



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0065986
(43) 공개일자 2016년06월09일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 209/38 (2006.01) A61K 31/404 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61K 9/10 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07D 209/38 (2013.01)
A61K 31/404 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7013692
(22) 출원일자(국제) 2014년10월20일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2016년05월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/061418
(87) 국제공개번호 WO 2015/061229
국제공개일자 2015년04월30일
- (30) 우선권주장
61/895,308 2013년10월24일 미국(US)

- (71) 출원인
조지타운 유니버시티
미국 20057 워싱턴 디.씨. 앤.더블유. 씨티세븐쓰
앤드 오 스트리츠
- (72) 발명자
토레츠키, 제프리, 에이.
미국 20057 워싱턴 디.씨. 앤.더블유. 씨티세븐쓰
앤드 오 스트리츠 조지타운 유니버시티 내
유렌, 에이쿠트
미국 20057 워싱턴 디.씨. 앤.더블유. 씨티세븐쓰
앤드 오 스트리츠 조지타운 유니버시티 내
- (74) 대리인
김순웅

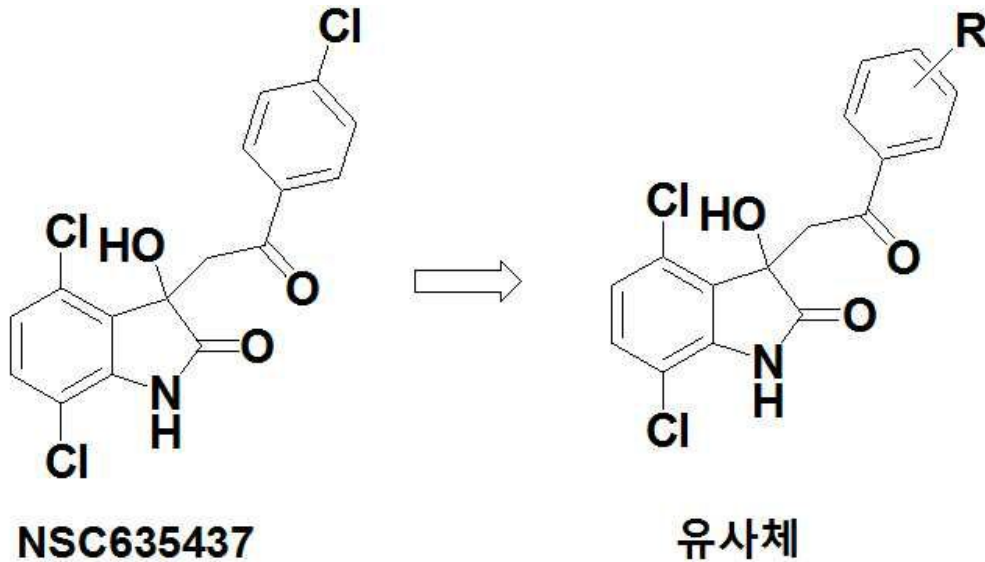
전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 암 치료용 방법 및 조성물

(57) 요약

본원에서 제공되는 방법 및 조성물은 암의 치료에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 조성물은 다형성 교모세포종 및 폐암을 포함하는 암의 치료에 유용성이 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 9/0019 (2013.01)

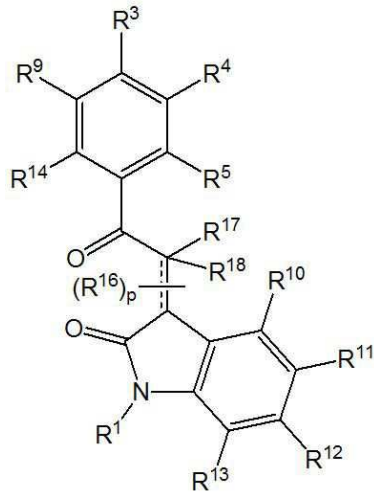
A61K 9/10 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

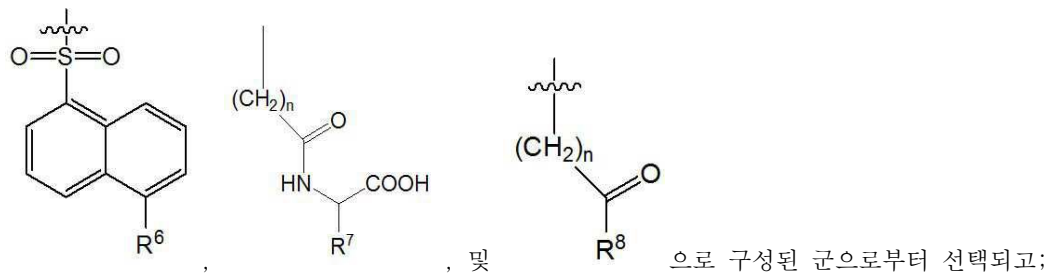
유효량의 화학식 I의 화합물:



화학식 (I)

또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 이를 필요로 하는 개체(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법으로서,

여기서 R^1 은 수소, C_{1-6} 알킬, 하나의 아미노산, 상호 연결되어 있는 두 개의 아미노산, 상호 연결되어 있는 세 개의 아미노산,



R^3 , R^4 , R^5 , R^9 , R^{14} , R^{17} 및 R^{18} 은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(=O)NH_2$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-OH$, $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되고;

R^{10} , R^{11} , R^{12} , 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(=O)NH_2$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-OH$, $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되고;

R^6 은 C_{1-6} 디알킬 아민이고;

R^7 은 수소 및 C_{1-6} 알킬로 구성된 군으로부터 선택되고;

R^8 및 R^{15} 은 각각 독립적으로 C_{1-6} 알킬이고;

각 R^{16} 은 독립적으로 수소, -OH, 또는 C_{1-6} 알콕시이고;

n은 0 내지 4인 정수이고;

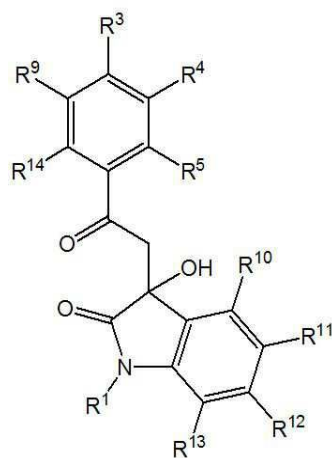
p는 1 또는 3이며; 및

점선(dashed line)은 선택적인 이중 결합을 나타내고 여기서 상기 이중 결합은 시스(cis) 및 트랜스(trans)로 구성된 군으로부터 선택된 입체배치(configuration)를 가지며,

R^3 , R^4 , R^5 , R^9 , 및 R^{14} 중 하나 이상이 $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 조건으로 하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 Ia의 화합물:

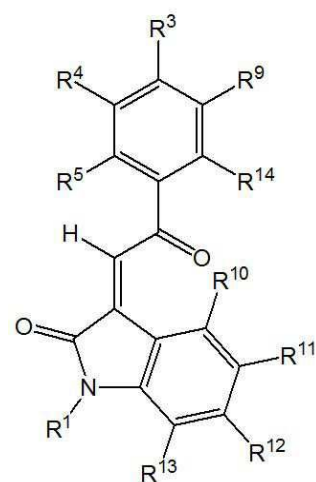


(Ia)

또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염인 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 Ib의 화합물:

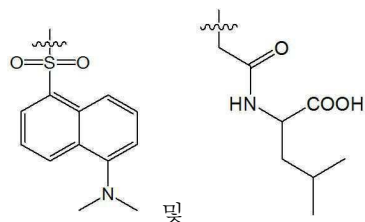


(Ib)

또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염인 것인, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R^1 은 Leu, Leu-Asp, Leu-Asp-Ala, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)\text{C}(\text{CH}_3)_2$,



으로 구성되는 군으로부터 선택된 것인, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R^3 은 $-\text{NH}(\text{R}^{15})$, $-\text{N}(\text{R}^{15})_2$, 및 $-\text{SR}^{15}$ 로부터 선택된 것인, 방법.

청구항 6

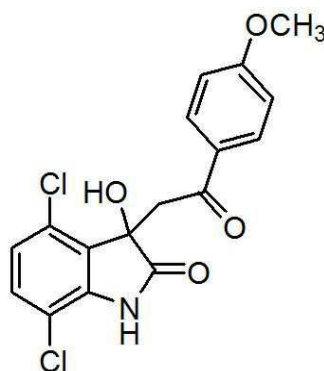
제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R^3 은 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 인 것인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R^3 은 $-\text{SCH}_3$ 인 것인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 화학식 I의 화합물은 하기 화학식의 화합물:



또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염인 것인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 포유류(mammalian)인 것인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 인간인 것인, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 폐선암(lung adenocarcinoma), 및 다형성 교모세포종으로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 방법.

청구항 12

제1항 내지 11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 FLI1, ETV1, ETV4, ERG, ETS1, 및 ETS2로 구성된 군으로

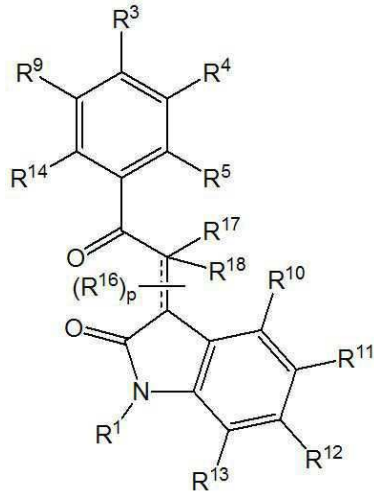
부터 선택된 ETS 유전자를 포함하는 전좌(translocation)를 포함하는 것인, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 비경구적으로 투여되는 것인, 방법.

청구항 14

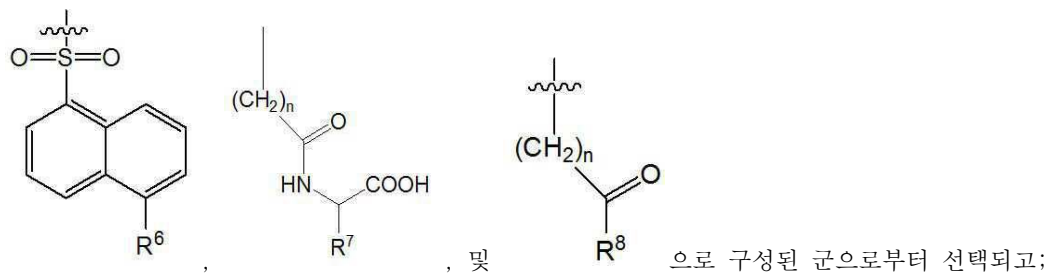
유효량의 화학식 I의 화합물:



화학식 (I)

또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염과 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 종양세포(neoplastic cell)를 죽이거나 성장을 저해하는 방법으로서,

여기서 R^1 은 수소, C_{1-6} 알킬, 하나의 아미노산, 상호 연결되어 있는 두 개의 아미노산, 상호 연결되어 있는 세 개의 아미노산,



R^3 , R^4 , R^5 , R^9 , R^{14} , R^{17} 및 R^{18} 은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(=O)NH_2$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-OH$, $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되고;

R^{10} , R^{11} , R^{12} , 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(=O)NH_2$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-OH$, $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되고;

R^6 은 C_{1-6} 디알킬 아민이고;

R^7 은 수소 및 C_{1-6} 알킬로 구성된 군으로부터 선택되고;

R^8 및 R^{15} 은 각각 독립적으로 C_{1-6} 알킬이고;

각 R^{16} 은 독립적으로 수소, -OH, 또는 C_{1-6} 알콕시이고;

n은 0 내지 4인 정수이고;

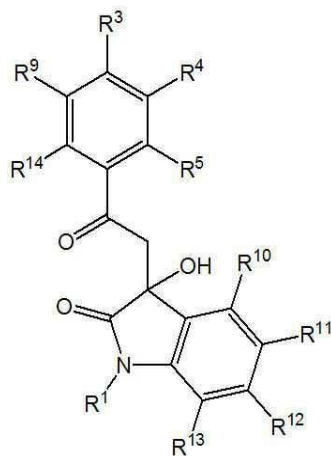
p는 1 또는 3이며; 및

점선은 선택적인 이중 결합을 나타내고 여기서 상기 이중 결합은 시스(cis) 및 트랜스(trans)로 구성된 군으로부터 선택된 입체배치를 가지며,

R^3 , R^4 , R^5 , R^9 , 및 R^{14} 중 하나 이상이 $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 조건으로 하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 Ia의 화합물:

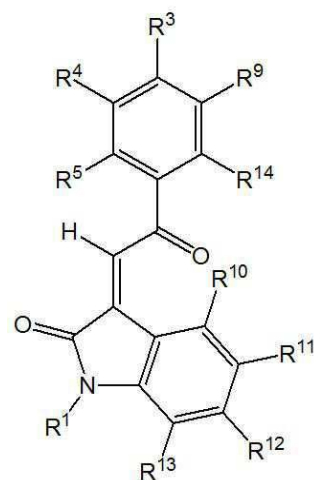


(Ia)

또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염인 것인, 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, 상기 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 Ib의 화합물:

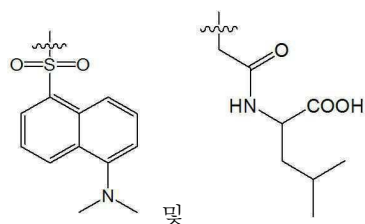


(Ib)

또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염인 것인 방법.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R^1 은 Leu, Leu-Asp, Leu-Asp-Ala, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)\text{C}(\text{CH}_3)_2$,



및 으로 구성되는 군으로부터 선택된 것인, 방법.

청구항 18

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R^3 은 $-\text{NH}(\text{R}^{15})$, $-\text{N}(\text{R}^{15})_2$, 및 $-\text{SR}^{15}$ 로부터 선택된 것인, 방법.

청구항 19

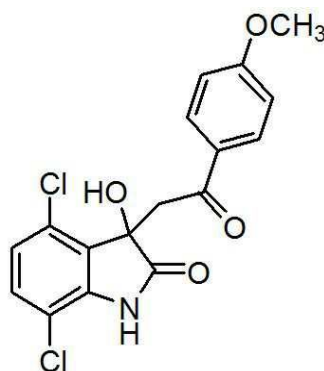
제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R^3 은 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 인 것인, 방법.

청구항 20

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R^3 은 $-\text{SCH}_3$ 인 것인, 방법.

청구항 21

제14항에 있어서, 상기 화학식 I의 화합물은 하기 화학식의 화합물:



또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염인 것인, 방법.

청구항 22

제14항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 포유류의 것인, 방법.

청구항 23

제14항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 인간의 것인, 방법.

청구항 24

제14항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 폐선암, 및 다형성 교모세포종으로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 방법.

청구항 25

제14항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 FLI1, ETV1, ETV4, ERG, ETS1, 및 ETS2로 구성된 군

으로부터 선택된 ETS 유전자를 포함하는 전좌를 포함하는 것인, 방법.

청구항 26

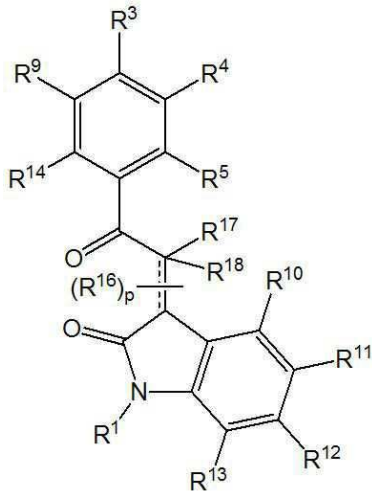
제14항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 생체 내(*in vivo*)의 것인, 방법.

청구항 27

제14항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 생체 외(*ex vivo*)의 것인, 방법.

청구항 28

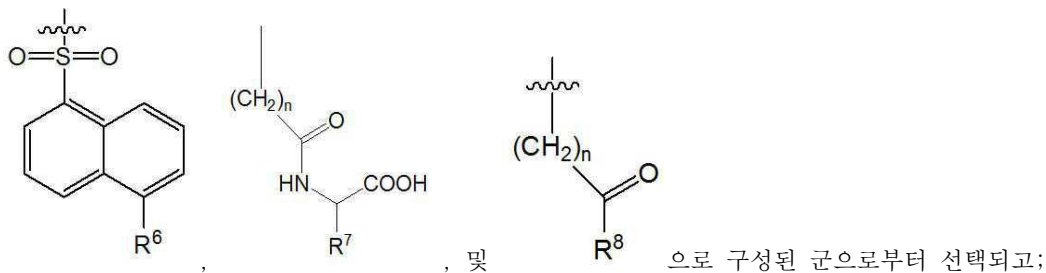
화학식 I의 화합물:



화학식 (I)

또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염으로서,

여기서 R^1 은 수소, C_{1-6} 알킬, 하나의 아미노산, 상호 연결되어 있는 두 개의 아미노산, 상호 연결되어 있는 세 개의 아미노산,



R^3 , R^4 , R^5 , R^9 , R^{14} , R^{17} 및 R^{18} 은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(=O)NH_2$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-OH$, $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되고;

R^{10} , R^{11} , R^{12} , 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(=O)NH_2$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-OH$, $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되고;

R^6 은 C_{1-6} 디알킬 아민이고;

R^7 은 수소 및 C_{1-6} 알킬로 구성된 군으로부터 선택되고;

R^8 및 R^{15} 은 각각 독립적으로 C_{1-6} 알킬이고;

각 R^{16} 은 독립적으로 수소, -OH, 또는 C_{1-6} 알콕시이고;

n 은 0 내지 4인 정수이고;

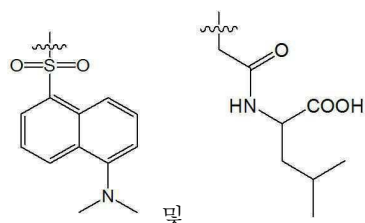
p 는 1 또는 3이며; 및

점선은 선택적인 이중 결합을 나타내고 여기서 상기 이중 결합은 시스(cis) 및 트랜스(trans)로 구성된 군으로부터 선택된 입체배치를 가지며,

R^3 , R^4 , R^5 , R^9 , 및 R^{14} 중 하나 이상이 $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 조건으로 하는 화합물.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 R^1 은 Leu, Leu-Asp, Leu-Asp-Ala, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)\text{C}(\text{CH}_3)_2$,



으로 구성되는 군으로부터 선택된 것인, 화합물.

청구항 30

제28항에 있어서, 상기 R^3 은 $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로부터 선택된 것인, 화합물.

청구항 31

제28항에 있어서, 상기 R^3 은 $-N(\text{CH}_3)_2$ 인 것인, 화합물.

청구항 32

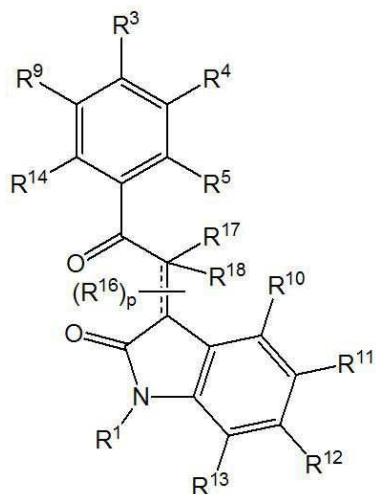
제28항에 있어서, 상기 R^3 은 $-\text{SCH}_3$ 인 것인, 화합물.

청구항 33

제28항 내지 제32항 중 어느 한 항의 화합물 및 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 34

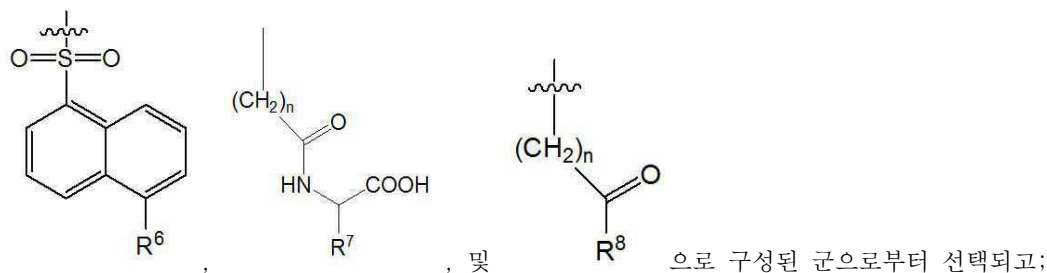
암을 치료하기 위한, 상기 화학식 I의 화합물:



화학식 (I)

또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염의 용도로서,

여기서 R^1 은 수소, C_{1-6} 알킬, 하나의 아미노산, 상호 연결되어 있는 두 개의 아미노산, 상호 연결되어 있는 세 개의 아미노산,



R^3 , R^4 , R^5 , R^9 , R^{14} , R^{17} 및 R^{18} 은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(=O)NH_2$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-OH$, $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되고;

R^{10} , R^{11} , R^{12} , 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(=O)NH_2$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-OH$, $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되고;

R^6 은 C_{1-6} 디알킬 아민이고;

R^7 은 수소 및 C_{1-6} 알킬로 구성된 군으로부터 선택되고;

R^8 및 R^{15} 은 각각 독립적으로 C_{1-6} 알킬이고;

각 R^{16} 은 독립적으로 수소, $-OH$, 또는 C_{1-6} 알콕시이고;

n 은 0 내지 4인 정수이고;

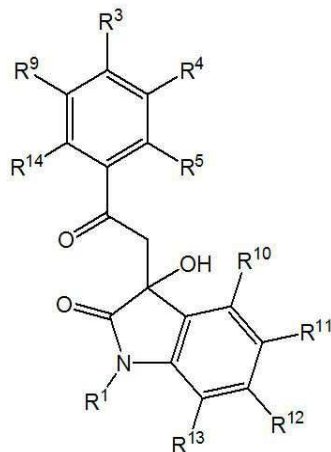
p 는 1 또는 3이며; 및

점선은 선택적인 이중 결합을 나타내고 여기서 상기 이중 결합은 시스(cis) 및 트랜스(trans)로 구성된 군으로부터 선택된 입체배치를 가지며,

R^3 , R^4 , R^5 , R^9 , 및 R^{14} 중 하나 이상이 $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 조건으로 하는 용도.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 Ia의 화합물:

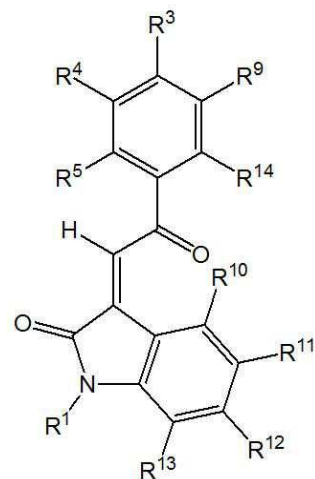


(Ia)

또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염인 것인, 용도.

청구항 36

제34항에 있어서, 상기 화학식 I의 화합물은 Ib의 화합물:

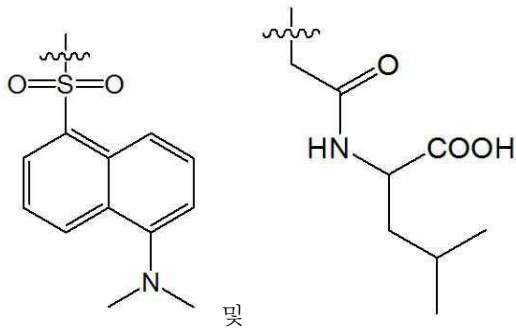


(Ib)

또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염인 것인, 용도.

청구항 37

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R^1 은 Leu, Leu-Asp, Leu-Asp-Ala, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)\text{C}(\text{CH}_3)_2$,



로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 용도.

청구항 38

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R³은 -NH(R¹⁵), -N(R¹⁵)₂, 및 -SR¹⁵ 로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 용도.

청구항 39

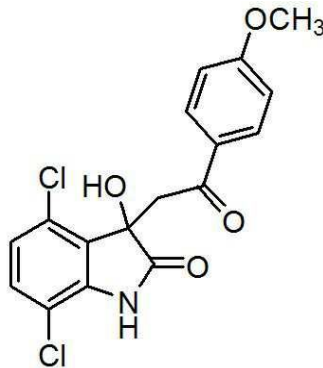
제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R³은 -N(CH₃)₂ 인 것인, 용도.

청구항 40

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R³은 -SCH₃ 인 것인, 용도.

청구항 41

제34항에 있어서, 상기 화학식 I은 하기 화학식의 화합물:



또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염인 것인, 용도.

청구항 42

제34항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 포유류인 것인, 용도.

청구항 43

제34항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 인간인 것인, 용도.

청구항 44

제34항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 폐선암, 및 다형성 교모세포종으로 구성된 군으로부터 선택된 것인, 용도.

청구항 45

제34항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 FLI1, ETV1, ETV4, ERG, ETS1, 및 ETS2로 구성된 군으

로부터 선택된 ETS 유전자를 포함하는 전좌를 포함하는 것인, 용도.

청구항 46

제34항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 비경구적으로 투여되는 것인, 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2013년 10월 24일자로 출원된 미국 가출원번호 61/895,308 "암 치료용 방법 및 조성물"의 이익을 주장하며, 이는 그 전체가 참조로 포함된다.

[0003] 연방 정부 지원 연구 개발에 관한 기술

[0004] 본 발명은 미국의 국립 보건원(National Institutes of Health of the United States of America)에 의해 수여된 NIH Grant/계약 번호 R01CA138212, R01CA133662 및 RC4CA156509의 지원을 받아 이루어졌다. 정부는 본 발명에 있어서 일정한 권리를 갖는다.

[0005] 기술분야

[0006] 본원에 제공되는 방법 및 조성물은 암의 치료에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 조성물은 다형성 교모세포종(glioblastoma multiforme) 및 폐암을 포함하는 암의 치료에 유용성이 있다.

배경 기술

[0007] 미국의 중앙 뇌 종양 등록(Central Brain Tumor Registry of the United States; CBTRUS)은 50개의 주에 대하여 원발성 악성 뇌 종양의 총 사망 인원을 열거하고 콜롬비아 특별구는 2012년 13,700명으로 추정된다. 교모세포종(glioblastomas; GBMs)은 외과적 절제, 수술 후 방사선 치료 및 테모졸로마이드(temozolomide) 화학치료로 구성된 표준 3중(tri-modality) 치료에도 불구하고 인간에 있어서 오직 14.6달의 평균(중앙값; median) 생존기간을 갖는 가장 흔한 뇌 악성 종양이다. 이들 종양 및 방사선 및 화학치료에 대한 이들의 고유 내성(intrinsic resistance)의 침윤성 성질로 인하여 치료는 대부분 완치되지 않는다. 최적의 치료에도 불구하고, 평균 생존 기간은 15달 미만이며, 단지 10%의 환자만이 병의 재발 없이 2년간 생존한다. 새로운 치료적 표적은 교모세포종 및 다른 암에 대하여 환자의 생존 및 삶의 질을 향상시키기 위하여 분명히 필요하다.

[0008] 또한, 유잉계 종양(Ewing's Sarcoma Family of Tumors; ESFT)은 어린이, 청소년 및 젊은 성인의 뼈와 연조직에서 발생하는 매우 공격적인 종양이다. 화학치료에 반응하여, 개선된 전이성 ESFT를 갖는 75% 내지 80%의 환자는 고용량의 화학치료에도 불구하고 5년 이내에 사망할 것이다(Grier, H.E *et al.*, N. Engl. J. Med. 348, 694-701 (2003)). ESFT는 매우 특징적인 염색체 전좌를 포함한다. 이는 다양한 융합 단백질의 발현으로 이어지며, 염색체 11, t(11:22)상에 위치하는 ets 계열 유전자는, 종종 프리엔드 백혈병 삽입(friend leukemia insertion; FLI)1에 대해 염색체 22에 위치하는 유잉 육종 유전자(Ewing's sarcoma gene; EWS)와 결합한다(Ayikut Uren, Jeffrey A Toretsky Ewing's sarcoma oncoproteins EWS-FLI1: the perfect target without a therapeutic agent, Future Oncol. 1(4), 521-528 (2005)).

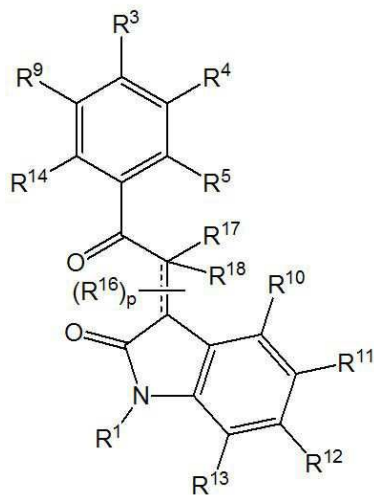
[0009] 생체 외(in vitro) 및 생체 내(in vivo) 연구는 ESTF 세포주의 증식 감소 및 종양 부피의 감소를 초래하는 종양 단백질, EWS-FLI1의 제거를 나타내었다. EWS-FLI1은 효소 활성이 부족하나, RHA 헬리카제 A(RHA helicase A; RHA)는 EWS-FLI1-조절 종양 형성(EWS-FLI1-modulated oncogenesis)을 증가시키고, 따라서 종양 증식의 유지를 위해 두 단백질 간의 단백질-단백질 상호 작용이 요구된다(Hyariye N Erkizan *et al.* A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interacting with RHA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. Nature Medicine 15(7) 750-756 (2009)). 주요 단백질의 상호작용 방해의 패러다임은 유사한 전좌(translocation)를 가지는 육종을 포함하는 질병의 치료에 유용성을 가질 수 있다(Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. Nat Rev Cancer 2003;3(9):685-94); and Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med 2004;350(15):1535-48). 또한, 비정상적인 단백질은 그들의 내인성 생화학적 특성을 기반으로 한 훌륭한 치료 표적이 될 수 있다(Cheng Y, LeGall T, Oldfield CJ, *et al.* Rational drug design via intrinsically disordered protein. Trends Biotechnol 2006;24(10):435-42).

[0010] 수년간의 EWS-FLI1에 대한 안티센스(antisense) 및 siRNA를 이용한 생체 외 및 이종이식(xenograft) 연구에도 불구하고, 이들 중 어느 것도 불충분한 전달 및 안정성으로 인해 인간 치료에 실용적이지 않다. 따라서, ESFT와 같은 질병의 치료를 위한 발현된 치료법의 필요성이 존재한다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0011] 일반적으로 적용되는 제1면(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한)에서, 화합물은 하기 화학식 I:

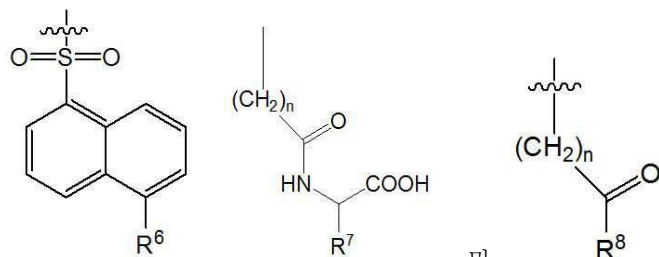


[0012]

[0013] 화학식 (I)

[0014] 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염으로 제공되며,

[0015] 여기서 R¹은 수소, C₁₋₆ 알킬, 하나의 아미노산, 상호 연결되어 있는 두 개의 아미노산, 상호 연결되어 있는 세 개의 아미노산,



[0016] , 및 으로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0017] R³, R⁴, R⁵, R⁹, R¹⁴, R¹⁷ 및 R¹⁸은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, -C(=O)NH₂, -NO₂, -NH₂, -OH, -NH(R¹⁵), -N(R¹⁵)₂, 및 -SR¹⁵로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0018] R¹⁰, R¹¹, R¹², 및 R¹³은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, -C(=O)NH₂, -NO₂, -NH₂, -OH, -NH(R¹⁵), -N(R¹⁵)₂, 및 -SR¹⁵로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0019] R⁶은 C₁₋₆ 디알킬 아민이고;

[0020] R⁷은 수소 및 C₁₋₆ 알킬로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0021] R^8 및 R^{15} 은 각각 독립적으로 C_{1-6} 알킬이고;

[0022] 각 R^{16} 은 독립적으로 수소, $-OH$, 또는 C_{1-6} 알콕시이고;

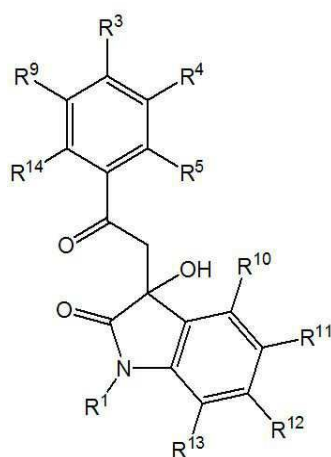
[0023] n 은 0 내지 4인 정수이고;

[0024] p 는 1 또는 3이며; 및

[0025] 점선(dashed line)은 선택적인 이중 결합을 나타내고 여기서 상기 이중 결합은 시스(cis) 및 트랜스(trans)로 구성된 군으로부터 선택된 입체배치(configuration)를 가지며,

[0026] R^3 , R^4 , R^5 , R^9 , 및 R^{14} 중 하나 이상이 $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 조건으로 한다.

[0027] 제1면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 Ia의 화합물:

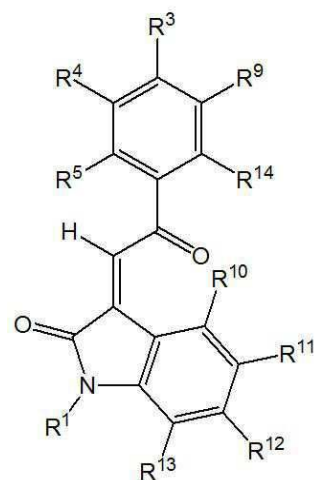


[0028]

[0029] (Ia)

[0030] 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염이다.

[0031] 제1면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 Ib의 화합물:



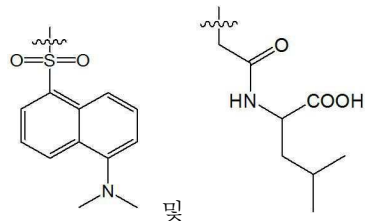
[0032]

[0033] (Ib)

[0034] 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염이다.

[0035] 제1면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한)

한) 것으로, R^1 은 Leu, Leu-Asp, Leu-Asp-Ala, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)\text{C}(\text{CH}_3)_2$,



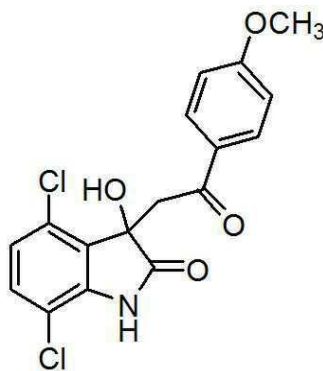
[0036] 으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0037] 제1면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, R^3 은 $-\text{NH}(\text{R}^{15})$, $-\text{N}(\text{R}^{15})_2$, 및 $-\text{SR}^{15}$ 로부터 선택된다.

[0038] 제1면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, R^3 은 $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ 이다.

[0039] 제1면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, R^3 은 $-\text{SCH}_3$ 이다.

[0040] 제1면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식의 화합물:



[0041]

[0042] 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염이다.

[0043] 일반적으로 적용되는 제2면(즉 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한)에서, 유효량의 화학식 I의 화합물을 이를 필요로 하는 개체(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 암을 치료하는 방법이 제공된다.

[0044] 제2면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 개체는 포유류(mammalian)이다.

[0045] 제2면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 개체는 인간이다.

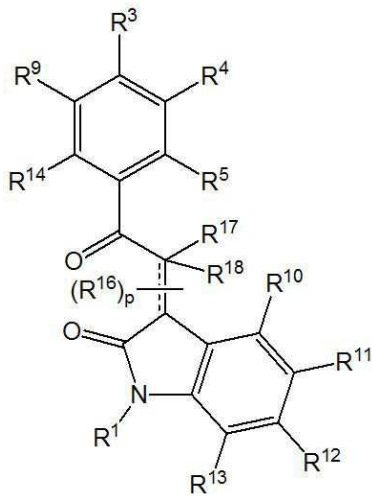
[0046] 제2면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 암은 폐선암(lung adenocarcinoma), 및 다형성 교모세포종으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0047] 제2면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 암은 FLI1, ETV1, ETV4, ERG, ETS1, 및 ETS2로 구성된 군으로부터 선택된 ETS 유전자를 포함하는 진좌를 포함한다.

[0048] 제2면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 화합물은 비경구적으로 투여된다.

[0049] 일반적으로 적용되는 제3면에서(즉 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한), 유효량

의 화학식 I의 화합물:



[0050]

[0051]

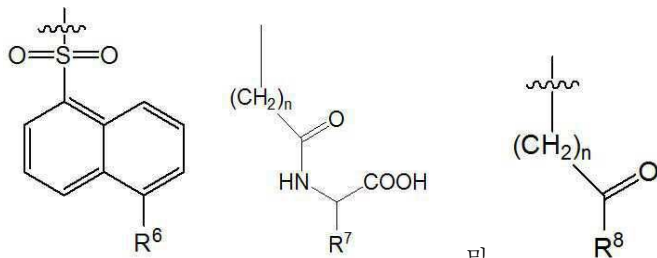
화학식 (I)

[0052]

또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염과 세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 종양세포를 죽이거나 성장을 제어하는 방법이 제공되며,

[0053]

여기서 R^1 은 수소, C_{1-6} 알킬, 하나의 아미노산, 상호 연결되어 있는 두 개의 아미노산, 상호 연결되어 있는 세 개의 아미노산,



[0054]

, , 및 으로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0055]

R^3 , R^4 , R^5 , R^9 , 및 R^{14} 는 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(=O)NH_2$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-OH$, $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0056]

R^{10} , R^{11} , R^{12} , 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(=O)NH_2$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-OH$, $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0057]

R^6 은 C_{1-6} 디알킬 아민이고;

[0058]

R^7 은 수소 및 C_{1-6} 알킬로 구성된 군으로부터 선택되고;

[0059]

R^8 및 R^{15} 은 각각 독립적으로 C_{1-6} 알킬이고;

[0060]

각 R^{16} 은 독립적으로 수소, $-OH$, 또는 C_{1-6} 알콕시이고;

[0061]

R^{17} 및 R^{18} 은 독립적으로 H 또는 F이고;

[0062]

n 은 0 내지 4인 정수이고;

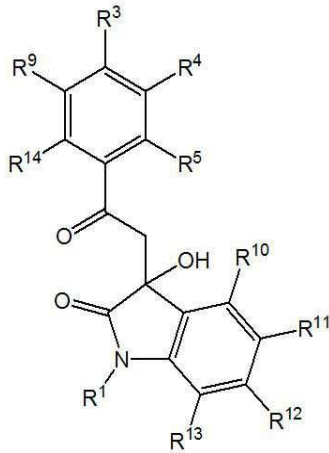
[0063]

p 는 1 또는 3이며; 및

[0064] 점선은 선택적인 이중 결합을 나타내고 여기서 상기 이중 결합은 시스(cis) 및 트랜스(trans)로 구성된 군으로부터 선택된 입체배치를 가지며,

[0065] R^3 , R^4 , R^5 , R^9 , 및 R^{14} 중 하나 이상이 $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 조건으로 한다.

[0066] 제3면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 Ia의 화합물:

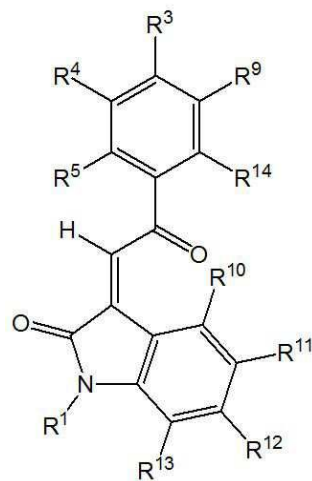


[0067]

[0068] (Ia)

[0069] 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염이다.

[0070] 제3면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 Ib의 화합물:

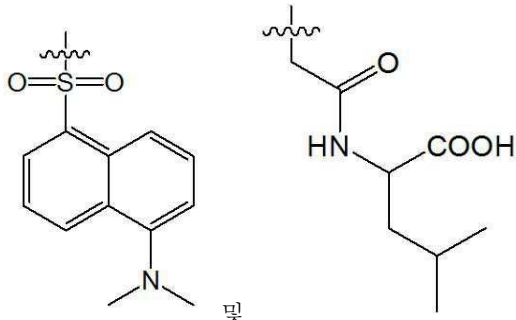


[0071]

[0072] (Ib)

[0073] 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염이다.

[0074] 제3면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, R^1 은 Leu, Leu-Asp, Leu-Asp-Ala, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)\text{C}(\text{CH}_3)_2$,



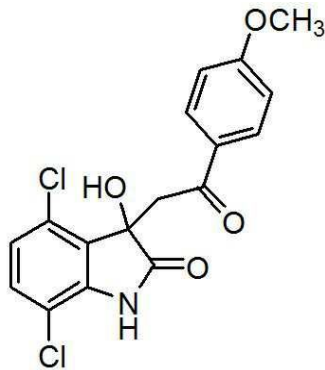
[0075] 및 으로 구성되는 군으로부터 선택된다.

[0076] 제3면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, R³은 -NH(R¹⁵), -N(R¹⁵)₂, 및 -SR¹⁵로부터 선택된다.

[0077] 제3면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, R³은 -N(CH₃)₂이다.

[0078] 제3면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, R³은 -SCH₃이다.

[0079] 제3면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식의 화합물:



[0080]

[0081] 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염이다.

[0082] 제3면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 세포는 포유류의 것이다.

[0083] 제3면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 세포는 인간의 것이다.

[0084] 제3면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 세포는 폐선암, 및 다형성 교모세포종으로 구성된 군으로부터 선택된다.

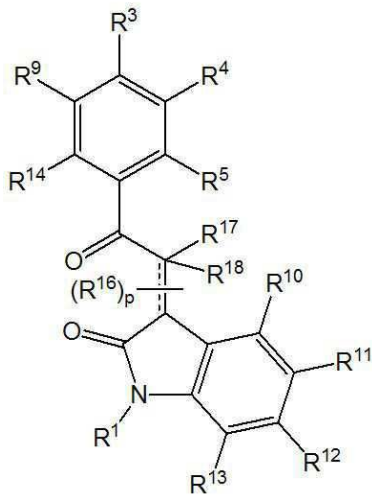
[0085] 제3면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 세포는 FLI1, ETV1, ETV4, ERG, ETS1, 및 ETS2으로 구성된 군으로부터 선택된 ETS 유전자를 포함하는 전좌를 포함한다.

[0086] 제3면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 세포는 생체 내(*in vivo*)이다.

[0087] 제3면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, 세포는 생체 외(*ex vivo*)이다.

[0088] 일반적으로 적용되는 제4면에서(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한), 화학

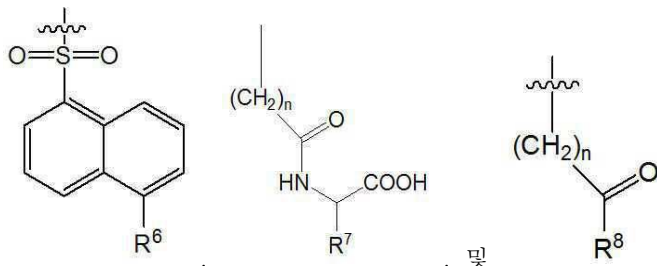
식 I의 화합물:



화학식 (I)

또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염인 화합물이 제공되며,

여기서 R^1 은 수소, C_{1-6} 알킬, 하나의 아미노산, 상호 연결되어 있는 두 개의 아미노산, 상호 연결되어 있는 세 개의 아미노산,



, , 및 으로 구성된 군으로부터 선택되고;

R^3 , R^4 , R^5 , R^9 , 및 R^{14} 은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(=O)NH_2$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-OH$, $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되고;

R^{10} , R^{11} , R^{12} , 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(=O)NH_2$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-OH$, $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되고;

R^6 은 C_{1-6} 디알킬 아민이고;

R^7 은 수소 및 C_{1-6} 알킬로 구성된 군으로부터 선택되고;

R^8 및 R^{15} 은 각각 독립적으로 C_{1-6} 알킬이고;

각 R^{16} 은 독립적으로 수소, $-OH$, 또는 C_{1-6} 알콕시이고;

R^{17} 및 R^{18} 은 독립적으로 H 또는 F이고;

n 은 0 내지 4인 정수이고;

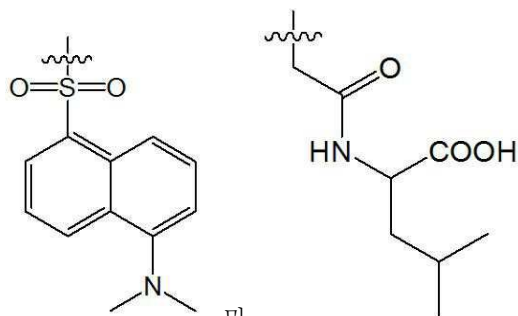
p 는 1 또는 3이며; 및

점선은 선택적인 이중 결합을 나타내고 여기서 상기 이중 결합은 시스(cis) 및 트랜스(trans)로 구성된 군으로

부터 선택된 입체배치를 가지며,

[0104] R^3 , R^4 , R^5 , R^9 , 및 R^{14} 중 하나 이상이 $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 조건으로 한다.

[0105] 제4면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, R^1 은 Leu, Leu-Asp, Leu-Asp-Ala, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NHCH}_2\text{COOH}$, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)\text{C}(\text{CH}_3)_2$,



[0106] 및 으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0107] 제4면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, R^3 은 $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로부터 선택된다.

[0108] 제4면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, R^3 은 $-N(\text{CH}_3)_2$ 이다.

[0109] 제4면의 구현예에서, 일반적으로 적용되는(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한) 것으로, R^3 은 $-\text{SCH}_3$ 이다.

[0110] 일반적으로 적용되는 제5면에서(즉, 본원에 확인된 임의의 일면 또는 구현예와 독립적으로 결합 가능한), 화학식 I의 화합물을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다.

[0111] 제5면에 대한 제1의 구현예의 임의의 특징은 본원에 확인된 모든 일면 및 구현예에 적용될 수 있다. 또한, 제5면에 대한 제1의 구현예의 임의의 특징은 독립적으로 본원에 기재된 다른 구현예와 부분적 또는 전적으로 어떤 식으로든 결합가능하다, 예를 들어, 하나, 둘, 또는 셋 또는 그 이상의 구현예는 전적으로 또는 부분적으로 결합할 수 있다. 또한, 제5면에 대한 제1의 구현예의 임의의 특징은 다른 일면 또는 구현예에 대해 선택적일도록 할 수 있다. 방법의 임의의 일면 또는 구현예는 또다른 일면 또는 구현예의 화합물을 이용하여 수행될 수 있으며, 화합물의 임의의 일면 또는 구현예는 또다른 일면 또는 구현예의 방법에서 사용되도록 구성될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0112] 도 1은 NSC635437의 구조 및 특정 유사체에 대한 일반적 구조를 나타낸다.

도 2는 YK-4-279의 효능 증가를 위한 예시적 전략을 나타낸다.

도 3a는 다양한 농도의 YK-4-279 및 PT-1-33에 대한 TC71 및 TC32 세포의 성장 억제 그래프이다. 도 3b는 다양한 농도의 YK-4-279, PT-1-33, 및 PT-1-55에 대한 TC71 세포의 성장 억제 그래프이다. 도 3c는 다양한 농도의 YK-4-279 및 PT-1-123에 대한 TC71 세포의 성장 억제 그래프이다.

도 4는 YK-4-279로 처리되고 RHA, EWS-FLI1 또는 총 단백질로 공침된(co-precipitated) TC32 세포 유래 단백질 용해물의 면역 블롯의 현미경 사진이다.

도 5a 내지 5g는 다양한 후보 약물에 의한 RHA에 대한 EWS-FLI1의 결합 억제를 측정한 ELISA 분석시 상대적 광학 밀도(optical density)의 그래프이다.

도 6a 및 도 6b는 NROB1 프로모터에 대한 EWS-FLI1의 결합 억제를 측정한 루시페라제 분석시 다양한 농도의 후보 약물에 대한 상대적 루시페라제(luciferase) 활성의 일반적 경향을 나타내는 그래프이다.

도 7a 내지 도 7i는 NROB1 프로모터에 대한 EWS-FLI1의 결합 억제를 측정한 루시페라제 분석시 다양한 농도의 후보 약물에 대한 루시페라제 활성을 나타낸다.

도 8은 암 유전체 웹사이트 인터페이스의 cBioPortal을 나타낸다.

도 9는 YK-4-279가 Biacore T100 기기에서 측정된 정상 상태 반응속도에서 각각 11.7 μ M 및 17.9 μ M의 KD를 갖는 ERG 및 ETV1에 결합함을 나타낸다.

도 10은 GBM 세포주가 YK-4-279 감도와 관련있는 FLI1을 과발현시킴을 나타낸다. 상단: 항-FLI1로 관찰된 면역 블롯. 양성 대조군으로서 포함된 유잉 육종(Ewing sarcoma) TC32. FLI1의 예상크기 50, EWS-FLI1의 예상크기 68 kDa. 하단: IC50 및 밀도 검사의 그래프.

도 11은 정상 뇌와 비교하여 FLI1의 GEMM 과발현을 나타낸다. RNA는 대조군 및 유전적으로 변형된 마우스의 정상 및 종양 조직으로부터 추출되었다. 혼성화(hybridization) 이후 표준화(normalization)는 FLI1 관찰 결과 종양이고 정상 뇌 조직이 아닌 경우에서 상당히 증가하였음을 나타낸다.

도 12는 FLI1의 GBM 발현을 나타낸다. 인간 교모세포종에서 FLI1에 대한 면역 염색은 혈관 내피 및 염증 세포뿐만 아니라 많은 종양 세포에서 양성 핵염색을 나타낸다(40x 대물렌즈).

도 13a 및 13b는 (S)-YK-4-279 또는 라세미체를 이용한 3일간의 치료는 상당한 종양 퇴행(regression)을 보임을 나타낸다. 도 13a: 400 mg/kg 화합물 또는 대조군으로 처리한 ES 이중이식 마우스를 나타낸다. 잘-형성된 종양(300 mm³)으로 시작하여, 마우스를 3일 동안, 6번의 총 투여량으로 복강 내로 화합물을 처리하였다. 도 13b: 동일한 실험의 H&E 염색된 종양.

도 14는 ERG가 폐암 전이 및 약물 내성으로 이어지는 EMT를 활성화시키는 ZEB1 및 ZEB2의 발현을 유도함을 나타낸다.

도 15는 ERG 단백질과 직접적으로 상호작용하는 YK-4-279를 나타낸다. 정제된 재조합 ERG는 Biacore CM5 마이크로칩에 고정되었고, SPR에 의해 직접 결합하는 8개의 다른 YK-4-279 농도(0.1-50 μ M)가 결정되었다. 정상 상태 KD는 Biaevaluation 소프트웨어를 이용하여 계산하였다.

도 16a 및 16b는 YK-4-279가 ERG의 전사 활성을 억제함을 나타낸다. 도 16a: ERG 및 Id-2 리포터 루시페라제 구성체와 동시 형질감염된 Cos-7 세포의 루시페라제 분석. YK-4-279 처리는 ERG 수치에 영향을 미치지 않고 Id-2 프로모터 활성을 감소시킨다(*;p<0.001). 도 16b: VCaP 세포를 siERG 또는 YK-4-279로 48시간 동안 처리하고 ERG 표적 mRNA 및 단백질 수치를 판단하였다. YK-4-279 처리 결과 PLAU, ADAM19 및 PLAT mRNA 발현이 감소되었다. PLAU 수치 또한 감소되었다.

도 17은 NSCLC 세포주가 ERG 단백질을 발현시킴을 나타낸다. 나타낸 NSCLC 세포주의 총 단백질 용해물은 PAGE를 통해 분리하였다. 인간 ERG 단백질의 발현은 항-ERG 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 통해 확인하였다(상단). 분자량 마커는 왼쪽에 주어졌다. 동일한 단백질 로딩은 스트리핑(stripping) 및 항-베타-액틴 항체로 동일한 막을 재-블롯팅하여 확인하였다(하단).

도 18a 및 18b는 ERG 발현이 EMT 마커를 유도함을 나타낸다. H358 NSCLC 세포는 인간 ERG 단백질을 암호화하기 위한 cDNA로 형질감염시켰다. 증가된 ERG 발현은 웨스턴 블롯팅으로 검출되었다(도 18a). 실시간 PCR 분석은 ERG 발현 세포에서 ZEB1 및 FOXC2의 높은 발현이 나타남을 드러내었다(도 18b). 데이터는 18S RNA에 대하여 정규화된 후 빈(empty) 벡터로 형질감염된 세포에 대한 배(fold) 유도로서 표시하였다.

도 19는 YK-4-279가 NSCLC에서 EMT를 억제함을 나타낸다. A549 세포는 증가된 TGF- β 발현과 함께 ZEB1 및 FOXC2의 높은 수준의 발현을 나타내고, YK-4-279에 의해 ERG가 억제와 함께 감소된 수치를 나타내었다. 데이터는 18S RNA에 대하여 표준화된 후 각 군의 대조군을 나누어 배(fold) 발현을 계산하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0113] 하기의 설명 및 구현에는 상세하게 개시된 발명의 일부 예시적인 구현예를 나타낸다. 당업자는 그 범위에 포함되는 본 발명의 다수의 변형 및 변경이 있다는 것을 인식할 것이다. 따라서, 특정 예시적인 구현예의 설명이 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

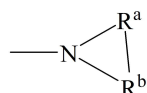
[0114] 3,000 개의 작은 분자들로 구성된 NCI/DTP 라이브러리를 표면 플라스몬 공명(Surface Plasmon Resonance)을 이용하여 EWS-FLI1 결합에 대해 스크리닝하였다. 화합물, NSC635437을 추가 최적화 및 추가 연구를 위한 적절한

후보로 선택하였다(도 1). 지정된 유사체(analogs)의 제1 시리즈 중에서, YK-4-279가 가장 활성이 있었다(도 2). YK-4-279는 기능적으로 EWS-FLI1 및 ESFT 세포를 억제함을 보였으며, 카스파제-3(caspase-3)의 활성 증가를 야기한다(Hyariye N Erkizan *et al.* A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interacting with RHA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. Nature Medicine 15(7) 750-756 (2009)). 본 출원은 개선된 화합물 및 폐선암, 다형성 교묘세포종, 및 FLI1, ETV1, ETV4, ERG, ETS1, 및 ETS2로 구성되는 군으로부터 선택된 ETS 유전자를 포함하는 전좌를 포함하는 암과 같은 질병을 치료하기 위한 이러한 화합물의 이용 방법에 관한 것이다.

[0115] 본원에 제공된 것들과 함께 유용한 다른 방법 및 조성물은 Int. Pub. No. WO 2008/083326; U.S. Pub. No. 2010/0167994; U.S. Prov App. No. 61/623349; 및 Int. Pub. No. WO 2013/155341에 개시되며, 이 개시내용은 그 전체가 명확히 참조로 포함된다.

[0116] 정의

[0117] 본원에 사용된, R , R^1 , R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} , R^{12} , R^{13} , R^{14} , R^{15} , R^a , R^b 와 같은 임의의 R기는 제한없이 지시된 원자에 부착될 수 있는 치환기(substituents)를 나타낸다. R기는 치환될 수도 있고 치환되지 않을 수도 있다. 두 개의 R기가 "함께하는" 것으로 설명되는 경우, 부착된 R기 및 원자는 시클로알킬(cycloalkyl), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl), 또는 헤테로시클(heterocycle)을 형성할 수 있다. 예를 들어, 제한 없이, $NR^{1a}R^{1b}$ 기의 R^{1a} 및 R^{1b} 이 "함께하는" 것으로 표시된다면, 이는 그들이 고리를 형성하기 위하여 서로 공유적으로 결합하는 것을 의미한다:



[0118]

[0119] 작용기가 "선택적으로 치환된" 것으로 기술된다면, 작용기는 치환되지 않거나 1 이상의 지시된 치환기로 치환될 수 있다. 마찬가지로, 작용기가 "치환되지 않거나 치환된" 것으로 기술될 때에 치환된다면, 치환기는 1 이상의 지시된 치환기로부터 선택될 수 있다. 지시된 치환기가 없는 경우, 지시된 "선택적으로 치환된" 또는 "치환된" 작용기는 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl), 시클로알킬(cycloalkyl), 시클로알케닐(cycloalkenyl), 시클로알키닐(cycloalkynyl), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl), 헤테로알리시클릴(heteroalicyclicyl), 아랄킬(aralkyl), 헤테로아랄킬(heteroaralkyl), (헤테로알리시클릴)알킬((heteroalicyclicyl)alkyl), 히드록시(hydroxy), 보호된 히드록실(protected hydroxyl), 알콕시(alkoxy), 아릴옥시(aryloxy), 아실(acyl), 머캡토(mercapto), 알킬티오(alkylthio), 아릴티오(arylthio), 시아노(cyano), 할로젠(halogen), 티오카보닐(thiocarbonyl), O-카바밀(O-carbamyl), N-카바밀(N-carbamyl), O-티오카바밀(O-thiocarbamyl), N-티오카바밀(N-thiocarbamyl), C-아미도(C-amido), N-아미도(N-amido), S-설포아미도(S-sulfonamido), N-설포아미도(N-sulfonamido), C-카복시(C-carboxy), 보호된 C-카복시(protected C-carboxy), O-카복시(O-carboxy), 이소시아나토(isocyanato), 티오시아나토(thiocyanato), 이소티오시아나토(isothiocyanato), 니트로(nitro), 실릴(silyl), 설페닐(sulfenyl), 설피닐(sulfinyl), 설포닐(sulfonyl), 할로알킬(haloalkyl), 할로알콕시(haloalkoxy), 트리메탄설포닐(trihalomethanesulfonyl), 트리메탄설포아미도(trihalomethanesulfonamido), 아미노(amino), 단일-치환된 아미노(mono-substituted amino) 및 이-치환된 아미노(di-substituted amino group), 및 이들의 보호된 유도체(protected derivatives)로부터 각각 그리고 독립적으로 선택된 1 이상의 작용기로 치환될 수 있음을 의미한다.

[0120] 본원에 사용된, "a" 및 "b"가 정수인 "C_a 내지 C_b"는 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl) 또는 알키닐(alkynyl)기에서 탄소 원자 수를 나타내거나 시클로알킬(cycloalkyl), 시클로알케닐(cycloalkenyl), 시클로알키닐(cycloalkynyl), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl) 또는 헤테로알리시클릴(heteroalicyclicyl)기의 고리에서 탄소 원자의 수를 나타낸다. 즉, 알킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알킬의 고리, 시클로알케닐의 고리, 시클로알키닐의 고리, 아릴의 고리, 헤테로아릴의 고리 또는 헤테로알리시클릴(heteroalicyclicyl)의 고리는 "a" 내지 "b"의 탄소 원자를 포함할 수 있다. 따라서, 예를 들어, "C₁ 내지 C₄ 알킬"기는 1 내지 4 개의 탄소를 가지는 모든 알킬기, 즉 CH₃-, CH₃CH₂-, CH₃CH₂CH₂-, (CH₃)₂CH-, CH₃CH₂CH₂CH₂-, CH₃CH₂CH(CH₃)- 및 (CH₃)₃C-를 의미한다. 알킬, 알케닐, 알키닐, 시클로알킬, 시클로알케닐, 시클로알키닐, 아릴, 헤테로아릴 또는 헤테로알리시클릴기와 관련하여 지정된 "a" 및 "b"가 없는 경우, 이러한 정의에서 기술된 가장 넓은 범위가 가정된다.

- [0121] 본원에 사용된, "알킬(alkyl)"은 완전히 포화된(이중 또는 삼중 결합이 없는) 탄화수소 작용기를 포함하는 직선형 또는 분지형 탄화수소 사슬에 관한 것이다. 알킬기는 1 내지 20 탄소 원자 (본원에 나타낸, "1 내지 20"과 같은 수치 범위는 주어진 범위에서 각 정수를 의미한다; 예를 들어, "1 내지 20 탄소 원자"는 1 탄소 원자, 2 탄소 원자, 3 탄소 원자, 등, 최대 20 탄소 원자를 포함하여 구성될 수 있는 알킬기를 의미하며, 수치 범위가 지정되지 않은 경우에도 본 정의가 용어 "알킬"의 존재에 적용된다)일 수 있다. 알킬기는 또한 1 내지 10 탄소 원자를 갖는 중간 크기의 알킬기일 수 있다. 알킬기는 또한 1 내지 6 탄소 원자를 갖는 저급 알킬일 수 있다. 화합물의 알킬기는 "C₁-C₄ 알킬"과 같이 또는 이와 유사하게 지정될 수 있다. 단지 예로서, "C₁-C₄ 알킬"은 알킬 사슬 내에 하나 내지 네 개의 탄소 원자가 존재함을 의미하고, 즉 알킬 사슬은 메틸(methyl), 에틸(ethyl), 프로필(propyl), 이소-프로필(iso-propyl), n-부틸(n-butyl), 이소-부틸(iso-butyl), sec-부틸(sec-butyl), 및 t-부틸(t-butyl)로부터 선택된다. 전형적인 알킬기는 메틸(methyl), 에틸(ethyl), 프로필(propyl), 이소프로필(isopropyl), 부틸(butyl), 이소부틸(isobutyl), t-부틸(tertiary butyl), 펜틸(pentyl) 및 헥실(hexyl)을 포함하나, 어떤식으로도 이에 제한되지 않는다. 알킬기는 치환되거나 비치환될 수 있다.
- [0122] 본원에 사용된, "알케닐(alkenyl)"은 직선형 또는 분지형 탄화수소 사슬 내에 1 이상의 이중 결합을 포함하는 알킬기를 의미한다. 알케닐기는 치환되거나 비치환될 수 있다.
- [0123] 본원에 사용된, "알키닐(alkynyl)"은 직선형 또는 분지형 탄화수소 사슬 내에 1 이상의 삼중 결합을 포함하는 알킬기를 의미한다. 알키닐기는 치환되거나 비치환될 수 있다.
- [0124] 본원에 사용된, "시클로알킬(cycloalkyl)"은 완전히 포화된(이중 또는 삼중 결합이 없는) 단일- 또는 다중- 시클릭 탄화수소 고리 시스템을 의미한다. 2 이상의 고리로 구성된 경우, 고리는 융합된 방식(fused fashion)으로 함께 결합할 수 있다. 시클로알킬기는 고리(들) 내 3 내지 10 원자 또는 고리(들) 내 3 내지 8 원자를 포함할 수 있다. 시클로알킬기는 치환되거나 비치환될 수 있다. 전형적인 시클로알킬기는 시클로프로필(cyclopropyl), 시클로부틸(cyclobutyl), 시클로펜틸(cyclopentyl), 시클로헥실(cyclohexyl), 시클로헵틸(cycloheptyl) 및 시클로옥틸(cyclooctyl)을 포함하나, 어떤식으로도 이에 제한되지 않는다.
- [0125] 본원에 사용된, "시클로알케닐(cycloalkenyl)"은 1 이상의 고리 내 1 이상의 이중 결합을 포함하는 단일- 또는 다중- 시클릭 탄화수소 고리 시스템을 의미한다; 이상의 이중결합이 존재하는 경우에도, 이중 결합은 모든 고리에 걸쳐 완전히 비편재화된(delocalized) 파이-전자 시스템(pi-electron system)을 형성할 수 없다(그렇지 않으면 상기 작용기는 본원에 정의된 바와 같은 "아릴(aryl)"일 수 있다). 2 이상의 고리로 구성된 경우, 고리는 융합된 방식(fused fashion)으로 함께 결합할 수 있다. 시클로알케닐기 치환되거나 비치환될 수 있다.
- [0126] 본원에 사용된, "시클로알키닐(cycloalkynyl)"은 1 이상의 고리 내 1 이상의 삼중 결합을 포함하는 단일- 또는 다중- 시클릭 탄화수소 고리 시스템을 의미한다. 1 이상의 삼중 결합이 존재하는 경우, 삼중 결합은 모든 고리에 걸쳐 완전히 비편재화된 파이-전자 시스템을 형성할 수 없다. 2 이상의 고리로 구성된 경우, 고리는 융합된 방식으로 함께 결합할 수 있다. 시클로알키닐기는 치환되거나 비치환될 수 있다.
- [0127] 본원에 사용된, "아릴(aryl)"은 모든 고리에 걸쳐 완전히 비편재화된(delocalized) 파이-전자 시스템(pi-electron system)을 갖는 카보시클릭(carbocyclic)(모든 탄소) 모노시클릭(monocyclic) 또는 멀티시클릭(multicyclic) 방향족 고리 시스템(aromatic ring system)(두 개의 카보시클릭 고리가 화학적 결합을 공유하는 융합된 고리 시스템을 포함하는)을 의미한다. 아릴기에서 탄소 원자의 수는 달라질 수 있다. 예를 들어, 아릴기는 C₆-C₁₄ 아릴기, C₆-C₁₀ 아릴기 또는 C₆ 아릴기일 수 있다. 아릴기의 예는 벤젠(benzene), 나프탈렌(naphthalene) 및 아줄렌(azulene)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 아릴기는 치환되거나 비치환될 수 있다.
- [0128] 본원에 사용된, "헤테로아릴(heteroaryl)"은 1 이상의 헤테로원자, 즉 질소, 산소 및 황을 포함하나 이에 제한되지 않는 탄소 이외의 원소를 포함하는 모노시클릭 또는 멀티시클릭 방향족 고리 시스템(완전히 비편재화된 파이-전자 시스템을 갖는 고리 시스템)을 의미한다. 헤테로아릴기의 고리(들) 내에 원자의 수는 달라질 수 있다. 예를 들어, 헤테로아릴기는 고리(들) 내에 4 내지 14 개의 원자, 고리(들) 내에 5 내지 10 개의 원자 또는 고리(들) 내에 5 내지 6 개의 원자를 포함할 수 있다. 또한, 용어 "헤테로아릴(heteroaryl)"은 1 이상의 아릴 고리 및 1 이상의 헤테로아릴 고리와 같은 두 개의 고리, 또는 2 이상의 헤테로아릴 고리가 1 이상의 화학적 결합을 공유하는 융합된 고리 시스템을 포함한다. 헤테로아릴 고리의 예는 퓨란(furan), 퓨라잔(furazan), 티오펜(thiophene), 벤조티오펜(benzothiophene), 프탈라진(phthalazine), 피롤(pyrrole), 옥사졸(oxazole), 벤즈옥사졸(benzoxazole), 1,2,3-옥사디아졸(1,2,3-oxadiazole), 1,2,4-옥사디아졸(1,2,4-oxadiazole), 티아졸

(thiazole), 1,2,3-티아디아졸(1,2,3-thiadiazole), 1,2,4-티아디아졸(1,2,4-thiadiazole), 벤조티아졸(benzothiazole), 이미다졸(imidazole), 벤즈이미다졸(benzimidazole), 인돌(indole), 인다졸(indazole), 피라졸(pyrazole), 벤조피라졸(benzopyrazole), 이속사졸(isoxazole), 벤즈이속사졸(benzoisoxazole), 이소티아졸(isothiazole), 트리아졸(triazole), 벤조트리아졸(benzotriazole), 티아디아졸(thiadiazole), 테트라졸(tetrazole), 피리딘(pyridine), 피리다진(pyridazine), 피리미딘(pyrimidine), 피라진(pyrazine), 퓨린(purine), 프테리딘(pteridine), 퀴놀린(quinoline), 이소퀴놀린(isoquinoline), 퀴나졸린(quinazoline), 퀴녹살린(quinoxaline), 시놀린(cinnoline) 및 트리아진(triazine)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 헤테로아릴기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[0129]

본원에 사용된, "헤테로시클릴(heterocyclyl)" 또는 "헤테로알리시클릴(heteroalicyclyl)"은 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-, 10, 최대 18-원자(membered) 모노시클릭(monocyclic), 바이시클릭(bicyclic) 및 트리시클릭(tricyclic) 고리 시스템을 의미하고, 여기서 1 내지 5 개의 헤테로원자를 가지고 있는 탄소 원자들은 함께 상기 고리 시스템을 구성한다. 헤테로시클(heterocycle)은, 그러나, 모든 고리에 걸쳐 완전히 비편재화된 파이-전자 시스템이 발생하지 않는 방식으로 위치한 1 이상의 불포화 결합을 선택적으로 포함할 수 있다. 헤테로원자(들)은 산소, 황 및 질소를 포함하나, 이에 제한되지 않는 탄소 이외의 원소이다. 헤테로시클은 또한 1 이상의 카보닐(carbonyl) 또는 티오카보닐(thiocarbonyl) 관능기(functionalities)를 포함할 수 있고, 정의하기 위하여 락탐(lactams), 락톤(lactones), 시클릭 이미드(cyclic imides), 시클릭 티오이미드(cyclic thioimides) 및 시클릭 카바메이트(cyclic carbamates)와 같은 옥소-시스템(oxo-systems) 및 티오-시스템(thio-systems)을 포함할 수 있다. 2 이상의 고리로 구성된 경우, 고리는 융합된 방식으로 함께 결합될 수 있다. 또한, 헤테로알리시클릭 내에 임의의 질소는 4기화될(quaternized) 수 있다. 헤테로시클릴 또는 헤테로알리시클릭기는 치환되지 않거나 치환될 수 있다. "헤테로시클릴(heterocyclyl)" 또는 "헤테로알리시클릴(heteroalicyclyl)"기의 예는 1,3-디옥신(1,3-dioxin), 1,3-디옥산(1,3-dioxane), 1,4-디옥산(1,4-dioxane), 1,2-디옥솔란(1,2-dioxolane), 1,3-디옥솔란(1,3-dioxolane), 1,4-디옥솔란(1,4-dioxolane), 1,3-옥사티안(1,3-oxathiane), 1,4-옥사틴(1,4-oxathiin), 1,3-옥사티올란(1,3-oxathiolane), 1,3-디티올(3-dithiole), 1,3-디티올란(1,3-dithiolane), 1,4-옥사티안(1,4-oxathiane), 테트라히드로-1,4-티아진(tetrahydro-1,4-thiazine), 2H-1,2-옥사진(2H-1,2-oxazine), 말레이미드(maleimide), 숙신이미드(succinimide), 바르비투르산(barbituric acid), 티오바르비투르산(thiobarbituric acid), 디옥소피페라진(dioxopiperazine), 히드안토인(hydantoin), 디히드로유라실(dihydrouracil), 트리옥산(trioxane), 헥사히드로-1,3,5-트리아진(hexahydro-1,3,5-triazine), 이미다졸린(imidazoline), 이미다졸리딘(imidazolidine), 이속사졸린(isoxazoline), 이속사졸리딘(isoxazolidine), 옥사졸린(oxazoline), 옥사졸리딘(oxazolidine), 옥사졸리딘논(oxazolidinone), 티아졸린(thiazoline), 티아졸리딘(thiazolidine), 모르폴린(morpholine), 옥시란(oxirane), 피페리딘 *N*-옥사이드(piperidine *N*-Oxide), 피페리딘(piperidine), 피페라진(piperazine), 피롤리딘(pyrrolidine), 피롤리돈(pyrrolidone), 피롤리디온(pyrrolidione), 4-피페리돈(4-piperidone), 피라졸린(pyrazoline), 피라졸리딘(pyrazolidine), 2-옥소피롤리딘(2-oxopyrrolidine), 테트라히드로피란(tetrahydropyran), 4H-피란(4H-pyran), 테트라히드로티오피란(tetrahydrothiopyran), 티오모르폴린(thiamorpholine), 티아모르폴린 설폭사이드(thiamorpholine sulfoxide), 티아모르폴린 설펜(thiamorpholine sulfone), 및 이들의 벤조-융합된 유사체(benzo-fused analogs)(예를 들어, 벤즈이미다졸리딘논(benzimidazolidinone), 테트라히드로퀴놀린(tetrahydroquinoline), 3,4-메틸렌디옥시페닐(3,4-methylenedioxyphenyl))를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0130]

본원에 사용된, "아랄킬(aralkyl)" 및 "아릴(알킬)(aryl(alkyl))"은 치환기로서, 저급 알킬렌(lower alkylene)기를 통해 연결된 아릴기를 의미한다. 아랄킬의 저급 알킬렌 및 아릴기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 예는 벤질(benzyl), 2-페닐알킬(2-phenylalkyl), 3-페닐알킬(3-phenylalkyl), 및 나프틸알킬(naphthylalkyl)을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0131]

본원에 사용된, "헤테로아랄킬(heteroaralkyl)" 및 "헤테로아릴(알킬)(heteroaryl(alkyl))"은 치환기로서, 저급 알킬렌기를 통해 연결된 헤테로아릴기를 의미한다. 헤테로아랄킬의 저급 알킬렌 및 아릴기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 예는 2-티엔일알킬(2-thienylalkyl), 3-티엔일알킬(3-thienylalkyl), 퓨릴알킬(furylalkyl), 티엔일알킬(thienylalkyl), 피롤릴알킬(pyrrolylalkyl), 피리딜알킬(pyridylalkyl), 이속사졸릴알킬(isoxazolylalkyl), 및 이미다졸릴알킬(imidazolylalkyl), 및 이들의 벤조-융합된 유사체를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0132]

"(헤테로알리시클릴)알킬((heteroalicyclyl)alkyl)" 및 "(헤테로시클릴)알킬((heterocyclyl)alkyl)"은 저급 알킬렌기를 통해 치환기로서 연결된 헤테로시클릭 또는 헤테로알리시클릭 작용기를 의미한다. (헤테로알리시클

릴)알킬의 저급 알킬렌 및 헤테로시클릴은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 예는 (테트라히드로-2H-피란-4-일)메틸((tetrahydro-2H-pyran-4-yl)methyl), (피페리딘-4-일)에틸((piperidin-4-yl)ethyl), (피페리딘-4-일)프로필((heteroalicyclicyl)alkyl), (테트라히드로-2H-티오피란-4-일)메틸((tetrahydro-2H-thiopyran-4-yl)methyl), 및 (1,3-티아지난-4-일)메틸((1,3-thiazinan-4-yl)methyl)을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0133] "저급 알킬렌기(lower alkylene groups)"는 이들의 말단 탄소 원자들을 통해 분자 조각들(fragments)을 연결하기 위하여 결합을 형성하는 직쇄-CH₂-연결기(tethering groups)이다. 예는 메틸렌(-CH₂-), 에틸렌(-CH₂CH₂-), 프로필렌(-CH₂CH₂CH₂-), 및 부틸렌(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 저급 알킬렌기는 "치환된(substituted)"의 정의 하에 열거된 치환기(들)를 가진 저급 알킬렌기의 1 이상의 수소를 대체함으로써 치환될 수 있다.

[0134] 본원에 사용된, "알콕시(alkoxy)"는 화학식 -OR을 의미하고, 여기서 R은 상기에 정의된 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl), 시클로알킬(cycloalkyl), 시클로알케닐(cycloalkenyl) 또는 시클로알키닐(cycloalkynyl)이다. 알콕시의 제한되지 않는 목록은 메톡시(methoxy), 에톡시(ethoxy), n-프로폭시(n-propoxy), 1-메틸에톡시(이소프로폭시)(1-methylethoxy (isopropoxy)), n-부톡시(n-butoxy), 이소-부톡시(iso-butoxy), sec-부톡시(sec-butoxy) 및 tert-부톡시(tert-butoxy)이다. 알콕시는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[0135] 본원에 사용된, "아실(acyl)"은 치환기로서, 카보닐(carbonyl)기를 통해 연결된 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl), 또는 아릴(aryl)을 의미한다. 예는 포르밀(formyl), 아세틸(acetyl), 프로판노일(propanoyl), 벤조일(benzoyl), 및 아크릴(acryl)을 포함한다. 아실은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[0136] 본원에 사용된, "히드록시알킬(hydroxyalkyl)"은 히드록시기에 의해 1 이상의 수소 원자가 대체된 알킬기를 의미한다. 예시적 히드록시알킬기는 2-히드록시에틸(2-hydroxyethyl), 3-히드록시프로필(3-hydroxypropyl), 2-히드록시프로필(2-hydroxypropyl), 및 2,2-디히드록시에틸(2,2-dihydroxyethyl)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 히드록시알킬은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[0137] 본원에 사용된, "할로알킬(haloalkyl)"은 할로젠에 의해 1 이상의 수소 원자가 대체된 알킬기(예를 들어, 모노-할로알킬(mono-haloalkyl), 디-할로알킬(di-haloalkyl) 및 트리-할로알킬(tri-haloalkyl))를 의미한다. 이러한 작용기는 클로로메틸(chloromethyl), 플루오로메틸(fluoromethyl), 디플루오로메틸(difluoromethyl), 트리플루오로메틸(trifluoromethyl) 및 1-클로로-2-플루오로메틸(1-chloro-2-fluoromethyl), 2-플루오로이소부틸(2-fluoroisobutyl)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 할로알킬은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[0138] 본원에 사용된, "할로알콕시(haloalkoxy)"는 할로젠에 의해 1 이상의 수소 원자가 대체된 알콕시기(즉, 모노-할로알콕시(mono-haloalkoxy), 디-할로알콕시(di-haloalkoxy) 및 트리-할로알콕시(tri-haloalkoxy))를 의미한다. 이러한 작용기는 할로메톡시(hloromethoxy), 플루오로메톡시(fluoromethoxy), 디플루오로메톡시(difluoromethoxy), 트리플루오로메톡시(trifluoromethoxy), 1-클로로-2-플루오로메톡시(1-chloro-2-fluoromethoxy), 및 2-플루오로이소부톡시(2-fluoroisobutoxy)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 할로알콕시는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[0139] 본원에 사용된, "아릴옥시(aryloxy)" 및 "아릴티오(arylthio)"는 RO- 및 RS-를 의미하며, R은 페닐과 같은, 그러나 이에 제한되지 않는 아릴이다. 아릴옥시 및 아릴티오는 모두 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[0140] "설페닐(sulfenyl)" 또는 "티오(thio)"기는 "-SR" 그룹을 의미하며, R은 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl), 시클로알킬(cycloalkyl), 시클로알케닐(cycloalkenyl), 시클로알키닐(cycloalkynyl), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl), 헤테로알리시클릴(heteroalicyclicyl), 아랄킬(aralkyl) 또는 (헤테로알리시클릴)알킬((heteroalicyclicyl)alkyl)일 수 있다. 설페닐은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 용어 "설페닐(sulfenyl)" 또는 "티오(thio)"는 -SR_k기(또한 R_k가 수소가 아닌 경우 "티오에테르(thioether)"를 의미하는) 뿐만 아니라 -SH기(또한 "티올(thiol)"기를 의미하는)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0141] "설페닐(sulfinyl)"기는 "-S(=O)-R"기를 의미하고, R은 설페닐에 대해 정의된 것과 동일할 수 있다. 설페닐은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

- [0142] "설포닐(sulfonyl)"기는 " SO_2R "기를 의미하고, R은 설페닐에 대해 정의된 것과 동일할 수 있다. 설포닐은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0143] "O-카복시(O-carboxy)"기는 " $\text{RC}(=\text{O})\text{O}-$ "기를 의미하고, R은 본원에 정의된 바와 같이 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl), 시클로알킬(cycloalkyl), 시클로알케닐(cycloalkenyl), 시클로알키닐(cycloalkynyl), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl), 헤테로알리시클릴(heteroalicycyl), 아랄킬(aralkyl) 또는 (헤테로알리시클릴)알킬((heteroalicycyl)alkyl)일 수 있다. O-카복시는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0144] 용어 "에스터(ester)" 및 "C-카복시(C-carboxy)"는 " $\text{-C}(=\text{O})\text{OR}$ "기를 의미하고, R은 O-카복시(O-carboxy)에 대해 정의된 것과 동일할 수 있다. 에스터 및 C-카복시는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0145] "티오키보닐(thiocarbonyl)"기는 " $\text{-C}(=\text{S})\text{R}$ "기를 의미하고, R은 O-카복시(O-carboxy)에 대해 정의된 것과 동일할 수 있다. 티오키보닐은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0146] "트리할로메탄설포닐(trihalomethanesulfonyl)"기는 " X_3CSO_2- "기를 의미하고, 여기서 X는 할로젠이다.
- [0147] "트리할로메탄설포아미도(trihalomethanesulfonamido)"기는 " $\text{X}_3\text{CS}(\text{O})_2\text{N}(\text{R}_\text{A})-$ "기를 의미하고, 여기서 X는 할로젠이며, R_A 는 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl), 시클로알킬(cycloalkyl), 시클로알케닐(cycloalkenyl), 시클로알키닐(cycloalkynyl), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl), 헤테로알리시클릴(heteroalicycyl), 아랄킬(aralkyl) 또는 (헤테로알리시클릴)알킬((heteroalicycyl)alkyl)이다.
- [0148] 본원에 사용된 용어 "아미노(amino)"는 $\text{-N}(\text{R})_2$ 기를 의미하고, 여기서 R은 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl), 시클로알킬(cycloalkyl), 시클로알케닐(cycloalkenyl), 시클로알키닐(cycloalkynyl), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl), 헤테로알리시클릴(heteroalicycyl), 아랄킬(aralkyl) 또는 (헤테로알리시클릴)알킬((heteroalicycyl)alkyl)로 구성된 군으로부터 독립적으로 선택된다. 아미노는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 용어 "아미노(amino)"는 -NH_2 기(또한 "암모늄(ammonium)"기를 의미하는), -NHR 기(또한 R이 수소가 아닌 경우 "이차아민(secondary amine)"을 의미하는), 또는 -NR_2 기(또한 R이 수소가 아닌 경우 "삼차아민(tertiary amine)"을 의미하는)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0149] 본원에 사용된, 용어 "히드록시(hydroxy)"는 -OH 기를 의미한다.
- [0150] "시아노(cyano)"기는 " -CN "기를 의미한다.
- [0151] 본원에 사용된 용어 "아지도(azido)"는 -N_3 기를 의미한다.
- [0152] "이소시아나토(isocyanato)"기는 " -NCO "기를 의미한다.
- [0153] "티오시아나토(thiocyanato)"기는 " -CNS "기를 의미한다.
- [0154] "이소티오시아나토(thiocyanato)"기는 " -NCS "기를 의미한다.
- [0155] "머캅토(mercapto)"기는 " -SH "기를 의미한다.
- [0156] "카보닐(carbonyl)"기는 C=O 기를 의미한다.
- [0157] "S-설포아미도(S-sulfonamido)"기는 " $\text{-SO}_2\text{N}(\text{R}_\text{A}\text{R}_\text{B})$ "기를 의미하고, R_A 및 R_B 는 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl), 시클로알킬(cycloalkyl), 시클로알케닐(cycloalkenyl), 시클로알키닐(cycloalkynyl), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl), 헤테로알리시클릴(heteroalicycyl), 아랄킬(aralkyl) 또는 (헤테로알리시클릴)알킬((heteroalicycyl)alkyl)일 수 있다. S-설포아미도는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0158] "N-설포아미도(N-sulfonamido)"기는 " $\text{RSO}_2\text{N}(\text{R}_\text{A})-$ "기를 의미하고, R 및 R_A 는 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl), 시클로알킬(cycloalkyl), 시클로알케닐(cycloalkenyl), 시클로알키닐(cycloalkynyl), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl), 헤테로알리시클릴(heteroalicycyl), 아랄킬(aralkyl) 또는 (헤테로알리시클릴)알킬((heteroalicycyl)alkyl)일 수 있다. N-설포아미도는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

- [0159] "O-카바밀(O-carbamyl)"기는 " $\text{-OC(=O)N(R}_A\text{R}_B\text{)}$ "기를 의미하고, R_A 및 R_B 는 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl), 시클로알킬(cycloalkyl), 시클로알케닐(cycloalkenyl), 시클로알키닐(cycloalkynyl), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl), 헤테로알리시클릴(heteroalicycyl), 아랄킬(aralkyl) 또는 (헤테로알리시클릴)알킬((heteroalicycyl)alkyl)일 수 있다. O-카바밀은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0160] "N-카바밀(N-carbamyl)"기는 " $\text{ROC(=O)N(R}_A\text{)}$ "기를 의미하고, R 및 R_A 는 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl), 시클로알킬(cycloalkyl), 시클로알케닐(cycloalkenyl), 시클로알키닐(cycloalkynyl), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl), 헤테로알리시클릴(heteroalicycyl), 아랄킬(aralkyl) 또는 (헤테로알리시클릴)알킬((heteroalicycyl)alkyl)일 수 있다. N-카바밀은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0161] "O-티오카바밀(O-thiocarbamyl)"기는 " $\text{-OC(=S)N(R}_A\text{R}_B\text{)}$ "기를 의미하고, R_A 및 R_B 는 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl), 시클로알킬(cycloalkyl), 시클로알케닐(cycloalkenyl), 시클로알키닐(cycloalkynyl), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl), 헤테로알리시클릴(heteroalicycyl), 아랄킬(aralkyl) 또는 (헤테로알리시클릴)알킬((heteroalicycyl)alkyl)일 수 있다. O-티오카바밀은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0162] "N-티오카바밀(N-thiocarbamyl)"기는 " $\text{ROC(=S)N(R}_A\text{)}$ "-기를 의미하고, R 및 R_A 는 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl), 시클로알킬(cycloalkyl), 시클로알케닐(cycloalkenyl), 시클로알키닐(cycloalkynyl), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl), 헤테로알리시클릴(heteroalicycyl), 아랄킬(aralkyl) 또는 (헤테로알리시클릴)알킬((heteroalicycyl)alkyl)일 수 있다. N-티오카바밀(N-thiocarbamyl)은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0163] "C-아미도(C-amido)"기는 " $\text{-C(=O)N(R}_A\text{R}_B\text{)}$ "기를 의미하고, R_A 및 R_B 는 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl), 시클로알킬(cycloalkyl), 시클로알케닐(cycloalkenyl), 시클로알키닐(cycloalkynyl), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl), 헤테로알리시클릴(heteroalicycyl), 아랄킬(aralkyl) 또는 (헤테로알리시클릴)알킬((heteroalicycyl)alkyl)일 수 있다. C-아미도는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0164] "N-아미도(N-amido)"기는 " $\text{RC(=O)N(R}_A\text{)}$ "-기를 의미하고, R 및 R_A 는 독립적으로 수소(hydrogen), 알킬(alkyl), 알케닐(alkenyl), 알키닐(alkynyl), 시클로알킬(cycloalkyl), 시클로알케닐(cycloalkenyl), 시클로알키닐(cycloalkynyl), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl), 헤테로알리시클릴(heteroalicycyl), 아랄킬(aralkyl) 또는 (헤테로알리시클릴)알킬((heteroalicycyl)alkyl)일 수 있다. N-아미도는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0165] 본원에 사용된 용어 "할로젠 원자(halogen atom)"는 불소(fluorine), 염소(chlorine), 브롬(bromine) 및 요오드(iodine)와 같은 원소 주기율표 7족의 방사성-안정(radio-stable) 원자 중 어느 하나를 의미한다.
- [0166] 치환기의 수가 명시되지 않은 경우(예를 들어, 할로알킬), 1 이상의 치환기가 존재할 수 있다. 예를 들어 "할로알킬(haloalkyl)"은 1 이상의 동일한 또는 상이한 할로젠을 포함할 수 있다. 또다른 예로서, " $\text{C}_1\text{-C}_3$ 알콕시페닐($\text{C}_1\text{-C}_3$ alkoxyphenyl)"은 하나, 둘, 또는 세 개의 원자를 포함하는 1 이상의 동일한 또는 상이한 알콕시(alkoxy)기를 포함할 수 있다.
- [0167] 본원에 사용된, 임의의 보호기(protective groups), 아미노산(amino acids) 또는 다른 화합물에 대한 약어는, 다른 지시가 없는한, 그들의 일반적인 용례, 인지된 약어, 또는 IUPAC-IUB 위원회의 생화학적 명명법 (Biochem. 11:942-944 (1972) 참조)을 따른다.
- [0168] 본원에 기재된 화합물은 동위원소(isotopically) 표지될 수 있는 것으로 이해될 수 있다. 듀테륨(deuterium)과 같이 동위원소를 갖는 치환기는, 예를 들어 생체 내 반감기의 증가 또는 필요한 투여량의 감소와 같은, 더 큰 대사적 안정성으로 인한 특정 치료적 이점을 제공할 수 있다. 화합물 구조 내에 나타난 것과 같이 각 화학 원소는 상기 원소의 임의의 동위원소(isotope)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 화합물 구조에서 수소 원자는 명시적으로 개시되거나 화합물 중에 존재하는 것으로 이해될 수 있다. 수소 원자가 존재할 수 있는 화합물의 임의의 위치에서, 수소 원자는 수소-1(프로튬(protium)) 및 수소-2(듀테륨(deuterium))을 포함하나, 이에 제한되지

않는 수소의 동위원소일 수 있다. 따라서, 문맥이 명백히 달리 지시하지 않는 한, 화합물에 대한 본원의 언급은 모든 잠재적인 동위 원소 형태를 포함한다.

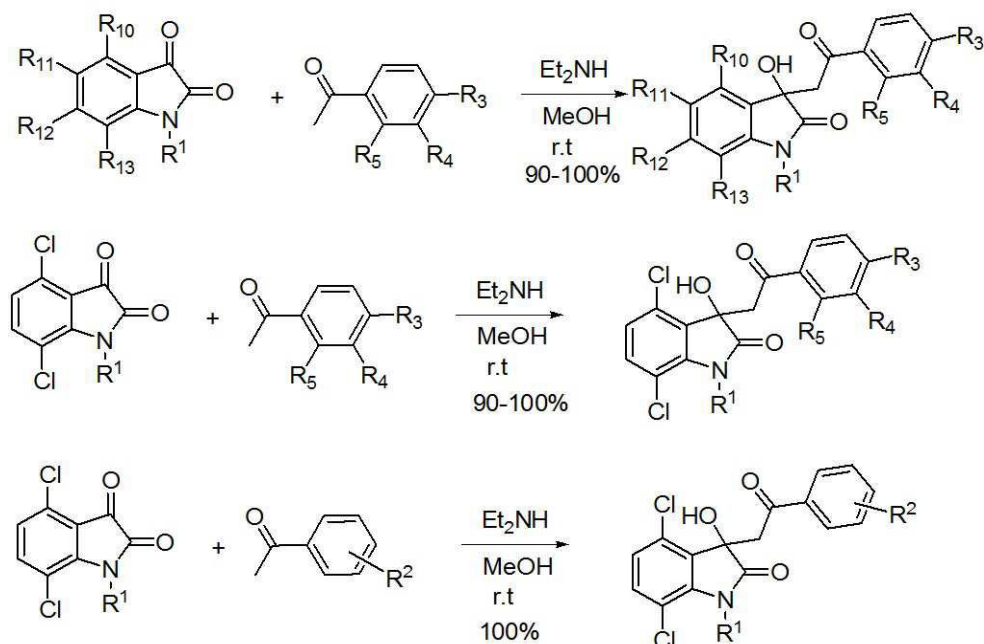
[0169] 본원에 기재된 방법 및 조합은 결정질 형태(또한 화합물의 동일한 원소 조성물의 상이한 결정 패킹 배열(crystal packing arrangements)을 포함하는 다형체(polymorphs)로 알려진), 비정질상(amorphous phases), 염(salts), 용매화물(solvates), 및 수화물(hydrates)을 포함하는 것으로 이해된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 화합물은 물, 에탄올, 또는 이와 유사한 약학적으로 허용 가능한 용매를 사용한 용매화물로 존재한다. 다른 구현예에서, 본원에 기재된 화합물은 비용매화된(unsolvated) 형태로 존재한다. 용매화물은 용매의 화학양론적 양 또는 비-화학양론적 양을 포함하고, 물, 에탄올 또는 이와 유사한 약학적으로 허용 가능한 용매로 결정화(crystallization) 하는 과정 중에 형성될 수 있다. 수화물은 용매가 물일 경우에 형성되고, 또는 알코올레이트(alcoholate)는 용매가 알코올인 경우에 형성된다. 또한, 본원에서 제공되는 화합물은 용매화된 형태뿐만 아니라 비용매화된 형태로도 존재할 수 있다. 일반적으로, 용매화된 형태는 본원에서 제공되는 화합물 및 방법의 목적을 위해 비용매화된 형태와 동등한 것으로 간주된다.

[0170] 값의 범위(range of values)가 제공되는 경우, 상한 및 하한, 및 범위의 상한 및 하한 사이의 중간 값은 구현예 내에 포함된다.

[0171] 특정 합성 방법

[0172] 일부 구현예에서, 적절한 아세토폰(acetophenone)(4.0 equiv.) 및 디에틸아민(diethylamine)의 촉매량(10 방울)을 메탄올(5 mL) 내 4,7-디클로로이사틴(dichloroisatin)(1.0 equiv.) 용액에 첨가하였다. 그 혼합물을 출발물질(4,7-디클로로이사틴)이 완전히 사라질 때까지 실온에서 교반하였다. 얻은 용액을 농축하고 정량적 수율로 순수한 생성물을 수득하기 위하여 헥산/에틸 아세테이트로 용리시키는 플래쉬 크로마토그래피(flash chromatography)에 적용하였다. 추가 정제는 헥산/에틸 아세테이트로 재결정함으로써 수행하였다. ¹H를 위한 NMR 스펙트럼을 Varian-400 분광기(400 MHz)를 이용하여 기록하였고, 화학적 이동(δ)은 내부적 기준으로서 테트라메틸실란(tetramethylsilane)으로부터 ppm 다운필드(downfield)에서 주어졌으며, 커플링 상수(J-값)는 헤르츠(Hz)이다. 원소 분석은 아틀란틱 마이크로랩(Atlantic Microlabs)에 의해 수행되었다.

[0173] 본원에서 제공되는 특정 화합물은 하기 합성 도식에 따라 제조될 수 있다.



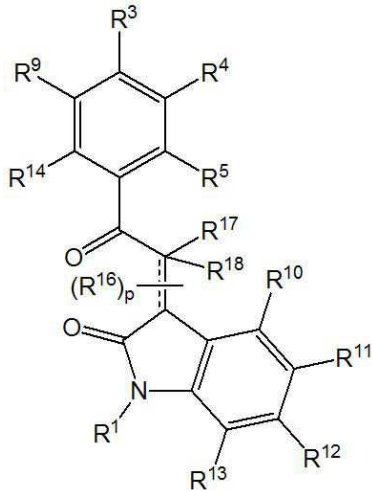
[0174]

[0175] 이러한 도식에서, 케톤(4.0 equiv.) 및 디에틸아민의 촉매량 (10 방울)을 메탄올(5mL) 내의 치환된 이사틴(isatin)(1.0 equiv.) 용액에 첨가하였다. 그 혼합물을 출발물질(치환된 이사틴)이 완전히 사라질 때까지 실온에서 교반하였다. 얻은 용액을 농축하고 정량적 수율로 순수한 생성물을 수득하기 위하여 헥산/에틸 아세테이트로 용리시키는 플래쉬 크로마토그래피에 적용하였다. 추가 정제는 헥산/에틸 아세테이트로 재결정함으로써 수행하였다.

[0176] 두 개의 고리 시스템을 연결하는 작용기에서 탄소-탄소 이중 결합을 포함하는 억제제는 당업계에 공지된 합성 기술을 이용하여 화합물을 감소시킴으로써 해당하는 포화된 억제제로부터 제조될 수 있다.

[0177] 특정 화합물

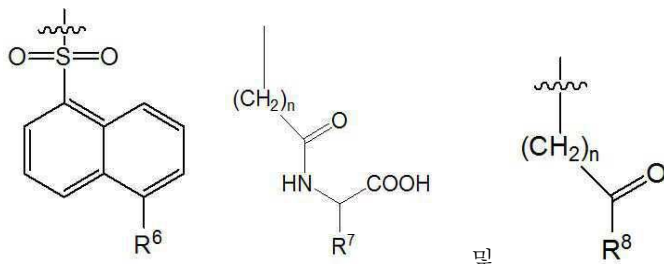
[0178] 본원에서 제공되는 특정 화합물은 하기 화학식 I을 갖는 화합물:



[0179]

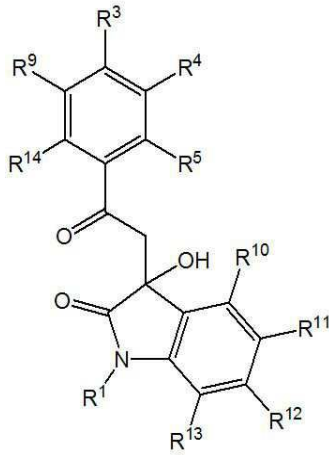
[0180] 화학식 (I)

[0181] 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하고, 여기서 R^1 은 수소, C_{1-6} 알킬, 하나의 아미노산, 상호 연결되어 있는 두 개의 아미노산, 상호 연결되어 있는 세 개의 아미노산,



[0182] , 및 으로 구성된 군으로부터 선택되고; R^3 , R^4 , R^5 , R^9 , R^{14} , R^{17} 및 R^{18} 은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(=O)NH_2$, $-NO_2$, NH_2 , $-OH$, $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되고; R^{10} , R^{11} , R^{12} , 및 R^{13} 은 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(=O)NH_2$, $-NO_2$, $-NH_2$, $-OH$, $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되고; R^6 은 C_{1-6} 디알킬 아민이고; R^7 은 수소 및 C_{1-6} 알킬로 구성된 군으로부터 선택되고; R^8 및 R^{15} 은 각각 독립적으로 C_{1-6} 알킬이고; 각 R^{16} 은 독립적으로 수소, $-OH$, 또는 C_{1-6} 알콕시이고; n은 0 내지 4인 정수이고; p는 1 또는 3이며; 및 점선(dashed line)은 선택적인 이중 결합을 나타내고 여기서 상기 이중 결합은 시스(cis) 및 트랜스(trans)로 구성된 군으로부터 선택된 입체배치(configuration)를 가지며, 1 이상의 R^3 , R^4 , R^5 , R^9 , 및 R^{14} 는 $-NH(R^{15})$, $-N(R^{15})_2$, 및 $-SR^{15}$ 로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 조건으로 한다.

[0183] 일부 구현예에서, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 Ia의 화합물:

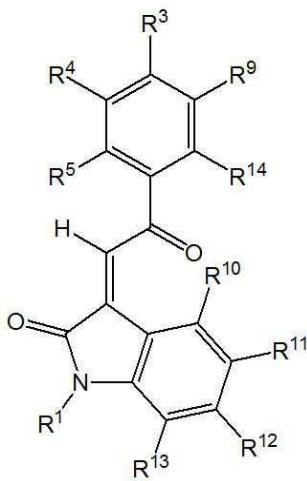


[0184]

[0185] (Ia)

[0186] 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염이다.

[0187] 일부 구현예에서, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 Ib의 화합물:

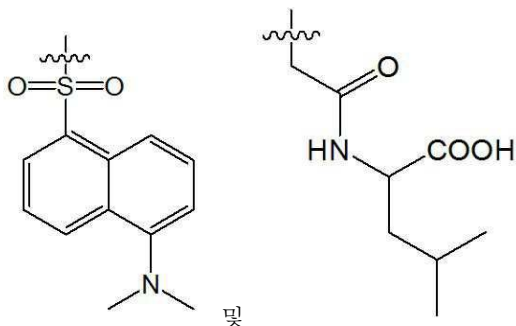


[0188]

[0189] (Ib)

[0190] 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염이다.

[0191] 일부 구현예에서, R¹은 Leu, Leu-Asp, Leu-Asp-Ala, -CH₂-C(=O)-NHCH₂COOH, -CH₂-C(=O)-(CH₂)C(CH₃)₂,



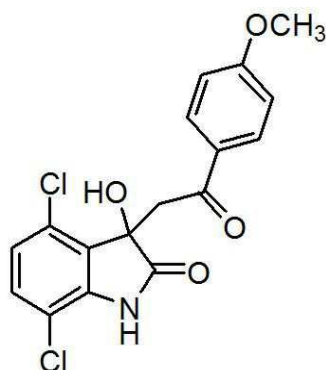
[0192] 및 으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0193] 일부 구현예에서, R³은 -NH(R¹⁵), -N(R¹⁵)₂, 및 -SR¹⁵로부터 선택된다.

[0194] 일부 구현예에서, R^3 은 $-N(CH_3)_2$ 이다.

[0195] 일부 구현예에서, R^3 은 $-SCH_3$ 이다.

[0196] 일부 구현예에서, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식의 화합물:



[0197]

[0198] 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염이다.

[0199] 치환기의 존재에 따라, 작은 분자 억제제(small molecule inhibitors)는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태일 수 있다. 본원에 사용된 용어 "약학적으로 허용 가능한 염(pharmaceutically acceptable salt)"은 광범위한 용어이고, 당업자에게 통상적이고 관습적인 의미를 부여하며(특별한 또는 사용자 정의의 의미에 제한되지 않는), 제한없이 약학적으로 허용 가능한, 비-독성 산 또는 염기로부터 제조된 염을 의미한다. 적절한 약학적으로 허용 가능한 염은 금속염, 예를 들어 알루미늄(aluminum), 아연(zinc) 염, 알칼리 금속 염, 리튬(lithium), 소듐(sodium), 및 포타슘(potassium) 염과 같은 알칼리 금속염(alkali metal salts), 칼슘(calcium) 및 마그네슘(magnesium) 염과 같은 알칼리 토금속염(alkaline earth metal salts); 유기염(organic salts), 예를 들어, 라이신(lysine), N,N'-디벤질에틸렌디아민(N,N'-dibenzylethylenediamine), 클로로프로카인(chloroprocaine), 클로린(choline), 디에탄올아민(diethanolamine), 에틸렌디아민(ethylenediamine), 메글루민(N-메틸글루카민(meglumine(N-methylglucamine))), 프로카인(procaine), 및 트리스(tris) 염; 유리산(free acids) 및 염기의 염; 무기염, 예를 들어, 설페이트(sulfate), 히드로클로라이드(hydrochloride), 및 히드로브로마이드(hydrobromide); 및 현재 약학적으로 널리 사용되고, 예를 들어, 머크 인덱스(The Merck Index)와 같이 당업자에게 잘 알려진 출처에서 열거된 다른 염을 포함한다. 임의의 적절한 구성 성분은 그것이 비독성이고 바람직한 활성을 실질적으로 방해하지 않는다면, 본원에 논의된 치료제의 염을 만들기 위해 선택될 수 있다.

[0200] 바람직한 구현예의 화합물은 이성질체(isomers), 라세미체(racemates), 광학 이성질체(optical isomers), 거울상 이성질체(enantiomers), 부분 입체 이성질체(diastereomers), 호변 이성질체(tautomers) 및 시스/트랜스 형태 이성질체(cis/trans conformers)를 포함할 수 있다. 이러한 모든 이성질체 형태는 이의 혼합물을 포함하여 바람직한 구현예 내에 포함된다. 상기한 바와 같이, 바람직한 구현예의 화합물은 카이랄 중심(chiral centers)을 가질 수 있는데, 예를 들어, 그들은 비대칭 탄소 원자를 포함할 수 있고, 따라서 거울상 이성질체 또는 부분 입체 이성질체 또는 이들의 혼합물, 예를 들어 라세미체로 존재할 수 있다. 비대칭 탄소 원자는 (R)-, (S)-, 또는 (R,S)-입체배치(configuration), 바람직하게 (R)- 또는 (S)-입체배치(configuration)로 존재하거나, 이들의 혼합물로 존재할 수 있다. 이성질체 혼합물은 바람직하게는, 순수한 이성질체를 얻기 위한 종래의 방법에 따라 분리될 수 있다.

[0201] 화합물은 비정질 형태 또는 결정질 형태일 수 있다. 바람직한 구현예의 화합물의 결정형은 바람직한 구현예에 포함된 다형체로서 존재할 수 있다. 또한, 바람직한 구현예의 일부 화합물은 물 또는 다른 유기 용매와 용매화물을 형성할 수 있다. 이러한 용매화물은 유사하게 바람직한 구현예의 범위 내에 포함된다.

[0202] 특정 약학적 조성물

[0203] 일반적으로 바람직한 구현예의 억제제를 정맥 또는 피하 단위 제형으로 투여하는 것이 바람직하다; 그러나, 다른 투여 경로 또한 고려된다. 고려되는 투여 경로는 경구, 비경구, 정맥, 및 피하를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 바람직한 구현예의 억제제는 예를 들어, 경구 투여를 위해서 액상 제제로 제형화될 수 있다. 적절한 형태는 현탁제(suspensions), 시럽(syrups), 엘릭서제(elixirs) 및 이와 유사한 것들을 포함한다. 경구 투여를 위

한 특히 바람직한 단위 투여 형태는 정제 및 캡슐제를 포함한다. 1일 1회 투여용으로 설정된 단위 투여 형태가 특히 바람직하다; 그러나, 특정 구현예에서 1일 2회 이상의 투여를 위한 단위 투여 형태로 설정되는 것이 바람직할 수 있다.

[0204] 바람직한 구현예의 약학적 조성물은 바람직하게는 수용자(recipient)의 혈액 또는 다른 체액과 등장(isotonic)이다. 조성물의 등장은 주석산 나트륨(sodium tartrate), 프로필렌 글리콜(propylene glycol) 또는 다른 무기 또는 유기 용질을 사용하여 달성될 수 있다. 염화나트륨(sodium chloride)이 특히 바람직하다. 아세트산(acetic acid) 및 그 염, 시트르산(citric acid) 및 그 염, 붕산(boric acid) 및 그 염, 및 인산(phosphoric acid) 및 그 염과 같은 완충제가 사용될 수 있다. 비경구적 비히클은 염화나트륨 용액, 링거 텍스트로스(Ringer's dextrose), 텍스트로스(dextrose) 및 염화나트륨, 락테이트화된 링거(lactated Ringer's) 또는 고정유(fixed oil)를 포함한다. 정맥 비히클은 유체 및 영양 보충액(nutrient replenishers), 전해질 보충액(electrolyte replenishers)(링거 텍스트로스를 기본으로 하는 것들과 같은) 및 이와 유사한 것들을 포함한다.

[0205] 약학적 조성물의 점도(viscosity)는 약학적으로 허용 가능한 증점제(thickening agent)를 이용하여 선택된 수준으로 유지될 수 있다. 메틸셀룰로오스(methylcellulose)는 손쉽고 경제적이며, 이를 가지고 작업하기 쉽기 때문에 바람직하다. 다른 적절한 증점제는, 예를 들어, 잔탄검(xanthan gum), 카복시메틸 셀룰로오스(carboxymethyl cellulose), 히드록시프로필 셀룰로오스(hydroxypropyl cellulose), 카보머(carbomer) 및 이와 유사한 것들을 포함한다. 증점제(thickener)의 바람직한 농도는 선택된 증점제에 따라 달라질 것이다. 선택된 점도를 달성하기 위한 바람직한 양이 사용된다. 점성 조성물(viscous compositions)은 일반적으로 이러한 증점제를 첨가함으로써 용액으로부터 제조된다.

[0206] 약학적으로 허용 가능한 보존제(preservative)는 약학적 조성물의 저장 수명(shelf life)을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 파라벤(parabens), 티메로살(thimerosal), 클로로부탄올(chlorobutanol) 또는 벤즈알코늄 클로라이드(benzalkonium chloride)를 포함하는 다양한 보존제가 또한 사용될 수 있음에도 불구하고, 벤질 알코올(benzyl alcohol)이 적합할 수 있다. 보존제의 적절한 농도는 선택된 약제에 따라 더 많거나 적은 양이 바람직할 수 있지만, 전형적으로 조성물의 총 중량을 기준으로 약 0.02% 내지 약 2%이다. 상기한 바와 같이, 환원제(reducing agents)는 제형의 양호한 저장 수명을 유지하기 위하여 유리하게 사용될 수 있다.

[0207] 바람직한 구현예의 억제제는 멸균수(sterile water), 생리 식염수(physiological saline), 글루코오스(glucose) 등과 같은 적절한 담체(carrier), 희석제(diluent) 또는 부형제(excipient)와의 혼합물일 수 있고, 투여 경로 및 원하는 제형에 따라, 습윤 또는 유화제(wetting or emulsifying agents), pH 완충제(pH buffering agents), 젤화 또는 점도 증강 첨가제(gelling or viscosity enhancing additives), 보존제(preservatives), 향미제(flavoring agents), 색소(colors) 등과 같은 보조 물질(auxiliary substances)을 포함할 수 있다. 예를 들어, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", Lippincott Williams & Wilkins; 20th edition (June 1, 2003) 및 "Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Pub. Co.; 18th and 19th editions (December 1985, and June 1990, respectively)을 참고하라. 이러한 제형(preparations)은 착화제(complexing agent), 금속 이온(metal ions), 폴리아세트산(polyacetic acid), 폴리글리콜산(polyglycolic acid), 히드로겔(hydrogels), 텍스트란(dextran)과 같은 고분자 화합물(polymeric compounds), 리포솜(liposomes), 마이크로에멀전(microemulsions), 미셀(micelles), 단일 또는 다중라멜라 비히클(unilamellar or multilamellar vesicles), 혈구 세포(erythrocyte ghosts) 또는 스페로블라스트(spheroblasts)를 포함할 수 있다. 리포솜 제제에 적절한 지질은, 제한 없이, 모노글리세라이드(monoglycerides), 다이글리세라이드(diglycerides), 설페타이드(sulfatides), 리소레스틴(lysolecithin), 인지질(phospholipids), 사포닌(saponin), 담즙산(bile acids) 및 이와 유사한 것들을 포함한다. 이러한 첨가 성분의 존재는 물리적 상태(physical state), 용해도(solubility), 안정성(stability), 생체 내 방출 속도(rate of *in vivo* release) 및 생체 내 제거 속도(rate of *in vivo* clearance)에 영향을 미칠 수 있고, 따라서 담체(carrier)의 특성이 선택된 투여 경로에 맞도록 의도된 적용에 따라 선택된다.

[0208] 경구 투여를 위해서, 약학적 조성물은 정제(tablet), 수성 또는 유성 현탁액(suspension), 분산성 분말(dispersible powder) 또는 과립(granule), 에멀전(emulsion), 경질 또는 연질 캡슐(hard or soft capsule), 시럽(syrup) 또는 엘릭서제(elixir)로서 제공될 수 있다. 경구용으로 의도된 조성물은 약학적 조성물의 제조를 위한 당업계의 공지된 임의의 방법에 따라 제조될 수 있고 1 이상의 하기 약제를 포함할 수 있다: 감미제(sweeteners), 향미제(flavoring agents), 색소(coloring agents) 및 보존제(preservatives). 수성 현탁액(aqueous suspensions)은 수성 현탁액의 제조에 적절한 부형제와 혼합하여 활성 성분을 포함할 수 있다.

- [0209] 경구용 제제는 또한 활성 성분(들)이 탄산 칼슘(calcium carbonate), 인산 칼슘(calcium phosphate) 또는 카올린(kaolin)과 같은 비활성 고체 희석제(inert solid diluent)와 혼합된 경질 젤라틴 캡슐 또는 연질 젤라틴 캡슐로서 제공될 수 있다. 연질 캡슐에서, 액제제는 물 또는 땅콩유(peanut oil), 올리브유(olive oil), 지방유(fatty oils), 액체 파라핀(liquid paraffin), 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜(liquid polyethylene glycols)과 같은 유성 매질(oil medium)과 같은 적절한 액체에 용해되거나 현탁될 수 있다. 경구 투여를 위한 제제에 안정제(stabilizers) 및 미소구체(microspheres)가 또한 사용될 수 있다. 캡슐은 젤라틴 및 글리세롤 또는 소르비톨과 같은 가소제(plasticizer)로 만들어진 연질, 밀봉된(sealed) 캡슐뿐만 아니라 젤라틴으로 만들어진 푸쉬-핏(push-fit) 캡슐을 포함할 수 있다. 푸쉬-핏 캡슐은 락토오스와 같은 충전제(fillers), 전분과 같은 결합제(binders) 및/또는 탈크 또는 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제(lubricants) 및, 선택적으로 안정화제(stabilizers)와 혼합된 활성성분을 포함할 수 있다.
- [0210] 정제(tablets)는 위장관에서 분해 및 흡수의 지연을 위하여 공지된 방법에 따라 코팅되지 않거나 코팅될 수 있고, 이로써 더 장시간 동안 지속된 작용을 제공할 수 있다. 예를 들어, 글리세릴 모노스테아레이트(glyceryl monostearate)와 같은 시간 지연 물질이 사용될 수 있다. 정제 형태와 같은 고체 형태로 투여되는 경우에, 고체 형태는 전형적으로 약 0.001 중량% 이하 내지 약 50 중량% 이상, 바람직하게는 약 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 또는 1 중량% 내지 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 또는 45 중량%의 활성 성분(들)을 포함한다.
- [0211] 정제는 불활성 물질(inert materials)을 포함하는 약학적으로 허용 가능한 무독성 부형제와 혼합된 활성 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 정제는 선택적으로 1 이상의 추가 성분과 함께 압축(compression) 또는 성형(molding)에 의해 제조될 수 있다. 압축된 정제는 적절한 기계에서 결합제(binder), 윤활제(lubricant), 비활성 희석제(inert diluent), 계면 활성제(surface active agent) 또는 분산제(dispersing agent)와 선택적으로 혼합된, 분말(powder) 또는 과립(granules)과 같은 자유-유동 형태(free-flowing form)에서 활성성분을 압축함으로써 제조할 수 있다. 성형된 정제는 적절한 기계에서 비활성 액체 희석제로 축축해진 분말 액제제의 혼합물을 성형함으로써 제조될 수 있다.
- [0212] 바람직하게는, 각 정제 또는 캡슐은 약 1 mg 이하 내지 약 1,000 mg 이상, 더욱 바람직하게는 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100 mg 내지 약 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 또는 900 mg의 바람직한 구현예의 액제제를 포함한다. 가장 바람직하게는, 정제 또는 캡슐은 투여될 분할된 투여량을 허용하는 투여량의 범위로 제공된다. 환자에게 적절한 투여량 및 매일 투여되는 투여 횟수는 편의상 선택될 수 있다. 특정 구현예에서, 단일 정제 또는 다른 투여 형태에 투여되는 2 이상의 치료제를 포함하는 것이 바람직할 수 있다(예를 들어, 병용 치료에서); 그러나, 다른 구현예에서, 분리된 투여 형태로 치료제를 제공하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0213] 적절한 불활성 물질은 탄수화물(carbohydrates), 만니톨(mannitol), 락토오스(lactose), 무수 락토오스(anhydrous lactose), 셀룰로오스(cellulose), 수크로오스(sucrose), 변형된 덱스트란(modified dextrans), 녹말(starch), 및 이와 유사한 것들과 같은 희석제 또는 삼인산 칼슘(calcium triphosphate), 인산 칼슘(calcium phosphate), 인산 나트륨(sodium phosphate), 탄산 칼슘(calcium carbonate), 탄산 나트륨(sodium carbonate), 탄산 마그네슘(magnesium carbonate), 및 염화나트륨(sodium chloride)과 같은 무기염을 포함한다. 붕해제(disintegrants) 또는 과립화제(granulating agents), 예를 들어, 옥수수 전분(corn starch)과 같은 전분(starches), 알긴산(alginic acid), 전분 글리콘산 나트륨(sodium starch glycolate), 앰벌라이트(Amberlite), 카복시메틸셀룰로오스나트륨(sodium carboxymethylcellulose), 울트라밀로펙틴(ultramyllopectin), 알긴산나트륨(sodium alginate), 젤라틴(gelatin), 오렌지 필(orange peel), 산성 카복시메틸셀룰로오스(acid carboxymethyl cellulose), 해면 스펀지(natural sponge) 및 벤토나이트(bentonite), 불용성 양이온 교환 수지(insoluble cationic exchange resins), 아가(agar), 카라야(karaya) 또는 트래거캔스(tragacanth)와 같은 분말 검(powdered gums), 또는 알긴산(alginic acid) 또는 이들의 염은 제제(formulation)에 포함될 수 있다.
- [0214] 결합제(binders)는 경질 정제(hard tablet)를 형성하는데 사용될 수 있다. 결합제는 아카시아(acacia), 트래거캔스(tragacanth), 전분(starch) 및 젤라틴(gelatin)과 같은 천연 산물로부터의 물질, 메틸 셀룰로오스(methyl cellulose), 에틸 셀룰로오스(ethyl cellulose), 카복시메틸 셀룰로오스(carboxymethyl cellulose), 폴리비닐 피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 히드록시프로필메틸 셀룰로오스(hydroxypropylmethyl cellulose), 및 그와 유사한 것들을 포함한다.
- [0215] 스테아린산(stearic acid) 또는 이들의 마그네슘 또는 칼슘염, 폴리테트라플루오로에틸렌

(polytetrafluoroethylene), 액체 파라핀(liquid paraffin), 식물성 오일(vegetable oils) 및 왁스(waxes), 라우릴 황산 나트륨(sodium lauryl sulfate), 라우릴 황산 마그네슘(magnesium lauryl sulfate), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 전분(starch), 탈크(talc), 피로제닉 실리카(pyrogenic silica), 수화된 실리코알루미네이트(hydrated silicoaluminate) 및 이와 유사한 것들과 같은 윤활제(lubricants)는 정제 제제에 포함될 수 있다.

[0216] 계면활성제(surfactant), 예를 들어, 라우릴 황산 나트륨(sodium lauryl sulfate), 디옥틸 소듐 설포석시네이트(dioctyl sodium sulfosuccinate) 및 디옥틸 소듐 설포네이트(dioctyl sodium sulfonate)와 같은 음이온성 세제(anionic detergents), 염화 벤잘코늄(benzalkonium chloride) 또는 염화 벤제토늄(benzethonium chloride)과 같은 양이온성 세제(cationic detergents), 또는 폴리옥시에틸렌경화피마자유(polyoxyethylene hydrogenated castor oil), 글리세롤 모노스테아레이트(glycerol monostearate), 폴리소르베이트(polysorbates), 자당 지방산 에스테르(sucrose fatty acid ester), 메틸 셀룰로오스(methyl cellulose) 또는 카복시메틸 셀룰로오스(carboxymethyl cellulose)와 같은 비이온성 세제(nonionic detergents)가 또한 사용될 수 있다.

[0217] 방출 제어형 제제(controlled release formulations)가 사용될 수 있고, 여기서 아미포스틴(amifostine) 또는 이들의 유사체(들)(analog(s))가 확산 또는 침출 메커니즘에 의해 방출되도록 하는 불활성 매트릭스(inert matrix)로 포함된다. 천천히 변성되는 매트릭스(degenerating matrices)는 또한 제제로 포함될 수 있다. 다른 전달 시스템은 지효성(timed release), 지연 방출성(delayed release) 또는 서방성(sustained release) 전달 시스템을 포함할 수 있다.

[0218] 코팅(coatings), 예를 들어, 메틸 셀룰로오스(methyl cellulose), 에틸 셀룰로오스(ethyl cellulose), 히드록시에틸 셀룰로오스(hydroxyethyl cellulose), 메틸히드록시-에틸 셀룰로오스(methylhydroxy-ethyl cellulose), 히드록시프로필 셀룰로오스(hydroxypropyl cellulose), 히드록시프로필-메틸 셀룰로오스(hydroxypropyl-methyl cellulose), 소듐 카복시-메틸 셀룰로오스(sodium carboxy-methyl cellulose), 프로비돈(providone) 및 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycols)과 같은 비장용성(nonenteric) 물질, 또는 프탈산에스테르(phthalic acid esters)와 같은 장용성(enteric) 물질이 사용될 수 있다. 염료(dyestuffs) 또는 색소(pigments)가 동정을 위하여 또는 억제제 용량의 다른 조합을 특성화하기 위하여 첨가될 수 있다.

[0219] 액체 형태로 경구 투여하는 경우에, 물, 석유(petroleum), 동물성 오일 또는 땅콩 기름, 미네랄 오일, 콩기름, 참기름과 같은 식물성 오일, 또는 합성 오일과 같은 액체 담체(liquid carrier)가 활성 성분(들)에 첨가될 수 있다. 생리 식염수 용액, 덱스트로스(dextrose), 또는 다른 당류 용액(saccharide solution), 또는 에틸렌 글리콜(ethylene glycol), 프로필렌 글리콜(propylene glycol) 또는 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)과 같은 글리콜이 또한 적절한 액체 담체이다. 약학적 조성물은 또한 수중유 에멀전(oil-in-water emulsions)의 형태일 수 있다. 유상(oily phase)은 올리브 또는 땅콩과 같은 식물성 오일, 액체 파라핀과 같은 미네랄 오일 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 적절한 유화제(emulsifying agents)는 검 아카시아(gum acacia) 및 검 트래거칸스(gum tragacanth)와 같은 천연 검(gums), 대두 레시틴(soybean lecithin)과 같은 천연 인지질(phosphatides), 지방산 및 소르비탄 모노-올레에이트(sorbitan mono-oleate)와 같은 헥시톨 무수물(hexitol anhydrides)로부터 유도된 에스테르 또는 부분 에스테르, 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노-올레에이트(polyoxyethylene sorbitan mono-oleate)와 같은 에틸렌 옥사이드(ethylene oxide)와 함께 이러한 부분 에스테르의 축합 생성물을 포함한다. 에멀전은 또한 감미제 및 향미제를 포함할 수 있다.

[0220] 또한 폐 전달(pulmonary delivery)이 사용될 수 있다. 화합물은 흡입(inhaling) 동안 폐로 전달되고 폐 상피벽을 거쳐 혈류로 이송된다. 치료제의 폐 전달을 위해 설계된, 당업자에게 친숙한 네블라이저(nebulizers), 정량 흡입기(metered dose inhalers), 및 분말 흡입기(powder inhalers)를 포함하나, 이에 제한되지 않는 광범위한 기계 장치가 사용될 수 있다. 이러한 장치는 화합물의 투여(dispensing)를 위해 적절한 제제를 사용한다. 일반적으로, 각각의 제제는 사용되는 유형에 특이적이고, 희석제, 보조제(adjuvants), 및/또는 치료에 유용한 담체 이외에, 적절한 분사제(propellant material)의 사용을 포함할 수 있다.

[0221] 화합물 및/또는 다른 선택적 활성 성분은 0.1 μm 이하 내지 10 μm 이상, 더욱 바람직하게는 약 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 또는 0.9 μm 내지 약 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 또는 9.5 μm 의 평균 입자 크기를 갖는 입자 형태로 폐 전달에 유리하도록 제조된다. 억제제의 폐 전달을 위한 약학적으로 허용 가능한 담체는 트레할로오스(trehalose), 만니톨(mannitol), 자일리톨(xylitol), 수크로오스(sucrose), 락토오스(lactose) 및 소르비톨(sorbitol)과 같은 탄수화물

(carbohydrates)을 포함한다. 제제의 사용을 위한 다른 성분은 DPPC, DOPE, DSPC 및 DOPC를 포함할 수 있다. 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol) 및 시클로덱스트란(cyclodextran)과 같은 덱스트란(dextran)을 포함하는 천연 또는 합성 계면활성제가 사용될 수 있다. 셀룰로오스 및 셀룰로오스 유도체뿐만 아니라, 담즙염(bile salts) 및 다른 관련 증강제, 및 아미노산이 또한 사용될 수 있다. 리포솜(liposomes), 마이크로캡슐(microcapsules), 미소구체(microspheres), 포집 화합물(inclusion complexes), 및 다른 유형의 담체가 또한 사용될 수 있다.

[0222] 제트(jet) 또는 초음파(ultrasonic) 네블라이저(nebulizer)와 함께 사용하기 위해 적절한 약학적 제제는 일반적으로 용액 1 mL 당 약 0.01 이하 내지 100 mg 이상, 바람직하게 용액 1 mL 당 약 0.1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 mg 내지 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 또는 90 mg의 농도로 물에 용해되거나 현탁된 억제제를 포함한다. 제제는 또한 완충제(buffer) 및 단순당(simple sugar)을 포함할 수 있다(예를 들어, 단백질 안정화 및 삼투압 조절을 위해). 네블라이저 제제는 또한 에어로졸 형성시 용액의 분무로 유발되는 억제제의 표면 유도 응집을 줄이거나 방지하기 위해 계면활성제를 포함할 수 있다.

[0223] 정량흡입기(metered-dose inhalers) 장치와 함께 사용하기 위한 제제는 일반적으로 계면활성제의 보조와 함께 분사제(propellant) 중 현탁된 활성 성분을 포함하는 미세화 분말을 포함한다. 분사제(propellant)는 클로로플루오로카본(chlorofluorocarbons), 히드로클로로플루오로카본(hydrochlorofluorocarbons), 히드로플루오로카본(hydrofluorocarbons), 및 탄화수소(hydrocarbons)와 같은 종래의 분사제를 포함할 수 있다. 바람직한 분사제는 트리클로로플루오로메탄(trichlorofluoromethane), 디클로로디플루오로메탄(dichlorodifluoromethane), 디클로로테트라플루오로에탄올(dichlorotetrafluoroethanol), 1,1,1,2-테트라플루오로에탄(1,1,1,2-tetrafluoroethane) 및 이들의 조합을 포함한다. 적절한 계면활성제는 소르비탄 트리올레이트(sorbitan trioleate), 대두 레시틴(soya lecithin), 및 올레산(oleic acid)을 포함한다.

[0224] 분말 흡입기(powder inhaler) 장치로부터 투여(dispensing)를 위한 제제는, 선택적으로 락토오스(lactose), 소르비톨(sorbitol), 수크로오스(sucrose), 만니톨(mannitol), 트레할로오스(trehalose) 또는 자일리톨(xylitol)과 같은 증량제(bulking agent)를 일반적으로 제제의 약 1 중량% 이하 내지 99 중량% 이상, 바람직하게는 제제의 약 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50 중량% 내지 약 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 또는 90 중량%의 장치로부터 분말의 분산을 용이하게하는 양을 포함하는 억제제를 함유하는 미세화된 건조 분말을 일반적으로 포함한다.

[0225] 바람직한 구현예의 화합물이 정맥, 비경구, 또는 다른 주사에 의해 투여되는 경우, 이것은 무발열원(pyrogen-free), 비경구적으로 허용 가능한 수용액 또는 유성(oleaginous) 현탁액의 형태인 것이 바람직하다. 현탁액은 적절한 분산 또는 습윤제 및 현탁제를 사용하여 당업계에 공지된 방법에 따라 제제화될 수 있다. 적절한 pH, 등장성, 안정성 등을 가진 허용 가능한 수용액의 제조는 당해 분야의 기술에 속한다. 주사를 위한 바람직한 약학적 조성물은 바람직하게 1,3-부탄디올(1,3-butanediol), 물, 등장 염화나트륨 용액, 링거액, 텍스트로스 용액, 텍스트로스 및 염화나트륨 용액과 같은 등장 비히클, 락테이트화된 링거액, 또는 당업계에 공지된 다른 비히클을 포함한다. 또한, 멸균 불휘발유(sterile fixed oils)가 용매 또는 현탁 매질로서 통상적으로 사용될 수 있다. 이러한 목적을 위해, 합성 모노 또는 디글리세리드를 포함하는 임의의 완하성 지방유(bland fixed oil)가 사용될 수 있다. 또한, 올레산(oleic acid)과 같은 지방산도 마찬가지로 주사제의 제형으로 사용될 수 있다. 약학적 조성물은 또한 안정화제(stabilizers), 보존제(preservatives), 완충제(buffers), 항산화제(antioxidants), 또는 당업계에 공지된 다른 첨가제(additives)를 포함할 수 있다.

[0226] 주사 기간은 다양한 요인에 따라 조절할 수 있고, 몇 초 이하의 단회 주사(single injection) 투여부터 0.5, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24시간 또는 그 이상의 지속적 정맥 투여를 포함할 수 있다.

[0227] 바람직한 구현예의 화합물은 또한 당해 기술 분야에서 확립된 방식 및 당해 기술 분야에서 확립된 수준에서 약학적 조성물 내에 종래 확인된 부가 성분을 사용할 수 있다. 따라서, 예를 들어, 조성물은 병용 치료를 위해 추가적으로 호환성있는 약학적 활성 물질(보조적인 항균제(antimicrobials), 항소양제(antipruritics), 수렴제(astringents), 국소 마취제(local anesthetics), 항-염증제(anti-inflammatory agents), 환원제(reducing agents), 화학치료제(chemotherapeutics) 및 이와 유사한 것들과 같은)을 포함할 수 있거나, 부형제(excipients), 염료(dyes), 증점제(thickening agents), 안정화제(stabilizers), 보존제(preservatives) 또는 항산화제(antioxidants)와 같은 바람직한 구현예들의 다양한 투여 형태를 물리적으로 제제화하는데 유용한 물질을 포함할 수 있다. 바람직한 구현예들의 화합물과 조합하여 사용될 수 있는 항암제는 빈블라스틴(vinblastine)

및 빈크리스틴(vincristine)과 같은 빈카 알칼로이드(vinca alkaloids); 독소루비신(doxorubicin), 다우노루비신(daunorubicin), 에피루비신(epirubicin)과 같은 안트라사이클린(anthracyclines); 비산트렌(bisantrene) 및 미톡산트론(mitoxantrone)과 같은 안트라센(anthracenes); 에토포시드(etoposide) 및 테니포시드(teniposide)와 같은 에피포도필로톡신(epipodophyllotoxins); 및 액티노미오신 D(actinomycin D), 미토마이신 C(mithomycin C), 미트라마이신(mitramycin), 메토크렉세이트(methotrexate), 도세탁셀(docetaxel), 에토포시드(VP-16), 파클리탁셀(paclitaxel), 도세탁셀(docetaxel) 및 아드리아마이신(adriamycin)과 같은 다른 항암제; 및 면역억제제(예를 들어, 사이클로스포린 A(cyclosporine A), 타크롤리무스(tacrolimus)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에서 제공되는 화합물, 조성물 및 방법은 히스톤 디아세틸라제 억제제(histone deacetylase inhibitors, HDAC), 오로라 키나아제 억제제(aurora kinase inhibitors), 디메틸화제(demethylating agents)(5-아자시티딘(5-AZA cytidine)과 같은), 자연 살해 세포(natural killer cells)에 의한 면역치료, IGF-IR 항체(IGF-IR antibodies), 유잉 항원 항체(Ewing antigen antibodies), 면역억제제(immunosuppressive drugs) 및 히드록시유레아(hydroxyurea)와 조합될 수 있다. 히스톤 디아세틸라제 억제제(histone deacetylase inhibitors)의 예는 보리노스타트(vorinostat), 로미덱신(romidepsin), 파노비노스타트(panobinostat), 발프로익산(valproic acid), 벨리노스타트(belinostat), 모세티노스타트(mocetinostat), 기비노스타트(givinostat), 및 트리코스타틴 A(trichostatin A)를 포함한다. 오로라 키나아제 억제제(aurora kinase inhibitors)의 예는 ZM447439, 헤스페라딘(hesperadin) 및 VX-680을 포함한다. 디메틸화제(demethylating agents)의 예는 5-아자시티딘(5-azacytidine), 5-아자데옥시티딘(5-azadeoxycytidine), 및 프로카인(procaine)을 포함한다. 면역억제제의 예는 6-머캅토피린(6-mercaptopurine) 및 아자티오프린(azathioprine)을 포함한다.

[0228] 특정 키트

[0229] 바람직한 구현예의 화합물은 키트의 형태로 투여하는 의사 또는 다른 의료 전문가에게 제공될 수 있다. 키트는 적절한 약학적 조성물 내의 화합물을 포함하는 용기(container) 및 약학적 조성물을 대상에게 투여하는 지침을 수용하는 패키지이다. 키트는 선택적으로 또한 1 이상의 추가적인 치료제, 예를 들어 본원에 기재된 육종(sarcomas)을 치료하기 위해 현재 사용되는 화학치료제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 1 이상의 추가적인 화학 치료제와 조합된 바람직한 구현예들의 화합물을 포함하는 1 이상의 조성물을 포함하는 키트가 제공되거나, 바람직한 구현예들의 억제제 및 추가적인 치료제를 포함하는 별개의 약학적 조성물이 제공될 수 있다. 키트는 또한 연속(serial) 또는 순차적(sequential) 투여를 위한 바람직한 구현예들의 화합물의 별도 용량을 포함할 수 있다. 키트는 선택적으로 1 이상의 진단 도구 및 사용을 위한 지침을 포함할 수 있다. 키트는 억제제(들) 및 임의의 다른 치료제를 투여하기 위한 지침과 함께 주사기 등과 같은 적절한 전달 장치를 포함할 수 있다. 키트는 선택적으로 포함된 임의의 또는 모든 치료제의 보관, 재구성(reconstitution)(해당되는 경우), 투여를 위한 지침을 포함할 수 있다. 키트는 대상에게 주어지는 투여 횟수를 반영하는 복수의 용기를 포함할 수 있다.

[0230]

[0231] 특정 치료 방법

[0232] 본원에서 제공되는 일부 구현예는 유잉계 종양(Ewing's sarcoma family of tumors; ESFT)의 치료 방법에 관한 것이다. ESFT는 독특한 융합 단백질 EWS-FLI1을 포함한다. ESFT는 3 내지 40세 사이의 연령의 환자들에게 영향을 미치고, 대부분의 경우 10대에 발병한다. ESFT가 유도되는 발생학적 세포 유형이 알려지지 않았음에도 불구하고, 암은 종종 뼈 부근에서 자라지만 부드러운 조직 덩어리로 발생할 수 있다. 국소적 종양을 나타내는 환자의 40% 이상에서 질환이 재발할 것이고 이러한 환자의 대부분은 ESFT로 사망할 것인 반면, 전이성 ESFT를 나타내는 환자의 75-80%는 고용량의 화학요법에도 불구하고 5년 안에 사망할 것이다(Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, et al. Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. N Engl J Med 2003;348(8):694-701). 이러한 생존률은 심지어 용량 강화 화학치료(dose-intensifying chemotherapy) 이후에도, 지난 20년간 나아지지 않았다. 생존률을 향상시키고 치료 관련 이환률(morbidity)을 감소시키기 위하여, 바람직한 구현예에 제공된 바와 같은 ESFT 환자 치료를 위한 신규한 표적 전략이 사용될 수 있다.

[0233] ESFT는 종양의 95%에서 발생하는, 22번 염색체에 위치한 EWS 유전자(유잉 육종)의 중심 엑손(central exons)과 11번 염색체, t(11;22)에 위치한 FLI1(Friend Leukemia Insertion) 또는 21번 염색체, t(21;22)에 위치한 ERG 인 ets 계열 유전자의 중심 엑손 사이의 전좌가 특징이다. EWS-FLI1 융합 전사물(transcript)은 두 개의 주요 도메인을 가지는 55 kDa 단백질(약 68 kD의 전기 운동성(electrophoretic motility))을 암호화한다. EWS 도메인

은 강력한 전사 활성화제인 반면, FLI1 도메인은 고도로 보존된 *ets* DNA 결합 도메인을 포함하고(May WA, Lessnick SL, Braun BS, *et al.* The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol* 1993;13(12):7393-8); 그 결과로 얻은 EWS-FLI1 융합 단백질은 비정상적인 전사 인자로서 작용한다. 마우스 섬유아세포의 EWS-FLI1 형질전환(transformation)은 EWS 및 FLI1 모두의 완전한 기능적 도메인을 필요로 한다(May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, *et al.* Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(12):5752-6).

[0234]

EWS-FLI1은 오직 종양 세포에서만 발현되고 ESFT 세포주의 성장을 유지하기 위해 요구된다는 점에서 뛰어난 치료 표적이다. 안티센스 올리고데옥시뉴클레오타이드(oligodeoxynucleotides; ODN)(Toretsky JA, Connell Y, Neckers L, Bhat NK. Inhibition of EWS-FLI-1 fusion protein with antisense oligodeoxynucleotides. *J Neurooncol* 1997;31(1-2):9-16; Tanaka K, Iwakuma T, Harimaya K, Sato H, Iwamoto Y. EWS-Flil antisense oligodeoxynucleotide inhibits proliferation of human Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor cells. *J Clin Invest* 1997;99(2):239-47) 또는 작은 간섭 RNA(small interfering RNAs; siRNA)(Ouchida M, Ohno T, Fujimura Y, Rao VN, Reddy ES. Loss of tumorigenicity of Ewing's sarcoma cells expressing antisense RNA to EWS-fusion transcripts. *Oncogene* 1995;11(6):1049-54; Maksimenko A, Malvy C, Lambert G, *et al.* Oligonucleotides targeted against a junction oncogene are made efficient by nanotechnologies. *Pharm Res* 2003;20(10):1565-7; Kovar H, Aryee DN, Jug G, *et al.* EWS/FLI-1 antagonists induce growth inhibition of Ewing tumor cells in vitro. *Cell Growth Differ* 1996;7(4):429-37)을 이용한 EWS-FLI1의 감소된 발현 수준은 누드 마우스에서 감소된 ESFT 세포주의 증식 및 종양의 퇴화를 유발한다. 나노기술에서의 최근의 발전은 siRNA의 전달 및 방출제어를 개선하였으나, 여전히 인간 EWS-FLI1의 안티센스 ODN 및 siRNA 감소는 모두 현재 기술로 불가능하다(Maksimenko A, Malvy C, Lambert G, *et al.* Oligonucleotides targeted against a junction oncogene are made efficient by nanotechnologies. *Pharm Res* 2003;20(10):1565-7; Lambert G, Bertrand JR, Fattal E, *et al.* EWS fli-1 antisense nanocapsules inhibits Ewing sarcoma-related tumor in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279(2):401-6). EWS-FLI1 표적화(targeting)에 대한 한가지 흥미로운 접근은 siRNA 감소된 EWS-FLI1 및 소분자들의 라이브러리(library) 사이에서 상대적 발현을 이용하였으며, 이는 Ara-C를 이용한 최근의 임상시험으로 이어졌다(Stegmaier K, Wong JS, Ross KN, *et al.* Signature-based small molecule screening identifies cytosine arabinoside as an EWS/FLI modulator in Ewing sarcoma. *PLoS medicine* 2007;4(4):e122). Ara-C 동정(identifying)의 방법은 또한 독소루비신 및 플로마이신이 EWS-FLI1 수준을 감소시키는 것을 나타냈다. 독소루비신은 현재 ESFT 환자를 위한 표준치료로서 사용되나, 여전히 생존률은 허용되기에 훨씬 못 미친다(Grier HE, Krailo MD, Tarbell NJ, *et al.* Addition of ifosfamide and etoposide to standard chemotherapy for Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumor of bone. *N Engl J Med* 2003;348(8):694-701). ESFT 환자에서 Ara-C의 사용은 현재 임상 2상 시험에서 평가되고 있다. 이것이 필요한 임상적 돌파구를 나타내기를 기대하고 있고, 이는 확실히 EWS-FLI1의 소분자 표적의 중요성을 나타낸다. 바람직한 구현에는 중요한 단백질 파트너로부터 EWS-FLI1를 방해함으로써 종양 특이성 및 더욱 정확한 EWS-FLI1의 표적화(targeting)를 달성하는, 소분자 단백질-단백질 상호작용 억제제(small molecule protein-protein interaction inhibitors; SMPPPII)를 제공한다.

[0235]

EWS-FLI1 융합 단백질이 전좌되지 않은 EWS 또는 FLI1과 다르게 기능한다고 결론 내릴 충분한 근거가 있다(May WA, Gishizky ML, Lessnick SL, *et al.* Ewing sarcoma 11;22 translocation produces a chimeric transcription factor that requires the DNA-binding domain encoded by FLI1 for transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(12):5752-6). EWS-FLI1-발현 세포주의 유전자 발현 프로파일의 변화(Braun BS, Frieden R, Lessnick SL, May WA, Denny CT. Identification of target genes for the Ewing's sarcoma EWS/FLI fusion protein by representational difference analysis. *Mol Cell Biol* 1995;15(8):4623-30) 또는 ESFT 환자로부터 채취된 종양세포는, EWS-FLI1 발현 결여 종양과 비교하여, EWS-FLI1이 전사 조절에 중요한 역할을 할 수 있음을 나타낸다(Khan J, Wei JS, Ringner M, *et al.* Classification and diagnostic prediction of cancers using gene expression profiling and artificial neural networks. *Nat Med* 2001;7(6):673-9; Baer C, Nees M, Breit S, *et al.* Profiling and functional annotation of mRNA gene expression in pediatric rhabdomyosarcoma and Ewing's sarcoma. *Int J Cancer* 2004;110(5):687-94). EWS-FLI1-조절 유전자 발현 메커니즘이 아직 명확히 밝혀지지 않았으나, 이러한 활성은 EWS-FLI1와 RNA 합성 및 스플라이싱의 조절 인자 사이에 직접 또는 이차적인 상호작용의 결과일 것이다(Uren A, Toretsky JA. Ewing's Sarcoma Oncoprotein

EWS-FLI1: the Perfect Target without a Therapeutic Agent. *Future Onc* 2005;1(4):521-8).

- [0236] EWS-FLI1은 오직 종양 세포에서만 발현되므로 좋은 치료 표적(target)이다; 그러나, 이러한 종양-특이적 암유전자를 표적으로 하는 능력은 이전에 성공적이지 않았다. 소분자 개발을 위한 과제 중 하나는 EWS-FLI1에 알려진 효소 도메인이 부족하다는 점이고, 효소 도메인이 표적화 치료를 위해 중요한 것으로 여겨지고 있다. 또한, EWS-FLI1은 비정상적인 단백질로, 이것은 구조 기반 약물 설계를 위해 사용될 수 있는 견고한 구조를 나타내지 않는다는 것을 의미한다(Uren A, Tcherkasskaya O, Toretsky JA. Recombinant EWS-FLI1 oncoprotein activates transcription. *Biochemistry* 2004;43(42):13579-89). 사실, EWS-FLI1의 비정상적인 특성은 이의 전사 조절에 중요하다(Ng KP, Potikyan G, Savene RO, Denny CT, Uversky VN, Lee KA. Multiple aromatic side chains within a disordered structure are critical for transcription and transforming activity of EWS family oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(2):479-84). 비정상적인 단백질은 이의 생화학적인 비정상적 특성때문에, 특히 소분자 단백질-단백질 상호작용 억제제를 위한 더욱 매력적인 표적으로 간주된다(Cheng Y, LeGall T, Oldfield CJ, *et al.* Rational drug design via intrinsically disordered protein. *Trends Biotechnol* 2006;24(10):435-42).
- [0237] EWS-FLI1은 생체 외(in vitro) 및 생체 내(in vivo)에서 RNA 헬리카제(RNA helicase)와 결합한다. EWS-FLI1의 단백질-단백질 상호작용은 그것의 발암 잠재력에 기여할 수 있다고 이해되므로; 따라서, 신규한 단백질이 EWS-FLI1과 직접 상호작용하거나 기능적으로 조절하는 것이 모색되고 있다. 전사적으로 활성인 재조합 EWS-FLI1(Uren A, Tcherkasskaya O, Toretsky JA. Recombinant EWS-FLI1 oncoprotein activates transcription. *Biochemistry* 2004;43(42):13579-89)은 상업용 펩타이드 파지 디스플레이 라이브러리(commercial peptide phage display library)를 스크리닝하기 위한 표적으로 사용되었다. EWS-FLI1에 다르게 결합하는 28 개의 신규한 펩타이드가 파지 시퀀싱(phage sequencing)으로부터 동정되었다. 이들 펩타이드와 상동(homologous)인 인간 단백질을 위한 미국 국립생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information) 데이터베이스 검색으로 인간 RNA 헬리카제 A(RHA, gene bank accession number A47363)의 아미노산 823-832에 상동인 펩타이드를 동정했다(Toretsky JA, Erkizan V, Levenson A, *et al.* Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A. *Cancer Res* 2006;66(11):5574-81).
- [0238] 단백질의 고도로 보존된 DEXD/H 박스 헬리카제(DEXD/H box helicase)계열의 구성원인 RHA는 인간 전사체(transcriptome)의 필수적이고, 다기능성 구성원이다(Zhang S, Grosse F. Multiple functions of nuclear DNA helicase II (RNA helicase A) in nucleic acid metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2004;36(3):177-83; von Hippel PH, Delagoutte E. A general model for nucleic acid helicases and their "coupling" within macromolecular machines. *Cell* 2001;104(2):177-90). 이들 단백질은 고세균(archaea), 진정세균(eubacteria), 고등 및 하등 진핵생물(eukaryotes) 및 플라비바이러스(Flavivirus) 계열의 양성-센스(positive-sense) RNA 바이러스를 포함하는 다수의 바이러스들로부터 다양한 유기체에서 다양한 기능과 관련되어 있다. RHA는 NF- κ B를 위한 전사 공활성인자(coactivator)이고, Creb-결합 단백질(Creb-binding protein; CBP)(Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, *et al.* RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* 1997;90(6):1107-12), RNA 폴리머라제 II(Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, *et al.* RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. *Cell* 1997;90(6):1107-12), 유방암 종양 억제제 BRCA1 (Anderson SF, Schlegel BP, Nakajima T, Wolpin ES, Parvin JD. BRCA1 protein is linked to the RNA polymerase II holoenzyme complex via RNA helicase A. *Nat Genet* 1998;19(3):254-6), 및, 가장 최근의 EWS-FLI1(Toretsky JA, Erkizan V, Levenson A, *et al.* Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A. *Cancer Res* 2006;66(11):5574-81)과 함께 복합체를 형성함을 나타내었다. EWS-FLI1은 독특하고 다른 어떤 RHA 결합 파트너를 위한 결합 부위로도 알려지지 않은 RHA의 부분과 결합한다(Toretsky JA, Erkizan V, Levenson A, *et al.* Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A. *Cancer Res* 2006;66(11):5574-81). RHA 발현은 EWS-FLI1 매개 비부착 콜로니(anchorage-independent colony) 형성을 증가시키는 반면, RHA의 불활성 돌연변이는 콜로니 형성을 방지했다(Toretsky JA, Erkizan V, Levenson A, *et al.* Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A. *Cancer Res* 2006;66(11):5574-81). 이러한 구조적 및 기능적 상호작용은 바람직한 구현예의 치료제의 기본이다.
- [0239] 암 형성(tumorigenesis)에서 전사의 중요성에도 불구하고, 이 과정에서 헬리카제(helicases)의 역할은 잘 연구되지 않았다. RHA는 다양한 기능을 가진 인간 전사체의 필수적인 구성원이다(Zhang S, Grosse F. Multiple functions of nuclear DNA helicase II (RNA helicase A) in nucleic acid metabolism. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2004;36(3):177-83; von Hippel PH, Delagoutte E. A general model for nucleic acid

helicases and their "coupling" within macromolecular machines. Cell 2001;104(2):177-90). 우리의 최근에 발표한 데이터는 RHA가 다기능성 EWS-FLI1 발암단백질과 상호작용함을 나타낸다(Toretsky JA, Erkizan V, Levenson A, *et al.* Oncoprotein EWS-FLI1 activity is enhanced by RNA helicase A. Cancer Res 2006;66(11):5574-81). 이러한 상호작용은 전사 개시 및 전사 후 RNA 변형 모두에서 기능하는 EWS-FLI1의 관찰되는 능력을 설명할 수 있다. RNA 헬리카제는 또한 스플라이싱 인자 U1C(Chen JY, Stands L, Staley JP, Jackups RR, Jr., Latus LJ, Chang TH. Specific alterations of U1-C protein or U1 small nuclear RNA can eliminate the requirement of Prp28p, an essential DEAD box splicing factor. Mol Cell 2001;7(1):227-32; Knoop LL, Baker SJ. The splicing factor U1C represses EWS/FLI-mediated transactivation. J Biol Chem 2000;275(32):24865-71), Creb-결합 단백질(CBP)(Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, *et al.* RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. Cell 1997;90(6):1107-12) 및 RNA 폴리머라제 II(Nakajima T, Uchida C, Anderson SF, *et al.* RNA helicase A mediates association of CBP with RNA polymerase II. Cell 1997;90(6):1107-12)를 포함하는 EWS-FLI1을 위한 결합 파트너로서 동정된 동일한 인자의 일부를 위해 결합하며 브리지(bridge)로서 작동함이 알려져 있다. RHA는 주요 프로세싱 단백질의 모임에서 작동하는, EWS-FLI1 및 RNA Pol II를 위한 유사한 기능을 수행할 수 있다. RHA는 또한 기능이 에너지원으로서 RHA의 ATPase 활성화에 의존하는 거대한 전사 복합체의 일부로서, EWS-FLI1을 유지함으로써 ESFT 암유전자에 기여할 수 있다. 최종적으로, RHA와 같은 헬리카제는 mRNA 종(species)을 안정화시킬 수 있다(Iost I, Dreyfus M. mRNAs can be stabilized by DEAD-box proteins. Nature 1994;372(6502):193-6). RHA에 의한 EWS-FLI1 전사된 mRNA의 안정화 및 대사는 EWS-FLI1의 발암성(oncogenic nature)을 증가시킬 수 있다.

[0240] EWS-FLI1은 ESFT 세포에 대해 꽤 특이적이지만, EWS 및 RHA는 도처에서 발견된다. EWS-FLI1이 종양에서만 발견되고 RHA와의 상호작용 지점이 독특할 수 있기 때문에, EWS-FLI1 및 RHA의 사이의 부분은 특이성을 가질 수 있는 분자 치료(therapeutic)의 표적이다. 치료제, 즉, 소분자 단백질-단백질 상호작용 억제제는 본원에서 EWS-FLI1의 기능을 억제하기 위하여 제공된다.

[0241] ESFT를 포함하여 대부분의 전좌-융합(translocation-fusion) 단백질 육종은 좋지 않은 예후를 보인다. 독특하고 중요한 융합 단백질 EWS-FLI1을 만드는 염색체 전좌 t(11;22)는 완벽한 암 표적이다. 많은 다른 육종들은 유사한 전좌 변종(variants)을 공유한다(표 2. from Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. Nat Rev Cancer 2003;3(9):685-94).

[0242] EWS-FLI1 전좌는 췌장의 고형 가유두상 종양(solid pseudopapillaryneoplasms)에서 보고되고 있으나(Maitra A., *et al.*, Detection of t(11;22)(q24;q12) translocation and EWS-FLI-1 fusion transcript in a case of solid pseudopapillary tumor of the pancreas. Pediatr Dev Pathol 2000;3:603-605), 고형 가유두상 종양에서의 EWS-FLI1의 역할은 밝혀지지 않았다(Katharina Tiemann *et al.*, Solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas are associated with FLI-1 expression, but not with *EWS/FLI-1* translocation).

[0243] EWS 또는 FLI1 상동은 광범위한 육종 및 백혈병에서 발생하는 전좌에서의 파트너이다. *EWS*, 또는 그것의 상동 TLS 또는 FUS는 투명세포육종(clear cell sarcoma), 점액성 지방육종(myxoid liposarcoma), 결합조직성 소원형 세포종양(desmoplastic small round cell tumor), 연골육종(chondrosarcoma) 및 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia)의 염색체 전좌와 관련되어 있다. *FLI1*은 ets 유전자 계열에 속한다. *FLI1* 상동 ERG는 대략 유잉 육종의 10% 및 급성 골수성 백혈병의 20%에서 전좌된다. 이는 EWS-FLI1이 다수의 환자들에게 영향을 미친 질병(전좌 파트너와 관련된)의 계열에 대해 영향을 미칠 수 있는 모델 시스템으로서 역할을 할 수 있음을 제시한다(Uren A., Tcherkasskaya O. and Toretsky J.A. Recombinant EWS-FLI1 oncoprotein activates transcription. Biochemistry 43(42) 13579-89 (2004)).

[0244] *ERG*는 또한 전립선암(prostate cancer)에서 전좌되고, 거기서 TMPRSS2:ERG 융합은 질병 진행의 위험을 정의할 수 있는 다른 분자 하위형(subtype)을 제시한다(F. Demichelis *et al.*, TMPRSS2:ERG gene fusion associated with lethal cancer in a watchful waiting cohort. Oncogene (2007)26, 4596-4599). EWS 또는 FLI1 계열 구성원의 전좌가 관찰된 다른 질병은 선천적 섬유육종(congenital fibrosarcoma) 및 세포성 중배엽성 신종(cellular mesoblastic nephroma)을 포함하고 거기서 ets 계열 구성원인 ETV6는 NTRK3와 병치(juxtaposed)된다. 다른 전좌 유전자 융합은 BCR-ABL 융합 단백질의 발현이 나타나는 만성 골수성 백혈병(chronic myeloid leukemia) 및 18번 염색체의 *SYT* 유전자가 X 염색체의 *SSX1* 또는 *SSX2*와 병치되는 활막육종(synovial sarcoma)을 포함한다(Aykut Uren and Jeffrey A. Toretsky, Pediatric malignancies provide unique cancer therapy targets. Curr Opin Pediatr 17:14-19 (2005)).

[0245] 따라서, 바람직한 구현예의 치료제는 많은 다른 종양에 대해 적용할 잠재력을 가지고 있다. 더욱 넓게, 가장 어려운 백혈병의 일부는 또한 혼합-혈통(mixed-lineage) 백혈병 유전자(MLL, 11q23)와 관련된 전좌-발생 융합 단백질을 가지고 있고, 우리의 연구는 암의 치료-내성군(treatment-resistant group)을 위한 패러다임으로서 역할을 할 수 있다(Pui CH, Chessells JM, Camitta B, *et al.* Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia* 2003;17(4):700-6.). 따라서 구현예는 전좌가 발생하는 암을 포함한다. 전좌 융합 유전자는 표 1에 열거되어 있다.

표 1

전좌	유전자	융합 유전자 유형
유잉 육종(Ewing's sarcoma)		
t(11;22)(q24;q12)	<i>EWSR1-FLI1</i>	전사 인자
t(21;22)(q22;q12)	<i>EWSR1-ERG</i>	전사 인자
t(7;22)(p22;q12)	<i>EWSR1-ETV1</i>	전사 인자
t(17;22)(q21;q12)	<i>EWSR1-ETV4</i>	전사 인자
t(2;22)(q33;q12)	<i>EWSR1-FEV</i>	전사 인자
투명-세포 육종(Clear-cell sarcoma)		
t(12;22)(q13;q12)	<i>EWSR1-ATF1</i>	전사 인자
결합조직형성 소원형세포 종양(Desmoplastic small round cell tumour)		
t(11;22)(p13;q12)	<i>EWSR1-WT1</i>	전사 인자
점액성 연골육종(Myxoid chondrosarcoma)		
t(9;22)(q22-31;q11-12)	<i>EWSR1-NR4A3</i>	전사 인자
지방육종(Myxoid liposarcoma)		
t(12;16)(q13;p11)	<i>FUS-DDIT3</i>	전사 인자
t(12;22)(q13;q12)	<i>EWSR1-DDIT3</i>	전사 인자
포상 횡문근육종(Alveolar rhabdomyosarcoma)		
t(2;13)(q35;q14)	<i>PAX3-FOXO1A</i>	전사 인자
t(1;13)(p36;q14)	<i>PAX7-FOXO1A</i>	전사 인자
활막육종 (Synovial sarcoma)		
t(X;18)(p11;q11)	<i>SYT-SSX</i>	전사 인자
용기성 피부섬유육종(Dermatofibrosarcoma protuberans)		
t(17;22)(q22;q13)	<i>COL1A1-PDGFB</i>	성장 인자
선천적 섬유육종 (Congenital fibrosarcoma)		
t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV6-NTRK3</i>	전사-인자 수용체
염증성 근섬유아세포종(inflammatory myofibroblastic tumor)		
2p23 재배치	<i>TMP3-ALK; TMP4-ALK</i>	성장-인자 수용체
포상 연부 육종 (Alveolar soft-part sarcoma)		
t(X;17)(p11.2;q25)	<i>ASPL-TFE3</i>	전사 인자

[0247] 특정 지칩

[0248] 본원에서 제공되는 특정 화합물, 조성물 및 방법은 전좌 유전자 융합(translocation gene fusion), 유잉 육종(Ewing's sarcoma), 투명세포육종(clear cell sarcoma), 점액성 지방육종(myxoid liposarcoma), 결합조직성 소원형세포종양(desmoplastic small round-cell tumor), 점액성 연골육종(myxoid chondrosarcoma), 급성 골수성 백혈병(acute myeloid leukemia), 선천성 섬유육종(congenital fibrosarcoma), 전립선암(prostate cancer), 유방암(breast cancer) 및 췌장암(pancreatic cancer)을 포함하는 종양과 같은 많은 질병의 치료에 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 암은 폐선암, 또는 다형성 교모세포종이다. 일부 구현예에서, 암은 FLI1, ETV1, ETV4, ERG, ETS1, 및 ETS2로 구성되는 군으로부터 선택된 ETS 유전자를 포함하는 전좌를 포함한다.

[0249] 실시예

[0250] 실험 및 달성된 결과를 포함하는 하기 실시예는 예시적인 목적으로만 제공되는 것이며 본 발명을 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다. 원자가(valency)가 채워지지 않은 원자를 묘사하는 화학 구조의 경우, 원자가가 1 이

상의 수소로 채워지는 것으로 이해해야 한다.

[0251] 실시예 1. 4,7-디클로로이사틴(dichloroisatin) 유사체의 합성

[0252]

[0253]

정량적 수율로 원하는 화합물을 제조하기 위하여 촉매량의 디에틸아민(diethylamine)의 존재 하에서 적당한 아세토폰(acetophenone) 및 4,7-디클로로이사틴(4,7-dichloroisatin)을 농축시켰다. 실시예 화합물: $R^1 = 4'-CN$ (PT-1-11); $2'-OCH_3$ (PT-1-12); $3'-OCH_3$ (PT-1-18); $2',4'-OCH_3$ (PT-1-19); $2',3'-OCH_3$ (PT-1-20); $3',4'OCH_3$ (PT-1-21); $3',5'OCH_3$ (PT-1-22); $2',3',4',-OCH_3$ (PT-1-23); $3',4',5'-OCH_3$ (PT-1-13); $4'-OC_2H_5$ (PT-1-14); $4'-CF_3$ (PT-1-15); $4'-OCF_3$ (PT-1-16); $4'-N(CH_3)_2$ (PT-1-17); $4'-OPh$ (PT-1-60); $4'-SCH_3$ (PT-1-67); 및 $4'-C(CH_3)_2$ (PT-1-67).

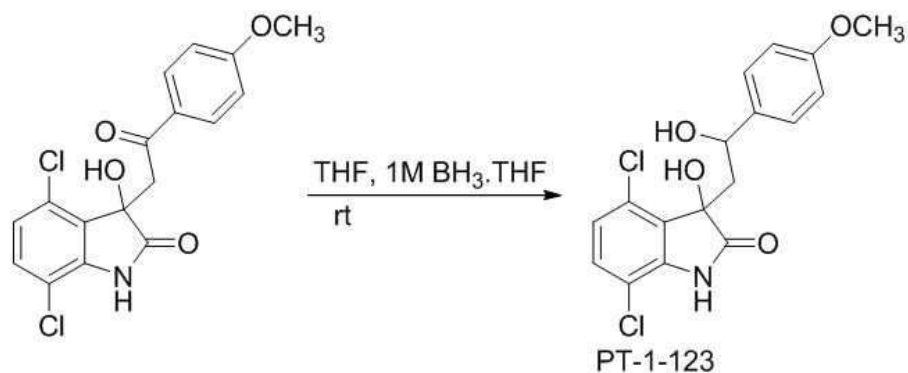
[0254] 실시예 2. 탈수된 4,7-디클로로이사틴 유사체의 합성

[0255]

[0256]

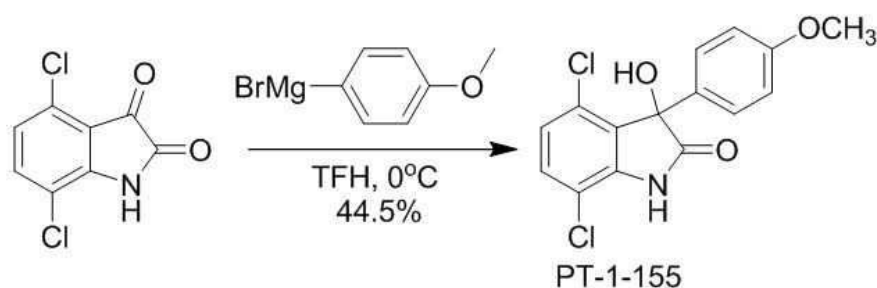
96% 황산(H_2SO_4) 내의 4,7-디클로로이사틴(4,7-dichloroisatin) 용액을 환원된(reduced) 유사체를 얻기 위해 실온에서 교반하였다. 실시예 화합물: $R^2 = 4'-OCH_3$ (PT-1-33); $2',4'-OCH_3$ (PT-1-39); $2',3',4',-OCH_3$ (PT-1-41); $4'-OC_2H_5$ (PT-1-43); 및 $4'-N(CH_3)_2$ (PT-1-38).

[0257] 실시예 3. 환원된 4,7-디클로로이소틴 유사체의 합성



[0258]

[0259] 실시예 4. 환원된 4,7-디클로로이소틴 피리딘 유도체의 합성



[0260]

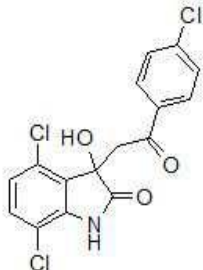
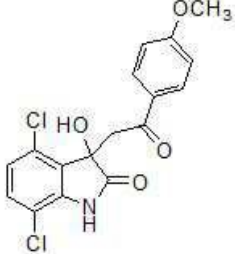
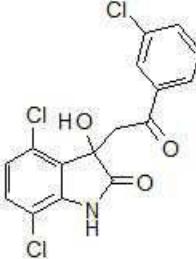
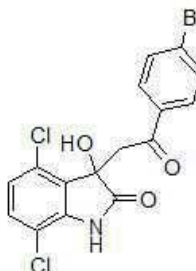
[0261] 실시예 5. 특정 화합물의 생물학적 활성

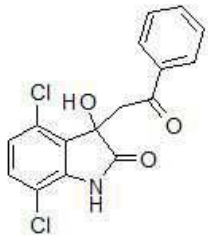
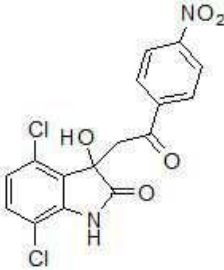
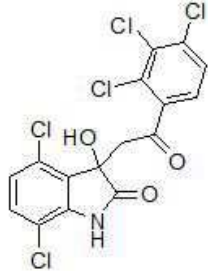
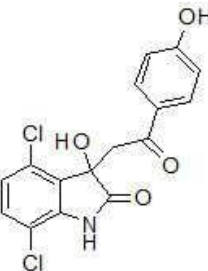
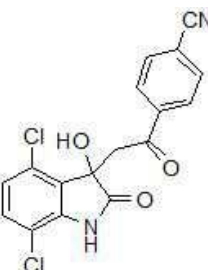
[0262] 표 2에서 제공된 화합물은 본원에 기재된 것들과 유사한 방법을 이용하여 제조하였다. PANC1(인간 췌장 암종 (carcinoma)), TC32(인간 ESFT 세포주) 및 TC71(인간 ESFT 세포주)에서의 특정 화합물의 구조 및 IC₅₀ 활성을 표 2에 요약하였다.

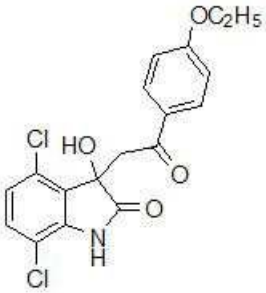
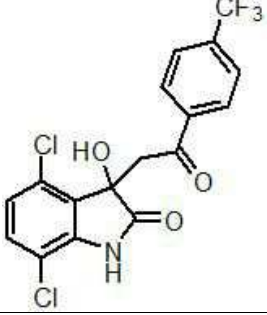
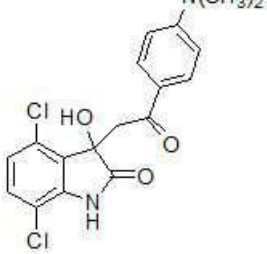
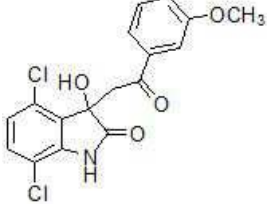
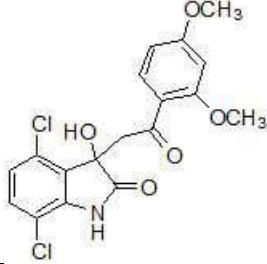
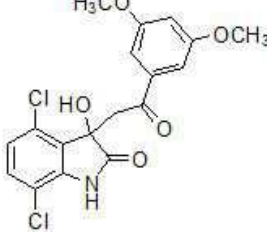
표 2

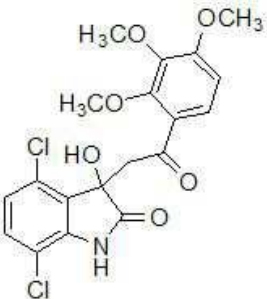
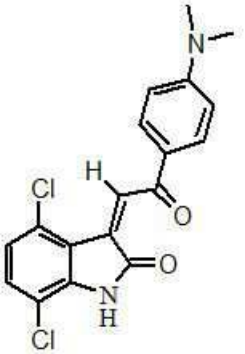
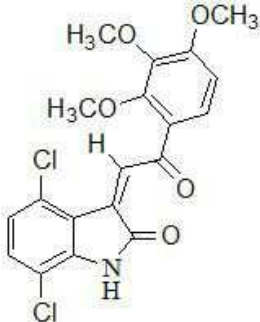
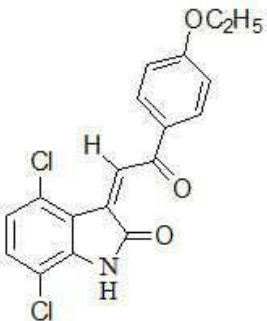
[0263]

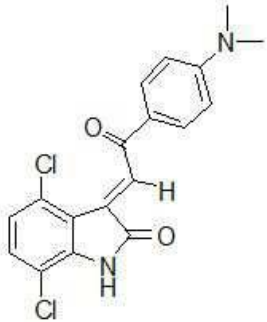
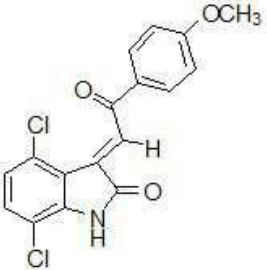
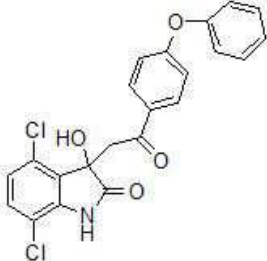
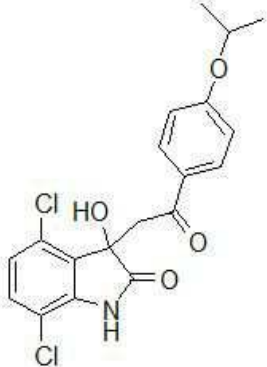
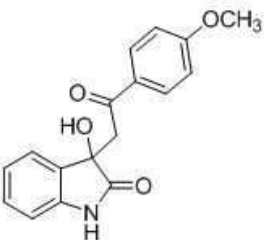
실시예	구조	IC ₅₀ (mM)		
		PANC 1	TC32	TC71

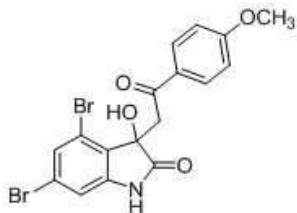
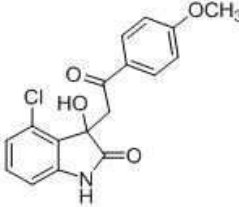
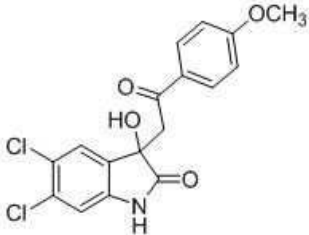
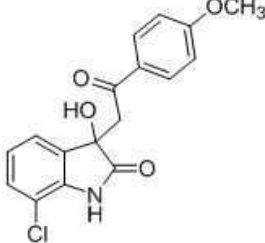
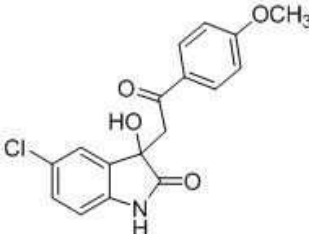
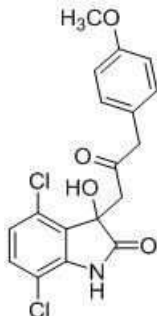
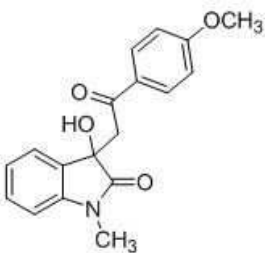
YK-4-275		11	40	23.95
YK-4-279		19.98; 33.96	0.9395; 0.7657	0.9178; 1.426
YK-4-280		40	12.11	30.08
YK-4-281		40	7.218	29.61
YK-4-283		12.66	8.911	25.96
YK-4-284		40	40	40

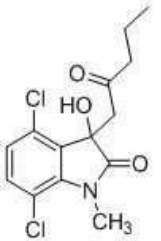
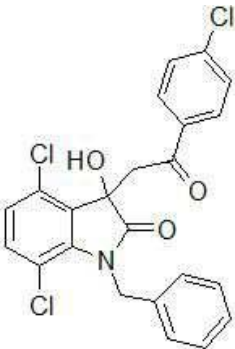
YK-4-285		40	40	40
YK-4-286		40	4.631	9.149
YK-4-287		12.6	6.32	15.82
YK-4-288		40	3.002	9.345
YK-4-289		40	40	40
PT-1-11		40	10.34	12.28

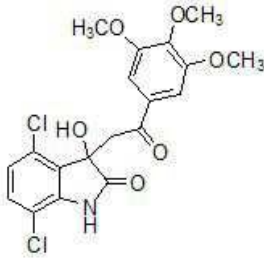
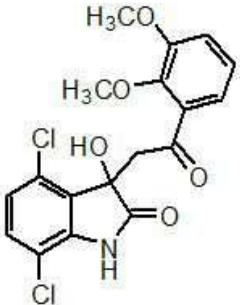
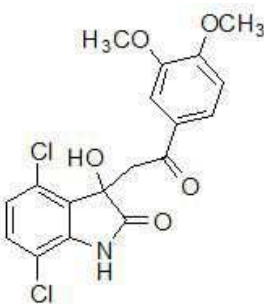
PT-1-14		11.11	2.698	3.568
PT-1-15		10.91	2.952	6.941
PT-1-17		40; 40	0.2589; 0.2836	0.4008; 0.2945
PT-1-18		40	40	40
PT-1-19		22.94	2.609	2.819
PT-1-22		40	8.988	40

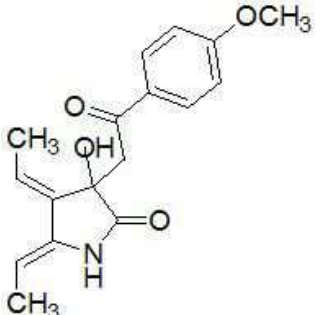
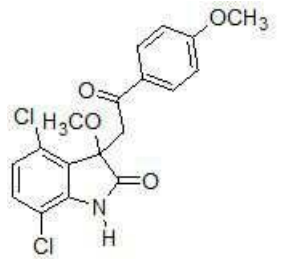
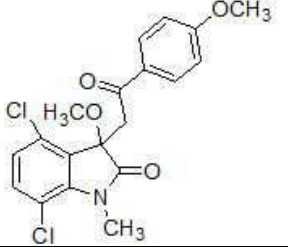
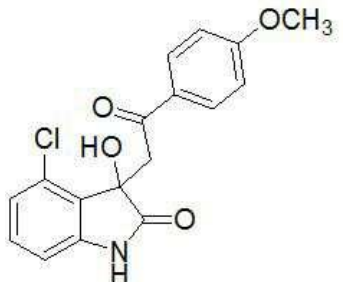
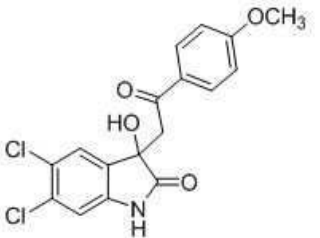
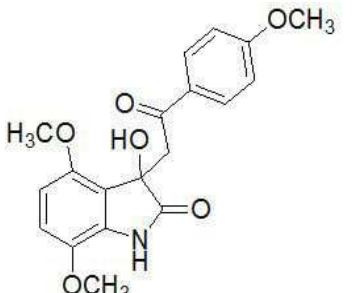
PT-1-23		40	2.698	4.422
PT-1-38		15.5; 40	0.2908; 0.3833	40; 0.5682
PT-1-39		5.413; 6.763	1.052; 1.664	1.806; 2.318
PT-1-41		2.855; 5.158	1.194; 1.611	2.142; 1.599
PT-1-43		10.98	1.409	5.655

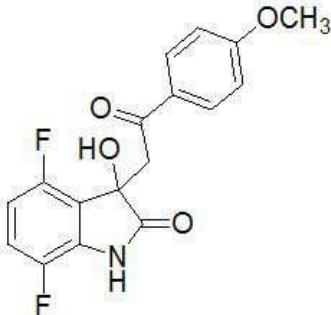
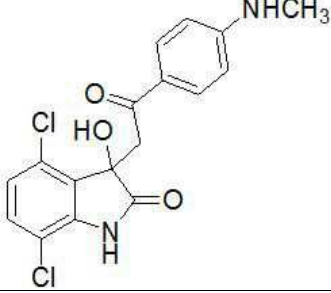
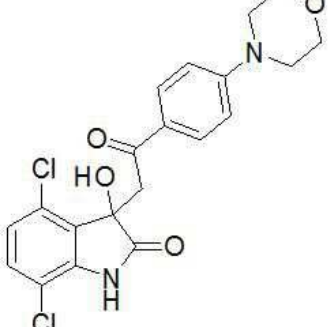
PT-1-53		2.202	40	4.08
PT-1-54		2.127; 40	1.498; 2.57	1.362; 2.202
PT-1-60		40	40	40
PT-1-64		40	32.8	40
PT-1-67		28.1; 40	0.9822; 1.203	0.9086; 1.409
PT-1-69		40	40	40
PT-1-267		40	40	40

PT-1-271		40	40	40
PT-1-275		40	40	40
PT-2-39		40	40	40
PT-2-52		40	40	40
PT-2-56		40	12.36	40
PT-2-59		40	40	40
PT-2-64		40	40	40

PT-2-69		40; 40	2.178; 2.305	0.7145; 2.341
PT-2-71		40	40	40
YK-4-276		40	40	40
YK-4-277		40	40	40
YK-4-278		40	40	40
YK-4-282		40	40	40

PT-1-12		40	40	40
PT-1-13		40	40	40
PT-1-16		40	40	40
PT-1-20		40	40	40
PT-1-21		40	40	40
PT-1-33		40	1.035	1.636

PT-2-37		40	40	40
PT-2-78		40	40	40
PT-2-79		11.19	12.13	16.98
PT-2-47				
PT-2-39				
PT-2-99				

PT-2-94				
PT-2-84				
PT-2-89				

[0264] 실시예 6. 치환된 유사체와 EWS-FLI1 세포의 성장 억제

[0265] ESFT 세포에 대한 YK-4-279의 영향은 이들의 성장 억제를 측정함으로써 시험하였다. 선도 화합물(lead compound)의 IC50은 단층으로 성장하는 세포에 대하여 900 nM이었다. ESFT 세포의 성장 억제는 특정 화합물의 다양한 농도에서 측정하였다. TC71 및 TC32 세포의 성장 억제는 YK-4-279 및 PT-1-33의 다양한 농도에서 측정하였다(도 3a). TC71 세포의 성장 억제는 YK-4-279, PT-1-33, 및 PT-1-55의 다양한 농도에서 측정하였다(도 3b). TC71 세포의 성장 억제는 YK-4-279 및 PT-1-123의 다양한 농도에서 측정하였다(도 3c). 유사체들의 일부는 YK-4-279와 유사한 활성을 가졌다. 탈수된 유사체 및 알코올 유사체는 ESFT 세포에 대하여 유사한 활성을 보였다(도 3a). 케톤의 변형은 화합물의 활성을 개선시키지 않았다(도 3b 및 도 3c).

[0266] 실시예 7. EWS-FLI1 세포의 아포토시스(apoptosis)

[0267] YK-4-279를 처리하고 RHA, EWS-FLI1 또는 총 단백질과 공침시킨 TC32 세포의 단백질 용해물로부터 면역블롯(immunoblots)을 준비하였다(도 4). YK-4-279는 EWS-FLI1 또는 RHA의 수준에 직접적으로 영향을 주지 않았으나, 그들의 상호작용을 방해하였다. EWS-FLI1과 RHA의 상호작용의 방해는 유잉계 육종에 대한 잠재적인 치료법으로서 소분자 부류의 개발을 위한 방안을 나타낸다. YK-4-279가 단백질-단백질 상호작용을 방해하는 반면, PT-1-17은 TC71 세포에서 더욱 강력함이 나타났다. YK-4-279의 탈수된 유사체는 화합물의 효능을 상당히 증가시키지는 않았다.

[0268] 실시예 8. EWS-FLI1 / RHA 결합의 방해

[0269] EWS-FLI1 및 His-tagged RHA 단백질, His-Tag RHA (647-1075) 사이의 결합을 방해하기 위한 후보 소분자의 활성은 ELISA 분석을 이용하여 스크리닝하였다. 간략하게, 후보 약물을 EWS-FLI1으로 코팅된 플레이트에서 RHA와 함께 배양하였다. 플레이트를 세척한 후, 플레이트에 결합하여 남아있는 RHA의 양을 1차 항-RHA 항체 및 2차 신호 항체를 이용하여 측정하였다.

[0270] 96-웰 플레이트에서 웰(well)들을 100 μ l/well 20 nM EWS-FLI1 단백질 용액(1M 이미다졸, 20 mM 트리스, 500 mM NaCl)과 함께 4 °C에서 밤새 배양하였다. PBS로 플레이트를 세척하고 실온에서 2 시간 이상 150 μ l/well 4% BSA로 고정시킨 후, ELISA 세척 용액((PBS+0.1 % T20, 200 μ l/well)으로 다시 세척하였다. 플레이트를 PBS(10 μ M 또는 50 μ M 최종) 내의 100 μ l/well 후보 약물 또는 DMSO 대조군과 함께 실온에서 1 시간 동안 배양하였다. 플레이트를 100 μ l/well 20 nM His-RHA 단백질 용액(0.5 M 이미다졸, 125 mM NaCl, 20 mM 트리스)과 함께 4 °C에서 하룻밤 동안 배양한 후, ELISA 세척 용액((PBS+0.1 % T20, 200 μ l/well)으로 세척하였다. 플레이트에 결합한 RHA를 100 μ l/well 일차 항-RHA 항체(1:1000 goat Anti-DHX9 / EB09297, Everest)와 함께 1 시간 동안 실온에서 배양함으로써 검출한 후, ELISA 세척 용액((PBS+0.1 % T20, 200 μ l/well)으로 세척하였다. 일차 항체를 100 μ l/well 이차 항-염소 항체(1:500 donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020)로 1 시간 동안 실온에서 배양함으로써 검출한 후, ELISA 세척 용액((PBS+0.1 % T20, 200 μ l/well)으로 세척하였다. 홀스래디쉬 과산화효소 분석 키트(horseradish peroxidase assay kit)를 각 웰에서 이차 항-염소 항체의 양을 측정하는데 사용하였고(Bio-Rad - TMB Peroxidase EIA Substrate Kit #172-1066), 450 nm에서 플레이트를 판독하였다. 적은 양의 HRP를 나타내는 상대적으로 낮은 광학 밀도는 EWS-FLI1-RHA 결합에 대한 증가된 억제 활성을 가진 후보 약물을 나타낸다. 결과는 도 5a - 5g에 요약하였다. 도 5a는 하기 후보 분자에 대한 결과를 요약한다: YK-4-275, YK-4-285, PT-1-12, PT-1-18, PT-1-19, PT-1-20, PT-1-21, PT-1-22, PT-1-23, PT-1-175. 도 5b는 하기 후보 분자에 대한 결과를 요약한다: PT-2-84, PT-2-59, PT-1-17, PT-2-71, PT-2-89, PT-1-123, PT-1-15, PT-1-60, PT-1-67, PT-1-69. 도 5c는 하기 후보 분자에 대한 결과를 요약한다: YK-4-285, YK-4-286, PT-1-33, PT-1-38, PT-1-271, PT-1-52, PT-1-56, PT-1-64, PT-2-94, PT-1-267). 도 5d는 하기 후보 분자에 대한 결과를 요약한다: YK-4-282, YK-4-287, YK-4-280, YK-4-289, YK-4-288, YK-4-278, YK-4-276, YK-4-283, YK-4-277, YK-4-281. 도 5e는 하기 후보 분자에 대한 결과를 요약한다: PT-1-54, YK-4-279 (S), YK-4-279 (R), PT-1-55, PT-2-75, PT-2-39, PT-2-79, PT-1-16, PT-1-13, PT-2-64. 도 5f는 하기 후보 분자에 대한 결과를 요약한다: YK-4-284, PT-1-14, PT-1-39, PT-1-41, PT-1-43, PT-1-53, PT-2-56, PT-2-52, PT-1-61, PT-1-183. 도 5g는 하기 후보 분자에 대한 결과를 요약한다: PT-1-275, PT-2-69, PT-2-99, YK-4-288, PT-1-19, PT-1-20, PT-1-69, PT-2-89, PT-1-17, PT-2-94.

[0271] 실시예 9. EWS-FLI1 전사 인자 활성의 방해

[0272] EWS-FLI1 전사 인자 활성을 방해하는 후보 소분자의 활성을 NROB1 프로모터에 결합하는 EWS-FLI1이 루시페라제(luciferase) 발현을 증가시키는 루시페라제 분석을 이용하여 스크리닝하였다. 간략하게, 세포를 루시페라제를 발현하는 NROB1 프로모터를 포함하는 벡터, 및 EWS-FLI1 발현 벡터로 형질주입하였다. 형질주입된 세포를 다양한 농도의 후보 약물로 처리하고, 루시페라제 발현의 상대적 수준의 변화를 측정하였다. COS7 세포를 96-웰 플레이트에 플레이트링하고 pcNEO/EF 벡터 및 pGL3-NROB1로 형질주입하였다. 대조군은 각 벡터만으로 형질주입된 것을 포함하였다. 형질주입된 세포를 다양한 농도의 후보 약물로 처리하고, 처리된 세포의 루시페라제 활성을 분석하였다. 감소된 루시페라제 활성은 루시페라제의 전사를 촉진하는 전사인자로서 작용하는 EWS-FLI1에서의 억제 활성을 가진 후보 약물을 나타낸다. 도 6a 및 6b는 후보 약물의 다양한 농도에 대한 상대적 루시페라제 활성의 일반적 경향을 나타낸다. 도 7a 내지 7i는 후보 약물의 다양한 농도에 대한 억제 활성을 나타낸다.

[0273] 실시예 10. 다형성 교모세포종의 치료

[0274] 다형성 교모세포종(GBM)은 고전적(classic), 전신경성(proneural), 신경성(neural), 및 간엽성(mesenchymal) 카테고리 분자 분리를 유도하는 이의 유전학의 관점에서 매우 잘 설명된 종양이다(Purow BW, Schiff D. Glioblastoma genetics: in rapid flux. Discov Med. 2010 Feb;9(45):125-31. PubMed PMID: 20193638. Pubmed Central PMCID: 3365574). GBM을 분류하는 유전적 변형은 신호전달 경로, 종양 억제의 감소, 대사 경로의 돌연변이, 비정상 DNA 수선, 및 유사분열 조절의 손실의 구조적 활성화를 포함한다(Suzuki E, Williams S, Sato S, Gilkeson G, Watson DK, Zhang XK. The transcription factor Fli-1 regulates monocyte, macrophage and dendritic cell development in mice. Immunology. 2013 Jul;139(3):318-27. PubMed PMID: 23320737. Pubmed Central PMCID: 3701178; Chow LM, Endersby R, Zhu X, Rankin S, Qu C, Zhang J, et al. Cooperativity within and among Pten, p53, and Rb pathways induces high-grade astrocytoma in adult brain. Cancer Cell. 2011 Mar 8;19(3):305-16. PubMed PMID: 21397855. Pubmed Central PMCID: 3060664; Solomon DA, Kim T, Diaz-Martinez LA, Fair J, Elkahlon AG, Harris BT, et al. Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. Science. 2011 Aug 19;333(6045):1039-43. PubMed PMID: 21852505. Epub 2011/08/20. eng). 이들 카테고리 내에서도, GBM은 상당한 종양내 이질성을 갖는 종양으로서 인식된다(Garraway LA, Lander ES. Lessons from the cancer genome. Cell. 2013 Mar 28;153(1):17-37. PubMed PMID: 23540688;

Nabils NH, Deleyrolle LP, Darst RP, Riva A, Reynolds BA, Kladde MP. Multiplex mapping of chromatin accessibility and DNA methylation within targeted single molecules identifies epigenetic heterogeneity in neural stem cells and glioblastoma. *Genome Res.* 2013 Oct 8. PubMed PMID: 24105770). 유전학적으로 이러한 특별한 가변성에도 불구하고, 전사적 조절에 대해 초점을 맞추는 것은 관심을 받지 못하고 있다. 전사 인자가 GBM에서 덜 연구된 이유 중 하나는 효과적인 소분자 저해제의 부재일 수 있다. 이에 대한 예외는 p53이며, 이의 야생형 기능은 소분자 단백질 상호작용 저해제 Nutlin-3으로 유지될 수 있다(Vassilev LT. p53 Activation by small molecules: application in oncology. *J Med Chem.* 2005 Jul 14;48(14):4491-9. PubMed PMID: 15999986).

[0275] 유전적 다양성에도 불구하고, GBM에 대한 표적 및 비-표적 치료를 평가하는 많은 임상 시험이 완료되었다. 이들 모든 시험에도 불구하고, 방사선 치료 및 분자적으로 유도된 외과적 수술을 포함하여, 효과적인, 장기적 GBM 치료를 위한 진행이 환자의 대다수에서 실패했다(Yin AA, Cheng JX, Zhang X, Liu BL. The treatment of glioblastomas: A systematic update on clinical Phase III trials. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2013 Sep;87(3):265-82. PubMed PMID: 23453191). 최근 테모졸로마이드를 더한 VEGFR 소분자 저해제의 임상 III상 시험 또한 기본 테모졸로마이드 치료에 방사선 치료를 더한 것 이상의 개선을 나타내지 않았다(Batchelor TT, Mulholland P, Neyns B, Nabors LB, Campone M, Wick A, et al. Phase III Randomized Trial Comparing the Efficacy of Cediranib As Monotherapy, and in Combination With Lomustine, Versus Lomustine Alone in Patients With Recurrent Glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2013 Sep 10;31(26):3212-8. PubMed PMID: 23940216). 임의의 GBM 치료에 대한 큰 도전은 혈액-뇌 장벽(BBB)을 극복하는 것이며, 이는 가능성 있는 표적 치료에 영향을 미쳤다(Juratli TA, Schackert G, Krex D. Current status of local therapy in malignant gliomas--a clinical review of three selected approaches. *Pharmacol Ther.* 2013 Sep;139(3):341-58. PubMed PMID: 23694764).

[0276] GBM의 생물학을 이해하고 새로운 치료법을 개발하기 위한 마이크로RNA(miRNA)의 사용은 디아실글리세롤 키나아제 알파(diacylglycerol kinase alpha)가 잠재적 표적이 될 수 있다는 새로운 발견을 이끌었으며, 소분자 최적화가 현재 이들 저해제에 대하여 진행되고 있다(Dominguez CL, Floyd DH, Xiao A, Mullins GR, Kefas BA, Xin W, et al. Diacylglycerol kinase alpha is a critical signaling node and novel therapeutic target in glioblastoma and other cancers. *Cancer Discov.* 2013 Jul;3(7):782-97. PubMed PMID: 23558954. Pubmed Central PMCID: 3710531). 또한, miRNA는 전사적 조절의 네트워크가 GBM 종양 형성에 명백히 중요하다는 것을 제시하는 생물정보학 모델을 만드는데 사용되었다(Sun J, Gong X, Purow B, Zhao Z. Uncovering MicroRNA and Transcription Factor Mediated Regulatory Networks in Glioblastoma. *PLoS computational biology.* 2012;8(7):e1002488. PubMed PMID: 22829753. Pubmed Central PMCID: 3400583).

[0277] 프리엔드백혈병 삽입-1(Friend Leukemia Insertion-1; FLI1)은 새로운 GBM 표적으로 추정된다

[0278] 전사 인자는 많은 암에 있어 암유전자를 발생시키는데 초점을 맞추지만, 효소 활성이 부족하기 때문에 '의약품이 될 수 없는(undruggable)'것으로 간주되었다. 현재까지, GBM에 대한 TCGA 데이터베이스에도 불구하고, 중요한 전사 노드(nodes)의 치료적 표적이 발생하지 않았다. ets 계열 전사 인자 FLI1은 TCGA 데이터베이스에 조회하는 것을 기반으로 한 GBM에서 발현된다(도 8). 초기 ETS-1 연구는 인간 정상세포 종양에서 잠재적 악성인 ETS-1 발현과 관련이 있었다(Kitange G, Kishikawa M, Nakayama T, Naito S, Iseki M, Shibata S. Expression of the Ets-1 proto-oncogene correlates with malignant potential in human astrocytic tumors. *Mod Pathol.* 1999 Jun;12(6):618-26. PubMed PMID: 10392639). 또한, 연구는 ETS-1이 정상세포 종양에서 혈관 형성을 유도할 수 있음을 나타내었다(Valter MM, Hugel A, Huang HJ, Cavenee WK, Wiestler OD, Pietsch T, et al. Expression of the Ets-1 transcription factor in human astrocytomas is associated with Fms-like tyrosine kinase-1 (Flt-1)/vascular endothelial growth factor receptor-1 synthesis and neoangiogenesis. *Cancer Res.* 1999 Nov 1;59(21):5608-14. PubMed PMID: 10554042). 많은 연구는 GBM 전사 및 전체적 생물학에 있어서 ets 계열 ELK 구성원의 중요한 역할을 제시한다(Day BW, Stringer BW, Spanevello MD, Charmsaz S, Jamieson PR, Ensby KS, et al. ELK4 neutralization sensitizes glioblastoma to apoptosis through downregulation of the anti-apoptotic protein Mcl-1. *Neuro Oncol.* 2011 Nov;13(11):1202-12. PubMed PMID: 21846680. Pubmed Central PMCID: 3199151; Shukla AA, Jain M, Chauhan SS. Ets-1/Elk-1 is a critical mediator of dipeptidyl-peptidase III transcription in human glioblastoma cells. *Febs J.* 2010 Apr;277(8):1861-75. PubMed PMID: 20236318; Uht RM, Amos S, Martin PM, Riggan AE, Hussaini IM. The protein kinase C-eta isoform induces proliferation in glioblastoma cell lines through an ERK/Elk-1

pathway. *Oncogene*. 2007 May 3;26(20):2885-93. PubMed PMID: 17146445). 한 면역조직화학적 연구는 GBM에서 FLI1 발현을 발견하지 못했으나, 항체 선택 및 항원 검색(retrieval)에 있어 이들 부정적인 결과에 영향을 미칠 수 있는 중요한 도전이다(Mhawech-Fauceglia P, Herrmann FR, Bshara W, Odunsi K, Terracciano L, Sauter G, et al. Friend leukaemia integration-1 expression in malignant and benign tumours: a multiple tumour tissue microarray analysis using polyclonal antibody. *J Clin Pathol*. 2007 Jun;60(6):694-700. PubMed PMID: 16917000. Pubmed Central PMCID: 195505).

[0279] 암 게놈 웹 인터페이스에 대한 cBioPortal을 사용하여, 암과 관련된 ets 계열 구성원의 하위부류가 평가되었다. 이러한 변형은 증폭(amplifications)(고체 빨간색 막대), 돌연변이(작은 초록색 사각형), 및 mRNA 상향조절(열린 빨간색 막대)을 포함한다. 도 8을 참조하라.

[0280] GBM에서 FLI1 표적은 또한 MDM2의 전사 활성화에 기반하여 지원된다(Truong AH, Cervi D, Lee J, Ben-David Y. Direct transcriptional regulation of MDM2 by Fli-1. *Oncogene*. 2005 Feb 3;24(6):962-9. PubMed PMID: 15592502). 이러한 경우, 높은 MDM2는 주요 종양 억제 단백질의 손실로 이어지는 p53의 저하를 유발할 것이다. 주목할 것은, 높은 FLI1 및 높은 MDM2를 갖는 이들 사이의 7개의 GBM 세포주간에 느슨한(loose) 상관관계가 있다는 것이다(표 3 및 도 10). 조혈(hematopoietic) 성장에 있어서, FLI1은 단백질이 상동 재조합에 의해 제거될 때 여러 면역 결합으로 인해 언급한 바와 같이 명백히 중요한 단백질이다(Suzuki E, Williams S, Sato S, Gilkeson G, Watson DK, Zhang XK. The transcription factor Fli-1 regulates monocyte, macrophage and dendritic cell development in mice. *Immunology*. 2013 Jul;139(3):318-27. PubMed PMID: 23320737. Pubmed Central PMCID: 3701178; Kruse EA, Loughran SJ, Baldwin TM, Josefsson EC, Ellis S, Watson DK, et al. Dual requirement for the ETS transcription factors Fli-1 and Erg in hematopoietic stem cells and the megakaryocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 18;106(33):13814-9. PubMed PMID: 19666492. Pubmed Central PMCID: 2728977; Liu F, Walmsley M, Rodaway A, Patient R. Fli1 acts at the top of the transcriptional network driving blood and endothelial development. *Curr Biol*. 2008 Aug 26;18(16):1234-40. PubMed PMID: 18718762). FLI1이 배발생(embryogenesis)에서 중요하지만, 이의 발현이 면역 세포 및 내피의 하위부류로 제한되기 때문에 성숙 조직에서 중요할 것 같지 않다(Watson DK, Smyth FE, Thompson DM, Cheng JQ, Testa JR, Papas TS, et al. The ERG/Fli-1 gene: isolation and characterization of a new member of the family of human ETS transcription factors. *Cell Growth Differ*. 1992 Oct;3(10):705-13. PubMed PMID: 1445800; Truong AH, Ben-David Y. The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation. *Oncogene*. 2000 Dec 18;19(55):6482-9. PubMed PMID: 11175364; Prasad DD, Rao VN, Reddy ES. Structure and expression of human Fli-1 gene. *Cancer Res*. 1992;52(20):5833-7). 또한, FLI1 표적에 대한 접근은 이의 발현을 제거하기보다는 단백질과 YK-4-279의 상호작용을 방해하는 방식이다.

[0281] YK-4-279는 ets 계열 구성원 ERG, ETV1, 및 EWS-FLI1의 기능을 억제한다

[0282] 어린이/젊은 성인의 암, 유잉 육종에서, EWS 전사 활성화 도메인은 새로운 융합 단백질, EWS-FLI1로 이어지는 ets 계열 구성원에 결합된다. 우리는 유잉 육종 세포주의 패널에서 세포 아포토시스를 초래하는, RHA에 대한 EWS-FLI1의 결합을 방지하는 소분자 YK-4-279를 동정 및 평가하였다(Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. *Nat Med*. 2009 Jul;15(7):750-6. PubMed PMID: 19584866. eng). 우리는 또한 유사한 용량에서 종양을 포함하는 비-EWS-FLI1의 성장에 영향을 미치지 않는 유잉 육종 이중이식 모델에서 감소된 종양 성장을 증명하였다. 특이성의 중요한 증거로서, 오직 YK-4-279의 (S) 거울상 이성질체만이 RHA에 결합, 전사를 활성화, 및 대안적 스플라이싱을 포함하는 EWS-FLI1의 기능적 활성을 억제할 수 있다(Barber-Rotenberg JS, Selvanathan SP, Kong Y, Erkizan HV, Snyder TM, Hong PS, et al. Single Enantiomer of YK-4-279 Demonstrates Specificity in Targeting the Oncogene EWS-FLI1. *Oncotarget*. 2012 Feb;3(2):172-82. PubMed PMID: 22383402. Epub 2012/03/03. eng). 후기(advanced) 전립선 암은 염색체 전좌 또는 유전자 증폭에 의해 ERG, ETV1 또는 ETV4를 과발현한다. ERG, ETV1, 또는 ETV4 활성은 침윤 및 전이를 증가시키는데 직접적으로 관여하였다. 3개 모두 FLI1와 상당한 상동성을 공유하는 ets 계열 단백질이며, DNA 결합 도메인과 본질적으로 동일하다. ERG 또는 ETV1에 의해 유도된 전립선 세포는 YK-4-279로 처리하였을 때 상당히 감소된 침윤을 나타내었다(Rahim S, Beauchamp EM, Kong Y, Brown ML, Toretsky JA, Uren A. YK-4-279 Inhibits ERG and ETV1 Mediated Prostate Cancer Cell Invasion. *PLoS ONE*. 2011;6(4):e19343. PubMed PMID: 21559405. Pubmed Central PMCID: 3084826. Epub 2011/05/12. eng). 이러한 ets 전사 인자의 상동성에 기반한 교차-종양 활성(cross-tumoral activity)은 ets 전사 인자에 의해 어느 정도 유도될 수 있는 추

가적 중양을 탐구하게 하였다.

[0283] ets 계열 구성원 FLI1은 따라서 새로운 분자 표적이 될 수 있으며 YK-4-279는 GBM에서 잠재적으로 표적할 수 있다. 동소성(orthotopic) 이종이식 및 유전적으로 조작된 GBM의 마우스 모델은 인간 임상적 시험의 발전을 위한 이론적 근거를 지원하는 원리의 증명(proof-of-principle) 연구에 도움을 준다. FLI1은 GBM에 대한 새로운 중요 표적일 수 있으며 YK-4-279는 미래의 치료에 유용할 수 있다.

[0284] GBM은 분석 가능한 여러 데이터 집합을 갖는 암 게놈 지도(The Cancer Genome Atlas; TCGA)의 표적된 종양 유형 중 하나이다. 매우 상동성 있는 단백질뿐만 아니라 FLI1의 변형이 검색되었으며 이는 GBM 표본의 23%가 새로운 표적으로서 FLI1을 지원하는 변형을 갖는다는 것을 발견하였다(도 8).

[0285] FLI1, ERG 및 ETV1 사이의 근접한 상동성을 고려하여, ERG 및 ETV1에 대한 YK-4-279의 결합을 평가하였다 (Rahim S, Beauchamp EM, Kong Y, Brown ML, Toretsky JA, Uren A. YK-4-279 Inhibits ERG and ETV1 Mediated Prostate Cancer Cell Invasion. PLoS ONE. 2011;6(4):e19343. PubMed PMID: 21559405. Pubmed Central PMCID: 3084826. Epub 2011/05/12. eng). EWS-FLI1에 대한 YK-4-279의 친화도(KD)는 9.5 μ M로 측정되었다 (Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. Nat Med. 2009 Jul;15(7):750-6. PubMed PMID: 19584866. Eng; Barber-Rotenberg JS, Selvanath). 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance)을 이용하여 재조합 ERG 및 ETV1에 결합하는 YK-4-279의 정상 상태 속도는 ERG에 대하여 11.7 μ M 및 ETV1에 대하여 17.4 μ M의 결합 친화도(KD)를 갖는 반면, 이는 122.4 μ M의 약한 친화도를 갖는 비특이적 단백질 BSA과 결합하였다. 도 9는 YK-4-279가 각각 11.7 μ M 및 17.9 μ M의 KD를 갖는 ERG 및 ETV1에 결합하는 것을 나타낸다. 정상 상태 속도는 전술한 바와 같이 Biacore T100 기기에서 측정하였으며(Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. Nat Med. 2009 Jul;15(7):750-6. PubMed PMID: 19584866. Eng; Barber-Rotenberg JS, Selvanath), SPR sensograms은 나타내지 않았다.

[0286] XX 세포주의 분석을 포함한 GBM의 큰 서열 프로젝트가 완료되었다(Solomon DA, Kim T, Diaz-Martinez LA, Fair J, Elkahlon AG, Harris BT, et al. Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer. Science. 2011 Aug 19;333(6045):1039-43. PubMed PMID: 21852505. Epub 2011/08/20. eng). 7개의 세포주를 GBM에서 발생하는 유전적 비정상성 스펙트럼으로 선별하였다. 표 3은 GBM 세포주의 이질성을 나타낸다. 질병의 이질성을 나타내는 GBM 세포주의 패널은 후천성이다. (+)는 야생형 또는 돌연변이의 열거된 단백질의 발현을 가리킨다. (-)는 면역 블롯 상에서 발현의 부재를 가리킨다. 이들 세포주는 저해제 YK-4-279에 대한 감도뿐만 아니라 FLI1의 발현을 평가하는데 사용되었다(표 3).

표 3

	DKMG	DBTRG	42MGBA	GAMG	U87MG	H4	8MGBA
EGFR	+	-	+	+	+	-	+
Myc	+	-	+	+	+	+	+
PTEN	+	-	-	+	+	-	+
MDM2	+	+	-	+	-	-	-
p53	+	+	+	+	-	-	+
p14ARF	-	-	-	-	-	-	+
21WAF1/CIP	+	+	+	+	+	+	+
CDK4	+	+	+	+	+	+	+
CDK6	+	+	+	+	-	+	+
p16INK4a	-	-	-	-	-	-	+
p18INK4c	+	+	+	+	-	+	+
RB	+	+	-	+	+	+	-

[0287]

[0288] 7개의 GBM 세포주 중 6개(85%)는 면역 블롯을 통해 FLI1 발현을 나타내었다(도 10, 상단). 이들 세포주의 각 성장은 0.5 내지 9.9 μ M까지의 IC50 범위를 갖는 YK-4-279에 의해 감소되었으며 FLI1의 수치 및 YK-4-279에 대한 감도 사이에서 반비례 관계가 관찰되었다($r^2 = 0.8$, 도 10).

[0289] GBM 표적으로서 FLI1의 가능성을 평가하기 위하여, 두개의 형질전환 모델을 분석하였다(Chow LM, Endersby R, Zhu X, Rankin S, Qu C, Zhang J, et al. Cooperativity within and among Pten, p53, and Rb pathways

induces high-grade astrocytoma in adult brain. Cancer Cell. 2011 Mar 8;19(3):305-16. PubMed PMID: 21397855. Pubmed Central PMCID: 3060664). 정상 뇌간(brainstem), 뇌간 성상세포, 및 대뇌피질 성상세포와 비교하여 두개의 FLI1 프로브 세트에서 매우 낮은 발현이 관찰되었다(도 11). 그러나, 22개의 이중 녹아웃(knock-out) (PTEN/p53) 중 20개 및 14개의 삼중 녹아웃(PTEN/p53/Rb) 중 13개의 종양은 분석된 두개의 프로브 세트에 기반한 FLI1의 상당한 발현을 나타내었다(도 11).

[0290] 인간 GBM에서 FLI1 발현 수준을 결정하기 위하여, GBM의 패넬을 FLI1 항체로 염색하였다. 패넬은 6개의 무작위로 선택된 4기 종양으로 구성된다; 6개 중 4개(66%)는 교차-반응 단백질 및 비특이적 신호를 제거하기 위해 최적화된 후 FLI1에 대한 확실한 IHC 염색을 나타내었다(도 12). 내부 양성 대조군인, 내피 세포가 양성인 아니므로, 4개의 추가적 종양은 평가할 수 없는 것으로 간주되었다.

[0291] GBM에 있어 새로운 표적 치료의 중요한 도전 중 하나는 혈액-뇌 장벽(BBB)을 극복하는 것이다. YK-4-279의 약동학적(pharmacokinetic) 평가의 일부로서, 조직 수치를 측정하고, 이를 75 mg/kg IV 라세미체 YK-4-279를 주입한 12마리의 마우스의 혈장과 비교하였다. 뇌 조직에서 YK-4-279의 수치는 유잉 육종 전경골(pretibial) 이중이식 종양의 그것에 74%였으며, 이는 FLI1 억제제를 위해 충분할 것이다. 또한, 랫트 약동학이 화합물의 IV 주사를 이용하여 수행되었을때, 랫트는 빠른 주입 후 줄았으며, 이는 느린 주입시엔 발생하지 않았고, 따라서 이는 BBB를 거쳐 중추 신경계를 통과하는 능력을 뒷받침한다.

[0292] 본원에서 제공되는 데이터는 GBM에 대한 잠재적 표적으로서 FLI1를 확인한다. TCGA 데이터의 결합, 세포주의 패넬, GEMM 모델, 및 인간 종양 유래 IHC의 패넬은 또한 FLI1의 추가 검증을 뒷받침한다.

[0293] GBM에서 새로운 표적으로서 FLI1의 검증

[0294] 잠재적 표적으로서 FLI1은 GBM 세포 성장에 필요한지 여부를 평가함으로써 검증된다. FLI1이 신경교 줄기 세포에서 잠재적 암유전자인지 여부가 판단된다. FLI1 표적화의 치료 지수를 확인하기 위해 FLI1의 중요성에 대하여, GBM 세포를 정상 인간 성상세포 및 신경교 줄기 세포와 비교하였다. 정상 뇌 세포와의 비교는 바람직한 치료 지수를 갖는 유효한 표적으로서 FLI1을 설정하는데 유용하다.

[0295] GBM 세포주가 생존, 성장, 및 침윤을 위해 FLI1 발현이 필요함이 확인된다.

[0296] FLI1의 3'UTR을 표적하는 EGFP로 표지된 shRNA 벡터를 이용하여 GBM 세포주가 생존, 성장, 및 침윤을 위하여 FLI1 발현이 필요함이 확인된다. shRNA는 렌티바이러스(lentiviral) 시스템을 이용하여 세포로 감염되었다. 따라서, 7개의 GBM 세포주에서 FLI1의 상대적 중요성은 유전자형 이질성의 정도에 따라 평가된다(표 3). FLI1가 shRNA에 의해 감소된 후, 변화는 스크램블된(scrambled) shRNA 대조군과 성장, 침윤, 앵커리지(anchorage)-의존적 성장, 및 종양 형성 분석(tumorigenesis assay)에 있어 FLI1 감소의 사이에서 관찰된다. 세포 배양 실험은 이전에 보고된 바와 같이 수행된다(Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. Nat Med. 2009 Jul;15(7):750-6. PubMed PMID: 19584866. Eng; Rahim S, Beauchamp EM, Kong Y, Brown ML, Toretsky JA, Uren A. YK-4-279 Inhibits ERG and ETV1 Mediated Prostate Cancer Cell Invasion. PLoS ONE. 2011;6(4):e19343. PubMed PMID: 21559405. Pubmed Central PMCID: 3084826. Epub 2011/05/12. eng). 침윤 분석은 종양 세포를 이용하여 수행되며 제대정맥 내피 세포를 통한 이들의 침윤은 악성 종양 세포에 의한 내피 세포의 실시간 침윤을 모니터링하고 정량화하는 전기 임피던스 기반의 기술을 이용한다. 세포 부착 및 이후 종양 세포가 이 부착을 방해함에 따른 전기 임피던스의 변화를 측정하는 Roche가 제조한 xCELLigence 기기가 사용된다(Rahim S, Beauchamp EM, Kong Y, Brown ML, Toretsky JA, Uren A. YK-4-279 Inhibits ERG and ETV1 Mediated Prostate Cancer Cell Invasion. PLoS ONE. 2011;6(4):e19343. PubMed PMID: 21559405. Pubmed Central PMCID: 3084826. Epub 2011/05/12. Eng; Rahim S, Uren A. A real-time electrical impedance based technique to measure invasion of endothelial cell monolayer by cancer cells. Journal of visualized experiments : JoVE. 2011 (50). PubMed PMID: 21490581. Pubmed Central PMCID: 3169283). 이중이식 실험은 7개의 세포주 모두에서 FLI1을 감소시킨 다중클론성(polyclonal) shRNA를 사용한다. 각 shRNA FLI1 및 스크램블된 세포주는 5마리의 흉선 제거 마우스에 주사성(stereotactically) 주사하였다(Fiandanca가 도움). (7 세포주, 세포주 당 5마리의 동물, +/- FLI1 = 70). 성장은 자원이 공유된 GU 동물 이미징에서 MRI로 7-10일간의 간격으로 모니터링하였다. 종양 성장 속도의 계산은 Bruker Paravision 5.0 소프트웨어 또는 ImageJ(NIH)를 이용하여 설명된 바와 같이 관심 영역(region of interest) 분석에 의해 수행되었다(Truong AH, Cervi D, Lee J, Ben-David Y. Direct transcriptional regulation of MDM2 by Fli-1. Oncogene. 2005 Feb 3;24(6):962-9. PubMed PMID: 15592502; Pimanda JE, Chan

WY, Donaldson IJ, Bowen M, Green AR, Gottgens B. Endoglin expression in the endothelium is regulated by Fli-1, Erg, and Elf-1 acting on the promoter and a -8-kb enhancer. Blood. 2006 Jun 15;107(12):4737-45. PubMed PMID: 16484587). 종양의 성장 통계는 진행 및 치료의 시간-의존적 프로파일을 구축하기 위하여 계산되었다.

[0297] 전체-길이의 FLI1 cDNA를 이용한 정상 인간 성상세포의 형질주입

[0298] 성상세포에 미치는 FLI1의 변형 효과를 확인하기 위하여, 정상 인간 성상세포를 렌티바이러스 시스템을 이용하여 전체-길이의 FLI1 cDNA로 형질주입되고, 부드러운 한천 및 생체 내 동소성 주입 분석시 형질전환에 대해 평가한다. 대조군(빈 벡터) 및 FLI1 형질감염된 다중클론성 세포를 앵커리지-의존적 성장 분석을 위해 부드러운 한천에 두었다(Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. Nat Med. 2009 Jul;15(7):750-6. PubMed PMID: 19584866. eng). 이종이식 연구는 전술한 바와 같이 수행된다(2 세포주 +/- FLI1, 세포주 당 5마리의 동물 = 20마리의 동물). 동물은 전술한 바와 같이, 10 일 마다 종양 성장을 평가하기 위해 MRI로 촬영하였다.

[0299] 신경교 줄기 세포는 FLI1의 본래의 발현 및 FLI1이 외생적으로 발현되는 경우의 암 유발 효과의 평가 모두에 대해 평가된다. 출판된(Lelievre E, Lionneton F, Mattot V, Spruyt N, Soncin F. Ets-1 regulates fli-1 expression in endothelial cells. Identification of ETS binding sites in the fli-1 gene promoter. J Biol Chem. 2002 Jul 12;277(28):25143-51. PubMed PMID: 11991951) 새로운 세포주가 사용된다. 앵커리지 의존적 성장 및 침윤 분석을 평가하기 위해, 모두 대조군 및 FLI1 발현을 수행하였다. 또한, 이들 세포주는 대조군 및 FLI1 발현으로 형질감염된 이종이식 실험에 사용된다(항상 평가 전 면역 블롯에 의해 입증되는). 이들 세포는 원시 신경 특성(pristine neural qualities)을 유지하기 위하여 모두 혈청보다는 외인성 성장 인자와 함께 최소 성장 배지에서 조심히 성장된다(Rossi S, Orvieto E, Furlanetto A, Laurino L, Ninfo V, Dei Tos AP. Utility of the immunohistochemical detection of FLI-1 expression in round cell and vascular neoplasm using a monoclonal antibody. Mod Pathol. 2004 May;17(5):547-52. PubMed PMID: 15001993). (3 세포주 +/-FLI1, 세포주 당 5마리의 동물 = 15마리의 동물).

[0300] YK-4-279 독성 및 FLI1 수치 사이의 상관관계가 측정된다. YK-4-279는 EWS-FLI1의 FLI1 성분을 표적한다(Barber-Rotenberg JS, Selvanathan SP, Kong Y, Erkizan HV, Snyder TM, Hong PS, et al. Single Enantiomer of YK-4-279 Demonstrates Specificity in Targeting the Oncogene EWS-FLI1. Oncotarget. 2012 Feb;3(2):172-82. PubMed PMID: 22383402. Epub 2012/03/03. Eng; Rahim S, Beauchamp EM, Kong Y, Brown ML, Toretsky JA, Uren A. YK-4-279 Inhibits ERG and ETV1 Mediated Prostate Cancer Cell Invasion. PLoS ONE. 2011;6(4):e19343. PubMed PMID: 21559405. Pubmed Central PMCID: 3084826. Epub 2011/05/12. eng). 세포주의 패널에 대한 FLI1 저해제 YK-4-279의 효과의 평가 및 FLI1 발현에 대한 억제제의 상관관계에 따라 상기 결과를 shRNA 데이터와 비교한다. FLI1 발현과 상관관계를 갖는 7개의 GBM 세포주에 대한 사전 데이터. 이는 도 9를 생성하는데 사용된 방법론과 함께 더 많은 세포주로 확장된다. 비-종양 신경교 세포주는 이들 비교에 포함된다.

[0301] FLI1 발현이 다른 공지된 GBM 유전자형 및 표현형과 상관관계가 있는지 여부를 판단한다. 우리의 세포주 데이터와의 상관관계뿐만 아니라 TCGA로부터 온라인 정보학 도구 시리즈가 사용된다. 분석은 FLI1 cDNA 또는 단백질 발현을 포함하며, FLI1이 PTEN의 손실, p16, p53 돌연변이, IDH1 점 돌연변이 또는 EGFR 돌연변이와 같은 다른 공지된 GBM 유전적 사건과 상관관계가 있는지 여부를 평가한다. 이는 진단시 절제된 환자 종양을 포함하도록 확장되며 유전적 마커의 패널로 FLI1이 포함되는지 평가된다.

[0302] 치료로서 YK-4-279를 평가하기 위해 GBM의 동물 모델을 활용

[0303] YK-4-279가 성장 둔화 또는 GBM의 퇴행 유발에 효과를 미치는지 여부를 확립하기 위하여, YK-4-279를 확립된 GBM을 가진 마우스에 투여하였다. 이를 GBM의 이종이식 및 형질전환 모델 모두에서 평가한다.

[0304] MRI로 하나씩 평가하기 보다는 마우스의 군에서 두개 내(intracranial) 병변을 평가하기 위한 방법을 확립한다. MRI가 GBM 종양의 매우 상세한 그래픽 및 대사 스펙트럼을 제공하지만, 마우스를 검사하는 시간은 규모가 큰 연구에서 이의 사용을 제한한다. 2개의 GBM 세포주가 제조되고, Xenogen 두개 내 영상에 이용되는 7개의 세포주의 GBM 동소성 검사로부터 선택된다. 2개의 GBM 세포주는 상기에 판단된 바와 같이 FLI1에 대한 요구사항 및 성장 속도에 기반하여 선택된다. 이들 2개의 GBM 세포주는 루시페라제로 안정적으로 형질전환되므로 동물군은 Xenogen 시스템을 이용하여 검사/모니터링될 수 있다. 더욱 자세한 연구 및 부피 비교를 위하여, 선택된 동물은

MRI를 이용하여 평가한다. 세포주는 동소성 이종이식 시험에 의해 생체 외에서 스크리닝된다(2 세포주 x 5 동물 = 10 동물). Xenogen 이미징에 앞서, 동물에 루시페라제 기질을 복강내 주입한다.

[0305] 이종이식 GBM 종양에 있어 YK-4-279는 종양 주입 7일 후 동물 및 종양의 증상을 갖는 동물들을 치료함으로써 평가된다. 초기 종양은 Xenogen으로 검사하고, 크기는 MRI와 관련이 있으며, 동물이 5 mm³ 병변일 때 치료를 시작한다. YK-4-279는 혈액-뇌 장벽을 넘는다. 동물은 유잉 육종 종양의 퇴행을 초래하는 용량과 유사하게 YK-4-279의 BID 주입하여 치료한다(도 13). 본 연구는 뇌 종양 부피, 동물의 증상, 및 총 생존을 평가할 것이다. 부검(necropsy)시, 종양 및 정상 인접 뇌는 GBM 마커, 아포토시스, 및 FLI1 조절된 표적 유전자에 대한 면역조직화학염색으로 평가될 것이다. 도 13은 (S)-YK-4-279 또는 라세미체를 이용한 3일간의 치료가 상당한 종양 퇴행을 보임을 나타낸다. 도 13a: 표시한 바와 같이, ES 이종이식한 마우스를 400 mg/kg 화합물 또는 대조군으로 처리하였다. 잘-형성된 종양(300 mm³)으로 시작하여, 마우스를 3일 동안, 6번의 총 투여량으로 복강 내로 화합물을 처리하였다. 도 13b: 동일한 실험의 H&E 염색된 종양.

[0306] 대부분의 GBM을 갖는 환자가 증상 및 비교적 큰 종양과 함께 존재하기 때문에, YK-4-279를 큰, 증상성 종양에 대해 실험한다. 따라서, YK-4-279는 잘 형성된, MRI에 의한 20 mm³의 GBM 상에서 종양이 형성되고 증상의 첫 번째 신호 이후에 동물을 치료함으로써 평가된다. 종양은 이때 Xenogen으로 검출된다. 동물은 치료 중 일주일에 두 번 Xenogen 평가를 받는다. 연구는 종양 부피, 동물의 증상, 및 총 생존을 비교한다. 부검 시, 종양 및 정상 인접 뇌는 GBM 마커, 아포토시스, 및 FLI1 조절된 표적 유전자에 대한 면역조직화학염색으로 평가될 것이다.

[0307] GBM의 GEMM 모델이 사용된다. 동물은 출판된 바와 같이 사육된다(Chow LM, Endersby R, Zhu X, Rankin S, Qu C, Zhang J, et al. Cooperativity within and among Pten, p53, and Rb pathways induces high-grade astrocytoma in adult brain. Cancer Cell. 2011 Mar 8;19(3):305-16. PubMed PMID: 21397855. Pubmed Central PMCID: 3060664). 대략 90일 동안, 동물은 GBM의 시작을 관찰하기 위해 10-14일마다 MRI 평가를 한다. 실험 1에서 동물은 90일의 시작시 YK-4-279 또는 대조군을 처리한다(대조군 및 처리군 내 10마리의 동물 = 20마리의 동물). 실험 2에서 동물은 증상의 시작 또는 MRI가 임의의 크기에서 2 mm보다 큰 종양을 측정했을 때 치료된다(대조군 및 처리군 내 10마리의 동물 = 20마리의 동물). 그 다음의 치료에서, 동물은 전술한 바와 같이 평가된다. YK-4-279의 투여는 복강 내 경로를 이용한다.

[0308] 데이터는 GBM을 유발하는 FLI1 및 잠재적으로 다른 ets 계열 구성원의 추가 연구를 뒷받침하기 위해 제공된다.

[0309] 선택된 암에 대해 적용되는 참조는 하기를 포함한다: CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2008 (March 23, 2012 Revision). Central Brain Tumor Registry of the United States [Internet]. 2012; <http://www.cbtrus.org>. Available from: <http://www.cbtrus.org>.

[0310] 실시예 11. 폐암을 치료하기 위한 YK-4-279의 사용

[0311] 상피 세포에서 중간엽 세포로의 전이(epithelial-to-mesenchymal transition; EMT)는 암종(carcinomas)의 발병의 주요 요소이다. EMT는 전이성 및 약물-내성 표현형을 부여하는 세포 형태 및 행동에 상당한 변화를 유도한다. 또한, EMT가 암 줄기 세포의 생성에 참여함을 제시하는 증거가 있다. 폐암은 일반적으로 주로 치료하기 어려운 발전된 상태에서 진단되기 때문에 암-관련 사망의 주된 원인이다. 암의 분자 유전학의 우리의 이해의 발전은 종양 형성에 요구되는 개별 분자를 확인하였다. 이는 특정 암을 치료하는데 성공적인 표적 치료의 발전을 이끌었다. 이들 분자 표적의 예는 세포 표면 성장 인자 수용체 및 세포 내 단백질 티로신 키나아제를 포함한다. 불행하게도, 이러한 치료는 폐암 환자의 전체 생존이나 삶의 질을 크게 개선시키지 않았다.

[0312] 본원에 기재된 최근의 발견은 E-26 변형 서열(E-26 Transforming Sequence; ETS)-관련 유전자 ERG의 생성물, 전사 인자의 ETS 계열의 구성원이, EMT에서 중요한 역할을 한다는 가설을 유도하였다. 또한, 이는 징크 핑거(zinc finger) E-box 결합 호메오박스(homeobox) 1 및 2 유전자(ZEB1, ZEB2)의 발현의 직접적인 상향 조절을 통하여 EMT 및 내피 세포의 악성 진행을 유도한다. ZEB1은 폐암 세포에서 EMT에 연결되며, siRNA를 이용한 이의 발현 억제는 EMT 반전시킬 뿐만 아니라 생체 외 및 생체 내 종양 성장을 억제한다. 폐암 세포가 높은 수치의 ERG를 발현시키므로, ERG는 ZEB를 통해 EMT를 유도할 수 있다. 실험은 ERG가 ZEB1/2에 의해 매개되는 폐암 세포의 EMT에 참여하는지 여부를 결정하도록 수행된다. YK-4-279의 새로운 제제는 폐암을 치료하기 위해 제조되고 평가된다.

[0313] ERG는 전사 인자로서 발암에 중요한 많은 유전자의 발현을 조절한다. 이전의 발견은 ERG의 종양형성 특성이 상

피 세포에서 중간엽 세포로의 전이(EMT)를 유발하는 이의 능력을 포함한다는 것을 제시하였다. 다른 실험적 시스템에서, ERG는 암 세포에서 EMT의 양성 조절자인 징크 핑거 E-box 결합 호메오박스 1 및 2 유전자(ZEB1, ZEB2)의 발현을 유도함을 나타내었다. EMT는 NSCLC에서 암세포의 전이 및 약물 내성을 유발하기 때문에, EMT를 유도하는 분자 경로의 억제는 상당한 임상적 유용성을 가질 수 있다.

[0314] 폐암 세포에서 EMT 매개시 ERG의 역할이 결정된다. ERG 발현의 변화에 대응하여 EMT 및 NSCLC 세포주의 약물 내성 표현형이 결정된다. 만일 ERG가 다른 상피 종양에서처럼 EMT를 유도한다면 결정된다. 또한, 만일 NSCLC에서 ERG 매개된 EMT가 ZEB1/2 유전자를 거치는 경우 결정된다. 이들 실험은 NSCLC 세포에서 RNAi 기술로 인한 ERG의 억제 및 ZEB 발현을 포함한다. EMT 표현형은 확립된 EMT 마커로 실시간 PCR 및 웨스턴 블롯팅에 의해 평가된다.

[0315] 비경구 투여될 수 있는 YK-4-279의 제제가 제조되고 폐암 세포의 증식 및 악성 특성에 미치는 YK-4-279의 효과가 판단된다. 부형제의 예는 β -히드록시프로필 시클로덱스트린(β -hydroxypropyl cyclodextrin; β -HPCD)이다. NSCLC 세포는 YK-4-279로 처리되고 이들의 반응은 생체 외 및 생체 내 모델에서 여러 번 측정된다. 면역력이 손상된 마우스에서 세포 생존율, 주화성(chemotaxis), 내피 세포 침윤 및 이종이식 성장이 측정된다. YK-4-279 및 NSCLC에 대해 가장 흔한 화학치료제 사이의 잠재적인 시너지 효과가 판단된다. EMT에 의해 매개되는 약물 내성 및 NSCLC 세포의 높은 전이 가능성의 특성은, NSCLC 환자의 좋지 않은 예후에 상당히 기여한다.

[0316] EMT에 의해 매개되는 약물 내성 및 NSCLC 세포의 높은 전이 가능성의 특성은, NSCLC 환자의 좋지 않은 예후에 상당히 기여한다. 폐암에서 EMT 표현형을 반전시키는 특정 단백질은 소분자를 이용하여 표적된다. 도 14는 ERG가 폐암 전이 및 약물 내성을 초래하는 EMT를 활성화하는 ZEB1 및 ZEB2의 발현을 유도함을 나타낸다.

[0317] 암 세포의 성장에 필요한 특정 분자에 대한 표적 약물은 분자 및 세포 생물학의 최근 발전에도 불구하고 어려운 도전으로 남아있다. 암 세포의 비조절되는 재생을 유도하는 단백질이 공지되었음에도 불구하고, 단지 소수만이 효과적 치료의 표적으로 제공된다. 예는 이의 활성이 만성 골수성 백혈병 치료에 사용되는 이매티닙 메실레이트(imatinib mesylate)로 불리는 소분자; 및 유방암 치료에 사용되는 단일클론 항체(트라스투주맙; trastuzumab)에 의해 제한되며, 세포 표면 성장 인자 수용체로 표적되는 세포 내 단백질 티로신 키나아제를 포함한다. 이러한 제한이나 중요하고 매우 고무적인 성공은 제약 산업에 대하여 지속적이고 강력한 연구를 자극하였다. 효소의 활성 또는 수용체 활성화의 억제는 이들 단백질의 생화학이 잘 인지되기 때문에 다양한 질병 및 암에 대한 약물 개발의 잘 확립된 목표이다. 반면에, 하나의 또다른 단백질에 결합하는 단백질의 결합에 관련되는 생화학은 더욱 복잡하고 잘 이해되지 않으며, 이는 이들 상호작용을 억제하기 때문에 상대적으로 적은 관심을 받았다.

[0318] ERG는 또한 핵에 편재하고 효소 활성이 부족하기 때문에 표적된 치료를 설계하기 위한 도전이다. YK-4-279는 ERG의 전사 활성을 억제하는 소분자이며, NSCLC 내 이의 역할이 조사된다. EMT에 요구되는 ERG에 결합하고 이의 기능을 방해함으로써 YK-4-279로 판단된 경우(도 14), NSCLC를 치료하기 위하여 사용될 수 있다.

[0319] ERG는 발암 단백질이다. E-26 변형 서열(ETS)-관련 유전자 ERG는 많은 조직에서 내피 세포의 항상성, 분화 및 혈관 신생에 필수적인 전사 인자의 ETS 계열의 구성원을 암호화한다(Liu F, Patient R. Genome-wide analysis of the zebrafish ETS family identifies three genes required for hemangioblast differentiation or angiogenesis. Circulation research. 2008;103:1147-54; Sashida G, Bazzoli E, Menendez S, Liu Y, Nimer SD. The oncogenic role of the ETS transcription factors MEF and ERG. Cell cycle. 2010;9:3457-9). 증거는 ERG에 의해 조절되는 특정 유전자의 활성화가 혈관 신생을 위해 필요함을 제시한다. 예를 들어, 이의 발현을 위해 ERG를 필요로 하는 VE-카데린(VE-cadherin)은 혈관 신생에 있어 중요한 내피 세포 접합 안정성 및 내피 생존에 필수적이다(Yuan L, Sacharidou A, Stratman AN, Le Bras A, Zwiers PJ, Spokes K, et al. RhoJ is an endothelial cell-restricted Rho GTPase that mediates vascular morphogenesis and is regulated by the transcription factor ERG. Blood. 2011;118:1145-53). 발암 현상에 있어서, ETS 전사 인자는 세포 외 기질의 분해, 및 세포-대-세포 및 세포-대-기질 접합의 형성을 포함하는 전이에 필요한 공정에 참여하는 다수의 유전자의 조절에 관여한다(Lelievre E, Lionneton F, Soncin F, Vandenbunder B. The Ets family contains transcriptional activators and repressors involved in angiogenesis. The international journal of biochemistry & cell biology. 2001;33:391-407). 특정 예는 혈관 내피 성장 인자, 엔도글린(endoglin), MMP(matrix metalloproteinases), 콜라게나제 1(collagenase 1), 및 헴옥시게나제1(heme oxygenase 1)에 대한 수용체를 포함한다. ERG는 조혈 및 상피 세포 암에서 과발현되며 인간 전립선 암에서 강력한 암유전자로서 역할을 한다(Chen Y, Chi P, Rockowitz S, Iaquina PJ, Shamu T, Shukla S, et al. ETS factors reprogram the androgen receptor cistrome and prime prostate tumorigenesis in response to PTEN loss. Nature medicine. 2013; Rahim S, Uren A. Emergence of ETS transcription factors as diagnostic tools and

therapeutic targets in prostate cancer. American journal of translational research. 2013;5:254-68; Turner DP, Watson DK. ETS transcription factors: oncogenes and tumor suppressor genes as therapeutic targets for prostate cancer. Expert review of anticancer therapy. 2008;8:33-42).

[0320] ERG 및 EMT는 NSCLC에서 좋지 않은 임상 결과를 의미한다. 폐암에서 ERG의 역할에 있어 우리의 흥미를 끄는 주목할만한 발견은 NSCLC에서 상대적으로 높은 수치의 ERG 발현 및 정상 조직과 비교하여 폐 종양 시료의 100%에서 ERG의 대안적 스플라이싱된 버전의 존재의 검출을 포함한다(Xi L, Feber A, Gupta V, Wu M, Bergemann AD, Landreneau RJ, et al. Whole genome exon arrays identify differential expression of alternatively spliced, cancer-related genes in lung cancer. Nucleic acids research. 2008;36:6535-47). 마이크로 분석에 의한 mRNA의 분석: ERG mRNA 발현은 NSCLC 조직 시료에서 상위 8%(Ramawamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. Nature genetics. 2003;33:49-54), 및 상위 11%(Ding L, Getz G, Wheeler DA, Mardis ER, McLellan MD, Cibulskis K, et al. Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. Nature. 2008;455:1069-75)에 랭크된다. ERG 타겟 유전자가 EMT 표현형에 관여하므로 우리는 ERG 매개된 EMT가 NSCLC의 악성 표현형에 기여할 수 있을 것이라는 가설을 세웠다.

[0321] EMT는 세포가 이들의 상피 특성을 잃고 중간엽 표현형을 얻을 때 초기 배아 발달에서 설명되었다(Sato M, Shames DS, Hasegawa Y. Emerging evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in lung carcinogenesis. Respirology. 2012;17:1048-59). EMT가 진행됨에 따라, 세포는 더욱 운동성있고 침윤성의 표현형을 획득한다. 따라서, EMT는 발암 현상의 중요한 성분으로 나타났다. EMT와 약물 내성 및 항-아포토시스 표현형뿐만 아니라 NSCLC 국소 침윤, 혈관 신생, 원격 전이 사이의 연관성은 생체 내 및 생체 외에서 수행된 많은 연구에 의해 증명되었다(표 4). 예를 들어, EMT에 관여하는 분자의 발현은 증가된 전이 및 짧은 환자의 총 생존을 포함하는 NSCLC의 임상병리학적 특징과 관련이 있다(Dauphin M, Barbe C, Lemaire S, Nawrocki-Raby B, Lagonotte E, Delepine G, et al. Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non small cell lung carcinomas. Lung cancer. 2013;81:117-22). 또한, 발암 현상에서 EMT의 중요한 역할은 줄기 세포의 특징인 세포의 표현형에 의해 표시된다(Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. Cell. 2008;133:704-15). 종합하면, 이들 연구는 폐암의 발전을 유발하는 EMT를 억제하기 위한 강한 정당성을 제공한다. 표 4는 NSCLC에서 임상적 특징과 관련이 있는 EMT에 관여하는 분자를 열거한다.

표 4

[0322]

EMT 유전자	임상적 특징	참조
상피 카데린 (Epithelial Cadherin)	증가된 총 생존(Longer overall survival)	Nakata S, Sugio K, Uramoto H, Oyama T, Hanagiri T, Morita M, et al. The methylation status and protein expression of CDH1, p16(INK4A), and fragile histidine triad in nonsmall cell lung carcinoma: epigenetic silencing, clinical features, and prognostic significance. Cancer. 2006;106:2190-9.
	림프절 전이에 부정적(Negative for lymph node metastasis)	Kase S, Sugio K, Yamazaki K, Okamoto T, Yano T, Sugimachi K. Expression of E-cadherin and beta-catenin in human non-small cell lung cancer and the clinical significance. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2000;6:4789-96.
SLUG	수술 후 재발(Postoperative relapse)	Shih JY, Tsai MF, Chang TH, Chang YL, Yuan A, Yu CJ, et al. Transcription repressor slug promotes carcinoma invasion and predicts outcome of patients with lung adenocarcinoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2005;11:8070-8.
	짧아진 총 생존(Shorter overall survival)	Chiou SH, Wang ML, Chou YT, Chen CJ, Hong CF, Hsieh WJ, et al. Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. Cancer research. 2010;70:10433-44.

SNAIL	짧아진 총 생존(Shorter overall survival)	Yanagawa J, Walser TC, Zhu LX, Hong L, Fishbein MC, Mah V, et al. Snail promotes CXCR2 ligand-dependent tumor progression in non-small cell lung carcinoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2009;15:6820-9.
TWIST	짧아진 총 생존(Shorter overall survival)	Hung JJ, Yang MH, Hsu HS, Hsu WH, Liu JS, Wu KJ. Prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1alpha, TWIST1 and Snail expression in resectable non-small cell lung cancer. Thorax. 2009;64:1082-9.
HIF-1 알파	짧아진 총 생존(Shorter overall survival) 짧아진 무재발 생존(Shorter recurrence free survival)	

[0323] ERG 표적 유전자 ZEB1은 EMT를 매개한다. EMT는 다중 신호 경로를 포함하는 복잡한 세포 반응이다. 징크 핑거 E-box-결합 호메오박스(ZEB) 단백질은 EMT의 주요 조절자이다(Takeyama Y, Sato M, Horio M, Hase T, Yoshida K, Yokoyama T, et al. Knockdown of ZEB1, a master epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene, suppresses anchorage-independent cell growth of lung cancer cells. Cancer letters. 2010;296:216-24). 특히, ZEB1은 EMT에 참여하는 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 조절함으로써 폐암의 EMT-관련 발암 표현형에서 주된 역할을 한다. 예를 들어, 폐암 세포주에서 siRNA로 인한 ZEB1 발현의 억제 EMT의 반전, 도세탁셀에 대한 증가된 감도, 및 생체 외 및 생체 내에서 폐암 세포의 감소된 성장의 결과를 가져온다(Ren J, Chen Y, Song H, Chen L, Wang R. Inhibition of ZEB1 reverses EMT and chemoresistance in docetaxel-resistant human lung adenocarcinoma cell line. Journal of cellular biochemistry. 2013;114:1395-403). 가장 중요한, ERG는 전립선 암 세포에서 ZEB 축을 통해 EMT를 매개한다(Leshem O, Madar S, Kogan-Sakin I, Kamer I, Goldstein I, Brosh R, et al. TMPRSS2/ERG promotes epithelial to mesenchymal transition through the ZEB1/ZEB2 axis in a prostate cancer model. PloS one. 2011;6:e21650). 또한, miR-30은 전립선 암 세포에서 ERG 발현을 직접적으로 표적함으로써 EMT를 억제한다(Kao CJ, Martiniez A, Shi XB, Yang J, Evans CP, Dobi A, et al. miR-30 as a tumor suppressor connects EGF/Src signal to ERG and EMT. Oncogene. 2013). 이들 및 다른 연구는 폐암에서 EMT를 반전시키기 위하여 ZEB1 및 ZEB2를 표적하기 위한 노력이 성공적일 수 있다는 결론을 내는 것은 합리적이라는 것을 나타낸다. RNAi 기술이 임상적으로 적용될만큼 충분히 발전되지 않았기 때문에, 폐암에서 ZEB1 발현을 억제하기 위한 대안적인 메커니즘을 확인하는 것이 필요할 것이다. ERG 결합 부위는 ZEB1 및 ZEB2 프로모터 영역 내에 존재하는 것으로 알려져 있다(Leshem O, Madar S, Kogan-Sakin I, Kamer I, Goldstein I, Brosh R, et al. TMPRSS2/ERG promotes epithelial to mesenchymal transition through the ZEB1/ZEB2 axis in a prostate cancer model. PloS one. 2011;6:e21650). 2009년에, 우리는 EWS-FLI1의 저해제로서 YK-4-279, 유잉 육종에서 종양-특이적 재배열된 유전자에 의해 암호화된 융합 단백질을 발견하였다(Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. Nature medicine. 2009;15:750-6). 더욱 최근에는, 두개의 ETS 구성원, FLI1 및 ERG 사이의 상동성에 기반하여, YK-4-279가 ERG에 직접적으로 결합하고 이의 전사 활성을 억제한다(Rahim S, Beauchamp EM, Kong Y, Brown ML, Toretsky JA, Uren A. YK-4-279 inhibits ERG and ETV1 mediated prostate cancer cell invasion. PloS one. 2011;6:e19343). 폐암 세포에서 ERG 기능의 억제는 ZEB 단백질에 의해 매개된 EMT를 반전시킬 수 있으며 전이 성장의 억제 및 화학치료 약물에 대한 증가된 감도를 유발할 수 있다.

[0324] YK-4-279는 ERG와 결합한다

[0325] EWS-FLI1에 직접적으로 결합하는 소분자인 YK-4-279는 유잉 육종 세포의 성장을 억제한다(Erkizan HV, Kong Y, Merchant M, Schlottmann S, Barber-Rotenberg JS, Yuan L, et al. A small molecule blocking oncogenic protein EWS-FLI1 interaction with RNA helicase A inhibits growth of Ewing's sarcoma. Nature medicine. 2009;15:750-6). EWS-FLI1은 염색체 전좌의 생성물이다. FLI1은 보존된 DNA 결합 도메인을 갖는 ETS 계열 전사 인자이다. 또다른 ETS 계열 구성원, ERG와 FLI1의 정렬시 아미노산 서열은 상당한 유사성을 나타낸다(63.5% 동일성, 80.2% 상동성). 시판중인 재조합 ERG 단백질(Origene, Rockville, MD)을 수득하고 리포터 부분(reporter moiety) 없이 실시간으로 분자 상호작용을 검출하는 Biacore T-100에서 YK-4-279의 직접 결합 친화도를 측정하였다(도 15). 재조합 단백질은 Biacore 마이크로칩에 고정되고 다양한 YK-4-279 농도의 존재 하에 결합을 측정하였다. 우리는 YK-4-279가 11.7 μ M의 정상 상태 KD로 ERG에 결합하는 것을 검출하였다. 도 15는 YK-4-279가 ERG 단백질과 직접적으로 상호작용함을 나타낸다. 정제된 재조합 ERG는 Biacore CM5 마이크로칩 상에 고정되고,

8가지 다양한 YK-4-279 농도(0.1-50 μ M)에 대한 직접적 결합을 SPR로 판단하였다. 정상 상태 KD는 Biaevaluation 소프트웨어를 이용하여 계산하였다.

[0326] YK-4279는 ERG의 전사 활성을 억제한다. ETS 단백질은 많은 경우 종양의 성장에 기여하는 다양한 생화학적 공정에 참여하는 단백질을 암호화하는 표적 유전자의 발현을 조절한다(Hollenhorst PC, McIntosh LP, Graves BJ. Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. Annual review of biochemistry. 2011;80:437-71). ERG의 전사 활성에 대한 YK-4-279의 효과는 프로모터 리포터 분석 및 내인성 유전자 발현 프로파일링을 이용하여 실험하였다. YK-4-279는 COS7 세포에서 루시페라제 발현을 조절하는 ETS 표적 유전자 프로모터(Id2)의 ERG 활성화를 억제하였다(도 16a). VCaP 전립선 암 세포는 TMPRSS2/ERG 융합 유전자를 가지며, 이 때 ERG는 PLAU, ADAM19 및 PLAT와 같은 특정 내인성 표적 유전자의 발현을 유도한다. 실시간(RT)-PCR 분석은 YK-4-279가 이들의 발현을 상당히 억제하였으나 ERG 발현은 억제하지 않음을 나타내었다(도 16b). 이러한 발견은 ERG 및 PLAU에 대한 단백질 수준으로 확장되었다. YK-4-279에 의한 억제는 세포를 ERG siRNA로 처리하였을 때 발견된 억제와 대등하였다(도 16b)(Rahim S, Beauchamp EM, Kong Y, Brown ML, Toretsky JA, Uren A. YK-4-279 inhibits ERG and ETV1 mediated prostate cancer cell invasion. PloS one. 2011;6:e19343). 상피 세포가 FLI1을 발현시키지 않기 때문에, YK-4-279의 효과는 ERG의 억제에 의한 것이다. 이는 YK-4-279가 단순히 전사 및 번역의 일반적 저해제가 아니고(ERG mRNA 및 단백질 수치가 변하지 않았다), 이는 구체적으로 ETS 계열 단백질의 전사적 활성을 억제하는 추가적인 증거를 제공한다.

[0327] ERG는 NSCLC 세포주에서 발현되고 EMT 마커를 유도한다

[0328] 상당한 ERG 발현이 인간 종양 시료에서 발견되는 것과 유사하게 존재하는지를 확인하기 위하여 5개의 NSCLC 세포주를 조사하였다. A549, H1944, H358, H1395, 및 H596 세포 용해물의 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다(도 17). 5개의 세포주 중 4개가 높은 수치의 ERG 단백질을 발현시켰다. ERG를 매우 조금 발현시킨 H358 세포주는 우리 연구에서 음성 대조군으로서 사용될 수 있을 것이다.

[0329] 다른 종양 유형에 있어서 초기 연구는 ERG가 EMT를 유도할 수 있음을 제시하였다. 실험을 위하여, 만일 NSCLC 세포 내에서 동일한 효과가 존재한다면, ERG 발현 백터를 상대적으로 매우 낮은 수치의 내인성 ERG 단백질을 갖는 H358 세포로 형질전환시켰다(도 18a). H358 세포가 높은 수치의 ERG 단백질을 발현시킨 경우, 우리는 2개의 EMT 마커, ZEB1 및 Foxc2의 발현에 있어 상당한 증가를 관찰하였으며(도 18b), 이는 ERG가 NSCLC 세포에서 EMT를 유도할 수 있음을 제시한다.

[0330] 도 18a 및 18b는 ERG 발현이 EMT 마커를 유도함을 나타낸다. H358 NSCLC 세포는 인간 ERG 단백질을 암호화하기 위한 cDNA로 형질전환되었다. 증가된 ERG 발현은 웨스턴 블롯팅으로 검출하였다(도 18a). 실시간 PCR 분석은 ERG 발현 세포에서 ZEB1 및 FOXC2의 높은 발현을 나타내었다(도 18b). 데이터는 먼저 18S RNA에 대하여 표준화된 후, 빈(empty) 백터로 형질감염된 세포에 비하여 배(fold) 유도로서 표시하였다.

[0331] YK-4-279는 ERG 의존적 EMT 마커의 발현을 억제한다

[0332] A549 세포는 상대적으로 높은 수치의 ERG 단백질을 발현시킨다(도 17). 우리는 실시간 정량적 PCR을 통해 이들 세포에서 EMT 마커 유전자 발현을 평가하였다(도 19). EMT 유도제로 알려진 TGF- β 는, A549 세포의 처리 결과 ZEB1 및 FOXC2 발현을 증가시켰다. 비형질감염된 A549 세포가 ERG 저해제, YK-4-279로 처리된 경우, 우리는 ZEB1 및 FOXC2 발현이 모두 억제되는 정 반대의 결과를 발견하였다.

[0333] 본원에 제시된 예비 데이터는 YK-4-279가 ERG 단백질에 직접적으로 결합하고 전사 인자로서 이의 기능을 억제함을 확인한다. 또한, 우리는 ERG가 NSCLC 세포에서 EMT 마커를 유도할 수 있으며 이 효과는 YK-4-279에 의해 반전될 수 있음을 증명하였다.

[0334] 이 섹션에서 요약된 실험은 ERG가 유도(EMT)에 의한 NSCLC의 발병에 기여할 수 있으며, ERG가 폐암 치료에 대한 표적이 될 수 있다는 가설을 실험하였다. 우리는 ERG가 새로운 치료적 접근으로서 YK-4-279에 의해 성공적으로 억제될 수 있음을 확립한다.

[0335] 폐암 세포에서 EMT 매개시 ERG의 역할

[0336] 우리는 폐암 세포주에서 특히 EMT에 관한 ERG 발현 수치의 조절 효과를 평가한다. 비소세포성 폐암으로부터 유래된 H358 세포주는 상대적으로 낮은 수치의 내인성 ERG 단백질을 발현시킨다(도 17). 우리는 이들 세포에서 ERG 수치를 증가시키기 위한 ERG-발현 백터를 도입한다. 다른 폐암 세포주(A549, H1944, H1395, 및 H596)는 매우 높은 수치의 내인성 ERG를 발현시킨다. 우리는 이들 세포에서 이의 발현 수치를 감소시키기 위해 ERG로 표적된

RNA 간섭 기술(shRNA 또는 siRNA)을 사용한다. 각 경우에, EMT에 대한 효과는 mRNAs의 발현 수치 및 하기와 같은 EMT에 대한 특정 마커로서 작용하는 이들의 동족(cognate) 단백질을 판단함으로써 평가된다: E-카드헤린(E-cadherin), 비멘틴(vimentin), 스네일(Snail), 슬러그(Slug), 및 ZEB1. ERG를 과발현하는 H358 세포에서 높아진 EMT 발현 프로파일 또는 ERG 발현이 RNA 간섭에 의해 억제된 세포(A549, H1944, H1395, 및 H596)에서 감소된 EMT 발현 프로파일이 관찰되고, 우리는 이들 연구를 ZEB1 및 ZEB 2 siRNA의 효과를 판단함으로써 확장한다. ZEB1 및 ZEB2 발현이 억제될 때 EMT에 대한 ETG의 효과가 감소된다면, ZEB1 및 ZEB2를 통해 EMT 기능을 매개한다는 가설이 뒷받침된다.

[0337] 우리는 5개의 NSCLC 세포주 상에서 통상적 화학치료제, 시스플라틴(cisplatin), 파클리탁셀(paclitaxel), 젬시타빈(gemcitabine), 에토포시드(etoposide), 및 빈블라스틴(vinblastine)의 IC50 값을 판단한다. 세포 생존률은 전기 임피던스 및 WST 분석에 의해 판단된다. 일단 기준 IC50 값이 설정되면, 우리는 변경된 EGR 발현으로 실험을 반복한다. ERG 발현은 A549, H1944, H1395, 및 H596 세포에서 shRNA로 제한된다. 만일 안정한 shRNA 발현 및 감소된 ERG 단백질 발현이 달성될 수 없다면, 우리는 siRNA 표적 ERG의 일시적인 형질주입과 함께 실험을 수행할 것이다. NSCLC 세포주에서 ERG 발현을 감소시키는 것은 IC50 곡선이 상당히 왼쪽으로 이동할 것으로 예상되며 이로써 세포는 더욱 이들 화학치료제에 대해 민감해진다. 이들 실험을 보완하기 위하여 우리는 포유류 발현 벡터로부터 높은 수치의 ERG 단백질을 발현하는 안정한 H358 세포주를 확인하였다. 이 세포주에서 우리는 IC50 곡선이 상당히 오른쪽으로 이동하는 것을 보며 이로써 세포는 화학치료에 더욱 내성이 생긴다.

[0338] 비경구 투여될 수 있는 YK-4-279의 새로운 제제를 제조하고 폐암 세포의 증식 및 악성 특성에 미치는 YK-4-279의 효과를 판단한다.

[0339] 선도 부형제는 β -히드록시프로필 시클로덱스트린(β -HPCD)이며, β -HPCD는 임상적으로 가능한 비히클이다. 상단의 7개의 제제는 HP β CD의 속도와 비교된다. CD-1은 IP(복강 내; intraperitoneal) 주입되고 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240 및 480분에 확인하였다. 24시간 시점에서도 지연된 간극(delayed clearance)을 확인하였다. IV(정맥 내; intravenous) 주입한 일련의 CD-1 마우스는 0, 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240의 시점에서 흡수 수치를 측정하는데 사용되었다. 혈장을 분석하고 약물동력학적 파라미터를 계산하였다. 이들 연구의 목적은 흡수 및 반감기의 비교를 통해 HP β CD에 우수한 제제가 있는지 여부를 결정하는 것이다. 만일 제제가 IP 흡수하고 24시간 동안 3 μ M 이상의 혈장 수치를 유지할 수 있다면, 우리는 상당한 개선을 고려한다. 이는 우리가 지속적인 주입 치료와 비교하여 일일 투여량을 평가할 수 있도록 한다. 지속적 IV보다는 일일 투여량의 사용이 미래의 동물 및 임상적 연구에 있어 더욱 바람직하다.

[0340] 우리는 YK-4-279로 처리함으로써 ERG 기능을 억제한다. EMT 마커의 변화는 YK-4-279 처리가 ERG(siRNA 또는 shRNA)의 부족과 같은 동일한 EMT 마커 발현 프로파일의 결과를 가져오는지를 확인하기 위해 전술한 바와 같이 판단한다. 하기 실험의 목적은 EMT가 변경될 때 기능적 결과에 미치는 영향을 평가하는 것이다. 이 목적을 위하여, 우리는 하기와 같은 악성 표현형의 대리(surrogate) 마커를 평가한다: 세포 운동성, 주화성, 내피 세포 단층의 침윤, 플라스틱상에서의 성장, 부드러운 한천에서의 성장, 및 이중이식과 같은 생체 내 성장. 병렬 실험에서, 세포를 YK-4-279 및 시스플라틴(cisplatin), 파클리탁셀(paclitaxel), 젬시타빈(gemcitabine), 에토포시드(etoposide), 및 빈블라스틴(vinblastine)을 포함하는 NSCLC에 대한 다양한 농도의 다른 화학치료제로 처리한다. 우리는 이들 약물 조합에서 YK-4-279에 의해 유도된 시너지 저해 효과를 관찰한다. ERG 발현을 억제하는 것은 ZEB1/2를 통해 EMT를 감소시킨다는 가설을 뒷받침하기 위하여, 우리는 적용된 ZEB1/2의 과발현이 세포 표현형에 미치는 YK-4-279의 영향을 반전시키는지 여부를 결정한다.

[0341] 우리는 NSCLC 세포 운동성 및 침윤에 미치는 YK-4-279의 효과를 실험한다. 우리는 NSCLC 세포 침윤을 억제하는 이의 능력에 대하여 xCelligence 시스템을 이용하여 YK-4-279를 실험한다. 이 새로운 방법은 다공성 막의 아래 표면 상에 금 전극 층을 갖는 고전적인 Boyden 챔버 형식으로 세포 운동성의 실시간 측정을 가능하게 한다(xCelligence sim-plates). 세포가 상부 챔버로부터 하부 챔버 내 화학유인물질(chemoattractant)에 대하여 막을 통해 이동함에 따라, 막의 표면 하에서 실시간으로 기록되는 전기 임피던스는 증가된다. 동일한 기기는 또한 내피 단층을 통한 침윤을 측정하는데 사용된다(Rahim S, Uren A. A real-time electrical impedance based technique to measure invasion of endothelial cell monolayer by cancer cells. Journal of visualized experiments : JoVE. 2011). 이 실험적 형식에 있어서, 인간 제대정맥 내피 세포(HUVEC)는 표면 상에 금 전극을 갖는 표준 세포 배양 플레이트(xCelligence E-plates)에서 성장한다. 내피 세포가 안정한 단층을 형성하면, NSCLC 세포는 상단에 첨가된다. 암 세포가 내피 세포간의 긴밀한 접합을 끊고 및 내피 단층을 관통함에 따라, 전기 임피던스가 변화된다. 이들 실험은 YK-4-279가 NSCLC 세포의 운동성, 주화성 및 침윤성 표현형을 변경하는

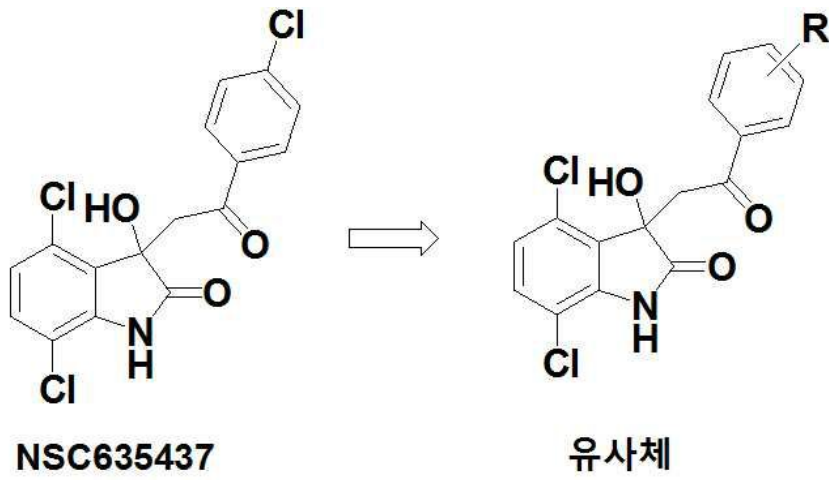
경우에 평가할 수 있도록 한다

- [0342] 우리는 YK-4-279 및 화학치료제(시스플라틴, 파클리탁셀, 젬시타빈, 에토포시드, 및 빈블라스틴)를 적정함으로 써 세포 배양시의 시너지 연구를 수행한다. 세포 사멸은 종결점으로 사용되며 임의의 잠재적인 시너지 효과는 조합 지수(combination index; CI) 아이소볼로그래프 식(isobologram equation) 방법에 의해 계산된다(Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacological reviews. 2006;58:621-81).
- [0343] 우리는 3개의 다른 인간 NSCLC 이종이식(높은 ERG 발현을 갖는 2개 및 낮은 ERG 발현을 갖는 1개)의 성장에 미치는 ERG 억제제의 효과를 실험한다. 마트릭렐(matrigel)에서 제조된 세포 현탁액을 4- 내지 6-주령의 수컷 SCID 마우스에 피하 이식한다. 속도 측정을 위한 조절에 있어서, 2군의 동물(10마리의 동물/이종이식 라인)을 YK-4-279 저해제, 및 각 이종이식 라인에 대한 제제 연구에 기반하여 단지 위약(placebo)을 투여한다. 약물 치료는 종양이 200 mm³의 크기에 도달할 때 시작한다. 종양 성장 및 체중은 일주일에 2번 측정한다. 모든 실험군은 총 종양 부피에서 35% 차이를 검출하도록 p<0.05를 갖는 83%의 전력을 갖는다. 동물이 손상되는 경우(주요 종양이 2000 mm³에 도달, 주요 종양의 궤양 생성, 또는 마우스가 고통 및 스트레스의 흔적을 나타내는 경우), 8주 또는 그 이전에 수거된다. 종양 조직의 절반은 면역조직화학 분석을 위해 파라핀에 포함되고, 나머지 절반은 분자 분석을 위해 급속 냉동한다. 우리는 NSCLC 이종이식에서 ERG 활성을 차단하는 것은 주요 종양 크기의 감소를 가져올 수 있을 것이라는 가설을 세운다.
- [0344] 본 개시내용은 도면 및 상기 설명에서 상세히 설명되고 기재되었으나, 이러한 설명 및 기재는 설명적 또는 예시적인 것으로 간주되어야 하며 한정적인 것으로 간주되어서는 안된다. 본 개시내용은 개시된 구현예들에 의해서 제한되지 않는다. 개시된 구현예들에 대한 변형은 도면, 명세서 및 첨부된 청구항의 연구로부터 청구된 발명을 실시하는데 있어 당업자에 의해 이해되고 실행될 수 있다.
- [0345] 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 포함된다. 참고문헌에 의해 포함된 출판물 및 특허 또는 특허 출원이 명세서 내에 포함된 발명과 모순되는 한도까지, 본 명세서는 그러한 모순된 물질을 대체 및/또는 우선하는 것을 의도한다.
- [0346] 다르게 정의되지 않는한, 모든 용어(기술적 및 과학적 용어를 포함하여)는 당업자에게 일반적이고 통상적인 의미로 주어지고, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한 특별한 또는 사용자 정의의 의미에 국한되는 것은 아니다. 본 발명의 특정 특성 또는 측면을 기술하는 경우에 특정 용어의 사용은 그 용어가 연관된 본 개시내용의 특정 또는 측면의 어떤 특정 특성을 포함하는 것으로 제한되기 위해 본원에서 재정의되는 것을 의미하는 것으로 간주되어서는 안된다. 특히 첨부된 청구항에서, 본 출원에 사용된 용어 및 문구와 이들의 변형은, 달리 명시하지 않는한, 제한하는 것과는 대조적으로 제약을 두지 않도록 해석되어야 한다. 상기의 예로서, 용어 '포함하는(including)'은 '제한없이 포함하는', '포함하나 제한되지 않는', 또는 이와 유사한 의미로 해석되어야 하고; 본원에 사용된 용어 '포함하는(comprising)'은 '포함하는(including)', '포함하는(containing)' 또는 '특징짓는(characterized by)'과 동의어이며, 포괄적(inclusive)이거나 또는 제약을 두지 않고(open-ended), 추가적이고 인용되지 않은 요소 또는 방법 단계를 제외하지 않으며; 용어 '가지고 있는(having)'은 '적어도 가지고 있는(having at least)'으로 해석되어야 하고; 용어 '포함한다(includes)'는 '포함하나 이에 제한되지 않는다(includes but is not limited to)'로 해석되어야 하며; 용어 '실시예(exemple)'는 논의하는 아이템의 예시적 사례를 제공하기 위하여 사용되는 것으로 이들의 완전하거나 제한된 목록은 아니고; '알려진(known)', 일반적인(normal)', '표준인(standard)'과 같은 형용사와 이와 유사한 의미의 용어는 주어진 주기(time period) 또는 주어진 시간에 가용한 아이টে를 기술하는 아이টে를 제한하는 것으로 해석되어서는 안되며, 그 대신에 현재 또는 미래의 어느 시간에 가용하거나 알려질 수 있는 알려진(known), 일반적인(normal), 또는 표준인(standard) 기술을 포함하는 것으로 해석되어야 하고; 및 '바람직하게(preferably)', '바람직한(preferred)', '원하는(desired)' 또는 '바람직한(desirable)'과 같은 용어 및 이와 유사한 단어의 사용은 어떤 특성이 중요하거나 필수적인, 또는 심지어 본 발명의 구조 또는 기능에 중요하다는 것을 의미하는 것으로 이해되어서는 안되나, 대신에 단순히 본 발명의 특정 구현예에서 사용되거나 사용되지 않을 수 있는 대체 또는 추가 특징을 강조하기 위해 의도된다. 마찬가지로, 접속사 '및'과 연결된 아이টে의 그룹은 이러한 아이টে의 각각 및 모든 것들이 그룹에서 존재한다는 것을 요구하는 것으로 이해되어서는 안되고, 오히려 명시적으로 다르게 기재되지 않는다면 '및/또는'으로서 이해되어야 한다. 유사하게, 접속사 '또는'과 연결된 아이টে의 그룹은 그 그룹사이의 상호 배타성을 필요로 하는 것으로 이해되어서는 안되고, 오히려 명시적으로 다르게 기재되지 않는다면 '및/또는'으로서 이해되어야 한다

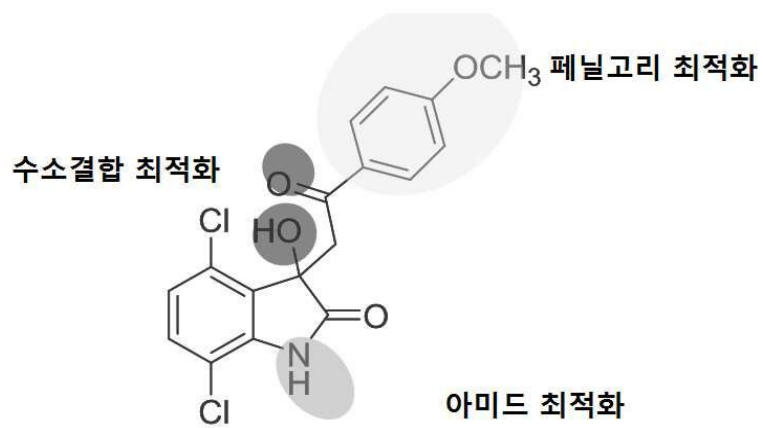
- [0347] 값(values)의 범위가 제공되는 경우에, 그것은 상한 및 하한으로 이해되고, 그 범위의 상한 및 하한 사이의 각 중간값은 구현에 내에 포함된다.
- [0348] 본원에서 실질적으로 임의의 복수 및/또는 단수 용어를 사용하는 것과 관련하여, 당업자는 문맥 및/또는 적용에 적절하게 복수로부터 단수 및/또는 단수로부터 복수로 바꿀 수 있다. 다양한 단수/복수 치환(permutations)은 명확성을 위해 본원에 기재될 수도 있다. 부정관사 "a" 또는 "an"은 복수성을 제외하지 않는다. 단일 프로세서 또는 다른 유닛은 청구항에 인용된 여러 아이템의 기능을 충족할 수 있다. 특정 방법(measures)이 서로 다른 종속항에 인용되어 있다는 단순한 사실은 이러한 방법의 조합이 유리하게 사용될 수 없다는 것을 나타내지 않는다. 청구항에서 어떠한 참조 기호도 범위를 한정하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0349] 또한 도입된 청구항 기재의 특별한 숫자가 의도된 경우, 이러한 의도는 청구항 내에 명시적으로 기재될 것이고, 이러한 기재가 없다면 그와 같은 의도가 없는 것으로 당업자는 이해할 것이다. 예를 들어, 이해에 도움을 주기 위해, 다음에 첨부된 청구항은 청구항 기재를 도입하는 "적어도 하나(at least one)" 및 "하나 이상(one or more)"의 도입 어구의 사용을 포함할 수 있다. 그러나, 이러한 어구의 사용은, 심지어 동일한 청구항이 도입 어구 "적어도 하나(at least one)" 또는 "하나 이상(one or more)" 및 "a" 또는 "an"과 같은 부정관사(예를 들어, "a" 및/또는 "an"은 전형적으로 "적어도 하나(at least one)" 또는 "하나 이상(one or more)"을 의미하는 것으로 해석되어야 한다)를 포함하는 경우라도, 부정 관사 "a" 또는 "an"에 의한 청구항 기재(recitation)의 도입(introduction)이 오직 하나의 그러한 기재를 포함하는 실시예에 대한 그러한 도입 청구항 기재를 포함하는 임의의 특정 청구항을 제한하는 것을 의미하는 것으로 이해되어서는 안되고; 같은 일이 청구항의 기재를 도입하는데 사용되는 정관사의 사용에 대해서도 적용된다. 또한, 도입된 청구항 기재의 특정한 수가 명백하게 기재되는 경우에도, 당업자는 이러한 기재가 일반적으로 적어도 기재된 수를 의미하는 것으로 해석하여야만 한다는 것을 인식할 것이다(예를 들어, 다른 수식어 없이 "두 기재(two recitations)"를 단순히 기재하는 것은 일반적으로 적어도 두 기재, 또는 둘 이상의 기재를 의미한다). 또한, "A, B, 및 C 등의 적어도 하나"와 유사한 관례가 사용되는 그러한 경우에, 일반적으로 그러한 구조는 당업자가 그 관례를 이해할 것이라는 의미로 의도된다(예를 들어, A, B, 및 C 중 적어도 하나를 갖는 시스템"은 A만, B만, C만, A와 B를 함께, A와 C를 함께, B와 C를 함께, 및/또는, A, B 및 C를 함께 가지는 시스템 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다). "A, B, 또는 C 등의 적어도 하나"와 유사한 관례가 사용되는 그러한 경우에, 일반적으로 그러한 구조는 당업자가 그 관례를 이해할 것이라는 의미로 의도된다(예를 들어, A, B, 또는 C 중 적어도 하나를 갖는 시스템"은 A만, B만, C만, A와 B를 함께, A와 C를 함께, B와 C를 함께, 및/또는, A, B 및 C를 함께 가지는 시스템 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는다). 또한, 설명, 청구항 또는 도면에서, 둘 이상의 대체 용어를 제시하는 거의 모든 이접적(disjunctive) 단어 및/또는 어구는 그 용어의 하나, 용어 중 어느 한 쪽, 또는 두 용어를 모두 포함하는 가능성을 가지는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 어구 "A또는 B"는 "A" 또는 "B" 또는 "A 및 B"의 가능성을 포함하는 것으로 이해될 것이다
- [0350] 명세서 내에 사용된 성분, 반응 조건 등의 양을 표현하는 모든 수치는 용어 "약(about)"에 의해 모든 경우에 변형되는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 반대의 지시가 없는 한, 본 명세서에 기재된 수치 파라미터는 얻고자 하는 바람직한 특성에 따라 변할 수 있는 근사치이다. 적어도, 그리고 본 출원의 우선권을 주장하는 모든 출원의 모든 청구항의 범위에 대한 균등론(doctrine of equivalents)의 적용을 제한하기 위한 시도로서가 아니라, 각각의 수치적 파라미터는 유효 숫자(significant digits) 및 통상적인 반올림 접근법(rounding approaches)의 수에 비추어 이해되어야 한다.
- [0351] 또한, 상기에서 명확성 및 이해의 목적을 위해 설명 및 실시예가 다소 상세히 기술되었음에도 불구하고, 당업자가 특정 변경 및 수정을 실시할 수 있음은 명백하다. 따라서, 설명 및 실시예는 본 발명의 범위를 특정 실시예 및 본원에 기재된 구현예에 제한하는 것으로 이해되어서는 안되고, 본 발명의 진정한 범위 및 사상을 포함하는 모든 변형 및 대안을 또한 다루는 것으로 이해되어야 한다.

도면

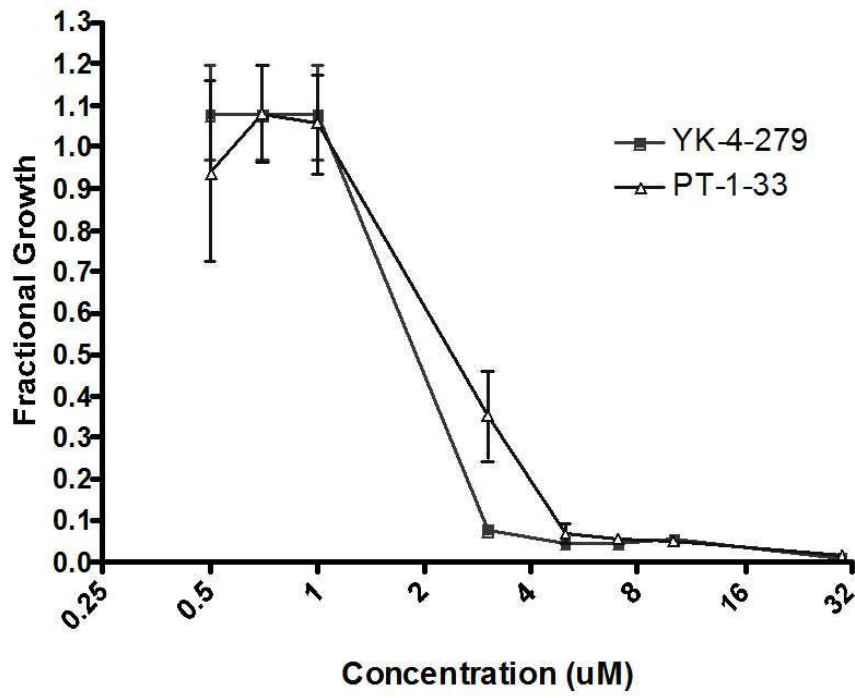
도면1



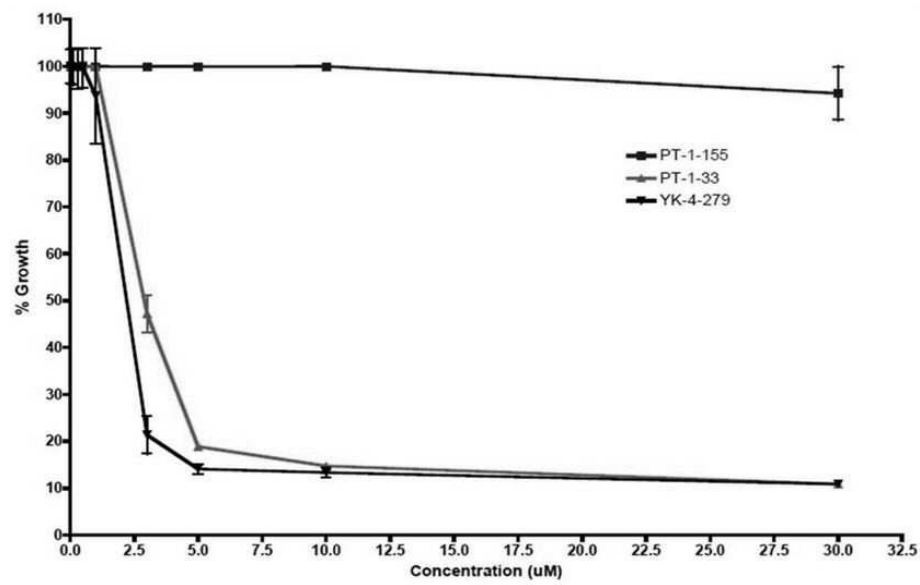
도면2



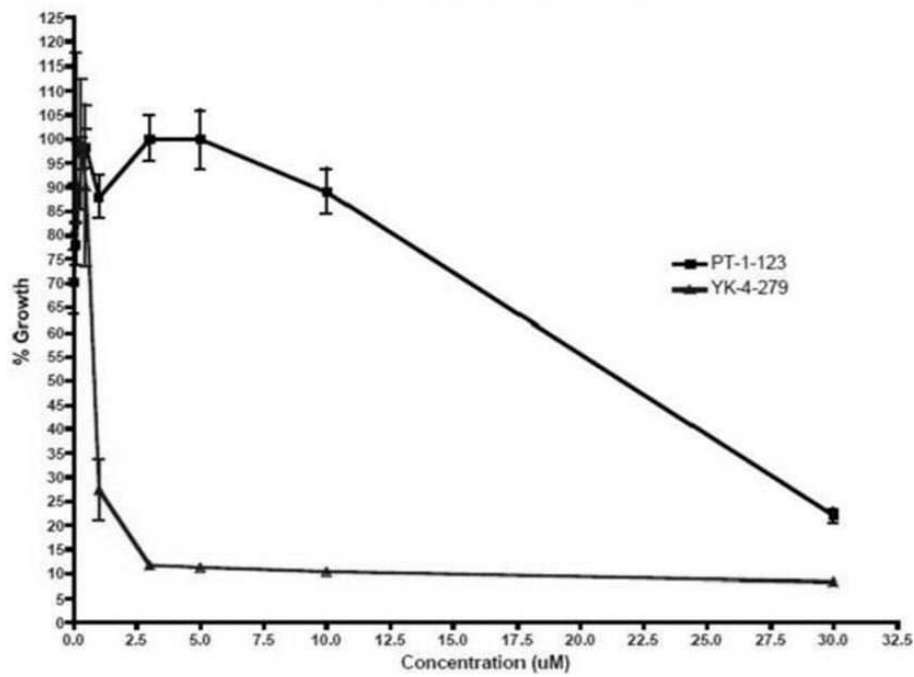
도면3a



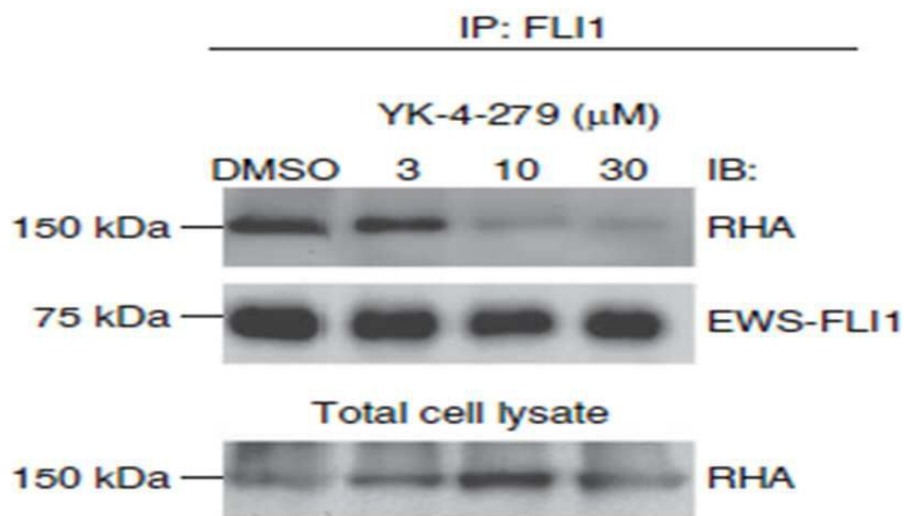
도면3b



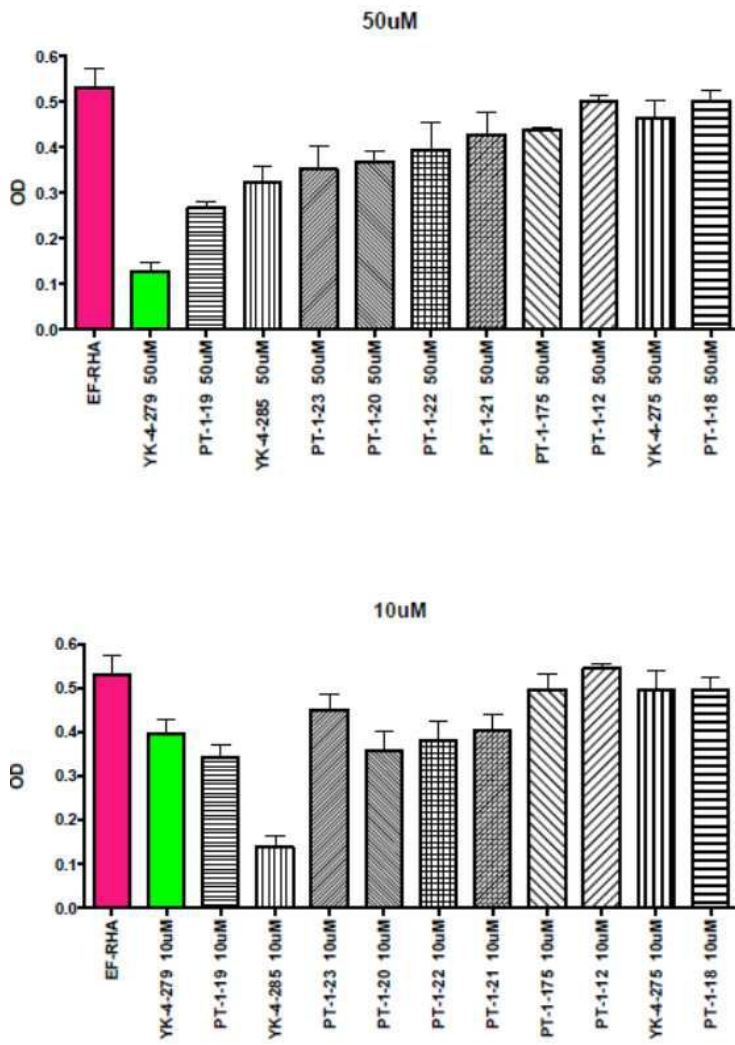
도면3c



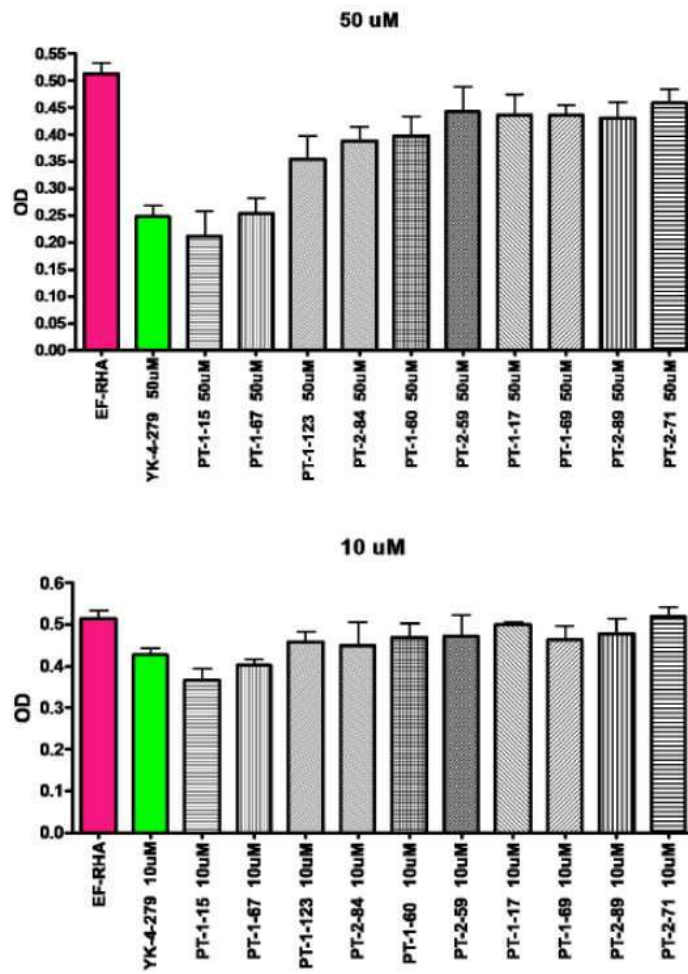
도면4



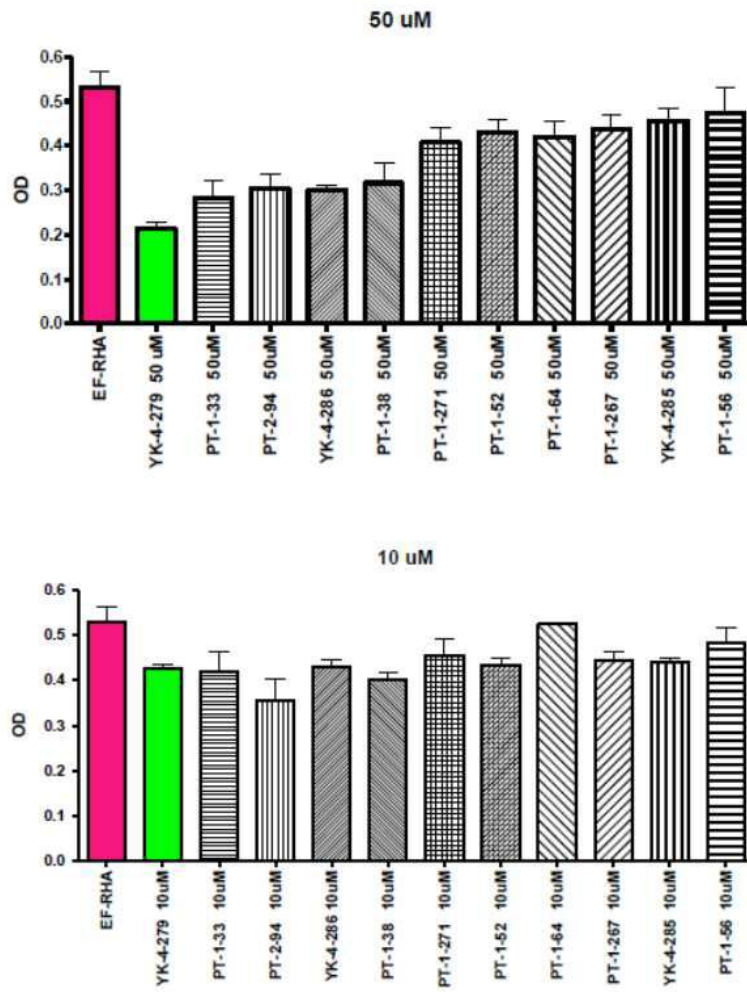
도면5a



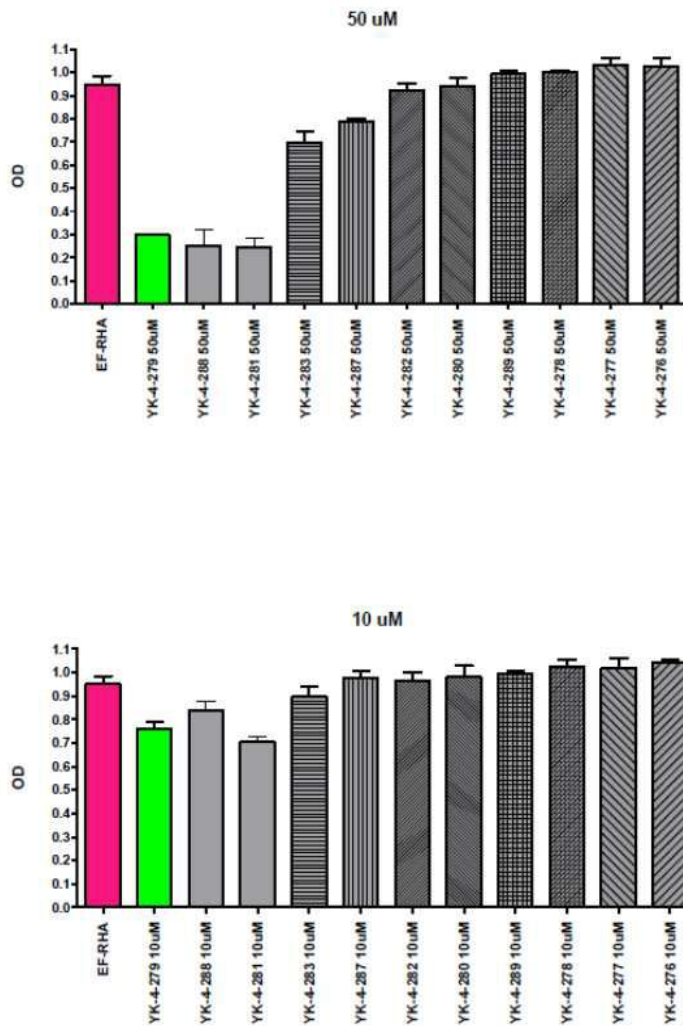
도면5b



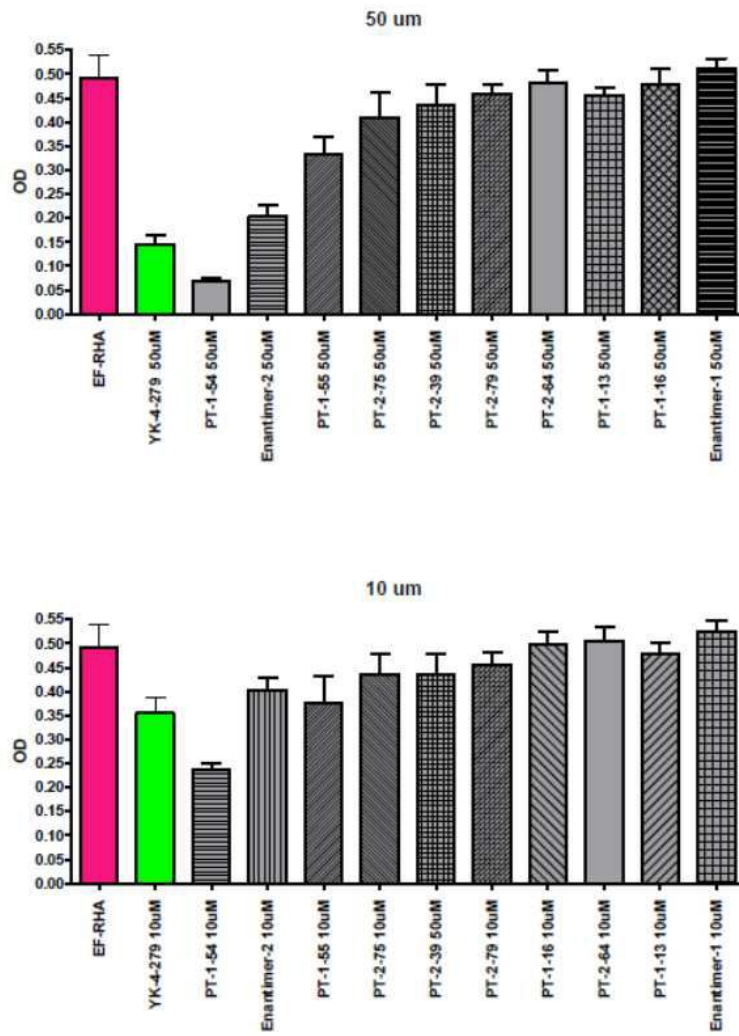
도면5c



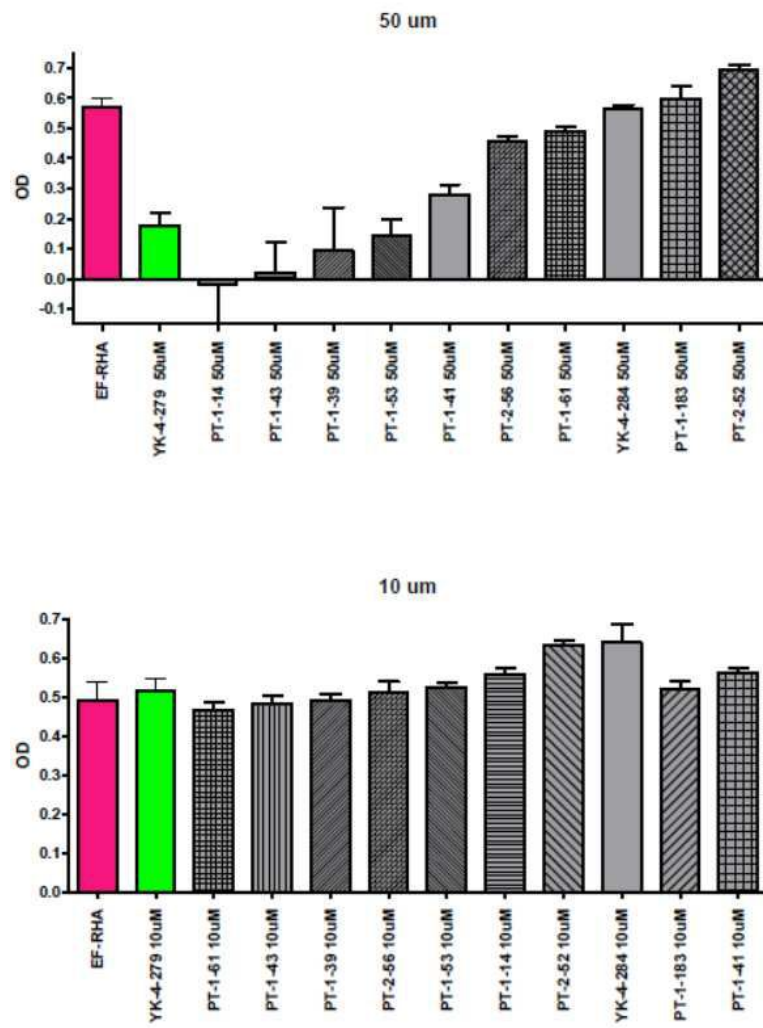
도면5d



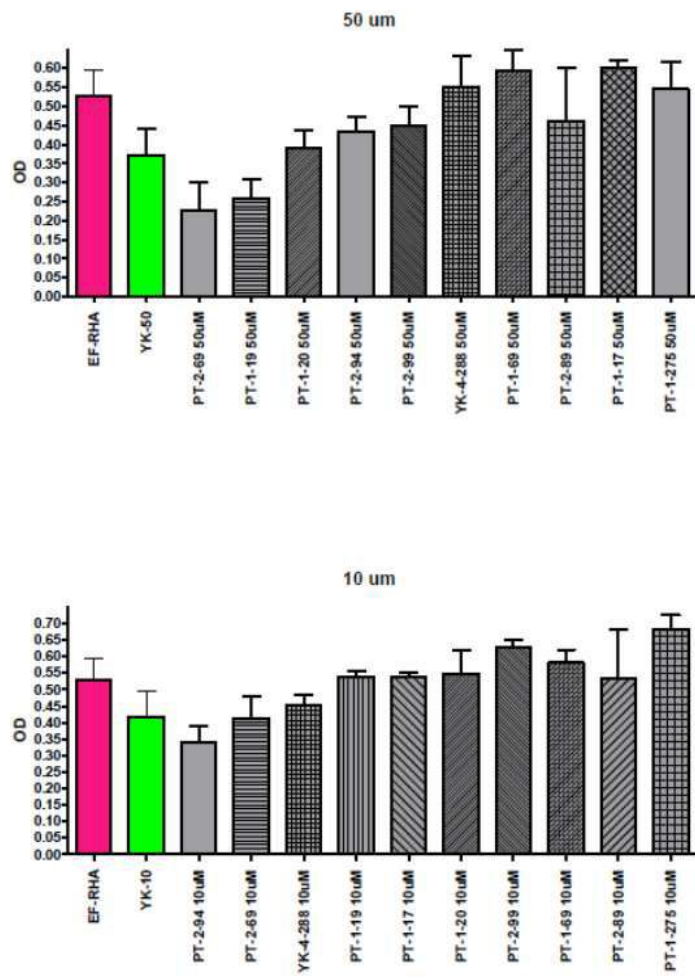
도면5e



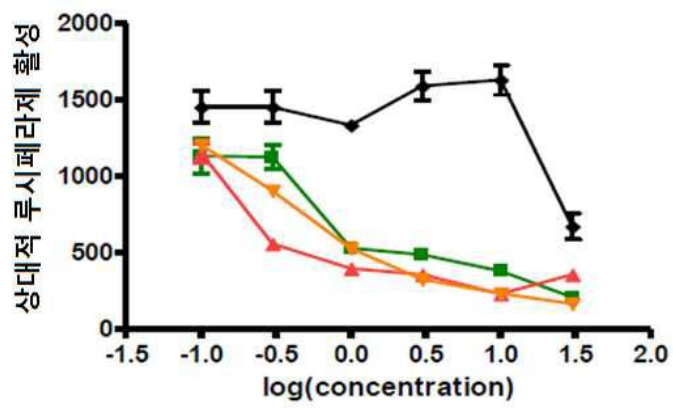
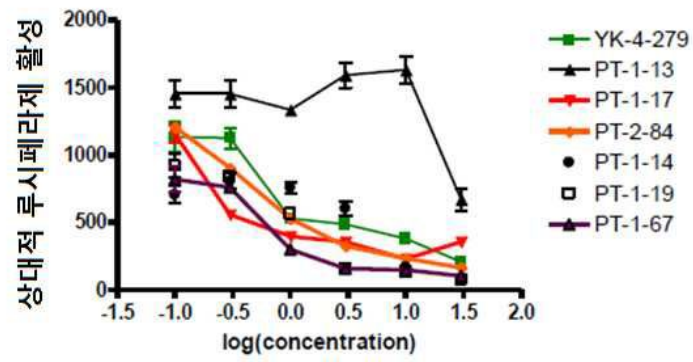
도면5f



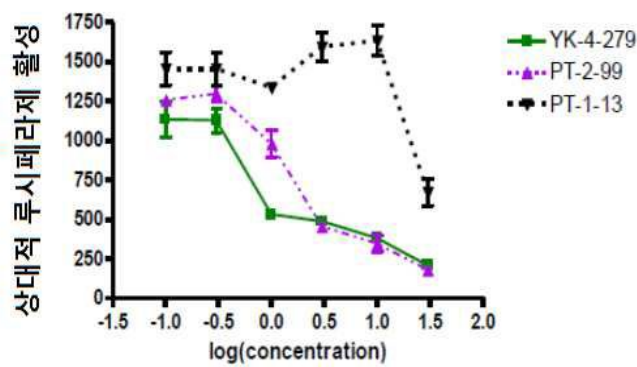
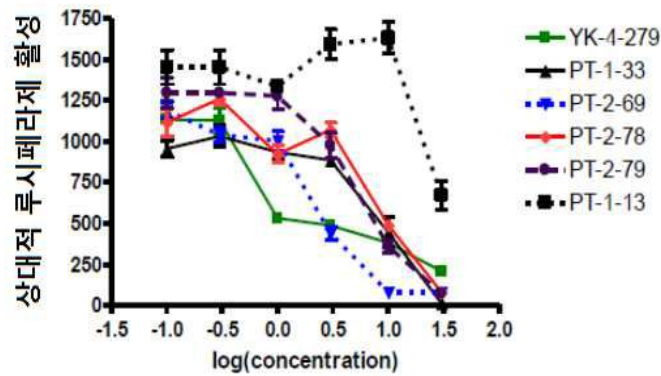
도면5g



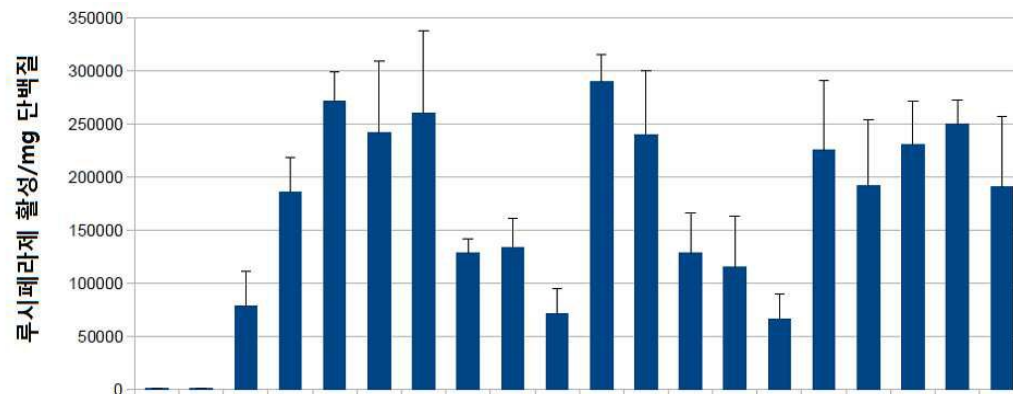
도면6a



도면6b

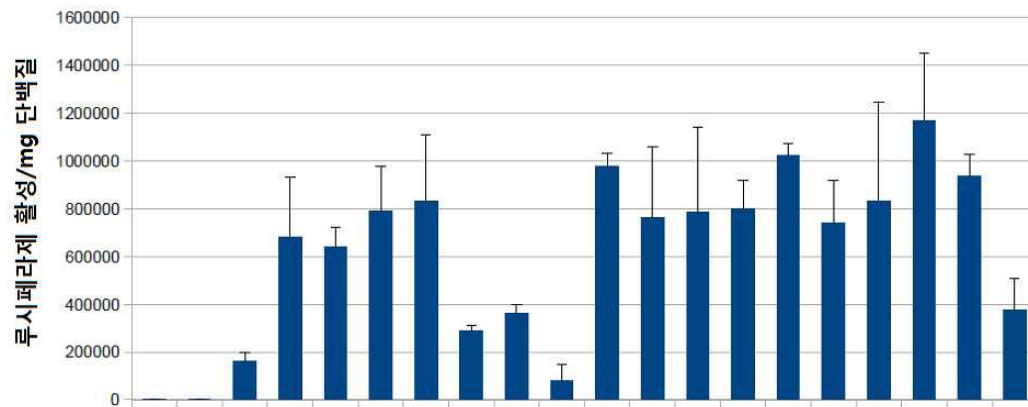


도면7a



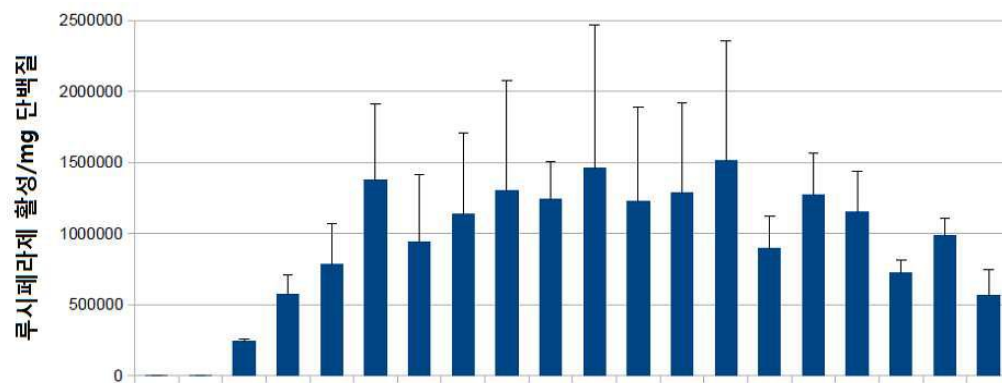
NROB1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
EWS-FLI1		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
EV			X																	
Fugene	X																			
DMSO					X															
YK-4-279						0.1	0.3	1	3	10										
PT-1-17											0.1	0.3	1	3	10					
PT-1-22																0.1	0.3	1	3	10

도면7b



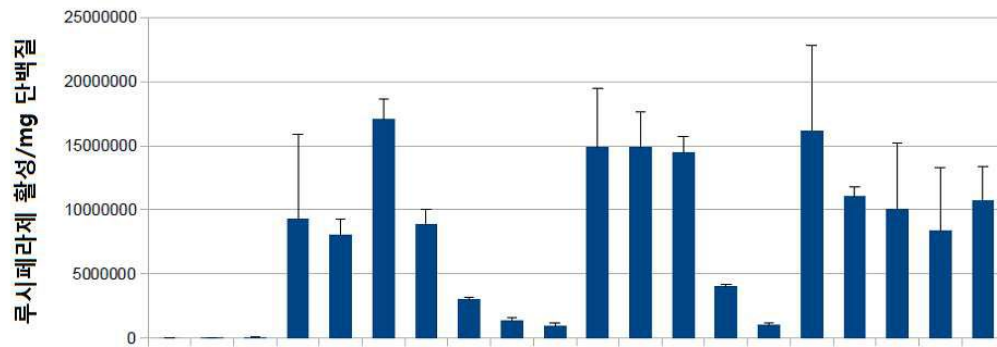
NROB1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
EWS-FLI1		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
EV			X																		
Fugene	X																				
DMSO					X																
E1						0.1	0.3	1	3	10											
PT-1-13											0.1	0.3	1	3	10						
PT-1-14																	0.1	0.3	1	3	10

도면7c



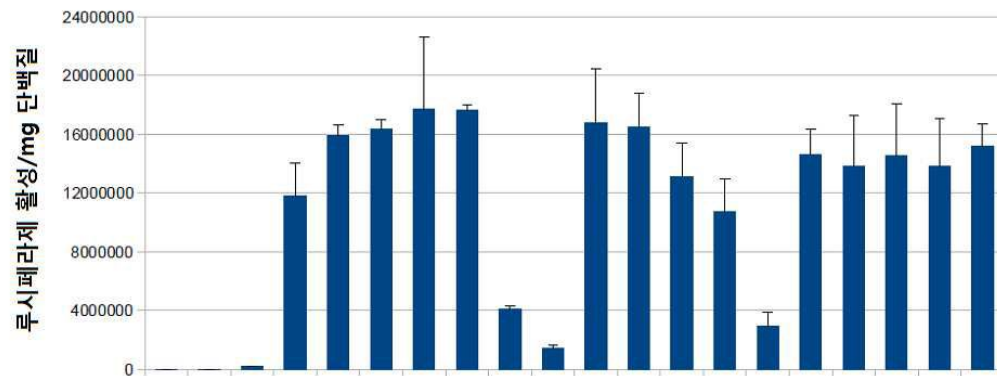
NROB1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
EWS-FLI1		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
EV			X																	
Fugene	X																			
DMSO					X															
PT-1-18						0.1	0.3	1	3	10										
PT-1-53											0.1	0.3	1	3	10					
YK-4-280																0.1	0.3	1	3	10

도면7d



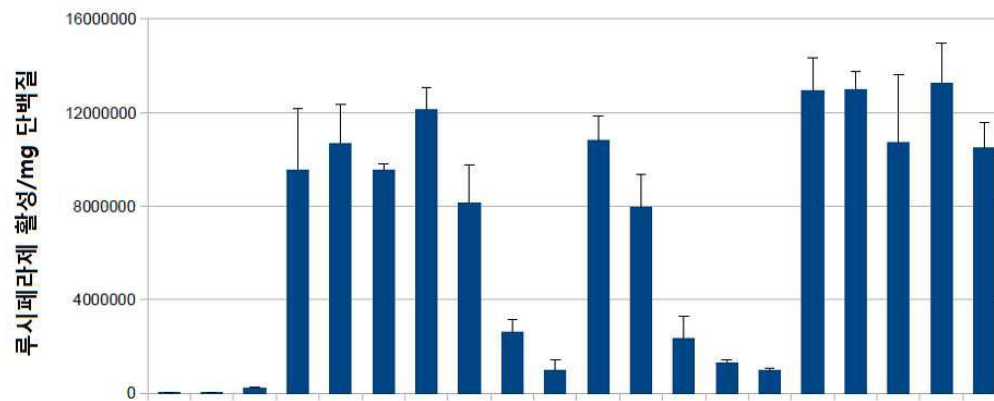
NROB1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
EWS-FLI1		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
EV			X																	
Fugene	X																			
DMSO					X															
PT-1-38						0.1	0.3	1	3	10										
PT-1-39											0.1	0.3	1	3	10					
YK-4-287																0.1	0.3	1	3	10

도면7e



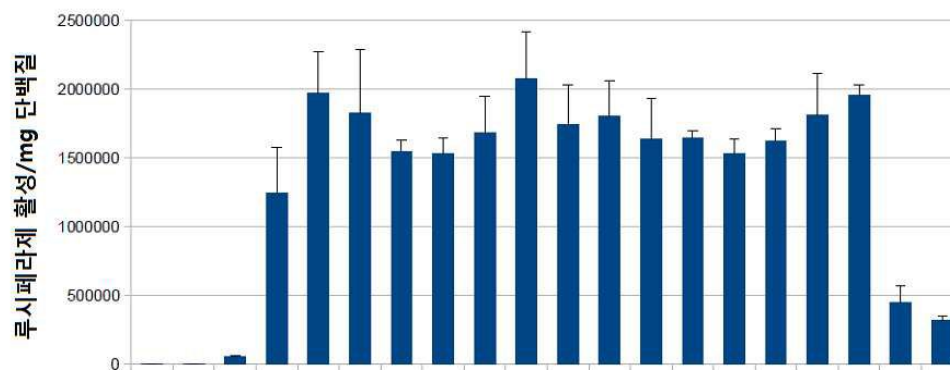
NROB1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
EWS-FLI1		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
EV			X																	
Fugene	X																			
DMSO					X															
PT-1-19						0.1	0.3	1	3	10										
PT-1-23											0.1	0.3	1	3	10					
YK-4-284																0.1	0.3	1	3	10

도면7f



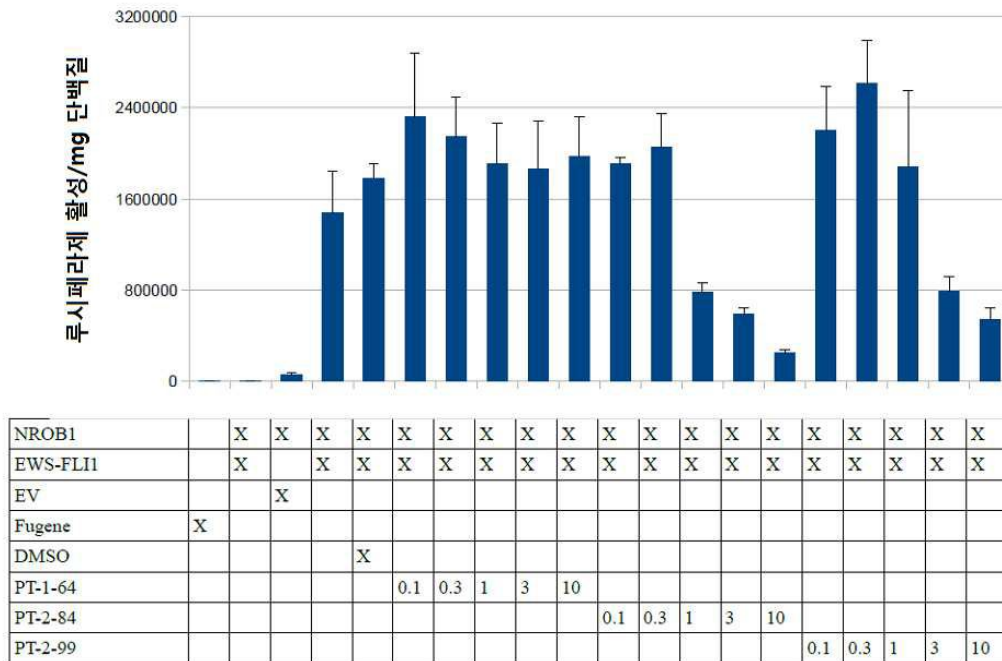
NROB1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
EWS-FLI1		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
EV			X																	
Fugene	X																			
DMSO					X															
PT-1-54						0.1	0.3	1	3	10										
PT-1-67											0.1	0.3	1	3	10					
YK-4-289																0.1	0.3	1	3	10

도면7g

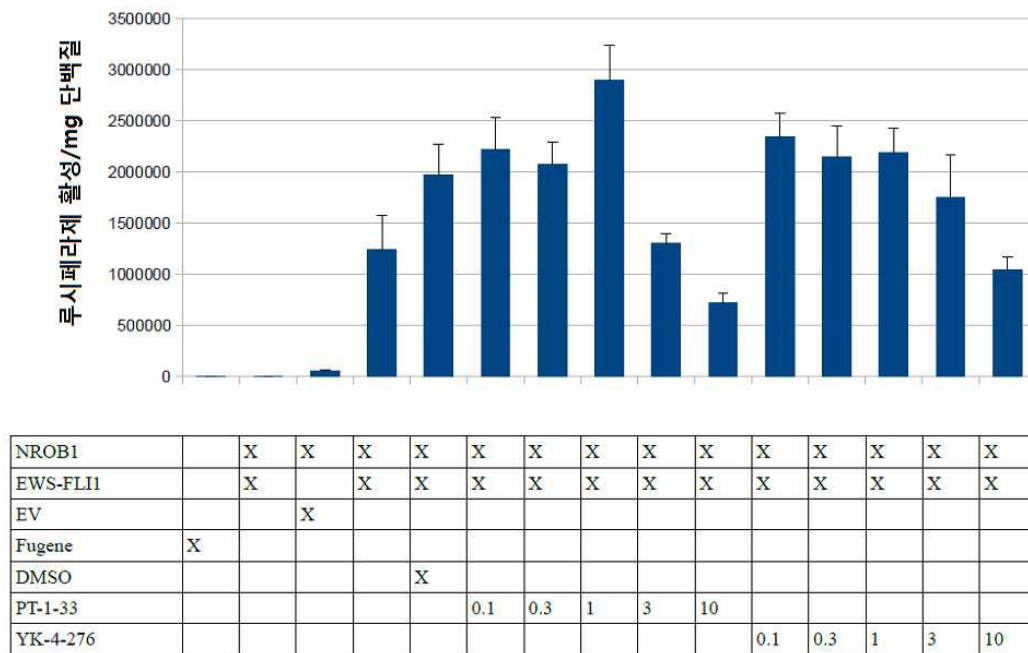


NROB1		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
EWS-FLI1		X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
EV			X																	
Fugene	X																			
DMSO					X															
PT-2-39						0.1	0.3	1	3	10										
PT-2-52											0.1	0.3	1	3	10					
PT-2-69																0.1	0.3	1	3	10

도면7h



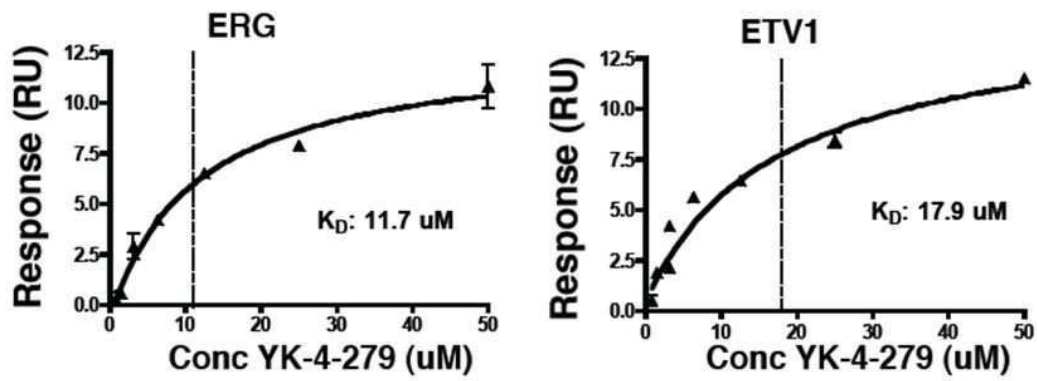
도면7i



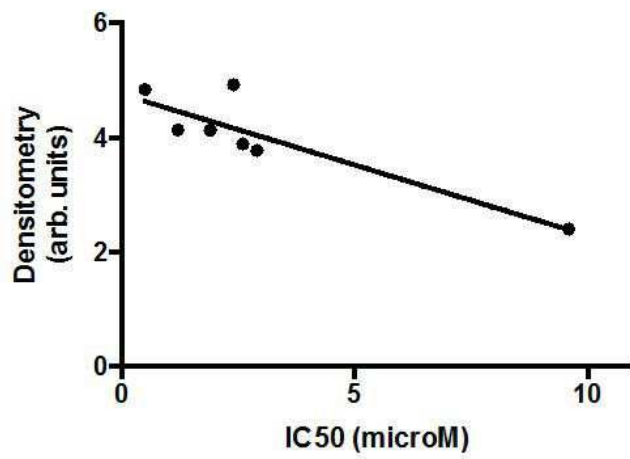
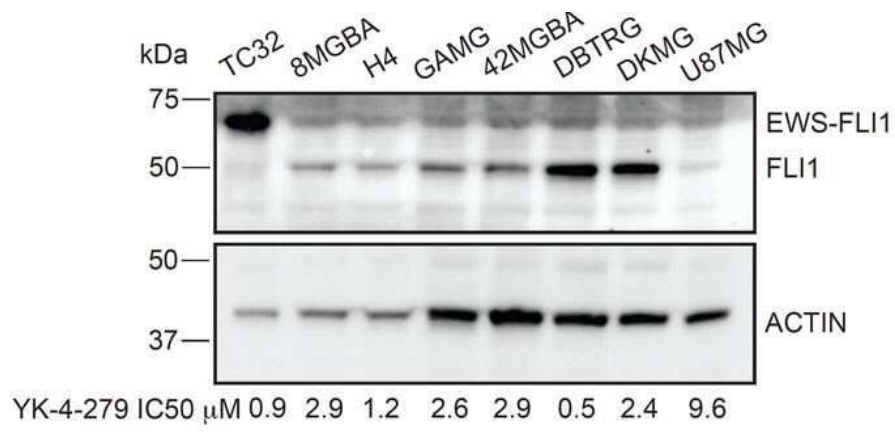
도면8



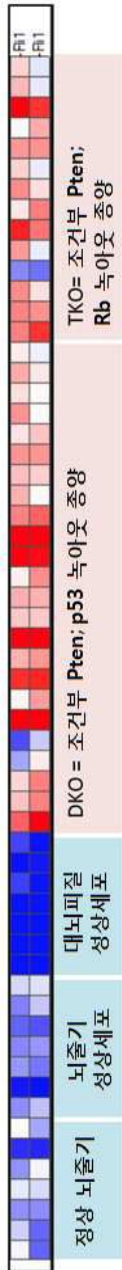
도면9



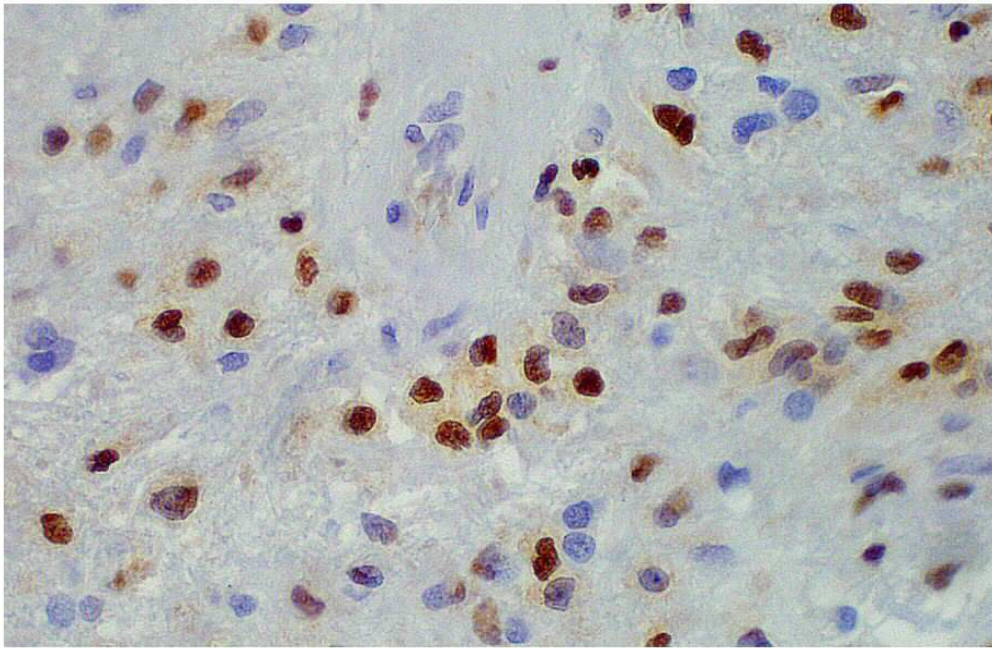
도면10



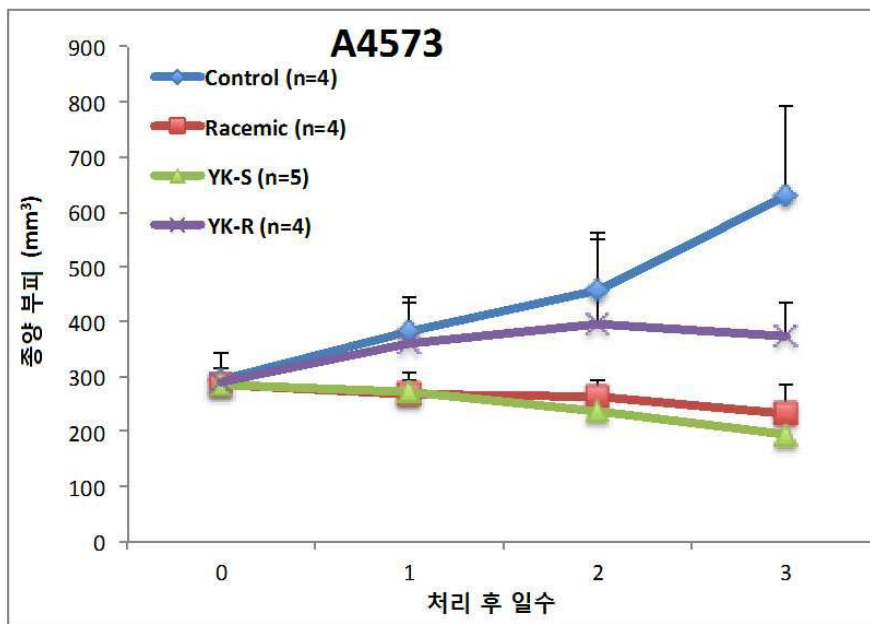
도면11



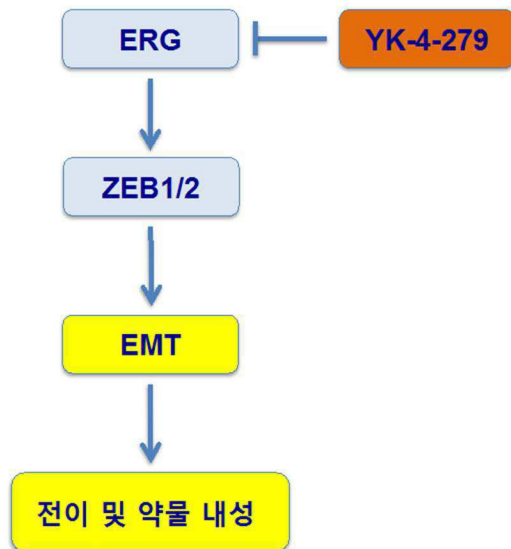
도면12



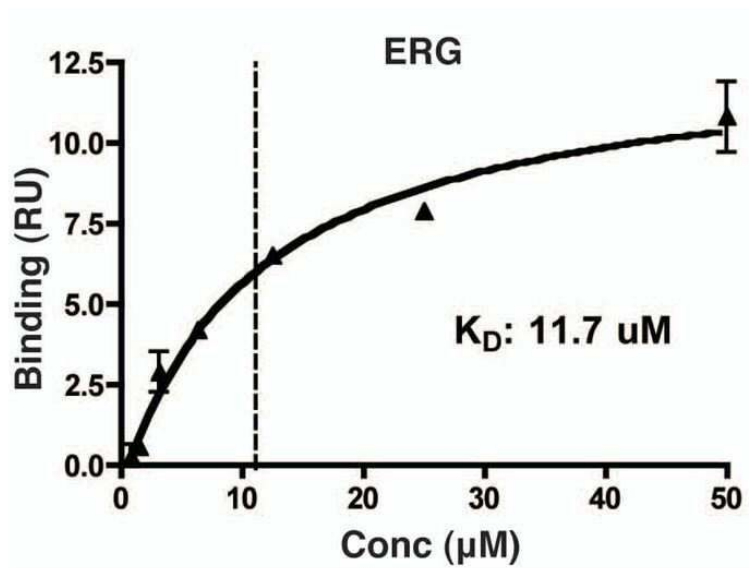
도면13



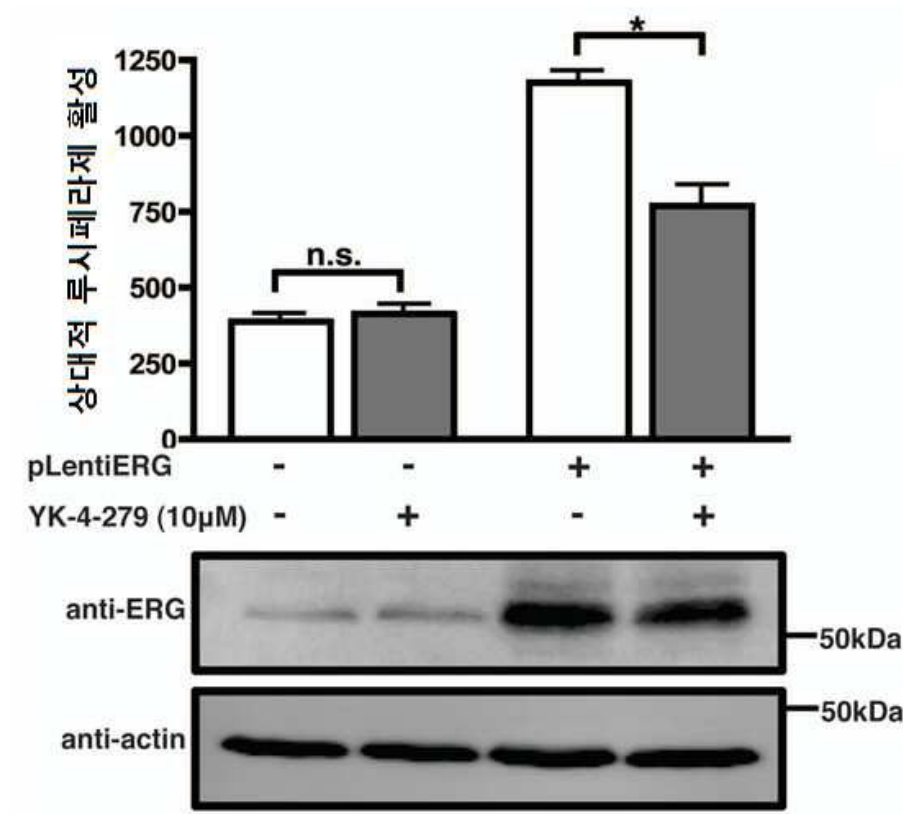
도면14



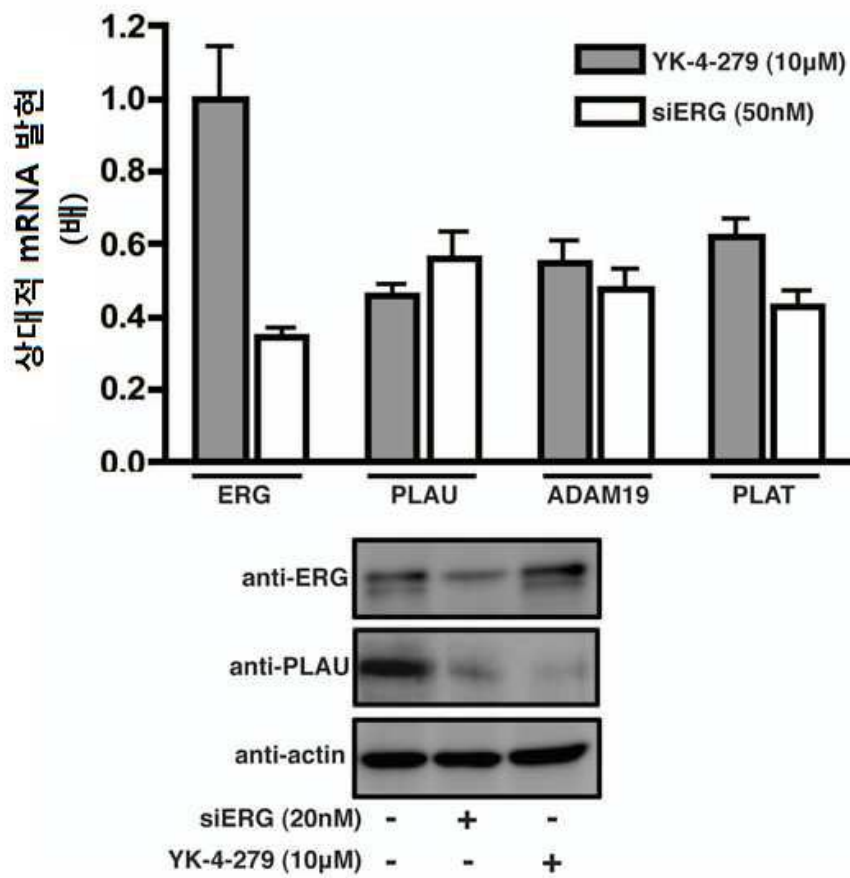
도면15



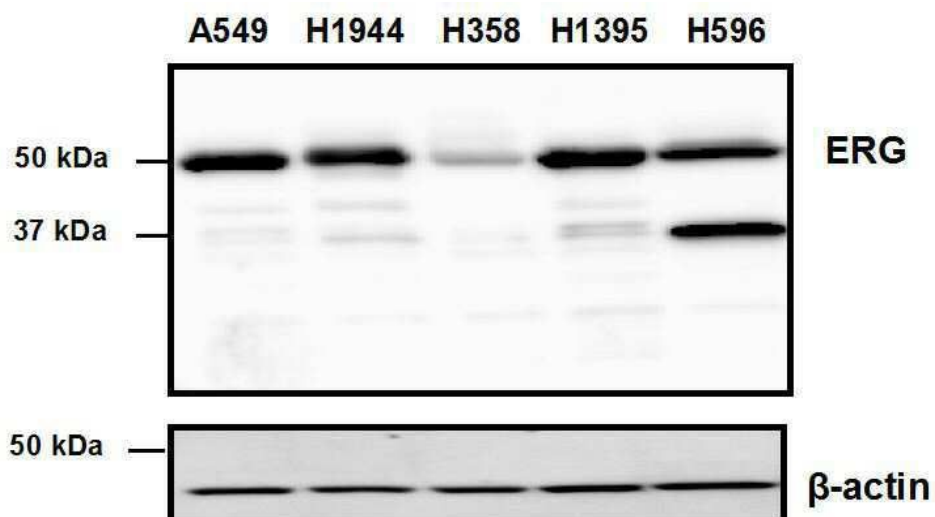
도면16



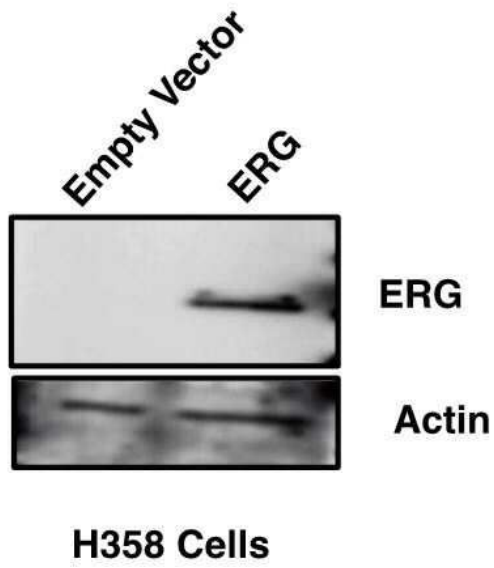
도면16b



도면17



도면18a



도면18b



도면19

