



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(51) . Int. Cl.

*C07D 241/20* (2006.01)

*C07D 401/04* (2006.01)

*C07D 403/04* (2006.01)

*A61K 31/4965* (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0054205

(43) 공개일자 2007년05월28일

(21) 출원번호 10-2007-7006216

(22) 출원일자 2007년03월19일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2007년03월19일

(87) 국제공개번호 WO 2006/021002

(86) 국제출원번호 PCT/US2005/029518

국제출원일자 2005년08월18일

국제공개일자 2006년02월23일

(30) 우선권주장 60/602,968 2004년08월19일 미국(US)

(71) 출원인 이코스 코포레이션  
미국 워싱턴 98021 사우스 이스트 보텔 투엔티스 애비뉴 22021

(72) 발명자 파로 프랑신 에스  
미국 워싱턴 98040 머서 아일랜드 93번가 사우스 이스트 4222  
홀콤 라이언  
미국 워싱턴 98033 커크랜드 2번가 1214  
톨셋 유진  
미국 워싱턴 98033 커크랜드 #304 2번가 사우스 410  
가우디노 존 조세프  
미국 콜로라도 80503 롱몬트 플래리 파이어 서클 4224

(74) 대리인 김진희  
강승옥

전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) C H K 1 억제에 유용한 화합물

(57) 요약

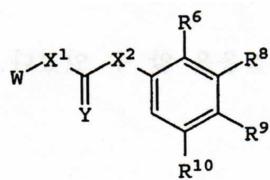
본 발명에는 DNA 복제시 DNA 손상 또는 병변과 관련된 질병 및 증상을 치료하는데 유용한 아릴- 및 헤테로아릴-치환된 우레아 화합물이 개시되어 있다. 또한, 본 발명에는 이 화합물의 제조 방법, 및 예를 들어, DNA 복제, 염색체 분리 또는 세포 분열에 있어서의 결합을 특징으로 하는 암 및 기타 질병의 치료에서의 상기 화합물의 치료제로서의 용도도 개시되어 있다.

**특허청구의 범위**

## 청구항 1.

하기 화학식 I의 화합물, 및 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 프로드러그 또는 용매화물:

화학식 I



상기 식 중,  $X^1$ 은 존재하지 않거나,  $-O-$ ,  $-S-$ ,  $-CH_2-$ , 또는  $-N(R^1)-$ 이고;

$X^2$ 는  $-O-$ ,  $-S-$ , 또는  $-N(R^1)-$ 이며;

$Y$ 는  $O$  또는  $S$ 이거나; 또는  $=Y$ 는 일반 탄소 원자에 결합되어 있는 2개의 수소 원자를 나타내며;

$W$ 는 헤테로아릴, 아릴, 헤테로시클로알킬, 시클로알킬, 및 헤테로아릴 또는 아릴 기로 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고,

여기서 (a) 상기  $W$  기의 아릴 또는 헤�테로아릴기는  $CF_3$  및 헤�테로아릴 중의 하나 이상으로 치환되며, (b) 상기  $W$  기의 아릴기는  $R^2$ 로 표시되는 1~3개의 치환기로 임의 치환되고, (c) 상기  $W$  기의 헤�테로아릴기는  $R^5$ 로 표시되는 1~3개의 치환기로 임의 치환되며;

$R^1$ 은 하이드로,  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{2-6}$ 알케닐,  $C_{2-6}$ 알키닐, 및 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되며;

$R^2$ 는 헤�테로아릴, 할로, 임의 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{2-6}$ 알케닐,  $OCF_3$ ,  $NO_2$ ,  $CN$ ,  $NC$ ,  $N(R^3)_2$ ,  $OR^3$ ,  $CO_2R^3$ ,  $C(O)N(R^3)_2$ ,  $C(O)R^3$ ,  $N(R^1)COR^3$ ,  $N(R^1)C(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $C(O)R^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $C(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $NHC(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $SO_2NR^3$ ,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $OR^3$  및  $SR^3$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

$R^3$ 은 하이드로, 할로,  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{2-6}$ 알케닐, 시클로알킬, 아릴, 헤�테로아릴,  $CO_2R^4$ ,  $SO_2R^4$ , 할로, 히드록시, 아릴, 헤테로아릴, 헤�테로시클로알킬,  $N(R^4)_2$  및  $SO_2R^4$  중 하나 이상으로 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{1-6}$ 알킬렌아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌헤테로아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $C_{3-8}$ 헤테로시클로알킬,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $SO_2$ 아릴, 임의 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬렌 $N(R^4)_2$ ,  $OCF_3$ ,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $(R^4)_3^+$ ,  $C_{3-8}$ 헤테로시클로알킬, 및  $CH(C_{1-6}$ 알킬렌 $N(R^4)_2)_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 2개의  $R^3$ 기는 함께 임의 치환되는 3~6원 지방족 고리를 형성하고;

$R^4$ 는 하이드로,  $C_{1-6}$ 알킬, 시클로알킬, 아릴, 헤�테로아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌아릴, 및  $SO_2C_{1-6}$ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 2개의  $R^4$ 기는 함께 임의 치환되는 3~6원 고리를 형성하고;

$R^5$ 는  $C_{1-6}$ 알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로시클로알킬,  $N(R^3)_2$ ,  $OR^3$ , 할로,  $N_3$ ,  $CN$ ,  $C_{1-6}$ 알킬렌아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $N(R^3)_2$ ,

$C(O)R^3$ ,  $C(O)OR^3$ ,  $C(O)N(R^3)_2$ ,  $N(R^1)C(O)R^3$ ,  $N(R^1)C(O)OR^3$ ,  $CF_3$ , 및  
부터 선택되며;

$R^6$ 은  $OR^{11}$ ,  $-C\equiv C-R^7$ , 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

$R^7$ 은 하이드로,  $C_{1-6}$ 알킬, 아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌아릴, 헤�테로아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌헤테로아릴, 및 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되며;

$R^8$ ,  $R^9$  및  $R^{10}$ 은 독립적으로 하이드로, 할로, 임의 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{2-6}$ 알케닐,  $C_{2-6}$ 알카닐,  $OCF_3$ ,  $CF_3$ ,  $NO_2$ ,  $CN$ ,  $NC$ ,  $N(R^3)_2$ ,  $OR^3$ ,  $CO_2R^3$ ,  $C(O)N(R^3)_2$ ,  $C(O)R^3$ ,  $N(R^1)COR^3$ ,  $N(R^1)C(O)OR^3$ ,  $N(R^8)C(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $C(O)R^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $C(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-3}$ 알킬렌 $OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $NHC(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $SO_2NR^3$ ,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $OR^3$ , 및  $SR^3$ 로 이루어진 군으로부터 선택되며;

$R^{11}$ 은 하이드로,  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{2-6}$ 알케닐, 시클로알킬, 헤�테로시클로알킬, 아릴, 헤�테로아릴,  $SO_2R^4$ , 할로, 히드록시, 아릴, 헤�테로아릴,  $N(R^4)_2$ , 및  $SO_2R^4$  중 하나 이상으로 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{1-6}$ 알킬렌아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌헤테로아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $C_{3-8}$ 헤테로시클로알킬,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $SO_2$ 아릴, 임의 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬렌 $N(R^4)_2$ ,  $OCF_3$ ,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $N(R^4)_3^+$ ,  $C_{3-8}$ 헤테로시클로알킬, 및  $CH(C_{1-6}$ 알킬렌 $N(R^4)_2)_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

## 청구항 2.

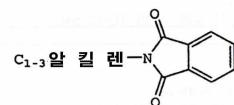
제1항에 있어서, 상기  $X^1$  및  $X^2$ 는  $-N(H)-$ 이고;  $Y$ 는  $O$  또는  $S$ 이며;  $W$ 는  $N$ ,  $O$  및  $S$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상의 이종 원자를 함유하는 헤�테로아릴이며, 상기 고리는  $C_{1-6}$ 알킬, 아릴, 헤�테로아릴,  $N(R^3)_2$ ,  $OR^3$ ,  $C(O)N(R^3)_2$ ,  $CO_2R^3$ ,  $CN$ ,  $CF_3$ , 및 할로로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 또는 2 개의 치환기로 임의 치환되는 것인 화합물.

## 청구항 3.

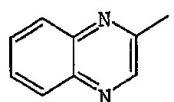
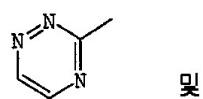
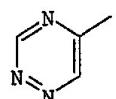
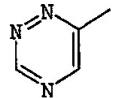
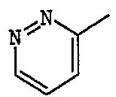
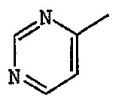
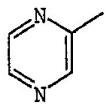
제2항에 있어서, 상기  $W$ 는 임의 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬, 아릴, 헤�테로아릴,  $N(R^3)_2$ ,  $OR^3$ ,  $C(O)OR^3$ ,  $C(O)N(R^3)_2$  및 할로로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 또는 2개의 치환기로 임의 치환되는, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐 및 트리아지닐로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 화합물.

## 청구항 4.

제2항에 있어서, 상기  $W$ 는



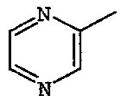
으로 이루어진 군으로



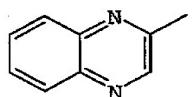
로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 화합물.

### 청구항 5.

제2항에 있어서, 상기 W는



및



로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 화합물.

청구항 6.

제2항에 있어서, 상기 W는 피라지닐인 것인 화합물.

청구항 7.

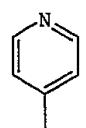
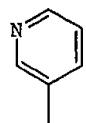
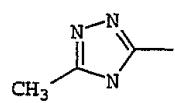
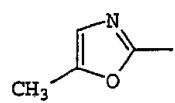
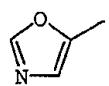
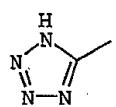
제1항에 있어서, 상기 R<sup>6</sup>는 OR<sup>11</sup>인 것인 화합물.

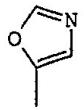
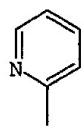
청구항 8.

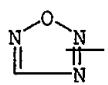
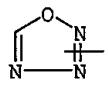
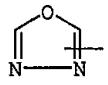
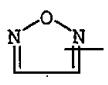
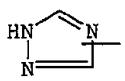
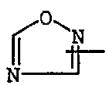
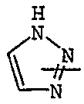
제1항에 있어서, 상기 R<sup>7</sup>은 헤테로아릴인 것인 화합물.

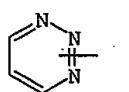
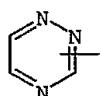
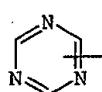
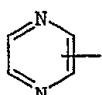
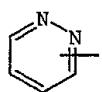
청구항 9.

제1항에 있어서, 상기 W 상의 헤테로아릴 치환기 및 R<sup>6</sup>의 헤�테로아릴기는 독립적으로,

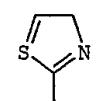






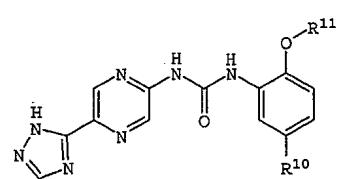
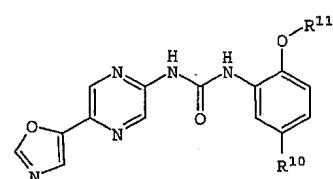
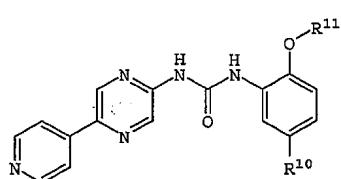
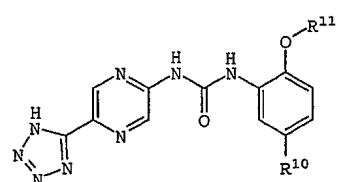
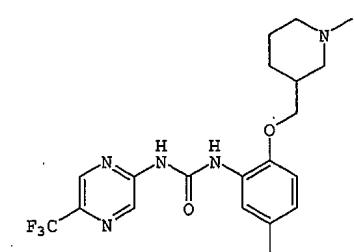
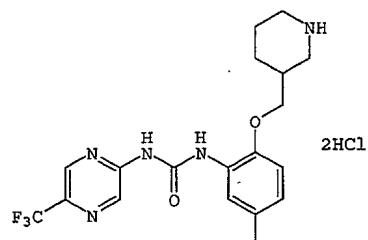
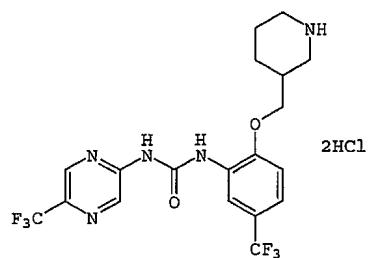


및

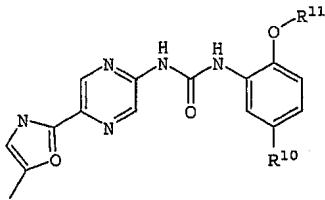


로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 화합물.

청구항 10.



및



로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물.

### 청구항 11.

제1항의 화합물 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물.

### 청구항 12.

세포와 유효량의 제1항의 화합물을 접촉시키는 단계를 포함하는 세포 내에서 체크포인트 키나제 1(checkpoint kinase 1)을 억제하는 방법.

### 청구항 13.

치료학적 유효량의 제1항의 화합물을 화학요법 제제, 방사선요법 제제 또는 이들의 혼합물과 조합하여 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 의학적 징후에 대하여 화학요법 치료 또는 방사선요법 치료를 받는 개체 내에서 세포를 감작하는 방법.

### 청구항 14.

제13항에 있어서, 하나 이상의 사이토카인, 림포카인, 성장 인자, 또는 다른 조혈 인자를 투여하는 단계를 더 포함하는 방법.

### 청구항 15.

제12항에 있어서, 화학요법 제제는 알킬화제, 대사 길항 물질, 호르몬 또는 이의 길항 물질, 방사성 동위 원소, 항체 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택하는 것인 방법.

### 청구항 16.

제13항에 있어서, 방사선요법 제제는 감마-방사선, X-레이 방사선, 자외선, 가시 광선, 적외 방사선, 및 마이크로파 방사선으로 이루어진 군으로부터 선택하는 것인 방법.

### 청구항 17.

제13항에 있어서, 의학적 징후는 결장직장암, 두경부암, 췌장암, 유방암, 위암, 방광암, 외음부 암, 백혈병, 림프종, 흑색종, 신장 세포 암종, 난소암, 뇌종양, 골육종 및 폐암종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암인 것인 방법.

## 청구항 18.

제13항에 있어서, 의학적 징후는 점액양 세포 및 원형 세포 암종, 국소 진행성 종양(locally advanced tumor), 전이성 암, 유인 육종, 암 전이, 림프관성 전이, 편평 세포 암종, 식도 편평 세포 암종, 구강 암종, 다발성 골수종, 급성 림프구성 백혈병, 급성 비림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 모상 세포 백혈병, 삼출성 림프종(체강계 삼출성 림프종), 흉선 림프종 폐암, 소세포 암종, 피부 T 세포 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 부신 피질 암, ACTH-생산 종양, 비소세포 암, 유방암, 소 세포 암종, 유선관 암종, 위암, 결장암, 결장직장암, 결장직장 신생물 관련 용종, 췌장암, 간암, 방광암, 원발성 표재성 방광 종양, 방광의 침윤성 이행 세포 암종, 근육-침윤성 방광암, 전립선암, 난소 암종, 원발성 복막 상피성 신생물, 자궁 경부 암종, 자궁 내막 암, 질암, 여성 외음부 암, 자궁암 및 난소 여포내 고형 암, 고환암, 음경암, 신장 세포 암종, 내인성 뇌종양, 신경아세포종, 성상신경교세포 뇌종양, 신경교종, 중추 신경계 내 전이성 종양 세포 침윤, 골 종, 골육종, 악성 흑색종, 사람 피부 각질 세포의 진행성 종양, 편평 세포 암, 갑상선 암, 망막아세포종, 신경아세포종, 복막 삼출, 악성 흉막 삼출, 중피종, 빌리스 종양, 담낭암, 영양막 신생물, 혈관주위세포종 및 카포시 육종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암인 것인 방법.

## 청구항 19.

제12항에 있어서, 치료는 류마티스성 관절염, 건선, 백반, 웨그너 육아종증 및 전신 홍반성 루프스병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염증성 징후에 대하여 투여하는 것인 방법.

## 청구항 20.

제13항에 있어서, 제1항의 화합물은 단백질 키나제 A, 단백질 키나제 C, cdc2 및 pp60v-src에 비하여 Chk1을 억제하는데 있어서 20배 이상의 선택성을 보유하는 것인 방법.

## 청구항 21.

제13항에 있어서, 제1항의 화합물은 단백질 키나제 A, 단백질 키나제 C, cdc2 및 pp60v-src에 비하여 Chk1을 억제하는데 있어서 75배 이상의 선택성을 보유하는 것인 방법.

## 청구항 22.

제13항에 있어서, 제1항의 화합물은 단백질 키나제 A, 단백질 키나제 C, cdc2 및 pp60v-src에 비하여 Chk1을 억제하는데 있어서 100배 이상의 선택성을 보유하는 것인 방법.

## 청구항 23.

제13항에 있어서, 화학요법 제제는 켐시타빈, 페메트렉시드, 시스플라틴, 카르보플라틴, 파클리탁셀, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 것인 방법.

## 청구항 24.

비정상적으로 증식하는 세포들 사이에서 세포 주기 정지가 실질적으로 동시에 일어나도록 비정상적으로 증식하는 세포를 포함하는 세포 군집을 Chk1 활성화제와 접촉시킨 후, 상기 세포 군집과 제1항의 화합물을 접촉시켜 상기 세포 주기 정지를 실질적으로 파기하는 단계를 포함하는 비정상적 세포 증식을 억제하는 방법.

**청구항 25.**

제24항에 있어서, Chk1 활성화제는 하나 이상의 화학요법 제제를 포함하는 것인 방법.

**청구항 26.**

제24항에 있어서, Chk1 활성화제는 이온화 또는 자외 방사선을 포함하는 것인 방법.

**청구항 27.**

제24항에 있어서, 상기 이온화 방사선은 방사선 감작제, 감광제, 또는 이들의 혼합물과 함께 투여하는 것인 방법.

**청구항 28.**

제24항에 있어서, 상기 비정상적으로 증식하는 세포는 비암성인 것인 방법.

**명세서****기술분야**

본 발명은 유전 물질의 완전성을 유지하고 손상을 복구하는 효소의 억제에 유용한 화합물에 관한 것이다. 더욱 구체적으로, 본 발명은 일련의 아릴- 및 헤테로아릴-치환 우레아 화합물, 이 화합물의 제조 방법 및 이 화합물의 치료제로서의 용도 예를 들어, 데옥시리보핵산(DNA) 복제, 염색체 분리 또는 세포 분열상 결손으로 특징되는 암 및 기타 질병의 치료에 사용되는 치료제로서의 용도에 관한 것이다.

**배경기술**

다수의 질병, 병상 및 장애(이하 "징후"라 칭함)은 비정상적으로 증식하는 세포가 관여하고 있는 것을 특징으로 한다. 본원에 사용된 "비정상적으로 증식하는 세포"(또는 "비정상 세포 증식")이란, 정상적이거나, 적절하거나 또는 예상되는 경로로부터 이탈된 세포 증식을 의미한다. 예를 들어, 비정상 세포 증식에는 DNA 또는 기타 세포 성분이 손상을 입거나 또는 결손된, 적당하지 않은 세포 증식을 포함한다. 비정상 세포 증식에는 또한 부적절하게 높은 수준의 세포 분열, 부적절하게 낮은 수준의 세포 사멸(예를 들어, 세포 사멸), 또는 이 둘 모두로부터 야기되거나, 매개되거나, 또는 이것이 원인이 되는 징후를 포함한다. 이러한 징후는 예를 들어, 세포, 세포군 또는 조직(들)의 단일 또는 다발성 국소 비정상 증식을 특징으로 할 수 있으며, 이 징후에는 암성(cancerous)(양성 또는 악성) 및 비암성(noncancerous) 징후를 포함한다.

정의상으로, 모든 암(양성 및 악성)은 몇몇 형태의 비정상 세포 증식을 포함한다. 이의 비제한적 예로서는 암종 및 육종을 포함한다. 다른 예에 관하여는 이하에 기술되어 있다. 일부 비암성 징후로서는 비정상 세포 증식도 포함한다. 비정상 세포 증식과 관련된 비암성 징후의 비제한적 예로서는 류마티스성 관절염, 건선, 백반, 웨그너 육아종증 및 전신 루프스병을 포함한다. 다른 예에 관하여는 이하에 기술되어 있다.

비정상적으로 증식하는 세포와 관련된 징후를 치료하는 한 가지 방법으로서는 DNA 손상 제제를 사용하는 것을 포함한다. 이 제제는 생명 유지에 필요한 세포내 경로 예를 들어, DNA 대사, DNA 합성, DNA 전사 및 방추 미세소관 형성을 파괴시켜 비정상적으로 증식하는 세포를 사멸시키도록 설계된다. 이 제제는 또한 예를 들어, 염색체 구조의 완전성을 교란시키는 병변을 DNA에 도입시킴으로써 작용할 수 있다. DNA 손상 제제는 정상적인 건강한 세포에는 최소한의 손상을 주도록 하면서, 비정상적으로 증식하는 세포는 최대한 손상시켜, 결국에는 세포가 사멸되도록 유도하는 방식으로 설계 및 투여된다.

다수의 DNA 손상 제제가 현재까지 개발되고 있다. 다른 제제들도 또한 개발중에 있다. DNA 손상 제제로서는 화학 요법 제제 및 방사선을 포함한다. 그러나 불행하게도, 비정상적 세포 증식과 관련된 증상을 치료하는데 있어서, 특히, 암 치료에 있어서, DNA 손상 제제의 효능은 기대에 못 미치고 있다. 건강한 세포보다 비정상적으로 증식하는 세포에 대한 이들 제제의 선택성(종종 치료 지수(therapeutical index)라고도 칭함)은 거의 없다고 볼 수 있다.

뿐만 아니라, 모든 세포는 DNA 손상 제제와는 다른 목적으로 작용할 수 있는 감작 및 복구 기작을 보유한다. 이러한 감작 기작(세포 주기 체크포인트(cell cycle checkpoint)라고도 함)들은 다수의 세포 복제 단계의 순서를 유지시키고 이를 각 단계가 높은 신뢰도로 실행될 수 있도록 돋는다[Hartwell et al., *Science*, 246:629-634 (1989); Weinert et al., *Genes Dev.*, 8:652 (1994)]. 세포가 DNA 손상 제제에 의하여 의도적으로 유도한 손상을 포함하여 DNA 손상을 탐지하면, 임의의 신호 전달 경로는 세포 주기 체크포인트를 활성화시키고, 세포 복제 주기를 일시적으로 정지시킨다("정지(arrest)"). 이러한 정지로 인하여, 세포가 비정상적으로 증식하는 시간에 그 세포의 DNA가 복구될 수도 있고, 종종 영향을 받은 세포가 계속해서 생존 및 증식하는데 충분하게 되기도 한다. 이와 같이 원하지 않는 복구 작용은 비정상적으로 증식하는 세포를 사멸시키는데 충분한 DNA 손상을 유도하려는 노력을 수포로 만드는 경향이 있다.

예를 들어, 화학 요법 제제 예를 들어, Gemzar<sup>TM</sup>(젬시타빈, 또는 2',2' 디플루오로-2'-데옥시시티딘)는 그 자체가 DNA 합성중에 DNA에 혼입되어 DNA를 손상시킨다. 복구되지 않고 남은 부분, 즉, 손상된 DNA는 일반적으로 생명을 유지할 수 없게 된다. 그러나, 다수의 표적화 세포에 있어서, 세포 주기 체크포인트는 적절치 못하게 생성된(또는 손상된) DNA를 탐지한다. 활성화된 세포 주기 체크포인트는 손상된 DNA가 복구되기에 충분한 시간 동안 세포 주기 정지를 일으킨다. 이는 비정상적으로 증식하는 세포가 DNA 손상 제제 예를 들어, 화학 요법 제제, 방사선 요법 제제 및 기타 요법 제제의 세포 사멸 효능을 방해한다는 것을 이론상으로 증명하는 한 가지 수단이다.

기타 DNA 손상 제제는 종양 세포를 S-기에 정지시킨다. 종양 세포는 화학 요법 제제가 투여되는 동안 단순히 S-기에 정지되어서 특정 화학 요법에 영향받지 않는 것으로 관찰되었다. 이 약품이 제거되면, DNA 손상은 복구되고, 세포 주기 정지(cell cycle arrest)는 멈추며, 이 세포들은 나머지 세포 주기를 진행하게 된다[Shi et al., *Cancer Res.* 61:1065-1072, 2001]. 기타 치료법은 다른 체크포인트 시점 예를 들어, G1 및 G2 기(이하, 보다 상세히 설명함)에 세포 주기 정지를 야기한다. 세포 주기 체크포인트를 활성화시키는 DNA 손상 제제를 본원에서는 일반적으로 "체크포인트 활성화제(checkpoint activator)"라 칭한다. "Chk1"("체크포인트 1"이라 칭함)으로 표시한 체크포인트를 활성화시키는 DNA 손상 제제를 "Chk1 활성화제"라 칭한다. 이러한 체크포인트에 대한 억제제를, 일반적으로 그리고 구체적으로, 각각 "체크포인트 억제제" 및 "Chk1 억제제"라 칭한다.

그러므로, 다양한 DNA 손상 체크포인트를 억제하는 것은, 치료 목적으로 유도된 DNA 손상을 세포가 복구하는 것을 차단하고 표적화된 세포가 DNA 손상 제제에 대하여 감작하는 것을 보조할 것으로 기대된다. 이와 같은 감작화는 이러한 치료제의 치료 지수를 증가시킬 것으로 기대된다.

본 발명을 더욱 깊이 이해하기 위하여, 이하에서는 세포 주기 단계 및 Chk1의 역할에 대하여 더욱 상세히 설명하고자 한다.

세포 주기는 모든 진핵 생물 종에 걸쳐서 기본적인 과정과 조절 방식이 구조적으로 그리고 기능적으로 동일하다. 유사 분열(체세포) 세포 주기는 4-기(phase)로 이루어진다: G1(휴지)기, S(합성)기, G2(휴지)기 및 M(유사 분열)기. 상기 G1, S 및 G2기를 총칭하여 세포 주기의 간기(interphase)라 칭한다. G1기 동안에는, 세포의 생물 합성이 고속으로 진행된다. S기는 DNA 합성이 시작될 때 개시되고, 세포 핵의 DNA 함량이 복제되고 2개의 동일한 염색체 세트가 형성되면 종료된다.

이후, 세포는 유사 분열이 개시될 때까지 지속되는 G2기에 들어간다. 유사 분열에 있어서, 염색체는 쌍을 이루고 분리되며, 2개의 핵이 형성되고, 세포는 2개의 염색체 세트 중 어느 하나를 함유하는 하나의 핵을 보유하는 2개의 떨 세포로 분열되는 세포질 분열이 일어나게 된다. 세포질 분열로 M기가 종료되는데, 이는 다음 세포 주기의 간기가 시작됨을 알리는 것이다. 세포 주기 단계들이 진행되는 순서는 엄격하게 조절되어서, 하나의 세포 주기 단계의 개시는 이전 세포 주기 단계가 완료되었는지 여부에 달려 있다. 이는 유전 물질이 제1 세대 체세포로부터 다음 세대로 유전물질이 복제 및 분리될 때의 신뢰성을 유지시키게 된다.

세포 주기 체크포인트는, 세포 주기 시그널 또는 염색체 기작의 결합에 반응하여 연속적으로 작용하는 3개 이상의 별도 폴리펩티드 클래스(class)를 포함하는 것으로 알려져 있다[Carr, A.M., *Science*, 271:314-315 (1996)]. 제1 클래스는 세포 주기 중 DNA 손상 또는 이상을 탐지 또는 감지하는 단백질 패밀리이다. 이러한 감지 인자의 예로서는 모세 혈관 확장성 운동 실조 돌연 변이 단백질(Atm) 및 모세 혈관 확장성 운동 실조 방사선 관련 단백질(Ataxia Telangiectasia Rad-related protein)(Atr)을 포함한다. 탐지체에 의하여 탐지되는 시그널을 증폭 및 전이시키는 제2 폴리펩티드 클래스의 예로서는 Rad53[Alen et al., *Genes Dev.* 8:2416-2488 (1994)] 및 Chk1이 있다. 폴리펩티드의 제3 클래스로는 예를 들어, 유사 분열 및 세포 사멸을 정지시키는 세포 반응을 매개하는 세포 주기 작동체(effectuator) 예를 들어, p53을 포함한다.

현재 세포 주기 체크포인트의 기능에 관하여 알고 있는 대부분의 사실들은 종양 유도성 세포주의 연구 결과로부터 밝혀진 것들이다. 많은 경우에 있어서, 종양 세포들은 중요한 세포 주기 체크포인트를 수행하지 않는다[Hartwell et al., *Science* 266:1821 28, 1994]. 세포가 신생물 형성 상태로 진화하는데 있어서 중요한 단계는, 예를 들어, p53을 포함하여, 세포 주기 체크포인트 경로를 불활성화하는 돌연 변이의 발생이라고 보고된 바 있다[Weinberg, R.A., *Cell* 81:323 330, 1995; Levine, A. J., *Cell* 88:3234 331, 1997]. 이와 같은 세포 주기 체크포인트의 손실은 DNA의 손상에도 불구하고 종양 세포의 복제가 일어나게 된다.

완전한 세포 주기 체크포인트를 수행하는 비암성 조직은 통상적으로 단일 체크포인트 경로의 일시적인 파괴로부터는 자유롭다. 그러나, 종양 세포는 세포 주기 진행을 제어하는 경로에 결함이 있어서, 추가적인 체크포인트 방해는 이들 종양 세포들을 DNA 손상 제제에 특히 민감하게 만든다. 예를 들어, 돌연 변이 p53을 함유하는 종양 세포는 G1 DNA 손상 체크포인트와 G2 DNA 손상 체크포인트를 유지시키는 능력 모두에 결함이 있다[Bunz et al., *Science*, 282:1497 501, 1998]. G2 체크포인트 또는 S기 체크포인트의 개시를 표적화하는 체크포인트 억제제는 상기 종양 세포가 DNA 손상을 복구하는 능력을 더욱 망쳐놓는 것으로 예측되며, 따라서 방사선 및 전신 화학 요법 양자 모두에 있어서 치료 지수를 증강시키는 후보 물질이다[Gesner, T., Abstract at SRI Conference: Protein Phosphorylation and Drug Discovery World Summit, March 2003].

DNA 손상 또는 DNA 복제에 대한 임의의 방해 물질 존재 하에, 체크포인트 단백질인 Atm 및 Atr은 세포 주기를 정지시키는 시그널 전달 경로를 개시한다. Atm은 이온화 방사선에 반응하여 DNA 손상 체크포인트에 영향을 미치는 것으로 파악된다. Atr은 이중 사슬 DNA 파괴 및 단일 사슬 DNA를 파괴시키는 제제와, DNA 방사선 조사를 차단하는 제제에 의해 자극된다.

Chk1은 DNA 손상 체크포인트 시그널 전달 경로에 있어서 Atm 및/또는 Atr의 하류에 존재하는 단백질 키나제이다 [Sanchez et al., *Science*, 277:1497 1501, 1997; 미국 특허 제 6,218,109 호]. 포유 동물 세포에 있어서, Chk1은 DNA를 손상시키는 제제 예를 들어, 이온화 방사선, 자외(UV) 광선 및 히드록시우레아에 반응하여 인산화된다[Sanchez et al., 상동; Lui et al., *Genes Dev.*, 14:1448 1459, 2000]. 포유 동물 세포 내에서 Chk1을 활성화하는 상기 인산화 작용은 Atm[Chen et al., *Oncogene*, 18:249-256, 1999] 및 Atr[Lui et al., 상동]에 의존적이다. 뿐만 아니라, Chk1은 세포 주기 제어에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 공지되어 있는 유전자 산물인 wee1[O'Connell et al., *BMBO J.*, 16:545 554, 1997] 및 Psd1[Sanchez et al., *Science*, 286:1166 1171, 1999]를 모두 인산화하는 것으로 파악된다.

이러한 연구 결과를 통하여, 포유 동물 Chk1은 세포 주기를 S기에 정지시키는 Atm 의존성 DNA 손상 체크포인트에 영향을 미친다는 사실이 입증되었다. 최근에 S기에 있는 포유 동물 세포에 있어서 Chk1의 역할 구체적으로, DNA 합성 과정의 완전성을 모니터함에 있어서 Chk1의 역할에 관하여 규명된 바 있다[Feijoo et al., *J. Cell Biol.*, 154:913-923, 2001; Zhao et al., *PNAS USA*, 99:14795-800, 2002; Xiao et al., *J Biol Chem.*, 278 (24) :21767- 21773, 2003; Sorensen et al., *Cancer Cell*, 3(3):247-58, 2003]. Chk1은 사이클린 A/cdk2 활성을 조절하는 Cdc25A를 인산화함으로써 S기 정지를 유발시킨다[Xiao et al., 상동, 및 Sorensen et al., 상동]. Chk1은 또한 보통 세포가 G2기에서 유사 분열기로 진행할 때 사이클린-B/cdc2(Cdk1이라고도 알려짐)를 탈인산화시키는 이중 특이성 포스파타제인 Cdc25C를 인산화 및 불활성화 시킴으로써 G2기에 정지시킨다[Fernery et al., *Science*, 277:1495 7, 1997; Sanchez et al., 상동, Matsuoka et al., *Science*, 282:1893-1897, 1998; 및 Blasina et al., *Curr. Biol.*, 9:1 10, 1999]. 상기 두 가지 경우에 있어서, Cdk 활성을 조절함으로써 세포 주기를 정지시켜, DNA 손상시 또는 비복제 DNA의 존재 하에서 세포가 유사 분열을 개시하는 것을 막을 수 있게 된다.

세포 주기 체크포인트 억제제의 추가적인 클래스는 G1 또는 G2/M기 중 어느 하나의 단계에서 작용을 한다. UCN-01, 또는 7-히드록시스토로스포린은 원래 비특이적 키나제 억제제(단백질 키나제 C에 주로 영향을 미침)로서 분리되었으나, 최근에는 Chk1의 활성을 억제하고 G2 세포 주기 체크포인트를 방해하는 것으로 파악되고 있다[Shi et al., 상동]. 그러므로, UCN-01은 비선택적 Chk1 억제제이고, UCN-01은 고 용량에서 세포에 독성이 있다. 반면에, 이를 소량 투여시에는 다수의 세포성 키나제를 비특이적으로 억제할 뿐만 아니라, G1 체크포인트도 방해한다[Tenzer and Prusky, *Curr. Med Chem. Anti-Cancer Agents*, 3:35-46, 2003].

UCN-01은 성공률이 제한적인 암 치료제 예를 들어, 방사선, 항암제인 캠토테신[Tenzer and Prusky, 상동] 및 켐시타빈[Shi et al., 상동]과 함께 사용되고 있다. 뿐만 아니라, UCN-01은 또한 뇌종양 세포에서 테모졸로미드(TMZ) 유도성 DNA 미스매치 복구(MMR)의 효능을 증가시키는데에도 사용되고 있다[Hirose et al., *Cancer Res.*, 61:5843-5849, 2001]. 임상적으로, UCN-01은 기대되는 만큼 효과적이지 못한 화학 요법 제제인데, 그 이유는 아마도 치료 계획 수립이 용이하지 않고, 특정 중요 분자 표적이 확인되지 않기 때문일 것이다[Grant and Roberts, *Drug Resistance Updates*,

6:15-26, 2003]. 즉, Mack et. al.에 따르면, 배양된 비소세포성 폐암종 세포주에 있어서 UCN-01에 의한 시스-플라틴의 세포 주기 의존성 강화 작용은 있으나, UCN-01에 의해 표적화된 중요 세포 주기 체크포인트의 특이성은 분석하지 못하였다 [Mack et al., Cancer Chemother Pharmacol., 51 (4) :337-348, 2003].

세포 주기에 영향을 미치는 화학 요법을 사용하는 치료에 대해서 종양 세포를 감작시키기 위한 몇 가지 방안이 존재한다. 예를 들어, 2-아미노퓨린을 투여하면 다수의 세포 주기 체크포인트 기작 예를 들어, 미모신-유도성 G1 정지 또는 히드록시우레아 유도성 S기 정지를 방해하여, 세포가 유사 분열로 진행시키도록 만드는 방법이 있다[Andreassen et al., Proc Natl Acad Sci USA., 86:2272-2276, 1992]. 메틸잔틴인 카페인도 또한 G2 체크포인트로의 진행을 막아하여, 세포 사멸을 초래하는 DNA-손상 제제 예를 들어, 시스-플라틴 및 이온화 방사선의 세포 독성을 강화시키는데 사용되고 있다 [Bracey et al., Clin. Cancer Res., 3:1371-1381, 1997]. 그러나, 세포 주기의 진행을 억제하는 데에 사용되는 카페인의 양은 임상학적으로 허용 가능한 수준을 초과하므로, 이를 치료용으로 선택하는 것은 바람직하지 않다. 또한, Chk1 키나제에 대한 안티센스 뉴클레오티드는 토포이소머라제 억제제인 BNP1350에 대한 감수성을 증가시키는데 사용되지만[Yin et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 295:435-44, 2002], 이는 통상적으로 안티센스 치료 및 유전자 요법과 관련하여 문제를 일으키게 된다.

Chk1 억제제에 관하여는 WO 02/070494, WO 04/014876 및 WO 03/101444에 개시되어 있다. 부가의 Chk1 억제제로서는 디아릴우레아 화합물 예를 들어, 아릴- 및 헤테로아릴-치환 우레아 화합물[미국 특허 공보 2003-0069284 A1]; 메틸잔틴 및 관련 화합물[Fan et al., Cancer Res., 55:1649-54 (1995)]; 우레이도티오펜[WO 03/029241]; N-피롤로피리디닐 카복사미드(WO 0/28724); 안티센스 Chk1 뉴클레오티드(WO 01/57206); Chk1 수용체 길항제(WO 00/16781); 헤테로방향족 카복사미드 유도체(WO 03/037886); 아미노티오펜(WO 03/029242); (인다졸릴)벤즈이미다졸(WO 03/004488); 복소환-히드록시이미노-플루오렌(WO 02/16326); 사이تون만 스켈레톤-함유 유도체(scytoneman skeleton-containing derivatives; 사이تون민)(미국 특허 제 6,495,586 호); 헤테로아릴벤즈아미드(WO 01/53274); 인다졸 화합물(WO 01/53268); 인돌라카바졸(Tenzer et al., 상동); 크로만 유도체(WO 02/070515); 폴론(Schultz et al., J. Med. Chem., Vol. 42:2909-2919 (1999)); 인데노피라졸(WO 99/17769); 플라본(Sedlacek et al., Int. J. Oncol., 9:1143-1168 (1996)); 세린-트레오닌 키나제 웹티드 루프의 웹티드 유도체(WO 98/53050); 및 옥신돌(WO 03/051838)을 포함한다.

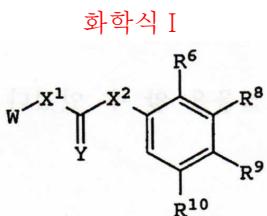
그러나, 당 업계에서는 여전히 효율적이고 선택적인 Chk1 억제제를 필요로 하고 있다. 본 발명은 상기 및 기타 요망에 부응하는 것이다.

### 발명의 개요

본 발명은 체크포인트 키나제 Chk1의 유효하고 선택적인 억제제에 관한 것이다. 본 발명의 Chk1 억제제는 비정상 세포 증식을 포함하는 정후를 치료하는데 유용하며, 또한 DNA 복제에 있어서 DNA 손상 또는 병변(lesion)과 관련된 정후를 치료하는 데에 있어서 화학 요법 감작제(chemosensitizing agent) 및 방사선 감작제(radiosensitizing agent)로서도 유용하다.

그러므로, 본 발명의 제1 측면은 하기 화학식 I의 화합물을 제공하는 것이다. 이 화합물은 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 프로드러그, 또는 용매화물을 유효량으로 개체에 투여하는 단계를 포함하는 Chk1 억제 방법에 유용하다.

화학식 I의 화합물은 다음과 같은 구조를 갖는다.



상기 식 중, X<sup>1</sup>은 존재하지 않거나, -O-, -S-, -CH<sub>2</sub>- 또는 -N(R<sup>1</sup>)-이고;

$X^2$ 는  $-O-$ ,  $-S-$  또는  $-N(R^1)-$ 이며;

Y는 O 또는 S이거나; 또는 =Y는 일반 탄소 원자에 결합되어 있는 2개의 수소 원자를 나타내며;

W는 헤테로아릴, 아릴, 및 헤테로아릴 또는 아릴기로 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 (a) 상기 W 기의 아릴 또는 헤테로아릴 기는  $CF_3$  및 헤테로아릴 중의 하나 이상으로 치환되며, (b) 상기 W 기의 아릴기는  $R^2$ 로 표시되는 1~3개의 치환기로 임의 치환되고, (c) 상기 W 기의 헤테로아릴기는  $R^5$ 로 표시되는 1~3개의 치환기로 임의 치환되며;

$R^1$ 은 하이드로,  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{2-6}$ 알케닐,  $C_{2-6}$ 알키닐 및 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되며;

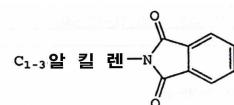
$R^2$ 는 헤테로아릴, 할로, 임의 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{2-6}$ 알케닐,  $OCF_3$ ,  $NO_2$ ,  $CN$ ,  $NC$ ,  $N(R^3)_2$ ,  $OR^3$ ,  $CO_2R^3$ ,  $C(O)N(R^3)_2$ ,  $C(O)R^3$ ,  $N(R^1)COR^3$ ,  $N(R^1)C(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌C(O)R<sup>3</sup>,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌C(O)OR<sup>3</sup>,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌OR<sup>3</sup>,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌NHC(O)OR<sup>3</sup>,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌SO<sub>2</sub>NR<sup>3</sup>,  $C_{1-6}$ 알킬렌OR<sup>3</sup> 및 SR<sup>3</sup>로 이루어진 군으로부터 선택되고;

$R^3$ 은 하이드로, 할로,  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{2-6}$ 알케닐, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴,  $CO_2R^4$ ,  $SO_2R^4$ , 할로, 히드록시, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로시클로알킬,  $N(R^4)_2$  및  $SO_2R^4$  중 하나 이상으로 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{1-6}$ 알킬렌아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌헤테로아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌C<sub>3-8</sub>헤테로시클로알킬,  $C_{1-6}$ 알킬렌SO<sub>2</sub>아릴, 임의 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬렌N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>,  $OCF_3$ ,  $C_{1-6}$ 알킬렌N(R<sup>4</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup>,  $C_{3-8}$ 헤테로시클로알킬, 및  $CH(C_{1-6}$ 알킬렌N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 2개의  $R^3$ 기는 함께 임의 치환되는 3~6원 지방족 고리를 형성하고;

$R^4$ 는 하이드로,  $C_{1-6}$ 알킬, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌아릴 및  $SO_2C_{1-6}$ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 2개의  $R^4$ 기는 함께 임의 치환되는 3~6원 고리를 형성하고;

$R^5$ 는  $C_{1-6}$ 알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로시클로알킬,  $N(R^3)_2$ ,  $OR^3$ , 할로,  $N_3$ ,  $CN$ ,  $C_{1-6}$ 알킬렌아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌N(R<sup>3</sup>)<sub>2</sub>,

$C(O)R^3$ ,  $C(O)OR^3$ ,  $C(O)N(R^3)_2$ ,  $N(R^1)C(O)R^3$ ,  $N(R^1)C(O)OR^3$ ,  $CF_3$ , 및



으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

$R^6$ 은  $OR^{11}$ ,  $-C\equiv C-R^7$ , 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

$R^7$ 은 하이드로,  $C_{1-6}$ 알킬, 아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌아릴, 헤테로아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌헤테로아릴, 및 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되며;

$R^8$ ,  $R^9$  및  $R^{10}$ 은 독립적으로 하이드로, 할로, 임의 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{2-6}$ 알케닐,  $C_{2-6}$ 알키닐,  $OCF_3$ ,  $CF_3$ ,  $NO_2$ ,  $CN$ ,  $NC$ ,  $N(R^3)_2$ ,  $OR^3$ ,  $CO_2R^3$ ,  $C(O)N(R^3)_2$ ,  $C(O)R^3$ ,  $N(R^1)COR^3$ ,  $N(R^1)C(O)OR^3$ ,  $N(R^8)C(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌C(O)R<sup>3</sup>,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌C(O)OR<sup>3</sup>,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌OR<sup>3</sup>,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌NHC(O)OR<sup>3</sup>,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌SO<sub>2</sub>NR<sup>3</sup>,  $C_{1-6}$ 알킬렌OR<sup>3</sup>, 및 SR<sup>3</sup>로 이루어진 군으로부터 선택되며;

R<sup>11</sup>은 하이드로, C<sub>1~6</sub>알킬, C<sub>2~6</sub>알케닐, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴, SO<sub>2</sub>R<sup>4</sup>, 할로, 히드록시, 아릴, 헤테로아릴, N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>, 및 SO<sub>2</sub>R<sup>4</sup> 중 하나 이상으로 치환되는 C<sub>1~6</sub>알킬, C<sub>1~6</sub>알킬렌아릴, C<sub>1~6</sub>알킬렌헤테로아릴, C<sub>1~6</sub>알킬렌C<sub>3~8</sub>헤테로시클로알킬, C<sub>1~6</sub>알킬렌SO<sub>2</sub>아릴, 임의 치환되는 C<sub>1~6</sub>알킬렌N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>, OCF<sub>3</sub>, C<sub>1~6</sub>알킬렌N(R<sup>4</sup>)<sub>3</sub><sup>+</sup>, C<sub>3~8</sub>헤테로시클로알킬, 및 CH(C<sub>1~6</sub>알킬렌N(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>)<sub>2</sub>로 이루어진 군으로부터 선택된다.

본 발명의 제2 측면은 하나 이상의 화학식 I의 화합물을 포함하는 약학 조성물, 및 질병 또는 질환의 치료에 있어서 이 조성물의 용도를 제공하며, 여기서 생체 내 또는 생체 외에서 Chk1의 억제는 치료적 이점을 제공하거나 또는 연구 또는 진단에 중요하다.

본 발명의 제3 측면은 화학식 I의 화합물을 화학 요법 제제, 방사능 요법 제제 또는 두 제제와 조합하여 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 의학적 증상에 대하여 화학 요법 또는 방사선 요법 치료를 받는 개체의 세포를 감작시키는 방법을 제공한다. 본 방법에 의하여 치료되는 비제한적 정후의 예로서는 암이 있다.

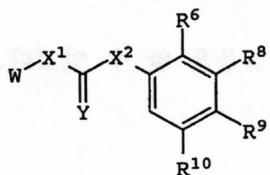
본 발명의 제4 측면은 비정상 세포 증식을 억제 또는 방지하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 본 방법은 비정상적으로 증식하는 세포들에서 세포 주기 정지를 실질적으로 동시에 일어나게 하는데(synchronize)에 충분한 양 및 충분한 시간 동안 비정상적으로 증식하는 세포를 포함하는 세포 군집을 하나 이상의 Chk1 활성화제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 세포 군집 내에서 세포 주기 정지를 실질적으로 동시에 일어나게 하는 데 있어서, 세포 군집은 실질적으로 세포 주기 정지를 파기(abrogate)하는데에 충분한 양과 이에 충분한 시간 동안 하나 이상의 Chk1 억제제와 접촉하게 된다.

본 발명의 상기 측면들 및 기타 측면들은 이하 바람직한 구체예의 상세한 설명을 통하여 명백해 질 것이다.

### 발명의 상세한 설명

본 발명의 화합물은 하기 화학식 I로 표시되는 화합물, 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 프로드러그 또는 이의 용매화물을 함유한다:

#### 화학식 I



상기 식 중, X<sup>1</sup>은 존재하지 않거나, -O-, -S-, -CH<sub>2</sub>- 또는 -N(R<sup>1</sup>)-이고;

X<sup>2</sup>는 -O-, -S- 또는 -N(R<sup>1</sup>)-이며;

Y는 O 또는 S이거나; 또는 =Y는 일반 탄소 원자에 결합되어 있는 2개의 수소 원자를 나타내며;

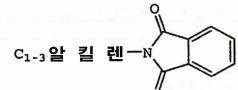
W는 헤테로아릴, 아릴, 및 헤테로아릴 또는 아릴기로 치환되는 C<sub>1~6</sub>알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서 (a) 상기 W 기의 아릴 또는 헤�테로아릴기는 CF<sub>3</sub> 및 헤�테로아릴 중의 하나 이상으로 치환되며, (b) 상기 W 기의 아릴기는 R<sup>2</sup>로 표시되는 1~3개의 치환기로 임의 치환되고, (c) 상기 W 기의 헤테로아릴기는 R<sup>5</sup>로 표시되는 1~3개의 치환기로 임의 치환되며;

R<sup>1</sup>은 하이드로, C<sub>1~6</sub>알킬, C<sub>2~6</sub>알케닐, C<sub>2~6</sub>알키닐 및 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되며;

$R^2$ 는 헤테로아릴, 할로, 임의 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{2-6}$ 알케닐,  $OCF_3$ ,  $NO_2$ ,  $CN$ ,  $NC$ ,  $N(R^3)_2$ ,  $OR^3$ ,  $CO_2R^3$ ,  $C(O)N(R^3)_2$ ,  $C(O)R^3$ ,  $N(R^1)COR^3$ ,  $N(R^1)C(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $C(O)R^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $C(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $NHC(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $SO_2NR^3$ ,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $OR^3$  및  $SR^3$ 로 이루어진 군으로부터 선택되고;

$R^3$ 은 하이드로, 할로,  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{2-6}$ 알케닐, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴,  $CO_2R^4$ ,  $SO_2R^4$ , 할로, 히드록시, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로시클로알킬,  $N(R^4)_2$  및  $SO_2R^4$  중 하나 이상으로 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{1-6}$ 알킬렌아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌헤테로아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $C_{3-8}$ 헤테로시클로알킬,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $SO_2$ 아릴, 임의 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬렌 $(R^4)_2$ ,  $OCF_3$ ,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $(R^4)_3^+$ ,  $C_{3-8}$ 헤테로시클로알킬, 및  $CH(C_{1-6}$ 알킬렌 $(R^4)_2)_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 2개의  $R^3$ 기는 함께 임의 치환되는 3~6원 지방족 고리를 형성하고;

$R^4$ 는 하이드로,  $C_{1-6}$ 알킬, 시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌아릴 및  $SO_2C_{1-6}$ 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는 2개의  $R^4$ 기는 함께 임의 치환되는 3~6원 고리를 형성하고;

$R^5$ 는  $C_{1-6}$ 알킬, 아릴, 헤테로아릴, 헤테로시클로알킬,  $N(R^3)_2$ ,  $OR^3$ , 할로,  $N_3$ ,  $CN$ ,  $C_{1-6}$ 알킬렌아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $(R^3)_2$ ,  $C(O)R^3$ ,  $C(O)OR^3$ ,  $C(O)N(R^3)_2$ ,  $N(R^1)C(O)R^3$ ,  $N(R^1)C(O)OR^3$ ,  $CF_3$ , 및  으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

$R^6$ 은  $OR^{11}$ ,  $-C\equiv C-R^7$ , 및 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고;

$R^7$ 은 하이드로,  $C_{1-6}$ 알킬, 아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌아릴, 헤테로아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌헤테로아릴, 및 알콕시로 이루어진 군으로부터 선택되며;

$R^8$ ,  $R^9$  및  $R^{10}$ 은 독립적으로 하이드로, 할로, 임의 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{2-6}$ 알케닐,  $C_{2-6}$ 알카닐,  $OCF_3$ ,  $CF_3$ ,  $NO_2$ ,  $CN$ ,  $NC$ ,  $N(R^3)_2$ ,  $OR^3$ ,  $CO_2R^3$ ,  $C(O)N(R^3)_2$ ,  $C(O)R^3$ ,  $N(R^1)COR^3$ ,  $N(R^1)C(O)OR^3$ ,  $N(R^8)C(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $C(O)R^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $C(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $NHC(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1-6}$ 알킬렌 $SO_2NR^3$ ,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $OR^3$ , 및  $SR^3$ 로 이루어진 군으로부터 선택되며;

$R^{11}$ 은 하이드로,  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{2-6}$ 알케닐, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 아릴, 헤테로아릴,  $SO_2R^4$ , 할로, 히드록시, 아릴, 헤테로아릴,  $N(R^4)_2$ , 및  $SO_2R^4$  중 하나 이상으로 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{1-6}$ 알킬렌아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌헤테로아릴,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $C_{3-8}$ 헤테로시클로알킬,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $SO_2$ 아릴, 임의 치환되는  $C_{1-6}$ 알킬렌 $(R^4)_2$ ,  $OCF_3$ ,  $C_{1-6}$ 알킬렌 $(R^4)_3^+$ ,  $C_{3-8}$ 헤테로시클로알킬, 및  $CH(C_{1-6}$ 알킬렌 $(R^4)_2)_2$ 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

본 발명의 바람직한 화합물은 상기  $X^1$  및  $X^2$ 가  $-N(H)-$ 이고;

$Y$ 는  $O$  또는  $S$ 이며;

바람직하게  $W$ 는 헤테로아릴이다.

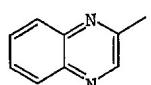
일 구체예에서, W는 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 2 이상의 이종 원자를 함유하는 헤테로아릴이며, 상기 헤테로아릴 고리는 임의 치환되는  $C_{1\sim 6}$ 알킬, 아릴, 헤테로아릴,  $N(R^3)_2$ ,  $OR^3$ ,  $C(O)N(R^3)_2$ ,  $CO_2R^3$ , CN, 및 할로로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 또는 2개의 치환체로 임의 치환되며, 여기서  $R^3$ 는 전술한 바와 같다.

상기 화학식 I의 바람직한 다른 화합물은 상기 W가  $C_{1\sim 6}$ 알킬, 아릴, 헤테로아릴,  $N(R^3)_2$ ,  $C(O)N(R^3)_2$ ,  $CO_2R^3$ ,  $OR^3$ , 및 할로로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 또는 2개의 치환기로 임의 치환되는, 피리다지닐, 피리미디닐, 피라지닐 및 트리아지닐로 이루어진 군으로부터 선택되는 화합물이다.

특정 바람직한 구체예에서, W는



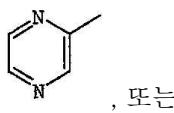
및



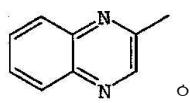
로 이루어진 군으로부터 선택되고,

$C_{1\sim 6}$ 알킬,  $C_{2\sim 6}$ 알카닐, 아릴, 헤테로아릴, CN,  $CO_2R^3$ ,  $N(R^3)_2$ ,  $OR_3$ , 및 할로로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 내지 4개의 치환기로 임의 치환된다.

보다 바람직한 구체예에서, W는



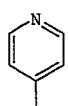
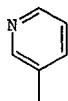
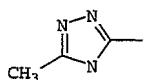
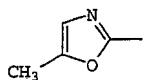
, 또는

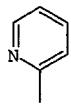


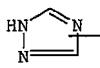
이다.

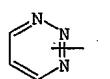
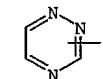
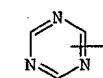
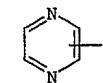
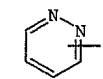
가장 바람직한 구체예에서, W는 피라지닐이고  $X^1$  및  $X^2$ 는 각각 N(H)이다.

다른 바람직한 구체예에서, W 상의 헤테로아릴 기 치환기 및  $R^6$ 의 헤�테로아릴기는 독립적으로









및



로 이루어진 군으로부터 선택된다.

본원에 사용된 "알킬"이라는 용어에는 정해진 수의 탄소 원자를 함유하는 직쇄형 및 분지형 탄화수소기(통상적으로 메틸, 에틸 및 직쇄형 및 분지형 프로필 및 부틸 기)를 포함한다. 달리 특정하지 않는 한, 탄화수소기는 20개 이하의 탄소 원자를 함유할 수 있다. "알킬"이라는 용어는 "가교형 알킬" 즉,  $C_6 \sim C_{16}$  이환형 또는 다환형 탄화수소기 예를 들어, 노르보닐, 아다만틸, 비시클로[2.2.2]옥틸, 비시클로[2.2.1]헵틸, 비시클로[3.2.1]옥틸 또는 데카하이드로나프틸을 포함한다. 알킬기는 예를 들어, 히드록시(OH), 할로, 아릴, 헤테로아릴, 시클로알킬, 헤테로시클로알킬, 아미노( $N(R^3)_2$ ) 및 셀포닐( $SO_2R^3$ ) [여기서,  $R^3$ 는 상기 정의한 바와 같음]로 임의 치환될 수 있다.

"시클로알킬"이란 용어는, 고리형  $C_{3 \sim 8}$  탄화수소기 예를 들어, 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로헥실 또는 시클로펜틸로서 정의된다. "헤테로시클로알킬"은, 고리가 산소, 질소 및 황으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 1개 ~ 3개의 이종 원자를 함유한다는 점을 제외하고는 시클로알킬과 유사하게 정의된다. 시클로알킬 및 헤�테로시클로알킬기는 예를 들어,  $C_{1 \sim 4}$  알킬,  $C_{1 \sim 3}$  알킬렌OH,  $C(O)NH_2$ ,  $NH_2$ , 옥소(=O), 아릴, 트리플루오로에탄오일 및 OH로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 1개 ~ 3개의 기로 임의 치환되는 포화 또는 부분 불포화 고리계일 수 있다. 헤�테로시클로알킬기는  $C_{1 \sim 6}$  알킬, 히드록시 $C_{1 \sim 6}$  알킬,  $C_{1 \sim 3}$  알킬렌아릴 또는  $C_{1 \sim 3}$  알킬렌헤테로아릴과 추가로 N-치환될 수도 있다.

"알케닐"이란 용어는, 탄소-탄소 이중 결합을 함유한다는 점을 제외하고는 "알킬"의 경우와 동일하게 정의된다.

"알키닐"이란 용어는, 탄소-탄소 삼중 결합을 함유한다는 점을 제외하고는 "알킬"의 경우와 동일하게 정의된다.

"알킬렌"이란 용어는, 치환기를 보유하는 알킬기를 의미한다. 예를 들어, " $C_{1 \sim 6}$  알킬렌C(O)OR"이란 용어는,  $-C(O)OR$ 기로 치환되는 1개 ~ 6개의 탄소 원자를 함유하는 알킬기를 의미한다. 상기 알킬렌기는 임의 알킬 치환기로서 상기 나열된 하나 이상의 치환기로 치환될 수도 있다.

"할로" 또는 "할로겐"이란 용어는 플루오르, 브롬, 염소 및 요오드로서 정의된다.

본원에서 "아릴"이라는 용어는, 단독으로 사용되거나 또는 조합하여 사용되는 경우, 단환 또는 다환 방향족 기, 바람직하게는 단환 또는 이환 방향족 기 예를 들어, 페닐 또는 나프틸로서 정의된다. 달리 표시하지 않는 한, 아릴기는 비치환되거나,

또는 예를 들어, 할로,  $C_{1\sim 6}$ 알킬,  $C_{2\sim 6}$ 알케닐,  $OCF_3$ ,  $NO_2$ ,  $CN$ ,  $NC$ ,  $N(R^3)_2$ ,  $OR^3$ ,  $CO_2R^3$ ,  $C(O)N(R^3)_2$ ,  $C(O)R^3$ ,  $N(R^1)COR^3$ ,  $N(R^1)C(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1\sim 3}$ 알킬렌 $C(O)R^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1\sim 3}$ 알킬렌 $C(O)OR^3$ ,  $N(R^1)C(O)C_{1\sim 3}$ 알킬렌 $SO_2NR^3$ ,  $C_{1\sim 3}$ 알킬렌 $OR^1$  및  $SR^3$ [여기서, 상기  $R^1$  및  $R^3$ 는 상기 정의한 바와 같음]로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 기, 구체적으로 1개 ~ 4개의 기로 치환될 수 있다. 대표적인 아릴기로서는 페닐, 나프틸, 테트라하이드로나프틸, 클로로페닐, 메틸페닐, 메톡시페닐, 트리플루오로메틸페닐, 니트로페닐, 2,4-메톡시클로로페닐 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. "아릴 $C_{1\sim 3}$ 알킬" 및 "헵테로아릴 $C_{1\sim 3}$ 알킬"이란 용어는,  $C_{1\sim 3}$ 알킬 치환기를 보유하는 아릴 또는 헵테로아릴 기로서 정의된다.

본원에서 "헵테로아릴"이란 용어는, 1개 또는 2개의 방향족 고리를 함유하고 이 방향족 고리내에 하나 이상의 질소, 산소 또는 황 원자를 함유하는 단환 또는 이환 고리계로서 정의된다. 달리 표시하지 않는 한, 헵테로아릴기는 치환되지 않거나, 또는 예를 들어,  $C_{1\sim 6}$ 알킬, 아릴, 헵테로아릴,  $CF_3$ ,  $CN$ ,  $C(O)N(R^3)_2$ ,  $CO_2R^2$ ,  $N(R^3)_2$ ,  $OR^3$  및 할로[여기서, 상기  $R^3$ 는 상기 정의한 바와 같음]로부터 선택되는 하나 이상의 치환기, 구체적으로 1개 ~ 4개의 치환기로 치환될 수 있다. 헵테로아릴기의 예로서는 티에닐, 푸릴, 피리딜, 옥사졸릴, 쿠놀릴, 이소퀴놀릴, 인돌릴, 트리아지닐, 트리아졸릴, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 이미디졸릴, 벤조티아졸릴, 피라지닐, 피리미디닐, 티아졸릴 및 티아디아졸릴을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

"하이드로"라는 용어는  $-H$ 로서 정의된다.

"히드록시"라는 용어는  $-OH$ 로서 정의된다.

"니트로"라는 용어는  $-NO_2$ 로서 정의된다.

"시아노"라는 용어는  $-CN$ 로서 정의된다.

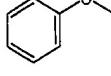
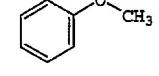
"이소시아노"라는 용어는  $-NC$ 로서 정의된다.

"트리플루오로메톡시"라는 용어는  $-OCF_3$ 로서 정의된다.

"아지도"라는 용어는  $-N_3$ 으로서 정의된다.

본원에 사용된 "3~8원 고리"라는 용어는, 탄소환 및 복소환 지방족 또는 방향족 기를 의미하는 것으로서, 아릴기에 대하여 상기와 같이 예시된 기로서, 하나 이상, 구체적으로 1개 ~ 3개의 기로 임의 치환되는, 모폴리닐, 피페리디닐, 페닐, 티오페닐, 푸릴, 피롤릴, 이미다졸릴, 피리미디닐 및 피리디닐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

부분(moiet)들을 포함하는 탄화수소의 탄소 원자 함량은 그 부분에 존재하는 탄소 원자의 최소 및 최대 수를 지정하는 아래 첨자로써 나타내는데, 예를 들어, " $C_{1\sim 6}$ 알킬"의 경우, 1개 ~ 6개의 탄소 원자를 보유하는 알킬기가 포함되어 있음을 나타낸다.

치환기가 결여된 결합에 관한 본원의 구조식에 있어서, 이 치환기는 메틸로서, 예를 들어,  는  이다.

치환기가 고리 상의 탄소 원자에 결합되어 있는 것으로 표시되지 않는 경우, 탄소 원자는 적당한 수의 수소 원자를 함유하고 있음을 알 수 있다. 뿐만 아니라, 치환기가 예를 들어 카보닐기 또는 질소 원자에 결합되어 있는 것으로 표시되지 않는 경우, 치환기는 수소임을 알 수 있는데, 예를 들어,  $\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{C}}{\text{||}}}-\text{R}'$ 는  $\text{R}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{C-H}}{\text{||}}}-\text{R}'$ 이고,  $\text{R}-\overset{\text{N}}{\underset{\text{H2}}{\text{||}}}-\text{R}'$ 는  $\text{R}-\overset{\text{NH2}}{\underset{\text{H2}}{\text{||}}}-\text{R}'$ 이다.

약어 "Me"는 메틸이다. 약어  $CO$  및  $C(O)$ 는 카보닐( $C=O$ )이다.

$N(R^X)_2$  [여기서, X는 예를 들어,  $R^a$ ,  $R^b$ ,  $R^3$  및  $R^4$  등과 같이 알파벳 또는 숫자를 나타냄]라는 표시는 2개의  $R^X$ 기가 공통의 질소 원자에 결합되어 있음을 나타내는 것이다. 이러한 표시에 사용될 경우,  $R^X$ 기는 동일하거나 또는 상이할 수 있으며, 상기  $R^X$ 기에 의하여 정의되는 군으로부터 선택된다.

"Chk1 억제제"란, 이미 공지되어 있거나 또는 그 이후에 발견된 천연 생성 또는 합성인 임의의 화합물로서, 최소한 부분적으로나마 Chk1 단백질의 세포 주기 체크포인트 활성을 파기할 수 있는 화합물을 의미한다. 세포 주기 체크포인트의 파기는 세포의 체크포인트 기작이, 세포 주기 중에 다음 단계로의 진행이 정지된 세포 주기 단계를 세포가 통과하거나 또는 세포가 직접적으로 세포 사멸 단계로 들어가는 것을 충분히 극복한 경우 이를 수 있다. 세포 주기 체크포인트를 파기하여, 세포는 손상 또는 결함을 이후의 세포 주기 단계에 전달할 수 있게 되며, 그 결과, 세포 사멸을 유도 또는 촉진하게 된다. 세포 사멸은 세포 사멸 및 비정상적 계속 분열(mitotic catastrophe)을 비롯한 임의의 기작에 의하여 유발될 수 있다.

"Chk1 활성화제"란, 세포 주기 체크포인트 시 DNA 복구 및 항상성(homeostasis)에 있어서, Chk1 키나제 활성을 활성화시키는 능력을 보유한, 최소한 부분적으로나마 세포 주기의 정지를 유도하는 공지된 임의의 제제 또는 후발견될 제제를 의미한다. Chk1 활성화제로서는 세포 주기 중 임의의 단계(본원에서는 그 활성화제에 대한 "표적 단계"라 칭할 수 있음)에 세포 주기를 정지시킬 수 있는 제제를 포함한다. 표적 단계로서는 유사 분열 단계를 제외한 세포 주기 단계들 중 임의의 단계 즉, G1기, S기 및 G2기를 포함한다. 본 발명에 유용한 Chk1 활성화제로서는 DNA 손상 제제 예를 들어, 화학 요법 제제 및/또는 방사선(또는 방사선 요법 제제), 예를 들어, 이온화 또는 자외 방사선을 포함한다. 방사선 Chk1 활성화제로서는 감마 방사선, X-레이 방사선, 자외 광선, 가시 광선, 적외 방사선, 마이크로파 방사선 및 이들의 혼합 방사선을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

"비정상 세포 증식의 억제"란, 비정상적으로 증식하는 세포가 증식하는 속도를 지연시키거나 또는 아예 증식시키지 않는 것을 의미한다. 이러한 억제는 복제율을 감소시키고 세포 사멸율을 증가시킴으로 인하거나, 또는 둘 다로 인할 수 있다. 세포 사멸은 세포 사멸 및 비정상적 계속 분열을 비롯한 임의의 기작에 의하여 유발될 수 있다.

"비정상 세포 증식의 예방"이란, 비정상 세포 증식 현상이 발생하기 이전에 그것을 억제하거나, 또는 이러한 비정상 증식 현상의 재발을 억제하는 것을 의미한다.

"생체 내"란, 살아있는 개체 즉, 동물 또는 사람의 체내를 의미한다. 본 발명에 있어서, 제제는 비정상적으로 복제하는 세포의 증식을 지연시키거나 또는 제거되도록 개체 내에서 치료적으로 사용될 수 있다. 이 제제는 또한 비정상 세포 증식의 발생 또는 재발이나, 비정상 증식과 관련된 증상의 발현을 방지하기 위한 예방약으로서 사용될 수도 있다.

"생체 외"란, 살아있는 개체의 외부를 의미한다. 생체 외 세포 군집의 예로서는 시험관 내 세포 배양물 및 생물학적 시료 예를 들어, 사람 또는 동물로부터 유래되는 유체 또는 조직 시료를 포함한다. 이러한 시료들은 당 업계에 널리 공지된 방법에 의하여 얻을 수 있다. 대표적인 생물학적 유체 시료로서는 혈액, 뇌척수액, 소변, 타액을 포함한다. 대표적인 조직 시료로서는 종양 및 이의 생검편을 포함한다. 여기서, 본 발명의 화합물은 다용도(치료적 용도 및 실험적 용도)로 사용될 수 있다.

본원에 사용된 "방사선 감작제(radiosensitizer)"이란 용어는, 전자기 방사선에 대한 세포의 감수성을 증가시키고/증가시키거나 전자기 방사선으로 치료 가능한 질병의 치료를 촉진시키기 위해 치료적 유효량으로 사람 또는 기타 동물에 투여되는 화합물로서 정의된다.

본원에 사용된 "전자기 방사선" 및 "방사선"이란 용어에는 광장이 10~20에서 100 나노미터인 방사선을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명은 화학식 I의 화합물로부터 도출 가능한 모든 입체 이성질체 및 기하 이성질체를 포함한다. 본 발명은 라세미 화합물뿐만 아니라, 광학 활성 이성질체도 포함한다. 화학식 I의 화합물이 단일 거울상 이성질체로서 바람직할 경우, 이 화합물은 최종 생산물을 분할(resolution)하거나, 또는 이성질체상 순수한 출발 물질이나 예를 들어, 문헌[Z. Ma et al., Tetrahedron: Asymmetry, 8(6), pages 883-888 (1997)]에 개시된 키랄 보조 시약을 사용하여 입체 특이적으로 합성함으로써 얻을 수 있다. 최종 산물, 중간체 또는 출발 물질의 분할은 당 업계에 공지된 임의의 방법에 의하여 실행 가능하다. 또한, 화학식 I의 화합물의 호변 이성질체가 생성될 수 있는 경우, 본 발명은 이 화합물의 모든 호변 이성질체도 포함한다. 이하에 기술된 바와 같이, 특이적 입체 이성질체는 예외적으로 화학 요법 또는 방사선 요법 치료와 함께 Chk1을 억제하는 능력을 나타낼 수도 있다.

화학식 I의 화합물의 프로드러그는 또한 본 발명의 방법에 있어서 화합물로서 사용될 수도 있다. 화합물을 제형화 및/또는 투여에 적당한 형태로 유도체화 한 후 생체 내에서 약물로서 방출시키는, 프로드러그 연구법은 화합물의 물리화학적 특성을 일시적으로(예를 들어, 생체 가변적으로) 바꾸는데에 성공적으로 적용된다는 사실은 널리 알려져 있는 바이다[H. Bundgaard, Ed., "Design of Prodrugs", Elsevier, Amsterdam, (1985) ; R.B. Silverman, "The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action," Academic Press, San Diego, chapter 8, (1992) ; K.M. Hillgren et al., Med. Res. Rev., 15, 83 (1995)].

본 발명의 화합물은 하나 이상의 작용기를 함유할 수 있다. 원하는 경우 또는 필요한 경우, 이 작용기는 변형되어 프로드러그를 제공할 수 있다. 적당한 프로드러그는 예를 들어, 산 유도체 예를 들어, 아미드 및 에스테르를 포함한다. 당업자는 N-산화물이 프로드러그로서 사용될 수 있다는 사실을 알고 있다.

본원에 사용된 "약학적으로 허용 가능한 염"이란 용어는, 산성 부분을 함유하고 적당한 양이온을 보유하는 염을 형성하는 화학식 I의 화합물을 의미한다. 약학적으로 허용 가능한 적당한 양이온으로서는 알칼리 금속(예를 들어, 나트륨 또는 칼륨) 및 알칼리 토금속(예를 들어, 칼슘 또는 마그네슘) 양이온을 포함한다. 뿐만 아니라, 염기성 중심부를 함유하는 약학적으로 허용 가능한 화학식 I의 화합물의 염은 약학적으로 허용 가능한 산으로 형성된 산부가 염이 있다. 이에 대한 비제한적 예로서는 염화수소산염, 브롬화수소산염, 황산염, 중황산염, 인산염, 인산수소염, 아세트산염, 벤조산염, 숙신산염, 푸말산염, 밀산염, 젖산염, 구연산염, 타르타르산염, 글루콘산염, 메탄설휠산염, 벤젠설휠산염 및 p-톨루엔설휠산염을 포함한다. 상기 나열한 예들을 비추어 볼 때, 본원에 나타낸 본 발명의 화합물에 대한 임의의 정의는 화학식 I의 화합물과 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물을 포함하는 의미이다.

본 발명의 화합물은 순수한 화합물로서 치료적으로 투여될 수 있으나, 화학식 I의 화합물은 약학 조성물 또는 제형으로서 투여되는 것이 바람직하다. 그러므로, 본 발명은 화학식 I의 화합물과 이를 위한 약학적으로 허용 가능한 희석제 또는 담체를 함께 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 뿐만 아니라, 본 발명은 화학식 I의 화합물과 이를 위한 약학적으로 허용 가능한 희석제 또는 담체를 혼합하는 것을 포함하는, 약학 조성물의 제조 방법을 제공한다.

따라서, 본 발명은 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 프로드러그 또는 용매화물과, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체 및, 임의로는 기타 치료 성분 및/또는 예방 성분을 포함하는 약학 제형을 추가로 제공한다. 상기 담체는 제형의 기타 성분들과 혼화 가능하고 이의 수용체에 무해하다는 점에서 "허용 가능한" 것이다. 이러한 담체는 예를 들어, 레밍턴의 약과학(Remington's Pharmaceutical Sciences)(17th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA. (1985) )에서 확인해 볼 수 있다.

체크포인트 키나제의 억제는 통상적으로 용량-반응 분석법(dose-response assay) 즉, 민감도가 높은 분석 시스템을, 효능이 관찰되지 않거나 또는 최소한으로 관찰되는 농도로 부터 부분적 효능이 관찰되는 보다 높은 농도에 걸쳐 최대의 효능이 관찰되는 포화 농도를 포함하는 다양한 농도 범위로 목적 화합물과 접촉시키는 분석법을 이용하여 측정된다. 이론상으로, 억제 화합물의 용량-반응 효과에 대한 분석 결과는 농도의 함수로서 억제 정도를 나타내는 S자형 곡선으로 나타낼 수 있다. 상기 곡선은 또한 이론상으로 분석법에서 최소 및 최대 효소 활성 간 차이의 50%에 해당하는 수준으로 체크포인트 효소의 활성을 감소시키는데 충분한 농도의 지점을 통과하기도 한다. 이 농도를 억제 농도(50%) 또는  $IC_{50}$  값이라 정의한다. 바람직하게, 상기  $IC_{50}$  값은 통상의 생화학적(무세포적) 분석 기술 또는 세포계 분석 기술을 이용하여 측정된다.

억제제 효능의 비교 결과는 상대적  $IC_{50}$  값을 참고로 하여 제공되는데, 여기서  $IC_{50}$  값이 클수록 시험 화합물의 효능은 기준 화합물(reference compound)에 비하여 떨어진다는 것을 의미하고,  $IC_{50}$  값이 작을수록 시험 화합물의 효능은 기준 화합물에 비하여 더 우수하다는 것을 의미한다. 본 발명의 화합물의  $IC_{50}$  값은 5  $\mu$ M 미만이고, 용량-반응 분석법을 이용하여 측정할 때에는 0.1 nM까지 떨어진다. 바람직한 화합물은  $IC_{50}$  값이 500 nM 이하이다. 본 발명의 더욱 바람직한 화합물의  $IC_{50}$  값은 250 nM 미만, 100 nM 미만, 50 nM 미만 또는 20 nM 미만이다.

본 발명의 바람직한 Chk1 억제제는 선택적이며, 다시 말해서, 다음과 같은 단백질 키나제에 비하여 Chk1을 억제하는 선택성이 20배 이상인 화합물이다: 단백질 키나제 A, 단백질 키나제 C, cdc2 및 pp60v-src. 더욱 바람직한 본 발명의 Chk1 억제제는 다음과 같은 단백질 키나제에 비하여 Chk1을 억제하는 선택성이 75배 이상인 화합물이다: 단백질 키나제 A, 단백질 키나제 C, cdc2 및 pp60v-src. 가장 바람직한 본 발명의 Chk1 억제제는 단백질 키나제 A, 단백질 키나제 C, cdc2

및 pp60v-src, 단백질 키나제 B/Akt-1, p38MapK, ERK1, p70S6K, cdc2, cdk2, chk2 및 ab1 티로신 키나제에 비하여 Chk1을 억제하는 선택성이 100배 이상인 화합물이다. "~배 선택성(fold selectivity)"은, 비교용 키나제에 대한 Chk1 억제제의 IC<sub>50</sub> 값을 Chk1에 대한 Chk1 억제제의 IC<sub>50</sub> 값으로 나눈 것으로 정의된다.

본 발명에 사용하기에 적당한 화합물 및 약학 조성물은 활성 성분이 의도하는 목적을 이룰 수 있는 유효량으로 투여되는 조성물을 포함한다. 보다 구체적으로, "치료적 유효량"이란, 정후를 보이는 개체를 치료하거나, 또는 이 정후에 따른 증상들을 경감시키는데 충분한 양을 의미한다. 치료적 유효량의 결정 방법은 당 업계의 숙련자에게 널리 알려져 있으며, 구체적으로 당업자는 본원에 제공된 상세한 설명을 참고로 하여 상기 치료적 유효량을 측정할 수 있다.

Chk1 억제제에 더하여, 본 발명의 약학 조성물은 사이토카인, 림포카인, 성장 인자, 기타 조혈 인자 또는 이들의 혼합물을 포함하여, 약학 조성물을 단독 투여할 때 발생할 수 있는 유해한 부작용을 감소시킬 수 있도록 제형화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 특히 유용한 사이토카인, 림포카인, 성장 인자 또는 기타 조혈 인자로서는 M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN, TNF, G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, 혈소판 증식 인자, 줄기 세포 인자, 적혈구 생성 촉진 인자, Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, 및/또는 인간 엔지오포이에틴-유사 폴리펩티드를 포함한 엔지오포이에틴, 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 엔지오제닌, 골 형성 단백질-1(BMP-1), BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8, BMP-9, BMP-10, BMP-11, BMP-12, BMP-13, BMP-14, BMP-15, BMP 수용체 IA, BMP 수용체 IB, 뇌 유래성 신경영양인자, 모양체 신경영양인자, 모양체 신경영양인자 수용체 사이토카인-유도성 중성구 화학 주성 인자 1, 사이토카인-유도성 중성구 화학 주성 인자 2, 사이토카인-유도성 중성구 화학 주성 인자 2, 내피 세포 성장 인자, 엔도셀린-1, 표피 성장 인자, 상피-유래 중성구 유인 물질, 섬유아세포 성장 인자(FGF) 4, FGF 5, FGF 6, FGF 7, FGF 8, FGF 8b, FGF 8c, FGF 9, FGF 10, FGF 산성, FGF 염기성, 신경교 세포주-유래 신경 영양 인자 수용체 1, 신경교 세포주-유래 신경영양 인자 수용체 2, 성장 관련 단백질, 성장 관련 단백질, 성장 관련 단백질, 혜파린 결합 표피 성장 인자, 간세포 성장 인자, 간세포 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 I, 인슐린-유사 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 II, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, 케라티노사이트 성장 인자, 백혈병 억제제, 백혈병 억제제 수용체, 신경 성장 인자, 신경 성장 인자 수용체, 뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 태반 성장 인자, 태반 성장 인자 2, 혈소판-유래 내피 세포 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자, 혈소판 유래 성장 인자 A 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 AA, 혈소판 유래 성장 인자 AB, 혈소판 유래 성장 인자 B 사슬, 혈소판 유래 성장 인자 BB, 혈소판 유래 성장 인자 수용체, 혈소판 유래 성장 인자 수용체, 전구 B 세포 성장 촉진 인자, 줄기 세포 인자, 줄기 세포 인자 수용체, 변형 성장 인자(TGF), TGF, TGF 1, TGF 1.2, TGF 2, TGF 3, TGF 5, 후기 TGF 1, TGF 결합 단백질 I, TGF 결합 단백질 II, TGF 결합 단백질 III, 제I형 종양 괴사 인자 수용체, 제II형 종양 괴사 인자 수용체, 유로기나제류 플라스미노겐 활성화제 수용체, 혈관 내피 성장 인자 및 이들의 키메라 단백질 및 생물학적 또는 면역학적 활성 단편을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

화학식 I의 화합물은 또한 치료 방법에 있어서 화합물의 유리한 특성을 개선시키는 보조 부분(auxiliary moiety)과 접합 또는 결합될 수 있다. 이러한 접합체는 화합물을 목적으로 하는 특정 해부학적 위치 또는 부위(예를 들어, 종양)에 운반하는 것을 촉진할 수 있으며, 표적 세포 내에서 화합물의 치료적 농도를 유지시키고, 이 화합물의 약물 동력학적 특성 및 약물 동태학적 특성을 바꾸고/바꾸거나, 이 화합물의 치료 지수 또는 안전성 프로필을 개선시킬 수 있다. 적당한 보조 부분으로서는 예를 들어, 아미노산, 올리고펩티드 또는 폴리펩티드 예를 들어, 항체 예를 들어, 모노클로날 항체 및 기타 가공된 항체; 및 표적 세포 또는 조직 내에 존재하는 수용체에 대한 천연 또는 합성 리간드를 포함한다. 기타 적당한 보조 부분으로서는 상기 화합물의 표적 세포에 의한 생분포 및/또는 흡수를 촉진하는 지방산 또는 지질부를 포함한다[예를 들어, Bradley et al., Clin. Cancer Res. (2001) 7:3229 참조].

본 발명의 제형은 특정 질병의 치료를 위하여 표준적인 방식 예를 들어, 경구, 비경구, 경점막(예를 들어, 설하 또는 구강 투여), 국소, 경피, 직장, 흡입(예를 들어, 비강 또는 심폐 흡입) 방식으로 투여될 수 있다. 비경구 투여법으로서는 정맥 내, 동맥 내, 복강 내, 피하, 근육 내, 척수강내 및 관절 내 투여법을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 비경구 투여법은 또한 고압 기술 예를 들어, POWDERJECT<sup>TM</sup>를 이용하여 수행될 수 있다.

경구 투여 및 구강 투여에 있어서, 조성물은 통상의 방식으로 제형화된 정제 또는 로진즈의 형태일 수 있다. 예를 들어, 경구 투여용 정제 및 캡슐은 통상의 부형제 예를 들어, 결합제(예를 들어, 시럽, 아카시아, 젤라틴, 솔비톨, 트라가칸트, 점성 전분 또는 폴리비닐피롤리돈), 충전제(예를 들어, 락토즈, 당, 미소결정형 세룰로즈, 옥수수 전분, 인산칼슘 또는 솔비톨), 윤활제(예를 들어, 스테아르산 마그네슘, 스테아르산, 활석, 폴리에틸렌 글리콜 또는 실리카), 붕해제(예를 들어, 감자 전분 또는 글리콜산 나트륨 전분) 또는 습윤제(예를 들어, 황산 나트륨 라우릴)를 함유할 수 있다. 정제는 당 업계에 널리 공지된 방법에 따라서 퍼복될 수 있다.

대안적으로, 본 발명의 화합물은 경구 투여용 액상 제제 예를 들어, 수성 또는 유성 혼탁액, 용액, 유액, 시럽 또는 엘리시르에 혼입될 수 있다. 또한, 이 화합물을 함유하는 제형은 사용 전에 물이나 기타 적당한 운반체와 함께 조성되는 건조 생산물로서 제공될 수 있다. 이러한 액상 제제는 통상적인 부가제 예를 들어, 혼탁제 예를 들어, 솔비톨 시럽, 메틸 셀룰로즈, 글루코즈/당 시럽, 젤라틴, 히드록시에틸셀룰로즈, 히드록시프로필메틸셀룰로즈, 카복시메틸셀룰로즈, 스테아르산알루미늄겔 및 수소화된 식용 지방; 유화제 예를 들어, 레시틴, 소르비탄 모노올레이트, 또는 아카시아; 비수성 운반체(식용 오일 포함할 수 있음) 예를 들어, 아몬드 오일, 분별증류한 코코넛 오일, 유성 에스테르, 프로필렌 글리콜 및 에틸 알콜; 및 보존제 예를 들어, 메틸 또는 프로필 p-히드록시벤조에이트 및 소르빈산을 함유할 수 있다.

이러한 제제는 또한 예를 들어, 통상의 좌제 베이스 예를 들어, 코코아 버터 또는 기타 글리세라이드를 함유하는 좌제로서 제형화될 수도 있다. 흡입용 조성물은 통상적으로 건조 분말로 투여될 수 있는 용액, 혼탁액 또는 유액의 형태로 제공되거나, 또는 통상적인 추진제 예를 들어, 디클로로디플루오로메탄 또는 트리클로로플루오로메탄을 사용하는 에어로졸 형태로 제공될 수 있다. 통상의 국소 및 경피 제형은 통상의 수성 또는 비수성 운반체 예를 들어, 안약, 크림, 연고, 로션 및 페이스트를 포함하거나, 또는 의학용 플라스터, 패치 또는 막의 형태일 수 있다.

부가적으로, 본 발명의 조성물은 주사 또는 연속 주입법에 의한 비경구 투여용으로 제형화될 수 있다. 주사용 제형은 유성 또는 수성 운반체 중의 혼탁액, 용액 또는 유액의 형태일 수 있으며, 제형화 제제 예를 들어, 혼탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 사용 전에 적당한 운반체(예를 들어, 멸균된, 발열원 무함유 수)와 함께 조성되는 분말 형태일 수 있다.

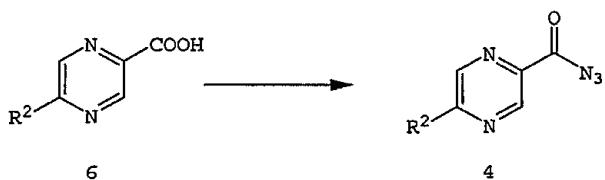
본 발명의 조성물은 또한 데포우(depot) 제제로서 제형화될 수 있다. 이와 같은 장기 작용성 제형은 임플란트(예를 들어, 피하 또는 근육 내) 또는 근육 내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물은 적당한 중합성 또는 소수성 물질(예를 들어, 허용 가능한 오일 중 유액), 이온 교환 수지로 제형화될 수 있거나, 또는 난용성인 유도체(예를 들어, 난용성 염)로서 제형화될 수 있다.

수의학적 용도로서, 화학식 I의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 프로드러그 또는 용매화물은 통상의 수의학적 방법에 따라서 적당히 허용 가능한 제형으로서 투여된다. 수의사는 특정 동물에 가장 적당한 투여 방식 및 투여 경로를 용이하게 결정할 수 있다. 본 발명의 화합물 및 방법에 의해 치료 가능한 동물의 예로서는 애완 동물, 가축, 전시용 동물(show animal) 및 동물원의 동물들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

### 합성 방법

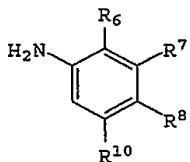
본 발명의 화합물은 다음의 합성 반응에 의하여 제조될 수 있다. 출발 물질은 상업적 공급처로부터 구입할 수 있으며, 또는 당업자에게 널리 알려져 있는 체계적으로 확립된 문헌에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. X, R<sup>1</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup>, R<sup>5</sup>, R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, R<sup>8</sup>, R<sup>9</sup>기는 하기에서 달리 언급하지 않으면 상기 정의한 바와 같다. R<sup>2</sup>는 상기 정의한 바와 같으며, 또한 다음의 합성 반응에서 CF<sub>3</sub> 및 헤테로아릴을 포함한다.

반응식 1

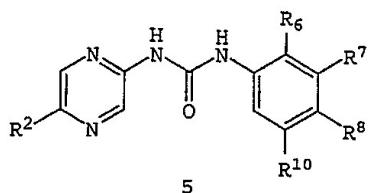
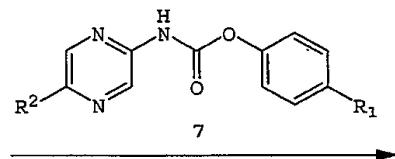


상기 반응식 1에 나타낸 바와 같이, 화학식 4의 화합물은 염기 예를 들어, DIEAL 및 디페닐 포스포릴 아지드를 처리하여 화학식 6의 화합물로부터 제조될 수 있다. 본 반응에 있어서 통상 사용되는 용매는 THF이며, 본 반응은 실온에서 1 내지 12 시간기간에 걸쳐서 통풍 차단막(blast shield) 뒤에서 진행된다.

## 반응식 2

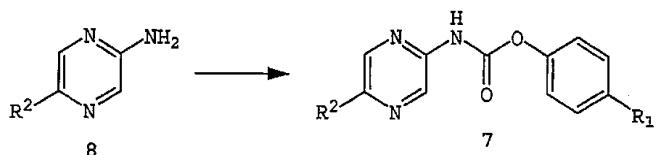


3



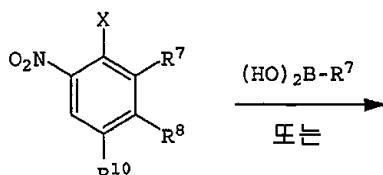
상기 반응식 2는 화학식 5의 화합물의 대안적 합성법을 나타내는 것이다. 화학식 3의 화합물은 반응식 3에 따KFKTJ 제조되는 화학식 7의 화합물로 처리된다. 이때 유용한 비제한적 용매는 DMF이고, 반응 온도는 1 ~ 12 시간에 걸쳐서 실온 ~ 60°C로 유지시킨다.

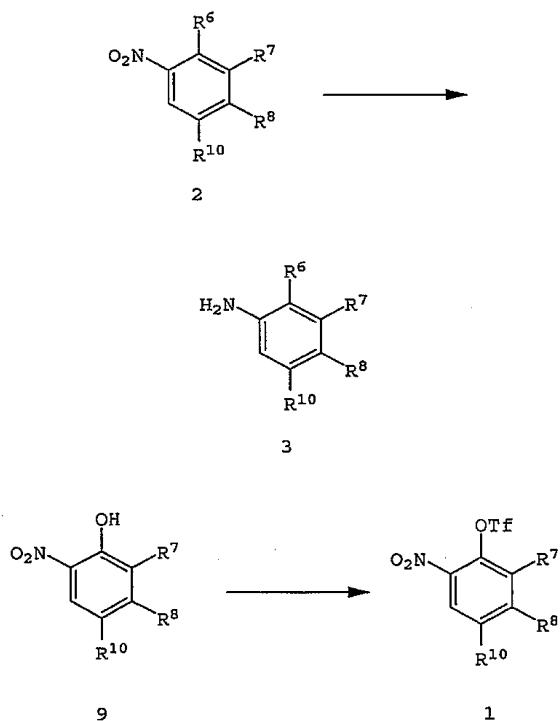
## 반응식 3



상기 반응식 3에 나타낸 바와 같이, 화학식 7의 화합물은 염기 예를 들어, 피리딘의 존재하에, 클로로포름산아릴 예를 들어, 클로로포름산페닐 또는 클로로포름산 p-니트로페닐을 처리하여 화학식 8의 화합물로부터 제조될 수 있다. 본 반응에 사용되는 비제한적 용매로서는  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  또는 피리딘을 포함하며, 이때의 온도는 0°C ~ 실온이다.

## 반응식 4

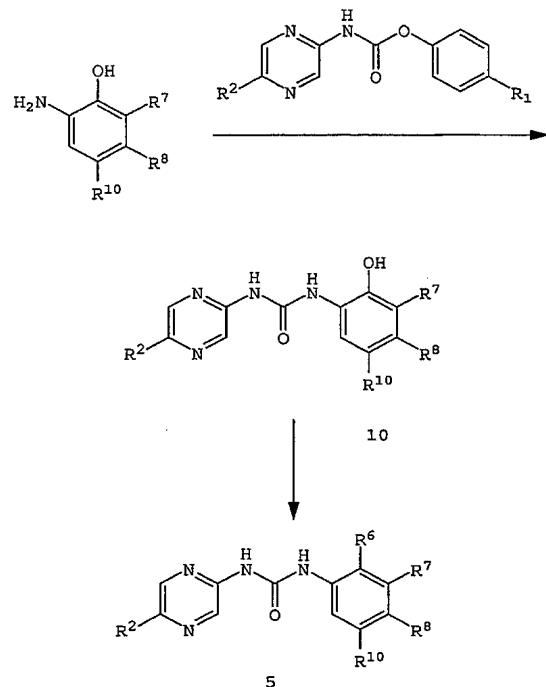
 $\text{X}=\text{OTf}, \text{Br}, \text{I}$



상기 반응식 4는 화학식 3의 화합물에 관한 접근법을 나타내는 것이다. 화학식 1의 화합물은 염기성 수용액 예를 들어, 중탄산나트륨, 탄산칼륨, 또는 인산칼륨의 존재하에 아릴 보론산 및 팔라듐(O) 공급원(예를 들어, 팔라듐 테트라카이스 트리페닐포스핀)으로 처리하여 화학식 2의 화합물로 전환된다. 본 반응에 사용된 용매의 비제한적 예로서는 THF, 디옥산 또는 에틸렌 글리콜 디메틸 에테르를 포함한다. 본 반응은 통상적으로 0~90°C의 온도에서 약 1~12 시간 동안 진행된다. 화학식 2의 화합물은 예를 들어, 탄소 상의 팔라듐, 탄소 상의 플래티늄, 또는 아연의 존재하에 화학식 3의 화합물로 전환된다. 본 반응에 사용된 용매의 예로서는 메탄올, 에탄올, 또는 아세트산을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 대안적으로, 화학식 1의 화합물은 촉매 예를 들어, 디클로로 팔라듐 비스 트리페닐 포스핀, 또는 임의의 다른 팔라듐(O) 공급원을 사용하여 말단 알ки기(11)를 아릴화하는데 사용할 수 있다. 반응은 통상적으로 염기 예를 들어, 트리에틸아민의 존재하에 실온~90°C의 다양한 온도에서 수행된다.

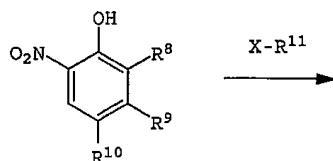
더욱이, 화학식 1의 화합물[식중, X는 트리플레이트 즉,  $\text{tfim}$ ]은 화학식 9의 화합물로부터 얻을 수 있다. 통상의 시약으로서는 트리플산 무수물 또는 N-페닐 트리플이미드를 포함한다. 본 반응은 통상적으로 -10°C ~ 실온의 온도에서 진행된다. 용매의 비제한적 예로서는 디클로로메탄이 있다. 염기의 비제한적 예로서는 트리에틸아민 또는 디이소프로필 에틸 아민이 있다.

## 반응식 5

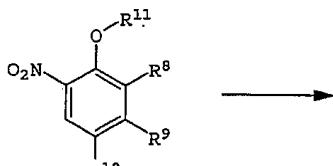


상기 반응식 5는 화학식 5의 화합물의 대안적 합성 방법을 나타내는 것이다. 화학식 3의 화합물은 반응식 2에 기술된 과정에 따라서 화학식 10의 화합물로 전환될 수 있다. 이후, 화학식 10의 화합물은 반응식 4에 기술된 과정에 따라서 화학식 5의 화합물로 전환될 수 있다.

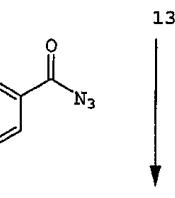
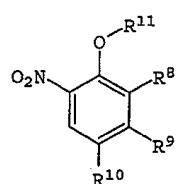
## 반응식 6



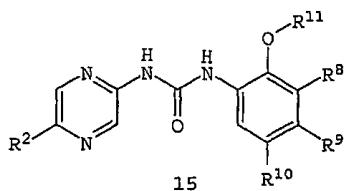
11



12



4



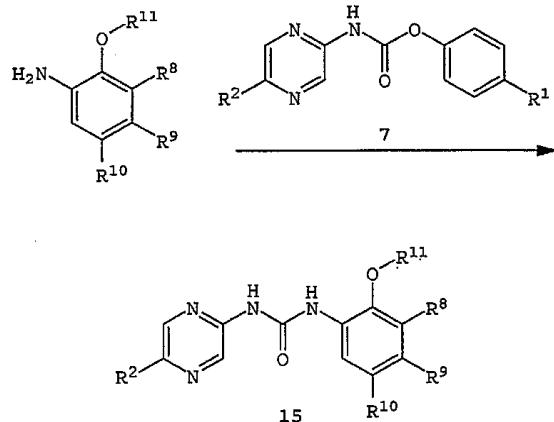
상기 반응식 6에 나타낸 바와 같이, 화학식 11의 화합물은, 염기 예를 들어, 탄산칼륨, 트리에틸아민 또는 수소화나트륨으로 처리하고, 이후에  $R^{11}X$  [여기서, X는 할로겐화물, 메실레이트 또는 토실레이트임]를 첨가하여 화학식 12의 화합물로 전환될 수 있다. 본 반응에서 사용된 용매의 예로서는 DMF, THF,  $CH_2Cl_2$  및 이의 혼합물을 포함한다. 본 반응은 0 ~ 100°C의 온도에서 약 15분 ~ 12 시간 동안 진행된다.

대안적으로, 화학식 11의 화합물은 화학식  $R^{11}X$  [여기서, X는 히드록실임]의 화합물과 혼합될 수 있으며, 생성된 혼합물을 용매 예를 들어, THF 중의 트리페닐포스핀 및 디이소프로필아조디카복실레이트로 처리하여 화학식 12의 화합물을 얻을 수 있다.

화학식 12의 화합물을 촉매 예를 들어, 산화백금, 탄소상 팔라듐 또는 레이니 니켈의 존재하에 수소 가스로 처리하거나, 또는 아연 금속의 존재하에 산 공급원 예를 들어, 포화 수성 염화암모늄 또는 수성 염화수소를 처리하여, 화학식 3의 화합물을 얻을 수 있다. 본 반응에 사용된 용매의 예로서는 메탄올, 에탄올, 아세트산에틸 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 일반적으로 본 반응은 실온 또는 그 이 하의 온도에서 1 ~ 12 시간 동안 실온 또는 그 이하의 온도에서 진행된다.

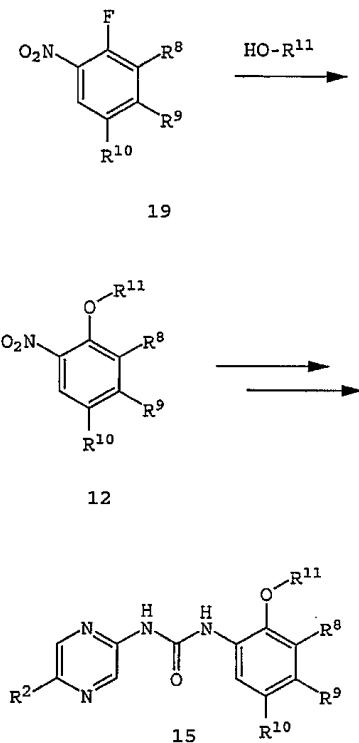
화학식 15의 화합물은 화학식 13의 화합물을 화학식 4의 화합물(반응식 1에 기술된 바와 같이 제조)과 배합함으로써 제조될 수 있다. 본 반응에 사용되는 용매의 예로서는 툴루엔, 벤젠 및 자일렌을 포함한다. 본 반응은 60 ~ 100°C의 온도에서 5 ~ 12 시간 동안 진행된다.

### 반응식 7



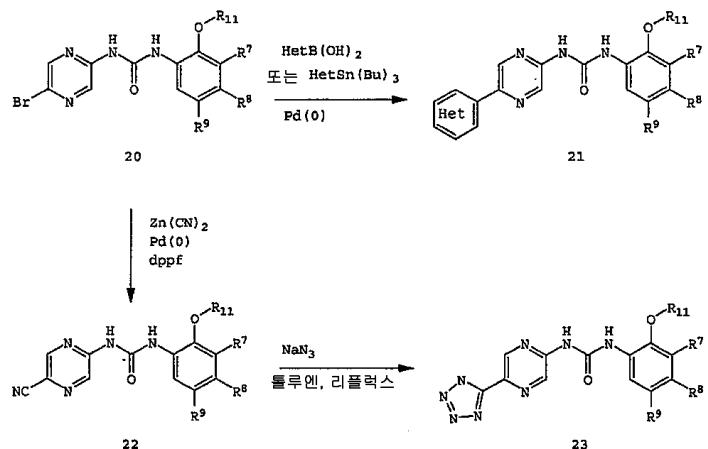
상기 반응식 7은 화학식 15의 화합물의 대안적 합성법을 나타내는 것이다. 화학식 3의 화합물은 화학식 7의 화합물(반응식 3에 따라서 제조됨)로 처리된다. 사용할 수 있는 하나의 용매는 DMF이고, 반응 온도는 1 ~ 12 시간에 걸쳐서 실온 ~ 60°C로 유지시킨다.

### 반응식 8



상기 반응식 8는 화학식 15의 화합물에 대한 대안적 합성법을 나타내는 것이다. 화학식 19의 화합물을 염기 예를 들어, 수소화나트륨, 포타슘 비스(트리메틸실릴)아미드 또는 n-부틸리튬의 존재하에 알콜로 처리하면 화학식 12의 화합물로 전환된다. 본 반응에 사용된 용매의 예로서는 THF 또는 디에틸 에테르를 포함한다. 본 반응은 통상적으로 -15°C ~ 실온의 온도에서 약 1 ~ 6 시간 동안 진행된다. 반응식 6에 기술된 방법이후에 화학식 12의 화합물은 화학식 15의 화합물로 전환된다.

### 반응식 9



상기 반응식 9는 화합물 22 및 23의 대안적 합성법을 보여준다. 화합물 20은 반응식 5 또는 반응식 6(여기서  $R_2 = Br$ 임)에 나타낸 방법을 사용하여 합성할 수 있다. 화합물 20은 염기성 수용액 예를 들어, 중탄산나트륨, 탄산칼륨, 또는 인산칼륨의 존재하에 헤테로아릴 보론산( $HetB(OH)_2$ ) 및 팔라듐(O) 공급원(예를 들어, 팔라듐 테트라카이스 트리페닐포스핀)으로 처리하여 화합물 21로 전환된다. 본 반응에 사용된 용매의 비제한적 예로서는 THF, 디옥산 또는 에틸렌 글리콜 디메틸 에테르를 포함한다. 본 반응은 통상적으로 0~90°C의 온도에서 약 1~12 시간 동안 수행된다. 대안적으로, 헤�테로아릴 보론산은 헤�테로아릴 주석산염(stannate)(예를 들어, ( $HetSn(Bu)_3$ ))으로 교체할 수 있다.

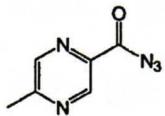
화합물 21은 또한 예컨대 트리에틸아민 또는 후니그 염기와 같은 염기 존재하에서, 시안화 아연 및 팔라듐(0) 공급원(예를 들어, 팔라듐 테트라카이스 트리페닐포스핀)으로 처리하여 화합물 22로 전환될 수 있다. 본 반응에서 사용된 용매의 비제한적 예로서는 80°C에서 1 내지 12시간 동안, DMF 및 DME이다. 대안적으로, 화합물 22는 팔라듐(0) 공급원(예를 들어, 팔라듐 테트라카이스 트리페닐포스핀), 및 구리 공급원(예를 들어, 요오드화 구리) 존재하에서, 시안화 칼륨을 사용하여, 화합물 21로부터 얻을 수 있다. 상기 반응은 통상 상온 내지 200°C 사이의 온도에서, 약 30분 내지 5시간 동안 수행된다. 본 발명에서 사용된 용매의 비제한적인 예로는 DMF를 포함한다.

마지막으로, 화합물 22는 트리에틸아민과 같은 염기 존재하에서, 예를 들어, 소듐 아제트를 사용하여, 화합물 23으로 전환될 수 있다. 본 반응에서 사용된 용매의 비제한적인 예로는 DMF 또는 니트로벤젠을 포함한다. 본 반응은 통상 80°C 내지 100°C 사이의 온도에서, 약 1 내지 5시간 동안 수행된다.

특이적이며 비제한적인 화학식 I의 화합물의 예를 이하에 제공하였는데, 이 화합물의 합성법은 이하에 제시된 방법과, 본 원에 참고용으로 인용되어 있는 공동 계류 미국 특허 출원의 공보 제 2003-0069284 A1에 개시된 방법에 따라서 수행된다.

이하 합성 방법에 사용된 약어는 다음과 같다: 시간(h), 물( $H_2O$ ), 황산마그네슘( $MgSO_4$ ), 염산(HCl), 디메틸설폐시드(DMSO), 디이소프로필 아조디카복실레이트(DIAD), 염화메틸렌( $CH_2Cl_2$ ), 클로로포름( $CHCl_3$ ), 메탄올(MeOH), 수소화암모늄( $NH_4OH$ ), 중 클로로포름(deuterated chloroform)( $CDCl_3$ ), 테트라하이드로푸란(THF), N-메틸파롤리돈(NMP), 아세트산(AcOH), 수산화나트륨(NaOH), 에틸아세테이트(EtOAc), 에탄올(EtOH), 디메틸설폐사이드(DMSO), 디에틸에테르( $Et_2O$ ), 탄산나트륨( $Na_2CO_3$ ), 중탄산나트륨( $NaHCO_3$ ), 질산( $HNO_3$ ), 염화나트륨(NaCl), 황산나트륨( $Na_2SO_4$ ), 디메틸포름아미드(DMF), 1,8-디아자비시클로-[5.4.0]운텍-7-엔(DBU), 및 N,N-디이소프로필에틸아민(DIEA).

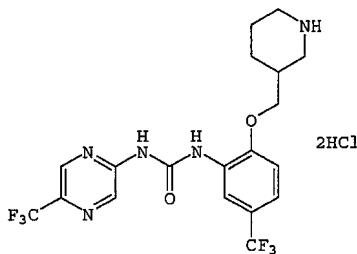
### 중간체 1:



### 5-메틸-피라진-2-카보닐 아지드

실온 및  $N_2$  대기 하에서, 540 mL THF 중의 5-메틸-피라진-2-카복실산(25 g, 181 mmol)의 교반 혼탁액에 DIEA(31.7 mL, 181 mmol)을 첨가하여 결과, 갈색 용액이 생성되었다. 이후 1 시간에 걸쳐 통풍 차단막 뒤에서 디페닐 포스포릴 아지드(39.2 mL, 181 mmol)를 50 mL THF 중 용액의 형태로 적가하였다. 이 반응물을 밤새도록 교반하였다. 이후 상기 반응물을 실온에서 회전 증발(rotoevaporation)시켜 부피를 작게 만들고, 이를  $Et_2O$ (1 L) 및  $H_2O$ (1 L) 사이에 분할하였다.  $H_2O$  층을  $Et_2O$ (2 × 250 mL)로 역추출한 다음, 합하여진 유기층을 포화 1 L의 중탄산나트륨으로 2회 세척하였다. 이 유기층을 건조시키고( $MgSO_4$ ), 여과, 농축 및  $Et_2O$ 로 분쇄하여 고체 메스로 만들어, 황색 고체인 생성물(15 g, 50%)을 얻었다. 20 mL  $Et_2O$  중 미정제 생성물 × g을 취하여 이를 실온에서 수 분 동안 1~2 g의 탈색 탄소로 처리한 결과, 보다 순수한 화합물을 분리할 수 있었다. 여과 및 농축 이후, 이 물질을 EtOAc 중에서 TLC로 균질화시켜서, 순수한 백색 물질을 얻었다. 회수율은 통상적으로 65%였다.

### 화합물 1:



### 1-[2-(피페리딘-3-일메톡시)-5-트리플루오로메틸-페닐]-3-(5-트리플루오로메틸-피라진-2-일)-우레이 하이드로클로라이드 염

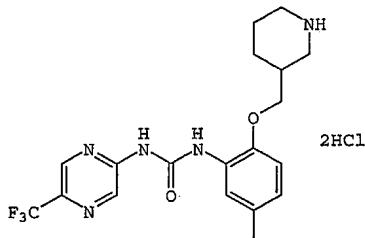
1 단계 : 3-[2-(4-니트로-페녹시카르보닐아미노)-4-트리플루오로메틸-페녹시메틸]-피페리딘-1-카르복실산 터트-부틸 에스테르. 0°C 및 질소하에서, 2 mL  $CH_2Cl_2$  중의 3-(2-아미노-4-트리플루오로메틸-페녹시메틸)-피페리딘-1-카르복실산 터트-부틸 에스테르(240 mg, 0.64 mmol)의 교반된 용액에 피리딘(57  $\mu$ L, 0.71 mmol)을 첨가하고 클로로포름산 p-니트로페닐(130 mg, 0.64 mmol)를 첨가하였다. 0°C에서 1시간 후, 상기 반응 혼합물을 30 mL의  $CH_2Cl_2$ 로 희석하고, 30 mL의 2 N HCl로 2번, 30 mL의 물로 1번, 그리고 30 mL의 염수로 1번 세척하였다. 유기층을 건조시키고( $MgSO_4$ ), 여과 및 농축하여 회백색의 발포체(foam)를 얻었다.

2 단계 : 3-{4-트리플루오로메틸-2-[3-(5-트리플루오로메틸-피라진-2-일)-우레이도]-페녹시메틸}-피페리딘-1-카르복실산 터트-부틸 에스테르. 3-[2-(4-니트로-페녹시카르보닐아미노)-4-트리플루오로메틸-페녹시메틸]-피페리딘-1-카르복실산 터트-부틸 에스테르(217 mg, 0.4 mmol) 및 5-트리플루오로메틸-피라진-2-일아민(66 mg, 0.4 mmol) (미국특허 제4,293,552의 방법에 따라 제조됨)을 고상으로 5 mL 반응 바이알에서 혼합하고, 400  $\mu$ L NMP로 희석했으며, 캡핑시키고 진한 황색 용액으로 교반시킨 후 85°C의 오일 배쓰에 함침시키고 6 시간 동안 교반시켰다. 상기 반응 혼합물을 상온으로 냉각시키고 밤새 교반시켰다. 이후 NMP를 0.5 mm 및 50°C에서 Kugelrohr 증류법으로 제거하였다. 갈색 잔류물을 30 mL의  $CH_2Cl_2$ 로 희석하고 30 mL의 1M  $Na_2CO_3$ 로 3번 세척하여 p-니트로-페놀을 제거하였다. 유기층을 건조시키고( $MgSO_4$ ), 여과 및 농축하여 EtOAc로 분말화된 미정제 고체를 얻고, 백색 고체의 바람직한 생성물을 얻기위해 여과하였다.

3 단계 : 상온에서 마개달린 플라스크에서 2 mL 디옥산중의 3-[2-(4-니트로-페녹시카르보닐아미노)-4-트리플루오로메틸-페녹시-메틸]-피페리딘-1-카르복실산 터트-부틸 에스테르(60 mg, 0.11 mmol)의 교반된 용액에 디옥산 중의 2N

HCl(2 mL)를 첨가하고 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 최종 혼탁물을 회전 증발 및 고 진공으로 농축시켜서 최종 산물에 해당하는 노란색 고체를 얻었다(57 mg, 99%).  $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ )  $\delta$  : 11.18 (br s, 1H), 9.91 (s, 1H), 9.13 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.62 (br s, 1H), 8.57 (s, 1H), 7.43 (d, 1H), 7.25 (d, 1H), 4.18 (m, 2H), 3.44 (m, 1H), 3.23 (m, 1H), 2.86 (m, 2H), 2.36 (m, 1H), 1.96 (m, 1H), 1.83 (m, 1H), 1.67 (m, 1H), 1.42 (m, 1H). LRMS (apci, positive) m/e 464.3 ( $\text{M}^+ 1$ ).

#### 화합물 2 :

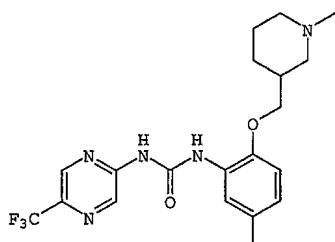


1-[5-메틸-2-(피페리딘-3-일메톡시)-페닐]-3-(5-트리플루오로메틸-피라진-2-일)-우레이 하이드로클로라이드 염

1 단계 : 3-{4-메틸-2-[3-(5-트리플루오로메틸-피라진-2-일)-우레이도]-페녹시메틸}-피페리딘-1-카르복실산 터트-부틸 에스테르. 화합물 1의 과정, 2 단계에 따라서 3-[4-메틸-2-(4-니트로-페녹시카르보닐아미노)-페녹시메틸]-피페리딘-1-카르복실산 터트-부틸 에스테르(WO02/070494)로부터 제조하였다. 생성물은 백색 고체로 분리하였다.

2 단계 : 화합물 1의 과정, 3 단계에 따라서 3-{4-메틸-2-[3-(5-트리플루오로메틸-피라진-2-일)-우레이도]-페녹시메틸}-피페리딘-1-카르복실산 터트-부틸 에스테르로부터 제조하였다. 최종 산물은 황색 고체로 분리되었다 (30 mg, 99 %).  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{d}_6\text{-DMSO}$ )  $\delta$  : 10.86 (s, 1H), 9.61 (s, 1H), 9.05 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 8.58 (br s, 1H), 7.98 (s, 1H), 6.98 (d, 1H), 6.83 (d, 1H), 3.99 (m, 2H), 3.40 (m, 1H), 3.23 (m, 1H), 2.81 (m, 2H), 2.23 (m, 1H), 2.22 (s, 3H), 1.91 (m, 1H), 1.80 (m, 1H), 1.62 (m, 1H), 1.39 (m, 1H). LRMS (apci, positive) m/e 410.4 ( $\text{M}^+ 1$ ).

#### 화합물 3 :

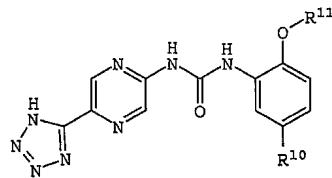


1-[5-메틸-2-(1-메틸-피페리딘-3-일메톡시)-페닐]-3-(5-트리플루오로메틸-피라진-2-일)-우레이

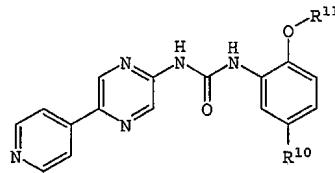
화합물 1의 과정 2 단계에 따라서 [5-메틸-2-(1-메틸-피페리딘-2-일메톡시)-페닐]-카르bam산 4-니트로-페닐 에스테르(WO 02/070494)로부터 백색 고체를 제조하였다.  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  : 11.01 (br s, 1H), 8.87 (br s, 1H), 8.82 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 6.84 (d, 1H), 6.76 (d, 1H), 3.84 (m, 2H), 3.16 (m, 1H), 2.81 (m, 1H), 2.37 (s, 3H), 2.29 (m, 1H), 2.20 (s, 3H), 1.99 (m, 1H), 1.87-1.62 (m, 4H), 1.11 (m, 1H). LRMS (apci, positive) m/e 424.3 ( $\text{M}^+ 1$ ).

추가적인 본 발명의 비제한적인 화합물을 하기에 나타내었다.

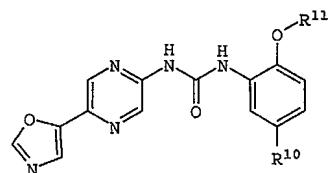
#### 화합물 4 :



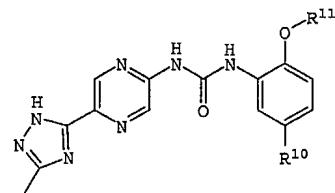
화합물 5 :



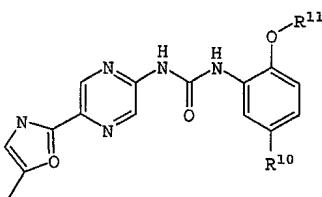
화합물 6 :



화합물 7 :



화합물 8 :



### 치료 방법

본 발명의 화합물은 예를 들어, 사람 및 기타 동물을 포함하는 진핵 생물의 암 및 기타 세포 증식 관련 질후를 치료하는데에 사용되는 방사선 및/또는 화학 요법 제제의 치료 효과를 배가시키는데에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 대사 길항 물질 예를 들어, 메토트렉세이트 또는 5-플루오로우라실(5-FU)로 통상 치료되는 종양의 치료 효능을 강화시키는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 화합물은 세포 즉, 암 세포 및 비암 세포 모두의 비정상적 증식을 억제한다.

본 발명의 화합물을 사용함으로써 비정상적으로 증식하는 세포를 부분적으로 또는 완전히 퇴화시킬 수 있는데, 즉, 이러한 세포들을 세포 군집으로부터 부분적으로 또는 완전히 사라지게 만들 수 있다. 그러므로, 예를 들어, 비정상적으로 증식하는 세포의 군집이 종양 세포일 때, 본 발명의 방법은 종양의 성장 속도를 늦추고, 종양의 크기와 수를 줄이거나 또는 종양을 부분적으로 또는 완전히 퇴화시키는데에 사용될 수 있다.

모든 구체예에서, 본 발명은 비정상 세포 증식이 확인되지 않거나, 비정상 세포 증식의 진행이 멈추었으나, 각각 비정상 세포 증식이 의심되거나 또는 예상되는 경우, 생체 내 또는 생체 외에서 사용될 수 있다. 뿐만 아니라, 본 발명은 또한 비정상 세포 증식이 재발하는 것을 예방하거나 또는 억제하기 위해 비정상 세포 증식을 미리 처치한 비정상 세포 군집에도 사용될 수도 있다. 본 구체예 및 관련 구체예에 있어서, "비정상적으로 증식하는 세포를 포함하는 세포 군집"이란, 비정상 세포 증식이 확인되지 않거나 진행을 멈추었으나, 각각 비정상 세포 증식이 의심되거나 또는 예상되는 임의의 세포 군집, 및/또는 비정상 세포 증식의 재발을 예방하거나 또는 억제하기 위해 미리 처치된 임의의 세포 군집을 의미한다.

본 발명의 방법은, 단일 또는 이중 사슬 DNA를 파괴하거나, 또는 DNA 복제 또는 세포 증식을 차단할 수 있는 화학 요법 제제와 함께 본 발명의 Chk1 억제 화합물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다. 대안적으로, 본 발명의 방법은 본 발명의 Chk1 억제 화합물 중 하나 이상을 치료적 유효량으로 투여하고, 이와 동시에 항체 예를 들어, 허셉틴(암 세포의 증식 억제 활성을 가짐)을 사용하는 것을 포함하는 치료법도 병행하는 것을 포함한다. 따라서, 암 예를 들어, 결장직장암, 두경부암, 췌장암, 유방암, 위암, 방광암, 외음부 암, 백혈병, 림프종, 흑색종, 신장 세포암, 난소암, 뇌종양, 골육종 및 폐암 종은, 화학 요법 제제 또는 항체와 함께 본 발명의 Chk1 억제제를 투여하는 개선된 치료법으로 치료 가능하다.

암은 세포 복제가 제어 불가능하며 진행중인 조직 세포의 성장에 의한 종양 또는 신생물을 포함한다. 이와 같은 성장물 중 일부는 양성이지만, 그 외의 성장물, 즉, "악성"이라 일컬어지며 유기체의 사멸을 야기할 수 있다. 악성 신생물, 또는 "암"은 공격적인 세포 증식 현상을 나타내고, 주변 조직에 침투하여 전이될 수 있다는 점에서 양성 성장(benign growth)과 구별된다. 뿐만 아니라, 악성 신생물은 분화의 손실이 보다 많아지며(보다 큰 "탈분화") 조직 상호 간 그리고 주위 조직의 기질화(organization)도 많이 손상시킨다. 이러한 특성을 "퇴화"라 칭한다.

본 발명에 의하여 치료 가능한 암으로서는 또한 고형 암 즉, 암종 및 육종을 포함한다. 암종은 주위 조직으로 침윤(즉, 침투)하여 전이를 일으키는 상피 세포 유래 악성 신생물을 포함한다. 선암종은 선조직 또는 인지 가능한 선구조물을 형성하는 조직으로부터 유래되는 암종이다. 기타 암의 광범위한 부류에는 육종 즉, 세포가 섬유상 또는 균질한 물질 예를 들어, 배의 결합 조직에 묻혀있는 종양을 포함한다. 본 발명은 또한 골수 또는 림프계 관련 암 예를 들어, 백혈병, 림프종, 및 통상적으로 종양 덩어리로 존재하지는 않고 혈관계 또는 림프 망계(lymphoreticular system)에 분포되어 있는 기타 암도 치료할 수 있다.

Chk1 활성을 예를 들어, 성인 및 소아 종양학에 있어서 다양한 형태의 암과 관련되어 있는데, 예를 들어, 고형 암/악성 종양의 성장, 점액양 세포 및 원형 세포 암종, 국소 진행성 종양(locally advanced tumor), 전이성 암, 사람 연조직 육종 예를 들어, 유잉(Ewing) 육종, 암 전이 예를 들어, 림프관성 전이, (구체적으로, 두경부의) 편평 세포 암종, 식도 편평 세포 암종, 구강 암종, 혈액 세포 악성 종양 예를 들어, 다발성 골수종, 백혈병 예를 들어, 급성 림프구성 백혈병, 급성 비림프구성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 및 모상 세포 백혈병, 삼출성 림프종(체강계 삼출성 림프종), 흉선 림프종 폐암(예를 들어, 소 세포 암종, 피부 T 세포 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 부신 피질 암, ACTH-생산 종양, 비소 세포 암, 유방암 예를 들어, 소 세포 암종 및 유선관 암종), 위장관 암(예를 들어, 위암, 결장암, 결장직장암, 및 결장직장 신생물 관련 용종), 췌장암, 간암, 비뇨기 암(예를 들어, 방광암 예를 들어, 원발성 표재성 방광 종양, 방광의 침윤성 이행 세포 암종 및 근육-침윤성 방광암), 전립선암, 여성 생식기 악성 종양(예를 들어, 난소 암종, 원발성 복막 상피성 신생물, 자궁 경부 암종, 자궁 내막 암, 질암, 여성 외음부 암, 자궁암 및 난소 여포내 고형 암), 남성 생식기 악성 종양(예를 들어, 고환암 및 음경암), 신장암(예를 들어, 신장 세포 암종), 뇌암(예를 들어, 내인성 뇌종양, 신경아세포종, 성상신경교세포 뇌종양, 신경교종 및 중추 신경계 내 전이성 종양 세포 침윤), 골암(예를 들어, 골종 및 골육종), 피부암(예를 들어, 악성 흑색종, 사람 피부 각질 세포의 진행성 종양, 및 편평 세포 암), 갑상선 암, 망막아세포종, 신경아세포종, 복막 삼출, 악성 흉막 삼출, 중피종, 빌리스 종양, 담낭암, 영양막 신생물, 혈관주위세포종 및 카포시 육종과 관련되어 있다. 그러므로, 본 발명의 Chk1 억제제를 투여하면 치료 효과를 강화시킬 수 있을 것으로 예상된다.

본 발명의 화합물은 또한 염증성 질환의 치료에 있어서 약물의 효능을 배가시킬 수도 있다. 본 발명의 방법에 적당한 화합물과의 병행 요법으로 치료 효과를 볼 수 있는 질병의 예로서는, 류마티스성 관절염, 건선, 백반, 웨그너 육아종증 및 전신 홍반성 루프스병(SLE)이 있다. 관절염, 웨그너 육아종증 및 SLE의 치료법에는 종종 면역 억제 치료제 예를 들어, 이온화 방사선, 메토트렉세이트 및 사이클로포스파미드를 사용하는 것을 포함한다. 이러한 치료법은 통상적으로 직접적으로나 또는 간접적으로 DNA 손상을 유발시킨다. 면역 세포 공격 기작에 있어서 Chk1 활성을 억제하면, 이 면역 세포는 표준적 치

료 방법에 의한 제어 기작에 더욱 민감해 진다. 일반적으로 건선 및 백반은 자외선 조사(UV)와 소라렌 투여를 병행하여 치료된다. 본 발명의 DNA 손상 제제는 UV 및 소라렌 사멸 효능을 유도하며, 이 치료법의 치료 지수를 증가시킨다. 일반적으로, 본 발명의 방법에 유용한 화합물은 현재 사용되고 있는 면역 억제 약물과 함께 투여될 때 염증성 질환 세포의 제어 효율이 증가된다.

상기 기술된 암 이외에도, 본 발명은 비암성 증식 세포를 치료하는 방법에 사용될 수도 있다. 이러한 증상으로서는 아테롬성 동맥경화증, 재협착증, 혈관염, 신장염, 망막증, 신장 질환, 증식성 피부 질환, 건선, 켈로이드 흉터, 광선 각화증, 스티븐-존슨 증후군, 류마티스성 관절염(RA), 전신 발병 연소자 만성 관절염(JCA), 골다공증, 전신 홍반성 루프스, 눈의 과증식 성 질환 예를 들어, 상피 하류 성장(down growth), 증식성 유리체망막병증(PVR), 당뇨병성 망막병증, 헤만지오-증식성 질환, 어린선 또는 유두종을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 Chk1 억제제를 투여하는 한 가지 바람직한 방법은 Keegan와 다수의 미국 출원 제 60/503,925 호(2003년 9월 17일자 출원) 및 여기에 참고 인용되어 있는 문헌에 기술되어 있다. 비정상 세포 증식을 억제하는 방법에는, Chk1 활성화제(예를 들어, 화학 요법 제제) 및 본 발명에 따른 Chk1 억제제를 투여하는 것을 포함한다. 이 방법에서, 하나 이상의 Chk1 활성화제는 증식 세포에 있어서 세포 주기 정지를 실질적으로 동일화(synchronize)시키기에 충분한 투여량 및 시간 동안 투여된다. 실질적인 단계 동일화가 일어나면, 하나 이상의 Chk1 억제제를 투여하여 세포 주기 정지를 파기하고 치료적 세포 사멸을 유도한다. 이 방법은 임의의 Chk1 활성화제를 사용하는 경우 유용하며, 암성 및 비암성 비정상 세포 증식을 치료 또는 예방하는데 사용된다.

비정상적 증식 세포 군집은 하나의 Chk1 억제제와 접촉시키거나 하나 이상의 Chk1 억제제와 접촉할 수 있다. 하나 이상의 Chk1 억제제가 사용되면, 이 Chk1 억제제들은 실험 참관의 또는 실험실 기술자에 의해 정해진 개별 시간에 공동 투여 또는 개별 투여될 수 있다.

비정상적으로 증식하는 세포 군집은 또한 하나의 Chk1 활성화제와 접촉하거나 하나 이상의 Chk1 활성화제와 접촉할 수 있다. 하나 이상의 Chk1 활성화제가 사용되면, 상기 Chk1 활성화제는 실험 참관의 또는 실험실 기술자에 의해 정해진 개별 시간에 공동 투여될 수 있거나 또는 개별 투여될 수 있다.

본 발명의 Chk1 억제제는 또한 세포 외 세포 군집의 양태를 연구하거나 변형시키는데도 적용될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 화합물은 세포 외에서, 소정의 정후, 세포 유형, 환자 및 기타 매개 변수에 대한 Chk1 억제제의 투여 스케줄 및/또는 투여량을 결정하는데 사용될 수 있다. 이러한 용도로부터 수집된 정보는 시험관 내 치료법에 대한 프로토콜을 설정하기 위한 실험 목적으로 또는 임상 실험에서 사용될 수 있다. 본 발명을 사용하기에 적당한 기타의 세포 외 용도는 당업자에게 널리 알려져 있다.

본 발명의 Chk1 억제제 화합물은 또한 세포를 방사선 감작시킬 수도 있다. 전자기 방사선으로 치료 가능한 질병으로서는 신생물 생성 질병, 양성 및 악성 종양 및 암 세포를 포함한다.

본원에 예시되어 있지 않은 기타 질병의 전자기 방사선 치료법도 또한 본 발명에 의해 고려된다. 본 발명의 바람직한 구체 예는 다음과 같은 전자기 방사선을 이용한다: 감마-방사선( $10^{-20}$  내지  $10^{-13}$  m), X-레이 방사선( $10^{-12}$  내지  $10^{-9}$  m), 자외 광선(10~400 nm), 가시 광선(400~700 nm), 적외 방사선(700 nm~1.0 mm) 및 마이크로파 방사선(1 mm~30 cm).

다수의 암 치료 프로토콜은 현재 전자기 방사선 예를 들어, X-선에 의해 활성화되는 방사선 감작제를 사용한다. X선-활성화 방사선 감작제의 예로서는 다음과 같은 것을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다: 메트로니다졸, 미소니다졸, 데스메틸미소니다졸, 피모니다졸, 에타니다졸, 니모라졸, 미토마이신 C, RSU 1069, SR 4233, EO9, RB6145, 니코틴아미드, 5-브로모데옥시우리딘(BUDR), 5-요도데옥시우리딘(IUDR), 브로모데옥시시티딘, 플루오로데옥시우리딘(FUDR), 히드록시우레아, 시스-플라틴 및 이들의 치료학적으로 유효한 유사체 및 유도체.

암의 광역학적 치료법(PDT: photodynamic therapy)에서는 감작제의 방사선 활성화제로서 가시 광선을 사용한다. 광역학적 방사선 감작제의 예로서는 다음과 같은 것들을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다: 헤마토포르피린 유도체, PHOTOFRIN®, 벤조포르피린 유도체, NPe6, 주석 에티오포르피린(SnET2), 포에보르비드-a, 박테리오클로로필-a, 나프탈로시아닌, 프탈로시아닌, 아연 프탈로시아닌, 및 이들의 치료학적으로 유효한 유사체 및 유도체.

방사선 감작제는 Chk1 억제제 이외에도 치료적 유효량의 하나 이상의 화합물과 함께 투여될 수 있으며, 상기 화합물로서는 예를 들어, 표적 세포로의 방사선 감작제의 혼입을 촉진하는 화합물, 치료제, 영양분 및/또는 산소의 표적 세포로의 흐

름을 제어하는 화합물, 부가 방사선과 함께 또는 단독으로 작용하는 화학 요법 제제, 또는 기타 치료학적으로 유효한 암 또는 기타 질병 치료용 화합물이 있다. 방사선 감작제와 함께 사용될 수 있는 부가 치료제의 예로서는 5-플루오로우라실(5-FU), 류코보린, 산소, 카보겐, 적혈구 수혈, 과불화탄소(예를 들어, FLUOSOLW®-DA), 2,3-DPG, BW12C, 칼슘 채널 차단제, 펜톡시필린, 항혈관형성 화합물, 히드라진 및 L-BSO를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

사용할 수 있는 화학 요법 제제로서는 알킬화제, 대사 길항 물질, 호르몬 및 이의 길항 물질, 방사성 동위 원소, 항체, 그리고 천연 생성물, 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 본 발명의 억제 화합물은 항생제 예를 들어, 독소루비신 및 기타 안트라사이클린 유사체, 질소 머스타드 예를 들어, 사이클로포스파미드, 피리딘 유사체 예를 들어, 5-플루오로우라실, 시스-플라틴, 히드록시우레아, 탁솔 및 이의 천연 및 합성 유도체 등과 함께 투여될 수 있다. 혼합 종양(mixed tumor) 예를 들어, 유방의 선암종의 경우(즉, 종양이 고나도트로핀-의존성 및 고나도트로핀-독립성 세포를 포함하는 경우), 본 발명의 화합물은 루프롤리드 또는 고세렐린(LH-RH의 합성 웨티드 유사체)과 함께 투여될 수 있다. 기타 신생물 억제프로토콜은 기타 치료 양상 예를 들어, 수술 또는 방사선 조사와 억제 화합물을 사용하는 것을 포함한다[본원에서는 "부가 항-신생 양상(adjunct anti-neoplastic modalities)"이라 칭함]. 본 발명에 유용한 부가의 화학 요법 제제로서는 호르몬 및 이의 길항 물질, 방사성 동위 원소, 항체, 천연 생성물 및 이들의 혼합물을 포함한다. 본 발명의 방법에 유용한 화학 요법 제제의 예로서는 이하 표 1에 나열된 것들이 있다.

[표 1]

알킬화제	질소 머스타드	메클로레타민
사이클로포스파미드	이포스파미드	멜파란
클로람부실	나트로소우레아	카머스틴(CCNU)
로머스틴(CCNU)	세머스틴(메틸-CCNU)	에틸렌이민/메틸렌아민
트리에틸렌멜라민(TEM)	트리에틸렌 트리포스포라미드	(티오태파)
헥사메틸멜라민	(HMM, 알트레타민)	알킬 살포네이트
부설판	트리아진	다카바진(DTIC)
대사길항물질	풀산 유사체	메토트렉세이트
트리메트렉세이트	피리미딘 유사체	5-플루오로우라실
플루오로데옥시우리딘 (AraC, 시타라빈)	젠타빈	시토신 아라비노시드
퓨린 유사체	5-아자시티딘	2,2'-디플루오로데옥시시티딘
아자티오프린	6-머캅토퓨린	6-티오구아닌
에리트로히드록시노닐아데닌 (EHNA)	2'-데옥시코포마이신	(펜토스타틴)
(클라드리빈, 2-CdA)	플루다라빈 포스페이트	2-클로로데옥시아데노신
캠프토테신	다중 표적화 안티플레이트	I형 토포이소머라제 억제제
천연 생성물	토포테칸	이리노테칸
빈카 알칼로이드	세포 분열 저해 약물	파클리탁셀
비노렐빈	빈블라스틴(VLB)	빈크리스틴
비노렐빈	탁소테어(도세탁셀)	에스트라마스틴
에스트라마스틴 포스페이트 에피포도필로톡신	에토포시드	테니포시드
항생제	액티노마이신 D	도노마이신(루비도마이신)
독소루비신(아드리아마이신)	미톡산트로네이다 루비신	블레오마이신스플리카마이신 (미트라마이신)

미토마이신 C	닥티노마이신	효소
L-아스파라기나제	생물 반응 개선제	인터페론-알파
IL-2	G-CSF	GM-CSF
분화 제제	레티논산 유도체	방사선 감작제
메트로니다졸	미소니다졸	데스메틸미소니다졸
피모니다졸	에타니다졸	니모라졸

RSU 1069	E0 9	RB 6145
SR 4233	니코틴아이드	5-브로모데오지우리딘
5-요도데옥시우리딘	브로모데옥시시티딘	기타 제제
백금 배위 칙물	시스-플라틴	카보플라틴
옥살리플라틴	안트라센디온	미토잔트론
치환 우레아	히드록시우레아	메틸히드라진 유도체
N-메틸히드라진(M1H)	프로카바진	아드레노코르티칼 억제제
미토탄(o,p'-DDD)	엔지오글루테티미드	사이토카인
인터페론(α, β, γ)	인터루킨-2 호르몬 및 길항제	아드레노코르티코스테로이드/ 길항제
프레드니손 및 균등물	덱사메타손	아이노글루테티미드
프로게스틴	히드록시프로게스테론 카프로에이트	메드록시프로게스테론 아세테이트
메게스트롤 아세테이트	에스트로겐	디에틸스틸베스트롤
에티닐 에스트라디올/ 균등물	안티에스트로겐	타목시펜
안드로겐	테스토스테론 프로피오네이트	플루옥시메스테론/균등물
안티안드로겐	플루타미드	고나도트로핀-방출
호르몬 유사체	루프롤리드	비스테로이드성 안티안드로겐
플루타미드	감광제	헤마토포르피린 유도체
포토프린	벤조포르피린 유도체	Npe6
주석 에티오포르피린(SnET2)	페오보라이드-a	박테리오클로로필-a
나프탈로시아닌	프탈로시아닌	아연 프탈로시아닌
성장 인자 수용체 길항 물질	EGFR 길항 물질	HER-2 길항 물질

방사선 감작제과 함께 사용할 경우 특히 유용한 화학 요법 제제의 예로서는 예를 들어, 캠프토테신, 카보플라틴, 시스-플라틴, 도노루비신, 독소루비신, 인터페론(알파, 베타, 감마), 이리노테칸, 히드록시우레아, 클로람부실, 5-플루오로우라실(5-FU), 메토트렉세이트, 2-클로로아데노신, 플루다라빈, 아자시티딘, 켐시타빈, 페메트렉시드, 인터루킨 2, 이리노테칸, 도세탁셀, 파클리탁셀, 토포테칸 및 이들의 치료학적으로 유효한 유사체 및 유도체를 포함한다.

본 발명에 의하면, 본 발명의 화합물은 켐시타빈과 함께, 또는 이 켐시타빈 및 파클리탁셀과 함께 투여될 때 유용하다. 본 발명의 화합물은 또한 페메트렉시드와 함께, 또는 이 페메트렉시드 및 시스 플라틴, 카보플라틴 또는 기타 플라틴과 함께 투여될 때 유용하다. 본 발명의 Chk1 억제제는 또한 켐시타빈과 페메트렉시드와 함께 투여될 수도 있다.

켐시타빈과 함께 투여된 본 발명의 Chk1 억제제는 예를 들어, 췌장암, 자궁 평활근 육종, 골 육종, 전이성 비소세포 폐암, 하지 구간 연조직 육종, 신장 세포 암, 선암종 및 호지킨병의 치료에 유용할 수 있다. 본 발명의 Chk1 억제제를 페메트렉시드와 함께 투여하면 중피종의 치료에 유용할 수 있다.

당 업계의 숙련자에 의하여 파악된 바와 같이, 치료법에 관한 본원의 참고 문헌은 확립된 질병 또는 증상의 예방법 및 치료법까지 그 범위를 확장할 수 있다. 치료법에 관한 참고 문헌은 또한 치료받은 징후의 증식 속도를 늦추거나 또는 이 징후의 재발률을 감소시키는 것에 관한 것이다. 치료에 사용되어야 하는 본 발명의 화합물의 양은 치료받을 증상의 특성과 환자의 연령 및 증상에 따라서 달라진다는 사실을 알 수 있으며, 이는 최종적으로 참관의 또는 수의사에 의하여 결정된다.

그러나, 일반적으로 성인에 투여되는 투여량은 통상적으로 하루에 0.001 ~ 약 100 mg/kg이다. 바람직한 투여량은 단일 투여 방식, 또는 복수 투여 방식[적당한 간격, 예를 들어, 하루에 2회, 3회, 4회 또는 그 이상의 횟수로 투여]으로 편리하게 투여될 수 있다. 실제로, 의사는 환자 개개인에 가장 적당한 투여 방식을 결정하며, 이때의 투여량은 연령, 체중 및 특정 환자의 반응에 따라서 달라진다. 상기 투여량은 보통의 경우를 예로 든 것에 불과하며, 경우에 따라서 더 많은 투여량, 또는 더 적은 투여량이 유리할 경우도 있으며, 이러한 사실은 본 발명의 범위 내에 포함된다.

세포 군집과 본 발명의 Chk1 억제제는 세포 주기 체크포인트가 실질적으로 파기되는데 충분한 투여량 및 시간으로 접촉할 수 있다. 통상적으로, 이러한 투여 시간은 여러 가지 인자에 따라서 약 72 ~ 약 96 시간 이하일 수 있으나, 반드시 그러한 것은 아니다. 몇몇 구체예에서, 대략 수 주일 이하 또는 그 이상의 기간(참관의 또는 기술자에 의해 결정)에 걸쳐서 Chk1 억제제를 투여하는 것이 바람직하며 또한 그렇게 할 필요가 있다. 그러므로, 본 발명의 Chk1 억제제는 통상적으로 약 1 시

간 이하, 약 2 시간 이하, 약 3 시간 이하, 약 4 시간 이하, 약 6 시간 이하, 약 12 시간 이하, 약 18 시간 이하, 약 24 시간 이하, 약 48 시간 이하, 또는 약 72 시간 이하 동안 투여될 수 있다. 당 업계의 숙련자는 본원에 예시된 시간 범위는 단지 예시적인 것이며, 이와 같이 예시된 시간 범위 및 이에 속하는 범위 내외도 본 발명의 범위에 포함된다는 사실을 이해하고 있다.

본 발명의 Chk1 억제제는 복수 회 투여하는 방식으로 투여될 수 있다. 예를 들어, Chk1 억제제는 다음과 같은 횟수로 투여될 수 있다: 4일 간격으로, 하루에 1회 투여하여 총 4회 투여(q4d × 4); 3일 간격으로, 하루에 1회 투여하여 총 4회 투여(q3d × 4); 5일 간격으로, 하루에 1회 투여(qd × 5); 3주 동안, 1주일에 1회 투여(qwk3); 5일 동안 매일 투여 → 2일간 투여 중지 → 5일 동안 매일 투여(5/2/5); 또는 경우에 따라서 적당한 것으로 판단되는 임의의 투여 방식.

## 실시예

### 실시예 1

#### Chk1 억제제의 IC<sub>50</sub> 값 측정

이미 기술된 국제 출원 공보 WO 99/11795(1998년 9월 4일자 발행)에 개시된 바와 같이, 사람 Chk1 cDNA를 동정하여 클로닝하였다. FLAG® 표지를 전체길이 Chk1의 아미노 말단을 보유하는 프레임 내에 삽입하였다. 상기 5' 프라이머는 EcoRI 위치, 코작 서열을 함유하며, 또한 M2 항체(Sigma, Saint Louis, IL)를 사용하는 친화성 정제용인 FLAG® 표지를 암호화하기도 한다. 상기 3' 프라이머는 Sall 위치를 함유한다. PCR-증폭 단편을 EcoRI-Sall 단편(Invitrogen, Carlsbad, CA)처럼 pCI-Neo에 클로닝한 다음, EcoRI-NotI 단편은 pFastBacI(Gibco-BRL, Bethesda, MD)에 서브 클로닝하였다. Gibco-BRL Bac-to-Bac 매뉴얼에 기술된 바와 같이 재조합 바클로바이러스를 제조하여, 이를 CCM3 배지(HyClone Laboratories, Logan, UT) 내에서 생장한 Sf-9 세포를 감염시키는데에 사용하여, FLAG®-태깅된 Chk1 단백질을 발현시켰다.

바클로바이러스-감염된 SF9 세포의 동결 펠렛으로부터 FLAG®-표지된 Chk1을 정제하였다. 동결 세포 펠렛을 동 부피의 2 X 용해(lysis) 완충액[100 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 50 mM B-글리세로포스페이트, 25 mM NaF, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EGTA, 0.2% TWEEN®-20, 2 mM 바나듐산나트륨, 2 mM DTT 및 단백질 억제제 혼합물(Complete mini, Boehringer Mannheim 2000 catalog #1836170) 함유]과 혼합하였다. 이후, 세포를 다운스 균질화기의 막자를 사용하여 20회 다운싱(douncing)시킨 후, 48,400 × g에서 1 시간 동안 원심분리시켰다. M2 친화도 컬럼을 10 컬럼 부피 만큼의 50 mM의 글리신(pH 3.5), 다음에 20 mM Tris(pH 7.5) 및 150 mM NaCl로 3회 번갈아가며 예비 세척하고 Tris NaCl로 마무리하였다. 이후 상기 컬럼을 25 컬럼 부피의 20 mM Tris(pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% TWEEN®-20, 1 mM EGTA, 1 mM EDTA 및 1 X 완전 미니 프로테아제 정제(complete mini protease tablet)로 세척하였다. 이후, 투명 해 진 용해물을 4°C의 수조 내에서 4 시간 동안 방지하여 M2 친화도 수지에 결합시켰다. 그 다음, 상기 수지 및 용해물의 혼합물을 컬럼에 붓고 컬럼으로 흘려보낸 통과 유액을 수집하였다. 이 수지를 10 컬럼 부피의 20 mM Tris(pH 7.5), 150 mM NaCl 및 3 mM N-옥틸 글루코사이드로 세척하였다. 이후, FLAG®-표지된 Chk1을 6 컬럼 부피의 0.5 mg/ml FLAG® 펩티드(Sigma, 2000 Catalog # F-3290) 함유하는 냉각된 20 mM Tris(pH 7.5), 150 mM NaCl, 3 mM N-옥틸 글루코사이드를 사용하여 컬럼으로부터 용리시켰다. 3개의 분획물을 수집하여 FLAG-표지된 Chk1이 존재 여부에 대하여 분석하였다.

100 ng 정제 FLAG®-Chk1(150 pmol ATP/분), 20 μM Cdc25C 펩티드(H-leu-tyr-arg-ser-pro-ser-met-pro-glu-asn-leu-asn-arg-arg-arg-OH)(서열번호 1), 4 μM ATP, 2 μCi[<sup>32</sup>P]γ-ATP, 20 mM Hepes(pH 7.2), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP40 및 1 mM DTT를 포함하여, 단백질 키나제를 Chk1 키나제 활성 분석에 사용하였다. 본 분석법은 본 발명의 화합물의 IC<sub>50</sub>을 측정하는데 이용하였다. ATP-함유 반응 혼합물을 첨가하여 반응을 개시하고 실온에서 10 분 동안 반응을 계속 진행시켰다. 여기에 인산(최종 농도 150 mM)을 첨가하여 상기 반응을 종결시키고, 이를 포스포셀룰로즈 디스크에 읊쳤다. 이 포스포셀룰로즈 디스크를 150 mM 인산으로 5회 세척한 다음, 공기 건조시켰다. 섬광 유체를 가하고 디스크를 월랙 섬광 계측기(Wallac scintillation counter)에서 계수하였다. 상기 분석법을 수행한 본 발명의 Chk1 억제제의 IC<sub>50</sub> 값은 약 8~약 500 nM이었다.

### 실시예 2

#### 선택성

하나 이상의 기타 단백질 키나제 즉, DNA-PK, Cdc2, 카세인 키나제 I(CKI), Chk2, p38 MAP 키나제, ERK 키나제, 단백질 키나제 A(PKA), 및/또는 칼슘-칼모듈린단백질 키나제 II(CaM KII)에 대한 선택성에 대하여 본 발명의 Chk1 억제제를 시험하였다. Chk2를 제외하고 상기 키나제 모두에 대한 분석 과정은 문헌 예를 들어, 미국 특허 공보 제 2002-016521 A1 및 미국 특허 출원 제 08/184,605 호(1994년 1월 21일 출원)[상기 참고 문헌 모두는 본원에 참고 인용되어 있음]에 이미 개시되어 있다.

Chk2에 대한 화합물의 활성은 다음과 같이 분석된다: 128 ng의 정제 His-표지된 Chk2를 4 mM ATP, 1 mCi [ $^{32}\text{P}$ ] $\gamma$ -ATP, 20 mM Hepes pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub> 및 0.25% NP<sub>40</sub>의 존재하에 실온에서 20분 동안 100 mM 이하의 Chk1 억제제와 함께 항온 처리하였다. 최종 농도 150 mM의 인산으로 반응을 종결시키고, 반응 혼합물의 5/8을 포스포셀룰로즈 디스크로 읊겼다. 이 디스크를 150 mM의 인산으로 5회 세척하고, 공기 건조시켰다. 섬광제를 가한 후 윌랙 베타 계측기로 방사능을 측정하였다.

p38 MAP 키나제, ERK 키나제, PKA, CaM KII 및 Cdc2를 뉴 잉글랜드 바이오랩(New England Biolabs)으로부터 구입하여, 제조자의 지침에 따라서 4~50  $\mu\text{M}$  ATP 및 시험용 Chk1 억제제(농도 = 100  $\mu\text{M}$ )를 사용하여 분석을 수행하였다. 기타 효소에 비하여 시험된 모든 억제제의 Chk1에 대한 선택성은 100배 이상 컸다.

### 실시예 3

#### 본 발명의 Chk1 억제제는 세포 내에서 Chk1 기능을 저해한다.

본 발명의 Chk1 억제제가 세포 내에서 Chk1 기능을 저해한다는 사실을 입증하기 위하여, 억제제를 분자 세포계 분석법으로 시험할 수 있었다. 포유 동물 Chk1은 시험관 내에서 Cdc25C를 인산화시키는 것으로 알려져 있고, 이는 상기 포유 동물 Chk1이 DNA 손상에 반응하여 사이클린 B/cdc2를 음성적으로 조절함을 의미하기 때문에, 사이클린 B/cdc2 활성을 강화시키는 Chk1 억제제의 능력을 분석할 수 있다. 그에 관한 실험은 다음과 같이 디자인할 수 있다: HeLa 세포에 800 rad의 방사선을 조사하고 37°C에서 7 시간 동안 항온 처리하였다. 상기 세포는 기능적으로 p53을 저해하므로, 이 세포는 주로 G2기에 머무르게 된다. 이후, 노코다졸을 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 첨가하고, 이 세포를 37°C에서 15 시간 동안 항온 처리하였다. 노코다졸을 첨가하면 임의의 세포들이 G2 정지 기를 거쳐 M기로 진행하게 된다. 마지막으로, Chk1 억제제를 8 시간 동안 첨가하고, 세포를 수집한 다음, 용해시켜, 제조자에 의해 제안된 바대로, 동량의 단백질을 사이클린 B1(New England Biolabs)에 대한 항체를 사용하여 면역 침강시켰다. 이후, 히스톤 H1 키나제 활성을 분석하여 사이클린 B-관련 cdc2 키나제 활성에 대한 면역 침강 결과를 분석하였다(Yu et al., J Biol Chem., Dec. 11, 1998; 273 (50) :33455-64).

뿐만 아니라, 본 발명의 Chk1 억제제가 이온화 방사선-유도성 G2 DNA 손상 체크포인트를 파기하는 능력은 유사 분열 지수 분석 실험을 통하여 확인할 수 있다. HeLa 세포(약 1 x 10<sup>6</sup>)를 상기와 같이 처리하였다. 원심분리로 세포를 수집하고, PBS로 1회 세척한 다음, 75 mM KCl 2.5 mL 중에 재현탁시켜, 다시 원심 분리하였다. 이후 상기 세포를 새로 제조한 냉각 아세트산:페탄올(1:3) 3 mL 중에서 고정시키고, 이를 20분 동안 얼음 상에서 항온 처리하였다. 세포를 펠렛화시키고, 고정 용액을 흡인기로 빨아낸 다음, PBS 0.5 mL 중에 재현탁하였다. 고정 세포 100  $\mu\text{L}$ 를 현미경 유리 슬라이드 상에 피펫팅하고, 시료를 1 mL의 고정 용액과 함께 그 위에 떨어뜨려서, 유사 분열 스프레드(mitotic spreads)를 준비하였다. 이후, 슬라이드를 공기 건조시키고, 라이트 염색약(Sigma)으로 1 분 동안 염색한 다음, 물로 1회 그리고 50% 메탄올로 또 1회 세척하였다. 염색체가 응축되고 핵 외피가 없어진 것으로 보아 세포가 유사 분열을 일으켰음을 알 수 있었다.

### 실시예 4

#### 본 발명의 Chk1 억제제는 암 치료에 의한 세포의 사멸률을 증가시킨다.

본 발명의 화합물에 의해 Chk1이 억제됨으로 인하여 표적화 세포가 DNA 손상 제제의 사멸 효과에 감작한다는 사실을 증명하기 위하여, 세포를 본 발명의 Chk1 억제제의 존재하에 항온 처리함과 동시에, 방사선 또는 DNA 손상 화학 제제에 노출시켰다. 96웰 미세 역가 평판 내 웰 당 1000 ~ 2000개의 밀도로 세포를 도말하고, 이 세포를 37°C의 가습 항온 처리기(5% CO<sub>2</sub>) 내에서 10% FBS, 100 U/mL 페니실린 및 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  스트렙토마이신 함유 RMPI 1640 중에 18 시간 동안 성장시켰다. 시험한 세포는 임의의 목적 세포 또는 세포주 예를 들어, HeLa, ACHN, 786-0, HCT116, SW620, HT29, Colo205, SK-MEL-5, SK-MEL-28, A549, H322, OVCAR-3, SK-OV-3, MDA-MB-231, MCF-7, PC-3, HL-60, K562 및 MOLT4를 포함할 수 있다. 모든 세포주의 명칭은 하기 표 2에 나타낸 바와 같이 사람 세포주에 대한 것이다:

[표 2]

HeLa	자궁 경부 선암종
ACHN	신장 선암종
786-0	신장 선암종
HCT116	결장 암종
SW620	결장 암종, 림프절 전이
HT29	대장 선암종
Colo205	결장 선암종
SK-MEL-5	흑색종
SK-MEL-28	악성 흑색종
A549	폐 암종
H322	기관세지폐포 암종
OVCAR-3	난소 선암종
SK-OV-3	난소 선암종
MDA-MB-231	유방 선암종
MCF-7	유방 선암종
PC-3	전립성 선암종(뼈로의 전이)
HL-60	급성 전골수성 백혈병
K562	만성 골수성 백혈병
MOLT4	급성 림프성 백혈병; T 임파 암구 세포

세포를 화학 요법 약물만을 함유하거나 또는 화학 요법 약물과 Chk1 억제제를 함유하는 배지로 처리하였다. 세포를 약 5일 동안 항온 처리한 다음, 3H-티미딘 흡수 수준을 측정하여 세포 성장률을 측정하였다. 화학 요법 약물로서는, 에토포시드, 독소루비신, 시스-플라틴, 클로람부실, 5-플루오로우라실(5-FU)를 포함한다. 미처리 대조구 세포의 90%까지 세포 성장을 억제하는데 필요한 약물의 농도를 GI<sub>90</sub>이라 정의한다.

본 발명의 화합물을 부가의 대사 길항 물질 예를 들어, 메토트렉세이트, 히드록시우레아, 2-클로로아데노신, 플루다라빈, 아자시티딘 및 켐시티빈과 함께 시험하여, 상기 제제들이 상기 화합물의 세포 사멸 능력을 증가시킬 수 있는지 평가하였다. 본 발명의 화합물을 켐시티빈과 함께 사용하여 HT29 결장 직장 암종의 사멸이 증가하였는지 여부를 평가함으로써 상호 비교할 수 있다.

또한, 본 발명의 Chk1 억제제가 방사선에 의한 사멸율을 상승시키는지 여부를 시험할 수 있다.

## 실시예 5

### 동물 종양 모델

본 발명의 Chk1 억제제가 마우스 내에서 DNA 손상 제제에 의한 종양의 사멸능을 강화시킬 수 있는 능력에 대하여 시험하기 위해서, 결장 종양 세포주를 사용하여 이종 이식 종양 모델을 확립하였다. 5-플루오로우라실(5-FU) 또는 켐시티빈이 DNA 손상 제제로 사용될 수 있다. HT29 및 Colo205(사람 결장 암종) 및 H460 및 Calu-6(비소세포 암종) 세포를 사용하여 6~8주령 암컷 흉선 Balb/c(nu/nu) 마우스 내에서 이종 이식 종양을 증식시켰다. 벨열원 무함유 조건하에서 총상 공기 유동 캐비넷 내에 마우스를 넣고, 멸균된 먹이 및 물을 임의로 공급하였다. 세포주를 5% CO<sub>2</sub> 가습 환경에서, 10% FBS, 100 U/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신 및 1.5 mM L-글루타민이 보강된 RPMI 1640 배지 내에서 종속 합류(subconfluence) 상태가 될 때까지 성장시켰다. CMF-PBS 내에 단일 세포 혼탁액을 준비하고, 세포 농도를  $1 \times 10^8$  세포/ml로 맞추었다. 마우스의 오른쪽 옆구리 또는 오른쪽 다리에 총  $1 \times 10^7$  개(100 µl)의 세포를 피하 주사(s.c.)하였다.

마우스를 4개의 치료 군으로 무작위로 나누어(5~15 마리/군), 종양 부피가 75~100 cm<sup>3</sup>(일반적으로 접종 후 7~11일 경과)가 될 때까지 마우스를 사용하였다. 버니어 캘리퍼스로 종양의 크기를 측정하고, 실험상 유도된 식에 따라서 종양 부피를 측정하였다: 종양 부피(cm<sup>3</sup>) = 종양 길이(cm) x 종양 폭(cm) x 종양 높이(cm)/3.3. 치료법은 i) 160 mg/kg의 젬시타빈 100 μl를 복강내(i.p) 주사하는 것을 포함한다. 젬시타빈 처리된 마우스 내에서는 종양 성장이 지연되는 것이 관찰되었다. 마우스에 160 mg/kg의 젬시타빈을 투여함과 동시에 Chk1 억제제를 경구 투여하면, 종양 부피를 줄여 개체의 생명을 연장시킬 것으로 기대된다. 종양 크기는 실험기간 동안 하루 걸러서 모니터하였다.

분명한 점은, 상기 제시된 비와 같이 본 발명에는 발명의 사상과 범위를 벗어나지 않고 다수의 변형 및 변화가 가하여 질 수 있다는 사실이다. 그러므로, 함축된 발명의 제한 범위는 오로지 첨부된 청구항에 의하여 한정되는 것이다.

### 서열목록

<110> ICOS Corporation

<120> Compounds Useful for Inhibiting CHK1

<130> 27866/40321A

<150> US 60/602,968

<151> 2004-08-19

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic peptide

<400> 1

Leu Tyr Arg Ser Pro Ser Met Pro Glu Asn Leu Asn Arg Arg Arg Arg

1

5

10

15