(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년07월21일
(11) 등록번호 10-2558501
(24) 등록일자 2023년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/497 (2006.01) *A61K 31/4965* (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/497 (2013.01)
A61K 31/4965 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7037451(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년01월11일
심사청구일자 2022년11월24일
(85) 번역문제출일자 2022년10월26일
(65) 공개번호 10-2023-0002511
(43) 공개일자 2023년01월05일
(62) 원출원 특허 10-2018-7022169
원출원일자(국제) 2017년01월11일
심사청구일자 2020년01월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/012939
(87) 국제공개번호 WO 2017/123588
국제공개일자 2017년07월20일
(30) 우선권주장
62/277,262 2016년01월11일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
J. Med. Chem. 2011, 54, 2320-2330
US08999632 B

(73) 특허권자
메리맥 파마슈티컬즈, 인크.
미국 02142 매사추세츠주 캠브릿지 원 브로드웨이 14쓰 플로어
(72) 발명자
드루몬드 다릴 씨.
미국, 매사추세츠 01773, 링컨, 1 브룩스 로드
젱 볼린
미국, 매사추세츠 01810, 앤도버, 7 오디세이 웨이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

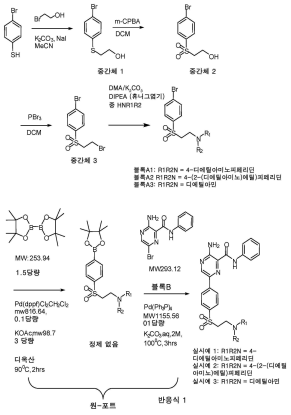
전체 청구항 수 : 총 18 항 심사관 : 박수진

(54) 발명의 명칭 **혈관확장성 운동실조증 및 Rad3-관련 단백질(ATR)의 억제**

(57) 요 약

ATR 단백질 키나제를 억제하는 신규 화합물은 본원에 기재된 화학식 I의 화합물, 및 ATR 단백질 키나제 억제제 화합물을 포함하는 리포좀 제형을 포함한다. 상기 조성물은 암 치료를 위해 유용하다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 9/1271 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(72) 발명자
키르포틴 드미트리 비.
미국, 매사추세츠 02151, 리비어, 아파트먼트 1509, 382 오션 애비뉴
팁파라주 수레쉬 케이.
미국, 매사추세츠 02474, 알링턴, 48 에핑 스트리트
코쉬캐리에브 알렉산더
미국, 매사추세츠 02459, 뉴턴, 15 클락 스트리트
알칸 오잔
미국, 매사추세츠 02139, 캠브리지, 6 살렘 스트리트

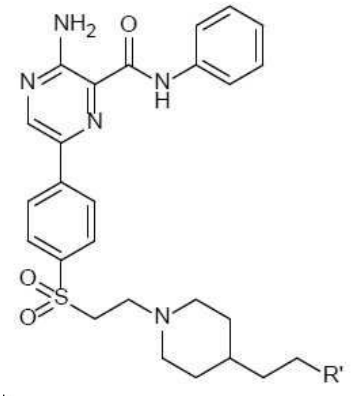
(30) 우선권주장
62/420,258 2016년11월10일 미국(US)
62/444,172 2017년01월09일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

화학식 Ia의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 암의 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물:

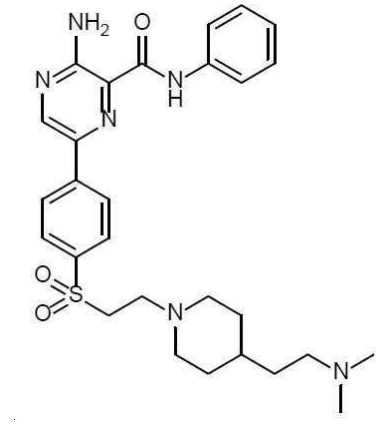


Ia,

식 중, R'는 NR^aR^b이고, 여기서 R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 C_1-C_4 알킬이다.

청구항 2

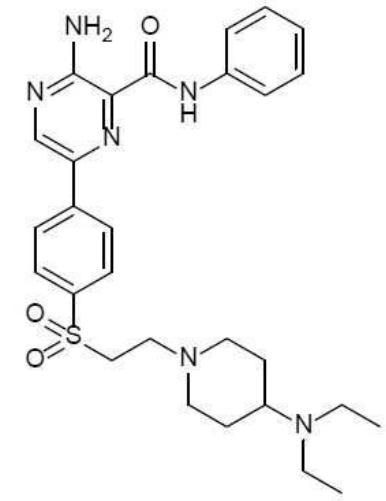
화합물 5의 화학식의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 암의 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물:



화합물 5.

청구항 3

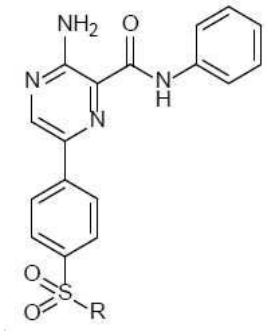
화합물 6의 화학식의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 암의 치료에 사용하기 위한 약제학적 조성물:



화합물 6.

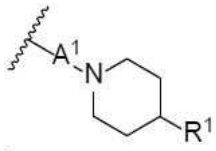
청구항 4

리포좀에 캡슐화된, 화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 암의 치료에 사용하기 위한 리포좀 조성물:



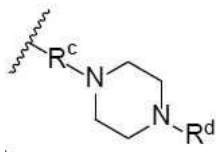
I,

식 중, R은

i)  (여기서, A^1은 부재이거나 C_1-C_4 알킬이고, R^1은 C_1-C_4 알킬아미노임);

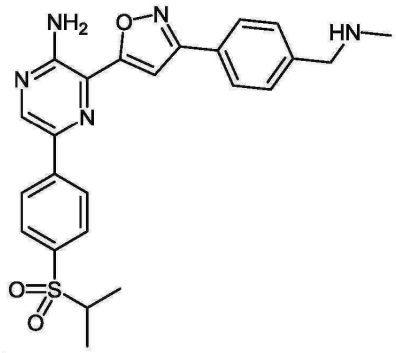
ii) -N(H)(C_1-C_4 알킬)-NR^aR^b (여기서, R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 C_1-C_4 알킬임);

iii) -(G)-NR^aR^b (여기서, R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 C_1-C_4 알킬이고; G는 C_1-C_4 알킬이고, 여기서, G는 임의로 C_1-C_4 알킬로 치환될 수 있음); 또는

iv)  (여기서, R^c 및 R^d는 각각 독립적으로 C_1-C_4 알킬임)이다.

청구항 5

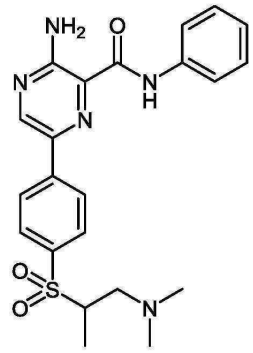
리포좀에 캡슐화된, 화합물 A 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 암의 치료에 사용하기 위한 리포좀 조성물:



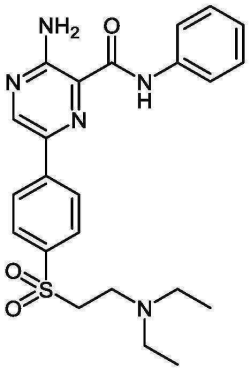
화합물 A.

청구항 6

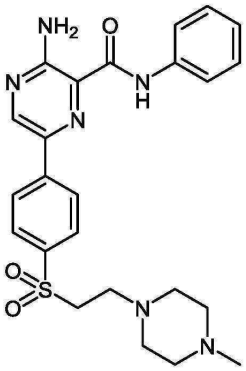
제4항에 있어서, 화합물이 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 리포좀 조성물:



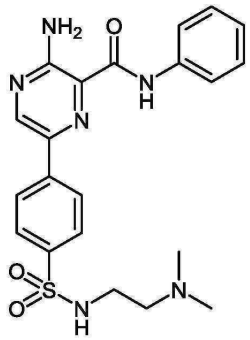
화합물 1 ,



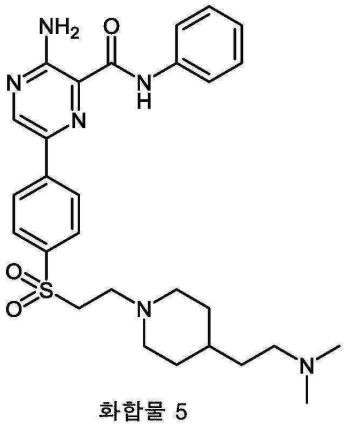
화합물 2 ,



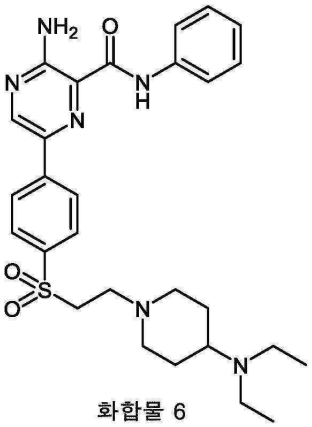
화합물 3 ,



화합물 4 ,



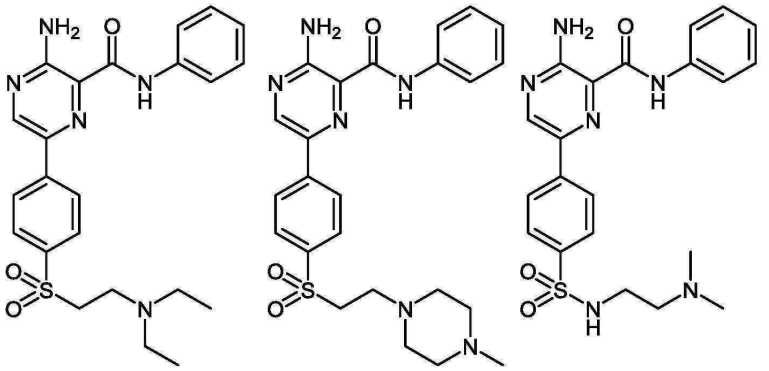
화합물 5 , 및



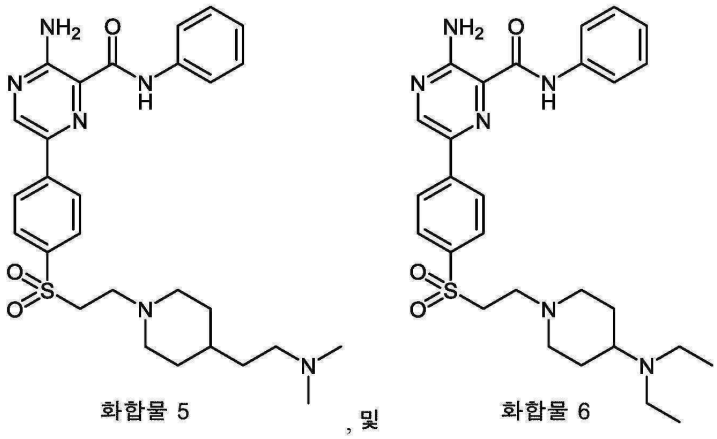
화합물 6 .

청구항 7

제4항에 있어서, 화합물이 하기로 이루어진 군으로부터 선택되는, 리포좀 조성물:



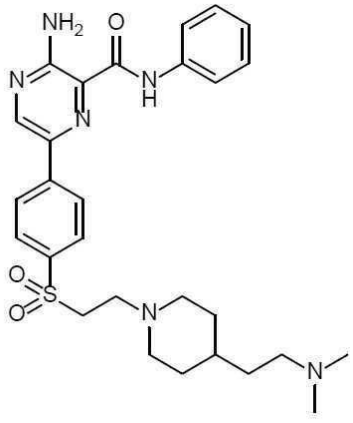
화합물 2 , 화합물 3 , 화합물 4 ,



화합물 5 , 및 화합물 6 .

청구항 8

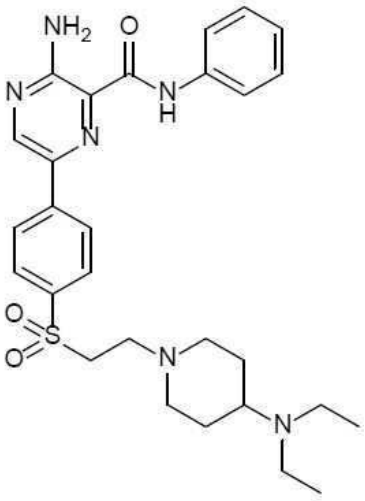
제7항에 있어서, 화합물 5 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 리포좀 조성물:



화합물 5.

청구항 9

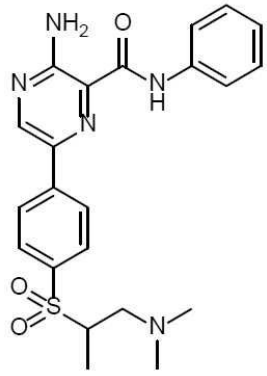
제7항에 있어서, 화합물 6 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 리포좀 조성물:



화합물 6.

청구항 10

제4항에 있어서, 화합물 1 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는, 리포좀 조성물:



화합물 1.

청구항 11

제4항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 리포좀이 콜레스테롤을 포함하는, 리포좀 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 리포좀이 PEG(2000)-디스테아로일글리세롤 (PEG-DSG)을 추가로 포함하는, 리포좀 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 리포좀이 콜레스테롤 및 PEG-DSG를 2:0.15의 몰비로 포함하는, 리포좀 조성물.

청구항 14

제4항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 리포좀이 하나 이상의 인지질을 포함하는, 리포좀 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 인지질이 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC)인, 리포좀 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서, 인지질이 수소화된 대두 포스파티딜콜린 (HSPC)인, 리포좀 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 자궁경부암, 폐암, 유방암, 결장직장암, 위암 또는 자궁내막암인, 약제학적 조성물.

청구항 18

제4항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 자궁경부암, 폐암, 유방암, 결장직장암, 위암 또는 자궁내막암인, 리포좀 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 하기 미국 출원의 우선권을 주장한다: 가특허 출원번호 제62/277,262호, 2016년 1월 11일자로 출원됨, 미국 가특허 출원번호 제62/420,258호, 2016년 11월 10일자로 출원됨, 미국 가특허 출원 번호 제62/444,172호, 2017년 1월 9일자로 출원됨, 상기 우선권 각각은 이들의 전문이 모든 목적을 위해 본원에 참조로 인용된다.

[0003] **기술 분야**

[0004] 본원의 개시내용은 암의 치료를 위해 유용한 방법 및 화합물을 포함하는, 혈관확장성 운동실조증 및 Rad3-관련 단백질 (ATR)을 억제하는 화합물 및 관련 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 혈관확장성 운동실조증 및 Rad3-관련 (ATR) 키나제는 세포 DNA 손상 복구 프로세스 및 세포 주기 신호전달에 관여하는 것으로 사료되는 세린/트레오닌 단백질 키나제이다. ATR 키나제는 ATM ("혈관확장성 운동실조증 돌연변이된") 키나제, 및 다른 단백질과 작용하여 DNA 손상에 대한 세포의 반응을 조절하고 이는 통상적으로 DNA 손상 반응 ("DDR")으로서 언급된다. DDR은 DNA 복구를 자극하고, 생존을 촉진시키고, 회복을 위한 시간을 제공하는 세포 주기 체크포인트에 의한 세포 주기 진행을 정지시키는 것으로 사료된다. DDR 없이, 세포는 DNA 복구에 매우 많이 민감성이고 DNA 복제와 같은 내인성 세포 프로세스 또는 암 치료요법에 통상적으로 사용되는 외인성 DNA 손상제에 의해 유도된 DNA 병변으로부터 쉽게 죽는다.

[0006] ATR 기능의 붕괴 (예를 들어, 유전자 결실에 의한)는 DNA 손상 제제의 부재 및 존재 둘 다에서 암 세포 사멸을 촉진시키는 것으로 나타났다. ATR의 돌연변이는 위 및 자궁내막 암과 관련되어 있고, 이온화 방사선에 증가된 민감성 및 폐지된 세포 주기 체크포인트를 유도한다. ATR은 체 세포의 생존력에 필수적이고, ATR의 결실은 손상 체크포인트 반응의 손실 및 세포사를 유도하는 것으로 나타났다. 다음 문헌을 참조한다: Cortez 등, Science 294:1713-1716 (2001). ATR은 또한 연약한 부위의 안정성에 필수적이고 세켈 증후군 환자에서 낮은 ATR 발현은 복제 스트레스 후 증가된 염색체 파손을 유도한다. 다음 문헌을 참조한다: Casper 등, Am.J.Hum.Genet 75:654-660 (2004). 복제 단백질 A (RPA) 복합체는 ATR 및 이의 상호작용 단백질 ATRIP를 DNA 손상 부위로 결집시키고 ATR 자체는 CHK1 신호전달 캐스케이드의 활성화를 매개한다. 다음 문헌을 참조한다: Zou 등, Science 300:1542-1548 (2003). 이의 관련된 체크포인트 키나제 ATM과 같은 ATR은 DNA-손상된 세포에서 체크포인트 신호전달에 중요한 캐스케이드에서 조기 RAD17을 인산화시킨다. 다음 문헌을 참조한다" Bao 등, Nature 411:969-974 (2001). ATR은 특히, 불완전 DNA 복제를 감지하고 유사분열 재난을 예방하기 위해 조기 포유동물 배아에 특히 필수적인 것으로 사료된다.

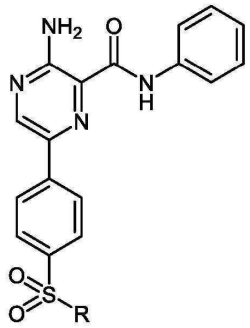
[0007] 그러나, DNA-손상 화학치료요법제 및 이온화 방사선(IR) 치료요법은 암 환자에게 초기 치료학적 이득을 제공하지만 기존의 치료요법은 임상적 효능을 상실하였다(예를 들어, 종양 세포 DNA 복구 반응으로 인해). ATR 억제제 및 DNA 손상제의 *생체내* 효과는 정상 세포에 상대적으로 암의 선택적 치료, 특히 G1 체크포인트 제어 (이는 생존을 위해 ATR에 보다 의존할 수 있다)가 결핍된 종양 세포를 치료하는데 일부 전망을 보여주었다.

[0008] 단일 제제로서 또는 조합 치료요법 (예를 들어, 화학치료요법 및/또는 방사선 치료요법과 조합된)의 일부로서, 암의 치료를 위해 ATR 억제제를 전달하기 위한 강력하고 선택적 치료요법을 개발할 필요성이 있다.

발명의 내용

[0009] 출원인은 혈관확장성 운동실조증 및 Rad3-관련 (ATR) 키나제를 억제하고 암의 치료를 위해 유용한 신규 화합물, 및 목적하는 성질(예를 들어, 혈액 순환계에서 연장된 반감기 및 종양을 치료하는데 있어서 효능)을 갖는 ATR 단백질 키나제의 특정 억제제의 리포좀 제형을 발견하였다. 본 발명은 부분적으로 ATR 단백질 키나제 억제제 화합물의 특정 리포좀 제형의 연장된 혈장 반감기 및 증진된 항종양 효능뿐만 아니라 ATR 단백질 키나제를 억제하기 위한 특정 신규 화합물의 발견을 기초로 한다.

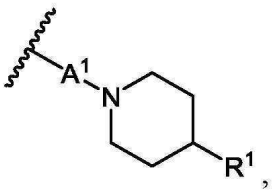
[0010] 제1 구현예에서, 화학식 I의 신규 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 혈관확장성 운동실조증 및 Rad3-관련 (ATR) 키나제를 억제하고 암의 치료에 유용하다:



(I),

[0011]

[0012] 여기서, R은 7.0 초과 (바람직하게 8.0 초과, 및 가장 바람직하게 적어도 약 9.5)의 pK_a을 갖는 아민을 포함하는 모이어티이다. 화학식 I의 화합물은 바람직하게 ATR의 목적하는 억제 및/또는 리포좀 형성 및 안정성 특징을 제공하도록 선택된 R에서 하나 이상의 3급 아민 모이어티를 포함한다. 일부 예에서, R은 제1 3급 치환된 질소를 포함하고, 바람직하게 제2 3급 치환된 질소를 포함하는 알킬아미노 모이어티로 치환된 헤테로사이클릭 모이어티이다. 특히, 화학식 I의 화합물은 R이 하기 화학식의 모이어티일 수 있는 것들을 포함한다:

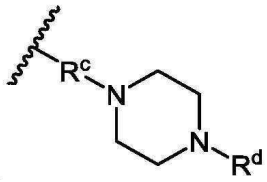


[0013]

[0014] 여기서, A^1은 부재이거나 알킬 (예를 들어,C_1-C_4 알킬 (바람직하게 $-(CH_2)_2-$)이고, R^1은 저급(예를 들어, C_1-C_4) 알킬아미노이다. 하나의 구현예에서, R^1은 (C_1-C_4 알킬)-NR^aR^b이고, 여기서, R^a 및 R^b은 각각 독립적으로 C_1-C_4 알킬이고, 예를 들어,R^1은 $-(CH_2)_2-N(CH_3)(CH_3)$이다. 또 다른 구현예에서, R^1은 NR^aR^b이고, 여기서, R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 C_1-C_4 알킬, 예를 들어, R^1은 $-N(CH_2CH_3)(CH_2CH_3)$이다.

[0015] 화학식 I의 또 다른 구현예에서, R은 $-N(H)(C_1$-C_4 알킬)-NR^aR^b이고, 여기서, R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 C_1-C_4 알킬이거나 R은 -(G)-NR^aR^b이고, 여기서, R^a 및 R^b은 각각 독립적으로 C_1-C_4 알킬이고, 여기서, G는 C_1-C_4 알킬이고, 여기서, G는 추가로 C_1-C_4 알킬로 치환될 수 있다.

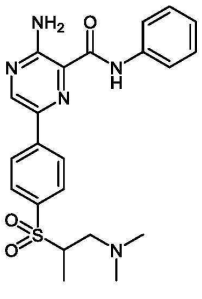
[0016] 화학식 I의 또 다른 구현예에서, R은 하기 화학식의 모이어티일 수 있다:



[0017]

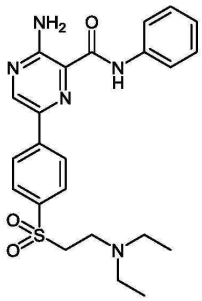
[0018] 여기서, R^c 및 R^d는 각각 독립적으로 C_1-C_4 알킬이다.

[0019] 바람직한 예는 화합물 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 화합물을 포함하는 리포좀을 포함한다.



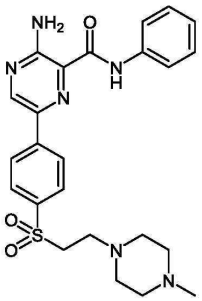
화합물 1

MW: 439.53



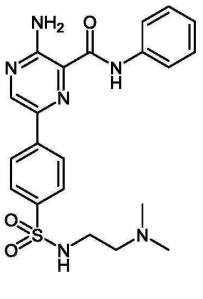
화합물 2

MW: 453.56



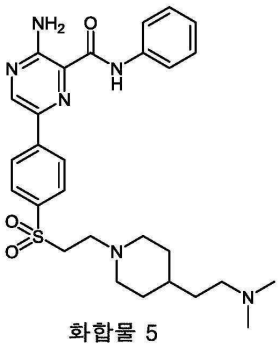
화합물 3

MW: 480.59



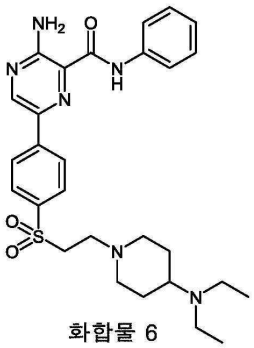
화합물 4

MW: 440.52



화합물 5

MW: 536.70



화합물 6

MW: 536.70

[0020]

[0021] 제2 구현예에서, ATR 억제제 화합물의 리포좀 제형은 하나 이상의 리포좀-형성 지질(예를 들어, 수소화된 대두 포스파티딜콜린 (HSPC)), 콜레스테롤 및 폴리머-접합된 지질(예를 들어, 메톡시-폴리(에틸렌 글리콜)-1,2-디스아로일-sn-글리세릴(PEG2000-DSG)로부터 형성된 단일라멜라 소포에서 다중음이온 (예를 들어, 다중음이온 당, 예를 들어, 슈크로스 옥타설페이트 또는 적합한 다중음이온화된 폴리올)으로 캡슐화된 화학식 I의 화합물 또는 다른 ATR 억제제 화합물(들) (예를 들어, 비교 화합물 A)을 포함할 수 있다. 리포좀-형성 지질은 바람직하게 하나 이상의 인지질을 포함하고, 인지질(들)과 콜레스테롤의 비율은 리포좀으로부터 화학식 I의 화합물의 충분히 감소된 양의 누출을 유지하면서 리포좀 막 강성의 목적하는 양을 제공하도록 선택된다. 폴리머-접합된 지질의 유형 및 양은 혈류에서 목적하는 수준의 단백질 결합, 리포좀 안정성 및 순환 시간을 제공하도록 선택될 수 있다. 일부 예에서, 리포좀 소포는 3:2 몰 비로 HSPC 및 콜레스테롤을 포함한다. 특히, 리포좀은 3:2:0.15 몰 비로 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG2000-DSG로 이루어진 소포를 포함할 수 있다. 화학식 I의 화합물은 슈크로스 옥타설페이트와 같은 적합한 다중음이온을 갖는 리포좀내에 포집될 수 있다. 일부 예에서, 리포좀은 화학식 I의 화합물과 슈크로스 옥타설페이트의 화학양론비에서 또는 이의 근처에서의 비율로 화학식 I의 화합물 및 슈크로스 옥타설페이트를 캡슐화한다.

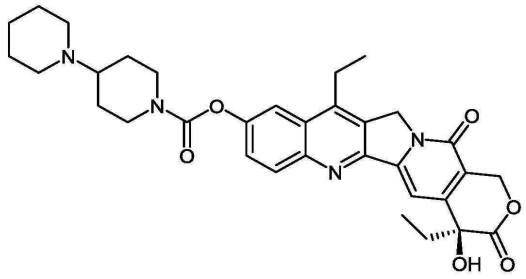
[0022] 하나의 특정 예는 3:2:0.15 몰비의 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG2000-DSG로부터 형성된 소포를 갖는 리포좀을 제공하고, 슈크로스 옥타설페이트 및 화합물 5를 캡슐화한다. 또 다른 예는 3:2:0.15 몰비의 HSPC, 콜레스테롤 및

PEG2000-DSG로부터 형성된 소포를 갖는 리포좀을 제공하고, 슈크로스 옥타설페이트 및 화합물 5를 캡슐화한다.

[0023] 또 다른 특정 예는 3:2:0.15 몰비의 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG2000-DSG로부터 형성된 소포를 갖는 리포좀을 제공하고, 슈크로스 옥타설페이트 및 화합물 6을 캡슐화한다.

[0024] 또 다른 특정 예는 3:2:0.15 몰비의 HSPC, 콜레스테롤 및 PEG2000-DSG로부터 형성된 소포를 갖는 리포좀을 제공하고, 슈크로스 옥타설페이트 및 화합물 A를 캡슐화한다.

[0025] 본원에 기재된 ATR 억제제 화합물 및/또는 이의 리포좀 제형은 치료요법 및 치료 방법에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 치료요법은 암 치료이다. 치료요법으로서 사용되는 경우, 리포좀 조성물은 하나 이상의 다른 화합물 또는 조성물과 함께 치료 용법에 사용될 수 있다 (예를 들어, 하기 이리노테칸과 조합된 MM-398과 같은 리포좀 제형).

[0026] 

[0027] 이리노테칸

[0028] 하나 이상의 다른 화합물 또는 조성물과 함께 리포좀 조성물의 투여는 동시, 별도 또는 연속일 수 있다. 하나 이상의 다른 화합물 또는 조성물은 추가의 치료제, 예를 들어, 추가로 항암제일 수 있거나 치료학적 제제의 음성 부작용을 개선시키도록 디자인된 화합물일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] **도1**은 본원에 기재된 특정 화합물을 제조하는데 유용한 제1 화학 반응 도식이다.

도2는 본원에 기재된 특정 화합물을 제조하는데 유용한 제2 화학 반응 도식이다.

도3은 본원에 기재된 특정 화합물을 제조하는데 유용한 제3 화학 반응 도식이다.

도4는 본원에 기재된 특정 화합물을 제조하는데 유용한 제4 화학 반응 도식이다.

도5는 실시예 8에 논의된 바와 같이 리포좀 ATR 억제제의 혈액 약력학을 보여주는 그래프이다.

도6은 실시예 9A에 기재된 바와 같이 자궁경부 MS751 이종이식 모델에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 A의 항종양 효능을 보여주는 그래프이다.

도7은 실시예 9A에 기재된 바와 같이 자궁경부 C33A 이종이식 모델에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 A의 항종양 효능을 보여주는 그래프이다.

도8은 실시예 9A에 따른 자궁경부 C33A 이종이식 모델에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 A의 항종양 효능을 보여주는 그래프이다.

도9는 실시예 9A에 따른 자궁경부 MS751에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 A의 관용성을 보여주는 그래프이다.

도10a 및 **도10b**는 각각 하기의 도면에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 5의 효능을 보여주는 그래프이다: NCI-H2170 (도10a) 또는 DMS-114 (도10b) 마우스 이종이식 모델, 실시예 10에서 논의된 바와 같이.

도11a 및 **도11b**는 각각 하기의 도면에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 5의 효능을 나타내는 카플란-메이어 생존 곡선을 보여주는 그래프이다: NCI-H2170 (도11a) 및 DMS-114 (도11b) 마우스 이종이식 모델, 실시예 10에서 논의된 바와 같이.

도12a 및 **도12b**는 각각 하기의 도면에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 5의 관용성을 보여주는 그래프이다: NCI-H2170 (도12a) 또는 DMS-114 (도12b), 마우스 이종이식 모델에서.

도13a 및 **도13b**는 각각 하기의 도면에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 5의 효능을 보여주는 그래프이다: Calu-6 (도13a) 또는 COLO-699 (도13b) 마우스 이종이식 모델, 실시예 11에서 논의된 바와 같이.

도14a 는 폐암 세포주의 패널에서 화합물 6 및 화합물 5의 시험관내 단독치료요법 세포 사멸을 설명하는 그래프이다.

도14b 는 3개의 화학치료학적 제제 (카보플라틴, 젬시타빈, 화?물 B)와 조합된 화합물 5 및 화합물 6의 효과를 설명하는 그래프이다.

도15 는 다양한 농도의 화합물 B의 존재 또는 부재하에 실시예 2의 ATR 단백질 키나제 억제제 화합물 6에 대해 Sum190PT 세포주 (삼중 음성 유방암, TNBC)에서 측정된 IC_{50} 쉬프트 값을 보여주는 그래프이다.

도16a 는 MDA-MB-453 TNBC 암 세포주에서 측정된, 실시예 2의 ATR 단백질 키나제 억제제 화합물 6의 조합의 IC_{50} 쉬프트 값을 보여주는 그래프이다.

도16b 는 MDA-MB-453 TNBC 암 세포주에서 측정된, ATR 단백질 키나제 억제제 화합물 A의 조합의 IC_{50} 쉬프트 값을 보여주는 그래프이다.

도17은 단독으로 또는 시험관내 조합된, 젬시타빈 [16nM] 또는 ATR 억제제 (화합물 A 또는 화합물 5 [1uM])에 노출된 폐암 세포 DMS-114로부터 수득된 웨스턴 블롯 분석이다.

도18a-b는 U2OS 세포에서, 다양한 농도에서 화합물 A 및 젬시타빈을 조합하여 수행된 세포사 및 성장 검정이다. 상기 결과는 2개의 화합물의 조합과 함께 세포 성장 및 사멸의 예측과 다시 비교된다(도18a). 생존 및 아폽토시스 세포의 수는 또한 USO2 세포에서 화합물 A (1 μM) 및 젬시타빈 (0.04 μM)의 설정 농도에서 결정된다(도18b).

도19는 세포의 수를 시간 경과에 따라 모니터링하면서, 여러 폐암 세포주 (NCI-H520 및 NCI-H596) 및 U2OS 세포에서 설정 농도 (각각 1 μM 및 0.2 μM)에서 단독으로 시험되고 SN38과 조합하여 시험된 화합물 A를 보여준다.

도20 은 자궁경부 암 세포주 MS751에서 조합되고 단독의 화합물 A 및 SN38의 효과를 설명하는 그래프이다.

도21a-c 는 젬시타빈과 화합물 A 또는 화합물 5를 조합한 효과를 입증한다. 도21a는 U2OS, H358, 및 A549 세포주에서, 다양한 농도에서 젬시타빈과 화합물 A 또는 화합물 5를 조합한 효과를 설명하는 히트 (heat) 맵이다. 세포에서 설정된 농도의 화합물 5 및 젬시타빈 또는 화합물 A 또는 젬시타빈로 처리된 세포의 현미경 이미지를 나타낸다(도21b). 설정된 농도와 함께 USO2 및 H358 세포의 증식 검정이 또한 보여진다(도21c).

도22a-b 는 SN38과 조합된 화합물 A 또는 화합물 5와 함께 A549 세포의 성장 곡선을 설명한다 (도22a) 또는 단독으로 (도22b).

도23 은 설정된 농도의 젬시타빈과 다양한 농도의 화합물 A 또는 화합물 5를 사용한 여러 세포주에서 IC50 값 (μM)을 보여준다.

도24 는 젬시타빈 또는 SN38과 조합된 화합물 A 또는 화합물 5에 반응성인 폐암 세포주의 개요를 보여준다.

도25a-b는 ATR (온-표적) 및 ATM (오프-표적)을 억제하는 이들의 능력에 대해 시험된 다양한 ATR 억제제를 보여준다. 억제는 nM의 IC50으로서 보고된다(도25a). 추가의 "오프-표적" 키나제는 또한 화합물 A 또는 화합물 5와 시험한다(도25b).

도26a-f는 하기의 세포에서 화합물 A 또는 화합물 5를 사용한 온-표적 결과를 보여준다: A549 폐 암 세포 (도26a-b), H23 폐 암 세포(도 26c-d), 및 DMS-114 세포 (도26e-f)에서. CHK1 S345 인산화, ATR 억제의 판독은 웨스턴 블롯에 의해 측정되었다. 각각의 화합물은 또한 고정된 농도의 젬시타빈과 함께 사용한다.

도27a-b는 HCC-70 TNBC, MDA-MB-468 TNBC, 및 DMS-114 세포주에 대한 추가의 온-표적 분석을 보여준다. 설정 농도의 SN38은 특정 농도 범위의 화합물 A 또는 화합물 5와 함께 사용된다. 다양한 온-표적 활성 파라미터는 웨스턴 블롯에 의해 시험되고 측정된다(도27a-b)

도28은 SN38 및 화합물 A 또는 화합물 5의 첨가 24시간 후에 SNM149 세포의 세포 주기 단계 프로파일을 보여준다.

도29는 MM398과 조합된 Ls-화합물 A 또는 Ls-화합물 5의 효과를 측정하기 위해 사용된 DMS-114 폐 이종이식 모

델을 보여준다. 설정 용량의 MM398은 상이한 용량의 화합물 A 또는 화합물 5(20mpk 또는 80mpk)와 함께 사용된다(5mpk). 치료 효과는 CHK1 S345 인산화 수준을 측정함에 의해 분석된다.

도30a-c는 SUM-149 세포주에서 MM398과 함께 Ls-화합물 A의 효과를 설명한다. 치료 효과는 하기의 인산화된 수준을 측정함에 의해 분석된다: RPA2 (도30a), DNAPK, CHK1, 및 γH2AX (도30b). Ls-화합물 5는 또한 MM398과 조합 없이 시험된다(도30c).

도31은 SUM-149 마우스 이종이식 모델에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 5의 효능을 보여주는 그래프이다.

도32는 SUM-149 마우스 이종이식 모델에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 5의 관용성을 보여주는 그래프이다.

도33은 세포주 패널 상에서 웨스턴 블롯에 의해 정량된, DNA 손상 반응 경로와 연합된 다양한 PD 마커의 기본 수준을 보여준다.

도34는 통합 스코어가 동적 세포 생존력 검정에서 각각의 웰에 대해 어떻게 계산되는지를 설명하는 도식이다.

도35는 ATR 억제제 화합물 5 및/또는 SN38에 노출된 폐 암 세포주에 걸친 기본 MRE11 단백질 발현 (웨스턴 블롯에 의해 정량된) 및 동적 세포 생존력의 척도인 통합 스코어의 상호관계를 보여준다.

도36은 ATR 억제제 화합물 5 및/또는 SN38에 노출된 폐 암 세포주에 걸친 기본 ATM 단백질 발현 (웨스턴 블롯에 의해 정량된) 및 동적 세포 생존력의 척도인 통합 스코어의 상호관계를 보여준다.

도37은 ATR 억제제 화합물 5 및/또는 SN38에 노출된 폐 암 세포주에 걸친 기본 NBS 단백질 발현 (웨스턴 블롯에 의해 정량된) 및 동적 세포 생존력의 척도인 통합 스코어의 상호관계를 보여준다.

도38은 ATR 억제제 화합물 5 및/또는 SN38에 노출된 p53 기능적으로 손상된 폐암 세포주에 걸친 기본 NBS 단백질 발현 (웨스턴 블롯에 의해 정량된) 및 동적 세포 생존력의 척도인 통합 스코어의 상호관계를 보여준다.

도39는 ATR 억제제 화합물 5 및/또는 SN38에 노출된 p53 기능적으로 손상된 폐암 세포주에 걸친 기본 NBS 단백질 발현 (웨스턴 블롯에 의해 정량된) 및 동적 세포 생존력의 척도인 통합 스코어의 상호관계를 보여준다.

도40a-f 는 ATR 억제 및/또는 SN38로의 노출 후 암 세포주 NCIH1299 약력학적 마커에서의 배수 변화를 보여준다.

도41a-f 는 ATR 억제 및/또는 SN38로의 노출 후 암 세포주 NCIH460 약력학적 마커에서의 배수 변화를 보여준다.

도42a-f 는 ATR 억제 및/또는 SN38로의 노출 후 암 세포주 DMS114 약력학적 마커에서의 배수 변화를 보여준다.

도43a-f 는 ATR 억제 및/또는 SN38로의 노출 후 암 세포주 HCC70 약력학적 마커에서의 배수 변화를 보여준다.

도44a-f 는 ATR 억제 및/또는 SN38로의 노출 후 암 세포주 MDAMB468 약력학적 마커에서의 배수 변화를 보여준다.

도45 는 ATR 억제 및/또는 젬시타빈에 6 또는 18시간 노출 후 암 세포주 A549에서 약력학 마커의 웨스턴 블롯을 보여준다.

도46 은 ATR 억제 및/또는 젬시타빈에 6 또는 18시간 노출 후 암 세포주 NCIH23에서 약력학 마커의 웨스턴 블롯을 보여준다.

도47 은 ATR 억제 및/또는 젬시타빈에 6 또는 18시간 노출 후 암 세포주 DMS114에서 약력학 마커의 웨스턴 블롯을 보여준다.

도48 은 ATR 억제 및/또는 젬시타빈에 6 또는 18시간 노출 후 암 세포주 U2OS에서 약력학 마커의 웨스턴 블롯을 보여준다.

도49 는 ATR 억제 및/또는 젬시타빈에 6 또는 18시간 노출 후 암 세포주 NCIH460에서 약력학 마커의 웨스턴 블롯을 보여준다.

도50 은 ATR 억제 및/또는 젬시타빈에 6 또는 18시간 노출 후 암 세포주 HCC827에서 약력학 마커의 웨스턴 블롯을 보여준다.

도51 은 화합물 5 및/또는 SN38에 18시간 노출 후 결장직장 암 세포주의 패널에서 약력학 마커의 웨스턴 블롯을 보여준다.

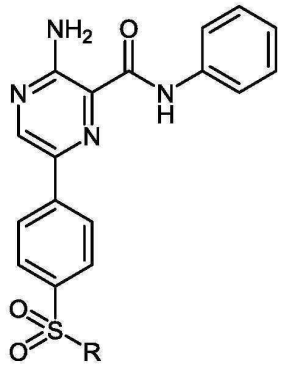
도52 는 화합물 5 및/또는 SN38에 18시간 노출 후 결장직장 암 세포주에서 인산화된 Chk1 수준의 규정화된 정량을 보여준다(각각의 세포주에 대한 신호는 단독의 SN38 의 존재하에 신호로 규정화된다).

도53 은 화합물 5 및/또는 SN38에 18시간 노출 후 결장직장 암 세포주에서 인산화된 RPA2 수준의 규정화된 정량을 보여준다(각각의 세포주에 대한 신호는 단독의 SN38 의 존재하에 신호로 규정화된다).

도54 는 화합물 5 및/또는 SN38에 18시간 노출 후 결장직장 암 세포주의 패널에서 γH2AX 수준의 규정화된 정량을 보여준다(각각의 세포주에 대한 신호는 단독의 SN38의 존재하에 신호로 규정화된다).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

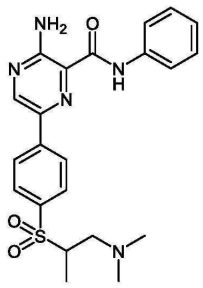
[0030] ATR 단백질 키나제를 억제하기 위한 신규 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 화학식 I로 나타낸다:



(I),

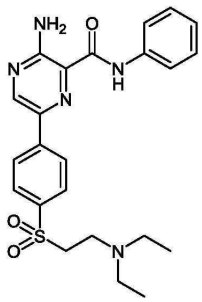
[0031]

[0032] 여기서, R은 마우스에서 적어도 약 5시간의 혈장 반감기를 제공하도록 선택된 (실시예 7에 따라 수득된) 7.0 초과 (바람직하게 8.0 초과, 및 가장 바람직하게 적어도 약 9.5)의 pK_a을 갖는 아민을 포함하는 모이어티이다. 바람직하게, R은 4 내지 12개 탄소를 갖는 아민-치환된 알킬 모이어티를 포함한다. R은 3급-치환된 아민 및 수소화된 알킬 그룹의 조합만을 포함하도록 선택될 수 있다. R은 바람직하게 적어도 7, 그러나 가장 바람직하게 적어도 약 9.5의 pK_a (예를 들어, 약 9.5 내지 10.5의 pK_a)를 갖는 3급-알킬 치환된 아민을 추가로 포함한다. 화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 예는 화합물 1 내지 6을 포함한다(실시예 1 내지 6 참조):



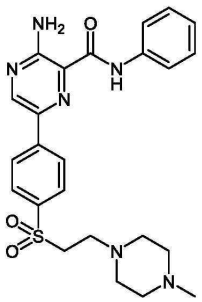
화합물 1

MW: 439.53



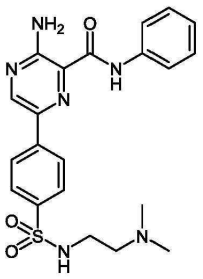
화합물 2

MW: 453.56



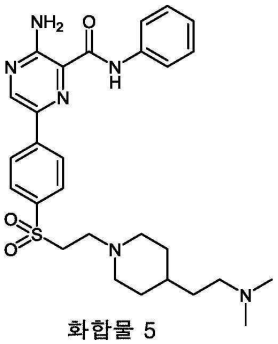
화합물 3

MW: 480.59



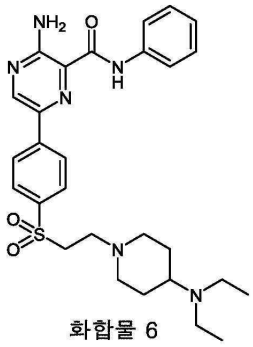
화합물 4

MW: 440.52



화합물 5

MW: 536.70

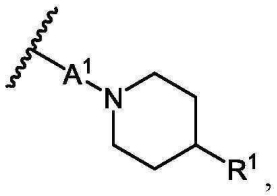


화합물 6

MW: 536.70

[0033]

[0034] 화학식 I의 화합물은 바람직하게 ATR의 목적하는 억제 및/또는 리포좀 형성 및 안정성 특징을 제공하도록 선택된 R에서 하나 이상의 3급 아민 모이어티를 포함한다. 일부 예에서, R은 제1 3급 치환된 질소를 포함하고, 바람직하게 제2 3급 치환된 질소를 포함하는 알킬아미노 모이어티로 치환된 헤테로사이클릭 모이어티이다. 특히, 화학식 I의 화합물은 R이 하기 화학식의 모이어티일 수 있는 것들을 포함한다:

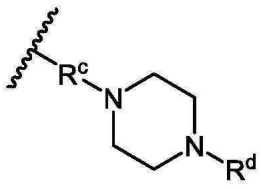


[0035]

[0036] 여기서, A^1은 부재이거나 알킬 (예를 들어,C_1-C_4 알킬 (바람직하게 $-(CH_2)_2-$)이고, R^1은 저급(예를 들어,C_1-C_4) 알킬아미노이다. 하나의 구현예에서, R^1은 (C_1-C_4 알킬)-NR^aR^b이고, 여기서, R^a 및 R^b은 각각 독립적으로 C_1-C_4 알킬이고, 예를 들어,R^1은 $-(CH_2)_2-N(CH_3)(CH_3)$이다. 또 다른 구현예에서, R^1은 NR^aR^b이고, 여기서, R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 C_1-C_4 알킬, 예를 들어,R^1은 $-N(CH_2CH_3)(CH_2CH_3)$이다.

[0037] 화학식 I의 또 다른 구현예에서, R은 $-N(H)(C_1$-C_4 알킬)-NR^aR^b이고, 여기서, R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 C_1-C_4 알킬이거나 R은 -(G)-NR^aR^b이고, 여기서, R^a 및 R^b은 각각 독립적으로 C_1-C_4 알킬이고, 여기서, G는 C_1-C_4 알킬이고, 여기서, G는 추가로 C_1-C_4 알킬로 치환될 수 있다.

[0038] 화학식 I의 또 다른 구현예에서, R은 하기 화학식의 모이어티일 수 있다:

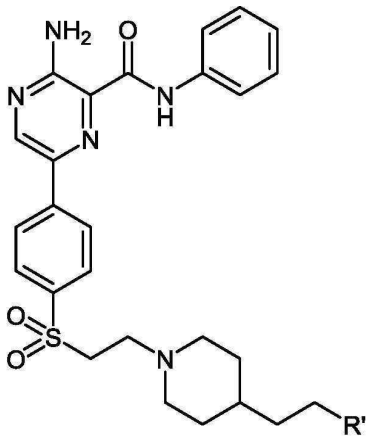


[0039]

[0040] 여기서, R^c 및 R^d는 각각 독립적으로 C_1-C_4 알킬이다.

[0041] 바람직한 예는 상기 화합물 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 화합물을 포함하는 리포좀을 포함한다. 일부 예에서, 상기 화합물은 화합물 5 또는 화합물 6이다.

[0042] 화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 화학식 Ia의 구조를 가질 수 있고, 여기서, R´은 약 9.5 이상의 pK_a를 갖는 3급 알킬 치환된 아민이다:



(Ia).

[0043]

[0044] 화학식 Ia의 화합물의 예는 본원에 기재된 화합물 5를 포함한다(예를 들어,실시예 1). 화학식 Ia의 하나의 구현예에서, R'는 NR^aR^b이고, 여기서, R^a 및 R^b는 각각 독립적으로 C_1-C_4 알킬이다.

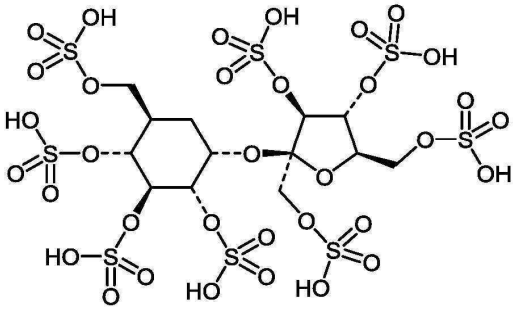
[0045] ATR 단백질 키나제 억제제 화합물의 리포좀 제형 (예를 들어, 실시예 7에 기재된 바와 같은)은 실시예 8에 기재된 마우스 모델에서 5시간 이상의 증진된 혈장 반감기와 같은 목적하는 약동학적 성질을 제공할 수 있다. 리포좀은 전형적으로 수성 내측을 둘러싸는 하나 이상의 지질 이중층을 함유하는 소포를 포함한다. 리포좀 조성물은 일반적으로 리포좀 외측 수성 유체와 같은 매질 중에 리포좀을 포함한다. 리포좀 지질은 양친매성 지질 성분을 포함할 수 있고 이는 수성 매질과 접촉시 자발적으로 인지질, 예를 들어, 포스파티딜콜린과 같은 이중층 막을 형성한다. 리포좀은 또한 스테롤, 예를 들어, 콜레스테롤과 같은 막-강화 성분을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 리포좀은 또한 리포좀이 응집하는 경향을 감소시키고 또한 다른 이로운 효과를 가질 수 있는 폴리에틸렌글리콜(PEG) 지질 유도체와 같은 친수성 폴리머에 접합된 지질을 포함한다.

[0046] 리포좀 제형은 하나 이상의 리포좀-형성 지질(예를 들어, 수소화된 대두 포스파티딜콜린 (HSPC)), 콜레스테롤 및 폴리머-접합된 지질(예를 들어, 메톡시-폴리(에틸렌 글리콜)-1,2-디스테아로일-sn-글리세릴(PEG2000-DSG)로부터 형성된 단일라멜라 소포에서 다중음이온 (예를 들어, 다중음이온 당, 예를 들어, 슈크로스 옥타설페이트 또는 적합한 다중음이온화된 폴리올)로 캡슐화된 화학식 I의 화합물을 포함할 수 있다. 리포좀-형성 지질은 바람직하게 하나 이상의 인지질을 포함하고, 인지질(들)과 콜레스테롤의 비율은 리포좀으로부터 화학식 I의 화합물의 충분히 감소된 양의 누출을 유지하면서 리포좀 막 강성의 목적하는 양을 제공하도록 선택된다.

[0047] 리포좀은 전형적으로 마이크론 또는 서브마이크론 범위의 크기를 갖고 이리노테칸과 같은 항암 약물을 포함하는 약제학적 물질을 운반하고 다양한 이로운 방식으로 이들의 약제학적 성질을 변화시키는 이들의 능력 때문에 널리 인지되고 있다. 약제학적 리포좀 조성물을 제조하고 특징 분석하는 방법은 당업계에 공지되어 있다 (문헌참조: 예를 들어,Lasic D.Liposomes:From physics to applications, Elsevier, Amsterdam 1993; G.Grereoriadis

(ed.),Liposome Technology, 3rd edition, vol.1-3, CRC Press, Boca Raton, 2006; Hong 등, 미국 특허 제 8,147,867호, 모든 목적을 위해 이들의 전문이 본원에 참조로 인용된다).

[0048] 일부 예에서 (예를 들어,실시예 7), ATR 단백질 키나제 억제제 조성물은 폴리설페이트화된 당 (예를 들어, 슈크로스 옥타설페이트)과 같은 다중음이온을 갖는 리포좀에 캡슐화된 ATR 단백질 키나제 억제제 화합물을 포함하는 리포좀을 포함할 수 있다. 슈크로소페이트, 완전히 양성자화된 형태로 하기의 구조를 갖는 슈크로스의 완전히 치환된 설페이트 에스테르:

[0049] 

[0050] 슈크로소페이트는 또한 슈크로스 옥타설페이트 또는 슈크로옥타설페이트 (SOS)로서 언급된다. 다양한 염, 예를 들어, 암모늄, 나트륨 또는 칼륨 염의 형태로 슈크로소페이트를 제조하는 방법은 당업계에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 제4,990,610호, 이는 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다).

[0051] ATR 단백질 키나제 억제제 리포좀은 TEA 함유 리포좀의 형성에 이어서 하기 화합물의 로딩을 포함하는 다중 단계로 제조될 수 있다: ATR 단백질 키나제 억제제 화합물(예를 들어,화합물 A 또는 화학식 I의 화합물))의 TEA가 리포좀을 이탈함으로써 리포좀으로의 로딩.예를 들어, ATR 단백질 키나제 억제제 리포좀은 (a) 슈크로소페이트의 트리에틸암모늄 염 (TEA-SOS)으로서 트리에틸아민 (TEA)을 함유하는 리포좀을 제조하는 단계, 및 (b) 후속적으로 이리노테칸이 리포좀으로 진입하고 상응하는 양의 TEA가 리포좀을 이탈하도록 (이에 의해 수득한 리포좀에 걸친 TEA의 농도 구배를 소모시키거나 감소시키는) 하는 효과적인 조건하에서 TEA-SOS 리포좀을 이리노테칸과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0052] 제1 단계는 리포좀 지질을 TEA 슈크로소페이트의 용액 중에 수화시키고 분산시킴에 의해 TEA-슈크로소페이트 함유 리포좀을 형성함을 포함할 수 있다. 이것은 예를 들어, 가열된 에탄올 중에서 HSPC 및 콜레스테롤을 포함하는 지질을 용해시키고 상기 용해되고 가열된 지질 용액을 리포좀 지질의 전이 온도 (T_m)초과의 하기의 온도에서 TEA-슈크로소페이트 수용액 중에 분산시킴에 의해 수행될 수 있다: 예를 들어, 60 ℃ 이상. 지질 분산액은 하기의 한정된 공극 크기를 갖는 트랙-에칭된 폴리카보네이트 막을 통해 압출시킴에 의해 리포좀으로 형성될 수 있고 이의 평균 크기는 75-125 nm (예를 들어, 80-120 nm, 또는 일부 구현예에서, 90-115 nm)이다: 예를 들어,100 nm.TEA-슈크로소페이트는 슈크로소페이트의 각각의 몰 당량에 대해 적어도 8몰 당량의 TEA를 포함하여 약 0.40-0.50 N의 농도 및 분산 및 압출 단계 동안에 리포좀 인지질의 허용될 수 없는 분해를 예방하기 위해 선택된 pH (예를 들어, 약 6.5) (예를 들어, 이들 단계 동안에 리포좀의 분해를 최소화하기 위해 선택된 pH)를 가질 수 있는 용액을 수득할 수 있다. 이어서, 비-포집된 TEA-SOS는 예를 들어, 약물 캡슐화 전에 투석, 겔 크로마토그래피, 이온 교환 또는 한외여과에 의해 리포좀 분산액으로부터 제거될 수 있다. 수득한 리포좀은 ATR 단백질 키나제 억제제 슈크로소페이트를 함유할 수 있다. 이들 ATR 억제제 리포좀은 수득한 리포좀 조성물 중 TEA의 양을 4 ℃에서 180일 후 라이소-PC 형성의 소정의 최대 수준 미만 또는 약 4 ℃에서, 또는, 보다 통상적으로, 5 ± 3 ℃에서 냉장고에서 저장 동안에 리포좀 조성물 중 라이소-PC 축적율의 소정의 최대 수준 미만을 유도하는 수준까지 감소시키기에 충분한 약물의 리포좀으로의 로딩에 의해 안정화될 수 있다: 예를 들어 다음으로 측정된다:mg/mL/개월, 또는 단위 시간에 대한 라이소-PC로의 % PC 전환, 예를 들어, mol% 라이소-PC/개월. 이어서, 임의의 비포집된 ATR 억제제와 함께 로딩 공정 동안에 리포좀으로부터 외측 매질로 교환된 TEA는 전형적으로 임의의 적합한 공지된 공정(들)에 의해 (예를 들어, 겔 크로마토그래피, 투석, 투석 여과, 이온 교환 또는 한외여과) 리포좀으로부터 제거된다. 리포좀 외측 매질은 목적하는 pH에서 완충된, 주사가능한 등장성 유체 (예를 들어, 염화나트륨의 등장성 용액)로 교환될 수 있다.

[0053] 리포좀 캡슐화된 ATR 단백질 억제제 화합물을 포함하는 다양한 리포좀 제형의 항종양 효능은 하기의 세포주에서 시험되었다: 인간 자궁경부 암 세포주 (예를 들어,MS751, C33A 및 SiHa 세포주, 실시예 9에 보여진 바와 같이), 및 편평 세포 암종 세포주를 포함하는 다양한 폐 암 세포주(예를 들어, 실시예 10에서 NCI-H2170 세포주), 소

세포 폐 암종 세포주 (예를 들어, 실시예 10에서 DMS-114 세포주), 및 인간 Calu-6 및 COLO-699 세포주 (실시예 11).

[0054] 하기 도 6-9 및 실시예 9를 참조하면, ATR 억제제 화합물 A의 리포좀 제형(실시예 7)은 단독으로 또는 이리노테칸 리포좀 제형 MM398과 조합하여 (실시예 9B) 마우스 제노그래프 모델 (실시예 9A) 에서 3개의 인간 자궁경부 암 세포주에 대해 시험되었다. 보다 큰 종양 용적은 3개의 자궁경부 암 세포주 중 2개 (MS571 및 C33A)에 대한 대조군 실험과 비교하여 실시예 7의 리포좀 화합물 A 제형에 대해 시간 경과시 관찰되었다. 그러나, 화합물 A 리포좀 제형 (실시예 7)과 조합된 이리노테칸 리포좀 MM398 (실시예 9B)의 투여는 단독의 MM398 또는 단독의 리포좀 화합물 A의 투여 중 어느 하나 보다 모든 3개의 자궁경부 암 세포주의 보다 큰 억제를 유도하였다.

[0055] 하기 도10a-10b 및 도11a-11b를 참조하면, 화학식 I 및 화학식 Ia의 ATR 억제제 화합물 5 (실시예 7에 기재된 바와 같은 리포좀으로서 제형화된 실시예 1의 화합물)의 리포좀 제형은 단독으로 및 이리노테칸 리포좀 제형 MM398 (실시예 9B)과 조합된 마우스 제노그래프 모델 (실시예 10)에서 2개의 폐 암 세포주에 대해 시험되었다. 하기 도10a 및 도10b를 참조하면, 화합물 5의 리포좀 제형의 투여는 실시예 10에서 대조군 실험과 비교하여, 시험된 각각의 세포주에서 종양 용적을 감소시켰고, MM398과 실시예 7의 화합물 5 리포좀 조성물의 조합은 마우스 모델에서 종양 용적을 다른 것과 무관하게 투여된 화합물 보다 큰 정도로 감소시켰다. 유사하게, 실시예 10에 제공된 카플란-메이어 생존 곡선(도11a 및 도11b)는 실시예 9B의 이리노테칸 리포좀 MM398 둘 다의 조합이 2개의 상이한 세포주를 사용한 실시예 7의 화합물 5 리포좀 제형과 조합하여 투여되는 경우 마우스 폐 암 제노그래프 시험에서 증가된 생존을 입증한다.

[0056] 하기 도 12a 및 도 12b를 참조하면, ATR 단백질 키나제 억제제 화합물의 다양한 제형의 관용성은 실시예 10에서 평가되었다. 하기 도 12a를 참조하면, NCI-H2170 마우스 제노그래프 모델에서 시험된 마우스 체중에서 감소는 이리노테칸 리포좀 MM398 (실시예 9B), 대조군 또는 MM398과 조합된 화합물 5의 리포좀 제형과 비교하여 화합물 5의 리포좀 제형 (실시예 7)에 대해 시간 경과에 따라 최저였다. 하기 도12b를 참조하면, DMS-114 마우스 제노그래프 모델에서 시험된 마우스 체중에서 감소는 화합물 5의 리포좀 제형 (실시예 7), 또는 독립적으로 투여된 이리노테칸 리포좀 MM398 (실시예 9B)과 비교하여, MM398과 조합된 화합물 5의 리포좀 제형의 조합에 대해 시간 경과에 따라 최저였다.

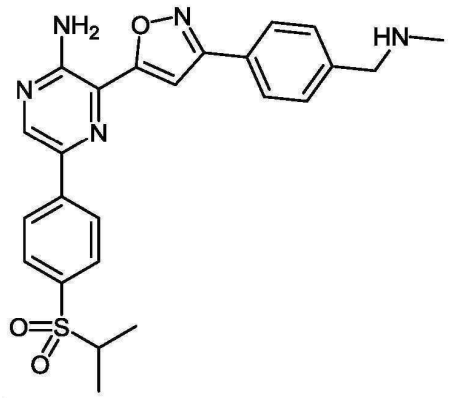
[0057] 하기 도13a 및 도13b를 참조하면, ATR 단백질 키나제 억제제 화합물 5의 리포좀 제형과 이리노테칸 리포좀 MM398 (실시예 9B)의 조합물의 투여는 대조군, 단독의 MM398 이리노테칸 리포좀의 투여, 화합물 A 리포좀 제형 (실시예 7)의 투여 또는 화합물 A 리포좀 제형(실시예 7)과 MM398 이리노테칸 리포좀 (실시예 9B)의 조합물의 투여와 비교하여, 마우스 제노그래프 모델에서 Calu-6 및 COLO699 세포주 둘 다에서 종양 용적의 최대 감소를 유도하였다.

[0058] **실시예**

[0059] 하기의 실시예는 본 발명의 일부 구현예를 설명한다. 하기의 실시예 및 제법은 당업자가 이들 및 본 발명의 다른 구현예를 보다 명백하게 이해하고 수행할 수 있도록 제공된다. 이들은 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되지 말아야 하고 단지 이의 예시 및 대표적인 예로서 간주되어야 한다.

[0060] ATR 퓁타이드는 문헌에 공지된 다양한 방법을 사용하여 발현되고 단리될 수 있다 (문헌참조: 예를 들어, Ünsal-Kaçmaz et al, PNAS 99:10, pp 6673-6678, May 14, 2002; see also Kumagai 등 Cell 124, pp 943-955, Mar.10, 2006; Unsal-Kacmaz 등 Molecular and Cellular Biology, February 2004, p 1292-1300; and Hall-Jackson 등 Oncogene 1999, 18, 6707-6713).

[0061] 화합물 A는 공개공보 WO2010/071827A1 (2010년 6월 24일자로 공개된)에 기재된 방법 (예를 들어)에 의해 수득될 수 있고, 화합물 II-A-7의 합성 및 용도에 관한 이의 일부는 본원에 참조로서 인용된다. 화합물 A의 구조는 다음과 같다:

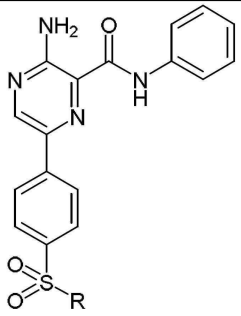


[0062]

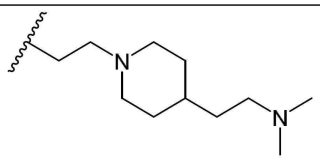
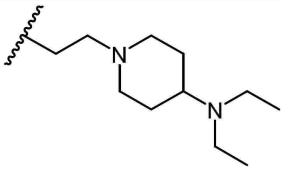
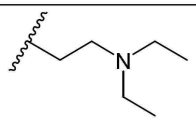
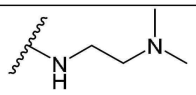
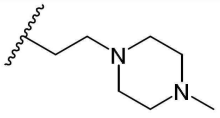
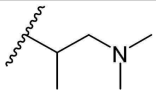
[0063] 화합물 A

[0064] 화학식 I의 다양한 화합물은 본원에 기재된 바와 같이 제조될 수 있고 하기의 표에 요약되어 있다.

[0065] 표 1:화학식 I의 선택된 화합물

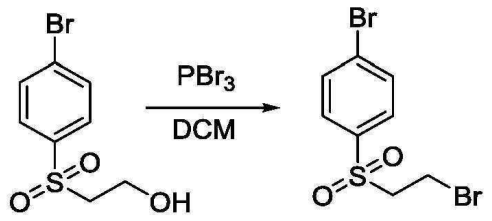


(I)

화합물	R	실시예
화합물 5		1
화합물 6		2
화합물 2		3
화합물 4		4
화합물 3		5
화합물 1		6

[0066]

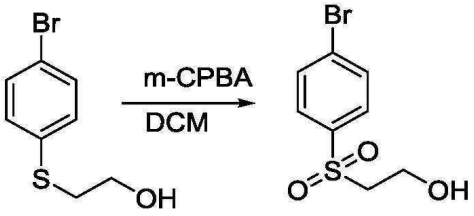
[0067] 화합물 1, 2, 3 및 6은 하기의 도에서 도식 1에 나타낸 동일계 생성된 보론산 에스테르를 사용한 원-팟 스즈키 교차-커플링에서 제조하였다. 하기 도1을 참조하면, 중간체 3의 합성:1-브로모-4-(2-브로모에틸설포닐)벤젠은 하기된 바와 같이 수득될 수 있다.

[0068] 

[0069] 중간체2 중간체3

[0070] DCM (400 mL) 중 중간체 2 (35 g, 133 mmol)의 용액에 PBr_3 (40 g, 146 mmol)을 0 ℃에서 적가하였다. 이어서 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 물 (15 mL)을 첨가하여 반응을 켄칭하였다. 이어서 수득물은 물 (120 mL) 및 염수 (120 mL)로 세척하였다. 유기상을 농축시켜 황색 오일로서 20 g의 조추출물 3을 수득하고 이는 다음 단계에서 추가의 정제 없이 사용하였다.

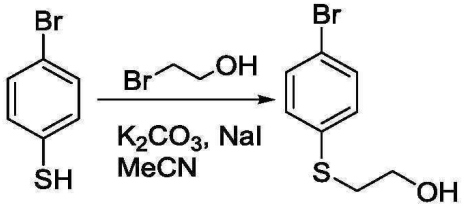
[0071] 하기 도 1을 참조하면, 중간체 2의 합성은 하기와 같이 수행될 수 있다:

[0072] 

[0073] 중간체1 중간체2

[0074] DCM (500 mL) 중 중간체 1 (45 g, 194 mmol)의 용액에 m-CPBA (134 g, 776 mmol)을 여러 배치에서 실온에서 첨가하였다. 이어서 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고 DCM (500 ml)을 첨가하여 고체를 세척하였다. 여과물은 NaOH (1M, 300 mL X 3) 및 염수 (300 mL)로 세척하였다. 유기층은 건조 농축시켜 백색 고체로서 36 g의 중간체 2 (70 %)를 수득하였다.

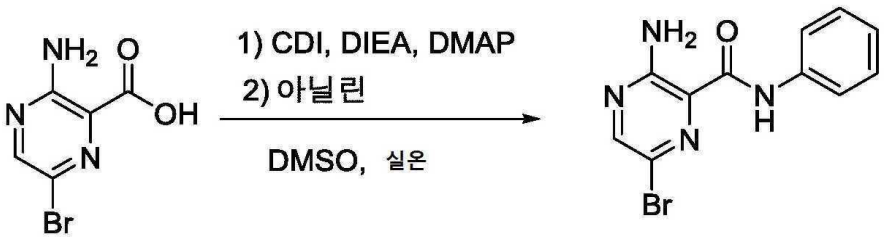
[0075] 하기 도 1을 참조하면, 중간체 1의 합성은 하기와 같이 수행될 수 있다:

[0076] 

[0077] 중간체 1

[0078] MeCN (600 ml) 중 4-브로모벤젠티올 (45 g, 238 mmol)의 용액에 K_2CO_3 (60 g, 476 mmol) 및 NaI (36 g, 238 mmol)을 첨가하였다. 혼합물은 10분 동안 실온에서 교반하였다. 이어서 2-브로모에탄올을 적가하였다. 첨가 후, 상기 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고 여과물을 건조 농축시켰다. 잔사를 실리카-겔 칼럼으로 정제하여 담황색 오일로서 45 g의 중간체 1 (81%)을 수득하였다.

[0079] 블록 B는 하기의 도에서 도식 2에 따라 제조할 수 있다: 도2.하기 도2를 참조하면, 블록 B의 합성은 하기와 같이 수행될 수 있다:



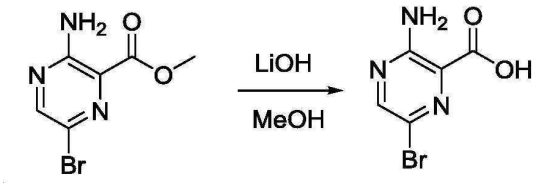
중간체 6 블록 B

[0080]

[0081] DMSO (30 mL) 중 중간체 6 (6.0 g, 27.4 mmol)의 용액에 CDI (8.9 g, 54.8 mmol), DIPEA (3.8g, 30.1 mmol) 및 DMAP (0.17g, 1.37 mmol)를 첨가하였다. 상기 용액은 4시간 동안 실온에서 교반하였다. 아닐린 (2.5 g, 27.4 mmol)을 첨가하고 혼합물은 밤새 실온에서 교반하였다. 물을 첨가하고 형성된 고체는 여과에 의해 수거하였다. 조 생성물을 실리카-겔 칼럼으로 정제하여 황색 고체로서 2.5 g의 블록 B (31 %)를 수득하였다.

[0082] LC-MS (M+1):293.2; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.28 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.78 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.74 (s, 2H), 7.36 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 7.13 (t, J = 7.6 Hz, 1H).

[0083] 하기 도2를 참조하면, 중간체 6의 합성은 하기와 같이 수행될 수 있다:



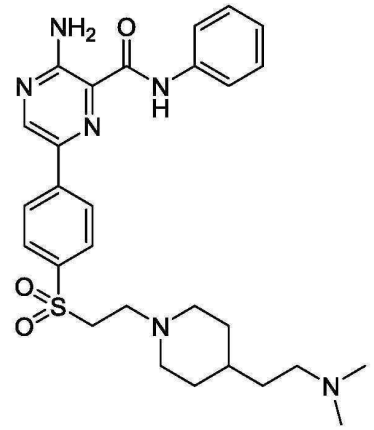
[0084]

[0085] 중간체 6

[0086] MeOH (70 mL) 중 메틸 3-아미노-6-브로모피라진-2-카복실레이트 (10.0 g 43.1 mmol)의 용액에 물 (70 mL) 중 LiOH (9.0 g, 215 mmol)의 용액을 첨가하였다. 상기 혼합물은 3시간 동안 90 ℃에서 교반하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고 HCl (2 M)을 사용하여 PH = 4~5로 산성화하였다. 상기 혼합물을 여과하여 황색 고체로서 7.4 g의 중간체 6 (79 %)을 수득하였다.

[0087] LC-MS (M+1):218.0; 1H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.39 (s, 1H), 7.59 (br, 2H).

[0088] **실시예 1: 화합물 5** (3-아미노-6-(4-((2-(4-(2-(디메틸아미노)에틸)피페리딘-1-일)에틸)설포닐)페닐)-N-페닐피라진-2-카복스아미드)의 합성



[0089]

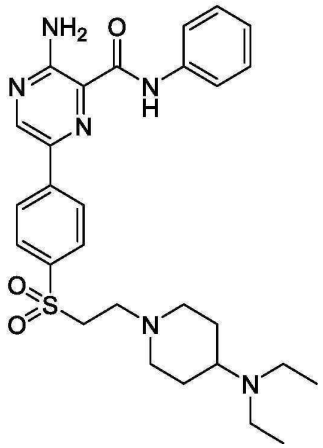
[0090] 정확한 질량: 536.26; 분자량: 536.70; 화합물 5; 보다 염기성; 143 mg; 수율 8.2 %; pK_a 10.00.

[0091] 무수 디옥산 (3 ml) 중 2-(1-(2-((4-브로모페닐)설포닐)에틸)피페리딘-4-일)-N,N-디메틸에탄-1-아민 (블록 A1) (261 mg, 0.648 mmol)의 용액에 칼륨 아세테이트 (191 mg, 1.944 mmol) 및 비스(피나콜라토) 디보란 (246 mg, 0.971 mmol)을 첨가하고 반응 용기를 진공/질소 주기를 반복함에 의해 탈기시키고 이어서 $Pd(dppf)_2Cl_2$를 첨가하

였다. CH_2Cl_2 (53 mg, 0.0648 mmol)을 다시 탈기시키고 반응물을 질소하에 2시간 동안 90 ℃에서 가열하였다. 반응물을 이어서 실온으로 냉각시키고 3-아미노-6-브로모-N-페닐피라진-2-카복스아미드 (블록 B), 2M K_2CO_3 (1 ml)를 첨가하고 탈기시키고 질소로 세정하였다. $Pd(PPh_3)_4$ (75 mg, 0.0648 mmol)를 첨가하였다. 상기 반응물은 4시간 동안 100 ℃에서 가열하였다. 반응물은 실온으로 냉각시키고 에틸 아세테이트로 희석하고 염수로 3회 세척하고 유기층을 Na_2SO_4상에서 건조시켰다. 회전증발기 상에 용매의 제거시, 암색 오일 잔여 조생성물을 수득하고 이를 용출제로서 디클로로메탄 중 0 내지 15 % 메탄올을 사용하는 실리카-겔 칼럼 크로마토그래피 (Reveleris Flash Chromatography System) 상에서 정제하였다. 목적하는 생성물은 황색 고체(149 mg, 수율 43 %)로서 수득하였다. MS (M+H)+ 537; ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6): δ 10.45 (s, 1H), 9.03 (s, 1H), 8.49 (d, 2H, 6.8Hz), 7.95 (d, 2H, 6.8Hz), 7.88 (s, br, 2H), 7.81 (d, 2H, 8.8Hz), 7.40 (t, 2H, 7.2Hz), 7.18(t, 1H, 7.2Hz), 3.53 (t, 2H, 7.2Hz), 2.64 (d, 2H, 11.6 Hz), 2.55 (t, 2H, 7.2Hz), 2.05 (m, 2H), 1.98 (s, 6H), 1.17 (m, 2H), 1.42 (d, 2H, 12.0Hz), 1.18 (m, 3H), 0.78 (m, 2H).

[0092] 고분리 질량 (Thermo ScientificTM Q ExactiveTM 하이브리드 쿠아드루폴-오비트랩 질량 분광측정기):계산치: $C_{28}H_{36}N_6O_3S$ + 양성자 (1.00728) = 537.2642; 단일 하전 이온의 이론치 m/z:537.2642; 실측치:537.2636.

[0093] **실시예 2: 화합물 6** (3-아미노-6-(4-((2-(4-(디에틸아미노)피페리딘-1-일)에틸)설포닐)페닐)-N-페닐피라진-2-카복스아미드)의 합성

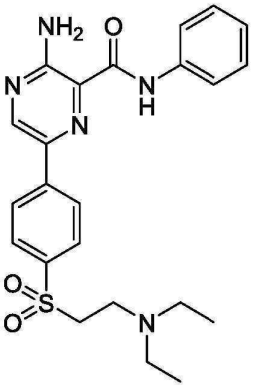
[0094] 

[0095] 정확한 질량: 536.26; 분자량: 536.70; 화합물 6; 보다 염기성; 53 mg; 수율 11.1%; pK_a 9.81.

[0096] 화합물 2는 블록 A2를 사용한 유사한 방식으로 제조하고 황색 고체로서 (1-(2-((4-브로모페닐)설포닐)에틸)-N,N-디에틸피페리딘-4-아민)을 수득하였다(52 mg, 수율 24 %). MS (M+H)+ 537; ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6): δ 10.45 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.51 (d, 2H, 8.4Hz), 7.94 (d, 2H, 8.8Hz), 7.87 (s, br, 2H), 7.79 (d, 2H, 8.8Hz), 7.42 (t, 2H, 8.4Hz), 7.18(t, 1H, 7.2Hz), 3.54 (t, 2H, 6.4Hz), 2.65 (d, 2H, 11.2 Hz), 2.56 (t, 2H, 6.4Hz), 2.20 (q, 4H, 6.8 Hz), 1.71 (t, 2, 10.4 Hz), 1.33 (d, 2H, 12.4Hz), 0.85 (qd, 2H, 12.4 Hz), 0.74(t, 6H, 7.2 Hz).

[0097] 1-(2-((4-브로모페닐)설포닐)에틸)-N,N-디에틸피페리딘-4-아민 (블록 A2)은 상응하는 4-디에틸아미노피페리딘을 사용한 유사한 방식으로 제조하였다. 무색 오일을 수득하였다(661 mg, 47 % 수율), MS (M+H)+ 403, 405.

[0098] **실시예 3:화합물 2** (3-아미노-6-(4-((2-(디에틸아미노)에틸)설포닐)페닐)-N-페닐피라진-2-카복스아미드)의 합성



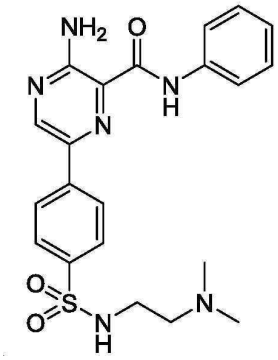
[0099]

[0100] 정확한 질량: 453.18; 분자량: 453.56; 화합물 2; 덜 염기성; 98 mg; 수율 7.7 %; pK_a 7.46.

[0101] 실시예 3의 화합물은 중간체 블록 A3을 사용한 유사한 방식으로 제조하고, 황색 고체로서 2-((4-브로모페닐)설포닐)에틸)-N,N-디에틸피페리딘-1-아민)을 수득하였다 (98 mg, 수율 11%). MS (M+H)+ 454; ^{1}H NMR (400MHz, DMSO-d_6): δ 10.46 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.51 (d, 2H, 6.8Hz), 7.98 (d, 2H, 6.8Hz), 7.88 (s, br, 2H), 7.81 (d, 2H, 8.8Hz), 7.41 (t, 2H, 7.2Hz), 7.17(t, 1H, 7.2Hz), 3.48 (dd, 2H, 6.8Hz), 2.73 (m, 2H), 2.33 (q, 4H, 6.8Hz), 0.81 (t, 6H, 6.8Hz).

[0102] 블록 A3 (2-((4-브로모페닐)설포닐)에틸)-N,N-디에틸에탄-1-아민)은 상응하는 4-디에틸아민을 사용한 유사한 방식으로 제조하였다. 무색 오일을 수득하였다 (1.42 g, 73 % 수율), MS (M+H)+ 320, 322.

[0103] **실시예 4: 화합물 4** (3-아미노-6-(4-(((2-(디메틸아미노)에틸)-λ^2-아자닐)설포닐)페닐)-N-페닐피라진-2-카복스아미드)의 합성



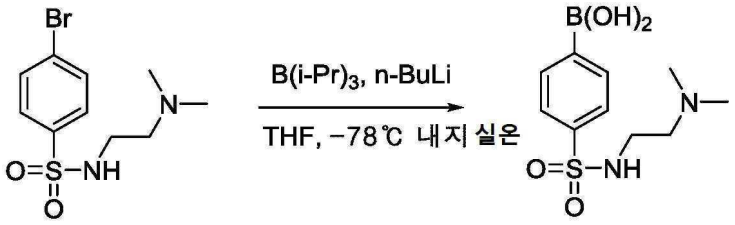
[0104]

[0105] 정확한 질량: 439.16; 분자량: 439.51; 화합물 4; pK_a 8.36.

[0106] 화합물 4는 도 3에서 도식 3에 따라 제조할 수 있다. 톨루엔 / 에탄올 / 물 (2 mL / 2 mL / 2 mL) 중 블록 B (150 mg, 0.51 mmol), 블록 F (153 mg, 0.56 mmol) 및 Na_2CO_3 (216 mg, 2.0 mmol)의 혼합물에 $Pd(dppf)Cl_2$ (30 mg)를 첨가하였다. 상기 혼합물은 4시간 동안 아르곤 대기하에서 75 ℃에서 교반하였다. 상기 반응 혼합물은 건조 농축시켰다. 잔류물을 prep-HPLC로 정제하여 100 mg의 TM4 (45 %)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0107] LC-MS (M+1):441.4; ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 8.88 (s, 1H), 8.33 (dd, J = 6.8 Hz, 1.6 Hz, 2H), 8.00 (dd, J = 6.8 Hz, 1.6 Hz, 2H), 7.80 (dd, J = 8.4 Hz, 1.2 Hz, 2H), 7.41 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.19 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 3.10 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.73 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.46 (s, 6H).

[0108] 하기 도 3에서 도식 3을 다시 참조하면, 블록 F의 합성은 하기와 같이 수행될 수 있다:



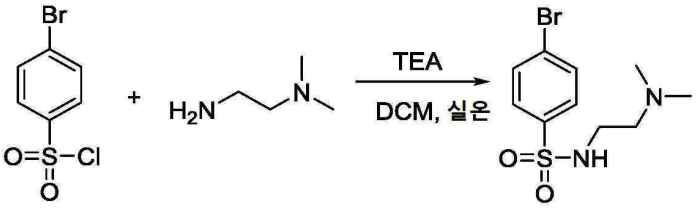
중간체 7 블록 F

[0109]

[0110] 아르곤 대기하에 -78 ℃에서 THF (200mL) 중 중간체 7 (10.0 g, 32.6 mmol)의 용액에 $B(i\text{-}Pr)_3$ (30.6 g, 163 mmol)를 첨가하였다. 이어서 n-BuLi (2.5 M, 65 mL)를 적가하였다. 상기 혼합물을 2시간 동안 -78 ℃에서 교반하고 이어서 실온에서 또 다른 16시간 동안 교반하였다. 물을 첨가하여 반응을 켄칭하였다. 상기 혼합물은 건조 농축시켰다. 잔사를 prep-HPLC로 정제하여 5.2 g의 **블록 F** (59 %)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0111] LC-MS (M+1):273.4; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.90-7.45 (m, 4H), 2.91 (s, 2H), 2.69 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.18 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.03 (s, 6H).

[0112] 하기 도3에서 도식 3을 다시 참조하면, 중간체 7의 합성은 하기와 같이 수행될 수 있다:

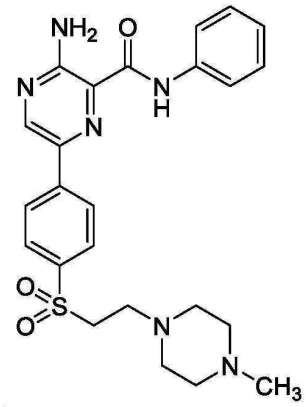


[0113]

[0114] 중간체 7

[0115] 0 ℃에서 DCM (300 mL) 중 4-브로모벤젠-1-설포닐 클로라이드 (20 g. 78.3 mmol)의 용액에 TEA (22 mL, 158 mmol)를 첨가하고 이어서 N,N'-디메틸에탄-1,2-디아민 (8.3 g, 94.0 mmol)을 첨가하였다. 수득한 용액을 1시간 동안 실온에서 교반하고 이어서 DCM (300 mL)으로 희석하였다. 용액을 물 (200 mL) 및 염수 (200 mL)로 세척하였다. 상기 유기층을 건조 농축시켰다. 잔사를 실리카-겔 칼럼으로 정제하여 회백색 고체로서 17.0 g의 **중간체 7** (71 %) 을 수득하였다.

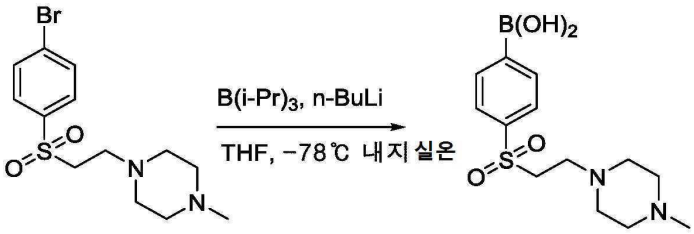
[0116] **실시예 5: 화합물 3** (3-아미노-6-(4-((2-(4-메틸피페라진-1-일)에틸)설포닐)페닐)-N-페닐피라진-2-카복스아미드)의 합성



[0117]

[0118] 정확한 질량: 480.19; 분자량: 480.59; 화합물 3; pK_a 7.73.

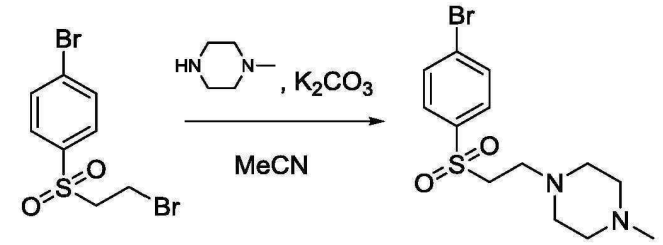
[0119] 실시예 5의 화합물은 하기 도에 나타낸 도식 4에 의해 수득될 수 있다. 도 4.도식 4에서 중간체 5는 하기된 바와 같이 수득될 수 있다.



[0120] 중간체 4 중간체 5

[0121] 아르곤 대기하에 -78 ℃에서 THF (30mL) 중 중간체 4 (1.7 g, 5.0 mmol)의 용액에 $B(i\text{-}Pr)_3$ (4.7 g, 25 mmol)를 첨가하였다. 이어서 n-BuLi (2.5 M, 10 mL)를 적가하였다. 상기 혼합물을 2시간 동안 -78 ℃에서 교반하고 이어서 실온에서 또 다른 16시간 동안 교반하였다. 물을 첨가하여 반응을 켄칭하였다. 상기 혼합물은 건조 농축시켰다. 잔사를 prep-HPLC로 정제하여 300 mg의 중간체 5 (19 %)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0122] 하기 도 4를 다시 참조하면 도식 4에서 중간체 4는 하기된 바와 같이 수득될 수 있다.

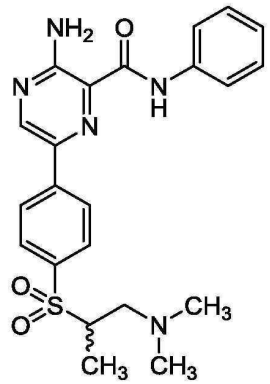


[0123]

[0124] 중간체 3 중간체 4

[0125] MeCN (300 mL) 중 중간체 3 (20 g, 60 mmol)의 용액에 1-메틸피페라진 (9.0 g, 90 mmol) 및 K_2CO_3 (16.6 g, 120 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고 여과물을 건조 농축시켰다. 잔사를 실리카-겔 칼럼으로 정제하여 흐린색 고체로서 15 g의 중간체 4 (71 %)를 수득하였다.

[0126] **실시예 6: 화합물 1**
(3-아미노-6-(4-((1-(디메틸아미노)프로판-2-일)설포닐)페닐)-N-페닐피라진-2-카복스아미드)의 합성



[0127]

[0128] 정확한 질량: 439.17; 분자량: 439.53; 화합물 1; 덜 염기성; 427 mg; 수율 12.9 %; pK_a 7.04.

[0129] 실시예 6의 화합물은 하기 문헌에 주어진 화합물 1을 제조하기 위한 과정에 따라 제조하였다: J.Med.Chem.1-브로모-4-(2-브로모에틸설포닐)벤젠을 사용하는 것을 제외하고는 2011, 54, 2320 (보충 물질). 황색 고체를 수득하였다 (427 mg, 수율 11 %). MS (M+H)+ 440; ^1H NMR (400MHz, DMSO-d_6): δ 10.46 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.52 (d, 2H, 6.8Hz), 7.93 (d, 2H, 6.8Hz), 7.89 (s, br, 2H), 7.82 (d, 2H, 8.0Hz), 7.40 (t, 2H, 7.2Hz), 7.18(t, 1H, 7.2Hz), 3.53 (t, 2H, 7.2Hz), 2.64 (d, 2H, 11.6 Hz), 2.55 (t, 2H, 7.2Hz), 2.05 (m, 2H), 1.98 (s, 6H), 1.17 (m, 2H), 1.42 (d, 2H, 12.0Hz), 1.18 (m, 3H), 0.78 (m, 2H).

[0130] **실시예 7: 포집된 트리에틸암모늄 SOS 염을 갖는 리포좀의 제조 및 ATRi의 리포좀으로의 로딩.**

[0131] 나트륨 슈크로스 옥타설페이트 (당량 중량 144.8)는 모든 하이드록실 그룹이 황산 에스테르를 형성하는 슈크로스 유도체의 나트륨 염이다. 60그램의 슈크로스 옥타설페이트 (SOS) 나트륨 염은 150 ml의 탈이온수에 용해시키고, 50 ℃의 물 욕조의 진탕 (스월링)과 함께 가열하였다. 용액을 설폰화된 폴리스티렌 디비닐벤젠 코폴리머 양이온 교환 수지 비드 (Dowex 50Wx8-100-200 mesh, Dow Chemical Co.)가 팩킹된 칼럼을 통해 통과시켰다. 칼럼은 수성 3-3.6 M HCl로 사전 평형화시켜 수지를 수소 형태로 만들고 유출이 <1 μS/cm의 전도성을 보여줄 때까지 탈이온수로 세척하였다. 용출물은 전도성 검출기를 사용하여 모니터링하였다. 전도성 피크에 상응하는 SOS 분획을 수거하고 즉시 순수 트리에틸아민 (TEA) 용액을 사용하여 pH 6-6.5로 적정하였다. 용액은 나트륨-민감성 전극을 사용한 전위차법에 의한 잔여 나트륨에 대해 및 굴절계를 사용한 SOS 농도에 대해 분석하였다. 0.25 % 미만의 잔여 나트륨을 갖는 용액은 탈이온수를 사용하여 최종 SOS 농도 1.1 M로 희석하고 이어서 Millipore 0.22 μm Steri-Top 필터를 사용하여 멸균-여과하였다.

[0132] 콜레스테롤 (Chol)은 제조원 (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Ala, USA)으로부터 구입하였고, 수소화된 대두 포스포콜린 (HSPC) 및 메톡시-폴리(에틸렌 글리콜)-1,2-디스테아로일-sn-글리세릴 (PEG2000-DSG) 은 제조원 (Lipoid GmbH, Ludwigshafen, Germany)으로부터 수득하였다.

[0133] Chol, HSPC 및 PEG2000-DSG는 100 % 에탄올 중에 65 ℃에서 3:2:0.15의 몰비로 동시 용해시켰다 (200-proof, Sigma cat#:459828). TEA-SOS (첨가된 에탄올의 용적 10배)의 용액은 60-65 ℃에서 지질 용액과 혼합하였고 다중라멜라 소포의 균일한 유백색 현탁액이 형성될 때까지 상기 온도에서 교반하였다. 상기 현탁액은 60-65 ℃에서 아르곤 압력 압출기 (Lipex Biomembranes)를 사용한 100 nm의 공극 크기를 갖는 5 적층된 폴리카보네이트 트랙-에칭된 필터 (Corning Nuclepore)를 통해 3회 압출하였고, 수득한 단일라멜라 리포좀은 빙속에서 신속히 냉각시키고 이어서 사용 전에 4-6 ℃에서 저장하였다. 인지질의 농도는 포스포페이트 검정에 의해 측정하였고 입자 직경은 맬버른 나노사이저 상에서 기록하였다.

[0134] 약물 로딩 전, TEA-SOS 농도구배는 겔-크로마토그래피 (Sepharose CL-4B, Pharmacia)를 사용하여 과량의 비-포집된 TEA-SOS를 제거함에 의해 생성시켰다. 리포좀의 삼투성은 50 % 덱스트로스 용액을 사용하여 균형화시켰다. 최종 덱스트로스 농도는 15 %였다.

[0135] ATR 억제제는 1 M HCl로 적정하고 45 ℃에서 가열하여 탈이온수 중에 15 % 덱스트로스 용액에 용해시키고 이어서 0.2 마이크론 NALGENE 13 mm 시린지 필터를 사용하여 여과하였다. 용액 중 약물 농도는 HPLC에 의해 검출하였다. 9-10 mg/mL의 약물을 함유하는 ATR 억제제의 스톡 용액을 800 mg/mmol 인지질의 약물/지질 비율로 리포좀에 첨가하고 pH는 1M Hepes 완충액 및 0.1 N NaOH를 사용하여 pH 6.5로 조정하였다.

[0136] 리포좀-약물 혼합물은 65 ℃에서 30분 동안 가끔의 진탕과 함께 항온처리하였다. 항온처리 혼합물은 신속하게 냉각시키고 0 ℃에서 10분 동안 항온처리함에 이어서 주위 온도에 도달하도록 방치하였다. 비-캡슐화된 약물은 HBS-6.5 완충액 (5 mM 2-(4-(2-하이드록시에틸)-피페라지노)-에틸설폰산 (HEPES), 144 mM NaCl, pH 6.5)을 사용하여 용출되는, Sephadex G-25 (Amersham Pharmacia) 상의 겔 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 보이드 용적으로 용출된 리포좀 분획물을 배합하고, 0.2 마이크론 여과에 의해 멸균시키고, 사용 전에 4-6 ℃에 저장하였다. 리포좀은 지질 농도, 약물 농도 및 입자 크기를 특징으로 하였다(표 2). 모든 ATR 억제제는 화합물 1을 제외하고는 양호한 로딩 효능을 보여주었고 여기서, 약물 대 지질 비율이 400 g/mol을 초과하는 시점에서 응집물이 형성되고 침전하였다.

[0137] **표 2ATR 억제제가 로딩된 리포좀의 특징 분석.**

[0138] **실시예 8: 리포좀 ATRi의 PK 연구의 일반 기재사항**

ATR 억제제	로딩 전 약물/지질 비율	로딩 후 약물/지질 비율	로딩 효능 (%)	리포좀 크기, (평균 ± SD) nm
화합물 6	743 ± 89	550 ± 64	74 ± 0.3	119 ± 28
화합물 2	642 ± 10	639 ± 22	100 ± 5	130 ± 34
화합물 5	732 ± 58	619 ± 110	84 ± 8	120 ± 29
화합물 3	646 ± 28	628 ± 6	97 ± 5	120 ± 27
화합물 A.	736 ± 57	716 ± 41	97 ± 2	121 ± 26
화합물 1	600-800	로딩될 수 없음.응집물이 형성되고 침전하였다		
	379	369	98	122 ± 24

[0139]

[0140] 도5는 리포좀 ATR 억제제의 혈액 약동학을 보여주는 그래프이다. ATR 억제제의 리포좀 제형은 실시예 7에 기재된 바와 같이 제조하였다. 리포좀은 20 mg 약물/kg의 용량으로 3마리의 7-9-주령 암컷 CD-1 마우스 (Charles River) (체중 약 25 g)에 정맥내 투여하였다. 혈액 샘플은 0.08, 1.5, 4, 8 및 24 h 시점에서 복재 정맥으로부터 채혈함에 의해 리튬 헤파린 튜브에 수거하였다. 혈장은 5분 동안 10000 rpm으로 원심분리함에 의해 세포 분획으로부터 분리하였다. 약물은 혈장 샘플을 메탄올 (1 % Ac/MeOH) 중 200 μl의 1% 산성 산으로 -80 ℃에서 적어도 2시간 까지 항온처리함에 의해 추출하였다. 혈장 단백질은 20분 동안 15000 rpm에서 원심분리하여 회전 하강시켰다. 이어서 75 μl의 상등액을 HPLC 바이알 (Thermo Scientific, Cat# C4011-LV1)로 이전시키고 추가로 75 μl의 1 % Ac/MeOH를 첨가하였다. 약물 함량은 HPLC로 분석하여 각각의 샘플을 2회 측정하였다. 데이터는 주사 후 시간에 대해 플롯팅된 % 주사된 용량으로서 표현하였다. 하기의 도5에 나타낸 바와 같이, 화합물 1, 화합물 3 및 화합물 2의 리포좀 제형은 24시간 시점에서 HPLC 분석에 의해 검출될 수 없는 리포좀 화합물 1 및 화합물 3과 함께 순환계에서 불안정하였고 리포좀 화합물 2는 8시간 시점에서 이미 검출될 수 없었다. 2개의 리포좀 제형 화합물 6 및 화합물 5는 24시간 후 초기 주사된 용량 16 % 초과로 양호한 순환계 지속성을 갖는다. 하기 표 2는 혈액 PK 곡선을 요약한다. 리포좀 화합물 6 및 화합물 5는 다른 리포좀 예와 비교하여 최고의 혈장 반감기를 보여준다.

[0141] **표 3 리포좀 ATR 억제제의 약동학 파라미터**

약물	C_{max} (mg/ml)	AUC (mg/ml*h)	Vd (ml)	Cl (ml/h)	$T_{1/2}$ (h)	ID의 % 24시간 후
Ls-화합물 3	0.271	1.659	2.020	0.330	4.24	0.0
Ls-화합물 6	0.303	3.021	1.655	0.166	6.91	16.4
Ls-화합물 2	0.080	0.160	5.806	2.890	1.39	0.0
Ls-화합물 5	0.227	2.504	2.012	0.182	7.65	17.2
Ls-화합물 A	0.237	1.902	0.712	0.089	5.56	9.0
Ls-화합물 1	0.053	0.043	6.358	7.841	0.56	0.0

[0142]

[0143] **실시예 9A: 마우스에서 자궁경부암 이종이식에 대한 TEA.SOS를 사용하여 제조된 LS-화합물 A의 *생체내* 항종양 효능 및 관용성**

[0144] 도 6은 실시예 9A에 기재된 바와 같이 자궁경부 MS571 이종이식 모델에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 A의 항종양 효능을 보여주는 그래프이다.

[0145] 도 7은 실시예 9A에 기재된 바와 같이 자궁경부 C33A 이종이식 모델에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 A의 항종양 효능을 보여주는 그래프이다.

[0146] 도 8은 실시예 9A에 기재된 바와 같이 자궁경부 C33A 이종이식 모델에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 A의 항종양 효능을 보여주는 그래프이다.

[0147] 도 9는 실시예 9A에 따른 자궁경부 MS751에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 A의 관용성을 보여주는 그래프이다.

[0148] MM-398 (리포좀 이리노테칸)과 조합된 ATR 억제제 화합물 A (Ls-화합물 A)가 로딩된 리포좀의 항종양 효능은 인간 자궁경부 MS751, C33A 및 SiHa 세포주의 모델에서 연구하였다. 세포는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection) (Rockville, MD)에서 수득하였고 10 % 태아 소 혈청, 50 U/mL 페니실린 G, 및 50 μg/mL의 스트렙토마이신 설페이트가 보충된 RPMI 배지에서 공급자에 의해 추천된 바와 같이 37 ℃, 5 % CO_2에서 증식시켰다. NCR nu/nu 동종접합성 무흉선 수컷 누드 마우스(4-5주령, 체중 적어도 16 g)는 제조원 (Charles River)으로부터 수득하였다. 마우스는 30 % 마트리겔이 보충된 PBS에서 현탁된 5 x 106 세포를 함유하는 0.1 mL의 현탁액을 우측 옆구리에 피하 접종하였다. 종양이 150 mm^3 내지 350 mm^3의 크기에 도달한 경우, 동물은 하기의 방법에 따라 치료 그룹에 할당하였다. 동물은 종양 크기에 따라 등급화하고 종양 크기를 감소시키는 6개 카테고리로 분할하였다. 10 동물/그룹의 4개의 치료 그룹은 각각의 크기 카테고리로부터 무작위로 선택함에 의해 형성되어 각각의 치료 그룹에서 모든 종양 크기는 균등하게 제공되도록 하였다.

[0149] 동물은 하기 제조의 7일 간격으로 4개의 꼬리 정맥 주사를 투여받았다:1) 대조군 (HEPES-완충 식염수 pH 6.5); 2) 주사 당 2 또는 5 mg/kg의 용량에서 MM-398; 3) 주사 당 20 또는 60 mg/kg에서 리포좀 화합물 A; 4) MM-398에 이어서 24시간 간격으로 리포좀 화합물 A의 주사.주사용 리포좀은 실시예 7에 기재된 바와 같이 제조하였다. 동물 체중 및 종양 크기는 주마다 2회 모니터링하였다. 종양 진행은 주당 2회 최대 (길이) 및 최소 (폭) 축을 따라 종양의 촉지 및 캘리퍼 측정에 의해 모니터링하였다. 종양 크기는 하기 식을 사용한 캘리퍼 측정으로부터 주당 2회 결정하였다(Geran, R.I., 등,1972 Cancer Chemother.Rep.3:1-88):

[0150] 종양 용적 = [(길이) x $(폭)^2$] / 2

[0151] 치료 관련 독성을 평가하기 위해, 동물은 또한 주당 2회 칭량하였다. 동물은 종양 접종 후 60일 동안 관찰하였다. 그룹 내 종양이 마우스 체중의 10 %에 도달하는 경우, 그룹 내 동물을 안락사시켰다. 그룹에 걸친 평균 종양 용적을 함께 플롯팅하고 시간 경과에 따라 비교하였다. 하기에 나타낸 바와 같이, 도 6, 7, 및 8은 MM-398과 리포좀 ATR 억제제 화합물 A의 조합물은 모든 3개의 이종이식 모델에서 단독의 MM-398 및 리포좀 화합물 A와 비교하여 상당히 강한 항종양 효과를 갖는다. 치료 관련 독성은 동물 체중의 동력학에 의해 평가하였다(도9). 어느 그룹도 임의의 유의적 독성을 나타내지 않았다. 모든 치료된 그룹에서 동물의 체중은 대조군 그룹에 상응하였고 지속적으로 증가하였다. 따라서, ATR 억제제 화합물 A의 리포좀 제형은 독성에서 감지할만한 증가 없이 연구된 종양 모델에서 증가된 항종양 활성을 보여주었다.

[0152] **실시예 9B: MM-398 이리노테칸 리포좀 제조**

[0153] 실시예 9a 및 본원의 다른 곳에 사용되는 MM398은 다중-단계 공정에서 제조될 수 있는 이리노테칸 리포좀이다. 먼저, 지질은 가열된 에탄올 중에서 용해시킨다. 지질은 3:2:0.015 몰비로 조합된 DSPC, 콜레스테롤 및 MPEG-2000-DSPE를 포함할 수 있다. 바람직하게, 리포좀은 3:2:0.015 몰비로 조합된 DSPC, 콜레스테롤 및 MPEG-2000-DSPE로 이루어진 소포에 캡슐화된 이리노테칸 슈크로스 옥타설페이트 (SOS)를 캡슐화할 수 있다. 수득한 에탄올-지질 용액은 필수적으로, 용해된 지질로부터 형성된 소포내 캡슐화된 치환된 아민 (암모늄 형태로) 및 다중음이온을 함유하는 단일라멜라 리포좀의 적당한 크기(예를 들어, 80-120 nm)를 형성하는데 효과적인 조건하에서 치환된 아민 및 다중음이온을 함유하는 수성 매질에 분산시킨다. 상기 분산은 예를 들어, 에탄올 지질 용액을 치환된 아민 및 다중음이온을 함유하는 수용액과 지질 전이 온도 초과의 온도에서 혼합함에 의해 수행되고, 예를 들어, 상기 온도는 60-70 ℃이고, 수득한 수화된 지질 현탁액 (다중라멜라 리포좀)을 하나 이상의 트랙-에칭된, 예를 들어, 폴리카보네이트, 한정된 공극 크기를 갖는 막 필터를 통해 압력하에 압출시키고, 예를 들어, 상기 공극 크기는 50 nm, 80 nm, 100 nm, 또는 200 nm이다. 치환된 아민은 트리에틸아민 (TEA)일 수 있고 다중음이온은 약 0.4-0.5N의 농도에서 화학양론적 비로 조합된 슈크로스 옥타설페이트 (SOS)일 수 있다(예를 들어,

TEA_8SOS). 모든 또는 실질적으로 모든 비-포집된 TEA 또는 SOS는 이어서 이리노테칸이 리포좀을, 이탈하는 TEA를 대체하면서 리포좀으로 진입하는데 효과적인 조건하에서 이리노테칸과 접촉시키기 전 제거 (예를 들어, 겔-여과, 투석 또는 한외여과에 의해)될 수 있다. 상기 조건은 하기로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 조건을 포함할 수 있다:삼투압제 (예를 들어, 5% 덱스트로스)의 리포좀 외부 배지로의 첨가로 포집된 TEA-SOS 용액의 삼투압을 균형화하고/하거나 로딩 동안에 리포좀의 붕괴를 예방하고, pH (예를 들어, 6.5까지)의 조정 및/또는 선택으로 로딩 단계 동안에 약물 및/또는 지질 분해를 감소시키고, 리포좀 지질의 전이 온도 초과로 온도의 증가 (예를 들어, 60 내지 70 ℃로)로 TEA 및 이리노테칸의 막관통 교환을 가속화한다. 리포좀을 거쳐 TEA를 대체하는 이리노테칸의 로딩은 바람직하게 모든 또는 실질적으로 모든 TEA가 리포좀으로부터 제거될 때까지 계속함으로써 리포좀에 걸친 농도 구배를 소모시킨다. 바람직하게, 이리노테칸 리포좀 로딩 공정은 수크로옥타설페이트에 대한 이리노테칸의 그램-당량 비율이 적어도 0.9, 적어도 0.95, 0.98, 0.99 또는 1.0일 때까지 (또는 약 0.9-1.0, 0.95-1.0, 0.98-1.0 또는 0.99-1.0 범위일 때까지) 계속한다. 바람직하게, 이리노테칸 리포좀 로딩 공정은 TEA가 TEA의 적어도 90 %, 적어도 95 %, 적어도 98 %, 적어도 99 % 이상이 리포좀 내부로부터 제거될 때까지 계속한다. 이리노테칸은 리포좀 내 이리노테칸 수크로소페이트를 형성할 수 있고 예를 들어, 이리노테칸 및 슈크로스 옥타설페이트의 몰비는 약 8:1이다. 이어서, 임의의 잔류 리포좀 외 이리노테칸 및 TEA를 예를 들어, 겔 (크기 배제) 크로마토그래피, 투석, 이온 교환 또는 한외여과 방법을 사용하여 제거하여 이리노테칸 리포좀을 수득한다. 리포좀 외부 배지는 주사 가능한, 약리학적으로 허용되는 유체, 예를 들어, 완충 등장 식염수로 대체한다. 최종적으로, 리포좀 조성물은 예를 들어, 0.2-마이크론 여과에 의해 멸균시키고 용량 바이알에 분배하고, 표지시키고 예를 들어 사용 때까지 2-8 ℃에서 냉장하여 저장하였다. 리포좀 외부 배지는 잔류 리포좀 외 이리노테칸 및 TEA가 제거됨과 동시에 약리학적으로 허용되는 유체로 대체될 수 있다. 조성물의 리포좀 외 pH는 예를 들어, 약 6.5 내지 8.0의 pH, 또는 (예를 들어, 7.0-8.0 및 7.25를 포함하는) 이들 사이의 임의의 적합한 pH 값에서 조성물을 제조함에 의해 목적하는 저장 안정성 성질을 제공하도록 (예를 들어, 180일 이상 4 ℃에서 저장 동안에 리포좀 내 라이소-PC의 형성을 감소시키기 위해) 조정되거나 달리 선택될 수 있다.

[0154] DSPC, 콜레스테롤 (Chol), 및 PEG-DSPE는 각각 3:2:0.015 몰비에 상응하는 양으로 칭량하였다(예를 들어, 1264 mg/412.5 mg/22.44 mg). 지질은 클로로포름/메탄올 (4/1 v/v)에 용해시키고, 완전히 혼합하고 4개 분취액(A-D)으로 분할하였다. 각각의 샘플은 60 ℃에서 회전 증발기를 사용하여 건조 증발시켰다. 잔여 클로로포름은 실온에서 12시간 동안 진공 (180 μtorr)하에 위치시킴에 의해 지질로부터 제거하였다. 건조된 지질은 60 ℃에서 에탄올 중에 용해시키고, 적당한 농도의 예비-가온된 TEA_8SOS를 첨가하여 최종 알콜 함량이 10 % (v/v)가 되도록 하였다. 지질 농도는 75 mM이었다. 지질 분산물은 리펙스 써모배럴 압출기 (Lipex thermobarrel extruder) (Northern Lipids, Canada)를 사용하여 약 10회 2 적층된 0.1 μm 폴리카보네이트 막 (Nucleopore)를 통해 약 65 ℃에서 압출시켜, 전형적인 평균 직경이 95-115 nm (준탄성 광 산란에 의해 결정된)인 리포좀을 제조하였다. 압출된 리포좀의 pH는 1N NaOH를 사용하여 필요한 만큼 pH 6.5로 조정하였다. 리포좀은 이온-교환 크로마토그래피 및 크기-배제 크로마토그래피로 정제하였다. 먼저, DOWEX IRA 910 수지는 1 N NaOH로 처리함에 이어서 탈이온수로 3회 세척하고 이어서 3N HCl로 3회 세척하고 이어서 물로 다수 세척한다. 리포좀은 제조된 수지를 통해 통과시키고 용출된 분획의 전도성은 유동-세포 전도성 측정기 (Pharmacia, Upsalla, Sweden)를 사용하여 측정하였다. 분획물은 전도성이 15 μS/cm 미만인 경우 추가의 정제를 위해 허용 가능한 것으로 간주되었다. 리포좀 용출물을 이어서 탈이온수로 평형화된 Sephadex G-75 (Pharmacia) 칼럼에 적용하고 수거된 리포좀 분획물은 전도성 (전형적으로 1 μS/cm 미만)에 대해 측정하였다. 교차-막 등장성은 40 % 덱스트로스 용액을 5 % (w/w)의 최종 농도로 첨가하고 스톡 용액 (0.5 M, pH 6.5)으로부터 최종 농도 10 mM까지 완충액 (Hepes)을 첨가하여 성취되었다.

[0155] 이리노테칸의 스톡 용액은 탈이온수 중 이리노테칸·HCl 삼수화물 분말을 물 함량 및 각각의 배치의 분석 서티피케이트로부터 수득된 불순물의 수준을 고려하여 15 mg/mL의 무수 이리노테칸-HCl로 용해시킴에 의해 제조하였다. 약물 로딩은 500 g/mol 리포좀 인지질에서 이리노테칸을 첨가하고 고온수 배치에서 30분 동안 60 ± 0.1 ℃로 가열함에 의해 개시하였다. 용액은 빙냉수에 침지시킴에 의해 물 욕조로부터 제거 즉시 신속히 냉각시켰다. 리포좀 외 약물은 Hepes 완충 식염수 (10 mM Hepes, 145 mM NaCl, pH 6.5)로 평형화하고 용출되는 세파덱스 G75 칼럼을 사용한 크기 배제 크로마토그래피로 제거하였다. 샘플은 HPLC에 의해 이리노테칸에 대해 분석하고 바틀렛 (Bartlett) 방법 (포스페이트 결정을 참조한다)에 의해 포스페이트에 대해 분석하였다.

[0156] 본원에 기재된 저장 안정한 이리노테칸 리포좀의 하나의 바람직한 예는 ONIVYDE (이리노테칸 리포좀 주사)로서 시판되는 제품이다. ONIVYDE는 정맥내 사용을 위해 이리노테칸 하이드로클로라이드 삼수화물과 함께 리포좀 분산물로 제형화된 토포이소머라제 억제제이다. ONIVYDE는 겜시타민-기반 치료요법 후 질환 진행 후의 췌장의 전

이성 선암종의 치료를 위해 지정된다.

[0157] ONIVYDE는 약 7.25의 pH를 갖는 저장 안정화된 리포좀이다. ONIVYDE 생성물은 이리노테칸 하이드로클로라이드 삼수화물 출발 물질로부터 수득된, 리포좀에 캡슐화된 이리노테칸 슈크로소페이트를 함유한다. 이리노테칸의 화합물 명은 (S)-4,11-디에틸-3,4,12,14-테트라하이드로-4-하이드록시-3,14-디옥소1H-피라노[3',4':6,7]-인돌리지노[1,2-b]퀴놀린-9-일-[1,4'비피페리딘]-1'-카복실레이트이다. ONIVYDE의 용량은 이리노테칸 리포좀을 제조하기 위해 사용된 이리노테칸 삼수화물 하이드로클로라이드 출발 물질의 등가량을 기준으로 또는 리포좀 내 이리노테칸의 양을 기준으로 계산될 수 있다. 이리노테칸 삼수화물 하이드로클로라이드의 그램 당 약 866 mg의 이리노테칸이 있다. 예를 들어, 이리노테칸 하이드로클로라이드 삼수화물 출발 물질의 양을 기준으로 하는 80 mg의 ONIVYDE 용량은 실질적으로 최종 제품 중 이리노테칸 약 0.866x (80 mg) (즉, 이리노테칸 하이드로클로라이드 출발 물질의 중량을 기준으로 ONIVYDE의 80 mg/m^2의 용량은 최종 제품에서 이리노테칸의 약 70 mg/m^2과 동등하다)을 함유한다. ONIVYDE는 멸균성의 백색 내지 연황색 불투명 등장성 리포좀 분산물이다. 각각의 10 mL의 단일-용량 바이알은 4.3 mg/mL의 농도로 43 mg의 이리노테칸 유리 염기를 함유한다. 리포좀은 단일라멜라 지질 이중층 소포이고 지경은 대략 110 nm이고, 이는 슈크로스 옥타설페이트 염으로서 겔화되거나 침전된 상태로 이리노테칸을 함유하는 수성 공간을 캡슐화한다. 소포는 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린 (DSPC) 6.81 mg/mL, 콜레스테롤 2.22 mg/mL, 및 메톡시-말단화된 폴리에틸렌 글리콜 (MW 2000)-디스테아로일포스파티딜에탄올아민 (MPEG-2000-DSPE) 0.12 mg/mL로 구성된다. 각각의 mL는 또한 완충액 4.05 mg/mL로서 2-[4-(2-하이드록시에틸) 피페라진-1-일]에탄설폰산 (HEPES)을 함유하고 등장성 시약 8.42 mg/mL로서 염화나트륨을 함유한다. ONIVYDE의 각각의 바이알은 단일-용량 바이알 중 백색 내지 연황색, 불투명, 리포좀 분산물로서 43 mg/10 mL의 이리노테칸 유리 염기를 함유한다.

[0158] 본 발명의 하나의 예에서, ONIVYDE 단위 투여 형태는 이리노테칸 하이드로클로라이드 삼수화물 80 mg/m2과 동등한 이리노테칸의 양 및 라이소-PC 약 20 % 미만을 제공하는, 이리노테칸 약 70 mg/m2의 총량을 제공하는 리포좀 내 캡슐화된 이리노테칸의 양을 포함하는 약제학적 조성물이다. 단위 투여 형태는 약 500 mL의 총 용적을 갖는 정맥내 제형일 수 있다. ONIVYDE는 다음과 같이 바이알로부터의 등장성 리포좀 분산물을 희석시킴에 의해 투여하기 위해 제조된다:바이알로부터 ONIVYDE의 계산된 용적을 인출한다. ONIVYDE는 500 mL 5 % 덱스트로스 주사액, USP 또는 0.9 % 염화나트륨 주사액, USP 중에 희석시키고 약한 뒤집기에 의해 희석된 용액을 혼합하고; 희석된 용액을 광으로부터 보호하고 실온에서 저장되는 경우 4시간 내에 제제의 희석된 용액을 투여하거나 냉장 조건 [2 ℃ 내지 8 ℃ (36 °F 내지 46 °F)]하에서 저장된 경우 24시간 내에 제제의 희석된 용액을 투여한다.

[0159] ONIVYDE (이리노테칸 리포좀 주사액)는 겜시타빈-기반 치료요법 후 진행된 췌장의 전이성 선암종을 갖는 환자의 치료를 위해, 5-플루오로우라실 및 류코보린과 조합하여 지정된다. 류코보린 및 플루오로우라실 전에 ONIVYDE를 투여한다. ONIVYDE의 추천된 용량은 2주 마다 90분에 걸쳐 정맥내 주입에 의해 투여되는 70 mg/m2 이리노테칸이다. UGT1A1*28 대립유전자에 동종접합성인 것으로 공지된 환자에서 ONIVYDE의 추천된 출발 용량은 90분에 걸쳐 정맥내 주입에 의해 투여되는 50 mg/m^2의 이리노테칸이다. ONIVYDE의 용량은 후속 주기에서 관용성인 바와 같이 70 mg/m^2로 증가될 수 있다. 정상의 상한치 초과로 혈청 빌리루빈을 갖는 환자를 위한 ONIVYDE에 대해 어떠한 추천된 용량이 없다. ONIVYDE는 90분에 걸쳐 정맥내로 희석된 용액으로서 주입된다.

[0160] 적합한 치료 용법은 (l+d 라세미 형태) 류코보린 400 mg/m^2 (또는 200 mg/m^2 의 활성 l 형태의 류코보린) 및 2주 마다 46시간에 걸쳐 플루오로우라실 2,400 mg/m^2 (ONIVYDE/5-FU/LV; n=117), 3주 마다 ONIVYDE 100 mg/m^2 (n=147), 또는 4주 동안 이어서 2주 휴지기 (5-FU/LV; n=134)까지 매주 24시간에 걸쳐 류코보린 200 mg/m^2 및 플루오로우라실 2000 mg/m^2과 함께 ONIVYDE 70 mg/m^2을 포함한다.

[0161] **실시예 10: 마우스에서 폐암 이종이식에 대한 TEA.SOS를 사용하여 제조된 LS-화합물 5의 생체내 항종양 효능 및 관용성**

[0162] 도10a 및 도10b는 각각 하기의 도면에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 5의 효능을 보여주는 그래프이다: NCI-H2170 (도10a) 또는 DMS-114 (도10b) 마우스 이종이식 모델, 실시예 10에서 논의된 바와 같이.

[0163] 도11a 및 도11b는 각각 하기의 도면에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 5의 효능을 나타내는 카플란-메이어 생존 곡선을 보여주는 그래프이다: NCI-H2170 (도11a) 및 DMS-114 (도11b) 마우스 이종이식 모델, 실시예 10에서 논의된 바와 같이.

[0164] 도12a 및 도12b는 각각 하기의 도면에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 5의 관용성을 보여주는 그래프이다: NCI-H2170 (도12a) 또는 DMS-114 (도12b), 마우스 이종이식 모델에서.

[0165] MM-398 (리포좀 이리노테칸)과 조합된 ATR 억제제 화합물 5로 로딩된 리포좀의 항종양 효능은 인간 NCI-H2170 (폐 편평 세포 암종) 및 DMS-114 (소 세포 폐 암종) 폐 세포주의 모델에서 연구되었다.

[0166] 세포는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection) (Rockville, MD)에서 수득하였고 10 % 태아 소 혈청, 50 U/mL 페니실린 G, 및 50 μg/mL의 스트렙토마이신 설페이트가 보충된 RPMI 배지에서 공급자에 의해 추천된 바와 같이 37 ℃, 5 % CO_2에서 증식시켰다. NCR nu/nu 동종접합성 무흉선 수컷 누드 마우스(4-5주령, 체중 적어도 16 g)는 제조원 (Charles River)으로부터 수득하였다. 마우스는 30 % 마트리겔이 보충된 PBS에서 현탁된 5 x 10^6 세포를 함유하는 0.1 mL의 현탁액을 우측 옆구리에 피하 접종하였다. 종양이 150 mm^3 내지 350 mm^3의 크기에 도달한 경우, 동물은 하기의 방법에 따라 치료 그룹에 할당하였다. 동물은 종양 크기에 따라 등급화하고 종양 크기를 감소시키는 6개 카테고리로 분할하였다. 10 동물/그룹의 4개의 치료 그룹은 각각의 크기 카테고리로부터 무작위로 선택함에 의해 형성되어 각각의 치료 그룹에서 모든 종양 크기는 균등하게 제공되도록 하였다. 동물은 하기 제조의 7일 간격으로 4개의 꼬리 정맥 주사를 투여받았다:1) 대조군 (HEPES-완충 식염수 pH 6.5); 2) 주사 당 5 mg/kg의 용량에서 MM-398; 3) 주사 당 80 mg/kg에서 리포좀 화합물 5; 4) MM-398에 이어서 24시간 간격으로 리포좀 화합물 5의 주사.주사용 리포좀은 실시예 7에 기재된 바와 같이 제조하였다. MM-398은 실시예 9B에 기재되어 있다.

[0167] 동물 체중 및 종양 크기는 주마다 2회 모니터링하였다. 종양 진행은 주당 2회 최대 (길이) 및 최소 (폭) 축을 따라 종양의 촉지 및 캘리퍼 측정에 의해 모니터링하였다. 종양 크기는 하기 식을 사용한 캘리퍼 측정으로부터 주당 2회 결정하였다.

[0168] 종양 용적 = [(길이) x $(폭)^2$] / 2

[0169] 치료 관련 독성을 평가하기 위해, 동물은 또한 주당 2회 칭량하였다. 그룹 내 종양이 마우스 체중의 10 %에 도달하는 경우, 그룹 내 동물을 안락사시켰다. 그룹에 걸친 평균 종양 용적을 함께 플롯팅하고 시간 경과에 따라 비교하였다.

[0170] 하기에 입증된 바와 같이, 도10a 및 10b 및 도.11a 및 11b, 리포좀 ATR 억제제 화합물 5는 폐 이종이식 모델에서 MM-398의 항종양 효능을 유의적으로 개선시켰다. 리포좀 ATR 억제제 및 MM-398의 조합 치료는 동물의 체중에 영향을 미치지 않았다(도 12a 및 12b).

[0171] **실시예 11: 마우스에서 폐암 이종이식에 대해 MM-398과 조합된 리포좀 억제제 Ls-화합물 5 및 LS-화합물 A의 생체내 항종양 효능의 비교**

[0172] 도13a 및 13b는 각각 하기의 도면에서 MM-398과 조합된 리포좀 화합물 5의 효능을 보여주는 그래프이다: Calu-6 (도13a) 또는 COLO-699 (도13b) 마우스 이종이식 모델. 예를 들어, 도.13a 및 13b의 데이터는, 리포좀 ATR 억제제 화합물 5는 2개의 모델에서 MM-398의 항종양 효능을 유의적으로 개선시키지만, 리포좀 중에 제형화된 화합물 A는 COLO-699 이종이식 모델에서만 활성이었음을 보여준다.

[0173] MM-398 (리포좀 이리노테칸)과 조합된 ATR 억제제 화합물 5로 로딩된 리포좀의 항종양 효능은 인간 Calu-6 및 COLO-699 폐 세포주의 이종이식 모델에서 화합물 A의 리포좀 제형과 비교하였다.

[0174] 세포는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection) (Rockville, MD)에서 수득하였고 10% 태아 소 혈청, 50 U/mL 페니실린 G, 및 50 μg/mL의 스트렙토마이신 설페이트가 보충된 RPMI 배지에서 공급자에 의해 추천된 바와 같이 37 ℃, 5 % CO2에서 증식시켰다. NCR nu/nu 동종접합성 무흉선 수컷 누드 마우스(4-5주령, 체중 적어도 16 g)는 제조원 (Charles River)으로부터 수득하였다. 마우스는 30 % 마트리겔이 보충된 PBS에서 현탁된 5 x 106 세포를 함유하는 0.1 mL의 현탁액을 우측 옆구리에 피하 접종하였다. 종양이 150 mm^3 내지 350 mm^3의 크기에 도달한 경우, 동물은 하기의 방법에 따라 치료 그룹에 할당하였다. 동물은 종양 크기에 따라 등급화하고 종양 크기를 감소시키는 6개 카테고리로 분할하였다. 10 동물/그룹의 4개의 치료 그룹은 각각의 크기 카테고리로부터 무작위로 선택함에 의해 형성되어 각각의 치료 그룹에서 모든 종양 크기는 균등하게 제공되도록 하였다. 동물은 하기 제조의 7일 간격으로 4개의 꼬리 정맥 주사를 투여받았다: 1) 대조군 (HEPES-완충 식염수 pH 6.5); 2) 주사 당 10 또는 20 mg/kg의 용량에서 MM-398; 3) 주사 당 80 mg/kg에서 리포좀 화합물 5;

4) 주사 당 80 mg/kg에서 리포좀 화합물 A; 5) MM-398에 이어서 24시간 간격으로 리포좀 화합물 5의 주사. 6) MM-398에 이어서 24시간 간격으로 리포좀 화합물 A의 주사. 주사용 리포좀은 실시예 7에 기재된 바와 같이 제조하였다.

[0175] 동물 체중 및 종양 크기는 주마다 2회 모니터링하였다. 종양 진행은 주당 2회 최대 (길이) 및 최소 (폭) 축을 따라 종양의 촉지 및 캘리퍼 측정에 의해 모니터링하였다. 종양 크기는 하기 식을 사용한 캘리퍼 측정으로부터 주당 2회 결정하였다.

[0176] $$\text{종양 용적} = [(\text{길이}) \times (\text{폭})^2] / 2$$

[0177] 치료 관련 독성을 평가하기 위해, 동물은 또한 주당 2회 칭량하였다. 그룹 내 종양이 마우스 체중의 10 %에 도달하는 경우, 그룹 내 동물을 안락사시켰다. 그룹에 걸친 평균 종양 용적을 함께 플롯팅하고 시간 경과에 따라 비교하였다.

[0178] **실시예 12: 유리 약물 조합 스크리닝 연구**

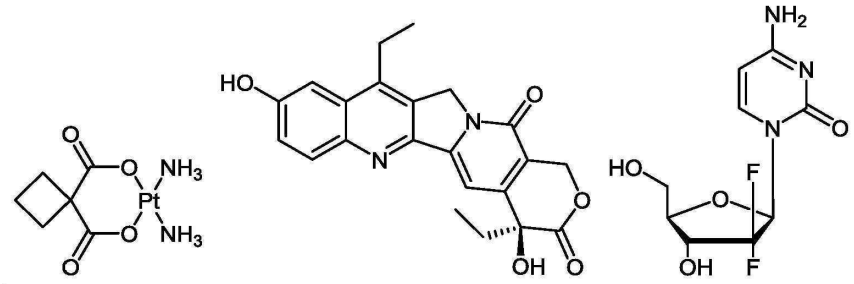
[0179] 도 14a는 폐암 세포주의 패널에서 화합물 6 및 화합물 5의 시험관내 단독치료요법 세포 사멸을 보여주는 그래프이다. 화합물 5는 화합물 6 보다 낮은 IC_{50} ~3 (=100.5) 배수로 보다 효과적이다. 도14b는 이에 대한 화합물 5의 효과를 보여주는 그래프이다. 3개의 화학치료학적 제제 (카보플라틴, 젬시타빈, 화합물 B)와 조합된 화합물 6. 상기 도는 1 μg/ml의 화합물 6 또는 화합물 5와 화학치료학적 제제의 조합의 로그 (μM)에서 IC_{50}을 비교한다. 화합물 5의 화학치료학적 제제로의 첨가는 모든 시험된 세포독성 제제에서 및 하나를 제외한 모든 세포주에서 화합물 6 보다 강력하다 (보다 낮은 IC_{50}).

[0180] 도15는 Sum190PT 세포주 (TNBC)에서 조합 (실시예 2 + 화합물 B) IC_{50} 전환을 보여주는 그래프이다.

[0181] 도16a 및 도16b는 MDA-MB-453 세포주 (TNBC)에서 화합물 A와 화합물 B의 조합에 대한 실시예 2의 화합물과 화합물 B의 IC50 전환의 비교를 보여주는 그래프이다.

[0182] **배양/치료 조건**

[0183] 시험관내 효능 연구는 Corning Cat #3707 384웰 백색 투명 바닥 플레이트와 함께 CELLTITER-GLO 발광성 세포 생존 검정 (Promega)을 사용하여 수행하였다. 세포는 384웰 포맷에서 분주하고 (1000 세포/웰) 37 ℃에서 24시간 동안 항온처리되도록 방치하였다. 단독치료요법 약물은 24시간 시점에서 첨가하고 이어서 37 ℃에서 24시간 동안 항온처리되도록 방치하였다. 48시간 시점에서, 배지 중 약물을 제거하고, PBS로 세척하고 새로운 배지를 첨가하였다. 세포는 이어서 37 ℃에서 72시간 동안 항온처리하였다. 조합 연구를 위해, 세포는 24시간 동안 카보플라틴 또는 화합물 B 또는 젬시타빈에 노출시킴에 이어서 화학치료학적 제제를 제거하고 세포는 24시간 동안 2차 화합물 (ATR 억제제)에 노출시켰다. 세포는 추가로 48시간 동안 새로운 배지에서 항온처리하였다.

[0184] 

[0185] 카보플라틴 화합물 B 젬시타빈

[0186] 120시간 시점에서 배지를 제거하고 CELLTITER-GLO (CTG) 시약을 첨가하였다(PBS와 1:1 비율). 플레이트는 발광 분석기 (Envision 다중표지 판독기)를 사용하여 판독하였다.

[0187] 데이터 분석:

[0188] 데이터는 Matlab (Mathworks, Natick MA)을 사용하여 개발된 인-하우스 알고리즘을 사용하여 분석하였다. 요약하면, 평균 CTG 평균 발광 값은 4개의 복제 웰에 대해 계산하였다. 특이점 검출은 변동 계수 (CV>20 %)를 계산함에 의해 수행되고 특이점은 평균으로부터 제거하였다. CTG 값은 대조군 비-처리된 웰을 기준으로 규정화하였

다. 마이크로몰 (μM)의 약물 농도는 4개 파라미터 로지스틱 곡선에 피팅하기 전에 로그 전환시켰다.

[0189] $$y = b + \frac{(a-b)}{(1+10^{(IC50-C)*기울기})}$$

[0190] *여기서, C:약물의 농도, y:규정화된 CTG 값, a:상부 점근선 (최대 세포 사멸을 나타낸다), b:하부 점근선 (제한된 0.8-1.2), IC50, 기울기:로지스틱 곡선 기울기.*

[0191] 데이터 품질 관리는 농도 범위가 이들 법칙에 따라 최적이도록 보장하기 위해 수행되었다: (1) 최저 농도가 70 % 초과의 세포를 사멸시키는 경우, 상기 농도 범위는 또한 강력한 것으로 간주되고 (2) 최고 농도가 30 % 미만의 세포를 사멸시키는 경우, 상기 농도 범위는 낮은 것으로 간주되거나 세포주는 또한 내성이다. 추가로, 피트의 양호함은 R^2를 사용하여 평가하였고 R^2<0.9는 나쁜 피트로서 플래그된다.

[0192] 통계학적 분석은 JMP을 사용하여 수행하였다 (SAS Institute Inc.,NC) 및 p<0.05는 유의적인 것으로 고려되었다.

[0193] **실시예 13: ATR 활성 결정**

[0194] EC_{50} 결정은 기질로서 GST 태그된 전장 p53을 사용한 Eurofins ATR/ATRIP HTRF 검정에서 선형 효소 농도를 사용하여 키나제 ATR/ATRIP (h)에 대해 공급된 세트의 화합물에 대해 수행되었다.

[0195] 15 μM의 Km 내 ATP 농도에서 ATR/ATRIP(h)의 활성은 10 μM로부터 세미-로그 희석된 화합물의 9개 농도에서 결정되었다. Ser15에 대한 p53의 ATR/ATRIP 인산화는 유로피움 표지된 항-포스포 Ser15 p53 항체 및 항-GST-d2 항체로 이루어진 에너지 전달 복합체의 형성을 통해 측정하였다. 모든 데이터 지점은 DMSO 대조군 및 EDTA 블랭크와 함께 2회 수행하였다.

[0196] ATR/ATRIP(h)는 25 mM HEPES pH 8.0, 0.01 % Brij-35, 1 % 글리세롤, 5 mM DTT, 1 mg/mL BSA에서 예비 희석하였고 기질로서 30 nM GST,cMyc p53-(hu,FL)을 사용하는 25 mM HEPES pH 8.0, 0.01 % Brij-35, 1 % Glycerol, 10 mM $MnCl_2$에서 검정하였다. 반응은 ATP를 10 μM의 최종 농도로 첨가하여 개시하였다.

[0197] 개별 레플리케이트는 DMSO 양성 대조군 활성의 % 측면에서 표현하였다. 각각의 개시제 농도의 평균 활성 (% 대조군)은 억제제 농도에 대해서 플롯팅하고, EC_{50} 값은 GRAPHPAD PRISM를 사용하여 결정하였다.

[0198] % 대조군 활성으로서 표현되는 데이터는 억제제 농도에 대해 플롯팅하고 GRAPHPAD PRISM을 사용한 4개 파라미터 로지스틱에 피팅하였다. 각각의 화합물에 대한 그래프는 첨부된 엑셀 보고서에서의 데이터와 함께 나타낸다. 화합물 효능의 요약은 하기에 나타낸다.

[0199] **표 4**

[0200]

화합물 ID	키나제	ATP μM	EC_{50}* nM	상부	하부	힐	r^2
화합물 6	ATR ATRIP(h)	10	470.8	101	-2	-0.768	0.998
화합물 2	ATR ATRIP(h)	10	139.8	94	1	-0.911	0.998
화합물 5	ATR ATRIP(h)	10	233.9	95	1	-0.819	0.996
화합물 1	ATR ATRIP(h)	10	49.6	95	-1	-0.772	0.994
화합물 4	ATR ATRIP(h)	10	353.4	97	1	-0.860	0.997
화합물 3	ATR ATRIP(h)	10	196.1	98	-3	-0.776	0.999
화합물 A.	ATR ATRIP(h)	10	<1	ND	ND	ND	ND

[0201] **실시예 14:ATM 활성 결정**

[0202] 평가된 IC_{50} 값은 다음과 같다 (표준 키나제 프로파일러를 사용하여 수득된):

[0203] **표 5**

화합물	키나제	IC_{50} (nM)
화합물 6	ATM(h)	>10,000
화합물 2	ATM(h)	4817
화합물 5	ATM(h)	>10,000
화합물 1	ATM(h)	3864
화합물 4	ATM(h)	6869
화합물 3	ATM(h)	>10,000
화합물 A.	ATM(h)	42

[0204]

[0205] **실시예 15: 웨스턴 블롯 분석을 사용한 전체 및 포스포-ATR의 검출**

[0206] 하기 도17을 참조하여, 폐암 세포 DMS-114는 단독으로 또는 *시험관내* 조합된 젬시타빈 [16 nM] 또는 ATR 억제제 (화합물 A 또는 화합물 5 [1 μM])에 노출시켰다. 전체 세포 단백질 용해물은 2 % SDS 함유 세포 용해 완충액을 사용한 1, 3, 6 및 24 시간 후 생성하고 샘플이 수거되고 웨스턴 블롯 분석을 위해 동시에 함께 수행할 때까지 -80 ℃에서 저장하였다. 하기의 단백질 및 목적하는 인단백질은 제조원 (Cell Signaling Technology) (하기 방법 및 재료를 참조한다)으로부터 구입한 항체에 의해 검출하였다: 총 및 포스포-ATR (S428), 포스포-CHK1 (S317 및 S345), γH2AX, 베타-액틴.

[0207] 도 17의 결과: 총계 및 포스포-ATR 신호는 2개의 ATR 억제제 (화합물 A 및 화합물 5) 중 어느 하나의 첨가와 함께 시간 경과에 따라 강하게 감소하였고 대조군 또는 젬시타빈 단독의 치료에서는 그렇지 않았다 (예를 들어, 24시간에서 레인 1, 2를 3, 4 또는 5, 6과 비교한다). 젬시타빈에 응답하여, 포스포-CHK1 (S317 및 S345) 신호 전달은 24시간의 기간 동안 상당히 증가한다. 임의의 사용되는 ATR 억제제 (화합물 A 또는 화합물 5)의 첨가는 CHK1의 인산화 신호를 폐지시킨다. 억제제 둘 다에 의한 ATR 단백질 및 다운스트림 CHK-1 신호 전달의 감소는 2개 분자의 특이적 온-표적 효과를 확인시켜 준다. 보다 중요하게, 우리의 가설은 세포 주기 정지 및 DNA 손상 복구를 유도하는 것으로 보이는 CHK1 인산화 신호전달에 의해 구동된 세포 주기의 상실이 DNA 손상의 누적에 의해 세포사를 유도한다는 것이다. 증가된 γH2AX 신호는 DNA 손상의 증가된 독성 및 누적의 측정을 위한 대용물로서 나타날 수 있다.

[0208] **세포 배양물**

[0209] U2OS 및 모든 다른 세포는 10 % 태아 소 혈청 (FBS) 및 항생제가 보충된 (RPMI)에서 성장시켰다. 이미지화 및 시간-지체 상용성 NucLight 적색 세포주는 제조원 (Essen Bioscience Inc)에 의해 추천된 바와 같이 렌티바이러스 입자, 감염 및 푸로마이신 선택 프로토콜을 사용하여 생성하였다.

[0210] **항체 및 웨스턴-블롯**

[0211] 모든 표적 및 포스포-특이적 항체는 제조원 (Cell Signaling and/or Epitomics)으로부터 구입하였고 1:1000 희석으로 사용하였다. 모든 항체의 목록은 표 6에서 가용하다. 표준 항체 기반 웨스턴 블롯 및 면역조직화학 프로토콜을 사용하였다. 간략하게, 2 % SDS 기반 세포 용해 완충액을 사용하여 웨스턴 블롯팅에 대한 전체 세포 용해물을 수거하였다. 2차 항체 및 염색 프로토콜은 제조원 (LiCor Biosciences and/or BD Bioscience)으로부터 구입하고 이에 따라 수행하였다.

[0212] **표 6**

표적	회사	카탈로그 #
ATR	세포 신호전달 기술	2790
ATR 포스포 (S428)	세포 신호전달 기술	2853
CHK1 포스포 (S317)	세포 신호전달 기술	12302
CHK1 포스포 (S345)	세포 신호전달 기술	2348
H2AX 포스포 (S139)	세포 신호전달 기술	9718
베타-액틴	세포 신호전달 기술	4970

[0213]

[0214] **전체 세포 용해 프로토콜**

[0215] 세포는 6 cm 디쉬 스케일에서 성장시키고 처리하였다. 세포를 수거하기 위해 배지를 제거하고 신속하게 빙냉 PBS로 대체하였다. 이어서 PBS는 250 μL의 2 % SDS 용해 완충액으로 대체하였다. 항온처리 5분 후, 용해된 세포는 박리시키고 세포 용해물 균질화기 미세원심분리 회전-칼럼상에 로딩하였다 (QIAshredder, Qiagen, Cat.-Nr.79656). 여과물은 이어서 0.2 μm 원심분리 필터 칼럼 상에 로딩하였다 (Nanosep MF 0.2_m, Pall, Cat.-Nr.ODM02C34). 용해물은 이어서 -80 ℃에 저장하였다.

[0216] 2 % SDS 함유 용해 완충액 (표 7)은 하기에 따라 변형시켰다: Steven 등,"Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways," Nat Med 10, no.12 (December 2004):1390-1396

[0217] **표 7**

적정 pH=6.8	최종 농도
트리즈마-염기 (Trizma-Base)	50mM
SDS	2%
글리세롤	5%
EDTA	5mM
NaF	1mM

[0218]

[0219] **실시예 16: 광범위 키나제 패널 스크리닝 (359)**

[0220] 359 중 주요 히트는 다음과 같다:ALK, ARK, c-MER, CLK1, DYRK, GSK3a, GSK3b, FLT2, FLT3, MLK1, SIK2, TNIK, 및 YSK4.

[0221] **표 8**

키나제:	화합물 5 (M)	Log IC_{50}	키나제:	nM
ALK1/ACVRL1	3.57E-08	-7.45	ALK1/ACVRL1	35.7
ALK2/ACVR1	1.66E-08	-7.78	ALK2/ACVR1	16.6
ARK5/NUAK1	1.68E-08	-7.78	ARK5/NUAK1	16.8
CLK1	1.34E-07	-6.87	CLK1	134
CLK4	8.86E-08	-7.05	CLK4	88.6
DDR1	1.91E-07	-6.72	DDR1	191
DYRK2	7.18E-08	-7.14	DYRK2	71.8
FLT4/VEGFR3	6.34E-08	-7.20	FLT4/VEGFR3	63.4
GSK3a	5.73E-09	-8.24	GSK3a	5.73
GSK3b	6.30E-08	-7.20	GSK3b	63
MLK1/MAP3K9	1.13E-08	-7.95	MLK1/MAP3K9	11.3
MLK2/MAP3K10	9.58E-09	-8.02	MLK2/MAP3K10	9.58
MLK3/MAP3K11	5.90E-09	-8.23	MLK3/MAP3K11	5.9
PIM1	7.26E-08	-7.14	PIM1	72.6
PKCmu/PRKD1	1.34E-07	-6.87	PKCmu/PRKD1	134
PKD2/PRKD2	1.57E-07	-6.80	PKD2/PRKD2	157
RET	7.74E-08	-7.11	RET	77.4
SIK2	1.49E-07	-6.83	SIK2	149
TNIK	1.10E-07	-6.96	TNIK	110
YSK4/MAP3K19	2.92E-08	-7.53	YSK4/MAP3K19	29.2

[0222]

[0223] 발명은 이의 특정 구현예와 연계하여 기재되었지만, 추가로 변형시킬 수 있고 본원은 일반적으로 발명의 원칙에 따르고 발명이 속하는 기술 분야에서 공지되거나 통상적인 관행 내에 있는 본원의 개시내용으로부터 출발함을 포함하는 발명의 임의의 변형, 사용 또는 적응을 보호하고자 하는 것으로 이해되고 본원에 제시된 필수 구성에 적용될 수 있는 것으로 이해된다.

[0224] **실시예 17: 비교인자로서 화합물 A를 사용한 데이터.**

[0225] 세포사 및 성장 검정은 U2OS 세포에서, 다양한 농도에서 화합물 A 및 젬시타빈을 조합하여 수행되었다. 상기 결과는 2개의 화합물의 조합과 함께 세포 성장 및 사멸의 예측과 다시 비교된다(도18a). 생존 및 아폽토시스 세포의 수는 또한 USO2 세포에서 화합물 A (1 μM) 및 젬시타빈 (0.04 μM)의 설정 농도에서 결정된다(도18b). 상기 결과는 화합물 A와 젬시타빈의 조합이 다른 단독의 화합물 보다 세포사를 촉진시키는데 양호함을 보여준다.

[0226] 화합물 A는 또한 세포의 수를 시간 경과에 따라 모니터링하면서, 여러 폐암 세포주 (NCI-H520 및 NCI-H596) 및 U2OS 세포에서 설정 농도(각각 1 μM 및 0.2 μM)에서 단독으로 시험되고 SN38과 조합하여 시험되었다. 상기 결과는 상기 조합이 분리된 화합물 A 또는 SN38 보다 시간 경과에 따라 세포수를 유지하거나 감소시키는데 보다 효과적임을 지적한다 (도19).

[0227] 시험관내 성장 검정은 또한 자궁경부 암 세포주 Ms-751에서 조합으로 및 단독으로 화합물 A 및 Sn38과 함께 수행되었다. *시험관내* 검정은 단독의 화합물 중 어느 하나와 비교하여 조합과 함께 시간 경과에 따라 세포수에서의 감소를 보여준다(도20).

[0228] **실시예 18: 젬시타빈 또는 SN38과 조합된 화합물 A와 화합물 5의 비교.**

[0229] *시험관내* 세포 죽음 및 성장 검정은 U2OS, H358, 및 A549 세포주에서, 다양한 농도에서 젬시타빈과 화합물 A 또는 화합물 5를 조합하여 수행하였다. 상기 결과는 세포사를 유발하는데 요구되는 각각의 화합물 및 젬시타빈의 농도를 지적한다 (도21a). 화합물 5 및 젬시타빈 또는 화합물 A 및 젬시타빈의 설정된 농도는 또한 USO2 및 H358 세포에서 시험되었다. 모든 경우에, 상대적 세포 증식은 단독의 약물과 비교하여 조합했을때 감소한다(도

21b-c).

[0230] 화합물 A 또는 화합물 5는 A549 세포에서 SN38과 조합하여 사용하였다. 세포 성장은 시간 경과에 따라 그리고 일정 범위의 농도에서 측정하였다. 최적의 화합물/SN38 농도에서 성장 곡선은 강조된다 (도22a). A549 세포의 상대적 증식은 일정 범위의 농도에서 단독의 화합물 A 또는 화합물 5와 함께 측정되었다 (도22b).

[0231] IC50 값은 설정된 농도의 젬시타빈과 다양한 농도의 화합물 A 또는 화합물 5를 사용한 여러 세포주에서 IC50 값을 보여준다 (도23).

[0232] 젬시타빈 또는 SN38과 조합된 화합물 A 또는 화합물 5에 반응성인 폐암 세포주의 개요는 하기의 도면에 제공된다: 도24.

[0233] **실시예 19: 화합물 A 및 화합물 5의 온-표적 및 오프-표적 비교**

[0234] 다양한 ATR 억제제는 ATR (온-표적) 및 ATM (오프-표적)을 억제하는 이들의 능력에 대해 시험되었다. 억제는 nM의 IC50으로서 보고된다 (도25a). 추가의 "오프-표적" 키나제는 또한 화합물 A 또는 화합물 5와 시험하였다 (도25b).

[0235] 온-표적 시험은 하기의 세포에서 화합물 A 또는 화합물 5를 사용하여 수행하였다: A549 폐 암 세포 (도26a-b), H23 폐 암 세포(도 26c-d), 및 DMS-114 세포 (도26e-f)에서.CHK1 S345 인산화, ATR 억제의 판독은 웨스턴 블롯에 의해 측정하였다. 각각의 화합물은 또한 고정된 농도의 젬시타빈과 함께 사용하였다.

[0236] 추가의 온-표적 연구는 HCC-70 TNBC, MDA-MB-468 TNBC, 및 DMS-114 세포주에 대해 수행하였다. 설정 농도의 SN38은 특정 농도 범위의 화합물 A 또는 화합물 5와 함께 사용하였다. 다양한 온-표적 활성 파라미터는 웨스턴 블롯에 의해 시험하고 측정하였다 (도27a-b)

[0237] SNM149 세포의 세포 주기 단계 프로파일은 SN38 및 화합물 A 또는 화합물 5의 첨가 24시간 후에 결정하였다 (도28). 보다 큰 백분율의 세포는 대조군과 비교하여 조합된 약물을 투여받은 경우 G2 상에서 증식이 억제되었다

[0238] **실시예 20: MM398과 조합된 화합물 A 및 화합물 5의 리포좀 제형의 비교.**

[0239] DMS-114 폐 이종이식 모델은 MM398과 조합된 Ls-화합물 A 또는 Ls-화합물 5의 효과를 측정하기 위해 사용되었다. 설정 용량의 MM398은 상이한 용량의 화합물 A 또는 화합물 5 (20mpk 또는 80mpk)와 함께 사용되었다 (5mpk). 치료 효과는 CHK1 S345 인산화 수준을 측정함에 의해 분석하였다 (도29).

[0240] MM 398과 Ls-화합물 A의 효과는 또한 SUM-149 세포주에서 시험되었다. 치료 효과는 RPA2, DNAPK, CHK1, 및 γH2AX의 인산화된 수준을 측정함에 의해 분석하였다. Ls-화합물 5는 또한 MM398과의 조합 없이 시험하였다 (도30a-c)

[0241] **실시예 21: 마우스에서 3중 음성 유방암 이종이식에 대해 TEA.SOS를 사용하여 제조된 Ls- 화합물 5의 생체내 항종양 효능 및 관용성**

[0242] MM-398 (리포좀 이리노테칸)과 조합된 ATR 억제제 화합물 5로 로딩된 리포좀의 항종양 효능은 인간 SUM-149 (3중 음성 유방암) 세포주의 모델에서 연구되었다.

[0243] 세포는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection) (Rockville, MD)에서 수득하였고 10 % 태아 소 혈청, 50 U/mL 페니실린 G, 및 50 μg/mL의 스트렙토마이신 설페이트가 보충된 RPMI 배지에서 공급자에 의해 추천된 바와 같이 37 ℃, 5 % CO2에서 증식시켰다. NCR nu/nu 동종접합성 무흉선 수컷 누드 마우스(4-5주령, 체중 적어도 16 g)는 제조원 (Charles River)으로부터 수득하였다. 마우스는 30 % 마트리겔이 보충된 PBS에서 현탁된 107 세포를 함유하는 0.1 mL의 현탁액을 우측 옆구리에 피하 접종하였다. 종양이 150 mm3 내지 350mm3 의 크기에 도달한 경우, 동물은 하기의 방법에 따라 치료 그룹에 할당하였다. 동물은 종양 크기에 따라 등급화하고 종양 크기를 감소시키는 6개 카테고리로 분할하였다. 10 동물/그룹의 4개의 치료 그룹은 각각의 크기 카테고리로부터 무작위로 선택함에 의해 형성되어 각각의 치료 그룹에서 모든 종양 크기는 균등하게 제공되도록 하였다. 동물은 하기 제조의 7일 간격으로 5개의 꼬리 정맥 주사를 투여받았다:1) 대조군 (HEPES-완충 식염수 pH 6.5); 2) 주사 당 5 mg/kg의 용량에서 MM-398; 3) 주사 당 80 mg/kg에서 리포좀 화합물 5; 4) MM-398에 이어서 24시간 간격으로 리포좀 화합물 5의 주사; 5) Mm-398에 이어서 유리된 비캡슐화된 ATR 억제제 화합물 A의 주사.주사용 리포좀은 실시예 10에 기재된 바와 같이 제조하였다.

[0244] 동물 체중 및 종양 크기는 주마다 2회 모니터링하였다. 종양 진행은 주당 2회 최대 (길이) 및 최소 (폭) 축을

따라 종양의 촉지 및 캘리퍼 측정에 의해 모니터링하였다. 종양 크기는 하기 식을 사용한 캘리퍼 측정으로부터 주당 2회 결정하였다.

[0245] 종양 용적 = [(길이) x (폭)^2] / 2

[0246] 치료 관련 독성을 평가하기 위해, 동물은 또한 주당 2회 칭량하였다. 그룹 내 종양이 마우스 체중의 10 %에 도달하는 경우, 그룹 내 동물을 안락사시켰다. 그룹에 걸친 평균 종양 용적을 함께 플롯팅하고 시간 경과에 따라 비교하였다.

[0247] 도 31에서 입증된 바와 같이, 리포좀 ATR 억제제 화합물 5는 이종이식 모델에서 Mm-398의 항종양 효능을 유의적으로 개선시켰다. 리포좀 ATR 억제제 및 MM-398의 조합 치료는 동물의 체중에 영향을 미치지 않았다 (도 32).

[0248] **실시예 22: 세포주 프로파일링 및 Incucyte 데이터와의 비교**

[0249] 형광 표지된 세포주의 패널은 DNA 손상 경로에 관여하는 다양한 단백질에 대해 프로파일링되었다. 모 암 세포주는 NucLight Red 렌티바이러스로 형질도입하고 푸로마이신으로 선택되었다. 기본 단백질 수준은 웨스턴 블롯 분석에 의해 측정하고 정량하였다. 정량이 수행된 경우, PD 마커 신호는 베타 액틴 신호로 규정화하였다. 단백질 수준은 화합물 5 및 화학치료요법 조합 치료에 대한 시험관내 세포 반응의 척도로서 세포주의 "통합 스코어"와 상호 관련시켰다. 통합 스코어는 다음과 같이 계산될 수 있다:

[0250] 도 33 및 34를 참조하면, 세포주는 96웰 플레이트에 씨딩하고 각각의 웰은 4일동안 화합물 5 및 화학치료요법의 용량 매트릭스에 노출시켰다. 동력학 세포 생존능은 Incucyte 검정을 사용하여 측정하였다. 용량 매트릭스에서 각각의 약물 조합을 위해, 용량 조합-특이적 통합 스코어는 규정화된 세포 증식 곡선 이하 면적을 합산함에 의해 계산하였다. 세포주 특이적 통합 스코어는 용량 매트릭스 상에서 4개의 최대 스코어를 평균화하여 계산하였다.

[0251] 도 35 및 36을 참조하여, 화합물 5 및 Sn38에 노출된 폐 암 세포주에서, 기본 MRE11 단백질 수준 및 기본 ATM 수준 둘 다가 세포주 통합 스코어와 유의적으로 상호 관련이 있는 것으로 관찰되었다. p53 손상된 배경을 갖고 화합물 5 및 SN38에 노출된 폐 암 세포에서, 통합 스코어는 NBS, MRE11 및 RAD50 단백질 수준과 서로 관련이 있다. "손상된 p53" 세포는 비-제로 기본 p53 단백질 수준 (대부분의 세포에서 p53 수준은 단지 치료 후 웨스턴 블롯에서만 가시적이다)을 갖는 것들이다. (도 37, 도 38 및 도 39를 참조한다).

[0252] **실시예 23: 신호전달 실험:화합물 5 대화합물 A, SN38과 조합된:6개 상이한 PD 마커**

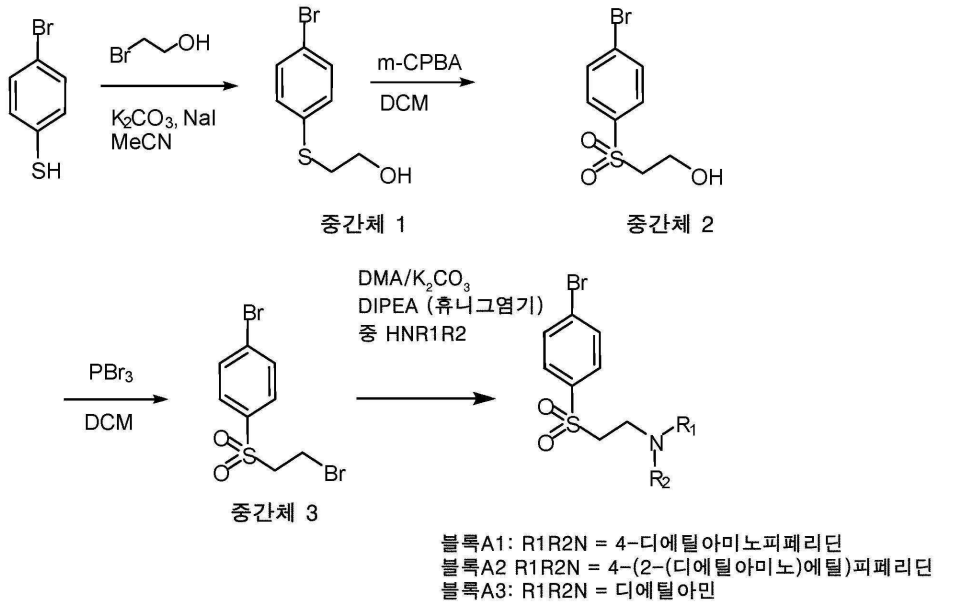
[0253] 도 40 내지 44를 참조하여: 약력학 마커들 pChk1, pRPA2, pATR, pDNAPK, pChk2 및 γH2AX는 암 세포주를 Sn38과 조합된 다양한 용량의 화합물 5 또는 화합물 A에 노출시킨 후 웨스턴 블롯에 의해 정량하였다. HCC70, DMS114, MDAMB468, NCIH1299 및 NCIH460 세포는 12웰 플레이트에 씨딩하여 밤새 항온처리되도록 한 다음 SN38 및/또는 ATR 억제제에 노출시킨다. 약물 노출의 24시간 후, 세포는 웨스턴 블롯팅을 위해 용해시켰다. 정량이 수행된 경우, PD 마커 신호는 베타 액틴 신호로 규정화하였다.

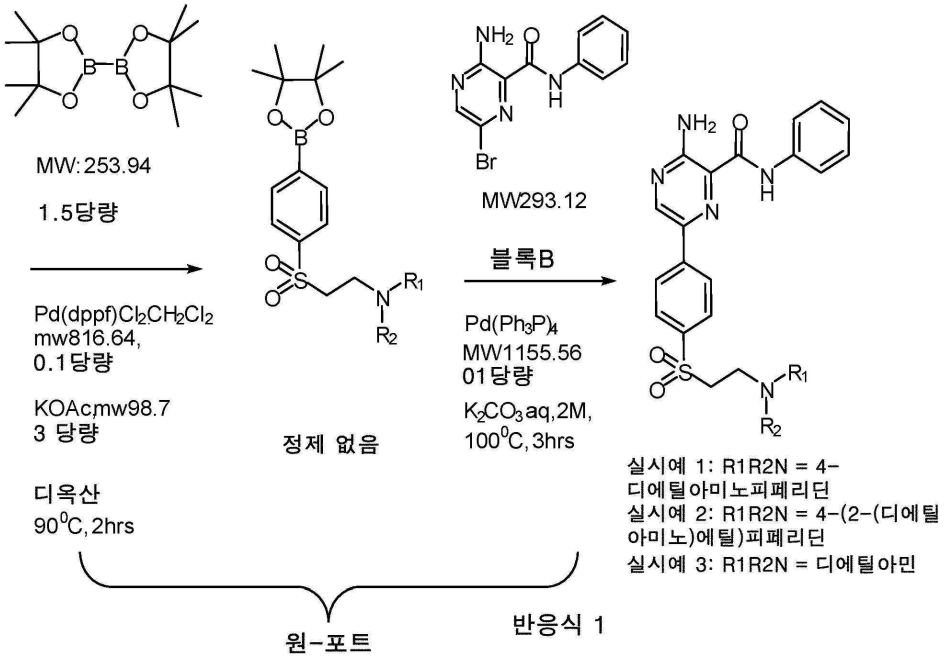
[0254] **실시예 24: 신호전달 실험:화합물 5 대젬시타빈과 조합된 화합물 A:3개 상이한 PD 마커**

[0255] 도 45 내지 50을 참조하여:6개의 형광 표지된 세포주는 ATR 억제제 및/또는 젬시타빈에 노출 후 DNA 손상 경로에 관여하는 다양한 단백질에 대해 프로파일링하였다. 모 암 세포주는 NucLight Red 렌티바이러스로 형질도입하고 푸로마이신으로 선택되었다. 약력학 마커들 pChk1, pATR 및 γH2AX는 암 세포주를 16 nM의 젬시타빈과 조합된 다양한 용량의 화합물 5 또는 화합물 A에 노출시킨 후 웨스턴 블롯에 의해 정량하였다. A549, NCIH23, DMS114, U2OS, HCC827 및 NCIH460 세포는 12웰 플레이트에 씨딩하여 밤새 항온처리되도록 한 다음 SN38 및/또는 ATR 억제제에 노출시킨다. 약물 노출의 6 또는 18시간 후, 세포는 웨스턴 블롯팅을 위해 용해시켰다. 정량이 수행된 경우, PD 마커 신호는 베타 액틴 신호로 규정화하였다.

도면

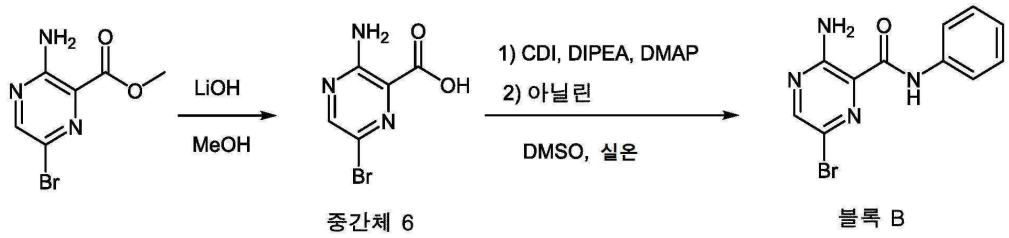
도면1


Br
OH
K2CO3, NaI
MeCN
m-CPBA
DCM
SH
S
O
중간체 1
중간체 2
PBr3
DCM
중간체 3
DMA/K2CO3
DIPEA (휴니그염기)
중 HNR1R2
R1
R2
블록A1: R1R2N = 4-디에틸아미노피페리딘
블록A2 R1R2N = 4-(2-(디에틸아미노)에틸)피페리딘
블록A3: R1R2N = 디에틸아민


MW:253.94
1.5당량
Pd(dppf)Cl2CH2Cl2
mw816.64,
0.1당량
KOAc;mw98.7
3 당량
디옥산
90°C, 2hrs
정제 없음
NH2
Br
MW293.12
블록B
Pd(Ph3P)4
MW1155.56
01당량
K2CO3 aq, 2M,
100°C, 3hrs
실시예 1: R1R2N = 4-
디에틸아미노피페리딘
실시예 2: R1R2N = 4-(2-(디에틸
아미노)에틸)피페리딘
실시예 3: R1R2N = 디에틸아민
원-포트
반응식 1

도면2

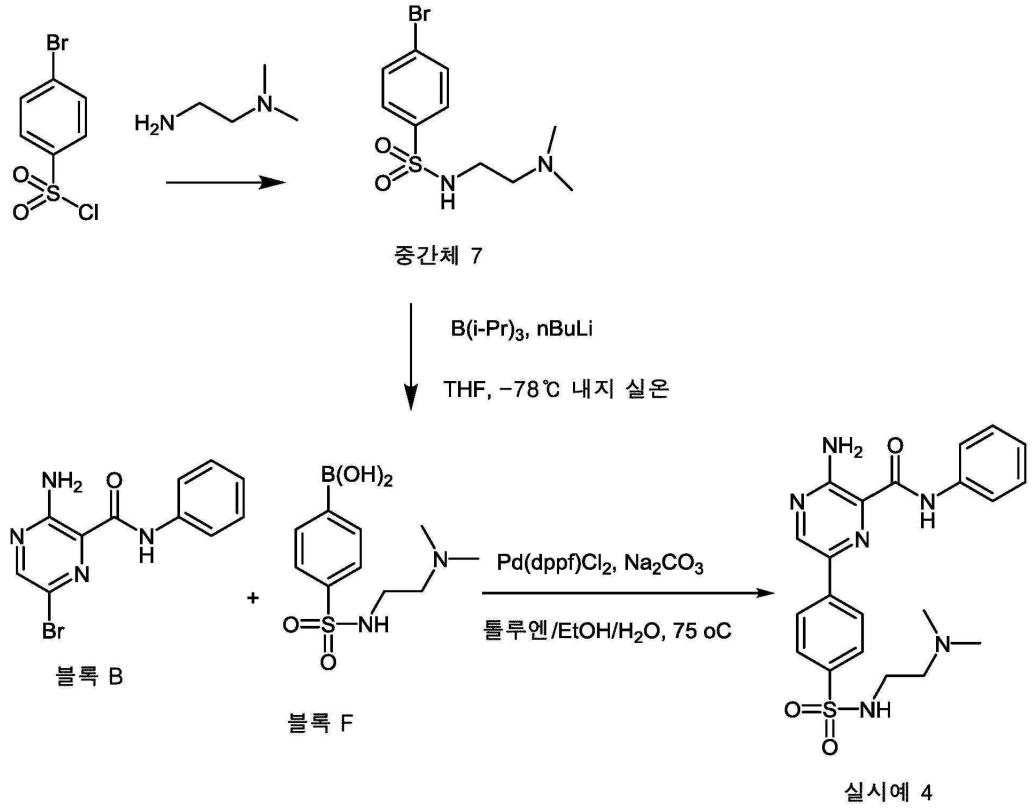
반응식 2



중간체 6

블록 B

도면3



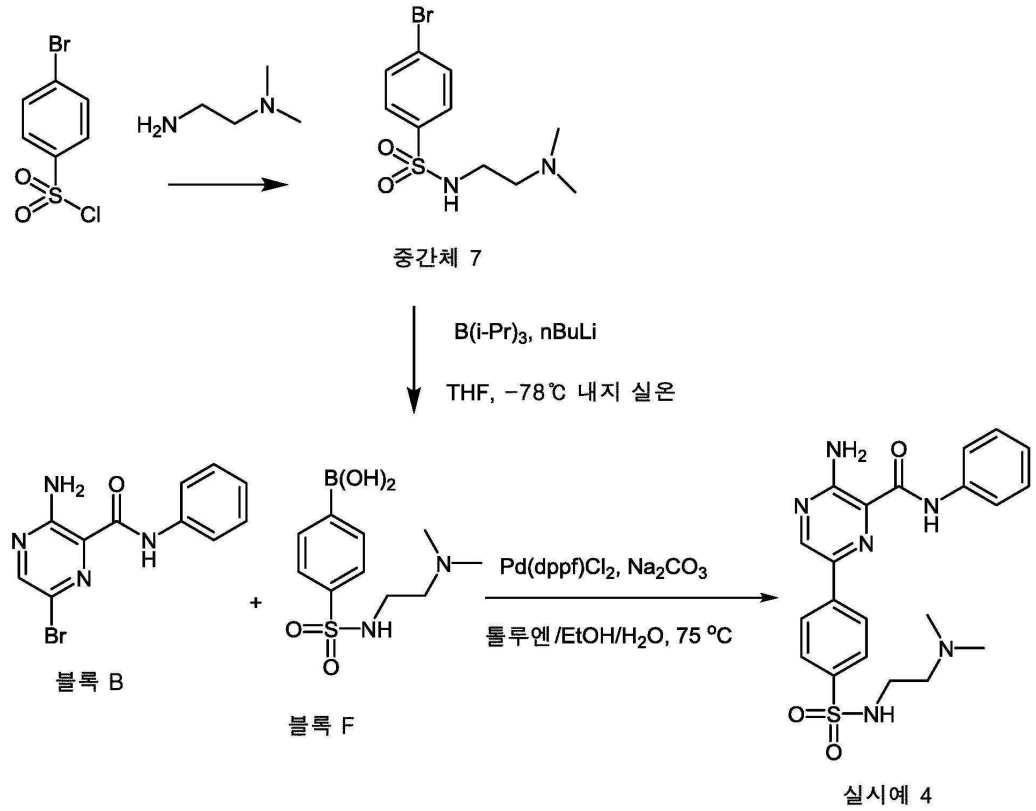
중간체 7

블록 B

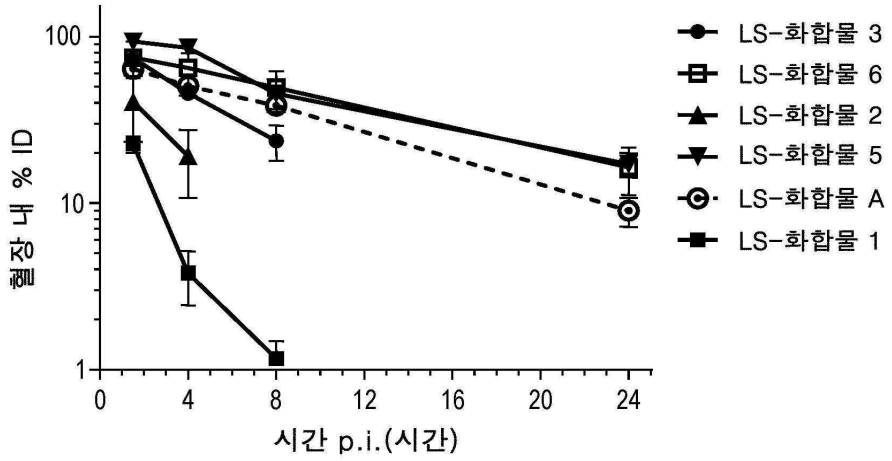
블록 F

실시예 4

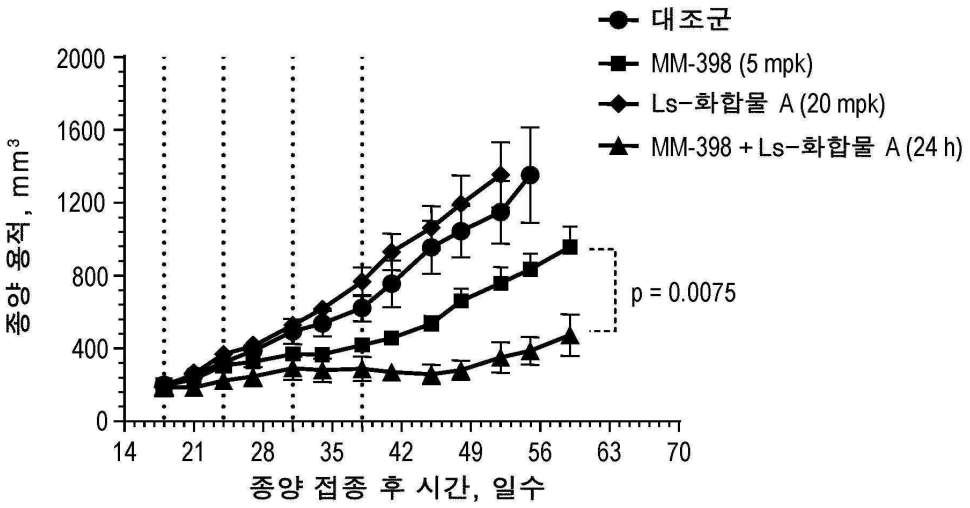
도면4


Br
H2N
N
O
S
Cl
중간체 7
B(i-Pr)3, nBuLi
THF, −78℃ 내지 실온
NH2
O
N
H
Br
블록 B
B(OH)2
O=S—NH
블록 F
Pd(dppf)Cl2, Na2CO3
톨루엔/EtOH/H2O, 75 ºC
실시예 4

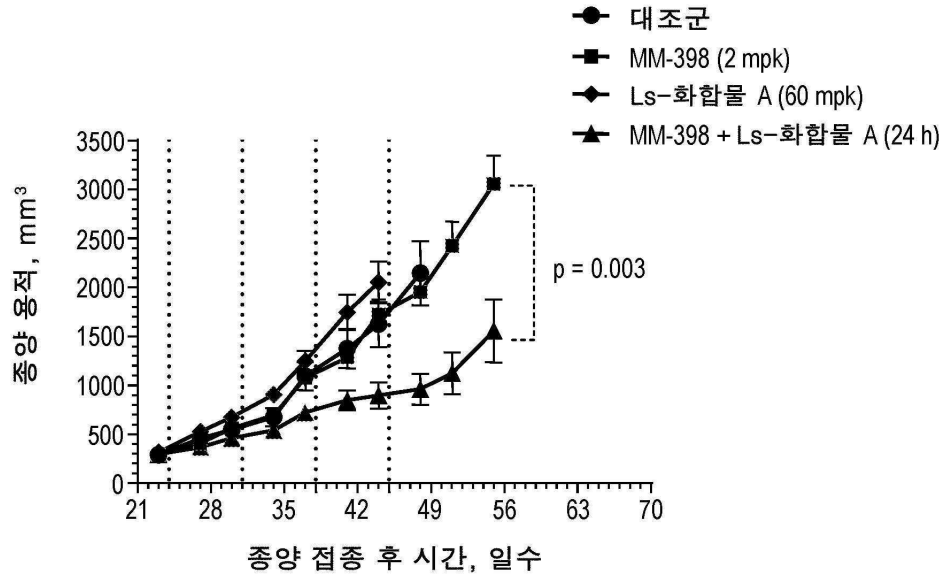
도면5


100
10
1
혈장 내 % ID
0
4
8
12
16
20
24
시간 p.i.(시간)
LS-화합물 3
LS-화합물 6
LS-화합물 2
LS-화합물 5
LS-화합물 A
LS-화합물 1

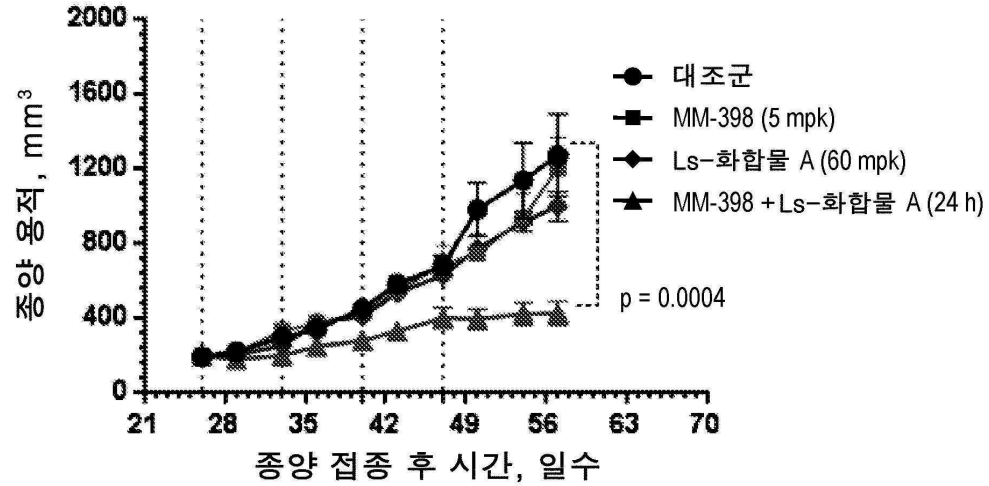
도면6


대조군
MM-398 (5 mpk)
Ls-화합물 A (20 mpk)
MM-398 + Ls-화합물 A (24 h)
종양 용적, mm³
2000
1600
1200
800
400
0
14
21
28
35
42
49
56
63
70
p = 0.0075
종양 접종 후 시간, 일수

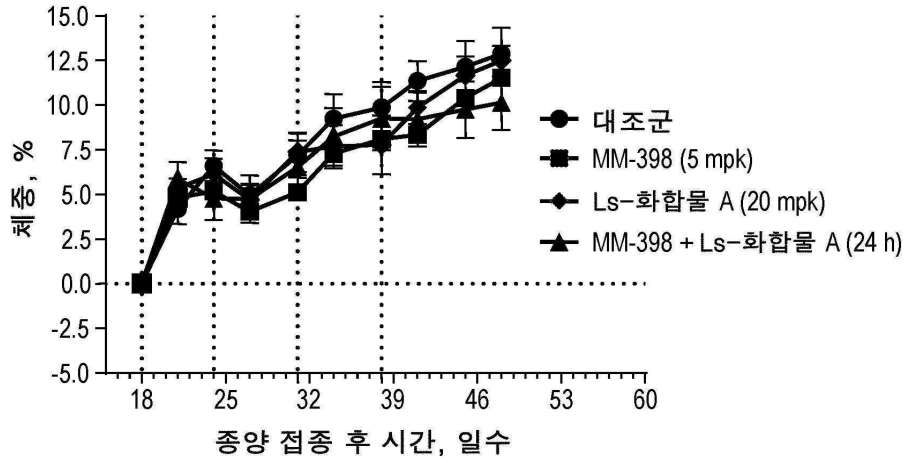
도면7


대조군
MM-398 (2 mpk)
Ls-화합물 A (60 mpk)
MM-398 + Ls-화합물 A (24 h)
종양 용적, mm³
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
21
28
35
42
49
56
63
70
p = 0.003
종양 접종 후 시간, 일수

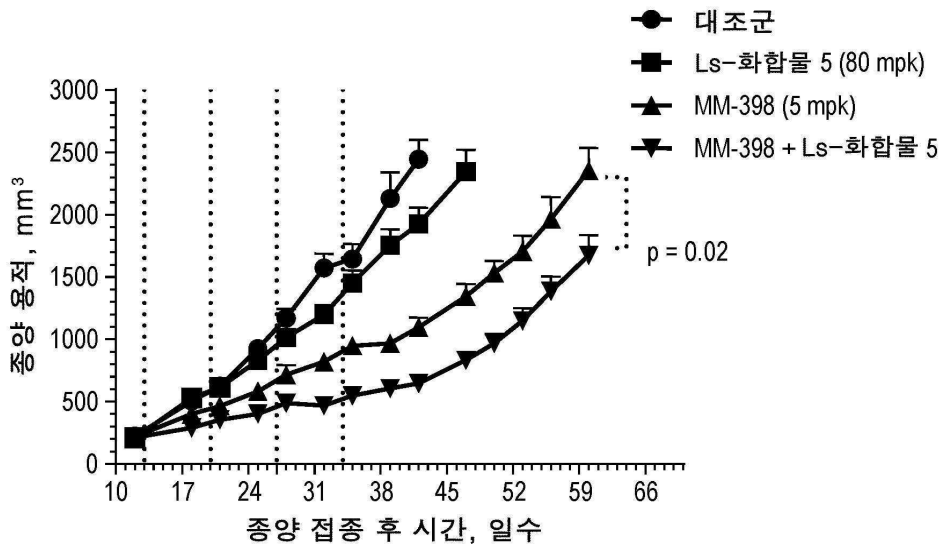
도면8


대조군
MM-398 (5 mpk)
Ls-화합물 A (60 mpk)
MM-398 + Ls-화합물 A (24 h)
종양 용적, mm³
2000
1600
1200
800
400
0
21
28
35
42
49
56
63
70
p = 0.0004
종양 접종 후 시간, 일수

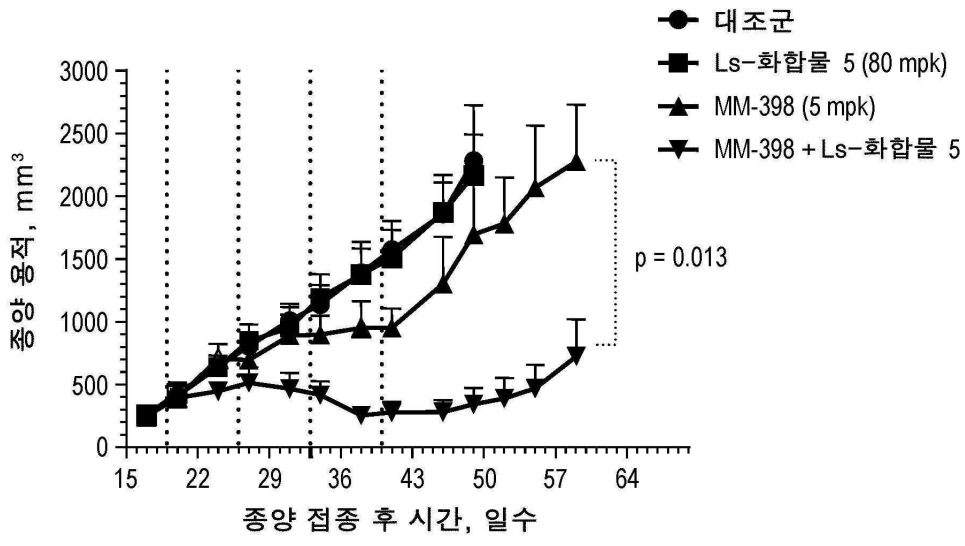
도면9



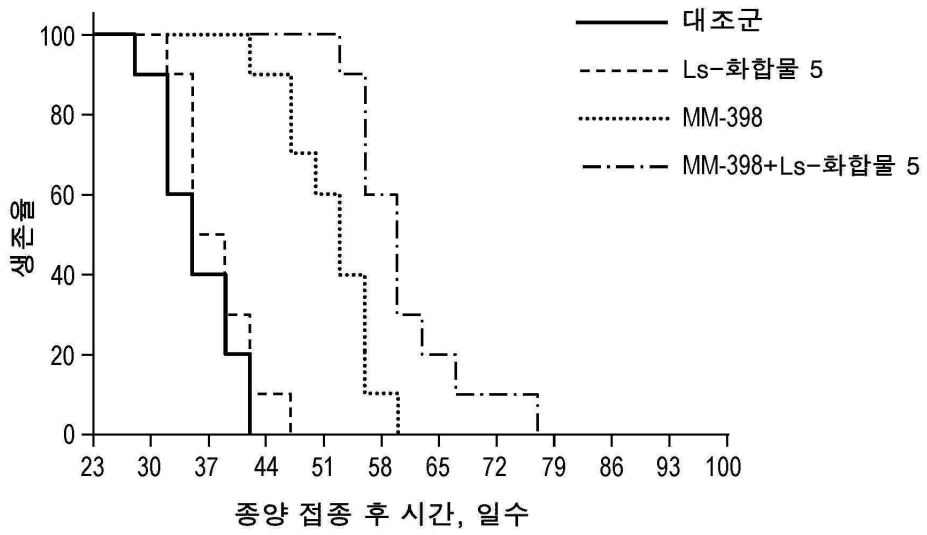
도면10a



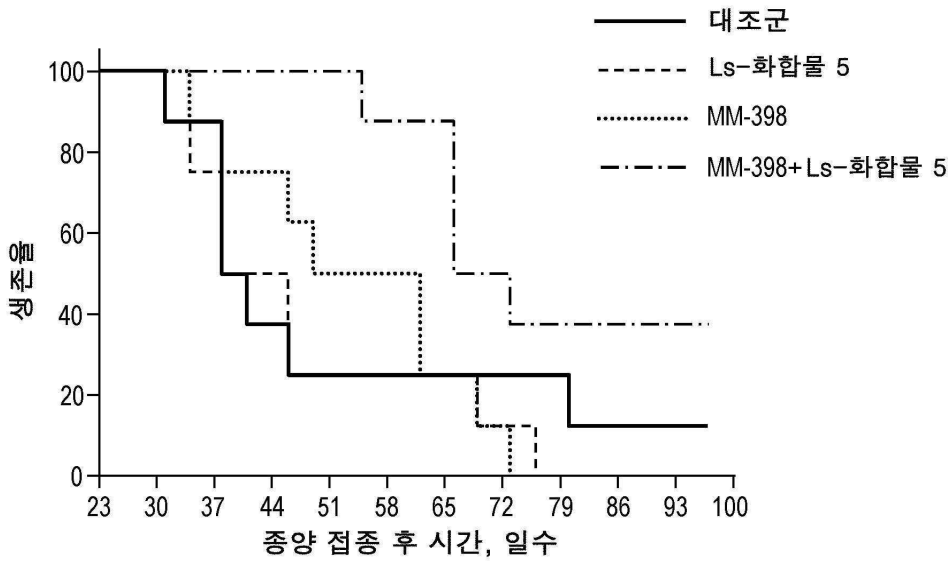
도면10b



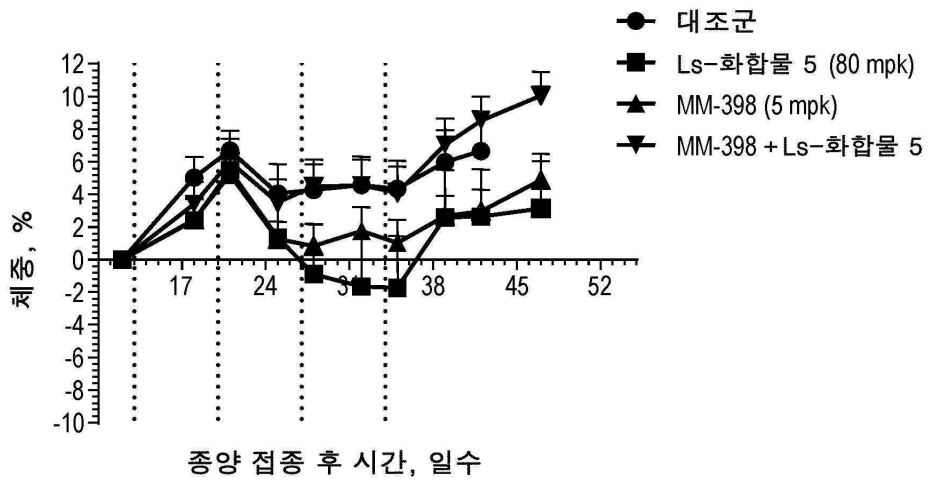
도면11a



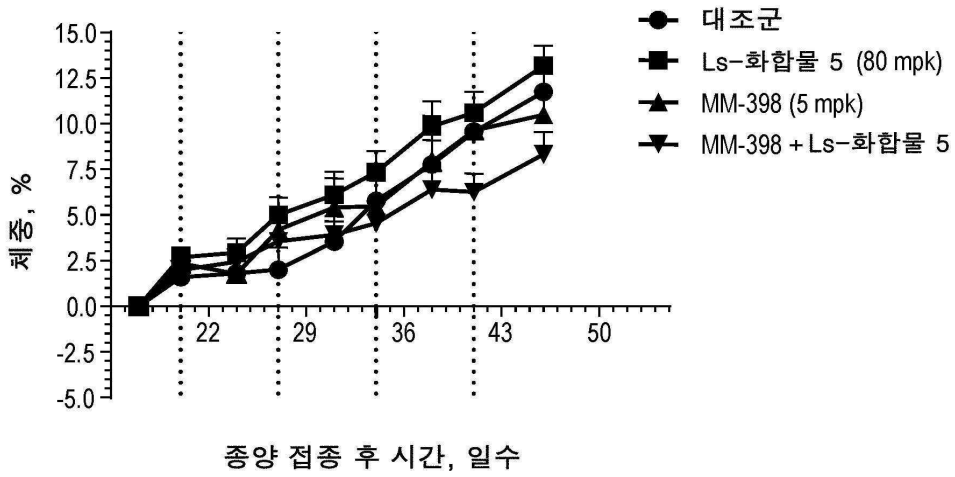
도면11b



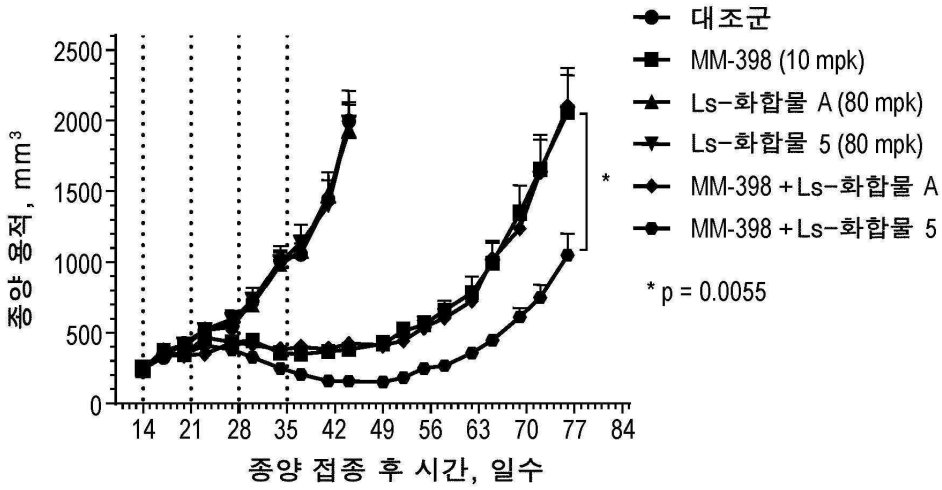
도면12a



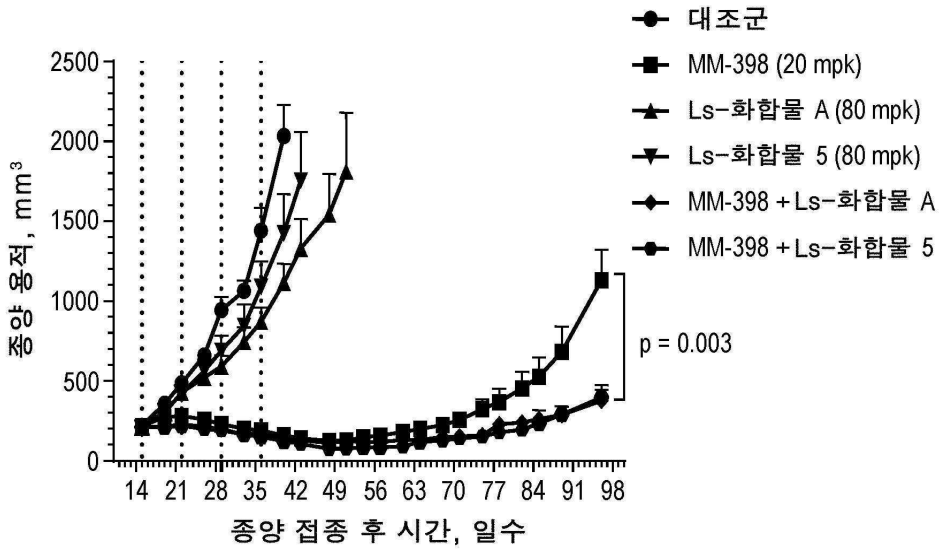
도면12b



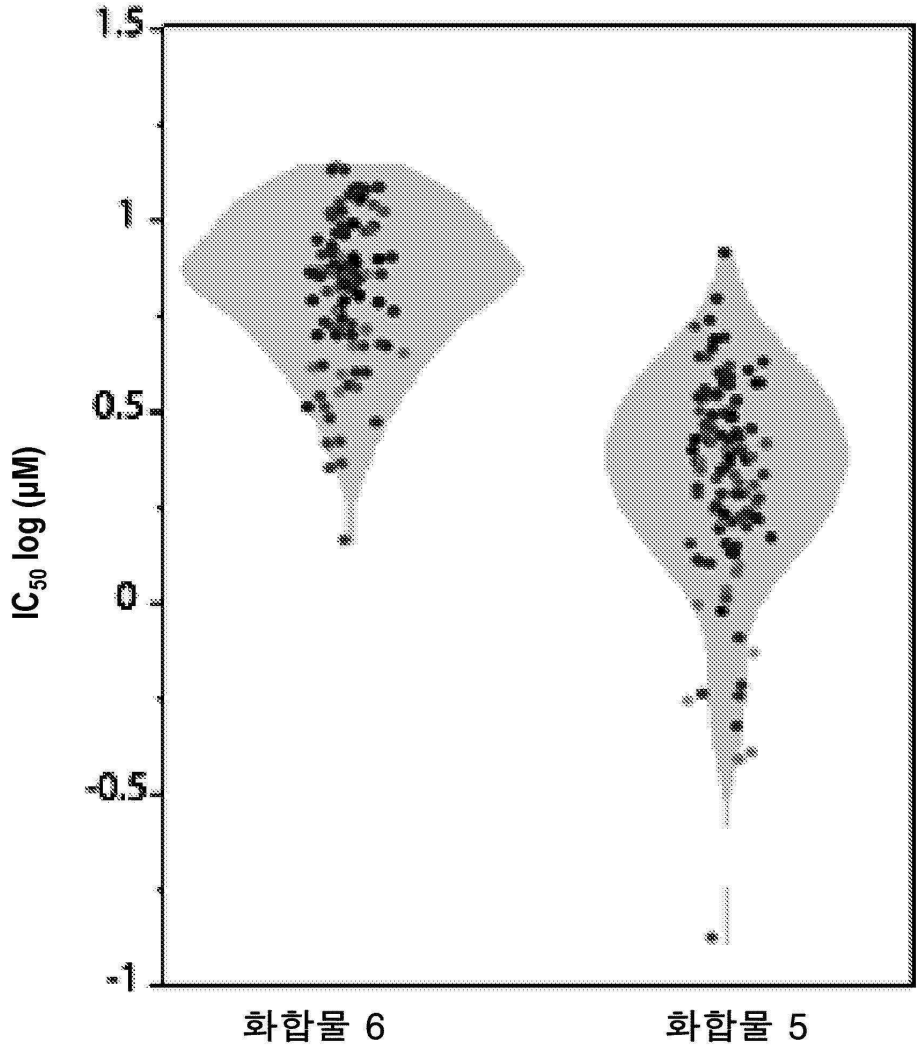
도면13a



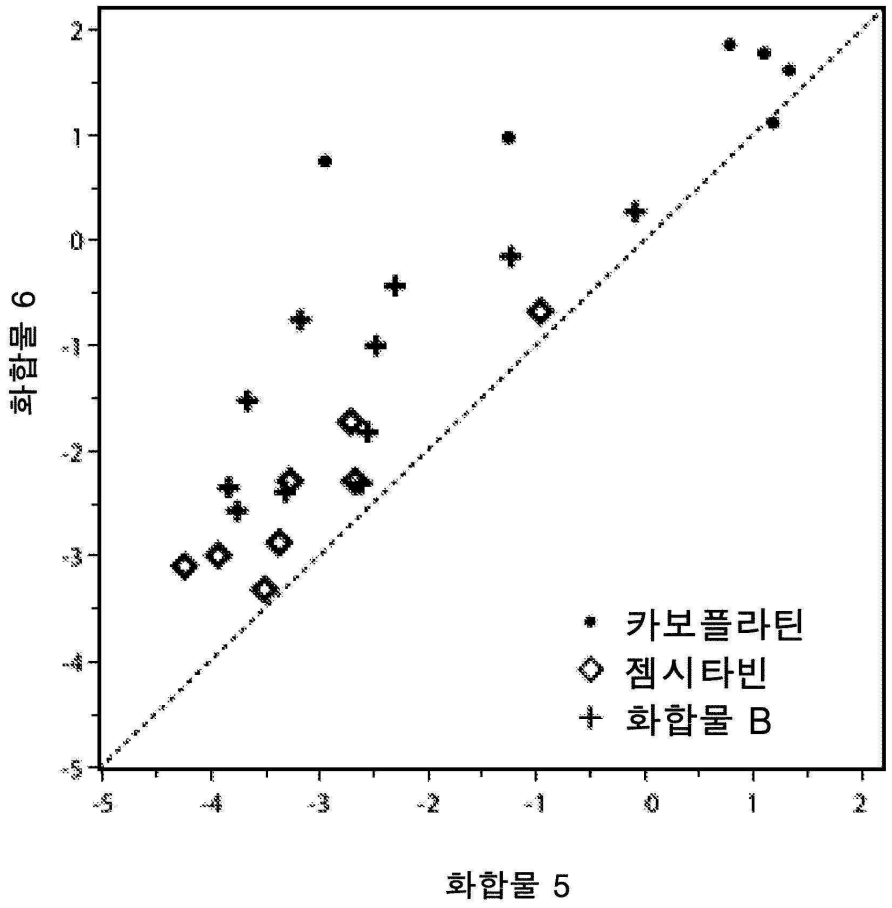
도면13b



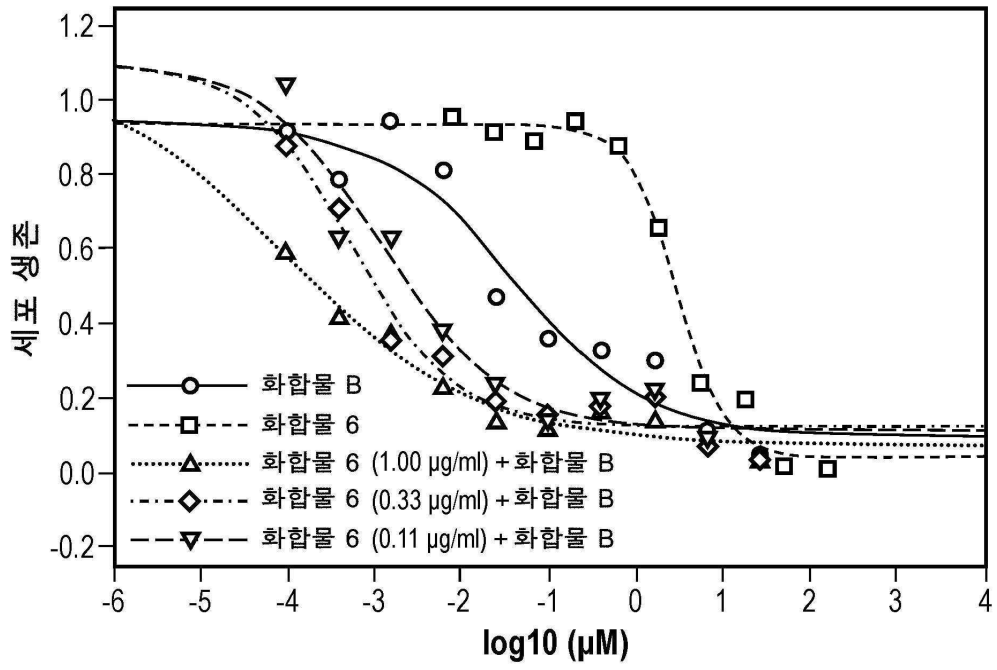
도면14a



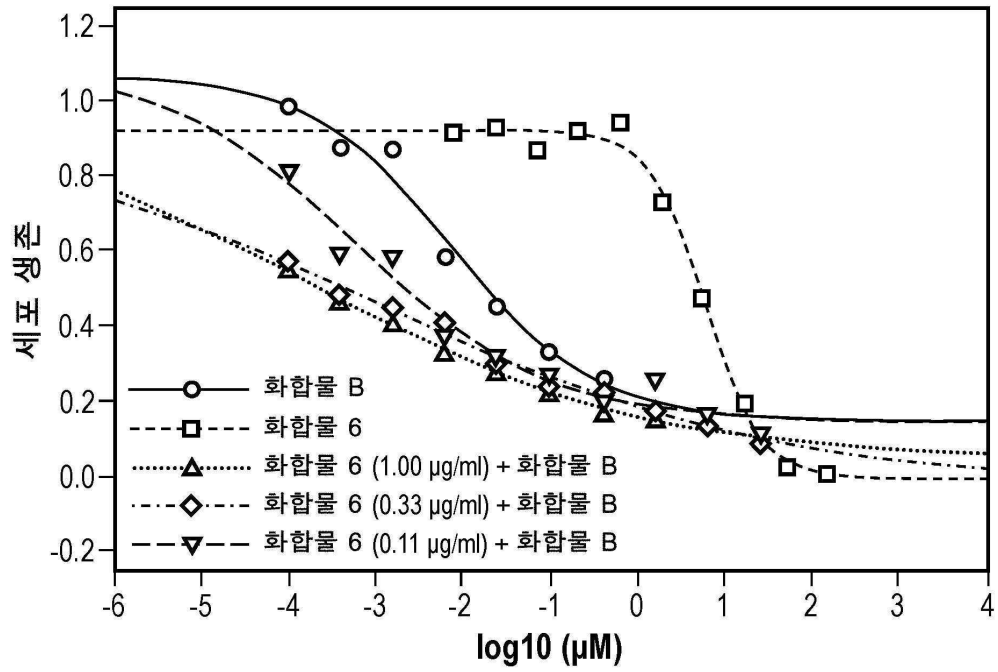
도면14b


화합물 6
화합물 5
카보플라틴
젬시타빈
화합물 B

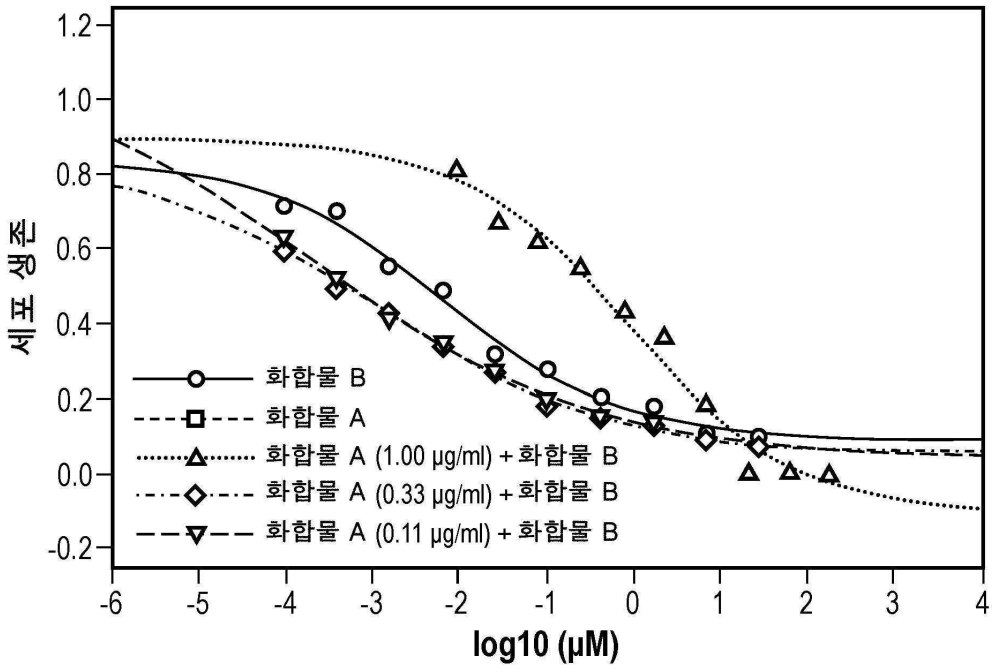
도면15


세포 생존
log10 (μM)
화합물 B
화합물 6
화합물 6 (1.00 μg/ml) + 화합물 B
화합물 6 (0.33 μg/ml) + 화합물 B
화합물 6 (0.11 μg/ml) + 화합물 B

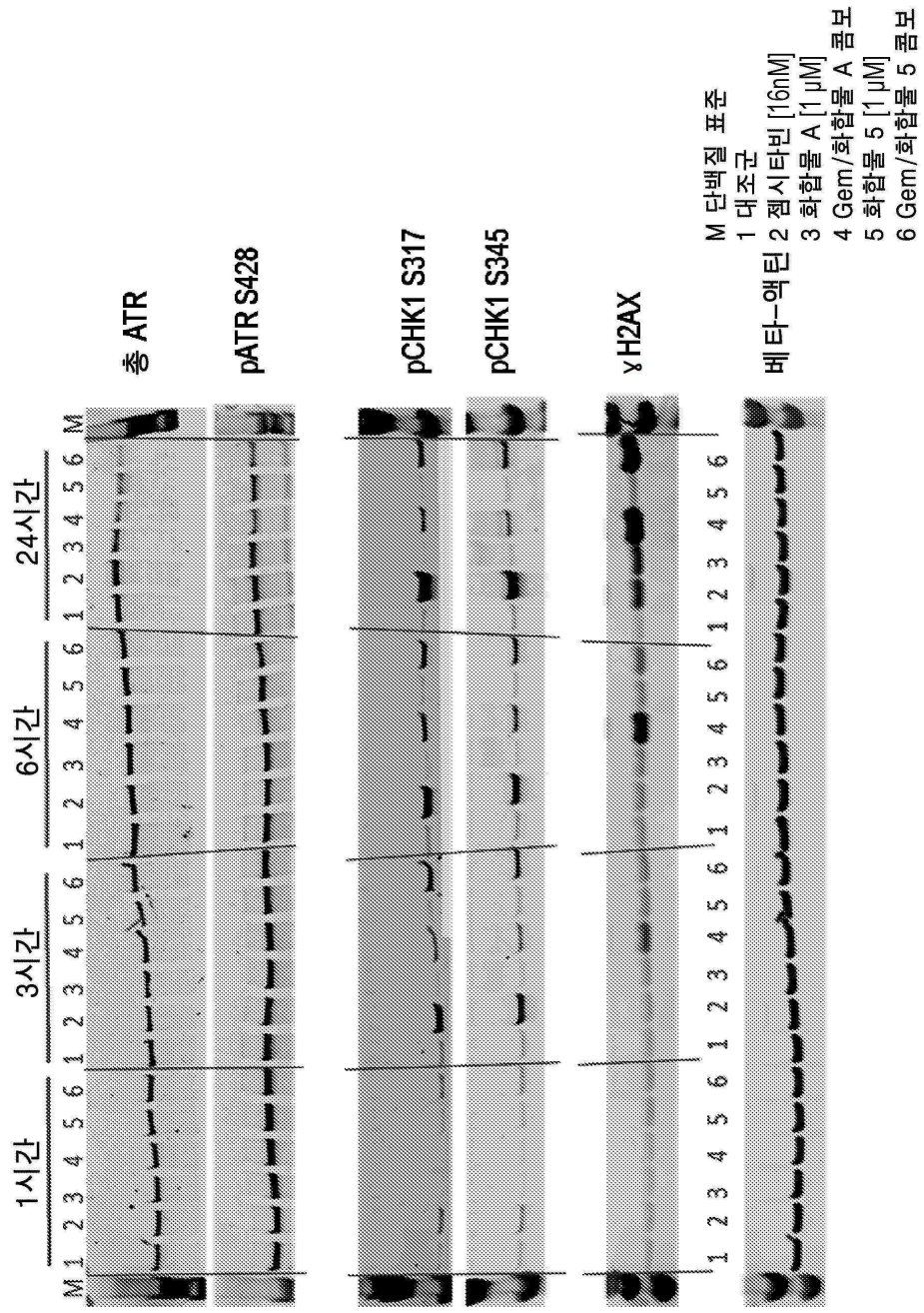
도면16a


1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
세포 생존
화합물 B
화합물 6
화합물 6 (1.00 μg/ml) + 화합물 B
화합물 6 (0.33 μg/ml) + 화합물 B
화합물 6 (0.11 μg/ml) + 화합물 B
-6
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
log10 (μM)

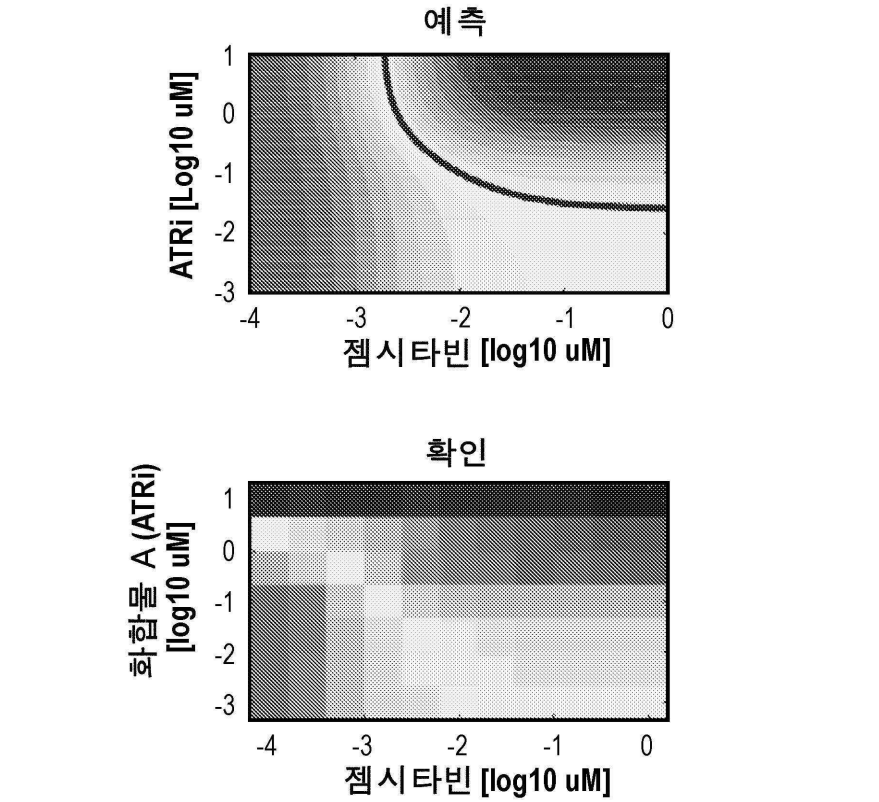
도면16b

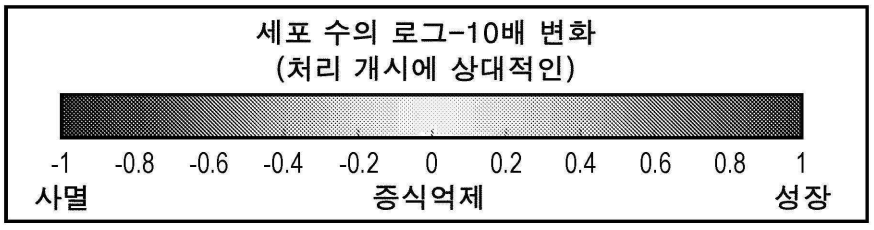

1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
세포 생존
화합물 B
화합물 A
화합물 A (1.00 μg/ml) + 화합물 B
화합물 A (0.33 μg/ml) + 화합물 B
화합물 A (0.11 μg/ml) + 화합물 B
-6
-5
-4
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
log10 (μM)

도면17

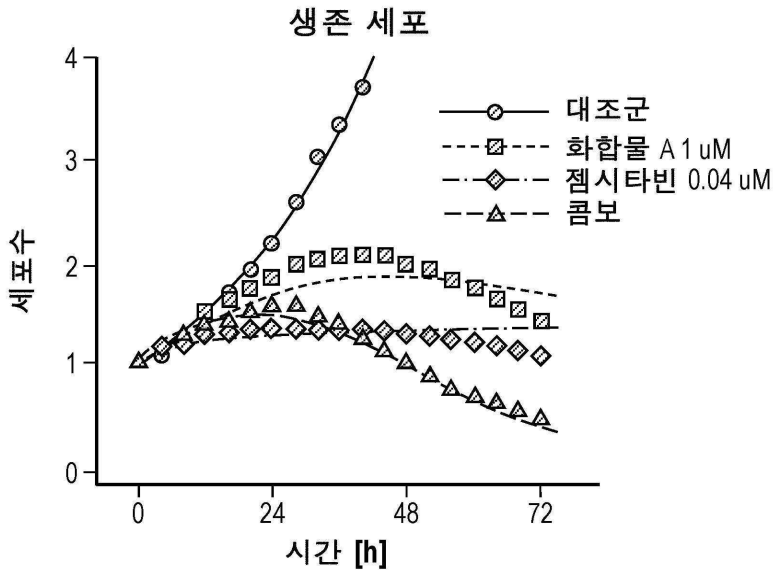

총 ATR
pATR S428
pCHK1 S317
pCHK1 S345
γH2AX
베타-액틴
M 단백질 표준
1 대조군
2 젬시타빈 [16nM]
3 화합물 A [1 μM]
4 Gem/화합물 A 콤보
5 화합물 5 [1 μM]
6 Gem/화합물 5 콤보
1시간
3시간
6시간
24시간
M 1 2 3 4 5 6

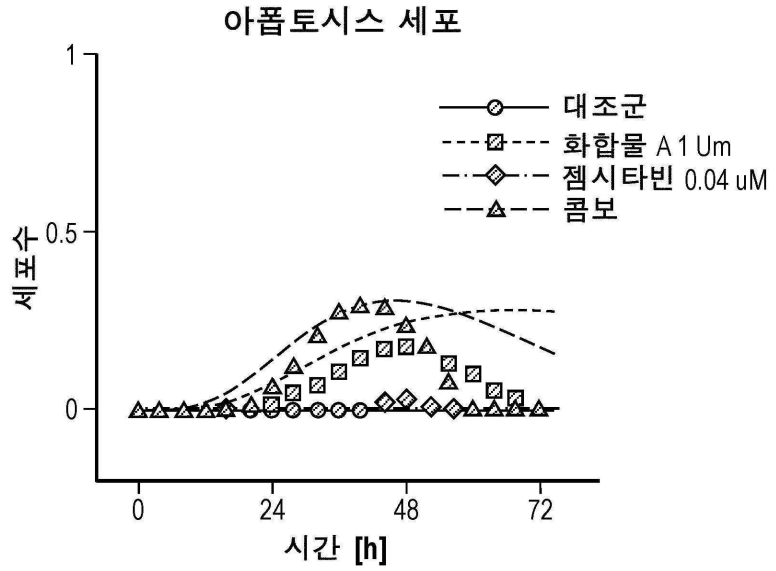
도면18a


예측
ATRi [Log10 uM]
1
0
-1
-2
-3
-4
-3
-2
-1
0
젬시타빈 [log10 uM]
확인
화합물 A (ATRi) [log10 uM]
1
0
-1
-2
-3
-4
-3
-2
-1
0
젬시타빈 [log10 uM]

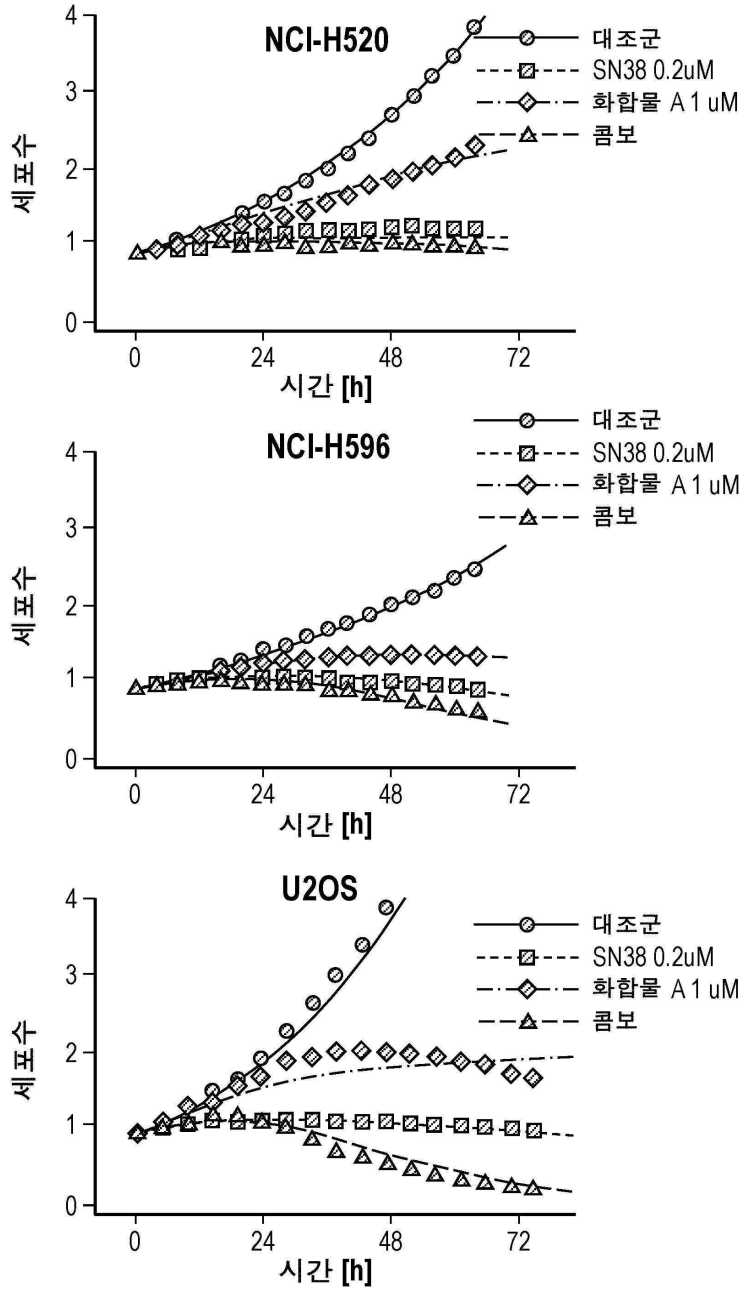

세포 수의 로그-10배 변화
(처리 개시에 상대적인)
-1
-0.8
-0.6
-0.4
-0.2
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
사멸
증식억제
성장

도면18b

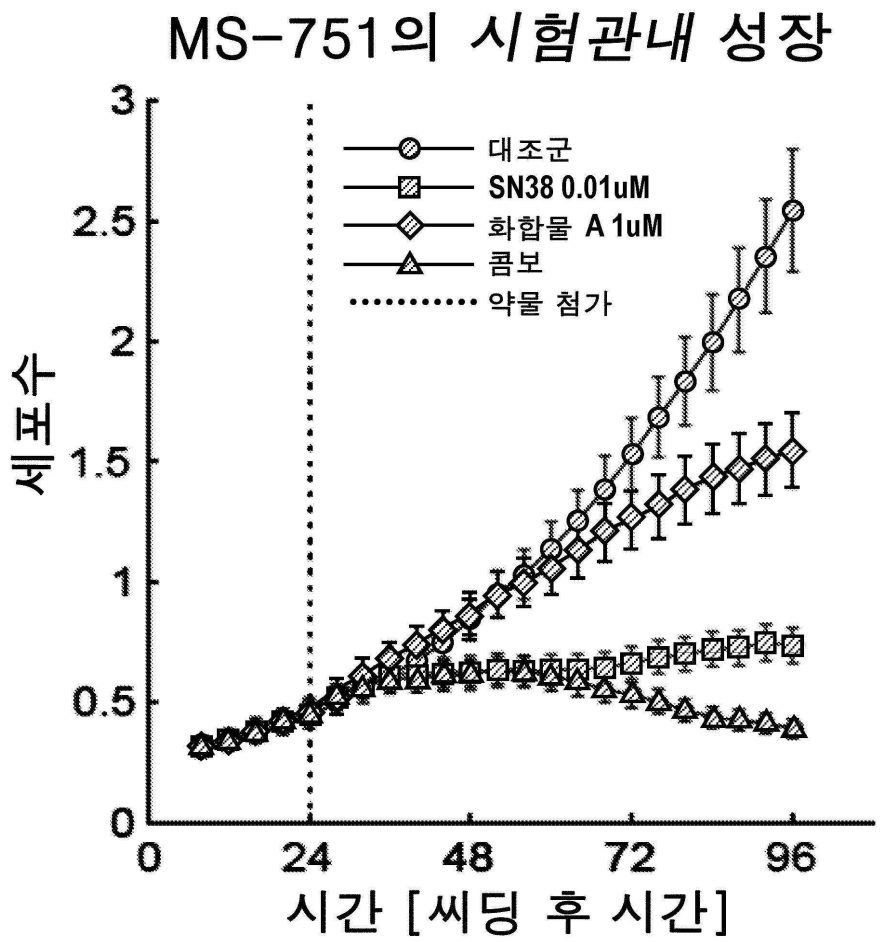

생존 세포
세포수
4
3
2
1
0
0
24
48
72
시간 [h]
대조군
화합물 A 1 uM
젬시타빈 0.04 uM
콤보


아폽토시스 세포
세포수
1
0.5
0
0
24
48
72
시간 [h]
대조군
화합물 A 1 Um
젬시타빈 0.04 uM
콤보

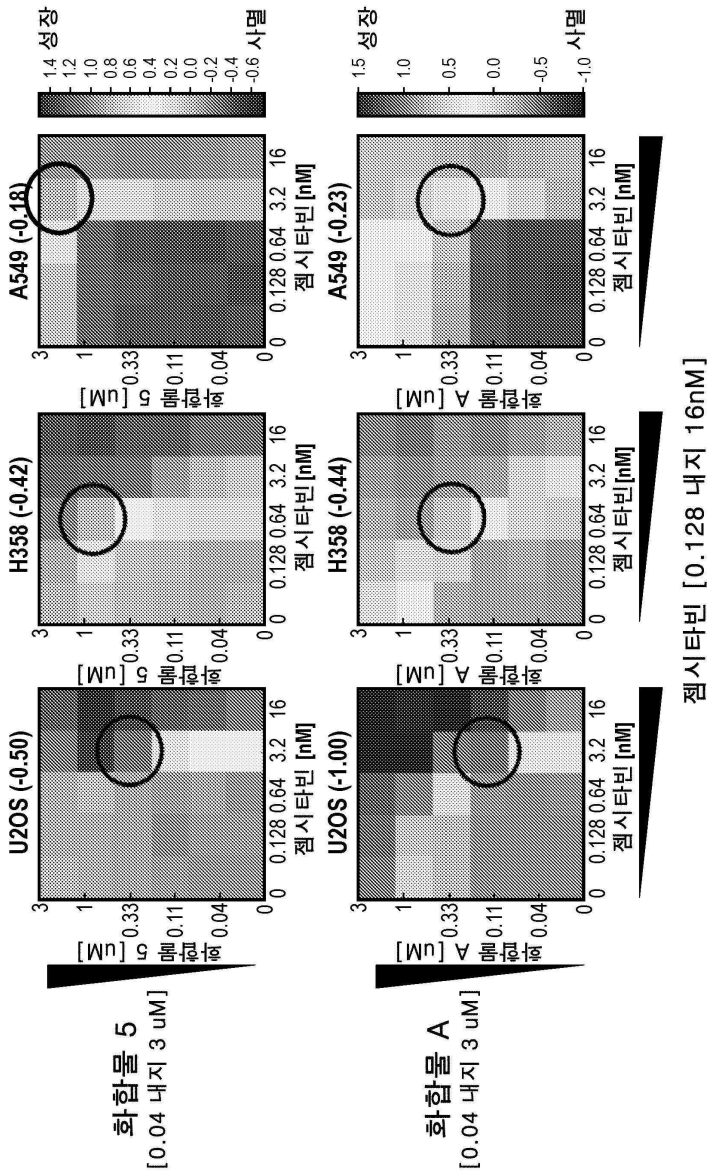
도면19


NCI-H520
대조군
SN38 0.2uM
화합물 A 1 uM
콤보
세포수
시간 [h]
NCI-H596
대조군
SN38 0.2uM
화합물 A 1 uM
콤보
세포수
시간 [h]
U2OS
대조군
SN38 0.2uM
화합물 A 1 uM
콤보
세포수
시간 [h]

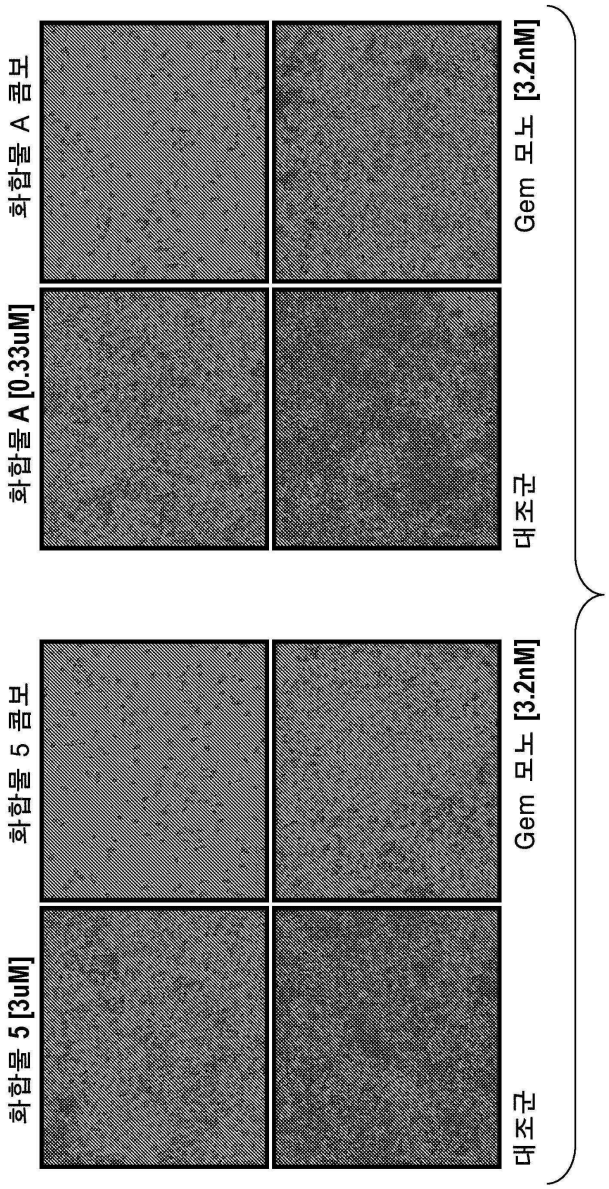
도면20


MS-751의 시험관내 성장
대조군
SN38 0.01uM
화합물 A 1uM
콤보
약물 첨가
세포수
시간 [씨딩 후 시간]
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
0
24
48
72
96

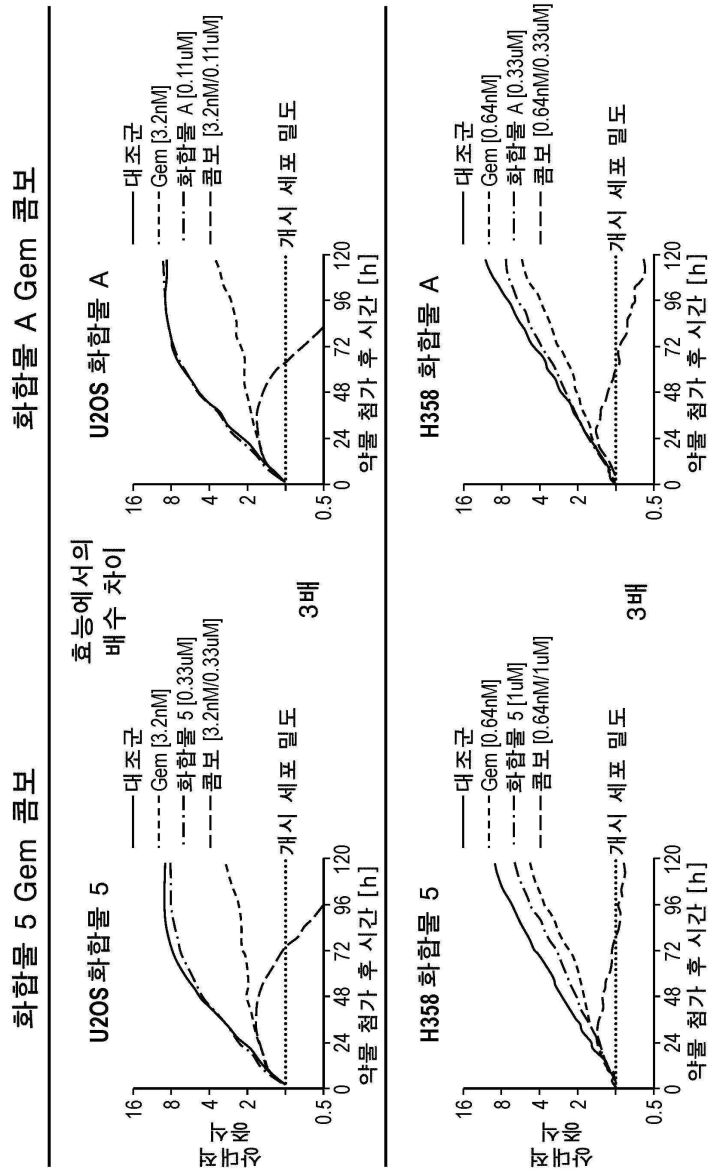
도면21a


화합물 5
[0.04 내지 3 uM]
화합물 A
[0.04 내지 3 uM]
젬시타빈 [0.128 내지 16nM]
U2OS (-0.50)
H358 (-0.42)
A549 (-0.18)
U2OS (-1.00)
H358 (-0.44)
A549 (-0.23)
화합물 5 [uM]
화합물 A [uM]
젬시타빈 [nM]
젬시타빈[nM]
0 0.128 0.64 3.2 16
3 1 0.33 0.11 0.04 0
성장
사멸
1.4 1.2 1.0 0.8 0.6 0.4 0.2 0.0 -0.2 -0.4 -0.6
1.5 1.0 0.5 0.0 -0.5 -1.0

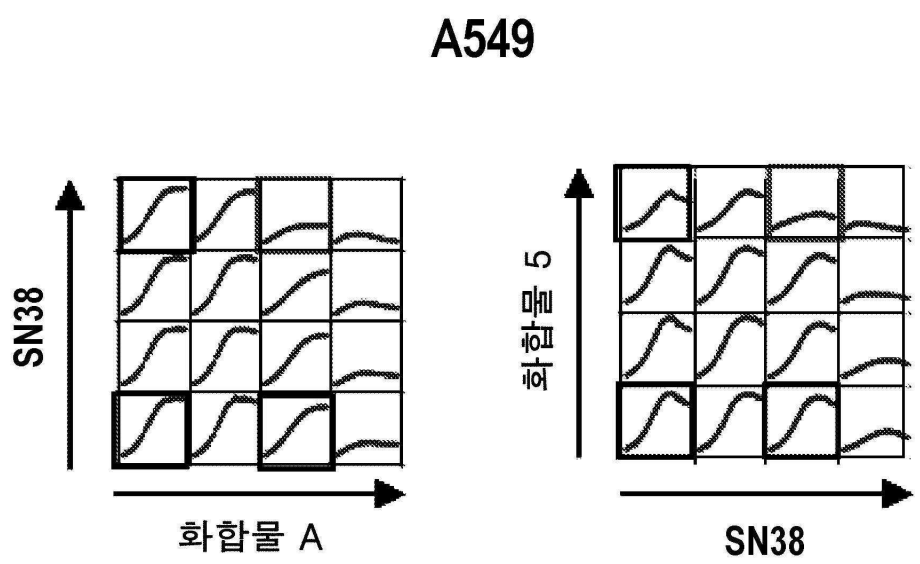
도면21b


화합물 A 콤보
화합물 A [0.33uM]
화합물 5 콤보
화합물 5 [3uM]
Gem 모노 [3.2nM]
대조군
Gem 모노 [3.2nM]
대조군

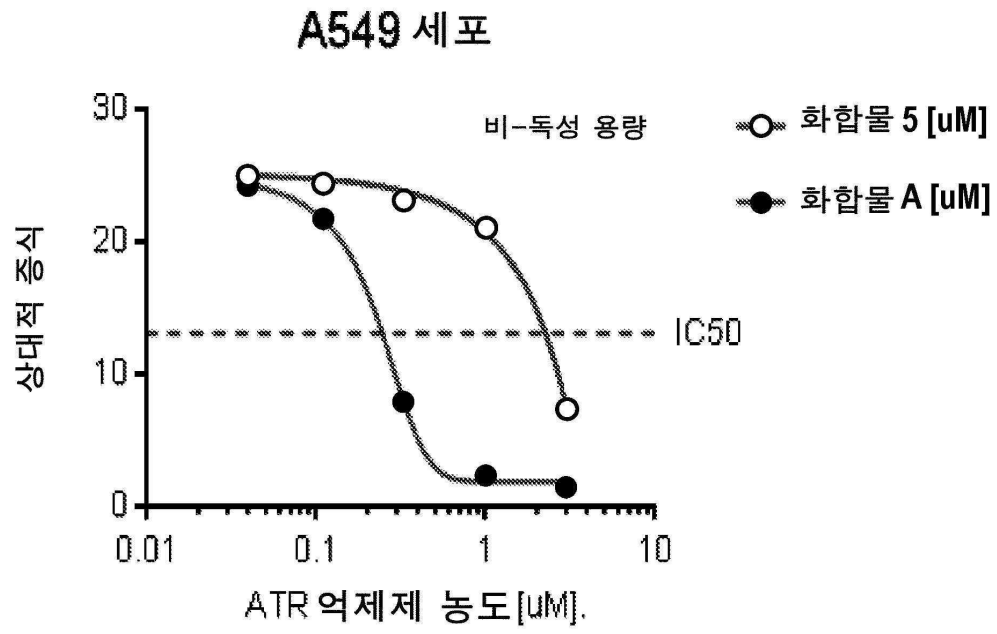
도면21c


화합물 5 Gem 콤보
화합물 A Gem 콤보
효능에서의 배수 차이
U2OS 화합물 5
U2OS 화합물 A
H358 화합물 5
H358 화합물 A
대조군
Gem [3.2nM]
화합물 5 [0.33uM]
콤보 [3.2nM/0.33uM]
화합물 A [0.11uM]
콤보 [3.2nM/0.11uM]
Gem [0.64nM]
화합물 5 [1uM]
콤보 [0.64nM/1uM]
화합물 A [0.33uM]
콤보 [0.64nM/0.33uM]
개시 세포 밀도
3배
약물 첨가 후 시간 [h]
0
24
48
72
96
120
0.5
2
4
8
16

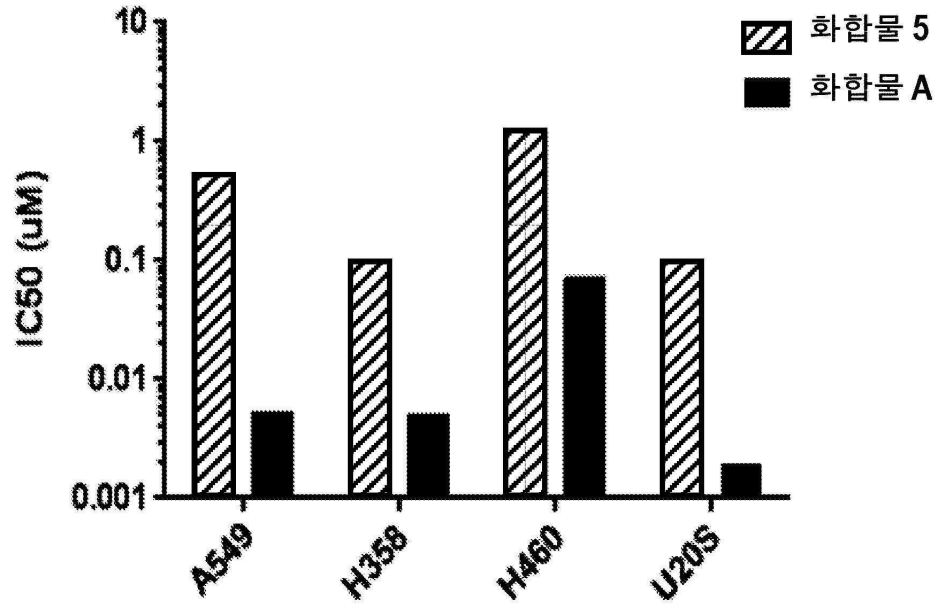
도면22a


A549
SN38
화합물 A
화합물 5
SN38

도면22b


A549 세포
비-독성 용량
화합물 5 [uM]
화합물 A [uM]
IC50
상대적 증식
30
20
10
0
0.01
0.1
1
10
ATR 억제제 농도 [uM].

도면23



도면24

젬시타빈	화합물 A	화합물 5
응답자	A549, HCC827, H2170, H358, H460	A549, HCC827, H2170, H358, H460
비-응답자	H2170, H358, H596	H2170, H358, H596

SN38	화합물 A	화합물 5
응답자	A549, DMS-114, H1299, H23, H460, Calu-6	A549, DMS-114, H1299, H23, H460, Calu-6
비-응답자	Calu-6, H1993, H23, H596	Calu-6, H1993, H23, H596

도면25a

키나제	**ATR** IC_{50} (nM)	**ATM** IC_{50} (nM)
화합물 **6**	470.8	> 10,000
화합물 **2**	139.8	4817
화합물 **5**	**233.9**	> 10,000
화합물 **4**	353.4	6869
화합물 **3**	196.1	> 10,000
화합물 **A**	< 1 *	42
화합물 **1** ***	49.6 **	3864

Lit. ref.

EuroFin, 영국, 셀 프리시스템

* KI < 0.2nM

** KI = 6 nM
IC50 = 120nM

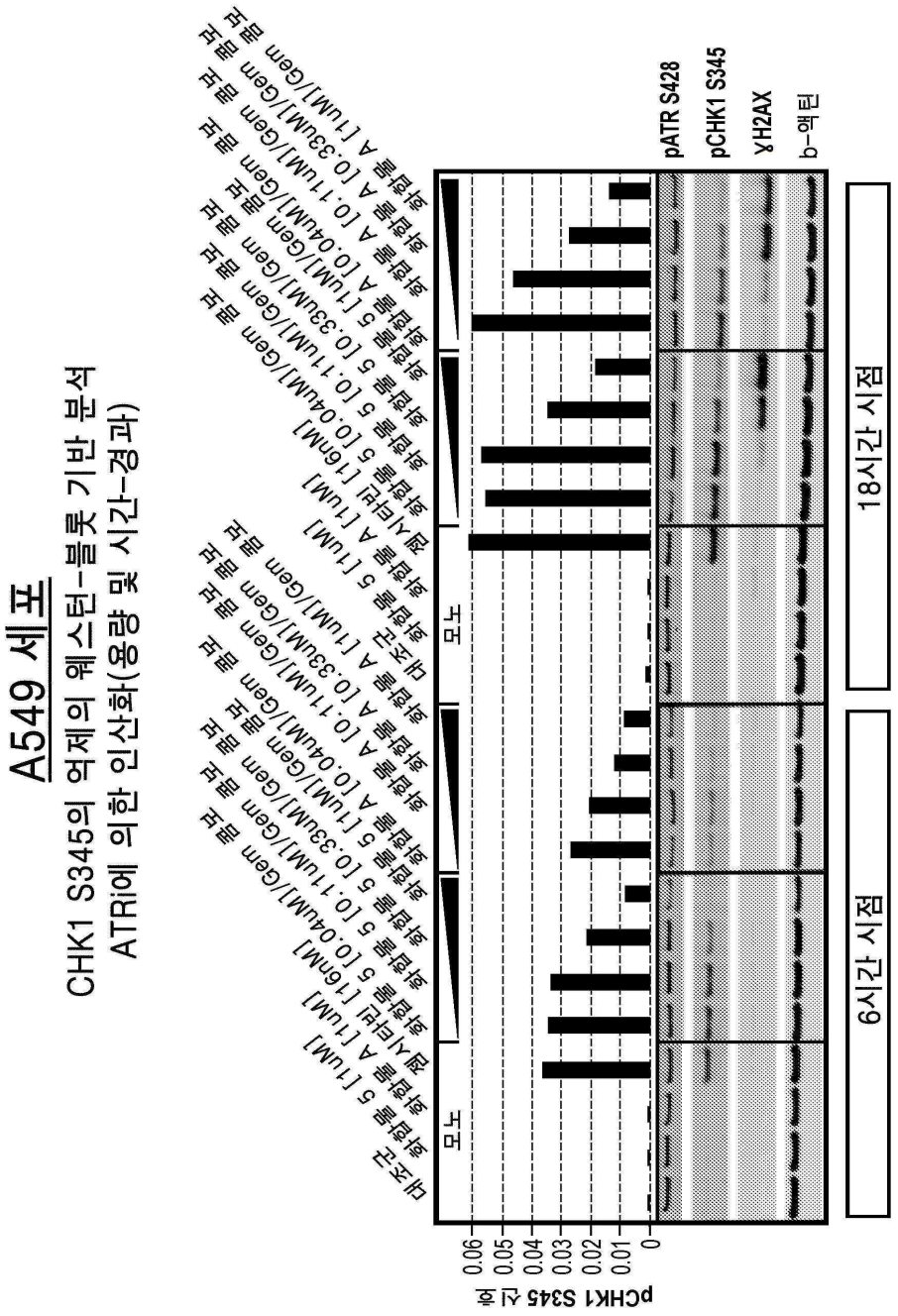
*** 중단된

도면25b

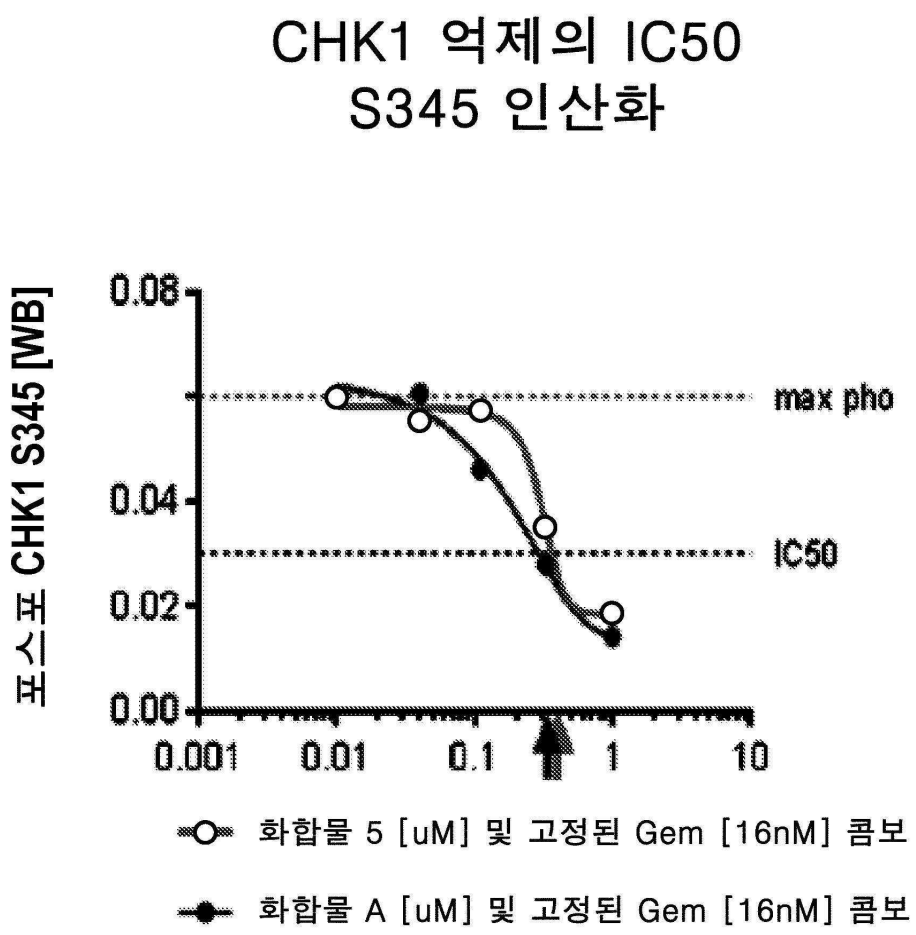
키나제	화합물 5 IC_{50} (nM)	화합물 A IC_{50} (nM)
GSK3α	206	126
GSK3β	876	210
MLK1	74	59
MLK2	91	76

EuroFin, 영국, 셀 프리시스템

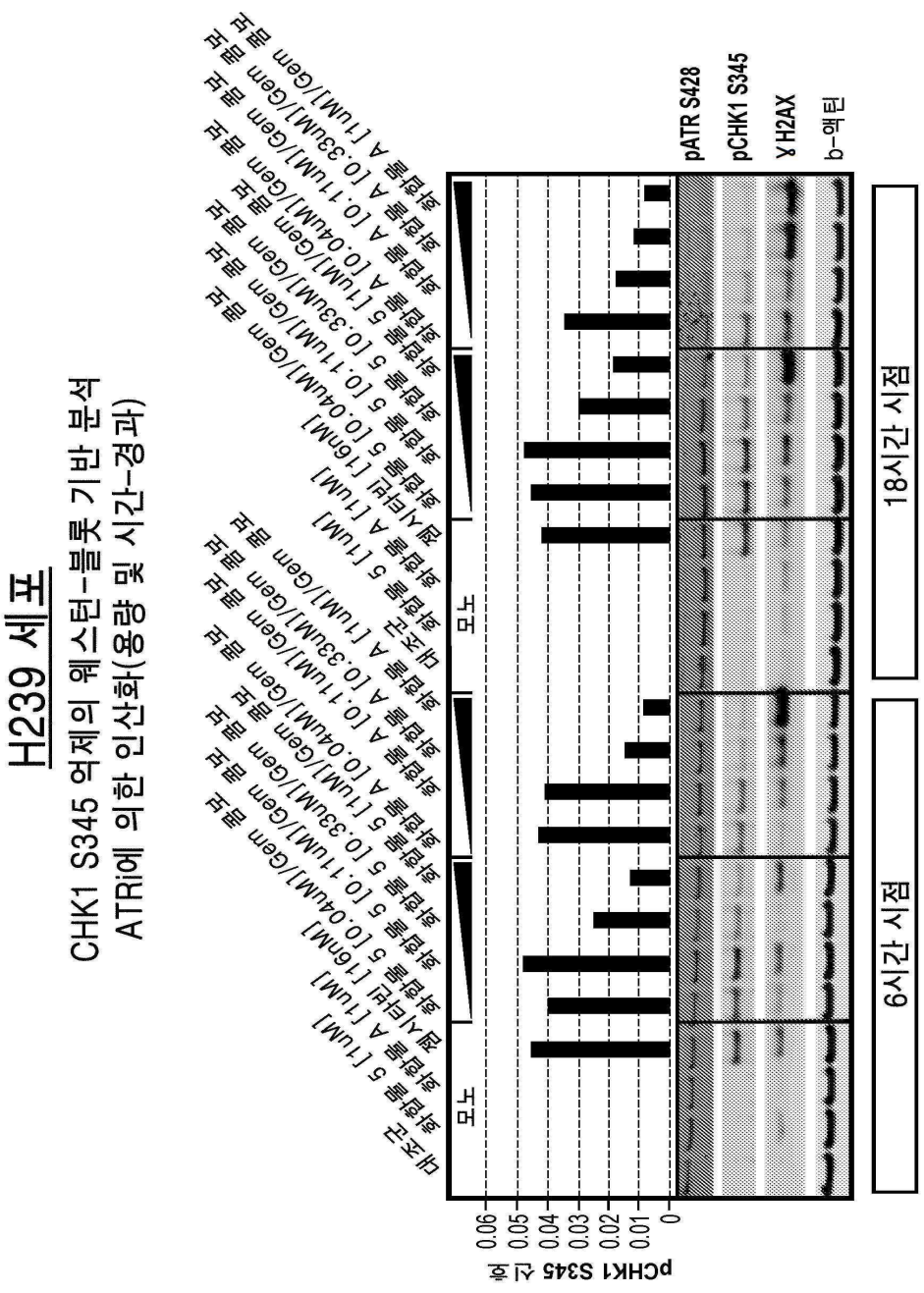
도면26a


A549 세포
CHK1 S345의 억제의 웨스턴-블롯 기반 분석
ATRi에 의한 인산화(용량 및 시간-경과)
pCHK1 S345 신호
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
모노
pATR S428
pCHK1 S345
γH2AX
b-액틴
6시간 시점
18시간 시점
대조군
화합물 5 [1uM]
화합물 A [1uM]
화합물 A [16nM]
화합물 5 [16nM]
화합물 5 [0.04uM]/Gem 젬
화합물 A [0.11uM]/Gem 젬
화합물 5 [0.11uM]/Gem 젬
화합물 A [0.33uM]/Gem 젬
화합물 5 [0.33uM]/Gem 젬
화합물 A [1uM]/Gem 젬

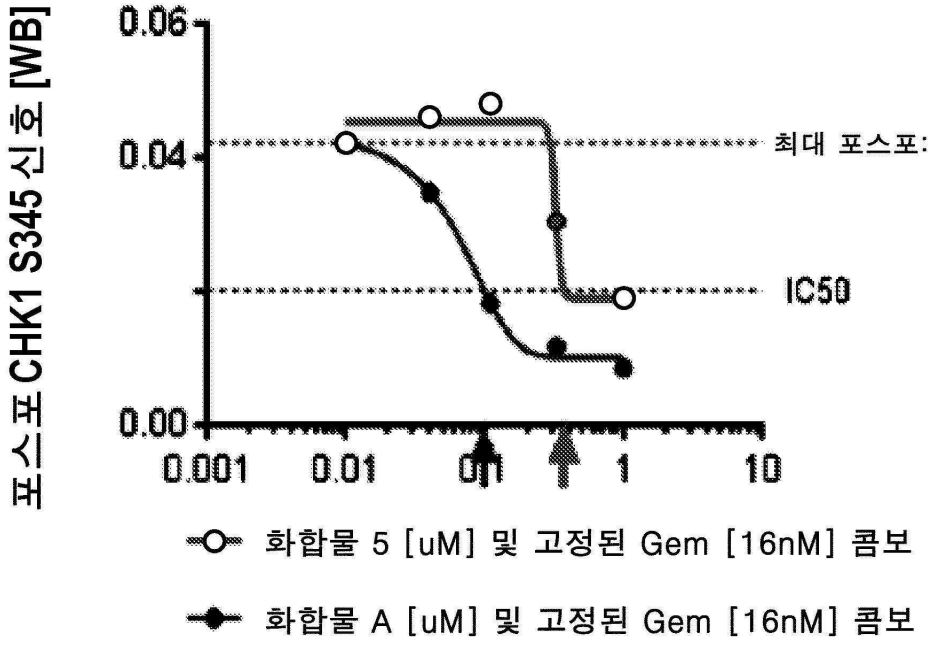
도면26b


CHK1 억제의 IC50
S345 인산화
포스포 CHK1 S345 [WB]
0.08
0.04
0.02
0.00
0.001
0.01
0.1
1
10
max pho
IC50
화합물 5 [uM] 및 고정된 Gem [16nM] 콤보
화합물 A [uM] 및 고정된 Gem [16nM] 콤보

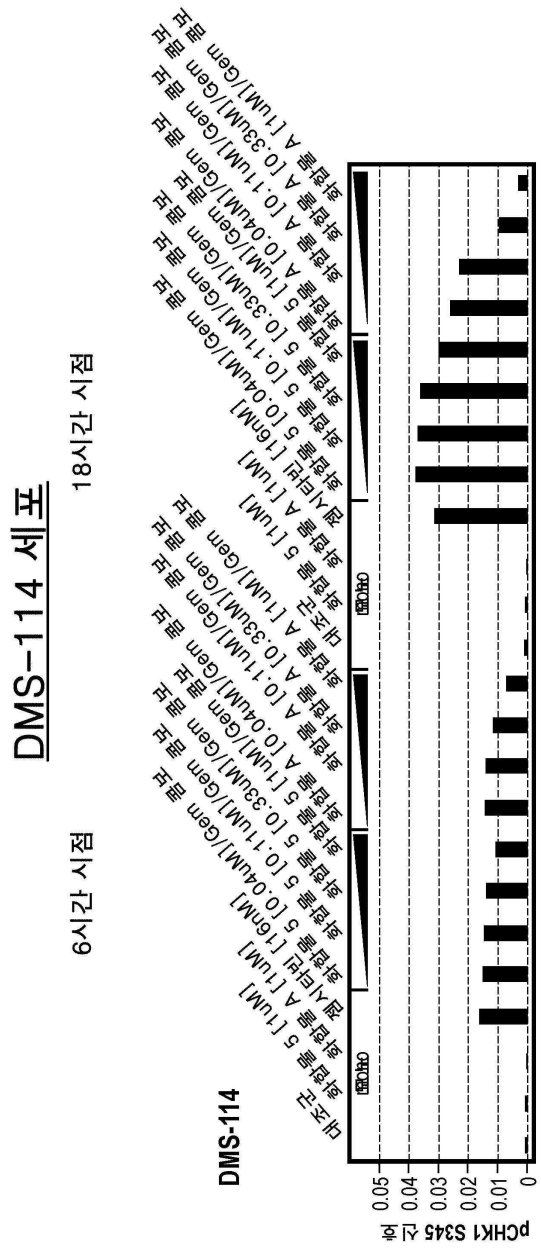
도면26c


H239 세포
CHK1 S345 억제의 웨스턴-블롯 기반 분석
ATRi에 의한 인산화(용량 및 시간-경과)
pCHK1 S345 신호
0
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
0.06
pATR S428
pCHK1 S345
γH2AX
b-액틴
6시간 시점
18시간 시점
모노
모노
대조군
화합물 5 [1uM]
화합물 A [1uM]
정사티닙 [16nM]
화합물 5 [1uM] + 화합물 A [1uM]
화합물 5 [0.33uM] + 화합물 A [1uM]
화합물 5 [0.11uM] + 화합물 A [1uM]
화합물 5 [0.04uM] + 화합물 A [1uM]
화합물 5 [1uM] + 화합물 A [0.33uM]
화합물 5 [0.33uM] + 화합물 A [0.33uM]
화합물 5 [0.11uM] + 화합물 A [0.33uM]
화합물 5 [0.04uM] + 화합물 A [0.33uM]
화합물 5 [1uM] + 화합물 A [0.11uM]
화합물 5 [0.33uM] + 화합물 A [0.11uM]
화합물 5 [0.11uM] + 화합물 A [0.11uM]
화합물 5 [0.04uM] + 화합물 A [0.11uM]
화합물 5 [1uM] + 화합물 A [0.04uM]
화합물 5 [0.33uM] + 화합물 A [0.04uM]
화합물 5 [0.11uM] + 화합물 A [0.04uM]
화합물 5 [0.04uM] + 화합물 A [0.04uM]

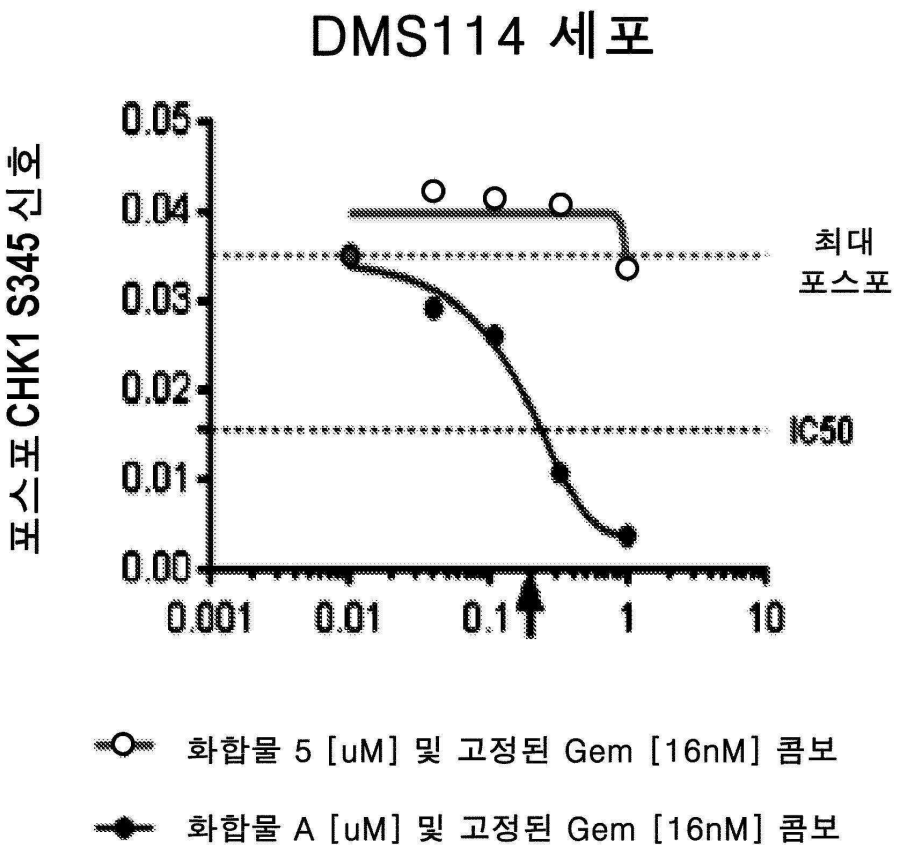
도면26d


CHK1 억제의 IC50
S345 인산화
포스포CHK1 S345 신호 [WB]
0.06
0.04
0.00
0.001
0.01
0.1
1
10
최대 포스포:
IC50
화합물 5 [uM] 및 고정된 Gem [16nM] 콤보
화합물 A [uM] 및 고정된 Gem [16nM] 콤보

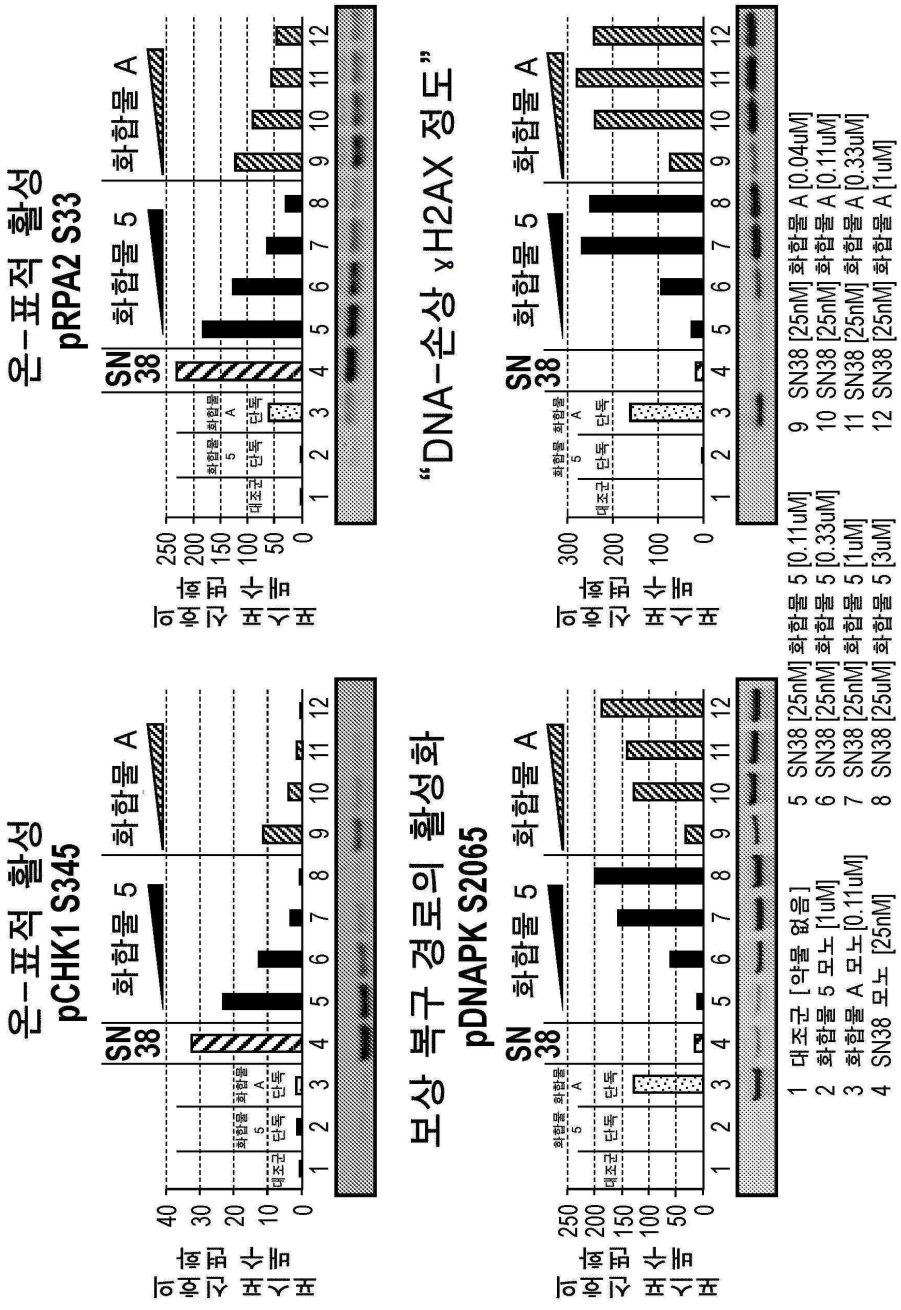
도면26e


DMS-114 세포
6시간 시점
18시간 시점
DMS-114
pCHK1 S345 신호
0
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
대조군
젬시타빈 [16nM]
젬시타빈 [1uM]
젬시타빈 [16nM]
젬시타빈 [1uM]
화합물 5 [1uM]
화합물 5 [1uM] 젬
화합물 5 [0.33uM] 젬
화합물 5 [0.11uM] 젬
화합물 5 [0.04uM] 젬
화합물 A [1uM]
화합물 A [1uM] 젬
화합물 A [0.33uM] 젬
화합물 A [0.11uM] 젬
화합물 A [0.04uM] 젬

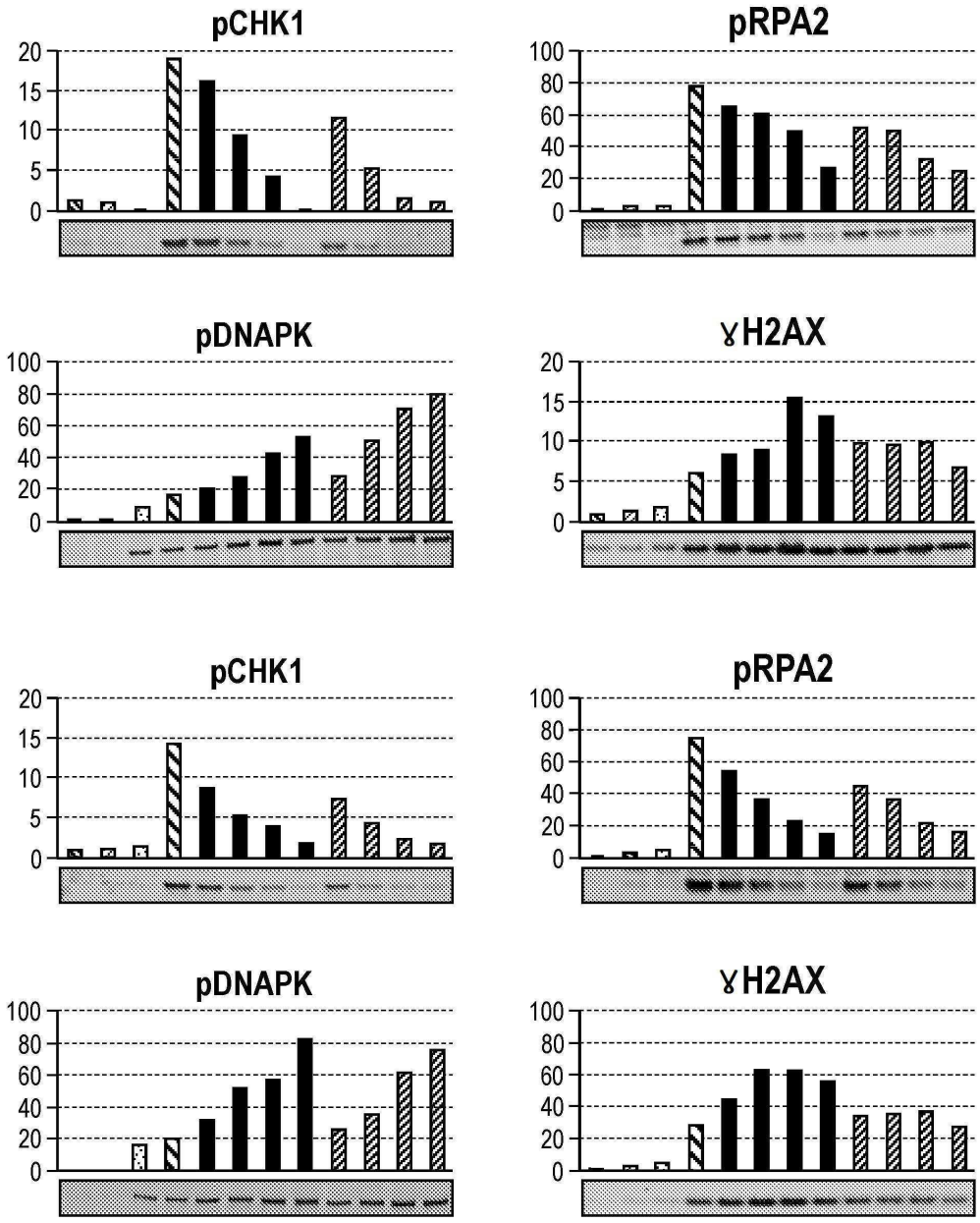
도면26f

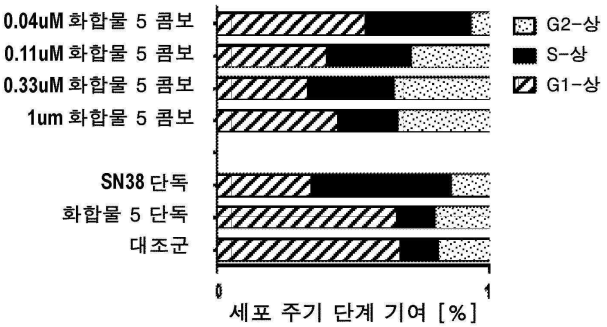

DMS114 세포
포스포 CHK1 S345 신호
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
0.001
0.01
0.1
1
10
최대
포스포
IC50
화합물 5 [uM] 및 고정된 Gem [16nM] 콤보
화합물 A [uM] 및 고정된 Gem [16nM] 콤보

도면27a

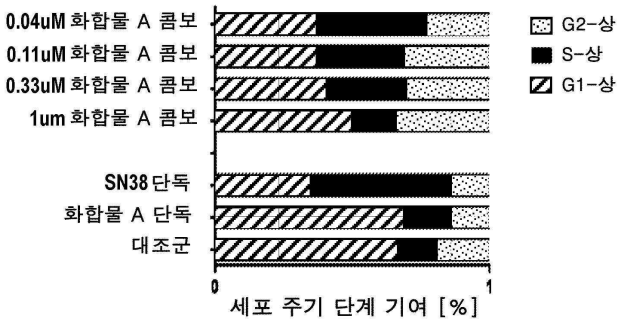

온-표적 활성
pCHK1 S345
보상 복구 경로의 활성화
pDNAPK S2065
온-표적 활성
pRPA2 S33
"DNA-손상 γH2AX 정도"
SN38
화합물 5
화합물 A
대조군
단독
화합물 5 + 화합물 A
정규화된 표시 수준
1 대조군 [약물 없음]
2 화합물 5 모노 [1uM]
3 화합물 A 모노 [0.11uM]
4 SN38 모노 [25nM]
5 SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
6 SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
7 SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
8 SN38 [25uM] 화합물 5 [3uM]
9 SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
10 SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
11 SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
12 SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

도면27b





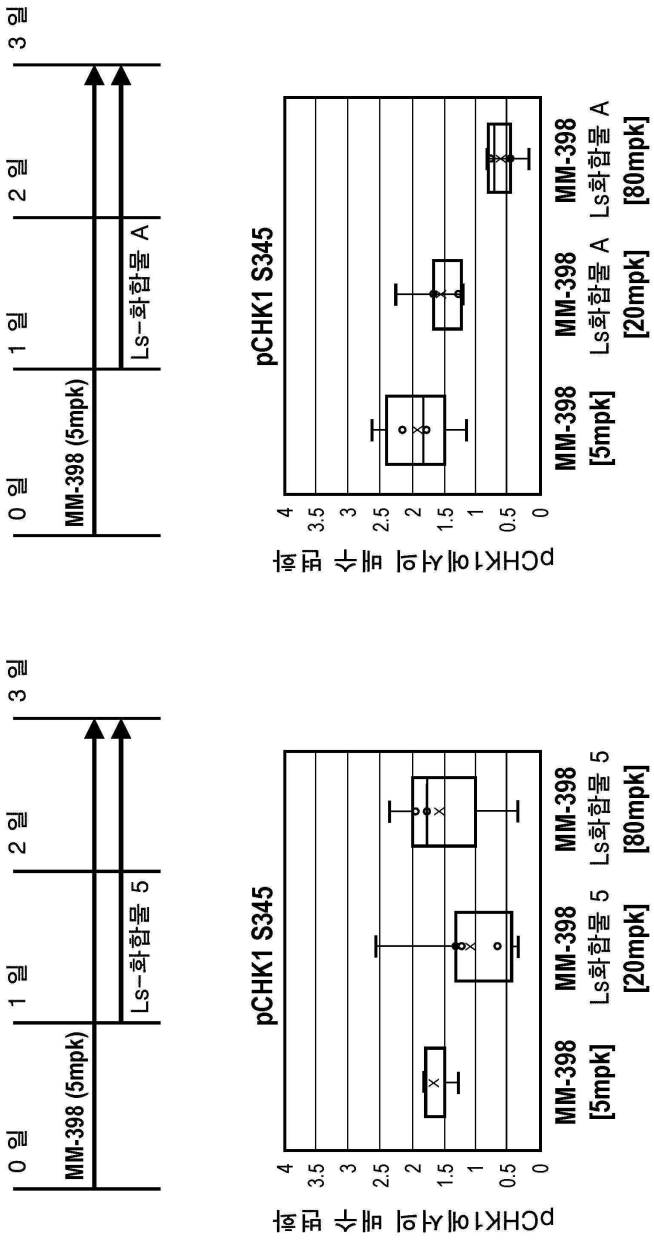
	G1	S	G2
대조군	67%	14%	19%
화합물 5 단독 [1uM]	66%	14%	20%
SN38 단독 [25nM]	35%	51%	14%
SN38 [25nM] 화합물 5 {3uM]	44%	22%	34%
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]	34%	31%	35%
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]	40%	31%	29%
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]	54%	39%	7%



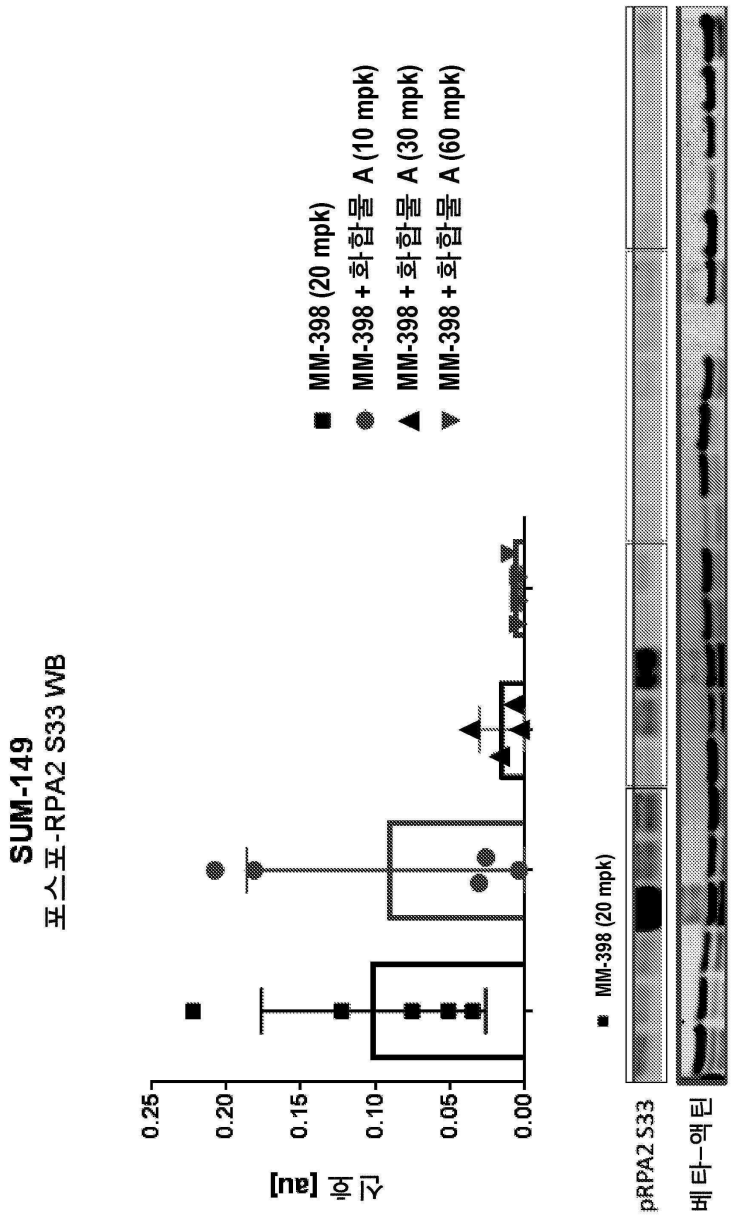
	G1	S	G2
대조군	67%	14%	19%
화합물 A 단독 [1uM]	69%	17%	14%
SN38 단독 [25nM]	35%	51%	14%
SN38 [25nM] 화합물 A {3uM]	50%	16%	35%
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]	41%	29%	30%
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]	37%	32%	31%
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]	37%	40%	23%

등록특허 10-2558501

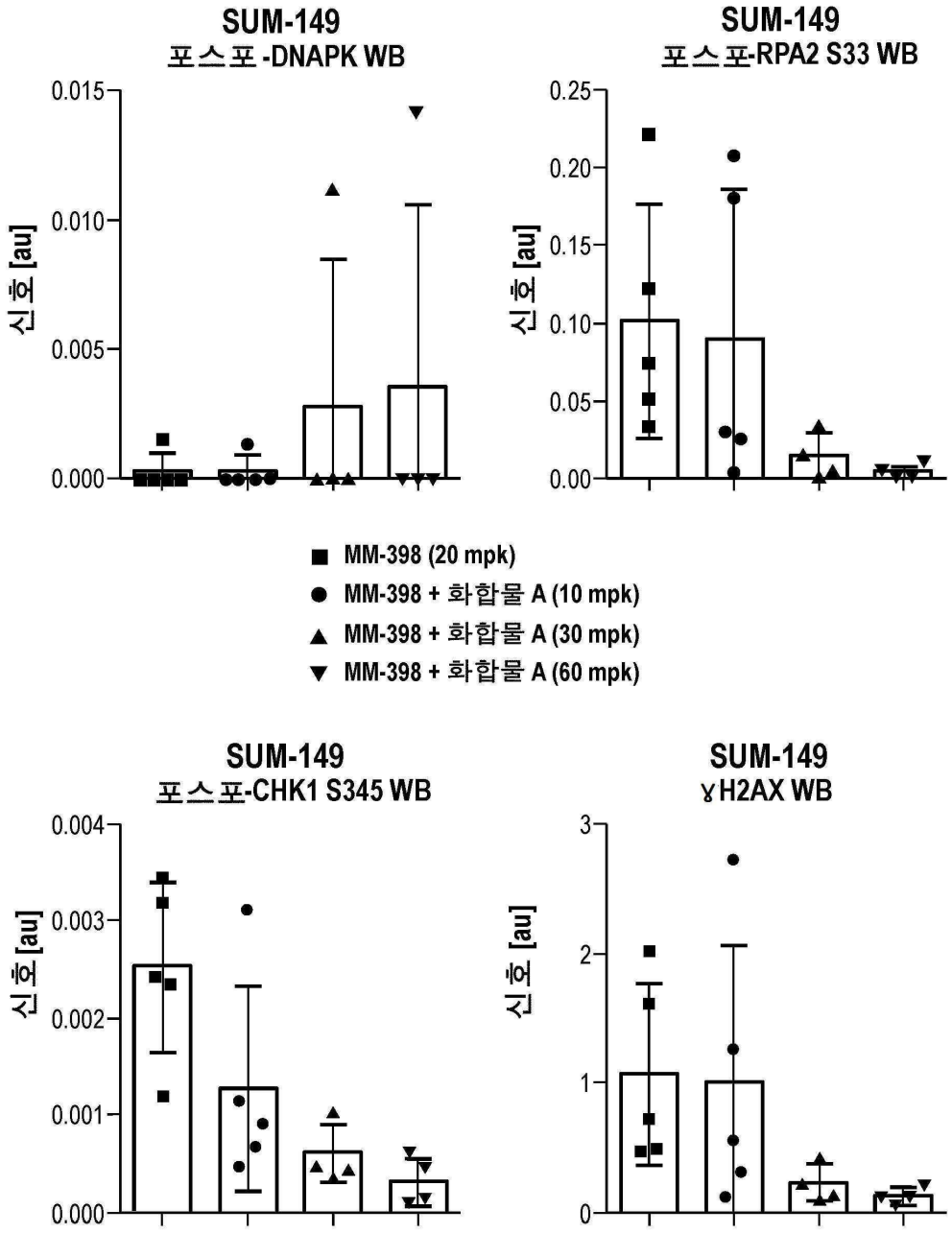
도면29


0 일
1 일
2 일
3 일
MM-398 (5mpk)
Ls-화합물 A
Ls-화합물 5
pCHK1 S345
pCHK1에서의 변화 수
MM-398 [5mpk]
MM-398 Ls화합물 A [20mpk]
MM-398 Ls화합물 A [80mpk]
MM-398 Ls화합물 5 [20mpk]
MM-398 Ls화합물 5 [80mpk]

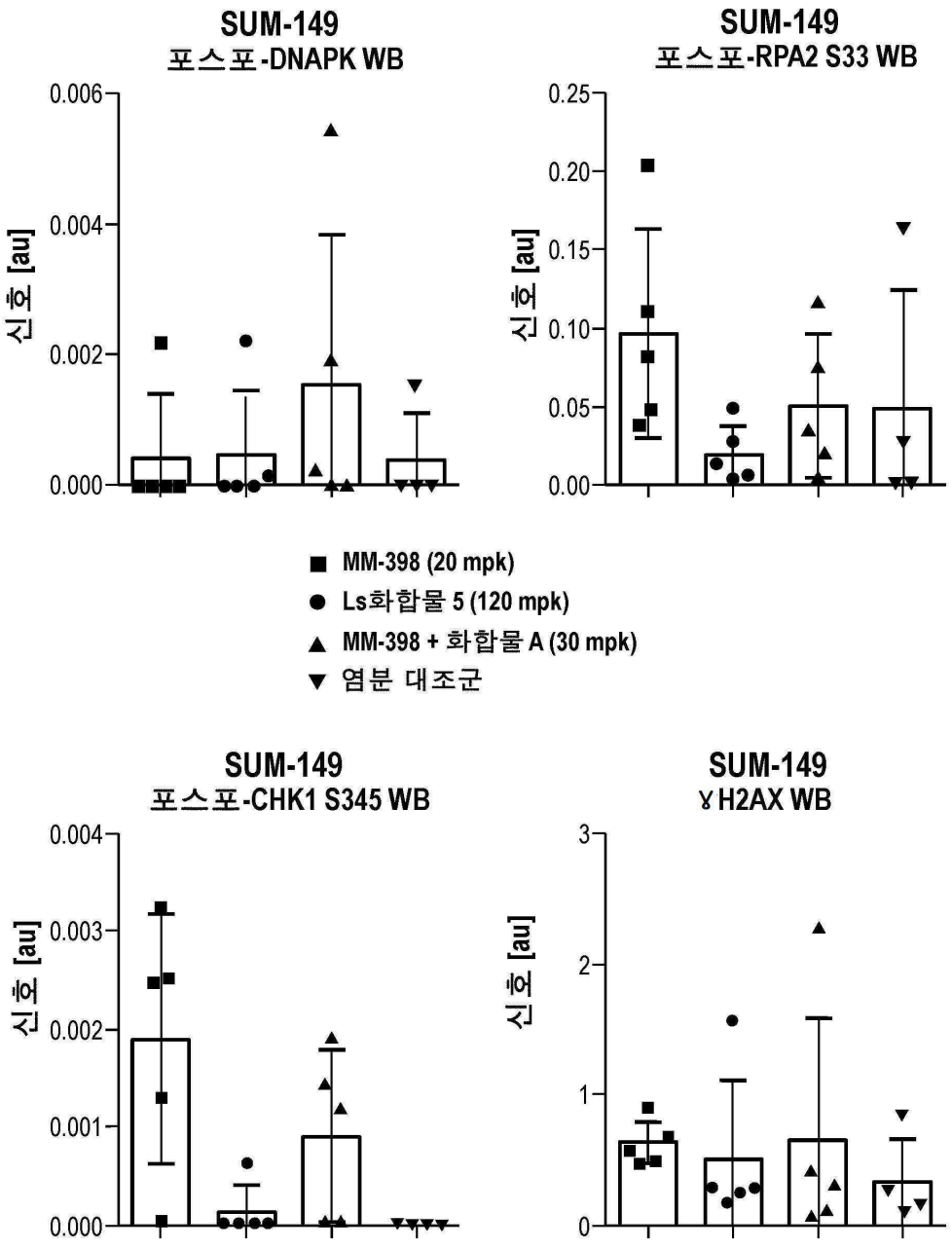
도면30a


SUM-149
포스포-RPA2 S33 WB
MM-398 (20 mpk)
MM-398 + 화합물 A (10 mpk)
MM-398 + 화합물 A (30 mpk)
MM-398 + 화합물 A (60 mpk)
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
[au]
MM-398 (20 mpk)
pRPA2 S33
베타-액틴

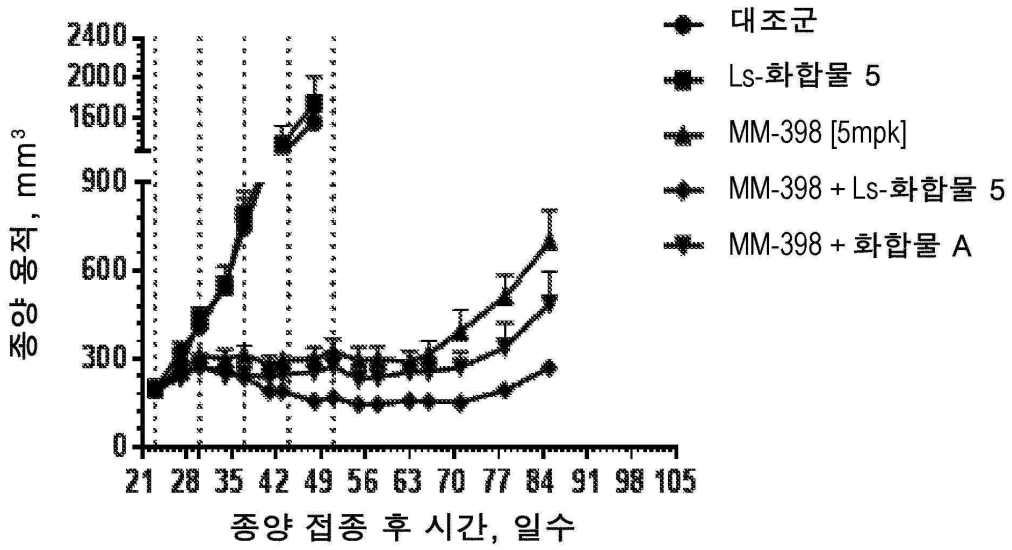
도면30b


SUM-149
포스포-DNAPK WB
신호 [au]
0.015
0.010
0.005
0.000
SUM-149
포스포-RPA2 S33 WB
신호 [au]
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
MM-398 (20 mpk)
MM-398 + 화합물 A (10 mpk)
MM-398 + 화합물 A (30 mpk)
MM-398 + 화합물 A (60 mpk)
SUM-149
포스포-CHK1 S345 WB
신호 [au]
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
SUM-149
γH2AX WB
신호 [au]
3
2
1
0

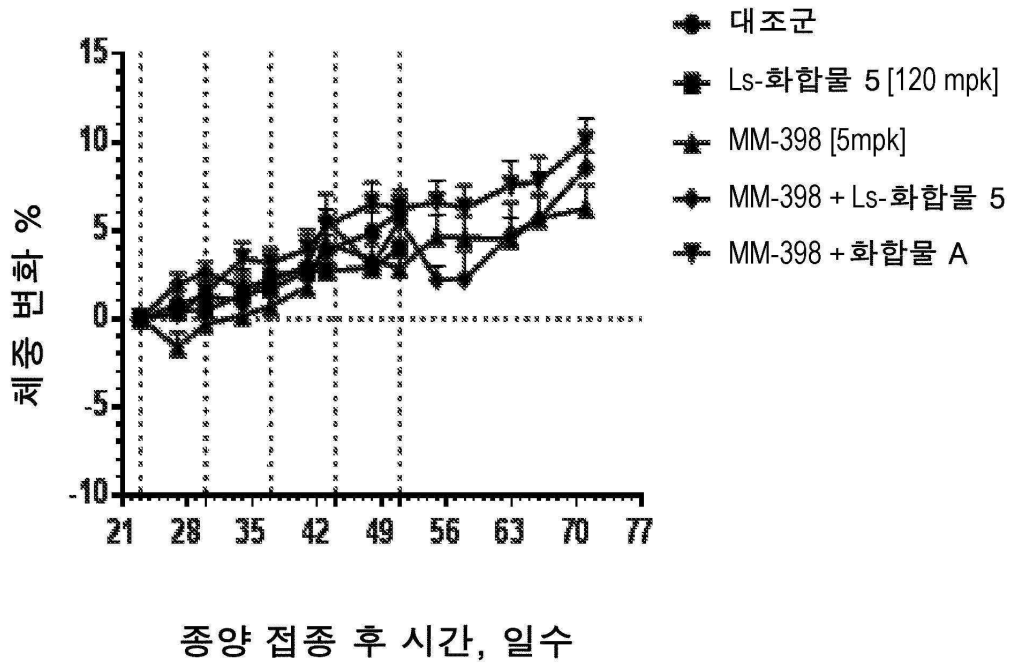
도면30c


SUM-149
포스포-DNAPK WB
신호 [au]
0.006
0.004
0.002
0.000
SUM-149
포스포-RPA2 S33 WB
신호 [au]
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
MM-398 (20 mpk)
Ls화합물 5 (120 mpk)
MM-398 + 화합물 A (30 mpk)
염분 대조군
SUM-149
포스포-CHK1 S345 WB
신호 [au]
0.004
0.003
0.002
0.001
0.000
SUM-149
γH2AX WB
신호 [au]
3
2
1
0

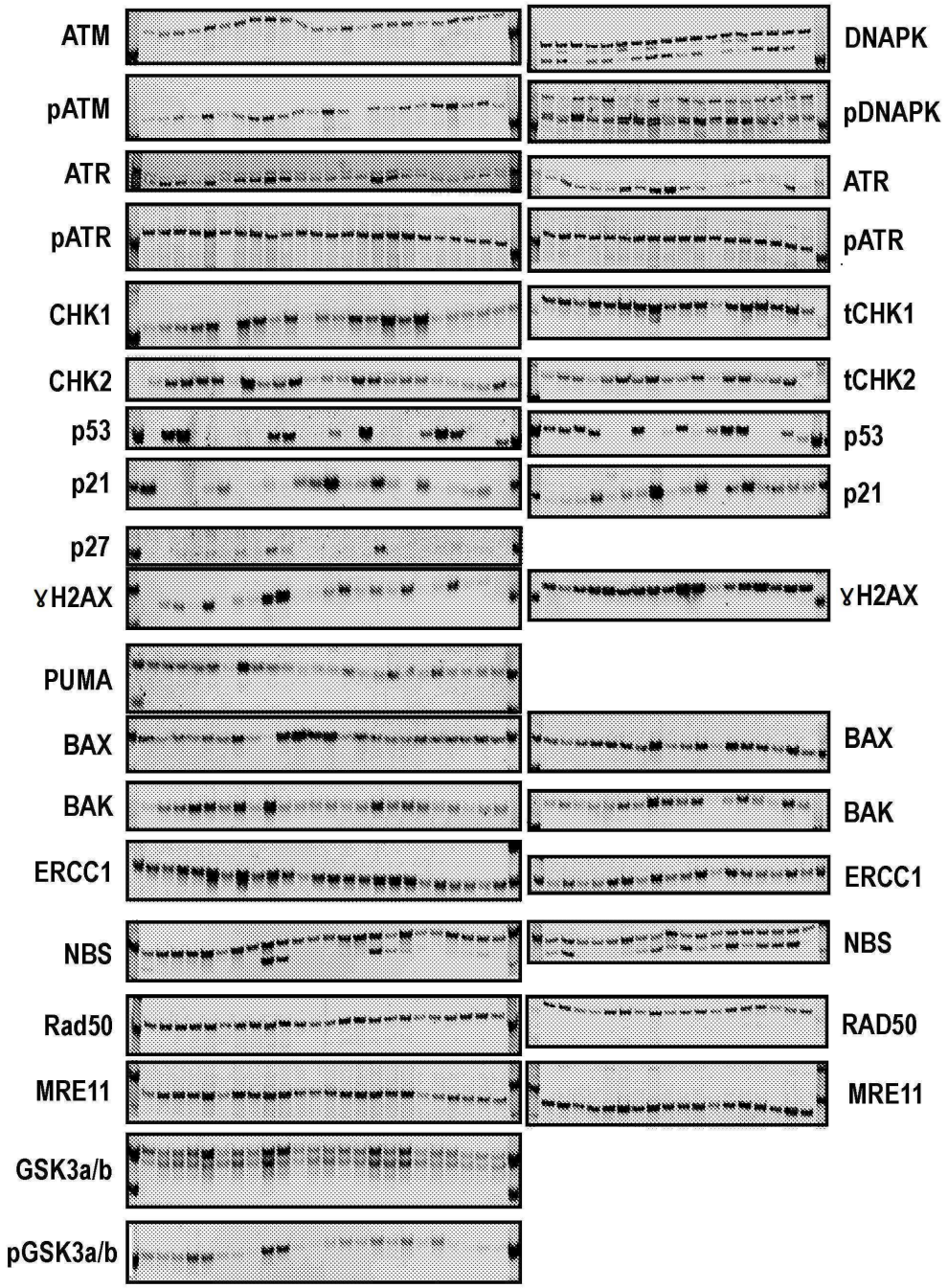
도면31


대조군
Ls-화합물 5
MM-398 [5mpk]
MM-398 + Ls-화합물 5
MM-398 + 화합물 A
종양 용적, mm3
2400
2000
1600
900
600
300
0
21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98 105
종양 접종 후 시간, 일수

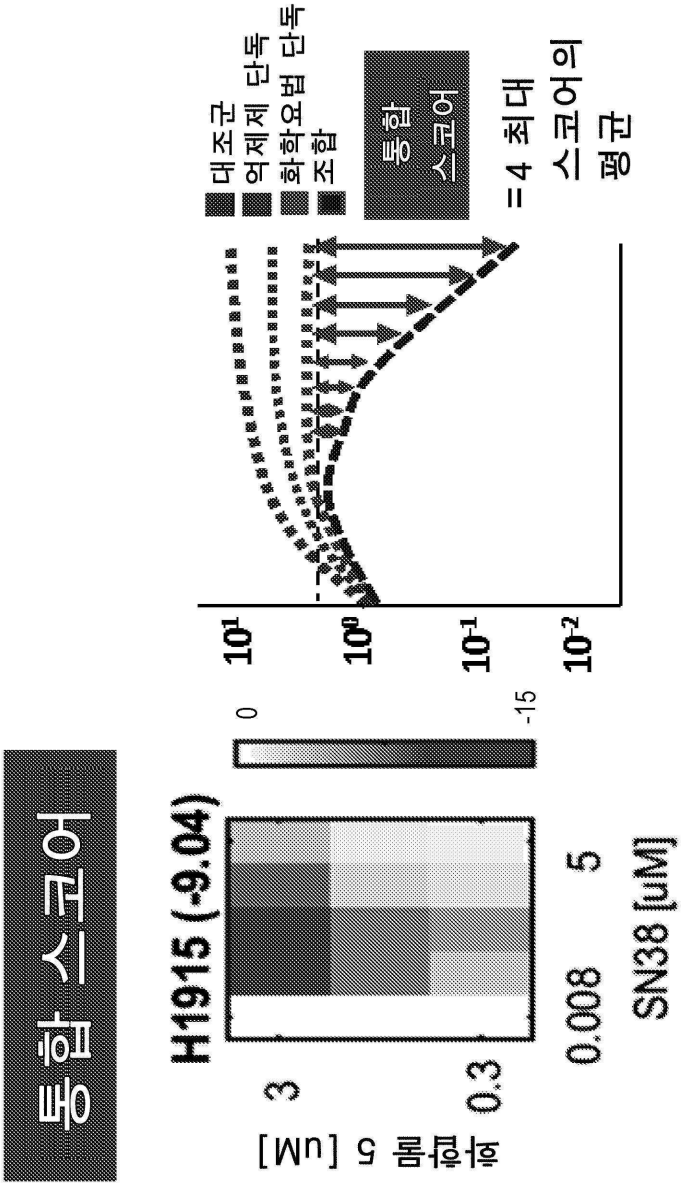
도면32


대조군
Ls-화합물 5 [120 mpk]
MM-398 [5mpk]
MM-398 + Ls-화합물 5
MM-398 + 화합물 A
체중 변화 %
15
10
5
0
-5
-10
21 28 35 42 49 56 63 70 77
종양 접종 후 시간, 일수

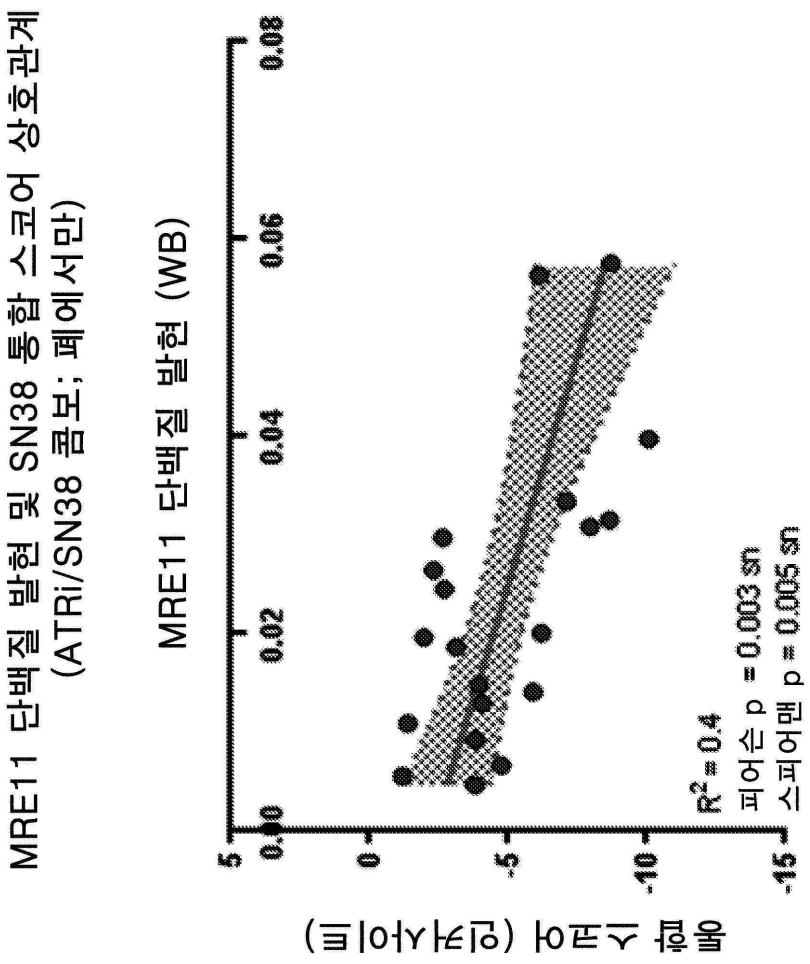
도면33


ATM
DNAPK
pATM
pDNAPK
ATR
ATR
pATR
pATR
CHK1
tCHK1
CHK2
tCHK2
p53
p53
p21
p21
p27
γH2AX
γH2AX
PUMA
BAX
BAX
BAK
BAK
ERCC1
ERCC1
NBS
NBS
Rad50
RAD50
MRE11
MRE11
GSK3a/b
pGSK3a/b

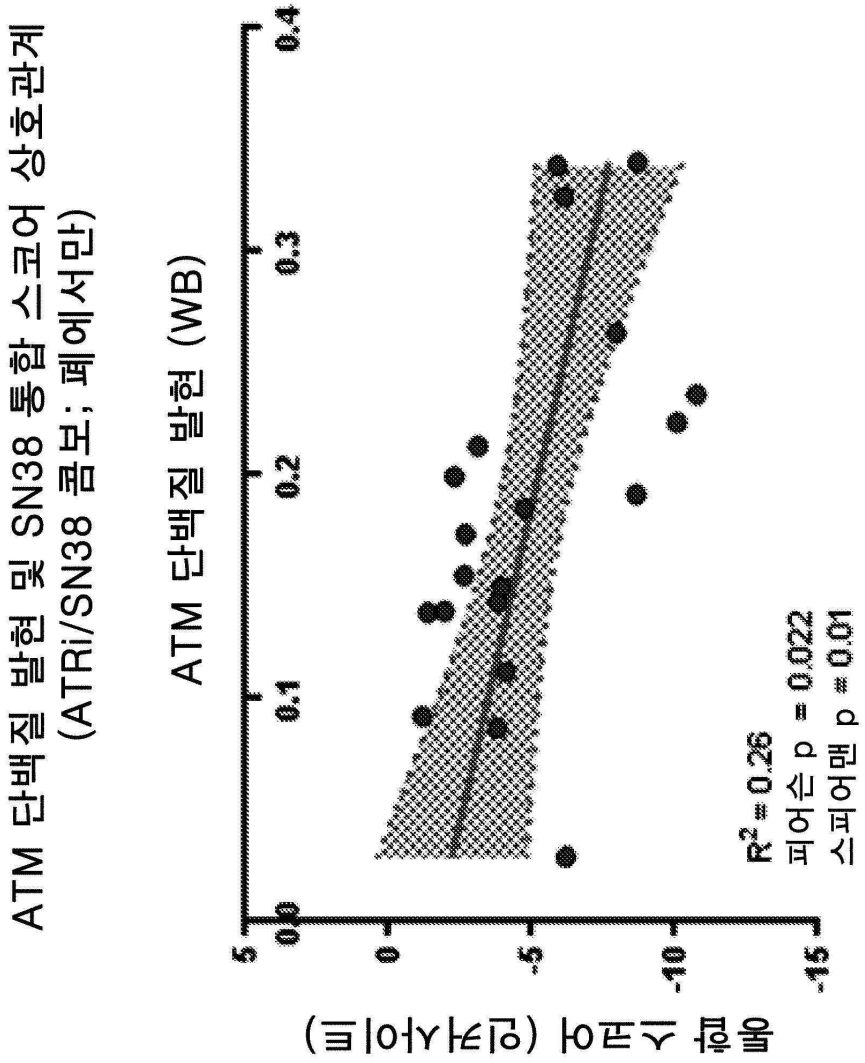
도면34


통합 시큐어
H1915 (-9.04)
화합물 5 [uM]
3
0.3
0.008
5
SN38 [uM]
0
-15
10^{1}
10^{0}
10^{-1}
10^{-2}
= 4 최대 스코어의 평균
통합 시큐어
대조군
억제제 단독
화학요법 단독
조합

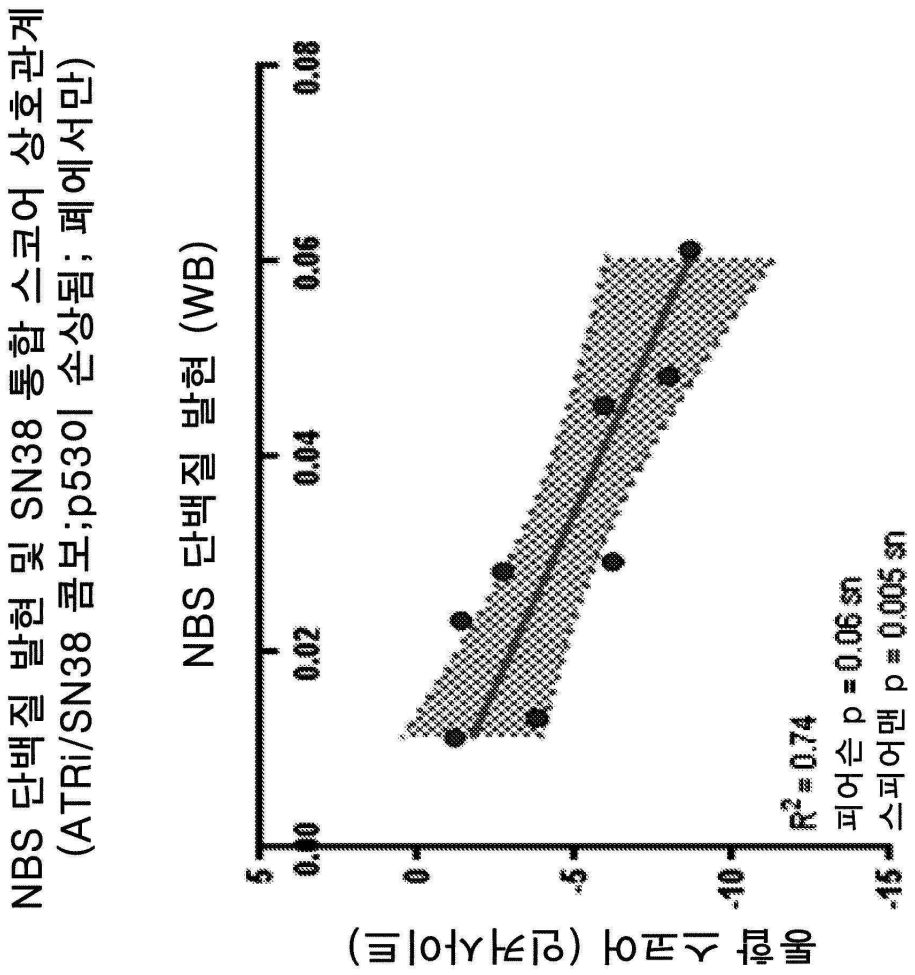
도면35


MRE11 단백질 발현 및 SN38 통합 스코어 상호관계
(ATRi/SN38 콤보; 폐에서만)
MRE11 단백질 발현 (WB)
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
통합 스코어 (인커사이트)
5
0
-5
-10
-15
R^2 = 0.4
피어슨 p = 0.003 sn
스피어맨 p = 0.005 sn

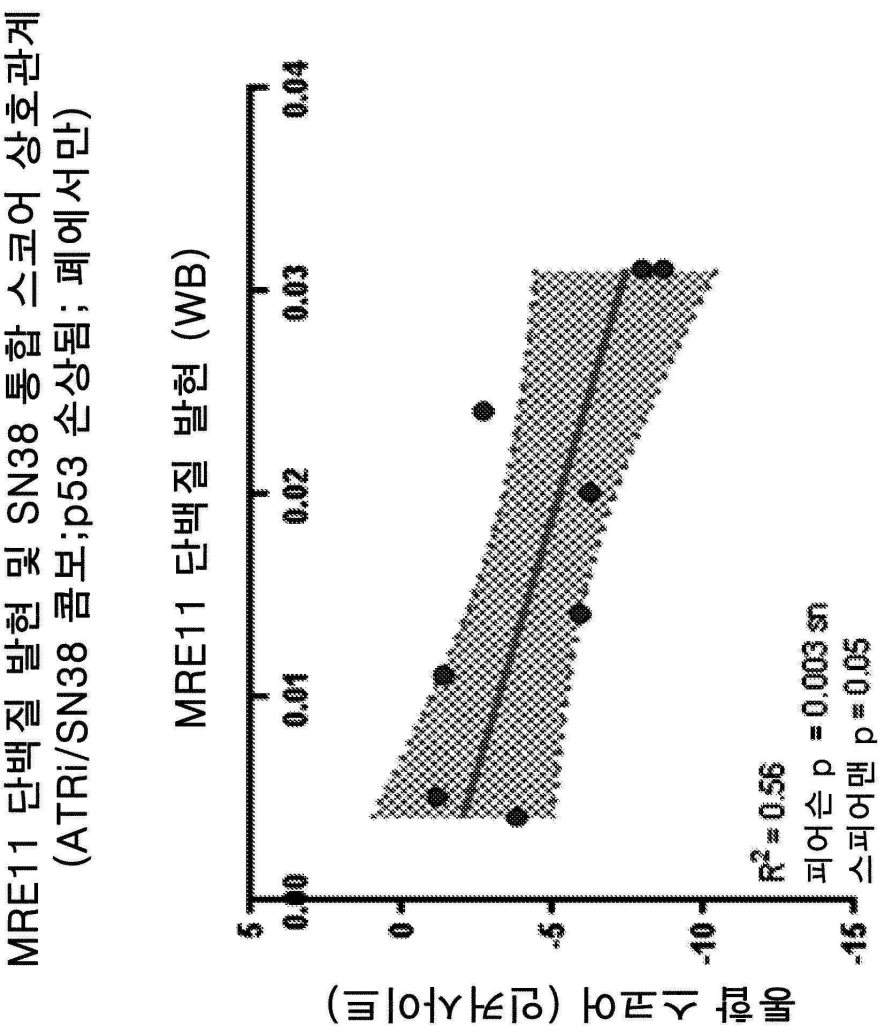
도면36


ATM 단백질 발현 및 SN38 통합 스코어 상호관계
(ATRi/SN38 콤보; 폐에서만)
ATM 단백질 발현 (WB)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
통합 스코어 (인커사이트)
5
0
-5
-10
-15
R2 = 0.26
피어슨 p = 0.022
스피어맨 p = 0.01

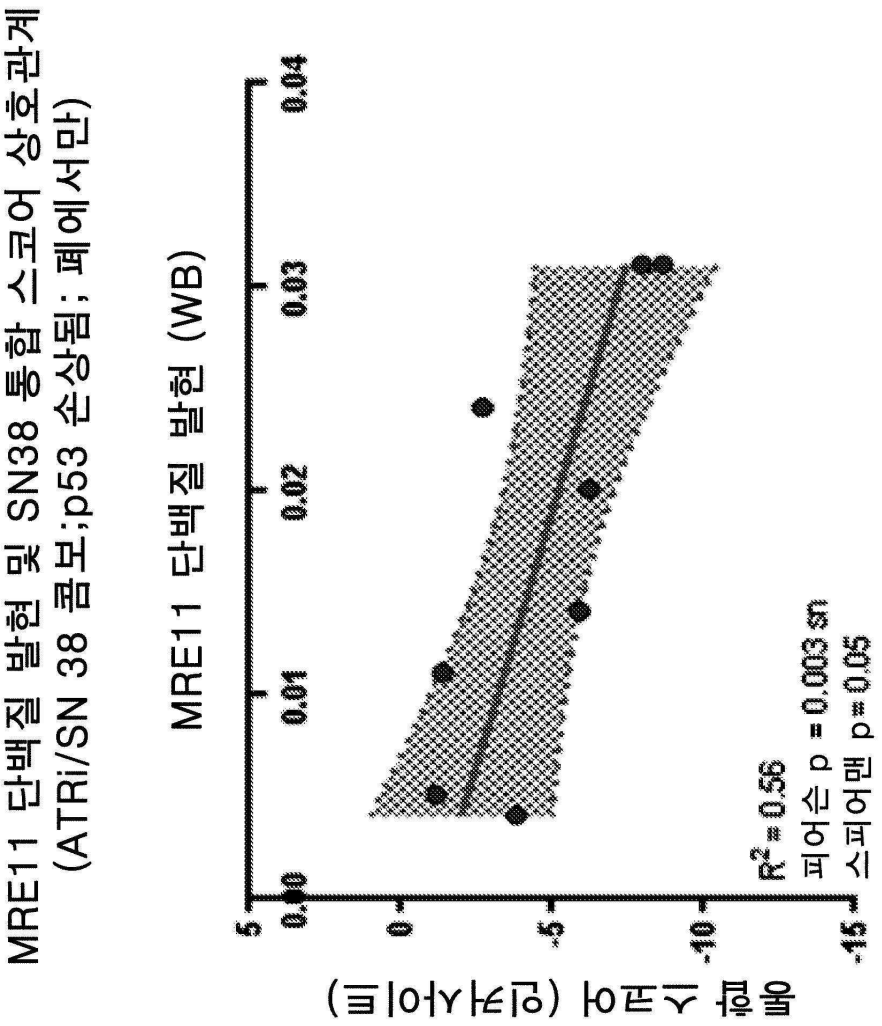
도면37


NBS 단백질 발현 및 SN38 통합 스코어 상호관계
(ATRi/SN38 콤보;p53이 손상됨; 폐에서만)
NBS 단백질 발현 (WB)
통합 스코어 (인capture)
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
5
0
-5
-10
-15
R^2 = 0.74
피어슨 p = 0.06 sn
스피어맨 p = 0.005 sn

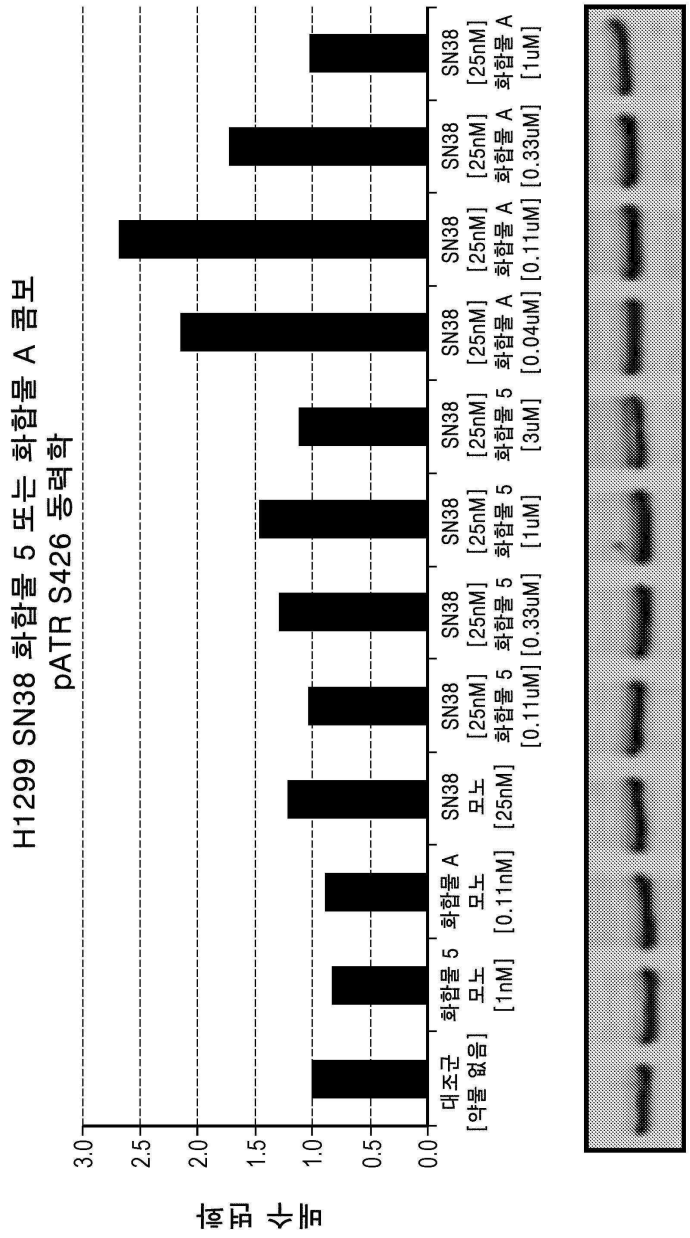
도면38


MRE11 단백질 발현 및 SN38 통합 스코어 상호관계
(ATRi/SN38 콤보;p53 손상됨; 폐에서만)
MRE11 단백질 발현 (WB)
통합 스코어 (인히비트)
0.04
0.03
0.02
0.01
0.00
5
0
-5
-10
-15
R^2 = 0.56
피어슨 p = 0.003 sn
스피어맨 p = 0.05

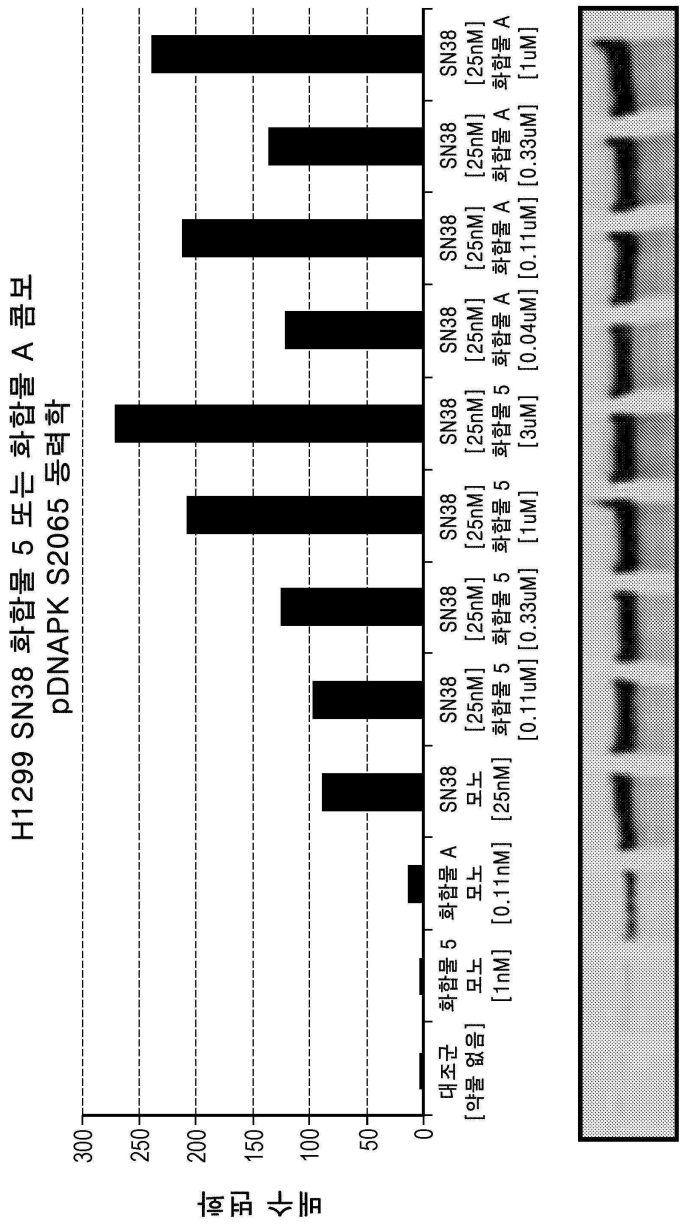
도면39


MRE11 단백질 발현 및 SN38 통합 스코어 상호관계
(ATRi/SN 38 콤보;p53 손상됨; 폐에서만)
MRE11 단백질 발현 (WB)
0.00
0.01
0.02
0.03
0.04
통합 스코어 (인치사이트)
5
0
-5
-10
-15
R^2 = 0.56
피어슨 p = 0.003 sn
스피어먼 p = 0.05

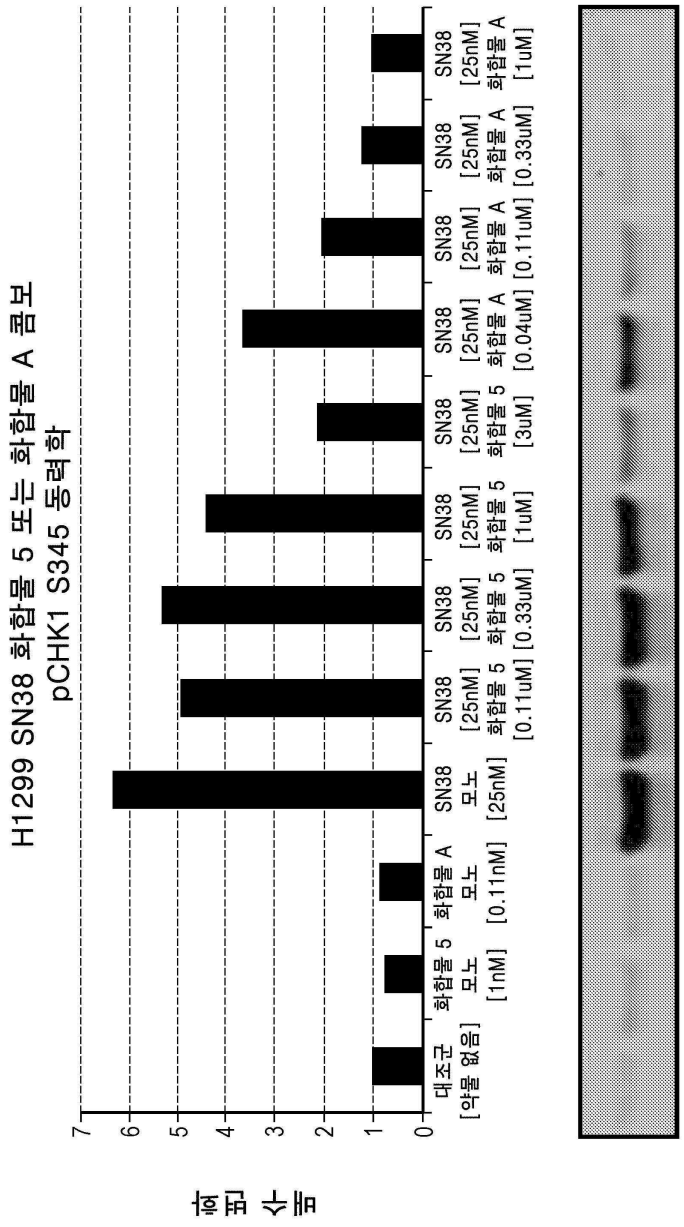
도면40a


H1299 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pATR S426 동력학
밀도 변화
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

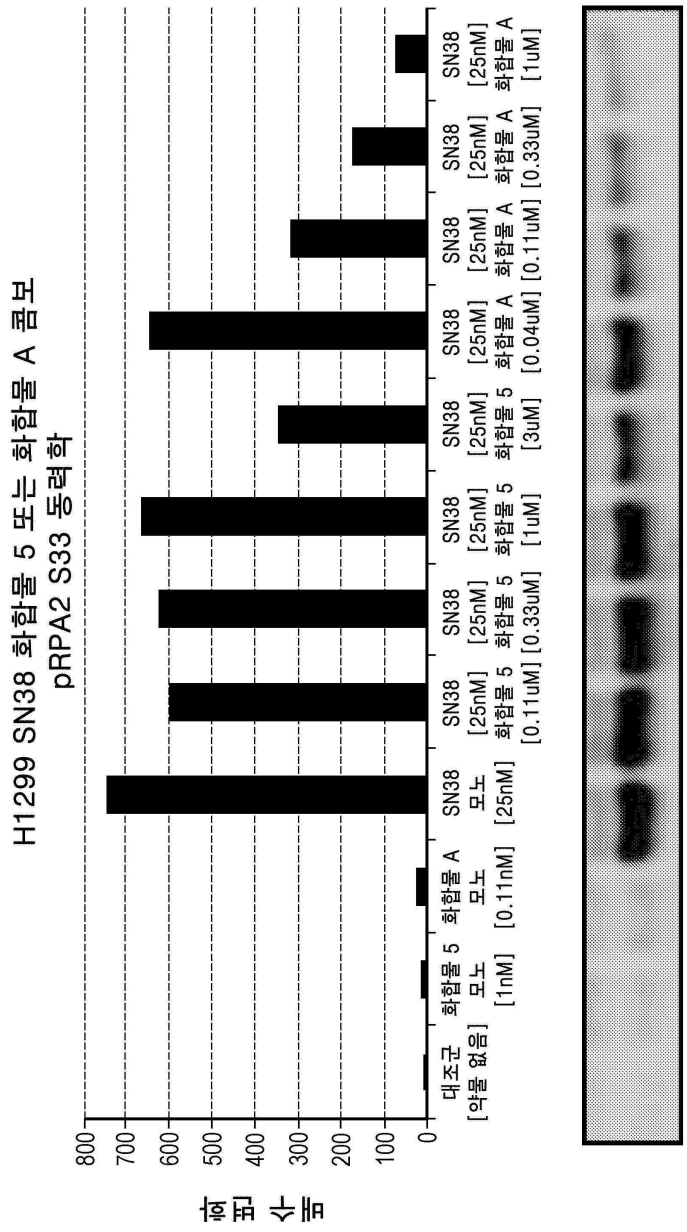
도면40b


H1299 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pDNAPK S2065 동력학
세포 수 변화
300
250
200
150
100
50
0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

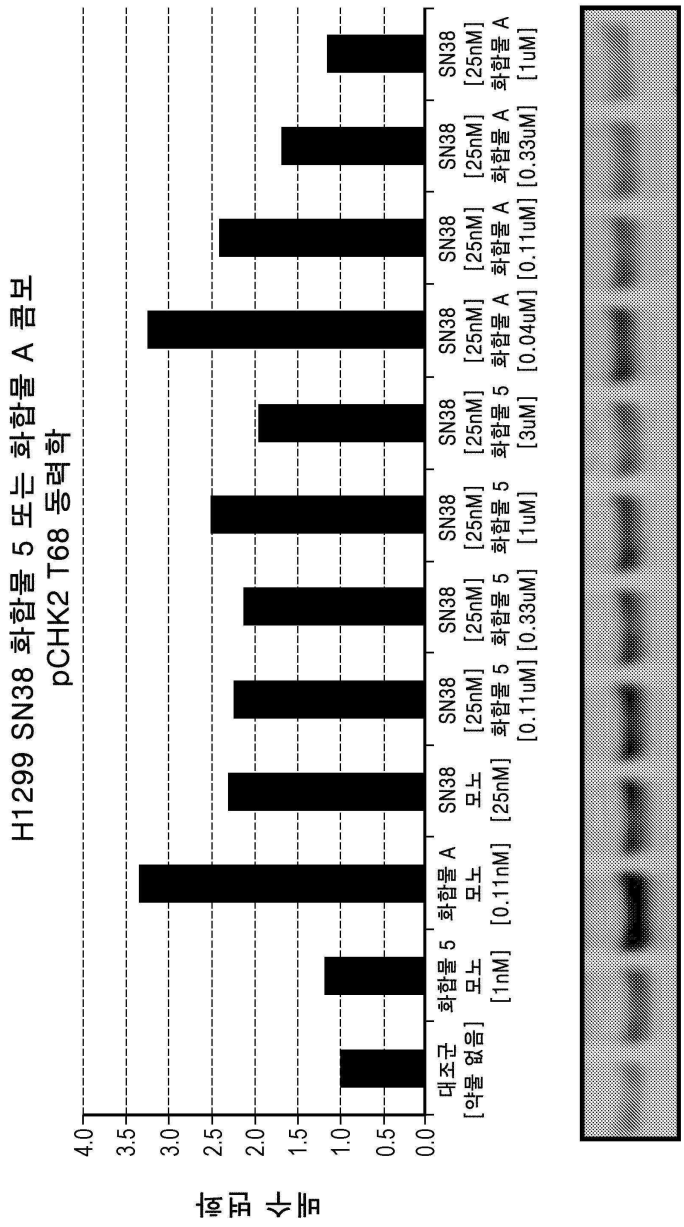
도면40c


H1299 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pCHK1 S345 동력학
배수 변화
0
1
2
3
4
5
6
7
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

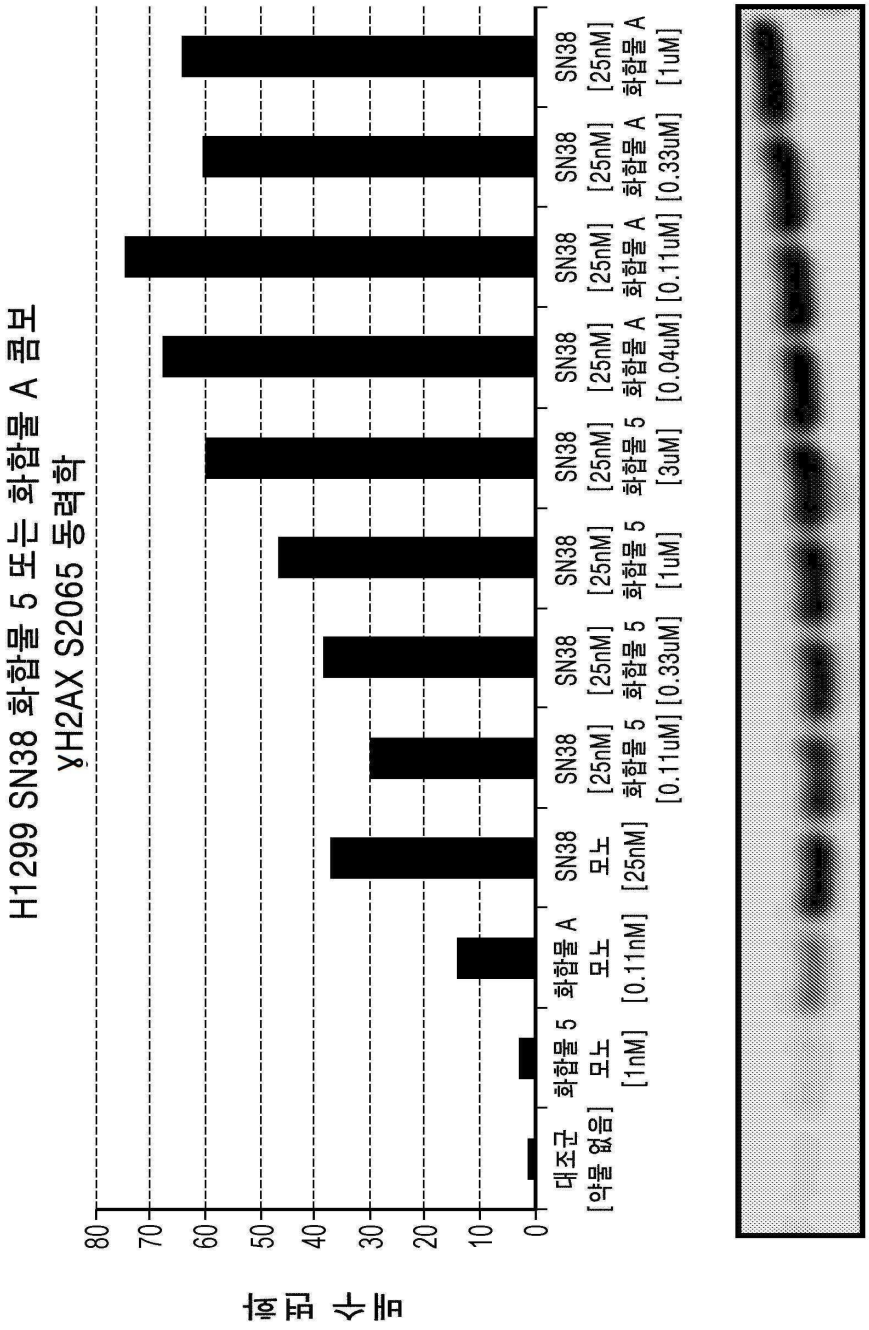
도면40d


H1299 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pRPA2 S33 동력학
비수 변화
800
700
600
500
400
300
200
100
0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

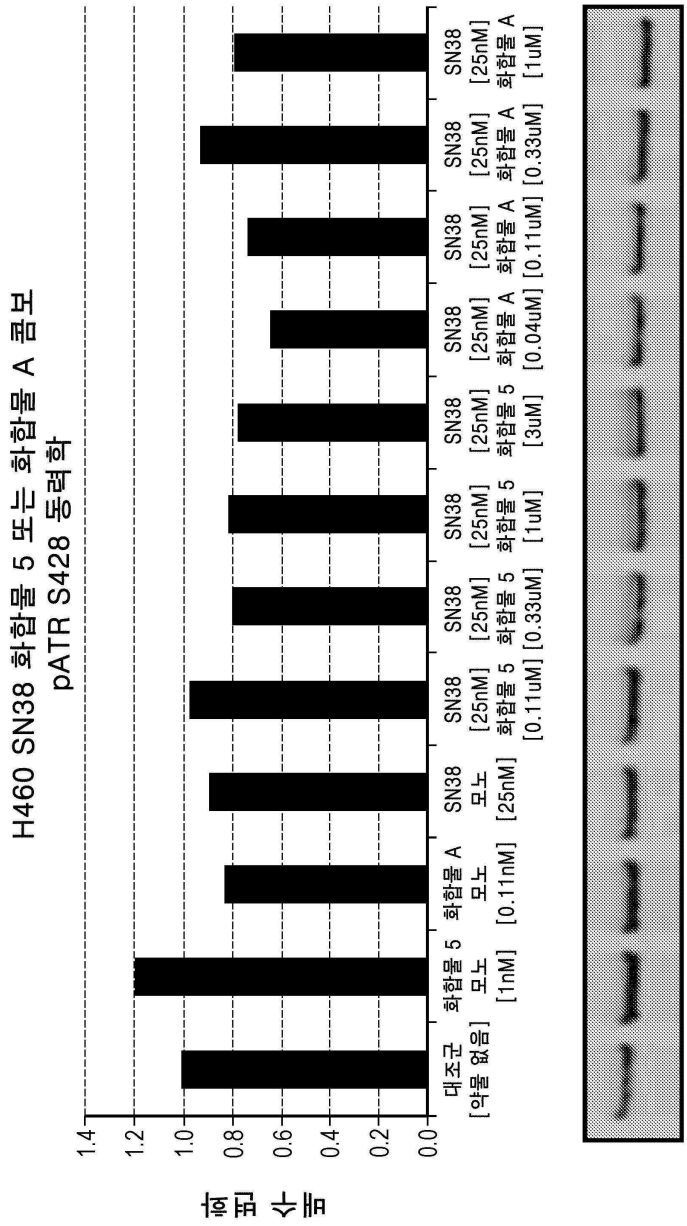
도면40e


H1299 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pCHK2 T68 동력학
배수 변화
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

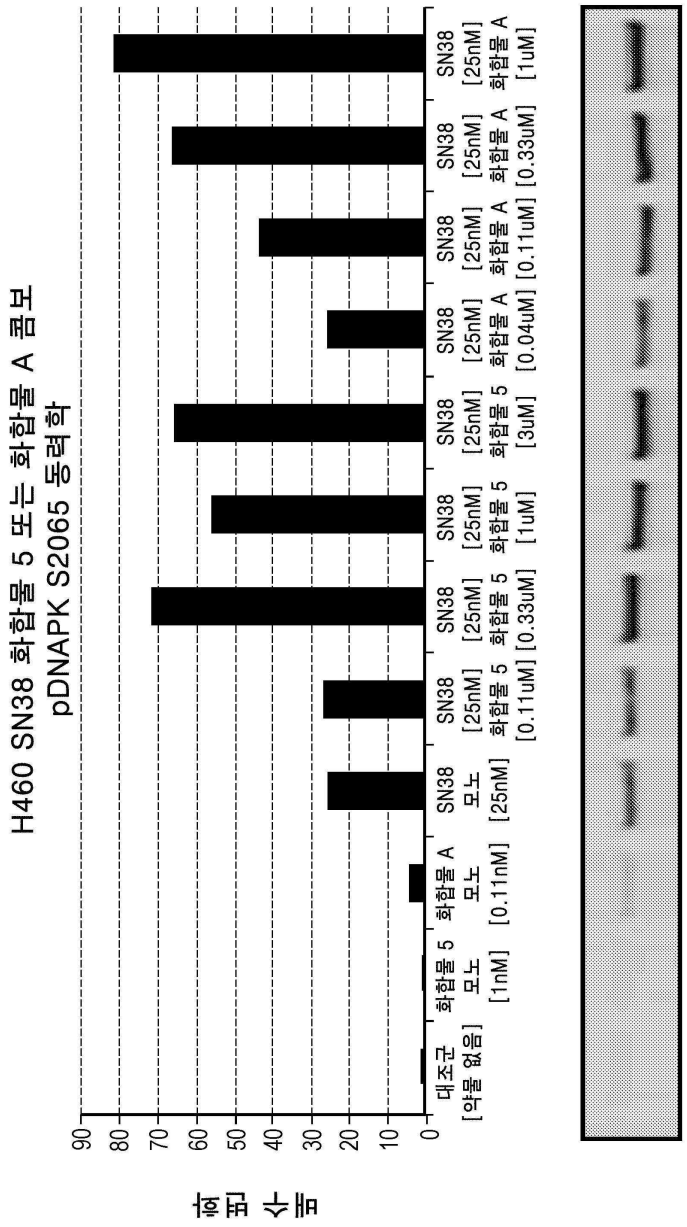
도면40f


H1299 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
γH2AX S2065 동력학
비수 변화
0
10
20
30
40
50
60
70
80
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

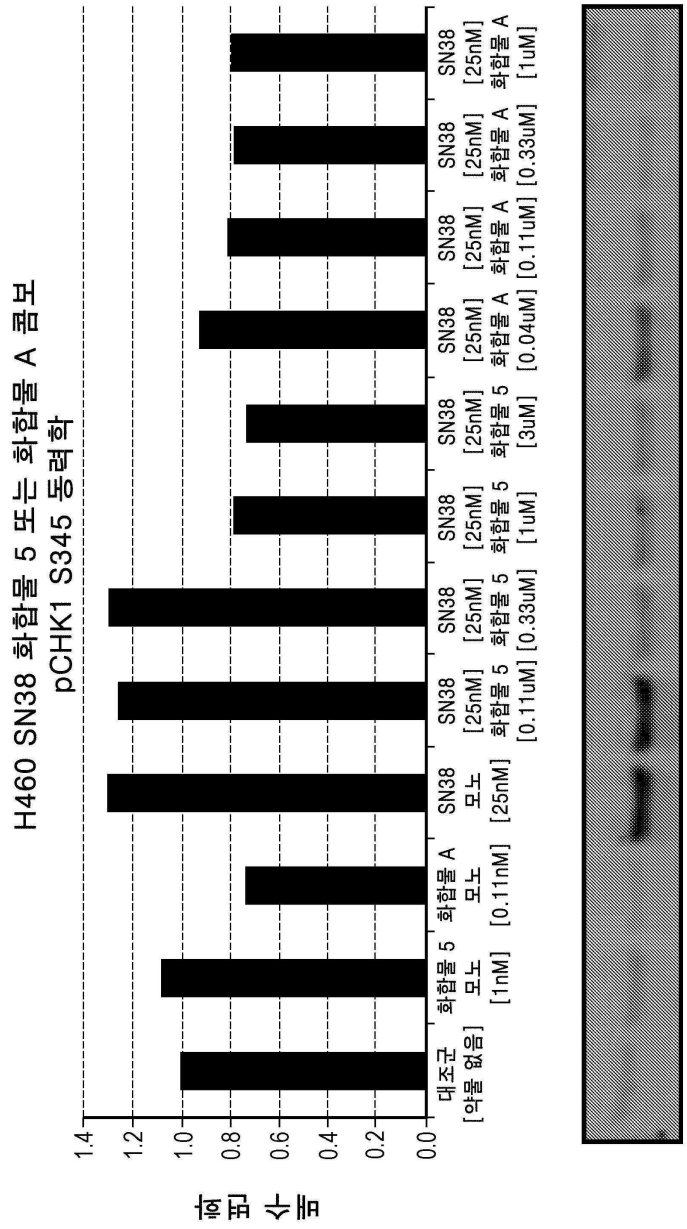
도면41a


H460 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pATR S428 동력학
배수 변화
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

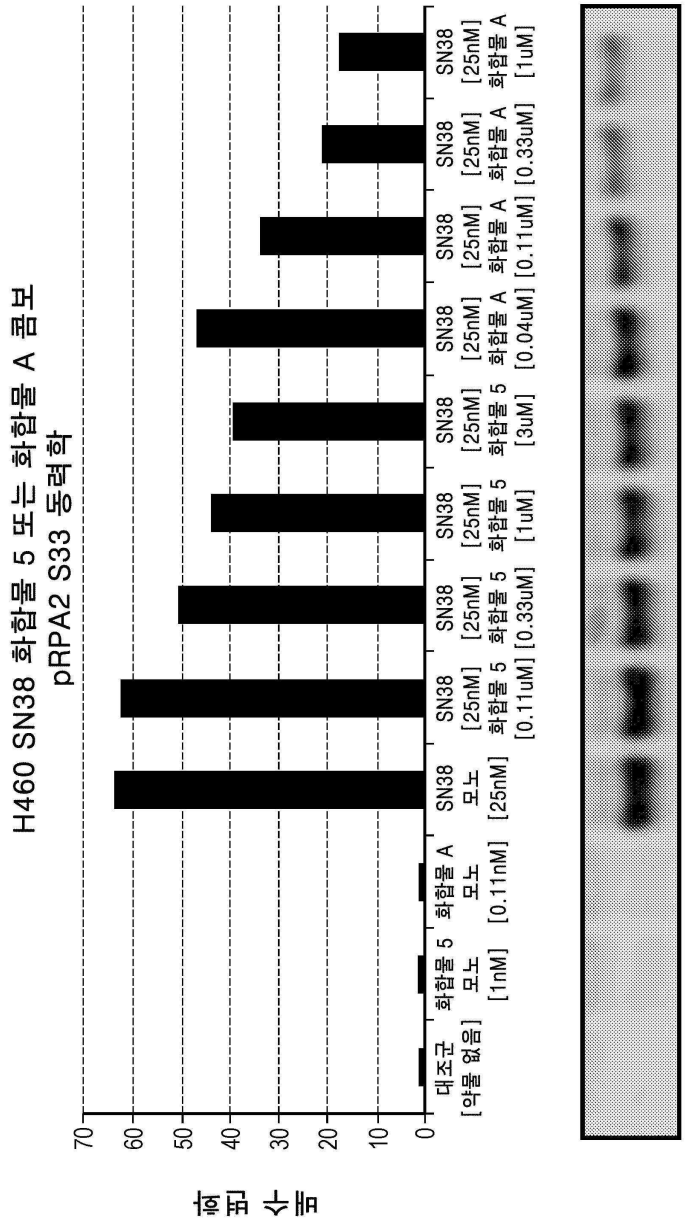
도면41b


H460 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pDNAPK S2065 동력학
볼수 변화
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

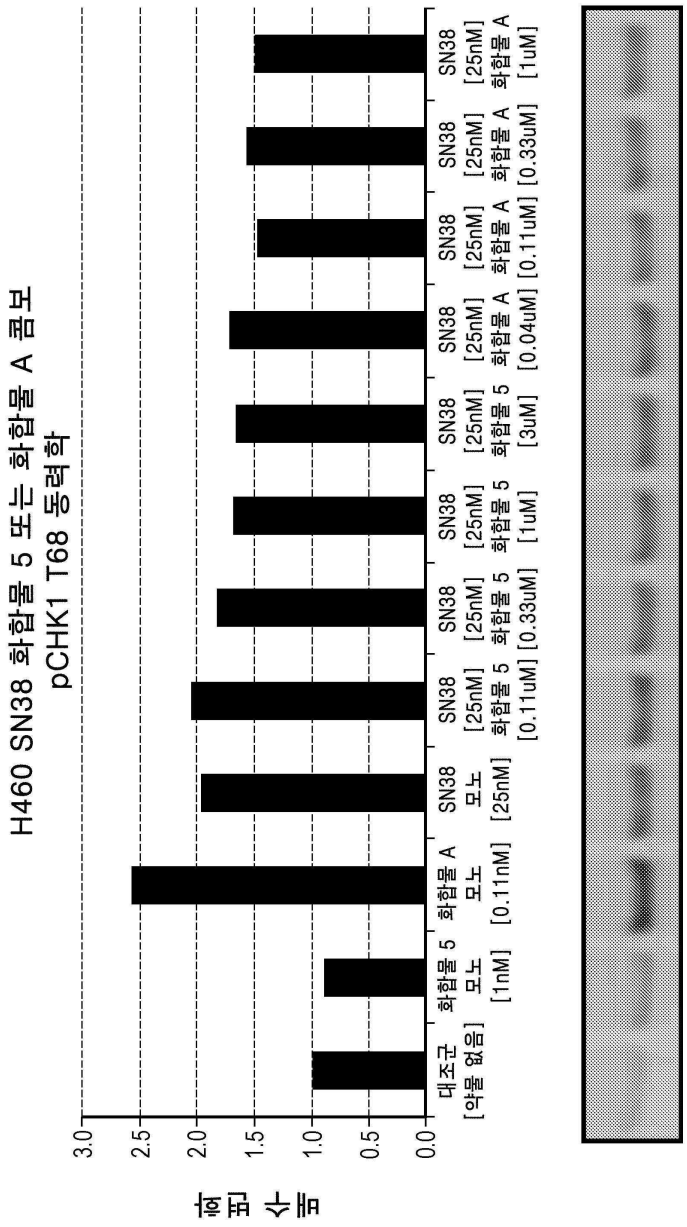
도면41c


H460 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pCHK1 S345 동력학
배수 변화
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

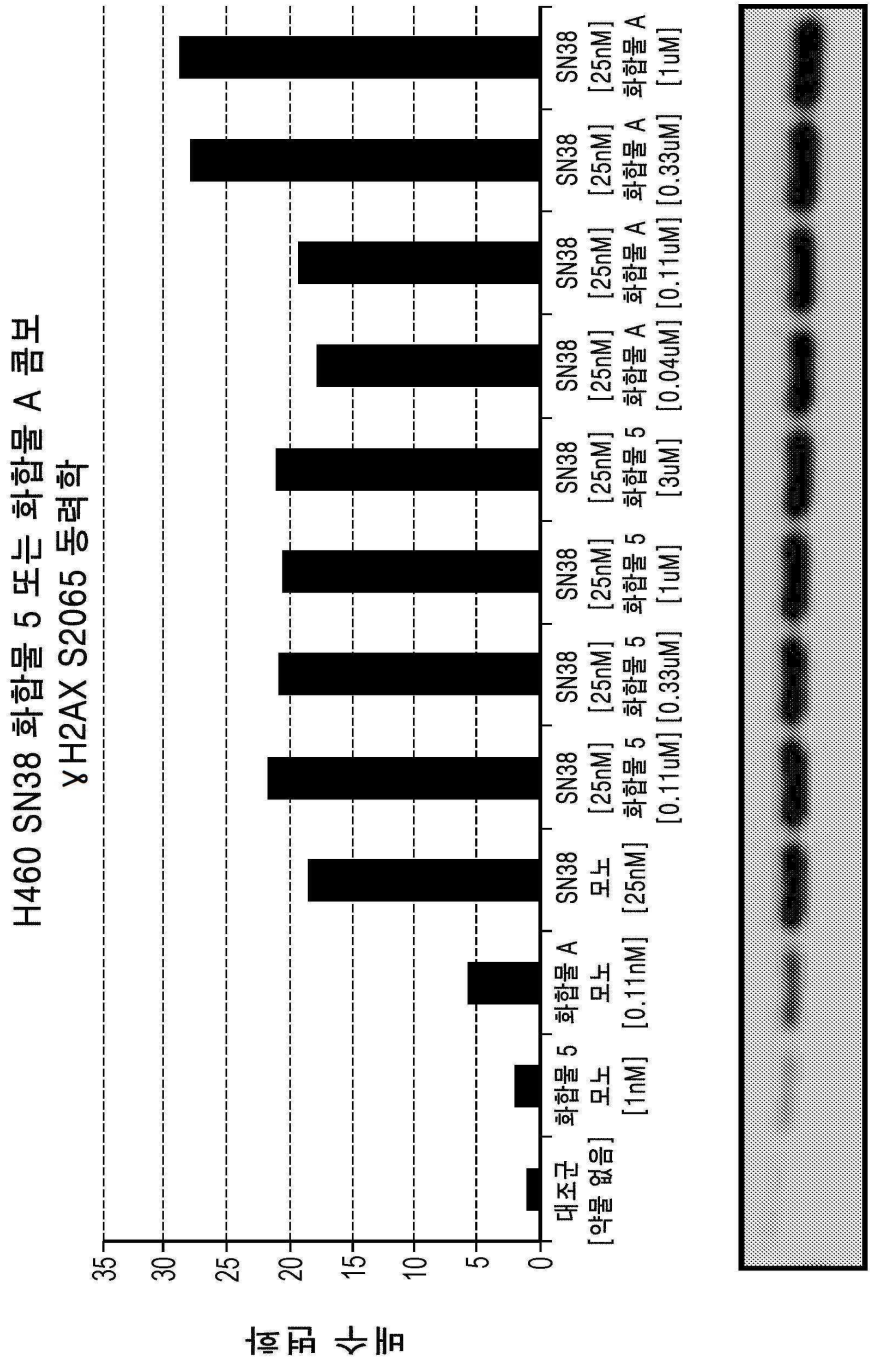
도면41d


H460 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pRPA2 S33 동력학
밴드 변화
0
10
20
30
40
50
60
70
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

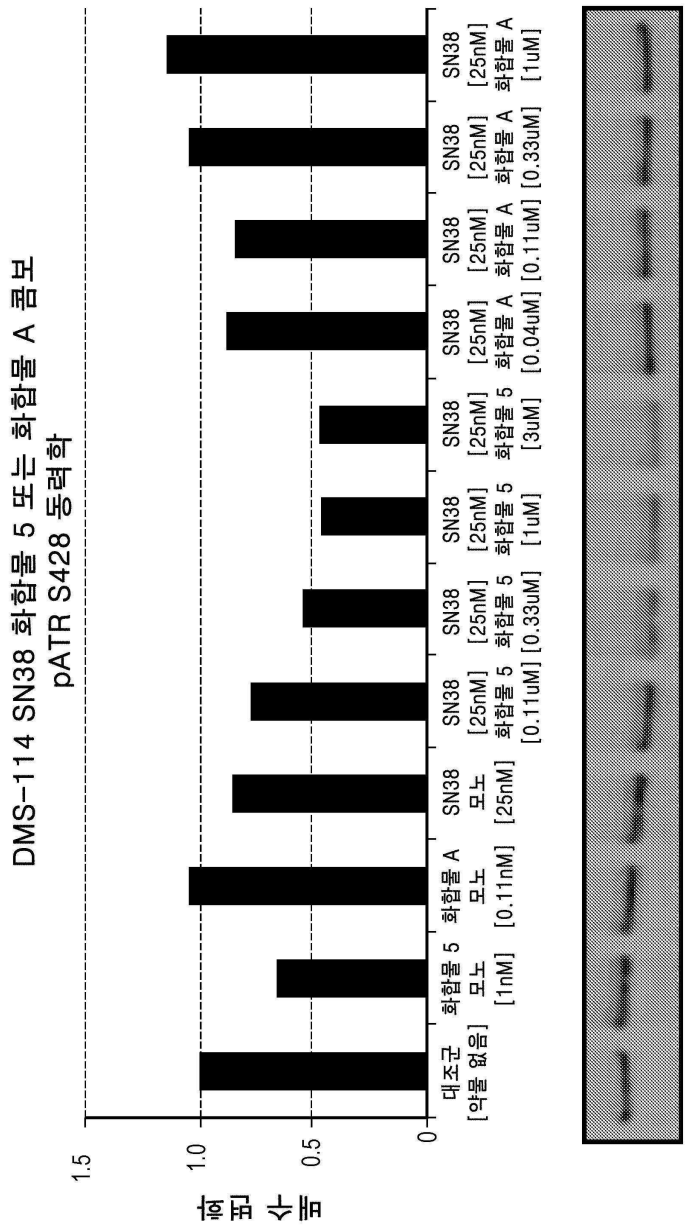
도면41e


H460 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pCHK1 T68 동력학
배수 변화
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

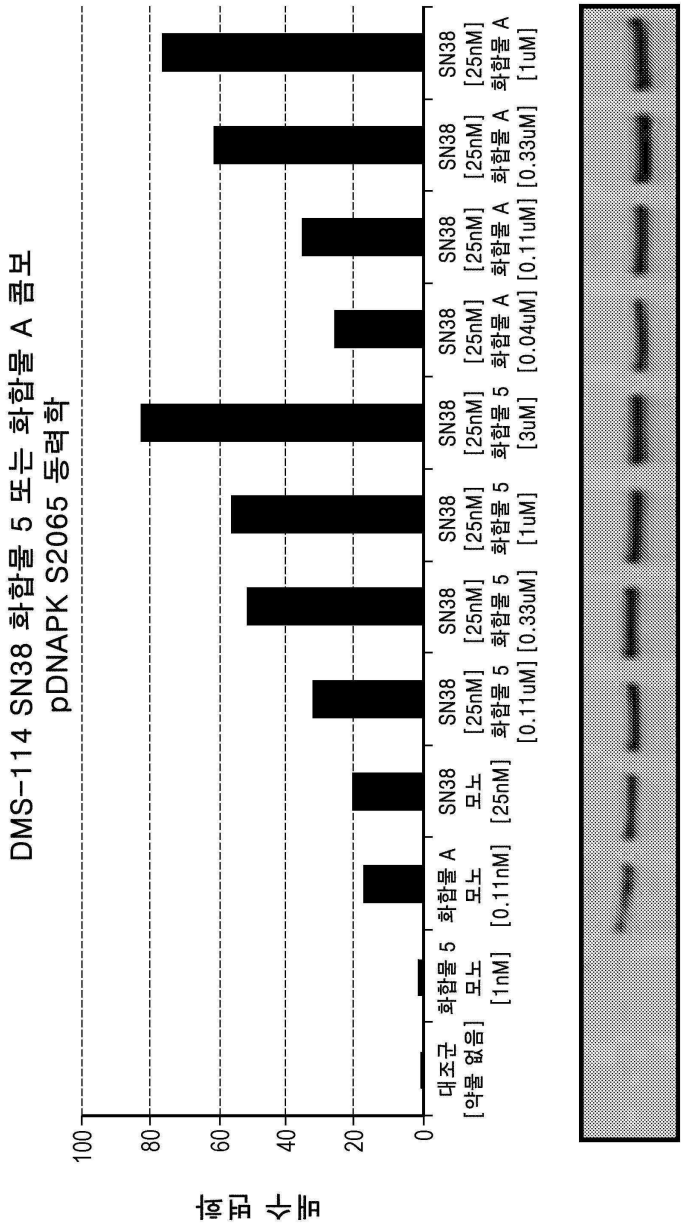
도면41f


H460 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
γH2AX S2065 동력학
배수 변화
35
30
25
20
15
10
5
0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

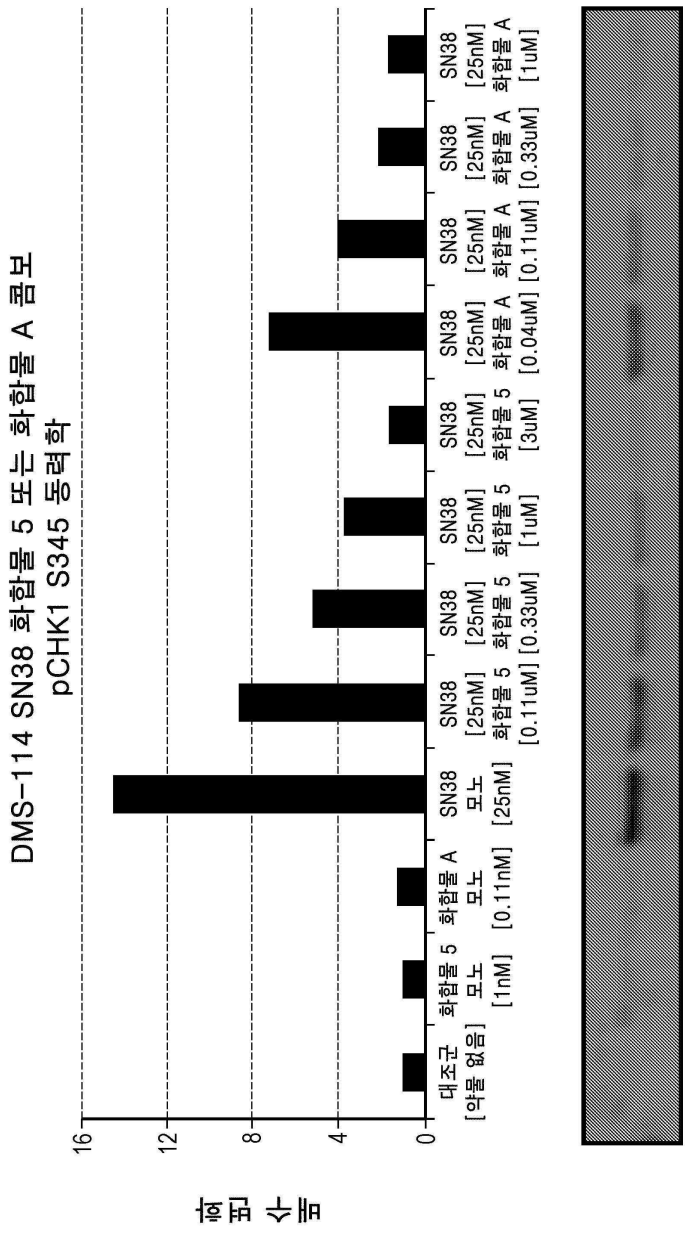
도면42a


DMS-114 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pATR S428 동력학
배수 변화
1.5
1.0
0.5
0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

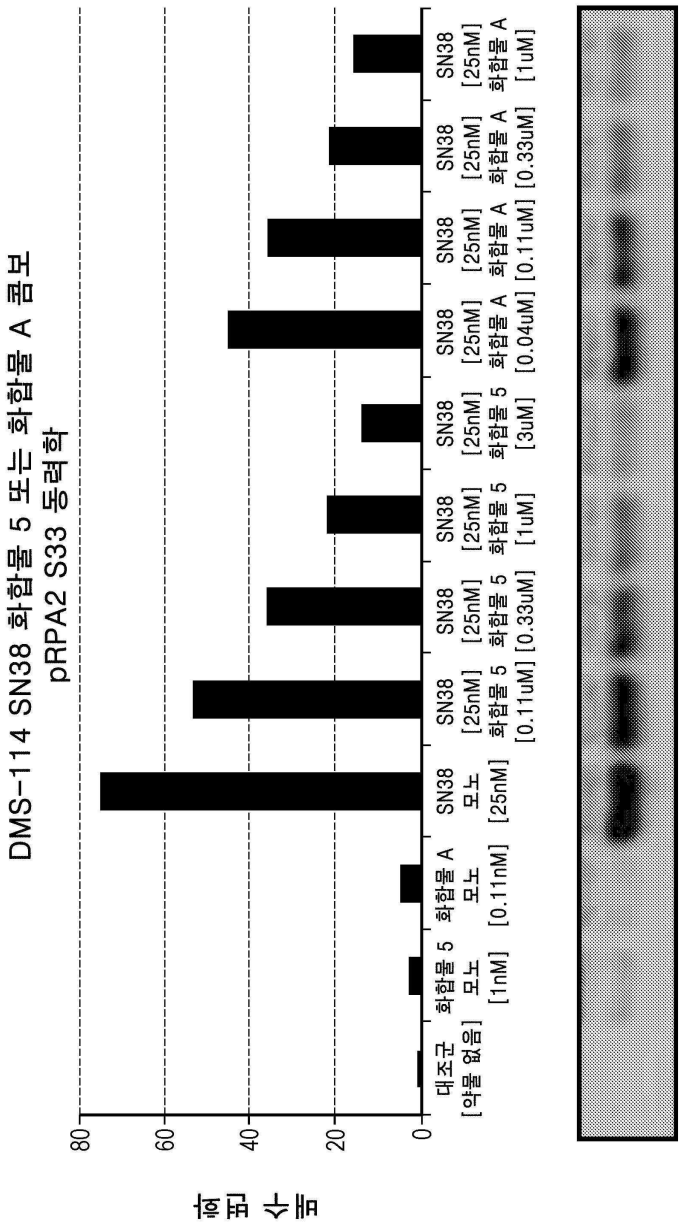
도면42b


DMS-114 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pDNAPK S2065 동력학
세포 변화
100
80
60
40
20
0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

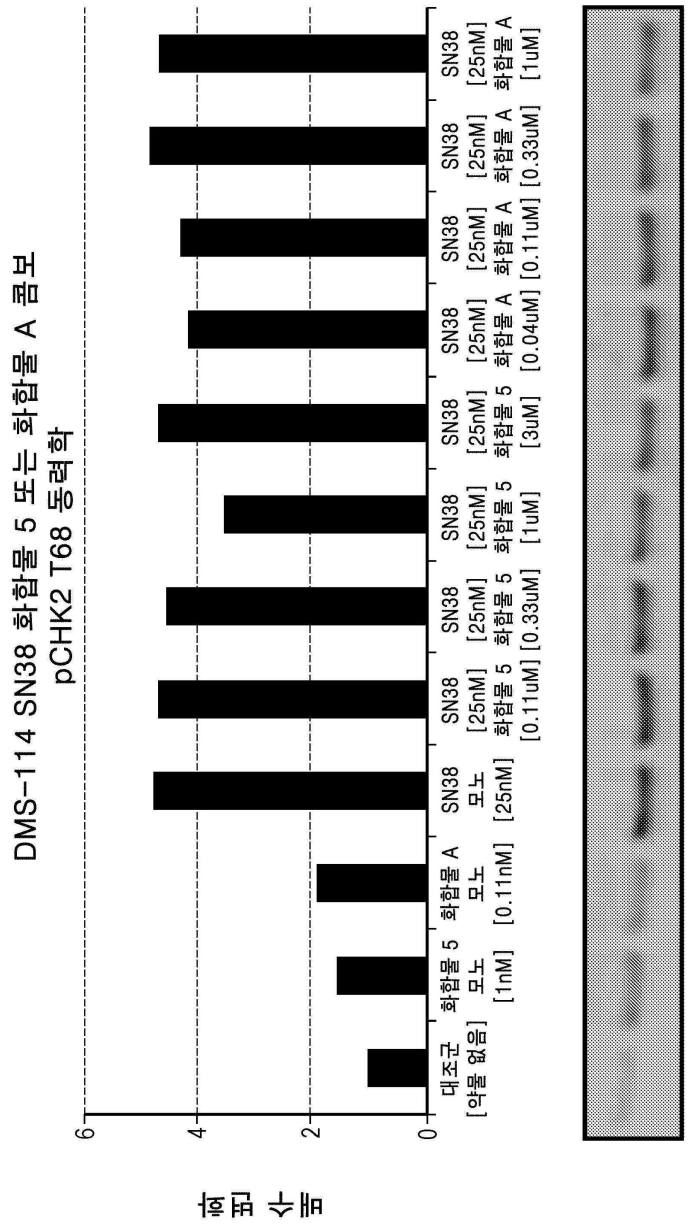
도면42c


DMS-114 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pCHK1 S345 동력학
배수 변화
16
12
8
4
0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

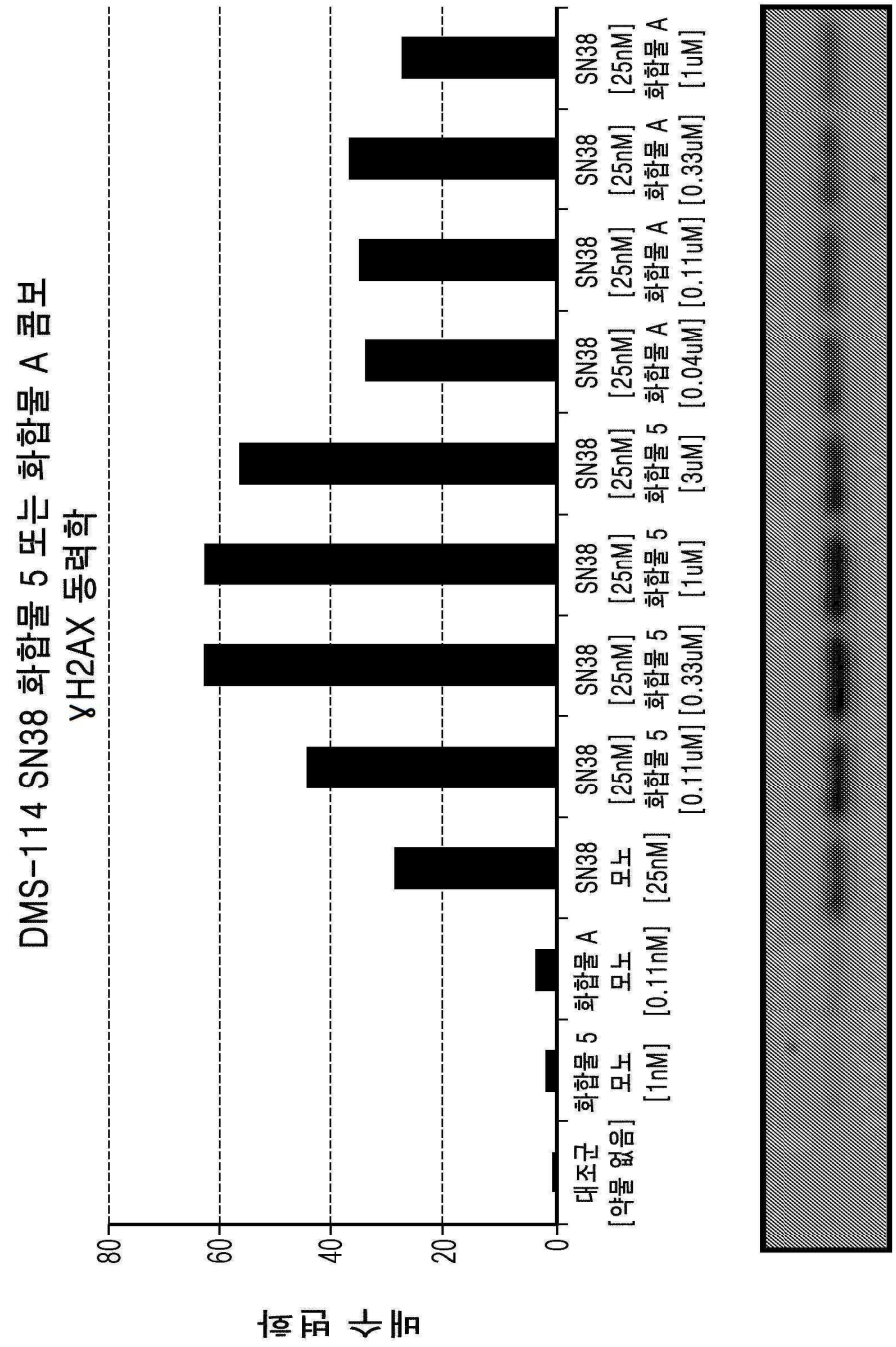
도면42d


DMS-114 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pRPA2 S33 동력학
밴드 변화
0
20
40
60
80
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

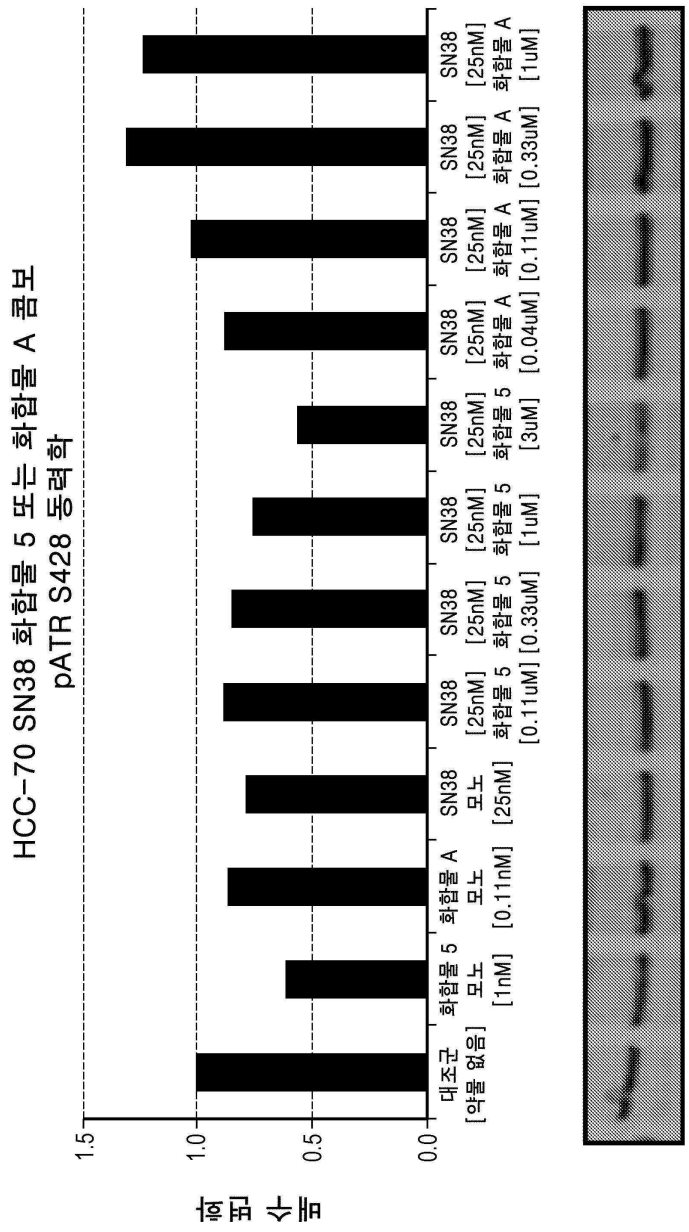
도면42e


DMS-114 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pCHK2 T68 동력학
배수 변화
0
2
4
6
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

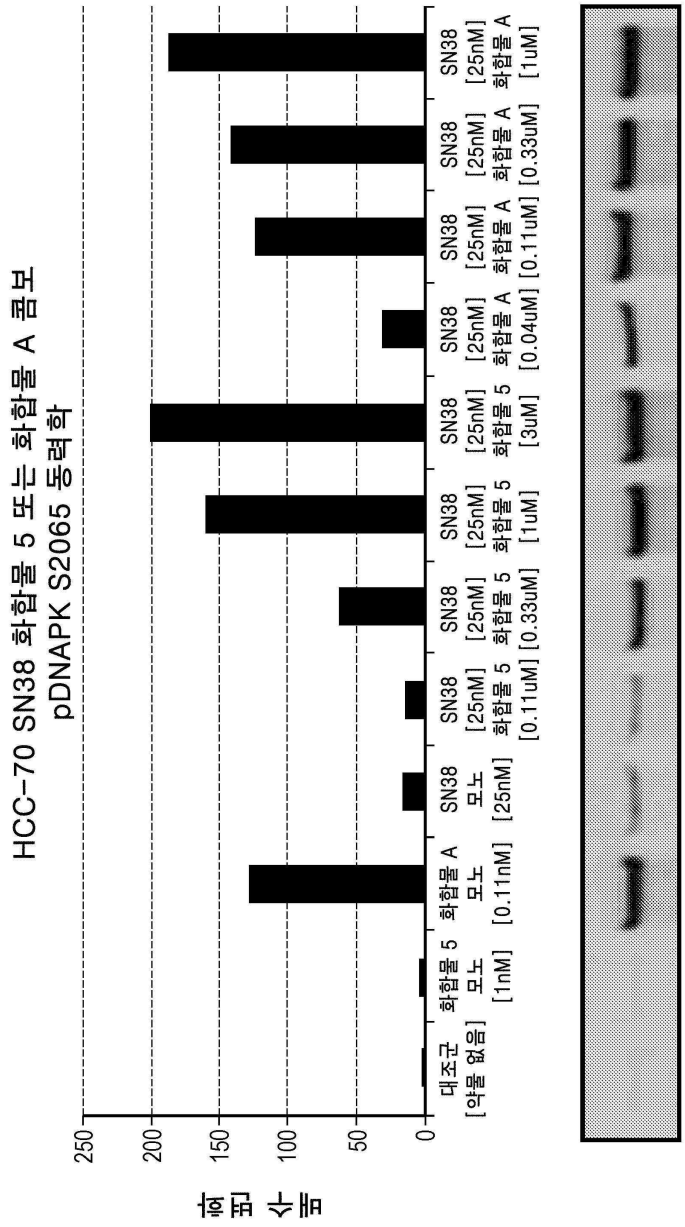
도면42f


DMS-114 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
γH2AX 동력학
세포 수 변화
0
20
40
60
80
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

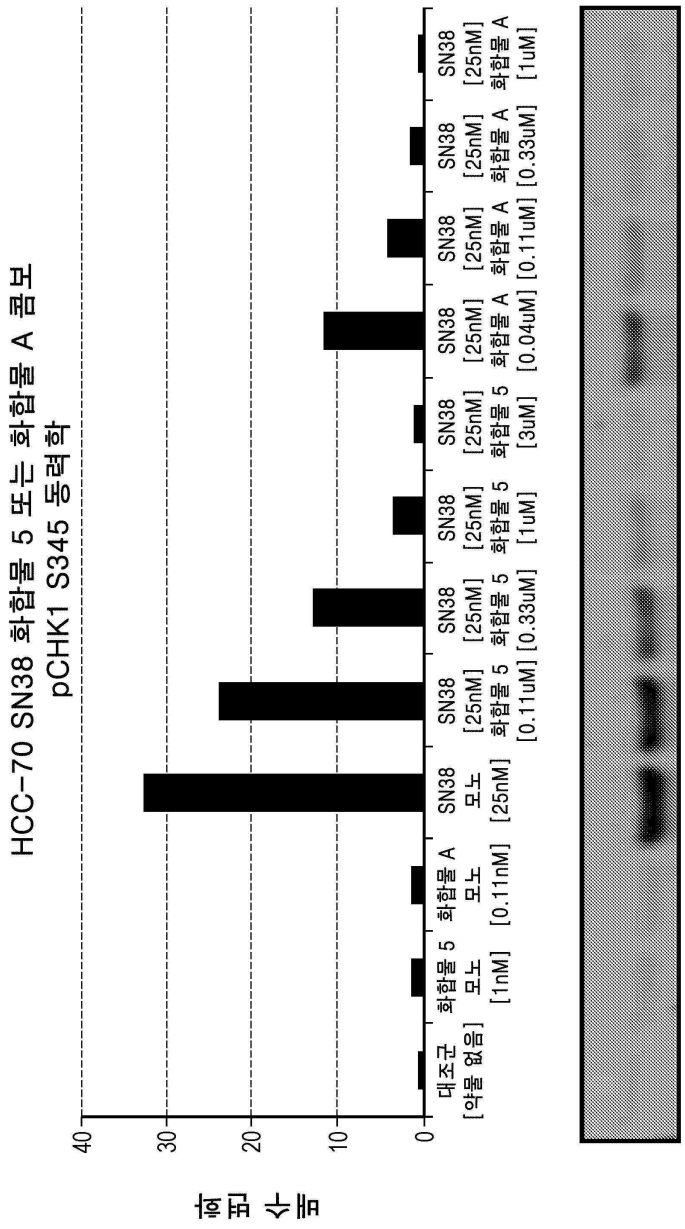
도면43a


HCC-70 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pATR S428 동력학
비율 변화
1.5
1.0
0.5
0.0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

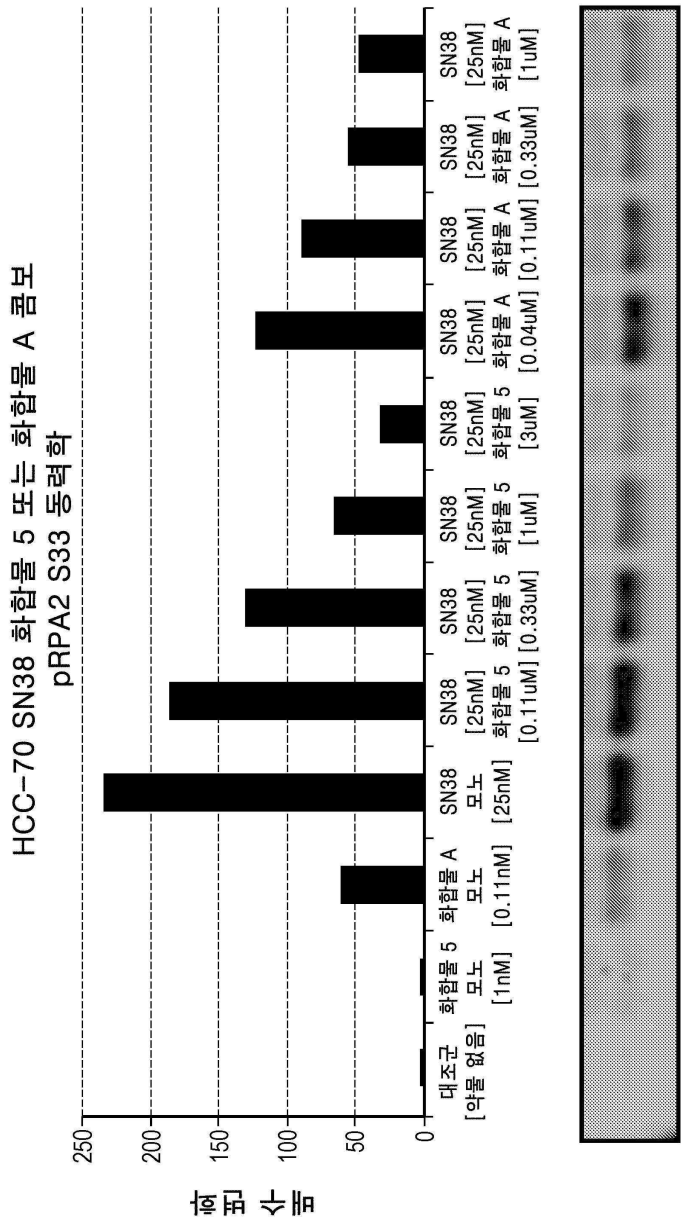
도면43b


HCC-70 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pDNAPK S2065 동력학
픽셀 변화
250
200
150
100
50
0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

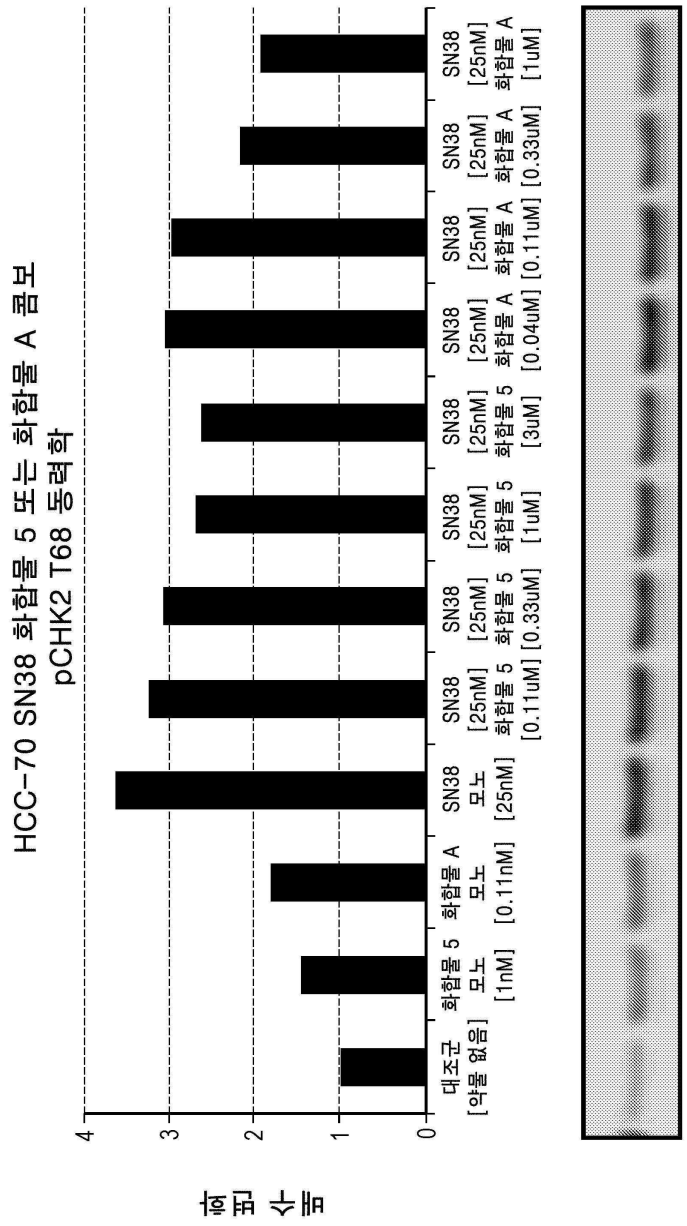
도면43c


HCC-70 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pCHK1 S345 동력학
배수 변화
40
30
20
10
0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

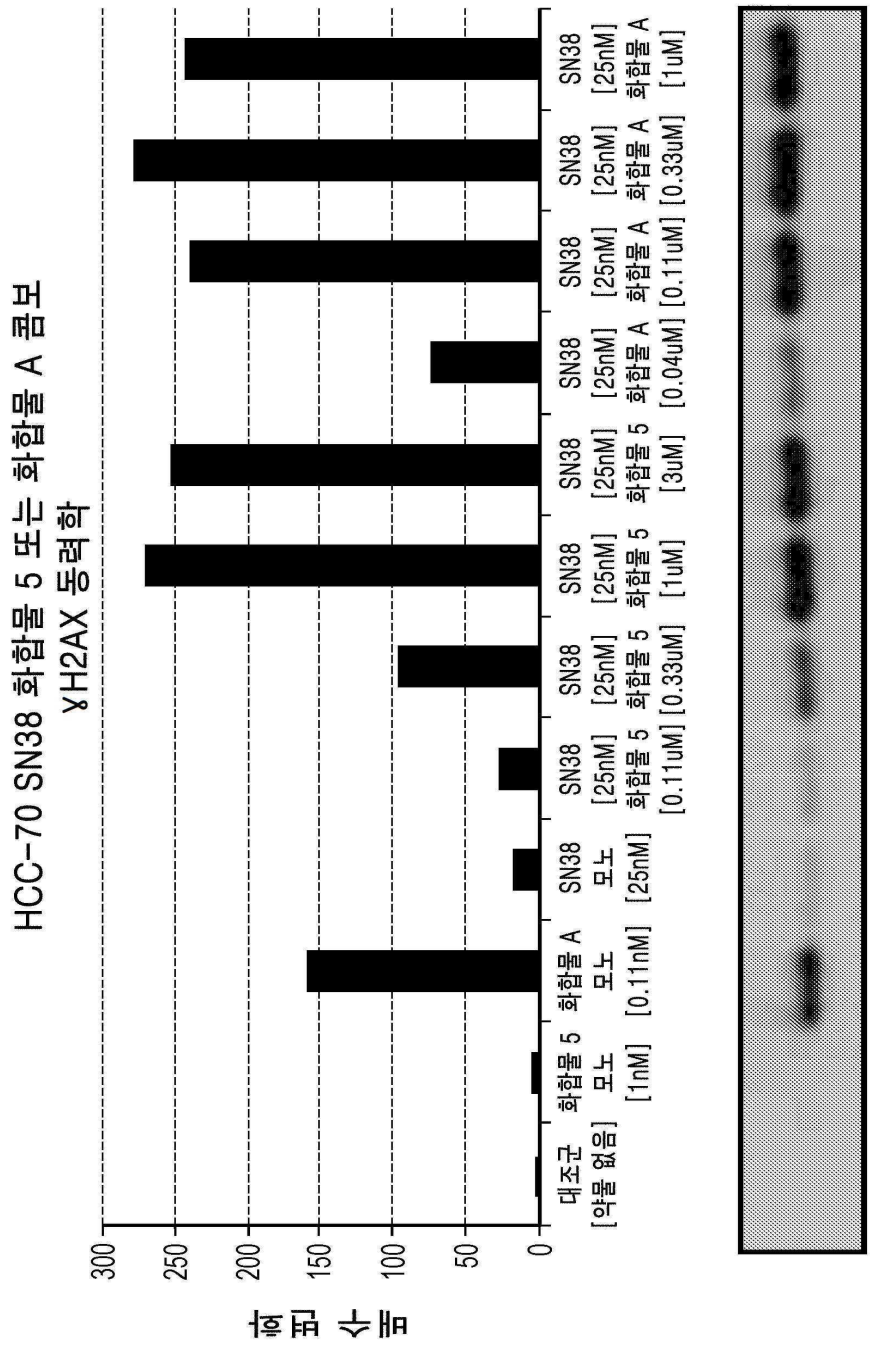
도면43d


HCC-70 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pRPA2 S33 동력학
세포 변화
250
200
150
100
50
0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

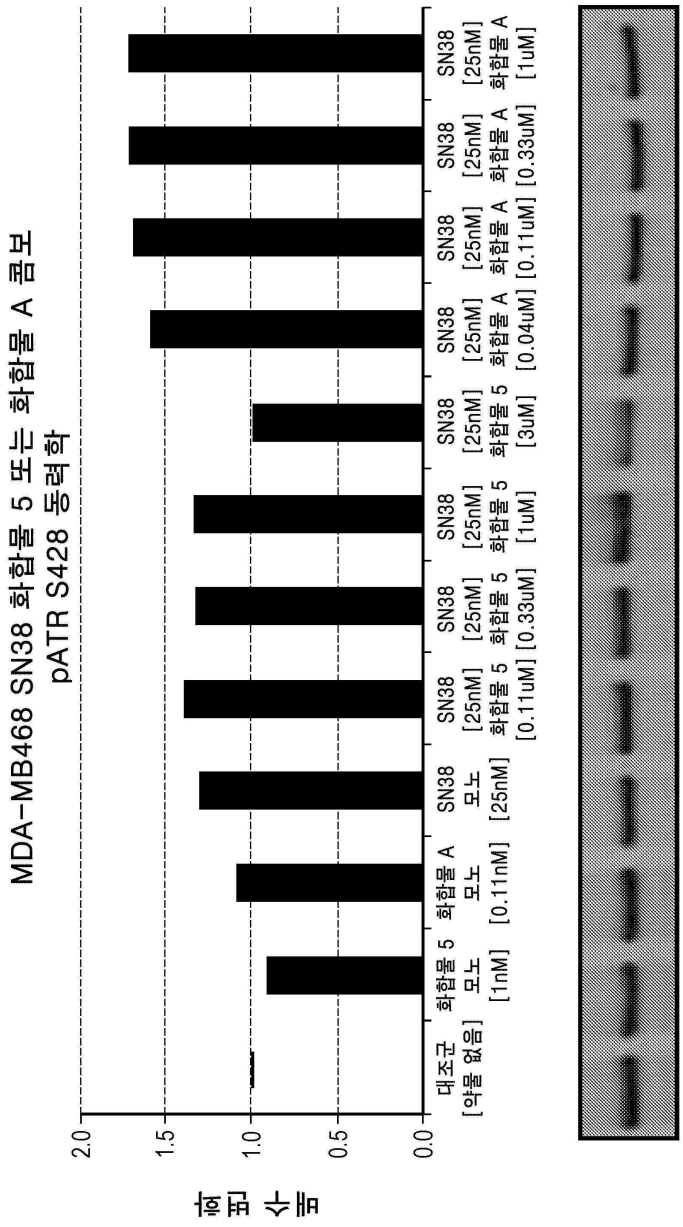
도면43e


HCC-70 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pCHK2 T68 동력학
배수 변화
0
1
2
3
4
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

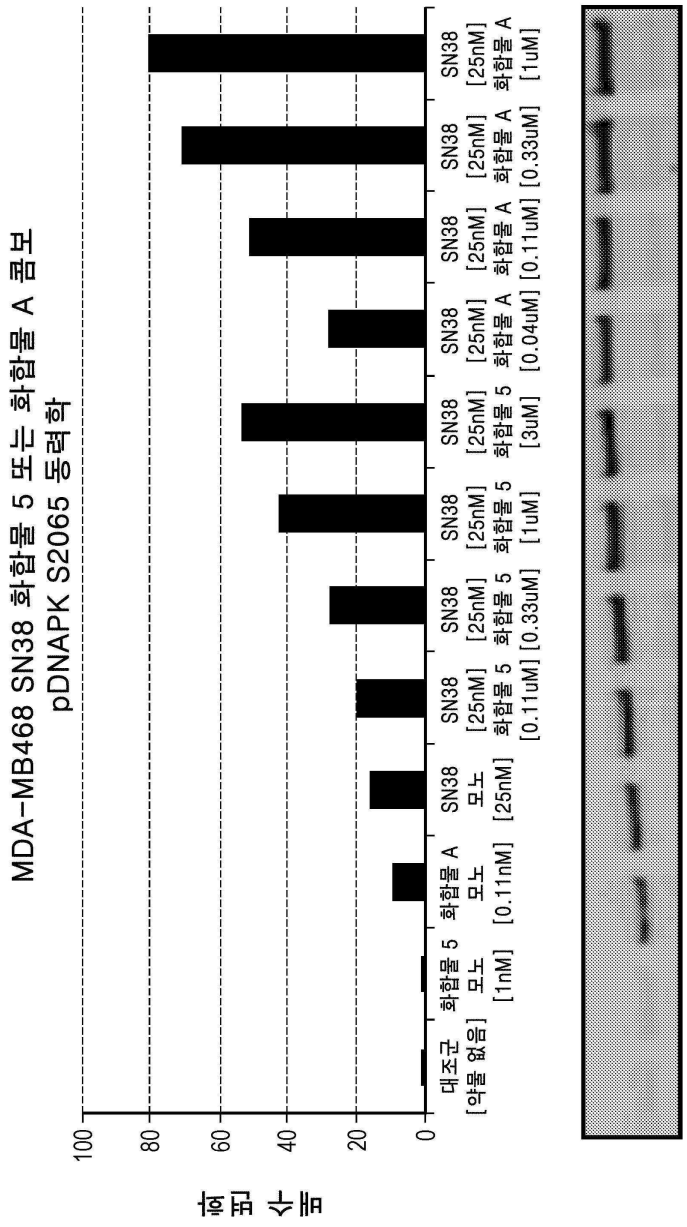
도면43f


HCC-70 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
γH2AX 동력학
세포 수 변화
300
250
200
150
100
50
0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

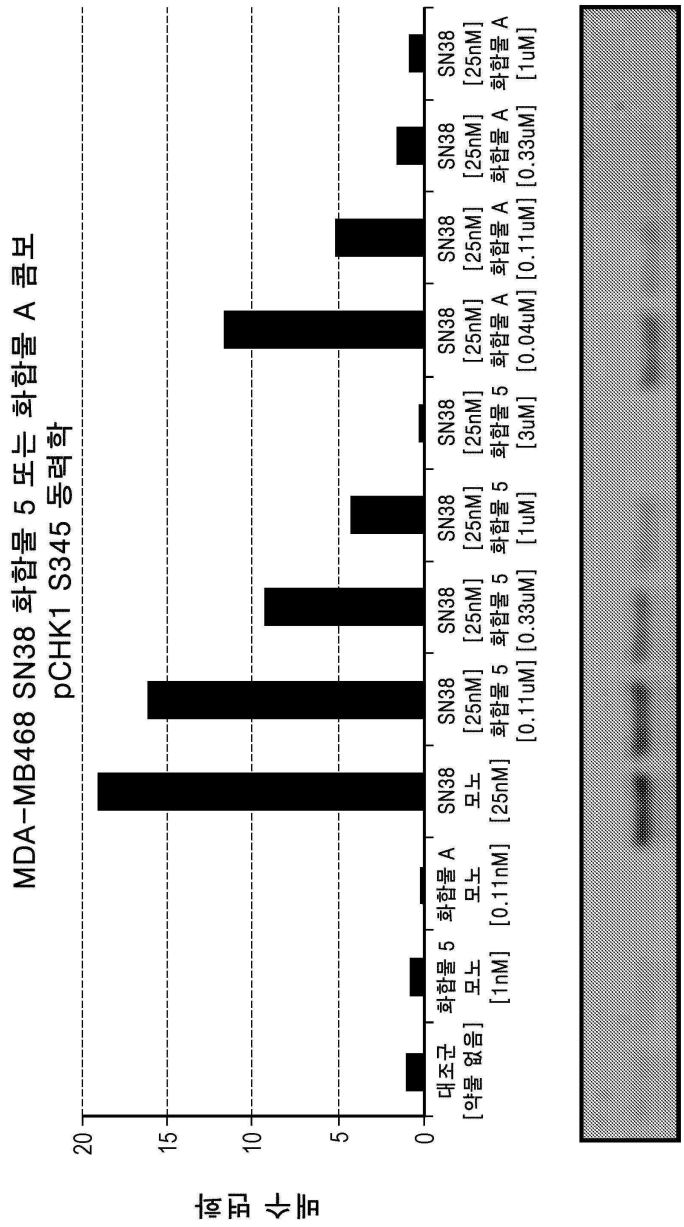
도면44a


MDA-MB468 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pATR S428 동력학
배수 변화
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

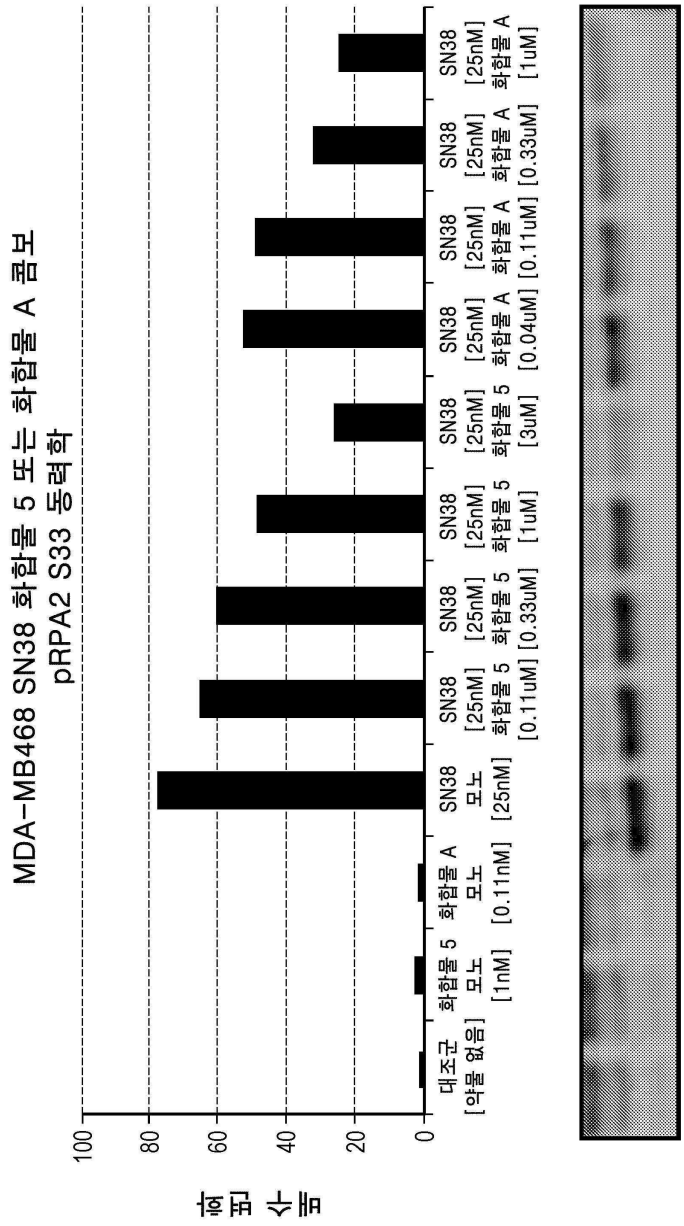
도면44b


MDA-MB468 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pDNAPK S2065 동력학
백분율 변화
100
80
60
40
20
0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

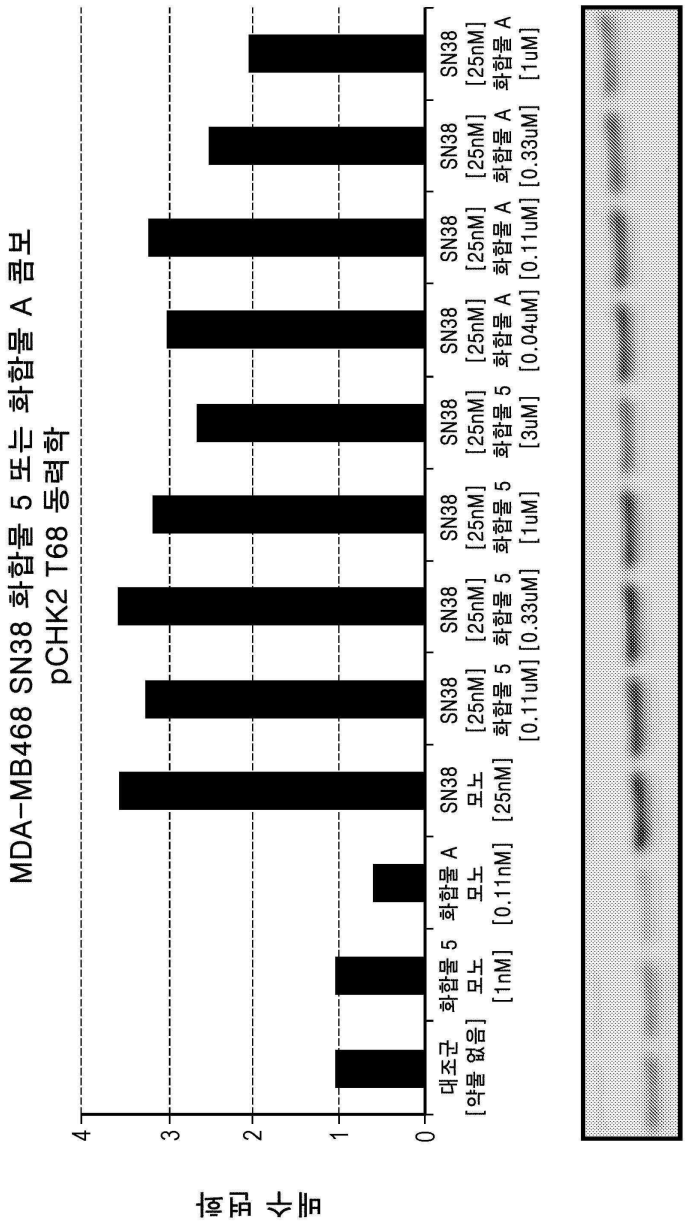
도면44c


MDA-MB468 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pCHK1 S345 동력학
배수 변화
20
15
10
5
0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

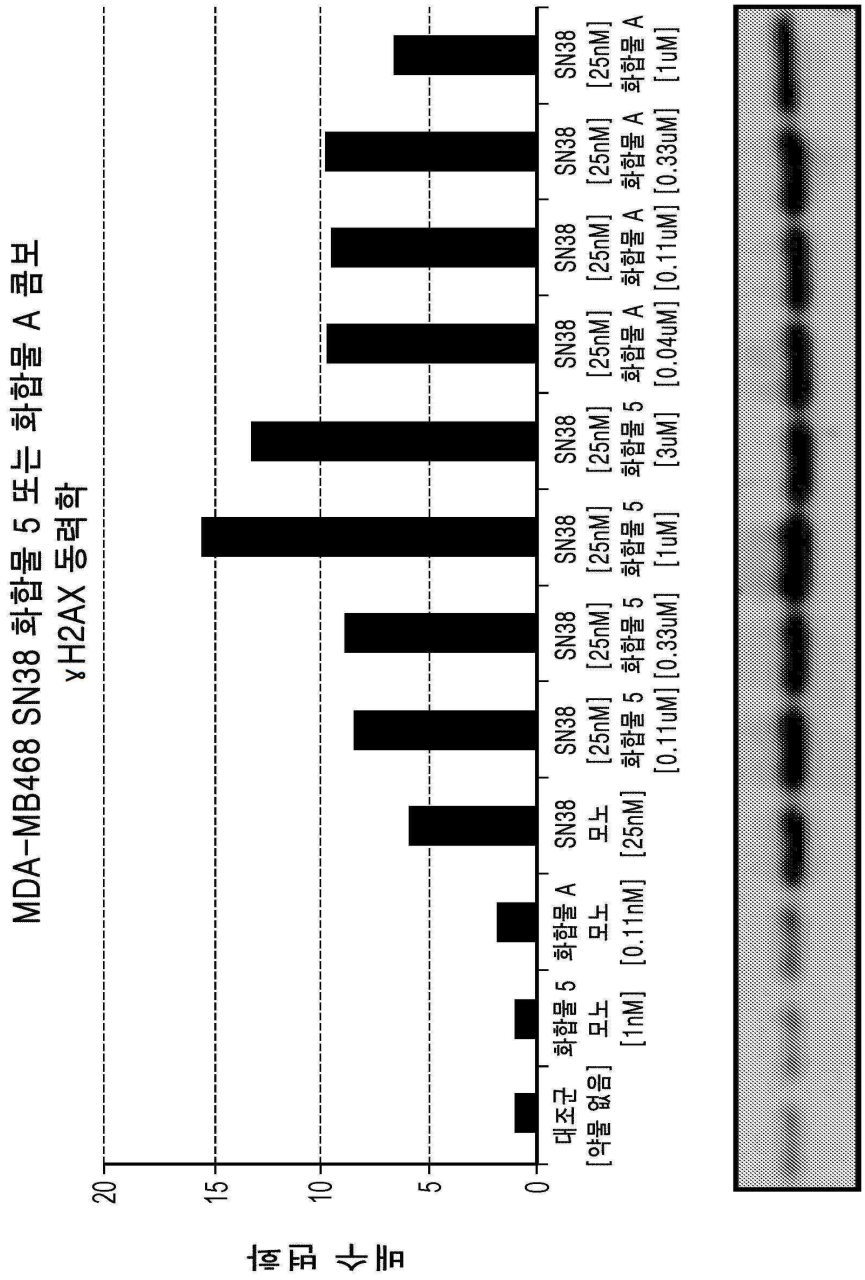
도면44d


MDA-MB468 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pRPA2 S33 동력학
배수 변화
100
80
60
40
20
0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

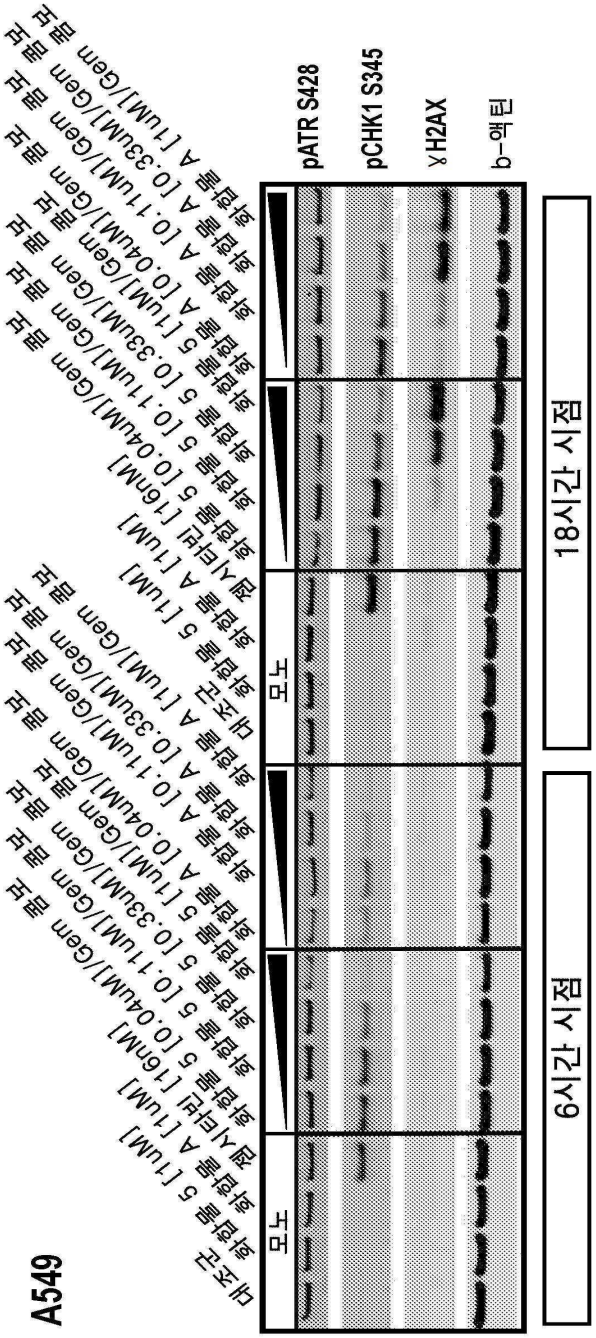
도면44e


MDA-MB468 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
pCHK2 T68 동력학
배수 변화
0
1
2
3
4
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

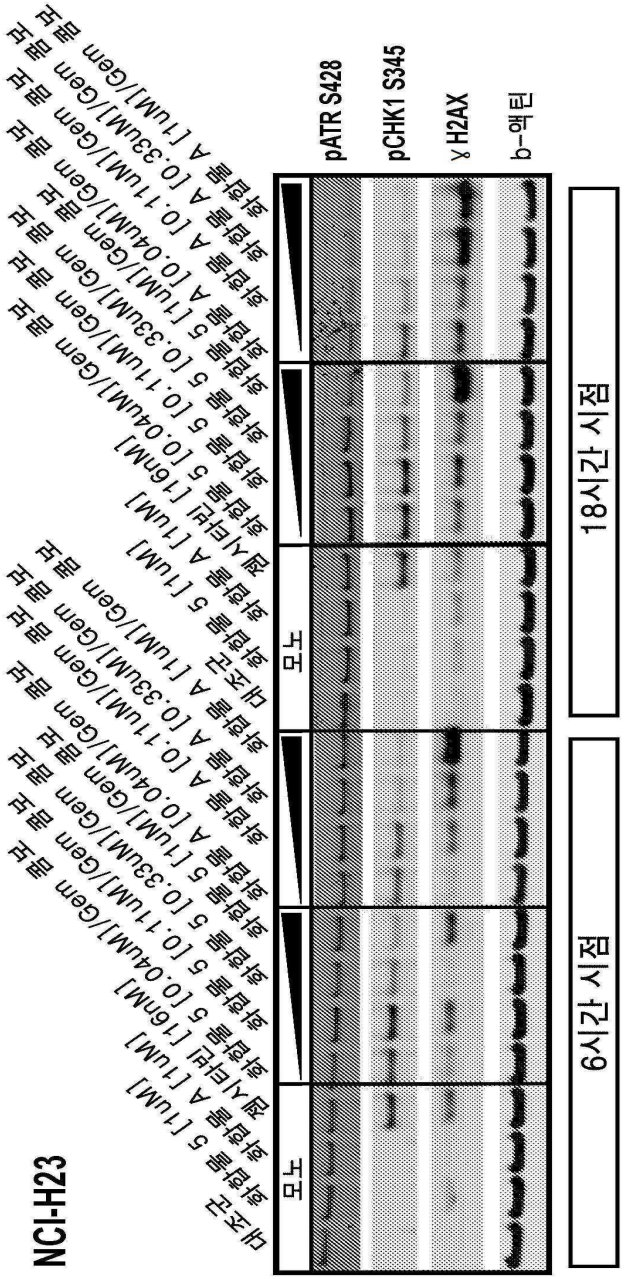
도면44f


MDA-MB468 SN38 화합물 5 또는 화합물 A 콤보
γH2AX 동력학
배수 변화
20
15
10
5
0
대조군 [약물 없음]
화합물 5 모노 [1nM]
화합물 A 모노 [0.11nM]
SN38 모노 [25nM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [1uM]
SN38 [25nM] 화합물 5 [3uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.04uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.11uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [0.33uM]
SN38 [25nM] 화합물 A [1uM]

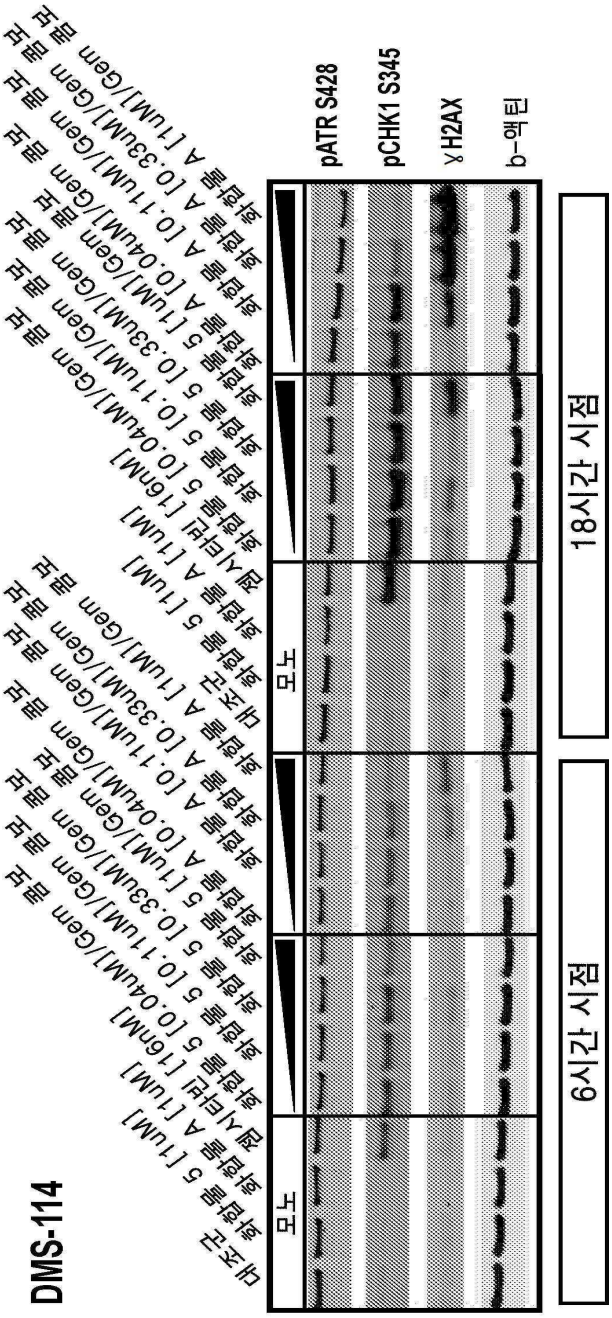
도면45


A549
대조군
화합물 5 [1uM]
화합물 A [1uM]
화합물 A [16nM] 화합물 5 [1uM]
화합물 A [0.04uM] 화합물 5 [1uM]/Gem 화합물
화합물 A [0.11uM] 화합물 5 [1uM]/Gem 화합물
화합물 A [0.33uM] 화합물 5 [1uM]/Gem 화합물
대조군
화합물 5 [1uM]
화합물 A [1uM]
화합물 A [16nM] 화합물 5 [1uM]
화합물 A [0.04uM] 화합물 5 [1uM]/Gem 화합물
화합물 A [0.11uM] 화합물 5 [1uM]/Gem 화합물
화합물 A [0.33uM] 화합물 5 [1uM]/Gem 화합물
모노
모노
pATR S428
pCHK1 S345
γH2AX
b-액틴
6시간 시점
18시간 시점

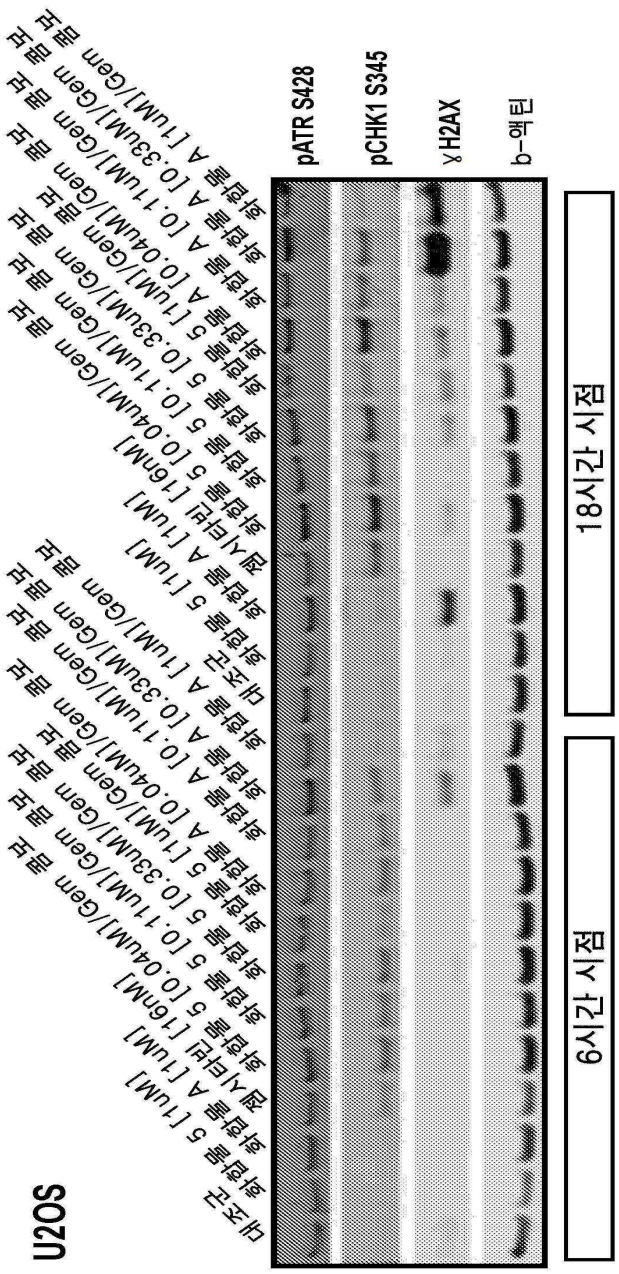
도면46


NCI-H23
대조군
화합물 5 [1uM]
젬시타빈 [16nM]
화합물 5 [0.04uM] / Gem 병용
화합물 5 [0.11uM] / Gem 병용
화합물 5 [0.33uM] / Gem 병용
화합물 A [1uM]
화합물 A [0.04uM] / Gem 병용
화합물 A [0.11uM] / Gem 병용
화합물 A [0.33uM] / Gem 병용
대조군
화합물 5 [1uM]
젬시타빈 [16nM]
화합물 5 [0.04uM] / Gem 병용
화합물 5 [0.11uM] / Gem 병용
화합물 5 [0.33uM] / Gem 병용
화합물 A [1uM]
화합물 A [0.04uM] / Gem 병용
화합물 A [0.11uM] / Gem 병용
화합물 A [0.33uM] / Gem 병용
모노
모노
pATR S428
pCHK1 S345
γH2AX
b-액틴
6시간 시점
18시간 시점

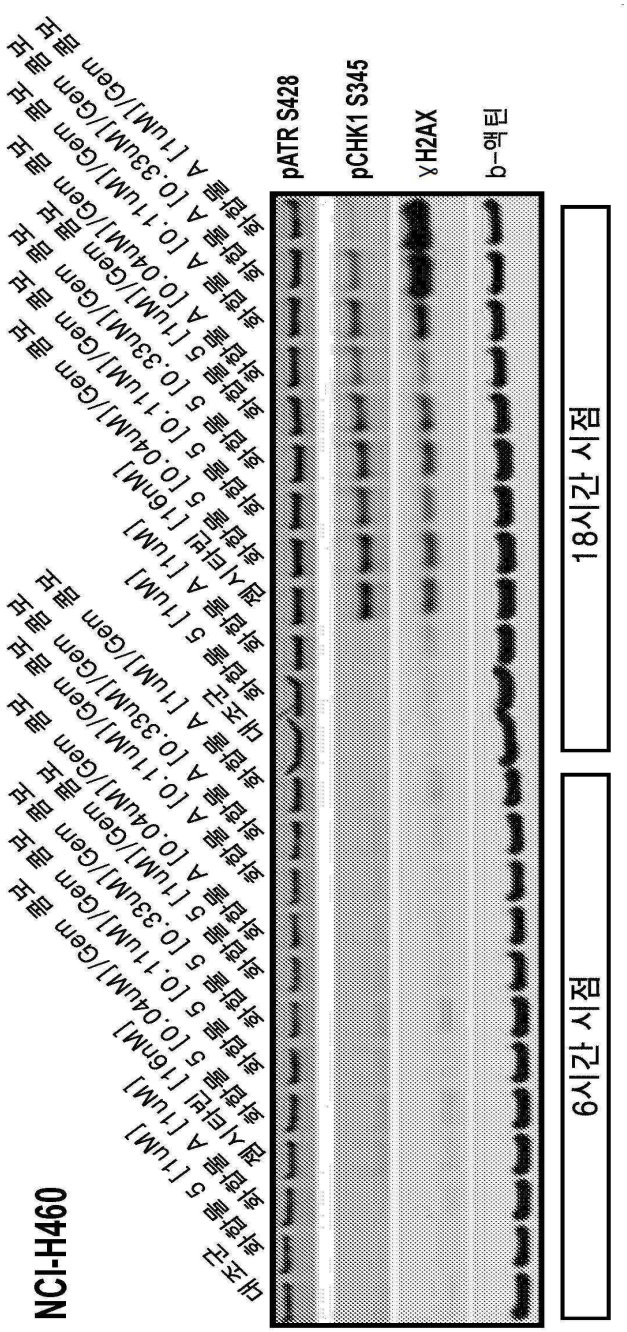
도면47


DMS-114
대조군
화합물 5 [1uM]
젬시타빈 [1uM]
화합물 A [1uM]
화합물 5 [16nM]
화합물 5 [0.04uM]/Gem 젬
화합물 A [0.04uM]/Gem 젬
화합물 5 [0.11uM]/Gem 젬
화합물 A [0.11uM]/Gem 젬
화합물 5 [0.33uM]/Gem 젬
화합물 A [0.33uM]/Gem 젬
화합물 5 [1uM]/Gem 젬
화합물 A [1uM]/Gem 젬
모노
6시간 시점
18시간 시점
pATR S428
pCHK1 S345
γH2AX
b-액틴

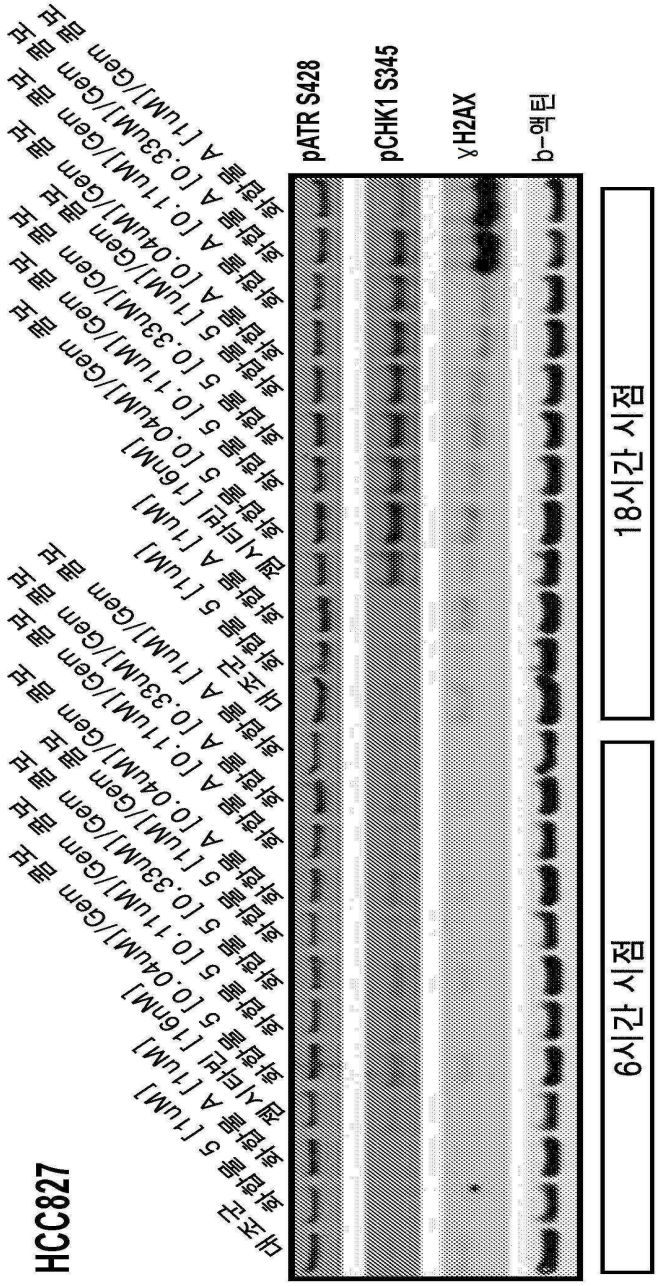
도면48


U2OS
대조군
화합물 5 [1uM]
화합물 A [1uM]
정시타빈 [16nM]
화합물 5 [16nM]
화합물 A [0.11uM]/Gem 젬자
화합물 5 [0.11uM]/Gem 젬자
화합물 A [0.04uM]/Gem 젬자
화합물 5 [0.04uM]/Gem 젬자
화합물 A [0.33uM]/Gem 젬자
화합물 5 [0.33uM]/Gem 젬자
화합물 A [1uM]/Gem 젬자
화합물 5 [1uM]/Gem 젬자
pATR S428
pCHK1 S345
γH2AX
b-액틴
6시간 시점
18시간 시점

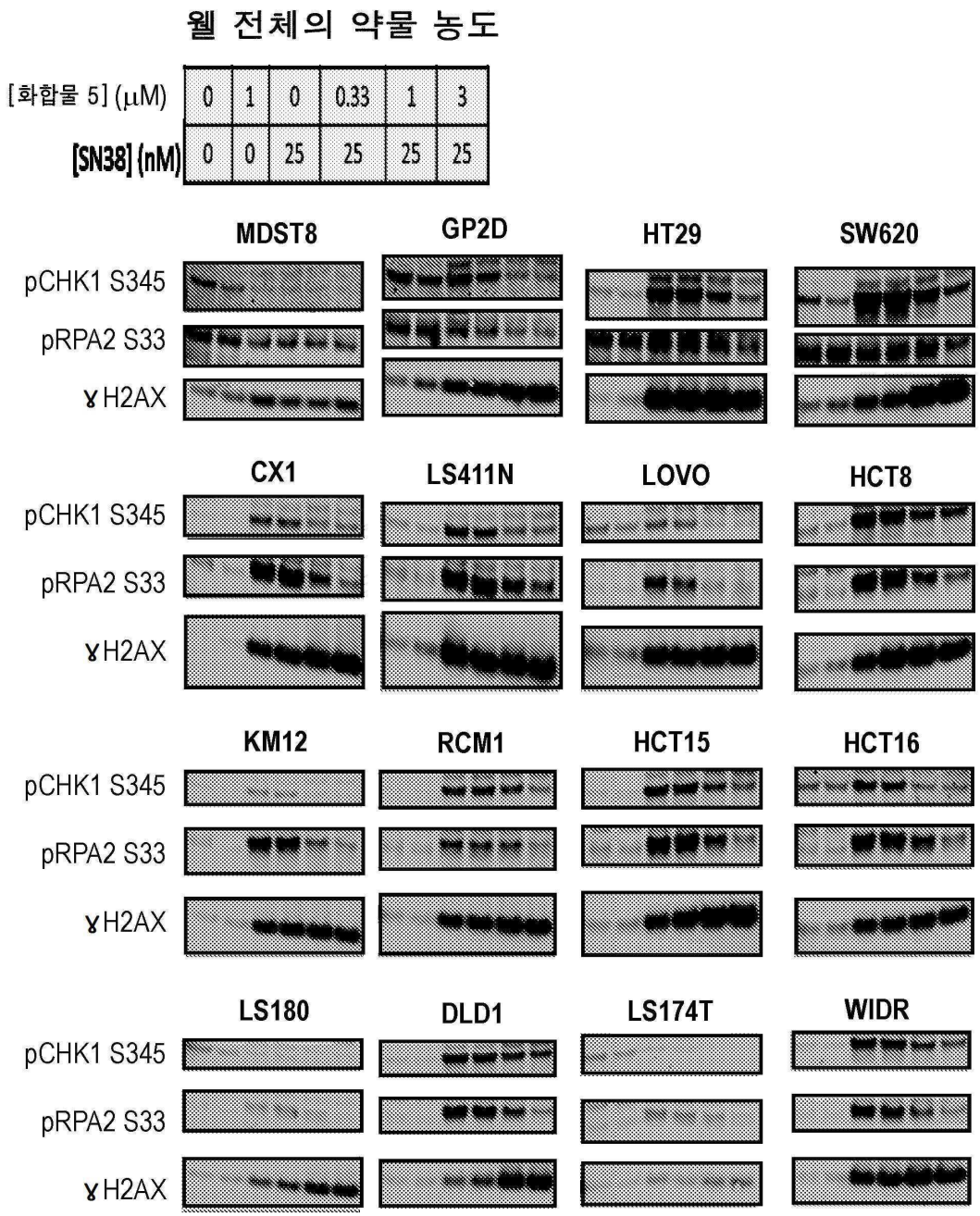
도면49


NCI-H460
대조군
화합물 5 [1uM]
화합물 A [1uM]
화합물 A [16nM]
화합물 5 [0.04uM]/Gem 1uM
화합물 5 [0.11uM]/Gem 1uM
화합물 5 [0.33uM]/Gem 1uM
화합물 A [0.04uM]/Gem 1uM
화합물 A [0.11uM]/Gem 1uM
화합물 A [0.33uM]/Gem 1uM
대조군
화합물 5 [1uM]
화합물 A [1uM]
화합물 A [16nM]
화합물 5 [0.04uM]/Gem 1uM
화합물 5 [0.11uM]/Gem 1uM
화합물 5 [0.33uM]/Gem 1uM
화합물 A [0.04uM]/Gem 1uM
화합물 A [0.11uM]/Gem 1uM
화합물 A [0.33uM]/Gem 1uM
6시간 시점
18시간 시점
b-액틴
γH2AX
pCHK1 S345
pATR S428

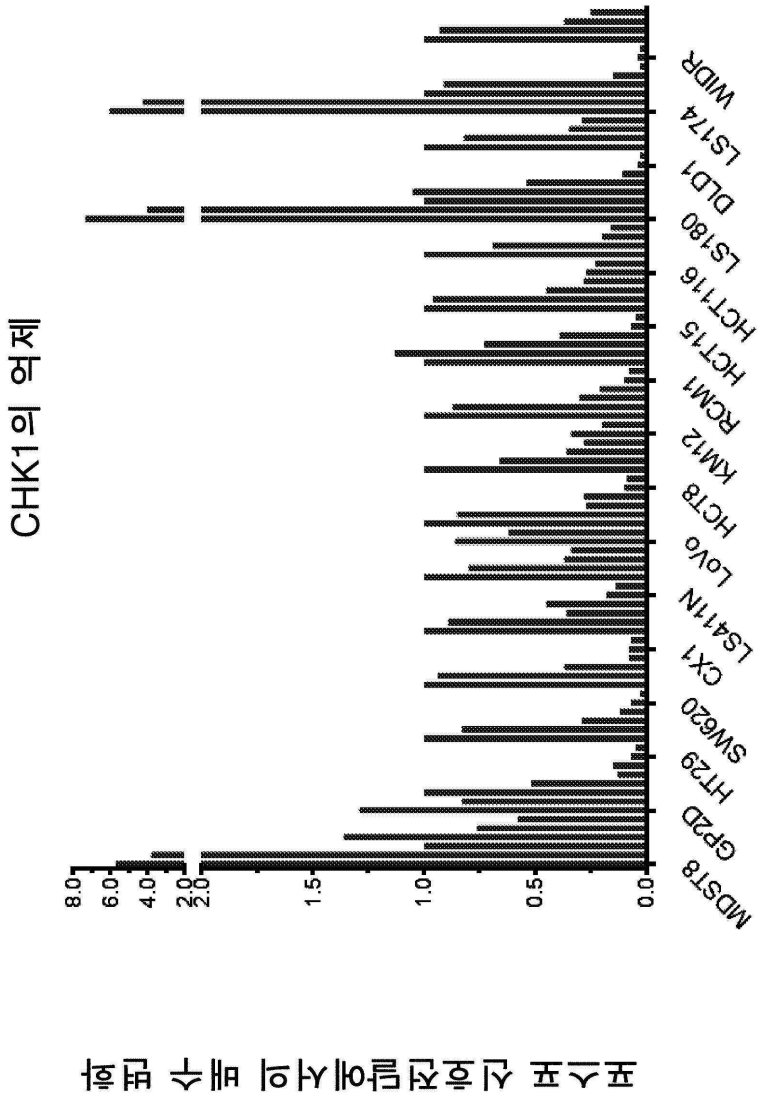
도면50


HCC827
대조군
화합물 5 [1uM]
젬시타빈 [1uM]
젬시타빈 [6nM]
화합물 A [1uM]
화합물 A [0.33uM] /Gem 병용
화합물 A [0.11uM] /Gem 병용
화합물 A [0.04uM] /Gem 병용
화합물 5 [1uM] /Gem 병용
화합물 5 [0.33uM] /Gem 병용
화합물 5 [0.11uM] /Gem 병용
화합물 5 [0.04uM] /Gem 병용
pATR S428
pCHK1 S345
γH2AX
b-액틴
6시간 시점
18시간 시점

도면51

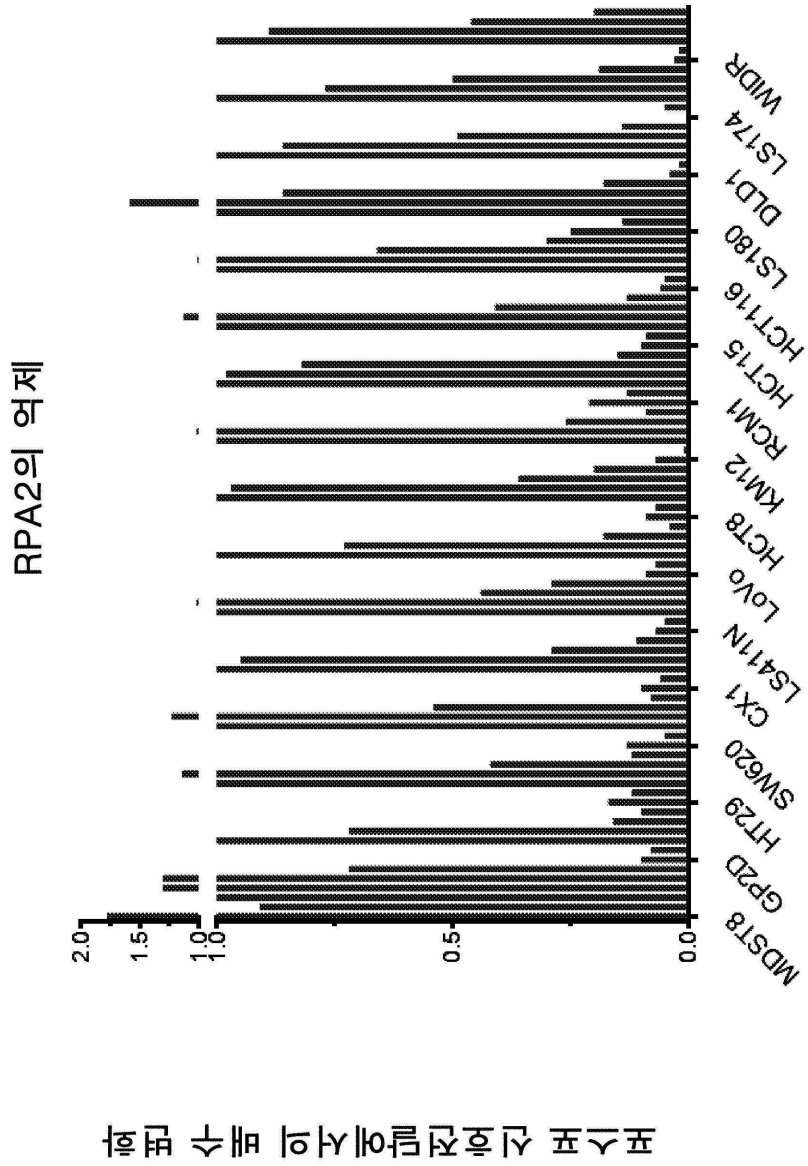

웰 전체의 약물 농도
[화합물 5] (μM) 0 1 0 0.33 1 3
[SN38] (nM) 0 0 25 25 25 25
MDST8
GP2D
HT29
SW620
pCHK1 S345
pRPA2 S33
γH2AX
CX1
LS411N
LOVO
HCT8
KM12
RCM1
HCT15
HCT16
LS180
DLD1
LS174T
WIDR

도면52



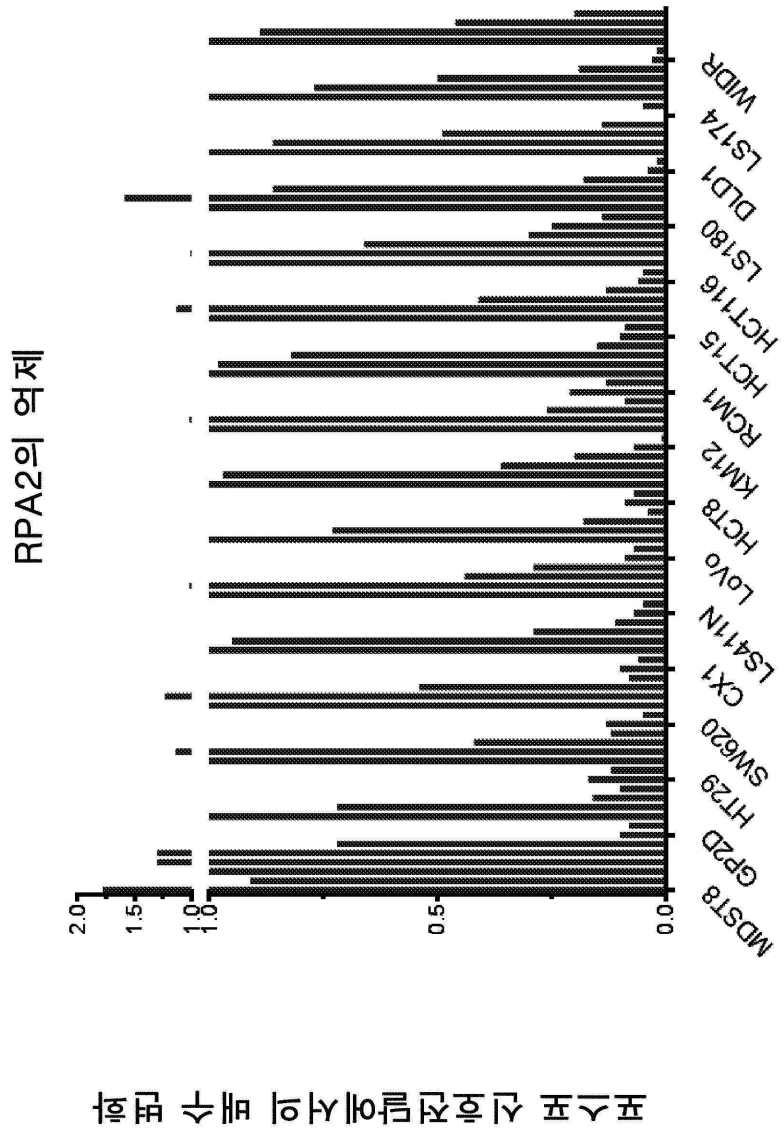
포스포 신호전달에서의 배수 변화

도면53



포스포 신호전달에서의 배수 변화

도면54



포스포 신호전달에서의 배수 변화