



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0099217
(43) 공개일자 2012년09월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/519 (2006.01) A61K 31/505 (2006.01)
A61K 31/501 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7010300
(22) 출원일자(국제) 2010년09월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년04월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/050495
(87) 국제공개번호 WO 2011/038380
국제공개일자 2011년03월31일
(30) 우선권주장
61/246,265 2009년09월28일 미국(US)
61/385,738 2010년09월23일 미국(US)

(71) 출원인
글락소스미스클라인 엘엘씨
미국 델라웨어 카운티 오브 뉴 캐슬 월링턴 스위트 400 센터빌 로드 2711 코포레이션 서비스 컴퍼니 (우: 19808)
(72) 발명자
아우거, 커트, 알.
미국 19422 펜실베이니아주 칼리지빌 사우쓰 칼리지빌 로드 1250
바크만, 커티스, 얼
미국 19426 펜실베이니아주 칼리지빌 사우쓰 칼리지빌 로드 1250
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
심미성, 장수길, 양영환

전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 **조합물**

(57) 요약

본 발명은 포유동물에서의 암의 치료 방법 및 그러한 치료에 유용한 제약 조합물에 관한 것이다. 특히, 상기 방법은 MEK 억제제: N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 PI3 키나제 억제제: 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는 신규한 조합물, 이를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다.

(72) 발명자

길머, 토나, 엠.

미국 27709 노스 캐롤라이나주 리서치 트라이앵글
파크 파이프 무어 드라이브

그리거, 제임스, 지., 주니어

미국 19426 펜실베이니아주 칼리지빌 사우스 칼리지
빌 로드 1250

그리쇼크, 조엘, 데이비드

미국 19426 펜실베이니아주 칼리지빌 사우스 칼리지
빌 로드 1250

라퀴레, 실비에

미국 19406 펜실베이니아주 킹 오브 프리시아 스웨
델란드 로드 709

리우, 리

미국 19406 펜실베이니아주 킹 오브 프리시아 스웨
델란드 로드 709

모리스, 샤논, 레네

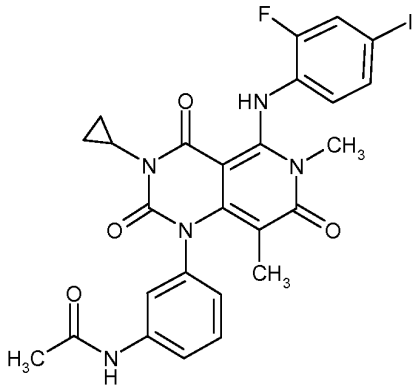
미국 27709 노스 캐롤라이나주 리서치 트라이앵글
파크 파이프 무어 드라이브

특허청구의 범위

청구항 1

(i) 하기 구조식 I의 제1 화합물:

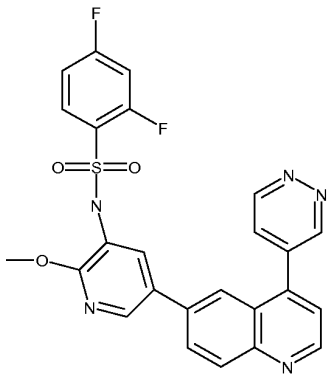
<화학식 I>



또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물; 및

(ii) 하기 구조식 II로 표시되는 제2 화합물:

<화학식 II>



또는 그의 제약상 허용되는 염

을 포함하는 조합물.

청구항 2

제1항에 있어서, 구조식 I의 화합물이 수화물인 조합물.

청구항 3

제1항에 있어서, 구조식 I의 화합물이 아세트산, 에탄올, 니트로메탄, 클로로벤젠, 1-펜탄올, 이소프로필 알콜, 에틸렌 글리콜, 3-메틸-2-부탄올 및 디메틸 술폭시드로 이루어진 군으로부터 선택되는 용매화물인 조합물.

청구항 4

제1항에 있어서, 구조식 I의 화합물이 디메틸 술폭시드 용매화물인 조합물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 조합물을 제약상 허용되는 담체 또는 담체들과 함께 포함하는 조합 키트.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 구조식 I의 화합물 또는 그의 용매화물의 양이 0.125 mg 내지 10 mg으로부터 선택되는 양이고, 구조식 II의 화합물의 양이 0.05 mg 내지 10 mg으로부터 선택되는 양인 조합물.

청구항 7

N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물 및 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물의 조합물의 치료 유효량을 암의 치료를 필요로 하는 인간에게 투여하는 것을 포함하며,

여기서 상기 조합물은 특정 기간 이내에 투여되며,

상기 조합물은 지속 기간 동안 투여되는 것인,

암의 치료를 필요로 하는 인간에서의 암의 치료 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물의 양이 약 0.5 mg 내지 약 4 mg으로부터 선택되고, 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물의 양이 약 0.5 mg 내지 약 5 mg으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물의 양이 약 0.125 mg 내지 약 3 mg으로부터 선택되고, 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물의 양이 약 0.05 mg 내지 약 3 mg으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 상기 양의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물이 연속 7일 이상의 기간 동안 매일 서로에 대해 12시간 이내에 투여되고, 이어서 임의로 1회 이상의 반복 투여 사이클이 후속되는 것인 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 상기 양의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물이 연속 7일 이상의 기간 동안 매일 서로에 대해 24시간 이내에 투여되고, 이어서 임의로 1회 이상의 반복 투여 사이클이 후속되는 것인 방법.

청구항 12

약 0.125 mg 내지 10 mg의 N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물을 암의 치료를 필요로 하는 인간에게 제1일부터 제30일까지 1일 1회 투여하고, 이어서 임의로 후속하여 1회 이상의 사이클을 반복하고; 약 0.05 mg 내지 10 mg의 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매

화물을 상기 인간에게 제1일부터 제30일까지 주기적으로 투여하고, 이어서 임의로 후속하여 1회 이상의 사이클을 반복하는 것을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 인간에서의 암의 치료 방법.

청구항 13

약 0.5 mg 내지 4 mg의 N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물을 암의 치료를 필요로 하는 인간에게 제1일부터 제30일까지 1일 1회 투여하고, 이어서 임의로 후속하여 1회 이상의 사이클을 반복하고; 약 0.5 mg 내지 5 mg의 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물을 상기 인간에게 제1일부터 제30일까지 주기적으로 투여하고, 이어서 임의로 후속하여 1회 이상의 사이클을 반복하는 것을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 인간에서의 암의 치료 방법.

청구항 14

약 0.05 mg 내지 10 mg의 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물을 암의 치료를 필요로 하는 인간에게 제1일부터 제30일까지 1일 1회 또는 2회 투여하고, 이어서 임의로 후속하여 1회 이상의 사이클을 반복하고; 약 0.125 mg 내지 10 mg의 N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물을 상기 인간에게 제1일부터 제30일까지 주기적으로 투여하고, 이어서 임의로 후속하여 1회 이상의 사이클을 반복하는 것을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 인간에서의 암의 치료 방법.

청구항 15

약 0.5 mg 내지 5 mg의 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물을 암의 치료를 필요로 하는 인간에게 제1일부터 제30일까지 1일 1회 또는 2회 투여하고, 이어서 임의로 후속하여 1회 이상의 사이클을 반복하고; 약 0.5 mg 내지 4 mg의 N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물을 상기 인간에게 제1일부터 제30일까지 주기적으로 투여하고, 이어서 임의로 후속하여 1회 이상의 사이클을 반복하는 것을 포함하는, 암의 치료를 필요로 하는 인간에서의 암의 치료 방법.

청구항 16

제12항 또는 제13항에 있어서, 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드가 2 내지 4일 마다 1회 투여되고, 이어서 임의로 후속하여 1회 이상의 사이클이 반복되는 것인 방법.

청구항 17

제12항 또는 제13항에 있어서, 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드가 5 내지 7일 마다 1회 투여되고, 이어서 임의로 후속하여 1회 이상의 사이클이 반복되는 것인 방법.

청구항 18

제12항 또는 제13항에 있어서, 2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드가 8 내지 15일 마다 1회 투여되고, 이어서 임의로 후속하여 1회 이상의 사이클이 반복되는 것인 방법.

청구항 19

제14항 또는 제15항에 있어서, N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드 디메틸 술폰옥시드가 2 내지 4일 마다 1회 투여되고, 이어서 임의로 후속하여 1회 이상의 사이클이 반복되는 것인 방법.

청구항 20

제14항 또는 제15항에 있어서, N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드 디메틸 술폭시드가 5 내지 7일 마다 1회 투여되고, 이어서 임의로 후속하여 1회 이상의 사이클이 반복되는 것인 방법.

청구항 21

제14항 또는 제15항에 있어서, N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드 디메틸 술폭시드가 8 내지 15일 마다 1회 투여되고, 이어서 임의로 후속하여 1회 이상의 사이클이 반복되는 것인 방법.

청구항 22

제12항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암이 결장암, 폐암, 간암, 췌장암 또는 유방암인 방법.

청구항 23

제12항 또는 제14항에 있어서, 상기 암이 췌장암, 결장암 또는 폐암인 방법.

청구항 24

제13항 또는 제15항에 있어서, 상기 암이 유방암인 방법.

청구항 25

제23항에 있어서, 상기 암이 KRAS 돌연변이인 방법.

청구항 26

제22항에 있어서, 상기 유방암이 ER 음성 유방암인 방법.

청구항 27

제22항에 있어서, 상기 유방암이 기저양 (basal-like) 유방암인 방법.

청구항 28

제22항에 있어서, 상기 유방암이 삼중 음성 암인 방법.

청구항 29

제22항에 있어서, 상기 암이 간암인 방법.

청구항 30

제22항에 있어서, 상기 암이 췌장암인 방법.

청구항 31

제24항에 있어서, 상기 암이 HER2 음성, ER 음성 및 PR 음성 암인 방법.

청구항 32

제29항에 있어서, 상기 간암이 NRAS 돌연변이인 방법.

청구항 33

제22항에 있어서, 상기 암이 HER2 양성 유방암인 방법.

청구항 34

제7항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드가 디메

틸 술폭시드 용매화물 형태로 투여되는 것인 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 포유동물에서 암을 치료하는 방법, 및 이러한 치료에 유용한 조합물에 관한 것이다. 특히, 상기 방법은 MEK 억제제: *N*-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-*d*]피리미딘-1(2*H*)-일]페닐]아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 PI3K 억제제: 2,4-디플루오로-*N*-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는 신규한 조합물, 이를 포함하는 제약 조성물, 및 암의 치료에서 이러한 조합물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 암을 비롯한 과증식성 장애의 효과적 치료는 종양학 분야에서 지속적인 목표이다. 일반적으로, 암은 세포 분열, 분화, 및 아포토시스성 세포 사멸을 제어하는 정상적인 과정의 조절이상에 의해 초래된다. 아포토시스(예정된 세포 사멸)는 배아 발생 및 다양한 질병, 예컨대, 퇴행성 신경 질환, 심혈관 질환 및 암의 발병기전에서 필수적인 역할을 수행한다. 아포토시스의 키나제 조절이 관련된 가장 많이 연구된 경로 중 하나는, 세포 표면의 성장 인자 수용체로부터 핵으로의 세포 신호전달이다 (문헌 [Crews and Erikson, Cell, 74:215-17, 1993]).

[0003] 효소의 중요한 큰 패밀리는 단백질 키나제 효소 패밀리이다. 현재, 약 500 가지의 상이한 단백질 키나제가 공지되어 있다. 단백질 키나제는 ATP-Mg²⁺ 복합체의 γ -포스페이트를 아미노산 측쇄로 전달하여 다양한 단백질에서 아미노산 측쇄의 인산화를 촉매하는 역할을 한다. 이러한 효소는 세포 내부에서 신호전달 과정의 대부분을 조절하여, 단백질 내 세린, 트레오닌 및 티로신 잔기의 히드록실기의 가역적 인산화를 통해 세포 기능, 성장, 분화 및 파괴(아포토시스)를 관장한다. 단백질 키나제가 신호 전달, 전사 조절, 세포 운동성 및 세포 분열을 비롯한 수많은 세포 기능의 핵심 조절인자임이 연구를 통해 제시되어 왔다. 또한 여러 종양 유전자가 단백질 키나제를 코딩함이 제시되어 왔고, 이는 키나제가 종양발생에서 소정의 역할을 함을 시사하였다. 이들 과정은, 종종 각각의 키나제 그 자체가 하나 이상의 키나제에 의해 조절될 복잡한 서로 맞물리는 경로에 의해 고도로 조절된다. 따라서, 이상이 있거나 부적절한 단백질 키나제 활성화, 양성 및 악성 증식성 질환 및 또한 면역계 및 신경계의 부적절한 활성화로부터 초래되는 질환을 비롯한, 그러한 이상 키나제 활성화와 관련한 질환 상태의 유발에 기여할 수 있다. 이들의 생리학적 관련성, 다양성 및 편재성으로 인해, 단백질 키나제는 생화학 및 의학 연구에서 가장 중요하고 널리 연구되는 효소의 패밀리 중 하나가 되었다.

[0004] 효소의 단백질 키나제 패밀리는 통상적으로 이들이 인산화하는 아미노산 잔기에 따라 2가지 주요 하위패밀리: 단백질 티로신 키나제 및 단백질 세린/트레오닌 키나제로 분류된다. 단백질 세린/트레오닌 키나제 (PSTK)에는 시클릭 AMP- 및 시클릭 GMP-의존성 단백질 키나제, 칼슘 및 인지질 의존성 단백질 키나제, 칼슘- 및 칼모듈린-의존성 단백질 키나제, 카세인 키나제, 세포 분열 주기 단백질 키나제 등이 포함된다. 이들 키나제는 통상적으로 세포질성이거나, 또는 (아마도 고정 (anchoring) 단백질에 의해) 세포의 미립 분획과 회합한다. 이상 단백질 세린/트레오닌 키나제 활성화는 류마티스성 관절염, 건선, 폐혈성 쇼크, 골 손실, 다수의 암 및 기타 증식성 질환과 같은 다수의 병리에 연관되었거나, 또는 연관이 있는 것으로 의심된다. 따라서, 세린/트레오닌 키나제 및 이들이 그 중 일부인 신호 전달 경로는 약물 설계의 중요한 표적이다. 티로신 키나제는 티로신 잔기를 인산화한다. 티로신 키나제는 세포 조절에 있어 동등하게 중요한 역할을 한다. 이들 키나제에는 표피 성장 인자 수용체, 인슐린 수용체, 혈소판 유래 성장 인자 수용체 등을 비롯한 성장 인자 및 호르몬과 같은 분자에 대한 다수의 수용체가 포함된다. 연구에서 다수의 티로신 키나제는, 그의 수용체 도메인이 세포 외부에 위치하고 키나제 도메인이 내부에 있는 막횡단 단백질임이 나타났다. 또한 티로신 키나제의 조절자를 확인하기 위한 다수의 연구가 진행 중에 있다.

[0005] 미토젠-활성화 단백질 키나제 (MAPK) 키나제/세포의 신호-조절 키나제 (ERK) 키나제 (이후 MEK로 지칭됨)는 여러 세포 과정의 조절에 관여하는 것으로 공지되어 있다. Raf 패밀리 (B-Raf, C-Raf 등)는 MEK 패밀리 (MEK-1, MEK-2 등)를 활성화시키고, MEK 패밀리는 ERK 패밀리 (ERK-1 및 ERK-2)를 활성화시킨다. 넓게 보면, RAF/MEK/ERK 경로의 신호전달 활성화는 mRNA 번역을 제어한다. 이는 세포 주기와 관련된 유전자를 포함한다. 따라서, 이러한 경로의 과활성화는 제어되지 않은 세포 증식을 야기할 수 있다. ERK 과활성화에 의한

RAF/MEK/ERK 경로의 조절이상은 모든 인간 악성종양의 대략 30%에서 보여진다 (문헌 [Allen, LF, *et al.* Semin. Oncol. 2003. 30(5 Suppl 16):105-16]). PI3K/AKT 및 RAF/MEK/ERK 둘 다를 통해 신호전달할 수 있는 RAS는 모든 암의 15%에서 돌연변이된 발암 단백질을 가진다 (문헌 [Davies, H. *et al.* Nature. 2002. 417:949-54]). 또한, BRAF 돌연변이의 활성화는 특정 종양 유형 (예, 흑색종)에서 높은 빈도로 확인되었다 (문헌 [Davies, H. *et al.* Nature. 2002. 417:949-54]). MEK 자체에서 돌연변이를 활성화시키는 것은 인간 암에서 빈번히 나타나지 않으나, MEK의 ERK 경로에서의 중추적인 역할에 기인하여 MEK는 인간 암 치료의 중요한 약물 표적인 것으로 생각된다. 또한, MEK 억제 활성화는 ERK1/2 활성화의 억제를 효과적으로 유도하고 세포 증식을 억제하며 (문헌 [The Journal of Biological Chemistry, vol. 276, No. 4, pp. 2686-2692, 2001]), 그 화합물은 종양 발생 및/또는 암과 같은 바람직하지 않은 세포 증식에 의해 야기되는 질환에 효과를 나타낼 것으로 예상된다.

[0006] 포스포이노시티드 3-키나제 (PI3K) 경로는 인간 암에서 가장 통상적으로 활성화된 경로 중 하나이다. 종양 형성 및 종양 진행에서 이러한 경로의 기능 및 중요성은 잘 확립되어 있다 (문헌 [Samuels & Ericson. Curr. Opp in Oncology, 2006. 18: 77-82]). PI3K-AKT 신호전달은 세포 생존, 증식 및 대사의 중심이 되는 조절자인 것으로 보인다. 이에 라파마이신의 포유동물 표적 (mTOR), PI3K 단백질 패밀리 구성원 및 세포 성장 및 번역의 직접 조절인자의 활성화가 포함된다. 따라서, 종양에서 PI3K/AKT/mTOR 신호전달의 조절이상은 무한정 생식 가능성 및 아포토시스의 회피를 포함한 악성종양의 다수의 특징을 나타내는 세포 표현형에 기여한다 (문헌 [Hanahan & Weinberg, Cell. 2000. 100:57-70]).

[0007] PI3K 패밀리는 특히 그의 키나제 도메인 내에서 서열 상동성을 공유하는 15개의 단백질로 이루어지나, 이들은 구별되는 기질 특이성 및 조절 모드를 갖는다 (문헌 [Vivanco & Sawyers. Nat. Rev. Cancer, 2002.2:489-501]). 클래스 I PI3-키나제는 3 위치에 포스포타르티르노시톨 (PtdIns)로 공지된 이노시톨-함유 지질을 인산화한다. 클래스 I 패밀리 구성원의 1차 기질 PtdIns-4,5-P2 (PIP2)는 이러한 키나제에 의해 PtdIns-3,4,5-P3 (PIP3)으로 전환된다. PIP3은 플렉스트린 상동성 도메인을 함유하는 단백질을 세포막으로 동원하여 활성화되게 하는, 결정적인 제2 메신저이다. 이러한 단백질 중 가장 많이 연구된 것은 세포 생존, 성장 및 증식을 촉진하는 AKT이다. 활성화시 AKT는 세포질 및 핵으로 이동하여 mTOR (TORC1)을 비롯한 다수의 기질을 인산화한다. AKT에 부가적으로, PI3K는 발암에 연루된 다른 경로, 예컨대, PDK1, CDC42 및 RAC1을 활성화한다 (문헌 [Samuels & Ericson. Curr. Opp in Oncology, 2006. 18: 77-82]).

[0008] 인간 종양 연구에서, PI3K/AKT/mTOR 신호전달 경로의 활성화는 다수의 기작을 통해 일어날 수 있다. 경로의 유전적 조절이상은 흔하며 여러 방식으로 일어날 수 있다 (문헌 [Samuels & Ericson. Curr. Opp in Oncology, 2006. 18: 77-82]에서 검토됨). (PI3K의 p110 α 촉매적 서브유닛을 코딩하는) PIK3CA 유전자의 활성화 돌연변이는 유방암, 난소암, 자궁내막암 및 결장직장암을 비롯한 인간 종양의 상당한 비율에서 나타난다. 이러한 유전자의 활성화 DNA 증폭은 또한 다수의 상이한 종양 유형에서 덜 빈번하게 나타난다. PIK3R1과 PIK3CA 사이의 C2-iSH2 상호작용을 교란하는 것으로 여겨지는, PI3K의 p85 α 조절 서브유닛 (PIK3R1)에서의 돌연변이는 난소암, 교모세포종 및 결장직장암에서 나타난다. PIP3을 탈인산화하여 PIP2를 생성시킴으로써 PI3K 경로의 억제제로서 작용하는 종양 억제자 PTEN은 흔하게 돌연변이되거나, 결실되거나 후생적으로 침묵된다. 마지막으로, 상기 경로는 또한 AKT의 DNA 증폭 또는 돌연변이에 의해 PI3K의 하류에서 유전적으로 활성화될 수 있으나, 이러한 유전적 사건은 인간 암에서는 훨씬 덜 나타난다. PI3K 이소형 (isoform), 특히 PI3K α 의 억제는 암의 치료에서 유용한 것으로 공지되어 있다 (예를 들어 WO 05/121142, WO 08/144463, WO 08/144464, WO 07/136940 참고).

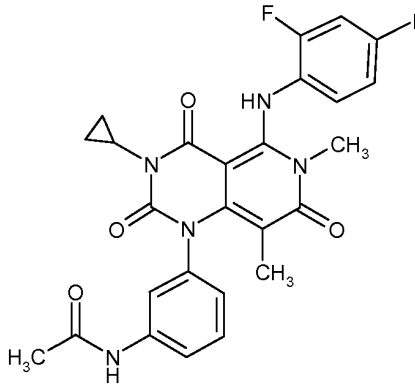
발명의 내용

[0009] 발명의 개요

[0010] 본 발명의 한 실시양태는

[0011] (i) 하기 구조식 I의 화합물:

[0012] <화학식 I>



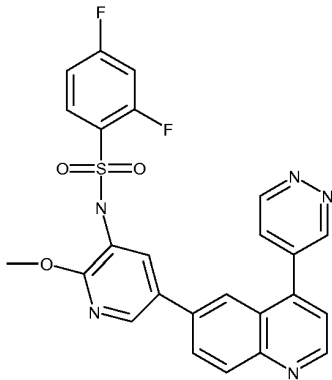
[0013]

[0014] *N*-(3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-*d*]피리미딘-1(2*H*)-일]페닐)아세트아미드 (이후 화합물 A)

[0015] 또는 그의 제약상 허용되는 염; 및

[0016] (ii) 하기 구조식 II의 화합물:

[0017] <화학식 II>



[0018]

[0019] 2,4-디플루오로-*N*-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐)벤젠설포나미드 (이후 화합물 B)

[0020] 또는 그의 제약상 허용되는 염

[0021] 을 포함하는 조합물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 한 실시양태는 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 적합하게는 디메틸 술폰시드 용매화물, 및 화합물 B, 또는 그의 제약상 허용되는 염의 조합물의 치료 유효량을 암의 치료를 필요로 하는 인간에게 생체내 투여하는 것을 포함하는, 상기 인간에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 한 실시양태는 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 적합하게는 디메틸 술폰시드 용매화물, 및 화합물 B, 또는 그의 제약상 허용되는 염의 조합물의 치료 유효량을 암의 치료를 필요로 하는 인간에게 생체내 투여하는 것을 포함하며,

[0024] 여기서 상기 조합물은 특정 기간 이내에 투여되고,

[0025] 상기 조합물은 지속 기간 동안 투여되는 것인,

[0026] 상기 인간에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명의 한 실시양태는 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 적합하게는 디메틸 술폰시드 용매화물, 및 화합물 B, 또는 그의 제약상 허용되는 염의 조합물의 치료 유효량을 암의 치료를 필요로 하는 인간에게 생체내 투여하는 것을 포함하며,

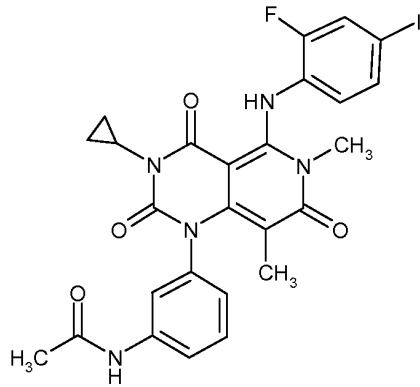
[0028] 여기서 상기 화합물 A 및 B는 순차적으로 투여되는 것인,

[0029] 상기 인간에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 본 발명은 항증식성 활성을 나타내는 조합물에 관한 것이다. 적합하게는, 본 방법은 하기 구조식 I:

[0031] <화학식 I>

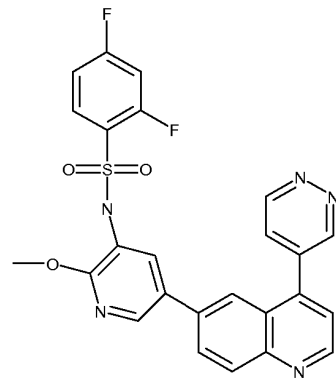


[0032]

[0033] 로 표시되는 화합물 *N*-(3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-*d*]피리미딘-1(2*H*)-일]페닐)아세트아미드 (화합물 A), 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 적합하게는 디메틸 술폭시드 용매화물, 및

[0034] 하기 구조:

[0035] <화학식 II>



[0036]

[0037] 로 표시되는 화합물 2,4-디플루오로-*N*-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐)벤젠술폰아미드 (화합물 B), 또는 그의 제약상 허용되는 염을 공동-투여하여 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0038] *N*-(3-[3-시클로프로필-5-(2-플루오로-4-아이오도-페닐아미노)-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로-2*H*-피리도[4,3-*d*]피리미딘-1-일]페닐)아세트아미드로도 공지된 화합물 A는 그의 제약상 허용되는 염 및 용매화물과 함께, 국제 출원일이 2005년 6월 10일이고, 국제 공보 번호가 WO 2005/121142이고, 국제 공개일이 2005년 12월 22일인 국제 출원 번호 PCT/JP2005/011082 (이의 전문은 본원에 참고로 포함됨)에, 특히 암 치료에서, MEK 활성의 억제제로서 유용한 것으로 개시되고 청구되었으며, 화합물 A는 실시예 4-1의 화합물이다. 화합물 A는 국제 출원 번호 PCT/JP2005/011082에 기재된 대로 제조할 수 있다. 화합물 A는 2006년 1월 19일 공개된 미국 특허 공개공보 번호 US 2006/0014768 (이의 전문은 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 대로 제조할 수 있다.

[0039] 적합하게는, 화합물 A는 디메틸 술폭시드 용매화물 형태이다. 적합하게는, 화합물 A는 나트륨 염 형태이다. 적합하게는, 화합물 A는 다음으로부터 선택되는 용매화물 형태이다: 수화물, 아세트산, 에탄올, 니트로메탄, 클로로벤젠, 1-펜탄올, 이소프로필 알콜, 에틸렌 글리콜 및 3-메틸-1-부탄올. 이러한 용매화물 및 염 형태는 국제 출원 번호 PCT/JP2005/011082 또는 미국 특허 공개공보 번호 US 2006/0014768의 기재내용으로부터 당업자가 제조할 수 있다.

- [0040] 화합물 B는 그의 제약상 허용되는 염과 함께, 국제 출원일이 2008년 5월 16일이고, 국제 공보 번호가 WO 2008/144463이고, 국제 공개일이 2008년 11월 27일인 국제 출원 번호 PCT/US2008/063819 (이의 전문은 본원에 참고로 포함됨)에, 특히 암의 치료에서, PI3K 활성의 억제제로서 유용한 것으로 개시되고 청구되었으며, 화합물 B는 실시예 345의 화합물이다. 화합물 B는 국제 출원 번호 PCT/US2008/063819에 기재된 대로 제조할 수 있다.
- [0041] 적합하게는, 화합물 B는 유리 염기 형태이다.
- [0042] 본 발명의 화합물은, 용질 (본 발명에서는, 화합물 A 또는 그의 염 및/또는 화합물 B 또는 그의 염) 및 용매에 의해 형성된 가변적 화학량론의 복합체인 것으로 이해되는 용매화물을 형성할 수 있다. 본 발명의 목적상 이러한 용매는 용질의 생물학적 활성을 방해하지 않는 것일 수 있다. 적합한 용매의 예에는, 비제한적으로, 물, 메탄올, 디메틸 술폭시드, 에탄올 및 아세트산이 포함된다. 적합하게는 사용되는 용매는 제약상 허용되는 용매이다. 적합한 제약상 허용되는 용매의 예에는, 비제한적으로, 물, 디메틸 술폭시드, 에탄올 및 아세트산이 포함된다. 적합하게는 사용되는 용매는 물이다.
- [0043] 본 발명의 화합물의 제약상 허용되는 염은 당업자에 의해 용이하게 제조된다.
- [0044] 본원에 사용시 용어 "치료하는" 및 그의 파생어는, 치료적 요법을 의미한다. 특정 상태와 관련하여, 치료는 다음을 의미한다: (1) 상태의 생물학적 징후의 하나 이상의 상태를 완화 또는 예방함, (2) (a) 상태를 야기하거나 그의 원인이 되는 생물학적 캐스케이드에서의 하나 이상의 지점 또는 (b) 상태의 하나 이상의 생물학적 징후를 방해함, (3) 상태 또는 그의 치료와 관련된 하나 이상의 증상, 효과 또는 부작용을 완화함, 또는 (4) 상태 또는 상태의 하나 이상의 생물학적 징후의 진행 속도를 늦춤. 본원에서는 예방적 요법 또한 고려된다. 당업자는 "예방"이 절대적인 용어가 아님을 인지할 것이다. 의학에서, "예방"은 상태 또는 그의 생물학적 징후의 가능성 또는 중증도를 실질적으로 감소시키기 위한, 또는 그러한 상태 또는 그의 생물학적 징후의 개시를 지연시키기 위한 약물의 예방적 투여를 지칭하는 것으로 이해된다. 예방적 요법은 예를 들어, 대상체가 암 발병 위험이 높은 것으로 고려될 때, 예컨대, 대상체가 강한 암 가족력을 지니거나 대상체가 발암물질에 노출되었을 때 적절하다.
- [0045] 용어 "주기적 투여" 또는 그의 파생어는 약물을 휴약기를 통해 인간에게 투여하지 않음을 의미한다. 휴약기 (종종 또한 약물 휴식기, 의약 휴식기, 구조화된 치료 중단기 또는 전략적 치료 중단기로도 불림)는 환자가 수일 내지 수개월 사이의 임의의 일정 지속 기간 동안 의약(들) 복용을 중단하는 기간이다.
- [0046] 본원에 사용시, 용어 "유효량"은 예를 들어, 연구자 또는 임상상에 의해 모색되는 조직, 시스템, 동물 또는 인간의 생물학적 또는 의학적 반응을 유발하는 약물 또는 제약 작용제의 양을 의미한다. 또한, 용어 "치료 유효량"은 이러한 양을 투여받지 않은 상응하는 대상체에 비해, 질환, 장애 또는 부작용의 개선된 치료, 치유, 예방 또는 완화를 초래하거나, 질환 또는 장애의 진행 속도 감소를 초래하는 임의의 양을 의미한다. 상기 용어의 범위 내에는 또한 정상적인 생리적 기능을 증강시키는데 유효한 양이 포함된다.
- [0047] 본원에 사용시 용어 "조합물" 및 그의 파생어는, 치료 유효량의 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 화합물 B 또는 그의 제약상 허용되는 염의 동시 투여 또는 임의의 방식의 개별적 순차적 투여를 의미한다. 바람직하게는, 투여가 동시에 이루어지지 않으면, 화합물은 서로 매우 짧은 시차를 두고 투여된다. 나아가, 화합물을 동일한 투여 형태로 투여하는지는 중요하지 않으며, 예를 들어, 한 화합물은 국소 투여할 수 있고, 다른 화합물은 경구 투여할 수 있다. 적합하게는 두 화합물은 경구 투여된다.
- [0048] 본원에 사용시 용어 "조합 키트"는 본 발명에 따른 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 화합물 B, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 투여하는데 사용되는 제약 조성물 또는 조성물들을 의미한다. 두 화합물을 동시에 투여하는 경우, 조합 키트는 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 화합물 B, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 단일 제약 조성물, 예컨대, 정제, 또는 별개의 제약 조성물 중에 함유할 수 있다. 화합물을 동시에 투여하지 않는 경우, 조합 키트는 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 화합물 B, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 별개의 제약 조성물 중에 함유할 것이다. 조합 키트는 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 화합물 B, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 단일 패키지 내 별개의 제약 조성물 중에 또는 별개의 패키지 내 별개의 제약 조성물 중에 포함할 수 있다.
- [0049] 한 측면에서, 하기 구성요소를 포함하는 조합 키트가 제공된다:
- [0050] 제약상 허용되는 담체와 함께, 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물; 및

- [0051] 제약상 허용되는 담체와 함께, 화합물 B, 또는 그의 제약상 허용되는 염.
- [0052] 본 발명의 한 실시양태에서, 조합 키트는 하기 구성요소를 포함하며:
- [0053] 제약상 허용되는 담체와 함께, 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물; 및
- [0054] 제약상 허용되는 담체와 함께, 화합물 B, 또는 그의 제약상 허용되는 염,
- [0055] 여기서 구성요소는 순차적, 개별적 및/또는 동시 투여에 적합한 형태로 제공된다.
- [0056] 한 실시양태에서, 조합 키트는 하기를 포함한다:
- [0057] 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물을 제약상 허용되는 담체와 함께 포함하는 제1 용기; 및
- [0058] 화합물 B, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 제약상 허용되는 담체와 함께 포함하는 제2 용기, 및 상기 제1 및 제2 용기를 수용하기 위한 용기 수단.
- [0059] "조합 키트"는 또한 지침, 예컨대, 투여량 및 투여 지침에 따라 제공될 수 있다. 이러한 투여량 및 투여 지침은 의사에게 예를 들어, 약품 라벨에 의해 제공되는 유형일 수 있고, 또는 의사가 예컨대 환자에게 제공하는 지침 유형일 수 있다.
- [0060] 본원에 사용시 용어 "삼중 음성" 유방암은 에스트로겐 수용체 (ER), 프로게스테론 수용체 (PR) 또는 Her2/neu 에 대한 유전자를 발현하지 않는 임의의 유방암을 의미한다. 유방암의 이러한 하위유형은 보다 공격적이고, 표준 치료에 덜 반응성이며, 보다 불량한 전체적인 관련 환자 예후를 임상적 특징으로 한다. 이는 보다 젊은 여성, BRCA1 돌연변이를 갖는 여성 및 아프리카계 미국인 및 히스패닉 종족에 속하는 여성 및 근래 출산을 한 여성에서 보다 빈번히 진단된다.
- [0061] 기저양 (basal-like) 유방 종양은 짧은 재발 시간을 갖는 공격적 유방암의 하위유형이다. 폐경전의 아프리카계 미국인 여성은, 에스트로겐, 프로게스테론 및 HER2 수용체에 대해 보통 삼중 음성인 기저양 유방 종양이 발병할 위험이 평균보다 높다. 기저양 유방 종양은 고 등급일 수 있고, 말기에 진단될 수 있어, 강력한 화학요법 계획이 요구될 수 있다.
- [0062] 본원에 사용시 용어 "화합물 A²"는 화합물 A, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물을 의미한다.
- [0063] 본원에 사용시 용어 "화합물 B²"는 화합물 B, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 의미한다.
- [0064] 적합하게는 본 발명의 조합물은 "특정 기간" 이내에 투여된다.
- [0065] 본원에 사용시 용어 "특정 기간" 및 그의 파생어는 화합물 A² 및 화합물 B² 중 하나와 화합물 A² 및 화합물 B² 중 다른 하나를 투여하는 사이의 시간 간격을 의미한다. 달리 정의되지 않는 한, 특정 기간은 동시적 투여를 포함할 수 있다. 달리 정의되지 않는 한, 특정 기간은 하루 동안의 화합물 A² 및 화합물 B²의 투여를 지칭한다.
- [0066] 적합하게는, 화합물이 "특정 기간" 이내에 투여되고 동시에 투여되지 않는다면, 이들은 둘 다 서로에 대해 약 24시간 이내에 투여되고 (이 경우, 특정 기간은 약 24시간일 것임); 적합하게는 이들은 둘 다 서로에 대해 약 12시간 이내에 투여될 것이고 (이 경우, 특정 기간은 약 12시간일 것임); 적합하게는 이들은 둘 다 서로에 대해 약 11시간 이내에 투여될 것이고 (이 경우, 특정 기간은 약 11시간일 것임); 적합하게는 이들은 둘 다 서로에 대해 약 10시간 이내에 투여될 것이고 (이 경우, 특정 기간은 약 10시간일 것임); 적합하게는 이들은 둘 다 서로에 대해 약 9시간 이내에 투여될 것이고 (이 경우, 특정 기간은 약 9시간일 것임); 적합하게는 이들은 둘 다 서로에 대해 약 8시간 이내에 투여될 것이고 (이 경우, 특정 기간은 약 8시간일 것임); 적합하게는 이들은 둘 다 서로에 대해 약 7시간 이내에 투여될 것이고 (이 경우, 특정 기간은 약 7시간일 것임); 적합하게는 이들은 둘 다 서로에 대해 약 6시간 이내에 투여될 것이고 (이 경우, 특정 기간은 약 6시간일 것임); 적합하게는 이들은 둘 다 서로에 대해 약 5시간 이내에 투여될 것이고 (이 경우, 특정 기간은 약 5시간일 것임); 적합하게는 이들은 둘 다 서로에 대해 약 4시간 이내에 투여될 것이고 (이 경우, 특정 기간은 약 4시간일 것임); 적합하게는 이들은 둘 다 서로에 대해 약 3시간 이내에 투여될 것이고 (이 경우, 특정 기간은 약 3시간일 것임); 적합하게는 이들은 둘 다 서로에 대해 약 2시간 이내에 투여될 것이고 (이 경우, 특정 기간은 약 2시간일 것임); 적합하게는 이들은 둘 다 서로에 대해 약 1시간 이내에 투여될 것이다 (이 경우, 특정 기

간은 약 1시간일 것임). 본원에 사용시, 약 45분 미만 간격인 화합물 A² 및 화합물 B²의 투여는 동시 투여로 간주된다.

[0067] 적합하게는, 본 발명의 조합물이 "특정 기간" 내에 투여되면, 화합물은 "지속 기간" 동안 공동-투여될 것이다.

[0068] 본원에 사용시 용어 "지속 기간" 및 그의 파생어는, 본 발명의 두 화합물이 지시된 연속 일수 동안 투여됨을 의미한다. 달리 정의되지 않는 한, 연속 일수는 치료 시작시 개시되거나 치료가 끝날 때 종료되어야 하는 것은 아니며, 단지, 연속 일수가 치료 동안의 일정 시점에 이루어지는 것이 요구된다.

[0069] "특정 기간" 투여에 관하여:

[0070] 적합하게는, 두 화합물은 적어도 1일 동안 특정 기간 이내에 투여될 것이고 (이 경우 지속 기간은 적어도 1일 일 것임); 적합하게는 치료 과정 동안, 두 화합물은 적어도 연속 3일 동안 특정 기간 이내에 투여될 것이고 (이 경우 지속 기간은 적어도 3일일 것임); 적합하게는 치료 과정 동안, 두 화합물은 적어도 연속 5일 동안 특정 기간 이내에 투여될 것이고 (이 경우 지속 기간은 적어도 5일일 것임); 적합하게는 치료 과정 동안, 두 화합물은 적어도 연속 7일 동안 특정 기간 이내에 투여될 것이고 (이 경우 지속 기간은 적어도 7일일 것임); 적합하게는 치료 과정 동안, 두 화합물은 적어도 연속 14일 동안 특정 기간 이내에 투여될 것이고 (이 경우 지속 기간은 적어도 14일일 것임); 적합하게는 치료 과정 동안, 두 화합물은 적어도 연속 30일 동안 특정 기간 이내에 투여될 것이다 (이 경우 지속 기간은 적어도 30일일 것임).

[0071] 적합하게는, 화합물이 "특정 기간" 동안 투여되지 않는다면, 이들은 순차적으로 투여된다. 본원에 사용시 용어 "순차적 투여" 및 그의 파생어는 화합물 A² 및 화합물 B² 중 하나가 연속 2일 이상 동안 1일 1회 투여되고, 화합물 A² 및 화합물 B² 중 다른 하나가 후속하여 연속 2일 이상 동안 1일 1회 투여되는 것을 의미한다. 또한, 화합물 A² 및 화합물 B² 중 하나와 화합물 A² 및 화합물 B² 중 다른 하나의 순차적 투여 사이에 휴약기를 이용하는 것이 본원에서 고려된다. 본원에 사용시, 휴약기는 화합물 A² 및 화합물 B² 중 하나의 순차적 투여 이후, 화합물 A² 및 화합물 B² 중 다른 하나의 투여 전, 화합물 A² 및 화합물 B² 중 어느 것도 투여하지 않는 일수의 기간이다. 적합하게는 휴약기는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일 및 14일로부터 선택되는 일수의 기간일 것이다.

[0072] 순차적 투여와 관련하여:

[0073] 적합하게는, 화합물 A² 및 화합물 B² 중 하나가 연속 2 내지 30일 동안 투여되고, 이어서 임의적 휴약기를 갖고, 이어서 화합물 A² 및 화합물 B² 중 다른 하나가 연속 2 내지 30일 동안 투여된다. 적합하게는, 화합물 A² 및 화합물 B² 중 하나가 연속 2 내지 21일 동안 투여되고, 이어서 임의적 휴약기를 갖고, 이어서 화합물 A² 및 화합물 B² 중 다른 하나가 연속 2 내지 21일 동안 투여된다. 적합하게는, 화합물 A² 및 화합물 B² 중 하나가 연속 2 내지 14일 동안 투여되고, 이어서 1 내지 14일의 휴약기를 갖고, 이어서 화합물 A² 및 화합물 B² 중 다른 하나가 연속 2 내지 14일 동안 투여된다. 적합하게는, 화합물 A² 및 화합물 B² 중 하나가 연속 3 내지 7일 동안 투여되고, 이어서 3 내지 10일의 휴약기를 갖고, 이어서 화합물 A² 및 화합물 B² 중 다른 하나가 연속 3 내지 7일 동안 투여된다.

[0074] 적합하게는, 화합물 B²가 순차에서 첫 번째로 투여되고, 이어서 임의적 휴약기를 갖고, 이어서 화합물 A²가 투여될 것이다. 적합하게는, 화합물 B²가 연속 3 내지 21일 동안 투여되고, 이어서 임의적 휴약기를 갖고, 이어서 화합물 A²가 연속 3 내지 21일 동안 투여될 것이다. 적합하게는, 화합물 B²가 연속 3 내지 21일 동안 투여되고, 이어서 1 내지 14일의 휴약기를 갖고, 이어서 화합물 A²가 연속 3 내지 21일 동안 투여될 것이다. 적합하게는, 화합물 B²가 연속 3 내지 21일 동안 투여되고, 이어서 3 내지 14일의 휴약기를 갖고, 이어서 화합물 A²가 연속 3 내지 21일 동안 투여될 것이다. 적합하게는, 화합물 B²가 연속 21일 동안 투여되고, 이어서 임의적 휴약기를 갖고, 이어서 화합물 A²가 연속 14일 동안 투여될 것이다. 적합하게는, 화합물 B²가 연속 14

일 동안 투여되고, 이어서 1 내지 14일의 휴약기를 갖고, 이어서 화합물 A²가 연속 14일 동안 투여될 것이다. 적합하게는, 화합물 B²가 연속 7일 동안 투여되고, 이어서 3 내지 10일의 휴약기를 갖고, 이어서 화합물 A²가 연속 7일 동안 투여될 것이다. 적합하게는, 화합물 B²가 연속 3일 동안 투여되고, 이어서 3 내지 14일의 휴약기를 갖고, 이어서 화합물 A²가 연속 7일 동안 투여될 것이다. 적합하게는, 화합물 B²가 연속 3일 동안 투여되고, 이어서 3 내지 10일의 휴약기를 갖고, 이어서 화합물 A²가 연속 3일 동안 투여될 것이다.

[0075] "특정 기간" 투여 및 "순차적" 투여에 이어 반복된 투여가 후속될 수 있거나, 교대 투여 프로토콜이 후속될 수 있고, 반복 투여 또는 교대 투여 프로토콜에 앞서 휴약기가 선행될 수 있는 것으로 이해된다.

[0076] 적합하게는, 본 발명에 따른 조합물의 일부로서 투여되는 화합물 A²의 양은 약 0.125 mg 내지 약 10 mg으로부터 선택되는 양일 것이고; 적합하게는, 그 양은 약 0.25 mg 내지 약 9 mg으로부터 선택될 것이고; 적합하게는, 그 양은 약 0.25 mg 내지 약 8 mg으로부터 선택될 것이고; 적합하게는, 그 양은 약 0.5 mg 내지 약 8 mg으로부터 선택될 것이고; 적합하게는, 그 양은 약 0.5 mg 내지 약 7 mg으로부터 선택될 것이고; 적합하게는, 그 양은 약 1 mg 내지 약 7 mg으로부터 선택될 것이고; 적합하게는, 그 양은 약 5 mg일 것이다. 따라서, 본 발명에 따른 조합물의 일부로서 투여되는 화합물 A의 양은 약 0.125 mg 내지 약 10 mg으로부터 선택되는 양일 것이다. 예를 들어, 본 발명에 따른 조합물의 일부로서 투여되는 화합물 A²의 양은 0.125 mg, 0.25 mg, 0.5 mg, 0.75 mg, 1 mg, 1.5 mg, 2 mg, 2.5 mg, 3 mg, 3.5 mg, 4 mg, 4.5 mg, 5 mg, 5.5 mg, 6 mg, 6.5 mg, 7 mg, 7.5 mg, 8 mg, 8.5 mg, 9 mg, 9.5 mg, 10 mg일 수 있다.

[0077] 적합하게는, 본 발명에 따른 조합물의 일부로서 투여되는 화합물 B²의 양은 약 0.25 mg 내지 약 75 mg으로부터 선택되는 양일 것이고; 적합하게는, 그 양은 약 0.5 mg 내지 약 50 mg으로부터 선택될 것이고; 적합하게는, 그 양은 약 1 mg 내지 약 25 mg으로부터 선택될 것이고; 적합하게는, 그 양은 약 2 mg 내지 약 20 mg으로부터 선택될 것이고; 적합하게는, 그 양은 약 4 mg 내지 약 16 mg으로부터 선택될 것이고; 적합하게는, 그 양은 약 6 mg 내지 약 12 mg으로부터 선택될 것이고; 적합하게는, 그 양은 약 10 mg일 것이다. 따라서, 본 발명에 따른 조합물의 일부로서 투여되는 화합물 B²의 양은 약 0.5 mg 내지 약 50 mg으로부터 선택되는 양일 것이다. 예를 들어, 본 발명에 따른 조합물의 일부로서 투여되는 화합물 B²의 양은 0.5 mg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 20 mg, 21 mg, 22 mg, 23 mg, 25 mg, 26 mg, 27 mg, 28 mg, 29 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg 또는 50 mg일 수 있다.

[0078] 본원에 사용시, 화합물 A² 및 화합물 B²에 대해 특정된 모든 양은 용량 당 유리된 또는 비염화 및 비용매화 화합물의 투여되는 양으로 기재된다.

[0079] 본 발명의 방법은 또한 암 치료의 다른 치료적 방법과 함께 이용될 수 있다.

[0080] 요법에 사용하기 위해, 본 발명의 조합물의 치료 유효량을 원 화학물질로서 투여하는 것이 가능할 수 있지만, 조합물을 제약 조성물 또는 조성물들로 제공하는 것이 바람직하다. 따라서, 본 발명은 화합물 A² 및/또는 화합물 B², 및 하나 이상의 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제약 조성물을 추가로 제공한다. 본 발명의 조합물은 상기 기재된 바와 같다. 담체(들)는 제제의 다른 성분과 상용성이라는 의미에서 허용가능해야 하고, 제약 제제화가 가능해야 하며, 그의 수령자에게 유해하지 않아야 한다. 본 발명의 또 다른 측면에 따라 화합물 A² 및/또는 화합물 B²와 하나 이상의 제약상 허용되는 담체를 부가혼합하는 것을 포함하는, 제약 제제의 제조 방법이 또한 제공된다. 상기된 바와 같이, 사용되는 제약 조합물의 이러한 요소는 별개의 제약 조성물로 제공될 수 있거나, 하나의 제약 제제로 함께 제제화될 수 있다.

[0081] 제약 제제는 단위 용량 당 소정량의 활성 성분을 함유하는 단위 용량 형태로 제공될 수 있다. 당업자에게 공지된 바와 같이, 용량 당 활성 성분의 양은 치료될 상태, 투여 경로 및 환자의 연령, 체중 및 상태에 좌우될 것이다. 바람직한 단위 투여 제제는 활성 성분의 1일 용량 또는 분할-용량, 또는 그의 적절한 분획을 함유하는 것이다. 또한, 이러한 제약 제제는 약학 분야에 널리 공지된 임의의 방법으로 제조할 수 있다.

[0082] 화합물 A² 및 화합물 B²는 임의의 적합한 경로로 투여될 수 있다. 적합한 경로에는 경구, 직장, 비강, 국소

(협측 및 설하 포함), 질 및 비경구 (피하, 근육내, 정맥내, 피내, 척추관내 및 경막외 포함)가 포함된다. 예를 들어, 조합물의 수령자의 상태 및 치료될 암에 따라 바람직한 경로는 달라질 수 있음이 인지될 것이다. 또한 투여되는 각각의 작용제는 동일 또는 상이한 경로로 투여될 수 있고, 화합물 A² 및 화합물 B²가 제약 조성물/제제 내에서 함께 배합될 수 있음이 인지될 것이다.

[0083] 본 발명의 화합물 또는 조합물은 캡슐, 정제, 또는 주사가능 제제와 같은 편리한 투여 형태 내로 도입된다. 고체 또는 액체 제약 담체가 사용된다. 고체 담체에는 전분, 락토스, 황산칼슘 이수화물, 테라 알바, 수크로스, 활석, 젤라틴, 한천, 펙틴, 아카시아, 스테아르산마그네슘 및 스테아르산이 포함된다. 액체 담체에는 시럽, 땅콩 오일, 올리브 오일, 염수 및 물이 포함된다. 유사하게는, 담체에는 서방형 재료, 예컨대, 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트가 단독으로 또는 왁스와 함께 포함될 수 있다. 고체 담체의 양은 크게 가변적이거나, 바람직하게는 투여 단위 당 약 25 mg 내지 약 1 g일 것이다. 액체 담체가 사용되는 경우, 제제는 적합하게는 시럽, 엘릭시르, 에멀전, 연질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사가능 액체, 예컨대, 앰플, 또는 수성 또는 비수성 액체 현탁액의 형태일 것이다.

[0084] 예를 들어, 정제 또는 캡슐 형태로 경구 투여하는 경우, 활성 약물 구성요소는 경구 비독성 제약상 허용되는 불활성 담체, 예컨대, 에탄올, 글리세롤, 물 등과 조합될 수 있다. 분말은 화합물을 적합한 미세 크기로 분쇄하고 유사하게 분쇄된 제약 담체, 예컨대, 식용 탄수화물, 예를 들어, 전분 또는 만니톨과 혼합하여 제조된다. 향미제, 보존제, 분산제 및 착색제 또한 존재할 수 있다.

[0085] 상기 언급된 성분에 부가적으로 제제는, 해당 제제의 유형과 관련된 분야에서 통상적인 다른 작용제를 포함할 수 있음이 이해되어야 하며, 예를 들어, 경구 투여에 적합한 것으로는 향미제가 포함될 수 있다.

[0086] 상기된 바와 같이, 본 발명의 조합물 (화합물 B²와 조합된 화합물 A²)의 치료 유효량이 인간에게 투여된다. 통상적으로, 본 발명의 투여되는 작용제의 치료 유효량은 예를 들어, 대상체의 연령 및 체중, 치료가 필요한 정확한 상태, 상태의 중증도, 제제의 성질 및 투여 경로를 비롯한 다수의 인자에 좌우될 것이다. 최종적으로, 치료 유효량은 담당 의사의 재량일 것이다.

[0087] 본 발명의 조합물을 공지된 절차에 따라 효능, 유리한 특성 및 상승작용적인 특성에 대해 시험한다. 적합하게는, 본 발명의 조합물을 일반적으로 하기 조합 세포 증식 검정에 따라 효능, 유리한 특성 및 상승작용적인 특성에 대해 시험한다. 세포를 96 또는 384-웰 플레이트에 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신으로 보충된, 각각의 세포 유형에 적합한 배양 배지 중에 플레이팅하고, 37°C, 5% CO₂에서 밤새 인큐베이션했다. 세포를 희석된 화합물 A² (화합물에 따라 0.250-20 μM로부터 출발한 3배 희석물의 10개 희석물 (무 화합물 포함))로 격자 방식으로 처리하고, 또한 화합물 B² (화합물에 따라 0.150-20 μM로부터 출발한 3배 희석물의 10개 희석물 (무 화합물 포함))로 처리하여, 상기한 바와 같이 추가 72시간 동안 인큐베이션했다. 일부 예에서, 화합물을 시차를 두는 방식으로 첨가하고, 인큐베이션 시간을 7일까지 연장할 수 있다. 세포 성장을 셀타이터-글로 (CellTiter-Glo)[®] 시약을 사용하여 생산자의 프로토콜에 따라 측정하고, 신호를 퍼킨엘머 (PerkinElmer) 엔비전 (EnVision)[™] 판독기 세트 상에서 0.5-초 판독 발광 모드로 판독했다. 데이터를 하기한 바와 같이 분석했다.

[0088] 결과를 t=0 값의 백분율로 표현하고 화합물(들) 농도에 대해 플로팅했다. t=0 값을 100%으로 정규화했고, 이는 화합물 첨가시 존재하는 세포의 수를 나타낸다. 마이크로소프트 엑셀 (Microsoft Excel) 소프트웨어를 위한 IDBS XL피트 플러그-인 (IDBS XLfit plug-in)을 사용하여 농도에 대해 세포 생존력의 4- 또는 6-파라미터 곡선 피트(curve fit)를 이용하고, 세포 성장의 50% 억제에 요구되는 농도 (gIC₅₀)를 측정하여, 각각의 화합물 및/또는 화합물 조합물에 대한 세포 반응을 측정했다. 세포를 함유하지 않는 웰로부터의 값을 차감하여 배경 보정을 했다. 각각의 약물 조합물에 대해, 조합 지수 (CI), 최고 단일 작용제에 대한 초과량 (Excess Over Highest Single Agent; EOHS) 및 블리스에 대한 초과량 (Excess Over Bliss; EOBliss)를, 공지된 방법, 예컨대, 문헌 [Chou and Talalay (1984) *Advances in Enzyme Regulation*, 22, 37 to 55]; 및 문헌 [Berenbaum, MC (1981) *Adv. Cancer Research*, 35, 269-335]에 기재된 방법에 따라 계산했다.

[0089] 본 발명의 조합물이 상기 검정에서 활성이므로, 이들은 암 치료에서 유리한 치료적 유용성을 나타낸다.

[0090] 적합하게는, 본 발명은 다음으로부터 선택되는 암의 치료 또는 중증도 감소 방법에 관한 것이다: 뇌암 (신경교종), 교모세포종, 바나얀-조나나 증후군, 코우텐병, 레르미트-두클로스병, 유방암, 염증성 유방암, 율름 중

양, 유잉 육종, 횡문근육종, 상의세포종, 수모세포종, 결장암, 두경부암, 신장암, 폐암, 간암, 흑색종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 육종, 골육종, 골거대세포종, 갑상선암,

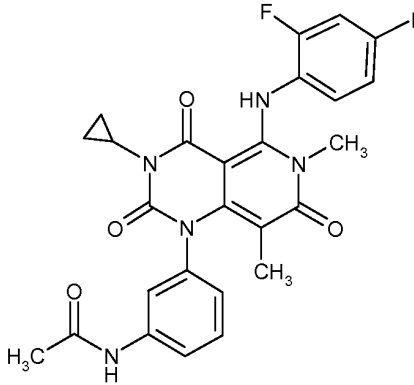
- [0091] 림프모구성 T 세포 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 림프성 백혈병, 모발상-세포 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 호중구성 백혈병, 급성 림프모구성 T 세포 백혈병, 형질세포종, 면역모세포 대세포 백혈병, 외투 세포 백혈병, 다발성 골수종 거핵모구성 백혈병, 다발성 골수종, 급성 거대모구성 백혈병, 전골수구성 백혈병, 적백혈병,
- [0092] 악성 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 림프모구성 T 세포 림프종, 버킷 림프종, 여포성 림프종,
- [0093] 신경모세포종, 방광암, 요로상피암, 폐암, 외음부암, 자궁경부암, 자궁내막암, 신장암, 중피종, 식도암, 타액선암, 간세포암, 위암, 비인두암, 협부암, 구강암, GIST (위장관 기질 종양) 및 고환암.
- [0094] 적합하게는, 본 발명은 다음으로부터 선택되는 암의 치료 또는 중증도 감소 방법에 관한 것이다: 뇌암 (신경교종), 교모세포종, 바나얀-조나나 증후군, 코우텐병, 레르미트-두클로스병, 유방암, 결장암, 두경부암, 신장암, 폐암, 간암, 흑색종, 난소암, 췌장암, 전립선암, 육종 및 갑상선암.
- [0095] 적합하게는, 본 발명은 난소암, 간암, 결장암, 유방암, 췌장암 및 전립선암으로부터 선택되는 암의 치료 또는 중증도 감소 방법에 관한 것이다.
- [0096] 적합하게는, 본 발명은 유방암, 간암, 폐암, 췌장암 및 결장암으로부터 선택되는 암의 치료 또는 중증도 감소 방법에 관한 것이다.
- [0097] 적합하게는, 본 발명은 특정 바이오마커(들)에 대한 야생형 또는 돌연변이형인 암의 치료 또는 중증도 감소 방법에 관한 것이다.
- [0098] 당업계에서 이해되는 용어 "야생형"은 유전자 변형이 되지 않은 본래의 개체에서 나타나는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 또한 당업계에서 이해되는 "돌연변이"는, 각각 야생형 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드에서 발견되는 상응하는 아미노산 또는 핵산과 비교하여 아미노산 또는 핵산에 적어도 하나의 변형이 있는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것으로 이해된다. 돌연변이라는 용어에는, 가장 일반적으로 확인되는 (야생형) 핵산 가닥과 비교하여 핵산 가닥의 서열에 단일 염기쌍 차이가 존재하는 단일 염기 다형성 (SNP)이 포함된다.
- [0099] 바이오마커(들)에 대한 야생형 또는 돌연변이형 및 PI3K/Pten에 대한 야생형 또는 돌연변이형인 암은 공지된 방법으로 식별된다.
- [0100] KRAS로도 공지된 V-Ki-ras2 키르스텐 (Kirsten) 래트 육종 바이러스 종양유전자 동족체는 인간에서 KRAS 유전자에 의해 코딩되는 단백질이다. Ras 패밀리의 다른 구성원과 마찬가지로 KRAS 단백질은 GTPase이고, 다수의 신호 전달 경로에서 초기 참가자이다. KRAS는 그의 C-말단 상의 이소프레닐기의 존재로 인하여 보통 세포막에 묶여있다. 돌연변이되면, KRAS는 종양유전자이다. 정상 KRAS 유전자의 단백질 산물은 정상 조직 신호전달에서 필수적인 기능을 수행하며, KRAS 유전자의 돌연변이는 다수의 암의 발생에서 필수적인 단계이다.
- [0101] N-ras 종양유전자는 RAS 유전자 패밀리의 구성원이다. 이는 염색체 1 상에 매핑되어 있고, HL60의 전골수세포 백혈병 세포주에서 활성화되어 있다. 인근 유전자의 순서는 다음과 같다: cen--CD2--NGFB--NRAS--tel. 포유동물 ras 유전자 패밀리는 하비 및 키르스텐 ras 유전자 (c-Hras1 및 c-Kras2), 각각의 불활성 위 (pseudo)유전자 (c-Hras2 및 c-Kras1) 및 N-ras 유전자로 이루어진다. 이들은 C-말단 40개 아미노산에서만 현저히 상이하다. 이러한 ras 유전자는 GTP/GDP 결합 및 GTPase 활성을 가지며, 그의 정상 기능은 세포 성장의 정상 제어에 관련된 G-유사 조절 단백질로서의 기능일 수 있다. 아미노산 잔기 12, 13 또는 61을 변화시키는 돌연변이는 배양된 세포를 변환시키는 N-ras의 잠재력을 활성화하며 다양한 인간 종양에 연관되어 있다. N-ras 유전자는 2Kb 및 4.3Kb의 두 주요 전사체를 특징한다. 두 전사체 간의 차이점은 2Kb 전사체의 종결 부위를 통한 단순한 연장이다. N-ras 유전자는 7개의 엑손 (-I, I, II, III, IV, V, VI)으로 이루어진다. 보다 작은 2Kb 전사체는 VIa 엑손을 함유하고, 보다 큰 4.3Kb 전사체는 VIa 엑손보다 단순히 더 긴 형태의 VIb 엑손을 함유한다. 두 전사체는 오직 3' 비번역 영역에서만 상이하므로 동일한 단백질을 코딩한다. 보다 짧은 2Kb 전사체의 서열은 본원에 제시된다. 4.3Kb 전사체 서열은 입수가능하지 않다.
- [0102] 야생형 또는 돌연변이형 Ras/Raf 또는 PI3K/PTEN 종양 세포는 DNA 증폭 및 서열분석 기술, 비제한적으로, 각각 노던 (Northern) 및 서던 (Southern) 블롯을 비롯한 DNA 및 RNA 검출 기술 및/또는 다양한 바이오칩 및 어레이 기술로 식별할 수 있다. 이는 세포유전적 이상 및 풍부한 전사체를 포함할 수 있다. 야생형 및 돌연변

이 폴리펩티드는, 비제한적으로, 면역진단 기술, 예컨대, ELISA, 웨스턴 (Western) 블롯 또는 면역세포 화학을 비롯한 다양한 기술로 검출할 수 있다.

- [0103] 본 발명은 N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는 조합물을 제공한다.
- [0104] 본 발명은 또한 요법에 사용하기 위한, N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는 조합물을 제공한다.
- [0105] 본 발명은 또한 암 치료에 사용하기 위한, N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는 조합물을 제공한다.
- [0106] 본 발명은 또한 N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염의 조합물을 포함하는 제약 조성물을 제공한다.
- [0107] 본 발명은 또한 N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는 조합 키트를 제공한다.
- [0108] 본 발명은 또한 의약의 제조에서의 N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는 조합물의 용도를 제공한다.
- [0109] 본 발명은 또한 암 치료를 위한 의약의 제조에서의 N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염을 포함하는 조합물의 용도를 제공한다.
- [0110] 본 발명은 또한 N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염의 조합물을 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법을 제공한다.
- [0111] 본 발명은 또한 N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물, 및 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염의 조합물을 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물의 양이 약 0.5 mg 내지 약 3 mg으로부터 선택되고, 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드, 또는 그의 제약상 허용되는 염 또는 용매화물의 양이 약 0.5 mg 내지 약 3 mg으로부터 선택되는 것인 암의 치료 방법에 관한 것이다.
- [0112] 하기 실시예는 오직 예시를 위한 것이며, 본 발명의 범주를 어떠한 방식으로도 제한하고자 하는 것이 아니다.
- [0113] 실험 상세사항

[0114] **MEK 억제제의 제조**

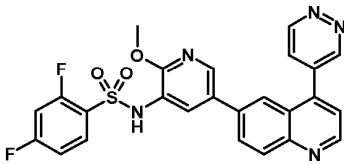
[0115] 본 조합물에 사용하기에 적합한 MEK 억제제, 특히 N-{3-[3-시클로프로필-5-(2-플루오로-4-아이오도-페닐아미노)6,8-디메틸;-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로-2H-피리도[4,3-d]피리미딘-1-일]페닐}아세트아미드 디메틸 술폭시드



[0116]

[0117] 는 국제 특허 공보 번호 W02005/121142에 따라 제조할 수 있다.

[0118] 본 조합물에 사용하기에 적합한 PI3K 억제제, 특히 2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드



[0119]

[0120] 는 국제 특허 공보 번호 W008/144463 (실시예 345)에 따라 제조할 수 있다.

[0121] 실험부에서 기재되는 화합물 A는 N-{3-[3-시클로프로필-5-(2-플루오로-4-아이오도-페닐아미노)6,8-디메틸;-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로-2H-피리도[4,3-d]피리미딘-1-일]페닐}아세트아미드의 디메틸 술폭시드 용매화물을 지칭한다.

[0122] **종양 세포주에서 화합물 A, 화합물 B 및 이들의 조합물에 의한 시험관내 세포 성장 억제 및 아폽토시스 유도**

[0123] 연구 #1. 결장암, 폐암 및 췌장암 세포주

[0124] **실험 조제물(들)**

[0125] 화합물 A 및 B를 사용한 조합 약물 시험을 인간 결장암 (n=26), 폐암 (n=14) 및 췌장암 (n=6)으로부터의 세포주의 페닐 (표 1)을 이용하여 수행했다. 세포주는 시중에서 구입했고 [ATCC (미국 버지니아주 매너서스 소재) 또는 DSMZ (독일 브라운슈바이크 소재)로부터], 2 mM 글루타민, 1 mM 나트륨 피루베이트 및 10% 소태아혈청으로 보충된 RPMI-1640 중에서 성장시키고 (Capan-1 및 HuP-T4는 제외, 이들은 20% 소태아혈청을 이용해 성장시킴), 항습 인큐베이터 내에서 37°C 및 5% CO₂에서 유지시켰다.

[0126] 실험 프로토콜(들)

[0127] 고정 비율 약물 조합물 검정

[0128] 고정 비율 약물 조합물 검정의 회석 설계는 도 1에서 확인할 수 있다. 먼저, 시험 화합물을 100% 디메틸 술폭시드 (DMSO) 중 10 mM 스톱으로 준비했다. 화합물은 DMSO를 이용하여 추가 희석시켰다. 제1 시험 화합물 (화합물 A로 표시)은 96 웰 마이크로타이터 플레이트 내 B-E 열에서 10개의 회석 지점에 대해 3배 단계 희석을 이용하여 수평 방향으로 희석시켰다. 제2 시험 화합물 (화합물 B로 표시)은 별도의 96 웰 마이크로타이터 플레이트 내 D-G 열에서 10개의 회석 지점에 대해 3배 단계 희석을 이용하여 수평 방향으로 희석시켰다. 각각의 약물 플레이트로부터 동일한 부피를 사용하여 세포 배양 배지 안에서 두 화합물을 조합했다. 그 결과 세포 배양 배지 내에서 약물의 1:50 희석이 이루어졌다. 화합물 A는 플레이트의 B 및 C열에서 개별적으로 적정된 한편, 화합물 B는 F 및 G열에서 단독으로 투여되었다. 세포에 약물을 첨가하기 전에 세포 배양 배지 내

에서 약물의 추가적 1:10 희석을 수행했다. 세포에 약물을 첨가한 결과 약물의 추가적 1:2 희석이 이루어졌다. 약물 플레이트 대 세포의 총 희석은 1:1000이었다. 화합물 B에 대한 최종 투여 농도 범위는 0.008-150.0 nM이었고, 화합물 A의 경우 0.013-250.0 nM이었다. 양성 대조군은 0.1%의 DMSO를 함유한 배양 배지 및 세포로 이루어졌으며, 약물은 함유하지 않았다. 음성 대조군은 0.1%의 DMSO 용액을 함유한 배양 배지로 이루어졌다.

[0129] 검정은 각각의 세포주의 이전 연구로부터 추산된 적절한 시딩 밀도로 96 웰 마이크로타이터 플레이트 내에서 수행되었다. 투여한 후, 세포주를 습한 공기 중 37°C, 5% CO₂에서 72시간 동안 인큐베이션했다. 세포 증식은 셀타이터 글로 (프로메가 코퍼레이션 (Promega Corporation), 미국 위스콘신주 매디슨 소재) 시약을 생산자 프로토콜에 따라 사용하여 측정했다. 플레이트를 셀타이터 글로 용액으로 처리하고, 몰레큘라 디바이시스 스펙트라맥스 M5 (Molecular Devices SpectraMax M5; 미국 캘리포니아주 서니베일 소재) 플레이트 판독기를 사용하여 RLU (상대 광 단위)에 대해 분석했다.

[0130] **데이터 분석**

[0131] 세 가지 독립적 계량치를 사용하여 화합물 B 및 화합물 A의 성장 억제에 대한 조합 효과를 분석했다.

[0132] 1. 최고 단일 작용제에 대한 초과량 (EOHSA)- 약물 조합 효과를 측정하는 한 표준 기준은 세포 성장 억제에 대한 효과를 절대적으로 분석하는 것이다. 이 경우, 약물의 조합물을 두 개별 치료 (단일 작용제) 중보다 반응성이 큰 것과 비교한다. 각각의 조합물 실험을 위해, 곡선을 따라 각각의 용량의 최고 단일 작용제에 대한 효과%를 생성한다. 이러한 "최고 단일 작용제에 대한 초과량 (EOHSA)"의 척도는 약물 조합물의 상승 작용을 평가하는데 사용되는 기준 중 하나이다 (문헌 [Borisyy AA Elliott PJ, Hurst NW, Lee MS, Lehar J, Price ER, Serbedzija G, Zimmermann GR, Foley MA, Stockwell BR, Keith CT. Systematic discovery of multicomponent therapeutics. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jun 24;100(13):7977-82]).

[0133] 2. 블리스 (Bliss) 상승작용- 조합물 상승작용을 측정하는데 종종 사용되는 두 번째 기준은 블리스 독립성 또는 "상가성"에 대한 초과 억제를 평가하는 것이다 (문헌 [Bliss, C.I, Mexico, DF, The Toxicity of Poisons Applied Jointly. Annals of Applied Biology 1939, Vol 26, Issue 3, August 1939]). 이 모델은 하기 수식을 이용하여 두 화합물의 조합된 반응을 독립적으로 추정한다:

[0134]
$$\text{점수} = E_a + E_b - (E_a * E_b)$$

[0135] (식 중, E_a는 화합물 A의 효과 (또는 억제%)이고, E_b는 화합물 B의 효과임).

[0136] 두 화합물의 조합물의 생성 효과를 블리스에 의한 그의 예상된 상가성과 비교하고, 반응 곡선을 따라 각각의 용량에 대해 상승작용 점수를 생성한다.

[0137] 3. 조합 지수 (CI)- 상승작용의 평가를 위한 세 번째 기준은 추 (Chou) 및 탈랄레이 (Talalay)에 의해 유도된 조합 지수 (CI)이다 (문헌 [Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv Enzyme Regul.1984;22:27-55]). 하기 수식은 상이한 작용 기작으로 거동하는 화합물에 사용되는 모델이다 (상호 비배타적 식).

[0138]
$$\text{조합 지수} = \frac{a:b\text{에서의 } D_a}{IC_{50(a)}} + \frac{a:b\text{에서의 } D_b}{IC_{50(b)}} + \frac{(a:b\text{에서의 } D_a)(a:b\text{에서의 } D_b)}{(IC_{50(a)})(IC_{50(b)})}$$

[0139] CI가 낮을수록, 조합물이 잠재적으로 지니는 상승작용은 크다. 1 초과 CI는 연구되는 조합물이 길항성일 수 있음을 시사한다. 또한, 상기 식 중 각각의 화합물에 대한 IC₅₀을 해당 억제 농도로 교체하여 25% (IC₂₅) 및 75% (IC₇₅)의 억제 농도에 대해 CI 점수를 생성한다.

[0140] 강도% 값을 마이크로소프트 엑셀에서 XL피트의 모델 205에서 이용하여 4 파라미터 로지스틱 피트 (logistical fit)를 사용한 gIC₅₀ 값을 계산했다. 성장 범위 (growth window)의 중간점 (gIC₅₀)은 화합물 첨가 시 (T=0)의 세포 수와 DMSO로 처리한 대조군 세포의 72시간에서의 성장 사이의 중간에 들어간다. 반응 곡선의 바닥에서의 강도 값 (Y_{min})으로부터 영점 시간에서의 세포 수 (T₀)를 나누어 세포 사멸에 대한 척도 (Y_{min}/T₀)를 생성한다. 1 미만의 Y_{min}/T₀ 값은 그보다 높은 값과 비교시 해당 치료의 보다 강한 효능을 나타낸

다.

- [0141] EOHSA 및 블리스에 있어서, 적절한 표기 (상승작용, 보통의 상승작용 등)를 하기 위해서는, 한 실험 내에서 두 기술적 복제물 모두에서 상승작용 점수가 나타나야 한다. 각각의 조합물 실험은 단일 작용제로서의 두 화합물에 대한 복제물 및 또한 조합물에 대한 기술적 복제물을 함유한다.
- [0142] 극도로 낮은 농도 (예, 용량 1, 용량 2)에서 EOHSA 및 블리스에 대한 상승작용 점수는 보다 큰 편차의 대상이므로 일반적으로 분석에서 제외된다. 반대로 말하면, 치료적 투여 범위에서 많이 벗어나 있는 가장 높은 농도 (용량 10)에서의 상승작용 점수는, 관찰되는 효과가 표적을 벗어난 사건에 더욱 취약하므로 일반적으로 분석에서 제외된다.
- [0143] EOHSA 및 블리스 상승작용 척도에 있어서, 점수는 반응 곡선을 따라 각각의 용량에 대해 생성된다. 점수는 '길항적' (<-10), '상가적' (-10 내지 10), '보통의 상승작용적' (10 내지 20) 또는 '상승작용적' (>20)으로 분류되었다. 이러한 점수는 해석 중인 모델에 따라, 최고 작용제를 초과하는 백분율 또는 블리스 상가성보다 큰 백분율을 반영한다.
- [0144] 조합 지수에 있어서, CI가 낮을수록, 조합물이 잠재적으로 지니는 상승작용은 크다. 0 내지 0.7의 점수는 상승작용적인 것으로 고려되는 한편, 0.7 내지 0.9의 점수는 보통의 상승작용으로 고려되었다. 다른 모든 점수는 조합 지수에 있어서 상승작용을 표시하지 않았다.
- [0145] 조합물의 화합물 중 하나에 있어서 25%의 억제 농도에 전혀 도달하지 않은 세포주에 있어서, CI 값을 계산할 수 없어서 CI에 'N/A'로 기재했다.
- [0146] **세포주 돌연변이 데이터**
- [0147] KRAS 유전자에 대한 상태에 대해 돌연변이 데이터를 수집 분석했다. 데이터 소스는 암 데이터베이스에서 체세포 돌연변이의 카탈로그 (COSMIC)의 일부로서 발표된 암 세포주 돌연변이 스크리닝 데이터이다 (문헌 [Bamford S. *et al.* Br. J. Cancer. 2004. 91:355-58]). 증식 검정에 사용된 세포주의 정체가 COSMIC 데이터베이스의 것과 일치하는 것을 보장하기 위해, 민감성 스크린에서의 세포주와 COSMIC에서의 세포주 사이에 유전자형 비교를 수행했다. 구체적으로, 이는 다음과 같은 단계를 수반했다:
 - [0148] 1. 어피메트릭스 500K 'SNP 칩' (어피메트릭스, 인크. (Affymetrix, Inc.), 미국 캘리포니아주 서니베일 소재) 및 RLMM 알고리즘 (문헌 [Rabbee & Speed, Bioinformatics, 2006. 22: 7-12])을 사용하여 각각의 세포주에 대한 유전자형을 계산한다.
 - [0149] 2. COSMIC에서 돌연변이 프로파일을 갖는 각각의 세포주에 대해 앞서 계산한 유전자형에 대한 각각의 세포주의 유전자형 일치율을 확인한다.
 - [0150] 3. 유전자형 일치율을 기초로 하여 각각의 세포주에 대한 돌연변이 상태를 배정한다.
- [0151] **결과**
- [0152] PI3K 억제제 화합물 B 및 MEK 억제제 화합물 A의 조합물로 처리한 각각의 세포주에 대해 상승작용 정도의 종합적 범주화를 수행했다. 세포주는 적어도 하나의 계량치가 상승작용적으로서의 점수를 얻은 경우 상승작용을 가지는 것으로 고려됐다. 결장암, 췌장암 및 폐암 세포주에 대한 상승작용 데이터를 표 1 내지 4에 나타냈다. 췌장암 세포주 계산치에 대한 데이터는 부록 A 표 7 내지 9에서 찾아볼 수 있다.

표 1

조합물 연구에 사용된 췌장, 결장 및 폐 세포주의 점수 패널

세포주	장기 부위	진단/조직학	KRAS 돌연변이 상태
NCI-H747	결장	선암	G13D
LS-1034	결장	선암	A146T
SW948	결장	선암	Q61L
LS-174T	결장	선암	G12D
SW116	결장	선암	G12A
T84	결장	암종	G13D
Colo 201	결장	선암	WT
SW403	결장	암종	G12V
DLD-1	결장	암종	G13D
Colo 205	결장	선암	G12V
Colo320 HSR	결장	선암	WT
SW620	결장	선암	G12V
NCI-H508	결장	선암	WT
Colo 320DM	결장	선암	입수불가
SW837	결장	선암	G12C
KM-12	결장	선암	WT
WIDr	결장	선암	WT
HCT-8	결장	회맹부 결장직장 선암	G13D
RKO	결장	암종	WT
HT-29	결장	암종	WT
SW480	결장	선암	G12V
HCT-15	결장	선암	G13D
HCT-116	결장	암종	G13D
SW48	결장	선암	WT
SW1417	결장	선암	WT
HCC2998	결장	암종	A146T
Calu 6	폐	선암	Q61K
SK-MES-1	폐	편평상피 세포 암종	WT
A549	폐	폐포 기저 상피- 편평상피	G12S
NCI-H2170	폐	편평상피 세포 암종	WT
NCI-H2228	폐	선암	WT
NCI-H23	폐	선암	WT
NCI-H1792	폐	선암	G12C
NCI-H358	폐	기관지-폐포	G12C
NCI-H2122	폐	선암	G12C
NCI-H520	폐	편평상피 세포 암종	WT
NCI-H1299	폐	비-소세포 폐암	WT
NCI-H1563	폐	선암	WT
NCI-H460	폐	대세포 암종	Q61H
NCI-H2030	폐	선암	G12C
BxPC3	췌장	선암	WT
SW1990	췌장	선암	G12D
YAPC	췌장	암종	G12V
MiaPaCa	췌장	암종	G12C
Capan-1	췌장	선암	G12V
HuP-T4	췌장	암종	G12V

표 1 주

세포주 = 세포주 명칭
 장기 부위 = 세포가 유래된 장기
 진단/조직학 = 조직의 병리 진단
 KRAS = 돌연변이 상태; WT = 야생형

[0153]

표 2

각각의 결합 세포주에 대한 기초 척도 및 상승작용 판단

세포주	gIC ₅₀ (nM)	Y _{min}	Y _{min} /T ₀	EOHSA	블리스	조합 지수
Colo201	0.56	4.04	0.22	보통의 상승작용	상가적	보통의 상승작용
Colo205	0.67	-0.41	-0.06	보통의 상승작용	상가적	상승작용
Colo320DM	7.35	15.65	1.55	보통의 상승작용	보통의 상승작용	N/A
Colo320HSR	53.62	22.25	4.65	길항작용	상가적	N/A
DLD1	7.77	12.21	1.71	상승작용	상승작용	상승작용
HCC2998	10.78	8.78	0.97	상승작용	상승작용	상승작용
HCT116	7.50	6.31	1.24	상승작용	상승작용	보통의 상승작용
HCT15	5.46	10.14	1.19	상승작용	보통의 상승작용	N/A
HCT8	23.70	5.64	0.76	상승작용	보통의 상승작용	상승작용
HT29	0.59	1.70	0.19	상승작용	보통의 상승작용	상승작용
KM12	21.95	8.21	0.61	상승작용	상승작용	상승작용
LS1034	12.26	7.20	0.35	보통의 상승작용	길항작용	보통의 상승작용
LS174T	46.60	4.02	0.19	보통의 상승작용	길항작용	N/A
NCIH508	0.08	1.90	0.07	보통의 상승작용	상가적	상승작용
NCIH747	2.59	4.65	0.14	보통의 상승작용	상가적	상승작용
RKO	25.52	1.42	0.15	상승작용	상승작용	상승작용
SW116	#N/A	11.25	0.18	상승작용	상승작용	상승작용
SW1417	1.09	21.32	1.21	상승작용	상가적	상승작용
SW403	1.04	1.51	0.05	상승작용	상가적	상승작용
SW48	0.68	-0.30	-0.02	상승작용	보통의 상승작용	상승작용
SW480	1.35	17.03	0.67	상승작용	상가적	상승작용
SW620	6.95	14.69	2.12	상승작용	상승작용	N/A
SW837	1.24	13.39	0.46	상승작용	상가적	상승작용
SW948	32.97	2.82	0.14	상승작용	상승작용	상승작용
T84	0.78	-3.52	-0.12	상승작용	상승작용	상승작용
WIDr	6.34	-0.02	0.00	보통의 상승작용	상가적	보통의 상승작용

표 2-7 주

세포주 = 중앙-유래 세포주
gIC₅₀ = 50% 성장 억제를 야기하는데 요구되는 화합물의 농도 (nM)
Y_{min} = T=0 (화합물 B 첨가시 세포의 수)에서의 %로 측정된 화합물 B의 존재하에서 최소 세포 성장 (DMSO 대조군 대비). 음수는 T=0에 비해 세포의 순 손실을 나타냄.
Y_{min}/T₀ = T0 값으로 나눈 Y_{min} 값이며, 여기서 Y_{min} 은 농도-반응 곡선으로부터 유도되며, T0 값은 화합물 첨가시 세포의 수를 나타냄 (CTG 측정).
EOHSA= 최고 단일 작용제 대한 초과량 결정
블리스 = 블리스 상승작용 결정
조합 지수 = 조합 지수 점수

[0154]

표 3

각각의 폐 세포주에 대한 기초 척도 및 상승작용 판단

세포주	gIC ₅₀ (nM)	Y _{min}	Y _{min} /T ₀	EOHSA	블리스	조합 지수
NCIH2122	4.01	1.34	0.08	길항작용	길항작용	상승작용
A549	3.00	0.32	0.06	상승작용	보통의 상승작용	상승작용
Calu6	2.79	3.51	0.22	상승작용	상승작용	상승작용
NCIH1299	1.55	11.11	1.14	상승작용	보통의 상승작용	상승작용
NCIH1563	0.41	1.56	0.04	상승작용	상승작용	상승작용
NCIH1792	2.89	1.34	0.05	상승작용	보통의 상승작용	상승작용
NCIH2030	0.92	8.19	0.43	상승작용	보통의 상승작용	상승작용
NCIH2170	3.25	4.05	0.22	상승작용	보통의 상승작용	상승작용
NCIH2228	2.95	3.29	0.28	상승작용	상승작용	상승작용
NCIH23	1.11	7.72	0.47	상승작용	상승작용	상승작용
NCIH358	4.97	2.40	0.11	상승작용	상승작용	상승작용
NCIH460	1.91	5.11	1.25	상승작용	보통의 상승작용	상승작용
NCIH520	5.97	15.31	1.13	상승작용	상승작용	상승작용
SKMES1	2.91	0.09	0.00	상승작용	상승작용	상승작용

[0155]

표 4

각각의 해당 세포주에 대한 기초 척도 및 상승작용 판단

세포주	gIC ₅₀ (nM)	Y _{min}	Y _{min} /T ₀	EOHSA	블리스	조합 지수
BxPC3	0.43	0.81	0.02	상승작용	보통의 상승작용	상승작용
Capan1	1.17	12.34	0.37	상승작용	보통의 상승작용	상승작용
HUPT4	0.22	3.77	0.12	상승작용	상승작용	상승작용
MiaPaCa	5.10	8.10	1.03	상승작용	보통의 상승작용	상승작용
SW1990	5.28	3.28	0.21	상승작용	상승작용	상승작용
YAPC	7.34	16.35	0.81	상승작용	보통의 상승작용	상승작용

[0156]

[0157]

연구 #2. 에스트로겐 수용체에 대해 분석된 유방암 세포주

[0158]

실험 조제물(들)

[0159]

MEK 억제제 (화합물 A) 및 PI3K 억제제 (화합물 B)를 사용한 조합 약물 시험을 인간 유방암으로부터의 세포주의 패널 (n=10) (표 1)을 이용하여 수행했다. 세포주는 시중에서 구입했고 [ATCC (미국 버지니아주 매너서스 소재) 또는 DSMZ (독일 브라운슈바이크 소재)로부터], 2 mM 글루타민, 1 mM 나트륨 피루베이트 및 10% 소태아 혈청으로 보충된 RPMI-1640 중에서 성장시키고, 항습 인큐베이터 내에서 37°C 및 5% CO₂에서 유지시켰다.

[0160]

실험 프로토콜(들)

[0161]

고정 비율 약물 조합물 검정

[0162]

고정 비율 약물 조합물 검정의 회석 설계는 도 1에서 확인할 수 있다. 먼저, 시험 화합물을 100% 디메틸 술폰(DMSO) 중 10 mM 스톱으로 준비했다. 화합물을 DMSO를 이용하여 추가 희석시켰다. 제1 시험 화합물 (화합물 1로 표시)은 96 웰 마이크로타이타 플레이트 내 B-E 열에서 10개의 회석 지점에 대해 3배 단계 희석을 이용하여 수평 방향으로 희석시켰다. 제2 시험 화합물 (화합물 2로 표시)은 별도의 96 웰 마이크로타이타 플레이트 내 D-G 열에서 10개의 회석 지점에 대해 3배 단계 희석을 이용하여 수평 방향으로 희석시켰다. 각각의 약물 플레이트로부터 동일한 부피를 사용하여 세포 배양 배지 안에서 두 화합물을 조합했다. 그 결과 세포 배양 배지 내에서 약물의 1:50 희석이 이루어졌다. 화합물 1은 플레이트의 B 및 C열에서 개별적으로 적정된 한편, 화합물 2는 F 및 G열에서 단독으로 투입되었다. 세포에 약물을 첨가하기 전에 세포 배양 배지 내에서 약물의 추가적 1:10 희석을 수행했다. 세포에 약물을 첨가한 결과 약물의 추가적 1:2 희석이 이루어졌다. 약물 플레이트 대 세포의 총 희석은 1:1000이었다. GSK2126458A에 대한 최종 투여 농도 범위는 0.008-150.0 nM이었고, GSK1120212B의 경우 0.013-250.0 nM이었다. 양성 대조군은 0.1%의 DMSO를 함유하는 배양 배지 및 세포로 이루어졌고, 약물은 함유하지 않았다. 음성 대조군은 0.1%의 DMSO 용액을 함유한 배양 배지로 이루어졌다.

[0163]

검정은 각각의 세포주의 이전 연구로부터 추산된 적절한 시딩 밀도로 96 웰 마이크로타이타 플레이트 내에서 수행되었다. 투여한 후, 세포주를 습한 공기 중 37°C, 5% CO₂에서 72시간 동안 인큐베이션했다. 세포 증식은 셀타이타 글로 (프로메가 코포레이션, 미국 위스콘신주 매디슨 소재) 시약을 생산자 프로토콜에 따라 사용하여 측정했다. 플레이트를 셀타이타 글로 용액으로 처리하고, 몰레쿨라 디바이시스 스펙트라맥스 M5 (미국 캘리포니아주 서니베일 소재) 플레이트 판독기를 사용하여 RLU (상대 광 단위)를 분석했다.

[0164]

데이터 분석

[0165]

강도% 값을 마이크로소프트 엑셀에서 XLfit의 모델 205에서 이용하여 4 파라미터 로지스틱 피트를 사용함으로써, 성장창 gIC₅₀의 중간점, 영점 시간에서의 세포 수 (T₀) 및 반응 곡선의 바닥에서의 강도 값 Y_{min}을 포함하는 반응 계량치를 계산했다. 각각의 조합물 실험은 단일 작용제로서의 두 화합물에 대한 복제물 및 또한 조합물에 대한 기술적 복제물을 함유했다. 평균 값을 후속 분석에 사용했다.

[0166]

세 가지 독립적 계량치를 사용하여 화합물 A 및 화합물 B의 성장 억제에 대한 조합 효과를 분석했다. 상기 계량치에는 i.) 최고 단일 작용제에 대한 초과량 (EOHSA; 문헌 [Borisy et al, 2003]; FDA 21 CFR 300.50), ii.) 블리스 상승작용 및 iii.) 조합 지수 (CI)가 포함된다. 이들 세 가지 계량치 및 그의 계산 방법의 설명은 상기에 기재되어 있다. 또한, 각각의 계량치를 통해 상승작용 정도를 결정하는데 사용하는 기준도 상기에

서 확인할 수 있다. EOHS A 및 블리스에 있어서, 적절한 표기 (상승작용, 보통의 상승작용 등)를 하기 위해서는, 한 실험 내에서 두 기술적 복제물 모두에서 상승작용 점수가 나타나야 한다. 간단하게 말하면, 세 가지 계량치 (CI, 블리스 상승작용, EOHS A) 중 적어도 하나가 상기한 바와 같은 상승작용적 범위 내의 점수를 얻을 경우 상승작용적인 것으로 고려되었다.

[0167] 에스트로겐 수용체 (ER) 및 프로게스테론 수용체 (PR) 전사체 존재비는 어피메트릭스 U133 플러스2 진칩스 (Plus2 GeneChips)를 사용하여 모든 세포주에 대해 삼중으로 측정했다. 전사체 존재비는 모든 프로브 신호 강도를 어피메트릭스 마이크로어레이 어널리시스 스위트 5.0 (Microarray Analysis Suite 5.0)에서 mas5 알고리즘을 이용하여 150의 값으로 정규화하여 추산했다. 후속 분석을 위해, 대표 프로브를 선택하고, 삼중의 평균 프로브 강도를 사용했다.

[0168] **결과**

[0169] 화합물 A 및 B의 조합물로 처리한 각각의 세포주에 대해 상승작용 정도의 종합적 범주화를 수행했다.

표 5

조합물 연구에서 사용된 유방암 세포주의 점수 패널

세포주	장기 부위	진단/조직학
DU4475	유방	암종
EFM19	유방	암종
HCC1954	유방	암종
HCC70	유방	암종
MT3	유방	암종
MX1	유방	암종
NCI-ADR-RES	유방	암종
UACC893	유방	암종
T47D	유방	암종
ZR-75-1	유방	암종

[0170]

표 6

각각의 유방암 세포주에 대한 기초 척도 및 상승작용 판단

세포주	gIC ₅₀ (nM)	Y _{min}	Y _{min} /T ₀	EOHSA	블리스	조합 지수
DU4475	0.12	-0.29	-0.02	상승작용 없음	상승작용 없음	보통의 상승작용
EFM19	3.43	14.97	0.49	상승작용 없음	상승작용 없음	N/A
HCC1954	6.53	0.32	0.03	상승작용	상승작용	상승작용
HCC70	0.31	-0.63	-0.02	상승작용	상승작용	상승작용
MT3	4.47	5.59	0.39	상승작용	상승작용	상승작용
MX1	5.99	13.99	1.04	상승작용 없음	상승작용 없음	N/A
NCI-ADR-RES	49.01	36.28	2.17	상승작용	상승작용	N/A
UACC893	3.44	-0.32	-0.01	보통의 상승작용	보통의 상승작용	N/A
T47D	0.93	23.68	0.97	상승작용	상승작용	N/A
ZR-75-1	0.03	2.73	0.06	상승작용 없음	상승작용 없음	상승작용

[0171]

표 7

화합물 B 및 화합물 A에 대한 조합물 실험에 사용된 유방 세포주의 패널 (n=10), ER/PR 전사체 존재비 측정

CL 명칭	에스트로젠 수용체 발현 (mas5)	프로게스테론 수용체 발현 (mas5)
HCC70	75	33
DU4475	32	30
HCC1954	128	34
NCI-ADR-RES	42	120
UACC893	114	37
EFM19	2122	1333
MT3	34	25
MX1	1318	74
T47D	1329	3621
ZR-75-1	822	1103

[0172]

[0173] 연구 #3. Her2 DNA 사본 수 변화에 대해 분석한 간세포 암종 세포주 패널 및 유방암 세포주 패널에서의, 화합물 A 및 B에 의한 시험관내 세포 성장 억제 및 아폽토시스 유도

[0174] 세포주 및 성장 조건

[0175] 간세포 암종 (HCC)으로부터의 인간 종양 세포주 C3A, Hep3B, HepG2, PLC/PRF/5, SNU182, SNU387, SNU398, SNU423, SNU449 및 SNU475를 ATCC로부터 구입했다. 인간 유방 종양 세포주 HCC2218, HCC1419, BT-474, SK-BR-3, UACC893, JIMT-1, MDA-MB-361, HCC202, MDA-MB-175-VII, HCC1569, HCC1937, HCC38, MDA-MB-157, HCC1954, HCC1500, BT483, KPL-1, SUM225 및 ZR-75-1 (ATCC로부터), SUM52 및 SUM190 (애스터랜드, PLC (Asterand, PLC) (미국 미시간주 디트로이트 소재)로부터)을 10% FBS를 함유하는 RPMI 1640 배지 내에서 배양했고; SKBR3-W13 및 BT-474-J4는 10% FBS 및 1 μM 라파티닙을 함유하는 RPMI 1640 배지 내에서 배양했고; KPL4 세포주는 준이치 구레바야시 박사 (Dr. Junichi Kurebayashi) (가와사키 메디컬 스쿨 (Kawasaki Medical School), 일본 오카야마 소재)로부터 호의로 제공받아, 5% FBS를 함유하는 DMEM 내에서 배양했다. 유러피안 컬렉션 오브 셀 컬처스 (European Collection of Cell Cultures; 영국)으로부터의 JIMT-1은 트라스투주맙 (헤르셉틴(Herceptin)®

)에 임상적으로 내성인 환자로부터 유래된 세포주이다. SK-BR-3-W13은 SK-BR-3 세포를 0.5 μM 라파티닙으로 단일 처리한 후 클로닝 실린더 (cloning cylinder)로 단리한 단일 세포 클론이다. BT-474-J4는 3 μM 농도까지의 라파티닙 내에서 성장하는 것으로 선별된 BT-474 세포의 풀로부터 유래된 단일 세포 클론이다.

[0176] 세포 성장 억제 측정 및 조합물 데이터 분석

[0177] 세포를 10% FBS를 함유하는 RPMI 배지의 96-웰 조직 배양 플레이트 (NUNC 136102)에 웰 당 500-2,000개의 세포로 시딩했다. 플레이트 후 대략 24시간 후, 세포를 화합물 A 또는 B 또는 2:1 몰비의 두 작용제 (각각 화합물 A 및 B)의 조합물의 10개의, 2배 또는 3배 단계 희석물에 노출시켰다. 일부 경우, 세포를 10% FBS를 함유하는 RPMI 배지 내에서 2 ng/mL 간세포 성장 인자 (HGF)의 존재 또는 부재 하에서 성장시켰다. 세포를 화합물의 존재하에서 3일 동안 인큐베이션했다. ATP 수준을 셀타이터-글로®

(프로메가)를 생산자의 프로토콜에 따라 첨가하여 측정했다. 간단하게 기재하면, 셀타이터-글로®

를 각각의 플레이트에 첨가하고, 20분 동안 인큐베이션한 후, 발광 신호를 스펙트라맥스 (SpectraMax) L 플레이트 판독기 상에서 0.5초 통합 시간으로 판독했다. 모든 검정은 적어도 2중으로 수행했다.

[0178] 세포 성장의 억제는 화합물 또는 화합물들의 조합물로 3일 동안 처리한 후 추산하고 비히클 (DMSO)로 처리한 세포와 신호를 비교했다. 세포 성장은 비히클 (DMSO) 처리된 대조군 웰과 비교하여 계산했다. 하기 수식:

$$y = \frac{A + (B - A)}{1 + \left(\frac{C}{x}\right)^D}$$

[0179]

[0180]

(식 중, A는 최소 반응 (y_{min})이고, B는 최대 반응 (y_{max})이고, C는 곡선의 변곡점 (EC_{50})이고, D는 힐 계수임)으로 비선형 회귀를 이용하여, DMSO 처리된 대조군 웰의 $y=50\%$ 일 때 대조군 세포 성장의 50%를 억제하는 화합물의 농도 (IC_{50})를 내삽했다.

[0181]

효능에 대한 조합 효과를, 조합 지수 (CI) 및 최고 단일 작용제에 대한 초과량 (EOHSA) 방법을 이용하여 평가했다.

[0182]

본 연구에서, $CI < 0.9$ 또는 $EOHSATD > 0$ 일 경우, 화합물 A 및 B의 공동-투여는 특정 세포주에서 효능 또는 반응 규모에 있어서 상승작용적 상호작용을 나타내는 것이다.

[0183]

세포 아폽토시스 검정- 카스파제-3/7 활성화 및 DNA 단편화

[0184]

아폽토시스의 유도를 조사하기 위하여, 모든 세포주를 96-웰 조직 배양 플레이트 내에 웰 당 5,000개 세포로 플레이팅하고 대략 24시간 동안 부착되도록 했다. 그 후, 세포를 상기한 화합물로 처리했다. 화합물 처리 24시간 후, 활성화 카스파제 3 및 카스파제 7의 수준을 카스파제 글로™ 3/7 (프로메가, cat G8093)을 이용하여 생산자가 제공한 지침에 따라 측정했다. 화합물로 처리한 48시간 후, 아폽토시스의 수준을 로슈 세포 사멸 ELISA (로슈, 인크 (Roche, Inc.), 스위스 바젤 소재; Cat. No. 11 774 425 001)를 이용하여 생산자가 제공한 지침에 따라 추산했다.

[0185]

선택된 세포주의 분자 특성화의 목적상, 여러 주요한 단백질의 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 측정했다. 이에 는, E-카드헤린 (CDH-1), 비멘틴 (VIM), HER3 STAT3, MET, AKT 및 ERK1/2가 포함되었다. 각 경우 대조군으로서 액틴을 사용했다.

[0186]

DNA 사본 수

[0187]

HER2 유전자에 대한 DNA 사본 수 데이터를, 어피메트릭스 500K 칩 (어피메트릭스 인크, 미국 캘리포니아주 서니베일 소재)을 사용하여 모든 유방암 세포주에 대해 수집했다. 간단하게 기재하면, 각각의 세포주로부터 DNA를 추출하고, 제한 효소 Nsp 또는 Sty로 절단하고, 어댑터에 결합시키고, PCR로 증폭시켰다. PCR 후, DNA를 단편화시키고, 표지하고, 변성시키고, 어피메트릭스 500K 칩에 혼성화시켰다. 혼성화 완결시, 각각의 검정물을 세척하고 염색했다. 이미지 데이터를 획득했다. 패널 10 이배체 비-종양형성 림프모구성 세포주로부터 유사하게 수집된 데이터를 사용하여 DNA 사본 수를 계산했다. 모든 'SNP 칩' 이미지 ('CEL 파일')는 디칩 (dChip) 소프트웨어 패키지를 이용하여 추출하고, 판독하고, 정규화했다 (문헌 [Lin *et al.* 2004. *Bioinformatics*. 20:1233-40]). 림프모구성 참조 패널을 이용하여 모든 암 세포주에 대해 SNP-방식 '사본-수 비율' (\log_2 스케일)을 계산하고, 원형 이진 세그먼트화 (circular binary segmentation)로 분석하여 잡음을 감소시켰다 (문헌 [Olshen *et al.* 2004. *Biostatistics*. 5:557-72]). HER2의 \log_2 비율 > 0.65 인 세포주는 HER2+인 것으로 간주되었다.

[0188]

결과

[0189]

화합물 A 및 화합물 B 조합물에 의한 간세포 암종 세포주에 대한 세포 성장 억제 및 아폽토시스의 효과

[0190]

10개의 간세포 암종 (HCC) 세포주에서 웨스턴 블롯으로 분석한 유전적 배경 및 단백질 발현을 도 2에 나타내었다. 세포주 C3A, Hep3B, HepG2, PLC/PRF/5 및 SNU182는 높은 수준의 CDH-1을 발현하고, 극히 낮은 내지 낮은 수준의 VIM을 발현하는 한편, SNU387, SNU398, SNU423, SNU449 및 SNU475 세포주는 비교적 높은 수준의 VIM 및 극히 낮은 수준의 CDH-1을 발현한다. 높은 수준의 CDH-1 및 낮은 수준의 VIM 또는 VIM의 부재는 상피 세포의 특징인 한편, 높은 VIM 및 낮은 CDH-1은 간엽 세포의 특징이다. 따라서, C3A, Hep3B, HepG2, PLC/PRF/5 및 SNU182는 상피-유사 세포로, SNU387, SNU398, SNU423, SNU449 및 SNU475는 간엽-유사 세포로 정의된다. 이는 HER3이 상피-유사 HCC 세포주에서 고도로 발현되고, AXL이 간엽-유사 세포에서 고도로 발현된다는 사실과 부합한다 (이 데이터는 또한 도 2에 제시됨). STAT3, AKT 및 ERK1/2 (총 단백질)는 상피-유사 및 간엽-유사 세포주에서 유사한 수준으로 발현된 한편, MET 발현은 가변적이었으나, 세포의 어느 군과도 구별되도록 연관되지 않았다. AKT의 인산화/활성화는 간엽-유사 세포주에서 pAKT-T308 보다 pAKT-S473에서 높

은 수준으로 우선적으로 관찰된다. pERK1/2 또한 간엽-유사 세포에서 우선적으로, 그러나 배타적이지 않게 존재했다.

[0191] 화합물 A, 화합물 B 및 이들의 조합물에 의한 세포 성장 억제의 효과가 10개 HCC 세포주에서 결정됐다. (적어도 두 독립적 실험으로부터의) 평균 IC₅₀ 및 IC₅₀에서의 조합 효과가 표 8에 요약되어 있다. 세 상피-유사 HCC 세포주 (HepG2, C3A 및 Hep3B)는 화합물 A에 의한 세포 성장 억제에 강하게 민감했고 (IC₅₀ < 37 nM), SNU 182 및 PLC/PRF/5 상피-유사 세포주는 화합물 A에 약하게 민감했다 (IC₅₀ = 1.2-2.8 μM). 두 간엽-유사 HCC 세포주 (SNU387 및 SNU423)는 화합물 A에 의한 세포 성장 억제에 중간정도로 민감했던 한편 (IC₅₀ = 74-577 nM), 세 간엽-유사 세포주 (SNU398, SNU449 및 SNU475)는 화합물 A에 의한 세포 성장 억제에 민감하지 않았다. 모든 10개의 HCC 세포주는 화합물 B에 의한 세포 성장 억제에 민감했다 (IC₅₀ < 103 nM). 나아가, 화합물 A 및 화합물 B (1:2 비율)를 이용한 조합물 처리는, 10개 중 8개의 HCC 세포주에서 0.22 내지 0.78 범위의 조합 지수 값으로 확인되었던 또는 EOHSATD 분석 (5-20 ppt) 및 EOHA 분석 (12-27 ppt)에 의해 최고 단일 작용제보다 더 큰 바 강한 상승작용을 나타냈다. HGF의 존재는 약물 단독 또는 조합물에서 반응성에 대한 일관된 효과를 갖지 않았다.

[0192] 이러한 10개의 HCC 세포주를, 카스파제 3/7 활성으로 결정되는, 화합물 A, 화합물 B 또는 화합물 A 및 화합물 B의 조합물의 아포토시스 유도 능력에 대해 추가로 평가했다. 카스파제 3의 활성화는 아포토시스 유도의 특징이다. 이러한 세포에 대한 대표적 카스파제 3/7 활성 곡선은 도 3에 제공되었다. SNU182를 제외한 모든 세포주는 화합물 A 또는 화합물 B를 이용한 단일 작용제 처리에 비해, 화합물 A 및 화합물 B를 이용한 조합물 처리에 의해 아포토시스의 강한 증강을 나타냈다. SNU182 세포는 화합물 A 및 화합물 B의 단일 작용제 처리에 비해, 이들을 이용한 조합물 처리에 의해 아포토시스의 중간정도의 증강을 나타냈다.

[0193] Her2 수준으로 측정되는 화합물 A 및 화합물 B 조합물에 의한 인간 유방 종양 세포주에 대한 세포 성장 억제의 효과

[0194] HER2 유전자에서의 사본 수 변경의 분석으로 14개가 HER2 양성 (HER2+) 유방 종양 세포주로서 확인되었다. 이는 BT474, BT474-J4, HCC1419, HCC1954, HCC202, HCC2218, JIMT-1, KPL-4, MDA-MB-361, SK-BR-3, SK-BR-3-W13, SUM190, SUM225 및 UACC893이었다. 총 10개는 HER2 음성 (HER2-)으로 간주되었다. 이에 BT483, HCC1500, HCC1569, HCC1937, HCC38, KPL-1, MDA-MB-157, MDA-MB-175-VII, ZR-75-1 및 SUM52가 포함된다.

[0195] 화합물 A, 화합물 B 및 이들의 조합물에 의한 세포 성장 억제의 효과를 이러한 25개 세포주에서 결정했다. (적어도 두 독립적 실험으로부터의) 평균 IC₅₀ 값 및 IC₅₀ 값에서의 조합 효과를 표 9에 요약했다.

[0196] 세포주 SUM52 및 MDA-MB-175II는 IC₅₀ 값 0.099 μM 이하로 화합물 A에 민감하다. 대조적으로, HCC1937, SK-BR-3-W13 및 MDA-MB-157을 제외한 모든 세포주는 IC₅₀ < 0.1 μM으로 화합물 B에 민감하다. 화합물 A 및 화합물 B의 조합물은 SUM52, HCC1954 (HER2+) 및 MDA-MB-175II (HER2-) 세포주에서 조합 지수 (CI) 값 0.48 내지 0.83으로 및 가장 활성인 단일 작용제 분석 (EOSHA)보다 큰 15 내지 25 ppt로서 상승작용을 나타냈다. 화합물 A 및 화합물 B의 조합물은 또한 HER2+ (SUM190, HCC202) 및 HER2- 세포주 (MDA-MB-157, HCC1937)의 부분집합에서 가장 활성인 단일 작용제 분석 (EOSHA)보다 큰 10 내지 15 ppt의 이점을 나타냈다. 화합물 A 및 화합물 B의 조합물은 나머지 세포주에서 가장 활성인 단일 작용제에 필적하는 효과를 나타냈다. Her2+ 세포주 (n=14)에 대한 평균 EOHA 점수는 9.1 (±7.4)인 한편, Her2- 세포주 (n=10)에 대한 평균 점수는 6.9 (±7.2)이었다. 이러한 EOHA 점수는 군 간에 유의하게 상이하지 않았다 (p = 0.45; t-시험).

표 8

인간 간세포 암종 중앙 세포주에서 화합물 A, 화합물 B 및 이들의 조합물에 의한 세포 성장 억제.

세포주	HGF (2ng/ml)	단일 작용제 (IC ₅₀ , μM)		조합물 (IC ₅₀ , μM)		조합 효과 (A:B=1:2)			
		화합물 A	화합물 B	화합물 A	화합물 B	CI	EOHSATD, ppt	EOHSA, ppt	
상피 유사	HepG2	-	0.001 ±0.000	0.009 ±0.008	0.001 ±0.000	0.001 ±0.001	0.72 ±0.05	<0	13.5 ±5.0
		+	0.003 ±0.001	0.009 ±0.008	0.001 ±0.000	0.002 ±0.001	0.57 ±0.12	8.2 ±1.1	22.7 ±7.3
	C3A	-	0.010 ±0.003	0.013 ±0.001	0.001 ±0.000	0.002 ±0.000	0.30 ±0.06	11.4 ±3.6	20.6 ±1.4
		+	0.036 ±0.011	0.013 ±0.001	0.002 ±0.000	0.004 ±0.001	0.39 ±0.03	11.1 ±2.2	16.5 ±2.1
	Hep3B	-	0.026 ±0.008	0.028 ±0.002	0.005 ±0.003	0.010 ±0.005	0.61 ±0.26	12.6 ±9.9	19.2 ±9.9
		+	0.037 ±0.008	0.057 ±0.020	0.006 ±0.000	0.012 ±0.001	0.44 ±0.18	19.3 ±10.2	25.0 ±9.7
	SNU182	-	1.758 ±0.224	0.017 ±0.001	0.003 ±0.000	0.005 ±0.000	0.31 ±0.01	13.4 ±2.0	20.5 ±2.7
		+	1.282 ±1.223	0.017 ±0.004	0.002 ±0.000	0.005 ±0.000	0.29 ±0.09	14.9 ±6.0	21.5 ±6.2
	PLC/RF/5	-	1.604 ±0.509	0.018 ±0.012	0.002 ±0.001	0.005 ±0.002	0.32 ±0.12	15.4 ±10.6	22.2 ±10.8
		+	2.871 ±1.556	0.015 ±0.001	0.003 ±0.001	0.006 ±0.001	0.41 ±0.06	8.4 ±1.8	15.3 ±1.4
간엽 유사	SNU423	-	0.218 ±0.130	0.023 ±0.016	0.006 ±0.003	0.011 ±0.007	0.55 ±0.05	4.8 ±1.8	11.7 ±2.1
		+	0.577 ±0.569	0.021 ±0.007	0.008 ±0.004	0.016 ±0.008	0.78 ±0.09	<0	5.9 ±2.7
	SNU449	-	>5	0.024 ±0.006	0.013 ±0.007	0.026 ±0.013	NA	<0	-0.6 ±5.6
		+	>5	0.024 ±0.011	0.015 ±0.003	0.029 ±0.006	NA	<0	-3.5 ±4.3
	SNU475	-	>5	0.050 ±0.019	0.016 ±0.002	0.033 ±0.003	NA	<0	9.0 ±11.4
		+	>5	0.039 ±0.017	0.018 ±0.003	0.036 ±0.007	NA	<0	0.3 ±16.9
	SNU398	-	>5	0.098 ±0.021	0.009 ±0.003	0.020 ±0.007	NA	20.1 ±4.8	26.9 ±5.7
		+	>5	0.083 ±0.002	0.008 ±0.001	0.016 ±0.001	NA	20.1 ±1.7	26.8 ±2.0
	SNU387	-	0.074 ±0.046	0.103 ±0.010	0.006 ±0.002	0.012 ±0.004	0.22 ±0.00	14.2 ±4.9	21.0 ±0.8
		+	0.094 ±0.021	0.071 ±0.010	0.008 ±0.003	0.016 ±0.005	0.34 ±0.13	11.3 ±4.9	15.4 ±4.8

표 8 주:

HGF: 간세포 성장 인자; '+'=존재시, '-'=부재시.

IC₅₀: 세포 성장을 50% 감소시키는 화합물(들)의 농도;

CI: 조합 지수; NA =적용불가

EOHSATD: 총 투여량에서의 최고 단일 작용제 대한 초과량 (Excess Over Highest Single Agent at Total Dose), %로 측정

EOHSA: 최고 단일 작용제 대한 초과량 (Excess Over Highest Single Agent), %로 측정

[0197]

표 9

유방 중앙 세포주에서 화합물 A, 화합물 B 및 이들의 조합물에 의한 세포 성장 억제.

유방 세포주	HER2	단일 작용제 (IC ₅₀ , μM)		조합물 (A:B=1:1)		
		화합물 A	화합물 B	화합물 A 또는 B (IC ₅₀ , μM)*	CI	EOHSA (A 또는 B; ppt)
HCC1954	HER2+	1.018 ±0.839	0.011 ±0.003	0.005 ±0.002	0.48 ±0.07	24.5 ±3.3
SUM190	HER2+	>1	0.006 ±0.003	0.003 ±0.001	NA	15.0 ±5.6
HCC202	HER2+	>1	0.045 ±0.004	0.013 ±0.000	NA	11.5 ±0.3
HCC2218	HER2+	>1	0.018 ±0.013	0.009 ±0.002	NA	9.6 ±9.4
JIMT-1	HER2+	>1	0.028 ±0.005	0.018 ±0.002	NA	9.3 ±6.7
UACC893	HER2+	>1	0.003 ±0.003	0.002 ±0.002	NA	8.6 ±3.8
SK-BR-3-W13	HER2+	>1	0.129 ±0.099	0.091 ±0.107	NA	6.8 ±5.2
BT474-J4	HER2+	>1	0.014 ±0.008	0.012 ±0.011	NA	5.6 ±4.9
MDA-MB-361	HER2+	>1	0.009 ±0.002	0.007 ±0.002	NA	4.3 ±4.8
HCC1419	HER2+	>1	0.024 ±0.014	0.020 ±0.011	NA	3.7 ±3.1
KPL4	HER2+	>1	0.003 ±0.001	0.003 ±0.001	NA	-1.7 ±7.8
SK-BR-3	HER2+	>1	0.024 ±0.020	0.024 ±0.016	NA	-1.6 ±2.4
SUM225	HER2+	>1	0.013 ±0.014	0.011 ±0.011	NA	1.2 ±2.7
BT474	HER2+	>1	0.030 ±0.007	0.033 ±0.010	NA	-0.9 ±1.1
SUM52	HER2-	0.009 ±0.005	0.004 ±0.000	0.002 ±0.000	0.83 ±0.11	22.7 ±5.5
MDA-MB-175-VII	HER2-	0.099 ±0.097	0.007 ±0.001	0.004 ±0.001	0.60 ±0.08	15.0 ±5.1
MDA-MB-157	HER2-	>1	>1	0.077 ±0.047	NA	15.5 ±4.2
HCC1937	HER2-	>1	0.114 ±0.063	0.069 ±0.048	NA	11.0 ±3.8
KPL1	HER2-	>1	0.008 ±0.004	0.007 ±0.002	NA	2.0 ±3.4
ZR-75-1	HER2-	>1	0.006 ±0.001	0.005 ±0.001	NA	3.2 ±0.5
BT483	HER2-	>1	0.106 ±0.081	0.082 ±0.083	NA	4.4 ±4.4
HCC1500	HER2-	>1	0.061 ±0.036	0.035 ±0.012	NA	9.5 ±5.8
HCC38	HER2-	>1	0.095 ±0.034	0.059 ±0.005	NA	9.7 ±7.8
HCC1569	HER2-	>1	0.076 ±0.042	0.095 ±0.082	NA	-1.6 ±7.5

표 9 주:
 HER2: HER2+ = HER2 양성, HER2 DNA 사본 수의 log₂ 비율 > 0.65; HER2- = HER2 음성,
 HER2 DNA 사본 수의 log₂ 비율 < 0.65.
 *IC₅₀: 세포 성장을 50% 감소시키는 등물 화합물 B의 존재 하의 화합물 A의 농도;
 CI: 조합 지수; NA = 적용불가; EOHSA: 최고 단일 작용제 대한 초과량, %로 측정.

[0198]

[0199] 실시예 1 - 캡슐 조성물

[0200] 하기 표 I에 나타난 비율의 성분을 표준 2-조각 경질 젤라틴 캡슐에 채워 본 발명의 조합물을 투여하기 위한 경구 투여 형태를 제조했다.

[0201] [표 I]

성분	양
N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드 디메틸 술폰사이드 (화합물 A의 디메틸 술폰사이드 용매화물)	5mg
2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드 (화합물 B)	10mg
만니톨	50 mg
활석	25 mg
스테아르산마그네슘	2mg

[0202]

[0203] 실시예 2 - 캡슐 조성물

[0204] 하기 표 II에 나타난 비율의 성분을 표준 2-조각 경질 젤라틴 캡슐에 채워 본 발명의 화합물 중 하나를 투여 하기 위한 경구 투여 형태를 제조했다.

[0205] [표 II]

성분	양
N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드 디메틸 술폰시드 (화합물 A의 디메틸 술폰시드 용매화물)	5mg
만니톨	55 mg
활석	16 mg
스테아르산마그네슘	4 mg

[0206]

[0207] 실시예 3 - 캡슐 조성물

[0208] 하기 표 III에 나타난 비율의 성분을 표준 2-조각 경질 젤라틴 캡슐에 채워 본 발명의 화합물 중 하나를 투여 하기 위한 경구 투여 형태를 제조했다.

[0209] [표 III]

성분	양
2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드 (화합물 B)	10mg
만니톨	50mg
활석	25mg
스테아르산마그네슘	2mg

[0210]

[0211] 실시예 4 - 정제 조성물

[0212] 하기 표 IV에 나타난 수크로스, 미세결정질 셀룰로스 및 본 발명의 조합물의 화합물을, 나타난 비율로 10% 젤라틴 용액과 혼합하고 과립화했다. 습식 과립을 스크리닝하고, 건조시키고, 전분, 활석 및 스테아르산과 혼합하고, 이어서 스크리닝하고 정제로 압착시켰다.

[0213] [표 IV]

성분	양
N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드 디메틸 술폰시드 (화합물 A의 디메틸 술폰시드 용매화물)	10mg
2,4-디플루오로-N-{2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐}벤젠술폰아미드 (화합물 B)	10mg
미세결정질 셀룰로스	60mg
수크로스	5mg
전분	10mg
활석	5mg
스테아르산	2mg

[0214]

[0215] 실시예 5 - 정제 조성물

[0216] 하기 표 V에 나타난 수크로스, 미세결정질 셀룰로스 및 본 발명의 조합물의 한 화합물을, 나타난 비율로 10% 젤라틴 용액과 혼합하고 과립화했다. 습식 과립을 스크리닝하고, 건조시키고, 전분, 활석 및 스테아르산과 혼합하고, 이어서 스크리닝하고 정제로 압착시켰다.

[0217] [표 V]

성분	양
N-{3-[3-시클로프로필-5-[(2-플루오로-4-아이오도페닐)아미노]-6,8-디메틸-2,4,7-트리옥소-3,4,6,7-테트라히드로피리도[4,3-d]피리미딘-1(2H)-일]페닐}아세트아미드 디메틸 술폰시드 (화합물 A의 디메틸 술폰시드 용매화물)	5mg
미세결정질 셀룰로스	30mg
수크로스	4mg
전분	2mg
활석	1mg
스테아르산	0.5mg

[0218]

[0219] 실시예 6 - 정제 조성물

[0220] 하기 표 VI에 나타낸 수크로스, 미세결정질 셀룰로스 및 본 발명의 조합물의 한 화합물을, 나타낸 비율로 10% 젤라틴 용액과 혼합하고 과립화했다. 습식 과립을 스크리닝하고, 건조시키고, 전분, 활석 및 스테아르산과 혼합하고, 이어서 스크리닝하고 정제로 압착시켰다.

[0221] [표 VI]

성분	양
2,4-디플루오로-N-(2-(메틸옥시)-5-[4-(4-피리다지닐)-6-퀴놀리닐]-3-피리디닐)벤젠술폰아미드 (화합물 B)	10mg
미세결정질 셀룰로스	60mg
수크로스	5mg
전분	10mg
활석	5mg
스테아르산	2mg

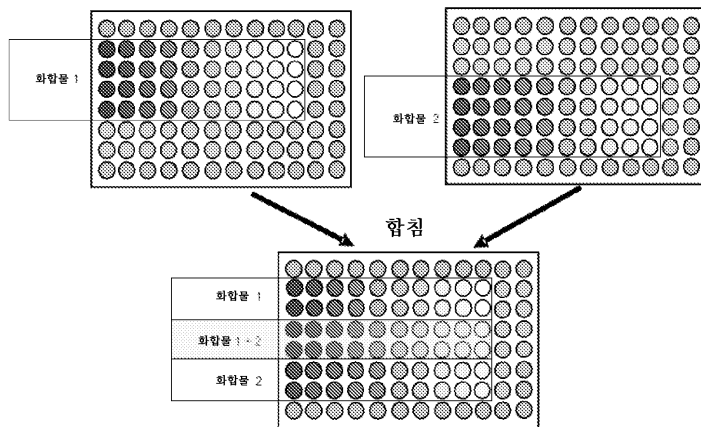
[0222]

[0223] 본 발명의 바람직한 실시예를 상기 예시했지만, 본 발명은 본원에 개시된 정확한 지침에 한정되는 것이 아니며, 후속되는 청구범위의 범주 내에 들어가는 모든 변경사항에 대한 권리가 보호된다는 것이 이해되어야 한다.

도면

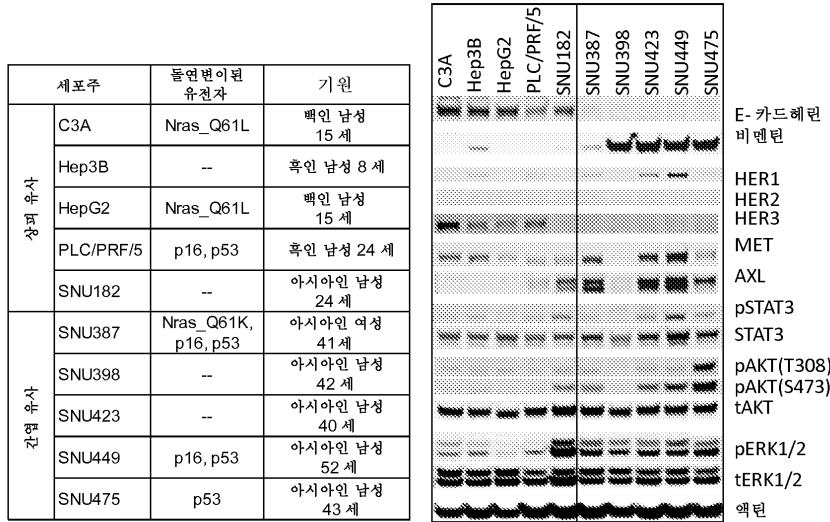
도면1

96 웰 플레이트에서 고정 농도 투여를 위한 플레이트 배열의 표시



도면2

HCC 세포주에서의 유전적 돌연변이 상태 및 단백질 발현.
HCC 세포로부터의 총 세포 용해물 (50 μ g)을 표시된 바와 같은 특이적 항체로 탐침함.
 β -액틴을 부하 대조군으로 사용함.



* 선택된 암 유전자에 대한 돌연변이

도면3

카스파제 3/7 활성화로 측정된 아폴토시스 유도.

