



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0100838  
(43) 공개일자 2008년11월19일

(51) Int. Cl.

*A61K 31/337* (2006.01) *A61K 31/4745* (2006.01)  
*A61K 31/5517* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7024155

(22) 출원일자 2008년10월02일

심사청구일자 2008년10월02일

번역문제출일자 2008년10월02일

(86) 국제출원번호 PCT/IB2007/000928

국제출원일자 2007년03월26일

(87) 국제공개번호 WO 2007/113671

국제공개일자 2007년10월11일

(30) 우선권주장

60/789,276 2006년04월04일 미국(US)

(71) 출원인

화이자 프로덕츠 인코포레이티드

미국 코네티컷주 06340 그로톤 이스턴 포인트 로드

(72) 발명자

앤더스 켄나 린

미국 캘리포니아주 92121 샌디에고 사이언스 센터 드라이브 10777아구론 파마슈티컬스 인코포레이티드

블라시나 알레산드라

미국 캘리포니아주 92121 샌디에고 사이언스 센터 드라이브 10777아구론 파마슈티컬스 인코포레이티드

(74) 대리인

김창세

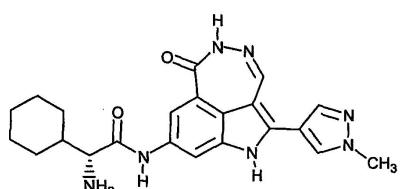
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) (2R, Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-페라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-C D]인돌-8-일)아세트아미드의 복합 요법

### (57) 요 약

본 발명은 항암제 또는 방사선 요법과 병행되는, (2R, Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-페라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드(화합물 1), 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물, 또는 이들의 혼합물의 신규의 복합 요법에 관한 것이다:

화학식 1



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

암 치료가 필요한 포유동물에게 항암제 및 방사선 요법으로부터 선택된 치료 유효량의 항암 치료와 병행하여, 치료 유효량의 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-페라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제페노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드, 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물, 또는 이들의 혼합물을 투여함을 포함하는, 상기 포유동물 암의 치료 방법.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

(2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-페라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제페노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드, 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물, 또는 이들의 혼합물의 투여가 항암 치료의 치료 효과를 상승시키는 방법.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서,

(2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-페라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제페노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드, 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물, 또는 이들의 혼합물, 및 항암 치료의 개별 투여의 상승작용적 치료 효과를 나타내는 방법.

### 청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

암이 결장암, 전립선암, 유방암 및 백혈병으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 5

제 4 항에 있어서,

암이 결장암인 방법.

### 청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

항암 치료가 치료 유효량의 항암제인 방법.

### 청구항 7

제 6 항에 있어서,

항암제가 액티노마이신 D, 아드리아마이신, 암사크린, 아라-C, 9-(3-D-아라비노실-2-플루오로아데닌, BCNU, 블레오마이신, 캄토테신, 카보플라틴, 2-클로로-2-데옥시아데노신, CPT-11, 사이클로포스파미드, 도세탁셀, 독소루비신, 에도테카린, 에토포시드, 플루다라빈, 5-플루오로유라실(5-FU), 켐시타빈, HU-켐자, 이리노테칸, 메토트렉세이트, 6-엠류린, 마이토미신-C, 패클리탁셀, 시스-플라틴, SN-38, 탁솔, 티오텐파, 6-티오구아닌, 트라이메트렉세이트, 빈블라스틴, 빈크리스틴 및 VP-16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 8

제 7 항에 있어서,

항암제가 켐시타빈, 이리노테칸, 도세탁셀, SN-38, 카보플라틴, 독소루비신 및 마이토미신-C로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

### 청구항 9

제 8 항에 있어서,

항암제가 쟈시타빈인 방법.

#### 청구항 10

제 8 항에 있어서,

항암제가 이리노테칸인 방법.

#### 청구항 11

제 8 항에 있어서,

항암제가 도세탁셀인 방법.

#### 청구항 12

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

항암제가 DNA 손상제인 방법.

#### 청구항 13

제 12 항에 있어서,

DNA 손상제가 알킬화제, 대사길항물질, 항종양 항생제, 백금 동족체, 국소이성화효소 I 억제제 및 국소이성화효소 II 억제제로부터 선택되는 방법.

#### 청구항 14

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

항암제가 유사분열 억제제인 방법.

#### 청구항 15

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

(2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드, 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물, 또는 이들의 혼합물의 하나 이상의 용량을 선행 항암 치료 용량 투여 후 1 내지 48 시간째에 투여하는 방법.

#### 청구항 16

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

(2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드, 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물, 또는 이들의 혼합물의 하나 이상의 용량을 항암 치료 용량과 동시에 투여하는 방법.

### 명세서

#### 기술 분야

<1>

본 발명은 포유동물에서 암을 치료하기 위해 항암제 또는 방사선 요법과 병행하여, (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 사용하는 방법에 관한 것이다.

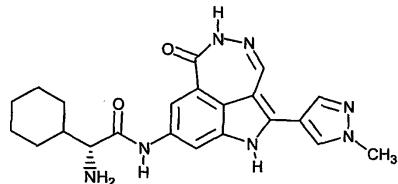
#### 배경 기술

<2>

하기 화합물 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드(또한 "화합물 1"이라 칭함)뿐만 아니라 이의 약학적으로

허용되는 염은, 2005년 11월 22일자로 허여된 미국 특허 제 6,967,198 호(이의 내용이 본 발명에 참고로 인용된다)에 개시되어 있다:

## 화학식 1



&lt;3&gt;

<4> 다수의 항암제뿐만 아니라 방사선 요법은 세포, 특히 암 세포에 DNA 손상을 일으킨다. CHK1 억제는 상기 DNA 손상된 세포의 S 및 G<sub>2</sub> 정지를 파기하고 따라서 상기 세포의 유사분열을 파국에 이르게 하고 세포사를 유도함으로써 상기 항암제 또는 방사선 요법의 항암 효과를 상승시킨다. (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드는 효능 있는 CHK1 단백질 키나제 억제제이다. 항암제 또는 방사선 요법과 병행되는 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드, 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물, 또는 이들의 혼합물을 사용은 상기 항암제 또는 방사선 요법의 항암 효과를 크게 상승시킬 것이다.

&lt;5&gt;

### 발명의 요약

&lt;6&gt;

하나의 실시태양에서, 본 발명은 포유동물에게 과증식 억제제 및 방사선 요법으로부터 선택된 치료 유효량의 과증식 억제 치료와 병행하여, 치료 유효량의 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드, 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물, 또는 이들의 혼합물을 투여함을 포함하는, 상기 포유동물에서 과증식성 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

&lt;7&gt;

상기 실시태양의 하나의 특정 태양에서, 상기 과증식 억제제는 효소 파르네실 트랜스페라제의 억제제 및 수용체 타이로신 키나제 PDGFr의 억제제로부터 선택된다. 바람직하게는, 상기 과증식 억제제는 하기에 개시되고 청구된 화합물이다: 미국 특허 제 6,080,769 호; 미국 특허 제 6,194,438 호; 미국 특허 제 6,258,824 호; 미국 특허 제 6,586,447 호; 미국 특허 제 6,071,935 호; 미국 특허 제 6,495,564 호; 및 미국 특허 제 6,150,377 호; 미국 특허 제 6,596,735 호; 미국 특허 제 6,479,513 호; 국제 특허 출원 공보 제 WO 01/40217; 미국 출원 제 2003-0166675 호. 상기 특허 및 특허 출원들은 각각 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용된다.

&lt;8&gt;

상기 실시태양의 하나의 특정 태양에서, 상기 과증식 억제제는 PDGFr 억제제이다. 상기 PDGFr 억제제는 비 제한적으로 국제 특허 출원 공보 제 WO01/40217 호 및 제 WO2004/020431 호에 개시된 것들을 포함하며, 이들 공보의 내용은 모든 목적을 위해 내용 전체가 참고로 인용된다. 바람직한 PDGFr 억제제는 화이자의 CP-673,451 및 CP-868,596 및 이의 염을 포함한다.

&lt;9&gt;

또 다른 실시태양에서, 본 발명은 포유동물에게 항암제 및 방사선 요법으로부터 선택된 치료 유효량의 항암 치료와 병행하여, 치료 유효량의 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드, 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물, 또는 이들의 혼합물을 투여함을 포함하는, 상기 포유동물에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.

&lt;10&gt;

상기 실시태양의 하나의 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 방법은 항암 치료의 치료 효과를 상승시킨다.

&lt;11&gt;

상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 방법은 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드, 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물, 또는 이들의 혼합물, 및 항암 치료의 상승적인 치료 효과를 보인다.

&lt;12&gt;

상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 암은 결장암, 전립선암, 유방암 및 백혈병으로부터 선택된다. 훨씬 더 바람직하게는, 상기 암은 결장암이다.

&lt;13&gt;

상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암 치료는 항암

제이다. 바람직하게는, 상기 항암제는 암을 치료하는 것으로 임상적으로 입증된 화학적 또는 생물학적 물질이다. 보다 바람직하게, 상기 항암제는 액티노마이신 D, 아드리아마이신, 암사크린, 아라-C, 9-(3-D-아라비노실-2-플루오로아데닌, BCNU, 블레오마이신, 캄토테신, 카보플라틴, 2-클로로-2-데옥시아데노신, CPT-11, 사이클로포스파미드, 도세탁센, 독소루비신, 에도테카린, 에토포시드, 플루다라빈, 5-플루오로유라실(5-FU), 쟈시타빈, HU-캡자, 이리노테칸, 메토트렉세이트, 6-엠류린, 마이토미신-C, 패클리탁센, 시스-플라틴, SN-38, 탁솔, 티오텐파, 6-티오구아닌, 트라이메트렉세이트, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 및 VP-16으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 훨씬 더 바람직하게, 상기 항암제는 쟈시타빈, 이리노테칸, 도세탁센, SN-38, 카보플라틴, 독소루비신 및 마이토미신-C로 이루어진 군으로부터 선택된다. 훨씬 더 바람직하게, 상기 항암제는 쟈시타빈이다. 훨씬 더 바람직하게, 상기 항암제는 이리노테칸이다. 훨씬 더 바람직하게, 상기 항암제는 도세탁센이다.

<14> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암제는 DNA 손상제이다. 바람직하게는, 상기 "DNA 손상제"는 암을 치료하는 것으로 임상적으로 입증된 화학적 또는 생물학적 물질이다. 보다 바람직하게, 상기 DNA 손상제는 알킬화제, 대사길항물질, 항종양 항생제, 백금 동족체, 국소이성화효소 I 억제제 및 국소이성화효소 II 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다.

<15> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암제는 알킬화제이다. 바람직하게, 상기 알킬화제는 아파지쿠온, 알트레타민, 브로스탈리신, 벤다머스틴, 뷔설판, 카보쿠온, 카머스틴, 클로람부실, 클로르메틴, 사이클로포스파미드, 에스트라머스틴, 포테머스틴, 글루포스파미드, 아이포스파미드, 로머스틴, 마포스파미드, 메클로르에타민 옥사이드, 메실리남, 멜팔란, 미토브로니톨, 미톨락톨, 니머스틴, 질소 겨자 N-옥사이드, 피포브로만, 라니머스틴, 테모졸로미드, 티오텐파, 트레오설판, 및 트로포스프라미드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 훨씬 더 바람직하게, 상기 알킬화제는 사이클로포스파미드이다.

<16> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암제는 대사길항물질이다. 바람직하게, 상기 대사길항물질은 알림타, 아라-C, 5-아자시티딘, 카페시타빈, 카르모푸어, 클라드리빈, 클로파라빈, 시타라빈, 시토신 아라비노시드, 데시타빈, 이나트륨 프레메트렉시드, 독시플루리딘, 에플로르니틴, 에노시타빈, 에티닐시티딘, 플록슈리딘, 플루다라빈, 5-플루오로유라실(5-FU), 쟈시타빈, 하이드록시유레이, 류코보린, 멜팔란, 6-머캅토퓨린, 메토트렉세이트, 미토잔트론, 6-엠류린, 펜토스타틴, 펠리트렉솔, 랄티트렉시드, 리보시드, 메토트렉세이트, 머캅토퓨린, 넬라라빈, 놀라트렉시드, 옥포스페이트, 테가퓨어, 6-티오구아닌(6-TG), 티오구아닌, 트라이아핀, 트라이메트렉세이트, 비다라빈, 빈크리스틴, 비노렐빈 및 UFT로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 바람직하게, 상기 대사길항물질은 5-플루오로유라실 및 쟈시타빈으로부터 선택된다. 훨씬 더 바람직하게, 상기 대사길항물질은 쟈시타빈이다.

<17> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암제는 항종양 항생제이다. 바람직하게, 상기 항종양 항생제는 아클라루비신, 액티노마이신 D, 암루비신, 안나마이신, 아드리아마이신, 블레오마이신, 닥티노마이신, 다우노루비신, 독소루비신, 엘사미트루신, 에피루비신, 갈라루비신, 아이다루비신, 미토마이신 C, 마이코페놀산, 네모루비신, 네오카지노스타틴, 웬토스타틴, 폐플로마이신, 피라루비신, 레베카마이신, 스티말라머, 스트렙토조신, 발루비신 및 지노스타틴으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 바람직하게는, 상기 항생제는 액티노마이신 D, 블레오마이신, 독소루비신 및 미토마이신-C로 이루어진 군으로부터 선택된다. 훨씬 더 바람직하게, 상기 항종양 항생제는 미토마이신-C 및 독소루비신으로부터 선택된다.

<18> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암제는 백금 동족체이다. 바람직하게, 상기 백금 동족체는 카보플라틴(파라플라틴), 시스플라틴, 엘록사틴(옥살리플라틴, 사노피(Sanofi)) 엡타플라틴, 로바플라틴, 네다플라틴 및 사트르플라틴으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 바람직하게, 상기 백금 동족체는 시스플라틴, 카보플라틴 및 엘록사틴(옥살리플라틴)으로부터 선택된다. 훨씬 더 바람직하게, 상기 백금 동족체는 카보플라틴이다.

<19> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암제는 국소이성화효소 I 억제제이다. 바람직하게, 상기 국소이성화효소 I 억제제는 BN-80915(로슈(Roche)), 캄토테신, CPT-11, 에도테카린, 엑사테칸, 이리노테칸, 오라테신(수퍼젠(Supergen)), SN-38, 및 토포테칸으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 바람직하게는, 상기 국소이성화효소 I 억제제는 이리노테칸, SN-38 및 토포테칸으로부터 선택된다. 훨씬 더 바람직하게는, 상기 국소이성화효소 I 억제제는 이리노테칸이다.

<20> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암제는 국소이성화효소 II 억제제이다. 바람직하게, 상기 국소이성화효소 II 억제제는 암사크린, 에토포시드, 에토포시드 포스페이트 및 에피루비신(엘렌스(Elience))으로부터 선택된다.

- <21> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암제는 아클라루비신, 아모나피드, 벨로테칸, 캄토테신, 10-하이드록시캄토테신, 9-아미노캄토테신, 디플로모테칸, 이리노테칸 HC1(캄포사르(Camptosar)), 에도테카린, 에피루비신(엘렌스), 에토포시드, 엑사테칸, 지마테칸, 루르토테칸, 미톡산트론, 피라루비신, 픽산트론, 투비테칸, 소부족산, SN-38, 타플루포시드, 토포테칸으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 작용제를 포함한다. 바람직하게, 상기 항암제는 캄토테신, 10-하이드록시캄토테신, 9-아미노캄토테신, 이리노테칸 HC1(캄포사르), 에도테카린, 에피루비신(엘렌스), 에토포시드, SN-38, 토포테칸 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 작용제를 포함한다.
- <22> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암제는 유사분열 억제제이다. 바람직하게, 상기 유사분열 억제제는 도세탁셀(탁소테레(Taxotere)), 에스트라미스틴, 패클리탁셀, 라족산, 탁솔, 테니포시드, 빈블라스틴, 빙크리스틴, 빈데신 및 비노렐빈으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 보다 바람직하게, 상기 유사분열 억제제는 도세탁셀, 빙크리스틴, 빈블라스틴 및 탁솔로부터 선택된다. 훨씬 더 바람직하게, 상기 유사분열 억제제는 도세탁셀이다.
- <23> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암 치료는 방사선 요법이다.
- <24> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드, 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물, 또는 이들의 혼합물의 하나 이상의 용량, 바람직하게는 모든 용량의 20% 이상, 보다 바람직하게는 모든 용량의 50% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 모든 용량의 90% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 각각의 단일 용량을 상기 항암 치료 용량의 투여 후 1 내지 48 시간, 보다 바람직하게는 2 내지 40 시간, 보다 바람직하게는 4 내지 32 시간, 보다 바람직하게는 8 내지 28 시간, 훨씬 더 바람직하게는 16 내지 26 시간, 훨씬 더 바람직하게는 23 내지 25 시간, 훨씬 더 바람직하게는 약 24 시간째에 투여한다.
- <25> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드, 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물, 또는 이들의 혼합물의 하나 이상의 용량, 바람직하게는 모든 용량의 20% 이상, 보다 바람직하게는 모든 용량의 50% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 모든 용량의 90% 이상, 훨씬 더 바람직하게는 각각의 단일 용량을 상기 항암 치료 용량과 동시에 투여한다. 본 발명에 사용된 "동시에"는 전 또는 후 4 시간 이내, 바람직하게는 2 시간 이내, 바람직하게는 1 시간 이내, 훨씬 더 바람직하게는 30 분, 15 분 또는 5 분 이내를 지칭한다.
- <26> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 방법은 정상적인(p53-적격) 세포에는 최소의 세포독성 효과를 미치면서 p53-결손 세포를 선택적으로 표적화한다.
- <27> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암제는 혈관형성 억제제이다. 바람직하게는, 상기 혈관형성 억제제는 EGF 억제제, EGFR 억제제, VEGF 억제제, VEGFR 억제제, TIE2 억제제, IGF1R 억제제, COX-II(사이클로옥시게나제 II) 억제제, MMP-2(기질-메탈로프로테이나제 2) 억제제, 및 MMP-9(기질-메탈로프로테이나제 9) 억제제로부터 선택된다.
- <28> 바람직한 VEGF 억제제는 예를 들어 항-VEGF 단클론 항체(미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 소재의 제네테크 인코포레이티드(Genentech, Inc.))인 아바스틴(베바시주맙)을 포함한다. 추가적인 VEGF 억제제는 CP-547,632(미국 뉴욕 소재의 화이자 인코포레이티드(Pfizer Inc.)), AG13736(화이자 인코포레이티드), ZD-6474(아스트라제네카(AstraZeneca)), AEE788(노바르티스(Novartis)), AZD-2171, VEGF 트랩(레게네론/아벤티스(Regeneron/Aventis)), 바탈라닙(또한 PTK-787, ZK-222584로도 공지됨; 노바르티스 앤 쉐링 아게(Novartis & Schering AG)), 마쿠젠(페캡타닙 옥타소듐, NX-1838, EYE-001, 화이자 인코포레이티드/길레드(Gilead)/아이테크(Eyetech)), IM862(미국 위싱톤 커크랜드 소재의 사이트란 인코포레이티드(Cytran Inc.)); 및 안지오자임, 미국 콜로라도 볼더 소재의 리보자임(Ribozyme) 및 미국 캘리포니아 에머리빌 소재의 키론(Chiron)으로부터의 합성 리보자임 및 이들의 조합을 포함한다. 본 발명의 실시에 유용한 VEGF 억제제는 미국 특허 제 6,534,524 및 6,235,764 호에 개시되어 있으며, 이를 특허는 모두 내용 전체가 모든 목적을 위해 인용된다. 추가의 VEGF 억제제가 예를 들어 국제 특허 출원 공보 제 WO 99/24440 호, 제 WO 95/21613 호, 제 WO 99/61422 호, 미국 특허 제 5,834,504 호, WO 98/50356, 미국 특허 제 5,883,113 호, 미국 특허 제 5,886,020 호, 미국 특허 제 5,792,783 호, 미국 특허 제 6,653,308 호, 국제 특허 출원 공보 제 WO 99/10349 호, 제 WO 97/32856 호, 제

WO 97/22596 호, 제 WO 98/54093 호, 제 WO 98/02438 호, 제 WO 99/16755 호, 및 제 WO 98/02437 호에 개시되어 있으며, 이들은 모두 내용 전체가 본 발명에 참고로 인용되어 있다.

<29> 바람직한 EGFR 억제제에는 비 제한적으로 이레사(제피티닙, 아스트라제네카), 타세바(에를로티닙 또는 OSI-774, OSI 파마슈티컬스 인코포레이티드(OSI Pharmaceuticals Inc.)), 에르비툭스(세툭시맙, 임클론 파마슈티컬스 인코포레이티드(Imclone Pharmaceuticals, Inc.)), EMD-7200(메르크 아게(Merck AG)), ABX-EGF(암젠 인코포레이티드(Amgen Inc.) 및 압게닉스 인코포레이티드(Abgenix Inc.)), HR3(쿠바 정부), IgA 항체(에르란겐-누렘베르그 대학(University of Erlangen-Nuremberg)), TP-38(IVAX), EGFR 융합 단백질, EGF-백신, 항-EGFR 면역리포솜(헤르메스 바이오사이언시스 인코포레이티드(Hermes Biosciences Inc.)) 및 이들의 조합이 포함된다. 훨씬 더 바람직하게, 상기 EGFR 억제제는 이레사, 에르비툭스, 타세바 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

<30> 다른 혈관형성 억제제는 아시트레틴, 펜레티니드, 탈리도미드, 콜레드론산, 안지오스타틴, 아플리딘, 실렌티드, 콤브레타스타틴 A-4, 엔도스타틴, 할로퓨지논, 레비마스타트, 레모맵, 레블리미드, 스쿠알라민, 유크레인, 비탁신 및 이들의 조합을 포함한다.

<31> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암제는 범 키나제 억제제이다. 바람직한 범 키나제 억제제는 수텐트(상표명)(수니티니브)로, 미국 특허 제 6,573,293 호(미국 뉴욕 소재의 화이자 인코포레이티드)에 개시되어 있다.

<32> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 항암제는 범 Erb 수용체 억제제 또는 ErbB2 수용체 억제제, 예를 들어 CP-724,714(화이자 인코포레이티드), CI-1033(카네르티니브, 화이자 인코포레이티드), 헤르셉틴(트라스투주맙, 제넨테크 인코포레이티드(Genentech Inc.)), 오미타그(2C4, 페르투주맙, 제넨테크 인코포레이티드), TAK-165(타케다(Takeda)), GW-572016(로나파르니브, 글락소스미스클라인(GlaxoSmithKlein)), GW-282974(글락소스미스클라인), EKB-569(와이스(Wyeth)), PKI-166(노바르티스), dHER2(HER2 백신, 코리사(Corixa) 및 글락소스미스클라인), APC8024(HER2 백신, 덴드레온(Dendreon)), 항-HER2/neu 이중특이 항체(데코프 캔서 센터(Decof Cancer Center)), B7.her2.IgG3(아젠시스(Agensys)), AS HER2(리서치 인스티튜트 포 래드 바이올로지 앤 메디슨(Research Institute for Rad Biology & Medicine)), 삼작용성 이중특이 항체(뮌헨 대학(University of Munich)) 및 mAB AR-209(아로넥스 파마슈티컬스 인코포레이티드(Aronex Pharmaceuticals Inc.)) 및 mAB 2B-1(키론) 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

<33> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암제는 화이자의 MEK1/2 억제제 PD325901, 어레이 바이오파(Array Biopharm)의 MEK 억제제 ARRY-142886, 브리스톨 마이어스(Bristol Myers)의 CDK2 억제제 BMS-387,032, 화이자의 CDK 억제제 PD0332991 및 아스트라제네카의 AXD-5438, 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

<34> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 항암제는 셀레콕시브(미국 특허 제 5,466,823 호), 발데콕시브(미국 특허 제 5,633,272 호), 파레콕시브(미국 특허 제 5,932,598 호), 데라콕시브(미국 특허 제 5,521,207 호), SD-8381(미국 특허 제 6,034,256 호, 실시예 175), ABT-963(WO 2002/24719), 로페콕시브(CAS 제 162011-90-7 호), WO 1998/03484에 개시된 바와 같은 MK-663(또는 에토리콕시브), WO 1999/11605에 개시된 바와 같은 COX-189(루미라콕시브), BMS-347070(미국 특허 제 6,180,651 호), NS-398(CAS 123653-11-2), RS 57067(CAS 17932-91-3), 4-메틸-2-(3,4-다이메틸페닐)-1-(4-설파모일-페닐)-1H-피롤, 2-(4-에톡시페닐)-4-메틸-1-(4-설파모일페닐)-1H-피롤, 및 멜록시캄으로부터 선택된다.

<35> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암제는 제나센스(오그메로센, 젠타(Genta)), 파니투무맙(압제닉스/암젠), 제발린(쉐링), 벡사(코리사/글락소스미스클라인), 아바렐릭스, 알립타, EPO 906(노르바티스), 다이스코더몰리드(XAA-296), ABT-510(아보트(Abbott)), 네오바스타트(에테르나(Aeterna)), 엔자스타우린(엘리 릴리(Eli Lilly)), 콤브레스타틴 AAP(옥시젠(Oxigene)), ZD-6126(아스트라제네카), 플라보피리돌(아벤티스), CYC-202(사이클라셀(Cyclacel)), AVE-8062(아벤티스), DMXAA(로슈/안티소마(Antisoma)), 티미택(엑시미아스(Eximias)), 테모다(테모졸로미드), 쉐링 폴루프(Schering Polug) 및 케빌립드(셀레젠(Celegene)) 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

<36> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암제는 사이팻(사이프로테론 아세테이트), 히스테렐린(히스트렐린 아세테이트), 플레나이시스(아바렐릭스 데포), 아트라센탄(ABT-627), 사트라플라틴(JM-216), 탈로미드(탈리도미드), 쎄라토프, 테밀리펜(DPPE), ABI-007(패클리탁셀),

에비스타(랄록시펜), 아타메스탄(Biomed-777), 자이오텍스(폴리글루타메이트 패클리탁셀), 타제틴(벡사로틴) 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

<37> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암제는 트라이자온(티라파자민), 아포신(엑시슐린드), 네바스타트(AE-941), 세플렌(히스타민 다이하이드로클로라이드), 오라테신(루비테칸), 비롤리진, 가스트리뮨(G17DT), DX-8951f(엑사테칸 메실레이트), 온코나제(란피르나제), BEC2(미투모앱), 엑스사이트린(모텍사핀 가돌리늄) 및 이들의 조합으로부터 선택된다.

<38> 상기 실시태양의 또 다른 특정 태양에서, 모순되지 않는 임의의 다른 특정 태양과 함께, 상기 항암제는 세아백(CEA), 노이트렉신(트라이메트레세이트 글루쿠로네이트) 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 추가적인 항종양제를 하기의 작용제, 오바렉스(오레고보맵), 오시펩(IDM-1) 및 이들의 조합으로부터 선택할 수 있다. 추가의 항종양제를 하기의 작용제, 아드백신(ING 201), 티라존(티라파자민), 및 이들의 조합으로부터 선택할 수 있다. 추가적인 항종양제를 하기의 작용제, RSR13(에파프록시랄), 코타라(1311 chTNT 1/b), NBI-3001(IL-4) 및 이들의 조합으로부터 선택할 수 있다. 추가의 항종양제를 하기의 작용제, 캔박신, GMK 백신, PEG 인테론 A, 탁소프렉신(DHA/패클리탁셀) 및 이들의 조합으로부터 선택할 수 있다.

<39> 본 발명에 사용된 "알킬화제", "대사길항물질", "항종양 항생제", "백금 동족체", "국소이성화효소 I 억제제", "국소이성화효소 II 억제제" 및 "유사분열 억제제"란 용어는 임상적으로 사용되는 화학적 또는 생물학적 항암제 부류를 지칭한다. 상기 용어들은 각각 특정 부류 내에 포함되는 현재 임상적으로 사용되는 항암제들 중 임의의 항암제뿐만 아니라, 아직 발명되지 않았지만 특정 부류 내에 포함될 임의의 미래의 임상 항암제를 포함한다. 이들 각각의 항암제 부류의 예에 대해서, 문헌[Physician's Cancer Chemotherapy Drug Manual, 2006, ISBN 0-7637-4019-5]을 참조하시오. 이들 각각의 항암제 부류의 보다 포괄적인 목록에 대해서 문헌[Martindale's Complete Drug Reference, 34th Edition]을 참조하시오.

<40> 본 발명에 사용된 바와 같은 "항암 치료"란 용어는 "항암제" 또는 "방사선 요법"을 지칭한다.

<41> 상기 "항암제"는 암을 치료하는데 사용될 수 있는 임의의 화학적 또는 생물학적 물질을 지칭한다.

<42> "DNA 손상제"란 용어는 포유동물에서 DNA의 정상적인 복제 또는 정상적인 기능을 직접 또는 간접적으로 방지하는 임의의 화학적 또는 생물학적 항암제를 지칭한다. "DNA 손상제"의 예로는 비 제한적으로 본 발명에 정의된 바와 같은 알킬화제, 대사길항물질, 항암 항생제, 백금 동족체, 국소이성화효소 I 억제제 및 국소이성화효소 II 억제제가 있다.

<43> "병행하여"란 용어는 또 다른 치료학적 치료, 예를 들어 항암제 또는 방사선 요법의 투여 타이밍에 대해, 치료가 필요한 포유동물에 대한 치료학적 치료, 예를 들어 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드, 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물, 또는 혼합물의 상대적인 투여 타이밍을 지칭하며, 상기 상대적인 타이밍은 복합요법용 약물 분야에 통상적으로 사용되는 것이다. 특히, 상대적인 타이밍은 연속적이거나 동시적일 수 있다. 연속적인 투여의 바람직한 실시태양은 먼저 항암제 또는 방사선 요법을 투여한 다음 24 시간 내에 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드, 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 이의 용매화물, 또는 혼합물을 투여한다.

<44> "과증식성 질환"이란 용어는 정상 세포의 비정상적인 성장 및 비정상적인 세포의 성장을 포함하여, 정상적인 조절 기전(예를 들어 접촉 억제의 상실)과 무관한 비정상적인 세포 성장을 지칭한다. 여기에는 비 제한적으로 악성 및 양성 모두의 종양 세포의 비정상적인 성장(종양)이 포함된다. 상기와 같은 양성 증식성 질병의 예는 건선, 양성 전립선 비대, 인 유두종 바이러스(HPV) 및 레스티노시스이다.

<45> "암"이란 용어는 비 제한적으로 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두경부암, 피부 또는 안내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 항문 부위암, 위암, 결장암, 유방암, 자궁암, 난관암종, 자궁내막 암종, 경부 암종, 질 암종, 음문암종, 호지킨병, 식도암, 소장암, 내분비계 암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구성 림프종, 방광암, 신장 또는 요관암, 신세포 암종, 신우 암종, 중추신경계(CNS) 암, 원발성 CNS 림프종, 척추 종양, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 또는 상기 암들 중 하나 이상의 조합을 포함한다. 상기 방법의 또 다른 실시태양에서, 상기 비정상적인 세포 성장은 양성 증식성 질병, 예를 들어 비 제한적으로 건선, 양성 전립선 비대 또는 레스티노시스이다.

<46> "CHK1 단백질 키나제 활성에 의해 매개된"이란 용어는 CHK1 단백질 키나제 활성에 의해 조절, 변경 또는 억제되

는 생물 또는 분자 과정을 지칭한다.

<47> "약학적으로 허용되는 염"이란 용어는 화합물 중에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 지칭한다. 본래 염기성인 화합물은 다양한 무기 및 유기 산과 광범위하게 다양한 염을 형성할 수 있다. 상기와 같은 염기성 화합물의 약학적으로 허용되는 산 부가염을 제조하는데 사용될 수 있는 산은 무독성 산 부가염, 즉 약물학적으로 허용되는 음이온을 함유하는 염, 예를 들어 아세테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 바이카보네이트, 바이설페이트, 바이타르트레이트, 보레이트, 브로마이드, 칼슘 에데테이트, 캠실레이트, 카보네이트, 클로라이드, 클라불라네이트, 시트레이트, 다이하이드로클로라이드, 에데테이트, 에디슬리에이트, 에스톨레이트, 에실레이트, 에틸숙시네이트, 퓨마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루타메이트, 글리콜릴아르스아닐레이트, 헥실레소르시네이트, 하이드라바민, 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 요오다이드, 아이소티오네이트, 락테이트, 락토바이오네이트, 라우레이트, 말레이트, 말리에이트, 만텔레이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 뮤케이트, 나프실레이트, 나이트레이트, 올리에이트, 옥살레이트, 파모에이트(엠보네이트), 팔미테이트, 판토테이트, 포스페이트/다이포스페이트, 폴리갈락튜로네이트, 살리실레이트, 스테아레이트, 수바세테이트, 숙시네이트, 탄네이트, 타르트레이트, 테오클레이트, 토실레이트, 트라이에티오도드, 및 빌레레이트 염을 형성하는 것들이다. 바람직하게는 바람직한 염은 포스페이트 및 글루코네이트 염을 포함한다.

<48> "약학 조성물"이란 용어는 본 발명에 개시된 화합물들, 또는 이의 생리학적으로/약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물 중 하나 이상과 다른 화학 성분들, 예를 들어 생리학적으로/약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와의 혼합물을 지칭한다. 약학 조성물의 목적은 화합물의 유기체에의 투여를 촉진하는 것이다.

<49> "방사선 요법"이란 용어는 약성 세포를 억제하기 위한 방사선의 의학적 사용을 지칭한다.

<50> "치료 유효량"이란 용어는 일반적으로 치료하려는 질환의 증상들 중 하나 이상을 어느 정도 경감시키는, 투여되는 화합물, 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물, 또는 이들의 혼합물의 양을 지칭한다. 특히, 상기 용어가 복합 요법을 개시하는데 사용될 때, "치료 유효량"은 (1) 항암제 또는 방사선 요법과 같은 또 다른 치료의 치료학적 효과를 상승시키거나, 또는 (2) 다른 치료와 병행하여, 치료하려는 질환의 증상들 중 하나 이상을 어느 정도 경감시키는 특정 치료제의 양을 지칭한다. 암 치료에 관하여, 상기 치료하려는 질병의 증상들을 경감시킴은 (a) 종양의 크기를 감소시키고; (b) 종양 또는 전이를 억제시키고(즉, 어느 정도까지 늦추고, 바람직하게는 정지시키고); (c) 종양 성장을 어느 정도로 억제시킴(즉 어느 정도까지 늦추고, 바람직하게는 정지시킴)을 포함한다.

<51> 본 발명에 사용된 바와 같은 "치료함"이란 용어는 달리 나타내지 않는 한 상기와 같은 용어가 적용되는 질환 또는 병, 또는 상기와 같은 질환 또는 병의 하나 이상의 증상을 역전, 경감시키거나, 또는 이의 진행을 억제시키거나 예방함을 의미한다. 본 발명에 사용된 바와 같은 "치료"란 용어는 달리 나타내지 않는 한 바로 위에서 정의한 바와 같은 "치료함"과 같은 치료 작용을 지칭한다.

### 발명의 상세한 설명

<52> 오직 본 명세서에서만 사용되는 "화합물 1"이란 용어는 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드, 이의 약학적으로 허용되는 염 또는 용매화물, 또는 이들의 혼합물을 지칭하며; "MTD"는 최대로 허용되는 용량을 지칭하고; Q3d x 4는 4 회 처리에 대해 매 3일마다 1 회의 투여 스케줄을 지칭하고; Q1w x 3은 3 회 처리에 대해 매주 1 회의 투여 스케줄을 지칭한다.

<53> (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드를 다양한 시험관 내 및 생체 내 시스템에서 연구하여 이의 분자 표적에 대한 효능, 키나제 선택성, 작용 기전, PK/PD 관계, 및 항종양 효능의 화학상승작용을 측정하였다.

#### I. 키나제 선택성

<55> (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드는 CHK1의 효능 있는 ATP-길항 억제제이다. CHK1(1-289) 촉매 도메인에 대한 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드의  $K_i$  값은  $0.49 \pm 0.29 \text{ nM}$ 이었다.

<56> Chk1에 대한 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드의 키나제 선택성을 100 개 이상의 단백질 키나제 패널에

대한 생화학적 키나제 선별 분석으로 평가하였다. 8 개의 키나제는 CHK1 촉매 도메인의  $K_i$ 에 대해 선별된 상기 키나제의  $IC_{50}$  또는  $K_i$ 의 비가 약 100 배 이하임을 보였다. 이들 8 개의 키나제는 오로라-A, FGFR3, Flt3, Fms(CSF1R), Ret, VEGFR2, Yes 및 CHK2이다(표 1). 선택성을 고려하여 CHK1 억제제에 가장 약물학적으로 적합한 키나제는 일시적인 간헐적 억제가 세포 주기 진행(예를 들어 CDK, 유사분열 키나제), 체크포인트 조절(예를 들어 CHK2, ATM, ATR)에 영향을 미치거나, 세포자멸 경로 상에서 작용하는 것(예를 들어 AKT, p38)이다. 이를 근거로, VEGFR2, Fms/CSF1R, FGFR2, Flt3 및 Ret는, 상기 RTK로부터 관찰가능한 약물학을 불러내기 위해서는 지속적인 억제가 필요하므로, 적절하지 않은 것으로 고려된다. 유사하게, Yes 녹아웃 마우스는 의미 있는 표현형을 나타내지 않으므로, Yes 키나제의 일시적인 억제로부터 효과가 예상되지 않는다. 오로라-A는 적합한 키나제이긴 하나, 상기 효소 분석은 세포 활성과 그다지 상관이 있지 않은 것으로 밝혀졌다. 세포 기재 작용 분석에서, (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드는 오로라 키나제에 대해 100 배 이상의 선택성을 보였다. 최종적으로, CHK2에 대한 선택성 비는 필수적으로 100 배와 같으며, 우리는 CHK2 활성이 세포 기재 또는 생체 외 분석에서 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드에 의해 조정된다는 증거를 관찰하지 못했다. 표 1은 선택된 키나제에 대한 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드의  $IC_{50}$  또는  $K_i$  값 및 CHK1의  $K_i$ 에 대한 상기 선택된 키나제의  $IC_{50}$  또는  $K_i$  간의 비를 나타낸다.

표 1

선택된 키나제에 대한 $IC_{50}$		
키나제	$IC_{50}$ (nM)	선택성 배수
EGFR2	8 ( $K_i$ )	16
Yes	14 <sup>a</sup>	29
Fms	10	20
Aurora-A	23	47
FGFR3	23	47
Flt3	25	51
Ret	39 <sup>a</sup>	80
Chk2	47 ( $K_i$ )	96
p70S6K	61	124
Rsk1	98	200
Axl	117	239
Fgr	153	312
Rsk3	171	349
Bmx	233	476
Lyn	266	543
PAR-1Ba	350	714
Blk(m)	365	745
Lck	396	808
PDK1	439	896
cSRC	442	902
Rsk2	621	1267
Abl(m)	929	1896
Fyn	953	1945
TrkA	1270	2592
PRK2	1980	4041
PDGFRa	2810	5735
PKBa	9200	18776
EphB4	>10000	>20000

&lt;57&gt;

&lt;58&gt;

## II. 세포 기재 작용성 분석에서 세포독성 상승 효과

&lt;59&gt;

체크포인트-매개된 세포 주기 정지는 화학요법제 또는 방사선에 의해 유도된 DNA 손상에 대한 전형적인 반응이다. 쟈시타빈, 아리노테칸 및 독소루비신과 같은 통상적으로 사용되는 화학요법제와 함께, (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드는 DNA 손상제에 의해 유도된 S 및 G<sub>2</sub> 체크포인트를 파기하고 세포독성을 상승시킨다. 이러

한 체크포인트 파기 활성 및 상승된 세포독성 활성은 p53-적격 정상 세포보다 p53-결손 암세포 주에 대해 선택성을 나타낸다. 체크포인트 파기는 쓰레오닌-14 및 타이로신-15 탈인산화 및 유사분열 단백질 키나제 CDK1의 활성화, 조기 유사분열, 유사분열 파국, 및 최종적으로 세포자멸성 세포사를 특징으로 한다. 일련의 실험을 수행하여 (1) DNA 손상 유도된 세포 주기 체크포인트의 파기를 입증하고; (2) 일부 화학요법제와 병행된 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드의 화학상승작용 활성을 평가하고; (3) p53-결손 암세포에 대한 선택성을 입증하였다.

<60> 체크포인트 파기 활성:

<61> 히스톤 H3 인산화 분석은 유사분열에 들어가는 세포를 검출하며, 캄토테신에 의해 유도된 G<sub>2</sub> 체크포인트의 파기에서 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드의 세포 효능을 측정하는데 사용되는 주요 시험관 내 세포 기재 분석을 나타낸다. EC<sub>50</sub> 값은 유사분열에의 등장의 마커인 Ser10 상의 히스톤 H3 인산화의 증가에 의해 측정 시 45 nM이었다. DNA 손상의 부재 하에서, (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드는 세포 주기에 영향을 미치지 않았다. 쟈시타빈과 병행 시, 유식 세포측정 분석은 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드와 함께 쟈시타빈 유도된 S기 정지의 파기를 나타낸다. (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드에 의해 유도된 S기 세포의 시간 의존성 감소는 G<sub>2</sub>-M 및 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 세포 집단의 증가에 상응하였으며, 이는 세포가 유사분열에 들어가는 중이고 세포 주기에 재등장하고자 시도함을 입증한다. 유식 세포측정 분석은 쟈시타빈 단독 치료에 비해, 쟈시타빈 및 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드 병행 치료에서 세포자멸성 세포가 현저하게 증가함을 입증하였다.

<62> 화학상승작용:

<63> 세포 생존 및 MTT (3-(4,5-다이메틸티아졸-2-일)-2,5-다이페닐테트라졸륨 브로마이드 분석) 분석을 p53-결손 인간 암세포 주의 패널에서 수행하여, 쟈시타빈, 이리노테칸, 카보플라틴, 독소루비신 및 미토마이신 C의 세포독성 효과를 상승시킴에 있어서 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드의 활성을 특성화하였다. (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드는 대조군(처리되지 않은 것) 세포에 비해 단독으로 세포 생육력에 현저한 영향을 일으키지 않았다. 쟈시타빈과 함께, (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드는 쟈시타빈 단독에 비해 쟈시타빈 세포독성의 현저한 상승 작용(89%)을 유도하였다. (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드는 대부분의 작용제와 함께 확고하고 일관된 상승작용을 유도하였으며, 일부 생육력이 세포 주를 사이에서 관찰되었다(표 2). 표 2에서, 쟈시타빈을 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드의 부재 하에서 독성을 유발하지 않거나 최소로 유발하는(<10%) 농도로 사용하였다: 5 nM(Colo205 세포), 10 nM(MDA-MB-231, HT29, 및 K562 세포) 또는 20 nM(PC-3 세포).

## 표 2

<64>

선택된 세포 주에서 시험관 내 복합 세포독성					
세포 (종양유형)	HT29 주 (결장)	Colo205 (결장)	PC-3 (전립선)	MDA-MB-231 (유방)	K562 (백혈병)
IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	1.8	1.3	1.6	1.4	0.42
OTSI <sup>b</sup>	8.5	14	13.2	2.1	9.3
DNA 손상제 PF <sub>50</sub> <sup>c</sup>					
제시타빈	9	11.3	12.2	3.6	5.6

SN-38	3.7	2.1	1.3	2.4	1.9
카보플라틴	3	5.4	3.1	2.55	1.9
독소루비신	2.2	1.1	1.5	2.25	1.1
마이토미신 C	3.7	5.3	ND <sup>d</sup>	1.2	ND <sup>c</sup>

<sup>a</sup>(2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드를 또 다른 세포독성제의 부재 하에서 사용하였다.

<sup>b</sup>OTSI(적중 선택성 지수)를 복합 치료의 IC<sub>50</sub>에 대한 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드의 IC<sub>50</sub>으로서 계산하였다.

<sup>c</sup>PF<sub>50</sub>(상승작용 인자<sub>50</sub>)을 IC<sub>50</sub>(세포독성제 단독)/IC<sub>50</sub>(복합 치료)으로서 계산하였다. (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드를 K-562 세포를 제외하고(이 경우 4 x EC<sub>50</sub>(180 nM)으로 사용하였다) 모든 세포 주에서 8 x EC<sub>50</sub>(360 nM)로 사용하였다.

<sup>d</sup>측정 안 됨; 이 분석에서, 곡선의 프로파일은 정확한 PF<sub>50</sub>의 계산을 허용하지 않았다.

&lt;65&gt;

p53-결손 세포에 대한 선택성:

&lt;66&gt;

DNA 지향된 화학요법과 병행된 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드는 정상(p53-적격) 세포에 최소의 세포독성 영향을 미치면서 p53-결손 암세포를 선택적으로 표적화하는 것으로 예상된다. 정상 세포에서 화학요법제와 병행된 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드의 세포독성 효과를 평가하기 위해서, 세포 생존 분석을 HUVEC 세포에서 수행하였다. (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드를 켐시타빈 또는 캄토테신(이들을 모두 최소 세포 독성(<10%)을 유도하는 고정 농도로 사용하였다)과 병행하였다. 병행 시 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드의 최고 농도(12 x EC<sub>50</sub>, 540 nM)는 켐시타빈 또는 캄토테신 단독에 비해 세포사를 각각 31.2% 또는 21.7% 증가시킨다. HUVEC 세포에서 상기 복합 치료에 의해 유도된 세포독성 효과는 종양 세포에서 동일한 치료에 의해 유도된 세포독성에 비해 무시할만하다. 화학요법과 병행된, p53-적격 비 종양 세포에서 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드에 의해 유도된 최소 독성은 p53-결손 암세포에 대한 이의 선택성 및 정상 세포에서 최소의 부작용을 가질 가능성을 지지하는 증거를 제공한다. 세포 생존 분석을 또한 HTC116 세포(인간 결장 암종)(p53 야생형 또는 돌연변이를 함유하는 플라스미드에 의해 일시적으로 형질감염되었다)에서 수행하였다. 돌연변이체 p53 HCT116 세포에서 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드와 켐시타빈의 병행은 켐시타빈 단독에 비해 44%의 세포 성장 억제를 유도한 반면, 야생형 p53 HCT116 세포에서 상기 동일한 복합 치료는 켐시타빈 단독에 비해 단지 15% 세포 성장 억제를 유도하였다. 이러한 결과는 p53-결손 암 세포가 이의 p53-적격 대응물보다 Chk1 억제에 더 약함을 입증한다.

&lt;67&gt;

III. 생체 내 연구에서 화학상승작용 효과

&lt;68&gt;

(2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드와 세포독성제와의 병행 연구를 HT29 및 Colo205 인간 결장 암종 이종이식 편에서 수행하였다. 실험 1 내지 39를 마우스 이종이식편에서 수행하였다. 실험 40 내지 42를 래트 이종이식 편에서 수행하였다. 구체적으로, 이리노테칸 병행 연구를 HT29 및 Colo205에서 수행하였다. 켐시타빈 병행 연구는 Colo205에서 수행하였다. 도세탁셀 병행 연구는 Colo205에서 수행하였다. (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드의 화학상승작용이 상기 모든 병행 연구들에서 입증되었다.

&lt;69&gt;

켐시타빈 및 이리노테칸은 체크포인트 활성화 및 후속의 S/G<sub>2</sub>M-기 정지를 유도하는 것으로 공지된 DNA 지향된 세포독성제이다. (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드를 켐시타빈 또는 이리노테칸의 선행 투여 후 24 시간째에

일반적으로 투여하였다. 도세탁셀은 유사분역 억제제이며, 최근의 발견은 유사분열 체크포인트에서 CHK1에 대한 이의 새로운 작용을 개시하고 있다. (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-페라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드를 도세탁셀과 동시에 투여하였다. 상기 각각의 연구에서, (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-페라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드를 나트륨 아세테이트 및 4% 텍스트로스/수 용액 중에서 5 mg/kg으로 투여하였다. 결과를 표 3에 요약한다.

표 3

종양 억제 활성의 생체 내 화학 상승 작용								
실시예 번호	종양 유형	세포 독성제	Amt A (mg/kg)	Amt B (mg/kg)	TGI (%)	상승된 TGI (%)	성장 지연 (일수)	TTP (%)
1	Colo 205	젬시타빈	120	0	58	n/a	8	n/a
2	Colo 205	젬시타빈	120	4	58		8	
3	Colo 205	젬시타빈	120	8	63	12	8	
4	Colo 205	젬시타빈	120	12	68	23	8.5	
5	Colo 205	젬시타빈	120	20	76	43	12	17
6	Colo 205	젬시타빈	120	24	81	55	12	17
7	Colo 205	젬시타빈	120	40	90	75	20	50
8	Colo 205	이리노테칸	10	0	35		18	
9	Colo 205	이리노테칸	10	4	50	22	18	
10	Colo 205	이리노테칸	10	20	69	52	24	33
11	Colo 205	이리노테칸	10	40	59	37	20.5	12
12	Colo 205	이리노테칸	10	0	35		18	
13	Colo 205	이리노테칸	30	0	65		22	
14	Colo 205	이리노테칸	60	0	83		48	
15	Colo 205	이리노테칸	10	40	59	37	20.5	12
16	Colo 205	이리노테칸	30	40	73	24	34	54
17	Colo 205	이리노테칸	60	40	91	47	52	8
18	Colo 205	도세탁셀	30	30	85		54	
19	Colo 205	도세탁셀	30	7.5	90	35	53	
20	Colo 205	도세탁셀	30	15	93	57	68	36
21	Colo 205	도세탁셀	30	30	103	122	74	50
22	Colo 205	도세탁셀	15	15	49		4.75	
23	Colo 205	도세탁셀	15	15	65	31	19.75	72
24	Colo 205	도세탁셀	15	30	79	59	41.5	177
25	Colo 205	도세탁셀	15	60	99	99	35	145
26	HT29	이리노테칸	10	0	26		1.75	
27	HT29	이리노테칸	10	4	26		7.5	29
28	HT29	이리노테칸	10	20	61	47	9.5	39
29	HT29	이리노테칸	10	40	57	42	10.5	44
30	HT29	이리노테칸	10	0	8		2.75	
31	HT29	이리노테칸	30	0	13		4	
32	HT29	이리노테칸	60	0	49		12.5	
33	HT29	이리노테칸	10	40	22	15	1.0	0
34	HT29	이리노테칸	30	40	66	60	17.5	61
35	HT29	이리노테칸	60	40	77	55	21	28
36	HT29	이리노테칸	50	0	65		7.5	
37	HT29	이리노테칸	100	0	70		11.5	
38	HT29	이리노테칸	50	40	77	36	14	24
39	HT29	이리노테칸	100	40	89	62	21	49
40	HT29	이리노테칸	100	0	45		4.0	
41	HT29	이리노테칸	100	25	58	23	4.0	
42	HT29	이리노테칸	100	100	77	58	8.0	24

&lt;70&gt;

<71> 표 3에 사용된 "Exp No."는 실시예 번호를 지칭하고; "Amt A"는 용량당 이종이식편에 투여되는 세포독성제의 양을 지칭하며; "Amt B"는 용량당 이종이식편에 투여되는 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-페라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드의 양을 지칭하고; TGI(종양 성장 억제)(%)를  $100 \times [1 - (TV_f - TV_i) / (TV_f - TV_i)_{비하]$  (여기에서  $TV_f$  및  $TV_i$ 는 각각 최종 용량 + 2 일 및 군의 초기 평균 종양 부피이다)로서 계산하였으며; 상승된 TGI(%)는  $100 \times [1 - (TV_f - TV_i)_{병행} / (TV_f - TV_i)_{세포독성 단독}]$  (여기에서  $TV_f$  및  $TV_i$ 는 각각 최종 용량 + 2일 및 군의 초기 평균 종양 부피이다)로서 계산하였고; 성장 지연은 종양 일수가 2 배(800 mm<sup>3</sup>)로 되는 처리-비하를(T-C)로서 계산하였으며; TTP ER(진행 상승 비까지의 시간)(%)을 지연[(병행)/지연(세포독성제 단독) x 100 - 100)]으로서 계산하였다.

&lt;72&gt;

실시예 1 내지 17에서 이리노테칸 또는 젬시타빈(적용가능한 경우)을 Q3d x 4에 따라 복강 내(IP) 투여하였으며, (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-페라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드를 이리노테칸 또는 젬시타빈 후 24 시간째에 시작하여 Q3d

x 4에 따라 IP 투여하였다.

- <73> 실시예 18 내지 25에서, 도세탁셀 및 (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드를 Q1w x 3 스케줄에 따라 동시에 복강 내(IP) 투여하였다. 실시예 25에서, (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드를 120 mg/kg의 전체 용량으로 2주기 동안 투여하였다.
- <74> 실시예 26 내지 35에서, 이리노테칸을 Q3d x 4에 따라 복강 내(IP) 투여하고, (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드를 이리노테칸 또는 쟈시타빈 후 24 시간째에 시작하여 Q3d x 4에 따라 IP 투여하였다.
- <75> 실시예 36 내지 39에서, 이리노테칸을 Q1w x 3에 따라 IP 투여하고, (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드를 3주 동안 이리노테칸 투여 후 24 및 72 시간째에, 매주 2회 IP 투여하였다.
- <76> 실시예 40 내지 42에서, 이리노테칸을 Q3d x 4에 따라 IP 투여하고, (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드를 이리노테칸 투여 후 24 시간째에 시작하여 Q3d x 4에 따라 2시간 IV 주입을 통해 투여하였다.
- <77> (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드의 MTD는 10내지 20%의 평균 체중 손실 발생에 의해 평가 시 40 mg/kg Q3d x 4 또는 60 mg/kg Q1w x 3인 것으로 결정되었다.
- <78> IV. 화합물 1의 방사성 감작 효과에 대한 생체 내 연구
- <79> 암컷 Balb/c 누드 마우스(6주된 것)에게 PBS 중의  $3 \times 10^6$  A431 세포를 우측 뒷다리에 접종하고 종양이 평균 종양 부피 약 100  $\text{mm}^3$ 으로 성장하도록 하였다. 상기 마우스를 각 군당 10마리의 군으로 무작위화하였다.
- <80> 이어서 마취시키지 않은 마우스를 조사(radiation)하였다. 조사는 배리안(Varian) 2100 선형 가속화기(Palo Alto, CA)로부터 6 MeV 고용량 비율 전자 광선을 사용하여 전달되었다. 상기 사용된 용량 비율은 20 Gy/min이었다. 상기 전자 광선의 깊이-용량 특징은  $\pm 5\%$  이내의 용량 균등이 10  $\text{mm}$  깊이의 조직에 대해 획득되도록 하는 것이었다. 이는 조사된 모든 종양을 포함하기에 충분하였다. 상기 종양은 6  $\text{mm}$  두께의 퍼스펙스(Perspex) 시트에 부착된 3  $\text{mm}$  두께 연판으로부터 25  $\text{mm}$  시준기 컷을 통해 조사되었다. 상기 종양과 상기 표면 시준기의 하부(Perspex) 면 사이의 간격은 대략 25  $\text{mm}$ 였다. 상기 장치는 상기 마우스에서 열 손실 효과를 감소시키기 위해 37 °C로 가열된 판 상에 지지되었다. 조사 용량을 계산하였으며 이는 선배 방사선 물리학자에 의해 전달되었다. 방사선요법을 0내지 4일째에 2, 3 또는 4 Gy 매일 분획으로서 상술한 바와 같이 제공하였다.
- <81> (2R,Z)-2-아미노-2-사이클로헥실-N-(5-(1-메틸-1H-피라졸-4-일)-1-옥소-2,6-다이하이드로-1H-[1,2]다이아제피노[4,5,6-cd]인돌-8-일)아세트아미드(화합물 1)를 pH 완충된 수용액으로서 제조하였다. 상기 용액을 투여 직전에 제조하고 (15 mg/kg)을 방사선요법에 바로 이어서 0내지 4일째에 15 mg/kg으로 복강 내 주입에 의해 투여하였다. 화합물 1을 함유하지 않는 상기 용액을 "약물 비히클" 또는 "비히클"로서 간주한다. 약물 비히클을 동일한 스케줄로 0.1  $\text{ml}/10\text{ g}$  체중으로 투여하였다.
- <82> 각각의 마우스 군을 화합물 1 단독, 방사선 단독, 또는 화합물 1과 방사선의 조합으로 처리하였다. 동물들을 종양 부피 비(TVR)가 4에 도달하거나 이를 초과한 경우, 또는 상기 마우스가 0일째에 이의 기본 체중의 15%를 초과하여 체중을 잃은 경우 죽였다. 종양 부피 비는 특정 시점에서의 종양 부피와 기준 종양 부피(0일째의 종양 부피) 간의 비로서 정의된다.
- <83> 종양 부피를 0일에서부터 11일 및 심지어 추가로 23일까지 매주 3회 측정하였다. 종양 부피를 전자 캘리퍼스를 사용하여 측정하고 길이/2 x 너비<sup>2</sup>로서 계산하였다. 평균 종양 부피를 각 군의 마우스에 대해 계산하였다. 표 4는 처리되지 않은 경우, 약물 비히클, 화합물 1, 방사선, 또는 화합물 1과 방사선의 조합으로 처리한 각 군의 마우스의 평균 종양 부피를 나타낸다.

표 4

A431 마우스 이종이식편에서 화합물 1과 병행된 방사선 요법의 항종양 효능									
시간 (일수)	처리 안됨	비히클 단독	화합물 1 단독	2 Gy + 비히클	3 Gy + 비히클	4 Gy + 비히클	2 Gy + 화합물 1	3 Gy + 화합물 1	4 Gy + 화합물 1
0	104.78	104.36	104.23	101.97	104.63	105.32	94.51	104.26	101.97
2	166.76	149.37	158.07	150.81	161.82	155.29	145.53	149.88	150.81
4	218.14	216.64	242.46	209.44	219.40	209.07	198.57	210.23	209.44
7	342.07	302.86	418.28	307.93	279.82	259.44	255.23	200.48	307.93
9	460.18	391.63	580.35	294.63	232.98	242.81	339.76	164.45	294.63
11	814.89	792.78	790.82	487.78	342.32	368.51	401.96	210.35	487.78
14				815.01	364.79	484.81	644.80	283.51	815.01
16					528.51	643.06		408.01	
18						889.01		433.83	
21								395.17	
23									513.31

&lt;84&gt;

<85> 표 5는 표 4에 나타낸 종양 부피 데이터를 근거로, 종양 성장 지연 및 상승 비를 나타낸다. 종양 성장 지연은 종양이 4의 TVR에 도달하는 종양 시간(일수) - 비히클 대조군 종양이 동일한 크기에 도달하는 시간으로서 정의된다. 표준화된 성장 지연은 복합 처리된 마우스의 종양이 4의 TVR에 도달하는 시간(일수) - 약물 단독으로 처리된 마우스의 종양이 동일한 크기에 도달하는 시간(일수)으로서 정의된다. 상승비는 약물 및 방사선으로 처리된 마우스의 표준화된 종양 성장 지연을 방사선만으로 처리된 마우스의 종양 성장 지연으로 나눈 것으로서 정의된다.

표 5

&lt;86&gt;

A431 종양 이종이식편에서 화합물 1의 방사선 감작 효과의 생체 내 연구				
	TVR=4까지의 종양 시간(일수)	종양 성장 지연 (일수)	표준화된 종양 성장 지연(일수)	상승비
화합물 1 단독	7.35	-1.05		
방사선(2 Gy x 5)	10.7	2.3		
방사선(3 Gy x 5)	11.3	2.9		
방사선(4 Gy x 5)	11.9	3.5		
화합물 1 + 방사선(2 Gy x 5)	11.1	2.7	3.75	1.6
화합물 1 + 방사선(3 Gy x 5)	15.1	6.7	7.75	2.7
화합물 1 + 방사선(4 Gy x 5)	13	4.6	5.65	1.6