



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년04월29일

(11) 등록번호 10-2246265

(24) 등록일자 2021년04월23일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 401/12 (2006.01) *A61K 31/506* (2006.01)
C07D 403/12 (2006.01) *C07D 413/14* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07D 401/12 (2013.01)
A61K 31/506 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7007411(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2013년05월14일
 심사청구일자 2020년04월07일
- (85) 번역문제출일자 2020년03월12일
- (65) 공개번호 10-2020-0038990
- (43) 공개일자 2020년04월14일
- (62) 원출원 특허 10-2014-7031572
 원출원일자(국제) 2013년05월14일
 심사청구일자 2018년05월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2013/051233
- (87) 국제공개번호 WO 2013/171470
 국제공개일자 2013년11월21일
- (30) 우선권주장
 61/647,200 2012년05월15일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 WO2009044162 A1

- (73) 특허권자
 캔서 리서치 테크놀로지 리미티드
 영국 런던 이20 1제이큐 레드맨 플레이스 2
- (72) 발명자
 콜린스, 이안
 영국, 서튼 서리 에스엠2 5엔지, 15 코츠월드 로드, 더 인스티튜트 오브 캔서 리서치
- 매튜스, 토마스 피터
 영국, 서튼 서리 에스엠2 5엔지, 15 코츠월드 로드, 더 인스티튜트 오브 캔서 리서치
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 특허법인한얼

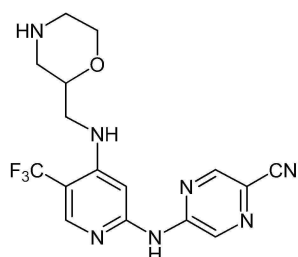
전체 청구항 수 : 총 21 항

심사관 : 광희찬

(54) 발명의 명칭 5-[[4-[[모르폴린-2-일]메틸아미노]-5-(트리플루오로메틸)-2-피리딜]아미노]피라진-2-카보니트릴 및 그의 치료적 용도

(57) 요약

본 발명은 일반적으로 치료 화합물의 분야에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 특히, 체크포인트 키나제 1(CHK1)의 키나제 기능을 저해하는 5-[[4-[[모르폴린-2-일]메틸아미노]-5-(트리플루오로메틸)-2-피리딜]아미노]피라진-2-카보니트릴 화합물("FM 화합물"로서 칭해짐)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 화합물을 포함하는 약학적 조성물 및 시험관내 및 생체내 모두에서 CHK1 키나제 기능을 저해하고; 임의로 다른 약제, 예를 들어, (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 이온화 방사선; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 또는 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제와의 조합으로 암 등과 같은 증식 증상을 비롯하여, CHK1으로 매개되고, CHK1 키나제 기능의 저해로 개선되는 등의 질환 및 증상을 치료하기 위한 상기 화합물 및 조성물의 용도에 관한 것이다.



(52) CPC특허분류

C07D 403/12 (2013.01)

C07D 413/14 (2013.01)

(72) 발명자

파리아 다 폰세카 맥하디, 타티아나

영국, 서튼 서리 에스엠2 5엔지, 15 코츠월드
로드, 더 인스티튜트 오브 캔서 리서치

오스본, 제임스

영국, 사프란 월든 에섹스 씨비10 1엑스엘, 체스터
포드 파크, 체스터포드 리서치 파크, 바이오포커스

레인치버리, 마이클

영국, 할로우 에섹스 씨엠19 5티알, 플렉스
메도우, 8-9 스파이어 그린 센터, 아르젠타 디스커
버리 2009 리미티드

월턴, 마이클 이안

영국, 서튼 서리 에스엠2 5엔지, 15 코츠월드
로드, 더 인스티튜트 오브 캔서 리서치

개럿, 미셸 다운

영국, 서튼 서리 에스엠2 5엔지, 15 코츠월드
로드, 더 인스티튜트 오브 캔서 리서치

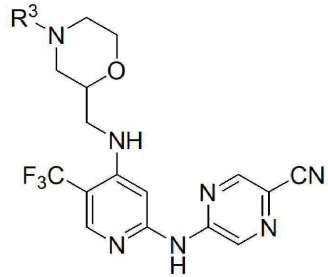
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 II에 따른 화합물, 또는 이의 염:

[화학식 II]



상기 식에서,

R^3 은 $\text{---}\overset{\text{O}}{\parallel}\text{---}X$ 이고, 여기서 X 는 메틸 ($-\text{CH}_3$), 벤질옥시 ($-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), t -부톡시 ($-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 2-트리메틸실릴에틸옥시, 또는 알릴옥시이다.

청구항 2

제1항에 있어서, X 가 메틸 ($-\text{CH}_3$)인, 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서, X 가 벤질옥시 ($-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$)인, 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서, X 가 t -부톡시 ($-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$)인, 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서, X 가 2-트리메틸실릴에틸옥시인, 화합물.

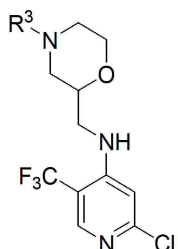
청구항 6

제1항에 있어서, X 가 알릴옥시인, 화합물.

청구항 7

화학식 III의 화합물, 또는 이의 염:

[화학식 III]



상기 식에서,

R^3 은 수소 또는  이고, 여기서 X는 메틸 ($-CH_3$), 벤질옥시 ($-OCH_2C_6H_5$), t-부톡시 ($-OC(CH_3)_3$), 2-트리메틸실릴에틸옥시, 또는 알릴옥시이다.

청구항 8

제7항에 있어서, R^3 가 수소인, 화합물.

청구항 9

제7항에 있어서,

R^3 가  이고, 여기서 X는 메틸 ($-CH_3$), 벤질옥시 ($-OCH_2C_6H_5$), t-부톡시 ($-OC(CH_3)_3$), 2-트리메틸실릴에틸옥시, 및 알릴옥시로부터 선택되는 것인, 화합물.

청구항 10

제7항에 있어서, X가 메틸 ($-CH_3$)인, 화합물.

청구항 11

제7항에 있어서, X가 벤질옥시 ($-OCH_2C_6H_5$)인, 화합물.

청구항 12

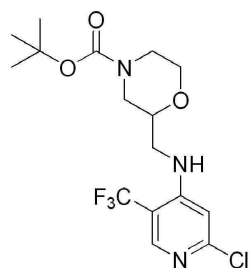
제7항에 있어서, X가 2-트리메틸실릴에틸옥시인, 화합물.

청구항 13

제7항에 있어서, X가 알릴옥시인, 화합물.

청구항 14

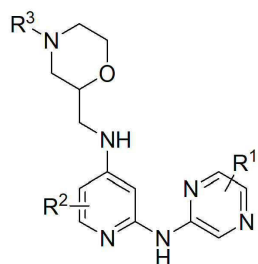
제7항에 있어서, 화합물이



또는 이의 염인 것인, 화합물.

청구항 15

하기 구조에 따른 화합물 또는 이의 염을 제조하는 방법:

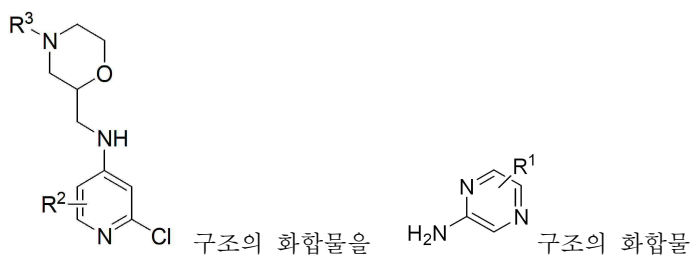


여기서

R^1 은 CN이고;

R^2 는 CF_3 이고;

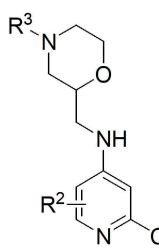
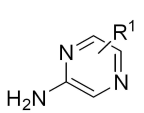
R^3 은 $\text{---} \text{C}(=\text{O})\text{---}X$ 이고, 여기서 X는 메틸 ($-\text{CH}_3$), 벤질옥시 ($-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), t-부톡시 ($-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 2-트리메틸실릴에틸옥시, 또는 알릴옥시이며;



상기 방법은 크로스 커플링 반응 조건을 사용하여
에 커플링시키는 단계를 포함한다.

청구항 16

제15항에 있어서, 크로스 커플링 반응 조건이 하기를 포함하는 것인, 방법:

화합물 , 화합물 , 유기 포스핀 화합물, 탄산 세슘, 및 팔라듐(0) 화합물을 비양
자성 유기 용매에 현탁시키는 단계; 및
현탁액을 가열하는 단계,

여기서 R^1 , R^2 , 및 R^3 는 제15항에 정의된 바와 같다.

청구항 17

제16항에 있어서, 가열이 100°C 에서 수행되는, 방법.

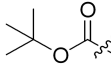
청구항 18

제16항에 있어서, 가열이 22시간 동안 지속되는, 방법.

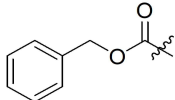
청구항 19

제17항에 있어서, 가열이 22시간 동안 지속되는, 방법.

청구항 20

제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, R³가 인, 방법.

청구항 21

제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, R³가 인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2012년 5월 15일자 출원된 미국 특허 출원 제61/647,200호에 관한 것이며, 이의 내용은 그 전체가 본 명세서에서 참고로 포함된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본 발명은 일반적으로 치료 화합물의 분야에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 특히, 체크포인트 키나제 1(CHK1) 키나제 기능을 저해하는 5-[[4-[[[모르폴린-2-일]메틸아미노]-5-(트리플루오로메틸)-2-피리딜]아미노]피라진-2-카보니트릴 화합물(본 명세서에서 "FM 화합물"로서 언급됨)에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이러한 화합물을 포함하는 약학적 조성물 및 시험관내 및 생체내 모두에서 CHK1 키나제 기능을 저해하고; 임의로 다른 약제, 예를 들어, (a) DNA 토폰이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 이온화 방사선; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 또는 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제와의 조합으로 암 등과 같은 증식 증상을 비롯하여, CHK1으로 매개되고, CHK1 키나제 기능의 저해로 개선되는 등의 질환 및 증상을 치료하기 위한 상기 화합물 및 조성물의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 본 발명 및 본 발명이 관련된 기술 수준을 더욱 완전히 설명 및 개시하기 위해 다수의 공개물을 본 명세서에서 인용한다. 이들 참고 문헌은 각각, 각각의 개별적인 참고 문헌이 명확하게 그리고 개별적으로 참고로 인용되었다고 나타낸 것과 동일한 정도로, 본 개시에 그 전체가 참고로 인용된다.

[0006] 이후 청구 범위를 포함하여 본 명세서 전체에서, 문맥이 달리 필요로 하지 않는 한, 용어 "~들을 포함하다" 및 "~을 포함한다"와 "포함하는"과 같은 이의 변형어는 기재된 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 군을 포함하는 것을 의미하지만, 임의의 다른 정수 또는 단계 또는 정수 또는 단계의 군을 배제하는 것은 아님을 의미하는 것으로 이해해야 할 것이다.

[0007] 명세서 및 청구 범위에서 사용되는 단수 형태 "하나" (a, an) 및 "상기" (the)는 문맥이 달리 명시하지 않는 한 복수의 의미도 포함함을 알아야 한다. 따라서, 예컨대 "하나의 약학적 담체"는 2 이상의 이러한 담체의 혼합물 등을 포함한다.

[0008] 본 명세서에서 범위는 종종 "약" 하나의 특정 값에서 및/또는 "약" 다른 특정 값까지로 표현된다. 이러한 범위가 표현된 경우, 다른 실시양태는 하나의 특정 값에서 및/또는 다른 특정 값까지를 포함한다. 유사하게, 앞에 "약"을 사용하여 값이 대략적으로 표현된 경우, 이는 특정 값이 다른 실시양태를 형성함을 이해할 것이다.

[0009] 본 개시는 본 발명을 이해하는 데에 유용할 수 있는 정보를 포함한다. 이는 본 명세서에 제공된 어떤 정보도 선

행 기술이거나 또는 현재 청구된 발명과 관련된 것이거나 또는 명시적으로 또는 암시적으로 인용된 임의의 공개물이 선행 기술임을 인정한다는 것은 아니다.

[0010] 체크포인트 키나제 1 (CHK1)

[0011] 세포 분열 주기를 통한 진행은 엄중히 통제되는 과정이며, 세포 주기 체크포인트로서 알려진 다수의 위치에서 감시된다(예컨대, Weinert and Hartwell, 1989; Bartek and Lukas, 2003 참조). 이들 체크포인트는 G1, S(DNA 복제), G2 및 M(유사분열)의 4개 전 세포 주기 단계에서 관찰되며, 이들은 DNA 복제 및 세포 분열의 충실성을 제어하는 주요 이벤트가 올바르게 끝나도록 보장한다. 세포 주기 체크포인트는 결함이 있는 복제로 초래되는 DNA 손상 및 DNA 에러를 포함한 많은 자극으로 활성화된다. 이것이 일어나면, 세포 주기는 정지되어 DNA 복구가 일어날 수 있는 시간을 허용하거나 또는 손상이 너무 심하면, 세포 과정의 활성화로 세포사의 규제를 받게 될 것이다.

[0012] 정의상 모든 암은 어느 정도의 이상 세포 분열 주기 형태를 가진다. 암 세포는 종종 하나 이상의 결함이 있는 세포 주기 체크포인트를 지니거나 또는 특정 DNA 수복 경로에 결함을 갖는다. 따라서, 이들 세포는 비암성 세포(여기서 모든 체크포인트 및 DNA 수복 경로는 무손상이다)에 비해 보통 잔류 세포 주기 체크포인트 및 수복 경로에 더욱 의존하게 된다. DNA 손상에 대한 암 세포의 반응은 흔히 증식을 계속할지 또는 세포사 과정 및 죽음을 활성화할지를 결정하는데 주요 인자이다. 예를 들어, 종양 억제인자 p53의 돌연변이형(들)을 함유하는 종양 세포는 G1 DNA 손상 체크포인트에서 결핍되어 있다. 따라서, G2 또는 S-상 체크포인트의 저해제는 손상된 DNA를 수복하기 위한 종양 세포의 능력을 추가 손상시킬 것으로 예상된다.

[0013] 알려진 많은 암 치료는 세포의 DNA를 물리적으로 변경하거나, 예컨대 DNA 대사, DNA 합성, DNA 전사 및 미소관 방추체 형성과 같이, DNA 복제 및 세포 분열의 충실성에 영향을 미칠 수 있는 필수적인 세포 과정을 붕괴시킴으로써 DNA 손상을 일으킨다. 이러한 치료로서는 예를 들어, DNA 스트랜드 절단을 야기하는 방사선치료 및 토포이소머라제 저해제, 대사길항물질, DNA-알킬화제 및 백금-함유 세포독성 약물을 비롯한 각종 화학치료요법제를 들 수 있다. 이들 유전독성 치료의 커다란 제한은 약물 내성이다. 이러한 내성을 이끄는 가장 중요한 기전중 하나는 손상된 DNA를 수복하기 위한 종양 세포에 시간을 주는, 세포 주기 체크포인트의 활성화에 의한다. 특정 세포 주기 체크포인트를 없애거나 또는 특정 형태의 DNA 수복을 저해함으로써, 유전독성제에 대한 종양 세포 내성을 피하고, DNA 손상으로 유도되는 종양 세포사를 증가시켜 이들 암 치료의 치료 지수를 높이는 것이 가능할 수 있다.

[0014] CHK1은 결함이 있는 복제로 야기되는 DNA 손상 및 DNA에서의 에러에 반응하여 세포 주기 체크포인트 신호 조절에 관여하는 세린/트레오닌 키나제이다(예를 들어, Bartek and Lukas, 2003 참조). CHK1은 세포 주기 정지 및 DNA 수복을 비롯한 많은 세포 활성화에 관여하는 기질의 인산화를 통해 이들 신호를 전달한다. CHK1의 두 주요 기질은 CDK1을 탈인산화하여 그를 활성화시키는 Cdc25A 및 Cdc25C 포스포타제로서, G2에서 나와 유사분열(M 상)로 진입하는데 필요하다(예를 들어, Sanchez *et al.*, 1997 참조). CHK1에 의한 Cdc25C 및 관련 Cdc25A의 인산화는 CDK1을 활성화하는 능력을 봉쇄하여 세포가 G2를 빠져나와 M 상으로 진입하지 못하도록 한다. DNA 손상-유도된 G2 세포 주기 체크포인트에서 CHK1의 역할이 CHK1 기능을 폐지시킨 다수의 연구에서 입증되었다(예를 들어, Liu *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2002; Zachos *et al.*, 2003 참조).

[0015] DNA 손상-유도된 G2 체크포인트의 CHK1 의존성은 CHK1의 표적 저해를 포함한, 암 치료를 위한 치료 전략의 일례를 제공한다. DNA 손상시에, p53 종양 억제인자 단백질은 안정화 및 활성화되어 p53-의존성 G1 정지를 야기함으로써 아포토시스 또는 DNA 수복으로 이어진다(Balain and Vousden, 2001). 모든 암의 반 이상이 p53에 대한 기능적 결함이 있으며, 이들을 이온화 방사선(IR) 및 특정 형태의 화학치료요법과 같은 유전독성 암 치료에 내성으로 만든다(예를 들어, Greenblatt *et al.*, 1994; Carson and Lois, 1995 참조). 이들 p53 결핍 세포는 G1 체크포인트에서 정지하지 못하거나, 아포토시스 또는 DNA 수복을 거침으로써, 생존성 및 복제 충실성에 대해 G2 체크포인트에 더 의존적으로 될 수 있다. 따라서, CHK1 키나제 기능의 저해를 통한 G2 체크포인트의 폐지는 p53 결핍 암 세포를 유전독성 암 치료에 대해 선택적으로 민감화시킬 수 있고, 이는 입증되었다(예를 들어, Wang *et al.*, 1996; Dixon and Norbury, 2002 참조).

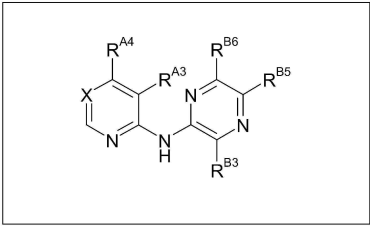
[0016] 또, CHK1은 상동 재조합에 의해 S 상 세포 주기 체크포인트 및 DNA 수복에 관여하는 것으로도 나타났다. 따라서, 이들 암에서 DNA 손상후 이들 과정에 의존하는 CHK1 키나제의 저해는 CHK1 저해제를 사용한 암 치료에 추가의 치료 전략을 제공할 수 있다(예를 들어, Sorensen *et al.*, 2005 참조). 그밖에, 특정 암은 고수준의 내인성 DNA 손상으로 인하거나(예를 들어, Cavalier *et al.*, 2009; Brooks *et al.*, 2012 참조) 또는 종양유전자, 예를 들어 증폭 또는 과발현된 MYC 유전자로 유도되는 상승된 복제를 통해(예를 들어, Di Micco *et al.*

2006; Cole *et al.*, 2011; Murga *et al.* 2011 참조) 복제 스트레스를 나타낼 수 있다. 이같은 암은 CHK1 키나제를 통해 상승된 신호전달을 나타낼 수 있다(예를 들어, Hoeglund *et al.*, 2011 참조). 이들 암에서 이러한 과정에 의존하는 CHK1 키나제의 저해는 CHK1 저해제를 사용한 암 치료에 추가의 치료 전략을 제공할 수 있다(예를 들어, Cole *et al.*, 2011; Davies *et al.*, 2011; Ferrao *et al.*, 2011 참조).

CHK1 선택적 siRNA를 사용한 최근 데이터는 관련 치료 접근으로서 CHK1의 선택적 저해를 뒷받침하며, 특정의 다른 체크포인트 키나제와의 병용 저해가 추가적인 이점을 제공하지 못하고, 비효과적일 수 있음을 제안한다(예를 들어, Xiao *et al.*, 2006; Guzi *et al.*, 2011 참조). 다양한 화학 부류로부터 CHK1 키나제 기능의 소분자 선택적 저해제가 개시되었다(예를 들어, Tao *et al.*, 2006 참조).

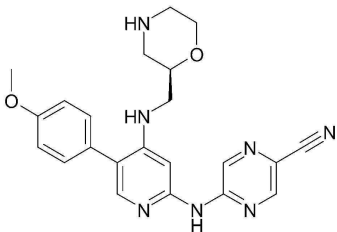
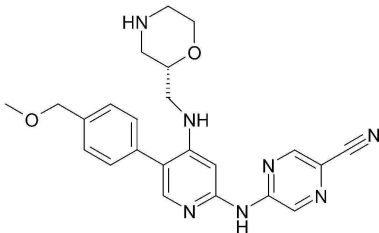
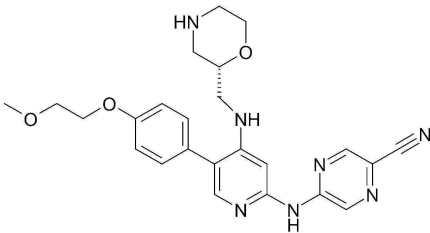
공지 화합물

콜린스 등(Collins *et al.*, 2009a (WO 2009/044162 A1))은 체크포인트 키나제 1(CHK1) 키나제 기능을 저해하고, 예컨대 암 치료에 유용한 하기 화학식의 특정 화합물을 개시하였다:

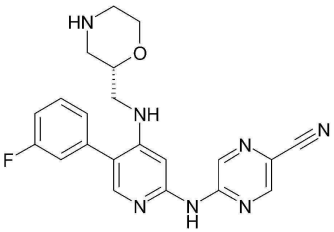
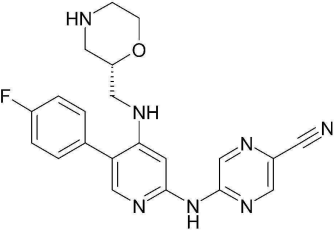
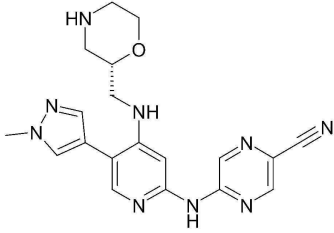


상기 콜린스 등(Collins *et al.*, 2009a)에는 다음의 화합물이 예시되었다:

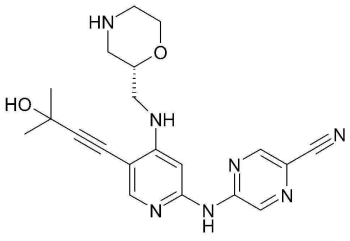
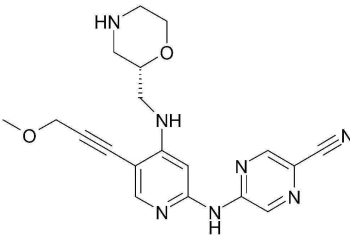
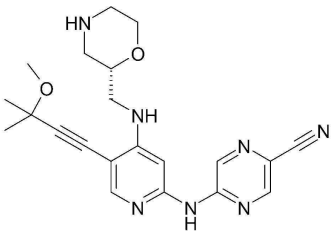
표 1			
#	등록번호	코드	화학 구조
1	1137477-07-6	Y-081	The image shows the chemical structure of Y-081. It is a pyrimidine derivative with a morpholine ring and a nitrile group. The structure is shown within a rectangular box.
2	1137477-35-0	Y-102	The image shows the chemical structure of Y-102. It is a pyrimidine derivative with a morpholine ring and a nitrile group. The structure is shown within a rectangular box.
3	1168103-91-0	Y-146	The image shows the chemical structure of Y-146. It is a pyrimidine derivative with a morpholine ring and a nitrile group. The structure is shown within a rectangular box.

표 1			
#	등록번호	코드	화학 구조
4	1137478-38-6	Y-147	
5	1137478-39-7	Y-148	
6	1137478-40-0	Y-149	

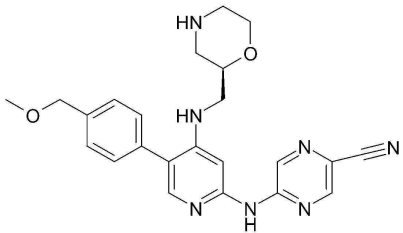
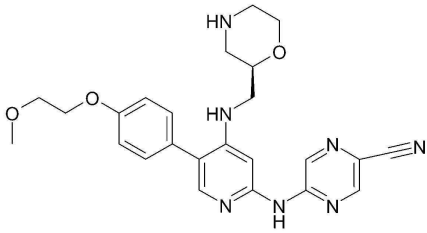
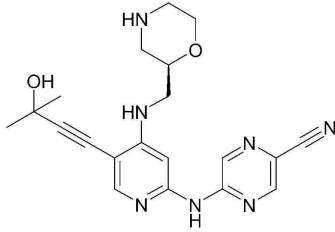
[0024]

표 1			
#	등록번호	코드	화학 구조
7	1137478-41-1	Y-150	
8	1137478-44-4	Y-151	
9	1137478-45-5	Y-152	

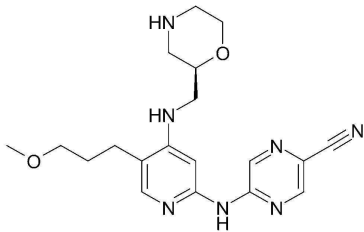
[0025]

표 1			
#	등록번호	코드	화학 구조
10	1137478-46-6	Y-153	
11	1137478-47-7	Y-154	
12	1137478-48-8	Y-155	

[0026]

표 1			
#	등록번호	코드	화학 구조
13	1137478-50-2	Y-156	
14	1137478-51-3	Y-157	
15	1137478-52-4	Y-158	

[0027]

표 1			
#	등록번호	코드	화학 구조
16	1137478-54-6	Y-159	

[0028]

[0029]

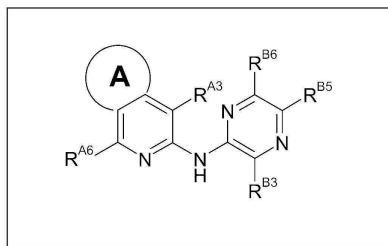
콜린스 등(Collins et al., 2009a)에서 정의된 그룹에서, X는 -CR^{A5}-일 수 있고(예를 들어, 이곳의 8쪽, 27행 참조), -R^{A5}는 -Q^{A5}일 수 있다(예를 들어, 이곳의 9쪽, 1행 참조). 그룹 -Q^{A5}는 광범하게 정의되었으며(예를 들어, 31쪽, 27행 내지 38쪽 13행 참조), 예를 들어, -CF₃일 수 있다(예를 들어, 31쪽, 32행 및 33쪽, 21행 참조).

[0030]

그러나, 콜린스 등(Collins et al., 2009a)에는 X가 -CR^{A5}-이고, -R^{A5}가 -CF₃인 것은 예시되지 않았다.

[0031]

콜린스 등(Collins et al., 2009b)은 체크포인트 키나제 1(CHK1) 키나제 기능을 저해하고, 예컨대 암 치료에 유용한 하기 화학식의 특정 화합물을 개시하였다:



[0032]

[0033]

윌튼 등(Walton et al., 2010)은 SAR-020106으로 칭한 CHK1 저해제의 전임상 연구에 대해 기술하였다.

[0034]

알메이다 등(Almeida et al., 2008)은 암 치료에 유용하다고 주장된 특정 피라졸-아미노-치환된 피라진을 개시하였다.

[0035]

요안니디스 등(Ioannidis et al., 2009)은 야누스-관련(Janus-associated) 키나제(JAK)를 저해하는 특정 화합물을 개시하였다. 예를 들어, 6526쪽에 있는 반응식 5를 참조한다.

[0036]

린 등(Lin et al., 2005)은 단백질 키나제 저해제로서 유용하다고 주장된 특정 마크로사이클릭 우레아 화합물을 개시하였다. 예를 들어, 1쪽 [0004] 단락을 참조한다.

[0037]

타오 등(Tao et al., 2005)은 단백질 키나제 저해제로서 유용하다고 주장된 특정 마크로사이클릭 우레아 화합물을 개시하였다. 예를 들어, 2쪽을 참조한다.

[0038]

리 등(Li et al., 2007)은 특정 마크로사이클릭 우레아 CHK1 저해제의 제조 및 검사에 대해 기술하였다. 예를 들어, 6502쪽 표 1을 참조한다.

[0039]

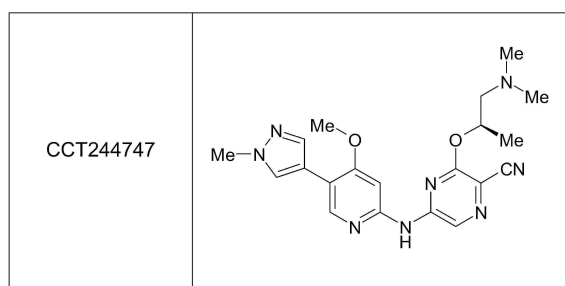
타오 등(Tao et al., 2007a)은 특정 마크로사이클릭 우레아 CHK1 저해제의 제조 및 검사에 대해 기술하였다. 예를 들어, 6596쪽 표 2를 참조한다.

[0040]

타오 등(Tao et al., 2007b)은 특정 마크로사이클릭 우레아 CHK1 저해제의 제조 및 검사에 대해 기술하였다. 예를 들어, 1517쪽 표 3을 참조한다.

[0041]

한명 이상의 발명자가 CCT244747로서 칭해지는 다음 화합물을 비롯하여, 다수의 CHK1 저해제가 기술되어 있는 최근 공보물에 관여하였다. [Lainchbury et al., 2012(2012년 10월 19일에 온라인상에 명백하게 공개)] 및 [Walton et al., 2012(2012년 10월 15일에 온라인상에 명백하게 공개)] 참조.



[0042]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0043]

발명의 개요

[0044]

본 발명의 일 측면은 본 명세서에 기재된 바와 같은 5-[[4-[[모르폴린-2-일]메틸아미노]-5-(트리플루오로메틸)-2-피리딜]아미노]피라진-2-카보니트릴 화합물(본 명세서에서 "TFM 화합물"로 지칭함)에 관한 것이다.

[0045]

본 발명의 다른 측면은 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 조성물(예컨대 약학적 조성물)에 관한 것이다.

[0046]

일 실시양태에서, 조성물(예컨대, 약학적 조성물)은 대상체에 경구 투여하기에 적합하다.

[0047]

일 실시양태에서, 조성물은 경구 정제, 경구 과립제, 경구 분말, 경구 캡슐, 경구 카세(cachet) 또는 경구 환제

형태이다.

- [0048] 본 발명의 다른 측면은 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 혼합하는 단계를 포함하는 조성물(예컨대 약학적 조성물)의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명의 다른 측면은 세포를 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 시험관내에서 또는 생체내에서 세포내 CHK1 키나제 기능을 저해하는 방법에 관한 것이다.
- [0050] 일 실시양태에서, 본 방법은 세포를 (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 이온화 방사선; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 및 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제로부터 선택되는 하나 이상의 다른 약제와 접촉시키는 것을 추가로 포함한다.
- [0051] 본 발명의 다른 측면은 세포를 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 시험관내에서 또는 생체내에서 세포 증식(예컨대, 세포의 증식)을 조절(예컨대, 저해)하는 방법, 세포 주기 진행을 저해하는 방법, 세포 아포토시스를 촉진하는 방법 또는 이들 하나 이상의 조합에 관한 것이다.
- [0052] 일 실시양태에서, 본 방법은 세포를 (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 이온화 방사선; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 및 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제로부터 선택되는 하나 이상의 다른 약제와 접촉시키는 것을 추가로 포함한다.
- [0053] 본 발명의 다른 측면은 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물의 치료학적 유효량을, 바람직하게는 약학적 조성물 형태로 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 치료 방법에 관한 것이다.
- [0054] 일 실시양태에서, 상기 투여는 경구적 투여이다.
- [0055] 일 실시양태에서, 본 방법은 대상체에게 (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 이온화 방사선; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 및 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제로부터 선택되는 하나 이상의 다른 약제를 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- [0056] 본 발명의 다른 측면은 치료요법에 의한 인체 또는 동물체의 치료 방법에 사용하기 위한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물에 관한 것이다.
- [0057] 일 실시양태에서, 화합물은 경구 투여에 의한 치료요법에 의한 인체 또는 동물체의 치료 방법에 사용하기 위한 것이다.
- [0058] 일 실시양태에서, 치료 방법은 (i) TFM 화합물 및 (ii) (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 이온화 방사선; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 및 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제로부터 선택되는 하나 이상의 다른 약제의 양자로 치료하는 것을 포함한다.
- [0059] 본 발명의 다른 측면은 치료에 사용하기 위한 약제 제조에서의, 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물의 용도에 관한 것이다.
- [0060] 일 실시양태에서, 약제는 경구 투여용 약제이다.
- [0061] 일 실시양태에서, 치료는 (i) TFM 화합물을 포함하는 약제 및 (ii) (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 이온화 방사선; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 및 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제로부터 선택되는 하나 이상의 다른 약제의 양자로 치료하는 것을 포함한다.
- [0062] 일 실시양태에서, 치료는 CHK1으로 매개되는 질환 또는 증상의 치료이다.
- [0063] 일 실시양태에서, 치료는 CHK1 키나제 기능의 저해로 개선되는 질환 또는 증상의 치료이다.
- [0064] 일 실시양태에서, 치료는 증식 증상의 치료이다.
- [0065] 일 실시양태에서, 치료는 암의 치료이다.
- [0066] 일 실시양태에서, 치료는 두부암; 경부암; 신경계암; 뇌암; 신경모세포종; 폐/종격암; 유방암; 식도암; 위암;

간암; 담도암; 췌장암; 소장암; 대장암; 결장직장암; 부인과암; 비뇨생식기암; 난소암; 갑상선암; 부신암; 피부암; 흑색종; 골육종; 연조직육종; 소아과 악성 종양; 호지킨병; 비호지킨 림프종; 골수종; 백혈병; 또는 원발 부위 불명으로부터의 전이의 치료이다.

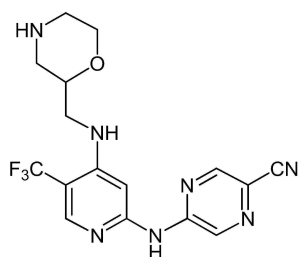
- [0067] 일 실시양태에서, 치료는 폐암, 유방암, 난소암, 췌장암, 결장직장암, 림프종, 흑색종, 신경교종 또는 신경모세포종의 치료이다.
- [0068] 일 실시양태에서, 치료는 p53 결핍 암의 치료이다.
- [0069] 일 실시양태에서, 치료는 MYC-증폭 암의 치료이다.
- [0070] 일 실시양태에서, 치료는 c-MYC-증폭 암의 치료이다.
- [0071] 일 실시양태에서, 치료는 MYCN-증폭 암의 치료이다.
- [0072] 일 실시양태에서, 치료는 MYC의 과발현을 특징으로 하는 암의 치료이다.
- [0073] 일 실시양태에서, 치료는 MYCN의 과발현을 특징으로 하는 암의 치료이다.
- [0074] 일 실시양태에서, 치료는 c-MYC의 과발현을 특징으로 하는 암의 치료이다.
- [0075] 일 실시양태에서, 치료는 MYCN-증폭 신경모세포종의 치료이다.
- [0076] 일 실시양태에서, 치료는 c-MYC-증폭 B 세포 림프종의 치료이다.
- [0077] 일 실시양태에서, 치료는 내인성 복제 스트레스의 증가를 특징으로 하는 암의 치료이다.
- [0078] 일 실시양태에서, 치료는 CHK1 신호전달의 내인성 활성화 증가를 특징으로 하는 암의 치료이다.
- [0079] 본 발명의 다른 측면은 바람직하게는 (a) 약학적 조성물로서 그리고 적절한 용기에 및/또는 적절한 포장과 함께 제공되는, 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물 및 (b) 사용을 위한 설명서, 예컨대 화합물의 투여 방법에 대한 서면 설명서를 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0080] 일 실시양태에서, 키트는 추가로 (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 전신 방사성 의약품; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 및 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제로부터 선택되는 하나 이상의 다른 약제를 포함한다.
- [0081] 본 발명의 다른 측면은 본 명세서에 기재된 바와 같은 합성 방법에 의해 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 합성 방법을 포함하는 방법에 의해 얻을 수 있는 TFM 화합물에 관한 것이다.
- [0082] 본 발명의 다른 측면은 본 명세서에 기재된 바와 같은 합성 방법에 의해 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 합성 방법을 포함하는 방법에 의해 얻을 수 있는 TFM 화합물에 관한 것이다.
- [0083] 본 발명의 다른 측면은 본 명세서에 기재된 합성 방법에 사용하기에 적절한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 신규 중간체에 관한 것이다.
- [0084] 본 발명의 다른 측면은 본 명세서에 기재된 합성 방법에서의, 본 명세서에 기재된 바와 같은 이러한 신규 중간체의 용도에 관한 것이다.
- [0085] 당업자가 이해하는 바와 같이, 본 발명의 일 측면의 특징 및 바람직한 실시양태도 또한 본 발명의 다른 측면과 관련될 것이다.

과제의 해결 수단

[0086] **발명의 상세한 설명**

[0087] **화합물**

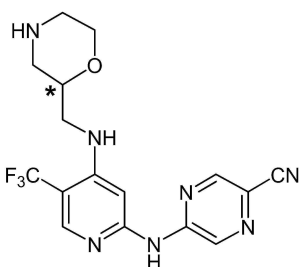
[0088] 본 발명의 일 측면은 하기 화학식의 화합물 및 그의 약학적으로 허용가능한 염, 수화물 및 용매화물(편의상 본 명세서에서는 총괄하여 "5-[[4-[[모르폴린-2-일]메틸아미노]-5-(트리플루오로메틸)-2-피리딜]아미노]피라진-2-카보니트릴 화합물" 또는 "TFA 화합물"로 칭해짐)에 관한 것이다:



[0089]

[0090]

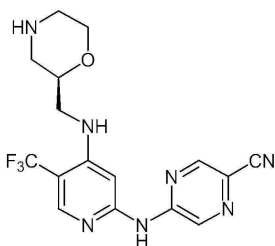
모르폴리딘 그룹의 부착점은 독립적으로 (*R*) 또는 (*S*) 배열될 수 있는 키랄 중심(하기 화학식에서 별표로 표시)이다. 달리 언급이 없으면, 상기 배열 둘 모두를 포함하고자 한다.



[0091]

[0092]

일 실시양태에서, 화합물은 하기 화학식의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염, 수화물 또는 용매화물이다:



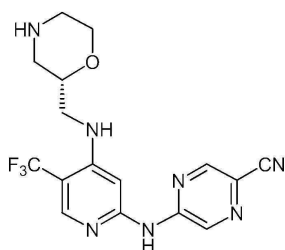
[0093]

[0094]

상기 화합물은 또한 5-[[4-[(2*R*)-모르폴린-2-일]메틸아미노]-5-(트리플루오로메틸)-2-피리딜]아미노]피라진-2-카보니트릴로서 공지되었다.

[0095]

일 실시양태에서, 화합물은 하기 화학식의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염, 수화물 또는 용매화물이다:



[0096]

[0097]

상기 화합물은 또한 5-[[4-[(2*S*)-모르폴린-2-일]메틸아미노]-5-(트리플루오로메틸)-2-피리딜]아미노]피라진-2-카보니트릴로서 공지되었다.

[0098]

실질적으로 정제된 형태

[0099]

본 발명의 일 측면은 정제된 형태의 TFM 화합물에 관한 것이다.

[0100]

일 실시양태에서, 화합물은 실질적으로 정제된 형태 및/또는 실질적으로 오염물을 포함하지 않는 형태이다.

[0101]

일 실시양태에서, 화합물은 순도가 적어도 50 중량%, 예컨대 적어도 60 중량%, 예컨대 적어도 70 중량%, 예컨대 적어도 80 중량%, 예컨대 적어도 90 중량%, 예컨대 적어도 95 중량%, 예컨대 적어도 97 중량%, 예컨대 적어도 98 중량%, 예컨대 적어도 99 중량%인 실질적으로 정제된 형태이다.

- [0102] 명시하지 않는 한, 실질적으로 정제된 형태는 임의의 입체이성체 또는 거울상이성체 형태의 화합물을 지칭한다. 예컨대 일 실시양태에서, 실질적으로 정제된 형태는 거울상이성체의 혼합물, 즉 다른 화합물에 대해 정제된 거울상이성체의 혼합물을 지칭한다. 일 실시양태에서, 실질적으로 정제된 형태는 거울상이성체의 동물 혼합물(즉, 라세미 혼합물, 라세미체)을 지칭한다. 일 실시양태에서, 실질적으로 정제된 형태는 하나의 거울상이성체, 예컨대 광학적으로 순수한 거울상이성체를 지칭한다.
- [0103] 일 실시양태에서, 화합물은 오염물을 50 중량% 이하, 예컨대 40 중량% 이하, 예컨대 30 중량% 이하, 예컨대 20 중량% 이하, 예컨대 10 중량% 이하, 예컨대 5 중량% 이하, 예컨대 3 중량% 이하, 예컨대 2 중량% 이하, 예컨대 1 중량% 이하로 나타내는 실질적으로 오염물을 포함하지 않는 형태이다.
- [0104] 명시하지 않는 한, 오염물은 거울상이성체 외의 다른 화합물을 지칭한다. 일 실시양태에서, 오염물은 다른 화합물 및 다른 거울상이성체를 지칭한다.
- [0105] 일 실시양태에서, 화합물은 적어도 60%(즉, 물 기준으로 화합물의 60%가 바람직한 거울상이성체이고, 40%가 바람직하지 않은 거울상이성체임), 예컨대 적어도 70%, 예컨대 적어도 80%, 예컨대 적어도 90%, 예컨대 적어도 95%, 예컨대 적어도 97%, 예컨대 적어도 98%, 예컨대 적어도 99% 광학적으로 순수한 실질적으로 정제된 형태이다.
- [0106] 이성체
- [0107] 특정 화합물은 시스- 및 트랜스-형태; E- 및 Z-형태; c-, t- 및 r-형태; 엔도- 및 엑소-형태; R-, S- 및 메소-형태; D- 및 L-형태; d- 및 l-형태; (+) 및 (-) 형태; 케토-, 에놀- 및 에놀레이트-형태; syn- 및 anti-형태; 양쪽에서 서로 경사진- 및 서로 반대쪽으로 경사진-형태; α- 및 β-형태; 축 및 적도 형태; 보트-, 의자-, 트 위스트-, 봉투- 및 반의자-형태; 및 이의 조합[이하 총체적으로 "이성체"(또는 "이성체 형태")로 지칭함]을 포함하나 이에 한정되지 않는, 하나 이상의 특정 기하, 광학, 거울상이성체, 부분입체이성체, 에피머, 위축, 입체 이성체, 호변이성체, 형태이성체 또는 아노머 형태로 존재할 수 있다.
- [0108] 호변이성체 형태에 대해 하기에 논의하는 것을 제외하고는, 본 명세서에 사용된 바의 용어 "이성체"에서 구조(또는 구성) 이성체(즉, 단지 공간 내 원자의 위치 보다는 원자 사이의 연결이 상이한 이성체)는 특징적으로 제외됨을 주지바란다.
- [0109] 상기 제외는 호변이성체 형태, 예컨대 하기 호변이성체 쌍: 케토/에놀(하기 도식), 이민/엔아민, 아미드/이미노알콜, 아미딘/아미딘, 니트로소/옥심, 티오케톤/에네티올, N-니트로소/하이드록시아조 및 니트로/아시-니트로에서와 같은 케토-, 에놀- 및 에놀레이트-형태와 관련되지 않는다.
- $\text{H}-\text{C}=\text{O} \rightleftharpoons \text{C}=\text{C}-\text{OH} \xrightleftharpoons[\text{H}^+]{\text{H}^+} \text{C}=\text{C}-\text{O}^-$
 케토 에놀 에놀레이트
- [0110]
- [0111] 용어 "이성체"는 하나 이상의 동위 원소 치환된 화합물을 특징적으로 포함함을 주지바란다. 예컨대 H는 ^1H , $^2\text{H}(\text{D})$ 및 $^3\text{H}(\text{T})$ 를 비롯한 임의의 동위 원소 형태로 존재할 수 있고; C는 ^{12}C , ^{13}C 및 ^{14}C 를 비롯한 임의의 동위 원소 형태로 존재할 수 있으며; O는 ^{16}O 및 ^{18}O 를 비롯한 임의의 동위 원소 형태로 존재할 수 있는 등이다.
- [0112] 달리 명시하지 않는 한, 특정 화합물에 대한 지칭은 이의 혼합물(예컨대 라세미 혼합물)을 비롯한 모든 이러한 이성체 형태를 포함한다.
- [0113] 이러한 이성체 형태의 제조(예컨대 비대칭 합성) 및 분리(예컨대 분별 결정 및 크로마토그래피 방식) 방법은 당업자에게 공지되어 있거나 또는 공지된 방식으로 본 명세서에 교시된 방법 또는 공지된 방법을 채택하여 용이하게 얻는다.
- [0114] 염
- [0115] 화합물의 상응하는 염, 예컨대 약학적으로 허용가능한 염을 제조, 정제 및/또는 취급하는 것이 편리하거나 또는 바람직할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 염의 예는 문헌(Berge *et al.*, 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," *J. Pharm. Sci.*, Vol. 66, pp. 1-19)에 논의되어 있다.
- [0116] 예컨대, 화합물이 음이온성이거나 음이온일 수 있는 작용기를 갖는 경우(예컨대 $-\text{COOH}$ 는 $-\text{COO}^-$ 일 수 있음), 적

적절한 양이온을 갖는 염이 형성될 수 있다. 적절한 무기 양이온의 예는 알칼리 금속 이온, 예컨대 Na^+ 및 K^+ , 알칼리 토금속 양이온, 예컨대 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 및 다른 양이온, 예컨대 Al^{3+} 을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 적절한 유기 양이온의 예는 암모늄 이온(즉 NH_4^+) 및 치환된 암모늄 이온(예컨대 NH_3R^+ , NH_2R_2^+ , NHR_3^+ , NR_4^+)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 적절한 치환된 암모늄 이온의 예는 하기로부터 유도된 것들이다: 에틸아민, 디에틸아민, 디사이클로헥실아민, 트리에틸아민, 부틸아민, 에틸렌디아민, 에탄올아민, 디에탄올아민, 피페라진, 벤질아민, 페닐벤질아민, 콜린, 메글루민 및 트로메타민 뿐 아니라, 아미노산, 예컨대 리신 및 아르기닌. 통상적인 4차 암모늄 이온의 예는 $\text{N}(\text{CH}_3)_4^+$ 이다.

[0117] 화합물이 양이온성이거나 또는 양이온일 수 있는 작용기를 갖는 경우(예컨대 $-\text{NH}_2$ 는 $-\text{NH}_3^+$ 일 수 있음), 적절한 음이온을 갖는 염이 형성될 수 있다. 적절한 무기 음이온의 예는 하기 무기산으로부터 유도된 것들을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 황산, 아황산, 질산, 아질산, 인산 및 아인산.

[0118] 적절한 유기 음이온의 예는 하기 유기산으로부터 유도된 것들을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 2-아세트시벤조산, 아세트산, 아스코르브산, 아스파르트산, 벤조산, 캄페실론산, 신남산, 시트르산, 에데트산, 에탄디설포산, 에탄설포산, 푸마르산, 포름산, 글루코헵톤산, 글루콘산, 글루탐산, 글리콜산, 하이드록시말레산, 하이드록시나프탈렌 카복실산, 이세티온산, 락트산, 락토비온산, 라우르산, 말레산, 말산, 메탄설포산, 뮤신산, 올레산, 옥살산, 팔미트산, 팜산, 판토텐산, 페닐아세트산, 페닐설포산, 프로피온산, 피루브산, 살리실산, 스테아르산, 숙신산, 설파닐산, 타르타르산, 톨루엔설포산 및 발레르산. 적절한 고분자 유기 음이온의 예는 하기 고분자산으로부터 유도된 것들을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다: 탄닌산, 카복시메틸 셀룰로오스.

[0119] 달리 명시하지 않는 한, 특정 화합물에 대한 지칭은 이의 염 형태도 포함한다.

[0120] 수화물 및 용매화물

[0121] 화합물의 상응하는 용매화물을 제조, 정제 및/또는 취급하는 것이 편리하거나 또는 바람직할 수 있다. 용어 "용매화물"은 본 명세서에서 통상적인 의미로 용질(예컨대 화합물, 화합물의 염) 및 용매의 복합물을 지칭하는 데에 사용된다. 용매가 물인 경우, 용매화물은 편리하게는 수화물, 예컨대 반수화물, 일수화물, 1.5 수화물, 이수화물, 삼수화물 등을 지칭할 수 있다.

[0122] 달리 명시하지 않는 한, 특정 화합물에 대한 지칭은 이의 용매화물 및 수화물 형태도 포함한다.

[0124] 화학적으로 보호된 형태

[0125] 화학적으로 보호된 형태의 화합물을 제조, 정제 및/또는 취급하는 것이 편리하거나 또는 바람직할 수 있다. 용어 "화학적으로 보호된 형태"는 본 명세서에서 통상적인 화학적 의미로 사용되며, 하나 이상의 반응성 작용기가 특정 조건(예컨대 pH, 온도, 방사선, 용매 등) 하에서 바람직하지 않은 화학 반응으로부터 보호된 화합물에 관한 것이다. 실제로, 잘 알려진 화학적 방법을 이용하여 특정 조건 하에서 반응성이 있을 수 있는 작용기에 비반응성을 가역적으로 부여한다. 화학적으로 보호된 형태에서, 하나 이상의 반응성 작용기는 보호된 그룹 또는 보호기(차폐된 기 또는 차폐기 또는 차단된 기 또는 차단기로도 공지됨)의 형태이다. 반응성 작용기를 보호함으로써, 다른 비보호된 반응성 작용기와 관련된 반응을 보호기에 영향을 미치지 않고 수행할 수 있으며; 보호기는 일반적으로 후속 단계에서 분자의 나머지에 실질적으로 영향을 미치지 않고 제거할 수 있다. 예컨대 문헌 [Protective Groups in Organic Synthesis(T. Green and P. Wuts; 4th Edition; John Wiley and Sons, 2006)] 참조.

[0126] 매우 다양한 이러한 "보호", "차단" 또는 "차폐" 방법은 널리 이용되며, 유기 합성 분야에 잘 알려져 있다. 예컨대 양쪽이 특정 조건 하에서 반응성이 있을 수 있는 2개의 동일하지 않은 반응성 작용기를 갖는 화합물을 특정 조건 하에서 유도체화하여 작용기 중 하나를 "보호"시켜 이에 따라 비반응성으로 만들 수 있고; 이러한 보호된 화합물을 단 1개의 반응성 작용기를 효과적으로 갖는 반응물로서 사용할 수 있다. (다른 작용기와 관련된) 소정 반응이 완료된 후, 보호기를 "탈보호"시켜 이의 원래 작용성으로 되돌릴 수 있다.

[0127] 예를 들어, 아민 그룹은 예컨대 아마이드($-\text{NRCO}-\text{R}$) 또는 우레탄($-\text{NRCO}-\text{OR}$)으로서, 예컨대 메틸 아마이드($-\text{NHCO}-\text{CH}_3$); 벤질옥시 아마이드($-\text{NHCO}-\text{OCH}_2\text{C}_6\text{H}_5$, $-\text{NH}-\text{Cbz}$); t-부톡시 아마이드($-\text{NHCO}-\text{OC}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{NH}-\text{Boc}$); 2-바이페닐-2-프

로콕시 아미드(-NHCO-OC(CH₃)₂C₆H₄C₆H₅, -NH-Bpoc), 9-플루오레닐메톡시 아미드(-NH-Fmoc), 6-니트로베라트릴옥시 아미드(-NH-Nvoc), 2-트리메틸실릴에틸옥시 아미드(-NH-Teoc), 2,2,2-트리클로로에틸옥시 아미드(-NH-Troc), 알릴옥시 아미드(-NH-Alloc), 2-(페닐설폰닐)에틸옥시 아미드(-NH-Psec); 또는 적절한 경우(예컨대 환식 아민), 니트록사이드 라디칼(>N-O·)로서 보호될 수 있다.

[0128] 프로드럭

[0129] 프로드럭 형태의 화합물을 제조, 정제 및/또는 취급하는 것이 편리하거나 또는 바람직할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바의 용어 "프로드럭"은(예컨대 생체내에서) 대사시 소정의 활성 화합물을 생성하는 화합물에 관한 것이다. 전형적으로, 프로드럭은 비활성이거나 또는 소정 활성 화합물보다 활성이 적지만, 유리한 취급, 투여 또는 대사 특성을 제공할 수 있다.

[0130] 조성물

[0131] 본 발명의 일 측면은 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 조성물(예컨대 약학적 조성물)에 관한 것이다.

[0132] 본 발명의 다른 측면은 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함하는 조성물(예컨대 약학적 조성물)의 제조 방법에 관한 것이다.

[0133] 바람직한 일 실시양태에서, 조성물(예컨대, 약학적 조성물)은 대상체에 경구 투여하기에 적합하다

[0134] 바람직한 일 실시양태에서, 조성물은 경구 정제, 경구 과립제, 경구 분말, 경구 캡슐, 경구 카세 또는 경구 환제의 형태이다.

[0135] 용도

[0136] 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물은, 본 명세서에 기재된 바와 같이, 예컨대 CHK1 키나제 기능의 저해로 개선되는 장애(예컨대, 질환)의 치료에 유용하다.

[0137] CHK1의 저해 방법에서의 용도

[0138] 본 발명의 일 측면은 CHK1 키나제를 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 시험관내에서 또는 생체내에서 CHK1 키나제 기능을 저해하는 방법에 관한 것이다.

[0139] 본 발명의 일 측면은 세포를 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 시험관내에서 또는 생체내에서 세포내 CHK1 기능을 저해하는 방법에 관한 것이다.

[0140] 일 실시양태에서, 본 방법은 추가로 세포를 (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 이온화 방사선; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 및 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제로부터 선택되는 하나 이상의 다른 약제와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0141] CHK1 키나제 기능 저해를 결정하는데 적합한 분석이 본 명세서에 기재되고/되거나, 당업계에 공지되어 있다.

[0142] 일 실시양태에서, 본 방법은 시험관내에서 수행된다.

[0143] 일 실시양태에서, 본 방법은 생체내에서 수행된다.

[0144] 일 실시양태에서, TFM 화합물은 약학적으로 허용가능한 조성물의 형태로 제공된다.

[0145] 지방질, 폐, 위장관(예컨대 장, 결장 포함), 유방(유선), 난소, 전립선, 간(간의), 콩팥(신장), 방광, 췌장, 뇌 및 피부를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의 타입의 세포가 처리될 수 있다.

[0146] 당업자들은 후보 화합물이 CHK1 키나제 기능을 저해하는지의 여부를 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 적합한 분석이 본 명세서에 기술되었다.

[0147] 세포 증식의 저해 방법 등에서의 용도

[0148] 본 명세서에 기재된 TFM 화합물은 예컨대 (a) 세포 증식을 조절(예컨대 저해)하는 방법; (b) 세포 주기 진행을 저해하는 방법; (c) 아포토시스를 촉진하는 방법; 또는 (d) 이들 중 하나 이상의 조합을 수행한다.

[0149] 본 발명의 일 측면은 세포를 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는,

시험관내 또는 생체내에서의 세포 증식(예컨대 세포의 증식)의 조절(예컨대 저해) 방법, 세포 주기 진행의 저해 방법, 아포토시스의 촉진 방법 또는 이들 하나 이상의 조합에 관한 것이다.

- [0150] 일 실시양태에서, 본 방법은 세포를 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물의 유효량과 접촉시키는 것을 포함하는, 시험관내 또는 생체내에서의 세포 증식(예컨대 세포의 증식)의 조절(예컨대 저해) 방법이다.
- [0151] 일 실시양태에서, 본 방법은 추가로 세포를 (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 이온화 방사선; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 및 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제로부터 선택되는 하나 이상의 다른 약제와 접촉시키는 포함한다.
- [0152] 일 실시양태에서, 본 방법은 시험관내에서 수행한다.
- [0153] 일 실시양태에서, 본 방법은 생체내에서 수행한다.
- [0154] 일 실시양태에서, TFM 화합물은 약학적으로 허용가능한 조성물의 형태로 제공된다.
- [0155] 폐, 위장관(예컨대 장, 결장 포함), 유방(유선), 난소, 전립선, 간(간의), 콩팥(신장), 방광, 췌장, 뇌 및 피부를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의 타입의 세포가 처리될 수 있다.
- [0156] 당업자는 후보 화합물이 세포 증식을 조절(예컨대 저해)하는지 여부 등을 용이하게 측정할 수 있다. 예컨대 특정 화합물에 의해 제공된 활성을 평가하는 데에 편리하게 이용할 수 있는 분석을 본 명세서에 기재한다.
- [0157] 예컨대 세포(예를 들면 종양 유래)의 샘플을 시험관내에서 증식시키고 화합물을 상기 세포와 접촉시켜, 이들 세포에 대한 화합물의 효과를 관찰할 수 있다. "효과"의 예로서, 세포의 형태적 증상(예컨대 살았는지 죽었는지 등)을 결정할 수 있다. 화합물이 세포에 영향을 미친다고 밝혀진 경우, 이는 동일한 세포 유형의 세포를 보유하는 환자의 치료 방법에서 화합물의 효능의 예후 또는 진단 마커로서 사용될 수 있다.
- [0159] 치료요법 방법에서의 용도
- [0160] 본 발명의 다른 측면은 치료요법에 의해 인체 또는 동물체의 치료 방법에 사용하기 위한 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물에 관한 것이다.
- [0161] 본 발명의 다른 측면은 경구 투여에 의한 치료요법에 의해 인체 또는 동물체의 치료 방법에 사용하기 위한 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물에 관한 것이다.
- [0162] 일 실시양태에서, 치료 방법은 (i) 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물 및 (ii) (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 이온화 방사선; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 및 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제로부터 선택되는 하나 이상의 다른 약제의 양자로 치료하는 것을 포함한다.
- [0163] 본 발명의 다른 측면은 치료요법에 의한 인체 또는 동물체의 치료 방법에 사용하기 위한, 본 명세서에 기재된 바와 같은 (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제(TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 전신 방사성 의약품; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 및 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제에 관한 것이며, 여기서 치료 방법은 (i) 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물 및 (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 전신 방사성 의약품; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 또는 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제로의 치료를 포함한다.
- [0164] 약제 제조에서의 용도
- [0165] 본 발명의 다른 측면은 치료에 사용하기 위한 약제의 제조에서의 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물의 용도에 관한 것이다.
- [0166] 본 발명의 다른 측면은 경구 투여에 의한 치료에 사용하기 위한 약제의 제조에서의 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물의 용도에 관한 것이다.
- [0167] 일 실시양태에서, 약제는 TFM 화합물을 포함한다.

- [0168] 일 실시양태에서, 치료는 (i) 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물을 포함하는 약제 및 (ii) (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 이온화 방사선; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 및 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제로부터 선택되는 하나 이상의 다른 약제의 양자로 치료하는 것을 포함한다.
- [0169] 본 발명의 다른 측면은 치료에 사용하기 위한 약제의 제조에서의 본 명세서에 기재된 바와 같은, (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 이온화 방사선; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 또는 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제의 용도에 관한 것으로서, 여기서 치료는 (i) 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물 및 (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 이온화 방사선; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 또는 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제의 양자로 치료하는 것을 포함한다.
- [0170] 치료 방법
- [0171] 본 발명의 다른 측면은 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물의 치료학적 유효량을 바람직하게는 약학적 조성물 형태로 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함하는 치료 방법에 관한 것이다.
- [0172] 본 발명의 다른 측면은 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물의 치료학적 유효량을 바람직하게는 약학적 조성물 형태로 치료를 필요로 하는 환자에게 경구적으로 투여하는 것을 포함하는 치료 방법에 관한 것이다.
- [0173] 일 실시양태에서, 본 방법은 추가로 대상체에게 (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 이온화 방사선; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 및 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제로부터 선택되는 하나 이상의 다른 약제를 투여하는 것을 포함한다.
- [0174] 치료되는 증상 - CHK1으로 매개되는 증상
- [0175] (예컨대 치료요법 방법에서의 용도, 약제의 제조에서의 용도, 치료 방법의) 일 실시양태에서, 치료는 CHK1으로 매개되는 질환 또는 증상의 치료이다.
- [0176] 치료되는 증상 - CHK1 키나제 기능의 저해로 개선되는 증상
- [0177] (예컨대 치료요법 방법에서의 용도, 약제의 제조에서의 용도, 치료 방법의) 일 실시양태에서, 치료는 CHK1 키나제 기능의 저해로 개선되는 질환 또는 증상의 치료이다.
- [0178] 치료되는 장애 - 증식 증상
- [0179] (예컨대 치료요법 방법에서의 용도, 약제의 제조에서의 용도, 치료 방법의) 일 실시양태에서, 치료는 증식 증상의 치료이다.
- [0180] 본 명세서에서 사용되는 용어 "증식 증상"은 신생물 또는 과다형성 성장과 같이 원하지 않는, 과도하거나 또는 비정상적인 세포의 원치않거나, 제어되지 않는 세포 증식에 관한 것이다.
- [0181] 일 실시양태에서, 치료는 하기의 치료이다: 예컨대 신생물, 과다형성 및 종양(예컨대 조직구종, 신경아교종, 별아교세포종, 골종), 암(하기 참조), 건선, 골 질환, (예컨대 결합 조직의) 섬유 증식성 질환, 폐 섬유증, 죽상경화증, 혈관내 민무늬근 세포 증식, 예컨대 혈관 성형술 후 협착 또는 재협착을 포함하나 이에 한정되지 않는, 양성, 전암성 또는 악성 세포 증식을 특징으로 하는 증식 증상.
- [0182] 치료되는 장애 - 암
- [0183] (예컨대 치료요법 방법에서의 용도, 약제의 제조에서의 용도, 치료 방법의) 일 실시양태에서, 치료는 암의 치료이다.
- [0184] 일 실시양태에서, 치료는 증식 증상의 치료이다.
- [0185] 일 실시양태에서, 치료는 암의 치료이다.
- [0186] 일 실시양태에서, 치료는 폐암, 소세포 폐암, 비소세포 폐암, 위장관암, 위암, 대장암, 결장직장암, 직장암, 직

장결장직장암, 갑상선암, 유방암, 난소암, 자궁내막암, 전립선암, 고환암, 간암, 신장암, 신세포(renal cell) 암종, 방광암, 췌장암, 뇌암, 신경모세포종, 신경아교종, 육종, 골육종, 골암, 비인두암(예컨대 두부암, 경부암), 피부암, 편평 세포암(squamous cancer), 카포시 육종, 흑색종, 악성 흑색종, 림프종 또는 백혈병의 치료이다.

- [0187] 일 실시양태에서, 치료는 하기의 치료이다:
- [0188] 암종, 예컨대 방광, 유방, 결장(예컨대 직장결장 암종, 예컨대 결장 선암종 및 결장 선종), 신장, 표피, 간, 폐(예컨대 선암종, 소세포 폐암 및 비소세포 폐 암종), 식도, 담낭, 난소, 췌장(예컨대 외분비 췌장 암종), 위, 자궁경부, 갑상선, 전립선, 피부(예컨대 편평 세포 암종)의 암종;
- [0189] 림프 계통(lymphoid lineage)의 조혈 종양, 예컨대 백혈병, 급성 림프성 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 모발상 세포 림프종 또는 버킷 림프종;
- [0190] 골수 계통의 조혈 종양, 예컨대 급성 및 만성 골수 백혈병, 골수 형성 이상 증후군 또는 전골수구성 백혈병;
- [0191] 중간엽 유래의 종양, 예컨대 섬유 육종 또는 횡문근 육종;
- [0192] 증추 또는 말초 신경계의 종양, 예컨대 별아교세포종, 신경모세포종, 신경아교종 또는 신경초종;
- [0193] 흑색종; 정상피종; 기형 암종; 골육종; 제노데로마 피그멘토움(xenoderoma pigmentum); 케라톡탄토마(keratoctanthoma); 갑상선 소포암; 또는 카포시 육종.
- [0194] 일 실시양태에서, 치료는 두부암; 경부암; 신경계암; 뇌암; 신경모세포종; 폐/종격암; 유방암; 식도암; 위암; 간암; 담도암; 췌장암; 소장암; 대장암; 결장직장암; 부인과암; 비뇨생식기암; 난소암; 갑상선암; 부신암; 피부암; 흑색종; 골육종; 연조직육종; 소아과 악성 종양; 호지킨병환; 비호지킨 림프종; 골수종; 백혈병; 또는 원발 부위 불명으로부터의 전이의 치료이다.
- [0195] 일 실시양태에서, 치료는 폐암, 유방암, 난소암, 췌장암, 결장직장암, 림프종, 흑색종, 신경교종 또는 신경모세포종의 치료이다.
- [0196] 일 실시양태에서, 암은 p53 결핍 암을 특징으로 하거나 또는 이를 추가 특징으로 한다. 일 실시양태에서, 암은 p53 결핍 암이다.
- [0197] 일 실시양태에서, 암은 MYC-증폭 암을 특징으로 하거나 또는 이를 추가 특징으로 한다. 일 실시양태에서, 암은 MYC-증폭 암이다.
- [0198] 일 실시양태에서, 암은 c-MYC-증폭 암을 특징으로 하거나 또는 이를 추가 특징으로 한다. 일 실시양태에서, 암은 c-MYC-증폭 암이다.
- [0199] 일 실시양태에서, 암은 MYCN-증폭 암을 특징으로 하거나 또는 이를 추가 특징으로 한다. 일 실시양태에서, 암은 MYCN-증폭 암이다.
- [0200] 일 실시양태에서, 암은 MYC의 과발현을 특징으로 하거나 또는 이를 추가 특징으로 한다. 일 실시양태에서, 암은 MYC의 과발현을 특징으로 하는 암이다.
- [0201] 일 실시양태에서, 암은 MYCN의 과발현을 특징으로 하거나 또는 이를 추가 특징으로 한다. 일 실시양태에서, 암은 MYCN의 과발현을 특징으로 하는 암이다.
- [0202] 일 실시양태에서, 암은 c-MYC의 과발현을 특징으로 하거나 또는 이를 추가 특징으로 한다. 일 실시양태에서, 암은 c-MYC의 과발현을 특징으로 하는 암이다.
- [0203] 일 실시양태에서, 암은 MYCN-증폭 신경모세포종이다.
- [0204] 일 실시양태에서, 암은 c-MYC-증폭 B 세포 림프종이다.
- [0205] 일 실시양태에서, 암은 내인성 복제 스트레스 증가를 특징으로 하거나 또는 이를 추가 특징으로 한다. 일 실시양태에서, 암은 내인성 복제 스트레스의 증가를 특징으로 하는 암이다.
- [0206] 일 실시양태에서, 암은 CHK1 신호전달의 내인성 활성화 증가를 특징으로 하거나 또는 이를 추가 특징으로 한다. 일 실시양태에서, 암은 CHK1 신호전달의 내인성 활성화 증가를 특징으로 하는 암이다.
- [0207] 일 실시양태에서, 치료는 암 전이의 치료이다.

- [0208] 일 실시양태에서, 암은 암 줄기세포를 특징으로 하거나 또는 이를 추가 특징으로 한다.
- [0209] 항암 효과는 세포 증식의 조절, 세포 주기 진행의 저해, 혈관 형성(신생 혈관의 형성)의 저해, 전이(이의 유래로부터의 종양의 확산)의 저해, 세포 이동(암 세포의 다른 신체 부위로의 확산)의 저해, 침입(종양 세포의 이웃하는 정상 구조로의 확산)의 저해 또는 아폽토시스(프로그램화된 세포사)의 촉진을 포함하나 이에 한정되지 않는 하나 이상의 기전을 통해 일어날 수 있다. 본 발명의 화합물은 본 명세서에 논의된 기전과 무관하게 본 명세서에 기재된 암의 치료에 사용될 수 있다.
- [0210] 치료
- [0211] 장애의 치료라는 문맥에서 본 명세서에서 사용되는 바의 용어 "치료"는 일반적으로 몇 가지 소정의 치료 효과, 예컨대 장애의 진행 저해, 진행 속도의 감소, 진행 속도의 정지, 장애의 증상 개선, 장애의 개선 및 장애의 치유가 달성되는 인간 또는 동물의 치료(예컨대 수의과적 용도에서)에 관한 것이다. 예방적 조치(즉 예방)로서의 치료도 포함된다. 예컨대, 아직 장애가 생기지 않았으나 장애가 생길 위험이 있는 환자에서의 사용도 용어 "치료"에 포함된다.
- [0212] 예컨대 치료는 암의 예방, 암 발생 감소, 암 증상 개선 등을 포함한다.
- [0213] 본 명세서에서 사용되는 바의 용어 "치료학적 유효량"은 소정의 치료 치료요법에 따라 투여시 적당한 이익/위험비를 가지며 일부 소정의 치료 효과를 생성시키기에 유효한 화합물 또는 물질 또는 화합물을 포함하는 조성물 또는 제형의 양에 관한 것이다.
- [0214] 병용 치료요법
- [0215] 용어 "치료"는 2 이상의 치료 또는 치료요법을 예컨대 순차적으로 또는 동시에 조합한 병용 치료 및 치료요법을 포함한다. 예컨대 본 명세서에 기재된 화합물은 또한 병용 치료요법으로, 예컨대 다른 제제와 함께 사용할 수 있다. 치료 및 치료요법의 예는 화학 치료요법[예컨대 약물, (예컨대 면역 치료요법에서와 같이) 항체, (예컨대 광역학 치료요법, GDEPT, ADEPT 등에서와 같이) 프로드럭을 비롯한 활성제의 투여]; 수술; 방사선 치료요법; 광역학 치료요법; 유전자 치료요법; 및 식이 제어를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0216] 본 발명의 일 측면은 후술하는 바와 같이 하나 이상(예컨대 1, 2, 3, 4 등)의 추가 치료제, 예를 들어 상이한 기전을 통해 세포 증식 또는 생존 또는 분화를 조절하여 암 발생의 몇가지 특징적인 면을 치료하는 약제 또는 치료요법과 조합되는 본 명세서에 기재된 바와 같은 화합물에 관한 것이다.
- [0217] 특정 조합은 숙련의에게 공지된 투여 치료요법 및 일반 상식을 이용하여 용량을 선택할 수 있는 의사의 결정에 달려 있다.
- [0218] 약제(즉, 본 명세서에 기재된 화합물 + 1 이상의 다른 약제)는 동시에 또는 순차적으로 투여할 수 있으며, 용량 스케줄을 변경하고 상이한 경로를 통해 따로 투여할 수 있다. 예컨대 순차 투여시, 약제를 가까운 간격으로(예컨대 5 내지 10 분의 기간에 걸쳐) 또는 더 긴 간격으로(예컨대 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의 시간 간격으로 또는 필요시 더 긴 기간으로) 투여할 수 있으며, 정확한 투여 치료요법은 치료제(들)의 특성에 맞춘다.
- [0219] 약제(즉, 본 명세서에 기재된 화합물 + 1 이상의 다른 약제)는 단일 제형에 함께 제제화할 수 있거나 또는 대안적으로 개별 약제를 따로 제제화하고 임의로 이의 사용 설명서와 함께 키트의 형태로 제공할 수 있다.
- [0220] 병용 치료요법을 위한 추가 약제
- [0221] 본 명세서에 기술된 바와 같이, 일부 실시양태에서, TFM 화합물은 (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 이온화 방사선; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 및 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제로부터 선택되는 하나 이상의 다른 약제와 조합하여(예를 들면, 결합하여) 사용된다.
- [0222] TFM 화합물 및 하나 이상의 다른 약제가 모두 사용되는 경우, 이들은 어떤 순서로도 사용(예컨대, 접촉, 투여 등)될 수 있다. 또한 이들은 함께, 단일 제형의 일부로서 또는 분리된 제형으로서 별도로 사용(예컨대, 접촉, 투여 등)될 수 있다.
- [0223] 예를 들어, TFM 화합물 및 하나 이상의 다른 약제를 모두 사용하는 치료 방법에 있어서, TFM 화합물의 처리(예컨대, 그의 투여)는 하나 이상의 다른 약제로의 처리(예컨대, 그의 투여)전, 그와 동시 또는 후에 일어날 수

있다.

- [0224] 일 실시양태에서, TFM 화합물로의 처리(예컨대, 그의 투여)는 하나 이상의 다른 약제로의 처리(예컨대, 그의 투여)와 동시에 또는 후에 일어날 수 있다.
- [0225] 일 실시양태에서, 하나 이상의 다른 약제는 DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; 예를 들어, 에토포시드, 토포테칸, 캄포테신, 이리노테칸, SN-38, 독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신 및 미톡산트론이다.
- [0226] 일 실시양태에서, 하나 이상의 다른 약제는 DNA 손상제; 예컨대, 알킬화제, 예를 들어, 테모졸로미드, 다카바진, 미토마이신 C, 사이클로포스파미드, 이포스파미드, BCNU, CCNU, 멜팔란, 부설판 및 클로람부실; 백금 화제, 예를 들어, 시스플라틴, 카보플라틴 및 옥살리플라틴; 또는 자유 래디칼을 발생하는 화합물, 예를 들어, 블레오마이신이다.
- [0227] 일 실시양태에서, 하나 이상의 다른 약제는 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제(TS) 저해제; 예를 들어, 5-플루오로우라실, 하이드록시우레아, 잼시타빈, 시타라빈, 플루다라빈, 카페시타빈, 넬라라빈, 랄티트렉세드, 페메트렉세드 및 ZD9331이다.
- [0228] 일 실시양태에서, 하나 이상의 다른 약제는 미소관 표적제; 예를 들어, 파클리탁셀, 도세탁셀, 카바지탁셀, 에리布林, 빈크리스틴, 빈블라스틴 및 비노렐빈이다.
- [0229] 일 실시양태에서, 하나 이상의 다른 약제는 예를 들어, 외부 빔 조사로 전달되거나 또는 전신 방사성 의약품, 예를 들어, ^{131}I -메타요오도벤질구아니딘, 소듐(^{131}I) 요오다이드, 요오드(^{131}I) 토시투맙 및 이리투모맙(^{90}Y) 티옥세탄의 투여로 전달되는 이온화 방사선(예컨대, 방사선 치료의 일부로서)이다.
- [0230] 일 실시양태에서, 하나 이상의 다른 약제는 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제, 예를 들어, Wee1 키나제의 저해제, 오로라 키나제의 저해제 또는 폴로-유사 키나제 1의 저해제이다.
- [0231] 일 실시양태에서, 하나 이상의 다른 약제는 DNA 손상 신호 전달물질의 저해제, 예를 들어, ATR 키나제의 저해제, ATM 키나제의 저해제, CHK2의 저해제 또는 MK2의 저해제이다.
- [0232] 일 실시양태에서, 하나 이상의 다른 약제는 DNA 손상 수복 효소의 저해제, 예를 들어, 폴리 ADP 리보스 폴리머라제(PARP)의 저해제, 예를 들어, 올라파립이다.
- [0233] 다른 용도
- [0234] 본 명세서에 기재된 TFM 화합물은 또한 CHK1 키나제 기능을 저해하거나, 예를 들면 세포 증식 등을 저해하기 위해 세포 배양 첨가제로서 사용할 수 있다.
- [0235] 본 명세서에 기재된 TFM 화합물은 또한 예컨대 후보 숙주가 해당 화합물로의 치료로부터 이익을 얻을 수 있는지를 결정하기 위해 시험관내 분석의 일부로서 사용할 수 있다.
- [0236] 본 명세서에 기재된 TFM 화합물은 예컨대 다른 화합물, 다른 CHK1 키나제 기능 저해제, 다른 항증식제, 다른 항암제 등을 확인하기 위한 분석에서 표준물질로서 사용할 수 있다.
- [0237] 키트
- [0238] 본 발명의 일 측면은 (a) 예컨대 바람직하게는 적절한 용기에 및/또는 적절한 포장과 함께 제공된 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물 또는 본 명세서에 기재된 TFM 화합물을 포함하는 조성물; 및 (b) 사용 설명서, 예컨대 화합물 또는 조성물의 투여 방법에 대한 서면 설명서를 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0239] 일 실시양태에서, 키트는 추가로 (a) DNA 토포이소머라제 I 또는 II 저해제; (b) DNA 손상제; (c) 대사길항물질 또는 티미딜레이트 신타제 (TS) 저해제; (d) 미소관 표적제; (e) 전신 방사성 의약품; (f) 유사분열 조절제 또는 유사분열 체크포인트 조절제의 저해제; (g) DNA 손상 신호 전달물질의 저해제; 및 (h) DNA 손상 수복 효소의 저해제로부터 선택되는 하나 이상의 다른 약제를 포함한다.
- [0240] 서면 설명서는 또한 활성 성분이 적절한 치료제라는 지시 리스트를 포함할 수 있다.
- [0241] 투여 경로
- [0242] TFM 화합물 또는 TFM 화합물을 포함하는 약학적 조성물은 전신적/말초적으로든 또는 국소적으로든(즉 소정 작용 부위에) 임의의 편리한 투여 경로에 의해 대상체에게 투여할 수 있다.

- [0243] 투여 경로는 경구(예컨대 섭취에 의함); 볼; 설하; 경피(예컨대 패치, 반창고에 의한 것 포함); 경점막(예컨대 패치, 반창고에 의한 것 포함); 비내(예컨대 코 스프레이에 의함); 눈(예컨대 점안액에 의함); 폐(예컨대 입 또는 코를 통한 에어로졸을 통한 흡입 또는 통기 치료요법에 의함); 직장(예컨대 좌제 또는 관장제에 의함); 질(예컨대 페서리에 의함); 예컨대 피하, 피내, 근육내, 정맥내, 동맥내, 심장내, 척추강내, 척수강내, 피막내, 피막하, 안와내, 복막내, 기관내, 표피하, 관절내, 거미막하 및 흉골내를 비롯한 주입에 의한 비경구; 예컨대 피하 또는 근육내 데포 또는 저장소(reservoir)의 이식에 의한 것을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0244] 바람직하게는, 투여 경로는 경구에 의한 것이며, TFM 화합물 또는 TFM 화합물을 포함하는 약학적 조성물은 대상체에 경구적으로 투여된다.
- [0245] 대상체/환자
- [0246] 대상체/환자는 척삭 동물, 척추 동물, 포유 동물, 태반 포유 동물, 유대 동물(예컨대 캥거루, wombats), 설치류(예컨대 기니피그, 햄스터, 래트, 마우스), 생쥐(예컨대 마우스), 토끼목 포유 동물(예컨대 토끼), 조류(예컨대 새), 갯과 동물(예컨대 개), 고양이과 동물(예컨대 고양이), 말류(예컨대 말), 돼지류(예컨대 돼지), 양류(예컨대 양), 숫과 동물(예컨대 소), 영장류, 유인원(예컨대 꼬리 있는 원숭이 또는 꼬리 없는 원숭이), 꼬리 없는 원숭이(예컨대 명주 원숭이, 개코 원숭이), 꼬리 없는 원숭이(예컨대 고릴라, 침팬지, 오랑우탄, 긴팔 원숭이) 또는 인간일 수 있다.
- [0247] 또한, 대상체/환자는 발생 형태에 있는 임의의 것, 예컨대 태아일 수 있다.
- [0248] 바람직한 일 실시양태에서, 대상체/환자는 인간이다.
- [0249] 제제
- [0250] TFM 화합물을 단독으로 투여할 수 있지만, 이는 적어도 하나의 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물을, 약학적으로 허용가능한 담체, 희석제, 부형제, 보조제, 충전제, 완충제, 보존제, 향산화제, 운환제, 안정화제, 가용화제, 계면활성제(예컨대 습윤제), 차폐제, 착색제, 향미제 및 감미제를 포함하나 이에 한정되지 않는 당업자에게 잘 알려진 하나 이상의 다른 약학적으로 허용가능한 성분과 함께 포함하는 약학적 제제(예컨대 조성물, 제제, 약제)로서 제공하는 것이 바람직하다. 제제는 다른 활성화제, 예컨대 다른 치료제 또는 예방제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0251] 따라서, 본 발명은 상기 정의된 바의 약학적 조성물 및 적어도 하나의 본 명세서에 기재된 바와 같은 TFM 화합물을 당업자에게 잘 알려진 하나 이상의 다른 약학적으로 허용가능한 성분, 예컨대 담체, 희석제, 부형제 등과 함께 혼합하는 것을 포함하는 약학적 조성물의 제조 방법을 추가로 제공한다. 분리된 단위(예컨대 정제 등)으로 제제화하는 경우, 각각의 단위는 소정량(용량)의 화합물을 함유한다.
- [0252] 본 명세서에서 사용되는 바의 용어 "약학적으로 허용가능한"은 건전한 의학적 판단의 범위 내에 있고, 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 다른 문제 또는 합병증 없이 해당 대상체(예컨대 인간)의 조직과 접촉시 사용하기에 적절하며, 적당한 이익/위험 비를 갖는 화합물, 성분, 재료, 조성물, 제형 등에 관한 것이다. 각각의 담체, 희석제, 부형제 등은 또한 다른 제제 성분과 양립한다는 측면에서 "허용가능"해야 한다.
- [0253] 적절한 담체, 희석제, 부형제 등은 표준 약학 문헌, 예컨대 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990; and Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th Edition, 2005)에서 찾을 수 있다.
- [0254] 제제는 약학 분야에 잘 알려진 임의의 방법에 의해 제조할 수 있다. 이러한 방법은 화합물을 하나 이상의 보조 성분을 구성하는 담체와 회합시키는 단계를 포함한다. 일반적으로, 제제는 화합물을 담체(예컨대 액상 담체, 미분화된 고상 담체 등)와 균일 및 친밀하게 회합시킨 후 필요할 경우 생성물을 성형하는 단계에 의해 제조한다.
- [0255] 고속 또는 저속 방출; 즉시 방출, 지연(delayed) 방출, 시한(timed) 방출 또는 지속 방출; 또는 이의 조합을 제공하도록 제제를 제조할 수 있다.
- [0256] 제제는 적절하게는 액체, 용액(예컨대 수성, 비수성), 현탁액(예컨대 수성, 비수성), 에멀전(예컨대 수중유, 유중수), 엘릭시르, 시럽, 연질약, 구강 세척제, 점적 약제, 정제(예컨대 코팅 정제 포함), 과립, 분말, 로젠지, 향정, 캡슐(예컨대 경질 및 연질 젤라틴 캡슐 포함), 카세제, 환제, 앰플, 볼러스, 좌제, 페서리, 텅크제, 겔, 페이스트, 연고, 크림, 로션, 오일, 폼, 스프레이, 분무제 또는 에어로졸의 형태일 수 있다.
- [0257] 제제는 적절하게는 하나 이상의 화합물 및 임의로 예컨대 관통, 침투 및 흡수 강화제를 비롯한 하나 이상의 다

른 약학적으로 허용가능한 성분이 함유된 패치, 접착성 반창고, 붕대, 드레싱 등으로서 제공할 수 있다. 제제는 또한 적절하게는 데포 또는 저장소의 형태로 제공할 수 있다.

- [0258] 화합물은 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 성분용 용해되거나, 이에 현탁되거나 또는 이와 혼합될 수 있다. 화합물은 예컨대 혈액 성분 또는 하나 이상의 기관에 화합물을 표적화하도록 설계된 리포솜 또는 다른 미립자에 제공될 수 있다.
- [0259] (예컨대 섭취에 의한) 경구 투여에 적절한 제제는 액체, 용액(예컨대 수성, 비수성), 현탁액(예컨대 수성, 비수성), 에멀전(예컨대 수중유, 유중수), 엘릭시르, 시럽, 연질약, 정제, 과립, 분말, 캡슐, 카세제, 환제, 앰플 및 볼러스를 포함한다.
- [0260] 볼 투여에 적절한 제제는 구강 세척제, 로젠지, 향정 뿐 아니라, 패치, 접착성 반창고, 데포 및 저장소를 포함한다. 로젠지는 통상적으로 향미 베이스, 일반적으로 수크로오스 및 아카시아 또는 트래거캔스에 화합물을 포함한다. 향정은 통상적으로 젤라틴 및 글리세린 또는 수크로오스 및 아카시아와 같은 불활성 매트릭스에 화합물을 포함한다. 구강 세척제는 통상적으로 적절한 액상 담체에 화합물을 포함한다.
- [0261] 설하 투여에 적절한 제제는 정제, 로젠지, 향정, 캡슐 및 환제를 포함한다.
- [0262] 경구 경점막 투여에 적절한 제제는 액체, 용액(예컨대 수성, 비수성), 현탁액(예컨대 수성, 비수성), 에멀전(예컨대 수중유, 유중수), 구강 세척제, 로젠지, 향정 뿐 아니라, 패치, 접착성 반창고, 데포 및 저장소를 포함한다.
- [0263] 비경구 경점막 투여에 적절한 제제는 액체, 용액(예컨대 수성, 비수성), 현탁액(예컨대 수성, 비수성), 에멀전(예컨대 수중유, 유중수), 좌제, 페서리, 겔, 페이스트, 연고, 크림, 로션, 오일 뿐 아니라, 패치, 접착성 반창고, 데포 및 저장소를 포함한다.
- [0264] 경피 투여에 적절한 제제는 겔, 페이스트, 연고, 크림, 로션 및 오일 뿐 아니라, 패치, 접착성 반창고, 붕대, 드레싱, 데포 및 저장소를 포함한다.
- [0265] 정제는 통상적인 수단, 예컨대 임의로 하나 이상의 보조 성분과의 압축 또는 성형에 의해 제조할 수 있다. 압축 정제는 적절한 기계에서 분말 또는 과립과 같은 자유 유동 형태의 화합물을 압축하고, 임의로 하나 이상의 결합제(예컨대 포비돈, 젤라틴, 아카시아, 소르비톨, 트래거캔스, 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스); 충전제 또는 희석제(예컨대 락토오스, 미정질 셀룰로오스, 인산수소칼슘); 윤활제(예컨대 스테아르산마그네슘, 탈크, 실리카); 붕해제(예컨대 글리콜산전분나트륨, 가교 포비돈, 가교 나트륨 카복시메틸 셀룰로오스); 계면활성제 또는 분산제 또는 습윤제(예컨대 황산라우릴나트륨); 보존제(예컨대 메틸 p-하이드록시벤조에이트, 프로필 p-하이드록시벤조에이트, 소르브산); 향미제, 향미 강화제 및 감미제와 혼합하여 제조할 수 있다. 성형 정제는 적절한 기계에서 불활성 액상 희석제로 습윤된 분말화 화합물의 혼합물을 성형하여 제조할 수 있다. 정제는 임의로 코팅 또는 스코어링(scoring)할 수 있으며, 예컨대 소정 방출 프로필을 제공하기 위해 다양한 비율로 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스를 사용하여 화합물의 지속 또는 제어 방출을 제공하기 위해 제제화할 수 있다. 정제에 임의로 예컨대 방출에 영향을 미치기 위한 코팅, 예컨대 위 외에 창자의 일부에서 방출되도록 하기 위한 장용 코팅을 제공할 수 있다.
- [0266] 연고는 통상적으로 화합물 및 파라핀 또는 수산화성 연고 베이스로부터 제조한다.
- [0267] 크림은 통상적으로 화합물 및 수중유 크림 베이스로부터 제조한다. 필요할 경우, 크림 베이스의 수상은 예컨대 적어도 30% w/w의 다가 알콜, 즉 2 이상의 하이드록실기를 갖는 알콜, 예컨대 프로필렌 글리콜, 부탄-1,3-디올, 만니톨, 소르비톨, 글리세롤 및 폴리에틸렌 글리콜 및 이의 혼합물을 포함할 수 있다. 국소 제제는 바람직하게는 피부 또는 다른 영향 받은 부분을 통한 화합물의 흡수 또는 침투를 강화시키는 화합물을 포함할 수 있다. 이러한 피부 침투 강화제의 예는 디메틸설폭사이드 및 관련 유사체를 포함한다.
- [0268] 에멀전은 통상적으로 화합물 및 임의로 유화제[에멀전트(emulgent)로도 공지됨]만을 포함할 수 있는 유상으로부터 제조하거나 또는 이는 적어도 하나의 유화제와 지방 또는 오일 또는 지방 및 오일 모두의 혼합물을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 친수성 유화제가 안정화제로서 작용하는 친지성 유화제와 함께 포함된다. 오일 및 지방 모두를 포함하는 것도 바람직하다. 안정화제(들)가 있거나 없는 유화제(들)는 소위 유화 왁스를 구성하고, 왁스는 오일 및/또는 지방과 함께 크림 제제의 유성 분산상을 형성하는 소위 유화 연고 베이스를 구성한다.
- [0269] 적절한 에멀전트 및 에멀전 안정화제는 Tween 60, Span 80, 세토스테아릴 알콜, 미리스틸 알콜, 글리세틸 모노스테아레이트 및 황산라우릴나트륨을 포함한다. 제제에 적절한 오일 또는 지방의 선택은 소정의 미용 특성의 달

성을 기준으로 하는데, 이는 약학적 에멀전 제제에 사용 가능한 대부분의 오일에서 화합물의 용해도가 매우 낮을 수 있기 때문이다. 따라서, 크림은 바람직하게는 튜브 또는 다른 용기로부터의 누출을 피하기 위해 적절한 일관성을 갖는 기름기 없고 오염이 안 되며 세정 가능한 제품이어야 한다. 직쇄형 또는 분지쇄형 사슬, 일염기성 또는 이염기성 알킬 에스테르, 예컨대 디소아디페이트, 이소세틸 스테아레이트, 코코넛 지방산의 프로필렌 글리콜 디에스테르, 이소프로필 미리스테이트, 데실 올레에이트, 이소프로필 팔미테이트, 부틸 스테아레이트, 2-에틸헥실 팔미테이트 또는 Crodamol CAP로서 공지된 분지쇄형 에스테르의 블렌드를 사용할 수 있으며, 마지막 3개가 바람직한 에스테르이다. 이들은 요구되는 특성에 따라 단독 사용하거나 병용할 수 있다. 대안적으로, 고용점 액체, 예컨대 백색 연질 파라핀 및/또는 액상 파라핀 또는 다른 광유를 사용할 수 있다.

[0270] 담체가 액체인 경우 비내 투여에 적절한 제제는 예컨대 코 스프레이, 코 점적액을 포함하거나 또는 분무기에 의한 에어로졸 투여의 경우 화합물의 수성 또는 유성 용액을 포함한다.

[0271] 담체가 고체인 경우 비내 투여에 적절한 제제는 예컨대 약 20 내지 약 500 미크론 범위의 입자 크기를 갖는 거친 분말로서 제공된 것들을 포함하며, 이는 코로 들이쉬는, 즉 코 가까이 놓인 분말의 용기로부터 비강을 통해 빠르게 흡입시키는 방식으로 투여된다.

[0272] (예컨대 흡입 또는 통기 치료요법에 의한) 폐 투여에 적절한 제제는 가압 팩으로부터 나오는 에어로졸 스프레이로서 제공된 것들을 포함하며, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로-테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적절한 가스와 같은 적절한 추진제를 사용한다.

[0273] 눈 투여에 적절한 제제는 화합물이 적절한 담체, 특히 화합물에 대한 수성 용매에 용해 또는 현탁된 점안액을 포함한다.

[0274] 직장 투여에 적절한 제제는 예컨대 천연 또는 경화 오일, 왁스, 지방, 반액상 또는 액상 폴리올, 예컨대 코코아 버터 또는 살리실레이트를 포함하는 적절한 베이스를 포함하는 좌제로서 또는 관장제에 의한 치료를 위한 용액 또는 현탁액으로서 제공될 수 있다.

[0275] 질 투여에 적절한 제제는 화합물 외에 적절한 것으로 당업계에 공지된 담체를 함유하는 페서리, 탐폰, 크림, 젤, 페이스트, 폼 또는 스프레이 제제로서 제공될 수 있다.

[0276] (예컨대 주입에 의한) 비경구 투여에 적절한 제제는 화합물이 용해, 현탁 또는 (예컨대 리포솜 또는 다른 미립자에) 제공된 수성 또는 비수성, 등장성, 무발열, 살균 액체(예컨대 용액, 현탁액)를 포함한다. 이러한 액체는 추가로 다른 약학적으로 허용가능한 성분, 예컨대 항산화제, 완충제, 보존제, 안정화제, 정균제, 현탁제, 증점제 및 의도하는 수용자의 혈액(또는 다른 관련 체액)으로 제제에 등장성을 부여하는 용질을 함유할 수 있다. 부형제의 예는 예컨대 물, 알콜, 폴리올, 글리세롤, 식물성 오일 등을 포함한다. 이러한 제제에 사용하기에 적절한 등장성 담체의 예는 염화나트륨 주사액, 링거액 또는 유산 링거 주사액을 포함한다. 통상적으로, 액체 중 화합물의 농도는 약 1 ng/ml 내지 약 10 µg/ml, 예컨대 약 10 ng/ml 내지 약 1 µg/ml이다. 제제는 단일 용량 또는 다중 용량 밀봉 용기, 예컨대 앰플 및 바이알에 제공될 수 있으며, 사용 직전에 주사를 위한 살균 액상 담체, 예컨대 물의 첨가만을 필요로 하는 동결 건조 조건에서 저장할 수 있다. 임시 주사액 및 현탁액을 살균 분말, 과립 및 정제로부터 제조할 수 있다.

[0277] 용량

[0278] TFM 화합물 및 TFM 화합물을 포함하는 조성물의 적당한 용량은 환자에 따라 달라질 수 있음을 당업자는 이해할 것이다. 최적 용량의 결정은 일반적으로 임의의 위험 또는 해로운 부작용에 대한 치료 이익의 수준의 균형을 맞추는 것을 수반할 것이다. 선택되는 용량 수준은 특정 TFM 화합물의 활성, 투여 경로, 투여 시간, TFM 화합물의 배설 속도, 치료 지속 기간, 병용하는 다른 약물, 화합물 및/또는 재료, 장애의 심각도 및 환자의 종, 성별, 연령, 체중, 증상, 전신 건강 및 이전의 의학적 이력을 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 인자에 따라 달라질 것이다. 일반적으로 실질적으로 유해하거나 해로운 부작용을 초래하지 않고 소정 효과를 달성하는 작용 부위에서 국소 농도를 달성하도록 용량이 선택될 것이지만, TFM 화합물의 양 및 투여 경로는 최종적으로 의사, 수의사 또는 임상가가 선택할 것이다.

[0279] 투여는 치료 과정에 거쳐 일 투여로, 계속적으로 또는 간헐적으로(예컨대 적절한 간격의 분할 투여로) 실시할 수 있다. 가장 효과적인 투여 수단 및 용량을 결정하는 방법은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 치료요법에 사용되는 제제, 치료요법의 목적, 치료되는 표적 세포(들) 및 치료되는 대상체에 따라 달라질 수 있다. 단일 투여 또는 다중 투여를 실시할 수 있으며, 용량 수준 및 패턴은 치료 의사, 수의사 또는 임상가가 선택한다.

[0280] 일반적으로, TFM 화합물의 적절한 용량은 1일당 대상체의 체중 1 kg당 약 10 μ g 내지 약 250 mg(더욱 전형적으로 약 100 μ g 내지 약 25 mg) 범위이다. 화합물이 염, 에스테르, 아마이드, 프로드럭 등인 경우, 투여량은 모화합물을 기준으로 계산하며, 이에 따라 사용되는 실제 중량은 비례하여 증가한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0281] 실시예

[0282] 화학적 합성

[0283] 하기 실시예는 본 발명을 설명하기 위해서만 제공되는 것이며, 본 명세서에 기술된 바와 같은 본 발명의 영역을 제한하고자 하지 않는다.

[0285] 합성 1

[0286] 5-[[4-[[[(2R)-모르폴린-2-일]메틸아미노]-5-(트리플루오로메틸)-2-피리딘]아미노]피라진-2-카보니트릴 (화합물 1)

[0287] 합성 1A

[0288] (R)-tert-부틸 2-(토실옥시메틸)모르폴린-4-카복실레이트



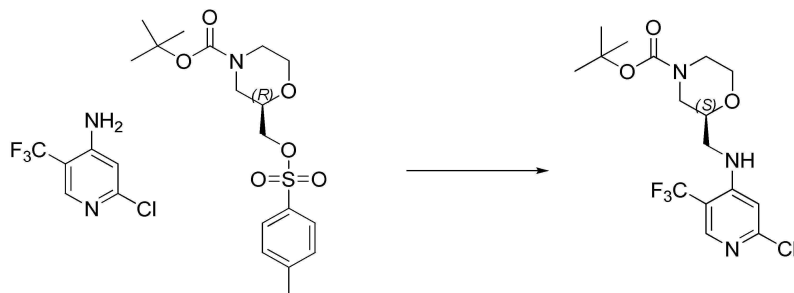
[0289]

[0290] 트리에틸아민 (15.46 mL, 110 mmol)을 디클로로메탄 (50.0 mL) 중의 (R)-tert-부틸 2-(하이드록시메틸)-모르폴린-4-카복실레이트 (21.73 g, 100 mmol)에 첨가하여 무색 용액을 얻고 빙조로 냉각하였다. 4-톨루엔설포닐 클로라이드 (20.02 g, 105 mmol)를 내부 온도를 3°C 아래로 유지하면서 소량씩 첨가하였다. 슬러리를 실온에서 21 시간 동안 교반한 다음, 진공 하에 농축하였다. 조물질을 에틸 아세테이트 (750 mL)에 용해시키고, 물 (450 mL), 염수 (200 mL)로 세척한 뒤, 황산마그네슘으로 건조시켰다. 여과 및 진공 하에 휘발물질을 제거한 후, 헥산 (150 mL)을 첨가하고, 생성된 백색 침전을 여과한 다음, 헥산 (300 mL)으로 세척한 뒤, 건조하여 표제 화합물을 백색 분말로 수득하였다 (35.66 g, 96 %).

[0291] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.46 (9H, s), 2.46 (3H, s), 2.62-2.73 (1H, m), 2.85-2.94 (1H, m), 3.44-3.49 (1H, m), 3.58-3.63 (1H, m), 3.77-3.94 (3H, m), 3.99-4.06 (2H, m), 7.36 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.80 (2H, d, J = 8.5 Hz). LC-MS (Agilent 4 min) R_t 2.90 min; m/z (ESI) 372 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0293] 합성 1B

[0294] (S)-tert-부틸 2-((2-클로로-5-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일아미노)메틸)모르폴린-4-카복실레이트



[0295]

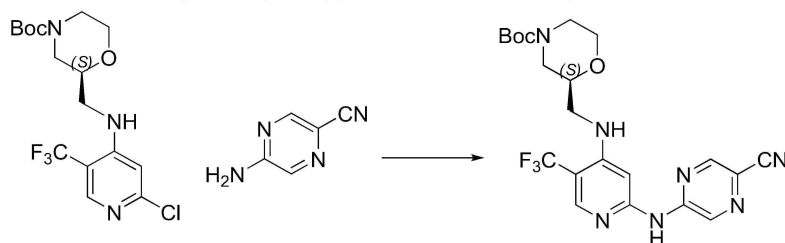
[0296] 디메틸포름아미드 (95 mL) 중의 2-클로로-5-(트리플루오로메틸)피리딘-4-아민 (2.9 g, 14.75 mmol) 용액에 수소화나트륨 (오일중 60 중량%; 1.180 g, 29.5 mmol)을 실온에서 나누어 첨가하고, 혼합물을 80°C에서 10 분동안 교반하였다. (R)-tert-부틸 2-(토실옥시메틸)모르폴린-4-카복실레이트를 나누어 첨가하고, 반응 혼합물을 80°C

에서 2.5 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 식히고, 탄산수소나트륨 포화 수용액 (100 mL)에 부어 물 (250 mL)로 희석하고, 에틸 아세테이트 (100 mL)로 추출하였다. 두 층을 분리한 후, 수성층을 에틸 아세테이트 (2 x 100 mL)로 추가 추출하였다. 유기층을 모아 염수 (4 x 100 mL)로 세척한 뒤, 황산마그네슘으로 건조하고, 여과한 다음, 농축하고, 진공하에 완전히 건조하였다. 조물질을 먼저 디클로로메탄중의 2.5% 디에틸 에테르 / 2.5% 에틸 아세테이트, 이어 목적 생성물이 칼럼으로부터 용출될 때 디클로로메탄중의 20% 디에틸 에테르로 용출하면서 칼럼 크로마토그래피로 정제하였다. 적절한 분획을 합하고, 농축하여 표제 화합물을 회백색 분말로서 수득하였다 (4.51 g, 77%).

[0297] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.49 (9H, s), 2.70-2.84 (1H, m), 2.92-3.05 (1H, m), 3.18-3.23 (1H, m), 3.33-3.37 (1H, m), 3.55-3.61 (1H, m), 3.66-3.71 (1H, m), 3.80-4.07 (3H, m), 5.32 (1H, broad s), 6.61 (1H, s), 8.24 (1H, s). LC-MS (Agilent 4 min) R_t 3.04 min; m/z (ESI) 396 $[\text{MH}^+]$.

[0299] 합성 1C

[0300] (S)-tert-부틸 2-((2-(5-시아노피라진-2-일아미노)-5-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일아미노)메틸)모르폴린-4-카복실레이트



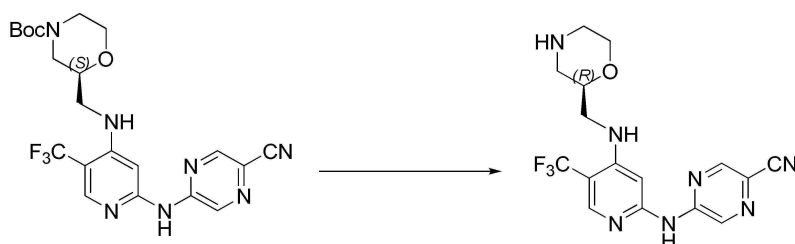
[0301]

[0302] 아르곤하에서, (S)-tert-부틸 2-((2-클로로-5-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일아미노)메틸)모르폴린-4-카복실레이트 (4.67 g, 11.8 mmol), 2-아미노-5-시아노피라진 (1.98 g, 16.5 mmol), 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐 (0) (0.86 g, 0.94 mmol), *rac*-2,2'-비스(디페닐포스포노)-1,1'-바이나프틸 (0.54 g, 0.87 mmol) 및 탄산세슘 (7.69 g, 23.6 mmol)을 무수 디옥산 (108 mL)에 현탁시켰다. 혼합물을 통해 아르곤을 30 분동안 버블링하고, 현탁액을 29 시간 동안 100°C로 가열하였다. 반응 혼합물을 식히고, 디클로로메탄으로 희석한 후, 실리카겔 상에 흡착시켰다. 예비-흡착된 실리카겔을 헥산중 20% 에틸 아세테이트로 평형화시킨 340 g KP-Sil SNAP 칼럼에 첨가하였다. 칼럼 크로마토그래피를 헥산중 20-35% 에틸 아세테이트의 구배로 용출하여 부분 정제된 물질을 오렌지색 검으로 얻었다. 이를 디클로로메탄중의 20% 에틸 아세테이트로 용출하면서 칼럼 크로마토그래피로 추가 정제하여 표제 화합물을 밝은 황갈색 분말로 수득하였다 (3.28 g, 58%).

[0303] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.49 (9H, s), 2.73-2.86 (1H, m), 2.94-3.07 (1H, m), 3.26-3.31 (1H, m), 3.38-3.43 (1H, m), 3.57-3.61 (1H, m), 3.70-3.75 (1H, m), 3.83-4.08 (3H, m), 5.31 (1H, broad s), 7.12 (1H, s), 8.13 (1H, s), 8.23 (1H, s), 8.57 (1H, s), 8.87 (1H, s). LC-MS (Agilent 4 min) R_t 2.90 min; m/z (ESI) 480 $[\text{MH}^+]$.

[0305] 합성 1D

[0306] 5-[[4-[[[(2R)-모르폴린-2-일]메틸아미노]-5-(트리플루오로메틸)-2-피리딜]아미노]피라진-2-카보니트릴 (화합물 1)



[0307]

[0308] 디클로로메탄 (8 mL) 중의 (S)-tert-부틸 2-((2-(5-시아노피라진-2-일아미노)-5-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일

아미노)메틸)모르폴린-4-카복실레이트 (1.09 g, 2.273 mmol)의 용액을 실온에서 무수 디클로로메탄 (227 mL) 중의 트리플루오로아세트산 (52.7 mL, 709 mmol) 및 트라이소프로필실란 (2.61 mL, 12.73 mmol)의 용액에 10 분간 적가하였다. 30 분동안 교반한 다음, 혼합물을 진공 하에 농축하였다. 농축물을 디클로로메탄 (200 mL)에 재현탁시키고, 진공 하에 농축한 뒤, 톨루엔 (100 mL)에 재현탁시켜 농축하였다.

[0309] 상기 과정을 3 번 행한 후 (각각 1.09 g (S)-tert-부틸 2-((2-(5-시아노피라진-2-일아미노)-5-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일아미노)메틸)모르폴린-4-카복실레이트로 출발), 생성된 조 생성물 세 분획을 모아 2 x 20 g Biotage NH2 Isolute 칼럼 상에서 메탄올로 용출하면서 이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 용리액을 농축하고, 디에틸 에테르 (25 mL) 중 10% 메탄올을 첨가하였다. 생성된 고체를 여과하고, 디에틸 에테르 (30 mL)로 세척한 뒤, 진공 하에 건조하여 표제 화합물을 밝은 밀짚색 분말로 수득하였다 (2.30 g, 89%).

[0310] ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 2.62 (1H, $J = 12, 10$ Hz), 2.78-2.84 (2H, m), 2.95 (1H, dd, $J = 12, 2$ Hz), 3.27-3.38 (2H, m), 3.63 (1H, ddd, $J = 14, 9.5, 3$ Hz), 3.73-3.78 (1H, m), 3.91 (1H, ddd, $J = 11, 4, 2$ Hz), 7.26 (1H, s), 8.18 (1H, s), 8.63 (1H, s), 9.01 (1H, s). LC-MS (Agilent 4 min) R_t 1.22 min; m/z (ESI) 380 $[\text{M}+\text{H}]^+$. 선광도 $[\alpha]_D^{24} = +7.0$ (c 1.0, DMF).

[0312] 합성 2

[0313] 5-[[4-[[[(2S)-모르폴린-2-일]메틸아미노]-5-(트리플루오로메틸)-2-피리딜]아미노]피라진-2-카보니트릴 (화합물 2)

[0314] 합성 2A

[0315] (S)-tert-부틸 2-(토실옥시메틸)모르폴린-4-카복실레이트



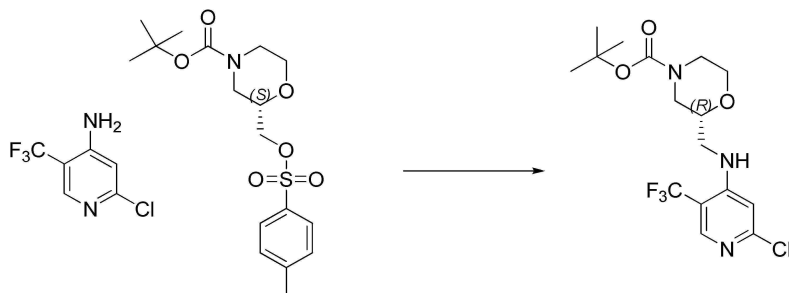
[0316]

[0317] 트리에틸아민 (6.05 mL, 43.0 mmol)을 디클로로메탄 (19.56 mL) 중의 (S)-tert-부틸 2-(하이드록시메틸)-모르폴린-4-카복실레이트 (8.5 g, 39.1 mmol)에 첨가하여 무색 용액을 얻었다. 4-톨루엔설포닐 클로라이드 (7.83 g, 41.1 mmol)를 0°C에서 소량씩 첨가하였다. 반응물을 실온에서 18 시간 동안 교반한 후, 감압하에 증발하여 농축시켰다. 농축물을 에틸 아세테이트 (300 mL)에 용해시키고, 생성된 용액을 물 (150 mL), 염수 (150 mL)로 세척한 뒤, 황산마그네슘으로 건조시키고, 여과하고, 감압하에 증발하여 농축시켰다. 농축물에 헥산을 첨가하고, 진공하에 휘발물질을 제거하여 표제 화합물을 백색 분말로 수득하였다 (14.46 g, 99%).

[0318] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.46 (9H, s), 2.46 (3H, s), 2.61-2.75 (1H, m), 2.85-2.94 (1H, m), 3.43-3.49 (1H, m), 3.58-3.63 (1H, m), 3.76-3.93 (3H, m), 3.99-4.06 (2H, m), 7.35 (2H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.80 (2H, d, $J = 8.5$ Hz). LC-MS (Agilent 4 min) R_t 2.94 min; m/z (ESI) 394 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

[0320] 합성 2B

[0321] (R)-tert-부틸 2-((2-클로로-5-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일아미노)메틸)모르폴린-4-카복실레이트



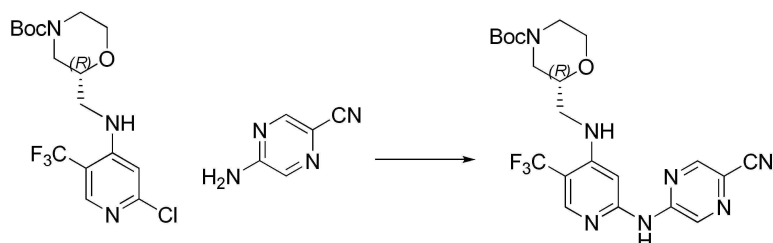
[0322]

[0323] 실온에서, 디메틸포름아미드 (32.6 mL) 중의 2-클로로-5-(트리플루오로메틸)피리딘-4-아민 (1 g, 5.09 mmol)의 용액에 수소화나트륨 (오일중 60 중량%; 0.407 g, 10.18 mmol)을 조금씩 첨가한 후, 80℃에서 10 분동안 교반하였다. (S)-tert-부틸 2-(토실옥시메틸)모르폴린-4-카복실레이트 (2.268 g, 6.11 mmol)를 나누어 첨가하고, 반응 혼합물을 80℃에서 2.5 시간 동안 교반하였다. 냉각후, 혼합물을 탄산수소나트륨 포화 수용액 (30 mL), 물 (100 mL) 및 에틸 아세테이트 (30 mL)로 분배하였다. 유기층을 분리한 후, 수성층을 에틸 아세테이트 (2 x 30 mL)로 추가 추출하였다. 유기층을 모아 염수 (2 x 70 mL)로 세척한 뒤, 황산마그네슘으로 건조하고, 여과한 다음, 농축후, 진공 하에 완전히 건조시켰다. 조물질을 90 g Thomson SingleStep 칼럼 상에서 디클로로메탄중의 2.5% 디에틸 에테르 / 2.5% 에틸 아세테이트의 등용매 믹스로 용출하면서 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 맑은 검으로 얻고 나중에 결정화로 백색 분말을 수득하였다 (1.47 g, 73%).

[0324] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.48 (9H, s), 2.71-2.83 (1H, m), 2.92-3.05 (1H, m), 3.18-3.23 (1H, m), 3.33-3.37 (1H, m), 3.56-3.61 (1H, m), 3.66-3.71 (1H, m), 3.80-4.07 (3H, m), 5.32 (1H, broad s), 6.61 (1H, s), 8.24 (1H, s). LC-MS (Agilent 4 min) R_t 3.04 min; m/z (ESI) 396 $[\text{MH}^+]$.

[0326] 합성 2C

[0327] (R)-tert-부틸 2-((2-(5-시아노피라진-2-일아미노)-5-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일아미노)메틸)모르폴린-4-카복실레이트



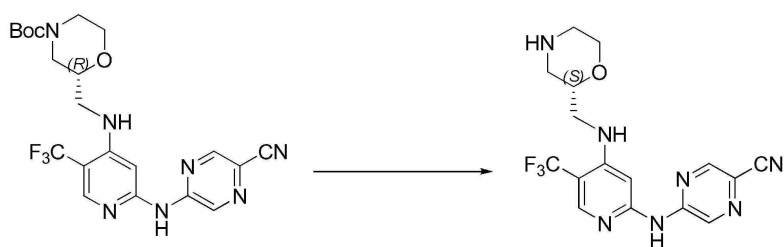
[0328]

[0329] 아르곤하에 (R)-tert-부틸 2-((2-클로로-5-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일아미노)메틸)모르폴린-4-카복실레이트 (1.44 g, 3.64 mmol), 2-아미노-5-시아노피라진 (0.612 g, 5.09 mmol, 1.4 eq.), 트리스(디벤질리텐아세톤)디팔라듐(0) (0.267 g, 0.291 mmol, 0.08 eq.), *rac*-2,2'-비스(디페닐포스포노)-1,1'-바이나프틸 (0.362 g, 0.582 mmol, 0.16 eq.) 및 탄산세슘 (2.37 g, 7.28 mmol)을 무수 디옥산 (33 mL)에 현탁시켰다. 혼합물을 통해 아르곤을 30 분동안 버블링하고, 혼합물을 22 시간 동안 100℃로 가열하였다. 반응 혼합물을 식히고, 디클로로메탄으로 희석한 후, 실리카겔 상에 흡착시켰다. 예비-흡착된 실리카겔을 100 g KP-Sil SNAP 칼럼에 가하고, 헥산중 20-50% 에틸 아세테이트로 용출하여 부분 정제된 물질을 오렌지색 검으로 얻었다. 조 생성물을 디클로로메탄에 용해시키고, 90 g SingleStep Thomson 칼럼 상에서 디클로로메탄중의 20% 에틸 아세테이트로 용출시키면서 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 수득하였다 (1.19 g, 68%).

[0330] ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.50 (9H, s), 2.71-2.88 (1H, m), 2.93-3.08 (1H, m), 3.27-3.32 (1H, m), 3.40-3.44 (1H, m), 3.55-3.64 (1H, m), 3.71-3.77 (1H, m), 3.82-4.11 (3H, m), 5.33 (1H, broad s), 7.19 (1H, s), 8.23 (1H, s), 8.58 (1H, s), 8.84 (1H, s). LC-MS (Agilent 4 min) R_t 2.93 min; m/z (ESI) 480 $[\text{MH}^+]$.

[0332] 합성 2D

[0333] 5-[[4-[[[(2S)-모르폴린-2-일]메틸아미노]-5-(트리플루오로메틸)-2-피리딘]아미노]피라진-2-카보니트릴 (화합물 2)



[0334]

[0335] 디클로로메탄 (8 mL) 중의 (R)-tert-부틸 2-((2-(5-시아노피라진-2-일아미노)-5-(트리플루오로메틸)피리딘-4-일아미노)메틸)모르폴린-4-카복실레이트 (1.19 g, 2.48 mmol)의 용액을 실온에서 무수 디클로로메탄 (248 mL) 중의 트리플루오로아세트산 (57.5 mL, 774 mmol) 및 트리이소프로필실란 (2.85 mL, 13.90 mmol)의 용액에 10 분간 적가하였다. 30 분동안 교반한 다음, 혼합물을 진공 하에 농축하였다. 농축물을 디클로로메탄 (200 mL)에 재현탁시키고, 진공 하에 농축한 뒤, 톨루엔 (100 mL)에 재현탁시켜 진공 하에 농축하였다. 조 물질을 20 g Biotage NH2 Isolute 칼럼 상에서 메탄올로 용출하면서 이온 교환 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 용리액을 농축하고, 디에틸 에테르 (8 mL) 중 10% 메탄올을 첨가하였다. 고체를 여과하고, 디에틸 에테르 (20 mL)로 세척한 뒤, 진공 하에 건조하여 표제 화합물을 밝은 밀짚색 분말로 수득하였다 (0.604 g, 64% 수율).

[0336] ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 2.62 (1H, $J = 12, 10$ Hz), 2.78-2.84 (2H, m), 2.95 (1H, dd, $J = 12, 2$ Hz), 3.27-3.38 (2H, m), 3.63 (1H, ddd, $J = 14, 9.5, 3$ Hz), 3.73-3.78 (1H, m), 3.91 (1H, ddd, $J = 11, 4, 2$ Hz), 7.26 (1H, s), 8.18 (1H, s), 8.63 (1H, s), 9.01 (1H, s). LC-MS (Agilent 4 min) R_t 1.26 min; m/z (ESI) 380 $[\text{M}+\text{H}]^+$. 선광도 $[\alpha]_D^{24} = -6.9$ (c 1.0, DMF).

[0338] 생물학적 방법

[0339] 분석 1: 캘리퍼스(Caliper) 분석 방식으로 CHK1에 대한 저해제 효능의 측정

[0340] CHK1 키나제 활성을 그의 기질로부터 인산화된 산물의 분리를 추적 관찰하는 마이크로 유체 분석으로 측정하였다. 분석은 CR-8 (500 nM, #760278, Caliper LS)을 함유하는 분리 완충제 (#760367 Caliper LS)를 사용하여 EZ Reader II (Caliper Life Sciences Ltd, Runcorn, UK)에서 행하였다. ECHO® 550 (Labcyte IncTM) 어쿠스틱 디스펜서(acoustic dispenser)를 사용하여 384 폴리프로필렌 분석 플레이트 (Greiner Bio-One, Gloucestershire, UK)에 직접 중복 8 pt 희석 커브를 생성하였다. 각각의 시험 화합물에 대해, 100% DMSO 중 50 μM 스톡(stock) 농도를 사용하였다. 웰당 분배된 DMSO의 총량은 250 nL로, 2.5% DMSO의 최종 분석 농도 및 0.5-1000 nM 범위의 시험 화합물 농도를 제공하는 것이었다. 이 분석 플레이트에, 6 μL CHK1 (2 nM 최종 농도, 자가 단백질 제조), 2 μL 펩티드 10 (5-FAM-KKKVSRSGLYRSPMPENLNRP-COOH, 1.5 μM 최종 농도, #760354 캘리퍼스 LS) 및 2 μL ATP (90 μM 최종 농도) (모두 키나제 완충제 (HEPES 50 mM, NaN_3 0.02%, BSA 0.01%, 소듐 오르토바나테이트 0.1 mM, DTT 1 mM, MgCl_2 2 mM, Tween 20 0.1%)에서 희석됨)을 첨가하였다. 플레이트를 봉하여 원심분리한 후 (1 분, 1000 rpm), 실온에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 분리 완충제 (90 μL)를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 플레이트를 1.5 psi 및 1750 ΔV 로 장비 세팅된 12-시퍼 칩(sipper chip) (760137-0372R, 캘리퍼스 LS)을 이용하여 EZ Reader II에서 관독하였다. 기질로부터 산물의 전환율(%)은 자동으로 생성되었으며, 저해율(%)은 블랭크 웰 (무효소 및 2.5% DMSO 함유) 및 전체 웰 (모든 시약 및 2.5% DMSO 함유)에 대해 계산되었다. CHK1 IC_{50} 값은 로그(저해제 농도)의 비선형 회귀 피팅 대 가변 경사 방정식으로부터의 반응을 이용하여 GraphPad Prism5에서 계산되었다.

[0342] 분석 2: 유사분열 저해 분석(MIA)에서 세포 효능

[0343] 유전독성제로의 처리 (G2 정지의 유도를 위해)에 이어, 상기 정지를 해제하기 위해 노코나졸과 함께 CHK1 저해제 시험 화합물로 처리한 후 유사분열에 갇힌 세포수를 정량화하도록 설계된 유로폼 기반 ELISA 분석을 이용하여, 유전독성제와 결합한 CHK1 키나제 기능 저해제에 의한 체크포인트 패지를 평가하였다. HT29 세포를 160 μL 의 부피로 96-웰 플레이트에 웰당 10^4 세포로 시딩하고, 36 시간 동안 부착되도록 두었다. 에토포시드 (DMSO 중 10 mM 스톡)를 배지에서 250 μM 로 희석하고, 40 μL 를 적절한 웰에 첨가하여 50 μM 의 최종 농도로 만든 다음,

1 시간 동안 인큐베이션하였다. 이 처리는 처리 16 시간후 세포의 80%에서 G2 정지를 유도하도록 사전에 최대한 조정되었다. 유전독성 약물에 노출후, 배지를 제거하고, 새로운 배지 (160 μ L)로 교환하였다. 세포는 비처리되었거나 (비처리 대조군 또는 단독 에토포시드 예비-처리), 에토포시드 예비처리후 노코다졸에 또는 노코다졸 단독 (100 ng/mL 최종 농도)에 노출되었거나 또는 노코다졸 (100 ng/mL 최종 농도)과 함께 시험 화합물의 농도를 증가시키면서 (0.01 nM 내지 200 μ M 최종 농도) 노출되었다. CHK1 저해제 시험 화합물을 각 농도에 대해 사중 웰을 사용하여 40 μ L 분취액에 첨가하였다. 21 시간 노출후, 배지를 제거하고, 세포를 4°C에서 인산염 완충 염수 (PBS, pH 7.4, 4°C로 예냉) 중 4% 포름알데하이드에 30 분 고정시킨 후, 주변 온도에서 100% 메탄올 (-20°C로 예냉)에 10 분 고정시켰다. 웰을 PBS로 세척한 뒤, 37°C에서 트리스-완충 염수 (TBS, pH 7.4) 중의 5% 건조유 (Marvel)로 30 분간 봉쇄하였다. 각 웰을 0.1% Tween 20을 함유하는 물로 3회 세척하였다. 일차 항체 (MPM-2, Upstate cat# 05-368, TBS 중 우유에서 1 μ g/mL)를 각 웰에 첨가하고, 4°C에서 진탕하면서 밤새 인큐베이션하였다. 일차 항체를 제거하고, 웰을 0.1% Tween 20을 함유하는 물로 세척하였다. 이차 항체 (유로폼 표지된 항-마우스, Perkin-Elmer cat# AD0124, 분석 완충제 Perkin-Elmer cat# 1244-111 중에 333 ng/mL)를 각 웰에 첨가하고, 37°C에서 1 시간 동안 인큐베이션하였다. 각 웰을 0.1% Tween 20을 함유하는 물로 세척한 뒤, 강화 (enhancement) 용액 (Perkin-Elmer cat# 1244-105)으로 처리하였다. 유로폼 방출을 Wallac, Victor2 계수기 (Perkin-Elmer, Bucks UK)에서 계수하였다. 적절한 대조군을 포함시키고, 결과를 세포의 50%가 유사분열에 진입하는데 필요한 CHK1 저해제 시험 화합물의 농도로서 나타내었다 (MIA IC₅₀).

[0345] 분석 3: CHK1-의존성 체크포인트 폐지 대 세포독성에 대한 세포내 선택성의 평가

[0346] 화합물 세포독성을 96 시간 설포로다민 B 분석 (SRB, Sigma catalog number S9012)을 이용하여 평가하였다. HT29 또는 SW620 세포를 160 μ L 배지의 부피에서 96-웰 플레이트에 웰당 1.6 내지 3.2×10^3 세포로 시딩하고, 처리전에 36 시간 동안 부착되도록 두었다. CHK1 저해제 (DMSO 중 10 mM 스톱)의 세포독성 분석을 위해, 화합물을 250 μ M의 농도에서 시작하여 배지에서 연속 희석한 후, 40 μ L를 적절한 웰에 4 번 첨가하여 최종 농도를 50 내지 0.1 μ M로 만들었다 (10개의 농도). 유전독성제의 경우에는, 화합물 (SN38, LKT laboratories 카탈로그 번호 C0154 및 겐시타빈, Lilly "Gemzar", DMSO 중 10 mM 스톱)을 2 μ M의 농도에서 시작하여 배지에서 연속 희석한 후, 40 μ L를 각 웰에 4 번 첨가하여 최종 농도를 200 내지 0.39 nM로 만들었다 (10개의 농도). 세포를 습윤화 5% CO₂ 환경중 37°C에서 96 시간 동안 인큐베이션한 후 (4 배중), 고정시키고, SRB로 염색하였다. 적절한 대조군을 포함시키고, 결과를 비처리 대조군에 대해 세포 증식을 50% 저해하는데 필요한 시험 화합물의 농도로서 나타내었다 (SRB IC₅₀).

[0347] CHK1-의존성 체크포인트 폐지 대 세포독성의 영향에 대한 CHK1 저해제 시험 화합물의 선택성의 척도인 활성 지수 (AI)를 CHK1 저해제 세포독성 IC₅₀ 대 MIA IC₅₀의 비 (즉, AI = CHK1 저해제 SRB IC₅₀ / MIA IC₅₀)로부터 계산하였는데, 둘 다 HT29 세포에서 측정되었다.

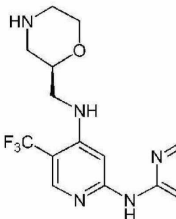
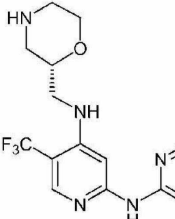
[0349] 분석 4: SN38 또는 겐시타빈과 조합시 HT29 또는 SW620 결장직장암종 세포에서의 세포 효과

[0350] SN38 (토포이소머라제-I 저해제 이리노테칸의 활성 대사산물) 및 겐시타빈 (대사길항물질) 세포독성을 증대시키는 CHK1 저해제 화합물의 능력을 96 시간 설포로다민 B 분석 (SRB, Sigma cat# S9012)을 이용하여 평가하였다. HT29 또는 SW620 세포를 160 μ L 배지의 부피에서 96-웰 플레이트에 웰당 1.6 내지 3.2×10^3 세포로 시딩하고, 처리전에 36 시간 동안 부착되도록 두었다. 증강 분석은 20 μ L 배지의 부피에서 겐시타빈 또는 SN38의 고정된 SRB IC₅₀ 농도 (상기 분석 3에서의 방법을 이용하여 결정됨) (10 x 최종 농도)를 각 웰에 4 번 첨가하고, 1 분간 혼합하는 것을 포함한다. CHK1 저해제 시험 화합물 (10 mM 스톱)을 배지에서 50 μ M의 농도에서 시작하여 배지에서 연속 희석한 후, 20 μ L를 웰당 4 번 첨가하여 최종 농도를 5 내지 0.039 μ M로 만들고 (8개의 농도), 1 분간 혼합한 뒤, 37°C의 습윤화 분위기하에서 96 시간 동안 37°C에서 인큐베이션하고(4배중), 고정시킨 다음, SRB로 염색하였다. 비처리 및 유전독성 단독 처리 대조군을 포함시키고, 결과를 세포 증식을 50% 저해하는데 필요한 CHK1 저해제의 농도로서 나타내었다 (증강 IC₅₀).

[0351] 증강 지수 (PI)를 SN38 또는 겐시타빈 세포독성을 증대시키는 CHK1 저해제 능력의 척도로서 계산하고, CHK1 저해제 단독의 세포독성 IC₅₀ 대 유전독성과 결합된 CHK1 저해제의 증강 IC₅₀의 비 (즉, PI = CHK1 저해제 SRB IC₅₀ / 증강 IC₅₀)로서 나타내었다.

[0353] 분석 5: 마우스에서 경구 생체이용성 및 약동학

- [0354] 모든 작업은 동물 (과학적 절차) 법안 1986 하의 영국 내무성 규정 및 UKCCCR 지침에 따라 수행되었다.
- [0356] CHK1 저해제 화합물을 10% DMSO, 1% Tween 20 및 89% 멸균 염수에서 제제화하였다. 암컷 Balb/c 마우스 (Charles River UK Ltd, Margate, U.K.)에 CHK1 저해제 화합물을 10 mg/kg으로 정맥내 (iv) 및 경구 (po) 투여 하였다. 대조군 동물에는 비히클만을 투여하였다. 세마리 마우스 그룹에 시점당 주입하였다. 투여 5, 15 및 30 분 및 1, 2, 4, 6 및 24 시간후에, 혈액을 heparin화된 주사기를 사용하여 마우스로부터 마취하에(할로탄/산소 믹스) 심장천자로 채취하였다. 원심분리 (9000 x g, 2 분, 4℃)후, 혈장을 드라이아이스 상에서 냉동시켜 -80℃ 에서 저장하였다. 조직을 절개하고, 액체 질소에서 급속 냉동시킨 후(snap frozen), -80℃에서 저장하였다. 해동한 혈장 샘플을 내부 표준을 함유하는 3 부피의 메탄올을 사용하여 단백질을 침전으로 추출하였다. 블랭크 혈장 매트릭스에 CHK1 저해제 화합물을 스파이킹하고, 시험 샘플에 따라 추출하여 보정 표준 (혈장중 2 내지 10000 nM) 및 QC를 제조하였다. 원심분리후, 상등액을 분석을 위해 옮겼다. 추출한 혈장 샘플을 CHK1 저해제 화합물 및 내부 표준의 정량을 위해 Agilent 6410 삼중 사극 질량 분석계에 커플링된 Agilent 1200 또는 1290 LC에서 LC-MS-MS로 분석하였다. 화합물을 55℃로 유지되는 Phenomenex Kinetex C18 분석 칼럼 (50 x 2.1 mm, 2.6 μM) 상에서 분리하였다. 이동상은 0.4 mL/분 유속의 10 mM 암모늄 아세테이트 및 메탄올로 이루어졌다. 7 분 구배를 이용하여 분석물을 분리하였다. 양이온 모드의 전기분무 이온화를 사용하였고, 화합물을 적절한 전이를 모니터링하는 (예를 들어 화합물 1에 대해 380.2 내지 320.3, 단편화 전압 154 V 및 충돌 에너지 20 V) MRM으로 검출 하였다.
- [0357] Pharsight WinNonlin 소프트웨어(버전5.2.1)로 무구획(non-compartmental) 약동학적 분석 (모델 200 및 201)을 수행하였다.
- [0359] 생물학적 데이터
- [0361] 상술된 분석을 이용하여 얻은 화합물 1 및 화합물 2에 대한 데이터를 하기 표에 요약하였다.

표 2		
화합물 구조	화합물 1	화합물 2
		
분석 1: CHK1 IC ₅₀ (nM)	1.4 (±0.3, n = 3)	2.1 (±0.5)
분석 2: CHK1 세포 효능 MIA IC ₅₀ (nM)	30 (±12, n = 6)	18 (±7.5, n = 3)
분석 3: 세포 선택성 (활성 지수; 배수)	26.4 (±8.6, n = 6)	150 (±85, n = 3)
분석 4: HT29 세포에서 세포 효능 + SN38 (증감 지수; 배수)	1.8 (±0.3, n = 3)	-
분석 4: SW620 세포에서 세포 효능 + 겐시타빈 (증감 지수; 배수)	16.9 (±3.4, n = 7)	8.1 (±3.6, n = 3)
분석 5: 마우스에서 경구 생체이용률 (%)	105	-

- [0362]
- [0364] (상기 분석 1을 통해 얻은) 화합물 1 및 2에 대한 CHK1 IC₅₀ 데이터와 콜린스 등(Collins et al., 2009a)에서 입증된 16개의 유사 화합물에 대해 얻은 상응하는 데이터 (콜린스 등(Collins et al., 2009a)에 기술된 바와 같은 DELFIA 분석을 이용하여 얻은)의 비교를 하기 표에 나타내었다.

표 3		
#	화합물	CHK1 IC ₅₀ (nM)
	화합물 1	1.4
	화합물 2	2.1
1	Y-154	1
2	Y-081	2
3	Y-152	2
4	Y-158	2
5	Y-147	4
6	Y-153	4
7	Y-155	5
8	Y-149	10
9	Y-156	10
10	Y-146	11
11	Y-148	13
12	Y-157	15
13	Y-150	17
14	Y-102	20
15	Y-159	23
16	Y-151	24

[0365]

[0366]

(상기 분석 2를 통해 얻은) 화합물 1 및 2에 대한 CHK1 세포 효능 MIA 데이터와 콜린스 등(Collins et al., 2009a)에서 입증된 16개의 유사 화합물에 대해 얻은 상응하는 데이터의 비교를 하기 표에 나타내었다.

표 4				
#	화합물	CHK1 세포 효능 MIA IC ₅₀ (nM)	(배수 향상) 화합물 1	(배수 향상) 화합물 2
	화합물 1	30	-	-
	화합물 2	18	-	-
1	Y-154	90	~ 3	~ 5
2	Y-155	120	~ 4	~ 7
3	Y-153	180	~ 6	~ 10
4	Y-158	280	~ 9	~ 15
5	Y-081	310	~ 10	~ 17
6	Y-150	390	~ 13	~ 22
7	Y-152	400	~ 13	~ 22
8	Y-156	560	~ 19	~ 31
9	Y-157	600	~ 20	~ 33
10	Y-159	700	~ 23	~ 39
11	Y-151	800	~ 27	~ 44
12	Y-102	800	~ 27	~ 44
13	Y-147	900	~ 30	~ 50
14	Y-148	900	~ 30	~ 50
15	Y-149	1100	~ 34	~ 61
16	Y-146	1500	~ 50	~ 83

[0367]

[0368]

화합물 1 및 2는 명백히 현저한 CHK1 세포 효능(MIA 분석)을 나타낸다. CHK1의 저해를 위한 높은 세포 효능은 CHK1 저해제의 개발을 위해 중요하다. 화합물 1 및 2는 CHK1-매개 효과에 대해 16개의 모든 화합물 보다 실질적으로 더 높은 세포 효능을 가지며, 그 다음으로 가장 효능있는 화합물 (Y-154) 보다 각각 약 3-배 및 5-배 정도 더 효능이 있다.

[0369]

(상기 분석 3을 통해 얻은) 화합물 1 및 2에 대한 세포 선택성 데이터와 콜린스 등(Collins et al., 2009a)에서

입증된 16개의 유사 화합물에 대해 얻은 상응하는 데이터의 비교를 하기 표에 나타내었다.

표 5				
#	화합물	세포 선택성(배수)	(배수 향상) 화합물 1	(배수 향상) 화합물 2
	화합물 1	26	-	-
	화합물 2	150	-	-
1	Y-155	11	~ 2.4	~ 13
2	Y-150	10	~ 2.6	~ 15
3	Y-159	9.9	~ 2.6	~ 15
4	Y-153	9.2	~ 2.8	~ 16
5	Y-154	9.0	~ 2.9	~ 17
6	Y-157	6.3	~ 4.1	~ 24
7	Y-151	6.0	~ 4.3	~ 25
8	Y-156	5.4	~ 4.8	~ 28
9	Y-102	4.6	~ 5.6	~ 33
10	Y-146	4.5	~ 5.8	~ 33
11	Y-148	4.4	~ 5.9	~ 34
12	Y-147	4.3	~ 6.0	~ 35
13	Y-158	4.3	~ 6.0	~ 35
14	Y-149	3.5	~ 7.4	~ 43
15	Y-152	3.5	~ 7.4	~ 43
16	Y-081	3.5	~ 7.4	~ 43

[0370]

[0371]

화합물 1 및 2는 명백히 증식 저해 분석에서 CHK1 세포 효능(MIA 분석)과 비특이적 세포독성간 비로서 측정된 바, 현저한 세포 선택성을 나타낸다. CHK1 매개 효과 대 비특이적 세포독성에 대한 세포 선택성은 치료창을 극대화하기 위해 CHK1 저해제의 개발에 있어서 중요하다. 화합물 1 및 2는 각각 약 26-배 선택적 및 150-배 선택적인 반면, 그 다음으로 선택적인 화합물은 약 11-배 선택적일 뿐이다 (Y-155).

[0372]

(상기 분석 4를 통해 얻은) 화합물 1 및 2에 대한 세포 효과 데이터와 콜린스 등(Collins et al., 2009a)에서 입증된 16개의 유사 화합물에 대해 얻은 상응하는 데이터의 비교를 하기 표에 나타내었다.

표 6		
#	화합물	세포 효과 + SN38 HT29 (배수)
	화합물 1	1.8
	화합물 2	n/a
1	Y-157	2
2	Y-150	2
3	Y-156	1.6
4	Y-151	1.5
5	Y-159	1.3
6	Y-081	1.2
7	Y-153	1
8	Y-155	0.9
9	Y-154	0.8
10	Y-152	0.7
11	Y-147	n/a
12	Y-158	n/a
13	Y-146	n/a
14	Y-148	n/a
15	Y-149	n/a
16	Y-102	n/a

[0373]

표 7		
#	화합물	세포 효과 + 겔시타빈 SW620 (배수)
	화합물 1	17
	화합물 2	8.1
1	Y-157	n/a
2	Y-150	4.8
3	Y-156	n/a
4	Y-151	n/a
5	Y-159	n/a
6	Y-081	n/a
7	Y-153	8.6
8	Y-155	n/a
9	Y-154	n/a
10	Y-152	8
11	Y-147	n/a
12	Y-158	n/a
13	Y-146	n/a
14	Y-148	n/a
15	Y-149	n/a
16	Y-102	n/a

- [0374] 화합물 1 및 2는 명백히, SN38 및 겐시타빈의 두 대표적인 유전독성 치료제에 대해 세포를 민감화시키는 능력으로서 측정된 바, 현저한 세포 효과를 나타낸다. 개발가능한 화합물을 위해 >1 값이 필수이다(그렇지 않으면 화합물은 유전독성 치료의 효과를 감소시키도록 작용한다).
- [0375] 화합물 1이 SN38에 대해 거의 최고의 증강 작용을 가지며(약 1.8-배), 겐시타빈에 대해 최고의 증강 작용을 가지는데(약 17-배), 이는 강력한 효과를 나타낸다. SN38에 대해 가장 증강적인 화합물은 Y-150(약 2-배)이지만, 겐시타빈에 대해서는 고작 약 4.8-배이다. 겐시타빈에 대해 그 다음으로 증강적인 화합물은 Y-153(약 8.6-배)인데, SN38에 대해서는 증강 효과가 없다(즉, 약 1-배).
- [0376] 또한, 화합물 1은 마우스에서 현저한 경구 생체이용성을 가진다: 100%(상기 표에서 "105%"로서 보고됨).
- [0377] 이상으로 본 발명의 원리, 바람직한 실시양태 및 조작 방식이 설명되었다. 그러나, 본 발명이 논의된 특정 실시양태로만 제한되는 것으로 해석하여서는 안된다. 대신, 상술된 실시양태는 제한적인 것이라기 보다는 설명으로서 간주되어야 하고, 당업자들이 본 발명의 영역을 벗어나지 않고 이들 실시양태를 변형시킬 수 있는 것으로 이해하여야 한다.
- [0379] 참조문헌
- [0380] 본 발명 및 본 발명이 관련된 기술 수준을 더욱 완전히 설명 및 개시하기 위해 다수의 간행물을 본 명세서에서 인용되었다. 이들 간행물의 모든 예시를 하기에 제공한다. 이들 참고 문헌은 각각, 각각의 개별적인 간행물이 명확하게 그리고 개별적으로 참고로 인용되었다고 나타낸 것과 동일한 정도로, 본 개시에 그 전체가 참고로 포함된다.

- Almeida *et al.*, 2008, "Pyrazolyl-amino-substituted pyrazines and their use for the treatment of cancer", international (PCT) patent publication number WO 2008/117050 A1 published 02 October 2008.
- Balaint and Vousden, 2001, "Activation and activities of the p53 tumour suppressor protein," *Br. J. Cancer*, Vol. 85, pp. 1813-1823.
- Bartek and Lukas, 2003, "Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer," *Cancer Cell*, Vol. 3, pp. 421-429.
- Brooks *et al.*, 2012, "A potent chk1 inhibitor is selectively toxic in melanomas with high levels of replicative stress," *Oncogene*, doi:10.1038/onc.2012.72.
- Carson and Lois, 1995, "Cancer progression and p53," *Lancet*, Vol. 346, pp. 1009-1011.
- Cavelier *et al.*, 2009, "Constitutive activation of the DNA damage signaling pathway in acute myeloid leukemia with complex karyotype: Potential importance for checkpoint targeting therapy," *Cancer Res.*, Vol. 69, pp. 8652-8661.
- Cole *et al.*, 2011 "RNAi screen of the protein kinome identifies checkpoint kinase 1 (chk1) as a therapeutic target in neuroblastoma," *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 108, pp. 3336-3341.
- Collins *et al.*, 2009a, "Pyrazin-2-yl-2-yl-amine and pyrazin-2-yl-pyrimidin-4-yl-amine compounds and their use", international (PCT) patent publication number WO 2009/044162 A1 published 09 April 2009.
- Collins *et al.*, 2009b, "Bicycylaryl-aryl-amine compounds and their use", international (PCT) patent publication number WO 2009/103966 A1 published 27 August 2009.
- Davies *et al.*, 2011, "Single-agent inhibition of chk1 is antiproliferative in human cancer cell lines in vitro and inhibits tumor xenograft growth in vivo," *Oncol. Res.*, Vol. 19, pp. 349-363.
- Di Micco *et al.*, 2006, "Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication," *Nature*, Vol. 444, pp. 638-642.
- Dixon and Norbury, 2002, "Therapeutic exploitation of checkpoint defects in cancer cells lacking p53 function," *Cell Cycle*, Vol. 1, pp. 362-368.
- Ferrao *et al.*, 2011, "Efficacy of chk inhibitors as single agents in myc-driven lymphoma cells," *Oncogene*, doi:10.1038/onc.2011.358.
- Greenblatt *et al.*, 1994, "Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis," *Cancer Res.*, Vol. 54, pp. 4855-4878.
- Guzi *et al.*, 2011, "Targeting the replication checkpoint using SCH 900776, a potent and functionally selective CHK1 inhibitor identified via high content screening," *Mol. Cancer Ther.*, Vol. 10, pp. 591-602.
- Höglund *et al.*, 2011, "Therapeutic Implications for the Induced Levels of Chk1 in Myc-Expressing Cancer Cells," *Clin. Cancer Res.*, Vol. 17, pp. 7067-7079.
- Ioannidis *et al.*, 2009, "Discovery of pyrazol-3-ylamino pyrazines as novel JAK2 inhibitors", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, Vol. 19, pp. 6524-6528.

[0381]

- Lainchbury *et al.*, 2012, "Discovery of 3-alkoxyamino-5-(pyridin-2-ylamino)pyrazine-2-carbonitriles as selective, orally bioavailable CHK1 inhibitors", J. Med. Chem., Vol. 55, No. 22, pp. 10229-10240.
- Li *et al.*, 2007, "Synthesis and in-vitro biological activity of macrocyclic urea CHK1 inhibitors", Bioorg. Med. Chem. Lett., Vol. 17, pp. 6499-6504.
- Lin *et al.*, 2005, "Macrocyclic kinase inhibitors", US patent publication number US 2005/0215556 A1 published 29 September 2005.
- Liu *et al.*, 2000, "Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint," Genes Dev., Vol. 14, pp. 1448-1459.
- Murga *et al.*, 2011, "Exploiting oncogene-induced replicative stress for the selective killing of Myc-driven tumors," Nat. Struct. Mol. Biol., Vol. 18, pp. 1331-1335.
- Sanchez *et al.*, 1997, "Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25," Science, Vol. 277, pp. 1497-1501.
- Sorensen *et al.*, 2005, "Cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair," Nat. Cell Biol., Vol 7, pp. 195-201.
- Tao *et al.*, 2005, "Macrocyclic kinase inhibitors", international (PCT) patent publication number WO 2005/047294 A1 published 26 May 2005.
- Tao *et al.*, 2006, "Chk1 inhibitors for novel cancer treatment," Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, Vol. 6, pp. 377-388.
- Tao *et al.*, 2007a, "Macrocyclic ureas as potent and selective CHK1 inhibitors: an improved synthesis, kinome profiling, structure-activity relationships, and preliminary pharmacokinetics," Bioorg. Med. Chem. Lett., Vol. 17, pp. 6593-6601.
- Tao *et al.*, 2007b, "Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of potent and selective macrocyclic checkpoint kinase 1 inhibitors," J. Med. Chem., Vol. 50, pp. 1514-1527.
- Walton *et al.*, 2010, "The preclinical pharmacology and therapeutic activity of the novel CHK1 inhibitor SAR-020106," Mol. Cancer Ther., Vol. 9, No. 1, pp. 89-100.
- Walton *et al.*, 2012, "CCT244747 is a novel potent and selective CHK1 inhibitor with oral efficacy alone and in combination with genotoxic anticancer drugs", Clin. Cancer Res., Vol. 18, No. 20, pp. 5650-5661.
- Wang *et al.*, 1996, "UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53," J. Natl. Cancer Inst., Vol. 8, pp. 956-965.
- Weinert and Hartwell, 1989, "Control of G2 delay by the rad9 gene of *Saccharomyces cerevisiae*," J. Cell Sci. Suppl., Vol. 12, pp. 145-148.
- Xiao *et al.*, 2006, "Differential roles of checkpoint kinase 1, checkpoint kinase 2, and mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 in mediating DNA damage-induced cell cycle arrest: implications for cancer therapy," Mol. Cancer Ther., Vol. 5, pp. 1935-1943.
- Zachos *et al.*, 2003, "Chk1-deficient tumour cells are viable but exhibit multiple checkpoint and survival defects," EMBO J., Vol. 22, pp. 713-723.

[0382]

[0383]

- Zhao *et al.*, 2002, "Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints," Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 99, pp. 14795-14800.