



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월02일

(11) 등록번호 10-2185175

(24) 등록일자 2020년11월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 39/3955 (2013.01)

A61K 31/519 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-7014678

(22) 출원일자(국제) 2013년11월01일

심사청구일자 2018년10월31일

(85) 번역문제출일자 2015년06월02일

(65) 공개번호 10-2015-0084885

(43) 공개일자 2015년07월22일

(86) 국제출원번호 PCT/US2013/067956

(87) 국제공개번호 WO 2014/071125

국제공개일자 2014년05월08일

(30) 우선권주장

4595/CHE/2012 2012년11월02일 인도(IN)

61/771,812 2013년03월02일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2010014595 A1

EP2000541 A

(73) 특허권자

티지 셰라퓨틱스, 인코포레이티드

미국 10014 뉴욕 뉴욕 나인스 플로어 갠스브루 스트리트 2

리젠 파마슈티컬스 소시에떼 아노님

스위스 세아쉬-2300 라 슈 드 폰 프릿츠 코르브와지에 40

라보라토이레 프란카이즈 듀 프락티온네먼트 에트 데스 바이오테크놀로지스

프랑스, 레스 올리스 에프-91940, 자 데 쿼타보에프, 에비뉴 데스 트로피퀘스 3

(72) 발명자

와이스, 마이클

미국 뉴욕 10019 뉴욕 48층 7번 애비뉴 787 티지 셰라퓨틱스 인코포레이티드 내

미스킨, 하리

미국 뉴욕 10019 뉴욕 48층 7번 애비뉴 787 티지 셰라퓨틱스 인코포레이티드 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

박장원

전체 청구항 수 : 총 29 항

심사관 : 이현지

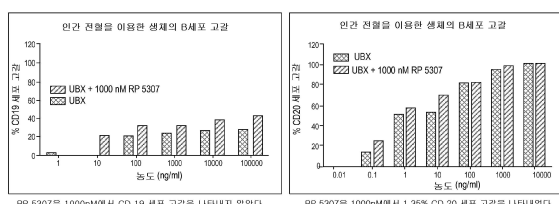
(54) 발명의 명칭 항CD20 항체와 PI3 키나아제 선택적 억제제의 조합물

(57) 요약

본 발명에 따라, PI3K δ 및/또는 CD20 매개된 질병 및 장애 및 경감하기 위해 화학식 A의 화합물 (PI3K δ 선택적 억제제)과 항CD20 항체와의 고도로 효과적인 조합물이 제공된다. 특히, 상기 조합은 암 및 자가면역 질환을 치료하는데 이용될 수 있다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 혈액암 예컨대 백혈병 및 림프종과 같은 혈액암의 치료 및/또는 경감을 위한, 화학식 A의 화합물, 또는 그의 입체이성질체, 및 유블리투시맙의 조합을 제공하는 것이다.

대표도

결과



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

C07K 16/2887 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/73 (2013.01)

(72) 발명자

스포르텔리, 피터

미국 뉴욕 10019 뉴욕 48층 7번 애비뉴 787 티지
쉴라퓨틱스 인코포레이티드 내

바칼란카, 스와롭 케이.브이.에스.

스위스 2300 라 슈 드 폰 프릿츠 코르브와지에 40
리젠 파마슈티컬스 소시에떼 아노님 내

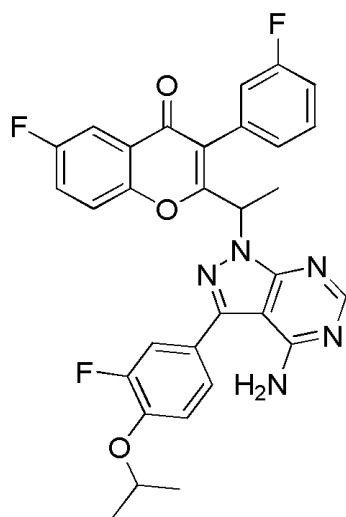
명세서

청구범위

청구항 1

B-세포를 포함하는 CD20+ 세포 집단을

(i) 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 또는 라세미 혼합물



(A)

또는 약학적으로 허용가능한 염, 또는 용매화합물, 및

(ii) 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편

을 포함하는 조합물에 접촉시키는 것을 포함하는 상기 세포 집단의 증식을 억제하는 시험관내(*in vitro*) 방법으로서,

단, 상기 항CD20 항체는 유블리투시맙, 리투시맙, 오파투무맙, 오크렐리주맙, 벨투주맙, GA101, AME-133v, PR0131921, 토시투모맙, hA20, 및 PR070769, 또는 이들과 동일한 에피토프에 결합하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 항체이거나 또는 이들의 항원-결합 단편인 것인, 세포 집단의 증식을 억제하는 시험관내(*in vitro*) 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항CD20 항체는 유블리투시맙이거나 또는 유블리투시맙과 동일한 에피토프에 결합하거나 또는 그의 항원-결합 단편인 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열 SEQ ID NO:1, 2, 및 3의 VH CDR1, CDR2 및 CDR3 영역 및 서열 SEQ ID NO:6, 7, 및 8의 VL CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함하고, 선택적으로 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:4의 VH 및 SEQ ID NO:9의 VL을 포함하는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항CD20 항체는 유블리투시맙인 것인 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 화학식 A의 화합물은

(RS)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 또는

(S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온

인 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 화학식 A의 화합물은 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온인 것인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 세포 집단을

(i) 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물, 및

(ii) 항CD20 항체

를 포함하는 조성물에 접촉시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 있어서, 세포 집단을

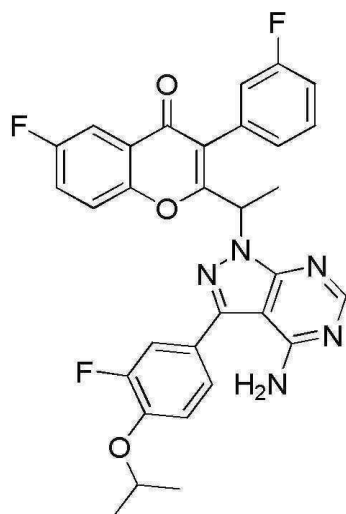
(i) 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물을 포함하는 제1 조성물, 및

(ii) 항CD20 항체를 포함하는 제2 조성물

과 접촉시키는 것인 방법.

청구항 9

(i) 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 또는 라세미 혼합물,



(A)

또는 약학적으로 허용가능한 염, 또는 용매화합물, 및

(ii) 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편

을 포함하는, 암 또는 자가면역질환 또는 장애 치료용 의약으로서 사용되기 위한 약학적 조합물로서,

단, 상기 항CD20 항체는 유블리투시맙, 리투시맙, 오파투무맙, 오크렐리주맙, 벨투주맙, GA101, AME-133v, PR0131921, 토시투모맙, hA20, 및 PR070769, 또는 이들과 동일한 에피토프에 결합하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 항체이거나 또는 이들의 항원-결합 단편인 것인, 암 또는 자가면역질환 또는 장애 치료용 의약으로서 사용되기 위한 약학적 조합물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 CD20 항체는 유블리투시맙이거나 또는 유블리투시맙과 동일한 에피토프에 결합하거나 또는 상기 항체의 항원-결합 단편인 것인 약학적 조합물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 서열 SEQ ID NO:1, 2, 및 3의 VH CDR1, CDR2 및 CDR3 영역 및 서열 SEQ ID NO:6, 7, 및 8의 VL CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함하고, 선택적으로 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:4의 VH 및 SEQ ID NO:9의 VL을 포함하는 것인 약학적 조합물.

청구항 12

제10항에 있어서, 항CD20 항체는 유블리투시맙인 것인 약학적 조합물.

청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 화합물은

(RS)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 또는

(S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온

으로부터 선택되는 것인 약학적 조합물.

청구항 14

제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 화학식 A의 화합물은 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온인 것인 약학적 조합물.

청구항 15

제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 화학식 A의 화합물은 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온의 p-톨루엔설포네이트 염이고 상기 항CD20 항체는 유블리투시맙인 것인 약학적 조합물.

청구항 16

제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 암은 선택적으로 림프종 또는 백혈병인 혈액암이고, 상기 혈액암은 선택적으로 급성 림프구 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구 백혈병(CLL), 소림프구 림프종(SLL), 다발골수종(MM), 비호지킨 림프종(NHL), 외투세포 림프종(MCL), 소포림프종, 발덴스트롬 마크로글루볼린혈증(WM), B 세포 림프종 및 광범위 큰 B 세포 림프종(DLBCL)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 약학적 조합물.

청구항 17

제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 암은 CD20을 과발현시키거나 및/또는 암은 화학요법에 대해 난치성인 것인 약학적 조합물.

청구항 18

제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 약학적 조합물이 적용되는 대상자는 이전에 화학요법, 리투시맙 또는 이의 조합에 의해 치료된 적이 있는 대상자인 것인 약학적 조합물.

청구항 19

제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 화학식 A의 화합물 및 상기 항CD20 항체 또는 그의 단편은 대상자에게 순차적으로 또는 동시에 투여되고, 선택적으로 상기 화학식 A의 화합물 및 상기 항CD20 항체 또는 그의 단편은 동일한 의약 조성물에 함유되어 있거나 또는 별개의 의약 조성물들에 함유되어 있는 것인 약학적 조합물.

청구항 20

제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 약학적 조합물은 적어도 1종의 부가적인 치료제를 포함하고, 상기 부가적인 치료제는 선택적으로 프로테아좀 억제제, 보르테오미드(Velcade®), 카르필조미드(PR-171), PR-047, 디술피람, 락타시스틴, PS-519, 에포네마이신, 에폭소마이신, 아클라시노마이신, CEP-1612, MG-132, CVT-63417, PS-341, 비닐 술폰 트리펩타이드 억제제, 리토나비어, PI-083, (+/-)-7-메틸로무랄라이드, (-)-7-메틸로무랄라이드, 레날리도마이드, 및 이들의 조합으로부터 선택되는 것인 약학적 조합물.

청구항 21

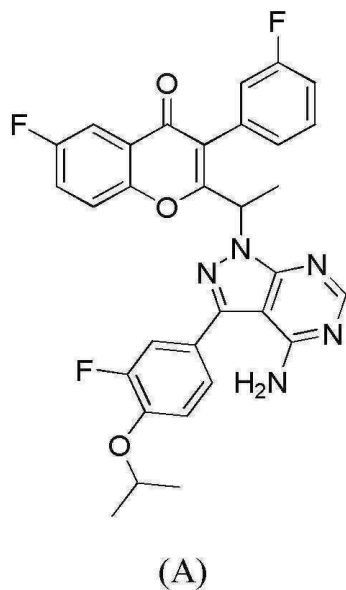
제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 약학적 조합물은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 2종의 부가적인 치료제를 포함하는 것인 약학적 조합물:

- a) 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 프레드니손(CHOP);
- b) 리투시맙-CHOP;
- c) 과다분할 시클로포스파미드, 빈크리스틴, 독소루비신, 텍사메타손, 메토트렉세이트, 시타라빈(하이퍼CV AD);
- d) 리투시맙-하이퍼CV AD;

- e) 플루다라빈, 시클로포스파미드, 미토잔트론;
- f) 리톡시맙, 플루다라빈, 시클로포스파미드, 미토잔트론;
- g) 보르테조밐 및 리톡시맙;
- h) 템시롤리무스 및 리톡시맙;
- i) 템시롤리무스 및 Velcade[®];
- j) 요오드-131 토시투모맙 (Bexxar[®]) 및 CHOP;
- k) 시클로포스파미드, 빈크리스틴, 프레드니손 (CVP);
- l) 리톡시맙-CVP;
- m) 이포스파미드, 카르보플라틴, 에토포시드 (ICE);
- n) 리톡시맙-ICE;
- o) 플루다라빈, 시클로포스파미드, 리톡시맙;
- p) 플루다라빈, 리톡시맙; 및
- q) 텍사메타손, 탈리도마이드, 시스플라틴, 아드리아마이신, 시클로포스파미드, 에토포시드.

청구항 22

(i) 화학식 A의 화합물의 (S)-이성질체 또는 라세미 혼합물,



또는 약학적으로 허용가능한 염, 또는 용매화합물, 및

(ii) 및 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편

을 포함하는, 암 또는 자가면역질환 또는 장애 치료에 사용되기 위한 키트로서,

단, 상기 항CD20 항체는 유블리톡시맙, 리톡시맙, 오파투무맙, 오크렐리주맙, 벨투주맙, GA101, AME-133v, PR0131921, 토시투모맙, hA20, 및 PR070769, 또는 이들과 동일한 에피토프에 결합하는 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 항체이거나 또는 이들의 항원-결합 단편인 것인, 암 또는 자가면역질환 또는 장애 치료에 사용되기 위한 키트.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 CD20 항체는 유블리톡시맙이거나 또는 유블리톡시맙과 동일한 에피토프에 결합하거나 또

는 상기 항체의 항원-결합 단편인 것인 키트.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 항CD20 항체는 유블리투시맙인 것인 키트.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 화학식 A의 화합물은

(RS)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 또는

(S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온

으로부터 선택되는 것인 키트.

청구항 26

제22항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 화학식 A의 화합물은 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온인 것인 키트.

청구항 27

제22항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 화학식 A의 화합물은 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온의 p-톨루엔설포네이트 염이고 상기 항CD20 항체는 유블리투시맙인 것인 키트.

청구항 28

제22항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 항CD20 항체 또는 그의 단편 및 상기 화합물은 동일한 조성물에 함유되어 있거나 또는 별개 조성물들에 함유되어 있는 것인 키트.

청구항 29

제22항 내지 제24항 중 어느 하나의 항에 있어서, 하나 이상의 부가적인 활성제제를 더 포함하는 것인 키트.

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] [0001] 이 출원은 2013년 3월 2일자 미국 가특허출원 61/771,812에 기초한 우선권 주장 출원으로서, 상기 출원의 내용은 그 전체가 본 발명에 참조 병합되었다.

[0002] **발명의 분야**

[0003] [0002] 본 발명에 따라 PI3K δ 및/또는 CD20 매개 질환 및 장애의 치료 및 경감을 위해 화학식 A의 화합물(PI3K δ 선택적 억제제)과 항CD20 항체와의 고도로 효과적인 조합물이 제공된다. 특히, 이 조합물은 암 및 자가면역 질환을 치료하는데 이용될 수 있다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 백혈병 및 림프종과 같은 혈액암의 치료 및/또는 경감을 위하여, 화학식 A의 화합물, 또는 그의 입체이성질체와 유블리투시맙과의 조합을 제공한다.

배경 기술

[0004] [0003] PI3K δ 효소와 CD20 두 가지 모두가 매우 광범위한 인간 암, 특히 혈액암에 있어서 개별적으로 종양발생에 기여함을 가리키는 증거가 많이 있다. 포스포이노시타이드 3-키나아제(PI3Ks)는 포스포이노시타이드 제2-메신저 분자의 생성에 의해 모든 유형의 세포에서 다양한 생물학적 기능을 조절하는 효소 패밀리아다. 이들 포스포이노시타이드 제2 메신저의 활성화는 그들의 인산화(phosphorylation) 상태에 따라 결정되므로, 이들 지질을 개질시키는 작용을 하는 키나아제와 포스파타이즈는 세포내 시그널링 이벤트의 중심이 된다. PI3K는 이노시톨 고리의 3-히드록실 잔기에서 지질을 인산화시켜(Whitman 등, *Nature* 332:664 (1988)) 인산화 인지질(PIP3s)을 생성하는데 이것은 Akt 및 포스포이노시타이드- 의존성 키나아제-1(PDK1)와 같은, 지질 결합 도메인(플렉스트린 상동(PH: plekstrin homology) 영역을 포함한다)을 갖는 키나아제를 동원하는 제2 메신저로서 작용한다. 맛의 막 PIP3에 대한 결합에 의해Akt의 형질막(plasma membrane)으로의 전좌가 일어나고, 이로 인해 Akt가 PDK1과 접촉하게 되고, 이에 따라, Akt가 활성화된다. 종양-서프레스 포스파타제, PTEN (10번 염색체 상에서 결실된 포스파타제 및 텐신 상동체)은 PIP3을 탈인산화하고 이에 따라, Akt 활성화의 네거티브 조절자로서 작용한다. PI3-키나아제들인 Akt 및 PDK1은 세포 사이클 조절, 증식, 생존, 세포자멸사 및 이동성을 비롯한 여러가지 세포

과정에서 중요한 역할을 하며 암, 당뇨병 및 면역염증과 같은 질환의 분자 메커니즘에 있어서 유의적인 성분이 다 (Vivanco 등, *Nature Rev. Cancer* 2:489 (2002); Phillips 등, *Cancer* 83:41 (1998)).

[0005] [0004] PI3Ks 패밀리는 다음의 4가지 서로 다른 클래스로 이루어져 있다: Classes I, II, III 및 IV. 클래스 I-III은 지질 키나아제이고 클래스 IV는 세린/쓰레오닌 단백질 키나아제이다.

[0006] [0005] PI3Ks의 클래스 I 패밀리의 구성원들은 조절 서브유닛과 촉매 서브유닛의 이량체이다. 클래스 I 패밀리는 110 kDa 촉매 서브유닛 α 베타, 감마 및 δ 에 의해 결정되는, 4가지 이소폼으로 구성되어 있다. 문헌 [Engelman J.A., *Nat Rev Genet* 7:606-619 (2006); Carnero A., *Curr Cancer Drug Targets* 8:187-198 (2008); 및 Vanhaesebroeck B., *Trends Biochem Sci* 30:194-204 (2005)] 참조. 클래스 I은 다시 2 가지 서브클래스인 클래스 Ia과 클래스 Ib로 세분되는데: 클래스 Ia는 Class Ia, formed by the combination of p110 α 베타, 및 δ 와 조절 서브유닛 (p85, p55 또는 p50)과의 조합에 의해 형성되고; 및 클래스 Ib는 p110 감마 및 p101 조절 서브유닛에 의해 형성된다.

[0007] [0006] PI3K 및 관련 단백질 키나아제 경로에 관한 연구가 여러 연구 그룹에 의해 간행된 바 있으며, 여기에는 Liu 등, *Nature Reviews Drug Discovery* 8:627-644 (2009); Nathan 등, *Mol. Cancer Ther.* 8(1) (2009); 및 Marone 등, *Biochimica et Biophysica Acta* 1784:159-185 (2008)의 문헌이 포함된다. 공지의 2 가지 PI3K 억제제인, LY294002 및 워트만닌(Wortmannin)은 클래식 Class I PI3K α 베타, 감마 및 δ 의 4 가지 구성원을 구별하지 못하므로, 비특이적인 PI3K 억제제이다. 암의 치료를 위해 몇몇 PI3K 억제제들이 임상 시험 중에 있으며, 유방암, 비소세포폐암(NSCLC) 및 혈액암을 비롯한 다양한 종류의 암들이 치료 관심 대상으로 고려되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] [0007] CD20은 성숙한 B 림프구의 표면에 존재하는 분자량 35-37 kDa의 소수성 막투과 단백질이다. 이것은 전 (pre)-B 단계부터 형질세포로 분화될 때까지 B 림프구 세포(B 세포)의 발달 과정 동안 발현된다. CD20은 대부분의 비호지킨 B 세포 림프종 (NHL) 및 B형 만성 림프구성 백혈병 (B-CLL)을 비롯한 악성 B 세포와 정상 B 림프구 두 가지 모두에 존재한다. CD20 항원은 조혈 줄기세포나 또는 형질세포 상에서는 발현되지 않는다.

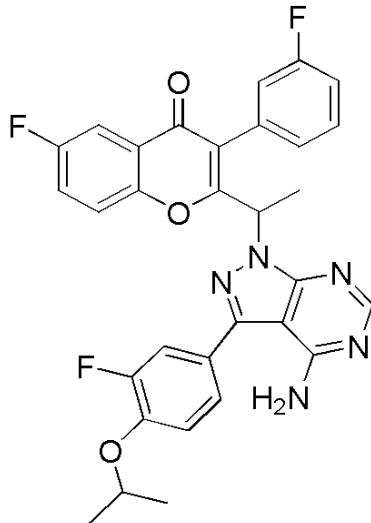
[0009] [0008] 항CD20 항체는 B 세포 질환 치료를 위해 이제까지 개발되어 왔으며 앞으로도 지속적으로 개발 예정에 있다. 항CD20 항체 리툽시맙은 성공한 것으로 보고되었다. 그러나, 리툽시맙을 이용한 치료에 순응하지 못하거나, 리툽시맙을 이용한 장기간의 치료 도중 내성을 일으킨 환자들이 상당수 존재한다 (단일 제제로 사용한 경우 또는 심지어 다른 화학요법 제와 병용한 경우).

[0010] [0009] 따라서, PI3K δ 효소 및/또는 CD20 단백질의 변형과 관련된 질환 또는 질병의 치료 및/또는 경감, 특히 B 세포 질환의 치료 및/또는 경감을 위한 보다 효과적인 치료법이 요구되고 있다..

과제의 해결 수단

[0011] 발명의 개요

[0012] [0010] 본 발명은 다음 화학식 (A) 의 PI3K δ 선택적 억제제,



(A)

[0013]

[0014] [0011] 및 그의 입체이성질체, 그의 호변이성질체, 약학적으로 허용가능한 염, 그의 용매화합물 및 전구약물과, 적어도 1종의 항CD20 항체를 포함하는 조합물(combination)에 관한 것이다.

[0015] [0012] 이 조합물은 PI3K δ 효소- 및/또는 CD20 단백질-관련 질환, 질병 또는 병태, 예컨대, 암과 같은 증식성 질환의 치료에 사용되는데 적합하다. 특히, 이 조합물은 예컨대, 혈액암과 같은 B 세포 질환의 치료 또는 경감에 적합하다.

[0016] [0013] 따라서, 몇몇 구체예에서, 세포 집단의 증식을 억제하기 위한 방법이 제공된다. 몇몇 구체예에서, 이 방법은 세포 집단을 (i) 화학식 A의 화합물, 그의 입체이성질체, 그의 호변이성질체, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염, 용매화합물 또는 전구약물, (ii) 및 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조합물과 접촉시키는 것을 포함하는데, 여기서 상기 항CD20 항체 또는 단편은 유플리톡시맵과 동일한 에피토프에 결합하는 것이다.

[0017] [0014] 몇몇 구체예에서, 이 방법은 세포 집단을 (i) 화학식 A의 화합물, 그의 입체이성질체, 그의 호변이성질체, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염, 용매화합물 또는 전구약물, 및 (ii) 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편(여기서 상기 항CD20 항체 또는 단편은 Fc-감마RIII (CD16)에 높은 친화도를 나타낸다)을 포함하는 조합물과 접촉시키는 것을 포함한다.

[0018] [0015] 몇몇 구체예에서, 이 방법은 세포 집단을 (i) 화학식 A의 화합물, 그의 입체이성질체, 그의 호변이성질체, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염, 용매화합물 또는 전구약물, 및 (ii) 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (여기서 상기 항체 또는 단편의 푸코스 함량은 65% 미만임)을 포함하는 조합물과 접촉시키는 것을 포함한다.

[0019] [0016] 몇몇 구체예에서, 이 방법은 세포 집단을the method comprises contacting the cell population with a combination comprising (i) 화학식 A의 화합물, 그의 입체이성질체, 그의 호변이성질체, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염, 용매화합물 또는 전구약물, 및 (ii) 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편 (여기서 상기 항체 또는 단편은 서열 SEQ ID NO:1, 2, 및 3의 VH CDR1, CDR2 및 CDR3 영역, 및 SEQ ID NO:6, 7, 및 8의 VL CDR1, CDR2 및 CDR3 영역 서열을 포함한다)을 포함하는 조합물과 접촉시키는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:4의 VH 및 SEQ ID NO:9의 VL을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 유플리톡시맵이다.

[0020] [0017] 몇몇 구체예에서, 화학식 A의 화합물은:

[0021] (RS)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온;

[0022] (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-

(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 또는

- [0023] (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온이다.
- [0024] [0018] 몇몇 구체예에서, 화학식 A의 화합물 (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온이다.
- [0025] [0019] 몇몇 구체예에서, 세포 집단의 증식을 억제하는 방법은 그 세포 집단을 (i) 적어도 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및 (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 화합물, 및 (ii) 적어도 1종의 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조합물과 접촉시키는 것을 포함한다..
- [0026] [0020] 몇몇 구체예에서, 세포 집단의 증식을 억제하는 방법은 그 세포 집단을 (i) 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및 (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물 및 (ii) 적어도 1종의 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 조합물과 접촉시키는 것을 포함하되, 여기서 상기 항CD20 항체 또는 그의 단편은 유플리톡시맙, 리톡시맙, 오파투무맙, 오크렐리주맙, 벨투주맙, GA101, AME-133v, PR0131921, 토시투모맙, hA20, 및 PR070769과 동일한 에피토프와 결합하는 항체 및 그의 단편으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것이다.
- [0027] [0021] 몇몇 구체예에서, 세포 집단을
- [0028] (i) 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온;
- [0029] (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및
- [0030] (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물, 및
- [0031] (ii) 항CD20 항체
- [0032] 를 포함하는 조성물과 접촉시킨다.
- [0033] [0022] 몇몇 구체예에서, 세포 집단을
- [0034] (i) 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온;
- [0035] (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및
- [0036] 1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물을 포함하는 제1 조성물, 및
- [0037] (ii) 항CD20 항체를 포함하는 제2 조성물
- [0038] 과 접촉시킨다.
- [0039] [0023] 몇몇 구체예에서, 세포 집단은 B 세포들을 포함한다.
- [0040] [0024] 몇몇 구체예에서, 세포 집단은 인간 대상자의 세포 집단이다.
- [0041] [0025] 몇몇 구체예에서, 대상자는 과도한 B 세포 증식과 연관된 질환 또는 장애를 앓는 대상자이다.

- [0042] 몇몇 구체예에서, 대상자는 암 환자이다. 몇몇 구체예에서, 암은 혈액암이다. 몇몇 구체예에서, 혈액암은 림프종 또는 백혈병이다. 몇몇 구체예에서, 혈액암은 급성 림프구 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 림프구 백혈병(CLL), 소림프구 림프종(SLL), 다발골수종 (MM), 비호지킨 림프종(NHL), 외투세포 림프종(MCL), 소포림프종, 발덴스트롬 마크로글루볼린혈증(WM), B 세포 림프종 및 광범위 큰 B 세포 림프종 (DLBCL)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 몇몇 구체예에서, 암은 CD20을 과발현한다. 몇몇 구체예에서, 암은 화학요법에 불응성인 것이다.

[0043] [0027] 몇몇 구체예에서, 대상자는 자가면역질환 또는 장애를 갖는 대상자이다. 몇몇 구체예에서, 자가면역질환 또는 장애는 알레르기성 비염, 천식, 만성폐쇄성 폐질환(COPD), 또는 류마티스 관절염이다.

[0044] [0028] 몇몇 구체예에서, 대상자는 리툽시맵에 대해 불응성인 대상자이다.

[0045] [0029] 몇몇 구체예에서, 대상자는 이전에 화학요법제, 리툽시맵, 또는 이들의 조합으로 치료된 적이 있는 대상자이다.

[0046] [0030] 몇몇 구체예에서, (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온 및 항CD20 항체 또는 단편은 순차적으로 투여된다.

[0047] [0031] 몇몇 구체예에서, (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온 및 항CD20 항체 또는 단편은 동시에 투여된다. 몇몇 구체예에서, (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온 및 항CD20 항체 또는 단편은 동일한 의약 조성물 내에 함유된다. 몇몇 구체예에서, (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온, 및 항CD20 항체 또는 단편은 별개의 서로 다른 의약 조성물들에 함유된다.

[0048] [0032] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 대상자에게 적어도 1종의 부가적인 치료제를 더 투여하는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 이러한 적어도 1종의 부가적인 치료제는 프로테아좀 억제제, 보르테조밐 (Velcade[®]), 카르필조밐 (PR-171), PR-047, 디술피람, 락타시스틴, PS-519, 에포네마이신, 에폭소마이신, 아클라시노마이신, CEP-1612, MG-132, CVT-63417, PS-341, 비닐 술폰 트리헵타이드 억제제, 리토나비어, PI-083, (+/-)-7-메틸로 무랄라이드, (-)-7-메틸로 무랄라이드, 레날리도마이드, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0049] [0033] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 방법은 대상자에게 적어도 2종의 부가적인 치료제를 더 투여하는 것을 포함하는데, 여기서 상기 적어도 2종의 부가적인 치료제는: a) CHOP (시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴, 프레드니손); b) R-CHOP (리툽시맵-CHOP); c) 하이퍼CV AD (파다분할 시클로포스파미드, 빈크리스틴, 독소루비신, 텍사메타손, 메토크세이트, 시타라빈); d) R-하이퍼CV AD (리툽시맵-하이퍼CV AD); e) FCM (플루다라빈, 시클로포스파미드, 미토잔트론); f) R-FCM (리툽시맵, 플루다라빈, 시클로포스파미드, 미토잔트론); g) 보르테조밐 및 리툽시맵; h) 템시롤리무스 및 리툽시맵; i) 템시롤리무스 및 Velcade[®] j) Iodine-131 토시투모밐 (Bexxar[®]) 및 CHOP; k) CVP (시클로포스파미드, 빈크리스틴, 프레드니손); l) R-CVP (리툽시맵-CVP); m) ICE (이포스파미드, 카르보플라틴, 에토포시드); n) R-ICE (리툽시맵-ICE); o) FCR (플루다라빈, 시클로포스파미드, 리툽시맵); p) FR (플루다라빈, 리툽시맵); 및 q) D.T. PACE (텍사메타손, 탈리도마이드, 시스플라틴, 아드리아마이신, 시클로포스파미드, 에토포시드)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0050] [0034] 몇몇 구체예에서, B 세포들을 고갈시키는(depleting) 방법이 제공된다. 몇몇 구체예에서, 이 방법은 B 세포들을 포함하는 조성물을 (i) 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및 (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 화학식 A의 화합물, 및 (ii) 적어도 1종의 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 것을 포함한다.

[0051] [0035] 몇몇 구체예에서, 세포자멸사(apoptosis)를 촉진하는 방법이 제공된다. 몇몇 구체예에서, 이 방법은 B 세포를 (i) 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및 (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및 (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 화학식 A의 화합물, 및 (ii) 적어도 1종의 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 것을 포함한다.

루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일) 에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 화학식 A의 화합물, 및 (ii) 적어도 1종의 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 것을 포함한다.

[0052] [0036] 몇몇 구체예에서, 세포-사이클 정지(cell-cycle arrest)를 촉진하는 방법이 제공된다. 몇몇 구체예에서, 이 방법은 세포를 (i) 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및 (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 화학식 A의 화합물, 및 (ii) 적어도 1종의 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 접촉시키는 것을 포함한다.

[0053] [0037] 몇몇 구체예에서, 화학식 A의 화합물 및 항CD20 항체 또는 단편은 순차적으로 전달된다.

[0054] [0038] 몇몇 구체예에서, 화학식 A의 화합물 및 항CD20 항체 또는 단편은 동시에 전달된다. 몇몇 구체예에서, 화학식 A의 화합물 및 항CD20 항체 또는 단편은 동일 조성물 내에서 전달된다. 몇몇 구체예에서, 화학식 A의 화합물 및 항CD20 항체 또는 단편은 별개의 다른 조성물들에서 전달된다.

[0055] [0039] 키트 역시도 제공된다. 몇몇 구체예에서, 키트는 (i) 화학식 A의 화합물, 그의 입체이성질체, 그의 호변 이성질체, 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염, 용매화합물 또는 전구약물, 및 (ii) 상기 화합물을 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 조합 사용하기 위한 지침서를 포함하되, 여기서 상기 항CD20 항체 또는 단편은 (a) 유블리투시맵과 동일한 에피토프에 결합하고, (b) Fc-감마RIII (CD16)에 대해 높은 친화도를 나타내거나, 또는 (c) 65% 미만의 푸코스 함량을 갖는 것이다.

[0056] [0040] 몇몇 구체예에서, 키트는

[0057] (i) 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온;

[0058] (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및

[0059] (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일) 에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 화합물, 및

[0060] (ii) 상기 화합물을 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편과 조합 사용하기 위한 지침서

[0061] 를 포함한다

[0062] [0041] 몇몇 구체예에서, 키트는 항CD20 항체 또는 단편을 포함한다.

[0063] [0042] 몇몇 구체예에서, 키트는:

[0064] (i) 적어도 1종의 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 및

[0065] (ii) 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온;

[0066] (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및

[0067] (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일) 에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 화합물과 항CD20 항체 또는 단편을 조합 사용하기 위한 지침서

[0068] 를 포함하되, 여기서 항CD20 항체 또는 그의 단편은 (a) 유블리투시맵과 동일한 에피토프에 결합하고, (b) Fc-감마RIII (CD16)에 대해 높은 친화도를 나타내거나, 또는 (c) 푸코스 함량이 65% 미만인 것이다.

[0069] [0043] 몇몇 구체예에서, 키트는

[0070] (i) 적어도 1종의 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편 및

- [0071] (ii) 항CD20 항체 또는 단편을, 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및 (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 1종의 화합물과 조합 사용하기 위한 지침서
- [0072] 를 포함한다.
- [0073] [0044] 몇몇 구체예에서, 키트는
- [0074] (i) 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온;
- [0075] (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및
- [0076] (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물, 및
- [0077] (ii) 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편
- [0078] 을 포함하되, 여기서 상기 항CD20 항체 또는 단편은 (a) 유블리투시맙과 동일한 에피토프에 결합하고, (b) Fc-감마RIII (CD16)에 대해 높은 친화도를 나타내거나, 또는 (c) 푸코스 함량이 65% 미만인 것이다.
- [0079] [0045] 몇몇 구체예에서, 키트는
- [0080] (i) 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온;
- [0081] (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및
- [0082] (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물, 및
- [0083] (ii) 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편
- [0084] 을 포함한다.
- [0085] [0046] 몇몇 구체예에서, 상기 항CD20 항체 또는 단편 및 화합물은 동일 조성물 내에 함유된다.
- [0086] [0047] 몇몇 구체예에서, 상기 항CD20 항체 또는 단편 및 화합물은 별도의 조성물 내에 함유된다.
- [0087] [0048] 몇몇 구체예에서, 키트는 1종 이상의 부가적인 활성화제를 더 포함한다.
- [0088] [0049] 의약 조성물 역시도 제공된다. 몇몇 구체예에서, 의약 조성물은
- [0089] (i) 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온;
- [0090] (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및
- [0091] (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물, 및
- [0092] (ii) 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편
- [0093] 을 포함한다.
- [0094] [0050] 몇몇 구체예에서, 의약 조성물은
- [0095] (i) 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-

(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온;

[0096] (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온; 및

[0097] (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일) 에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온으로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물, 및

[0098] (ii) 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편

[0099] 을 포함하되, 여기서 상기 항CD20 항체 또는 단편은 (a) 유블리투시맙과 동일한 에피토프에 결합하고, (b) Fc-감마RIII (CD16)에 대해 높은 친화도를 나타내거나, 또는 (c) 푸코스 함량이 65% 미만인 것이다.

[0100] 발명의 상세한 설명

[0101] I. 정의

[0102] [0063] 본 발명의 이해를 돕기 위해, 몇몇 용어와 표현들을 이하에 정의하였다.

[0103] [0064] "CD20" (B 림프구 CD20 항원, MS4A1, B 림프구 표면 항원 B1, Bp35, 백혈구 표면 항원 Leu-16이라고도 알려짐)이라는 용어는 달리 언급하지 않는 한, 천연 CD20을 지칭한다. "CD20"이라는 용어는 "전장(full-length)"의 프로세싱되지 않은 CD20 뿐만 아니라 당해 세포 내에서 프로세싱의 결과로 된 여하한 형태의 CD20도 모두 포괄한다. 이 용어는 또한 CD20의 자연발생적인 변이체, 예컨대, 스플라이스 변이체(splice variants), 대립유전자 변이체(allelic variants) 및 이소폼(isoforms)도 포괄한다. 본 명세서에 기재된 CD20 폴리펩타이드들은 인간의 조직이나 다른 소스와 같은 다양한 소스로부터 분리되거나 또는 재조합 방법 또는 합성 방법에 의해 분리될 수 있다. CD20 서열의 비제한적인 예로는 NCBI 레퍼런스 번호 NP_068769.2 및 NP_690605.1을 들 수 있다.

[0104] [0065] "항체"라는 용어는 면역글로불린 분자로서, 단백질, 폴리펩타이드, 펩타이드, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, 지질 또는 이들의 조합과 같은 표적을 인식하고, 그 면역글로불린 분자의 가변부 내의 적어도 하나의 항원 인식부를 통해 상기한 표적에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자를 의미한다. 본 명세서에서, "항체"라는 용어는 온전한(intact) 폴리클로날 항체, 온전한 모노클로날 항체, 항체 단편 (예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편), 단일 사슬 Fv (scFv) 돌연변이체, 다중특이 항체, 예컨대, 적어도 2개의 온전한 항체로부터 생성된 이중특이 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, 인간 항체, 어떤 항체의 항원결정부분을 포함하는 융합 단백질, 및 그 항체가 목적하는 생물학적 활성을 나타내는 한, 항원 인식자리를 포함하는 기타 변형된 면역글로불린 분자를 모두 포괄한다. 항체는 각각 α 델타, 엡실론, 감마, 및 뮤라고 칭해지는 중쇄 불변부 도메인의 아이덴티티에 기초하여 다음 5종의 주요 면역글로불린 클래스 중 어느 하나 일 수 있다: IgA, IgD, IgE, IgG, 및 IgM, 또는 그의 서브클래스(이소형) (예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2). 상이한 클래스의 면역글로불린들은 서로 다른 공지의 서브유닛 구조와 3차원 배열을 갖는다. 항체는 독소, 방사능동위원소, 단백질 등과 같은 다른 분자들과 컨쥬게이트되거나 단독(naked)일 수 있다.

[0105] [0066] "블로킹(blocking)" 항체 또는 "안타고니스트(antagonist)" 항체는 CD20과 같이 그것이 결합하는 항원의 생물학적 활성을 억제 또는 감소시키는 항체이다. 특정 구체예에서, 블로킹 항체 또는 안타고니스트 항체는 실제로 또는 완전히 그 항원의 생물학적 활성을 억제한다. 종기로는 생물학적 활성이 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 심지어 100% 감소되는 것이 바람직하다.

[0106] [0067] "항CD20 항체" 또는 "CD20에 결합하는 항체"라는 용어는 CD20을 표적화하는데 있어서 진단 및/또는 치료제로서 유용할 정도로 충분한 친화도로 CD20에 결합할 수 있는 항체를 의미한다. 항CD20 항체가 관련없는 비 CD20 단백질(non-CD20 protein)에 결합하는 정도는 예컨대 방사면역측정법 (RIA)에 의해 측정시, CD20에 대한 그 항체의 결합도의 약 10% 미만이다. 특정 구체예에서, CD20에 결합하는 항체는 ≤ 1 μM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, 또는 ≤ 0.1 nM의 해리상수(Kd)를 갖는다.

[0107] [0068] "항체 단편"이라는 용어는 온전한 항체의 일부로서 온전한 항체의 항원결정 가변영역을 지칭하는 것이다. 항체 단편의 비제한적인 예로는 Fab, Fab', F(ab')₂, 및 Fv 단편, 선형 항체, 단일사슬 항체 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이 항체를 들 수 있다.

[0108] [0069] "모노클로날 항체"라 함은 단일 항원결정기 또는 에피토프를 고도로 특이적으로 인식하고 이에 결합하는

균질한 항체 집단을 가리킨다. 이것은 일반적으로, 다양한 항원결정기에 지향된 여러가지 상이한 항체들을 포함하는 폴리클로날 항체와 대조되는 것이다. "모노클로날 항체"라는 용어는 온전한 그리고 전장의 모노클로날 항체 뿐만 아니라 항체 단편들(예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일 사슬(scFv) 돌연변이체, 항체 일부를 포함하는 융합 단백질, 및 항원 인식자리를 포함하는 여하한 기타의 변형된 면역글로불린 분자를 포괄한다. 또한, "모노클로날 항체"라 함은 하이브리도마, 파지 선별, 재조합 발현 및 트랜스제닉 동물을 비롯한 여러가지 방식에 의해 만들어진 항체들도 포함하며, 이에 한정되지 않는다.

[0109] [0070] "인간화 항체(humanized antibody)"라는 용어는 최소한의 비인간(예컨대 쥐(murine)) 서열을 함유하는 특이적인 면역글로불린 사슬, 키메라 면역글로불린 또는 그의 단편인 비인간) 항체이다. 일반적으로, 인간화 항체는 상보성 결정영역(CDR: complementary determining region)으로부터의 잔기들이, 소망하는 특이성, 친화도 및 기능을 갖는 비인간 종 (예컨대, 마우스, 래트, 토끼, 햄스터)의 CDR로부터의 잔기들에 의해 대체된 인간의 면역글로불린이다(Jones 등, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann 등, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen 등, *Science*, 239:1534-1536 (1988)). 몇몇 사례에서, 인간 면역글로불린의 Fv 프레임워크 영역(framework region: FR) 잔기들이, 소망되는 특이성, 친화도 및 기능을 갖는 비인간 종으로부터의 항체들 중 대응하는 잔기들에 의해 대체된다. 인간화된 항체를 Fv 프레임워크 영역 및/또는 대체된 비인간 잔기들 중의 부가적인 잔기들의 치환에 의해 추가로 변형시켜 항체 특이성, 친화도 및/또는 기능을 더욱 정제 및 최적화시킬 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 비인간 면역글로불린에 대응하는 CDR 영역을 모두 또는 실제로 모두 함유하는 가변부 도메인 적어도 1개 및 일반적으로 2 또는 3개를 실제로 전부 포함하는 반면, 실제로 모든 FR 영역들은 인간화 면역글로불린 컨센서스 서열의 것들이다. 인간화 항체는 또한, 일반적으로 인간 면역글로불린의, 면역글로불린 불변부 또는 불변 도메인(Fc)을 포함할 수도 있다. 인간화 항체를 만드는데 이용되는 방법의 예는 미국특허 5,225,539 또는 5,639,641에서 찾아볼 수 있다.

[0110] [0071] 항체의 "가변부(variable region)"라 함은 단독 또는 조합 상태의 항체 경쇄의 가변부 또는 항체 중쇄의 가변부를 가리킨다. 중쇄와 경쇄 가변부들은 각각 하이퍼가변부라고도 알려져 있는 3개의 상보성 결정영역(CDRs)에 의해 연결된 4개의 프레임워크 영역(FR: framework regions)으로 이루어져 있다. 각 사슬의 CDR들은 FR에 의해 서로 인접되게 유지되며, 다른 사슬로부터의 CDR들은 항체의 항원-결정부의 형성에 기여한다. CDR을 결정하는 데는 적어도 다음과 같은 2 가지 기술이 있다: (1) 교차-종 서열 다양성에 기초한 접근법(즉, Kabat 등, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)); 및 (2) 항원-항체 복합체의 결정그래프 연구에 기초한 접근법(Al-lazikani 등 *J. Molec. Biol.* 273:927-948 (1997)). 이에 더해, 기술분야에서는 CDR을 결정하기 위해 이들 두 가지 접근법의 조합을 이용하기도 한다.

[0111] [0072] 카바트(Kabat) 넘버링 시스템은 가변 도메인의 잔기(경쇄의 약 1-107 잔기 및 중쇄의 1-113 잔기)를 가리킬 때 일반적으로 사용된다(예컨대, Kabat 등, *Sequences of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[0112] [0073] Kabat에서와 같은 아미노산 위치 넘버링은 Kabat 등의 문헌 [*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)]에서 항체 컴필레이션의 중쇄 가변 도메인 또는 경쇄 가변 도메인에 대해 사용된 넘버링 시스템이다. 이 넘버링 시스템을 이용하면, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 도메인의 FR 또는 CDR의 단축 또는 CDR로의 삽입에 대응하는 보다 적거나 많은 아미노산을 함유할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변부 도메인은 H2의 잔기 52 후에 단일 아미노산 삽입체(Kabat에 따른 잔기 52a) 및 중쇄 FR 잔기 82 후에 삽입된 잔기 (예컨대, Kabat에 따른 잔기 82a, 82b, 및 82c 등)을 포함할 수 있다. 잔기들의 Kabat 넘버링은 당해 항체의 서열의 상동성 영역을 "스탠다드" Kabat 넘버링된 서열과 정렬시킴으로써 주어진 항체에 대해 결정할 수 있다. 코티아(Chrothia)는 구조적 루프의 위치에 대해 대신 언급한 바 있다(Chothia 및 Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Kabat 넘버링 컨벤션을 이용하여 넘버링된 경우 Chothia CDR-H1 루프의 말단은 루프의 길이에 따라 H32와 H34 사이에서 변화한다 (이것은 Kabat 넘버링 방식이 H35A와 H35B에 삽입을 설정하기 때문이다; 만일 35A와 35B 중 어느 것도 존재하지 않을 경우, 루프는 32에서 종결되며; 35A만이 존재할 경우, 루프는 33에서 종결되고; 35A 및 35B가 두 가지 모두 존재할 경우, 루프는 34에서 종결된다). AbM 하이퍼가변부들은 Kabat CDR과 Chothia 구조 루프 사이에 어떤 타협점(compromise)을 나타내며, Oxford Molecular's AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 이용된다.

Loop	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B (Kabat Numbering)	H26-H32..34
H1	H31-H35	H26-H35 (Chothia Numbering)	H26-H32
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0113]

[0114]

[0074] "인간 항체(human antibody)"라는 용어는 인간에 의해 생산된 항체 또는 공지의 기술에 의해 만들어진, 인간에 의해 생산된 항체에 대응하는 아미노산 서열을 갖는 항체를 의미한다. 인간 항체의 이 정의에는 온전하거나 또는 전장 항체, 그의 단편 및/또는 예컨대 쥐의 경쇄 및 인간 중쇄 폴리펩타이드를 포함하는 항체와 같이, 적어도 하나의 인간 중쇄 및/또는 경쇄 폴리펩타이드를 포함하는 항체가 포함된다.

[0115]

[0075] "키메라 항체(chimeric antibodies)"라는 용어는 면역글로불린 분자의 아미노산 서열이 2 가지 이상의 종(species)으로부터 유래한 항체를 가리킨다. 전형적으로, 경쇄 및 중쇄 두 가지 모두의 가변부는 소망되는 특이성, 친화도, 및 기능을 갖는 한 가지 포유동물 종 (예컨대, 마우스, 래트, 토끼 등)으로부터 유래된 항체들의 가변부에 대응하는 한편, 불변부는 그 종에서 면역반응 도출을 회피하기 위해 다른 종(대개 인간)으로부터 유래된 항체 중의 서열과 상동적이다.

[0116]

[0076] "에피토프" 또는 "항원결정기"라는 용어는 본 명세서에서 호환적으로 사용되며 특정 항체에 의해 인식 및 특이적으로 결합할 수 있는 항원 부분을 가리킨다. 항원이 폴리펩타이드인 경우, 에피토프는 단백질의 3차 폴딩에 의해 병치된(juxtaposed) 인접 아미노산과 비인접 아미노산의 양자로부터 형성될 수 있다. 인접 아미노산들로부터 형성된 에피토프들은 일반적으로 단백질 변성 시에도 유지되는 반면, 3차위너 폴딩에 의해 형성된 에피토프들은 일반적으로 단백질 변성시 소실된다. 일반적으로 에피토프는 독특한 공간 배치로 적어도 3개, 보다 일반적으로는 적어도 5개 또는 8 내지 1개의 아미노산을 포함한다.

[0117]

[0077] "결합 친화도(Binding affinity)"는 일반적으로 어떤 분자 (예컨대, 항체)의 단일 결합 자리와 그의 결합 파트너(예컨대, 항원) 간의 비공유 상호반응의 총합 강도를 칭한다. 본 명세서에서 달리 언급되지 않는 한, "결합 친화도"는 결합쌍 (예컨대, 항체와 항원)의 멤버들 간의 1:1 상호반응을 반영하는 고유한 결합 친화도를 가리킨다. 분자 X의 그의 파트너 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리상수(Kd: dissociation constant)로 나타낼 수 있다. 친화도는 본 명세서에 설명된 것들을 포함하여, 기술분야에 공지인 방법에 의해 측정될 수 있다. 저친화도 항체는 일반적으로 항원에 천천히 결합하고 쉽게 해리되는 반면, 고친화도 항체는 일반적으로 항원에 빨리 결합하고 보다 오래 결합된 채로 유지된다. 결합 친화도를 측정하는 다양한 방법이 기술분야에 알려져 있으며, 본 발명에서는 이러한 공지 방법을 어떤 것이든 사용할 수 있다. 이하에서는 설명 목적을 위해 특정한 방법을 들어 설명한다.

[0118]

[0078] 본 명세서에서 "또는 그보다 우수한(or better)"라는 용어가 결합 친화도와 관련하여 사용될 경우, 이는 어떤 분자와 그의 결합 파트너 사이에 보다 강한 결합을 지칭하는 것이다. 본 명세서에서 사용될 경우 "또는 그보다 우수한"은 보다 작은 수치의 Kd 값에 의해 표시되는, 보다 강한 결합을 가리킨다. 예를 들어, "0.6 nM 또는 그보다 우수한"의 항원에 대한 친화도를 갖는 항체에서, 항원에 대한 그 항체의 친화도는 <0.6 nM, 즉, 0.59 nM, 0.58 nM, 0.57 nM 등이거나, 0.6 nM 미만의 여하한 값을 가리키는 것이다.

[0119]

[0079] 본 명세서에서 "실질적으로 유사한(substantially similar)," 또는 "실질적으로 동일한(substantially the same)"이라는 표현은 2개의 숫자 간에 충분히 높은 정도의 유사성이 있음을 가리키는 것으로서, 통상의 기술자가 이들 2 값 간의 차이가 거의 없거나 또는, 상기 값들 (예컨대 Kd 값)에 의해 측정되는 생물학적 특징의

맥락에서, 생물학적 및/또는 통계적 유의성이 전혀 또는 거의 없다고 간주하는 정도를 의미한다. 상기 2개의 값들 간의 차이는 레퍼런스/컴퍼레이터(comparator) 항체에 대한 값의 함수로서 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 또는 약 10% 미만이다.

- [0120] [0080] "분리된(isolated)" 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 세포, 또는 조성물은 자연에서는 발견되지 않는 형태의 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 세포, 또는 조성물이다. 분리된 폴리펩타이드, 항체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 세포 또는 조성물에는 더이상 자연에서 발견되지 않는 형태까지의 정도로 정제된 것들이 포함된다. 몇몇 구체예에서, 분리된 항체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 세포, 또는 조성물은 실질적으로 순수하다.
- [0121] [0081] 본 명세서에서, "실질적으로 순수한" 이라 함은 물질이 적어도 50% 순수한 것 (즉, 오염물질이 없는 것), 적어도 90% 순수한 것, 적어도 95% 순수한 것, 적어도 98% 순수한 것, 또는 적어도 99% 순수한 것을 가리킨다
- [0122] [0082] "암" 및 "암성(cancerous)"라는 용어는 포유동물에 있어서 세포 집단이 제어되지 않은 세포 성장에 의해 특징지어지는 생리학적 상태를 가리키거나 설명하는것이다. 암의 예로는 암종, 림프종, 모세포종, 육종 및 백혈병을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 이러한 암의 보다 특별한 예로는 편평세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평암종, 복막암, 감세포암, 위장관암, 췌장암, 교모세포종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간암종, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘암종, 신장암, 간암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 간암종 및 다양한 종류의 두경부암을 들 수 있다.
- [0123] [0083] "종양" 및 "신생물(신생물)"이라 함은 양성(비암성)이건 악성(암성)이건, 전암성 병변을 포함하여, 과도한 세포 성장 또는 증식의 결과에 기인하는 조직 덩어리를 가리킨다.
- [0124] [0084] "암세포", "종양세포" 및 문법상 동의어는 종양 세포 집단 벌크를 포함하는 비종양원성 세포 및 종양원성 줄기세포(암줄기세포) 양자를 모두 포함하는, 종양 또는 전암성 병변으로부터 유래하는, 세포들의 총 집단을 가리킨다. 본 명세서에서, "종양세포"라는 용어는, 암줄기 세포로부터 종양세포를 식별하기 위해 재생(renew) 및 분화시키는 능력이 결여된 종양 세포만을 칭할 경우
- [0125] 비종양원성(non-tumorigenic)"이라는 용어에 의해 변형될 것이다.
- [0126] [0085] "대상자(subject)"라는 용어는 특정 치료를 받을 수혜자를 가리키는 것으로, 여기에는 인간, 비인간 영장류, 설치류 등과 같은 동물(예컨대 포유동물)이 포함되나 이에 한정되지 않는다. 일반적으로, "대상자" 및 "환자"는 본 명세서에서 인간 대상자에 관한 한 호환적으로 사용된다.
- [0127] [0086] 세포 "집단(population)"이라는 용어는 단일 세포 또는 복수개의 세포를 칭하는 것일 수 있다. 세포 또는 세포들은 배양체 중의 세포이거나 장기 중의 세포일 수 있다. 예를 들어, 세포 집단은 대상자 또는 환자일 수 있다.
- [0128] [0087] "의약 포물레이션(pharmaceutical formulation)"이라는 용어는 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이 되도록 하여하는 형태로 존재하고, 그 포물레이션이 투여될 대상자에게 허용되지 않을 정도의 독성을 일으키는 부가적인 성분을 전혀 함유하지 않는 형태의 조제물을 가리킨다. 이러한 포물레이션은 멸균된 것일 수 있다.
- [0129] [0088] 본 명세서에서 항체의 "유효량"이라 함은 특정하게 진술된 목적을 수행하는데 충분한 양을 가리킨다. "유효량"은 천명된 목적에 대해, 실험적으로 그리고 일상적인 방식으로, 결정될 수 있다.
- [0130] [0089] "치료적 유효량(therapeutically effective amount)"이라는 용어는 대상자 또는 포유동물의 질환 또는 장애를 "치료"하는데 효과적인 항체 또는 기타 약물의 양을 가리킨다. 암의 경우, 약물의 치료적 유효량은 암세포 수; 종양 크기를 감소시킬 수 있고; 주변 조직 내로의 암세포의 침윤을 억제(즉, 어느 정도까지 둔화시키고 특정 구체예에서 중단시킴)할 수 있으며; 종양 전이를 억제(즉, 어느 정도까지 둔화시키고 특정 구체예에서 중단시킴)할 수 있으며; 종양의 성장을 어느 정도까지 억제하며; 및/또는 암과 관련된 1 이상의 증상을 어느 정도까지 완화시킬 수 있다. 본 명세서의 "치료(treating)"에 대한 정의를 참조할 것. 약물이 기존의 암세포의 성장을 예방 및/또는 사멸시킬 수 있는 한도까지 이것은 세포증식억제(cytostatic) 및/또는 세포독성(cytotoxic)일 수 있다. "예방적 유효량(prophylactically effective amount)" 이라 함은 소망되는 예방학적 결과를 달성하는데 필요한 기간 동안 효과적인 투여량을 가리킨다. 예방학적 투여량은 질병 발병 전 또는 초기 단계에서 대상자에게 사용되는 것이므로, 반드시 그러한 것은 아니지만, 일반적으로 예방학적 유효량은 치료적 유효량에 비해 적을 것이다.

- [0131] [0090] "치료하는" 또는 "치료" 또는 "치료하다" 또는 "경감하는" 또는 "경감하다" 등의 용어는 1) 증상을 치유, 둔화, 경감 및/또는 진단된 병리학적 상태 또는 장애의 진행을 중단시키는 치료적 수단과 2) 표적이 되는 병리학적 상태 또는 장애의 발달을 예방 및/또는 둔화시키는 예방학적 또는 예방적 수단이라는 두 가지 모두를 아우르는 것이다. 따라서, 치료를 필요로 하는 대상자들은 이미 질환에 걸린 자; 질환에 걸리기 쉬운 자; 및 질환이 예방되고자 하는 자를 모두 포괄한다. 특정 구체예에서, 만일 대상자가 다음 중 한 가지 이상을 나타낼 경우 그 대상자는 본 발명의 방법에 따라 암이 성공적으로 "치료된" 것이며, 하기 각각은 National Cancer Institute and the U.S. Food and Drug Administration for the approval of new drugs. See Johnson 등, *J. Clin. Oncol.* 21(7):1404-1411 (2003)에 의해 제시된 스탠다드에 의해 측정되는 것이다: 카케시아(cachexia)의 감소, 생존시간 연장, 종양 진행까지 걸리는 시간의 지연, 종양 덩어리의 감소, 종양 부담(burden)의 감소 및/또는 종양 전이, 종양 재발까지 걸리는 시간의 연장, 종양 반응, 완전한 반응, 부분적 반응, 안정한 질병, 진행성 질병, 무진행 생존 (pregression free survival:PFS), 전체생존(overall survival: OS).
- [0132] [0091] 항CD20 항체와 PI3K δ 선택적 억제제와의 "조합(combination)"은 본 명세서에 정의된 바와 같은 항CD20 항체 또는 그의 단편 및 화합물과 동일 세포 집단 또는 동일 대상자에게 동시, 순차 또는 동시적 그리고 순차적 양자 모두로 투여되도록 의도된 본 발명에 정의된 바와 같은 화합물 A를 가리킨다. 따라서, 예를 들어, 화합물 A의 투여 전 또는 투여 후 (예컨대 시간, 일, 주일, 또는 개월 간격으로) 항CD20 항체 또는 그의 단편을 투여하는 것은 항CD20 항체 또는 그의 단편과 화합물 A의 조합을 투여하는 것을 구성하는 것이다. 이에 더해, 항CD20 항체 또는 그의 단편과 화합물 A의 동시 투여 역시도, 항CD20 항체 또는 그의 단편과 화합물 A가 단일 의약 포물레이션 내에서 함께 투여되는지 또는 별개 의약 포물레이션들로서 동일 또는 상이한 투여 경로에 의해 동시 투여되는지와 관계없이, 항CD20 항체 또는 그의 단편과 화합물 A의 조합의 투여를 구성하는 것이다.
- [0133] [0092] 항CD20 항체를 이용한 치료에 대해 "반응하지 않거나", "잘 반응하지 않거나", 또는 "난치성(refractory)"인 종양은 인식된 동물 모델 또는 인간 임상시험에서 무처리군 또는 위약 치료군과 비교할 때 항CD20 항체 치료에 대한 반응에 있어서 통계적으로 유의한 개선을 나타내지 않는 종양이거나 또는 항CD20 항체를 이용한 초기 치료에 대해 반응하지만 치료가 지속됨에 따라 성장하는 종양을 가리킨다.
- [0134] [0093] 항CD20 항체에 대한 종양 또는 세포 유형의 반응 능력은 Raji 또는 Wi12-S와 같은 실험실 세포주, 또는 환자 도너 세포주를 이용하여 검사할 수 있다. 이에 더해, 예컨대, 환자로부터의 전혈에서 B 세포 고갈 분석을 이용하여 활성을 측정할 수 있다.
- [0135] [0094] "폴리뉴클레오타이드" 또는 "핵산"은 본 명세서에서 호환적으로 사용되는 용어로서, 임의 길이의 뉴클레오타이드 폴리머를 가리키며 여기에는 DNA 및 RNA가 포함된다. 뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드, 리보뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드 또는 염기, 및/또는 그의 유사체일 수 있고 또는 DNA 폴리머라제 또는 RNA 폴리머라제에 의해 폴리머 내로 병합될 수 있는 여하한 기질을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 메틸화 뉴클레오타이드 및 그의 유사체와 같은 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 존재할 경우, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 폴리머 조립 전 또는 후에 이루어질 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비뉴클레오타이드 성분에 의해 간섭될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 예컨대 라벨링 성분에 의한 컨쥬게이션에 의해, 중합 후 더 변형될 수 있다. 그 밖의 변형 유형으로는 예컨대 하나 이상의 자연발생적인 뉴클레오타이드를 예컨대 전하를 띄지 않는 결합을 갖는 것들 (예컨대 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포아미데이트, 카바메이트 등) 및 전하를 띄는 결합을 갖는 것들 (예컨대 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등), 펜던트 모이어티를 함유하는 것들 예컨대 단백질 (예컨대, 뉴클리아제, 독소, 항체, 시그널 펩타이드, pLy-L-라이신 등), 인터칼레이터를 갖는 것들 (예컨대, 아크리딘, 소랄렌 등), 킬레이터를 함유하는 것들 (예컨대, 금속, 방사능 금속, 붕소, 산화성 금속 등), 알킬레이터를 함유하는 것들, 변형된 결합을 함유하는 것들 (예컨대 α 노머 핵산 등), 및 폴리뉴클레오타이드(들)의 비변형 형태로 "캡(caps)" 치환하는 것이 포함된다. 또한, 당 내에 일반적으로 존재하는 히드록실기들은 예컨대 포스포네이트기, 포스포에이트기에 의해 대체되거나, 표준 보호기에 의해 보호되거나 또는 부가적인 뉴클레오타이드에 대한 부가적 결합을 제공하기 위해 활성화되거나, 또는 고체 지지체에 컨쥬게이트될 수도 있다. 5' 및 3' 말단 OH는 인산화되거나 또는 아민이나 1 내지 20개의 탄소 원자를 갖는 유기 캡핑기 모이어티로 치환될 수 있다. 그 밖의 히드록실 역시도 표준 보호기로 유도될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드들은 또한 예컨대, 2'-O-메틸-, 2'-O-알릴, 2'-플루오로- 또는 2'-아지도-리보스, 카르복실 당 유사체, α 노머 당, 에피머 당 예컨대 아라비노스, 자일로스 또는 릭소스, 피라노스 당, 퓨라노스 당, 세도헥톨로스, 비환상(acyclic) 유사체 및 무염기(abasic) 뉴클레오타이드 유사체 예컨대 메틸 리보사이드를 비롯한, 기술 분야에 일반적으로 알려진 리보스 또는 데옥시리보스 당류의 유사체 형태를 함유할 수도 있다. 하나 이상의 포스포디에스테르 결합은 대체 결합기에 의해 대체될 수 있다. 이들 대체 결합기들의 비제한적인 예로는, 포스페

이트가 P(O)S ("티오에이트"), P(S)S ("디티오에이트"), (O)NR₂ ("아미테이트"), P(O)R, P(O)OR', CO 또는 CH₂ ("포름아세탈")에 의해 대체된 구체예를 들 수 있으며, 상기 각 R 또는 R'은 독립적으로 H이거나 또는 치환 또는 비치환된 알킬(1-20 C)이고, 이들은 에테르(-O-) 결합, 아릴, 알케닐, 시클로알킬, 시클로알케닐 또는 알르알딜을 함유할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 내의 모든 결합이 동이할 필요는 없다. 전술한 내용은 RNA와 DNA를 비롯하여 본 명세서에 언급되는 모든 폴리뉴클레오타이드에 대해 적용된다.

[0136] [0095] "벡터"라는 용어는 숙주 세포에서 하나 이상의 유전자(들) 또는 서열(들)을 전달 및 발현할 수 있는 구조체를 의미한다. 벡터의 예로는 바이러스 벡터, 네이키드(naked) DNA 또는 RNA 발현 벡터, 플라스미드, 코스미드 또는 파지 벡터, 양이온 축합제와 관련된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 리포좀 내에 캡슐화된 DNA 또는 RNA 발현 벡터, 및 프로듀서 세포와 같은 어떤 진핵 세포들을 들 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0137] [0096] "폴리펩타이드," "펩타이드," 및 "단백질"은 본 명세서에서 여하한 길이의 아미노산 폴리머를 가리키는 데 호환적으로 이용되는 용어들이다. 상기 폴리머는 선형 또는 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있으며, 비아미노산(non-amino acids)에 의해 개재될 수 있다. 이 용어는 또한 자연적으로 변형되거나 또는 개재: 예컨대, 디설파이드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화 또는 그 밖의 조작 또는 변형, 예컨대 라벨링 요소와의 컨주게이션에 의한 개재에 의해 변형된 아미노산 폴리머를 포괄한다. 이 정의에는 또한, 예컨대, 아미노산(예컨대 비자연적 아미노산 등이 포함됨)의 유사체를 하나 이상 함유하는 폴리펩타이드 뿐만 아니라, 기술분야에 공지인 기타 변형된 폴리펩타이드도 포함된다. 본 발명의 폴리펩타이드는 항체에 기반한 것이므로, 특정 구체예에서, 폴리펩타이드는 단일 사슬 또는 연합(associated) 사슬로서 발생할 수 있다.

[0138] [0097] 2 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드와 관련하여 "동일(identical)" 또는 퍼센트 "동일성"이라는 용어는 용어는 최대의 대응성으로 비교 및 정렬될 경우 서로 동일한 2 이상의 서열 또는 서브서열을 가리키거나 또는 서로 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기의 특정 백분율을 가리키는 것으로, 서열 동일성의 일부로서 보존적 아미노산 치환은 고려하지 않는다. 퍼센트 동일성은 서열 비교 소프트웨어 또는 알고리즘을 이용하거나 또는 육안 검사에 의해 측정가능하다. 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열 정렬을 위한 다양한 알고리즘과 소프트웨어가 기술분야에 알려져 있다. 이러한 서열 정렬 알고리즘의 비제한적인 한가지 예로는 문헌 [Karlin 등, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2264-2268 (1990), Karlin 등, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:5873-5877 (1993), 및 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 (Altschul 등, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1991)에 병합된 것)에 설명된 것을 들 수 있다. 특정 구체예에서, Gapped BLAST를 Altschul 등, *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402 (1997)에 설명된 바에 따라 사용할 수 있다. BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul 등, *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996)), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, California) 또는 Megalign (DNASTAR)은 서열 정렬을 위해 사용가능한 또 다른 공개적으로 이용가능한 소프트웨어 프로그램이다. 특정 구체예에서, 2개의 뉴클레오타이드 서열 간의 퍼센트 동일성은 GCG 소프트웨어의 GAP 프로그램을 이용하여 결정한다 (예컨대, NWSgapdna.CMP 매트릭스 및 갭 중량 40, 50, 60, 70, 또는 90 및 길이 중량 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6을 이용). 특정한 대체 구체예에서, Needleman 및 Wunsch (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970))의 알고리즘에 병합된 GCG 소프트웨어 패키지의 GAP 프로그램을 이용하여 2개의 아미노산 서열 간의 퍼센트 동일성을 구할 수 있다 (예컨대, Blossum 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스를 이용하고, 갭 중량 16, 14, 12, 10, 8, 6, 또는 4 및 길이 중량 1, 2, 3, 4, 5를 이용). 별법으로, 특정 구체예에서, 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열 간의 퍼센트 동일성은 Myers 및 Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)) 알고리즘을 이용하여 결정할 수 있다. 예를 들어, 퍼센트 동일성은 ALIGN 프로그램 (버전 2.0) 및 PAM120을 이용하되, 잔기 표, 갭 길이 페널티 12 및 갭 페널티 4로 설정하여 구할 수 있다. 통상의 기술자는 특정한 정렬 소프트웨어에 의한 최대 정렬을 위한 적절한 파라미터들을 결정할 수 있다. 특정 구체예에서, 정렬 소프트웨어의 디폴트 파라미터가 사용된다. 특정 구체예에서, 제2 아미노산 서열에 대한 제1 아미노산 서열의 퍼센트 동일성 "X"는 100 x (Y/Z)로 계산되는데, 여기서 Y는 제1 서열과 제2 서열 정렬시 동일하게 매치된 (육안 검사 또는 특정 서열 정렬 프로그램에 이용함) 아미노산 잔기들의 수를 나타내고 Z는 제2 서열 중의 잔기들의 총 수를 나타낸다. 제1 서열의 길이가 제2 서열보다 길면, 제2 서열에 대한 제1 서열의 퍼센트 동일성은 제1 서열에 대한 제2 서열의 퍼센트 동일성보다 길 것이다.

[0139] [0098] 비제한적인 예로서 특정 구체예에서, 어떤 특정 폴리뉴클레오타이드가 레퍼런스 서열에 대해 특정 퍼센트의 서열 동일성 (예컨대, 적어도 80% 동일, 적어도 85% 동일, 적어도 90% 동일 및 몇몇 구체예에서, 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 동일)을 갖는지 아닌지 여부를, Bestfit 프로그램 (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)을 이용하여 알아낼 수 있다. Bestfit은 Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2: 482-489 (1981)의 로컬 상동성 알고리즘을 이용하여, 2개의 서열 간의 최상의 상동성 세그먼트

를 찾아낸다. 특정 서열이 예컨대 본 발명에 따른 레퍼런스 서열에 대해 95% 동일성을 갖는지를 알아보기 위해, Bestfit 또는 그 밖의 서열 정렬 프로그램을 사용할 경우, 서열 동일성은 레퍼런스 뉴클레오타이드 서열에 전장에 대해 계산되고 레퍼런스 서열 중의 뉴클레오타이드의 총 갯수의 최대 5% 이내로 상동성 갭이 허용되도록 파라미터가 설정된다.

- [0140] [0099] 몇몇 구체예에서, 본 발명의 2개의 핵산 또는 폴리펩타이드들은 실제로 동일한데, 이는, 서열 비교 알고리즘 또는 육안 검사에 의해 측정되는 바와 같이 최대 대응hel도록 비교 정렬될 경우, 이들이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 및 몇몇 구체예에서 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기 동일성을 가짐을 의미한다. 특정 구체예에서, 길이가 적어도 약 10, 약 20, 약 40-60 개 잔기 또는 그 사이의 정수 값의 서열 영역에 걸쳐 동일성이 존재하거나 또는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 실제로 동일한 서열, 예컨대 뉴클레오타이드 서열의 코딩 영역이 존재한다..
- [0141] [0100] "보존적 아미노산 치환"이라 함은 하나의 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 다른 아미노산 잔기에 의해 대체되는 것을 말한다. 유사한 측쇄들을 갖는 아미노산 잔기들의 패밀리가 기술 분야에 정의되어 있으며, 여기에는 염기성 측쇄 (예컨대, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예컨대, 아스파르트산, 글루탐산), 하전되지 않은 극성 측쇄 (예컨대, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 스레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예컨대, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예컨대, 스레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄 (예컨대, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)이 포함된다. 예를 들어, 티로신을 페닐알라닌으로 치환하는 것은 보존적 치환이다. 특정 구체예에서, 본 발명의 폴리펩타이드 및 항체 서열에 있어서 보존적 치환은 그 아미노산 서열을 함유하는 폴리펩타이드 또는 항체의, 그 폴리펩타이드 또는 항체가 결합하는 항원(들), 즉 FOLR1에 대한 결합을 망치지 않는다. 항원 결합을 제거하지 않는 뉴클레오타이드 및 아미노산 보존적 치환을 동정하는 방법은 기술분야에 잘 알려져 있다 (예컨대, Brummell 등, *Biochem. 32*: 1180-1 187 (1993); Kobayashi 등 *Protein Eng. 12*(10):879-884 (1999); 및 Burks 등 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94*: 412-417 (1997) 참조).
- [0142] [00101] 본 명세서에 나타난 모든 재료의 양, 비율, 재료의 물리적 특성 및/또는 용도는 달리 명시되지 않는 한 "약"이라는 단어에 의해 변경가능한 것으로 이해되어야 한다. "약"이라는 용어가 숫자 또는 수치 범위에 대해 사용될 경우 그 숫자 또는 수치 범위는 실험적 다양성 (또는 통계적 실험 오차)이내의 근사치이며, 따라서 그 숫자 또는 수치 범위는 예컨대 명시된 숫자 또는 수치 범위의 1% 내지 15% 이내에서 변할 수 있다.
- [0143] [00102] 본 발명의 화합물은 하나 이상의 비대칭 중심(키랄 중심)을 가질 수 있으며 따라서 에난티오머, 부분입체이성질체 및 절대 입체화학 관점에서, (R)- 또는 (S)-로서 정의될 수 있는 기타 입체이성질체 형태로 발생할 수 있다.. 본 발명의 개시 내용은 이러한 가능한 모든 형태 뿐만 아니라, 이들의 라세미 형태 및 분할된 형태 그리고 혼합물도 포괄한다. 개별적인 에난티오머들은 본 명세서의 개시내용을 참조로 공지 기술에 따라 분리될 수 있다.
- [0144] [00103] 본 명세서에서, "입체이성질체"라는 용어는 개별적인 분자들에 있어서 공간에서의 그의 원자들의 배향에서만 차이가는 모든 이성질체들을 가리키는 일반적 용어이다. 여기에는 에난티오머 및 서로 거울상 이미지가 아닌 두 개 이상의 키랄 중심을 갖는 화합물들의 이성질체가 포함된다 (부분입체이성질체).
- [0145] [00104] "키랄 중심(chiral center)"이라 함은 4개의 서로 다른 기가 결합되어 있는 탄소 원자를 가리킨다.
- [0146] [00105] "에난티오머(enantiomer)" 및 "에난티오머의(enantiomeric)"라는 용어는 그의 거울상 이미지가 포개지지 않음으로 해서, 그 에난티오머가 한 방향의 편광면에서 회전할 경우 광학 활성적이고 그의 거울상 이미지 화합물이 반대 방향으로 편광면에서 회전하는 것을 말한다.
- [0147] [00106] "라세믹(racemic)"이라 함은 에난티오머의 동등한 부분들의 혼합물을 가리키는 것으로서 그 혼합물은 광학적으로 불활성적이다.
- [0148] [00107] "분할(resolution)"이라 함은 어떤 분자의 2개의 에난티오머 형태들 중 하나의 분리, 농축 또는 고갈을 가리킨다.
- [0149] [00108] 본 명세서는 본 발명의 화합물의 용매화합물을 포괄한다. 용매화합물들은 일반적으로 당해 화합물의 물리적 활성이나 독성을 유의적으로 변경시키지 않으며, 그에 따라, 약리학적 동등물로서 기능할 수 있다. 본 명세서에서 "용매화합물"이라는 용어는 용매 분자와 용매 분자와 본 발명 화합물의 비율이 예컨대 각각 약 2:1, 약 1:1 또는 약 1:2인 이용매화합물, 일용매화합물 또는 반용매화합물과 같이, 본 발명의 화합물이 용매 분자와 조합, 물리적 결합 및/또는 용매화된 것을 의미한다. 이 물리적 회합은 수소 결합을 비롯하여 이온결합 및 공유

결합의 정도를 변화시키는 것을 포함한다. 특정 사례에서, 용매화합물은 예컨대 하나 이상의 용매 분자가 결정성 고체의 결정 격자 내로 혼입되는 경우, 분리될 수 있다. 따라서, "용매화합물"은 용액상(solution-phase) 및 분리가능한 용매화합물 양자 모두를 포괄한다. 본 발명의 화합물은 예컨대 물, 메탄올, 에탄올 등과 같은 약학적으로 허용가능한 용매와 함께 용매화된 형태로서 제시될 수 있으며, 본 발명은 본 발명 화합물의 용매화된 형태와 용매화되지 않은 형태 양자 모두를 포괄한다. 용매화합물의 한 가지 유형은 수화물이다. "수화물"이라 함은 용매 분자가 물인 용매화합물의 특정한 서브그룹에 관련된 것이다. 용매화합물들은 일반적으로 약학적 동등물로서 기능할 수 있다. 용매화합물의 제조에 관하여는 기술분야에 알려져 있다. 예컨대, M. Caira 등, *J. Pharmaceut. Sci.*, 93(3):601-611 (2004); E.C. van Tonder 등, *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 5(1):Article 12 (2004); 및 A.L. Bingham 등, *Chem. Commun.* 603-604 (2001) 참조. 용매화합물의 일반적인, 비제한적인 제조공정은 본 발명의 화합물을 소망되는 용매(유기용매, 물 또는 이들의 혼합물)에 약 20℃ 내지 약 25℃의 온도에서 용해시킨 다음, 결정을 형성하는데 충분한 속도로 용액을 냉각시키고, 공지 방법, 예컨대 여과에 의해 결정을 분리하는 것을 포함할 것이다. 적외선 분광분석법과 같은 분석 기술을 이용하여 용매화합물 결정 중의 용매의 존재 여부를 확인할 수 있다.

[0150] [00109] "전구약물(prodrug)"이라는 용어는 체내에서 정상적인 대사과정에 의해 그의 활성 형태로 변환되는, 어떤 화합물의 불활성 전구체(precursor)이다. 전구약물의 설계에 관하여는 일반적으로 Hardma, 등 (Eds.), *Goodman 및 Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th ed., pp. 11-16 (1996)에 기재되어 있다. 이에 관한 상세한 논의가 Higuchi, 등, *Prodrugs as Novel Delivery Systems*, Vol. 14, ASCD Symposium Series, 및 Roche (ed.), *Bioreversible Carriers in Drug Design*, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press (1987)에 기재되어 있다. 이에 관하여 설명하자면, 전구약물은 예컨대 에스테르 또는 아미드 결합의 가수분해를 통해 약학적으로 활성인 형태로 전환됨으로써, 결과적인 생성물 상의 관능기를 도입하거나 노출시킬 수 있다. 전구약물은 내인성 화합물과 반응하여 예컨대 증가된 순환반감기와 같은 화합물의 약리학적 특성,을 더 증강시키는 수용성 컨쥬게이트를 형성하도록 설계될 수 있다. 별법으로, 전구약물은 예컨대 글루쿠론산, 설페이트, 글루타치온, 아미노산 또는 아세테이트와 같은 관능기 상에서 공유적 변형을 일으키도록 설계될 수 있다. 결과적인 컨쥬게이트는 불활성화되어 노 중에 배설되거나, 모화합물에 비해 더 강력하게 변형될 수 있다. 고분자량 컨쥬게이트는 또한 담즙 내로 분비되어, 효소분해된 후 순화계로 다시 방출됨으로써, 본래 투여된 화합물의 생물학적 반감기를 효과적으로 증가시킬 수 있다. 본 발명의 화합물의 전구약물들도 본 발명의 범위에 포괄되는 것으로 의도된다.

[0151] [00110] 본 발명은 또한 동위원소적으로 농축된(isotopically enriched) 원자가 하나 이상 존재하는지에 있어서만 차이가 있는, 즉, 예컨대 수소가 중수소 또는 삼중수소로 대체되거나 또는 탄소가 ^{13}C - 또는 ^{14}C -농축 탄소에 의해 대체된 화합물을 포함할 수도 있다. 본 발명의 화합물은 또한 그러한 화합물을 구성하는 하나 이상의 원자들에서 부자연스런 비율로 원자의 동위원소를 함유할 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 예컨대 중수소(^3H), 요오드-125 (^{125}I) 또는 탄소-14 (^{14}C)와 같은 방사능 동위원소로 방사능 표지될 수 있다. 본 발명의 화합물의 모든 동위원소 변형은 방사능이건 그렇지 않건, 본 발명의 범위에 포괄된다.

[0152] [00111] 본 발명의 개시내용은 비독성의 약학적으로 허용가능한 염을 비롯하여, 본 발명으이 화합물의 염들도 포괄한다. 약학적으로 허용가능한 부가염의 예로는 무기산 부가염 및 유기산 부가염 그리고 염기성 염을 들 수 있다. 약학적으로 허용가능한 염의 비제한적인 예로는 예컨대 나트륨염, 칼륨염, 세슘염 등과 같은 금속염; 칼슘염, 마그네슘염 등과 같은 알칼리토 금속염; 트리에틸아민염, 피리딘염, 피콜린염, 에탄올아민염, 트리에탄올아민염, 디시클로헥실아민염, N,N'-디벤질에틸렌디아민염 등과 같은 유기 아민염; 염산염, 히드로브로마아이드, 포스페이트, 설페이트 등과 같은 무기산염; 시트레이트, 락테이트, 타르트레이트, 말리에이트, 푸마레이트, 만델레이트, 아세테이트, 디클로로아세테이트, 트리플루오로아세테이트, 옥살레이트, 포르메이트, 숙시네이트, 팔모에이트, 벤조에이트, 살리실레이트, 아스코르베이트, 글리세로포스페이트, 케토글루타레이트 등과 같은 유기산염; 메탄설포네이트, 벤젠설포네이트, p-톨루엔설포네이트 등과 같은 설포네이트; 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 노르류신, 티로신, 시스틴, 시스테인, 메티오닌, 프롤린, 히드록시프롤린, 히스티딘, 오미틴, 라이신, 아르기닌 및 세린과 같은 천연 아미노산의 염; 및 비자연적 아미노산의 염, 예컨대 D-이성질체 또는 치환된 아미노산; 구아니딘의 염; 및, 치환기가 니트로, 아미노, 알킬, 알케닐, 알킬닐, 암모늄 또는 치환된 암모늄 염 및 암모늄염으로부터 선택되는 것인 치환된 구아니딘의 염을 들 수 있다.

[0153] [00112] 생물학적 활성 물질에 적용되는 바와 같은 "선택적 억제제"라는 용어는 표적과의 직간접적인 상호반응을 통해, 오프-표적 시그널링 활성화에 비교되는 바와 같이, 표적 시그널링 활성을 선택적으로 감소시킬 수 있는

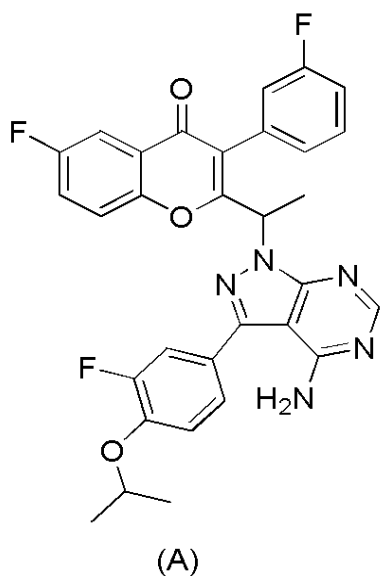
그 물질의 능력을 가리킨다.

- [0154] [00113] "PI3K δ 선택적 억제제"라는 용어는 PI3K δ 이소폼의 활성을 PI3K 패밀리의 다른 이소폼(α , β , 및 γ)에 비해, 효과적으로 더 선택적으로 억제하는, 본 명세서에 정의된 바와 같은 화합물 A를 가리킨다. 예를 들어, 화합물 A의 화합물은 다른 나머지 PI3K 이소폼 (α , β , 및 γ)의 억제제의 50% 억제농도(IC₅₀)에 비해 적어도 20배 더 낮은 δ 타입 PI3-키나아제의 50% 억제농도(IC₅₀)를 갖는 화합물일 수 있다.
- [0155] [00114] PI3K δ 의 억제는 다양한 병태, 예컨대, 비제한적인 예로서 자가면역질환, 알레르기 질환 및 관절염 질환을 비롯한 염증성 반응으로 특징지어지는 병태를 치료하는데 있어서 치료적으로 유리할 수 있다. 중요한 것은 PI3K δ 기능의 억제제 생존능 및 생식능과 같은 생물학적 기능에는 영향을 미치지 않는 듯 하다는 것이다.
- [0156] [00115] 본 명세서에서 "염증성 반응"이라 함은 발적, 발열, 팽창 및 통증(즉 염증)으로 특징지어지며, 일반적으로 조직 손상 또는 파괴가 수반된다. 염증성 반응은 일반적으로 손상을 주는 물질 및 손상된 조직 양자 모두를 파괴, 회식 또는 차단(격리)하는 역할을 하는, 조직 손상 또는 파괴에 의해 유발되는 국소화된, 방어적 응답이다. 염증성 반응은 백혈구의 유입 및/또는 백혈구(예컨대 호중구) 주화성과 명백히 연관되어 있다. 염증성 반응은 병원성 미생물 및 바이러스에 의한 감염, 비감염성 수단 예컨대 외상 또는 심근경색 또는 뇌졸중 후 재관류, 외래항원에 대한 면역반응 및 자가면역 질환으로부터 결과될 수 있다. 본 발명의 방법 및 화합물로 치료될 수 있는 염증성 반응에는 특이적인 방어 시스템의 반응과 연관된 병태 뿐 아니라 비특이적인 방어 시스템의 반응과 연관된 병태가 모두 포괄된다.
- [0157] [00116] 본 발명의 치료방법은 염증성 세포 활성화와 연관된 병태의 치료방법을 포함한다. "염증성 세포 활성화"라 함은 증식성 세포 반응의 자극(시토카인, 항원 또는 자가-항체를 포함하나 이에 한정되지 않음)에 의한 유도, 가용성 매개자(비제한적인 예로서 시토카인, 산소 라디칼, 효소, 프로스타노이드 또는 혈관에 작용하는 아민)의 생산, 또는 염증성 세포(비제한적인 예로서 단핵구, 대식세포, T 림프구, B 림프구, 과립구(호중구, 호염기구 및 호산구를 비롯한 다형핵 백혈구) 비만세포, 수지상 세포, 랑게르한스 세포 및 내피세포)에서 새롭거나 증가된 수의 매개자(비제한적인 예로서, 주요 조직적합성 항원 또는 세포 부착 분자)의 세포 표면 발현을 의미한다. 통상의 기술자라면 이들 세포에서 이들 표현형의 한가지 또는 조합의 활성화가 염증성 병태의 개시, 영구화(perpetuation) 또는 악화에 기여함을 이해할 것이다.
- [0158] [00117] "자가면역 질환"이라는 용어는 본 명세서에서 조직 손상이 몸 자체의 구성성분에 대해 체액성 또는 세포-매개형 반응과 연관된 여하한 질병군을 가리키는 것이다.
- [0159] [00118] 본 명세서에서 "이식거부(transplant rejection)"라 함은 이식된 조직에 대해 지향된 면역반응을 가리킨다(이식된 조직 및 주변 조직의 기능 상실, 통증, 팽윤, 백혈구증가 및 혈소판감소에 의해 특징지어지는, 장기 또는 세포 예컨대 골수를 비롯함).
- [0160] [00119] 본 명세서에서 "알레르기 질환"이라 함은 알레르기로부터 초래되는 여하한 증상, 조직 손상 또는 조직 기능의 상실을 가리킨다.
- [0161] [00120] 본 명세서에서 "관절염 질환(arthritic disease)"이라 함은 다양한 병인에 기인하는 관절의 염증성 병변에 의해 특징지어지는 여하한 질병을 가리킨다.
- [0162] [00121] 본 명세서에서 "피부염"이라 함은 다양한 병인에 기인하는 피부의 염증으로 특징지어지는 피부 질환의 대분류를 가리킨다.
- [0163] [00122] 본 명세서에서 "상승 효과(synergistic effect)"라 함은, 화합물들의 조합에 의해 생성된 치료 효과가, 화합물들을 개별적으로 단독 투여시 얻어지는 효과의 단순 합계보다 더 큰 경우를 가리킨다. 본 발명의 구체예는 혈액암 치료시 상승 효과를 나타내며, 여기서 상기 효과는 대응하는 합산 효과보다 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 500%, 또는 적어도 1000% 더 큰 것이다.
- [0164] [00123] 본 명세서에서 "치료적 시너지(Therapeutic synergy)"라 함은 항CD20 항체와 화합물 A와의 조합이 이들을 각각 단독 사용하는 경우 항CD20 항체 PI3K δ 선택적 억제제의 부가적인 효과보다 더 큰 치료적 효과를 생산함을 의미한다.
- [0165] [00124] 본 명세서와 청구범위에서 단수 형태 "a," "an," 및 "the"는 해당 문맥이 명백히 달리 해석되지 않는 한, 복수 형태를 포함한다.

[0166] [00125] 본 명세서에서 구체예가 "포함하는(comprising)"라는 용어와 함께 설명될 경우, "구성되는(consisting of)" 및/또는 "본질적으로 구성되는(consisting essentially of)"이라는 표현도 모두 포괄하는 것이다.

[0167] II. PI3K δ 선택적 억제제

[0168] [00126] 본 명세서에서 항CD20 항체 및 그의 항원-결합 단편과 조합적으로 사용되는 PI3K δ 선택적 억제제는 화학식 A의 화합물:



[0169]

[0170] [00127] 및 그의 입체이성질체, 그의 호변이성질체, 약학적으로 허용가능한 염, 그의 용매화합물 및 전구약물이다.

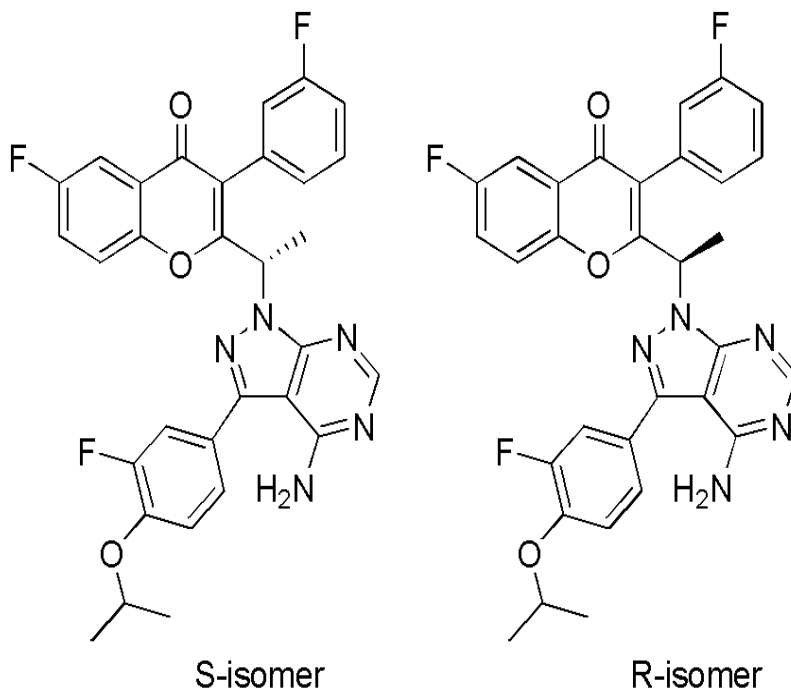
[0171]

[00128] 일 구체예에서, 항CD20 항체 및 그의 항원-결합 단편과 조합적으로 사용되는 화합물 A는, (S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온, 약학적으로 허용가능한 그의 염, 용매화합물 및 전구약물이다. 이 입체이성질체는 또한 본 명세서에서 "화학식 A의 화합물의 S-이성질체," "S-이성질체," "TGR-1202" 및 "RP 5307"이라 칭한다.

[0172]

[00129] 또 다른 구체예에서, 항CD20 항체 및 그의 항원-결합 단편과 조합적으로 사용되는 화합물 A는 (R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온, 약학적으로 허용가능한 그의 염, 용매화합물 및 전구약물이다.

[0173] [00130] 이들 화합물들의 화학 구조를 다음에 나타내었다:



[0174]

[0175] **III. 항CD20 항체**

[0176] [00131] CD20은 인간 및 마우스에서 전(pre)-B 세포 및 성숙한 말초 B 세포에서 대대적으로 발현되는 테트라스 패닝 막투과(테트라spanning transmembrane) 포스포-단백질이다. 인간에서, CD20은 또한 대부분의 성숙한 B 세포 악성질환(malignancies)에서 강하고도 균질하게 발현된다.

[0177] [00132] 본 발명에서 항CD20 항체 및 그의 항원-결합 단편은 PI3K δ 선택적 억제제로 조합 사용될 수 있다.

[0178] [00133] 몇 가지 항CD20 항체가 알려져 있으며 이의 예로는, 유블리톡시맙 리톡시맙, 오파투무맙 (HuMax; Intracel), 오크렐리주맙, 벨투주맙, GA101 (오비누투주맙), AME-133v (Applied Molecular Evolution), 오키라투주맙 (Mentrik Biotech), PR0131921, 토시투모맙, 이브리투모맙-티옥세탄, hA20 (Immunomedics, Inc.), BLX-301 (Biolex Therapeutics), Reditux (Dr. Reddy's Laboratories), 및 PR070769 (WO2004/056312에 개시됨)을 들 수 있다.

[0179] [00134] 유블리톡시맙 (UtuxinTM, LFB-R603, TG20, EMAB603)은 CD20 상의 특이적이고도 독특한 에피토프를 표적화하는 모노클로날 항체로서 증강된 임상 활성 및 효능을 위해 바이오엔지니어링 조작된 바 있다.

[0180] [00135] 리톡시맙은 CD20 항원에 대해 지향된 유전자 조작된 키메라 쥐/인간 모노클로날 항체이다. 리톡시맙은 미국특허 No.5,736,137에서 "C2B8"이라 칭해진 항체이다. 리톡시맙 항체의 아미노산 및 차이네즈 햄스틴 난소 (CHO) 세포에서의 재조합 발현을 경유한 그의 예시적인 제조방법이 미국특허 No. 5,736,137에 설명되어 있으며 이 문헌은 그 내용 전체가 본 발명에 참조 병합되었다.

[0181] [00136] 오파투무맙은 항CD20 IgG1 κ 인간 모노클로날 항체이다. 연구 결과 오파투무맙은 리톡시맙에 비해 더 느린 속도로 CD20으로부터 해리하여 막-근위의 에피토프에 결합한다. Zhang 등, *Mabs* 1: 326-331 (2009). 에피토프 맵핑 결과 오파투무맙은 리톡시맙에 의해 표적화된 위치에 비해 CD20의 N-말단에 보다 근접하게 위치한 에피토프에 결합하며 항원의 세포의 루프를 포함하는 것으로 나타났다. *Id.*

[0182] [00137] 따라서, 몇몇 구체예에서, 항 CD-20 항체 또는 그의 단편은 유블리톡시맙과 동일한 에피토프 리톡시맙, 오파투무맙, 오크렐리주맙, 벨투주맙, GA101, AME-133v, PR0131921, 토시투모맙, hA20, 또는 PR070769에 결합하는 항체들로 이루어진 군으로부터 선택된다. 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체 또는 그의 단편은 유블리톡시맙 리톡시맙, 오파투무맙, 오크렐리주맙, 벨투주맙, GA101, AME-133v, PR0131921, 토시투모맙, hA20, PR070769, 또는 그의 단편이다.

- [0183] [00138] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체 또는 그의 단편은 유블리투시맙과 동일한 에피토프에 결합한다. 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체 또는 그의 단편은 CD20의 아미노산 N153-S179을 포함하는 서열에 결합한다. 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체 또는 그의 단편은 CD20의 아미노산 N153-S179의 불연속적인 에피토프에 결합한다.
- [0184] [00139] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체 또는 그의 단편은 해리상수 KD가 약 10^{-7} M 미만, 약 10^{-8} M 미만 또는 약 10^{-9} M 미만인 것이 특징인 친화도를 갖는 CD20에 결합한다. 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체 또는 그의 단편은 10^{-10} 내지 10^{-9} M의 해리 상수 KD에 의해 특징지어지는 친화도를 갖는 CD20에 결합한다. 몇몇 구체예에서 항CD20 항체 또는 그의 단편은 0.7×10^{-9} M의 해리 상수 KD에 의해 특징지어지는 친화도를 갖는 CD20에 결합한다. 항체 결합 해리 상수와 관련된 문맥 상 "약"이라는 용어는 항체 친화도를 측정하는데 이용된 방법에 내재된 변화 정도를 감안한 것이다. 예를 들어, 사용된 기기의 정밀도 수준, 측정된 샘플 수에 기초한 표준 오차 및 반올림 오차에 따라, "약 10^{-2} M"이라는 표현은 예컨대 0.05 M 내지 0.005 M을 포함할 수 있다.
- [0185] [00140] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 Fc-감마RIII (CD16)에 대해 높은 친화도를 나타낸다. 몇몇 구체예에서, CD16에 대한 그 항체의 Fc 영역에 대한 그의 높은 친화도의 결과, 그러한 항체들은 IgG 폴리클로날 항체, 특히 혈청에 존재하는 IgG에 의해 축출되지 않는다. 몇몇 구체예에서 항체는 예컨대 Scatchard 분석법 또는 BIAcore 기술 (무라벨 표면 플라즈몬 공명 기반 기술)에 의해 탐지되는 바와 같이 적어도 $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, 적어도 $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ 또는 $2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 의 친화도로 CD16 (예컨대 대식세포 상에 발현됨)에 결합한다.
- [0186] [00141] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 그의 Fc 영역에서 낮은 푸코스 함량으로 특징지어지는 글리코실화 패턴을 나타낸다. 예컨대, 몇몇 구체예에서, 어떤 조성물은 Fc-감마 글리코실화 자리(Asn 297, EU numbering)에 결합된 N-글리코사이드-결합된 당 사슬을 포함하는 항CD20 항체를 포함하는데, 여기서 조성물의 모든 항체의 N-글리코사이드-결합된 당 사슬 중, 푸코스 함량은 65% 미만, 60% 미만, 55% 미만, 50% 미만, 45% 미만, 또는 40% 미만이다. 몇몇 구체예에서, 조성물의 모든 항체들의 N-글리코사이드-결합된 당 사슬에서의 푸코스 함량은 15 내지 45% 또는 20 내지 40%이다.
- [0187] [00142] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 시험관내 항체-의존성 세포독성(ADCC)을 나타낸다. 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 건강한 도너로부터의 내츄럴 킬러(NK) 세포를 이용하여 50 ng/ml의 농도에서 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 또는 적어도 약 30%의 ADCC 플레토(plateau)를 생성한다. ADCC의 측정 기술은 기술 분야에 공지이며, 예컨대 Romeau 등, *British Journal of Haematology* 140: 635-643 (2008)에 설명되어 있다. 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 건강한 도너로부터의 NK 세포를 이용하여 50 ng/ml의 농도에서 약 35%의 ADCC 플레토를 생성한다.
- [0188] [00143] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 NF-카파-B 활성을 저감시킬 수 있다. 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 SNAIL 발현을 감소시킬 수 있다. 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 RKIP 활성을 증가시킬 수 있다. 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 PTEN 활성을 증가시킬 수 있다. 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 TRAIL-세포자멸사에 대한 세포의 감작화를 증가시킬 수 있다.
- [0189] [00144] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 최적화된 Fc-감마-RIIIA (CD16)이다. III형 Fc 수용체를 활성화시킬 수 있고 특정 글리칸 구조를 갖는 항체들이 예컨대 미국특허 No. 7,931,895에 설명되어 있으며 상기 특허문헌은 그 내용 전체가 본 발명에 참조 병합되었다. 따라서, 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 미국특허 No. 7,931,895에 설명된 바와 같이 바이-안테나(bi-antennary) 및/또는 올리고만노사이드형 N- 글리코실화에 의해 Asn 297 (EU 넘버링) 상에서 변형된다. 면역계의 이펙터 세포의 수용체 CD16에 대해 강한 친화도를 갖는 항체의 생산방법이 예컨대 미국 특허공개된 출원번호 No. 2005/0271652에 개시되어 있으며 이 문헌은 그 내용 전체가 본 발명에 참조 병합되었다.
- [0190] [00145] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 높은 ADCC 활성을 갖는다. 높은 ADCC 활성을 갖는 항체의 제조방법이 예컨대 미국특허 No. 7,713,524에 설명되어 있으며 상기 문헌은 그 내용 전체가 본 발명에 참조 병합되었다.
- [0191] [00146] 유블리투시맙은 하기 제공된 항체 서열을 포함한다:
- [0192] 중쇄 가변부 CDR1: Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn (SEQ ID NO:1)
- [0193] 중쇄 가변부 CDR2: Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr (SEQ ID NO:2)
- [0194] 중쇄 가변부 CDR3: Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr (SEQ ID NO:3)

- [0195] 중쇄 가변부:
- [0196] Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Gly Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Gly Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser (SEQ ID NO:4)
- [0197] 중쇄 불변부:
- [0198] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys (SEQ ID NO:5)
- [0199] 경쇄 가변부 CDR1: Ser Ser Val Ser Tyr (SEQ ID NO:6)
- [0200] 경쇄 가변부 CDR2: Ala Thr Ser (SEQ ID NO:7)
- [0201] 경쇄 가변부 CDR3: Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr (SEQ ID NO:8)
- [0202] 경쇄 가변부 :
- [0203] Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys (SEQ ID NO:9)
- [0204] 경쇄 불변부:
- [0205] Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys (SEQ ID NO:10)
- [0206] **[00147]** 따라서, 몇몇 구체예에서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 면역글로불린 중쇄 가변부 도메인 (VH 도메인)을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 또는 본질적으로 구성되는데, 여기서 VH 도메인의 적어도 하나 (즉, 하나, 두개 또는 세개)의 CDR은, 서열 SEQ ID NO:1, 2, 또는 3의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 영역과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 동일한 아미노산을 가지며, 여기서 그 VH 도메인을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 CD20에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있다.
- [0207] **[00148]** 또 다른 구체예에서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 면역글로불린 중쇄 가변부 도메인 (VH 도메인)을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 또는 본질적으로 구성되는데, 여기서 VH 도메인의 적어도 하나 (즉, 하나, 두개 또는 세개)의 CDR은, 1, 2, 3, 4, 또는 5 개의 보존적 아미노산 치환을 제외하고서 열 SEQ ID NO:1, 2, 또는 3의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 영역과 동일한 아미노산 서열을 갖는데, 여기서, 그 VH 도메인을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 CD20에 특이적으로 또는 우선

적으로 결합할 수 있다.

- [0208] **[00149]** 또 다른 구체예에서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 SEQ ID NO:4의 VH 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 VH 도메인을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 또는 본질적으로 구성되는데, 여기서 그 VH 도메인을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 CD20에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있다.
- [0209] **[00150]** 또 다른 구체예에서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 중쇄 아미노산을 포함하는 SEQ ID NOs: 4 및 5과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 중쇄를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 또는 본질적으로 구성되는데, 여기서 그 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 CD20에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있다.
- [0210] **[00151]** 몇몇 구체예에서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 VL 도메인의 적어도 하나 (즉, 하나, 두개 또는 세개)의 CDR이 서열 SEQ ID NO:6, 7, 또는 8의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 영역과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 것인 면역글로불린 경쇄 가변부 도메인(VL 도메인)을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 또는 본질적으로 구성되는데, 여기서 그 VL 도메인을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 CD20에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있다.
- [0211] **[00152]** 또 다른 구체예에서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 면역글로불린 경쇄 가변부 도메인 (VL 도메인)을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 또는 본질적으로 구성되는데, 여기서 그 VL 도메인의 적어도 하나 (즉, 하나, 두개 또는 세개)의 CDR은 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 보존적 아미노산 치환을 제외하고, SEQ ID NO:6, 7, 또는 8의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 영역과 동일한 아미노산 서열을 갖는데, 여기서 그 VL 도메인을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 CD20에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있다.
- [0212] **[00153]** 또 다른 구체예에서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 SEQ ID NO:9의 VL 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 VL 도메인을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 또는 본질적으로 구성되는데, 여기서, 그 VL 도메인을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 CD20에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있다.
- [0213] **[00154]** 또 다른 구체예에서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 SEQ ID NOs:9 및 10을 포함하는 중쇄 아미노산 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 또는 본질적으로 구성되는데, 여기서, 그 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 CD20에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있다.
- [0214] **[00155]** 몇몇 구체예에서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 면역글로불린 중쇄 가변부 도메인 (VH 도메인) 및 면역글로불린 경쇄 가변부 도메인 (VL 도메인)을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 또는 본질적으로 구성되는데, 여기서, VH 도메인의 적어도 하나 (즉, 하나, 두개 또는 세개)의 CDR은 서열 SEQ ID NO:1, 2, 또는 3의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 영역과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 가지며, 여기서 VL 도메인의 적어도 하나 (즉, 하나, 두개 또는 세개)의 CDR은 서열 SEQ ID NO:6, 7, 또는 8의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 영역과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 가지며, 여기서 상기 VH 도메인 및 VL을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 CD20에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있다.
- [0215] **[00156]** 또 다른 구체예에서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 면역글로불린 중쇄 가변부 도메인 (VH 도메인), 및 면역글로불린 경쇄 가변부 도메인 (VL 도메인)을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 또는 본질적으로 구성되는데, 여기서, VH 도메인의 적어도 하나 (즉, 하나, 두개 또는 세개)의 CDR은 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 보존적 아미노산 치환을 제외하고, 서열 SEQ ID NO:1, 2, 또는 3의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 영역과 동일한 아미노산 서열을 가지며, 여기서 VL 도메인의 적어도 하나 (즉, 하나, 두개 또는 세개)의 CDR은 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 보존적 아미노산 치환을 제외하고, 서열 SEQ ID NO:6, 7, 또는 8의 CDR1, CDR2 또는 CDR3 영역과 동일한 아미노산 서열을 가지며, 여기서 상기 VH 및 VL을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합

단편, 변이체, 또는 유도체는 CD20에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있다.

- [0216] [00157] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 서열 SEQ ID NO:1, 2, 및 3의 VH CDR1, CDR2 및 CDR3 영역 및 서열 SEQ ID NO:6, 7, 및 8의 VL CDR1, CDR2 및 CDR3 영역을 포함한다.
- [0217] [00158] 또 다른 구체예에서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 VH 도메인 및 VL 도메인을 포함하거나, 이것으로 구성되거나 또는 본질적으로 구성되는데, 여기서, 상기 VH는 SEQ ID NO:4의 VH 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖고, VL 도메인은 SEQ ID NO:9의 VL 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 가지며, 여기서 상기 VH 및 VL 도메인을 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 CD20에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있다.
- [0218] [00159] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:4의 VH 및 SEQ ID NO:9의 VL을 포함한다.
- [0219] [00160] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:4의 VH 및 SEQ ID NO:9의 VL을 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합한다.
- [0220] [00161] 또 다른 구체예에서, 단리된 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 중쇄 및 경쇄를 포함하거나, 이것으로 구성되거나 또는 본질적으로 구성되는데, 여기서, 상기 중쇄는 SEQ ID NOs: 4 및 5을 포함하는 중쇄 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 것이고, 상기 경쇄는 SEQ ID NOs: 9 및 10을 포함하는 중쇄 아미노산 서열과 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 가지며, 여기서 상기 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체는 CD20에 특이적으로 또는 우선적으로 결합할 수 있다.
- [0221] [00162] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 SEQ ID NOs: 4 및 5를 포함하는 중쇄 및 SEQ ID NOs: 9 및 10을 포함하는 경쇄를 포함한다.
- [0222] [00163] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 SEQ ID NO:4 및 SEQ ID NO:5를 포함하는 항체와 동일한 에피토프에 결합한다.
- [0223] [00164] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 유블리특시맵이다.
- [0224] [00165] 몇몇 구체예에서, 항체는 Collection Nationale des Cultures de Microorganismes에 수탁번호 CNCM I-3529로 기탁된 클론 R603-12D11에 의해 생산된, EMAB603이다 (본 발명에 그 내용 전체가 참조 병합된 WO2006/064121을 참조할 것).
- [0225] [00166] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 래트 하이브리도마 YB2/0 세포주 (세포 YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, American Type Culture Collection에 수탁번호 ATCC CRL-1662로 등록됨)에서 생산된다.
- [0226] [00167] CD20에 특이적으로 결합하여 소망되는 활성을 유지할 수 있는 항체의 정확한 화학 구조는 몇가지 인자에 좌우된다. 이 분자에는 이온화가능한 아미노기 및 카르복실기가 존재하므로, 특정한 폴리펩타이드가 산성염 또는 염기성염 또는 중성 형태로서 수득될 수 있다. 적절한 환경 조건 하에 놓일 때 그의 생물학적 활성을 유지하는 이러한 모든 조제물이 본 발명에 따른 항CD20 항체의 정의에 포함된다. 또한, 항체의 일차 아미노산 서열은 당 부분(글리코실화) 또는 다른 보충 분자들 예컨대 지질, 포스페이트, 아세틸기 등에 의한 유도화(derivatization)에 의해 증대될 수 있다. 이것은 또한 사카라이드와의 컨주게이션에 의해서도 증대될 수 있다. 이러한 증대의 특정 측면은 생산 숙주의 후변역 프로세싱 시스템을 통해 달성된다; 이러한 변형의 또 다른 측면은 시험관내 도입될 수 있다. 어떠한 경우든, 이러한 변형은 항CD20 항체의 소망되는 특성이 파괴되지 않는 한, 본 발명에서 사용된 항CD20 항체의 정의 내에 포함된다. 이러한 변형은 다양한 분석에서 폴리펩타이드의 활성을 증가 또는 감소시키므로써, 그 활성에 정량적 또는 정성적인 영향을 미칠 수 있다. 나아가, 해당 사슬 내의 개별적인 아미노산 잔기들은 산화, 환원 또는 기타 유도화에 의해 변형될 수 있으며, 폴리펩타이드를 절단하여 활성을 유지하는 단편들을 얻을 수 있다. 목적하는 특성(예컨대, CD20에 대한 결합 특이성)을 파괴하지 않는 그러한 변형은 본 발명에 사용된 바와 같은 관심 대상의 항CD20 항체의 정의로부터 폴리펩타이드 서열을 제거하지 않는다.

- [0227] [00168] 이 기술은 폴리펩타이드 변이체의 제작 및 사용과 관련하여 실질적인 지침을 제공한다. 항CD20 결합 분자의 변이체, 예컨대, 항체 또는 그의 항원-결합 단편, 변이체, 또는 유도체를 제조하는데 있어서, 통상의 기술자는 천연 단백질의 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열에 대한 어떤 변형이 의약 조성물의 치료적 활성 성분으로서 사용되는데 적합한 변이체를 결과시킬 것인지 쉽게 결정할 수 있을 것이다.
- [0228] [00169] 항체 분자의 프레임워크 영역에서만 또는 CDR 영역에서만 돌연변이를 도입할 수 있다. 도입된 돌연변이는 침묵 돌연변이 또는 뉴트럴 미스센스 돌연변이일 수 있다. 즉, 항원에 대한 항체의 결합능에 전혀, 또는 거의 영향을 미치지 않을 수 있다. 이러한 돌연변이 유형은 코돈 사용을 최적화하거나 또는 하이브리도마의 항체 생산을 개선하는데 유용할 수 있다. 별법으로, 비뉴트럴 미스센스 돌연변이는 항체의 항원에 대한 결합능을 변경시킬 수 있다. 가장 침묵적이고 중성적인 미스센스 돌연변이 위치는 프레임워크 영역 내에 존재하는 듯한 반면, 가장 비뉴트럴한 미스센스 돌연변이 위치는 CDR 내에 위치하는 듯 한데, 이것이 절대적인 요구사항은 아니다. 통상의 기술자라면 항원-결합 활성의 변경없이 또는 결합활성을 변경하면서 목적하는 특성을 갖는 돌연변이 분자를 설계 및 검사할 수 있을 것이다 (예컨대 항원-결합 활성의 개선 또는 항체 특이성의 변화). 돌연변이 후, 코딩된 단백질은 통상적으로 발현될 수 있고, 코딩된 단백질의 기능적 및/또는 생물학적 활성(예컨대, CD20 폴리펩타이드의 적어도 하나의 에피토프에 면역특이적으로 결합하는 능력)을 본 명세서에 설명된 기술 또는 기술분야에 알려진 기술을 통상적으로 변형하여 탐지할 수 있다.
- [0229] [00170] 특정 구체예에서, 항CD20 항체는 적어도 하나의 최적화된 상보성-결정영역(complementarity-determining region: CDR)을 포함한다. "최적화된 CDR"이라 함은 그 CDR이 변형되어, 유지되거나 개선된 결합 친화도 및/또는 최적화된 CDR을 포함하는 항CD20 항체에 부여된 항CD20 활성에 기초하여, 최적화된 서열이 선택됨을 가리킨다. "항CD20 활성"은 예컨대, CD20과 연관된 다음 활성들, 예컨대 B 세포의 세포자멸사를 유도하는 능력, B 세포에 대한 ADCC를 유도하는 능력 (예컨대, CLL 세포), NF-κB 활성을 억제하는 능력, Snail 발현을 억제하는 능력, RKIP를 탈-억압(de-repress)하는 능력, PTEN을 탈-억압하는 능력, 종양세포를 TRAIL-세포자멸사에 감작화시키는 능력 또는 CD20과 연관된 기타 활성 중 하나 이상을 조절하는 활성을 포함할 수 있다. 이러한 활성은 예컨대 본 명세서에 그 내용 전체가 참조 병합된 문헌인 Baritaki 등, *International Journal of Oncology* 38: 1683-1694 (2011)에 설명되어 있다. 이러한 변형은 항CD20 항체가 CD20 항원에 대한 특이성을 보유하여 개선된 결합 친화도 및/또는 개선된 항CD20 활성을 갖도록, CDR 내에서 아미노산 잔기들을 대체하는 것을 포함할 수 있다.
- [0230] [00171] 어떤 항CD20 항체, 또는 그의 항원-결합 단편들에서, 불변부 도메인 하나 이상의 분획이 결실되거나 변형되어, 소망되는 생화학적 특징들 예컨대 감소된 이펙터 기능, 비공유적으로 이량화하는 능력, 중앙 부위에 국소화하는 능력의 증가, 전체적인 변경되지 않은 항체와 비교할 경우 감소된 혈청 반감기, 또는 증가된 혈청 반감기, 대략 동일한 면역원성의 변경되지 않은 항체가 제공된다. 예컨대, 어떤 항체들은 어떤 면역글로불린 중쇄와 유사한 폴리펩타이드 사슬을 포함하지만, 하나 이상의 중쇄 도메인의 적어도 일부는 결여하는, 도메인 결실된 항체이다. 예를 들어, 어떤 항체에서, 변형된 항체의 불변부의 하나의 전체 도메인이 결실되는데, 예컨대, CH2 도메인 전체 또는 일부가 결실된다.
- [0231] [00172] 어떤 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편에서, 공지 기술에 따라 Fc 부분을 돌연변이시켜 이펙터 기능을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 증가된 항원 특이성 또는 항체 유연성으로 인해, 개선된 국소화능을 가능케 하는 올리고당 모이어티 또는 디설파이드 결합을 변형하기 위해, 불변부 변형이 이용될 수 있다. 그러한 변형의 결과적인 생리학적 프로파일, 생체이용성 및 기타 생화학적 효과는 과도한 실험을 행하지 않고도 공지의 면역학적 기술을 이용함으로써 용이하게 측정 및 정량화 가능하다.
- [0232] [00173] 특정 구체예에서, 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 치료대상 동물, 예컨대 인간에서 해로운 면역 반응을 이끌어내지 않는다. 일 구체예에서, 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 기술분야에 알려진 기술을 이용하여 그들의 면역원성을 감소시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 항체를 인간화, 영장류화, 탈면역시키거나 또는 키메라 항체를 만들 수 있다. 이러한 종류의 항체들은 모항체의 항원-결합 특성을 보유 또는 실질적으로 보유하지만 인간에서 덜 면역원적인 비인간 항체, 전형적으로는 쥐 또는 영장류 항체로부터 유도된다. 이것은 (a) 전체 비인간 가변부 도메인을 인간 불변부에 그래프팅하여 키메라 항체를 생성하고; (b) 하나 이상의 비인간 상보성 결정 영역(CDR)의 적어도 일부분을, 크리티컬 프레임워크 잔기를 보유하거나 보유하지 않는 인간 프레임워크 및 불변부 내로 그래프팅하거나; 또는 (c) 전체 비인간 가변부 도메인을 이식하지만, 표면 잔기의 치환에 의해 인간과 유사한 섹션으로 이들을 "은폐(cloaking)"하는 것을 포함하는 다양한 방법에 의해 달성될 수 있다. 이러한 방법은 그 내용 전체가 본 발명에 참조 병합된 문헌, 즉 Morrison 등, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-6855 (1984); Morrison 등, *Adv. Immunol.* 44:65-92 (1988); Verhoeven 등, *Science* 239:1534-

1536 (1988); Padlan, *Molec. Immun.* 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.* 31:169-217 (1994), 및 미국 특허 Nos. 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762, 및 6,190,370에 설명되어 있다.

- [0233] [00174] 항체 또는 그의 항원-결합 단편들의 변형된 형태는 공지 기술을 이용하여 전체 전구체 또는 모항체로부터 만들 수 있다.
- [0234] [00175] 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편은 공지 기술을 이용하여 만들거나 제작할 수 있다. 특정 구체예에서, 항체 분자 또는 그의 단편들은 "재조합적으로 제조된다". 즉, 항체 분자 또는 그의 단편들은 재조합 DNA 기술을 이용하여 생산된다. 항CD20 항체 또는 그의 단편들은 폴리클로날 항체의 생산 또는 모노클로날 항체의 제조를 비롯한 적절한 공지 방법, 예컨대 하이브리도마 또는 파지 디스플레이를 이용하여 생산할 수 있다.
- [0235] [00176] 다양한 숙주-발현 벡터 시스템을 이용하여 항체 분자들을 발현할 수 있다. 중쇄 유래된 폴리펩타이드를 인코딩하는 제1 벡터와 경쇄 유래된 폴리펩타이드를 인코딩하는 제2 벡터의 2 가지 발현 벡터들로 숙주 세포를 공-트랜스펙션시킬 수 있다(co-transfected). 이들 2가지 벡터들은 중쇄 및 경쇄 폴리펩타이드들의 동등한 발현을 가능케하는 동일한 선택가능한 마커를 함유할 수 있다. 별법으로, 중쇄 폴리펩타이드와 경쇄 폴리펩타이드 2 가지 모두를 인코딩하는 단일 벡터를 이용할 수도 있다. 이러한 상황에서는, 과량의 유해한 자유 중쇄를 피하기 위해 중쇄 앞에 경쇄가 위치하는 것이 유리하다(Proudfoot, *Nature* 322:52 (1986); Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197 (1980)). 숙주 세포는 또한
- [0236] The host cell can also be transfected with a single 벡터 encoding a 중쇄 유래된 폴리펩타이드 및 경쇄 유래된 폴리펩타이드를 인코딩하는 단일 벡터로 트랜스펙션시킬 수도 있다. 중쇄 및 경쇄에 대한 코딩 서열은 cDNA 또는 게놈 DNA를 포함할 수 있다
- [0237] [00177] 발현 벡터 또는 벡터들은 통상적인 기술에 의해 숙주 세포로 전달될 수 있으며 이렇게 트랜스펙션된 세포들은 통상의 기술에 의해 배양되어 항체를 생산할 수 있다. 따라서, 항체 또는 그의 중쇄 또는 경쇄를 인코딩하고 이질적인 프로모터에 작동적으로 링크된 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 숙주 세포가 제공된다. 이중-사슬형 항체의 발현을 위한 특정 구체예에서, 전체 면역글로불린 분자의 발현을 위해 중쇄와 경쇄 두 가지를 모두 인코딩하는 벡터들을 숙주 세포에서 공-발현시킬 수 있다.
- [0238] [00178] 숙주-발현 시스템은 목적하는 코딩 서열을 생산 및 후속적으로 정제할 수 있는 비히클을 나타낼 뿐만 아니라, 적절한 뉴클레오타이드 코딩 서열에 의해 형질전환된 또는 트랜스펙션될 경우, in situ로 CD20 항체를 발현할 수 있는 세포도 나타낸다. 여기에는 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 박테리오파지 DNA, 플라스미드 DNA 또는 코스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 세균 (예컨대, *E. coli*, *B. subtilis*); 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 효모 발현 벡터에 의해 형질전환된 효모(예컨대, *Saccharomyces*, *Pichia*); 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 바이러스 발현벡터(예컨대, 배칼로바이러스)에 의해 감염된 곤충 세포 시스템; 재조합 바이러스 발현 벡터 (예컨대, 칼리플라워 모자이크 바이러스, CaMV; 담배 모자이크 바이러스, TMV)에 의해 감염되거나 또는 항체 코딩 서열을 함유하는 재조합 플라스미드 발현 벡터 (예컨대, Ti 플라스미드)에 의해 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유동물 세포의 게놈으로부터 유도된 프로모터(예컨대, 메탈로티오네인 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유도된 프로모터 (예컨대, 아데노바이러스 후기 프로모터; 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터)를 함유하는 재조합 발현 구조물을 산생하는 포유동물 세포 시스템(예컨대, COS, CHO, BLK, 293, 3T3 세포)이 포함되나 이들로 한정되지 않는다. 예컨대, 전체 재조합 항체 분자의 발현을 위한 대장균과 같은 세균 세포 또는 진핵세포들이 재조합 항체 분자의 발현에 이용된다. 예를 들어, 인간의 시토메갈로바이러스로부터의 주요 중간조기 유전자 프로모터 요소와 같은 벡터와 컨정선된, 차이니스 햄스터 난소세포와 같은 포유동물 세포는 항체에 대해 효과적인 발현 시스템이다(Foecking 등, *Gene* 45:101 (1986); Cockett 등, *Bio/Technology* 8:2 (1990)). 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 CHO 세포가 아닌 숙주 세포에서 생산된다.
- [0239] [00179] 일단 항체가 재조합적으로 발현되면, 크로마토그래피 (예컨대, 이온 교환, 친화, 특히 단백질 A 후 특이 항원에 대한 친화, 및 사이징 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 용해도차, 또는 기타 단백질 정제를 위한 표준 기술과 같이, 면역글로불린 분자의 정제를 위한 공지 기술에 의해 항체를 정제할 수 있다.
- [0240] [00180] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 래트 하이브리도마 세포주에 의해 생산된다. 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 YB2/0 (ATCC CRL-1662)에서 생산된다.

[0241] IV. 의약 조성물

- [0242] [00181] 화학식 A의 화합물 및 항CD20 항체는 통상의 기술자가 정하는 바에 따라 임의의 순서 및 임의의 간격으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 화학식 A의 화합물 및 항CD20 항체는 순차적으로 (어떠한 순서로든), 동시에 또는 순차 및 동시 투여의 조합에 따라 투여가능하다. 화학식 A의 화합물 및 항CD20 항체는 동일한 의약 조성물로서 또는 별개의 의약 조성물로서 투여될 수 있다.
- [0243] [00182] 동시적이건, 순차(임의의 순서)적이건 또는 양자 모두의 조합 투여를, 통상의 기술자가 결정한 대로, 소망되는 분 간격 (예컨대, 0-60분), 시간 간격(예컨대, 0-24시간), 일 간격 (예컨대, 0-7일), 및/또는 주일 간격 (예컨대, 0-52 주일)으로 투여할 수 있다. 또한 예컨대 일정 기간 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6 주일) 동안 주1회 투여로 시작하여, 그 후 2주마다 투여, 3주마다 투여, 4주마다 투여, 5주마다 투여 또는 6주마다 투여하는 것과 같이, 경시적으로 투여를 다변화시킬 수도 있다.
- [0244] [00183] 화학식 A의 화합물 및 항CD20 항체는 인간을 비롯한 포유동물에게 투여하기 위해 의약 조성물로서 포물레이션될 수 있다. 의약 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 예컨대 이온 교환제, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질 예컨대 인간 혈청 알부민, 포스페이트와 같은 완충물질, 글리신, 소르브산, 포타슘 소르베이트, 포화된 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물, 물, 염 또는 전해질, 예컨대 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨, 아연염, 콜로이드알 시리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐 피롤리돈, 셀룰로스로케 물질, 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 카르복시메틸셀룰로스, 폴리아크릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 폴리머, 폴리에틸렌 글리콜 및 울 팻(wool fat)을 포함한다.
- [0245] [00184] 조성물은 적절한 방법, 예컨대 비경구, 뇌실내(intraventricularly), 경구, 흡입 스프레이, 국소, 직장내, 비내, 볼내(buccally), 질내 또는 임플란트된 저장소를 통해 투여될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 화학식 A의 화합물은 경구 투여된다. 본 명세서에서 "비경구"라는 용어에는 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활막내, 흉골내, 경막내, 간내, 병변내 및 두개내 주사 또는 주입 기술이 포함된다.
- [0246] [00185] 비경구 포물레이션은 주입 또는 로딩 볼루스(bolus) 투여량의 일회 볼루스 투여 후 유지 투여량일 수 있다. 이러한 조성물들은 특이적인 고정 또는 가변 간격, 예컨대, 1일 1회 또는 "필요에 따라" 투여될 수 있다. 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 정맥 투여된다(IV).
- [0247] [00186] 어떤 의약 조성물들은 예컨대 캡슐, 정제, 수성 현탁액 또는 용액을 비롯한 허용가능한 투여 형태로 경구 투여될 수 있다. 어떤 의약 조성물들은 또한 코 에어로졸 또는 흡입에 의해 투여될 수도 있다. 이러한 조성물들은 벤질 알코올 또는 기타 적절한 보존제, 생체이용성 증진을 위한 흡수 프로모터, 및/또는 기타 통상적인 가용화제 또는 분산제 내의 용액으로서 조제될 수 있다.
- [0248] [00187] 특정 환자에 대한 특이적인 투여량 및 투여 용법은 사용된 특정 치료제, 환자의 연령, 체중, 일반적인 건강상태, 성별 및 식이, 투여 시기, 배설률, 약물 조합 및 치료되는 특정 질환의 위중도를 비롯한 다양한 인자에 따라 달라진다. 의약품공자에 의한 이러한 인자의 판단은 통상적인 기술 범위 내이다. 투여량 역시 치료될 개별 환자, 투여 경로, 포물레이션의 종류, 사용된 화합물의 특징, 질병의 위중도 및 소망되는 효과에 따라 달라진다. 사용량은 기술분야에 잘 알려져 있는 약동학적 및 약력학적 이론에 따라 정할 수 있다.
- [0249] [00188] 몇몇 구체예에서, 항CD20 항체는 187.5 mg/m^2 미만, 75 mg/m^2 미만, 37.5 mg/m^2 미만, 15 mg/m^2 미만, 7.5 mg/m^2 미만, 3.75 mg/m^2 미만의 투여량으로 투여된다. 몇몇 구체예에서, 투여량은 187.5 mg/m^2 내지 75 mg/m^2 , 75 mg/m^2 내지 37.5 mg/m^2 , 75 mg/m^2 내지 15 mg/m^2 , 75 mg/m^2 내지 7.5 mg/m^2 , 또는 75 mg/m^2 내지 3.75 mg/m^2 일 수 있다.
- [0250] [00189] 몇몇 구체예에서, 화학식 A의 화합물은 하루에 10 to 2500 mg/일, 10 내지 1500 mg/일, 50 내지 1000 mg/일, 100 내지 750 mg/일, 150 내지 500 mg/일의 투여량으로 투여된다. 몇몇 구체예에서, 투여량은 하루 200 내지 400 mg일 수 있다. 몇몇 구체예에서, 투여량은 500, 1000, 1500, 2000 또는 2500 mg/일일 수 있다.
- [0251] [00190] 보조 활성 화합물 역시도 조성물 내로 혼입될 수 있다. 예를 들어, 항CD20 항체 및 화학식 A의 화합물을 항암제와 같은 1종 이상의 부가적인 치료제와 함께 공동조성시키거나 및/또는 공동투여할 수 있다.
- [0252] V. 키트
- [0253] [00191] 본 발명은 화학식 A의 화합물, 항CD20 항체, 기타 제제를 포함하고 본 명세서에 설명된 방법을 수행하

는데 사용가능한 키트를 제공한다. 특정 구체예에서, 키트는 하나 이상의 용기 중에 CD20에 대한 적어도 1종의 정제된 항체 및 그 항체를 화학식 A의 화합물과 조합 사용하기 위한 지침서를 포함한다. 특정 구체예에서, 키트는 화학식 A의 화합물 및 상기 억제제를 항CD20 항체와 조합 사용하기 위한 지침서를 포함한다. 특정 구체예에서, 키트는 적어도 1종의 항CD20 항체 및 화학식 A의 화합물을 포함한다.

[0254] [00192] 화학식 A의 화합물 및/또는 1종 이상의 항CD20 항체를 포함하여, 본 발명의 조성물 및 의약 화합물의 1 이상의 성분들로 충전된 하나 이상의 용기를 포함하는 의약품 키트 역시도 제공된다. 이러한 키트는 또한 예컨대 다른 화합물 및/또는 조성물, 상기 화합물 및/또는 조성물을 투여하기 위한 기구(들), 의약 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규율하는 정부당국에 의해 규정된 형태의 서면 지침서를 포함할 수도 있다.

[0255] [00193] 통상의 기술자는 개시된 항체 및 본 발명에 설명된 화학식 A의 화합물이 본 발명이 속한 기술분야에 잘 알려진 확립된 키트 포맷 중 하나로 쉽게 병합될 수 있음을 이해할 것이다.

[0256] [00194] (a) 화학식 A의 화합물, 항CD20 항체, 또는 그의 조합 및 (b) 부가적인 항암제를 포함하는 키트도 제공된다. 특정 구체예에서, 부가적인 항암제는 화학요법제이다.

[0257] VI. 화학식 A의 화합물과 항CD20 항체와의 조합의 사용방법

[0258] [00195] 화학식 A의 화합물과 항CD20 항체의 조합을 대상자의 질병 또는 장애를 치료하는 방법에 이용할 수 있다.

[0259] [00196] 따라서, 화학식 A의 화합물을 항CD20 항체와 조합적으로(예컨대, 순차 또는 동시)투여하는 증식성 질환의 치료를 위한 의약 제조에 있어서, 화학식 A의 화합물의 용도가 제공된다. 이에 더해, 항CD20 항체가 화학식 A의 화합물과 조합적으로(예컨대, 순차 또는 동시) 투여되는 증식성 질환의 치료를 위한 의약 제조에 있어서 항CD20 항체의 용도 역시도 제공된다.

[0260] [00197] 본 발명은 또한 환자에게 본 발명의 조합의 유효량을 투여함으로써, 환자에 있어서 PI3K δ 이소폼 및/또는 CD20을 억제하는 방법을 제공한다.

[0261] [00198] 본 발명은 또한 환자에게 본 발명의 조합의 유효량을 투여함으로써, 환자에 있어서 PI3K δ 매개 질환, 장애 또는 병태 및/또는 CD20 매개 질환, 장애, 또는 병태(예컨대 암 또는 기타, 증식성 질환 또는 장애)를 치료, 예방 및/또는 억제하는 방법도 제공한다.

[0262] [00199] 본 발명은 또한 본 발명의 조합의 유효량을 환자에게 투여함으로써 환자에 있어서 PI3K δ 이소폼 및/또는 CD20 관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하는 방법도 제공한다. 일 구체예에서, 조합적으로 투여되는 화합물의 양은 PI3K δ 및/또는 CD20의 선택적 억제에 의해 PI3K δ 이소폼 및/또는 CD20 관련 질환, 장애 또는 병태를 치료하는데 충분한 양이다.

[0263] [00200] 본 발명은 또한 증식성 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 본 발명의 적어도 1종의 화학식 A의 화합물 및 항체의 유효량을 투여함으로써 증식성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 조합 투여되는 화합물의 양은 PI3K δ의 선택적 억제 및/또는 CD20의 억제에 의해 증식성 질환을 치료하는데 충분하다.

[0264] [00201] 본 발명은 또한 증식성 질환의 치료를 필요로 하는 환자에게 본 발명의 조합물의 유효량을, 적어도 1종의 다른 항암제와 부가적으로 조합 (동시적 또는 순차적으로)하여 투여함으로써 증식성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 화합물 A의 투여량은 PI3K δ의 선택적 억제에 의해 증식성 질환을 치료 (또는 치료를 용이화)하는데 충분한 양이다.

[0265] [00202] 본 발명의 조합물은 비제한적인 예로서 다음을 비롯한 다양한 암을 치료하는데 유용하다:

[0266] ● 다음의 암종을 포함하는 암종: 방광, 유방, 결장, 신장, 간, 폐(소세포폐암을 포함), 식도, 담낭, 자궁, 난소, 고환, 후두, 구강, 위장관 (예컨대, 식도, 위, 췌장), 뇌, 자궁경부, 갑상선, 전립선, 혈액 및 피부(편평세포 암종을 포함);

[0267] ● 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 림프모구 백혈병, B 세포 림프종, T 세포 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 털세포 림프종 및 버킷 림프종을 비롯한, 림프구 계통의 조혈 종양;

[0268] ● 급성 및 만성 골수성 백혈병, 골수형성이상증후군 및 전골수세포 백혈병을 비롯한 골수 계통의 조혈 종양;

- [0269] ● 섬유육종 및 횡문근육종을 비롯한, 중간엽 기원의 종양;
- [0270] ● 별아교세포종, 신경모세포종, 신경아교종 및 슈반세포종을 비롯한 중추 및 말초신경계의 종양; 및
- [0271] ● 흑색종, 고환종, 기형암종, 골육종, 케라토탄토마 (keratoctanthoma) 갑상선 소포암 및 카포시 육종을 비롯한 기타 종양.
- [0272] [00203] 세포자멸사의 조절제로서의 본 발명의 조합물은 암(전술한 유형의 암을 포함하나 이에 한정되지 않음)을 치료, 예방 및 억제하는데 유용하다.
- [0273] [00204] 본 발명의 조합물은 암의 화학예방에 유용하다. 화학예방(Chemoprevention)은 돌연변이발생 이벤트의 개시를 차단하거나, 이미 발작을 겪은 전악성 세포의 진행 차단 또는 종양 재발의 억제에 의해 침윤성 암의 발달을 억제하는 것을 포함한다. 본 발명의 화합물들은 또한 종양 혈관형성 및 전이를 억제하는데도 유용하다. 본 발명의 일 구체예는 본 발명의 1종 이상의 화합물을 유효량으로 투여함으로써 환자에 있어서 종양 혈관형성 또는 전이를 억제하는 방법이다.
- [0274] [00205] 본 발명은 또한 면역계-관련 질환(예컨대, 자가면역 질환), 염증을 동반하는 질환 또는 장애 (예컨대, 천식, 만성 폐쇄성 폐질환, 류마티스 관절염, 염증성 장질환, 사구체신염, 신경염증성 질환, 다발경화증, 포도막염 및 면역계 질환), 암, 또는 기타 증식성 질환, 간 질환 또는 장애 또는 신장 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 본 발명의 조합물의 유효량을 투여하는 것을 포함한다.
- [0275] [00206] 본 발명의 화합물에 의해 치료가능한 면역 질환의 비제한적인 예로는 건선, 류마티스 관절염, 맥관염, 염증성 장질환, 피부염, 골관절염, 천식, 염증성 근육질환, 알레르기성 비염, 질염, 간질성 방광염, 공피증, 골다공증, 습진, 동종이형 또는 이종발생형 이식(장기, 골수, 줄기세포 및 기타 세포 및 조직) 이식편 거부, 이식편-대-숙주 질환, 홍반루푸스, 염증성 질환, I형 당뇨병, 폐섬유증, 피부근염, 쇄그렌 증후군, 갑상선염(예컨대, 하시모토 및 자가면역성 갑상선염), 중증근육무력증, 자가면역성 용혈성 빈혈, 다발경화증, 낭성섬유증, 만성 재발성 간염, 원발성 담즙성 간경변, 알레르기성 결막염 및 아토피 피부염을 들 수 있다.
- [0276] [00207] 본 발명은 또한 본 발명의 조합물의 치료적 유효량을 투여함으로써 환자에 있어서 백혈병을 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 만성 림프구 백혈병(CLL), 비호지킨 림프종 (NHL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 다발골수종 (MM), 소림프구 림프종(SLL), 및 무통성 비호지킨 림프종(I-NHL)을 치료하는데 효과적이다.
- [0277] [00208] 전술한 치료방법에 있어서, 본 발명의 조합물과 함께 1종 이상의 부가적인 활성제제를 투여할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 조합물은 공지 항암치료법 예컨대 방사능요법과 조합되거나(함께 또는 순차적으로 투여됨) 또는 1종 이상의 세포증식억제, 세포독성 또는 항암제 예컨대 DNA 상호작용제제 예컨대 시스플라틴 독소루비신; 토포이소머라제 II 억제제, 예컨대 에토포시드; 토포이소머라제 I 억제제 예컨대 CPT-11 또는 토포테칸; 튜불린 상호작용 제제 예컨대 천연 또는 합성의 파클리탁셀, 도세탁셀 또는 에포틸론 (예컨대 익사베필론); 호르몬 제제 예컨대 타목시펜; 티미딜레이트 합성효소 억제제 예컨대 5-플루오로우라실; 및 항대사산물 예컨대 메토트렉세이트; 기타 티로시나제 키나아제 억제제 예컨대 Iressa 및 OSI-774; 혈관형성 억제제; EGF 억제제; VEGF 억제제; CDK 억제제; SRC 억제제; c-Kit 억제제; 에르비투스(EGF) 및 허셉틴(Her2)과 같이 성장인자 수용체에 지향된 Her1/2 억제제 및 모노클로날 항체; 및 기타 단백질 키나아제 조절제와 조합 사용되는데 유용하다. 부가적인 활성약물은 또한 프로테아좀 억제제, 보르테오미드 (Velcade[®]), 카르필조미드 (PR-171), PR-047, 디술피람, 락타시스틴, PS-519, 에포네마이신, 에폭소마이신, 아클라시노마이신, CEP-1612, MG-132, CVT-63417, PS-341, 비닐 술폰 트리캡타이드 억제제, 리토나비어, PI-083, (+/-)-7-메틸로무랄라이드, (-)-7-메틸로무랄라이드, 레날리도마이드 (Revlimid[®]), 또는 이들의 조합물일 수 있다.
- [0278] [00209] 본 발명의 조합물은 또한 1종 이상의 스테로이드계 소염약물, 비스테로이드계 소염약물(NSAIDs) 또는 면역선택적 소염 유도제(ImSAIDs)와 함께 조합 (함께 또는 순차 투여됨) 사용되는데도 유용하다.
- [0279] [00210] 특정한 일 구체예에서, 암은 혈액암 및/또는 고형 종양이다. 또 다른 특정 구체예에서, 혈액암은 백혈병 또는 림프종이다.
- [0280] [00211] 몇몇 구체예에서, 림프종은 성숙한(말초) B 세포 신생물이다. 특정 구체예에서, 성숙한 B 세포 신생물은 B 세포 만성 림프성 백혈병/소 림프성 림프종; B 세포 전림프성 백혈병; 림프형질세포성 림프종; 변연부 림프종, 예컨대 비장 변연부 B 세포 림프종 (+/-용모 림프구), 결절 변연부 림프종 (+/-단핵구모양 B 세포들), 및

점막-관련 림프구 조직(MALT) 유형의 엑스트라결절 변연부 B 세포 림프종; 털세포 백혈병; 형질세포 골수종/형질세포종; 소포림프종, 모낭 중심; 맨틀세포 림프종; 광범위 큰세포 B 세포 림프종 (세로칸 큰세포 B 세포 림프종, 혈관내 큰세포 B 세포 림프종, 및 원발성 삼출 림프종을 포함); 및 버킷 림프종/버킷 세포 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택된다

[0281] [00212] 몇몇 구체예에서, 림프종은 다발골수종 (MM) 및 비호지킨 림프종(NHL), 외투세포 림프종(MCL), 소포림프종, 발덴스트롬 마크로글루볼린혈증(WM) 또는 B 세포 림프종 및 광범위 큰 B 세포 림프종 (DLBCL)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0282] [00213] 또 다른 특정 구체예에서, 백혈병은 급성 림프구 백혈병/ 급성 림프모구 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 림프구 백혈병(CLL), 및 소림프구 림프종(SLL)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 몇몇 구체예에서, 비호지킨 림프종(NHL)은 공격적 NHL 또는 무통성 NHL로부터 선택된다. 공격적 NHL의 예로는 B 세포 신생물, 광범위 큰세포 B 세포 림프종, T/NK 세포 신생물, 역형성 큰세포 림프종, 말초 T 세포 림프종, 전구체 B-림프모구 백혈병/림프종, 전구체 T-림프모구 백혈병/림프종, 버킷 림프종, 성인 T 세포 림프종/백혈병 (HTLV1+), 원발성 CNS 림프종, 맨틀세포 림프종, 다형성 이식후 림프세포증식 질환(PTLD), AIDS-관련 림프종, 진성 조직구성 림프종, 및 모세포 NK-세포 림프종을 들 수 있다. 공격적 NHL의 가장 흔한 유형은 광범위 큰세포 림프종이다. 무통성 NHL의 비제한적인 예로는 소포림프종, 소 림프성 림프종, 변연부 림프종 (예컨대 엑스트라결절 변연부 림프종 (점액관련 림프세포 조직-MALT 림프종이라고도 칭해짐), 결절 변연부 B 세포 림프종 (단핵구모양 B 세포 림프종), 비장 변연부 림프종), 및 림프형질세포성 림프종 (발덴스트롬 마크로글루볼린혈증)을 들 수 있다. 몇몇 구체예에서, 대상자는 공격적 NHL 또는 무통성 NHL을 앓는다.

[0283] [00214] 몇몇 구체예에서, 환자는 외투세포 림프종(MCL), 광범위 큰세포 B 세포 림프종 (DLBCL), 소포림프종 (FL), 급성 림프구 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 림프구 백혈병(CLL), 및 소림프구 림프종 (SLL), 다발골수종 (MM), 및 변연부 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 병태를 갖는다.

[0284] [00215] 몇몇 구체예에서, 환자는 재발성 또는 난치성 병태를 갖는다. 특정 구체예에서, 대상자는 화학치료법으로는 난치성이거나 또는 화학요법 치료 후 재발된다.

[0285] [00216] 몇몇 구체예에서, 암은 리툽시맙 치료에 대해 내성을 갖는다. 몇몇 구체예에서, 암은 리툽시맙 치료에 대해 감소된 응답을 나타낸다. 몇몇 구체예에서, 대상자는 이전에 리툽시맙으로 치료된 경력이 있다.

[0286] [00217] 특정한 일 구체예에서, 이 방법은 환자에 있어서 NF-카파-B 활성 수준의 감소, SNAIL 발현의 감소, RKIP 활성의 증가, PTEN 활성의 증가, TRAIL-세포자멸사에 대한 중앙 감작성의 증가, PI3K δ 활성 수준의 감소 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0287] [00218] 특정한 일 구체예에서, 화학식 A의 화합물과 항CD20 항체와의 조합물은 인간 전혈로부터 B 세포를 고갈시킨다. 몇몇 구체예에서, 화학식 A의 화합물과 항CD20 항체와의 조합물은, 화학식 A의 화합물 또는 항CD20 항체가 인간 전혈로부터 B 세포를 고갈시키는 것보다 더 큰 정도로 인간 전혈로부터 B 세포를 고갈시킨다. 몇몇 구체예에서, 화학식 A의 화합물과 항CD20 항체와의 조합물은 화학식 A의 화합물에 의한 고갈과 항CD20 항체에 의한 고갈의 합보다 더 큰 정도로 전혈로부터 B 세포를 고갈시킨다.

[0288] [00219] 몇몇 구체예에서, 화학식 A의 화합물 및 항CD20 항체는 과도한 B 세포 증식과 관련된 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 이용되는데, 상기 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 대상자에게 화학식 A의 화합물 및 항CD20 항체를 투여하는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 화학식 A의 화합물 및 항CD20 항체는 과도한 B 세포 활성화와 관련된 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 이용되는데, 상기 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 대상자에게 화학식 A의 화합물 및 항CD20 항체를 투여하는 것을 포함한다. 몇몇 구체예에서, 화학식 A의 화합물 및 항CD20 항체는 과도한 수의 B 세포와 관련된 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 이용되는데, 상기 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 대상자에게 화학식 A의 화합물 및 항CD20 항체를 투여하는 것을 포함한다.

[0289] [00220] 화학식 A의 화합물은 국제특허출원공개 No. WO 2011/055215 A2 및 미국특허 출원공개 No. 2011/0118257 A1에 개시된 일반 합성법을 이용하여 제조될 수 있으며, 특정한 화합물의 제조법이 2012년 7월 4일자 인도 가특허출원 2693/CHE/2012, 2012년 8월 21일자 미국 가특허출원 No. 61/691,586, 2013년 7월 2일자 PCT/US2013/055434 및 2013년 7월 2일자 미국출원 No. 13/933,856에 설명되어 있다. 이들 각 출원 및 공개문헌의 내용은 그 전체가 본 발명에 참조 병합된다.

도면의 간단한 설명

[0290]

[0051] 도 1: 인간 전혈로부터 CD19-포지티브 세포 고갈 (좌측) 및 CD20-포지티브 세포 고갈 (우측)에 미치는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 및 유블리톡시맙의 효과를 나타내는 막대 그래프.

[0052] 도 2: 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 및 유블리톡시맙이 LPS-유도된 CD19-포지티브 세포 증식에 미치는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 및 유블리톡시맙의 효과를 나타내는 도면.

[0053] 도 3: LPS-유도된 CD20-포지티브 세포 증식에 미치는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 및 유블리톡시맙의 효과를 나타내는 막대 그래프.

[0054] 도 4: Daudi, RPMI-8226, Raji, 및 U266B1 세포에서 세포자멸사에 미치는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 및 유블리톡시맙의 효과를 나타내는 막대 그래프.

[0055] 도 5: U266B1 세포에서 세포 사이클에 미치는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체의 효과를 나타내는 U266B1 세포 히스토그램.

[0056] 도 6: U266B1 세포에서 세포 사이클에 미치는 항CD20 항체 유블리톡시맙의 효과를 나타내는 히스토그램.

[0057] 도 7: U266B1 세포에서 세포 사이클에 미치는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 및 항CD20 항체 유블리톡시맙의 효과를 나타내는 히스토그램.

[0059] 도 8: Raji 세포에서 세포 사이클에 미치는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체의 효과를 나타내는 히스토그램.

[0059] 도 9: Raji 세포에서 세포 사이클에 미치는 항CD20 항체 유블리톡시맙의 효과를 나타내는 히스토그램,

[0060] 도 10: Raji 세포에서 세포 사이클에 미치는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 및 항CD20 항체 유블리톡시맙의 효과를 나타내는 히스토그램.

[0061] 도 11: LY1 세포에서 세포자멸사에 미치는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 및 유블리톡시맙의 효과를 나타내는 카스파제 3 활성의 플롯.

[0062] 도 12: Raji 세포에서 세포자멸사에 미치는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 및 유블리톡시맙의 효과를 나타내는 카스파제 3 활성의 플롯.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0291]

실시예

[0292]

화학식 A의 화합물의 합성

[0293]

[00221] 달리 명시되지 않는 한, 정제는 정지상으로서 실리카겔을 사용하고 이동상으로서 적절한 극성을 갖는 메탄올 및 에틸 아세테이트 또는 디클로로메탄 및 페트롤륨 에테르 (비점 60-80℃)와의 혼합물을 이용하는 컬럼 크로마토그래피를 의미한다 "RT"라는 용어는 주변 온도(25-28℃)를 가리킨다.

[0294]

중간체 1: 2-(1-브로모에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온

[0295]

[00222] **단계-1** [1-(5-플루오로-2-히드록시페닐)-2-(3-플루오로페닐)에탄온]: 3-플루오로페닐아세트산 (7.33 g, 47.56 mmol)을 25 ml 디클로로메탄에 용해시켰다. 이 혼합물에, 옥살릴클로라이드(7.54 g, 59.46 mmol) 및 DMF (3 방울)을 0℃에서 첨가하고 30분간 교반하였다. 용매를 증발시키고 25 ml 디클로로메탄에 용해시켰다. 이 혼합물에, 4-플루오로아니솔 (5.00 g, 39.64 mmol)을 첨가하고 0℃로 냉각하였다. 0℃에서, AlCl₃ (7.95 g, 59.46 mmol)을 첨가하고 반응 혼합물을 RT로 승온시킨 다음 12 시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 2N HCl 첨가에 의해 급냉(quenched)시키고, 에틸 아세테이트로 추출한 다음, 황산나트륨으로 건조 및 농축하였다. 조질의 생성물을 에틸 아세테이트:페트롤륨 에테르를 이용하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 무색의 고체로서 얻었다(4.5 g, 45% 수율). ¹H-NMR (δ ppm, DMSO-D₆, 400 MHz): δ 11.34 (s, 1H), 7.75 (dd, J=9.4, 3.1 Hz, 1H), 7.42 (m, 2H), 7.12 (m, 3H), 7.05 (dd, J=9.0, 4.5 Hz, 1H), 4.47 (s, 2H).

[0296]

[00223] **단계-2** [2-에틸-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온]: **단계-1** 에서 수득한 1-(5-플루오로-2-히드록시페닐)-2-(3-플루오로페닐)에탄온(3.00 g, 12.08 mmol)을 둥근 바닥 플라스크에 넣고 여기에 트리에틸아민 (25 ml) 및 무수 프로피온산 (4.92 g, 37.82 mmol)을 첨가한 다음 혼합물을 24 시간 환류시켰다. RT

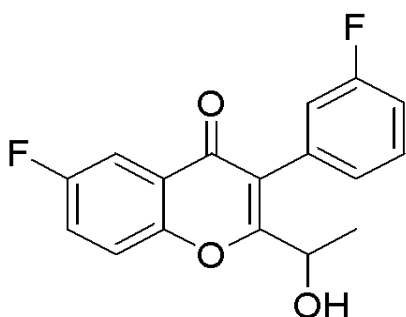
로 냉각시킨 후, 1N HCl 용액 첨가에 의해 반응 혼합물을 산성화시키고, 에틸 아세테이트로 추출한 다음, 중탄산나트륨 용액으로 세척하고, 황산나트륨으로 건조 및 농축하였다. 조질의 생성물을 에틸 아세테이트:페트롤륨 에테르를 이용하는 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 회황색 고체로서 수득하였다 (1.80 g, 52% 수율). $^1\text{H-NMR}$ (δ ppm, DMSO- D_6 , 400 MHz): δ 7.80 (m, 1H), 7.76 (m, 2H), 7.51 (dd, $J=8.0$, 6.4 Hz), 7.22 (m, 1H), 7.18 (m, 2H), 2.56 (q, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.20 (t, $J=7.6$ Hz, 3H).

[0297]

[00224] 단계-3: 사염화탄소 (20 ml) 중 **단계-2**로부터 수득한 2-에틸-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온(1.80 g, 6.28 mmoles)의 용액에, N-브로모숙신이미드(1.11 g, 6.28 mmoles)를 첨가하고 80°C로 가열하였다. 아조비스이소부티로니트릴 (10 mg)을 80°C에서 반응 혼합물에 첨가하였다. 12 시간 후, 반응 혼합물을 RT로 냉각하고, 디클로로메탄을 희석한 다음 물로 세척하였다. 유기층을 황산나트륨으로 건조하고 감압 농축하여 조질의 표제 화합물을 황색 고체로서 수득하였다(1.25 g, 55% 수율). $^1\text{H-NMR}$ (δ ppm, DMSO- D_6 , 400 MHz): δ 7.91 (dd, $J=9.2$, 4.3 Hz, 1H), 7.81 (dt, $J=8.2$, 2.8 Hz, 1H), 7.74 (dd, $J=8.3$, 3.1 Hz, 1H), 7.57 (m, 1H), 7.32 (dt, $J=8.5$, 2.4 Hz, 1H), 7.19 (m, 2H), 5.00 (q, $J=6.8$ Hz, 1H), 1.97 (d, $J=6.8$ Hz, 3H).

[0298]

중간체 2: 6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-2-(1-히드록시에틸)-4H-크로멘-4-온



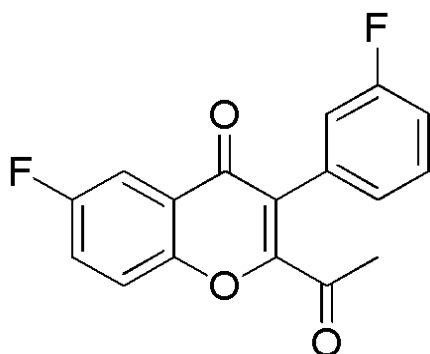
[0299]

[0300]

[00225] DMSO (150 ml) 중 중간체 1 (15.0 g, 40.84 mmol)의 용액에, n-부탄올 (7.5 ml)을 첨가하고 120°C로 3 시간 가열하였다. 반응 혼합물을 RT로 냉각하고, 물로 급냉한 다음 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 황산나트륨으로 건조시키고 감압 농축하였다. 조질의 생성물을 에틸 아세테이트:페트롤륨 에테르를 이용하는 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물을 회백색 고체로서 얻었다(7.90 g, 64%). $^1\text{H-NMR}$ (δ ppm, CDCl_3 , 400 MHz): 7.85 (dd, $J = 8.1$, 3 Hz, 1H), 7.54 (dd, $J = 9.2$, 4.2 Hz, 1H), 7.47-7.37 (m, 2H), 7.15-6.98 (m, 3H), 4.74 (quintet, $J= 6.8$ Hz, 1H), 2.23 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 1.54 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H).

[0301]

중간체 3: 2-아세틸-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온

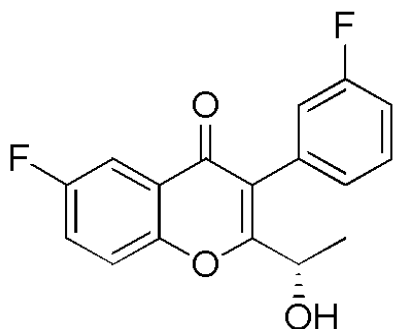


[0302]

[0303]

[00226] DMSO (5.60 ml, 79.14 mmol)를 디클로로메탄 (40 ml)에 첨가하고 -78°C로 냉각한 다음, 옥살릴 클로라이드(3.40 ml, 39.57 mmol)를 첨가하였다. 10분 후, 디클로로메탄 (54 ml) 중 중간체 2 (6.00 g, 19.78 mmol)를 적가하고 20분간 교반하였다. 트리에틸아민 (12 ml)을 첨가하고 1 시간 교반하였다. 반응 혼합물을 물로 급냉하고 디클로로메탄으로 추출하였다. 유기층을 황산나트륨으로 건조시키고 감압 농축하였다. 조질의 생성물을 에틸 아세테이트:페트롤륨 에테르를 이용하는 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황색 고체 (4.2 g, 71%)로서 수득하고 이것을 다음 단계에 그대로 사용하였다.

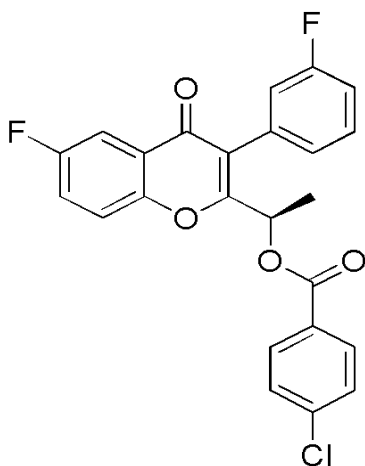
[0304] 중간체 4: (S)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-2-(1-히드록시에틸)-4H-크로멘-4-온



[0305]

[0306] [00227] 중간체 3 (2.00 g, 6.66 mmol)에, R-Alpine 보란(THF 중 0.5 M, 20 ml)을 첨가하고 60℃로 20 시간 가열하였다. 반응 혼합물을 2N HCl으로 급냉하고 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 황산나트륨으로 건조시키고 감압 농축하였다. 조질의 생성물 에틸 아세테이트:페트롤륨 에테르를 이용하는 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 회백색 고체(1.51 g, 75%)로서 수득하였다. 광학순도(Enantiomeric excess): 94.2%, 키랄팩(chiralpak) AD-H 컬럼 상에서 HPLC로 측정시, 급속 용리 이성질체(체류시간: 8.78 분) 농축됨.

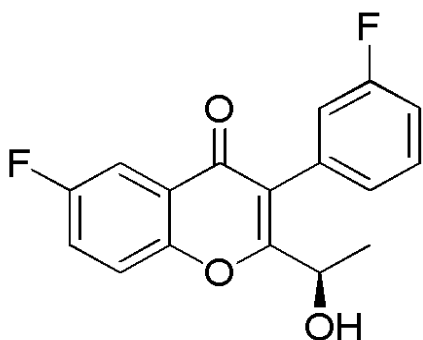
[0307] 중간체 5: (R)-1-(6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4-옥소-4H-크로멘-2-일)에틸 4-클로로벤조에이트



[0308]

[0309] [00228] THF (15 ml) 중 중간체 4 (1.45 g, 4.78 mmol)의 용액에, 4-클로로벤조산 (0.748 g, 4.78 mmol) 및 트리페닐포스핀 (1.88 g, 7.17 mmol)을 첨가하고 45℃로 가열한 다음 디이소프로필아조디카르복실레이트 (1.4 ml, 7.17 mmol)를 첨가하였다. 1시간 후, 반응 혼합물을 농축하고 잔사를 에틸 아세테이트:페트롤륨 에테르를 이용하는 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 회백색 고체(1.81 g, 86%)로서 수득한 다음 이를 다음 단계에 추가 정제 없이 사용하였다.

[0310] 중간체 6: (R)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-2-(1-히드록시에틸)-4H-크로멘-4-온



[0311]

[0312] 방법 A

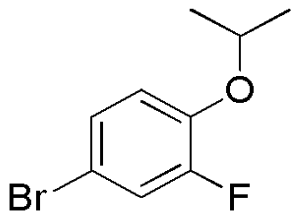
[0313] [00229] 메탄올 (17 ml) 중 중간체 5 (1.75 g, 3.96 mmol)를 10℃로 냉각하고, 탄산칼륨 (0.273 g, 1.98 mmol)을 첨가하여 30분간 교반하였다. 반응 혼합물을 농축하고 2N HCl 용액으로 산성화시킨 다음 에틸 아세테이트로 추출하고, 황산나트륨으로 건조 및 감압 농축하였다. 조질의 생성물을 에틸 아세테이트:페트롤륨 에테르를 이용하는 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황색 고체(1.05 g, 87% 수율)로서 수득하였다. 광학순도: 93.6%, 키랄팩 AD-H 컬럼 상에서 HPLC로 측정시 후기 용리 이성질체 (체류시간: 11.12 분)에 농축됨.

[0314] **방법 B**

[0315] [00230] **단계-1** [(R)-2-(1-(벤질옥시)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온]: 디클로로메탄 중 1-(5-플루오로-2-히드록시페닐)-2-(3-플루오로페닐)에탄올 (11.00 g, 44.31 mmol)에, HATU (33.7 g, 88.63 mmol) 및 R-(+)-2-벤질옥시프로피온산 (9.58 g, 53.17 mmol)을 첨가하고 10분간 교반하였다. 트리에틸아민 (66.7 ml, 0.47 mol)을 적가하고 RT에서 24 시간 교반하였다. 반응 혼합물을 물로 급냉하고, 디클로로메탄으로 추출한 다음, 황산나트륨으로 건조 및 감압 농축하였다. 조질의 생성물을 에틸 아세테이트:페트롤륨 에테르를 이용하는 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황색 고체 (10.5 g, 60% 수율)로서 수득하였다. ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 7.85 (dd, J = 8.1, 3 Hz, 1H), 7.58 (dd, J = 9.1, 4.1 Hz, 1H), 7.47-7.39 (m, 1H), 7.39-7.34 (m, 1H), 7.28-7.20 (m, 3H), 7.20-7.14 (m, 2H), 7.16-7.07 (m, 1H), 6.99-6.89 (m, 2H), 4.50-4.31 (m, 3H), 1.56 (d, J = 6.4 Hz, 3H).

[0316] [00231] **단계-2**: 디클로로메탄 (110 ml) 중 **단계-1**에서 수득한 (R)-2-(1-(벤질옥시)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온(10.5 g, 26.69 mmol)을 0℃로 냉각하고, 알루미늄 클로라이드 (5.35 g, 40.03 mmol)를 적가한 다음 RT에서 6 시간 교반하였다. 반응 혼합물을 2N HCl 용액으로 급냉하고, 디클로로메탄으로 추출한 다음 황산나트륨으로 건조 및 감압 농축하였다. 조질의 생성물을 에틸 아세테이트:페트롤륨 에테르를 이용하는 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 중간체 6을 황색 고체(6.1 g, 76% 수율)로서 수득하였다. 광학순도: 97.7%, 키랄팩 AD-H 컬럼 상에서 HPLC로 측정시 후기 용리 이성질체 (체류시간: 11.12 분) 농축됨.

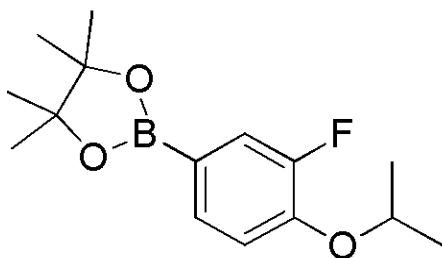
[0317] **중간체 7: 4-브로모-2-플루오로-1-이소프로폭시벤젠**



[0318]

[0319] [00232] THF (100ml) 중 4-브로모-3-플루오로페놀 (10 g, 52.35 mmol)의 용액에, 이소프로필 알코올 (4.8 ml, 62.62 mmol) 및 트리페닐포스핀 (20.6 g, 78.52 mmol)을 첨가하고 45℃로 가열한 다음 디이소프로필아조디카르복실레이트 (15.4 ml, 78.52 mmol)를 첨가하였다. 이 혼합물을 1 시간 환류하고, 농축한 다음 잔사를 에틸 아세테이트:페트롤륨 에테르를 이용하는 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 무색 액체(13.1 g, 99% 수율)로서 수득한 후 이것을 정제하지 않고 다음 단계에 이용하였다.

[0320] **중간체 8: 2-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란**

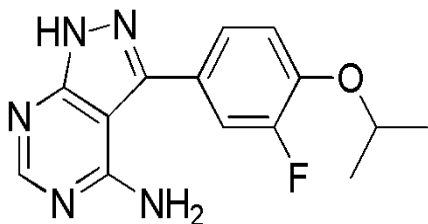


[0321]

[0322] [00233] 디옥산(125 ml) 중 중간체 7 (10.52 g, 107.2 mmol)의 용액에 포타슘 아세테이트 (10.52 g, 107.2 mmol) 및 비스(피나콜라토)디보론 (15 g, 58.96 mmol)을 첨가하고, 용액을 30분간 탈기시켰다. [1,1'-비스(디페닐포스피노)페로센]디클로로 팔라듐(II) CH₂Cl₂ (4.4 g, 5.36 mmol)을 질소 분위기 하에 첨가하고 80℃로 가열

하였다. 12시간 후, 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여과 및 농축하였다. 조질의 생성물을 에틸 아세테이트:페트롤륨 에테르를 이용하는 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 황색 오일(13.9g, 99%)로서 수득하고 이것을 정제하지 않고 다음 단계에 이용하였다.

[0323] **중간체 9: 3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민**



[0324]

[00234] DMF (110 ml) 중 3-요오도-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-4-아민 (11.0 g, 42.14 mmol)의 용액에, 에탄올 (55 ml) 및 물 (55 ml), 중간체 8 (23.4 g, 84.28 mmol) 및 탄산나트륨 (13.3 g, 126.42 mmol)을 첨가하고 30 분간 탈기시켰다. 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0) (2.4 g, 2.10 mmol)을 질소 분위기 하에 첨가하고 80℃로 가열하였다. 12시간 후, 반응 혼합물을 셀라이트를 통해 여여과하고, 농축한 다음 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 황산나트륨으로 건조시키고 감압 농축하였다. 조질의 생성물을 디에틸 에테르로 분쇄하고, 여과 및 진공 건조시켜 표제 화합물을 담갈색 고체(3.2 g, 26% 수율)로서 수득한 다음 이것을 다음 단계에 그대로 사용한다.

[0326] **(RS)- 2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온**

[00235] DMF (2 ml) 중 중간체 9 (0.080 g, 0.293 mmol)의 용액에, 탄산칼륨 (0.081 g, 0.587 mmol)을 첨가하고 RT에서 10분간 교반하였다. 이 혼합물에 중간체 1 (0.215 g, 0.587 mmol)을 첨가하고 12 시간 교반하였다. 반응 혼합물을 물로 희석하고 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 황산나트륨으로 건조시키고 감압 농축하였다. 조질의 생성물을 메탄올: 디클로로메탄을 이용하는 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물을 담황색 고체 (0.045 g)로서 수득하였다. MP: 175-177℃. ¹H-NMR (δ ppm, DMSO-D₆, 400 MHz): δ 8.20 (s, 1H), 7.85 (dd, *J* = 81, 3.0 Hz, 1H), 7.48-7.33 (m, 5H), 7.14 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.02 (m, 2H), 6.90 (m, 1H), 6.10 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 5.42 (s, 2H), 4.64 (quintet, *J* = 6.0 Hz, 1H), 1.99 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.42 (d, *J* = 6.1 Hz, 6H).

[0328] **(S)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온 ("S-이성질체")**

[00236] THF (2.0 ml) 중 중간체 9 (0.134 g, 0.494 mmol)의 용액에, 중간체 6 (0.150 g, 0.494 mmol) 및 트리페닐포스핀 (0.194 g, 0.741 mmol)을 첨가하고 RT에서 5분간 교반하였다. 디이소프로필아조디카르복실레이트 (0.15 ml, 0.749 mmol)를 첨가 및 45℃로 가열하였다. 2 시간 후, 반응 혼합물을 물로 급냉하고 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 황산나트륨으로 건조시키고 감압 농축하였다. 조질의 생성물을 에틸 아세테이트 : 페트롤륨 에테르를 이용하는 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물을 회백색 고체(0.049 g, 20 % 수율)로서 수득하였다. MP: 139-142℃. 질량: 571.7 (M⁺). 광학순도: 89.8% 키랄팩 AD-H 컬럼 상에서 HPLC로 측정시, 급속 용리 이성질체 (체류 시간 = 10.64 분)에 농축됨.

[0330] **(R)-2-(1-(4-아미노-3-(3-플루오로-4-이소프로폭시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)에틸)-6-플루오로-3-(3-플루오로페닐)-4H-크로멘-4-온**

[00237] THF (5.0 ml) 중 중간체 8 (0.284 g, 0.989 mmol)의 용액에, 중간체 4 (0.250 g, 0.824 mmol) 및 트리스(4-메톡시)페닐포스핀 (0.435 g, 1.23 mmol)을 첨가하고 RT에서 5 분간 교반하였다. 디이소프로필아조디카르복실레이트 (0.25 ml, 1.23 mmol)를 RT에서 첨가 및 교반하였다. 12 시간 후 반응 혼합물을 물로 급냉하고 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기층을 황산나트륨으로 건조시키고 감압 농축하였다. 조질의 생성물을 에틸 아세테이트 : 페트롤륨 에테르를 이용하는 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 회백색 고체 (0.105 g, 22 % 수율)로서 수득하였다. MP: 145-148℃. 질량: 571.7 (M⁺). 광학순도: 95.4% 키랄팩 AD-H 컬럼 상에서 HPLC로

측정시, 후기 용리 이성질체 (채류 시간 = 14.83 분)에 농축됨.

[0332] **생물학적 평가**

[0333] 화학식 A의 화합물 및 항CD20 항체의 조합물

[0334] **실시예 1:** 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 및 유블리투시맵 조합물은 전혈로부터 B 세포를 고갈시킨다

[00238] 유세포 분석법을 이용하여, 화학식 A의 화합물의 S-이성질체, 유블리투시맵 (Ubx), 및 그의 조합물이 인간 전혈(HWB)로부터 B 세포를 고갈시키는 능력을 비교하였다. 이 분석에서, 50 μ l의 HWB 샘플을 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 (1000 nM), UBX (100 μ g/ml 내지 0.1 μ g/ml), 또는 1000 nM에서 화학식 A의 화합물의 S-이성질체와 조합된 UBX 로 처리한 다음 37°C 및 5% CO₂에서 24 시간 동안 인큐베이션시켰다. 20 μ l의 처리된 샘플을 1.5 ml 원심분리 튜브에 넣고 CD45 FITC 및 CD19 PE 또는 CD20 FITC 항체로 라벨링하고 RT의 암실에서 1 시간 동안 인큐베이션시켰다. 1 ml의 적혈구 세포(RBC) 용해(lysing) 용액을 첨가하고, 튜브를 3000 rpm에서 10 분간 원심분리하였다. 상등액을 흡입하고, 250 μ l의 PBS를 펠릿에 첨가하였다. 튜브를 보텍스 처리하고 5000 이벤트를 Guava[®] easyCyte[™] 유세포분석기 상에서 획득하고 이를 Incyte Software로 분석하였다.

[00239] CD45-포지티브 세포의 게이트 집단을 CD19에 대해 추가 분석하였다. CD45 및 CD19에 대해 포지티브한 세포 수를 계산하고, 데이터를 집단 중 CD19 포지티브 세포의 백분율로서 표시하였다. CD20-포지티브 집단을 평균 포지티브 마이너스 무라벨 세포로 게이트시키고, 데이터를 집단 중 CD20-포지티브 세포들의 백분율로서 표현하였다. 대조군으로부터의 CD19 / CD20 집단의 손실분을 계산하고 이를 대조군에 대한 % 고갈(depletion)로서 나타내었다

[00240] 결과를 도 1에 나타내었다. 화학식 A의 화합물의 S-이성질체는 10 μ M 이하의 농도에서는 B 세포들에 대해 세포독성적이지 않다. 따라서, CD19-포지티브 또는 CD20-포지티브 HWB B 세포들의 감소는 1 μ M 화학식 A의 화합물의 S-이성질체의 경우 관찰되지 않았다. UBX 항CD20 항체는 1 내지 100,000 ng/ml의 투여량에서는 단지 20-30%의 B 세포들의 고갈을 야기하였으나, CD20+ B 세포들에 있어서는 투여량-의존적 감소를 일으켰다. 1000 nM 화학식 A의 화합물의 S-이성질체와 10 ng/ml UBX와의 조합은 CD19+ 세포 고갈의 강화를 야기하였고, 1000 nM 화학식 A의 화합물의 S-이성질체와 0.1-10 ng/ml 농도의 UBX와의 조합은 경미한(modest) 부가 효과를 일으켰다. 이러한 결과는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 (1000 nM)와 UBX (10 ng/ml)와의 조합이 CD19-포지티브 세포 고갈을 강화하고 CD20-포지티브 세포 고갈에 대해서는 경미한 효과를 나타냈음을 입증하는 것이다.

[0338] **실시예 2:** 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 및 UBX 조합은 LPS-유도된 B 세포 증식을 일으킨다

[00241] HWB에 있어서, CD19 및 CD20 세포의 LPS-유도된 증식에 미치는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체, Ubx, 및 이들의 조합의 효과를 연구하기 위해 유세포분석법을 이용하였다. 이 실험에서, 250 μ l의 희석된 (RPMI-HG Media로 1:3.5 희석) HWB 샘플을 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 (10 μ M 내지 0.1 μ M), UBX (100 μ g/ml 내지 0.1 μ g/ml) 또는 UBX와 1000 nM의 화학식 A의 화합물의 S-이성질체로 15분간 처리한 다음 20 μ g/ml LPS를 도입하고 37°C 및 5% CO₂에서 72 시간 인큐베이션하였다. 20 μ l의 처리된 샘플을 1.5 ml 원심분리 튜브에 넣고 CD20 FITC 및 CD19 PE 항체로 라벨링한 다음 RT의 암실에서 1 시간 인큐베이션하였다. 1 ml의 RBC 용해 용액을 첨가하고 튜브를 3000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 흡입하고, 250 μ l의 PBS를 펠릿에 첨가하였다. 튜브를 보텍스 처리하고, 5000 이벤트를 Guava[®] easyCyte[™] 유세포분석기 상에서 획득하여 Incyte Software로 분석하였다.

[00242] 림프구 포지티브 세포들의 게이트 집단을 CD19 및 CD20에 대해 추가 분석하였다. CD19 및/또는 CD20에 대해 포지티브인 세포들을 계산하고, 데이터를 집단 중 포지티브 세포의 백분율로서 표시하였다. LPS 도입에 의해 대조군으로부터의 포지티브 집단의 손실분을 계산하고 대조군에 대해 % 억제로서 표시하였다.

[00243] 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다. 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 (1 μ M)는 HWB 를 이용한 LPS 유도된 CD19+ B 세포 증식의 투여량-의존 억제를 일으켰다(~60%). 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 1 μ M를 여러 가지 농도의 UBX에 첨가한 경우 CD19+ 세포의 최소 효과로 인해 반응성을 ~ 60% 넘게 증가시키지 않았다. 그러나, CD19+ 세포 증식에 미치는 조합물의 부가적 효과는 100 ng/ml 농도의 UBX에서 인식되었다.

[00244] CD19+ 세포 증식에 미치는 그의 효과와 대조적으로, 화학식 A의 화합물의 S-이성질체는 1 μ M에서 CD20+ 세포를 ~40% 억제시켰다. 1 μ M 화학식 A의 화합물의 S-이성질체와 UBX의 조합의 부가적 효과는 특히,

0.1 ng/ml 투여량에서 명백하였다.

- [0343] **실시예 3:** 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 및 UBX의 조합은 암 세포에서 세포자멸사를 증가시킨다
- [0344] [00245] 화학식 A의 화합물의 S-이성질체, UBX, 및 이들의 조합이 암 세포에서의 세포자멸사에 미치는 효과를 알아보기 위해, *in situ* 카스파제-3 키트 (Millipore)를 이용하였다. 세포들을 0.5×10^6 세포/ml의 농도로 6 웰 플레이트에 도말하고, 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 (1000 nM), UBX (100 $\mu\text{g/ml}$ 내지 0.1 $\mu\text{g/ml}$), 또는 UBX와 1000 nM의 화학식 A의 화합물의 S-이성질체로 처리한 다음, 37°C 및 5% CO₂에서 24 시간 인큐베이션시켰다. 이어서 세포들을 마이크로퓨지 튜브로 옮겨 10 μl 의 갓 제조한 FLICA™ 시약을 넣고 37°C 및 5% CO₂에서 빛을 차단한 채로 1 시간 인큐베이션시켰다. 세척 완충액으로 집중적으로 세척한 후, 테스트 샘플들을 PBS 중의 세포수를 동등하게 조정하였다. 100 μl 의 각 세포 현탁액을 블랙 96-웰 플레이트에 이중 도말하고, 490 nm의 여기 파장 및 520 nm의 방출 파장에서 플레이트 판독기로 형광값을 판독하였다. DMSO 대조군에 대한 형광 강도를 테스트 화합물들의 강도로부터 제하였다. 데이터를 최대 반응(100%)에 대한 백분율로서 나타내고 그에 따라 플롯팅하였다.
- [0345] [00246] 결과를 도 4에 나타내었다. UBX는 시험된 세포주들에서 카스파제-3 활성으로 유도하는데 제한적인 능력을 나타내었다. 카스파제-3 활성은 세포주들을 1 μM 화학식 A의 화합물의 S-이성질체와 함께 인큐베이션시킴으로써 40-75% 증가하였다. Daudi 세포에서는 조합물의 상승 효과가 100 ng/ml UBX 농도에서 나타난 반면, RPMI-8226, Raji, 및 U226B1 세포주에서는 보다 높은 농도 (10 & 100 ng/ml)의 UBX에서도 부가 효과가 관찰되었다.
- [0346] **실시예 4:** 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 및 UBX 조합물은 세포 사이클 정지(Cell Cycle Arrest)를 일으킨다
- [0347] [00247] 암 세포에 있어서 세포 사이클에 미치는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체, UBX, 및 이들의 조합의 효과를 알아보기 위해 세포 사이클 분석 시약(Millipore)을 이용하였다. 이들 실험에서, 세포를 0.5×10^6 세포/ml의 농도로 6-웰 플레이트에 도말하고, 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 (10 μM 내지 0.1 μM), UBX (100 $\mu\text{g/ml}$ 내지 0.1 $\mu\text{g/ml}$), 또는 UBX와 1000 nM의 화학식 A의 화합물의 S-이성질체로 처리한 다음, 37°C 및 5% CO₂에서 72 시간 동안 인큐베이션시켰다. 세포들을 마이크로퓨지 튜브로 옮겨 50 μl 의 세포 사이클 시약을 넣고 RT에서 빛을 차단한 채로 30분간 인큐베이션하였다. 이어서 세포들을 300-400 μl PBS로 희석하고, 최소 10,000 이벤트를 Guava® easyCyte™ 유세포분석기 상에서 획득하였다. 데이터를 Express Pro 소프트웨어로 분석하고 대조군과 상이한 세포 사이클 단계의 세포 집단의 백분율을 히스토그램으로 나타내었다.
- [0348] [00248] 도 5-10은 U266B1, 및 Raji 세포에서 얻어진 결과를 나타낸 도면이다. 이에 더해, 하기의 표 1-12는 U266B1, DB, Raji, 및 Daudi 세포를 이용하여 수득된 정량적 결과를 제공한다.

표 1: U266B1 세포 - 화학식 A의 화합물과 72 시간 인큐베이션

처리	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
대조군	60.22	4.29	31.72	3.01
10,000 nM	2.00	0.94	64.31	28.88
1000 nM	47.80	4.69	47.13	0.88
100 nM	48.69	5.49	45.76	0.75
10 nM	55.33	5.38	39.28	0.76
1 nM	57.73	4.87	36.19	0.94
0.1 nM	59.26	6.55	30.71	2.75

[0349]

표 2: U266B1 세포 – UBX 항 CD20 항체와 72 시간 인큐베이션

처리	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
대조군	60.22	4.29	31.72	3.01
100 ng/ml	52.95	7.91	39.65	1.95
10 ng/ml	56.85	6.34	37.86	0.78
1 ng/ml	58.81	7.07	36.07	0.51
0.1 ng/ml	57.53	7.63	35.64	1.35
0.01 ng/ml	59.32	6.57	35.48	0.74
0.001 ng/ml	60.79	6.00	30.49	1.34

표 3: U266B1 세포 – UBX + 화학식 A 의 화합물 (1000 nM)과 72 시간 인큐베이션

처리	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
대조군	60.22	4.29	31.72	3.01
100 ng/ml + Comp. A	1.25	0.68	84.46	12.76
10 ng/ml + Comp. A	1.68	1.20	84.97	11.70
1 ng/ml + Comp. A	47.97	3.81	46.37	0.63
0.1 ng/ml + Comp. A	47.31	4.28	46.47	0.50
0.01 ng/ml + Comp. A	47.48	3.84	46.51	0.56
0.001 ng/ml + Comp. A	47.09	3.97	47.05	0.59

[0350]

표 4: DB 세포 - 화학식 A 의 화합물과 72 시간 인큐베이션

처리	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
대조군	54.30	8.00	36.38	0.48
10,000 nM	1.40	0.89	94.87	2.06
1000 nM	0.75	0.42	92.79	5.36
100 nM	41.21	6.96	50.22	0.43
10 nM	47.22	4.98	46.85	0.55
1 nM	50.61	6.53	41.44	0.54
0.1 nM	54.37	4.84	39.41	0.84

표 5: DB 세포 - UBX 항 CD20 항체과 72 시간 인큐베이션

처리	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
대조군	54.30	8.00	36.38	0.48
100 ng/ml	45.98	7.66	46.55	0.67
10 ng/ml	49.52	10.07	40.56	0.56
1 ng/ml	51.36	6.46	40.07	0.52
0.1 ng/ml	56.34	12.34	38.40	1.10
0.01 ng/ml	54.99	7.73	34.79	0.73
0.001 ng/ml	54.38	9.45	34.02	0.59

[0351]

표 6: DB 세포 - UBX + 화학식 A 의 화합물과 72 시간 인큐베이션

처리	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
대조군	54.30	8.00	36.38	0.48
100 ng/ml + Comp. A	0.48	0.32	93.78	5.91
10 ng/ml + Comp. A	0.70	0.99	93.34	4.79
1 ng/ml + Comp. A	0.31	0.74	92.65	6.00
0.1 ng/ml + Comp. A	0.44	0.63	92.84	5.83
0.01 ng/ml + Comp. A	0.09	0.84	93.97	4.30
0.001 ng/ml + Comp. A	0.06	0.17	94.48	5.31

표 7: Raji 세포 - 화학식 A 의 화합물과 72 시간 인큐베이션

처리	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
대조군	54.10	9.08	33.54	2.14
10,000 nM	10.12	23.17	58.09	4.90
1000 nM	52.04	3.92	41.21	1.29
100 nM	52.81	6.72	37.80	1.04
10 nM	55.96	5.80	34.81	1.06
1 nM	56.93	5.51	34.13	1.89
0.1 nM	56.54	8.38	33.63	1.32

[0352]

표 8: Raji 세포- UBX 항 CD20 항체와 72 시간 인큐베이션

처리	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
대조군	54.10	9.08	33.54	2.14
100 ng/ml	22.19	11.05	33.74	34.78
10 ng/ml	45.01	8.15	12.90	31.86
1 ng/ml	39.72	14.82	15.35	27.32
0.1 ng/ml	41.11	8.93	22.00	23.73
0.01 ng/ml	54.54	12.65	25.08	5.51
0.001 ng/ml	50.52	10.61	33.66	4.35

표 9: Raji 세포 - UBX + 화학식 A 의 화합물 (1000 nM)과 72 시간 인큐베이션

처리	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
대조군	54.10	9.08	33.54	2.14
100 ng/ml + Comp. A	44.19	3.20	0.21	51.17
10 ng/ml + Comp. A	46.93	5.98	3.20	42.80
1 ng/ml + Comp. A	46.35	6.75	5.98	40.10
0.1 ng/ml + Comp. A	44.85	9.72	13.00	30.88
0.01 ng/ml + Comp. A	50.11	12.22	24.04	13.51
0.001 ng/ml + Comp. A	49.23	5.16	38.21	4.73

[0353]

표 10: Daudi 세포 - 화학식 A 의 화합물과 72 시간 인큐베이션

처리	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
대조군	50.91	11.10	28.51	10.81
10,000 nM	2.53	21.92	65.03	5.01
1000 nM	48.27	7.91	40.10	2.22
100 nM	47.39	11.33	38.05	1.30
10 nM	46.84	12.55	37.79	1.68
1 nM	48.11	13.27	36.75	0.74
0.1 nM	49.56	14.13	33.23	0.34

표 11: Daudi 세포 - UBX 항 CD20 항체와 72 시간 인큐베이션

처리	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
대조군	50.91	11.10	28.51	10.81
100 ng/ml	43.66	9.28	28.55	19.55
10 ng/ml	40.92	13.23	28.08	17.77
1 ng/ml	40.52	17.54	26.99	14.95
0.1 ng/ml	37.40	17.06	32.42	13.42
0.01 ng/ml	36.24	19.15	37.83	6.77
0.001 ng/ml	38.12	17.90	41.95	2.03

[0354]

표 12: Daudi 세포 - UBX + 화학식 A 의 화합물 (1000 nM)과 72 시간 인큐베이션

처리	G0/G1	S	G2/M	Sub G0
대조군	50.91	11.10	28.51	10.81
100 ng/ml + Comp. A	38.37	8.43	12.95	40.24
10 ng/ml + Comp. A	49.56	8.47	9.80	32.17
1 ng/ml + Comp. A	51.73	8.75	11.81	26.26
0.1 ng/ml + Comp. A	56.23	7.25	11.60	24.80
0.01 ng/ml + Comp. A	55.87	6.17	17.00	22.02
0.001 ng/ml + Comp. A	36.58	17.03	35.74	10.64

[0355]

- [0356] [00249] 이들 결과들은 화학식 A의 화합물의 S-이성질체와 접촉한 세포들이 투여량-의존 방식으로 G2/M 정지 (arrest)를 일으켰음을 입증한다. 이에 더해, UBX에 의한 72 시간 처리는 광범위 큰 B 세포 림프종 (DB) 및 U266B1 세포에서 경미한 G2/M 정지를 일으킨 반면, Raji 및 Daudi 세포에서는 Sub G0 세포의 수를 증가시켰다. 1 μ M 화학식 A의 화합물의 S-이성질체와의 조합은 시험된 세포주 전반에 걸쳐 UBX 반응성을 강조시켜주었다.
- [0357] **실시예 5:** 화학식 A의 화합물의 S-이성질체와 UBX의 조합물은 암 세포에 있어서 세포자멸사를 상승적으로 증가시킨다
- [0358] [00250] 암 세포에 있어서 세포자멸사에 미치는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체, UBX, 및 이들의 조합물의 효과를 알아보기 위해, *in situ* 카스파제-3 키트(Millipore)를 이용하였다. 세포들을 0.5×10^6 세포/ml의 농도로 6 웰 플레이트에 도말하고, 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 (200-5000 nM), UBX (10,000 ng/ml 내지 10 ng/ml), 또는 UBX와 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 (지시된 대로)로 처리한 다음, 37°C 및 5% CO₂에서 24 시간 동안 인큐베이션시켰다. 이어서 세포들을 마이크로피지 튜브로 옮기고 10 μ l의 갓 제조된 FLICA™ 시약을 넣은 다음 37°C 및 5% CO₂에서 빛을 차단한 채 1 시간 인큐베이션시켰다. 세척 완충액으로 집중 세척한 후, 테스트 샘플들을 PBS 중에서 세포 수를 동등하게 조정하였다. 100 μ l의 각 8세포 현탁액을 블랙 96-웰 플레이트로 이중 도말하고, 490 nm의 여기 파장 및 520 nm의 방출 파장에서 플레이트 판독기로 형광값을 판독하였다. DMSO 대조군에 대한 형광 강도를 테스트 화합물들의 강도로부터 제하였다. 데이터를 최대 반응(100%)에 대한 백분율로서 나타내고 그에 따라 플롯팅하였다. 데이터를 카스파제-3 활성으로 나타내고 조합지수 (C.I.)를 산출하였다. C.I.가 1 미만이면 상승효과를 1이면 부가효과를, 그리고 1을 초과하면 길항성(antagonism)임을 가리킨다.
- [0359] [00251] DBCL 세포주 LY1에 대한 결과를 도 11 및 표 13-15에 나타내었다. UBX는 LY1에서 카스파제-3 활성을 유도하였다. 카스파제-3 활성은 UBX (모든 농도) 및 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 (1000 nM)의 존재 하에 상승적으로 증가하였다.
- [0360] [00252] 버킷 림프종 세포주 Raji에 대한 결과를 도 12 및 표 16-18에 나타내었다. UBX는 Raji LY1에서 카스파제-3 활성을 유도하였다. 카스파제-3 활성은 UBX (모든 농도) 및 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 (200 nM)의 존재 하에 상승적으로 증가하였다.

표 13: S-이성질체와 인큐베이션된 LY1 세포

[00253] S-이성질체	
[00254] 농도 (nM)	[00255] 카스파제 3 활성
[00256] 200	0.06
[00257] 1000	0.17
[00258] 5000	0.61

[0361]

표 14: UBX 와 인큐베이션된 LY1 세포

[00259] UBX	
[00260] 농도(ng/ml)	[00261] 카스파제 3 활성
[00262] 10	0.23
[00263] 100	0.32
[00264] 1000	0.53
[00265] 10,000	0.59

[0362]

표 15: S-이성질체 및 UBX 와 인큐베이션된 LY1 세포

[00266] 조합			
S-이성질체 (nM)	UBX (ng/ml)	카스파제 3 활성	C.I.
200	10	0.2715	0.6
200	100	0.3404	1.2
200	1000	0.5902	0.2
200	10000	0.6317	0.8
1000	10	0.3811	0.5
1000	100	0.5523	0.2
1000	1000	0.743	0.1
1000	10000	0.8181	0.1
5000	10	0.7359	0.5
5000	100	0.8339	0.3
5000	1000	0.999	0.0
5000	10000	0.999	0.0

[0363]

표 16: S-이성질체와 인큐베이션된 Raji 세포

[00267] S-이성질체	
[00268] 농도(nM)	[00269] 카스파제 3 활성
[00270] 200	0.36
[00271] 1000	0.56
[00272] 5000	0.80

표 17: UBX 와 인큐베이션된 Raji 세포

[00273] UBX	
[00274] 농도(ng/ml)	[00275] 카스파제 3 활성
[00276] 10	0.18
[00277] 100	0.31
[00278] 1000	0.51
[00279] 10,000	0.60

[0364]

표 18: S-이성질체 및 UBX 와 인큐베이션된 Raji 세포

[00280] 조합			
S-이성질체 (nM)	UBX (ng/ml)	카스파제 3 활성	C.I.
200	10	0.696	0.20
200	100	0.895	0.04
200	1000	0.999	0.00
200	10000	0.993	0.00
1000	10	0.805	0.49
1000	100	0.939	0.11
1000	1000	0.928	0.13
1000	10000	0.866	0.30
5000	10	0.901	0.97
5000	100	0.829	2.03
5000	1000	0.861	1.52
5000	10000	0.844	1.80

[0365]

[0366]

[00281] 전술한 바와 같이 카스파제 3 활성화에 미치는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 및 UBX의 조합의 효과를 3 가지 부가적인 세포주인, LY10 (DLBCL), Toledo (DLBCL) 및 Daudi (버킷 림프종)에 대해 평가하였다. 결과를 표 19-21에 나타내었다. 상기 조합은 또한 카스파제 3의 상승적 활성화를 입증하였다.

표 19: S-이성질체 및 UBX (DLBCL)와 인큐베이션된 LY10 세포

S-이성질체 (nM)	UBX (ng/mL)	카스파제 3 활성화	C.I.
5000	50	0.999	0.021
1000	10	0.421	0.560
200	2	0.119	0.440

표 20: S-이성질체 및 UBX (DLBCL)와 인큐베이션된 Toledo 세포

S-이성질체 (nM)	UBX (ng/mL)	카스파제 3 활성화	C.I.
5000	50	0.988	0.336
1000	10	0.685	0.548
200	2	0.136	0.576

표 21: S-이성질체 및 UBX (버킷 림프종)와 인큐베이션된 Daudi 세포

S-이성질체 (nM)	UBX (ng/mL)	카스파제 3 활성화	C.I.
5000	50	0.999	0.004
1000	10	0.594	0.582
200	2	0.296	0.393

[0367]

[0368]

[00282] 전술한 바와 같이 카스파제 3 활성화에 미치는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 및 UBX의 조합의 효과를 3종의 외투세포 림프종(MCL) 세포주들인, Jeko, Maver 및 Rec-1에 대해 평가하였다. 결과를 표 22-24에 나타내었다. 조합물은 보다 높은 S-이성질체 및 UBX 농도에서 최적화된 상승효과로, 카스파제 3의 상승적 활성화를 입증하였다.

표 22: S-이성질체 및 UBX 와 인큐베이션된 Jeko 세포

S-이성질체 (nM)	UBX (ng/mL)	카스파제 3 활성	C.I.
5000	50	0.999	0.000
1000	10	0.655	0.274
200	2	0.335	0.506

표 23: S-이성질체 및 UBX 와 인큐베이션된 Maver 세포

S-이성질체 (nM)	UBX (ng/mL)	카스파제 3 활성	C.I.
5000	50	0.999	0.000
1000	10	0.437	0.603
200	2	0.213	0.648

표 24: S-이성질체 및 UBX 와 인큐베이션된 Rec-1 세포

S-이성질체 (nM)	UBX (ng/mL)	카스파제 3 활성	C.I.
5000	50	0.999	0.000
1000	10	0.484	0.303
200	2	0.403	0.132

[0369]

[0370]

[00283] 전체적으로, 이들 결과는 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 및 UBX가 B 세포 림프종 모델에서 세포자멸사의 마커인 카스파제 3의 활성화를 강력하게 상승작용시킴을 입증하는 것이다.

[0371]

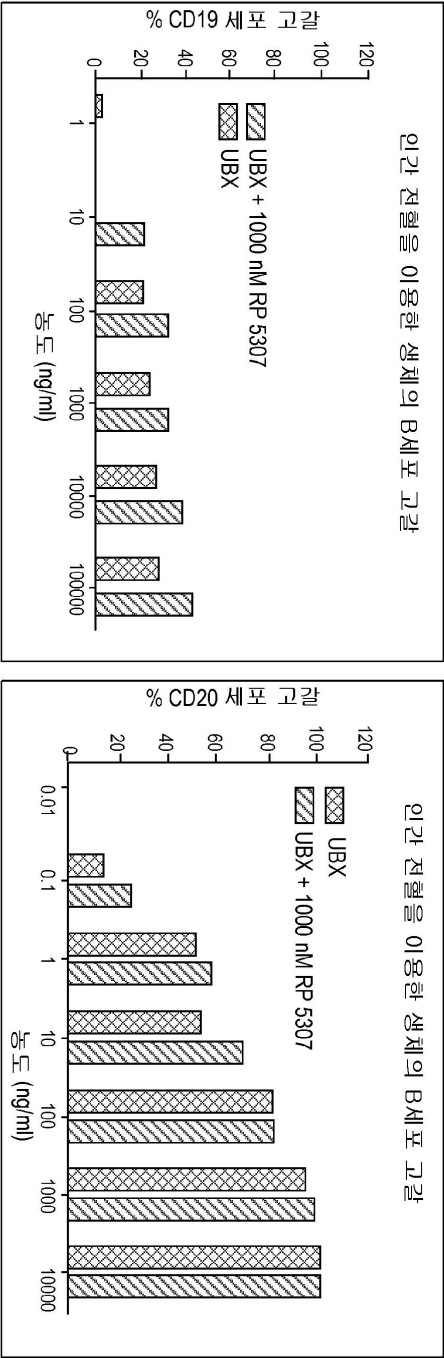
[00284] 특정 기능 및 그의 관련성 실행을 설명하는 기능적 빌딩 블록들의 도움을 받아 이상과 같이 본 발명에 대해 설명하였다. 이러한 기능적 빌딩 블록들의 경계는 본 명세서에서 설명 편의상 임의로 정의되었다. 특정된 기능과 그의 관련성이 적절히 수행되는 한, 다른 대체적인 경계도 규정될 수 있다.

[0372]

[00285] 전술한 특정 구체예에 대한 설명은 본 발명의 일반적인 특징을 여실히 보여주며, 다른 이들도 통상의 기술분야의 지식을 적용함으로써, 과도한 실험 없이, 본 발명의 정신으로부터 벗어나지 않고, 이러한 특정 구체예를 쉽게 변형하거나 및/또는 적절히 다양하게 조정할 수 있을 것이다. 따라서, 이러한 변형 및 조정은 본 명세서에 제시된 교시 및 지침에 기초하여 개시된 구체예의 의미와 동등물 범위 내에 포함되는 것이다. 본 명세서의 문장 및 용어는 어디까지나 설명 목적을 위한 것이지 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니며, 본 명세서의 용어와 문장은 본 명세서의 교시 내용과 지침을 참조로 통상의 기술자에게 적절히 해석될 수 있을 것이다. 본 명세서에 인용된 참조문헌들은 본 발명에 참조 병합되었다.

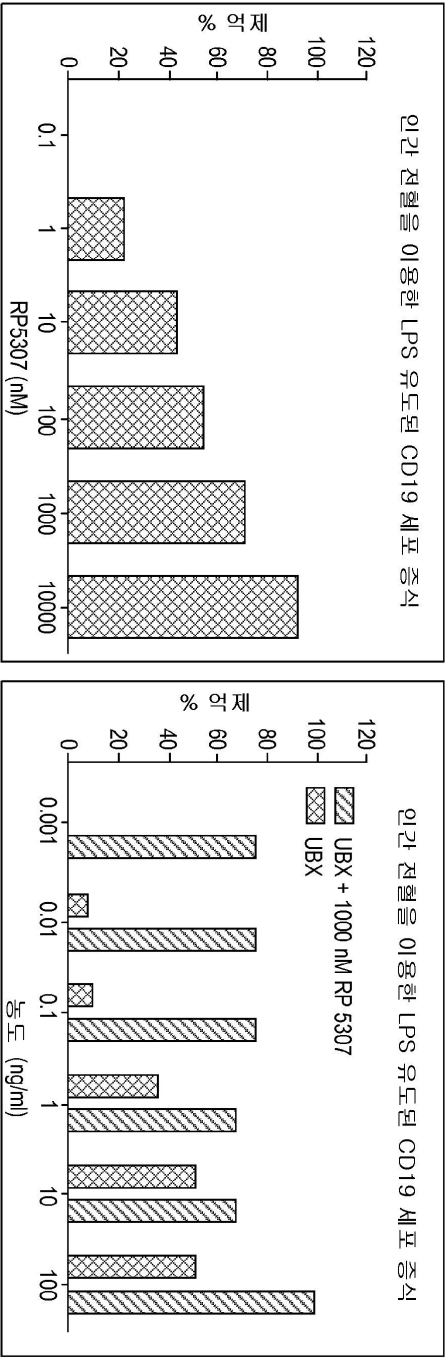
도면

도면1



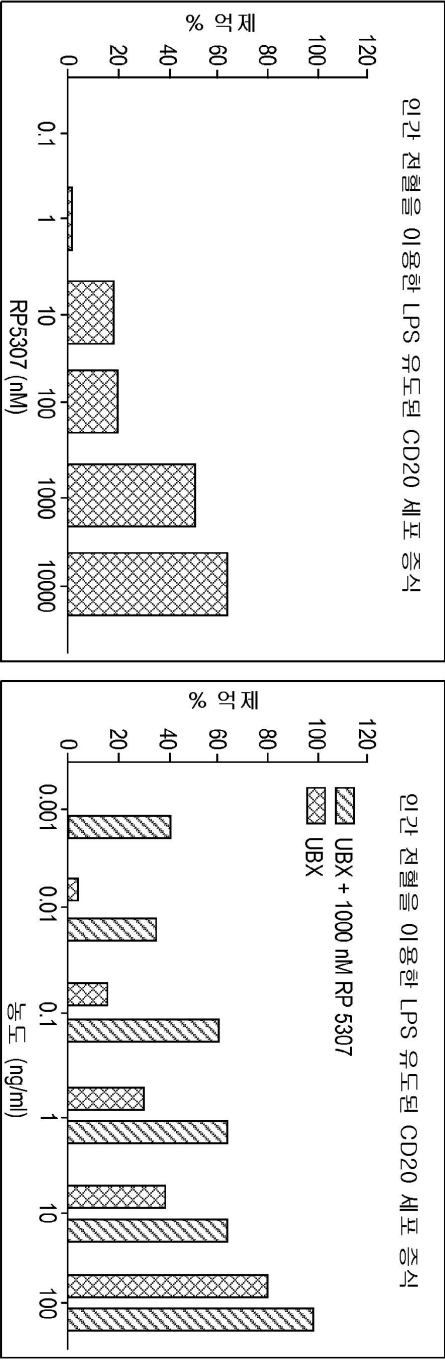
결과

도면2



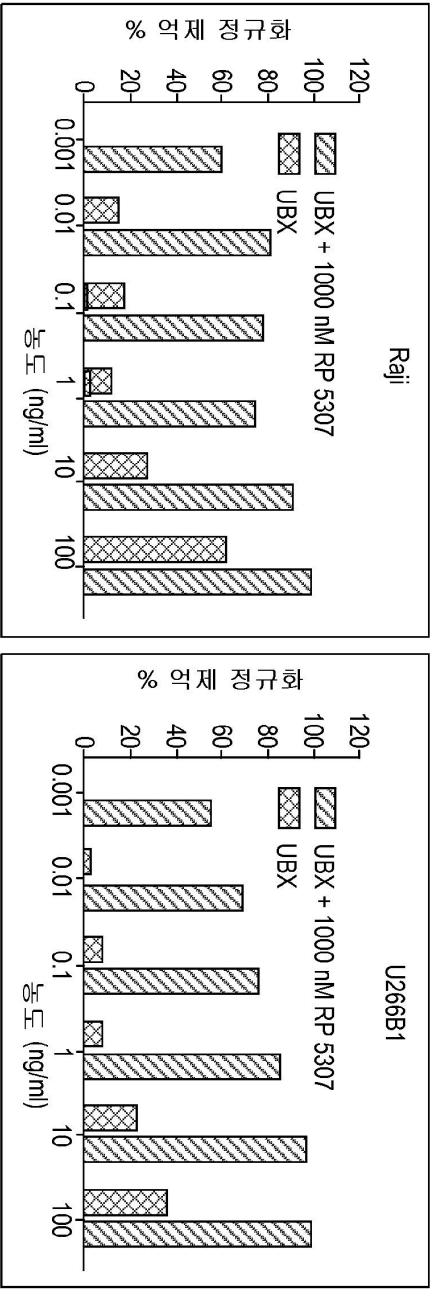
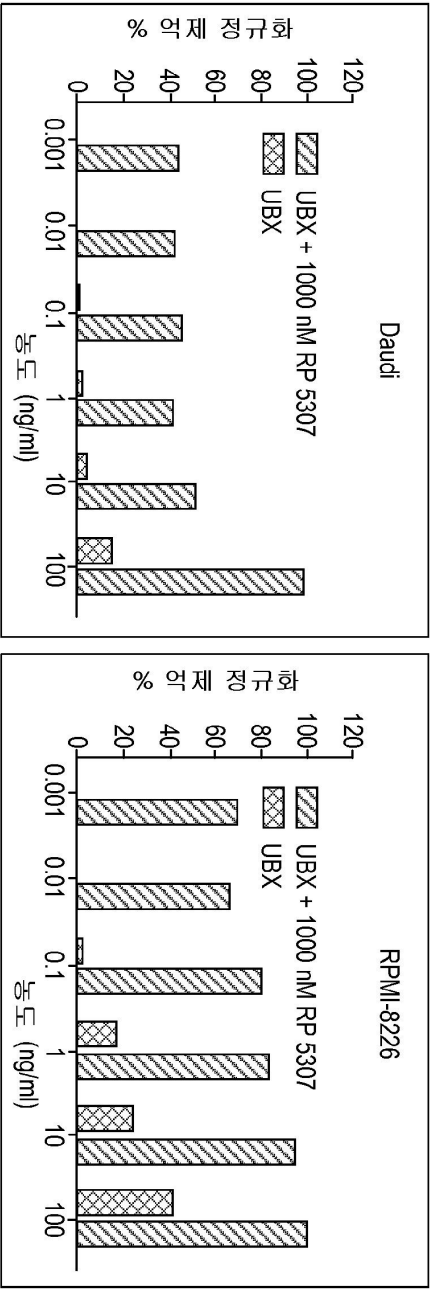
결과

도면3



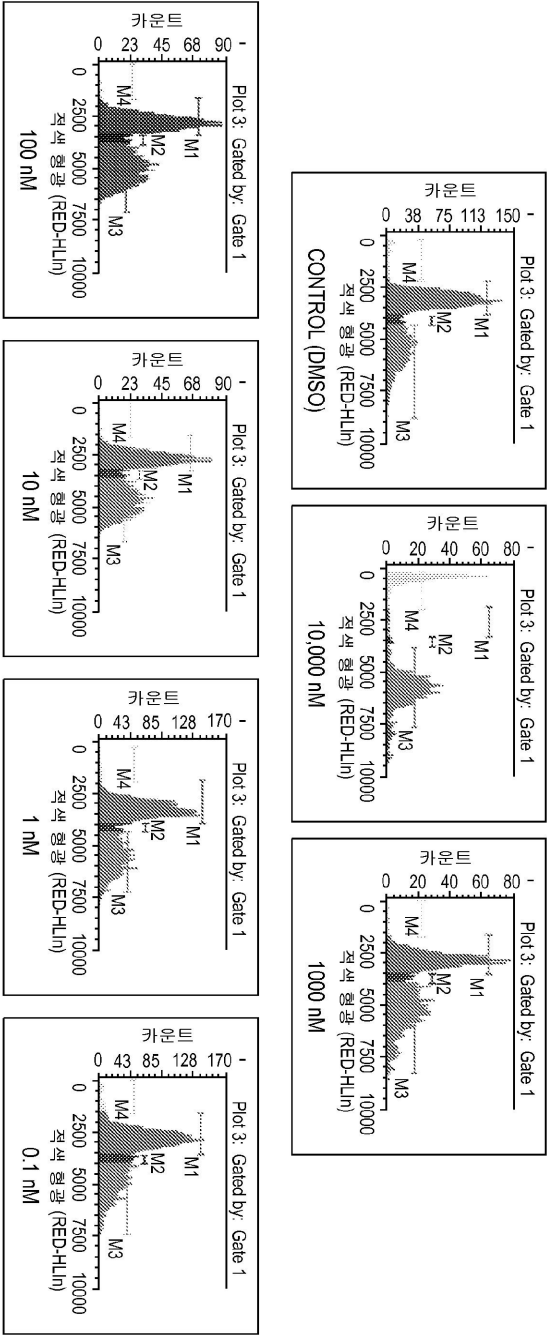
결과

결과



도면4

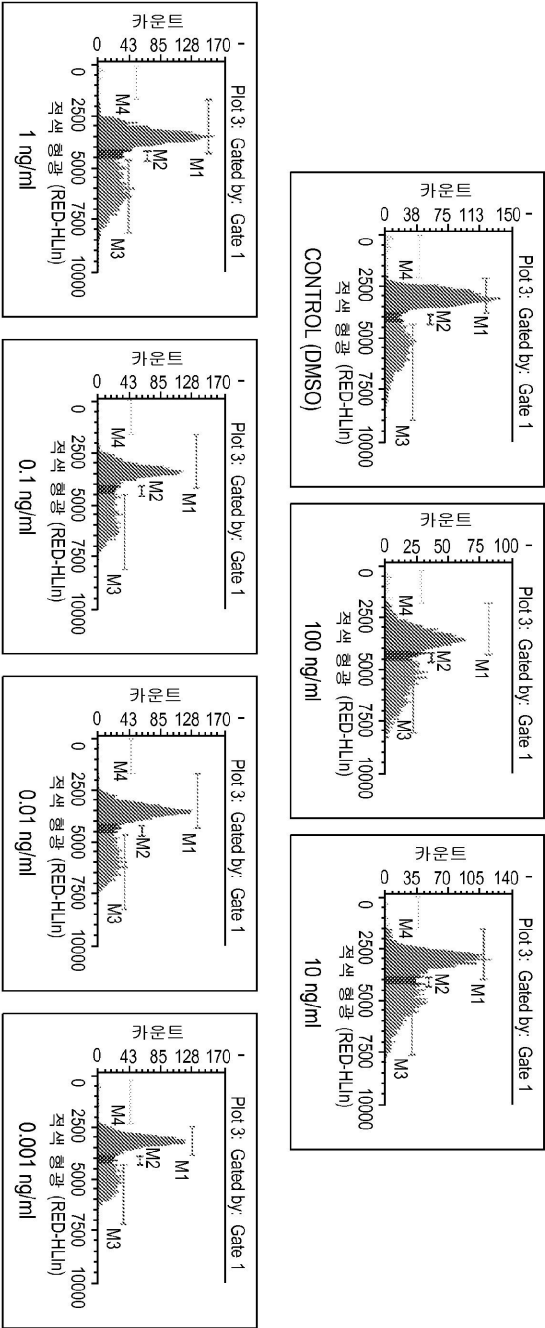
U266B1- 72 h 인큐베이션 -RP 5307



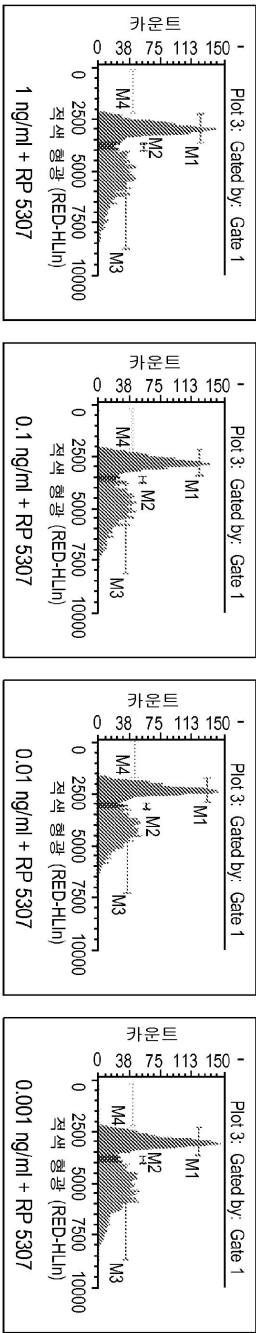
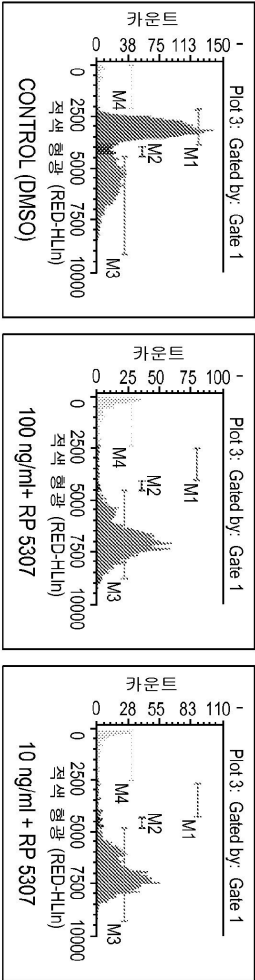
도면5

U266B1- 72 h UBX 항 CD20 항체

도면6

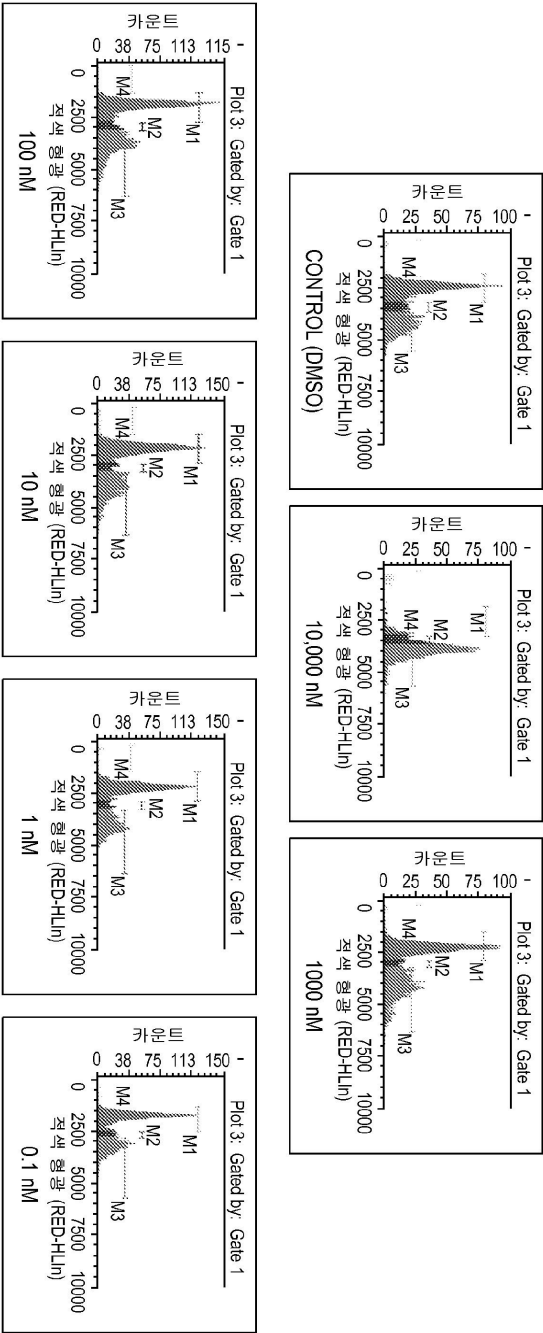


U266B1- 72 h UBX + RP 5307(1000 nM)



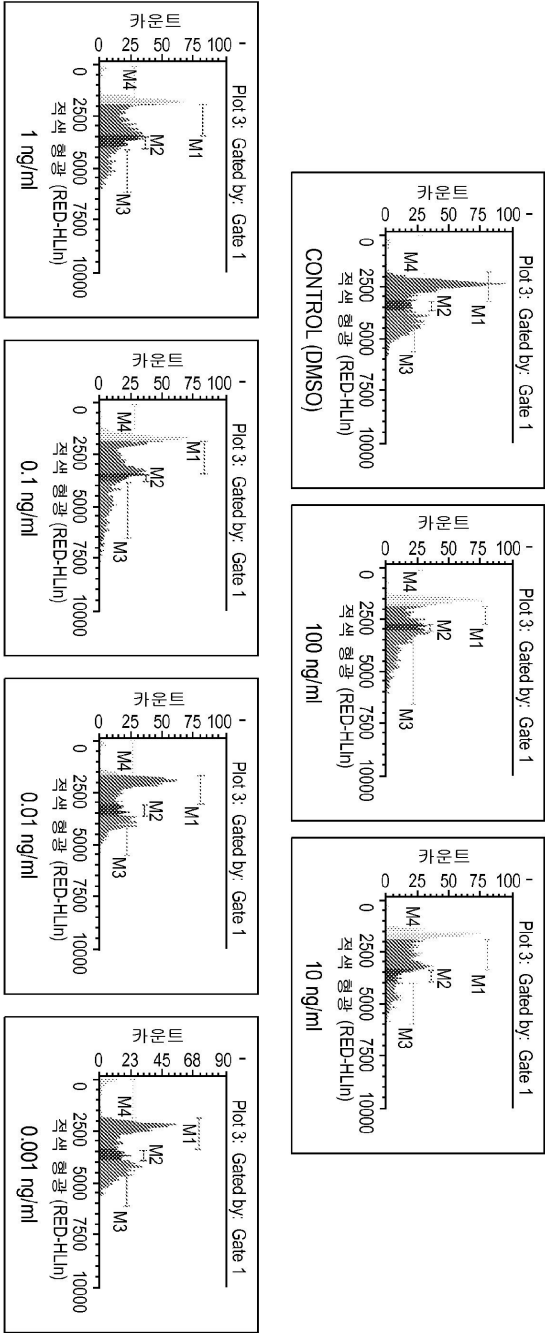
도면7

Raji- 72 h 인큐베이션 -RP 5307



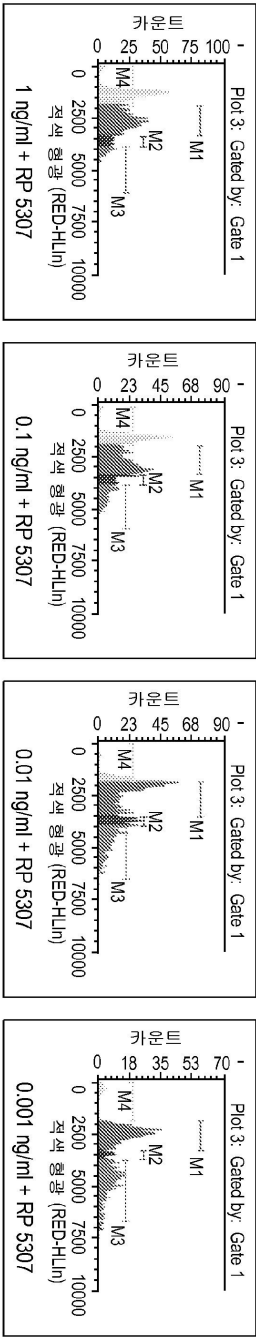
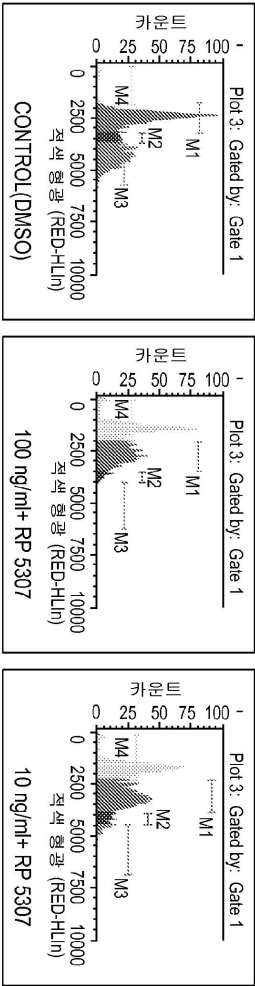
도면8

Raji- 72 h UBX 항 CD20 항체



도면9

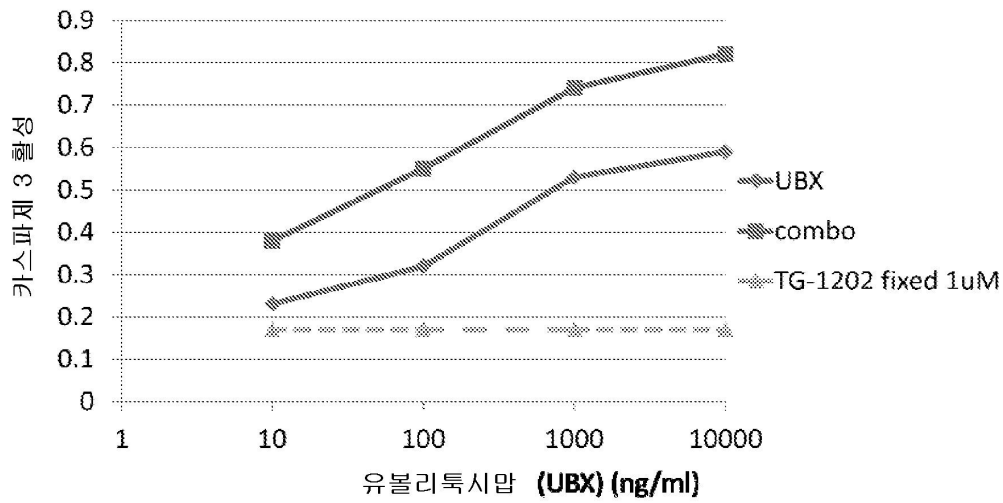
Raji- 72 h UBX + RP 5307(1000 nM)



도면10

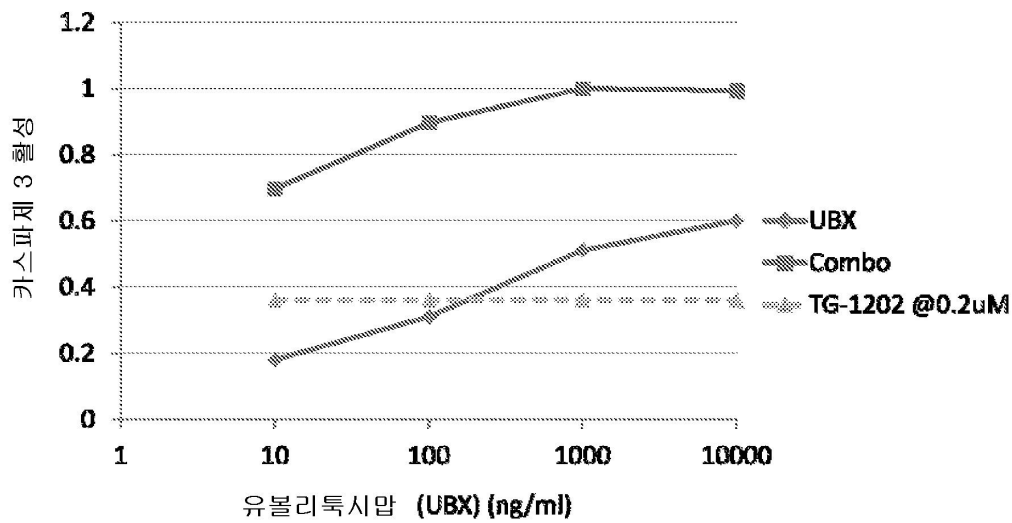
도면11

TGR-1202 및 유볼리톡시맵은 DLBCL 세포주 LY1에서
카스파제 3을 상승적으로 활성화시켰다



도면12

TGR-1202 및 유볼리톡시맵은 버킷 림프종 세포주 Raji에서
카스파제 3을 상승적으로 활성화시켰다



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> TG Therapeutics, Inc.

Rhizen Pharmaceuticals SA

LFB Biotechnologies

<120> COMBINATION OF ANTI-CD20 ANTIBODY AND PI3 KINASE SELECTIVE
INHIBITOR

<130> 43-101wo1

<150> IN 4595/CHE/2012

<151> 2012-11-02

<150> US 61/771,812

<151> 2013-03-02

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody fragment

<400> 1

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody fragment

<400> 2

Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr

1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody fragment

<400> 3

Ala Arg Tyr Asp Tyr Asn Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody fragment

<400> 4

Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

1	5	10	15
Ser	Val	Lys	Met
Ser	Cys	Lys	Ala
Ser	Gly	Tyr	Thr
Phe	Thr	Ser	Tyr
20	25	30	
Asn	Met	His	Trp
Val	Lys	Gln	Thr
Pro	Arg	Gln	Gly
Leu	Glu	Trp	Ile
35	40	45	
Gly	Gly	Ile	Tyr
Pro	Gly	Asn	Gly
Asp	Thr	Ser	Tyr
Asn	Gln	Lys	Phe
50	55	60	
Lys	Gly	Lys	Ala
Thr	Leu	Thr	Val
Gly	Lys	Ser	Ser
Ser	Thr	Ala	Tyr

65	70	75	80
Met	Gln	Leu	Ser
Ser	Leu	Thr	Ser
Glu	Asp	Ser	Ala
Val	Tyr	Phe	Cys
85	90	95	
Ala	Arg	Tyr	Asp
Tyr	Asn	Tyr	Ala
Met	Asp	Tyr	Trp
Gly	Gln	Gly	Thr
100	105	110	
Ser	Val	Thr	Val
Ser	Ser		
115			

<210> 5

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody fragment

<400> 5

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Gly
Gly	Thr	Ala	Ala
Leu	Gly	Cys	Leu
Val	Lys	Asp	Tyr
20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro
Val	Thr	Val	Ser
Trp	Asn	Ser	Gly
Ala	Leu	Thr	Ser
35	40	45	
Gly	Val	His	Thr
Phe	Pro	Ala	Val
Leu	Gln	Ser	Ser
Gly	Leu	Tyr	Ser
50	55	60	

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

 325 330

<210>	6
<211>	5
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	antibody fragment
<400>	6

Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210>	7
<211>	3
<212>	PRT
<213>	Artificial Sequence
<220><223>	antibody fragment
<400>	7

Ala	Thr	Ser
1		
<210>	8	
<211>	9	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antibody fragment	
<400>	8	

Gln	Gln	Trp	Thr	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr
1				5				
<210>	9							
<211>	106							
<212>	PRT							
<213>								
>	Artificial Sequence							
<220><223>	antibody fragment							
<400>	9							

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Phe Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Phe Asn Pro Pro Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 10

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> antibody fragment

<400> 10

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
20 25 30
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100

105

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 16

【변경전】

제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 암은 선택적으로 림프종 또는 백혈병인 혈액암이고, 상기 혈액암은 선택적으로 급성 림프구 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구 백혈병(CLL), 소 림프구 림프종(SLL), 다발골수종(MM), 비호지킨 림프종(NHL), 외투세포 림프종(MCL), 소포림프종, 발덴스트롬 마크로글루블린혈증(WM), B 세포 림프종 및 광범위 큰 B 세포 림프종(DLBCL)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 약학적 조합물.

【변경후】

제9항 내지 제12항 중 어느 하나의 항에 있어서, 암은 선택적으로 림프종 또는 백혈병인 혈액암이고, 상기 혈액암은 선택적으로 급성 림프구 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 만성 림프구 백혈병(CLL), 소 림프구 림프종(SLL), 다발골수종(MM), 비호지킨 림프종(NHL), 외투세포 림프종(MCL), 소포림프종, 발덴스트롬 마크로글루블린혈증(WM), B 세포 림프종 및 광범위 큰 B 세포 림프종(DLBCL)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 약학적 조합물.

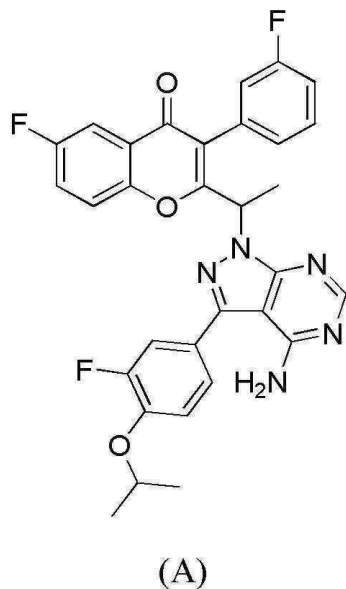
【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 9

【변경전】

(i) 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 또는 라세미 혼합물,



또는 약학적으로 허용가능한 염, 또는 용매화합물, 및

(ii) 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편

을 포함하는, 암 또는 자가면역질환 또는 장애 치료용 의약으로서 사용되기 위한 약학적 조합물.

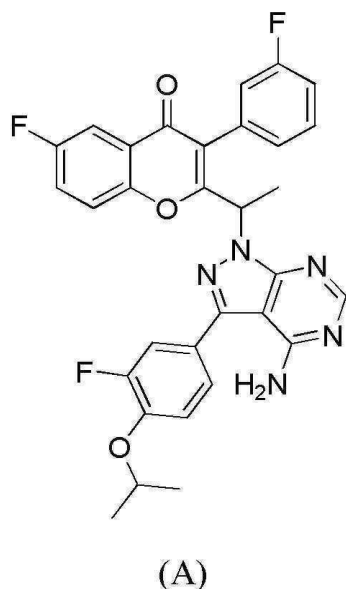
(ii) 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편

을 포함하는, 암 또는 자가면역질환 또는 장애 치료용 의약으로서 사용되기 위한 약학적 조합물로서,

단, 상기 항CD20 항체는 유블리투시맙, 리투시맙, 오파투무맙, 오크렐리주맙, 벨투주맙, GA101, AME-133v, PR0131921, 토시투모맙, hA20, 및 PR070769, 또는 이들과 동일한 에피토프에 결합하는 항체로 이루어진 군 으로부터 선택된 항체이거나 또는 이들의 항원-결합 단편인 것인, 암 또는 자가면역질환 또는 장애 치료용 의약으로서 사용되기 위한 약학적 조합물.

【변경후】

(i) 화학식 A의 화합물의 S-이성질체 또는 라세미 혼합물,



또는 약학적으로 허용가능한 염, 또는 용매화합물, 및

(ii) 항CD20 항체 또는 그의 항원-결합 단편

을 포함하는, 암 또는 자가면역질환 또는 장애 치료용 의약으로서 사용되기 위한 약학적 조합물로서,

단, 상기 항CD20 항체는 유블리투시맙, 리투시맙, 오파투무맙, 오크렐리주맙, 벨투주맙, GA101, AME-133v, PR0131921, 토시투모맙, hA20, 및 PR070769, 또는 이들과 동일한 에피토프에 결합하는 항체로 이루어진 군 으로부터 선택된 항체이거나 또는 이들의 항원-결합 단편인 것인, 암 또는 자가면역질환 또는 장애 치료용 의약으로서 사용되기 위한 약학적 조합물.