



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0077193
(43) 공개일자 2016년07월01일

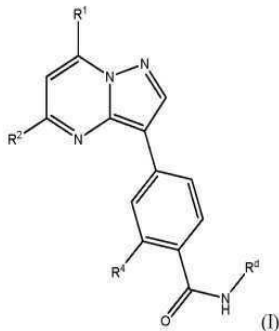
- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 487/04 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)
C07D 401/12 (2006.01) C07D 471/04 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C07D 487/04 (2013.01)
A61K 31/519 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-7014375</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2014년11월14일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2016년05월30일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/CA2014/051091</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2015/070349
국제공개일자 2015년05월21일</p> <p>(30) 우선권주장
PCT/CA2013/000957 2013년11월15일 캐나다(CA)</p> | <p>(71) 출원인
유니버시티 헬스 네트워크
캐나다 온타리오 엠5췌 2췌4 토론토 엘리자베스
스트리트 190 알. 프레이저 엘리엇 빌딩-룸 1
에스-417</p> <p>(72) 발명자
라우퍼, 라도슬라프
캐나다 온타리오 엠6엠 4췌8 오크빌 메도우글렌
드라이브 2145
엔취, 그레이스
캐나다 온타리오 엠6췌 0케이8 마크햄 스테글린
코트 23
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
인비전 특허법인</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 피라졸로피리미딘 화합물

(57) 요약

본 발명은 하기 구조식 (식 (I))으로 표현되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:



. 또한, 약학적 조성물 및 이의 이용 방법이 기재되어 있다.

(52) CPC특허분류

C07D 401/12 (2013.01)

C07D 471/04 (2013.01)

(72) 발명자

리, 시즈-완

캐나다 토론토 온타리오 엠5엔 1케이2 로즈론 에비뉴 509

폴스, 하인즈 더블유.

캐나다 온타리오 엘6엘 5에이4 오크빌 포쓰 라인 460

리우, 용

캐나다 온타리오 엘6에이치 3케이5 오크빌 하크로프트 코트 1066

파텔, 나렌드라 쿠마르 비.

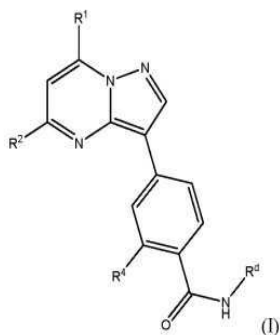
캐나다 온타리오 엘6알 2알4 브램턴 비치서프 로드 21

명세서

청구범위

청구항 1

하기 구조식으로 표현되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:



식에서, R^1 은 $-NH-CH_2-Cy$,

Cy는 알킬 및 하이드록실로부터 선택되는 한 개 또는 두 개의 기로 선택적으로 치환되는 C_3-C_4 사이클로알킬;

R^2 는 -O-피리디닐; 사이클로프로필 또는 이소프로필로 선택적으로 치환되는 $-NH-(C_2-C_6)$ 하이드록시알킬; 또는 하이드록실 또는 (C_1-C_2) 하이드록시알킬로 선택적으로 치환되는 $-NH-(C_3-C_6)$ 사이클로알킬;

R^4 는 수소, 할로젠, 및 (C_1-C_3) 알킬에서 선택되고; 및

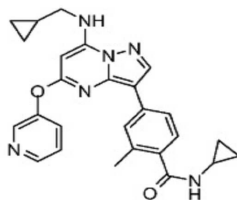
R^d 는 사이클로프로필이다.

청구항 2

제1항에 있어서, R^4 는 염소 또는 메틸인 화합물.

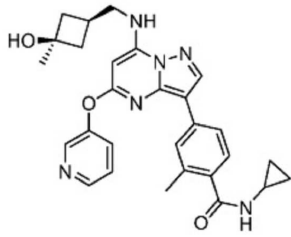
청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화합물은 다음 구조식으로 표현되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 화합물:



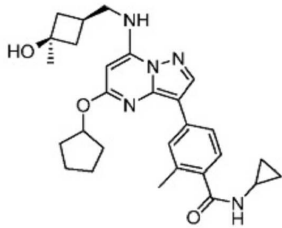
청구항 4

제1항에 있어서, 상기 화합물은 다음 구조식으로 표현되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 화합물:



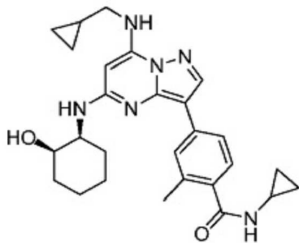
청구항 5

제1항에 있어서, 상기 화합물은 다음 구조식으로 표현되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 화합물:



청구항 6

제1항에 있어서, 상기 화합물은 다음 구조식으로 표현되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 화합물:



청구항 7

이전 청구항들 중 어느 한 항에 따른 화합물 및 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 8

암 치료가 필요한 대상체에 유효한 양의 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 상기 화합물 또는 제7항의 상기 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 암을 치료하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 암은 췌장암, 전립선암, 폐암, 흑색종, 유방암, 대장암, 또는 난소암인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련출원

[0002] 본 출원은 2013년 11월 15일자로 출원된 국제 출원 번호 제 PCT/CA2013/000957호에 대한 이익을 주장한다. 이 출원의 전체 내용은 참조로서 본원에 병합된다.

배경 기술

[0003] 발명의 배경

[0004] 단백질 키나아제는 암과 같은 다양한 질병을 위한 새로운 치료 제제들에 대한 연구에 있어 집중적으로 연구의 대상이 되고 있다. 단백질 키나아제는 뉴클레오시드 트리포스페이트에서 신호전달 경로에 관여하는 단백질 수용체로 포스포릴을 전달함으로써, 세포내 신호전달을 매개한다고 알려졌다. 세포외 및 기타 자극들이 세포 내에서 다양한 세포 반응을 일으키게 하는 수많은 키나아제 및 경로들이 있다.

[0005] 티로신 트레오닌 키나아제, 이중 특이성 단백질 키나아제 TTK, 단극성 스핀들 1 (Monopolar Spindle 1, Mps1), 및 포스포티로신-픽크 트레오닌 키나아제(Phosphotyrosine-Picked Threonine Kinase, PYT)으로도 알려진, 인간 TTK 단백질 키나아제(TTK)는, 대장균에서 발현될 경우, 세린, 트레오닌, 및 티로신 잔기를 인산화할 수 있는 보존성 다중특이적 키나아제이다 (Mills *et al.*, *J. Biol. Chem.* 22(5): 16000-16006 (1992)). TTK mRNA는 인간의 대부분의 생리적 정상 조직에서는 발현되지 않는다(*Id.*). TTK mRNA는 고환 및 흉선과 같은 일부 빠르게 증식하는 조직뿐만 아니라 일부 종양에서 발현된다(예컨대, TTK mRNA는 신장 세포 암종에서는 발현되지 않았고, 유방암 샘플 중 50%에서 발현되었으며, 고환 종양과 난소암 샘플에서 발현되었음, *Id.*). TTK는 정상적인 세포에 대하여 일부 암 세포주 및 종양에서 발현된다(*Id.*; WO 02/068444 A1도 참조).

[0006] 따라서, 단백질 키나아제, 특히 TTK를 저해하는 제제는 암을 치료할 잠재성을 가진다. 단백질 키나아제 저해제, 특히 TTK 저해제로서 작용할 수 있는 추가 제제가 필요하다.

[0007] 또한, 암 재발, 약물 내성, 또는 전이는 암 치료의 주요 과제 중 하나이다. 초기 항암요법에 양호하게 반응하는 암 환자들은 종종 질병의 재발을 일으키는 약물 내성 및 이차 종양으로 발전한다. 종양의 성장 및 번식 능력이 종양 내의 세포 소형 서브세트에 따라 달라진다고 것은 최근의 연구가 입증하고 있다. 이러한 세포들을 종양-개시 세포(tumor-initiating cells, TICs) 또는 암 줄기 세포라 한다. TIC는 약물 내성, 암 재발 및 전이와 관련이 있다고 생각된다. 이러한 종양-개시 세포의 성장 및 생존을 저해할 수 있는 화합물을 암, 전이를 치료하거나 암의 재발을 방지하는데 이용할 수 있다. 따라서, 종양-개시 세포의 성장 및 생존을 저해할 수 있는 새로운 화합물이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

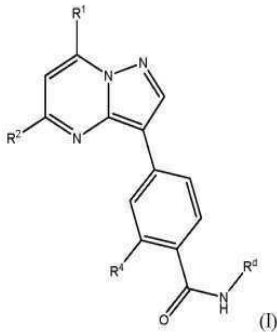
[0008] 본 발명의 목적은 종양-개시 세포의 성장 및 생존을 저해할 수 있는 새로운 화합물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 발명의 요약

[0010] 출원인은 소정의 피라졸로피리미딘 화합물이, TTK 단백질 키나아제와 같은 잠재적 키나아제 저해제임을 밝혀냈다(실시예 B 참조). 또한, 출원인은 세포 배양 연구에서 이러한 화합물이 유방암, 대장암, 난소암에 대하여 잠재적 항암 활성을 갖는다는 것을 밝혀냈다(실시예 C와 D 참조). 이러한 사실에 기반하여, 피라졸로피리미딘 화합물, 이의 약학적 조성물, 및 피라졸로피리미딘 화합물로 암을 치료하는 방법이 본원에 개시되어 있다.

[0011] 본 교시는, 적어도 부분적으로, 하기 구조식으로 표현되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다:



[0012]

[0013]

[0014]

[0015]

[0016]

[0017]

[0018]

[0019]

[0020]

[0021]

[0022]

[0023]

발명의 효과

[0024]

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025]

[0026]

식에서, R^1 은 $-NH-CH_2-Cy$,

Cy는 알킬 및 하이드록실로부터 선택되는 한 개 또는 두 개의 기로 선택적으로 치환되는 C_3-C_4 사이클로알킬;

R^2 는 $-O$ -피리디닐; 사이클로프로필 또는 이소프로필로 선택적으로 치환되는 $-NH-(C_2-C_6)$ 하이드록시알킬; 또는 하이드록실 또는 (C_1-C_2) 하이드록시알킬로 선택적으로 치환되는 $-NH-(C_3-C_6)$ 사이클로알킬;

R^4 는 수소, 할로젠, 및 (C_1-C_3) 알킬에서 선택되고; 및

R^d 는 사이클로프로필이다. 바람직하게, R^d 는 염소 또는 메틸이다.

한 구체예에서, 본 교시는 약학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제 및 상기 구조식 (I)으로 표현되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 포함한다.

다른 구체예에서, 본 교시는 암을 지닌 대상체를 치료하는 방법으로서, 유효한 양의 구조식 (I)의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 상기 대상체에 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

본 교시의 다른 구체예는 TTK 활성의 저해를 요하는 대상체에서 TTK 활성을 저해하는 방법으로서, 유효한 양의 구조식 (I)로 표현되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

본 교시의 다른 구체예는 구조식 (I)로 표현되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 치료에 이용하는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 상기 치료는 암이 있는 대상체를 치료하는 것이다. 대안적으로, 상기 치료는 TTK 활성의 저해를 요하는 대상체에서 TTK 활성을 저해하는 것이다.

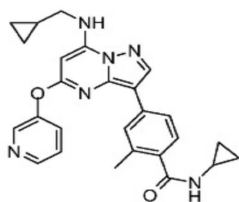
본 교시의 다른 구체예는 구조식 (I)로 표현되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을, 암이 있는 대상체를 치료하는 약물의 제조에 이용하는 것을 포함한다.

본 교시의 다른 구체예는 구조식 (I)로 표현되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을, TTK 활성의 저해를 요하는 대상체에서 TTK 활성을 저해하는 약물의 제조에 이용하는 것을 포함한다.

본 발명에 따르면 종양-개시 세포의 성장 및 생존을 저해할 수 있는 새로운 화합물이 제공된다.

발명의 상세한 설명

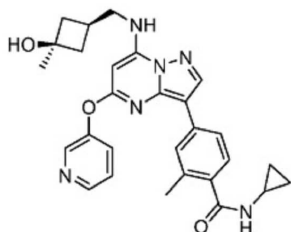
한 구체예에서, 본 교시는 구조식 (I) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 예시에서 구조에 의하여 표현되고 및/또는 명칭에 의한 서술되는 화합물을 포함하며, 중성 형태뿐만 아니라 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함한다. 또한, 본원에 기재된 바와 같은 이러한 화합물(중성 형태 및 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함)로 치료 및/또는 이의 이용이 본 발명에 포함된다. 본 발명의 화합물의 구체적인 예가 하기에 보인다:



[0027]

[0028]

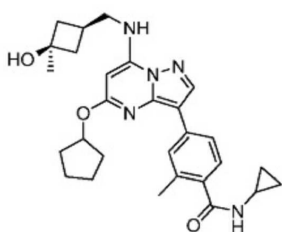
또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 화합물.



[0029]

[0030]

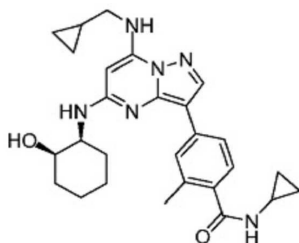
또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 화합물.



[0031]

[0032]

또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 화합물.



[0033]

[0034]

또는 이의 약학적으로 허용가능한 염인 화합물.

[0035]

단독으로 또는 "하이드록시알킬실" 등과 같은 큰 부분의 일부로서 사용되는 용어 "알킬"은 포화 지방족 직쇄 또는 분지쇄 단가 탄화수소 라디칼을 의미한다. 달리 특정되어 있지 않으면, 알킬기는 전형적으로 1개 내지 6개의 탄소 원자를 갖는, 즉 (C₁-C₆)알킬이다. 본원에서 사용되는 "(C₁-C₆)알킬"기는 선형 또는 분지형 배열에서 1개 내지 6개의 탄소 원자를 갖는 라디칼이다.

[0036]

"사이클로알킬"은 하나 이상의 이중 결합을 선택적으로 갖는 포화 지방족 사이클릭 탄화수소 라디칼을 의미한다. 이는 모노사이클릭, 비사이클릭(예, 브리지 비사이클릭 고리), 폴리사이클릭(예, 트리사이클릭)이거나 융합될 수 있다. 예를 들면, 모노사이클릭 (C₃-C₇)사이클로알킬은 모노사이클릭 고리에 배열되는 3개 내지 7개 탄소 원자를 갖는 라디칼을 의미한다. (C₃-C₇)사이클로알킬은, 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헥센을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0037]

본원에 기재되는 소정 화합물은 다양한 입체 이성질체 또는 호변 이성질체 형태로 존재할 수 있다. 입체 이성질체는 공간 배열만 상이한 화합물들이다. 개시된 화합물이 입체화학 표시 없이 구조로 명명되거나 표현되는 경우, 그 이름 또는 구조는 가능한 입체 이성질체, 호변 이성질체, 기하 이성질체 또는 이의 조합 모두를 포함하는 것으로 이해한다.

- [0038] 기하 이성질체가 명칭 또는 구조로 기재되어 있는 경우, 상기 명명되거나 표현된 기하 이성질체 순도는 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 99% 또는 99.9% 순수 중량이다. 기하 이성질체 순도는 상기 명명되거나 표현된 기하 이성질체의 중량을 혼합물의 모든 기하 이성질체의 총 중량으로 나누어 결정한다.
- [0039] 라세미형 혼합물은 50%의 거울상 이성질체와 50%의 상응하는 거울상 이성질체를 의미한다. 본 교시는 본원에 기재된 화합물들의 거울상 이성질체적으로 순수한, 거울상 이성질체적으로 풍부한, 부분입체이성질체적으로 순수한, 부분입체이성질체적으로 풍부한, 및 라세미형 혼합물, 및 부분입체이성질체 혼합물 모두를 포함한다.
- [0040] 거울상 이성질체 및 부분입체 이성질체 혼합물은, 키랄-상 기체 크로마토그래피, 키랄-상 고성능 액체 크로마토그래피, 상기 화합물을 키랄 염 착물로 결정화하거나, 상기 화합물을 키랄 용매에서 결정화하는 것과 같은 주지의 방법에 의하여, 상기 혼합물의 성분인 거울상 이성질체 또는 입체 이성질체로 분해될 수 있다. 또는 거울상 이성질체 및 부분입체 이성질체는 주지의 비대칭 합성 방법에 의하여 부분입체 이성질체적으로 또는 거울상 이성질체적으로 순수한 중간물, 시약, 및 촉매로부터 얻을 수 있다.
- [0041] 화합물이 단일 거울상 이성질체를 나타내는 명칭 또는 구조로 지정되어 있다면, 달리 언급되지 않는 한, 상기 화합물은 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 99% 또는 99.9% 광학적으로 순수하다("거울상 이성질체적으로 순수하다"라고도 함). 광학적 순도는 명명되거나 표현된 거울상 이성질체의 혼합물의 중량을 두 거울상 이성질체의 혼합물의 총 질량으로 나눈 것이다.
- [0042] 개시된 화합물의 입체화학이 구조로 명명되거나 표현되고, 상기 명명되거나 표현된 구조는 하나 이상의 입체 이성질체(예, 부분입체 이성질체 쌍에서와 같은)를 포함한다면, 상기 포함된 입체 이성질체 중 하나 또는 상기 포함된 입체 이성질체의 임의의 혼합물을 포함하는 것으로 이해한다. 또한, 상기 명명되거나 표현된 입체 이성질체의 입체이성질체적 순도는 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 99% 또는 99.9% 중량인 것으로 이해한다. 이 경우, 입체이성질체 순도는 명칭 또는 구조에 의하여 포함된 입체 이성질체의 혼합물의 총 질량을 모든 입체 이성질체 혼합물의 총 질량으로 나누어 결정한다.
- [0043] 본원에 개시된 화합물의 약학적으로 허용가능한 염은 본 교시에 포함된다. 개시된 화합물은 염기성 아민기를 가져서, 약학적으로 허용가능한 산(들)과 함께 약학적으로 허용가능한 염을 형성할 수 있다. 본원에 기재된 화합물의 적절한 약학적으로 허용가능한 산 부가 염은 무기산(예를 들면, 염산, 브롬화 수소산, 인산, 질산, 황산)의 염 및 유기산(예를 들면, 아세트산, 벤젠설폰산, 벤조산, 메탄설폰산, 및 p-톨루엔설폰산)의 염을 포함한다. 카르복실산과 같은 산성기를 갖는 본 교시의 화합물은 약학적으로 허용가능한 염기(들)과 함께 약학적으로 허용가능한 염을 형성할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용가능한 염기성 염은 암모늄 염, 알칼리 금속 염(예를 들면, 나트륨염 및 칼륨염) 및 알칼리 토금속 염(예를 들면, 마그네슘염 및 칼슘염)을 포함한다. 또한 4차 암모늄기를 갖는 화합물은 클로라이드, 브로마이드, 요오드, 아세테이트, 퍼클로레이트 등과 같은 상대음이온(counteranion)을 함유할 수 있다. 그러한 염이 다른 예들은 염산염, 브롬화수소산염, 황산염, 메탄설폰네이트, 니트레이트, 벤조에이트, 및 글루탐산과 같은 아미노산을 갖는 염을 포함한다.
- [0044] 본원에 기재된 화합물은 TTK를 포함하는, 다양한 키나아제를 저해할 수 있다. 따라서, 일반적으로, 본원에 기재된 화합물은 그러한 키나아제와 관련된 질병 또는 상태의 치료에 유용하다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 화합물은 TTK를 저해할 수 있다.
- [0045] 한 구체예에서, 본원에 기재된 화합물은 TTK 저해제이며, 그러한 키나아제와 관련된 암과 같은 질병을 치료하는데 유용하다.
- [0046] 본 교시의 다른 태양은 본원에 기재된 화합물을 유효한 양으로 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 암이 있는 대상을 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 화합물은 종양의 성장을 저해한다. 예를 들면, 본원에 기재된 화합물은 TTK를 과발현하는 종양의 성장을 저해한다.
- [0047] 본 교시의 방법에 의하여 치료(재발의 가능성을 감소시키는 것을 포함)될 수 있는 암은 폐암, 유방암, 대장암, 뇌암, 신경아세포종, 전립선암, 흑색종, 다형성교아종, 난소암, 림프종, 백혈병, 흑색종, 육종, 부종양(paraneoplasia), 골육종, 배세포종, 신경교종, 및 중피종을 포함한다. 한 구체예에서, 상기 암은 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 유방암, 뇌암, 대장암, 결장암, 두경부암, 간세포 암종, 폐 선암종, 전이성 흑색종, 췌장암, 전립선암, 난소암, 및 신장암에서 선택된다. 한 구체예에서, 상기 암은 폐암, 대장암, 뇌암, 신경아세포종, 전립선암, 흑색종, 다형성교아종, 또는 난소암이다. 다른 구체예에서, 상기 암은 췌장암, 전립선암, 폐암, 흑색종, 유방암, 대장암 또는 난소암이다. 또 다른 구체예에서, 상기 암은 유방암이다. 또 다른 구체예에서, 상기 암은 기저 서브-타입 유방

암 또는 내장 B 서브-타입 유방암이다. 또 다른 구체예에서, 상기 암은 TTK를 과발현하는 기저 서브-타입 유방암이다. 또 다른 구체예에서, 상기 기저 서브-타입 유방암은 ER(에스트로겐 수용체), HER2, 및 프로게스테론 수용체(PR) 음성 유방암이다. 또 다른 구체예에서, 상기 암은 연부 조직암이다. "연부 조직암"은 신체의 임의의 연조직에서 유래하는 종양을 포함하는, 기술분야에서 인정되는 용어이다. 그러한 연조직은, 평활근, 골격근, 힘줄, 섬유 조직, 지방 조직, 혈액 및 림프 혈관, 혈관 주위 조직, 신경, 중간엽 세포 및 활막 조직을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 신체의 다양한 구조 및 기관을 연결, 지지, 또는 감싼다. 따라서, 연조직암은 지방 조직, 근육 조직, 신경 조직, 결합 조직, 혈관, 림프관, 및 섬유 조직일 수 있다. 연조직 암은 양성 또는 악성일 수 있다. 일반적으로, 악성 연조직 암은 육종 또는 연조직 육종으로 지칭된다. 연조직 종양의 유형에는 많은 것이 있는데, 지방종, 지방아세포종, 동면선종, 지방육종, 자궁근종, 평활근육종, 횡문근종, 횡문근육종, 신경섬유종, 쉬반종(신경초종), 신경종, 악성 쉬반종, 신경섬유육종, 신경성 육종, 결합성 활액막염, 활막육종, 혈관종, 사구 종양, 혈관주위세포종, 혈관내피종, 혈관육종, 카포시 육종, 림프관종, 섬유종, 탄력섬유종, 표면 섬유종증, 섬유 조직구종, 섬유육종, 섬유종증, 피부 섬유 용기(dermatofibrosarcoma protuberans, DFSP), 악성 섬유 조직구종(malignant fibrous histiocytoma, MFH), 점액종, 과립 세포종, 악성 간엽종, 폐포 연부 육종, 상피 육종, 투명 세포 육종, 및 결합조직형성 소 세포종을 포함한다. 특정 구체예에서, 연조직 암은 섬유육종, 위장 육종, 평활근육종, 탈분화 지방육종, 다형성 지방육종, 악성 섬유 조직구종, 원형 세포 육종, 및 활막 육종으로 구성되는 군에서 선택되는 육종이다.

- [0048] 일부 구체예에서, 본 교시는 항암 요법을 받은 대상체에서 종양-개시 세포의 성장을 저해하거나 암의 재발 가능성을 감소시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 다음 단계를 포함한다:
- [0049] a) 암에 차도가 있는지 여부를 판단하도록 상기 대상체를 평가하는 단계; 및
- [0050] b) 암에 차도가 있으면, 상기 대상체에 유효한 양의 TTK 저해제(예, 구조식(I)로 표현되는 화합물)를 투여하는 단계. 만약 암에 차도가 없으면, 상기 방법은, 선택적으로, 상기 암에 차도가 보이기 시작할 때까지 항암 요법을 계속하는 단계 이후, 유효한 양의 TTK 저해제(예, 구조식(I)로 표현되는 화합물)를 투여하는 상기 b) 단계를 추가로 포함한다.
- [0051] 본원에서 사용되는 용어 "종양-개시 세포(tumor-initiating cells)" 또는 "TIC"는 자기 갱신 및 증식 능력을 지니는 일부 종양 내에 존재하는 세포를 말한다. 종종 이러한 세포는 종양 줄기 세포(cancer stem cells, CSCs)로 불리며, 줄기 세포-유사 표현형 및 기능을 포함하여, 정상 줄기 세포와 소정의 특성을 공유하는 것이 관찰될 수 있다. 일부 구체예에서, TIC는 면역결핍 마우스에 이종이식 후에 종양을 형성하는 능력을 갖는 것이 특징이다.
- [0052] 일부 구체예에서, 본 교시는, 암에 차도가 있는 대상체에서 종양-개시 세포의 성장을 저해하거나 암의 재발 가능성을 감소시키는 방법으로서, 상기 방법이 유효한 양의 TTK 저해제(예, 구조식(I)로 표현되는 화합물)를 상기 대상체에 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0053] 예컨대, 암의 재발 가능성이 감소하도록 상기 대상체를 치료하는 일부 구체예에서, 상기 대상체는 항암 요법 치료를 이미 받은 상태이다. 또는, 상기 대상체는 항암 요법을 이미 받은 상태이고 차도가 있는 상태이다.
- [0054] 일부 구체예에서, 본 교시는 암이 있는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에 유효한 항암 요법과 조합하여 유효한 양의 구조식 (I)로 표현되는 화합물을 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 한 구체예에서, 상기 암은 전이암이다. "전이암"은 그 일차 부위에서 신체의 다른 부분으로 확산되는 암이다.
- [0055] 다른 구체예에서, 본 교시는 약물-내성 암이 있는 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다. "약물-내성 암"은 암 치료에 전형적으로 이용된 한 개, 두 개, 세 개, 네 개, 다섯 개 또는 그 이상의 약물에 반응하지 않는 암이다. 한 구체예에서, 약물-내성 암은 종양-개시 세포의 성장으로 매개되어 있다.
- [0056] 당해 분야에서 공지된 적합한 방법이 암에 차도가 있는지의 여부를 판단하도록 대상체를 평가하는데 이용될 수 있다. 예를 들면, 종양 및/또는, 통상 종양과 관계가 있는 종양 마커의 크기를 암의 상태를 판단하기 위하여 모니터링할 수 있다. 종양의 크기는, X-선, MRI, CAT 스캔, 초음파, 유방 촬영, PET, 등과 같은 촬상 장치를 이용하여, 또는 조직 검사를 통해 모니터링 할 수 있다.
- [0057] 본원에 기재된 방법, 예컨대, 공-투여 방법에 있어서, 항암 요법은 수술, 방사선 요법, 면역요법, 내분비 요법, 유전자 요법, 및 항암제 투여로 구성되는 군에서 선택된다. 대안적으로, 항암 요법은 방사선 요법이다. 다른 대안으로, 항암 요법은 면역 요법이다. 다른 대안으로, 항암 요법은 항암제의 투여이다. 또 다른 대안으로, 항암 요법은 수술이다.

- [0058] 방사선 요법은 암을 죽이거나, 파괴하거나, 치료하기 위하여 방사선을 이용하는 것이다. 예시적인 방사선 요법은 감마선, 중성자 빔 방사선 요법, 전자빔 방사선 요법, 양성자 요법, 근접 치료 요법, 및 방사선 동위 원소 요법(즉, 전신성 방사선 동위 원소 요법)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0059] 내분비 요법은 호르몬을 첨가하거나, 차단하거나, 제거하는 치료법이다. 예를 들면, 에스트로겐의 생성 또는 활성을 차단하는 화학치료제가 유방암 치료에 이용되고 있다. 또한, 면역계의 호르몬 자극이 신장 세포 암종 및 흑색종과 같은 특이암을 치료하는데 이용되고 있다. 한 구체예에서, 내분비 요법은, 천연 호르몬, 합성 호르몬, 신체의 천연 호르몬의 생성을 차단하거나 증가시키는 기타 합성 호르몬을 투여하는 것을 포함한다. 다른 구체예에서, 내분비 요법은 소정 호르몬을 만드는 분비선을 제거하는 것을 포함한다.
- [0060] 본원에 이용되는, 유전자 요법은 대상체의 세포 및 생물학적 조직에 유전자를 삽입하여, 암과 같은 질환을 치료하는 것이다. 예시적인 유전자 요법은 생식 계열 유전자 요법 및 체세포 유전자 요법을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0061] 면역 요법(생물학적 반응 조절제 요법 생물학 요법, 생물 요법, 면역 요법, 또는 생물학적 요법이라고도 지칭됨)은 면역계의 일부를 이용하여 질환과 싸우는 치료법이다. 면역 요법은 면역계가 암세포를 인식하도록 도와주거나 암세포에 대한 반응을 향상시킬 수 있다. 면역요법은 능동적 및 수동적 면역요법을 포함한다. 수동적 면역요법이 일반적으로 신체 밖에서 만들어지는 면역계 성분을 일반적으로 이용하는 반면에, 능동적 요법은 신체 자체의 면역계를 자극한다.
- [0062] 능동적 요법의 예는 암 백신, 종양 세포 백신(자가 또는 동종), 수지상 세포 백신, 항원 백신, 항-유전형 백신, DNA 백신, 바이러스 백신, 또는 인터루킨-2(Interleukin-2, IL-2)이 있는 종양-침윤 림프구(Tumor-Infiltrating Lymphocyte, TIL) 백신을 포함하는 백신, 또는 림포카인-활성 킬러(Lymphokine-Activated Killer, LAK) 세포 요법을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0063] 수동 면역 요법의 예는 단일클론 항체 및 독소를 포함하는 표적 요법을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 단일클론 항체는 네이키드 항체(naked antibodies) 및 복합 단일클론 항체(태그된, 표지된, 또는 로딩된 항체라고도 지칭됨)를 포함한다. 네이키드 단일클론 항체는 약물 또는 부착된 방사선 물질을 갖지 않는 반면에, 복합 단일클론 항체는, 예를 들면, 화학요법 약물(화학표지된), 방사선 입자(방사선표지된), 또는 독소(면역독소)와 결합한다. 이러한 네이키드 단일클론 항체 약물의 예는 다음을 포함하나 이에 제한되지 않는다: 리투시맵(Rituxan), 예컨대 B 세포 비-호지킨 림프종 치료에 사용되는 CD20 항원에 대한 항체; 트라스투주맵(Herceptin), 예컨대 진행성 유방암 치료에 사용되는 HER2 단백질에 대한 항체; 알렘투주맵(Campath), 예컨대 B 세포 만성 림프성 백혈병(B cell chronic lymphocytic leukemia, B-CLL) 치료에 사용되는 CD52 항원에 대한 항체; 세록시맵(Erbixux), 이리노테칸과 조합하여, 예컨대 진행성 결장암 및 두경부암 치료에 사용되는 EGFR 단백질에 대한 항체; 및 베바시주맵(Avastin), VEGF 단백질에 대하여 작용하는 항-혈관형성 요법으로, 예를 들면, 화학요법과 조합하여, 예컨대 전이성 결장암 치료에 사용됨. 복합 단일클론 항체의 예는 양성 B 림프구에 직접 방사능을 제공하고, 예를 들면, B 세포 비-호지킨 림프종의 치료에 이용되는 방사성표지된 항체 이브리투모맵 튜세탄(Zevalin); 예를 들면, 소정 유형의 비-호지킨 림프종의 치료에 이용되는 방사성표지된 항체 토시투모맵(Bexxar); 및 칼리키아미신을 함유하고, 예를 들면, 급성 골수성 백혈병(acute myelogenous leukemia, AML)의 치료에 이용되는 면역독소 캄투주맵 오조가미신(Mylotarg)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. BL22는, 예를 들면, 털 세포 백혈병 치료를 위한 복합 단일클론 항체, 예를 들면, 백혈병, 임파종, 뇌 종양 치료를 위한 면역독소, 및 예를 들면, 결장암 및 난소암을 위한, OncoScint, 및 예를 들면, 전립선암을 위한 ProstaScint과 같은, 방사성 표지된 항체이다.
- [0064] 이용될 수 있는 치료 항체의 추가적인 예는, 전이성 유방암이 있는 환자의 치료를 위한 인간화된 항-HER2 단일클론 항체인 HERCEPTIN[®](트라스투주맵, Genentech, CA); 혈전 형성의 예방을 위한 혈소판 상의 항-당단백 IIb/IIIa 수용체인 REOPRO[®](압식시맵(abciximab), Centocor); 급성 신장 이식 거부 예방을 위한 면역억제, 인간화된 항-CD25 단일클론 항체인 ZENAPAX[®](다클리주맵, Roche Pharmaceuticals, Switzerland); 류마 항-17-IA 세포 표면 항원 IgG2a 항체 (Glaxo Wellcome/Centocor)인 PANOREX[™]; 류마 항-유전형(GD3 에피토프) IgG 항체 (ImClone System)인 BEC2; 키메릭 항-EGFR IgG 항체(ImClone System)인 IMC-C225; 인간화된 항-αVβ3 인테그린 항체(Applied Molecular Evolution/MedImmune)인 VITAXIN[™]; 인간화된 항 CD52 IgG1 항체(Leukosite)인 Campath 1H/LDP-03; 인간화된 항-CD33 IgG 항체(Protein Design Lab/Kanebo)인 Smart M195; 키메릭 항-CD20

IgG1 항체(IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zetenyaku)인 RITUXANTM; 인간화된 항-CD22 IgG 항체(Immunomedics)인 LYMPHOCIDETM; LYMPHOCIDETM Y-90 (Immunomedics); Lymphoscan (Tc-99m-labeled; radioimaging; Immunomedics); Nuvion (against CD3; Protein Design Labs); 인간화된 항-ICAM3 항체(ICOS Pharm)인 CM3; 영장화된 항-CD80 항체(IDEC Pharm/Mitsubishi)인 IDEC-114; 방사성표지된 무린 항-CD20 항체(IDEC/Schering AG)인 ZEVALINTM; 인간화된 항-CD40L 항체(IDEC/Eisai)인 IDEC-131; 영장화된 항-CD4 항체(IDEC)인 IDEC-151; 영장화된 항-CD23 항체(IDEC/Seikagaku)인 IDEC-152; 인간화된 항-CD3 IgG(Protein Design Lab)인 SMART 항-CD3; 인간화된 항-complement factor 5 (C5) 항체(Alexion Pharm)인 5G1.1; 인간화된 항-TNF- α 항체(CAT/BASF)인 D2E7; 인간화된 항-TNF- α Fab 분절(Celltech)인 CDP870; 영장화된 항-CD4 IgG1 항체(IDEC Pharm/SmithKline Beecham)인 IDEC-151; 인간 항-CD4 IgG 항체(Medarex/Eisai/Genmab)인 MDX-CD4; CD20-스냅트다비딘(+비오틴-이트류 90; NeoRx); 인간화된 항-TNF- α IgG4 항체(Celltech)인 CDP571; 인간화된 항- $\alpha 4\beta 7$ 항체(LeukoSite/Genentech)인 LDP-02; 인간화된 항-CD4 IgG 항체(Ortho Biotech)인 OrthoClone OKT4A; 인간화된 항-CD40L IgG 항체(Biogen)인 ANTOVATM; 인간화된 항-VLA-4 IgG 항체(Elan)인 ANTEGRENTM; 및 인간 항-TGF- β_2 항체(Cambridge Ab Tech)인 CAT-152을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0065] 본 교시에 이용될 수 있는 면역요법은 면역 보조제를 포함한다. 그 예는, 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF), 과립구-콜로니 자극 인자(granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF), 대식세포 염증 단백질(macrophage inflammatory protein, MIP)-1- α , 인터루킨(IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 및 IL-27), 종양 괴사 인자(TNF- α 를 포함), 인터페론(IFN- α , IFN- β , 및 IFN- γ)과 같은 사이토킨; 수산화 알루미늄(명반); Bacille Calmette-Guerin(BCG); 키홀 림펫 헤모시아닌(Keyhole limpet hemocyanin, KLH); 불완전 프로인트 보조제(Incomplete Freund's adjuvant, IFA); QS-21; DETOX; 레바미솔; 및 디니트로페닐(Dinitrophenyl, DNP), 및 이의 조합, 예를 들면, 인터루킨, 예컨대, IL-2와 IFN- α 과 같은 기타 사이토킨의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0066] 대안적으로, 본원에 기재된 항암 요법은 항암제의 투여를 포함한다. "항암제"는, 유효한 양으로 암이 있는 환자에 투여되었을 때, 부분적으로 또는 실질적으로 다음 중 하나 이상을 이룰 수 있는 화합물이다: 암의 성장을 억제, 암의 정도를 감소(예컨대, 종양 크기를 줄임), 암의 성장물을 저해, 암(예컨대 조직 또는 혈청 성분 등)과 관련된 임상 증상 또는 지시자를 개선 또는 향상, 대상체의 수명을 증가.

[0067] 본원에 기재된 방법의 이용에 적합한 항암제는 암 치료가 승인된 항암제를 포함한다. 한 구체예에서, 항암제는, 표적 항체, 혈관 신생 저해제, 알킬화제, 항대사물질, 빈카 알칼로이드, 타산, 포도필로톡신, 토포이소머라제 저해제, 호르몬성 항종양제, 및 기타 항종양제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0068] 본 교시의 방법에 유용한 알킬화제의 예는 질소 머스타드(예, 메클로로에타민, 사이클로포스파미드, 클로람부실, 멜팔란, 등), 에틸렌이민 및 메틸메라민(예, 핵사메틸메라민, 티오테파), 알킬 설포네이트(예, 부술판), 니트로소우레아(예, 카르무스틴, 로무스틴, 세무스틴, 스트렙토조신, 등), 또는 트리아젠(테카르바진 등)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 교시의 방법에 유용한 항-대사물질의 예는 엽산 유사체(예, 메토틱렉세이트), 또는 피리미딘 유사체(예, 플루오로우라실, 플록소우리딘, 사이타라빈), 퓨린 유사체(예, 머캅토피린, 티오구아닌, 펜토스타틴)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 식물 알칼로이드 및 테르페노이드 또는 이들의 유사체의 예는, 빈카 알칼로이드(예, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 비노렐빈, 빈데신), 포도필로톡신, 및 타산(예, 파클리탁셀, 도세탁셀)을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 토포이소머라아제 저해제의 예는 이리노테칸, 토포테칸, 암사크린, 에토포시드, 에토포시드 포스페이트, 및 테니포시드를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 항종양제의 예는 악티노마이신, 안트라사이클린(예, 독소루비신, 다우노루비신, 발루비신, 이다루비신, 에피루비신), 블레오마이신, 플리카마이신, 및 미토마이신을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0069] 한 구체예에서, 본 교시에 이용될 수 있는 항암제는 아드리아마이신, 닥티노마이신, 블레오마이신, 빈블라스틴, 시스플라틴, 아시비신; 아클라루비신; 아코다졸 하이드로클로라이드; 아크로닌; 아도젤레신; 알데스루킨; 알트레타민; 암보마이신; 아메탄트론 아세테이트; 아미노글루테티미드; 암사크린; 아나스트로졸; 안트라마이신; 아스파라기나제; 아스페를린; 아자시티딘; 아제테파; 아조토마이신; 바티마스타트; 벤조테파; 비칼루타미드; 비산트렌 하이드로클로라이드; 비스타피드디메실레이트; 비젤레신; 블레오마이신 설페이트; 브레퀴나르 소듐; 브로피리민; 부술판; 캅티노마이신; 칼루스테론; 카라세미드; 카르베티머; 카르보플라틴; 카르무스틴; 카루비신 하이드로클로라이드; 카르젤레신; 세데핀골; 클로람부실; 시롤레마이신; 클라드리빈; 크리스나톨 메실레이트; 사이클로포스파미드; 시타라빈; 다카바진; 다우노루비신 하이드로클로라이드; 데시타빈; 텍소르파플라틴; 데자구

아닌; 데자구아닌 메실레이트; 디아지쿠온; 독소루비신; 독소루비신 하이드로클로라이드; 드롤록시펜; 드롤록시펜 시트레이트; 드로모스타놀론 프로피오네이트; 다우조마이신; 에다트렉세이트; 에플로르니틴 하이드로클로라이드; 엘사미트루신; 엔로플라틴; 엔프로메이트; 에피프로피딘; 에피루비신 하이드로클로라이드; 에르볼로졸; 에소루비신 하이드로클로라이드; 에스트라무스틴; 에스트라무스틴 포스페이트 소듐; 에타니다졸; 에토포시드; 에토포시드 포스페이트; 에토프린; 파드로졸 하이드로클로라이드; 파자라빈; 펜레티니드; 플록스우리딘; 플루다라빈 포스페이트; 플루오로 우라실; 플루로시타빈; 포스퀴돈; 포스트리에신 소듐; 켈시타빈; 켈시타빈 하이드로클로라이드; 하이드록시우레아; 이다루비신 하이드로클로라이드; 이포스파미드; 일모포신; 인터루킨 II (재조합 인터루킨 II, 또는 rIL2 포함); 인터페론 α -2B; 인터페론 α -n1; 인터페론 α -n3; 인터페론 β -1a; 인터페론 γ -1b; 이프로플라틴; 이리노테칸 하이드로클로라이드; 란레오티드 아세테이트; 레트로졸; 레우프롤리드 아세테이트; 리아졸 하이드로클로라이드; 로메트렉솔 소듐; 로무스틴; 록소산트론 하이드로클로라이드; 마소프로콜; 마이탄신; 메틀로레탄민 하이드로클로라이드; 메게스트롤 아세테이트; 멜렌게스트롤 아세테이트; 멜팔란; 메노가렐; 머캅토피린; 메토티렉세이트; 메토티렉세이트 소듐; 메토피린; 메투레데파; 미틴도미드; 미토카르신; 미토크로민; 미토길린; 미토말신; 미토마이신; 미토스페르; 미토탄; 미톡산트론 하이드로클로라이드; 마이토펜산; 노코다졸; 노갈라마이신; 오르마플라틴; 옥시수란; 페가스파르가세; 펠리오마이신; 펜타무스틴; 페프로마이신 술페이트; 페르포스파미드; 피포브로만; 피포술판; 피록산트론 하이드로클로라이드; 플리카마이신; 플로메스탄; 포르피머 소듐; 포르피로마이신; 프레드니무스틴; 프로카르바진 하이드로클로라이드; 퓨로마이신; 퓨로마이신 하이드로클로라이드; 피라조핀; 리보프린; 로글레티미드; 사핀골; 사핀골 하이드로클로라이드; 세무스틴; 심트라젠; 스파르포세이트 소듐; 스파르소마이신; 스피로게르마늄 하이드로클로라이드; 스피로무스틴; 스피로플라틴; 스트렙토니그린; 스트렙토조신; 술로페누르; 탈리소마이신; 테코갈란 소듐; 테가푸르; 텔록산트론 하이드로클로라이드; 테모포르핀; 테니포시드; 테록시론; 테스토락톤; 티아미프린; 티오구아닌; 티오테파; 티아조핀; 티라파자민; 토레미펜 시트레이트; 트레스톨론 아세테이트; 트리스리빈 포스페이트; 트리메트렉세이트; 트리메트렉세이트 글루쿠로네이트; 트립토헤린; 투블로졸 하이드로클로라이드; 우라실 무스타드; 우레데파; 우레데파; 바르레오티드; 베르테포르핀; 빈블라스틴, 술페이트; 빈크리스틴 술페이트; 빈데신; 빈데신 술페이트; 비네피딘 술페이트; 빈글리시네이트 술페이트; 빈레우로신 술페이트; 비노렐빈 타르테이트; 빈로시딘 술페이트; 빈줄리딘 술페이트; 보로졸; 제니플라틴; 지노스타틴; 조루비신 하이드로클로라이드를 포함한다.

[0070]

본 교시에 이용될 수 있는 또 다른 항암제/약물은, 20-에피-1,25 디하이드록시 비타민 D3; 5-에티닐우라실; 아비라 테론; 아클라루비신; 아실폴벤; 아데시페놀; 아도젤레신; 알테스루킨; ALL-TK 길항제; 알트레타민; 암바무스틴; 아미독스; 아미포스틴; 아미노레블린산; 암비루신; 암사크린; 아나그렐리드; 아나스트로졸; 안드로그라폴리드; 혈관신생 저해제; 길항제 D; 길항제 G; 안타렐릭스; 항-도살라이징 형태 형성 단백질-1; 항안드로젠, 전립선 암; 항에스트로젠; 항네오플라스톤; 안티센스 올리고뉴클레오티드; 아피디콜린 글리시네이트; 아폼토시스 유전자 조절자; 아폼토시스 조절자; 아푸린산; 아라-CDP-DL-PTBA; 아르기닌 테아미나아제; 아술라크린; 아타메스탄; 아트리무스틴; 악시나스타틴 1; 악시나스타틴 2; 악시나스타틴 3; 아자세트론; 아자톡신; 아자티로신; 바카틴 III 유도제; 발라놀; 바티마스맷; BCR/ABL 길항제; 벤조클로린; 벤조일스타우로스포린; 베타 락탐 유도제; 베타-알레틴; 베타클라마이신 B; 베틀린산; bFGF 저해제; 비칼루타미드; 비산트렌; 비스아지리디닐 스퍼민; 비스나피드; 비스트라텐 A; 비젤레신; 브레펠레이트; 브로피리민; 부도티탄; 부티오닌 설포시민; 칼시포트리올; 칼포스틴 C; 캄프로테신 유도제; 카나리폭스 IL-2; 카페시타빈; 카복사미드-아미노-트라이아졸; 카복시아미도트라이아졸; CaRest M3; CARN 700; 연골 유래의 저해제; 카르젤레신; 카세인키나아제 저해제(ICOS); 카스타노스퍼민; 세크로핀 B; 세트로렐릭스; 클로를론; 클로로퀴녹살린 설포아미드; 시카프로스트; 시스-포르피린; 클라드리빈; 클로미펜 유사체; 클로트리마졸; 콜리스마이신 A; 콜리스마이신 B; 콤브레타스타틴 A4; 콤브레타스타틴 유사체; 코나게닌; 크람베시딘 816; 크리스나톨; 크립토파이신 8; 크립토파이신 A 유도제; 쿠라신 A; 사이클로펜타안트라퀴논; 사이클로플라탐; 사이페마이신; 사이타라빈 옥토스페이트; 세포용해 인자; 사이토스타틴; 다클릭시탐; 데시타빈; 디하이드로디렘인 B; 데슬로렐린; 텍사메타손; 텍시포스파미드; 텍스라족산; 텍스베라파밀; 디아지쿠온; 디렘인 B; 디독스; 디에틸노르스퍼민; 디하이드로-5-아자시티딘; 9-디옥사마이신; 다이페닐 스파이로무스틴; 도코사놀; 둘라세트론; 독시플루리딘; 드롤록시펜; 드로나비롤; 두오카르마이신 SA; 엡셀렌; 에코무스틴; 에델포신; 에드레콜로람; 에플로르니틴; 엘레벤; 에미테푸르; 에피루비신; 에프리스테리드; 에스트라무스틴 유사체; 에스트로젠 작용제; 에스트로젠 길항제; 에타니다졸; 에토포시드 포스페이트; 엑세메스탄; 파드로졸; 파자라빈; 펜레티니드; 필그라스티م; 피나스테리드; 플라보피리돌; 플레젤라스틴; 플루아스테론; 플루다라빈; 플루오로다우노루비신 하이드로클로라이드; 포르페니맥스; 포르메스탄; 포스트리에신; 포테무스틴; 가돌리늄 텍사피린; 갈륨 니트레이트; 갈로시타빈; 가니렐릭스; 젤라티나아제 저해제; 켈시타빈; 글루타티온 저해제; 헵술팜; 헤레굴린; 헥사메틸렌 비스아세트아미드; 하이페리신; 이반드론산; 이다루비신; 이독시펜; 이드라

만톤; 일모포신; 일로마스텐; 이미다조아크리돈; 이미퀴모드; 면역자극 펩티드; 인슐린 유사 성장 인자-1 수용체 저해제; 인터페론 작용제; 인터페론; 인터루킨; 이오벤구안; 요오도독소루비신; 이포메아놀, 4-; 이로플라크트; 이소스글라딘; 이소벤가졸; 이소호모할리콘드린 B; 이타세트론; 자스플라키놀리드; 카할랄리드 F; 라멜라린-N 트라이아세테이트; 란레오티드; 레이나마이신; 레노그라스티; 렌티난 설페이트; 랩톨스타틴; 레트로졸; 백혈병 억제 인자; 백혈구 알파 인터페론; 루프롤리드+에스트로젠+프로게스테론; 루프로렐린; 레바미솔; 리아로졸; 선형 폴리아민 유사체; 친지질성 이당류 펩티드; 친지질성 백금 화합물; 리소클리나미드 7; 로바플라틴; 롬브리신; 로메트렉솔; 로니다민; 로속산트론; 로바스타틴; 록소리빈; 루르토테칸; 루테튬 텍사피린; 리소필린; 용해 펩티드; 마이탄신; 만노스타틴 A; 마리마스텐; 마소프로콜; 마스핀; 마트릴리신 저해제; 기질 메탈로프로테이나제 저해제; 메노가릴; 메르바론; 메테렐린; 메티오니나아제; 메토클로프라미드; MIF 저해제; 미페프리스톤; 밀테포신; 미리모스틴; 미스매치된 이중가닥 RNA; 미토구아존; 미토락툴; 미토마이신 유사체; 미토나피드; 모토톡신 섬유모세포 성장 인자-사포린; 미톡산트론; 모파로텐; 몰그라모스틴; 단일클론 항체, 인간 용모막 성선자극 호르몬; 모노포스포릴 지질 A+미오박테리아 세포벽 sk; 모피다몰; 다중약물 내성 유전자 저해제; 다발성 종양 저해제 1-기반 치료제; 머스터드 항암제; 마이카파옥사이드 B; 마이코박테리아 세포벽 추출물; 마이리아포론; N-아세틸디날린; N-치환된 벤즈아미드; 나파렐린; 나그레스티; 날록손+펜타조신; 나파빈; 나프테르핀; 나르토그라스티; 네다플라틴; 네모루비신; 네리드론산; 중성 엔도펩티다아제; 닐루타미드; 니사마이신; 산화질소 조절자; 니트록시드 항산화제; 니트룰린; 06-벤질구아닌; 옥트레오티드; 오키세논; 올리고뉴클레오티드; 오나프리스톤; 온단세트론; 온단세트론; 오라신; 경구 사이토킨 유도제; 오르마플라틴; 오사테론; 옥살리플라틴; 옥사우노마이신; 팔라우아민; 팔미토일리족신; 파미드론산; 파낙시트리올; 파노미펜; 파라박틴; 파젤리프틴; 페가스파르가아제; 펜데신; 펜토산 폴리설페이트 소듐; 펜토스타틴; 펜트로졸; 퍼플루브론; 퍼포스파미드; 페틸릴 알코올; 페나지노마이신; 페닐아세테이트; 포스파타아제 저해제; 피시바닐; 필로카르핀 하이드로클로라이드; 피라루비신; 피리트렉심; 플라세틴 A; 플라세틴 B; 플라스미노젠 활성화인자 저해제; 백금 착물; 백금 화합물; 백금-트라이아민 착물; 포르피머 소듐; 포르피로마이신; 프레드니손; 프로필 비스-아크리돈; 프로스타글란딘 J2; 프로테아솜 저해제; 단백질 A-기반 면역 조절자; 단백질 키나아제 C 저해제; 단백질 키나아제 C 저해제, 미세조류; 단백질 티로신 포스파타아제 저해제; 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라아제 저해제; 푸르퓨린; 피라졸로아크리딘; 피리독실화된 헤모글로빈 폴리옥시에틸렌 접합체; raf 길항제; 랄티트렉세드; 라모세트론; ras 파르네실 단백질 트랜스페라아제 저해제; ras 저해제; ras-GAP 저해제; 메틸이 제거된 레텔립틴; 레늄 Re 186 에티드로네이트; 리족신; 리보자임; RII 레틴아미드; 로글레티미드; 로히투카인; 로무르티드; 로퀴니맥스; 루비기논 B1; 루복실; 사평골; 사인토펜; SarCNU; 사르코파이트 A; 사르그라모스틴; Sdi 1 모방체; 세무스틴; 노화 유래의 저해제 1; 센스 올리고뉴클레오티드; 신호전달 저해제; 신호전달 조절자; 단일 사슬 항원 결합단백질; 시조피란; 소부족산; 소듐 보로캅테이트; 소듐 페닐아세테이트; 솔베롤; 소마토 메딘 결합 단백질; 소네르민; 스파르포스산; 스피카마이신 D; 스파이로무스틴; 스플레노넨; 스폰지스타틴 1; 스쿠알라민; 줄기세포 저해제; 줄기세포 분열 저해제; 스티피아미드; 스트로멜리신 저해제; 술피노신; 과활성의 혈관작용 장 펩티드 길항제; 수라디스타; 수라민; 스와인소닌; 합성 글리코사미노글리칸; 탈리무스틴; 타목시펜 메티오다이드; 타우로무스틴; 타자로텐; 테코갈란 소듐; 테가퓨르; 텔루라피릴륨; 텔로머라아제 저해제; 테모포르핀; 테모졸로미드; 테니포시드; 테트라클로로데카옥사이드; 테트라조민; 탈리블라스틴; 티오코랄린; 트롬보포이어틴; 트롬보포이어틴 모방체; 티말파신; 티모포이어틴 수용체 작용제; 티모트리난; 갑상선 자극 호르몬; 주석 에틸 에티오프루핀; 티라파자민; 티타노센 바이클로라이드; 톱센틴; 토레미펜; 전능성 줄기세포 인자; 번역 저해제; 트레티노인; 트라이아세틸우리딘; 트리시리빈; 트리메트렉세이트; 트립토텐린; 트로피세트론; 투로스테라이드; 티로신 키나아제 저해제; 티르포스틴; UBC 저해제; 유베니맥스; 비노생식독 유래의 성장 억제 인자; 우로키나아제 수용체 길항제; 바프레오티드; 바리올린 B; 벡터 시스템, 적혈구 유전자 요법; 벨라레솔; 베라민; 베르딘; 베르테포르핀; 비노렐빈; 빈크살틴; 비탁신; 보로졸; 자노테론; 제니플라틴; 질라스코르브; 및 지노스타틴 스티말라머를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 바람직한 추가적인 항암약물은 5-플루오로우라실 및 루코보린이다.

[0071] 한 구체예에서, 본원에 기재된 방법에서 사용된 항암제는 파클리탁셀, 도세탁셀, 5-플루오로우라실, 트라스투주맵, 라파티닙, 베바시주맵, 레트로졸, 고세렐린, 타목시펜, 세톡시맵, 파니투무맵, 겐시타빈, 카페시타빈, 이리노테칸, 옥살리플라틴, 카르보플라틴, 시스플라틴, 독소루비신, 에피루비신, 사이클로포스파미드, 메토트렉세이트, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 멜팔란, 및 이의 조합으로 구성된 군에서 선택된다.

[0072] 한 구체예에서, 상기 항암제 및 구조식 (I)로 표현되는 화합물은 동시에 투여한다. 항암제와 화합물을 동시에 투여하는 경우, 동일한 제형 또는 상이한 제형으로 투여할 수 있다. 대안적으로, 화합물과 추가적인 항암제를 별도로 투여한다. 대안적으로, 화합물과 추가적인 항암제는, 별도의 조성물로서 순차적으로, 숙련된 임상치의 결정(예컨대, 치료제의 약효가 중첩하는 데 충분한 시간)에 따른 적절한 시간 프레임(예컨대, 암 치료 시간/간

격 (예, 약 1.5 시간 내지 약 5 시간 내지 약 10시간 내지 약 15 시간 내지 약 20 시간; 약 1일 내지 약 2일 내지 약 5일 내지 약 10일 내지 약 14일)) 안에 투여할 수 있다. 화합물과 추가적인 항암제는 희망하는 치료 효과 (예, 종양 성장 저해)를 성취하는데 적절한 순서 또는 스케줄에서 단일 투여 또는 다중 투여로 투여할 수 있다.

[0073] 한 구체예에서, 본원에 기재된 방법에서 상기 대상체는 TTK 저해제(예, 구조식 (I)로 표현되는 화합물)로 사전에 처리하지 않았다.

[0074] 용어 "종양-개시 세포의 성장을 저해하는 것"은 종양-개시 세포의 증식을 및/또는 생존률을 감소시키는 것을 지칭한다.

[0075] 본원에서 사용된 용어 "암의 재발 가능성을 감소시키는 것"은 차도의 기간 이후에 1차 부위 또는 2차 부위에서 또는 근처에서 암의 재발을 부분적으로 또는 완전히 저해하거나 연기시키는 것을 의미한다. 그것은 또한 암이 존재하지 않을 때보다 본원에 기재된 치료로 재발하지 않을 것임을 의미한다.

[0076] 본원에서 사용된 용어 "차도"는 대상체가 항암요법으로 성공적으로 치료받은 후에 일반적으로 암과 관련된 임상 증상 또는 지표가 사라지거나 검출할 수 없는 암의 상태를 지칭한다.

[0077] 본원에서 기재된 "치료"는 임상 결과를 포함하여, 유리하거나 희망하는 결과를 얻기 위한 접근법이다. 유리하거나 희망하는 임상 결과는, 하나 이상의 증상 또는 상태를 완화시키거나 경감시키는 것, 질환의 정도를 감소시키는 것, 질환의 안정화된(즉, 악화되지 않음) 상태, 질환 확산 가능성을 감소시키는 것, 질환 진행을 지연시키거나 느리게 하는 것, 질환 상태를 완화시키거나 일시적으로 완화시키는 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 또한 "치료"는 치료를 받지 않을 경우 예상되는 생존에 비교하여 생존을 연장시키는 것을 의미한다. 또한, "치료"는 질환의 재발 가능성을 감소시키는 것을 포함한다.

[0078] 본원에서 사용된, "암이 있는 대상체를 치료하는 것"은 다음 중 하나 이상을 부분적으로 또는 실질적으로 성취하는 것을 포함한다: 암의 성장을 억제, 암의 정도를 감소(예컨대, 종양 크기를 줄임), 암의 성장률을 저해, 암(예컨대 조직 또는 혈청 성분 등)과 관련된 임상 증상 또는 지시자를 개선 또는 향상, 대상체의 수명을 증가; 및 암의 재발 가능성을 감소시킴.

[0079] 일반적으로, 본원에서 교시된 화합물의 유효한 양은, 주어진 약물 또는 화합물, 약학 제형, 투여 경로, 질환 또는 장애의 유형, 치료 대상체 또는 숙주의 정체성, 등등과 같은 다양한 인자에 따라 다르나, 이에 불구하고 당업자에 의하여 통상적으로 결정할 수 있다. 본 교시의 화합물의 유효한 양은 당해 기술 분야에서 공지된 통상적인 방법에 의하여 당업자에 의하여 용이하게 결정할 수 있다.

[0080] 용어 "유효한 양"은, 대상체에 투여될 경우, 예컨대, 대조군에 비하여 대상체에서 암을 저해하거나, 억제하거나, 감소시키는 임상적 결과(임상적 증상 또는 암세포의 양에 의하여 결정)를 포함하여, 유익하거나 희망하는 결과를 얻게 되는 양을 의미한다.

[0081] 한 구체예에서, 본원에 교시된 화합물의 유효한 양은 약 0.1 내지 약 1000 mg/kg 체중, 대안적으로 약 1 내지 약 500 mg/kg 체중, 및 다른 대안으로, 약 20 내지 약 300 mg/kg 체중의 범위이다. 다른 구체예에서, 본원에 교시된 화합물의 유효한 양은 약 0.5 내지 약 5,000 mg/m², 대안적으로 약 5 내지 약 2,500 mg mg/m², 및 다른 대안으로, 약 50 내지 약 1,000 mg/m²의 범위이다. 소정 인자가 암으로 고통받는 대상체를 효과적으로 치료하거나 암이 재발 가능성을 감소시키는데 요구되는 용량에 영향을 줄 수 있다는 것을 당업자는 알 수 있을 것이다. 이러한 인자는 질환 또는 장애의 정도, 이전 치료, 대상체의 일반적인 건강 및/또는 연령, 및 기타 현재 질환을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0082] 또한, 본원에 기재된 방법(암이 있는 대상체를 치료하거나 암의 재발 가능성을 감소시키는 것을 포함함)에 있어서, 본 교시의 유효한 양의 화합물로 대상체를 "치료" 또는 투약 처방하는 것은 단일 투여로 구성될 수 있거나, 대안적으로 일련의 적용을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 교시의 화합물은 적어도 주 1회 투여할 수 있다. 그러나, 다른 구체예에서, 주어진 치료에 있어서 화합물은 1주 당 약 1회 내지 하루에 1회로 대상체에 투여할 수 있다. 치료 기간은 질환의 정도, 환자의 연령, 본 교시 화합물의 농도 및 활성, 또는 이의 조합과 같은 다양한 인자에 따라 다르다. 또한, 치료에 이용되는 화합물의 유효한 용량은 특정 치료 요법의 과정에서 증가시키거나 감소시킬 수 있음을 알 수 있을 것이다. 용량의 차이는 당해 분야에서 공지된 표준 진단 분석에 의하여 확실해질 수 있을 것이다. 일부 경우에, 만성적인 투여가 필요할 수 있다.

[0083] "대상체"는 포유류이며, 바람직하게는 인간이나, 수의과 치료가 필요한 동물, 예컨대, 반려 동물(예, 개, 고양이

이, 등등), 가축(예, 소, 양, 돼지, 말, 등등), 및 실험 동물(예, 래트, 마우스, 기니피그, 등등)일 수 있다.

- [0084] 당업자가 알 수 있는 바와 같이, 본원에 교시된 화합물은 선택된 투여 경로에 따라 다양한 유형의 환자에게 투여할 수 있다. 본 교시의 화합물은, 예를 들면, 경구, 비경구, 구강, 설하, 비강, 직장, 패치, 펌프 또는 경피 투여할 수 있으며, 그에 따라 제제화된 약학적 조성물에 의해 투여할 수 있다. 비경구 투여는 정맥내, 복강내, 피하, 근육내, 경상피, 비강, 폐내, 척추강내, 직장, 및 국소 투여 모드를 포함한다. 비경구 투여는 선택된 기간 동안의 연속적 주입일 수 있다.
- [0085] 본원에 교시된 화합물은 대상체에 투여하기 위하여 약학적 조성물로 적절하게 제제화될 수 있다. 본 교시의 약학적 조성물은 선택적으로 락토스, 전분, 셀룰로스, 및 텍스트로스와 같은, 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체 및/또는 희석제를 포함한다. 또한, 착향제; 감미료; 메틸, 에틸, 프로필 및 부틸 파라벤 등의 보존제와 같은 기타 부형제를 포함할 수 있다. 더 완전한 적절한 부형제의 리스트는 Handbook of Pharmaceutical Excipients (5th Ed., Pharmaceutical Press (2005))에서 찾아볼 수 있다. 당업자는 다양한 투여 경로에 적합한 제형을 제조하는 방법을 알 것이다. 적합한 제형의 선택 및 제조를 위한 기존의 절차 및 성분은, 예를 들면, Remington's Pharmaceutical Sciences (2003 - 20th edition) 및 미국 약전: The National Formulary (USP 24 NF19) 1999년 판에 기재되어 있다. 담체, 희석제, 및/또는 부형제는, 약학 조성물의 기타 성분과 적합하다는 의미에서 "허용가능"하며, 이것을 받는 사람에게 유해하지 않다.
- [0086] 일반적으로, 경구 치료 투여에서, 본 교시의 화합물은 부형제와 결합할 수 있으며, 섭취 가능한 정제, 협측 정제(buccal tablets), 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼, 등등의 형태로 이용될 수 있다.
- [0087] 일반적으로 비경구 투여를 위하여, 본 교시의 화합물의 용액은 일반적으로 하이드록시프로필셀룰로스와 같은 표면활성제와 적합하게 혼합할 수 있도록 물에서 제조될 수 있다. 또한, 분산액은 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, DMSO, 및 이의 혼합물에서 물과 함께 또는 물 없이, 및 오일에서 제조할 수 있다. 통상적인 저장 및 이용 조건하에서, 이러한 제제는 미생물의 성장을 방지하는 보존제를 포함한다.
- [0088] 일반적으로, 주사용을 위하여, 멸균 주사 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위하여, 본원에 기재된 화합물의 멸균 수용액 또는 분산, 및 멸균 분말이 적절하다.
- [0089] 비강 투여를 위하여, 본 교시의 화합물은 에어로졸, 드롭, 젤, 및 분말로 제제화될 수 있다. 일반적으로 에어로졸 제형은 생리학적으로 허용되는 수성 또는 비-수성 용매에 활성 물질의 용액 또는 미세 현탁액을 포함하며, 밀폐 용기에 무균 형태로 단일 또는 다중 투여량으로 존재하며, 카트리지의 형태를 취하거나 분무 장치와 함께 사용하기 위하여 충전할 수 있다. 대안적으로, 밀폐 용기는 사용 후 처분하기 위한 계량 밸브에 설치되는 단일 투여 비강 흡입기 또는 에어로졸 디스펜서와 같은 단일 분배 장치일 수 있다. 제형이 에어로졸 디스펜서를 포함한다면, 압축가스와 같은 추진제 또는 플루오로클로로 하이드로카르본과 같은 유기 추진제를 함유할 수 있을 것이다. 또한, 에어로졸 제형은 펌프-분무기의 형태를 취할 수 있다.
- [0090] 구강 또는 설하 투여에 있어서, 본 교시의 화합물은 당, 아카시아, 트라가칸트, 또는 젤라틴과 같은 담체 및 글리세린으로, 정제, 로젠, 또는 향정으로서 제제화될 수 있다.
- [0091] 직장 투여에 있어서, 본원에 기재된 화합물은 코코아 버터 같은 종래의 좌약 베이스을 함유하는 좌약의 형태로 제제화할 수 있다.
- [0092] 본 발명의 화합물은 하기 일반적인 반응식 및 절차 및 후속 제조예에서 설명된 바와 같이, 당업자에게 공지된 방법으로 제조될 수 있다. 모든 개시 물질은 상업적으로 입수하거나 당업자에 공지된 방법과 하기의 절차에 의하여 제조될 수 있다.
- [0093] 본 발명의 다른 태양에 따르면, 본 발명의 화합물은 당해 분야에서 확립된 화합물과 유사한 공정으로 제조할 수 있다. 청구된 화합물을 합성하기 위한 일반적인 방법은 하기 실시예 A에 서술되어 있다.
- [0094] 실시예
- [0095] 실시예 A: 합성
- [0096] 일반적인 방법
- [0097] 상업적으로 입수가능한 출발 물질, 시약, 및 용매를 입수하여 사용하였다. 통상, 질소 또는 아르곤 같은 비활성 환경하에서 무수 반응을 실시하였다. PoraPak[®] Rxn CX는 Waters에서 입수가능한 상업적인 양이온 교환 수지를

지칭한다.

[0098] 마이크로파 반응은 Biotage Initiator 마이크로파 반응기로 실시하였다. 반응 진행은 254 nm UV에 의하여 시각화된 Merck 실리카 겔 플레이트를 이용한 TLC에 의하여, 분석 HPLC에 의하여, LCMS(Bruker Exquire 4000 또는 Waters Acquity UPLC system)에 의하여, 일반적으로 모니터할 수 있다. 중간 산물 또는 최종 산물의 플래시 컬럼 크로마토그래피 정제를 EMD chemicals or Silicycle의 230-400 메시 실리카 겔 60을 이용하여 실행하거나, KP-SIL or HP-SIL 실리카 카트리지가 있는 Biotage Isolera 또는 KP-NH 기본 개질된 실리카 및 대응 샘플을 이용하여 정제하였다. 약 5-30% MeCN 또는 MeOH/0.05% TFA-H₂O 내지 70-90% MeCN 또는 H₂O 중 MeOH/0.05% TFA를 이용하여, 20-40분 동안 30-80 mL/min의 유속으로, Varian Monochrom 10 μ C-18 역-상 컬럼이 설치된 Varian PrepStar 모델 SD-1 HPLC 시스템 상에서 역-상 HPLC 정제를 실시하였다. 또한, 10-95% MeOH 또는 H₂O 중 CH₃CN/0.1% TFA를 이용하여, KP-C18-H 컬럼이 설치된 Biotage Isolera를 이용하여, 역-상 정제를 실시하였다. 양성자 NMR을 Bruker 400 MHz 분광기 상에 기록하고, Bruker Esquire 4000 분광기 또는 Waters Acquity UPLC 시스템을 이용하여 질량 스펙트럼을 얻었다.

[0099] 화합물명은 CambridgeSoft-PerkinElmer's ChemBioDraw Ultra 버전 11.0 또는 12.0으로 만들어진 소프트웨어를 이용하여 생성하였다.

[0100] 약어

[0101] aq 수성

[0102] Ar 아르곤

[0103] Boc *tert*-부톡시카르보닐

[0104] br. 넓다

[0105] calcd 계산치

[0106] d 이중항

[0107] DCM 디클로로메탄

[0108] DIPEA 디이소프로필에틸아민

[0109] DMF N,N-디메틸포름아미드

[0110] DMSO 디메틸설폭시드

[0111] dppf 1,1'-비스(디페닐포스피노) 페로센

[0112] h 시간

[0113] HPLC 고성능 액체 크로마토그래피

[0114] LC-MS 액체 크로마토그래피 결합 질량 분석

[0115] min 분

[0116] m 다중항

[0117] MS ESI 질량 스펙트럼, 전자분무 이온화

[0118] NMR 핵자기 공명

[0119] O/N 밤새

[0120] PE 석유 에테르

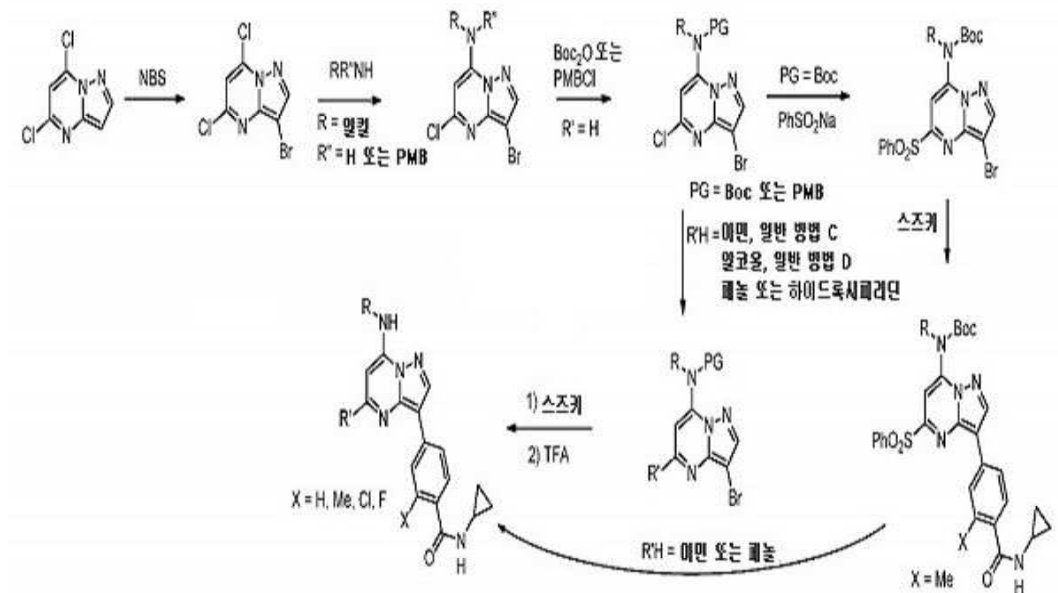
[0121] PMB 파라-메톡시벤질

[0122] prep 제조

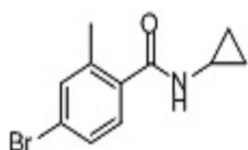
[0123] rt 상온

[0124] s 단일항

- [0125] t 삼중항
- [0126] TFA 트리플루오로아세트산
- [0127] THF 테트라하이드로퓨란

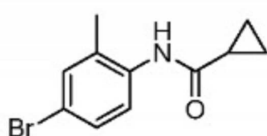


- [0128]
- [0129] **중간물:**
- [0130] 4-브로모-N-사이클로프로필-2-메틸벤즈아미드



- [0131]
- [0132] 4-브로모-2-메틸벤조산(43.0 g, 200 mmol) 및 DCM(300 mL) 중 옥사릴 디클로라이드(30.5 g, 240 mmol)의 현탁액에 DMF(0.1 mL)를 첨가하였다. 그 결과의 반응 혼합물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 반응물은 16시간 동안 투명한 황색 용액으로 천천히 변했다. 이어서, 용매를 진공에서 제거하고, 조 생성물을 추가 정제없이 다음 단계에서 사용하였다. 조생산물을 DCM (300 mL)에서 재용해하고 0℃에서 냉각하였다. TEA(42 mL, 300 mmol)와 DCM(100 mL) 중 사이클로프로필아민12.6 g, 220 mmol)의 혼합물을 15분 동안 천천히 첨가하고, 그 결과의 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 DCM(200 mL)으로 희석하고, 물을 첨가하였다. 그 결과의 혼합물을 DCM으로 추출하고, 합성 유기 추출액을 MgSO₄로 건조하고 농축하여, 희망하는 생성물을 얻은 분홍색 고체로 얻었다 (50.1 g, 99%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.37 (s, 1H), 7.31 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.17 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 5.93 (br. s, 1H), 2.90-2.85 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 0.90-0.85 (m, 2H), 0.62-0.58 (m, 2H); MS ESI [M + H]⁺ 253.9, 계산치 [C₁₁H₁₂BrNO + H]⁺ 254.0.

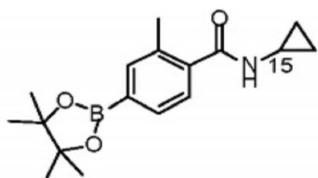
- [0133] N-(4-브로모-2-메틸페닐)사이클로프로판카르복사미드



- [0134]
- [0135] 100 mL RBF에서, , 4-브로모-2-메틸아닐린(3.7 g, 20 mmol) 및 DIPEA (6.95 mL, 40 mmol)을 DMF (40 mL)와 결

합하였다. 반응물을 얼음 수조에서 0℃로 냉각하고, 사이클로프로판카르보닐 클로라이드(2.1 g, 20 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 0℃에서 1 시간 동안 교반하였다. 물과 EtOAc을 첨가하여 상을 분리하고, 수성 상을 EtOAc로 추출하였다. 유기층을 결합하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고, 감압하여 농축하여, 표제 화합물을 흰색 고체로 얻었다 (4.76 g, 94%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.85-7.72 (m, 1H), 7.38-7.28 (m, 2H), 7.15-7.02 (m, 1H), 2.27 (s, 3H), 1.57-1.48 (m, 1H), 1.10 (quint, *J* = 3.9 Hz, 2 H), 0.92-0.79 (m, 2H); MS ESI [M + H]⁺ 253.9, 계산치 [C₁₁H₁₂BrNO + H]⁺ 254.0.

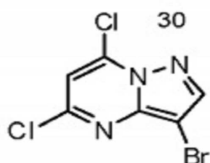
[0136] N-사이클로프로필-2-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)벤즈아미드



[0137]

[0138] 4-브로모-N-사이클로프로필-2-메틸벤즈아미드(3.73 g, 14 mmol), 비스(피나콜라토)디보론(5.59 g, 22 mmol), 및 DMF(37 mL) 중 KOAc(4.29 g, 43 mmol)의 혼합물을 실온에서 10시간 동안 Ar으로 퍼지하였다. 이어서, PdCl₂(dppf) · DCM(0.59 g, 5 mol%)을 첨가하고, 반응물을 수조에서 4시간 동안 오일에서 100℃에서 가열하였다. 반응 완료 후에, 반응 물질을 EtOAc(200 mL) 및 H₂O(100 mL)으로 희석하였다. 결합층을 셀라이트 패드로 여과하고, 소량의 EtOAc로 세척하였다. 수성층을 EtOAc(50 mL)로 추가로 추출하고, 결합 유기층을 염수로 세척하고, Na₂SO₄로 건조하고, 여과하고, 농축하여, 조 오일 잔류물을 얻었다. 조 생성물을 플래시 크로마토그래피(구배: EtOAc/hex 0-100%)로 정제하여, 표제 화합물을 크림 같은 고체로 얻었다 (4.15 g, 94%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.66 (s, 1H), 7.63-7.61 (d, *J* = 7.6 Hz, 1 H), 7.32-7.30 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 5.85 (s, 1 H), 2.93-2.87 (m, 1H), 2.46 (s, 3H), 1.35 (s, 12H), 0.90-0.86 (m, 2H), 0.63-0.59 (m, 2H); MS ESI [M + H]⁺ 302.2, 계산치 [C₁₇H₂₄BNO₃ + H]⁺ 302.2.

[0139] 3-브로모-5,7-디클로로피라졸로[1,5-a]피리미딘



[0140]

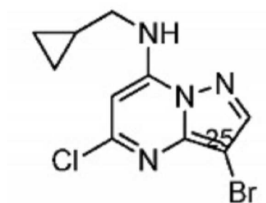
[0141] 종래의 방법으로 나트륨(281.3 g, 12.0 mol) 및 EtOH(10 L)으로 제조된, EtOH 내 소듐 에톡사이드 교반 용액에, 디에틸 말로네이트(963.7 g, 6.02 mol)을 주위 온도에서 첨가한 다음, 화합물 1H-피라졸-3-아민(500 g, 6.02 mol)을 첨가하였다. 혼합물을 12시간 동안 환류하였다. 침전액을 실온으로 냉각한 후, 여과하여 회수하고 물에 용해하였다. 수용액을 2 M HCl(pH = 2)로 산성화하였다. 그 결과의 침전물을 여과하여 회수하고, 감압하여 건조하여, 피라졸로[1,5-a]피리미딘-5,7(4H,6H)-디온(649 g, 71%)을 황색 고체로서 수득하고, 추가 정제 없이 다음 반응에 이용하였다.

[0142] 피라졸로[1,5-a]피리미딘-5,7(4H,6H)-디온(265 g, 1.75 mol) 및 POCl₃(2.00 kg, 13.2 mol) 중 *N,N*-디메틸아닐린(335.6 mL)의 교반 현탁액을 4시간 동안 환류하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각한 후, 얼음물에 붓고, 30 분 동안 교반한 다음, 포화 수성 소듐 카르보네이트로 중화시킨 후, EtOAc로 추출하였다. 결합 유기층을 물과 염수로 세척하고, MgSO₄로 건조시킨 후, 여과하고 증발시켰다. 잔류물을 실리카 겔(구배: EtOAc/PE 1:10) 상의 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 5,7-디클로로피라졸로[1,5-a]피리미딘(287 g, 87%)을 황색 고체로서 얻었다.

[0143] CH₃CN(1.8 L) 중 5,7-디클로로피라졸로[1,5-a]피리미딘(246.6 g, 1.31 mol)의 용액에 NBS(245 g, 1.38 mol)를 첨가하였다. 결과의 혼합물을 실온에서 2분 동안 교반하였다. 용액을 제거한 후, 반응 혼합물을 실리카

겔(구배: EtOAc/PE 1:5) 상의 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물(287 g, 87%)을 얻은 황색 고체로서 얻었다. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ ppm 7.04 (s, 1H), 8.21 (s, 1H); MS ESI $[\text{M} + \text{H}]^+$ 265.9, 계산치 $[\text{C}_6\text{H}_2\text{BrCl}_2\text{N}_3 + \text{H}]^+$ 265.9.

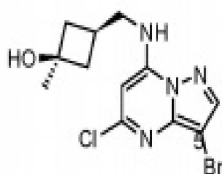
[0144] 3-브로모-5-클로로-N-(사이클로프로필메틸)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-아민



[0145]

[0146] DCM(50 mL) 중 3-브로모-5,7-디클로로피라졸로[1,5-a]피리미딘(5.0 g, 19 mmol)의 용액에 사이클로프로필메탄아민(1.48 g, 21 mmol) 및 DIPEA(6.6 mL, 38 mmol)을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 물과 DCM을 첨가하여 상을 분리하고, 수성 상을 DCM으로 추출하였다. 결합 유기 추출물을 Na_2SO_4 으로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 조 생성물을 플래시 크로마토그래피(구배: EtOAc/hex 0-50%)로 정제하여, 표제 화합물을 황색 고체로 얻었다(5.25 g, 92%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.97 (s, 1H), 6.50 (br. s, 1H), 5.97 (s, 1H), 3.25 (dd, $J = 7.3, 5.5$ Hz, 2H), 1.26-1.13 (m, 1H), 0.74-0.65 (m, 2H), 0.37 (q, $J = 5.0$ Hz, 2H); MS ESI $[\text{M} + \text{H}]^+$ 301.0, 계산치 $[\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{BrClN}_4 + \text{H}]^+$ 301.0.

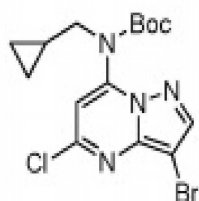
[0147] (1s,3s)-3-(((3-브로모-5-클로로피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노)메틸)-1-메틸 사이클로부탄올



[0148]

[0149] DCM(200 mL) 중 3-브로모-5,7-디클로로피라졸로[1,5-a]피리미딘(14.6 g, 55.3 mmol)의 용액에 시스-하이드록시-3-메틸사이클로부탄-1-메틸아민(7.0 g, 60.9 mmol), 및 DIPEA(19.2 mL, 110.6 mmol)을 첨가하였다. 반응물을 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 물과 DCM을 첨가하여 상을 분리하고, 수성 상을 DCM으로 추출하였다. 결합 유기 추출액을 Na_2SO_4 으로 건조하고, 여과하고, 농축하여, 황색 고체의 표제 화합물을 수득하였다(18.1 g, 95%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 7.96 (s, 1H), 6.60-6.49 (m, 1H), 5.99 (s, 1H), 3.47 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.38-2.27 (m, 3H), 1.96-1.85 (m, 2H), 1.43 (s, 3H); MS ESI $[\text{M} + \text{H}]^+$ 345.1, 계산치 $[\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{BrClN}_4\text{O} + \text{H}]^+$ 345.0.

[0150] 테트-부틸 (3-브로모-5-클로로피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)(사이클로프로필메틸)카르바메이트

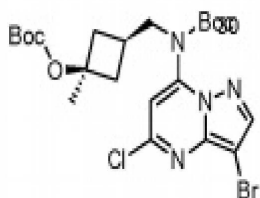


[0151]

[0152] DCM(150 mL) 중 3-브로모-5-클로로-N-(사이클로프로필메틸)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-아민(5.25 g, 17.5 mmol) 용액에 Boc_2O (5.70 g, 26.2 mmol), DMAP(0.21 g, 1.75 mmol), 및 TEA(7.3 mL, 52.5 mmol)을 첨가하였다.

반응물을 실온에서 4시간 동안 교반하였다. 물과 DCM을 첨가하여 상을 분리하고, 수성 상을 DCM으로 추출하였다. 결합 유기 추출액을 MgSO_4 으로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 조 생성물을 플래시 크로마토그래피(구배: EtOAc/hex 0-40 %)로 정제하여, 표제 화합물을 황색 고체로 얻었다(6.24 g, 89%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 8.12 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 3.72 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.05-0.94 (m, 1H), 0.46-0.37 (m, 2H), 0.13-0.03 (m, 2H); MS ESI $[\text{M} - \text{C}_4\text{H}_8]^+$ 345.0, 계산치 $[\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{BrClN}_4\text{O}_2 - \text{C}_4\text{H}_8]^+$ 345.0.

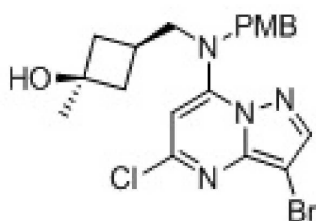
[0153] 터트-부틸 (3-브로모-5-클로로피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)((1s,3s)-3-((터트-부톡시카르보닐)옥시)-3-메틸 사이클로부틸)메틸)카르바메이트



[0154]

[0155] (1s,3s)-3-(((3-브로모-5-클로로피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노)메틸)-1-메틸 사이클로부탄올(18.1 g, 52.6 mmol), Boc_2O (34.3 g, 158 mmol), 및 DCM(200 mL) 중 TEA(22 mL, 157.8 mmol)의 용액에 DMAP(1.28 g, 10.5mmol)을 첨가하였다. 반응물을 40℃에서 16시간 동안 교반하였다. 용매를 진공에서 제거하고, 물과 DCM을 첨가하여 상을 분리하고, 수성 상을 DCM으로 추출하였다. 결합 유기 추출물을 Na_2SO_4 으로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 조 생성물을 플래시 크로마토그래피(3 Biotage 100g SiO_2 평행 컬럼, 구배: EtOAc/hex 0-30%)로 정제하여, 표제 화합물을 베이지 고체로 얻었다(12.7 g, 44%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 8.11 (s, 1H), 6.74 (s, 1H), 3.88 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 2.17 (s, 3H), 1.99-1.88 (m, 2H), 1.47 (s, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.35 (s, 9H); MS ESI $[\text{M} + \text{H}]^+$ 545.1, 계산치 $[\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{BrClN}_4\text{O}_5 + \text{H}]^+$ 545.1.

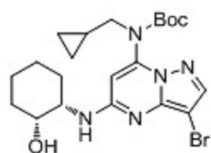
[0156] (1s,3s)-3-(((3-브로모-5-클로로피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)(4-메트옥시벤질)아미노)메틸)-1-메틸 사이클로부탄올



[0157]

[0158] (1s,3s)-3-(((3-브로모-5-클로로피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)아미노)메틸)-1-메틸 사이클로부탄올(12.0 g, 34.7 mmol) 및 DMF (50 mL) 중 4-메트옥시벤질 클로라이드(5.2 mL, 38.2 mmol)의 용액에 K_2CO_3 (9.6 g, 69.4 mmol)을 첨가하였다. 그 결과의 혼합물을 60℃에서 3시간 동안 교반하였다. 물과 EtOAc을 첨가하여 상을 분리하고, 수성 상을 EtOAc로 추출하였다. 결합 유기 추출액을 물로 세척하고, MgSO_4 로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 조 생성물을 세 개의 평행 컬럼을 이용하여 플래시 크로마토그래피(구배: EtOAc/hex 10-100%)로 정제하였다. 불순한 분획을 회수하고, 상기 조건을 이용하여 플래시 크로마토 그래피로 정제하였다. 순수한 분획을 결합시키고, 농축하여 회수하는 생성물을 얻은 황색 고체로 얻었다(13.1 g, 81%). ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ ppm 8.01 (s, 1H), 7.17 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.67 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.02 (s, 1H), 4.98 (s, 2H), 3.83 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.25-2.16 (m, 3H), 1.76-1.72 (m, 2H), 1.36 (s, 3H); MS ESI $[\text{M} + \text{H}]^+$ 467.1, 계산치 $[\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{BrClN}_4\text{O}_2 + \text{H}]^+$ 467.1.

[0159] 터트-부틸 (3-브로모-5-(((1s,2R)-2-하이드록시사이클로헥실)아미노)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)(사이클로프로필)메틸)카르바메이트



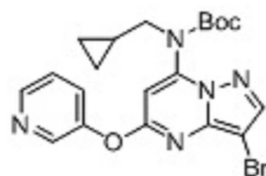
[0160]

[0161]

NMP(90 mL) 중 터트-부틸 (3-브로모-5-클로로피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)(사이클로프로필메틸)카르바메이트(9.0 g, 22.5 mmol)의 용액에 (1R,2S)-2-아미노사이클로헥사놀·HCl(4.08 g, 27.0 mmol) 및 DIPEA(3.47 g, 25.1 mmol)을 첨가하였다. 반응물을 나누어 6개의 전자레인저 비알에 밀봉하였다. 각 비알을 전자레인저로 데웠다. 물과 EtOAc을 첨가하여 상을 분리하고, 수성 상을 EtOAc로 추출하였다. 결합 유기 추출물을 Na₂SO₄으로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 조 생성물을 평행한 3개의 컬럼을 이용한 플래시 크로마토그래피(구배: EtOAc/hex 0-50%)로 정제하여, 표제 화합물을 베이지색 고체로 얻었다(8.51 g, 79%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.80 (s, 1H), 6.08 (s, 1H), 5.33-5.19 (m, 1H), 4.26-4.14 (m, 1H), 4.13-4.06 (m, 1H), 3.61 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 2.51 (br. s, 1H), 1.89-1.62 (m, 8H), 1.55-1.45 (m, 2H), 1.40 (s, 9H), 1.06-0.95 (m, 1H), 0.47-0.38 (m, 2H), 0.17-0.07 (m, 2H); MS ESI [M + H]⁺ 408.3, 계산치 [C₂₁H₃₀BrN₅O₃ + H]⁺ 480.2.

[0162]

터트-부틸 (3-브로모-5-(피리딘-3-일옥시)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)(사이클로프로필메틸)카르바메이트



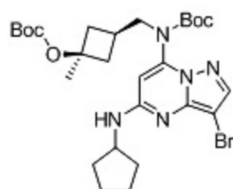
[0163]

[0164]

터트-부틸 (3-브로모-5-클로로피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)(사이클로프로필메틸)카르바메이트(400 mg, 1.0 mmol), 3-하이드록시피리딘(475 mg, 5.0 mmol), 및 DME(5 mL) 중 DBU(0.75 mL, 5.0 mmol)의 혼합물을 결합시키고, 전자레인저 비알에 밀봉하였다. 혼합물을 85℃에서 1시간 동안 전자레인저로 데웠다. 물과 EtOAc을 첨가하여 상을 분리하고, 수성 상을 EtOAc로 추출하였다. 결합 유기 추출물을 Na₂SO₄으로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 조 생성물을 플래시 크로마토그래피(구배: EtOAc/hex 0-50%)로 정제하여, 표제 화합물을 갈색 고체로 얻었다(367 mg, 80%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 8.64 (d, J = 2.5 Hz, 1H) 8.54 (dd, J = 4.5, 1.5 Hz, 1H) 7.97 (s, 1H), 7.78-7.72 (m, 1H), 7.44-7.38 (m, 1H) 6.61 (s, 1H) 3.71 (d, J = 7.3 Hz, 2H) 1.39 (s, 9 H), 1.06-1.01 (m, 1H) 0.45 (s, 2H), 0.13-0.09 (m, 2H); MS ESI [M + H]⁺ 460.0, 계산치 [C₂₀H₂₂BrN₅O₃ + H]⁺ 460.1.

[0165]

터트-부틸 (3-브로모-5-(사이클로헥실아미노)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)((1s,3s)-3-((터트-부톡시카르보닐)옥시)-3-메틸사이클로부틸)메틸)카르바메이트



[0166]

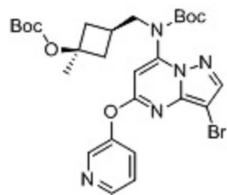
[0167]

NMP (4 mL) 중 터트-부틸 (3-브로모-5-클로로피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)((1s,3s)-3-((터트-부톡시카르보닐)옥시)-3-메틸사이클로부틸)메틸)카르바메이트(0.45 g, 0.83 mmol)의 용액에 사이클로헥실아민(0.085 g, 1.0 mmol) 및 DIPEA(0.21 g, 1.66 mmol)을 첨가하였다. 반응물을 130℃에서 3시간 동안 전자레인저로 데웠다. 물과 EtOAc을 첨가하여 상을 분리하고, 수성 상을 EtOAc로 추출하였다. 결합 유기 추출물을 Na₂SO₄으로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 조 생성물을 플래시 크로마토그래피(구배: EtOAc/hex 0-60%)로 정제하여, 표제 화합물을 흰색 고체로 얻었다(0.40 g, 67%). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 7.79 (s, 1H), 5.94 (s, 1H), 5.08 (br.

s, 1H), 4.23 (br. s, 1H), 3.85-3.72 (m, 2H), 2.28-2.06 (m, 5H), 2.02-1.89 (m, 2H), 1.81-1.61 (m, 5H), 1.48 (s, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.36 (s, 9H); MS ESI $[M + H]^+$ 594.3, 계산치 $[C_{27}H_{40}BrN_5O_5 + H]^+$ 594.2.

[0168]

터트-부틸 (3-브로모-5-(피리딘-3-일옥시)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)((1s,3s)-3-((터트-부톡시카르보닐)옥시)-3-메틸사이클로부틸)메틸)카르바메이트



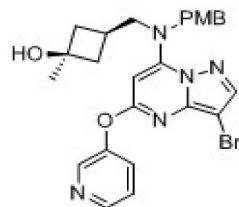
[0169]

[0170]

터트-부틸 (3-브로모-5-클로로피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)((1s,3s)-3-((터트-부톡시카르보닐)옥시)-3-메틸 사이클로부틸)메틸)카르바메이트(12.7 g, 23.3 mmol), 3-하이드록시피리딘(4.43 g, 46.6 mmol), 및 K_2CO_3 (9.65 g, 69.9 mmol)의 혼합물을 DMF(100 mL)에서 결합하고, 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 혼합물을 EtOAc로 희석하고, 물로 세척하고, Na_2SO_4 로 건조하고, 여과하고, 진공에서 농축하였다. 조 생성물을 Et_2O 를 이용하여 마쇄하고, 여과하여, 표제 화합물을 베이지색 고체(8.43 g, 14.0 mmol)로 얻었다. 모액을 진공에서 농축하고, 플래시 크로마토그래피(구배: EtOAc/hex 0-40%)로 정제하여, 표제 화합물을 얻은 오렌지색 고체(4.07 g, 6.74 mmol)로 얻었다. 마쇄 및 플래시 크로마토그래피를 통하여 얻은 고체를 결합하여 표제 화합물을 얻은 오렌지색 고체)로 얻었다(12.50 g, 89%). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 8.65 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 8.55 (dd, J = 4.6, 1.4 Hz, 1H), 7.98 (s, 1H), 7.78-7.73 (m, 1H), 7.46-7.40 (m, 1H), 6.50 (s, 1H), 3.89 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 2.30-2.15 (m, 3H), 2.02-1.93 (m, 2H), 1.50 (s, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.38 (s, 9H); MS ESI $[M + H]^+$ 604.3, 계산치 $[C_{27}H_{34}BrN_5O_6 + H]^+$ 604.2.

[0171]

(1s,3s)-3-(((3-브로모-5-(피리딘-3-일옥시)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)(4-메트옥시벤질)아미노)메틸)-1-메틸 사이클로부탄올



[0172]

[0173]

(1s,3s)-3-(((3-브로모-5-클로로피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)(4-메트옥시벤질)아미노)메틸)-1-메틸 사이클로부탄올(13.1 g, 28.2 mmol) 및 DMF(70 mL) 중 3-하이드록시피리딘(4.0 g, 42.3 mmol)의 용액에 K_2CO_3 (7.8 g, 56.3 mmol)을 첨가하였다. 결과의 혼합물을 80℃에서 22시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물에 첨가하기 전에, 60% NaH(0.6 g, 15 mmol) 및 DMF 중 3-하이드록시피리딘(1.4 g, 14.7 mmol)의 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 결과의 용액을 100℃에서 20시간 동안 교반하였다. 물과 EtOAc을 첨가하여 상을 분리하고, 수성 상을 EtOAc로 추출하였다. 결합 유기 추출액을 물로 세척하고, $MgSO_4$ 으로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 조 생성물을 3개의 평행 컬럼을 이용하여 플래시 크로마토그래피(구배: EtOAc/헥산 10-100%)로 정제하였다. 불순한 분획을 수거하고, 플래시 크로마토그래피(구배: EtOAc/헥산 50-100%)로 정제하였다. 순수한 분획은 결합하고 농축하여 희망하는 생성물을 흐린 황색 고체로서 얻었다(9.5 g, 64%). 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 8.56 (d, J = 4 Hz, 1H), 8.45 (d, J = 8 Hz, 1H), 8.00 (s, 1H), 7.69-7.65 (m, 1H), 7.36 (dd, J = 4.8, 0.4 Hz, 1H), 7.19 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.85 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 5.71 (s, 1H), 4.91 (s, 2H), 3.87 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 3.87 (s, 3H), 2.30-2.15 (m, 3H), 1.77 (t, J = 8.1 Hz, 2H), 1.37 (s, 3H); MS ESI $[M + H]^+$ 524.2, 계산치 $[C_{25}H_{26}BrN_5O_3 + H]^+$ 524.1.

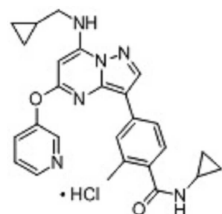
[0174]

N-사이클로프로필-4-(7-(((1s,3s)-3-하이드록시-3-메틸사이클로부틸)메틸)(4-메트옥시벤질)아미노)-5-(피리딘-

다(2.09 g, 25%, 2 단계에 걸침). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 8.21 (s, 1H), 7.51-7.37 (m, 3H), 5.67 (br. s, 1H), 4.04-3.82 (m, 2H), 3.46-3.37 (m, 2H), 2.93-2.82 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 1.89-1.64 (m, 6H), 1.61-1.42 (m, 2H), 1.31-1.21 (m, 1H), 0.88-0.78 (m, 2H), 0.70-0.58 (m, 4H), 0.46-0.36 (m, 2H); MS ESI $[\text{M} + \text{H}]^+$ 475.3, 계산치 $[\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_6\text{O}_2 + \text{H}]^+$ 475.3. HPLC purity: 98% at 254 nm.

[0182]

A2: N-사이클로프로필-4-(7-((사이클로프로필메틸)아미노)-5-(피리딘-3-일옥시)피라졸로[1,5-a]피리미딘-3-일)-2-메틸벤즈아미드 하이드로클로라이드



[0183]

[0184]

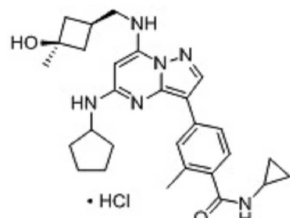
터트-부틸 (3-브로모-5-(피리딘-3-일옥시)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)(사이클로프로필메틸)카르바메이트(367 mg, 0.80 mmol), N-사이클로프로필-2-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)벤즈아미드(289 mg, 0.96 mmol), $\text{PdCl}_2\text{dppf} \cdot \text{DCM}$ (65 mg, 0.080 mmol), 및 THF(4 mL) 중 2M K_3PO_4 (1.4 mL, 2.8 mmol)의 혼합물을 전자레인지 비알에 밀봉하였다. 비알을 Ar으로 충전하고, 전자레인지에서 130°C에서 4시간 동안 가열하였다. 물과 EtOAc을 첨가하여 상을 분리하고, 수성 상을 EtOAc로 추출하였다. 결합 유기 추출물을 Na_2SO_4 으로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 조 생성물을 플래시 크로마토그래피(구배: EtOAc/헥산 20-100%)로 정제하여 황색 오일을 얻었다.

[0185]

상기 화합물을 DCM(6 mL)에 용해하고, TFA(20 mL)로 실온에서 1시간 동안 처리하였다. 반응 완료 후에, 용매를 진공에서 제거하고, 조 생성물을 MeOH(4 mL)에 재용해하고, 여과하고, prep HPLC로 정제하였다. 분획을 PoraPak 컬럼을 통과시키고, Et_2O 를 이용하여 마쇄하여, 표제 화합물을 자유 염기(흰색 고체, 119 mg)로 얻었다. 이어서, 자유 염기(67 mg, 0.15 mmol)를 MeOH(10 mL)에 용해한 다음, HCl (1M Et_2O , 2 당량)을 천천히 첨가하였다. 혼합물을 농축하고, Et_2O 를 이용하여 마쇄하여 표제 화합물을 HCl 염 내에서 황색 고체로 얻었다(55 mg, 25% 수율, 2 단계에 걸침). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 9.10 (s, 1H), 8.82 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 8.73-8.66 (m, 1H), 8.41 (s, 1H), 8.24-8.15 (m, 1H), 7.69 (s, 1H), 7.60 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.07 (s, 1H), 3.39 (d, $J = 7.0$ Hz, 2H), 2.89-2.78 (m, 1H), 2.29 (s, 3H), 1.37-1.23 (m, 1H), 0.86-0.75 (m, 2H), 0.70-0.56 (m, 4H), 0.45-0.38 (m, 2H); MS ESI $[\text{M} + \text{H}]^+$ 455.2, 계산치 $[\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_2 + \text{H}]^+$ 455.2. HPLC 순도: 254 nm에서 95.9%.

[0186]

A3: 4-(5-(사이클로헥틸아미노)-7-((((1s,3s)-3-하이드록시-3-메틸사이클로부틸)메틸)아미노)피라졸로[1,5-a]피리미딘-3-일)-N-사이클로프로필-2-메틸벤즈아미드 하이드로클로라이드



[0187]

[0188]

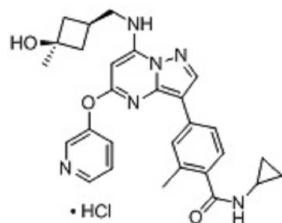
터트-부틸 (3-브로모-5-(사이클로헥틸아미노)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)((((1s,3s)-3-((터트-부톡시카르보닐)옥시)-3-메틸사이클로부틸)메틸)카르바메이트(0.40 g, 0.67 mmol), N-사이클로프로필-2-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)벤즈아미드(0.26 g, 0.88 mmol), $\text{PdCl}_2\text{dppf} \cdot \text{DCM}$ (0.055 g, 0.067 mmol), 및 THF(4 mL) 중 2M K_3PO_4 (1 mL, 2.01 mmol)의 혼합물을 Ar로 충전하고, 130°C 전자레인지에서 3시간 동안 가열하였다. 물과

EtOAc을 첨가하여 상을 분리하고, 수성 상을 EtOAc로 추출하였다. 결합 유기 추출물을 Na_2SO_4 으로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 조 생성물을 플래시 크로마토그래피(구배: EtOAc/헥산 20-100%)로 정제하여 황색 오일을 얻었다.

[0189] 상기 화합물을 DCM(6 mL)에 용해하고, TFA(20 mL)로 실온에서 3시간 동안 처리하였다. 반응 완료 후에, 용매를 진공에서 제거하고, 조 생성물을 MeOH(5 mL)에 용해하였다. 혼합물을 여과하고, prep-HPLC로 정제하였다. 화합물을 PoraPak 카트리지를 통과시키고, Et_2O 를 이용하여 마쇄하여, 표제 화합물을 자유 염기(흰색 고체)로 얻었다. 자유 염기를 MeOH(5 mL)에 용해한 다음, HCl(1M Et_2O , 2 당량)을 천천히 첨가하였다. 용매를 진공에서 제거하여 표제화합물을 HCl 염 중 얻은 오렌지색 고체를 얻었다(75 mg, 21%, 2 단계에 걸침). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 8.18 (s, 1H), 7.42 (s, 3H), 5.52 (br. s, 1H), 4.23-4.11 (m, 1H), 3.68-3.54 (m, 2H), 2.93-2.81 (m, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.38-2.27 (m, 1H), 2.26-2.07 (m, 4H), 1.99-1.89 (m, 2H), 1.88-1.59 (m, 6H), 1.35 (s, 3H), 0.86-0.79 (m, 2H), 0.66-0.58 (m, 2H); MS ESI $[\text{M} + \text{H}]^+$ 489.4, 계산치 $[\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_2 + \text{H}]^+$ 489.3. HPLC 순도: 254 nm에서 99%.

[0190] A4: N-사이클로프로필-4-(7-(((1s,3s)-3-하이드록시-3-메틸사이클로부틸)메틸)아미노)-5-(피리딘-3-일옥시)피라졸로[1,5-a]피리미딘-3-일)-2-메틸벤즈아미드 하이드로클로라이드 및 이의 자유 염기

[0191] A). Boc 탈보호화:

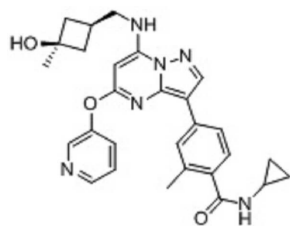


[0192]

[0193] 터트-부틸 (3-브로모-5-(사이클로펜틸아미노)피라졸로[1,5-a]피리미딘-7-일)((0.57s,3s)-3-((터트-부톡시카르보닐)옥시)-3-메틸사이클로부틸)메틸)카르바메이트(0.23 g, 0.38 mmol), N-사이클로프로필-2-메틸-4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)벤즈아미드(0.15 g, 0.49 mmol), PdCl_2dppf ·DCM(0.15 g, 0.49 mmol), 및 THF(4 mL) 중 2M K_3PO_4 (1 mL, 1.14 mmol)의 혼합물을 Ar로 충전하고, 130°C 전자레인지에서 3시간 동안 가열하였다. 물과 EtOAc을 첨가하여 상을 분리하고, 수성 상을 EtOAc로 추출하였다. 결합 유기 추출물을 Na_2SO_4 으로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 조 생성물을 플래시 크로마토그래피(구배: EtOAc/헥산 20-60%)로 정제하여 황색 오일을 얻었다.

[0194] 상기 중간물을 DCM(10 mL)에 용해하고, TFA(3 mL)로 실온에서 3시간 동안 처리하였다. 반응 완료 후에, 용매를 진공에서 제거하고, 조 생성물을 MeOH(5 mL)에 용해하였다. 혼합물을 여과하고, prep-HPLC로 정제하였다. 화합물을 PoraPak 카트리지를 통과시키고, Et_2O 를 이용하여 마쇄하여, 표제 화합물을 자유 염기(흰색 고체)로 얻었다. 자유 염기를 MeOH(5 mL)에 용해한 다음, HCl(1M Et_2O , 2 당량)을 천천히 첨가하였다. 용매를 진공에서 제거하여 표제화합물을 HCl 염 중 베이지색 고체를 얻었다(96 mg, 47%, 2 단계에 걸침). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 9.14 (br. s, 1H), 8.89-8.82 (m, 1H), 8.79-8.71 (m, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.31-8.21 (m, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.06 (s, 1H), 3.56 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.88-2.79 (m, 1H), 2.40-2.31 (m, 1H), 2.29 (s, 3H), 2.26-2.18 (m, 2H), 1.99-1.89 (m, 2H), 1.37 (s, 3H), 0.85-0.76 (m, 2H), 0.63-0.53 (m, 2H); MS ESI $[\text{M} + \text{H}]^+$ 499.3, 계산치 $[\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_3 + \text{H}]^+$ 499.2. HPLC 순도: 254 nm에서 99.5%

[0195] B). PME 탈보호화:



[0196]

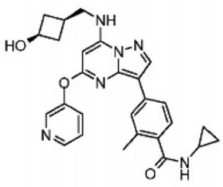
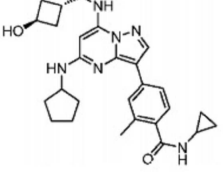
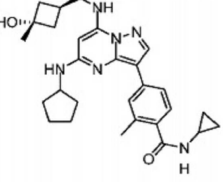
[0197] N-사이클로프로필-4-(7-((((1s,3s)-3-하이드록시-3-메틸사이클로부틸)메틸)(4-메트옥시벤질)아미노)-5-(피리딘-3-일옥시)피라졸로[1,5-a]피리미딘-3-일)-2-메틸벤즈아미드(9.6 g, 15.5 mmol) 및 DCE(70 mL) 중 TFA(50 mL)의 혼합물을 50℃ 오일 배스에서 4시간 동안 가열하였다. 반응 완료 후에, 용매를 진공에서 제거하고, 조 생성물을 MeOH/DCM(100 mL/25 mL)의 혼합물에 용해하였다. 이어서, 2M Na₂CO₃(150 mL)을 첨가하고, 결과의 혼합물을 실온에서 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 DCM으로 희석하고, 상을 분리하였다. 수성 상을 DCM으로 추출하고, 결합 유기 추출액을 물로 세척하고, MgSO₄으로 건조하고, 여과하고, 농축하였다. 조 생성물을 뿜고, DCM/Et₂O(10 mL/70 mL)의 혼합물에서 초음파처리하여 표제 화합물을 자유 염기 내 흰색 고체로 얻었다(5.9 g, 77%). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ ppm 8.58-8.53 (m, 1H), 8.50-8.46 (m, 1H), 8.36 (s, 1H), 7.86-7.80 (m, 1H), 7.76-7.72 (m, 1H), 7.61-7.55 (m, 2H), 7.18 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.92 (s, 1H), 3.52 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 2.86-2.77 (m, 1H), 2.38-2.28 (m, 1H), 2.25 (s, 3H), 2.24-2.18 (m, 2H), 1.99-1.88 (m, 2H), 1.37 (s, 3H), 0.84-0.75 (m, 2H), 0.64-0.54 (m, 2H); MS ESI [M + H]⁺ 499.2, 계산치 [C₂₈H₃₀N₆O₃ + H]⁺ 499.2. HPLC 순도: 235 nm에서 96.1%.

[0198] 다음 최종 화합물을 A1-4의 합성과 유사하게 합성하였다.

표 1

[0199]

구조	실시예 번호 MS 계산치; MS ESI [M+H] ⁺ 염 형태; HPLC 순도	¹ H NMR
	A5 [C ₂₈ H ₃₀ N ₆ O ₃ +H] ⁺ 499.2; 499.3; 자유염기; 254 nm에서 98.9%	(400 MHz, CD ₃ OD) δ ppm 8.55 (dd, J = 2.8, 0.4 Hz, 1H), 8.47 (dd, J = 4.8, 1.6 Hz, 1H), 8.33 (s, 1H), 7.83-7.80 (m, 1H), 7.72 (s, 1H), 7.58-7.55 (m, 2H), 7.18 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 5.89 (s, 1H), 3.49 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 2.87-2.78 (m, 2H), 2.28-2.23 (m, 5H), 1.97-1.92 (m, 2H), 1.36 (s, 3H), 0.82-0.77 (m, 2H), 0.62-0.58 (m, 2H).
	A6 [C ₂₇ H ₂₈ N ₆ O ₃ +H] ⁺ 485.2; 485.3; HCl 염; 254 nm에서 98.8%	(400 MHz, CD ₃ OD) δ ppm 9.13 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 8.86 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 8.77-8.69 (m, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.26 (dd, J = 8.8, 5.8 Hz, 1H), 7.67 (s, 1H), 7.59 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.07 (s, 1H), 4.53-4.39 (m, 1H), 3.57 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 2.89-2.79 (m, 1H), 2.76-2.61 (m, 1H), 2.30 (s, 3H), 2.29-2.21 (m, 2H), 2.21-2.08 (m, 2H), 0.85-0.78 (m, 2H), 0.65-0.58 (m, 2H).
	A8 [C ₂₇ H ₃₄ N ₆ O ₂ +H] ⁺ 475.3; 475.4; HCl 염; 254 nm에서 99.3%	(400 MHz, CD ₃ OD) δ ppm 8.22 (s, 1H), 7.51-7.36 (m, 3H), 5.68 (s, 1H), 3.77 (s, 2H), 3.37-3.33 (m, 2H), 2.93-2.84 (m, 1H), 2.47 (s, 3H), 2.07-1.95 (m, 4H), 1.93-1.72 (m, 4H), 1.34-1.19 (m, 1H), 0.88-0.78 (m, 2H), 0.69-0.59 (m, 4H), 0.45-0.37 (m, 2H).

	A11 $[C_{27}H_{28}N_6O_3 + H]^+$ 485.2 485.2; HCl 염; 254 nm에서 98.6%	(400 MHz, CD_3OD) δ ppm 9.14 (s, 1H), 8.85 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H), 8.79-8.72 (m, 1H), 8.40 (s, 1H), 8.30-8.21 (m, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.59 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.23 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.06 (s, 1H), 4.17-4.06 (m, 1H), 3.54 (d, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.88-2.78 (m, 1H), 2.53-2.43 (m, 2H), 2.29 (s, 4H), 1.81-1.68 (m, 2H), 0.84-0.77 (m, 2H), 0.62-0.56 (m, 2H).
	A12 $[C_{27}H_{34}N_6O_2 + H]^+$ 475.3; 475.4; HCl 염; 254 nm에서 97.5%	(400 MHz, CD_3OD) δ ppm 8.18 (s, 1H), 7.55-7.29 (m, 3H), 5.54 (br, s, 1H), 4.50-4.37 (m, 1H), 4.26-4.07 (m, 1H), 3.62 (d, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.92-2.83 (m, 1H), 2.75-2.61 (m, 1H), 2.46 (s, 3H), 2.31-2.02 (m, 6H), 1.92-1.56 (m, 6H), 0.91-0.75 (m, 2H), 0.71-0.52 (m, 2H).
	A13 $[C_{28}H_{36}N_6O_2 + H]^+$ 489.3; 489.4 TFA 염; 254 nm에서 98.2%	(400 MHz, CD_3OD) δ ppm 8.18 (s, 1H), 7.48-7.36 (m, 3H), 5.52 (s, 1H), 4.23-4.10 (m, 1H), 3.65-3.57 (m, 2H), 2.93-2.75 (m, 2H), 2.46 (s, 3H), 2.31-2.21 (m, 2H), 2.20-2.11 (m, 3H), 2.06-1.89 (m, 2H), 1.89-1.50 (m, 6H), 1.37 (s, 3H), 0.87-0.79 (m, 2H), 0.68-0.56 (m, 2H).

[0200] 실시예 B: TTK 저해 어세이

[0201] 전장 인간 TTK의 아미노 말단 GST 융합으로서 활성 TTK를 Invitrogen에서 구입하였다. 아미노 말단 6 히스티딘, 태그된 인간 TTK (잔기 1-275)를 대장균에서 발현시키고, Ni^{2+} 아가로스, 겔 여과, 및 이온 교환 크로마토그래피에 의하여 >95% 동종성으로 정제하였다.

[0202] TTK 활성을 간접 ELISA 검출 시스템을 이용하여 측정하였다. 아미노 말단 6 히스티딘, sumo 태그된 TTK(아미노 산 잔기 1-275)로 예비-코팅된 96 웰 미세적정 플레이트에서, 16 μ M ATP(Sigma cat# A7699) 또는 100 μ M ATP, 50mM Hepes pH 7.2, 1mM EGTA, 10mM $MgCl_2$, 0.1% Pluronic의 존재하에, GST-TTK(0.68 nM)을 배양하였다.

[0203] 반응을 30분 동안 진행하고, 플레이트를 워시 버퍼(0.2% Tween 20으로 보완된 인산 완충 식염수)로 5번 세정하고, 일차 항체의 1:3000 희석액(Cell Signaling cat# 9381)으로 30분 동안 배양하였다. 플레이트를 워시 버퍼로 5번 세척하고, 호스 라디쉬 페록시다제(horse radish peroxidase, BioRad cat# 1721019, 1:3000 농도)에 결합된 이차 항체의 존재하에 30분 동안 배양하고, 워시 버퍼로 추가로 5번 세척하고, TMB 기질(Sigma cat# T0440)의 존재하에 배양하였다. 비색 반응을 5분 동안 계속한 후, 정지 용액(0.5 N 황산)을 첨가하고, 450 nm에서 단색 또는 필터 기반 플레이트 리더(각각 Molecular Devices M5 또는 Beckman DTX880)로 검출하여 정량하였다.

[0204] 화합물 저해도를 고정 농도(10 μ M) 또는 다양한 저해제 농도(일반적으로 0.5 μ M 내지 0.001 μ M)에서 측정하였다. ATP 첨가 전, 5분 동안 효소의 존재하에 화합물을 예비 배양하고, 남아있는 활성을 상술된 활성 어세이를 이용하여 정량화하였다. 화합물의 % 저해도를 다음 식을 이용하여 결정하였다: % 저해도 = $100 \times (1 - (\text{실험치} - \text{배경치}) / (\text{고활성대조치} - \text{배경치}))$. IC_{50} 값을 식; $A + (B / (1 + (x/C)^D))$, A = 배경치, B = 범위, C = 변곡점, D = 곡선 맞춤 매개변수를 갖는 비-선형 4점 산정 곡선 맞춤(XLfit4, IDBS)을 이용하여 결정하였다.

[0205] 하기 표 2에서, 예시된 화합물의 IC_{50} 값 범위가 100 μ M ATP를 이용하여 주어진다. IC_{50} 범위는 "A," "B," 및 "C"로 표시되고, 0.1 μ M 이하의 값, 0.1 μ M 초과 0.5 μ M 이하의 값, 0.5 μ M 초과 1.0 μ M 이하의 값을 각각 나타낸다. 별표로 지정된 IC_{50} 범위는 분석에서 16 μ M ATP(Sigma cat# A7699)가 사용되었음을 보여주었다.

[0206] 실시예 C: 본 발명의 예시적 화합물에 대한 암 세포 주 데이터

[0207] 화합물 중첩 전에, 유방암 세포(MDA-MB-468), 대장암 세포(HCT116) 및 난소암 세포(OVCAR-3)를 96 웰 플레이트에 24시간 동안 접종하였다(세포 성장률에 따라 웰 당 80 μ l 중 1000 내지 4000). 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함유한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 세포 성장 매질(Invitrogen,

Burlington, ON, Canada)로 50 nM 내지 250 μ M로 희석된 100% DMSO 중 10 mM 모액으로서 화합물을 제조하였다. 각 농도로부터의 분액(20 μ l)을 96 웰 플레이트 내의 미리-접종된 세포 80 μ l에 겹쳐서 최종 농도 10 nM 내지 50 μ M를 만들었다. 세포를 5일 동안 배양한 후, 설포르다민 B 어세이(sulforhodamine B assay, SBA)를 실시하여 화합물의 세포 성장 저해 활성을 측정하였다.

[0208] 설포르다민 B (Sigma, Oakville, ON, Canada에서 구입)는 세포 단백질의 염기성 아미노산과 결합하는 수용성 염료이다. 따라서, 결합된 염료의 비색 측정은 세포수와 관련된 총 단백질 질량을 예측하게 한다. 배양액을 천천히 흡입하고 웰당 50 μ l의 빙냉 10% 트리클로로아세트산(TCA)를 첨가함으로써 세포를 그 자리에서 고정한다. 다음, 4°C에서 60분 동안 배양하였다. 플레이트를 H₂O로 다섯번 세척하고, 5분 동안 공기에서 건조하였다. 각 웰에 1% (v/v) 아세트산 중 50 μ l의 0.4%(w/v) SRB 용액을 첨가하고 실온에서 30분 동안 배양하여 염색 반응을 완료하였다. 염색한 다음, 플레이트를 1% 아세트산으로 네번 세척하여 결합되지 않은 염료를 제거하고 나서, 5분 동안 공기에서 건조하였다. 웰 당 100 μ l의 10 mM 트리스 pH 10.5로 착색제를 용해하였다. 흡광도는 570 nm에서 측정하였다.

[0209] 상대적 성장 저해율(%)은 DMSO로 처리한 세포하고만 비교하여 계산하였다(100%). 독성 활성을 갖는 화합물을 대하여 GI₅₀를 측정하였다. GI₅₀는 GraphPad PRISM 소프트웨어(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하여 계산하였다. GI₅₀(성장 저해)는 세포 성장의 50% 저해를 야기하는 화합물 농도이다.

[0210] 유방암 세포주(MDA-MB-468), 대장암 세포주(HCT116), 및 난소암 세포주(OVCAR-3)에 대한 예시된 화합물들의 GI₅₀ 값 범위가 하기 표 2에 제시되어 있다. 예시된 화합물들은, 유방암, 대장암, 및 난소암의 세포들에 대한 다양한 성장 저해/세포 사멸 활성을 입증하였다. IC₅₀ 범위는 "A," "B," 및 "C"로 표시되고, 0.1 μ M 이하의 값, 0.1 μ M 초과 0.5 μ M 이하의 값, 0.5 μ M 초과 1.0 μ M 이하의 값을 각각 나타낸다.

[0211] **실시예 D: 예시된 화합물의 대장 및 난소 암 종양-개시 세포 데이터**

[0212] 재료 및 방법: 비-조직 또는 조직 배양 처리된 75 플라스크 및 96-웰 플레이트는 VWR에서 구입하였다. 비타민 B-27 보충제, 최소 필수 배지 비필수 아미노산(minimum essential medium non-essential amino acids, MEM NEAA), 피루브산 나트륨, L-글루타민, N₂ 보충제, 페니실린-스트렙토마이신 및 편지존/암포테리시 B는 Invitrogen에서 구입하였다. 지질 혼합물, 헤파린 및 EGF는 Sigma에서 구입하고, bFGF는 BD Biosciences에서 구입하였다. 대장으로부터의 종양 개시 세포(Tumor Initiating Cells, TICs)는 0.2XB-27 보충제, 4ug/ml 헤파린, 1XMEM NEAA, 1X피루브산 나트륨, 1 mM 글루타민, 10 pg/ul bFGF, 20 pg/ul EGF, 1X N₂ 보충제, 지질 혼합물, 페니실린-스트렙토마이신 및 편지존/암포테리시 B를 함유한 DMEM:F12 배지 내에서의 비-조직 배양 처리된 T-75 플라스크를 이용하여 일반적으로 유지하였다. 난소 TIC는 1XB-27 보충제, 4ug/ml 헤파린, 20 pg/ul bFGF, 20 pg/ul EGF, 및 페니실린-스트렙토마이신을 함유한 DMEM:F12 배지 내에서의 조직 배양 처리된 T-75 플라스크를 이용하여 일반적으로 유지하였다.

[0213] 어세이 프로토콜: 본원에 기재된 화합물을 DMSO에 용해하고, 세포 배양액에 희석하여 GI₅₀를 측정하였다. 대장 TIC를 트립신화하고, 비-조직 배양 처리된 96-플레이트에 4,000 세포/웰로 접종하였다. 24시간 후에, 화합물을 상이한 농도로 세포 배양액에 첨가하고, DMSO의 최종 농도를 0.1%로 조정하였다. 이어서, 세포를 37°C에서 9일 동안 배양하였다. 난소 TIC를 트립신화하고, 조직 배양 처리된 96-플레이트에 1,000 세포/웰로 접종하였다. 24시간 후에, 화합물을 상이한 농도로 세포 배양액에 첨가하고, DMSO의 최종 농도를 0.1%로 조정하였다. 이어서, 세포를 37°C에서 6일동안 배양하였다. 세포 생존률은 Alamar Blue 어세이로 평가하였다: 10 ul의 Alamar Blue를 각 웰에 첨가하였다. 37°C에서 4시간 동안 배양한 후, 여기 544 방출 590에서 형광을 기록하였다. GI₅₀(성장 저해)는 GraphPad Prism 4.0 소프트웨어를 이용하여 계산하였다. 본원에 기재된 화합물의 세포 성장 저해 데이터가 하기 표에 나타나있다.

[0214] TIC(대장 12 및 난소 2393A)에 대한 예시된 화합물의 GI₅₀ 값 범위가 하기 표 2에 나타나있다. IC₅₀ 범위는 "A," "B," 및 "C"로 표시되고, 0.1 μ M 이하의 값, 0.1 μ M 초과 0.5 μ M 이하의 값, 0.5 μ M 초과 1.0 μ M 이하의 값을 각각 나타낸다.

[0215] 표 2: 예시된 화합물의 생체의 활성

표 2

[0216]

실시예 번호	TTK IC ₅₀ 범위	암세포 주 GI ₅₀ 범위			종양개시세포 GI ₅₀ 범위	
		MDA-MB-468	HCT116	OVCAR-3	난소 2393A	대장 12
A1	A	A	A	A	A	A
A2	A	A	A	A	ND	ND
A3	A	A	A	A	ND	ND
A4	A	A	A	A	A	ND
A5	A	A	A	B	ND	ND
A6	A	A	A	A	A	A
A8	A	B	B	C	ND	ND
A11	A	A	A	A	ND	ND
A12	A	A	A	A	ND	ND
A13	A	B	A	B	ND	ND