



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년09월28일  
(11) 등록번호 10-1902325  
(24) 등록일자 2018년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07D 495/04 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2013-7028748  
(22) 출원일자(국제) 2013년03월30일  
심사청구일자 2017년02월07일  
(85) 번역문제출일자 2013년10월30일  
(65) 공개번호 10-2014-0023333  
(43) 공개일자 2014년02월26일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/031361  
(87) 국제공개번호 WO 2012/135571  
국제공개일자 2012년10월04일  
(30) 우선권주장  
61/470,849 2011년04월01일 미국(US)  
61/559,489 2011년11월14일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
US20100222343 A1\*  
W02011130628 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
쿠리스 인코퍼레이션  
미국 매사추세츠 렉싱턴 맥과이어 로드 4 (우:  
02421)  
(72) 발명자  
카이, 숭  
미국 01730 매사추세츠 베드포드 리버티 로드 37  
자이, 하이시아오  
미국 01730 매사추세츠 베드포드 사우스 로드 283  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 4 항

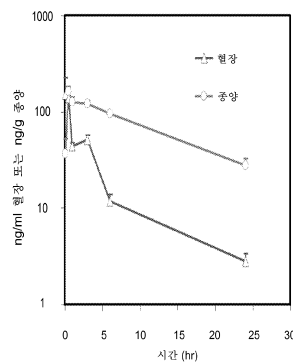
심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 아연 결합 모이어티를 갖는 포스포이노시티드 3-키나아제 억제제

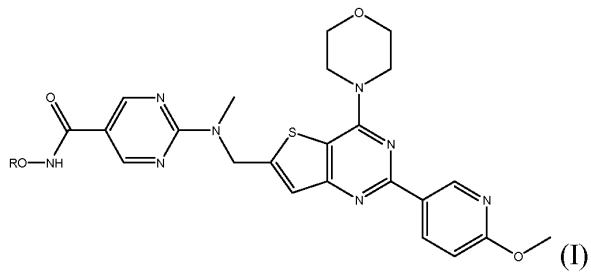
(57) 요약

본 발명은 하기 화학식(I)의 화합물, 이러한 화합물을 포함하는 억제학적 조성물, 및 포스포이노시티드 3-키나아 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



제 관련 질병 및 질환, 예컨대, 암의 치료에서 그러한 화합물의 용도를 제공한다:



본 출원은 추가로 히스톤 데아세틸라아제와 포스포이노시티드 3-키나아제 둘 모두와 관련된 히스톤 데아세틸라아제 관련 질환 및 질병의 치료에 관한 것이다.

(72) 발명자

**라이, 쟁정**

미국 02478 매사추세츠 벨몬트 옥스포드 씨클 3

**첸, 창궐**

미국 01778 매사추세츠 웨이랜드 올드 코네티컷 패스 163

**바오, 루디**

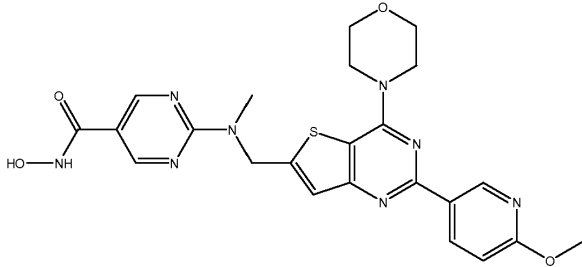
미국 02482 매사추세츠 웰즐리 아이비 로드 1

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 화학식으로 표현되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염:



#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

활성 성분으로서 제 1항의 화합물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

#### 청구항 6

활성 성분으로서 제 1항의 화합물 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암을 치료하기 위한 경구 투여용 약제학적 조성물.

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

삭제

#### 청구항 10

삭제

#### 청구항 11

삭제

## 청구항 12

제 5항 또는 제 6항에 있어서, 암이 유두종(papilloma), 신경아교종(blastoglioma), 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 흑색종(melanoma), 비-소세포 폐암(non-small cell lung cancer), 난소암, 전립선암, 편평 세포 암종(squamous cell carcinoma), 성상세포종(astrocytoma), 두부암(head cancer), 경부암, 방광암, 유방암, 폐암, 대장암, 갑상선암, 췌장암, 위암, 간세포 암종, 백혈병, 림프종, 호지킨병(Hodgkin's disease) 및 버킷병(Burkitt's disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 약제학적 조성물.

## 청구항 13

삭제

## 청구항 14

삭제

## 청구항 15

삭제

## 청구항 16

삭제

## 청구항 17

삭제

## 청구항 18

삭제

## 청구항 19

삭제

## 청구항 20

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

### [0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2011년 4월 1일에 출원된 미국 가출원 번호 제61/470,849호, 및 2011년 11월 14일에 출원된 미국 가출원 번호 제61/559,489호의 우선권을 주장한다. 상기 출원의 전체 교시는 본원에 참조로 포함된다.

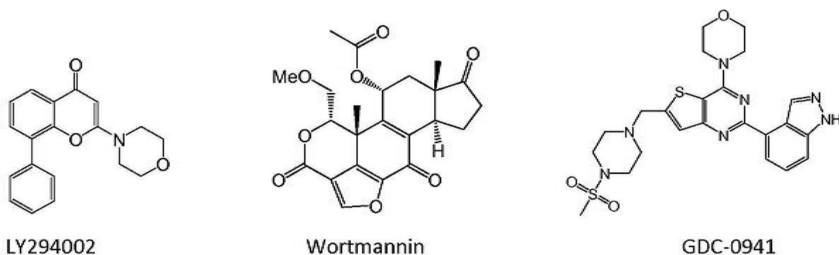
## 배경 기술

[0003] 포스파티딜이노시톨의 인산화 유도체인 포스포이노시티드(PI)는 진핵 세포에서 필수적이며, 이는 핵 과정, 세포 골격 동역학, 신호전달 및 막 트래피킹(trafficking)을 조절한다. PI 물질대사와 관련된 효소 중, PI3-키나아제(PI3K)가 이의 중앙발생 특성 및 약물 표적으로서의 잠재성 때문에 특히 주목을 받고 있다. PI3-키나아제는 이노시톨 고리의 3-위치에서 포스파티딜이노시톨 또는 PI를 인산화시킨다[Lindmo et. al. Journal of Cell Science 119, 605-614, 2006]. PI3K 활성화에 의해 발생된 3-인산화된 인지질은 단백질 키나아제 B(PKB)의 플렉스트린 상동성(pleckstrin homology: PH) 도메인에 결합하여, 세포막으로의 PKB의 전위 및 후속적인 PKB의 인산화를 야기한다. 인산화된 PKB는 아포토시스-유도 단백질, 예컨대, FKHR, Bad, 및 카스파제(caspase)를 억제하고, 암 발달에서 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다. PI3K는 클래스 I 내지 III로 나뉘어지고, 클래스 I은 추가로 클래스 Ia 및 Ib로 하위분류된다. 상기 아형(isoform) 중에서, 클래스 Ia 효소가 성장 인자-티로신 키

나아제 경로 활성화에 대한 세포 증식에서 가장 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다[Hayakawa et. al., Bioorganic & Medicinal Chemistry 14 6847-6858, 2006]. 암에서 3개의 빈번한 돌연변이가 PI3K  $\alpha$ 를 구성적으로 활성화시키고, 세포에서 발현되는 경우, 이들은 암 세포에서 흔히 보여지는 PKB, S6K 및 4E bp1과 같은 분자에 의한 하위 신호전달의 만성 활성화 및 종양발생 전환을 유도한다[Stephens et. al., Current Opinion in Pharmacology, 5(4) 357-365, 2005]. 이와 같이, PI3-키나아제는 증식 질병의 치료를 위한 매력적인 표적이다.

[0004]

Wortmannin 및 LY294002를 포함하는 여러 공지된 PI3-키나아제 억제제가 존재한다. Wortmannin은 낮은 나노몰의 IC<sub>50</sub> 값을 갖는 강력한 PI3K 억제제이나, 이는 낮은 생체내 항종양 활성을 지닌다[Hayakawa et al, Bioorg Med Chem 14(20), 6847-6858 (2006)]. 최근에, 모르폴린 치환된 퀴나졸린, 피리도피리미딘 및 티에노피리미딘 화합물의 군이 PI3 키나아제 p110  $\alpha$ 를 억제하는데 효과적인 것으로 보고되었다[Hayakawa, 6847-6858]. 모르폴린 치환된 티에노피리미딘 화합물(GDC-0941)의 경구 투여량은 생체내에서 교모세포종 이종이식에서 종양 억제를 나타내었다[Folkes et. al., Journal of Medicinal Chemistry, 51, 5522-5532, 2008]. 다음 간행물에는 일련의 티에노피리미딘, 피리도피리미딘 및 퀴나졸린 기반의 PI3-키나아제 억제제를 개시되어 있다: WO 2008/073785; WO 2008/070740; WO 2007/127183; 미국 특허 공보 20080242665.



[0005]

[0006]

히스톤 아세틸화는 가역적 변형이며, 탈아세틸화는 히스톤 데아세틸라아제(HDAC)로 칭해지는 효소 측에 의해 촉매작용된다. HDAC는 인간에서 18개의 유전자에 의해 표현되고, 4개의 별개의 부류로 나뉘어진다[J Mol Biol, 2004, 338:1, 17-31]. 포유동물에서, 클래스 I HDAC(HDAC1-3, 및 HDAC8)는 효모 RPD3 HDAC와 관련이 있고, 클래스 2(HDAC4-7, HDAC9 및 HDAC10)는 효모 HDA1, 클래스 4(HDAC11), 및 클래스 3(효모 Sir2와 관련된 시르투인(sirtuin)을 포함하는 별개의 클래스)과 관련이 있다.

[0007]

문헌[Csordas, Biochem. J., 1990, 286: 23-38]에는 히스톤이 히스톤 아세틸 트랜스퍼라아제(HAT1)에 의해 촉매작용되는 반응인 N-말단 리신 잔기의  $\epsilon$ -아미노기의 변역후 아세틸화에 주어진다는 것이 교시되어 있다. 아세틸화는 리신 측쇄의 양성 전하를 중화시키고, 이는 크로마틴 구조에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 실제로, 크로마틴 주형으로의 전사 인자의 접근은 히스톤 과아세틸화에 의해 향상되며, 저아세틸화된 히스톤 H4에서의 부화(enrichment)가 유전체의 전사 침묵 영역에서 발견되었다[Taunton et al., Science, 1996, 272:408-411]. 종양 억제 유전자의 경우, 히스톤 변형으로 인한 전사 침묵은 발암성 형질전환(oncogenic transformation) 및 암을 초래할 수 있다.

[0008]

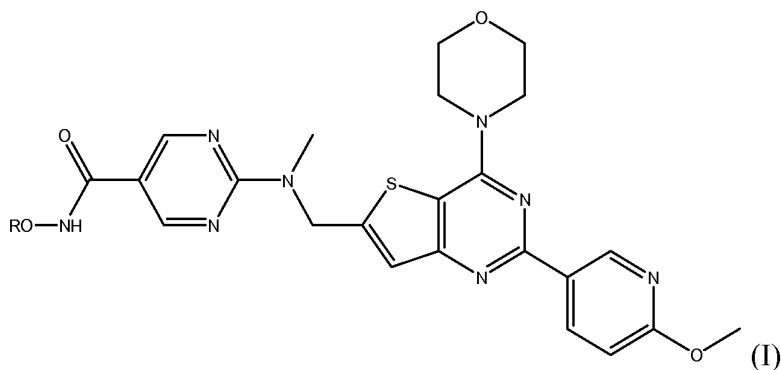
현재 여러 부류의 HDAC 억제제가 임상 연구에 의해 평가되고 있다. 그러한 예에는 하이드록삼산 유도체, 수베로일아닐리드 하이드록삼산(Suberoylanilide hydroxamic acid: SAHA), PXD101 및 LAQ824가 포함되며, 이들은 현재 임상 개발중이다. HDAC 억제제의 벤즈아미드 부류에서, MS-275, MGCD0103 및 CI-994가 임상 시험에 도달하였다. 문헌[Mourne et al. (Abstract #4725, AACR 2005)]에는 벤즈아미드의 티오펜 변형이 HDAC1에 대한 HDAC 억제 활성을 현저히 향상시킨다는 것이 입증되어 있다.

[0009]

특정 암이 상기 조합 방법으로 효과적으로 치료되어 왔으나, 세포독성 약물의 콕테일(cocktail)을 이용한 치료요법은 흔히 용량 제한 독성 및 약물-약물 상호작용에 의해 제한된다. 분자적으로 표적화된 약물을 이용한 보다 최근의 발전사항들이 암에 대한 조합 치료에 대한 신규한 방법을 제공하여, 다수의 표적화된 작용제가 동시에 사용되거나, 용량 제한 독성에 도달함이 없이 결과를 개선시키기 위해 표준 화학요법제 또는 방사선과 상기 요법을 조합시키는 것을 가능하게 하였다. 그러나, 현재 상기 조합을 사용하는 능력은 양립가능한 약리학 및 약역학적 특성을 나타내는 약물에 제한된다. 또한, 조합 요법의 안전성 및 효능을 입증하는 규제 요건은 상응하는 단일 작용제의 시험보다 비용이 많이 들고 길어질 수 있다. 일단 승인되면, 조합 전략은 또한 요구되는 보다 복잡한 투여 패러다임 때문에 환자에 대해 증가된 비용 뿐만 아니라 감소된 환자 순응도와 결부될 수 있다.

## 발명의 내용

[0010] 본 발명은 하기 화학식(I)의 화합물 및 이의 약제학적으로 허용되는 염에 관한 것이다:



[0011]

[0012] 상기 식에서, R은 수소 또는 아실 기이다. 아실 기는 바람직하게는 R<sub>1</sub>C(O)-이고, 여기서 R<sub>1</sub>은 치환되거나 비치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>24</sub>-알킬, 바람직하게는 C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>-알킬, 더욱 바람직하게는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-알킬이고; 치환되거나 비치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-알케닐, 바람직하게는 C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-알케닐, 더욱 바람직하게는 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-알케닐; 치환되거나 비치환된 C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-알키닐, 바람직하게는 C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-알키닐, 더욱 바람직하게는 C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-알키닐; 치환되거나 비치환된 아릴, 바람직하게는 치환되거나 비치환된 페닐; 또는 치환되거나 비치환된 헤테로아릴이다.

[0013] 본 발명은 또한 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체와 조합된 화학식(I)의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0014] 화학식(I)의 화합물, 특히, 화합물 1은 치료제로서의 용도, 예컨대, 암, 및 PI3 키나아제 활성 및/또는 HDAC 활성과 관련된 다른 질병 및 질환의 치료에 유리한 특성을 지닌다. 예를 들어, 화합물 1은 분자 표적 PI3K 및 HDAC에 대한 강력한 억제 활성, 및 생체의 다양한 암 세포주에 대한 강력한 항증식 활성을 지닌다. 화합물 1은 동물 모델에서 관찰되는 바와 같이 상당한 경구 생물학적이용도를 지닌다. 이종이식 종양 보유 마우스에서 경구 또는 정맥내 투여 시, 화합물은 종양 조직에 의한 상당한 흡수 및 및 종양 조직에서의 약역학적 활성을 나타낸다. 화합물 1은 또한 경구 또는 정맥내 투여 후 마우스의 이종이식 종양 모델에서 실질적인 항종양 활성을 나타낸다. 화합물은 또한 예를 들어, 에임스 시험(Ames test)을 이용하는 유전독성 시험에 의해 입증하는 경우, 유리한 안전 프로파일을 지닌다.

[0015] 본 발명은 추가로 암과 같은 PI3K 관련 질병 및 질환의 치료에서의 본 발명의 화합물의 용도에 관한 것이다. 이러한 화합물은 추가로 아연 이온을 결합하는 이의 능력 덕분에 HDAC 억제제로서 작용한다. 이러한 화합물은 다수의 치료 표적에서 활성이며, 다양한 질병을 치료하는데 효과적이다. 더욱이, 일부 경우에 이러한 화합물은 개별적으로 PI3-키나아제 억제 활성 및 HDAC 억제 활성을 지니는 별개의 분자들의 조합의 활성에 비해 향상된 활성을 지니는 것으로 밝혀졌다. 다시 말해서, 단일 분자에서 PI3-키나아제와 HDAC 억제 활성의 조합은 단독의 PI3-키나아제 및 HDAC 억제제에 비해 상승 효과를 제공할 수 있다.

[0016] 더욱이, 단일-작용제 PI3K 경로 억제제의 효능은 선천적(primary)/후천적(acquired) 유전자 변형의 존재 및 다수의 생존 촉진(pro-survival) 및 성장 경로의 활성에 의해 제한된다[Engelman (2009) Nature Reviews Cancer, 9: 550-562]. 단일-작용제 PI3K 경로 억제제에 의한 PI3K의 억제는 실제로 음성 피드백 루프의 방출에 의해 RAF-MEK-ERK 경로의 신호전달을 상향조절할 수 있다. 본 발명의 화합물은 통합된 PI3K/HDAC 억제 활성 덕분에 단일-표적 PI3K 억제제에 의한 암의 치료에서의 한계를 극복할 가능성을 제공한다. 본 발명의 화합물은 생체내 및 생체의 실험에서 암 네트워크를 방해하여 PI3K-AKT-mTOR 경로의 지속성 있는 억제, RAF-MEK-ERK 경로의 억압, 및 수용체 티로신 키나아제(receptor tyrosine kinase: RTK) 단백질 수준의 하향조절을 야기한다. 또한, 본 발명의 화합물은 세포 주기 정지 및 세포사멸(apoptosis)을 유도하여 생체의 종양 세포주에서 종양 억제유전자 p53 및 p21의 상향조절을 야기한다. 이에 따라서, 본 발명의 화합물은 선천적 및 후천적 약물 내성을 극복할 가능성을 지니며, 임상적 적용에서 단일-작용제 PI3K 경로 억제제에 의한 단일-치료보다 더욱 효과적일 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 양태는 PI3 키나아제를 효과적인 억제량의 화학식(I)의 화합물, 또는 이의 약제학적으로 허

용되는 염과 접촉시킴으로써 PI3 키나아제 활성을 억제하는 방법을 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

[0018]

도 1은 H2122 이종이식 종양 보유 누드 마우스에 대한 경구 투여에 따른 혈장 및 종양 조직에서의 시간에 대한 화합물 1의 농도의 그래프이다.

도 2a는 25, 50 및 100mg/kg의 경구 투여에 따른 다우디(Daudi) 이종이식 종양 보유 스킨(Skid) 마우스에서의 시간에 대한 화합물 1 혈장 농도의 그래프이다.

도 2b는 25, 50 및 100mg/kg의 경구 투여에 따른 다우디 이종이식 종양 보유 스킨 마우스에서의 시간에 대한 화합물 1 종양 농도의 그래프이다.

도 2c는 100mg/kg의 경구 투여에 따른 다우디 이종이식 종양 보유 스킨 마우스의 혈장 및 종양 조직에서의 시간에 대한 화합물 1 농도의 그래프이다.

도 3은 대조군 및 화합물 1로 치료된(25, 50 및 100mg/Kg) 다우디 종양 이종이식을 보유한 스킨 마우스로부터의 종양 조직 추출물의 웨스턴 블롯(Western blot)을 나타낸 것이다.

도 4는 경구 또는 정맥내 투여에 따른 비글 견에서의 시간에 대한 화합물 1 혈장 농도의 그래프이다.

도 5a는 화합물 1 또는 비히클로 처리된 H2122 이종이식 종양 보유 누드 마우스에서의 시간에 대한 종양 성장의 그래프이다.

도 5b는 화합물 1 또는 비히클로 처리된 다우디 이종이식 종양 보유 누드 마우스에서의 시간에 대한 종양 성장의 그래프이다.

도 5c는 화합물 1 또는 비히클로 처리된 OPM2 이종이식 종양 보유 누드 마우스에서의 시간에 대한 종양 성장의 그래프이다.

도 6은 화합물 1 또는 비히클로 처리한 후 T 및 B 림프구의 순환 혈액 수준을 보여주는 그래프이다.

도 7a 내지 7g는 대조군 및 화합물 1로 처리된 H460(Kras, PI3K) 세포로부터의 추출물의 웨스턴 블롯을 나타낸 것이다. GDC는 GDC-0941이고; LBH는 LBH-589이다.

도 8a 내지 8c는 대조군 및 화합물 1로 처리된 H1975(EGFR, PI3K), BT474(HER2, PI3K), H1975(EGFR, PI3K), A375(B-Raf) 및 RPMI-822(p53<sup>-</sup>) 세포로부터의 추출물의 웨스턴 블롯을 나타낸 것이다.

도 9는 화합물 1 또는 비히클로 경구 처리된 다우디 이종이식 종양 보유 스킨 마우스에서의 시간에 대한 종양 성장의 그래프이다.

도 10은 비히클, 화합물 1, SAH, GDC-0941 또는 SAHA와 GDC-0941의 조합으로 처리된 다우디 이종이식 종양 보유 스킨 마우스에서의 시간에 대한 종양 성장의 그래프이다.

도 11은 화합물 1 또는 비히클로 경구 처리된 SU-DHL4 이종이식 종양 보유 누드 마우스에서의 시간에 대한 종양 성장의 그래프이다.

도 12는 화합물 1 또는 비히클로 처리된 OPM2 이종이식 종양 보유 누드 마우스에서의 시간에 대한 종양 성장의 그래프이다.

도 13은 화합물 1 또는 비히클로 처리된 MM1S 이종이식 종양 보유 스킨 마우스에서의 시간에 대한 종양 성장의 그래프이다.

도 14는 화합물 1 또는 비히클로 처리된 MM1R 이종이식 종양 보유 스킨 마우스에서의 시간에 대한 종양 성장의 그래프이다.

도 15는 화합물 1로 처리된 다우디, SuDHL-4, HS-Sultan, DOHH-2, OPM-2, MM1R 또는 MM1S 이종이식 종양을 보유한 스킨 마우스로부터의 종양 추출물의 웨스턴 블롯을 나타낸 것이다.

도 16은 화합물 1, CAL-101 또는 비히클로 처리된 다우디 종양 보유 스킨 마우스에서의 시간에 대한 종양 성장의 그래프이다.

도 17은 화합물 1, 사이클로포스파미드, 화합물 1과 사이클로포스파미드의 조합, 또는 비히클로 치료된 다우디

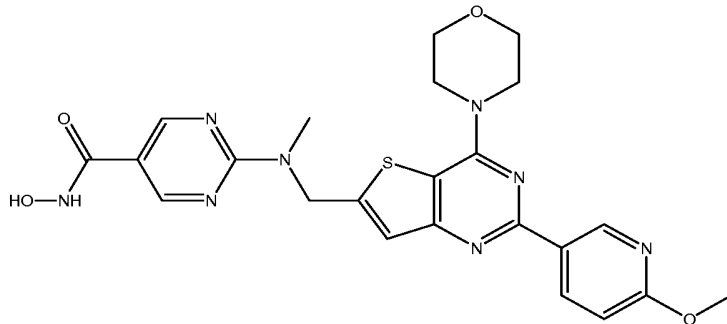


종양 보유 스킨드 마우스에서의 시간에 대한 종양 성장의 그래프이다.

도 18은 화합물 1, 레날리도마이드, 화합물 1과 레날리도마이드의 조합, 또는 비히클로 처리된 MM1S 종양 보유 스킨드 마우스에서의 시간에 대한 종양 성장의 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

바람직한 구체예에서, 화학식(I)의 화합물은 하기로 기재된다:



(이하에서 N-하이드록시-2-(((2-(6-메톡시피리딘-3-일)-4-모르폴리노티에노[3,2-d]피리미딘-6-일)메틸)(메틸)아미노)피리미딘-5-카르복사미드로도 지칭되는 "화합물 1" 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염).

본 발명은 추가로 세포의 이상 증식, 분화 또는 생존과 연관된 질병 또는 병태를 예방하거나 치료하기 위한 방법을 제공한다. 한 가지 구체예에서, 본 발명은 추가로 세포의 이상 증식, 분화 또는 생존과 연관된 질병을 정지시키거나 감소시키기 위한 약제의 제조에서의 본 발명의 하나 이상의 화합물의 용도를 제공한다. 바람직한 구체예에서, 질병은 암이다. 한 가지 구체예에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 본 발명의 화합물을 암을 치료하는 것을 필요로 하는 피검체에게 투여함을 포함하는 그러한 피검체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

용어 "암"은 악성 신생물 세포의 증식에 의해 야기되는 어떠한 암, 예컨대, 종양, 신생물, 암종, 육종, 백혈병, 및 림프종 등을 의미한다. 예를 들어, 암은 중피종, 백혈병 및 림프종, 예컨대, 피부성 T 세포 림프종 (cutaneous T-cell lymphomas: CTCL), 비피부성 말초 T 세포 림프종(noncutaneous peripheral T-cell lymphomas), 인간 T 세포 림프친화성 바이러스(human T-cell lymphotropic virus: HTLV)와 관련된 림프종, 예컨대, 성인 T 세포 백혈병/림프종(adult T-cell leukemia/lymphoma: ATLL), B 세포 림프종(B-cell lymphoma), 급성 비림프구성 백혈병(acute nonlymphocytic leukemias), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia), 만성 골수성 백혈병(chronic myelogenous leukemia), 급성 골수성 백혈병(acute myelogenous leukemia), 림프종, 및 다발성 골수종(multiple myeloma), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin lymphoma), 급성 림프성 백혈병(acute lymphatic leukemia: ALL), 만성 림프성 백혈병(chronic lymphatic leukemia: CLL), 호지킨 림프종, 버킷 림프종(Burkitt lymphoma), 성인 T 세포 백혈병 림프종(adult T-cell leukemia lymphoma), 급성 골수성 백혈병(acute-myeloid leukemia: AML), 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia: CML), 또는 간 세포 암종을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 추가 예는 골수형이상 증후군(myelodysplastic syndrome), 유년기 고형 종양(childhood solid tumor), 예컨대, 뇌 종양, 신경모세포종(neuroblastoma), 망막모세포종(retinoblastoma), 윌름스 종양(Wilms' tumor), 골 종양, 및 연조직 육종(soft-tissue sarcomas), 성인의 흔한 고형 종양, 예컨대, 두경부암(예, 경구, 후두, 코인두 및 식도), 비뇨생식기 암(예, 전립선, 방광, 신장, 자궁, 난소, 고환), 폐암(예, 소세포 및 비소세포), 유방암, 췌장암, 흑색종 및 다른 피부 암, 위암, 뇌 종양, 골린 증후군(Gorlin's syndrome)과 관련된 종양(예, 수모세포종, 수막종 등), 및 간암을 포함한다. 본 발명의 화합물에 의해 치료될 수 있는 암의 추가의 예시적 형태는 골격근 또는 평활근의 암, 위암, 소장암, 직장 암종, 타액선 암, 자궁내막암, 신장암, 항문암, 직장암, 부갑상선암, 및 뇌하수체암을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

본원에 기재된 화합물로 예방하고, 치료하고, 연구하는데 유용할 수 있는 추가적인 암은, 예를 들어, 결장 암종, 가족성 선종성 용종증 암종(familial adenomatous polyposis carcinoma) 및 유전성 비용종증 직장결장 암(hereditary non-polyposis colorectal cancer), 또는 흑색종이다. 추가로, 암은 입술 암종, 후두 암종, 하인두 암종, 혀 암종, 타액선 암종, 위 암종, 선암종, 갑상선 암(골수 및 유두 갑상선 암종), 신장 암종(renal carcinoma), 신장 실질 암종(kidney parenchyma carcinoma), 경부 암종, 자궁체부 암종, 자궁내막 암종, 융모막 암종, 고환 암종, 비뇨기 암종, 흑색종, 뇌종양, 예컨대, 교모세포종(glioblastoma), 성상세포종



(astrocytoma), 수막종(meningioma), 수모세포종(medulloblastoma) 및 말초 신경외배엽 종양(peripheral neuroectodermal tumor), 담낭 암종, 기관지 암종, 다발성 골수종, 기저세포암(basaloma), 기형종(teratoma), 망막모세포종(retinoblastoma), 맥락막 흑색종(choroidea melanoma), 고환종, 횡문근육종, 머리인두종, 골육종, 연골육종, 근육종, 지방육종, 섬유육종, 유잉 육종(Ewing sarcoma), 및 형질세포종(plasmocytoma)을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 본 발명의 한 가지 양태에서, 본 발명은 암을 치료하기 위한 약제의 제조에서의 본 발명의 하나 이상의 화합물의 용도를 제공한다.

[0025] 한 가지 구체예에서, 본 발명의 화합물은 혈액암 또는 혈액 전암 병태를 치료하는데 사용된다. 혈액암은 백혈병, 림프종 및 다발성 골수종을 포함한다. 그러한 예는 림프구성 백혈병, 예컨대, 전구체 B 급성 림프모구 백혈병, 전구체 T 급성 림프모구 백혈병, 버킷 림프종, 및 급성 이중표현형 백혈병(acute biphenotypic leukemia)을 포함하는 급성 림프구성 백혈병; 및 B-세포 전림프구성 백혈병을 포함하는 만성 림프구성 백혈병; 및 골수성 백혈병, 예컨대, 급성 전골수성 백혈병(acute promyelocytic leukemia), 급성 골수아구성 백혈병(acute myeloblastic leukemia), 및 급성 거핵모구성 백혈병(acute megakaryoblastic leukemia)을 포함하는 급성 골수성 백혈병; 및 만성 단핵구성 백혈병(chronic monocytic leukemia)을 포함한 만성 골수성 백혈병; 급성 단핵구성 백혈병을 포함한다. 다른 백혈병은 모발상 세포 백혈병(hairy cell leukemia); T-세포 전림프루성 백혈병; 거대 과립 림프구성 백혈병(large granular lymphocytic leukemia); 및 성인 T-세포 백혈병을 포함한다. 림프종은 B-세포 림프종, T-세포 림프종, 예컨대, 피부성 T-세포 림프종, 및 NK 세포 림프종을 포함하는 호지킨 림프종 및 비호지킨 림프종을 포함한다. 혈액 전암 병태는 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome) 및 골수증식성 질환(myeloproliferative disorder), 예컨대, 일차 골수섬유증(primary myelofibrosis), 진성다혈구증(polycythemia vera), 및 본태성 혈소판증가증(essential thrombocythemia)을 포함한다.

[0026] 본 발명의 화합물은 가역성 림프구감소증(lymphopenia)을 유발하는 것으로 밝혀졌고, 그에 따라서, 림프구성 혈통의 암 세포의 순환 수준을 없애거나 감소시키는데 사용된다. 그러한 화합물은 또한 자가면역 질환을 치료하거나 면역 반응 조절하는데 사용된다.

[0027] 한 가지 구체예에서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 화합물을 피검체에 투여하는 것을 포함하는, 피검체에서 순환 림프구 수를 감소시키는 방법을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 감소된 순환 림프구 수는 가역적이다. 즉, 순환 림프구 수는 본 발명의 화합물의 투여를 중지한 후에 정상 범위로 되돌아간다. 한 가지 구체예에서, 감소된 순환 림프구 수는 정상 범위 아래이며, 피검체의 림프구는 감소된다. 바람직하게는, 피검체는 감소된 순환 림프구 수로부터 치료적 또는 예방적 이점을 얻는다. 그러한 피검체는 혈액 질병, 예컨대, 혈액암을 앓고 있는 피검체, 자가면역 질환을 앓고 있는 피검체, 및 면역 반응 조절이 필요한 피검체, 예컨대, 당뇨병을 앓고 있는 환자 또는 장기 이식 수용자를 포함한다. 인간 피검체에서, 순환 림프구 수, 예를 들어, B-림프구, T-림프구, 또는 이 둘 모두는 정상 범위로부터 림프구감소 범위로 떨어질 수 있다. 특정 질병에서 순환 림프구 수는 비정상적으로 높다. 그러한 질병에서, 순환 림프구 수는 정상 범위로 또는 림프구감소 상태로 감소될 수 있다.

[0028] 한 가지 구체예에서, 본 발명은 세포의 추가 이상 증식, 분화 또는 생존을 예방하는 약제의 제조에서의 본 발명의 하나 이상의 화합물의 용도를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 크기 증가 또는 전이 상태 도달로부터 종양을 예방하는데 유용할 수 있다. 본 발명의 화합물은 암의 진행 또는 발달을 중지시키거나, 종양 아폽토시스를 유도하거나, 종양 혈관신생을 억제하기 위해 투여될 수 있다. 또한, 본 발명은 암의 재발을 예방하기 위한 본 발명의 화합물의 용도를 포함한다.

[0029] 본 발명은 추가로 세포 증식 질환, 예컨대, 과다형성, 형성이상 및 전암성 병변의 치료 또는 예방을 포함한다. 형성이상은 병리학자에 의해 생검에서 인지가능한 전암성 병변의 가장 이른 형태이다. 본 발명의 화합물은 연속적으로 확장되거나 암성이 되는 것으로부터 상기 과다형성, 형성이상 또는 전암성 병변을 예방하기 위해 투여될 수 있다. 전암성 병변의 예는 피부, 식도 조직, 유방 및 경부 피내 조직에서 발생할 수 있다.

[0030] "조합 요법"은 다른 생물학적 활성 성분(비제한적인 예로, 제 2 및 상이한 항신생물 작용제) 및 비-약물 요법(비제한적인 예로, 수술 또는 방사선 치료)과 추가로 조합되는 본 발명의 화합물의 투여를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 다른 약제학적 활성 화합물, 바람직하게는 본 발명의 화합물의 효과를 향상시킬 수 있는 화합물과 조합하여 이용될 수 있다. 본 발명의 화합물은 다른 약물 요법과 동시(단일 제조물 또는 별개의 제조물로서)에 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 일반적으로, 조합 요법은 단일 주기 또는 요법 과정 동안 2종 이상의 약물의 투여가 계획된다.

[0031] 본 발명의 한 가지 양태에서, 본 발명의 화합물은 다양한 질병 상태와 관련된 단백질 키나아제를 조절하는 하나

이상의 별개의 작용제와 조합하여 투여될 수 있다. 이러한 키나아제의 예는 세린/트레오닌 특이적 키나아제, 수용체 티로신 특이적 키나아제 및 비-수용체 티로신 특이적 키나아제를 포함할 수 있지만, 이로 제한되지 않는다. 세린/트레오닌 키나아제는 미토겐 활성화 단백질 키나아제(MAPK), 감수분열 특이적 키나아제(MEK), RAF 및 오로라(aurora) 키나아제를 포함한다. 수용체 키나아제 족의 예는 표피 성장 인자 수용체(EGFR)(예, HER2/neu, HER3, HER4, ErbB, ErbB2, ErbB3, ErbB4, Xmrk, DER, Let23); 섬유모세포 성장 인자(FGF) 수용체(예, FGF-R1, FGF-R2/BEK/CEK3, FGF-R3/CEK2, FGF-R4/TKF, KGF-R); 간세포 성장/분산 인자 수용체(HGFR)(예, MET, RON, SEA, SEX); 인슐린 수용체(예, IGF1-R); Eph(예, CEK5, CEK8, EBK, ECK, EEK, EHK-1, EHK-2, ELK, EPH, ERK, HEK, MDK2, MDK5, SEK); Ax1(예, Mer/Nyk, Rse); RET; 및 혈소판 유래 성장 인자 수용체(PDGFR)(예, PDGF  $\alpha$ -R, PDGF  $\beta$ -R, CSF1-R/FMS, SCF-R/C-KIT, VEGF-R/FLT, NEK/FLK1, FLT3/FLK2/STK-1)를 포함한다. 비수용체 티로신 키나아제 족은 BCR-ABL(예, p43<sup>abl</sup>, ARG); BTK(예, ITK/EMT, TEC); CSK, FAK, FPS, JAK, SRC, BMX, FER, CDK 및 SYK를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명의 또 다른 양태에서, 본 발명의 화합물은 비-키나아제 생물학적 표적 또는 과정을 조절하는 하나 이상의 별개의 작용제와 조합하여 투여될 수 있다. 이러한 표적은 히스톤 데아세틸라아제(HDAC), DNA 메틸트랜스퍼라아제(DNMT), 열충격 단백질(예, HSP90), 헤지호그(hedgehog) 경로-관련 단백질(예, 소닉 헤지호그, 패치형(patched), 평활화형(smoothened)) 및 프로테오솜을 포함한다.

[0033] 한 바람직한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 하나 이상의 생물학적 표적을 억제하는 항신생물 작용제(예, 소분자, 모노클로날 항체, 안티센스 RNA, 및 융합 단백질), 예컨대, 졸리나(Zolinza), 타르세바(Tarceva), 이레싸(Iressa), 티커브(Tykerb), 글리벡(Gleevec), 수텐트(Sutent), 스프리셀(Sprycel), 넥사바르(Nexavar), 소라피니브(Sorafenib), CNF2024, RG108, BMS387032, 어피니탁(Affinitak), 아바스틴(Avastin), 허셉틴(Herceptin), 에르비투스(Erbix), AG24322, PD325901, ZD6474, PD184322, 오바토다스(Obatodax), ABT737, GDC-0449, IPI-926, BMS833923, LDE225, PF-04449913 및 AEE788과 조합될 수 있다. 이러한 조합물은 작용제 중 어느 하나 단독에 의해 달성되는 효능에 비해 치료 효능을 향상시킬 수 있고, 내성 돌연변이 변이체의 출현을 방지하거나 지연시킬 수 있다.

[0034] 특히 바람직한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 화학요법제와 조합하여 투여된다. 화학요법제는 종양학 분야에서 광범위한 치료적 치료제를 포함한다. 이러한 작용제는 종양을 수축시키고/시키거나, 수술 후에 존재하는 잔여 암 세포를 파괴하고/하거나, 완화를 유도하고/하거나, 완화를 유지시키고/시키거나, 암 또는 이의 치료와 관련된 증상을 경감시키기 위해 질병의 여러 단계에서 투여된다. 상기 작용제의 예는 알킬화 작용제, 예컨대, 머스타드 가스 유도제(멜로로에타민, 사이클로포스파미드, 클로람부실, 멜팔란, 이포스파미드), 에틸렌이민(티오테파, 헥사메틸텔라닌), 알킬설포네이트(부술판), 하이드라진 및 트리아진(알트레타민, 프로카르바진, 다카르바진 및 테모졸로미드), 니트로소우레아(카르무스틴, 로무스틴 및 스트렙토조신), 이포스파미드 및 금속염(카르보플라틴, 시스플라틴, 및 옥살리플라틴); 식물 알칼로이드, 예컨대, 포도필로톡신(에토포시드 및 테니소피드), 타산(파클리탁셀 및 도세탁셀), 빈카 알칼로이드(빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신 및 비노렐빈), 및 캄프토테칸 유사체(이리노테칸 및 토포테칸); 항종양 항생제, 예컨대, 크로모마이신(닥티노마이신 및 플리카마이신), 안트라시클린(독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신, 미토산트론, 발루비신 및 이다루비신), 및 이종혼합(miscellaneous) 항생제, 예컨대, 미토마이신, 악티노마이신 및 블레오마이신; 항대사물질, 예컨대, 폴산 길항제(메토트렉세이트, 페메트렉세드, 말티트렉세드, 아미노프테린), 피리미딘 길항제(5-플루오로우라실, 플록스우리딘, 시타라빈, 카페시타빈, 및 젬시타빈), 퓨린 길항제(6-머캅토피린 및 6-티오구아닌) 및 아데노신 데아미나아제 억제제(클라드리빈, 플루다라빈, 머캅토피린, 클로파라빈, 티오구아닌, 넬라라빈 및 펜토스타틴); 토포이소머라아제(topoisomerase) 억제제, 예컨대, 토포이소머라아제 I 억제제(이리노테칸, 토포테칸) 및 토포이소머라아제 II 억제제(암사크린, 에토포시드, 에토포시드 포스페이트, 테니포시드); 모노클로날 항체(알렘투주맵, 젬투주맵 오조가미신, 리툽시맵, 트라스투주맵, 이브리투모맵 티옥세탄, 세툽시맵, 파니투무맵, 토시투모맵, 베바시주맵); 및 이종혼합 항신생물제, 예컨대, 리보뉴클레오타이드 환원효소 억제제(하이드록시우레아); 부신피질 스테로이드 억제제(미토탄); 효소(아스파라기나제 및 페가스파르가아제); 항미세소관 작용제(에스트라무스틴); 및 레티노이드(백사로텐, 이소트레티노인, 트레티노인(ATRA), 및 레날리도마이드를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0035] 특정 바람직한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 화학보호제와 조합하여 투여된다. 화학보호제는 신체를 보호하거나 화학요법의 부작용을 최소화시키는 작용을 한다. 상기 작용제의 예는 암포스틴, 메스나, 및 텍스라족산을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

- [0036] 본 발명의 한 가지 양태에서, 본 발명의 화합물은 방사선요법과 조합하여 투여된다. 방사선은 흔히 내부적(암 부위 근처의 방사능 재료의 이식) 또는 광자(x-선 또는 감마선) 또는 입자 방사선을 이용하는 기계로부터 외부적으로 전달된다. 조합 요법이 추가로 방사선 치료를 포함하는 경우, 방사선 치료는 치료제 및 방사선 치료의 조합의 공동 작용으로부터 이로운 효과가 달성되는 한 어떠한 적합한 시간으로 실시될 수 있다. 예를 들어, 적절한 경우, 방사선 치료가 치료제의 투여로부터 일시적으로 제거되는 경우에 아마도 수일 또는 또한 수주까지 이로운 효과가 계속해서 달성된다.
- [0037] 본 발명의 화합물이 면역치료제와 조합하여 사용될 수 있음이 인지될 것이다. 면역요법의 한 형태는 종양으로부터 떨어진 부위의 백신 조성물의 투여에 의한 숙주 기원의 활성 전신 종양 특이적 면역 반응의 발생이다. 분리된 종양-항원 백신 및 항-이디오타입(anti-idiotypic) 백신을 포함하는 다양한 유형의 백신이 제안되었다. 또 다른 방법은 치료하고자 하는 피검체로부터의 종양 세포, 또는 이러한 세포의 유도체를 사용하는 것이다 [Schirmacher *et al.* (1995) J. Cancer Res. Clin. Oncol. 121:487에 개관됨]. 미국 특허 번호 제5,484,596호에서, 한나 주니어 등(Hanna Jr. *et al.*)은 종양을 외과술로 제거하고, 콜라게나아제로 세포를 분산시키고, 세포에 방사선 조사하고, 약  $10^7$ 개 세포의 3회 이상의 연속적 투여로 환자를 백신접종시키는 것을 포함하는, 재발 또는 전이를 예방하기 위해 절제가능한 암종을 치료하는 방법을 청구하고 있다.
- [0038] 본 발명의 화합물이 유리하게는 하나 이상의 보조 치료제와 함께 사용될 수 있음이 인지될 것이다. 보조 요법에 적합한 작용제의 예는 5HT<sub>1</sub> 효능제, 예컨대, 트립탄(예, 수마트립탄 또는 나라트립탄); 아데노신 A1 효능제; EP 리간드; NMDA 조정자, 예컨대, 글리신 길항제; 나트륨 채널 차단제(예, 라모트리진); 물질 P 길항제(예, NK<sub>1</sub> 길항제); 카나비노이드; 아세타미노펜 또는 페나세틴; 5-리폭시게나아제 억제제; 류코트리엔 수용체 길항제; DMARD(예, 메토트렉세이트); 가바펜틴 및 관련 화합물; 트리아이클릭 항우울제(예, 아미트립틸린); 뉴런 안정화 항간질 약물; 모노-아민능계통(mono-aminergic) 흡수 억제제(예, 벤라팍신); 기질 금속단백분해효소 억제제; 산화질소 신타제(NOS) 억제제, 예컨대, iNOS 또는 nNOS 억제제; 방출 또는 종양 피사 인자 .알파.의 작용의 억제제; 항체 요법제, 예컨대, 모노클로날 항체 요법제; 항바이러스제, 예컨대, 뉴클레오시드 억제제(예, 라미부딘) 또는 면역계 조정자(예, 인터페론); 아편양진통제; 국소 마취제; 카페인을 포함한 자극제; H<sub>2</sub>-길항제(예, 라니티딘); 양성자 펌프 억제제(예, 오메프라졸); 제산제(예, 수산화알루미늄 또는 수산화마그네슘); 항팽만제(예, 시메티콘); 충혈제거제(예, 페닐에프린, 페닐프로판올아민, 슈도에페드린, 옥시메타졸린, 에피네프린, 나파졸린, 자일로메타졸린, 프로필렉세드린, 또는 레보-데스옥시에페드린); 진해제(예, 코데인, 히드로코돈, 카르미펜, 카르베타멘탄, 또는 데스트라메토르판); 이뇨제; 또는 진정성 또는 비진정성 항히스타민을 포함한다.
- [0039] 본 발명의 화합물은 또한 히스톤 데아세틸라아제(HDAC)의 조절이상을 포함하거나, 이에 관해서이거나, 이와 관련된 질환의 치료에 사용될 수 있다. HDAC 활성화에 연루되거나, HDAC 활성화에 의해 적어도 부분적으로 매개되는 것으로 공지된 다수의 질환이 존재하고, 여기서 HDAC 활성화는 질병 발생을 촉발시키는데 역할을 하는 것으로 공지되어 있거나, 상기 질병의 증상은 HDAC 억제제에 의해 경감되는 것으로 공지되거나 밝혀졌다. 본 발명의 화합물을 이용한 치료에 적용될 수 있는 것으로 예상되는 상기 유형의 질환은 다음 질환을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다: 항증식 질환(예, 암); 헌팅턴병(Huntington's Disease), 폴리글루타민 질병(Polyglutamine disease), 파킨슨병(Parkinson's Disease), 알츠하이머병(Alzheimer's Disease), 발작, 선조체 흑질계 변성(Striatonigral degeneration), 진행성 핵상마비(Progressive supranuclear palsy), 염전근긴장증(Torsion dystonia), 연축 사경 및 운동이상(Spasmodic torticollis and dyskinesia), 가족성 진전(Familial tremor), 질 드 라 뚜렛 증후군(Gilles de la Tourette syndrome), 미만성 루이 소체 질병(Diffuse Lewy body disease), 진행성 핵상마비(Progressive supranuclear palsy), 피크 병(Pick's disease), 대뇌내 출혈(intracerebral hemorrhage), 원발성 측삭경화증(Primary lateral sclerosis), 척수 근위축(Spinal muscular atrophy), 근위축성 측색 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis), 비후성 간질성 다발성 신경병(Hypertrophic interstitial polyneuropathy), 색소성 망막염(Retinitis pigmentosa), 유전성 시신경 위축(Hereditary optic atrophy), 유전성 연축성 대마비(Hereditary spastic paraplegia), 진행성 운동 실조(Progressive ataxia) 및 샤이-드래거 증후군(Shy-Drager syndrome)을 포함한 신경변성 질병; 2형 당뇨병을 포함한 대사성 질병; 녹내장(Glaucoma), 연령 관련 황반 변성(Age-related macular degeneration), 신생혈관 녹내장(Rubeotic glaucoma)을 포함한 안구의 퇴행성 질병; 류머티스 관절염(Rheumatoid Arthritis: RA), 골관절염(Osteoarthritis), 연소성 만성 관절염(Juvenile chronic arthritis), 이식편대 숙주병(Graft versus Host disease), 건선(Psoriasis), 천식(Asthma), 척추관절병증(Spondyloarthropathy), 크론병(Crohn's Disease), 염증성 장질환(inflammatory bowel disease), 궤양성 대장염(Colitis Ulcerosa), 알콜성 간염(alcoholic hepatitis), 당뇨병, 쇼그렌 증후군



(Sjogrens's syndrome), 다발성 경화증(Multiple Sclerosis), 강직성 척추염(Ankylosing spondylitis), 막 사구체병증(Membranous glomerulopathy), 추간관성 동통(Discogenic pain), 및 전신성 홍반성 루푸스(Systemic Lupus Erythematosus)를 포함한 염증 질병 및/또는 면역계 질환; 암, 건선, 류머티스 관절염을 포함한 혈관신생과 관련된 질병; 양극성 질병(bipolar disease), 정신 분열증(schizophrenia), 조증(mania), 우울증(depression) 및 치매(dementia)를 포함한 심리 질환; 허혈 관련 또는 재관류 관련 혈관 및 심근 조직 손상, 심부전, 재협착 및 동맥경화의 예방 및 치료를 포함한 심혈관 질병; 간 섬유증, 낭성 섬유증 및 혈관섬유증을 포함한 섬유성 질병; 진균 감염, 예컨대, 칸디다증(candidiasis) 또는 칸디다 알비칸스(Candida Albicans), 박테리아 감염, 바이러스 감염, 예컨대, 단순헤르페스(Herpes Simplex), 폴리오바이러스(poliovirus), 리노바이러스(rhinovirus) 및 콕사키바이러스(coxsackievirus), 원생동물 감염, 예컨대, 말라리아, 리슈만편모충 감염(Leishmania infection), 트리파노소마 브루세이 감염(Trypanosoma brucei infection), 톡소포자충증(Toxoplasmosis) 및 콕시디아증(coccidiosis)을 포함한 감염성 질병; 및 지중해빈혈증(thalassemia), 빈혈증(anemia) 및 겸상적혈구빈혈증(sickle cell anemia)을 포함한 조혈 질환.

[0040]

본 발명의 화합물은 또한 PI3 키나아제의 조절 이상을 포함하거나, 이에 관한 것이거나, 이와 관련된 질환의 치료에 사용될 수 있다. PI3 키나아제 활성은 다양한 질환에 연루되거나, 이와 관련된 것으로 밝혀졌다. 특정 경우에, PI3 키나아제 활성은 질병 발생을 촉발시키는 것과 관련된 반면, 다른 경우에, 증상은 PI3 키나아제 활성의 억제에 의해 경감되는 것으로 공지되거나 경감되는 것으로 밝혀졌다. 본 발명의 화합물로 치료될 수 있는 것으로 예상되는 상기 유형의 질환은 백혈병, 피부암, 방광암, 유방암, 자궁암, 난소암, 전립선암, 폐암, 결장암, 췌장암, 신장암, 위암 및 뇌암을 포함하는 암; 재협착, 죽상경화증, 뼈 질환, 관절염, 당뇨병망막병증, 건선, 양성 전립선 비대, 죽상경화증, 염증, 혈관신생, 면역학적 질환, 췌장염 및 신장 질병을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0041]

한 가지 구체예에서, 본 발명의 화합물은 정상적인 발달 및 항상성에 중요한 생리학적 세포 사멸 과정인 아포토시스를 유도하거나 억제하는데 사용될 수 있다. 아포토시스 경로의 변경은 다양한 인간 질병의 발병기전에 기여한다. 아포토시스의 조정자로서의 본 발명의 화합물은 암(특히, 비제한적으로, 소포림프종(follicular lymphomas), p53 돌연변이를 갖는 암종, 유방, 전립선 및 난소의 호르몬 의존성 종양, 및 전암 병변, 예컨대, 가족성 선종성 용종증), 바이러스 감염(비제한적으로, 헤르페스 바이러스(herpes virus), 포스바이러스(poxvirus), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus), 신드비스 바이러스(Sindbis virus) 및 아데노바이러스(adenovirus) 포함), 자가면역 질병(비제한적으로, 전신 홍반 루푸스, 면역 매개 사구체신염, 류머티스 관절염, 건선, 염증성 장 질병, 및 자가면역 당뇨병 포함), 신경변성 질환(비제한적으로, 알츠하이머병, AIDS-관련 치매, 파킨슨병, 근위축성 측색 경화증, 색소성 망막염, 척수근위축증 및 소뇌 변성 포함), AIDS, 골수형이상증후군, 재생불량빈혈, 심근경색증과 관련된 허혈 손상, 뇌졸중 및 뇌졸중 손상, 부정맥, 죽상경화증, 독소 유발 또는 알콜 유발 간 질병, 혈액 질병(비제한적으로, 만성 빈혈 및 재생불량빈혈 포함), 근골격계의 변성 질병(비제한적으로, 골다공증 및 관절염 포함), 아스피린-민감성 비부비동염, 낭성섬유증, 다발성 경화증, 신장 질병, 및 암 동통을 포함하는, 아포토시스의 이상과 관련된 다양한 인간 질병의 치료에 유용할 것이다.

[0042]

한 가지 양태에서, 본 발명은 면역 반응 또는 면역 매개 반응 및 질병의 치료 및/또는 예방, 예컨대, 이종이식편을 포함한 심장, 신장, 간, 골수, 피부, 각막, 혈관, 폐, 췌장, 장, 수족, 근육, 신경 조직, 심이지장, 소장, 췌장 섬세포 등과 같은 조직의 기능의 전부 또는 일부를 대체하기 위한 합성 또는 유기 이식 재료, 세포, 기관 또는 조직의 이식 후의 거부를 예방하거나 치료하고; 이식편대 숙주병, 자가면역 질병, 예컨대, 류머티스 관절염, 전신 홍반성 루푸스, 갑상선염, 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 다발성 경화증, 중증근무력증(myasthenia gravis), I형 당뇨병, 포도막염, 유년기 발생 또는 최근-발생 당뇨병, 포도막염, 그레이브스병(Graves disease), 건선, 아토피 피부염, 크론병, 궤양성 대장염, 혈관염, 자가항체 매개 질병, 재생불량빈혈, 에반스 증후군(Evan's syndrome), 및 자가면역 용혈 빈혈(autoimmune hemolytic anemia) 등을 치료하거나 예방하고; 이상 면역 반응 및/또는 활성화를 야기하는 감염성 질병, 예를 들어, B형 간염 및 C형 간염, HIV, 스타필로코쿠스 아우레우스 감염(staphylococcus aureus infection), 바이러스 뇌염, 패혈증, 염증 반응에 의해 손상이 유도되는 기생충 질병(예, 나병(leprosy))에 의해 야기되는 것을 포함하는 외상 또는 병원체 유발 면역 조절 이상과 같은 감염성 질병을 추가로 치료하고; 순환기 질병, 예컨대, 동맥경화증, 죽상경화증, 혈관염, 결절성 다발동맥경화염 및 심근염을 예방하거나 치료하기 위한 본 발명의 화합물의 용도를 제공한다. 또한, 본 발명은 유전자 요법 치료와 관련된 면역 반응, 예컨대, 외래 유전자의 자가 세포로의 도입 및 엔코딩되는 생성물의 발현을 예방/억제하기 위해 사용될 수 있다. 따라서, 한 가지 구체예에서, 본 발명은 치료적 유효량의 본 발명의 화합물을 면역 반응 질병 또는 질환 또는 면역 매개 반응 또는 질환을 치료하는 것을 필요로 하는 피검체에게 투여함을 포함하는 그러한 피검체에서 면역 반응 질병 또는 질환 또는 면역 매개 반응 또는 질환을 치료하는 방

법에 관한 것이다.

[0043] 한 가지 양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 완전하지 않은 목록의 다양한 신경변성 질병의 치료에서 본 발명의 화합물의 용도를 제공한다: I. 다른 현저한 신경학적 증상의 부재하에서의 진행성 치매를 특징으로 하는 질환, 예컨대, 알츠하이머병; 알츠하이머 유형의 노인성 치매; 및 피크병(뇌엽위축); II. 다른 현저한 신경학적 비정상을 갖는 진행성 치매와 조합된 증후군, 예컨대, A) 성인에서 주로 나타나는 증후군(예, 헌팅턴병, 실조 및/또는 파킨슨병의 증상을 갖는 치매와 조합된 다계통위축, 진행성 핵상마비(스틸-리차드슨-울스제위스키(Steel-Richardson-Olszewski)), 미만성 루이 소체 질병, 및 코르티코덴테이토니그럴 변성(corticodentatonigral degeneration); 및 B) 아동 또는 청년에서 주로 나타나는 증후군(예, 할러보르텐-슈파츠병(Hallervorden-Spatz disease) 및 진행성 가족성 미오클로누스성 간질(progressive familial myoclonic epilepsy)); III. 자세 및 운동의 비정상이 점진적으로 발달하는 증후군, 예컨대, 진전 마비(파킨슨병), 선조체 흑질계 변성, 진행성 핵상마비, 염전근이긴장증(염전성 경련; 변형근육긴장이상증), 연축사경 및 다른 운동이상증, 가족성 진전, 및 질 드 라 뚜렛 증후군; IV. 진행성 실조의 증후군, 예컨대, 소뇌 변성(예, 소뇌 피질 변성 및 올리브교소뇌위축(olivopontocerebellar atrophy: OPCA)); 및 척수소뇌변성(프리이드라이히 운동실조 및 관련 질환); V. 중추 자율신경계 부전의 증후군(샤이-드라거 증후군(Shy-Drager syndrome)); VI. 감각 변화가 없는 근육 약화 및 소모 증후군(운동 뉴런 질병, 예컨대, 근육위축가쪽경화증, 척수근육위축증(예, 영아 진행성 척수성 근위축증(베르드니히-호프만(Werdnig-Hoffman)), 소아 척수 근육 위축증(볼파르트-쿠겔베르크-벨란더(Wohlfart-Kugelberg-Welander)) 및 가족성 척수 근육 위축증의 다른 형태), 원발성가쪽경화증, 및 유전성 연축성 대마비; VII. 감각 변화를 갖는 근육 약화 및 소모와 결합된 증후군(진행성 신경 근육 위축증; 만성 가족성 다발신경병증), 예컨대, 비골근 위축증(샤르코-마리-투스(Charcot-Marie-Tooth)), 비후성 간질 다발신경병증(데제린-소타(Dejerine-Sottas)), 및 만성 진행성 신경병증의 혼합 형태; VIII. 진행성 시각 상실 증후군, 예컨대, 망막색소변성(색소성 망막염), 및 유전성 시신경위축(레베르병(Leber's disease)). 또한, 본 발명의 화합물은 염색질 재조정에 연루될 수 있다.

[0044] 본 발명은 상기 기재된 바와 같이 본 발명의 화합물의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 본 발명은 또한 본 발명의 화합물의 용매화물, 및 상기 용매화물, 예컨대, 수화물, 메탄올레이트 또는 에탄올레이트를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 용어 "용매화물"은 결정 격자 내에 용매 분자의 존재를 포함하는 화합물의 고체, 바람직하게는 결정질 형태를 의미한다. 제공된 용매를 포함하는 화합물의 용매화물은 통상적으로 용매로부터의 화합물의 결정화에 의해 제조된다. 용매화물은 물, 메탄올 및 에탄올을 포함하는 다양한 용매를 포함할 수 있다. 용어 "수화물"은 용매가 물인 용매화물을 의미하며, 이는 반수화물, 일수화물, 이수화물, 및 삼수화물 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 본 발명은 추가로 결정질 및 결정질 용매화물 형태를 포함하는 본 발명의 화합물의 어떠한 고체 또는 액체 물리적 형태를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 결정질 형태 또는 비정질 형태로 되어 있을 수 있고, 임의의 입자 크기를 가질 수 있다. 입자는 미분화되거나, 응집될 수 있고, 미립자 과립, 분말, 오일, 오일성 현탁액 또는 고체 또는 액체 물리 형태의 어떠한 다른 형태일 수 있다.

[0045] 본 발명의 화합물, 및 이의 유도체, 단편, 유사체, 동족체, 약제학적으로 허용되는 염 또는 용매화물은 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께 투여에 적합한 약제학적 조성물에 혼합될 수 있다. 이러한 조성물은 통상적으로 치료적 유효량의 상기 화합물 중 어떠한 화합물, 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 바람직하게는, 암을 치료하는 경우 유효량은 적합한 신생물 세포의 말단 분화를 선택적으로 유도하기에 효과적인 양이고, 환자에서 독성을 유발하는 양보다 적다.

[0046] 본 발명의 화합물은 비경구, 정맥내, 근내, 피하, 이식, 경구, 설하, 협측, 비내, 폐내, 경피, 국소, 질내, 직장내, 및 점막 투여 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 어떠한 적합한 수단에 의해 투여될 수 있다. 국소 투여는 또한 경피 투여, 예컨대, 경피 패치 또는 이온이동법(iontophoresis) 장치의 사용을 포함할 수 있다. 약제학적 제조물은 선택 투여 방식에 적합한, 활성 성분으로서 본 발명의 화합물을 함유하는 고체, 반고체 또는 액체 제조물(정제, 펠릿, 트로키(troche), 캡슐, 좌약, 크림, 연고, 에어로졸, 분말, 액체, 에멀전, 현탁액, 시럽, 주사 등)을 포함한다. 한 가지 구체예에서, 약제학적 조성물은 경구 투여되고, 그에 따라서, 경구 투여에 적합한 형태, 즉, 고체 또는 액체 제조물로 제형화된다. 적합한 고체 경구 제형은 정제, 캡슐, 환약, 과립, 펠릿, 사세(sachet) 및 발포제(effervescent), 및 분말 등을 포함한다. 적합한 액체 경구 제형은 용액, 현탁액, 분산액, 에멀전, 및 오일 등을 포함한다. 본 발명의 한 가지 구체예에서, 조성물은 캡슐 내에 제형화된다. 이러한 구체예에 따르면, 본 발명의 조성물은 활성 화합물에 더하여 비활성 담체 또는 희석제, 경질 젤라틴 캡슐을 포함한다.

- [0047] 본 발명의 제형에는, 예를 들어, 검(gum), 전분, 당, 셀룰로오스 재료, 아크릴레이트 또는 이들의 혼합물과 같이 담체 또는 희석제로 흔히 사용되는 어떠한 비활성 부형제가 사용될 수 있다. 바람직한 희석제는 미정질 셀룰로오스이다. 조성물은 봉해제(예, 크로스카르멜로오스 소듐) 및 윤활제(예, 마그네슘 스테아레이트)를 추가로 포함할 수 있고, 결합제, 완충제, 프로테아제 억제제, 계면활성제, 가용화제, 가소제, 유화제, 안정화제, 점도 증가제, 감미제, 필름 형성제, 또는 이들의 어떠한 조합물로부터 선택된 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 조절 방출 또는 즉시 방출 제형의 형태일 수 있다.
- [0048] 액체 제형의 경우, 약제학적으로 허용되는 담체는 수성 또는 비수성 용액, 현탁액, 에멀전 또는 오일일 수 있다. 비수성 용매의 예는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 및 주사가 가능한 유기 에스테르, 예컨대, 에틸 올레에이트이다. 수성 담체는 물, 알콜성/수성 용액, 에멀전, 또는 염수 및 완충 매질을 포함한 현탁액을 포함한다. 오일의 예는 석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일, 예를 들어, 땅콩유, 대두유, 광유, 올리브유, 해바라기유, 및 생선-간 오일이다. 용액 또는 현탁액은 또한 다음 성분을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예컨대, 주사용수, 염수 용액, 고정유, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 항균제, 예컨대, 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대, 아스코르브산 또는 소듐 비셀파이트; 킬레이트제, 예컨대, 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA); 완충제, 예컨대, 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트, 및 긴장성을 조절하기 위한 작용제, 예컨대, 염화나트륨 또는 텍스트로오스. pH는 산 또는 염기, 예컨대, 염산 또는 수산화나트륨으로 조절될 수 있다.
- [0049] 또한, 조성물은 결합제(예, 아카시아, 옥수수전분, 젤라틴, 카르보머, 에틸 셀룰로오스, 구아 검, 하이드록시프로필 셀룰로오스, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스, 포비돈), 봉해제(예, 옥수수전분, 감자 전분, 알긴산, 이산화규소, 크로스카르멜로오스 소듐, 크로스포비돈, 구아 검, 소듐 전분 글리콜레이트, 프리모겔(Primogel)), 다양한 pH 및 이온 강도의 완충제(예, 트리스-HCl, 아세테이트, 포스페이트), 표면으로의 흡수를 방지하는 첨가제, 예컨대, 알부민 또는 젤라틴, 세제(예, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, 담즙산염), 프로테아제 억제제, 계면활성제(예, 소듐 라우릴 설페이트), 투과 향상제, 가용화제(예, 글리세롤, 폴리에틸렌 글리세롤, 폴리에틸렌 글리콜), 활택제(예, 콜로이드성 이산화규소), 항산화제(예, 아스코르브산, 소듐 메타비셀파이트, 부틸화된 하이드록시아니솔), 안정화제(예, 하이드록시프로필 셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스), 점도 증가제(예, 카르보머, 콜로이드성 이산화규소, 에틸 셀룰로오스, 구아 검), 감미제(예, 수크로오스, 아스파탐, 시트르산), 착향제(예, 페퍼민트, 메틸 살리실레이트, 또는 오렌지 착향제), 보존제(예, 티메로살, 벤질 알콜, 파라벤), 윤활제(예, 스테아르산, 마그네슘 스테아레이트, 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 설페이트), 유동-보조제(예, 콜로이드성 이산화규소), 가소제(예, 디에틸 프탈레이트, 트리에틸 시트레이트), 유화제(예, 카르보머, 하이드록시프로필 셀룰로오스, 소듐 라우릴 설페이트), 중합체 코팅(예, 폴록사머 또는 폴록사민), 코팅 및 필름 형성제(예, 에틸 셀룰로오스, 아크릴레이트, 폴리메타크릴레이트) 및/또는 애쥬번트를 추가로 포함할 수 있다.
- [0050] 한 가지 구체예에서, 활성 화합물은 이식 및 미세캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 조절 방출 제형과 같은 신체로부터의 신속한 제거에 대해 화합물을 보호할 담체와 함께 제조된다. 생분해성의 생체적합성 중합체, 예컨대, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리언하이드라이드, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 상기 제형을 제조하기 위한 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 상기 재료는 또한 Alza Corporation 및 Nova Pharmaceuticals, Inc.로부터 시중에서 구입할 수 있다. 리포솜 현탁액(바이러스 항원에 대한 모노클로날 항체로 감염된 세포에 표적화된 리포솜 포함)이 또한 약제학적으로 허용되는 담체로서 사용될 수 있다. 이들은, 예를 들어, 미국 특허 번호 제4,522,811호에 기재된 바와 같이 당업자에게 공지된 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0051] 투여 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 경구 조성물을 제형화하는 것이 특히 유리하다. 본원에서 사용되는 투여 단위 형태는 치료하고자 하는 피검체에 대해 단일 투여량으로 적합한 물리적으로 별개의 단위를 의미하며; 각각의 단위는 필요한 약제학적 담체와 관련된 요망되는 치료 효과를 생성시키기 위해 계산된 소정량의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 투여 단위 형태에 대한 규격은 활성 화합물의 독특한 특성 및 달성되는 특정 치료 효과, 및 개체의 치료를 위해 상기 활성 화합물을 배합하는 당해 분야 고유의 제한에 의해 지시되며, 이러한 것들에 직접적으로 좌우된다.
- [0052] 경구 투여용으로 의도된 본 발명의 제형은 장쇄 지방산 또는 이의 염, 예컨대, 데칸산 및 소듐 데카노에이트를 포함하여 하나 이상의 투과 향상제를 포함할 수 있다.
- [0053] 한 가지 바람직한 구체예에서, 본 발명의 화합물은 정맥내 주사용 수용액에서 제형화될 수 있다. 한 가지 구체



예에서, 가용화제가 적합하게 사용될 수 있다. 특히 바람직한 가용화제는 CyDex, Inc.에 의해 상품명 CAPTISOL<sup>®</sup> 하에 판매되는 설포부틸에테르-7-β-사이클로덱스트린과 같은 설포산 치환된 β-사이클로덱스트린을 포함하여 사이클로덱스트린 및 개질된 사이클로덱스트린, 예컨대, 설포산 치환된 β-사이클로덱스트린 유도체 또는 이의 염을 포함한다.

[0054] 약제학적 조성물은 투여 설명서와 함께 용기, 팩, 또는 분배기에 포함될 수 있다.

[0055] 일일 투여는 수일 내지 수년의 기간 동안 연속적으로 반복될 수 있다. 경구 치료는 1주 내지 환자의 생애 동안 지속될 수 있다. 바람직하게는, 투여는 5일 연속 동안 이루어질 수 있으며, 이 기간 후 환자는 추가 투여가 필요한지 결정하기 위해 평가될 수 있다. 투여는 연속적이거나 간헐적일 수 있고, 예를 들어, 다수의 연속적인 수일 후에 휴지 기간이 있을 수 있다. 본 발명의 화합물은 치료 첫번째 날에 정맥내 투여될 수 있고, 치료 둘째 날 및 이후의 연속적인 모든 날에 경구 투여될 수 있다.

[0056] 활성 성분을 함유하는 약제학적 조성물의 제조는, 예를 들어, 혼합, 과립화, 또는 정제 형성 공정에 의해 당해 분야에 널리 이해되어 있다. 활성 치료 성분은 종종 약제학적으로 허용되고 활성 성분과 양립되는 부형제와 혼합된다. 경구 투여의 경우, 활성제는 상기 목적을 위한 관례적인 첨가제, 예컨대, 비히클, 안정화제, 또는 비활성 희석제와 혼합되고, 상기 기재된 바와 같이 관례적인 방법에 의해 투여에 적합한 형태, 예컨대, 정제, 코팅된 정제, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐, 수성, 알콜성 또는 오일성 용액 등으로 전환된다.

[0057] 환자에게 투여되는 화합물의 양은 환자에서 독성을 유발할 양 미만이다. 특정 구체예에서, 환자에게 투여되는 화합물의 양은 환자의 혈장 내의 화합물의 농도가 화합물의 독성 수준과 동등하거나 이를 초과하도록 하는 양 미만이다. 바람직하게는, 환자의 혈장 내의 화합물의 농도는 약 10nM로 유지된다. 한 가지 구체예에서, 환자의 혈장 내의 화합물의 농도는 약 25nM로 유지된다. 한 가지 구체예에서, 환자의 혈장 내의 화합물의 농도는 약 50nM로 유지된다. 한 가지 구체예에서, 환자의 혈장 내의 화합물의 농도는 약 100nM로 유지된다. 한 가지 구체예에서, 환자의 혈장 내의 화합물의 농도는 약 500nM로 유지된다. 한 가지 구체예에서, 환자의 혈장 내의 화합물의 농도는 약 1000nM로 유지된다. 한 가지 구체예에서, 환자의 혈장 내의 화합물의 농도는 약 2500nM로 유지된다. 한 가지 구체예에서, 환자의 혈장 내의 화합물의 농도는 약 5000nM로 유지된다. 본 발명의 실시예에서 환자에게 투여되어야 하는 화합물의 최적량은 사용되는 특정 화합물 및 치료하고자 하는 암의 유형에 좌우될 것이다.

[0058] 정의

[0059] 본 발명을 기재하기 위해 사용된 다양한 용어의 정의가 하기에 기재된다. 이러한 정의는 개별적으로 또는 보다는 큰 그룹의 일부로 달리 특정 예로 제한되지 않는 한 본 명세서 및 청구항 전체에 걸쳐 사용되는 용어에 적용된다.

[0060] 용어 "아실"은 수소, 알킬, 부분적으로 포화되거나 완전히 포화된 사이클로알킬, 부분적으로 포화되거나 완전히 포화된 헤테로사이클, 아릴, 및 헤테로아릴 치환된 카르보닐기를 의미한다. 예를 들어, 아실은 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)알카노일 (예, 포르밀, 아세틸, 프로피오닐, 부틸릴, 발레릴, 카프로일, t-부틸아세틸 등), (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)사이클로알킬카르보닐 (예, 사이클로프로필카르보닐, 사이클로부틸카르보닐, 사이클로펜틸카르보닐, 사이클로헥실카르보닐 등), 헤테로사이클릭 카르보닐(예, 피롤리딘카르보닐, 피롤리드-2-온-5-카르보닐, 피페리딘카르보닐, 피페라지닐카르보닐, 테트라하이드로푸라닐카르보닐 등), 아로일(예, 벤조일) 및 헤테로아로일(예, 티오펜-2-카르보닐, 티오펜-3-카르보닐, 푸라닐-2-카르보닐, 푸라닐-3-카르보닐, 1H-피로일-2-카르보닐, 1H-피로일-3-카르보닐, 벤조[b]티오펜-2-카르보닐 등)과 같은 기를 포함한다. 또한, 아실기의 알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클, 아릴 및 헤테로아릴 부분은 각각의 정의에 기재된 기 중 어느 하나일 수 있다. "치환되거나 비치환된"으로 표현되는 경우, 아실기는 비치환되거나, "치환된"에 대한 정의에서 하기 나열된 치환기의 군으로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기(통상적으로, 1 내지 3개의 치환기)로 치환되거나 비치환될 수 있거나, 아실기의 알킬, 사이클로알킬, 헤테로사이클, 아릴 및 헤테로아릴 부분은 치환기의 바람직한 목록 및 더욱 바람직한 목록에서 상기 기재된 바와 같이 각각 치환될 수 있다.

[0061] 용어 "알킬"은 1 내지 약 20개의 탄소 원자, 또는 바람직하게는 1 내지 약 12개의 탄소 원자를 갖는 선형 또는 분지형 라디칼을 포함한다. 더욱 바람직한 알킬 라디칼은 1 내지 약 10개의 탄소 원자를 갖는 "저급 알킬" 라디칼이다. 가장 바람직한 것은 1 내지 약 8개의 탄소 원자를 갖는 저급 알킬 라디칼이다. 상기 라디칼의 예는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, 2차-부틸, 3차-부틸, 펜틸, 이소-아밀, 및 헥실 등을 포함한다.



- [0062] 용어 "알케닐"은 2 내지 약 20개의 탄소 원자, 또는 바람직하게는 2 내지 약 12개의 탄소 원자의 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 선형 또는 분지형 라디칼을 포함한다. 더욱 바람직한 알케닐 라디칼은 2 내지 약 10개의 탄소 원자, 더욱 바람직하게는 약 2 내지 약 8개의 탄소 원자를 갖는 "저급 알케닐" 라디칼이다. 알케닐 라디칼의 예는 에테닐, 알릴, 프로페닐, 부테닐 및 4-메틸부테닐을 포함한다. 용어 "알케닐" 및 "저급 알케닐"은 "시스" 및 "트랜스" 배향, 또는 대안적으로 "E" 및 "Z" 배향을 갖는 라디칼을 포함한다.
- [0063] 용어 "알키닐"은 2 내지 약 20개의 탄소 원자 또는 바람직하게는 2 내지 약 12개의 탄소 원자의 하나 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 선형 또는 분지형의 라디칼을 포함한다. 더욱 바람직한 알키닐 라디칼은 2 내지 약 10개의 탄소 원자, 더욱 바람직하게는 약 2 내지 약 8개의 탄소 원자를 갖는 "저급 알키닐" 라디칼이다. 알키닐 라디칼의 예는 프로파르길, 1-프로피닐, 2-프로피닐, 1-부틴, 2-부티닐 및 1-펜티닐을 포함한다.
- [0064] 단독 또는 조합되어 용어 "아릴"은 1, 2 또는 3개의 고리를 함유하는 카르보사이클릭 방향족 시스템을 의미하며, 상기 고리는 펜던트(pendent) 방식으로 함께 부착될 수 있거나, 융합될 수 있다. 용어 "아릴"은 페닐, 나프틸, 테트라하이드로나프틸, 인단 및 바이페닐과 같은 방향족 라디칼을 포함한다.
- [0065] 용어 "헤테로사이클릴", "헤테로사이클", "헤테로사이클릭" 또는 "헤테로사이클로"는 포화되고, 부분적으로 불포화되고, 불포화된 헤테로원자-함유 고리 모양 라디칼을 포함하며, 이는 또한 상응하여 "헤테로사이클릴", "헤테로사이클로알케닐" 및 "헤테로아릴"로 칭해질 수 있고, 여기서 헤테로원자는 질소, 황 및 산소로부터 선택될 수 있다. 포화된 헤테로사이클릴 라디칼의 예는 1 내지 4개의 질소 원자를 함유하는 포화된 3 내지 6원 헤테로모노사이클릭(예, 피롤리딘, 이미다졸리딘, 피페리딘, 피페라지닐 등); 1 내지 2개의 산소 원자 및 1 내지 3개의 질소 원자를 함유하는 포화된 3 내지 6원 헤테로모노사이클릭(예, 모르폴리닐 등); 1 내지 2개의 황 원자 및 1 내지 3개의 질소 원자를 함유하는 포화된 3 내지 6원 헤테로모노사이클릭(예, 티아졸리딘 등)를 포함한다. 부분적으로 불포화된 헤테로사이클릴 라디칼의 예는 디하이드로티오펜, 디하이드로피란, 디하이드로푸란 및 디하이드로티아졸을 포함한다. 헤테로사이클릴 라디칼은 테트라졸륨 및 피리디늄 라디칼에서와 같은 5가 질소를 포함할 수 있다. 용어 "헤테로사이클"은 또한 헤테로사이클릴 라디칼이 아릴 또는 사이클로알킬 라디칼과 융합된 라디칼을 포함한다. 이러한 융합된 바이사이클릭 라디칼의 예는 벤조푸란, 및 벤조티오펜 등을 포함한다.
- [0066] 용어 "헤테로아릴"은 불포화 헤테로사이클릴 라디칼을 포함한다. 헤테로아릴 라디칼의 예는 1 내지 4개의 질소 원자를 함유하는 불포화 3 내지 6원, 바람직하게는 5 또는 6원 헤테로모노사이클릭, 예를 들어, 피롤릴, 피롤리닐, 이미다졸릴, 피라졸릴, 피리딜, 피리미딜, 피라지닐, 피리다지닐, 트리아졸릴(예, 4H-1,2,4-트리아졸릴, 1H-1,2,3-트리아졸릴, 2H-1,2,3-트리아졸릴 등), 테트라졸릴(예, 1H-테트라졸릴, 2H-테트라졸릴 등) 등; 1 내지 5개의 질소 원자를 함유하는 불포화 축합 헤테로사이클릭, 예를 들어, 인돌릴, 이소인돌릴, 인돌리지닐, 벤즈이미다졸릴, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 인다졸릴, 벤조트리아졸릴, 테트라졸로피리다지닐(예, 테트라졸로[1,5-b]피리다지닐 등) 등; 산소 원자를 함유하는 불포화 3 내지 6원, 바람직하게는 5 또는 6원 헤테로모노사이클릭, 예를 들어, 피라닐, 푸릴 등; 황 원자를 함유하는 불포화 3 내지 6원 헤테로모노사이클릭, 예를 들어, 티에닐 등; 1 내지 2개의 산소 원자 및 1 내지 3개의 질소 원자를 함유하는 불포화 3 내지 6원, 바람직하게는 5 또는 6원 헤테로모노사이클릭, 예를 들어, 옥사졸릴, 이속사졸릴, 옥사디아졸릴(예, 1,2,4-옥사디아졸릴, 1,3,4-옥사디아졸릴, 1,2,5-옥사디아졸릴 등) 등; 1 내지 2개의 산소 원자 및 1 내지 3개의 질소 원자를 함유하는 불포화 축합 헤테로사이클릭(예, 벤즈옥사졸릴, 벤즈옥사디아졸릴 등); 1 내지 2개의 황 원자 및 1 내지 3개의 질소 원자를 함유하는 불포화 3 내지 6원 바람직하게는 5 또는 6원 헤테로모노사이클릭, 예를 들어, 티아졸릴, 티아디아졸릴(예, 1,2,4-티아디아졸릴, 1,3,4-티아디아졸릴, 1,2,5-티아디아졸릴 등) 등; 및 1 내지 2개의 황 원자 및 1 내지 3개의 질소 원자를 함유하는 불포화 축합 헤테로사이클릭(예, 벤조티아졸릴, 벤조티아디아졸릴 등) 등을 포함한다.
- [0067] 용어 "헤테로사이클로알킬"은 헤테로사이클로 치환된 알킬 라디칼을 포함한다. 더욱 바람직한 헤테로사이클로알킬 라디칼은 헤테로사이클로 라디칼에서 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 "저급 헤테로사이클로알킬" 라디칼이다.
- [0068] 용어 "치환된"은 주어진 구조에서의 하나 이상의 수소 라디칼의, 할로, 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 티올, 알킬티오, 아릴티오, 알킬티오알킬, 아릴티오알킬, 알킬설포닐, 알킬설포닐알킬, 아릴설포닐알킬, 알콕시, 아릴옥시, 아르알콕시, 아미노카르보닐, 알킬아미노카르보닐, 아릴아미노카르보닐, 알콕시카르보닐, 아릴옥시카르보닐, 할로알킬, 아미노, 트리플루오로메틸, 시아노, 니트로, 알킬아미노, 아릴아미노, 알킬아미노알킬, 아릴아미노알킬, 아미노알킬아미노, 하이드록시, 알콕시알킬, 카르복시알킬, 알콕시카르보

닐알킬, 아미노카르보닐알킬, 아실, 아르알콕시카르보닐, 카르복실산, 설펜산, 설포닐, 포스폰산, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로사이클릭, 및 지방족을 포함하지만 이로 제한되지는 않는 특정한 치환기의 라디칼로의 대체를 의미한다. 치환기가 추가로 치환될 수 있음이 이해된다.

[0069] 간단히, 전문에 걸쳐 정의되고 언급된 화학적 모이어티는 당업자에게 명백한 적절한 구조적 상황하에서 1가 화학 모이어티(예, 알킬, 아릴 등) 또는 다가 모이어티일 수 있다. 예를 들어, "알킬" 모이어티는 1가 라디칼(예,  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$ )을 의미할 수 있거나, 다른 예에서, 2가 연결 모이어티는 "알킬"일 수 있고, 이러한 경우 당업자는 알킬이 용어 "알킬렌"과 동등한 2가 라디칼(예,  $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$ )이 됨을 이해할 것이다. 유사하게는, 2가 모이어티가 요구되고, "알콕시", "알킬아미노", "아릴옥시", "알킬티오", "아릴", "헤테로아릴", "헤테로사이클릭", "알킬", "알케닐", "알키닐", "지방족" 또는 "사이클로알킬"로 언급되는 상황에서, 당업자는 용어 "알콕시", "알킬아미노", "아릴옥시", "알킬티오", "아릴", "헤테로아릴", "헤테로사이클릭", "알킬", "알케닐", "알키닐", "지방족" 또는 "사이클로알킬"이 상응하는 2가 모이어티를 의미하는 것을 이해할 것이다.

[0070] 본원에서 사용되는 용어 "할로젠" 또는 "할로"는 불소, 염소, 브롬 및 요오드로부터 선택된 원자를 의미한다.

[0071] 본원에서 사용되는 용어 "이상 증식"은 비정상적인 세포 성장을 의미한다.

[0072] 구 "보조 요법"은, 예를 들어, 항암 약물, 예를 들어, 골 재흡수 억제제, 심근보호 작용제의 독성 효과를 감소시키거나; 화학요법, 방사선요법 또는 수술과 관련된 구역 및 구토의 발생을 예방하거나 감소시키거나; 골수억제 항암 약물의 투여와 관련된 감염의 발생을 감소시키는 작용제를 포함하지만, 이로 제한되지 않는, 본 발명의 조합 요법과 관련된 부작용을 감소시키거나 방지하는 작용제로 피검체를 치료하는 것을 포함한다.

[0073] 본원에서 사용되는 용어 "혈관신생"은 혈관의 형성을 의미한다. 특히, 혈관신생은 내피 세포가 국소적으로 퇴화되고 이 자체의 기저막을 통해 침입하고, 간질 기질을 통해 혈관신생 자극을 향해 이동하고, 이동 침단 근위에서 증식하고, 혈관으로 조직화되고, 새로 합성된 기저막에 재유착되는 다단계의 과정이다[참조예: Folkman *et al.*, Adv. Cancer Res., Vol. 43, pp. 175-203 (1985)]. 항혈관신생 작용제는 상기 과정을 방해한다. 상기 단계 중 여러 단계를 방해하는 작용제의 예는 트롬보스폰딘-1(thrombospondin-1), 안지오스타틴(angiotatin), 엔도스타틴(endostatin), 인터페론 알파(interferon alpha) 및 이후에 새로 형성되는 혈관에 대한 경로를 개척하고 생성시키는 효소의 작용을 차단하는 화합물, 예컨대, 기질 금속단백분해효소(matrix metalloproteinase: MMP) 억제제; 혈관 세포가 모 혈관과 종양 사이를 연결하기 위해 사용하는 분자를 방해하는 화합물, 예컨대, .알파.v.베타.3 억제제(.alpha.v.beta.3 inhibitor); 새로운 혈관을 형성하는 세포의 성장을 방지하는 작용제, 예를 들어, 특정 COX-2 억제제; 및 상기 표적 중 여러 표적을 동시에 방해하는 단백질-기반의 화합물을 포함한다.

[0074] 본원에서 사용되는 용어 "아포토시스"는 세포 건강 및 조건의 노화 또는 상태가 지시되는 경우에 정상적으로 기능하는 인간 및 동물 세포에서 핵에 의해 신호전달됨에 따른 프로그램화된 세포 사멸을 의미한다. "아포토시스 유도 작용제"는 프로그램화된 세포 사멸의 과정을 촉발시킨다.

[0075] 본원에서 사용되는 용어 "암"은 세포의 조절되지 않는 분열, 및 상기 세포가 침습을 통한 인접 조직으로의 직접적인 성장 또는 전이에 의한 원위의 부위로의 이식에 의해 다른 조직을 침습하는 능력을 특징으로 하는 질병 또는 질환의 부류를 나타낸다.

[0076] 본원에 사용된 용어 "화합물" 및 "본 발명의 화합물"은 화학식(I)의 화합물 및 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 의미한다. 본 발명의 화합물은 결정질 및 비결정질 형태를 포함하여 여러 형태로 얻어질 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 용매화물, 예를 들어, 수화물, 또는 유기 용매, 바람직하게는 약제학적으로 허용되는 용매의 용매화물로서 발생될 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 다중 결정질, 또는 다형성 형태로 발생될 수 있다. 본 발명의 화합물은 화학식(I)의 화합물의 약제학적으로 허용가능한 프로드러그 및 에스테르를 추가로 포함한다.

[0077] 용어 "장치"는 특정 기능을 수행하기 위해 설계된, 보통 기계적이거나 전기적인 어떠한 기구를 의미한다.

[0078] 본원에서 사용되는 용어 "형성이상"은 비정상적인 세포 성장을 의미하며, 통상적으로 병리학자에 의해 생검에서 인지가능한 전암성 병변의 가장 이른 형태를 의미한다.

[0079] 본 발명의 치료 방법과 관련하여 본원에서 사용되는 용어 "유효량의 본 발명의 화합물"은 요망되는 용량 치료계획의 일부로서 전달되는 경우에, 예를 들어, 세포의 세포 증식 속도 및/또는 분화 상태 및/또는 생존률의 임상적으로 허용되는 기준으로 변화시키는 본 발명의 화합물의 양을 의미한다. 이러한 양은 추가로, 1) 암 세포 수

의 감소; 2) 종양 크기의 감소; 3) 말초 기관으로의 암세포 침윤의 억제(즉, 다소 느리게 하거나, 바람직하게는 정지시킴); 4) 종양 전이의 억제(즉, 다소 느리게 하거나, 바람직하게는 정지시킴); 5) 종양 성장의 다소의 억제; 6) 질환과 관련된 증상 중 하나 이상의 다소의 경감 또는 감소; 및/또는 7) 항암제의 투여와 관련된 부작용의 감소 또는 경감을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 신생물 질환의 증상 중 하나 이상을 다소 경감시킬 수 있다.

[0080] 본원에서 사용되는 용어 "과다형성"은 과도한 세포 분열 또는 성장을 의미한다.

[0081] 구 "면역요법제"는 면역 공여자, 예를 들어, 또 다른 사람 또는 동물의 면역성을 접종에 의해 숙주에 전달하기 위해 사용되는 작용제를 의미한다. 상기 용어는 또 다른 개체 또는 동물에 의해 생성된 수행 항체를 함유하는 혈청 또는 감마 글로불린; 비특이적 전신 접종; 애췌번트; 활성 특정 면역요법; 및 입양 면역요법의 사용을 포함한다. 입양 면역요법은 감작된 림프구의 호스트 접종, 전달 인자, 면역 RNA, 또는 혈청 또는 감마 글로불린 내의 항체를 포함하는 요법 또는 작용제에 의한 질병의 치료를 의미한다.

[0082] 신생물, 종양 성장 또는 종양 세포 성장의 문맥에서의 용어 "억제"는 특히 원발성 또는 속발성 종양의 지연 출현, 원발성 또는 속발성 종양의 발달 지체, 원발성 또는 속발성 종양의 발생 감소, 질병의 이차 효과의 지체되거나 감소된 중증도, 종양 성장의 저지 및 종양의 회귀에 의해 평가될 수 있다. 극단적으로, 완전한 억제는 본원에서 예방 또는 화학예방으로 언급된다.

[0083] 본원에서 사용되는 용어 "전이"는 혈관 및 림프관을 통해 본래의 종양 부위로부터 암세포가 이동하여 다른 조직에 암을 생성시키는 것을 의미한다. 전이는 또한 원위에서의 속발성 암 성장에 사용되는 용어이다.

[0084] 본원에서 사용되는 용어 "신생물"은 과도한 세포 분열로부터 생성되는 비정상적인 큰 조직을 의미한다. 신생물은 양성(암성이 아님) 또는 악성(암성)일 수 있고, 또한 종양으로 칭해질 수 있다. 용어 "신생물"은 종양 형성을 발생시키는 병리학적 과정이다.

[0085] 본원에서 사용되는 용어 "전암"은 악성이 아니지만, 치료하지 않은 채 방치되는 경우 악성이 될 가능성이 있는 병태를 의미한다.

[0086] 용어 "증식"은 유사분열을 겪는 세포를 의미한다.

[0087] 구 "PI3 키나아제 관련 질병 또는 질환"은 부적절한 포스포이노시티드-3-키나아제 활성 또는 포스포이노시티드-3-키나아제의 과다활성을 특징으로 하는 질병 또는 질환을 의미한다. 부적절한 활성은, (i) 정상적으로는 PI3 키나아제를 발현하지 않는 세포에서의 PI3 키나아제 발현; (ii) 원치않는 세포 증식, 분화 및/또는 성장을 초래하는 증가된 PI3 키나아제 발현; 또는, (iii) 세포 증식, 분화 및/또는 성장에서의 원치않는 감소를 초래하는 감소된 PI3 키나아제 발현을 의미한다. PI3 키나아제의 과다활성은 특히 PI3 키나아제를 엔코딩하는 유전자의 증폭 또는 세포 증식, 분화 및/또는 성장 질환과 관련될 수 있는 PI3 키나아제 활성의 수준(즉, PI3 키나아제의 수준이 증가함에 따라, 세포 질환의 증상 중 하나 이상의 중증도가 증가함)의 생성을 의미한다.

[0088] 구 "방사성 치료제"는 신생물의 치료에서의 전자기 또는 미립자 방사선의 사용을 의미한다.

[0089] 본원에서 사용되는 용어 "재발"은 완화 기간 후 암의 복귀를 의미한다. 이는 최초의 암으로부터의 세포의 불완전한 제거로 인한 것일 수 있으며, 국소적(최초 암과 동일 부위), 국부적(최초 암의 근접 부위, 아마 림프절 또는 조직 내), 및/또는 전이의 결과로서 원위에 발생할 수 있다.

[0090] 용어 "치료"는 인간을 포함하는 포유동물이 포유동물의 병태를 직접적 또는 간접적으로 개선시키려는 목적으로 의학적 보조제에 주어지는 어떠한 과정, 작용, 적용, 또는 요법 등을 의미한다.

[0091] 용어 "백신"은 환자의 면역계가 종양 관련 항원(Teas)을 발현하는 세포를 공격함으로써 종양에 대한 면역 반응을 개시하도록 유도하는 작용제를 포함한다.

[0092] 본원에서 사용되는 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은 충분한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 및 알레르기 반응 등이 없이 인간 및 하등 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고, 타당한 이익/위험 비에 상응하는 염을 의미한다. 약제학적으로 허용되는 염은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [S. M. Berge, *et al.*]에는 문헌 [J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977)]에 상술된 약제학적으로 허용되는 염이 기재되어 있다. 염은 본 발명의 화합물의 최종 분리 및 정제 동안 동일 반응계에서 제조될 수 있거나, 유리 염기 작용기를 적합한 유기산 또는 무기산과 반응시킴으로써 별개로 제조될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 비독성 산부가염의 예는 염산, 브롬화수소산, 인산, 황산 및 과염소산과 같은 무기산, 또는 아세트산,

말레산, 타르타르산, 시트르산, 숙신산, 락토비온산 또는 말론산과 같은 유기산에 의해, 이온 교환과 같은 당해 분야에서 사용되는 다른 방법을 이용하여 형성된 아미노기의 염을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 다른 약제학적으로 허용되는 염은 아디페이트, 알기네이트, 아스코베이트, 아스파테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 바이설페이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르설포네이트, 시트레이트, 사이클로헥탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실설페이트, 에탄설포네이트, 포르메이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페이트, 글루코네이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 하이드로아미노다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 락토바이오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 설페이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 메탄설포네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올레에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼설페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 석시네이트, 설페이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, *p*-톨루엔설포네이트, 운데카노에이트, 및 발레레이트 염 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 대표적인 알칼리 또는 알칼리토금속 염은 나트륨, 리튬, 칼륨, 칼슘, 및 마그네슘 등을 포함한다. 추가의 약제학적으로 허용되는 염은, 적절한 경우, 비독성 암모늄, 4차 암모늄, 및 할라이드, 하이드록사이드, 카르복실레이트, 설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 알킬 설포네이트, 설포네이트 및 아릴 설포네이트와 같은 상대이온을 이용하여 형성된 아민 양이온을 포함한다. 특정 염, 예컨대, 나트륨, 칼륨 및 콜린 염기 염뿐만 아니라 산성 염, 예컨대, 설페이트, 및 메탄설포네이트 염은 허용가능한 수성 매질에서 화학식(I)의 화합물의 용해도를 향상시키는 것으로 밝혀졌다. 한 가지 구체예에서, 화합물 1의 약제학적으로 허용되는 염은 콜린 염이다. 화합물 1의 바람직한 염에는 나트륨 염 및 칼륨 염이 포함된다. 그 밖의 바람직한 염에는 설페이트 및 메탄설포네이트 염이 포함된다.

[0093] 본원에서 사용되는 용어 "약제학적으로 허용되는 에스테르"는 생체내에서 가수분해되고, 인체 내에서 용이하게 분해되어 모 화합물 또는 이의 염을 남기는 것을 포함하는 에스테르를 의미한다. 적합한 에스테르기는, 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 지방족 카르복실산, 특히 알카노산, 알케노산, 사이클로알카노산 및 알칸디오산으로부터 유래된 것을 포함하며, 여기서 각각의 알킬 또는 알케닐 모이어티는 유리하게는 6개 이하의 탄소 원자를 갖는다. 특정 에스테르의 예는 포르메이트, 아세테이트, 프로피오네이트, 부티레이트, 아크릴레이트 및 에틸석시네이트를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0094] 용어 "약제학적으로 허용되는 프로드러그"는 충분한 의학적 판단의 범위 내에서 과도한 독성, 자극, 및 알레르기 반응 등을 갖는 인간 및 하등 동물의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하고, 타당한 이익/위험 비에 상응하고, 이의 의도된 용도에 효과적인 본 발명의 화합물의 프로드러그, 뿐만 아니라, 가능한 경우, 본 발명의 화합물의 양쪽성 이온 형태를 의미한다. 본원에서 사용되는 용어 "프로드러그"는 물질대사 수단에 의해(예, 가수분해에 의해) 본 발명의 화합물로 생체내에서 전환가능한 화합물을 의미한다. 프로드러그의 다양한 형태가 당해 분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌[Bundgaard, (ed.), Design of Prodrugs, Elsevier (1985); Widder, et al. (ed.), Methods in Enzymology, vol. 4, Academic Press (1985); Krogsgaard-Larsen, et al., (ed). "Design and Application of Prodrugs, Textbook of Drug Design and Development, Chapter 5, 113-191 (1991); Bundgaard, et al., Journal of Drug Deliver Reviews, 8:1-38(1992); Bundgaard, J. of Pharmaceutical Sciences, 77:285 et seq. (1988); Higuchi and Stella (eds.) Prodrugs as Novel Drug Delivery Systems, American Chemical Society (1975); 및 Bernard Testa & Joachim Mayer, "Hydrolysis in Drug And Prodrug Metabolism: Chemistry, Biochemistry And Enzymology," John Wiley and Sons, Ltd. (2002)]에 논의되어 있다.

[0095] 본원에서 사용되는 용어 "약제학적으로 허용되는 담체"는 멸균 발열원-비함유 물과 같이 약제학적 투여와 양립 가능한 용매, 분산 매질, 코팅, 항균제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제 등 중 어느 것 및 모두를 포함하는 것으로 의미된다. 적합한 담체는 당해 분야에서 표준 참고서이고 본원에 참조로 포함되는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences]의 가장 최신판에 기재되어 있다. 상기 담체 또는 희석제의 바람직한 예는 물, 염수, 링거액(finger's solution), 텍스트로오스 용액, 및 5% 인간 혈청 알부민을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 리포솜 및 비수성 비히클, 예컨대, 고정유가 또한 사용될 수 있다. 약제학적 활성 물질에 대한 상기 매질 및 작용제의 사용은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 어떠한 통상적인 매질 또는 작용제가 활성 화합물과 양립가능하지 않은 경우를 제외하고는, 조성물에서의 이의 용도가 고려된다. 보충 활성 화합물이 또한 조성물에 포함될 수 있다.

[0096] 본원에서 사용되는 용어 "전암"은 악성은 아니지만, 치료하지 않은 채 방지하는 경우 악성이 될 가능성이 있는 병태를 의미한다.



- [0097] 본원에서 사용되는 용어 "피검체"는 동물을 의미한다. 바람직하게는, 동물은 포유동물이다. 더욱 바람직하게는, 포유동물은 인간이다. 피검체는 또한, 예를 들어, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 기니아 피그, 어류, 및 조류 등을 의미한다.
- [0098] 본 발명의 화합물은 선택적 생물학적 특성을 향상시키기 위해 적절한 작용기를 부착시킴으로써 변형될 수 있다. 이러한 변형은 당해 분야에 공지되어 있으며, 주어지는 생물학적 시스템(예, 혈액, 림프계, 중추신경계)으로의 생물학적 침투를 증가시키고, 경구 이용가능성을 증가시키고, 주사에 의한 투여를 가능케 하도록 용해도를 증가시키고, 물질대사를 변경시키고, 배출 속도를 변경시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0099] 합성된 화합물은 반응 혼합물로부터 분리될 수 있고, 추가로 컬럼 크로마토그래피, 고압 액체 크로마토그래피, 또는 재결정화와 같은 방법에 의해 정제될 수 있다. 당업자에 의해 인지될 수 있는 바와 같이, 본원의 화학식의 화합물을 합성하는 추가 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 추가로, 다양한 합성 단계가 요망되는 화합물을 제공하기 위해 대안적 차례 또는 순서로 수행될 수 있다. 본원에 기재된 화합물을 합성하는데 유용한 합성 화학 변형 및 보호기 방법(보호 및 탈보호)이 당해 분야에 공지되어 있고, 이는, 예를 들어, 문헌[R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); T.W. Greene and P.G.M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 2d. Ed., John Wiley and Sons (1991); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); 및 L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995)], 및 이의 후속 판에 기재된 것을 포함한다.
- [0100] 약제학적 조성물
- [0101] 본 발명의 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 함께 제형화된 치료적 유효량의 본 발명의 화합물을 포함한다.
- [0102] 바람직하게는, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제는 어떠한 유형의 비독성의 비활성 고체, 반고체 또는 액체 충전제, 희석제, 캡슐화 재료 또는 제형 보조제이다. 약제학적으로 허용되는 담체로 작용할 수 있는 재료의 일부 예는 당, 예컨대, 락토오스, 글루코오스 및 수크로오스; 사이클로덱스트린, 예컨대, 알파-( $\alpha$ ), 베타-( $\beta$ ) 및 감마-( $\gamma$ ) 사이클로덱스트린; 전분, 예컨대, 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로오스 및 이의 유도체, 예컨대, 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스 및 셀룰로오스 아세테이트; 분말화된 트래거캔스; 맥아; 젤라틴; 탈크; 부형제, 예컨대, 코코아 버터 및 좌약 왁스; 오일, 예컨대, 땅콩유, 면실유, 잇꽃 오일, 참기름, 올리브유, 옥수수유 및 대두유; 글리콜, 예컨대, 프로필렌 글리콜; 에스테르, 예컨대, 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트; 아가; 완충제, 예컨대, 마그네슘 하이드록사이드 및 알루미늄 하이드록사이드; 알긴산; 발열원 비함유 물; 등장성 염수; 링거액; 에틸 알콜, 및 인산염 완충 용액이며, 또한 다른 비독성의 양립성 윤활제, 예컨대, 소듐 라우릴 설페이트 및 마그네슘 스테아레이트, 뿐만 아니라 착색제, 방출제, 코팅제, 감미제, 착향제 및 방향제, 보존제 및 항산화제도 제형 제조자의 판단에 따라 조성물에 존재할 수 있다.
- [0103] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구, 비경구, 흡입 스프레이, 국소, 직장내, 비내, 협측내, 질내 또는 이식 저장소를 통해 투여될 수 있고, 바람직하게는 경구 투여 또는 주사에 의한 투여에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 어떠한 통상적인 비독성의 약제학적으로 허용되는 담체, 애쥬번트 또는 비히클을 함유할 수 있다. 일부 경우에, 제형의 pH는 제형화된 화합물 또는 이의 전달 형태의 안정성을 향상시키기 위해 약제학적으로 허용되는 산, 염기 또는 완충제로 조절될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 비경구는 피하, 피내, 정맥내, 근내, 관절내, 동맥내, 활액내, 흉골내, 수막강내, 병변내 및 두개내 주사 또는 주입 기술을 포함한다.
- [0104] 경구 투여를 위한 액체 투여 형태는 약제학적으로 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭서(elixir)를 포함한다. 활성 화합물 외에, 액체 투여 형태는 예를 들어, 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대, 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일(특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 점오일(germ oil), 올리브유, 피마자유 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로푸르피릴 알콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물과 같이 당해 분야에서 흔히 사용되는 비활성 희석제를 함유할 수 있다. 비활성 희석제 외에, 경구 조성물은 또한 애쥬번트, 예컨대, 습윤제, 유화제 및 현탁제, 감미제, 착향제 및 방향제를 포함할 수 있다.
- [0105] 주사용 제조물, 예를 들어, 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액이 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁제를 이용하여 공지된 기술에 따라 제형화될 수 있다. 멸균 주사용 제조물은 또한 예를 들어, 1,3-부탄디올 중의 용액과 같이 비독성의 비경구적으로 허용가능한 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사용 용액, 현탁액 또는 에멀전일 수 있

다. 사용될 수 있는 허용가능한 비히클 및 용매 중에는 물, 링거액, U.S.P. 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 용매 또는 현탁 매질로서 멸균 고정유가 편리하게 이용된다. 이러한 목적으로, 합성 모노글리세라이드 또는 디글리세라이드를 포함하는 어떠한 블랜드 고정유가 사용될 수 있다. 또한, 주사용 제조물에 올레산과 같은 지방산이 사용된다.

[0106] 주사용 제형이, 예를 들어, 박테리아 보전 필터를 통한 여과에 의하거나, 사용 전에 멸균수 또는 다른 멸균 주사용 매질 중에 용해되거나 분산될 수 있는 멸균 고체 조성물의 형태에 멸균 작용제를 포함시킴으로써 멸균될 수 있다.

[0107] 약물의 효과를 연장시키기 위해, 피하 또는 근내 주사로부터 약물의 흡수를 늦추는 것이 종종 요망된다. 이는 불량한 수 용해도를 갖는 결정질 또는 비정질 재료의 액체 현탁액의 사용에 의해 달성될 수 있다. 이후, 약물의 흡수 속도는 차례로 결정 크기 및 결정질 형태에 좌우될 수 있는 약물의 용해 속도에 좌우된다. 대안적으로, 비경구로 투여되는 약물 형태의 지연 흡수는 약물을 오일 비히클에 용해시키거나 현탁시킴으로써 달성된다. 주사용 데포(depot) 형태는 폴리락티드-폴리글리콜리드와 같은 생분해성 중합체 중에 약물의 미세캡슐화 매트릭스를 형성시킴으로써 이루어진다. 약물 대 중합체의 비, 및 사용되는 특정 중합체의 성질에 따라, 약물 방출의 속도가 조절될 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수물)을 포함한다. 데포 주사용 제형은 또한 신체 조직과 양립가능한 리포솜 또는 마이크로에멀전에 약물을 엔트래핑(entrapping)시킴으로써 제조된다.

[0108] 직장 또는 질내 투여용 조성물은 바람직하게는 본 발명의 화합물을, 주위 온도에서는 고체이나 체온에서는 액체여서 직장강 또는 질강에서 용융되어 활성 화합물을 방출하는 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜 또는 좌약 왁스와 같은 적합한 비자극성 부형제 또는 담체와 혼합시킴으로써 제조될 수 있는 좌약이다.

[0109] 경구 투여용 고체 투여 형태는 캡슐, 정제, 환약, 분말 및 과립을 포함한다. 이러한 고체 투여 형태에서, 활성 화합물은 하나 이상의 비활성의 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체, 예컨대, 소듐 시트레이트 또는 디칼슘 포스페이트, 및/또는 a) 충전제 또는 증량제, 예컨대, 전분, 락토오스, 수크로오스, 글루코오스, 만니톨, 및 규산, b) 결합제, 예컨대, 카르복시메틸셀룰로오스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 수크로오스, 및 아카시아, c) 보습제, 예컨대, 글리세롤, d) 봉해제, 예컨대, 아가-아가, 칼슘 카르보네이트, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 실리케이트, 및 소듐 카르보네이트, e) 용액 지연제, 예컨대, 파라핀, f) 흡수 촉진제, 예컨대, 사차 암모늄 화합물, g) 습윤제, 예컨대, 세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테아레이트, h) 흡착제, 예컨대, 카올린 및 벤토나이트 점토, 및 i) 윤활제, 예컨대, 탈크, 칼슘 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 설페이트, 및 이들의 혼합물과 혼합된다. 캡슐, 정제 및 환약의 경우, 투여 형태는 또한 완충제를 포함할 수 있다.

[0110] 유사한 유형의 고체 조성물은 또한 락토오스 또는 밀크 슈가(milk sugar)와 같은 부형제 뿐만 아니라 고분자량의 폴리에틸렌 글리콜 등을 이용하여 연질 및 경질 충전 젤라틴 캡슐 중의 충전제로서 사용될 수 있다.

[0111] 정제, 당의정, 캡슐, 환약 및 과립의 고체 투여 형태는 장용 코팅 및 약제학적 제형화 분야에 널리 공지된 다른 코팅과 같은 코팅 및 껍질을 이용하여 제조될 수 있다. 이들은 임의로 불투명화제를 함유할 수 있고, 이는 또한 임의로 지연 방식으로 장관의 특정 부분에서 활성 성분(들)만 또는 활성 성분(들)을 우선적으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 엠베딩된 조성물의 예는 중합 물질 및 왁스를 포함한다.

[0112] 본 발명의 화합물의 국소 또는 경피 투여용 투여 형태는 연고, 페이스트, 크림, 로션, 젤, 분말, 용액, 스프레이, 흡입제 또는 패치를 포함한다. 활성 성분은 멸균 조건하에서 약제학적으로 허용되는 담체 및 어떠한 필요한 보존제 또는 요구될 수 있는 완충제와 혼합된다. 본 발명의 범위 내에 있는 안약 제형, 귀 점적제, 안구 연고, 분말 및 용액이 또한 고려된다.

[0113] 연고, 페이스트, 크림 및 젤은 본 발명의 활성 화합물 외에 부형제, 예컨대, 동물성 및 식물성 지방, 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트래거캔스, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 규산, 탈크 및 산화아연 또는 이들의 혼합물을 함유할 수 있다.

[0114] 분말 및 스프레이는 본 발명의 화합물 외에 부형제, 예컨대, 락토오스, 탈크, 규산, 알루미늄 하이드록사이드, 칼슘 실리케이트 및 폴리아미드 분말, 또는 이러한 물질들의 혼합물을 함유할 수 있다. 스프레이는 추가로 관례적인 추진제, 예컨대, 클로로플루오로하이드로카본을 함유할 수 있다.

[0115] 경피 패치는 신체로 화합물의 조절된 전달을 제공하는 추가 이점을 지닌다. 이러한 투여 형태는 화합물을 적절한 매질 중에 용해시키거나 분배시킴으로써 제조될 수 있다. 피부를 가로지르는 화합물의 유출을 증가시키기

위해 흡수 향상제가 또한 사용될 수 있다. 속도 조절 막을 제공하거나 중합체 매트릭스 또는 젤에 화합물을 분산시킴으로써 속도가 조절될 수 있다.

[0116] 폐 전달을 위해, 본 발명의 치료 조성물이 제형화되고, 직접적인 투여(예, 호흡계로의 흡입)에 의해 고체 또는 액체 미립자 형태로 환자에게 투여된다. 본 발명을 실시하기 위해 제조된 활성 화합물의 고체 또는 액체 미립자 형태는 호흡가능한 크기의 입자, 즉, 흡입 시 구강 및 후두를 통해 기관지 및 폐의 폐포로 통과하기에 충분히 작은 크기의 입자를 포함한다. 에어로졸화된 치료제, 특히 에어로졸화된 항생제의 전달이 당해 분야에 공지되어 있다[참조예: 미국 특허 번호 제5,767,068호(VanDevanter *et al.*), 미국 특허 번호 제5,508,269호(Smith *et al.*), 및 WO 98/43650호(Montgomery), 이들 모두는 참조로서 본원에 포함됨]. 항생제의 폐 전달에 대한 논의가 또한 참조로서 본원에 포함되는 미국 특허 번호 제6,014,969호에서 발견된다.

[0117] 본 발명의 화합물의 "치료적 유효량"은 어떠한 의학적 치료에 적용가능한 합리적인 이익/위험 비로 치료되는 피검체에 치료 효과를 부여하는 화합물의 양을 의미한다. 치료 효과는 객관적(즉, 일부 시험 또는 마커에 의해 측정가능함) 또는 주관적(즉, 피검체가 효과 표시 또는 느낌을 제공함)일 수 있다. 상기 기재된 유효량의 화합물은 약 0.1mg/Kg 내지 약 500mg/Kg, 바람직하게는 약 1 내지 약 50mg/Kg의 범위일 수 있다. 유효량은 또한 투여 경로 뿐만 아니라 다른 작용제의 공동 사용의 가능성에 따라 변할 것이다. 그러나, 본 발명의 화합물 및 조성물의 전체 일일 투여량은 충분한 의학적 판단의 범위 내에서 주치의에 의해 결정되는 것이 이해될 것이다. 어떠한 특정 환자에 대한 특정한 치료적 유효량 수준은 치료되는 질환 및 질환의 중증도; 사용되는 특정 화합물의 활성; 사용되는 특정 조성물; 환자의 연령, 체중, 전반적인 건강, 성별 및 식이; 사용되는 특정 화합물의 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 속도; 치료 기간; 사용되는 특정 화합물과 조합하거나 동시에 사용되는 약물; 및 의학 분야에 널리 공지된 유사 요인을 포함하는 다양한 요인에 좌우될 것이다.

[0118] 단일 용량 또는 나누어진 용량으로 인간 또는 다른 동물에 투여되는 본 발명의 화합물의 전체 일일 용량은, 예를 들어, 체중의 0.01 내지 50mg/kg 또는 더욱 일반적으로 체중의 0.1 내지 25mg/kg의 양일 것이다. 단일 용량 조성물은 일일 용량을 제조하기 위해 상기 양 또는 이의 분할수(submultiple)를 함유할 수 있다. 일반적으로, 본 발명에 따른 치료계획은 단일 또는 다중 용량으로 하루당 약 10mg 내지 약 1000mg의 본 발명의 화합물(들)을 그러한 치료를 필요로 하는 환자에게 투여하는 것을 포함한다.

[0119] 본원에 기재된 화학식의 화합물은, 예를 들어, 4 내지 120 시간마다 체중의 약 0.1 내지 약 500mg/kg 범위의 투여량, 대안적으로 1mg 내지 1000mg/용량의 투여량으로, 또는 특정 약물의 필요조건에 따라, 주사, 정맥내, 동맥내, 피하, 복막내, 근내, 또는 피하; 또는 경구, 협측내, 비내, 점막내, 국소, 안약 제조물 또는 흡입에 의해 투여될 수 있다. 본원의 방법은 요망되거나 언급된 효과를 달성하기 위해 유효량의 화합물 또는 화합물 조성물을 투여하는 것을 고려한다. 통상적으로, 본 발명의 약제학적 조성물은 하루당 약 1 내지 약 6회, 또는 대안적으로 연속 주입으로 투여될 것이다. 이러한 투여는 만성 또는 급성 요법으로 이용될 수 있다. 단일 투여 형태를 생성시키기 위해 약제학적 부형제 또는 담체와 조합될 수 있는 활성 성분의 양은 치료되는 숙주 및 특정 투여 방식에 좌우하여 달라질 것이다. 통상적인 제조물은 약 5중량% 내지 약 95중량%의 활성 화합물을 함유할 것이다. 대안적으로, 이러한 제조물은 약 20% 내지 약 80%의 활성 화합물을 함유할 것이다.

[0120] 상기 언급된 것보다 적거나 많은 용량이 요구될 수 있다. 어떠한 특정 환자에 대한 특정 투여량 및 치료 계획은 사용되는 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 전반적인 건강 상태, 성별, 식이, 투여 시간, 배출 속도, 약물 조합, 질병, 병태 또는 증상의 중증도 및 경과, 환자의 질병, 병태 또는 증상에 대한 성향, 및 치료 의사의 판단을 포함하는 다양한 요인에 좌우될 것이다.

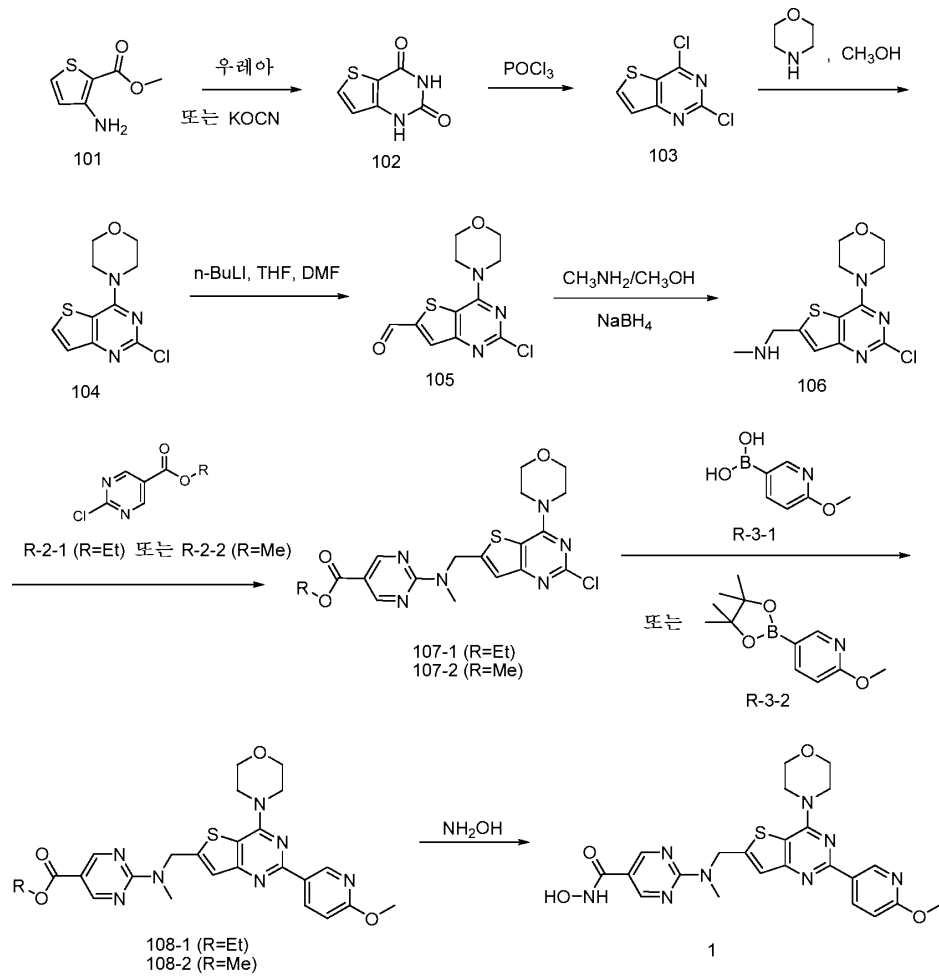
[0121] 환자의 병태의 개선 후, 필요시 본 발명의 화합물, 조성물 또는 조합물의 유지 용량이 투여될 수 있다. 후속적으로, 증상의 작용에 따라, 증상이 요망되는 수준으로 경감되는 경우에 개선된 병태가 유지되는 수준으로 투여량 또는 투여 빈도, 또는 이 둘 모두가 감소될 수 있다. 그러나, 환자는 질병 증상의 어떠한 재발 시 장기간을 기초로 하여 간헐적 치료를 필요로 할 수 있다.

[0122] 실시예

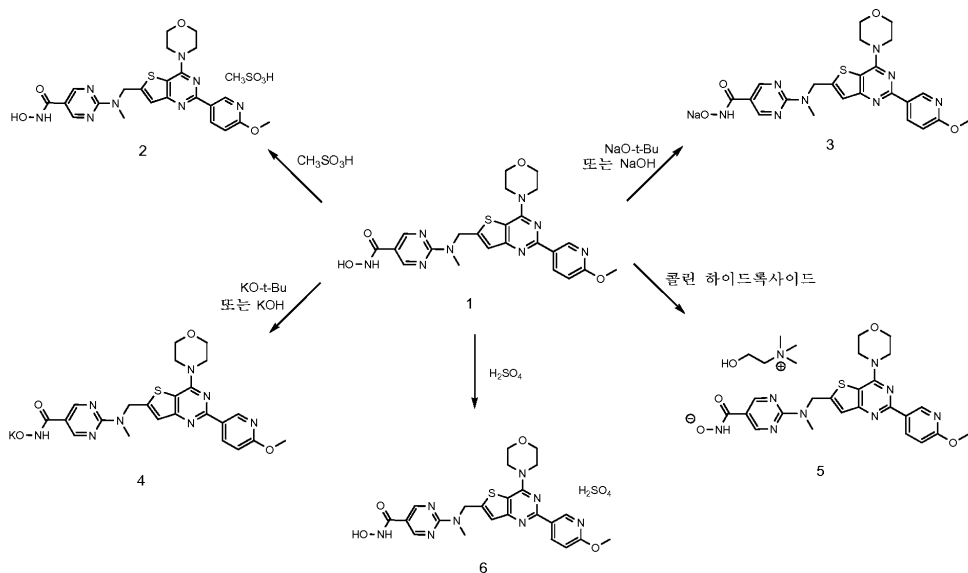
[0123] 본 발명의 화합물 및 방법은 하기 실시예와 관련하여 더 잘 이해될 것이며, 이는 단지 예시이며, 본 발명의 범위를 제한하고자 의도된 것이 아니다. 기재된 구체예에 대한 다양한 변화 및 변형은 당업자에게 명백할 것이며, 비제한적으로 본 발명의 화학 구조, 치환기, 유도체, 제형 및/또는 방법과 관련된 것을 포함하는 상기 변화 및 변형이 본 발명의 사상 및 첨부된 청구항의 범위를 벗어남이 없이 이루어질 수 있다.



[0124] 화합물 1, 및 이의 메탄설포네이트, 나트륨, 칼륨, 및 콜린 염의 합성이 하기 반응식으로 예시된다:

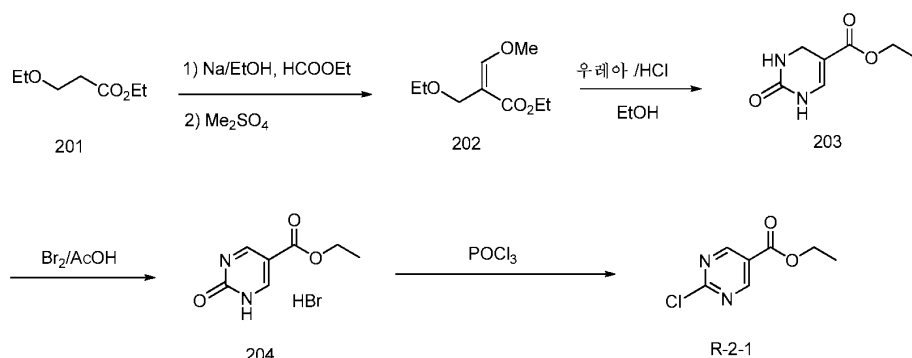


[0125]



[0126]

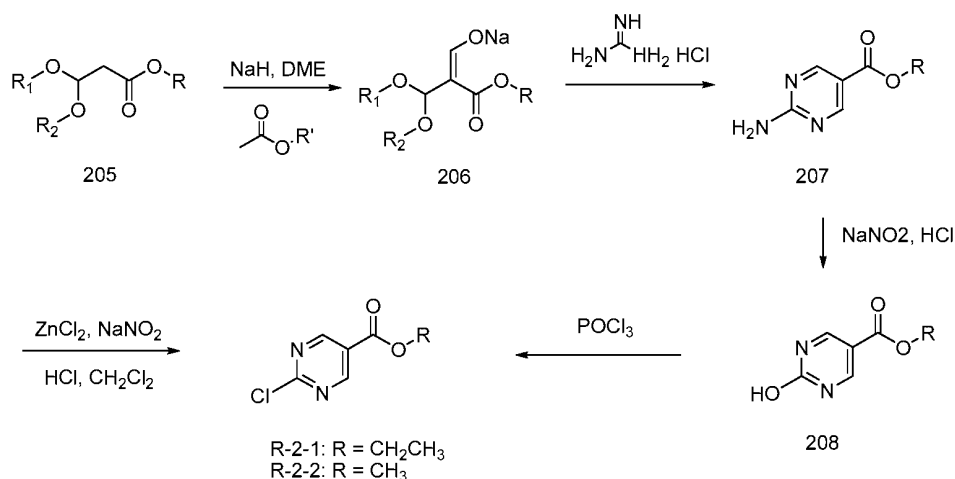
[0127] 106을 R-2-1 또는 R-2-2와 각각 반응시킴으로써 중간체 107-1 또는 107-2를 제조할 수 있다. R-2-1과 R-2-2의 합성에 대한 합성 반응식이 하기에 예시된다:



[0128]

[0129]

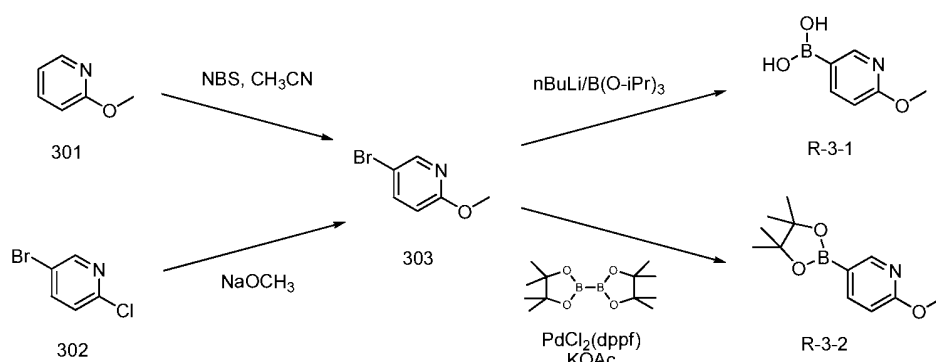
또는, 상기에 대한 대안적인 방법은 하기와 같다:



[0130]

[0131]

R-3-1 또는 R-3-2과 107-1 또는 107-2의 커플링 반응에 의해 중간체 108-1 및 108-2를 제조할 수 있고, 여기서, R-3-1 및 R-3-2는 하기 반응식에 따라 제조될 수 있다:



[0132]

[0133]

**실시예 1: N-하이드록시-2-(((2-(6-메톡시피리딘-3-일)-4-모르폴리노티에노[3,2-d]피리미딘-6-일)메틸)(메틸)아미노)피리미딘-5-카르복사미드 (화합물 1)의 제조**

[0134]

**단계 a: (Z)-에틸-2-(에톡시메틸)-3-메톡시아크릴레이트 (화합물 202)**

[0135]

나트륨(40.9g, 1.78mol)을 에탄올(750mL)에 주의하여 분획으로 첨가하고, 나트륨 금속 모두가 사라진 후 용액을 농축시켜 NaOEt 분말을 제공하였다. 교반 하에, 헥산(1.0L)을 첨가하고, 혼합물을 아이스워터 배쓰(ice-water bath)로 냉각시켰다. 201(130g, 0.89mol)과 에틸 포르메이트(131g, 1.78mol)의 혼합물을 0 내지 5℃에서 적가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 디메틸 셀레이트(224g, 1.78mol)를 아이스-워터 배쓰로 냉각시키면서 적가하였다. 생성된 혼합물을 50℃에서 2시간 동안 가열하였다. 혼합물에 트리에틸암모늄 클로라이드(122g) 및 소듐 하이드록사이드(20g)를 첨가하였다. 이후, 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하고, 여과

하였다. 여액을 물로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시켰다. 이를 농축시켜 표제 화합물(140g, 37%)을 무색 오일로서 수득하였고, 이를 다음 단계에서 추가 정제 없이 사용하였다.

[0136] **단계 b:** 에틸 2-옥소-1,2,3,4-테트라하이드로피리미딘-5-카르복실레이트(화합물 203)

[0137] 에탄올(500mL) 중의 화합물 202(140g, 0.745mol), 우레아(40.0g, 0.697mol) 및 진한 염산(34mL)의 혼합물을 밤새 환류하에 가열하였다. 반응물 부피의 ~50%를 증발시킨 후, 생성된 현탁액을 여과하고, 소량의 에탄올로 세척하고, 건조시켜 화합물 203(47g, 37%)을 백색 고형물로서 제공하였다.

[0138]

[0139] **단계 c:** 에틸 2-옥소-1,2-디하이드로피리미딘-5-카르복실레이트(화합물 204)

[0140] 아세트산(500mL) 중의 화합물 203(47g, 280mmol)의 용액에 브롬(49.0g, 307mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 환류하에 2시간 동안 가열하고, 실온으로 냉각시키고, 0 내지 5℃로 추가 냉각시키고, 여과하여 표제 화합물 204(38g, 54%)를 황색 고형물로서 제공하였다.

[0141]

[0142] **단계 d:** 에틸 2-클로로피리미딘-5-카르복실레이트(화합물 R-2-1)

[0143] 화합물 204(38.0g, 153mmol) 및 포스포릴 트리클로라이드(300mL) 및 N,N-디메틸아닐린(3mL)의 혼합물을 환류하에 2시간 동안 가열하고, 실온으로 냉각시키고, 농축시켰다. 잔여물을 얼음물로 주의하여 켄칭시키고, pH를 소듐 카르보네이트에 의해 7 내지 8로 조절하고, EtOAc로 추출하였다. 합한 유기물을 얼음물 및 염수로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시키고, 증발시키고, 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여(EtOAc/헥산으로 용리, 10%) 화합물 R-2-1(15g, 52%)을 백색 고형물로서 수득하였

[0144]

[0145] 무수 1,2-디메톡시에탄(300mL) 중의 NaH(27g, 미네랄 오일 중의 60%, 0.675mol)의 혼합물을 40 내지 50℃로 가열하고, 메틸 3,3-디메톡시 프로피오네이트(205)(100g, 0.675mol)를 적가하였다. 생성된 혼합물을 0.5시간 동안 교반하고, 무수 메틸 포르메이트(81g, 1.35mol)를 40 내지 50℃에서 적가하였다. 생성된 혼합물을 40 내지 50℃(내부 온도)에서 2시간 동안 교반한 후, 0℃로 냉각시켰다. 반응 혼합물이 25℃로 서서히 가온되게 하고, 밤새 교반하였다.  $\text{Et}_2\text{O}$ (150mL)을 첨가하고, 30분 동안 교반하였다. 생성된 현탁액을 여과하였다. 고형물을  $\text{Et}_2\text{O}$ (100mL)으로 세척하고, 수거하고, 건조시켜 표제 화합물 206(82g, 61%)을 오프-화이트(off-white)색 고형물로서 수득하였다.

[0146]

[0147] **단계 f:** 2-아미노-피리미딘-5-카르복실산 메틸 에스테르(화합물 207)

[0148] DMF(300mL) 중의 구아니딘 하이드로클로라이드(42.2g, 0.44mol)의 혼합물에 화합물 206(80g, 0.40mol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 100℃에서 1시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 여과한 후, 냉각시켰다. 여과 케이크를 50mL의 DMF로 세척하고, 합한 여액을 농축시켜 잔여물을 남기고, 이를 차가운 EtOH 중에 현탁시키고, 차가운 EtOH(50mL)로 세척하여 화합물 207(38g, 61.5%)을 황색 고형물로서 수득하였다.

LCMS (m/z): 154.2  $[\text{M}+1]^+$ , 195.1  $[\text{M}+42]^+$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  3.88 (s, 3H), 8.77 (s, 2H).

[0149] **단계 g:** 메틸 2-클로로피리미딘-5-카르복실레이트(화합물 R-2-2)

[0150] 화합물 207(7g, 0.046mol)을 진한 염산(15.2mL)과  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (60mL)의 혼합물에 첨가하였다. 냉각시킨 후,  $\text{ZnCl}_2$ (18.6g, 0.138mol)를 15 내지 20℃에서 첨가하였다. 혼합물을 15 내지 20℃에서 0.5시간 동안 교반하고, 5 내지 10℃로 냉각시켰다. 내부 온도를 5 내지 10℃로 유지하면서  $\text{NaNO}_2$ (9.5g, 0.138mol)를 분획으로 첨가하였다. 반응을 ~2시간 동안 계속 하였다. 반응 혼합물을 얼음물(50mL)에 부었다. 유기 층을 분리하고, 수성 상을  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (30mL×2)로 추출하였다. 합한 유기 추출물을 농축시켜 미정제물(4.2g)을 수득하였다. 미정제 화합물을 헥산(20mL) 중에 현탁시키고, 60℃에서 30분 동안 가열하고, 여과하였다. 여액을 농축시켜 표제 화합물 R-2-2(3.5g, 44.4%)을 오프-화이트색 고형물로서 수득하였다.

LCMS (m/z): 214.1[M+42]<sup>+</sup>.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): δ 4.00 (s, 3H), 9.15 (s, 2H).

[0151] **단계 h:** 5-브로모-2-메톡시피리딘(화합물 303)

[0152] 아세토니트릴(1.0L) 중의 2-메톡시-피리딘(100g, 0.92몰), NBS(180g, 1.0몰)의 용액을 21시간 동안 환류하에 교반하였다. TLC은 반응이 완료되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 농축시켰다. ~900ml의 용매를 수거하였다. 생성된 현탁액을 여과하고, n-헥산(~400mL)으로 세척하였다. 여액을 다시 농축시켜 미정제물을 수득하였다. 미정제물을 감압하에 증류하여(30℃/~0.3mmHg) 표제 화합물(146g, 84%)을 투명한 오일로 수득하였다.

LCMS (m/z): 190.0 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): δ 3.90 (s,

3H), 6.65 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 7.62 (dd,  $J$  = 8.8 Hz, 2.4Hz, 1H), 8.19 (s, 1H).

[0153]

[0154] **단계 i:** 6-메톡시피리딘-3-일보론산(R-3-1)

[0155] 무수 THF(180ml) 중의 화합물 303(20g, 0.11몰)의 용액에 -78℃에서 n-BuLi(59mL, THF 중의 2M)을 적가하고, 생성된 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. 트리이소프로필 보레이트(37mL)를 -78℃에서 첨가하고, 반응 혼합물을 실온으로 가온시키고, 밤새 계속 교반하였다. TLC(헥산/에틸 아세테이트=5:1)는 반응이 완료되었음을 나타냈다. 혼합물의 pH를 4N HCl(90ml)에 의해 3 내지 4로 조절하였다. 여과에 의해 침전물을 수거하여 미정제 화합물 R-3-1(21g, 128%)을 수득하였다. 미정제 화합물 R-3-1(21g)을 물(200ml) 중에 용해시키고, 용액의 pH를 진한 암모니아 용액에 의해 8 내지 9로 조절하고, 여과에 의해 침전물을 수거하여 순수한 표제 화합물 R-3-1(11g, 67%)을 백색 고형물로서 수득하였다.

LCMS

(m/z): 154.1 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): δ 3.86 (s, 3H), 6.76 (d,  $J$  = 8.4 Hz,

1H), 7.99 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.0 Hz, 1H), 8.05 (br, 2H), 8.52 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H).

[0156]

[0157] **단계 j:** 2-메톡시-5-(4,4,5,5,-테트라메틸-1,3,2-디옥사보로란-2-일)피리딘 (화합물 R-3-2)

[0158] 무수 디옥산(500mL) 중의 화합물 303(55g, 0.29mol), 4,4,4',4',5,5,5',5'-옥타메틸-2,2'-바이(1,3,2-디옥사보로란)(90g, 0.35mol), 포타슘 아세테이트(57g, 0.58mol) 및 비스(트리페닐포스핀)팔라듐(II) 클로라이드(2.2g, 3mmol)의 혼합물을  $\text{N}_2$  분위기하에 108℃에서 밤새 가열하였다. 반응 혼합물을 농축시키고, 헥산/에틸 아세테이트로 용리되는 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 표제 화합물 R-3-2(58g, 84%)를 수득하였다.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ): δ 1.30 (s,

12H), 3.88 (s, 3H), 6.81 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.88 (dd,  $J$  = 8.0 Hz, 2.0Hz, 1H), 8.41 (d,  $J$  =

2.0Hz, 1H).

[0159]

[0160] **단계 k:** 티에노[3,2-d]피리미딘-2,4(1H,3H)-디온(화합물 102)

[0161] **우레아 방법:** 메틸 3-아미노티오펜-2-카르복실레이트(101)(90.0g, 573mmol, 1.0eq)와 우레아(277.6g, 4.6mol, 8.0eq)의 혼합물을 190℃에서 3 내지 4시간 동안 가열하고, 실온으로 냉각시켰다. 반응 혼합물에 수성

NaOH(10%, 800mL)을 첨가하였다. 주위 온도에서 1시간 동안 교반한 후, 고형물을 여과에 의해 제거하였다. 여액의 pH를 HCl에 의해 3 내지 4로 산성화시키고, 침전된 고형물을 여과에 의해 수거하고, 물로 세척하고, 진공하에 건조시켜 요망되는 생성 화합물 102(87g, 89%)를 오프-화이트색 고형물로서 제공하였다.

m.p.:280-285°C. LCMS (m/z): 169.0 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400

MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 6.92 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.05 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 11.0-11.5 (br, 2H).

[0162]

[0163]

**KOCN 방법:** 3-아미노티오펜-2-카르복실레이트(101)(100.0g, 636.9mmol, 1.0eq), 아세트산(705mL) 및 물(600mL)의 혼합물에 물(326mL) 중의 포타슘 시아네이트(154.8g, 1.91mol, 3.0eq)의 용액을 1시간의 기간에 걸쳐 서서히 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 20시간 동안 교반하고, 여과하고, 물(500mL)로 세정하였다. 케이크를 적합한 크기의 반응기에 충전시키고, 2M 소듐 하이드록사이드 수용액(1.65L)을 첨가하고, 슬러리를 2시간 동안 교반하고, LCMS에 의해 요망되는 생성물의 형성을 확인하였다. 혼합물을 10°C로 냉각시키고, 3M 수성 염산(1.29L)을 pH = 5.0 ~ 6.0까지 첨가하였다. 슬러리를 여과하고, 물(700mL)로 세정하고, 50°C의 진공 오븐에서 24시간 동안 건조시켜 화합물 102(100g, 94%)를 오프-화이트색 고형물로서 수득하였다.

LCMS (m/z): 169.1 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR

(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 6.92 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.04 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 11.14 (s, 1H),

11.51 (s, 1H).

[0164]

[0165]

**단계 1:** 2,4-디클로로티에노[3,2-*d*]피리미딘(화합물 103)

[0166]

20°C 미만의 온도를 유지하면서 포스포로스 옥시클로라이드(152mL, 1.67mol, 7.0eq)를 아세토니트릴(250mL) 중의 화합물 102(40g, 238mmol, 1.0eq) 및 N,N-디메틸아닐린(22.5mL, 179mmol, 0.75eq)의 차가운 용액에 서서히 첨가하였다. 이후, 혼합물을 85°C로 가열하고, 24시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 15°C로 냉각시킨 후, 얼음과 차가운 물(360mL)의 혼합물 상에 서서히 부었다. 생성된 슬러리를 여과하고, 차가운 물(200mL)로 세정하였다. 케이크를 40°C의 진공 오븐에서 24시간 동안 건조시켜 화합물 103(40.5g, 83%)을 오프-화이트색 고형물로서 수득하였다.

M.p.:245-250°C. LCMS (m/z): 205.0 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ

7.75 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 8.71 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H).

[0167]

[0168]

**단계 m:** 2-클로로-4-모르폴리노티에노[3,2-*d*]피리미딘(화합물 104)

[0169]

화합물 103(34.2g, 167mmol, 1.0eq)과 메탄올(500mL)의 혼합물에 모르폴린(31.2mL, 367mmol, 2.2eq)을 서서히 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 침전물을 여과에 의해 수거하고, 메탄올로 세척하여, 진공하에 건조시켜 요망되는 생성 화합물 104(39g, 91%)를 연한 황색 고형물로서 제공하였다.

M.p.: 250-255°C. LCMS (m/z): 256.0 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400

MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3.76 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H), 3.92 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H), 7.42 (d, *J* = 5.2 Hz,

1H), 8.32 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H).

[0170]

[0171]

**단계 n:** 2-클로로-4-모르폴리노티에노[3,2-*d*]피리미딘-6-카르발데하이드(화합물 105)

[0172]

-78°C에서 THF(무수, 320mL) 중의 화합물 104(20g, 78.4mmol, 1.0eq)의 현탁액에 n-BuLi(헥산 중, 2.4M, 40.8mL, 102mmol, 1.3eq)을 질소하에서 서서히 첨가하였다. 생성된 슬러리가 -60°C까지 가온시켜 투명한 갈색 용액으로 변화되게 하였다. 이후, 반응 혼합물을 -78°C로 다시 냉각시키고, DMF(무수, 9.1mL, 118mmol, 1.5eq)를 서서히 첨가하였다. 생성된 용액을 -78°C에서 0.5시간 동안 교반하고, 0°C까지 1시간에 걸쳐 가온시키고, 수성 HCl(0.25M, 660mL)과 얼음물(320mL)의 혼합물에 서서히 부었다. 생성된 슬러리를 0 내지 10°C에서 0.5시간 동안 교반하고, 여과하고, 차가운 물로 세척하고, 진공하에 건조시켜 화합물 105(22g, 98%)를 황색 고형물로서 수득하였다.

M.p.:260-265°C. LCMS (m/z): 284.0 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR

(400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3.77 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H), 3.96 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H), 8.30 (s, 1H), 10.21 (s, 1H).

[0173]

[0174]

**단계 o:** (2-클로로-4-모르폴린-4-일-티에노[3,2-d]피리미딘-6-일메틸)-메틸-아민(화합물 106)

[0175]

질소 분위기 하에서 메탄올(125mL) 중의 화합물 105(20.0g, 70.4mmol, 1.0eq)의 용액에 메탄올 중의 메틸아민 용액(27부피%, 75mL, 563.2mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하고, 용매를 진공하에 제거하여 미정제 고형 생성물을 제공하고, 이를 질소하에 메탄올(550mL) 및 THF(220mL) 중에 용해시켰다. 소듐 보로하이드라이드(8g, 211.2mmol)를 분획으로 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 진공하에 증발시키고, 물(300mL)을 첨가하였다. 수성 혼합물을 메틸렌 클로라이드로 추출하고, 합한 추출물을 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 잔여물을 6M HCl(230mL) 중에 용해시키고, 30분 동안 교반하였다. 수용액을 메틸렌 클로라이드로 수회 세척하고, pH를 NaOH(4N)에 의해 9 내지 10으로 조절하였다. 침전된 고형물을 여과에 의해 수거하고, 건조시켜(60°C, 6시간) 연한 황색 고형물(18g, 85%)을 제공하였다.

M.p.:

240-245°C. LCMS (m/z): 299 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2.32 (s, 3H),

3.74 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H), 3.88 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H), 3.96 (s, 2H), 7.24 (s, 1H).

[0176]

[0177]

**단계 p(a):** 2-[(2-클로로-4-모르폴린-4-일-티에노[3,2-d]피리미딘-6-일메틸)-메틸-아미노]-피리미딘-5-카르복실산 에틸 에스테르(화합물 107-1)

[0178]

CH<sub>3</sub>CN(400mL) 중의 106(10g, 33.6mmol)과 R-2-1(6.8g, 36.4mmol)의 혼합물에 실온에서 디이소프로필에틸아민(220mL, 1.26mol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 이후, 혼합물을 증발시키고, 이어서, 메틸렌 클로라이드(300mL)를 첨가하였다. 유기 상을 물로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 상에서 건조시키고, 진공하에 농축시켜 잔여물을 남겼다. 잔여물에 에틸 아세테이트를 첨가하고, 생성된 혼합물을 아이스/워터 배쓰 온도에서 50분 동안 교반하였다. 생성된 고형물을 여과에 의해 수거하여 표제 생성물 107-1(10.6g, 70%)을 백색 고형물로서 제공하였다.

[0179]

LCMS: 449 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H

NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 1.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 3.25 (s, 3H), 3.71 (t, *J* = 5.2 Hz,

4H), 3.83 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H), 4.29 (m, 2H), 5.21 (s, 2H), 7.39 (s, 1H), 8.87 (s, 2H).

[0180]

[0181]

**단계 p(b):** 2-[(2-클로로-4-모르폴린-4-일-티에노[3,2-d]피리미딘-6-일메틸)-메틸-아미노]-피리미딘-5-카르복실산 메틸 에스테르(화합물 107-2)

[0182]

화합물 106(25g, 84mmol), CH<sub>3</sub>CN(500mL) 및 R-2-2(16g, 92mmol)의 혼합물을 실온에서 교반하였다. 디이소프로필에틸아민(DIPEA)(500mL, 2.9mol)을 첨가하였다. 용액을 밤새 교반하고, 증발시켰다. 메틸렌 클로라이드(500mL)를 첨가하고, 유기 상을 물로 세척하고, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 건조시키고, 진공하에 농축시켰다. 잔여물에 에틸 아세테이트(200mL)를 첨가하고, 혼합물을 아이스/워터 배쓰에서 50분 동안 교반하였다. 표제 생성물(29.4g, 81%)을 백색 고형물로서 수거하였다.

LCMS (m/z): 435.2 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):

3.25 (s, 3H), 3.71 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H), 3.82-3.84 (m, 7H), 5.21 (s, 2H), 7.39 (s, 1H), 8.87

(s, 2H).

[0183]

[0184]

**단계 q(a):** 에틸-2-(((2-(6-메톡시피리딘-3-일)-4-모르폴리노티에노 [3,2-d]피리미딘-6-일) (메틸) (메틸)아미노)피리미딘-5-카르복실레이트(화합물 108-1)

[0185]

방법 A: 혼합된 톨루엔(80ml), 에탄올(50ml) 및 물 (10ml)의 용매 중의 화합물 107-1(12g, 26.7mmol), R-3-



1(4.9g, 32mmol),  $\text{NaHCO}_3$ (6.7g, 80.1mmol) 및 비스(트리페닐포스핀)팔라듐(II) 클로라이드(188mg, 0.267mmol)의 혼합물을  $\text{N}_2$  분위기하에  $108^\circ\text{C}$ 에서 4.5시간 동안 가열하였다. TLC는 반응이 완료되었음을 나타냈다. 이후, 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 물(20ml)을 첨가하였다. 생성된 고형물을 여과에 의해 수거한 후, 에탄올(100mL) 중에 현탁시켰다. 현탁액을 실온에서 30분 동안 교반하고, 여과하였다. 수거된 고형물을 에탄올로 세척하고, 진공하에 건조시켜 표제 화합물 108-1(10g, 72%)을 백색 고형물로서 수득하였다.

[0186] 방법 B: 혼합된 톨루엔(24ml), 에탄올 (15ml), 및 물(3ml)의 용매 중의 화합물 107-1(1.5g, 3.34mmol), R-3-2(1.6g, 6.68mmol),  $\text{NaHCO}_3$ (0.84g, 10.0mmol) 및 비스(트리페닐포스핀)팔라듐(II) 클로라이드(118mg, 0.167mmol)의 혼합물을  $\text{N}_2$  분위기하에  $108^\circ\text{C}$ 에서 밤새 가열하였다. 반응 혼합물을 디클로로메탄과 물로 분배하였다. 유기 층을 분리하고, 염수로 세척하고,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 증발시켜 잔여물을 제공하고, 이를 헥산/에틸 아세테이트로 용리되는 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여 화합물 108-1(1.7g, 98%)을 백색 고형물로서 수득하였다.

m.p.  $198-202^\circ\text{C}$ . LCMS: 522.30  $[\text{M}+1]^+$ .  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  1.31

(t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 3.28 (s, 3H), 3.76 (t,  $J = 4.4$  Hz, 4H), 3.93 (t,  $J = 4.4$  Hz, 4H), 3.94 (s,

3H), 4.30 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 5.24 (s, 2H), 6.92 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 7.47 (s, 1H), 8.57 (dd,

$J = 8.8$  Hz, 2.0Hz, 1H), 8.88 (s, 2H), 9.15 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H).

[0187]

[0188] 단계 q(b): 메틸-2-(((2-(6-메톡시피리딘-3-일)-4-모르폴리노티에노 [3,2-d]피리미딘-6-일) 메틸) (메틸)아미노)피리미딘-5-카르복실레이트(화합물 108-2)

[0189] 디옥산(540mL) 중의 화합물 107-2(20g, 46.0mmol), B-3-1(9.2g, 60.2mmol, 1.3eq.)의 혼합물에 실온에서 고형  $\text{NaHCO}_3$ (11.6g, 138.1mmol, 3eq.)를 첨가하고, 이어서 물(40mL)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 용액의 표면에  $\text{N}_2$ 를 통과시킴으로써 탈기시켰다. 이후, 비스(트리페닐포스핀) 팔라듐(II) 클로라이드(323mg, 0.46mmol, 0.01eq.)를 첨가하고, 생성된 혼합물을  $108^\circ\text{C}$ 에서 15시간 동안 가열하였다. TLC 및 LCMS는 반응이 완료되었음을 나타냈다. 반응 혼합물을 계속해서 고온( $>90^\circ\text{C}$ )에 있게 하면서 셀라이트를 통해 여과하고, 디옥산(70mL)으로 세척하였다. 여액을 실온으로 점진적으로 냉각했는데, 냉각 기간 동안 백색의 미세한 결정체가 형성되었다. 현탁액을 여과하고, 디옥산(80mL)으로 세척하여 표제 화합물 108-2(18g, 78%)를 백색 고형물로서 수득하였다. LCMS(m/z): 508.3  $[\text{M}+1]^+$ .

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  3.28 (s, 3H), 3.76 (t,  $J = 4.8$  Hz,

4H), 3.82 (s, 3H); 3.92 (m, 4H), 3.93 (s, 3H), 5.20 (s, 2H), 6.91 (d,  $J = 8.8\text{Hz}$ , 1H), 7.47 (s,

1H), 8.57 (dd,  $J = 8.8\text{Hz}$ , 2.4Hz, 1H), 8.88 (s, 2H), 9.15 (d,  $J = 2.0\text{Hz}$ , 1H).

[0190]

[0191] 단계 r: N-하이드록시-2-(((2-(6-메톡시피리딘-3-일)-4-모르폴리노티에노 [3,2-d] 피리미딘-6-일)메틸)(메틸)아미노)피리미딘-5-카르복사미드(화합물 1)

[0192] 하이드록실아민 메탄올 용액의 제조

[0193] MeOH(400mL) 중의  $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ (80g, 1.12mol)의 혼합물을 60 내지  $65^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 가열하여 투명한 용액을 형성시켰다. 이후, 아이스-워터 배스에서 냉각시켰다. 반응 온도를 0 내지  $10^\circ\text{C}$ 에서 유지하면서 차가운 혼합물에 MeOH(240mL) 중의 KOH(96g, 1.68mol)의 용액을 적가하였다. 생성된 혼합물을  $0^\circ\text{C}$ 에서 30분 동안 교반한 후, 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ (700g)로 채워진 일정한 압력 편셀을 통해 여과하였다. 여액을 아이스-배쓰하에서 수거하고, 추후 사용을 위해 냉장고에 저장하였다.

[0194] 화합물 108-1로부터 화합물 1의 제조

[0195] 상기 것 제조된 하이드록실아민 메탄올 용액(1.79M, 350ml) 중에 화합물 108-1(10g, 19mmol)을 현탁시켰다. 이 혼합물에 디클로로메탄(100mL)을 첨가하였다. 반응 플라스크를 밀봉하고, 혼합물을 실온에서 5시간 동안 교반한 후, 이는 투명한 용액으로 변하였다. 반응물을 추가 9시간 동안 교반하고, 여과하여 어떠한 불용성 고형물을 제거하였다. 여액의 pH를 아세트산의 첨가에 의해 6 내지 7로 조절하여 고형 침전물을 형성시켰다. 여과에



의해 고형물을 수거하고, 물 및 최소량의 메탄올로 세척하고, 진공하에 60℃에서 5시간 동안 건조시켜 화합물 1(9.2g, 96%)을 백색 고형물로서 수득하였다.

m.p. 177-180°C. LCMS:

509.3 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3.24 (s, 3H), 3.76 (t, *J* = 5 Hz, 4H), 3.92 (t, *J* = 5 Hz, 4H), 3.92 (s, 3H), 5.20 (s, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.44 (s, 1H), 8.57 (dd, *J* = 8.8 Hz, 2.4Hz, 1H), 8.75 (s, 2H), 9.01 (s, 1H), 9.14 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 11.08 (s, 1H).

[0196]

화합물 108-2로부터 화합물 1의 제조

[0197]

디클로로메탄(310mL) 중의 화합물 108-2(31g, 61.1mmol)의 현탁액에 실온에서 상기 것 제조된 하이드록실아민 메탄올 용액(1.79M, 744mL)을 첨가하였다. 반응 플라스크를 밀봉하고, 반응 혼합물을 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물이 투명한 용액으로 변했다. 반응 용액을 여과하여 어떠한 불용성 고형물을 제거하였다. 이후, 여액에 물(310mL)을 첨가하였는데, 첨가 동안 형성된 고형물은 없었다. 교반하면서 아세트산(18.5mL)을 첨가하여 pH를 10.20으로 조절하였다(pH 미터에 의해 계속해서 모니터링함). 아세트산의 첨가 동안 내부 온도 변화는 없었다. 생성된 반응 혼합물을 추가 4시간 동안 계속 교반하였다. 백색 고형물이 점진적으로 형성되었다. 현탁액을 여과하고, 최소량의 메탄올(100mL×3)로 세척하였다. 수거된 백색 고형물을 메탄올(620mL) 및 물(124mL) 중에 재현탁시켜 현탁액을 형성시켰다. 상기 현탁액에 추가 아세트산(11g)을 첨가하여 pH를 5 내지 6으로 조절하였다. 고형물 형성의 변화를 관찰하였다. 현탁액을 추가 2시간 동안 계속 교반하고, 여과지를 통해 여과하고, 최소량의 메탄올(100mL×3)로 세척하였다. 수거된 백색 고형물을 오븐(50℃)에서 12시간 동안 건조시켜 표제 화합물 1(23.6g, 76.0%)을 백색 고형물로서 수득하였다.

[0198]

m. p.: 255-259°C. LCMS

(m/z): 509.3 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3.24 (s, 3H), 3.76 (t, *J* = 5.2 Hz, 4H), 3.92 (t, *J* = 5.2Hz, 4H), 3.92 (s, 3H), 5.20 (s, 2H), 6.91 (d, *J* = 8.4Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 8.57 (dd, *J* = 8.4Hz, 2.4Hz, 1H), 8.75 (s, 2H), 9.07 (s, 1H), 9.14 (d, *J* = 2.4Hz, 1H), 11.14 (s, 1H).

[0199]

실시예 2: N-하이드록시-2-(((2-(6-메톡시피리딘-3-일)-4-모르폴리노티에노[3,2-d]피리미딘-6-일)메틸)(메틸)아미노)피리미딘-5-카르복사미드 메탄설포네이트(화합물 2)의 제조

[0200]

방법 A: 화합물 1(300mg, 0.59mmol)과 MeOH/Et<sub>2</sub>O(3/1, 40mL)의 혼합물에 0℃에서 MeOH(3mL) 중의 메탄설포산(114mg, 1.18mmol)의 용액을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 0℃에서 3시간 동안 교반하였다. 침전물을 여과에 의해 수거하고, Et<sub>2</sub>O로 세척하여 화합물 2(260mg, 73%)를 백색 고형물로서 수득하였다.

[0201]

방법 B: 디클로로메탄/MeOH(40mL/10mL) 중의 화합물 1(1.5g, 2.95mmol)의 현탁액에 실온(15℃)에서 2mL의 MeOH 중의 메탄설포산(341mg, 3.55mmol)을 첨가하여 투명한 용액을 형성시켰다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물은 계속해서 투명했다. 에틸 아세테이트(40mL)를 혼합물에 첨가하고, 실온에서 3시간 동안 계속 교반하였다. 생성된 침전물을 여과에 의해 수거하여 화합물 2(1.45g, 83%)를 백색 고형물로서 수득하였다.

[0202]

m.p.: 179-185 °C. LCMS: 509.3 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 2.35

(s, 3H), 3.26 (s, 3H), 3.78 (t, *J* = 9.6 Hz, 4H), 3.95 (s, 3H), 4.03 (t, *J* = 9.2 Hz, 4H), 5.24 (s, 2H), 6.99 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 8.54 (dd, *J* = 8.8 Hz, 2.4 Hz, 1H), 8.76 (s, 2H), 9.12 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 11.11 (br, 1H).

[0203]

실시예 3: N-하이드록시-2-(((2-(6-메톡시피리딘-3-일)-4-모르폴리노티에노[3,2-d]피리미딘-6-일)메틸)(메틸)아미노)피리미딘-5-카르복사미드 나트륨 염(화합물 3)의 제조

[0204]

[0205] 메탄올(30mL) 중의 화합물 1(300mg, 0.59mmol)의 현탁액에 0℃에서 *t*-BuONa(85mg, 0.88mmol)을 서서히 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온으로 가온시키고, 2시간 동안 계속 교반하였다. 반응물을 농축시키고, 잔여물을 분쇄하고, 에탄올로 세척하고, 이어서 여과하여 화합물 3(230mg, 73%)을 백색 고형물로서 수득하였다.

m.p.: 178-183 °C. LCMS: 509.3 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400

MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3.17 (s, 3H), 3.75 (s, 4H), 3.92 (s, 7H), 5.16 (s, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.42 (s, 1H), 8.57 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 8.65 (s, 2H), 9.14 (s, 1H).

[0206]

[0207] 실시예 4: N-하이드록시-2-(((2-(6-메톡시피리딘-3-일)-4-모르폴리노티에노[3,2-*d*]피리미딘-6-일)메틸)(메틸)아미노)피리미딘-5-카르복사미드 포타슘 염(화합물 4)의 제조

[0208] 메탄올(50mL) 중의 화합물 1(400mg, 0.78mmol)의 혼합물에 N<sub>2</sub>하에 0℃에서 *t*-BuOK(132mg, 1.17mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 0℃에서 1시간 동안 교반하고, 실온에서 1.5시간 동안 계속 교반하였다. 여과에 의해 불용성 고형물을 제거하고, 여액을 -20℃로 냉각시켰다. Et<sub>2</sub>O(100mL)를 여액에 첨가하였다. 생성된 혼합물을 -20℃에서 1시간 동안 교반하였다. 헥산(70mL)을 첨가하고, 혼합물을 -20℃에서 2시간 동안 계속 교반하였다. 여과에 의해 고형물을 수거하고, 진공하에 건조시켜 화합물 4(150mg, 35%)를 백색 고형물로서 수득하였다.

m.p.: 174-179°C.

LCMS: 509.3[M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3.16 (s, 3H), 3.74-3.76 (m, 4H), 3.90-3.93 (m, 7H), 5.15 (s, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.4Hz, 1H), 7.43 (s, 1H), 8.39 (br, 1H), 8.58 (d, *J* = 8.8Hz, 1H), 8.62 (s, 2H), 9.15 (s, 1H).

[0209]

[0210] 실시예 5: N-하이드록시-2-(((2-(6-메톡시피리딘-3-일)-4-모르폴리노티에노[3,2-*d*]피리미딘-6-일)메틸)(메틸)아미노)피리미딘-5-카르복사미드 콜린 염(화합물 5)의 제조

[0211] DCM/MeOH(60mL/12mL) 중의 화합물 1(200mg, 0.39mmol)의 용액에 콜린 하이드록사이드(106mg, 0.39mmol, MeOH 중의 45%)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반한 후, 농축시켜 용매의 ~30mL를 제거하였다. 에틸 아세테이트(60mL)를 첨가하고, 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 소량의 침전물이 발생한 후, 혼합물을 농축시켜 용매의 ~40mL를 제거하고, 추가의 에틸 아세테이트(60mL)를 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하고, 여과하여 화합물 5(180mg, 76%)를 백색 고형물로서 수득하였다.

m.p.: 181-185°C. LCMS: 509.3[M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (400MHz,

DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3.11 (s, 9H), 3.17 (s, 3H), 3.40 (t, *J* = 4.8Hz, 2H), 3.75 (t, *J* = 4.8Hz, 4H), 3.84 (br, 2H), 3.90-3.93 (m, 7H), 5.15 (s, 2H), 6.89 (d, *J* = 8.8Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 8.57 (dd, *J* = 8.8Hz, 2.4Hz, 1H), 8.64 (s, 2H), 9.14 (d, *J* = 2.0Hz, 1H).

[0212]

[0213] 실시예 6: N-하이드록시-2-(((2-(6-메톡시피리딘-3-일)-4-모르폴리노티에노[3,2-*d*]피리미딘-6-일)메틸)(메틸)아미노)피리미딘-5-카르복사미드 셀레이트(화합물 6)의 제조

[0214] DCM/MeOH(30mL/7.5mL) 중의 화합물 1(200mg, 0.39mmol)의 현탁액에 황산(77mg, 0.79mmol, 1mL의 MeOH 중)을 첨가하여 투명한 용액을 형성시켰다. 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하였다. 침전물이 발생하였고, 이후 3차-부틸 메틸 에테르(60mL)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 1시간 동안 계속 교반하였다. 여과에 의해 고형물을 수거하여 화합물 6(180mg, 76%)을 백색 고형물로서 수득하였다.

M.p.: 243-246°C. LCMS: 509.3 [M+1]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H

NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3.26 (s, 3H), 3.78 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H), 3.96 (s, 3H), 4.03 (t, *J* = 4.4 Hz, 4H), 5.24 (s, 3H), 6.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.50 (s, 1H), 8.54 (dd, *J* = 8.8 Hz, 2.4 Hz, 1H), 8.76 (s, 2H), 9.12 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 11.06 (br, 1H).

[0215]

[0216] 실시예 7: PI3 키나아제 활성 검정

- [0217] 하기 검정을 이용하여 PI3K의 다양한 아형 및 돌연변이체를 억제하는 화합물 1의 능력을 측정하였다.
- [0218] PI3K  $\alpha$
- [0219] PI3K  $\alpha$ 의 활성을 ADP-Glo 발광 키나아제 검정을 이용하여 측정하였다. N-말단 GST-태깅된 재조합 전장 인간 p110  $\alpha$ 와 태깅되지 않은 재조합 전장 인간 p85  $\alpha$ 의 복합체인 PI3K  $\alpha$ 를 배클로바이러스 감염된 Sf9 세포 발현 시스템(Baculovirus infected Sf9 cell expression system)에서 공동발현시켰다. (GenBank Accession 번호는 p110  $\alpha$ 의 경우 U79143이고; p85  $\alpha$ 의 경우 XM\_043865이다). 글루타티온-아가로오스를 이용하여 1-단계 친화성 크로마토그래피에 의해 단백질을 정제하였다. 정제된 재조합 PI3K  $\alpha$ (p110  $\alpha$ /p85  $\alpha$ ) 및 PIP2의 존재하에서 ATP로부터 발생된 ADP의 양을 측정하기 위해 경쟁 검정을 수행하였다. PI3K  $\alpha$ 를 30℃에서 30분 동안 반응 완충액(50mM HEPES, pH 7.4, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 3  $\mu$ M Naorthovanadate, 1mM DTT, 10  $\mu$ M 초순수 ATP 및 0.5% DMSO) 중에서 20  $\mu$ M PIP2 기질과 함께 인큐베이션시켰다. 이후, 반응에서 발생된 ADP를 ADP-Glo 검정에 의해 측정하였다. 검정을 다음 두 가지 단계로 수행하였다: 첫 번째 단계에서, 동일한 부피의 ADP-GLO™ 시약(Promega)을 첨가하여 키나아제 반응을 종결시키고, 남아있는 ATP를 고갈시킨다. 두 번째 단계에서, 키나아제 검출 시약을 첨가하였는데, 이와 동시에 ADP가 ATP로 전환되었다. 새로 합성된 ATP를 결합된 루시페라아제/루시페린 반응을 이용하여 측정하였다. 이러한 검정에서 화합물 1에 대하여 측정된 IC<sub>50</sub>은 100nM 미만이었다.
- [0220] PI3K  $\alpha$  돌연변이체 H1047R 및 E545K를 억제하는 화합물 1의 능력을 또한 상기 기재된 일반적인 절차를 이용하여 측정하였다. 돌연변이체 둘 모두에 대하여 측정된 IC<sub>50</sub>은 100nm미만이었다.
- [0221] PI3K  $\beta$
- [0222] 균일 시분해 형광(homogenous time resolved fluorescence; HTRF) 기술을 이용하는 시분해 형광 공명 에너지 전달(time-resolved fluorescence resonance energy transfer; TR-FRET) 검정을 이용하여 PI3K  $\beta$ 의 활성을 측정하였다. N-말단 히스티딘-태깅된 재조합 전장 인간 P110  $\beta$ 와 태깅되지 않은 재조합 전장 인간 p85  $\alpha$ 의 복합체인 PI3K  $\beta$ 를 배클로바이러스 감염된 Sf21 세포 발현 시스템에서 공동 발현시켰다. (GenBank Accession 번호는 p110  $\beta$ 의 경우 NM\_006219이고; p85  $\alpha$ 의 경우 XM\_043865이다). 글루타티온-아가로오스를 이용하여 1-단계 친화성 크로마토그래피로 단백질을 정제하였다. 정제된 재조합 PI3K 베타(p110  $\beta$ /p85  $\alpha$ )의 존재하에서 PIP2로부터 발생된 PIP3의 양을 측정하기 위해 경쟁 검정을 수행하였다. PI3K  $\beta$ 를 30℃에서 30분 동안 반응 완충액(20mM HEPES, pH 7.5, 10mM NaCl, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM DTT, 10  $\mu$ M ATP 및 1% DMSO) 중에서 10  $\mu$ M PIP2 기질과 함께 인큐베이션시켰다. 이후, 반응 생성물을 PIP3 검출자 단백질, 유로퓸-라벨링된 항체, 비오틴-라벨링된 PIP3 프로브 및 알로피코시아닌-라벨링된 스트렙타비딘과 혼합하였다. 반응 혼합물에서 안정적인 TR-FRET 신호를 발생시키는 센서 복합체가 형성되었다. PIP3 검출자에 대한 비오틴-라벨링된 프로브 결합이 효소 활성에 의해 생성된 PIP3로 대체됨에 따라 상기 신호 강도가 감소하고, 혼합물 내의 결합되지 않은 비오틴-라벨링된 PIP3 프로브의 양이 증가하였다. 백그라운드 공제와 함께 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 TR-FRET 신호를 측정하였다.
- [0223] 상기 검정에서 화합물 1에 대하여 측정된 IC<sub>50</sub>은 100 내지 1000nM였다.
- [0224] PI3K  $\delta$
- [0225] PI3K  $\delta$ 의 활성을 형광 편광 검정을 이용하여 측정하였다. N-말단 히스티딘-태깅된 재조합 전장 인간 p110  $\delta$ 와 태깅되지 않은 재조합 전장 인간 p85  $\alpha$ 의 복합체인 PI3K  $\delta$ 를 배클로바이러스 감염된 Sf9 세포 발현 시스템에서 공동 발현시켰다. (GenBank Accession 번호는 p110  $\delta$ 의 경우 NM\_005026이다). 글루타티온-아가로오스를 이용하여 1-단계 친화성 크로마토그래피로 단백질을 정제하였다. 정제된 재조합 PI3K  $\delta$ (p110  $\delta$ /p85  $\alpha$ )의 존재하에서 PIP2로부터 발생된 PIP3의 양을 측정하기 위해 경쟁 검정을 수행하였다. PI3K  $\delta$ 를 30℃에서 1시간 동안 반응 완충액(20mM HEPES(pH 7.5), 10mM NaCl, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM DTT, 10  $\mu$ M ATP 및 1% DMSO) 중에서 10  $\mu$ M PIP2 기질과 함께 인큐베이션시켰다. 이후, 반응 생성물을 PIP3 검출자 단백질 및 형광 PIP3 프로브와 혼합하였다. PIP3 검출자에 대한 형광 프로브 결합이 효소 활성에 의해 생성된 PIP3로 대체됨에 따라 편광(mP) 값이 감소하고, 혼합물 내의 결합되지 않은 형광 프로브의 양이 증가하였다. 백그라운드 공제와 함께 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 편광도(mP) 값을 측정하였다.
- [0226] 상기 검정에서 화합물 1에 대하여 측정된 IC<sub>50</sub>은 100nM 미만이었다.
- [0227] PI3K  $\gamma$

[0228] 균일 시분해 형광(HTRF) 기술을 이용하는 시분해 형광 공명 에너지 전달(TR-FRET) 검정을 이용하여 PI3K  $\gamma$ 의 활성을 측정하였다. N-말단 히스티딘-태깅된 인간 PI3K  $\delta$ 를 배칼로바이러스 감염된 Sf9 세포 발현 시스템에서 발현시켰다. (GenBank Accession AF327656). 글루타티온-아가로오스를 이용하여 1-단계 친화성 크로마토그래피에 의해 단백질을 정제하였다. 정제된 재조합 PI3K  $\gamma$  (p120  $\gamma$ )의 존재하에서 PIP2로부터 발생된 PIP3의 양을 측정하기 위해 경쟁 검정을 수행하였다. PI3K  $\gamma$  (2 nM)를 30°C에서 30분 동안 반응 완충액(20mM HEPES, pH 7.5, 10mM NaCl, 4mM MgCl<sub>2</sub>, 2mM DTT, 10  $\mu$ M ATP 및 1% DMSO) 중에서 10  $\mu$ M PIP2 기질과 함께 인큐베이션시켰다. 이후, 반응 생성물을 PIP3 검출자 단백질, 유로퓸-라벨링된 항체, 비오틴-라벨링된 PIP3 프로브 및 알로피코시아닌-라벨링된 스트렙타비딘과 혼합하였다. 반응 혼합물에서 안정적인 TR-FRET 신호를 발생시키는 센서 복합체가 형성되었다. PIP3 검출자에 대한 비오틴-라벨링된 프로브 결합이 효소 활성에 의해 생성된 PIP3로 대체됨에 따라 상기 신호 강도가 감소하고, 혼합물 내의 결합되지 않은 비오틴-라벨링된 PIP3 프로브의 양이 증가하였다. 백그라운드 공제와 함께 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 TR-FRET 신호를 측정하였다.

[0229] 상기 검정에서 화합물 1에 대하여 측정된 IC<sub>50</sub>은 100 내지 1000nM였다.

# [0230] 실시예 8: HDAC 활성 검정

[0231] Biomol Color de Lys 시스템(AK-500, Biomol, Plymouth Meeting, PA)을 이용하여 HDAC 억제 활성을 평가하였다. 간단히, HeLa 세포 핵 추출물을 HDAC의 공급원으로 사용하였다. 여러 농도의 시험 화합물을 디메틸설폭사이드(DMSO)에 연속으로 희석시키고, 비색 인공 기질의 존재하에서 HeLa 세포 핵 추출물에 첨가하였다. 최종 검정 조건은 50mM Tris/Cl, pH 8.0, 137mM NaCl, 2.7mM KCl 및 1mM MgCl<sub>2</sub>를 함유하였다. 1시간 동안 실온(25°C)에서 반응을 수행한 후, 종결을 위해 디벨로퍼(developer)를 첨가하였다. WALLAC 빅터(WALLAC Victor) II 1420 마이크로플레이트 판독기에서 형광 강도로서 상대 효소 활성을 측정하였다(여기: 350-380nm; 방출: 440-460nm). IC<sub>50</sub> 계산을 위해 S자형 용량 반응 곡선 맞춤으로 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism)(v4.0a)을 이용하여 데이터를 분석하였다. 상기 검정에서 화합물 1에 대하여 측정된 IC<sub>50</sub>은 100nM 미만이었다.

[0232] HDAC 동종에 대한 화합물 1의 활성을 또한 측정하였다. BPS Bioscience(San Diego, CA)에서 HDAC 특이성 검정을 이의 표준 작동 절차에 따라 수행하였다. 간단히, 정제된 플래그-(인간 HDAC-1), NCOR2-(인간 HDAC3), GST-(인간 HDAC4, 6, 7, 10 및 11) 또는 His-(인간 HDAC 2, 5, 8 및 9) 태깅된 효소를 Sf9 곤충 세포에서 발현시키고, 사용 전에 정제하였다. HDAC1, 2, 3, 6, 7, 8, 9 및 11의 경우 사용된 기질은 BPS Bioscience에 의해 개발된 HDAC 기질 3이었다. 다른 HDAC 효소의 경우, HDAC 클래스 2a 기질을 사용하였다. HDAC11 효소 검정을 실온에서 3시간 동안 실시한 것을 제외하고, 모든 효소 반응을 37°C에서 30분 동안 2회 실시하였다.

[0233] 하기 표는 각각의 HDAC 1 내지 11에 대한 결과를 기재한 것이고, 제공된 IC<sub>50</sub> 값은 다음과 같다: I > 1000nM; 100nM < II < 1000nM; 10nM < III < 100nM; IV < 10nM.

HDAC	1	2	3	8	4	5	6	7	9	10	11
IC <sub>50</sub>	IV	IV	IV	II	II	II	III	II	II	IV	IV

[0234]

# [0235] 실시예 9: 세포 증식 검정

[0236] 인간 암 세포주를 American Type Culture Collection(Manassas, VA)으로부터 구매하고, 공급자에 의해 제안된 바와 같이 배양 배지와 함께 96-웰 평판-바닥 플레이트에 웰 당 5,000 내지 10,000개로 플레이팅하였다. 이후, 세포를 0.5부피%의 소태아혈청(fetal bovine serum: FBS)이 보충된 배양 배지에서 72시간 동안 다양한 농도의 화합물과 함께 인큐베이션시켰다. Promega CellTiter-Glo 키트를 이용하여 아데노신 트리포스페이트(ATP) 함량 검정에 의해 성장 억제를 평가하였다. Promega CellTiter-Glo 키트는 개포벌레 루시페라아제를 기반으로 하는 ATP 모니터링 시스템이다. 간단히, 16 $\mu$ l의 포유동물 세포 용해 및 기질 용액을 웰 당 84 $\mu$ l의 배양 배지에 첨가하여 세포를 용해시키고, ATP를 안정화시켰다. 혼합물을 섞이시키고, 30분 동안 인큐베이션시키고, 후속하여 발광을 측정하였다. 에스자형 용량-반응 곡선 맞춤으로 PRISM 소프트웨어(GraphPad Software)를 이용하여 IC<sub>50</sub> 값을 계산하였다.

[0237] 표 1은 화합물 1 및 참조 화합물 SAHA, GDC-0941 및 SAHA와 GDC-0941의 조합의 상기 세포-기반 검정에서의 항증

식 활성을 나타낸 것이다. 이러한 검정에서, 다음 등급화를 이용하였다: IC<sub>50</sub>에 대해 I > 10,000nM, 10,000nM ≥ II ≥ 1000nM, 1000nM > III ≥ 100nM, 100nM > IV ≥ 10nM, 및 V < 10nM.

표 1

암 유형 세포주		SAHA	GDC- 0941	SAHA/ GDC- 0941	화합물 1
결장	WiDr	II	I	III	IV
	HCT116	II	II	III	V
	SW403	II	I	II	V
	SW620	II	I	III	V
	SWI-116	II	I	II	V
	T-84	II	II	III	IV
NSCLC	H358	II	II	II	V
	H292	II	II	III	V
	H2122	II	II	III	V
	H460	I	I	II	IV
	A549	II	II	II	IV
	Calu6	II	I	II	IV
이자	MiaPaca2	II	I	II	IV
	CaPan2	II	I	III	IV
	CFPAC-1	II	I	II	IV
	PANC-1	II	II	II	IV
	SW1990	II	I	II	V
유방	HCC1500	II	I	II	V
	HCC1806	II	I	II	IV
	MDA-MB-231	II	I	II	IV
	SKBr3	II	I	II	IV
	BT474	II	III	III	V
	MDA-MB-361	II	III	IV	V
	UACC-893	II	II	III	IV
	MDA-MB-453	III	III	III	V

[0238]

	MCF-7	II	III	III	V
	T47D	II	I	III	IV
	ZR-75-1	II	III	II	IV
	MDA-MB-468	II	III	II	IV
ALL	MOLT-4	III	III	III	V
	SUP-B15	III	II	III	V
AML	HL-60	III	III	III	V
	U937	III	II	III	V
	THP-1	I	II	III	IV
	MV-4-11	III	II	III	V
B-세포 림프종	Pfeiffer	II	III	III	V
	Raji	II	I	II	IV
	RL	III	II	III	V
	DOHH2	III	IV	IV	V
	Granta 519	II	I	III	V
	Su-DHL4	II	III	III	V
	Daudi	II	I	III	IV
T-세포 림프종	HH	III	III	III	V
	MJ	III	I	III	V
	HuT78	IV	III	IV	V
CML	K562	II	II	III	IV
	MEG-01	II	I	II	V
다발성 골수증	RPMI-8226	II	I	III	V
	OPM-2	III	IV	III	V
	ARH77	II	I	III	V

[0239]

[0240]

**실시예 10: 화합물 1의 제형화**

[0241]

a. 30% 캡티솔(Captisol) 중의 화합물 1(10mg/mL):

[0242]

화합물 1(10mg)을 함유하는 바이알에 30% 캡티솔(0.937ml)을 첨가하였다. 혼합물을 2분 동안 초음파처리(sonication)하였다. 혼합물에 소듐 하이드록사이드(1N, 39.3 $\mu$ l, 2eq.)를 첨가하고, 초음파처리/와류(vortex)시켜 투명한 용액을 제공하였다(pH=12). 이후, 용액의 pH를 염산(1N, 23.6 $\mu$ l, 1.2eq.)에 의해 10으로 조절하였다.

[0243]

b. 30% 캡티솔 중의 화합물 1(7.5mg/mL):

[0244]

화합물 1(7.5mg)을 함유하는 바이알에 30% 캡티솔(0.941ml)을 첨가하였다. 혼합물을 2분 동안 초음파처리하였다. 혼합물에 소듐 하이드록사이드(1N, 29.5 $\mu$ l, 2eq.)를 첨가하고, 초음파처리/와류시켜 투명한 용액을 제공하였다(pH=12). 이후, 용액의 pH를 염산(1N, 29.5 $\mu$ l, 2eq.)에 의해 5로 조절하였다.

[0245]

c. C10/PEG1450/PEG400 중의 화합물 1(5mg/mL):



[0246] 화합물 1(5mg), 소듐 데카노에이트(20mg), PEG400(40 $\mu$ l), 및 PEG1450(40mg)을 함유하는 바이알에 H<sub>2</sub>O(0.88ml) 및 NaOH(1N, 24.6 $\mu$ l, 2.5eq.)를 첨가하였다. 혼합물을 초음파처리하고, 와류시켜 투명한 용액을 제공한 후, pH를 HCl(1N, 7.4 $\mu$ l, 0.75eq.)에 의해 10으로 조절하였다.

[0247] **실시예 11: 중양 보유 마우스에서 약동역학(Pharmacokinetics) 및 약역학(Pharmacodynamics) 연구**

[0248] H2122 중양을 보유한 누드 마우스

[0249] 약동역학 연구를 위해 H2122(인간 비-소세포 폐암 세포주) 이중이식 중양을 보유한 누드 마우스를 사용하였다. 화합물 1을 소듐 데카노에이트 및 PEG400(5mg/ml)과 함께 물 중에서 제형화하고, 각각의 동물에게 50mg/kg의 용량으로 위관영양법(gavage)을 통해 경구(PO) 투여하였다. 화합물 투여 후 다양한 시점에서, 시점당 3마리의 마우스를 CO<sub>2</sub>로 안락사시키고, 혈액 및 종양 조직을 채취하였다. 혈액을 소듐 헤파린이 함유된 튜브 내로 수거하였다. 원심분리를 통해 혈장을 분리하였다. 혈장 및 조직을 추후 분석을 위해 -80℃에서 저장하였다. PE Sciex API-3000 LC-MS/MS 시스템(Applied Biosystems, Inc.(Foster City, CA))을 이용하여 혈장 및 종양 조직 중 화합물 농도를 분석하였다.

[0250] 상기 연구의 결과는 도 1 및 하기 표 2에 요약되어 있다. 도 1은 경구 투여에 따른 시간에 대한 혈장 및 종양 조직 중 화합물 1 농도의 그래프이다. 결과는 화합물 1이 종양 조직에서 우선적으로 축적됨을 나타낸다. 이는 혈장에서보다 종양 조직에서 화합물 1의 반감기가 현저하게 길뿐만 아니라 화합물 1(AUC)에 대한 종양 조직의 노출이 현저하게 더 크다는 것을 나타내는 표 3에 기재된 결과에 의해 뒷받침된다.

표 2

파라미터	혈장	종양
반감기 (시간)	5.9	10.1
C <sub>max</sub> (ng/mL)	186	154
곡선 아래 면적 (ng/mL*hr)	478	2126
생체이용률 (%)	7.8	14.8

[0251]

[0252] 다우디 중양을 보유한 스킨드 마우스

[0253] 다우디(비호지킨 림프종 세포주) 세포를 암컷 스킨드(중증 복합 면역-결핍증: severe complex immune-deficient)의 마우스에 이식하였다. 종양의 확립 후, 30% 캡티솔, pH 10, 1.875, 3.75 또는 7.5mg/mL의 농도에서 각각 제형화된 25, 50 또는 100mg/kg의 화합물 1을 경구 위관영양법에 의해 동물에게 투여하였다.

[0254] 화합물 투여 후 다양한 시점에서, 시점당 3마리의 마우스를 CO<sub>2</sub>로 안락사시키고, 혈액 및 종양 조직을 채취하였다. 혈액을 소듐 헤파린이 함유된 튜브 내로 수거하였다. 원심분리를 통해 혈장을 분리하였다. 혈장 및 조직을 추후 분석을 위해 -80℃에서 저장하였다. PE Sciex API-3000 LC-MS/MS 시스템(Applied Biosystems, Inc.(Foster City, CA))을 이용하여 혈장 중 화합물 농도를 분석하였다.

[0255] 상기 연구의 결과는 도 2a, 2b 및 2c, 및 하기 표 3에 요약되어 있다. 도 2a는 경구 투여에 따른 시간에 대한 혈장 중 화합물 1 농도의 그래프이며, 화합물에 대한 용량-의존 노출을 나타낸다. 도 2b는 경구 투여에 따른 시간에 대한 종양 조직 중 화합물 1 농도의 그래프이다. 결과는 화합물 1이 용량 의존 방식으로 종양 조직에서 우선적으로 축적됨을 나타낸다. 100mg/kg의 용량에 따른 혈장 및 종양 농도는 도 2c에 비교되어 있으며, 이는 종양 조직이 화합물 1을 더 우수하게 흡수함을 나타낸다. 이는 화합물 1의 반감기가 혈장에서보다 종양 조직에서 현저하게 더 길뿐만 아니라 화합물 1(AUC)에 대한 종양 조직의 노출이 현저하게 더 크다는 것을 나타내는 표 3에 기재된 결과에 의해 뒷받침된다.



표 3

파라미터	혈장	종양
반감기 (시간)	7.73	12.62
C <sub>max</sub> (ng/mL)	2285.39	1044.7
곡선 아래 면적(ng/mL*hr)	1899.26	3973.56
T <sub>max</sub> (hr)	0.24	0.10

[0256]

[0257]

약역학

[0258]

종양을 25mg/Kg, 50mg/kg 및 100mg/kg의 화합물 1의 단일 용량으로 처리한 후 PD 평가를 위해 채취하였다. 제 조업체의 지시에 따라 Tissuelyser(Qiagen(Valencia, CA))를 이용하여 종양 조직으로부터 단백질을 추출하였다. 30 $\mu$ g의 단백질을 관례대로 상기 기재된 바와 같은 WB 분석에 사용하였다. 세포 용해물을 NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris 겔(Invitrogen) 중에 분해하고, 니트로셀룰로오스 막(Bio-Rad Laboratories(Hercules, CA))으로 옮겼다. 블롯을 다양한 일차 항체로 4℃에서 밤새 프로빙하였다. 각각의 검정에서 GAPDH(글리세르알데하이드 3-포스페이트 탈수소효소, 1:30,000, Abcam(Cambridge, MA))를 내부 대조군으로서 사용하였다. 이후, 막을 적외선 라벨링된 이차 항체(1:10000) 컨쥬게이션된-IR Dye-800(Rockland Immunochemicals, Inc.(Gilbertsville, PA)) 또는 컨쥬게이션된-Alexa 680(Invitrogen)과 함께 인큐베이션시켰다. 막을 Odyssey 적외선 영상 시스템(Infrared Imaging System)(Li-Cor Biotechnology(Lincoln, NE))으로 영상화시켰다.

[0259]

상기 연구의 결과는 3개의 용량 군으로부터 종양 조직 추출물의 웨스턴 블롯을 나타내는 도 3에 기재되어 있다. 이러한 결과는 화합물 1이 PI3K-AKT-mTOR 경로를 억제하며, RAF-MEK-ERK 경로를 억압하고, RTK 단백질 수준을 하향조절하고, 종양 억압제 p53 및 p21 수준을 상향조절한다는 것을 나타낸다.

[0260]

#### 실시예 12: 견에서의 약동역학 연구

[0261]

비글견에서 화합물 1의 약동역학 연구를 또한 소듐 데카노에이트/PEG400(5mg/ml)과 물 중의 5mg/kg의 정맥내 투여 및 장용성 캡슐에서 소듐 데카노에이트/PEG4000/PEG1450(pH 10)과 5mg/kg의 경구 투여를 이용하여 실시하였다. 다양한 시점에서 혈장을 채취하고, LC-MS/MS에 의해 화합물 1 농도에 대해 분석하였다. 연구 결과는 도 4 및 하기 표 4에 나타나 있다. 도 4는 경구 및 정맥내 투여의 경우의 시간에 대한 혈장 농도의 그래프이다. 화합물 1의 상당한 혈장 수준은 경구 투여를 통해 달성된다.

표 4

파라미터	IV	PO 캡슐
반감기 (시간)	1.85	4.88
C <sub>max</sub> (ng/mL)	6156.16	312.1
곡선 아래 면적 (ng/mL*hr)	2977.47	450.4
생체이용률 (%)		15.1

[0262]

[0263]

#### 실시예 13: 래트에서의 약동역학 연구

[0264]

이 연구의 목적은 화합물 1의 경구 투여에 따른 수컷 스프래그-다우리(Sprague-Dawley) 래트에서 화합물 1의 혈장 약동역학을 측정하기 위한 것이었다.

[0265]

화합물 1을 물 중의 30% 캡티솔 중에 용해시켜 경구 투여용 10mg/mL(pH=10)의 공칭 농도를 획득하였다. 생성된 투명한 황색 용액을 투여를 위해 집을 때까지 실온에 저장하였다.

- [0266] 이 연구에 Charles River Laboratories로부터의 세 마리의 수컷 스프래그-다우리 래트를 사용하였다. Research Diets Inc.로부터의 고지방식 사료(High fat diet)(VHFD, D12492i)를 상기 연구의 생존 기간 전체에 걸쳐 자유식으로 제공하였다. 단일 경구(PO) 위관영양법 투여에 의해 20mg/kg의 화합물 1을 투여하였다.
- [0267] 투여 후 0.25, 0.5, 1, 3, 6, 및 24 시간에 꼬리 정맥으로 혈액 샘플(약 150 $\mu$ l의 부피)을 채취하였다. 혈액 샘플을 소듐 헤파린이 함유된 튜브 내에 넣고, 4℃에서 6분 동안 8000rpm으로 원심분리하여 샘플로부터 혈장을 분리하였다. 원심분리 후, 생성된 혈장을 청결한 튜브로 옮기고, 생분석이 있을 때까지 -80℃에서 동결 저장하였다.
- [0268] 화합물 1 및 혈장 샘플 중 이의 일차 대사물질의 농도를 PE Sciex API-3000 LC-MS/MS 시스템(PE-Sciex.(Foster City, CA))을 이용하여 측정하였다.
- [0269] 시험 피검체에서의 평균 농도-시간 데이터로부터 약동역학적 파라미터를 측정하였다. WINNONLIN<sup>®</sup> Professional 5.2.의 구분되는 모델링을 이용하여 파라미터를 계산하였다. 정량 제한치 미만(정량 하한 제한치 = 1ng/mL)이었던 어떠한 농도는 개별 동물에서의 파라미터 계산으로부터 생략하였다.
- [0270] 화합물 1의 경구 투여 후, 화합물 1에 대한 C<sub>max</sub> 및 T<sub>max</sub>의 평균 값은 각각 39.5 $\mu$ g/L 및 0.1hr였다. AUC<sub>(0- $\infty$ )</sub>의 평균 값은 163.6 $\mu$ g/L\*hr였다. 반감기(T<sub>1/2</sub>)의 값은 11.7hr였다.
- [0271] **실시예 14: 이중이식 종양 모델에서의 화합물 1의 평가**
- [0272] A. SU-DHL4, H2122, 다우디 및 OPM2 이중이식 종양 모델
- [0273] SU-DHL4(미만성 거대 B-세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma) 세포주), H2122(인간 NSCLC 세포주), 다우디(비호지킨 림프종 세포주), 및 OPM2(다발성 골수종 종양 세포주) 세포를 누드 또는 스킨드(중증 복합 면역결핍증) 마우스에 이식하였다. 종양의 확립 후, 충분한 종양 크기를 지니는 동물을 활성군(화합물 1) 및 대조군(비히클)으로 무작위로 배정하였다. 화합물 1을 실시예 7(b)에서와 같이 경구 투여용으로 제형화하고, 각각 개별 동물들의 체중을 기준으로 하여 경구 위관영양법에 의해 전달하였다. 대조군을 상응하는 활성군과 동일한 투여 스케줄을 이용하여 비히클로 처리하였다.
- [0274] H2122 종양 군(누드 마우스)은 초기에 75mg/kg의 용량의 화합물 1을 1일 2회 받은 후, 75mg/Kg의 체중 감소로 인해 50mg/Kg을 11일로부터 주당 5일 동안 1일 2회 받았다. 한 가지 연구에서, 다우디 종양 군(스킨드 마우스)은 주당 5일 화합물 1을 25, 50 또는 100mg/Kg의 용량으로 받았다. 또 다른 연구에서, 다우디 종양 군에 50mg/Kg을 주당 5일 동안 1일 2회 투여하였다. 또 다른 연구에서, 다우디 종양 모델에서 경구 투여된 화합물 1의 효능을 경구용 GDC-0941과 경구용 보리노스타트(vorinostat)와 개별적으로 그리고 조합하여 이 둘 모두로 비교하였다. OPM2 종양 군은 화합물 1을 50mg/kg의 용량으로 주당 5일 동안 1일 2회 받았다. SU-DHL4 종양 군에는 경구로 100mg/Kg 또는 정맥내로 50mg/Kg 투여하였다.
- [0275] 연구 기간 동안, 전자식 캘리퍼(caliper)로 종양을 측정하고, 체중을 일주일에 2회 측정하였다. 하기 식을 이용하여 종양 부피를 계산하였다:
- [0276] 종양 부피 = (길이 × 폭<sup>2</sup>)/2
- [0277] 처리 기간에 걸친 화합물 활성을 기재하기 위해 종양 부피 변화율을 이용하였다.
- [0278] 상기 연구의 결과는 각각의 종양 유형에 대한 활성군 및 대조군의 시간에 대한 종양 크기를 보여주는 도 5a 내지 5c 및 9 내지 12에 요약되어 있다. 도 5a, 5b, 5c, 및 12는 화합물 1이 H2122, 다우디 및 OPM2 종양 모델에서 효과적임을 나타낸다. 도 9에 기재된 바와 같이, 화합물 1은 용량-의존 방식으로 다우디 종양 성장을 억제했다. 도 10은 다우디 모델에서 100mg/Kg의 화합물 1의 항종양 활성을 단독 또는 조합된 GDC-0941 또는 보리노스타트와 비교한 것이다. 지시된 용량은 각각의 처리의 최대 허용 용량(maximum tolerated dose: MTD)이고, 전처리 종양 크기는 157 ± 65mm<sup>3</sup>(평균 ± SE)였다. 데이터는 화합물 1이 보리노스타트, GDC-0941, 또는 이 둘 모두의 조합보다 더 효과적임을 나타낸다. 마지막으로, 화합물 1은 50mg/kg의 정맥내(IV) 투여 또는 100 mg/kg의 경구(PO) 투여에 따른 SU-DHL4 미만성 거대 B-세포 림프종 이중이식 모델에서 종양 성장을 크게 억제하였다(도 11). 전처리 종양 크기는 147 ± 21 mm<sup>3</sup>였다.
- [0279] MM1S 이중이식 모델

- [0280] 4주령된 암컷 스킨드/베이지 마우스를 통제된 기후 하에서 환기된 마이크로-아이솔레이터 케이지(INNOCAGE® IVC, Innovive Inc.(San Diego, CA))에 수용시키고, 멸균 고지방식 사료(Probiab-RMH 2000)를 자유식으로 공급하고, 멸균수를 제공하였다. 스킨드/베이지 마우스를 위한 모든 수용체 및 공급물은 사용 전에 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 마우스를 숙달된 동물 기관 직원 및 조사관에 의해 주말/휴일을 포함하여 매일 검사하였다. 모든 동물 절차는 생물안전작업대(biosafety cabinet)(주사용) 또는 층류 후드(laminar flow hood)(축산 및 비외과 절차용) 내에서 멸균 조건하에 수행하였다.
- [0281] MM1S 인간 MM 세포를 다발성 골수종 환자의 말초 혈액으로부터 최초로 입수하였다[Goldman-Leikin RE, et al., *J Lab Clin Invest.* 1980;113:335-345]. 저온보존된 세포를 37℃의 워터 배스에서 해동시키고, 5% CO<sub>2</sub>의 조직 배양 인큐베이터에서 10% 소태아혈청(FBS)이 더해진 RPMI 배지 중에 배양하였다. 세포를 마이코플라스마(PCR에 의한) 및/또는 바이러스(MAP 시험에 의한, Mouse Antibody Production)에 의한 오염물을 배제하도록 의도된 오염물 및 설치류 병원체 검사를 위한 외부 벤더로 보냈다. 배양 중의 세포가 이식에 충분한 경우, 세포를 혈청 비함유 헵크 발란스드 염 용액(Hank's balanced salt solution: HBSS)으로 세척하였다. 마지막으로, 세포를 이식을 위해 HBSS 중에 희석하였다. 90% 초과와 생존도(트리판 블루 제외(trypan blue exclusion)에 의한)의 단일-세포 현탁액만을 주사에 사용하였고, 0.2ml의 HBSS 중에 현탁된 동물 당 2천만 개의 세포를 최소 7일의 순응 기간 후에 혈관을 피하는 것을 주의하면서 26G 피하 주사침을 지니는 1CC 주사기를 이용하여 마우스의 오른쪽 뒷옆구리 부위에 피하로 주입하였다. 성공적인 이식은 피부 아래에 둥근 증가된 덩어리의 형성에 의해 나타났다. 이식된 마우스를 전반적인 건강 및 종양 발달에 대하여 매일 모니터링하였다.
- [0282] 이식한 지 약 2주 후에 종양이 검출가능하였다. 캘리퍼로 종양 크기를 측정하였다. 하기 식을 이용하여 종양 부피를 계산하였다:
- [0283] 종양 부피 = (길이 × 폭<sup>2</sup>)/2
- [0284] 종양을 이식한 지 3주 후, 종양은 평균 194.6 ± 37.9 mm<sup>3</sup>에 이르렀다. 허용가능한 종양 크기 및 모양을 지니는 동물을 분류 소프트웨어를 이용하여 8마리의 동물들의 2개의 군 각각 하나의 비히클 대조군 및 하나의 치료군으로 무작위로 배정하였다.
- [0285] 화합물 1을 다음과 같이 제형화하고 투여하였다: 7.5mg/ml를 각각 2몰당량의 NaOH 및 HCl과 30% 캡티솔 중에 용해시키고, 각각의 마우스의 체중을 기준으로 하여 주당 매일 5회 경구 위관영양법으로 투여하였다. 대조군에는 동일한 투여 패러다임을 이용하여 비히클(30% 캡티솔)을 투여하였다.
- [0286] 각각의 동물 연구 동안, 종양을 캘리퍼로 측정하고, 종양 크기를 상기 언급된 식을 이용하여 측정하고, 퍼센트로 종양 크기 변화를 계산하였다. 마우스의 체중을 저울로 일주일에 2회 측정하였다. a) 연구 설계에 나타난 소정 기일; 또는 b) 건강 문제의 개시 중 어느 것이 먼저 발생할 때까지 연구를 계속하였다. 또한, (1) 2500mm<sup>3</sup>를 초과하는 종양 부하(tumor burden) 및/또는 (2) 출발 체중의 ≥20%의 감소의 종양-관련 파라미터를 안락사 규정의 근거로 하였다. 종양 크기 변화의 측정에 더하여, 마지막 종양 측정치를 이중이식 종양 평가를 위해 국립 암 연구소(National Cancer Institute: NCI)에 의해 개발된 표준 측정기준, 종양 중량 변화율(T/C 값)을 생성시키는데 사용하였다. T/C 값을 다음 식을 이용하여 계산하였다: ΔT가 > 0인 경우, % T/C = 100 × ΔT/ΔC. 그러나, 종양 퇴축(tumor regression)이 발생하는 경우, 다음 식을 이용하였다: ΔT가 < 0인 경우, % T/T<sub>0</sub> = 100 × ΔT/T<sub>0</sub>.
- [0287] 처리 기간은 15일이었다. 종양 크기 및 체중을 연구 마지막 날에 다시 측정하였다.
- [0288] 도 13에 보여지는 바와 같이, 화합물 1 단일 작용제는 MM1S 피하 종양 모델에서 종양 성장을 억제하였다. T/C 값은 14일을 기초로 27.37%(p<0.0001, ANOVA)인 것으로 계산되었다. 화합물 1 단일 작용제의 치료군에서 체중 감소 또는 다른 부작용이 관찰되지 않았다.
- [0289] MM1R 이중이식 모델
- [0290] 4주령된 암컷 스킨드/베이지 마우스를 통제된 기후 하에서 환기된 마이크로-아이솔레이터 케이지(INNOCAGE® IVC, Innovive Inc.(San Diego, CA))에 수용시키고, 멸균 고지방식 사료(Probiab-RMH 2000)를 자유식으로 공급하고, 멸균수를 제공하였다. 스킨드/베이지 마우스를 위한 모든 수용체 및 공급물은 사용 전에 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 마우스를 숙달된 동물 기관 직원 및 조사관에 의해 주말/휴일을 포함하여 매일 검사하였다. 모든 동물 절차는 생물안전작업대(주사용) 또는 층류 후드(축산 및 비외과 절차용) 내에서 멸균 조건하에 수행

하였다.

- [0291] MM1R 인간 MM 세포를 다발성 골수종 환자의 말초 혈액으로부터 최초로 입수하였다[Goldman-Leikin RE, et al., *J Lab Clin Invest.* 1980;113:335-345]. 저온보존된 세포를 37℃의 워터 배스에서 해동시키고, 5% CO<sub>2</sub>의 조직 배양 인큐베이터에서 10% 소태아혈청(FBS)이 더해진 RPMI 배지 중에 배양하였다. 세포를 마이코플라스마(PCR에 의한) 및/또는 바이러스(MAP 시험에 의한, Mouse Antibody Production)에 의한 오염물을 배제하도록 의도된 오염물 및 설치류 병원체 검사를 위한 외부 벤더로 보냈다. 배양 중의 세포가 이식에 충분한 경우, 세포를 혈청 비함유 헹크 발란스드 염 용액(HBSS)으로 세척하였다. 마지막으로, 세포를 이식을 위해 HBSS 중에 희석하였다. 90% 초과와 생존도(트리판 블루 제외에 의한)의 단일-세포 현탁액만을 주사에 사용하였고, 0.1ml의 HBSS 중에 현탁된 동물 당 천오백만 개의 세포를 최소 7일의 순응 기간 후에 혈관을 피하는 것을 주의하면서 26G 피하 주사침을 지니는 1CC 주사기를 이용하여 마우스의 오른쪽 뒷옆구리 부위에 피하로 주입하였다. 성공적인 이식은 피부 아래에 둥근 증가된 덩어리의 형성에 의해 나타났다. 이식된 마우스를 전반적인 건강 및 종양 발달에 대하여 매일 모니터링하였다.
- [0292] 이식한 지 약 2주 후에 종양이 검출가능하였다. 캘리퍼로 종양 크기를 측정하였다. 하기 식을 이용하여 종양 부피를 계산하였다:
- [0293] 종양 부피 = (길이 × 폭<sup>2</sup>)/2
- [0294] 종양을 이식한 지 3주 후, 종양은 평균  $131.7 \pm 28.7 \text{ mm}^3$ 에 이르렀다. 허용가능한 종양 크기 및 모양을 지니는 동물을 분류 소프트웨어를 이용하여 8마리의 동물들의 2개 군 각각 하나의 비히클 대조군 및 하나의 치료군으로 무작위로 배정하였다.
- [0295] 화합물 1을 다음과 같이 제형화하고 투여하였다: 7.5mg/ml를 각각 2몰당량의 NaOH 및 HCl과 30% 캡티솔 중에 용해시키고, 각각의 마우스의 체중을 기준으로 하여 주당 매일 5회 경구 위관영양법으로 투여하였다. 대조군에는 동일한 투여 패러다임을 이용하여 비히클(30% 캡티솔)을 투여하였다.
- [0296] 각각의 동물 연구 동안, 종양을 캘리퍼로 측정하고, 종양 크기를 상기 언급된 식을 이용하여 측정하고, 퍼센트로 종양 크기 변화를 계산하였다. 마우스의 체중을 저울로 일주일에 2회 측정하였다. a) 연구 설계에 나타난 소정 기일; 또는 b) 건강 문제의 개시 중 어느 것이 먼저 발생할 때까지 연구를 계속하였다. 또한, (1) 2500mm<sup>3</sup>를 초과하는 종양 부하 및/또는 (2) 출발 체중의 ≥20%의 감소의 종양-관련 파라미터를 안락사 규정의 근거로 하였다. 종양 크기 변화의 측정에 더하여, 마지막 종양 측정치를 이중이식 종양 평가를 위해 국립 암 연구소(NCI)에 의해 개발된 표준 측정기준, 종양 중량 변화율(T/C 값)을 생성시키는데 사용하였다. T/C 값을 다음 식을 이용하여 계산하였다:  $\Delta T > 0$ 인 경우,  $\% T/C = 100 \times \Delta T / \Delta C$ . 그러나, 종양 퇴축이 발생하는 경우, 다음 식을 이용하였다:  $\Delta T < 0$ 인 경우,  $\% T/T_0 = 100 \times \Delta T / T_0$ .
- [0297] 처리 기간은 18일이었다. 종양 크기 및 체중을 연구 마지막 날에 다시 측정하였다.
- [0298] 도 14에 보여지는 바와 같이, 화합물 1 단일 작용제는 MM1R 피하 종양 모델에서 종양 성장을 억제하였다. T/C 값은 17일을 기초로 21.15%( $p < 0.0001$ , ANOVA)인 것으로 계산되었다. 화합물 1 단일 작용제의 치료군에서 체중 감소 또는 다른 부작용이 관찰되지 않았다.
- [0299] **실시예 15: 림프구 순환에 대한 화합물 1의 효과**
- [0300] CD1 야생형 마우스에서 T 및 B 림프구 순환에 대한 화합물 1의 효과를 검사하는 연구를 실시하였다. 5마리의 마우스를 실시예 8(b)(5mg/mL)에서와 같이 제형화된 100mg/kg의 화합물 1로 5일 연속하여 경구로 처리하였다. 추가 5마리의 마우스를 비히클로 처리하였다. 다양한 시점(투여 전, 투여 중, 및 투여 후 포함)에 아래턱 정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 혈액을 T 및 B 세포 정량을 위해 유세포분석기(flow cytometer)로 분석하였다.
- [0301] 림프 기관, 비장 및 림프절에서 T 및 B 림프구 수준에 대한 화합물 1의 효과를 또한 평가하였다. 마우스를 100mg/kg의 화합물 1로 5일 연속하여 경구로 처리하였다. 동물을 희생시키고, 림프 기관을 채취하였다. 조직으로부터 세포를 물리적으로 분리하고, 유세포분석기로 분석하였다. 항-CD3 및 -CD19 항체를 이용하여 T 및 B 세포를 각각 염색하였다.
- [0302] 도 6에 상기 연구 결과가 나타나 있으며, 여기서 그래프는 시간에 대한 혈액 림프구 수준을 나타낸다. 화합물 1은 대조군에 비해 T 및 B 림프구 둘 모두의 혈액 수준에서 현저한 가역적 감소를 나타낸다. 유사한 효과가 비

장 및 림프절에서의 림프구 수준에서 나타낸다. 이러한 기관 둘 모두는 화합물 1로 투여한 후에 대조군에 비해 T 및 B 림프구 둘 모두의 현저한 감소를 나타낸다.

[0303] 실시예 16: 골수에서 조혈 세포에 대한 화합물 1의 효과

[0304] 실시예 12에서 회생된 마우스로부터 골수를 또한 분리했다. 마우스의 장골로부터 골수 함유물을 채취하고, 유세포분석기로 분석하였다. 전구 또는 성숙 림프구에 대한 다양한 표식을 사용하였다. 결과는 화합물 1로의 처리가 대조군에 비해 말초 T 및 B 림프구 수의 감소를 야기하면서 골수 림프구 전구 세포의 보완적 증가를 유도하였음을 나타냈다.

[0305] 실시예 17: 미니-살모넬라/포유동물-마이크로솜 복귀 돌연변이 검정

[0306] 살모넬라 타이피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)의 2개의 균주(TA98 및 TA100)의 유전체에서 히스티딘 자리의 포유동물 마이크로솜 효소(S9-믹스)의 존재 또는 부재하에서 복귀 돌연변이(reverse mutation)를 유도하는 화합물 1의 능력을 평가하기 위해 이 연구를 실시하였다.

[0307] 변이원성 검정에 사용된 테스트 균주는 살모넬라 타이피뮤리움 테스트 균주 TA98(틀-이동(frame-shift) 복귀 돌연변이 검출용) 및 TA100(점(point) 복귀 돌연변이 검출용)이었다. 6-웰 플레이트를 이용하여 2개의 양성 대조군 및 공존 비히클(DMSO, 20 $\mu$ l/웰) 과 함께 S9 혼합물의 존재 및 부재하 둘 모두에서 검정을 실시하였다. 각각의 화합물에 대하여 1000 내지 62.5 $\mu$ g/웰(표준 에임스 검정에서 5000 내지 312.5 $\mu$ g/플레이트와 같음) 범위로 연이어 2배의 희석으로 되어 있는 5개의 농도를 시험하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 48 내지 72시간 동안의 인큐베이션 후, 화합물의 불용성 및 세포독성에 대해 플레이트를 관찰하고, 스캐닝하여 복귀돌연변이체 콜로니를 계수하였다. 매일 평균 대조군 값에 비해 복귀돌연변이체 콜로니의 재생가능한 2배 증분(>2x의 비히클 대조군)은 각각의 균주에 대한 유전자 돌연변이의 양성 반응으로 간주하였다.

[0308] 화합물 1을 음성(비히클) 대조군으로서도 작용하는 디메틸 설펍사이드(DMSO) 중에 용해시켰다. 2-니트로플루오렌 및 소듐 아자이드는 TA98 및 TA100 각각에 대하여 S9의 부재하에 양성 대조군으로서 작용하였다. 2-아미노안트라센은 TA98 및 TA100에 대하여 S9의 존재하에 양성 대조군으로서 작용하였다.

[0309] 결과

[0310] 화합물 1은 50mg/ml의 농도로 DMSO 중에 용해되는 때에 고동색(maroon) 용액으로 형성되었는데, 이는 가장 진한 원액이었다. 시험 물질은 3.125mg/ml 아래로 모두 연이어 2배의 희석으로 연한 고동색에서 무색 용액으로 남게 되었다. 시험 물질 및 연질 아가가 250 $\mu$ g/웰 이상의 농도에서 함께 혼합되는 때에 시험 물질의 침전을 관찰하였다. 48 내지 72시간의 인큐베이션 후, S9 믹스 단독의 부재하에서의 TA98 및 TA100은 250 $\mu$ g/웰에서 현미경 검사하에 시험 물질의 침전이 약간 보였고, S9 믹스의 존재 및 부재하에서의 TA98 및 TA100은 500 및 1000 $\mu$ g/웰에서 시험 물질의 침전 및 백그라운드 론(background lawn)의 조금의 감소가 적은 정도 내지 중간 정도로 보였다. 균주 TA98 및 TA100을 S9 믹스의 존재 및 부재 하에서 시험하는 경우 복귀돌연변이체 콜로니의 평균 갯수가 평균 대조군에 비해 현저히 증가되었다는 증거는 없었다(표 5).

[0311] 본 연구로부터의 결과는 시험 물질을 1000 $\mu$ g/웰(표준 에임스 검정에서 5000 $\mu$ g/플레이트와 같음)의 최대 농도 이하로 시험하는 경우, 마이크로솜 효소의 존재 및 부재하에 균주 TA98 및 TA100에서 화합물 1이 양성 돌연변이 반응을 유도하지 않았음을 나타냈다.



표 5: 화합물 1의 변이원성 검정 결과

웰 당 복귀돌연변이체								
	Conc. μg/웰	TA98			TA100			백그라운드 본 <sup>c</sup>
		1	2	평균	1	2	평균	TA98/ TA100
마이크로솜: 없음 (-S9)								
DMSO	-	5	6	6	26	32	29	4/4
화합물 1	62.5	4	4	4	34	30	32	4/4
화합물 1	125	4	6	5	32	34	33	4/4
화합물 1	250	6	5	6	34	29	32	4, sp/4, s p
화합물 1	500	5	3	4	33	31	32	3, sp/3, s p
화합물 1	1000	4	5	5	28	26	27	3, mp/3, mp
양성 대조군 <sup>a</sup>		55	63	59*	>300	>300	>300*	4/4
마이크로솜 (+S9)								
DMSO	-	6	6	6	34	33	34	4/4
화합물 1	62.5	4	6	5	34	30	32	4/4
화합물 1	125	6	3	5	28	30	29	4/4
화합물 1	250	8	6	7	30	28	29	4/4
화합물 1	500	6	6	6	32	37	35	3, sp/3, s p

[0312]

화합물 1	1000	6	7	7	33	34	34	3,mp/3,mp
양성 대조군 <sup>b</sup>		>300	>300	>300*	>300	>300	>300*	4/4

<sup>a</sup> TA98: 2-니트로플루오렌, 0.4μg/웰; TA100: 소듐 아자이드, 2.0 μg/웰

<sup>b</sup> TA98 및 TA100: 2-아미노안트라센, 0.8μg/웰

<sup>c</sup> 백그라운드 론 평가 코드:

5. 용매 대조군에 비해 향상된 성장,
4. 비히클 대조군과 유사 (정상, 독성 없음),
3. 25% 미만 감소 (25% 미만의 세포독성),
2. 25% 초과 내지 50% 미만 감소 (50% 미만의 세포독성),
1. 50% 초과 감소 (50% 초과 세포독성),
0. 성장 안됨 (100% 세포독성).

sp=약간 침전 mp=중간 정도의 침전 hp=심한 침전

\*: 확실한 증가

[0313]

[0314]

#### 실시예 18: 종양 세포주에서 약역학적 연구

[0315]

종양 세포주 H460(Kras, PI3K), BT474(HER2, PI3K), A375(B-Raf) 및 H1975(EGFR, PI3K)를 배양하고, DMSO 단독 (비히클 대조군) 또는 0.1 μmol/L 화합물 1 또는 참조 화합물로 16시간 동안 처리하였다. SDS 및 2-머캅토에탄올의 존재하에서 세포 추출물을 제조하고, 폴리아크릴아미드 겔 중에 분해시켰다. 단백질을 니트로셀룰로오스 필터로 옮기고, 지시된 일차 항체를 함유하는 블로킹 용액(Li-Cor Bioscience)으로 표준 절차를 이용하여 블로팅을 수행하였다. p-EGFR, EGFR, p-HER2, HER2, p-HER3, HER3, p-MET, MET, p-bRaf, p-cRaf, pMEK, MEK, p-ERK, ERK 및 튜블린에 대한 일차 항체를 Cell Signaling Technology로부터 구매하였다. IRdye 680, 800CW과 컨쥬게이션된 이차 항체를 사용하였고, Li-Cor Odyssey 영상기로 신호를 검출하였다.

[0316]

도면의 범례에 나타난 바와 같이 처리되었던 단층 배양에서 성장된 세포에 대하여 면역세포화학(Immunocytochemistry)을 수행한 후, 4% (w/v) 파라포름알데하이드로 고정시켰다. 1 × PBS로 세척한 후, 지시된 일차 항체 및 IRdye 680- 또는 800CW-컨쥬게이션된 이차 항체를 함유하는 Li-Cor 블로킹 용액에서 면역염색을 수행하였다. 인-셀-웨스턴(in-cell-western)의 경우, 결과의 검출 및 정량을 위해 Li-Cor Odyssey 적외선 영상기를 사용하였다.

[0317]

약역학적 표식의 조직학적 검사를 위하여, 종양 이종이식을 채취하고, 파라핀에 엠베딩시킨 후, 4 내지 5mm의 섹션으로 제조하였다. 이러한 섹션을 슬라이드 상에 장착하고, 일차 항체와 반응시키고, 이어서, 홀스래디쉬(horseradish) 퍼옥시다아제-컨쥬게이션된 이차 항체(Envision polymer-HRP, Dako, Glostrup, Denmark)와 반응시켰다. 이후, 공급업체에 의해 권장되는 디아미노벤지딘(DAB)을 이용하여 발색 반응(color reaction)을 수행하였다. 헤마톡시린으로 섹션의 대비 염색을 수행하였다.

[0318]

상기 연구의 결과는 도 7a 내지 7g 및 8a 내지 8c에 요약되어 있다. 화합물 1은 KRAS- 및 PI3KCA-돌연변이체 H460 비-소세포 폐암(NSCLC) 세포에서 HDAC 활성 및 PI3K 경로 신호전달을 억제한다. 세포를 DMSO 단독(비히클 대조군) 또는 시험 화합물을 함유하는 DMSO로 1시간 동안 처리한 후, 웨스턴 블롯 또는 인-셀-웨스턴을 수행하였다. 도 7a는 1 μmol/L의 화합물 1이 아세틸화된 히스톤 3(Ac-H3), 튜블린(Ac-Tub), 및 p53(Ac-p53)의 수준을 증가시킨다는 것을 나타낸다. 화합물은 또한 전체 p53 및 p21 함량을 상향조절한다. 도 7b 내지 7e에 기재된 데이터는 화합물 1이 용량-의존 방식으로 아세틸화된-튜블린(도 7b), 아세틸화된 히스톤 3(도 7c), 아세틸화된 p53(도 7d), 및 아세틸화된 p21(도 7e)의 수준을 증가시킨다는 것을 나타낸다. 생성된 IC<sub>50</sub> 값은 화합물 1이 검사된 암 세포에서 LBH 589에 필적하는 HDAC-억제 효능을 지닌다는 것을 시사한다. 1 μmol/L에서 화합물 1은 AKT, 및 하위 신호전달 단백질 4EBP-1 및 p70S6의 활성을 억제한다(도 7f). 화합물 1은 또한 용량-의존 방식으로 Akt의 인산화를 완강하고 강력하게 억제한다(도 7g).

[0319]

암 치료에서 PI3K 억제제의 한 가지 주요 한계는 RAF-MEK-ERK 경로의 활성화이다. HDAC 억제제는 우성유전학적

변형을 통해 암 세포에서 이러한 신호전달 경로의 키나아제 수준을 억제할 수 있다. 다양한 돌연변이, 예컨대, H460 세포에서의 KRAS 및 PI3K 돌연변이, A375 세포에서의 B-Raf 돌연변이, BT-474 세포에서의 HER2 및 PI3K 돌연변이, 및 H1975 세포에서의 EGFR 돌연변이를 지니는 종양 세포에서, 100nM의 화합물 1은 Raf, MEK, 및 ERK의 활성을 억압하였다. 강한 HDAC 억제제 LBH 589는 이러한 웨스턴 블롯 검정 중 일부에서 유사한 활성을 나타냈다(도 8a).

[0320] PI3K 및 MEK 경로의 억제에 더하여, 1  $\mu$ M의 화합물 1로 16시간 동안 RPMI-8226 골수종 세포를 처리하는 것은 p-STAT3(Y-705) 및 p-Src를 억제했다(도 8b).

[0321] EGFR-L858R-T790M 이중-돌연변이체 H1975 NSCLC 세포 및 HER2-과발현 BT-474 유방암 세포에서, 화합물 1은 16시간 동안의 인큐베이션 후 인산화된, 그리고 전체 수용체 티로신 키나아제 EGFR, HER2, HER3, 및 MET의 수준을 감소시키는 것으로 나타났다. 동일한 키나아제의 유사한 하향 조절이 LBH 589로 이러한 세포를 처리한 후에 관찰되었다(도 8c).

[0322] **실시예 19. 혈액학적 이종이식 종양 모델에서 PI3K110  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  및  $\delta$ 의 발현**

[0323] 6 내지 8주령된 암컷 면역-결핍 마우스(베이지/스키드)를 통제된 기후 하에서 환기된 마이크로-아이솔레이터 케이지에 수용시키고, 멸균 고지방식 사료(ProLab-RM 2000)를 자유식으로 공급하고, 멸균수를 제공하였다. 스킵드 베이지 마우스를 위한 모든 수용체 및 공급물은 일회용이었고, 사용 전에 Innovive로부터 방사선 처리된 것으로 구매하였다. 마우스를 숙달된 동물 기관 직원 및 조사관에 의해 주말/휴일을 포함하여 매일 검사하였다. 모든 동물 절차는 생물안전작업대(주사용) 또는 층류 후드(출산 및 비외과 절차용) 내에서 멸균 조건하에 수행하였다.

[0324] 인간 혈액암 세포주를 인간 암 환자로부터 최초로 입수하였다. 저온보존된 세포를 37°C의 워터 배스에서 해동시키고, 5% CO<sub>2</sub>의 조직 배양 인큐베이터에서 10 내지 15% 소태아혈청(FBS)이 더해진 RPMI 배지 중에 배양하였다. 세포를 마이코플라스마(PCR에 의한) 및/또는 바이러스(MAP 시험에 의한, Mouse Antibody Production)에 의한 오염물을 배제하도록 의도된 오염물 및 설치류 병원체 검사를 위한 외부 벤더로 보냈다.

[0325] 배양 중의 세포가 요망되는 갯수에 이른 경우, 세포를 채취하고, 혈청 비함유 둘베코 인산염 완충 식염수(Dulbecco's phosphate buffered saline: DPBS)로 세척하였다. 마지막으로, 세포를 이식을 위해 DPBS 중에 희석하였다. 90% 초과와 생존도(트리판 블루 제외에 의한)의 단일-세포 현탁액만을 주사에 사용하였다. 7일의 순응 기간 후, 0.1ml의 DPBS 중에 현탁된 동물 당 1 내지 2천만 개의 세포를 혈관을 피하는 것을 주의하면서 26G 피하 주사침을 지니는 0.5CC 주사기를 이용하여 동물의 오른쪽 뒷옆구리 부위에 피하(SC)로 주입하였다. 성공적인 이식은 피부 아래에 둥근 증가된 덩어리의 형성에 의해 나타났다. 이식된 마우스를 전반적인 건강 및 종양 발달에 대하여 매일 모니터링하였다.

[0326] 이식한 지 약 2주 반 후에 종양이 검출가능하였다. 캘리퍼로 종양 크기를 측정하였다. 하기 식을 이용하여 종양 부피를 계산하였다:

[0327] 종양 부피 = (길이  $\times$  폭<sup>2</sup>)/2

[0328] 종양 크기가 약 150 내지 300 mm<sup>3</sup>에 이르는 경우, 마우스를 3개의 치료군(25mg/kg, 50mg/kg 및 100mg/kg) 및 1개의 대조군을 포함한 4개의 군으로 분리하였다. 화합물 1로 투여한 지 15분, 1, 3, 6, 24 시간 후에 종양을 채취하였다(각각의 시점에 대하여 3마리의 마우스). 마우스를 CO<sub>2</sub>로 안락사시킨 후, 상기 열거된 시점에 따라 종양을 채취하였다. 샘플을 웨스턴 블롯 분석을 위해 -80°C 냉동고로 옮길 때까지 드라이 아이스에 두었다.

[0329] 균질기(homogenizer)(Tissuelyser, Qiagen(Valencia, CA))를 제조업체의 지시에 따라 이용하여 종양 조직으로부터 단백질을 추출하였다. 조직 튜브를 홀딩(holding)시키기 위한 어댑터를 -20°C에서 냉동시키고, 용해 완충액 및 비드를 사용 전에 4°C에서 냉각시켰다.

[0330] 100 내지 200  $\mu$ g의 조직을 포스파타아제 억제제(1:100 v/v, Tyr & Ser/Thr 포스파타아제 억제제 각테일, Upstate)가 보충된 300  $\mu$ l의 T-PER 포유동물 조직 단백질 추출 시약(Pierce(Rockford, IL))으로 균질화시켰다. 조직이 완전히 균질화될 때까지 시료를 각각의 순환(시간: 0.15분; 주파수: 30Hz) 후 시각적으로 확인하였다. 대부분의 경우에 약 4회 순환이 필요했다. 조직 용해물을 4°C에서 10분 동안 14,000rpm으로 원심분리하였다. 200  $\mu$ l의 상청액을 채취하고, -80°C에서 유지하였다. BCA 단백질 검정 키트(Pierce(Rockford, IL))를 제조업체의 지시에 따라 이용하여 단백질 농도를 측정하였다.

- [0331] 30 $\mu$ g의 전체 단백질 추출물을 NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris 겔(Invitrogen) 상에 용해시키고, Bio-Rad 반건식 트랜스퍼 머신(Semi-Dry Transfer Machine)을 이용하여 니트로셀룰로오스 막(Bio-Rad)으로 옮겼다. 블롯을 10ml의 블로킹 완충액(Odyssey 적외선 영상 시스템)과 함께 1시간 동안 인큐베이션시킨 후, 일차 항체로 웨이커 상에서 4℃로 밤새 프로빙하였다. 블롯을 일차 항체로 4℃에서 밤새 프로빙하였다. 일차 항체에는 PI3 키나아제 p110 $\alpha$  (#4249, 1:1000, 세포 신호전달), PI3 키나아제 p110 $\beta$  (#3011, 1:1000, 세포 신호전달), PI3 키나아제 p110 $\gamma$  (#5405, 1:1000, 세포 신호전달), PI3 키나아제 p110 $\delta$  (SC-7176, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA))가 포함되었다. 각각의 검정에 GAPDH(글리세르알데하이드 3-포스페이트 탈수소효소, 1/30,000, Abcam(Cambridge, MA))를 내부 대조군으로서 사용하였다.
- [0332] 막을 Tris-완충 식염수 Tween-20(TBST; DAKO)으로 4회 세정하고, 다음 적외선 컨쥬게이션된 이차 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션시켰다(1:10000): 항-라빗 컨쥬게이션된-IR Dye 800(Rockland), 또는 항-마우스 컨쥬게이션된-Alexa 680(Molecular Probes). 막을 TBST로 세척한 후, 영상화 및 분석을 위하여 Odyssey 적외선 영상 시스템에 두었다.
- [0333] 결과는 여러 비호지킨 림프종 및 다발성 골수종 이종이식으로부터 PI3K p110 아형, AKT 및 pAKT의 웨스턴 블롯을 나타내는 도 15에 기재되어 있다. 결과는 AKT의 활성이 다중 PI3K P110 아형에 의해 유도된다는 것을 나타낸다.
- [0334] **실시예 20: 다우디 이종이식 종양 모델에서 화합물 1과 CAL-101의 비교**
- [0335] 6 내지 8주령된 암컷 스킨드 베이지 마우스(CD-1 베이지 스킨드)를 통제된 기후 하에서 환기된 마이크로-아이솔레이터 케이지에 수용시키고, 멸균 고지방식 사료(ProLab-RMH 2000)를 자유식으로 공급하고, 멸균수를 제공하였다. 스킨드/베이지 마우스를 위한 모든 수용체 및 공급물은 일회용이었고, 사용 전에 Innovive로부터 방사선 처리된 것으로 구매하였다. 마우스를 숙달된 동물 기관 직원 및 조사관에 의해 주말/휴일을 포함하여 매일 검사하였다. 모든 동물 절차는 생물안전작업대(주사용) 또는 층류 후드(출산 및 비외과 절차용) 내에서 멸균 조건하에 수행하였다.
- [0336] 인간 버킷 림프종 환자로부터 다우디 인간 버킷 림프종 세포를 최초로 입수하였다. 저온보존된 세포를 37℃의 워터 배스에서 해동시키고, 5% CO<sub>2</sub>의 조직 배양 인큐베이터에서 15% 소태아혈청(FBS), 1% Penstrep, 및 1% Glutamax가 더해진 RPMI-1640 배지 중에 배양하였다. 세포를 마이코플라스마(PCR에 의한) 및/또는 바이러스(MAP 시험에 의한, Mouse Antibody Production)에 의한 오염물을 배제하도록 의도된 병원체 검사를 위한 외부 벤더로 보냈다. 배양 중의 세포가 요망되는 갯수에 이른 경우, 원심분리에 의해 세포를 채취하였다. 수거한 후, 세포를 혈청 비함유 돌베코 인산염 완충 식염수(DPBS)로 세척하였다. 마지막으로, 세포를 이식을 위해 DPBS 중에 희석하였다. 90% 초과와 생존도(트리판 블루 제외에 의한)의 단일-세포 현탁액만을 주사에 사용하였고, 0.1ml의 DPBS 중에 현탁된 동물 당 2천만 개의 세포를 최소 7일의 순응 기간 후에 혈관을 피하는 것을 주의하면서 26G 피하 주사침을 지니는 0.5CC 주사기를 이용하여 마우스의 오른쪽 뒷옆구리 부위에 피하로 주입하였다. 성공적인 이식은 피부 아래에 둥근 증가된 덩어리의 형성에 의해 나타났다. 이식된 마우스를 전반적인 건강 및 종양 발달에 대하여 매일 모니터링하였다.
- [0337] 이식한 지 약 2주 후에 종양이 검출가능하였다. 캘리퍼로 종양 크기를 측정하였다. 하기 식을 이용하여 종양 부피를 계산하였다:
- [0338] 종양 부피 = (길이  $\times$  폭<sup>2</sup>)/2
- [0339] 종양을 이식한 지 4주 후, 종양의 평균 크기는 300  $\pm$  126 mm<sup>3</sup>에 이르렀다. 허용가능한 종양 크기 및 모양을 지니는 동물을 분류 소프트웨어를 이용하여 7마리의 동물들의 3개의 군 각각 1개의 비히클 대조군 및 2개의 치료군으로 무작위로 배정하였다.

군	마우스 수	화합물	용량 ( mg/kg)	스케줄
1	7	30% 캡티솔	0	Qd* (월-금), PO**
2	7	CAL-101	30	BID*** (월-금)
3	7	화합물 1	100	Qd* (월-금), PO**

\*Qd = 1 일 1 회 투여, \*\*PO = 경구 위관영양법 투여, \*\*\*BID, 1 일 2 회

화합물 1을 다음과 같이 제형화하고 투여하였다: 화합물 1(7.5mg/ml)을 2몰당량의 HCl과 균형이 맞춰진 2몰당량의 NaOH와 30% 캡티솔 중에 용해시키고, 월요일에서 금요일까지 경구 위관영양법을 통해 투여하였다. 대조군에는 100mg/kg 부피(6.67 $\mu$ l/g)와 동일한 투여 패러다임을 이용하여 비히클(30% 캡티솔)을 투여하였다.

각각의 동물 연구 동안, 종양을 캘리퍼로 측정하고, 종양 크기를 상기 언급된 식을 이용하여 측정하고, 퍼센트로 종양 크기 변화를 계산하였다. 마우스의 체중을 저울로 일주일에 2회 측정하였다. a) 연구 설계에 나타난 소정 기일; 또는 b) 건강 문제의 개시 중 어느 것이 먼저 발생할 때까지 연구를 계속하였다. 또한, 2500mm<sup>3</sup>를 초과하는 종양 부하 및/또는 출발 체중의  $\geq 20\%$ 의 감소의 종양-관련 파라미터를 안락사 규정의 근거로 하였다. 종양 크기 변화의 측정에 더하여, 마지막 종양 측정치를 이중이식 종양 평가를 위해 국립 암 연구소(NCI)에 의해 개발된 표준 측정기준, 종양 중량 변화율(T/C 값)을 생성시키는데 사용하였다. T/C 값을 다음 식을 이용하여 계산하였다:  $\Delta T$ 가  $> 0$ 인 경우,  $\% T/C = 100 \times \Delta T/\Delta C$ . 그러나, 종양 퇴축이 발생하는 경우, 다음 식을 이용하였다:  $\Delta T$ 가  $< 0$ 인 경우,  $\% T/T_0 = 100 \times \Delta T/T_0$ .

체중의 10%를 초과하는 종양 크기로 인해 더 이른 종결이 요망되었던 비히클 및 CAL-101 군에 대한 처리 기간은 15일이었고, 화합물 1 군에 대한 처리 기간은 18일이었다. 종양 크기 및 체중을 연구 마지막 날에 다시 측정하였다.

상기 연구의 결과는 처리 시간의 함수로서 활성군 및 대조군에 대한 종양 성장을 보여주는 도 16에 나타나 있다. 화합물 1 군은 CAL-101 및 대조군에 비해 현저하게 저하된 종양 성장을 나타냈다.

#### 실시예 21. 다우디 이중이식 종양 모델에서 사이클로포스파미드와 화합물 1의 조합

6 내지 8주령된 암컷 스킨드 베이지 마우스(CD-1 베이지 스킨드)를 통제된 기후 하에서 환기된 마이크로-아이슬레이터 케이지에 수용시키고, 멸균 고지방식 사료(Probalab-RMH 2000)를 자유식으로 공급하고, 멸균수를 제공하였다. 스킨드 베이지 마우스를 위한 모든 수용체 및 공급물은 일회용이었고, 사용 전에 Innovive로부터 방사선 처리된 것으로 구매하였다. 마우스를 숙달된 동물 기관 직원 및 조사관에 의해 주말/휴일을 포함하여 매일 검사하였다. 모든 동물 절차는 생물안전작업대(주사용) 또는 층류 후드(축산 및 비외과 절차용) 내에서 멸균 조건하에 수행하였다.

인간 버킷 림프종 환자로부터 다우디 인간 버킷 림프종 세포를 최초로 입수하였다. 저온보존된 세포를 37°C의 워터 배스에서 해동시키고, 5% CO<sub>2</sub>의 조직 배양 인큐베이터에서 15% 소태아혈청(FBS), 1% Penstrep, 및 1% Glutamax가 더해진 RPMI-1640 배지 중에 배양하였다. 세포를 마이코플라스마(PCR에 의한) 및/또는 바이러스(MAP 시험에 의한, Mouse Antibody Production)에 의한 오염물을 배제하도록 의도된 병원체 검사를 위한 외부 벤더로 보냈다. 배양 중의 세포가 요망되는 갯수에 이른 경우, 원심분리에 의해 세포를 채취하였다. 수거한 후, 세포를 혈청 비함유 돌베코 인산염 완충 식염수(DPBS)로 세척하였다. 마지막으로, 세포를 이식을 위해 DPBS 중에 희석하였다. 90% 초과 생존도(트리판 블루 제외에 의한)의 단일-세포 현탁액만을 주사에 사용하였고, 0.1ml의 DPBS 중에 현탁된 동물 당 2천만 개의 세포를 최소 7일의 순응 기간 후에 혈관을 피하는 것을 주의하면서 26G 피하 주사침을 지니는 0.5CC 주사기를 이용하여 마우스의 오른쪽 뒷옆구리 부위에 피하로 주입하였다. 성공적인 이식은 피부 아래에 둥근 증가된 덩어리의 형성에 의해 나타났다. 이식된 마우스를 전반적인 건강 및 종양 발달에 대하여 매일 모니터링하였다.

이식한 지 약 2주 후에 종양이 검출가능하였다. 캘리퍼로 종양 크기를 측정하였다. 하기 식을 이용하여 종양



부피를 계산하였다:

[0349] 종양 부피 = (길이 × 폭<sup>2</sup>)/2

[0350] 종양을 이식한 지 4주 후, 종양의 평균 크기는  $189 \pm 47 \text{ mm}^3$ 에 이르렀다. 허용가능한 종양 크기 및 모양을 지니는 동물을 분류 소프트웨어를 이용하여 8마리의 동물들의 4개 군 각각 1개의 비히클 대조군 및 3개의 치료군으로 무작위로 배정하였다.

군	마우스 수	화합물	용량 (mg/kg)	스케줄
1	8	30% 캡티솔 0.9%NS	0	Qd* (월-금), PO**
2	8	화합물 1	75	Qd* (월-금), PO**
3	8	CTX	50	Day-0, iv
4	8	화합물 1 +CTX	75 50	Qd* (월-금), PO** Day-0, iv

\*Qd = 1 일 1 회 투여, \*\*PO = 경구 위관영양법 투여, \*\*\*BID, 1 일 2 회

[0351] 화합물 1을 다음과 같이 제형화하고 투여하였다: 화합물 1(7.5mg/ml)을 2몰당량의 HCl과 균형이 맞춰진 2몰당량의 NaOH와 30% 캡티솔 중에 용해시키고, 월요일에서 금요일까지 매일 75mg/kg을 경구 위관영양법을 통해 투여하였다. 5mg/ml의 사이클로포스파미드("CTX")를 0.9% NS 중에 용해시키고, 0일에 50mg/kg을 동물에게 정맥내 투여하였다(꼬리 정맥 주사). 조합군에 화합물 1과 CTX 둘 모두를 동일한 투여 스케줄을 이용하여 투여하였다. 대조군에는 조합군에 대한 패러다임과 동일한 투여 패러다임을 이용하여 비히클(30% 캡티솔) 및 0.9% NS를 투여하였다.

[0352] 각각의 동물 연구 동안, 종양을 캘리퍼로 측정하고, 종양 크기를 상기 언급된 식을 이용하여 측정하고, 퍼센트로 종양 크기 변화를 계산하였다. 마우스의 체중을 저울로 일주일에 2회 측정하였다. a) 연구 설계에 나타난 소정 기일; 또는 b) 건강 문제의 개시 중 어느 것이 먼저 발생할 때까지 연구를 계속하였다. 또한, 2500mm<sup>3</sup>를 초과하는 종양 부하 및/또는 출발 체중의 ≥20%의 감소의 종양-관련 파라미터를 안락사 규정의 근거로 하였다. 종양 크기 변화의 측정에 더하여, 마지막 종양 측정치를 이중이식 종양 평가를 위해 국립 암 연구소(NCI)에 의해 개발된 표준 측정기준, 종양 중량 변화율(T/C 값)을 생성시키는데 사용하였다. T/C 값을 다음 식을 이용하여 계산하였다:  $\Delta T$ 가 > 0인 경우, % T/C =  $100 \times \Delta T / \Delta C$ . 그러나, 종양 퇴축이 발생하는 경우, 다음 식을 이용하였다:  $\Delta T$ 가 < 0인 경우, % T/T<sub>0</sub> =  $100 \times \Delta T / T_0$ .

[0353] 처리 기간은 2주였다. 종양 크기 및 체중을 연구 마지막 날에 다시 측정하였다.

[0354] 상기 연구의 결과는 대조군과 치료군에 대한 처리 시간의 함수로서 종양 성장을 나타내는 도 17에 기재되어 있다. 단일 작용제로서 화합물 1 및 사이클로포스파미드는 이러한 방식에서 유사한 활성을 나타냈다. 화합물 1과 사이클로포스파미드의 조합은 이 둘 중 하나의 작용제 단독보다 실질적으로 더 큰 효능을 나타냈다.

#### [0355] 실시예 22. MM1S 이중이식 모델에서 레날리도마이드와 조합된 화합물 1

[0356] 4주령된 암컷 스킨드/베이지 마우스를 통제된 기후 하에서 환기된 마이크로-아이솔레이터 케이지(INNOVAGE® IVC, Innovive Inc.(San Diego, CA))에 수용시키고, 멸균 고지방식 사료(Probiab-RMH 2000)를 자유식으로 공급하고, 멸균수를 제공하였다. 스킨드/베이지 마우스를 위한 모든 수용체 및 공급물은 사용 전에 오토클레이브에 의해 멸균하였다. 마우스를 숙달된 동물 기관 직원 및 조사관에 의해 주말/휴일을 포함하여 매일 검사하였다. 모든 동물 절차는 생물안전작업대(주사용) 또는 층류 후드(출산 및 비외과 절차용) 내에서 멸균 조건하에 수행하였다.

[0358] 저온보존된 MM1S 인간 MM 세포를 37℃의 워터 배스에서 해동시키고, 5% CO<sub>2</sub>의 조직 배양 인큐베이터에서 10% 소 태아혈청(FBS)이 더해진 RPMI 배지 중에 배양하였다. 세포를 마이코플라스마(PCR에 의한) 및/또는 바이러스 (MAP 시험에 의한, Mouse Antibody Production)에 의한 오염물을 배제하도록 의도된 오염물 및 설치류 병원체 검사를 위한 외부 벤더로 보냈다. 배양 중의 세포가 이식에 충분한 경우, 세포를 혈청 비함유 헥스 발란스드 염 용액(HBSS)으로 세척하였다. 마지막으로, 세포를 이식을 위해 HBSS 중에 희석하였다. 90% 초과와 생존도 (트리판 블루 제외에 의함)의 단일-세포 현탁액만을 주사에 사용하였고, 0.2ml의 HBSS 중에 현탁된 동물 당 2천 만 개의 세포를 최소 7일의 순응 기간 후에 혈관을 피하는 것을 주의하면서 26G 피하 주사침을 지니는 1CC 주사 기를 이용하여 마우스의 오른쪽 뒷구리 부위에 피하로 주입하였다. 성공적인 이식은 피부 아래에 둥근 증가 된 덩어리의 형성에 의해 나타났다. 이식된 마우스를 전반적인 건강 및 종양 발달에 대하여 매일 모니터링하였다.

[0359] 이식한 지 약 2주 후에 종양이 검출가능하였다. 캘리퍼로 종양 크기를 측정하였다. 하기 식을 이용하여 종양 부피를 계산하였다:

[0360] 종양 부피 = (길이 × 폭<sup>2</sup>)/2

[0361] 종양을 이식한 지 3주 후, 종양은 평균 192 ± 32 mm<sup>3</sup>에 이르렀다. 허용가능한 종양 크기 및 모양을 지니는 동 물을 분류 소프트웨어를 이용하여 7마리의 동물들의 6개 군 각각 1개의 비히클 대조군 및 6개의 치료군으로 무 작위로 배정하였다.

군	마우스 수	화합물	용량 ( mg/kg)	스케줄
1	7	30% 캡티솔 MCT	0	Qd* (월-금), PO** Qd* (월-금), PO**
2	7	화합물 1	75	Qd* (월-금), PO**
3	7	레날리도마이드	12.5	Qd* (월-금), PO**
4	7	레날리도마이드	12.5	Qd* (월-금), PO**
5	7	화합물 1 +레날리도마이드	75 12.5	Qd* (월-금), PO** Qd* (월-금), PO**
6	7	화합물 1 +레날리도마이드	75 25	Qd* (월-금), PO** Qd* (월-금), PO**

[0362]

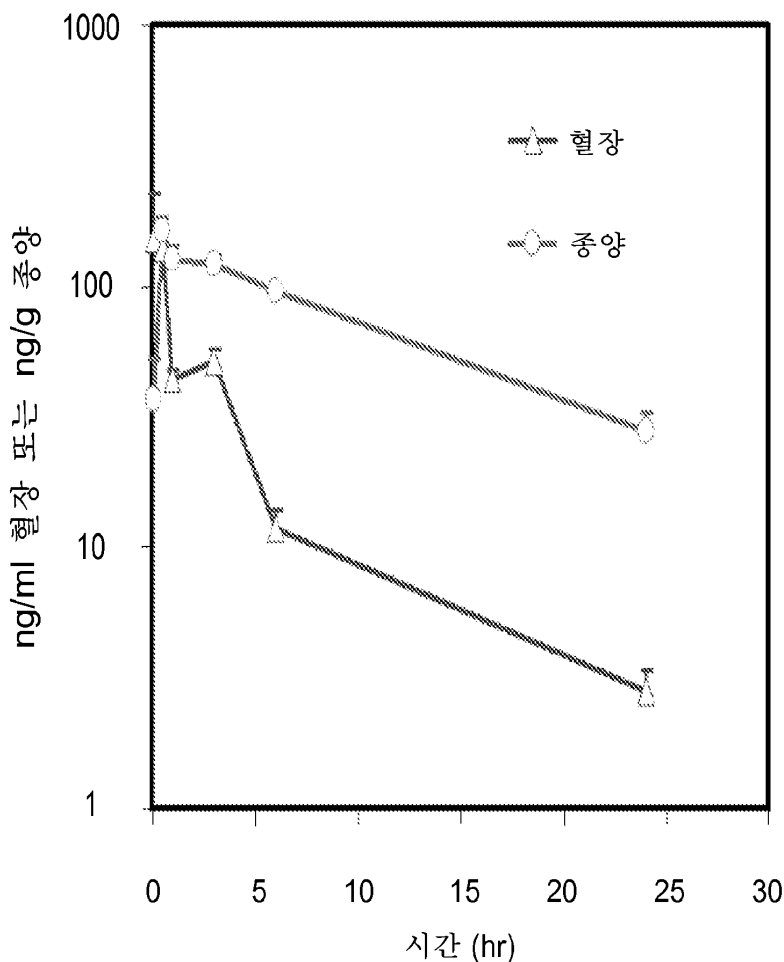
[0363] 화합물 1을 다음과 같이 제형화하고 투여하였다: 화합물 1(7.5mg/ml)을 2몰당량의 HCl과 균형이 맞춰진 2몰당량 의 NaOH와 30% 캡티솔 중에 용해시키고, 월요일에서 금요일까지 매일 75mg/kg을 경구 위관영양법을 통해 투여하 였다. 레날리도마이드(Selleck, 2.5mg/ml)를 MCT(0.5% 메틸 셀룰로오스 및 0.2% Tween80) 중에서 제형화하고, 12.5mg/kg 또는 25mg/kg을 투여하였다. 2개의 조합군에 1회 용량 수준의 레날리도마이드(12.5 또는 25mg/kg)가 더해진 75mg/kg의 화합물 1을 투여하였다. 대조군에는 조합군에 대한 패러다임과 동일한 패러다임을 이용하여 비히클(30% 캡티솔) 및 MCT를 투여하였다.

[0364] 각각의 동물 연구 동안, 종양을 캘리퍼로 측정하고, 종양 크기를 상기 언급된 식을 이용하여 측정하고, 퍼센트 로 종양 크기 변화를 계산하였다. 마우스의 체중을 저울로 일주일에 2회 측정하였다. a) 연구 설계에 나타난 소정 기일; 또는 b) 건강 문제의 개시 중 어느 것이 먼저 발생할 때까지 연구를 계속하였다. 또한, (1) 2500mm<sup>3</sup>를 초과하는 종양 부하 및/또는 (2) 출발 체중의 ≥20%의 감소의 종양-관련 파라미터를 안락사 규정의 근거로 하였다. 종양 크기 변화의 측정에 더하여, 마지막 종양 측정치를 이중이식 종양 평가를 위해 국립 암 연구소(NCI)에 의해 개발된 표준 측정기준, 종양 중량 변화율(T/C 값)을 생성시키는데 사용하였다. T/C 값을 다음 식을 이용하여 계산하였다: ΔT가 > 0인 경우, % T/C = 100 × ΔT/ΔC. 그러나, 종양 퇴축이 발생하는 경우, 다음 식을 이용하였다: ΔT가 < 0인 경우, % T/T<sub>0</sub> = 100 × ΔT/T<sub>0</sub>.

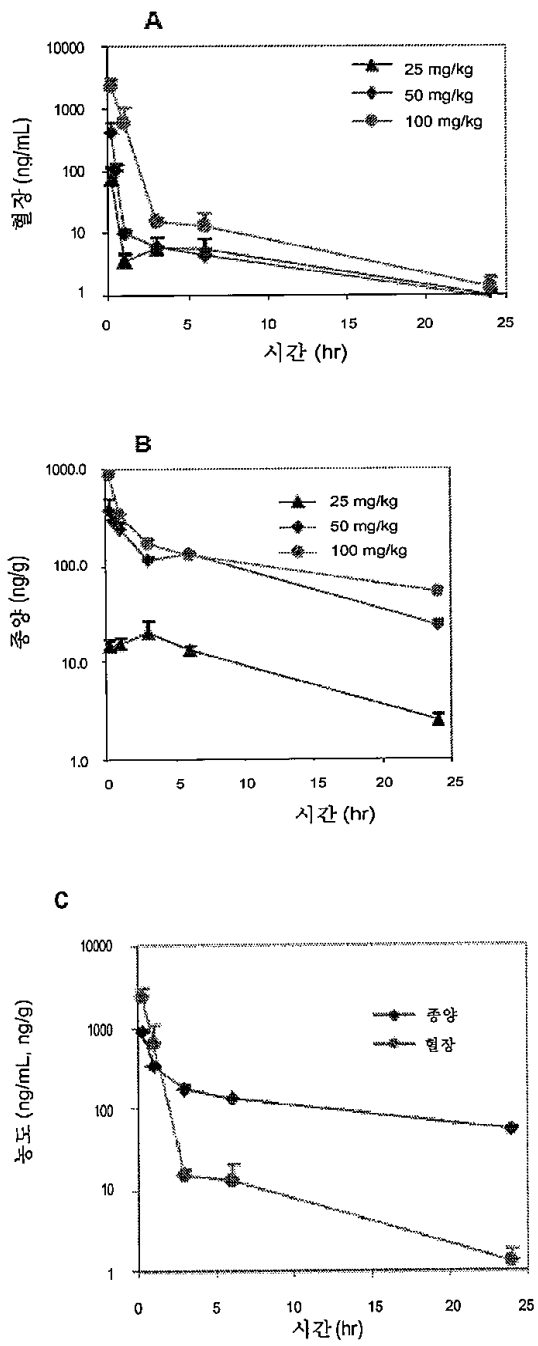
- [0365] 처리 기간은 17일이었다. 종양 크기 및 체중을 연구 마지막 날에 다시 측정하였다.
- [0366] 상기 연구의 결과는 처리 시간의 함수로서 종양 성장을 보여주는 도 18에 나타나 있다. 결과는 75mg/Kg P0의 화합물 1이 단일 작용제로서 12.5 또는 25mg/Kg P0의 레날리도마이드보다 더욱 효과적이라는 것을 나타낸다. 결과는 또한 화합물 1과 레날리도마이드의 조합이 이 둘 중 하나의 화합물 단독보다 현저하게 더욱 효과적이라는 것을 나타낸다.
- [0367] 본원에 언급된 특허 및 과학 문헌은 당업자가 이용가능한 지식을 확립한다. 본원에 인용된 모든 미국 특허 및 공개되거나 공개되지 않은 미국 특허 출원은 참조로서 포함된다. 본원에 인용된 모든 공개된 외국 특허 및 특허 출원은 참조로서 본원에 포함된다. 본원에 인용된 모든 다른 공개된 참고문헌, 문헌, 원고 및 과학 문헌은 참조로서 본원에 포함된다.
- [0368] 본 발명은 특허 이의 바람직한 구체예를 참조로 하여 제시되고 기재되었으나, 형태 및 세부사항에서의 다양한 변화가 첨부된 청구항에 의해 포함되는 본 발명의 범위를 벗어남이 없이 이루어질 수 있음이 이해될 것이다.

## 도면

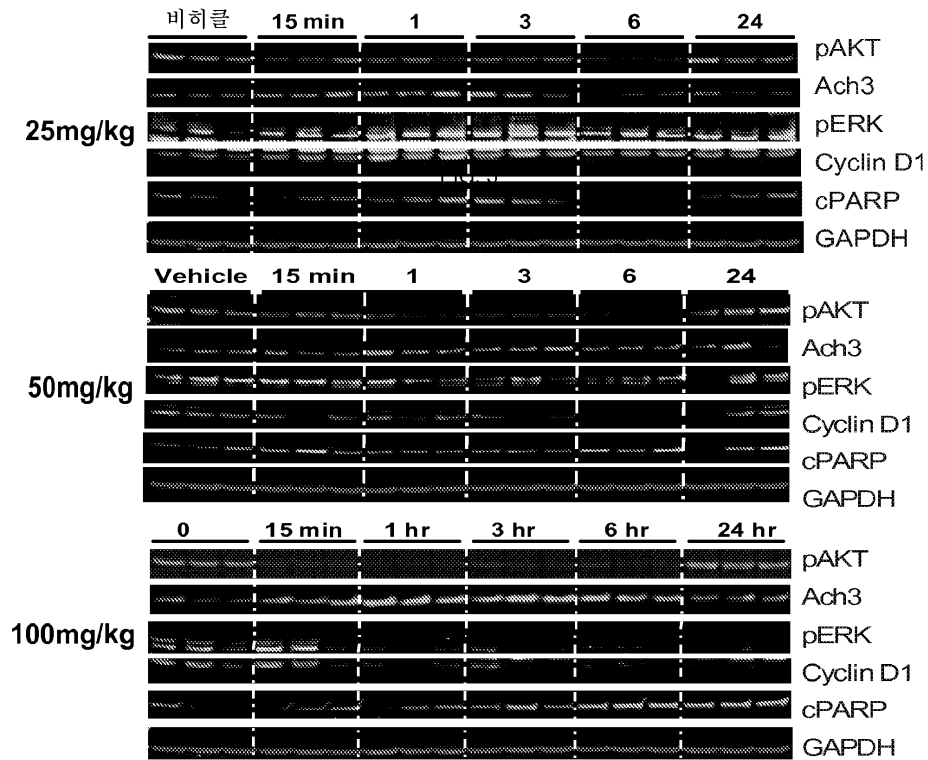
### 도면1



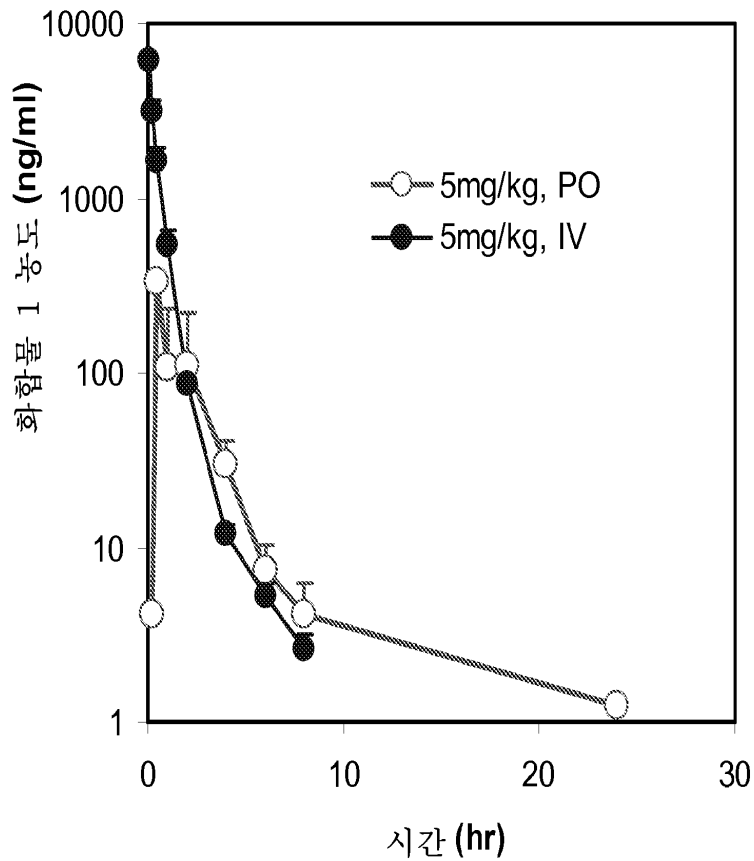
도면2



도면3

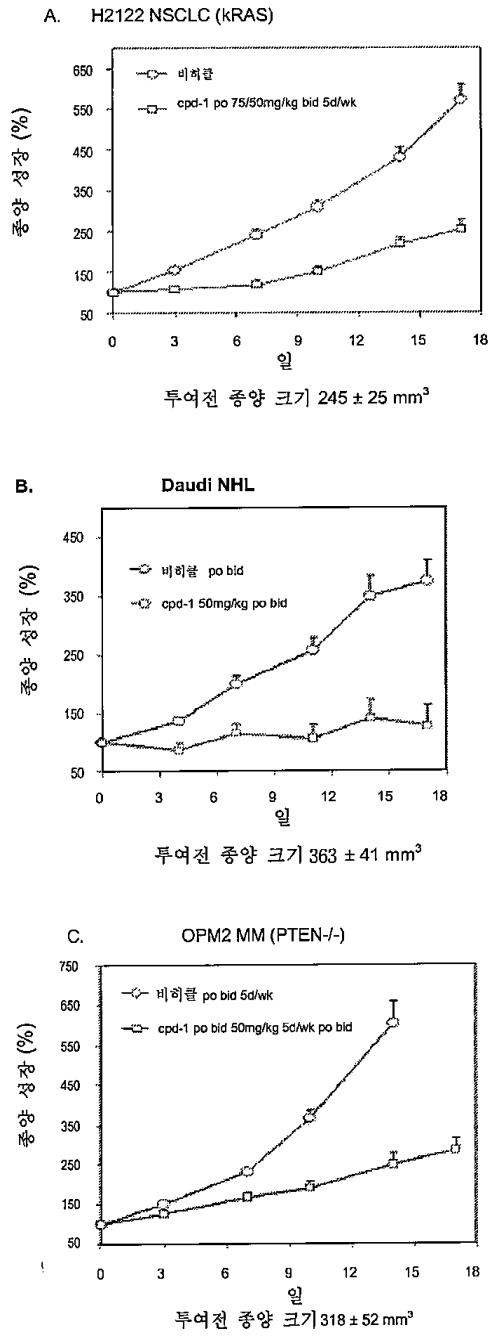


도면4

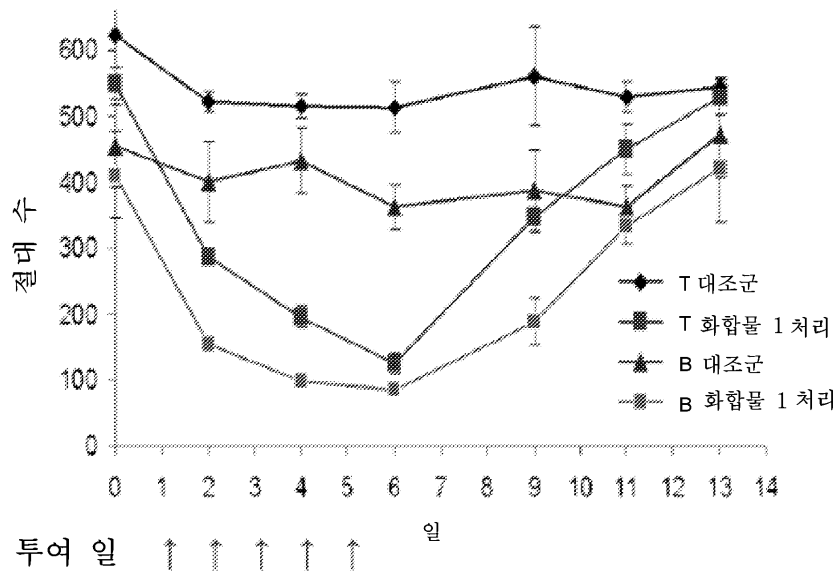




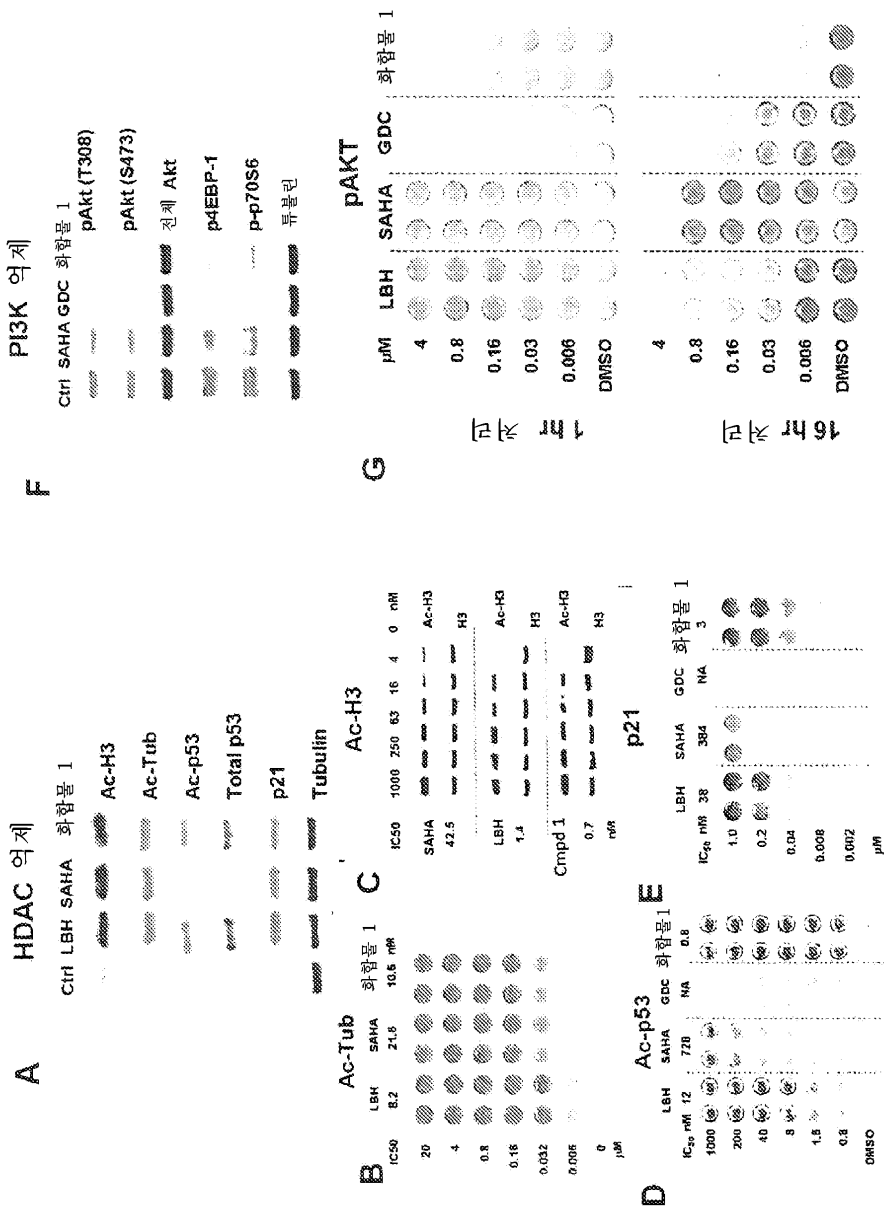
도면5



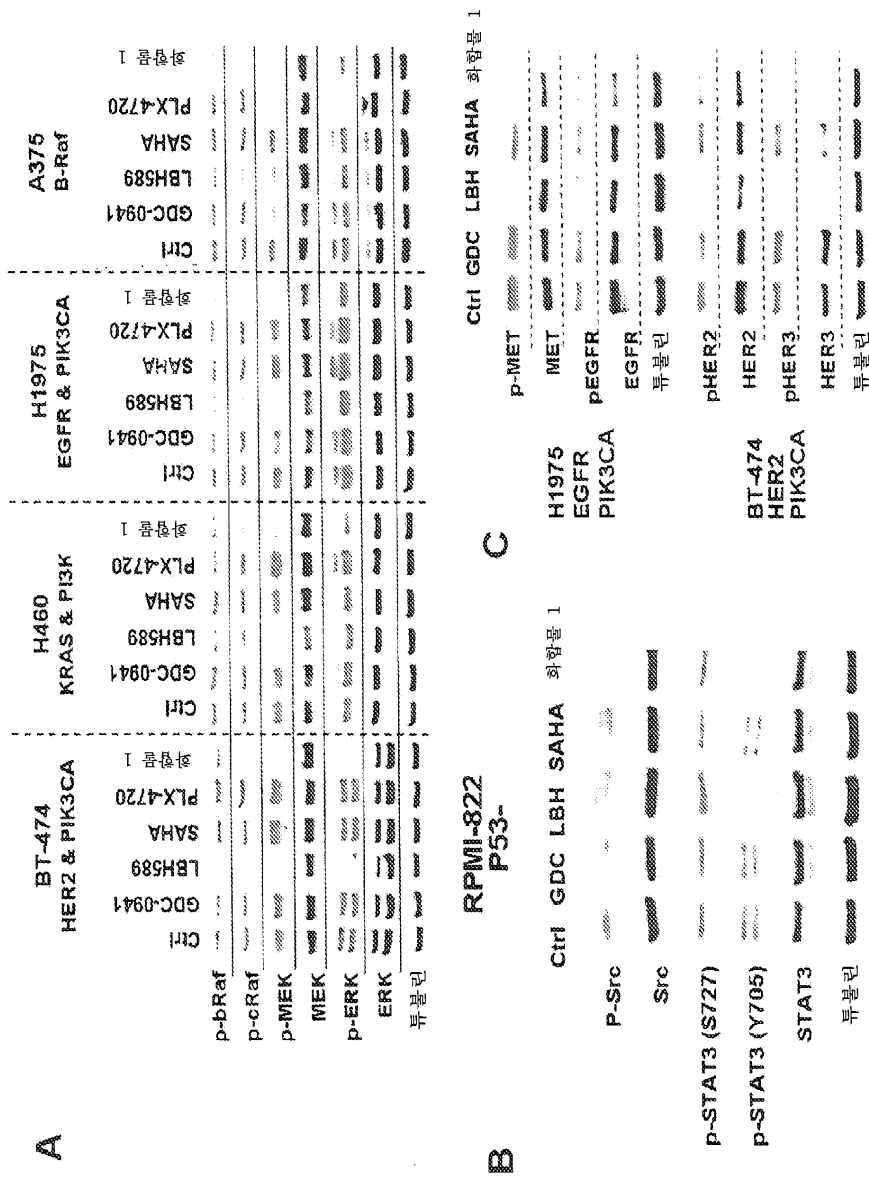
도면6



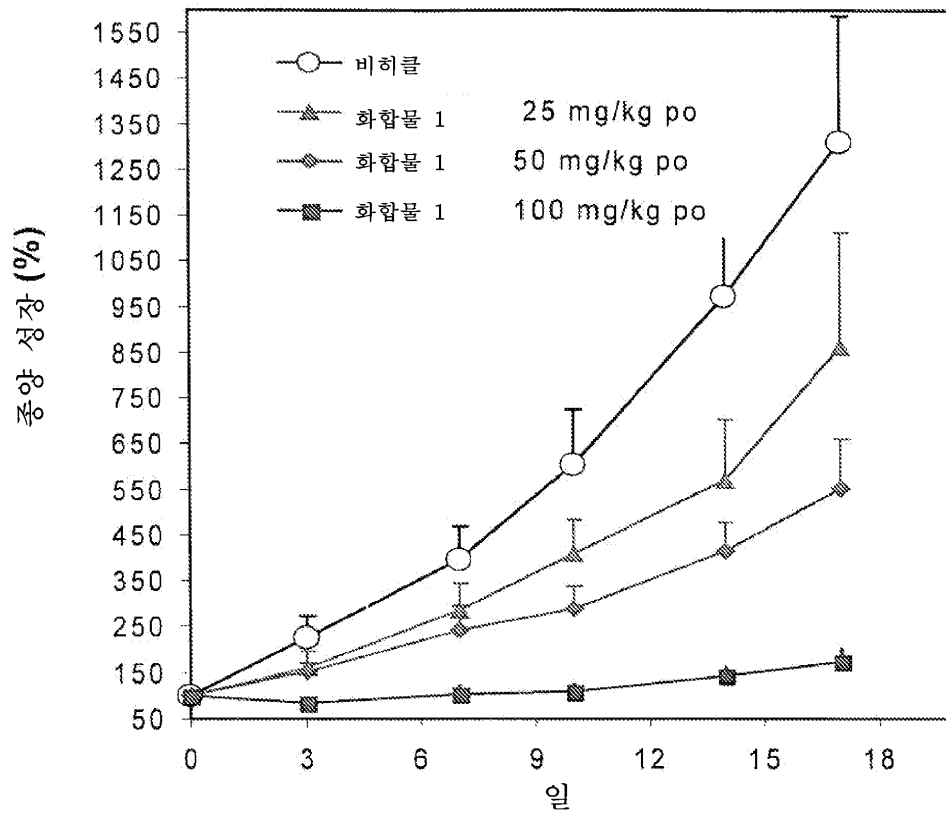
도면7



면도8

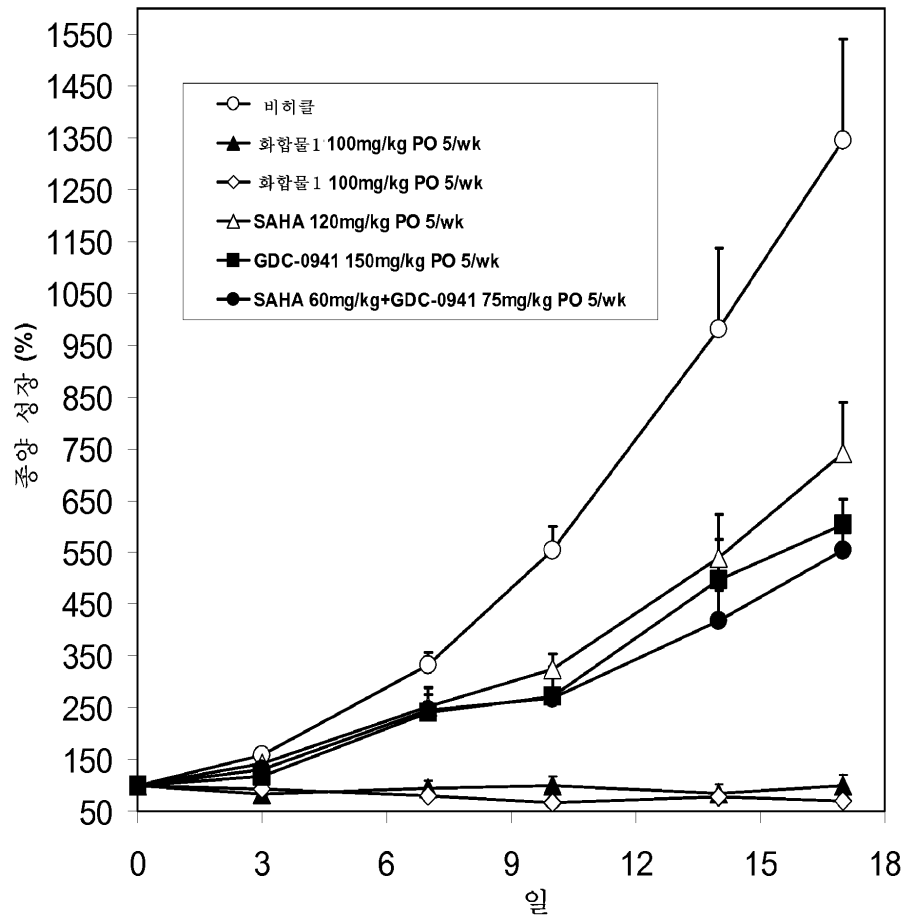


도면9

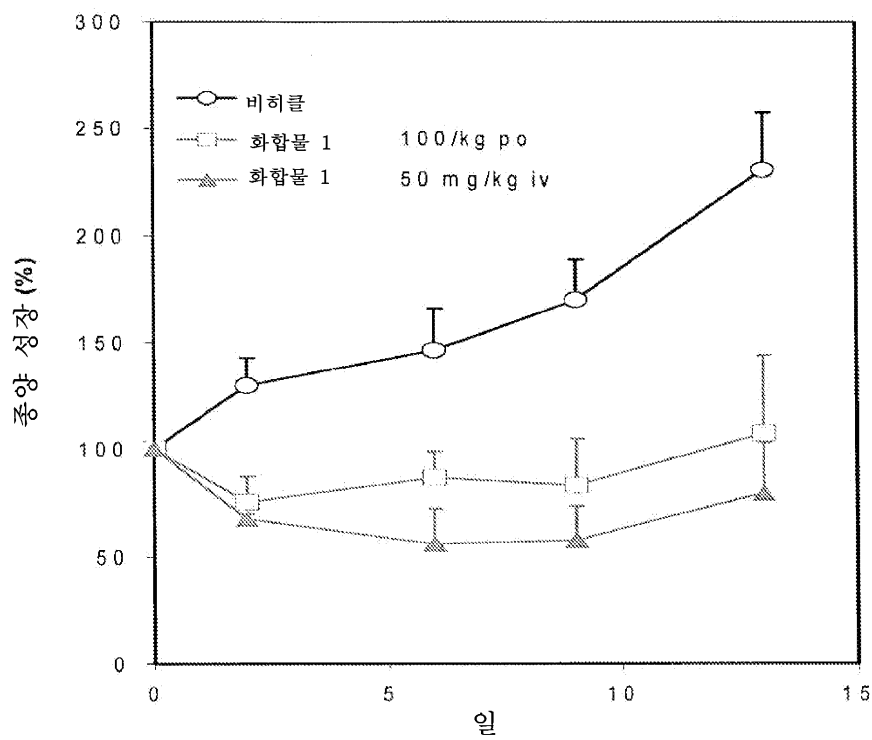




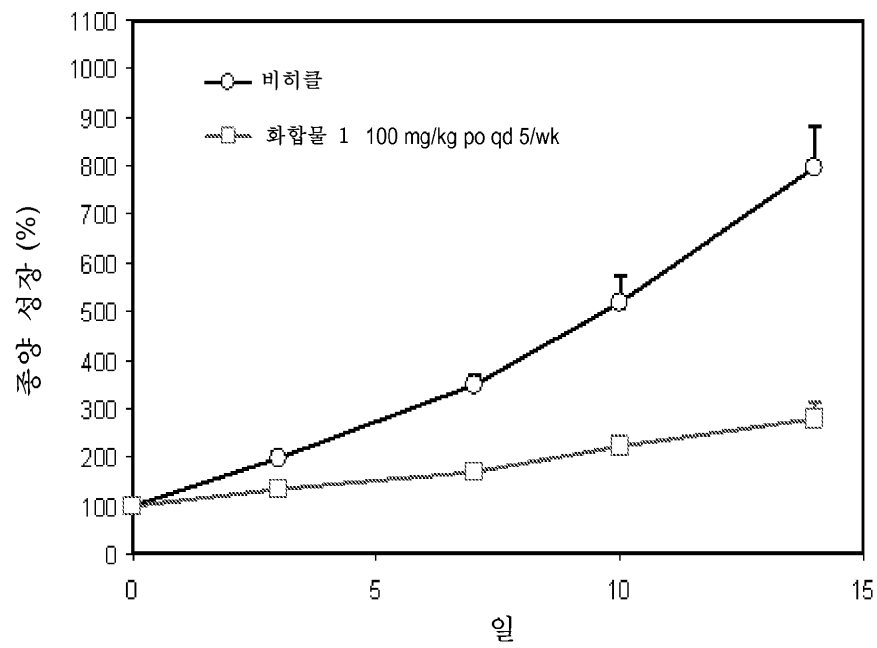
도면10



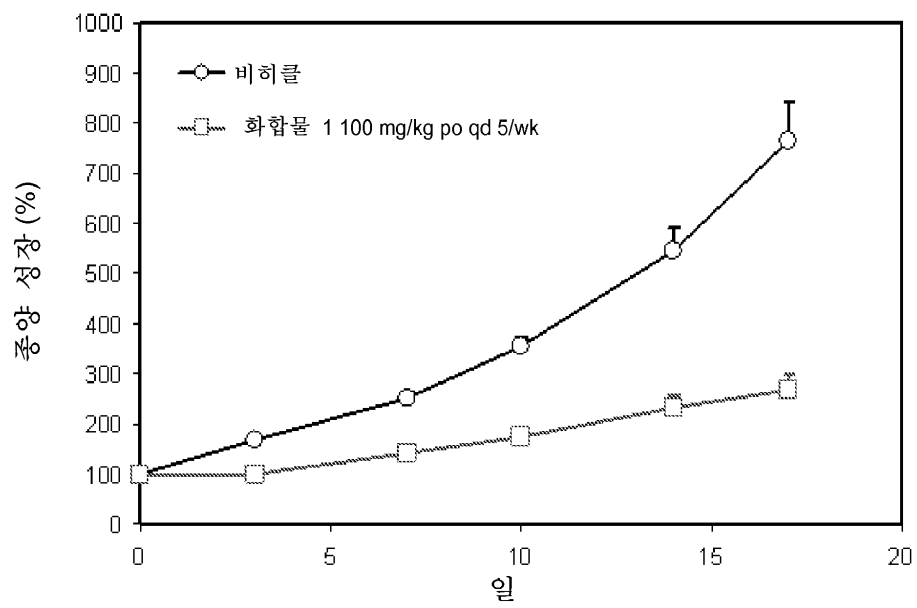
도면11



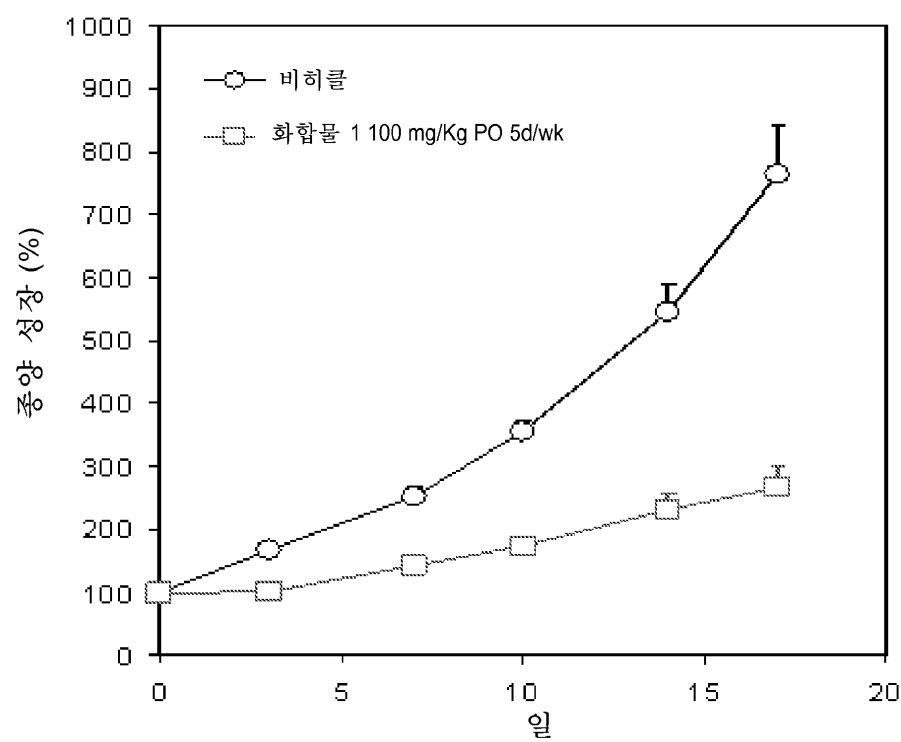
도면12



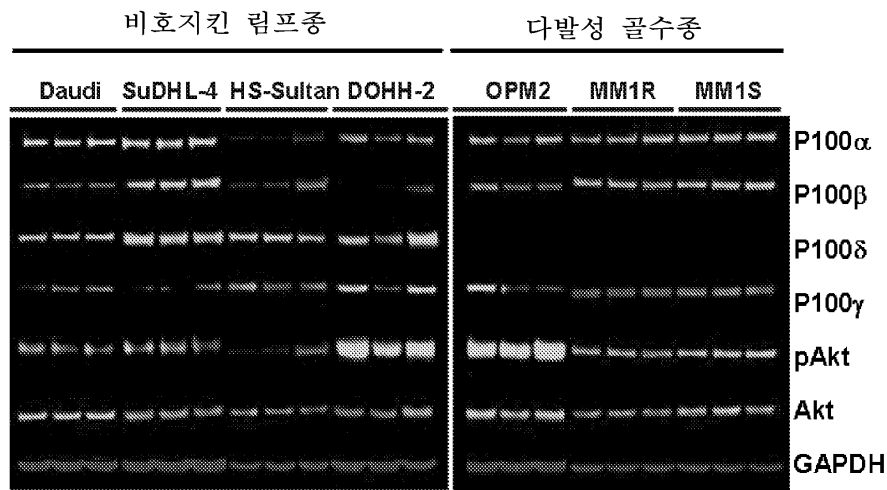
도면13



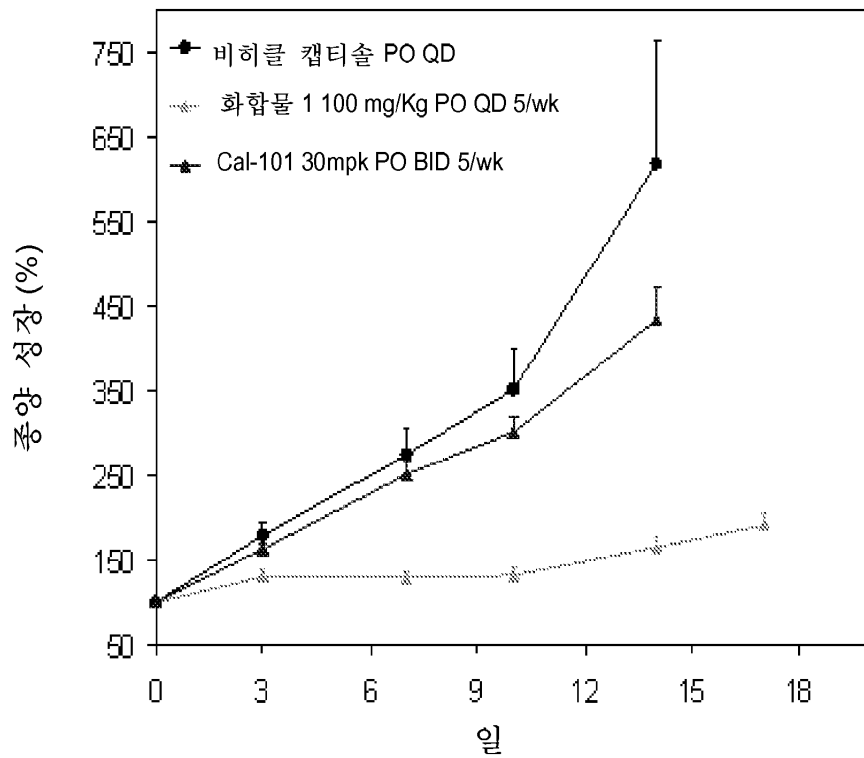
도면14



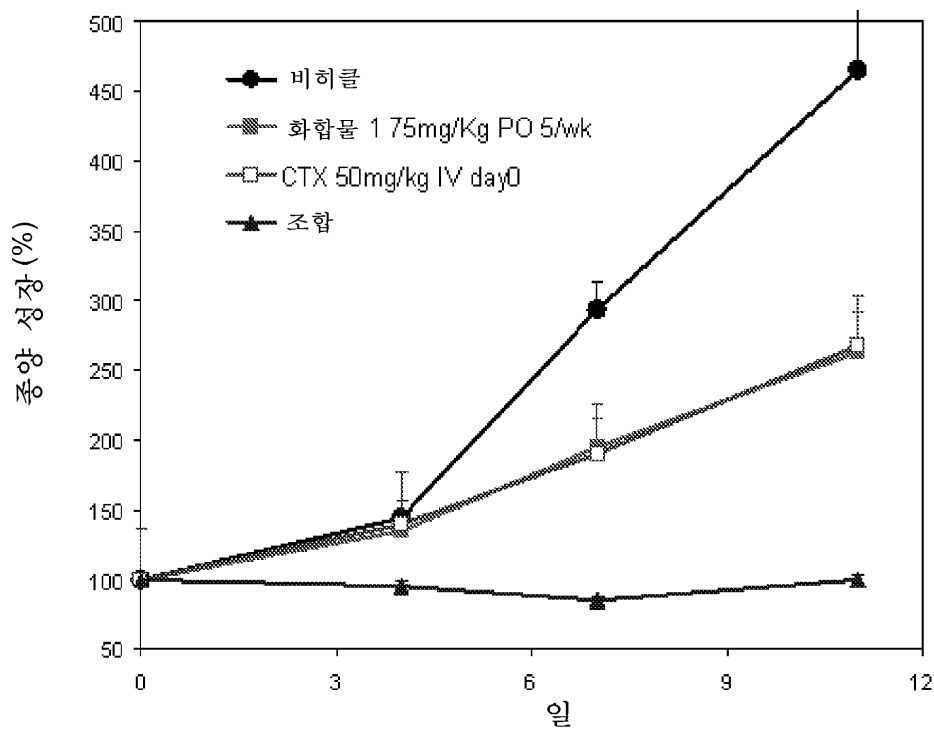
도면15



도면16



도면17



도면18

