(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0156443
(43) 공개일자 2023년11월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4025 (2006.01) *A61K 31/407* (2006.01)
A61K 31/635 (2014.01) *A61K 31/69* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4025 (2013.01)
A61K 31/407 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7037917(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년03월28일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2023-7019958
원출원일자(국제) 2017년03월28일
심사청구일자 2023년07월11일
(85) 번역문제출일자 2023년11월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/024618
(87) 국제공개번호 WO 2017/172826
국제공개일자 2017년10월05일
(30) 우선권주장
62/314,356 2016년03월28일 미국(US)

(71) 출원인
프레시지 바이오싸이언시스, 인크.
미국, 워싱턴 98109, 씨애틀, 스위트 1000, 페어뷰 애비뉴 노쓰 530
(72) 발명자
클링호퍼 리처드
미국, 워싱턴 98115, 씨애틀, 56쓰 애비뉴 7307
데이 조요티
미국, 워싱턴 98177, 쇼어라인, 유닛 3012, 엔더블유 195쓰 스트리트 2020
(74) 대리인
강명구

전체 청구항 수 : 총 1 항

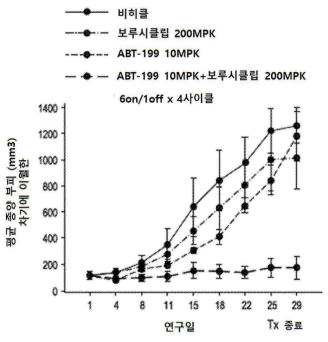
(54) 발명의 명칭 **암 치료를 위한 제약학적 조합물**

(57) 요 약

본 발명의 개시 내용은 백혈병, 림프종 및 삼중 음성 유방암과 같은 암을 치료하기 위한 조합 요법을 제공한다.

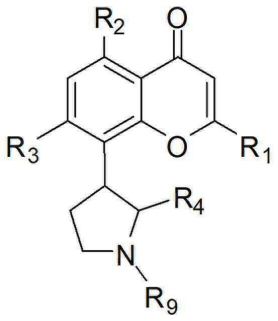
(뒷면에 계속)

대 표 도



도 26A

본 개시 내용은 암을 치료하기 위한 CDK 억제제, 예를 들어, 화학식 I로 표시되는 CDK 억제제 또는 제약학적으로 허용 가능한 이의 염과 BCL-2 억제제 또는 프로테아좀 억제제의 조합 요법을 제공한다:



I.

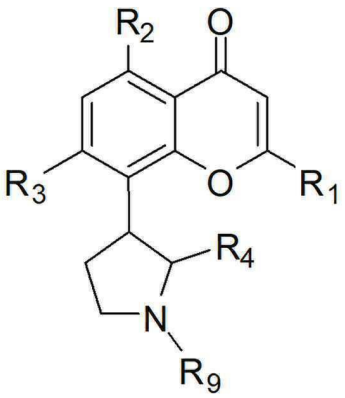
(52) CPC특허분류
A61K 31/635 (2020.08)
A61K 31/69 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 35/02 (2018.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

명 세 서

청구범위

청구항 1

치료적으로 유효한 양의 하기 화학식 I로 표시되는 CDK 억제제 또는 제약학적으로 허용 가능한 이의 염, 및 치료적으로 유효한 양의 BCL-2 억제제를 그것을 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 혈액암(blood cancer)을 치료하는 방법:



I,

상기에서:

R_1은 선택적으로 치환된 페닐이며;

R_2 및 R_3는 하이드록시 및 OR_8로부터 각각 독립적으로 선택되고, 상기에서 R_8은 선택적으로 치환된 C_1-C_{10}-알킬이며;

R_4는 선택적으로 치환된 C_1-C_4-알킬이고; 및

R_9은 수소 또는 선택적으로 치환된C_1-C_4-알킬이다.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **교차-참조**

[0002] 본 출원은 이의 전체 내용이 본 발명에 참고문헌으로서 포함된, 2016년 3월 28일에 출원된 미국 가출원 번호 62/314,356에 대해 우선권을 주장한다.

배 경 기 술

[0003] l Death and Tumor Regression. Blood, 128(22): 4167.

[0004] Paiva 외 (2015). Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor P1446A Induces Apoptosis in a JNK/p38 MAPK-Dependent Manner in Chronic Lymphocytic Leukemia B-Cells. Public Library of Science One, 25(11)

[0005] DC PHILLIPS 외: Loss in MCL-1 1-15 function sensitizes non-Hodgkin's lymphoma cell lines to the BCL-2-selective inhibitor venetoclax (ABT-199), Blood Cancer Journal, vol . 5, no. 11, November 13, 2015 (2015-11-13), 페이지 e368.

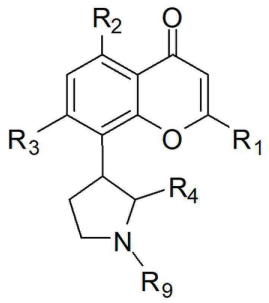
[0006] Nitesh P. SHIRSATH 외: P276-00, acyclin-dependent kinase inhibitor, modulates cell cycle and induces apoptosis in vitro and in vivo in mantle cell lymphoma eel l lines, Molecular Cancer, Biomed Central, London, GB, vol . 11, no. l, October 18, 2012.

[0007] WANG, S., 외: Cyclin-dependent kinase 9: a key transcriptional regulator and potential drug target in oncology, virology and cardiology, Trends in Pharmacological Sciences, vol. 29, no. 6, June 1, 2008, 페이지 302-313.

발명의 내용

[0008] **요약**

[0009] 일 측면에서, 본 개시 내용은 치료적으로 유효한 양의 하기 화학식 I로 표시되는 CDK 억제제 또는 제약학적으로 허용 가능한 이의 염, 및 치료적으로 유효한 양의 BCL-2 억제제를 그것을 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 혈액암(blood cancer)을 치료하는 방법을 제공하며:



[0010] I,

[0011] 상기에서:

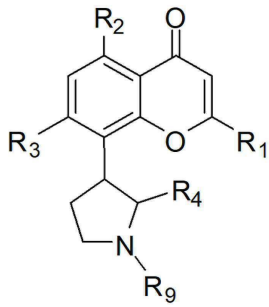
[0012] R_1은 선택적으로 치환된 페닐이며;

[0013] R_2 및 R_3는 하이드록시 및 OR_8로부터 각각 독립적으로 선택되고, 상기에서 R_8은 선택적으로 치환된 C_1-C_{10}-알킬이며;

[0014] R_4는 선택적으로 치환된 C_1-C_4-알킬이고; 및

[0015] R_9은 수소 또는 선택적으로 치환된C_1-C_4-알킬이다.

[0016] 특정 측면에서, 본 개시 내용은 치료적으로 유효한 양의 하기 화학식 I로 표시되는 CDK 억제제 또는 제약학적으로 허용 가능한 이의 염, 및 치료적으로 유효한 양의 프로테아좀 억제제를 그것을 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 암을 치료하는 방법을 제공하며:



[0017] I,

[0018] 상기에서:

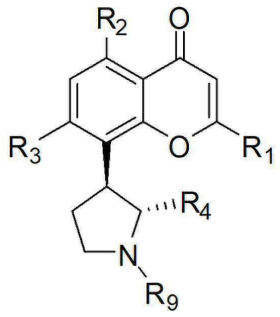
[0019] R_1은 선택적으로 치환된 페닐이고;

[0020] R_2 및 R_3는 각각 독립적으로 하이드록시 및 OR_8으로부터 선택되며, 상기에서 R_8은 선택적으로 치환된 C_1-C_{10}-알킬이고;

[0021] R_4는 선택적으로 치환된 C_1-C_4-알킬이며; 및

[0022] R_9은 수소 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_4-알킬이다. 특정 구현예에서, 암은 혈액암 및 삼중 음성 유방암 (TNBC)으로부터 선택된다.

[0023] 특정 구현예에서, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 Ia로 표시되는 화합물:



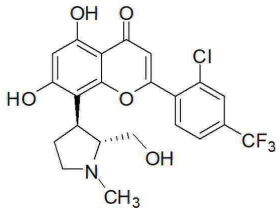
[0024] Ia, 또는 제약학적으로 허용 가능한 이의 염이다.

[0025] 화학식 I 또는 Ia의 화합물 또는 염에 대한 특정 구현예에서, R_1은 하이드록시, 시아노, 할로, 아미노, C_1-C_4-알킬, C_1-C_4-알콕시, C_1-C_4-하이드록시알킬, C_1-C_4-할로알킬, 및 나이트로로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된다. 특정 구현예에서, R_1은 할로 및 C_1-C_4-할로알킬로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 치환된다. 특정 구현예에서, R_1은 2-클로로-4-트리플루오로메틸페닐이다.

[0026] 화학식 I 또는 Ia의 화합물 또는 염에 대한 특정 구현예에서, R_2 및 R_3는 하이드록시 및 OR_8로부터 각각 독립적으로 선택되며, 상기 R_8은 하이드록시, 시아노, 할로, 아미노, =O, =S, C_1-C_4-알콕시, 및 나이트로로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 C_1-C_{10}-알킬이다. 특정 구현예에서, R_2 및 R_3는 각각 하이드록시이다.

[0027] 화학식 I 또는 Ia의 화합물 또는 염에 대한 특정 구현예에서, R_4는 하이드록시, 시아노, 할로, 아미노, =O, =S, C_1-C_4-알콕시, 및 나이트로로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 치환된 C_1-C_4-알킬이다. 특정 구현예에서, R_4는 하이드록시, 시아노, 할로, 아미노, =O, =S, C_1-C_4-알콕시, 및 나이트로로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 치환된 C_1-C_4-알킬이다. 특정 구현예에서, R_4는 2-하이드록시메틸이다.

[0028] 화학식 I 또는 Ia의 화합물 또는 염에 대한 특정 구현예에서, R_9은 하이드록시, 시아노, 할로, 아미노, =O, =S, C_1-C_4-알콕시, 및 나이트로로 선택적으로 치환된C_1-C_4-알킬이다. 특정 구현예에서, R_9은 메틸이다. 특정 구현예에서 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 Ib로 표시되는 화합물:



[0029] Ib, 또는 제약학적으로 허용 가능한 이의 염이다.

[0030] 특정 구현예에서, 본 발명에 기재된 방법의 BCL-2 억제제는 BH3-모방체이다. BCL-2 억제제는 Bc1-2 단백질을 특이적으로 억제할 수 있다. BCL-2 억제제는 나비토클락스, 베네토클락스, A-1155463, A-1331852, ABT-737, 오바토클락스, S44563, TW-37, A-1210477, AT101, HA14-1, BAM7, 사부토클락스, UMI-77, 감보그산, 마리토클락스, MIM1, 메틸프리드니솔론, iMAC2, Bax 억제제 펩타이드 V5, Bax 억제제 펩타이드 P5, Bax 채널 차단제, 및 ARRY 520 트리플루오로아세테이트로부터 선택될 수 있다. 특정 구현예에서, 본 발명에 기재된 방법의 BCL-2 억제제는 나비토클락스 및 베네토클락스 또는 이들 중 어느 하나의 제약학적으로 허용가능한 염으로부터 선택된다.

[0031] 특정 구현예에서, 본 발명에 기재된 방법의 혈액암은 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 림프구 백혈병 (ALL), 및 만성 림프구 백혈병 (CLL), 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 원발성 종격동 B-세포 림프종, 종격동 거대 B-세포 림프종, 소포성 림프종, 소 림프구 림프종 (SLL), 외투 세포 림프종, 변연부 B-세포 림프종, 결절외 변연부 B-세포 림프종, 림프절 변연부 B-세포 림프종, 비장가장자리 변연부 B-세포 림프종, 버킷 림프종, 림프형질세포성 림프종, 및 원발성 중추신경계 림프으로부터 선택된다. 혈액암은 미만성 거대 B-세포 림프종, 급성 골수성 백혈병 또는 만성 림프구 백혈병일 수 있다.

[0032] 본 발명에 기재된 특정 방법에 대해, CDK 억제제 및 BCL-2 억제제는 동시에 투여될 수 있다. 본 발명에 기재된

방법에 대해, CDK 억제제 및 BCL-2 억제제는 서로 약 12시간 이내에, 예컨대, 서로 약 5시간 이내에 순차적으로 투여될 수 있다.

[0033] 본 발명에 기재된 특정 방법에 대해, CDK 억제제 및 BCL-2 억제제는 제약학적 조성물로 공동-제제화될 수 있다.

[0034] 본 발명에 기재된 특정 방법에 대해, CDK 억제제 및 BCL-2 억제제는 매일, 격일로 또는 3일마다 투여될 수 있다.

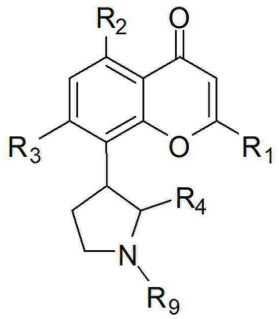
[0035] 본 발명에 기재된 특정 방법에 대해, 프로테아좀 억제제는 보르테조밉, 마리조밉, 익사조밉, 디설피람, 에피갈로카테킨-3-갈레이트, 살리노스포라마이드 A, 카필조밉, ONX 0912, CEP-18770, MLN9708, 에폭소미신, MG132 및 이들 중 어느 하나의 제약학적으로 허용가능한 염으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 프로테아좀 억제제는 보르테조밉, 마리조밉, 익사조밉, 및 이들 중 어느 하나의 제약학적으로 허용가능한 염으로부터 선택된다.

[0036] 본 발명에 기재된 특정 방법에서, CDK 억제제 및 프로테아좀 억제제는 동시에 투여된다. CDK 억제제 및 프로테아좀 억제제는 서로 약 12 시간 이내에, 예컨대, 서로 5시간 이내에 순차적으로 투여될 수 있다.

[0037] 본 발명에 기재된 특정 방법에서, CDK 억제제 및 프로테아좀 억제제는 제약학적 조성물로 공동-제제화된다.

[0038] 본 발명에 기재된 특정 방법에서, CDK 억제제 및 BCL-2 억제제는 매일, 격일로 또는 3일마다 투여된다.

[0039] 특정 측면에서 본 개시 내용은 치료적으로 유효한 양의 하기 화학식 I으로 표시되는 CDK 억제제 또는 제약학적으로 허용 가능한 이의 염, 치료적으로 유효한 양의 BCL-2 억제제 또는 프로테아좀 억제제, 및 제약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 제약학적 조성물을 제공한다:



[0040] I,

[0041] 상기에서:

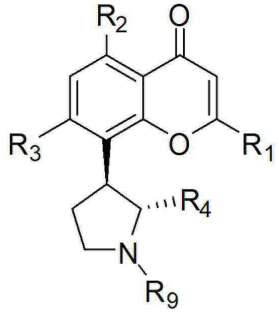
[0042] R_1은 선택적으로 치환된 페닐이고;

[0043] R_2 및 R_3는 하이드록시 및 OR_8로부터 각각 독립적으로 선택되며, 상기에서 R_8은 선택적으로 치환된 C_1-C_{10}-알킬이고;

[0044] R_4는 선택적으로 치환된 C_1-C_4-알킬이며; 및

[0045] R_9은 수소 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_4-알킬이다.

[0046] 특정 구현예에서, 화학식 I의 화합물 또는 염은 하기 화학식 Ia로 표시된다:



[0047] Ia.

[0048] 본 발명에 기재된 조성물에 대해, 화학식 I 또는 Ia의 화합물 또는 염에 대해, R_1은 하이드록시, 시아노, 할로, 아미노, C_1-C_4-알킬, C_1-C_4-알콕시, C_1-C_4-하이드록시알킬, C_1-C_4-할로알킬, 및 나이트로로부터 독립적으로 선택되

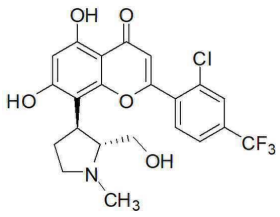
는 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환될 수 있다. 특정 구현예에서, R_1은 할로 및 C_1-C_4-할로알킬로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 치환된다. 특정 구현예에서, R_1은 2-클로로-4-트리플루오로메틸페닐이다.

[0049] 본 발명에 기재된 조성물에 대해, 화학식 I 또는 Ia의 화합물 또는 염에 대해, R_2 및 R_3는 하이드록시 및 OR_8로부터 각각 독립적으로 선택되며, 상기 R_8은 하이드록시, 시아노, 할로, 아미노, =O, =S, C_1-C_4-알콕시, 및 나이트로로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 C_1-C_{10}-알킬 이다. 특정 구현예에서, R_2 및 R_3는 각각 하이드록시이다.

[0050] 본 발명에 기재된 조성물에 대해, 화학식 I 또는 Ia의 화합물 또는 염에 대해, R_4는 하이드록시, 시아노, 할로, 아미노, =O, =S, C_1-C_4-알콕시, 및 나이트로로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 치환된 C_1-C_4-알킬이다. 특정 구현예에서, R_4는 C_1-C_4-알킬 -하이드록시, 시아노, 할로, 아미노, =O, =S, C1-C4-알콕시, 및 나이트로로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 치환된다. 특정 구현예에서, R_4는 2-하이드록시메틸이다.

[0051] 본 발명에 기재된 조성물에 대해, 화학식 I 또는 Ia의 화합물 또는 염에 대해, R_9은 하이드록시, 시아노, 할로, 아미노, =O, =S, C_1-C_4-알콕시, 및 나이트로로 선택적으로 치환된 C_1-C_4-알킬일 수 있다. 특정 구현예에서, R_9은 메틸이다.

[0052] 본 발명에 기재된 조성물에 대해, 화학식 I의 화합물은 하기 화학식 Ib로 표시되는 화합물:



[0053] Ib, 또는 제약학적으로 허용 가능한 이의 염일 수 있다.

[0054] 본 발명에 기재된 BCL-2 억제제를 포함하는 조성물에 대해, BCL-2 억제제는 나비토클락스, 베네토클락스, A-1155463, A-1331852, ABT-737, 오바토클락스, S44563, TW-37, A-1210477, AT101, HA14-1, BAM7, 사부토클락스, UMI-77, 감보그산, 마리토클락스, MIM1, 메틸프리드니솔론, iMAC2, Bax 억제제 펩타이드 V5, Bax 억제제 펩타이드 P5, Bax 채널 차단제, ARRY 520 트리플루오로아세테이트 및 이들 중 어느 하나의 제약학적으로 허용가능한 염으로부터 선택될 수 있다. The BCL-2 억제제는 나비토클락스 및 베네토클락스 또는 이들 중 어느 하나의 제약학적으로 허용가능한 염으로부터 선택될 수 있다. 특정 구현예에서, BCL-2 억제제는 베네토클락스이다.

[0055] 본 발명에 기재된 프로테아좀 억제제를 포함하는 조성물에 대해, 프로테아좀 억제제는 보르테조밉, 마리조밉, 익사조밉, 디설피람, 에피갈로카테킨-3-갈레이트, 살리노스포라마이드 A, 카필조밉, ONX 0912, CEP-18770, MLN9708, 에폭소미신, MG132 및 이들 중 어느 하나의 제약학적으로 허용가능한 염으로부터 선택될 수 있다. 특정 구현예에서, 프로테아좀 억제제는 보르테조밉, 마리조밉, 익사조밉, 및 이들 중 어느 하나의 제약학적으로 허용가능한 염으로부터 선택된다.

[0056] **참고문헌으로서 포함**

[0057] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은 각 간행물, 특허, 또는 특허 출원이 특이적으로 및 개별적으로 참고문헌으로서 포함되는 것으로 나타내는 것과 동일한 정도로 본 발명에 참고문헌으로서 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0058] **도면의 간단한 설명**

본 발명의 신규한 특징은 청구된 청구 범위에서 구체적으로 설명된다. 본 발명의 원리가 사용되는 실례가 되는 구현예를 설명하는 하기의 상세한 설명 및 참조 도면을 참고함으로써 본 발명의 특징 및 장점을 더욱 잘 이해할 수 있을 것이다:

도 1은 38 카이네이즈(kinase)에 대한 보루시클립(voruciclib) 및 플라보피라돌(flavopiradol)의 활성 비교를 도시한다.

도 2는 사이클린-의존성 카이네이즈에 대한 보루시클립의 한-자릿수 nM 효능을 도시한다.

도 3A-3D는 베네토클락스 (ABT-199)과 조합한 보루시클립의 시너지 효과를 도시한다. 보루시클립은 NU-DHL-1 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL) 세포에서 베네토클락스에 의해 유도된 골수성 백혈병 세포 분화 단백질 (myeloid leukemia cell differentiation protein, MLC-1)의 유도(induction)를 억제한다. MCL-1 = 빨간색; DAPI = 파란색; 형광 추적 마커(fluorescent tracking marker, FTM) = 초록색.

도 4A-4D는 NU-DHL-1 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL) 세포에서 보루시클립 및 베네토클락스의 조합 처리에 의해 증가된 세포자멸사(apoptosis)를 도시한다. 절단된 케스페이즈(caspase)-3 (CC3) = 빨간색; DAPI = 파란색; 형광 추적 마커 (FTM) = 초록색.

도 5A-5D는 나비토클락스 (ABT-263)와 조합한 보루시클립의 시너지 효과를 도시한다. 라모스 버킷 림프종 세포주에 보루시클립 및 나비토클락스의 처리는 세포자멸사를 유발한다. 절단된 케스페이즈-3 (CC3) = 빨간색; DAPI = 파란색; 형광 추적 마커 (FTM) = 초록색.

도 6A-6E는 미만성 거대 B-세포 림프종의 다섯 가지 모델에 걸친 베네토클락스와 조합한 보루시클립의 시너지 효과를 도시한다.

도 7은 CDK9을 통한 MCL-1의 억제가 세포를 세포자멸사로 이끄는데 도움을 주는 것을 도시한다.

도 8A-8D는 삼중 음성 유방암 (TNBC)에서 프로테아좀 억제가 MCL-1의 상향 조절을 유도하는 것을 도시한다. **도 8A**는 HCC1187 TNBC 이종 이식 모델에서 스크리닝된 화합물의 목록을 도시한다. **도 8B**는 다양한 화합물 처리에 의한 MCL-1 유도에서의 평균 % 변화를 도시한다. **도 8C-8D**는 비히클로 염색하고 보르테조밉을 처리한 후의 CC3 (빨간색으로 나타낸)에 대한 세포 염색을 도시한다.

도 9A-9D는 마리조밉과 조합한 보루시클립의 NudHL1 DLBCL 세포에 대한 시너지 효과를 도시한다. 절단된 케스페이즈-3 (CC3) = 빨간색; DAPI = 파란색; 형광 추적 마커 (FTM) = 초록색.

도 10A-10D는 보르테조밉과 조합한 보루시클립의 NudHL1 DLBCL 세포에 대한 시너지 효과를 도시한다. 절단된 케스페이즈-3 (CC3) = 빨간색; DAPI = 파란색; 형광 추적 마커 (FTM) = 초록색.

도 11A-11D는 보르테조밉과 조합한 보루시클립의 삼중 음성 유방암 세포에 대한 시너지 효과를 도시한다. 절단된 케스페이즈-3 (CC3) = 빨간색; DAPI = 파란색; 형광 추적 마커 (FTM) = 초록색.

도 12A-12E는 보르테조밉과 조합한 보루시클립의 HCC1187 삼중 음성 유방암 세포에 대한 시너지 효과를 도시한다. **도 12A-12D**는 보루시클립 및 보르테조밉을 처리한 HCC1187 TNBC 마우스 모델에서 감소된 종양 부피를 도시한다. **도 12E**는 보루시클립 및 보르테조밉 또는 보루시클립 및 튜니카마이신(tunicamycin)을 처리한 HCC1187 TNBC 세포에서의 MCL-1 발현을 입증하는 웨스턴 블롯을 도시한다.

도 13은 HCC1187 TNBC 마우스 모델에서 체중에 대한 보루시클립 및 보르테조밉 및 보루시클립 및 보르테조밉의 조합의 효과를 도시한다

도 14는 HCC1187 TNBC 마우스 모델에서의 CDK4/6 억제제인 팔보시클립(palbociclib)과 조합한 보르테조밉의 효과를 도시한다

도 15A-15B는 보르테조밉-유도 MCL-1 및 유비퀴틴-단백질 라이게이즈 XIAP 발현을 감소시키는 것을 도시한다. **도 15A**는 CDK9의 보루시클립 억제의 제안된 모델을 도시한다. **도 15B**는 보루시클립이 보르테조밉-유도에 의한 MCL-1 및 E3 유비퀴틴-단백질 라이게이즈 XIAP 발현 증가를 억제하는 것을 입증하는 웨스턴 블롯을 도시한다.

도 16A-16B는 보르테조밉 처리에 대한 세포 내성을 도시한다. **도 16A**는 보르테조밉 처리에 의해 다른 세포가 제거된 영역에서 보르테조밉 처리에 대한 세포 내성을 도시한다. **도 16B**는 보르테조밉에 내성인 세포가 ER 스트레스 반응의 일부로서 발현되는 단백질인 GRP78을 발현하는 것을 도시한다.

도 17은 세 가지 다른 ER 스트레스 반응 경로를 도시한다.

도 18A-18B는 보루시클립이 IRE1α-의존성 ER 스트레스 반응 경로에 영향을 미칠 수 있음을 도시한다. **도 18A**는 IRE1α-의존성 ER 스트레스 반응 경로를 도시한다. **도 18B**는 ER 스트레스 유도자 튜니카마이신이 생존(pro-survival) (항-종양 세포 사멸) 단백질인 X-box 결합 단백질 1 (XBP1)을 급격하게 상향 조절하는 것을 입증하는 웨스턴 블롯을 도시한다. 이 효과는 보루시클립에 의해 급격하게 경감된다. 6시간차에, 오직 튜니카마이신이 이 효과를 도시하나, 24시간차에는, 보르테조밉 및 튜니카마이신 모두가 이 효과를 도시한다.

도 19A-19B는 보루시클립에 의한 보르테조밉-유도 XBP1 전사의 억제를 도시한다. STF083010 = IRE1α 엔도리보뉴클레아제 활성 억제제; Tm = 튜니카마이신

도 20A-20D는 익사조밉과 조합한 보루시클립의 시너지적 효과를 도시한다. 절단된-케스페이즈 3 (CC3) = 빨간색; DAPI = 파란색; 형광 추적 마커 (FTM) = 초록색.

도 21A-21B는 CDK 억제제, 보루시클립, 팔보시클립, 디나시클립(dinaciclib) 및 플라보피라돌을 익사조밉과 조합하여 처리한 고형 종양 섹션을 도시한다. 오직 보루시클립 + 익사조밉만이 24시간 이내에 명백하게 종양 세포 제거를 재현 가능하게 초래한다.

도 22A-B는 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL) SU-DHL-4 모델에서의 보루시클립 및 베네토클락스의 시너지를 도시한다.

도 23A-23C는 OCI Ly10 모델인 SU-DHL-4 모델 및 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL)의 U2932 모델에서의 보루시클립 및 베네토클락스의 시너지를 도시한다.

도 24는 보루시클립이 DLBCL 이종 이식 종양에서 MCL1 발현을 억제하는 것을 도시한다.

도 25A-25B는 ABC-타입 (RIVA) DLBCL 마우스에서 보루시클립 및 베네토클락스의 시너지 효과를 도시한다.

도 26A-26B는 DLBCL인 마우스의 경우 U2932 모델에서의 보루시클립 및 베네토클락스의 시너지 효과 및 체중에 대한 영향을 도시한다

도 27A-27B는 DLBCL인 마우스의 NUDHL1 모델에서 보루시클립 및 베네토클락스의 시너지 효과를 도시한다.

도 28은 GC DLBCL의 SUDHL4 모델에서의 보루시클립 및 베네토클락스의 시너지 효과를 도시한다.

도 29는 베네토클락스에 의한 p53 차폐(abrogate)를 보루시클립이 회복시키는 것을 도시한다.

도 30A-30C는 보루시클립이 AML 세포주에서 단일 약제 활성을 가지는 것을 도시한다.

도 31은 보루시클립 및 베네토클락스 조합이 AML 세포주에서 시너지적인 세포 사멸을 유도하는 것을 도시한다.

도 32는 보루시클립 및 베네토클락스의 조합이 SKM1 AML 이종 이식에서 종양 성장을 방해하는 시너지 효과를 도시한다.

도 33은 보루시클립-유도 세포자멸사가 MCL의 억제와 관련된 것을 도시한다

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] **상세한 설명**

[0060] 본 개시 내용은 암의 치료를 위한 조합 요법(combination therapies)을 제공한다. 특히, 본 개시 내용은 CDK 억제제와 암 치료를 위한 다른 항암제의 조합 요법을 제공한다. 일 측면에서 본 개시 내용은 BCL-2 억제제와 함께 조합한 CDK 억제제로 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 그런 조합은 암의 치료 및 특히 혈액암, 예를 들어, 백혈병 및 림프종의 치료에서 시너지 효과를 제공한다.

[0061] 또 다른 측면에서, 본 개시 내용은 프로테아좀 억제제와 조합한 CDK 억제제로 암을 치료하기 위한 조성물 및 방법을 제공한다. 그런 조합은 암의 치료 및 특히 혈액암 및 삼중 음성 유방암의 치료에서 시너지 효과를 제공한다.

[0062] 특별히 다르게 나타내지 않으면, 본 발명에서 상기 및 하기에서 사용된 일반 용어는 바람직하게는 본 개시 내용의 내용 내에서 하기 의미를 가진다. 따라서, 본 발명의 내용에서 사용된 바와 같은 일반 용어의 정의는 하기에 제공된다:

[0063] 단수형 "a," "an," 및 "the"는 문맥상 명백히 달리 지시하지 않는 한 복수형을 포함한다.

[0064] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 일반적으로 통상의 기술자에 의해 결정된 특정 값에 대한 허용가능한 에러 범위를 말하며, 이는 부분적으로 어떻게 값을 측정하거나 결정하는가에 달려있다. 예를 들어, "약"은 1 이내 또는 1 표준 편차 이상을 의미할 수 있다. 또는, "약"은 주어진 값의 20%이하, 10% 이하, 5% 이하 또는 1% 이하의 범위를 의미할 수 있다. 또는 특히 생물학적 시스템 또는 과정에 대해서, 용어는 값의 5-배 이내, 및 2-배 이내의 한도 내에서 의미할 수 있다.

[0065] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "하나 이상"은 하나 또는 그 이상을 말한다. 예를 들어, 용어 "하나 이상의 항암제"는 조합이 단일 항암제 또는 그 이상의 항암제를 포함하는 것을 의미한다.

[0066] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "유효량" 또는 "치료적으로 유효한 양,"은 일반적으로 질병 또는 질환 치료를 포함하나 이에 한정되지 않는, 의도된, 설정된 또는 규정된 용도에 영향을 미치기에 충분한 본 발명에 기재된 화합물의 양을 말한다. 치료적으로 유효한 양은 예를 들어, 대상의 체중 및 연령, 질병 상태의 심각성 및 투여 방식과 같은 적용 (예를 들어, *in vitro* 또는 *in vivo*), 또는 대상 및 치료되는 질병 상태에 따라 다를 수 있다. 용어는 또한 표적 세포에 예를 들어, 증식의 감소 또는 표적 단백질 활성의 하향 조절과 같은 특정 반응을 유도하는 용량에 적용될 수 있다. 특정 용량은 선택된 특정 화합물, 따라야 할 투여 요법(dosing regime), 다른 화합물과 조합 투여 여부, 투여 시기, 그 것이 투여될 조직, 및 그 것이 운반되는 물리적 전달 시스템에 따라 다를 수 있다.

[0067] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "제약학적으로 허용가능한"은 담체, 희석제, 부형제, 및/또는 염이 제제(formulation)의 다른 성분과 양립 가능해야 하고, 이의 수용자에 유해하지 않아야하는 것을 의미한다. "제약학적으로 허용가능한"은 또한 조성물 또는 제형(dosage form)이 이성적 의학 판단 범위 내에 있으며, 지나친 독성, 자극, 알러지 반응, 또는 다른 문제 또는 합병증이 없이 동물 또는 인간에 이용하기 적합하고, 합리적인 유해성/유익성 비(benefit/risk ratio)에 비례하는 것을 의미한다.

[0068] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "조합" 또는 "제약학적 조합"은 항암제들의 조합된 투여를 말한다. 본 개시 내용의 조합은 예를 들어, 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물과 같은 CDK 억제제, 및 BCL-2 억제제 및 프로테아좀 억제제로부터 선택되는 하나 이상의 항암제를 포함하며; 항암제들은 그것을 필요로 하는 대상에게, 예를 들어, 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있다.

[0069] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "시너지적," 또는 "시너지 효과" 또는 "시너지"는 일반적으로 조성물의 조합의 하나 이상의 효과가 각 요소 단독의 하나 이상의 효과보다 크거나 또는 이들이 각 요소 단독의 하나 이상의 효과의 합보다 더 클 수 있는 효과를 말한다. 시너지 효과는 요소 중 하나만을 가진 대상에서의 효과 또는 개별적으로 투여되었을 때 각 요소의 부가적인 효과보다 약 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 75 %, 100 %, 110 %, 120 %, 150 %, 200 %, 250 %, 350 %, 또는 500% 또는 그 이상 클 수 있다. 효과는 본 발명에 기재된 측정 가능한 임의의 효과일 수 있다. 바람직하게, 조합되었을 때 약제들 사이의 그런 시너지는 하나 또는 두 약제의 더 적은 용량의 사용을 허용할 수 있고, 동일한 용량에서 더 좋은 효능을 제공할 수 있으며, 다제 내성(multi-약물 resistance)의 빌드-업(build-up)을 방지하거나 지연시킬 수 있다. Chou 및 Talalay의 조합 지수(combination index, CI) 방법은 조합하여 사용된 약제들의 시너지, 부가 또는 길항 효과를 결정하는데 사용될 수 있다. CI 값이 1미만인 경우, 조합되어 사용된 화합물들 간의 시너지가 있고; CI 값이 1인 경우, 조합되어 사용된 화합물들 간에 부가 효과가 있으며 및 CI 값이 1 이상인 경우, 길항 효과가 있다. 시너지 효과는 제약학적 조합의 제제들을 공동-제제화함으로써 달성될 수 있다. 시너지 효과는 둘 이상의 약제들을 동시에 또는 순차적으로 투여되는 개별 제제로 투여함으로써 달성될 수 있다.

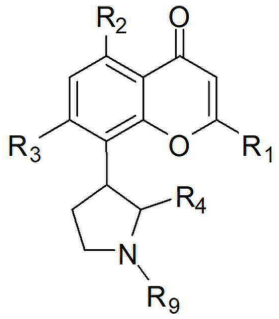
[0070] 사이클린-의존성 카이네이즈 (CDKs)는 세포 주기의 특정 기(phase)에 활성화되는 효소 패밀리이다. CDK는 촉매 서브유닛 (실제 사이클린-의존성 카이네이즈 또는 CDK) 및 조절 서브유닛 (사이클린)으로 이루어진다. 9가지 이상의 CDK (CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7, CDK8, CDK9, 등) 및 15가지 이상의 종류의 사이클린 (사이클린 A, B1, B2, D1, D2, D3, E, H 등)이 있다. 세포 주기의 각 단계는 그런 CDK 복합체에 의해 조절된다: G1/S 이행(transition) (CDK2/사이클린 A, CDK4/사이클린 D1-D3, CDK6/사이클린 D3), S 기 (CDK2/사이클린 A), G2 기 30 (CDK1/사이클린 A), G2/M 이행기(transition phase) (CDK1/사이클린 B).

[0071] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "CDK 억제제"는 하나 이상의 사이클린 의존성 카이네이즈 (CDK)를 억제할 수 있는 약제를 말한다. 카이네이즈의 이상 발현 및 과발현은 암과 같은 많은 질병 상태에서 입증된다. 본 발명의 경우에, 본 발명에 기재된 제약학적 조합의 CDK 억제제는 화학식 I, Ia, 또는 Ib 화합물 또는 이들의 제약학적으로 허용가능한 염일 수 있다. 본 발명의 개시 내용의 화합물은 하나 이상의 CDK1/사이클린 B, CDK2/사이클린 E, CDK4/사이클린 D, CDK4/사이클린 D1 및 CDK9/사이클린 T1을 특이적으로 억제할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 개시 내용의 화합물은 CDK9/사이클린 T1 또는 CDK9을 특이적으로 억제한다.

[0072] 본 발명에 개시된 것은 암, 예를 들어, 백혈병, 림프종 및 유방암의 치료를 위한 조합 요법이다. 본 발명에 기재된 방법 및 조성물은 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물 또는 제약학적으로 허용 가능한 이의 염과 같은 사이클린-의존성 카이네이즈 (CDK) 억제제를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 조합 요법은 프로테아좀 억제제와 조합한

CDK 억제제를 포함할 수 있다. 다른 경우에, 조합 요법은 BCL-2 억제제와 조합한 CDK 억제제를 포함할 수 있다.

[0073] 특정 구현예에서, 본 개시 내용의 CDK 억제제는 각각의 전체 내용이 본 발명에 참고 문헌으로서 포함된 미국 특허 번호 7,271,193; 7,915,301; 8,304,449; 7,884,127; 8,563,596에 개시된 화합물로 표시된다. 특정 구현예에서, 본 개시 내용의 CDK 억제제는 하기 화학식 I로 표시되고:



[0074] I,

[0075] 또는 제약학적으로 허용 가능한 이의 염이다, 상기에서:

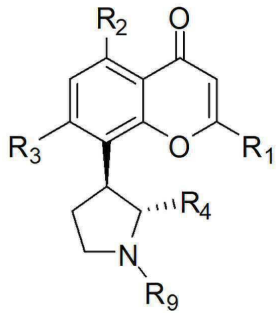
[0076] R1은 선택적으로 치환된 페닐이고;

[0077] R2 및 R3는 하이드록시 및 OR8로부터 각각 독립적으로 선택되며, 상기에서 R8은 선택적으로 치환된 C1-C10-알킬이고;

[0078] R4는 선택적으로 치환된 C1-C4-알킬이며; 및

[0079] R9은 수소 또는 선택적으로 치환된 C1-C4-알킬이다

[0080] 특정 구현예에서, 화학식 I의 화합물 또는 염은 하기 화학식 Ia로 표시된다:



[0081] Ia.

[0082] 화학식 I 또는 Ia의 화합물 또는 염에 대한 특정 구현예에서, R_1은 하이드록시, 시아노, 할로, 아미노, C_1-C_4-알킬, C_1-C_4-알콕시, C_1-C_4-하이드록시알킬, C_1-C_4-할로알킬, 및 나이트로로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된다. 특정 구현예에서, R_1은 하이드록시, 시아노, 할로, C_1-C_4-알킬, 및 C_1-C_4-할로알킬로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 치환된다. 특정 구현예에서, R_1은 할로 및 C_1-C_4-할로알킬로부터 독립적으로 선택된 하나 이상의 치환기로 치환된다. 특정 구현예에서, R_1은 2-클로로-4-트리플루오로메틸페닐이다.

[0083] 용어 "알킬"은 탄소 및 수소 원자만으로 이루어지고 불포화를 포함하지 않는 직쇄 또는 분지된 탄화수소 사슬 라디칼을 말한다. 특정 구현예에서, 알킬은 1 내지 8개의 탄소 원자 (즉, C_1-C_8 알킬)를 포함한다. 다른 구현예에서, 알킬은 1 내지 5개의 탄소 원자 (즉, C_1-C_5 알킬)를 포함한다. 다른 구현예에서, 알킬은 1 내지 4개의 탄소 원자 (즉, C_1-C_4 알킬)을 포함한다. 다른 구현예에서, 알킬은1 내지 3개의 탄소 원자 (즉, C_1-C_3 알킬)를 포함한다. 다른 구현예에서, 알킬은 1 내지 2개의 탄소 원자 (즉, C_1-C_2 알킬)를 포함한다. 다른 구현예에서, 알킬은 하나의 탄소 원자 (즉, C_1 알킬)를 포함한다. 다른 구현예에서, 알킬은 5 내지 8개의 탄소 원자 (즉, C_5-C_8 알킬)를 포함한다. 다른 구현예에서, 알킬은 2 내지 5개의 탄소 원자 (즉, C_2-C_5 알킬)를 포함한다. 다른 구현예에서, 알킬은 3 내지 5개의 탄소 원자 (즉, C_3-C_5 알킬)를 포함한다. 특정 구현예에서, 알킬기는 메틸, 에틸, 1-

프로필 (*n*-프로필), 1-메틸에틸 (*이*소-프로필), 1-부틸 (*n*-부틸), 1-메틸프로필 (*sec*-부틸), 2-메틸프로필 (*이*소-부틸), 1,1-디메틸에틸 (*tert*-부틸), 1-펜틸 (*n*-펜틸)로부터 선택된다. 알킬은 단일 결합에 의해 분자의 남은 부분에 부착된다. 본 명세서에서 특별히 언급하지 않는 한, 알킬기는 하나 이상의 본 발명에 기재된 치환기들과 같은 치환기로 선택적으로 치환된다.

[0084] 용어 "알콕시"는 화학식 -O-알킬의 산소 원자를 통한 라디칼을 결합을 말하며, 여기에서 알킬은 상기에서 정의된 바와 같은 알킬 사슬이다

[0085] 용어 "아미노"는 -NR'R" 기를 말하며, 상기에서 R' 및 R"는 수소; 및 하나 이상의 하이드록시, 시아노, 할로, 아미노, C_1-C_4-알킬, C_1-C_4-알콕시, C_1-C_4-하이드록시알킬, C_1-C_4-할로알킬, 및 나이트로와 같은 치환기로 선택적으로 치환될 수 있는 임의의 알킬, 하이드록실, 아릴, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 및 헤테로아릴로부터 독립적으로 선택된다.

[0086] 알킬과 같은 화학 모이어티와 함께 사용될 때 용어 "C_{x-y}"는 사슬에 x 내지 y개의 탄소를 포함하는 기를 포함하는 것으로 여겨진다. 예를 들어, 용어 "C_{x-y}알킬"은 트리플루오로메틸 및 2,2,2-트리플루오로에틸, 등과 같은 할로알킬기를 포함하는, 사슬에 x 내지 y개의 탄소를 포함하는 직-쇄 알킬 및 분지-쇄 알킬기를 포함하는, 치환된 또는 비치환된 포화 탄화수소기를 말한다.

[0087] 용어 "할로알킬"은 예를 들어, 트리플루오로메틸, 디플루오로메틸, 플루오로메틸, 2,2,2-트리플루오로에틸, 1-클로로메틸-2-플루오로에틸, 등과 같은 하나 이상의 할로 라디칼로 치환된 알킬기를 말한다. 일부 구현예에서, 할로알킬의 알킬 부분은 본 발명에 기재된 바와 같이 선택적으로 추가로 치환된다.

[0088] 용어 "하이드록시알킬"은 예를 들어, 하이드록시메틸, 하이드록시에틸, 디하이드록시메틸, 등과 같이 하나 이상의 하이드록시 라디칼로 치환된 알킬기를 말한다. 일부 구현예에서, 하이드록시알킬의 알킬 부분은 본 발명에 기재된 바와 같이 선택적으로 추가로 치환된다.

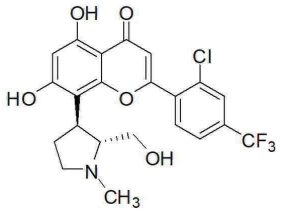
[0089] 화학식 I 또는 Ia의 화합물 또는 염에 대한 특정 구현예에서, R_2 및 R_3는 하이드록시 및 OR_8으로부터 각각 독립적으로 선택되며, 상기 R_8은 하이드록시, 시아노, 할로, 아미노, =O, =S, C_1-C_4-알콕시, 및 나이트로로부터 독립적으로 선택되는 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된 C_1-C_{10}-알킬이다._특정 구현예에서, R_2 및 R_3는 각각 독립적으로 하이드록시이다.

[0090] 화학식 I 또는 Ia의 화합물 또는 염에 대한 특정 구현예에서, R_4는 선택적으로 치환된 C_1-C_4-알킬이며, 상기 R_4는 하이드록시, 시아노, 할로, 아미노, =O, =S, C1-C4-알콕시, 및 나이트로로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 선택적으로 치환된다. 특정 구현예에서, R_4는 선택적으로 치환된 C_1-C_2-알킬이다. 특정 구현예에서, R_4는 예를 들어, 2-하이드록시메틸과 같은 하이드록시알킬이다.

[0091] 화학식 I 또는 Ia의 화합물 또는 염에 대한 특정 구현예에서, R_9는 하이드록시, 시아노, 할로, 아미노, =O, =S, C1-C4-알콕시, 및 나이트로로 선택적으로 치환된 C1-C4-알킬이다. 특정 구현예에서, R_9은 선택적으로 치환된 C_1-C_2-알킬이다. 특정 구현예에서, R_9은 메틸이다. 특정 구현예에서, R_9은 수소이다.

[0092] 화학식 I 또는 Ia의 화합물 또는 염에 대한 특정 구현예에서, 화학식 I의 화합물은: (+)-트랜스-2-(2-클로로-4-트리플루오로메틸페닐)-8-(2-하이드록시메틸-1-메틸-피롤리딘-3-일)-5,7-디메톡시-크로멘-4-온; (+)-트랜스-2-(2-클로로-4-트리플루오로메틸페닐)-5,7-디하이드록시-8-(2-하이드록시메틸-1-메틸피롤리딘-3-일)-크로멘-4-온; 및 (+)-트랜스-2-(2-클로로-4-트리플루오로메틸페닐)-5,7-디하이드록시-8-(2-하이드록시메틸-1-메틸-피롤리딘-3-일)-크로멘-4-온 하이드로클로라이드로부터 선택된 화합물 또는 제약학적으로 허용가능한 염이다.

[0093] 특정 구현예에서, 화학식 I 또는 Ia의 화합물은 하기 화학식 Ib로 표시되고:



[0094] Ib,

[0095] 또는 제약학적으로 허용 가능한 이의 염이다. 특정 구현예에서, 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물은 하이드로클로라이드 염과 같이, 산 부가 염의 형태이다.

[0096] 용어 "치환된"은 구조의 하나 이상의 탄소 또는 헤테로 원자 상의 수소를 대체한 치환기를 가진 모이어티를 말한다. "치환" 또는 "-로 치환된"이 재배열, 고리화, 제거 등과 같은 변형을 쉽게 겪지 않는 안정한 화합물을 나타내는 것 뿐만 아니라 그런 치환이 치환된 원자 및 치환기의 허용된 원자가를 따른다는 것을 암시하는 단서를 포함하는 것이 이해될 것이다. 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "치환된"은 유기 화합물의 허용되는 모든 치환기를 포함하는 것으로 고려된다. 광범위한 측면에서, 허용되는 치환기는 유기 화합물의 비고리 및 고리, 분지 및 비분지, 탄소 고리 및 헤테로 고리, 방향성 및 비-방향성 치환기를 포함한다. 허용되는 치환기는 적절한 유기 화합물과 하나 이상 및 동일하거나 다를 수 있다. 본 개시 내용의 목적을 위해, 질소와 같은 헤테로 원자는 헤테로 원자의 원자가를 만족시키는 본 발명에 기재된 유기 화합물의 수소 치환기 및/또는 임의의 허용되는 치환기를 가질 수 있다.

[0097] 치환기는 본 발명에 기재된, 예를 들어, 할로겐, 하이드록시, 카보닐 (카복실, 알콕시카보닐, 포르밀, 또는 아실과 같은), 티오카보닐 (티오에스터, 티오아세테이트, 또는 티오포메이트와 같은), 알콕실, 포스포릴, 포스페이트, 포스포네이트, 포스피네이트, 아미노, 아미도, 아미딘, 이민, 시아노, 나이트로, 아지도, 설피드릴, 알킬티오, 설페이트, 설포네이트, 설파모일, 설폰아미도, 설포닐, 헤테로사이클릴, 아랄킬, 카보사이클, 헤테로사이클, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 방향성 및 헤테로방향성 모이어티와 같은 임의의 치환기를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 치환기는 본 발명에 기재된, 예를 들어: 할로겐, 하이드록시, 옥소 (=O), 티옥소 (=S), 시아노 (-CN), 나이트로 ($-NO_2$), 이미노 (=N-H), 옥시모 (=N-OH), 하이드라지노 ($=N-NH_2$), $-R^b-OR^a$, $-R^b-OC(O)-R^a$, $-R^b-OC(O)-OR^a$, $-R^b-OC(O)-N(R^a)_2$, $-R^b-N(R^a)_2$, $-R^b-C(O)R^a$, $-R^b-C(O)OR^a$, $-R^b-C(O)N(R^a)_2$, $-R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)_2$, $-R^b-N(R^a)C(O)OR^a$, $-R^b-N(R^a)C(O)R^a$, $-R^b-N(R^a)S(O)_tR^a$ (여기에서 t는 1 또는 2), $-R^b-S(O)_tR^a$ (여기에서 t는 1 또는 2), $-R^b-S(O)_tOR^a$ (여기에서 t는 1 또는 2), 및 $-R^b-S(O)_tN(R^a)_2$ (여기에서 t는 1 또는 2); 및 알킬, 알케닐, 알키닐, 할로겐, 하이드록시, 할로알킬, 할로알케닐, 할로알키닐, 옥소 (=O), 티옥소 (=S), 시아노 (-CN), 나이트로 ($-NO_2$), 이미노 (=N-H), 옥시모 (=N-OH), 하이드라진 ($=N-NH_2$), $-R^b-OR^a$, $-R^b-OC(O)-R^a$, $-R^b-OC(O)-OR^a$, $-R^b-OC(O)-N(R^a)_2$, $-R^b-N(R^a)_2$, $-R^b-C(O)R^a$, $-R^b-C(O)OR^a$, $-R^b-C(O)N(R^a)_2$, $-R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)_2$, $-R^b-N(R^a)C(O)OR^a$, $-R^b-N(R^a)C(O)R^a$, $-R^b-N(R^a)S(O)_tR^a$ (여기에서 t는 1 또는 2), $-R^b-S(O)_tR^a$ (여기에서 t는 1 또는 2), $-R^b-S(O)_tOR^a$ (여기에서 t는 1 또는 2) 및 $-R^b-S(O)_tN(R^a)_2$ (여기에서 t는 1 또는 2)로 선택적으로 치환될 수 있는 임의의 알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 아랄킬, 아랄케닐, 아랄키닐, 사이클로알킬, 사이클로알킬알킬, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬알킬, 헤테로아릴, 및 헤테로아릴알킬과 같은 치환기를 포함할 수 있으며; 상기에서 각 R^a 는 독립적으로 수소, 알킬, 사이클로알킬, 사이클로알킬알킬, 아릴, 아랄킬, 헤테로사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬알킬, 헤테로아릴, 또는 헤테로아릴알킬로부터 선택되고, 상기에서, 허용 원자가, 각 R^a는 알킬, 알케닐, 알키닐, 할로겐, 할로알킬, 할로알케닐, 할로알키닐, 옥소 (=O), 티옥소 (=S), 시아노 (-CN), 나이트로 ($-NO_2$), 이미노 (=N-H), 옥시모 (=N-OH), 하이드라진 ($=N-NH_2$), $-R^b-OR^a$, $-R^b-OC(O)-R^a$, $-R^b-OC(O)-OR^a$, $-R^b-OC(O)-N(R^a)_2$, $-R^b-N(R^a)_2$, $-R^b-C(O)R^a$, $-R^b-C(O)OR^a$, $-R^b-C(O)N(R^a)_2$, $-R^b-O-R^c-C(O)N(R^a)_2$, $-R^b-N(R^a)C(O)OR^a$, $-R^b-N(R^a)C(O)R^a$, $-R^b-N(R^a)S(O)_tR^a$ (여기에서 t는 1 또는 2), $-R^b-S(O)_tR^a$ (여기에서 t는 1 또는 2), $-R^b-S(O)_tOR^a$ (여기에서 t는 1 또는 2) 및 $-R^b-S(O)_tN(R^a)_2$ (여기에서 t는 1 또는 2)로 선택적으로 치환될 수 있으며; 및 상기에서 각 R^b는 직접 결합 또는 또는 직쇄 또는 분지된 알킬렌, 알케닐렌, 또는 알키닐렌사슬로부터 독립적으로 선택되고, 각 R^c는 직쇄 또는 분지된 알킬렌, 알케닐렌 또는 알키닐렌사슬이다.

[0098] 화학식 I, Ia, 및 Ib의 화합물 또는 제약학적으로 허용 가능한 이의 염 제조 방법은 PCT 특허 공보 번호 WO2004004632 (미국 특허 7,271,193에 상응하는) 및 PCT 특허 공보 번호 WO2007148158에서 찾을 수 있다.

[0099] 본 개시 내용은 본 발명에 기재된 임의의 화합물의 제약학적으로-허용가능한 염, 예를 들어, 화학식 I, Ia, Ib

의 화합물, BCL-2 억제제 및 프로테아좀 억제제를 제공한다. 제약학적으로-허용가능한 염 은, 예를 들어, 산-부가 염 및 염기-부가 염을 포함한다. 산-부가 염을 형성하기 위해 화합물에 부가되는 산은 유기산 또는 무기산일 수 있다. 염기-부가 염을 형성하기 위해 화합물에 부가되는 염기는 유기 염기 또는 무기 염기일 수 있다. 일부 경우에, 제약학적으로-허용가능한 염은 금속염이다. 일부 경우에, 제약학적으로 허용가능한 염은 암모늄 염이다.

[0100] 산 부가 염은 본 발명에 기재된 화합물에 산을 첨가함으로써 만들 수 있다. 일부 경우에, 산은 유기산이다. 일부 경우에, 산은 무기산이다. 적합한 산의 비-제한적인 예는 염산(hydrochloric acid), 브롬화 수소산(hydrobromic acid), 요오드화 수소산(hydroiodic acid), 질산(nitric acid), 아질산(nitrous acid), 황산(sulfuric acid), 아황산(sulfurous acid), 인산(phosphoric acid), 니코틴산(nicotinic acid), 이소니코틴산(isonicotinic acid), 젖산(lactic acid), 살리실산(salicylic acid), 4-아미노살리실산(4-aminosalicylic acid), 타르타르산(tartaric acid), 아스코르브산(ascorbic acid), 겐티시닉산(gentisinic acid), 글루콘산(gluconic acid), 글루카론산(glucaronic acid), 사카린산(saccaric acid), 포름산(formic acid), 벤조산(benzoic acid), 글루탐산(glutamic acid), 판토텐산(pantothenic acid), 아세트산(acetic acid), 피로피온산(propionic acid), 부티르산(butyric acid), 푸마르산(fumaric acid), 숙신산(succinic acid), 구연산(citric acid), 옥살산(oxalic acid), 말레산(maleic acid), 하이드록시말레산, 메틸말레산, 글리콜산(glycolic acid), 말산(malic acid), 신남산(cinnamic acid), 만델산(mandelic acid), 2-페녹시벤조산(2-phenoxybenzoic acid), 2-아세톡시벤조산(2-acetoxybenzoic acid), 엠본산(embonic acid), 페닐아세트산(phenylacetic acid), N-사이클로헥실설폰 산(N-cyclohexylsulfamic acid), 메탄설폰산(methanesulfonic acid), 에탄설폰산(ethanesulfonic acid), 벤젠설폰산(benzenesulfonic acid), p-톨루엔설폰산(p-toluenesulfonic acid), 2-하이드록시에탄설폰산(2-hydroxyethanesulfonic acid), 에탄-1,2-디설폰산(ethane-1,2-disulfonic acid), 4-메틸벤젠설폰산(4-methylbenzenesulfonic acid), 나프탈렌-2 설폰산(naphthalene-2-sulfonic acid), 나프탈렌-1,5-디설폰산(naphthalene-1,5-disulfonic acid), 2-포스포글리세린산(2-phosphoglyceric acid), 3-포스포글리세린산, 글루코스-6-인산(glucose-6-phosphoric acid), 및 아미노산을 포함한다.

[0101] 금속염은 본 발명의 화합물에 무기산을 첨가함으로써 만들 수 있다. 무기염기는 예를 들어, 수산화물(hydroxide), 카보네이트(carbonate), 비카보네이트(bicarbonate), 또는 포스페이트와 같은 염기성 반대 이온(counterion)과 쌍을 이루는 금속 양이온으로 이루어진다. 금속은 알카리 금속, 알카리 토금속, 전이 금속, 또는 주족 금속(main group metal)일 수 있다. 일부 구현예에서, 금속은 리튬, 나트륨, 칼륨, 세슘, 세륨, 마그네슘, 망간, 철, 칼슘, 스트론튬, 코발트, 티타늄, 알루미늄, 구리, 카드뮴, 또는 아연이다.

[0102] 일부 구현예에서, 금속염은 리튬염, 나트륨염, 칼륨염, 세슘염, 세륨염, 스트론튬염, 코발트염, 티타늄염, 알루미늄염, 구리염, 카드뮴염, 또는 아연염이다.

[0103] 암모늄염은 본 발명에 기재된 화합물에 암모니아 또는 유 아민을 첨가함으로써 만들 수 있다. 적절한 유기 아민의 비-제한적인 예는 트리에틸 아민, 디이소프로필 아민, 에탄올 아민, 디에탄올 아민, 트리에탄올 아민, 모르폴린, N-메틸모르폴린, 피페리딘, N-메틸피페리딘, N-에틸피페리딘, 디벤질 아민, 피페라진, 피리딘, 피라졸, 피피라졸, 이미다졸, 피라진, 피피라진, 에틸렌디아민, N,N'-디벤질에틸렌 디아민, 프로카인, 클로로프로카인, 콜린, 디사이클로헥실 아민, 및 N-메틸글루카민를 포함한다.

[0104] 적합한 암모늄 염의 비-제한적인 예는 트리에틸 아민 염, 디이소프로필 아민 염, 에탄올 아민 염, 디에탄올 아민 염, 트리에탄올 아민 염, 모르폴린 염, N-메틸모르폴린 염, 피페리딘 염, N-메틸피페리딘 염, N-에틸피페리딘 염, 디벤질 아민 염, 피페라진 염, 피리딘 염, 피라졸 염, 피피라졸 염, 이미다졸 염, 피라진 염, 피피라진 염, 에틸렌 디아민 염, N,N'-디벤질에틸렌 디아민 염, 프로카인 염, 클로로프로카인 염, 콜린 염, 디사이클로헥실 아민 염, 및 N-메틸글루카민 염을 포함한다.

[0105] 적합한 산 부가 염의 비-제한적인 예는 하이드로클로라이드 염, 브롬화 수소산염, 요오드화 수소산염, 질산염, 아질산염, 황산염, 아황산염, 인산염, 인산수소염, 인산 이수소염, 탄산염(carbonate salt), 중탄산염, 니코틴산염, 이소니코틴산염, 젖산염, 살리실산염, 4-아미노살리실산염, 타르타르산염, 아스코르브산염, 겐티시닉산염, 글루콘산염, 글루카론산염, 사카린산염, 포름산염, 벤조산염, 글루탐산염, 판토텐산염, 아세트산염, 피로피온산염, 부티르산염, 푸마르산염, 숙신산염, 구연산염, 옥살산염, 말레산염, 하이드록시말레산염, 메틸말레산염, 글리콜산염, 말산염, 신남산염, 만델산염, 2-페녹시벤조산염, 2-아세톡시벤조산염, 엠본산염, 페닐아세트산염, N-사이클로헥실설폰산 염, 메탄설폰산염, 에탄설폰산염, 벤젠설폰산염, p-톨루엔설폰산염, 2-하이드록시에탄설폰산염, 에탄-1,2-디설폰산염, 4-메틸벤젠설폰산염, 나프탈렌-2-설폰산염, 나프탈렌-1,5-디설폰산

염, 2-포스포글리세린산염, 3-포스포글리세린산염, 글루코스-6-인산염, 및 아미노산염을 포함한다.

[0106] 본 발명에 기재된 화합물, 예를 들어, 화학식 I, Ia, Ib의 화합물 및 염, BCL-2 억제제 및 프로테아좀 억제제는 일부 경우에 부분입체이성질체(diastereomers), 거울상 이성질체(enantiomers), 또는 다른 입체 이성질체(stereoisomer) 형태로 존재할 수 있다. 본 발명에 제시된 화합물은 모든 부분입체이성질체, 거울상이성질체, 및 에피머 형태(epimeric form)와 이들의 적절한 혼합물을 포함한다. 입체 이성질체의 분리는 크로마토그래피에 의해 또는 부분입체이성질체 형성 및 재결정화에 의한 분리, 또는 크로마토그래피, 또는 이의 임의의 조합에 의해 수행될 수 있다. (본 개시 내용에 대해 참고문헌으로서 본 발명에 포함된, Jean Jacques, Andre Collet, Samuel H. Wilen, "Enantiomers, Racemates and Resolutions", John Wiley And Sons, Inc., 1981). 입체 이성질체는 또한 입체 선택적 합성에 의해 얻을 수 있다.

[0107] 본 발명에 기재된 화합물, 예를 들어, 화학식 I, Ia, Ib의 화합물 및 염, BCL-2 억제제 및 프로테아좀 억제제는 비정질 형태와 결정형 형태 (다형체로도 알려진)의 용도를 포함한다. 본 발명에 기재된 화합물은 제약학적으로 허용가능한 염의 형태일 수 있다. 또한, 동일한 종류의 활성을 가지는 이들 화합물의 활성 대사물이 본 개시 내용의 범위에 포함된다. 또한, 본 발명에 기재된 화합물은 비용매화된 형태뿐만 아니라 물, 에탄올 등과 같은 제약학적으로 허용가능한 용매로 용매화된 형태로도 존재할 수 있다. 본 발명에 제시된 화합물의 용매화된 형태는 또한 본 발명에 개시된 것으로 간주된다.

[0108] 본 발명에 기재된 화합물, 예를 들어, 화학식 I, Ia, Ib의 화합물 및 염, BCL-2 억제제 및 프로테아좀 억제제는 그들의 자연 동위원소 존재도(nature isotopic abundance)를 나타내는 화합물 및 하나 이상의 원자가 동일한 원자 번호를 가지는 특정 동위원소로 인위적으로 풍부하나, 원자 질량 또는 질량 번호는 자연에서 대부분 발견된 원자 질량 또는 질량 번호와 다른 화합물을 포함한다. 방사성 여부와 상관없이, 본 발명의 화합물의 모든 동위원소 변이는 본 발명의 범위 내에 포함된다. 예를 들어, 수소는 ^{1}H (프로튬(protium)), ^{2}H (듀테륨(deuterium)), 및 ^{3}H (트리튬(tritium))으로 표시되는 3가지의 자연 발생 동위원소를 가진다. 프로튬은 자연에서 가장 풍부한 수소의 동위원소이다. 듀테륨을 풍부하게 하는 것은 증가된 생체 내 반감기 및/또는 노출과 같은 특정 치료적 이점을 제공할 수 있고, 또는 생체 내 약물 제거 및 대사 경로를 조사하는데 유용한 화합물 제공할 수 있다. 동위원소적으로-풍부한 화합물이 제조될 수 있다.

[0109] 본 발명에 기재된 화합물, 예를 들어, 화학식 I, Ia, Ib의 화합물 및 염, BCL-2 억제제 및 프로테아좀 억제제는 화합물이 탄소-탄소 이중 결합 또는 탄소-질소 이중 결합을 가지는 것에 해당하는 경우, *Z*- 또는 *E*- 형태 (또는 *시스(cis)*- 또는 *트랜스(trans)*- 형태)로 존재할 수 있다. 또한, 일부 화학 물질들(chemical entities)은 다양한 토토머 형태로 존재할 수 있다. 별도로 특정하지 않는 한, 본 발명에 기재된 화학 물질들은 모든 *Z*-, *E*- 및 토토머 형태도 포함하는 것을 의미한다.

[0110] 특정 경우에, 본 발명에 기재된 화합물은 예를 들어, 모화합물에서 존재하는 카복실산이 에스터로 표시되는 것과 같은 프로드러그일 수 있다. 용어 "프로드러그"는 생리학적 조건 하에 제약 제제로 변환되는 본 개시 내용의 화합물, 즉 모화합물을 포함하는 것을 의미한다. 프로드러그를 제조하는 한 방법은 생리학적 조건 하에 가수분해되어 원하는 분자를 드러내는 하나 이상의 선택된 모이어티를 포함하는 것이다. 특정 구현예에서, 프로드러그는 숙주 동물에서 특정 표적 세포에서의 효소 활성과 같은 숙주 동물의 효소 활성에 의해 변환된다. 예를 들어, 에스터 또는 카보네이트 (예를 들어, 알코올 또는 카복실산의 에스터 또는 카보네이트)가 본 개시 내용의 바람직한 프로드러그이다.

[0111] 프로드러그는 일부 상황에서 그들이 모약물(parent drug)보다 투여하기가 더 쉽기 때문에 종종 유용하다. 예를 들어, 모약물은 아닌 반면 그들은 경구 투여에 의해 생물학적으로 이용 가능할 수 있다. 프로드러그는 모약물에 비해 화합물의 세포 투과성을 향상시키는데 도움이 될 수 있다. 예를 들어, 프로드러그는 모화합물보다 세포 투과성을 향상시킬 수 있다. 프로드러그는 또한 제약학적 제제에서 모약물보다 용해도를 향상시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 프로드러그의 설계는 제약제제(pharmaceutical agent)의 친유성(lipophilicity)을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 프로드럭의 설계는 효과적인 물 용해도를 증가시킨다.

[0112] 특정 구현예에서, 사이클린-의존성 카이네이즈 (CDK) 억제제, 예를 들어, 화학식 I, Ia 또는 Ib의 화합물 또는 염은 BCL-2 패밀리에 속하는 하나 이상의 단백질의 억제제와 조합되어 사용될 수 있다. BCL-2 항-세포자멸사 패밀리 단백질의 억제제는 적어도 세포 생존 경로를 바꾼다. 세포자멸사 활성화는 세포 표면 사멸 수용체(cell surface death receptors)의 활성화에 의해 촉발되는 외재적인 경로 또는 발달 신호(developmental cue) 및 다양한 세포 내 스트레스에 의해 촉발되는 내재적 경로를 통해 발생할 수 있다. 스트레스 경로 또는 미토콘드리아

경로로도 알려진 이 내재적 경로는 주로, BH1-BH4 도메인을 가지는 항-세포자멸사 (생존(pro-survival)) 단백질 (BCL-2, *즉,* BCL-2 항-세포자멸사 단백질 패밀리의 BCL-2 단백질 구성원), BCL-xL, BCL-w, A1, MCL-1, 및 BCL-B); BH1, BH2, 및 BH3 도메인을 가지는 전-세포자멸사(pro-apoptotic) 단백질 (BAX, BAK, 및 BOK); 및 전-세포자멸사 BH3-only 단백질 (BIK, BAD, BID, BIM, BMF, HRK, NOXA, 및 PUMA)로 이루어진 케스페이즈 활성화의 핵심 조절자 유형인, BCL-2 패밀리에 의해 조절된다 (*예를 들어,* Cory 외, *Nature Reviews Cancer* 2:647-56 (2002); Cory 외, *Cancer Cell* 8:5-6 (2005); Adams 외, *Oncogene* 26:1324-1337 (2007), *참조*). BCL-2 항-세포자멸사 단백질은 전-세포자멸사 멀티-도메인 단백질 BAX 및 BAK 의 활성화를 차단한다 (*예를 들어,* Adams 외, *Oncogene* 26:1324-37 (2007), *참조*).

[0113] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "BCL-2 억제제"는 항-세포자멸사 단백질의 BCL-2 패밀리에 속하는 하나 이상의 단백질, 예를 들어, BCL-2, BCL-xL, 및 BCL-w를 억제할 수 있는 약제를 말한다. 특정 구현예에서, 본 개시 내용의 BCL-2 억제제는 BCL-2 패밀리에 속하는 한 단백질을 선택적으로 억제하며, 예를 들어, BCL-2 억제제는 BCL-2를 선택적으로 억제할 수 있으나, BCL-xl 또는 BCL-w는 억제할 수 없다.

[0114] 억제제 본 발명에 기재된 BCL-2는 하나 이상의 BCL-2, BCL-xL, 및 BCL-w를 억제할 수 있다. 특정 구현예에서, BCL-2 항-세포자멸사 패밀리 단백질의 억제제는 BCL-2를 억제한다. 특정 구현예에서, BCL-2 항-세포자멸사 패밀리 단백질의 억제제는 BCL-2를 억제하고, 예를 들어, BCL-xL 또는 BCL-w를 억제하지 않는 것과 같이 BCL-2 패밀리 단백질의 다른 구성원은 억제하지 않는다._특정 구현예에서, BCL-2 억제제는 BH3-모방체이다.

[0115] 특정 구현예에서, 본 개시 내용의 BCL-2 억제제는 BCL-xL 기능을 억제한다. BCL-xL의 억제에 추가로, 예를 들어, BCL-xL/BCL-2 억제제와 같은, 억제제는 또한 BCL-2의 하나 이상의 기능과 상호작용 및/또는 기능을 억제할 수 있다. 특정 구현예에서, 본 개시 내용의 BCL-2 억제제는 BCL-xL 및 BCL-w를 각각 억제한다. 특정 구현예에서, 본 개시 내용의 BCL-2 억제제는 BCL-xL, BCL-2, 및 BCL-w를 억제한다.

[0116] 특정 구현예에서, BCL-2 억제제는 BCL-2 항-세포자멸사 단백질 패밀리 구성원과 BCL-2 항-세포자멸사 단백질 패밀리 구성원이 억제제의 부재하에 결합할 것인 하나 이상의 리간드 또는 수용체 사이의 상호작용을 방해한다. 다른 구현예에서, 하나 이상의 BCL-2 단백질 을 특이적으로 억제하는, 하나 이상의 BCL-2 항-세포자멸사 단백질 패밀리 구성원의 억제제는 하나 이상의 BCL-xL, BCL-2, BCL-w와만 결합하고, Mcl-1 및 BCL2A1과 같은 다른 Bcl-2 항-세포자멸사 Bcl-2 패밀리 구성원과는 결합하지 않는다.

[0117] BCL-2 억제제의 BCL-2 패밀리 단백질에 대한 결합 친화도가 측정될 수 있다. 예로서, BCL-xL 억제제의 결합 친화도가, 전술된 바와 같이 형광 BAK BH3 도메인 펩타이드가 증가하는 농도의 BCL-XL 억제제의 존재 또는 부재하에 BCL-xL 단백질 (또는 다른 BCL-2 패밀리 단백질)과 인큐베이션되는 경쟁적 형광 편광 분석법(competition fluorescence polarization assay)을 이용하여 결정될 수 있다 (*예를 들어,* 미국 특허 공보 20140005190; Park 외, *Cancer Res.* 73:5485-96 (2013); Wang 외, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 97:7124-9 (2000); Zhang 외, *Anal. Biochem.* 307:70-5 (2002); Bruncko 외, *J. Med. Chem.* 50:641-62 (2007), *참조*). 억제 백분율은 방정식: 1-[(웰의 mP 값 - 음성 대조군)/범위)] x 100%로 결정될 수 있다. 억제 상수 (K_i) 값은 Bruncko 외, *J. Med. Chem.* 50:641-62 (2007)에 기재된 바와 같이 공식: $K_i = [I]_{50}/([L]_{50}/K_d+[P]_0/K_d+1)$로 결정된다 (Wang, *FEBS Lett.* 360:111-114 (1995) 또한 참조).

[0118] BCL-2 억제제의 예는 ABT-263 (4-[4-[[2-(4-클로로페닐)-5,5-디메틸사이클로헥센-1-일]메틸]피페라진-1-일]-N-[4-[[(2R)-4-모르폴린-4-일-1-페닐설파닐부탄-2-일]아미노]-3-(트리플루오로메틸설포닐)페닐]설포닐벤즈아마이드 또는 IUPAC, (R)-4-(4-((4'-클로로-4,4-디메틸-3,4,5,6-테트라하이드로-[1,1'-비페닐]-2-일)메틸)피페라진-1-일)-N-((4-((4-모르폴리노-1-(페닐티오)부탄-2-일)아미노)-3-((트리플루오로메틸)설포닐)페닐)설포닐)벤즈아마이드) (*예를 들어,* Park 외, 2008, *J. Med. Chem.* 51:6902; Tse 외, *Cancer Res.*, 2008, 68:3421; 국제 출원 번호 WO 2009/155386; 미국 특허 번호 7390799, 7709467, 7906505, 8624027, *참조*) 및 ABT-737 (4-[4-[(4'-클로로[1,1'-비페닐]-2-일)메틸]-1-피페라지닐]-N-[[4-[[(1R)-3-(디메틸아미노)-1-[(페닐티오)메틸]프로필]아미노]-3-나이트로페닐]설포닐]벤즈아마이드, 벤즈아마이드, 4-[4-[(4'-클로로[1,1'-비페닐]-2-일)메틸]-1-피페라지닐]-N-[[4-[[(1R)-3-(디메틸아미노)-1-[(페닐티오)메틸]프로필]아미노]-3-나이트로페닐]설포닐]- 또는 4-[4-[[2-(4-클로로페닐)페닐]메틸]피페라진-1-일]-N-[4-[[(2R)-4-(디메틸아미노)-1-페닐설파닐부탄-2-일]아미노]-3-나이트로페닐]설포닐벤즈아마이드) (*예를 들어,* Oltersdorf 외, *Nature*, 2005, 435:677; 미국 특허 번호 7973161; 미국 특허 번호7642260, *참조*)를 포함한다.

[0119] 다른 구현예에서, BCL-2 억제제는 퀴나졸린 설폰아마이드(quinazoline sulfonamide) 화합물이다 (*예를 들어,*

Sleebs 외, 2011, *J. Med. Chem.* 54:1914, *참조*). 또 다른 구현예에서, BCL- 억제제는 Zhou 외, *J. Med. Chem.*, 2012, 55:4664 (*예를 들어,* 화합물 21 (R)-4-(4-클로로페닐)-3-(3-(4-(4-(4-((4-(디메틸아미노)-1-(페닐티오)부탄-2-일)아미노)-3-나이트로페닐설폰아미도)페닐)피페라진-1-일)페닐)-5-에틸-1-메틸-1H-피롤-2-카복실산, *참조*) 및 Zhou 외, *J. Med. Chem.*, 2012, 55:6149 (*예를 들어,* 화합물 14 (R)-5-(4-클로로페닐)-4-(3-(4-(4-(4-((4-(디메틸아미노)-1-(페닐티오)부탄-2-일)아미노)-3-나이트로페닐설폰아미도)페닐)피페라진-1-일)페닐)-1-에틸-2-메틸-1H-피롤-3-카복실산; 화합물 15 (R)-5-(4-클로로페닐)-4-(3-(4-(4-(4-((4-(디메틸아미노)-1-(페닐티오)부탄-2-일)아미노)-3-나이트로페닐설폰아미도)페닐)피페라진-1-일)페닐)-1-이소프로필-2-메틸-1H-피롤-3-카복실산, *참조*)에 기재된 바와 같이 소분자 화합물이다. 다른 구현예에서, BCL- 억제제는 BM-1074 (*예를 들어,* Aguilar 외, 2013, *J. Med. Chem.* 56:3048, *참조*); BM-957 (*예를 들어,* Chen 외, 2012, *J. Med. Chem.* 55:8502, *참조*); BM-1197 (*예를 들어,* Bai 외, *PLoS One* 2014 Jun 5;9(6):e99404. Doi: 10.1371/journal.pone. 009904, *참조*); 미국 특허 출원 번호 2014/0199234; N-아실설폰아마이드 화합물 (*예를 들어,* 국제 출원 번호 WO 2002/024636, 국제 출원 번호 WO 2005/049593, 국제 출원 번호 WO 2005/049594, 미국 특허 번호7767684, 미국 특허 번호7906505, *참조*)와 같은 BCL-2/BCL-xL 억제제이다. 또 다른 구현예에서, BCL-2 억제제는 소분자 거대 고리 화합물이다 (*예를 들어,* 국제 출원 번호 WO 2006/127364, 미국 특허 번호7777076, *참조*). 또 다른 구현예에서, BCL-2 억제제는 이속사졸리딘 화합물이다 (*예를 들어,* 국제 출원 번호 WO 2008/060569, 미국 특허 번호7851637, 미국 특허 번호7842815, *참조*). 또 다른 구현예에서, BCL-2 억제제는 S44563이다 (*예를 들어,* Loriot et. al., *Cell Death and Disease*, 2014, 5, e1423, *참조*). 일 구현예에서, BCL-2 억제제는 (R)-3-((4'-클로로-[1,1'-비페닐]-2-일)메틸)-N-((4-(((R)-4-(디메틸아미노)-1-(페닐티오)부탄-2-일)아미노)-3-나이트로페닐)설포닐)-2,3,4,4a,5,6-헥사하이드로-1H-피라지노[1,2-a]퀴놀린-8-카복사마이드이다. 또 다른 구현예에서, BCL-2 억제제는 소분자 헤테로고리(heterocyclic) 화합물이다 (*예를 들어* ,미국 특허 번호9018381, *참조*).

[0120] 특정 경우에, BCL-2 억제제는 화학식 I, Ia 또는 Ib의 화합물 또는 염과 조합되어 사용된다. 임의의 BCL-2 억제제가 사용될 수 있고 화학식 I, Ia 또는 Ib의 화합물 또는 염과 조합되었을 때 시너지 효과를 나타낼 수 있다. BCL-2 패밀리 억제제는 Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, BAK1, BAX, BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L2, BCL2L10, BCL2L13, BCL2L14, BOK 및 MCL1를 포함하는 BCL-2 패밀리의 하나 이상의 구성원을 억제할 수 있다. 특정 구현예에서, 화학식 I, Ia 또는 Ib의 화합물 또는 염은 임의의 나비토클락스, 베네토클락스, A-1155463, A-1331852, ABT-737, 오바토클락스, TW-37, A-1210477, AT101, HA14-1, BAM7, 사부토클락스, UMI-77, 감보그산, 마리토클락스, MIM1, 메틸프리드니솔론, iMAC2, Bax 억제제 펩타이드 V5, Bax 억제제 펩타이드 P5, Bax 채널 차단제, 및 ARRY 520 트리플루오로아세테이트와 조합되어 사용된다. 일부 실시예에서, 보루시클립은 나비토클락스와 조합되어 사용된다. 특정 구현예에서, 보루시클립은 베네토클락스와 조합되어 사용된다.

[0121] 일부 구현예에서, BCL-2 억제제는 혈액암의 치료를 위해, 본 개시 내용의 CDK 억제제, 예를 들어, 화합물 of 화학식 I, Ia 또는 Ib와 조합되어 사용된다. 특정 구현예에서, 혈액암은 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 림프구 백혈병 (ALL), 및 만성 림프구 백혈병 (CLL)과 같은 백혈병이다. 특정 구현예에서, 혈액암은 B-세포 또는 T-세포 림프종과 같은 비-호지킨 림프종이다. B-세포 림프종은 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL), 원발성 종격동 B-세포 림프종, 종격동 거대 B-세포 림프종, 소포성 림프종, 소 림프구 림프종 (SLL), 외투 세포 림프종, 변연부 B-세포 림프종, 결절외 변연부 B-세포 림프종, 림프절 변연부 B-세포 림프종, 비장가장자리 변연부 B-세포 림프종, 버킷 림프종, 림프형질세포성 림프종, 및 원발성 중추신경계 림프종을 포함한다. T-세포 림프종은 전구체 T-림프모구 림프종, 말초 T-세포 림프종, 피부T-세포 림프종, 서브타입 무증후성 만성(smoldering chronic), 급성(acute), 및 림프종을 가진 성인 T-세포 림프종, 혈관면역모구 T-세포 림프종, 결절외 자연살해/T-세포 림프종, 코 타입(nasal type), 서브타입 I 및 II을 가진 장질환-관련 (enteropathy-associated intestinal) T-세포 림프종 (EATL), 및 역형성 대세포 림프종 (ALCL)를 포함한다. 개시 내용의 조합, 예를 들어, 본 발명에 기재된 CDK 억제제 및 BCL-2 억제제의 조합이 본 발명에 기재된 혈액암을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0122] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다," "치료하는" 또는 "치료,"는 예를 들어, 예방적 및/또는 치료적으로 질병 또는 질환 발달의 저지, 질병 또는 질환의 완화, 질병 또는 질환의 회귀 초래, 질병 또는 질환에 의한 상태 완화, 또는 질병 또는 질환의 증상 정지하는, 질병 또는 질환 증상의 완화, 약화 또는 개선, 추가적인 증상의 예방, 증상의 근본 원인의 개선 또는 예방, 질병 또는 질환의 억제를 포함할 수 있다.

[0123] 본 개시 내용은 그것을 필요로 하는 대상에서 암의 재발을 예방하는, 또는 감소시키는 방법을 제공한다. 특정 구현예에서, 질병 또는 장애와 관련하여 용어 "예방하다" 또는 "예방하는"은 통계 샘플에서, 처리되지 않은 대

조군 샘플에 비해 처리된 샘플에서 장애 또는 질환의 발생을 감소시키거나, 처리되지 않은 대조군 샘플에 비해 장애 또는 질환의 하나 이상의 증상의 개시를 지연시키거나 심각성을 감소시키는 화합물 또는 조합을 지칭할 수 있다. 방법은 예를 들어, 또 다른 암 치료의 중지 후 연장된 또는 확대된 요법으로서, 미세잔존질환(minimal residual disease)을 치료하기 위해 본 발명에 기재된 조합 요법 및/또는 유지 요법(maintenance therapy)을 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 조합 요법은 화학요법, 방사선 치료 및/또는 수술과 같은 또 다른 암 치료의 중지 후에 투여될 수 있다.

[0124] 특정 측면에서, 프로테아좀 억제제는 본 개시 내용의 CDK 억제제, 예를 들어, 화학식 I, Ia, 또는 Ib 중 임의의 하나의 화합물 또는 염과 결합되거나 조합되어 사용될 수 있다. 진핵세포에서, 유비퀴틴 (Ub)-프로테아좀 경로(UPS)는 Ub 변형 및 그 이후의 단백질 기질의 분해를 수반한다. UPS는 전사인자, 세포 주기 조절 단백질 및 다양한 세포 과정에 참여하는 인자를 포함하는 많은 세포 조절 단백질의 수준을 조절한다. UPS 경로의 일반적인 특징은 고도로 보존된 Ub가 표적 단백질에 일련의 효소, 즉, E1 Ub-활성화 효소, E2 Ub-결합 효소 및 E3 Ub 라이게이즈를 통해 공유결합적으로 부착되는 것이다. 우선 E1이 Ub를 활성화하고 이를 E2로 전달한다. E2 효소로부터, Ub가 표적 단백질에 직접적으로 또는 E3 Ub 라이게이즈를 통해 간접적으로 전달된다. 폴리유비퀴틴화된 단백질은 다중 단백질 분해 활성을 가진 큰 복합체, 26S 프로테아좀에 의해 인식되고 분해된다.

[0125] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "프로테아좀 억제제"는 프로테아좀의 작용을 차단하는 약제를 말한다. 프로테아좀 억제는 전-세포자멸사 경로의 억제에 의존하는 종양 세포에서 프로그램된 세포 사멸의 활성화를 허용하는, p53 단백질과 같은 전-세포자멸사 인자의 분해를 방지할 수 있다.

[0126] 임의의 프로테아좀 억제제가 사용될 수 있으며 CDK 억제제, 예를 들어, 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물 또는 염과 조합하여 사용될 때 시너지 효과를 나타낼 수 있다. 프로테아좀 억제제의 비-제한적인 예는 보르테조밉, 마리조밉, 익사조밉, 디설피람, 에피갈로카테킨-3-갈레이트, 살리노스포라마이드 A, 카필조밉, ONX 0912, CEP-18770, MLN9708, 에폭소미신, 및 MG132를 포함할 수 있다.

[0127] 일부 구현예에서, 프로테아좀 억제제는 미만성 거대 B-세포 림프종 또는 삼중 음성 유방암과 같은 혈액암의 치료를 위해 본 개시 내용의 CDK 억제제, 예를 들어, 화학식 I, Ia 또는 Ib의 화합물와 조합하여 사용된다.

[0128] 일부 측면에서, 본 발명에 기재된 조합, 예를 들어, BCL-2 억제제 또는 프로테아좀 억제제와 CDK 억제제의 조합은 암 치료를 위해 활용될 수 있다. 본 발명에 기재된 조합 요법은 그것을 필요로 하는 대상에서 전이 가능성을 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 전이(metastasis)는 고형 종양이다. 일부 구현예에서, 전이는 액상 종양이다. 액상 종양인 암은 예를 들어, 혈액, 골수, 및 림프절에서 발생하는 암일 수 있으며, 예를 들어, 백혈병, 골수성 백혈병, 림프구 백혈병, 림프종, 호지킨 림프종, 흑색종, 및 다발성 골수종을 포함할 수 있다. 백혈병은, 예를 들어, 급성 림프모구 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 림프구 백혈병 (CLL), 만성 골수성 백혈병 (CML), 및 털세포백혈병을 포함한다. 고형 종양인 암은, 예를 들어, 전립선암, 고환암, 유방암, 뇌종양, 췌장암, 결장암, 갑상샘암, 위암, 폐암, 난소암, 카포시 육종, 피부암, 편평 세포 피부암, 신장암(renal cancer), 두경부암, 후두암, 코, 입 목구멍의 습한 점막 내피에 형성된 편평 상피암, 방광암, 골육종, 자궁경부암, 자궁내막암, 식도암, 간암, 및 신장암(kidney cancer)을 포함한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 기재된 방법에 의해 치료되는 질환은 흑색종 세포, 전립선암 세포, 고환암 세포, 유방암 세포, 뇌종양 세포, 췌장암 세포, 직장암 세포, 갑상샘암 세포, 위암 세포, 폐암 세포, 난소암 세포, 카포시 육종 세포, 피부암 세포, 신장암 세포, 두경부암 세포, 후두암 세포, 편평 상피암 세포, 방광암 세포, 골육종 세포, 자궁경부암 세포, 자궁내막암 세포, 식도암 세포, 간암 세포, 또는 신장암 세포의 전이이다.

[0129] 본 발명에 기재된 방법은 또한 전이성 암 종양의 진행을 억제하는데 사용될 수 있다. 암의 비-제한적인 예는 부신피질 암종, 소아 부신피질 암종, AIDS-관련 암, 항문암, 맹장암, 기저 세포 암종, 소아 기저 세포 암종, 방광암, 소아 방광암, 골암, 뇌종양, 소아 성상세포종, 소아 뇌간신경교종, 소아 중추신경계 비정형 유기형/간상 종양, 소아 중추신경계 배아성 종양, 소아 중추신경계 생식세포 종양, 소아 두개인두 뇌종양, 소아 뇌실막뇌종양, 유방암, 소아 기관지 종양, 유암종, 소아 유암종, 위 유암종, 원발부위 불명 암종, 원발부위 불명 소아 암종, 소아 심장 종양, 자궁경부암, 소아 자궁경부암, 소아 척색종, 만성 척수증식성 장애, 결장암, 대장암, 소아 대장암, 간외 담관암, 유관상피내암 (DCIS), 자궁내막암, 식도암, 소아 식도암, 소아 감각신경모세포종, 안암, 골의 악성 섬유성 조직구종, 담낭암, 위장(위) 암, 소아 위장암, 위장관기질종양 (GIST), 소아 위장관기질종양 (GIST), 소아 두개강외생식세포 종양, 성선외생식세포종양, 임신성융모종양, 신경교종, 두경부암, 소아 두경부암, 간암, 하인두암, 신장암, 신세포암, 빌름스 종양, 소아 신장종양, 랑게르한스 세포 조직 구증, 후두암, 소아 후두암, 백혈병, 급성 림프모구 백혈병 (ALL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 림프구 백혈병 (CLL), 만

성 골수성 백혈병 (cml), 털세포백혈병, 구순암, 간암 (원발성), 소아 간암 (원발성), 소엽성 상피내암 (LCIS), 폐암, 비-소세포 폐암, 소세포 폐암, 림프종, AIDS-관련 림프종, 버킷 림프종, 피부 t-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 원발성 중추신경계 림프종 (CNS), 흑색종, 소아 흑색종, 안구 내 흑색종, 메켈 세포암종, 악성중피종, 소아 악성중피종, 잠복 원발을 가진 전이성 편평 경부암, NUT 유전자가 관여된 중간선 관 암종, 구강암(mouth cancer), 소아 다발내분비샘종양, 균상식육종, 골수형성이상증후군, 골수형성이상종양, 골수증식종양, 다발성골수종, 비강암, 비인두암, 소아 비인두암, 신경모세포종, 구강암(oral cancer), 소아 구강암, 구강인두암, 난소암, 소아 난소암, 상피성 난소암, 저 악성 종양 난소암, 췌장암, 소아 췌장암, 췌장 신경내분비종양 (섬세포 종양) , 소아 유두종증 , 부신경절종, 부비동암, 부갑상샘암, 음경암, 인두암, 크롬친화세포종, 형질세포종양, 소아 흉막폐아세포종, 전립선암, 직장암, 신우이행 세포암, 망막모세포종, 침샘암, 소아 침샘암, 종양의 유잉 육종 패밀리, 카포시 육종, 골육종, 횡문근육종, 소아 횡문근육종, 연부조직 종양, 자궁육종, 세자리 증후군(Sezary syndrome), 소아 피부암, 비흑색종 피부암, 소장암, 편평상피 세포 암종, 소아 편평상피 세포 암종, 고환암, 소아 고환암, 식도암, 흉선종 및 흉선암, 소아 흉선종 및 흉선암, 갑상샘암, 소아 갑상샘암, 요관 이행세포암, 요도암, 자궁내막 자궁암, 질암, 외음부암, 및 발덴스트룀 거대글로불린혈증(Waldenstrëm macroglobulinemia)을 포함한다.

[0130] 본 발명에 기재된 조합 요법은 방사선 치료와 같은 다른 요법과 함께 사용될 수 있다. 화학 요법 및 방사선치료 치료 요법은 한정된 수의 약물-투여 요법(on-drug therapy) 후 약물-중단 요법(off-drug therapy)의 사이클을 포함하거나, 화학 요법 또는 방사선 치료가 시행되는 한정된 기간을 포함할 수 있다. 프로토콜은 치료될 대상과 함께 임상 시험, 약물 라벨, 및 임상 스태프에 의해 결정될 수 있다. 화학 요법 또는 방사선 치료의 사이클 수 또는 화학 요법 또는 방사선 치료 요법의 총 시간 길이는 암 치료에 대한 대상의 반응에 따라 다를 수 있다. 본 발명에 기재된 제약 제제는 화학 요법 또는 방사선 치료의 치료 요법이 완료된 후에 투여될 수 있다.

[0131] 일부 측면에서, 본 발명에 기재된 조합은 그것을 필요로 하는 대상을 치료하기 위해 활용될 수 있다. 일부 경우에, 본 발명에 기재된 방법 및 조성물로 치료될 대상은 인간 대상일 수 있다. 본 발명에 기재된 방법 및 조성물로 치료될 대상은 비-인간 동물일 수 있다. 비-인간의 비-제한적인 예는 비-인간 유인원, 가축 동물, 애완 동물, 및 실험 동물을 포함할 수 있다.

[0132] 특정 구현예에서, 본 발명에 기재된 조합 요법은 별개의 약제로 투여되거나 단일 제약학적 조성물로 조합될 수 있다. 예를 들어, CDK 억제제, 예를 들어, a 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물 또는 염, 및 BCL-2 억제제, 예를 들어, 베네토클락스 또는 나비토클락스는 두 개의 별개의 제약학적 조성물로 제제화되거나 두 개의 약제가 단일 제약학적 조성물로 공동-제제화될 수 있다.

[0133] 특정 구현예에서, CDK 억제제, 예를 들어, 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물 또는 염은 BCL-2 억제제 또는 프로테아좀 억제제와 공동-제제화된다. 일부 경우에, 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물은 나비토클락스, 베네토클락스, 보르테조밉, 마리조밉 또는 익사조밉 또는 이의 조합 중 임의의 하나와 공동-제제화된다.

[0134] 특정 구현예에서, 본 개시 내용은, 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물 또는 염을 포함하는, 예를 들어, 경구 또는 비경구 투여용, 제약학적 조성물을 제공한다. 일부 측면에서, 제약학적 조성물은 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물 또는 염을 적어도 약 1 mg 내지 약 1000 mg, 약 100 mg 내지 약 400 mg, 약 100 mg 내지 약 200 mg, 약 200 mg 내지 약 400 mg, 또는 약 250 mg 내지 약 350 mg의 양으로 포함한다. 일부 측면에서, 제약학적 조성물은 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물 또는 염을 적어도 약 1 mg 내지 약 1000 mg, 약 100 mg 내지 약 400 mg, 약 100 mg 내지 약 200 mg, 약 200 mg 내지 약 400 mg, 또는 약 250 mg 내지 약 350 mg의 양으로 포함한다. 예를 들어, 본 개시 내용의 제약학적 조성물은 약 100 mg, 약 120 mg, 약 140 mg, 약 160 mg, 약 180 mg, 약 200 mg, 약 220 mg, 약 240 mg, 약 260 mg, 약 280 mg, 약 300 mg, 약 320 mg, 약 340 mg, 약 360 mg, 약 380 mg, 약 400 mg, 약 420 mg, 약 440 mg, 약 460 mg, 약 480 mg, 또는 약 500 mg의 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물을 포함할 수 있다. 염의 형태로 제약학적 조성물로 제제화된 본 발명에 기재된 화합물, 예를 들어, 화학식 Ib의 화합물에 대해, 화합물의 양은 염 형태의 무게가 아닌 유리 염기 중량(free base weight)을 반영할 수 있다. 특정 구현예에서, 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물 또는 염의 제약학적 조성물은 추가적인 항암제, 예를 들어, a BCL-2 억제제 또는 프로테아좀 억제제를 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 제약학적 조성물은 추가적인 항암제, 예를 들어, BCL-2 억제제 또는 프로테아좀 억제제를 포함한다.

[0135] 본 개시 내용의 치료적으로 유효한 양의 화합물, 예를 들어, 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물 또는 염은 대상 체중의 kg 당 화합물의 mg(mg of the compound per kg of subject body mass)으로 표현될 수 있다. 일부 경우에, 치료적으로 유효한 양의 용량은 적어도 약 0.1 mg/kg 내지 약 20 mg/kg, 예를 들어, 약 0.1 mg/kg, 0.2

mg/kg, 0.3 mg/kg, 0.4 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.8 mg/kg, 0.9 mg/kg, 1 mg/kg, 약 2 mg/kg, 약 3 mg/kg, 약 4 mg/kg, 약 5 mg/kg, 약 6 mg/kg, 약 7 mg/kg, 약 8 mg/kg, 약 9 mg/kg, 약 10 mg/kg, 또는 약 20 mg/kg일 수 있다. 염의 형태로 제약학적 조성물로 제제화된 본 발명에 기재된 화합물, 예를 들어, 화학식 Ib의 화합물에 대해, 치료적으로 유효한 양의 화합물은 염 형태의 무게가 아닌 유리 염기 중량을 반영할 수 있다.

[0136] 특정 구현예에서, 본 개시 내용은, BCL-2 억제제, 예를 들어, 베네토클락스 또는 나비토클락스를 포함하는, 예를 들어, 경구 또는 비경구 투여용, 제약학적 조성물을 제공한다. 제약학적 조성물은 BCL-2 억제제를 적어도 약 1 mg 내지 약 1000 mg, 약 100 mg 내지 약 1000 mg, 약 100 mg 내지 약 800 mg, 약 200 mg 내지 약 800 mg, 또는 약 300 mg 내지 약 8000 mg의 양으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시 내용의 제약학적 조성물은 약 100 mg, 약 120 mg, 약 140 mg, 약 160 mg, 약 180 mg, 약 200 mg, 약 220 mg, 약 240 mg, 약 260 mg, 약 280 mg, 약 300 mg, 약 320 mg, 약 340 mg, 약 360 mg, 약 380 mg, 약 400 mg, 약 420 mg, 약 440 mg, 약 460 mg, 약 480 mg, 약 500 mg, 약 520 mg, 약 540 mg, 약 560 mg, 약 580 mg, 약 600 mg, 약 620 mg, 약 640 mg, 약 660 mg, 약 680 mg, 약 700 mg, 약 720 mg, 약 740 mg, 약 760 mg, 약 780 mg, 약 800 mg, 약 820 mg, 약 840 mg, 약 860 mg, 약 880 mg, 약 900 mg, 약 920 mg, 약 940 mg, 약 960 mg, 약 980 mg, 또는 약 1000 mg의 BCL-2 억제제, 예를 들어, 베네토클락스 또는 나비토클락스를 포함할 수 있다.

[0137] 특정 구현예에서, 본 개시 내용은, 프로테아좀 억제제, 예를 들어, 보르테조밉, 마리조밉, 또는 익사조밉을 포함하는, 예를 들어, 경구 또는 비경구 투여용, 제약학적 조성물을 제공한다. 제약학적 조성물은 프로테아좀 억제제를 적어도 약 0.5 mg 내지 약 50 mg, 약 1 mg 내지 약 30 mg, 약 1 mg 내지 약 20 mg, 약 1 mg 내지 약 10 mg, 또는 약 1 mg 내지 약 5 mg의 양으로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시 내용의 제약학적 조성물은 약 0.5 mg, 약 1 mg, 약 2 mg, 약 3 mg, 약 4 mg, 약 5 mg, 약 6 mg, 약 7 mg, 약 8 mg, 약 9 mg, 약 10 mg, 약 11 mg, 약 12 mg, 약 13 mg, 약 14 mg, 약 15 mg, 약 16 mg, 약 17 mg, 약 18 mg, 약 19 mg, 또는 약 20 mg의 프로테아좀 억제제, 예를 들어, 보르테조밉, 마리조밉, 또는 익사조밉을 포함할 수 있다.

[0138] 특정 구현예에서, 본 개시 내용의 제제는 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물 또는 염, BCL-2 억제제 또는 프로테아좀 억제제를 포함하며, 상기에서 화합물 또는 염은 불순물이 약 70% 내지 약 99.99%, 약 80% 내지 약 99.9%, 약 85% 내지 약 99%, 약 90% 내지 약 99%, 약 95% 내지 약 99%, 약 97% 내지 약 99%, 약 98% 내지 약 99%, 약 98% 내지 약 99.9%, 약 99% 내지 약 99.99%, 약 99.5% 내지 약 99.99%, 약 99.6% 내지 약 99.99%, 약 99.8 내지 약 99.99%, 또는 약 99.9% 내지 약 99.99% 없다.

[0139] 특정 구현예에서, 본 개시 내용의 제약학적 조성물은, 예를 들어, 100 내지 400 mg의 화학식 Ib의 화합물 또는 염 및 200 내지 800 mg의 BCL-2 억제제, 예를 들어, 베네토클락스를 포함하는 제약학적 조성물과 같이, 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물 또는 염 및 BCL-2 억제제 모두를 본 발명에 기재된 것과 같은 양으로 포함한다.

[0140] 특정 구현예에서, 본 개시 내용의 제약학적 조성물은, 예를 들어, 100 내지 400 mg의 화학식 Ib의 화합물 또는 염 및 1 내지 10 mg의 프로테아좀 억제제, 예를 들어, 익사조밉을 포함하는 제약학적 조성물과 같이, 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물 또는 염 및 프로테아좀 억제제 모두를 본 발명에 기재된 것과 같은 양으로 포함한다.

[0141] 본 발명에 기재된 제약학적 조성물은 액상 제제, 고형 제제 또는 이의 조합의 형태일 수 있다. 제제의 비-제한적인 예는 정제, 캡슐, 알약, 젤, 페이스트, 용액 및 크림을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 치료제, 예를 들어, 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물 또는 염, BCL-2 억제제 또는 프로테아좀 억제제는, 결정화된 형태일 수 있다. 둘 이상의 치료제를 포함하는 제약학적 조성물에서, 각 약제는 개별적으로 결정화되어 합해지거나 함께 결정화될 수 있다. 조성물은 하나 이상의 물리적 상태에서 둘 이상의 치료제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 한 치료제는 고형 제제로 및 또 다른 치료제 또는 약물은 젤 제제로 포함하는 정제일 수 있다. 특정 구현예에서, 조성물은 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물 또는 염을 제 1 물리적 상태로 포함하고 BCL-2 family 억제제 또는 프로테아좀 억제제를 제 2 물리적 상태로 포함하는 단일 제약학적 조성물이다.

[0142] 본 개시 내용의 조성물은 부형제 또는 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 부형제는 임의의 및 모든 용매, 코팅, 킬레이트제, 향료, 착색제, 윤활제, 붕해제, 방부제, 감미제, 소포제, 완충제, 중합체, 항산화제, 결합제, 희석제, 및 비히클 (또는 담체)를 포함할 수 있다. 일반적으로 부형제는 본 개시 내용의 치료용 조성물과 양립 가능하다.

[0143] 경구 투여를 위한 액상제(Liquid preparations)는 예를 들어, 용액, 시럽 또는 현탁액의 형태를 취할 수 있고, 또는 이들은 사용 전에 물 또는 다른 적합한 비히클로 재구성하기 위한 건조 산물로 제공될 수 있다. 이런 액상

제는 현탁제 (예를 들어, 솔비톨 시럽, 메틸 셀룰로오스 또는 수소화 식용 지방); 유화제 (예를 들어, 레시틴 또는 아카시아); 비-수계 비히클 (예를 들어, 아몬드 오일, 유성 에스터 또는 에틸 알코올); 방부제 (예를 들어, 메틸 또는 프로필 p-하이드록시벤조에이트 또는 소르브산); 및 인공 또는 천연 착색제 및/또는 감미제와 같은 제약학적으로 허용가능한 첨가물로 통상적인 시도에 의해 제조될 수 있다.

[0144] 물이 일부 화합물의 분해를 촉진시킬 수 있기 때문에, 본 개시 내용은 추가로 유효 성분을 포함하는 무수 조성물 및 제형을 포함한다. 본 개시 내용의 무수 조성물 및 제형은 무수 또는 저 수분 함유 성분 및 저 수분 및 저 습도 조건을 이용하여 제조될 수 있다. 제조, 포장, 및/또는 저장 중 수분 및/또는 습도와의 상당한 접촉이 예상되는 경우, 락토오스를 함유하는 본 개시 내용의 조성물 및 제형은 무수물로 만들 수 있다. 무수 조성물은 무수 특성이 유지되도록 제조 및 보관될 수 있다. 따라서, 무수 조성물은 물에 노출되는 것을 방지하는 재료를 이용하여 포장될 수 있고 그래서 그들은 적합한 의약품집 키트(formulary kit)에 포함될 수 있다. 적합한 포장의 예는 밀봉된 호일, 플라스틱, 단위 용량 용기, 블리스터 팩, 및 스트립 팩을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0145] 본 발명에 기재된 성분은 통상적인 제약학적 조합 기술에 따라 제약학적 담체와 긴밀한 혼합물로 조합될 수 있다. 담체는 투여를 위한 원하는 제제 형태에 따라 매우 다양한 형태를 취할 수 있다. 경구 제형을 위한 조성물의 제조시, 경구 액상제 (현탁액, 용액, 및 엘릭서와 같은) 또는 에어로졸의 경우, 예를 들어, 물, 글리콜, 오일, 알코올, 향미제, 방부제, 착색제와 같은, 임의의 통상적인 제약학적 매질이 담체로서 사용될 수 있고; 또는 경구 고형제의 경우, 일부 구현예에서 락토오스를 사용하지 않고, 전분, 당, 미정질 셀룰로오스, 희석제, 과립화제, 윤활제, 결합제, 및 붕해제와 같은 담체가 사용될 수 있다. 예를 들어, 고체 경구제로 적합한 담체는 분말, 캡슐, 및 정제를 포함한다. 원하는 경우, 정제는 표준 수계 또는 비수계 기술로 코팅될 수 있다.

[0146] 제약학적으로 허용가능한 담체로 제공 가능한 재료의 일부 예는: (1) 락토오스, 글루코스 및 수크로스와 같은, 당; (2) 옥수수 전분, 감자 전분과 같은 전분; (3) 셀룰로오스, 및 소듐 카복시 메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스 및 셀룰로오스 아세테이트와 같은 이의 유도체; (4) 분말 트라가칸트; (5) 몰트; (6) 젤라틴; (7) 탈크; (8) 코코아버터 및 좌제 왁스와 같은 부형제; (9) 땅콩 오일, 면실유, 홍화유, 참기름, 올리브오일, 옥수수유 및 대두유와 같은 오일; (10) 프로필렌 글리콜과 같은 글리콜; (11) 글리세린, 솔비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리올; (12) 에틸 올레이트 및 에틸 라우레이트와 같은 에스터; (13) 아가; (14) 마그네슘 하이드록사이드 및 알루미늄 하이드록사이드와 같은 완충제; (15) 알긴산; (16) 발열성 물질 없는 물; (17) 등장성 식염수; (18) 링거 용액; (19) 에틸 알코올; (20) 포스페이트 버퍼 용액; 및 (21) 제약학적 제제에 사용된 다른 비-독성 양립 가능한 물질들을 포함한다.

[0147] 제형에 이용하기에 적합한 결합제는 옥수수 전분, 감자 전분, 또는 다른 전분들, 젤라틴, 아카시아와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 알지네이트, 알긴산, 다른 알지네이트들, 분말 트라가칸트, 구아검, 셀룰로오스 및 이의 유도체 (예를 들어, 에틸 셀룰로오스, 셀룰로오스 아세테이트, 카복시메틸 셀룰로오스 칼슘, 소듐 카복시메틸 셀룰로오스), 폴리바이닐 피롤리돈, 메틸 셀룰로오스, 호화 전분, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로오스, 미정질셀룰로오스, 및 이의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0148] 본 발명에 기재된 조성물 및 제형에 이용되는 적합한 충전제의 예는 탈크, 칼슘 카보네이트 (예를 들어, 과립 또는 분말), 미정질 셀룰로오스, 분말 셀룰로오스, 덱스트레이트, 카올린, 만니톨, 규산, 솔비톨, 전분, 호화 전분, 및 이의 혼합물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0149] 경구 투여를 위해 수성 현탁액 및/또는 엘릭서가 요구되는 경우, 그 안의 유효 성분은 다양한 감미료 또는 향미제, 착색제 또는 염료 및, 필요하다면, 유화제 및/또는 현탁제, 물, 에탄올, 프로필렌 글리콜, 글리세린과 같은 희석제와 함께 및 이의 다양한 조합과 조합될 수 있다.

[0150] 일 구현예에서, 조성물은 우수한 가용성 및/또는 본 개시 내용의 화합물의 용해를 보장하고 본 개시 내용의 화합물의 침전을 최소화하는 가용화제를 포함할 수 있다. 이는 특히 비-경구용 조성물, 예를 들어, 주사용 조성물에 중요할 수 있다. 또한 계면활성제와 같은 가용화제가 친수성 약물 및/또는 다른 성분의 용해도를 증가시키기 위해, 또는 안정한 또는 균질한 용액 또는 분산액으로 조성물을 유지하기 위해 추가될 수 있다.

[0151] 본 발명에 기재된 제약학적 조성물은 그것을 필요로 하는 대상에게 경구로 투여되기 적합할 수 있다. 일부 경우에, 경구 투여를 위한 서방형이 위장관에서 체액과 접촉하는 활성제의 제어된 방출을 달성하기 위해, 및 혈장에서 활성제를 실질적으로 일정하고 유효한 수준으로 제공하기 위해 제조될 수 있다. 결정형은 이 목적을 위해 생분해성 중합체, 물-용해성 중합체 또는 이 둘의 혼합물, 및 선택적으로 적합한 계면활성제의 중합체 기질로 포

매(embed)될 수 있다. 포매는 이러한 맥락에서 미세-입자의 중합체의 기질로의 혼입(incorporation)을 의미할 수 있다. 제어 방출 제제는 또한 공지된 분산 또는 유화 코팅 기술을 통해 분산된 미세-입자 또는 유화된 미세-액적의 캡슐화를 통해 달성된다.

[0152] 일부 구현예에서, 조성물은 식품 조성물로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 식품 담체와 관계 없이 음료 또는 다른 액체, 고체 식품, 반-고체 식품일 수 있다. 예를 들어, 조성물은 임의의 본 발명에 기재된 조성물로 보충된 홍차를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 식품 조성물로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 음료, 고체 식품, 반-고체 식품, 또는 식품 담체를 포함할 수 있다.

[0153] 특정 구현예에서, 제약학적 제제는 유성 또는 수성 비히클 중의 멸균 현탁액, 용액, 또는 유화액과 같이 비경구 주사에 적합한 형태일 수 있고, 현탁제, 안정화제, 및/또는 분산제와 같은 제제화제(formulation agent)를 함유할 수 있다. 비경구 투여를 위한 제약학적 제제는, 예를 들어, 수용성 형태의 활성 화합물의 수용액을 포함한다. 활성 화합물의 현탁액은, 예를 들어, 유성 주사 현탁액으로 제조될 수 있다. 적합한 친수성 용매 또는 비히클은 참기름과 같은 지방 오일, 또는 에틸올레이트, 이소프로필팔미테이트, 또는 중쇄 트리글리세리드와 같은 합성 지방산 에스터, 또는 리포좀을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 경구 투여를 위한 제제는 수용성 현탁액이다.

[0154] 본 발명에 기재된 화합물은 조성물에 농도 범위로 존재할 수 있으며, 범위는 임의의 상기 농도로부터 선택된 상한값 및 하한값으로 정의된다. 예를 들어, 본 개시 내용의 화합물 또는 염은 제제에 약 1 nM 내지 약 100 mM, 약 10 nM 내지 약 10 mM, 약 100 nM 내지 약 1 mM, about500 nM 내지 약 1 mM, 약 1 mM 내지 약 50 mM, 약 10 mM 내지 약 40 mM, 약 20 mM 내지 약 35 mM, 또는 약 20 mM 내지 약 30 mM의 농도로 존재할 수 있다.

[0155] 본 발명에 기재된 화합물을 포함하는 조성물의 제조 방법은 화합물을 하나 이상의 불활성의 제약학적으로-허용가능한 부형제와 함께 제제화하는 것을 포함할 수 있다. 액체 조성물은 예를 들어, 화합물이 분산된 용액, 화합물이 포함된 유화액, 또는 본 발명에 기재된 화합물을 포함하는 리포좀, 미셀, 또는 나노입자를 함유하는 용액을 포함한다. 이들 조성물은 또한 소량의 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 및 다른 제약학적으로-허용가능한 첨가물과 같은 비독성, 보조 물질을 함유할 수 있다.

[0156] 주사를 위한 제제는 예를 들어, 방부제가 첨가된 앰플 또는 다중-용량 용기와 같은 단위 투여 형태(unit dosage form)로 제공될 수 있다. 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 유화액과 같은 형태를 취할 수 있고, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제제화제를 함유할 수 있다. 조성물은 단위-용량 또는 다중-용량 용기, 예를 들어, 봉인된 앰플 및 바이알로 제공될 수 있으며, 사용 직전에 멸균된 액체 담체, 예를 들어, 식염수 또는 멸균된 발열성 물질 없는 물의 첨가만을 필요로 하는 분말 형태 또는 냉동-건조된 (동결 건조된) 상태로 저장될 수 있다. 즉석 주사 용액 및 현탁액은 상기 기재된 종류의 멸균된 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.

[0157] 비경구 투여를 위한 제약학적 제제는 항산화제, 완충제, 세균발육저지제 및 제제를 지정된 수용자의 혈액과 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 활성 화합물의 수용성 및 비-수용성 (유성) 멸균 주사 용액; 및 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있는 수용성 및 비-수용성 멸균 현탁액을 포함한다. 적합한 친수성 용매 또는 비히클은 참기름과 같은 지방 오일, 또는 에틸 올레이트 또는 트리글리세리드와 같은 합성 지방산 에스터, 또는 리포좀을 포함한다.

[0158] 본 발명에 기재된 조성물, 예를 들어, 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물 또는 염, 또는 BCL-2 억제제 또는 프로테아좀 억제제 또는 화학식 I, Ia, 또는 Ib의 화합물과 BCL-2 억제제 또는 프로테아좀 억제제와의 공동-제제의 제약학적 조성물은 매일 한 번 이상 투여될 수 있다. 조성물은 연속적으로(serially) 투여될 수 있다 (예를 들어, 치료 요법 기간 동안 휴식 없이 매일). 일부 경우에, 치료 요법은 1주 미만, 1주, 2주, 3주, 한 달, 또는 한 달 초과일 수 있다. 일부 경우에, 본 개시 내용의 조성물은 적어도 12주의 기간에 걸쳐 투여된다. 다른 경우에, 조성물은 하루, 적어도 2일 연속, 적어도 3일 연속, 적어도 4일 연속, 적어도 5일 연속, 적어도 6일 연속, 적어도 7일 연속, 적어도 8일 연속, 적어도 9일 연속, 적어도 10일 연속, 또는 10일 연속 초과 동안 투여된다. 일부 경우에, 치료적으로 유효한 양이 1 회/주, 2 회/주, 3 회/주, 4 회/주, 5 회/주, 6 회/주, 7 회/주, 8 회/주, 9 회/주, 10 회/주, 11 회/주, 12 회/주, 13 회/주, 14 회/주, 15 회/주, 16 회/주, 17 회/주, 18 회/주, 19 회/주, 20 회/주, 25 회/주, 30 회/주, 35 회/주, 40 회/주, 또는 40 회/주 초과 투여될 수 있다. 일부 경우에, 치료적으로 유효한 양이 1회/일, 2 회/일, 3 회/일, 4 회/일, 5 회/일, 6 회/일, 7 회/일, 8 회/일, 9 회/일, 10 회/일, 또는 10 회/일 초과 투여될 수 있다. 일부 경우에, 조성물은 하루에 두 번 이상 투여된다. 조성물은 적어도 매 시간마다, 적어도 매 2시간마다, 적어도 3시간마다, 적어도 4시간마다, 적어도 5시간마다, 적

어도 6시간마다, 적어도 7시간마다, 적어도 8시간마다, 적어도 9시간마다, 적어도 10시간마다, 적어도 11시간마다, 적어도 12시간마다, 적어도 13시간마다, 적어도1 4시간마다, 적어도 15시간마다, 적어도 16시간마다, 적어도 17시간마다, 적어도 18시간마다, 적어도 19시간마다, 적어도 20시간마다, 적어도 21시간마다, 적어도 22시간마다, 적어도 23시간마다, 또는 적어도 매일 투여된다.

[0159] 본 개시 내용의 제약학 조성은 급성 또는 만성적으로 투여될 수 있다. 본 발명의 제약학적 조성물은 단일 치료 또는 치료 코스로 투여될 수 있다. 치료는 1회/일, 2회/일, 3회/일, 아침에, 저녁에, 자기 전에, 또는 하루 종일 연속적으로 투여될 수 있다. 치료는 매일, 격일로, 3일에 한 번, 주에 두 번, 주에 한 번, 격주로, 매달, 6주마다, 격달로, 3달에 한 번, 6달에 한 번, 매년, 격년으로, 5년마다, 또는 필요에 따라 적용될 수 있다.

[0160] 특정 구현예에서, 투여될 약물의 용량은 특정 기간 동안 일시적으로 감소 또는 일시적으로 유예된다. 특정 구현예에서, 환자는 일정 기간 동안 환자가 약물을 투약받지 않거나 감소된 양의 약물을 투약받는 휴약기(drug holiday)를 가질 것이다. 휴약기는, 예를 들어, 2 일, 3 일, 4 일, 5 일, 6 일, 7 일, 10 일, 12 일, 15 일, 20 일, 28 일, 또는 28일 이상을 단지 예로서 포함하는, 2일 내지 1년일 수 있다. 휴약기는 약 1 달, 약 2 달, 약 3 달, 약 4 달, 약 5 달, 약 6 달, 약 7 달, 약 8 달, 약 9 달, 약 10 달, 약 11 달 또는 약 12 달 동안 일 수 있다. 휴약기 동안 용량 감소는, 예를 들어, 원래 투여된 용량의 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 및 100%를 단지 예로서 포함하는, 원래 투여된 용량의 10%-100% 일 수 있다. 용량 감소의 추가 예는 10% 내지 100%, 20% 내지 80%, 30% 내지 70%, 50% 내지 90%, 80% 내지 100% 또는 90% 내지 100%.일 수 있다.

[0161] 환자의 상태가 개선되면, 필요한 경우 유지량(maintenance dose)이 투여될 수 있다. 그 후, 투여량 또는 투여 빈도, 또는 이 둘 모두가 증상의 기능으로서 개선된 질병, 장애 또는 질환이 유지될 수 있는 수준으로 감소될 수 있다.

[0162] 본 발명에 기재된 제제를 투여하는 추가적인 방법은 예를 들어, 경구, 위 또는 십이지장 공급관, 직장 좌약, 직장 관장, 비경구 경로, 주사, 주입, 동맥내, 심내, 피내, 십이지장내, 골수내강내, 근육내, 골내, 복강내, 척추강 내, 혈관내, 정맥내, 유리체내, 전방내, 경막외, 피하, 흡입, 경피, 경점막, 설하, 구강, 국소, 표피, 피부, 점적(enemaear drops), 비강, 및 질내 투여를 포함한 장관 경로를 통한 전달을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명에 기재된 화합물은 치료가 필요한 지역에 예를 들어, 수술 중 국부 주입, 크림, 연고, 주사, 카테터, 또는 임플란트와 같은 국소 적용과 같이 국부적으로 투여될 수 있다. 또한 주사에 의해 질병 조직 또는 기관 위치에 직접 투여될 수 있다.

[0163] 투여 기간 및/또는 투여량(dosing amount)은 의사 또는 임의의 다른 유형의 임상의에 의해 결정될 수 있다. 의사 또는 임상의는 투여된 조성물에 대한 대상의 반응을 관찰할 수 있으며 대상의 수행에 기초하여 투약(dosing)을 조정할 수 있다. 예를 들어, 에너지 조절에서 감소된 효과를 나타내는 대상에 대한 투약은 원하는 결과를 얻기 위해 증가될 수 있다.

[0164] 일부 구현예에서, 본 발명에 기재된 조합 요법이 동시에 같은 경로로 함께 투여되거나, 별개로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물 중의 성분이 동일하거나 상이한 투여 경로를 이용하여 투여될 수 있다.

[0165] 일부 구현예에서, 본 개시 내용은 또한 본 발명에 기재된 조성물을 제조하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 발명에 기재된 조성물의 제조는 둘 이상의 성분을 혼합 또는 조합하는 것을 포함한다.

[0166] 일부 구현예에서, 조성물은 제약학적 활성제 또는 치료제, 담체, 및/또는 부형제와 조합되거나 혼합될 수 있다. 그런 성분의 예가 본 발명에 기재된다. 조합된 조성물은 정제, 캡슐, 젤 캡슐, 서방정, 등과 같은 단위 투약량(unit dosage)으로 형성될 수 있다.

[0167] 일부 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 성분이 조성물 전체에 고르게 분산되어 조성물이 정제, 알약 및 캡슐과 같은 균등한 유효한 단위 투여 형태로 쉽게 세분될 수 있도록, 하나 이상의 성분이 실질적으로 균질한 혼합물을 함유하는 고체 조성물이 얻어지도록 제조된다.

[0168] 단위 용량은 용기에 포장되어 사용자에게 전달될 수 있다. 단위 용량은 튜브, 단지, 박스, 바이알, 백, 트레이, 드럼, 병, 주사, 또는 캔에 포장될 수 있다.

[0169] 본 개시 내용의 또 다른 측면은 하나 이상의 대상에서 특정 기간 동안 본 발명에 기재된 조성물 조합의 투여 후 원하는 효과를 달성하는 것을 제공한다. 예를 들어, 본 발명에 기재된 조성물의 바람직한 효과는 대상에게 조성물의 투여 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 또는 52 주 후에 관찰될 수 있다.

[0170] 특정 구현예에서, 본 발명에 기재된 조합 요법은 조합 치료 요법(combination treatment regimen)으로 투여될 수 있다. 조합 치료 요법은 본 발명에 기재된 화합물, 또는 제약학적으로 허용 가능한 이의 염의 투여가 본 발명에 기재된 두 번째 약제로 치료하기 전에, 치료 중에, 또는 치료 후에 개시되고 두 번째 약제로 치료하는 동안 또는 두 번째 약제를 이용한 치료가 끝난 후 임의의 시간까지 지속되는 치료 요법을 포함할 수 있다. 본 개시 내용은 또한 조합되어 사용되는 본 발명에 기재된 화합물, 또는 제약학적으로 허용 가능한 이의 염, 및 두 번째 약제가 동시에 또는 상이한 시간에 및/또는 치료 기간 동안 감소 또는 증가하는 간격으로 투여되는 치료를 포함한다. 조합 치료는 환자의 임상 관리를 돕기 위해 여러번 시작 및 중지하는 주기적인 치료를 추가로 포함한다.

[0171] 특정 구현예에서, 조합 요법이 두 치료 방식과 관련된 차등 독성 관점에서 치료적 이점을 제공할 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 기재된 것들과 같은 CDK 억제제로 치료하는 것은 항암제, 예를 들어, BCL-2 억제제 또는 프로테아좀 억제제로 나타내지 않은 특정 독성을 유발할 수 있으며, 그 반대도 마찬가지다. 이와 같이, 이러한 차등 독성은 상기 독성이 없거나 최소한인 용량으로 투여될 각각의 치료를 허용할 수 있으므로, 조합 요법은 함께 조합 약제의 각 성분의 독성은 피하면서 치료 용량을 제공한다. 또한, 조합 치료의 결과로 달성된 치료 효과가 시너지적일 때, 약제의 각 용량을 더욱 줄일 수 있으므로, 관련 독성을 훨씬 더 낮게 줄일 수 있다.

[0172] 본 발명에 기재된 화합물 또는 제약학적으로 허용 가능한 이의 염과 조합 요법은 질병 또는 질환의 발생 전, 중 또는 후에 투여될 수 있으며, 화합물을 함유하는 조성물 투여 시기는 다양하다. 본 발명에 기재된 화합물은 예방적으로 사용될 수 있으며 질병 또는 질환의 발생을 방지하기 위해 질환 또는 질병이 발달될 경향을 가진 대상에게 연속적으로 투여될 수 있다. 본 발명에 기재된 화합물 및 이의 조성물은 증상이 개시되는 동안 또는 증상이 개시된 후 가능한 빨리 대상에게 투여될 수 있다. 본 발명에 기재된 화합물은 질병 또는 질환의 개시가 검출 또는 의심된 후 실현 가능한 한 빨리, 질병의 치료가 필요한 기간 동안 투여될 수 있다.

[0173] **실시예**

[0174] 하기 실시예는 본 발명의 다양한 구현예를 예시하기 위해 제시되며 임의의 방식으로 본 발명을 제한하려는 것이 아니다. 본 발명에 기재된 발명과 함께 본 실시예는 현재 바람직한 구현예를 대표하고, 예시적이며, 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니다. 본 발명의 변경 및 청구 범위에 의해 정의된 본 발명의 사상 내에 포함되는 다른 용도가 통상의 기술자에게 자명할 것이다.

[0175] 모든 *in vitro* 약물 메카니즘-작용-연구에 대해, 하기 개설된 재료 및 방법이 사용되었다.

[0176] **표 1**에 나타낸 부착 또는 현탁 세포주를 6-웰 디쉬 또는 T10 플라스크에 각각 처리하고, 총 부피 3-10 ml로 처리하기에 앞서 ml 당 백만개의 밀도로 분주하였다. *in vitro* 세포 처리에 사용된 모든 약제는 원하는 농도 (각 도 라벨/범례에 표시된 대로)를 달성하기 위해 DMSO가 0.01%를 초과하지 않는 농도로 물/DMSO에 제제화하였다. 약물 공급원은 하기 'CIVO 미세 주입 연구' 표에 나타냈다. 세포들을 각각의 도에 나타낸 바와 같이 실험 시점: 처리 후 2, 6, 또는 24 시간에 수득하였고, 먼저 15 ml팔콘 튜브에서 차가운 PBS로 세포를 2회 세척하였으며, 1000 rpm 에서 5분 동안 원심분리한 후 하기 섹션에서 기재한 바와 같이 각각의 세포 펠릿을 파쇄하였다. 주석: 약물 내성 NUDHL1 Dox 1000 nM 및 Toledo Dox 1000 nM 세포주는 여러 계대에 걸쳐 단계적으로 증가하는 독소루비신 농도를 가진 배지에서 모계주를 배양함으로써 Presage에서 생성되었다. 이 세포들은 1uM Dox에 대한 내성이 달성되었을 때 이종 이식을 만드는데 사용되었다.

표 1

[0177]

DLBCL 세포주		
세포주 명칭	공급업체	5% CO2/37 도 C 에서의 배양 조건
RIVA (또는 RI-1)	DSMZ, 독일	RPMI 1640 (Thermofisher) + 10% FBS
SU-DHL-4	ATCC, 미국	RPMI 1640 (Thermofisher) + 10% FBS
U2932	DSMZ	RPMI 1640 (Thermofisher) + 10% FBS
NUDHL1	DSMZ	RPMI 1640 (Thermofisher) + 10% FBS
TOLEDO	DSMZ	RPMI 1640 (Thermofisher) + 10% FBS
OCI Ly10	UHN, 프린세스 마가렛 병원, 캐나다	IMDM (Thermofisher) + 20% 인간 혈청 (Valley biomedical) – 매 계대에 새로운 배지
TNBC 세포주		
HCC1187	ATCC	RPMI 1640 (Thermofisher) + 10% FBS
AML 세포주		
SKM1	DSMZ	RPMI 1640 (Thermofisher) + 10% FBS
MV-4-11	ATCC	IMDM (Thermofisher) + 20% 인간 혈청 (Valley biomedical)
OCI AML3	DSMZ	RPMI 1640 (Thermofisher) + 10% FBS

[0178] 모든 웨스턴 블롯 분석 연구에 대해, 하기 개설된 재료 및 방법이 사용되었다.

[0179] 1X RIPA 버퍼 (from 10X, Millipore)와 1X-3X Halt 프로테아제 및 포스파타아제 억제제 칵테일 (100X, Pierce)을 세포 펠릿에 첨가하여 차가운 단백질 파쇄물을 제조한 후 펄스 초음파 (~3-5초)를 3회 수행하였다. 파쇄물을 14K rpm 에서 15-20분 동안 원심분리하여 제거하였고 상등액 (파쇄물)을 이후의 분석을 위해 수집하였다. 동결보존된(cryopreserved) 이종 이식 종양 조직으로부터 파쇄물을 제조하기 위해, 휴대용 조직 균질기(hand-held tissue homogenizer) (Cole Palmer)를 이용하여 상기 파쇄 버퍼에서 조직을 우선 균질화한 후 상기 기재한 바와 같이 펄스 초음파 및 원심분리를 수행하였다. 상기 단계는 차가운 조건에서 수행되었다. 1x RIPA를 포함하는 적절한 블랭크 대조군을 이용하여 1:10 또는 그 이상의 희석 배수에서 브래드포드 분석(Bradford assay) (Biorad)을 이용하여 단백질 샘플을 정량하였다. 각 샘플로부터 20-25 마이크로그램의 단백질을 BOLT 4-12% Bis-Tris 젤 (Thermofisher)을 이용하여 SDS-PAGE하였으며 0.45 또는 0.2 마이크론 기공 크기의 멤브레인 (단백질 분자 크기에 따라 적용 가능), 및 나이트로셀룰로오스 (NC) 또는 pvdf (Thermofisher)에 제조사의 프로토콜에 따라 트랜스퍼하였고, 상온에서 한 시간 동안 5% 우유에서 블로킹하였으며, 4 도 C에서 밤새 일차 항체 (**표 2**)로 탐지하고 상응하는 HRP-결합 이차 항체 (Jackson Immunoresearch, 1:10,000-1:20,000 희석)로 상온에서 1시간 동안 탐지하였다. 각 항체 인큐베이션 후에 PBS/0.01% Tween-20로 세 번 세척하였다 (각각 5-10 분). 단백질 신호를 검출하기 위해 ECL 화학발광 기질 (Pierce 또는 GE) 및 방사선 필름 (Thermofisher)를 사용하였다.

표 2

[0180]

DLBCL 및 AML 실험			
일차 항체	종	공급업체/카달로그 번호	희석/희석제
cPARP	래빗	CST 5625	NC에 대해 5% 우유에서 1:1000 (또는 pvdf 멤브레인에 대해 1:400 0)
MCL1	래빗	CST 39224; CST 5453	NC에 대해 5% 우유에서 1:1000 (또는 pvdf 멤브레인에 대해 1:400 0)
cMYC	래빗	Ab32072	5% 우유에서 1:10,000 (pvdf)
P53	래빗	CST 2527 및 CST 9282	5% 우유에서 1:4000 (pvdf)
포스포 RNA pol II (Ser 2)	래트	활성 모티프 61083	5% BSA/PBS에서 1:1000 (pvdf)
베타 액틴 (로딩 대조군)	마우스	CST 12262	5% 우유에서 1:40,000 (pvdf)
BCL2	마우스	Dako M0887	5% 우유에서 1:5000 (pvdf)
TNBC 실험			
일차 항체	종	공급업체	희석
XBP1s	래빗	CST 12782	5% 우유에서 1:1000 (NC)
XIAP	래빗	CST 2042	5% 우유에서 1:1000 (NC)
MCL1	래빗	CST 94296	5% 우유에서 1:1000 (NC)
베타 액틴 (로딩 대조군)	마우스	Sigma A5441	5% 우유에서 1:10,000 (NC)
포스포 P38MAPK	래빗	CST 4631	5% BSA에서 1:1000 (NC)
포스포 JNK	래빗	CST 9251	5% BSA에서 1:1000 (NC)
총 p38	래빗	CST 9212	5% BSA에서 1:1000 (NC)
총 JNK	래빗	CST 9225	5% BSA에서 1:1000 (NC)
NOXA	마우스	Millipore OP180 clone	5% 우유에서 1:500 (NC)
BAK	래빗	Ab32371	5% BSA에서 1:1000 (NC)
pIRE1a	래빗	Novus NB100 2323	5% BSA에서 1:1000 (NC)
GADD34	래빗	Protein Tech	5% BSA에서 1:1000 (NC)

[0181] 모든 *in vivo* 연구에 대해, 하기 개설된 재료 및 방법이 사용되었다.

[0182] 마우스에서의 모든 작업은 Presage Biosciences, Seattle, WA의 IACUC Board에 의해 승인되었다. 모든 관련 절차는 마취하에 수행되었으며 통증 및 고통을 최소화하기 위해 모든 노력을 기울였다. 본 연구에 참여한 마우스 중 어느 개체도 실험 완료 전에 아프거나 죽지 않았으며, 하기 기재된 바와 같이 약물 처리를 받은 모든 마우스는 일상적인 건강 모니터링을 받았고 실험 종료시 인도적으로 안락사되었다. 하기 (**표 3**)으로 작성한 하기 세포주/마우스 주를 이용하여 측면 피하 이종 이식이 생성되었다. 마트리젤 (Corning)과 1:1의 비율인 세포 현탁액 200ul을 1 ml 주사기 (BD 309659) 및 27G 바늘 (BD 305109)을 이용하여 오른쪽 측면에 주사하였다.

표 3

[0183]

DLBCL 및 AML 이종 이식			
세포주	공급원	접종 세포 # 마우스 당	마우스 주
RIVA (or RI-1)	DSMZ	$5x10^6$ 백만	NOD SCID (Envigo)
SU-DHL-4	ATCC	$5x10^6$ 백만	SCID Beige (Charles River/Envigo)
U2932	DSMZ	$5x10^6$ 백만	NOD SCID (Envigo)
SKM1 (AML)	DSMZ	$5x10^6$ 백만	NOD SCID (Envigo)
NUDHL1	DSMZ	$5x10^6$ 백만	NOD SCID (Envigo)
TOLEDO	DSMZ	$5x10^6$ 백만	NOD SCID (Envigo)
TNBC 이종 이식			
HCC1187	ATCC	$5x10^6$ 백만	Athymic nude (Envigo)

[0184] 모든 CIVO 미세 주입 연구에 대해, 하기 개설된 재료 및 방법이 사용되었다.

[0185] 종양 부피가 대략 1000 mm^3에 달했을 때 마우스를 CIVO 약물 연구에 등록하였다. 전술한 바와 같이 (Klinghoffer 외, Science Translational Medicine 2015) CIVO 장치를 이용하여 미세 주입 연구를 수행하였다. 장치는 주사 깊이 6 mm 및 총 부피 전달 3 μl로 설정된 6개의 주사 바늘 구성되었다. 각 약물 또는 약물 조합과 함께 전달하기 위해 형광 추적 마커 (FTM)를 비히클로 각 약물 저장소에 추가하였다. 모든 미세-투여량은 Exploratory IND (Investigational New Drug) 연구에 대한 FDA 지침에 따라 및 약물의 비히클 용해도에 따라 허용되는 양과 같거나 더 낮았다. 주사된 약제의 총량은 하기 **표 4**에 작성하였다.

표 4

[0186]

DLBCL CIVO 미세 주입			
약물	**양**	**공급원**	**제제**
보루시클립	15.2 ug	Presage	5% DMSO/물
벤토클락스 (ABT-199)	26 ng	Chemietek	5% DMSO/물
나비토클락스 (ABT-263)	29.2 ng	Chemietek	5% DMSO/물
TNBC CIVO 미세 주입			
약물	**양**	**공급원**	**제제**
익사조밉 (screen)	15 ug	Selleck	20% HPbCD
독소루비신 (screen)	5.1 ug	Pfizer	0.9% 식염수
카보플라틴 (screen)	15 ug	Selleck	물
5-FU (screen)	2 ug	Selleck	5% DMSO/물
아브락산 (screen)	14.25	Celgene	0.9% 식염수
올라파립 (screen)	13.05 ug	Selleck	5% DMSO/물
트라메티닙 (screen)	18.5 ug	Selleck	5% DMSO/물
에베로리무스 (screen)	7.2 ug	Selleck	5% DMSO/물
BEZ 235 (screen)	14.1 ug	Selleck	5% DMSO/물
PUH71 (screen)	15.4 ug	Selleck	물
에를로티닙 (screen)	2.95 ug	Selleck	5% DMSO/물
수니티닙 (screen)	3 ug	Selleck	5% DMSO/물
소라페닙 (screen)	13.95 ug	Selleck	5% DMSO/물
다사티닙 (screen)	14.6 ug	Selleck	5% DMSO/물
보르테조밉 (screen)	1.2 ug	Chemietek	5% DMSO/물
디나시클립 (screen)	11.88 ug	Selleck	5% DMSO/물
플라보피리돌 (screen)	12.1 ug	Sigma	5% DMSO/물
팔보시클립 (screen)	13.44 ug	Chemietek	5% DMSO/물
마리조밉	94 ng	Triphase	5% DMSO/0.9% 식염수

[0187] 모든 전신 약물 효능 연구에 대해, 하기 개설된 재료 및 방법이 사용되었다.

[0188] 종양이 평균 150-200 mm^3의 부피에 달했을 때 마우스를 연구에 등록하였다. 종양 부피는 V = 길이 x 너비 x 높이로 계산되었고, 3치수 모두 디지털 캘리퍼스를 이용하여 체중과 함께 측정되었다. 종양의 측정된 3 치수 중 어느 하나가 2 cm를 초과, 2500 mm^3 부피 초과, 궤양 또는 20% 초과의 체중 감소일 때 동물들을 연구에서 제외하였다.

[0189] 종양 성장 억제 % (TGI)는 하기로 정의된다:

[0190]
$$\frac{(V_{최종}(\text{비히클}) - V_{개시}(\text{비히클})) - (V_{최종}(\text{처리}) - V_{개시}(\text{처리}))}{(V_{최종}(\text{비히클}) - V_{개시}(\text{비히클}))} \times 100$$

[0191] 여기에서 측정은 각각의 시험군(arm)에서 종양에 대한 평균이다. Wilcoxon Rank 합 또는 Mann-Whitney 테스트가 각 시험군(arm) 간의 차이를 결정하는 통계 검정으로서 사용되었다.

[0192] 약물 용량, 투여 경로, 일정 및 제제 프로토콜은 하기에 설명하였다. 경구 섭식을 위해, Instech, Ref: FTP--

20-‐38 공급관이, IV를 위해, BD 인슐린 주사기가 사용되었다.

[0193] DLBCL 연구

[0194] ·**RIVA**: 4 주 동안 보루시클립 200 mpk (PO) 6 on/ 1 off 및 ABT 199 (PO) 1 mpk 2x/주

[0195] ·**SUDHL4**: 4 주 동안 보루시클립 200 mpk (PO) 6 on/ 1 off 및 ABT 199 (PO) 25 mpk 6 on/ 1 off

[0196] ·**U2932**: 4 주 동안 보루시클립 200 mpk (PO) 6 on/ 1 off 및 ABT 199 (PO) 10 mpk 2x/주

[0197] AML 연구

[0198] ·**SKM1**: 3 주 동안 보루시클립 200 mpk (PO) 6 on/1 off + ABT 199 (PO) 10 mpk 6 on/1 off

[0199] TNBC 연구

[0200] ·**HCC1187**: 2 주 동안 보루시클립 200 mpk (PO) 5 on / 2 off + 익사조밉/MLN2238 (PO) 3 mpk 3. 6. 10, 13일

[0201] ·**HCC1187**: 2 주 동안 팔보시클립 120 mpk (PO) QD x 14 + 보르테조밉 0.42mpk (IV), 1, 4, 8, 11일

[0202] ·**HCC1187**: 2주 동안 보루시클립 200 mpk (PO) + 보르테조밉 0.42 mpk (IV), 1, 4, 8 11일

[0203] **실시예 1. 보루시클립은 사이클린-의존성 카이네이즈-9 (CDK9)의 강력한 억제제이다**

[0204] 보루시클립은 강력한 CDK4/6 억제제로 생각된다. 보루시클립의 38개의 각각 다른 카이네이즈에 대한 활성을 CDK9 억제제로 알려진 플라보피라돌과 비교하여 시험하였다. **도 1**은 보루시클립 및 플라보피리돌의 구조와 보루시클립 및 플라보피라돌의 억제 프로파일의 비교를 도시한다. **도 1**는 플라보피라돌과 유사하게, 보루시클립이 CDK9의 강력한 억제제 (K_i < 10nM)인 것을 입증한다. 그러나, 보루시클립은 플라보피라돌보다 CDKs에 더욱 특이적이다. **도 1**은 플라보피라돌이 세린/트레오닌 단백질 카이네이즈 MAK 및 ICK의 강력한 억제제임을 나타내는 반면, 보루시클립은 MAK 또는 ICK의 억제를 강력하게 나타내지 않았다. MAK 및 ICK는 위장 상피 세포와 관련되어 있고, 플라보피라돌 처리와 관련된 심각한 설사를 설명할 수 있다. 다른 한편으로, 보루시클립은 더 적은 위장관 부작용을 나타낼 수 있다. DiscoveRx 및 Thermofisher 스크리닝(screen): 10 uM 및 50 nM에서의, DiscoveRx ScanMax 카이네이즈 패널의 468개 카이네이즈 분석 및 ThermoFisher SelectScreen 카이네이즈 패널의 414개 카이네이즈 분석에 대한 카이네이즈 활성의 억제 백분율. 시험 물품은 Presage에서 미리 무게를 재고 실란화 엠버 스크류 캡 바이알에 넣어져 DiscoveRx and Reaction Biology로 운송되었다. ThermoFisher의 경우, 화합물의 무게를 재고 선적하기 전에 대기 조건에서 10 mM DMSO 에 용해시켰다. 수령시, 바이알을 사용전까지 -20C에서 보관하였다. 분말은 DMSO에 10 mM로 용해시켰다.

[0205] **도 2**는 CDK9을 가장 강력하게 억제하는 보루시클립의 CDKs 1, 4, 6, 및 9에 대한 한 자릿수 nM 효능을 나타낸다. 반응 생물학 프로파일링: 본 발명의 목적은 48개 카이네이즈의 보루시클립 하이드로클로라이드에 대한 민감도 순서를 결정하는 것이다. 시험 기관은 Reaction Biology Corp이었다. 카이네이즈 활성은 γ-33P-ATP를 포스페이트 공여자로서 이용한 필터 결합 검정(filter binding assay)을 이용하여 측정되었다. ATP 농도는 각 카이네이즈에 대해 Km에 가까웠다. 각 카이네이즈에 대해, 시험 물품의 10-점 농도 곡선으로부터 IC50 값이 계산되었고 Ki 값으로 변환되었다. 본 발명에서 연구된 48개의 카이네이즈는 이전의 스크리닝 실험에서 가장 유망한 표적 후보로 확인되었다.

[0206] **실시예 2. 보루시클립은 Bcl-2 패밀리 억제제, 베네토클락스 (ABT-199)와 조합하여 시너지 효과를 나타낸다.**

[0207] NU-DHL-1 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL) 세포를 보루시클립 단독, 베네토클락스 (ABT-199) 단독, 또는 보루시클립 및 베네토클락스의 조합의 비히클로 처리하였다. **도 3A-3D**는 항-세포자멸사 단백질에 대해 염색된 NU-DHL-1 세포가 골수성 백혈병 분화 단백질 Mcl-1 (MCL-1) (빨간색으로 나타냄)을 유도하는 것을 나타낸다. **도 3A**는 비히클만으로 처리된 세포를 나타낸다. **도 3B**에서, 보루시클립은 단독으로 윤곽선 **301**에서 어두운 윤곽 영역의 증가로 나타난, MCL-1의 발현을 감소시켰다. **도 3C**의 윤곽선 **302**내의 밝은 색 영역에 나타난 바와 같이, 베네토클락스는 단독으로 MCL-1의 발현을 증가시켰다. 보루시클립 및 베네토클락스의 조합은 **도 3D**에 나타난, 윤곽선 **303**의 어두운 영역에 나타난, MCL-1 발현의 현저한 감소를 유발하였다.

[0208] **도 4A-4D**는 MCL-1 억제와 세포자멸사의 시너지적 유발 사이의 상관관계를 입증한다. NU-DHL-1 미만성 거대 B-세포 림프종 (DLBCL) 세포에 비히클, 보루시클립 단독, 베네토클락스 (ABT-199) 단독, 또는 보루시클립 및 베네토클락스의 조합을 처리하였다. 세포를 세포자멸사 마커로서 절단된 케스페이즈-3 (CC3) (빨간색으로 나타냄)에

대해 염색하였다. **도 4A**는 비히클 단독으로 처리된 세포를 나타낸다. **도 4B**에서 나타낸, 보루시클립 단독 처리는 윤곽선 **401** 내의 밝은 색 영역에 나타난 바와 같이, CC3의 경미한 발현 증가를 나타냈다. 유사하게, **도 4C**에서 나타낸, 베네토클락스 단독 처리는 윤곽선 **402** 내의 밝은 색 영역에 나타난 바와 같이, CC3의 경미한 발현 증가를 나타냈다. **도 4D**에서 보루시클립 및 베네토클락스의 조합은 윤곽선 **403**내의 넓은 밝은 색 영역으로 나타난 바와 같이, CC3의 시너지적인 발현 증가를 나타냈고, 이는 처리된 세포에서 증가된 세포자멸자 유도를 시사한다.

[0209] **도 6A-6E**는 보루시클립 및 베네토클락스의 세포자멸사에 대한 시너지 효과가 다수의 DLBCL 모델에 걸쳐 재현 가능한 것을 입증한다. 간단히, RIVA, Toledo, Toledo/Dox1000, NUDHL, 및 NUDHL/Dox1000 세포들을 **도 6A, 도 6B, 도 6C, 도 6D,** 및 **도 6E**에 각각 나타낸 바와 같이 보루시클립 단독, 베네토클락스 단독 또는 보루시클립 및 베네토클락스 조합으로 처리하였다. 보루시클립 단독 처리 및 베네토클락스 단독 처리는 CC3 발현에 대해 경미한 효과를 나타냈으나, 보루시클립 및 베네토클락스의 조합은 5개의 DLBCL 모델에 모두에 걸쳐 시너지적인 CC3 발현 유도를 입증하였다.

[0210] **도 7**는 이 시너지 효과의 제안된 모델을 도시한다. 보루시클립이 Bcl-2 억제와 조합되었을 때 CDK9를 통한 MCL-1의 억제를 통해 세포를 세포자멸사로 전환시킬 것이다.

[0211] **실시예 3. 보루시클립은 Bcl-2 패밀리 억제제, 나비토클락스와 조합하여 시너지 효과를 나타낸다**

[0212] 라모스 버킷 림프종 세포에 비히클, 보루시클립 단독, 나비토클락스 (ABT-263) 단독, 또는 보루시클립 및 나비토클락스의 조합을 처리하였다. **도 5A-5D**는 세포자멸사의 마커로서 절단된 케스페이즈-3 (CC3) (빨간색으로 나타냄)에 대해 염색된 라모스 버킷 림프종 세포를 나타낸다. **도 5A**는 비히클 단독으로 처리된 세포를 나타낸다. **도 5B**에 나타난 바와 같이, 보루시클립 단독 처리는, 윤곽선 **501**의 밝은 영역 내에 나타난 바와 같이, CC3의 발현에서 경미한 증가를 나타냈다. 유사하게, **도 5C**에 나타난 바와 같이, 베네토클락스 단독 처리는 윤곽선 **502**의 밝은 영역 내에 나타난 바와 같이, CC3의 발현에서 경미한 증가를 나타냈다. **도 5D**의 윤곽선 **503** 내의 넓은 밝은 색 영역으로 나타난 바와 같이, 보루시클립 및 나비토클락스의 조합은 CC3의 발현에서 현저한 증가를 나타냈으며, 이는 처리된 세포에서 세포자멸사의 증가된 유도를 시사한다.

[0213] **실시예 4. 보루시클립은 프로테아좀 억제제와 조합하여 시너지 효과를 나타낸다**

[0214] 다수의 약물을 동시에 시험하기 위해 시험 약물 스크리닝(screen)이 수행되었다. **도 8A**는 HCC1187 삼중 음성 유방암 (TNBC) 이종 이식 모델에 주사된 다양한 화합물 목록을 나타낸다. **도 8B**는 이종 이식에서 MCL-1 유도의 평균 % 변화를 나타낸다. 프로테아좀 억제제, 보르테조밉은 MCL-1 발현 증가를 나타냈다. **도 8C**은 비히클로 처리된 이종 이식을 나타낸다. **도 8D**는 보르테조밉을 처리하고 MCL-1 발현 (빨간색으로 나타냄)에 대해 염색한 이종 이식을 나타낸다. 윤곽선 **801** 내의 밝은 색 영역의 증가로 나타난 바와 같이, 보르테조밉은 이들 세포에서 MCL-1의 발현을 현저히 증가시켰다.

[0215] **실시예 5. 보루시클립은 프로테아좀 억제제, 마리조밉과 조합하여 시너지 효과를 나타낸다**

[0216] NudHL1 DLBCL 이종 이식을 비히클, 보루시클립 단독, 마리조밉 단독, 또는 보루시클립 및 마리조밉의 조합으로 6시간 동안 처리하였다. **도 9A-9D**는 상기와 같이 처리되고 세포자멸사의 마커로서 절단된 케스페이즈-3 (CC3) (빨간색으로 나타냄)로 염색된 세포를 도시한다. **도 9A**는 비히클 단독으로 처리된 세포를 나타낸다. **도 9B**에 나타난 바와 같이, 보루시클립을 단독 처리한 세포는 윤곽선 **901** 내의 좁은 밝은 색 영역으로 나타난 바와 같이 CC3 발현이 거의 또는 전혀 증가하지 않았다. 유사하게, **도 9C**에 나타난 바와 같이, 마리조밉을 단독 처리한 세포는 윤곽선 **902** 내의 좁은 밝은 색 영역으로 나타난 바와 같이 CC3 발현이 거의 또는 전혀 증가하지 않았다. 보루시클립 및 마리조밉의 조합으로 처리한 세포는 **도 9D**의 윤곽선 **903** 내의 넓은 밝은 색 영역으로 나타난 바와 같이 CC3 발현에서 현저한 증가를 나타냈으며, 이는 이들 세포에서 세포자멸사의 유도에 대한 시너지 효과를 시사한다.

[0217] **실시예 6. 보루시클립은 프로테아좀 억제제, 보르테조밉과 조합하여 시너지 효과를 나타낸다**

[0218] 간단히, NudHL1 DLBCL 이종 이식을 비히클, 보루시클립 단독, 보르테조밉 단독, 또는 보루시클립 및 보르테조밉의 조합으로 6시간 동안 처리하였다. **도 10A-10D**는 상기와 같이 처리되고 세포자멸사의 마커로서 절단된 케스페이즈-3 (CC3) (빨간색으로 나타냄)로 염색한 세포를 도시한다.

[0219] **도 10A**는 비히클 단독으로 처리된 세포를 나타낸다. **도 10B**에 나타난 바와 같이, 보루시클립 단독 처리한 세포는 CC3 발현이 거의 또는 증가하지 않았다. 유사하게, **도 10C**에 나타난 바와 같이 보르테조밉 단독 처리한 세포

는 윤곽선 1001 내의 좁은 밝은 색 영역으로 나타난 바와 같이 CC3 발현이 거의 또는 증가하지 않았다. 보루시클립 및 보르테조밉의 조합으로 처리된 세포는 **도 10D**의 윤곽선 1002 내의 넓은 밝은 색 영역으로 나타난 바와 같이 CC3 발현에서 현저한 증가를 나타냈으며, 이는 이들 세포에서 세포자멸사의 유도에 대한 시너지 효과를 시사한다.

[0220] **도 11**은 HCC1187 삼중 음성 유방암 (TNBC) 이종 이식 모델에서 수행된 유사한 실험을 도시한다. 간단히, 세포들을 비히클, 보루시클립 단독, 보르테조밉 단독, 또는 보루시클립 및 보르테조밉의 조합으로 처리하였다. 그 후 세포들을 세포자멸사의 마커로서 CC3 발현 (빨간색으로 나타냄)에 대해 염색하였다. **도 11A**는 비히클 단독으로 처리된 세포를 나타낸다. **도 11B**에 나타난 바와 같이, 보루시클립 단독 처리된 세포는, CC3 발현이 거의 또는 증가하지 않았다. 유사하게, **도 11C**에 나타난 바와 같이, 보르테조밉 단독 처리된 세포는 CC3 발현이 거의 또는 증가하지 않았다. 보루시클립 및 보르테조밉의 조합으로 처리된 세포는 **도 11D**의 윤곽선 1101 내의 넓은 밝은 색 영역으로 나타난 바와 같이, CC3 발현에서 현저한 증가를 나타냈으며, 이는 이들 세포에서 세포자멸사의 유도에 대한 시너지 효과를 시사한다.

[0221] HCC1187 삼중 음성 유방암 (TNBC) 이종 이식 마우스 모델에 비히클, 보루시클립 (200mg/kg), 보르테조밉 (0.42mg/kg), 또는 보루시클립 (200mg/kg) 및 보르테조밉 (0.42mg/kg)의 조합을 처리하였다. 종양 부피는 시간 경과에 따라 각각의 마우스에서 측정되었으며, 그 결과는 **도 12A-12D**에 나타냈다. 보루시클립 및 보르테조밉의 조합으로 처리된 마우스 (**도 12D**)는 보루시클립 단독 (**도 12B**) 또는 보르테조밉 단독 (**도 12C**) 처리된 마우스에 비해, 시간 경과에 따른 정규화된(normalized) 종양 부피에서 현저한 감소를 나타냈다. **도 12E**는 MLC-1 단백질 발현에 대한 웨스턴 블롯을 나타낸다. 보르테조밉을 처리한 세포들은 보르테조밉이 처리되지 않은 샘플들에 비해 MCL-1 단백질 발현이 증가된 반면, 보루시클립을 처리한 세포는 보루시클립이 처리되지 않은 샘플에 비해 MCL-1 단백질 발현이 감소되었다. 또한, 보루시클립은 보르테조밉에 의해 유도된 MCL-1 발현 증가를 감소시켰다.

[0222] **도 13**은 마우스 체중이 보루시클립 단독, 보르테조밉 단독 또는 보루시클립 및 보르테조밉의 조합 처리에 의해 영향받지 않음을 입증한다. 이 데이터는 보루시클립 및 보르테조밉의 조합 요법이 독성이 거의 나타내지 않을 수 있다는 것을 시사한다.

[0223] 또한, 보루시클립이 보르테조밉에 의해 유도된 전-생존 단백질인, MCL-1 및 E3 유비퀴틴-단백질 라이게이즈 XIAP의 상향 조절을 차폐한다. **도 15A**는 CDK9의 보루시클립 억제의 제안된 모델을 도시한다. **도 15B**는 보루시클립 단독, 보르테조밉 단독, 또는 보루시클립 및 보르테조밉의 조합이 처리된 세포에서의 MCL-1 및 XIAP 단백질 수준을 나타낸다. 웨스턴 블롯은 보루시클립이 이들 세포에서 보르테조밉에 의해 유도된 MCL-1 및 XIAP 단백질 모두의 상향 조절을 약화시키는 것을 입증한다.

[0224] **실시예 7. CDK 4/6 억제제인 팔보시클립은 보르테조밉과 조합하여 시너지 효과를 나타내지 않는다**

[0225] HCC1187 삼중 음성 유방암 (TNBC) 이종 이식 마우스 모델에 팔보시클립 (120mg/kg), 보르테조밉 (0.42mg/kg), 또는 팔보시클립 (120mg/kg) 및 보르테조밉 (0.42mg/kg)의 조합을 처리하였다. 종양 부피는 시간 경과에 따라 각각의 마우스에서 측정되었으며, 그 결과는 **도 14**에 나타냈다. 보루시클립과 달리, 팔보시클립은 보르테조밉과 조합시 종양 부피에 대한 시너지 효과를 나타내지 않았다. 보루시클립이 CDK9을 표적화하는 반면, 팔보시클립은 CDK4/6 억제제에 특이적이다. 따라서, 이러한 차이는 CDK9-특이적일 수 있다.

[0226] **실시예 8. 소포체 (ER) 스트레스 반응 경로는 보르테조밉과 조합한 보루시클립의 시너지 효과에서 중요한 역할을 한다**

[0227] **도 16A**는 보르테조밉으로 처리된 조직 섹션을 나타낸다. 보르테조밉은 일부 세포에서 세포자멸사를 유도하는 반면, 일부 세포에서 보르테조밉 처리에 내성을 나타낸다. 세포는 ER 샤페론 단백질 GRP178/BiP에 대해 염색되었다. **도 16B**는 보르테조밉에 의한 세포자멸사에 내성인 세포가 GRP178/BiP를 발현하는 것을 입증한다.

[0228] 그 다음, HCC1187 삼중 음성 유방암 세포에 보루시클립 단독, 보르테조밉 단독, 튜니카마이신 단독 (ER 스트레스 유도물질), 또는 조합을 처리하였다. 튜니카마이신의 단독 처리는 ER 스트레스 경로의 IRE1α 암(arm)의 ER 스트레스 단백질인 X-box 결합 단백질 1 (XBP1)을 6시간째에 강력하게 유도하였다. 또한, 튜니카마이신 및 보르테조밉은 24시간째에 XBP1 발현을 강력하게 유도하였다 **(도 18B)**. 보루시클립과 보르테조밉 또는 튜니카마이신의 조합은 XBP1 상향 조절을 약화시켰다. 이 결과들은 보루시클립이 ER 스트레스 경로의 IRE1α 암(arm)을 억제할 수 있음을 시사한다 **(도 18B)**. 보루시클립은 또한 보르테조밉에 의해 유도된 XBP1의 전사적 유도를 감소시켰다 **(도 19A-19B)**. HCC1187 세포들을 보루시클립 (1.5uM), 보르테조밉 (10nM), STF083010 IRE1a 엔도리보뉴클레

아제 활성 억제제 (Millipore) (60uM) 또는 튜니카마이신 (Sigma)(100nM)으로 4시간 동안 처리하였다. mRNA를 Qiagen RNAeasy Kit를 이용하여 수득하였고, 나노드랍 분광광도계(Nanodrop spectrophotometer)를 이용하여 정량하였다. High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) 및 제조사의 프로토콜을 이용하여 각 조건에서의 mRNA 1 ug으로 cDNA를 생성하였다. XBP1 또는 스플라이스 형태(splice form)를 증폭하기 위해 cDNA 100ng을 PCR 분석 수행에 사용하였다- 94 도 C에서 2 분, (94 도 C에서 15 초, 55 도 C에서 30 초, 72 도 C에서 1 분) x 30 사이클, 72 도 C에서 7 분, 4 도 C에서 중단. 스플라이싱된 또는 스플라이싱되지 않은 XBP1 변이체가 검출되었다.

[0229] **실시예 9. 보루시클립은 프로테아좀 억제제, 익사조밉과 조합하여 시너지 효과를 나타낸다**

[0230] **도 20A-20D**는 HCC1187 삼중 음성 유방암 (TNBC) 이종 이식 모델을 도시한다. 간단히, 세포에 보루시클립 단독, 익사조밉 단독, 또는 보루시클립 및 익사조밉의 조합을 처리하였다. 그 후 세포들을 세포자멸사의 마커로서 CC3 발현 (빨간색으로 나타냄)에 대해 염색하였다.

[0231] **도 20A**는 비히클 단독으로 처리된 세포를 나타낸다. **도 20B**에 나타난 바와 같이, 보루시클립을 단독 처리한 세포는 윤곽선 **2001** 내의 좁은 밝은 색 영역으로 나타난 바와 같이 CC3 발현이 거의 또는 증가하지 않았다. 유사하게, **도 20C**에 나타난 바와 같이 익사조밉을 단독 처리한 세포는 윤곽선 **2002** 내의 좁은 밝은 색 영역으로 나타난 바와 같이 CC3 발현이 거의 또는 증가하지 않았다. 보루시클립 및 익사조밉의 조합을 처리한 세포는 **도 20D**의 윤곽선 **2003** 내의 넓은 밝은 색 영역으로 나타난 바와 같이 CC3 발현에서 현저한 증가를 나타냈으며, 이는 이들 세포에서 세포자멸사의 유도에 대한 시너지 효과를 시사한다.

[0232] **도 21A 및 21B**에 나타낸 바와 같이, 다양한 CDK 억제제가 익사조밉과 조합되어 처리되었다. 윤곽선 **2101** 및 **2102** 내의 밝은 색 영역으로 나타난 바와 같이, 오직 보루시클립만이 익사조밉과 조합되어 종양 세포의 세포자멸사에 대한 시너지 효과를 입증하였다. 비히클 단독, 익사조밉 단독, 팔보시클립 및 익사조밉, 디나시클립 및 익사조밉, 및 플라보피라돌 및 익사조밉 모두 종양의 세포자멸사에 대해 보루시클립 및 익사조밉의 조합이 나타낸 것 만큼 시너지 효과를 나타내지 않았다.

[0233] **실시예 10. 보루시클립은 베토클락스와 조합하여 시너지 효과를 나타낸다**

[0234] **도 22A-B**는 보루시클립 및 베네토클락스의 SU-DHL-4 모델에서의 시너지를 도시한다. 절단된 PARP (cPARP)는 세포자멸사의 바이오마커로 사용될 수 있다. 보루시클립 및 베네토클락스의 두 약제의 조합 효과를 평가하기 위해, 각각의 낮은 용량 (150 nM 보루시클립 및 20 nM 베네토클락스)이 단일 약제로서 또는 조합으로서 DLBCL의 SUDHL4 모델에서 시험되었다. 세포 파쇄 및 PARP의 절단된 형태, MCL-1, C-MYC, 및 **도 22A**의 베타 액틴 (단백질 로딩 대조군으로서) 및 **도 22B**에서 추가적인 단백질 로딩 대조군으로서 BCL2에 특이적인 항체들을 이용한 웨스턴 블롯 실험 24h 전에 세포들을 약물에 노출시켰다. **도 22A**는 DLBCL 모델에서 보루시클립이 MCL1을 1.5 Um에 억제하는 것을 도시한다.

[0235] **도 22B**는 단일 약제로서 세포자멸사를 효과적으로 유도하는 것으로 나타난 농도의 1/10인, 0.15 uM 농도의 보루시클립을 사용한다. 이 보루시클립의 수준은 MCL-1 발현 억제에 대한 일부 효능을 유지하는 반면 (**도 22B**의 레인 1 & 2 비교), 베네토클락스에 노출된 세포는 MCL-1 발현을 유도한다 (**도 22B**의 레인 1 & 3 비교). 낮은 보루시클립 노출도 베네토클락스에 의해 유도된 MCL-1을 억제한다 (**도 22B**의 3 & 4 비교).

[0236] **도 23A-C**는 DLBCL의 SU-DHL-4 모델, OCI Ly10 모델, 및 U2932 모델에서의 보루시클립 및 베네토클락스의 시너지를 도시한다. 절단된 PARP (cPARP)는 세포자멸사의 바이오마커로서 사용될 수 있다. 보루시클립 및 베네토클락스의 두 약제의 조합 효능을 평가하기 위해, 각각의 낮은 용량이 단일 약제로서 또는 조합으로서 DLBCL의 세 모델에서 시험되었다. 세포 파쇄 및 PARP의 절단된 형태 및 베타 액틴 (단백질 로딩 대조군으로서)에 특이적인 항체들을 이용한 웨스턴 블롯 실험 24h 전에 세포들을 약물에 노출시켰다.

[0237] **도 23A**는 0.15 uM 보루시클립 및 20 nM의 베네토클락스의 조합이 DLBCL의 SUDHL4 모델에서 세포자멸사 유도에 시너지를 나타내고, 어느 화합물도 단일 약제로는 세포자멸사를 유도하지 않는 것을 도시한다. **도 23B**는 5 uM 보루시클립 및 50 nM의 베네토클락스의 조합이 DLBCL의 OCI Ly10 모델에서 세포자멸사 유도에 시너지를 나타내고 어느 화합물도 단일 약제로는 세포자멸사를 유의적으로 유도하지 않는 것을 도시한다. **도 23C**는 5 uM 보루시클립 및 50 nM의 베네토클락스의 조합이 DLBCL의 U2932 모델에서 세포자멸사 유도에 시너지를 나타내며, 두 화합물의 조합이 단일 약제로서의 각각의 화합물의 단순한 첨가보다 명백히 더 큰 것을 도시한다.

[0238] **실시예 11. 보루시클립은 DLBCL 이종 이식 마우스의 종양에서 MCL1 발현을 억제한다**

[0239] **도 24**는 보루시클립이 마우스의 DLBCL 이종 이식 종양에서 MCL1 억제하는 것을 도시한다. DLBCL 이종 이식 종양(OCILY10)을 품은 마우스는 경구 섭식으로 보루시클립 또는 비히클 대조군을 5일 동안 매일 투여받았으며 최종 투여 4h 후에 MCL-1 발현 분석을 위해 종양을 수득하였다. 종양 샘플을 반으로 잘라, 반은 웨스턴 블롯 분석을 위해 파쇄 버퍼에 용해시켰고 다른 반은 면역조직화학염색을 위해 포르말린에 고정하고 준비하였다. MCL-1 또는 베타 액틴 (단백질 로딩 대조군)에 특이적인 항체들로 처리군 당 3마리의 개별 마우스 유래 종양 파쇄물의 웨스턴 블롯을 수행하였다. 그래프는 DLBCL 이종 이식 종양에서 단일 약제로서의 보루시클립이 100 mpk에서 MCL1 발현을 억제하는 것을 도시한다.

[0240] **실시예 12. 보루시클립 및 베네토클락스는 DLBCL 이종 이식 마우스의 종양의 성장을 방해한다**

[0241] **도 25A-B**는 보루시클립 및 베네토클락스의 조합이 DLBCL 이종 이식 종양의 성장을 방해하는 것을 도시한다. 면역 결핍 NOD SCID 마우스에 DLBCL의 RIVA (활성화된 B-세포, 또는 ABC) 모델을 이식하였다. 이종 이식된 종양을 NOD SCID 숙주에서 200 mm^3에 도달할 때까지 성장하도록 하였으며, 그 시점에 이종 이식된 동물들을 4개의 연구군: 1. 비히클 대조군; 2. 200 mpk의 보루시클립; 3. 1 mpk의 베네토클락스; 및 4. 200 mpk의 보루시클립 및 1 mpk의 베네토클락스의 조합으로 무작위 추출하였다. 보루시클립은 경구 섭식으로, 주에 6일 동안 매일 투여되고 사이클 사이에 하루 쉬도록 투여되었다. 베네토클락스는 각 주간 사이클의 1일 및 4일차에 경구 섭식으로 투여되었다. 약물 효과는 주에 2회 연구에서 각 대상의 처리에 대해 알지 못하는 기술자에 의해 종양 부피 측정을 통해 평가되었다. N=5-6 마리/처리군(treatment arm).

[0242] **도 25A**는 4개의 각 연구군: 비히클, 단일 약제 보루시클립, 단일 약제 베네토클락스, 및 보루시클립 및 베네토클락스의 조합에 대한 평균 종양 부피 (mm^3)를 그래프로 나타낸다. 단일 약제 처리시 더 긴 연구 기간에 걸쳐 종양 부피가 감소하는 것으로 나타났다. 조합 처리시 종양 부피 크기가 훨씬 더 크게 감소하였고, 연구 3주까지 평균 종양 부피의 2배 이상 감소하는 것으로 나타났다.

[0243] **도 25B**는 4개의 각 연구군의 동물의 종양 이미지를 도시한다: 비히클, 단일 약제 보루시클립, 단일 약제 베네토클락스, 및 보루시클립 및 베네토클락스의 조합. 비히클은 윤곽선 **2501**로 나타낸 바와 같이 종양 크기가 가장 크다. 윤곽선 **2502**로 나타낸, 단일 약제 보루시클립의 종양은 더 작다. 윤곽선 **2503**로 나타낸, 단일 약제 베네토클락스의 종양 또한 비히클보다 작다. 비히클 또는 단일 약제 요법들의 종양보다 현저하게 작은, 윤곽선 **2504**로 나타낸 조합 요법 종양은 시너지 효과를 시사한다.

[0244] **도 26A-B**는 보루시클립 및 베네토클락스의 조합이 DLBCL 이종 이식 종양의 성장을 방해하는 것을 도시한다. 면역 결핍 NOD SCID 마우스는 DLBCL의 U2932 모델로 이식되었다. 이종 이식된 종양은 NOD SCID 숙주에서 200 mm^3에 도달할 때까지 성장되도록 허용되었으며, 그 시점에 이종 이식된 동물들을 4개의 연구군: 1. 비히클 대조군; 2. 200 mpk의 보루시클립; 3. 10 mpk의 베네토클락스; 및 4. 200 mpk의 보루시클립 및 10 mpk의 베네토클락스의 조합으로 무작위 추출하였다. 보루시클립은 경구 섭식으로, 주에 6일 동안 매일 투여되고 사이클 사이에 하루 쉬도록 투여되었다. 베네토클락스는 각 주간 사이클의 1일 및 4일차에 경구 섭식으로 투여되었다. 약물 효과는 주에 2회 연구에서 각 대상의 처리에 대해 알지 못하는 기술자에 의해 종양 부피 측정을 통해 평가되었다. N=5-6 마리/처리군.

[0245] **도 26A** 는 4개의 각 연구군에 대한 평균 종양 부피 (mm^3)를 그래프로 나타낸다. 단일 약제 처리시 더 긴 연구 기간에 걸쳐 종양 부피가 감소되는 것으로 나타났다. 조합 처리시 평균 종양 부피가 29일 연구 기간에 걸쳐 일관되게 유지되어, 종양 성장을 거의 나타내지 않았다

[0246] **도 26B**는 4 개의 각 연구군에서 대상에 대한 평균 체중 그램 (g)을 그래프로 나타낸다. 4개의 연구군 모두 건강 및 안전성의 일반적인 지수인, 안정되고 일관된 체중을 나타냈다.

[0247] **도 27A-B**는 보루시클립 및 베네토클락스의 조합이 DLBCL 이종 이식 종양의 성장을 방해하는 것을 도시한다. 면역 결핍 NOD SCID 마우스는 DLBCL의 NUDHL1 모델로 이식되었다. 이종 이식된 종양은 NOD SCID숙주에서 200 mm^3에 도달할 때까지 성장하도록 허용되었으며, 그 시점에 이종 이식된 동물들을 4개의 연구군: 1. 비히클 대조군; 2. 200 mpk의 보루시클립; 3. 50 mpk의 베네토클락스; 및 4. 200 mpk의 보루시클립 및 50 mpk의 베네토클락스의 조합으로 무작위 추출하였다. 보루시클립은 경구 섭식으로, 주에 6일 동안 매일 투여되고 사이클 사이에 하루 쉬도록 투여되었다. 베네토클락스는 각 주간 사이클의 1일 및 4일차에 경구 섭식으로 투여되었다. 약물 효과는 주에 2회 연구에서 각 대상의 처리에 대해 알지 못하는 기술자에 의해 종양 부피 측정을 통해 평가되었다.

N=5-6 마리/처리군.

[0248] **도 27A** 는 4개의 각 연구군에 대한 정규화된 종양 부피 (mm^3)를 그래프로 나타낸다. 단일 약제 처리시 더 긴 연구 기간에 걸쳐 종양 부피가 감소하는 것으로 나타났다. 조합 처리시 종양 부피 크기가 훨씬 더 크게 감소했고, 연구 3주까지 평균 종양 부피의 2배 이상 감소하는 것으로 나타났다.

[0249] **도 27B**는 4개의 각 연구군의 동물의 종양 이미지를 도시한다: 비히클, 단일 약제 보루시클립, 단일 약제 베네토클락스, 및 보루시클립 및 베네토클락스의 조합. 비히클은 윤곽선 **2701**로 나타낸 바와 같이 종양 크기가 가장 크다. 윤곽선 **2702**로 나타낸, 단일 약제 보루시클립의 종양은 더 작다. 윤곽선 **2703으**로 나타낸, 단일 약제 베네토클락스의 종양 또한 비히클보다 작다. 비히클 또는 단일 약제 요법들의 종양보다 현저하게 작은, 윤곽선 **2704**로 나타낸 조합 요법 종양은 시너지 효과를 시사한다.

[0250] **도 28**는 보루시클립 및 베네토클락스의 조합이 DLBCL 이종 이식 종양의 성장을 방해하는 것을 도시한다. 면역결핍 NOD SCID 마우스는 DLBCL의 SUDHL4 모델로 이식되었다. 이종 이식된 종양은 NOD SCID숙주에서 200 mm^3에 도달할 때까지 성장하도록 허용되었으며, 그 시점에 이종 이식된 동물들을 4개의 연구군: 1. 비히클 대조군; 2. 200 mpk의 보루시클립; 3. 25 mpk의 베네토클락스; 및 4. 200 mpk의 보루시클립 및 25 mpk의 베네토클락스의 조합으로 무작위 추출하였다. 보루시클립은 경구 섭식으로, 주에 6일 동안 매일 투여되고 사이클 사이에 하루 쉬도록 투여되었다. 베네토클락스는 경구 섭식으로, 주에 6일 동안 매일 투여되고 사이클 사이에 하루 쉬도록 투여되었다. 약물 효과는 주에 2회 연구에서 각 대상의 처리에 대해 알지 못하는 기술자에 의해 종양 부피 측정을 통해 평가되었다. N=5-6 마리/처리군. **도 28** 는 4개의 각 연구군에 대한 정규화된 종양 부피 (mm^3)를 그래프로 나타낸다. 단일 약제 처리시 연구 기간 동안 종양 부피가 증가하는 것으로 나타났다. 조합 처리시 단일 약제 처리 및 비히클 처리보다 종양 성장이 더 적은 것으로 나타냈다.

[0251] **도 29**의 각 레인은 개별 SUDHL4 이종 이식을 나타낸다. 이와 함께, 웨스턴 블롯은 보루시클립이 베네토클락스에 의해 차폐된 p53를 회복시키는 것을 도시한다. 종양은 26일째, 처리 4시간 후에 수득되었다. 각 종양은 2개로 분할하였다. 반은 IHC 분석에 기초한 FFPE에 이용하였고, 다른 반은 웨스턴 블롯 분석에 사용하였다.

[0252] **실시예 13. 보루시클립은 AML 세포주에서 MCL1 발현을 억제한다**

[0253] **도 30A-30C**는 보루시클립이 AML 세포주에서 단일 약제 활성을 가지는 것을 도시한다. AML 세포주 (SKM-1, MV-4-11, 및 OCI-AML-3)는 처리하지 않고 놔두거나 임상적으로 달성될 수 있는 수준의 보루시클립 (1.5 및 5.0 마이크로몰)에 2, 6, 또는 24 h동안 노출시켰다. 주어진 시점에, 세포들을 파쇄하고 인산화된 RNA pol II (pSer2), MCL-1, 절단된 PARP, 및 베타-액틴을 특이적으로 인식하는 항체로 웨스턴 불롯 분석을 수행하였다. 세 AML 세포주 (SKM-1, MV-4-11, 및 OCI-AML-3) 모두에서, 윤곽선 **3001**, **3003**, 및 **3005**내에 나타난 바와 같이, 보루시클립은 MCL-1를 억제하고 세포자멸사를 유도한다. 절단된 PARP (cPARP)는 세포자멸사의 바이오마커로 사용될 수 있다. 세 AML 세포주 (SKM-1, MV-4-11, 및 OCI-AML-3) 모두에서, 윤곽선 **3002**, **3004**, 및 **3006**에 나타난 바와 같이, 보루시클립 세포자멸사를 유도한다.

[0254] **실시예 14. 보루시클립 및 베네토클락스 조합은 AML 세포주에서 세포 사멸을 유도한다**

[0255] **도 31**은 보루시클립 및 베네토클락스의 조합이 AML 세포주에서 시너지적인 세포 사멸을 유도하는 것을 도시한다. AML 세포주 (SKM-1, MV-4-11, 및 OCI-AML-3)는 처리되지 않고 놔두거나 이전에 단일 약제 세포자멸사를 유도하는데 필요한 수준 이하로 나타난 수준의 보루시클립 (1.5 마이크로몰), 베네토클락스 (100 nM) 또는 부-영향(sub-effective) 농도로 조합한 두 약물에 24h 동안 노출되었다. 주어진 시점에, 세포들을 파쇄하고 인산화된 RNA pol II (pSer2), MCL-1, 절단된 PARP, 및 베타-액틴을 특이적으로 인식하는 항체로 웨스턴 불롯 분석을 수행하였다. 윤곽선 **3101** 및 **3102** 내에 나타난 바와 같이, 어느 것도 약제 단독으로는 세포자멸사를 유도하지 않을 때, 보루시클립 및 베네토클락스의 조합은 세포자멸사 (PARP)를 유도한다. 베네토클락스는 세 세포주 모두에서 MCL-1 상향 조절을 유도하는 것으로 관찰된다. 보루시클립은 세 세포주 모두에서 MCL-1 주도 내성 메카니즘을 약화시킨다.

[0256] **실시예 15. 보루시클립 및 베네토클락스 조합은 AML 이종 이식에서 종양 성장을 방해한다**

[0257] **도 32**는 보루시클립 및 베네토클락스가 SKM1 AML 이종 이식에서 종양 성장을 방해하는 것을 도시한다. 베네토클락스의 단일 약제 요법은 비히클과 유사한 정규화된 종양 부피를 가진다. 보루시클립 단일 약제 처리는 경미한 종양 부피 감소를 나타내는 반면, 보루시클립 및 베네토클락스의 조합은 종양 성장을 현저히 방해하여, 그 결과

연구 22일째에 비히클의 약 절반의 종양 부피를 가진다.

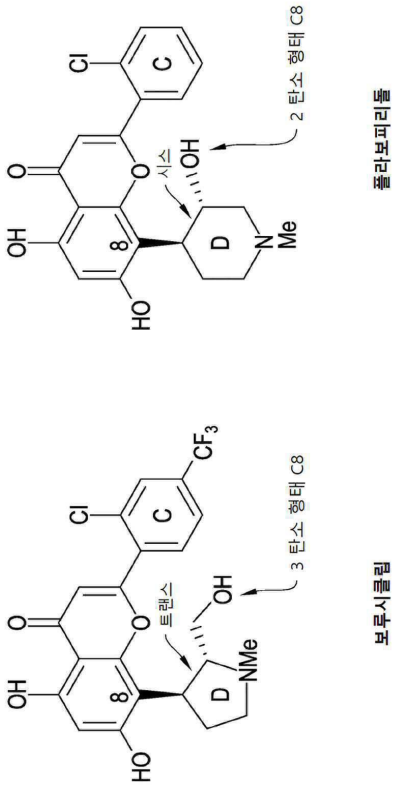
[0258] **실시예 16. 보루시클립은 DLBCL 모델에서 단일 약제로서 세포자멸사를 유도한다**

[0259] **도 33**은 보루시클립에 의해 유도된 세포자멸사가 MCL-1의 억제와 관련된 것을 도시한다. 세 DLBCL 모델: SUDHL4, RIvA, 및 U2932이 사용되었다. 절단된 PARP (cPARP)는 세포자멸사의 바이오마커로 사용될 수 있다. 웨스턴 블롯은 세포자멸사가 보루시클립의 농도가 증가함에 따라 증가한 것을 나타낸다. 유사하게, 보루시클립은 보루시클립의 농도가 증가함에 따라 MCL-1을 억제하고 세포자멸사를 유도한다.

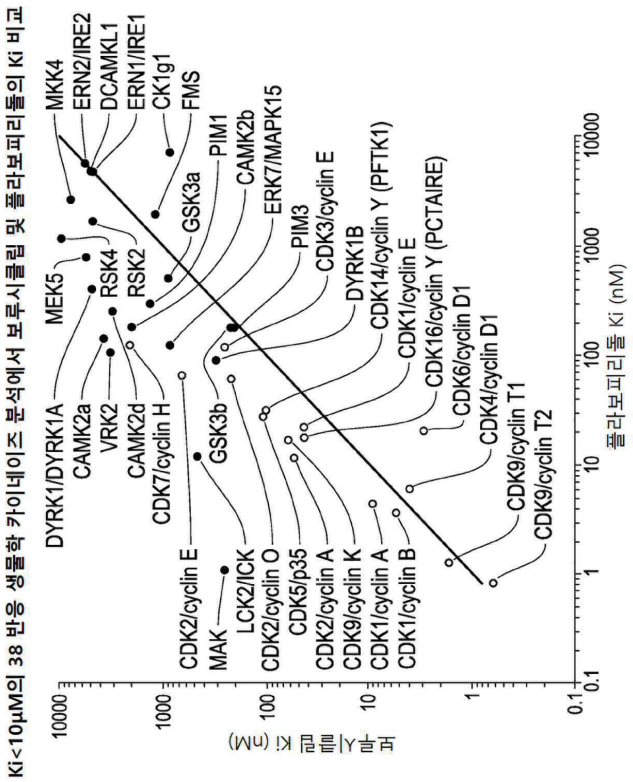
[0260] 본 발명의 바람직한 구현예가 본 발명에 표시되고 기재되었지만, 이러한 구현예가 단지 실시예의 방식으로 제공된다는 것이 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 본 발명에서 벗어나지 않고 통상의 기술자에게 수많은 변이, 변화, 및 대체가 이루어질 것이다. 본 발명에 기재된 본 발명의 구현예에 대한 다양한 대안이 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있음이 이해되어야 한다. 하기의 청구 범위는 본 발명의 범위를 정의하고 이들 청구 범위 내의 방법 및 구조 및 이들의 등가물은 이들에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

도면

도면1a

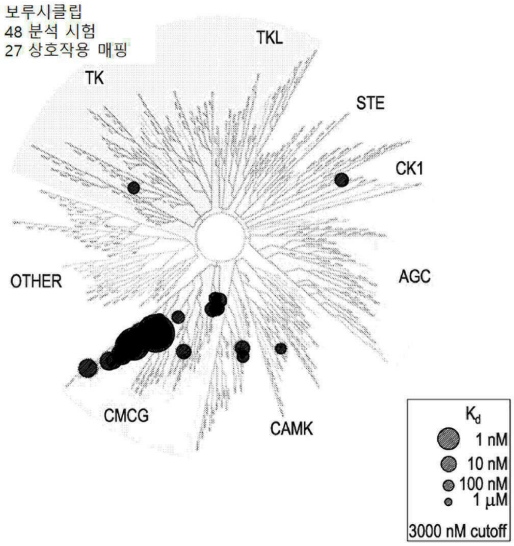


도면1b

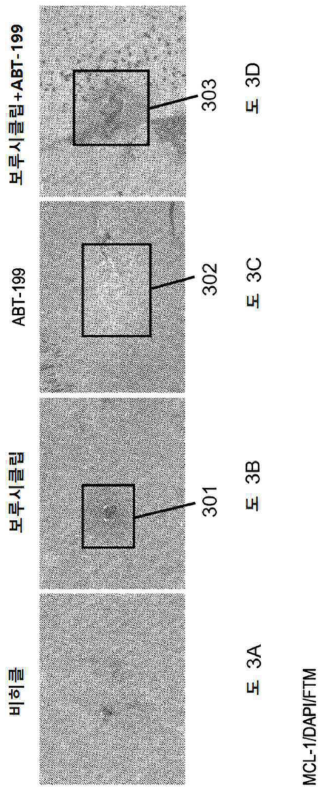


도면2

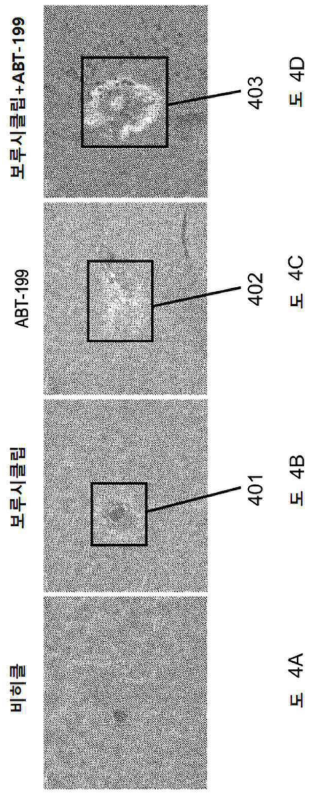
표적	Ki (nM)
CDK9/cyc T2	0.626
CDK9/cyc T1	1.68
CDK6/cyc D1	2.92
CDK4/cyc D1	3.96
CDK1/cyc B	5.4
CDK1/cyc A	9.1



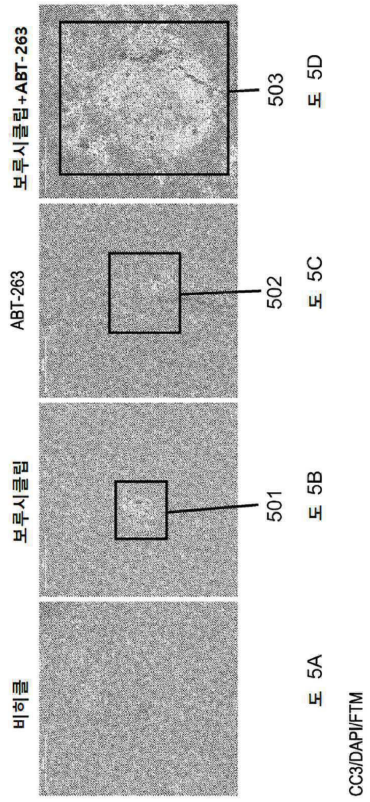
도면3


비히클
보루시클립
ABT-199
보루시클립+ABT-199
301
302
303
도 3A
도 3B
도 3C
도 3D
MCL-1/DAPI/FTM

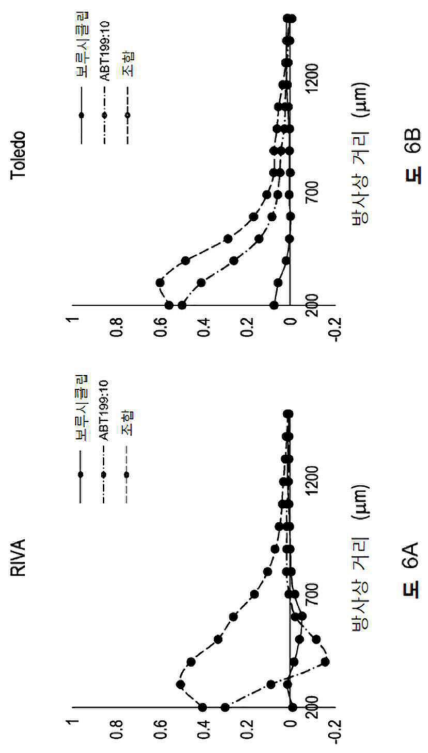
도면4


비히클
보루시클립
ABT-199
보루시클립+ABT-199
401
402
403
도 4A
도 4B
도 4C
도 4D

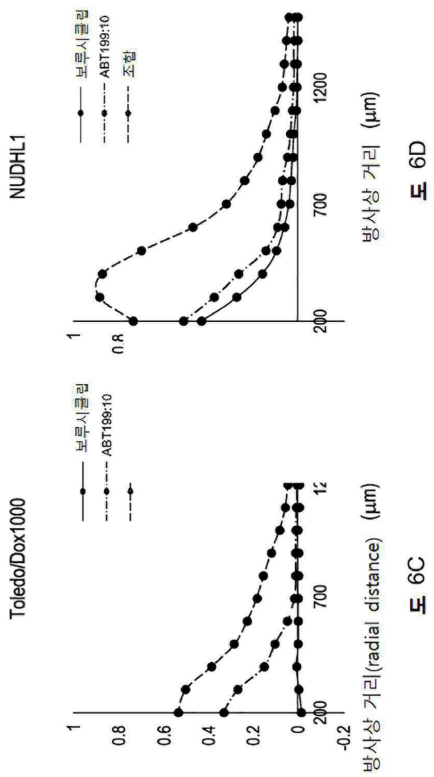
도면5


비히클
보루시클립
ABT-263
보루시클립+ABT-263
501
502
503
도 5A
도 5B
도 5C
도 5D
CC3/DAPI/FTM

도면6a


RIVA
Toledo
보루시클립
ABT199:10
조합
방사상 거리 (μm)
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
200
700
1200
도 6A
도 6B

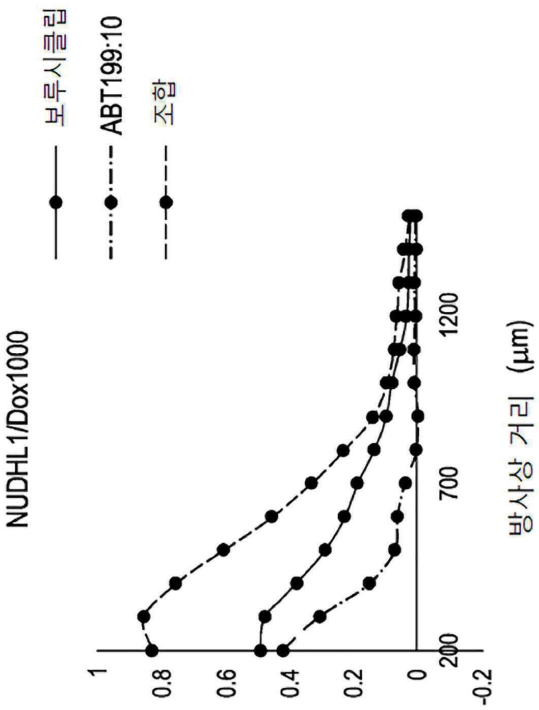
도면6b



도 6D

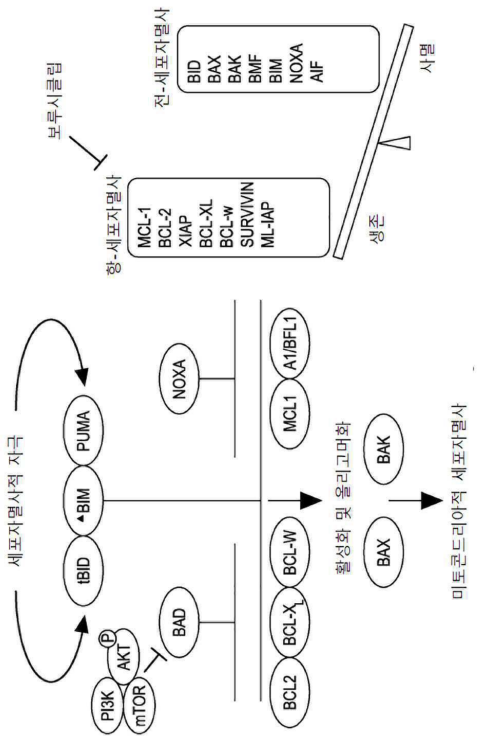
도 6C

도면6c



도 6E

도면7

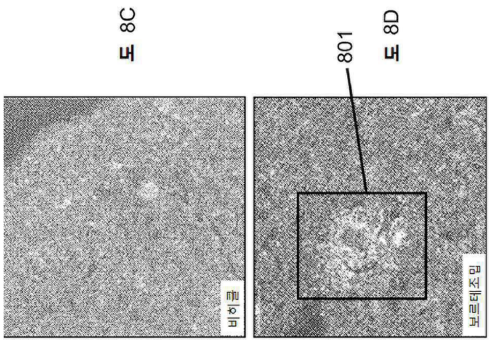


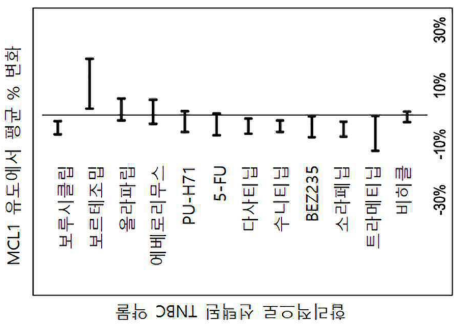
도면8a

HCC1187에서 CIVO 스크리닝	
화학/DNA 손상 약제	독소루비신
백금화제	카보플라틴
S기 독소	5-FU
유사분열 억제제	아브락산
PARP 억제제	올라파립
MEK 억제제	트라메티닙
mTOR 억제제	에베로리무스
PI2K 억제제	BEZ235
HSP90 억제제	PU-H71
JAK2 억제제	룩소리티닙(Ruxolitinib)
EGFR 억제제	에를로티닙
VEGFR TK	수니티닙
VEGFR TK	소라페닙
Src 억제제	다사티닙
프로테오좀 억제제	보르테조밉
프로테오좀 억제제	익사조밉

도 8A

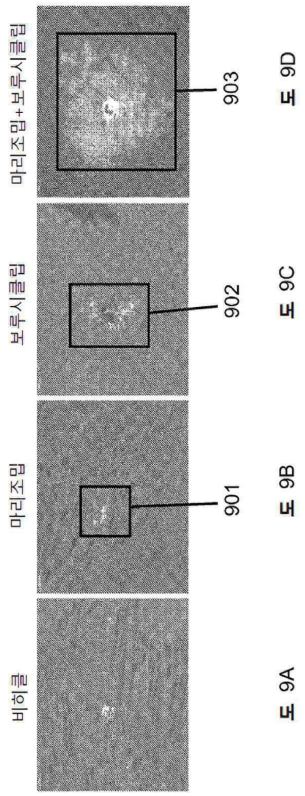
도면8b


도 8C
801
도 8D
비히클
보르테조밉

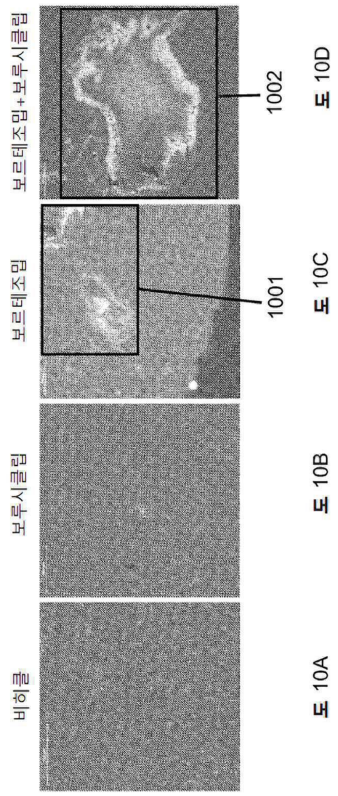

MCL1 유도에서 평균 % 변화
보루시클립
보르테조밉
올라파립
에베로리무스
PU-H71
5-FU
다사티닙
수니티닙
BEZ235
소라페닙
트라메티닙
비히클
-30%
-10%
10%
30%
합리적으로 선택된 TNBC 약물

도 8B

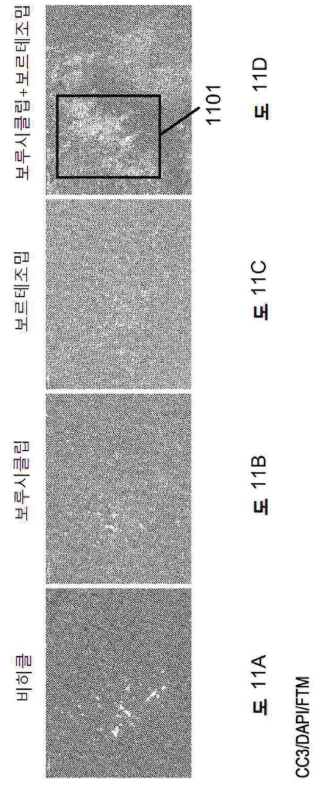
도면9


비히클
마리조밉
보루시클립
마리조밉+보루시클립
901
902
903
도 9A
도 9B
도 9C
도 9D

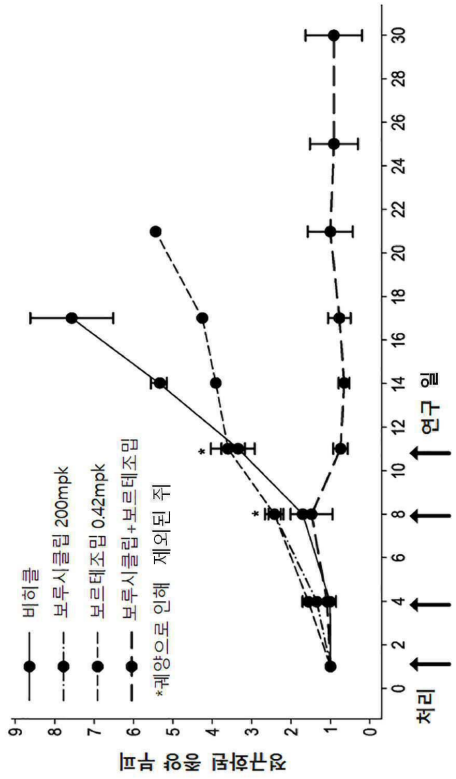
도면10


비히클
보루시클립
보르테조밉
보르테조밉+보루시클립
1001
1002
도 10A
도 10B
도 10C
도 10D

도면11

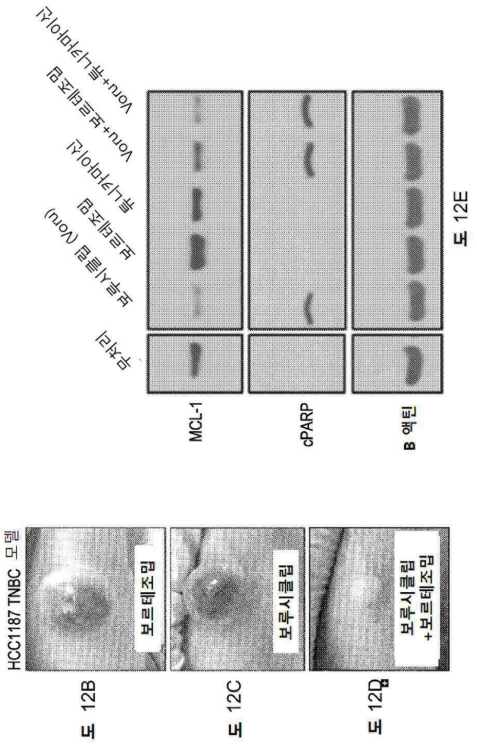

비히클
보루시클립
보르테조밉
보루시클립+보르테조밉
1101
도 11A
도 11B
도 11C
도 11D
CC3/DAPI/FTM

도면12a



도 12A

도면12b



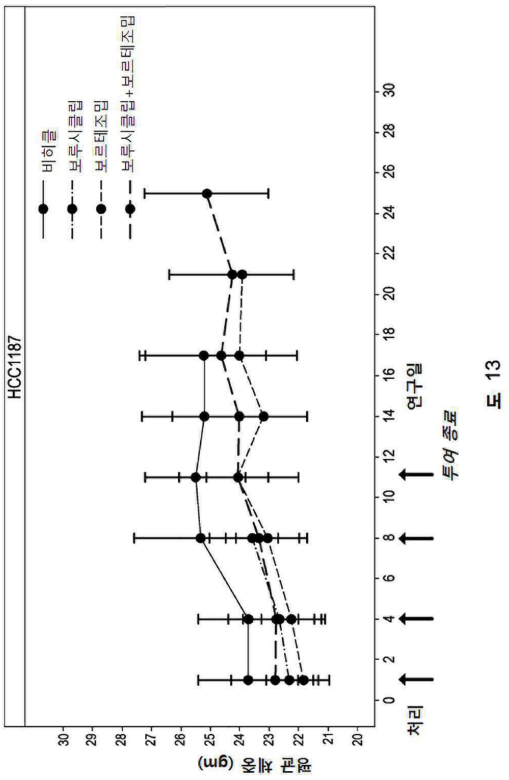
도 12B

도 12C

도 12D

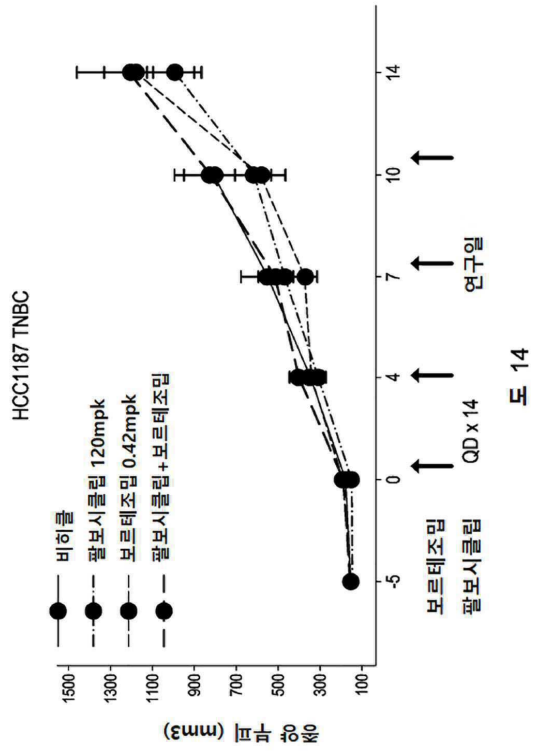
도 12E

도면13



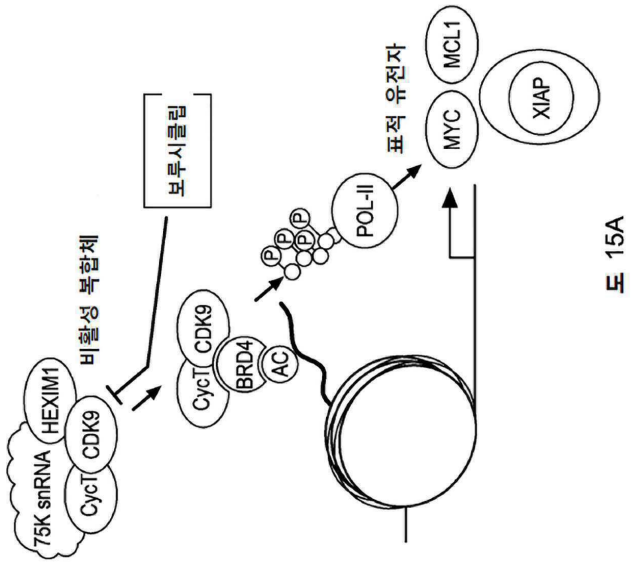
도 13

도면14



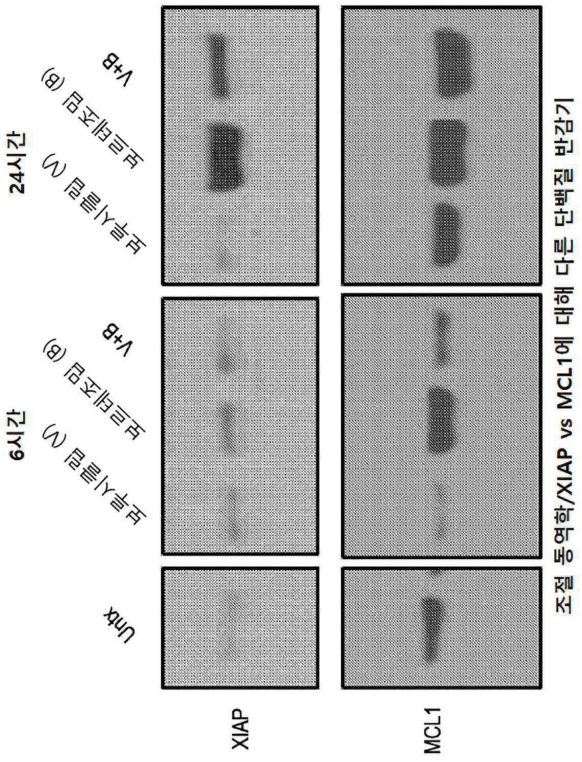
도 14

도면15a



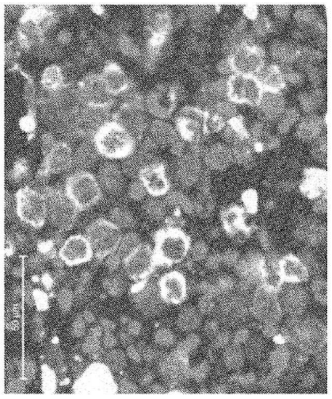
도 15A

도면15b

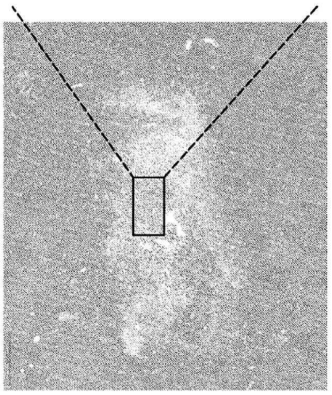


도 15B

도면16

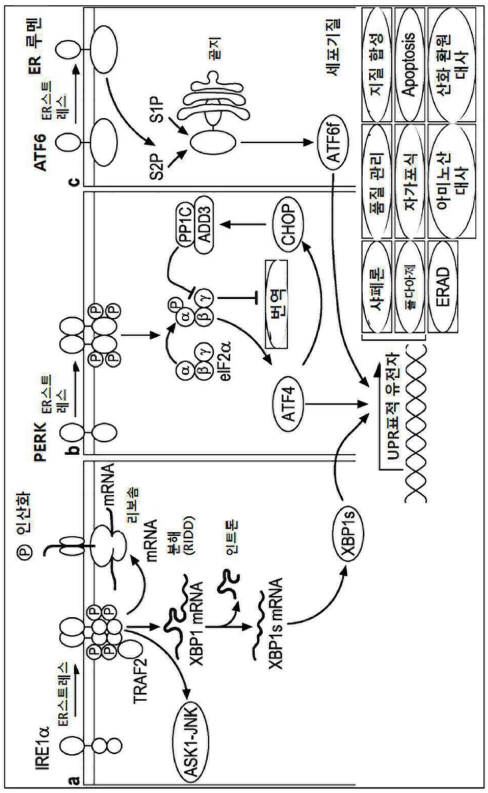


도 16B



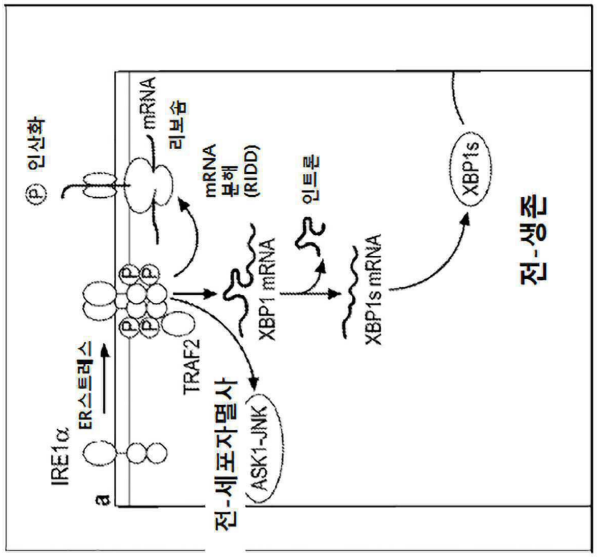
도 16A

도면17



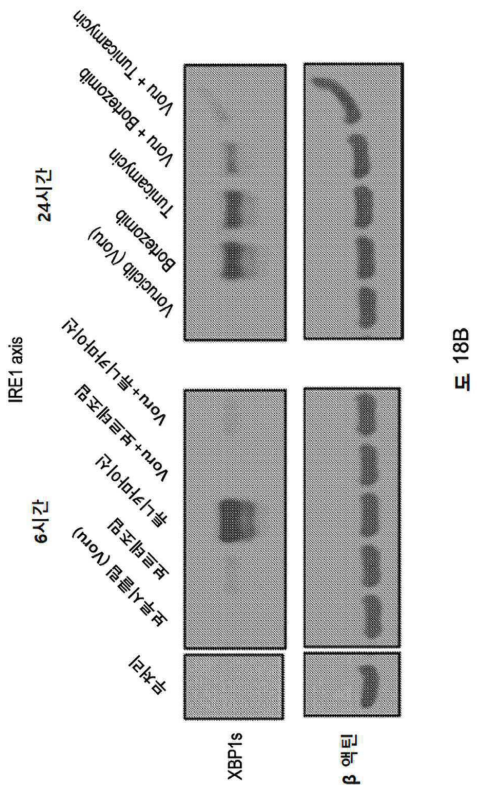
도 17

도면18a



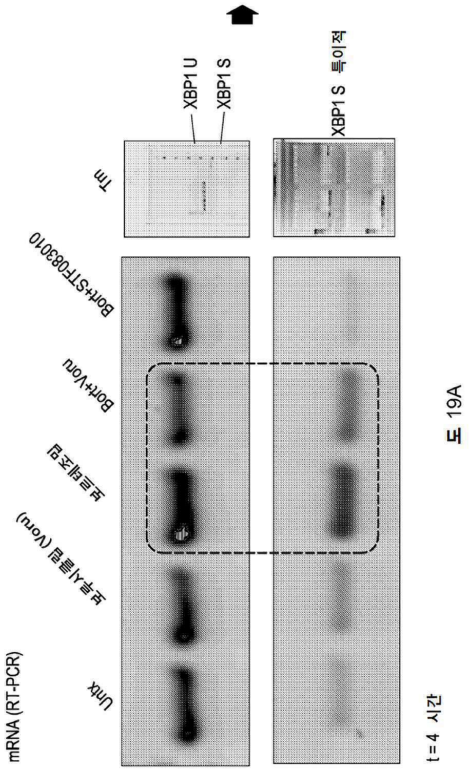
도 18A

도면18b



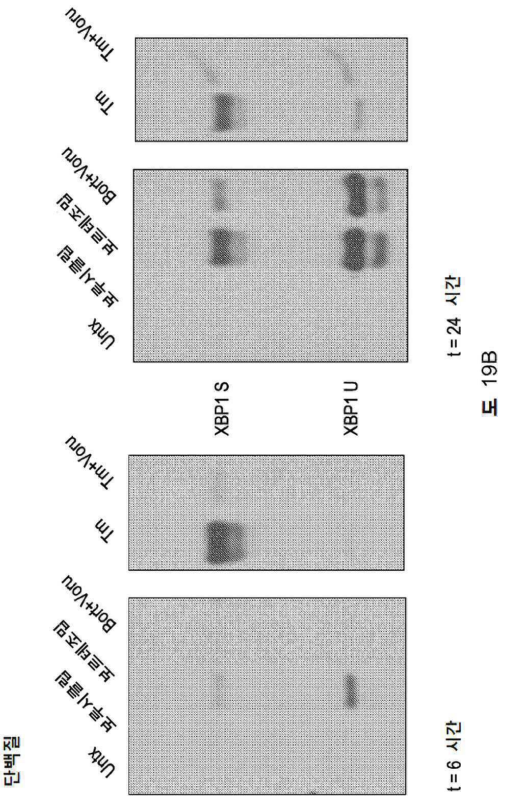
도 18B

도면19a



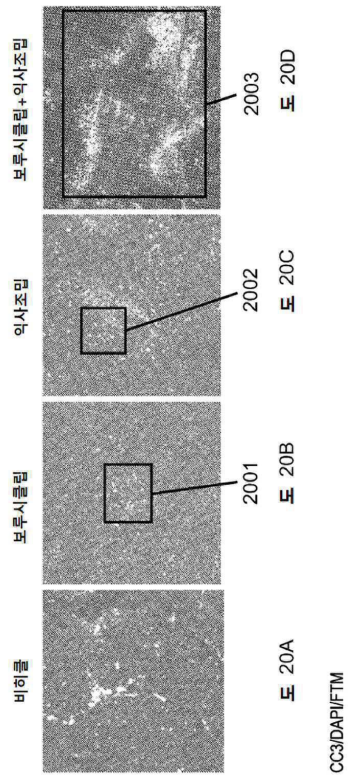
도 19A

도면19b

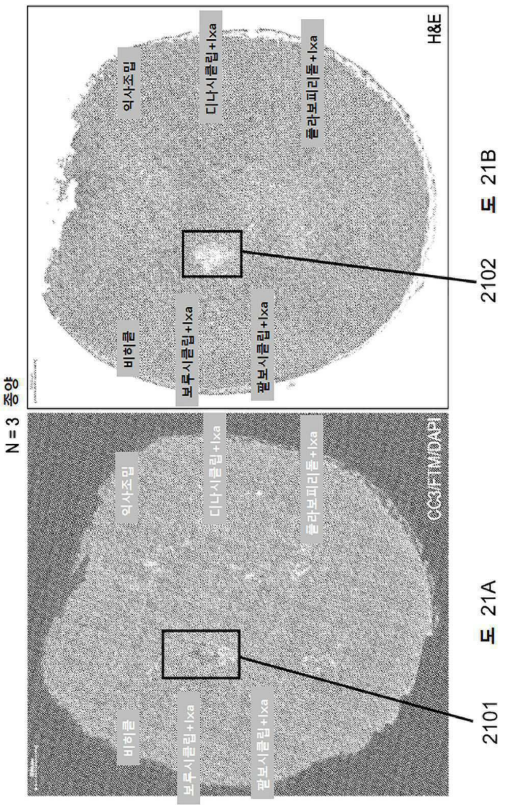


도 19B

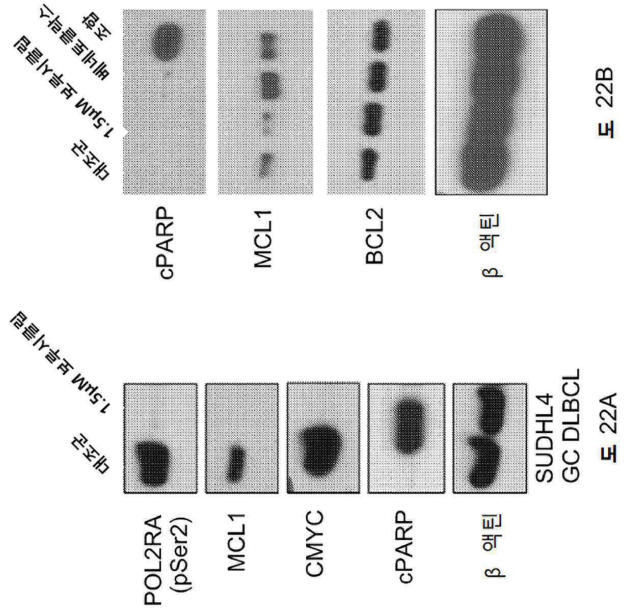
도면20


비히클
보루시클립
익사조밉
보루시클립+익사조밉
2001
2002
2003
도 20A
도 20B
도 20C
도 20D
CC3/DAPI/FTM

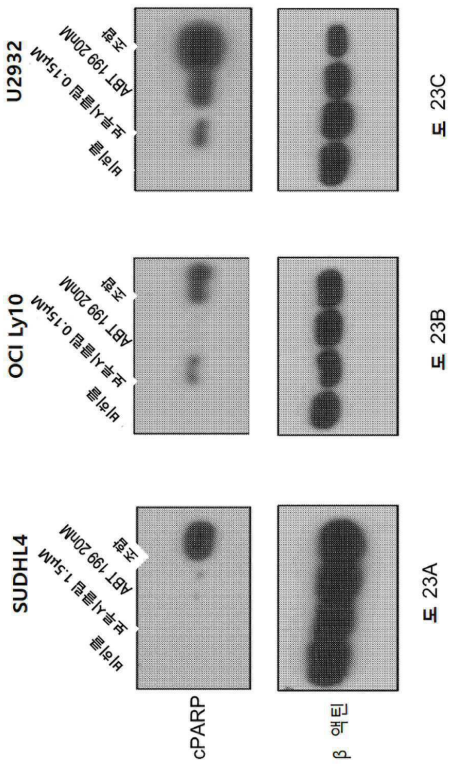
도면21


N = 3 중양
H&E
CC3/FITM/DAPI
비히클
보루시클립+Ixa
익사조밉
다나시클립+Ixa
글보시클립+Ixa
클라보피리톨+Ixa
2101
2102
도 21A
도 21B

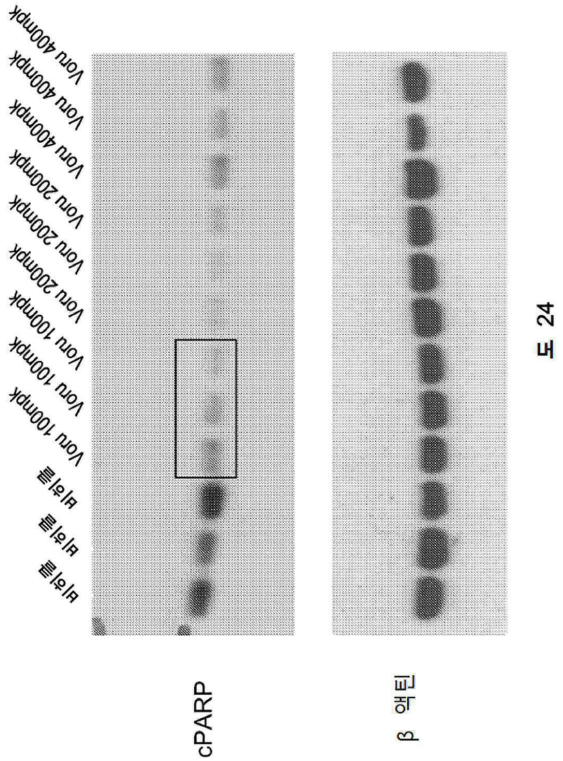
도면22


POL2RA (pSer2)
MCL1
CMYC
cPARP
β 액틴
SUDHL4 GC DLBCL
도 22A
cPARP
MCL1
BCL2
β 액틴
도 22B

도면23

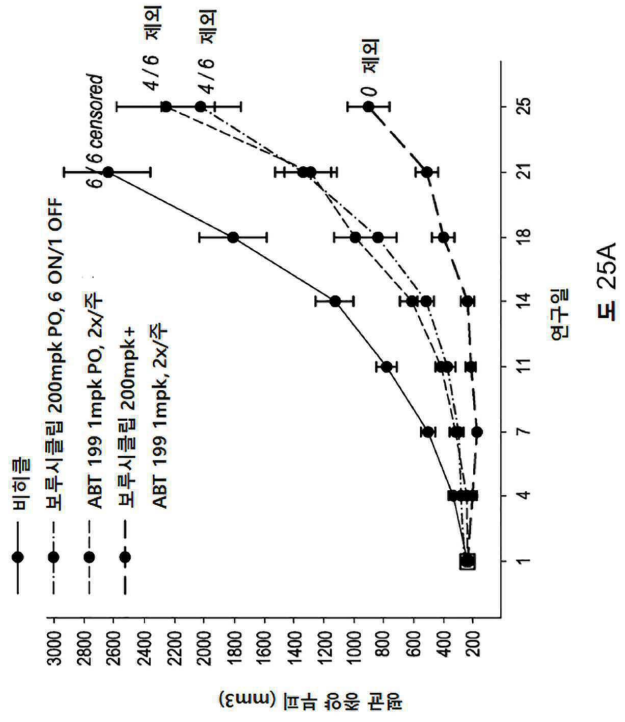

SUDHL4
OCI Ly10
U2932
cPARP
β 액틴
도 23A
도 23B
도 23C

도면24



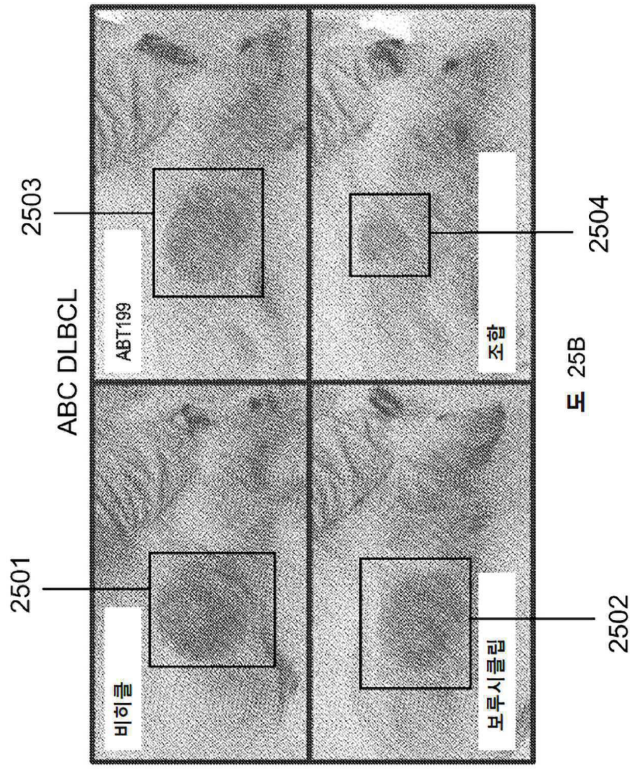
도 24

도면25a



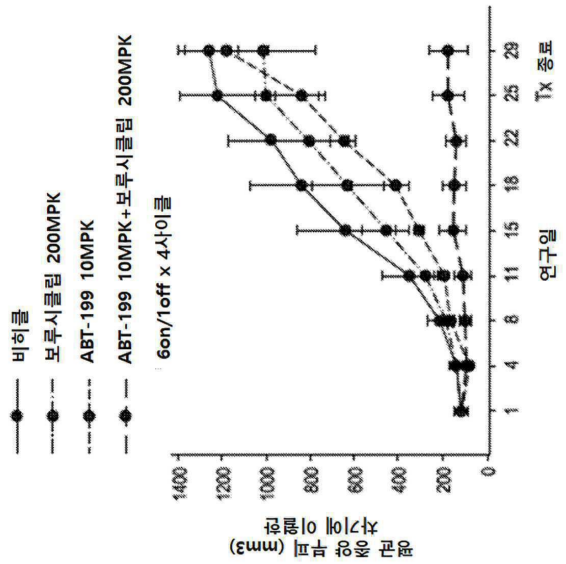
도 25A

도면25b



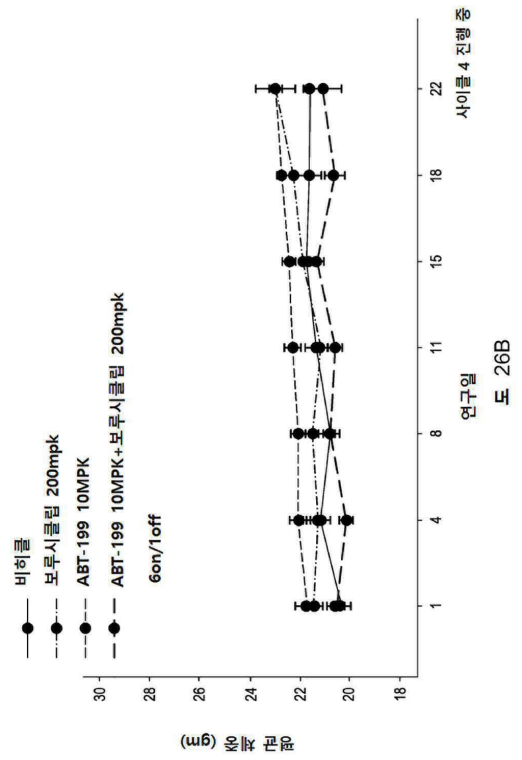
도 25B

도면26a



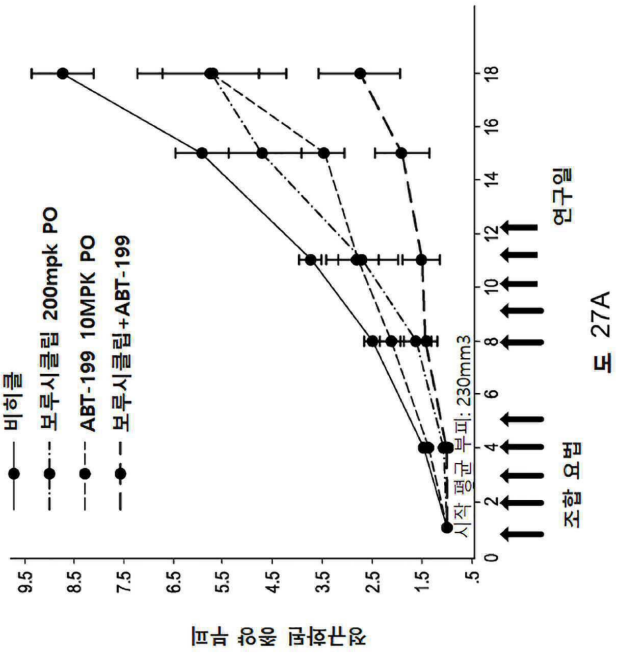
도 26A

도면26b



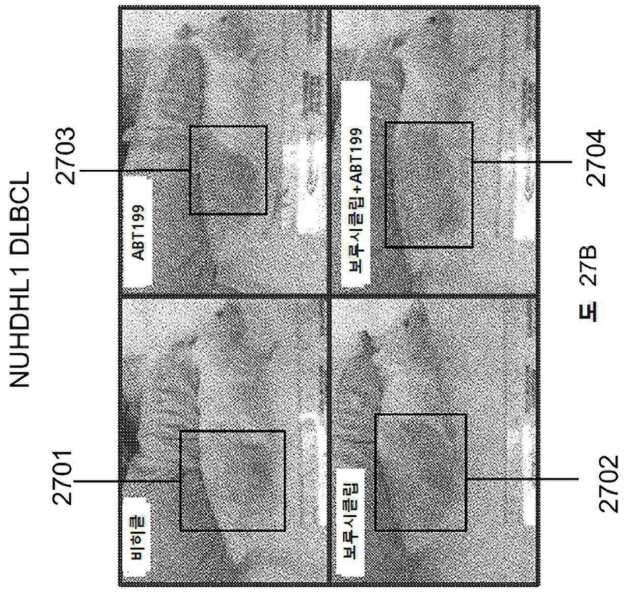
도 26B

도면27a



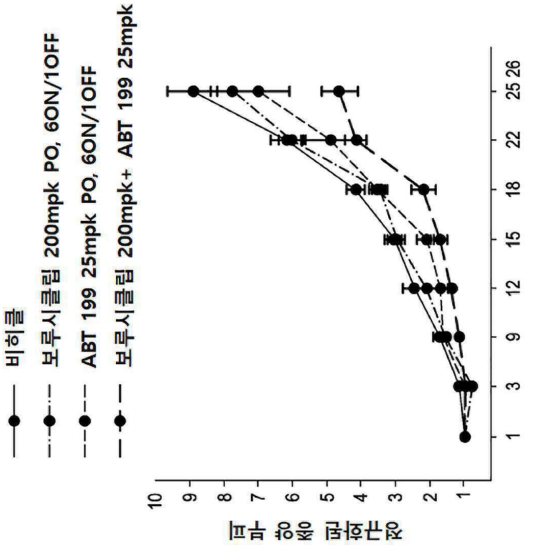
도 27A

도면27b



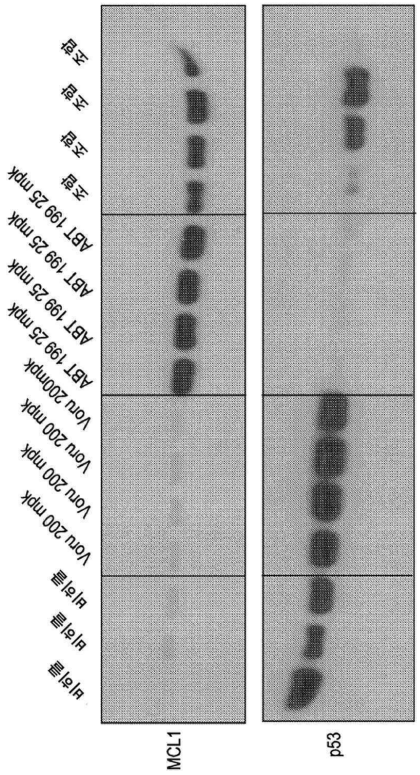
도 27B

도면28



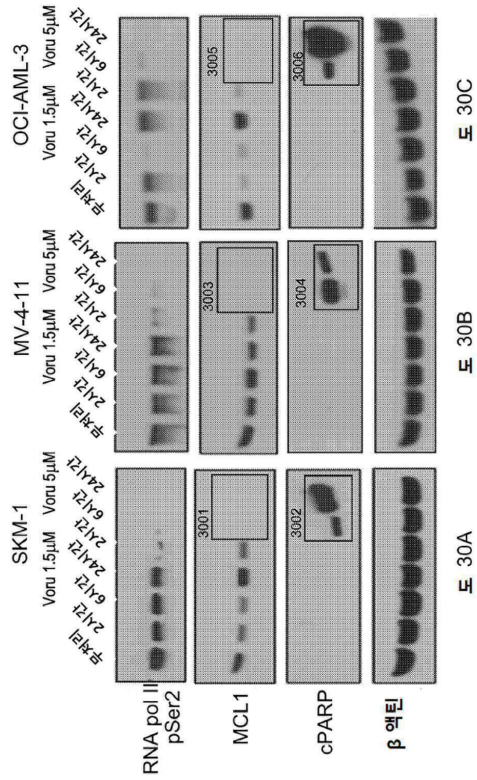
도 28

도면29



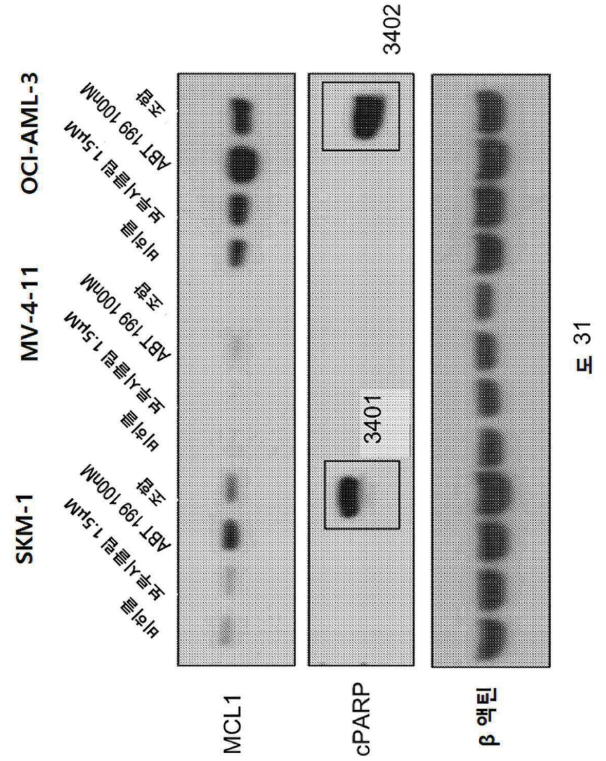
도 29

도면30



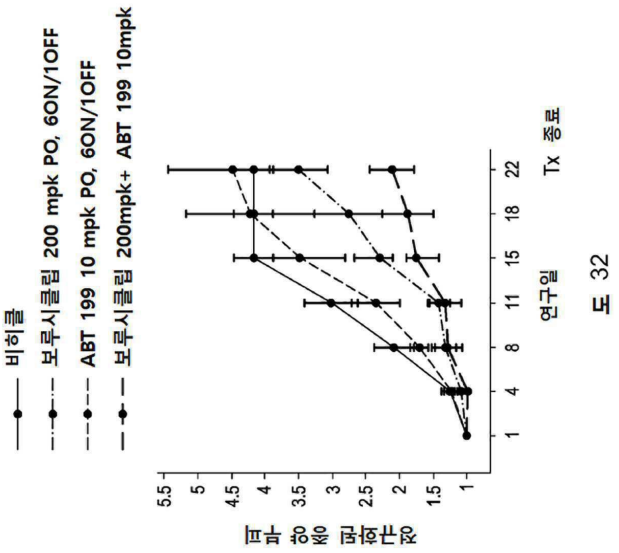
도 30A 도 30B 도 30C

도면31



도 31

도면32



도 32

도면33

