



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0119768
(43) 공개일자 2009년11월19일

(51) Int. Cl.

A61K 31/444 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

A61K 38/21 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7018743

(22) 출원일자 2008년03월07일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년09월08일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/056122

(87) 국제공개번호 WO 2008/112509

국제공개일자 2008년09월18일

(30) 우선권주장

60/894,046 2007년03월09일 미국(US)

60/911,406 2007년04월12일 미국(US)

(71) 출원인

노파르티스 아게

스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35

(72) 발명자

하이즈, 칼라 씨.

미국 94510 캘리포니아주 베니시아 호손 레인 436

홀렌바흐, 폴

미국 94552 캘리포니아주 카스트로 밸리 글렌우드
드라이브 20793

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 위혜숙

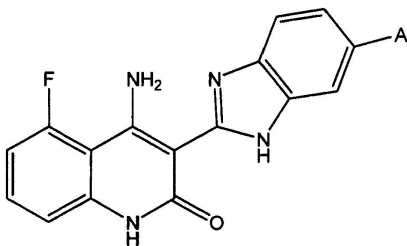
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 흑색종 치료법

(57) 요약

본 발명에 따른 흑색종 치료 방법은 대상체에게 하기 화학식 I의 화합물, 상기 화합물의 호변이성질체, 상기 화합물의 제약상 허용가능한 염, 상기 호변이성질체의 제약상 허용가능한 염, 또는 이들의 혼합물을 투여하는 것을 포함한다. 상기 화합물, 호변이성질체, 상기 화합물의 염, 상기 호변이성질체의 염 또는 이들의 혼합물은 전이성 암 치료용 의약의 제조에 사용될 수 있다. 변수 A는 본원에서 정의된 값을 갖는다.

<화학식 I>



(72) 발명자

메네제스, 다니엘

미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 어드미럴 드라이브 6 어파트먼트 에이277

프리어, 낸시

미국 94707 캘리포니아주 켄싱턴 코벤트리 로드 433

렌달, 캐서린

미국 94708 캘리포니아주 버클리 그리즐리 피크 블러버드 1221

비스만, 마리온

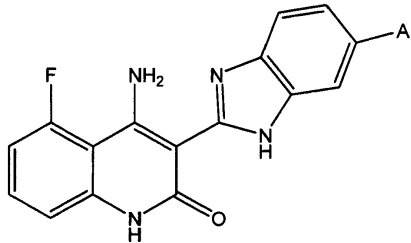
미국 94005 캘리포니아주 브리스베인 스왈로테일 코트 512

특허청구의 범위

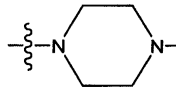
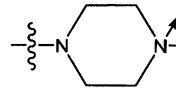
청구항 1

흑색종이 있는 대상체에게 치료 유효량의 하기 화학식 I의 화합물, 상기 화합물의 호변이성질체, 상기 화합물의 제약상 허용가능한 염, 상기 호변이성질체의 제약상 허용가능한 염, 또는 이들의 혼합물을 투여하는 것을 포함하는, 흑색종의 치료 방법:

<화학식 I>



상기 식에서,

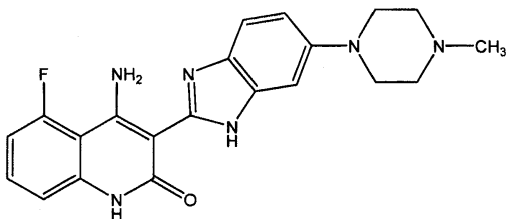
A는  또는 로부터 선택된 기이고,

R¹은 H이거나, 또는 1개 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알킬기로부터 선택된다.

청구항 2

제1항에 있어서, R¹이 메틸기이고, 화학식 I의 화합물이 하기 화학식 IA를 갖는 것인 방법:

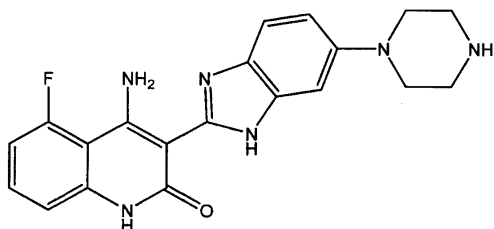
<화학식 IA>



청구항 3

제1항에 있어서, R¹이 수소이고, 화학식 I의 화합물이 하기 화학식 IB를 갖는 것인 방법:

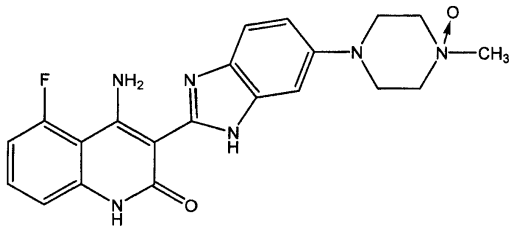
<화학식 IB>



청구항 4

제1항에 있어서, R¹이 메틸기이고, 화학식 I의 화합물이 하기 화학식 IC를 갖는 것인 방법:

<화학식 IC>



청구항 5

제1항에 있어서, 화학식 I의 화합물의 락테이트 염 또는 그의 호변이성질체를 대상체에게 투여하는 것인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 흑색종이 전이된 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 흑색종이 표재성 확산 흑색종, 결절성 흑색종, 말단성 흑점양 흑색종, 흑점양 악성 흑색종 또는 점막 흑점양 흑색종인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 흑색종이 피부 또는 피부외인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 흑색종이 안내(眼內) 또는 연질 조직의 투명 세포 육종인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 흑색종 치료를 위한 1종 이상의 항암 약물을 투여하는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 1종 이상의 항암 약물이 알킬화 항암 약물, 니트로소우레아, 탁산, 빈카 알칼로이드, 토포이소머라제 억제제, 항암 항생제, 및 백금 항암 약물로 구성된 군에서 선택된 것인 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 1종 이상의 항암 약물이 다카르바진, 테모졸로미드, 카르무스틴, 로무스틴, 포테무스틴, 파클리탁셀, 도세탁셀, 빈블라스틴, 이리노테칸, 탈리도미드, 스트렙토조신, 닥티노마이신, 메클로레타민, 시스플라틴, 카르보플라틴, 이마타닙 메실레이트, 소라페닙, 수텐트 또는 예블로티닙으로 구성된 군에서 선택된 것인 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 1종 이상의 항암 약물이 인터페론 및 인터루킨-2로 구성된 군에서 선택된 것인 방법.

청구항 15

제11항에 있어서, 1종 이상의 항암 약물이 인터페론 알파-2a, 인터페론 알파-2b, PEG화(pegylated) 인터페론 알

파-2b 및 인터루킨-2로 구성된 군에서 선택된 것인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 화합물의 치료 유효량이 약 0.25 mg/kg 내지 약 30 mg/kg의 범위인 방법.

청구항 17

제1항에 있어서, 화합물의 치료 유효량이 약 25 mg/일 내지 약 1500 mg/일의 범위인 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 화합물의 치료 유효량이 약 100 mg/일 내지 약 600 mg/일의 범위인 방법.

청구항 19

제1항에 있어서, 흑색종이 섬유아세포 성장 인자 수용체 1, 2, 3 및/또는 4를 발현하는 것인 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 흑색종이 야생형 Raf, 돌연변이체 Raf, 야생형 Ras, 돌연변이체 Ras, 야생형 c-Kit 또는 돌연변이체 c-Kit를 발현하는 것인 방법.

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 일반적으로 대상체에서 흑색종을 치료하기 위한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 보다 특히, 본 발명은 흑색종의 치료 및 흑색종 치료용 의약의 제조에 있어서 화합물, 예컨대 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]퀴놀린-2(1H)-온 및 그의 호변이성질체, 염 및 이들의 혼합물의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- <2> 모세혈관은 인간 신체의 거의 모든 조직에 뻗어 있고 조직에 산소 및 영양분을 공급할 뿐만 아니라 노폐물을 제거한다. 전형적인 조건하에서는 모세혈관들을 라이닝하는 내피 세포가 분열하지 않기 때문에, 모세혈관은 인간 성인에서 그의 수 또는 크기가 증가하지 않는다. 그러나, 조직이 손상된 경우이거나 월경 주기의 특정 일부 기간 동안과 같은 정상적인 특정 조건하에서는 모세혈관이 신속하게 증식되기 시작한다. 기존의 혈관으로부터 새로운 모세혈관이 형성되는 이러한 과정은 혈관신생(angiogenesis) 또는 신혈관생성(neovascularization)이라 공지되어 있다. 문헌 [Folkman, J. Scientific American 275, 150-154 (1996)]을 참조한다. 창상 치유 동안의 혈관신생은 성인의 삶 동안 병태생리적인 신혈관생성의 예이다. 창상 치유 동안에 추가의 모세혈관이 산소 및 영양분을 공급하고, 육아형성(granulation) 조직을 자극하며 노폐물 제거를 돕는다. 치유 과정이 끝난 후, 모세혈관은 통상적으로 퇴행한다 [Lymboussaki, A. "Vascular Endothelial Growth Factors and their Receptors in Embryos, Adults, and in Tumors" Academic Dissertation, University of Helsinki, Molecular/Cancer Biology Laboratory and Department of Pathology, Haartman Institute, (1999)].
- <3> 혈관신생은 또한 암 세포의 성장에서도 중요한 역할을 수행한다. 일단 암 세포의 네스트(nest)가 특정 크기, 대충 1 내지 2 mm 직경에 이르면 확산으로는 암 세포에 충분한 산소와 영양분이 원활하게 공급되지 못하기 때문에 해당 암 세포는 종양이 더 크게 성장하도록 혈액 공급을 발달시켜야 한다는 것이 공지되어 있다. 따라서, 혈관신생의 억제가 암 세포의 성장을 정지시킨다고 예상된다.
- <4> 수용체 티로신 키나제 (RTK)는 발생학적 세포 성장 및 분화, 성인 조직의 리모델링 및 재생을 조절하는 막횡단 폴리펩티드이다 ([Mustonen, T. et al., J. Cell Biology 129, 895-898 (1995)], [van der Geer, P. et al. Ann Rev. Cell Biol. 10, 251-337 (1994)]). 성장 인자 또는 사이토킨이라 공지된 폴리펩티드 리간드는 RTK를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. RTK의 신호전달은 리간드 결합 및 수용체 외부 도메인에서의 형태 변화로 인한 상기 수용체의 이량체화를 포함한다 ([Lymboussaki, A. "Vascular Endothelial Growth Factors and their Receptors in Embryos, Adults, and in Tumors" Academic Dissertation, University of Helsinki, Molecular/Cancer Biology Laboratory and Department of Pathology, Haartman Institute, (1999)],

[Ullrich, A. et al., Cell 61, 203-212 (1990)]). RTK에 리간드가 결합하면 특정 티로신 잔기에서 수용체 인산 전달이 일어난 후에 세포질 기질의 인산화를 위한 촉매 도메인이 활성화된다 [상기 문헌].

- <5> RTK의 2종의 하위부류는 혈관 내피에 특이적이다. 이것은 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 하위부류 및 Tie 수용체 하위부류를 포함한다. 클래스 V RTK는 VEGFR1 (FLT-1), VEGFR2 (KDR (인간), Flk-1 (마우스)) 및 VEGFR3 (FLT-4)을 포함한다 [Shibuya, M. et al., Oncogene 5, 519-525 (1990)], [Terman, B. et al., Oncogene 6, 1677-1683 (1991)], [Aprelikova, O. et al., Cancer Res. 52, 746-748 (1992)]).
- <6> 암은 종양-세포 증식을 구동하는 다양한 유전적 결함을 수반하는 질환이다. 따라서, 다양한 세포 신호전달 경로를 동시에 억제하는 전략이 보다 유리한 치료 결과를 가져올 수 있다. 종양 세포에서는 RTK 과다발현 및/또는 돌연변이 활성화가 흔히 존재하며, 종양 성장과 관련이 있다 ([Blume-Jensen, P and Hunter, T., "Oncogenic Kinase Signaling," Nature, 411, pp. 355-65 (2001)], [Carmeliet, P., "Manipulating Angiogenesis in Medicine," J. Intern. Med., 255, pp. 538-61 (2004)]). 대부분의 RTK는 리간드 결합과 관련이 있는 세포의 도메인, 및 자가인산화, 신호 도입 사건들의 캐스케이드를 촉발하는 하류 신호전달 분자의 동원을 매개하는 세포내 키나제 도메인을 포함한다. 암과 관련이 있는 RTK는 30종이 넘으며, 예를 들어 제III형 (PDGFR, CSF-1R, FLT3 및 c-KIT), 제IV형 (FGFR1 내지 4) 및 제V형 (VEGFR1-3) RTK가 있다.
- <7> 흑색종은 피부 색 안료인 멜라닌을 생성하는 세포인 멜라닌세포의 악성 종양이다. 흑색종은 전형적으로 피부에서 발생하지만, 점막 표면이나 멜라닌 세포가 존재할 수 있는 신체내 어디에서든 발생할 수 있다. 흑색종은 그의 특징적인 외관 및 거동에 따라 다음과 같이 분류될 수 있다: 1) 표재성 확산 흑색종 (Superficial Spreading Melanoma, SSM), 2) 결절성 악성 흑색종 (Nodular Malignant Melanoma, NM), 3) 말단성 흑점양 흑색종 (Acral Lentiginous Melanoma, ALM), 4) 흑점양 악성 흑색종 (Lentiginous Malignant Melanoma, LMM), 및 5) 점막 흑점양 흑색종 (Mucosal Lentiginous Melanoma, MLM). SSM은 가장 흔한 유형의 흑색종이고, 피부에서 짙거나 평평하거나 약간 솟아오른 다양한 색상의 자국으로 나타나는 경우가 흔하다. 상기 암은 초기 방사상 단계에서는 표피를 통해 퍼져나가며 치유에 대한 예후가 양호하다. SSM이 일단 수직 성장 단계로 들어가면, 이것은 진피 및 하부 구조로 퍼져나가며 더 위험해지고 치유가 더 어려워진다. NM은 가장 공격적인 형태의 흑색종으로, 신속하게 발생하여 위아래 양방향으로 동시에 성장해 나간다. 이것은 전형적으로는 피부에서 균일하게 흑색인 결절로 나타나지만, 다른 색상도 가능하다. ALM은 또다른 공격적인 형태의 흑색종으로, 짙은 색상의 피부를 가진 환자에서 보다 흔히 발생한다. 이것은 갈색, 흑색 또는 다양한 색상일 수 있고, 평평할 수도 있고 결절성일 수도 있다. LMM은 가장 덜 일반적인 흑색종으로, 전형적으로는 노령자의 코와 볼에서 발생한다. 상기 병변은 평평하며, 황갈색, 갈색, 흑색 또는 다른 색상일 수도 있고, 매우 크게 성장할 수 있다 (3 cm 내지 6 cm). LMM은 서서히 전파되며 전이되는 경향이 없다. MLM은 ALM과 외관상 유사하며, 구강, 식도, 항문, 질 및 결막을 비롯한 다양한 점막 부위에서 발생한다. 흑색종이 국소화된 채로 유지되는 경우에는 수술로 절제하고, 치유율도 대개 양호하다. 그러나, 흑색종이 일단 1차 병변에서 예를 들어 림프계, 및 보다 먼 부위, 예컨대 중추신경계, 간 또는 폐로 전이된다면 치료하기가 매우 어려워진다. 2006년에 미국에서는 62,000명이 넘는 새로운 흑색종 사례가 발생했고, 7,900명이 넘는 환자가 흑색종으로 사망한 것으로 추정된다.
- <8> 다양한 인돌릴 치환된 화합물이 최근에 WO 01/29025, WO 01/62251 및 WO 01/62252에 개시되었고, 다양한 벤즈이미다졸릴 화합물이 최근에 WO 01/28993에 개시되었다. 보고된 바에 따르면, 이들 화합물은 수용체형 및 비-수용체형 티로신 키나제 둘다의 신호 도입을 억제, 조정 및/또는 조절할 수 있다. 개시된 화합물 중 일부는 인돌릴기 또는 벤즈이미다졸릴기에 결합된 퀴놀린을 함유한다.
- <9> 4-히드록시 퀴놀린 및 4-히드록시 퀴놀린 유도체의 합성은 수많은 참고문헌에 개시되어 있으며, 이들 문헌은 어떠한 목적으로도 완전하게 본원에 기술되어 있는 것과 마찬가지로 그 전문이 참고로 포함된다. 예를 들어, 우크라이네츠(Ukrainets) 등은 3-(벤즈이미다졸-2-일)-4-히드록시-2-옥소-1,2-디히드로퀴놀린의 합성을 개시하였다 ([Ukrainets, I. et al., Tet. Lett. 42, 7747-7748 (1995)], [Ukrainets, I. et al., Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinii, 2, 239-241 (1992)]). 우크라이네츠는 또한 다른 4-히드록시 퀴놀린 및 티오 유사체, 예컨대 1H-2-옥소-3-(2-벤즈이미다졸릴)-4-히드록시퀴놀린의 합성, 그의 항-경련성 및 항-갑상선 활성을 개시하였다 ([Ukrainets, I. et al., Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinii, 1, 105-108 (1993)], [Ukrainets, I. et al., Khimiya Geterotsiklicheskikh Soedinii, 8, 1105-1108 (1993)], [Ukrainets, I. et al., Chem. Heterocyclic Comp. 33, 600-604 (1997)]).
- <10> 다양한 퀴놀린 유도체의 합성은 WO 97/48694에 개시되어 있다. 이들 화합물은 핵 호르몬 수용체에 결합할 수 있고, 골모세포 증식 및 골 성장을 자극하는데 유용한 것으로 개시되어 있다. 상기 화합물은 또한 핵 호르몬

수용체 부류와 관련이 있는 질환의 치료 또는 예방에 유용한 것으로 개시되어 있다.

<11> 퀴놀린의 벤젠 고리가 황의 기로 치환된 다양한 퀴놀린 유도체가 WO 92/18483에 개시되어 있다. 이들 화합물은 제약 제제에서 유용하고 의약으로서 유용한 것으로 개시되어 있다.

<12> 퀴놀론 및 쿠마린 유도체는 의약 및 제약 제제와 관련이 없는 다양한 분야에서의 용도를 갖는 것으로 개시된 바 있다. 광중합가능한 조성물에서의 용도 또는 발광 특성을 갖는 퀴놀론 유도체의 제조를 기재하는 참고문헌은 오카모토(Okamoto) 등에게 허여된 미국 특허 제5,801,212호, JP 8-29973, JP 7-43896, JP 6-9952, JP 63-258903, EP 797376 및 DE 23 63 459를 포함하며, 이들 문헌 모두는 어떠한 목적으로도 완전하게 본원에 기술되어 있는 것과 마찬가지로 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

<13> 혈관신생 및 혈관 내피 성장 인자 수용체 티로신 키나제를 억제하고 다른 티로신 및 세린/트레오닌 키나제를 억제하는데 유용한 다양한 퀴놀린은 벤즈이미다졸 화합물, 예를 들어 4-아미노-5-플루오로-3-[5-(4-메틸피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]퀴놀린-2(1H)-온 또는 그의 호변이성질체가 하기하는 문헌에 개시되어 있으며, 이들 문헌 각각은 어떠한 목적으로도 완전하게 본원에 기술되어 있는 것과 마찬가지로 그 전문이 본원에 참고로 포함된다: 미국 특허 제6,605,617호, 미국 특허 제6,756,383호, 미국 특허 출원 제10/116,117호 (2003년 2월 6일에 US 2003/0028018로 공개됨), 미국 특허 출원 제10/644,055호 (2004년 5월 13일에 미국 특허 출원 공개 제 2004/0092535호로 공개됨), 미국 특허 출원 제10/983,174호, 미국 특허 출원 제10/706,328호 (2004년 11월 4일에 2004/0220196로 공개됨), 미국 특허 출원 제10/982,757호 (2005년 6월 3일에 2005/0137399로 공개됨) 및 미국 특허 출원 제10/982,543호 (2005년 9월 22일에 2005/0209247로 공개됨).

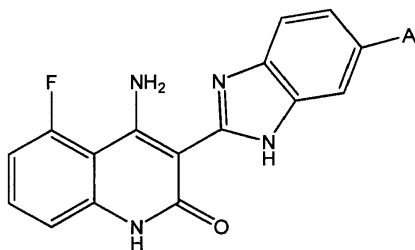
<14> 종양 및 암의 치료 방법에 있어서의 최근 진보에도 불구하고, 암의 신규 치료 방법 및 특히 흑색종 치료를 위한 신규 방법 및 조성물이 여전히 크게 요구된다.

<15> 발명의 요약

<16> 본 발명은 흑색종, 특히 전이된 흑색종을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명은 흑색종 치료를 위한 제약 제제 및 의약을 사용하는데 있어서 화합물, 그의 호변이성질체, 그의 염, 및 이들의 혼합물의 용도를 추가로 제공한다.

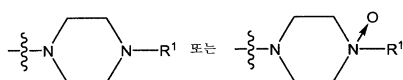
<17> 한 측면에서, 본 발명은 대상체, 예컨대 인간 흑색종 환자에서 흑색종을 치료하는 방법을 제공한다. 흑색종은 피부 흑색종 또는 피부외 흑색종일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 전이된 흑색종을 치료하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 대상체에게 유효량의 화학식 I의 화합물, 상기 화합물의 호변이성질체, 상기 화합물의 제약상 허용 가능한 염, 상기 호변이성질체의 제약상 허용 가능한 염, 또는 이들의 혼합물을 투여하는 것을 포함한다. 화학식 I은 하기 화학식을 갖는다:

화학식 I



<18>

<19> 상기 식에서,



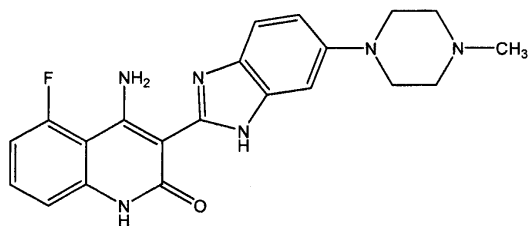
<20> A는 $\text{--}\text{N--}\text{N--}\text{R}^1$ 또는 $\text{--}\text{N--}\text{N--}\text{R}^1$ 의 구조 중 하나를 갖는 기이고,

<21> 여기서의 R^1 은 H이거나, 또는 1개 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알킬기로부터 선택된다.

<22> 본 발명의 방법의 다양한 실시양태에서, 본원에 개시된 것과 같은 화합물의 투여 후에는 대상체에서 흑색종의 성장이 억제되거나 상기 질환이 퇴행하거나 안정화되거나, 또는 별법으로는 투여 후에 대상체에서 흑색종의 크기 및/또는 범위가 감소된다.

<23> 몇몇 실시양태에서, R¹은 메틸기이고, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 IA를 갖는다:

화학식 IA

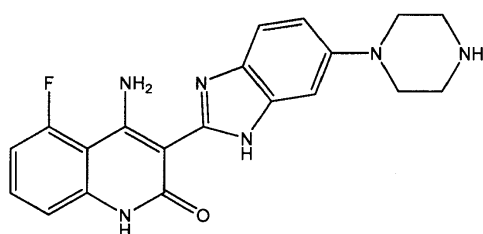


<24>

<25> 화학식 IA의 화합물은 본원에서 "화합물 1", "TKI258" 또는 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-1H-퀴놀린-2-온이라 지칭되기도 한다.

<26> 몇몇 실시양태에서, R¹은 수소이고, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 IB를 갖는다:

화학식 IB

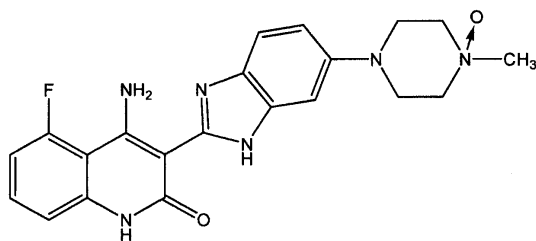


<27>

<28> 화학식 IB의 화합물은 본원에서 "화합물 2" 또는 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-1H-퀴놀린-2-온이라 지칭되기도 한다.

<29> 몇몇 실시양태에서, R¹은 메틸기이고, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 IC를 갖는다:

화학식 IC



<30>

<31> 화학식 IC의 화합물은 본원에서 "화합물 3" 또는 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸-4-옥시도피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-1H-퀴놀린-2-온이라 지칭되기도 한다.

<32> 몇몇 실시양태에서, 상기 화합물은 화학식 I, IA, IB 또는 IC의 화합물이고, 상기 화합물의 락테이트 염 또는 호변이성질체를 대상체에게 투여한다.

<33> 몇몇 실시양태에서, 흑색종은 야생형 또는 돌연변이체 섬유아세포 성장 인자 수용체 1, 2, 3 및/또는 4를 발현한다. 다른 실시양태에서, 흑색종은 야생형 또는 돌연변이체 c-Kit를 발현한다. 다른 실시양태에서, 흑색종은 섬유아세포 성장 인자 수용체 1 및 2, 1 및 3, 1 및 4, 2 및 3, 2 및 4, 3 및 4, 또는 1, 2, 및 3, 또는 1, 2, 3 및 4를 발현한다. 본원에 개시한 방법에 따라 치료될 수 있는 특정 흑색종에서는 야생형 또는 돌연변이체 FGFR1, FGFR2, FGFR3 또는 FGFR4 중 1종 이상이 발현된다. 본원에 개시한 방법으로 치료될 수 있는 특정 흑색종은 야생형 또는 돌연변이체 c-Kit를 발현한다. 다른 실시양태에서, 흑색종은 야생형 Raf, 돌연변이체 Raf, 야생형 Ras, 돌연변이체 Ras, 야생형 c-Kit 및/또는 돌연변이체 c-Kit 단백질을 발현한다.

<34> 예를 들어 표재성 확산 흑색종, 결절성 악성 흑색종, 말단성 흑점양 흑색종, 흑점양 악성 흑색종 및 점막 흑점

양 흑색종을 비롯한 여러가지 상이한 유형의 흑색종이 본 발명의 방법에 따라 치료될 수 있다. 원발성 흑색종은 피부 또는 피부외일 수도 있다. 피부외 원발성 악성 흑색종은 안구 흑색종 및 연질 조직의 투명 세포 육종을 포함한다. 추가의 적응증은 RTK 표적의 관련성이 연관되어 있을 수 있는 회귀 흑색종 또는 전암(pre-cancerous) 병변을 포함한다. 본 발명의 방법은 또한 전이된 흑색종의 치료에도 유용하다.

- <35> 흑색종 치료 방법은 흑색종 치료를 위한 1종 이상의 항암 약물을 본원에서 정의한 바와 같은 화합물과 함께 투여하는 것을 추가로 포함한다. 예를 들어, 흑색종, 특히 전이성 흑색종 치료를 위한 항암 약물은 알킬화 항암 약물, 예컨대 다카르바진, 테모졸로미드, 메클로레타민, 및 니트로소우레아, 예컨대 카르무스틴, 로무스틴 및 포테무스틴; 탁산, 예컨대 파클리탁셀 및 도세탁셀; 빈카 알칼로이드, 예컨대 빈블라스틴; 토포이소머라제 억제제, 예컨대 이리노테칸; 탈리도미드; 항암 항생제, 예컨대 스트렙토조신 및 닥티노마이신; 또는 백금 항암 약물, 예컨대 시스플라틴 및 카르보플라틴으로부터 선택될 수 있다. 본 발명의 화합물은 복합화합요법, 예컨대 다르트마우스(Dartmouth) 요법, CVD (시스플라틴, 빈블라스틴 및 다카르바진) 및 BOLD (블레오마이신, 빈크리스틴, 로무스틴 및 다카르바진)에 추가될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 항암 약물은 인터페론, 예컨대 (이에 제한되지 않음) 인터페론 알파-2a, 인터페론 알파-2b, PEG화(pegylated) 인터페론, 예컨대 PEG화 인터페론 알파-2b로부터 선택된다. 인터루킨, 예컨대 인터루킨-2 역시 본원에 개시된 화합물과 조합하여 사용될 수 있다.
- <36> 본원에 기재한 흑색종 치료 방법에서, 화합물의 치료 유효량은 대상체의 체중 1 kg 당 약 0.25 mg 내지 약 30 mg의 범위일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 화합물의 치료 유효량은 약 0.5 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 25 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 15 mg/kg, 또는 약 1 또는 2 mg/kg 내지 약 10 mg/kg의 범위일 수 있다. 다른 실시양태에서, 대상체에게 투여되는 화합물의 양은 약 25 내지 약 1500 mg/일, 바람직하게는 약 100 또는 200 mg/일 내지 약 500 또는 600 mg/일의 범위이다.
- <37> 몇몇 실시양태에서, 본원에 기재한 흑색종 치료 방법은 치료 주기의 일부로서 화학식 I, IA, IB 또는 IC의 화합물을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 치료 주기는 화학식 I, IA, IB 또는 IC의 화합물이 대상체에게 규칙적으로 제공되는 투여 단계 및 화합물이 투여되지 않는 휴지기를 포함한다. 예를 들어, 치료 주기는 소정량의 화학식 I의 화합물을 7일, 14일, 21일 또는 28일 동안 매일 투여한 후에 7일 또는 14일 동안 화합물을 투여하지 않는 것을 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 치료 주기는 소정량의 상기 화합물을 7일 동안 매일 투여한 후에 7일 동안 화합물을 투여하지 않는 것을 포함한다. 치료 주기가 1회 이상, 예컨대 2회, 4회 또는 6회 반복되는 치료 과정을 제공할 수 있다. 더욱 일반적으로, 치료 과정은 대상체가 본 발명의 방법에 의한 흑색종 치료를 받는 기간을 지칭한다. 따라서, 치료 과정은 대상체에게 본원에 개시된 화합물의 투여량을 매일 또는 간헐적으로 투여하는 기간 뿐만이 아니라 치료 주기를 1회 이상 연장한 기간을 지칭하는 것일 수 있다. 또한, 화합물은 치료 주기의 투여 단계 동안에 매일 1회, 2회, 3회 또는 4회 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, 상기 방법은 치료 과정 동안에 소정량의 화합물을 매일 또는 격일로 1회, 2회, 3회 또는 4회 투여하는 것을 추가로 포함한다.
- <38> 따라서, 본 발명은 암이 있는 대상체에게 화학식 I, IA, IB 또는 IC를 갖는 화합물, 그의 제약상 허용가능한 염, 그의 호변이성질체, 또는 상기 호변이성질체의 제약상 허용가능한 염을 투여하는 것을 포함하고, 이때 제1 치료 주기에 투여되는 화합물의 양은 1일 25 mg이고, 각각의 후속 치료 주기에서는 투여되는 화합물의 양을 대상체에게 1일 1500 mg의 화합물이 투여되거나 대상체에서 투여량-제한 독성이 관찰될 때까지 증가시키는 것인, 흑색종 치료 방법을 추가로 제공한다. 이러한 방법에서는 전형적으로, 투여되는 화합물의 양은 제1 치료 주기 이후에 각각의 후속 치료 주기에서 2배이다. 예를 들어, 제1 치료 주기는 대상체에게 1일 25 mg 투여하는 것을 포함할 수 있고, 후속 치료 주기는 대상체에게 1일 50 mg 투여하는 것을 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 치료 주기는 동량의 화합물을 7일 동안 매일 투여한 후에 7일 동안 화합물을 투여하지 않는 것을 포함한다.
- <39> 한 측면에서, 본 발명은 본 발명의 임의의 방법의 임의의 실시양태에서 사용하기 위한 의약 또는 제약 제제의 제조에 있어서 화학식 I, IA, IB 및/또는 IC의 화합물, 상기 화합물의 호변이성질체, 상기 화합물의 제약상 허용가능한 염, 상기 호변이성질체의 제약상 허용가능한 염, 또는 이들의 혼합물의 용도를 제공한다.
- <40> 또다른 측면에서, 본 발명은 화학식 I, IA, IB 및/또는 IC의 화합물, 상기 화합물의 호변이성질체, 상기 화합물의 제약상 허용가능한 염, 상기 호변이성질체의 제약상 허용가능한 염, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 용기를 포함하는 키트를 제공한다. 상기 키트는 흑색종 치료에 사용하기 위한 또다른 화합물을 포함할 수 있다. 상기 키트는 본 발명의 임의의 방법을 수행하기 위한 지침이 기재된 설명서를 추가로 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 설명서는 키트의 용기와 분리된 문서로 포함될 수도 있고, 다른 실시양태에서는 상기 설명법이 키트의 용기에 부착된 라벨에 기재될 수도 있다.

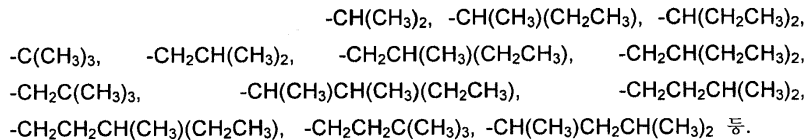
<41> 본 발명의 추가의 목적, 특징 및 이점은 하기하는 발명의 상세한 설명 및 도면으로부터 명백할 것이다.

발명의 상세한 설명

- <48> 본 발명은 흑색종, 특히 전이된 흑색종의 치료 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 흑색종 치료용 의약 또는 제약 제제의 제조에 있어서 화합물 (예를 들어, 화학식 I, IA, IB 및 IC의 화합물), 그의 호변이성질체, 염 및 이들의 혼합물의 용도를 제공한다. 이론에 얽매이고 싶지는 않지만, 흑색종 치료에 있어서 본원에 개시된 화합물의 놀랄 만큼 효능있는 효과는 상기 화합물의 이중 활성화로 인한 것이라고 여겨진다. 본 발명의 화합물은 1종 이상의 FGF 수용체를 발현하는 흑색종 세포를 억제하고, VEGFR, FGFR 및 PDGFR β 를 차단하여 흑색종과 관련이 있는 혈관신생을 억제함으로써, 흑색종에 대한 항-종양 효과를 발휘한다고 여겨진다. 또한, 본원에 개시된 화합물은 야생형 또는 돌연변이체 Raf 또는 Ras 유전형의 흑색종에 대하여 효능이 있을 수도 있다.
- <49> 하기하는 약어 및 정의가 본 명세서 전반에 걸쳐서 사용된다:
- <50> "bFGF"는 염기성 섬유아세포 성장 인자를 나타내는 약어이다.
- <51> "C-Kit"는 줄기 세포 인자 수용체 또는 비만 세포 성장 인자 수용체라고도 공지되어 있다.
- <52> "CSF-1R"은 콜로니 자극 인자 1 수용체에 대한 약어이다.
- <53> "FGF"는 FGFR1, FGFR2, FGFR3 및 FGFR4와 상호작용하는 섬유아세포 성장 인자에 대한 약어이다.
- <54> "FGFR1"은 또한 bFGFR로도 공지되어 있으며, 섬유아세포 성장 인자, FGF와 상호작용하는 티로신 키나제를 나타내는 약어이다. 관련 수용체 티로신 키나제는 FGFR2, FGFR3 및 FGFR4를 포함한다. 이들 키나제 중 1종 이상이 흑색종에서 흔히 발현된다 (실시에 참조).
- <55> "Flk-1"은 태아 간 티로신 키나제 1을 나타내며, 키나제-삽입 도메인 티로신 키나제 또는 KDR (인간)로도 공지되어 있으며, 또한 혈관 내피 성장 인자 수용체-2 또는 VEGFR2 (KDR (인간), Flk-1 (마우스))로도 공지되어 있는 약어이다.
- <56> "FLT-1"은 fms-유사 티로신 키나제-1을 나타내며, 또한 혈관 내피 성장 인자 수용체-1 또는 VEGFR1로도 공지되어 있는 약어이다.
- <57> "FLT-3"은 fms-유사 티로신 키나제-3을 나타내며, 또한 줄기 세포 티로신 키나제 I (STK I)로도 공지되어 있는 약어이다.
- <58> "FLT-4"는 fms-유사 티로신 키나제-4를 나타내며, 또한 VEGFR3으로도 공지되어 있는 약어이다.
- <59> "MIA"는 흑색종 억제 활성을 나타낸다. 본원에서 사용된 바와 같이, MIA 단백질은 진뱅크(GenBank) 데이터베이스에서 관리 번호 NP_006524로 공개적으로 이용가능하고, 진뱅크 관리 번호 NM_006533으로 기재된 cDNA에 의해 코딩되는 12 kDa 가용성 단백질을 지칭하며, 포유동물의 상동체 또는 그의 단편은 상기 MIA 단백질의 10개 이상의 연속 잔기를 포함한다. MIA 단백질은 피브로넥틴 및 라미닌 분자에 결합하여 흑색종 세포가 세포외 매트릭스로부터 박리되는 것에 관여하고, 이로 인해 세포-매트릭스 상호작용을 저해한다고 밝혀진 바 있다 [Brockez L. et al., Br. J. Dermatol. 143:256-268 (2000)]. 처치 전과 처치 후에 측정된 MIA 단백질의 존재 또는 농도는 흑색종 억제제를 사용한 처치에 대한 포유동물 대상체의 반응을 결정하는데 이용될 수 있다.
- <60> "MEK1"은 Raf-MEK1-ERK로 형성된 모듈에서 MAPK (미토젠 활성화 단백질 키나제) 신호 도입 경로의 세린 트레오닌 키나제를 나타내는 약어이다. MEK1은 ERK (Extracellular Regulated Kinase, 세포외 조절 키나제)를 인산화한다.
- <61> "PDGF"는 혈소판-유래 성장 인자를 나타내는 약어이다. PDGF는 티로신 키나제 PDGFR α 및 PDGFR β 와 상호작용한다.
- <62> "Raf"는 MAPK 신호 도입 경로에서의 세린/트레오닌 키나제이다.
- <63> "RTK"는 수용체 티로신 키나제를 나타내는 약어이다.
- <64> "Tie-2"는 Ig 및 EGF 상동성 도메인을 갖는 티로신 키나제를 나타내는 약어이다.
- <65> "VEGF"는 혈관 내피 성장 인자를 나타내는 약어이다.
- <66> "VEGF-RTK"는 혈관 내피 성장 인자 수용체 티로신 키나제를 나타내는 약어이다.

<67> 일반적으로, 특정 원소, 예컨대 수소 또는 H에 대한 언급은 해당 원소의 모든 동위원소를 포함한다. 예를 들어, 화학식 I의 화합물에 기가 표지되어 있지 않거나 H로 나타낸 경우, 이것은 수소 또는 H, 중수소, 및 삼중 수소를 포함하는 것으로 정의된다.

<68> 어구 "1개 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 또는 분지쇄 알킬기"는 헤테로원자를 함유하지 않으며 1개 내지 6개의 탄소 원자를 포함하는 비-시클릭 알킬기를 지칭한다. 따라서, 상기 어구는 직쇄 알킬기, 예를 들어 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸 및 헥실을 포함한다. 상기 어구는 또한 하기를 포함하지만 이에 제한되지 않는 직쇄 알킬기의 분지쇄 이성질체를 포함한다:



<69>

<70> 몇몇 실시양태에서, 알킬기는 1개 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 및 분지쇄 알킬기를 포함한다. 다른 실시양태에서, 알킬기는 1개 내지 4개의 탄소 원자를 갖는다. 다른 실시양태에서, 알킬기는 1개 또는 2개의 탄소 원자를 갖는 직쇄 알킬기 (메틸기 또는 에틸기)이다. 다른 실시양태에서, 알킬기는 오직 1개의 탄소 원자를 가지며 메틸기 ($-\text{CH}_3$)이다.

<71>

"제약상 허용가능한 염"은 무기 염기, 유기 염기, 무기산, 유기산, 또는 염기성 또는 산성 아미노산과의 염을 포함한다. 본 발명은 무기 염기의 염으로서 예를 들어 알칼리 금속, 예컨대 나트륨 또는 칼륨의 염; 알칼리 토 금속, 예컨대 칼슘, 마그네슘 또는 알루미늄의 염; 및 암모늄 염을 포함한다. 본 발명은 유기 염기의 염으로서 예를 들어 트리메틸아민, 트리에틸아민, 피리딘, 피콜린, 에탄올아민, 디에탄올아민 또는 트리에탄올아민으로 형성된 염을 포함한다. 무기산의 염은 예를 들어 염산, 붕화수소산, 질산, 황산 및 인산의 염을 포함한다. 본 발명은 유기산의 염으로서 예를 들어 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 푸마르산, 옥살산, 타르타르산, 말레산, 락트산, 시트르산, 숙신산, 말산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산 및 p-톨루엔술폰산의 염을 포함한다. 본 발명은 염기성 아미노산의 염으로서 예를 들어 아르기닌, 라이신 및 오르니틴의 염을 포함한다. 산성 아미노산 염은 예를 들어 아스파르트산 및 글루탐산의 염을 포함한다.

<72>

화학식 I의 화합물은 하기 실시예 섹션에 기재되고 하기 문헌에 개시된 절차를 이용하여 쉽게 합성되며, 이들 문헌 각각은 어떠한 목적으로도 완전하게 본원에 기술되어 있는 것과 마찬가지로 그 전문이 본원에 참고로 포함된다: 미국 특허 제6,605,617호, 미국 특허 출원 제10/644,055호 (미국 2004/0092535로 공개됨), 미국 특허 출원 제10/983,174호 (미국 2005/0261307로 공개됨), 미국 특허 출원 제10/726,328호 (미국 2004/0220196으로 공개됨), 미국 특허 출원 제10/982,757호 (미국 20050137399로 공개됨), 미국 특허 출원 제10/982,543호 (미국 2005/209247로 공개됨) 및 PCT 특허 출원 제PCT/US2006/019349호 (WO 2006/125130으로 공개됨).

<73>

화학식 I의 화합물, 상기 화합물의 호변이성질체, 상기 화합물의 제약상 허용가능한 염, 상기 호변이성질체의 제약상 허용가능한 염, 및 이들의 혼합물은 의약 및 제약 제제를 제조하는데 사용될 수 있다. 이러한 의약 및 제약 제제는 본원에 기재한 치료 방법에 사용될 수 있다.

<74>

제약 제제는 상기한 임의의 실시양태의 임의의 화합물, 호변이성질체 또는 염, 및 제약상 허용가능한 담체, 예컨대 본원에 기재된 것을 포함할 수 있다.

<75>

본 발명은 또한 1종 이상의 본 발명의 화합물, 또는 그의 제약상 허용가능한 염 또는 호변이성질체, 또는 이들의 혼합물을 제약상 허용가능한 담체, 부형제, 결합제, 희석제 등과 혼합하여 제조될 수 있는, 전이된 종양과 관련이 있는 장애를 치료하거나 완화시키기 위한 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 기재한 바와 같은 전이된 종양을 치료하는데 사용되는 제제를 생성하는데 사용될 수 있다. 이러한 조성물은 예를 들어 과립제, 산제, 정제, 캡슐제, 시럽제, 좌제, 주사제, 에멀전제, 엘릭시르제, 현탁액제 또는 용액제의 형태일 수 있다. 본 발명의 조성물은 다양한 투여 경로, 예를 들어 경구 투여, 비측(鼻側) 투여, 직장 투여, 피하 주사, 정맥내 주사, 근육내 주사 또는 복막내 주사용으로 제제화될 수 있다. 예로서 하기하는 투여 형태가 제공되지만, 이것이 본 발명을 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

<76>

경구, 협측(頰側) 및 설하(舌下) 투여의 경우, 산제, 현탁액제, 과립제, 정제, 환제, 캡슐제, 젤캡제 및 캐플릿제가 고체 투여 형태로서 허용가능하다. 이것들은 예를 들어 1종 이상의 본 발명의 화합물, 그의 제약상 허용가능한 염, 호변이성질체, 또는 이들의 혼합물을 1종 이상의 첨가제, 예컨대 전분 또는 다른 첨가제와 혼합하여

제조할 수 있다. 적합한 첨가제는 수크로스, 락토스, 셀룰로스 당, 만니톨, 말티톨, 텍스트란, 전분, 한천, 알기네이트, 키틴, 키토산, 펙틴, 트라가칸스 고무, 아라비아 고무, 젤라틴, 콜라겐, 카제인, 알부민, 합성 또는 반-합성 중합체 또는 글리세리드이다. 임의로, 경구 투여 형태는 투여를 돕는 다른 성분, 예컨대 불활성 희석제 또는 윤활제, 예컨대 스테아르산마그네슘, 또는 보존제, 예컨대 파라벤 또는 소르브산, 또는 항-산화제, 예컨대 아스코르브산, 토코페롤 또는 시스테인, 붕해제, 결합제, 증점제, 완충제, 감미제, 향미제 또는 방향제를 함유할 수 있다. 정제 및 환제는 당업계에 공지된 적합한 코팅 물질로 추가로 처리될 수 있다.

<77> 경구 투여용 액체 투여 형태는 제약상 허용가능한 에멀전제, 시럽제, 엘릭시르제, 현탁액제 및 용액제의 형태일 수 있고, 이것은 불활성 희석제, 예컨대 물을 함유할 수 있다. 제약 제제 및 의약품 오일, 물, 알콜, 및 이들의 조합물을 포함하지만 이에 제한되지 않는 멸균 액체를 사용하여 액체 현탁액제 또는 용액제로 제조될 수 있다. 경구 또는 비경구 투여를 위해 제약상 적합한 계면활성제, 현탁화제, 유화제가 첨가될 수 있다.

<78> 상기한 바와 같이, 현탁액제는 오일을 포함할 수 있다. 이러한 오일은 낙화생유, 호마유, 면실유, 옥수수유 및 올리브유를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 현탁 제제는 지방산의 에스테르, 예컨대 에틸 올레에이트, 이소프로필 미리스테이트, 지방산 글리세리드 및 아세틸화된 지방산 글리세리드를 함유할 수도 있다. 현탁 제제는 알콜, 예컨대 (이에 제한되지 않음) 에탄올, 이소프로필 알콜, 헥사데실 알콜, 글리세롤 및 프로필렌 글리콜을 포함할 수 있다. 에테르, 예컨대 (이에 제한되지 않음) 폴리(에틸렌글리콜), 석유 탄화수소, 예컨대 광유 및 바셀린, 및 물도 현탁 제제에 사용될 수 있다.

<79> 비측 투여용 제약 제제 및 의약품 적절한 용매(들) 및 임의로는 다른 화합물, 예컨대 (이에 제한되지 않음) 안정화제, 항-미생물제, 항-산화제, pH 개질제, 계면활성제, 생체이용률 개질제 및 이들의 조합물을 함유하는 분무제 또는 에어로졸제일 수 있다. 에어로졸 제제를 위한 추진제는 압축 공기, 질소, 이산화탄소, 또는 탄화수소 기체의 저비점 용매를 포함할 수 있다.

<80> 일반적으로, 주사가능한 투여 형태는 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 제조될 수 있는 수성 현탁액제 또는 오일 현탁액제를 포함한다. 주사가능한 형태는 용액 상일 수도 있고, 또는 용매 또는 희석제로 제조되는 현탁액제의 형태일 수도 있다. 허용가능한 용매 또는 비히클은 멸균수, 링거(Ringer's) 용액, 또는 등장성 수성 염수 용액을 포함한다. 별법으로, 멸균 오일이 용매 또는 현탁화제로 사용될 수 있다. 바람직하게는, 오일 또는 지방산은 비-휘발성이고, 천연 또는 합성 오일, 지방산, 모노-, 디- 또는 트리-글리세리드를 포함한다.

<81> 주사용 제약 제제 및/또는 의약품 상기한 바와 같은 적절한 용액을 사용하여 재구성하기에 적합한 산제일 수 있다. 이의 예는 냉동 건조, 회전 건조 또는 분무 건조된 분말, 비결정질 분말, 과립, 침전물 또는 미립자를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 주사용 제제는 임의로 안정화제, pH 개질제, 계면활성제, 생체이용률 개질제 및 이들의 조합물을 함유할 수 있다.

<82> 직장 투여용 제약 제제 및 의약품 장, S자 결장 및/또는 직장에서 화합물을 방출하기 위한 좌제, 연고제, 관장제, 정제 또는 크림제의 형태일 수 있다. 직장 좌제는 1종 이상의 본 발명의 화합물, 또는 상기 화합물의 제약상 허용가능한 염 또는 호변이성질체를 통상의 저장 온도에서는 고상으로 존재하고 직장 내와 같은 체내의 약물 방출에 적합한 온도에서는 액상으로 존재하는 허용가능한 비히클, 예를 들어 코코아 버터 또는 폴리에틸렌 글리콜과 혼합하여 제조된다. 오일은 연질 젤라틴 유형의 제제 및 좌제를 제조하는데 사용될 수도 있다. 물, 염수, 수성 텍스트로스 및 관련 당 용액, 및 글리세롤은, 현탁화제, 예컨대 펙틴, 카르보머, 메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스 또는 카르복시메틸 셀룰로스, 및 또한 완충제 및 보존제도 함유할 수 있는 현탁 제제의 제조에 사용될 수 있다.

<83> 상기한 대표적인 투여 형태에 추가하여, 제약상 허용가능한 부형제 및 담체는 일반적으로 당업자에게 공지되어 있고, 이에 따라 본 발명에 포함된다. 이러한 부형제 및 담체는 예를 들어 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., New Jersey (1991)]에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 어떠한 목적으로도 완전하게 본원에 기술되어 있는 것과 마찬가지로 그 전문이 본원에 참고로 포함된다.

<84> 본 발명의 제제는 상기한 바와 같이 속효형, 급속 방출형, 지속형 및 서방형이 되도록 디자인될 수 있다. 따라서, 상기 제약 제제는 또한 제어 방출형 또는 저속 방출형이도록 제제화될 수 있다.

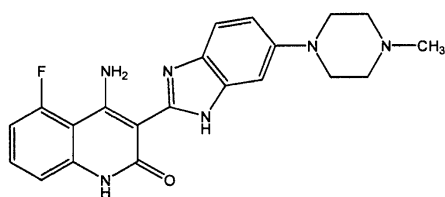
<85> 본 발명의 조성물은 또한 예를 들어 미셀 또는 리포솜, 또는 일부 다른 캡슐화 형태를 포함할 수도 있고, 또는 연장된 저장 및/또는 전달 효과를 제공하기 위한 연장 방출 형태로 투여될 수도 있다. 따라서, 상기 제약 제제 및 의약품 펠렛 또는 실린더로 압착되어 저장부(depot) 주사 또는 이식물, 예컨대 스텐트로서 근육내 또는 피하

이식될 수 있다. 이러한 이식물은 공지의 불활성 물질, 예컨대 실리콘 및 생분해성 중합체를 사용할 수 있다.

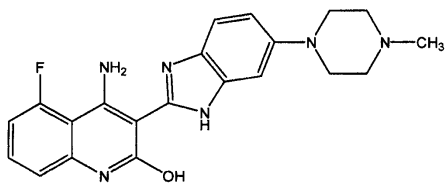
- <86> 구체적 투여량은 질환의 상태, 대상체의 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 성별 및 식이요법, 투여 간격, 투여 경로, 배출률, 및 약물 조합에 따라 조정될 수 있다. 유효량을 함유하는 임의의 상기 투여 형태는 통상의 실험 범위 내에서 명백하며, 이에 따라 본 발명의 범위 내에 속한다.
- <87> 치료 유효 투여량은 투여 경로 및 투여 형태에 따라 달라질 수 있다. 본 발명의 바람직한 화합물(들)은 높은 치료 지수를 나타내는 제제이다. 치료 지수는 LD₅₀과 ED₅₀ 사이의 비율로 표현될 수 있는, 독성과 치료 효과 사이의 투여량 비율이다. LD₅₀은 집단의 50%에게 치명적인 투여량이고, ED₅₀은 집단의 50%에서 치료 유효한 투여량이다. LD₅₀ 및 ED₅₀은 동물 세포 배양물 또는 실험 동물에서 표준 제약 절차에 의해 결정된다.
- <88> 본 발명의 내용에서, "치료하는" 및 "치료"는 장애 또는 질환과 관련이 있는 증상의 경감, 또는 해당 증상의 추가의 진행 또는 악화의 억제, 정지 또는 역전, 또는 질환 또는 장애의 방지 또는 예방을 의미한다. 추가로, 본 발명의 내용에서, "치료하는" 및 "치료"는 피부, 피하 또는 내장 흑색종의 성장 억제, 피부, 피하 또는 내장 흑색종의 크기 감소, 피부, 피하 또는 내장 병변의 수 감소, 또는 피부, 피하 또는 내장 병변의 크기 감소를 의미한다. 추가로, 본 발명의 내용에서, "치료하는" 및 "치료"는 질환 반응의 생체마커 변경, 예를 들어 흑색종 억제 활성 단백질의 순환 수준의 감소를 의미한다. 예를 들어, 흑색종 환자를 치료하는 경우에서의 성공적인 치료는 흑색종(들) 또는 질환에 걸린 조직에 영양을 공급하는 모세혈관의 증식 감소, 흑색종, 모세혈관의 증식 또는 질환에 걸린 조직에 의한 암성 성장과 관련이 있는 증상의 경감, 모세혈관 증식의 억제 또는 정지, 또는 흑색종의 진행 또는 흑색종 세포의 성장 또는 전이에 있어서의 억제 또는 정지, 또는 흑색종의 퇴행 또는 부분적 이거나 완전한 차도, 질환 안정화, 또는 흑색종 환자의 전체 생존율 증가를 포함할 수 있다.
- <89> 또한, 치료는 본 발명의 제약 제제를 다른 요법과 조합하여 투여하는 것을 포함할 수도 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물 및 제약 제제를 수술 절차 및/또는 방사선 요법의 실시 이전, 실시 동안 또는 실시 이후에 투여할 수 있다. 본 발명의 화합물은 흑색종 치료에 사용되는 다른 항암 약물과 함께 투여될 수도 있다. 항암 약물이란, 종양학자 또는 다른 전문의와 같은 당업자가 악성종양 및 암성 성장의 치료에 사용하는 작용제를 의미한다. 따라서, 항암 약물 및 본원에 개시된 화합물 (예를 들어, 화학식 I, IA, IB 및 IC의 화합물)은 동시에, 별도로 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 적절한 조합물 및 투약법은 종양학 및 의학 분야의 당업자가 결정할 수 있다.
- <90> 본 발명의 화합물 및 제제는 항암 약물, 예컨대 타산, 니트로소우레아, 백금 화합물, 알킬화제, 토포이소머라제 I 및 II 억제제, 빈카 알칼로이드, 항암 항생제; 인터페론, 인터루킨-2, 및 방사선 치료와 조합되어 사용될 때 부가적이거나 그보다 높은 효과 또는 상승작용 효과를 나타냈거나 나타낼 것으로 예상되는 경우에 그러한 조합 요법에 사용하기에 특히 적합하다. 따라서, 한 측면에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물 및 그의 호변이성질체, 염 및/또는 이들의 혼합물을 포함하는 제약 제제를 항암 약물과 조합하여 제공한다. 상기 조합물은 동시, 별도로 또는 순차적 투여를 위한 키트에 별도로 또는 함께 패키징될 수 있다. 본 발명은 또한 이러한 제제 및 의학의 제조에 있어서 상기 화합물, 호변이성질체, 염 및/또는 혼합물의 용도를 제공한다.
- <91> 또다른 측면에서, 본 발명은 전이된 흑색종의 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 그러한 치료가 필요한 대상체에게 다카르바진 (DITC-DOME), 테모졸로미드 (테모다르(TEMODAR)), 카르무스틴 (BCNU, BICNU), 로무스틴 (CCNU, CEENU), 포테무스틴, 파클리탁셀 (탁솔(TAXOL)), 도세탁셀 (탁소테레(TAXOTERE)), 빈블라스틴 (벨반(VELBAN)), 이리노테칸 (캄프토사르(CAMPTOSAR)), 탈리도미드 (탈리도미드(THALIDOMID)), 스트렙토조신 (자노사르(ZANOSAR)), 닥티노마이신 (코스메겐(COSMEGEN)), 메클로레타민 (무스타르겐(MUSTARGEN)), 시스플라틴 (플라티놀-에이큐(PLATINOL-AQ)), 카르보플라틴 (파라플라틴(PARAPLATIN)), 이마타닙 메실레이트 (글리벡(GLEEVEC)), 소라페닙 (BAY43-9006, 넥사바르(NEXAVAR)), 수텐트 (SU1248, 아바스틴(AVASTIN)) 또는 에를로티닙 (타르세바(TARCEVA))으로부터 선택된 1종 이상의 항암 약물을 투여하는 것을 포함한다. 본 발명의 화합물은 복합화학요법, 예컨대 다르트마우쓰 요법, CVD (시스플라틴, 빈블라스틴 및 다카르바진) 및 BOLD (블레오마이신, 빈크리스틴, 로무스틴 및 다카르바진)에 추가될 수 있다. 본원에 개시된 화합물과의 조합 사용에 적합한 다른 화학요법제는 문헌 [Lens and Eisen, Expert Opin Pharmacother, 2003 4(12): 2205-2211]에서 논의된 것들을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 항암 약물은 인터페론, 예컨대 (이에 제한되지 않음) 인터페론 알파-2a, 인터페론 알파-2b (인트론-에이(INTRON-A)), PEG화 인터페론, 예컨대 PEG화 인터페론 알파-2b로부터 선택된다. 인터루킨, 예컨대 인터루킨-2 (프로루킨(Proleukin))가 본원에 개시된 화합물과 조합하여 사용될 수도 있다.

<92> 본 발명의 화합물은 다양한 대상체를 치료하는데 사용될 수 있다. 적합한 대상체는 포유동물 및 인간과 같은 동물을 포함한다. 적합한 포유동물은 영장류, 예컨대 (이에 제한되지 않음) 여우원숭이, 유인원 및 원숭이; 설치류, 예컨대 래트, 마우스 및 기니아 피그; 토끼 및 산토끼; 젓소; 말; 돼지; 염소; 양; 주머니쥐; 및 육식 동물, 예컨대 고양이, 개 및 곰을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 몇몇 실시양태에서, 대상체 또는 환자는 인간이다. 다른 실시양태에서, 대상체 또는 환자는 설치류, 예컨대 마우스 또는 래트이다. 몇몇 실시양태에서, 대상체 또는 환자는 인간 이외의 동물이고, 이러한 일부 실시양태에서는 상기 대상체 또는 환자가 인간 이외의 포유동물이다.

<93> 본 발명에서 사용되는 유기 화합물은 호변이성질체화 현상을 나타낼 수 있음을 이해해야 한다. 본 명세서에서는 가능한 호변이성질체 형태 중 하나만을 화학 구조로서 나타냈을 수 있지만, 본 발명이 도시한 구조의 임의의 호변이성질체 형태를 포함한다는 것을 이해해야 한다. 예를 들어, 화학식 IA는 한 호변이성질체, 호변이성질체 Ia로 다음과 같이 표시된다:



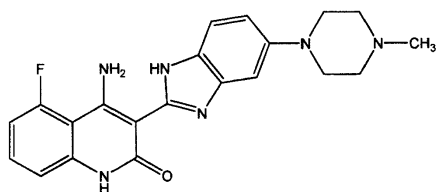
I



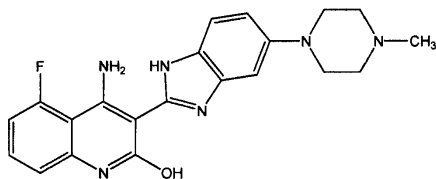
Ia

<94>

<95> 화학식 IA의 다른 호변이성질체, 호변이성질체 Ib 및 호변이성질체 Ic는 다음과 같이 표시된다:



Ib



Ic

<96>

<97> 이와 같이 일반적으로 기재된 본 발명은 하기 실시예에 대한 언급을 통해 보다 쉽게 이해될 것이며, 이것은 예시를 위해 제공된 것이지만 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니다.

실시예

<98> 본 명세서 전반에 걸쳐서 화학 용어와 관련하여 하기 약어가 사용된다:

<99> ATP: 아데노신 트리포스페이트

<100> Boc: N-tert-부톡시카르보닐

<101> BSA: 소 혈청 알부민

- <102> DMSO: 디메틸설폭시드
- <103> DTT: DL-디티오프레이톨
- <104> DMEM: 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modification of Eagle's medium)
- <105> ED₅₀: 집단의 50%에서 치료 유효한 투여량
- <106> EDTA: 에틸렌 디아민 테트라아세트산
- <107> EGTA: 에틸렌 글리콜 테트라아세트산
- <108> EtOH: 에탄올
- <109> FBS: 태아 소 혈청
- <110> Hepes: 4-(2-히드록시에틸)-1-피페라진에탄술폰산
- <111> HPLC: 고압 액체 크로마토그래피
- <112> IC₅₀ 값: 측정된 활성에서 50% 감소를 일으키는 억제제의 농도
- <113> KHMS: 칼륨 비스(트리메틸실릴)아미드
- <114> LC/MS: 액체 크로마토그래피/질량 분광법
- <115> MOPS: 3-(N-모르폴리노)-프로판술폰산
- <116> PBS: 인산염 완충 염수
- <117> PMSF: 페닐메탄설폰닐플루오라이드
- <118> RIPA: 예를 들어 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 5 µg/mL 아프로티닌 (Aprotinin), 5 µg/mL 류페틴(Leupeptin), 1% 트리톤(Triton) X-100, 1% 나트륨 데옥시콜레이트, 0.1% SDS 를 함유하는 세포 용해 완충제
- <119> SDS: 나트륨 도데실 황페이트
- <120> TBME: tert-부틸 메틸 에테르
- <121> THF: 테트라히드로푸란
- <122> Tris: 2-아미노-2-(히드록시메틸)프로판-1,3-디올

<123> **화합물의 정제 및 특징규명**

<124> 본 발명의 화합물을 2690 분리 모듈 (미국 매사추세츠주 소재의 밀포드(Milford))의 워터스 밀레니엄(Waters Millenium) 크로마토그래피 시스템을 사용한 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 특징규명하였다. 분석용 컬럼은 알테크(Alltech) (미국 일리노이주 디어필드 소재)의 알티마(Alltima) C-18 역상, 4.6×250 mm이었다. 전형적으로는 5% 아세토니트릴/95% 물로 출발하여 40분의 기간에 걸쳐 100% 아세토니트릴로 진행하는 구배 용출을 이용하였다. 모든 용매는 0.1% 트리플루오로아세트산 (TFA)을 함유하였다. 220 nm 또는 254 nm에서의 자외선 광 (UV) 흡수로 화합물을 검출하였다. HPLC 용매는 버딕 앤드 잭슨(Burdick and Jackson) (미국 미시간주 무스케간 소재) 또는 피셔 사이언티픽(Fisher Scientific) (미국 펜실바니아주 피츠버그 소재) 제품이었다. 몇몇 예에서, 유리 또는 플라스틱 배킹(backed) 실리카겔 플레이트, 예를 들어 베이커-플렉스 (Baker-Flex) 실리카겔 1B2-F 가요성 시트를 사용한 박층 크로마토그래피 (TLC)로 순도를 평가하였다. TLC 결과는 자외선 광하에서 가시적으로 쉽게 검출하거나 널리 공지된 요오드 증기 및 기타 다양한 염색 기술을 이용하여 쉽게 검출하였다.

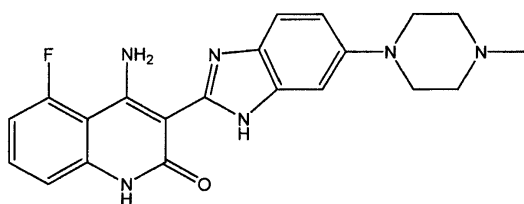
<125> 질량 분광 분석은 하기하는 2종의 LCMS 기기 중 하나에서 수행하였다: 워터스 시스템 (알리안스(Alliance) HT HPLC 및 마이크로매스(Micromass) ZQ 질량 분광기; 컬럼: 이클립스(Eclipse) XDB-C18, 2.1×50 mm; 용매 시스템: 0.05% TFA를 함유하는 물 중 5%→95% 아세토니트릴; 유속 0.8 mL/분; 분자량 범위 150 내지 850; 콘 전압(Cone Voltage) 20 V; 컬럼 온도 40℃) 또는 휴렛 팩커드(Hewlett Packard) 시스템 (시리즈 1100 HPLC; 컬럼: 이클립스 XDB-C18, 2.1×50 mm; 용매 시스템: 0.05% TFA를 함유하는 물 중 1%→95% 아세토니트릴; 유

속 0.4 mL/분; 분자량 범위 150 내지 850; 콘 전압 50 V; 컬럼 온도 30℃). 모든 질량은 양성자화된 모(parent) 이온의 것으로 보고하였다.

<126> GCMS 분석은 휴렛 팩커드 기기 (질량 선택적 검출기(Mass Selective Detector) 5973이 장착된 HP6890 시리즈 기체 크로마토그래프; 주입기 부피: 1 μ L; 초기 컬럼 온도: 50℃; 최종 컬럼 온도: 250℃; 램프 시간: 20분; 기체 유속: 1 mL/분; 컬럼: 5% 페닐 메틸 실록산, 모델 #HP 190915-443, 치수: 30.0 m \times 25 μ m \times 0.25 μ m)에서 수행하였다.

<127> 정제용 분리는 플래쉬(Flash) 40 크로마토그래피 시스템 및 KP-Sil, 60A (미국 버지니아주 살러츠빌 소재의 바이오티지(Biotage)) 또는 C-18 역상 컬럼을 사용한 HPLC로 수행하였다. 플래쉬 40 바이오티지 시스템에 사용한 전형적인 용매는 디클로로메탄, 메탄올, 에틸 아세테이트, 헥산 및 트리에틸아민이었다. 역상 HPLC에 사용한 전형적인 용매는 0.1% 트리플루오로아세트산을 함유하는 다양한 농도의 아세토니트릴 및 물이었다.

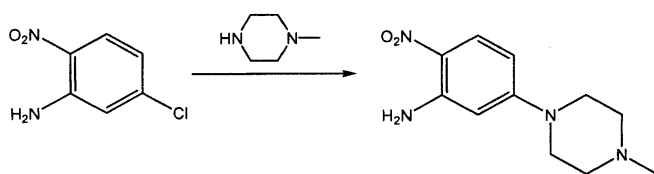
<128> 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-1H-퀴놀린-2-온의 합성



<129>

<130> A. 5-(4-메틸-피페라진-1-일)-2-니트로아닐린의 합성

<131> 절차 A



<132>

<133> 5-클로로-2-니트로아닐린 (500 g, 2.898 mol) 및 1-메틸 피페라진 (871 g, 8.693 mol)을 응축기가 장착된 2000 mL 플라스크에 넣고, N₂로 퍼징(purging)하였다. 상기 플라스크를 100℃의 오일조에 넣고, HPLC로 결정했을 때 5-클로로-2-니트로아닐린이 완전하게 반응할 때까지 (전형적으로는 밤새) 가열하였다. HPLC로 5-클로로-2-니트로아닐린이 사라진 것을 확인한 후, 상기 반응 혼합물 (여전히 따뜻함)을 실온수 2500 mL에 직접 부으면서 기계적으로 교반하였다. 생성된 혼합물을 실온에 도달할 때까지 교반한 후에 여과하였다. 이로써 수득된 황색 고체를 물 1000 mL에 첨가하고, 30분 동안 교반하였다. 생성된 혼합물을 여과하고, 생성된 고체를 TBME (500 mL, 2회)로 세척한 후에 고무 막을 사용하여 진공하에 1시간 동안 건조시켰다. 생성된 고체를 건조 트레이로 옮기고 50℃의 진공 오븐에서 일정 중량으로 건조시켜 표제 화합물 670 g (97.8%)을 황색 분말로써 수득하였다.

<134> 절차 B

<135> 5-클로로-2-니트로아닐린 (308.2 g, 1.79 mol)을 오버헤드 교반기, 응축기, 기체 유입구, 첨가 깔때기 및 온도계 프로브가 장착된 5000 mL의 4구 둥근 바닥 플라스크에 첨가하였다. 이어서, 상기 플라스크를 N₂로 퍼징하였다. 1-메틸피페라진 (758.1 g, 840 mL, 7.57 mol) 및 200 프루프 에탄올 (508 mL)을 상기 반응 플라스크에 첨가하면서 교반하였다. 상기 플라스크를 다시 N₂로 퍼징하고, 반응물을 N₂하에 유지하였다. 상기 플라스크를 가열 맨틀에서 97℃ (±5℃)의 내부 온도로 가열하고, HPLC로 결정했을 때 반응이 완료될 때까지 (전형적으로는 약 40시간) 이 온도에서 유지하였다. 반응 완료 후에 가열을 중단하고, 반응물을 약 20℃ 내지 25℃의 내부 온도로 냉각시키며 교반하고, 반응물을 2시간 내지 3시간 동안 교반하였다. 이미 침전이 일어난 것이 아니라면, 5-(4-메틸-피페라진-1-일)-2-니트로아닐린의 시드(seed) 결정 (0.20 g, 0.85 mmol)을 상기 반응 혼합물에 첨가하였다. 물 (2,450 mL)을 약 1시간의 기간에 걸쳐 상기 반응 혼합물에 첨가하면서, 내부 온도를 약 20℃ 내지 30℃ 범위의 온도로 유지하였다. 물 첨가가 완료된 후, 생성된 혼합물을 약 1시간 동안 20℃ 내지 30℃의 온도에서 교반하였다. 이어서, 생성된 혼합물을 여과하고, 플라스크 및 필터 케이크를 물 (3 \times 2.56 L)로 세척하였다. 금빛 황색 고체 생성물을 약 50℃의 진공 오븐에서 진공하에 416 g (98.6% 수율)의 일정 중량으로 건조시

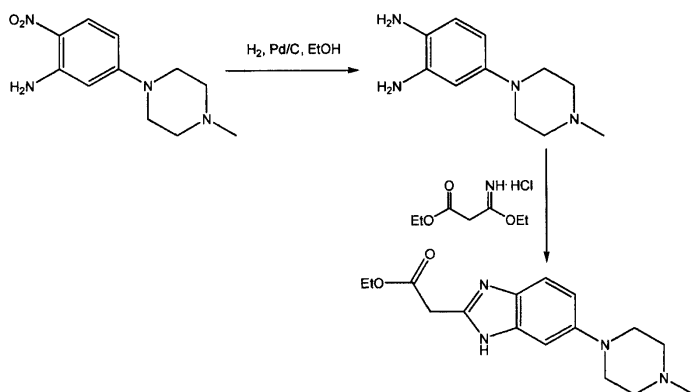
켰다.

<136> 절차 C

<137> 5-클로로-2-니트로아닐린 (401 g, 2.32 mol)을 오버헤드 교반기, 응축기, 기체 유입구, 첨가 깔때기 및 온도계 프로브가 장착된 12 L의 4구 둥근 바닥 플라스크에 첨가하였다. 이어서, 상기 플라스크를 N₂로 퍼징하였다. 1-메틸피페라진 (977 g, 1.08 L, 9.75 mol) 및 100% 에탄올 (650 mL)을 상기 반응 플라스크에 첨가하면서 교반하였다. 상기 플라스크를 다시 N₂로 퍼징하고, 반응물을 N₂하에 유지하였다. 상기 플라스크를 가열 맨틀에서 97℃ (±5℃)의 내부 온도로 가열하고, HPLC로 결정했을 때 반응이 완료될 때까지 (전형적으로는 약 40시간) 이 온도에서 유지하였다. 반응 완료 후에 가열을 중단하고, 반응물을 약 80℃의 내부 온도로 냉각시키며 교반하고, 상기 혼합물에 물 (3.15 L)을 1시간의 기간에 걸쳐 첨가 깔때기를 통해 첨가하면서, 내부 온도는 82℃ (±3℃)로 유지하였다. 물 첨가가 완료된 후, 가열을 중단하고 상기 반응 혼합물이 4시간 이상의 기간 동안 20℃ 내지 25℃의 내부 온도로 냉각되도록 하였다. 이어서, 반응 혼합물을 20℃ 내지 30℃의 내부 온도로 1시간 더 교반하였다. 이어서, 생성된 혼합물을 여과하고, 플라스크 및 필터 케이크를 물 (1×1 L), 50% 에탄올 (1×1 L) 및 95% 에탄올 (1×1 L)로 세척하였다. 금빛 황색 고체 생성물을 건조 팬에 넣고 약 50℃의 진공 오븐에서 진공하에 546 g (99% 수율)의 일정 중량으로 건조시켰다.

<138> B. [6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤조이미다졸-2-일]-아세트산 에틸 에스테르의 합성

<139> 절차 A



<140>

<141> 5000 mL의 4구 플라스크에 교반기, 온도계, 응축기 및 기체 유입구/배출구를 장착하였다. 상기 장착된 플라스크에 5-(4-메틸-피페라진-1-일)-2-니트로아닐린 265.7 g (1.12 mol, 1.0 당량) 및 200 프루프 EtOH 2125 mL를 충전하였다. 생성된 용액을 15분 동안 N₂로 퍼징하였다. 다음으로, 5% Pd/C (50% H₂O w/w) 20.0 g을 첨가하였다. 상기 반응물을 40℃ 내지 50℃ (내부 온도)에서 격렬하게 교반하면서, H₂를 상기 혼합물에 버블링하였다. 반응물을 5-(4-메틸-피페라진-1-일)-2-니트로아닐린이 사라졌는지에 대하여 HPLC로 매 시간마다 모니터링하였다. 전형적인 반응 시간은 6시간이었다.

<142> 모든 5-(4-메틸-피페라진-1-일)-2-니트로아닐린이 반응물로부터 사라진 후, 상기 용액을 15분 동안 N₂로 퍼징하였다. 다음으로, 에틸 3-에톡시-3-이미노프로판오에이트 히드로클로라이드 440.0 g (2.25 mol)을 고체로서 첨가하였다. 상기 반응물을 반응 완료시까지 40℃ 내지 50℃ (내부 온도)에서 교반하였다. HPLC에 의해 디아미노 화합물이 사라졌는지를 확인하여 반응을 모니터링하였다. 전형적인 반응 시간은 1시간 내지 2시간이었다. 반응 완료 후, 이것을 실온으로 냉각시키고 셀라이트 여과 물질 패드를 통해 여과하였다. 셀라이트 여과 물질을 무수 EtOH (2×250 mL)로 세척하고, 여액을 감압하에 농축시켜 농후한 갈색/오렌지색 오일을 수득하였다. 생성된 오일을 0.37% HCl 용액 850 mL 중에 취하였다. 이어서, 고체 NaOH (25 g)를 한꺼번에 첨가하였고, 침전물이 형성되었다. 생성된 혼합물을 1시간 동안 교반한 후에 여과하였다. 고체를 H₂O (2×400 mL)로 세척하고, 50℃의 진공 오븐에서 건조시켜 [6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤조이미다졸-2-일]-아세트산 에틸 에스테르 251.7 g (74.1%)을 얻은 황색 분말로서 수득하였다.

<143> 절차 B

<144> 5000 mL의 4구 재킷(jacketed) 플라스크에 기계적 교반기, 응축기, 온도 프로브, 기체 유입구 및 오일 버블러를

장착하였다. 상기 장착된 플라스크에 5-(4-메틸-피페라진-1-일)-2-니트로아닐린 300 g (1.27 mol) 및 200 프루프 EtOH 2400 mL를 충전하였다 (상기 반응은 95% 에탄올을 사용하여 수행될 수도 있고, 그렇게 수행하였으며, 이 반응에는 200 프루프 에탄올의 사용이 필요치 않았음). 생성된 용액을 교반하고, 15분 동안 N₂로 퍼징하였다. 다음으로, 5% Pd/C (50% H₂O w/w) 22.7 g을 반응 플라스크에 첨가하였다. 상기 반응 용기를 15분 동안 N₂로 퍼징하였다. N₂로 퍼징한 후에, 느리지만 일정한 유속의 H₂를 상기 플라스크에 유지시켜서 상기 반응 용기를 H₂로 퍼징하였다. HPLC로 결정했을 때 5-(4-메틸-피페라진-1-일)-2-니트로아닐린이 완전하게 소모될 때까지 상기 반응물을 45℃ 내지 55℃ (내부 온도)로 교반하면서 H₂를 상기 혼합물에 버블링하였다. 전형적인 반응 시간은 6시간이었다.

<145>

모든 5-(4-메틸-피페라진-1-일)-2-니트로아닐린이 상기 반응물로부터 사라진 후, 상기 용액을 15분 동안 N₂로 퍼징하였다. 디아민 중간체는 공기에 민감하기 때문에 공기에 노출되지 않도록 주의하였다. 에틸 3-에톡시-3-이미노프로파노에이트 히드록로라이드 500 g (2.56 mol)을 약 30분의 기간에 걸쳐 상기 반응 혼합물에 첨가하였다. HPLC로 결정했을 때 디아민이 완전하게 소모될 때까지 상기 반응물을 45℃ 내지 55℃ (내부 온도)에서 N₂하에 교반하였다. 전형적인 반응 시간은 약 2시간이었다. 반응 완료 후, 상기 반응물을 따뜻하게 유지하면서 셀라이트 패드로 여과하였다. 이어서, 상기 반응 플라스크 및 셀라이트를 200 프루프 EtOH (3×285 mL)로 세척하였다. 여액을 5000 mL 플라스크에서 합하고, 에탄올 약 3300 mL를 진공하에 제거하여 오렌지색 오일을 수득하였다. 생성된 오일에 물 (530 mL)을 첨가한 후에 1 M HCL (350 mL)을 첨가하고, 생성된 혼합물을 교반하였다. 생성된 용액을 격렬하게 교반하면서 30% NaOH (200 mL)를 약 20분의 기간에 걸쳐 첨가하며 내부 온도는 약 25℃ 내지 30℃로 유지하고, pH는 9 내지 10이 되도록 하였다. 생성된 현탁액을 약 4시간 동안 교반하면서, 내부 온도를 약 20℃ 내지 25℃로 유지하였다. 생성된 혼합물을 여과하고, 필터 케이크를 H₂O (3×300 mL)로 세척하였다. 수집된 고체를 50℃의 진공 오븐에서 진공하에 일정 중량으로 건조시켜 [6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤조이미다졸-2-일]-아세트산 에틸 에스테르 345.9 g (90.1%)을 얻은 황색 분말로서 수득하였다. 별법의 후처리 절차에서는 여액을 합하고 에탄올을 약 90 이상%이 제거될 때까지 진공하에 제거하였다. 이어서, 생성된 오일에 중성 pH의 물을 첨가하고, 용액을 약 0℃로 냉각시켰다. 이어서, 수성 20% NaOH 용액을 서서히 첨가하면서 신속하게 교반하여 pH가 최대 9.2 (pH 미터로 측정함)가 되도록 하였다. 이어서, 생성된 혼합물을 여과하고 상기한 바와 같이 건조시켰다. 별법의 후처리 절차를 통해 밝은 황갈색 내지 밝은 황색의 생성물이 97%나 되는 높은 수율로 수득되었다.

<146>

[6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤조이미다졸-2-일]-아세트산 에틸 에스테르의 물 함량 감소 방법

<147>

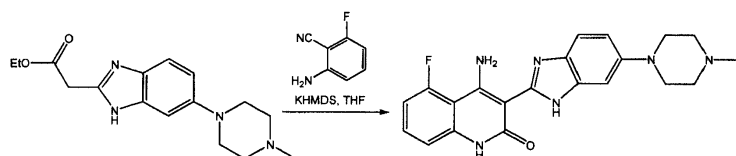
미리 후처리하고 건조시켜 물 함량이 약 8% 내지 9% H₂O가 되도록 한 [6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤조이미다졸-2-일]-아세트산 에틸 에스테르 (120.7 g)를 2000 mL 둥근 바닥 플라스크에 넣고, 무수 에탄올 (500 mL) 중에 용해하였다. 상기 호박색 용액을 회전 증발기를 사용하고 가열하면서 모든 용매가 제거될 때까지 농후한 오일로 농축시켰다. 상기 절차를 2회 더 반복하였다. 이로써 수득된 농후한 오일을 상기 플라스크에 남겨 두고 50℃로 가열된 진공 오븐에 밤새 넣어 두었다. 칼 피셔(Karl Fischer) 분석 결과는 물 함량이 5.25%인 것을 나타냈다. 이러한 방법으로 물 함량이 낮아져서, 하기 실시예 절차에서의 수율이 증가되었다. 이러한 건조 공정에서는 에탄올 대신 다른 용매, 예컨대 톨루엔 및 THF를 사용할 수 있다.

<148>

C. 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤조이미다졸-2-일]-1H-퀴놀린-2-온의 합성

<149>

절차 A



<150>

<151>

[6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤조이미다졸-2-일]-아세트산 에틸 에스테르 (250 g, 820 mmol) (상기한 바와 같이 에탄올로 건조시킴)를 응축기, 기계적 교반기, 온도 프로브가 장착된 5000 mL 플라스크에서 THF (3800 mL) 중에 용해하고 아르곤으로 퍼징하였다. 2-아미노-6-플루오로-벤조니트릴 (95.3 g, 700 mmol)을 상기 용액에 첨가하였고, 내부 온도는 40℃로 상승하였다. 모든 고체가 용해되고 용액 온도가 40℃에 이르르면, 고체 KHMDS (376.2 g, 1890 mmol)를 5분의 기간에 걸쳐 첨가하였다. 칼륨 염기의 첨가가 완료되었을 때 불균일 황색 용액

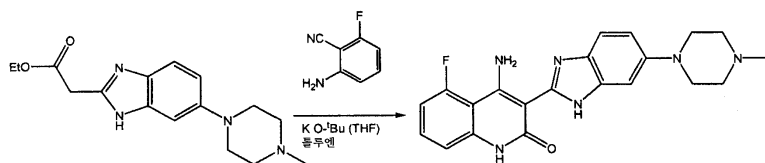
이 수득되었고, 내부 온도는 62℃로 상승하였다. 60분의 기간 후에 내부 온도는 다시 40℃로 감소하였고, HPLC에 의해 반응이 완료된 것으로 결정되었다 (출발 물질 또는 고리화되지 않은 중간체가 존재하지 않음). 이어서, 상기 농후한 반응 혼합물을 H₂O (6000 mL)에 붓고 생성된 혼합물을 실온 도달시까지 교반하여 켄칭(quenching)시켰다. 이어서, 혼합물을 여과하고, 필터 패드를 물 (1000 mL, 2×)로 세척하였다. 밝은 황색 고체를 건조 트레이에 넣고, 50℃의 진공 오븐에서 밤새 건조시켜 원하는 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-1H-퀴놀린-2-온을 155.3 g (47.9%) 수득하였다.

<152> 절차 B

<153> 5000 mL의 4구 재킷 플라스크에 증류 장치, 온도 프로브, N₂ 기체 유입구, 첨가 깔때기 및 기계적 교반기를 장착하였다. [6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-아세트산 에틸 에스테르 (173.0 g, 570 mmol)를 상기 반응기에 충전하고, 반응기를 15분 동안 N₂로 퍼징하였다. 이어서, 무수 THF (2600 mL)를 상기 플라스크에 충전하면서 교반하였다. 모든 고체가 용해된 후, 필요하다면 가열하면서 용매를 증류 (진공 또는 대기압 (더 높은 온도를 사용하면 물 제거를 도움))로 제거하였다. 용매 1000 mL가 제거된 후에 증류를 멈추고, 반응물을 N₂로 퍼징하였다. 이어서, 무수 THF 1000 mL를 상기 반응 용기에 첨가하였고, 모든 고체가 용해되면 용매가 1000 mL 더 제거될 때까지 증류 (진공 또는 대기압)를 다시 수행하였다. 무수 THF를 첨가하고 용매를 제거하는 과정을 4회 이상 반복하였고 (처음 3회의 증류시에는 용매의 겨우 40%만이 제거되었으나, 4번째 증류시에는 용매의 60%가 제거됨), 이후에는 샘플 1 mL를 취하여 물 함량 측정을 위한 칼 피셔 분석을 실시하였다. 상기 분석에서 샘플이 물을 0.20% 미만으로 함유하는 것으로 나타나면, 다음 단락에 기재한 바와 같이 반응을 계속하였다. 그러나, 상기 분석에서 물이 0.20%를 초과하는 것으로 나타나면, 물 함량 0.20% 미만이 달성될 때까지 상기한 건조 과정을 계속하였다.

<154> 이전 단락에 기재한 절차를 이용하여 물 함량 약 0.20% 이하가 달성된 후에 증류 장치를 환류 응축기로 교체하고, 반응물을 2-아미노-6-플루오로-벤조니트릴 (66.2 g, 470 mmol) (일부 절차에서는 0.95 당량을 사용함)과 함께 충전하였다. 이어서, 내부 온도가 38℃ 내지 42℃가 될 때까지 반응물을 가열하였다. 내부 온도가 38℃ 내지 42℃에 이르면 KHMDS 용액 (1313 g, 1.32 mol, THF 중 20% KHMDS)을 5분의 기간에 걸쳐 첨가 깔때기를 통해 상기 반응물에 첨가하였고, 이러한 첨가 동안에 내부 온도는 약 38℃ 내지 50℃로 유지하였다. 칼륨 염기의 첨가가 완료되면, 반응물을 3.5시간 내지 4.5시간 동안 교반 (일부 예에서는 30분 내지 60분 동안 교반하였고, 이시간 이내에 반응이 완료될 수 있음)하면서, 내부 온도를 38℃ 내지 42℃로 유지하였다. 이어서, 반응 샘플을 취하여 HPLC로 분석하였다. 반응이 완료되지 않은 경우에는 추가의 KHMDS 용액을 5분의 기간에 걸쳐 상기 플라스크에 첨가하고, 반응물을 38℃ 내지 42℃에서 45분 내지 60분 동안 교반하였다 (KHMDS 용액의 첨가량은 다음과 같이 결정하였음: IPC 비율이 < 3.50인 경우에는 125 mL를 첨가하고, 10.0 ≥ IPC 비율 ≥ 3.50인 경우에는 56 mL를 첨가하고, 20.0 ≥ IPC 비율 ≥ 10인 경우에는 30 mL를 첨가함. IPC 비율은 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-1H-퀴놀린-2-온에 상응하는 면적을 고리화되지 않은 중간체에 상응하는 면적으로 나눈 값임). 일단 반응이 완료 (IPC 비율 > 20)되면, 상기 반응기를 25℃ 내지 30℃의 내부 온도로 냉각시키고, 상기 반응기에 물 (350 mL)을 15분의 기간에 걸쳐 충전하면서, 내부 온도를 25℃ 내지 35℃로 유지하였다 (한 별법의 방법에서는, 반응을 40℃에서 수행하고, 물을 5분 이내에 첨가함. 보다 신속한 켄칭은 시간에 따라 형성되는 불순물의 양을 감소시킴). 이어서, 환류 응축기를 증류 장치로 교체하고, 필요에 따라서는 가열을 이용하면서 용매를 증류 (진공 또는 대기압)로 제거하였다. 용매 1500 mL가 제거된 후에 증류를 중단하고, 반응물을 N₂로 퍼징하였다. 이어서, 물 (1660 mL)을 상기 반응 플라스크에 첨가하면서, 내부 온도를 20℃ 내지 30℃로 유지하였다. 이어서, 반응 혼합물을 20℃ 내지 30℃에서 30분 동안 교반한 후에 5℃ 내지 10℃의 내부 온도가 되도록 냉각한 후에 1시간 동안 교반하였다. 생성된 현탁액을 여과하고, 플라스크 및 필터 케이크를 물 (3×650 mL)로 세척하였다. 이로써 수득된 고체를 50℃의 진공 오븐에서 진공하에 일정 중량으로 건조시켜 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-1H-퀴놀린-2-온 103.9 g (42.6% 수율)을 황색 분말로서 수득하였다.

<155> 절차 C



<156>

<157>

가열 맨틀에 설치되고 응축기, 기계적 교반기, 기체 유입구 및 온도 프로브가 장착된 12 L의 4구 플라스크에 [6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-아세트산 에틸 에스테르 (608 g, 2.01 mol) (건조) 및 2-아미노-6-플루오로-벤조니트릴 (274 g, 2.01 mol)을 충전하였다. 상기 반응 용기를 N₂로 퍼징하고, 톨루엔 (7.7 L)을 상기 반응 혼합물에 충전하면서 교반하였다. 상기 반응 용기를 다시 N₂로 퍼징하고 N₂하에 유지하였다. 63℃ (±3℃)의 온도가 달성될 때까지 혼합물의 내부 온도를 상승시켰다. 혼합물의 내부 온도를 63℃ (±3℃)로 유지하면서, 톨루엔 대략 2.6 L를 감압하에 플라스크로부터 증류하였다 (380±10 torr, 증류 헤드 t = 40℃ (±10℃)) (칼 피셔 분석을 이용하여 혼합물 중의 물 함량을 확인하였음. 물 함량이 0.03% 초과인 경우에는 톨루엔을 2.6 L 더 첨가하고 증류를 반복함. 이 과정을 물 함량 0.03% 미만이 달성될 때까지 반복함). 물 함량 0.03% 미만이 달성된 후에는 가열을 중단하고 반응물을 N₂하에 17℃ 내지 19℃의 내부 온도로 냉각시켰다. 이어서, THF 중 칼륨 t-부톡사이드 (THF 중 20%; 3.39 kg, 6.04 mol 칼륨 t-부톡사이드)를 상기 반응물의 내부 온도가 20℃ 미만으로 유지되는 속도로 상기 반응물에 N₂하에 첨가하였다. 칼륨 t-부톡사이드의 첨가가 완료된 후, 반응물을 20℃ 미만의 내부 온도에서 30분 동안 교반하였다. 이어서, 상기 온도를 25℃로 상승시키고, 반응물을 1시간 이상 교반하였다. 이어서, 상기 온도를 30℃로 상승시키고, 반응물을 30분 이상 교반하였다. 이어서, HPLC를 사용하여 출발 물질의 소모에 대해 확인하여 반응이 완료되었는지를 모니터링하였다 (전형적으로는 2시간 내지 3시간 이내에 2종의 출발 물질 모두가 소모됨 (HPLC 면적%로 0.5% 미만)). 2시간 후에 반응이 완료되지 않으면 시간마다 칼륨 t-부톡사이드 0.05 당량을 더 첨가하였고, HPLC에서 반응이 완료된 것으로 나타나면 상기 과정을 종료하였다. 반응 완료 후, 교반된 반응 혼합물에 물 650 mL를 첨가하였다. 이어서, 반응물을 50℃의 내부 온도로 가온하고, THF를 감압하에 반응 혼합물로부터 증류해 냈다 (부피 약 3 L). 이어서, 첨가 깔때기를 통해 상기 반응 혼합물에 물 (2.6 L)을 적가하였다. 이어서, 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 1시간 이상 교반하였다. 이어서, 혼합물을 여과하고, 필터 케이크를 물 (1.2 L), 70% 에탄올 (1.2 L) 및 95% 에탄올 (1.2 L)로 세척하였다. 상기 밝은 황색 고체를 건조 트레이에 넣고, 일정 중량이 수득될 때까지 50℃의 진공 오븐에서 건조시켜 원하는 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-1H-퀴놀린-2-온을 674 g (85.4%) 수득하였다.

<158>

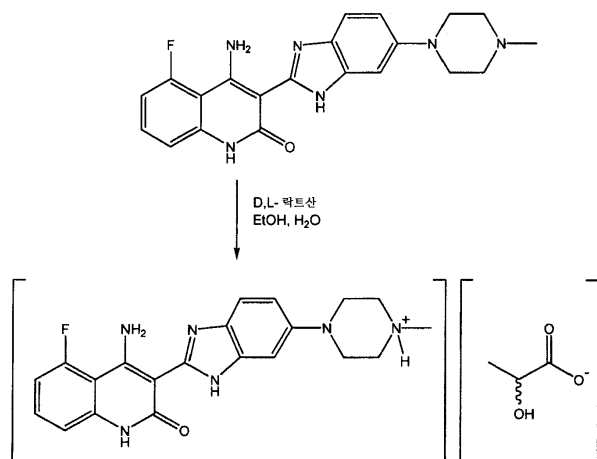
4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-1H-퀴놀린-2-온의 정제

<159>

응축기, 온도 프로브, N₂ 기체 유입구 및 기계적 교반기가 장착된 3000 mL의 4구 플라스크를 가열 맨틀에 넣었다. 이어서, 상기 플라스크에 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-1H-퀴놀린-2-온 (101.0 g, 0.26 mol)을 충전하고, 상기 황색 고체를 95% 에탄올 (1000 mL) 중에 현탁하여 교반하였다. 일부 경우에는 8:1 용매 비율을 사용하였다. 이어서, 현탁물을 부드러운 환류 (약 76℃의 온도)시까지 가열하면서 약 1시간의 기간에 걸쳐 교반하였다. 이어서, 반응물을 45분 내지 75분 동안 교반하면서 환류시켰다. 이 시점에 플라스크의 가열을 멈추고, 현탁물이 25℃ 내지 30℃의 온도로 냉각되도록 하였다. 이어서, 현탁물을 여과하고, 필터 패드를 물 (2×500 mL)로 세척하였다. 이어서, 황색 고체를 건조 트레이에 넣고, 50℃의 진공 오븐에서 일정 중량이 수득될 때까지 (전형적으로는 16시간) 건조시켜 정제된 생성물 97.2 g (96.2%)을 황색 분말로써 수득하였다.

<160>

D. 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-1H-퀴놀린-2-온의 락트산 염의 제조



<161>

<162>

3000 mL의 4구 재킷 플라스크에 응축기, 온도 프로브, N₂ 기체 유입구 및 기계적 교반기를 장착했다. 상기 반응 용기를 15분 이상 동안 N₂로 퍼징한 후에 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-1H-퀴놀린-2-온 (484 g, 1.23 mol)을 충전하였다. D,L-락트산 (243.3 g, 단량체 (하기 단락 참조) 1.72 mol), 물 (339 mL) 및 에탄올 (1211 mL)의 용액을 제조한 후에 상기 반응 플라스크에 충전하였다. 중간 속도로 교반을 시작하고, 반응물을 68℃ 내지 72℃의 내부 온도로 가열하였다. 반응물의 내부 온도를 68℃ 내지 72℃로 15분 내지 45분 동안 유지한 후에 가열을 중단하였다. 생성된 혼합물을 10 내지 20 마이크로미터 프리트(frit)으로 여과하면서 여액을 12 L 플라스크에 수집하였다. 상기 12 L 플라스크에는 내부 온도 프로브, 환류 응축기, 첨가 깔때기, 기체 유입구, 배출구 및 오버헤드 교반기를 장착하였다. 이어서, 여액을 중간 속도로 교반하고 환류시까지 가열 (약 78℃의 내부 온도)하였다. 부드러운 환류를 유지하면서, 상기 플라스크에 에탄올 (3,596 mL)을 약 20분의 기간에 걸쳐 충전하였다. 이어서, 상기 반응 플라스크를 15분 내지 25분 이내에 약 64℃ 내지 70℃ 범위의 내부 온도로 냉각시키고, 이 온도를 약 30분의 기간 동안 유지하였다. 반응기에 결정이 생겼는지를 조사하였다. 결정이 존재하지 않은 경우에는 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-1H-퀴놀린-2-온의 락트산 염 결정 (484 mg, 0.1 mol%)을 상기 플라스크에 첨가하고, 반응물을 64℃ 내지 70℃에서 30분 동안 교반한 후에 플라스크에 결정이 생겼는지를 조사하였다. 일단 결정이 존재하면, 교반 속도를 느리게 하고, 반응물을 64℃ 내지 70℃에서 90분 더 교반하였다. 이어서, 반응물을 약 2 시간의 기간에 걸쳐 약 0℃로 냉각시키고, 생성된 혼합물을 25 내지 50 마이크로미터 프리트 필터로 여과하였다. 반응기를 에탄올 (484 mL)로 세척하고, 내부 온도가 약 0℃가 될 때까지 교반하였다. 차가운 에탄올을 사용하여 필터 케이크를 세척하고, 상기 절차를 2회 더 반복하였다. 수집된 고체를 50℃의 진공 오븐에서 진공하에 일정 중량으로 건조시켜 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-1H-퀴놀린-2-온의 결정질 황색 락트산 염 510.7 g (85.7%)을 수득하였다. 전형적으로, 여과 공정 동안에는 고무 막 또는 불활성 조건을 사용하였다. 상기 건조 고체는 흡습성이 높아 보이지 않았으나, 습윤 필터 케이크는 물을 끌어들이며 점착성이 되려는 경향이 있었다. 상기 습윤 필터 케이크가 대기에 오래 노출되지 않도록 특별히 주의를 기울였다.

<163>

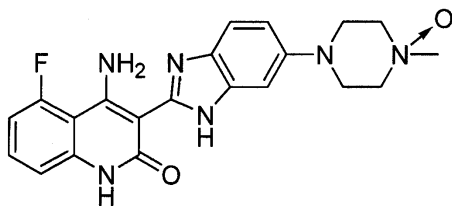
시판 락트산은 일반적으로 약 8% 내지 12% w/w 물을 함유하고, 단량체 락트산에 추가하여 이량체 및 삼량체를 포함한다. 락트산 이량체:단량체의 몰비는 일반적으로 약 1.0:4.7이다. 모노락테이트 염은 반응 혼합물에서 우선적으로 침전되기 때문에 상기 단락에 기재한 방법에서 시판 등급의 락트산이 사용될 수 있다.

<164>

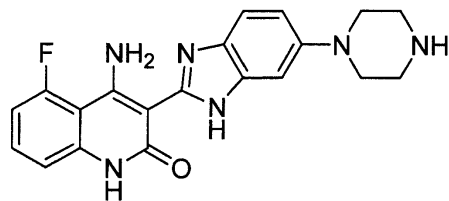
대사물질의 동정

<165>

본원에 포함된 참고문헌에 기재된 바와 같은 2주간의 독성학 연구에서는 수집된 래트 혈장에서 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸-피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]-1H-퀴놀린-2-온 (화합물 1)의 2종의 대사물질이 동정되고 특징규명되었다. 상기 2종의 동정된 대사물질은 하기 나타낸 피페라진 N-옥시드 화합물 (화합물 2) 및 N-탈메틸화 화합물 (화합물 3)이었다:



화합물 2



화합물 3

<166>

<167>

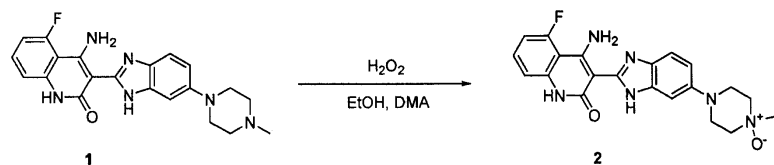
4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸-4-옥시도피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]퀴놀린-2(1H)-온 (화합물 2) 및 4-아미노-5-플루오로-3-(6-피페라진-1-일-1H-벤즈이미다졸-2-일)퀴놀린-2(1H)-온 (화합물 3)의 합성

<168>

화합물 1의 동정된 대사물질들의 구조를 확인하기 위해서, 상기 대사물질들을 독립적으로 합성하였다.

<169>

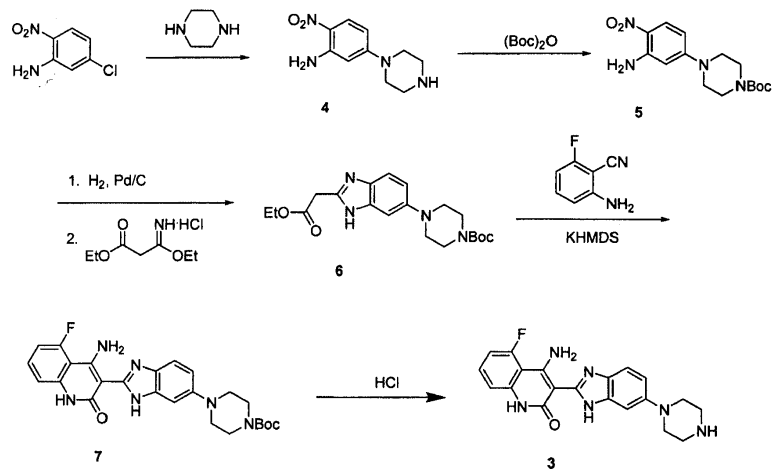
화합물 1의 N-옥시드 대사물질인 화합물 2는 하기 반응식에 나타난 바와 같이 하여 합성하였다. 화합물 1을 에탄올, 디메틸아세트아미드 및 과산화수소의 혼합물 중에서 가열하였다. 반응 완료시에 화합물 2를 여과로 분리하고 에탄올로 세척하였다. 필요하다면, 상기 생성물을 컬럼 크로마토그래피로 추가 정제할 수 있다.



<170>

<171>

화합물 1의 N-데스메틸 대사물질인 화합물 3은 하기 반응식에 나타난 바와 같이 하여 합성하였다. 5-클로로-2-니트로아닐린을 피페라진으로 처리하여 4를 수득하였고, 이후에 이것을 부틸옥시카르보닐 (Boc)기로 보호하여 5를 수득하였다. 니트로기를 환원시킨 후에 3-에톡시-3-이미노프로피온산 에틸 에스테르와 축합하여 6을 수득하였다. 염기로서 칼륨 헥사메틸디실아지드를 사용하여 6을 6-플루오로안트라닐로니트릴과 축합시켜 7을 수득하였다. 조 7을 수성 HCl로 처리하여 정제한 후에는 원하는 대사물질을 황색/갈색 고체로서 수득하였다.



<172>

<173>

검정 절차

<174>

티로신 키나제

<175>

ATP 및 인산화된 티로신 아미노산 잔기를 함유하는 적절한 펩티드 또는 단백질을 제공하고, 포스페이트 부분이 티로신 잔기로 전달되었는지를 검정하여 수많은 단백질 티로신 키나제의 키나제 활성을 결정하였다. FLT-1

(VEGFR1), VEGFR2, VEGFR3, Tie-2, PDGFR α , PDGFR β 및 FGFR1 수용체의 세포질 도메인에 상응하는 재조합 단백질을 바칼로바이러스 발현 시스템 (인비트로젠(InVitrogen))을 사용하여 Sf9 곤충 세포에서 발현시켰고, 이것은 Glu 항체 상호작용 (Glu-에피토프 태그가 부착된 구조물의 경우) 또는 금속 이온 크로마토그래피 (His₆ (서열 1) 태그가 부착된 구조물의 경우)를 통해 정제할 수 있었다. 각각의 검정을 위해서 시험 화합물을 DMSO 중에 계열 희석한 후에 적절한 키나제 반응 완충제 및 ATP와 혼합하였다. 키나제 단백질 및 적절한 바이오닐화된 펩티드 기질을 최종 부피 50 μ l 내지 100 μ l가 될 때까지 첨가하고, 반응물을 1시간 내지 3시간 동안 실온에서 인큐베이션한 후에 45 mM EDTA, 50 mM Hepes (pH 7.5) 25 μ l 내지 50 μ l를 첨가하여 중단시켰다. 중단된 반응 혼합물 (75 μ l)을 스트렙타비딘-코팅된 미량역가 플레이트 (베링거 만하임(Boehringer Mannheim))로 옮겨 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인산화된 펩티드 생성물을 유로퓸(Europium)-표지된 항-포스포티로신 항체 PT66을 이용하여 DELFIA 시간-분해(time-resolved) 형광 시스템 (윌락(Wallac) 또는 피이 바이오사이언시스(PE Biosciences))으로 측정하였고, 이때 DELFIA 검정 완충제는 항체 희석을 위해 1 mM MgCl₂가 보충되도록 변형시켰다. 시간-분해 형광을 윌락 1232 DELFIA 플루오로미터 또는 PE 빅터(Victor) II 다중 신호 판독기에서 판독하였다. 50% 억제하는 각 화합물의 농도 (IC₅₀)를 XL Fit 데이터 분석 소프트웨어를 사용한 비-선형 회귀법으로 계산하였다.

<176> FLT-1, VEGFR2, VEGFR3, FGFR3, Tie-2 및 FGFR1 키나제를 50 mM Hepes (pH 7.0), 2 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂, 1 mM NaF, 1 mM DTT, 1 mg/mL BSA, 2 μ M ATP, 및 0.20 내지 0.50 μ M의 상응하는 바이오닐화된 펩티드 기질에서 검정하였다. FLT-1, VEGFR2, VEGFR3, Tie-2 및 FGFR1 키나제를 각각 0.1 μ g/mL, 0.05 μ g/mL 또는 0.1 μ g/mL로 첨가하였다. PDGFR 키나제 검정을 위해서, ATP 및 펩티드 기질 농도를 1.4 μ M ATP, 및 0.25 μ M 바이오틴-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (서열 2) 펩티드 기질로 변경시켰다는 점을 제외하고는 상기와 동일한 완충제 조건하에 120 μ g/mL 효소를 사용하였다.

<177> 재조합 및 활성 티로신 키나제 Fyn 및 Lck은 시판되고 있으며, 업스테이트 바이오테크놀로지(Upstate Biotechnology)로부터 구입하였다. 각각의 검정을 위해서, 시험 화합물을 DMSO 중에 계열 희석한 후에 적절한 키나제 반응 완충제 및 10 nM ³³P 감마-표지된 ATP와 혼합하였다. 키나제 단백질 및 적절한 바이오닐화된 펩티드 기질을 최종 부피 150 μ l가 될 때까지 첨가하였다. 반응물을 3시간 내지 4시간 동안 실온에서 인큐베이션한 후에 100 mM EDTA 및 50 μ M 미표지 ATP의 정지 반응 완충제 100 μ l를 함유하는 스트렙타비딘-코팅된 백색 미량역가 플레이트 (써모 랩시스템스(Thermo Labsystems))로 옮겨서 중단시켰다. 1시간 동안 인큐베이션한 후에 스트렙타비딘 플레이트를 PBS로 세척하고, 마이크로싯트 20(Microscint 20) 섬광계수액 200 μ l를 웰마다 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고 탑카운트(TopCount)를 사용하여 계수하였다. 각 화합물의 50% 억제 농도 (IC₅₀)를 XL Fit 데이터 분석 소프트웨어를 사용한 비-선형 회귀법으로 계산하였다.

<178> Fyn, Lck 및 c-ABL를 위한 키나제 반응 완충제는 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM MgCl₂, 30 mM MnCl₂, 2 mM DTT, 2 mM EDTA, 25 mM 베타-글리세롤 포스페이트, 0.01% BSA/PBS, 0.5 μ M의 적절한 펩티드 기질 (바이오닐화된 Src 펩티드 기질: Fyn 및 Lck의 경우에는 바이오틴-GGGGKVEKIGEGTYGVVYK-NH₂ (서열 3)), 1 μ M 미표지 ATP 및 1 nM 키나제를 함유하였다.

<179> ATP 및 인산화를 위한 티로신 아미노산 잔기를 함유하는 펩티드 또는 단백질을 제공하고, 포스페이트 부분이 티로신 잔기로 전달되었는지를 검정하여 c-Kit 및 FLT-3의 키나제 활성을 결정하였다. c-Kit 및 FLT-3 수용체의 세포질 도메인에 상응하는 재조합 단백질을 구입하였다 (프로키나제(Prokinase)). 시험을 위해서, 예시적인 화합물, 예를 들어 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]퀴놀린-2(1H)-온을 DMSO 중에 희석한 후에 하기의 키나제 반응 완충제 및 ATP와 혼합하였다. 키나제 단백질 (c-Kit 또는 FLT-3) 및 바이오닐화된 펩티드 기질 (바이오틴-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (서열 2))을 최종 부피 100 μ l가 될 때까지 첨가하였다. 이들 반응물을 2시간 동안 실온에서 인큐베이션한 후에 45 mM EDTA, 50 mM HEPES (pH 7.5)를 첨가하여 중단시켰다. 중단된 반응 혼합물 (75 μ l)을 스트렙타비딘-코팅된 미량역가 플레이트 (베링거 만하임)로 옮기고, 1시간 동안 인큐베이션하였다. 인산화된 펩티드 생성물을 유로퓸-표지된 항-포스포티로신 항체 PT66을 이용하여 DELPHIA 시간-분해 형광 시스템 (윌락 또는 피이 바이오사이언시스)으로 측정하였고, 이때 DELFIA 검정 완충제는 항체 희석을 위해 1 mM MgCl₂가 보충되도록 변형시켰다. 시간-분해 형광 값은 윌락 1232 DELFIA 플루오로미터 또는 PE 빅터 II 다중 신호 판독기에서 결정하였다. 각 화합물의 50% 억제 농도 (IC₅₀)를 XL Fit

데이터 분석 소프트웨어를 사용한 비-선형 회귀법으로 계산하였다.

<180> FLT-3 및 c-Kit 키나제를 50 mM Hepes (pH 7.5), 1 mM NaF, 2 mM MgCl₂, 10 mM MnCl₂ 및 1 mg/mL BSA, 8 μM ATP 및 1 μM의 상응하는 바이오닐화된 펩티드 기질 (바이오틴-GGLFDDPSYVNVQNL-NH₂ (서열 2)) 에서 검정하였다. FLT-3 및 c-Kit 키나제의 농도는 2 nM로 하여 검정하였다. 최종 농도 1 μM의 인산화된 펩티드 기질을 유로폼-표지된 항-포스포티로신 항체 (PT66) (미국 매사추세츠주 보스턴 소재의 퍼킨 엘머 라이프 사이언시스(Perkin Elmer Life Sciences))와 함께 인큐베이션하였다. 유로폼을 시간-분해 형광으로 검출하였다. IC₅₀을 비-선형 회귀법으로 계산하였다.

<181> 하기 방법 각각을 이용하여 제3자(third party vendor)가 FGFR2 및 FGFR4를 검정하였다:

<182> 방법 A: 키나제프로파일러(KinaseProfiler) (업스테이트(Upstate)/밀리포어(Millipore)) 직접 방사측정 검정을 다음과 같이 이용하였다. FGFR2 또는 FGFR4 (인간, 5 mU 내지 10 mU)를 최종 반응 부피 25 μl로 하여 8 mM MOPS (pH 7.0), 0.2 mM EDTA, 2.5 내지 10 mM MnCl₂, 0.1 mg/mL 폴리(Glu,Tyr) 4:1, 10 mM Mg 아세테이트 및 [감마-³²P-ATP] 비활성 대략 500 cpm/pmol (필요에 따라 농축함)와 함께 인큐베이션하였다. MgATP 혼합물을 첨가하여 반응을 개시하였다. 40분 동안 실온에서 인큐베이션한 후에 3% 인산 용액 5 μl를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 이어서, 반응물 10 μl를 필터매트 A(Filtermat A)에 스팟팅하고, 75 mM 인산 중에서 5분 동안 3회 세척하고 메탄올 중에서 1회 세척한 후에 건조 및 섬광계수를 실시하였다.

<183> 방법 B: 밀리포어 Z'-LYTE 키나제 검정 (인비트로젠)은 형광 공명 에너지 전달을 기초로 하며, 다음과 같이 사용하였다: 2× FGFR2 또는 FGFR4/Tyr 04 펩티드 혼합물을 50 mM HEPES (pH 7.5), 0.01% BRIJ-35, 10 mM MgCl₂, 4 mM MnCl₂, 1 mM EGTA, 2 mM DTT 중에서 제조하였다. 최종 10 μl 키나제 반응물은 50 mM HEPES (pH 7.5), 0.01% BRIJ-35, 10 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 1 mM EGTA, 1 mM DTT 중 0.3 내지 2.9 ng의 FGFR2 또는 2.4 내지 105 ng의 FGFR4 및 2 μM Tyr 04 펩티드로 구성되었다. 1시간 동안 키나제 반응물을 인큐베이션한 후, 발색 시약 B의 1:32 희석물 5 μl를 첨가하였다.

<184> **MIA 단백질**

<185> 웨스턴 블롯 분석: CHL-1 세포 또는 혈장을 본원에 기재한 바와 같이 MIA 단백질에 대해 검정하였다. 혈장 준비를 위해 BD 마이크로타이너(microtainer)^R 분리기 튜브 (미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재의 벡톤 딕킨슨(Becton Dickinson))에 전혈을 수집하였다. CHL-1 세포를 인산염 완충 염수 (PBS, 미국 버지니아주 헤르돈 소재의 메디아테크, 인크.(Mediatech, Inc.)) 중에 2회 세척하고, 신선한 1 mM 페닐메틸설포닐플루오라이드, 완전 미니(Complete Mini) 프로테아제 억제제 칵테일(Cocktail) 정제 (용해 완충제 25 mL 당 정제 2개) (독일 만하임 소재의 로셰 다이아그노스틱스 게엠베하(Roche Diagnostics GmbH)) 및 1× 포스포타제 억제제 칵테일 II (미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich))를 함유하는 RIPA 완충제 (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 2 mM 나트륨 오르토타나테이트, 20 mM 피로포스페이트, 1% 트리톤 X-100, 1% 나트륨 데옥시콜레이트 및 0.1% SDS)에서 20분 동안 빙상에서 용해시켰다. 용해물을 원심분리 튜브에서 14 K RPM으로 4℃에서 20분 동안 회전시켜 수집하고, QIAshredder 튜브 (미국 캘리포니아주 발렌시아 소재의 퀴아젠, 인크.(QIAGEN, Inc.))로 여과하였다. BCA 검정을 제조업체 (미국 일리노이주 록스포드 소재의 피어스(Pierce))의 프로토콜에 따라 이용하여 단백질 농도를 결정하였다. 샘플에 노벡스(Novex)[®] 18% Tris-글리신 겔 (미국 캘리포니아주 칼스배드 소재의 인비트로젠)을 사용한 표준 방법에 따른 웨스턴 블롯을 수행하기 위한 처리를 하였다. 5% 분유를 함유하는 TBST (0.1% Tween[®] 20 (미국 뉴햄프셔주 햄튼 소재의 피셔 사이언티픽))을 함유하는 Tris 완충 염수) 중에 1:1000으로 희석한 염소 폴리클로날 항체 (미국 미네소타주 미네아폴리스 소재의 알앤디 시스템즈(R&D Systems))로 MIA를 검출하고, 밤새 4℃에서 인큐베이션하였다. 2차 항체는 1:5000으로 희석한 호스래디쉬(horseradish) 퍼옥시다제-연결된 항-염소 항체 (미국 캘리포니아주 버링게임 소재의 벡터 래보라토리즈(Vector Laboratories))였다. 단백질 밴드는 고감도 화학발광제(Enhanced Chemiluminescence) (미국 뉴저지주 피스카타웨이 소재의 아머삼 바이오사이언시스(Amersham Biosciences))를 사용하여 가시화하였다. 동일한 로딩 및 전달은 β-액틴 검출 (미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마-알드리치)로 확인하였다. 2개의 시판업체 (미국 캘리포니아 샌 디에고 소재의 악소라, 엘엘씨(Axxora, LLC) 및 이스라엘 레호보트 소재의 프로스펙-타니 테크노진, 엘티디(ProSpec-Tany TechnoGene, LTD))로부터 구입한 인간 재조합 MIA 단백질 (MW 12 kDa)을 양성 대조군으로 사용하였다.

- <186> MIA ELISA 검정: 동일 수의 인간 흑색종 및 결장직장 암종 세포 (각각의 세포주마다 약 250,000개 세포)를 조직 배양 플레이트에 접종하고, 48시간 후에 각 세포주마다 배양 배지를 수집하였다. 배양 배지 또는 혈장 중 MIA의 수준은 시판하는 단일 단계 ELISA 키트를 제조업체의 프로토콜 (미국 인디애나주 인디애나 소재의 로쉐 다이아그노스틱스 코퍼레이션(Roche Diagnostics Corporation))에 따라 사용하여 결정하였다. 시험 샘플 중의 MIA 농도는 3 내지 37 ng/mL 범위의 표준 곡선을 이용하여 계산하였다. MIA 농도가 최고 표준 농도를 넘어가면, 해당 샘플을 1:5로 희석하고 다시 검정하여 결과가 표준 곡선의 선형 범위 내에 들도록 하였다. 데이터를 유의성 수준으로서 $P \leq 0.05$ 를 사용한 스튜덴트 t-검정(Student t-test) (2-테일링(tailed) 분포, 2-샘플의 동일하지 않은 분산)으로 평가하였다.
- <187> **통계적 분석**
- <188> 선형 회귀법은 마이크로소프트 엑셀(Microsoft Excel) (미국 워싱턴주 레드몬드 소재)로 수행하였다. 스튜덴트 t-검정을 이용하여 2개의 처치군 사이의 통계적 유의성을 결정하였다. 다중 비교는 1원 분산 분석 (ANOVA)을 이용하여 수행하였고, 여러 처치 수단을 비교하는 후시험은 스튜덴트-뉴만 큐엘 검정(Student-Newman Keul's test) (미국 캘리포니아주 산 라페엘 소재의 시그마스타트(SigmaStat))으로 수행하였다. 생존 연구를 위해서, 로그 랭크 시험(log rank test)을 이용하여 여러가지 처치군 대 비히클군 (미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재의 프리즘(Prism))의 생존 커브 사이의 유의성을 결정하였다. 연구 종료시에 희생시킨 정상적인 건강 상태의 마우스는 장기 생존체로 간주하고, 본 분석에서 제외시켰다. 차이는 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다 ($p < 0.05$).
- <189> 흑색종 세포주의 웨스턴 분석: 흑색종 세포주를 차가운 PBS로 세척하여 플레이트로부터 수확하고, 프로테아제 및 포스파타제 억제제 콕테일 (미국 인디애나주 인디애나 소재의 로쉐 다이아그노스틱스) 및 1 mM PMSF (시그마)를 함유하는 RIPA 완충제 (20 mM Tris (pH 8), 135 mM NaCl, 2 mM EDTA (pH 8), 10% 글리세롤, 1% 트리톤 X-100, 0.1% SDS, 0.1% 나트륨 데옥시콜레이트) 중에서 1시간 동안 4°C에서 용해시켰다. 단백질을 용해물을 14000 rpm으로 10분 동안 원심분리하고, 생성된 상등액을 수집하였다. 단백질 함량을 BCA 검정 (미국 일리노이주 로크포드 소재의 피어스 케미칼 컴퍼니(Pierce Chemical Company))으로 결정하였다. 전체 단백질을 노벡스 Tris-글리신 SDS-PAGE 겔 (인비트로젠)에서 전기영동하고, 단백질을 0.45 μ m 니트로셀룰로스 막 (인비트로젠)으로 옮겼다. FGFR-1, 2, 3 및 4의 단백질을 검출하기 위해서, 전체 단백질 (100 μ g)을 노벡스 Tris-글리신 SDS-PAGE 겔 (인비트로젠)에서 전기영동하고, 단백질을 0.45 μ m 니트로셀룰로스 막 (인비트로젠)으로 옮겼다. 막을 5% 비-지방 분유를 함유하는 TBS-T (0.1% Tween 20) (차단 완충제) 중에서 최소 1시간 동안 4°C에서 차단한 후에 3시간 내지 4시간 동안 또는 밤새 차단 완충제 (전체 단백질) 또는 5% BSA (포스포-단백질)를 함유하는 여과된 TBS-T 중의 1차 항체와 인큐베이션하였다. 차단 완충제 중 2차 항-마우스 또는 항-토끼를 1시간 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 막을 TBS-T (0.1% Tween 20)로 15분씩 3회 세척한 후, 코닥(Kodak) 필름에 노출시킨 후에 ECL 웨스턴 검출 (아머샴 바이오사이언시스)을 수행하였다. 웨스턴 분석은 FGFR-1 (노부스 바이올로지칼스(Novus Biologicals) ab10646), FGFR-2 (노부스 바이올로지칼스 ab5476), FGFR3 (노부스 바이올로지칼스 ab10649) 및 FGFR-4 (산타 크루즈(Santa Cruz) C-16)에 특이적인 항체를 사용하여 수행하였다.
- <190> 클론원성 검정: 클론원성 생존 검정을 변형된 2층 연결 한천 검정법을 이용하여 24웰 플레이트 포맷으로 수행하였다. 요약하면, 바닥층은 웰 1개 당 20% 태아 소 혈청, 0.01% w/v 젤타마이신 및 0.75% 한천이 보충된 이스코브 변형 돌베코 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (인비트로젠) 0.2 mL로 구성되었다. 인간 흑색종 세포주들을 NMRI nu/nu 마우스에서 피하 성장하는 종실성 인간 종양 이종이식편으로서 연속 계대로 증식시켰다. 기계적 해리 및 이후 RPMI-1640 배지 (인비트로젠) 중 콜라게나제 제IV형 (41 U/mL, 시그마), DNase I (125 U/mL, 로쉐) 및 히알루로니다제 제III형 (100 U/mL, 시그마)으로 이루어진 효소 소화액과 함께 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하여 단일 세포 현탁액을 생성하였다. 세포를 200 μ m 및 50 μ m 메쉬 크기의 체에 통과시켜 멸균 PBS로 2회 세척하였다. 세포 (1.5×10^4 개 내지 6×10^4 개)를 0.4% 한천이 보충된 배양 배지에 단독으로 접종하고 기저층에 플레이트링하여 다양한 농도의 화합물 1에 노출시킨 후에 가습 대기하에 37°C 및 7.5% 이산화탄소에서 8일 내지 20일 동안 인큐베이션시켰다. 세포를 콜로니 성장 (직경 $> 50 \mu$ m)에 대해 현미경으로 모니터링했다. 최대 콜로니 형성 시점에, 자동 화상 분석 시스템 (옵니콘(OMNICON) 3600, 바이오시스 게엠베하(Biosys GmbH))으로 계수를 수행하였다.
- <191> 약물 효과는 처치 웰 중 콜로니의 평균 수를 미처치 대조군의 평균 콜로니 계수값과 비교하여 수득한, 콜로니 형성 백분율(%)로 표현하였다 (상대적인 콜로니 계수값을 시험군/대조군, T/C-값 [%]로 플롯팅하였음). EC_{50}

값, EC₇₀ 값 및 EC₉₀ 값은 콜로니 형성을 각각 50%, 70% 및 90% 억제하는데 필요한 약물 농도이다. 각 실험의 양성 대조군으로서 1000 µg/mL 농도의 5-FU (메닥(Medac))를 사용하여 30% 미만의 대조군 콜로니 생존률을 달성하였다.

<192> 생체내 FGF-매개 매트릭셀 혈관신생 검정: 요약하면, 0.5 mL 매트릭셀 (미국 매사추세츠주 베드포드 소재의 벡톤 디킨슨) 및 2 µg 소 bFGF (미국 캘리포니아 에머리빌 소재의 키론 코퍼레이션(Chiron Corporation))의 혼합물을 암컷 BDF1 마우스 (미국 매사추세츠주 윌밍턴 소재의 찰스 리버(Charles River))에 피하 이식하였다. 매트릭셀 이식 후에 비히클 또는 화합물 1을 8일 동안 매일 경구 투여하였다. 매트릭셀 플러그 내의 헤모글로빈 수준을 이것을 동물로부터 제거한 후에 측정하여 혈관 형성을 정량하였다. 헤모글로빈 함량은 드라빈(Drabkin's) 절차 (미국 미주리주 세인트 루이스 소재의 시그마 다이아그노스틱스(Sigma Diagnostics))를 제조업체의 지시에 따라 수행하여 측정하였다.

<193> 동물: 찰스 리버 래보러토리즈, 인크. (미국 매사추세츠주 윌밍턴 소재)로부터 얻은 면역결핍 Nu/Nu 암컷 마우스 (4주 내지 8주령)를 12시간의 명암 주기를 갖는 멸균 필터-뚜껑이 있는 우리의 사방이 막힌 시설(barrier facility)에 가두고, 멸균 설치류 먹이 및 물을 무제한 제공하였다. 마우스에게는 도착시 피하 ID 칩을 이식한 후에 적어도 7일 동안 순응하게 한 후 연구를 시작하였다. 모든 동물 연구는 국제 실험 동물 관리 평가 인증 협회(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International)의 허가를 받고 동물 실험 윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 모든 지침 및 실험 동물의 관리 및 사용에 관한 지침(Guide for The Care and Use of Laboratory Animals) (내셔널 리서치 카운실(National Research Council))에 따른 시설에서 수행하였다.

<194> 생체내 효능 연구를 위한 세포 배양: 인간 흑색종 세포주 A375M을 5% CO₂를 함유하는 가습 대기하에 37°C에서 10% FBS, 1% 비타민, 비-필수 아미노산 (NEAA) 및 Na 피루베이트를 함유하는 EMEM 배지 중에서 6 계대 동안 배양하였다. 인간 흑색종 세포주 CHL-1을 5% CO₂를 함유하는 가습 대기하에 37°C에서 낮은 함량의 글루타민 + 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지 중에서 6 계대 동안 배양하였다.

<195> A375 (돌연변이체 B-Raf) 및 CHL-1 (야생형 B-Raf) 모델에서 단일 작용제 화합물 1의 생체내 효능: 종양 세포 이식일에 종양 세포를 수거하고 HBSS (A375 세포) 또는 50% HBSS + 50% 매트릭셀 (CHL-1 세포, 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재의 벡톤 디킨슨 앤드 컴퍼니(Becton Dickinson and Company)) 중에 2.5×10⁷개 세포/mL로 재현탁하였다. 세포를 마우스 1 마리 당 200 µL 중에 5×10⁶개 세포로 하여 오른쪽 옆구리에 피하 접종하였다.

<196> 평균 종양 부피가 약 200 mm³에 도달하면 (세포 접종 후 12일 내지 15일), 마우스를 종양 부피에 기초하여 9 마리 또는 10 마리씩의 군으로 무작위화하고, 비히클 또는 10, 30, 60 또는 80 mg/kg의 화합물 1을 매일 p.o. 투여하였다. 군의 크기는 군 당 동물 9 마리 (A375 연구) 또는 군 당 동물 10 마리 (CHL-1 연구)였다. 화합물 1 (배치 41)을 5 mM 시트레이트 중에 제제화하였다. 종양 부피 및 체중을 스터디 디렉터(Study Director) 1.4 소프트웨어 (미국 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코 소재의 스터디로그 시스템즈, 인크.(Studylog Systems, Inc.))로 매주 2회 내지 3회 평가하였다. 종양의 캘리퍼 측정치를 하기 식을 이용하여 평균 종양 부피 (mm³)로 전환시켰다: $\frac{1}{2} [\text{길이 (mm)} \times \text{너비 (mm)}]^2$. 종양 성장 억제율 (TGI)을 $[1 - T/C] \times 100\%$ (여기서, T = 시험군의 평균 종양 부피, C = 대조군 (단일 작용제 연구)의 평균 종양 부피)로 계산하였다. 처치군 대 비히클군에서의 평균 종양 부피 비교를 스튜데نت 2-테일링 t-검정 (엑셀 소프트웨어)로 평가하였다.

<197> CHL-1 연구에서는 흑색종 세포가 분비한 흑색종 마커 흑색종-억제 활성 (MIA) 단백질의 혈장 수준도 측정하였다.

<198> 화합물 1 + 카르보플라틴 + 파클리탁셀 조합물의 생체내 효능 연구: 암컷 nu/nu 마우스 (6주 내지 8주령)에게 3×10⁶개 A375M 또는 CHL-1 세포 (5×10⁶개 세포, 50% 매트릭셀/0.1 mL/마우스)를 마우스 오른쪽 옆구리에 s.c. 접종하였다. 처치는 평균 종양 부피가 200 내지 250 mm³일 때 시작하였다 (연구 제0일, n = 10 마리 마우스/군). 처치는 약물 비히클 단독, qd; 카르보플라틴 (50 mg/kg) + 파클리탁셀 (20 또는 25 mg/kg; 매주 1회씩, 4주); 화합물 1 (30 또는 50 mg/kg); 또는 화합물 1 및 카르보플라틴 + 파클리탁셀의 조합 요법 (표시한 투여량, 제1일), 4주 동안 qd로 구성되었다.

- <199> 종양 부피 및 체중을 스테디 디렉터 1.4 소프트웨어 (미국 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코 소재의 스테디로 그 시스템즈, 인크.)로 매주 2회 내지 3회 평가하였다. 종양의 캘리퍼 측정치를 하기 식을 이용하여 평균 종양 부피 (mm^3)로 전환시켰다: $\frac{1}{2} [\text{길이} (\text{mm}) \times \text{너비} (\text{mm})]^2$. 종양 성장 억제율 (TGI)을 $[1 - \{(\text{처치군의 평균 종양 부피} - \text{무작위화 시점의 종양 부피}) / (\text{대조군의 평균 종양 부피} - \text{무작위화 시점의 종양 부피})\} \times 100]$ 으로 계산하였다. 비히클의 평균 종양 부피가 약 1500 내지 2000 mm^3 일 때 TGI를 계산하였다. 반응은 처치 개시시 각 동물에서의 종양 부피와 비교하여 완전한 반응 (CR, 측정가능한 종양이 없음) 또는 부분적 반응 (PR, 50% 내지 99%의 종양 부피 감소)으로 정의하였다.
- <200> 상승작용 효과는 조합 요법의 기대되는 종양 성장 억제율(%)의 비율 $[(\% \text{ T/C}_{\text{기대치}} = \% \text{ T/C}_{\text{처치1}} \times \% \text{ T/C}_{\text{처치2}})]$ 을 조합 치료의 관찰된 $\% \text{ T/C}$ ($\% \text{ T/C}_{\text{관찰치}}$)로 나눈 값이 > 1 인 경우로 정의되었다. 부가적인 효과는 $\% \text{ T/C}_{\text{기대치}} / \% \text{ T/C}_{\text{관찰치}} = 1$ 로 정의되고, 길항작용은 $\% \text{ T/C}_{\text{기대치}} / \% \text{ T/C}_{\text{관찰치}} < 1$ 로 정의되었다 (39).
- <201> FGF-R 세포 포획 ELISA 검정: 제1일 - 세포 접종: HEK293 세포를 트립신처리하여 CASY 계수기 (샤르페 시스템 (Scharfe System))로 계수하고, 웰 1개 당 10⁴ 개 세포로 100 μL 의 DMEM 4.5 g/L 글루코스, 10% FBS, 1% L-글루타민 중에 96웰 플레이트 (TPP # 92096)에 플레이팅하였다. 세포를 24시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다.
- <202> 제1일. 세포 형질감염 및 시험 플레이트의 코팅: 퓨진(Fugene)-6-시약 (로쉐 #11814443001)을 다음과 같이 사용하여 HEK293 세포를 pcDNA3.1-FGF-R1, pcDNA3.1-FGF-R2, pcDNA3.1-FGF-R3, pcDNA3.1-FGF-R4 또는 pcDNA3.1 벡터로 형질감염시켰다. 퓨진-6-시약 (0.15 μL /웰)을 먼저 옵티맵(Optimem) I (김코(Gibco) # 31985-047) (5 μL /웰)과 혼합한 후에 벡터 DNA (0.05 μg /웰)를 첨가하였다. 상기 혼합물을 15분 동안 실온에서 인큐베이션하였다. 이어서, 상기 혼합물 5.2 μL 를 세포에 첨가하였다. 세포를 24시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 인큐베이션하였다. 플루오로넌크(FluoroNunc) 96웰 플레이트 (맥시소르프 블랙(Maxisorp black) F96, 넌크(Nunc) # 437111A)를 2 $\mu\text{g/mL}$ 의 α -FGF-R1 AB (알앤디 시스템즈 # MAB766), α -FGF-R2 AB (알앤디 시스템즈 # MAB665), α -FGF-R3 AB (알앤디 시스템즈 # MAB766) 또는 α -FGF-R4 AB (알앤디 시스템즈 # MAB685) AB로 코팅하였다. 상기 플루오로넌크 플레이트를 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다.
- <203> 제3일. 화합물 희석, 세포 처치 및 세포 프로세싱: 상기 플루오로넌크 코팅 플레이트를 0.05% Tween[®] 20 (시그마 # P-1379)을 함유하는 PBS/O 200 μL 로 3회 세척하고, 0.05% Tween[®] 20, 3% 탑블럭(TopBlock) (브이더블유 알-인터내셔널(VWR-International) # 232010)을 함유하는 PBS/O 200 μL 로 2시간 동안 실온에서 차단하였다. 이어서, 상기 플레이트를 0.05% Tween[®] 20을 함유하는 PBS/O 200 μL 로 3회 세척하였다. 화합물 (10 mM의 원액)의 계열 희석을 우선적으로 DMSO (세르바(Serva) # 20385) 중에서 수행하였다. 최종 희석 단계는 성장 배지 중에서 수행하여 세포에 대해 0.2% DMSO에 이르게 하였다. 각각의 희석물 11.5 μL 를 세포에 3별로 첨가하였다. 처치는 40분 동안 37°C에서 진행하였다. 세포를 100 μL /웰의 ELISA 용해 완충제 (50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 5 mM EDTA, 1% 트리톤, 2 mM Na-바나테이트, 1 mM PMSF 및 프로테아제 억제제 콕테일 로쉐 # 11873580001) 중에서 용해하고, 세포 용해물 50 μL 를 플루오로넌크 코팅 플레이트로 옮겼다. 이어서, 상기 코팅된 플레이트를 5시간 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. 상기 플레이트를 웰 1개 당 0.05% Tween[®] 20을 함유하는 PBS/O 200 μL 로 3회 세척하였다. α -pTyr-AP AB (지메드(Zymed) PY20 # 03-7722) (0.3% 탑블럭/PBS/O.05% Tween[®] 20 중 1:10,000)를 웰 1개 당 50 μL 로 첨가하였다. 상기 플레이트를 써모웰 (Thermowell)TM 밀봉기를 사용하여 밀봉하고 밤새 4°C에서 인큐베이션하였다.
- <204> 제4일 - 검정 결과의 확인: 상기 플루오로넌크 플레이트를 0.05% Tween[®] 20을 함유하는 PBS/O 200 μL 로 3회 세척하고 H₂O로 1회 세척하였다. CDP-Star (어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) # MS1000RY) 90 μL 를 각각의 웰에 첨가하였다. 상기 플레이트를 45분 동안 실온의 암실에서 인큐베이션한 후에 발광을 탑 카운트 (TOP Count) NXT 발광측정기 (패커드 바이오사이언스(Packard Bioscience))로 측정하였다.
- <205> 결과
- <206> 화합물 1은 FGFR 키나제 활성의 강력한 억제를 입증함

<207> 화합물 1의 특이성을 상기한 바와 같이 정제된 효소를 사용한 ATP-경쟁적 결합 검정을 통해 다양한 패널의 RTK에 대하여 시험하였다. 화합물 1은 소정 범위의 키나제에 대하여 매우 강력한 활성을 갖는 것으로 나타났다 - 예를 들어, FLT3 (1 nM), c-KIT (2 nM), VEGFR1/2/3 (10 nM), FGFR1/3 (8 nM), PDGFRβ (27 nM) 및 CSF-1R (36 nM)에 대하여 나노몰 활성을 나타냈다 (표 1A 참조). 클래스 III, IV 및 V RTK에 대한 선택성을 확인하기 위해서, 화합물 1을 PI3K/Akt 및 MAPK(K) 경로의 다른 키나제에 대하여 시험하였고, 이때의 활성은 무시할 만한 것으로 확인되었다 ($IC_{50} > 10 \mu M$) (표 1A 참조).

표 1A

다양한 RTK에 대한 4-아미노-5-플루오로-3-[6-(4-메틸피페라진-1-일)-1H-벤즈이미다졸-2-일]퀴놀린-2(1H)-온의 활성

RTK	IC_{50} (μM)
FLT3	0.001
c-KIT	0.002
CSF-1R	0.036
FGFR1	0.008
FGFR2	0.05
FGFR3	0.009
FGFR4	3
VEGFR1/Flt1	0.01
VEGFR2/Flk1	0.013
VEGFR3/Flt4	0.008
PDGFRβ	0.027
PDGFRα	0.21
TIE2	4

<208>

<209> 수많은 단백질 티로신 키나제의 키나제 활성을 화합물 2 및 화합물 3에 대하여 상기한 절차로 측정하여, 하기 표 1B에 나타낸 IC_{50} 값을 획득하였다:

표 1B

화합물 2 및 화합물 3의 IC_{50}

화합물	IC_{50} (μM)					
	VEGFR flt	VEGFR flk1	bFGFR	PDGFR	Flt3	c-kit
화합물 2	0.004	0.009	0.005	0.010	0.0004	0.0002
화합물 3	0.019	0.012	0.019	0.037	0.0001	0.0002

<210>

<211> 인간 흑색종 세포에서 FGFR1 내지 4의 발현: FGFR1 내지 4의 단백질 수준을 소정 패널의 인간 원발성 흑색종 종양 외식편(explant) (온코테스트(Oncotest) 종양: 1341/3, 1765/3, 276/7, 462/6, 514/12, 672/3, 989/7) 및 세포주 (CHL-1, HMCB, SK-Mel-2, A375M, G361, SK-Mel-28, SK-Mel-31)에서 시험하여, 4종의 FGF 수용체의 상대적인 발현을 웨스턴 분석으로 프로파일링하였다 (도 1). 각각의 FGFR에 대한 항체 특이성은, 각각의 FGFR을 발현하는 일시적으로 발현된 FGFR⁺ 293T 세포로부터의 단백질 용해물을 사용하여 확인하였다 (데이터는 나타내지 않음).

<212> 도 1에 나타난 바와 같이, 모든 흑색종 세포는 세포상에 FGFR을 차별적인 패턴으로 발현하였다. 상당한 수준의 FGFR1 (SK-Mel-28 제외), FGFR2 (MEXF 462 제외), FGFR3 (G361 제외)이 흑색종 세포에서 발견되었다. FGFR4 발현은 약간 더 일관적이지 못하여, FGFR4의 발현이 CHL-1, HMCB, A375M, G361에서는 높은 수준이었고, 276/7, 514/12, 672/3, 989/7에서는 중간 수준이었고, SK-Mel-2, 462/6, 1765/3에서는 낮은 수준이었으며, SK-Mel-28, SK-Mel-31 및 1341/3에서는 검출가능한 수준이 아니었다.

<213> 흑색종 종양 세포에 대한 화합물 1의 시험관내 클론원성 평가: 본 출원인은 화합물 1의 연결 한천 클론원성 활성을 하기 7종의 원발성 흑색종 외식편에 대하여 생체의 평가하였다: 1341/3, 1765/3, 276/7, 462/6, 514/12,

672/3, 989/7. 상기 실험에서, 종양 세포를 0.001 nM 내지 10 μ M 농도 범위에서 다양한 농도의 화합물 1에 노출시켰다. 약물 반응은 상대적인 EC₅₀ 값으로부터 평가하였다 (표 2 참조). 화합물 1에 대한 일반적인 반응성은 다음과 같은 순서였다:

1765/3 (2.58 μ M) >
989/7 (2.54 μ M) > 1341/3 (2.24 μ M) > 672/3 (1.67 μ M) > 276/7 (1.14 μ M) >
514/12 (1.05 μ M) > 462/6 (0.70 μ M).

표 2

흑색종 종양 세포에 대한 화합물 1의 클론원성 평가

MEXF	IC ₅₀
1765/3	2.58
989/7	2.54
1341/3	2.24
672/3	1.67
276/7	1.14
514/12	1.05
462/6	0.70

화합물 1은 FGF-매개 생체내 혈관신생을 억제함: 화합물 1이 bFGF-매개 혈관신생을 생체내 억제할 수 있는지 여부를 결정하기 위해서, 그의 효과를 bFGF-유도된 매트릭스 이식편 모델에서 평가하였다. 매트릭스 단독 (bFGF 보충 없음)의 경우에는 주변부 신혈관생성이 관찰되었으나, 피하 매트릭스 이식편에 bFGF를 첨가하면 매트릭스 플러그 중 헤모글로빈 수준의 정량화로 결정할 때 신혈관생성이 유의하게 유도되었다 (도 2). 화합물 1을 3 내지 100 mg/kg의 용량으로 8일 동안 매일 처리하면, bFGF-유도된 신혈관생성의 용량-의존적 억제가 나타났다 (IC₅₀: 3 mg/kg). 모든 용량은 비히클에 비해 통계적으로 유의한 감소를 초래하였다 ($p < 0.05$). 흥미롭게도, 10 mg/kg 초과인 모든 용량은 보충되지 않은 매트릭스 이식편에서 관찰된 기본적인 헤모글로빈 수준보다 낮았으며, 이는 화합물 1이 bFGF-유도된 혈관신생을 강력하게 생체내 억제함을 명백하게 나타낸다.

화합물 1의 항-종양 효능 연구: 단일 작용제 화합물 1의 활성 또는 카르보플라틴 + 파클리탁셀과 조합된 경우의 활성을 FGFR 발현 프로파일은 유사하지만 B-Raf 돌연변이 상태는 상이한 2개의 흑색종 종양 모델 (A375M B-Raf 돌연변이체 및 CHL-1 B-Raf 야생형)에서 벤치마킹하였다.

A375 흑색종 모델에서 단일 작용제로서 화합물 1의 활성: 화합물 1은 Nu/Nu 마우스의 인간 흑색종 A375M 피하 이종이식편 모델에서 유의한 종양 성장 억제를 입증하였다. 원발성 종양 성장의 분석을 도 3에 나타냈다. 투여 제3일, 제5일, 제21일 및 제25일에 80 mg/kg 처리군에서의 평균 종양 성장은 비히클군과 비교하여 유의한 차이가 있었다. 종양 성장 억제 (TGI)의 백분율(%)은 제25일의 종양 부피를 기준으로 하였다. 화합물 1을 10, 30, 60 및 80 mg/kg으로 경구 투여했을 때의 TGI는 각각 28%, 45%, 58% 및 69%였다. 어떠한 군에서도 유의한 체중 손실은 없었고 (체중 손실률이 약 5% 초과인 경우는 없었음), 독성에 대한 다른 임상적 징후도 관찰되지 않았다.

CHL-1 흑색종 모델에서 단일 작용제로서 화합물 1의 활성: 화합물 1은 Nu/Nu 마우스의 인간 흑색종 CHL-1 피하 이종이식편 모델에서 유의한 종양 성장 억제를 입증하였다. 원발성 종양 성장의 분석을 도 4에 나타냈다. 투여 제8일 내지 제25일에 30, 60 및 80 mg/kg 처리군에서의 평균 종양 성장은 비히클군과 비교하여 유의한 차이가 있었다. TGI의 백분율(%)은 제25일의 종양 부피를 기준으로 하였다. 화합물 1을 10, 30, 60 및 80 mg/kg으로 경구 투여했을 때의 TGI는 각각 64%, 73%, 89% 및 87%였다. 어떠한 군에서도 유의한 체중 손실은 없었고 (체중 손실률이 약 5% 초과인 경우는 없었음), 독성에 대한 다른 임상적 징후도 관찰되지 않았다.

<220> 혈장 MIA 수준을 제0일, 제8일 및 제22일에 비히클, 30 mg/kg 및 80 mg/kg 처치군에서 평가하였다 (테이타는 나타내지 않음). 제0일에는 모든 군에서의 MIA 수준이 검출 역치값 이하였다. 제8일에는 비히클군에서의 MIA 수준이 7.7 ng/mL로 상승되었으나, 처치군에서의 MIA 수준은 검출가능하지 않았다. 제22일에는 종양 부피 및 MIA 수준 역시 비히클군에 비해 낮았다. 전반적으로, 제8일 및 제22일에는 혈장 MIA 수준이 처치 동물에서 낮았고 (즉, 검출가능하지 않음) 비히클 대조군에서 더 높았다.

<221> 카르보플라틴 + 파클리탁셀과 조합된 화합물 1의 활성: A375M 흑색종 모델에서, 화합물 1을 단독으로 매일 투여하면 비히클 처치와는 통계적으로 상이한 유의한 종양 성장 억제가 달성되었다 (74% TGI, $p < 0.05$). 카르보플라틴 (50 mg/kg) 및 파클리탁셀 (20 mg/kg)을 매주 투여한 경우에는 TGI가 대략 45%였다 (도 5 및 표 3). 화합물 1 및 카르보플라틴 + 파클리탁셀의 조합 처치는 항-종양 활성을 증진 (94% TGI vs. 비히클, $p < 0.001$)시켜 이러한 처치 코호트에서 1/10 부분 반응이 관찰되었고, 단일요법보다 우수하였다. 일반적으로, 화합물 1 (50 mg/kg)과 카르보플라틴 + 파클리탁셀의 조합 요법은 단일 작용제 및 조합물군에서 체중 손실률 (BWL) 5% 미만으로 허용되었고, 부가적 반응으로서 분석되었다 (표 2/3 참조. 즉, 기대치/관찰치 (E/O)가 약 1임).

표 3

A375M 흑색종 모델에서 조합 처치시 화합물 1의 활성

처치, n = 10/군	평균 TV, 제25일	% TGI, 제25일	P 값 vs. 비히클, 제25일	PR/CR	평균 BW 변화율(%) vs. 초기값	임상적 관찰	% T/C 관찰치 (O)	T/C 기대치 (E)	비율 (E/O)
비히클	759				0%	BAR			
화합물 1 50 mg/kg, qd	315	75%	<.01		0%	BAR	0.42		
카르보플라틴 50 mg/kg + 파클리탁셀 20 mg/kg, 매주 1회	494	45%	>.05		1%	BAR	0.65		
TK1258 50 mg/kg + 카르보플라틴 + 파클리탁셀	203	94%	<.001	1PR	-5%	제25일에 BWL > 15%인 마우스 1마리	0.27	0.27	1.01

<222>

<223> 종양 성장 억제율 (TGI) = $[1 - \{(\text{처치군의 평균 종양 부피, TV} - \text{무작위화 시점의 종양 부피}) / (\text{대조군의 평균 종양 부피} - \text{무작위화 시점의 종양 부피}) \}] \times 100$; BAR = 활발하고 의식이 뚜렷하고 외부 자극에 반응함(Bright, Alert, Responsive); BWL = 체중 손실률; 통계 시험 = 랭크/딘에서의 크루스칼-왈리스 1원 분산 분석(Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks/Dunn's); 반응 = CR (완전한 반응, 측정가능한 종양이 없음), 또는 PR (부분적 반응, 처치 개시 시점에 각 동물의 종양 부피에 비해 50% 내지 99%의 종양 부피 감소); 부가적 반응 = E/O의 비율이 1.0임.

<224> 화합물 1 및 카르보플라틴 + 파클리탁셀의 조합 요법을 CHL-1 모델에서도 평가하였다. 도 6 및 표 4에서 나타난 바와 같이, 화합물 1 (30 mg/kg)을 매일 투여하고 카르보플라틴 (50 mg/kg) + 파클리탁셀 (25 mg/kg)을 매주 투여한 경우의 종양 억제는 단일 작용제에 비해 유의하게 증진되었다 (84% TGI). 화합물 1 및 카르보플라틴 + 파클리탁셀의 조합 요법은 잘 허용되었고, 카르보플라틴 + 파클리탁셀과는 유의하게 상이하였으나 ($p < .05$, ANOVA/Dunn's), 화합물 1 (30 mg/kg, qd) 단독의 경우는 그렇지 않았다 ($p < .05$, t-검정). 그러나, 약물 반응의 보다 상세한 분석에서는 CHL-1 흑색종 모델에서 화합물 1 + 카르보플라틴 + 파클리탁셀 사용시에 부가적 반응보다 더 우수한 효과 (상승작용을 시사함) ($E/O > 1$)가 관찰되었다.

표 4

암컷 Nu/Nu 마우스에서 BRAf WT CHL-1 흑색종 종양에 대한
화합물 1 및/또는 카르보플라틴 + 파클리탁셀의 조합물

처치 (n = 10/군)	제14일에 TV의 평균	최대 % TGI, 제14일	TGI vs. 비히클 p-값, 제14일	초기 BW에서의 평균 변화율 (%)	임상적 관찰	T/C 관찰치 (O)	T/C 기대치 (E)	비율 (E/O)
비히클	1567			8.1%				
카르보플라틴 50 mg/kg + 파클리탁셀 25 mg/kg, 매주 1회	1693	-9.65%	>.05	2.4%	BAR	1.08		
화합물 1 30 mg/kg, qd	884	52.51%	>.05	4.3%	BAR	0.56		
화합물 1 30 mg/kg + 카르보플라틴 + 파클리탁셀	476	83.79%	>.05	3.5%	1 BWL > 15%	.030	0.61	2.00

<225>

<226>

종양 성장 억제율 (TGI) = $[1 - \{(\text{처치군의 평균 종양 부피, TV} - \text{무작위화 시점의 종양 부피}) / (\text{대조군의 평균 종양 부피} - \text{무작위화 시점의 종양 부피})\}] \times 100$; BAR = 활발하고 의식이 뚜렷하고 외부 자극에 반응함; BWL = 체중 손실률; 랭크/던에서의 크루스칼-왈리스 1원 ANOVA; E/O = 1 (부가적 반응). E/O > 1 (상승작용).

<227>

FGF-R 세포 포획 ELISA 검정: 표 5에서 하기 나타낸 바와 같이, 화합물 1은 FGF 수용체 및 또한 다른 티로신 키나제의 세포 인산화를 억제한다.

표 5

화합물 1은 RTK 표적의 세포 인산화를 억제함.

표적	세포주	TKI258 nM IC ₅₀
FGFR1	형질감염된 HEK293	166
FGFR2	형질감염된 HEK293	78
FGFR3K650E*	형질감염된 HEK293	55
FGFR4	형질감염된 HEK293	1915
FLT3	RS4;11 AML	500
FLT3-ITD	MV4;11 AML	1-5
VEGFR1	KM12L4a 결장	< 50
VEGFR2	HMVEC	<10
PDGFRb	KM12L4a 결장	< 50

<228>

<229>

(* FGFR3K650E는 여러 흑색종 환자 하위세트에서 나타나는 활성화 돌연변이임)

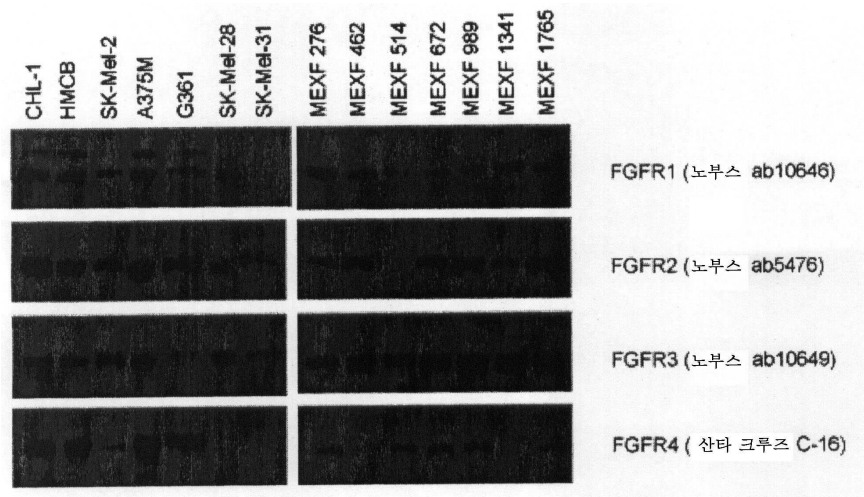
- <230> 화학식 I의 다른 화합물, 예컨대 화학식 IB 및 IC의 화합물을 상기한 바와 같이 제조하였다. 이들 화합물을 사용한 연구는 화합물 1에 대하여 상기한 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 이러한 연구는 이들 화합물도 마우스, 인간, 및 다른 포유동물 대상체에서 흑색종을 치료하는데 유용함을 보여줄 것이다.
- <231> 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허 출원서, 허여된 특허, 및 기타 문헌은 각각의 개별적인 간행물, 특허 출원서, 허여된 특허, 또는 기타 문헌이 구체적이고 개별적으로 그 전문이 참고로 포함된다고 언급된 것과 마찬가지로 본원에 참고로 포함된다. 참고로 포함된 문헌에 기재된 정의가 본 개시내용에서의 정의와 상충되는 경우에는, 상기 참고로 포함된 문헌에서의 정의를 배제한다.
- <232> 본 발명은 본원에서 예시를 위해 기재한 실시양태로 제한되지 않지만, 이의 모든 그러한 형태를 본 발명의 범위에 속하는 것으로 하여 포함한다는 것을 이해해야 한다.

도면의 간단한 설명

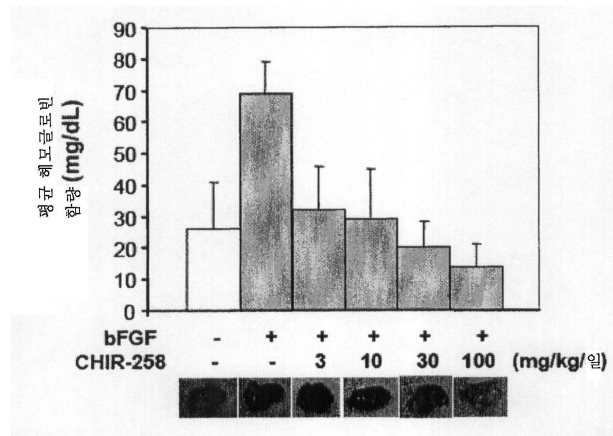
- <42> 도 1은 흑색종 세포에서의 FGFR1 내지 4의 발현을 웨스턴 블롯으로 특징규명한 것을 보여준다.
- <43> 도 2는 bFGF-유도된 매트릭셀 플러그 검정에서 화합물 1이 강력한 항-혈관신생 활성을 나타냄을 보여준다.
- <44> 도 3은 A375M (B-Raf 돌연변이체) 인간 흑색종 이종이식편 모델에서 화합물 1이 평균 종양 부피에 미치는 유의한 항-종양 효과를 보여주는 그래프이다.
- <45> 도 4는 CHL-1 (야생형 B-Raf) 인간 흑색종 이종이식편 모델에서 화합물 1이 평균 종양 부피에 미치는 유의한 항-종양 효과를 보여주는 그래프이다.
- <46> 도 5는 nu/nu 마우스의 흑색종 A375M (BRaf 돌연변이체) 모델에서 화합물 1, 카르보플라틴 및 파클리탁셀의 조합 요법이 평균 종양 부피에 미치는 유의한 항-종양 효과를 보여주는 그래프이다.
- <47> 도 6은 암컷 Nu/Nu 마우스의 CHL-1 흑색종 종양에 대하여 화합물 1을 매일 투여하고/하거나 카르보플라틴 및 파클리탁셀을 매주 투여한 경우에 이것이 평균 종양 부피에 미치는 유의한 항-종양 효과를 보여주는 그래프이다.

도면

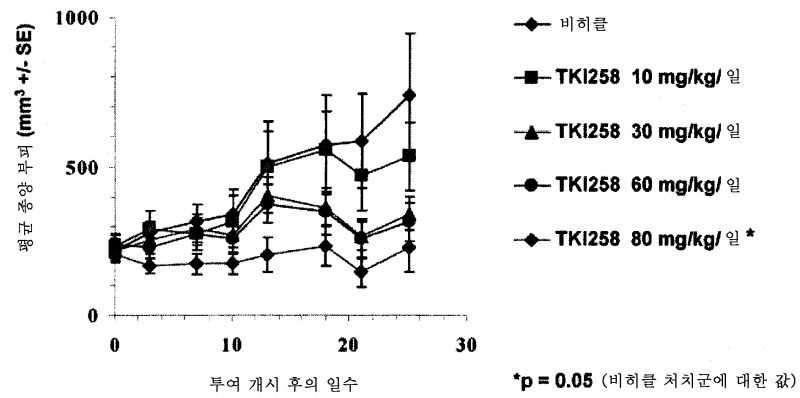
도면1



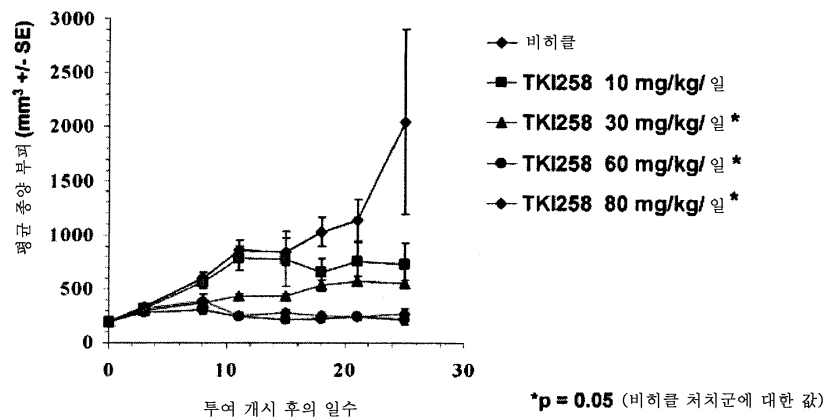
도면2



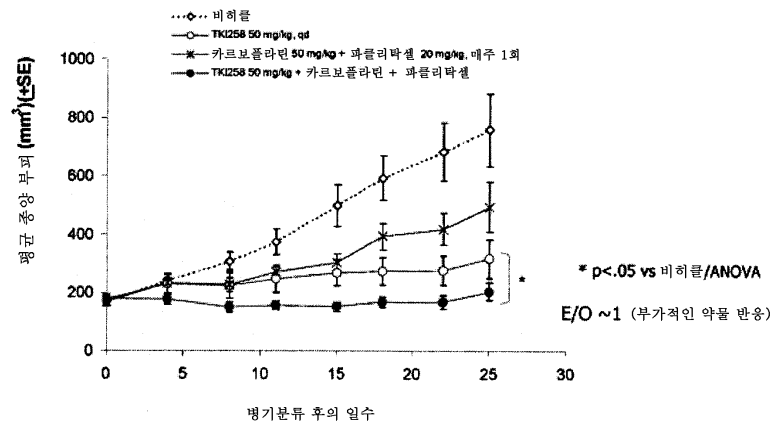
도면3



도면4



도면5



도면6

