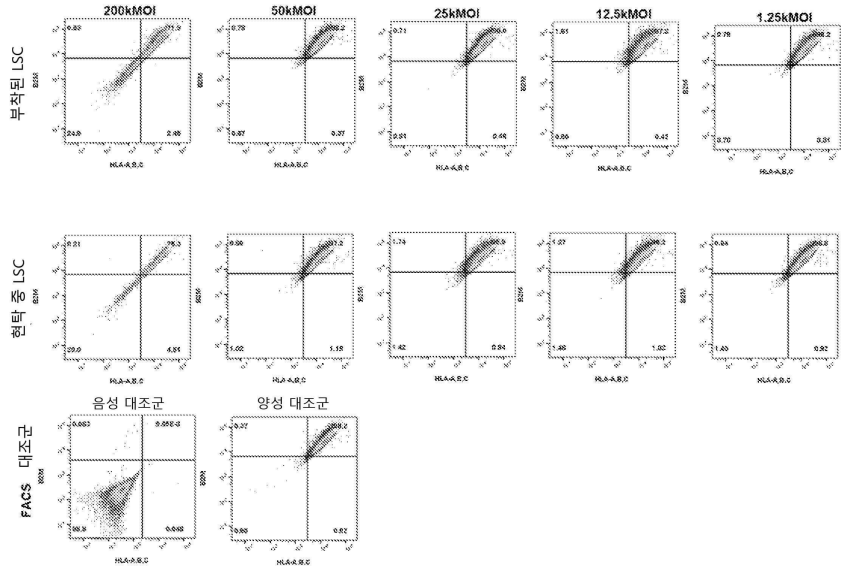

도면29



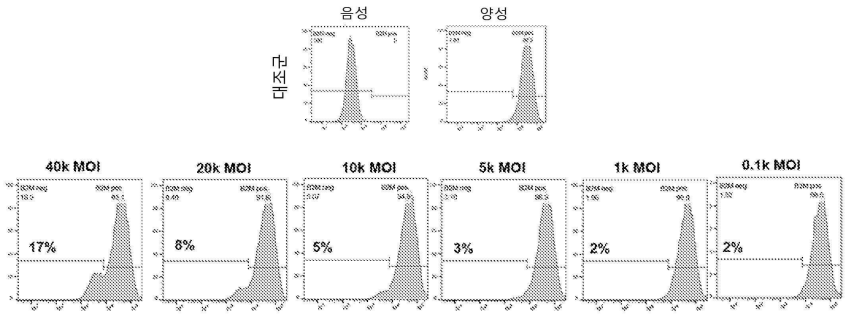

도면30



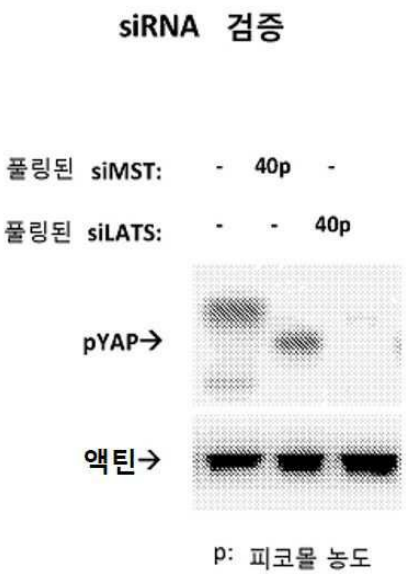
도면31




도면32



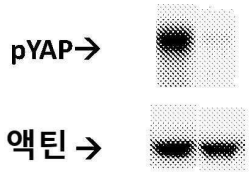

도면33a



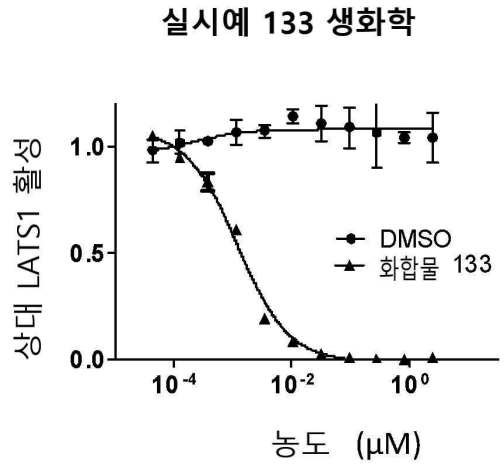
도면33b

실시예 133 세포

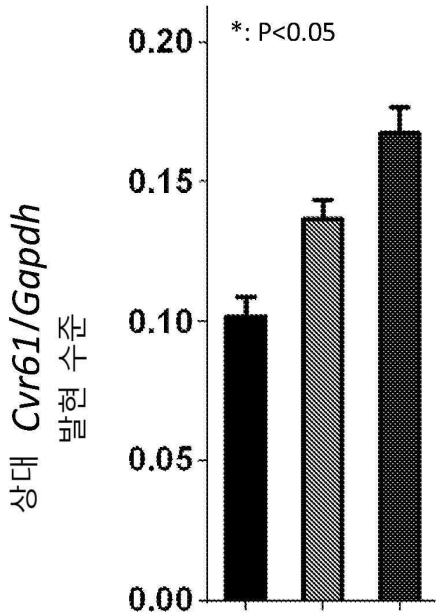
실시예 133 (uM): - 9



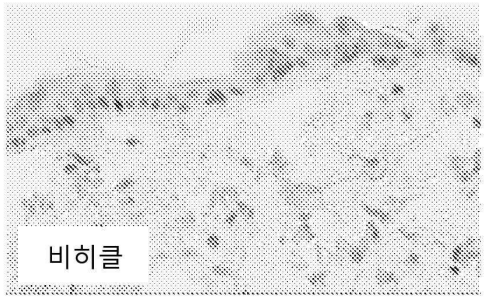

도면33c



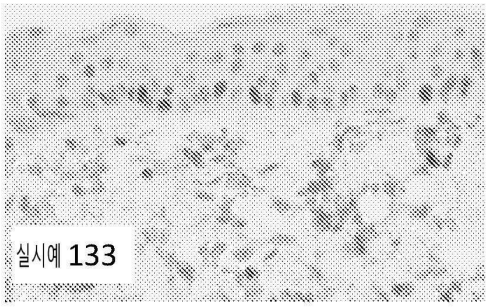
도면34




도면35a

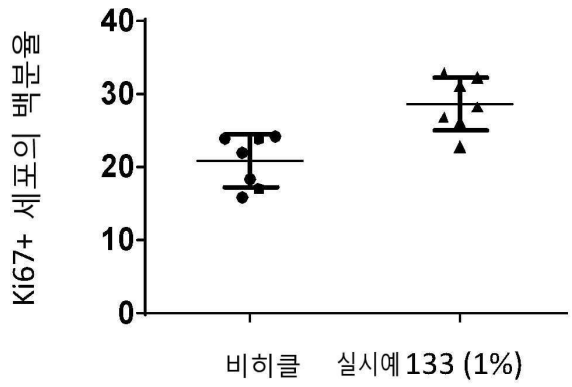



표피




표피

도면35b




서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> NOVARTIS AG

<120> 6-6 FUSED BICYCLIC HETEROARYL COMPOUNDS AND THEIR USE AS LATS INHIBITORS

<130> PAT057699-WO-PCT

<140><141><150> 62/650,232

<151> 2018-03-29

<150> 62/491,475

<151> 2017-04-28

<150> 62/491,484

<151> 2017-04-28

<150> 62/491,573

<151> 2017-04-28

<150> 62/491,526

<151> 2017-04-28

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1130

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Lys Arg Ser Glu Lys Pro Glu Gly Tyr Arg Gln Met Arg Pro Lys

1 5 10 15

Thr Phe Pro Ala Ser Asn Tyr Thr Val Ser Ser Arg Gln Met Leu Gln

20 25 30

Glu Ile Arg Glu Ser Leu Arg Asn Leu Ser Lys Pro Ser Asp Ala Ala

35 40 45

Lys Ala Glu His Asn Met Ser Lys Met Ser Thr Glu Asp Pro Arg Gln

50 55 60

Val Arg Asn Pro Pro Lys Phe Gly Thr His His Lys Ala Leu Gln Glu

65 70 75 80

Ile Arg Asn Ser Leu Leu Pro Phe Ala Asn Glu Thr Asn Ser Ser Arg

85 90 95

Ser Thr Ser Glu Val Asn Pro Gln Met Leu Gln Asp Leu Gln Ala Ala

100 105 110

Gly Phe Asp Glu Asp Met Val Ile Gln Ala Leu Gln Lys Thr Asn Asn

115 120 125

Arg Ser Ile Glu Ala Ala Ile Glu Phe Ile Ser Lys Met Ser Tyr Gln

130 135 140

Asp Pro Arg Arg Glu Gln Met Ala Ala Ala Ala Ala Arg Pro Ile Asn

145 150 155 160

Ala Ser Met Lys Pro Gly Asn Val Gln Gln Ser Val Asn Arg Lys Gln

165 170 175

Ser Trp Lys Gly Ser Lys Glu Ser Leu Val Pro Gln Arg His Gly Pro

180 185 190

Pro Leu Gly Glu Ser Val Ala Tyr His Ser Glu Ser Pro Asn Ser Gln

195 200 205

Thr Asp Val Gly Arg Pro Leu Ser Gly Ser Gly Ile Ser Ala Phe Val

210 215 220

Gln Ala His Pro Ser Asn Gly Gln Arg Val Asn Pro Pro Pro Pro Pro

225 230 235 240

Gln Val Arg Ser Val Thr Pro Pro Pro Pro Pro Arg Gly Gln Thr Pro

245 250 255

Pro Pro Arg Gly Thr Thr Pro Pro Pro Pro Ser Trp Glu Pro Asn Ser

260 265 270

Gln Thr Lys Arg Tyr Ser Gly Asn Met Glu Tyr Val Ile Ser Arg Ile

275 280 285

Ser Pro Val Pro Pro Gly Ala Trp Gln Glu Gly Tyr Pro Pro Pro Pro

290 295 300

Leu Asn Thr Ser Pro Met Asn Pro Pro Asn Gln Gly Gln Arg Gly Ile

305 310 315 320

Ser Ser Val Pro Val Gly Arg Gln Pro Ile Ile Met Gln Ser Ser Ser

325 330 335

Lys Phe Asn Phe Pro Ser Gly Arg Pro Gly Met Gln Asn Gly Thr Gly

340 345 350

Gln Thr Asp Phe Met Ile His Gln Asn Val Val Pro Ala Gly Thr Val

355 360 365

Asn Arg Gln Pro Pro Pro Pro Tyr Pro Leu Thr Ala Ala Asn Gly Gln

370 375 380

Ser Pro Ser Ala Leu Gln Thr Gly Gly Ser Ala Ala Pro Ser Ser Tyr

385 390 395 400

Thr Asn Gly Ser Ile Pro Gln Ser Met Met Val Pro Asn Arg Asn Ser

405 410 415

His Asn Met Glu Leu Tyr Asn Ile Ser Val Pro Gly Leu Gln Thr Asn

420 425 430

Trp Pro Gln Ser Ser Ser Ala Pro Ala Gln Ser Ser Pro Ser Ser Gly

435 440 445

His Glu Ile Pro Thr Trp Gln Pro Asn Ile Pro Val Arg Ser Asn Ser

450 455 460

Phe Asn Asn Pro Leu Gly Asn Arg Ala Ser His Ser Ala Asn Ser Gln

465 470 475 480

Pro Ser Ala Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Pro Ala Pro Ile Gln Gln

485 490 495

Pro Val Lys Ser Met Arg Val Leu Lys Pro Glu Leu Gln Thr Ala Leu
500 505 510
Ala Pro Thr His Pro Ser Trp Ile Pro Gln Pro Ile Gln Thr Val Gln

515 520 525
Pro Ser Pro Phe Pro Glu Gly Thr Ala Ser Asn Val Thr Val Met Pro
530 535 540
Pro Val Ala Glu Ala Pro Asn Tyr Gln Gly Pro Pro Pro Pro Tyr Pro
545 550 555 560
Lys His Leu Leu His Gln Asn Pro Ser Val Pro Pro Tyr Glu Ser Ile
565 570 575
Ser Lys Pro Ser Lys Glu Asp Gln Pro Ser Leu Pro Lys Glu Asp Glu

580 585 590
Ser Glu Lys Ser Tyr Glu Asn Val Asp Ser Gly Asp Lys Glu Lys Lys
595 600 605
Gln Ile Thr Thr Ser Pro Ile Thr Val Arg Lys Asn Lys Lys Asp Glu
610 615 620
Glu Arg Arg Glu Ser Arg Ile Gln Ser Tyr Ser Pro Gln Ala Phe Lys
625 630 635 640
Phe Phe Met Glu Gln His Val Glu Asn Val Leu Lys Ser His Gln Gln

645 650 655
Arg Leu His Arg Lys Lys Gln Leu Glu Asn Glu Met Met Arg Val Gly
660 665 670
Leu Ser Gln Asp Ala Gln Asp Gln Met Arg Lys Met Leu Cys Gln Lys
675 680 685
Glu Ser Asn Tyr Ile Arg Leu Lys Arg Ala Lys Met Asp Lys Ser Met
690 695 700
Phe Val Lys Ile Lys Thr Leu Gly Ile Gly Ala Phe Gly Glu Val Cys

705 710 715 720
Leu Ala Arg Lys Val Asp Thr Lys Ala Leu Tyr Ala Thr Lys Thr Leu
725 730 735
Arg Lys Lys Asp Val Leu Leu Arg Asn Gln Val Ala His Val Lys Ala

740 745 750

Glu Arg Asp Ile Leu Ala Glu Ala Asp Asn Glu Trp Val Val Arg Leu

755 760 765

Tyr Tyr Ser Phe Gln Asp Lys Asp Asn Leu Tyr Phe Val Met Asp Tyr

770 775 780

Ile Pro Gly Gly Asp Met Met Ser Leu Leu Ile Arg Met Gly Ile Phe

785 790 795 800

Pro Glu Ser Leu Ala Arg Phe Tyr Ile Ala Glu Leu Thr Cys Ala Val

805 810 815

Glu Ser Val His Lys Met Gly Phe Ile His Arg Asp Ile Lys Pro Asp

820 825 830

Asn Ile Leu Ile Asp Arg Asp Gly His Ile Lys Leu Thr Asp Phe Gly

835 840 845

Leu Cys Thr Gly Phe Arg Trp Thr His Asp Ser Lys Tyr Tyr Gln Ser

850 855 860

Gly Asp His Pro Arg Gln Asp Ser Met Asp Phe Ser Asn Glu Trp Gly

865 870 875 880

Asp Pro Ser Ser Cys Arg Cys Gly Asp Arg Leu Lys Pro Leu Glu Arg

885 890 895

Arg Ala Ala Arg Gln His Gln Arg Cys Leu Ala His Ser Leu Val Gly

900 905 910

Thr Pro Asn Tyr Ile Ala Pro Glu Val Leu Leu Arg Thr Gly Tyr Thr

915 920 925

Gln Leu Cys Asp Trp Trp Ser Val Gly Val Ile Leu Phe Glu Met Leu

930 935 940

Val Gly Gln Pro Pro Phe Leu Ala Gln Thr Pro Leu Glu Thr Gln Met

945 950 955 960

Lys Val Ile Asn Trp Gln Thr Ser Leu His Ile Pro Pro Gln Ala Lys

965 970 975

Leu Ser Pro Glu Ala Ser Asp Leu Ile Ile Lys Leu Cys Arg Gly Pro

980 985 990

Glu Asp Arg Leu Gly Lys Asn Gly Ala Asp Glu Ile Lys Ala His Pro

995 1000 1005

Phe Phe Lys Thr Ile Asp Phe Ser Ser Asp Leu Arg Gln Gln Ser

1010 1015 1020

Ala Ser Tyr Ile Pro Lys Ile Thr His Pro Thr Asp Thr Ser Asn

1025 1030 1035

Phe Asp Pro Val Asp Pro Asp Lys Leu Trp Ser Asp Asp Asn Glu

1040 1045 1050

Glu Glu Asn Val Asn Asp Thr Leu Asn Gly Trp Tyr Lys Asn Gly

1055 1060 1065

Lys His Pro Glu His Ala Phe Tyr Glu Phe Thr Phe Arg Arg Phe

1070 1075 1080

Phe Asp Asp Asn Gly Tyr Pro Tyr Asn Tyr Pro Lys Pro Ile Glu

1085 1090 1095

Tyr Glu Tyr Ile Asn Ser Gln Gly Ser Glu Gln Gln Ser Asp Glu

1100 1105 1110

Asp Asp Gln Asn Thr Gly Ser Glu Ile Lys Asn Arg Asp Leu Val

1115 1120 1125

Tyr Val

1130

<210> 2

<211> 690

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Lys Arg Ser Glu Lys Pro Glu Gly Tyr Arg Gln Met Arg Pro Lys

1 5 10 15

Thr Phe Pro Ala Ser Asn Tyr Thr Val Ser Ser Arg Gln Met Leu Gln

20 25 30

Glu Ile Arg Glu Ser Leu Arg Asn Leu Ser Lys Pro Ser Asp Ala Ala

35 40 45

Lys Ala Glu His Asn Met Ser Lys Met Ser Thr Glu Asp Pro Arg Gln

50 55 60

Val Arg Asn Pro Pro Lys Phe Gly Thr His His Lys Ala Leu Gln Glu
65 70 75 80

Ile Arg Asn Ser Leu Leu Pro Phe Ala Asn Glu Thr Asn Ser Ser Arg
85 90 95

Ser Thr Ser Glu Val Asn Pro Gln Met Leu Gln Asp Leu Gln Ala Ala
100 105 110

Gly Phe Asp Glu Asp Met Val Ile Gln Ala Leu Gln Lys Thr Asn Asn
115 120 125

Arg Ser Ile Glu Ala Ala Ile Glu Phe Ile Ser Lys Met Ser Tyr Gln
130 135 140

Asp Pro Arg Arg Glu Gln Met Ala Ala Ala Ala Ala Arg Pro Ile Asn
145 150 155 160

Ala Ser Met Lys Pro Gly Asn Val Gln Gln Ser Val Asn Arg Lys Gln
165 170 175

Ser Trp Lys Gly Ser Lys Glu Ser Leu Val Pro Gln Arg His Gly Pro
180 185 190

Pro Leu Gly Glu Ser Val Ala Tyr His Ser Glu Ser Pro Asn Ser Gln
195 200 205

Thr Asp Val Gly Arg Pro Leu Ser Gly Ser Gly Ile Ser Ala Phe Val
210 215 220

Gln Ala His Pro Ser Asn Gly Gln Arg Val Asn Pro Pro Pro Pro Pro
225 230 235 240

Gln Val Arg Ser Val Thr Pro Pro Pro Pro Pro Arg Gly Gln Thr Pro
245 250 255

Pro Pro Arg Gly Thr Thr Pro Pro Pro Pro Ser Trp Glu Pro Asn Ser
260 265 270

Gln Thr Lys Arg Tyr Ser Gly Asn Met Glu Tyr Val Ile Ser Arg Ile
275 280 285

Ser Pro Val Pro Pro Gly Ala Trp Gln Glu Gly Tyr Pro Pro Pro Pro
290 295 300

Leu Asn Thr Ser Pro Met Asn Pro Pro Asn Gln Gly Gln Arg Gly Ile
305 310 315 320
Ser Ser Val Pro Val Gly Arg Gln Pro Ile Ile Met Gln Ser Ser Ser
325 330 335

Lys Phe Asn Phe Pro Ser Gly Arg Pro Gly Met Gln Asn Gly Thr Gly
340 345 350
Gln Thr Asp Phe Met Ile His Gln Asn Val Val Pro Ala Gly Thr Val
355 360 365
Asn Arg Gln Pro Pro Pro Pro Tyr Pro Leu Thr Ala Ala Asn Gly Gln
370 375 380
Ser Pro Ser Ala Leu Gln Thr Gly Gly Ser Ala Ala Pro Ser Ser Tyr
385 390 395 400

Thr Asn Gly Ser Ile Pro Gln Ser Met Met Val Pro Asn Arg Asn Ser
405 410 415
His Asn Met Glu Leu Tyr Asn Ile Ser Val Pro Gly Leu Gln Thr Asn
420 425 430
Trp Pro Gln Ser Ser Ser Ala Pro Ala Gln Ser Ser Pro Ser Ser Gly
435 440 445
His Glu Ile Pro Thr Trp Gln Pro Asn Ile Pro Val Arg Ser Asn Ser
450 455 460

Phe Asn Asn Pro Leu Gly Asn Arg Ala Ser His Ser Ala Asn Ser Gln
465 470 475 480
Pro Ser Ala Thr Thr Val Thr Ala Ile Thr Pro Ala Pro Ile Gln Gln
485 490 495
Pro Val Lys Ser Met Arg Val Leu Lys Pro Glu Leu Gln Thr Ala Leu
500 505 510
Ala Pro Thr His Pro Ser Trp Ile Pro Gln Pro Ile Gln Thr Val Gln
515 520 525

Pro Ser Pro Phe Pro Glu Gly Thr Ala Ser Asn Val Thr Val Met Pro
530 535 540
Pro Val Ala Glu Ala Pro Asn Tyr Gln Gly Pro Pro Pro Pro Tyr Pro

545 550 555 560

Lys His Leu Leu His Gln Asn Pro Ser Val Pro Pro Tyr Glu Ser Ile

565 570 575

Ser Lys Pro Ser Lys Glu Asp Gln Pro Ser Leu Pro Lys Glu Asp Glu

580 585 590

Ser Glu Lys Ser Tyr Glu Asn Val Asp Ser Gly Asp Lys Glu Lys Lys

595 600 605

Gln Ile Thr Thr Ser Pro Ile Thr Val Arg Lys Asn Lys Lys Asp Glu

610 615 620

Glu Arg Arg Glu Ser Arg Ile Gln Ser Tyr Ser Pro Gln Ala Phe Lys

625 630 635 640

Phe Phe Met Glu Gln His Val Glu Asn Val Leu Lys Ser His Gln Gln

645 650 655

Arg Leu His Arg Lys Lys Gln Leu Glu Asn Glu Met Met Arg Val Lys

660 665 670

Pro Phe Lys Met Ser Ile Phe Ile Leu Asn His Leu Phe Ala Trp Cys

675 680 685

Leu Phe

690

<210> 3

<211> 1088

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Arg Pro Lys Thr Phe Pro Ala Thr Thr Tyr Ser Gly Asn Ser Arg

1 5 10 15

Gln Arg Leu Gln Glu Ile Arg Glu Gly Leu Lys Gln Pro Ser Lys Ser

20 25 30

Ser Val Gln Gly Leu Pro Ala Gly Pro Asn Ser Asp Thr Ser Leu Asp

35 40 45

Ala Lys Val Leu Gly Ser Lys Asp Ala Thr Arg Gln Gln Gln Gln Met

50 55 60

Arg Ala Thr Pro Lys Phe Gly Pro Tyr Gln Lys Ala Leu Arg Glu Ile
65 70 75 80
Arg Tyr Ser Leu Leu Pro Phe Ala Asn Glu Ser Gly Thr Ser Ala Ala

85 90 95
Ala Glu Val Asn Arg Gln Met Leu Gln Glu Leu Val Asn Ala Gly Cys
100 105 110
Asp Gln Glu Met Ala Gly Arg Ala Leu Lys Gln Thr Gly Ser Arg Ser
115 120 125
Ile Glu Ala Ala Leu Glu Tyr Ile Ser Lys Met Gly Tyr Leu Asp Pro
130 135 140
Arg Asn Glu Gln Ile Val Arg Val Ile Lys Gln Thr Ser Pro Gly Lys

145 150 155 160
Gly Leu Met Pro Thr Pro Val Thr Arg Arg Pro Ser Phe Glu Gly Thr
165 170 175
Gly Asp Ser Phe Ala Ser Tyr His Gln Leu Ser Gly Thr Pro Tyr Glu
180 185 190
Gly Pro Ser Phe Gly Ala Asp Gly Pro Thr Ala Leu Glu Glu Met Pro
195 200 205
Arg Pro Tyr Val Asp Tyr Leu Phe Pro Gly Val Gly Pro His Gly Pro

210 215 220
Gly His Gln His Gln His Pro Pro Lys Gly Tyr Gly Ala Ser Val Glu
225 230 235 240
Ala Ala Gly Ala His Phe Pro Leu Gln Gly Ala His Tyr Gly Arg Pro
245 250 255
His Leu Leu Val Pro Gly Glu Pro Leu Gly Tyr Gly Val Gln Arg Ser
260 265 270
Pro Ser Phe Gln Ser Lys Thr Pro Pro Glu Thr Gly Gly Tyr Ala Ser

275 280 285
Leu Pro Thr Lys Gly Gln Gly Gly Pro Pro Gly Ala Gly Leu Ala Phe
290 295 300
Pro Pro Pro Ala Ala Gly Leu Tyr Val Pro His Pro His His Lys Gln

305 310 315 320

Ala Gly Pro Ala Ala His Gln Leu His Val Leu Gly Ser Arg Ser Gln

325 330 335

Val Phe Ala Ser Asp Ser Pro Pro Gln Ser Leu Leu Thr Pro Ser Arg

340 345 350

Asn Ser Leu Asn Val Asp Leu Tyr Glu Leu Gly Ser Thr Ser Val Gln

355 360 365

Gln Trp Pro Ala Ala Thr Leu Ala Arg Arg Asp Ser Leu Gln Lys Pro

370 375 380

Gly Leu Glu Ala Pro Pro Arg Ala His Val Ala Phe Arg Pro Asp Cys

385 390 395 400

Pro Val Pro Ser Arg Thr Asn Ser Phe Asn Ser His Gln Pro Arg Pro

405 410 415

Gly Pro Pro Gly Lys Ala Glu Pro Ser Leu Pro Ala Pro Asn Thr Val

420 425 430

Thr Ala Val Thr Ala Ala His Ile Leu His Pro Val Lys Ser Val Arg

435 440 445

Val Leu Arg Pro Glu Pro Gln Thr Ala Val Gly Pro Ser His Pro Ala

450 455 460

Trp Val Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ala

465 470 475 480

Ala Glu Gly Leu Asp Ala Lys Glu Glu His Ala Leu Ala Leu Gly Gly

485 490 495

Ala Gly Ala Phe Pro Leu Asp Val Glu Tyr Gly Gly Pro Asp Arg Arg

500 505 510

Cys Pro Pro Pro Pro Tyr Pro Lys His Leu Leu Leu Arg Ser Lys Ser

515 520 525

Glu Gln Tyr Asp Leu Asp Ser Leu Cys Ala Gly Met Glu Gln Ser Leu

530 535 540

Arg Ala Gly Pro Asn Glu Pro Glu Gly Gly Asp Lys Ser Arg Lys Ser

545 550 555 560

Ala Lys Gly Asp Lys Gly Gly Lys Asp Lys Lys Gln Ile Gln Thr Ser
565 570 575
Pro Val Pro Val Arg Lys Asn Ser Arg Asp Glu Glu Lys Arg Glu Ser
580 585 590
Arg Ile Lys Ser Tyr Ser Pro Tyr Ala Phe Lys Phe Phe Met Glu Gln

595 600 605
His Val Glu Asn Val Ile Lys Thr Tyr Gln Gln Lys Val Asn Arg Arg
610 615 620
Leu Gln Leu Glu Gln Glu Met Ala Lys Ala Gly Leu Cys Glu Ala Glu
625 630 635 640
Gln Glu Gln Met Arg Lys Ile Leu Tyr Gln Lys Glu Ser Asn Tyr Asn
645 650 655
Arg Leu Lys Arg Ala Lys Met Asp Lys Ser Met Phe Val Lys Ile Lys

660 665 670
Thr Leu Gly Ile Gly Ala Phe Gly Glu Val Cys Leu Ala Cys Lys Val
675 680 685
Asp Thr His Ala Leu Tyr Ala Met Lys Thr Leu Arg Lys Lys Asp Val
690 695 700
Leu Asn Arg Asn Gln Val Ala His Val Lys Ala Glu Arg Asp Ile Leu
705 710 715 720
Ala Glu Ala Asp Asn Glu Trp Val Val Lys Leu Tyr Tyr Ser Phe Gln

725 730 735
Asp Lys Asp Ser Leu Tyr Phe Val Met Asp Tyr Ile Pro Gly Gly Asp
740 745 750
Met Met Ser Leu Leu Ile Arg Met Glu Val Phe Pro Glu His Leu Ala
755 760 765
Arg Phe Tyr Ile Ala Glu Leu Thr Leu Ala Ile Glu Ser Val His Lys
770 775 780
Met Gly Phe Ile His Arg Asp Ile Lys Pro Asp Asn Ile Leu Ile Asp

785 790 795 800
Leu Asp Gly His Ile Lys Leu Thr Asp Phe Gly Leu Cys Thr Gly Phe

805 810 815

Arg Trp Thr His Asn Ser Lys Tyr Tyr Gln Lys Gly Ser His Val Arg

820 825 830

Gln Asp Ser Met Glu Pro Ser Asp Leu Trp Asp Asp Val Ser Asn Cys

835 840 845

Arg Cys Gly Asp Arg Leu Lys Thr Leu Glu Gln Arg Ala Arg Lys Gln

850 855 860

His Gln Arg Cys Leu Ala His Ser Leu Val Gly Thr Pro Asn Tyr Ile

865 870 875 880

Ala Pro Glu Val Leu Leu Arg Lys Gly Tyr Thr Gln Leu Cys Asp Trp

885 890 895

Trp Ser Val Gly Val Ile Leu Phe Glu Met Leu Val Gly Gln Pro Pro

900 905 910

Phe Leu Ala Pro Thr Pro Thr Glu Thr Gln Leu Lys Val Ile Asn Trp

915 920 925

Glu Asn Thr Leu His Ile Pro Ala Gln Val Lys Leu Ser Pro Glu Ala

930 935 940

Arg Asp Leu Ile Thr Lys Leu Cys Cys Ser Ala Asp His Arg Leu Gly

945 950 955 960

Arg Asn Gly Ala Asp Asp Leu Lys Ala His Pro Phe Phe Ser Ala Ile

965 970 975

Asp Phe Ser Ser Asp Ile Arg Lys Gln Pro Ala Pro Tyr Val Pro Thr

980 985 990

Ile Ser His Pro Met Asp Thr Ser Asn Phe Asp Pro Val Asp Glu Glu

995 1000 1005

Ser Pro Trp Asn Asp Ala Ser Glu Gly Ser Thr Lys Ala Trp Asp

1010 1015 1020

Thr Leu Thr Ser Pro Asn Asn Lys His Pro Glu His Ala Phe Tyr

1025 1030 1035

Glu Phe Thr Phe Arg Arg Phe Phe Asp Asp Asn Gly Tyr Pro Phe

1040 1045 1050

Arg Cys Pro Lys Pro Ser Gly Ala Glu Ala Ser Gln Ala Glu Ser

1055 1060 1065

Ser Asp Leu Glu Ser Ser Asp Leu Val Asp Gln Thr Glu Gly Cys

1070 1075 1080

Gln Pro Val Tyr Val

1085

<210> 4

<211> 5

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

Target sequence"

<220><

221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 4

nggng 5

<210> 5

<211> 7

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

Target sequence"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 5

nnagaaw 7

<210> 6

<211> 5

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:
Target sequence"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 6

nngrr 5

<210> 7

<211> 8

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:
Target sequence"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(4)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 7

nnnngatt 8

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Simian virus 40

<400> 8

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210> 9

<211> 42

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<400> 9

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uaugcuguuu ug 42

<210> 10

<211> 86

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> misc_feature

<222> (80)..(86)

<223> /note="This region may encompass 1-7 nucleotides"

<220><221> misc_feature

<222> (80)..(86)

<223> /note="This region may or may not be present"

<220>

<221> source

<223> /note="See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments"

<400> 10

aacuuaccaa ggaacagcau agcaaguuaa aauaaggcua guccguuauc aacuugaaaa 60

aguggcaccg agucggugcu uuuuuu 86

<210> 11

<211> 74

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<220><221> misc_feature

<222> (68)..(74)

<223> /note="This region may encompass 1-7 nucleotides"

<220><221> misc_feature

<222> (68)..(74)

<223> /note="This region may or may not be present"

<220>

<221> source

<223> /note="See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments"

<400> 11

aacagcauag caaguuaaaa uaaggcuagu ccguuaucaa cuugaaaaag uggcaccgag 60

ucggugcuuu uuuu 74

<210> 12

<211> 102

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(19)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<220><221> misc_feature

<222> (96)..(102)

<223> /note="This region may encompass 1-7 nucleotides"

<220><221> misc_feature

<222> (96)..(102)

<223> /note="This region may or may not be present"

<220>

<221> source

<223> /note="See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments"

<400> 12

nnnnnnnnnn nnnnnnnnng uuuuagagcu agaaauagca aguuaaaaua aggcuagucc 60

guuaucaacu ugaaaaagug gcaccgaguc ggugcuuuuu uu 102

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:
Target sequence"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(18)

<223> a, c, t, or g

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 13

nnnnnnnnnn nnnnnnnnng g 21

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:
Target sequence"

<220><221
> modified_base

<222> (1)..(16)

<223> a, c, t, or g

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 14

nnnnnnnnnn nnnnnnngg 19

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

Target sequence"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(14)

<223> a, c, t, or g

<220><221> modified_base

<222> (15)..(16)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 15

nnnnnnnnnn nnnnnnagaa w 21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

Target sequence"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(14)

<223> a, c, t, or g

<220><221> modified_base

<222> (15)..(16)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 16

nnnnnnnnnn nnnnnnagaa w 21

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Unknown

<220

><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

Target sequence"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(18)

<223> a, c, t, or g

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<220><221> modified_base

<222> (22)..(22)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 17

nnnnnnnnnn nnnnnnnnng gng 23

<210> 18

<211> 16

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

Target sequence"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(11)

<223> a, c, t, or g

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 18

nnnnnnnnnn nnggng 16

<210> 19

<211> 8

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

Target sequence"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(4)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 19

nnnngatt 8

<210> 20

<211> 8

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

Target sequence"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(4)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 20

nnnngctt 8

<210> 21

<211> 6

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

Target sequence"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 21

nngrrt 6

<210> 22

<211> 6

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

Target sequence"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 22

nngrrv 6

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

'LAGLIDADG' family peptide motif sequence"

<400> 23

Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly

1 5

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 24

Lys Lys Leu Arg Arg Thr Leu Ser Val Ala

1 5 10

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

6xHis tag"

<400> 25

His His His His His His

1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

8xHis tag"

<400> 26

His His His His His His His His

1 5

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<220><221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> Norvaline

<400> 27

Xaa Lys Lys Arg Asn Arg Arg Leu Ser Val Ala

1 5 10

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide"

<400> 28

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 29

<211> 13

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

Target sequence"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(6)

<223> a, c, t, or g

<220><221> modified_base

<222> (7)..(8)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 29

nnnnnnnnag aaw 13

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

Target sequence"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(11)

<223> a, c, t, or g

<220><221> modified_base

<222> (12)..(13)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 30

nnnnnnnnnn nnnagaaw 18

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

Target sequence"

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, t, or g

<220><221> modified_base

<222> (21)..(21)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<220><221> modified_base

<222> (24)..(24)

<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 31

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nggng 25