



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년02월13일
(11) 등록번호 10-2634732
(24) 등록일자 2024년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 493/22 (2006.01) A61K 31/35 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 493/22 (2013.01)
A61K 31/35 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7032300
(22) 출원일자(국제) 2018년04월03일
심사청구일자 2021년04월01일
(85) 번역문제출일자 2019년10월31일
(65) 공개번호 10-2019-0137121
(43) 공개일자 2019년12월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/025887
(87) 국제공개번호 WO 2018/187331
국제공개일자 2018년10월11일
(30) 우선권주장
62/482,030 2017년04월05일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
Francis G. Fang 등, Tetrahedron letters, 제3
3권, 페이지 1557-1560

(73) 특허권자
프레지던트 앤드 펠로우즈 오브 하바드 칼리지
미합중국, 메사추세츠 02138, 캠브리지, 퀸시스트
리트17
에자이 알앤디 매니지먼트 가부시키키가이사
일본국 도쿄도 분쿄구 코이시가와 4쵸메 6반 10교
(72) 발명자
키시, 요시토
미국 02142-1233 메사추세츠주 캠브리지 유닛
이902 캠브리지 파크웨이 75
키라, 가즈노부
일본 300-2635 츠쿠바-시 이바라키 도쿄다이
5-1-3 츠쿠바 리서치 라보라토리스 에자이 씨오.,
엘티디. 내
이토, 켄
일본 300-2635 츠쿠바-시 이바라키 도쿄다이
5-1-3 츠쿠바 리서치 라보라토리스 에자이 씨오.,
엘티디. 내
(74) 대리인
양영준, 김영

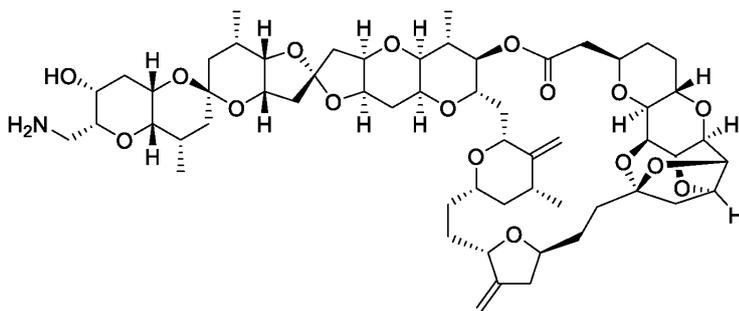
전체 청구항 수 : 총 42 항

심사관 : 홍승우

(54) 발명의 명칭 마크로시클릭 화합물 및 그의 용도

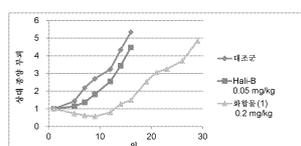
(57) 요약

본 발명은, 임의적으로 제약상 허용되는 담체 중, 중앙 혈관 재형성 효과 및/또는 항-CAF (암 연관 섬유모세포) 활성을 갖는 신규 화합물 (1) 또는 그의 제약상 허용되는 염, 및 그의 의학적 용도를 제공한다.



화합물 (1)

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/3955 (2013.01)
A61K 39/39558 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2863 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)

(30) 우선권주장

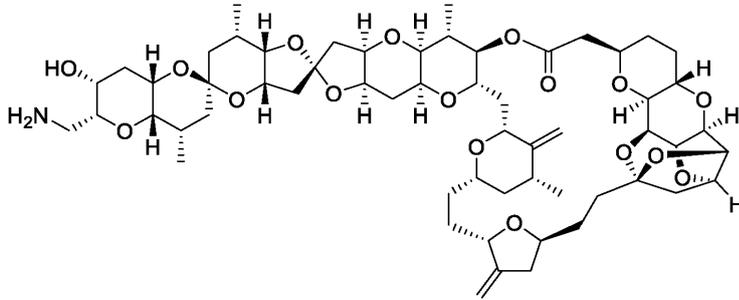
62/526,677	2017년06월29일	미국(US)
15/814,105	2017년11월15일	미국(US)
62/586,416	2017년11월15일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 구조의 화합물:



또는 그의 제약상 허용되는 염.

청구항 2

제1항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는, 대상체에서 종양 또는 암의 성장을 억제하는데 사용하거나 또는 대상체에서 종양 또는 암의 치료에 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 3

제1항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는, 대상체에서 종양 또는 암의 성장을 억제하는데 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 4

제1항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는, 대상체에서 종양 또는 암의 치료에 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 5

제1항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는, 대상체에서 혈관신생, 침습 또는 전이를 특징으로 하는 종양 또는 암의 성장을 억제하는데 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 6

제1항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는, 대상체에서 혈관신생, 침습 또는 전이를 특징으로 하는 종양 또는 암의 치료에 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 7

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 암 또는 종양이 두경부암, 유방암, 식도암, 자궁암, 난소암, 결장직장암, 자궁내막암, 위암, 소장암, 방광암 또는 육종인 제약 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 암 또는 종양이 두경부암인 제약 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 두경부암이 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN)인 제약 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 두경부암이 선양 양성 암종인 제약 조성물.

청구항 11

제7항에 있어서, 암 또는 종양이 유방암인 제약 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 유방암이 HER2-양성 유방암인 제약 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 유방암이 HER2-음성 유방암인 제약 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서, 유방암이 삼중 음성 유방암인 제약 조성물.

청구항 15

제7항에 있어서, 암 또는 종양이 결장직장암인 제약 조성물.

청구항 16

제7항에 있어서, 암 또는 종양이 식도암인 제약 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 식도암이 식도 선암종인 제약 조성물.

청구항 18

제7항에 있어서, 암 또는 종양이 자궁암인 제약 조성물.

청구항 19

제7항에 있어서, 암 또는 종양이 난소암인 제약 조성물.

청구항 20

제7항에 있어서, 암 또는 종양이 육종인 제약 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 육종이 자궁 육종, 섬유육종, 활막 육종, 연부 조직 육종 또는 혈관육종인 제약 조성물.

청구항 22

제7항에 있어서, 암 또는 종양이 위암인 제약 조성물.

청구항 23

제7항에 있어서, 암 또는 종양이 소장암인 제약 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, 소장암이 소장 선암종인 제약 조성물.

청구항 25

제7항에 있어서, 암 또는 종양이 방광암인 제약 조성물.

청구항 26

제25항에 있어서, 방광암이 요로상피암인 제약 조성물.

청구항 27

제7항에 있어서, 암 또는 종양이 자궁내막암인 제약 조성물.

청구항 28

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 프로그램화된 사멸 1 단백질 (PD-1) 항체와 조합하여 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 29

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 프로그램화된 사멸 L1 단백질 (PD-L1) 항체와 조합하여 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 30

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 항-EGFR (표피 성장 인자 수용체) 항체와 조합하여 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 항-EGFR 항체가 항-EGFR 모노클로날 항체 (mAb)인 제약 조성물.

청구항 32

제30항에 있어서, 암 또는 종양이 두경부암인 제약 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 두경부암이 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN)인 제약 조성물.

청구항 34

제31항에 있어서, 항-EGFR mAb가 세특시맵인 제약 조성물.

청구항 35

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, HER2 (인간 표피 성장 인자 수용체) 항체와 조합하여 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, HER2 항체가 HER2 mAb인 제약 조성물.

청구항 37

제35항에 있어서, 암 또는 종양이 유방암인 제약 조성물.

청구항 38

제36항에 있어서, HER2 mAb가 트라스투주맵인 제약 조성물.

청구항 39

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 방사선 요법과 조합하여 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 40

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 수술과 조합하여 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 41

제1항의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는, 대상체에서 HER2-음성 유방암 또는 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN)을 치료하는데 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 42

제2항 내지 제6항 및 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 제약 조성물.

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

- 청구항 57
- 삭제
- 청구항 58
- 삭제
- 청구항 59
- 삭제
- 청구항 60
- 삭제
- 청구항 61
- 삭제
- 청구항 62
- 삭제
- 청구항 63
- 삭제
- 청구항 64
- 삭제
- 청구항 65
- 삭제
- 청구항 66
- 삭제
- 청구항 67
- 삭제
- 청구항 68
- 삭제
- 청구항 69
- 삭제
- 청구항 70
- 삭제
- 청구항 71
- 삭제
- 청구항 72
- 삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에 2017년 4월 5일에 출원된 미국 특허 가출원 U.S.S.N. 62/482,030, 2017년 6월 29일에 출원된 U.S.S.N. 62/526,677, 및 2017년 11월 15일에 출원된 U.S.S.N. 62/586,416, 및 35 U.S.C. § 120 하에 2017년 11월 15일에 출원된 미국 특허 출원 U.S.S.N. 15/814,105를 우선권 주장하며; 이들 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 중앙 혈관 재형성 효과 및 항-CAF (암 연관 섬유모세포) 활성을 갖는 신규 마크로시클릭 화합물을 제공한다. 화합물은 대상체에서 암을 치료하거나 또는 중앙 성장을 억제하기 위해 사용될 수 있다.

배경 기술

[0005] 할리콘드린, 예컨대 할리콘드린 B는 해양 해면 할리콘드리아 오카다이(*Halichondria okadai*)로부터 최초 단리되었고 (예를 들어, 문헌 [D. Uemura et al. "Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge" J. Am. Chem. Soc., 107, 4796 (1985)] 참조), 그 후 악시넬라(*Axinella*) 종, 파켈리아 카르테리(*Phakellia carteri*), 및 리손덴드릭스(*Lissondendryx*) 종에서 발견된 항암제이다. 할리콘드린 B의 전합성은 1992년에 공개되었다 (예를 들어, 문헌 [Y. Kishi et al. "Total Synthesis of Halichondrin B and Norhalichondrin B" J. Am. Chem. Soc., 114, 3162 (1992)] 참조). 할리콘드린 B는 튜블린 중합, 미세관 조립, 베타 5-튜블린 가교, 튜블린에 대한 GTP 및 빈블라스틴 결합, 및 튜블린-의존성 GTP 가수분해의 시험관내 억제를 입증한 바 있고, 시험관내 및 생체내 항암 특성을 제시한 바 있다 (예를 들어, 문헌 [Y. Hirata et al. "Halichondrins-antitumor polyether macrolides from a marine sponge" Pure Appl. Chem., 58, 701 (1986); Fodstad et al. "Comparative antitumor activities of halichondrins and vinblastine against human tumor xenografts" J. of Experimental Therapeutics & Oncology 1996; 1: 119, 125] 참조).

[0006] 할리콘드린 B를 기반으로 하여 개발된 에리볼린 메실레이트 (할라벤(Halaven)TM) (예를 들어, 국제 공개 번호 WO 1999/065894 (1999년 12월 23일 공개); 국제 공개 번호 WO 2005/118565 (2005년 12월 15일 공개); 및 문헌 [W. Zheng et al. "Macrocyclic ketone analogues of halichondrin B" Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14, 5551-5554 (2004)] 참조)는, 예를 들어, 전이성 유방암 및 진행성 지방육종의 치료를 위해 많은 국가에서 현재 임상 사용 중에 있다.

[0007] 할리콘드린이 기재되어 있는 추가의 특허 공개는 미국 특허 번호 5,436,238 (Kishi, et al., 1995년 7월 25일 허여); 미국 특허 번호 5,338,865 (Kishi, et al., 1994년 8월 16일 허여); 및 WO 2016/003975 (Kishi, et al.)를 포함하며, 이들 모두는 프레지던트 앤드 펠로우즈 오브 하버드 칼리지(President and Fellows of Harvard College)에 양도되어 있다.

[0008] 또한, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,786,492; 미국 특허 번호 8,598,373; 미국 특허 번호 9,206,194; 미국 특허 번호 9,469,651; WO/2009/124237A1; WO/1993/017690A1; WO/2012/147900A1; 미국 특허 번호 7,982,060; 미국 특허 번호 8,618,313; 미국 특허 번호 9,303,050; 미국 특허 번호 8,093,410; 미국 특허 번호 8,350,067; 미국 특허 번호 8,975,422; 미국 특허 번호 8,987,479; 미국 특허 번호 8,203,010; 미국 특허 번호 8,445,701; 미국 특허 번호 8,884,031; 미국 특허 번호 RE45,324; 미국 특허 번호 8,927,597; 미국 특허 번호 9,382,262; 미국

특허 번호 9,303,039; WO/2009/046308A1; WO/2006/076100A3; WO/2006/076100A2; WO/2015/085193A1; WO/2016/176560A1; 미국 특허 번호 9,278,979; 미국 특허 번호 9,029,573; WO/2011/094339A1; WO/2016/179607A1; WO/2009/064029A1; WO/2013/142999A1; WO/2015/066729A1; WO/2016/038624A1; 및 WO/2015/000070A1을 참조한다.

[0009] 다양한 고형 종양에서 광범위하게 발견되는 암 연관 섬유모세포 (CAF)는 기질 세포이다. CAF가 혈관신생, 침습 및 전이에서 중요한 역할을 한다는 것은 널리 공지되어 있다. CAF의 양과, 예를 들어, 침습성 유방암 (예를 들어, 문헌 [M. Yamashita et al. "Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome" Breast Cancer 19, 170, 2012] 참조) 및 식도 선암종 (예를 들어, 문헌 [T. J. Underwood et al. "Cancer-associated fibroblasts predict poor outcome and promote periostin-dependent invasion in esophageal adenocarcinoma" Journal of Pathol., 235, 466, 2015] 참조)에서의 임상 예후 사이에 밀접한 상관관계가 있다는 것이 보고되어 있다. 또한 CAF가 다양한 종양 예컨대, 예를 들어, 유방암 (예를 들어, 문헌 [P. Farmer et al. "A stroma-related gene signature predicts resistance to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer" Nature Medicine., 15(1), 68, 2009] 참조), 및 두경부암 (예를 들어, 문헌 [S. Schmitz et al. "Cetuximab promotes epithelial to mesenchymal transition and cancer associated fibroblasts in patients with head and neck cancer" Oncotarget, 6 (33), 34288, 2015; Y. Matsuoka et al. "The tumor stromal features are associated with resistance to 5-FU-based chemoradiotherapy and a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma" APMIS 123(3), 205, 2015] 참조)에서의 저항성과 상관관계가 있다는 것이 보고된 바 있다.

[0010] 이와 같이 종양 혈관 재형성 효과 및 항-CAF 활성은 암 미세환경의 개선을 초래하며, 이로써 종양 치료를 보조하는 것으로 관찰된 바 있다. 혈관은 종양의 성장에 있어서 필수적이다. 종양 내 재구축된 혈관은, 저산소증의 완화를 달성할 뿐만 아니라, 항암제를 종양으로 전달할 수 있다. 비정상적 종양 혈관계의 에리블린-유도된 재형성이 종양 내의 저산소증의 제거로 인해 종양의 공격성을 감소시킬 수 있는 보다 기능적인 미세환경을 유도하는 것으로 보고되어 있다. 비정상적 종양 미세환경은 약물 내성 및 전이를 둘 다 증진시키기 때문에, 이들 공격적인 특징을 역전시키기 위한 에리블린의 확실한 능력은 그의 임상 이익에 기여할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Y. Funahashi et al. "Eribulin mesylate reduces tumor microenvironment abnormality by vascular remodeling in preclinical human breast cancer models" Cancer Sci. 105 (2014), 1334-1342] 참조). 종양 혈관 재형성 효과 및 항-CAF 활성을 갖는 항암 약물이 현재로서는 보고된 바 없다.

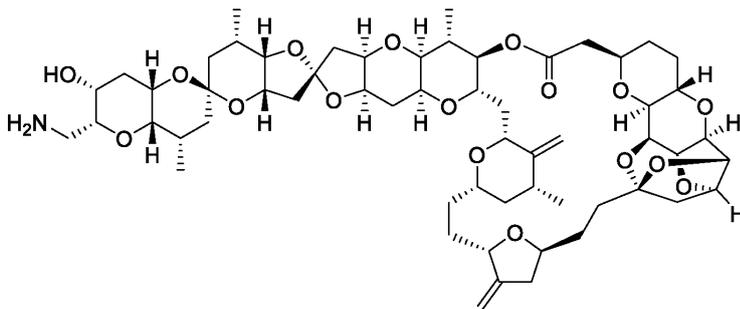
[0011] 진전이 있었음에도 불구하고, 종양 및 암의 연구 및 의료 관리의 진전을 위해 추가적인 화합물이 요구된다.

발명의 내용

[0012] 본 발명은 종양 혈관 재형성 효과 및 항-CAF 활성을 갖는 마크로시클릭 화합물 (예를 들어, 화합물 (1)), 및 그의 제약상 허용되는 염, 및 그의 동위원소 표지된 유도체, 및 그의 제약 조성물에 관한 것이다.

[0013] 본 발명은 또한 암을 치료하기 위해 화합물 (1)을 사용하는 방법, 세포에서 유사분열을 가역적으로 또는 비가역적으로 억제하기 위한 방법, 및 시험관내, 생체내, 또는 대상체에서 종양 성장을 억제하기 위한 방법을 포함한다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염, 또는 그의 제약 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.

[0014] 한 측면에서, 본 발명은 화합물 (1)인 화합물:



화합물 (1)

[0015]

- [0016] 및 그의 제약상 허용되는 염; 및 그의 동위원소 표지된 유도체를
- [0017] 를 특색으로 한다.
- [0018] 한 측면에서, 본 발명은 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 제약 조성물은 1종 이상의 제약상 허용되는 부형제 또는 담체를 포함할 수 있다. 제약 조성물은 원하는 치료 목적을 달성하기 위해 조합, 대체, 또는 다른 종류의 동기화된 요법으로 1종 이상의 추가적인 치료제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명은 또한 화합물 (1) 또는 그의 중간체를 제조하는 방법을 특색으로 한다. 합성 중간체가 또한 본 발명의 일부로서 본원에 제공된다.
- [0020] 화합물 (1)이 도면 및 실시예에서 입증된 바와 같이, 중앙 혈관 재형성에 있어서 유리한 효과를 가지며 항-CAF 활성을 갖는다는 것이 발견되었다. 따라서, 화합물 (1)은 암 (예를 들어, 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN), 유방암, 식도암, 자궁암, 난소암, 결장직장암, 자궁내막암, 위암, 소장암, 방광암, 육종, 희귀암)의 치료에서 잠재적인 용도를 갖는다.
- [0021] 또 다른 측면에서, 본 발명은 대상체, 전형적으로 인간에서, 중앙 혈관 재형성 효과 및/또는 항-CAF 활성을 갖는 화합물에 반응할 임의의 중앙 성장 또는 암을 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체로 억제하기 위한 방법을 제공한다.
- [0022] 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 조성물은 환자에게 유익한 결과를 제공하는 임의의 다른 활성제와 조합되어 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 화합물 (1)은 항체 (예를 들어, 모노클로날 항체)와 조합되어 사용된다. 한 실시양태에서, 화합물 (1)은 하기에 더욱 상세히 기재된 바와 같이, 면역요법, 예컨대 항-EGFR (표피 성장 인자 수용체) 항체, 항-HER2 (인간 표피 성장 인자 수용체) 항체, 항-PD-1 항체, 또는 항-PD-L1 항체와의 조합, 대체, 또는 다른 동기화된 요법으로 사용된다.
- [0023] 예를 들어, 항-EGFR (표피 성장 인자 수용체) 모노클로날 항체 (mAb) 요법과 조합하여, 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 조성물의 유효량을 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN)의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체, 전형적으로 인간에서 두경부의 편평 세포 암종을 치료하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 항-EGFR (표피 성장 인자 수용체) mAb는 세특시맙이다.
- [0024] 또 다른 예로서, HER2 (인간 표피 성장 인자 수용체) mAb 요법과 조합하여, 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 조성물의 유효량을 유방암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체, 전형적으로 인간에서 유방암을 치료하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, HER2 (인간 표피 성장 인자 수용체) mAb는 트라스투주맙이다. 다른 실시양태에서, 화합물 (1)은 전통적인 화학요법 예컨대 아드리아마이신, 시클로포스파미드, 탁솔 등, 또는 항에스트로겐제 예컨대 선택적 에스트로겐 조절제 (SERM), 선택적 에스트로겐 분해제 (SERD), 부분 또는 완전 에스트로겐 억제제 (예컨대 플베스트란트), 또는 CDK 4/6 억제제 예컨대 팔보시클립 (화이자(Pfizer))과 조합되어 유방암을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 측면은 투여 형태 패키지일 수 있는 키트 내에 있는, 수화물, 용매화물, 다형체의 형태로 존재할 수 있는 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 조성물을 제공한다. 본원에 기재된 키트는 단일 용량 또는 다중 용량의 화합물 또는 그의 제약 조성물을 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 제공된 치료 투여 형태의 사용에 대한 지침서 (예를 들어, 키트에 포함된 화합물 또는 제약 조성물의 사용에 대한 지침서)를 포함할 수 있다.
- [0026] 따라서, 본 발명은 적어도 하기 특색을 포함한다:
- [0027] (i) 임의적으로 수화물, 용매화물 또는 다형체의 형태로 존재할 수 있는 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체;
- [0028] (ii) 두경부암 (예를 들어, 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN), 선양 양성 암종), 유방암 (예를 들어, HER2-음성 유방암, 삼중 음성 유방암), 식도암 (예를 들어, 식도 선암종), 자궁암 (예를 들어, 자궁 육종), 난소암, 결장직장암, 육종 (예를 들어, 활막 육종, 혈관육종, 연부 조직 육종, 섬유육종, 자궁 육종), 방광암 (예를 들어, 요로상피암), 위암, 소장암 (예를 들어, 소장 선암종), 자궁내막암, 또는 희귀암을 치료하기 위한, 임의적으로 수화물, 용매화물 또는 다형체의 형태로 존재할 수 있는 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위

원소 표지된 유도체의 유효량을 대상체 예컨대 인간에게 투여하는 것을 포함하는 치료 방법;

- [0029] (iii) 의학적 장애 예컨대 혈관 재형성 효과 및/또는 항-CAF 활성에 반응하는 암 또는 종양을 치료하는데 사용하기 위한, 임의적으로 수화물, 용매화물 또는 다형체의 형태로 존재할 수 있는 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체의 유효량을 대상체 예컨대 인간에게 투여하는 것을 포함하는 치료 방법;
- [0030] (iv) 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN), 유방암, 식도암, 자궁암, 난소암, 결장직장암, 육종, 방광암, 위암, 소장암, 자궁내막암, 또는 희귀암을 치료하는데 사용하기 위한, 임의적으로 수화물, 용매화물 또는 다형체의 형태로 존재할 수 있는 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체;
- [0031] (v) 의학적 장애 예컨대 혈관 재형성 효과 및/또는 항-CAF 활성에 반응하는 암 또는 종양을 치료하는데 사용하기 위한, 임의적으로 수화물, 용매화물 또는 다형체의 형태로 존재할 수 있는 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체;
- [0032] (vi) 화합물 (1)의 중수소화 유도체;
- [0033] (vii) 장애 예컨대 혈관 재형성 효과 및/또는 항-CAF 활성에 반응하는 암 또는 종양을 치료하거나 또는 예방하기 위한 치료학적 용도로 의도된 의약을 제조하기 위한 방법으로서, 임의적으로 상기 기재된 수화물, 용매화물 또는 다형체, 또는 한 실시양태의 활성 화합물의 형태로 존재할 수 있는 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체가 제조에 사용되는 것을 특징으로 하는 방법;
- [0034] (viii) 실질적으로 순수한 형태 (예를 들어, 적어도 90 또는 95%)의 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체;
- [0035] (ix) 제약상 허용되는 담체 또는 부형제 중, 임의적으로 수화물, 용매화물 또는 다형체의 형태로 존재할 수 있는 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체의 제약상 허용되는 조성물;
- [0036] (x) 임의적으로 제약상 허용되는 담체 또는 부형제 중, 임의적으로 수화물, 용매화물 또는 다형체의 형태로 존재할 수 있는 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체의 제약상 허용되는 투여 형태;
- [0037] (xi) 혈관 재형성 효과 및/또는 항-CAF 활성 이외의 작용 메커니즘을 통해 작용함으로써 본원에 기재된 장애를 치료하기 위한, 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체; 및
- [0038] (xii) 본원에 기재된 화합물, 및 합성에서의 중간체의 제조 방법.

도면의 간단한 설명

[0039] 본 명세서에 포함되며 그의 일부를 구성하는 첨부 도면은 본 발명의 여러 실시양태를 예시하는 것으로, 상세한 설명과 함께 본 발명의 비제한적 예를 제공한다.

도 1은 약리학적 시험 실시예 4에 기재된 바와 같이 마우스의 FaDu 피하 이종이식편 모델 (두경부암)에서의 단독요법으로서의 화합물 (1)의 항종양 효과를 제시한다.

도 2는 약리학적 시험 실시예 5에 기재된 바와 같이 마우스의 OSC-19 피하 이종이식편 모델 (두경부암)에 대한 단독요법으로서의 화합물 (1)의 항종양 활성을 제시한다.

도 3은 약리학적 시험 실시예 6에 기재된 바와 같이 마우스의 HCC-1806 피하 이종이식편 (유방암) 모델에 대한 단독요법으로서의 화합물 (1)의 항종양 활성을 제시한다.

도 4는 약리학적 시험 실시예 7에 기재된 바와 같이 마우스의 FaDu 피하 이종이식편 모델에서의 세톡시맙과 조합된 화합물 (1)의 항종양 효과를 제시한다.

도 5는 약리학적 시험 실시예 8에 기재된 바와 같이 마우스의 KPL-4 피하 이종이식편 모델 (유방암)에서의 트라스투주맙과 조합된 화합물 (1)의 항종양 활성을 제시한다.

도 6a-6b는 HSC-2 동소 이식 마우스 모델에서의 화합물 (1)의 항종양 효과를 제시한다. 도 6a. 누드 마우스에 루시페라제-형질도입된 HSC-2 (1 x 10⁶개 세포/스팟)를 설부에서 이식하였다. 루시페라제-형질도입된 HSC-2의 양을 생체내 영상화 시스템 (IVIS)을 사용하여 분석하였다. 데이터는 각각의 마우스의 설부에서의 생물발광 수

준을 제시한다. 도 6b. 16마리의 마우스의 대표적인 생물발광 영상. SCCHN 암 환자의 치료에 현재 사용되는 CDDP, CTX, CDDP+CTX를 비교자로서 사용하였다. CDDP= 시스플라틴, CTX= 세특시맙.

도 7b-7b는 HSC-2 동소 이식 마우스 모델에서의 세특시맙과 조합된 화합물 (1)의 생존상 이점을 제시한다. 도 7a. 누드 마우스에 루시페라제-형질도입된 HSC-2 (1 x 10⁶ 개 세포/스팟)를 설부에서 이식하였다. 데이터는 약물의 치료 후 제100일까지의 생존 곡선을 제시한다 (n=16). *P<0.0001 vs 화합물 (1) 또는 CTX 단독 (로그-순위 (Mantel-Cox) 검정). 도 7b. 루시페라제-형질도입된 HSC-2의 양을 생체내 영상화 시스템 (IVIS)을 사용하여 분석하였다. 제100일에서의 화합물 (1) + CTX 조합 그룹의 10마리의 생존한 마우스의 생물발광 영상. RBW= 상대 체중. CDDP= 시스플라틴, CTX= 세특시맙.

도 8a-8b는 FaDu 마우스 이종이식편 모델에서의 방사선 요법과 조합된 화합물 (1)의 항종양 효과를 제시한다. 도 8a. 누드 마우스에 루시페라제-형질도입된 FaDu (5 x 10⁶ 개 세포/스팟)를 우측 넓적다리에서 피하로 이식하였다. 접종으로부터 13일 후, 마우스를 무작위 배정하고 (n=6), 제4일 및 제11일에서의 18 Gy의 RT와 함께 또는 RT 없이 제1일 및 제8일에 90 µg/kg의 화합물 (1)을 정맥내로 주사하였다. 루시페라제-형질도입된 FaDu의 양을 생체내 영상화 시스템 (IVIS)을 사용하여 분석하였다. 데이터는 제1일에 대한 평균 상대 생물발광 수준 및 SEM을 제시한다 (n=6). SEM= 평균의 표준 오차. *제29일에서의 P<0.05 vs 비-치료 (독립표본 t-검정). 도 8b. 제29일에서의 각각의 그룹의 6마리의 마우스의 대표적인 생물발광 영상. RT= 방사선 요법.

도 9는 항-mPD-1 항체와 조합된 화합물 (1)의 항종양 활성을 제시한다. CT26 s.c. 동계 마우스 모델 (결장 암 종)을 3주 동안 화합물 (1) 및 항-mPD-1 항체로 각각 Q7D 스케줄 및 1주 2회 스케줄로 치료하였다. 결과는 종양 부피 (mm³)의 평균 ± SEM을 제시한다 (n=8).

도 10a는 무세포 튜블린 중합 검정을 제시한다. 화합물 (1)은 튜블린 중합에 대해 억제 활성을 갖는다. 도 10b는 미세관 동역학 검정을 제시한다. 화합물 (1)은 또한 미세관 동역학에 대해서도 억제 활성을 갖는다.

도 11은 화합물 (1)이 식도암 (OE21, OE33 및 TE-8) 및 자궁암 (MES-SA, MES-SA/Dx5-Rx1) 세포주에서 강력한 항증식제라는 것을 제시한다.

도 12는 화합물 (1)이 단독요법으로서 유방암 및 난소암 (각각 KPL-4 및 COLO-704)의 피하 이종이식편 모델에서 강력한 항종양 활성을 갖는다는 것을 제시한다.

도 13은 종양 미세환경에 대한 화합물 (1)의 효과를 제시한다. 제시된 바와 같이, 화합물 (1)은 미세혈관 밀도를 증가시킨다. * P < 0.05, ** P < 0.01, ****P < 0.0001 vs 비-치료 (던넛 다중 비교 검정).

도 14는 종양 미세환경에 대한 화합물 (1)의 효과를 제시한다. 제시된 바와 같이, 화합물 (1)은 α-SMA 양성 CAF를 감소시킨다.

도 15는 화합물 (1)이 FaDu 피하 이종이식편 모델에서 CAF로부터의 ECM 단백질을 감소시킨다는 것을 제시한다. FaDu 이종이식 종양을 제1일에서의 화합물 (1) 180 µg/kg + 세특시맙의 단일 투여 후 제6일에 수집하였다.

도 16은 화합물 (1)이 FaDu 피하 이종이식편 모델에서 세특시맙과 함께 용량-의존성 조합 효과를 나타낸다는 것을 제시한다. 단일 용량, n = 6. 화합물 (1) 및 세특시맙 (CTX)을 FaDu 이종이식편 모델에 제1일에 투여하였다.

도 17은 마우스의 연부 조직 육종 이종이식편 모델에서의 단독요법으로서의 항종양 효과를 제시한다. MES-SA (인간 자궁 육종), HT-1080 (인간 섬유육종) 및 CTG-2041 (인간 혈관육종)이 제시되어 있다.

도 18은 마우스의 자궁내막암 이종이식편 모델에서의 단독요법으로서의 항종양 효과를 제시한다. HEC-108 및 AN3CA (자궁내막암)가 제시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 정의

[0041] 본원에 사용된 용어 "염"은 임의의 및 모든 염을 지칭하고, 제약상 허용되는 염을 포괄한다. 용어 "제약상 허용되는 염"은 타당한 의학적 판단의 범주 내에서 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응 등을 갖지 않으면서 인간 및 하등 동물의 조직과 접촉시켜 사용하기에 적합하고, 합리적인 이익/위험 비에 상응하는 염을 지칭한다. 제약상 허용되는 염은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 제약상 허용되는 염은 문헌 [Berge et

al. J. Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1-19]에 상세히 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본원에 참조로 포함된다. 본 발명의 화합물의 제약상 허용되는 염은 적합한 무기 및 유기 산 및 염기로부터 유래된 것들을 포함한다. 제약상 허용되는, 비독성 산 부가염의 예는 무기 산, 예컨대 염산, 브로민화수소산, 인산, 황산 및 과염소산으로, 또는 유기 산, 예컨대 아세트산, 옥살산, 말레산, 타르타르산, 시트르산, 숙신산 또는 말론산으로, 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 방법 예컨대 이온 교환을 사용함으로써 형성된 아미노 기의 염이다. 다른 제약상 허용되는 염은 아디페이트, 알기네이트, 아스코르베이트, 아스파르테이트, 벤젠술포네이트, 벤조에이트, 비술펜에이트, 보레이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포르술포네이트, 시트레이트, 시클로펜탄프로피오네이트, 디글루코네이트, 도데실술펜에이트, 에탄술포네이트, 포르메이트, 푸마레이트, 글루코헵토네이트, 글리세로포스페이트, 글루코네이트, 헤미술펜에이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 히드로아이오다이드, 2-히드록시-에탄술포네이트, 락토비오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 술펜에이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 메탄술포네이트, 2-나프탈렌술포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올레에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 과모에이트, 펙티네이트, 퍼술펜에이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 스테아레이트, 숙시네이트, 술펜에이트, 타르트레이트, 티오시아네이트, p-톨루엔술포네이트, 운데카노에이트, 발레레이트 염 등을 포함한다. 적절한 염기로부터 유래된 염은 알칼리 금속, 알칼리 토금속, 암모늄 및 $N^+(C_{1-4} \text{알킬})_4^-$ 염을 포함한다. 대표적인 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 나트륨, 리튬, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등을 포함한다. 추가의 제약상 허용되는 염은, 적절한 경우에, 반대이온 예컨대 할라이드, 히드록시드, 카르복실레이트, 술펜에이트, 포스페이트, 니트레이트, 저급 알킬 술포네이트 및 아릴 술포네이트를 사용하여 형성된 비독성 암모늄, 4급 암모늄 및 아민 양이온을 포함한다. 화합물 (1)은 또한 유리 염기로서 제공되며 투여될 수 있다.

[0042] 또한, 동일한 분자식을 갖지만 그의 원자의 결합의 성질 또는 순서 또는 그의 원자의 공간 상의 배열이 상이한 화합물이 "이성질체"로 지칭된다는 것이 이해되어야 한다. 그의 원자의 공간 상의 배열이 상이한 이성질체는 "입체이성질체"로 지칭된다.

[0043] 용어 "조성물" 및 "제제"는 상호교환가능하게 사용된다.

[0044] 투여가 고려되는 "대상체"는 인간 (즉, 임의의 연령대의 남성 또는 여성, 예를 들어, 소아 대상체 (예를 들어, 영아, 아동 또는 청소년) 또는 성인 대상체 (예를 들어, 청년 성인, 중년 성인 또는 노년 성인)) 또는 비-인간 동물을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 비-인간 동물은 포유동물 (예를 들어, 영장류 (예를 들어, 시노몰구스 원숭이 또는 레서스 원숭이), 상업적으로 관련된 포유동물 (예를 들어, 소, 돼지, 말, 양, 염소, 고양이, 또는 개), 또는 조류 (예를 들어, 상업적으로 관련된 조류, 예컨대 닭, 오리, 거위, 또는 칠면조))이다. 특정 실시양태에서, 비-인간 동물은 어류, 파충류 또는 양서류이다. 비-인간 동물은 임의의 발달 단계에 있는 수컷 또는 암컷일 수 있다. 비-인간 동물은 트랜스제닉 동물 또는 유전자 조작된 동물일 수 있다. 용어 "환자"는 질환의 치료를 필요로 하는 인간 대상체를 지칭한다.

[0045] 용어 "투여하다", "투여하는" 또는 "투여"는 본원에 기재된 화합물, 또는 그의 조성물을 대상체 내에 또는 대상체 상에 이식하거나, 흡수시키거나, 섭취시키거나, 주사하거나, 흡입시키거나 또는 달리 도입하는 것을 지칭한다.

[0046] 용어 "치료", "치료하다" 및 "치료하는"은 본원에 기재된 질환을 역전시키거나, 완화시키거나, 그의 발병을 지연시키거나, 또는 그의 진행을 억제하는 것을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 치료는 질환의 1종 이상의 징후 또는 증상이 발생하였거나 또는 관찰된 후에 투여될 수 있다. 다른 실시양태에서, 치료는 질환의 징후 또는 증상의 부재 시에 투여될 수 있다. 예를 들어, 치료는 증상의 발병 전에 감수성 대상체에게 투여될 수 있다. 또한, 예를 들어, 재발을 지연시키거나 또는 예방하기 위해, 증상이 해소된 후에도 치료를 계속할 수 있다.

[0047] 본원에 기재된 화합물의 "유효량"은 원하는 생물학적 반응을 도출하기에 충분한 양을 지칭한다. 본원에 기재된 화합물의 유효량은 원하는 생물학적 종점, 화합물의 약동학, 치료될 상태, 투여 방식, 및 대상체의 연령 및 건강상태와 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 특정 실시양태에서, 유효량은 치료 유효량이다. 대안적으로, 별개의 방법 또는 용도로, 본 발명은, 지시되고 유효한 경우에, 예방적 치료로서 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 유효량은 단일 용량으로의 본원에 기재된 화합물의 양이다. 특정 실시양태에서, 유효량은 다중 용량으로의 본원에 기재된 화합물의 합한 양이다.

[0048] 본원에 기재된 화합물의 "치료 유효량"은 상태의 치료 시 치료 이익을 제공하거나 또는 상태와 연관된 1종 이상의 증상을 지연시키거나 또는 최소화하기에 충분한 양이다. 화합물의 치료 유효량은 상태의 치료 시 치료 이익을 제공하는, 단독의 또는 다른 요법과 조합된 치료제의 양을 의미한다. 용어 "치료 유효량"은 전체 요법을 개

선시키고/거나, 상태의 증상, 징후 또는 원인을 감소시키거나 또는 회피하고/거나, 또 다른 치료제의 치료 효능을 증진시키는 양을 포괄할 수 있다. 특정 실시양태에서, 치료 유효량은 기재된 임의의 질환 또는 상태에서의 치료를 위한 충분한 양이다.

[0049] 본원에 사용된 "억제", "억제하는", "억제하다" 및 "억제제" 등은 생물학적 과정 (예를 들어, 종양 성장)의 활성을 감소시키거나, 둔화시키거나, 중단시키거나 또는 방지하는 화합물의 능력을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 억제는 약 45% 내지 50%이다. 특정 실시양태에서, 억제는 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99.9%, 또는 100%이다.

[0050] 용어 "신생물" 및 "종양"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되며, 조직 덩어리의 성장이 정상 조직의 성장을 능가하고 그와 조화를 이루지 않는 비정상적인 조직 덩어리를 지칭한다. 신생물 또는 종양은 하기 특징에 따라 "양성" 또는 "악성"일 수 있다: 세포 분화 정도 (형태 및 기능성 포함), 성장 속도, 국부 침습, 및 전이. "양성 신생물"은 대체로 잘 분화되고, 악성 신생물보다 특징적으로 더 느린 성장을 가지며, 기원 부위에 국한된 채로 남아있다. 추가로, 양성 신생물은 원위 부위로 침윤, 침습 또는 전이되는 능력을 갖지 않는다. 대조적으로, "악성 신생물"은 대체로 불량하게 분화되고 (퇴행성), 주위 조직의 진행성 침윤, 침습 및 파괴를 동반한 특징적으로 급속한 성장을 갖는다. 게다가, 악성 신생물은 일반적으로 원위 부위로 전이되는 능력을 갖는다. 용어 "전이", "전이성" 또는 "전이되다"는 원발성 또는 원래 종양으로부터 또 다른 기관 또는 조직으로의 암성 세포의 확산 또는 이동을 지칭하며, 전형적으로 속발성 (전이성) 종양이 위치하는 기관 또는 조직의 것이 아닌 원발성 또는 원래 종양의 조직 유형의 "속발성 종양" 또는 "속발성 세포 덩어리"의 존재에 의해 확인 가능하다.

[0051] 용어 "암"은 제어불가능하게 증식하며 정상 신체 조직을 침윤 및 파괴하는 능력을 갖는 비정상 세포의 발생을 특징으로 하는 질환의 부류를 지칭한다.

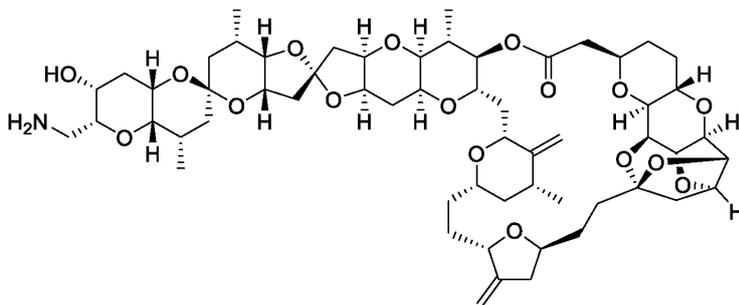
[0052] 용어 "회귀암"은 상대적으로 소수의 환자에서 발생하는 암을 지칭한다. 회귀암은 육종 (예를 들어, 연부 조직 육종, 지방육종, 자궁 육종, 평활근육종, 점액섬유육종, 골육종, 혈관육종, 유방 육종, 활막 육종, 횡문근육종), 악성 림프종, 흉선암 (예를 들어, 흉선종), 중피종, 위장 기질 종양 (GIST), 신경내분비 암, 안암, 뇌 종양, 골 연부 조직 종양, 피부암, 및 배세포 종양을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0053] 용어 "항암제"는 대상체에서 암을 치료하는데 (예를 들어, 대상체에서 암 또는 종양 성장을 억제하는데) 유용한 임의의 치료제를 지칭한다. 항암제는 생물요법 항암제 뿐만 아니라 화학요법제를 포괄한다.

[0054] 특정 실시양태의 상세한 설명

[0055] 본 발명은 본 발명의 실시양태 등과 관련하여 하기에 상세히 기재되어 있다. 본 발명은 화합물 (예를 들어, 화합물 (1)), 및 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 및 그의 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 본원에 제공된 화합물 또는 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 성장을 억제하고/거나 암을 치료하는 방법을 제공한다. 본원에 기재된 바와 같이, 화합물 또는 조성물은 단독요법으로서 또는 또 다른 요법과 조합되어 투여될 수 있다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 화합물 (1)을 제조하는 방법, 및 상기 목적에 유용한 합성 중간체를 제공한다.

[0056] 본 발명은 하기 구조의 화합물:



화합물 (1)

[0057] 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체를 포함하며, 이는 임의적으로 제약상 허용되는 담체 또는 부형제 중에, 임의적으로 수화물, 용매화물 또는 다형체의 형태로 존재할 수 있다.

- [0059] 화합물 (1)은 결정 다형체로서 존재할 수 있고, 본 발명의 화합물은 단일 결정 형태 또는 2중 이상의 결정 형태의 혼합물 중 어느 하나로 존재할 수 있다. 화합물 (1)은 무정형 형태로 존재할 수 있거나, 또는 무수물 또는 용매화물, 예컨대 수화물일 수 있다.
- [0060] 본 발명은 화합물 (1) 및 그의 제약상 허용되는 염의 동위원소 표지된 유도체를 포함한다. 동위원소 표지된 화합물은, 원자(들) 중 1개 이상이 자연에서 통상적으로 발견되는 것들과는 상이한 원자 질량 또는 질량수를 갖는 원자(들)에 의해 대체된 것을 제외하고는 화합물 (1)과 같다. 본 발명의 화합물에 혼입될 수 있는 동위원소의 예는 수소, 탄소, 질소, 산소, 인, 플루오린, 아이오딘, 브로민 및 염소의 동위원소, 예컨대 ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{18}F , ^{35}S , ^{123}I , 및 ^{125}I 를 포함한다.
- [0061] 동위원소 표지된 화합물, 예컨대 ^3H 및/또는 ^{14}C 와 같은 방사성 동위원소가 혼입된 화합물은 의약 및/또는 매트릭스에 대한 조직 분포 검정을 위해 유용하다. 동위원소 ^3H 및 ^{14}C 는, 이들 동위원소가 용이하게 제조되며 검출될 수 있기 때문에 유용한 것으로 간주된다. 동위원소 ^{11}C 및 ^{18}F 는 PET (양전자 방출 단층촬영)에서 유용하다. 동위원소 ^{125}I 는 SPECT (단일 광자 방출 컴퓨터 단층촬영)에서 유용한 것으로 간주되며, 뇌 영상화에서 유용할 수 있다. 보다 무거운 동위원소 예컨대 ^2H 에 의한 대체는 그의 보다 높은 대사 안정성으로 인해 치료에서, 예를 들어, 생체내 반감기의 연장 또는 필요한 용량의 감소의 몇몇 이점을 유발하며, 따라서 주어진 환경 하에 유용한 것으로 간주된다. 동위원소 표지된 화합물은 비-동위원소 표지 시약 대신에 용이하게 입수가 가능한 동위원소 표지된 시약을 사용하고 하기 기재된 반응식 및/또는 실시예에 개시된 방법을 수행함으로써 유사하게 제조될 수 있다.
- [0062] 화합물 (1)은 생물학적 활성 저분자량 화합물의 표적 단백질을 포획하기 위한 화학적 프로브로서 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 화합물은 문헌 [J. Mass Spectrum. Soc. Jpn. Vol. 51, No. 5, 2003, p. 492-498], W02007/139149 등에 기재된 방법에 의해 화합물의 활성 발현에 필수적인 구조 모이어티 이외의 모이어티로 표지 기, 링커 등을 도입함으로써 친화성 크로마토그래피 프로브, 광친화성 프로브 등으로 변형될 수 있다.
- [0063] 이러한 화학적 프로브에 사용되는 표지 기, 링커 등의 예는 하기 군 (1) 내지 (5)에 속하는 기를 포함한다. (1) 단백질 표지 기 예컨대 광친화성 표지 기 (예컨대 벤조일 기, 벤조페논 기, 아지드 기, 카르보닐 아지드 기, 디아지리딘 기, 에논 기, 디아조 기 및 니트로 기), 및 화학적 친화성 기 (예컨대 알파 탄소 원자가 할로젠 원자에 의해 치환된 케톤 기, 카르바모일 기, 에스테르 기, 알킬티오 기, α, β -불포화 케톤, 에스테르 등의 마이클 수용자, 및 옥시란 기); (2) 절단가능한 링커 예컨대 효소 반응에 의해 절단될 수 있는 S-S, O-Si-O, 모노사카라이드 (예컨대 글루코스 군 또는 갈락토스 군) 및 디사카라이드 (예컨대 락토스), 및 올리고펩티드 링커; (3) 피싱 태그 군 예컨대 비오틴 및 3-(4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4H-3a,4a-디아자-4-보라-s-인다센-3-일)프로피오닐 기; (4) 방사성 표지 기 예컨대 ^{125}I , ^{32}P , ^3H 및 ^{14}C ; 형광 표지 기 예컨대 플루오레세인, 로다민, 단실, 움벨리페론, 7-니트로푸라자닐, 및 3-(4,4-디플루오로-5,7-디메틸-4H-3a,4a-디아자-4-보라-s-인다센-3-일) 프로피오닐 기; 화학발광 기 예컨대 루시페린 및 루미놀; 및 중금속 이온 예컨대 란타노이드 금속 이온 및 라듐 이온을 검출할 수 있는 마커; 및 (5) 고체 상 담체 예컨대 유리 비드, 유리 층, 마이크로리터 플레이트, 아가로스 비드, 아가로스 층, 폴리스티렌 비드, 폴리스티렌 층, 나일론 비드 및 나일론 층에 결합될 기.
- [0064] 상기 언급된 문헌 등의 문헌 중 어느 하나에 기재된 방법에 의해 상기 기재된 군 (1) 내지 (5)로부터 선택된 표지 기 등을 본 발명의 화합물로 도입함으로써 제조된 프로브는 새로운 잠재적 약물 표적의 연구에 유용한 마커 단백질을 확인하기 위한 화학적 프로브로서 사용될 수 있다.
- [0065] 본원에서 사용되는 "염"의 예는 무기 산과의 염, 유기 산과의 염, 및 산성 아미노산과의 염을 포함하고, 특히 제약상 허용되는 염이 바람직하다. 게다가, 본 발명의 화합물의 염은 그의 제약상 허용되는 염의 무수물 및 제약상 허용되는 염의 용매화물, 예컨대 수화물을 포괄한다. 무기 산과의 염의 바람직한 예는 염산, 브로민화수소산, 황산, 질산, 인산 등과의 염을 포함하고, 유기 산과의 염의 바람직한 예는 아세트산, 숙신산, 푸마르산, 말레산, 타르타르산, 시트르산, 락트산, 스테아르산, 벤조산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 벤젠술폰산, p-톨루엔술폰산 등과의 염을 포함한다. 산성 아미노산과의 염의 바람직한 예는 아스파르트산 및 글루탐산 등과의 염을 포함한다.
- [0066] 본 발명에 따른 화합물 (1)이 화합물 (1)의 염 또는 화합물 (1)의 수화물로서 수득되는 경우에, 염 및 수화물은 통상적인 방법에 의해 화합물 (1)의 유리물로 전환될 수 있다.

- [0067] 제약 조성물, 키트, 및 투여
- [0068] 본 발명은 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 화합물, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체는 제약 조성물 중에 유효량 (예를 들어, 치료 유효량)으로 제공된다.
- [0069] 본원에 기재된 제약 조성물은 약리학 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 제조 방법은 화합물 (1) (즉, "활성 성분")을 담체 또는 부형제, 및/또는 1종 이상의 다른 보조 성분과 혼합하도록 한 다음, 필요한 경우에 및/또는 바람직한 경우에, 생성물을 원하는 단일- 또는 다중-용량 단위로 성형 및/또는 패키징하는 것을 포함한다.
- [0070] 본 발명의 제약 조성물은 공지된 방법 예컨대 일본 약전 제16판, 미국 약전, 및 유럽 약전 제9판의 제법에 관한 통칙에 기재된 방법에 따라 제조될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 투여 형태에 따라 적절하게 환자에게 투여될 수 있다.
- [0071] 제약 조성물은 벌크로, 단일 단위 용량으로, 및/또는 복수의 단위 단위 용량으로 제조, 패키징 및/또는 판매될 수 있다. "단위 용량"은 미리 결정된 양의 활성 성분을 포함하는 제약 조성물의 분리된 양이다. 활성 성분의 양은 일반적으로 대상체에게 투여될 활성 성분의 투여량 및/또는 이러한 투여량의 편리한 분량, 예컨대 이러한 투여량의 1/2 또는 1/3과 동일하다.
- [0072] 본원에 기재된 제약 조성물 중 활성 성분, 제약상 허용되는 부형제 및/또는 임의의 추가적인 성분의 상대적 인양은 치료되는 대상체의 정체, 신체치수 및/또는 상태에 따라 달라질 것이며, 추가로 조성물이 투여될 경로에 따라 달라질 것이다. 조성물은 0.1% 내지 100% (w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있다.
- [0073] 제공된 제약 조성물의 제조에 사용되는 제약상 허용되는 부형제는 불활성 희석제, 분산제 및/또는 과립화제, 표면 활성제 및/또는 유화제, 봉해제, 결합제, 보존제, 완충제, 윤활제, 및/또는 오일을 포함한다. 부형제 예컨대 코코아 버터 및 좌제 왁스, 착색제, 코팅제, 감미제, 향미제, 및 퍼프제가 또한 조성물에 존재할 수 있다.
- [0074] 본원에 제공된 화합물은 전형적으로 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 제제화된다. 그러나, 본원에 기재된 조성물의 총 1일 사용량은 타당한 의학적 판단의 범주 내에서 의사에 의해 결정될 것이라는 것이 이해될 것이다. 임의의 특정한 대상체 또는 유기체에 대한 구체적인 치료 유효 용량 수준은 치료될 질환 및 장애의 중증도; 이용되는 특정한 활성 성분의 활성; 이용되는 특정한 조성물; 대상체의 연령, 체중, 전반적 건강, 성별 및 식이; 투여 시간, 투여 경로, 및 이용되는 특정한 활성 성분의 배출 속도; 치료의 지속기간; 이용되는 특정한 활성 성분과 조합되어 또는 동시에 사용되는 약물; 및 의학 기술분야에 널리 공지된 기타 인자를 포함한 다양한 인자에 좌우될 것이다.
- [0075] 본원에 제공된 본 발명의 화합물 (화합물 (1)) 및 그의 조성물은 경장 (예컨대 경구), 비경구, 정맥내, 근육내, 동맥내, 수질내, 척수강내, 피하, 뇌실내, 경피, 피내, 직장, 질내, 복강내, 국소 (분말, 연고, 크림 및/또는 점적제에 의한 것과 같이), 점막, 비강, 협측, 설하; 기관내 점적주입, 기관지 점적주입 및/또는 흡입; 및/또는 구강 스프레이, 비강 스프레이 및/또는 에어로졸을 포함한 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 구체적으로 고려되는 경로는 경구 투여, 정맥내 투여 (예를 들어, 전신 정맥내 주사), 혈액 및/또는 림프 공급을 통한 국부 투여, 및/또는 이환 부위로의 직접 투여이다. 일반적으로, 가장 적절한 투여 경로는 작용제의 성질 (예를 들어, 위장관 환경에서의 그의 안정성) 및/또는 대상체의 상태 (예를 들어, 대상체가 경구 투여를 견딜 수 있는지의 여부)를 포함한 다양한 인자에 좌우될 것이다.
- [0076] 유효량을 달성하기 위해 요구되는 화합물 (1)의 정확한 양은, 예를 들어, 대상체의 종, 연령 및 전반적 상태, 부작용 또는 장애의 중증도, 특정한 화합물의 정체, 투여 방식 등에 따라 대상체마다 달라질 것이다. 유효량은 단일 용량 (예를 들어, 단일 경구 용량) 또는 다중 용량 (예를 들어, 다중 경구 용량)으로 포함될 수 있다. 특정 실시양태에서, 다중 용량이 대상체에게 투여되거나 또는 조직 또는 세포에 적용되는 경우에, 다중 용량 중 임의의 2회 용량은 상이하거나 또는 실질적으로 동일한 양의 본원에 기재된 화합물을 포함한다. 특정 실시양태에서, 다중 용량이 대상체에게 투여되거나 또는 조직 또는 세포에 적용되는 경우에, 다중 용량을 대상체에게 투여하거나 또는 다중 용량을 조직 또는 세포에 적용하는 빈도는, 비제한적 예에서, 1일 3회 용량, 1일 2회 용량, 1일 1회 용량, 2일마다 1회 용량, 3일마다 1회 용량, 1주마다 1회 용량, 2주마다 1회 용량, 3주마다 1회 용량, 또는 4주마다 1회 용량, 또는 심지어 약물 전달 디바이스를 사용하는 선택된 시간 기간에 걸쳐서의 느린 용량 제어 전달일 수 있다. 특정 실시양태에서, 다중 용량을 대상체에게 투여하거나 또는 다중 용량을 조직 또는 세포에 적용하는 빈도는 1일 1회 용량이다. 특정 실시양태에서, 다중 용량을 대상체에게 투여하거나 또는 다중

용량을 조직 또는 세포에 적용하는 빈도는 1일 2회 용량이다. 특정 실시양태에서, 다중 용량을 대상체에게 투여하거나 또는 다중 용량을 조직 또는 세포에 적용하는 빈도는 1일 3회 용량이다. 특정 실시양태에서, 다중 용량이 대상체에게 투여되거나 또는 조직 또는 세포에 적용되는 경우에, 다중 용량의 최초 용량과 최종 용량 사이의 지속기간은 약 또는 적어도 1일, 2일, 4일, 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 6개월, 9개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 7년, 10년, 15년, 20년, 또는 대상체, 조직 또는 세포의 수명이다. 특정 실시양태에서, 다중 용량의 최초 용량과 최종 용량 사이의 지속기간은 약 또는 적어도 3개월, 6개월 또는 1년이다. 특정 실시양태에서, 다중 용량의 최초 용량과 최종 용량 사이의 지속기간은 대상체, 조직 또는 세포의 수명이다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 용량 (예를 들어, 단일 용량, 또는 다중 용량의 임의의 용량)은 독립적으로 화합물 (1)의 0.001 mg/kg 내지 0.01 mg/kg, 0.01 mg/kg 내지 0.1 mg/kg, 또는 0.1 mg/kg 내지 1 mg/kg (언급된 값 포함)을 포함한다. 예를 들어 투여 형태에 적어도 약 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 10, 5, 20, 25 또는 50 mg의 활성 화합물, 또는 그의 염을 갖는 투여 형태가 있다.

[0077] 본원에 기재된 바와 같은 용량 범위는 제공된 제약 조성물의 성인에게 투여에 대한 지침을 제공한다. 예를 들어, 아동 또는 청소년에게 투여될 양은 의료 진료의 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있으며, 성인에게 투여되는 것보다 적거나 또는 그와 동일할 수 있다.

[0078] 또한, 본 개시내용은 키트 (예를 들어, 제약 팩)를 포괄한다. 제공된 키트는 제약 조성물 또는 화합물 (1) 및 용기 (예를 들어, 바이알, 앰플, 병, 시린지, 및/또는 디스펜서 패키지, 또는 다른 적합한 용기)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제공된 키트는 임의적으로 제약 조성물 또는 화합물 (1)의 회석 또는 현탁을 위한 제약 부형제를 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 용기 및 제2 용기에 제공된 제약 조성물 또는 화합물 (1)이 조합되어 하나의 단위 투여 형태를 형성한다. 본원에 기재된 키트는 본원에 기재된 1종 이상의 추가적인 제약 작용제를 별개의 조성물로서 포함할 수 있다.

[0079] 치료 방법 및 용도

[0080] 본원에 제시된 바와 같이, 화합물 (1)은 유의한 종양 혈관 재형성 효과 및 항-CAF 활성을 가지며, 따라서, 이는 암의 치료 및/또는 종양 성장의 억제를 위한 잠재적인 용도를 갖는다.

[0081] 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 제약 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 본 발명은 또한 대상체에서 암을 치료하는데 사용하기 위한, 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 제약 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 암을 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서의, 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 제약 조성물의 용도를 제공한다.

[0082] 또한, 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 제약 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 종양 성장을 억제하는 방법이 본원에 제공된다. 또한, 대상체에서 종양 성장을 억제하는데 사용하기 위한, 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 제약 조성물이 본원에 제공된다. 본 발명은 또한 종양 성장을 억제하기 위한 의약의 제조에 있어서의, 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 제약 조성물의 용도를 제공한다.

[0083] 본원에 제공된 방법 및 용도의 특정 실시양태에서, 암은 두경부암, 유방암, 식도암, 자궁암, 난소암, 결장직장암, 자궁내막암, 위암, 소장암, 방광암 또는 육종이다.

[0084] 본원에 제공된 방법 및 용도의 특정 실시양태에서, 암은 두경부암 (예를 들어, 두경부 편평 세포 암종, 구강암, 인후암, 타액선암, 설암, 선양 양성 암종)이다. 특정 실시양태에서, 암은 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN)이다. 특정 실시양태에서, 암은 선양 양성 암종이다. 특정 실시양태에서, 암은 유방암 (예를 들어, HER2-양성 유방암, 삼중 음성 유방암)이다. 특정 실시양태에서, 암은 HER2-양성 유방암이다. 특정 실시양태에서, 암은 삼중 음성 유방암이다. 특정 실시양태에서, 암은 결장직장암 (예를 들어, 결장 암종)이다. 특정 실시양태에서, 암은 결장 암종이다. 특정 실시양태에서, 암은 식도암 (예를 들어, 식도 선암종)이다. 특정 실시양태에서, 암은 식도 선암종이다. 특정 실시양태에서, 암은 자궁암 (예를 들어, 자궁 육종)이다. 특정 실시양태에서, 암은 자궁 육종이다. 특정 실시양태에서, 암은 난소암이다. 특정 실시양태에서, 암은 육종 (예를 들어, 자궁 육종, 섬유육종, 혈관육종, 활막 육종, 연부 조직 암종)이다. 특정 실시양태에서, 암은 섬유육종이다. 특정 실시양태에서, 암은 혈관육종이다. 특정 실시양태에서, 암은 활막 육종이다. 특정 실시양태에서, 암은 연부 조직 암종이다. 특정 실시양태에서, 암은 위암이다. 특정 실시양태에서, 암은 장암 (예를 들어, 소

장암, 소장 선암종)이다. 특정 실시양태에서, 암은 소장암이다. 특정 실시양태에서, 암은 소장 선암종이다. 특정 실시양태에서, 암은 방광암 (예를 들어, 요로상피암)이다. 특정 실시양태에서, 암은 요로상피암이다. 특정 실시양태에서, 암은 자궁내막암이다. 특정 실시양태에서, 암은 희귀암이다.

- [0085] 조합 요법
- [0086] 단독요법으로서의 투여 이외에도, 화합물 (1)은 다른 치료제 또는 치료 양식과 조합되어 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 추가적인 치료제는 항체이다. 특정 실시양태에서, 추가적인 치료제는 모노클로날 항체이다. 본 발명의 화합물은 또 다른 치료제, 예컨대 항-EGFR 요법, 항-HER2 요법, 항-PD-1 요법, 항-PD-L1 요법 또는 방사선조사 요법과 조합되어 투여될 수 있다.
- [0087] 특정 실시양태에서, 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 제약 조성물은 항-EGFR 요법 (예를 들어, 항-EGFR 모노클로날 항체 (mAb), 예컨대 세특시맵)과 조합되어 투여된다. 특정 실시양태에서, 항-EGFR 요법은 항-EGFR 항체이다. 예를 들어, 항-EGFR (표피 성장 인자 수용체) mAb 요법과 조합하여, 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 제약 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN)을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 특정 실시양태에서, 항-EGFR mAb는 세특시맵 (CTX)이다.
- [0088] 특정 실시양태에서, 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 제약 조성물은 항-HER2 요법 (예를 들어, 항-HER2 모노클로날 항체 (mAb) 예컨대 트라스투주맵)과 조합되어 투여된다. 특정 실시양태에서, 항-HER2 요법은 항-HER2 항체이다. 예를 들어, HER2 (인간 표피 성장 인자 수용체) mAb 요법과 조합하여, 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 조성물을 유방암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 유방암을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 특정 실시양태에서, 항-HER2 mAb는 트라스투주맵이다.
- [0089] 특정 실시양태에서, 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 제약 조성물은 항-PD-1 또는 항-PD-L1 요법 (예를 들어, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 모노클로날 항체)과 조합되어 투여된다. 특정 실시양태에서, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 요법은 항체이다. 예를 들어, 항-PD-1 또는 항-PD-L1 요법 (예를 들어, mAb 요법)과 조합하여, 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 조성물을 결장직장암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체에서 결장직장암을 치료하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0090] 특정 실시양태에서, 화합물 (1), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 동위원소 표지된 유도체, 또는 그의 제약 조성물은 방사선 요법 (RT)과 조합되어 사용된다. 특정 실시양태에서, 화합물은 수술과 조합되어 투여된다.
- [0091] 실시예
- [0092] 화합물 (1)의 합성
- [0093] 일반적 절차 및 방법
- [0094] 본 발명에 따른 화합물은 하기 실시예에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 그러나, 이들 실시예는 단지 예시적 목적을 위한 것이고, 본 발명에 따른 화합물은 어떠한 방식으로든 하기 언급된 구체적 실시예로 제한되지 않는다.
- [0095] 실시예에서, 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피를 사용하는 것에 의한 정제를 위한 실리카 겔은 하이-플래쉬(Hi-Flash)TM 칼럼 (실리카 겔, 30 μm 60 Å 또는 40 μm 60 Å, 야마젠 코퍼레이션(Yamazen Corporation))이었고, NH 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피를 사용하는 것에 의한 정제를 위한 실리카 겔은 크로마토렉스 NH 실리카 겔 (후지 실리시아 케미칼 리미티드(Fuji Silysia Chemical LTD))이었다. 분석용 박층 크로마토그래피 (TLC)는 TLC 실리카 겔 60 F₂₅₄, 층 두께 0.25mm (머크 카게아아(Merck KGaA)) 또는 크로마토렉스 TLC NH 실리카 겔 F₂₅₄, 층 두께 0.25mm (후지 실리시아 케미칼 리미티드)를 사용하여 수행되었다. TLC 플레이트는 p-아니스알데히드 염색제, 포스포몰리브데넘산 염색제 또는 하네시안 염색제로 염색함으로써 가시화되었다.
- [0096] 수분에 민감한 반응은 모두 불활성 분위기 하에 수행되었다. 시약 및 용매는, 달리 나타내지 않는 한, 상업용 등급이었고 공급된 그대로 사용되었다. .
- [0097] NMR 스펙트럼은 제올 ECZ500R (500 MHz), 제올 ECZ400S (400 MHz), 배리안 이노바 500 (500 MHz), 배리안 머큐

리 400 (400 MHz) 또는 브루커 아반스 (600 MHz) 분광계로 기록되었다. 화학적 이동은 백만분율 (ppm) 단위로 기록된다. ¹H NMR 스펙트럼 (CDCl₃, C₆D₆ 및/또는 CD₃OD)에서, 잔류 용매 피크가 내부 참조 (CDCl₃ 중 7.27 ppm; C₆D₆ 중 7.16 ppm; CD₃OD 중 3.31 ppm)로서 사용되었다.

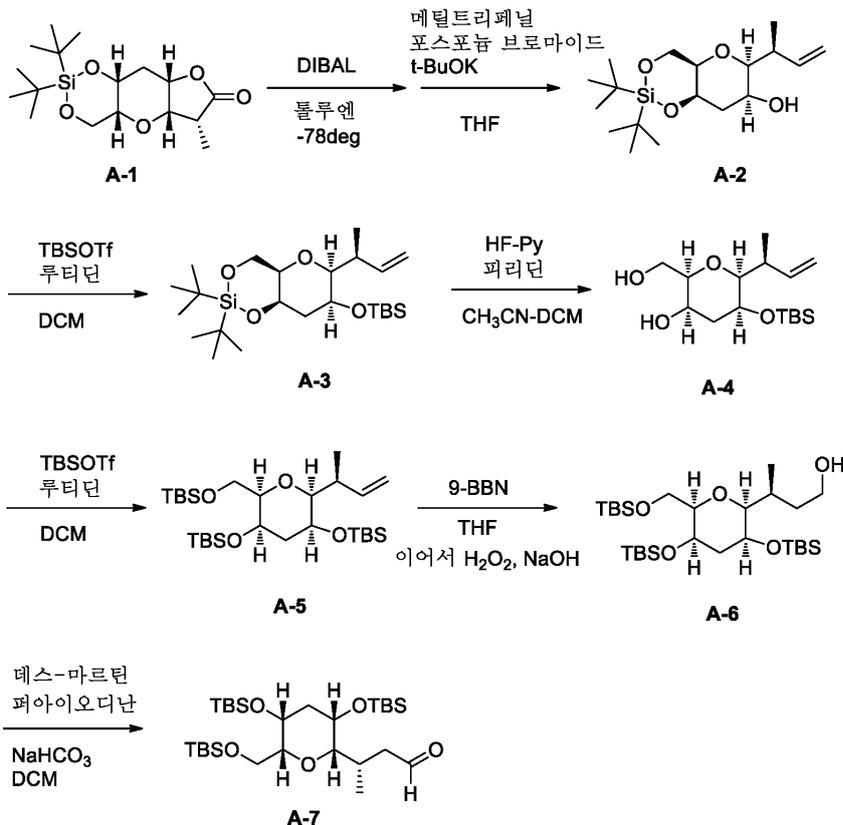
[0098] 분석용 질량 스펙트럼 (MS) 결과는 단일 사중극자 검출기 (SQ 검출기 2) 또는 LTQ 오비트랩 XL™ (써모사이언티픽(ThermoScientific))이 장착된 워터스 액티비 UPLC를 사용하여 입수되었다.

[0099] 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)는 UV 분광광도측정 검출기 (200 nm, 시마즈 SPD-10A) 상의 시마즈 LC-10AD로 수행되었다.

[0100] 본원에 사용된 약어는 하기와 같다: AIBN: 2,2'-아조비스(이소부티로니트릴); 9-BBN: 9-보라비시클로[3.3.1]노난; Bu₃SnH: 트리-노르말-부틸주석 히드라이드; (+)-CSA: (1S)-(+)-10-캄포르술포산; DMAP: 4-디메틸아미노피리딘; DCM: 디클로로메탄; DDQ: 2,3-디클로로-5,6-디시아노-1,4-벤조퀴논; DIBAL: 디이소부틸알루미늄 히드라이드; DMF: N, N-디메틸포름아미드; DMSO: 디메틸 술폭시드; Et₃N: 트리에틸아민; EtOAc: 에틸 아세테이트; HF-피리딘: 플루오린화수소 피리딘; HPLC: 고성능 액체 크로마토그래피; IPA: 이소프로필 알콜; MeCN: 아세토니트릴; MeOH: 메탄올; MPM: 파라-메톡시벤질; PPh₃: 트리페닐포스핀; t-BuOH: 3급-부틸 알콜; tBuLi: 3급-부틸 리튬; TBME: 메틸 3급-부틸 에테르; TBAF: 테트라부틸암모늄 플루오라이드; TBS: 3급-부틸디메틸실릴; THF: 테트라히드로푸란; TMS: 트리메틸실릴; Ts: 파라-톨루엔술포닐.

[0101] 본원에 개시된 합성 중간체는 본 발명의 일부로 간주된다.

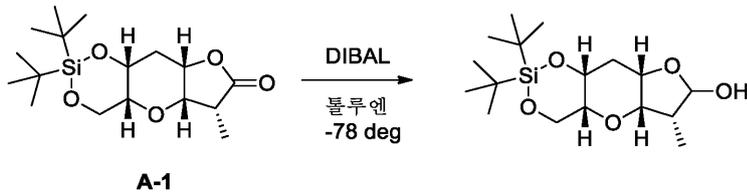
[0102] 반응식 A; 화합물 A-7의 제조



[0103]

[0104] 실시예 1

[0105] (4aR,5aS,6R,8aS,9aR)-2,2-디-tert-부틸-6-메틸옥타히드로푸로[2',3':5,6]피라노[3,2-d][1,3,2]디옥사실린-7-올



[0106]

[0107] 질소 분위기 하에, -78℃에서 톨루엔 (275 mL) 중 문헌 [Organic Letters (2009), 11(2), 409-412]에 기재된 방법에 의해 수득된 화합물 A-1: (4aR,5aS,6R,8aS,9aR)-2,2-디-tert-부틸-6-메틸헥사히드로피라노[3,2-d][1,3,2]디옥사실린-7(8aH)-온 (A-1 18.5 g, 54.0 mmol) (CAS No; 1095280-04-8)의 용액에, DIBAL (70.2 mL, 70.2 mmol, 1.0 M 톨루엔 용액)을 30분에 걸쳐 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 -78℃에서 교반하였다. 90분 후, 반응물을 -78℃에서 MeOH (4.37 mL)로 조심스럽게 퀘칭하고, 이어서 냉각 조를 제거하였다. 포화 타르타르산나트륨칼륨 4수화물 용액 (300 mL)을 반응 혼합물에 첨가하고, 실온에서 2시간 동안 계속 교반하였다. 반응 혼합물을 분리 깔때기에 부은 다음, 층을 분리하였다. 수성 층을 EtOAc (300 mL)로 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수 (300 mL)로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 조 락트를 후속 반응에 정제 없이 사용하였다.

[0108]

실시예 2

[0109]

(4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-부트-3-엔-2-일)-2,2-디-tert-부틸헥사히드로피라노[3,2-d][1,3,2]디옥사실린-7-올 (화합물 A-2)



[0110]

[0111] 질소 분위기 하에, THF (200 mL) 중 메틸트리페닐포스포늄 브로마이드 (73.30 g, 205.2 mmol)의 현탁액에, 칼륨 tert-부톡사이드 (17.27 g, 153.9 mmol)를 -5℃에서 10분에 걸쳐 첨가하고, 이어서 -5℃에서 60분 동안 교반하였다. THF (40 mL) 중 실시예 1에 기재된 조 락트의 용액을 반응 혼합물에 -5℃에서 10분에 걸쳐 옮기고, 이어서 -5℃에서 1시간 동안, 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 빙수 (400 mL)로 퀘칭하고, 이어서 TBME (400 mL)로 희석하고, 이어서 층을 분리하였다. 수성 층을 TBME (400 mL)로 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수 (400 mL)로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 헵탄/EtOAc = 1/1 (100 mL)로 현탁시켰다. 생성된 현탁액을 여과하고, 헵탄/EtOAc = 1/1 (100 mL)로 행구어 트리페닐포스핀 유래된 물질을 제거하였다. 이어서, 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 (400 g, 실리카 겔 60, 구형, 40-50 μm, 칸토 케미칼(Kanto Chemical)) 상에서 0%에서 20% EtOAc/헵탄을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 표제 화합물 (화합물 A-2, 16.7 g, 90% 수율)을 수득하였다.

[0112]

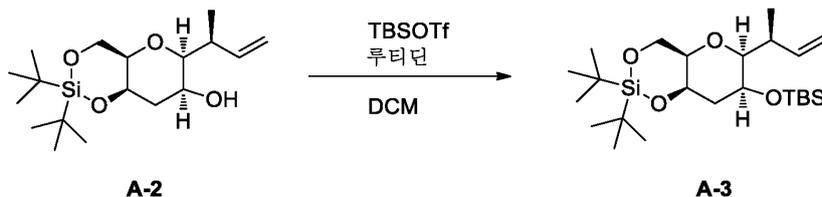
¹H NMR (400 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 1.03 (d, J=6.8 Hz, 3 H) 1.05 (s, 9 H) 1.07 (s, 9 H) 1.75 (dt, J=14.5, 3.0 Hz, 1 H) 2.37 (dt, J=14.5, 2.9 Hz, 1 H) 2.65 - 2.76 (m, 1 H) 3.03 (dd, J=9.8, 1.0 Hz, 1 H) 3.31 (m, 1 H) 3.69 (d, J=15.0 Hz, 1 H) 3.75 - 3.79 (m, 1 H) 4.16 - 4.31 (m, 2 H) 4.41 (t, J=2.9 Hz, 1 H) 4.95 - 5.09 (m, 2 H) 6.02 (ddd, J=17.3, 10.5, 6.3 Hz, 1 H).

[0113]

실시예 3

[0114]

(4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-부트-3-엔-2-일)-2,2-디-tert-부틸-7-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)헥사히드로피라노[3,2-d][1,3,2]디옥사실린 (화합물 A-3)



[0115]

[0116]

질소 분위기 하에, 0°C에서 DCM (150 mL) 중 실시예 2에 기재된 화합물 A-2: (4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-부트-3-엔-2-일)-2,2-디-tert-부틸헥사히드로피라노[3,2-d][1,3,2]디옥사실린-7-올 (9.85 g, 28.8 mmol)의 용액에 2,6-루티딘 (6.68 mL, 57.5 mmol) 및 tert-부틸디메틸실릴 트리플루오로메탄술포네이트 (9.25 mL, 40.3 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 0°C에서 30분 동안, 이어서 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 디에틸 에테르로 희석하였다. 유기 층을 0.5 N HCl aq, 포화 NaHCO₃ aq 및 이어서 염수로 세척하였다. 합한 유기 층을 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고 (소량의 SiO₂), 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 상에서 0%에서 15% EtOAc/헥탄을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 표제 화합물 (화합물 A-3, 12.0 g, 91% 수율)을 수득하였다.

[0117]

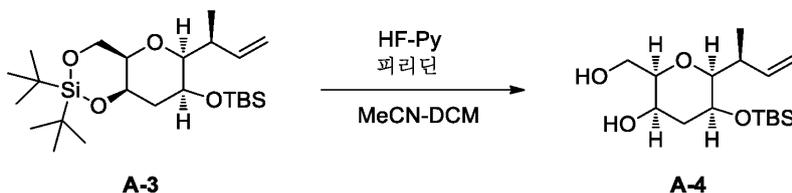
¹H NMR (500 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 0.10 (s, 3 H) 0.19 (s, 3 H) 0.91 (s, 9 H) 0.96 (d, J=6.3 Hz, 3 H) 1.02 (s, 9 H) 1.06 (s, 9 H) 1.73 (dt, J=15.0, 4.0 Hz, 1 H) 2.26 (dt, J=15.0, 2.5 Hz, 1 H) 2.66 - 2.74 (m, 1 H) 2.95 (dd, J=9.5, 2.2 Hz, 1 H) 3.17 (m, 1 H) 3.81 - 3.84 (m, 1 H) 4.12 - 4.22 (m, 2 H) 4.24 (t, J=2.7 Hz, 1 H) 4.93 - 5.06 (m, 2 H) 6.08 (ddd, J=17.3, 10.5, 6.3 Hz, 1 H).

[0118]

실시예 4

[0119]

(2R,3R,5S,6S)-6-((S)-부트-3-엔-2-일)-5-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-2-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-3-올 (화합물 A-4)



[0120]

[0121]

질소 분위기 하에, -10°C에서 MeCN (120 mL) 및 DCM (40 mL) 중 실시예 3에 기재된 화합물 A-3: (4aR,6S,7S,8aR)-6-((S)-부트-3-엔-2-일)-2,2-디-tert-부틸-7-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)헥사히드로피라노[3,2-d][1,3,2]디옥사실린 (12 g, 26.3 mmol)의 용액에 MeCN 20 mL 중 HF-피리딘 (4.0 mL) 및 피리딘 (20 mL)의 예비혼합된 용액을 첨가하였다. 반응 혼합물을 -10°C에서 15분 동안, 이어서 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 0°C에서 포화 NaHCO₃ aq로 켄칭하고, DCM으로 희석하고, 이어서 층을 분리하였다. 수성 층을 DCM으로 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하였다. 합한 유기 층을 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 상에서 15%에서 60% EtOAc/헥탄을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 표제 화합물 (화합물 A-4, 8.4 g, 정량적 수율)을 수득하였다.

[0122]

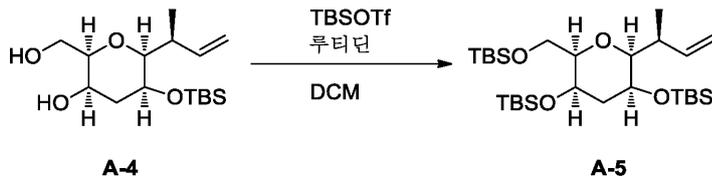
¹H NMR (500 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 0.13 (s, 3 H) 0.19 (s, 3 H) 0.94 (s, 9 H) 0.96 (d, J=6.8 Hz, 3 H) 1.72 (dt, J=14.6, 2.9 Hz, 1 H) 2.15 (dd, J=9.8, 2.4 Hz, 1 H) 2.23 (dt, J=14.6, 2.9 Hz, 1 H) 2.55 - 2.65 (m, 1 H) 3.03 (d, J=9.8 Hz, 1 H) 3.41 - 3.46 (m, 1 H) 3.49 (d, J=11.7 Hz, 1 H) 3.62 - 3.72 (m, 2 H) 3.92 (ddd, J=11.7, 8.3, 2.4 Hz, 1 H) 4.02 (t, J=2.7 Hz, 1 H) 5.01 - 5.12 (m, 2 H) 5.93 (ddd, J=17.4, 10.4, 7.3 Hz, 1 H).

[0123]

실시예 5

[0124]

((2S,3S,5R,6R)-2-((S)-부트-3-엔-2-일)-6-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)테트라히드로-2H-피란-3,5-디일)비스(옥시))비스(tert-부틸디메틸실란) (화합물 A-5)



[0125]

[0126]

질소 분위기 하에, 5°C에서 DCM (10 mL) 중 실시예 4에 기재된 화합물 A-4: (2R,3R,5S,6S)-6-((S)-부트-3-엔-2-일)-5-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-2-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-3-올 (997 mg, 3.15 mmol)의 용액에 2,6-루티딘 (1.83 mL, 15.8 mmol) 및 tert-부틸디메틸실릴 트리플루오로메탄술포네이트 (2.17 mL, 9.45 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 디에틸 에테르로 희석하고, 포화 NaHCO₃ aq로 켄칭하고, 이어서 층을 분리하였다. 합한 유기 추출물을 연속적으로 0.5 N HCl aq, 포화 NaHCO₃ aq 및 이어서 염수로 세척하였다. 유기 층을 MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 상에서 0%에서 5% EtOAc/헵탄 (1% Et₃N 함유)을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 표제 화합물 (화합물 A-5, 1.69 g, 98% 수율)을 수득하였다.

[0127]

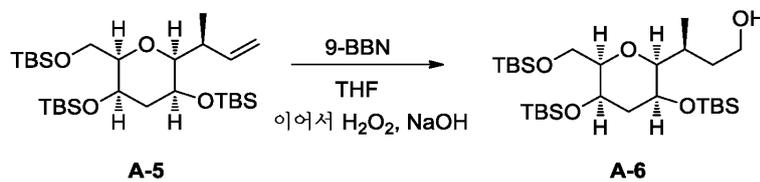
¹H NMR (500 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 0.02 - 0.08 (m, 15 H) 0.11 (s, 3 H) 0.89 (s, 9 H) 0.90 - 0.92 (m, 18 H) 0.94 (d, J=6.8 Hz, 3 H) 1.82 (dt, J=14.9, 4.8 Hz, 1 H) 2.00 (dt, J=14.9, 2.9 Hz, 1 H) 2.62 - 2.72 (m, 1 H) 2.93 (dd, J=9.3, 2.0 Hz, 1 H) 3.27 - 3.34 (m, 1 H) 3.66 - 3.79 (m, 3 H) 3.83 - 3.87 (m, 1 H) 4.91 - 5.07 (m, 2 H) 6.11 (ddd, J=17.3, 10.7, 6.1Hz, 1 H).

[0128]

실시예 6

[0129]

(S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)부탄-1-올 (화합물 A-6)



[0130]

[0131]

0°C에서 THF (10 mL) 중 실시예 5에 기재된 화합물 A-5: (((2S,3S,5R,6R)-2-((S)-부트-3-엔-2-일)-6-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)테트라히드로-2H-피란-3,5-디일)비스(옥시))비스(tert-부틸디메틸실란) (1.32 g, 2.42 mmol)의 용액에 9-BBN (9.69 mL, 0.5 M THF 용액, 4.84 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 0°C에서 1시간 동안 교반하고, 실온에서 1.5시간 동안 교반하였다. 3.0 M NaOH aq (3 mL, 9.00 mmol) 및 과산화수소 (물 중 35%, 3 mL)를 0°C에서 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 0°C에서 30분 동안, 이어서 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 포화 Na₂SO₃ aq로 켄칭하고, 이어서 층을 분리하였다. 수성 층을 EtOAc로 추출하였다 (3회). 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 상에서 0%에서 20% EtOAc/헵탄을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 표제 화합물 (화합물 A-6, 1.36 g, 100% 수율)을 수득하였다.

[0132]

¹H NMR (500 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 0.03 (s, 3 H) 0.05 - 0.08 (m, 12 H) 0.10 (s, 3 H) 0.88 (d, J=6.8 Hz, 3 H) 0.89 - 0.93 (m, 27 H) 1.55 - 1.65 (m, 1H) 1.82 (dt, J=15.4, 4.4 Hz, 1 H) 1.87 - 1.96 (m, 1 H) 1.97 - 2.03 (m, 1 H) 2.17- 2.26 (m, 1H) 2.67 (dd, J=7.8, 3.9 Hz, 1 H) 2.98 - 3.10 (m, 1 H) 3.34 - 3.40 (m, 1 H) 3.59 - 3.86 (m, 6 H)

[0133]

ESI-MS (m/z): 563.64 [M+H]⁺, 585.62 [M+Na]⁺

[0134]

실시예 7

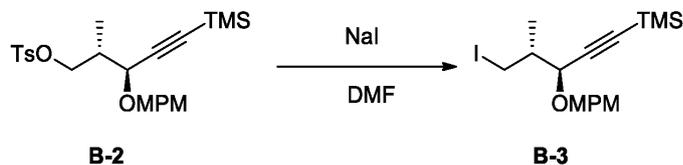
[0135]

(S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)부탄알 (화합물 A-7)

Hz, 2 H).

[0146] 실시예 9

[0147] ((3S, 4R)-5-아이오도-3-((4-메톡시벤질)옥시)-4-메틸펜트-1-인-1-일)트리메틸실란 (화합물 B-3)

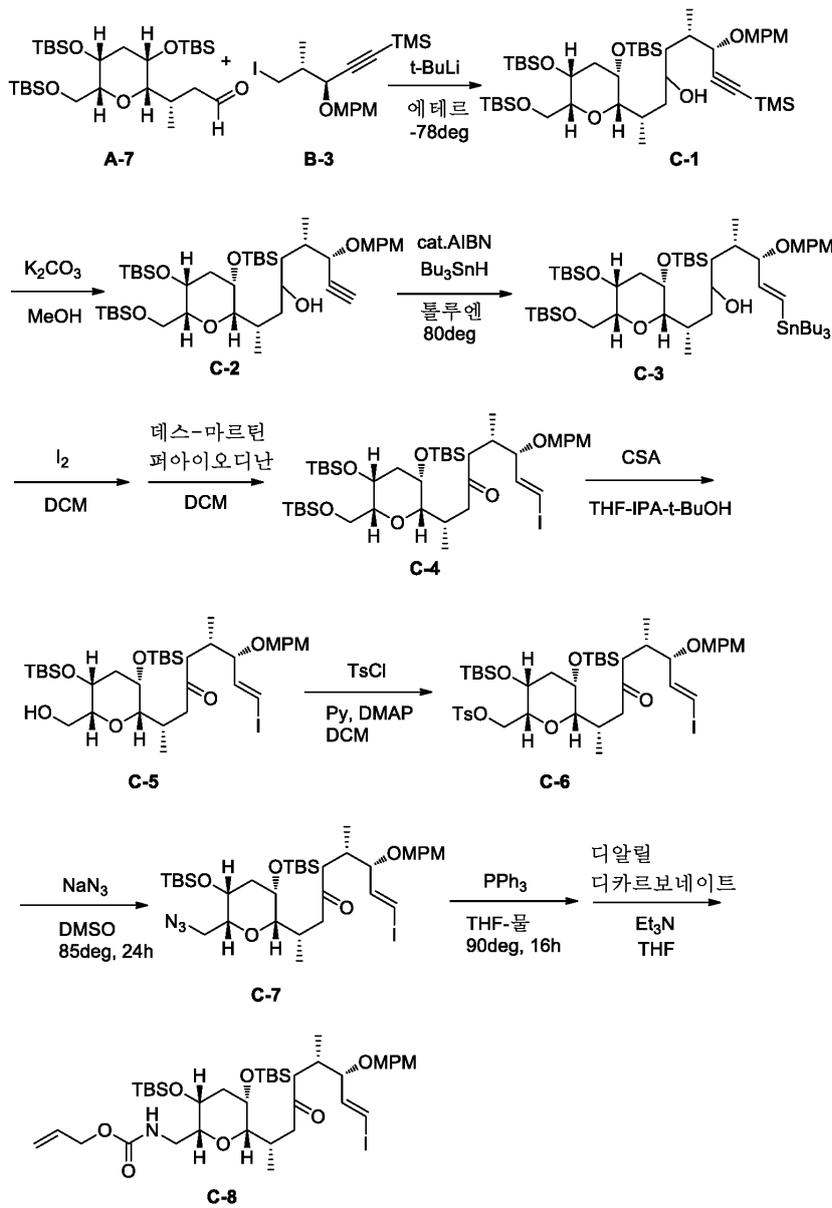


[0148]

[0149] 질소 분위기 하에, DMF (360 mL) 중 실시예 8에 기재된 화합물 B-2: (2S,3S)-3-((4-메톡시벤질)옥시)-2-메틸-5-(트리메틸실릴)펜트-4-인-1-일 4-메틸벤젠설포네이트 (17.7 g, 38.4 mmol)의 용액에, NaI (7.49 g, 50.0 mmol)를 실온에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 80℃에서 2시간 동안 교반하였다. 추가 2.0g의 NaI를 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응물을 80℃에서 1.5시간 동안 교반하고, 이어서 실온으로 냉각시켰다. 혼합물을 디에틸 에테르로 희석하고, 물 및 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 (실리카 겔 60, 구형, 40-50 μm, 칸토 케미칼) 상에서 10%에서 20% EtOAc/헥산을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 표제 화합물 (화합물 B-3, 14.3g, 89% 수율)을 수득하였다.

[0150] ¹H NMR (500 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 0.21 (s, 9 H) 1.10 (d, J=6.8 Hz, 3 H) 1.74 - 1.84 (m, 1 H) 3.30 - 3.37 (m, 2 H) 3.82 (s, 3 H) 3.96 (d, J=7.3 Hz, 1 H) 4.44 (d, J=11.2 Hz, 1 H) 4.73 (d, J=11.2 Hz, 1 H) 6.89 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.30 (d, J=8.8 Hz, 2 H).

[0151] 반응식 C; 화합물 C-8의 제조



[0152]

[0153] 실시예 10

[0154] (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸-9-(트리메틸실릴)논-8-인-4-올 (화합물 C-1)

[0155]

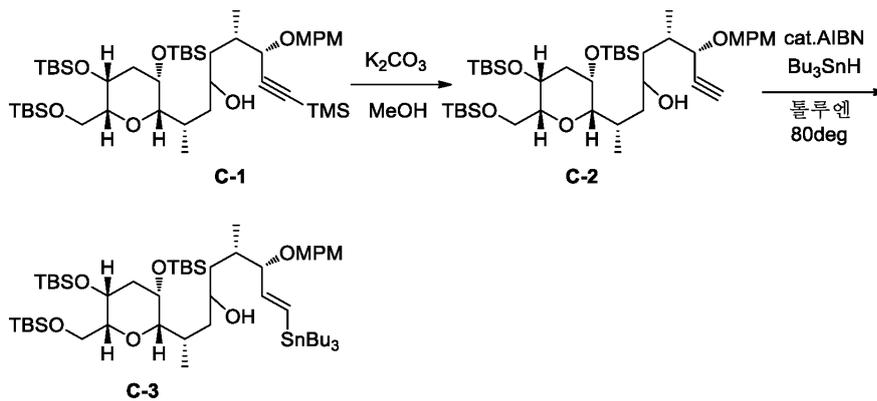
[0156] 아르곤 분위기 하에, -78°C에서 디에틸 에테르 (25 mL) 중 실시예 9에 기재된 화합물 B-3: ((3S,4R)-5-아이오도-3-((4-메톡시벤질)옥시)-4-메틸펜트-1-인-1-일)트리메틸실란 (1408 mg, 3.382 mmol)의 용액에 tert-부틸리튬 (펜탄 중 1.61M, 4.11 mL, 6.62 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 -78°C에서 45분 동안 교반하였다. 디에틸 에테르 5.0 mL 중 실시예 7에 기재된 화합물 A-7: (S)-3-((2S,3S,5R,6R)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)부탄알 (825 mg, 1.47 mmol)을 -78°C에서 반응 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 -78°C에서 60분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 포화 NH₄Cl aq로

켄칭하였다. 유기 층을 염수로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시킨 다음, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 상에서 0%에서 25% EtOAc/헥탄을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 표제 화합물 (화합물 C-1, 1167 mg, 93% 수율)을 수득하였다.

[0157] ¹H NMR (500 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 0.00 - 0.12 (m, 21 H) 0.15 - 0.24 (m, 6 H) 0.82 - 0.96 (m, 30 H) 1.03 (d, J=6.3 Hz, 3H) 1.38 - 1.55 (m, 1H) 1.68 - 1.99 (m, 4 H) 2.10 - 2.30 (m, 2 H) 2.76 - 2.87 (m, 1 H) 3.15 (d, J=9.75 Hz, 1 H) 3.33 - 3.38 (m, 1 H) 3.56 - 4.02 (m, 9 H) 4.37 - 4.50 (m, 1 H) 4.64 - 4.78 (m, 1 H) 6.83 - 6.88 (m, 2H) 7.23 - 7.35 (m, 2H).

[0158] 실시예 11

[0159] (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸-9-(트리부틸스탄닐)논-8-엔-4-올 (화합물 C-3)



[0160]

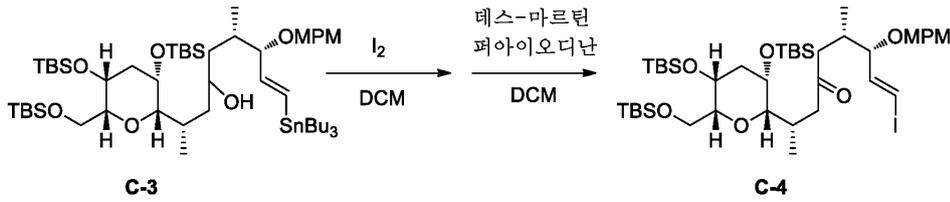
[0161] 20℃에서 MeOH (20 mL) 중 실시예 10에 기재된 화합물 C-1: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸-9-(트리메틸실릴)논-8-인-4-올 (1165 mg, 1.37 mmol)의 용액에 K₂CO₃ (189 mg, 1.37 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 20℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc로 희석하고, 포화 NH₄Cl aq로 켄칭하고, 이어서 층을 분리하였다. 수성 층을 EtOAc로 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 상에서 0%에서 15% EtOAc/헥탄을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 화합물 C-2: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸논-8-인-4-올 (1050 mg, 98% 수율)을 수득하였다. ESI-MS (m/z): 801.50 [M+Na]⁺

[0162] 질소 분위기 하에, 20℃에서 톨루엔 (15 mL) 중 상기 수득된 화합물 C-2: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸논-8-인-4-올 (780 mg, 1.00 mmol)의 용액에 트리-n-부틸주석 히드라이드 (2.5 mL, 9.36 mmol) 및 2,2'-아조비스(이소부티로니트릴) (82 mg, 0.50 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 90℃에서 15분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 상에서 0%에서 15% EtOAc/헥탄을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 표제 화합물 (화합물 C-3, 970 mg, 91% 수율)을 수득하였다.

[0163] ¹H NMR (500 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 0.02 - 0.13 (m, 18 H) 0.84 - 0.96 (m, 48 H) 1.22 - 1.37 (m, 6 H) 1.47 - 1.56 (m, 7 H) 1.72 - 1.90 (m, 3 H) 1.95-2.03 (m, 1 H) 2.11 - 2.28 (m, 2 H) 2.82 - 2.86 (m, 1 H) 3.08 - 3.15 (m, 1 H) 3.33 - 3.40 (m, 1 H) 3.43 - 3.53 (m, 1 H) 3.58 - 3.87 (m, 8 H) 4.25 - 4.31 (m, 1 H) 4.49 - 4.54 (m, 1 H) 5.83 (dd, J=19.3, 7.6Hz, 1 H) 6.05 - 6.13 (m, 1 H) 6.83 - 6.90 (m, 2 H) 7.24 (d, J=8.8 Hz, 2 H).

[0164] 실시예 12

[0165] (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)-9-아이오도-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸논-8-엔-4-올 (화합물 C-4)



[0166]

[0167]

질소 분위기 하에, 5°C에서 DCM 30 mL 중 실시예 11에 기재된 화합물 C-3: (2S,6S,7S)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸-9-(트리부틸스탄닐)논-8-엔-4-올 (970 mg, 0.91 mmol)의 용액에 DCM (6 mL) 중 아이오딘 (242 mg, 0.95 mmol)을, 아이오딘 색상을 유지할 때까지 첨가하였다. 반응 혼합물을 포화 Na₂SO₃ aq 로 켄칭하고, 층을 분리하였다. 수성 층을 DCM으로 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하였다. 합한 유기 층을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 상에서 0%에서 25% EtOAc/헥탄을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)-9-아이오도-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸논-8-엔-4-올 (768 mg, 93% 수율)을 수득하였다.

[0168]

질소 분위기 하에, 실온에서 DCM (25 mL) 중 상기 수득된 (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)-9-아이오도-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸논-8-엔-4-올 (768 mg, 0.85 mmol)의 용액에 NaHCO₃ (17.8 mg, 0.21 mmol) 및 Dess-마르틴 퍼아이오디난 (485 mg, 1.14 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 DCM으로 희석하고, 포화 NaHCO₃ aq 및 포화 Na₂SO₃ aq로 켄칭하고, 이어서 층을 분리하였다. 수성 층을 DCM으로 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 상에서 0%에서 20% EtOAc/헥탄을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 표제 화합물 (화합물 C-4, 776 mg, 정량적 수율)을 수득하였다.

[0169]

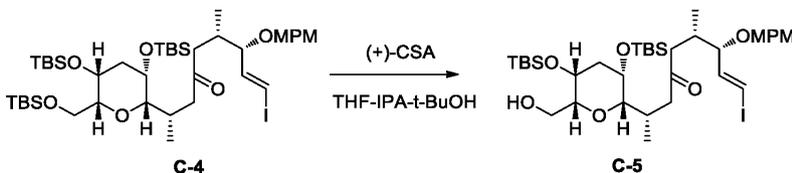
¹H NMR (500 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 0.00 (s, 3 H) 0.03 - 0.07 (m, 12 H) 0.10 (s, 3 H) 0.81 (d, J=6.3 Hz, 3 H) 0.84 (d, J=6.3 Hz, 3 H) 0.89 (s, 9 H) 0.91 (s, 9 H) 0.92 (s, 9 H) 1.80 (dt, J=15.0, 4.5 Hz, 1 H) 1.99 (dt, J=15.0, 2.5 Hz, 1 H) 2.17 (dd, J=16.6, 10.2 Hz, 1 H) 2.20 - 2.29 (m, 2 H) 2.43 - 2.48 (m, 1 H) 2.54 (d, J=12.7 Hz, 1 H) 2.87 (dd, J=9.0, 1.7 Hz, 1 H) 2.99 (dd, J=16.6, 2.9 Hz, 1 H) 3.27 (td, J=5.8, 2.4 Hz, 1 H) 3.50 - 3.56 (m, 1 H) 3.66 - 3.74 (m, 2H) 3.75 - 3.78 (m, 1 H) 3.80 (s, 3 H) 3.81 - 3.85 (m, 1 H) 4.26 (d, J=11.7 Hz, 1 H) 4.50 (d, J=11.7 Hz, 1 H) 6.26 (d, J=14.6 Hz, 1 H) 6.42 (dd, J=14.6, 7.8 Hz, 1 H) 6.87 (d, J=8.3 Hz, 2 H) 7.21 (d, J=8.3 Hz, 2 H). ESI-MS (m/z): 927.39 [M+Na]⁺

[0170]

실시예 13

[0171]

(2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)-9-아이오도-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸논-8-엔-4-온 (화합물 C-5)



[0172]

[0173]

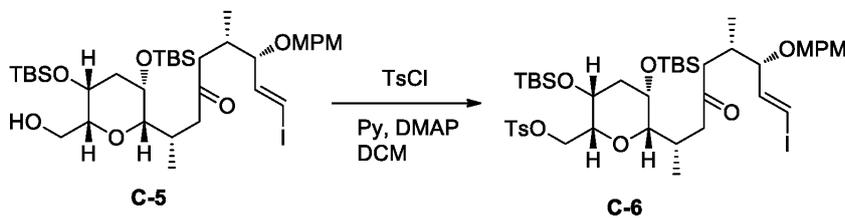
4°C에서 THF (5.0 mL), IPA (5.0 mL) 및 t-BuOH (5.0 mL) 중 실시예 12에 기재된 화합물 C-4: (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-(((tert-부틸디메틸실릴)옥시)메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)-9-아이오도-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸논-8-엔-4-온 (600 mg, 0.66 mmol)의 용액에 (1S)-(+)-10-카포르술폰산 (154 mg, 0.66 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 4°C에서 20시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc로 희석하고, 포화 NaHCO₃ aq로 켄칭하고, 이어서 층을 분리하였다. 수성 층을 EtOAc로 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고, MgSO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다.

잔류물을 실리카 겔 상에서 0%에서 35% EtOAc/헥탄을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 표제 화합물 (화합물 C-5, 500 mg, 95% 수율)을 수득하였다.

[0174] ^1H NMR (500 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 0.01 (s, 3 H) 0.04 (s, 3 H) 0.07 (s, 3 H) 0.11 (s, 3 H) 0.86 - 0.91 (m, 15 H) 0.93 (s, 9 H) 1.83 (dt, J=14.9, 4.8 Hz, 1 H) 1.93 - 2.00 (dt, J=14.9, 4.8 Hz, 1 H) 2.19 - 2.26 (m, 1 H) 2.29 (dd, J=14.9, 5.6 Hz, 1 H) 2.39 (dd, J=16.6, 8.3 Hz, 1 H) 2.44 - 2.66 (m, 4 H) 2.91 (dd, J=9.5, 1.7 Hz, 1 H) 3.36 - 3.41 (m, 1 H) 3.48 (td, J=11.3, 2.7 Hz, 1 H) 3.59 (t, J=7.1 Hz, 1 H) 3.74 - 3.78 (m, 2 H) 3.80 (s, 3 H) 3.85 (m, 1 H) 4.25 (d, J=11.2 Hz, 1 H) 4.46 (d, J=11.2 Hz, 1 H) 6.28 (d, J=14.6 Hz, 1 H) 6.43 (dd, J=14.6, 7.8 Hz, 1 H) 6.87 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.21 (d, J=8.8 Hz, 2 H). ESI-MS (m/z): 813.30 [M+Na]⁺

[0175] 실시예 14

[0176] ((2R,3R,5S,6S)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-((2S,6S,7S,E)-9-아이오도-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸-4-옥소논-8-엔-2-일)테트라히드로-2H-피란-2-일)메틸 4-메틸벤젠술포네이트 (화합물 C-6)



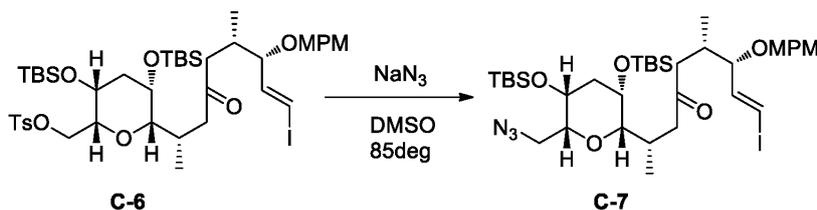
[0177]

[0178] 질소 분위기 하에, 5°C에서 DCM (10 mL) 중 실시예 13에 기재된 화합물 C-5: (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-(히드록시메틸)테트라히드로-2H-피란-2-일)-9-아이오도-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸-4-옥소논-8-엔-4-온 (500 mg, 0.63 mmol)의 용액에 피리딘 (2.54 mL, 31.6 mmol), p-톨루엔술포닐 클로라이드 (723 mg, 3.79 mmol) 및 4-디메틸아미노피리딘 (77 mg, 0.63 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. p-톨루엔술포닐 클로라이드 (150 mg, 0.79 mmol)를 실온에서 반응 혼합물에 첨가하였다. 이어서, 반응 혼합물을 실온에서 8시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 DCM으로 희석하고, 포화 NaHCO₃ aq로 켄칭하고, 이어서 층을 분리하였다. 수성 층을 DCM으로 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 상에서 0%에서 25% EtOAc/헥탄을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 표제 화합물 (화합물 C-6, 560 mg, 94% 수율)을 수득하였다.

[0179] ^1H NMR (500 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 0.01 (s, 3 H) 0.04 (s, 3 H) 0.04 (s, 3 H) 0.08 (s, 3 H) 0.81 (d, J=6.8 Hz, 3 H) 0.83 (s, 9 H) 0.86 (d, J=6.8 Hz, 3 H) 0.89 (s, 9 H) 1.81 (dt, J=14.9, 4.5 Hz, 1 H) 1.91 - 1.96 (m, 1 H) 2.15 - 2.32 (m, 3 H) 2.36 - 2.42 (m, 1 H) 2.43 (s, 3 H) 2.57 (d, J=12.7 Hz, 1 H) 2.77 (dd, J=16.6, 3.4 Hz, 1 H) 2.87 (dd, J=9.0, 1.7 Hz, 1 H) 3.53 - 3.58 (m, 2 H) 3.70 - 3.75 (m, 1 H) 3.80 - 3.85 (m, 1H) 3.81 (s, 3 H) 4.06 (dd, J=10.0, 5.0 Hz, 1 H) 4.08 - 4.16 (m, 1 H) 4.28 (d, J=11.2 Hz, 1 H) 4.51 (d, J=11.2 Hz, 1 H) 6.30 (d, J=14.6 Hz, 1 H) 6.45 (dd, J=14.6, 7.8 Hz, 1 H) 6.88 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.24 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.31 (d, J=8.3 Hz, 2 H) 7.76 (d, J=8.3 Hz, 2 H).

[0180] 실시예 15

[0181] (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-6-(아지도메틸)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)-9-아이오도-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸-4-옥소논-8-엔-4-온 (화합물 C-7)



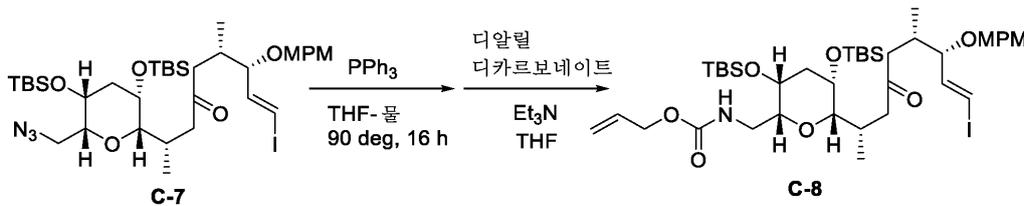
[0182]

[0183] 질소 분위기 하에, 20℃에서 DMSO (5.6 mL) 중 실시예 14에 기재된 화합물 C-6: ((2R,3R,5S,6S)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-((2S,6S,7S,E)-9-아이오도-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸-4-옥소노-8-엔-2-일)테트라히드로-2H-피란-2-일)메틸 4-메틸벤젠설포네이트 (560 mg, 0.59 mmol)의 용액에 아지드화나트륨 (385 mg, 5.92 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 85℃에서 교반하였다. 2시간 후, 아지드화나트륨 (100 mg, 1.54 mmol)을 반응 혼합물에 첨가하고, 이어서 반응 혼합물을 85℃에서 14시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc로 희석하고, H₂O로 켄칭하고, 이어서 층을 분리하였다. 유기 추출물을 연속적으로 물 및 염수로 세척하였다. 합한 유기 층을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켜 조 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 실리카 겔 상에서 0%에서 15% EtOAc/헵탄을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 표제 화합물 (화합물 C-7, 298 mg, 62% 수율)을 수득하였다.

[0184] ¹H NMR (500 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 0.03 (s, 3 H) 0.06 (s, 3 H) 0.07 (s, 3 H) 0.10 (s, 3 H) 0.84 (d, J=6.8 Hz, 3 H) 0.85 (d, J=6.8 Hz, 3 H) 0.91 (s, 9 H) 0.92 (s, 9 H) 1.86 (dt, J=15.0, 4.7 Hz, 1 H) 1.98 (dt, J=15.0, 2.9 Hz, 1 H) 2.19 - 2.32 (m, 3 H) 2.41 - 2.49 (m, 1 H) 2.58 (d, J=12.7 Hz, 1 H) 2.94 (dd, J=16.6, 2.9 Hz, 1 H) 2.98 (dd, J=8.8, 2.0 Hz, 1 H) 3.02 (dd, J=12.7, 2.9 Hz, 1 H) 3.47 (dt, J=8.8, 2.7 Hz, 1 H) 3.49 - 3.54 (m, 1 H) 3.63 (dd, J=12.7, 8.8 Hz, 1 H) 3.69 - 3.73 (m, 1 H) 3.81 (s, 3H) 3.83 - 3.88 (m, 1 H) 4.26 (d, J=11.7 Hz, 1 H) 4.50 (d, J=11.7 Hz, 1 H) 6.26 (d, J=14.6 Hz, 1 H) 6.42 (dd, J=14.6, 7.8 Hz, 1 H) 6.87 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.22 (d, J=8.8 Hz, 2 H).

[0185] 실시예 16

[0186] (((2R,3R,5S,6S)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-((2S,6S,7S,E)-9-아이오도-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸-4-옥소노-8-엔-2-일)테트라히드로-2H-피란-2-일)메틸)카르바메이트 (화합물 C-8)

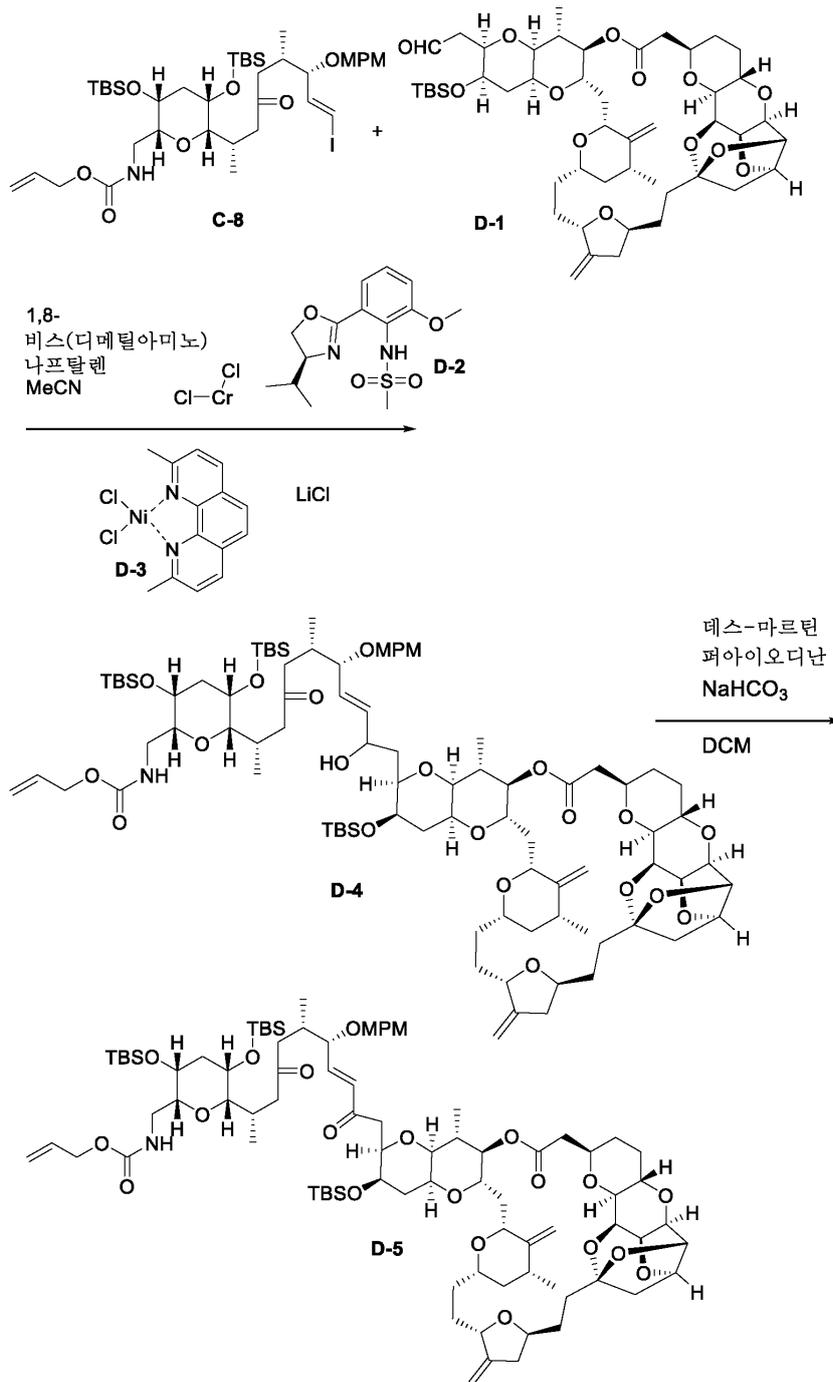


[0187]

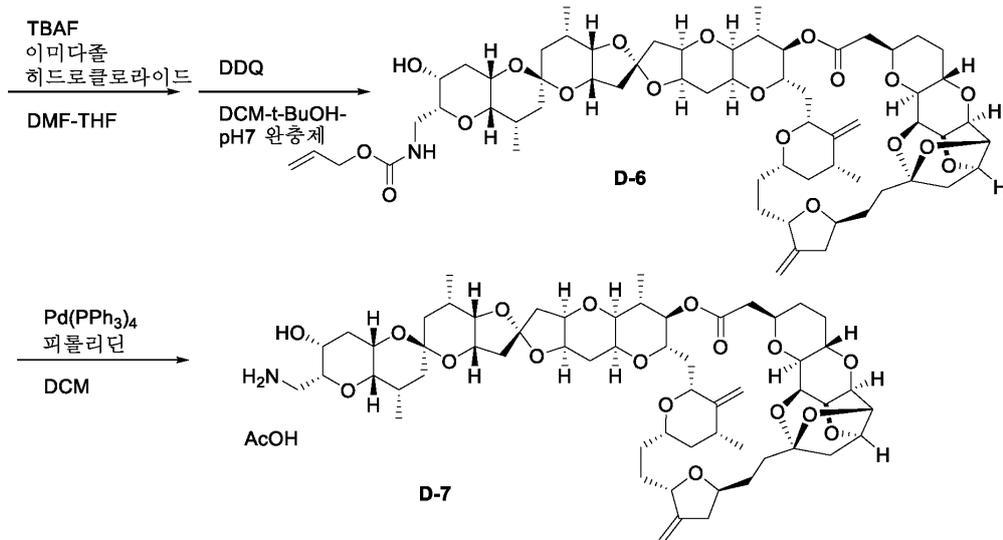
[0188] 20℃에서 THF (10 mL) 및 물 (1.0 mL) 중 실시예 15에 기재된 화합물 C-7: (2S,6S,7S,E)-2-((2S,3S,5R,6R)-6-(아지도메틸)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)테트라히드로-2H-피란-2-일)-9-아이오도-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸노-8-엔-4-온 (298 mg, 0.37 mmol)의 용액에 트리페닐포스핀 (1437 mg, 5.478 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 70℃에서 1.5시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축시켜 조 아민을 수득하였다. 5℃에서 THF (10 mL) 중 상기 수득된 조 아민의 용액에 Et₃N (0.51 mL, 3.66 mmol) 및 디알릴 디카르보네이트 (341 mg, 1.83 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 60분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 상에서 0%에서 25% EtOAc/헵탄을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 표제 화합물 (화합물 C-8, 300 mg, 94% 수율)을 수득하였다.

[0189] ¹H NMR (500 MHz, 클로로포름-d) δ ppm 0.05 - 0.07 (m, 9 H) 0.11 (s, 3 H) 0.85 (d, J=6.3 Hz, 3 H) 0.87 (d, J=6.3 Hz, 3 H) 0.90 (s, 9 H) 0.93 (s, 9 H) 1.80 (dt, J=15.0, 4.4 Hz, 1 H) 1.96 (dt, J=15.0, 2.8 Hz, 1 H) 2.16 - 2.29 (m, 2 H) 2.32 - 2.39 (m, 1 H) 2.53 - 2.60 (m, 3 H) 2.86 (d, J=7.3 Hz, 1 H) 3.04 - 3.11 (m, 1 H) 3.30 - 3.34 (m, 1 H) 3.38 - 3.48 (m, 1 H) 3.58 (t, J=7.1 Hz, 1 H) 3.70 - 3.76 (m, 1 H) 3.80 (s, 3 H) 3.81 - 3.84 (m, 1 H) 4.25 (d, J=11.2 Hz, 1 H) 4.46 (d, J=11.2 Hz, 1 H) 4.53 - 4.63 (m, 2 H) 5.19 (dd, J=10.7, 1.5 Hz, 1 H) 5.32 (d, J=17.1 Hz, 1 H) 5.47 (d, J=6.8 Hz, 1 H) 5.88 - 5.99 (m, 1 H) 6.28 (d, J=14.6 Hz, 1 H) 6.43 (dd, J=14.6, 7.8 Hz, 1 H) 6.87 (d, J=8.8 Hz, 2 H) 7.21 (d, J=8.8 Hz, 2 H). ESI-MS (m/z): 896.34 [M+Na]⁺

[0190] 반응식 D; 화합물 D-7의 제조



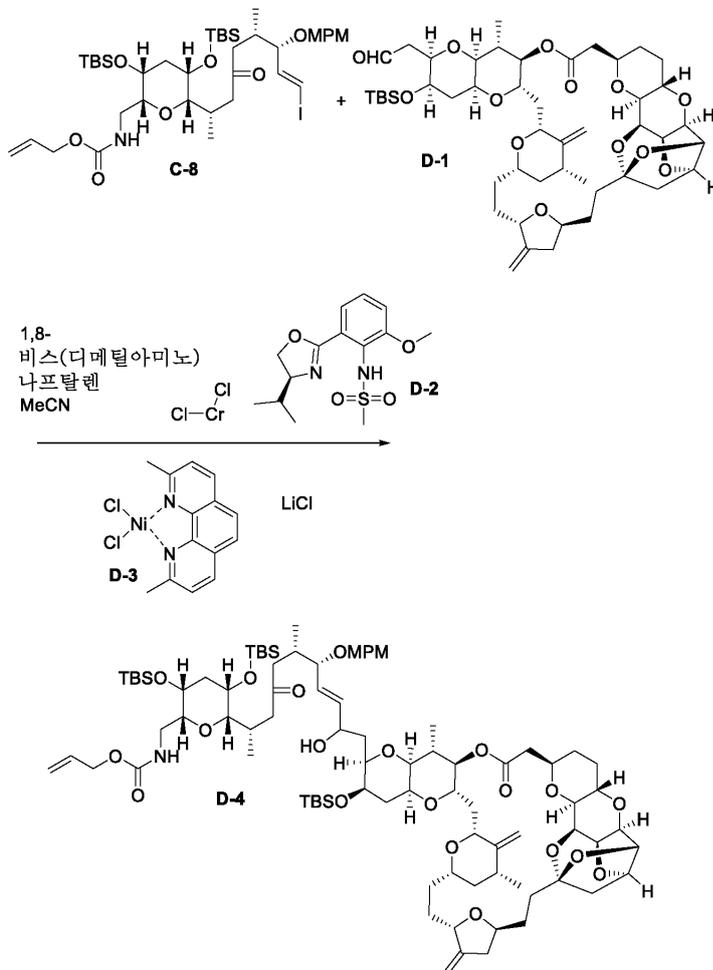
[0191]



[0192]

[0193] 실시예 17

[0194] 화합물 D-4



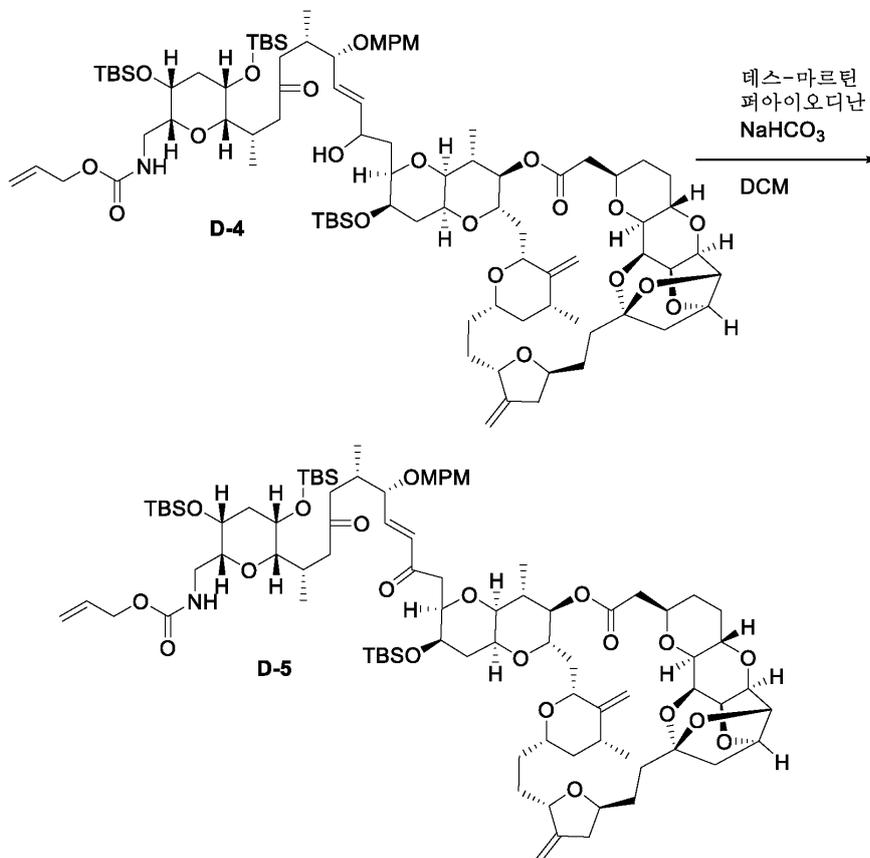
[0195]

[0196] 질소 분위기 하에 (글로브 박스 내에서), MeCN (0.75 mL) 중 문헌 [Organic Letters (2002), 4 (25), 4431-4434]에 기재된 방법에 의해 수득된 화합물 D-2: (S)-N-(2-(4-이소프로필-4,5-디히드록사졸-2-일)-6-메톡시페닐)메탄술폰아미드 (155 mg, 0.497 mmol) (CAS No; 546141-34-8) 및 1,8-비스(디메틸아미노)나프탈렌 (107 mg, 0.497 mmol)의 용액에 크로뮴(II) 클로라이드 (55.5 mg, 0.452 mmol)를 첨가하고, 이어서 생성된 혼합물을 글

로브 박스 내에서 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 생성된 녹색 용액을 실시예 16에 기재된 화합물 C-8: 알릴(((2R,3R,5S,6S)-3,5-비스((tert-부틸디메틸실릴)옥시)-6-((2S,6S,7S,E)-9-아이오도-7-((4-메톡시벤질)옥시)-6-메틸-4-옥소노-8-엔-2-일)테트라히드로-2H-피란-2-일)메틸)카르바메이트 (99.0 mg, 0.113 mmol), 문헌 [Journal of the American Chemical Society (1992), 114 (8), 3162-3164]에 기재된 방법에 의해 수득된 화합물 D-1 (80.0 mg, 0.09 mmol) (CAS No; 157322-23-1), 문헌 [Journal of the American Chemical Society (2009), 131(42), 15387 - 15393]에 기재된 방법에 의해 수득된 화합물 D-3: 디클로로(2,9-디메틸-1,10-페난트롤린)니켈 (0.46 mg, 1.36 μmol) (CAS No; 21361-04-6) 및 염화리튬 (3.83 mg, 0.09 mmol)의 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 글로브 박스 내에서 실온에서 60분 동안 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 글로브 박스로부터 꺼내어, 디에틸 에테르-EtOAc (5.0 mL - 5.0 mL)로 희석하고, 이어서 플로리실(Florisil)® (1600 mg, 15.94 mmol) (CAS No; 1343-88-0)을 혼합물에 첨가하였다. 이어서, 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 혼합물을 여과하고 (셀라이트(Celite)®), EtOAc/헵탄 = 2/1로 세척하고, 이어서 여과물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 상에서 3%에서 55% EtOAc/헵탄을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 표제 화합물 (화합물 D-4, 140 mg, 95% 수율)을 수득하였다.

[0197] 실시예 18

[0198] 화합물 D-5



[0199]

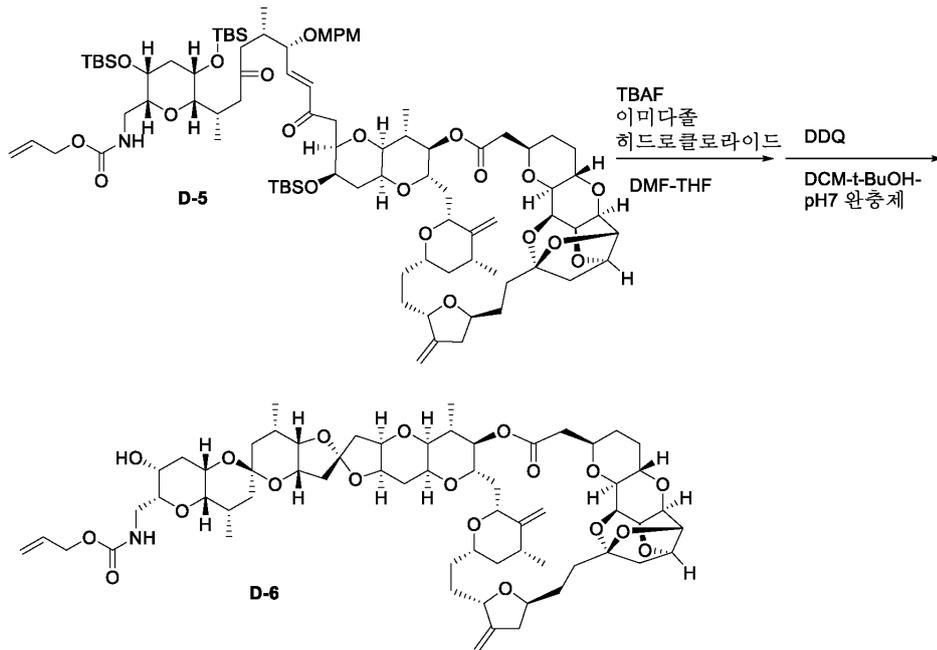
[0200] 질소 분위기 하에, 5°C에서 DCM (5.0 mL) 중 실시예 17에 기재된 화합물 D-4 (140 mg, 0.09 mmol)의 용액에 NaHCO₃ (28.8 mg, 0.34 mmol) 및 데스-마르틴 피라이오디난 (72.7 mg, 0.17 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 60분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 DCM으로 희석하고, 포화 NaHCO₃ aq 및 포화 Na₂SO₃ aq로 켄칭하고, 이어서 층을 분리하였다. 수성 층을 DCM으로 추출하였다. 합한 유기 추출물을 염수로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 실리카 겔 상에서 2%에서 60% EtOAc/헵탄을 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 표제 화합물 (화합물 D-5, 120 mg, 86%)을 수득하였다.

[0201] ¹H NMR (500 MHz, 벤젠-d₆) δ ppm 0.01 - 0.05 (m, 9 H) 0.10 - 0.12 (m, 6 H) 0.15 (s, 3 H) 0.76 (d, J=6.1 Hz, 3 H) 0.96 (s, 9 H) 1.02 (s, 9 H) 1.04 (s, 9 H) 0.95 - 1.10 (m, 7H) 1.20 (d, J=7.3 Hz, 3 H) 1.31 - 1.37 (m, 3 H) 1.41 (dd, J=12.8, 4.9 Hz, 1 H) 1.40 - 1.58 (m, 4 H) 1.59 - 1.64 (m, 1 H) 1.69 -

1.89 (m, 3H) 1.90 - 1.99 (m, 2 H) 2.02 - 2.25 (m, 8 H) 2.26 - 2.48 (m, 6 H) 2.49 - 2.70 (m, 6 H) 2.71 - 2.84 (m, 2 H) 3.00 - 3.07 (m, 1 H) 3.12 - 3.30 (m, 4 H) 3.36 (s, 3 H) 3.40 (br.s, 1 H) 3.44 - 3.53 (m, 2 H) 3.65 (dd, J=6.4, 4.0 Hz, 1 H) 3.69 - 3.84 (m, 4H) 3.86 - 4.03 (m, 4H) 4.07 - 4.17 (m, 3 H) 4.27 - 4.29 (m, 1H) 4.27 (d, J=11.0 Hz, 1H) 4.48 - 4.58 (m, 1 H) 4.49 (d, J=11.0 Hz, 1H) 4.65 - 4.70 (m, 2 H) 4.68 (d, J=5.5 Hz, 1H) 4.74 - 4.86 (m, 2H) 4.78 (s, 1H) 4.93 (s, 1 H) 5.05 (d, J=10.4 Hz, 1 H) 5.09 (br. s., 1 H) 5.19 (br. s., 1 H) 5.30 (dd, J=17.1, 1.2 Hz, 1 H) 5.82 (d, J=8.0 Hz, 1 H) 5.86 - 5.96 (m, 1 H) 6.46 (d, J=15.9 Hz, 1 H) 6.84 - 6.92 (m, 3 H) 7.31 (d, J=8.6 Hz, 2 H).

[0202] 실시예 19

[0203] 화합물 D-6



[0204]

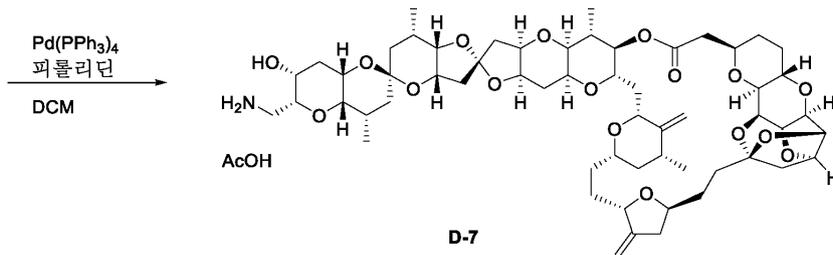
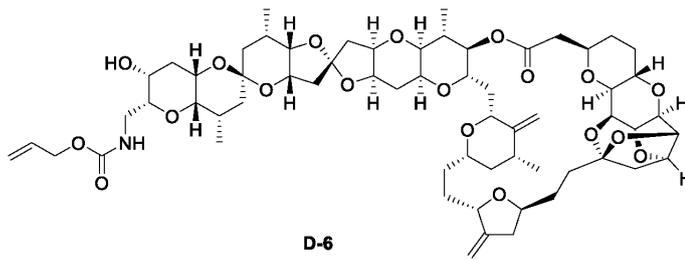
[0205] 이미다졸 히드로클로라이드 (155 mg, 1.48 mmol)를 DMF (2.9 mL) 중에 용해시켜 DMF 중 0.5 M 이미다졸 히드로클로라이드 용액을 수득하였다. 이 용액 1.0 mL를 TBAF (1.0 M, THF 용액) 1.0 mL와 혼합하여 THF-DMF (1:1) 중 0.5 M TBAF 및 0.25 M 이미다졸 히드로클로라이드의 예비혼합된 용액을 수득하였다. 질소 분위기 하에, 20 °C에서 DMF (7.0 mL) 중 실시예 18에 기재된 화합물 D-5 (80.0 mg, 0.05 mmol)의 용액에 상기 제조된 THF-DMF (1:1) 중 TBAF (0.5 M) 및 이미다졸 히드로클로라이드 (0.25 M)의 예비혼합된 용액 0.588 mL를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 14시간 동안 교반하였다. CaCO₃ 1.6 g 및 다우엑스(Dowex)® 50WX8 (수소 형태, 200-400 메쉬, 시그마-알드리치(SIGMA-ALDRICH)) 4.0 g을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 이어서, 혼합물을 EtOAc로 희석한 다음, 여과하고 (셀라이트®), EtOAc로 세척하였다. 여과물을 감압 하에 농축시켜 조 잔류물을 수득하였다. CaCO₃ 1000 mg 및 다우엑스® 50WX8 2.25 g을 조 잔류물의 EtOAc (6.0 mL) 용액에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 2.5시간 동안 교반하였다. 이어서, 혼합물을 EtOAc로 희석하고, 여과하고 (셀라이트®), EtOAc로 세척하였다. 여과물을 감압 하에 농축시켜 조 잔류물 (63.0 mg)을 수득하였다. DCM (6.0 mL), t-BuOH (0.6 mL) 및 pH 7 포스페이트 완충제 (0.6 mL, 1/15 M) 중 상기 수득된 조 잔류물 (63.0 mg)의 용액에 실온에서 DDQ (111 mg, 0.49 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 45분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 포화 NaHCO₃ aq로 켄칭하고, 이어서 DCM으로 희석하고, 층을 분리하였다. 수성 층을 DCM으로 추출하였다 (3회). 합한 유기 추출물을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 여과하고, 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 NH 실리카 겔 상에서 10%에서 100% EtOAc/헥산, 이어서 10% MeOH/ EtOAc를 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 거의 정제된 표제 화합물 (화합물 D-6, 15.0 mg, 27%)을 수득하였다.

[0206] ¹H NMR (500 MHz, 메탄올-d₄) δ ppm 0.97 (d, J=7.0 Hz, 3 H) 0.97 (d, J=7.0 Hz, 3 H) 1.00 - 1.02 (m, 1 H) 1.05 (d, J=7.3 Hz, 3 H) 1.09 (d, J=6.3 Hz, 3 H) 1.31 - 1.45 (m, 6H) 1.46 - 1.63 (m, 5H) 1.64 - 1.75 (m, 3 H) 1.80 - 1.86 (m, 2 H) 1.87 - 1.93 (m, 2 H) 1.94 - 2.11 (m, 9H) 2.13 - 2.27 (m, 8H) 2.33 (d,

J=2.4 Hz, 2 H) 2.39 (dd, J=13.4, 6.1 Hz, 1 H) 2.44 (dd, J=17.6, 2.0 Hz, 1 H) 2.55 (dd, J=17.6, 9.3 Hz, 1 H) 2.75 - 2.84 (m, 1 H) 2.97 (dd, J=9.3, 2.0 Hz, 1 H) 3.21 (dd, J=6.6, 4.6 Hz, 1 H) 3.32 (m, 1 H) 3.41 - 3.46 (m, 1 H) 3.57 (br. s., 1 H) 3.60 (d, J=11.7 Hz, 1 H) 3.67 - 3.74 (m, 2 H) 3.78 (br. s., 1 H) 3.86 - 3.90 (m, 2 H) 3.97 (d, J=2.4 Hz, 1 H) 4.02 - 4.11 (m, 4 H) 4.17 (dd, J=6.6, 4.6 Hz, 1 H) 4.23 (dd, J=11.5, 2.2 Hz, 1 H) 4.29 (br. s., 1 H) 4.31 (td, J=9.3, 3.9 Hz, 1 H) 4.44 (d, J=10.2 Hz, 1 H) 4.51 (d, J=5.4 Hz, 2 H) 4.59 (t, J=4.9 Hz, 1 H) 4.61 (dd, J=7.3, 4.9 Hz, 1 H) 4.69 (t, J=4.6 Hz, 1 H) 4.80 (s, 1 H) 4.85 - 4.87 (m, 1 H) 5.01 (s, 1 H) 5.05 (s, 1 H) 5.16 (dd, J=10.7, 1.0 Hz, 1 H) 5.28 (dd, J=17.1, 2.0 Hz, 1 H) 5.92 (m, 1 H). ESI-MS (m/z): 1172.57 [M+Na]⁺

[0207] 실시예 20

[0208] 화합물 D-7



[0209]

[0210] 질소 분위기 하에, 실온에서 DCM (2.0 mL) 중 실시예 19에 기재된 화합물 D-6 (15.0 mg, 0.013 mmol), 피롤리딘 (10.8 μL, 0.13 mmol)의 용액에 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0) (7.53 mg, 6.52 μmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축시켰다. 잔류물을 NH 실리카 겔 상에서 50% EtOAc/헵탄, 이어서 0%에서 20% MeOH/EtOAc를 사용하여 플래쉬 크로마토그래피하여 거의 정제된 생성물을 수득하였다. 수득된 거의 정제된 생성물을 HPLC에 의해 정제하여 표제 화합물 (D-7, 7.0 mg, 47%, 체류 시간 = 13.8분)을 수득하였다.

[0211] HPLC 조건:

[0212] 칼럼: YMC 팩 프로 C18 (20 mm x 250 mm)

[0213] 검출 파장: 200 nm

[0214] 칼럼 온도: 실온

[0215] 이동상: MeCN-물 (0.05% AcOH)

[0216] 유량: 8 mL/분

[0217] 용리액:

[0218] MeCN/물 25% (등용매, 2분), 이어서

[0219] MeCN/물 25%에서 60% (구배, 20분)

[0220] ¹H NMR (500 MHz, 메탄올-d₄) δ ppm 0.99 (d, J=6.7 Hz, 3 H) 1.00 - 1.03 (m, 1 H) 1.04 (d, J=7.3 Hz, 3 H) 1.06 (d, J=7.3 Hz, 3 H) 1.10 (d, J=6.1 Hz, 3 H) 1.29 - 1.63 (m, 10 H) 1.65 - 1.78 (m, 3 H) 1.79 - 1.89

(m, 2 H) 1.92 - 2.12 (m, 10 H) 1.93 (s, 3 H) 2.13 - 2.36 (m, 9 H) 2.41 (dd, J=13.5, 6.1 Hz, 1 H) 2.45 (dd, J=17.6, 2.2 Hz, 1 H) 2.56 (dd, J=17.6, 9.8 Hz, 1 H) 2.75 - 2.84 (m, 1 H) 2.98 (dd, J=9.8, 1.8 Hz, 1 H) 3.12 (dd, J=12.8, 3.7 Hz, 1 H) 3.22 (dd, J=6.4, 4.6 Hz, 1 H) 3.26 (dd, J=13.2, 7.8 Hz, 1 H) 3.39 (d, J=1.8 Hz, 1 H) 3.61 (d, J=12.8 Hz, 1 H) 3.63 - 3.68 (m, 2 H) 3.68 - 3.76 (m, 2 H) 3.81 - 3.94 (m, 3 H) 4.00 (d, J=2.5 Hz, 1 H) 4.03 - 4.15 (m, 4 H) 4.18 (dd, J=6.4, 4.6 Hz, 1 H) 4.25 (ddd, J=11.0, 4.3, 1.8 Hz, 1 H) 4.27 - 4.36 (m, 2 H) 4.46 (d, J=11.0 Hz, 1 H) 4.57 - 4.65 (m, 2 H) 4.70 (t, J=4.6 Hz, 1 H) 4.81 (d, J=1.2 Hz, 1 H) 5.02 (br. s., 1 H) 5.06 (d, J=1.8 Hz, 1 H). ESI-MS (m/z): 1066.96 [M+H]⁺, 1090.19 [M+Na]⁺

[0221] 화합물 (1) (화합물 D-7의 염 유리 형태): ¹H NMR (600 MHz, 메탄올-d₄) δ ppm 0.98 (d, J=7.2 Hz, 3 H) 1.00 (d, J=6.8 Hz, 3 H) 1.02 (m, 1 H) 1.05 (d, J=6.8 Hz, 3 H) 1.09 (d, J=6.4 Hz, 3 H) 1.28 - 1.45 (m, 5 H) 1.46 - 1.59 (m, 4 H) 1.57 - 1.63 (m, 1 H) 1.65 - 1.71 (m, 1 H) 1.70 - 1.75 (m, 2 H) 1.79 - 1.86 (m, 2 H) 1.91 (dt, J=14.9, 3.1 Hz, 1 H) 1.94 - 2.11 (m, 8 H) 2.14 - 2.34 (m, 9 H) 2.39 (dd, J=13.2, 6.0 Hz, 1 H) 2.44 (dd, J=17.4, 1.9 Hz, 1 H) 2.56 (dd, J=17.6, 9.6 Hz, 1 H) 2.69 (dd, J=13.2, 4.2 Hz, 1 H) 2.79 (ddq, J=15.9, 7.6, 2.0 Hz, 1 H) 2.92 (dd, J=13.2, 8.3 Hz, 1 H) 2.97 (dd, J=9.6, 1.7 Hz, 1 H) 3.21 (dd, J=6.4, 4.9 Hz, 1 H) 3.29 (m, 1 H) 3.34 (dd, J=8.3, 4.15 Hz, 1 H) 3.58 (br. s., 1 H) 3.60 (br.d, J=11.3 Hz, 1 H) 3.68 - 3.73 (m, 2 H) 3.80 (br. s., 1 H) 3.84 - 3.90 (m, 2 H) 3.98 (d, J=2.3 Hz, 1 H) 4.03 - 4.13 (m, 4 H) 4.17 (dd, J=6.4, 4.9 Hz, 1 H) 4.24 (ddd, J=11.3, 4.5, 1.5 Hz, 1 H) 4.29 (dd, J=4.0, 1.9 Hz, 1 H) 4.32 (td, J=10.2, 4.2 Hz, 1 H) 4.44 (br. d, J=11.0 Hz, 1 H) 4.59 (t, J=4.5 Hz, 1 H) 4.62 (dd, J=7.4, 4.7 Hz, 1 H) 4.69 (t, J=4.7 Hz, 1 H) 4.80 (br. s., 1 H) 4.87 (s, 1 H) 5.00 (br. s., 1 H) 5.05 (br.d, J=1.1 Hz, 1 H)

[0222] ESI-MS (m/z): 1066.57 [M+H]⁺, 1088.55 [M+Na]⁺

[0223] 약리학적 시험 실시예

[0224] 일반적 정보

[0225] 천연 할리콘드린 화합물 및 그의 변형된 화합물은 문헌에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [D. Uemura et al. "Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge" J. Am. Chem. Soc., 107, 4796 (1985); Marc Litaudon et al. "Antitumor Polyether Macrolides: New and Hemisynthetic Halichondrins from the New Zealand Deep-Water Sponge Lissodendoryx sp." J. Org. Chem., 1997, 62, 1868-1871] 참조). 그러나, 이들 대부분은 용이하게 입수가 가능하지 않다. 예를 들어, 우에무라 박사 등은 600 kg 정도의 할리콘드리아 오카다이 카도타로부터 12.5 mg의 할리콘드린 B, 35.0 mg의 노르할리콘드린 A 및 17.2 mg의 호모할리콘드린 A를 단리하였다 (예를 들어, 문헌 [D. Uemura et al. "Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge" J. Am. Chem. Soc., 107, 4796 (1985)] 참조). 천연 할리콘드린 화합물 중에, 할리콘드린 B는 시험관내에서 B-16 흑색종 세포에 대해 가장 강력한 항종양 활성을 제시하며, 생체내에서 L-1210 백혈병에 대해 고도로 활성이다 (예를 들어, 문헌 [D. Uemura et al. "Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge" J. Am. Chem. Soc., 107, 4796 (1985)] 참조). 할리콘드린 C도 또한 다양한 생체내 모델에서 활성이지만, 할리콘드린 B와 비교하여 수용액 중에서 불안정하다. 노르할리콘드린 B는 시험관내 뿐만 아니라 생체내에서 할리콘드린 B보다 훨씬 더 약하다 (예를 들어, 문헌 [D. Uemura et al. "Norhalichondrin A: An Antitumor Polyether Macrolide from a Marine Sponge" J. Am. Chem. Soc., 107, 4796 (1985)] 참조). 하기 약리학적 시험은 필요에 따라 할리콘드린 B (Hali-B)를 참조 화합물로서 사용한다.

[0226] 약리학적 시험 실시예 1. FaDu 성장 억제 검정

[0227] 본 검정에서, 인간 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN) 세포주 FaDu에서의 시험 화합물의 성장 억제 활성을 측정하였다. FaDu 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C) 내 10% 태아 소 혈청 (FBS: 니치레이(Nichirei), 12D168), 및 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 (와코 퓨어 케미칼 인더스트리즈, 리미티드(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 187-02021) 배지 중에 유지하였다. 96 웰 플레이트 (백톤, 디킨슨 앤드 캄파니 (Becton, Dickinson and Company), 353219)의 각각의 웰에, 배양 배지로 4x10⁴ 개 세포/mL의 농도로 조정된 FaDu 세포 현탁액 75 μL를 첨가하고, 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C)에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날

에, 배양 배지 중에 현탁된 일련의 3배 희석물로 화합물 (1) 또는 할리콘드린 B 25 μ L를 각각의 웰에 첨가하고, 생성물을 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C)에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포 생존율을 엔비전 2103 멀티라벨 리더 (매사추세츠주 웰슬리 소재의 퍼킨-엘머(Perkin-Elmer))를 사용한 셀타이터-글로(CellTiter-Glo)[®] 발광 세포 생존율 검정 (프로메가(Promega))에 의해 결정하였다. 시험 화합물을 첨가하지 않은 채로 세포를 함유하는 웰의 값을 100%로서 정의하였고, 세포를 함유하지 않는 웰의 값을 0%로서 정의하였다. 세포 성장을 50%만큼 억제하기 위해 필요한 시험 화합물의 농도 (즉, IC₅₀ 값)를 계산하였고, 표 1에 제시하였다.

[0228] 표 1

FaDu	
시험 화합물	(IC ₅₀ (nM))
할리콘드린 B	0.124
화합물 (1)	0.0714

[0229]

[0230] 약리학적 시험 실시예 2. MDA-MB231 성장 억제 검정

[0231] 본 검정에서, 인간 유방암 세포주 MDA-MB231에서의 시험 화합물의 성장 억제 활성을 측정하였다. MDA-MB231 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C) 내 10% 태아 소 혈청 (FBS: 니치레이, 12D168), 및 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 돌베코 변형 이글 배지 (와코 퓨어 케미칼 인더스트리즈, 리미티드, 044-29765)라는 배지 중에 유지하였다. 96 웰 플레이트 (백톤, 디킨슨 앤드 캠퍼니, 353219)의 각각의 웰에, 배양 배지로 4x10⁴개 세포/mL의 농도로 조정된 MDA-MB231 세포 현탁액 75 μ L를 첨가하고, 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C)에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날에, 배양 배지 중에 현탁된 일련의 3배 희석물로 화합물 (1) 또는 할리콘드린 B 25 μ L를 각각의 웰에 첨가하고, 생성물을 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C)에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포 생존율을 엔비전 2103 멀티라벨 리더 (매사추세츠주 웰슬리 소재의 퍼킨-엘머)를 사용한 셀타이터-글로[®] 발광 세포 생존율 검정 (프로메가)에 의해 결정하였다. 시험 화합물을 첨가하지 않은 채로 세포를 함유하는 웰의 값을 100%로서 정의하였고, 세포를 함유하지 않는 웰의 값을 0%로서 정의하였다. 세포 성장을 50%만큼 억제하기 위해 필요한 시험 화합물의 농도 (즉, IC₅₀ 값)를 계산하였고, 표 2에 제시하였다.

[0232] 표 2

MDA-MB231	
시험 화합물	(IC ₅₀ (nM))
할리콘드린 B	1.000
화합물 (1)	0.109

[0233]

[0234] 약리학적 시험 실시예 3. HCC1954 성장 억제 검정

[0235] 본 검정에서, 인간 유방암 세포주 HCC1954에서의 시험 화합물의 성장 억제 활성을 측정하였다. HCC1954 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C) 내 10% 태아 소 혈청 (FBS: 니치레이, 12D168), 및 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하며, 2 mM L-글루타민, 10 mM HEPES, 1 mM 피루브산나트륨, 4500 mg/L 글루코스 및 1500 mg/L 중탄산나트륨 (ATCC 30-2001)을 함유하도록 변형된 RPMI-1640 배지 중에 유지하였다. 96 웰 플레이트 (백톤, 디킨슨 앤드 캠퍼니, 353219)의 각각의 웰에, 배양 배지로 4x10⁴개 세포/mL의 농도로 조정된 HCC1954 세포 현탁액 75 μ L를 첨가하고, 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C)에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날에, 배양 배지 중에 현탁된 일련의 3배 희석물로 화합물 (1) 또는 할리콘드린 B 25 μ L를 각각의 웰에 첨가하고, 생성물을 5% CO₂ 인큐베이터

(37°C)에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포 생존율을 엔비전 2103 멀티라벨 리더 (매사추세츠주 웰슬리 소재의 퍼킨-엘머)를 사용한 셀타이터-글로® 발광 세포 생존율 검정 (프로메가)에 의해 결정하였다. 시험 화합물을 첨가하지 않은 채로 세포를 함유하는 웰의 값을 100%로서 정의하였고, 세포를 함유하지 않는 웰의 값을 0%로서 정의하였다. 세포 성장을 50%만큼 억제하기 위해 필요한 시험 화합물의 농도 (즉, IC₅₀ 값)를 계산하였고, 표 3에 제시하였다.

[0236] 표 3

HCC1954	
시험 화합물	(IC ₅₀ (nM))
할리콘드린 B	0.154
화합물 (1)	0.0668

[0237]

[0238] 약리학적 시험 실시예 4. 단독요법으로서의 마우스의 FaDu 피하 이종이식편 모델에서의 항종양 효과

[0239] 10% FBS, 및 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지 중에 배양된, 인간 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN) 세포주 FaDu를 헵크 평형 염 용액으로 4.8 x 10⁷ 개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 7주령 누드 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 찰스 리버 래보러토리즈 재팬 인크.(Charles River Laboratories Japan Inc.))의 우측 측복부의 피하 부위로 100 μL의 부피를 접종하였다. 세포 접종으로부터 9일 후, 하기 계산식에 따라 종양의 부피를 계산하기 위해, 각각의 마우스에서 종양의 최단 직경 및 최장 직경을 전자 디지털 캘리퍼 (디지매틱(Digimatic)TM 캘리퍼, 미스토요 코포레이션(Mitutoyo Corporation))를 사용하여 측정하였다:

[0240] 종양 부피 (mm³) = 최장 직경 (mm) x 최단 직경 (mm) x 최단 직경 (mm)/2

[0241] 상대 종양 부피 (RTV) = 종양 부피 (제X일) / 종양 부피 (첫째날)

[0242] 종양 퇴행 (%) = (1 - 최소 RTV) x100

[0243] 투여 첫째날에 입수된 종양의 부피에 기반하여, 그룹 간에 종양 부피의 평균이 실질적으로 같도록 마우스를 그룹으로 나누었다. 각각의 시험 화합물을 DMSO 중에 용해시키고, 용액을 사용 전에는 냉동기에 저장하였다. 투여 직전에, 스톱 용액을 100 μM의 히드록시프로필-β-시클로텍스트린이 함유된 염수로 희석하였다. 각각의 평가 샘플을 최대 허용 용량 (MTD)으로 정맥내로 투여하였다. 한편, 실험은 4마리의 마우스로 각각 이루어진 그룹으로 수행하였다. 각각의 시험 화합물의 종양 퇴행 (%)을 표 4에 제시하였다.

[0244] 표 4

시험 화합물	용량 (mg/kg)	종양 퇴행 (%)
할리콘드린 B	0.05	0
화합물 (1)	0.2	43

[0245]

[0246] 약리학적 시험 실시예 5. 단독요법으로서의 마우스의 피하 이종이식편 모델에서의 OSC-19에 대한 항종양 활성

[0247] 10% FBS, 및 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 DMEM/렘 F-12 (1:1) 배지 중에 배양된, 인간 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN) 세포주 OSC-19를 PBS로 1 x 10⁸ 개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하고, 현탁액을 1:1의 비로 매트릭겔(Matrigel)TM (BD 바이오사이언스(BD Bioscience), #366237)과 혼합하여 5 x 10⁷ 개 세포/mL의 농도로 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 5주령 누드 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 찰스 리버 래보러토리즈 재팬 인크.)의 우측 측복부의 피하 부위로 100 μL의 부피를 접종하였다. 세포 접종으로부터 6일 후, 하기 계산식에 따라 종양의 부피를 계산하기 위해, 각각의 마우스에서 종양의 최단 직경 및 최장 직경을 전자 디지털 캘리퍼 (디지매틱TM 캘리퍼, 미스토요 코포레이션)를 사용하여 측정하였다:

[0248] 종양 부피 (mm³) = 최장 직경 (mm) x 최단 직경 (mm) x 최단 직경 (mm)/2

[0249] 상대 종양 부피 (RTV) = 종양 부피 (제X일) / 종양 부피 (첫째날)

[0250] 종양 퇴행 (%) = (1 - 최소 RTV) x100

[0251] 투여 첫째날에 입수된 종양의 부피에 기반하여, 그룹 간에 종양 부피의 평균이 실질적으로 같도록 마우스를 그룹으로 나누었다. 실험은 6마리의 마우스로 각각 이루어진 그룹으로 수행하였다. 시험 화합물을 염수 중에 용해시키고, 2주 동안 1주에 1회 (Q7Dx2 스케줄) 0.06 mg/kg 내지 0.18 mg/kg의 용량으로 정맥내로 투여하였다. 각각의 시험 용량의 종양 퇴행 (%)을 표 5에 제시하였다.

[0252] 표 5

시험 화합물	용량 (mg/kg)	종양 퇴행 (%)
화합물 (1)	0.06	59
화합물 (1)	0.18	90

[0253]

[0254] 약리학적 시험 실시예 6. 단독요법으로서의 마우스의 피하 이종이식편 모델에서의 HCC1806에 대한 항종양 활성

[0255] 10% FBS, 및 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지 중에 배양된, 인간 유방암 세포주 HCC1806을 PBS로 1 x 10⁸개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하고, 현탁액을 1:1의 비로 매트릭젤™ (BD 바이오사이언스, #366237)과 혼합하여 5 x 10⁷개 세포/mL의 농도로 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 5주령 누드 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 찰스 리버 래보러토리즈 재팬, 인크.)의 우측 측복부의 피하 부위로 100 μL의 부피를 접종하였다. 세포 접종으로부터 12일 후, 하기 계산식에 따라 종양의 부피를 계산하기 위해, 각각의 마우스에서 종양의 최단 직경 및 최장 직경을 전자 디지털 캘리퍼 (디지털매틱™ 캘리퍼, 미스토요 코포레이션)를 사용하여 측정하였다:

[0256] 종양 부피 (mm³) = 최장 직경 (mm) x 최단 직경 (mm) x 최단 직경 (mm)/2

[0257] 상대 종양 부피 (RTV) = 종양 부피 (제X일) / 종양 부피 (첫째날)

[0258] 종양 퇴행 (%) = (1 - 최소 RTV) x100

[0259] 투여 첫째날에 입수된 종양의 부피에 기반하여, 그룹 간에 종양 부피의 평균이 실질적으로 같도록 마우스를 그룹으로 나누었다. 실험은 6마리의 마우스로 각각 이루어진 그룹으로 수행하였다. 시험 화합물을 염수 중에 용해시키고, 2주 동안 1주에 1회 (Q7Dx2 스케줄) 0.18 mg/kg으로 정맥내로 투여하였다. 화합물 (1)에 대한 종양 퇴행 (%)을 표 6에 제시하였다.

[0260] 표 6

시험 화합물	용량 (mg/kg)	종양 퇴행 (%)
화합물 (1)	0.18	90

[0261]

[0262] 약리학적 시험 실시예 7. 마우스의 FaDu 피하 이종이식편 모델에서의 세특시맙과의 조합 시의 항종양 효과

[0263] 10% FBS, 및 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지 중에 배양된, 인간 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN) 세포주 FaDu를 행크 평형 염 용액으로 5 x 10⁷개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 7주령 누드 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 찰스 리버 래보러토리즈 재팬 인크.)의 우측 측복부의 피하 부위로 100 μL의 부피를 접종하였다. 세포 접종으로부터 10일 후, 하기 계산식에 따라 종양의 부피를 계산하기 위해, 각각의 마우스에서 종양의 최단 직경 및 최장 직경을 전자 디지털 캘리퍼 (디지털매틱™ 캘리퍼, 미스토요 코포레이션)를 사용하여 측정하였다:

[0264] 종양 부피 (mm³) = 최장 직경 (mm) x 최단 직경 (mm) x 최단 직경 (mm)/2

[0265] 상대 종양 부피 (RTV) = 종양 부피 (제X일) / 종양 부피 (첫째날)

[0266] 제35일에서의 종양 퇴행 (%) = (1- 제35일에서의 RTV) x100

[0267] 투여 첫째날에 입수된 종양의 부피에 기반하여, 그룹 간에 종양 부피의 평균이 실질적으로 같도록 마우스를 그룹으로 나누었다. 각각의 시험 화합물을 DMSO 중에 용해시키고, 용액을 사용 전에는 냉동기에 저장하였다. 투여 직전에, 스톱 용액을 100 μM의 히드록시프로필-β-시클로텍스트린이 함유된 염수로 희석하였다. 각각의 시험 화합물을 1/4 MTD 내지 1/2 MTD의 용량으로 세특시맵 (에르비투스, 머크 세로노 캄파니, 리미티드(Merck Serono Co., Ltd.))과 조합하여 정맥내로 투여하였다. 한편, 실험은 4마리의 마우스로 각각 이루어진 그룹으로 수행하였다. 각각의 시험 화합물의 제35일에서의 종양 퇴행 (%)을 표 7에 제시하였다.

[0268] 표 7

시험 화합물	용량 (mg/kg)	세특시맵 (mg/kg)	제35일에서의 종양 퇴행 (%)
-	-	20	-242
할리콘드린 B	0.0125	20	-38
	0.025	20	-2
화합물 (1)	0.05	20	38
	0.1	20	60

[0269]

[0270] 약리학적 시험 실시예 8. 마우스의 KPL-4 피하 이종이식편 모델에서의 트라스투주맵과의 조합 시의 항종양 활성

[0271] 10% FBS, 및 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지 중에 배양된, 인간 HER-2 양성 유방암 세포주 KPL-4를 행크 평형 염 용액으로 1 x 10⁸ 개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 7주령 누드 마우스 (CAN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 찰스 리버 래보러토리즈 재팬, 인크.)의 우측 측복부의 피하 부위로 100 μL의 부피를 접종하였다. 세포 접종으로부터 16일 후, 하기 계산식에 따라 종양의 부피를 계산하기 위해, 각각의 마우스에서 종양의 최단 직경 및 최장 직경을 전자 디지털 캘리퍼 (디지털캘리퍼, 미스트요 코포레이션)를 사용하여 측정하였다:

[0272] 종양 부피 (mm³) = 최장 직경 (mm) x 최단 직경 (mm) x 최단 직경 (mm)/2

[0273] 상대 종양 부피 (RTV) = 종양 부피 (제X일) / 종양 부피 (첫째날)

[0274] 종양 퇴행 (%) = (1 - 최소 RTV) x100

[0275] 투여 첫째날에 입수된 종양의 부피에 기반하여, 그룹 간에 종양 부피의 평균이 실질적으로 같도록 마우스를 그룹으로 나누었다. 실험은 6마리의 마우스로 각각 이루어진 그룹으로 수행하였다. 각각의 시험 화합물을 DMSO 중에 용해시키고, 용액을 사용 전에는 냉동기에 저장하였다. 투여 직전에, 스톱 용액을 염수로 희석하였다. 시험 화합물을 0.09 mg/kg 또는 0.18 mg/kg으로 트라스투주맵 (헤르셉틴, 제넨테크, 인크.(Genentech, Inc.))과 조합하여 정맥내로 투여하였다. 화합물 (1)에 대한 종양 퇴행을 표 8에 제시하였다.

[0276] 표 8

시험 화합물	용량 (mg/kg)	트라스투주맙 (mg/kg)	종양 퇴행 (%)
-	-	10	0
화합물 (1)	0.09	-	43
	0.09	10	83
	0.18	-	87
	0.18	10	100

[0277]

[0278]

[0279]

약리학적 시험 실시예 9. 마우스의 FaDu 피하 모델에서의 CD31-양성 혈관에 대한 효과

10% FBS, 및 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지 중에 배양된, 인간 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN) 세포주 FaDu를 PBS로 5×10^7 개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 7주령 누드 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 찰스 리버 래보러토리즈 재팬, 인크.)의 우측 측복부의 피하 부위로 100 μ L의 부피를 접종하였다. 세포 접종으로부터 10일 후, 100 μ M의 히드록시프로필- β -시클로텍스트린이 함유된 염수 중의 시험 화합물을 1/2 MTD 내지 MTD의 용량으로 정맥내로 투여하였다. 실험은 3마리의 마우스로 각각 이루어진 그룹으로 수행하였다. 투여로부터 5일 후, 종양 샘플을 수집하고, 24시간 동안 4°C에서 IHC 아연 고정제 (BD 파밍겐(BD Pharmingen))로 고정하였다. 파라핀-포매된 조직을 절편화하고 (3 μ m), 양으로 하전된 슬라이드 상에 탑재하고, 공기-건조시켰다. CD31의 면역조직화학적 염색을 벤타나 자동염색기 모델 디스커버 XT (로슈 다이아그노스틱스(Roche Diagnostics))를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 수행하였다. 절편을 탈파라핀화하고, 컨디셔닝하고, 항원을 CC1 (벤타나 메디칼 시스템즈(Ventana Medical Systems))로 복구하였다. 슬라이드를 차단제 A 및 차단제 B (내인성 비오틴 차단 키트, 로슈 다이아그노스틱스)로 차단시켰다. 래트 항-마우스 IgG CD31 항체 (디아노바 게엠베하(Dianova GmbH))를 2 μ g/mL로 적용하였다. 절편을 항체와 함께 6시간 동안 인큐베이션하였고, 이어서 2.2 μ g/mL의 비오틴화된 항-래트 IgG 항체 (잭슨 이뮤노리서치 래보러토리즈(Jackson ImmunoResearch Laboratories))와 함께 32분 인큐베이션하였다. 검출을 16분 동안 스트렙타비딘-HRP D로 수행하였고, 이어서 8분 동안 DAB D 및 DAB H₂O₂ D (DABMap 키트, 벤타나 메디칼 시스템즈, 인크.)와 함께 인큐베이션하였다. 슬라이드를 16분 동안 헤마톡실린 II (로슈 다이아그노스틱스)로 대조 염색하였고, 이어서 4분 동안 청색화 시약과 함께 인큐베이션하였다. 절편을 등급별 에탄올로 탈수시키고, 크실렌 대체로 탈지하고, DPX (머크 카게아아)로 커버링하였다.

[0280]

면역염색된 슬라이드를 벡트라(Vectra) 2 자동 슬라이드 영상화 시스템 (피킨 엘머 인크.)을 사용하여 스캐닝하였다. 전체 종양 내 혈관의 수를 inForm 2 소프트웨어 (피킨엘머 인크.)를 사용하여 CD31-양성 객체를 카운팅함으로써 정량화하였다. 종양 영역의 면적을 inForm 2 소프트웨어 (피킨엘머 인크.)를 사용하여 헤마톡실린-염색 면적을 산출함으로써 측정하였다. 혈관의 수를 종양 영역의 면적에 의해 정규화하였다. 시험 화합물-투약 그룹의 혈관 수의 증가율을 하기 식으로 계산하였고, 표 9에 제시하였다.

[0281]

혈관 수의 증가율 (%) = ((시험 화합물-투약 그룹의 혈관 수 - 대조군 그룹의 혈관 수) / 대조군 그룹의 혈관 수) x100

[0282] 표 9

시험 화합물	용량 (mg/kg)	혈관 수의 증가율 (%)
할리콘드린 B	0.025	31
	0.05	39
화합물 (1)	0.10	69
	0.20	154

[0283]

[0284]

[0285]

약리학 적 시험 실시예 10. FaDu 피하 모델에서의 α-SMA 양성-CAF에 대한 효과

10% FBS, 및 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지 중에 배양된, 인간 두경부의 편평 세포 암 종 (SCCHN) 세포주 FaDu를 PBS로 5x10⁷ 개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 5 내지 6주령 누드 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 찰스 리버 레보러토리즈 재팬, 인크.)의 우측 측복부의 피하 부위로 100 μL의 부피를 접종하였다. 세포 접종으로부터 10일 후, 100 μM의 히드록시프로필-β-시클로덱스트린이 함유된 염수 중의 시험 화합물을 1/2 MTD 및 MTD로 정맥내로 투여하였다. 실험은 3마리의 마우스로 각각 이루어진 그룹으로 수행하였다. 투여로부터 2일 후, 종양 샘플을 수집하고, 24시간 동안 4°C에서 IHC 아연 고정제 (BD 파밍겐)로 고정하였다. 과라핀-포매된 조직을 절편화하고 (3 μm), 양으로 하전된 슬라이드 상에 탑재하고, 6시간 동안 공기-건조시켰다. α-SMA의 면역조직화학적 염색을 벤타나 자동염색기 모델 디스커버 XT (로슈 다이아그노스틱스)를 사용하여 수행하였다. 절편을 탈파라핀화하고, 컨디셔닝하고, 항원을 등록 상표의 완충제인 EZPrep 및 CC1 (벤타나 메디칼 시스템즈)로 복구하였다. 알칼리성 포스파타제와 접합된 마우스 항-α-SMA 모노클로날 항체 (클론 1A4, 시그마)를 5 μg/mL로 적용하였다. 절편을 항체와 함께 6시간 동안 인큐베이션하였다. 검출을 RedMap 키트 (벤타나 메디칼 시스템즈, 인크.)로 수행하였다. 절편을 등급별 에탄올로 탈수시키고, 크실렌 대체로 탈지하고, DPX (머크 카게아아)로 커버링하였다. 일련의 종양 슬라이드를 탈파라핀화하고, 1분 동안 메이어 헤마톡실린 (뮤토 퓨어 케미칼스(Muto Pure Chemicals))으로 염색하였다. 절편을 등급별 에탄올로 탈수시키고, 크실렌 대체로 탈지하고, DPX (머크 카게아아)로 커버링하였다.

[0286]

면역염색된 슬라이드를 벡트라 2 자동 슬라이드 영상화 시스템 (피킨 엘머 인크.)을 사용하여 스캐닝하였다. 전체 종양 내 α-SMA-양성 영역의 면적을 inForm 2 소프트웨어 (피킨엘머 인크.)를 사용하여 α-SMA-양성 객체를 카운팅함으로써 정량화하였다. 종양 영역의 면적을 inForm 2 소프트웨어 (피킨엘머 인크.)를 사용하여 헤마톡실린-염색 면적을 산출함으로써 측정하였다. α-SMA 양성 영역의 면적을 종양 영역의 면적에 의해 정규화하였다. 시험 화합물-투약 그룹의 α-SMA 양성 영역의 저해율을 하기 식으로 계산하였고, 표 10에 제시하였다.

[0287]

표 10

시험 화합물	용량 (mg/kg)	α-SMA 양성 영역의 저해율 (%)
할리콘드린 B	0.025	7
	0.05	3
화합물 (1)	0.10	21
	0.20	28

[0288]

[0289]

α-SMA 양성 영역의 저해율 (%) = - ((시험 화합물-투약 그룹의 α-SMA 양성 영역 - 대조군 그룹의 α-SMA 양성 영역) / 대조군 그룹의 α-SMA 양성 영역) x100

[0290]

약리학 적 시험 실시예 11. HSC-2 동소 이식 마우스 모델

[0291] 루시페라제-형질도입된 HSC-2-Luc 세포를 레트로바이러스-매개 유전자 전달에 의해 확립하였다. 먼저, 반딧불이 루시페라제를 코딩하는 DNA 단편을 pGL3-인핸서 플라스미드 (진뱅크#:U47297)로부터 입수하여, 레트로바이러스 벡터 pCX4pur (진뱅크#: AB086386)로 서브클로닝하였다. 이어서, 상기 레트로바이러스 발현 벡터를 pGP 및 pE-Ampho 플라스미드 (다카라 바이오(Takara Bio); 일본 시가)와 함께 293T 세포 (ATCC; 미국 마나사스)로 형질감염시킴으로써 헬퍼-무함유 재조합 레트로바이러스를 생산하였다. 그 다음에, HSC-2 세포를 재조합 레트로바이러스로 감염시키고, 퓨로마이신 (2 µg/mL)의 존재 하에 2주 동안 배양하였다. 감염된 세포를 배양물의 폴리클로날 증식성 집단으로부터 선택하였다.

[0292] 마취 하에, 인간 SCCHN 세포주인 HSC-2-Luc를 6주령 암컷 누드 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j 마우스; 찰스 리버, 인크.; 일본 시즈오카)의 설부에 접종하였다 (50 µL의 PBS 중 1 x 10⁶개 세포). 이식으로부터 7일 후, 중앙 부피를 HSC-2-Luc 세포로부터의 생물발광 신호를 사용하여 분석하였다. 생물발광 영상화를 위해, 15 mg/mL D-루시페린 (위스콘신주 매디슨 소재의 프로메가) 0.1 mL를 1% 내지 2% 흡입된 이소플루란 마취 하에 누드 마우스에 복강내로 주사하였다. 생물발광 신호를 고감도의, 냉각형 전하결합 디바이스 카메라로 이루어진 IVIS 스펙트럼 시리즈 (매사추세츠주 월섬 소재의 퍼킨엘머)를 사용하여 모니터링하였다. 리빙 이미지 소프트웨어 (매사추세츠주 월섬 소재의 퍼킨엘머)를 사용하여, 영상화 데이터를 격자화하고 각각의 관심 영역 (ROI)에서의 총 생물발광 신호를 통합하였다. 모든 생물발광 영상은 1초 노출로 획득하였다. 데이터를 ROI에서의 총 광자 플럭스 방출 (광자 / 초)을 사용하여 분석하였다.

[0293] 투여 첫째날에 입수된 총 광자 플럭스 방출에 기반하여, 그룹 간에 총 광자 플럭스 방출의 평균이 실질적으로 같도록 마우스를 그룹으로 나누었다. 화합물 (1) 또는 시스플라틴을 3주 동안 1주에 1회 (Q7Dx3 스케줄) 세특시맙 (에르비투스, 머크 세로노 캄파니, 리미티드)과 함께 또는 세특시맙 없이 정맥내로 투여하였다. 동일한 절차를 사용하여 2회 실험을 수행하였고, 실험으로부터의 모든 데이터를 수집하였다. 각각의 그룹은 16마리의 마우스로 이루어졌다.

[0294] 영상화 데이터는 세특시맙과 함께 화합물 (1)로 치료한 경우에만 제14일 후에 모든 마우스에서 생물발광 신호가 분명히 감소되었다는 것을 제시하였다 (도 6a-6b). 중앙 생존 시간 (MST)을 각각의 치료 그룹에 대해 사망 날의 중앙값으로서 계산하였다. 증가 수명 (ILS)은 하기 식에 의해 계산되었다: ILS (%) = (시험 화합물로 치료된 동물의 MST - 대조군 동물의 MST) / 대조군 동물의 MST x 100. 각각의 시험 화합물의 ILS (%)를 표 11에 제시하였다.

[0295] 표 11

시험 화합물	용량 (mg/kg)	세특시맙 (mg/kg)	ILS (%)
-	-	5	231
시스플라틴	5	-	0
	5	5	150
화합물 (1)	0.09	-	238
	0.09	5	>1150

[0296] 약리학적 시험 실시예 12. 방사선과 조합된 FaDu s.c. 이중이식편 모델

[0298] 루시페라제-형질도입된 FaDu-Luc 세포를 레트로바이러스-매개 유전자 전달에 의해 확립하였다. 먼저, 반딧불이 루시페라제를 코딩하는 DNA 단편을 pGL3-인핸서 플라스미드 (진뱅크#:U47297)로부터 입수하여, 레트로바이러스 벡터 pCX4pur (진뱅크#: AB086386)로 서브클로닝하였다. 이어서, 상기 레트로바이러스 발현 벡터를 pGP 및 pE-Ampho 플라스미드 (다카라 바이오; 일본 시가)와 함께 293T 세포 (ATCC; 미국 마나사스)로 형질감염시킴으로써 헬퍼-무함유 재조합 레트로바이러스를 생산하였다. 그 다음에, FaDu 세포를 재조합 레트로바이러스로 감염시키고, 퓨로마이신 (2 µg/mL)의 존재 하에 2주 동안 배양하였다. 감염된 세포를 배양물의 폴리클로날 증식성 집단으로부터 선택하였다.

[0299] 10% FBS, 및 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지 중에 배양된, 루시페라제-형질도입된 인간 SCCHN 세포주 FaDu-Luc를 행크 평형 염 용액으로 5×10^7 개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 6주령 누드 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 찰스 리버 래보러토리즈 재팬, 인크.)의 우측 넓적다리의 피하 부위로 100 μ L의 부피를 접종하였다. 세포 접종으로부터 13일 후, 종양 부피를 FaDu-Luc 세포로부터의 생물발광 신호를 사용하여 분석하였다. 생물발광 영상화를 위해, 15 mg/mL D-루시페린 (위스콘신주 매디슨 소재의 프로메가) 0.1 mL를 1% 내지 2% 흡입된 이소플루란 마취 하에 누드 마우스에 복강내로 주사하였다. 생물발광 신호를 고감도의, 냉각형 전하결합 디바이스 카메라로 이루어진 IVIS 스펙트럼 시리즈 (매사추세츠주 월섬 소재의 퍼킨엘머)를 사용하여 모니터링하였다. 리빙 이미지 소프트웨어 (매사추세츠주 월섬 소재의 퍼킨엘머)를 사용하여, 영상화 데이터를 격자화하고 각각의 관심 영역 (ROI)에서의 총 생물발광 신호를 통합하였다. 모든 생물발광 영상은 1초 노출로 획득하였다. 데이터를 ROI에서의 총 광자 플럭스 방출 (광자 / 초)을 사용하여 분석하였다. 총 광자 플럭스 방출은 하기 계산식에 따라 계산되었다:

[0300] 상대 생물발광 수준 = 총 광자 플럭스 방출 (제X일) / 총 광자 플럭스 방출 (첫째날)

[0301] 종양 퇴행 (%) = (1 - 최소 상대 생물발광 수준) x 100

[0302] 투여 첫째날에 입수된 총 광자 플럭스 방출에 기반하여, 그룹 간에 총 광자 플럭스 방출의 평균이 실질적으로 같도록 마우스를 그룹으로 나누었다. 실험은 6마리의 마우스로 각각 이루어진 그룹으로 수행하였다. 화합물 (1)을 꼬리 정맥 주사를 통해 제1일 및 제8일에 투여하였다. 18 Gy의 방사선조사를 제4일 및 제11일에 수행하였다. 화합물 (1)에 대한 종양 퇴행을 표 12에 제시하였다.

[0303] 표 12

시험 화합물	용량 (mg/kg)	방사선 (Gy)	종양 퇴행 (%)
-	-	18	16
화합물 (1)	0.09	-	0
	0.09	18	97

[0304]

[0305] 약리학적 시험 실시예 13. 마우스의 CT26 피하 동계 모델에서의 항-mPD-1 항체와의 조합 시의 항종양 활성

[0306] 10% FBS, 및 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지 중에 배양된, 무린 미분화 결장 암종 세포주 CT26을 행크 평형 염 용액으로 2×10^7 개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하였다. 제1일에, 세포 현탁액을 6주령 BALB/c 마우스 (BALB/cAnNCr1Cr1j, 암컷, 찰스 리버 래보러토리즈 재팬, 인크.)의 우측 측 복부의 피하 부위로 100 μ L의 부피를 접종하였다. 세포 접종으로부터 2일 후, 마우스를 4개 그룹으로 무작위로 나누었고, 각각의 그룹은 8마리의 마우스로 이루어졌다. 하기 계산식에 따라 종양의 부피를 계산하기 위해, 각각의 마우스에서 종양의 최단 직경 및 최장 직경을 전자 디지털 캘리퍼 (디지털매틱™ 캘리퍼, 미스토요 코포레이션)를 사용하여 측정하였다:

[0307] 종양 부피 (mm³) = 최장 직경 (mm) x 최단 직경 (mm) x 최단 직경 (mm)/2

[0308] T/C = (치료 그룹의 평균 종양 부피)/(대조군 그룹의 평균 종양 부피)

[0309] 종양 성장의 억제 (%) = (1-T/C) x 100

[0310] 시험 화합물을 0.09 mg/kg으로 제3일 및 제11일에 정맥내로 투여하였다. 항-mPD-1 항체 (BE0146, 바이오 X 셀 (Bio X Cell))를 10 mg/kg으로 제3일, 제7일, 제11일 및 제15일에 정맥내로 투여하였다. 각각의 시험 화합물의 제15일에서의 종양 성장의 억제 (%)를 표 13에 제시하였다.

[0311] 표 13

시험 화합물	용량 (mg/kg)	항-mPD-1 항체 (mg/kg)	제15일에서의 중앙 성장의 억제 (%)
-	-	10	32
화합물 (1)	0.09	-	30
	0.09	10	62

[0312]
[0313] 약리학적 시험 실시예 14. 시험관내 튜블린 중합에 대한 효과 (도 10a)

[0314] 튜블린 중합 검정 키트를 시토스켈레톤, 인크.(Cytoskeleton, Inc.)로부터 구입하였다 (Cat.# BK011P). 키트는 돼지 뇌로부터 정제되어 동결건조된 튜블린 단백질 1병, 동결건조된 GTP 3튜브, 동결건조된 검정 완충제 2병, 및 튜블린 글리세롤 완충제 1병을 함유하였다. 검정 완충제는 내용물을 탈이온 멸균수 10 mL 중에 용해시킴으로써 제조하였다. 이 용액은 80 mmol/L 피페라진-N,N'-비스[2-에탄술폰산] 세스퀴나트륨 염, 2.0 mmol/L 염화마그네슘, 0.5 mmol/L 에틸렌 글리콜-비스(2-아미노-에틸 에테르) N,N,N',N'-테트라-아세트산, pH 6.9, 및 10 μmol/L 형광 리포터를 함유하였다. 완충제는 사용할 때까지 -70°C에서 저장하였다. 튜블린 글리세롤 완충제는 80 mmol/L 피페라진-N,N'-비스[2-에탄술폰산] 세스퀴나트륨 염, 2.0 mmol/L 염화마그네슘, 0.5 mmol/L 에틸렌 글리콜-비스(2-아미노-에틸 에테르) N,N,N',N'-테트라-아세트산, 및 60% v/v 글리세롤, pH 6.9로 이루어졌다. 이는 사용할 때까지 4°C에서 저장하였다. GTP 스톱 용액은 각각의 튜브의 내용물을 100 mmol/L GTP의 농도를 달성하도록 탈이온 멸균수 100 μL 중에 용해시킴으로써 제조하였다. 이 스톱의 분취물은 사용할 때까지 -70°C에서 저장하였다. 튜블린 스톱 용액 (10 mg/mL)은 검정 완충제 및 GTP 스톱 용액 (100:1, v/v)의 혼합물 1.1 mL를 첨가하여 튜블린 분말을 용해시킴으로써 제조하였다. 분취물은 액체 질소 중에 냉동시켰고, 그 후 사용할 때까지 -70°C에서 저장하였다.

[0315] 튜블린 중합 검정에서, 검정 완충제 820 μL, GTP 스톱 용액 17.6 μL, 및 튜블린 글리세롤 완충제 600 μL를 혼합함으로써 반응 혼합물을 제조하였다. 반응 혼합물 (1015 μL)을 튜블린 스톱 용액 240 μL와 합하였다. 이 용액을 튜블린 반응 혼합물이라 칭하였고, 시험 및 대조군 웰의 측정을 위해 사용하였다. 블랭크 웰의 측정을 위해 반응 혼합물 89.85 μL 및 검정 완충제 21.25 μL를 혼합함으로써 튜블린-무함유 반응 혼합물을 제조하였다. 화합물 (1) 용액 (6.25-100 μmol/L; 최종 농도 0.625-10 μmol/L) 또는 비히클을 5 μL로 96-웰 절반-구역 마이크로타이타 플레이트의 개별 웰에 첨가하였다. 튜블린 반응 혼합물 또는 튜블린-무함유 반응 혼합물을 45 μL로 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다. 460 nm에서의 형광 방출 (360 nm에서의 여기 파장)을 스펙트라맥스(SpectraMax)® M5e 마이크로플레이트 리더 (몰레큘라 디바이시스(Molecular Devices))를 사용하여 90분 동안 2분마다 측정하였다. 중합이 발생함에 따라 미세관으로 형광 리포터가 혼입되므로, 튜블린 중합은 형광 증강으로 이어졌다. 검정을 이중으로 수행하였다. 검정은 화합물 (1)이 농도-의존성 방식으로 튜블린 중합을 억제하였다는 것을 입증하였다. 각각의 시점에서의 형광 강도를 하기 식에 의해 계산하였다:

[0316] $\text{형광 강도} = \text{시험 웰 또는 대조군 웰의 평균 형광 측정치} - \text{블랭크 웰의 평균 형광 측정치}$; 블랭크 웰: 튜블린 없이 비히클 함유; 대조군 웰: 비히클 및 튜블린 함유; 시험 웰: 화합물 및 튜블린 함유.

[0317] 약리학적 시험 실시예 15. 세포-기반 미세관 동역학 검정 (도 10b)

[0318] 세포-기반 미세관 (MT) 동역학 검정을 U2OS-EB3-AG 골육종 세포주로 수행하였고, 여기서 EB3 (미세관 플러스 말단 결합 단백질) 및 아자미-그린의 융합 단백질 (EB3-AG)이 안정적으로 발현된다. U2OS-EB3-AG 세포를 가습된 5% CO₂ 분위기 중 37°C에서 10% FBS, 및 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지 중에 배양하였다. 살아있는 세포에서의 MT 동역학은 EB3-AG의 형성같은 구조의 이동으로서 가시화될 수 있다. 유리-기재 배양 플레이트 (EZVIEW 플레이트, 일본 소재의 AGC 테크노 글래스(AGC Techno Glass)) 상에 플레이팅된 U2OS-EB3-AG 세포를 지시된 농도의 화합물 (1)로 처리하고, 미세관 동역학을 60배 배율 유침 대물 렌즈를 갖는 형광 현미경 (BZ-X710, 일본 소재의 키엔스(KEYENCE))을 사용하여 실시간 영상화에 의해 모니터링하였다. 지정된 시점에서의 정지 영상이 도 10b에 제시되었다. 박스 안 구역의 보다 고배율 사진이 삽도로 제시되었다. 0.5 nM (U2OS-EB3-AG 세포에서의 항증식 활성에 대한 IC₅₀ 값)의 화합물 (1)로 처리되었을 때, 화합물의 첨가로부터 대략 60분

후에 형성같은 구조는 관찰하기가 어려워졌다. 이들 결과는 화합물 (1)이 MT 동역학을 저해하는 능력을 가졌다는 것을 분명히 입증하였다.

- [0319] 약리학적 시험 실시예 16. 시험관내 항증식 활성 (도 11)
- [0320] 화합물 (1)에 대한 시험관내 항증식 검정을 인간 식도의 편평 세포 암종 (OE21, TE-8), 인간 식도의 선암종 (OE33), 및 인간 자궁 육종 (MES-SA, MES-SA-Dx5-Rx1)을 포함한 암 세포주의 작은 패널을 사용하여 수행하였다. 모든 세포주를 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C) 내 10% FBS, 및 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지 (배양 배지) 중에 배양하였다. 96 웰 플레이트 (백톤, 디킨슨 앤드 캄파니, 353219)의 각각의 웰에, 배양 배지로 4x10⁴개 세포/mL의 농도로 조정된 세포 현탁액 75 μL를 첨가하고, 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C)에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날에, 배양 배지 중에 현탁된 일련의 3배 희석물로 화합물 (1) 25 μL를 각각의 웰에 첨가하고, 생성물을 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C)에서 72시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포 생존율을 2013 엔비전™ 멀티라벨 리더 (매사추세츠주 웰슬리 소재의 퍼킨-엘머)를 사용한 셀타이터-글로® 발광 세포 생존율 검정 (프로메가)에 의해 결정하였다. 시험 화합물을 첨가하지 않은 채로 세포를 함유하는 웰의 값을 100%로서 정의하였고, 세포를 함유하지 않는 웰의 값을 0%로서 정의하였다. 세포 성장을 50%만큼 억제하기 위해 필요한 화합물 (1)의 농도 (즉, IC₅₀ 값)를 계산하였고, 도 11에 제시하였다. P-gp 감수성은 P-gp를 과다발현하는 MES-SA-Dx5-Rx1 세포에서의 IC₅₀ 값 대 MES-SA 세포에서의 IC₅₀ 값의 비로서 계산하였다.
- [0321] 약리학적 시험 실시예 17. 단독요법으로서의 마우스의 KPL-4 이중이식편 모델에서의 항종양 효과; 단독요법으로서의 마우스의 COLO-704 이중이식편 모델에서의 항종양 효과 (도 12)
- [0322] 10% FBS, 및 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 중에 배양된, 인간 HER-2 양성 유방암 세포주 KPL-4를 헵크 평형 염 용액으로 1 x 10⁸개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 8주령 누드 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 찰스 리버 레보러토리즈 재팬 인크.)의 우측 측복부의 피하 부위로 100 μL의 부피를 접종하였다. 세포 접종 (제1일)으로부터 11일 후, 하기 계산식에 따라 종양의 부피를 계산하기 위해, 각각의 마우스에서 종양의 최단 직경 및 최장 직경을 전자 디지털 캘리퍼 (디지털매틱™ 캘리퍼, 미스토요 코포레이션)를 사용하여 측정하였다:
- [0323] 종양 부피 (mm³) = 최장 직경 (mm) x 최단 직경 (mm) x 최단 직경 (mm)/2
- [0324] 상대 종양 부피 (RTV) = 종양 부피 (제X일) / 종양 부피 (첫째날)
- [0325] 상대 체중 (RBW) = 체중 (제X일) / 체중 (첫째날)
- [0326] 제1일에 입수된 종양의 부피에 기반하여, 그룹 간에 종양 부피의 평균이 실질적으로 같도록 마우스를 그룹으로 나누었다. 실험은 6마리의 마우스로 각각 이루어진 그룹으로 수행하였다. 시험 화합물을 DMSO 중에 용해시키고, 용액을 사용 전에는 냉동기에 저장하였다. 투여 직전에, 스톱 용액을 염수로 희석하였다. 염수 중의 시험 화합물을 2주 동안 매주-1회 20 μg/kg, 60 μg/kg, 또는 180 μg/kg으로 정맥내로 투여하였다 (제1일 및 제8일). 종양 퇴행은 60 μg/kg- 및 180 μg/kg-치료 그룹에서 관찰되었고, 180 μg/kg의 투여는 제15일에 모든 마우스에서 이중이식 종양을 완전히 근절하였다.
- [0327] 10% FBS, 및 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 중에 배양된, 인간 난소암 세포주 COLO-704를 헵크 평형 염 용액으로 1 x 10⁸개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 5주령 누드 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 찰스 리버 레보러토리즈 재팬 인크.)의 우측 측복부의 피하 부위로 100 μL의 부피를 접종하였다. 세포 접종 (제1일)으로부터 9일 후, 하기 계산식에 따라 종양의 부피를 계산하기 위해, 각각의 마우스에서 종양의 최단 직경 및 최장 직경을 전자 디지털 캘리퍼 (디지털매틱™ 캘리퍼, 미스토요 코포레이션)를 사용하여 측정하였다:
- [0328] 종양 부피 (mm³) = 최장 직경 (mm) x 최단 직경 (mm) x 최단 직경 (mm)/2
- [0329] 상대 종양 부피 (RTV) = 종양 부피 (제X일) / 종양 부피 (첫째날)
- [0330] 상대 체중 (RBW) = 체중 (제X일) / 체중 (첫째날)
- [0331] 제1일에 입수된 종양의 부피에 기반하여, 그룹 간에 종양 부피의 평균이 실질적으로 같도록 마우스를 그룹으로

나누었다. 실험은 6마리의 마우스로 각각 이루어진 그룹으로 수행하였다. 시험 화합물을 DMSO 중에 용해시키고, 용액을 사용 전에는 냉동기에 저장하였다. 투여 직전에, 스톱 용액을 염수로 희석하였다. 염수 중의 시험 화합물을 2주 동안 매주-1회 20 µg/kg, 60 µg/kg, 또는 180 µg/kg으로 정맥내로 투여하였다 (제1일 및 제8일). 화합물 치료는 180 µg/kg에서 종양 퇴행을 유도하였고, 60 µg/kg에서 종양 성장 지연을 유도하였다. 180 µg/kg의 투여는 제22일에 모든 마우스에서 이종이식 종양을 완전히 근절하였다.

[0332] 약리학적 시험 실시예 18. 마우스의 FaDu 피하 모델에서의 CD31-양성 혈관에 대한 효과 (도 13)

[0333] 10% FBS, 및 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지 (배양 배지) 중에 배양된, 인간 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN) 세포주 FaDu를 배양 배지로 5×10^7 개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 6주령 누드 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 찰스 리버 래보러토리즈 재팬, 인크.)의 우측 측복부의 피하 부위로 100 µL의 부피를 접종하였다. 세포 접종으로부터 10일 후, 그룹 간에 종양 부피의 평균이 실질적으로 같도록 마우스를 그룹으로 나누었다. 실험은 6마리의 마우스로 각각 이루어진 그룹으로 수행하였다. 각각의 시험 화합물을 DMSO 중에 용해시키고, 용액을 사용 전에는 냉동기에 저장하였다. 투여 직전에, 스톱 용액을 염수로 희석하였다. 염수 중의 시험 화합물을 20 µg/kg, 60 µg/kg, 또는 180 µg/kg으로 정맥내로 투여하였다. 단일 투여로부터 5일 후, 종양 샘플을 수집하고, 24시간 동안 4°C에서 IHC 아연 고정제 (BD 파밍젠)로 고정하였다. 파라핀-포매된 조직을 절편화하고 (3 µm), 양으로 하전된 슬라이드 상에 탑재하고, 공기-건조시켰다. CD31의 면역조직화학적 염색을 벤타나 자동염색기 모델 디스커버 XT (로슈 다이아그노스틱스)를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 수행하였다. 절편을 탈파라핀화하고, 컨디셔닝하고, 항원을 CC1 (벤타나 메디칼 시스템즈)로 복구하였다. 슬라이드를 차단제 A 및 차단제 B (내인성 비오틴 차단 키트, 로슈 다이아그노스틱스)로 차단시켰다. 래트 항-마우스 IgG CD31 항체 (디아노바 게엠베하)를 2 µg/mL로 적용하였다. 절편을 항체와 함께 6시간 동안 인큐베이션하였고, 이어서 2.2 µg/mL의 비오틴화된 항-래트 IgG 항체 (잭슨 이뮤노리서치 래보러토리즈)와 함께 32분 인큐베이션하였다. 검출을 16분 동안 스트렙타비딘-HRP D로 수행하였고, 이어서 8분 동안 DAB D 및 DAB H₂O₂ D (DABMap 키트, 벤타나 메디칼 시스템즈, 인크.)와 함께 인큐베이션하였다. 슬라이드를 16분 동안 헤마톡실린 II (로슈 다이아그노스틱스)로 대조염색하였고, 이어서 4분 동안 청색화 시약과 함께 인큐베이션하였다. 절편을 등급별 에탄올로 탈수시키고, 크실렌 대체로 탈지하고, DPX® (머크 카게아아)로 커버링하였다. 면역염색된 슬라이드를 벡트라® 2 자동 슬라이드 영상화 시스템 (퍼킨엘머 인크.)을 사용하여 스캐닝하였다. 전체 종양 내 혈관의 수를 inform 2 소프트웨어 (퍼킨엘머 인크.)를 사용하여 CD31-양성 객체를 카운팅함으로써 정량화하였다. 종양 영역의 면적을 inform 2 소프트웨어 (퍼킨엘머 인크.)를 사용하여 헤마톡실린-염색 면적을 산출함으로써 측정하였다. 혈관의 수를 종양 영역의 면적에 의해 정규화하였다. 20, 60 및 180 µg/kg의 용량으로의 시험 화합물의 단일 투여는 종양 혈관 수를 증가시켰다. 비-치료 그룹과 비교되는 시험 화합물-투약 그룹의 혈관 수의 비를 하기 식으로 계산하였다:

[0334] 종양 혈관 비 = 시험 화합물-투약 그룹의 혈관 수 / 비-치료 그룹의 혈관 수

[0335] 약리학적 시험 실시예 19. 마우스의 FaDu 피하 모델에서의 α-SMA-양성 CAF에 대한 효과 (도 14)

[0336] 10% FBS, 및 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지 (배양 배지) 중에 배양된, 인간 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN) 세포주 FaDu를 배양 배지로 5×10^7 개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 6주령 누드 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 찰스 리버 래보러토리즈 재팬, 인크.)의 우측 측복부의 피하 부위로 100 µL의 부피를 접종하였다. 세포 접종으로부터 10일 후, 그룹 간에 종양 부피의 평균이 실질적으로 같도록 마우스를 그룹으로 나누었다. 실험은 5마리의 마우스로 각각 이루어진 그룹으로 수행하였다. 각각의 시험 화합물을 DMSO 중에 용해시키고, 용액을 사용 전에는 냉동기에 저장하였다. 투여 직전에, 스톱 용액을 염수로 희석하였다. 염수 중의 시험 화합물을 20 µg/kg, 60 µg/kg, 또는 180 µg/kg으로 정맥내로 투여하였다. 단일 투여로부터 2일 또는 5일 후, 종양 샘플을 수집하고, 24시간 동안 4°C에서 IHC 아연 고정제 (BD 파밍젠)로 고정하였다. 파라핀-포매된 조직을 절편화하고 (3 µm), 양으로 하전된 슬라이드 상에 탑재하고, 공기-건조시켰다. 절편을 탈파라핀화하고, 컨디셔닝하고, 항원을 pH 6.0의 1 mM EDTA와 함께 마이크로웨이브를 사용하여 복구하였다. 절편을 TBS 중 1%의 BSA로 차단시켰다. 알칼리성 포스파타제와 접합된 마우스 항-α-SMA 모노클로날 항체 (클론 1A4, 시그마)를 5 µg/mL로 적용하였다. 절편을 항체와 함께 2.5시간 동안 인큐베이션하였다. 검출을 패스트 레드 II 기질 키트 (니치레이 바이오사이언스 인크.)로 수행하였다. 절편을 50초 동안 메이어 헤마톡실린 (뮤토 퓨어 케미칼스)으로 대조염색하였다. 절편을 등급별 에탄올로 탈수시키고, 크실렌 대체로 탈지하고, DPX (머크 카게아아)로 커버링하였다. 면역염색된 슬라이드를 벡트라 2 자동 슬라이드 영상화 시스템 (퍼킨 엘머 인크.)을 사용하여 스캐닝하였다. 전체 종양 내 α-SMA-양성 영역

의 면적을 inform 2 소프트웨어 (피킨엘머 인크.)를 사용하여 α-SMA-양성 객체를 카운팅함으로써 정량화하였다. 종양 영역의 면적을 inform 2 소프트웨어 (피킨엘머 인크.)를 사용하여 헤마톡실린-염색 면적을 산출함으로써 측정하였다. α-SMA 양성 영역의 면적을 종양 영역의 면적에 의해 정규화하였다. 시험 화합물의 단일 투여는 제3일에 60 및 180 μg/kg의 용량에서 및 제6일에 180 μg/kg의 용량에서 α-SMA 양성 영역을 유의하게 감소시켰다. 시험 화합물-투약 그룹의 α-SMA-양성 영역의 저해율을 하기 식으로 계산하였다:

[0337] α-SMA 비 = 시험 화합물-투약 그룹의 α-SMA 영역 / 비-치료 그룹의 α-SMA 영역

[0338] 약리학적 시험 실시예 20. 마우스의 FaDu 피하 모델에서의 테나신-C 및 EDA-피브로넥틴에 대한 효과 (도 15)

[0339] 10% FBS, 및 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지 (배양 배지) 중에 배양된, 인간 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN) 세포주 FaDu를 배양 배지로 5 x 10⁷개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 6주령 누드 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 찰스 리버 래보러토리즈 재팬, 인크.)의 우측 측복부의 피하 부위로 100 μL의 부피를 접종하였다. 세포 접종으로부터 10일 후, 그룹 간에 종양 부피의 평균이 실질적으로 같도록 마우스를 그룹으로 나누었다. 실험은 5마리의 마우스로 각각 이루어진 그룹으로 수행하였다. 화합물 (1)을 DMSO 중에 용해시키고, 용액을 사용 전에는 냉동기에 저장하였다. 화합물 (1) (180 μg/kg) 및 세특시맵 (CTX, 에르비투스®, 머크 세로노 캄파니 리미티드) (10 mg/kg)을 염수로 희석하고, 제1일에 정맥내로 주사하였다. 단일 투여로부터 5일 후, 종양 샘플을 수집하고, 24시간 동안 4°C에서 IHC 아연 고정제 (BD 파밍겐)로 고정하였다. 파라핀-포매된 조직을 절편화하고 (3 μm), 양으로 하진된 슬라이드 상에 탑재하고, 공기-건조시켰다. 절편을 탈파라핀화하고, 컨디셔닝하고, 테나신-C에 대해 항원을 pH 6.0의 1 mM EDTA와 함께 마이크로웨이브를 사용하여 복구하였다. EDA-피브로넥틴에 대해서는, 항원 복구 절차가 필요하지 않았다. 절편을 내인성 퍼옥시다제를 차단시키기 위해 10분 동안 블록을 차단 용액 (벡터 랩스(Vector Labs))과 함께, 또한 1시간 동안 마우스 온 마우스 Ig 차단 시약 (벡터 랩스)과 함께, 이어서 30분 동안 2.5% 정상 말 혈청과 함께 인큐베이션하였다. 테나신-C의 면역조직화학적 염색을 위해, 마우스 항-테나신-C 모노클로날 항체 (클론 4C8MS, IBL)를 5 μg/mL로 적용하였다. 절편을 항체와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. EDA-피브로넥틴의 면역조직화학적 염색을 위해, 마우스 항-EDA-피브로넥틴 모노클로날 항체 (클론 IST-9, 압캠 (Abcam))를 1.5 μg/mL로 적용하였다. 절편을 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 검출을 마우스 온 마우스 임프레스(ImmPRESS)TM 퍼옥시다제 폴리머 키트 (벡터 랩스)로 수행하였다. 절편을 50초 동안 메이어 헤마톡실린 (뮤토 푸어 케미칼스)으로 대조염색하였다. 절편을 등급별 에탄올내로 탈수시키고, 크실렌 대체로 탈지하고, DPX (머크 카게아아)로 커버링하였다. 면역염색된 슬라이드를 벡트라 2 자동 슬라이드 영상화 시스템 (피킨 엘머 인크.)을 사용하여 스캐닝하였다. 테나신-C 및 ED-A 피브로넥틴 둘 다의 발현 수준은 대조군 종양과 비교하여 화합물 (1) 및 CTX 치료된 종양에서 감소되었다.

[0340] 약리학적 시험 실시예 21. 마우스의 FaDu 피하 이종이식편 모델에서의 세특시맵과의 조합 시의 항종양 효과 (도 16)

[0341] 10% FBS, 및 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지 중에 배양된, 인간 두경부의 편평 세포 암종 (SCCHN) 세포주 FaDu를 헵크 평형 염 용액으로 5 x 10⁷개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 무흉선 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 7주령, 찰스 리버 재팬 인크.)의 우측 측복부의 피하 부위로 100 μL의 부피를 접종하였다. 세포 접종 (제1일)으로부터 10일 후, 하기 계산식에 따라 종양의 부피를 계산하기 위해, 각각의 마우스에서 종양의 길이 및 폭을 전자 디지털 캘리퍼 (미스토요 코포레이션)를 사용하여 측정하였다:

[0342] 종양 부피 (mm³) = 최장 직경 (mm) x 최단 직경 (mm) x 최단 직경 (mm)/2

[0343] 상대 종양 부피 (RTV) = 종양 부피 (제X일) / 종양 부피 (첫째날)

[0344] TV에 기반하여, 마우스를 무작위로 그룹으로 나누었다 (제1일). 각각의 그룹은 6마리의 마우스로 이루어졌다. 화합물 (1)을 DMSO 중에 용해시키고, 용액을 사용 전에는 냉동기에 저장하였다. 화합물 (1) (20, 60 또는 180 μg/kg) 및 세특시맵 (CTX, 에르비투스®, 머크 세로노 캄파니, 리미티드) (10 mg/kg)을 염수로 희석하고, 제1일에 정맥내로 주사하였다. 각각의 그룹의 RTV의 변화를 도 16에 제시하였다. 180 μg/kg 및 60 μg/kg의 용량에서, 화합물 (1)과 CTX의 항종양 효능은 종양 퇴행을 갖는 CTX 단독요법의 것보다 더 강력하였다. CTX와 조합된 20 μg/kg 용량의 화합물 (1)의 항종양 효능은 CTX 단독요법의 것보다 더 강력한 경향이 있었다.

[0345] 약리학적 시험 실시예 22. 단독요법으로서의 마우스의 연부 조직 육종 이종이식편 모델에서의 항종양 효과 (도

17)

- [0346] MES-SA
- [0347] 10% FBS, 및 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 중에 배양된, 인간 자궁 육종 세포주 MES-SA를 행크 평형 염 용액으로 2×10^8 개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하고, 현탁액을 1:1의 비로 겔트렉스(Geltrex)[®] (써모 피셔 사이언티픽 인크.(Thermo Fisher Scientific Inc.), #A1413202)와 혼합하여 1×10^8 개 세포/mL의 농도로 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 6주령 누드 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 찰스 리버 래보러토리즈 재팬 인크.)의 우측 측복부의 피하 부위로 100 μ L의 부피를 접종하였다. 세포 접종 (제1일)으로부터 6일 후, 하기 계산식에 따라 종양의 부피를 계산하기 위해, 각각의 마우스에서 종양의 최단 직경 및 최장 직경을 전자 디지털 캘리퍼 (디지매틱[™] 캘리퍼, 미스토요 코포레이션)를 사용하여 측정하였다:
- [0348] 종양 부피 (mm^3) = 최장 직경 (mm) x 최단 직경 (mm) x 최단 직경 (mm)/2
- [0349] 상대 종양 부피 (RTV) = 종양 부피 (제X일) / 종양 부피 (첫째날)
- [0350] 제1일에 입수된 종양의 부피에 기반하여, 그룹 간에 종양 부피의 평균이 실질적으로 같도록 마우스를 그룹으로 나누었다. 실험은 6마리의 마우스로 각각 이루어진 그룹으로 수행하였다. 시험 화합물을 DMSO 중에 용해시키고, 용액을 사용 전에는 냉동기에 저장하였다. 투여 직전에, 스톱 용액을 염수로 희석하였다. 염수 중의 시험 화합물을 2주 동안 매주-1회 180 μ g/kg으로 정맥내로 투여하였다 (제1일 및 제8일). 항종양 활성은 치료 그룹에서 종양 성장 지연으로 관찰되었다.
- [0351] HT-1080
- [0352] 10% FBS, NEAA 및 항생제를 함유하는 E-MEM 중에 배양된, 인간 섬유육종 세포주 HT-1080을 배지로 3×10^7 개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 무흉선 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 6주령, 찰스 리버 재팬 인크.)의 우측 측복부의 피하 부위로 100 μ L의 부피를 접종하였다. 세포 접종 (제1일)으로부터 6일 후, 하기 계산식에 따라 종양의 부피를 계산하기 위해, 각각의 마우스에서 종양의 길이 및 폭을 전자 디지털 캘리퍼 (미스토요 코포레이션)를 사용하여 측정하였다:
- [0353] 종양 부피 (mm^3) = 최장 직경 (mm) x 최단 직경 (mm) x 최단 직경 (mm)/2
- [0354] 상대 종양 부피 (RTV) = 종양 부피 (제X일) / 종양 부피 (첫째날)
- [0355] TV에 기반하여, 마우스를 무작위로 그룹으로 나누었다 (제1일). 각각의 그룹은 6마리의 마우스로 이루어졌다. 화합물 (1)을 DMSO 중에 용해시키고, 용액을 사용 전에는 냉동기에 저장하였다. 화합물 (1) (180 μ g/kg)을 염수로 희석하고, 제1일 및 제8일에 정맥내로 주사하였다. 각각의 그룹의 RTV의 변화를 도 17에 제시하였다. 항종양 활성은 치료 그룹에서 종양 퇴행으로 관찰되었다.
- [0356] CTG-2041
- [0357] 인간 혈관육종 CTG-2041의 종양 단편을 암컷 마우스의 좌측 측복부에 s.c. 이식하였다. 하기 계산식에 따라 종양의 부피를 계산하기 위해, 종양 성장을 1주에 2회 디지털 캘리퍼를 사용하여 모니터링하였다:
- [0358] 종양 부피 (mm^3) = 최장 직경 (mm) x 최단 직경 (mm) x 최단 직경 (mm)/2
- [0359] 상대 종양 부피 (RTV) = 종양 부피 (제X일) / 종양 부피 (첫째날)
- [0360] 종양의 부피가 대략 200 mm^3 에 도달하였을 때, 동물을 종양 부피에 의해 치료 또는 대조군 그룹으로 매칭시키고, 투약을 제1일에 개시하였다. 각각의 그룹은 5마리의 마우스로 이루어졌다. 화합물 (1)을 DMSO 중에 용해시키고, 용액을 사용 전에는 냉동기에 저장하였다. 화합물 (1) (100 μ g/kg)을 염수로 희석하고, 제1일 및 제8일에 정맥내로 주사하였다. 각각의 그룹의 RTV의 변화를 도 17에 제시하였다. 항종양 활성은 치료 그룹에서 종양 퇴행으로 관찰되었다.
- [0361] 약리학적 시험 실시예 23. 단독요법으로서의 마우스의 자궁내막암 육종 이종이식편 모델에서의 항종양 효과 (도 18)

- [0362] HEC-108
- [0363] 15% FBS 및 항생제를 함유하는 E-MEM 중에 배양된, 인간 자궁내막암 세포주 HEC-108을 배지로 7.14×10^7 개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 무흉선 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 6주령, 찰스 리버 재팬 인크.)의 우측 측복부의 피하 부위로 150 μ L의 부피를 접종하였다. 세포 접종(제1일)으로부터 13일 후, 하기 계산식에 따라 종양의 부피를 계산하기 위해, 각각의 마우스에서 종양의 길이 및 폭을 전자 디지털 캘리퍼 (미스토요 코포레이션)를 사용하여 측정하였다:
- [0364] 종양 부피 (mm^3) = 최장 직경 (mm) x 최단 직경 (mm) x 최단 직경 (mm)/2
- [0365] 상대 종양 부피 (RTV) = 종양 부피 (제X일) / 종양 부피 (첫째날)
- [0366] TV에 기반하여, 마우스를 무작위로 그룹으로 나누었다 (제1일). 각각의 그룹은 6마리의 마우스로 이루어졌다. 화합물 (1)을 DMSO 중에 용해시키고, 용액을 사용 전에는 냉동기에 저장하였다. 화합물 (1) (180 μ g/kg)을 염수로 희석하고, 제1일 및 제8일에 정맥내로 주사하였다. 각각의 그룹의 RTV의 변화를 도 18에 제시하였다. 항종양 활성은 치료 그룹에서 종양 성장 지연으로 관찰되었다.
- [0367] AN3CA
- [0368] 10% FBS, 및 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 E-MEM 중에 배양된, 인간 자궁내막암 세포주 AN3CA를 행크 평형 염 용액으로 1.4×10^8 개 세포/mL의 농도로 조정하여 세포 현탁액을 제조하고, 현탁액을 1:1의 비로 겔트렉스® (써모 피셔 사이언티픽 인크., #A1413202)와 혼합하여 7×10^7 개 세포/mL의 농도로 세포 현탁액을 제조하였다. 세포 현탁액을 6주령 누드 마우스 (CAnN.Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j, 암컷, 찰스 리버 래보러토리즈 재팬 인크.)의 우측 측복부의 피하 부위로 100 μ L의 부피를 접종하였다. 세포 접종(제1일)으로부터 12일 후, 하기 계산식에 따라 종양의 부피를 계산하기 위해, 각각의 마우스에서 종양의 최단 직경 및 최장 직경을 전자 디지털 캘리퍼 (디지털텍™ 캘리퍼, 미스토요 코포레이션)를 사용하여 측정하였다:
- [0369] 종양 부피 (mm^3) = 최장 직경 (mm) x 최단 직경 (mm) x 최단 직경 (mm)/2
- [0370] 상대 종양 부피 (RTV) = 종양 부피 (제X일) / 종양 부피 (첫째날)
- [0371] 제1일에 입수된 종양의 부피에 기반하여, 그룹 간에 종양 부피의 평균이 실질적으로 같도록 마우스를 그룹으로 나누었다. 실험은 5마리의 마우스로 각각 이루어진 그룹으로 수행하였다. 시험 화합물을 DMSO 중에 용해시키고, 용액을 사용 전에는 냉동기에 저장하였다. 투여 직전에, 스톱 용액을 염수로 희석하였다. 염수 중의 시험 화합물을 2주 동안 매주-1회 180 μ g/kg으로 정맥내로 투여하였다 (제1일 및 제8일). 항종양 활성은 치료 그룹에서 종양 퇴행으로 관찰되었다.
- [0372] 약리학적 시험 실시예 24. NCI-N87 및 MKN-28 성장 억제 검정
- [0373] 본 검정에서, 인간 위암 세포주 NCI-N87 및 MKN-28에서의 시험 화합물의 성장 억제 활성을 각각 측정하였다. NCI-N87 및 MKN-28 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C) 내 10% FBS, 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지 중에 유지하였다. 96-웰 플레이트 (백톤, 디킨슨 앤드 캄파니, 353219)의 각각의 웰에, 배양 배지로 3×10^4 개 세포/mL의 농도로 조정된 NCI-N87 또는 MKN-28 세포 현탁액 100 μ L를 첨가하고, 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C)에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날에, 배양 배지 중에 현탁된 일련의 3배 희석물로 화합물 (1) 또는 할리콘드린 B 100 μ L를 각각의 웰에 첨가하고, 생성물을 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C)에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포 생존율을 엔비전 2103 멀티라벨 리더 (매사추세츠주 웰슬리 소재의 퍼킨-엘머)를 사용한 셀타이터-글로® 발광 세포 생존율 검정 (프로메가)에 의해 결정하였다. 시험 화합물을 첨가하지 않은 채로 세포를 함유하는 웰의 값을 100%로서 정의하였고, 세포를 함유하지 않은 웰의 값을 0%로서 정의하였다. 세포 성장을 50%만큼 억제하기 위해 필요한 시험 화합물의 농도 (즉, IC₅₀ 값)를 계산하였고, 표 14에 제시하였다.

[0374] 표 14

	NCI-N87	MKN-28
시험 화합물	(IC₅₀ (nM))	(IC₅₀ (nM))
할리콘드린 B	0.007	0.017
화합물 (1)	0.002	0.015

[0375]

[0376] 약리학적 시험 실시예 25. HuTu 80 성장 억제 검정

[0377] 본 검정에서, 십이지장 조직으로부터 단리된 인간 소장암 세포주 HuTu 80에서의 시험 화합물의 성장 억제 활성을 측정하였다. HuTu 80 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C) 내 10% FBS, 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 EMEM 배지 중에 유지하였다. 96-웰 플레이트 (백톤, 디킨슨 앤드 캠퍼니, 353219)의 각각의 웰에, 배양 배지로 3x10⁴ 개 세포/mL의 농도로 조정된 HuTu80 세포 현탁액 100 µL를 첨가하고, 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C)에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날에, 배양 배지 중에 현탁된 일련의 3배 희석물로 화합물 (1) 또는 할리콘드린 B 100 µL를 각각의 웰에 첨가하고, 생성물을 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C)에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포 생존율을 엔비전 2103 멀티라벨 리더 (매사추세츠주 웰슬리 소재의 퍼킨-엘머)를 사용한 셀타이터-글로® 발광 세포 생존율 검정 (프로메가)에 의해 결정하였다. 시험 화합물을 첨가하지 않은 채로 세포를 함유하는 웰의 값을 100%로서 정의하였고, 세포를 함유하지 않는 웰의 값을 0%로서 정의하였다. 세포 성장을 50%만큼 억제하기 위해 필요한 시험 화합물의 농도 (즉, IC₅₀ 값)를 계산하였고, 표 15에 제시하였다.

[0378] 표 15

HuTu 80	
시험 화합물	(IC₅₀ (nM))
할리콘드린 B	0.031
화합물 (1)	0.019

[0379]

[0380] 약리학적 시험 실시예 26. SW780 성장 억제 검정

[0381] 본 검정에서, 인간 요로상피암 세포주 SW780에서의 시험 화합물의 성장 억제 활성을 측정하였다. SW780 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C) 내 10% FBS, 페니실린, 및 스트렙토마이신을 함유하는 RPMI-1640 배지 중에 유지하였다. 96-웰 플레이트 (백톤, 디킨슨 앤드 캠퍼니, 353219)의 각각의 웰에, 배양 배지로 3x10⁴ 개 세포/mL의 농도로 조정된 SW780 세포 현탁액 100 µL를 첨가하고, 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C)에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날에, 배양 배지 중에 현탁된 일련의 3배 희석물로 화합물 (1) 또는 할리콘드린 B 100 µL를 각각의 웰에 첨가하고, 생성물을 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C)에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포 생존율을 엔비전 2103 멀티라벨 리더 (매사추세츠주 웰슬리 소재의 퍼킨-엘머)를 사용한 셀타이터-글로® 발광 세포 생존율 검정 (프로메가)에 의해 결정하였다. 시험 화합물을 첨가하지 않은 채로 세포를 함유하는 웰의 값을 100%로서 정의하였고, 세포를 함유하지 않는 웰의 값을 0%로서 정의하였다. 세포 성장을 50%만큼 억제하기 위해 필요한 시험 화합물의 농도 (즉, IC₅₀ 값)를 계산하였고, 표 16에 제시하였다.

[0382] 표 16

SW780	
시험 화합물	(IC₅₀ (nM))
할리콘드린 B	0.032
화합물 (1)	0.017

[0383]

[0384] 약리학적 시험 실시예 27. HS-SY-II 성장 억제 검정

[0385] 본 검정에서, 인간 활막 육종 세포주 HS-SY-II에서의 시험 화합물의 성장 억제 활성을 측정하였다. HS-SY-II 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C) 내 10% FBS, 페니실린, 및 스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 배지 중에 유지하였다. 96-웰 플레이트 (백톤, 디킨슨 앤드 캄파니, 353219)의 각각의 웰에, 배양 배지로 3x10⁴ 개 세포/mL의 농도로 조정된 HS-SY-II 세포 현탁액 100 μL를 첨가하고, 세포를 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C)에서 밤새 인큐베이션하였다. 다음 날에, 배양 배지 중에 현탁된 일련의 3배 희석물로 화합물 (1) 또는 할리콘드린 B 100 μL를 각각의 웰에 첨가하고, 생성물을 5% CO₂ 인큐베이터 (37°C)에서 3일 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포 생존율을 엔비전 2103 멀티라벨 리더 (매사추세츠주 웰슬리 소재의 퍼킨-엘머)를 사용한 셀타이터-글로® 발광 세포 생존율 검정 (프로메가)에 의해 결정하였다. 시험 화합물을 첨가하지 않은 채로 세포를 함유하는 웰의 값을 100%로서 정의하였고, 세포를 함유하지 않는 웰의 값을 0%로서 정의하였다. 세포 성장을 50%만큼 억제하기 위해 필요한 시험 화합물의 농도 (즉, IC₅₀ 값)를 계산하였고, 표 17에 제시하였다.

[0386] 표 17

HS-SY-II	
시험 화합물	(IC₅₀ (nM))
할리콘드린 B	0.010
화합물 (1)	0.002

[0387]

[0388] 등가물 및 범주

[0389] 청구범위에서 단수 형태는, 달리 나타내지 않는 한 또는 문맥으로부터 달리 명백하지 않는 한, 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 군의 하나 이상의 구성원 사이에 "또는"을 포함하는 청구범위 또는 상세한 설명은, 달리 나타내지 않는 한 또는 문맥으로부터 달리 명백하지 않는 한, 군 구성원 중 하나, 하나 초과, 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 이용되거나, 또는 달리 그와 관련되어 있다는 것을 충족시키는 것으로 간주된다. 본 발명은 군의 정확히 하나의 구성원이 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 이용되거나, 또는 달리 그와 관련되어 있는 실시양태를 포함한다. 본 발명은 군 구성원 중 하나 초과, 또는 모두가 주어진 생성물 또는 공정에 존재하거나, 그에 이용되거나, 또는 달리 그와 관련되어 있는 실시양태를 포함한다.

[0390] 게다가, 본 발명은 열거된 청구항 중 하나 이상으로부터의 하나 이상의 제한, 요소, 항목 및 서술적 용어가 또 다른 청구항에 도입된 모든 변형, 조합 및 순열을 포괄한다. 예를 들어, 또 다른 청구항에 대해 종속항인 임의의 청구항은 동일한 기반 청구항에 대해 종속항인 임의의 다른 청구항에서 발견되는 하나 이상의 제한을 포함하도록 변형될 수 있다. 요소가 목록으로서, 예를 들어 마쿠쉬 군 포맷으로 제시되는 경우에, 요소의 각각의 하위군이 또한 개시되는 것이며, 임의의 요소(들)가 군으로부터 제거될 수 있다. 일반적으로, 본 발명 또는 본 발명의 측면이 특정한 요소 및/또는 특색을 포함하는 것으로 지칭된 경우에, 본 발명 또는 본 발명의 측면의 특정 실시양태는 이러한 요소 및/또는 특색으로 이루어지거나 또는 그로 본질적으로 이루어진 것으로 이해되어야 한다. 간략화의 목적을 위해, 이들 실시양태는 축약적 기재로 본원에 구체적으로 제시되지 않았다. 또한, 용어 "포함하는" 및 "함유하는"은 개방형이며 추가적인 요소 또는 단계의 포함을 허용하는 것으로 의도된다는 것을 주지한다. 범위가 주어진 경우에, 종점들이 포함된다. 게다가, 달리 나타내지 않는 한 또는 달리 문맥 및

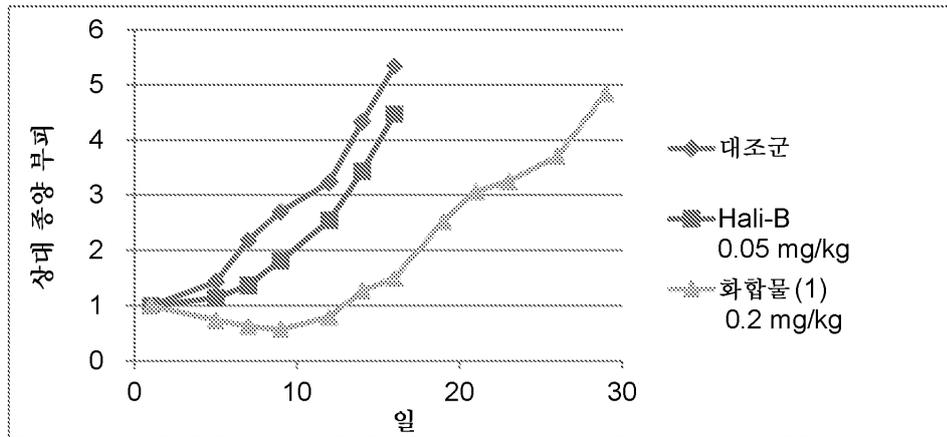
관련 기술분야의 통상의 기술자의 이해로부터 명백하지 않는 한, 범위로서 표현된 값은 본 발명의 상이한 실시양태에서 언급된 범위 내의 임의의 구체적 값 또는 하위-범위를, 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한, 범위의 하한 단위의 1/10까지 추정할 수 있다.

[0391]

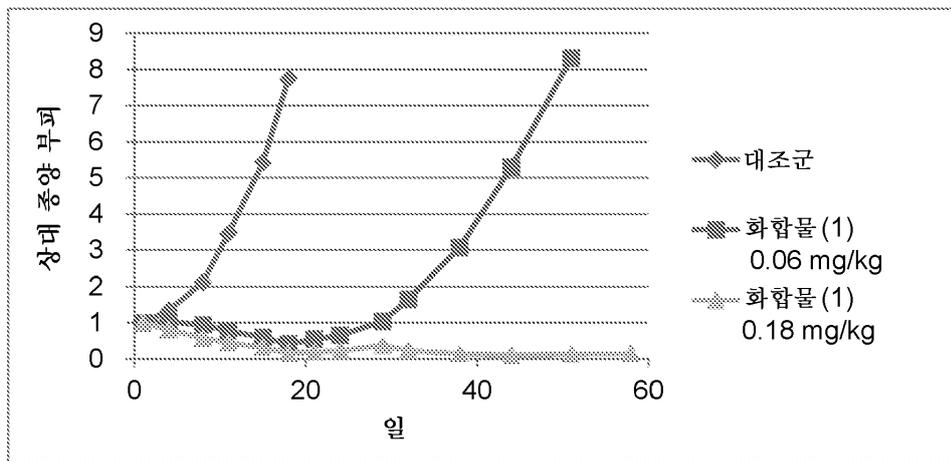
관련 기술분야의 통상의 기술자는 단지 상용 실험을 사용하여, 본원에 기재된 구체적 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 본원에 기재된 본 발명의 실시양태의 범주는 상기 상세한 설명으로 제한되도록 의도되지 않으며, 오히려 첨부된 청구범위에 제시된 바와 같다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상기 상세한 설명에 대한 다양한 변화 및 변형이 하기 청구범위에 정의된 바와 같은 본 발명의 취지 또는 범주로부터 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다는 것을 인지할 것이다.

도면

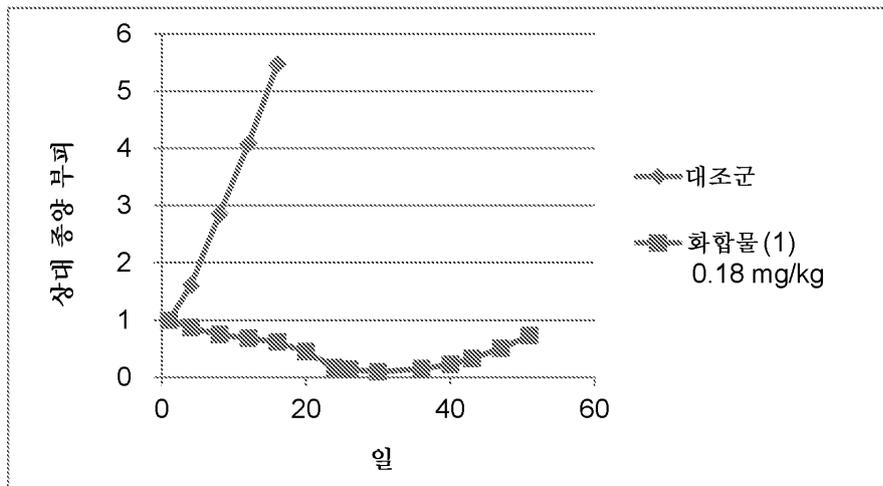
도면1



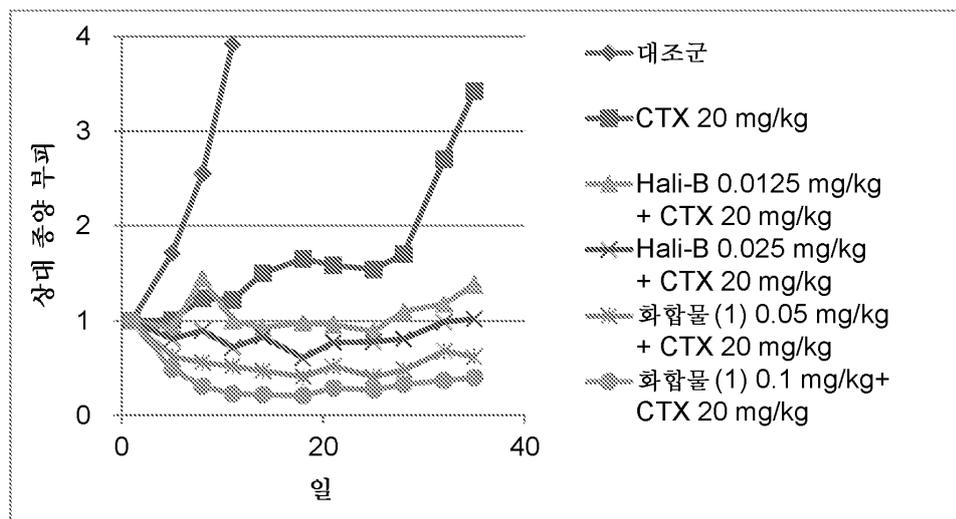
도면2



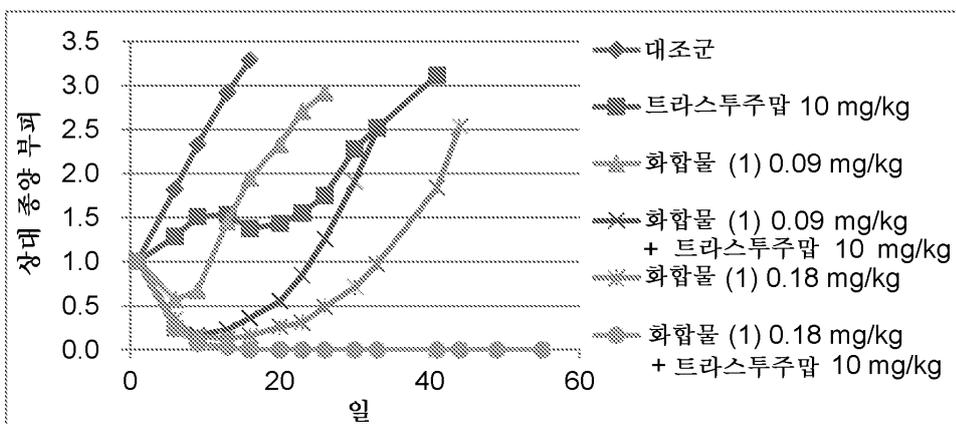
도면3



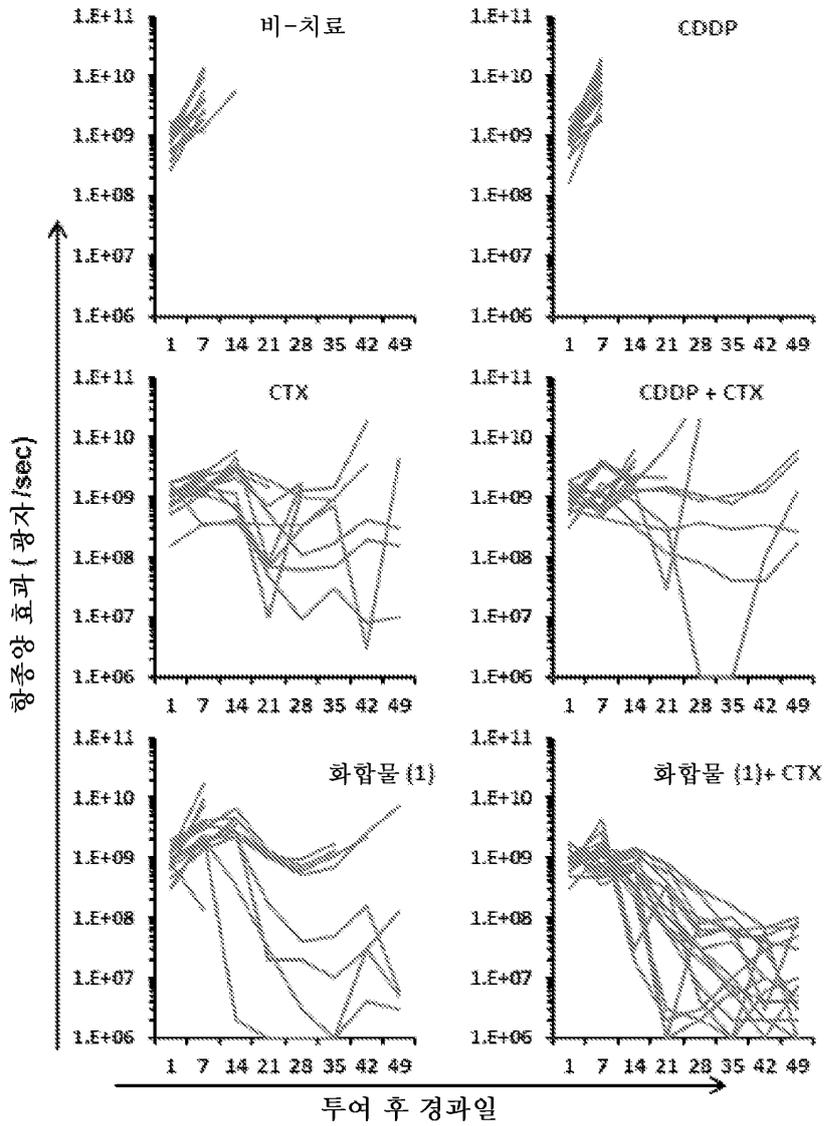
도면4



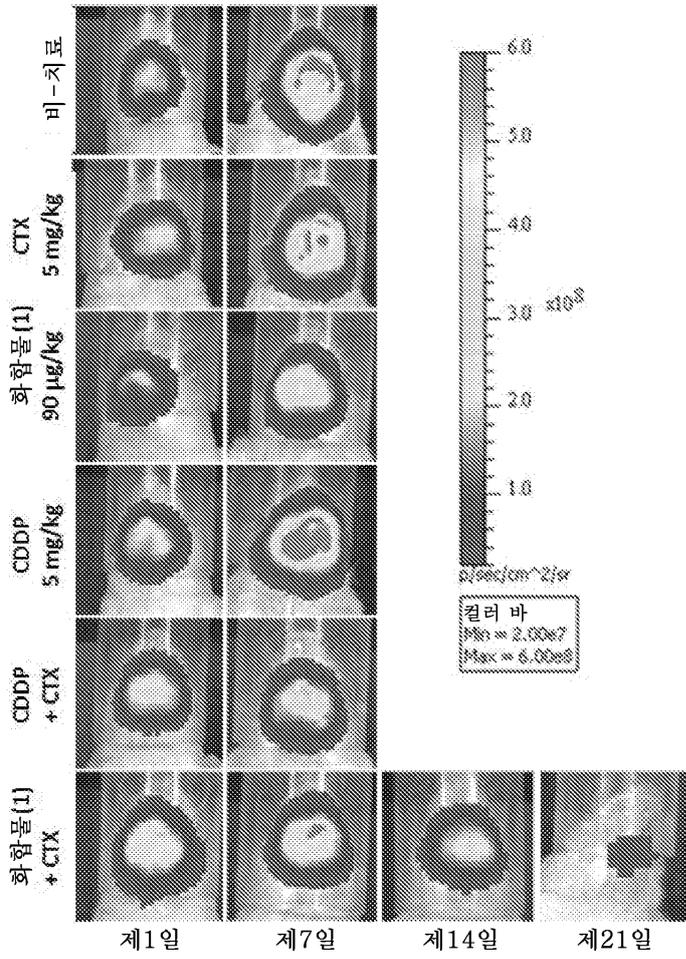
도면5



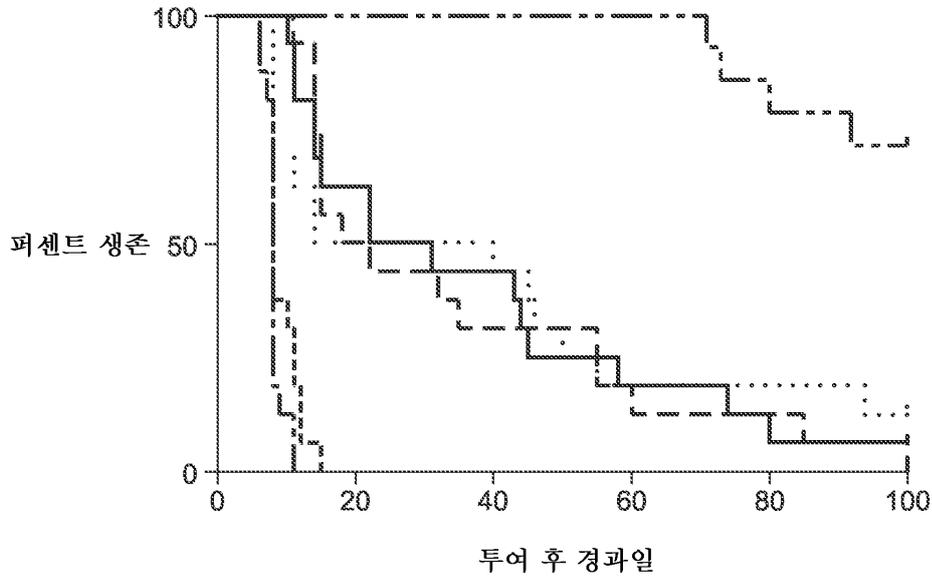
도면6a



도면6b

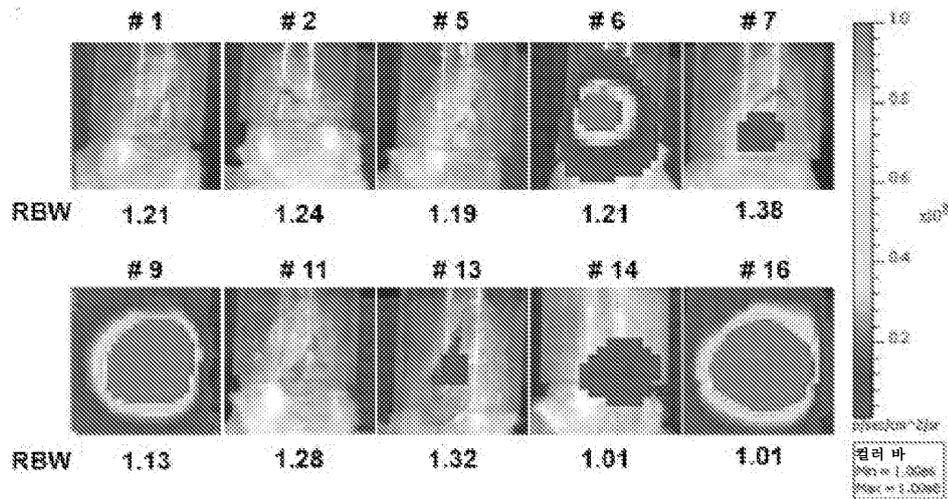


도면7a

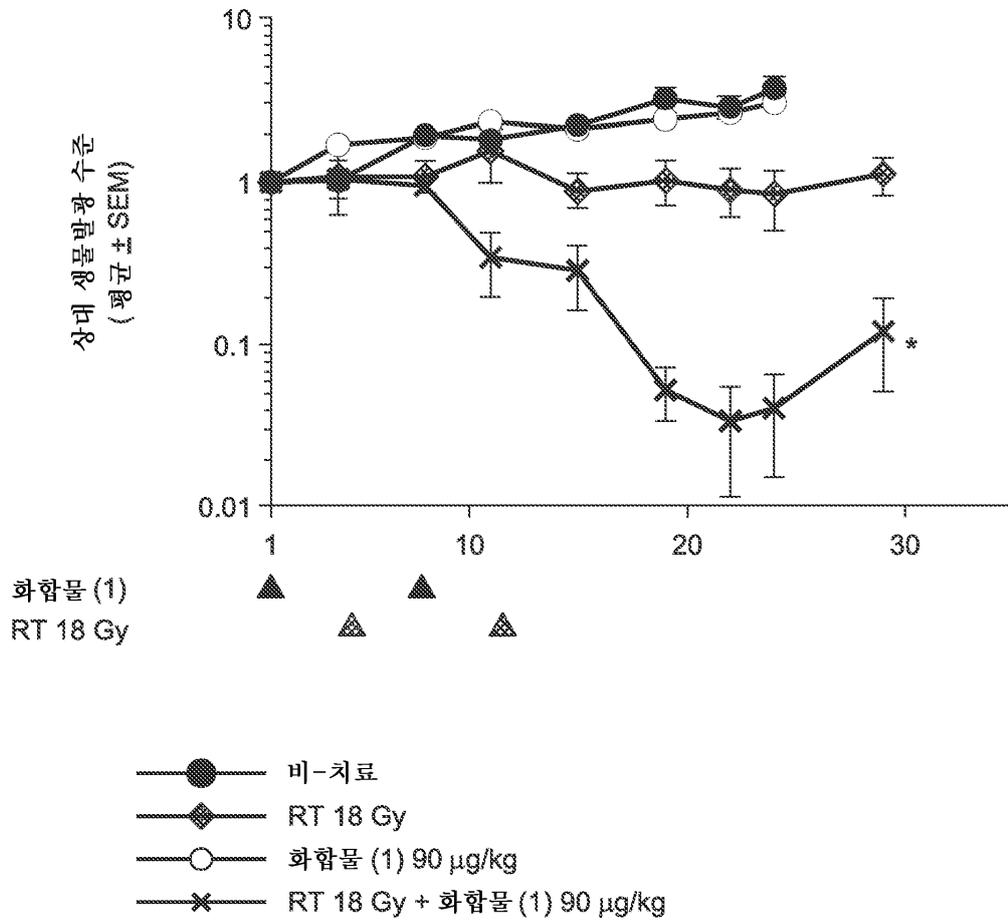


- 비-치료
- CTX 5 mg/kg
- 화합물 (1) 90 μg/kg
- CDDP 5 mg/kg
- 화합물 (1) 90 μg/kg + CTX 5 mg/kg
- CDDP 5 mg/kg + CTX 5 mg/kg

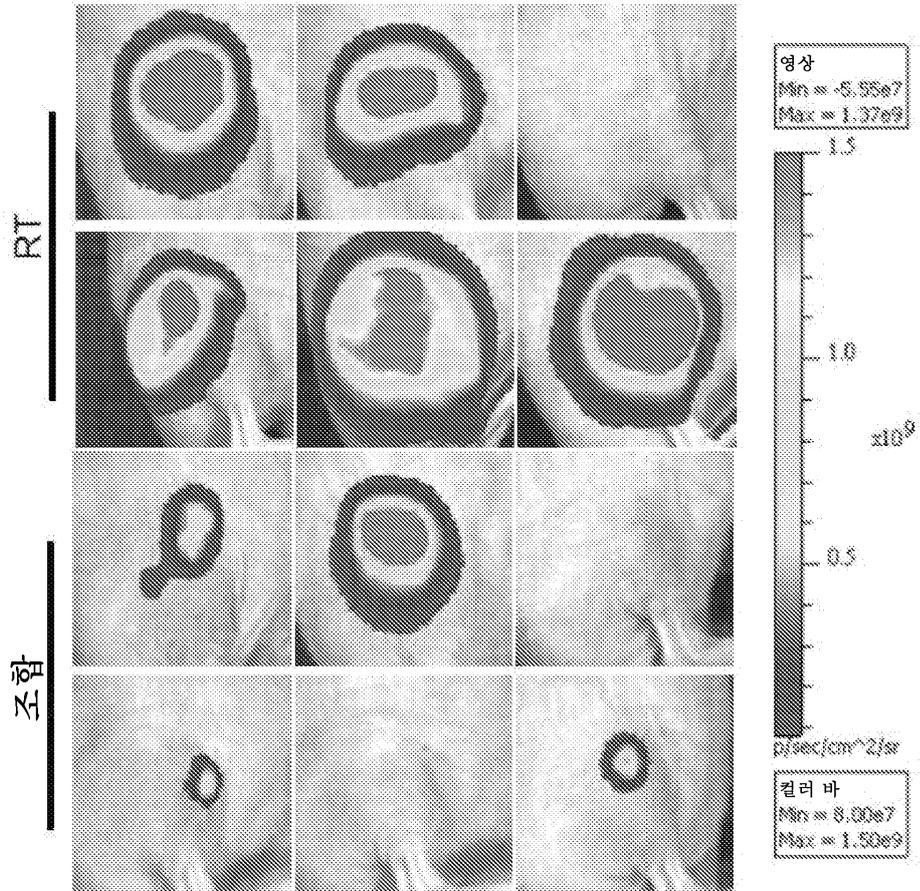
도면7b



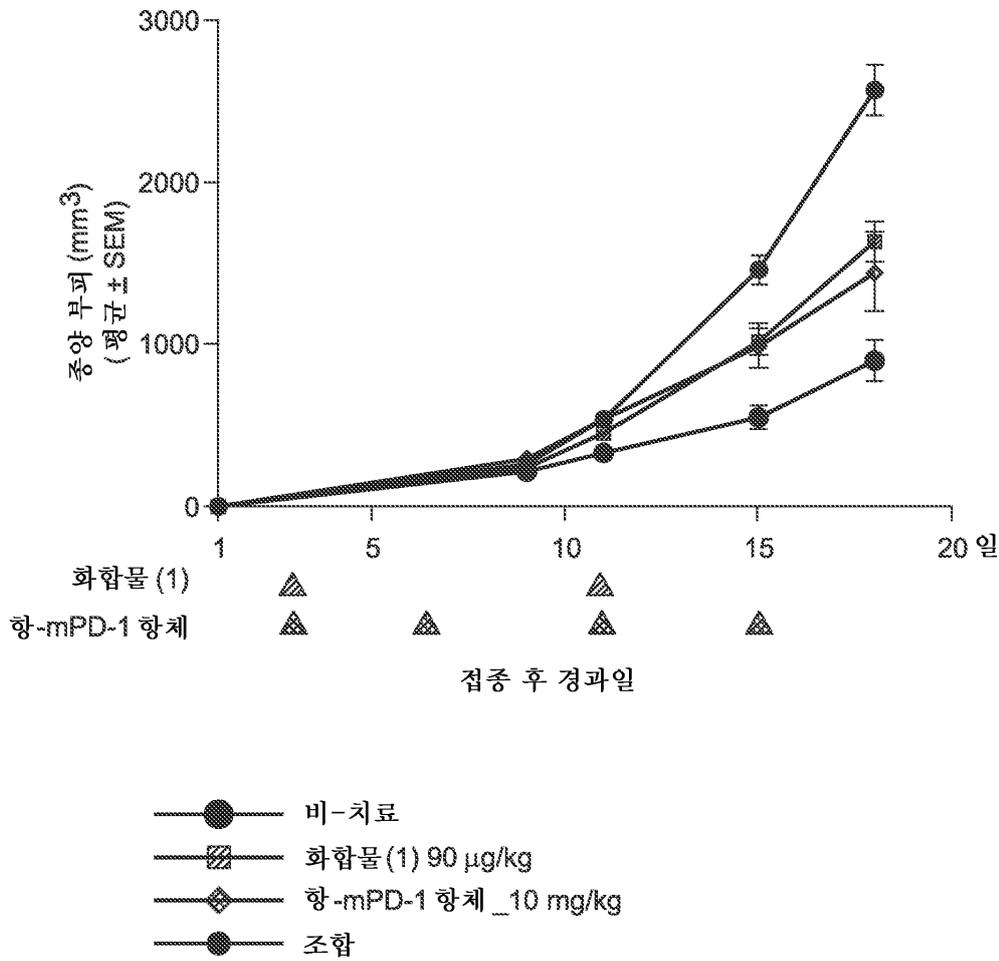
도면8a



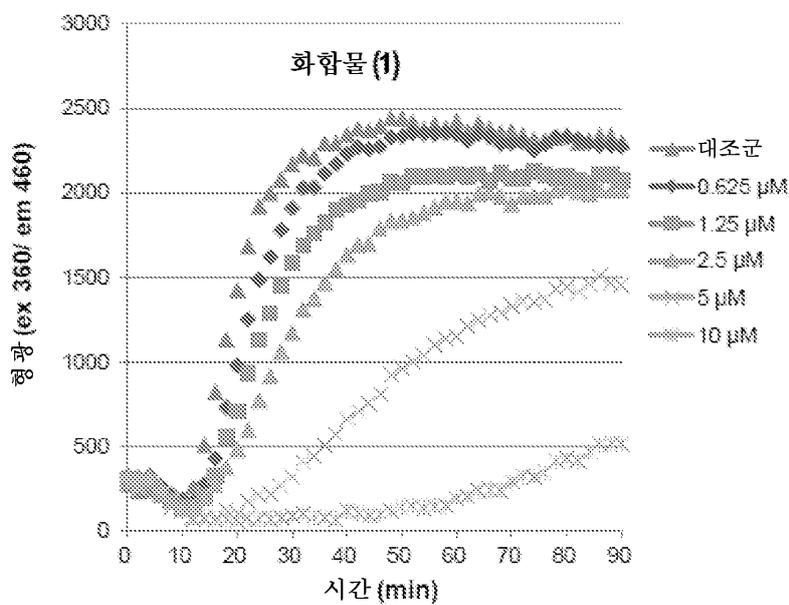
도면8b



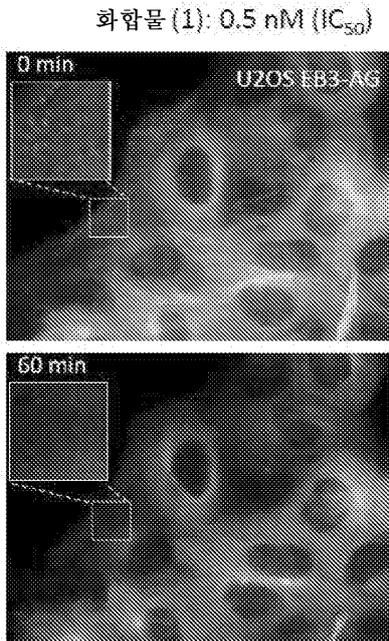
도면9



도면10a



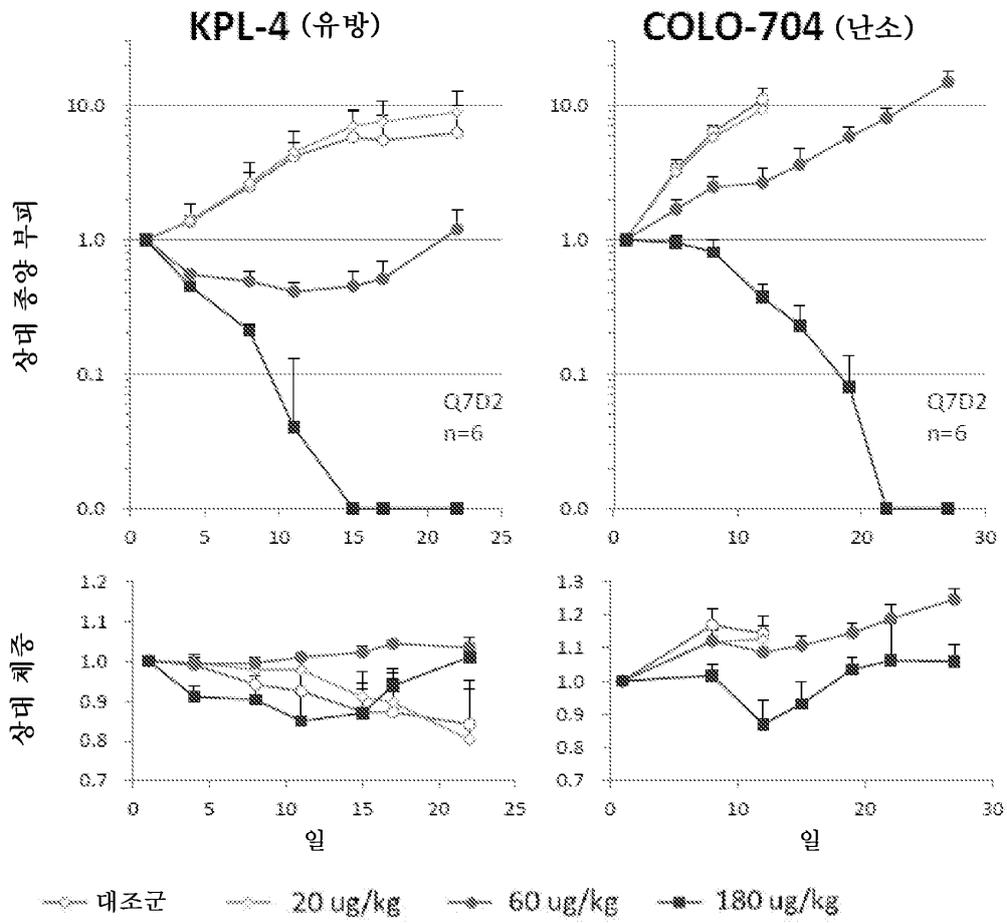
도면10b



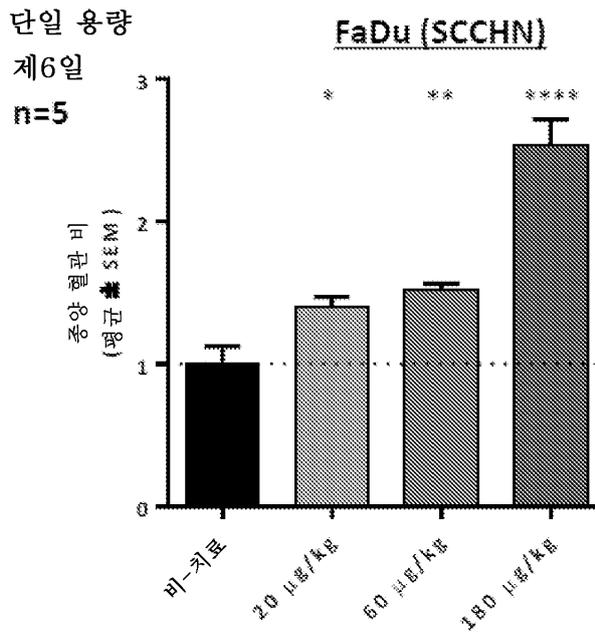
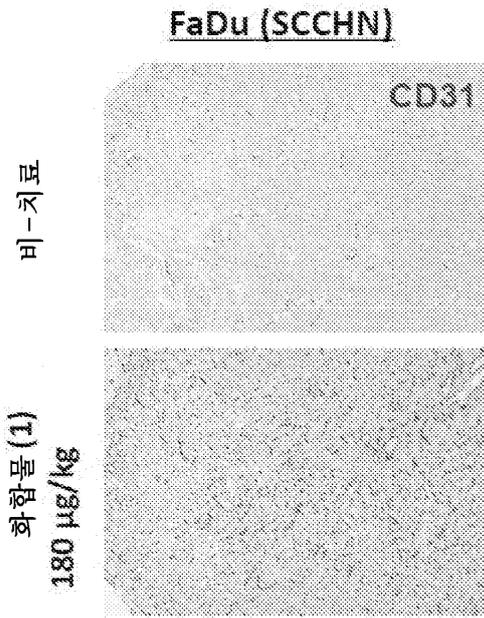
도면11

화합물	시험관내 세포 성장 억제 IC ₅₀ (nM)					P-gp 감수성
	식도암		자궁 육종			
	OE21	OE33	TE-8	MES-SA	MES-SA/Dx5-Rx1	
화합물 (1)	0.061	0.28	0.095	0.070	8.7	123

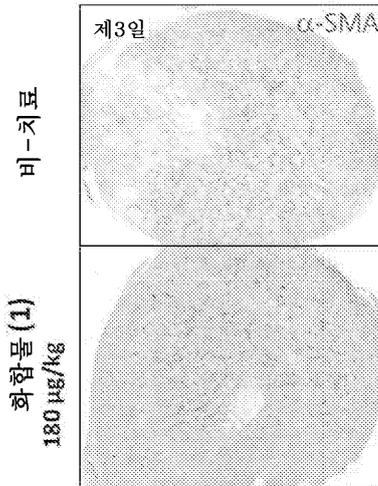
도면12



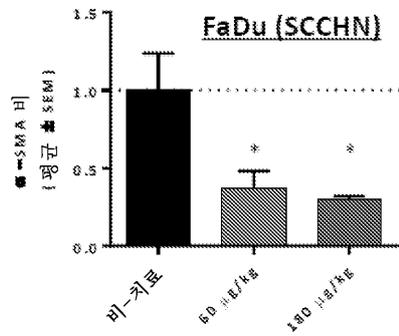
도면13



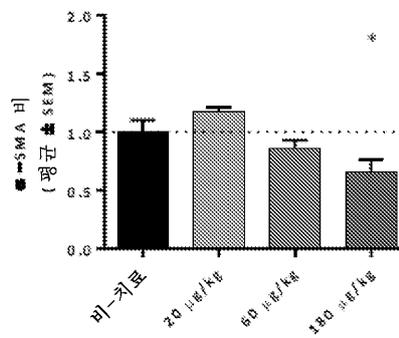
도면14



제3일
단일 용량
n=5



제6일



* $p < 0.05$ vs 비-치료
(던넛 다중 비교 검정),
** $p < 0.01$ vs 비-치료
(독립표본 t 검정)

도면15

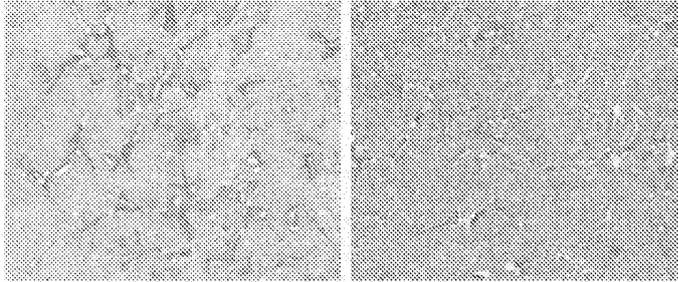
FaDu
(SCCHN)

단일 용량
제6일

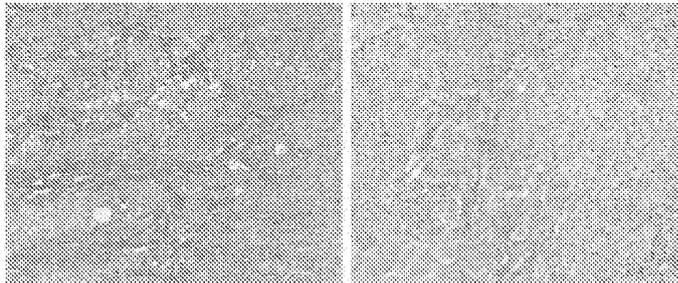
테나진-C

대조군

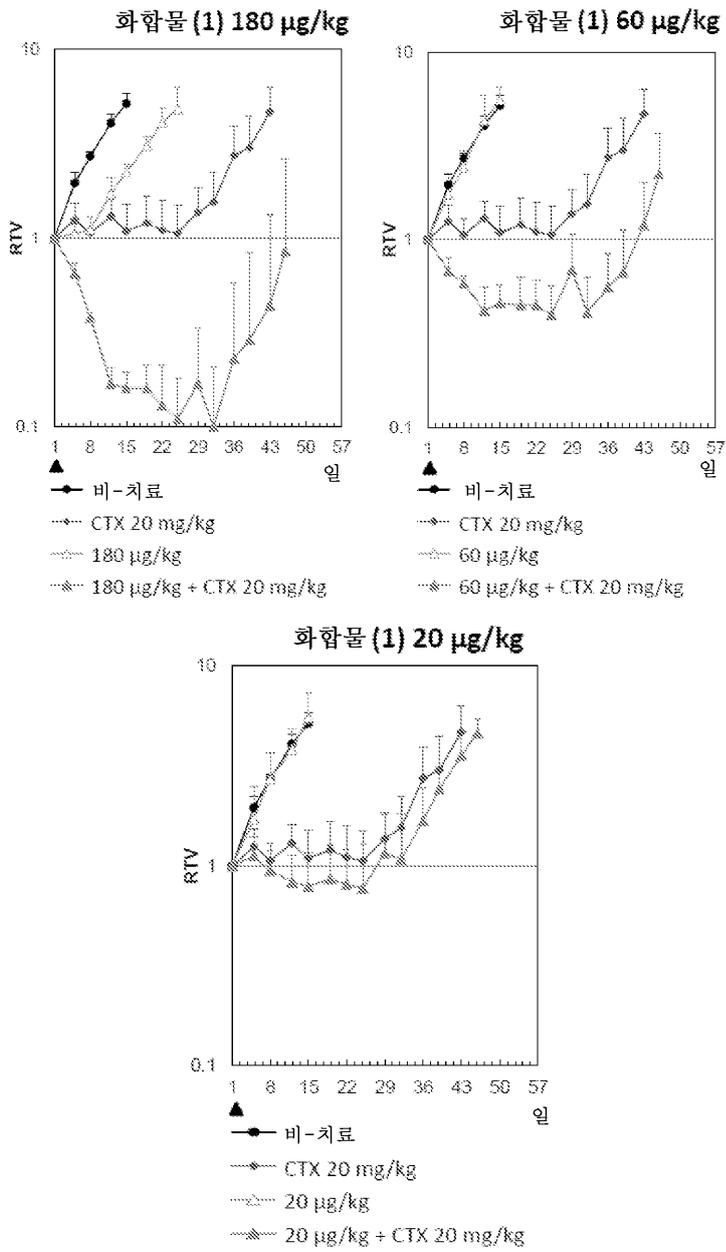
180 μ g/kg의 화합물 (1)
+ 세특시맙



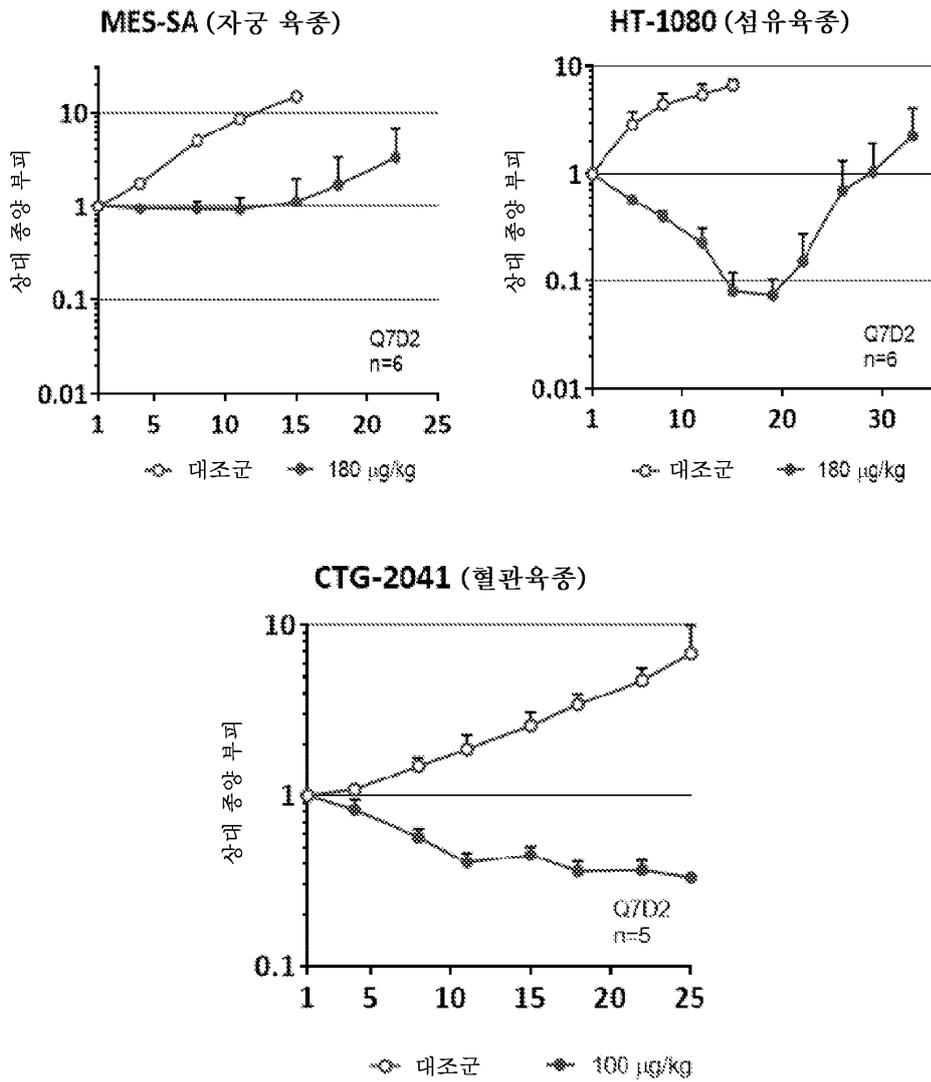
EDA-피브로블라스트



도면16



도면17



도면18

