



등록특허 10-2824318



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년06월24일

(11) 등록번호 10-2824318

(24) 등록일자 2025년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/519 (2006.01) A61K 31/497 (2006.01)

A61K 31/555 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/519 (2013.01)

A61K 31/497 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7018195

(22) 출원일자(국제) 2019년11월18일

심사청구일자 2022년10월27일

(85) 번역문제출일자 2021년06월14일

(65) 공개번호 10-2021-0094570

(43) 공개일자 2021년07월29일

(86) 국제출원번호 PCT/US2019/062064

(87) 국제공개번호 WO 2020/106647

국제공개일자 2020년05월28일

(30) 우선권주장

62/769,355 2018년11월19일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

W02016044772 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

암젠 인크

미국 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크, 원
암젠 센터 드라이브

(72) 발명자

립포드 제임스 러셀

미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스,
리걸 디파트먼트 - 페이튼트 오퍼레이션즈 엠에스
28-5-에이, 원 암젠 센터 드라이브

캐논 주드 로버트

미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스,
리걸 디파트먼트 - 페이튼트 오퍼레이션즈 엠에스
28-5-에이, 원 암젠 센터 드라이브

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인한일

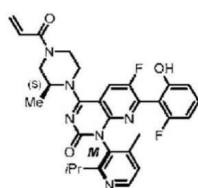
전체 청구항 수 : 총 6 항

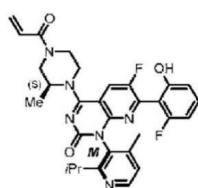
심사관 : 이형준

(54) 발명의 명칭 KRASG12C 억제제 및 하나 이상의 추가 제약 활성제를 포함하는 암 치료용 병용 요법

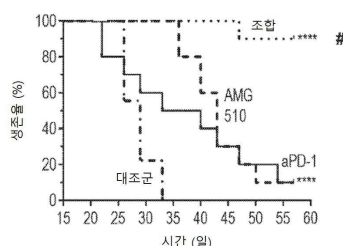
(57) 요약

[화학식 I]



본 발명은  과 같은 KRAS^{G12C} 억제제, 또는 이의 제약상 허용되는 염, 및 하나 이상의 추가 제약 활성제를 포함하는, 특히 암 치료를 위한 병용 요법을 제공한다. 본 발명은 또한, KRAS^{G12C} 억제제 및 하나 이상의 추가 제약 활성제를 함유하는 암 치료용 제약 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도45b



(52) CPC특허분류

A61K 31/555 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 16/2818 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

사이키 앤 와이.

미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스,
리걸 디파트먼트 - 패이튼트 오퍼레이션즈 엠에스
28-5-에이, 원 압젠 센터 드라이브

렉스 카렌 루이스

미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스,
리걸 디파트먼트 - 패이튼트 오퍼레이션즈 엠에스
28-5-에이, 원 압젠 센터 드라이브

(30) 우선권주장

62/821,376 2019년03월20일 미국(US)

62/865,819 2019년06월24일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

환자에서 KRAS G12C 돌연변이에 의해 매개되는 암의 치료에 사용하기 위한 제약 조성물로서, 제약 조성물이 치료 유효량의 6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-(1M)-1-[4-메틸-2-(프로판-2-일)피리딘-3-일]-4-[(2S)-2-메틸-4-(프로프-2-엔오일)피페라진-1-일]피리도[2,3-*d*]피리미딘-2(1H)-온, 또는 이의 제약상 허용되는 염을 포함하며, 제약 조성물이 치료 유효량의 카보플라틴과 조합되어 투여되는 것인, 제약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 암은 비소세포 폐암, 소장암, 충수암, 대장암, 자궁내막암, 췌장암, 피부암, 위암, 비강암, 또는 담관암인, 제약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 암은 췌장암인, 제약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 암은 대장암인, 제약 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 암은 비소세포 폐암인, 제약 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 제약 조성물이 치료 유효량의 6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-(1M)-1-[4-메틸-2-(프로판-2-일)피리딘-3-일]-4-[(2S)-2-메틸-4-(프로프-2-엔오일)피페라진-1-일]피리도[2,3-*d*]피리미딘-2(1H)-온을 포함하는, 제약 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2019년 6월 24일에 출원된 미국 가출원 번호 62/865,819, 2019년 3월 20일에 출원된 미국 가출원 번호 62/821,376, 및 2018년 11월 19일에 출원된 미국 가출원 번호 62/769,355에 대한 우선권 및 이익을 주장하며, 이들 전문은 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 전자 형식의 서열 목록과 함께 제출된다. 서열 목록은 2019년 10월 29일에 생성된 15.4 kb 크기의 A-2326-US-NP_SeqList_102919_ST25.txt라는 파일로 제공된다. 전자 형식 서열 목록의 정보 전체는 본원에 참조로 포함된다.

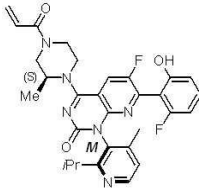
[0005] 기술분야

[0006] 본 발명은 KRAS^{G12C} 억제제 및 하나 이상의 추가 제약 활성제를 포함하는, 특히 암 치료를 위한 병용 요법을 제공한다. 본 발명은 또한, KRAS^{G12C} 억제제 및 하나 이상의 추가 제약 활성제를 함유하는 암 치료용 제약 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] *KRAS* 유전자 돌연변이는 췌장암, 폐 선암종, 대장암, 담낭암, 갑상선암, 및 담관암에서 흔하다. *KRAS* 돌연변이는 또한, 약 25%의 NSCLC 환자에서 관찰되고, 몇몇 연구에서는 *KRAS* 돌연변이가 NSCLC 환자에서 음성적 예후 인자임을 보여주었다. 최근, V-Ki-ras2 커스틴(Kirsten) 래트 육종 바이러스 종양유전자 동족체(*KRAS*) 돌연변이가 대장암에서 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 표적 요법에 대한 내성을 부여하는 것이 발견되었으며; 이에 따라, 돌연변이 상태의 *KRAS*는 TKI 요법의 처방에 앞서 중요한 정보를 제공할 수 있다. 종합하면, 췌장암, 폐 선암종, 또는 대장암 환자, 특히 *KRAS* 돌연변이를 특징으로 하는 이러한 암이 있는 것으로 진단받은 환자, 및 화학요법 이후 진행된 환자들을 위한 새로운 의학적 치료에 대한 요구가 존재한다. 잔기 G12, G13, 및 Q61에서의 종양유발성 *KRAS* 돌연변이는 고형 악성종양에서 발견되는 가장 흔한 RAS 돌연변이를 나타낸다. 최근, 스위치 II 포켓(SIIP)에 인접한 돌연변이 시스테인과 반응하여 *KRAS*를 비활성 GDP-결합 상태로 잠그는 공유 소분자 억제제를 사용하여 *KRAS*^{G12C}가 표적화될 수 있음이 입증되었다.
- [0008] *KRAS*는 인간 암에서 가장 빈번하게 돌연변이가 발생하는 종양유전자이며, 종양에서 주요 신호전달 단백질을 암호화한다. *KRAS*^{G12C} 돌연변이는 유망한 전임상 활성을 갖는 공유 억제제를 설계하는 데 이용되었던 시스테인을 보유하고 있다. 본 발명자들은 새로운 결합 상호작용 및 현저하게 향상된 효력과 선택성을 갖는 일련의 억제제를 최적화하였다. 이러한 노력으로 임상 개발에서 최초의 *KRAS*^{G12C} 억제제인 AMG 510이 발견되었다. 전임상 AMG 510 치료는 *KRAS p.G12C* 종양을 퇴행시켰고 화학요법 및 표적 제제의 항종양 효능을 크게 개선하였다. 면역 능력이 있는 마우스에서, AMG 510 치료는 전염증성 종양 미세환경을 형성시켰고 면역 체크포인트 억제와 함께 지속적 완치를 나타냈다. 완치된 마우스에서는 동질유전자 *KRAS p.G12D* 종양의 성장이 나타나지 않았으며, 이는 공유 항원에 대한 적응 면역을 시사한다. AMG 510은 첫 번째 투여 코호트에서 임상 항종양 활성의 예비 증거를 보여주었으며, 효과적인 치료가 부족한 환자에 대한 잠재적 변형 요법을 나타낸다.
- [0009] *KRAS* 종양단백질은 종양세포 성장 및 생존에 관여하는 세포내 신호전달 경로의 필수 매개체인 GTPase이다. 정상 세포에서, *KRAS*는 비활성 GDP-결합 상태와 활성 GTP-결합 상태 사이를 오가는 분자 스위치로서 기능한다. 이들 상태 간의 전이는 구아닌 뉴클레오티드 교환 인자(GEF)(GTP를 로딩하고 *KRAS*를 활성화함), 및 GTP 가수분해(GTPase 활성화 단백질(GAP)에 의해 촉매되어 *KRAS*를 비활성화함)에 의해 촉진된다. *KRAS*에 대한 GTP 결합은 이펙터의 결합을 촉진하여 RAF-MEK-ERK(MAPK)를 포함한 신호 전달 경로를 작동시킨다. *KRAS*의 체세포, 활성화 돌연변이는 암의 특징이며, GAP의 결합을 방지함으로써, 이펙터 결합을 안정화하고 *KRAS* 신호전달을 강화한다. *KRAS* 돌연변이 종양이 있는 환자는 결과가 현저히 나빠지고 예후가 나빠진다. 하위집단의 종양 유형에 대한 여러 MAPK 경로 단백질(예컨대, MEK, BRAF, EGFR)의 임상적으로 승인된 억제제가 존재하지만, 현재까지 *KRAS* 돌연변이 종양에 대해 선택적인 임상 분자는 없었다. 더욱이, 몇몇 MAPK-경로 표적 요법은 임상적 효능의 부족으로 인해 *KRAS* 돌연변이 종양 치료에 대한 사용이 금지되어 있다. 추가로, 비종양 또는 비돌연변이 선택적 요법은 정상 세포에서의 MAPK 신호전달의 억제로 인해 온-타겟 독성을 도입할 수 있다. 이는 이러한 제제를 표준 치료법 또는 면역요법과 조합하는 유용성을 제한할 수 있다. 따라서, 정상 세포에 불이익을 주지 않는 종양-선택적 요법의 개발에 대해 충족되지 않은 상당한 필요성이 존재한다.
- [0010] *KRAS p.G12C*는 대략적으로 폐 선암종의 13%, 대장암의 3%, 기타 고형 종양의 2%에 존재한다. *KRAS*^{G12C}의 돌연변이 시스테인은 비활성 GDP-결합 형태의 *KRAS*에 존재하는 포켓(P2)에 인접해 있다. P2와 돌연변이 시스테인의 근접성으로 인해 공유 억제제에 대한 광범위한 검색이 이루어졌다. *KRAS*^{G12C}의 첫 번째 보고된 친전자체 스크린은 ARS-1620의 최종 확인으로 이어졌으며, 이는 전임상 *KRAS p.G12C* 모델에서 생체내 효능을 보여준다. Araxes Pharma의 ARS-1620은 개념 증명, 돌연변이-선택적 *KRAS* 억제에 대한 하나의 기준이었지만, 전임상 연구를 위한 도구 화합물로 자리 매김하였다. Amgen, Inc.의 과학자들은 *KRAS*^{G12C}에서 이전에 개발되지 않은 표면 홈을 활용하여 효력과 선택성을 실질적으로 향상시키는 일련의 새로운 아크릴아미드계 분자를 확인하였다. 집약적인 친전자체 스크리닝 및 구조 기반 설계는 인간을 대상으로 한 임상 시험에 도달한 최초의 *KRAS*^{G12C} 억제제인 AMG 510의 발견으로 정점에 이르렀다(www.clinicaltrials.gov NCT03600883 참조). 본 발명은 AMG 510의 강력한 전임상 활성, 단일요법으로서 또는 다른 요법과 조합되었을 때의 종양세포 사멸을 향상시키는 능력, 및 종양 미세환경을 면역요법에 매우 민감하게 만드는 면역세포 침윤에 대한 극적인 영향을 포함한다. 임상 효능에 대한 예비 증거도 본원에 제시된다.

발명의 내용



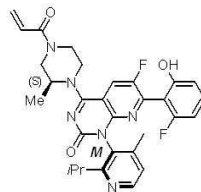
- [0011] 본 발명은 AMG 510, 또는 이의 제약상 허용되는 염; 하나 이상의 치료 또는 제약 활성제; 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.
- [0012] 본 발명은 항-PD-1 항체, 화학요법제, MEK 억제제, EGFR 억제제, TOR 억제제, SHP2 억제제, PI3K 억제제, 및 AKT 억제제로부터 선택되는 적어도 하나의 치료와 AMG 510 또는 이의 제약상 허용되는 염의 조합을 사용하여, 폐암, 결장암, 및 췌장암을 포함한(이에 한정되지 않음) 고형 종양과 같은 암을 치료하는 방법을 추가로 포함한다.
- [0013] 본 발명은 2개의 KRAS^{G12C} 대립형질을 포함하는 단리된 세포주를 추가로 포함하며, 여기서 세포주는 CT-26 *KRAS p.G12C*이다.
- [0014] 본 발명은 2개의 KRAS^{G12C} 대립형질을 포함하는 세포주를 생성하는 방법으로서,
- [0015] a) 2개의 KRAS^{G12D} 대립형질을 포함하는 세포주를, 2개의 KRAS^{G12C} 대립형질이 형성되도록 2개의 KRAS 대립형질 모두에 뉴클레오티드의 대체를 유도하는 CRISPR 작제물과 함께 인큐베이션하는 단계; 및
- [0016] b) 2개의 KRAS^{G12C} 대립형질을 포함하는 세포주를 단리하는 단계를 포함하는 방법을 추가로 포함한다.
- [0017] **제1 세트의 구현예**
- [0018] 1. 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명은 췌장암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 적어도 하나의 화학요법제를 투여하는 단계를 포함하는 췌장암 치료 방법을 포함한다.
- [0019] 2. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 결장암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 적어도 하나의 화학요법제를 투여하는 단계를 포함하는 결장암 치료 방법을 포함한다.
- [0020] 3. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 2에 있어서, 결장암이 *KRAS p.G12C* 돌연변이를 갖는, 방법을 포함한다.
- [0021] 4. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 폐암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 화학요법제를 투여하는 단계를 포함하는 폐암 치료 방법을 포함한다.
- [0022] 일부 이러한 구현예에서, 폐암은 소세포 폐암종이다.
- [0023] 5. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 1에 있어서, 췌장암이 *KRAS p.G12C* 돌연변이를 갖는, 방법을 포함한다.
- [0024] 6. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 1 내지 5 중 어느 한 구현예에 있어서, 화학요법제가 카보플라틴인, 방법을 포함한다.
- [0025] 7. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 췌장암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 MEK 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 췌장암 치료 방법을 포함한다.
- [0026] 8. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 결장암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 MEK 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 결장암 치료 방법을 포함한다.
- [0027] 9. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 폐암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 MEK 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 폐암 치료 방법을 포함한다.
- [0028] 10. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 9에 있어서, 폐암이 *p.KRAS G12C* 돌연변이를 갖는, 방법을 포함한다.
- [0029] 11. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 7 내지 10 중 어느 한 구현예에 있어서, MEK 억제제가

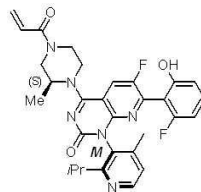
트라메티닙인, 방법을 포함한다.

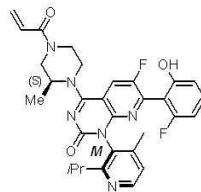
- [0030] 12. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 7 내지 10 중 어느 한 구현예에 있어서, MEK 억제제가 피마서텅, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973, 또는 AZD8330인, 방법을 포함한다.
- [0031] 13. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 췌장암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 EGFR 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 췌장암 치료 방법을 포함한다.
- [0032] 14. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 결장암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 EGFR 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 결장암 치료 방법을 포함한다.
- [0033] 15. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 폐암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 EGFR 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 폐암 치료 방법을 포함한다.
- [0034] 16. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 13 내지 15 중 어느 한 구현예에 있어서, EGFR 억제제가 아파티닙인, 방법을 포함한다.
- [0035] 17. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 13 및 15 중 어느 한 구현예에 있어서, EGFR 억제제가 에를로티닙인, 방법을 포함한다.
- [0036] 18. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 15에 있어서, EGFR 억제제가 라파티닙인, 방법을 포함한다.
- [0037] 19. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 췌장암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 SHP2 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 췌장암 치료 방법을 포함한다.
- [0038] 20. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 결장암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 SHP2 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 결장암 치료 방법을 포함한다.
- [0039] 21. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 폐암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 SHP2 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 폐암 치료 방법을 포함한다.
- [0040] 22. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 19 내지 21 중 어느 한 구현예에 있어서, SHP2 억제제가 RMC-4550인, 방법을 포함한다.
- [0041] 23. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 22에 있어서, SHP2 억제제가 RMC 4550인, 방법을 포함한다.
- [0042] 24. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 췌장암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 PI3K 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 췌장암 치료 방법을 포함한다.
- [0043] 25. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 결장암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 PI3K 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 결장암 치료 방법을 포함한다.
- [0044] 26. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 폐암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 PI3K 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 폐암 치료 방법을 포함한다.
- [0045] 27. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 24 내지 26 중 어느 한 구현예에 있어서, PI3K 억제제가 AMG 511인, 방법을 포함한다.
- [0046] 28. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 26에 있어서, PI3K 억제제가 부파리십인, 방법을 포함한다.
- [0047] 29. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 췌장암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 AKT 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 췌장암 치료 방법을 포함한다.
- [0048] 30. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 폐암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억

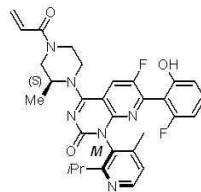
제제 및 AKT 억제제를 투여하는 단계를 포함하는 폐암 치료 방법을 포함한다.

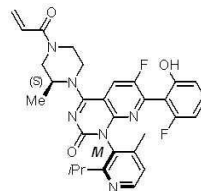
- [0049] 31. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 29 및 30 중 어느 한 구현예에 있어서, AKT 억제제가 AZD5363인, 방법을 포함한다.
- [0050] 32. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 결장암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 EGFR 항체를 투여하는 단계를 포함하는 결장암 치료 방법을 포함한다.
- [0051] 33. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 32에 있어서, EGFR 항체가 세툽시맙인, 방법을 포함한다.
- [0052] 32. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 결장암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 항-PD-1 항체를 투여하는 단계를 포함하는 결장암 치료 방법을 포함한다.
- [0053] 33. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 32에 있어서, 항-PD-1 항체가 AMG 404, 캄브롤리주맙, 및 니볼루맙으로부터 선택되는, 방법을 포함한다.
- [0054] 34. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 33에 있어서, 항-PD-1 항체가 캄브롤리주맙인, 방법을 포함한다.
- [0055] 35. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 33에 있어서, 항-PD-1 항체가 AMG 404인, 방법을 포함한다.
- [0056] 36. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 33에 있어서, 항-PD-1 항체가 니볼루맙인, 방법을 포함한다.

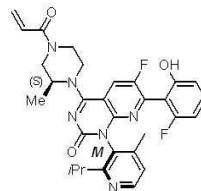


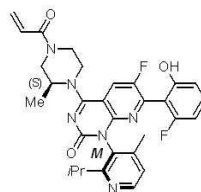
- [0057] 37. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 , 또는 이의 제약상 허용되는 염; 카보플라틴; 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.

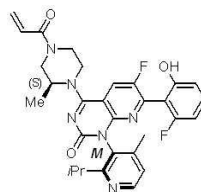


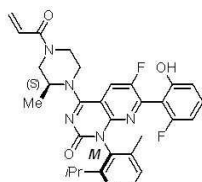
- [0058] 38. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 , 또는 이의 제약상 허용되는 염; 트라메티닙; 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.



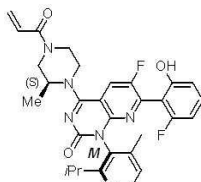
- [0059] 39. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 , 또는 이의 제약상 허용되는 염; 아파티닙; 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.



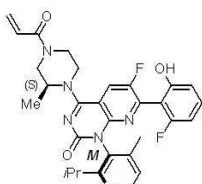
- [0060] 40. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 , 또는 이의 제약상 허용되는 염; 에를로티닙; 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.



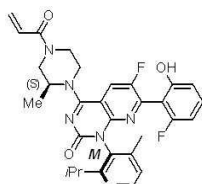
[0061] 41. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 , 또는 이의 제약상 허용되는 염; 라파티닙; 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.



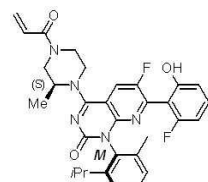
[0062] 42. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 , 또는 이의 제약상 허용되는 염; RMC-4550; 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.



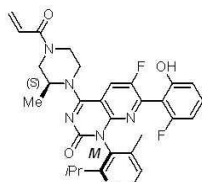
[0063] 43. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 , 또는 이의 제약상 허용되는 염; AMG 511; 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.



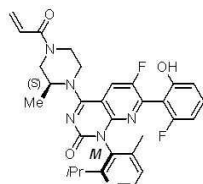
[0064] 44. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 , 또는 이의 제약상 허용되는 염; 부파리십; 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.



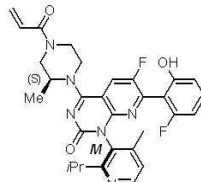
[0065] 45. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 , 또는 이의 제약상 허용되는 염; AZD5363; 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.



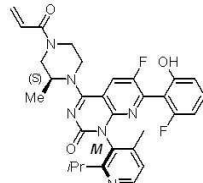
[0066] 46. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 , 또는 이의 제약상 허용되는 염; 세톡시맵; 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.



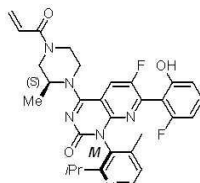
[0067] 47. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 , 또는 이의 제약상 허용되는 염; 항-PD-1 항체; 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.



[0068] 48. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 , 또는 이의 제약상 허용되는 염; AMG 404; 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.

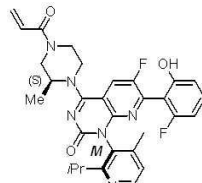


[0069] 49. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 , 또는 이의 제약상 허용되는 염; 펙브롤리주맙; 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.



[0070] 50. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 , 또는 이의 제약상 허용되는 염; 니볼루맙; 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 포함한다.

[0071] 51. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 1 내지 4, 또는 7 내지 36 중 어느 한 구현예에



있어서, KRAS^{G12C} 억제제가 , 또는 이의 제약상 허용되는 염인, 방법을 포함한다.

[0072] 52. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 고형 종양 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 MEK 억제제 의약의 조합을 포함한다.

[0073] 53. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 폐암 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 MEK 억제제 의약의 조합을 포함한다.

[0074] 54. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 결장암 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 MEK 억제제 의약의 조합을 포함한다.

[0075] 55. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 췌장암 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 MEK 억제제 의약의 조합을 포함한다.

[0076] 56. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 고형 종양 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 화학요법제 의약의 조합을 포함한다.

[0077] 57. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 폐암 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 화학요법제 의약의 조합을 포함한다.

[0078] 58. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 결장암 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 화학요법제 의약의 조합을 포함한다.

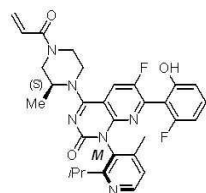
[0079] 59. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 췌장암 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 화학요법제 의약의 조합을 포함한다.

- [0080] 60. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 고형 종양 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 EGFR 억제제 의약의 조합을 포함한다.
- [0081] 61. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 폐암 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 EGFR 억제제 의약의 조합을 포함한다.
- [0082] 62. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 결장암 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 EGFR 억제제 의약의 조합을 포함한다.
- [0083] 63. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 췌장암 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 EGFR 억제제 의약의 조합을 포함한다.
- [0084] 64. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 고형 종양 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 항-PD-1 항체 의약의 조합을 포함한다.
- [0085] 65. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 폐암 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 항-PD-1 항체 의약의 조합을 포함한다.
- [0086] 66. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 결장암 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 항-PD-1 항체 의약의 조합을 포함한다.
- [0087] 67. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 췌장암 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 항-PD-1 항체 의약의 조합을 포함한다.
- [0088] 68. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 대상체의 췌장암, 폐암, 또는 결장암을 관리 또는 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서 화학요법제와 조합된 KRAS^{G12C} 억제제의 용도를 포함한다.
- [0089] 69. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 대상체의 췌장암, 폐암, 또는 결장암을 관리 또는 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서 MEK 억제제와 조합된 KRAS^{G12C} 억제제의 용도를 포함한다.
- [0090] 70. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 대상체의 췌장암, 폐암, 또는 결장암을 관리 또는 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서 EGFR 억제제와 조합된 KRAS^{G12C} 억제제의 용도를 포함한다.
- [0091] 71. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 대상체의 췌장암, 폐암, 또는 결장암을 관리 또는 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서 항-PD-1 항체와 조합된 KRAS^{G12C} 억제제의 용도를 포함한다.
- [0092] 72. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 2개의 KRAS^{G12C} 대립형질을 포함하는 단리된 세포주를 포함한다.
- [0093] 73. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 68에 있어서, CT-26 KRAS p.G12C인 세포주를 포함한다.
- [0094] 74. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 2개의 KRAS^{G12C} 대립형질을 포함하는 세포주를 생성하는 방법으로서,
- [0095] a) 2개의 KRAS G12D 대립형질을 포함하는 세포주를, 2개의 KRAS^{G12C} 대립형질이 형성되도록 2개의 KRAS 대립형질 모두에 뉴클레오티드의 대체를 유도하는 CRISPR 작제물과 함께 인큐베이션하는 단계; 및
- [0096] b) 2개의 KRAS^{G12C} 대립형질을 포함하는 세포주를 단리하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다.
- [0097] 75. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 70에 있어서, CRISPR 작제물이 서열 CTTGTGATGGTTGGAGCTGA(서열번호 21)를 포함하는, 방법을 포함한다.
- [0098] 76. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 적어도 하나의 추가 화학요법제를 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법을 포함한다.
- [0099] 77. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 고형 종양 치료를 위한 KRAS^{G12C} 억제제 의약과 항-PD-1 항체 의

약의 조합을 포함한다.

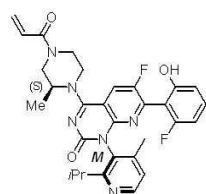
[0100] 78. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 대상체의 췌장암, 폐암, 또는 결장암을 관리 또는 치료하기 위한 의학의 제조에 있어서 적어도 하나의 추가 화학요법제와 조합된 KRAS^{G12C} 억제제의 용도를 포함한다.

[0101] 79. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 76에 있어서, KRAS^{G12C} 억제제가



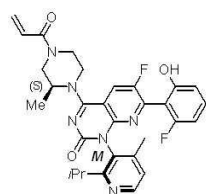
[0102] , 또는 이의 제약상 허용되는 염인, 방법을 포함한다.

[0103] 80. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 77에 있어서, KRAS^{G12C} 억제제가



[0104] , 또는 이의 제약상 허용되는 염인, 조합을 포함한다.

[0105] 81. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 78에 있어서, KRAS^{G12C} 억제제가



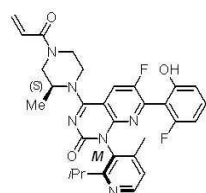
[0106] , 또는 이의 제약상 허용되는 염인, 용도를 포함한다.

[0107] 82. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 구현예 78에 있어서, 폐암이 비소세포 폐암중(NSCLC)인, 용도를 포함한다.

[0108] 제2 세트의 구현예

[0109] 1. 본 발명의 다른 구현예에서, 본 발명은 암 치료를 필요로 하는 환자에게 치료 유효량의 KRAS^{G12C} 억제제 및 적어도 하나의 추가 제약 활성제를 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법에 관한 것이다.

[0110] 2. 추가 구현예에서, 구현예 1에 있어서, KRAS^{G12C} 억제제는



[0111] , 또는 이의 제약상 허용되는 염인, 방법.

[0112] 3. 추가 구현예에서, 구현예 1에 있어서, 암은 KRAS p.G12C 돌연변이를 갖는, 방법.

[0113] 4. 추가 구현예에서, 구현예 1에 있어서, 암은 췌장암, 대장암, 폐암, 충수암, 자궁내막암, 또는 소장암인, 방법.

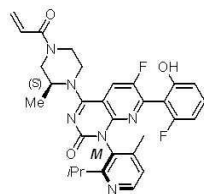
[0114] 5. 추가 구현예에서, 구현예 4에 있어서, 암은 췌장암인, 방법.

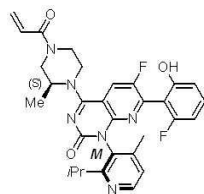
[0115] 6. 추가 구현예에서, 구현예 4에 있어서, 암은 대장암인, 방법.

[0116] 7. 추가 구현예에서, 구현예 4에 있어서, 암은 폐암인, 방법.

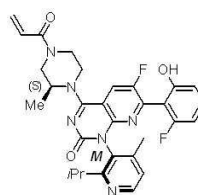
[0117] 8. 추가 구현예에서, 구현예 7에 있어서, 폐암은 비소세포 폐암(NSCLC)인, 방법.

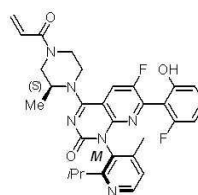
- [0118] 9. 추가 구현예에서, 구현예 4에 있어서, 암은 충수암인, 방법.
- [0119] 10. 추가 구현예에서, 구현예 4에 있어서, 암은 자궁내막암인, 방법.
- [0120] 11. 추가 구현예에서, 구현예 4에 있어서, 암은 소장암인, 방법.
- [0121] 12. 추가 구현예에서, 구현예 1에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 카보플라틴, 항-PD-1 억제제, MEK 억제제, EGFR 억제제, TOR 억제제, SHP2 억제제, PI3K 억제제, 또는 AKT 억제제인, 방법.
- [0122] 13. 추가 구현예에서, 구현예 12에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 카보플라틴인, 방법.
- [0123] 14. 추가 구현예에서, 구현예 12에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 항-PD-1 억제제인, 방법.
- [0124] 15. 추가 구현예에서, 구현예 14에 있어서, 항-PD-1 억제제는 AMG 404, 펌브롤리주맙, 및 니볼루맙으로부터 선택되는, 방법.
- [0125] 16. 추가 구현예에서, 구현예 15에 있어서, 항-PD-1 억제제는 펌브롤리주맙인, 방법.
- [0126] 17. 추가 구현예에서, 구현예 15에 있어서, 항-PD-1 억제제는 AMG 404인, 방법.
- [0127] 18. 추가 구현예에서, 구현예 15에 있어서, 항-PD-1 억제제는 니볼루맙인, 방법.
- [0128] 19. 추가 구현예에서, 구현예 12에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 MEK 억제제인, 방법.
- [0129] 20. 추가 구현예에서, 구현예 19에 있어서, MEK 억제제는 트라메티닙, 피마서텟, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973, 또는 AZD8330인, 방법.
- [0130] 21. 추가 구현예에서, 구현예 20에 있어서, MEK 억제제는 트라메티닙인, 방법.
- [0131] 22. 추가 구현예에서, 구현예 12에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 EGFR 억제제인, 방법.
- [0132] 23. 추가 구현예에서, 구현예 22에 있어서, EGFR 억제제는 아파티닙, 에를로티닙, 라파티닙, 또는 세툽시맙인, 방법.
- [0133] 24. 추가 구현예에서, 구현예 23에 있어서, EGFR 억제제는 아파티닙인, 방법.
- [0134] 25. 추가 구현예에서, 구현예 23에 있어서, EGFR 억제제는 세툽시맙인, 방법.
- [0135] 26. 추가 구현예에서, 구현예 12에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 SHP2 억제제인, 방법.
- [0136] 27. 추가 구현예에서, 구현예 26에 있어서, SHP2 억제제는 RMC 4550인, 방법.
- [0137] 28. 추가 구현예에서, 구현예 26에 있어서, SHP2 억제제는 RMC 4630인, 방법.
- [0138] 29. 추가 구현예에서, 구현예 12에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 PI3K 억제제인, 방법.
- [0139] 30. 추가 구현예에서, 구현예 29에 있어서, PI3K 억제제는 AMG 511 또는 부파리십인, 방법.
- [0140] 31. 추가 구현예에서, 구현예 30에 있어서, PI3K 억제제는 AMG 511인, 방법.
- [0141] 32. 추가 구현예에서, 구현예 30에 있어서, PI3K 억제제는 부파리십인, 방법.
- [0142] 33. 추가 구현예에서, 구현예 12에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 AKT 억제제인, 방법.
- [0143] 34. 추가 구현예에서, 구현예 33에 있어서, AKT 억제제는 AZD5363인, 방법.



- [0144] 35. 추가 구현예에서, , 또는 이의 제약상 허용되는 염; 적어도 하나의 추가 제약 활성제; 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물.
- [0145] 36. 추가 구현예에서, 구현예 35에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 카보플라틴, 항-PD-1 억제제, MEK 억제제, EGFR 억제제, TOR 억제제, SHP2 억제제, PI3K 억제제, 또는 AKT 억제제인, 조성물.

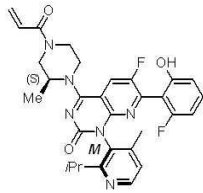
- [0146] 37. 추가 구현예에서, 구현예 36에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 카보플라틴인, 조성물.
- [0147] 38. 추가 구현예에서, 구현예 36에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 항-PD-1 억제제인, 조성물.
- [0148] 39. 추가 구현예에서, 구현예 38에 있어서, 항-PD-1 억제제는 AMG 404, 펌브롤리주맙, 및 니볼루맙으로부터 선택되는, 조성물.
- [0149] 40. 추가 구현예에서, 구현예 39에 있어서, 항-PD-1 억제제는 펌브롤리주맙인, 조성물.
- [0150] 41. 추가 구현예에서, 구현예 39에 있어서, 항-PD-1 억제제는 AMG 404인, 조성물.
- [0151] 42. 추가 구현예에서, 구현예 39에 있어서, 항-PD-1 억제제는 니볼루맙인, 조성물.
- [0152] 43. 추가 구현예에서, 구현예 36에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 MEK 억제제인, 조성물.
- [0153] 44. 추가 구현예에서, 구현예 43에 있어서, MEK 억제제는 트라메티닙, 피마서텅, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973, 또는 AZD8330인, 조성물.
- [0154] 45. 추가 구현예에서, 구현예 44에 있어서, MEK 억제제는 트라메티닙인, 조성물.
- [0155] 46. 추가 구현예에서, 구현예 36에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 EGFR 억제제인, 조성물.
- [0156] 47. 추가 구현예에서, 구현예 46에 있어서, EGFR 억제제는 아파티닙, 에를로티닙, 라파티닙, 또는 세특시맙인, 조성물.
- [0157] 48. 추가 구현예에서, 구현예 47에 있어서, EGFR 억제제는 아파티닙인, 조성물.
- [0158] 49. 추가 구현예에서, 구현예 47에 있어서, EGFR 억제제는 세특시맙인, 조성물.
- [0159] 50. 추가 구현예에서, 구현예 36에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 SHP2 억제제인, 조성물.
- [0160] 51. 추가 구현예에서, 구현예 50에 있어서, SHP2 억제제는 RMC 4550인, 조성물.
- [0161] 52. 추가 구현예에서, 구현예 50에 있어서, SHP2 억제제는 RMC 4630인, 조성물.
- [0162] 53. 추가 구현예에서, 구현예 36에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 PI3K 억제제인, 조성물.
- [0163] 54. 추가 구현예에서, 구현예 53에 있어서, PI3K 억제제는 AMG 511 또는 부파리십인, 조성물.
- [0164] 55. 추가 구현예에서, 구현예 54에 있어서, PI3K 억제제는 AMG 511인, 조성물.
- [0165] 56. 추가 구현예에서, 구현예 54에 있어서, PI3K 억제제는 부파리십인, 조성물.
- [0166] 57. 추가 구현예에서, 구현예 36에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 AKT 억제제인, 조성물.
- [0167] 58. 추가 구현예에서, 구현예 57에 있어서, AKT 억제제는 AZD5363인, 조성물.
- [0168] 59. 추가 구현예에서, KRAS^{G12C} 억제제, 또는 이의 제약상 허용되는 염; 및 적어도 하나의 추가 제약 활성제를 포함하는 키트.



- [0169] 60. 추가 구현예에서, 구현예 59에 있어서, KRAS^{G12C} 억제제는 , 또는 이의 제약상 허용되는 염인, 키트.
- [0170] 61. 추가 구현예에서, 구현예 59에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 카보플라틴, 항-PD-1 억제제, MEK 억제제, EGFR 억제제, TOR 억제제, SHP2 억제제, PI3K 억제제, 또는 AKT 억제제인, 키트.
- [0171] 62. 추가 구현예에서, 구현예 59에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 카보플라틴인, 키트.
- [0172] 63. 추가 구현예에서, 구현예 59에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 항-PD-1 억제제인, 키트.
- [0173] 64. 추가 구현예에서, 구현예 63에 있어서, 항-PD-1 억제제는 AMG 404, 펌브롤리주맙, 및 니볼루맙으로부터

선택되는, 키트.

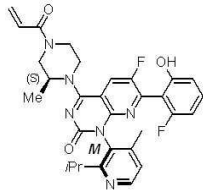
- [0174] 65. 추가 구현예에서, 구현예 64에 있어서, 항-PD-1 억제제는 펌브롤리주맙인, 키트.
- [0175] 66. 추가 구현예에서, 구현예 64에 있어서, 항-PD-1 억제제는 AMG 404인, 키트.
- [0176] 67. 추가 구현예에서, 구현예 64에 있어서, 항-PD-1 억제제는 니볼루맙인, 키트.
- [0177] 68. 추가 구현예에서, 구현예 61에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 MEK 억제제인, 키트.
- [0178] 69. 추가 구현예에서, 구현예 68에 있어서, MEK 억제제는 트라메티닙, 피마서팁, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973, 또는 AZD8330인, 키트.
- [0179] 70. 추가 구현예에서, 구현예 69에 있어서, MEK 억제제는 트라메티닙인, 키트.
- [0180] 71. 추가 구현예에서, 구현예 61에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 EGFR 억제제인, 키트.
- [0181] 72. 추가 구현예에서, 구현예 61에 있어서, EGFR 억제제는 아파티닙, 에를로티닙, 라파티닙, 또는 세특시맙인, 키트.
- [0182] 73. 추가 구현예에서, 구현예 62에 있어서, EGFR 억제제는 아파티닙인, 키트.
- [0183] 74. 추가 구현예에서, 구현예 62에 있어서, EGFR 억제제는 세특시맙인, 키트.
- [0184] 75. 추가 구현예에서, 구현예 61에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 SHP2 억제제인, 키트.
- [0185] 76. 추가 구현예에서, 구현예 75에 있어서, SHP2 억제제는 RMC 4550인, 키트.
- [0186] 77. 추가 구현예에서, 구현예 75에 있어서, SHP2 억제제는 RMC 4630인, 키트.
- [0187] 78. 추가 구현예에서, 구현예 61에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 PI3K 억제제인, 키트.
- [0188] 79. 추가 구현예에서, 구현예 78에 있어서, PI3K 억제제는 AMG 511 또는 부파리십인, 키트.
- [0189] 80. 추가 구현예에서, 구현예 79에 있어서, PI3K 억제제는 AMG 511인, 키트.
- [0190] 81. 추가 구현예에서, 구현예 79에 있어서, PI3K 억제제는 부파리십인, 키트.
- [0191] 82. 추가 구현예에서, 구현예 61에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 AKT 억제제인, 키트.
- [0192] 83. 추가 구현예에서, 구현예 82에 있어서, AKT 억제제는 AZD5363인, 키트.
- [0193] 84. 추가 구현예에서, 구현예 59에 있어서, 암 치료용인 키트.
- [0194] 85. 추가 구현예에서, 구현예 84에 있어서, 암은 *KRAS p.G12C* 돌연변이를 갖는, 키트.
- [0195] 86. 추가 구현예에서, 구현예 84에 있어서, 암은 췌장암, 대장암, 폐암, 충수암, 자궁내막암, 또는 소장암인, 키트.
- [0196] 87. 추가 구현예에서, 구현예 86에 있어서, 암은 췌장암인, 키트.
- [0197] 88. 추가 구현예에서, 구현예 86에 있어서, 암은 대장암인, 키트.
- [0198] 89. 추가 구현예에서, 구현예 86에 있어서, 암은 폐암인, 키트.
- [0199] 90. 추가 구현예에서, 구현예 89에 있어서, 폐암은 비소세포 폐암(NSCLC)인, 키트.
- [0200] 91. 추가 구현예에서, 구현예 86에 있어서, 암은 충수암인, 키트.
- [0201] 92. 추가 구현예에서, 구현예 86에 있어서, 암은 자궁내막암인, 키트.
- [0202] 93. 추가 구현예에서, 구현예 86에 있어서, 암은 소장암인, 키트.
- [0203] 94. 추가 구현예에서, 대상체의 암을 관리 또는 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서 적어도 하나의 추가 화학요법제와 조합된 KRAS^{G12C} 억제제의 용도.
- [0204] 95. 추가 구현예에서, 구현예 94에 있어서, KRAS^{G12C} 억제제는



[0205] , 또는 이의 제약상 허용되는 염인, 용도.

[0206] 96. 추가 구현예에서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제와 함께 암을 치료하는 데 사용하기 위한 KRAS^{G12C} 억제제인 화합물.

[0207] 97. 추가 구현예에서, 구현예 96에 있어서, KRAS^{G12C} 억제제는



[0208] , 또는 이의 제약상 허용되는 염인, 화합물.

[0209] 98. 추가 구현예에서, 구현예 96에 있어서, 암은 KRAS p.G12C 돌연변이를 갖는, 화합물.

[0210] 99. 추가 구현예에서, 구현예 96에 있어서, 암은 췌장암, 대장암, 폐암, 충수암, 자궁내막암, 또는 소장암인, 화합물.

[0211] 100. 추가 구현예에서, 구현예 99에 있어서, 암은 췌장암인, 화합물.

[0212] 101. 추가 구현예에서, 구현예 99에 있어서, 암은 대장암인, 화합물.

[0213] 102. 추가 구현예에서, 구현예 99에 있어서, 암은 폐암인, 화합물.

[0214] 103. 추가 구현예에서, 구현예 102에 있어서, 폐암은 비소세포 폐암(NSCLC)인, 화합물.

[0215] 104. 추가 구현예에서, 구현예 99에 있어서, 암은 충수암인, 화합물.

[0216] 105. 추가 구현예에서, 구현예 99에 있어서, 암은 자궁내막암인, 화합물.

[0217] 106. 추가 구현예에서, 구현예 99에 있어서, 암은 소장암인, 화합물.

[0218] 107. 추가 구현예에서, 구현예 96에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 카보플라틴, 항-PD-1 억제제, MEK 억제제, EGFR 억제제, TOR 억제제, SHP2 억제제, PI3K 억제제, 또는 AKT 억제제인, 화합물.

[0219] 108. 추가 구현예에서, 구현예 107에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 카보플라틴인, 화합물.

[0220] 109. 추가 구현예에서, 구현예 107에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 항-PD-1 억제제인, 화합물.

[0221] 110. 추가 구현예에서, 구현예 109에 있어서, 항-PD-1 억제제는 AMG 404, 펌브롤리주맙, 및 니볼루맙으로부터 선택되는, 화합물.

[0222] 111. 추가 구현예에서, 구현예 110에 있어서, 항-PD-1 억제제는 펌브롤리주맙인, 화합물.

[0223] 112. 추가 구현예에서, 구현예 110에 있어서, 항-PD-1 억제제는 AMG 404인, 화합물.

[0224] 113. 추가 구현예에서, 구현예 110에 있어서, 항-PD-1 억제제는 니볼루맙인, 화합물.

[0225] 114. 추가 구현예에서, 구현예 107에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 MEK 억제제인, 화합물.

[0226] 115. 추가 구현예에서, 구현예 114에 있어서, MEK 억제제는 트라메티닙, 피마서틴, PD-325901, MEK162, TAK-733, GDC-0973, 또는 AZD8330인, 화합물.

[0227] 116. 추가 구현예에서, 구현예 115에 있어서, MEK 억제제는 트라메티닙인, 화합물.

[0228] 117. 추가 구현예에서, 구현예 107에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 EGFR 억제제인, 화합물.

[0229] 118. 추가 구현예에서, 구현예 117에 있어서, EGFR 억제제는 아파티닙, 에를로티닙, 라파티닙, 또는 세특시맙인, 화합물.

- [0230] 119. 추가 구현예에서, 구현예 118에 있어서, EGFR 억제제는 아파티닙인, 화합물.
- [0231] 120. 추가 구현예에서, 구현예 118에 있어서, EGFR 억제제는 세톡시몹인, 화합물.
- [0232] 121. 추가 구현예에서, 구현예 107에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 SHP2 억제제인, 화합물.
- [0233] 122. 추가 구현예에서, 구현예 121에 있어서, SHP2 억제제는 RMC 4550인, 화합물.
- [0234] 123. 추가 구현예에서, 구현예 121에 있어서, SHP2 억제제는 RMC 4630인, 화합물.
- [0235] 124. 추가 구현예에서, 구현예 107에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 PI3K 억제제인, 화합물.
- [0236] 125. 추가 구현예에서, 구현예 124에 있어서, PI3K 억제제는 AMG 511 또는 부파리십인, 화합물.
- [0237] 126. 추가 구현예에서, 구현예 125에 있어서, PI3K 억제제는 AMG 511인, 화합물.
- [0238] 127. 추가 구현예에서, 구현예 125에 있어서, PI3K 억제제는 부파리십인, 화합물.
- [0239] 128. 추가 구현예에서, 구현예 107에 있어서, 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 AKT 억제제인, 화합물.
- [0240] 129. 추가 구현예에서, 구현예 128에 있어서, AKT 억제제는 AZD5363인, 화합물.
- [0241] 130. 추가 구현예에서, 구현예 1에 있어서, KRAS^{G12C} 억제제와 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 동시에 투여되는, 방법.
- [0242] 131. 추가 구현예에서, 구현예 1에 있어서, KRASG12C 억제제와 적어도 하나의 추가 제약 활성제는 개별적으로 투여되는, 방법.
- [0243] 본 발명의 추가 구현예는 화학요법제, PD-1 억제제, MEK 억제제, Pi3K 선택적 억제제, EGFR 억제제, TOR 억제제, SHP2 억제제, 또는 AKT 억제제로부터 선택되는 다른 치료제와 함께 KRAS^{G12C} 억제제를 포함하는 조합의 용도를 포함한다. 본 발명의 추가 구현예는 화학요법제, PD-1 억제제, MEK 억제제, Pi3K 선택적 억제제, EGFR 억제제, TOR 억제제, SHP2 억제제, 또는 AKT 억제제로부터 선택되는 다른 치료제와 함께 KRAS^{G12C} 억제제를 포함하는 암 치료용 조합의 용도를 포함한다. 본 발명의 추가 구현예는 화학요법제, PD-1 억제제, MEK 억제제, Pi3K 선택적 억제제, EGFR 억제제, TOR 억제제, SHP2 억제제, 또는 AKT 억제제로부터 선택되는 다른 치료제와 함께 KRAS^{G12C} 억제제를 포함하는 조합을 암 치료를 위해 사용하는 방법을 포함한다. 본 발명의 추가 구현예는 화학요법제, PD-1 억제제, MEK 억제제, Pi3K 선택적 억제제, EGFR 억제제, TOR 억제제, SHP2 억제제, 또는 AKT 억제제로부터 선택되는 다른 치료제와 함께 KRAS^{G12C} 억제제를 포함하는 암 치료용 조합의 용도를 포함하며, 여기서 용도는 조합을 자가 투여하는 것을 포함한다.
- [0244] 본 발명의 추가 구현예는 화학요법제, PD-1 억제제, MEK 억제제, Pi3K 선택적 억제제, EGFR 억제제, TOR 억제제, SHP2 억제제, 또는 AKT 억제제로부터 선택되는 다른 치료제와 함께 KRAS^{G12C} 억제제를 추가로 포함하는 조합을 처방하는 단계를 포함하는 암 치료 방법을 포함한다. 본 발명의 추가 구현예는 화학요법제, PD-1 억제제, MEK 억제제, Pi3K 선택적 억제제, EGFR 억제제, TOR 억제제, SHP2 억제제, 또는 AKT 억제제로부터 선택되는 다른 치료제와 함께 KRAS^{G12C} 억제제를 추가로 포함하는 조합을 암 치료를 필요로 하는 대상체에게 처방하는 단계를 포함하는 암 치료 방법을 포함한다.
- [0245] 본 발명의 추가 구현예는 화학요법제, PD-1 억제제, MEK 억제제, Pi3K 선택적 억제제, EGFR 억제제, TOR 억제제, SHP2 억제제, 또는 AKT 억제제로부터 선택되는 다른 치료제와 함께 KRAS^{G12C} 억제제를 포함하는 조합을 사용하여 암을 치료하는 방법을 포함하며, 이러한 방법은 상기 조합을 처방집에 나열하고 이러한 암 치료를 필요로 하는 환자에게 지시하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0246] 본 발명의 추가 구현예는 화학요법제, PD-1 억제제, MEK 억제제, Pi3K 선택적 억제제, EGFR 억제제, TOR 억제제, SHP2 억제제, 또는 AKT 억제제로부터 선택되는 다른 치료제와 함께 KRAS^{G12C} 억제제를 포함하는 조합을 암 치료를 위해 사용하는 방법을 포함하며, 이러한 방법은 이러한 암 치료를 필요로 하는 환자가 자가 투여를 위해 상기 조합을 구매하는 단계를 포함한다.
- [0247] 본 발명의 추가 구현예는 암 치료 방법으로서, 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게 화학요법제, 항-PD-1 억

제제, MEK 억제제, PI3K 선택적 억제제, EGFR 억제제, TOR 억제제, SHP2 억제제, 또는 AKT 억제제로부터 선택되는 다른 치료제와 함께 KRAS^{G12C} 억제제를 포함하는 조합을 투여하도록 지시하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다.

[0248] 본 발명의 추가 구현에는 본원에 기재된 조합을

[0249] A) 처방,

[0250] B) 판매 또는 판매 광고,

[0251] C) 구매,

[0252] D) 자가 투여하도록 지시, 또는

[0253] E) 투여

[0254] 하는 단계를 포함하되, 상기 조합은 암 치료를 필요로 하는 대상체에게 암 치료 규제 기관에서 승인한, 암 치료 방법을 포함한다.

[0255] 본 발명의 추가 구현에는 화학요법제, PD-1 억제제, MEK 억제제, PI3K 선택적 억제제, EGFR 억제제, TOR 억제제, SHP2 억제제, 또는 AKT 억제제로부터 선택되는 다른 치료제와 함께 KRAS^{G12C} 억제제를 포함하는 조합을 암 치료를 위해 공급하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 상기 조합의 판매에 대해 의사, 처방집, 환자, 또는 보험 회사에 상환하는 단계를 포함한다.

[0256] 명확성을 위해, "지시"라는 용어는 일반적으로 이해되는 정의 외에도, 규제 기관에서 승인한 표지에 대한 정보를 포함하는 것을 의미한다.

도면의 간단한 설명

[0257] 도 1은 카보플라틴과 조합된 AMG 510이 NCI-H358 NSCLC 종양 성장의 억제를 향상시킴을 보여준다.

도 2는 MEK 억제제 PD-325901과 조합된 AMG 510이 NSCLC NCI-H358 이중이식 모델에서 효능을 향상시킴을 보여준다.

도 3은 AMG 510이 CT-26 KRAS p.G12C 종양의 생체내 성장을 억제함을 보여준다.

도 4는 항-PD-1 항체와 조합된 AMG 510이 KRAS p.G12C 돌연변이 암의 마우스 모델에서 생존율을 증가시키고 지속적 완치를 나타냄을 보여준다.

도 5는 AMG 510 치료가 CT-26 G12C-H10 종양에서 CD8+ 및 CD4+ T세포 침윤을 증가시킴을 보여준다.

도 6은 AMG 510 치료가 CT-26 G12C-H10 종양에서 PD-L1 양성 호중구를 증가시킴을 보여준다.

도 7은 가산성 초과 매트릭스(additivity excess matrix)가 상승적 상호작용의 영역을 식별함을 보여준다.

도 8은 자체-교차 매트릭스(self-cross matrix)가 실험적으로 가산성을 모델링함을 보여준다.

도 9는 AMG 510이 RMC-4550(SHP2i) 및 트라메티닙(MEKi) 모두와 상승 작용을 하여 NCI-H358 세포주에서 세포 사멸을 달성함을 보여준다.

도 10은 아파티닙 또는 RMC-4550에서의 단일 제제 활성의 부족이 MIA PaCa-2 세포주에서의 더 약한 시너지 효과의 원인일 수 있음을 보여준다.

도 11은 3D 배양에서의 조합이 시너지 효과를 높일 수 있음을 보여준다.

도 12는 AMG 510 X 트라메티닙이 NCI-H358에서 시너지 효과가 있음을 보여준다.

도 13은 NCI-H358 세포주에서의 AMG 자체-교차를 보여준다.

도 14는 NCI-H358 세포주에서의 트라메티닙 자체-교차를 보여준다.

도 15는 AMG 510 X 트라메티닙이 MIA PaCa-2 세포주에서 약한 시너지 효과를 나타냄을 보여준다.

도 16은 3D 배양이 MIA PaCa-2에서 AMG 510 X 트라메티닙의 시너지 효과를 향상시킴을 보여준다.

- 도 17은 NCI-H1373 세포주에서의 AMG 510 X 트라메티닙(3D)을 보여준다.
- 도 18은 AMG 510 X 트라메티닙이 CT-26 *KRAS p.G12C*에서 각 단일 제제의 높은 효력으로 인해 약한 시너지 효과를 나타냄을 보여준다.
- 도 19는 AMG 510 X PD-325901이 MIA PaCa-2에서 약한 시너지 효과를 나타냄을 보여준다.
- 도 20은 AMG 510 X 아파티닙이 NCI-H358 세포주에서 시너지 효과가 있음을 보여준다.
- 도 21은 AMG 510 X 아파티닙이 MIA PaCa-2 세포주에서 약한 시너지 효과가 있음을 보여준다.
- 도 22는 3D 배양이 MIA PaCa-2 세포주에서 AMG 510 X 아파티닙의 시너지 효과를 향상시키지 않음을 보여준다.
- 도 23은 NCI-H1373 세포주에서의 AMG 510 X 아파티닙(3D)을 보여준다.
- 도 24는 AMG 510 X 아파티닙이 CT-26 *KRAS p.G12C*에서 적당히 시너지 효과가 있음을 보여준다.
- 도 25는 AMG 510 X 라파티닙이 NCI-H358 세포주에서 시너지 효과가 있음을 보여준다.
- 도 26은 AMG X 에를로티닙이 NCI-H358 세포주에서 적당히 시너지 효과가 있음을 보여준다.
- 도 27은 MIA PaCa-2 세포주에서 AMG 510 X 에를로티닙의 경우 에를로티닙 활성화의 부족으로 인해 시너지 효과가 관찰되지 않았음을 보여준다.
- 도 28은 SW837에서 AMG 510 X 세툽시맙의 경우 생체내 세툽시맙 활성화의 부족으로 인해 시너지 효과가 관찰되지 않았음을 보여준다.
- 도 29는 AMG 510 X RMC-4550이 NCI-H358 세포주에서 시너지 효과가 있음을 보여준다.
- 도 30은 AMG 510 X RMC-4550이 MIA PaCa-2 세포주에서 약한 시너지 효과가 있음을 보여준다.
- 도 31은 AMG 510 X RMC-4550이 CT-26 *KRAS p.G12C*에서 적당히 시너지 효과가 있음을 보여준다.
- 도 32는 AMG 510 X AMG 511이 NCI-H358 세포주에서 적당히 시너지 효과가 있음을 보여준다.
- 도 33은 AMG 510 X AMG 511이 MIA PaCa-2 세포주에서 약한 시너지 효과가 있음을 보여준다.
- 도 34는 AMG 510 X AMG 511이 CT-26 *KRAS p.G12C*에서 적당히 시너지 효과가 있음을 보여준다.
- 도 35는 AMG 510 X 부파리십(BKM120)이 NCI-H358 세포주에서 적당히 시너지 효과가 있음을 보여준다.
- 도 36은 AMG 510 X AZD5363이 NCI-H358 세포주에서 약한 시너지 효과가 있음을 보여준다.
- 도 37은 AMG 5120 X AZD5363이 MIA PaCa-2에서 약한 시너지 효과가 있음을 보여준다.
- 도 38은 AMG 510이 2D 배양의 CT-26 *KRAS p.G12C*에서 *KRAS* 신호전달을 억제함을 보여준다.
- 도 39는 마우스 CT-26 *KRAS p.G12C* 세포가 3D 배양에서 AMG 510에 민감함을 보여준다.
- 도 40a는 GDP 및 ARS-1620에 결합된 $KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}$ 의 X선 공결정 구조를 보여준다(PDB ID: 5V9U).
- 도 40b는 1.65 Å 분해능에서의 GDP 및 AMG 510에 결합된 $KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}$ 의 X선 공결정 구조를 보여준다(PDB ID: 아직 할당되지 않음).
- 도 40c는 정제된 $KRAS^{G12C/C118A}$ 또는 $KRAS^{C118A}$ 단백질을 사용한 SOS1-촉매 뉴클레오타이드 교환 분석에서 측정된 AMG 510 및 ARS-1620의 생화학적 활성을 보여준다($n=4$).
- 도 40d는 질량 분석법에 의해 측정된 AMG 510 및 ARS-1620의 속도론적 특성을 보여준다($n \geq 2$).
- 도 40e는 2시간의 치료 후 ERK1/2 인산화의 억제에 의해 측정된 NCI-H358 및 MIA PaCa-2에서의 AMG 510 및 ARS-1620의 세포 활성을 보여준다($n=2$).
- 도 40f는 2시간의 치료 후 NCI-H358 및 MIA PaCa-2 세포에서의 AMG 510에 의한 ERK 인산화 억제 및 $KRAS^{G12C}$ 점유율을 보여준다($n=3$).
- 도 40g는 72시간의 치료 후 세포 생존력에 미치는 영향에 의해 측정된 NCI-H358 및 MIA PaCa-2에서의 AMG 510

및 ARS-1620의 세포 활성을 보여준다($n=3$).

도 40h는 ERK 인산화의 억제에 의해 측정된 AMG 510 및 ARS-1620의 속도론적 특성을 보여준다($n \geq 2$).

도 41a는 AMG 510의 용량 반응으로 4시간 또는 24시간 치료 후 NCI-H358 또는 MIA PaCa-2에서의 세포 신호전달에 미치는 영향을 보여준다.

도 41b는 최대 24시간의 시점에서 0.1 μ M의 AMG 510으로 치료한 후 NCI-H358 또는 MIA PaCa-2에서의 세포 신호전달에 미치는 영향을 보여준다.

도 41c는 2시간의 치료 후 ERK1/2 인산화의 억제에 의해 측정된 *KRAS p.G12C* 및 비-*KRAS p.G12C* 돌연변이 세포주의 패널에 걸친 AMG 510의 세포 활성을 보여준다($n \geq 2$).

도 41d는 72시간의 치료 후 세포 생존력에 미치는 영향에 의해 측정된 *KRAS p.G12C* 및 비-*KRAS p.G12C* 돌연변이 세포주의 패널에 걸친 AMG 510의 세포 활성을 보여준다.

도 41e는 생존력 용량 반응 곡선이 적어도 $n=2$ 실험의 대표적인 예임을 보여준다. AMG 510을 사용한 72시간의 치료가 부착성 단층 또는 스페로이드 배양 조건에서 세포 생존력에 미치는 영향($n=2$).

도 41f는 1 μ M의 AMG 510으로 4시간 치료한 후의 NCI-H358 전체 세포 용해물의 시스테인 프로테오믹 분석을 보여준다($n=5$).

도 42a 내지 도 42d는 AMG 510이 생체내 *KRAS p.G12C* 돌연변이 종양에서 ERK1/2 인산화를 억제함을 보여준다. MIA PaCa-2 T2(도 42a, 도 42c, 도 42d) 또는 NCI-H358(도 42b) 종양이 있는 마우스에게 단위 용량의 비히클 또는 AMG 510(다른 모든 바)을 경구 투여하고, 2시간 후에(도 42a, 도 42b), 또는 표시된 대로 시간 경과에 따라(도 42c, 도 42d) 채취하고, MSD 면역분석으로 측정된 p-ERK 수준에 대해 평가하였다. 혈장 및 종양 샘플을 수집하고 AMG 510 농도에 대해 분석하였다(각각 빨간색 삼각형, 채워지지 않은 검은색 원). 데이터는 대조군 대비 비히클의 백분율로 표시된다. 데이터는 평균 종양 부피 $\pm$ SEM을 나타낸다($n=3$ /그룹). 도 42a 내지 도 42d, **** $P < 0.0001$; * $P < 0.05$ (Dunnett 검정).

도 42e는 MIA PaCa-2 T2가 있는 마우스에서의 p-ERK 억제와 상관 관계가 있는 질량 분석법을 사용한 *KRAS*^{G12C}의 공유 변형에서의 투여 요법에 대한 AMG 510 치료 결과를 보여준다.

도 42f는 NCI-H358이 있는 마우스에서의 p-ERK 억제와 상관 관계가 있는 질량 분석법을 사용한 *KRAS*^{G12C}의 공유 변형에서의 투여 요법에 대한 AMG 510 치료 결과를 보여준다.

도 42g는 MIA PaCa-2 T2가 있는 마우스에서의 p-ERK 억제와 상관 관계가 있는 질량 분석법을 사용한 *KRAS*^{G12C}의 공유 변형에서의 시간 경과에 따른 AMG 510 치료 결과를 보여준다.

도 43a는 MIA PaCa-2 T2 *KRAS p.G12C* 종양이 확인된 마우스에게 비히클 또는 AMG 510을 투여한 것을 보여준다. AMG 510은 *KRAS p.G12C* 돌연변이 종양의 생체내 성장을 선택적으로 억제한다.

도 43b는 NCI-H358 *KRAS p.G12C* 종양이 확인된 마우스에게 비히클 또는 AMG 510을 투여한 것을 보여준다. AMG 510은 *KRAS p.G12C* 돌연변이 종양의 생체내 성장을 선택적으로 억제한다.

도 43c는 CT-26 *KRAS p.G12C* 종양이 확인된 마우스에게 비히클 또는 AMG 510을 투여한 것을 보여준다. AMG 510은 *KRAS p.G12C* 돌연변이 종양의 생체내 성장을 선택적으로 억제한다.

도 43d는 비히클 또는 AMG 510으로 치료를 받은 마우스를 사용한 *KRAS*^{G12C} NSCLC PDX 모델에서의 종양 성장 결과를 보여준다. AMG 510은 *KRAS p.G12C* 돌연변이 종양의 생체내 성장을 선택적으로 억제한다.

도 43a, 도 43b, 도 43c, 및 도 43d에서, 데이터는 평균 종양 부피 $\pm$ SEM을 나타낸다($n=10$ /그룹). 도 43a, 도 43b, 및 도 43c, **** $P < 0.0001$, * $P < 0.05$ (Dunnett 검정에 의해 비히클과 치료군 비교), # $P < 0.05$ (회귀 대응 표본 t-검정), 및 **** $P < 0.0001$ (RM 이원 분산분석).

도 43e는 AMG 510으로 치료를 받은 2명의 *KRAS p.G12C* 폐암종 환자의 CT 스캔을 보여준다. 대표적인 치료전("기준선") 및 치료후(R_x) 스캔. 맨 왼쪽: 상단 패널은 폐의 좌상부엽을 나타내고, 하단 패널은 폐의 우하부엽을 나타낸다. 맨 오른쪽: 상단 패널은 폐의 좌상부엽을 나타내고, 하단 패널은 흉막을 나타낸다. AMG 510은 *KRAS p.G12C* 돌연변이 종양의 생체내 성장을 선택적으로 억제한다.

도 43f 및 도 47a는 CT-26 KRAS p.G12C 종양이 있는 마우스에게 비히클 또는 AMG 510을 투여한 것을 나타낸다. AMG 510-치료 마우스(100 mg/kg)의 개별 CT-26 KRAS p.G12C 종양 플롯.

도 43g 및 도 47a는 CT-26 KRAS p.G12C 종양이 있는 마우스에게 비히클 또는 AMG 510을 투여한 것을 나타낸다. AMG 510-치료 마우스(200 mg/kg)의 개별 CT-26 KRAS p.G12C 종양 플롯. 100 mg/kg 그룹의 계속된 치료는 퇴행이 지속되지 않았음을 시사했으며(도 43f), 이는 p-ERK의 불완전한 억제 때문일 수 있다(도 47a). 따라서, 200 mg/kg 용량의 AMG 510을 평가하였고, 그 결과 p-ERK를 거의 완전히 억제했으며(도 47a), 10마리 중 8마리가 지속적 완치를 나타냈고(도 43g), AMG-510 혈장 수준은 세포 IC90 바로 아래에 있었다(도 47h).

도 44a는 NCI-H358 종양 이종이식편에 대한 카보플라틴과 조합된 AMG 510을 나타낸다.

도 44b는 표적 제제와 AMG 510의 조합에 대한 시너지 점수를 Loewe 가산성 초과 알고리즘을 사용하여 계산하였고, 더 높은 점수(더 진한 빨간색)가 더 강한 상승적 상호작용을 나타내는 히트맵으로 표시한 것을 나타낸다.

도 44c는 NCI-H358 종양 이종이식편에 대한 MEK 억제제(PD-0325901)와 조합된 AMG 510을 나타낸다.

도 44a 및 도 44c에서, 데이터는 평균 종양 부피 $\pm$ SEM을 나타낸다($n=10$ /그룹). a *** $P<0.001$ (Dunnett 검정에 의해 병용 치료와 각 단일 제제 비교), # $P<0.001$ (대응표본 t-검정에 의한 회귀). c **** $P<0.001$ (Dunnett 검정에 의해 병용 치료와 각 단일 제제 비교), # $P<0.001$ (대응표본 t-검정에 의한 회귀). 모든 치료군의 결과는 비히클과 비교하여 유의미했다(**** $P<0.0001$ (Dunnett 검정)).

도 45a는 비히클, AMG 510, 항-PD-1, 또는 항-PD-1과 조합된 AMG 510으로 치료를 받은 개별 마우스에서의 CT-26 KRAS p.G12C 종양 성장을 보여준다($n=10$ /그룹). 원이 있는 선은 종양이 없는 마우스를 나타낸다.

도 45b는 대리 생존을 평가변수(종양 크기 $>800 \text{ mm}^3$)의 Kaplan Meier 분석을 보여준다. Mantel-Cox **** $P<0.001$ (비히클 대조군 대비); # $P<0.005$ (AMG 510 또는 항-PD-1 단독 대비 조합).

도 45c는 비히클, AMG 510, 항-PD-1, 항-PD-1과 조합된 AMG 510, 또는 MEKi로 4일에 걸쳐 치료를 받고 유세포 분석에 의해 면역표현형 분석된 마우스의 CT-26 KRAS p.G12C 종양을 보여준다($n=8$ /그룹). **** $P<0.0001$, *** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$ (Tukey 검정에 의해 비히클 대조군과 비교; NS=유의미하지 않음).

도 45d는 2일간의 치료 후 CT-26 KRAS p.G12C 종양으로부터 RNA를 단리시킨 것을 보여준다($n=5$ /그룹). 유전자 발현 및 점수는 NanoString 기술에 의해 계산되었다(방법 참조). **** $P<0.0001$, *** $P<0.001$ (Tukey 검정).

도 45e는 인터페론 감마("IFN γ ")의 존재 또는 부재하에 AMG 510으로 24시간 치료한 후 CT-26 KRAS p.G12C 세포에서의 MHC 클래스 I 항원 H-2K^d의 세포 표면 발현을 유세포 분석으로 측정된 것을 보여준다. 분비된 IFN- γ 의 수준은 ELISpot 분석으로 측정되었다($n=4-5$ /그룹).

도 45f는 AMG 510 + 항-PD-1 치료로 완치되어 CT-26 KRAS p.G12C, CT-26, 또는 4T1 세포로 재감염시킨 마우스의 개별 종양 성장을 보여준다.

도 45g는 비장세포를 채취하여 표시된 세포인 CT-26, CT-26 KRAS p.G12C, 또는 4T1 세포로 감염시킨 것을 보여준다. * $P=0.0269$ (독립표본 t-검정에 의해 대조군 대 조합 비교).

도 45h는 AMG 510 치료가 전염증성 종양 미세환경을 유도함을 보여준다. 비히클, AMG 510, 항-PD-1, 항-PD-1과 조합된 AMG 510, 또는 MEKi로 4일에 걸쳐 치료를 받은 마우스의 CT-26 KRAS p.G12C 종양을 면역조직화학으로 면역표현형 분석하였다($n=5$ /그룹). CD3:Ki67에 대한 면역조직화학 염색. Ki67 면역양성 염색은 청색이고 핵이며, CD3 및 CD8 면역양성 염색은 갈색이고 세포질이다. 도 45h의 화살표는 CD3 및 Ki67에 대한 이중 면역양성을 갖는 세포의 예를 가리킨다.

도 45i는 AMG 510 치료가 전염증성 종양 미세환경을 유도함을 보여준다. CD3 비히클, AMG 510, 항-PD-1, 항-PD-1과 조합된 AMG 510, 또는 MEKi로 4일에 걸쳐 치료를 받은 마우스의 CT-26 KRAS p.G12C 종양을 면역조직화학으로 면역표현형 분석하였다($n=5$ /그룹). CD8에 대한 면역조직화학 염색. Ki67 면역양성 염색은 청색이고 핵이며, CD3 및 CD8 면역양성 염색은 갈색이고 세포질이다.

도 46a는 정제된 KRAS^{G12C/C118A} 또는 KRAS^{C118A} 단백질을 사용한 SOS1-촉매 뉴클레오타이드 교환 분석에서 측정된 AMG 510 및 이의 비반응성 프로피온아미드 유사체의 생화학적 활성을 보여준다($n \geq 2$). 도 46a 내지 도 46e 모두에 있어서, 데이터는 표시된 독립 복제의 수에 대한 평균 $\pm$ SD를 나타낸다.

도 46b는 계산된 최대 반응 속도 및 AMG 510 및 ARS-1620의 최대 절반 속도를 달성하는 농도를 보여준다.

도 46c는 $t_{1/2}=12.2$ 분으로 NCI-H358 세포에서 RMC-4550에 의한 ERK 인산화의 억제를 보여준다($n=2$).

도 46d는 AMG 510을 사용한 72시간의 치료가 MIA PaCa-2 및 NCI-H1373의 부착성 단층 또는 스페로이드 배양 조건에서 세포 생존력에 미치는 영향을 보여준다($n=2$).

도 46b는 SILAC(Stable Isotope Labeling by/with Amino acids in Cell culture)에 의한 MIA PaCa-2 및 NCI-H358 세포에서의 KRAS의 반감기 측정을 보여준다.

도 47a 내지 도 47c는 CT-26 *KRAS p.G12C* 종양이 있는 마우스를 단회 용량의 비히클로 경구 치료하거나, 표시된 용량의 AMG 510으로 경구 치료하고 2시간 후에 채취한 것을 보여준다. p-ERK의 수준은 MSD 면역분석으로 측정되었다. 혈장 및 종양 샘플을 수집하고 AMG 510 농도에 대해 분석하였다(각각 빨간색 삼각형, 채워지지 않은 검은색 원). 데이터는 대조군(POC) 대 비히클의 백분율로 표시된다. **** $P<0.0001$, * $P<0.05$ (Dunnett 검정에 의해 비히클과 비교).

도 47d는 AMG 510 치료가 p-ERK 억제와 역상관 관계가 있는 KRASG12C의 공유 변형을 발생시킴을 보여준다.

도 47e는 SW480-1AC 이종이식 모델에서 종양 성장에 미치는 AMG 510의 영향을 보여준다.

도 47f는 *KRAS*^{G12C} SCLC PDX 모델에서 종양 성장에 미치는 AMG 510 치료의 효과를 보여준다. 도 47e 및 도 47f에서, 치료는 종양이 약 200 mm³에 도달했을 때 시작되었다. **** $P<0.0001$ (RM 이원 분산분석).

도 47g는 MIA PaCa-2 T2, NCI-H358 이종이식편으로부터의 AMG 510의 혈장 수준을 보여준다.

도 47h는 CT-26 *KRAS p.G12C* 이종이식편으로부터의 AMG 510의 혈장 수준을 보여준다.

도 47i는 14일차에서 32일차까지 BALB/c 누드 마우스에서 AMG 510 치료 마우스(200 mg/kg)의 개별 CT-26 *KRAS p.G12C* 종양 플롯을 보여준다.

도 47j는 AMG 510으로 치료를 받은 2명의 *KRAS p.G12C* 폐암종 환자의 CT 스캔을 보여준다. 도 43d에서 전술한 환자로부터의 추가 대표적인 치료전("기준선") 및 치료후(R_0) 스캔(맨 왼쪽 위에서 아래로, 폐의 좌상부엽, 폐의 좌하부엽, 림프절, 폐의 좌상부엽, 폐의 좌상부엽, 폐의 좌상부엽). 맨 오른쪽 위에서 아래로, 폐의 좌하부엽, 폐의 좌하부엽, 흉막, 및 부신.

도 47k는 NCI-H358 종양 이종이식편에 대한 단일 제제로서의, 또는 카보플라틴과 조합된 AMG 510을 나타낸다. **** $P<0.0001$ (Dunnett 검정에 의해 비히클 대조군과 비교), # $P<0.001$ (대응표본 t-검정에 의한 회귀).

도 48은 표시된 세포주에서 표적 제제와 조합하여 투여된 AMG 510의 성장 억제 매트릭스 및 Loewe 가산성 초과를 보여주며, 더 어두운 색은 더 큰 세포 사멸(성장 억제) 및 더 강한 상승적 상호작용(Loewe 초과)을 나타낸다. 각 조합에서의 억제제의 시험된 최대 농도 및 매트릭스에 포함되는 용량 범위가 나열되어 있다. 개별 이종 조합(AxB)은 각각의 시너지 점수를 자체-교차 성분(AxA 또는 BxB)의 시너지 점수와 비교하여 평가되었다. 이종 조합은 시너지 점수가 자체-교차 성분 시너지 점수의 3배를 초과할 때만 시너지 효과가 있는 것으로 간주되었다.

도 49a는 2시간의 치료 후 ERK1/2 인산화의 억제에 의해 측정된 CT-26 *KRAS p.G12C* 및 모체 CT-26 세포주에서의 AMG 510 및 MEK 억제제 트라메티닙의 세포 활성을 보여준다($n\geq 2$).

도 49b는 스페로이드 배양에서 72시간의 치료 후 세포 생존력에 미치는 영향에 의해 측정된 CT-26 *KRAS p.G12C* 및 모체 CT-26 세포주에서의 AMG 510 및 MEK 억제제 트라메티닙의 세포 활성을 보여준다($n=2$).

도 50a는 비히클, AMG 510, 항-PD-1, AMG 510 + 항-PD-1, 또는 MEKi로 4일에 걸쳐 치료를 받고 유세포 분석에 의해 면역표현형 분석된 마우스의 CT-26 *KRAS p.G12C* 종양을 보여준다($n=8$ /그룹).

도 50b는 CT-26 *KRAS p.G12C* 종양이 있는 마우스를 단회 용량의 비히클로 경구 치료하거나(검은색 바), 표시된 용량의 MEKi로 경구 치료하고 2시간 후에 채취한 것을 보여준다. p-ERK의 수준은 MSD 면역분석으로 측정되었다. 혈장 및 종양 샘플을 수집하고 MEKi 농도에 대해 분석하였다(각각 빨간색 삼각형, 채워지지 않은 검은색 원). 데이터는 대조군(POC) 대 비히클의 백분율로 표시된다.

도 50c는 시간 경과에 따른 종양 성장에 미치는 MEKi 치료의 효과를 CT-26 *KRAS p.G12C* 종양이 있는 마우스에서 측정된 것을 보여준다. 데이터는 평균 종양 부피 $\pm$ SEM을 나타낸다($n=10$ /그룹).

도 50d는 비히클, AMG 510, 항-PD-1, AMG 510 + 항-PD-1, 또는 MEKi로 4일에 걸쳐 치료를 받은 CT-26 *KRAS p.G12C* 종양이 있는 마우스의 종양 부피를 보여준다. 데이터는 평균 종양 부피 $\pm$ SEM을 나타낸다($n=8$ /그룹).

도 50e는 2일간의 치료 후 CT-26 *KRAS p.G12C* 종양으로부터 RNA를 분리시킨 것을 보여준다. 유전자 발현 및 점 수는 NanoString 기술에 의해 계산되었다($n=5$ /그룹).

도 50f는 IFN γ 의 존재 또는 부재하에 AMG 510으로 24시간 치료한 후 CT-26 ^{KRAS p.G12C} 세포에서의 MHC 클래스 I 항원(H-2D^d 및 H-2L^d)의 세포 표면 발현을 유세포 분석으로 측정된 것을 보여준다.

도 50g는 CT-26 또는 CT-26 *KRAS p.G12C* 종양이 있는 Balb/c 마우스의 성장 곡선을 보여준다.

도 50h는 AMG 510 또는 MEKi로 모체 CT-26 또는 CT-26 *KRAS p.G12C* 세포를 24시간 처리한 후 CXCL10 또는 CXCL11 전사체, 뿐만 아니라 분비된 IP-10 단백질의 정량화를 보여준다.

도 50i는 IFN γ 의 존재 또는 부재하에 AMG 510으로 48시간 치료한 후 MIA PaCA-2로 48시간 치료한 후 SW-1573으로 24시간 치료한 후 CT-26 *KRAS p.G12C* 세포에서의 MHC 클래스 I 항원(HLA, H-2D^d, 및 H-2K^d)의 세포 표면 발현을 유세포 분석으로 측정된 것을 보여준다.

도 50a, 도 50 b, 도 50 c, 도 50 e에서, * $P<0.05$ (Tukey 검정에 의해 비히클 대조군과 비교) NS=유의미하지 않음; *** $P<0.001$ (Dunnett 검정에 의해 비히클과 비교); 및 **** $P<0.0001$ (Dunnett 검정에 의해 비히클 대조군과 비교).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0258] 본 발명은 *KRAS*^{G12C} 억제제 및 하나 이상의 추가 제약 활성제를 포함하는, 특히 암 치료를 위한 병용 요법을 제공한다. 본 발명은 또한, *KRAS*^{G12C} 억제제 및 하나 이상의 추가 제약 활성제를 함유하는 암 치료용 제약 조성물에 관한 것이다. 본원에 개시된 화합물은, 본원에 개시된 화합물의 하나 이상의 원자가, 원자 번호는 동일하지만 자연에서 일반적으로 발견되는 원자 질량 또는 질량수와 다른 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자로 대체된 제약상 허용되는 모든 동위원소 표지 화합물을 포함한다. 개시된 화합물에 혼입될 수 있는 동위원소의 예는 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 불소, 염소, 및 요오드의 동위원소, 예컨대 각각 2H, 3H, 11C, 13C, 14C, 13N, 15N, 15O, 17O, 18O, 31P, 32P, 35S, 18F, 36Cl, 123I, 및 125I를 포함한다. 이러한 방사성 표지 화합물은, 예를 들어 작용 부위 또는 방식, 또는 약리학적으로 중요한 작용 부위에 대한 결합 친화성을 특성화함으로써, 화합물의 유효성을 확인하거나 측정하는 것을 돕는 데 유용할 수 있다. 본 발명의 특정 동위원소 표지 화합물, 예를 들어 방사성 동위원소를 포함하는 것들은 약물 및/또는 기질 조직 분포 연구에 유용하다. 방사성 동위원소 삼중수소, 즉 3H, 및 탄소-14, 즉 14C는 혼입 용이성 및 손쉬운 검출 수단의 관점에서 이러한 목적에 특히 유용하다.
- [0259] 중수소, 즉 2H와 같은 더 무거운 동위원소에 의한 치환은 더 큰 대사 안정성으로 인한 특정 치료적 이점(예를 들어, 생체내 반감기 증가 또는 필요 투여량 감소)을 제공할 수 있으므로 일부 상황에서 선호된다.
- [0260] 11C, 18F, 15O, 및 13N과 같은 양전자 방출 동위원소에 의한 치환은 기질 수용체 점유율을 조사하기 위한 양전자 방출 단층촬영(PET) 연구에 유용할 수 있다. 동위원소 표지된 구조 I의 화합물은 일반적으로, 당업자에게 알려진 통상적인 기술에 의해, 또는 이전에 사용된 비표지 시약 대신 적절한 동위원소 표지 시약을 사용하여 하기 제조 및 실시예에 기재된 것과 유사한 공정에 의해 제조될 수 있다.
- [0261] 본원에 개시된 동위원소 표지 화합물은 일반적으로, 당업자에게 알려진 통상적인 기술에 의해, 또는 이전에 사용된 비표지 시약 대신 적절한 동위원소 표지 시약을 사용하여 첨부 실시예 및 반응식에 기재된 것과 유사한 공정에 의해 제조될 수 있다.
- [0262] 본원에 개시된 특정 화합물은 광학 이성체 및 형태 이성체(또는 이형태체)를 포함한 입체이성체(즉, 원자의 공간 배열만 다른 이성체)로 존재할 수 있다. 본원에 개시된 화합물은 순수한 개별 입체이성체 제제 및 각각의 풍부한 제제 둘 다로서의 모든 입체이성체, 및 이러한 입체이성체의 라세미 혼합물뿐만 아니라 당업자에게 알려진 방법에 따라 분리될 수 있는 개별 부분입체이성체 및 거울상이성체 모두를 포함한다. 또한, 본원에 개시된 화합물은 화합물의 모든 호변이성체 형태를 포함한다.

- [0263] 본원에 개시된 특정 화합물은 회전장애 이성체로서 존재할 수 있으며, 이는 분자에서 단일 결합 주위의 회전이 분자의 다른 부분과의 입체적 상호작용의 결과로서 방지되거나 크게 지연될 때 일어나는 형태 입체이성체이다. 본원에 개시된 화합물은 순수한 개별 회전장애 이성체 제제 및 각각의 풍부한 제제 둘 다로서의 모든 회전장애 이성체, 또는 각각의 비특이적 혼합물을 포함한다. 단일 결합 주위의 회전 장벽이 충분히 높고 형태 사이의 상호변환이 충분히 느린 경우에 이성체 종의 분리 및 단리가 허용될 수 있다. 이성체 종의 분리 및 단리는 잘 알려진 승인된 기호 "M" 또는 "P"에 의해 정식으로 지정된다.
- [0264] 다른 구현예에서, 이들 화합물은 본 출원의 화합물 제조 공정에서 중간체로 사용될 수 있다.
- [0265] 다른 구현예에서, 이들 화합물은 제약상 허용되는 염의 형태일 수 있고, 제약상 허용되는 부형제와 함께 제약 제형으로 존재할 수 있다.
- [0266] 또한, 본원에 개시된 화합물을, 예를 들어 희석제 또는 담체와 같은 제약상 허용되는 부형제와 함께, 포함하는 제약 조성물이 본원에 제공된다. 본 발명에 사용하기에 적합한 화합물 및 제약 조성물은 화합물이 의도된 목적을 달성하기 위해 유효량으로 투여될 수 있는 것들을 포함한다. 화합물의 투여는 아래에서 더 자세히 설명된다.
- [0267] 다른 구현예에서, 이들 화합물은 본 출원의 화합물 제조 공정에서 중간체로 사용될 수 있다.
- [0268] 다른 구현예에서, 이들 화합물은 제약상 허용되는 염의 형태일 수 있고, 제약상 허용되는 부형제와 함께 제약 제형으로 존재할 수 있다.
- [0269] 또한, 본원에 개시된 화합물을, 예를 들어 희석제 또는 담체와 같은 제약상 허용되는 부형제와 함께, 포함하는 제약 조성물이 본원에 제공된다. 본 발명에 사용하기에 적합한 화합물 및 제약 조성물은 화합물이 의도된 목적을 달성하기 위해 유효량으로 투여될 수 있는 것들을 포함한다. 화합물의 투여는 아래에서 더 자세히 설명된다.
- [0270] 적합한 제약 제형은 투여 경로 및 필요한 투여량에 따라 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 1435-712 (18th ed., Mack Publishing Co, Easton, Pennsylvania, 1990)] 참조. 제형은 투여되는 제제의 물리적 상태, 안정성, 생체내 방출 속도 및 생체내 제거율에 영향을 미칠 수 있다. 투여 경로에 따라, 체중, 체표면적 또는 장기 크기별로 적합한 용량이 계산될 수 있다. 적절한 치료 용량을 결정하는 데 필요한 계산의 추가적인 개선은, 특히 본원에 개시된 투여량 정보 및 분석뿐만 아니라 동물 또는 인간 임상 시험을 통해 얻을 수 있는 약동학 데이터를 감안하면, 과도한 실험 없이 당업자에 의해 통상적으로 이루어진다.
- [0271] "제약상 허용되는" 또는 "약리학적으로 허용되는"이란 어구는 동물 또는 인간에게 투여될 때 이상 반응, 알러지 반응, 또는 기타 부작용을 일으키지 않는 분자 물질 및 조성물을 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "제약상 허용되는"은 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 향균 및 향진균제, 등장화제, 및 흡수 지연제 등을 포함한다. 제약 활성 물질에 대한 이러한 부형제의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 임의의 통상적인 매질 또는 제제가 치료 조성물과 상용성이 없는 경우를 제외하고, 이를 치료 조성물에서 사용하는 것이 고려된다. 보충적인 활성 성분 또한 조성물에 포함될 수 있다. 예시적인 구현예에서, 제형은 옥수수 시럽 고형분, 고올레산 홍화유, 야자유, 대두유, L-류신, 제3인산칼슘, L-티로신, L-프롤린, L-리신 아세테이트, DATEM(유화제), L-글루타민, L-발린, 제2인산칼슘, L-이소류신, L-아르기닌, L-알라닌, 글리신, L-아스파라긴 일수화물, L-세린, 시트르산칼슘, L-트레오닌, 시트르산나트륨, 염화마그네슘, L-히스티딘, L-메티오닌, 아스코르브산, 탄산칼슘, L-글루탐산, L-시스틴 2염산염, L-트립토판, L-아스파르트산, 염화칼륨, 타우린, m-이노시톨, 황산제1철, 아스코르빌 팔미테이트, 황산아연, L-카니틴, 알파-토코페릴 아세테이트, 염화나트륨, 나이아신아미드, 혼합 토크페롤, 판토텐산칼슘, 황산제2구리, 염화티아민 염산염, 비타민 A 팔미테이트, 황산망간, 리보플라빈, 피리독신 염산염, 엽산, 베타-카로틴, 요오드화칼륨, 필로퀴논, 비오틴, 셀렌산나트륨, 염화크롬, 폴리브텐산나트륨, 비타민 D3, 및 시아노코발라민을 포함할 수 있다.
- [0272] 화합물은 제약 조성물에 제약상 허용되는 염으로서 존재할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "제약상 허용되는 염"은 예를 들어 염기 부가염 및 산 부가염을 포함한다.
- [0273] 제약상 허용되는 염기 부가염은 금속 또는 아민, 예를 들어 알칼리 및 알칼리토류 금속 또는 유기 아민으로 형성될 수 있다. 화합물의 제약상 허용되는 염은 제약상 허용되는 양이온을 사용하여 제조될 수도 있다. 제약상 허용되는 적합한 양이온은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 알칼리, 알칼리토류, 암모늄, 및 4급 암모늄 양이온을 포함한다. 탄산염 또는 탄산수소염도 가능하다. 양이온으로서 사용되는 금속의 예로는 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 암모늄, 칼슘, 또는 제2철 등이 있다. 적합한 아민의 예는 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, N,N'-디벤

질에틸렌디아민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 디시클로헥실아민, 에틸렌디아민, N-메틸글루카민, 및 프로카인을 포함한다.

[0274] 제약상 허용되는 산 부가염은 무기산 또는 유기산 염을 포함한다. 적합한 산 염의 예는 염산염, 포름산염, 아세트산염, 시트르산염, 살리실산염, 질산염, 인산염을 포함한다. 제약상 허용되는 다른 적합한 염은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 유기 카복실산, 설펡산, 설폰산 또는 포스포산, 또는 N-치환 설펡산, 예를 들어 아세트산, 트리플루오로아세트산(TFA), 프로피온산, 글리콜산, 석신산, 말레산, 하이드록시말레산, 메틸말레산, 푸마르산, 말산, 타타르산, 락트산, 옥살산, 글루콘산, 글루카르산, 글루쿠론산, 시트르산, 벤조산, 신남산, 만델산, 살리실산, 4-아미노살리실산, 2-페녹시벤조산, 2-아세톡시벤조산, 엠본산, 니코틴산, 또는 이소니코틴산; 자연에서 단백질의 합성에 관여하는 20개의 알파 아미노산과 같은 아미노산, 예를 들어 글루탐산 또는 아스파르트산, 및 페닐아세트산, 메탄설펡산, 에탄설펡산, 2-하이드록시에탄설펡산, 에탄 1,2-디설펡산, 벤젠설펡산, 4-메틸벤젠설펡산, 나프탈렌 2-설펡산, 나프탈렌 1,5-디설펡산, 2- 또는 3-포스포글리세레이트, 글루코스 6-포스페이트, N-시클로헥실설펡산(시클라메이트의 형성), 또는 아스코르브산과 같은 다른 산성 유기 화합물과 함께, 포름산, 아세트산, 시트르산, 옥살산, 타타르산, 또는 만델산, 염화수소산, 브롬화수소산, 황산 또는 인산을 포함한다.

[0275] 본원에 개시된 화합물을 함유하는 제약 조성물은 통상적인 방식으로, 예를 들어 통상적인 혼합, 용해, 과립화, 당의정 제조, 분말화, 유화, 캡슐화, 봉입, 또는 동결건조 공정에 의해 제조될 수 있다. 적절한 제형은 선택된 투여 경로에 따라 다르다.

[0276] 경구 투여의 경우, 적합한 조성물은 본원에 개시된 화합물을 당업계에 잘 알려진 담체와 같은 제약상 허용되는 부형제와 조합함으로써 용이하게 제형화될 수 있다. 이러한 부형제 및 담체는 본 화합물을 치료될 환자의 경구 섭취용 정제, 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리, 현탁액 등으로서 제형화할 수 있도록 한다. 경구용 제약 제제는 본원에 개시된 화합물을 고체 부형제와 함께 첨가하고, 필요에 따라 생성 혼합물을 분쇄하고, 필요한 경우 적합한 보조제를 첨가한 후, 과립 혼합물을 가공하여 정제 또는 당의정 코어를 수득함으로써 얻을 수 있다. 적합한 부형제는 예를 들어 충전제 및 셀룰로스 제제를 포함한다. 필요한 경우, 붕해제가 첨가될 수 있다. 제약상 허용되는 성분은 다양한 유형의 제형에서 잘 알려져 있고, 예를 들어 다양한 제형 유형을 위한 결합제(예를 들어, 천연 또는 합성 중합체), 활택제, 계면활성제, 감미제 및 착향제, 코팅 재료, 보존제, 염료, 증점제, 아췌반트, 향미생물제, 향산화제, 및 담체일 수 있다.

[0277] 본원에 개시된 화합물의 치료 유효량이 경구 투여되는 경우, 조성물은 일반적으로 고체(예를 들어, 정제, 캡슐, 환제, 산제, 또는 트로키제) 또는 액체 제형(예를 들어, 수성 현탁액, 용액, 엘릭서, 또는 시럽)의 형태이다.

[0278] 정제 형태로 투여되는 경우, 조성물은 젤라틴 또는 아췌반트와 같은 기능성 고체 및/또는 고체 담체를 추가로 함유할 수 있다. 정제, 캡슐, 및 산제는 약 1 내지 약 95%의 화합물, 바람직하게는 약 15 내지 약 90%의 화합물을 함유할 수 있다.

[0279] 액체 또는 현탁액 형태로 투여되는 경우, 물, 석유, 또는 동물유 또는 식물유와 같은 기능성 액체 및/또는 액체 담체가 첨가될 수 있다. 액체 형태의 조성물은 생리 식염수, 당알코올 용액, 텍스트로스 또는 다른 당류 용액, 또는 글리콜을 추가로 함유할 수 있다. 액체 또는 현탁액 형태로 투여되는 경우, 조성물은 약 0.5 내지 약 90 중량%의 본원에 개시된 화합물, 바람직하게는 약 1 내지 약 50%의 본원에 개시된 화합물을 함유할 수 있다. 고려되는 일 구현예에서, 액체 담체는 비수성이거나 실질적으로 비수성이다. 액체 형태의 투여의 경우, 조성물은 투여 직전의 용해 또는 현탁을 위해 빠르게 용해되는 고체 제형으로서 공급될 수 있다.

[0280] 본원에 개시된 화합물의 치료 유효량이 정맥내, 피부, 또는 피하 주사에 의해 투여되는 경우, 조성물은 발열원이 없는, 비경구적으로 허용되는 수용액의 형태이다. pH, 등장성, 안정성 등을 감안한 이러한 비경구적으로 허용되는 용액의 제조는 당업계의 기술에 속한다. 정맥내, 피부, 또는 피하 주사용의 바람직한 조성물은 일반적으로, 본원에 개시된 화합물 외에도 등장성 비히클을 함유한다. 이러한 조성물은 하이드록시프로필 셀룰로스와 같은 계면활성제와 적합하게 혼합된 물 중의 유리 염기 또는 약리학적으로 허용되는 염의 용액으로서 투여하기 위해 제조될 수 있다. 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 이들의 혼합물 중의 분산액 및 오일 중의 분산액이 또한 제조될 수 있다. 통상의 보관 및 사용 조건에서, 이러한 제제는 미생물의 성장을 방지하기 위해 선택적으로 보존제를 함유할 수 있다.

[0281] 주사용 조성물은 멸균 수용액, 현탁액, 또는 분산액, 및 멸균 주사 용액, 현탁액, 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함할 수 있다. 모든 구현예에서, 제형은 멸균 상태이어야 하며, 주사가 용이할 정도로 유동적이어야 한다. 제형은 제조 및 보관 조건에서 안정적이어야 하며, 보존제를 선택적으로 포함하여 세균 및 진균

과 같은 미생물의 오염 작용에 견딜 수 있어야 한다. 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물, 및 식물유를 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 고려되는 일 구현예에서, 담체는 비수성이거나 실질적으로 비수성이다. 적절한 유동성은 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 구현예에서 화합물의 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등에 의해 이루어질 수 있다. 많은 구현예에서, 등장화제, 예를 들어 당 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사용 조성물의 장기간의 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 사용하여 이루어질 수 있다.

[0282] 멸균 주사 용액은 필요한 양의 활성 화합물을, 필요에 따라 상기 다양한 다른 성분과 함께, 용매에 혼합한 후, 여과 멸균하여 제조된다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산 매질 및 위에 열거된 것들 중 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클에 다양한 멸균 활성 성분을 혼합하여 제조된다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 구현예에서, 바람직한 제조 방법은 미리 멸균 여과된 용액으로부터 활성 성분과 임의의 추가적인 필요한 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결 건조 기술이다.

[0283] 위장관에서 체액과 접촉하는 활성 화합물의 제어 방출을 달성하기 위해, 그리고 혈장에서 활성 화합물의 실질적으로 일정하고 효과적인 수준을 제공하기 위해 서방형 또는 지속 방출형 제형이 제조될 수도 있다. 예를 들어, 방출은 용해, 확산, 및 이온 교환 중 한 가지 이상에 의해 제어될 수 있다. 또한, 서방형 접근법은 위장관 내의 포화 또는 제한 경로를 통해 흡수를 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 이러한 목적을 위해 화합물은 생분해 가능한 폴리머, 수용성 폴리머, 또는 이들의 혼합물, 및 선택적으로 적합한 계면활성제로 이루어진 폴리머 매트릭스에 포매될 수 있다. 이 문맥에서 포매는 폴리머 매트릭스에 마이크로 입자가 혼입되는 것을 의미할 수 있다. 제어 방출형 제형은 분산된 마이크로 입자 또는 유화된 마이크로 액적을 알려진 분산 또는 에멀전 코팅 기술을 통해 캡슐화하여 수득될 수도 있다.

[0284] 흡입 투여의 경우, 본 발명의 화합물은 적합한 추진제를 사용하여 가압 팩 또는 네블라이저로부터 에어로졸 스프레이 방식의 형태로 편리하게 전달된다. 가압 에어로졸의 구현예에서, 투여량 단위는 계량된 양을 전달하기 위한 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 흡입기 또는 취분기에 사용하기 위한, 예를 들어, 젤라틴의 캡슐 및 카트리지가 화합물과 락토스 또는 전분과 같은 적합한 분말 베이스의 분말 혼합물을 함유하여 제형화될 수 있다.

[0285] 본원에 개시된 화합물은 주사(예를 들어, 볼루스 주사 또는 연속 주입)에 의한 비경구 투여용으로 제형화될 수 있다. 주사용 제형은 첨가된 보존제와 함께 단위 투약 형태(예를 들어, 앰플 또는 다중-용량 용기)로 제공될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액, 또는 에멀전과 같은 형태를 취할 수 있고, 현탁액, 안정화제, 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다.

[0286] 비경구 투여용 제약 제형은 수용성 형태의 화합물의 수용액을 포함한다. 추가로, 화합물의 현탁액은 적절한 유성 주사 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클은 지방유 또는 합성 지방산 에스테르를 포함한다. 수성 주사 현탁액은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 함유할 수 있다. 선택적으로, 현탁액은 또한, 화합물의 용해도를 증가시키고 고농축 용액의 제조를 가능하게 하는 제제 또는 적합한 안정화제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 본 조성물은 사용 전에 적합한 비히클(예를 들어, 발열원이 없는 멸균수)과 함께 구성하기 위한 분말 형태일 수 있다.

[0287] 본원에 개시된 화합물은 또한, 좌제 또는 정제 관장제(예를 들어, 통상적인 좌제 베이스를 함유)와 같은 직장 조성물로 제형화될 수 있다. 전술한 제형 외에, 화합물은 또한 데포(depot) 제제로서 제형화될 수 있다. 이러한 지속성 제형은 이식(예를 들어, 피하 또는 근육내 이식) 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들어 화합물은 적합한 고분자 또는 소수성 물질과 함께 (예를 들어, 허용되는 오일 중의 에멀전으로서) 또는 이온 교환 수지와 함께, 또는 난용성 유도체, 예를 들어, 난용성 염으로서 제형화될 수 있다.

[0288] 특히, 본원에 개시된 화합물은 전분 또는 락토스와 같은 부형제를 함유하는 정제의 형태로, 또는 단독의 또는 부형제와 혼합된 캡슐 또는 오블 형태로, 또는 착향제 또는 착색제를 함유하는 엘릭서 또는 현탁액의 형태로, 경구, 협측, 또는 설하 투여될 수 있다. 이러한 액체 제제는 현탁제와 같은 제약상 허용되는 첨가제와 함께 제조될 수 있다. 화합물은 또한 비경구로, 예를 들어, 정맥내, 근육내, 피하, 또는 관상동맥내로 주사될 수 있다. 비경구 투여의 경우, 화합물은 용액을 혈액과 등장성으로 만들기 위한 다른 물질, 예를 들어 염, 또는 만니톨과 같은 당알코올, 또는 글루코스를 함유할 수 있는 멸균 수용액의 형태로 가장 잘 사용된다.

- [0289] 수의학적 용도의 경우, 본원에 개시된 화합물은 정상적인 수의학 실무에 따라 적합하게 허용되는 제형으로서 투여된다. 수의사는 특정 동물에 가장 적절한 투여 요법 및 투여 경로를 쉽게 결정할 수 있다.
- [0290] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 화합물을 단독으로 또는 다른 제제와 함께 사용하여 KRAS-관련 장애를 치료하는 데 필요하거나, 이러한 질환의 치료에 통상적으로 사용되는 중재에 필요한 모든 구성요소는 키트로 패키징될 수 있다. 구체적으로, 본 발명은 본원에 개시된 화합물뿐만 아니라 완충제 및 전달 가능한 의약 형태를 제조하기 위한 다른 구성요소를 포함하는 의약의 패키지 세트, 및/또는 이러한 의약을 전달하기 위한 기구, 및/또는 본원에 개시된 화합물과 함께 병용 요법에 사용되는 임의의 제제, 및/또는 의약과 함께 패키징된 질환 치료 설명서를 포함하는, 질환의 치료적 중재에 사용하기 위한 키트를 제공한다. 설명서는 임의의 유형 매체, 예를 들어 인쇄된 종이, 또는 컴퓨터 판독 가능한 자기 또는 광학 매체에 고정될 수 있거나, 인터넷을 통해 접속 가능한 월드 와이드 웹 페이지와 같은 원격 컴퓨터 데이터 소스를 참조 표시한 설명서일 수 있다.
- [0291] "치료 유효량"은 치료 대상체의 기존 증상을 치료 또는 완화하거나 이의 발병을 예방하는 데 효과적인 양을 의미한다. 유효량의 결정은, 특히 본원에 제공된 상세한 개시 내용을 감안하면, 당업자의 능력 범위 내에 있다. 일반적으로, "치료 유효 용량"은 원하는 효과가 달성되는 화합물의 양을 지칭한다. 예를 들어, 바람직한 일 구현예에서, 본원에 개시된 화합물의 치료 유효량은 대조군과 비교하여 KRAS 활성을 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 또는 적어도 90% 감소시킨다.
- [0292] 투여되는 화합물의 양은 치료 대상체, 대상체의 연령, 건강, 성별, 및 체중, 동시 치료의 종류(있는 경우), 고혈압의 중증도, 원하는 효과의 성질, 치료 방식과 빈도, 및 처방의사의 판단에 따라 다를 수 있다. 투여 빈도는 또한 동맥 산소압에 대한 약력학적 영향에 따라 달라질 수 있다. 그러나, 가장 바람직한 투여량은 과도한 실험 없이 당업자가 이해하고 결정할 수 있는 바와 같이 개별 대상체에게 맞춰질 수 있다. 여기에는 일반적으로 표준 용량의 조정(예를 들어, 환자의 체중이 낮을 경우 용량의 감소)이 포함된다.
- [0293] 개별 요구는 다르지만, 화합물의 유효량의 최적 범위의 결정은 당업계의 기술에 속한다. 본원에서 확인되는 병태 및 장애의 치유적 또는 예방적 치료에서 인간에게 투여할 경우, 예를 들어, 본 발명의 화합물의 전형적인 투여량은 약 0.05 mg/kg/일 내지 약 50 mg/kg/일, 예를 들어 적어도 0.05 mg/kg, 적어도 0.08 mg/kg, 적어도 0.1 mg/kg, 적어도 0.2 mg/kg, 적어도 0.3 mg/kg, 적어도 0.4 mg/kg, 또는 적어도 0.5 mg/kg, 바람직하게는 50 mg/kg 이하, 40 mg/kg 이하, 30 mg/kg 이하, 20 mg/kg 이하, 또는 10 mg/kg 이하일 수 있고, 이는 예를 들어 약 2.5 mg/일(0.5 mg/kg x 5 kg) 내지 약 5000 mg/일(50 mg/kg x 100 kg)일 수 있다. 예를 들어, 화합물의 투여량은 약 0.1 mg/kg/일 내지 약 50 mg/kg/일, 약 0.05 mg/kg/일 내지 약 10 mg/kg/일, 약 0.05 mg/kg/일 내지 약 5 mg/kg/일, 약 0.05 mg/kg/일 내지 약 3 mg/kg/일, 약 0.07 mg/kg/일 내지 약 3 mg/kg/일, 약 0.09 mg/kg/일 내지 약 3 mg/kg/일, 약 0.05 mg/kg/일 내지 약 0.1 mg/kg/일, 약 0.1 mg/kg/일 내지 약 1 mg/kg/일, 약 1 mg/kg/일 내지 약 10 mg/kg/일, 약 1 mg/kg/일 내지 약 5 mg/kg/일, 약 1 mg/kg/일 내지 약 3 mg/kg/일, 약 1 mg/일 내지 약 1000 mg/일, 약 20 mg/일 내지 약 750 mg/일, 약 3 mg/일 내지 약 500 mg/일, 약 5 mg/일 내지 약 250 mg/일, 약 10 mg/일 내지 약 100 mg/일, 약 3 mg/일 내지 약 10 mg/일, 또는 약 100 mg/일 내지 약 250 mg/일일 수 있다. 이러한 용량은 단위 용량으로 투여되거나 다중 용량으로 분할될 수 있다.
- [0294] **KRAS^{G12C} 억제제의 사용 방법**
- [0295] 본 발명은 세포를 본원에 개시된 하나 이상의 화합물의 유효량과 접촉시키는 단계를 포함하는, RAS-매개 세포 신호전달을 억제하는 방법을 제공한다. RAS-매개 신호 전달의 억제는 당업계에 알려진 다양한 방식에 의해 평가되고 입증될 수 있다. 비제한적인 예는 (a) RAS의 GTPase 활성 감소; (b) GTP 결합 친화성의 감소 또는 GDP 결합 친화성의 증가; (c) GTP의 K 오프의 증가 또는 GDP의 K 오프의 감소; (d) RAS 경로 하류의 신호 전달 분자 수준의 감소, 예컨대 pMEK, pERK, 또는 pAKT 수준의 감소; 및/또는 (e) Raf를 포함하는(이에 한정되지 않음) 하류 신호전달 분자에 대한 RAS 복합체 결합의 감소를 보여주는 것을 포함한다. 상기 예 중 하나 이상을 확인하기 위해 키트 및 상업적으로 이용 가능한 분석이 사용될 수 있다.
- [0296] 본 발명은 또한, G12C KRAS, HRAS, 또는 NRAS 돌연변이와 관련된 병태(예를 들어, 암)를 포함한(이에 한정되지 않음) 질환 상태를 치료하기 위해 본 발명의 화합물 또는 제약 조성물을 사용하는 방법을 제공한다.
- [0297] 일부 구현예에서, 암의 치료 방법으로서, 본원에 개시된 화합물을 포함하는 상기 임의의 제약 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 암은 KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C 돌연변이에 의해 매개된다. 다양한 구현예에서, 암은 췌장암, 대장암, 또는 폐암이다. 일

부 구현예에서, 암은 담낭암, 갑상선암, 및 담관암이다.

- [0298] 일부 구현예에서, 본 발명은 장애 치료를 필요로 하는 대상체에서 장애를 치료하는 방법으로서, 대상체에게 KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C 돌연변이가 있는지 확인하고, 대상체에게 KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C 돌연변이가 있는 것으로 확인될 경우, 본원에 개시된 적어도 하나의 화합물 또는 이의 제약상 허용되는 염의 치료 유효 용량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0299] 개시된 화합물은 부착-독립적 세포 성장을 억제하므로, 종양 전이를 억제할 가능성이 있다. 따라서, 다른 구현예에서 본 발명은 종양 전이를 억제하는 방법으로서, 본원에 개시된 화합물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0300] KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C 돌연변이는 또한, 혈액 악성종양(예를 들어, 혈액, 골수, 및/또는 림프절에 영향을 미치는 암)에서 확인된 바 있다. 따라서, 특정 구현예는 개시된 화합물(예를 들어, 제약 조성물 형태)을 혈액 악성종양의 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것에 관한 것이다. 이러한 악성종양은 백혈병 및 림프종을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 본원에 개시된 화합물은 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구성 백혈병(CLL), 소형 림프구성 림프종(SLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 급성 단핵구성 백혈병(AMoL), 및/또는 기타 백혈병과 같은 질환의 치료에 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 화합물은 모든 아류형 호지킨 림프종 또는 비호지킨 림프종과 같은 림프종의 치료에 유용하다. 다양한 구현예에서, 화합물은 다발성 골수종과 같은 형질세포 악성종양, 외투세포 림프종, 및 발렌스트롬 거대글로불린혈증의 치료에 유용하다.
- [0301] 종양 또는 암이 G12C KRAS, HRAS, 또는 NRAS 돌연변이를 포함하는지 여부를 확인하는 것은 KRAS, HRAS, 또는 NRAS 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 평가, KRAS, HRAS, 또는 NRAS 단백질의 아미노산 서열의 평가, 또는 추정 KRAS, HRAS, 또는 NRAS 돌연변이 단백질의 특성 평가에 의해 수행될 수 있다. 야생형 인간 KRAS, HRAS, 또는 NRAS의 서열은 당업계에 알려져 있다(예를 들어, 수탁 번호 NP203524).
- [0302] KRAS, HRAS, 또는 NRAS 뉴클레오타이드 서열에서 돌연변이를 검출하는 방법은 당업자에게 알려져 있다. 이들 방법은 중합효소 연쇄 반응-제한효소 단편 길이 다형성(PCR-RFLP) 분석, 중합효소 연쇄 반응-단일 가닥 형태 다형성(PCR-SSCP) 분석, 실시간 PCR 분석, PCR 시퀀싱, 돌연변이 대립형질-특이적 PCR 증폭(MASA) 분석, 직접 시퀀싱, 프라이머 연장 반응, 전기영동, 올리고뉴클레오타이드 라이게이션 분석, 혼성화 분석, TaqMan 분석, SNP 유전자형 분석, 고해상도 용융 분석, 및 마이크로어레이 분석을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 샘플은 실시간 PCR에 의해 G12C KRAS, HRAS, 또는 NRAS 돌연변이에 대해 평가된다. 실시간 PCR에서, KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C 돌연변이에 특이적인 형광 프로브가 사용된다. 돌연변이가 존재할 때, 프로브가 결합하고 형광이 검출된다. 일부 구현예에서, KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C 돌연변이는 KRAS, HRAS, 또는 NRAS 유전자에서 특정 영역(예를 들어, 엑손 2 및/또는 엑손 3)의 직접 시퀀싱 방법을 사용하여 확인된다. 이 기법은 염기서열이 분석된 영역의 모든 가능한 돌연변이를 확인할 것이다.
- [0303] KRAS, HRAS, 또는 NRAS 단백질에서 돌연변이를 검출하는 방법은 당업자에게 알려져 있다. 이들 방법은 돌연변이 단백질에 특이적인 결합제(예를 들어, 항체), 단백질 전기영동과 웨스턴 블롯팅, 및 직접 펩티드 시퀀싱을 사용한 KRAS, HRAS, 또는 NRAS 돌연변이의 검출을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0304] 종양 또는 암이 G12C KRAS, HRAS, 또는 NRAS 돌연변이를 포함하는지 여부를 확인하는 방법은 다양한 샘플을 사용할 수 있다. 일부 구현예에서, 샘플은 종양 또는 암이 있는 대상체로부터 채취된다. 일부 구현예에서, 샘플은 신선한 종양/암 샘플이다. 일부 구현예에서, 샘플은 동결된 종양/암 샘플이다. 일부 구현예에서, 샘플은 포르말린-고정 파라핀-포매 샘플이다. 일부 구현예에서, 샘플은 순환 종양세포(CTC) 샘플이다. 일부 구현예에서, 샘플은 세포 용해물로 처리된다. 일부 구현예에서, 샘플은 DNA 또는 RNA로 처리된다.
- [0305] 본 발명은 또한, 포유류에서 과다증식성 장애를 치료하는 방법으로서, 본원에 개시된 화합물 또는 이의 제약상 허용되는 염의 치료 유효량을 상기 포유류에게 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 급성 골수성 백혈병, 청소년기 암, 아동 부신피질 암종, AIDS 관련 암(예를 들어 림프종 및 카포시 육종), 항문암, 충수암, 성상세포종, 비정형 기형종, 기저세포 암종, 담관암, 방광암, 골암, 뇌간 교종, 뇌종양, 유방암, 기관지암, 버킷 림프종, 유암종, 비정형 기형종, 배아성 종양, 생식세포 종양, 원발성 림프종, 자궁경부암, 아동기 암, 척삭종, 심장 종양, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 골수증식성 장애, 결장암, 대장암, 두개인두종, 피부 T세포 림프종, 간외관 상피내암(DCIS), 배아성 종양, CNS 암, 자궁내막암, 상피세포종, 식도암, 감각신경모세포종, 유잉 육종, 두개외 생식세포 종양, 성선의 생식세포

포 종양, 안암, 뼈의 섬유조직구종, 담낭암, 위암, 위장관 유암종, 위장관 기질 종양(GIST), 생식세포 종양, 임신 영양막 종양, 모발상세포 백혈병, 두경부암, 심장암, 간암, 호지킨 림프종, 하인두암, 안내 흑색종, 도세포 종양, 췌장 신경내분비 종양, 신장암, 후두암, 구순 구강암, 간암, 소엽성 상피내암(LCIS), 폐암, 림프종, 잠재 원발성 정주관 암종이 있는 전이성 편평 경부암, 구강암, 다발성 내분비선종양 증후군, 다발성 골수종/형질세포 종양, 균상 식육종, 골수이형성 증후군, 골수이형성/골수증식성 종양, 다발성 골수종, 메르켈세포 암종, 악성 중피종, 뼈의 악성 섬유조직구종 및 골육종, 비강 및 부비동암, 비인두암, 신경모세포종, 비호지킨 림프종, 비소세포 폐암(NSCLC), 구강암, 구순 구강암, 구강인두암, 난소암, 췌장암, 유두종증, 부신경절종, 부비동 및 비강암, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 흉막폐 모세포종, 원발성 중추신경계(CNS) 림프종, 전립선암, 직장암, 이행 세포암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 피부암, 위암, 소세포 폐암, 소장암, 연조직 육종, T세포 림프종, 고환암, 인후암, 흉선종 및 흉선 암종, 갑상선암, 신우 및 요관의 이행세포암, 영양막 종양, 아동기의 희귀 암, 요도암, 자궁 육종, 질암, 외음부암, 또는 바이러스성 암과 같은 암을 앓고 있는 대상체의 치료에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 피부의 양성 과다형성(예를 들어, 건선), 재발협착증, 또는 전립선의 양성 과다형성(예를 들어, 양성 전립선 비대증(BPH))과 같은 비암성 과다증식성 장애의 치료에 관한 것이다.

[0306] 일부 구현예에서, 치료 방법은 폐암의 치료에 관한 것으로, 전술한 임의의 화합물(또는 이를 포함하는 제약 조성물)의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 폐암은 비소세포 폐암종(NSCLC), 예를 들어 선암종, 편평세포 폐암종, 또는 대세포 폐암종이다. 일부 구현예에서, 폐암은 소세포 폐암종이다. 개시된 화합물로 치료할 수 있는 다른 폐암은 선 종양, 유암종, 및 미분화 암종을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0307] 본 발명은 또한, G12C 돌연변이 KRAS, HRAS, 또는 NRAS 단백질을 본 발명의 화합물의 유효량과 접촉시켜 이러한 단백질의 활성을 조절하는 방법을 제공한다. 조절은 단백질 활성의 억제 또는 활성화일 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명은 G12C 돌연변이 KRAS, HRAS, 또는 NRAS 단백질을 용액 중의 본 발명의 화합물의 유효량과 접촉시켜 단백질 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 관심 단백질을 발현하는 세포, 조직, 또는 장기를 접촉시켜 G12C 돌연변이 KRAS, HRAS, 또는 NRAS 단백질 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 설치류 및 포유류(예를 들어, 인간)를 포함하는(이에 한정되지 않음) 대상체에게 본 발명의 화합물의 유효량을 투여하여 대상체에서 단백질 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 조절 백분율은 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%를 초과한다. 일부 구현예에서, 억제 백분율은 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90%를 초과한다.

[0308] 일부 구현예에서, 본 발명은 세포에서 KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C의 활성을 억제하는 데 충분한 양의 본 발명의 화합물과 상기 세포를 접촉시켜 상기 세포에서 KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 조직에서 KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C의 활성을 억제하는 데 충분한 양의 본 발명의 화합물과 상기 조직을 접촉시켜 상기 조직에서 KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 유기체에서 KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C의 활성을 억제하는 데 충분한 양의 본 발명의 화합물과 상기 유기체를 접촉시켜 상기 유기체에서 KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 동물에서 KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C의 활성을 억제하는 데 충분한 양의 본 발명의 화합물과 상기 동물을 접촉시켜 상기 유기체에서 KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 포유류에서 KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C의 활성을 억제하는 데 충분한 양의 본 발명의 화합물과 상기 포유류를 접촉시켜 상기 포유류에서 KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명은 인간에서 KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C의 활성을 억제하는 데 충분한 양의 본 발명의 화합물과 상기 인간을 접촉시켜 상기 인간에서 KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 본 발명은 KRAS, HRAS, 또는 NRAS G12C 활성에 의해 매개되는 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이러한 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0309] 병용 요법

[0310] 본 발명은 또한, 다른 경로를 조절하거나 동일한 경로의 다른 구성요소를 조절하는 것으로 알려진 제제, 또는 심지어 중복되는 세트의 표적 효소가 본 발명의 화합물 또는 이의 제약상 허용되는 염과 조합하여 사용되는 병용 요법을 위한 방법을 제공한다. 일 양태에서, 이러한 요법은 상승적 또는 상가적 치료 효과를 제공하기 위해 본 발명의 하나 이상의 화합물과 화학요법제, 치료용 항체, 및 방사선 치료의 조합을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0311] 많은 화학요법제가 현재 당업계에 알려져 있으며, 본 발명의 화합물과 조합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 화

합물 또는 제약 조성물은 적어도 하나 이상의 화학요법제와 조합하여 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 화학요법제는 유사분열 억제제, 알킬화제, 항대사제, 삼입 항생제, 성장 인자 억제제, 세포 주기 억제제, 효소, 국소 이성화효소 억제제, 생물학적 반응 조절제, 항호르몬제, 혈관형성 억제제, 및 항안드로겐제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 비제한적인 예는 화학요법제, 세포독성제, 및 비펩티드 소분자, 예를 들어 Gleevec®(이마티닙 메실레이트), Kyprolis®(카필조립), Velcade®(보르테오미드), Casodex(비칼루타미드), Iressa®(제피티닙), Venclexta™(베네토클락스), 및 Adriamycin™(도코루비신)뿐만 아니라 화학요법제의 숙주이다. 화학요법제의 비제한적 예는 알킬화제, 예를 들어 티오테파 및 시클로포스파미드(Cytoxan™); 알킬 설포네이트, 예를 들어 부셀판, 임프로셀판 및 피포셀판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리에틸렌올로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸멜라민; 질소 머스터드, 예를 들어 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 염산염, 멜팔란, 노벤비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 우라실 머스터드; 니트로소우레아, 예를 들어 카무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 라니무스틴; 항생제, 예를 들어 아클라시노마이신, 악티노마이신, 안트라마이신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 칼리케아미신, 카라비신, 카미노마이신, 카지노필린, Casodex™, 크로모마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신, 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니맥스, 지노스타틴, 조루비신; 항대사성물질, 예를 들어 메토크세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 염산 유사체, 예를 들어 데노프테린, 메토크세이트, 프레로프테린, 트리메트렉세이트; 푸린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-메르캅토푸린, 티아미프린, 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시타빈, 아자시타딘, 6-아자우리딘, 카모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 플록수리딘, 안드로겐, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 테스토라톤; 항부신제, 예를 들어 아미노글루테티미드, 미토탄, 트릴로스탄; 염산 보충제, 예를 들어 폴린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에토글루시드; 질산갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다민; 미토구아존; 미톡산트론; 모피다몰; 니트라크린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 포도필린산; 2-에틸히드라지드; 프로카바진; PSK; 라죽산; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 우레탄; 빈데신; 다카바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토라톨; 피프프로만; 가시토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 시클로포스파미드; 티오테파; 탁산, 예를 들어 파클리탁셀 및 도세탁셀; 레티노산; 에스페라미신; 카페시타빈; 및 이들의 제약상 허용되는 염, 산, 또는 유도체를 포함한다.

[0312] 또한, 적합한 화학요법적 세포 컨디셔너로서, 예를 들어 타목시펜(Nolvadex™), 탈록시펜, 고리화 억제 4(5)-이미다졸, 4-하이드록시타목시펜, 트리옥시펜, 케옥시펜, LY 117018, 오나프리스톤, 및 토레미펜(Fareston)을 포함하는 항에스트로겐제; 및 항안드로겐제, 예를 들어 플루타미드, 닐루타미드, 비칼루타미드, 류프롤리드, 및 고세렐린; 클로람부실; 켈시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토푸린; 메토크세이트; 백금 유사체, 예를 들어 시스플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미토마이신 C; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 나벨빈; 노반트론; 테니포시드; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; 캄프토테신-11(CPT-11); 국소이성화효소 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO)과 같은, 종양에 대한 호르몬 작용을 조절하거나 억제하도록 작용하는 항호르몬제가 포함된다.

[0313] 필요한 경우, 본 발명의 화합물 또는 제약 조성물은 통상적으로 처방되는 항암 약물, 예를 들어 Herceptin®, Avastin®, Erbitux®, Rituxan®, Taxol®, Arimidex®, Taxotere®, ABVD, AVICINE, 아바코보맵, 아크리딘 카복사미드, 아데카투무맵, 17-N-알릴아미노-17-데메톡시젤다나마이신, 알파라딘, 알보시딕, 3-아미노피리딘-2-카복살데히드 티오세미카바존, 아모나피드, 안트라센디온, 항-CD22 면역독소, 항종양제, 항종양형성 허브, 아파지쿠온, 아티프리모드, 아자티오프린, 벨로테칸, 벤다무스틴, BIBW 2992, 비리코다르, 브로스타리신, 브리오스타틴, 부티오닌 설포시딘, CBV(화학요법), 칼리콜린, 세포-주기 비특이적 항종양제, 디클로로아세트산, 디스코테르몰리드, 엘사미트루신, 에노시타빈, 에포틸론, 에리볼린, 에버롤리무스, 엑사테칸, 엑시술린드, 페루기놀, 포로데신, 포스페스트롤, ICE 화학요법, IT-101, 이맥손, 이미퀴모드, 인돌로카바줄, 이로폴벤, 라니퀴다르, 라로탁셀, 레날리도미드, 루칸톤, 루르토테칸, 마포스파미드, 미토줄로미드, 나폭시딘, 네다플라틴, 올라파립, 오르타탁셀, PAC-1, 파우파우, 픽산트론, 프로테아솜 억제제, 레베카마이신, 레시퀴모드, 루비테칸, SN-38, 살리노스포라미드 A, 사파시타빈, 스탠포드 V, 스와인소닌, 탈라포르핀, 타리퀴다르, 테가푸르-우라실,

테모다르, 테세탁셀, 트리플라틴 테트라니트레이트, 트리스(2-클로로에틸)아민, 트록사시타빈, 우라무스틴, 바디메잔, 빈플루닌, ZD6126, 또는 조수퀴다르와 조합하여 사용될 수 있다.

[0314] 본 발명은 또한, 본원에 제공된 화합물 또는 제약 조성물을 포유류에서 비정상적 세포 성장을 억제하거나 과다 증식성 장애를 치료하기 위해 방사선 치료와 조합하여 사용하는 방법에 관한 것이다. 방사선 치료를 투여하는 기법은 당업계에 알려져 있으며, 이들 기법은 본원에 기재된 병용 요법에서 사용될 수 있다. 이 병용 요법에서 본 발명의 화합물의 투여는 본원에 기재된 바와 같이 결정될 수 있다.

[0315] 방사선 치료는 외부-빔 치료, 내부 방사선 치료, 임플란트 방사선, 정위 방사선 수술, 전신 방사선 치료, 방사선 요법 및 영구 또는 일시적 조직내 근접치료를 포함하는(이에 한정되지 않음) 여러 방법 중 하나 또는 방법의 조합을 통해 투여될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "근접치료"는 종양 또는 기타 증식성 조직 질환 부위에서 또는 그 근처에서 신체 내로 삽입되는 공간적으로 한정된 방사성 물질에 의해 전달되는 방사선 치료를 지칭한다. 이 용어는 방사성 동위원소(예를 들어, At-211, I-131, I-125, Y-90, Re-186, Re-188, Sm-153, Bi-212, P-32, 및 Lu의 방사성 동위원소)에 대한 노출을 제한 없이 포함하는 것이다. 본 발명의 세포 컨디셔너로서 사용하기에 적합한 방사선 공급원은 고체 및 액체 둘 다를 포함한다. 비제한적인 예로, 방사선 공급원은 방사성 핵종, 예를 들어 고체 공급원으로서의 I-125, I-131, Yb-169, Ir-192, 고체 공급원으로서의 I-125이거나, 광자, 베타 입자, 감마선, 또는 기타 치료 광선을 방출하는 다른 방사성 핵종일 수 있다. 방사성 물질은 또한, 임의의 방사성 핵종(들)의 용액, 예를 들어, I-125 또는 I-131의 용액으로 만든 유체일 수 있거나, 방사성 유체는 Au-198, Y-90과 같은 고체 방사성 핵종의 작은 입자를 함유하는 적합한 유체의 슬러리를 사용하여 제조될 수 있다. 또한, 방사성 핵종(들)은 겔 또는 방사성 마이크로스피어로 형상화될 수 있다.

[0316] 본 발명의 화합물 또는 제약 조성물은 화학요법제, 항혈관형성제, 신호 전달 억제제, 항증식제, 당분해 억제제, 또는 자가포식 억제제로부터 선택되는 일정량의 하나 이상의 물질과 조합하여 사용될 수 있다.

[0317] MMP-2(기질-금속단백분해효소 2) 억제제, MMP-9(기질-금속단백분해효소 9) 억제제, 및 COX-11(시클로옥시게나제 11) 억제제와 같은 항혈관형성제가 본 발명의 화합물 및 본원에 기재된 제약 조성물과 함께 사용될 수 있다. 항혈관형성제는 예를 들어 라파마이신, 템시플리무스(CCI-779), 에버롤리무스(RAD001), 소라페닙, 수니티닙, 및 베바시주맵을 포함한다. 유용한 COX-II 억제제의 예는 알레콕시브, 발데콕시브, 및 로페콕시브를 포함한다. 유용한 기질 금속단백분해효소 억제제의 예는 WO 96/33172 WO 96/27583 유럽 특허 공개 EP0818442, 유럽 특허 공개 EP1004578, WO 98/07697, WO 98/03516, WO 98/34918, WO 98/34915, WO 98/33768, WO 98/30566, 유럽 특허 공개 606046, 유럽 특허 공개 931 788, WO 90/05719, WO 99/52910, WO 99/52889, WO 99/29667, WO1999007675, 유럽 특허 공개 EP1786785, 유럽 특허 공개 번호 EP1181017, 미국 특허 공개 번호 US20090012085, 미국 특허 공개 US5863 949, 미국 특허 공개 US5861 510, 및 유럽 특허 공개 EP0780386에 기재되어 있으며, 이들 모두 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 바람직한 MMP-2 및 MMP-9 억제제는 MMP-1을 억제하는 활성이 없거나 거의 없는 것들이다. 다른 기질-금속단백분해효소(즉, MAP-1, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP- 7, MMP- 8, MMP-10, MMP-11, MMP-12, 및 MMP-13)에 비해 MMP-2 및/또는 AMP-9를 선택적으로 억제하는 것들이 더욱 바람직하다. 본 발명에 유용한 MMP 억제제의 몇 가지 구체적인 예는 AG-3340, RO 32-3555, 및 RS 13-0830이다.

[0318] 본 화합물은 또한, 아세만난, 아클라루비신, 알데스류킨, 알렘투주맵, 알리트레티노인, 알트레타민, 아미포스틴, 아미노레블린산, 암루비신, 암사크린, 아나그렐리드, 아나스트로졸, ANCEP, 안세스탐, ARGLABIN, 삼산화비스, BAM 002(Novelos), 벡사로텐, 비칼루타미드, 브록수리딘, 카페시타빈, 셀모류킨, 세트로렐릭스, 클라드리빈, 클로트리마졸, 시타라빈 옥스포스페이트, DA 3030(Dong-A), 다클리주맵, 데니류킨 디프티톡스, 테스로렐린, 텍스라족산, 딜라제프, 도세탁셀, 도코사놀, 독세르칼시페롤, 독시플루리딘, 독소루비신, 브로모크립틴, 카무스틴, 시타라빈, 플루오로우라실, HIT 디클로페낙, 인터페론 알파, 다우노루비신, 독소루비신, 트레티노인, 에텔포신, 에드레콜로맵, 에플로르니틴, 에미테푸르, 에피루비신, 에포에틴 베타, 에토포시드 포스페이트, 엑세메스탄, 엑시술린드, 파드로졸, 필그라스탐, 피나스테리드, 플루다라빈 포스페이트, 포르메스탄, 포테무스틴, 질산갈륨, 켄시타빈, 켄투주맵 오조가미신, 기메라실/오테라실/테가푸르 조합, 글리코핀, 고세렐린, 헵타플라틴, 인간 옴모성 성선자극호르몬, 인간 태아 알파 태아단백, 이반드론산, 이다루비신, (이미퀴모드, 인터페론 알파, 천연 인터페론 알파, 인터페론 알파-2, 인터페론 알파-2a, 인터페론 알파-2b, 인터페론 알파-N1, 인터페론 알파-n3, 인터페론 알파콘-1, 천연 인터페론 알파, 인터페론 베타, 인터페론 베타-1a, 인터페론 베타-1b, 인터페론 감마, 천연 인터페론 감마-1a, 인터페론 감마-1b, 인터류킨-1 베타, 이오벤구안, 이리노테칸, 이르소글라딘, 란레오티드, LC 9018(Yakult), 레플루노미드, 레노그라스탐, 렌티난 셀페이트, 레트로졸, 백혈구 알파 인터페론, 류프로렐린, 레바미솔 + 플루오로우라실, 리아로졸, 로바플라틴, 로니다민, 로바스타틴, 마소프로콜, 멜라르소프롤, 메토클로프라미드, 미페프리스톤, 밀테포신, 미리모스탐, 미스매치 이중가닥 RNA, 미토구

아존, 미토라톨, 미톡산트론, 몰그라모스팀, 나파렐린, 날록손 + 펜타조신, 나르토크라스팀, 네다플라틴, 닐루타미드, 노스카핀, 신규 적혈구생성 자극 단백질, NSC 631570 옥트레오티드, 오프렐베킨, 오사테론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 파미드론산, 페그아스파르가제, 페그인터페론 알파-2b, 펜토산 폴리설페이트 나트륨, 펜토스타틴, 피시바닐, 피라루비신, 토끼 항흉선세포 폴리클론 항체, 폴리에틸렌 글리콜 인터페론 알파-2a, 포르피머 나트륨, 팔록시펜, 팔트트렉세드, 라스부리카제, 레늄 Re 186 에티드로네이트, RII 레틴아미드, 리톡시맙, 로무르티드, 사마륨(153 Sm) 렉시드로남, 사르그라모스팀, 시조피란, 소부족산, 소네르민, 염화스트론튬-89, 수라민, 타소네르민, 타자로텐, 테가푸르, 테모포르핀, 테모졸로미드, 테니포시드, 테트라클로로데카옥사이드, 탈리도미드, 티말파신, 티로트로핀 알파, 토포테칸, 토레미펜, 토시투모맙-요오드 131, 트라스투주맙, 트레오셀판, 트레티노인, 트리로스탄, 트리메트렉세이트, 트립토텔린, 천연 중앙 피사 인자 알파, 우베니멕스, 방광암 백신, 마루야마 백신, 흑색종 용해물 백신, 발루비신, 베르테포르핀, 비노렐빈, 비룰리진(VIRULIZIN), 지노스타틴 스티말라머, 또는 졸레드론산; 아바렐릭스; AE 941(Aeterna), 암바무스틴, 안티센스 올리고뉴클레오티드, bcl-2(Genta), APC 8015(Dendreon), 세톡시맙, 데시타빈, 텍스아미노글루테티미드, 디아지쿠온, EL 532(Elan), EM 800(Endorecherche), 에닐우라실, 에타니다졸, 펜레티나이드, 필그라스팀 SD01(Amgen), 폴베스트란트, 갈로시타빈, 가스트린 17 면역원, HLA-B7 유전자 치료(Vical), 파립구 대식세포 콜로니 자극 인자, 히스타민 이염산염, 이브리투모맙 티옥세탄, 일로마스타트, IM 862(Cytran), 인터류킨-2, 이프록시펜, LDI 200(Milkhaus), 레리디스팀, 린투주맙, CA 125 MAb(Biomira), 암 MAb(Japan Pharmaceutical Development), HER-2 및 Fc MAb(Medarex), 이디오타입 105AD7 MAb(CRC Technology), 이디오타입 CEA MAb(Trilex), LYM-1-요오드 131 MAb(Techniclone), 다형성 상피성 뮤신-이트럼 90 MAb(Antisoma), 마리마스타트, 메노가릴, 미투모맙, 모텍사핀 가돌리늄, MX 6(Galderma), 넬라라빈, 놀라트렉시드, P 30 단백질, 페그비소만트, 페메트렉시드, 포르피로마이신, 프리노마스타트, RL 0903(Shire), 루비테칸, 사트라플라틴, 페닐아세트산나트륨, 스파르포스산, SRL 172(SR Pharma), SU 5416(SUGEN), TA 077(Tanabe), 테트라티오몰리브데이트, 탈리블라스틴, 트롬보포이에틴, 주석 에틸 에티오프루핀, 티라파자민, 암 백신(Biomira), 흑색종 백신(New York University), 흑색종 백신(Sloan Kettering Institute), 흑색종 종양세포용해물 백신(New York Medical College), 바이러스 흑색종 세포용해물 백신(Royal Newcastle Hospital), 또는 발스포다르와 같은 다른 항종양제와 함께 병용 요법에 사용될 수 있다.

[0319] 본 발명의 화합물은 또한 VEGFR 억제제와 함께 사용될 수 있다. 다음의 특허 및 특허 출원에 기재된 다른 화합물이 병용 요법에 사용될 수 있다: US 6,258,812, US 2003/0105091, WO 01/37820, US 6,235,764, WO 01/32651, US 6,630,500, US 6,515,004, US 6,713,485, US 5,521,184, US 5,770,599, US 5,747,498, WO 02/68406, WO 02/66470, WO 02/55501, WO 04/05279, WO 04/07481, WO 04/07458, WO 04/09784, WO 02/59110, WO 99/45009, WO 00/59509, WO 99/61422, US 5,990,141, WO 00/12089, 및 WO 00/02871.

[0320] 일부 구현예에서, 조합은 적어도 하나의 항혈관형성제와 조합된 본 발명의 조성물을 포함한다. 제제는 시험관내 합성으로 제조된 화학 조성물, 항체, 항원 결합 영역, 방사성 핵종, 및 이들의 조합 및 접합체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 제제는 작용제, 길항제, 알로스테릭 조절제, 독소일 수 있거나, 보다 일반적으로는 이의 표적을 억제하거나 자극하여(예를 들어, 수용체 또는 효소 활성화 또는 억제), 세포 사멸을 촉진하거나 세포 성장을 저지하는 작용을 할 수 있다.

[0321] 종합적으로, 항체는 면역글로불린으로 알려진 혈장 단백질 계열을 형성하며, 면역글로불린 도메인으로 구성된다(Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed., Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, 1999). 본원에서 사용되는 용어 "항체"는, 중쇄와 경쇄를 포함하고 가변 영역과 불변 영역을 포함하는 통상적인 면역글로불린 형태를 갖는 단백질을 지칭한다. 예를 들어, 항체는 2개의 동일한 폴리펩티드 사슬 쌍의 "Y형" 구조인 IgG일 수 있으며, 각 쌍은 (일반적으로 약 25 kDa의 분자량을 갖는) 하나의 "경쇄" 및 (일반적으로 약 50~70 kDa의 분자량을 갖는) 하나의 "중쇄"를 갖는다. 항체에는 가변 영역과 불변 영역이 있다. IgG 형태에서, 가변 영역은 일반적으로 약 100~110개 이상의 아미노산이며, 3개의 상보성 결정 영역(CDR)을 포함하고, 항원 인식을 주로 담당하고, 상이한 항원에 결합하는 다른 항체들 사이에서 실질적으로 다르다. 불변 영역은 항체가 면역계의 세포와 분자를 공급할 수 있도록 한다. 가변 영역은 각각의 경쇄와 중쇄의 N-말단 영역으로 이루어진 반면, 불변 영역은 각각의 중쇄와 경쇄의 C-말단 부분으로 이루어져 있다(Janeway et al., "Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes", Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999)).

[0322] 항체의 CDR의 일반적인 구조와 특성은 당업계에 설명되어 있다. 간단히 설명하면, 항체 스캐폴드에서, CDR은 항

원 결합 및 인식을 주로 담당하는 영역을 구성하는 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 프레임워크 내에 포함된다. 일반적으로 가변 영역은 적어도 3개의 중쇄 또는 경쇄 CDR을(Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, Md.; 또한 문헌[Chothia and Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883] 참조), 프레임워크 영역(Kabat 등 (1991)에 의해 지정된 프레임워크 영역 1 내지 4, 즉 FR1, FR2, FR3, 및 FR4; 또한 상기 문헌[Chothia and Lesk, 1987] 참조) 내에 포함한다.

[0323] 항체는 당업계에 알려진 임의의 불변 영역을 포함할 수 있다. 인간 경쇄는 카파 및 람다 경쇄로 분류된다. 중쇄는 뮤, 델타, 감마, 알파, 또는 엡실론으로 분류되며, 항체의 동형을 각각 IgM, IgD, IgG, IgA, 및 IgE로 정의한다. IgG에는 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4를 포함하는(이에 한정되지 않음) 여러 하위부류가 있다. IgM에는, IgM1 및 IgM2를 포함하는(이에 한정되지 않음) 하위부류가 있다. 본 발명의 구현에는 항체의 이러한 모든 부류 또는 동형을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 예를 들어 카파형 또는 람다형 경쇄 불변 영역, 예를 들어 인간 카파형 또는 람다형 경쇄 불변 영역일 수 있다. 중쇄 불변 영역은 예를 들어 알파형, 델타형, 엡실론형, 감마형, 또는 뮤형 중쇄 불변 영역, 예를 들어 인간 알파형, 델타형, 엡실론형, 감마형, 또는 뮤형 중쇄 불변 영역일 수 있다. 따라서, 예시적인 구현예에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 중 어느 하나를 포함하는 동형 IgA, IgD, IgE, IgG, 또는 IgM의 항체이다.

[0324] 항체는 단클론 항체 또는 다클론 항체일 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 포유류, 예를 들어 마우스, 토끼, 염소, 말, 닭, 햄스터, 인간 등에 의해 생성된 자연 발생적 항체와 실질적으로 유사한 서열을 포함한다. 이와 관련하여, 항체는 포유류 항체, 예를 들어 마우스 항체, 토끼 항체, 염소 항체, 말 항체, 닭 항체, 햄스터 항체, 인간 항체 등으로 간주될 수 있다. 특정 양태에서, 항체는 인간 항체이다. 특정 양태에서, 항체는 키메라 항체 또는 인간화 항체이다. 용어 "키메라 항체"는 2개 이상의 상이한 항체에서 유래된 도메인을 포함하는 항체를 지칭한다. 키메라 항체는 예를 들어, 한 종에서 유래된 불변 도메인 및 제2 종에서 유래된 가변 도메인을 포함하며, 보다 일반적으로, 적어도 2개의 종에서 유래된 아미노산 서열의 스트레치를 포함할 수 있다. 키메라 항체는 또한, 동일한 종 내에 2개 이상의 상이한 항체의 도메인을 포함할 수 있다. 항체와 관련하여 사용될 때 용어 "인간화"는 원본 항체보다 실제 인간 항체와 더 유사한 구조와 면역 기능을 갖도록 조작된 비인간 공급원에서 유래된 적어도 CDR 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 예를 들어, 인간화는 마우스 항체와 같은 비인간 항체에서 유래된 CDR을 인간 항체에 이식하는 것을 포함할 수 있다. 인간화는 또한, 비인간 서열을 인간 서열과 더 유사하게 하기 위해 아미노산 치환을 선택하는 것을 포함할 수 있다.

[0325] 항체는, 예를 들어 파파인 및 펩신과 같은 효소에 의해 단편으로 절단될 수 있다. 파파인은 항체를 절단하여 2개의 Fab 단편 및 하나의 Fc 단편을 생성한다. 펩신은 항체를 절단하여 F(ab')₂ 단편 및 pFc' 단편을 생성한다. 본원에서 사용되는 용어 "항원 결합 항체 단편"은 항체의 항원에 결합할 수 있는 항체 분자의 부분을 지칭하며, "항원 결합 단편" 또는 "항원 결합 부분"으로도 알려져 있다. 예시적인 예에서, 항원 결합 항체 단편은 Fab 단편 또는 F(ab')₂ 단편이다.

[0326] 항체의 구조는 적어도 약 12~150 kDa의 분자량 범위에 걸친 점점 더 다양한 대체 형태를 생성하기 위해 활용되어 왔고, 단량체(n = 1)에서 이량체(n = 2), 삼량체(n = 3), 사량체(n = 4), 및 가능하게는 그 이상에 이르기까지의 원자가(n)를 가지며, 이러한 대체 형태는 본원에서 "항체 단백질 산물"로 지칭된다. 항체 단백질 산물은 전체 항체 구조에 기반한 것들 및 완전한 항원 결합 능력을 보유하는 항체 단편을 모방한 것들, 예를 들어 scFv, Fab, 및 VHH/VH(아래에서 논의됨)를 포함한다. 완전한 항원 결합 부위를 보유하는 가장 작은 항원 결합 항체 단편은 가변(V) 영역만으로 구성된 Fv 단편이다. 가용성의 유연한 아미노산 펩티드 링커를 사용하여 분자의 안정화를 위해 scFv(단쇄 단편 가변) 단편에 V 영역을 연결하거나, V 영역에 불변(C) 도메인을 추가하여 Fab 단편[단편, 항원 결합]을 생성한다. scFv 및 Fab 단편은 모두 숙주 세포, 예를 들어 원핵생물 숙주 세포에서 쉽게 생성될 수 있다. 다른 항체 단백질 산물은 이항화 결합 안정화 scFv(ds-scFv), 단쇄 Fab(scFab), 뿐만 아니라 올리고머화 도메인에 연결된 scFv로 구성된 다양한 형태를 포함하는 디아바디, 트리아바디, 및 테트라바디 또는 미니바디(miniAb)와 같은 이량체 및 다량체 항체 형태를 포함한다. 가장 작은 단편은 낙타류 중쇄 Ab 및 단일 도메인 Ab(sdAb)의 VHH/VH이다. 새로운 항체 형태를 생성하는 데 가장 흔히 사용되는 빌딩 블록은 약 15개 아미노산 잔기의 펩티드 링커에 의해 연결된 중쇄 및 경쇄에서 유래된 V 도메인(VH 및 VL 도메인)을 포함하는 단쇄 가변(V) 도메인 항체 단편(scFv)이다. 펩티바디 또는 펩티드-Fc 융합체는 또 다른 항체 단백질 산물이다. 펩티바디의 구조는 Fc 도메인에 그래프트된 생물학적 활성 펩티드로 구성된다. 펩티바디는 당업계에 잘 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌[Shimamoto et al., mAbs 4(5): 586-591 (2012)] 참조.

[0327] 기타 항체 단백질 산물은 단쇄 항체(SCA), 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 이중특이적 또는 삼중특이적 항

체 등을 포함한다. 이중특이적 항체는 BsIgG, 첨부된 IgG, BsAb 단편, 이중특이적 융합 단백질, 및 BsAb 접합체의 다섯 가지 주요 부류로 분류될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Spiess et al., Molecular Immunology 67(2) Part A: 97-106 (2015)] 참조.

[0328] 예시적인 항혈관형성제는 ERBITUX™(IMC-C225), KDR(키나제 도메인 수용체) 억제제(예를 들어, 키나제 도메인 수용체에 특이적으로 결합하는 항체 및 항원 결합 영역), 항-VEGF 제제(예를 들어, VEGF, 또는 가용성 VEGF 수용체 또는 이의 리간드 결합 영역에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 영역), 예를 들어 AVASTIN™ 또는 VEGF-TRAP™, 및 항-VEGF 수용체 제제(예를 들어, 이에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 영역), EGFR 억제제(예를 들어, 이에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 영역), 예를 들어 Vectibix(파니투무맙), IRESSA™(제피티닙), TARCEVA™(에를로티닙), 항-Ang1 및 항-Ang2 제제(예를 들어, 이에 또는 이들의 수용체, 예를 들어, Tie2/Tek에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 영역), 및 항-Tie2 키나제 억제제(예를 들어, 이에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 영역)를 포함한다. 본 발명의 제약 조성물은 또한, 성장 인자에 특이적으로 결합하고 이의 활성을 억제하는 하나 이상의 제제(예를 들어, 항체, 항원 결합 영역, 또는 가용성 수용체), 예를 들어 간세포 성장 인자(HGF, 산란 인자(Scatter Factor)로도 알려짐)의 길항제, 및 이의 수용체 "c-met"에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 영역을 포함할 수 있다.

[0329] 다른 항혈관형성제는 캄파트(Campath), IL-8, B-FGF, Tek 길항제(Ceretti 등, 미국 특허 공개 번호 2003/0162712; 미국 특허 번호 6,413,932), 항-TWEAK 제제(예를 들어, 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 영역, 또는 가용성 TWEAK 수용체 길항제; Wiley, 미국 특허 번호 6,727,225 참조), 인테그린의 이의 리간드와의 결합에 길항하는 ADAM 디스인테그린 도메인(Fanslow 등, 미국 특허 공개 번호 2002/0042368), 특이적으로 결합하는 항-eph 수용체 및/또는 항-ephrin 항체 또는 항원 결합 영역(미국 특허 번호 5,981,245; 5,728,813; 5,969,110; 6,596,852; 6,232,447; 6,057,124 및 이의 특허 패밀리 구성원), 및 항-PDGF-BB 길항제(예를 들어, 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 영역) 뿐 아니라 PDGF-BB 리간드에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 영역, 및 PDGFR 키나제 억제제(예를 들어, 이에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 영역)를 포함한다.

[0330] 추가의 항혈관형성제/항종양제는 다음을 포함한다: SD-7784(Pfizer, USA); 실린지타이드(Merck KGaA, Germany, EPO 770622); 페가타닙 옥타소듐(Gilead Sciences, USA); 알파스타틴(BioActa, UK); M-PGA(Celgene, USA, US 5712291); 일로마스타트(Arriva, USA, US 5892112); 예막사닙(Pfizer, USA, US 5792783); 바탈라닙(Novartis, Switzerland); 2-메톡시에스트라디올(EntreMed, USA); TLC ELL-12(Elan, Ireland); 아네코르타브 아세테이트(Alcon, USA); 알파-D148 Mab(Amgen, USA); CEP-7055(Cephalon, USA); 항-Vn Mab(Crucell, Netherlands) DAC: 항혈관형성제(ConjuChem, Canada); 안지오시딘(InKine Pharmaceutical, USA); KM-2550(Kyowa Hakko, Japan); SU-0879(Pfizer, USA); CGP-79787(Novartis, Switzerland, EP 970070); ARGENT technology(Ariad, USA); YIGSR-Stealth(Johnson & Johnson, USA); 피브리노젠-E 단편(BioActa, UK); 혈관형성 억제제(Trigen, UK); TBC-1635(Encysive Pharmaceuticals, USA); SC-236(Pfizer, USA); ABT-567(Abbott, USA); 메타스타틴(EntreMed, USA); 혈관형성 억제제(Tripep, Sweden); 마스핀(Sosei, Japan); 2-메톡시에스트라디올(Oncology Sciences Corporation, USA); ER-68203-00(IVAX, USA); 베네피(Lane Labs, USA); Tz-93(Tsumura, Japan); TAN-1120(Takeda, Japan); FR-111142(Fujisawa, Japan, JP 02233610); 혈소판 인자 4(RepliGen, USA, EP 407122); 혈관 내피 성장 인자 길항제(Boreau, Denmark); 베마시주맙(pINN)(Genentech, USA); 혈관형성 억제제(SUGEN, USA); XL 784(Exelixis, USA); XL 647(Exelixis, USA); MAb, 알파5베타3 인테그린, 2세대(Applied Molecular Evolution, USA 및 MedImmune, USA); 유전자 치료, 망막증(Oxford BioMedica, UK); 엔자스타우린 염산염(USAN)(Lilly, USA); CEP 7055(Cephalon, USA 및 Sanofi-Synthelabo, France); BC 1(Genoa Institute of Cancer Research, Italy); 혈관형성 억제제(Alchemia, Australia); VEGF 길항제(Regeneron, USA); rBPI 21 및 BPI-유래 항혈관형성제(XOMA, USA); PI 88(Progen, Australia); 실린지타이드(pINN)(Merck KGaA, Germany; Munich Technical University, Germany, Scripps Clinic and Research Foundation, USA); 세톡시맙(INN)(Aventis, France); AVE 8062(Ajinomoto, Japan); AS 1404(Cancer Research Laboratory, New Zealand); SG 292(Telios, USA); 엔도스타틴(Boston Childrens Hospital, USA); ATN 161(Attenuon, USA); ANGIOSTATIN(Boston Childrens Hospital, USA); 2-메톡시에스트라디올(Boston Childrens Hospital, USA); ZD 6474(AstraZeneca, UK); ZD 6126(Angiogene Pharmaceuticals, UK); PPI 2458(Praecis, USA); AZD 9935(AstraZeneca, UK); AZD 2171(AstraZeneca, UK); 바탈라닙(pINN)(Novartis, Switzerland 및 Schering AG, Germany); 조직 인자 경로 억제제(EntreMed, USA); 페갑타닙(Pinn)(Gilead Sciences, USA); 잔토리졸(Yonsei University, South Korea); 백신, 유전자 기반, VEGF-2(Scripps Clinic and Research Foundation, USA); SPV5.2(Supratek, Canada); SDX 103(University of California at San Diego, USA); PX 478(ProIX, USA);

METASTATIN(EntreMed, USA); 트로포닌 I(Harvard University, USA); SU 6668(SUGEN, USA); OXI 4503(OXiGENE, USA); o-구아니딘(Dimensional Pharmaceuticals, USA); 모투포라민 C(British Columbia University, Canada); CDP 791(Celltech Group, UK); 아티프리모드(pINN)(GlaxoSmithKline, UK); E 7820(Eisai, Japan); CYC 381(Harvard University, USA); AE 941(Aeterna, Canada); 백신, 혈관형성(EntreMed, USA); 유로키나제 플라스미노겐 활성화 억제제(Dendreon, USA); 오글루파니드(pINN)(Melmotte, USA); HIF-1알파 억제제(Xenova, UK); CEP 5214(Cephalon, USA); BAY RES 2622(Bayer, Germany); 안지오시딘(InKine, USA); A6(Angstrom, USA); KR 31372(Korea Research Institute of Chemical Technology, South Korea); GW 2286(GlaxoSmithKline, UK); EHT 0101(ExonHit, France); CP 868596(Pfizer, USA); CP 564959(OSI, USA); CP 547632(Pfizer, USA); 786034(GlaxoSmithKline, UK); KRN 633(Kirin Brewery, Japan); 약물 전달 시스템, 안구내, 2-메톡시에스트라디올(EntreMed, USA); 아지넥스(Maastricht University, Netherlands, 및 Minnesota University, USA); ABT 510(Abbott, USA); AAL 993(Novartis, Switzerland); VEGI(ProteomTech, USA); 중앙 의사 인자-알파 억제제(National Institute on Aging, USA); SU 11248(Pfizer, USA 및 SUGEN USA); ABT 518(Abbott, USA); YH16(Yantai Rongchang, China); S-3APG(Boston Childrens Hospital, USA 및 EntreMed, USA); MAb, KDR(ImClone Systems, USA); MAb, 알파5 베타1(Protein Design, USA); KDR 키나제 억제제(Celltech Group, UK, 및 Johnson & Johnson, USA); GFB 116(South Florida University, USA 및 Yale University, USA); CS 706(Sankyo, Japan); 콤프레타스타틴 A4 전구약물(Arizona State University, USA); 콘드로이티나제 AC(IBEX, Canada); BAY RES 2690(Bayer, Germany); AGM 1470(Harvard University, USA, Takeda, Japan, 및 TAP, USA); AG 13925(Agouron, USA); 테트라티오몰리브데이트(University of Michigan, USA); GCS 100(Wayne State University, USA) CV 247(Ivy Medical, UK); CKD 732(Chong Kun Dang, South Korea); MAb, 혈관 내피 성장 인자(Xenova, UK); 이르소글라딘(INN)(Nippon Shinyaku, Japan); RG 13577(Aventis, France); WX 360(Wilex, Germany); 스쿠알라민(pINN)(Genaera, USA); RPI 4610(Sirna, USA); 암 치료(Marinova, Australia); 헤파라닌제 억제제(InSight, Israel); KL 3106(Kolon, South Korea); 호노키올(Emory University, USA); ZK CDK(Schering AG, Germany); ZK 안지오(Schering AG, Germany); ZK 229561(Novartis, Switzerland, 및 Schering AG, Germany); XMP 300(XOMA, USA); VGA 1102(Taisho, Japan); VEGF 수용체 조절제(Pharmacopeia, USA); VE-카드헤린-2 길항제(ImClone Systems, USA); 바소스타틴(National Institutes of Health, USA); 백신, Flk-1(ImClone Systems, USA); TZ 93(Tsumura, Japan); TumStatin(Beth Israel Hospital, USA); 절단된 가용성 FLT 1(혈관 내피 성장 인자 수용체 1)(Merck & Co, USA); Tie-2 리간드(Regeneron, USA); 및, 트롬보스폰딘 1 억제제(Allegheny Health, Education and Research Foundation, USA).

[0331] 자가포식 억제제는 클로로퀸, 3-메틸아데닌, 하이드록시클로로퀸(Plaquenil™), 바필로마이신 A1, 5-아미노-4-이미다졸 카복사미드 리보시드(AICAR), 오카다산, 유형 2A 또는 유형 1의 단백질 포스포타제를 억제하는 자가포식-억제성 조류 독소, cAMP의 유사체, 및 cAMP 수준을 증가시키는 약물, 예를 들어 아데노신, LY204002, N6-메르캅토프린 리보시드, 및 빈블라스틴을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 또한, (자가포식에 관여하는) ATG5를 포함하는(이에 한정되지 않음) 단백질의 발현을 억제하는 안티센스 또는 siRNA도 사용될 수 있다.

[0332] 암의 치료에 사용될 수 있고 본 발명의 하나 이상의 화합물과 조합하여 사용될 수 있는 추가의 제약 활성 화합물/제제는 에포에틴 알파; 다베포에틴 알파; 파니투무맙; 페그필그라스티; 팔리퍼민; 필그라스티; 데노수맙; 안세스티; AMG 102; AMG 176; AMG 386; AMG 479; AMG 655; AMG 745; AMG 951; 및 AMG 706, 또는 이들의 제약상 허용되는 염을 포함한다.

[0333] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 조성물은 화학요법제와 함께 투여된다. 적합한 화학요법제는 천연 생성물, 예를 들어 빈카 알칼로이드(예를 들어, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 및 비노렐빈), 파클리탁셀, 에피도포도필로톡신(예를 들어, 에토포시드 및 테니포시드), 항생제(예를 들어, 닥티노마이신(악티노마이신 D), 다우노루비신, 독소루비신, 및 이다루비신), 안트라사이클린, 미톡산트론, 블레오마이신, 플리카마이신(미트라마이신), 미토마이신, 효소(예를 들어, L-아스파라긴을 전신적으로 대사시키고 이들 자신의 아스파라긴을 합성할 능력을 갖지 않은 세포를 박탈하는 L-아스파라기나제), 항혈소판제, 항증식/항유사분열 알킬화제, 예를 들어 질소 머스터드(예를 들어, 메클로레타민, 시클로포스파미드 및 유사체, 멜팔란, 및 클로람부실), 에틸렌이민 및 메틸멜라민(예를 들어, 핵사메틸멜라민 및 티오테파), CDK 억제제(예를 들어, 셀리시클립, UCN-01, P1446A-05, PD-0332991, 디나시클립, P27-00, AT-7519, RGB286638, 및 SCH727965), 설폰산알킬(예를 들어, 부설파), 니트로소우레아(예를 들어, 카무스틴(BCNU) 및 유사체, 및 스트렙토조신), 트라제네스-다카바지닌(DTIC), 항증식/항유사분열 항대사물질, 예를 들어 염산 유사체(예를 들어, 메토크세이트), 피리딘 유사체(예를 들어, 플루오로우라실, 플록수리딘, 및 시타라빈), 푸린 유사체 및 관련 억제제(예를 들어, 메르캅토프린, 티오구아닌, 펜토스타틴 및 2-클로로테옥시아데노신), 아로마타제 억제제(예를 들어, 아나스트로졸, 엑세메스탄, 및 레트로졸), 및 백금 배위 착

체(예를 들어, 시스플라틴 및 카보플라틴), 프로카바진, 하이드록시우레아, 미토탄, 아미노글루테티미드, 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제(예를 들어, 트리코스타틴, 부티르산나트륨, 아피시단, 수베로일 아닐리드 하이드로암산, 보리노스타트, LBH 589, 로미렙신, ACY-1215, 및 파노비노스타트), mTor 억제제(예를 들어, 템시폴리무스, 에버폴리무스, 리다포폴리무스, 및 시폴리무스), KSP(Eg5) 억제제(예를 들어, Array 520), DNA 결합제(예를 들어, 잘립시스), PI3K 델타 억제제(예를 들어, GS-1101 및 TGR-1202), PI3K 델타 및 감마 억제제(예를 들어, CAL-130), 다중-키나제 억제제(예를 들어, TG02 및 소라페닙), 호르몬(예를 들어, 에스트로겐) 및 호르몬 작용제, 예를 들어 황체 호르몬 방출 호르몬(LHRH) 작용제(예를 들어, 고세렐린, 류프롤리드 및 트립토텐린), BAFF-중화 항체(예를 들어, LY2127399), IKK 억제제, p38MAPK 억제제, 항-IL-6(예를 들어, CNT0328), 텔로머라제 억제제(예를 들어, GRN 163L), 오로라 키나제 억제제(예를 들어, MLN8237), 세포 표면 단클론 항체(예를 들어, 항-CD38(HUMAX-CD38), 항-CS1(예를 들어, 엘로투주맙), HSP90 억제제(예를 들어, 17 AAG 및 KOS 953), P13K / Akt 억제제(예를 들어, 페리포신), Akt 억제제(예를 들어, GSK-2141795), PKC 억제제(예를 들어, 엔자스타우린), FTI(예를 들어, 자르네스트라(ZarnestraTM)), 항-CD138(예를 들어, BT062), Torc1/2 특이적 키나제 억제제(예를 들어, INK128), 키나제 억제제(예를 들어, GS-1101), ER/UPR 표적화제(예를 들어, MKC-3946), cFMS 억제제(예를 들어, ARRY-382), JAK1/2 억제제(예를 들어, CYT387), PARP 억제제(예를 들어, 올라파립 및 벨리파립(ABT-888)), BCL-2 길항제를 포함할 수 있다. 기타 화학요법제는 메클로레타민, 캄프토텐신, 이포스파미드, 타목시펜, 탈록시펜, 챔시타빈, 나벨빈, 소라페닙, 또는 이들의 임의의 유사체 또는 유도 변이체를 포함할 수 있다.

[0334] 본 발명의 화합물은 또한, 방사선 치료, 호르몬 치료, 수술 및 면역요법과 조합하여 사용될 수 있으며, 이들 치료법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0335] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 제약 조성물은 스테로이드와 함께 투여된다. 적합한 스테로이드는 21-아세톡시프레그네놀론, 알클로메타손, 알제스톤, 암시노니드, 베클로메타손, 베타메타손, 부테소니드, 클로로프레드니손, 클로메타솔, 클로코르톨론, 클로프레드놀, 코르티코스테론, 코르티손, 코르티바졸, 데플라자코트, 데소니드, 데속시메타손, 텍사메타손, 디플로라손, 디플루코르톨론, 디푸프레드네이트, 에녹솔론, 플루아자코트, 플루클로로니드, 플루메타손, 플루니솔리드, 플루오시놀론 아세토니드, 플루오시노니드, 플루오코르틴 부틸, 플루오코르톨론, 플루오로메톨론, 플루페롤론 아세테이트, 플루프레드니텐 아세테이트, 플루프레드니솔론, 플루란드레놀리드, 플루티카손 프로피오네이트, 포르모코르탈, 할시노니드, 할로메타솔 프로피오네이트, 할로메타손, 하이드로코르티손, 로테프레드놀 에타보네이트, 마지프레돈, 메드리손, 메프레드니손, 메틸프레드니솔론, 모메타손 퓨로에이트, 파라메타손, 프레드니카르베이트, 프레드니솔론, 프레드니솔론 25-디에틸아미노아세테이트, 프레드니솔론 소듐 포스페이트, 프레드니손, 프레드니발, 프레드닐리텐, 리벡솔론, 텍스코르톨, 트리암시놀론, 트리암시놀론 아세토니드, 트리암시놀론 베네토니드, 트리암시놀론 헥사아세토니드, 및 이의 염 및/또는 유도체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 적합한 스테로이드는 21-아세톡시프레그네놀론, 알클로메타손, 알제스톤, 암시노니드, 베클로메타손, 베타메타손, 부테소니드, 클로로프레드니손, 클로메타솔, 클로코르톨론, 클로프레드놀, 코르티코스테론, 코르티손, 코르티바졸, 데플라자코트, 데소니드, 데속시메타손, 텍사메타손, 디플로라손, 디플루코르톨론, 디푸프레드네이트, 에녹솔론, 플루아자코트, 플루클로로니드, 플루메타손, 플루니솔리드, 플루오시놀론 아세토니드, 플루오시노니드, 플루오코르틴 부틸, 플루오코르톨론, 플루오로메톨론, 플루페롤론 아세테이트, 플루프레드니텐 아세테이트, 플루프레드니솔론, 플루란드레놀리드, 플루티카손 프로피오네이트, 포르모코르탈, 할시노니드, 할로메타솔 프로피오네이트, 할로메타손, 하이드로코르티손, 로테프레드놀 에타보네이트, 마지프레돈, 메드리손, 메프레드니손, 메틸프레드니솔론, 모메타손 퓨로에이트, 파라메타손, 프레드니카르베이트, 프레드니솔론, 프레드니솔론 25-디에틸아미노아세테이트, 프레드니솔론 소듐 포스페이트, 프레드니손, 프레드니발, 프레드닐리텐, 리벡솔론, 텍스코르톨, 트리암시놀론, 트리암시놀론 아세토니드, 트리암시놀론 베네토니드, 트리암시놀론 헥사아세토니드, 및 이의 염 및/또는 유도체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 특정 구현예에서, 본 발명의 화합물은 또한, 구역질을 치료하는 추가의 제약 활성제와 조합하여 사용될 수 있다. 구역질을 치료하는 데 사용될 수 있는 제제의 예는 드로나비놀; 그라니세트론; 메토클로프라미드; 온단세트론; 및 프로클로르페라진; 또는 이들의 제약상 허용되는 염을 포함한다.

[0336] 본 발명의 KRAS^{G12C} 억제제는 공개된 PCT 출원 W02011/031842에서 확인되는 것과 같은 오로라(Aurora) 키나제 억제제와 조합하여 사용될 수 있다. 특정 화합물은 AMG 900이다(모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함되는 W02011/031842의 실시예 1).

[0337] 본 발명의 KRAS^{G12C} 억제제는 MAP 키나제 경로 억제제와 조합하여 사용될 수 있다. 억제될 수 있는 MAP 키나제

경로의 단백질, 및 KRAS^{G12C} 억제제와 조합하여 사용되는 이러한 단백질의 억제제의 예는 BRAF 억제제, Pan-RAF 억제제, 및 MEK 억제제이다. ARAF, BRAF, 및 CRAF의 세 가지 주요 RAF 아이소형이 존재한다. pan-RAF 억제제는 둘 이상의 RAF 아이소형에 대해 억제 활성을 나타낸다. 대조적으로, BRAF 억제제는 다른 RAF 단백질보다 BRAF에 대해 더 큰 억제제 활성(또는 선택성)을 나타낸다.

[0338] 본 발명의 화합물은 또한, RAS-RAF-ERK 또는 PI3K-AKT-TOR 신호전달 경로를 방해하거나 억제하는 추가의 제약 활성 화합물과 조합하여 사용될 수 있다. 다른 이러한 조합에서, 추가의 제약 활성 화합물은 PD-1 및 PD-L1 길항제이다. 본 발명의 화합물 또는 제약 조성물은 또한, EGFR 억제제, MEK 억제제, PI3K 억제제, AKT 억제제, TOR 억제제, Mcl-1 억제제, BCL-2 억제제, SHP2 억제제, 프로테아솜 억제제, 및 면역 치료제(단클론 항체, 면역 조절 이미드(IMiD), 항-PD-1(또는 대안적으로 PD-1 억제제), 항-PDL-1, 항-CTLA4, 항-LAG1, 및 항-OX40 제제, G1TR 작용제, CAR-T세포, 및 BiTE를 포함)로부터 선택되는 일정량의 하나 이상의 물질과 조합하여 사용될 수 있다.

[0339] EGFR 억제제는 소분자 길항제, 항체 억제제, 또는 특정 안티센스 뉴클레오타이드 또는 siRNA를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 본 조합에 사용될 수 있는 EGFR 억제제는 아파티닙(상표명: Gilotrif[®], Boehringer Ingelheim에서 시판), 에를로티닙(상표명: Tarceva[®], Genetech/Astellas에서 시판), 및 라파티닙(상표명: Tykerb[®], Novartis에서시판)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. KRAS^{G12C} 억제제는 또한 본 발명에서 EGFR 항체와 조합하여 사용될 수 있다. 본 조합에 사용될 수 있는 EGFR 항체는 세톡시맵(상표명: Erbitux[®], Lilly)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. EGFR의 유용한 항체 억제제는 파니투무맵(Vectibix), 잘루투무맵, 니모투주맵, 및 마투주맵을 포함한다.

[0340] 소분자 EGFR 억제제의 비제한적 예는 다음 특허 공보에 기재된 임의의 EGFR 억제제, 및 상기 EGFR 억제제의 제약상 허용되는 모든 염 및 용매화물을 포함한다: 1992년 12월 30일 공개된 유럽 특허 출원 EP 520722; 1993년 10월 20일 공개된 유럽 특허 출원 EP 566226; 1996년 10월 31일 공개된 PCT 국제 공개 WO 96/33980; 1998년 5월 5일 등록된 미국 특허 번호 5,747,498; 1996년 10월 3일 공개된 PCT 국제 공개 WO 96/30347; 1997년 8월 6일 공개된 유럽 특허 출원 EP 787772; 1997년 8월 21일 공개된 PCT 국제 공개 WO 97/30034; 1997년 8월 21일 공개된 PCT 국제 공개 WO 97/30044; 1997년 10월 23일 공개된 PCT 국제 공개 WO 97/38994; 1997년 12월 31일 공개된 PCT 국제 공개 WO 97/49688; 1998년 4월 22일 공개된 유럽 특허 출원 EP 837063; 1998년 1월 22일 공개된 PCT 국제 공개 WO 98/02434; 1997년 10월 23일 공개된 PCT 국제 공개 WO 97/38983; 1995년 7월 27일 공개된 PCT 국제 공개 WO 95/19774; 1995년 7월 27일 공개된 PCT 국제 공개 WO 95/19970; 1997년 4월 17일 공개된 PCT 국제 공개 WO 97/13771; 1998년 1월 22일 공개된 PCT 국제 공개 WO 98/02437; 1998년 1월 22일 공개된 PCT 국제 공개 WO 98/02438; 1997년 9월 12일 공개된 PCT 국제 공개 WO 97/32881; 1998년 1월 29일 공개된 독일 출원 DE 19629652; 1998년 8월 6일 공개된 PCT 국제 공개 WO 98/33798; 1997년 9월 12일 공개된 PCT 국제 공개 WO 97/32880; 1997년 9월 12일 공개된 PCT 국제 공개 WO 97/32880; 1995년 11월 15일 공개된 유럽 특허 출원 EP 682027; 1997년 1월 23일 공개된 PCT 국제 공개 WO 97/02266; 1997년 7월 31일 공개된 PCT 국제 공개 WO 97/27199; 1998년 2월 26일 공개된 PCT 국제 공개 WO 98/07726; 1997년 9월 25일 공개된 PCT 국제 공개 WO 97/34895; 1996년 10월 10일 공개된 PCT 국제 공개 WO 96/31510'; 1998년 4월 9일 공개된 PCT 국제 공개 WO 98/14449; 1998년 4월 9일 공개된 PCT 국제 공개 WO 98/14450; 1998년 4월 9일 공개된 PCT 국제 공개 WO 98/14451; 1995년 4월 13일 공개된 PCT 국제 공개 WO 95/09847; 1997년 5월 29일 공개된 PCT 국제 공개 WO 97/19065; 1998년 4월 30일 공개된 PCT 국제 공개 WO 98/17662; 1998년 8월 4일 등록된 미국 특허 번호 5,789,427; 1997년 7월 22일 등록된 미국 특허 번호 5,650,415; 1997년 8월 12일 등록된 미국 특허 번호 5,656,643; 1999년 7월 15일 공개된 PCT 국제 공개 WO 99/35146; 1999년 7월 15일 공개된 PCT 국제 공개 WO 99/35132; 1999년 2월 18일 공개된 PCT 국제 공개 WO 99/07701; 및 1992년 11월 26일 공개된 PCT 국제 공개 WO 92/20642. 소분자 EGFR 억제제의 추가의 비제한적 예는 문헌[Traxler, P., 1998, Exp. Opin. Ther. Patents 8(12):1599-1625]에 기재된 임의의 EGFR 억제제를 포함한다.

[0341] 항체 기반 EGFR 억제제는 천연 리간드에 의한 EGFR 활성화를 부분적 또는 완전히 차단할 수 있는 임의의 항-EGFR 항체 또는 항체 단편을 포함한다. 항체 기반 EGFR 억제제의 비제한적 예는 문헌[Modjtahedi, H., et al., 1993, Br. J. Cancer 67:247-253; Teramoto, T., et al., 1996, Cancer 77:639-645; Goldstein et al., 1995, Clin. Cancer Res. 1:1311-1318; Huang, S. M., et al., 1999, Cancer Res. 59:1236-1243]에 기재된 것을 포함한다. 따라서, EGFR 억제제는 단클론 항체 MAb

E7.6.3(상기 Yang, 1999), 또는 MAb C225(ATCC 수탁 번호 HB-8508), 또는 이의 결합 특이성을 갖는 항체 또는 항체 단편일 수 있다.

[0342] 본 발명의 KRAS^{G12C} 억제제는 공개된 PCT 출원 WO2002/006213에서 확인되는 것과 같은 MEK 억제제와 조합하여 사용될 수 있다. 특정 화합물은 AMG 1009089 또는 1009089로도 알려진 N-(((2R)-2,3-디하이드록시프로필)옥시)-3,4-디플루오로-2-((2-플루오로-4-요오도페닐)아미노)벤자미드이다(실시예 39).

[0343] 본 발명의 KRAS^{G12C} 억제제는 공개된 PCT 출원 WO2008/153,947에서 확인되는 것과 같은 BRAF 억제제와 조합하여 사용될 수 있다. 특정 화합물은 AMG 2112819(2112819로도 알려짐)이다(실시예 56). 본 발명의 조합에 사용될 수 있는 다른 특정 BRAF 억제제는 다브라페닙이다. 본 발명의 조합에 사용될 수 있는 다른 BRAF 억제제는 베무라페닙이다.

[0344] Pan-RAF 억제제 또한 본 발명의 조합에서 KRAS^{G12C} 억제제와 함께 사용될 수 있다. 특정 Pan-Raf 억제제는 RAF265 및 MLN-2480을 포함한다.

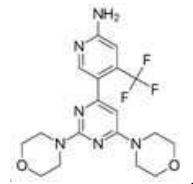
[0345] 본 발명의 KRAS^{G12C} 억제제는 MEK 억제제와 조합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조합에 사용될 수 있는 특정 MEK 억제제는 PD-325901, 트라메티닙, 피마서틴, MEK162[비니메티닙으로도 알려짐], TAK-733, GDC-0973, 및 AZD8330을 포함한다. 본 발명의 조합에서 KRAS^{G12C} 억제제와 함께 사용될 수 있는 특정 MEK 억제제는 트라메티닙(상표명: Mekinist[®], Novartis Pharmaceuticals Corp.에서 시판)이다. 다른 특정 MEK 억제제는 AMG 1009089, 1009089, 또는 PD-325901로도 알려진 N-(((2R)-2,3-디하이드록시프로필)옥시)-3,4-디플루오로-2-((2-플루오로-4-요오도페닐)아미노)벤자미드이다. 본 발명의 조합에 사용될 수 있는 다른 특정 MEK 억제제는 코비메티닙을 포함한다.

[0346] MEK 억제제는 CI-1040, AZD6244, PD318088, PD98059, PD334581, RDEA119, ARRY-142886, 및 ARRY-438162를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

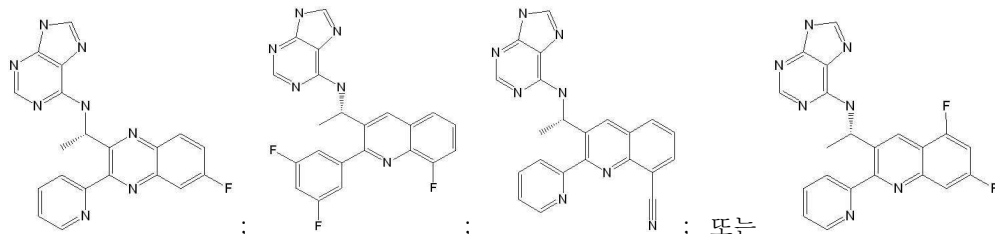
[0347] 다른 양태에서, 본 발명은 포스포티딜이노시톨 3-키나제(PI3K) 경로의 단백질의 억제제인 하나 이상의 약제와 조합된 본 발명의 화합물의 사용과 관련된다. PI3K 경로의 단백질의 예는 PI3K, mTOR, 및 PKB(Akt 또는 AKT로도 알려짐)를 포함한다. PI3K 단백질은 α , β , δ , 또는 γ 를 포함한 여러 아이소형으로 존재한다. 본 발명에 사용될 수 있는 PI3K 억제제는 하나 이상의 아이소형에 대해 선택적일 수 있는 것으로 고려된다. "선택적"이란 화합물이 하나 이상의 아이소형을 다른 아이소형보다 더 많이 억제함을 의미한다. 선택성은 당업자에게 잘 알려진 개념이며, 잘 알려진 시험관내 또는 세포 기반 활성 분석으로 측정될 수 있다. 바람직한 선택성은 다른 아이소형 대비 하나 이상의 아이소형에 대해 2배 초과, 바람직하게는 10배, 또는 더 바람직하게는 100배 더 큰 선택성을 포함한다. 일 양태에서, 본 발명의 화합물과 조합하여 사용될 수 있는 PI3K 억제제는 PI3K α 선택적 억제제이다. 다른 양태에서, 화합물은 PI3K δ 선택적 억제제이다. 또 다른 양태에서, 화합물은 PI3K β 선택적 억제제이다.

[0348] 본 발명의 하나 이상의 화합물과 조합하여 사용될 수 있는 PI3K 억제제의 예는 다음의 문헌에 개시된 것들을 포함한다: PCT 공개 출원 번호 WO2010/151791; PCT 공개 출원 번호 WO2010/151737; PCT 공개 출원 번호 WO2010/151735; PCT 공개 출원 번호 WO2010151740; PCT 공개 출원 번호 WO2008/118455; PCT 공개 출원 번호 WO2008/118454; PCT 공개 출원 번호 WO2008/118468; 미국 공개 출원 번호 US20100331293; 미국 공개 출원 번호 US20100331306; 미국 공개 출원 번호 US20090023761; 미국 공개 출원 번호 US20090030002; 미국 공개 출원 번호 US20090137581; 미국 공개 출원 번호 US2009/0054405; 미국 공개 출원 번호 US2009/0163489; 미국 공개 출원 번호 US2010/0273764; 미국 공개 출원 번호 US2011/0092504; 또는 PCT 공개 출원 번호 WO2010/108074. PI3K 억제제는 보르트만닌, WO 06/044453에 기재된 17-하이드록시보르트만닌 유사체, 4-[2-(1H-인다졸-4-일)-6-[[4-(메틸설포닐)피페라진-1-일]메틸]티에노[3,2-d]피리미딘-4-일]모르폴린(GDC 0941로도 알려져 있고 PCT 공개 번호 WO 09/036,082 및 WO 09/055,730에 기재되어 있음), 2-메틸-2-[4-[3-메틸-2-옥소-8-(퀴놀린-3-일)-2,3-디하이드로이미다조[4,5-c]퀴놀린-1-일]페닐]프로피오니트릴(BEZ 235 또는 NVP-BEZ 235로도 알려져 있고, PCT 공개 번호 WO 06/122806에 기재되어 있음), (S)-1-(4-((2-(2-아미노피리미딘-5-일)-7-메틸-4-모르폴리노티에노[3,2-d]피리미딘-6-일)메틸)피페라진-1-일)-2-하이드록시프로판-1-온(PCT 공개 번호 WO 2008/070740에 기재되어 있음), LY294002(Axon Medchem로부터 입수 가능한 2-(4-모르폴리닐)-8-페닐-4H-1-벤조피란-4-온), PI 103 염산염(Axon Medchem로부터 입수 가능한 3-[4-(4-모르폴리닐피리도-[3',2':4,5]퓨로[3,2-d]피리미딘-2-일]페놀 염산염), PIK 75(Axon Medchem로부터 입수 가능한 N'-[(1E)-(6-브로모이미다조[1,2-a]피리딘-3-일)메틸렌]-

N,2-디메틸-5-니트로벤젠설포노-히드라지드 염산염), PIK 90(Axon Medchem으로부터 입수 가능한 N-(7,8-디메톡시-2,3-디하이드로-이미다조[1,2-c]퀴나졸린-5-일)-니코틴아미드), GDC-0941 비스메실레이트(Axon Medchem으로부터 입수 가능한 2-(1H-인다졸-4-일)-6-(4-메탄설포닐-피페라진-1-일메틸)-4-모르폴린-4-일-티에노[3,2-d]피리미딘 비스메실레이트), AS-252424(Axon Medchem으로부터 입수 가능한 5-[1-[5-(4-플루오로-2-하이드록시-페닐)-퓨란-2-일]-메트-(Z)-일리덴]-티아졸리딘-2,4-디온), 및 TGX-221(Axon Medchem으로부터 입수 가능한 7-메틸-2-(4-모르폴리닐)-9-[1-(페닐아미노)에틸]-4H-피리도-[1,2-a]피리미딘-4-온), XL-765, 및 XL-147을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 다른 PI3K 억제제는 데메톡시비리딘, 페리포신, CAL101, PX-866, BEZ235, SF1126, INK1117, IPI-145, BKM120, XL147, XL765, 팔로미르 529, GSK1059615, ZSTK474, PWT33597, IC87114, TG100-115, CAL263, PI-103, GNE-477, CUDC-907, 및 AEZS-136을 포함한다.



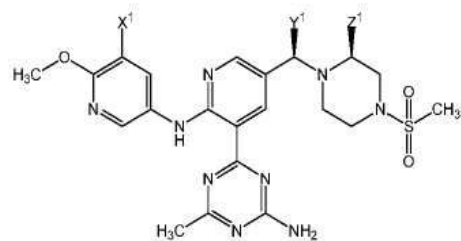
본 발명의 화합물과 조합하여 사용하기에 바람직한 PI3K 억제제는 부파리십으로도 알려진 Novartis Pharmaceuticals의 연구용 소분자,



허용되는 염을 포함한다.

아래 화학식 IIa의 화합물, 또는 이의 제약상 허용되는 염도 바람직하며,

[화학식 II]



식 중, X^1 은 불소 또는 수소이고; Y^1 은 수소 또는 메틸이고; Z^1 은 수소 또는 메틸이다. 본 발명의 조합에 사용될 수 있는 특정 PI3K 억제제는 공개된 PCT 출원 W02010/126895의 실시예 148인 AMG 511(AMG 2539965 또는 2539965로도 알려짐)이다.

본 발명의 조합에서 KRAS^{G12C} 억제제와 조합하여 사용될 수 있는 다른 PI3K 억제제는 BKM120 및 GDC-0941과 같은 Pan-PI3K 억제제; BYL719와 같은 PI3K α 선택적 억제제; 및 GSK-2636771과 같은 PI3K β 억제제를 포함한다.

PI3K 및 mTOR을 모두 억제하는 화합물(이중 억제제)은 알려져 있다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 KRAS^{G12C} 억제제와 조합하여 사용하기 위한 이중 PI3K 및 mTOR 억제제의 용도를 제공한다. 특정 이중 억제제의 예는 GDC-0980이다.

KRAS^{G12C} 억제제는 또한, 본 발명에서 SHP2 억제제와 조합하여 사용될 수 있다. 본 조합에 사용될 수 있는 SHP2 억제제는 SHP099, 및 Revolutions Medicines(Redwood City, CA)의 RMC-4550 또는 RMC-4630을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

mTOR은 PI3K 경로의 단백질이다. 본 발명의 다른 양태는 KRAS^{G12C} 억제제와 조합하여 mTOR 억제제를 사용하는 것이다. 본 발명의 화합물과 조합하여 사용될 수 있는 mTOR 억제제는 다음의 문헌에 개시된 것들을 포함한다: PCT

공개 출원 번호 WO2010/132598 및 PCT 공개 출원 번호 WO2010/096314. 본 발명의 조합에서 KRAS^{G12C} 억제제와 조합하여 사용될 수 있는 mTOR 억제제는 AZD2014 및 MLN0128을 포함한다.

- [0359] TOR 억제제는 AP-23573, CCI-779, 에버롤리무스, RAD-001, 라파마이신, 템시롤리무스, ATP-경쟁적 TORC1/TORC2 억제제(PI-103, PP242, PP30, 및 Torin 1 포함)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. FKBP12 인헨서에서의 기타 TOR 억제제; 라파마이신 및 이의 유도체는 다음을 포함함: CCI-779(템시롤리무스), RAD001(에버롤리무스; WO 9409010) 및 AP23573; 예를 들어 WO 98/02441 및 WO 01/14387에 개시된 바와 같은 라파로그, 예를 들어 AP23573, AP23464, 또는 AP23841; 40-(2-하이드록시에틸)라파마이신, 40-[3-하이드록시(하이드록시메틸)메틸프로파노에이트]-라파마이신(CC1779라고도 함), 40-에피-(테트라졸리트)-라파마이신(ABT578이라고도 함), 32-데옥소라파마이신, 16-펜티닐옥시-32(S)-디하이드로라파나인, 및 WO 05005434에 개시된 다른 유도체; 미국 특허 번호 5,258,389, WO 94/090101, WO 92/05179, 미국 특허 번호 5,118,677, 미국 특허 번호 5,118,678, 미국 특허 번호 5,100,883, 미국 특허 번호 5,151,413, 미국 특허 번호 5,120,842, WO 93/111130, WO 94/02136, WO 94/02485, WO 95/14023, WO 94/02136, WO 95/16691, WO 96/41807, WO 96/41807, 및 미국 특허 번호 5,256,790에 개시된 유도체; 인-함유 라파마이신 유도체(예를 들어, WO 05016252); 4H-1-벤조피란-4-온 유도체(예를 들어, 미국 가출원 번호 60/528,340)).
- [0360] PKB(AKT)도 PI3K 경로의 단백질이다. 본 발명의 다른 양태는 KRAS^{G12C} 억제제와 조합하여 AKT 억제제를 사용하는 것이다. 본 발명의 화합물과 조합하여 사용될 수 있는 AKT 억제제는 다음의 문헌에 개시된 것들을 포함한다: 미국 특허 번호 7,354,944; 미국 특허 번호 7,700,636; 미국 특허 번호 7,919,514; 미국 특허 번호 7,514,566; 미국 특허 출원 공개 번호 US 2009/0270445 A1; 미국 특허 번호 7,919,504; 미국 특허 번호 7,897,619; 또는 PCT 공개 출원 번호 WO 2010/083246 A1. 본 발명의 조합에서 KRAS^{G12C} 억제제와 조합하여 사용될 수 있는 특정 AKT 억제제는 MK-2206, GDC-0068, 및 AZD5363을 포함한다.
- [0361] AKT 억제제는 Akt-1-1(Akt1 억제)(Barnett et al. (2005) *Biochem. J.*, 385 (Pt. 2), 399-408); Akt-1-1,2(Ak1 및 2 억제)(Barnett et al. (2005) *Biochem. J.* 385 (Pt. 2), 399-408); API-59CJ-Ome(예를 들어, Jin et al. (2004) *Br. J. Cancer* 91, 1808-12); 1-H-이미다조[4,5-c]피리딘일 화합물(예를 들어, WO05011700); 인돌-3-카비놀 및 이의 유도체(예를 들어, 미국 특허 번호 6,656,963; Sarkar and Li (2004) *J Nutr.* 134(12 Suppl), 3493S-3498S); 페리포신(예를 들어, Akt 막 국제화 방해; Dasmahapatra et al. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10(15), 5242-52, 2004); 포스포티딜이노시톨 에테르 지질 유사체(예를 들어, Gills and Dennis (2004) *Expert. Opin. Investig. Drugs* 13, 787-97); 및 트리시리빈(TCN 또는 API-2 또는 NCI 식별자: NSC 154020; Yang et al. (2004) *Cancer Res.* 64, 4394-9)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0362] MCL-1 억제제는 AMG-176, MIK665, 및 S63845를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 골수성 세포 백혈병-1(MCL-1) 단백질은 B세포 림프종-2(BCL-2) 단백질 계열의 주요 항세포자멸 구성원 중 하나이다. MCL-1의 과발현은 종래의 화학요법에 대한 내성뿐만 아니라 ABT-263과 같은 BCL-2 억제제를 포함한 표적 치료제에 대한 내성 및 중앙 진행과 밀접한 관련이 있었다.
- [0363] 프로테아솜 억제제는 Kyprolis[®](카필조립), Velcade[®](보르테조립), 및 오프로조립을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0364] 면역 치료제는 항-PD-1 제제, 항-PDL-1 제제, 항-CTLA-4 제제, 항-LAG1 제제, 및 항-OX40 제제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0365] 단클론 항체는 Darzalex[®](다라투무맙), Herceptin[®](트라스투주맙), Avastin[®](베바시주맙), Rituxan[®](리툽시맙), Lucentis[®](라니비주맙), 및 Eylea[®](아플리버셉트)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0366] 면역조절제(IMiD)는 이미드기를 포함하는 면역조절 약물(면역 반응을 조절하는 약물)의 한 부류이다. IMiD 클래스는 탈리도마이드 및 이의 유사체(레날리도마이드, 포말리도마이드, 및 아프레밀라스트)를 포함한다.
- [0367] 항체를 포함하는(이에 한정되지 않음) 항-PD-1 억제제는 켈브롤리주맙(Keytruda[®]) 및 니볼루맙(Opdivo[®])을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 예시적인 항-PD-1 항체 및 이의 사용 방법은 문헌[Goldberg et al., *Blood* 110(1):186-192 (2007), Thompson et al., *Clin. Cancer Res.* 13(6):1757-1761 (2007)], 및 Korman 등의 국제 특허 출원 번호 PCT/JP2006/309606(공개 번호 WO 2006/121168 A1)에 기재되어 있으며, 이들 각각은 명백하게

본원에 참조로 포함된다. 다음을 포함한다: Yervoy™(이필리무맵) 또는 트레멜리무맵(CTLA-4), 갈릭시맵(B7.1), BMS-936558(PD-1), MK-3475(PD-1), AMP224(B7DC), BMS-936559(B7-H1), MPDL3280A(B7-H1), MEDI-570(ICOS), AMG557(B7H2), MGA271(B7H3), IMP321(LAG-3), BMS-663513(CD137), PF-05082566(CD137), CDX-1127(CD27), 항-OX40(Providence Health Services), huMAbOX40L(OX40L), 아타시셉트(TACI), CP-870893(CD40), 루카투무맵(CD40), 다세투주맵(CD40), 무로모납-CD3(CD3), 이필리무맵(CTLA-4). 면역 치료제는 또한, 유전자 조작된 T세포(예를 들어, CAR-T세포) 및 이중특이적 항체(예를 들어, BiTE)를 포함한다.

[0368] 특정 구현예에서, 본 발명의 화합물은 AMG 404와 같은 항-PD-1 항체와 조합하여 사용된다. 특정 구현예에서, 항-PD-1 항체(또는 이의 항원 결합 항체 단편)는 서열번호 1 내지 6의 CDR 아미노산 서열 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개 모두를 포함한다(순서대로 HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3을 나타냄). 특정 구현예에서, 항-PD-1 항체(또는 이의 항원 결합 항체 단편)는 서열번호 1 내지 6의 CDR 아미노산 서열 6개 모두를 포함한다. 다른 구현예에서, 항-PD-1 항체(또는 이의 항원 결합 항체 단편)는 (a) 서열번호 7의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열, 또는 1개 또는 2개의 아미노산만 상이하거나 적어도 또는 약 70%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이 서열, 또는 (b) 서열번호 8의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열, 또는 1개 또는 2개의 아미노산만 상이하거나 적어도 또는 약 70%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이 서열을 포함한다. 예시적인 구현예에서, 항-PD-1 항체(또는 이의 항원 결합 항체 단편)는 서열번호 7의 중쇄 가변 영역 아미노산 서열 및 서열번호 8의 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 항-PD-1 항체(또는 이의 항원 결합 항체 단편)는 (a) 서열번호 9의 중쇄 아미노산 서열, 또는 1개 또는 2개의 아미노산만 상이하거나 적어도 또는 약 70%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이 서열, 또는 (b) 서열번호 10의 경쇄 아미노산 서열, 또는 1개 또는 2개의 아미노산만 상이하거나 적어도 또는 약 70%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이 서열을 포함한다. 예시적인 구현예에서, 항-PD-1 항체(또는 이의 항원 결합 항체 단편)는 서열번호 9의 중쇄 아미노산 서열 및 서열번호 10의 경쇄 아미노산 서열을 포함한다.

[0369] 본 발명은 또한, 항-PD-1 항체(또는 이의 항원 결합 부분)를 암호화하는 핵산 서열을 제공한다. 예시적인 양태에서, 항체는 서열번호 11 내지 16의 핵산(들)에 의해 암호화되는 CDR 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개 모두를 포함한다(순서대로 HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, 및 LC CDR3을 나타냄). 다른 예시적인 양태에서, 항체는 서열번호 11 내지 16의 핵산에 의해 암호화되는 CDR 6개 모두를 포함한다. 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체(또는 이의 항원 결합 부분)는 (a) 서열번호 17에 의해 암호화되는 중쇄 가변 영역, 또는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 핵산만 상이하거나 적어도 또는 약 70%, 85%, 90%, 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이 서열, 또는 (b) 서열번호 18에 의해 암호화되는 경쇄 가변 영역, 또는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 핵산만 상이하거나 적어도 또는 약 70%, 85%, 90%, 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이 서열을 포함한다. 예시적인 구현예에서, 항-PD-1 항체(또는 이의 항원 결합 부분)는 서열번호 17에 의해 암호화되는 중쇄 가변 영역 및 서열번호 18에 의해 암호화되는 경쇄 가변 영역을 포함한다. 다른 구현예에서, 항-PD-1 항체(또는 이의 항원 결합 부분)는 (a) 서열번호 19에 의해 암호화되는 중쇄, 또는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 핵산만 상이하거나 적어도 또는 약 70%, 85%, 90%, 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이 서열, 또는 (b) 서열번호 20에 의해 암호화되는 경쇄, 또는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 또는 6개의 핵산만 상이하거나 적어도 또는 약 70%, 85%, 90%, 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이 서열을 포함한다. 예시적인 구현예에서, 항-PD-1 항체(또는 이의 항원 결합 부분)는 서열번호 19에 의해 암호화되는 중쇄 및 서열번호 20에 의해 암호화되는 경쇄를 포함한다. CT-26 KRAS p.G12C 세포는 CRISPR 기술을 이용해 두 KRAS p.G12D 대립형질 모두를 서열번호 21에 의해 암호화되는 p.G12C(ThermoFisher Scientific)로 대체하여 뮌헨 T-26 대장 세포주(ATCC)로부터 생성되었다.

서열번호	서열 유형	서열
1	PRT	Ser Tyr Asp Met Ser
2	PRT	Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys
3	PRT	Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val
4	PRT	Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala
5	PRT	Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
6	PRT	Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His Thr
7	PRT	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
8	PRT	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala

[0370]

		Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
9	PRT	Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu

[0371]

		Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
10	PRT	Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
11	DNA	agctatgaca tgagc
12	DNA	cttattagtg gtggtgtag tcaaacatac tacgcagaat ccgtgaaggg c
13	DNA	cccagtggcc actacttcta cgctatggac gtc
14	DNA	cgggcgagtc agggtattag caactggtta gcc
15	DNA	gtgcatcca gtttgcaaag t
16	DNA	caacagcgtg aaagtttccc tcacact
17	DNA	gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agctatgaca tgagctgggt ccgccaggct ccaggaagg ggctggaatg ggtctcactt attagtgggtg gtggtagtca aacatactac gcagaatccg tgaagggcg gttcaccatc tcagagaca attccaagaa cacgctgtat ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgc gtccccagt ggccactact tctacgctat ggacgtctgg ggccaaggga ccacgggtcac cgtctctca

[0372]

18	DNA	gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc gtgtctgcat ctgttggaga cagagtcacc atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc aactggtag cctggtatca gcagaaacca gggaaagccc ctaagctcct gatctttgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcacctca ccatcagcag cctgcagcct gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctgaaagtt tccttcacac tttcggcgga gggaccaagg tggagatcaa a
19	DNA	atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggtcctgctg tgctgtggct gagaggtgctg cgctgtgagg tgcagctgtt ggagtctggg ggaggttgg tacagcctgg ggggtcctg agactctcct gtgcagctc tggattcacc tttagcagct atgacatgag ctgggtccgc caggctccag ggaaggggct ggaatgggtc tcacttatta gtggtggtgg tagtcaaaca tactacgcag aatccgtgaa gggccggttc accatctcca gagacaattc caagaacacg ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatattt ctgtgcgtcc ccagtgggcc actacttcta cgctatggac gtctggggcc aaggggaccac ggtcaccgtc tcctcagcct ccaccaaggg cccatcgggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggtgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggctgcaca ccttcccggc tgtctacag tcctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag ccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccacgt gcccagcacc tgaactctg gggggaccgt cagtcttct cttccccca aaaccaagg acaacctcat gatctcccgg accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagtgc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgtg cgaggagcag tacggcagca cgtaccgttg cgtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtgtccaac aaagccctcc cagcccccac cgagaaaacc atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacaggtgt acacctgccc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggett ctatcccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccagcct cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc

[0373]

		cctgtctccg ggtaaa
20	DNA	atggacatga ggggtgccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggt gagaggtgcg cgctgtgaca tccagatgac ccagctctcca tcttccgtgt ctgcatctgt tggagacaga gtcaccatca cttgtcgggc gagtcagggt attagcaact ggttagcctg gtatcagcag aaaccaggga aagcccctaa gtcctgacg tttgctgcat ccagtttgca aagtggggtc ccatcaaggc tcagcggcag tggatctggg acagatttca ccctaccat cagcagcctg cagcctgaag attttgcaac ttactattgt caacaggctg aaagtttccc tcacacttcc ggcggaggga ccaagggtga gatcaaacga acgggtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgctt gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgcccctca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacagagaaa cacaaagtct acgectgca agtcacccat cagggcctga gctcgccctg cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt
21	PRT	Cys Thr Thr Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Thr Thr Gly Gly Ala Gly Cys Thr Gly Ala

[0374]

[0375]

GITR 작용제는 GITR 융합 단백질 및 항-GITR 항체(예를 들어, 2가 항-GITR 항체), 예컨대 미국 특허 번호 6,111,090 box c, 유럽 특허 번호 090505B1, 미국 특허 번호 8,586,023, PCT 공개 번호 WO 2010/003118 및 2011/090754에 기재된 GITR 융합 단백질, 또는 예를 들어 미국 특허 번호 7,025,962, 유럽 특허 번호 1947183B1, 미국 특허 번호 7,812,135, 미국 특허 번호 8,388,967, 미국 특허 번호 8,591,886, 유럽 특허 번호 EP 1866339, PCT 공개 번호 WO 2011/028683, PCT 공개 번호 WO 2013/039954, PCT 공개 번호 WO2005/007190, PCT 공개 번호 WO 2007/133822, PCT 공개 번호 WO2005/055808, PCT 공개 번호 WO 99/40196, PCT 공개 번호 WO 2001/03720, PCT 공개 번호 WO99/20758, PCT 공개 번호 WO2006/083289, PCT 공개 번호 WO 2005/115451, 미국 특허 번호 7,618,632, 및 PCT 공개 번호 WO 2011/051726에 기재된 항-GITR 항체를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0376]

KRAS^{G12C} 억제제는 또한, 본 발명에서 CDK4 및/또는 6 억제제와 조합하여 사용될 수 있다. 본 조합에 사용될 수 있는 CDK4 및/또는 6 억제제는 다음 문헌에 개시된 것들을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: PCT 공개 출원 번호 WO 2009/085185 또는 미국 특허 출원 공개 번호 US2011/0097305.

[0377]

본 발명의 조합에서 KRAS^{G12C} 억제제와 조합하여 사용될 수 있는 다른 화합물은 고유 세포자멸 경로의 일부인 단백질을 억제하는 화합물을 포함한다. 이러한 화합물의 예는 나비토클락스와 같은 Bcl2/BclxL 억제제, 및 ABT-199와 같은 Bcl2 억제제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0378]

본 발명의 조합에서 KRAS^{G12C} 억제제와 조합하여 사용될 수 있는 다른 화합물은 다사티닙과 같은(이에 한정되지 않음) BCR-ABL 억제제, 및 파노비노스타트와 같은 HDAC 억제제를 포함한다.

[0379]

본 발명의 조합에서 KRAS^{G12C} 억제제와 조합하여 사용될 수 있는 다른 화합물은 시스플라틴, 카보플라틴, 및 옥살리플라틴과 같은 플라티늄; 일반적으로 안트라사이클린 부류의 국소이성화효소 II 억제제, 예컨대 독소루비신, 다우노루비신, 이다루비신, 에피루비신, 페길화 리포솜 독소루비신 하이드로클로라이드, 마이오세트, 및 에토포시드; 이리노테칸(CPT-11)과 같은 국소이성화효소 I 억제제; 테모졸로미드와 같은 DNA 알킬화제; 및 시타라빈 및 데시타빈과 같은 뉴클레오시드 유사체를 포함한다.

[0380]

본 발명의 조합에서 KRAS^{G12C} 억제제와 조합하여 사용될 수 있는 다른 화합물은 티로신 키나제 억제제를 포함하는 수용체 및 비수용체 키나제 억제제를 포함한다. 이러한 화합물의 예는 이마티닙, 다사티닙, 포나티닙, 보수티닙, 닐로티닙, 퀴자르티닙, 미도스타우린, 에를로티닙, 및 라파티닙을 포함한다.

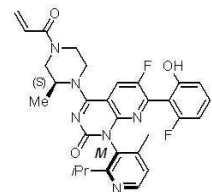
[0381]

본원에 기재된 화합물은 치료되는 병태에 따라, 본원에 개시된 제제 또는 다른 적합한 제제와 조합하여 사용될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서 본 발명의 하나 이상의 화합물은 전술한 바와 같이 다른 제제와 함께 투여될

것이다. 병용 요법에 사용시, 본원에 기재된 화합물은 제2 제제와 동시에 또는 개별적으로 투여된다. 이 병용 투여는 동일한 투약 형태의 두 제제의 동시 투여, 개별 투약 형태의 동시 투여, 및 개별 투여를 포함할 수 있다. 즉, 본원에 기재된 화합물과 상기 임의의 제제는 동일한 투약 형태로 함께 제형화되어 동시에 투여될 수 있다. 대안적으로, 본 발명의 화합물과 상기 임의의 제제는 동시에 투여될 수 있으며, 두 제제는 개별 제형으로 존재한다. 다른 대안예에서, 본 발명의 화합물은 상기 임의의 제제가 투여되기 바로 전에 투여될 수 있으며, 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 개별 투여 프로토콜의 일부 구현예에서, 본 발명의 화합물 및 상기 임의의 제제는 수 분 간격, 또는 수 시간 간격, 또는 수일 간격으로 투여된다.

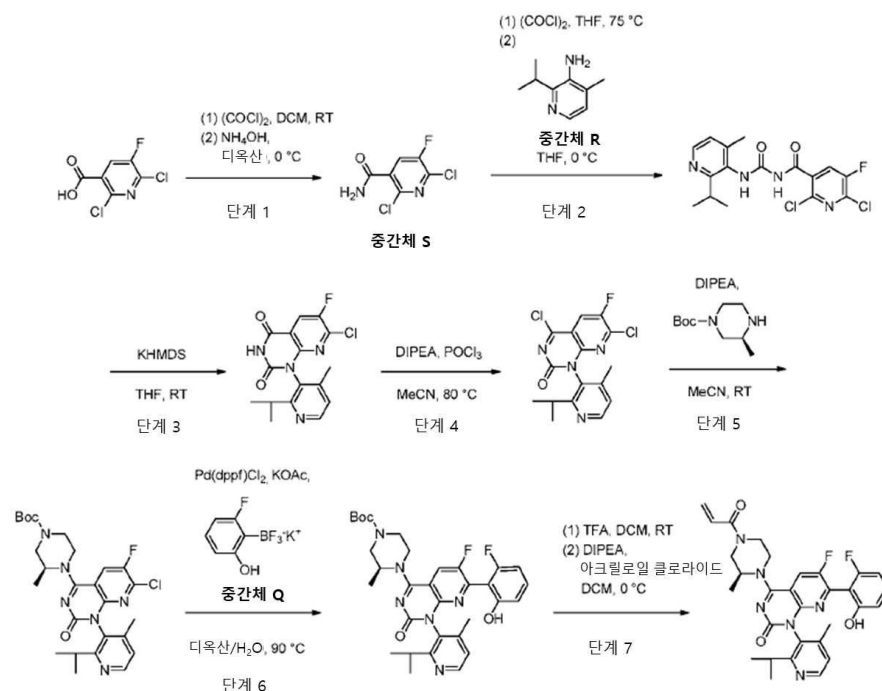
[0382] 본 발명의 일 양태는 개별 투여될 수 있는 제약 활성 화합물의 조합으로 질환/병태를 치료하는 것을 고려하므로, 본 발명은 또한 개별 제약 조성물을 키트 형태로 조합하는 것에 관한 것이다. 키트는 2개의 개별 제약 조성물, 즉 본 발명의 화합물, 및 제2 제약 화합물을 포함한다. 키트는 개별 조성물을 수용하는 용기, 예를 들어 분할된 병 또는 분할된 호일 패키지를 포함한다. 용기의 추가 예는 주사기, 박스, 및 백을 포함한다. 일부 구현예에서, 키트는 개별 구성요소의 사용을 위한 지침을 포함한다. 키트 형태는 개별 구성요소가 바람직하게는 상이한 투약 형태(예를 들어, 경구 및 비경구)로 투여되거나 상이한 투여 간격으로 투여되는 경우, 또는 처방 전문 의료진에 의해 조합의 개별 구성요소의 적정이 요구되는 경우에 특히 유리하다.

[0383] AMG 510의 합성



[0384] 본 발명의 KRAS^{G12C} 억제제는 공개된 PCT 출원 WO 2018/119183에 개시된 것들을 포함한다. 의 구조를 갖는 AMG 510의 합성은 후술하는 바와 같이, 2017년 5월 22일에 출원된 가출원 번호 62/509,629의 우선권 및 이익을 주장하는 2018년 5월 21일에 출원된 U.S.S.N. 15/984,855에 기재되어 있다.

[0385] 최종 생성물을 분해하여 M-회전장애 이성체를 분리하는 다음의 공정을 사용해 6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-1-(4-메틸-2-(2-프로파닐)-3-피리디닐)-4-((2S)-2-메틸-4-(2-프로페노일)-1-피페라지닐)피리도[2,3-d]피리미딘-2(1H)-온을 제조하였다.



[0386]

[0387] 단계 1: 2,6-디클로로-5-플루오로니코틴아미드(중간체 S). 디클로로메탄(48 mL) 중 2,6-디클로로-5-플루오로-니코틴산(4.0 g, 19.1 mmol, AstaTech Inc., AstaTech Inc., Bristol, PA)의 혼합물에 염화옥살릴(DCM 중 2 M 용액, 11.9 mL, 23.8 mmol)을 첨가한 후, 촉매량의 DMF(0.05 mL)를 첨가하였다. 반응물을 밤새 실온에서 교반한 후, 농축하였다. 잔류물을 1,4-디옥산(48 mL)에 용해시키고 0℃까지 냉각시켰다. 수산화암모늄 용액(28.0~30%의

NH₃ 기준, 3.6 mL, 28.6 mmol)을 시린지를 통해 서서히 첨가하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 30분 동안 교반한 후, 농축하였다. 잔류물을 EtOAc/헵탄의 1:1 혼합물로 희석하고 5분 동안 교반한 후, 여과하였다. 여과된 고형물을 버리고, 남은 모액을 부분적으로 절반 부피까지 농축하고 여과하였다. 여과된 고형물을 헵탄으로 세척하고, 감압 오븐(45℃)에서 밤새 건조시켜 2,6-디클로로-5-플루오로니코틴아미드를 제공하였다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8.23 (d, *J* = 7.9 Hz, 1 H) 8.09 (br s, 1 H) 7.93 (br s, 1 H). *m/z* (ESI, +ve 이온): 210.9 (M+H)⁺.

[0388]

단계 2: 2,6-디클로로-5-플루오로-N-((2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)카바모일)니코틴아미드. THF(20 mL) 중 2,6-디클로로-5-플루오로니코틴아미드(중간체 S, 5.0 g, 23.9 mmol)의 빙냉 슬러리에 염화옥살릴(DCM 중 2 M 용액, 14.4 mL, 28.8 mmol)을 시린지를 통해 서서히 첨가하였다. 생성된 혼합물을 75℃에서 1시간 동안 가열한 후, 가열을 중단하고, 반응물을 절반 부피까지 농축하였다. 0℃까지 냉각시킨 후, THF(20 mL)를 첨가한 다음, THF(10 mL) 중 2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-아민(중간체 R, 3.59 g, 23.92 mmol)의 용액을 캐놀라를 통해 적가하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 1시간 동안 교반한 후, 염수와 포화 수성 염화암모늄의 1:1 혼합물로 킨칭하였다. 혼합물을 EtOAc(3x)로 추출하고, 합한 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 농축하여 2,6-디클로로-5-플루오로-N-((2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)카바모일)니코틴아미드를 제공하였다. 이 물질을 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. *m/z* (ESI, +ve 이온): 385.1(M+H)⁺.

[0389]

단계 3: 7-클로로-6-플루오로-1-(2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)피리도[2,3-*d*]피리미딘-2,4(1H,3H)-디온. THF(40 mL) 중 2,6-디클로로-5-플루오로-N-((2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)카바모일)니코틴아미드(9.2 g, 24.0 mmol)의 빙냉 용액에 KHMDs(THF 중 1 M 용액, 50.2 mL, 50.2 mmol)를 시린지를 통해 서서히 첨가하였다. 빙조를 제거하고, 생성된 혼합물을 실온에서 40분 동안 교반하였다. 반응물을 포화 수성 염화암모늄으로 킨칭하고 EtOAc(3x)로 추출하였다. 합한 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고 농축하였다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피(용리액: 0~50% 3:1 EtOAc-EtOH/헵탄)로 정제하여 7-클로로-6-플루오로-1-(2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)피리도[2,3-*d*]피리미딘-2,4(1H,3H)-디온을 제공하였다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12.27 (br s, 1H), 8.48-8.55 (m, 2 H), 7.29 (d, *J* = 4.8 Hz, 1 H), 2.87 (quin, *J* = 6.6 Hz, 1 H), 1.99-2.06 (m, 3 H), 1.09 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H), 1.01 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆) δ: -126.90 (s, 1 F). *m/z* (ESI, +ve 이온): 349.1 (M+H)⁺.

[0390]

단계 4: 4,7-디클로로-6-플루오로-1-(2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)피리도[2,3-*d*]피리미딘-2(1H)-온. 아세트니트릴(20 mL) 중 7-클로로-6-플루오로-1-(2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)피리도[2,3-*d*]피리미딘-2,4(1H,3H)-디온(4.7 g, 13.5 mmol) 및 DIPEA(3.5 mL, 20.2 mmol)의 용액에 옥시염화인(1.63 mL, 17.5 mmol)을 시린지를 통해 적가하였다. 생성된 혼합물을 80℃에서 1시간 동안 가열한 후, 실온까지 냉각시키고, 농축하여 4,7-디클로로-6-플루오로-1-(2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)피리도[2,3-*d*]피리미딘-2(1H)-온을 제공하였다. 이 물질을 추가 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. *m/z* (ESI, +ve 이온): 367.1 (M+H)⁺.

[0391]

단계 5: (S)-tert-부틸 4-(7-클로로-6-플루오로-1-(2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)-2-옥소-1,2-디하이드로피리도[2,3-*d*]피리미딘-4-일)-3-메틸피페라진-1-카복실레이트. 아세트니트릴(20 mL) 중 4,7-디클로로-6-플루오로-1-(2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)피리도[2,3-*d*]피리미딘-2(1H)-온(13.5 mmol)의 빙냉 용액에 DIPEA(7.1 mL, 40.3 mmol)를 첨가한 후, (S)-4-N-Boc-2-메틸 피페라진(3.23 g, 16.1 mmol, Combi-Blocks, Inc., San Diego, CA, USA)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온까지 가온하고 1시간 동안 교반한 후, 차가운 포화 수성 중탄산나트륨 용액(200 mL) 및 EtOAc(300 mL)로 희석하였다. 혼합물을 추가 5분 동안 교반하고, 층들을 분리하고, 수층을 추가의 EtOAc(1x)로 추출하였다. 합한 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고 농축하였다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피(용리액: 0~50% EtOAc/헵탄)로 정제하여 (S)-tert-부틸 4-(7-클로로-6-플루오로-1-(2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)-2-옥소-1,2-디하이드로피리도[2,3-*d*]피리미딘-4-일)-3-메틸피페라진-1-카복실레이트를 제공하였다. *m/z* (ESI, +ve 이온): 531.2 (M+H)⁺.

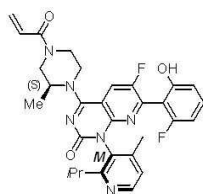
[0392]

단계 6: (3S)-tert-부틸 4-(6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-1-(2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)-2-옥소-1,2-디하이드로피리도[2,3-*d*]피리미딘-4-일)-3-메틸피페라진-1-카복실레이트. 1,4-디옥산(80 mL) 중 (S)-tert-부틸 4-(7-클로로-6-플루오로-1-(2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)-2-옥소-1,2-디하이드로피리도[2,3-*d*]피리미딘-4-일)-3-메틸피페라진-1-카복실레이트(4.3 g, 8.1 mmol), 칼륨 트리플루오로(2-플루오로-6-하이드록

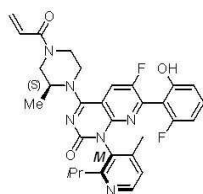
시페닐)보레이트(중간체 Q, 2.9 g, 10.5 mmol), 아세트산칼륨(3.2 g, 32.4 mmol), 및 디클로로메탄(661 mg, 0.81 mmol)과의 복합체, [1,1'-비스(디페닐포스포노)페로센]디클로로팔라듐(II)의 혼합물을 질소로 1분 동안 탈기시켰다. 탈산소화 물(14 mL)을 첨가하고, 생성된 혼합물을 90℃에서 1시간 동안 가열하였다. 반응물을 실온까지 냉각시키고, 반포화 수성 중탄산나트륨으로 켄칭하고, EtOAc(2x) 및 DCM(1x)으로 추출하였다. 합한 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고 농축하였다. 잔류물을 실리카겔 크로마토그래피(용리액: 0~60% 3:1 EtOAc-EtOH/헵탄)로 정제하여 (3S)-tert-부틸 4-(6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-1-(2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)-2-옥소-1,2-디하이드로피리도[2,3-d]피리미딘-4-일)-3-메틸피페라진-1-카복실레이트를 제공하였다. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 10.19 (br s, 1 H), 8.38 (d, J = 5.0 Hz, 1 H), 8.26 (dd, J = 12.5, 9.2 Hz, 1 H), 7.23-7.28 (m, 1 H), 7.18 (d, J = 5.0 Hz, 1 H), 6.72 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 6.68 (t, J = 8.9 Hz, 1 H), 4.77-4.98 (m, 1 H), 4.24 (br t, J = 14.2 Hz, 1 H), 3.93-4.08 (m, 1 H), 3.84 (br d, J=12.9 Hz, 1 H), 3.52-3.75 (m, 1 H), 3.07-3.28 (m, 1 H), 2.62-2.74 (m, 1 H), 1.86-1.93 (m, 3 H), 1.43-1.48 (m, 9 H), 1.35 (dd, J = 10.8, 6.8 Hz, 3 H), 1.26-1.32 (m, 1 H), 1.07 (dd, J = 6.6, 1.7 Hz, 3 H), 0.93 (dd, J = 6.6, 2.1 Hz, 3 H). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) δ: -115.65 (s, 1 F), -128.62 (s, 1 F). m/z (ESI, +ve 이온): 607.3 (M+H)⁺.

[0393]

단계 7: 6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-1-(4-메틸-2-(2-프로파닐)-3-피리디닐)-4-((2S)-2-메틸-4-(2-프로페노일)-1-피페라지닐)피리도[2,3-d]피리미딘-2(1H)-온. 트리플루오로아세트산(25 mL, 324 mmol)을 DCM(30 mL) 중 (3S)-tert-부틸 4-(6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-1-(2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)-2-옥소-1,2-디하이드로피리도[2,3-d]피리미딘-4-일)-3-메틸피페라진-1-카복실레이트(6.3 g, 10.4 mmol)의 용액에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반한 후, 농축하였다. 잔류물을 DCM(30 mL)에 용해시키고, 0℃까지 냉각시키고, DIPEA(7.3 mL, 41.7 mmol) 및 DCM(3 mL; 시린지를 통하여 적가) 중 염화아크릴로일(0.849 mL, 10.4 mmol)의 용액으로 순차 처리하였다. 반응물을 0℃에서 10분 동안 교반한 후, 반포화 수성 중탄산나트륨으로 켄칭하고 DCM(2x)으로 추출하였다. 합한 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고 농축하였다. 잔류물을 크로마토그래피(실리카겔; 용리액: 0~100% EtOAc-EtOH(3:1)/헵탄)로 정제한 후, 초임계 유체 크로마토그래피(키랄팩 IC, 30 × 250 mm, 5 μm, 55% MeOH/CO₂, 120 mL/분, 102 bar; 첫 번째 용리 피크 수집)를 사용하여 키랄 분해하여 AMG 510(2.25 g, 43% 수율)을 제공하였다. 6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-1-(4-메틸-2-(2-프로파닐)-3-피리디닐)-4-((2S)-2-메틸-4-(2-프로페노일)-1-피페라지닐)피리도[2,3-d]피리미딘-2(1H)-온. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 10.20 (s, 1 H), 8.39 (d, J = 4.8 Hz, 1 H), 8.24-8.34 (m, 1 H), 7.23-7.32 (m, 1 H), 7.19 (d, J = 5.0 Hz, 1 H), 6.87 (td, J = 16.3, 11.0 Hz, 1 H), 6.74 (d, J = 8.6 Hz, 1 H), 6.69 (t, J = 8.6 Hz, 1 H), 6.21 (br d, J = 16.2 Hz, 1 H), 5.74-5.80 (m, 1 H), 4.91 (br s, 1 H), 4.23-4.45 (m, 2 H), 3.97-4.21 (m, 1 H), 3.44-3.79 (m, 2 H), 3.11-3.31 (m, 1 H), 2.67-2.77 (m, 1 H), 1.91 (s, 3 H), 1.35 (d, J = 6.8 Hz, 3 H), 1.08 (d, J = 6.6 Hz, 3 H), 0.94 (d, J = 6.8 Hz, 3 H). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) δ ppm -115.64 (s, 1 F), -128.63 (s, 1 F). m/z (ESI, +ve 이온): 561.2 (M+H)⁺.

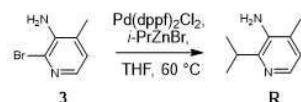


[0394]

본원에서 언급되는 AMG 510은 의 화학식을 갖는 6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-1-(4-메틸-2-(2-프로파닐)-3-피리디닐)-4-((2S)-2-메틸-4-(2-프로페노일)-1-피페라지닐)피리도[2,3-d]피리미딘-2(1H)-온 또는 이의 제약상 허용되는 염의 M 회전장애 이성체이다.

[0395]

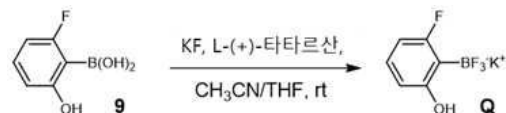
중간체의 합성



[0396]

[0397]

2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-아민(R): 디클로로메탄과의 복합체 [1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센]디클로로팔라듐(II)(79 mg, 0.10 mmol)을 THF(4 mL) 중 3-아미노-2-브로모-4-피콜린(**3**; 360 mg, 1.9 mmol, Combi-Blocks, San Diego, CA)의 슬러리에 첨가하고, 생성된 혼합물에 아르곤을 2분 동안 분사하였다. 2-프로필아렌 브로마이드(THF 중의 0.5 M 용액, 5.40 mL, 2.7 mmol)를 첨가하고, 생성된 용액을 60℃에서 17시간 동안 가열한 후, 실온까지 냉각시켰다. 물(10 mL) 및 1 N의 수성 NaOH(20 mL)를 첨가하고, 생성된 혼합물을 EtOAc(2x)로 추출하였다. 합한 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고 진공에서 농축하였다. 잔류물을 크로마토그래피(실리카겔, 용리액: 0~15% MeOH/DCM)로 정제하여 **R**(284 mg, 98% 수율)을 제공하였다. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.66 p.p.m. (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 6.78 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.72 (br s, 2H), 3.14-3.25 (m, 1H), 2.08 (s, 3H), 1.14 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H); *m/z* (ESI, +ve 이온): 151.1 (M+H)⁺.



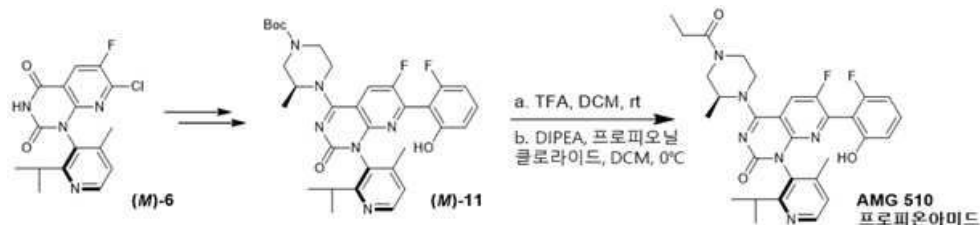
[0398]

[0399]

(2-플루오로-6-하이드록시페닐)칼륨 트리플루오로보레이트(Q): 물(75 mL) 중 불화칼륨(44.7 g, 770 mmol)의 용액을 아세토니트릴(750 mL) 중 (2-플루오로-6-하이드록시페닐)보론산(**9**; 30 g, 192 mmol, Combi-Blocks, San Diego, CA)의 현탁액에 첨가하였다. 2분간 교반한 후, THF(375 mL) 중 L-(+)-타타르산(72.2 g, 481 mmol)의 용액을 10분에 걸쳐 첨가하였다. 생성된 혼합물을 1시간 동안 기계적으로 교반하였다. 부유 고형물을 여과로 제거하고 소량의 THF로 세척하였다. 이어서, 합한 여과액을 고형물이 침전되기 시작할 때까지 진공에서 부분적으로 농축하였다. 여과액을 -20℃까지 냉각시키고 16시간 동안 교반한 후, 상온까지 서서히 가온하였다. 2-프로판올(20 mL)을 첨가하고, 침전된 고형물을 여과로 수집하고 2-프로판올로 세척하여 27.5 g의 고형물을 제공하였다. (침전물이 관찰될 때까지) 여과액을 다시 부분적으로 농축하고, -20℃까지 냉각시키고 20분 동안 교반하였다. 추가의 2-프로판올을 첨가하고, 침전된 고형물을 여과로 수집하고 2-프로판올로 세척하였다. 두 배치의 고형물을 합하여 **Q**(34.6 g, 82% 수율)를 제공하였다. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8.07 p.p.m. (q, *J* = 14.7 Hz, 1H), 6.93 (q, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.30-6.38 (m, 2H).

[0400]

AMG 510 프로피온아미드의 합성



[0401]

[0402]

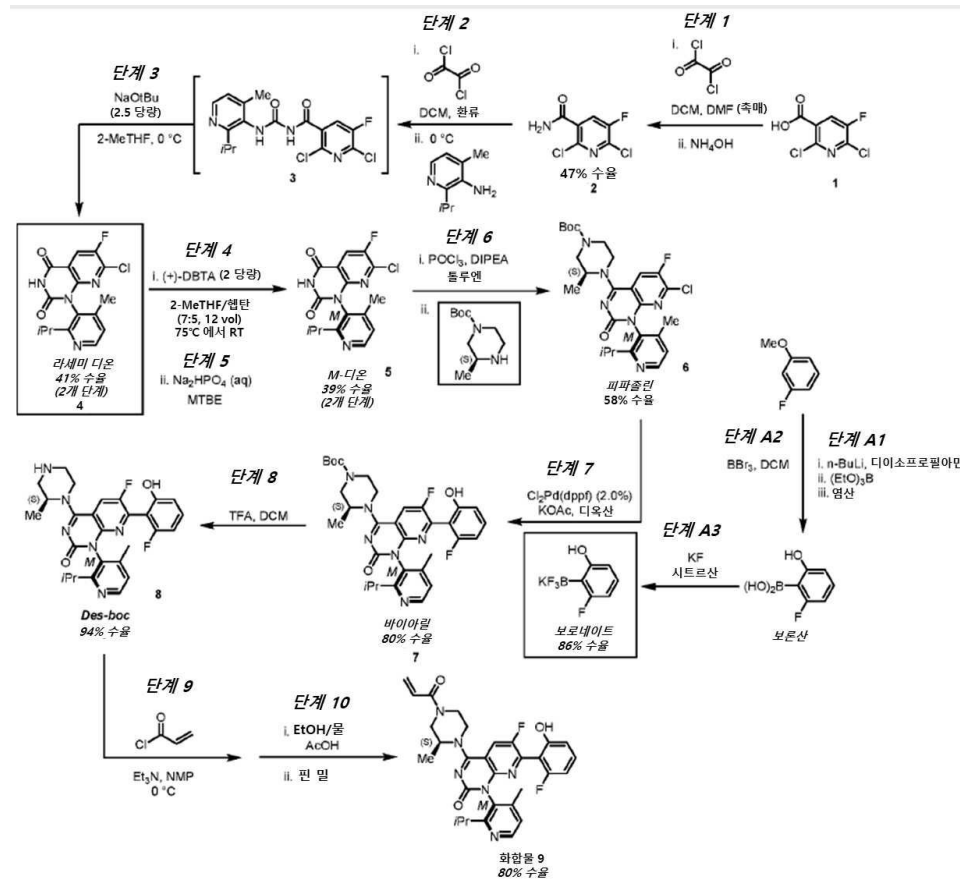
(M)-6 & (M)-11: 라세미체 **6**을 초임계 유체 크로마토그래피(키랄팩 AD, 21 × 250 mm, 5 μm, 40% MeOH/CO₂, 80 mL/분, 110 bar; 두 번째 용리 피크를 수집)로 분해하여 **(M)-6**을 제공하고, 이를 라세미 기질에 대해 보고된 절차를 사용하여 **(M)-11**로 변환하였다.

[0403]

(M)-6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-1-(4-메틸-2-(2-프로파닐)-3-피리디닐)-4-((2S)-2-메틸-4-프로파노일-1-피페라지닐)피리도[2,3-*d*]피리미딘-2(1H)-온(AMG 510 프로피온아미드): 트리플루오로아세트산(4.0 mL, 51.9 mmol)을 DCM(5 mL) 중 **(M)-11**(0.196 g, 0.323 mmol)의 용액에 첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 20분 동안 교반하였다. 이어서, 혼합물을 진공에서 농축하고, 잔류물을 DCM(10 mL)에 용해시키고, 0℃까지 냉각시키고, DIPEA(0.169 mL, 0.969 mmol) 및 프로피오닐 클로라이드(0.016 mL, 0.194 mmol)로 순차 처리하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 10분 동안 교반한 후, 포화 수성 중탄산나트륨으로 희석하고 DCM(2x)으로 추출하였다. 합한 추출물을 무수 황산나트륨으로 건조시키고 진공에서 농축하였다. 잔류물을 크로마토그래피(실리카겔; 용리액: 0~70% EtOAc-EtOH(3:1)/헵탄)로 정제하여 AMG 510 프로피온아미드(0.180 g, 99% 수율)를 제공하였다. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 10.20 p.p.m. (s, 1H), 8.40 (d, *J*=5.0 Hz, 1H), 8.27 (br dd, *J*=15.1, 9.3 Hz, 1H), 7.27 (m, 1H), 7.21 (br d, *J*=4.8 Hz, 1H), 6.73 (d, *J*=8.3 Hz, 1H), 6.69 (t, *J*=8.9 Hz, 1H), 4.87 (br s, 1H), 4.31 (m, 1.5H), 4.21 (br d, *J*=13.5 Hz, 0.5H), 3.94 (br d, *J*=12.2 Hz, 0.5H), 3.82 (br d, *J*=13.3

Hz, 0.5H), 3.62-3.76 (m, 1H), 3.52-3.62 (m, 0.5H), 3.43-3.51 (m, 0.5H), 3.18 (br dd, J=13.3, 3.3 Hz, 0.5H), 3.06 (br t, J=10.7 Hz, 0.5H), 2.73 (br dd, J=10.5, 6.1 Hz, 1H), 2.33-2.48 (m, 2H), 1.91 (s, 3H), 1.29-1.42 (m, 3H), 0.98-1.12 (m, 6H), 0.94 (d, J=6.6 Hz, 3H); m/z (ESI, +ve 이온): 563.2 (M+H)⁺.

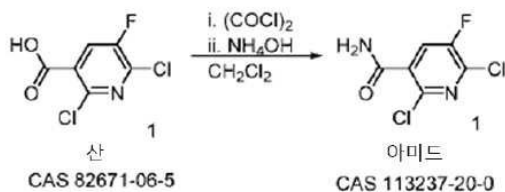
[0404] 대안적 공정에서, AMG 510을 합성하였고, 관련 중간체는 2018년 11월 16일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/768,802에 설명되었다. 대안적 공정은 단계 4 및 5에서 라세미 디온의 분해가 회전장애 이성체의 성공적 분리를 촉진하는 하기 단계들을 포함한다:



[0405]

[0406] 공정 설명

[0407] 단계 1



[0408]

물질	CAS #	MW (g/mol)	당량/부피	물	이론치
2,6-디클로로-5-플루오로-3-피리딘카복실산	82671-06-5	209.99	1.0 당량	119.1	25 kg
DCM	74-09-2	84.93	16.51 당량	2354.9	200 kg
DMF	68-12-2	73.09	0.068 당량	8.1	592 g (627 mL)
염화옥살릴	79-37-8	126.93	1.25 당량	148.9	18.9 kg
수산화암모늄	1336-21-6	35.05	5 당량	595.5	40.2 L
물	7732-18-5	18.02	N/A	N/A	261 L

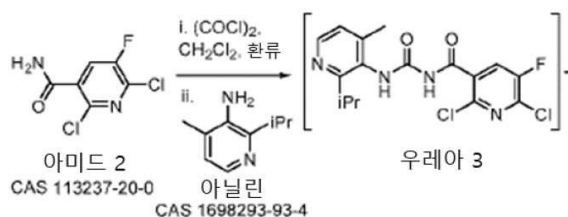
[0409]

[0410]

내부 온도를 15~20℃로 유지하면서 디클로로메탄(167 kg) 및 DMF(592 g) 중 2,6-디클로로-5-플루오로-3-피리딘 카복실산(화합물 1)(25 kg; 119.1 mol)의 용액에 염화옥살릴(18.9 kg; 148.9 mol)을 첨가하였다. 추가 디클로로메탄(33 kg)을 린스로서 첨가하고 반응 혼합물을 2시간 동안 교반하였다. 내부 온도를 $0 \pm 10^\circ\text{C}$ 로 유지하면서 반응 혼합물을 냉각시킨 후, 수산화암모늄(40.2 L; 595.5 mol)으로 켄칭하였다. 생성된 슬러리를 90분 동안 교반한 후, 생성물을 여과에 의해 수집하였다. 여과된 고형물을 탈이온수(3X 87 L)로 세척하고, 건조시켜 2,6-디클로로-5-플루오로니코틴아미드(화합물 2)를 제공하였다.

[0411]

단계 2



[0412]

물질	CAS #	MW (g/mol)	당량/부피	물	이론치
아미드 (2,6-디클로로-5-플루오로니코틴아미드)	113237-20-0	209.99	1.0 당량	77.8	16.27 kg
염화옥살릴	79-37-8	126.93	1.2 당량	93.8	11.9 kg (7.9 L)
디클로로메탄	75-09-2	84.93	N/A	N/A	730.7 kg (551.5 L)
아닐린 DCM 용액 2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-아민	1698293-93-4	150.22	1.1 당량	85.9	12.9 kg (아닐린 함유 중량)

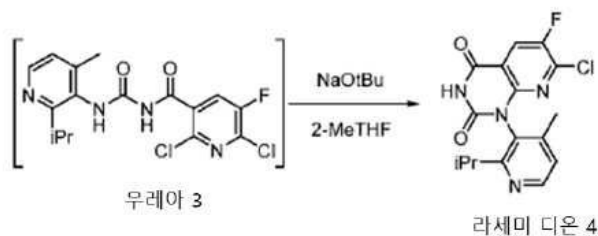
[0413]

[0414]

반응기 A에서, 75분 동안 25℃ 이하의 온도를 유지하면서 디클로로메탄(359.5 kg) 중 2,6-디클로로-5-플루오로니코틴아미드(화합물 2)(16.27 kg; 77.8 mol)의 용액에 염화옥살릴(11.9 kg; 93.8 mol)을 첨가하였다. 이어서, 생성된 용액을 40℃ $\pm$ 3℃까지 가열하고 3시간 동안 에이징하였다. 진공을 이용해, 용액을 증류하여 용액이 교반기 아래에 있을 때까지 디클로로메탄을 제거하였다. 이어서, 디클로로메탄(300 kg)을 첨가하고, 혼합물을 $0 \pm 5^\circ\text{C}$ 까지 냉각시켰다. 깨끗하고 건조된 반응기(반응기 B)에 2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-아민(ANILINE)(12.9 kg; 85.9 mol)을 첨가한 후, 디클로로메탄(102.6 kg)을 첨가하였다. 내부 온도를 20~25℃로 유지하면서 ANILINE 용액을 진공 증류를 통해 공비 건조시켜, KF 분석에 의해 용액이 건조될 때까지 추가 디클로로메탄으로

대체시켰다(한계 $\leq 0.05\%$). 디클로로메탄을 사용하여 용액 부피를 약 23 L 부피로 조정하였다. 이어서, 첨가하는 동안 내부 온도를 $0 \pm 5^\circ\text{C}$ 로 유지하면서, 건조된 ANILINE 용액을 반응기 A에 첨가하였다. 이어서, 혼합물을 23°C 까지 가열하고 1시간 동안 에이징하였다. 용액을 깨끗한 반응기에 연마 여과하여 2,6-디클로로-5-플루오로-N-((2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)카바모일)니코틴아미드(화합물 3)를 DCM 중의 용액으로서 제공하고, 다음 단계에서 직접 사용하였다.

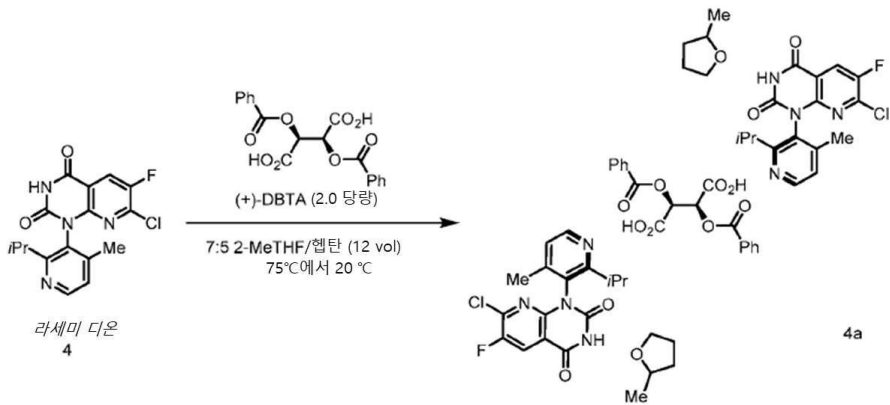
단계 3



물질	CAS #	MW (g/mol)	당량/부피	물	이론치
우레아, DCM 중의 용액 2,6-디클로로-5-플루오로-N-([4-메틸-2-(프로판-2-일)피리딘-3-일]카바모일)피리딘-3-카복사미드	N/A	385.22	1.0 당량	38.9	208.3 kg (15 kg 함유 중량)
2-메틸테트라하이드로퓨란	96-47-9	86.13	N/A	N/A	308 kg (358 L)
나트륨 tert-부톡사이드	865-48-5	96.11	2.0 당량	97.8	9.4 kg
염화암모늄	12125-02-9	53.49	N/A	430	23.0 kg
염산	7467-01-0	36.46	N/A	41	1.6 kg
황산마그네슘	7487-88-9	120.37	N/A	195	23.5 kg
염화나트륨	7647-14-5	58.44	N/A	282	16.5 kg
헵탄	142-82-5	100.21	N/A	N/A	94 L
10% 시트르산					75 kg

내부 온도를 $20\sim 25^\circ\text{C}$ 로 유지하면서 진공 증류를 이용해 2,6-디클로로-5-플루오로-N-([4-메틸-2-(프로판-2-일)피리딘-3-일]카바모일)피리딘-3-카복사미드(우레아(화합물 3))(15 kg 함유; 38.9 mol)의 디클로로메탄 용액을 2-MeTHF로 용매 교환하였다. 반응기 부피를 40 L로 조정한 후, 추가 2-MeTHF를 첨가하였다(105.4 kg). $5\sim 10^\circ\text{C}$ 를 유지하면서 나트륨 t-부톡사이드를 첨가하였다(9.4 kg; 97.8 mol). 내용물을 23°C 까지 가온하고 3시간 동안 교반하였다. 이어서, 내용물을 $0\sim 5^\circ\text{C}$ 까지 냉각시키고, 염화암모늄을 탈이온수 60 L 중의 용액으로서 첨가하였다(23.0 kg; 430 mol). 혼합물을 20°C 까지 가온하고, 탈이온수(15 L)를 첨가하고, 30분 동안 추가로 에이징하였다. 교반을 중단하고 층들을 분리하였다. 수층을 제거하고, 유기층에 탈이온수(81.7 L)를 첨가하였다. 진한 HCl(1.5 kg)과 물(9 L)의 혼합물을 제조한 후, pH가 4-5로 측정될 때까지 반응기에 서서히 첨가하였다. 층들을 분리하고, 2-MeTHF(42.2 kg)를 사용하여 수층을 다시 추출하였다. 두 유기층을 합하고, 10% 시트르산 용액(75 kg)으로 세척한 후, 물(81.7 L)과 포화 NaCl(19.8 kg)의 혼합물로 세척하였다. 이어서, 유기층을 포화 중탄산나트륨(75 kg)으로 세척하고, 수층에서 7.0 이상의 목표 pH를 달성하기 위해 필요한 경우 반복하였다. 유기층을 염수(54.7 kg)로 다시 세척한 후, 황산마그네슘(5 kg)으로 건조시켰다. 2-MeTHF(49.2 kg)로 여과층을 행구면서 혼합물을 여과하여 황산마그네슘을 제거하였다. 합한 여과액 및 세척액을 진공을 이용해 40 L 부피까지 증류하였다. 농축된 용액을 55°C 까지 가열하고, 혼탁점까지 헵탄(10-12 kg)을 서서히 첨가하였다. 용액을 2시간에 걸쳐 23°C 까지 냉각시킨 후, 2시간에 걸쳐 헵탄(27.3 kg)을 첨가하였다. 생성물 슬러리를 $20\sim 25^\circ\text{C}$ 에서 3시간 동안 에이징한 후, 여과하고 2-MeTHF(2.8 kg)와 헵탄(9 kg)의 혼합물로 세척하였다. 질소 및 진공을 이용해 생성물을 건조시켜 고형물 7-클로로-6-플루오로-1-(2-이소프로필-4-메틸피리딘-3-일)피리딘[2,3-d]피리미딘-2,4(1H,3H)-디온(라세미 디온(화합물 4))을 수득하였다.

[0419] 단계 4



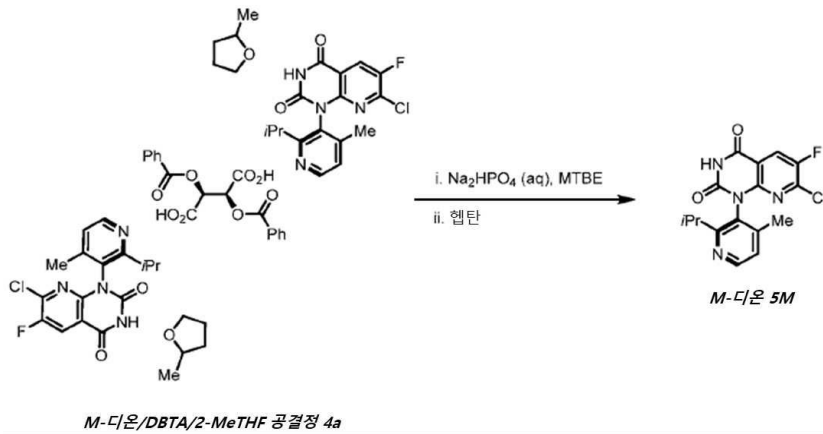
[0420] M-디온 DBTA 공결정

물질	CAS #	MW (g/mol)	당량/부피	몰	이론치
라세미 디온	N/A	348.76	1.0	—	—
(+)-2,3-디벤조일-D-타타르산	17026-42-5	358.30	2.0	—	—
2-메틸테트라하이드로퓨란	96-47-9	86.13	7.0	—	—
헵탄	142-82-5	100.21	2.0	—	—
헵탄	142-82-5	100.21	3.0	—	—
2-메틸테트라하이드로퓨란	96-47-9	86.13	4.0	—	—
헵탄	142-82-5	100.21	2.0	—	—

[0421]

[0422] 2-메틸테트라하이드로퓨란(7.0 L/kg) 중 화합물 4의 교반 현탁액(1.0 당량)이 있는 용기에 (+)-2,3-디벤조일-D-타타르산(2.0 당량)을 질소 분위기하에 첨가하였다. 2-MeTHF은 키랄이지만, 라세미 혼합물로서 사용된다. 2-MeTHF의 상이한 거울상이성체는 공결정에 무작위로 혼입된다. 생성된 현탁액을 75℃까지 가온하고, 완전한 용해가 관찰될 때까지(30분 이내) 75℃에서 에이징하였다. 생성된 용액을 75℃에서 2차 용기에 연마 여과하였다. 연마 여과된 용액에, 내부 온도를 65℃보다 높게 유지하는 속도로 n-헵탄(2.0 L/kg)을 첨가하였다. 이어서, 용액을 60℃까지 냉각시키고, 결정(0.01 kg/kg)으로 시딩하고, 30분 동안 에이징시켰다. 생성된 현탁액을 4시간에 걸쳐 20℃까지 냉각시킨 후, HPLC에 의한 키랄 순도 분석을 위한 샘플을 채취하였다. 현탁액에 n-헵탄(3.0 L/kg)을 첨가한 후, 질소 분위기하에 20℃에서 4시간 동안 에이징하였다. 현탁액을 여과하고, 단리된 고형물을 2:1의 n-헵탄:2-메틸테트라하이드로퓨란(3.0 L/kg)으로 2회 세척하였다. 이 물질을 질소 및 진공으로 건조시켜 M-디온:DBTA: Me-THF 복합체(화합물 4a)를 수득하였다.

[0423] 단계 5



[0424]

물질	CAS #	MW (g/mol)	당량/부피	물	이론치
M-디온/DBTA/Me-THF 공결정	N/A	1228.08	1.0	74.2	46.9 kg (M-디온에 대해 보정시 25.9 kg)
메틸 <i>tert</i> -부틸 에테르	1634-04-4	88.15	45.0	17593	2100 L
인산수소이나트륨	7558-79-4	141.96	2.0	148.4	21.1 kg
USP 정제수					필요에 따라
황산마그네슘	7487-88-9	120.37	N/A	N/A	25 kg
헵탄	142-82-5	100.20	60.0	19322	2835 L

[0425]

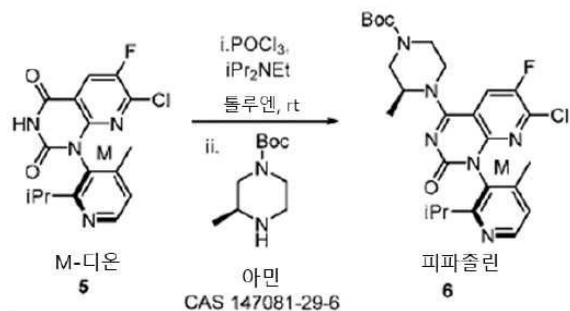
[0426]

용기 A에, 탈이온수(296.8 L, 6.3 L/kg) 중 인산수소이나트륨(21.1 kg, 2.0 당량)의 현탁액을 용해가 관찰될 때까지(30분 이상) 교반하였다. 용기 B에, 메틸 *tert*-부틸 에테르(517.8 L, 11.0 L/kg) 중 M-디온:DBTA: Me-THF 복합체(조성물 4a)[46.9 kg(M-디온에 대해 보정시 25.9 kg, 1.0 당량)]의 현탁액을 15 내지 30분 동안 교반하였다. 용기 A에서 생성된 용액을 용기 B에 첨가한 후, 혼합물을 3시간 넘게 교반하였다. 교반을 중단하고, 2상 혼합물을 30분 넘게 분리되도록 두었다. 하층의 수성상을 제거한 후, 메틸 *tert*-부틸 에테르(77.7 L, 1.7 L/kg)로 다시 추출하였다. 유기상들을 용기 B에서 합하고 황산마그네슘(24.8 kg, 0.529 kg/kg)으로 건조시켰다. 용기 B에서 생성된 현탁액을 3시간 넘게 교반한 후, 용기 C에 여과하였다. 용기 B에, 메틸 *tert*-부틸 에테르(46.9 L, 1.0 L/kg) 린스를 첨가한 후, 용기 C에 여과하였다. 용기 C의 내용물을 10℃까지 냉각시킨 후, 35℃까지 서서히 가온하면서 진공하에 증류하였다. 320~350 kg(6.8~7.5 kg/kg)의 메틸 *tert*-부틸 에테르가 수집될 때까지 증류를 계속하였다. 용기 C의 내용물을 20℃까지 냉각시킨 후, 1시간에 걸쳐 *n*-헵탄(278.7 L, 5.9 L/kg)을 첨가한 다음, 35℃까지 서서히 가온하면서 진공하에 증류하였다. 메틸 *tert*-부틸 에테르와 *n*-헵탄의 혼합물 190~200 kg(4.1~4.3 kg/kg)이 수집될 때까지 증류를 계속하였다. 용기 C의 내용물을 20℃까지 냉각시킨 후, 1시간에 걸쳐 2회째 *n*-헵탄(278.7 L, 5.9 L/kg)을 첨가한 다음, 35℃까지 서서히 가온하면서 진공하에 증류하였다. 메틸 *tert*-부틸 에테르와 *n*-헵탄의 혼합물 190~200 kg(4.1~4.3 kg/kg)이 수집될 때까지 증류를 계속하였다. 용기 C의 내용물을 20℃까지 냉각시킨 후, 1시간에 걸쳐 3회째 *n*-헵탄(195.9 L, 4.2 L/kg)을 첨가한 다음, GC에 의한 용매 조성 분석을 위한 샘플을 채취하였다. 용기 C의 현탁액을 1시간 넘게 계속 교반하였다. 용기 C로부터 현탁액을 여과한 후, *n*-헵탄(68.6 L, 1.5 L/kg) 린스로 세척하였다. 단리된 고형물을 50℃에서 건조시키고, 보관 적합성에 대한 샘플을 채취하였다. 7-클로로-6-플루오로-(1*M*)-1-[4-메틸-2-(프로판-2-일)피리딘-3-일]피리도[2,3-*d*]피리미딘-2,4(1*H*,3*H*)-디온(M-디온), 화합물 5M을 수득하였다.

[0427]

앞서 강조한 1세대 공정의 확장성은 200 kg 이상의 라세미 디온 출발 물질(화합물 5)에 대해 성공적이었다. 이 공정에서, 열역학적으로 안정한 라세미 디온 결정 형태(낮은 용해도를 나타냄)로 결정화를 시도하면 배치 실패(batch failure)가 발생할 것이다. 본 발명자들의 후속 연구에 따르면, DBTA 당량을 높이고 헵탄 첨가 스케줄을 조정하여 시드 온도를 낮추면 공정의 완전성(robustness)이 개선된다는 것이 확인되었다. 개선된 공정은 열역학적으로 안정한 라세미 디온 결정 형태의 존재에 크게 영향을 받지 않으며, 회전장에 이성체의 성공적인 분리를 촉진한다. 후속 배치에는 대규모 제조를 위한 개선된 공정이 통합될 것이다.

[0428] 단계 6



[0429]

물질	CAS #	MW (g/mol)	당량/부피	몰	이론치
M-디온	N/A	348.76	1 당량	9.8	3.7 kg
톨루엔	108-88-3	92.14	N/A	375	34.6 kg (40 L)
염화포스포릴	10025-87-3	153.33	1.2 당량	11.7	1.8 kg (1.1 L)
N,N-다이소프로필에틸아민	7087-68-5	129.24	3.0 당량	29.4	3.8 kg (5.1 L)
(s)-1-Boc-3-메틸피페라진	147081-29-6	200.28	1.1 당량	10.8	2.214 kg
중탄산나트륨	144-55-8	84.01	N/A	N/A	973 g
디클로로메탄	75-09-2	84.93	N/A	871	74 kg (55.6 L)
염화나트륨	7647-14-5	58.44	N/A	103	6.0 kg
에틸 아세테이트	141-78-6	88.11	N/A	288	25.4 kg (28.2 L)

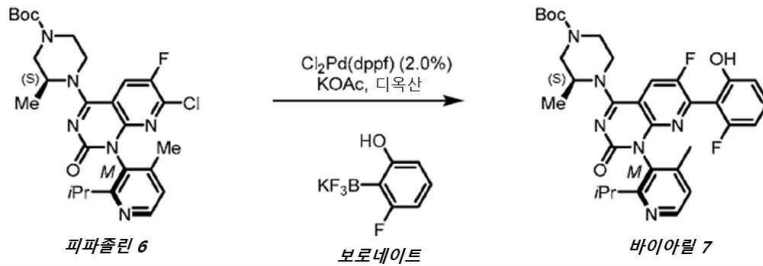
[0430]

[0431]

7-클로로-6-플루오로-(1*M*)-1-[4-메틸-2-(프로판-2-일)피리딘-3-일]피리도[2,3-*d*]피리미딘-2,4(1*H*,3*H*)-디온(M-디온)(3.7 kg; 9.8 mol)을 반응기(A)에서 10.5 kg의 톨루엔과 합하고, 45℃의 설정점을 유지하면서 오일로 증류하여 물을 제거하였다. 잔류물에 톨루엔(21 kg)을 첨가하고, 혼합물을 40~45℃에서 30분 동안 교반하였다. 내용물을 22℃까지 냉각시킨 후, 염화포스포릴(1.8 kg; 11.7 mol)을 첨가하였다. 혼합물을 0~5℃까지 냉각시킨 후, 온도를 5℃ 미만으로 유지하면서 N,N-다이소프로필에틸아민(2.5 kg; 19.34 mol)을 첨가하였다. 용액을 22℃에서 3시간 동안 에이징하였다. 별도의 반응기(B)에서, (s)-1-boc-3-메틸피페라진(2.21 kg; 10.8 mol) 및 N,N-다이소프로필에틸아민(1.26 kg; 9.75 mol)을 톨루엔(6 kg)에 합한 후, 25℃ 미만으로 유지하면서 반응기(A)에 첨가하였다. 반응 혼합물을 22℃에서 15분 동안 에이징한 후, 온도를 25℃ 미만으로 유지하면서 물(12.9 L) 중 중탄산나트륨(973 g)으로 켄칭하였다. 혼합물을 30분 동안 교반한 후, 1시간 동안 계속 교반하면서 DCM(36.8 kg)을 첨가하였다. 층들을 분리시키고, 하층의 유기층을 반응기(C)로 배출시켰다. DCM(18.4 kg)을 사용해 반응기(A) 내의 수층을 다시 추출하고, 합한 유기층을 염수 용액(6.0 kg NaCl; 16.5 kg 탈이온수)으로 세척하였다. 내부 온도를 45~55℃로 유지하면서 상압하에서 유기층을 증류하였다. 증류하는 동안 DCM을 대체하여 용액을 공비 건조시켰다. 증류 후, DCM을 사용하여 용액 부피를 19 L로 조정하였다. 용액을 30℃까지 냉각시키고 얼마 여과하였다. 여과액을 에틸 아세테이트(8.5 kg)와 합한 후, 11~13 kg이 용기에 수집될 때까지 상압에서 증류하였다. 용액을 30 g의 정식 제품으로 시딩하고 25~30℃에서 1시간 동안 에이징한 후, 8.2 kg의 증류액이 수집될 때까지 45~55℃의 내부 온도에서 상압하에 추가로 증류하였다. 슬러리를 22℃까지 냉각시키고 밤새 에이징한 후, 0~5℃까지 더 냉각시켰다. 생성물을 여과로 수집하고, 에틸 아세테이트를 사용하여 2회(각각 4.2 kg) 세척하였다. 케이크를 질소 및 진공으로 건조시켜 *tert*-부틸(3*S*)-4-{7-클로로-6-플루오로-(1*M*)-1-[4-메틸-2-(프로판-2-일)피리딘-3-일]-2-옥소-1,2-디하이드로피리도[2,3-*d*]피리미딘-4-일}-3-메틸피페라진-1-카복실레이트(화합물 6, 피파줄린)를 수득하였다.

[0432]

단계 7



[0433]

물질	CAS #	MW (g/mol)	당량/부피	물	이론치
[1,1'-비스(디페닐포스포노)페로센] 디클로로팔라듐(II)	72287-26-4	731.714	0.020	1.01	0.74 kg
디클로로메탄	75-09-2	84.93	-	N/A	400 kg
1,4-디옥산	123-91-1	88.1052	5.0	N/A	168 kg
에틸렌디아민테트라아세트산 이나트륨염 이수화물	6381-92-6	336.207	1.0	45.2	15.2 kg
헵탄	142-82-5	100.21	-	-	200 kg
질소	-	-	-	-	필요에 따라
피파졸린	N/A	531.0	1.0	45.2	24.0 kg
아세트산칼륨	127-08-2	98.1417	5.0	225.99	22.2 kg
칼륨 트리플루오로(2-플루오로-6-하이드록시페닐)보레이트	N/A	233.03	1.20	54.24	12.6 kg
2-프로판올	67-63-0	66.10	-	N/A	850 kg
Si-티올	N/A	N/A	-	N/A	13.2 kg
수산화나트륨	1310-73-2	40.00	-	-	6.5 kg
USP 정제수	-	-	-	-	필요에 따라

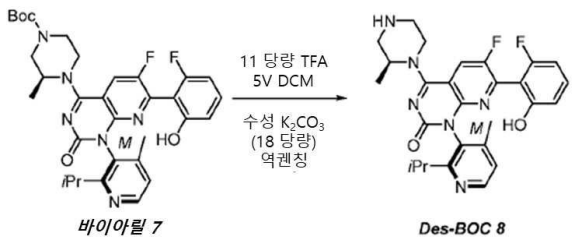
[0434]

[0435]

탈기된 디옥산(74.2 kg), *tert*-부틸(3S)-4-{7-클로로-6-플루오로-(1*M*)-1-[4-메틸-2-(프로판-2-일)피리딘-3-일]-2-옥소-1,2-디하이드로피리도[2,3-*d*]피리미딘-4-일}-3-메틸피페라진-1-카복실레이트(화합물 6, 피파졸린)(24.0 kg, 45.2 mol), 아세트산칼륨(22.2 kg, 45.2 mol), 및 (dppf)PdCl₂(0.74 kg, 1.01 mol)를 반응기에 첨가하였다. 반응기를 질소 가스로 불활성화시켰다. 산소 함량이 500 mg/L 미만이 될 때까지 용액에 질소 가스를 분사하였다. 반응물을 87.5℃까지 가열하였다. 내부 온도를 82.5℃ ± 7.5℃로 유지하면서, 산소 함량이 500 mg/L 미만인 탈기된 디옥산(49.4 kg)과 탈기된 물(14.4 kg) 중 칼륨 트리플루오로(2-플루오로-6-하이드록시페닐)보레이트(12.6 kg, 54.3 mol)의 용액을 반응물에 옮겼다. 반응물을 87.5℃ ± 1.5℃로 조정하고 75분 ± 15분 동안 교반하였다. 내부 온도를 85℃ ± 5℃로 유지하면서 1.0 M의 EDTA 용액(47.3 kg)에 이어 물(40.1 kg)을 반응기에 첨가하였다. 반응물을 2시간 넘게 20℃ ± 3℃까지 냉각시킨 후, 16시간 넘게 교반하였다. 반응물을 여과하고, 미정제 고형물을 물(3 x 120 kg)로 행구었다. 고형물을 헵탄(28.8 kg)과 2-프로판올(33.1 kg)의 혼합물로 행군 후, 50℃ 미만에서 10시간 넘게 건조시켰다. 깨끗한 반응기에 미정제 고형물과 디클로로메탄(240 kg)을 첨가하였다. 내용물을 20℃ ± 5℃에서 30분 넘게 교반하였다. 반응기에 Si-티올(144 kg) 및 디클로로메탄(14.9 kg)을 첨가하였다. 반응물을 20℃ ± 5℃에서 18시간 동안 교반하였다. 반응물을 여과하고 디클로로메탄(84 kg)으로 행구었다. 용액을 증류하고 용매를 2-프로판올로 교체하였다. 반응물을 60℃ ± 3℃까지 가열하고, 반응 온도를 60℃ ± 3℃로 유지하면서 헵탄(108 kg)을 첨가하였다. 반응물을 45분 동안 교반한 후, 냉각시켜 20℃ ± 5℃에서 2.5시간 동안 교반하였다. 반응물을 여과하고 50% v/v 헵탄/2-프로판올(61.9 kg)으로 행구었다. 단리된 고형물을 50℃ 미만에서 12시간 넘게 건조시켜 *tert*-부틸(3S)-4-{6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-(1*M*)-1-[4-메틸-2-(프로판-2-일)피리딘-3-일]-2-옥소-1,2-디하이드로피리도[2,3-*d*]피리미딘-4-일}-3-메틸피페라진-1-카복실레이트(화합물 7, 바이아릴)를

수득하였다.

단계 8

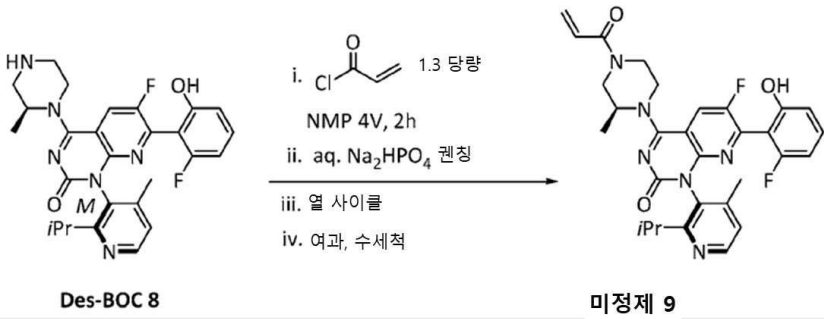


일반 사항: 모든 당량 및 부피는 바이아릴 7을 기준으로 표시

물질	CAS #	MW (g/mol)	당량/부피	물	이론치
바이아릴 7	NA	606.67	1.0 당량	5.27	2.75 kg
TFA	76-05-1	114.02	11 당량	49.7	5.67 kg
DCM	74-09-2	84.93	5 vol	NA	13.71 L
메탄올	67-56-1	32.04	5 vol	NA	13.71 L
물	7732-18-5	18.02	20 vol	NA	54.8 L
탄산칼륨	584-08-7	138.20	18 당량	94.91	11.24 kg
DCM	74-09-2	84.93	1 vol	NA	2.75 L
물	7732-18-5	18.02	10 vol	NA	27.5 L
물	7732-18-5	18.02	10 vol	NA	27.5 L

tert-부틸 (3*S*)-4-{6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-(1*M*)-1-[4-메틸-2-(프로판-2-일)피리딘-3-일]-2-옥소-1,2-디하이드로피리도[2,3-*d*]피리미딘-4-일}-3-메틸피페라진-1-카복실레이트 (화합물 7, 바이아릴) (2.75 kg, 5.27 mol), DCM (13.7 L), 및 TFA (5.67 kg, 49.7 mol)를 반응기에 첨가하였다. 반응물을 20 ± 5℃에서 8-16시간 동안 교반하였다. 제2 반응기에 탄산칼륨 (11.24 kg), 물 (54.8 L), 및 메탄올 (13.7 L)을 첨가하여 균질한 용액을 형성하였다. 반응 혼합물을 2시간 걸쳐 탄산칼륨 용액에 첨가하였다. 혼합물을 20 ± 5℃에서 추가 12시간 동안 교반하였다. 생성된 슬러리를 여과하고 물 (2 x 27.5 L)로 행구었다. 습윤 케이크를 24시간 동안 건조시켜 6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-4-[(2*S*)-2-메틸피페라진-1-일]-(1*M*)-1-[4-메틸-2-(프로판-2-일)피리딘-3-일]피리도[2,3-*d*]피리미딘-2(1*H*)-온 (화합물 8, DESBOC)을 수득하였다.

단계 9



[0443] 일반 사항: 모든 당량 및 부피는 Des-BOC를 기준으로 표시

물 질	CAS #	MW (g/mol)	당량/부피	mmol	질량	부피
Des-BOS	NA	506.56	1.0 당량	308.4	156.25 g	-
아크릴로일 클로라이드 ¹	814-68-6	90.51	1.3 당량	401.0	36.29 g	-
NMP N-메틸 피롤리디논 ²	872-50-4	99.13	4 vol	NA	-	625 mL
물	7732-18-5	18.02	20 vol	NA	3125 g	3125 mL
Na ₂ HPO ₄ ³	7558-79-4	141.96	4 당량	1233.6	175.12 g	-
물	7732-18-5	18.02	20 vol	NA	3125 g	3,125 mL

¹ 아크릴로일 클로라이드는 이 규모에서 7 분에 걸쳐 첨가되었다. 과냉각 반응을 피할 것. 반응 온도가 낮아지면 반응 시간이 길어져 출발 물질이 생성물과 반응함에 따라 m/z 1066 불순물 수준이 높아졌다. 이상적인 온도 범위는 22~25°C이다.

² 건조 케이크의 NMP 함량은 일반적으로 1~2 wt%.

³ 표의 인산이나트륨은 무수물 기준이다. 수화물이 사용될 수 있으며, 이에 따라 필요한 mmol 을 얻기 위해 질량을 조정한다.

[0444]

[0445]

6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-4-[(2S)-2-메틸피페라진-1-일]-(1M)-1-[4-메틸-2-(프로판-2-yl)피리딘-3-일]피리도[2,3-d]피리미딘-2(1H)-온(화합물 8, DESBOC)(156.25 g)을 N-메틸 피롤리디논(625 mL)과 합하고 상온에서 교반하였다. 내부 온도를 30°C 미만으로 유지하면서, 생성된 용액에 아크릴로일 클로라이드(36.29 g; 401.0 mmol)를 첨가하였다. 내용물을 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. 별도의 반응기에서, 탈이온수(3.1 L) 중 인산이나트륨(175.1 g; 1234 mmol)의 용액을 제조하였다. 이어서, 25°C에서 2시간 넘게 미정제 생성물 용액을 인산이나트륨 용액이 들어있는 반응기로 옮겼다. 첨가 도중에 슬러리를 45°C까지 가열하고, 첨가 완료 후, 같은 온도에서 2시간 동안 에이징하였다. 혼합물을 25°C까지 냉각시키고 4시간 동안 에이징한 후, 진공 여과로 고형물을 수집하였다. 고형물을 물로 2회(각각 1.5 L) 세척하고, 생성물을 질소 및 진공하에 건조시켜 생성물, 6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-(1M)-1-[4-메틸-2-(프로판-2-일)피리딘-3-일]-4-[(2S)-2-메틸-4-(프로판-2-엔오일)피페라진-1-일]피리도[2,3-d]피리미딘-2(1H)-온(미정제 화합물 9)을 수득하였다.⁴

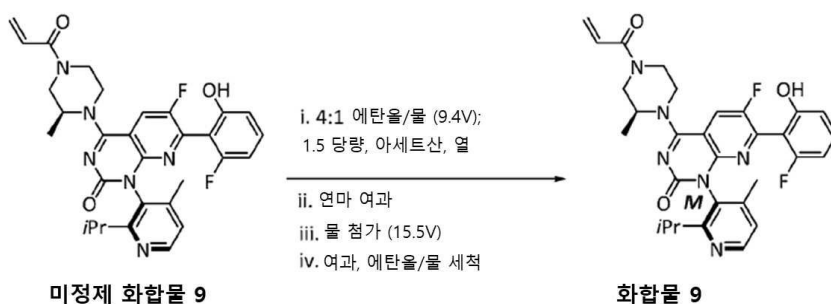
[0446]

[0447]

⁴ 이 리드 로트에 대한 결과: 154.06 g의 단리된 질량, 93 wt%, 82.9%의 보정된 수율, 18,000 ppm의 NMP

[0448]

단계 10



[0449]

[0450] 일반 사항: 모든 당량 및 부피는 미정제 약물 물질을 기준으로 표시

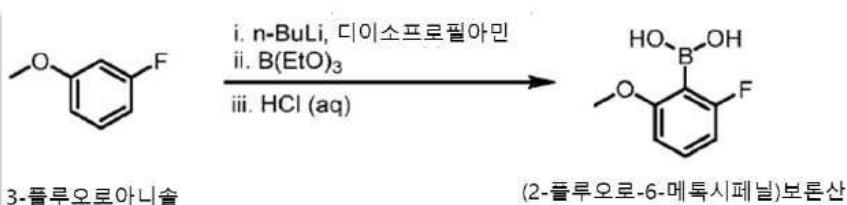
물질	CAS #	MW (g/mol)	당량/부피	mmol	질량	부피
미정제 화합물 9	NA	560.60	1.0 당량	253.9	142.33 g	-
에탄올 (200 프루프)	64-17-5	-	7.5 V	-	-	1067 mL
USP 정제수	-	18.02	1.9 V	-	-	270 mL
아세트산	64-19-7	60.05	1.5 당량	380.8	22.87 g	21.82 mL
WFI 정제수	-	18.02	15.5 vol	-	-	2200 mL
에탄올 (세척용)	64-17-5	-	2.5 V	-	-	356 mL
WFI 정제수 (세척용)	-	-	5.0 V	-	-	712 mL
화합물 9 시드 ⁶	-	560.60	0	-	0.3-0.7 g	-

⁶ 시드는 밀링을 통해, 또는 밀링할 수 없는 경우에는 다른 유형의 기계적 분쇄(유발/막자)로 입자 크기를 줄였을 때 최적이다. 실제 사용되는 시드는 시드 가용성을 기반으로 한다. 0.25% 내지 0.5%의 시드가 목표량이다.

[0451]

[0452] 6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-(1*M*)-1-[4-메틸-2-(프로판-2-일)피리딘-3-일]-4-[(2*S*)-2-메틸-4-(프로프-2-엔오일)피페라진-1-일]피리도[2,3-*d*]피리미딘-2(1*H*)-온(미정제 화합물 9)(142.33 g; 253.9 mmol)을 에탄올(996mL) 및 물(270mL)과 합하였다. 아세트산(21.8 mL; 380.8 mmol)을 첨가하고, 혼합물을 75℃까지 가열하여 용액을 형성하고 이를 깨끗한 반응기에 연마 여과하였다. 용액을 45℃까지 냉각시킨 후, 내부 온도를 40℃보다 높게 유지하면서 물(1067 mL)을 첨가하였다. 용액을 정식 화합물 9로 시딩하고 생성된 혼합물을 30분 동안 에이징하였다. 이어서, 2시간에 걸쳐 물(1138 mL)을 첨가하였다. 혼합물을 25℃까지 냉각시키고 8시간 동안 에이징한 후, 고형물을 진공 여과에 의해 수집하고, 에탄올(355.8 mL)과 물(711.6 mL)의 혼합물을 사용하여 세척하였다. 고형물을 진공 및 질소를 이용해 건조시켜 6-플루오로-7-(2-플루오로-6-하이드록시페닐)-(1*M*)-1-[4-메틸-2-(프로판-2-일)피리딘-3-일]-4-[(2*S*)-2-메틸-4-(프로프-2-엔오일)피페라진-1-일]피리도[2,3-*d*]피리미딘-2(1*H*)-온(화합물 9)을 수득하였다.

[0453] 단계 A1 반응식 및 첨가량 표



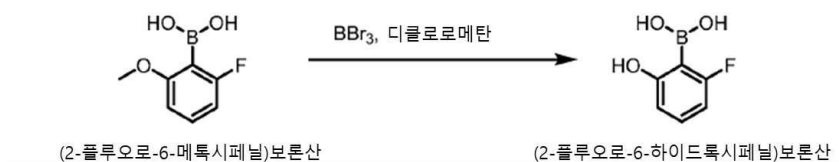
[0454]

물질	CAS #	MW (g/mol)	당량/부피	물	질량 (g)	부피 (L)
3-플루오로아니솔	456-49-5	126.13	1.0	1.19	150	0.136
n-부틸리튬 (헥산 중의 2.5 M)	109-72-8	64.06	1.5	1.78	N/A	0.712
디이소프로필아민	108-18-9	101.19	1.4	1.66	168	0.233
트리에틸보레이트	150-46-9	145.99	2.0	2.38	347.5	0.405
테트라하이드로퓨란	109-99-9	72.11	12 vol	N/A	N/A	1.8
염산 (2N)	7647-01-0	36.46	10 vol	N/A	N/A	1.5
메틸 tert-부틸 에테르	1634-04-4	88.15	12 vol	N/A	N/A	1.8
헵탄	142-82-5	100.20	10.5 vol	N/A	N/A	1.575

[0455]

[0456] 반응기 A에 THF(6 vol) 및 디이소프로필아민(1.4 당량)을 첨가하였다. 생성된 용액을 -70℃까지 냉각시키고, n-BuLi(헥산 중 2.5 M, 1.5 당량)를 서서히 첨가하였다. 첨가 완료 후, THF(6 vol) 중 3-플루오로아니솔(1.0 당량)의 용액을 서서히 첨가하고 -70℃에서 5분 동안 유지시켰다. B(EtO)₃(2.0 당량)을 서서히 첨가하고 -70℃에서 10분 동안 유지시켰다. 반응 혼합물을 2N HCl로 킨칭하였다. 킨칭된 반응 혼합물을 MTBE(3 x 4 vol)로 추출하였다. 합한 유기상을 총 1.5~3 부피로 농축하였다. 헵탄(7~9 vol)을 적가하고, 혼합물을 0~10℃까지 냉각시키고, 3시간 동안 교반하였다. 혼합물을 여과하고 헵탄(1.5 vol)으로 헹구었다. 고형물을 30℃ 미만에서 질소하에 건조시켜 (2-플루오로-6-메톡시페닐)보론산을 수득하였다.

[0457] 단계 A2 반응식 및 첨가량 표



[0458]

물질	CAS #	MW (g/mol)	당량/부피	물	질량 (g)	부피 (L)
(2-플루오로-6-메톡시페닐) 보론산	78495-63-3	169.95	1.0	0.118	20	N/A
보론 3 브롬화물	10294-33-4	250.52	1.5	0.177	44.2	0.017
디클로로메탄	75-09-2	84.93	4 vol	N/A	N/A	0.080
물	7732-18-5	18.02	13 vol	N/A	N/A	0.26
메틸 tert-부틸 에테르	1634-04-4	88.15	13 vol	N/A	N/A	0.26
헵탄	142-82-5	100.20	10 vol	N/A	N/A	0.20

[0459]

[0460] 반응기 A에 디클로로메탄(4 vol) 및 2-플루오로-6-메톡시-4-메틸페닐보론산(1 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 -30℃까지 냉각시키고 1.5 BBr₃(1.5 당량)을 적가하였다. 첨가 완료 후, 혼합물을 25℃까지 가온하고 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 빙냉(0~5℃) 물(10 vol)에 킨칭하였다. MTBE(10 vol)를 첨가하고, 혼합물을 25℃까지 가온하고, 모든 고형물이 용해될 때까지 1~2시간 동안 교반하였다. 수상을 분리하고 MTBE(3 vol)로 추출하였다. 합한 유기 추출물을 물(3 vol)로 세척한 후, 총 1 부피로 농축하였다. 혼합물에 헵탄(10 vol)을 첨가하고 2시간 동안 교반하였다. 얻어진 생성물을 여과에 의해 분리하고, 30℃ 미만에서 건조시켜 (2-플루오로-6-하이드록시페닐)보론산을 수득하였다.

[0461] 단계 A3 반응식 및 첨가량 표



[0462]

물질	CAS #	MW (g/mol)	당량/부피	물	질량 (kg)	부피 (L)
(2-플루오로-6-하이드록시페닐)보론산	1256345-60-4	155.92	1.0	89.79	14.00	N/A
시트르산 일수화물	5949-29-1	210.14	1.64	147.26	30.94	N/A
아세토니트릴	75-05-8	41.05	21 vol	N/A	220.1	294
불화칼륨	7789-23-3	58.10	4.00	359.16	20.87	N/A
USP 정제수	7732-18-5	18.02	2.0 vol	N/A	28.00	28.00
셀라이트	N/A	N/A	N/A	N/A	7.00	N/A
2-프로판올	67-63-0	60.10	25 vol	N/A	275	350

[0463]

[0464] 단계 A3

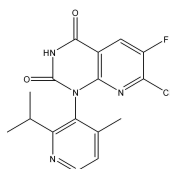
[0465] 불화칼륨(21.0 kg; 20.87 mol)을 반응기(반응기 A)에서 물(28 L)과 합하고, 내용물을 30분 동안 교반하였다. 별도의 반응기(반응기 B)에서, (2-플루오로-6-하이드록시페닐)보론산(14.00 kg, 89.79 mol)을 첨가한 후, 25℃에서 아세트니트릴(206.1 kg) 및 시트르산(30.94 kg; 147.26 mol)을 첨가하였다. 25℃에서 반응기 A의 내용물을 반응기 B에 첨가하고, 그 온도에서 10시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 셀라이트층(7.0 kg)을 통해 여과하고, 아세트니트릴(42 kg)로 행구었다. 여과액을 이소프로판올(56 kg)과 합한 후, 반응기에 증류된 부피를 이소프로판올로 대체하면서 35℃ 미만의 온도에서 진공하에 증류하고, 필요에 따라 반복하여 아세트니트릴에서 이소프로판올로의 용매 교환을 완료하였다. 슬러리를 15℃까지 냉각시키고 1시간 동안 에이징한 후, 여과하고 28 kg의 이소프로판올로 세척하였다. 케이크를 진공 및 질소를 이용해 건조시키고 패키징하여 화합물 A3을 수득하였다.

[0466] M-디온 화합물 5의 분해

[0467] M-디온 중간체의 크로마토그래피 분해

[0468] 화합물 4로부터 M-디온을 분리하기 위해 여러 키랄 크로마토그래피 기술 및 방법을 사용하였다. 이러한 기술 및 정지상은 당업계에 잘 알려져 있으며, 표 1에 요약되어 있다.

[0469] [화합물 4]



[0471] 표 1

기술	정지상	이동상	수율 [^]
SFC	Chiralpak® AD	40% 메탄올/60% CO ₂ *	약 95%
HPLC	Chiralpak® AD	90/10/0.1 에탄올/메탄올/트리에틸아민	약 94%
HPLC	Chiralpak® IG	60/40/0.1 에탄올/메탄올/트리에틸아민	약 92%
모사 이동층(SMB)	Chiralpak® IC	아세트니트릴	약 96%

[0472] [^] 수율은 98% ee 초과와 필요한 순도로 회수된 사용 가능한 M-디온의 %로 정의된다.

[0473] * 이 분리는 여러 번 수행되었다. 재료의 각 로트에 대해, 로트에서의 편차를 수용하기 위해 이동상은 약간 변경되었을 수 있다. 정제에 사용된 추가 이동상은 다음을 포함했다:

[0475] 1) 25/75 메탄올/CO₂,

[0476] 2) 30/70 메탄올/CO₂, 및

[0477] 3) 50/50 메탄올/CO₂.

[0478] SFC, HPLC, 및 SMB 기술은 당업계에 잘 알려져 있으며, Chiralpak® 정지상은 Fisher Scientific 및 Daicel Corporation과 같은 상업적 공급원으로부터 상업적으로 이용 가능하다.

[0479] 그러나, M-디온(화합물 5)을 분리하기 위한 보다 효율적인 공정을 개발하는 것이 바람직하다.

[0480] 전형적인 분해

[0481] 본 발명은 M/P-디온 라세미체(화합물 4)에 대한 실행 가능한 전형적인 분해의 개발에 관한 것이다.

[0482] 총 100개의 공결정 스크리닝 실험을 수행하였으며, 가능성 있는 세 가지 디온 공결정이 확인되었다. 잔류 고형물에서의 M/P-디온의 최고 면적비와 상청액에서의 최저 면적비에 기초하여, 분해를 위한 키랄 시약으로서 (+)-

2,3-디벤조일-D-타타르산(DBTA)을 선택하였다.

- [0483] 100개의 공결정 스크리닝 실험 및 20개의 추가 용매 스크리닝의 결과에 따라, 2-MeTHF/n-헵탄이 다른 용매 시스템보다 더 나은 분해 결과를 제공하는 것으로 확인되었다. 2-MeTHF와 n-헵탄의 다양한 비에서의 M-디온 공결정과 P-디온 공결정의 용해도 결과를 바탕으로, 분해를 위한 최적의 용매 조성물로서 2-MeTHF/n-헵탄(1.4:1, v/v)을 선택하였다.
- [0484] 키랄 분해의 결정화 공정 중의 디온 라세미체 또는 M/P-디온으로의 가능한 형태 변환을 찾기 위해, 다양한 온도에서 2-MeTHF/n-헵탄(1.4:1, v/v) 중의 M-디온 공결정, P-디온 공결정, M+P-디온 공결정 혼합물(1:1, w/w), 디온 라세미체 및 DBTA의 용해도를 측정하였다. 다양한 온도에서 7일 동안 M-디온 공결정 및 P-디온 공결정에 대한 형태 변화는 관찰되지 않았다. 그러나, 다양한 온도에서 7일 동안 M+P-디온 공결정 혼합물(1:1, w/w)을 교반한 후, 디온 라세미체 타입 C가 수득되었다. 해당 온도에서 7일 동안 디온 라세미체를 교반한 후, 디온 라세미체 타입 D(20℃ 및 30℃) 또는 디온 라세미체 타입 C(40℃, 50℃, 60℃, 및 65℃)가 관찰되었다. DBTA의 경우 모든 온도에서 약 100 mg/mL의 용해도가 관찰되었다.
- [0485] 분해 공정을 더 최적화하기 위해, 평형 용해도 결과를 바탕으로 작성한 M/P-디온 공결정의 3원계 상태도에서 공용점은 얻어지지 않았으며, 이는 M-디온 공결정과 P-디온 공결정이 모두 존재할 때 라세미체 타입 C가 결정화될 수 있기 때문일 것이다. 평형 용해도 결과를 바탕으로 작성한 M/P-디온의 다른 3원계 상태도에서 공용점은 얻어지지 않았으며, 이는 M-디온과 P-디온이 모두 존재할 때 디온 라세미체 타입 C 또는 타입 D가 결정화될 수 있기 때문일 것이다.
- [0486] 요약하면, 디온 라세미체의 분해를 위한 키랄 시약(DBTA)과 용매 시스템(2-MeTHF/n-헵탄(1.4:1, v/v))을 확인하였다. 분해 시약과 용매 시스템을 사용한 소규모 결정화 공정은 M-디온에 대해 39%의 수율과 99%의 ee 순도를 달성할 수 있었다. 또한, 스크리닝 실험 중에 디온 라세미체의 다형성이 관찰되고 조사되었다.
- [0487] 본 발명의 화합물은 또한, 구역질을 치료하는 제약 활성제와 조합하여 사용될 수 있다. 구역질을 치료하는 데 사용될 수 있는 제제의 예는 드로나비늘; 그라니세트론; 메토클로프라미드; 온단세트론; 및 프로클로르페라진; 또는 이들의 제약상 허용되는 염을 포함한다.
- [0488] 본 발명의 화합물은 또한, 방사선 치료, 호르몬 치료, 수술 및 면역요법과 조합하여 사용될 수 있으며, 이들 치료법은 당업자에게 잘 알려져 있다.
- [0489] 본 발명의 일 양태는 개별 투여될 수 있는 제약 활성 화합물의 조합으로 질환/병태를 치료하는 것을 고려하므로, 본 발명은 또한 개별 제약 조성물을 키트 형태로 조합하는 것에 관한 것이다. 키트는 2개의 개별 제약 조성물, 즉 본 발명의 화합물, 및 제2 제약 화합물을 포함한다. 키트는 개별 조성물을 수용하는 용기, 예를 들어 분할된 병 또는 분할된 호일 패키지를 포함한다. 용기의 추가 예는 주사기, 박스, 및 백을 포함한다. 일반적으로, 키트는 개별 구성요소의 사용을 위한 지침을 포함한다. 키트 형태는 개별 구성요소가 바람직하게는 상이한 투약 형태(예를 들어, 경구 및 비경구)로 투여되거나 상이한 투여 간격으로 투여되는 경우, 또는 처방 의사 또는 의사에 의해 조합의 개별 구성요소의 적정이 요구되는 경우에 특히 유리하다.
- [0490] 이러한 키트의 예는 소위 блистер 팩이다. блистер 팩은 포장 산업에서 잘 알려져 있으며, 제약 단위 투약 형태(정제, 캡슐 등)의 포장에 널리 사용되고 있다. 일반적으로 блистер 팩은 바람직하게는 투명한 플라스틱 재료의 호일로 덮인 비교적 단단한 재료의 시트로 구성된다. 포장 공정 중에 플라스틱 호일에 홈이 형성된다. 홈은 포장될 정제 또는 캡슐의 크기와 형상을 가지고 있다. 이어서, 정제 또는 캡슐이 홈 안에 배치하고, 비교적 단단한 재료의 시트가, 홈이 형성된 방향과 반대인 호일의 면에서 플라스틱 호일에 대해 밀봉된다. 그 결과, 정제 또는 캡슐은 플라스틱 호일과 시트 사이의 홈에 밀봉된다. 홈에 수동으로 압력을 가하여 홈의 위치에서 시트에 개구가 형성됨으로써 정제 또는 캡슐이 блистер 팩으로부터 제거될 수 있도록 하는 시트의 강도가 바람직하다. 이어서, 정제 또는 캡슐은 상기 개구를 통해 제거될 수 있다.
- [0491] 예를 들어, 정제 또는 캡슐 옆에 숫자 형태로 키트에 기억 보조수단을 제공하여 숫자가 이렇게 지정된 정제 또는 캡슐을 섭취해야 하는 요법의 날짜에 부합하도록 하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 기억 보조수단의 다른 예는, 예를 들어, "1주차, 월요일, 화요일, ... 등 ... 2주차, 월요일, 화요일, ..." 등과 같이 카드에 인쇄된 달력이다. 기억 보조수단의 다른 변형은 쉽게 명백해질 것이다. "1일 용량"은 하나의 정제 또는 캡슐이거나, 주어진 날에 복용할 여러 개의 환제 또는 캡슐일 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물의 1일 용량은 하나의 정제 또는 캡슐로 구성될 수 있는 반면, 제2 화합물의 1일 용량은 여러 개의 정제 또는 캡슐로 구성될 수 있으며, 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 기억 보조수단은 이를 반영해야 하며 활성제의 정확한 투여를 보조해야 한다.

- [0492] 본 발명의 다른 특정 구현예에서, 의도된 사용 순서에 따라 한 번에 하나씩 1일 용량을 분배하도록 설계된 디스펜서가 제공된다. 바람직하게, 디스펜서는 요법 준수를 더욱 용이하게 하기 위해 기억 보조수단을 구비한다. 이러한 기억 보조수단의 예는 분배된 1일 용량의 횟수를 나타내는 기계식 카운터이다. 이러한 기억 보조수단의 다른 예는 액정 판독기와 결합된 배터리 구동 마이크로 칩 메모리, 또는 예를 들어 마지막 1일 용량을 복용한 날짜를 읽거나 다음 용량을 언제 복용해야 하는지 알려주는 가청 알람 신호이다.
- [0493] 본 발명의 화합물 및 다른 제약 활성 화합물은 필요한 경우 경구, 직장내, 비경구(예를 들어, 정맥내, 근육내, 또는 피하), 낭내, 질내, 복강내, 방광내, 국소적으로(예를 들어, 산제, 연고, 또는 적제), 또는 흡착 또는 비강 분무제로 환자에게 투여될 수 있다. 제약 활성제를 투여하기 위해 당업자에 의해 사용되는 모든 방법이 고려된다.
- [0494] 비경구 주사에 적합한 조성물은 생리학적으로 허용되는 멸균 수성 또는 비수성 용액, 분산액, 현탁액, 또는 에멀전, 및 멸균 주사 용액 또는 분산액으로 재구성하기 위한 멸균 분말을 포함할 수 있다. 적합한 수성 및 비수성 담체, 희석제, 용매, 또는 비히클의 예는 물, 에탄올, 폴리올(프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세롤 등), 이들의 적합한 혼합물, 식물유(예컨대, 올리브유), 및 에틸 올레이트와 같은 주사 가능한 유기 에스테르를 포함한다. 적절한 유동성은 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- [0495] 이들 조성물은 또한, 보존제, 습윤제, 유화제, 및 분산제와 같은 아췌반트를 함유할 수 있다. 미생물 오염은 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산 등을 첨가하여 방지될 수 있다. 등장화제, 예를 들어 당, 염화나트륨 등을 포함하는 것이 또한 바람직할 수 있다. 주사용 제약 조성물의 장기간의 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 사용하여 이루어질 수 있다.
- [0496] 경구 투여용 고체 투약 형태는 캡슐, 정제, 산제, 및 과립제를 포함한다. 이러한 고체 투약 형태에서, 활성 화합물은 시트르산나트륨 또는 인산이칼슘과 같은 하나 이상의 불활성 통상적 부형제(또는 담체) 또는 (a) 충전제 또는 증량제, 예를 들어 전분, 락토스, 수크로스, 만니톨, 및 규산; (b) 결합제, 예를 들어 카복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 수크로스, 및 아카시아; (c) 보습제, 예를 들어 글리세롤; (d) 봉해제, 예를 들어 한천, 탄산칼슘, 감자, 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 복합 규산염, 및 탄산나트륨; (e) 용액 지연제, 예를 들어 파라핀; (f) 흡수 촉진제, 예를 들어 4차 암모늄 화합물; (g) 습윤제, 예를 들어 세틸 알코올 및 글리세롤 모노스테아레이트; (h) 흡착제, 예를 들어 카올린 및 벤토나이트; 및 (i) 활택제, 예를 들어 활석, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 라우릴 설페이트, 또는 이들의 혼합물과 혼합된다. 캡슐 및 정제의 경우, 투약 형태는 또한 완충제를 포함할 수 있다.
- [0497] 락토스 또는 유당, 뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 부형제를 사용하여 연질 및 경질 충전 젤라틴 캡슐의 충전제로서, 유사한 유형의 고체 조성물이 또한 사용될 수 있다.
- [0498] 정제, 당의정, 캡슐, 환제, 및 과립제와 같은 고체 투약 형태는 장용 코팅 및 당업계에 잘 알려진 다른 코팅과 같은 코팅 및 셸로 제조될 수 있다. 이들은 또한 불투명화제를 함유할 수 있고, 또한 지연된 방식으로 장관의 특정 부분에서 활성 화합물 또는 화합물들을 방출하는 조성을 가질 수 있다. 사용될 수 있는 포매 조성물의 예는 폴리머 물질 및 왁스이다. 활성 화합물은 또한, 적절한 경우 상기 부형제 중 하나 이상과 함께 마이크로캡슐화된 형태일 수 있다.
- [0499] 경구 투여용 액체 투약 형태는 제약상 허용되는 에멀전, 용액, 현탁액, 시럽제, 및 엘릭서를 포함한다. 활성 화합물 외에, 액체 투약 형태는 당업계에서 일반적으로 사용되는 불활성 희석제, 예컨대 물 또는 기타 용매, 가용화제 및 유화제, 예를 들어 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일, 특히 면실유, 땅콩유, 옥수수 배아유, 올리브유, 피마자유, 및 참깨유, 글리세롤, 테트라하이드로푸르피릴 알코올, 폴리에틸렌 글리콜, 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 또는 이들 물질의 혼합물 등을 함유할 수 있다.
- [0500] 이러한 불활성 희석제 외에, 조성물은 또한 습윤제, 유화제 및 현탁제, 감미제, 착향제, 및 방향제와 같은 아췌반트를 포함할 수 있다. 현탁액은 활성 화합물 외에, 현탁제, 예를 들어 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 및 소르비탄 에스테르, 미결정질 셀룰로스, 알루미늄 메타하이드록사이드, 벤토나이트, 한천, 및 트래거캔스, 또는 이들 물질의 혼합물 등을 함유할 수 있다.
- [0501] 직장 투여용 조성물은 바람직하게는 좌제이며, 이는 본 발명의 화합물을 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 또는

좌약 왁스와 같이 상온에서는 고체이지만 체온에서는 액체이므로 직장이나 질강에서 녹아 활성 성분을 방출하는 적합한 비자극성 부형제 또는 담체와 혼합하여 제조될 수 있다.

[0502] 본 발명의 화합물의 국소 투여용 투약 형태는 연고, 산제, 분무제, 및 흡입제를 포함한다. 활성 화합물 또는 화합물들은 생리학적으로 허용되는 담체, 및 필요할 수 있는 임의의 보존제, 완충제, 또는 추진제와 멸균 조건에서 혼합된다. 안과용 제형, 안연고, 산제, 및 용액도 본 발명의 범위 내에 속하는 것으로 고려된다.

[0503] 본 발명의 화합물은 하루에 약 0.1 내지 약 3,000 mg 범위의 투여량 수준으로 환자에게 투여될 수 있다. 체중이 약 70 kg인 정상적인 성인의 경우, 체중 킬로그램당 약 0.01 내지 약 100 mg 범위의 투여량이면 일반적으로 충분하다. 사용될 수 있는 구체적인 투여량 및 투여량 범위는 환자의 요건, 치료되는 병태 또는 질환의 중증도, 및 투여되는 화합물의 약리학적 활성을 포함하는 여러 인자에 따라 달라진다. 본 발명의 화합물의 특정 투여량은, 화합물이 승인된 경우 FDA 승인된 투여량이다.

[0504] 본 발명의 화합물은 제약상 허용되는 염, 에스테르, 아마이드, 또는 전구약물로서 투여될 수 있다. 용어 "염"은 본 발명의 화합물의 무기염 및 유기염을 지칭한다. 염은 화합물의 최종 단리 및 정제 중에 인시튜로 제조되거나, 유리 염기 또는 산 형태의 정제된 화합물을 적합한 유기 또는 무기 염기 또는 산과 별도로 반응시키고 이렇게 형성된 염을 단리함으로써 제조될 수 있다. 대표적인 염은 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 아세테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 라우레이트, 보레이트, 벤조에이트, 락테이트, 포스페이트, 토실레이트, 시트레이트, 말레에이트, 푸마레이트, 석시네이트, 타타레이트, 나프틸레이트, 메실레이트, 글루코헵토네이트, 락토바이오네이트, 및 라우릴설포네이트 염 등을 포함한다. 염은 나트륨, 리튬, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등과 같은 알칼리 및 알칼리토류 금속 기반의 양이온, 뿐만 아니라 암모늄, 테트라메틸암모늄, 테트라에틸암모늄, 메틸아민, 디메틸아민, 트리메틸아민, 트리에틸아민, 에틸아민 등을 포함하는(이에 한정되지 않음) 비독성 암모늄, 4차 암모늄, 및 아민의 양이온을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[S. M. Berge, et al., "Pharmaceutical Salts," J Pharm Sci, 66: 1-19 (1977)] 참조.

[0505] 본 발명의 화합물의 제약상 허용되는 에스테르의 예는 C₁-C₈ 알킬 에스테르를 포함한다. 허용되는 에스테르는 또한 C₅-C₇ 시클로알킬 에스테르, 뿐만 아니라 벤질과 같은 아릴알킬 에스테르를 포함한다. C₁-C₄ 알킬 에스테르가 일반적으로 사용된다. 본 발명의 화합물의 에스테르는 당업계에 잘 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0506] 본 발명의 화합물의 제약상 허용되는 아마이드의 예는 암모니아, 1차 C₁-C₈ 알킬아민, 및 2차 C₁-C₈ 디알킬 아민으로부터 유래된 아마이드를 포함한다. 2차 아민의 경우, 아민은 또한 적어도 하나의 질소 원자를 함유하는 5 또는 6원 헤테로시클로알킬기의 형태일 수 있다. 암모니아, C₁-C₃ 1차 알킬 아민, 및 C₁-C₂ 디알킬 2차 아민으로부터 유래된 아마이드가 일반적으로 사용된다. 본 발명의 화합물의 아마이드는 당업자에게 잘 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0507] 용어 "전구약물"은 생체내 변환되어 본 발명의 화합물을 생성하는 화합물을 의미한다. 변환은 다양한 메커니즘에 의해, 예를 들어 혈액에서 가수분해를 통해 발생할 수 있다. 전구약물의 사용에 관한 논의는 문헌[T. Higuchi and W. Stella, "Prodrugs as Novel Delivery Systems," A.C.S. 심포지움 시리즈의 Vol. 14, 및 Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987]에 제공된다.

[0508] 예를 들어, 본 발명의 화합물은 카복실산 작용기를 함유하므로, 전구약물은 (C₁-C₈) 알킬, (C₂-C₁₂)알카노일옥시메틸, 4 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 1-(알카노일옥시)에틸, 5 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 1-메틸-1-(알카노일옥시)에틸, 3 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 알콕시카보닐옥시메틸, 4 내지 7개의 탄소 원자를 갖는 1-(알콕시카보닐옥시)에틸, 5 내지 8개의 탄소 원자를 갖는 1-메틸-1-(알콕시카보닐옥시)에틸, 3 내지 9개의 탄소 원자를 갖는 N-(알콕시카보닐)아미노메틸, 4 내지 10개의 탄소 원자를 갖는 1-(N-(알콕시카보닐)아미노메틸, 3-프탈리딜, 4-크로토노락토닐, 감마-부티로락톤-4-일, 디-N,N-(C₁-C₂)알킬아미노(C₂-C₃)알킬(예컨대, β-디메틸아미노에틸), 카바모일-(C₁-C₂)알킬, N,N-디(C₁-C₂)알킬카바모일-(C₁-C₂)알킬 및 피페리디노-, 피롤리디노-, 또는 모르폴리노(C₂-₃)알킬과 같은 기로 산기의 수소 원자를 대체하여 형성된 에스테르를 포함할 수 있다.

[0509] 본 발명의 화합물은 비대칭 또는 키랄 중심을 포함할 수 있으므로, 서로 다른 입체이성체 형태로 존재한다. 상기 화합물뿐만 아니라 라세미 혼합물을 비롯한 이들의 혼합물의 모든 입체이성체 형태가 본 발명의 일부를 형성하는 것으로 고려된다. 또한, 본 발명은 모든 기하이성체 및 위치이성체를 고려한다. 예를 들어, 화합물이 이중

결합을 포함하는 경우, 시스 및 트랜스 형태(각각 Z 및 E로 나타냄) 둘 다, 뿐만 아니라 혼합물이 고려된다.

- [0510] 부분입체이성체 혼합물과 같은 입체이성체의 혼합물은 크로마토그래피 및/또는 분별 결정화와 같은 공지된 방법에 의해 물리화학적 차이에 기초하여 개별 입체화학 성분으로 분리될 수 있다. 거울상이성체는 또한, 적절한 광학 활성 화합물(예를 들어, 알코올)과의 반응에 의해 거울상이성체 혼합물을 부분입체이성체 혼합물로 변환하고, 부분입체이성체들을 분리하고 개별 부분입체이성체를 상응하는 순수 거울상이성체로 변환(예를 들어, 가수분해)함으로써 분리될 수 있다. 또한, 일부 화합물은 회전장애 이성체(예를 들어, 치환된 바이아릴)일 수 있다.
- [0511] 본 발명의 화합물은 물(수화물), 에탄올 등과 같은 제약상 허용되는 용매와 용매화된 형태뿐만 아니라 용매화되지 않은 형태로 존재할 수 있다. 본 발명은 용매화된 형태와 용매화되지 않은 형태 모두를 고려하고 포함한다.
- [0512] 본 발명의 화합물은 서로 다른 호변이성체 형태로 존재할 수도 있다. 본 발명의 화합물의 모든 호변이성체가 고려된다. 예를 들어, 테트라졸 모이어티의 호변이성체 형태 모두는 본 발명에 포함된다. 또한, 예를 들어 화합물의 모든 케토-엔올 또는 이민-엔아민 형태가 본 발명에 포함된다.
- [0513] 당업자는 본원에 포함된 화합물 명칭 및 구조가 화합물의 특정 호변이성체에 기초할 수 있음을 인식할 것이다. 특정 호변이성체에 대한 명칭 또는 구조만 사용될 수도 있지만, 달리 언급되지 않는 한, 모든 호변이성체가 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.
- [0514] 또한, 본 발명은 합성 화학자에게 잘 알려진 것과 같은 실험실 기술을 사용하여 시험관내 합성된 화합물; 또는 생체내 기술을 사용하여, 예를 들어 대사, 발효, 소화 등을 통해 합성된 화합물을 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 본 발명의 화합물은 시험관내 및 생체내 기술의 조합을 사용하여 합성될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0515] 본 발명은 또한, 본원에 언급된 것과 동일하지만 자연에서 일반적으로 발견되는 원자 질량 또는 질량수와 다른 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자로 하나 이상의 원자가 대체된다는 사실에 대해 동위원소 표지된 화합물을 포함한다. 본 발명의 화합물에 혼입될 수 있는 동위원소의 예는 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 불소, 및 염소의 동위원소, 예컨대 ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{16}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , 및 ^{36}Cl 을 포함한다. 일 양태에서, 본 발명은 하나 이상의 수소 원자가 중수소(^2H) 원자로 대체된 화합물에 관한 것이다.
- [0516] 상기 동위원소 및/또는 다른 원자의 다른 동위원소를 함유하는 본 발명의 화합물은 본 발명의 범위 내에 속한다. 본 발명의 특정 동위원소 표지 화합물, 예를 들어 ^3H 및 ^{14}C 와 같은 방사성 동위원소가 혼입된 것들은 약물 및/또는 기질 조직 분포 분석에 유용하다. 삼중수소, 즉 ^3H , 및 탄소-14, 즉 ^{14}C 동위원소가 제조 및 검출의 용이성 때문에 특히 바람직하다. 또한, 중수소, 즉 ^2H 와 같은 더 무거운 동위원소에 의한 치환은 더 큰 대사 안정성으로 인한 특정 치료적 이점(예를 들어, 생체내 반감기 증가 또는 필요 투여량 감소)을 제공할 수 있으므로 일부 상황에서 선호될 수 있다. 일반적으로 본 발명의 동위원소 표지 화합물은 동위원소 비표지 시약을 쉽게 이용할 수 있는 동위원소 표지 시약으로 대체하여 제조될 수 있다.
- [0517] 본 발명의 화합물은 결정질 상태 및 비정질 상태를 포함한 다양한 고체 상태로 존재할 수 있다. 본 화합물의 상이한 결정질 상태(다형체라고도 함), 및 비정질 상태가 본 발명의 일부로서 고려된다.
- [0518] 본 발명의 화합물을 합성함에 있어, 특정 이탈기를 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 용어 "이탈기"("LG")는 일반적으로, 친핵체에 의해 치환될 수 있는 기를 지칭한다. 이러한 이탈기는 당업계에 알려져 있다. 이탈기의 예는 할라이드(예를 들어, I, Br, F, Cl), 설포네이트(예를 들어, 메실레이트, 토시레이트), 설파이드(예를 들어, SCH_3), N-하이드록시석신이미드, N-하이드록시벤조트리아졸 등을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 친핵체의 예는 아민, 티올, 알코올, 그리나르 시약, 음이온 종(예를 들어, 알콕사이드, 아마이드, 카바니온) 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는다.
- [0519] 본원에 인용된 모든 특허, 특허 출원, 및 기타 문헌은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0520] 이하 제시되는 실시예는 본 발명의 구체적인 구현예를 예시한다. 이들 실시예는 대표적인 것으로 여겨지며, 어떤 방식으로든 청구범위를 제한하는 것이 아니다.
- [0521] **실시예**
- [0522] AMG 510은 강력한 생화학적 세포 활성 및 강력한 생체내 효능을 가진 KRAS^{G12C}의 생체 이용 가능한 경구 공유 억

제제로서 개발되었다. AMG 510으로 처리된 NCI-H358 세포의 시스템인 프로테오믹 분석 결과 KRAS의 G12C-함유 펩티드만 공유 변형된 것으로 나타났다. AMG 510은 재조합 돌연변이 KRAS^{G12C/C118A}의 SOS-촉매 뉴클레오티드 교환을 억제했지만, 12번 위치에서 야생형인 KRAS^{C118A}에 최소한의 영향을 미쳤다. 세포 분석에서, AMG 510은 시험된 모든 KRAS p.G12C 돌연변이 세포주에서 KRAS^{G12C}를 공유 변형시켰고 ERK12/의 인산화에 의해 측정된 KRAS^{G12C} 신호전달을 억제했지만, 다양한 다른 KRAS 돌연변이가 있는 세포주에서는 ERK1/2 인산화를 억제하지 않았다. AMG 510은 또한 KRASp.G12C 돌연변이 세포주의 생존력을 선택적으로 손상시켰지만, 다른 KRAS 돌연변이가 있는 세포주에는 영향을 미치지 않았다. 생체내 약력학적 분석은 인간 췌장(MIA PaCa-2 T2) 및 NSCLC(NCI-H358) 종양 이종 이식편에서 ERK1/2의 인산화(p-ERK)에 의해 측정된 KRAS^{G12C} 신호전달의 용량- 및 시간-의존적 억제를 보여주었다. AMG 510에 의한 KRAS^{G12C}의 공유 변형은 질량 분석법으로 측정되었고, 종양에서의 p-ERK 억제와 상관 관계가 있었다. 종양이 있는 마우스의 시간 경과 연구는 투여 0.5시간 후에 AMG 510의 혈장 노출이 정점에 이르렀고 바로 이어 종양에서의 p-ERK 억제를 보여주었다. AMG 510은 MIA PaCa-2 T2 및 NCI-H358 이종이식편의 성장을 상당히 억제했고, 더 높은 용량에서 종양 퇴행을 유발했다. 공유 KRAS^{G12C} 억제제를 사용한 KRAS p.G12C 세포주의 처리는 HLA의 발현을 증가시켰다. 다른 세포 신호전달 경로의 억제제와 AMG 510의 병용 치료는 세포 생존력에 대한 시너지 효과의 증거를 나타냈다. 표준 치료 카보플라틴과 AMG 510의 병용 치료는 단일 제제에 비해 향상된 NCI-H358 종양 성장 억제를 보여주었다. 유사하게, MEK 억제제와 조합된 AMG 510은 단일 제제에 비해 향상된 항종양 효능을 나타냈다.

[0523] 생체내 면역 감시에 대한 KRAS^{G12C} 억제의 영향을 시험하기 위해, 체크포인트 억제제 요법과 조합하여 AMG 510을 시험하기에 적합한 신규 동계 종양 세포주를 생성하여 시험관 내에서 특성화하였다. 새로 개발된 KRAS-G12C 돌연변이 암 모델에서, AMG 510 치료는 종양 성장을 상당히 억제했고 퇴행을 유발했다. 놀랍게도, 면역 체크포인트 억제제와 AMG 510의 조합은 전체 생존율을 현저하게 향상시켰고 지속적 완치를 나타냈다. 무린 KRAS p.G12C 종양의 면역표현형 분석은 치료 후 T세포 침윤의 상당한 증가를 나타냈으며, 이는 AMG 510이 면역 체크포인트 억제에 보다 민감한 종양 미세환경을 유도할 수 있음을 시사한다.

[0524] 신규 동계 CT-26 KRAS p.G12C 종양 모델

[0525] 무린 CT26(Colon Tumor #26) 세포는 BALB/c 마우스를 N-니트로소-N-메틸우레탄(NMU)에 노출시켜 쉽게 이식되고 용이하게 전이되는 급속 성장 등급 IV 암종을 형성시킴으로써 1975년에 개발되었다. 500개가 넘는 발표된 연구에 사용된 CT26 결장 암종은 약물 개발에서 가장 일반적으로 사용되는 세포주 중 하나이다. 특정 신호전달 경로를 표적으로 하는 치료제뿐만 아니라 수많은 세포독성제가 이러한 세포에 대해 연구되었다. 또한, BALB/c 마우스의 CT26 모델은 동계 생체내 시험 시스템을 제공하므로, 면역치료 개념의 개발 및 시험에 자주 사용된다. *BMC Genomics*. 2014 Mar 13;15:190. doi: 10.1186/1471-2164-15-190. Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma.

[0526] 표 A 및 도 3, 도 4, 도 5, 도 6, 도 18, 도 24, 도 31, 도 34, 도 38, 및 도 39에 요약된 바와 같이 세포주와 면역요법의 병용 연구를 가능하게 하도록 동계 CT-26 KRAS p.G12C 종양 모델이 개발되었다. CT-26 동계 종양 세포주는 모계에 존재하는 KRAS-G12D 돌연변이를 갖는 것에 기초하여 선택되었다. KRAS-G12D 돌연변이의 존재는 세포주 성장 및 생존이 항시성 KRAS 신호전달(G12D)에 의해 유도될 수 있으며 잠재적으로 KRAS 억제에 민감할 수 있음을 시사했다. CT-26 무린 대장 종양 세포주로부터 CT-26 KRAS p.G12C 세포를 생성하였다. 선행 기술 문헌[Liang et al. (Journal of Biotechnology 241 (2017) 136-146)]에 기재된 바와 같은 CRISPR 기술을 이용해 두 KRAS p.G12D 대립형질 모두를 서열 CTTGTGATGGTTGGAGCTGA(서열번호 21)를 활용하여 KRAS p.G12C로 대체하였다. 클론 10은 차세대 시퀀싱(NGS)에 의해 KRAS p.G12C 대립형질에 대해 동형접합성인 것으로 확인되었으며, CT-26 KRAS G12C-H10으로 식별된다. AMG 510에 의한 KRAS 신호전달의 억제를 가능하게 하는 이 새로운 단리된 동계 종양 세포주, CT-26 KRAS p.G12C를 모든 CT-26 G12C 생체내 연구(도 3, 도 4, 도 5, 및 도 6 참조) 및 시험관내 연구(도 18, 도 24, 도 31, 도 34, 도 38, 및 도 39)에 사용하였다.

[0527] 본 발명은 2개의 KRAS^{G12C} 대립형질을 포함하는 신규 단리된 세포주, 및 2개의 KRAS^{G12C} 대립형질을 포함하는 세포주를 생성하는 방법을 포함하며, 상기 방법은

[0528] a) 2개의 KRAS^{G12D} 대립형질을 포함하는 세포주를, 2개의 KRAS^{G12C} 대립형질이 형성되도록 2개의 KRAS 대립형질 모두에 뉴클레오티드의 대체를 유도하는 CRISPR 작제물과 함께 인큐베이션하는 단계; 및

- [0529] b) 2개의 KRAS^{G12C} 대립형질을 포함하는 세포주를 분리하는 단계를 포함한다.
- [0530] 고처리량 시퀀싱으로도 알려진 차세대 시퀀싱(NGS)은 다음과 같은 것들을 포함한 다양한 최신 시퀀싱 기술을 설명하는 데 사용되는 포괄적인 용어이다:
- [0531] · Illumina (Solexa) 시퀀싱
- [0532] · Roche 454 시퀀싱
- [0533] · Ion torrent: 양성자/PGM 시퀀싱
- [0534] · SOLiDTM 시퀀싱
- [0535] Thermo-Fisher Scientific에서 시판하는 Ion TorrentTM Personal Genome MachineTM 플랫폼을 본 발명에서 사용하였다. 이러한 최신 기술을 통해 과학자들은 이전에 사용된 Sanger 시퀀싱보다 훨씬 빠르고 저렴하게 DNA와 RNA를 시퀀싱할 수 있다.
- [0536] **시험관내 세포 기반 병용 연구**
- [0537] 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection), DSMZ(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures), 및 JCRB(Japanese Collection of Research Bioresources)에서 구입하였다. 각 세포주는 권장 성장 배지에서 배양되었다.
- [0538] 양방향 화합물 조합의 경우, 세포를 웰당 500 내지 2500개 세포 범위의 초기 밀도로 96웰 또는 384웰 세포 배양 플레이트에 접종하였다.
- [0539] 16 내지 24시간 후, 배양 플레이트에 매트릭스 형태로 화합물을 첨가하고, 하나의 제제는 x축을 따라 적정하고 두 번째 제제는 y축을 따라 적정하였다.
- [0540] 임의의 주어진 세포주에서 시험된 모든 조합에 대해, 조합 스크리닝 형태를 위해 선택된 용량 범위에 걸쳐 곡선 최대값, 곡선 최소값, 및 기울기를 잘 정의하도록 각 화합물의 시작 고농도 및 희석 인자를 선택하였다.
- [0541] CellTiter-Glo® 발광 세포 생존력(Promega) 분석 키트를 사용하여 생존 세포의 수를 측정하였다.
- [0542] 화합물의 첨가 전 시간 제로(V0)에서, 뿐만 아니라 72시간의 화합물 처리 후에, 각 세포주에 대해 EnVision® 멀티라벨 판독기(Perkin Elmer)로 발광을 측정하였다.
- [0543] 다음 식에 따라 200-포인트 스케일로 성장 억제(GI)를 계산하였으며, 식에서 V72는 72시간에서 DMSO 대조군의 발광이고, T72는 화합물로 처리된 샘플의 발광이다: $T72 > V0$ 일 경우, $GI = 100 \times (1 - ((T72 - V0) / (V72 - V0)))$; $T72 < V0$ 일 경우, $GI = 100 \times (1 - ((T72 - V0) / V0))$.
- [0544] 0, 100, 및 200의 GI 값은 각각, 억제되지 않은 세포 성장(즉, DMSO 대조군), 세포 정체, 및 완전한 세포 사멸을 나타낸다.
- [0545] 4-파라미터 로지스틱 모델을 사용하여 시그모이드 용량 반응 곡선을 플롯팅하였다.
- [0546] Loewe 가산성 모델을 기반으로 시너지 점수를 생성하는 ChaliceTM 분석 소프트웨어(Zalicyus)를 사용하여 상승적 상호작용에 대해 데이터를 분석하였다.
- [0547] 이전에 설명된 바와 같이 매트릭스의 각 웰에 대한 성장 억제를 계산하였고, Loewe 가산성 모델을 기반으로 시너지 점수를 생성하는 ChaliceTM 분석 소프트웨어(Zalicyus; Cambridge, MA)를 사용하여 상승적 상호작용에 대해 데이터를 분석하였다(Leher, J., et al. (2009). "Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity." *Nat Biotech* **27**(7): 659-666 및 Rickles, et al (2012) "Adenosine A2A and Beta-2 Adrenergic Receptor Agonists: Novel Selective and Synergistic Multiple Myeloma Targets Discovered through Systematic Combination Screening" *Mol Cancer Therapeutics* **11** (7): 1432).
- [0548] Loewe ADD(가산성) 모델(도 7 내지 도 37에 나타냄)은 병용 효과를 정량화한다. ADD 부피 = $\sum C_X, C_Y (I_{\text{데이터}} - I_{\text{Loewe}})$ 로 정의되는 가산성 초과 부피에 의해 처음에 조합에 순위를 매겼고, 식에서 $I_{\text{Loewe}}(C_X, C_Y)$ 는 $(C_X/EC_X) + (C_Y/EC_Y) = 1$ 을 만족하는 억제이고, $EC_{X,Y}$ 는 단일 제제 곡선에 대한 I_{Loewe} 에서의 유효 농도이다. 모든 비단일 제

제 농도 쌍에 대해 합산된 시너지 점수 $S = \log f_x \log f_y \sum I_{\text{데이터}} (I_{\text{데이터}} - I_{\text{Loewe}})$ 인 "시너지 점수"도 사용하였으며, 식에서 $\log f_{x,y}$ 는 각 단일 제제에 사용된 희석 인자의 자연 로그이다. 이는, 높은 억제에 가중치가 부여되고 다양한 희석 인자에 대해 보정된, Loewe 가산성 반응 표면과 측정 표면 사이의 부피를 효과적으로 계산한다. $I_{\text{데이터}}$ 값에 대한 측정된 오차 및 표준 오차 전파에 기초하여, 각 시너지 점수에 대해 불확실성 σ_s 를 계산하였다.

[0549] 표시된 예에서, 성장 억제(%) 매트릭스는 상기 식을 사용하여 발광 데이터로부터 계산된 공통 성장 억제 값을 포함하고; ADD 모델 성장 억제(%) 매트릭스는 모델링된 단일 제제 성장 억제 곡선에서 도출된 Loewe 가산성 모델 기반 예측 성장 억제 값을 포함하고; ADD 초과 성장 억제(%) 매트릭스는 가산성 모델을 초과하는 성장 억제 값을 포함한다. 가산성 모델은 "귀무가설" 역할을 하며, 두 제제 간의 상승적 상호작용이 없다고 가정한다. 성장 억제 용량 반응 매트릭스(=ADD 초과 성장 억제)에서 ADD 모델을 뺀 후 관찰되는 모든 활성은 시너지 효과를 나타낸다.

[0550] 아래 표 A는 특정 암 유형에 대해 하나 이상의 추가 제약 활성제와 KRAS^{G12C} 억제제의 시험관내 특정 조합을 예시한다. 도 7 내지 도 39에 요약된 획득 데이터는 표 A에 제시된 조합이 병용 요법의 개별 구성 제제가 단독으로 사용될 때 예상되는 것보다 향상된 항암 활성을 보임을 나타낸다. 나타나는 치료 시너지 효과의 크기는 치료되는 암의 유형과 사용된 제제에 따라 다를 수 있다.

[0551] 표 A

	EGFRi			SHP2i	MEKi	PI3Ki		AKTi	EGFR Ab
	AMG 510 아파티닙	AMG 510 에를로티닙	AMG 510 라파티닙	AMG 510 RMC-4550	AMG 510 트라메티닙	AMG 510 AMG 511	AMG 510 부파리닙	AMG 510 AZD5363	AMG 510 세록시맵
NCI-H358 (폐)	22.3	12.4	19.7	25	17	10.5	13.5	4.53	--
MIA PaCa-2 (췌장)	4.7	2.07	--	6.36	3.06	5.53	--	2.67	--
MIA PaCa-2 3D	2.76	--	--	--	7.46	--	--	--	--
NCI-H1373 3D (폐)	8.7*	--	--	--	11.8	--	--	--	--
CT-26 KRAS p.G12C 3D (마우스 결장)	10.8*	--	--	11.7*	2.63	10.8	--	--	--
SW837 (결장)	--	--	--	--	--	--	--	--	2.96

[0552] · 더 높은 농도에서의 오프-타겟 효과는 상승된 시너지 점수에 기여할 수 있음

[0553] · 생체내 종양 이중이식 병용 연구

[0554] 다음과 같은 일반적인 절차에 따라 생체내 종양 이중이식 연구를 수행하였다.

[0555] 종양세포를 배양하고, 채취하여, 암컷 무흉선 누드 마우스의 오른쪽 옆구리에 피하 이식하였다. 종양이 약 200 mm³에 도달했을 때, 마우스를 치료군(n=10/그룹)에 무작위 배정하고, (그래프에 표시된 날에) 치료를 시작했다.

[0556] 종양 크기와 체중은 주당 2~3회 측정하였다. 종양 부피를 디지털 캘리퍼스로 측정하고, L x W x H로 계산하여 mm³ 단위로 표시하였다. 성장 곡선들 간에 관찰된 차이의 통계적 유의성은, 대조군과 치료군을 비교하는 Dunnett 조정 다중 비교를 사용하여 로그 변환된 종양 부피 데이터의 공분산의 반복 측정 분석(RMANOVA)에 의해

평가되었다. 병용 연구의 경우, RMANOVA는 각 단일 제제 치료군과 일대일 비교한 병용 그룹으로 실행되었다.

[0557] BD Matrigel™ 기저막 매트릭스는 EHS(Engelbreth-Holm-Swarm) 마우스 육종(BD Biosciences, San Jose, CA)에서 추출한 가용화된 기저막 제제이다.

[0558] 모든 연구는 맹검 방식으로 측정되었다.

[0559] 도 3, 도 4, 도 5, 및 도 6의 항-마우스 PD-1(클론 29F.1A12) 항체는 Bio X 세포(West Lebanon, New Hampshire)에서 시판된다.

[0560] 도 1, 도 2, 도 3, 도 4, 도 5, 및 도 6은 특정 암 유형에 대해 하나 이상의 추가 제약 활성제와 KRAS^{G12C} 억제제의 생체내 특정 조합을 예시한다. 도면에 요약된 획득 데이터는 도면에 제시된 조합이 병용 요법의 개별 구성 제제가 단독으로 사용될 때 예상되는 것보다 향상된 항암 활성을 보임을 나타낸다. 나타나는 치료 시너지 효과의 크기는 치료되는 암의 유형과 사용된 제제에 따라 다를 수 있다.

[0561] 도 4에서, CT26-KRASG12C 동계 종양 모델에서의 AMG 510과 항-PD1 항체(클론 29F.1A12)의 병용 치료는 단일 제제 치료에 비해 생존율을 크게 향상시켰고 지속적 완치를 나타냈다. AMG 510 단일요법 또는 항-PD1 단일요법은 대조군에 비해 종양 성장을 지연시켰다. 각각의 단일요법 치료에서는 10마리 중 1마리가 완전 관해를 나타냈다. AMG 510 + 항-PD1의 병용 치료에서는 10마리 중 9마리가 완전 관해를 나타냈다. 이들은 지속적 완치로 간주되었으며, 이들 9마리는 치료가 중단된(43일차) 후 연구가 종료된 57일차까지 종양이 없는 상태를 유지했다.

[0562] **AMG 510의 강화된 결합 및 효력**

[0563] ARS-1620이 KRAS^{G12C}의 직접 억제 접근법을 검증했지만, 임상 시험에 적합한 개선된 억제제를 확인하는 것은 어려운 것으로 입증되었다. ARS-1620이 차지하는 알로스테릭 포켓의 작은 부피로 인해 추가적인 단백질-리간드 상호작용에 대해 제한된 통로를 제공하기 때문에 중요한 과제는 차선의 효력이라고 생각된다. 이는 ARS-1620과 히스티딘 95(H95) 간의 수소 결합이 두드러지게 나타나는(파선) KRAS^{G12C}/ARS-1620 공유 복합체의 X선 결정 구조(도 40a)에 의해 설명된다. 본 발명자들의 획기적 발견은, H95의 대안적 배향에 의해 생성된 표면 홈을 치환된 방향족 고리가 차지할 수 있고, 이에 의해 KRAS^{G12C}와의 상호작용이 강화되었다는 것이다. AMG 510은 향상된 효력 및 유리한 개발 특성의 수렴을 나타내기 때문에 H95 홈-결합 분자의 최적화에서 최고의 후보물질로 부상했다. 공유 AMG 510-KRAS^{G12C} 복합체의 X선 공결정 구조(도 40b)는 KRAS의 P2 포켓에서 AMG 510의 결합을 두드러지게 한다. 이소프로필-메틸피리딘 치환기는 Y96, H95, 및 Q99 사이의 홈을 차지하고, 나선 2(H95, Y96)의 백본에서 유연한 스위치 II 루프(E62, E63)의 백본까지 연장되는 25개 리간드-단백질 반데르발스 접점의 연속 네트워크에 관여한다.

[0564] 강화된 상호작용이 AMG 510의 효력에 미치는 영향을 평가하기 위해, 본 발명자들은 잔기 118에 추가의 시스테인-알라닌 치환을 갖는 재조합 GDP-결합 KRAS^{C118A} 또는 KRAS^{G12C/C118A}를 이용해 비-C12 시스테인과의 반응성을 회피하는 두 가지 분석을 사용했다. 효소적 뉴클레오티드-교환 분석에서는 c-RAF의 RAS-결합 도메인(RBD)이 KRAS의 두 버전 모두에 결합하는 것을 촉진하기 위해 SOS1-촉매 GDP/GTP 교환을 활용하였다. 40분 반응에서, AMG 510은 ARS-1620보다 약 10배 더 큰 효력(평균 IC₅₀ = 0.09 μM)을 보여주었다(도 40c). AMG 510은 KRAS^{C118A}를 그다지 억제하지 않았으며(도 40c), AMG 510의 비반응성 유사체는 이러한 분석에서 최소한의 활성을 나타냈다(도 46a). 유사 1차 조건에서 AMG 510과 GDP-KRAS^{G12C/C118A} 간의 반응 속도는 질량 분석법(MS)에 의해 측정되었다. 농도-속도 데이터의 비선형 피팅(도 40d)에 의해 최대 반응 속도 k_{inact} = 0.85 ± 0.08 s⁻¹ 및 최대 절반 속도에서의 AMG 510 농도 K_I = 8.6E-05 ± 1.4E-05 M이 설정되어, 9.8E+03 ± 1.8E+03 M⁻¹s⁻¹의 k_{inact}/K_I 비가 산출되었다. AMG 510과 KRAS^{G12C/C118A} 간의 반응 속도는 ARS-1620에 비해 크게 개선되었다. 임상에서의 시스테인-표적 키나제 억제제에 비해, AMG 510은 ARS-1620에 대해 이전에 설명된 KRAS-유도 촉매 메커니즘과 일치하는 훨씬 더 큰 k_{inact}를 특징으로 하였다. 5 mM의 글루타티온과 AMG 510의 비특이적 반응성은 비교적 느렸고(AMG 510 t_{1/2} = 196 분), 임상 공유 아크릴아미드의 범위 내에 있었다.

[0565] **종양세포 신호전달 및 성장의 억제**

- [0566] ERK1/2의 기저 인산화(p-ERK) 측정에 의해, 그리고 AMG 510에 의한 KRAS^{G12C}의 공유 접합(즉, 점유)을 검출하는 MS에 의해 AMG 510의 세포 활성을 평가하였다. 두 *KRAS p.G12C* 세포주에서, AMG 510은 2시간의 처리 후 거의 검출할 수 없는 수준까지 p-ERK를 강력하게 억제했고(IC₅₀은 각각 약 0.02 및 0.03 μM), ARS-1620보다 20배 더 강력했다(도 40e). 이러한 억제는 AMG 510에 의한 KRAS^{G12C}의 점유율과 거의 일치하였고, 두 분석 모두 약 0.2 μM 에서 거의 최대 수준에 도달했다(도 40f). AMG 510은 또한 두 세포주 모두에서 세포 생존력을 크게 손상시켰다(IC₅₀은 약 0.006 μM 및 0.009 μM , ARS-1620보다 약 40배 더 강력)(도 40g).
- [0567] 두 *KRAS p.G12C* 세포주에서의 AMG 510의 세포 속도론은 AMG 510에 의한 KRAS^{G12C} 점유율을 반영하는 p-ERK 억제 의 시간 및 농도 의존성을 이용해 결정되었다. p-ERK 억제율은 AMG 510의 농도에 따라 증가했으며, 3 μM 초과 의 농도에서 포화가 발생했다. AMG 510 및 ARS-1620에 대한 농도-속도 곡선 피팅 결과(도 40h 및 도 46b), AMG 510에 의한 KRAS^{G12C} 억제에 대한 세포 속도론적 효율이 ARS-1620보다 약 23배 더 큰 것으로 나타났다. AMG 510에 의한 ERK 인산화의 최대 억제율($8.9\text{E-}04\text{ s}^{-1}$)은 최근의 속도론 모델에서 제안된 율속 GTP-KRAS^{G12C} 가수분해 속도(EGFR 억제로부터 추정된 속도 = $4.2\text{E-}04\text{ s}^{-1}$; $t_{1/2} = 27.4$ 분)보다 약 2배 더 크다. KRAS^{G12C}에 의한 GTP 가수 분해 속도의 대체 추정치를 제공하기 위해, SHP2 억제제를 사용하여 KRAS에 대한 모든 상류 신호전달을 제거했 다. 이 실험은 $9.4\text{E-}04\text{ s}^{-1}$ 의 세포 GTP 가수분해 속도를 산출했으며($t_{1/2} = 12.2$ 분; 도. 46c), 이는 AMG 510에 대 해 관찰된 속도와 일치한다.
- [0568] KRAS^{G12C} 억제제의 신호전달 영향에 대한 광범위한 평가를 위해, 두 세포주를 4시간 및 24시간 동안 다중 용량의 AMG 510으로 처리하고, 웨스턴 블롯을 수행하여 다중 신호전달 노드를 평가하였다(도 41a). KRAS^{G12C}와 AMG 510의 공유 부가물 형성은 더 느리게 이동하는 KRAS 밴드(위쪽 화살표)의 이동도 변화에 의해 감지되었다. 두 세포 주 모두에서 이러한 이동된 종은 시간과 용량이 증가함에 따라 축적되었으며, MAPK 경로(즉, p-MEK1/2 및 p-ERK1/2)의 하류 억제와 일치했다(도 41a, 도 41b). AMG 510에 의한 KRAS 억제는 또한 활성 EGFR(p-EGFR Y1068)를 축적시켰다. AKT 인산화(p-AKT)의 억제는 한 세포주에서 분명했지만, 리보솜 단백질 S6(p-S6)의 인산화 감 소는 두 세포주 모두에서 24시간에 관찰되었다. 카스파제-3의 절단 또한 24시간에 관찰되었으며, 이는 세포자멸 의 유도를 시사한다. 보다 광범위한 시간 과정에서, 0.1 μM 의 AMG 510 처리(도 41b)는 MAPK 및 EGFR에 대해 빠 른(2시간 미만) 효과 및 지속적(24시간 초과) 효과를 유도한 반면, p-S6 및 카스파제 절단은 두 세포주 모두에 서 처리 8~16시간 후에 나타났다.
- [0569] 활성 및 선택성을 평가하기 위해, *p.G12C* 이외의 이형접합 또는 동형접합 *KRAS p.G12C* 또는 *KRAS* 돌연변이, 뿐 만 아니라 야생형(WT) *KRAS* 세포주를 보유한 22개의 세포주에서 AMG 510을 프로파일링하였다. AMG 510을 사용한 2시간의 처리는 모든 *KRAS p.G12C* 세포주에서 기저 p-ERK를 억제했으며, IC₅₀ 값은 0.010 μM 내지 0.123 μM 의 범위였다(도 41c 및 보충 표 1). AMG 510은 어떠한 비-*KRAS p.G12C* 세포주에서도 p-ERK를 억제하지 않았다(IC₅₀ > 10 μM ; 도 41c 및 보충 표 1).
- [0570] 세포 생존력 분석에서, AMG 510은 SW1573을 제외한 모든 동형접합 및 이형접합 *KRAS p.G12C* 세포주의 성장을 손 상시켰으며, IC₅₀ 값은 0.004 μM 내지 0.032 μM 의 범위였다(도 41d 및 보충 표 1). 모든 *KRAS p.G12C* 세포주 는 p-ERK에 대해 유사한 최대 억제를 나타냈지만, 세포 생존력에 대한 최대 효과는 다양했다. *p.G12C* 이외의 *KRAS* 돌연변이가 있거나 *KRAS* 이외의 유전자에 돌연변이가 있는 세포주는 AMG 510에 민감하지 않았다(IC₅₀ > 7.5 μM ; 도 41d 및 보충 표 1). *KRAS p.G12C* 세포주의 하위집단을 선택하여, 스펜로이드 형성을 유도하는 저부착 조건에서 생존력을 평가하였다. 다른 KRAS^{G12C} 억제제에 대해 보고된 바와 같이, 이러한 조건은 시험된 모든 세포 주의 AMG 510에 대한 민감성을 향상시켰으며, 효력을 최대 20배 증가시켰고 최대 억제를 2.5배 증가시켰다(도 41c, 도 46d, 및 보충 표 1). SW1573은 최소한으로 민감성을 유지했으며, 이는 동시발생 드라이버 돌연변이 *PIK3CA p.K111E* 때문일 수 있다.
- [0571] KRAS^{G12C}와 AMG 510의 공유 상호작용의 선택성을 추가로 결정하고 세포에서 다른 잠재적 '오프-타겟' 시스템-함유 단백질을 확인하기 위해, MS에 의한 시스템-프로테오믹 프로파일링을 설명된 바와 같이 수행하였다. DMSO 또는 1 μM 의 AMG 510(30배 초과 p-ERK IC₅₀)으로 세포를 4시간 동안 처리한 후, 시스템 프로테오믹이 농축되

있고, 펩티드가 확인되었다. 6451개의 고유한 시스테인-함유 펩티드 중에, KRAS^{G12C}의 Cys12 펩티드가 공유 표적 결합 기준을 충족하는 확인된 유일한 펩티드였다(도 41f).

[0572] **AMG 510은 생체내 KRAS 신호전달을 억제**

[0573] p-ERK를 측정하는 약력학적(PD) 분석으로 KRAS^{G12C} 신호전달에 미치는 AMG 510 경구 치료의 효과를 평가하였다. KRAS p.G12C를 보유한 인간 종양에서, AMG 510은 치료 2시간 후 용량 의존적 방식으로 p-ERK를 억제했다(도 42a, 도 42b). AMG 510 치료(100 mg/kg) 후 p-ERK의 억제는 대조군에 비해 69%(MIA PaCa-2 T2) 내지 83%(NCI-H358) 감소된 범위였다. CRISPR 기술을 이용해 생성된 동계 CT-26 KRAS p.G12C 세포주를 사용한 마우스 종양 모델에서 p-ERK 수준에 미치는 AMG 510의 유사한 효과가 관찰되었다(도 47a). 시간 경과 PD 분석은 단회 투여(10 mg/kg) 0.5시간 후에 AMG 510의 최대 혈장 및 종양 노출을 보여주었으며, 치료 2~4시간 후에 p-ERK의 최대 억제를 나타냈고 48시간 동안 지속적인 상당한 억제를 나타냈다(도 42c, 도 42d). 이는 KRAS^{G12C} 단백질의 비교적 긴 20~24시간의 반감기와 일치한다(도 46e).

[0574] 또한, 병행 실험에서, AMG 510에 의한 KRAS^{G12C}의 점유율은 MS에 의해 측정되었으며, 최고 용량(100 mg/kg)에서 100%에 근접하였고, p-ERK의 최대 억제와 상관 관계가 있었다(도 42e 및 도 42f). 시간 경과 연구에서, 0.5시간 후 AMG 510에 의한 부분 점유가 검출 가능했고 2시간 후 약 100% 점유가 관찰된 것으로 나타났다(도 42g).

[0575] **돌연변이-선택적 생체내 종양 억제**

[0576] 마우스에서 인간 KRAS p.G12C 및 KRAS p.G12V(SW480-1AC) 종양 이종이식편의 성장을 억제하는 능력에 대해 AMG 510을 평가하였다. AMG 510은 모든 용량 수준에서 MIA PaCa-2 T2 및 NCI-H358 종양의 성장을 상당히 억제했으며, 더 높은 용량에서 종양 퇴행이 관찰되었다(도 43a, 도 43b). 대조적으로, AMG 510 치료는 KRAS p.G12V 종양 성장에 영향을 미치지 않았다(도 47b). AMG 510의 혈장 수준은 모든 모델에서 일관되었다(데이터는 미도시). 면역 능력이 있는 마우스에서 성장한 무린 CT-26 KRAS p.G12C 종양 모델에서, AMG 510은 최고 용량에서 종양 성장 억제 및 퇴행을 유발했다(도 43c). 10마리의 마우스(100 mg/kg 그룹) 중 2마리는 29일차에 연구 종료시 검출 가능한 종양이 없었다. AMG 510은 또한 마우스에서 인간 KRAS p.G12C 돌연변이 환자 유래 이종이식편(PDX)의 성장을 상당히 억제했다(도 43d 및 도 47c).

[0577] **임상 활성의 증거**

[0578] AMG 510은 강화된 효력, 강력한 효능, 및 유리한 제약 프로파일로 인해 임상 시험에 진입할 최초 KRAS^{G12C} 억제제로서 선정되었다(Clinical trials.gov NCT03600883). 특히, 처음 두 환자 코호트에서, AMG 510 치료는 KRAS p.G12C NSCLC 환자 2명이 (RECIST 1.1에 따른) 객관적인 부분 반응을 나타냈다(도 43e 및 도 47d). 두 환자 모두 카보플라틴, 페메트렉시드, 및 니볼루맙을 포함한 여러 이전 전신 치료를 진행했으며 질병 진행이 문서화되었다. 첫 번째 환자는 6주의 AMG 510 치료 후 34%의 종양 수축을 보였다. 두 번째 반응자는 단지 2주의 AMG 510 치료 후 67%의 종양 감소를 보였다. 이들 환자는 각각 6개월 및 2개월 후에도 AMG 510 치료를 받고 있다(현재 미국 특허 가출원일 기준). 어떤 부작용도 보고되지 않았다. 이들 환자는 KRAS p.G12C 돌연변이 종양이 있는 암 환자에 대한 하나의 기준을 나타내는 돌연변이-특이적 KRAS 억제제에 처음으로 반응했다.

[0579] **조합시 향상된 효능**

[0580] 폐 선암종에서 KRAS p.G12C의 높은 유병률을 감안할 때, 폐암에 대한 표준 치료 화학요법제인 카보플라틴과 AMG 510의 병용 치료가 NCI-H358 모델에서 조사되었다. 단일 제제(AMG 510 또는 카보플라틴)로 치료한 결과 상당한 종양 성장 억제가 발생했다(도 44a). 그러나, 다양한 용량의 병용 치료로 인해 항종양 효능이 크게 향상되었다(도 44a 및 도 47e). 알고 있는 한, 이는 돌연변이-선택적 KRAS 억제제를 화학요법제와 조합하여 효능을 향상시킨 첫 번째 시연이며, 임상에서 이러한 접근법에 대한 근거를 제공한다.

[0581] BRAF 및 MEK 억제제를 조합하는 임상적으로 검증된 전략은 MAPK(및 AKT) 신호전달 경로의 다른 억제제와 AMG 510의 조합이 종양세포 사멸을 향상시키고 내성을 극복할 수 있음을 시사한다²⁶. 따라서, AMG 510과 HER 키나제, EGFR, SHP2, PI3K, AKT, 및 MEK 억제제의 매트릭스를 사용하여 여러 KRAS p.G12C 세포주에서 시험관내 병용 실험을 수행하였다(도 48). AMG 510에 의한 유도 p-EGFR이 시사하는 바와 같이, AMG 510과 여러 제제의 조합은 NCI-H358에서 상승 작용에 의한 종양세포 사멸을 일으켰다(도 44b 및 도 48). 시너지 효과는 다른 세포주에서 더 제한적이었지만, MEKi와의 조합은 여러 설정에서 시너지 효과를 보였고 스펜로이드 성장 조건에서 향상되었

다(도 44b). 단일 제제 단독과 비교할 때, MEKi와 조합된 AMG 510의 최소 유효 용량으로 상당히 향상된 생체내 항종양 활성이 또한 관찰되었다(도 44c). 종합하면, 이들 데이터는 AMG 510을 MAPK 경로의 다른 노드를 표적으로 하는 제제와 조합하여, 효능을 제한하거나 내성을 유도할 수 있는 잔류 또는 우회 신호전달을 소멸시키는 흥미로운 임상 접근법을 시사한다.

[0582] 전염증성 종양 미세환경

[0583] 면역 체크 포인트 세포 예정사 1/예정사 리간드 1(PD-1/PD-L1) 축의 차단은 특정 암 환자에 대해 임상적으로 검증되고 승인되었다. 항-PD-1 요법과 조합된 AMG 510의 활성은 CT-26 *KRAS p.G12C* 모델의 면역 적격 환경에서 평가되었다. 이 세포주는 *KRAS p.G12C* 대립형질에 영향을 받으며(도 49a, 도 49b), AMG 510에 민감했다(도 43c 및 도 47a). 앞서 나타난 바와 같이(도 43c), AMG 510은 단일 제제로서 종양 퇴행을 일으켰다(도 45a). 그러나, 시간이 지남에 따라, 10개의 종양 중 1개만 완전 퇴행된 상태로 남았다(도 45a). 항-PD-1 단일요법은 10개의 종양 중 1개만 완전 퇴행을 보이며 종양 성장을 지연시켰다. 놀랍게도, 병용 치료는 10마리 중 9마리가 완전 관해를 나타냈다(도 45a). 치료는 43일차 후에 중단되었고, 마우스는 추가 112일 동안 계속 모니터링되었다. 병용 치료로 완전 관해를 나타낸 모든 반응체는 계속해서 종양이 발견되지 않았으며, 이는 항-PD-1 항체와 AMG 510의 조합이 지속적 완치를 이끌어 냈음을 나타낸다. 대리 생존율 평가변수(종양 크기 $>800 \text{ mm}^3$)를 사용하면, 병용 치료는 단일요법에 비해 생존율을 현저하게 증가시켰다(도 45b).

[0584] 종양에서 면역세포 구성에 대한 치료의 효과를 이해하기 위해, CT-26 *KRAS p.G12C* 종양을 치료 후 면역표현형 분석하였다. 4일간의 치료 후, AMG 510은 T세포 침윤, 주로 CD8+ T세포를 현저하게 증가시켰다(도 45c 및 도 50a). 증가된 CD8+ T세포 침윤은 항-PD-1 단일요법 후에는 발생하지 않았기 때문에 주로 AMG 510에 의해 유도된 병용 그룹에서 또한 관찰되었다. 추가 비교자로서, RAS의 하류에서 MAPK 신호전달을 차단하고(도 50b) AMG 510과 유사한 CT-26 *KRAS p.G12C* 종양 성장 억제를 나타낸(도 50c, 도 50d) MEK 억제제(MEKi)는 침윤 CD8+ T세포의 수에 영향을 주지 않았다(도 45c). AMG 510 치료는 또한 대식세포 및 수지상 세포의 침윤을 증가시켰으며, 이는 MEKi에서는 관찰되지 않았다(도 45c). CD8+ T세포에서의 PD-1 발현은 AMG 510 및 MEKi 모두에 의해 적당히 증가했다(도 44a). 치료 후 전체 종양의 RNA를 정제하고, 면역 유전자 패널의 전사 프로파일을 평가하였다. 단지 2일간의 치료 후, AMG 510에 의한 $KRAS^{G12C}$ 의 억제는 증가된 인터페론 신호전달, 항원 처리, 세포독성, 및 NK 세포 활성, 뿐만 아니라 MEK 억제제에 의해 유도된 효과에 비해 훨씬 더 높은 고유 면역 자극의 마커를 특징으로 하는 전염증성 미세환경을 유도했다(도 45d 및 도 44e). AMG 510은 또한 CT-26 *KRAS p.G12C* 종양세포에서 MHC-I 단백질의 발현을 유도했다(도 45e 및 도 50f). 이러한 데이터는 종양세포에 대한 AMG 510의 치료 효과가 T세포 프라이밍 및 항원 인식을 증가시킬 수 있음을 시사했다. 이를 시험하기 위해, 병용 치료로 완치된 마우스(도 45a)에게 CT-26 *KRAS p.G12C* 및 모체 CT-26(*KRAS p.G12D*), 또는 CT-26 *KRAS p.G12C* 및 무관한 마우스 유방 종양 모델 4T1의 양측 종양을 재감염시켰다. 모든 4T1 종양(4/4)은 성장했지만, CT-26 *KRAS p.G12C* 종양 중 어떤 것도(0/8) 확인되지 않았다(도 45f). 특히, CT-26 모체 종양을 감염시킨 모든 마우스는 40일 후 종양이 없었다(도 45f). 나이브 마우스의 별도의 대조군에서, 15개의 모체 CT-26 및 CT-26 *KRAS p.G12C* 종양 중 15개(100% 선택률)가 성장했다(도 50g). 완치된 마우스에서 채취한 비장세포를 CT-26, CT-26 *KRAS p.G12C*, 또는 4T1 종양 세포로 자극하고, 분비된 IFN- γ 의 수준을 종양-특이적 T세포 프라이밍 및 활성의 마커로서 측정하였다. CT-26 *KRAS p.G12C* 세포 및 모체 CT-26 세포는 4T1 세포에 의해 유도되지 않은 IFN- γ 를 약 3배 증가시켰다(도 45g).

[0585] 고찰

[0586] $KRAS^{G12C}$ 의 H95 그루브와의 새로운 상호작용의 발견은 현저하게 증가된 효력을 가능하게 했고 환자의 임상 활성의 증거가 있는 혁신 신약 경구용 $KRAS^{G12C}$ 억제제인 AMG 510의 확인을 가능하게 했다. AMG 510은 *KRAS p.G12C* 종양을 선택적으로 표적화하고, 세포독성 및 표적 제제와 조합하여 상승 작용에 의해 종양세포를 사멸시킨다. AMG 510에 의한 종양세포 사멸은 면역 체크포인트 억제에 민감하게 반응하는 염증성 종양 미세환경을 유발했다. 항-PD-1과 MEKi의 병용 치료는 여러 보고서에서 강력한 전임상 효능을 나타냈으며, 이는 T세포 침윤의 증가와 관련이 있었다. 본 연구에서, 선택적 $KRAS^{G12C}$ 억제 후의 면역세포 침윤은 MEKi에 의해 유도된 것보다 훨씬 더 강력했다. T세포 증식 및 프라이밍을 차단하는 비-종양-선택적 MEKi의 보고된 효과와 대조적으로, AMG 510에 의한 $KRAS^{G12C}$ 의 선택적 억제는 T세포 프라이밍을 증가시켰다. 이러한 데이터는, 항-PD-1 치료와 조합된 AMG 510-유도 종양세포 사멸이 적응 면역 반응을 일으켜 비-*p.G12C* 종양이 인식되고 근절되는 향상된 항원 인식 및 T세포 기억의 모델을 뒷받침한다. 종양내 *KRAS* 돌연변이 상태는 동일한 종양 내에서, 뿐만 아니라 원발 부위와 전이 부

위 사이에서 이질적일 수 있다는 충분한 증거가 있다. 종합하면, 본 발명자들의 데이터는 KRAS^{G12C} 발현이 이질적인 환경에서도 AMG 510이 효과적인 항종양제일 수 있음을 시사한다.

[0587] **방법**

[0588] **제조합 단백질**

[0589] 제조합 His-태그 인간 KRAS^{G12C/C118A} (1-169), GST-인간 c-RAF(1-149), 및 His-태그 인간 KRAS^{C118A} (1-169)를 대장균에서 발현시키고, 친화성 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다. 제조합 His-태그 인간 SOS1(564-1049, 곤충 코돈 최적화됨)을 트리코플루시아 니(*Trichoplusia ni*)에서 발현시키고, 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제하고, His-태그를 제거한 후, 크기 배제 크로마토그래피로 추가 정제하였다. Ostrem 등¹⁵의 연구를 기반으로 한 공결정화 연구를 위해 시스테인-광 돌연변이 작제물을 사용하였다. 제조합 His-태그 인간 KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S} (1-169)를 대장균에서 발현시키고, 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 및 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 정제하고, 결정화를 위해 His-태그를 제거하였다.

[0590] **화합물 및 항체**

[0591] ARS-1620, PD-0325901, 트라메티닙, 아파티닙, 에를로티닙, RMC-4550, 및 AZD5363은 상업적 출처에서 입수하였다. AMG 511은 자체적으로 합성하였다. AMG 510 및 이의 비반응성 프로피온아미드의 합성은 본원에 설명되어 있다. 시험관내 실험에 사용된 AMG 510 및 기타 모든 억제제의 모액은 100% 디메틸 설폭사이드(DMSO) 중의 10 mM 용액으로 제조되었다. 생체내 연구의 경우, AMG 510 및 MEKi(PD-0325901)를 2% HPMC, 1% Tween 80에 제형화하여 10 mL/kg으로 매일 경구 위관 영양법을 통해 투여하였다. 10 mg/mL의 카보플라틴 모액은 1% PBS에 5 mg/mL 또는 3 mg/mL로 추가 희석하여 1주에 1회 복강내 주사(IP)로 투여하였다. 마우스 IgG1 백분을 포함하도록 래트 항-마우스 PD1 클론 29F.1A12를 키메라화하였다. 또한, 이펙터 기능을 감소시키기 위해 IgG 중쇄 영역에 Fc 수용체 침묵 돌연변이 N297G를 도입하였다. 항-PD-1 항체인 29F.1A12를 1X PBS에 500 µg/mL의 농도로 희석하여 3일에 1회 총 3회 IP 주사로 투여하였다. 항-RAS(Abcam), 항-포스포-ERK1/2(ThermoFisher Scientific), 및 항-베타-액틴-HRP(Sigma)를 제외하고, 웨스턴 블롯팅에 사용된 모든 항체는 Cell Signaling에서 구입하였다.

[0592] **세포주**

[0593] 미국 국립 암 연구소에서 입수한 KM12 및 NCI-H3122를 제외하고, 모든 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 구입하였다. 세포주는 짧은 직렬 반복(STR) 프로파일링에 의해 인증되었다. 생체내 성장 속도론을 개선하기 위해, 마우스에서 MIA PaCa-2 및 SW480 세포를 계대하여 MIA PaCa-2 T2 및 SW480-1AC 세포를 각각 생성하였다. CT-26 KRAS p.G12C 세포는 CRISPR 기술을 이용해 두 KRAS p.G12D 대립형질 모두를 p.G12C(ThermoFisher Scientific)로 대체하여 무린 CT-26 대장 세포주로부터 생성되었다. 클론 H10은 KRAS p.G12C 대립형질에 대해 동형접합성인 것으로 확인되었고, CT-26 KRAS p.G12C-H10으로 식별되며, CT-26 KRAS p.G12C로 지칭된다. 모든 세포주는 37°C, 5% CO₂의 가습 인큐베이터 내 10% 소 태아 혈청 및 1x 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민이 보충된 RPMI 1640 배지에서 배양되었다.

[0594] **X선 결정학**

[0595] pH 7.5의 20 mM HEPES, 150 mM NaCl 중의 정제된 미태그 KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S} ("KRAS")를 40 mg/mL로 농축하고, DMSO에 용해된 2배 몰과량의 고체 AMG 510 화합물에 첨가하였다. 단백질-복합체 샘플을 실온에서 16시간 동안 회전 진탕기(orbital shaker)로 처리한 후, 회전여과하였다. 시팅 드롭 증기 확산(sitting drop vapor diffusion) 방법을 사용하여 공결정화를 수행하였다. "KRAS"-AMG 510 단백질-복합체 샘플과 결정화 완충액(1 mM MgCl₂, pH 6.5의 0.1 M MES, 30% w/v 폴리에틸렌 글리콜 4000)을 혼합하였다. 20°C에서 하루 만에 평평한 막대형상 결정이 나타났다.

[0596] 결정을 액체 질소에서 동결하기 전에 동결방지제인 결정화 완충액에서 평형화시켰다. 파장 0.97741 Å 및 온도 100 K의 고급 광원 빔라인(Advanced Light Source Beamline) 5.0.1에서 Pilatus 6M 실리콘 픽셀 검출기에 데이터 세트를 수집하였다. HKL2000을 이용해 데이터를 적분하고 조정하였다. 결정은 a = 40.9 Å, b = 58.4 Å, c = 65.9 Å, α = 90°, β = 90°, γ = 90°의 단위셀 치수를 갖는 사방정계 공간군 P2₁2₁에 속한다(보충 표 2 참조). apo KRAS 구조가 검색 모델인 MolRep을 이용해 분자 대체에 의해 구조를 분석하였다. 비대칭 단위에는 하나의 단백질 분자가 있다. Refmac5를 이용해 구조를 세밀화하고 그래픽 프로그램 Coot를 이용해 모델 구축을

수행하였다. PRODRG를 사용하여 리간드를 생성하였다. GDP와 AMG 510에 결합된 KRAS^{G12C/C51S/C80L/C118S}의 구조는 18.1%의 R-인자 및 21.5%의 R_{free}로 1.65 Å까지 세밀화되었다. Ramachandran 통계는 98.2% 선호, 1.8% 허용이었고, 이상치(outlier)는 없었다. 아미노산 잔기 105 내지 107은 결정 구조에서 분석되지 않았다. 원자 좌표 및 구조 인자는 Protein Data Bank(PDB ID 코드: 아직 할당되지 않음)에 저장될 것이다.

[0597] **결합 뉴클레오티드 교환 분석**

[0598] KRAS^{G12C/C118A} 또는 KRAS^{C118A}의 SOS1-촉매 뉴클레오티드 교환의 역제는 Alpha(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay) 기술을 이용해 측정되었다. 20 nM의 GDP-결합 인간 KRAS^{G12C/C118A} 또는 KRAS^{C118A} 단백질을 2배 연속 희석된 AMG 510 또는 DMSO와 함께 반응 완충액(25 mM HEPES, pH 7.4; 10 mM MgCl₂; 0.01% 트리톤 X-100)에서 5분 동안 실온(RT) 인큐베이션하였다. 모든 후속 단계에서, DTT를 1 mM의 최종 농도로 반응 완충액에 첨가하였다. 이어서, GTP 및 SOS-1을 각각 1.25 mM 또는 500 nM의 최종 농도로 DTT-반응 완충액에 첨가하고, 30 분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 마지막으로, c-RAF RBD(최종 50 nM), 알파 글루타티온 공여체 비드(PerkinElmer; 최종 20 µg/mL), 및 AlphaLISA[®] 니켈 킬레이트 수용체 비드(PerkinElmer; 최종 20 µg/mL)를 모두 DTT-반응 완충액에 희석하여 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 5분 동안 인큐베이션한 후, AlphaScreen 프로토콜을 사용하여 EnVision[®] 멀티라벨 판독기에서 플레이트를 판독하였다. 발광 신호는 680 nm에서 180 ms 여기 후 570 nm에서 측정되었다. 신호 강도는 c-RAF RBD와 GTP-결합 KRAS^{G12C/C118A} 또는 KRAS^{C118A}의 결합과 부합했고, DMSO 대조군으로 정규화되었다.

[0599] **ERK1/2 인산화 분석**

[0600] 세포 분석을 위해, 96웰 플레이트에 웰당 2.5E+04개의 세포를 접종하고, 37°C, 5% CO₂에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날, 3배 연속 희석된 화합물 또는 DMSO를 세포에 첨가하고, 플레이트를 37°C, 5% CO₂에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 처리 후, 세포를 냉 PBS로 세척하고, 프로테아제 및 포스포타제 억제제를 함유하는 RIPA 용해 완충액(0 mM 트리스-HCl, pH 7.5; 1% Igepal; 0.5% 나트륨 데옥시콜레이트; 150 mM NaCl; 0.1% 나트륨 도데실 설페이트)에 용해시켰다. 제조업체의 프로토콜에 따라 포스포-ERK1/2 전체 세포 용해물 키트(Meso Scale Discovery)를 사용하여, 처리된 세포 용해물에서 기저 ERK1/2 인산화 수준을 측정하였다. 신호 강도는 포스포-ERK1/2 수준과 부합했고, DMSO 대조군으로 정규화되었다.

[0601] 생체내 약력학적 분석에서 얻은 종양세포 용해물의 경우, 제조업체의 프로토콜에 따라 포스포-ERK1/2 및 총 ERK1/2 전체 세포 용해물 키트(Meso Scale Discovery)를 사용하여 샘플당 50 µg의 총 단백질을 분석하였다. 포스포-ERK1/2 신호는 주어진 샘플에 대해 총 ERK1/2 신호로 정규화되었고, ERK 인산화의 억제 %는 비히클 그룹에 대해 계산되었다.

[0602] **세포 생존력 분석**

[0603] 부착성 생존력 분석을 위해, 384웰 플레이트에 웰당 0.5~1.0E+03개의 세포(또는 96웰 플레이트에 웰당 2.5~4.0E+04개의 세포)를 접종하고, 37°C, 5% CO₂에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날, 연속 희석된 화합물 또는 DMSO를 세포에 첨가하고, 플레이트를 37°C, 5% CO₂에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 CellTiter-Glo[®] 발광 세포 생존력 분석 키트(Promega)를 사용하여 세포 생존력을 측정하였다. 처리된 샘플의 발광 신호는 DMSO 대조군으로 정규화되었다.

[0604] 스페로이드 생존력 분석을 위해, 96웰 스페로이드 마이크로플레이트(Corning)에 웰당 2.5~4.0E+04개의 세포를 접종하고, 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 제조업체의 프로토콜에 따라 CellTiter-Glo[®] 3D 세포 생존력 분석 키트(Promega)를 사용하여 세포 생존력을 측정한 것을 제외하고, 전술한 것과 동일한 절차를 따랐다.

[0605] **상승적 병용 연구**

[0606] AMG 510과 다른 억제제의 상승적 상호작용을 시험관 내에서 평가하기 위한 병용 실험은 이전에 설명된 바와 같이 수행하였다(Saiki, A. Y. *et al.* MDM2 antagonists synergize broadly and robustly with compounds targeting fundamental oncogenic signaling pathways. *Oncotarget* 5, 2030-2043,

doi:10.18632/oncotarget.1918 (2014)).

[0607] **속도론적 분석**

[0608] 공유 억제제-KRAS^{G12C} 부가물의 형성은 이전에 설명된 바와 같이⁴⁴ 측정하였다. 다양한 인큐베이션 시간에서의 다양한 억제제 농도에 대한 상대적 % 결합 값을 지수 방정식으로 피팅하여 Prism(GraphPad Software)을 이용해 시험된 각각의 농도에 대한 k_{obs} 값을 생성하였다. 이어서, 생성된 k_{obs} 값을 억제제 농도에 대해 다시 플롯팅하여 k_{inact} 및 K_i 값을 생성하였다.

[0609] 세포에서의 공유 억제제-KRAS^{G12C} 부가물 형성의 속도론 값을 구하기 위해, 정확히 전술한 바와 같이 다양한 인큐베이션 시간에서 다양한 억제제 농도로 처리한 후 기저 ERK1/2 인산화 수준을 측정하고, 활성 % 값을 속도론적 계산에 사용하였다.

[0610] **시스템인 프로테옴 분석**

[0611] 인간 비소세포 폐암 NCI-H358 세포를 2.0E+06개 세포/10 cm 플레이트로 접종하고, 37°C, 5% CO₂에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날, 세포를 1 μ M의 AMG 510 또는 DMSO로 처리하고($n=5$), 37°C, 5% CO₂에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 처리 후, 프로테아제 억제제를 함유하는 빙냉 PBS로 세포를 세척하고 나서 플레이트에서 꺼냈다. 즉시-동결된 세포 펠렛을 Patricelli 등에 의해 설명된 프로토콜에 따라 질량 분석법(MS)에 의해 IQ Proteomics, LLC에서 처리하였다. 간단히 설명하면, 세포 펠렛을 용해시키고, 100 μ M의 데스티오비오틴 요오도아세트아미드 처리하여, 남은 미반응 용매 노출 시스템인을 표지하였다. 트립신 분해 후, 각각의 샘플에서 생성된 펩티드 혼합물을 TMT-10 plex(Tandem Mass Tag) 동중핵 표지 시약(ThermoFisher Scientific)으로 표지하였다. 표지 후, 고용량 스트렙타비딘 아가로스를 사용하여 데스티오비오틴화 펩티드를 농축하기 전에 샘플을 혼합하였다. 농축된 펩티드를 Orbitrap Lumos 질량 분석기(ThermoFisher Scientific)에서 3시간 구배 및 동기식 전구체 선택(PS) 기반 MS3 방법을 사용하여 나노-LC-MS로 분석하였다. 데스티오비오틴화 펩티드의 식별은 SEQUEST를 활용하는 하버드 의대의 Gygi 랩에서 개발한 맞춤형 정보학 파이프라인을 통해 데이터베이스를 검색하여 얻었다. 모든 스펙트럼을 돌연변이 KRAS^{G12C} 단백질 서열 및 공통 오염물이 추가된 Human Uniprot(2018) 단백질 서열 데이터베이스에 대해 검색하였다. 펩티드와 단백질을 1% FDR(false discovery rate)까지 여과하고, 최소 신호 대 잡음비 200 및 단리 순도 50% 초과하는 기준을 충족하는 펩티드만 정량 분석에 사용했다. 통계 분석을 위한 모든 데이터 처리는 시스템인-함유 펩티드의 정규화된 피크 존재비를 사용하여 마이크로소프트 엑셀에서 수행하였다. DMSO 대조군과 AMG 510-처리 샘플 그룹 간에 Log₂-배수 변화를 계산하였다. 동일한 분산을 가정하여 처리 샘플 그룹과 DMSO 대조군 샘플 그룹 간 차이의 통계적 유의성을 평가하기 위해 각 펩티드에 대한 양측 t 검정(two-tailed t test)을 수행하였다. 각각의 데스티오비오틴화 시스템인-함유 펩티드에 대한 log₂-배수 변화에 대해, 음의 log₁₀ p-값을 보여주는 볼케이노 플롯을 플롯팅하였다. 존재비의 log₂-배수 감소가 2보다 크고 p-값이 0.0001 미만인 펩티드를 AMG 510의 공유 표적으로 지정하였다($n = 5$ 개의 생물학적 복제).

[0612] **동물 연구**

[0613] 모든 동물 실험 절차는 Amgen 동물 관리 및 사용 위원회 및 실험실 동물 관리 평가 및 인증 협회 표준의 지침에 따라 수행하였다. 모든 연구에서는 4-7주령 암컷 무흉선 누드 또는 암컷 Balb/c 마우스(Charles River Laboratories)를 사용했다. 무흉선 누드 마우스는 멸균 하우징의 필터-캡 케이지당 5마리를 수용하고, Balb/c 마우스는 12시간의 명암 주기로 환경이 제어된 방(온도 23 $\pm$ 2°C, 상대 습도 50 $\pm$ 20%)의 비멸균 하우징에서 필터-캡 케이지당 5마리를 수용했다. 마우스에게는 상용 설치류 사료를 공급했다.

[0614] **유전자 발현 분석**

[0615] 2일 동안 비히클 경구, AMG 510 경구(100 mg/kg QD) 또는 MEKi 경구(PD-0325901, 10 mg/kg QD)로 처리된 CT-26 KRAS p.G12C 종양($n=5$ /그룹)의 총 RNA를 RNeasy 미니 키트(QIAGEN)로 정제하였다. DropSense 96(PerkinElmer Inc)으로 RNA를 정량화하였다. 750개의 표적 유전자, 20개의 하우스키핑 유전자, 8개의 내부 음성 대조군, 및 6개의 내부 양성 대조군을 포함하는 마우스 범암 면역 프로파일링 패널이 있는 nCounter™(NanoString Technologies)에서 300 ng의 RNA를 실행하였다. 미가공 데이터는 nSolver 소프트웨어(NanoString Technologies)에 의해 품질 관리되고, 정규화되고, 분석되었다. 미가공 데이터를 log₂ 변환하고, 통계 분석을 수행하였다. 경로 점수(인터페론 점수, 항원 처리 점수, MHC 점수, TLR 점수, 및 T세포 기능 점수) 및 세포 프

로파일링 점수(NK 세포 점수, 세포독성 세포 점수, 및 CD45 점수)는 nSolver Advanced Analysis(NanoString Technologies)에 의해 생성되었다.

[0616] 각 점수에 포함된 유전자의 세부 목록, 및 경로 점수와 세포 프로파일링 점수를 계산하는 데 사용된 p 값은 보충 표 3A, 표 3B, 표 3C, 표 3D, 및 표 3E를 참조.

[0617] 종양 약력학적 분석

[0618] MIA PaCa-2 T2, NCI-H358, 및 CT-26 *KRAS p.G12C* 종양이 있는 마우스에서 ERK1/2 인산화에 미치는 AMG 510의 영향을 평가하였다. MIA PaCa-2 T2 또는 NCI-H358 종양세포(5.0E+06개 세포)를 2:1 비의 세포 대 Matrigel(BD Bioscience, San Jose, CA)로 압착 무흉선 누드 마우스의 옆구리에 피하 주사하였다. 평균 종양 크기가 약 300~600 mm³에 도달했을 때 비히클 또는 AMG 50(0.3, 1, 3, 10, 30, 및 100 mg/kg)의 단회 경구 용량을 마우스에게 투여하고($n=3$ /그룹) 2시간 후 채취하였다. 시간 경과 연구에는 AMG 510(10 mg/kg)의 단회 경구 용량을 사용하였다. 암컷 Balb/c 마우스에게 CT-26 *KRAS p.G12C* 종양세포(3.0E+05개 세포)를 피하 주사하였다. 평균 종양 부피가 486 mm³일 때 마우스를 그룹에 무작위 배정하고($n=3$ /그룹), 비히클 또는 AMG 510(3, 10, 30, 또는 100 mg/kg), 또는 MEKi(PD-0325901, 10 mg/kg)의 단회 경구 용량을 투여하고, 2시간 후 채취하였다. 모든 연구에서, 혈장 및 종양을 분석하여 시험 검체 농도를 구하였다. 또한, 종양 샘플을 지정된 시간에 수집하고, 액체 질소에서 즉시 동결하고, 생물학적 분석을 위해 처리하거나 cryoPREP[®] Dry Impactor(Covaris)를 사용하여 분쇄하였다. 분쇄된 샘플을 프로테아제 및 포스파타제 억제제를 함유하는 RIPA 용해 완충액에 재현탁하고 균질화하였다. 이어서, 제거된 용해물을 전술한 바와 같이 ERK1/2 인산화 수준에 대해 분석하고, MS로 KRAS^{G12C}의 공유 변형에 대해 분석하였다.

[0619] 이종이식 및 동계 연구

[0620] MIA PaCa-2 T2, NCI-H358, 또는 SW480-1AC 세포(Matrigel과의 비가 2:1인 5.0E+06개 세포)를 암컷 무흉선 누드 마우스의 옆구리에 피하 주사하였다($n=10$ /그룹). 종양이 약 170 mm³이 되었을 때(MIA PaCa-2 T2 및 NCI-H358 연구) 또는 약 200 mm³이 되었을 때(SW480-1AC 모델) 치료를 시작하였다. 용량 반응 연구에서는, 마우스에게 비히클 경구(QD) 또는 AMG 510 경구(3, 10, 30, 및 100 mg/kg QD)로 투여하였다. AMG 510 및 카보플라틴을 사용한 NCI-H358 병용 연구에서는, 마우스를 8개 그룹으로 무작위 배정하고($n=10$ /그룹), 비히클 경구(QD) + PBS 복강내(1x/주); AMG 510 경구(10 또는 30 mg/kg QD) + PBS 복강내(1x/주); 비히클 경구(QD) + 카보플라틴(50 또는 100 mg/kg) 복강내(1x/주); AMG 510 경구(10 또는 30 mg/kg QD) + 카보플라틴(50 또는 100 mg/kg) 복강내(1x/주)로 투여하였다. AMG 510 및 MEKi를 사용한 병용 연구에서는, 마우스를 4개 그룹으로 무작위 배정하고($n=10$ /그룹), 비히클 경구(QD); AMG 510 경구(10 mg/kg QD); MEKi 경구(1 mg/kg QD); AMG 510 경구(10 mg/kg QD) + MEKi 경구(1 mg/kg QD)로 투여하였다. 동계 연구의 경우, CT-26 *KRAS p.G12C* 세포(3.0E+05개 세포)를 암컷 Balb/c 마우스의 옆구리에 피하 주사하였다. 종양이 약 170 mm³이 되었을 때(용량 반응 연구) 및 약 130mm³이 되었을 때(병용 연구) 치료를 시작하였다($n=8$ /그룹인 MEKi 용량 반응 연구를 제외하고 $n=10$ /그룹). 용량 반응 연구에서는, 마우스에게 비히클 경구(QD), AMG 510 경구(3, 10, 30, 및 100 mg/kg QD) 또는 MEKi(PD-0325901) 경구(1, 3, 또는 10 mg/kg QD)로 투여하였다. 병용 연구에서는, 마우스를 4개 그룹으로 무작위 배정하고($n=10$ /그룹), 15일차부터 43일차까지 비히클 경구(QD) + PBS 복강내(Q3Dx3); AMG 510 경구(100 mg/kg QD) + PBS 복강내(Q3Dx3); 비히클 경구(QD) + 항-PD-1 항체(29F.1A12; 100 µg/용량, Q3Dx3) 복강내; AMG 510 경구(100 mg/kg QD) + 항-PD-1 항체(29F.1A12; 100 µg/용량, Q3Dx3) 복강내로 투여하였다. 병용 치료 연구는 맹검 방식으로 수행되었다. Pro-Max 전자 디지털 캘리퍼(Japan Micrometer Mfg. Co. LTD)를 사용하여 매주 2회 종양 치수를 평가하고, 길이 x 너비 x 높이의 공식을 사용하여 종양 부피를 계산하고 mm³으로 표시하였다. *KRAS p.G12C* 폐 PDX 모델에서는, 마우스에게 약 70 mg 크기의 종양 덩어리를 피하 이식하였다. 종양 부피가 약 160~200 mm³일 때 마우스를 무작위 배정하고, 무작위 배정 다음 날 비히클 경구(QD) 또는 AMG 510 경구(100 mg/kg QD)로 투여하였다. 너비² x 길이 x 0.52의 공식을 사용하여 종양 치수를 주 2회 수집하고 mm³으로 표시하였다. 데이터는 평균 ± SEM으로 표시된다.

[0621] AMG 510-KRAS^{G12C} 접합체 검출

[0622] 항-인간 RAS(항-RAS) 항체를 Abcam에서 구입하고, 공급 업체가 설명하는 프로토콜을 사용하여 EZ-Link NHS-

PEG4-Biotin(ThermoFisher Scientific)으로 비오틴화하였다. 잔류 비오틴을 제거하고, 생성된 비오틴-항-RAS를 실온에서 진탕하면서 1시간 동안 Dynabeads[®] MyOne[™] 스트렙타비딘 C1 비드(ThermoFisher Scientific)에 1:1의 비로 로딩하였다. 시험관내-처리 세포 또는 전술한 생체내-처리 종양세포의 용해물을 실온에서 진탕하면서 3시간 동안 비오틴화 항-RAS 비드와 함께 인큐베이션하였다. 자석을 사용하여, 비드를 PBST(3x), PBS(1x), 및 물(1x)로 순차 세척하였다. 2% 수성 포름산/10% 수성 아세트니트릴을 사용하여 비드로부터 샘플을 용리한 후, 10분 동안 진탕하면서 실온에서 인큐베이션하였다. 상청액을 96웰 플레이트에 옮기고 건조시켰다. 샘플을 변성 완충액(10 mM TCEP, 8 M 우레아)에 재현탁하고, 15분 동안 진탕하면서 65℃에서 인큐베이션하였다. 요오도아세트아미드(40 mM)를 첨가하고, 빛으로부터 보호하면서 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 50 mM의 NH₄HCO₃ 및 트립신(0.01 µg/µL)을 첨가하고, 샘플을 약 16~20시간 동안 37℃에서 밤새 분해한 후, 마지막으로 포름산으로 켄칭하여 1%(v:v)의 최종 농도를 얻었다. 이어서, Acquity UPLC(Waters)에 연결된 6500 QTRAP(AB SCIEX)을 사용하여 양이온 전기분무 모드에서 다중 반응 모니터링(MRM)에 의해 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분석법(LC-MS/MS)으로 샘플을 분석하였다. 샘플을 Acquity UPLC BEH C8 1.7 µm, 2.1 x 100 mm 컬럼(Waters)에 주입하였다. 이동상은 이동상 A(물 + 0.1% 포름산) 및 이동상(아세트니트릴 + 0.1% 포름산)으로 구성되었다. LC 구배는 5분 내 5~50% B, 0.5분 내 50~95% B, 및 1분 내 95% B였다. 다음의 펩티드 KRAS^{G12C} LVVVGAC(CAM)GVGK(529.8 → 846.3) 및 AMG 510 변형-KRAS^{G12C} AMG 510-LVVVGAC(CAM)GVGK(521.4 → 675.2)를 모니터링하였다. 점유율은 비변형 및 변형 KRAS^{G12C} 펩티드의 합으로 정규화된 AMG 510 변형-KRAS^{G12C} 펩티드의 백분율로서 계산되었다.

[0623] 유세포 분석

[0624] MHC 클래스 I 항원 발현에 미치는 AMG 510의 영향에 대한 시험관내 분석을 위해, CT-26 *KRAS p.G12C* 세포(5.0E+04개 세포/웰)를 96웰 플레이트에 접종하고, 25 또는 250 pg/mL의 최종 농도에서 IFN γ 의 존재 또는 부재 하에 AMG 510의 3배 연속 희석액으로 처리하였다. 플레이트를 37℃, 5% CO₂에서 24시간 동안 인큐베이션하였다. 세포를 웰에서 비효소적으로 분리하고, 염색 완충액(PBS/0.5% BSA)으로 세척한 후, 얼음에서 30분 동안 PE-접합 H-2D^d, H-2K^d, 또는 H-2L^d 항체(BioLegend)와 함께 인큐베이션하였다. 세척 후, 세포를 SYTOX Blue Dead Cell Stain(Life Technologies)이 함유된 염색 완충액에 재현탁한 이후 유세포 분석으로 분석하였다. 데이터 수집 및 분석은 BD FACSDiva 소프트웨어를 사용하여 BD LSRFortessa 유세포 분석기에서 수행하였다.

[0625] 생체내 연구의 경우, CT-26 *KRAS p.G12C* 세포를 약 6주령의 Balb/c 암컷 마우스에 이식하였다. 이식 후 22일차에, 비히클 경구(QD) + PBS 복강내(Q3Dx2); AMG 510 경구(100 mg/kg QD) + PBS 복강내(Q3Dx2); 비히클 경구(QD) + 항-PD-1 항체(29F.1A12; 100 µg/dose, Q3Dx2) 복강내; AMG 510 경구(100 mg/kg QD) + 항-PD-1 항체(29F.1A12; 100 µg/dose, Q3Dx2) 복강내; 또는 MEKi 경구(10 mg/kg, QD) + PBS 복강내(Q3Dx2)로 4일 동안 투여되는 $n=8$ /그룹의 5개 그룹으로 이루어진 4일 투여 코호트에 마우스를 무작위 배정하였다. 4일간의 투여 후, 종양을 채취하고, 주변 근육에서 절개하고, 무게를 재고, 기계적으로 갈아, 리버라제 TL(0.2 mg/ml, Roche) 및 DNase I(20 µg/ml, Ambion)에 넣었다. 이어서, 종양 용액을 저속 MACS 해리기(Miltenyi Biotech)를 사용하여 기계적으로 균질화하고, 37℃에서 15분 동안 MACSmix Tube Rotator(Miltenyi Biotech)에 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 0.02% EDTA(Sigma) 및 열-비활성화 FBS(ThermoFisher Scientific)로 처리하고, 70 µm 필터를 통과시켜 덩어리를 제거했다. 이어서, 세포를 원심분리하고, 상청액을 버린 후, 세포 펠렛을 30분 동안 LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain(ThermoFisher Scientific)에 재현탁했다. 이어서, 세포내 염색을 위해 세포의 고정 및 막투과(Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set, eBiosciences) 전에 표시 항체(보충표 4)로 세포 표면 염색을 수행하였다. CountBright[™] 절대 계수 비드(ThermoFisher Scientific)를 각 샘플 웰에 첨가하여 LSR II 유세포 분석기(BD Biosciences)에서 분석하기 전에 세포 계수가 가능하도록 하였다. 모든 분석은 FlowJo 소프트웨어 v10(FlowJo)으로 수행되었다. 절대 세포 계수는 기록된 비드를 분석된 종양 부분표본의 부피 및 종양의 질량으로 나눈 값으로 세포 수를 정규화하여 결정되었다.

[0626] ELISpot(Enzyme-linked immunoSpot) 분석

[0627] 항원-특이적 T세포 반응은 IFN- γ ELISpot 분석(Cellular Technology Ltd.)을 사용하여 평가되었다. 비장세포를 채취하여($n=4-5$ /그룹) 전세포 ELISpot 분석에 사용하였다. 간단히 설명하면, 2.5E+05개의 비장세포를 2.5E+04개의 CT-26, CT-26 *KRAS p.G12C*, 또는 4T1 종양세포와 혼합하고, 37℃에서 20시간 동안 인큐베이션하였다. CTLA6 Fluorospot 분석기(Cellular Technology Ltd.)를 사용하여 스팟을 계수하였다.

[0628] 통계 분석

- [0629] 약리학 실험은 일원 분산분석에 이어 Dunnett 사후 검정에 의해 분석되었다. 효능 연구의 경우, 분산의 반복 측정 및 분석(RMANOVA)을 수행한 후, GraphPad Prism 7.04를 사용하여 Dunnett 사후 검정을 수행하였다. 퇴행 분석은 대응표본 t-검정에 의해 수행되었다. 생존율에 대한 통계 분석은 GraphPad Prism 7.04를 사용하여 곡선들을 비교하기 위해 Mantel-Cox log-순위가 포함된 Kaplan-Meier 추정기에 의해 결정되었다. 유세포 분석 데이터는 이원 분산분석 다중 비교에 이어 Turkey 사후 검정에 의해 분석되었다. NanoString 데이터는 일원 분산분석 다중 비교에 이어 Turkey 사후 검정에 의해 분석되었다. ELISpot 데이터 비교는 GraphPad Prism을 사용하여 독립표본 t-검정에 의해 수행되었다.
- [0630] **AMG 510에 대한 LC-MS/MS 생물분석 방법**
- [0631] TissueLyzer(Qiagen)에서 텅스텐 카바이드 비드를 사용하여 조직에 물을 첨가하여(4:1 mL:g) 종양 조직 호모지네이트를 제조하였다. 20 μ L의 샘플(혈장 또는 종양 조직 호모지네이트)에 IS(200 ng/mL 톨부타미드)를 함유하는 100 μ L의 아세토니트릴을 첨가하고, 샘플을 10분 동안 볼텍싱하고, 3500 g로 10분 동안 원심분리하고, 90 μ L의 상청액을 수집하였다. 수집된 상청액에 100 μ L의 물(0.1% 포름산 함유)을 첨가하고, 생성된 용액 5 μ L를 LC-MS/MS 시스템에 주입하였다. H₂O 중의 0.1% 포름산(이동상 A)과 아세토니트릴 중의 0.1% 포름산(이동상 B)을 사용하여 50°C에 유지되는 Phenomenex Kinetex(C18 50 x 2.1 mm, 2.7 μ m)를 이용해 크로마토그래피 분리를 수행하였다. 크로마토그래피 구배는 다음과 같이 실행되었다: 10% 이동상 B로 0분에서 0.1분까지 등용매, 0.1분에서 0.85분까지 95% 이동상 B로 선형 증가, 95% 이동상 B로 0.85분에서 1.10분까지 등용매 유지, 1.10분에서 1.11분까지 10% 이동상 B로 선형 감소, 10% 이동상 B로 1.11분에서 1.40분까지 등용매 유지. 일반적으로 API 4000 질량 분석기가 분석에 사용되었고, 561.179 > 134.100 AMG 510) 및 271.100 > 134.100(톨부타미드)의 MS/MS 전이 후 포지티브 모드 ESI에서 실행되었다. 피크 면적은 Analyst®(Sciex)를 사용하여 적분되었다. 피크 면적 적분 후, 데이터를 Watson LIMS™(ThermoFisher Scientific)에 내보내고, 혈장 보정 표준의 명목 농도 대 피크 면적비(AMG 510의 피크 면적/IS의 피크 면적)의 가중($1/x^2$) 선형 회귀에 의해 농도를 구하였다. 혈장에서 AMG 510에 대한 보정 범위는 1.0 내지 10,000 ng/mL였다(LLOQ 1.0 ng/mL). 종양 조직 호모지네이트에서 AMG 510에 대한 보정 범위는 5.0 내지 50,000 ng/mL였다(LLOQ 5.0 ng/mL).
- [0632] **세포 배양에서 아미노산에 의한 안정적인 동위원소 표지(SILAC)**
- [0633] 100 mL의 투석 FBS, 10.4 g의 분말 RPMI-1640 배지, 2 g의 중탄산나트륨, 200 mg의 L-아르기닌, 48 mg의 L-리신, 100 mg의 L-류신, 및 1x Pen-Strep 성분을 1 L의 최종 부피로 첨가하여 경질 배지(LM)를 제조하고, 이를 0.22 μ m 필터 시스템으로 여과하였다. 중질 배지(HM)는 LM과 동일하게 제조되었지만, 동위원소 비농축 L-류신을 100 mg [¹³C₆]-L-류신(Cambridge Isotope Laboratories)으로 대체하였다. LM이 있는 T75 플라스크에 MIA PaCa-2 및 NCI-H358 세포(3E+05개 세포)를 접종하였다(LM은 매일 변경됨). 48시간 후, 세포를 1x PBS로 세척하고, 배지를 HM으로 전환하였다(HM은 4일 동안 매일 변경됨). 6일차에, 세포를 1x PBS로 세척하고, 배지를 LM으로 전환하였다(LM은 매일 변경됨). 6일차부터, MIA PaCa-2 샘플을 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 30, 36, 48, 및 72시간에 수집하였다. 6일차부터, NCI-H358 샘플을 0, 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72, 및 96시간에 수집하였다. 삼중으로 준비된 개별 T75 플라스크를 각 시점에 수집하고 용해물로 처리하였다.
- [0634] **SILAC 샘플 수집 및 용해 단백질 제조**
- [0635] T75 플라스크를 1x PBS로 세척하고, 트립신으로 처리하고 2분 동안 인큐베이션한 후, 10%의 투석 FBS가 함유된 빙냉 PBS를 첨가하였다. 세포를 잘 혼합하고 수집한 후, Vi-CELL XR을 사용하여 세포를 계수하였다. 나머지 세포를 원심분리하고, 빙냉 PBS(Mg⁺² 없음, Ca⁺² 없음)로 세척하였다. 세포를 다시 원심분리하고, PBS를 제거하고, 포스파타제(PhosSTOP, Roche) 및 프로테아제(cOmplete EDTA-free, Roche) 억제제가 함유된 소량의 빙냉 RIPA에 세포를 용해시켰다. 생성된 용해물을 볼텍싱하고, 10분 동안 얼음 위에 놓고, 원심분리하여 불용성 파편을 제거한 후, 추가 처리 전까지 -80°C에 보관하였다.
- [0636] **SILAC KRAS^{G12C} 표적 반감기 측정**
- [0637] 항-인간 RAS(항-RAS) 항체를 Abcam에서 구입하고, 공급 업체가 설명하는 프로토콜을 사용하여 EZ-Link NHS-PEG4-Biotin(ThermoFisher Scientific)으로 비오틴화하였다. 잔류 비오틴을 제거하고, 생성된 비오틴-항-RAS를 실온에서 진탕하면서 1.5시간 동안 Dynabeads® MyOne™ 스트렙타비딘 C1 비드(ThermoFisher Scientific)에 로딩하였다. (상기) 세포 용해물을 실온에서 진탕하면서 2시간 동안 비오틴화 항-RAS 비드와 함께

인큐베이션하였다. 자석을 사용하여, 비드를 PBST(3x)에 이어 PBS(1x)로 세척하였다. 3% 수성 포름산/30% 수성 ACN을 사용하여 비드로부터 샘플을 용리한 후, 10분 동안 진탕하면서 실온에서 인큐베이션하였다. 상청액을 96 웰 플레이트에 옮기고 건조시켰다. 샘플을 변성 완충액(10 mM TCEP, 8 M 우레아)에 재현탁하고, 수조를 사용하여 1시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 요오도아세트아미드(40 mM)를 첨가하고, 빛으로부터 보호하면서 25℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 50 mM의 NH_4HCO_3 및 트립신(0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)을 첨가하고, 샘플을 24시간 동안 37℃에서 분해한 후, 포름산으로 퀀칭하여 1%(v:v)의 최종 농도를 얻었다. 질량 분석법으로 분석하기 전에 샘플을 약 80 μL 로 농축하였다. Acquity UPLC(Waters)에 연결된 6500 QTRAP(AB SCIEX)을 사용하여 양이온 전기분무 모드에서 다중 반응 모니터링(MRM)에 의해 액체 크로마토그래피-탠덤 질량 분석법(LC-MS/MS)으로 샘플을 분석하였다. 샘플을 Acquity UPLC BEH C8 1.7 μm , 2.1 x 100 mm 컬럼(Waters)에 주입하였다. 이동상은 이동상 A(물 + 0.1% 포름산) 및 이동상 B(아세트오닐트릴 + 0.1% 포름산)으로 구성되었다. LC 구배는 5분 내 5~50% B, 0.5분 내 50~95% B, 및 1분 내 95% B였다. KRAS^{G12C}(LVVVVGAC(CAM)GVGK(529.8 → 846.3) & 13C-LVVVGAC(CAM)GVGK(532.8 → 846.3)), 및 RAS WT(LVVVGAGGVGK(478.3 → 743.2) & 13C-LVVVGAGGVGK(481.3 → 743.2))에 대한 다음 펩티드를 사용하여 무거운 표지에서 가벼운 표지로의 전이를 모니터링하였다. 상대적 동위원소 존재비(RIA)는 하기 식을 사용하여 구하였다:

$$\text{RIA} = \frac{A_{\text{heavy}}}{A_{\text{light}} + A_{\text{heavy}}}$$

KRAS^{G12C} 반감기의 SILAC 측정

단백질 반감기의 측정에 미치는 세포 성장의 영향을 고려하기 위해, 각 시점과 관련된 세포 수 및 RIA 데이터를 일련의 방정식에 동시에 피팅하여 MIA PaCa-2 및 NCI-H358 세포에서의 KRAS^{G12C}의 반감기를 구하였다. 하기 방정식들을 사용하였다:

무거운 펩티드에 대한 1차 방정식:

$$\frac{d \text{Hv}}{dt} = -k_{\text{dec}} \text{Hv}$$

가벼운 펩티드에 대한 1차 방정식:

$$\frac{d \text{lt}}{dt} = k_{\text{dec}} (\text{Hv}_0 + \text{lt}_0) - k_{\text{dec}} \text{lt} + \frac{\text{cell}_{\text{new}}}{\text{cell}_{(0)}} (\text{Hv}_0 + \text{lt}_0) k_{\text{dec}} - k_{\text{dec}} \frac{\text{cell}_{\text{new}}}{\text{cell}_{(0)}} \text{lt}$$

셀 성장에 대한 1차 방정식:

$$\frac{d \text{cell}_{\text{new}}}{dt} = -k_{\text{dil}} (\text{cell}_{(0)} + \text{cell}_{\text{new}})$$

추가 방정식:

$$k_{\text{syn}} = k_{\text{dec}} (\text{Hv}_0 + \text{lt}_0)$$

$$\text{반감기} = \frac{0.693}{k_{\text{dec}}}$$

시간 0은 HM이 LM으로 변경된 시간으로 정의되고, Hv는 무거운 펩티드의 농도이고, lt는 가벼운 펩티드의 농도이고, cell_{new}는 새로운 세포의 수이고, k_{dec}는 분해에 대한 1차 속도 상수이고, k_{syn}는 합성에 대한 0차 속도 상수이고, k_{dil}는 1차 세포 성장 상수이고, cell₍₀₎은 시간 0에서의 세포 수이고, Hv₍₀₎은 시간 0에서의 무거운 펩티드의 농도이고, lt₍₀₎은 시간 0에서의 가벼운 펩티드의 농도이다. 단계별 접근법이 모델링에 사용되었으며, 첫 번째 단계에서 k_{dil}는 세포 수로부터 추정되고, 두 번째 단계에서 k_{dec}는 상기 방정식들을 사용하여 추정된다.

[0651] k_{dil} 는 LM으로 변경 후 세포 수를 정량화하고 하기 방정식을 적용하여 추정되었다: $A = A_0 e^{-k_{dil} t}$, 식 중 A 및 A_0 는 각각 시간 t 및 0에서의 세포 수를 나타낸다.

[0652] 보충 표 1. 세포 분석 데이터

돌연변이	세포주	기원의 조직	기저 p-ERK1/2 IC ₅₀ (μM)	세포 생존력 IC ₅₀ (μM)	스페로이드 세포 생존력 IC ₅₀ (μM)
KRAS p.G12C 동형접합	MIA PaCa-2	췌장	0.036 ± 0.002	0.005 ± 0.001	0.001 ± 0.001
	NCI-H1373	폐	0.010 ± 0.0001	0.020 ± 0.006	0.005 ± 0.002
	NCI-H2030	폐	0.040 ± 0.020	0.006 ± 0.003	ND
	NCI-H2122	폐	0.123 ± 0.006	0.032 ± 0.005	0.009 ± 0.002
	SW1463	결장	0.033 ± 0.004	0.015 ± 0.007	ND
	SW1573	폐	0.027 ± 0.001	> 7.5	>10
	UM-UC-3	방광	0.029 ± 0.016	0.005 ± 0.001	ND
KRAS p.G12C 이형접합	Calu-1	폐	0.013 ± 0.004	0.004 ± 0.001	ND
	NCI-H1792	폐	0.045 ± 0.023	0.011 ± 0.008	ND
	NCI-H23	폐	0.090 ± 0.017	0.006 ± 0.001	ND
	NCI-H358	폐	0.035 ± 0.003	0.004 ± 0.001	0.003 ± 0.002
	SW837	결장	0.018 ± 0.002	0.009 ± 0.006	ND
KRAS p.G12D 동형접합	AsPC-1	췌장	> 10	> 7.5	ND
KRAS p.G12D 이형접합	A-427	폐	> 10	> 7.5	ND
	LS 174T	결장	> 10	> 7.5	ND
KRAS p.G12V 동형접합	SW480	결장	> 10	> 7.5	ND

[0653]

돌연변이	세포주	기원의 조직	기저 p-ERK1/2 IC ₅₀ (μM)	세포 생존력 IC ₅₀ (μM)	스페로이드 세포 생존력 IC ₅₀ (μM)
<i>KRAS</i> p.G12S 동형결합	A549	폐	> 10	> 7.5	ND
<i>KRAS</i> p.G13C 이형결합	NCI-H1355	폐	> 10	> 7.5	ND
<i>KRAS</i> WT <i>EGFR</i> p.E746_A750del	HCC-827	폐	> 10	> 7.5	ND
<i>KRAS</i> WT <i>EML4-ALK</i> 융합	NCI-H1322	폐	> 10	> 7.5	ND
<i>KRAS</i> WT <i>TPM3-NTRK</i> 융합	KM12	결장	> 10	> 7.5	ND
<i>KRAS</i> WT <i>BRAF</i> p.V600E	COLO-205	결장	> 10	> 7.5	ND

[0654]

[0655]

돌연변이 주석은 암의 체세포 돌연변이 카탈로그(COSMIC)¹ 또는 Misale et al. 2019²에서 얻었다. 기저 ERK1/2 인산화 및 세포 생존력 분석에 대한 평균 IC₅₀ 값은 적어도 n=2 실험에서 얻었다. ND = 결정되지 않음

[0656]

보충 표 2. 데이터 수집 및 세밀화 통계(분자 대체)

KRAS ^{G12C/C51S/C80L/C118S} AMG 510	
데이터 수집	
공간군	P 21 21 21
셀 치수	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	40.87, 58.42, 65.89
α , β , γ (°)	90, 90, 90
분해능 (Å)	30.0-1.65 (1.71- 1.65)
<i>R</i> _{sym}	0.162 (0.521)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	6.9 (2.5)
완결도 (%)	97.0 (96.3)
중복	4.4 (4.2)
세밀화	
분해능 (Å)	30.00 - 1.65
반사 수	18077
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.1809 / 0.2152
원자 수	1613
단백질	1336
리간드/이온	70
물	207
<i>B</i> -인자	24.8
단백질	24.3
리간드/이온	24.1
물	34.1
R.m.s. 편차	
결합 길이 (Å)	0.005
결합각 (°)	1.08

[0657]

[0658]

이 구조에 대해 하나의 결정 데이터 세트가 수집되었음

[0659]

*괄호 안의 값은 최고 분해능 셀에 대한 것이다.

[0660] 보충 표 3. 유전자 발현 경로 점수 분석

[0661] 보충 표 3A

T 세포 기능 경로 점수 계산에 관여된 유전자	P-값	T 세포 기능 경로 점수 계산에 관여된 유전자	P-값
STAT1	1.72E-09	LCP1	1.20E-04
H2-T23	2.70E-09	IKZF2	1.46E-04
ADA	5.22E-09	SOCS1	1.63E-04
EGR1	7.09E-09	TCF7	2.02E-04
TGFB3	1.22E-08	CEBPB	2.26E-04
TLR6	1.24E-08	IL1R1	5.42E-04
ITGA1	1.40E-08	JAK3	6.60E-04
THY1	1.65E-08	PVRL2	6.90E-04
NFATC2	2.31E-08	CD1D1	8.57E-04
H2-AB1	3.62E-08	CD274	8.63E-04
H2-AA	4.93E-08	ICOS	9.52E-04
CTSH	5.80E-08	TNFSF13B	9.63E-04
CD48	6.78E-08	IL4RA	1.02E-03
ITGAL	6.82E-08	STAT4	1.07E-03
CD74	7.35E-08	FAS	1.09E-03
ITGAM	8.78E-08	LGALS3	1.18E-03
IL2RG	8.97E-08	IL13RA1	1.28E-03
H2-DMA	1.33E-07	IFNG	1.29E-03
CD83	1.41E-07	FASL	1.39E-03
TNFRSF14	1.48E-07	IRF4	1.47E-03
MAF	1.60E-07	TRAF6	1.63E-03
CD247	1.66E-07	CD2	1.65E-03
PTPRC	1.70E-07	TIGIT	1.65E-03
TAP1	2.32E-07	TLR4	1.69E-03
CD3G	2.80E-07	CD47	2.26E-03
MILL2	3.39E-07	VEGFA	2.31E-03
CD27	3.64E-07	PDCD1LG2	2.47E-03
LCK	4.04E-07	BCL6	2.48E-03
CD3E	4.62E-07	IL12RB1	3.49E-03
SPP1	5.19E-07	RORA	3.60E-03
IKZF1	5.24E-07	NFKB1	3.96E-03
CCR2	7.34E-07	CXCL12	4.63E-03

[0662]

T 세포 기능 경로 점수 계산에 관여된 유전자	P-값	T 세포 기능 경로 점수 계산에 관여된 유전자	P-값
ZAP70	7.73E-07	RIPK2	4.83E-03
NFATC1	8.07E-07	GFI1	4.88E-03
LAG3	8.54E-07	IL15	5.01E-03
IRF1	8.95E-07	IL12B	5.09E-03
SYK	9.31E-07	IL2RA	5.56E-03
IRF8	1.17E-06	CD276	6.24E-03
PSMB10	1.17E-06	BTLA	6.27E-03
XCL1	1.36E-06	FOXP3	6.70E-03
PVR	1.54E-06	ANXA1	7.25E-03
CXCR3	1.54E-06	SOC3	7.29E-03
CD3D	1.56E-06	CD40	7.52E-03
IL18R1	1.93E-06	CD80	1.21E-02
EOMES	1.95E-06	MAPK1	1.22E-02
PSEN2	2.40E-06	MAP3K7	1.43E-02
CCL5	3.67E-06	TRP53	1.46E-02
IFNAR1	3.85E-06	TRAF2	1.59E-02
JAK1	4.90E-06	IL12RB2	1.78E-02
CXCR4	4.94E-06	NOS2	1.79E-02
CARD11	6.83E-06	TGFB1	2.02E-02
ICAM1	6.84E-06	JAK2	2.46E-02
FCGR4	6.94E-06	SPN	2.48E-02
IL1B	7.10E-06	YY1	2.53E-02
CCL2	7.33E-06	STAT6	2.90E-02
CMA1	7.69E-06	CCL3	2.97E-02
H2-K1	9.48E-06	MAPK8	3.73E-02
VCAM1	1.03E-05	IL7R	5.28E-02
IL6ST	1.16E-05	TNFSF11	5.45E-02
BCL2	1.21E-05	CCND3	6.50E-02
ICOSL	1.35E-05	TNF	1.23E-01
TYK2	1.57E-05	CSF2	1.54E-01
ITGB2	1.62E-05	RELB	1.55E-01
CD86	1.68E-05	CCL11	1.73E-01
IL18RAP	1.72E-05	SELL	1.91E-01
CCR5	1.74E-05	ITGAX	2.11E-01
ITK	1.84E-05	CCR7	2.17E-01
ITCH	1.94E-05	TNFRSF4	2.31E-01
IL18	2.01E-05	RPS6	2.43E-01
CD8A	2.41E-05	HAVCR2	3.03E-01
REL	2.69E-05	TNFSF18	3.43E-01

[0663]

T 세포 기능 경로 점수 계산에 관여된 유전자	P-값	T 세포 기능 경로 점수 계산에 관여된 유전자	P-값
CD8B1	3.06E-05	FLT3	3.64E-01
CD5	3.39E-05	GZMB	3.89E-01
H2-D1	3.80E-05	FUT7	4.36E-01
STAT5B	3.93E-05	IDO1	4.69E-01
PDCD1	5.10E-05	CASP3	4.78E-01
CCL7	5.31E-05	CCR6	5.02E-01
CREBBP	5.39E-05	TMED1	5.07E-01
H2-M3	5.67E-05	BCL10	5.21E-01
CD4	5.83E-05	CXCL13	6.89E-01
TBX21	7.14E-05	CD28	7.48E-01
PSEN1	7.20E-05	TNFSF14	7.51E-01
GATA3	7.48E-05	CTLA4	7.97E-01
POU2F2	7.52E-05	CD40LG	8.17E-01
TXK	8.94E-05	IL7	8.86E-01
DPP4	9.70E-05	RORC	1.00E+00

[0664]

[0665]

보충 표 3B

인터페론 경로 점수 계산에 관여된 유전자	P-값	인터페론 경로 점수 계산에 관여된 유전자	P-값
GBP5	7.49E-09	DDX58	1.73E-05
IFIT3	2.66E-08	IFIT2	5.17E-05
H2-AB1	3.62E-08	TBK1	5.83E-05
H2-AA	4.93E-08	IFI35	7.52E-05
IFI44L	8.05E-08	SH2D1B1	4.08E-04
IFNAR2	1.13E-07	IFITM2	5.30E-04
IRGM2	1.18E-07	IFI27	6.90E-04
CIITA	1.68E-07	ULBP1	9.81E-04
CD3E	4.62E-07	TMEM173	1.10E-03
IFNGR1	5.77E-07	H60A	2.91E-03
IFIH1	7.59E-07	IFIT1	3.52E-03
IRF8	1.17E-06	IL12RB2	1.78E-02
IRF7	1.19E-06	NOS2	1.79E-02
NLRC5	1.46E-06	RUNX3	9.02E-02
EOMES	1.95E-06	CCR7	2.17E-01
IFNAR1	3.85E-06	FADD	2.37E-01
CXCL16	6.82E-06	IFITM1	6.10E-01
IFI44	8.06E-06	MAVS	8.59E-01

[0666]

[0667] 보충 표 3C

MHC 경로 점수 계산에 관여된 유전자	P-값
H2-T23	2.70E-09
KLRK1	3.47E-08
H2-AB1	3.62E-08
H2-EB1	4.45E-08
H2-AA	4.93E-08
CTSH	5.80E-08
CD74	7.35E-08
MR1	9.98E-08
H2-DMA	1.33E-07
CIITA	1.68E-07
TAP1	2.32E-07
FCER1G	2.41E-07
LAG3	8.54E-07
CD160	1.02E-06
FCGR3	1.13E-06
NLRC5	1.46E-06
FCGR1	1.50E-06
TAPBP	1.53E-06
H2-K1	9.48E-06
H2-D1	3.80E-05
TAP2	4.89E-05
PML	5.37E-05
H2-M3	5.67E-05
FCGR2B	6.05E-05
H2-DMB1	1.80E-04
CD1D1	8.57E-04
H2-DMB2	1.17E-02
H2-Q2	4.41E-02
H2-OB	1.92E-01
CD40LG	8.17E-01

[0668]

[0669] 보충 표 3D

항원 처리 경로 점수 계산에 관여된 유전자	P-값
H2-T23	2.70E-09
H2-AB1	3.62E-08
H2-EB1	4.45E-08
H2-AA	4.93E-08
H2-EA-P	4.94E-08
NOD1	4.97E-08
CD74	7.35E-08
MR1	9.98E-08
H2-DMA	1.33E-07
PSMB8	2.03E-07
TAP1	2.32E-07
FCER1G	2.41E-07
FCGR3	1.13E-06
FCGR1	1.50E-06
TAPBP	1.53E-06
PSMB9	2.02E-06
SLC11A1	2.53E-06
ICAM1	6.84E-06
H2-K1	9.48E-06
H2-D1	3.80E-05
TAP2	4.89E-05
H2-M3	5.67E-05
FCGR2B	6.05E-05
H2-DMB1	1.80E-04
CD1D1	8.57E-04
H2-DMB2	1.17E-02
H2-Q2	4.41E-02
RELB	1.55E-01
H2-OB	1.92E-01
CCR7	2.17E-01
NOD2	2.69E-01

[0670]

[0671] 보충 표 3E

TLR 경로 점수 계산에 관여된 유전자	P-값
TLR6	1.24E-08
TICAM2	1.88E-08
TLR7	4.46E-08
TLR8	9.04E-08
TLR9	1.23E-07
TLR1	2.11E-07
TLR2	3.63E-06
CD86	1.68E-05
TLR3	2.63E-05
TBK1	5.83E-05
IRAK2	1.44E-04
PRKCE	3.72E-04
TICAM1	8.09E-04
IRF4	1.47E-03
TRAF6	1.63E-03
TLR4	1.69E-03
TLR5	1.90E-03
MYD88	4.49E-03
GFI1	4.88E-03
MAP3K7	1.43E-02
IRF3	3.71E-02
MAPKAPK2	1.16E-01
IRAK1	1.39E-01
NFKBIA	1.62E-01
TRAF3	6.07E-01
TIRAP	9.18E-01

[0672]

[0673] 보충 표 4. 유세포 분석 항체

항체	클론	카탈로그 #	공급업체
BUV737 래트 항-마우스 CD4	RM4-5	564933	BD Biosciences
BV421 래트 항-마우스 CD8a	53-6.7	563898	BD Biosciences
BV510 래트 항-CD11b	M1/70	562950	BD Biosciences
BUV737 래트 항-CD11b	M1/70	564443	BD Biosciences
BV421 햄스터 항-마우스 CD11c	HL3	562782	BD Biosciences
BB700 래트 항-마우스 CD19	1D3	566411	BD Biosciences
FITC 래트 항-마우스 CD24	M1/69	11-0242-81	ThermoFisher Scientific
BV650 래트 항-마우스 CD25	PC61	564021	BD Biosciences
BV786 마우스 항-마우스 CD45.2	104	563686	BD Biosciences
APC/Cy7 래트 항-마우스 CD90.2	30-H12	105328	BioLegend
APC 햄스터 항-마우스 CD103	2E7	17-1031-80	ThermoFisher Scientific
PE 래트 항-마우스 CD274	MIH5	558091	BD Biosciences
PE 햄스터 항-마우스 CD279 (PD-1)	J43	12-9985-82	ThermoFisher Scientific
FITC 래트 항-마우스 CD335 (NKp46)	29A1.4	560756	BD Biosciences
BV650 래트 항-마우스 F4/80	BM8	123149	BioLegend
APC 래트 항-마우스 FOXP3	FJK-16s	17-5773	ThermoFisher Scientific
BV711 래트 항-마우스 Ly-6C	HK1.4	128037	BioLegend
APC-H7 래트 항-마우스 Ly-6G	1A8	565369	BD Biosciences
BV510 래트 항-마우스 I-A/I-E (MHCII)	M5/114.15.2	107635	BioLegend
BV711 햄스터 항-마우스 TCR β 사슬	H57-597	563135	BD Biosciences

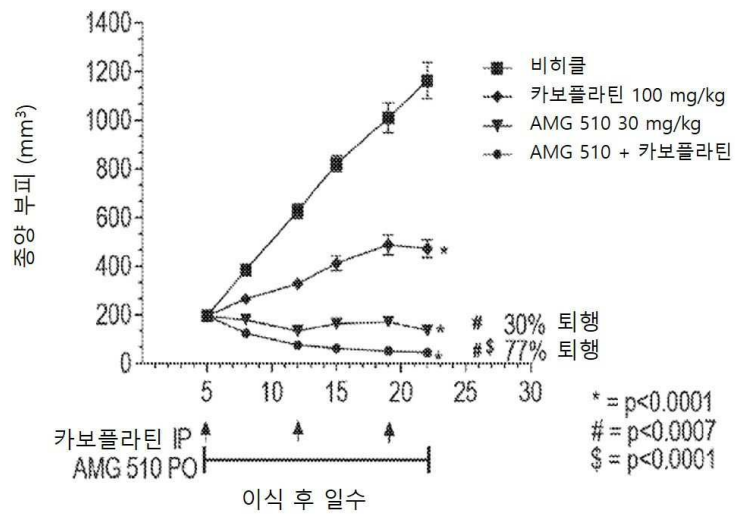
[0674]

[0675]

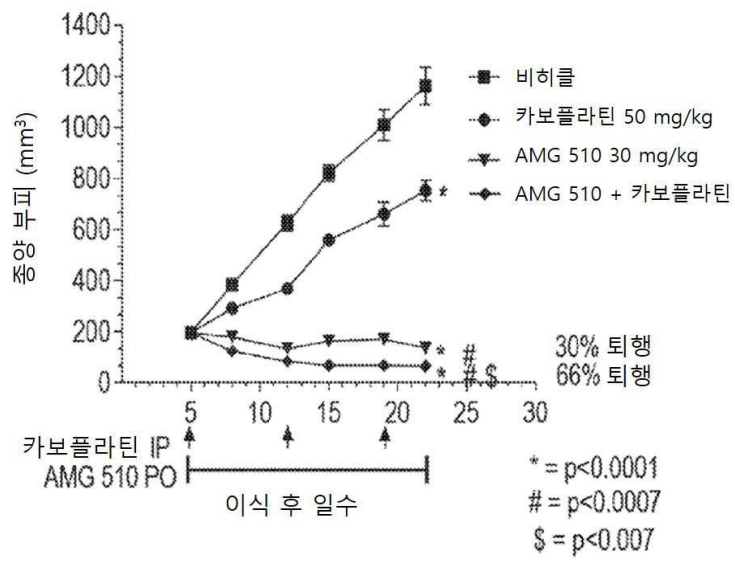
본 발명은 바람직한 구현예와 관련하여 설명된다. 그러나, 본 발명은 개시된 구현예에 한정되지 않는다는 것을 이해해야 한다. 본원에서 본 발명의 구현예의 설명을 고려할 때 당업자에 의해 다양한 변형이 이루어질 수 있음은 이해된다. 이러한 변형은 아래의 청구범위에 포함된다.

도면

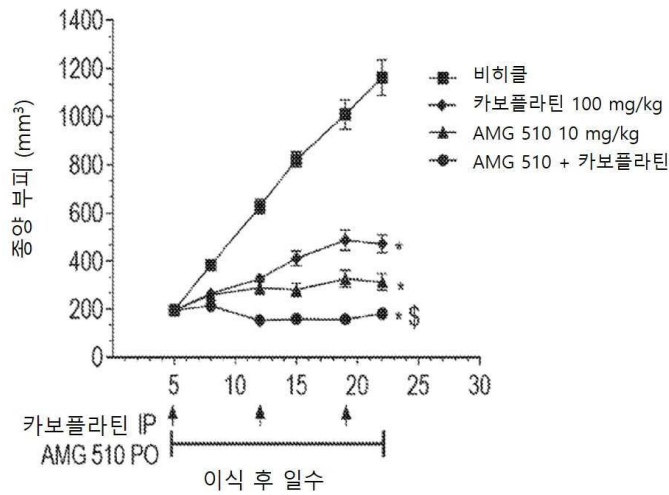
도면1a



도면1b

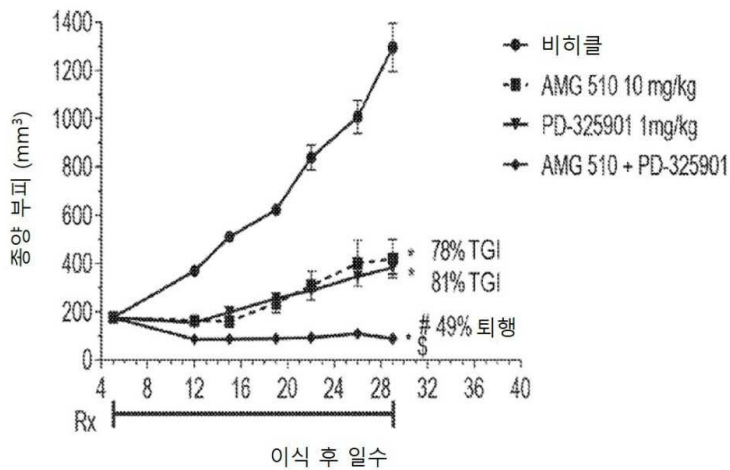


도면1c



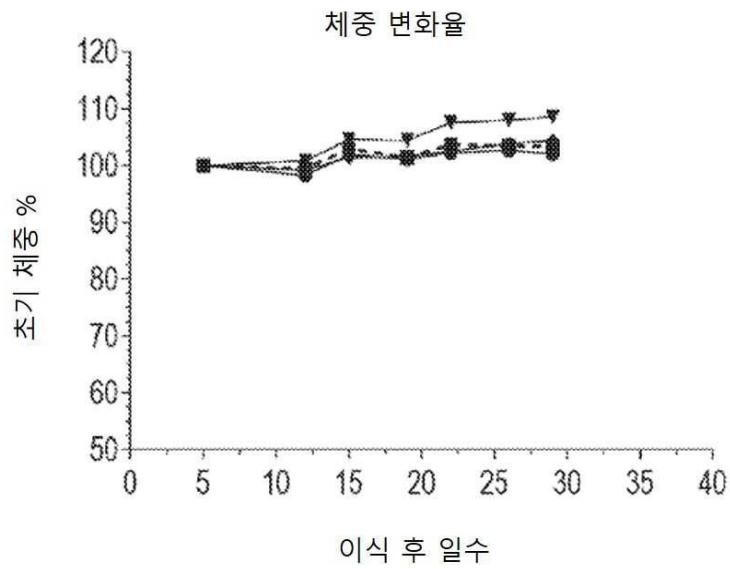
\$ = $p < 0.002$ 조합 대 AMG 510 10 mg/kg 그룹 또는 카보플라틴 100 mg/kg
 * = $p < 0.0001$ LME에 이어 Dunnett 사후 검정에 의해 비히클과 비교

도면2a

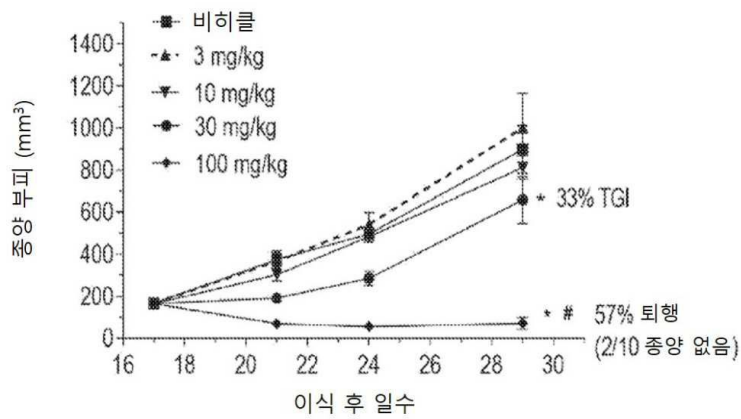


AMG 510 및 PD-325901 PO, QD 투여 * $p < 0.0001$ Dunnett 사후 검정에 의해 비히클과 비교
 TGI: 종양 성장 억제 # $p < 0.0001$ 대응표본 T-검정에 의한 회귀
 \$ $p < 0.0005$ 조합과 단일 제제 비교

도면2b



도면3



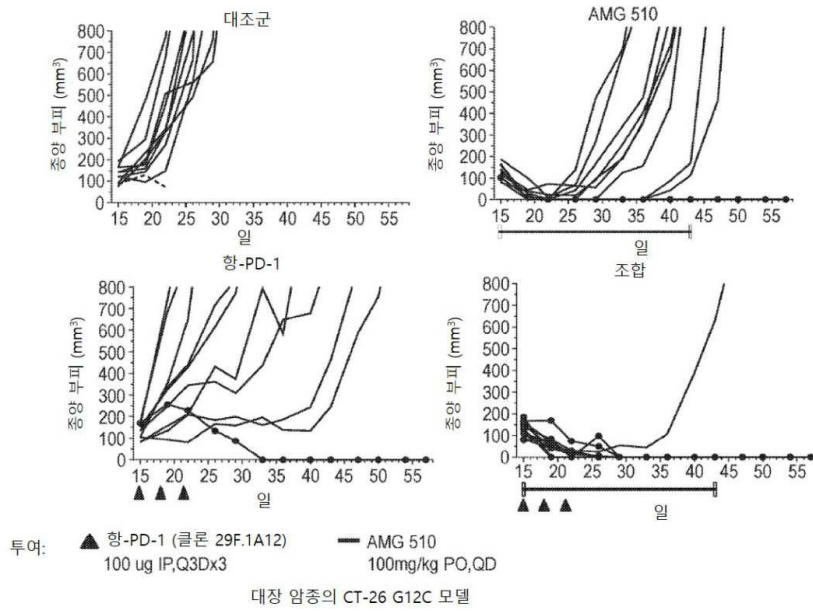
* = $p < 0.02$ Dunnett 사후 검정에 의해 비히클과 비교

= $p < 0.03$ 대응표본 T-검정에 의한 종양 회귀

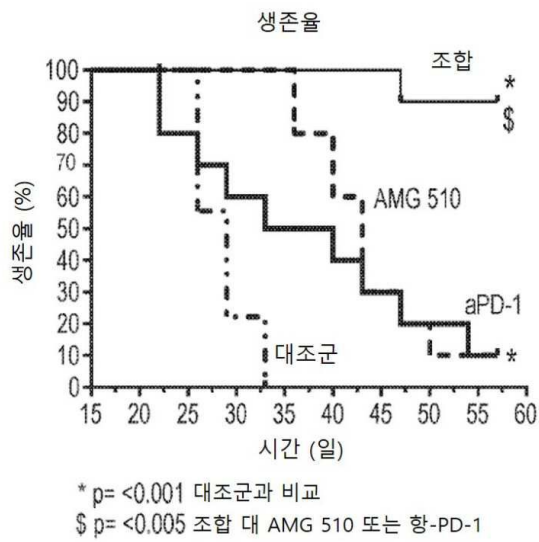
AMG 510 PO, QD 투여

TGI: 종양 성장 억제

도면4a

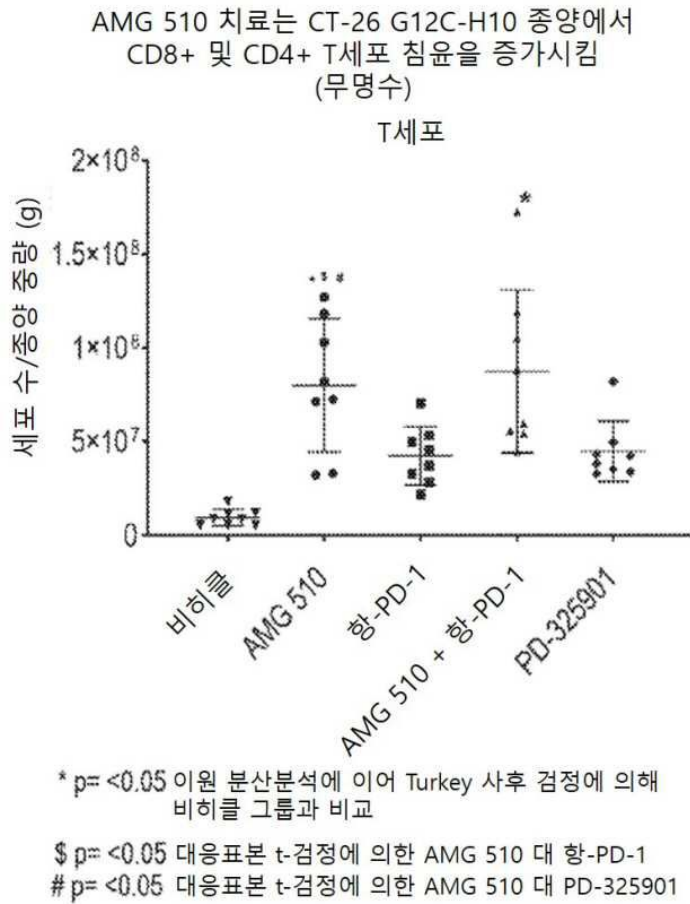


도면4b

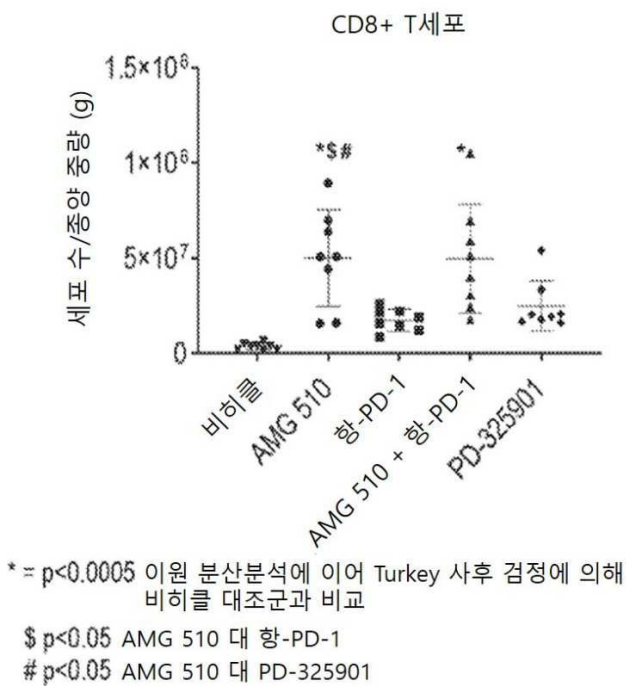


생존율은 800 mm³ 초과 of 종양 크기에 도달하는 시간으로 정의된 대리 평가변수임

도면5a

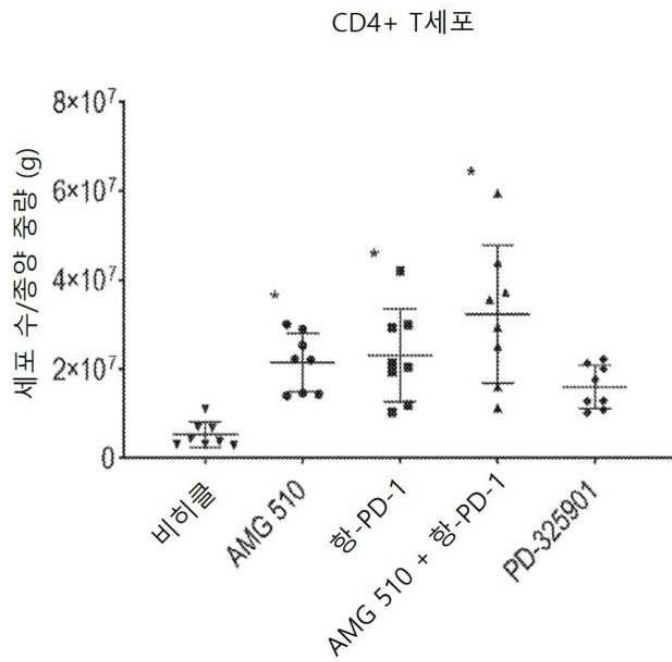


도면5b



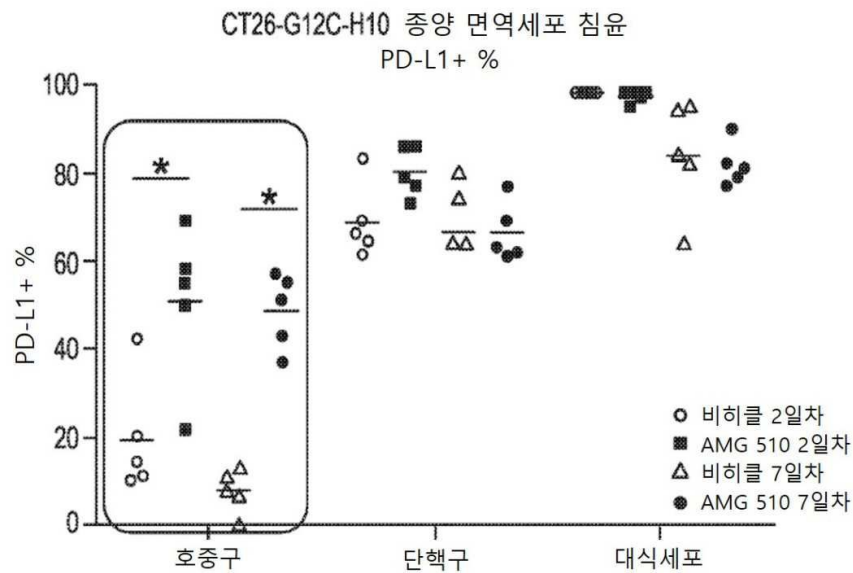
도면5c

AMG 510 치료는 CT-26 G12C-H10 종양에서
CD8+ 및 CD4+ T세포 침윤을 증가시킴
(무명수)

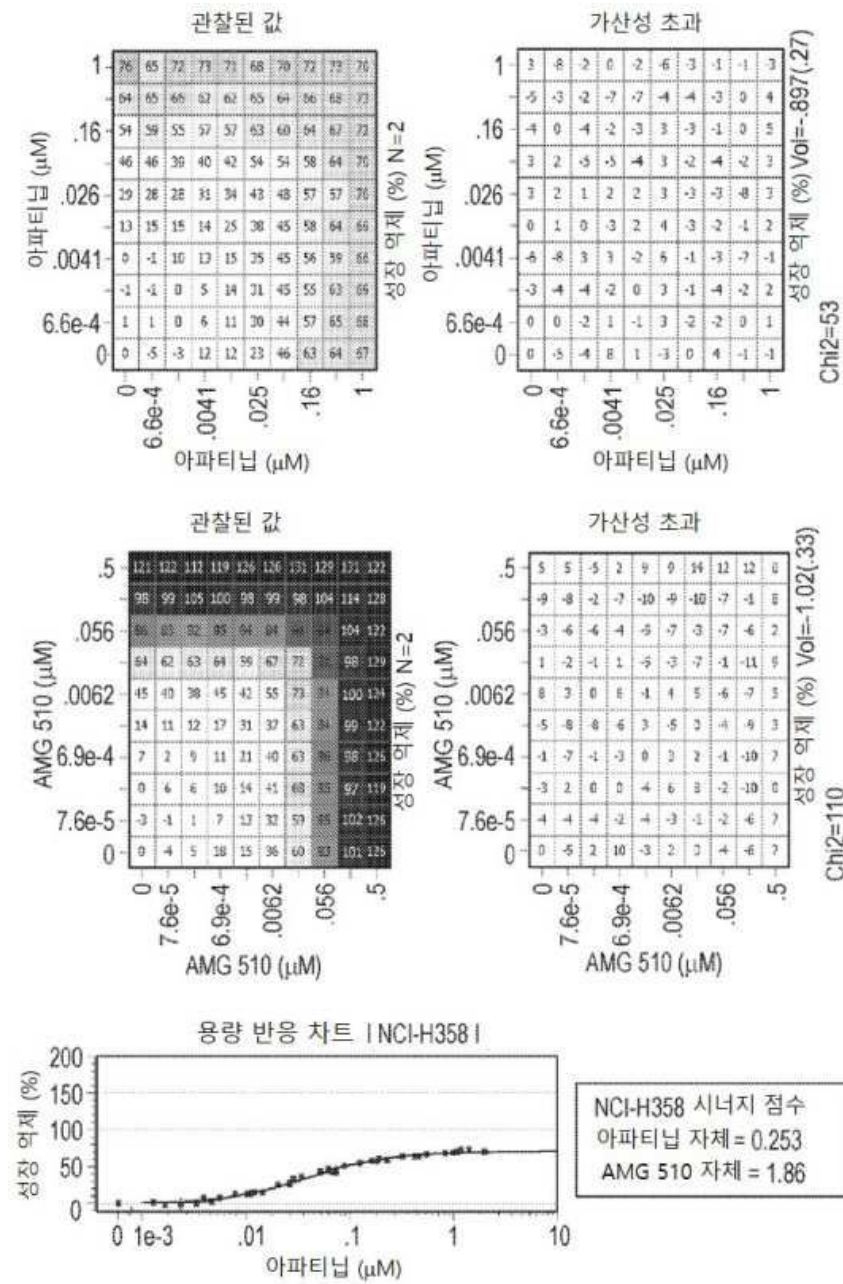


* $p < 0.05$ 이원 분산분석에 이어 Turkey 사후 검정에 의해
비히클 그룹과 비교

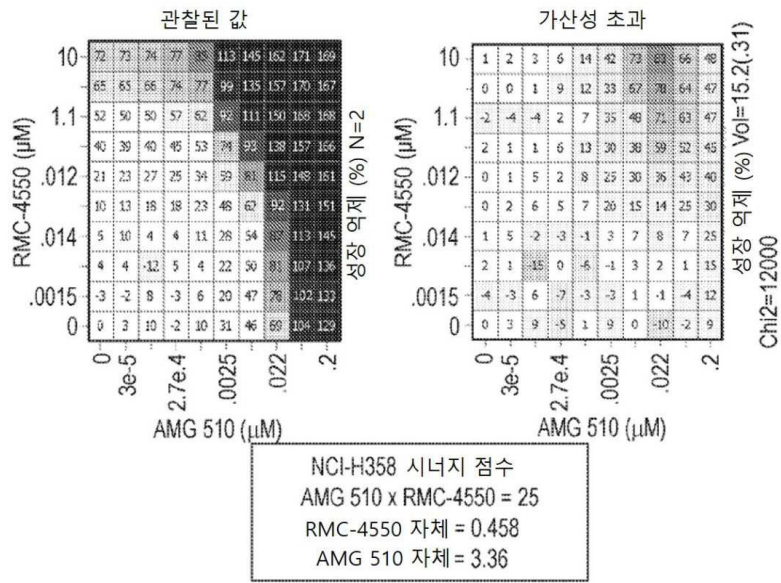
도면6a



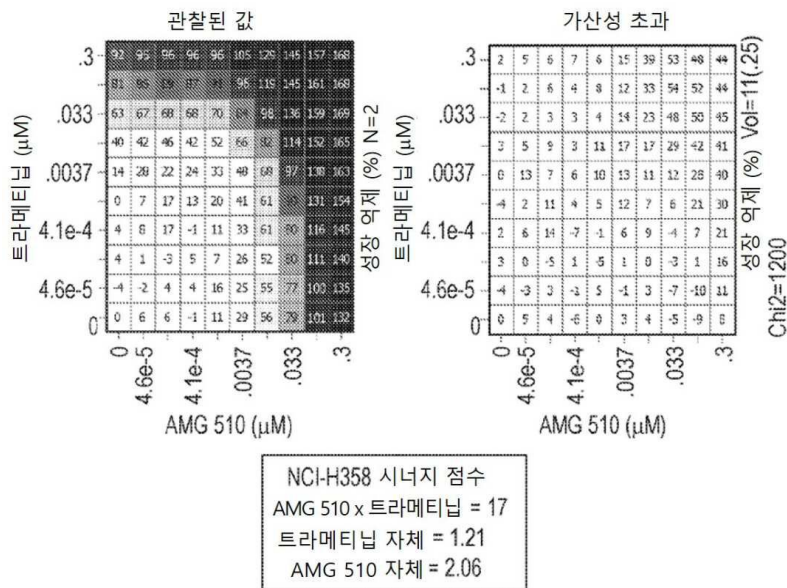
도면8



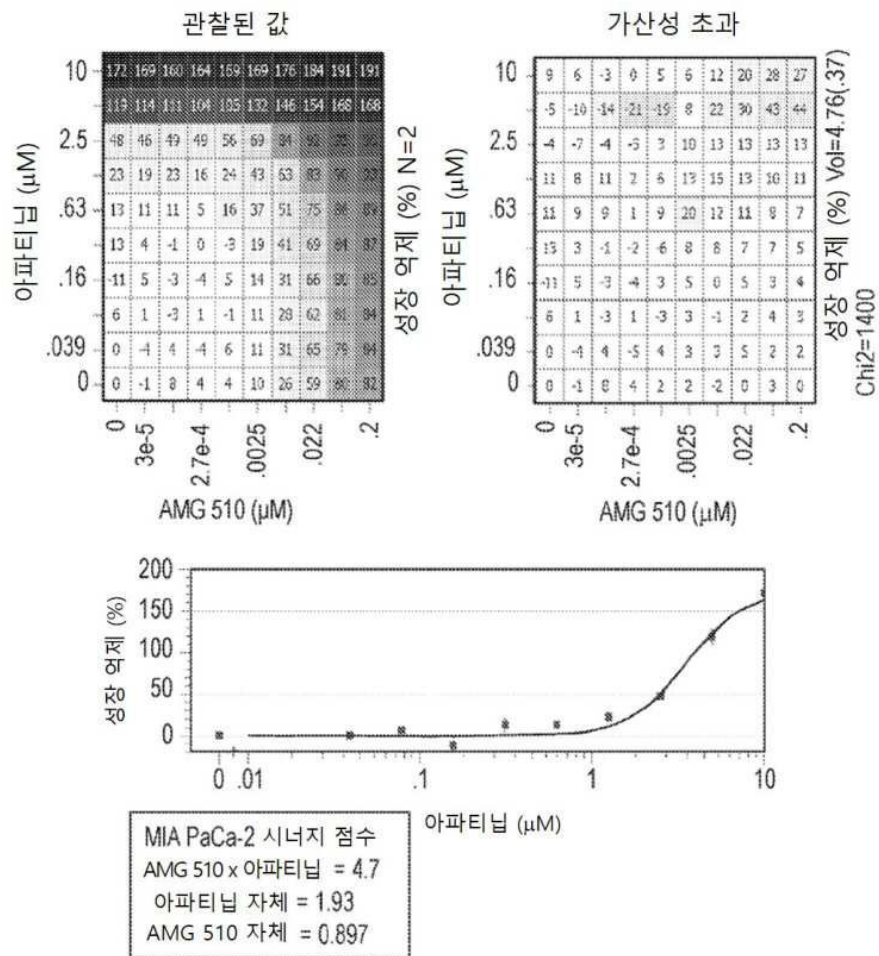
도면9a



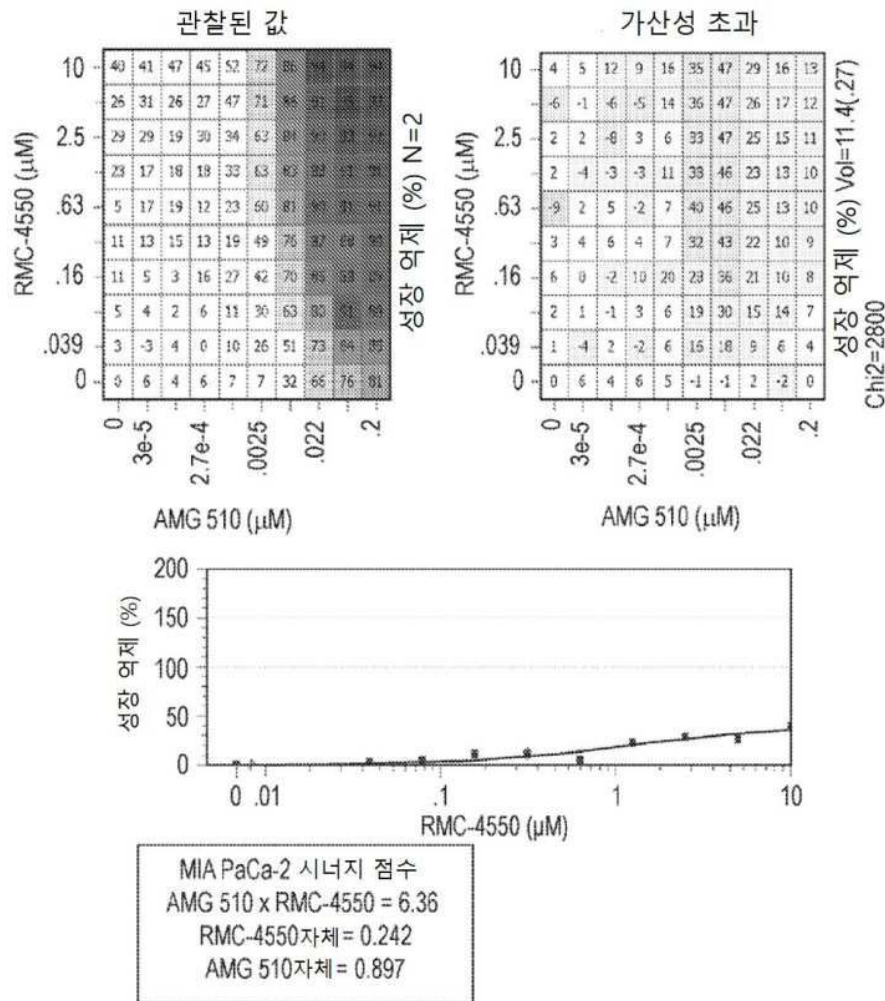
도면9b



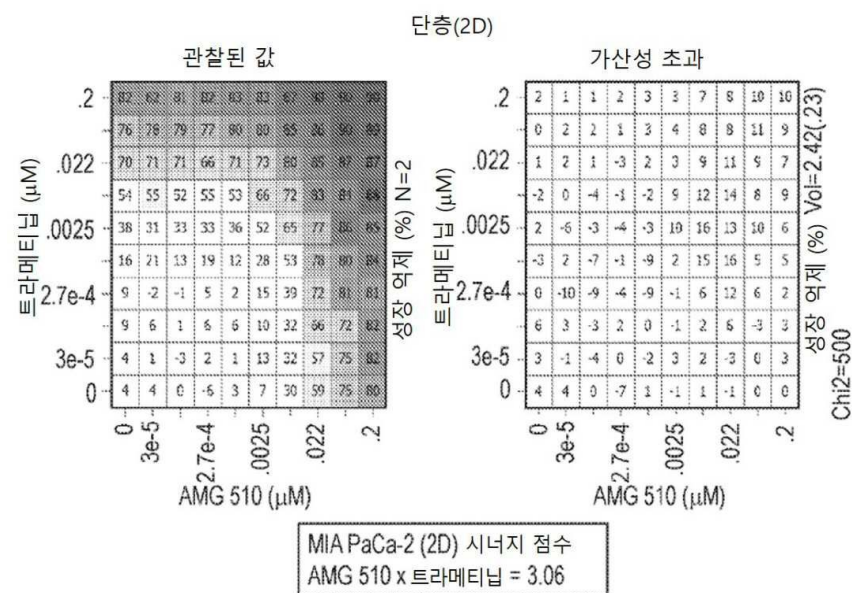
도면10a



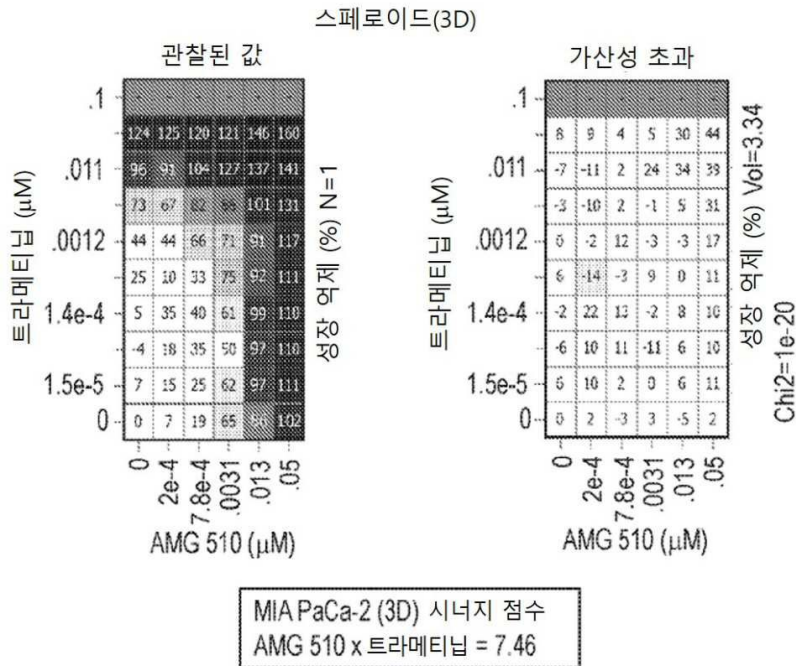
도면10b



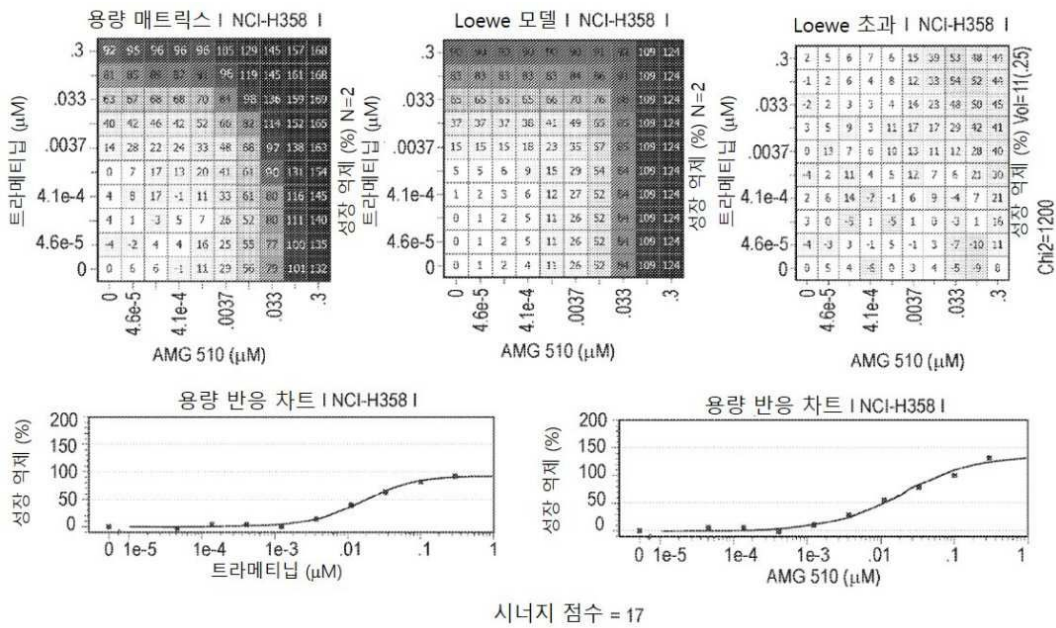
도면11a



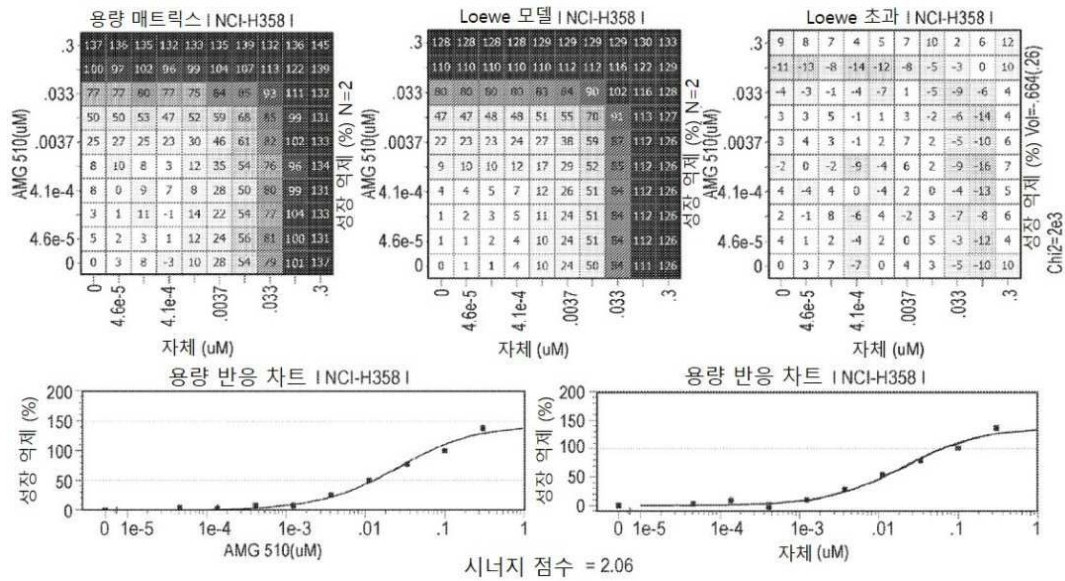
도면11b



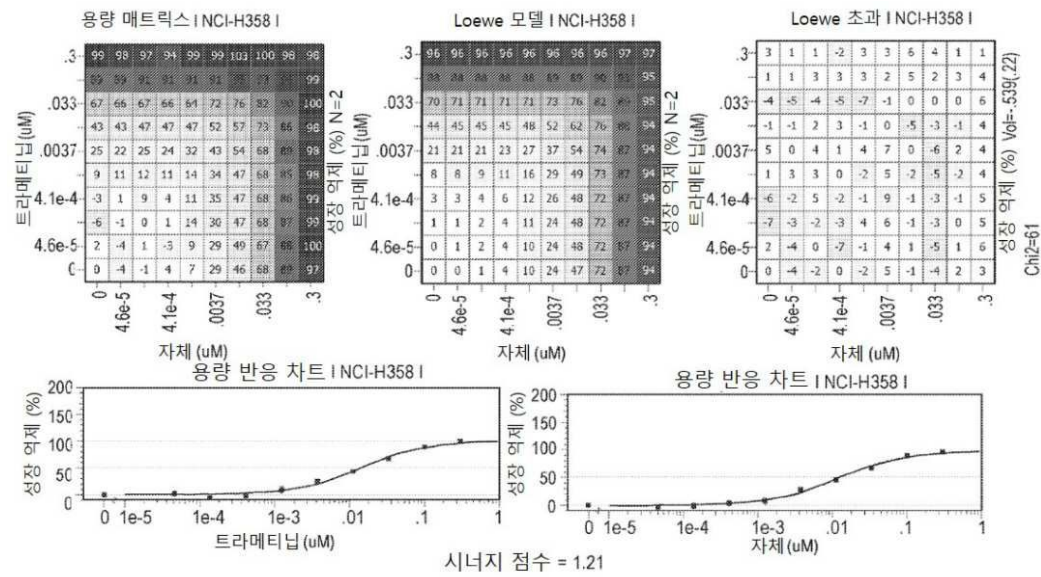
도면12



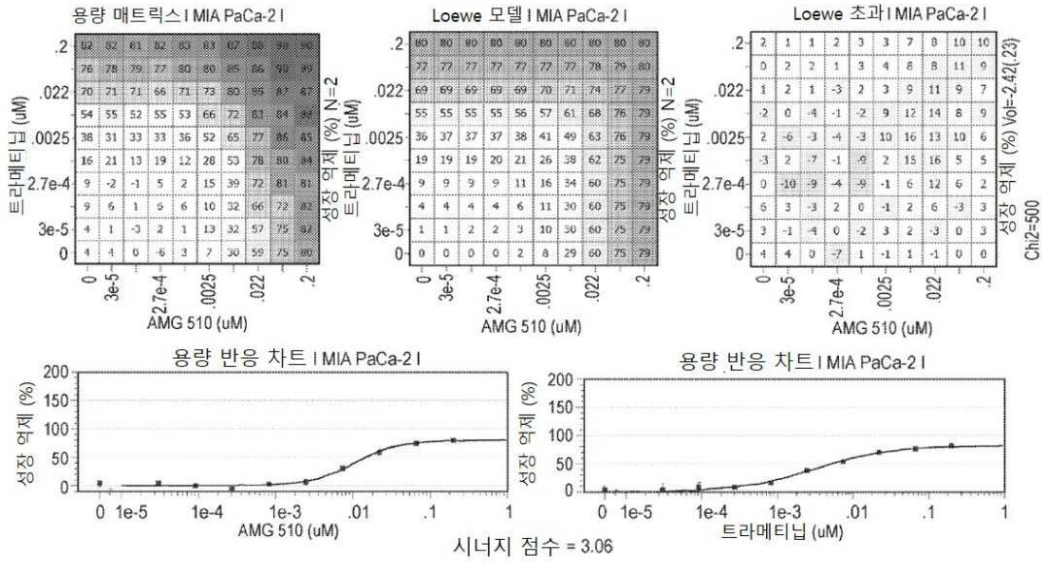
도면13



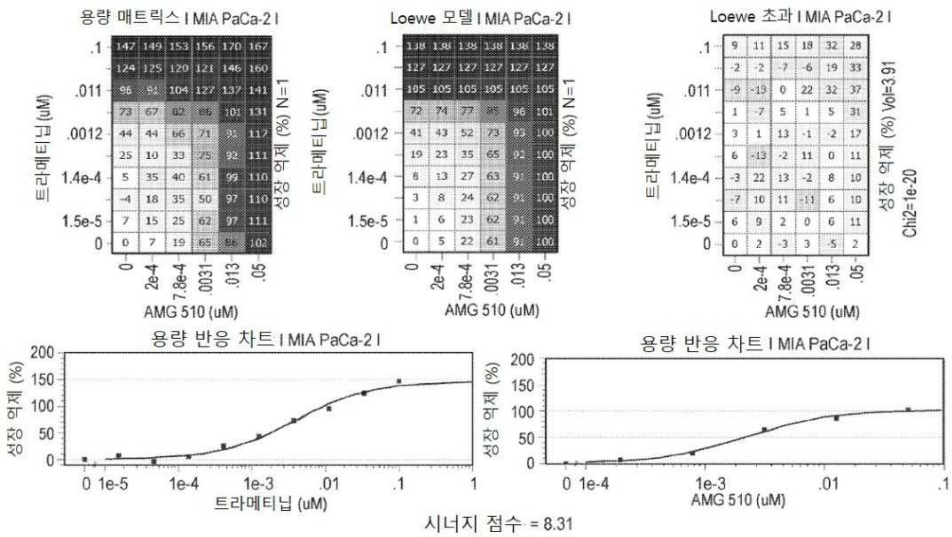
도면14



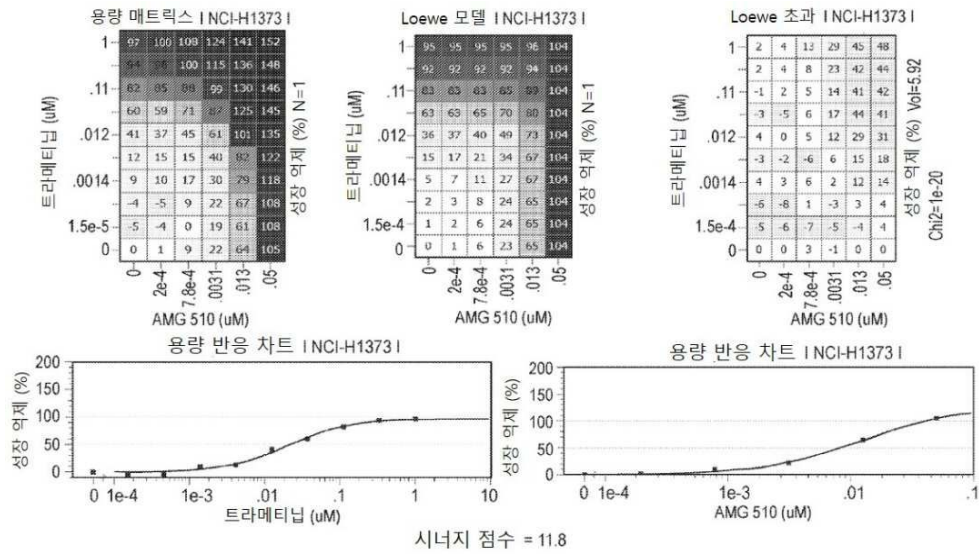
도면15



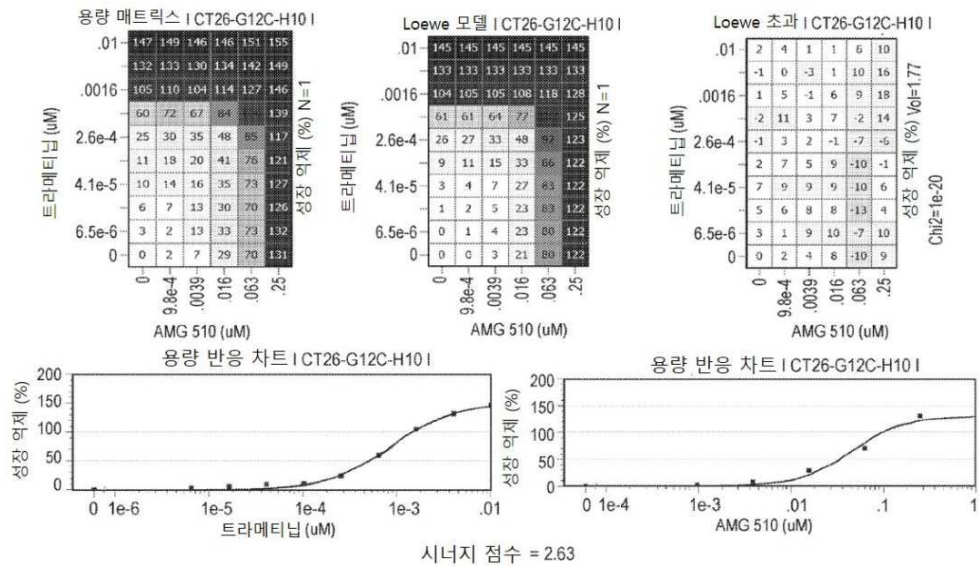
도면16



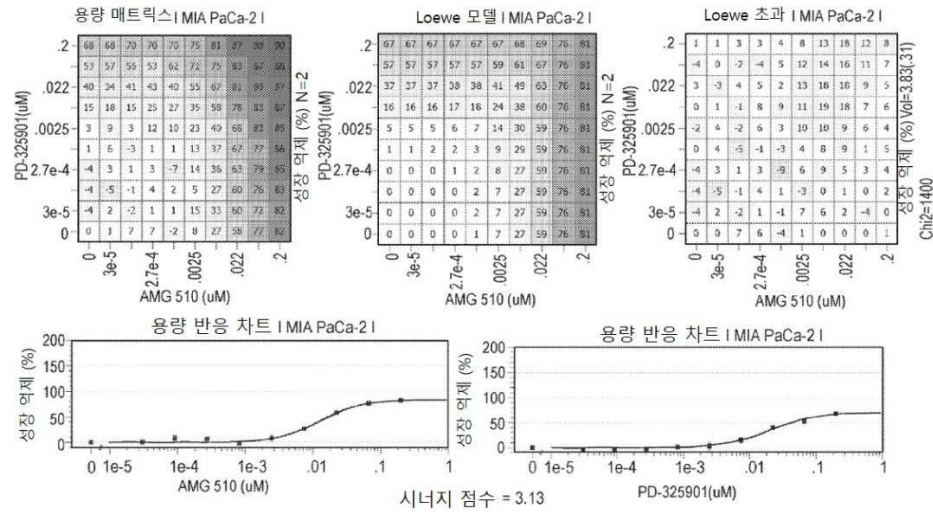
도면17



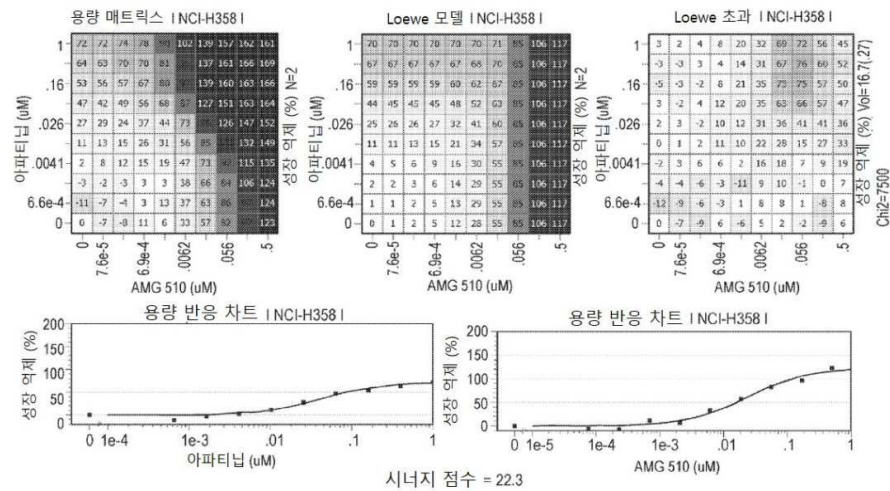
도면18



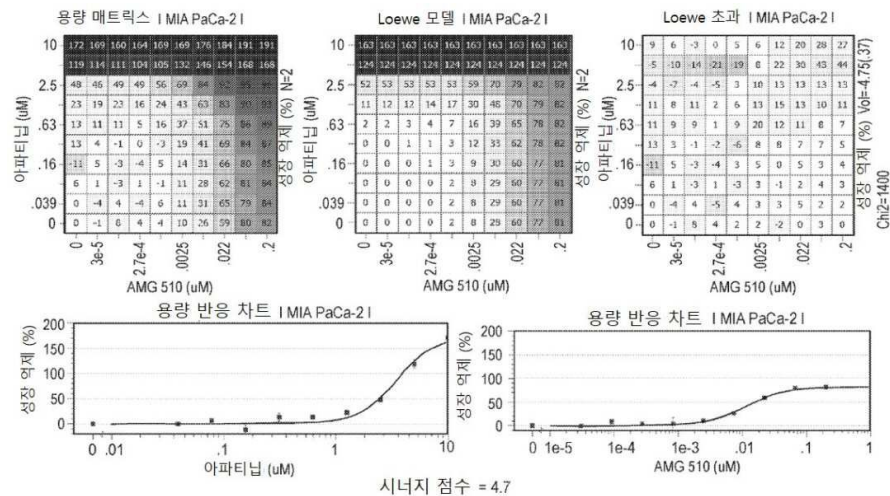
도면19



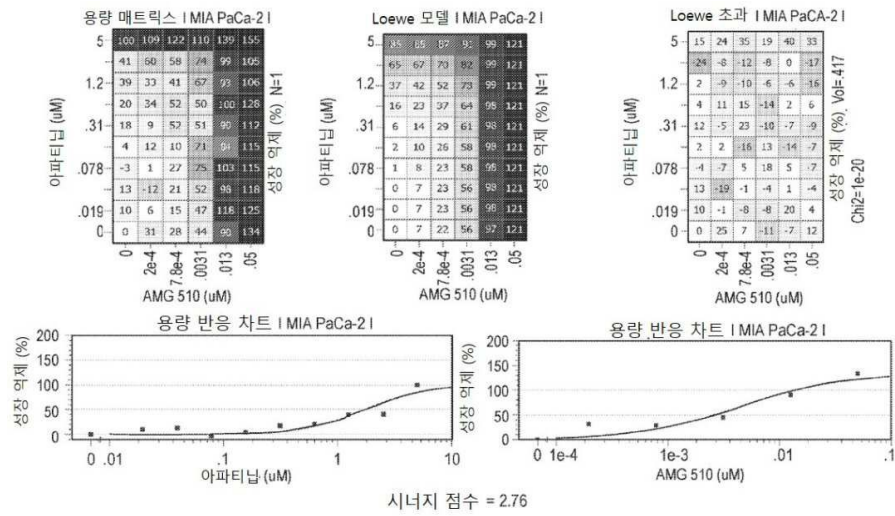
도면20



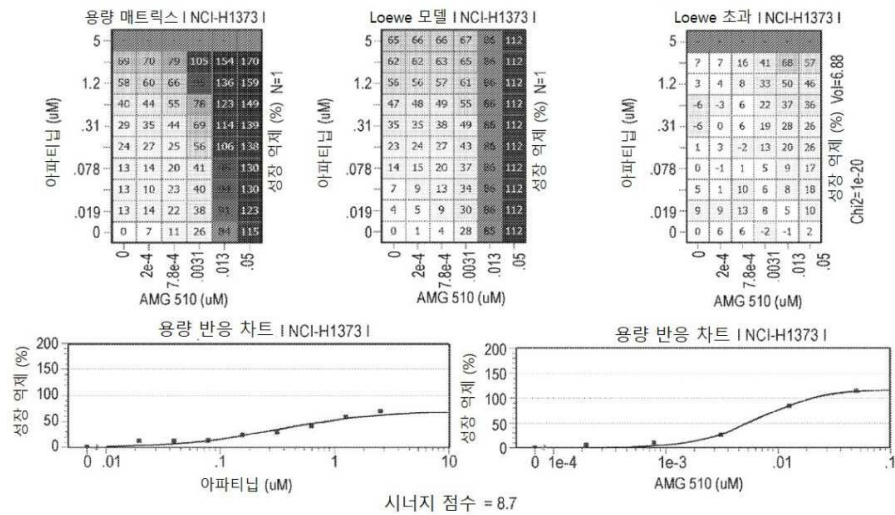
도면21



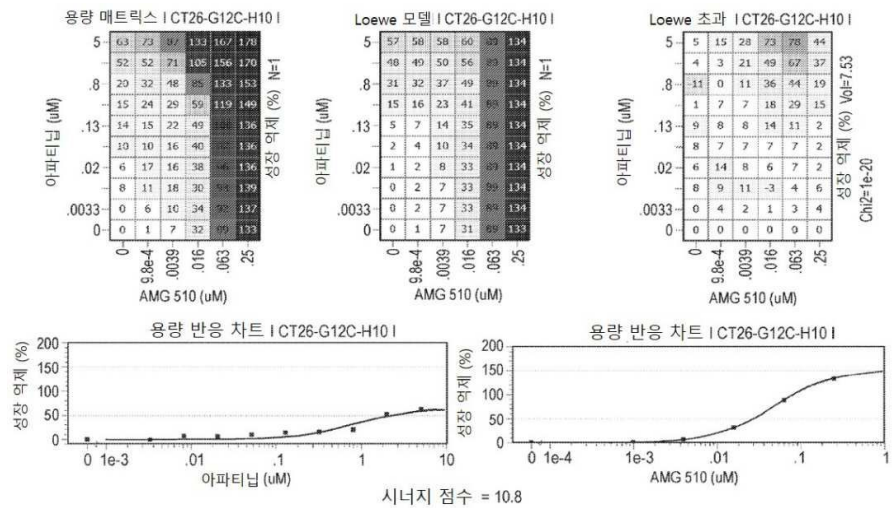
도면22



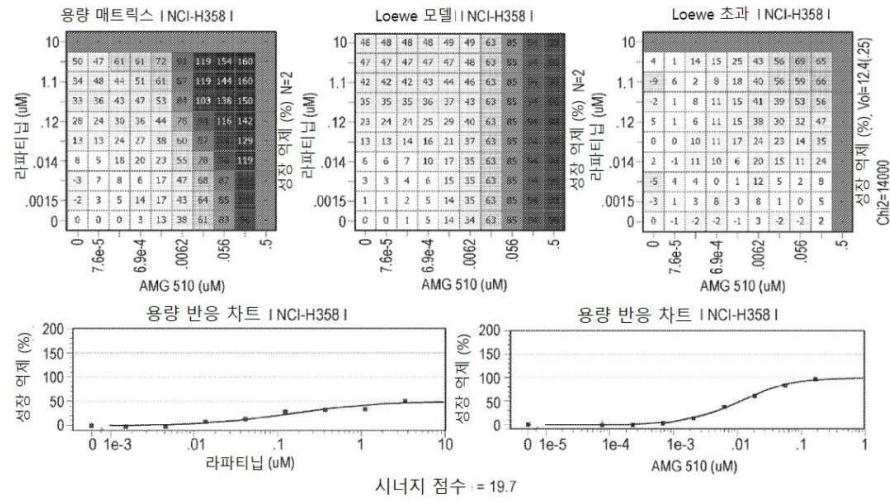
도면23



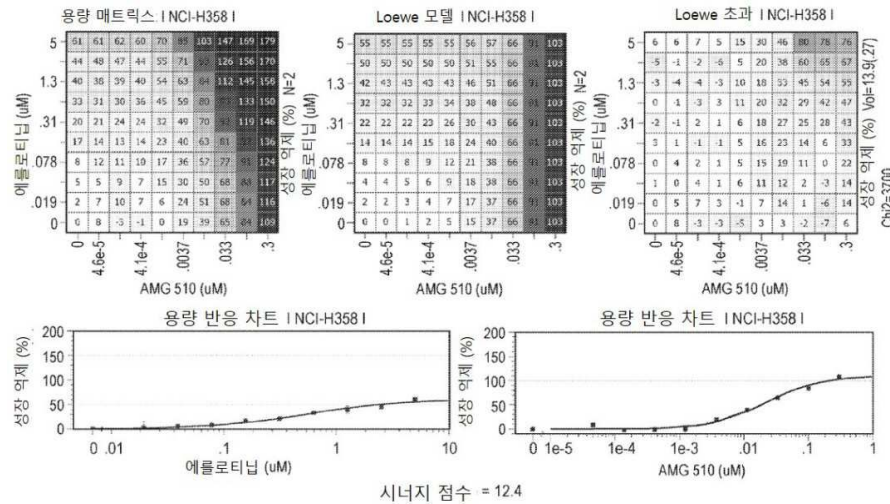
도면24



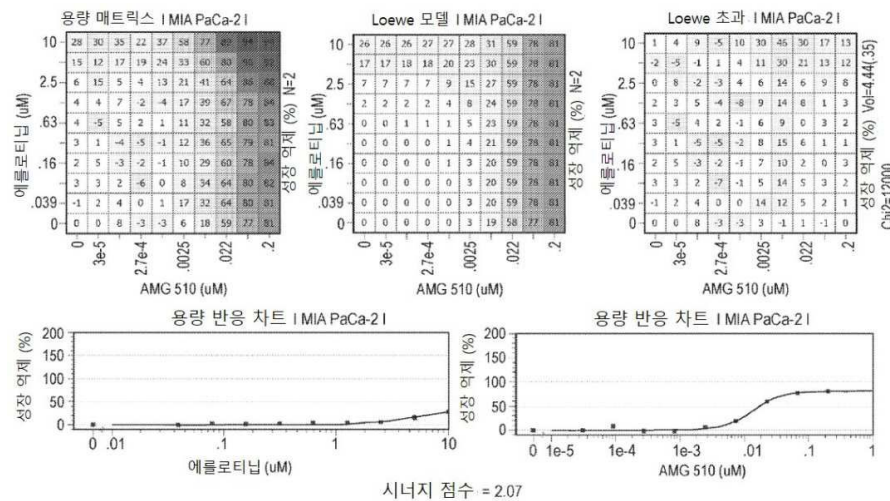
도면25



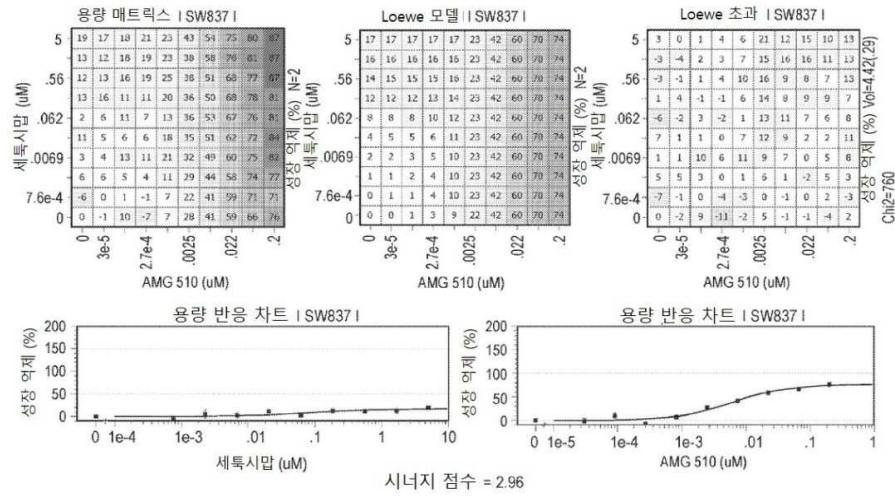
도면26



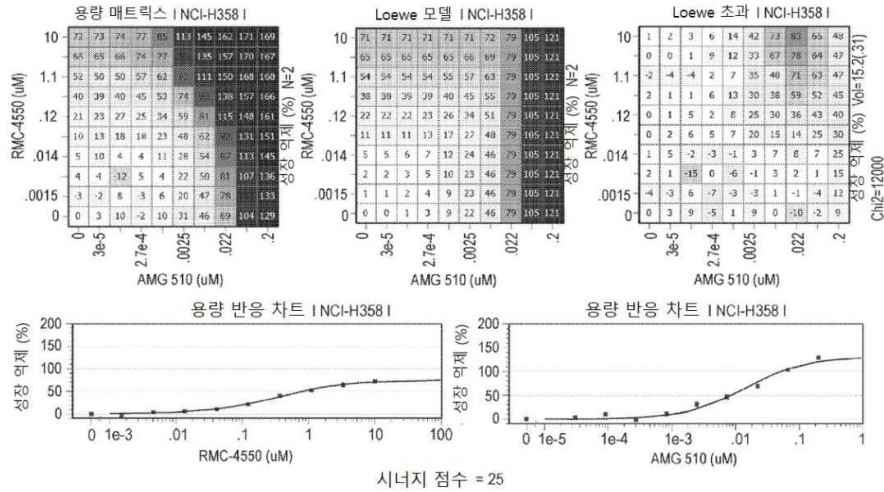
도면27



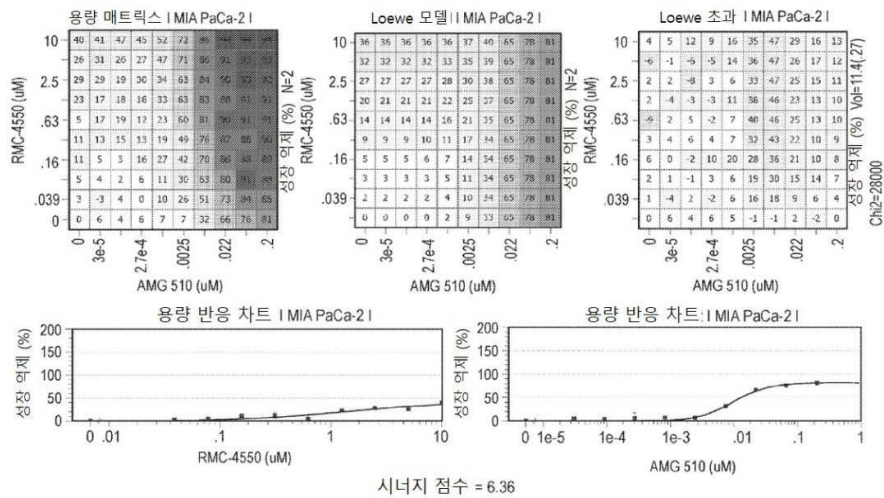
도면28



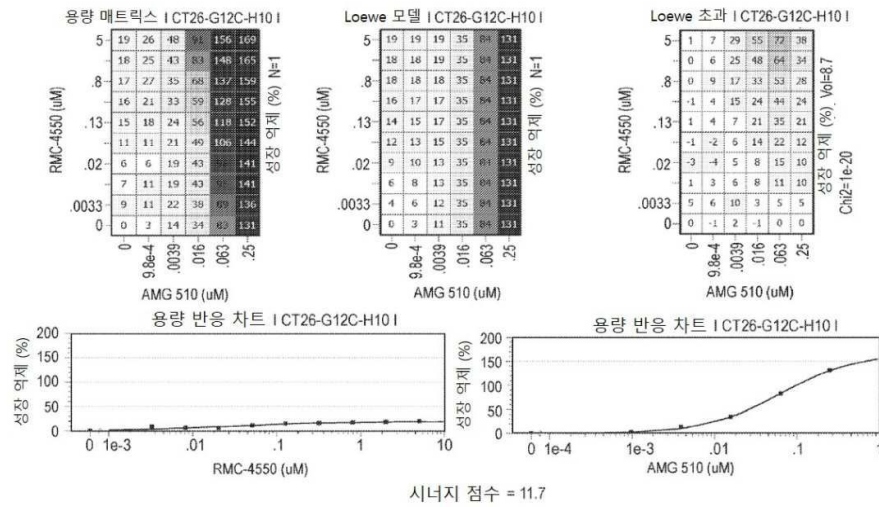
도면29



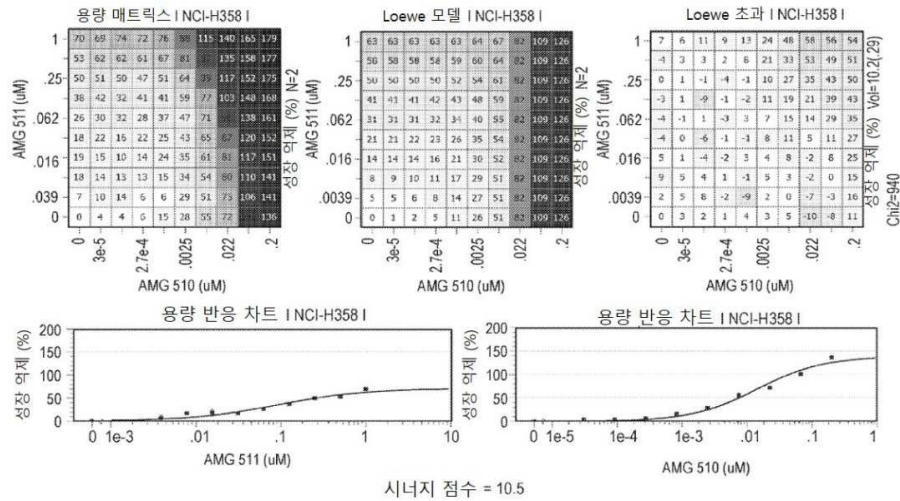
도면30



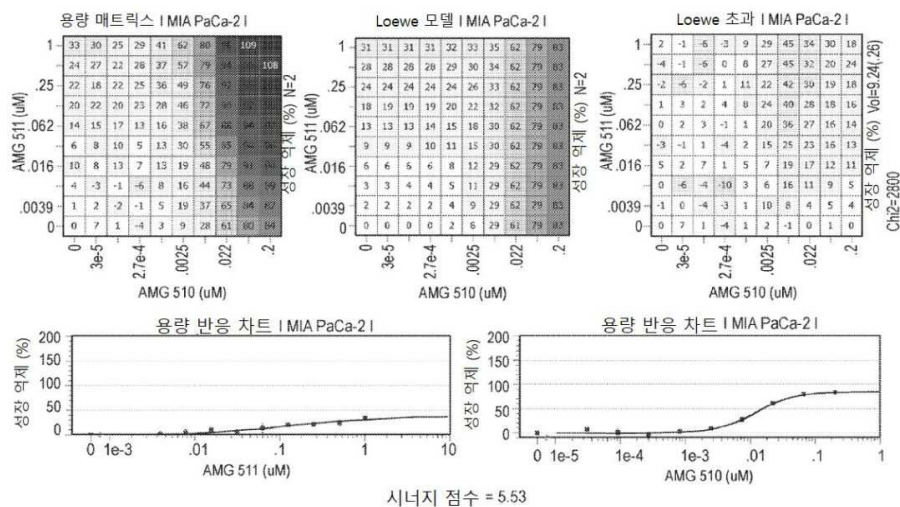
도면31



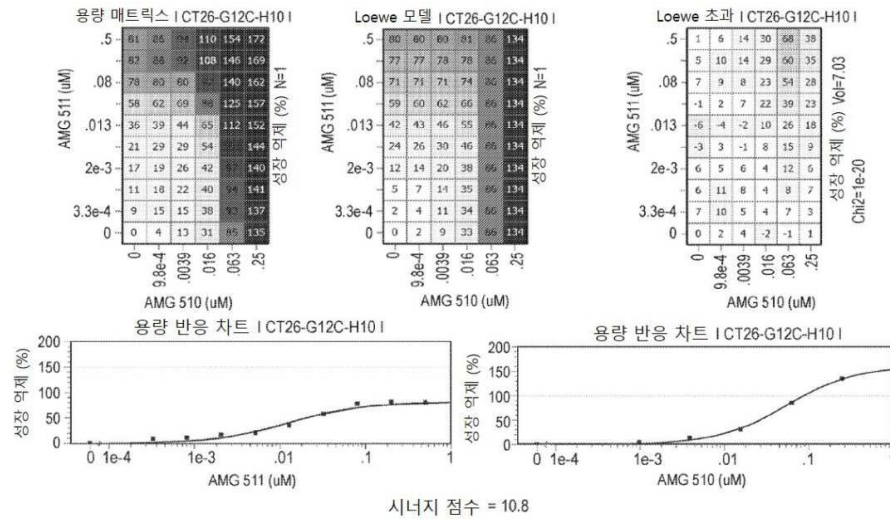
도면32



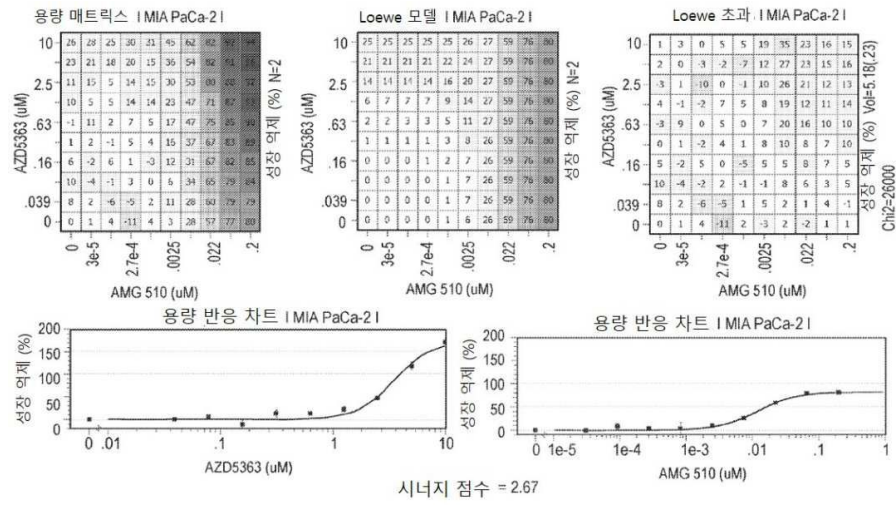
도면33



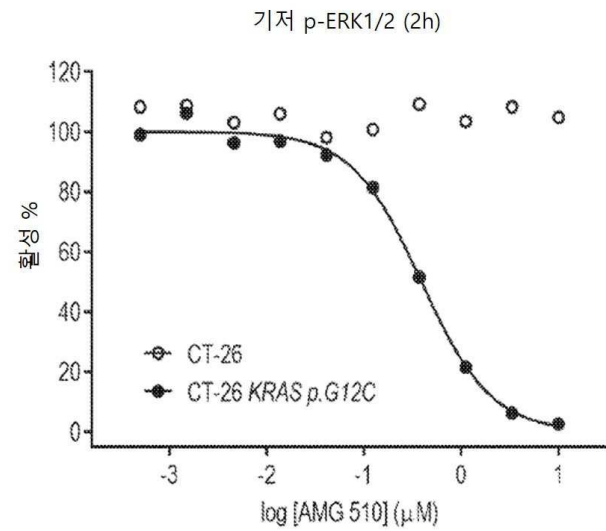
도면34



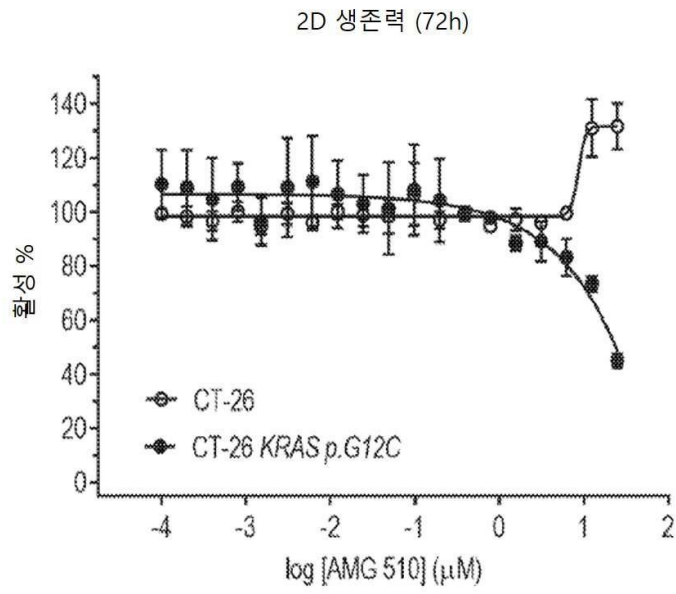
도면37



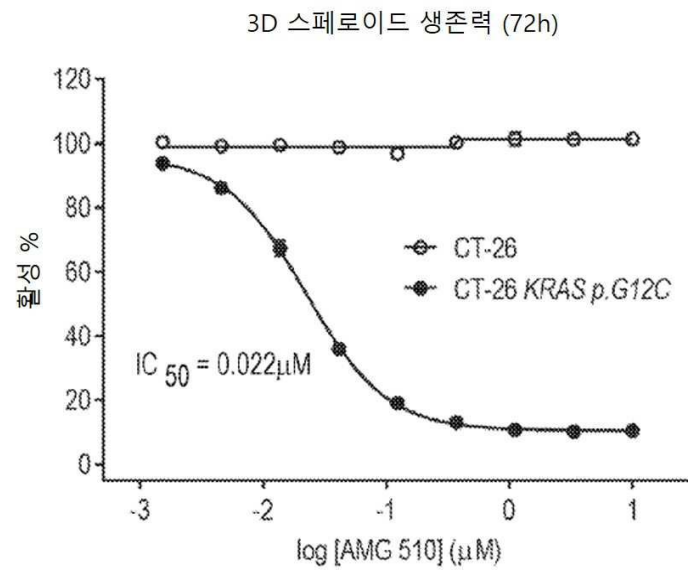
도면38



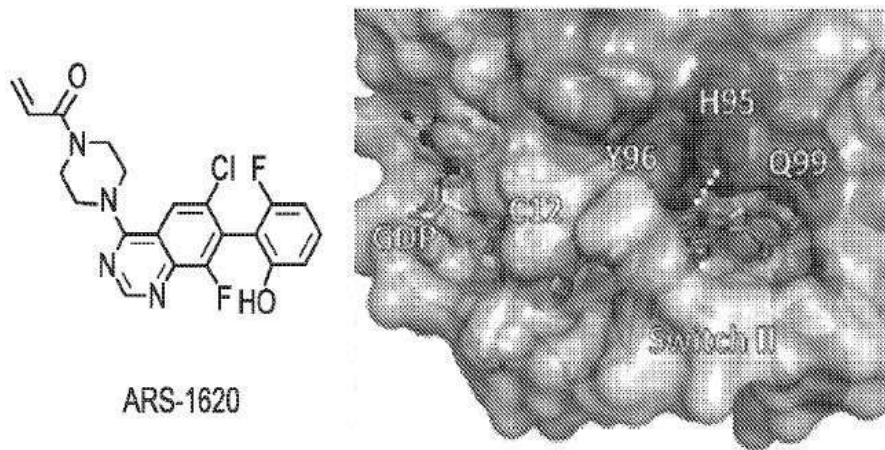
도면39a



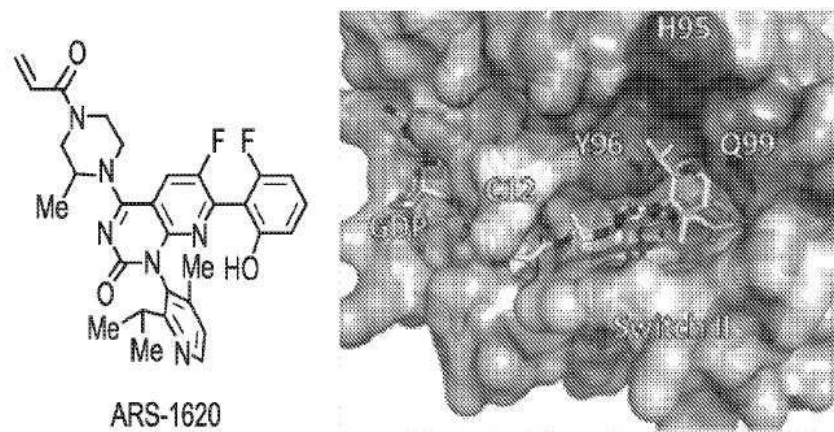
도면39b



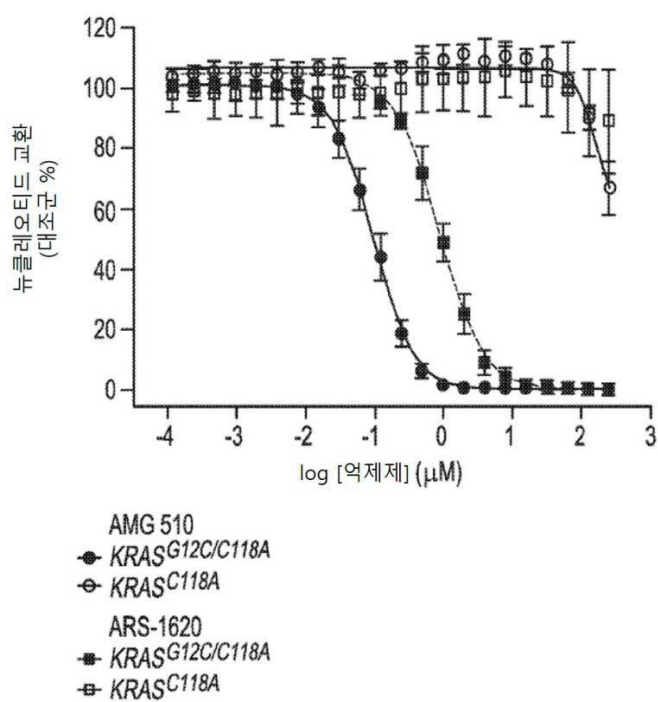
도면40a



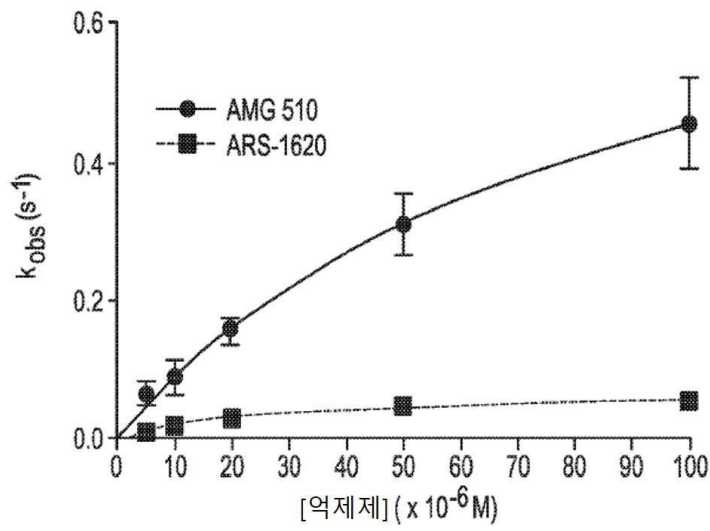
도면40b



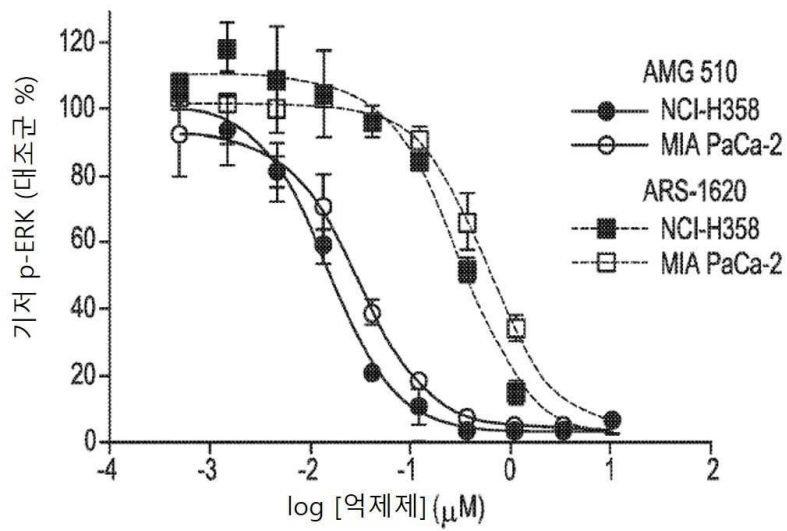
도면40c



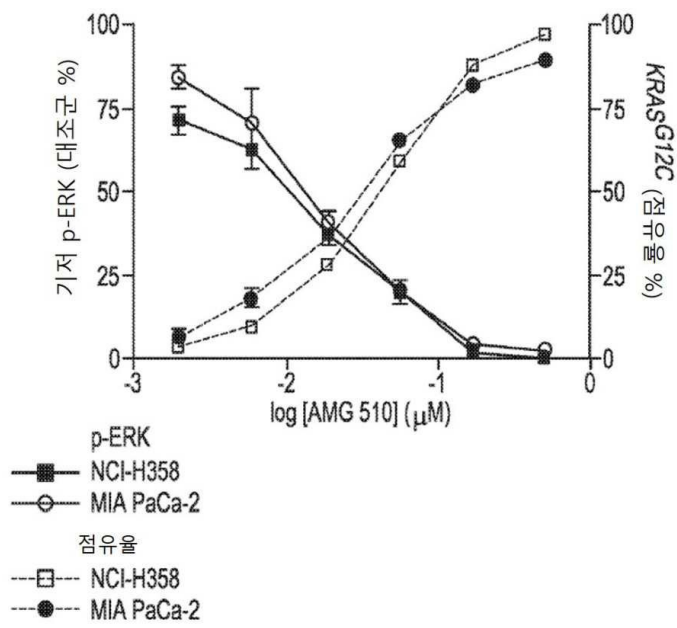
도면40d



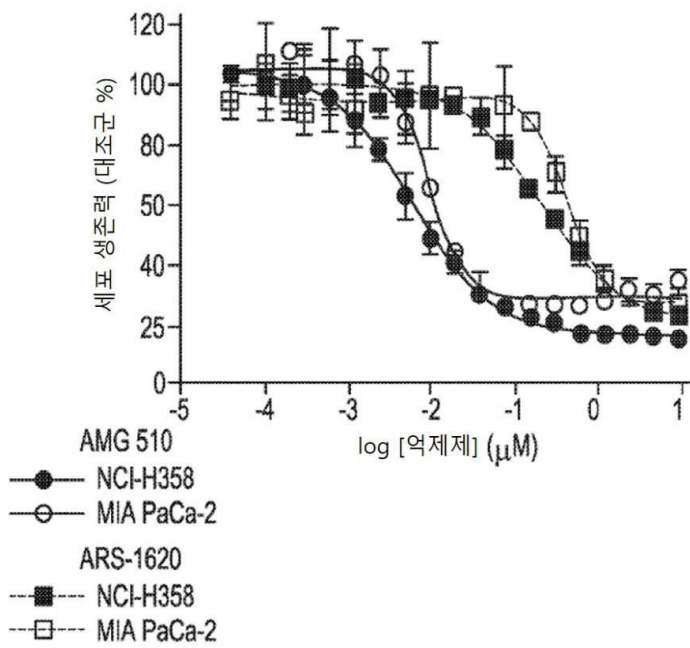
도면40e



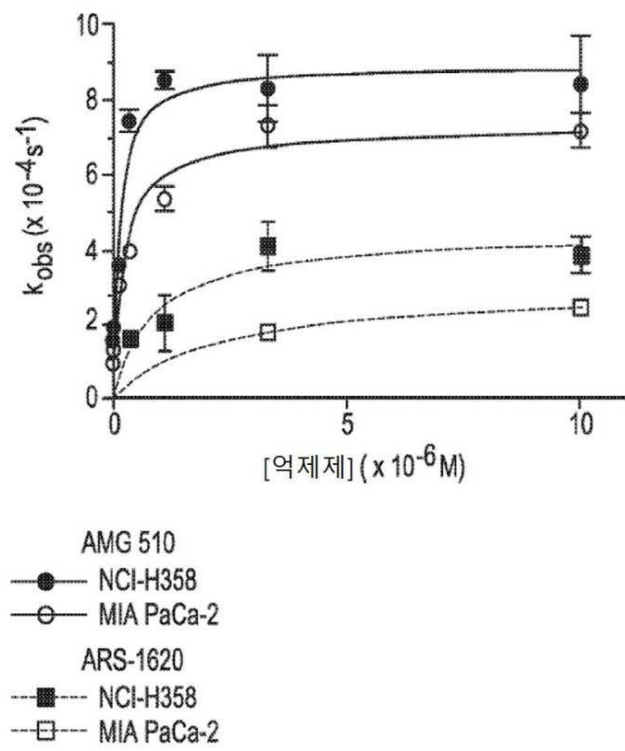
도면40f



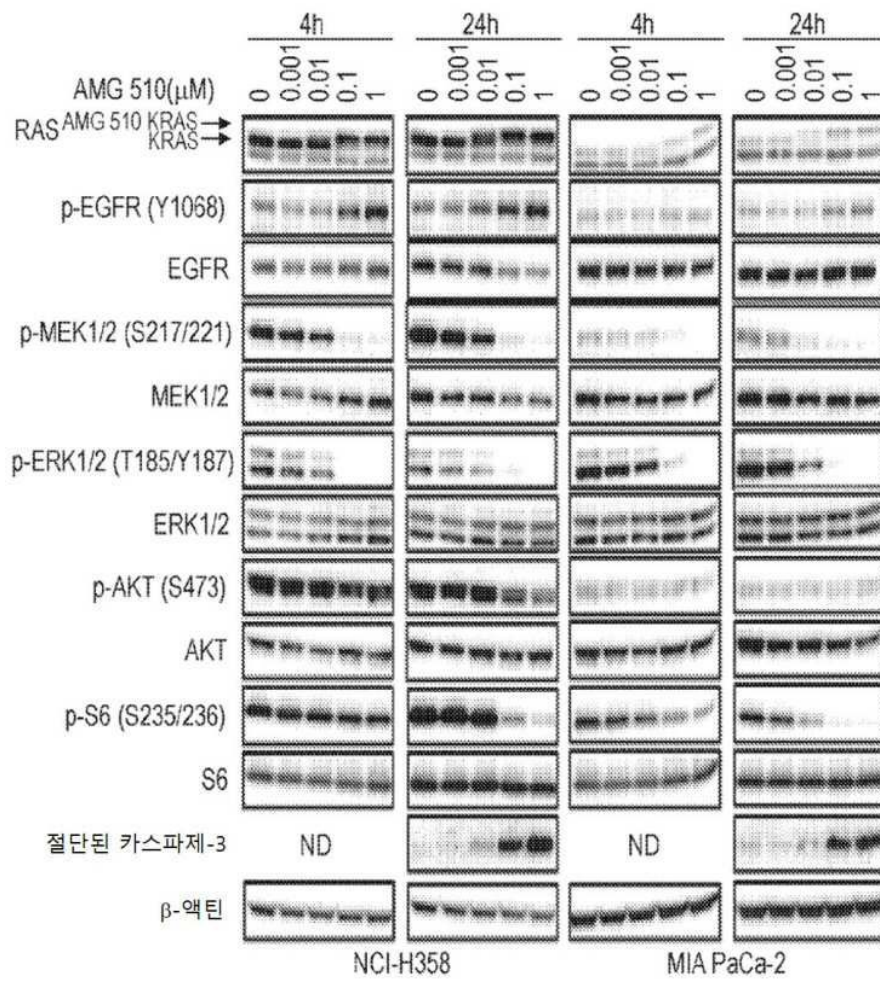
도면40g



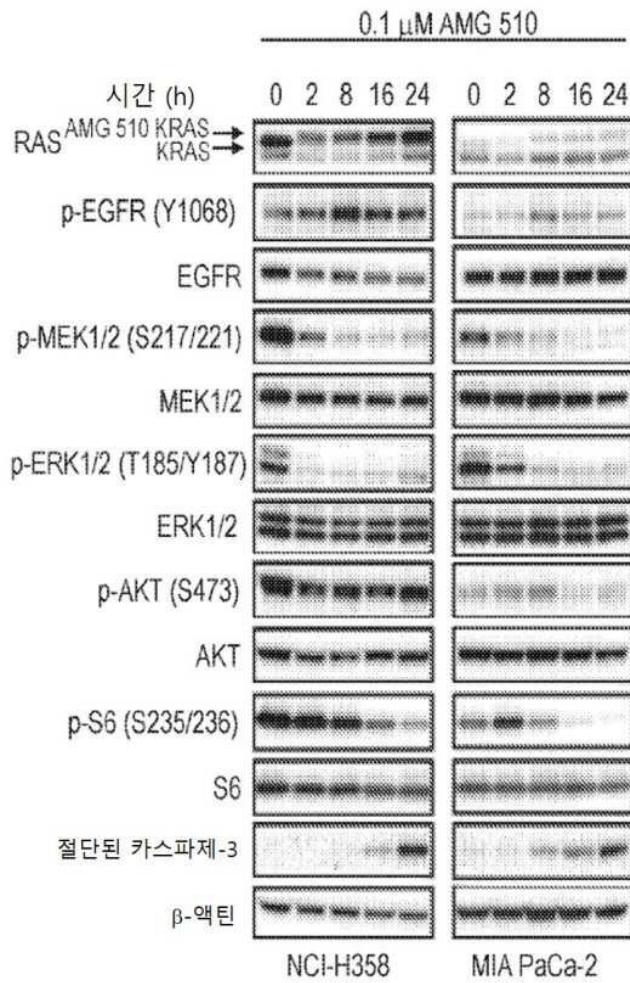
도면40h



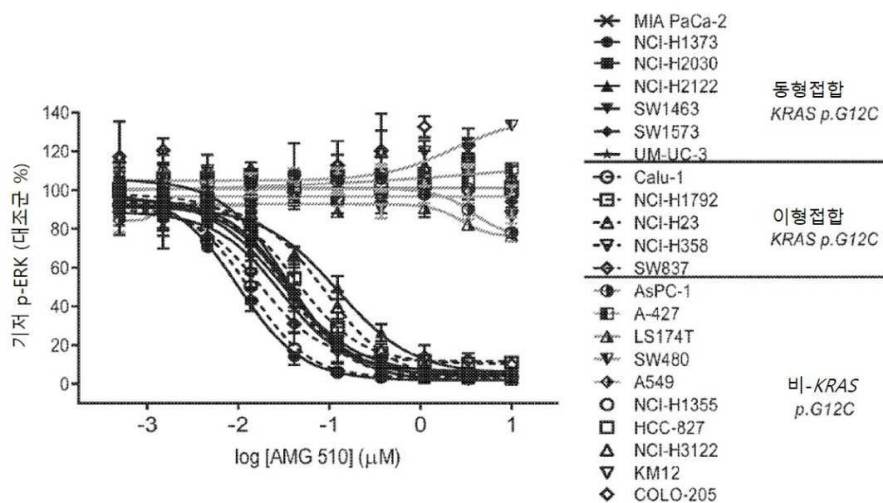
도면41a



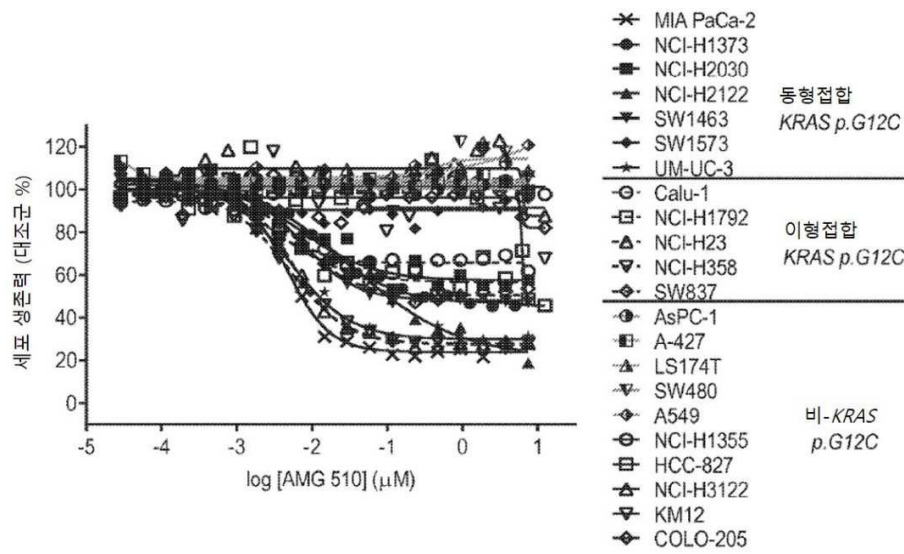
도면41b



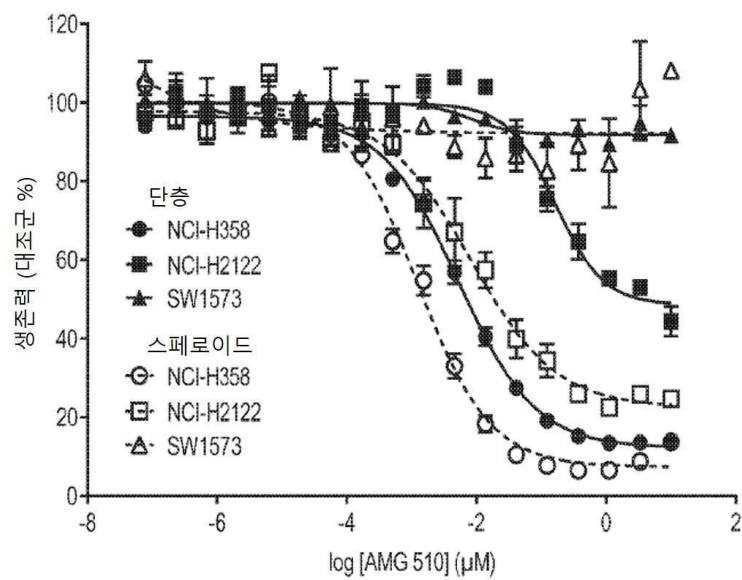
도면41c



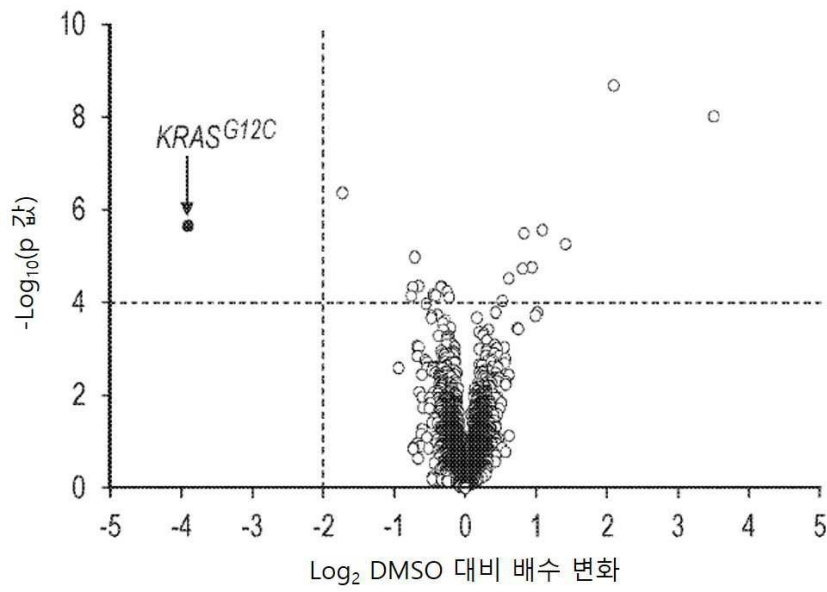
도면41d



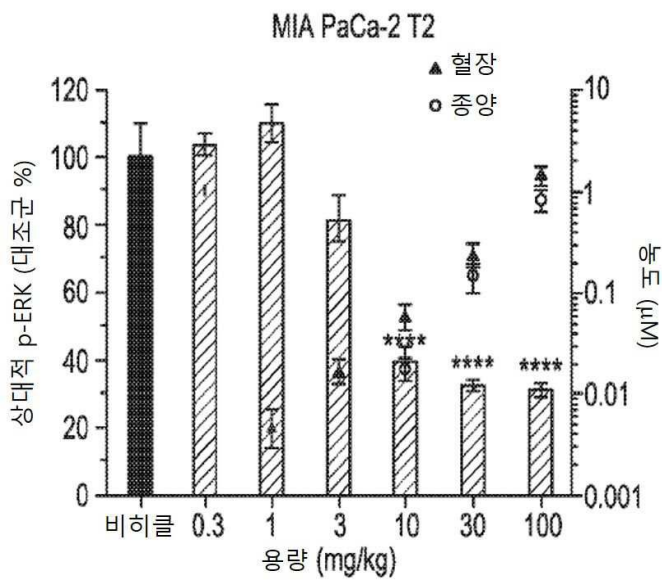
도면41e



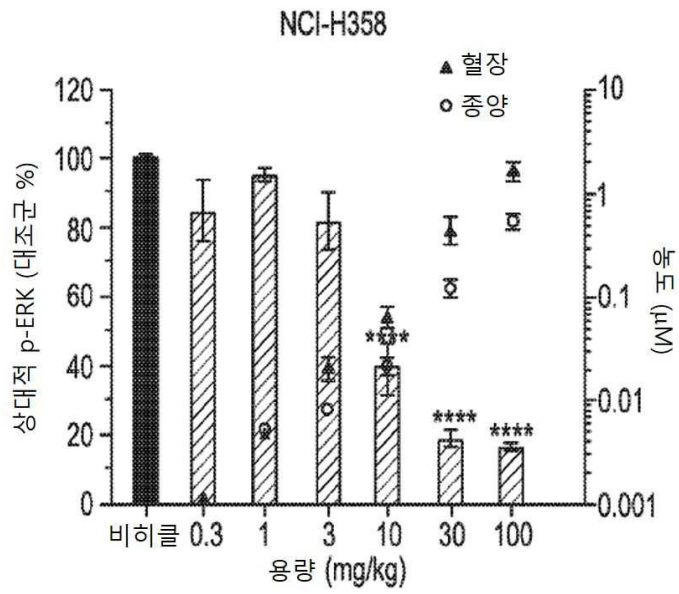
도면41f



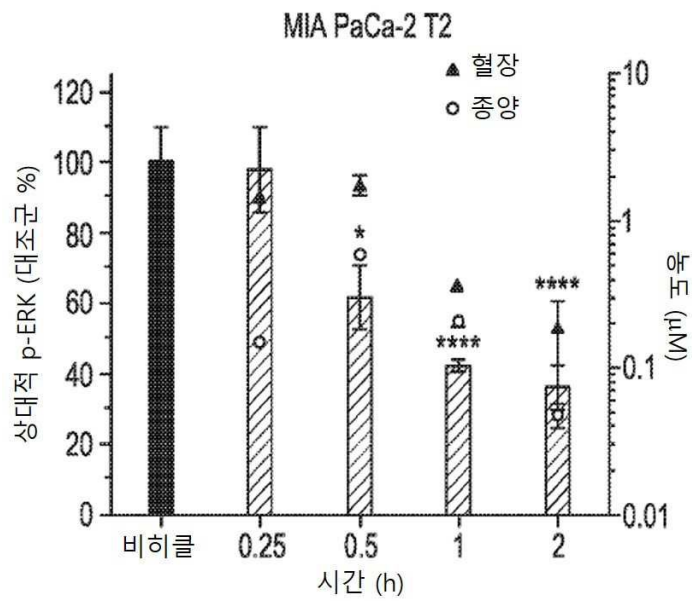
도면42a



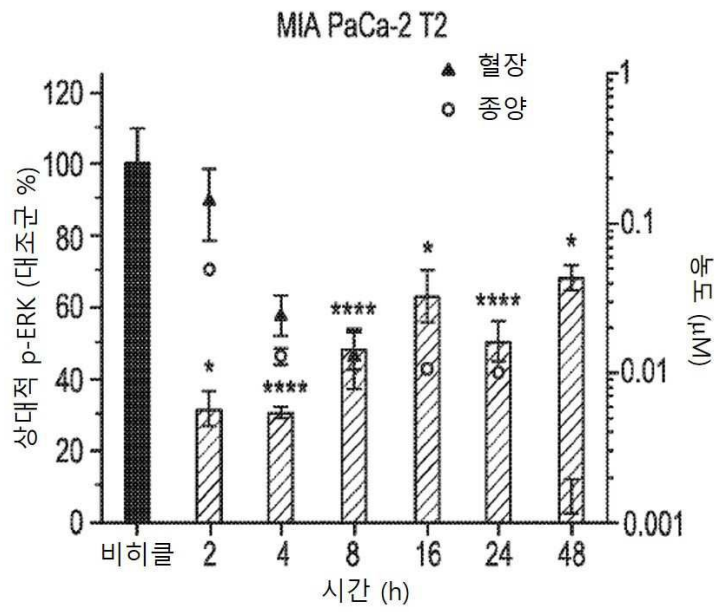
도면42b



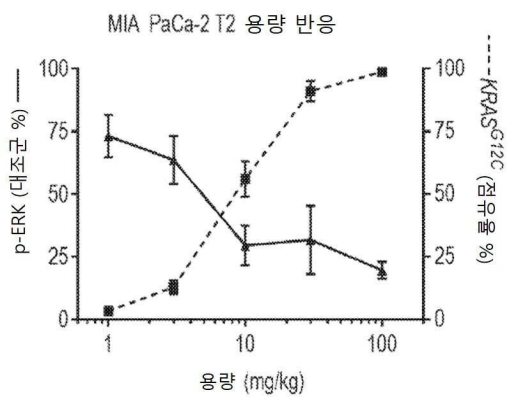
도면42c



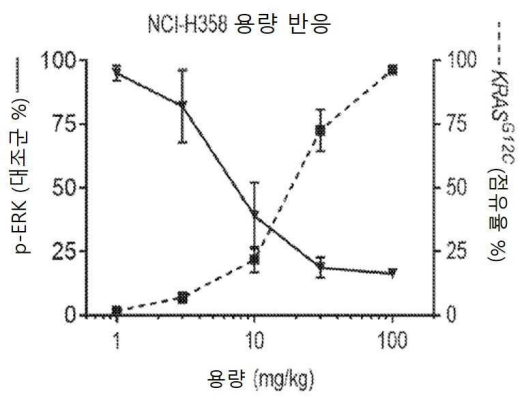
도면42d



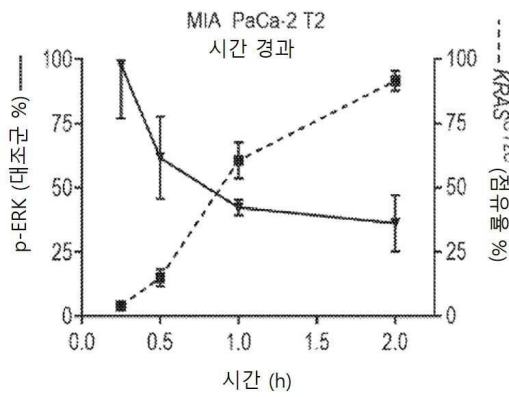
도면42e



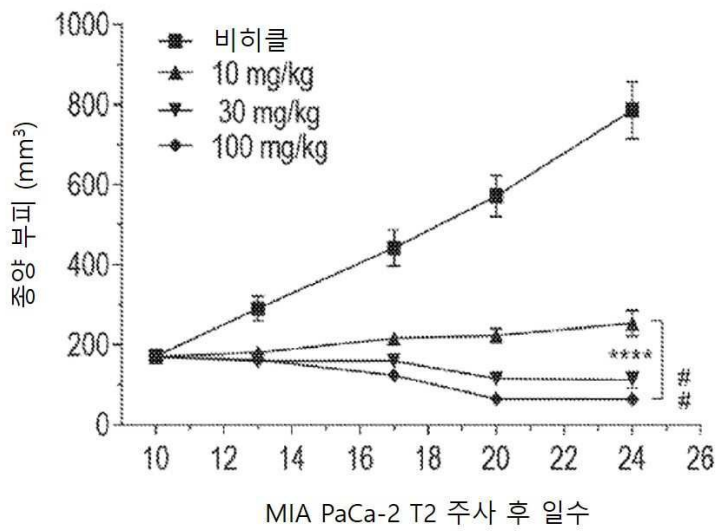
도면42f



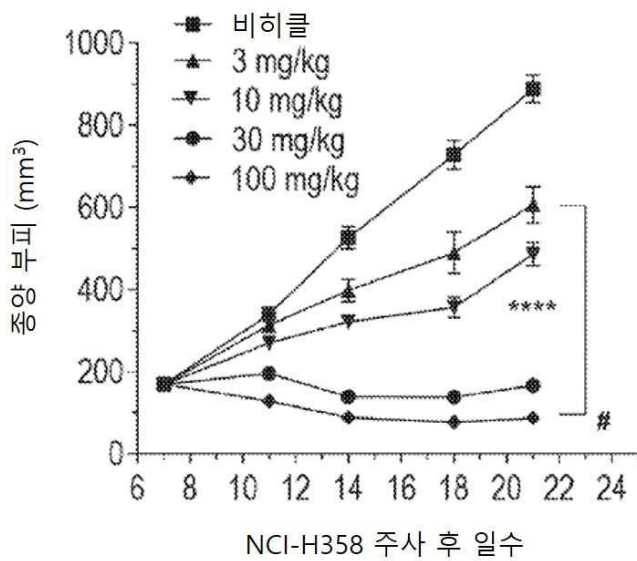
도면42g



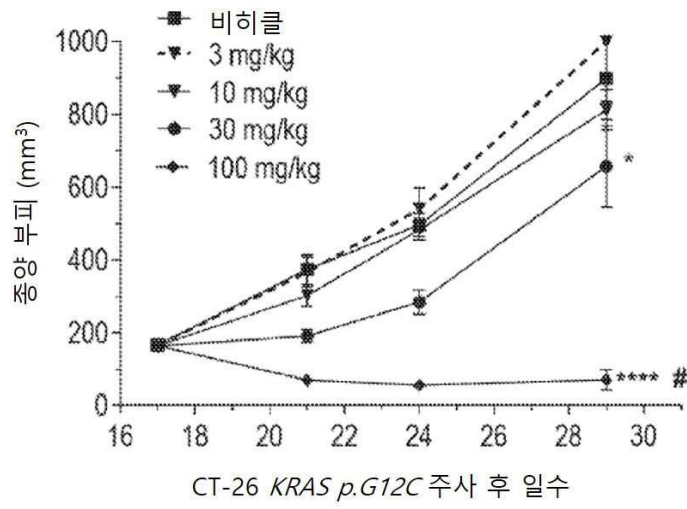
도면43a



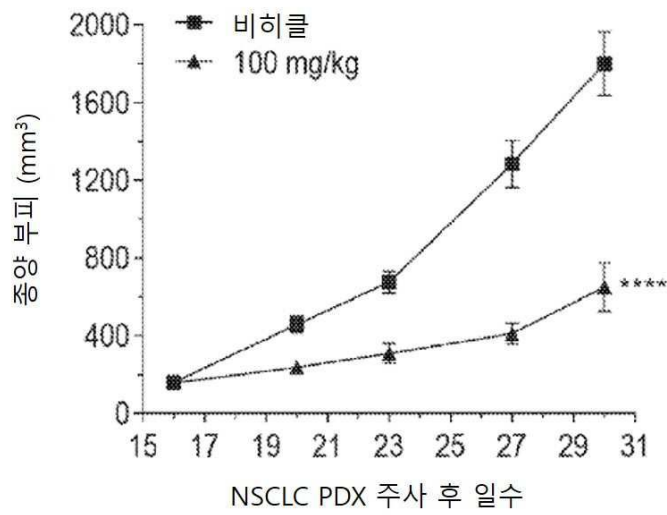
도면43b



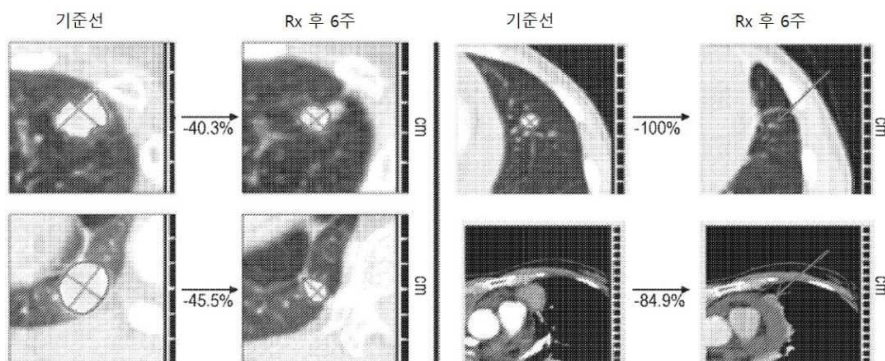
도면43c



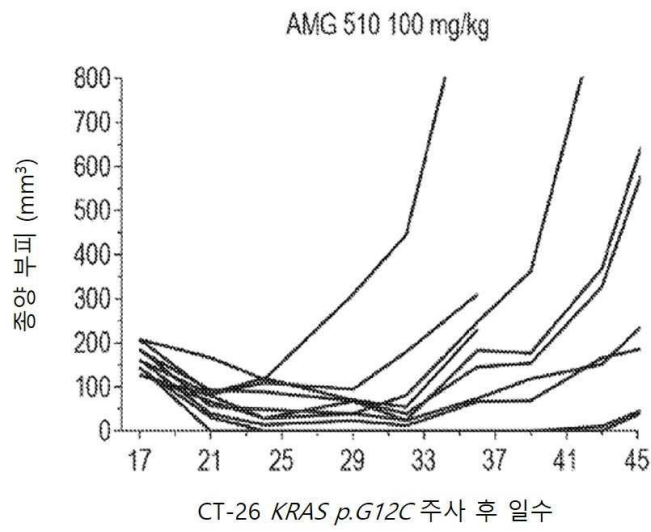
도면43d



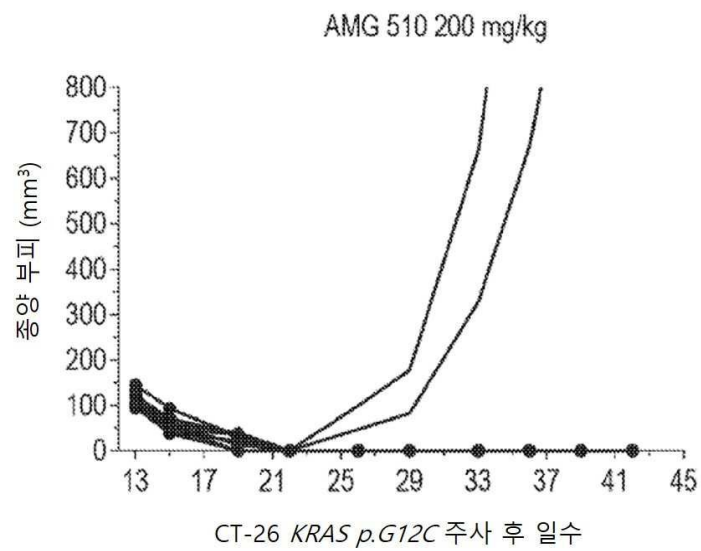
도면43e



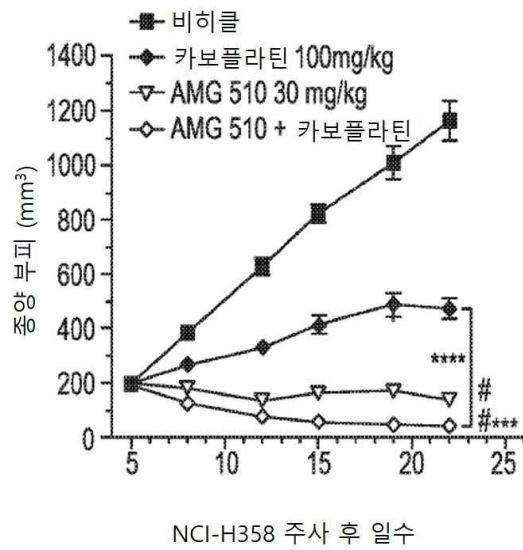
도면43f



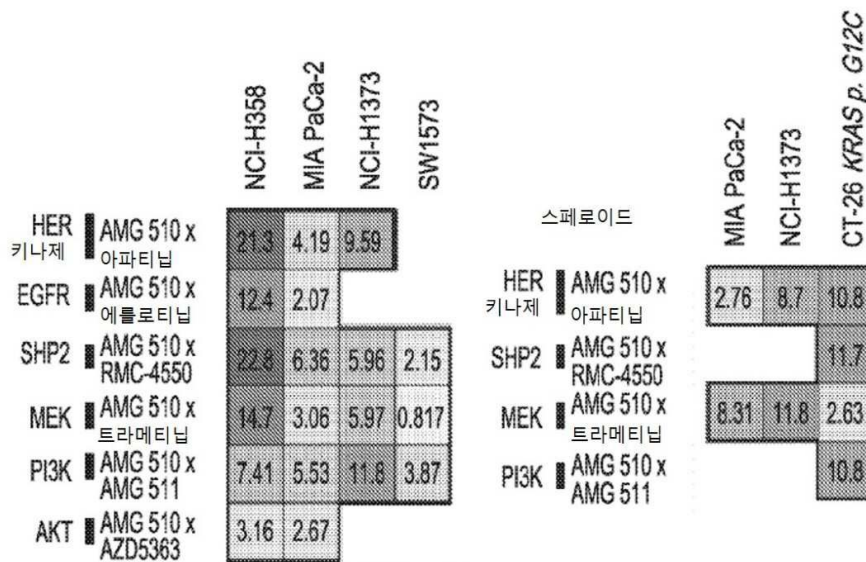
도면43g



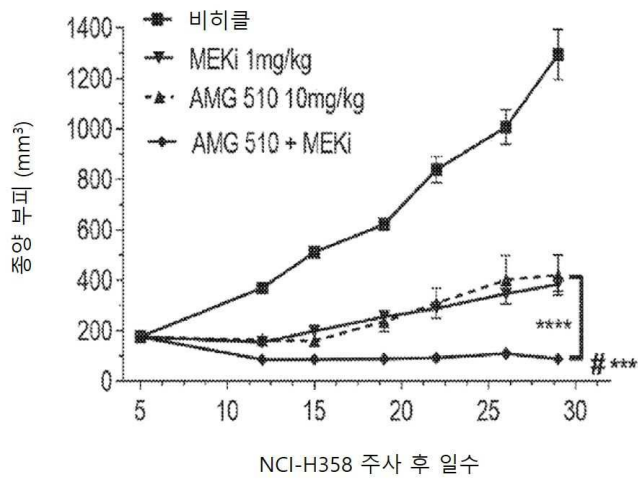
도면44a



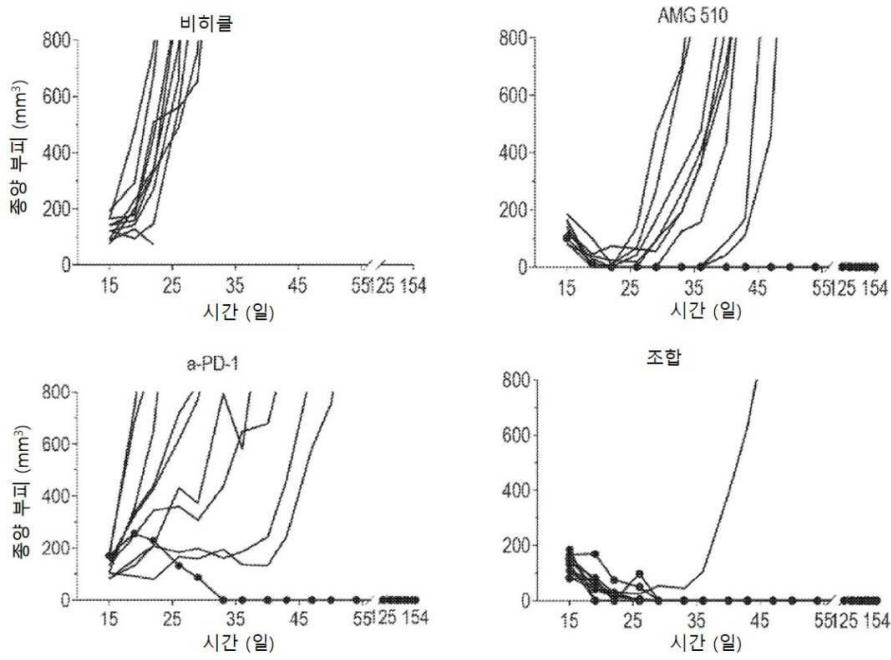
도면44b



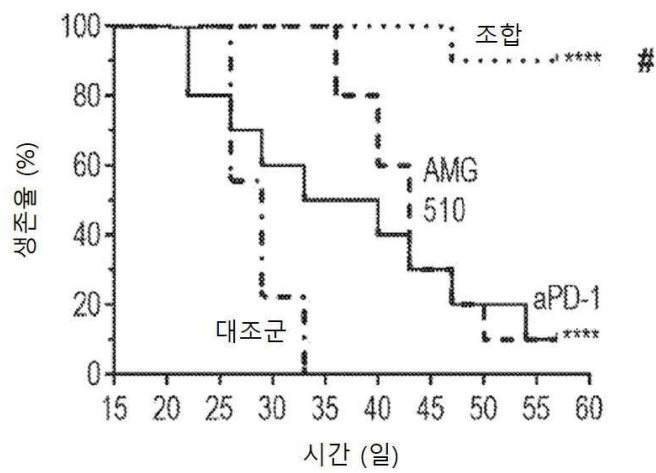
도면44c



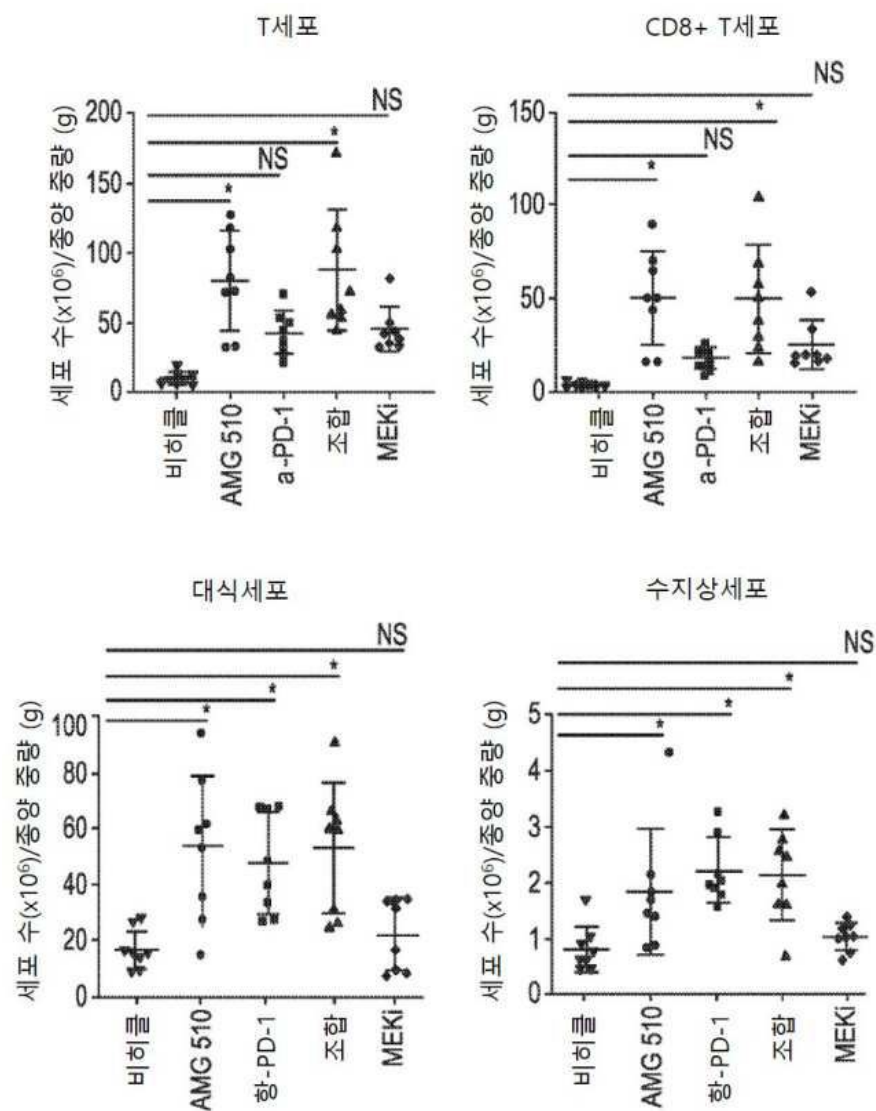
도면45a



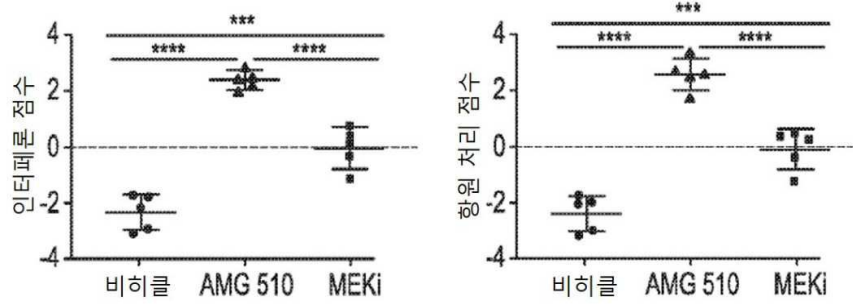
도면45b



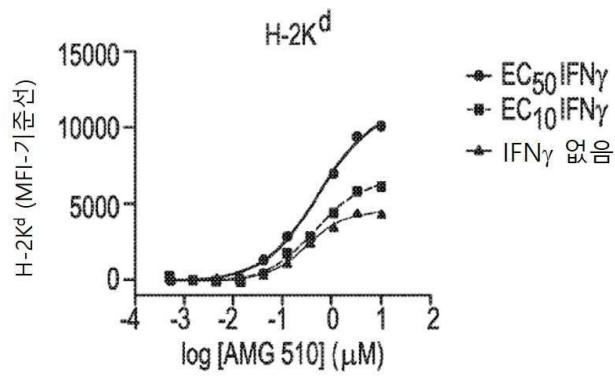
도면45c



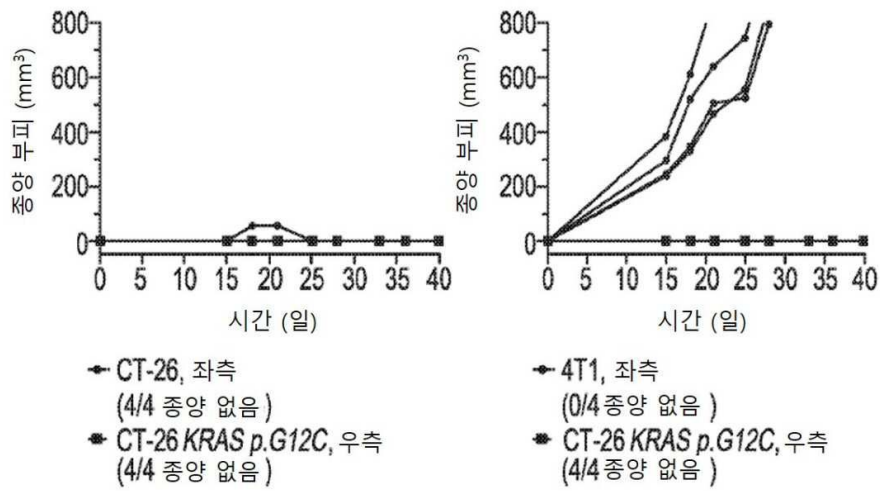
도면45d



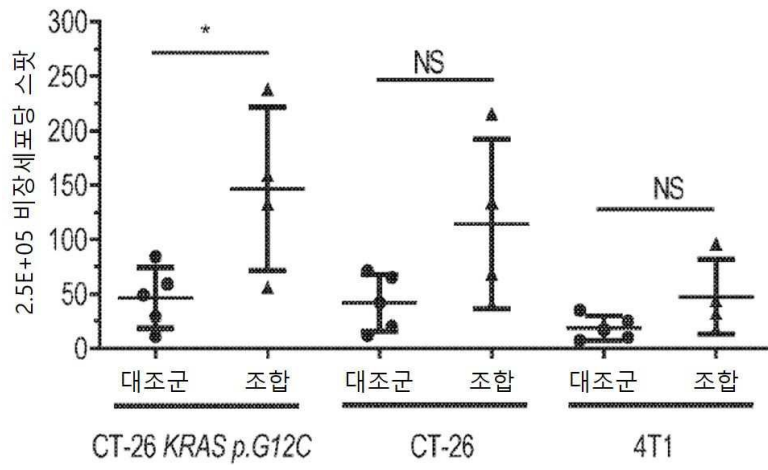
도면45e



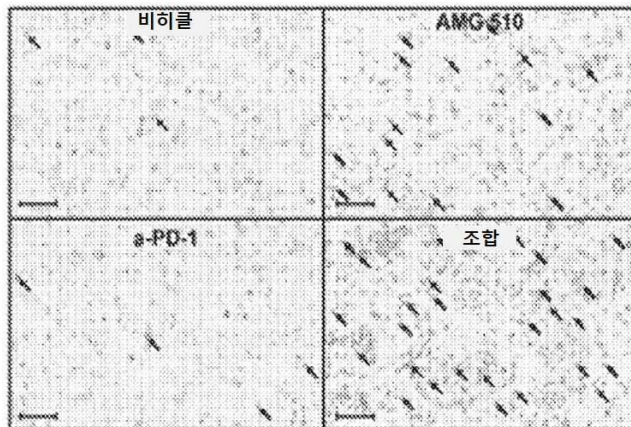
도면45f



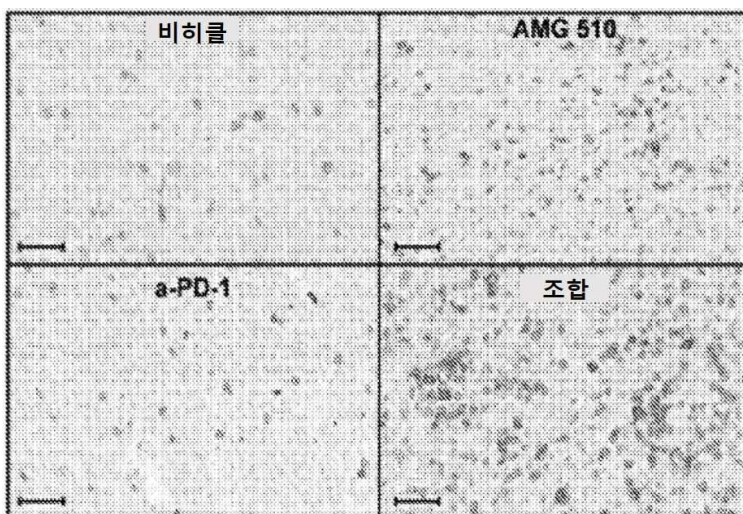
도면45g



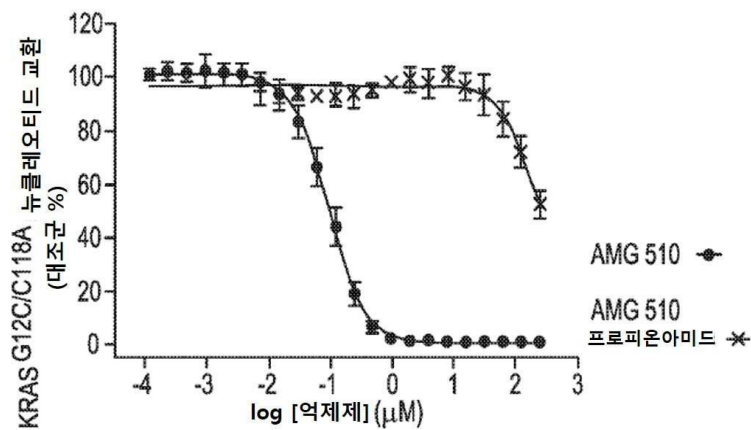
도면45h



도면45i



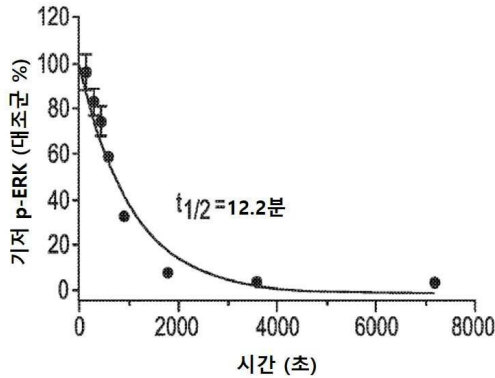
도면46a



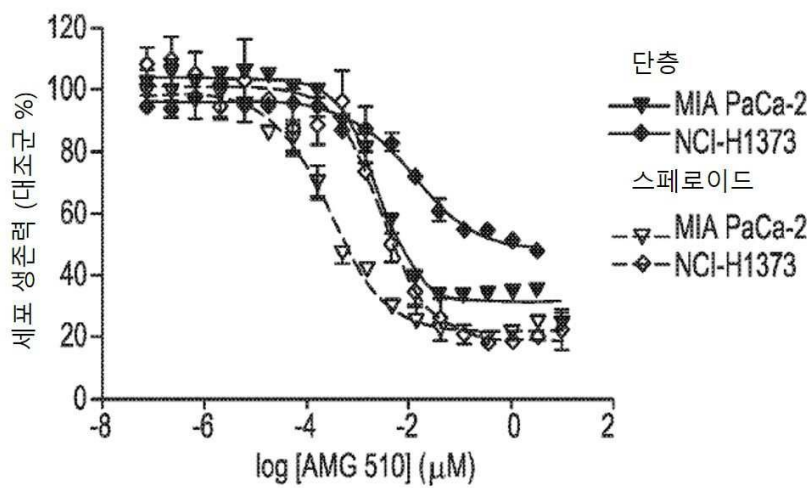
도면46b

		최대 k_{inact} 또는 k_{obs} (s^{-1})	K_i 또는 $[I]_{50}$ (M)	최대 k_{inact} 또는 k_i 또는 최대 $k_{obs}/[I]_{50}$ ($M^{-1}s^{-1}$)
질량 분석법	AMG 510	$8.5E-01 \pm 7.8E-02$	$8.6E-05 \pm 1.4E-05$	$9.8E+03 \pm 1.8E+03$
	ARS-1620	$7.3E-02 \pm 3.0E-03$	$3.1E-05 \pm 3.1E-06$	$2.4E+03$
MIA PaCa-2	AMG 510	$7.3E-04 \pm 3.6E-05$	$2.5E-07 \pm 6.2E-09$	$3.0E+03 \pm 7.1E+01$
	ARS-1620	$3.1E-04 \pm 2.2E-05$	$2.4E-06 \pm 6.6E-07$	$1.3E+02 \pm 2.7E+01$
NCI-H358	AMG 510	$8.9E-04 \pm 7.4E-05$	$1.3E-07 \pm 1.5E-08$	$7.1E+03 \pm 1.4E+03$
	ARS-1620	$4.6E-04 \pm 3.7E-05$	$1.1E-06 \pm 4.9E-07$	$4.8E+02 \pm 2.5E+02$

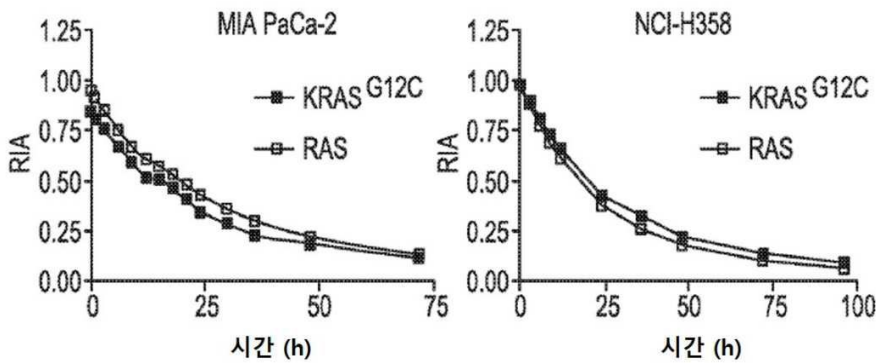
도면46c



도면46d

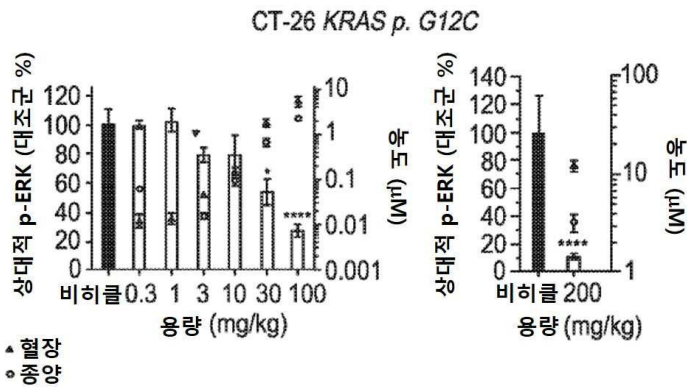


도면46e

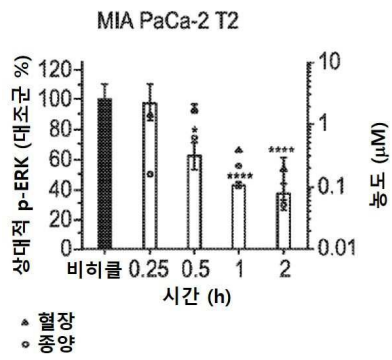


			k _{dil} 보정 없음		k _{dil} 보정 있음		
세포	분석 기간 (h)	세포 배가 시간 (h)	k _{dec} (h ⁻¹)	KRAS ^{G12C} 반감기 (h)	k _{dl} (h ⁻¹)	k _{dec} (h ⁻¹)	KRAS ^{G12C} 반감기 (h)
MIA PaCa-2	72	24	0.042	17	0.006	0.035	20
NCI-H358	96	36	0.037	19	0.010	0.029	24

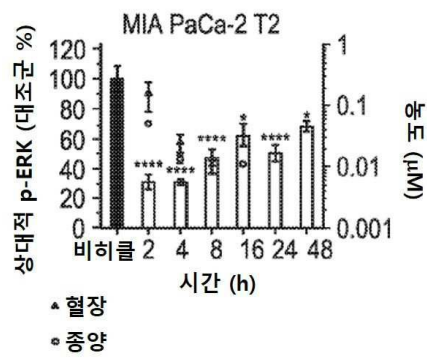
도면47a



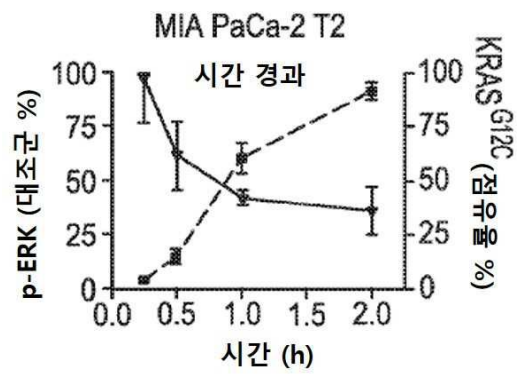
도면47b



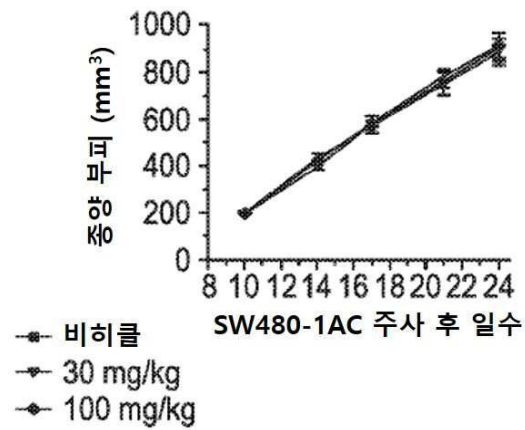
도면47c



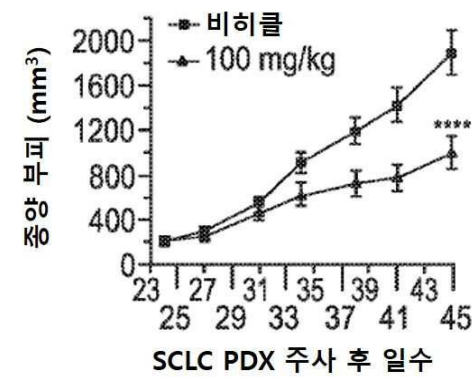
도면47d



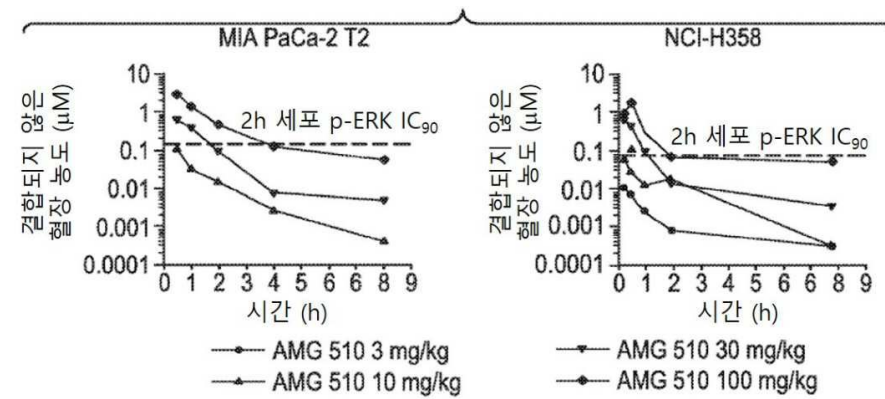
도면47e



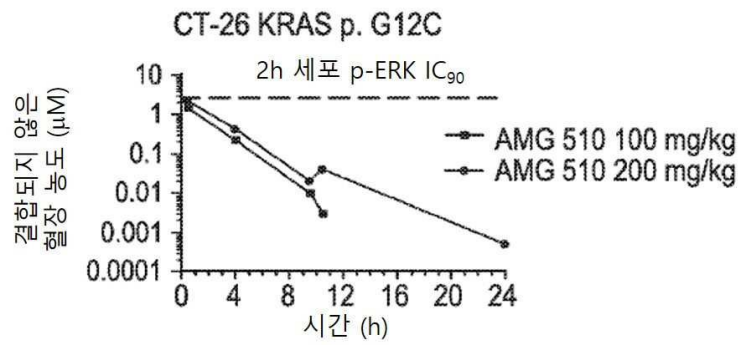
도면47f



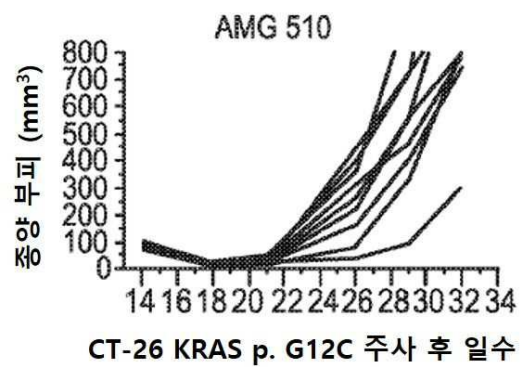
도면47g



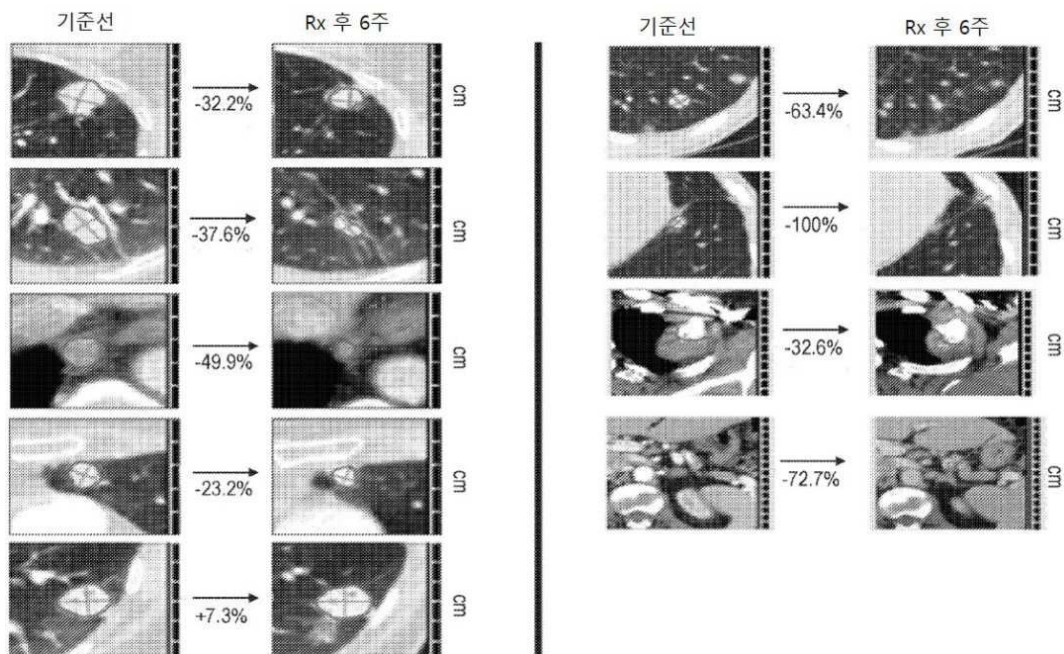
도면47h



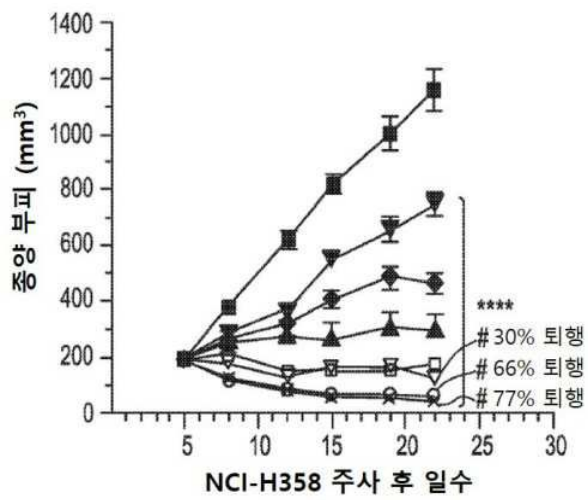
도면47i



도면47j

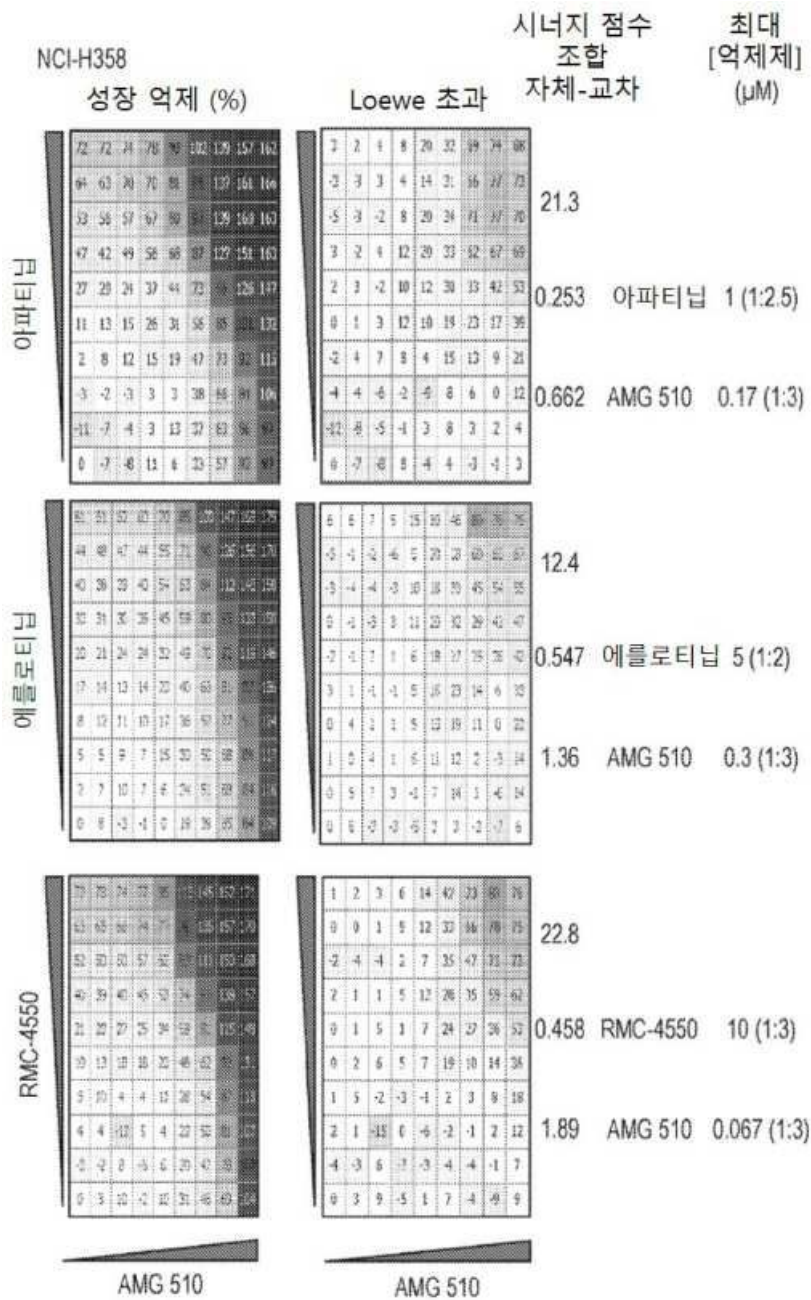


도면47k

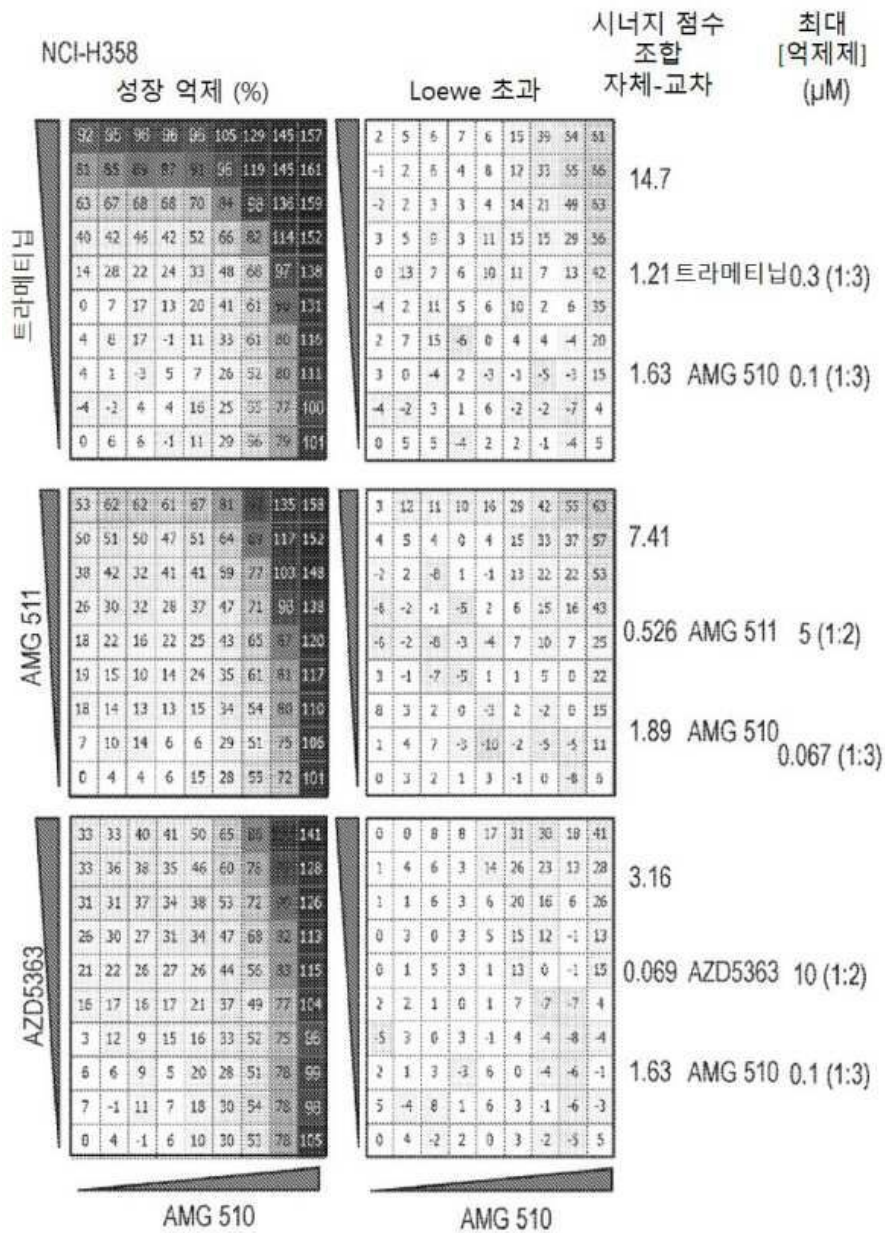


- 비히클
- ▲ AMG 510 10 mg/kg
- ▽ AMG 510 30 mg/kg
- ▼ 카보플라틴 50 mg/kg
- ◆ 카보플라틴 100 mg/kg
- AMG 510 10 mg/kg + 카보플라틴 100 mg/kg
- × AMG 510 30 mg/kg + 카보플라틴 100 mg/kg
- AMG 510 30 mg/kg + 카보플라틴 50 mg/kg

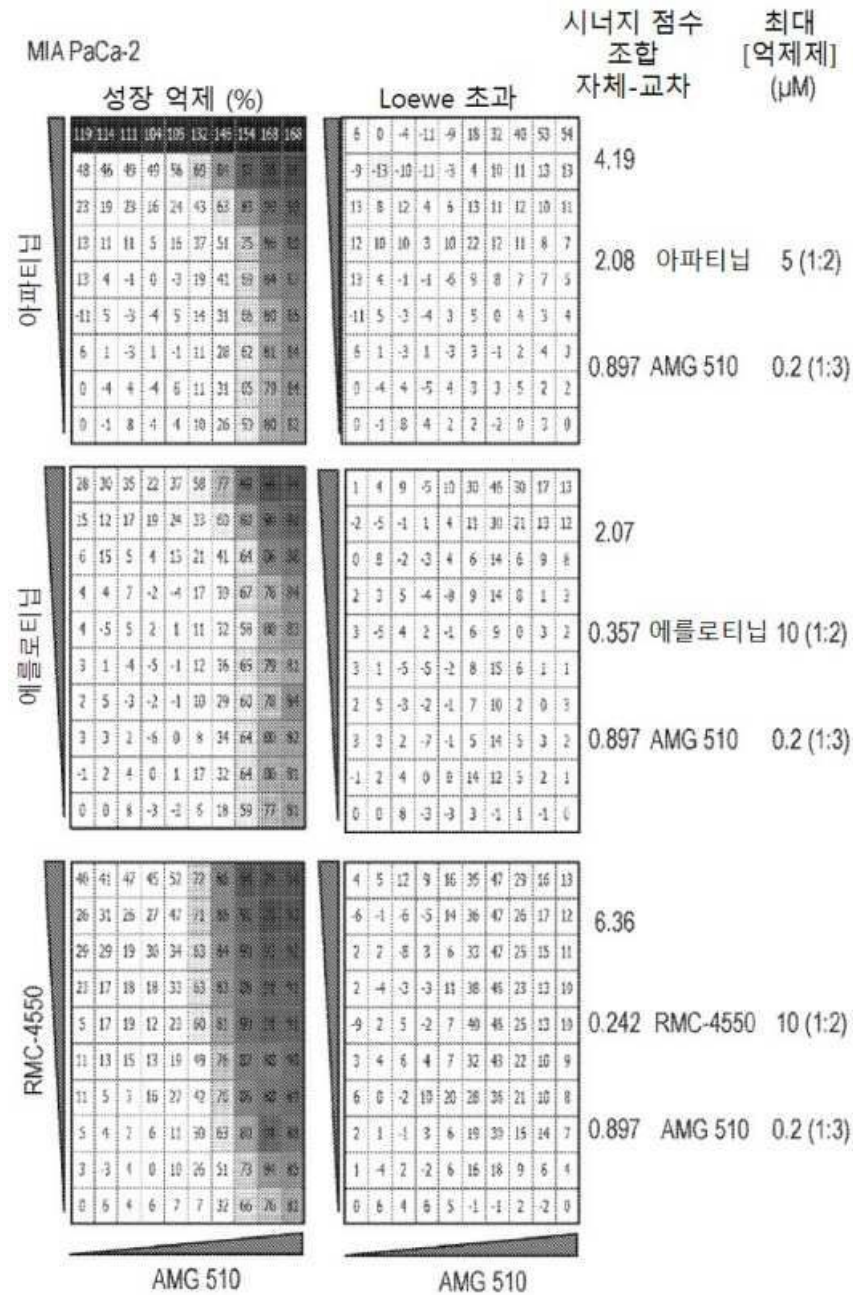
도면48a



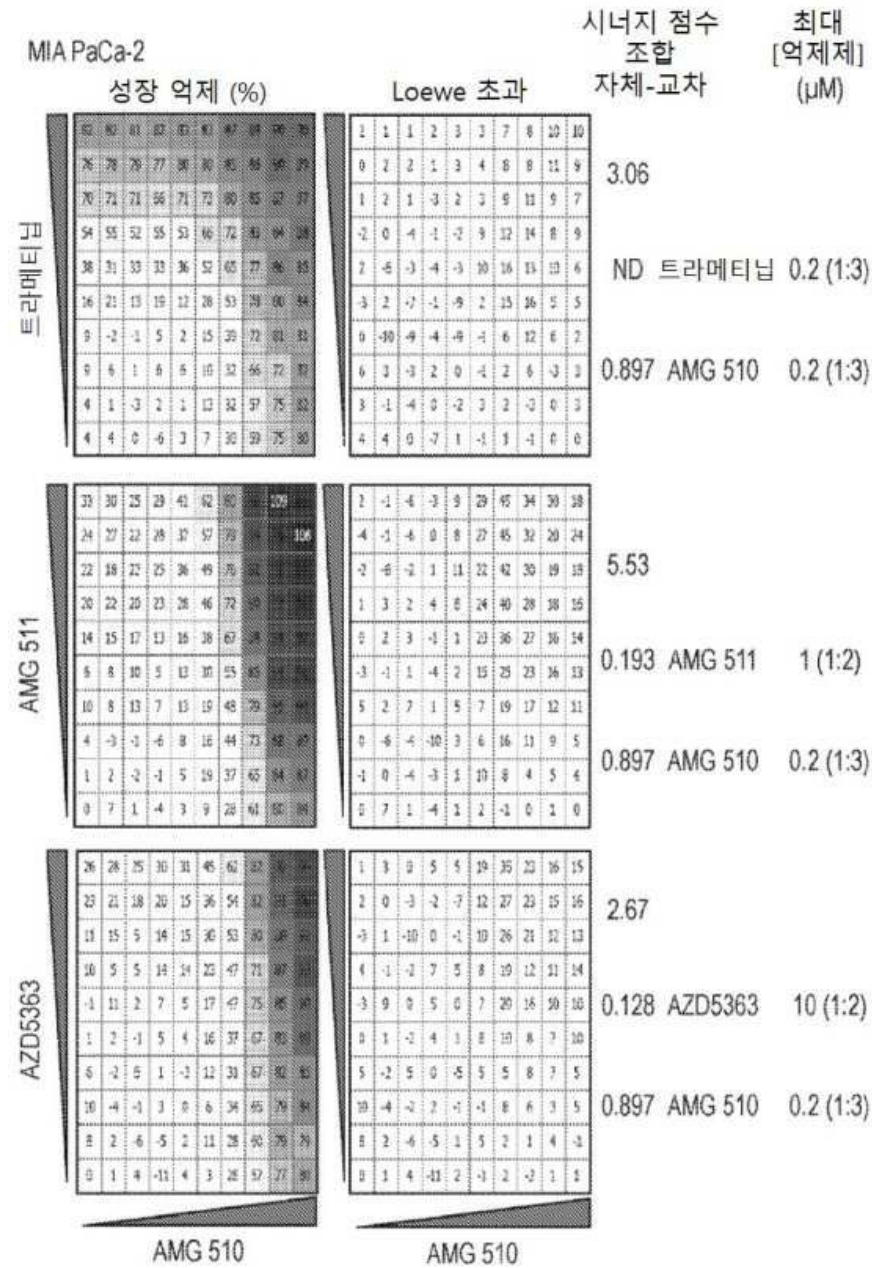
도면48b



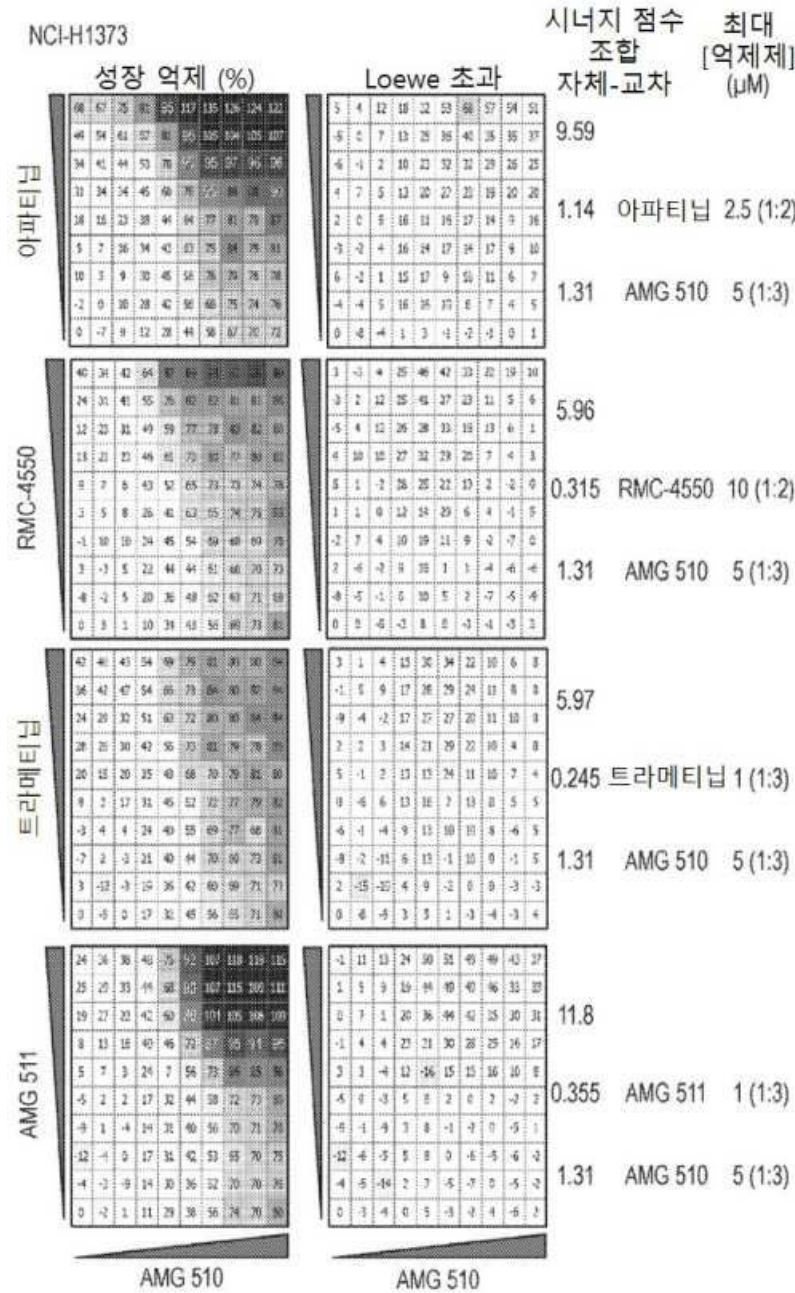
도면48c



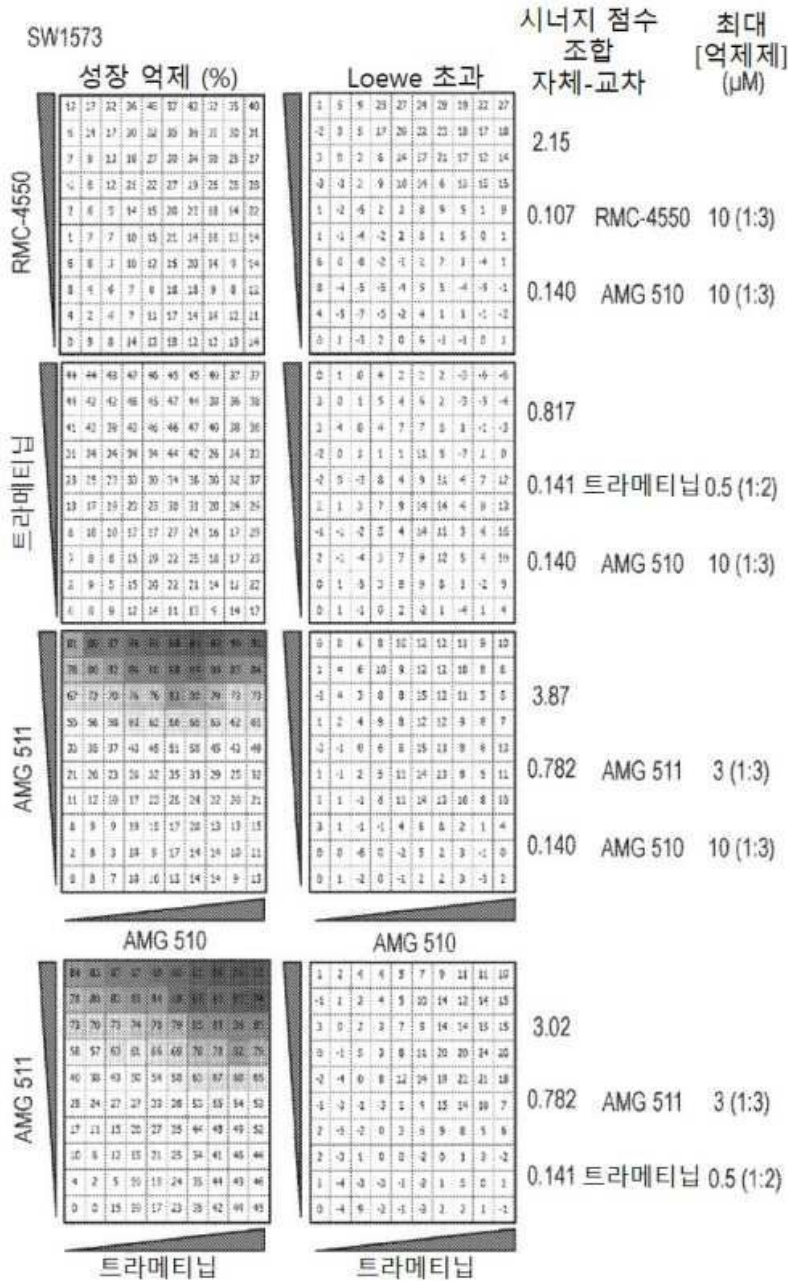
도면48d



도면48e



도면48f



도면48g

MIA PaCa-2 스페로이드

성장 억제 (%)

41	60	58	74		105
39	33	41	67	90	106
20	34	52	50		128
18	9	52	51	96	112
4	12	10	71	84	115
-3	1	27	75	103	115
13	-12	21	52		118
10	6	15	47	118	125
0	31	28	44	96	134

부속 1

Loewe 초과

2	20	18	19	1	-17
4	-3	3	12	-5	-16
-6	5	16	-5	2	6
4	-11	21	-5	-7	-9
-1	-1	18	16	-14	-7
-5	-9	3	20	5	-7
12	-20	-1	-4	1	-4
10	-1	-8	-8	20	4
0	25	7	-11	-7	12

시너지 점수
조합
자체-교차

최대
[억제제]
(μM)

1.5

2.08 아파트입 2.5 (1:2)

1.33 AMG 510 0.05 (1:4)

1131023

147	149	153	156	170	167
124	125	120	121	146	166
91	91	104	127	137	141
73	67	82	86		131
44	44	66	71	91	117
25	19	33	75	91	111
5	35	40	61		110
-4	18	35	50		110
7	15	25	62		111
0	7	19	65	86	102

AMG 510

9	11	15	18	32	28
-2	-2	-7	-6	19	33
-9	-13	0	22	32	37
1	-7	5	1	5	31
3	1	13	-1	-2	17
6	-13	-2	11	0	11
-3	22	13	-2	8	10
-7	10	11	-11	6	10
6	9	2	0	6	11
0	2	-3	3	-5	2

AMG 510

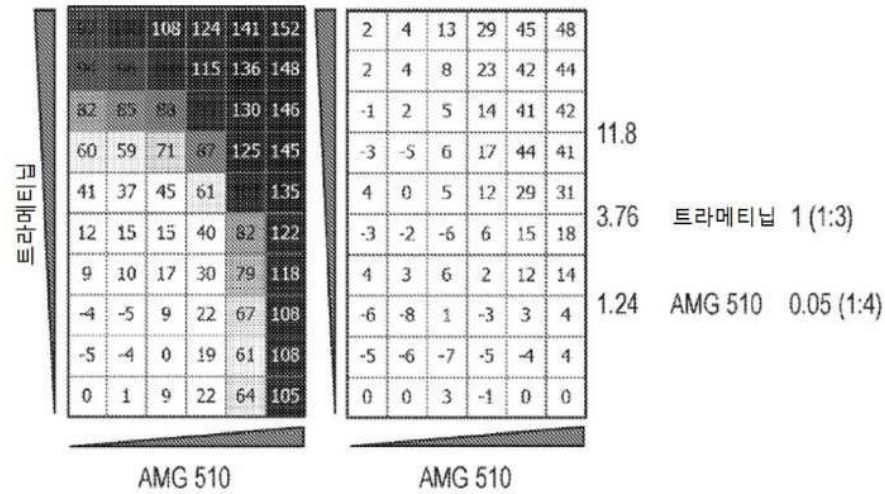
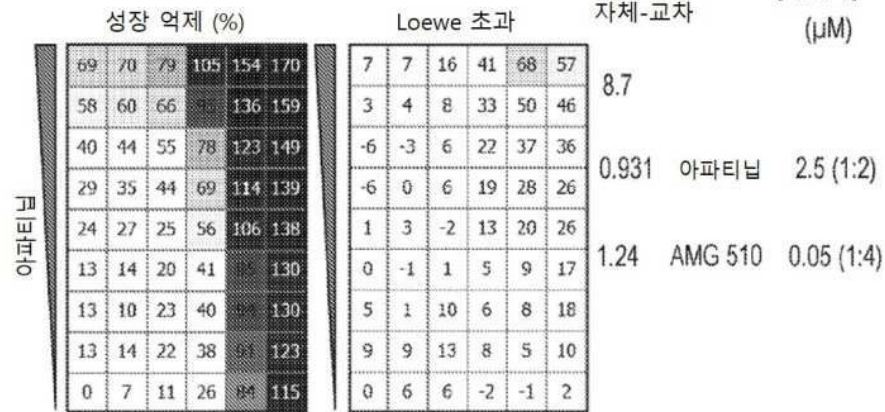
8.31

4.14 트라메티닙 0.1 (1:3)

1.33 AMG 510 0.05 (1:4)

도면48h

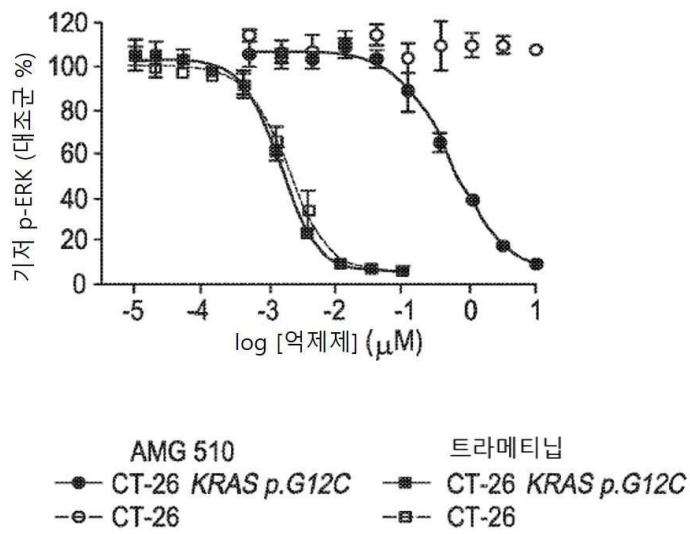
NCI-H1373 스페로이드



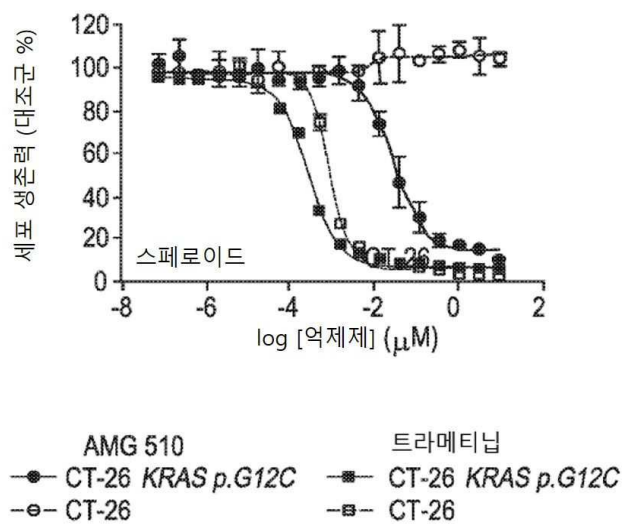
도면48i

CT-26 KRAS p.G12C - 스페로이드							시너지 점수 조합		최대 [억제제] (μ M)				
성장 억제 (%)							Loewe 초과		자체-교차				
아파티닙	63	73	87	113	167	178	5	15	28	73	78	-44	10.8
	52	52	71	105	156	170	4	3	21	49	67	37	
	20	32	48	85	133	153	-11	0	11	36	-44	19	
	15	24	29	59	119	149	1	7	7	18	29	15	
	14	15	22	49	106	136	9	8	8	14	11	2	
	10	10	16	40	87	138	8	7	7	7	7	2	
	6	17	16	38	86	136	6	14	8	6	7	2	
	8	11	18	30	93	139	8	9	11	-3	4	6	
	0	6	10	34	82	137	0	4	2	1	3	4	
	0	1	7	32	89	133	0	0	0	0	0	0	
RMC-4550	19	26	48	81	156	169	1	7	29	55	72	38	11.7
	18	25	43	83	148	165	0	6	25	48	64	34	
	17	27	35	68	137	159	0	9	17	33	53	28	
	16	21	33	59	128	155	-1	4	15	24	44	24	
	15	18	24	56	118	152	1	-1	7	21	35	21	
	11	11	21	49	106	144	-1	-2	6	14	22	12	
	6	6	19	43	96	141	-3	-4	5	8	15	10	
	7	11	19	43	96	141	1	3	6	8	11	10	
	9	11	22	38	89	136	5	6	10	3	5	5	
	0	3	14	34	83	131	0	-1	2	-1	0	0	
트라메티닙	147	149	146	146	151	155	2	4	1	1	6	10	2.63
	132	133	130	134	142	148	-1	0	-3	1	10	16	
	105	110	104	114	127	146	1	5	-1	6	9	18	
	60	72	67	84	106	139	-2	11	3	7	-2	14	
	25	30	35	48	85	117	-1	3	2	-1	-7	-6	
	11	18	20	41	76	121	2	7	5	9	-10	-1	
	10	14	16	35	71	127	7	9	9	9	-10	6	
	6	7	13	30	70	126	5	6	8	8	-13	4	
	3	2	13	33	73	132	3	1	9	10	-7	10	
	0	2	7	29	70	131	0	2	4	8	-10	9	
AMG 511	81	86	91	110	154	172	1	6	14	30	68	38	10.8
	82	88	92	100	146	169	5	10	14	29	60	35	
	78	80	80	97	140	162	7	9	8	23	54	28	
	58	62	68	80	125	157	-1	2	7	22	39	23	
	36	39	44	65	112	152	-6	-4	-2	10	26	18	
	21	29	29	54	105	144	-3	3	-1	8	15	9	
	17	19	26	42	87	140	6	5	6	4	12	6	
	11	18	22	40	84	141	6	11	8	4	8	7	
	9	15	15	38	87	137	7	10	5	-4	7	3	
	0	4	13	31	85	135	0	2	4	-2	-1	1	
AMG 510							AMG 510						

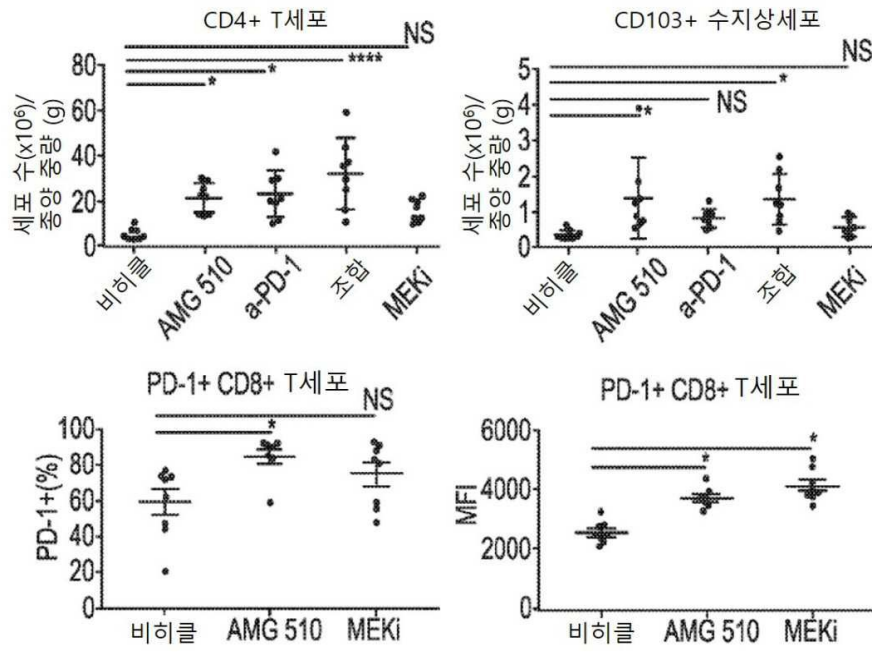
도면49a



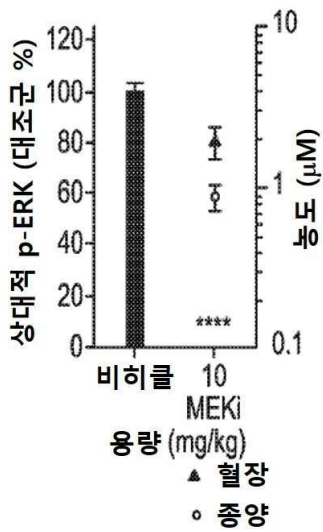
도면49b



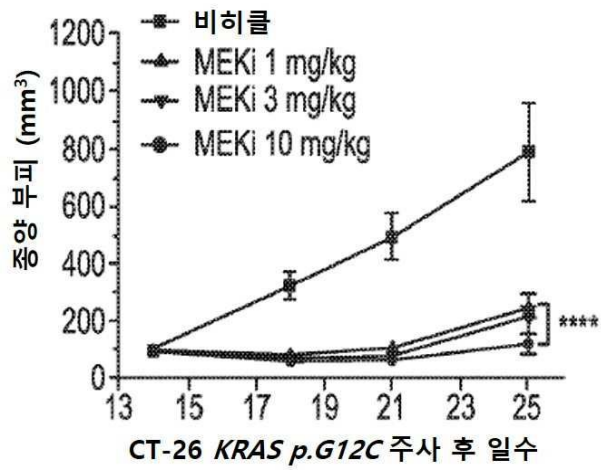
도면50a



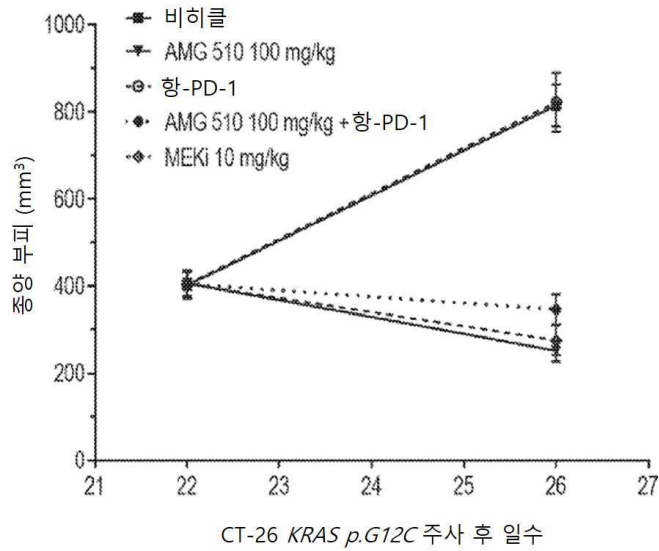
도면50b



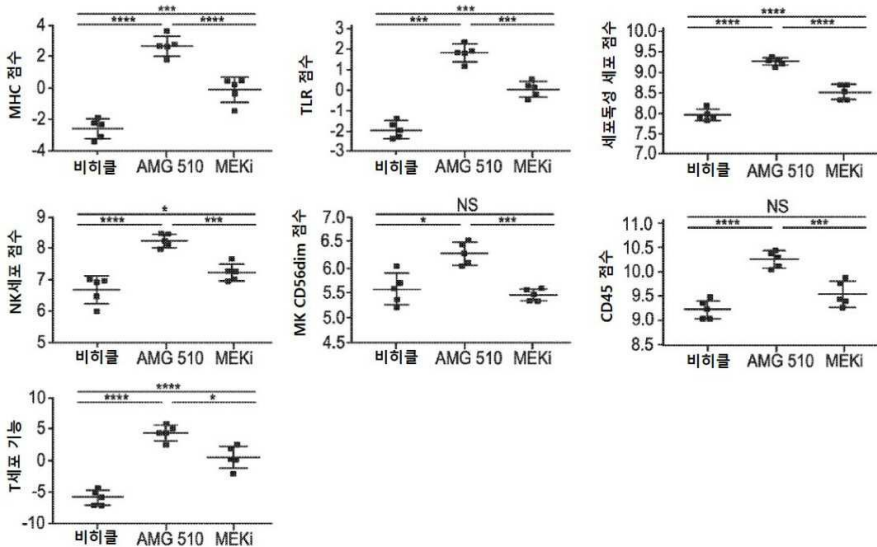
도면50c



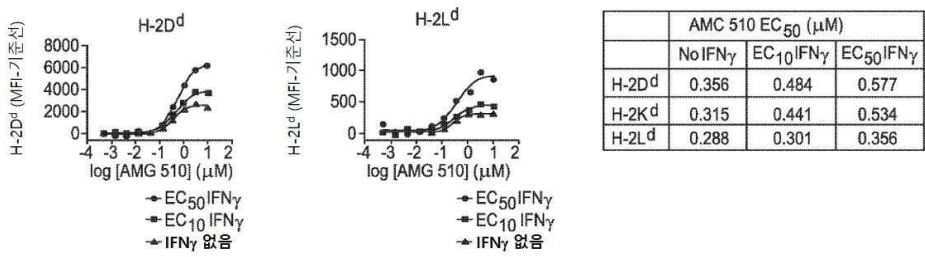
도면50d



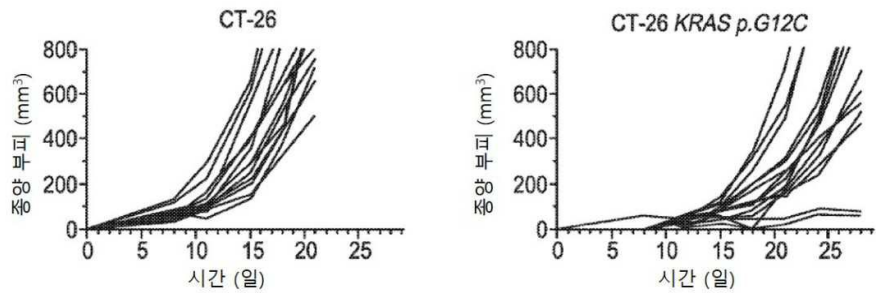
도면50e



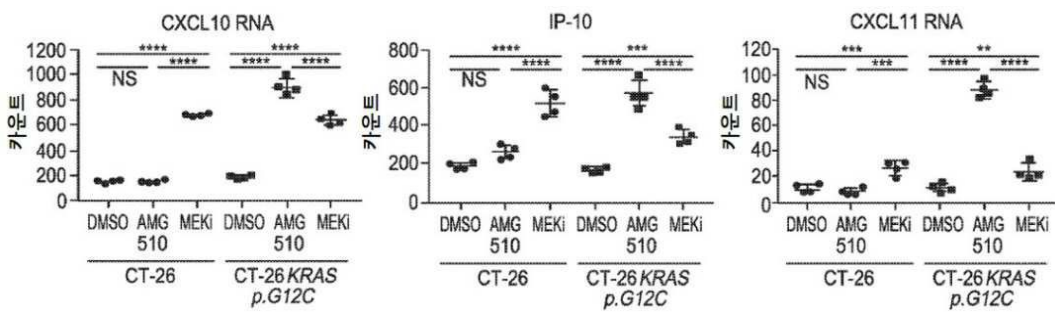
도면50f



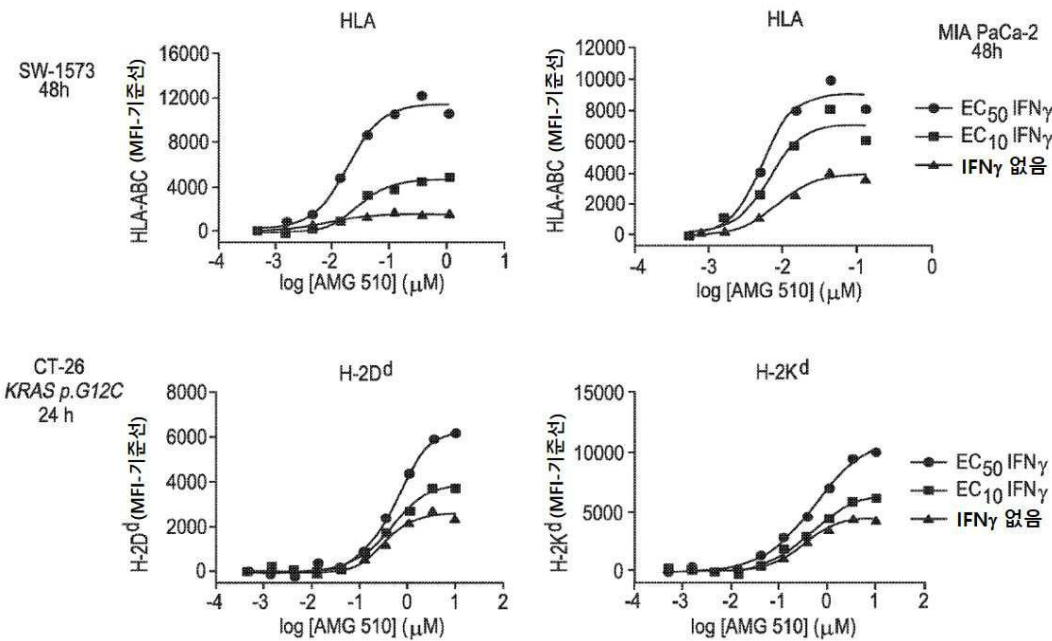
도면50g



도면50h



도면50i



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Amgen Inc.
 LIPFORD, James Russell
 CANON, Jude Robert
 SAIKI, Anne Y.
 REX, Karen Louise
- <120> COMBINATION THERAPY INCLUDING A KRASG12C INHIBITOR
 AND ONE OR MORE ADDITIONAL PHARMACEUTICALLY ACTIVE
 AGENTS FOR THE TREATMENT OF CANCERS
- <130> IPA210590-US
- <150> 62/769,355
- <151> 2018-11-19
- <150> 62/821,376
- <151> 2019-03-20
- <150> 62/865,819
- <151> 2019-06-24
- <160> 21
- <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 1

Ser Tyr Asp Met Ser

1 5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 2

Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys

1 5 10 15

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 3

Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val

1 5 10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 5

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<

400> 6

Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His Thr

1 5

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 7

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala Met Asp Val Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Trp

20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Glu Ser Phe Pro His

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 9

<211> 472

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic peptide

<400> 9

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp

1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
 20 25 30
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 35 40 45
 Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 50 55 60
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Leu Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 85 90 95
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 100 105 110
 Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ser Pro Ser Gly His Tyr Phe Tyr Ala
 115 120 125
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 130 135 140
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 165 170 175
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 180 185 190
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 195 200 205
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 210 215 220
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 225 230 235 240
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 245 250 255
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro

260 265 270
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 275 280 285
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 290 295 300
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Cys Glu Glu Gln

 305 310 315 320
 Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Cys Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 325 330 335
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 340 345 350
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 355 360 365
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr

 370 375 380
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 385 390 395 400
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 405 410 415
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 420 425 430
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe

 435 440 445
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 450 455 460
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470
 <210> 10
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic peptide

<400> 10

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Leu Arg Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Gln Gly Ile Ser Asn Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
100 105 110

Ala Glu Ser Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 11
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 11
 agctatgaca tgagc 15
 <210> 12
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 12
 cttattagtgt gtggtggttag tcaaacatac tacgcagaat ccgtgaaggg c 51
 <210> 13
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 13
 cccagtggcc actacttcta cgctatggac gtc 33
 <210> 14
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 14
 cgggcgagtc aggttattag caactggtta gcc 33
 <210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 15	
gctgcatcca gtttgcaaag t	21
<210> 16	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic polynucleotide	
<400> 16	
caacaggctg aaagtttccc tcacact	27
<210> 17	
<211> 360	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic polynucleotide	
<400> 17	
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgaca tgagctgggt ccgccaggct	120
ccagggaagg ggctggaatg ggtctcactt attagtgggt gtggtagtca aacatactac	180
gcagaatccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgc gtccccccagt	300
ggccactact tctacgtat ggacgtctgg ggccaaggga ccacggtcac cgtctcctca	360
<210> 18	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic polynucleotide	
<400> 18	
gacatccaga tgaccacgac tccatcttcc gtgtctgcat ctgttggaga cagagtcacc	60
atcacttgtc gggcgagtc ggggtattagc aactggttag cctggatatca gcagaaacca	120
gggaaagccc ctaagctcct gatctttgct gcattccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca	180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcagcag cctgcagcct	240
gaagattttg caacttacta ttgtcaacag gctgaaagt tccctcacac tttcggcgga	300
gggaccaagg tggagatcaa a	321

<210> 19

<211> 1416

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 19

atggacatga ggggtgccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg 60

cgctgtgagg tgcagctgtt ggagctctgg ggaggcttgg tacagcctgg ggggtccctg 120

agactctcct gtgcagcctc tggattcacc tttagcagct atgacatgag ctgggtccgc 180

caggctccag ggaaggggct ggaatgggtc tcacttatta gtggtgggtg tagtcaaaca 240

tactacgcag aatccgtgaa gggccgggtc accatctcca gagacaattc caagaacacg 300

ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ccgtatattt ctgtgcgtcc 360

cccagtggcc actacttcta cgctatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcacctgc 420

tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg caccctctc caagagcacc 480

tctgggggca cagcggccct gggctgccctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 540

gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtctacag 600

tcctcaggac tctactcct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 660

cagacctaca tctgcaactg gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagt 720

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gccagcacc tgaactcctg 780

gggggaccgt cagtcttctt ctcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg 840

acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 900

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgtg cgaggagcag 960

tacggcagca cgtaccgttg cgtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1020

ggcaaggagt acaagtgcga ggtgtccaac aaagccctcc cagcccccac cgagaaaacc 1080

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1140

gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1200

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1260

cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctatagca agctcaccgt ggacaagagc 1320

aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1380

tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 1416

<210> 20

<211> 708

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 20

```

atggacatga gggtgcccgc tcagctcctg gggctcctgc tgctgtggct gagaggtgcg      60
cgctgtgaca tccagatgac ccagtcctcca tcttccgtgt ctgcatctgt tggagacaga      120
gtcaccatca ctgtcgggc gagtcagggt attagcaact ggtagcctg gtatcagcag      180
aaaccaggga aagcccctaa gctcctgac tttgctgcat ccagtttgca aagtggggtc      240

ccatcaaggt tcagcggcag tggatctggg acagatttca ccctcaccat cagcagcctg      300
cagcctgaag attttgcaac ttactattgt caacaggctg aaagtttccc tcacactttc      360
ggcggaggga ccaaggtgga gatcaaacga acggtggctg caccatctgt ctcatcttc      420
ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac      480
ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac      540
tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc      600
ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaggtct acgcctgcga agtcacccat      660

cagggcctga gctgcgccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgt      708

```

<210> 21

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CRISPR Molecule

<400> 21

```

Cys Thr Thr Gly Thr Gly Ala Thr Gly Gly Thr Thr Gly Gly Ala Gly
1           5           10           15
Cys Thr Gly Ala
20

```