(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0005505
(43) 공개일자 2025년01월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 405/12 (2006.01) *A61K 31/5377* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 405/12 (2013.01)
A61K 31/5377 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7041285(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년04월11일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2022-7029511
원출원일자(국제) 2013년04월11일
심사청구일자 2022년09월23일
(85) 번역문제출일자 2024년12월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/036193
(87) 국제공개번호 WO 2013/155317
국제공개일자 2013년10월17일
(30) 우선권주장
61/624,215 2012년04월13일 미국(US)

(71) 출원인
에피자임, 인코포레이티드
미국 02139 메사추세츠주 캠브리지 4th 플로어 테크놀러지 스퀘어 400
에자이 알앤드디 매니지먼트 가부시키가이샤
일본국 도쿄도 분쿄쿠 코이시가와 4쵸메 6반 10고
(72) 발명자
쿤츠 케빈 웨인
미국 01801 메사추세츠주 워번 뉴 빌리지 로드 8
황 관춘
미국 01810 메사추세츠주 앤도버 코포레이트 드라이브 4 에자이 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희, 김태홍

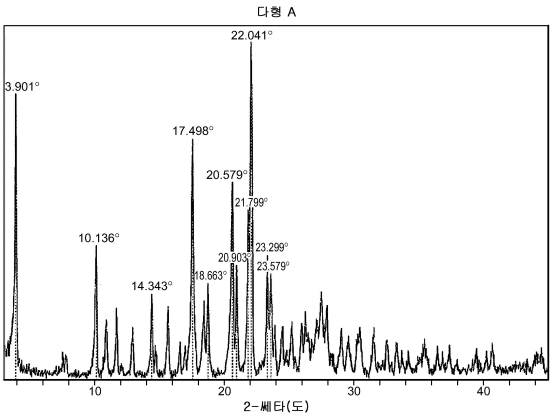
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 **인간 히스톤 메틸트랜스퍼라제 ＥＺＨ２ 억제제의 염 형태**

(57) 요 약

N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드 히드로브로마이드가 본원에 제공된다. 또한, 이 화합물의 특정 다형체도 본원에 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07B 2200/13 (2013.01)
(72) 발명자
최 형욱
미국 메사추세츠주 앤도버 코포레이트 드라이브 4 에자이 내
샌더스 크리스틴
미국 01810 메사추세츠주 앤도버 코포레이트 드라이브 4 에자이 내
마티유 스티븐
미국 01810 메사추세츠주 앤도버 코포레이트 드라이브 4 에자이 내
찬다 아라니
미국 01810 메사추세츠주 앤도버 코포레이트 드라이브 4 에자이 내
팡 프랭크
미국 01810 메사추세츠주 앤도버 코포레이트 드라이브 4 에자이 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드 히드로브로마이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 모노히드로브로마이드인 화합물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 화합물은 결정성인 것인 화합물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 불순물이 실질적으로 없는 것인 화합물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 화합물은 비정형 N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드 히드로브로마이드가 실질적으로 없는 결정성 고체인 것인 화합물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화합물, 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 7

N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드를 히드로브롬산과 조합하는 단계를 포함하는, 제1항의 화합물의 제조 방법.

청구항 8

N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드 히드로브로마이드의 다형(polymorph) A.

청구항 9

제8항에 있어서, 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 약 17.5 +/- 0.3도 및 약 22.0 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 1개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타내는 것인 다형.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 약 17.5 +/- 0.3도 및 약 22.0 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타내는 것인 다형.

청구항 11

제8항에 있어서, 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 약 14.3 +/- 0.3도, 약 18.7 +/- 0.3도, 약 23.3 +/- 0.3도 및 약 23.6 +/- 0.3 도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 1개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타내는 것인 다형.

청구항 12

제8항에 있어서, 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 10.1 +/- 0.3도, 14.3 +/- 0.3도, 17.5 +/- 0.3도, 18.7 +/- 0.3도, 20.6 +/- 0.3도, 20.9 +/- 0.3도, 21.8 +/- 0.3도, 22.0 +/- 0.3도, 23.3 +/- 0.3도 및 23.6 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 5개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타내는 것인 다형.

청구항 13

제8항에 있어서, 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 10.1 +/- 0.3도, 14.3 +/- 0.3도, 17.5 +/- 0.3도, 18.7 +/- 0.3도, 20.6 +/- 0.3도, 20.9 +/- 0.3도, 21.8 +/- 0.3도, 22.0 +/- 0.3도, 23.3 +/- 0.3도 및 23.6 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 6개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타내는 것인 다형.

청구항 14

제8항에 있어서, 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 10.1 +/- 0.3도, 14.3 +/- 0.3도, 17.5 +/- 0.3도, 18.7 +/- 0.3도, 20.6 +/- 0.3도, 20.9 +/- 0.3도, 21.8 +/- 0.3도, 22.0 +/- 0.3도, 23.3 +/- 0.3도 및 23.6 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 7개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타내는 것인 다형.

청구항 15

제8항에 있어서, 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 10.1 +/- 0.3도, 14.3 +/- 0.3도, 17.5 +/- 0.3도, 18.7 +/- 0.3도, 20.6 +/- 0.3도, 20.9 +/- 0.3도, 21.8 +/- 0.3도, 22.0 +/- 0.3도, 23.3 +/- 0.3도 및 23.6 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 8개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타내는 것인 다형.

청구항 16

제8항에 있어서, 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 10.1 +/- 0.3도, 14.3 +/- 0.3도, 17.5 +/- 0.3도, 18.7 +/- 0.3도, 20.6 +/- 0.3도, 20.9 +/- 0.3도, 21.8 +/- 0.3도, 22.0 +/- 0.3도, 23.3 +/- 0.3도 및 23.6 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 9개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타내는 것인 다형.

청구항 17

제8항에 있어서, 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 10.1 +/- 0.3도, 14.3 +/- 0.3도, 17.5 +/- 0.3도, 18.7 +/- 0.3도, 20.6 +/- 0.3도, 20.9 +/- 0.3도, 21.8 +/- 0.3도, 22.0 +/- 0.3도, 23.3 +/- 0.3도 및 23.6 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 10개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타내는 것인 다형.

청구항 18

제8항에 있어서, 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 10.1 +/- 0.3도, 14.3 +/- 0.3도, 17.5 +/- 0.3도, 18.7 +/- 0.3도, 20.6 +/- 0.3도, 20.9 +/- 0.3도, 21.8 +/- 0.3도, 22.0 +/- 0.3도, 23.3 +/- 0.3도 및 23.6 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타내는 것인 다형.

청구항 19

제8항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 다형은 실질적으로 도 1에 따른 X-선 분말 회절 패턴을 나타내는 것인 다형.

청구항 20

제8항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 다형은 실질적으로 표 1에 따른 X-선 분말 회절 패턴을 나타내는 것인 다형.

청구항 21

제8항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 다형은 255 +/- 5℃의 온도에서 ℃의 단위로 표시되는 특징적 피크를 가지는 시차 주사 열량법 열분석도를 나타내는 것인 다형.

청구항 22

제8항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 다형은 실질적으로 도 3에 따른 시차 주사 열량법 열분석도를 나타내는 것인 다형.

청구항 23

N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드를 히드로브롬산과 조합하는 단계를 포함하는, 제8항 내지 제22항 중 어느 한 항의 다형을 제조하는 방법.

청구항 24

(a) 다형 A를 제1 용매에 용해시키는 단계 및 (b) 제2 용매를 첨가하여, 상기 다형을 재결정화시키는 단계를 포함하는, 제8항 내지 제22항 중 어느 한 항의 다형을 재결정화하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 제1 용매는 에탄올이고, 제2 용매는 MTBE인 것인 방법.

청구항 26

제16항에 있어서, (a) 다형 A를 에탄올에 용해시키는 단계, (b) 혼합물을 가열하는 단계, (c) MTBE를 혼합물에 첨가하여, 상기 다형을 포함하는 침전을 형성하고, 침전을 여과하여 상기 다형을 재결정화시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 27

제8항 내지 제22항 중 어느 한 항의 다형, 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 28

암 치료가 필요한 대상(subject)에게, 치료 유효량의, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화합물, 제8항 내지 제22항 중 어느 한 항의 다형, 또는 제6항 또는 제27항의 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 암은 비호지킨 림프종 또는 유방암인 것인 방법.

청구항 30

EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성의 억제가 필요한 대상에게, 유효량의, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제8항 내지 제22항 중 어느 한 항의 다형을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상에서의 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제하는 방법.

청구항 31

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화합물 또는 제8항 내지 제22항 중 어느 한 항의 다형을 투여하는 단계를 포함하는, 시험관내 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제하는 방법.

청구항 32

암 치료가 필요한 대상에서 암을 치료하기 위한 의약을 제조하기 위한, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화합

물 또는 제8항 내지 제22항 중 어느 한 항의 다형의 용도.

청구항 33

5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실산(5)을 3-(아미노메틸)-4,6-디메틸-디히드로-피리딘-2(1H)-온의 염과 반응시키는 단계를 포함하는, N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드의 제조 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, (5)는 결정성 형태인 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원

[0002] 본원은 2012년 4월 13일에 출원된 미국 가특허출원 제61/624,215호에 대한 우선권 및 그것의 이익을 주장하며, 그 전문은 본원에 참조 인용된다.

배 경 기 술

[0003] 2012년에는 160만명 초과의 사람들이 암 진단을 받은 것으로 산정된다. 예를 들면, 여성에게 가장 통상적인 형태의 암은 유방암이고, 이 질환은 여성에게 영향을 미치는 모든 암들의 최고 사망률 중 하나의 원인이 된다. 현 유방암 치료는 전체 또는 부분적인 유방절제술, 방사능요법 또는 화학요법에 국한된다. 2012년의 암 사례들 중 거의 230,000건이 유방암일 것이고, 이는 산정 40,000건의 사망을 초래할 것이다. 문헌 [Siegel et al., Ca Cancer J Clin 2012; 62:10-9]을 참조한다.

[0004] 다수의 암 사망이 백혈병, 골수종 및 림프종을 비롯한 혈액암에 의해 야기된다. 2012년에는 암 사례들 중 거의 80,000건이 림프종일 것이며, 이는 산정 20,000건의 사망을 초래할 것이다.

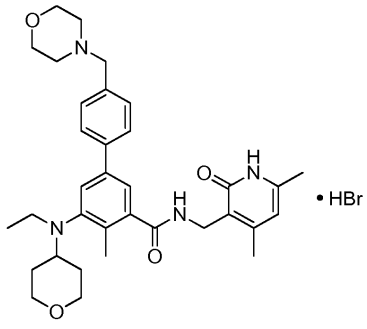
[0005] 방사능요법, 화학요법 및 수술이 암 치료의 주요 암 치료법이다. 그러나, 이 요법들은 암이 초기 단계에 검출될 때에만 가장 성공적이다. 일단 암이 침윤/전이 단계에 도달하면, 침윤 세포 또는 전이 세포의 세포주가 검출에서 빠질 수 있어 재발을 유발하게 되고, 이에 의해 매우 독한 요법의 사용이 요구된다. 이 점에 있어, 암 세포 및 환자의 영향을 받지 않은 세포 모두가 독한 요법에 노출되고, 이로써 다른 합병들 중에서도 면역계의 약화가 유발된다.

[0006] 이에 따라, 환자에서의 암, 예컨대 유방암 또는 림프종의 신규 치료법이 당업계에 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0007] 발명의 개요

[0008] 따라서, N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드 히드로브로마이드가 본원에 제공된다:

[0009] 

.

[0010] 또한, N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메

틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드 히드로브로마이드("다형(polymorph) A" 또는 "N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드 히드로브로마이드의 다형 A")의 특정 다형체도 본원에 제공된다. 본원에 기재되는 바와 같은, 본원에 제공되는 히드로브로마이드 염뿐만 아니라 다형 A는 신규 약물학적 성질을 얻기 위해 활용할 수 있고 약물 물질과 약물 제품 개발에 이용될 수 있는 물성을 나타낸다.

[0011] 한 실시양태에서, 상기 히드로브로마이드는 결정성이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 히드로브로마이드는 불순물이 실질적으로 없다. 또 다른 실시양태에서, 상기 히드로브로마이드는 비정형 N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드 히드로브로마이드가 실질적으로 없는 결정성 고체이다.

[0012] 한 측면에서, 상기 기재된 히드로브로마이드 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다.

[0013] 한 측면에서, 상기 기재된 히드로브로마이드는 N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드를 히드로브롬산과 조합하는 단계를 포함하는 방법을 이용하여 제조된다.

[0014] N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드의 다형 A는 그것의 X-선 분말 회절 패턴에 따라 정의될 수 있다. 따라서, 한 실시양태에서, 상기 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 약 17.5 +/- 0.3도 및 약 22.0 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 1개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 상기 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 약 17.5 +/- 0.3도 및 약 22.0 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 1개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 상기 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 10.1 +/- 0.3도, 14.3 +/- 0.3도, 17.5 +/- 0.3도, 18.7 +/- 0.3도, 20.6 +/- 0.3도, 20.9 +/- 0.3도, 21.8 +/- 0.3도, 22.0 +/- 0.3도, 23.3 +/- 0.3도 및 23.6 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 1개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 상기 다형은 실질적으로 도 1에 따른 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 상기 다형은 실질적으로 표 1에 따른 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다.

[0015] 다형 A는 또한 시차 주사 열량법 열분석도에 따라서도 정의될 수 있다. 한 실시양태에서, 상기 다형은 255 +/- 5℃의 온도에서 ℃의 단위로 표시되는 특징적 피크를 가지는 시차 주사 열량법 열분석도를 나타낸다. 한 실시양태에서, 상기 다형은 실질적으로 도 3에 따른 시차 주사 열량법 열분석도를 나타낸다.

[0016] 한 측면에서, 다형 A는 N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드를 히드로브롬산과 반응시키는 단계를 포함하는 방법을 이용하여 제조된다.

[0017] 다른 측면에서, (a) 다형 A를 제1 용매에 용해시키는 단계 및 (b) 제2 용매를 첨가하여, 상기 다형을 재결정화시키는 단계를 포함하는, 다형 A를 재결정화하는 방법이 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 상기 제1 용매는 에탄올이고, 제2 용매는 MTBE이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 다형 A를 에탄올에 용해시키는 단계, (b) 혼합물을 가열하는 단계, (c) MTBE를 혼합물에 첨가하여 상기 다형을 포함하는 침전물을 형성하고, 침전물을 여과하여 상기 다형을 재결정화하는 단계를 포함한다.

[0018] 또 다른 측면에서, 다형 A 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다.

[0019] 또한, 관련 치료가 필요한 대상에게, 치료 유효량의 상기 기재된 히드로브로마이드 화합물, 다형 A 또는 이들 화합물 중 하나를 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 암 치료 방법도 본원에 제공된다. 비호지킨 림프종 또는 유방암을 비롯한 각종 암들이 치료될 수 있다.

[0020] 다른 측면에서, 관련 억제가 필요한 대상에게, 유효량의 상기 기재된 히드로브로마이드 화합물, 다형 A 또는 이들 화합물 중 하나를 포함하는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상에서의 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제하는 방법이 본원에 제공된다.

[0021] 또 다른 측면에서, 상기 기재된 히드로브로마이드 화합물 또는 다형 A를 투여하는 단계를 포함하는, 시험관내 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제하는 방법이 본원에 제공된다.

[0022] 또한, 관련 치료가 필요한 대상에서 암을 치료하기 위한 의약을 제조하기 위한 상기 기재된 히드로브로마이드 화합물, 다형 A 또는 이들 화합물 중 하나를 포함하는 약학적 조성물의 용도가 본원에 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0023] **도 1**는 다형 A (모노히드로브로마이드)의 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다.

도 2는 화합물 I의 디히드로브로마이드의 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다.

도 3은 다형 A의 시차 주사 열량법 열분석도를 나타낸다.

도 4는 상기 화합물의 낮은 흡습성을 나타내는, 다형 A의 동적 증기 흡착을 나타낸다.

도 5는 상승된 온도에서 3일에 걸친 다형 A의 HPLC 분석을 나타낸다. 다형 A는 이 시간에 걸쳐 최소의 불순물을 생성시켰다.

도 6은 상기 화합물의 유의적 흡습성을 나타내는, 화합물 I의 나트륨 염의 동적 증기 흡착을 나타낸다.

도 7은 상기 화합물이 중간 정도로 높은 흡습성을 가짐을 입증하는, 화합물 I의 헤미술페이트 염의 동적 증기 흡착을 나타낸다.

도 8은 상기 화합물이 결정성이 좋지 않음을 가리키는, 화합물 I의 모노히드로클로라이드 염의 시차 주사 열량법 데이터를 나타낸다.

도 9는 합성 중간체 5의 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다.

도 10은 다형 B의 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다.

도 11은 화합물 I의 모노히드로브로마이드의 X-선 결정 구조를 나타낸다.

도 12 내지 **14**는 인간 림프종 세포주에서의 화합물 I의 히드로브로마이드의 생체내 연구 결과를 나타낸다.

도 15 내지 **16**은 림프종 마우스 이종이식 모델에 대한 화합물 I의 히드로브로마이드의 항암 효과를 나타낸다.

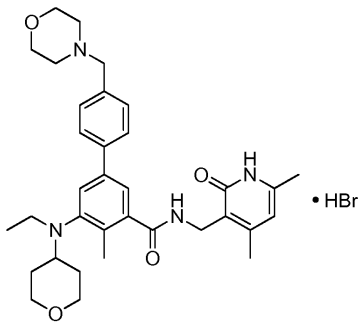
도 17은 합성 중간체 2의 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다.

도 18A 및 **18B**는 상기 화합물의 유의적 흡습성을 나타내는, (A) 화합물 I의 트리히드로클로라이드 염의 X-선 분말 회절 패턴 및 (B) 화합물 I의 모노히드로클로라이드 염의 동적 증기 흡착을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] HBr 염 형태 및 다형체 A

[0025] N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드 히드로브로마이드가 본원에 제공된다:

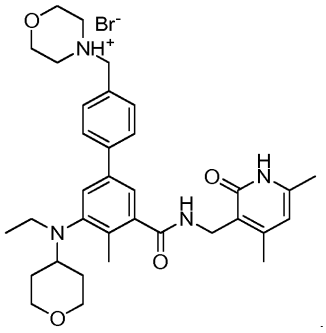


[0026] .

[0027] 본원에 사용되는 "화합물 I"은 N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드를 지칭한다. 화합물 I의 히드로브로마이드는 대상내 또는 시험관내 EZH2의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제하기 위해 사용될 수 있다. 화합물 I의 히드로브로마이드는 또한 관련 치료가 필요한 대상에서 암을 치료하기 위해서도 사용될 수 있다.

[0028] 화합물 I은 이의 기본 위치, 예컨대 모르폴린, 2치환 아닐린 및/또는 피리돈 부분구조 중 1개 이상에서 양성자

화될수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 화합물 I의 모노히드로브로마이드, 디히드로브로마이드 또는 트리히드로브로마이드가 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 화합물 I의 모노히드로브로마이드가 본원에 제공된다. 화합물이 모노히드로브로마이드일 때, 그 화합물은 임의의 기본 위치에서 양성자화될 수 있다. 한 비제한적 실시양태에서, 화합물 I은 모르폴리노 치환기의 질소에서 양성자화되어, 하기 구조를 가지는 화합물 I의 모노히드로브로마이드를 제공한다:

[0029] 

[0030] 이 특정 모노히드로브로마이드는 "4-((3'-(((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)카르바모일)-5'-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4'-메틸-[1,1'-비페닐]-4-일)메틸)모르폴린-4-이움 브롬화물"으로 지칭될 수 있다. 도 11은 이 특정 염 형태의 X-선 결정 구조를 나타낸다.

[0031] 화합물 I의 히드로브로마이드는 이의 유리 염기 형태뿐만 아니라 유리 염기의 다른 염보다 많은 유리한 물성을 가진다. 특히, 화합물 I의 히드로브로마이드는 화합물 I의 다른 염 형태에 비해 낮은 흡습성을 가진다. 요법에 유효한 화합물의 경우, 화합물이 최소한 흡습성일 것이 일반적으로 요구된다. 고흡습성인 약물 형태는, 그것이 습도가 가변적인 환경설정에서 저장할 때 약물 형태의 용해 속도가 변화할 수 있어, 불안정할 수 있다. 또한, 흡습성은 화합물의 대규모 취급 및 제조에 영향을 미칠 수 있어, 흡습성 활성제를 포함하는 약학적 조성물을 제조할 때, 그 활성제의 참 중량을 구하기 어려울 수 있다. 화합물 I의 히드로브로마이드는 화합물 I의 다른 염 형태에 비해 낮은 흡습성을 가진다. 이에 따라, 그것이 상당한 기간에 걸쳐 보관될 수 있고, 예를 들면 용해도, 밀도 또는 심지어 화학 조성의 유해한 변화를 겪지 않을 수 있다.

[0032] 상기 이점에 부가하여, 화합물 I의 히드로브로마이드는 고결정성 형태로 생성될 수 있어, 이는 약학적 제형의 제조에 유용하고, 약물 화합물의 일반적 취급, 조작 및 저장을 향상시키게 된다. 한 바람직한 실시양태에서, 화합물 I의 히드로브로마이드의 상기 결정성 형태가 "다형 A"로 칭해지는 형태의 것이다.

[0033] 물질이 1종 초과의 결정 형태로 존재할 수 있는 능력이 다형으로 정의되며; 상이한 결정 형태들의 특정 물질은 "다형"으로 칭해진다. 일반적으로, 다형은 물질의 한 분자가 그것의 입체형태를 변화시킬 수 있는 능력, 또는 상이한 다형의 결정 격자의 상이한 원자 배치로 반영되는, 분자간 또는 분자내 상호작용, 특히 수소 결합을 형성할 수 있는 능력에 의해 영향을 받는다. 이와 대조적으로, 물질의 전반적 외부 형태가 "형상(morphology)"으로 알려져 있고, 이는 내부 구조를 참조하지 않으면서 존재하는 결정 및 평판의 외부 형상을 지칭한다. 결정은 상이한 조건, 예를 들면 성장 속도, 교반 및 불순물의 존재에 기초하여 상이한 형상을 나타낼 수 있다.

[0034] 한 물질의 상이한 다형은 결정 격자의 상이한 에너지들을 보유할 수 있어, 고체 상태에서 그것은 형태, 밀도, 융점, 색, 안정성, 용해도, 용해 속도 등과 같은 물성을 상이하게 나타낼 수 있고, 이는 다시 소정의 다형의 안정성, 용해 속도 및/또는 생체유용성, 및 그 다형의 의약 및 약학적 조성물로서의 용도에의 적합성에 영향을 줄 수 있다.

[0035] 다형 A는 고결정성이고, 저흡습성을 나타낸다. 또한, 이 다형은 재현가능하게 수득될 수 있고, 약간의 결정화 조건 변화는 상이한 결정 형태를 유발하지 않는다.

[0036] 화합물 I의 히드로브로마이드의 상이한 다형에의 접근은 많은 이유에서 바람직하다. 그러한 이유 중 하나는, 결정화 시에 상이한 불순물 또는 화학 잔류물이 개별 다형에 도입될 수 있다는 것이다. 예를 들면, 불순물은 화합물 I을 다형 A로 전환하는 과정 중에 제거될 수 있다.

[0037] 이론에 의해 국한되고자 함은 아니나, 조밀한 결정 형상을 나타내는 다형체는 여과 용이성 및 유동 용이성의 관점에서 이점을 가진다. 다형 A는 조밀한 결정 형상을 나타내며, 이에 따라 이 이점들을 가지게 된다.

[0038] 특정 실시양태에서, 다형 A는 X-선 분말 회절 분석에서의 특징적 피크에 기초하여 확인가능하다. XRPD로도 칭해지는 X-선 분말 회절은 구조 특징분석을 위한 분말, 마이크로결정성 또는 다른 고체 물질에 대한 X-선, 중성자

또는 전자 회절을 이용한 과학 기법이다. 한 실시양태에서, 다형 A는 약 3.9 +/- 0.3도, 약 17.5 +/- 0.3도 및 약 22.0 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 1개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 상기 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 약 17.5 +/- 0.3도 및 약 22.0 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 1개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다.

[0039] 한 실시양태에서, 다형 A는 약 3.9 +/- 0.3도, 10.1 +/- 0.3도, 14.3 +/- 0.3도, 17.5 +/- 0.3도, 18.7 +/- 0.3도, 20.6 +/- 0.3도, 20.9 +/- 0.3도, 21.8 +/- 0.3도, 22.0 +/- 0.3도, 23.3 +/- 0.3도 및 23.6 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 5개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 다형 A는 약 3.9 +/- 0.3도, 10.1 +/- 0.3도, 14.3 +/- 0.3도, 17.5 +/- 0.3도, 18.7 +/- 0.3도, 20.6 +/- 0.3도, 20.9 +/- 0.3도, 21.8 +/- 0.3도, 22.0 +/- 0.3도, 23.3 +/- 0.3도 및 23.6 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 6개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 다형 A는 3.9 +/- 0.3도, 10.1 +/- 0.3도, 14.3 +/- 0.3도, 17.5 +/- 0.3도, 18.7 +/- 0.3도, 20.6 +/- 0.3도, 20.9 +/- 0.3도, 21.8 +/- 0.3도, 22.0 +/- 0.3도, 23.3 +/- 0.3도 및 23.6 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 7개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 상기 다형 A는 약 3.9 +/- 0.3도, 10.1 +/- 0.3도, 14.3 +/- 0.3도, 17.5 +/- 0.3도, 18.7 +/- 0.3도, 20.6 +/- 0.3도, 20.9 +/- 0.3도, 21.8 +/- 0.3도, 22.0 +/- 0.3도, 23.3 +/- 0.3도 및 23.6 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 8개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 다형 A는 약 3.9 +/- 0.3도, 10.1 +/- 0.3도, 14.3 +/- 0.3도, 17.5 +/- 0.3도, 18.7 +/- 0.3도, 20.6 +/- 0.3도, 20.9 +/- 0.3도, 21.8 +/- 0.3도, 22.0 +/- 0.3도, 23.3 +/- 0.3도 및 23.6 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 9개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 상기 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 10.1 +/- 0.3도, 14.3 +/- 0.3도, 17.5 +/- 0.3도, 18.7 +/- 0.3도, 20.6 +/- 0.3도, 20.9 +/- 0.3도, 21.8 +/- 0.3도, 22.0 +/- 0.3도, 23.3 +/- 0.3도 및 23.6 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 10개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다.

[0040] 또 다른 실시양태에서, 상기 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 약 14.3 +/- 0.3도, 약 18.7 +/- 0.3도, 약 23.3 +/- 0.3도 및 약 23.6 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 1개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다.

[0041] 또 다른 실시양태에서, 상기 다형은 약 3.9 +/- 0.3도, 약 10.1 +/- 0.3도, 약 14.3 +/- 0.3도, 약 17.5 +/- 0.3도, 약 18.7 +/- 0.3도, 약 20.6 +/- 0.3도, 약 20.9 +/- 0.3도, 약 21.8 +/- 0.3도, 약 22.0 +/- 0.3도, 약 23.3 +/- 0.3도 및 약 23.6 +/- 0.3도 2-쎄타에서 도 2-쎄타로 표시되는 1개 이상의 특징적 피크를 가지는 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 상기 다형은 실질적으로 도 1에 따른 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 상기 다형은 실질적으로 표 1에 열거된 2-쎄타 값에 따른 X-선 분말 회절 패턴을 나타낸다.

[0042] 본원에 사용되는 용어 "약"은, 도 2-쎄타 값과 관련하여 사용될 때, 상기 언급된 값 +/- 0.3도 2-쎄타를 지칭한다.

[0043] 다형 A를 포함하는 약학적 조성물은 조성물의 X-선 분말 회절 패턴을 다형 A의 X-선 분말 회절 패턴과 비교함으로써 확인될 수 있다. 다형 A를 포함하는 약학적 조성물은 순수 다형 A의 X-선 분말 회절 패턴과 비교 시, 동일하지 않은 X-선 분말 회절 패턴을 나타낼 수 있음이 인지될 것이다.

[0044] 특정 실시양태에서, 다형 A는 시차 주사 열량법 열분석도에서 관찰되는 특징적 피크에 기초하여 확인가능하다. 시차 주사 열량법 또는 DSC는 샘플 및 기준물의 온도를 증가시키는 데 필요한 열량의 차이를 온도의 함수로 측정하는 열분석 기법이다. 한 실시양태에서, 다형 A는 약 255 +/- 5℃의 온도에서 ℃의 단위로 표시되는 특징적 피크를 가지는 시차 주사 열량법 열분석도를 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 다형 A는 250 내지 255℃의 온도 범위에서 관찰되는 단일 흡열 피크를 가지는 시차 주사 열량법 열분석도를 나타낸다. 또 다른 실시양태에서, 다형 A는 실질적으로 도 3에 따른 시차 주사 열량법 열분석도를 나타낸다.

[0045] 특정 실시양태에서, 다형 A는 불순물을 함유할 수 있다. 불순물의 비제한적 예에는 바람직하지 않은 다형체 또는 잔류 유기 및 무기 분자, 예컨대 용매, 물 또는 염이 포함된다. 한 실시양태에서, 다형 A는 불순물이 실질적으로 없다. 또 다른 실시양태에서, 다형 A는 10 중량% 미만의 총 불순물을 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 다형 A는 5 중량% 미만의 총 불순물을 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 다형 A는 1 중량% 미만의 총 불순물을 함유한다. 또 다른 실시양태에서, 다형 A는 0.1 중량% 미만의 총 불순물을 함유한다.

[0046] 특정 실시양태에서, 다형 A는 비정형 화합물 I 히드로브로마이드가 실질적으로 없는 결정성 고체이다. 본원에 사용되는 용어 "비정형 화합물 I 히드로브로마이드가 실질적으로 없는"이란, 화합물이 유의적 양의 비정형 화합물 I 히드로브로마이드를 함유하지 않음을 의미한다. 특정 실시양태에서, 약 95 중량% 이상의 결정성 다형 A가 존재한다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 약 99 중량% 이상의 결정성 다형 A가 존재한다.

[0047] 또 다른 실시양태에서, 다형 A는 실질적으로 다형 B가 없다.

[0048] 본 발명의 염 및 이의 결정 형태 다형 A는 다른 물질과 함께 발견되거나, 단리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 염 및 이의 결정 형태는 실질적으로 단리된다. "실질적으로 단리된"이란, 염 또는 이의 결정 형태는 그것이 형성되거나 검출되는 환경으로부터 적어도 부분적으로 또는 실질적으로 분리됨을 의미한다. 부분적 분리는 예를 들면 본 발명의 염이 풍부한 조성물을 포함할 수 있다. 실질적 분리는 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상 또는 약 99 중량% 이상의 화합물 I의 히드로브로마이드 및 다형 A를 함유하는 조성물을 포함할 수 있다. 화합물 및 이의 염을 단리하는 방법은 당업계에 통상적이다.

[0049] 화합물 I의 히드로브로마이드 및 다형 A의 양자 모두는 임의의 합당한 호변이성질체 또는 합당한 호변이성질체들의 혼합물로서 일어날 수 있다. 본원에 사용되는 "호변이성질체"는 평형으로 존재하고 하나의 이성질체 형태에서 또 다른 이성질체 형태로 쉽게 전환되는 2개 이상의 구조적 이성질체들 중 하나를 지칭한다. 예에는 케토-에톨 호변이성질체, 예컨대 아세톤/프로판-2-올 등이 포함된다. 화합물 I의 히드로브로마이드 및 다형 A는 1개 이상의 호변이성질체를 가질 수 있고, 이에 따라 이는 각종 이성질체, 즉 피리딘-2(1H)-온 및 상응하는 피리딘-2-올을 함유할 수 있다. 그러한 모든 이성질 형태의 상기 화합물들이 본 발명에 명백히 포함된다.

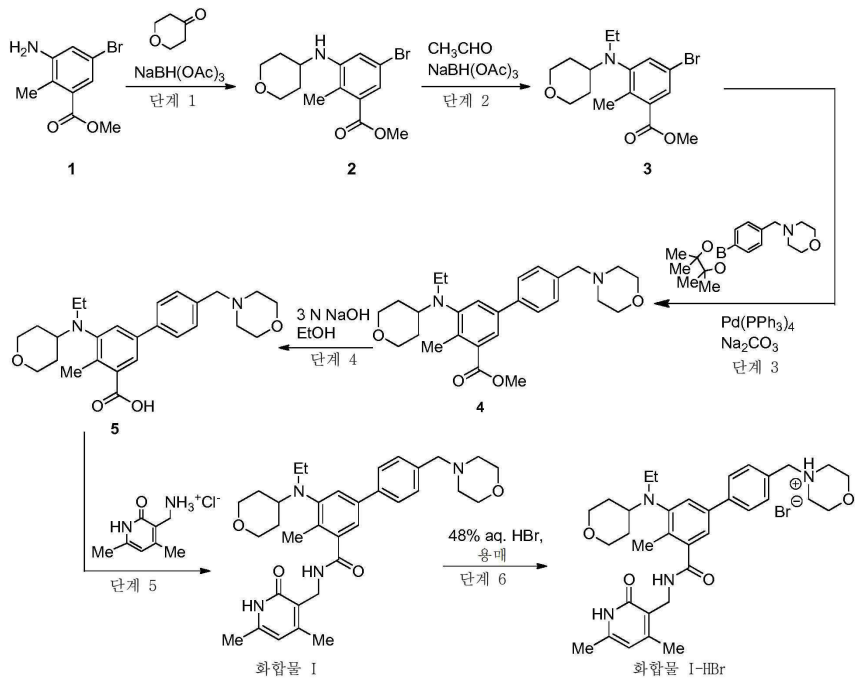
[0050] HBr 염 형태 및 다형 A의 제조

[0051] 화합물 I의 히드로브로마이드뿐만 아니라 다형 A는 공지된 기법을 이용하여 제조될 수 있다. 통상적으로, 염 형태는 용액 내에서 유리 염기 화합물 및 요망되는 염 형태의 음이온을 함유하는 산을 조합한 후, 반응 용액으로부터 (예를 들면, 결정화, 석출, 증발 등에 의해) 고체 염 생성물을 단리함으로써 제조된다. 다른 염 형성 기법이 이용될 수 있다.

[0052] 이하 반응식 1은 화합물 I의 유리 염기뿐만 아니라 화합물 I의 히드로브로마이드의 생성을 위한 특정 실시양태를 나타낸다. 간략히, 단계 1에서, 환원적 아민화 조건 하에서 메틸 3-아미노-5-브로모-2-메틸벤조에이트(1)를 디히드로-2H-피란-4(3H)-온과 반응시켜, 메틸 5-브로모-2-메틸-3-((테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)벤조에이트(2)을 형성시킨다. 단계 2에서, 환원적 아민화를 다시 이용하여, 5-브로모-3-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-2-메틸벤조에이트(3)를 형성한다. 이어서, 이 화합물을 단계 3에서 스즈키(Suzuki) 커플링 조건 하에서 반응시켜, 메틸 5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실레이트(4)를 형성시키고, 이를 단계 4에서 상응하는 산(5)으로 가수분해한다. 단계 5에서, 산(5)을 아미드 커플링 조건 하에서 3-(아미노메틸)-4,6-디메틸-디히드로-피리딘-2(1H)-온 히드로클로라이드와 반응시켜, 화합물 I을 형성한다.

[0053] 나와 있는 바와 같이, 화합물 I을 이어서 수성 HBr와 반응시켜, 화합물 I의 히드로브로마이드를 형성할 수 있다.

[0054] [반응식 1]



[0055]

[0056] 상기 합성은 다수의 이점을 가진다. 예를 들면, 그것은 단리될 수 있는 결정성 형태로 제조될 수 있는 다수의 중간체를 이용한다. 결정성 중간체를 이용함으로써, 최소 정제 기법(예를 들면, 크로마토그래피)이 필요하고, 이는 최종 화합물 I의 전반적 향상된 수율을 가져온다.

[0057] 따라서, 중간체 화합물 1의 결정성 형태가 본원에 제공된다. 또 다른 실시양태에서, 중간체 화합물 2의 결정성 형태가 본원에 제공된다. 도 17은 결정성 화합물 2의 X-선 분말 회절 패턴을 보여준다. 또 다른 실시양태에서, 상기 중간체 화합물 5는 결정성이다. 도 9는 결정성 화합물 5의 X-선 분말 회절 패턴을 보여준다. 다른 실시양태에서, 화합물 2 및/또는 5는 크로마토그래피를 사용하지 않고 실질적으로 순수한 형태로 생성된다. 중간체의 결정화는 반드시 노력없이 또는 효율적으로 진행되는 것은 아님이 인지될 것이다.

[0058] 또한, 5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실산(5)을 3-(아미노메틸)-4,6-디메틸-디히드로-피리딘-2(1H)-온의 염과 반응시키는 단계를 포함하는, N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드의 제조 방법도 본원에 제공된다. 이 방법의 한 실시양태에서, (5)는 결정성 형태이다.

[0059] 화합물 I을 적절한 용매의 존재 하에서 수성 HBr과 반응시켜, 히드로브로마이드의 다형 A, 즉 특정 결정 형태를 형성시킬 수 있다. 한 실시양태에서, 화합물 I을 에탄올 및 아세트산에틸의 존재 하에 수성 HBr와 반응시켜, 다형 A를 형성시킨다.

[0060] 일단 다형이 제조되면, 그것을 다형 또는 상이한 용매(또는 용매들)을 제조하는 데 사용되는 동일 용매(또는 용매들)를 이용하여 재결정화할 수 있고, 이로써 증가된 결정화도를 가지는 조성물이 생성된다. 일반적으로, 다형 A는 1개 이상의 용매들 내에 다형을 용해시키고, 임의적으로 가열한 후, 임의적 냉각 단계 및 이에 이은 예를 들어 여과 단계를 통해 결정 구조의 단리를 통해 결정화될 수 있다. 다형을 먼저 제1 용매(또는 용매들의 조합) 내에 용해시킨 후, 한 부가적인 상이한 용매를 공정 중에 (가열 전 또는 후, 냉각 전 또는 후, 등) 첨가하여, 요망되는 결정 구조를 형성할 수 있다. 예를 들면, 제1 용매를 사용하여 다형 화합물을 형성시킬 수 있고, 이어서 제2 용매(예를 들면, 항-용매)를 첨가하여 다형이 용액으로부터 석출될 수 있다. 한 실시양태에서, 물을 제1 용매에 첨가하여 다형을 용해시킨다.

[0061] 다형 A의 재결정화를 위해 사용될 수 있는 용매의 비제한적 예는 다음과 같다: 메탄올, 에탄올, 아세트산에틸, 메틸 tert-부틸 에테르, 물, 이소프로필 알코올, 테트라히드로푸란, 아세톤, 아세토니트릴 및 2-메틸테트라히드로푸란뿐만 아니라 이의 조합. 다형 A의 재결정화에 유용한 용매 조합의 비제한적 예는 (용매 및 항-용매(여기서, 물을 제1 용매에 첨가하여, 다형의 용해를 도울 수 있음)): 메탄올/물 및 아세트산에틸, 이소프로필 알코올

/물 및 아세트산에틸, 테트라히드로푸란/물 및 아세트산에틸, 아세톤 및 아세트산에틸, 아세토니트릴/물 및 아세트산에틸, 에탄올/물 및 메틸 tert-부틸 에테르, 이소프로필 알코올/물 및 메틸 tert-부틸 에테르, 에탄올/물 및 테트라히드로푸란, 이소프로필 알코올/물 및 아세톤 및 에탄올/물 및 아세트산에틸. 특정 실시양태에서, 상기 용매 조합은 메탄올/물 및 아세트산에틸, 이소프로필 알코올/물 및 아세트산에틸, 에탄올/물 및 2-메틸테트라히드로푸란 및 메탄올/2-메틸테트라히드로푸란이다.

[0062] 한 측면에서, 다형 A는 N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드를 히드로브롬산과 반응시키는 단계를 포함하는 방법을 이용하여 제조된다.

[0063] 한 측면에서, (a) 다형 A를 제1 용매에 용해시키는 단계 및 (b) 제2 용매를 첨가하여, 상기 다형을 재결정화시키는 단계를 포함하는, 다형 A를 재결정화하는 방법이 본원에 제공된다. 한 실시양태에서, 상기 제1 용매는 에탄올이고, 제2 용매는 MTBE이다. 또 다른 실시양태에서, 상기 방법은 (a) 다형 A를 에탄올에 용해시키는 단계, (b) 혼합물을 가열하는 단계, (c) MTBE를 혼합물에 첨가하여, 상기 다형을 포함하는 침전물을 형성하고, 침전물을 여과하여 상기 다형을 재결정화시키는 단계를 포함한다.

[0064] 약학적 조성물

[0065] 한 측면에서, 화합물 I의 히드로브로마이드 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다. 또한, 다형 A 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를 포함하는 약학적 조성물도 본원에 제공된다.

[0066] 용어 "약학적 조성물"은 포유동물, 예를 들면 인간에게 투여하기에 적당한 제제를 포함한다. 본 발명의 화합물이 포유동물, 예를 들면 인간에 의약으로서 투여될 때, 이는 그 자체로 또는 약학적으로 허용되는 담체와 조합하여 예를 들면 0.1% 내지 99.9%(보다 바람직하게는 0.5 내지 90%)의 유효 성분을 함유하는 약학적 조성물로서 투입될 수 있다.

[0067] 본원에 기재된 화합물(즉, 화합물 I의 히드로브로마이드 및 다형 A)은 통상적 약학적 배합 기법에 따라 조합될 수 있다. 본원에 사용되는 "약학적으로 허용되는 담체"는 요망되는 특정 투약 형태에 적합화한, 임의의 모든 용매, 희석제 또는 다른 액체 비히클, 분산액 또는 현탁 보조제, 계면활성제, 등장화제, 증점 또는 유효화제, 보존제, 고체 결합제, 윤활제 등을 포함할 수 있다. 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980)]은 약학적 조성물의 제형에 사용되는 각종 담체 및 이의 제조를 위한 공지된 기법을 개시한다. 임의의 통상적 담체 매질이, 임의 바람직하지 않은 생물학적 효과 또는 이와 달리 약학적 조성물의 임의의 다른 성분(들)과 유해한 방식으로 상호작용을 발생시키는 것 등에 의해, 화합물과 상용적이지 않는 한의 경우를 제외하고는, 그것의 용도도 본 발명의 범주 내에 포함되는 것으로 고려된다. 약학적으로 허용되는 담체로서 작용할 수 있는 물질의 몇몇 예에는 당, 예컨대 락토스, 글루코스 및 수크로스; 전분, 예컨대 옥수수 전분 및 감자 전분; 셀룰로스 및 이의 유도체, 예컨대 나트륨 카르복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 셀룰로스 아세테이트; 분말화 트라가칸트; 맥아; 젤라틴; 탈크; 부형제, 예컨대 코코아 버터 및 좌약 왁스; 오일, 예컨대 땅콩유, 면실유; 홍화유, 참깨씨유; 올리브유; 옥수수유 및 대두유; 글리콜;, 예컨대 프로필렌 글리콜; 에스테르, 예컨대 올레산에틸 및 라우르산에틸; 아가; 완충제, 예컨대 수산화마그네슘 및 수산화알루미늄; 알긴산; 발열원 무함유 물; 등장염수; 링거액; 에틸 알코올 및 포스페이트 완충 용액뿐만 아니라 다른 비독성 상용성 윤활제, 예컨대 라우릴황산나트륨 및 스테아르산마그네슘뿐만 아니라 착색제, 해리제, 코팅제, 감미료, 향료 및 방향제가 포함되나 이들에 국한되지 않고, 보존제 및 항산화제도 또한 제형자의 판단에 따라 조성물 내에 존재할 수 있다.

[0068] 또한, 담체는 투여에 요망되는 제제 형태에 따라 매우 다양한 형태들, 예를 들면 경구, 비강, 직강, 질내, 비경구(정맥내 주사 또는 주입 포함) 형태를 포함할 수 있다. 경구 투약 형태용 조성물 제조 시에, 통상적 약학적 매질 중 임의의 것이 이용될 수 있다. 통상적 약학적 매질에는, 예를 들면 (예컨대 현탁액, 용액, 유화액 및 엘릭시르와 같은) 경구용 액체 제제의 경우에는 물, 글리콜, 오일, 알코올, 향료, 보존제, 착색제 등; 에어로졸; 또는 (예컨대 분말, 캡슐 및 정제와 같은) 경구용 고체 제제의 경우에는 담체, 예컨대 전분, 당, 마이크로결정성 셀룰로스, 희석제, 조립제, 윤활제, 결합제, 붕괴제 등이 포함된다.

[0069] 습윤제, 유화제 및 윤활제, 예컨대 라우릴황산나트륨 및 스테아르산마그네슘뿐만 아니라 착색제, 해리제, 코팅제, 감미료, 향료 및 방향제, 보존제 및 항산화제가 또한 조성물 내에 존재할 수 있다.

[0070] 약학적으로 허용되는 항산화제의 예에는 수용성 항산화제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 히드로클로라이드,

나트륨 비술페이트, 나트륨 메타비술파이트, 나트륨 술피트 등; 가용성 항산화제, 예컨대 팔미트산아스코르빌, 부틸화 히드록시아니졸(BHA), 부틸화 히드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, 토코페롤 등; 및 금속 킬레이트화제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 타르타르산, 인산 등이 포함된다.

[0071] 상기 화합물을 포함하는 약학적 조성물은 요망되는 임의의 농도를 가지도록 제형될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 조성물은 적어도 치료 유효량을 포함하도록 제형된다. 몇몇 실시양태에서, 상기 조성물은 한 가지 이상의 원치 않는 부작용을 야기하지 않는 양을 포함하도록 제형된다.

[0072] 화합물 I의 히드로브로마이드의 결정성 형태가 그것의 제조 중에 더욱 용이하게 제형되기 때문에, 고체 투약 형태는 본 발명의 약학적 조성물에 바람직한 형태이다. 경구 투약을 위한 고체 투약 형태, 예컨대 캡슐, 정제, 환약, 분말 및 과립이 특히 바람직하다. 요망되는 경우, 당업계에 공지된 기법에 의해 정제를 코팅할 수 있다.

[0073] 약학적 조성물은 경구, 설하, 비강, 직강, 질내, 국소, 협측 및 비경구(피하, 근육내 및 정맥내 포함)에 적당한 것을 포함하나, 가장 적당한 경로는 피치로 병태의 성질 및 중증도(중증도)에 따라 다르다. 조성물은 단위 투약 형태로 편리하게 제시되고, 제약 기술 분야에 공지된 방법들 중 임의의 것에 의해 제조될 수 있다. 특정 실시양태에서, 상기 약학적 조성물은 환약, 캡슐, 로젠지 또는 정제의 형태로 경구 투약을 위해 제형된다. 다른 실시양태에서, 상기 약학적 조성물은 현탁액 형태의 것이다.

[0074] 본원에 제공되는 화합물은 특히 EZH2 관련 장애, 특히 암 치료에 효능적인 약학적 조성물 내 활성제로서 적당하다. 각종 실시양태들에서의 약학적 조성물은 약학적 유효량의 화합물 I의 히드로브로마이드 또는 다형 A를 다른 약학적으로 허용되는 부형제, 담체, 필러, 희석제 등과 함께 가진다.

[0075] 치료적 또는 약학적 "유효량"이란, 투여 시에 질환 또는 병태의 증상을 경감시키는, 예를 들면 암의 각종 형태 및 형체 증상을 예방하는, 화합물(화합물 I의 히드로브로마이드 또는 다형 A)의 양이다. 한 예에서, 화합물 I의 히드로브로마이드 또는 다형 A의 유효량은 대상에서의 암 치료에 충분한 양이다. 그 양은 대상의 크기 및 체중, 병 유형, 또는 본 발명의 특정 화합물과 같은 인자들에 따라 다를 수 있다. "유효량"을 구성하는 화합물 I의 히드로브로마이드 또는 다형 A의 양은 화합물, 질환 상태 및 이의 중증도, 치료될 환자의 연령 등에 따라 다를 것이다. 유효량은 그 지식 및 본 개시내용과 관련한 기술분야의 통상의 기술을 가진 자에 의해 또한 통상 결정될 수 있다.

[0076] 투여 과정(regime)은 약학적 유효량을 구성하는 것에 영향을 줄 수 있다. 화합물 I의 히드로브로마이드 또는 다형 A, 및 이들 화합물 중 어느 것을 포함하는 조성물은 질환 시작 전 또는 후에 대상에게 투여될 수 있다. 또한, 몇가지 분할된 투약뿐만 아니라 시차를 둔 투약은 매일 또는 차례로 투여될 수 있거나, 투약이 연속으로 투입되거나 한 회분으로(bolus) 주사될 수 있다. 또한, 투약은 치료 또는 예방 상황의 긴급 사태에 의해 비례적으로 증가되거나 감소될 수 있다.

[0077] 치료 방법

[0078] 본 발명의 화합물(즉, 화합물 I의 히드로브로마이드뿐만 아니라 다형 A)은 EZH2 또는 이의 돌연변이체의 히스톤 메틸트랜스퍼라제 활성을 억제하므로, 본 발명의 한 측면에서, 본원에 개시된 일부 화합물은 일부 병태 및 질환을 치료 또는 예방하기 위한 후보 물질이다. 본 발명은 히스톤 또는 다른 단백질의 메틸화 상태의 조절에 의해 영향을 받을 수 있는 경과를 갖는 병태 및 질환을 치료하는 방법도 제공하는데, 여기서 상기 메틸화 상태는 적어도 부분적으로 EZH2의 활성에 의해 매개된다. 히스톤의 메틸화 상태의 조절은 이에 다시 메틸화에 의해 활성화되는 표적 유전자 및/또는 메틸화에 의해 억제되는 표적 유전자의 발현 수준에 영향을 미칠 수 있다. 상기 방법은 치료 유효량의 본 발명의 화합물을 상기 치료가 필요한 대상에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0079] EZH2 매개 단백질 메틸화가 일정한 역할을 수행하는 장애는 암 또는 전암성 병태일 수 있다. 본 발명은 또한 EZH2 매개 단백질 메틸화의 조절에 의해 영향을 받을 수 있는 경과를 갖는 암 또는 전암의 치료에 있어서 또는 이러한 암 또는 전암의 치료에 유용한 약제의 제조를 위한 본 발명의 화합물(즉, 화합물 I의 히드로브로마이드뿐만 아니라 다형 A)의 용도도 제공한다. 치료될 수 있는 예시적 암은 비호지킨 림프종, 여포성 림프종(FL) 및 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL)을 포함하는 림프종; 흑색종; 및 CML을 포함하는 백혈병을 포함한다. 예시적 전암성 병태는 골수형성이상 증후군(MDS; 과거 전백혈병으로서 알려짐)을 포함한다.

[0080] 또 다른 실시양태에서, 관련 치료가 필요한 대상에게, 유효량의 화합물 I의 히드로브로마이드를 투여하는 단계를 포함하는, 림프종의 치료 방법이 본원에 제공된다.

[0081] 또 다른 실시양태에서, 관련 치료가 필요한 대상에게, 유효량의 다형 A를 투여하는 단계를 포함하는, 림프종의 치료 방법이 본원에 제공된다.

[0082] 본 발명은 또한 치료 유효량의 본 발명의 화합물(즉, 화합물 I의 히드로브로마이드뿐만 아니라 다형 A)을 관련 치료가 필요한 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, EZH2 매개 단백질 메틸화가 상기 대상에서 일정한 역할을 수행하는 장애로부터 보호하는 방법을 제공한다. 상기 장애는 암, 예를 들면 EZH2 매개 단백질 메틸화가 일정 역할을 수행하는 암일 수 있다. 본 발명은 또한 적어도 부분적으로 EZH2 매개 단백질 메틸화와 관련된 세포 증식 장애의 예방에 유용한 의약의 제조를 위한, 본 발명의 화합물(즉, 화합물 I의 히드로브로마이드뿐만 아니라 다형 A)의 용도도 제공한다.

[0083] 본 발명의 화합물은 단백질(예를 들면, 히스톤) 메틸화의 조절, 예를 들면 히스톤 메틸트랜스퍼라제 또는 히스톤 데메틸라제 효소 활성의 조절을 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물들 중 적어도 일부는 단백질 메틸화의 조절을 위해 생체내에서 또는 시험관내에서 사용될 수 있다. 히스톤 메틸화는 암에서의 일부 유전자들의 비정상적인 발현 및 비신경세포에서의 신경 유전자들의 침묵에 관여하는 것으로 보고되어 왔다. 본원에 기재된 적어도 일부 화합물들은 이들 질환들을 치료하는 데에, 즉 메틸화를 감소시키거나 메틸화를 상응하는 정상 세포내의 대략적인 그의 수준까지 복귀시키는 데에 적당한 후보물질이다.

[0084] 메틸화 조절제인 화합물은 세포 증식의 조절을 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 몇몇 경우 과도한 증식은 메틸화를 감소시키는 물질에 의해 감소될 수 있는 반면, 불충분한 증식은 메틸화를 증가시키는 물질에 의해 자극될 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물에 의해 치료될 수 있는 질환은 과다증식 질환, 예컨대 양성 세포 성장 및 악성 세포 성장을 포함할 수 있다.

[0085] 본원에서 사용되는 "관련 치료가 필요한 대상"은 EZH2 매개 단백질 메틸화가 일정한 역할을 수행하는 장애를 가지는 대상 또는 일반 대중에 비해 상대적으로 이러한 장애를 발달시킬 증가된 위험을 가지는 대상이다. 관련 치료를 필요로 하는 대상은 전암성 병태를 가질 수 있다. 바람직하게는, 관련 치료를 필요로 하는 대상은 암을 가진다. "대상"은 포유동물을 포함한다. 포유동물은 예를 들면, 인간 또는 적절한 비인간 포유동물, 예컨대 영장류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 소, 말, 염소, 낙타, 양 또는 돼지일 수 있다. 상기 대상은 조류 또는 가금류일 수도 있다. 한 실시양태에서, 상기 포유동물은 인간이다.

[0086] 본원에서 사용되는 용어 "세포 증식 장애"는 세포의 비조절 또는 비정상적 성장 또는 양자 모두가 암성이거나 암성이 아닐 수 있는 원치 않는 병태 또는 질환의 발달을 초래할 수 있는 병태를 의미한다. 본 발명의 화합물로 치료될 수 있는 예시적 세포 증식 장애는 세포 분열이 탈조절되어 있는 다양한 병태들을 포괄한다. 예시적 세포 증식 장애는 신생물, 양성 종양, 악성 종양, 전암성 병태, 상피내 종양, 캡슐화된 종양, 전이성 종양, 액상 종양, 고형 종양, 면역학적 종양, 혈액 종양, 암, 암종, 백혈병, 림프종, 육종 및 신속히 분열하는 세포를 포함하나 이들로 국한되지 않는다. 본원에서 사용되는 용어 "신속히 분열하는 세포"는 동일한 조직 내의 인접하는 세포들 또는 나란히 놓여있는 세포들 사이에서 예측된 또는 관찰된 속도를 초과하거나 이 속도보다 더 높은 속도로 분열하는 임의의 세포로서 정의된다. 세포 증식 장애는 전암 또는 전암성 병태를 포함한다. 세포 증식 장애는 암을 포함한다. 한 측면에서, 본원에서 제공되는 방법은 암 증상의 치료 또는 완화를 위해 또는 이러한 목적에 적당한 후보물질의 확인을 위해 사용될 수 있다. 용어 "암"은 고형 종양뿐만 아니라 혈액 종양 및/또는 악성 종양도 포함한다. "전암 세포" 또는 "전암성 세포"는 전암 또는 전암성 병태인 세포 증식 장애를 나타내는 세포이다. "암 세포" 또는 "암성 세포"는 암인 세포 증식 장애를 나타내는 세포이다. 임의의 재현가능한 측정 수단을 이용하여 암 세포 또는 전암성 세포를 확인할 수 있다. 암 세포 또는 전암성 세포는 조직 샘플(예를 들면, 생검 샘플)의 조직학적 분류 또는 등급화에 의해 확인될 수 있다. 암 세포 또는 전암성 세포는 적절한 분자 마커의 사용을 통해 확인될 수 있다.

[0087] 본 발명의 하나 이상의 화합물을 사용하여 치료될 수 있는 예시적 비암성 병태 또는 장애는 자가면역 질환; 림프증식 병태; 말단비대증; 류마티스성 척추염; 골관절염; 통풍, 다른 관절염성 병태; 패혈증; 패혈증성 쇼크; 내독성 쇼크; 그람 음성 패혈증; 독성 쇼크 증후군; 천식; 성인 호흡 곤란 증후군; 만성 폐쇄성 폐 질환; 만성 폐 염증; 염증성 장 질환; 크론병; 건선; 습진; 궤양성 결장염; 췌장 섬유증; 간 섬유증; 급성 및 만성 신장 질환; 과민성 장 증후군; 발열; 재협착증; 뇌 말라리아; 뇌졸중 및 허혈성 손상; 신경 외상; 알쯔하이머병; 헌팅톤병; 파킨슨병; 급성 및 만성 통증; 알레르기성 비염; 알레르기성 결막염; 만성 심부전; 급성 관상동맥 증후군; 악액질; 말라리아; 한센병; 리슈만편모충증; 라임병; 레이터 증후군; 급성 활막염; 근육 퇴행; 윤활낭염; 건염; 건막염; 헤르니아, 파열 또는 탈출 추간판 증후군; 골화석증; 혈전증; 재협착증; 규폐증; 폐 췌육증; 골 흡수 질환, 예컨대 골다공증; 이식편-대-숙주 반응; 다발성 경화증; 루푸스; 섬유 근육통; AIDS 및 다른 바

이러스 질환, 예컨대 대상포진, 헤르페스 심플렉스 I 또는 II, 인플루엔자 바이러스 및 사이토메갈로바이러스; 및 당뇨병을 포함하나 이들로 국한되지 않는다.

[0088] 본 발명의 1개 이상의 화합물을 사용하여 치료될 수 있는 예시적 암은 부신피질암종, AIDS 관련 암, AIDS 관련 림프종, 항문암, 항문직장암, 항문관암, 충수암, 소아 소뇌 성상세포종, 소아 뇌 성상세포종, 기저세포암종, 피부암(비흑색종), 담낭암, 간외담관암, 간내담관암, 방광암, 요로방광암, 골 및 관절 암, 골육종 및 악성 섬유조직구종, 뇌암, 뇌종양, 뇌간 신경아교종, 소뇌 성상세포종, 뇌 성상세포종/악성 신경아교종, 뇌실막종, 수모세포종, 천막상원시신경외배엽 종양, 시각 경로 및 시상하부 신경아교종, 유방암, 기관지 선암종/카르시노이드, 카르시노이드 종양, 위장암, 신경계암, 신경계 림프종, 중추신경계암, 중추신경계 림프종, 자궁경부암, 소아암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 만성 골수증식 장애, 결장암, 결장직장암, 경피 T 세포 림프종, 림프 신생물, 균상식육종, 세지아리(Seziary) 증후군, 자궁내막암, 식도암, 두개외 생식세포 종양, 성선외 생식세포 종양, 간외담관암, 안암, 안구내 흑색종, 망막모세포종, 담낭암, 위(복부)암, 위장 카르시노이드 종양, 위장 간질 종양(GIST), 생식세포 종양, 난소 생식세포 종양, 임신 영양막 종양 신경아교종, 두경부암, 간세포(간)암, 호지킨 림프종, 하인두암, 안구내 흑색종, 안구암, 췌도 세포 종양(내분비 췌장), 카포시 육종, 신장암, 신암, 신장암, 후두암, 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 모발세포 백혈병, 입술구강암, 간암, 폐암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, AIDS 관련 림프종, 비호지킨 림프종, 원발성 중추신경계 림프종, 발덴스트람(Waldenstram) 거대글로불린혈증, 수모세포종, 흑색종, 안구내(눈) 흑색종, 메르켈(merkel) 세포 암종, 악성 중피종, 중피종, 전이성 편평경부암, 입암, 설암, 다발성 내분비 신생물 증후군, 균상식육종, 골수형성이상 증후군, 골수형성이상/골수증식 질환, 만성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, 만성 골수증식 장애, 비인두암, 신경모세포종, 구암, 구강암, 구인두암, 난소암, 난소상피암, 난소 저악성 잠재(low malignant potential) 종양, 췌장암, 췌도 세포 췌장암, 부비동 및 비강암, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 크롬친화세포종, 송과체모세포종 및 천막상원시신경외배엽 종양, 뇌하수체 종양, 혈장 세포 신생물/다발성 골수종, 흉막폐 모세포종, 전립선암, 직장암, 신우 및 요관암, 전이세포암, 망막모세포종, 횡문근육종, 타액선암, 유잉(ewing) 패밀리의 육종 종양, 카포시 육종, 연조직 육종, 자궁암, 자궁육종, 피부암(비흑색종), 피부암(흑색종), 메르켈 세포 피부암종, 소장암, 연조직 육종, 편평세포암종, 복부(위)암, 천막상원시신경 외배엽 종양, 정소암, 인후암, 흉선종, 흉선종 및 흉선암종, 갑상선암, 신우, 요관 및 다른 뇨기관의 전이세포암, 임신 영양막 종양, 요도암, 자궁내막 자궁암, 자궁육종, 자궁체부암, 질암, 음문암 및 윌름 종양을 포함하나 이들로 국한되지 않는다.

[0089] "혈액계의 세포 증식 장애"는 혈액계의 세포를 수반하는 세포 증식 장애이다. 혈액계의 세포 증식 장애는 림프종, 백혈병, 골수성 신생물, 비만 세포 신생물, 척수형성이상증, 양성 단일클론 감마글로불린병증, 림프종모양 육아종증, 림프종모양 구진증, 진성적혈구증가증, 만성 골수세포성 백혈병, 원인불명 골수화생 및 본태성 혈소판혈증을 포함할 수 있다. 혈액계의 세포 증식 장애는 혈액계의 세포의 과다형성증, 형성이상증 및 화생을 포함할 수 있다. 한 측면에서, 본 발명의 조성물은 본 발명의 혈액암 또는 본 발명의 혈액 세포 증식 장애로 이루어진 군으로부터 선택된 암을 치료하는 데에 사용될 수 있거나 이러한 목적에 적당한 후보물질을 확인하는 데에 사용될 수 있다. 본 발명의 혈액암은 다발성 골수종, 림프종(호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 소아 림프종 및 림프구 및 경피 유래의 림프종을 포함함), 백혈병(소아 백혈병, 모발세포 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수세포성 백혈병, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수세포성 백혈병, 만성 골수성 백혈병 및 비만 세포 백혈병을 포함함), 골수성 신생물 및 비만 세포 신생물을 포함할 수 있다.

[0090] "폐의 세포 증식 장애"는 폐 세포를 수반하는 세포 증식 장애이다. 폐의 세포 증식 장애는 폐 세포에 영향을 미치는 모든 형태의 세포 증식 장애를 포함할 수 있다. 폐의 세포 증식 장애는 폐암, 폐의 전암 또는 전암성 병태, 폐의 양성 증식물 또는 병변, 폐의 악성 증식물 또는 병변 및 폐 이외의 신체 조직 및 장기의 전이성 병변을 포함할 수 있다. 한 측면에서, 본 발명의 조성물은 폐암 또는 폐의 세포 증식 장애를 치료하는 데에 사용될 수 있거나 이러한 목적에 적당한 후보물질을 확인하는 데에 사용될 수 있다. 폐암은 모든 형태의 폐암을 포함할 수 있다. 폐암은 악성 폐 신생물, 상피내암종, 전형적인 카르시노이드 종양 및 비전형적인 카르시노이드 종양을 포함할 수 있다. 폐암은 소세포 폐암("SCLC"), 비소세포 폐암("NSCLC"), 편평세포암종, 선암종, 소세포암종, 대세포암종, 선편평세포암종 및 중피종을 포함할 수 있다. 폐암은 "반흔암종", 기관지폐포암종, 거대세포암종, 방추세포암종 및 대세포 신경내분비암종을 포함할 수 있다. 폐암은 조직학적 및 초미세구조적 불균질성(예를 들면, 혼합된 세포 유형)을 가지는 폐 신생물을 포함할 수 있다.

[0091] 폐의 세포 증식 장애는 폐 세포에 영향을 미치는 모든 형태의 세포 증식 장애를 포함할 수 있다. 폐의 세포 증식 장애는 폐암 및 폐의 전암성 병태를 포함할 수 있다. 폐의 세포 증식 장애는 폐의 과다형성증, 화생 및 형성

이상증을 포함할 수 있다. 폐의 세포 증식 장애는 석면에 의해 유도된 과다형성증, 편평 화생 및 양성 반응성 중피 화생을 포함할 수 있다. 폐의 세포 증식 장애는 중층 편평 상피에 의한 원주 상피의 치환 및 점막 형성이상증을 포함할 수 있다. 흡입된 손상성 환경 물질, 예컨대 담배 연기 및 석면에 노출된 개체는 폐의 세포 증식 장애를 발달시킬 증가된 위험에 있을 수 있다. 개체가 폐의 세포 증식 장애의 발달에 취약하게 만들 수 있는 기존 폐 질환은 만성 간질 폐 질환, 괴사 폐 질환, 공피증, 류마티스성 질환, 사르코이드증, 간질 폐렴, 결핵, 반복된 폐렴, 특발성 폐 섬유증, 육아종, 석면증, 섬유화 폐포염 및 호지킨병을 포함할 수 있다.

[0092] "결장의 세포 증식 장애"는 결장의 세포를 수반하는 세포 증식 장애이다. 바람직하게는, 결장의 세포 증식 장애는 결장암이다. 한 측면에서, 본 발명의 조성물은 결장암 또는 결장의 세포 증식 장애를 치료하는 데에 사용될 수 있거나 이러한 목적에 적당한 후보물질을 확인하는 데에 사용될 수 있다. 결장암은 모든 형태의 결장암을 포함할 수 있다. 결장암은 산발성 결장암 및 유전성 결장암을 포함할 수 있다. 결장암은 악성 결장 신생물, 상피내암종, 전형적인 카르시노이드 종양 및 비전형적인 카르시노이드 종양을 포함할 수 있다. 결장암은 선암종, 편평세포암종 및 선편평세포암종을 포함할 수 있다. 결장암은 유전성 비용종증 결장직장암, 가족성 선종성 용종증, 가드너(Gardner) 증후군, 포이츠-제거스(Peutz-Jeghers) 증후군, 터코트(Turcot) 증후군 및 소아 용종증으로 이루어진 군으로부터 선택된 유전성 증후군과 관련될 수 있다. 결장암은 유전성 비용종증 결장직장암, 가족성 선종성 용종증, 가드너 증후군, 포이츠-제거스 증후군, 터코트 증후군 및 소아 용종증으로 이루어진 군으로부터 선택된 유전성 증후군에 의해 야기될 수 있다.

[0093] 결장의 세포 증식 장애는 결장 세포에 영향을 미치는 모든 형태의 세포 증식 장애를 포함할 수 있다. 결장의 세포 증식 장애는 결장암, 결장의 전암성 병태, 결장의 선종성 용종 및 결장의 속발성 병변을 포함할 수 있다. 결장의 세포 증식 장애는 선종을 포함할 수 있다. 결장의 세포 증식 장애는 결장의 과다형성증, 화생 및 형성이상증을 특징으로 할 수 있다. 개체가 결장의 세포 증식 장애의 발생에 취약하게 만들 수 있는 기존 결장 질환은 기존 결장암을 포함할 수 있다. 개체가 결장의 세포 증식 장애의 발생에 취약하게 만들 수 있는 현행 질환은 크론병 및 궤양성 결장염을 포함할 수 있다. 결장의 세포 증식 장애는 p53, ras, FAP 및 DCC로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자에서의 돌연변이와 관련될 수 있다. 개체는 p53, ras, FAP 및 DCC로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자에서의 돌연변이의 존재로 인해 결장의 세포 증식 장애를 발달시킬 상승된 위험을 가질 수 있다.

[0094] "췌장의 세포 증식 장애"는 췌장의 세포를 수반하는 세포 증식 장애이다. 췌장의 세포 증식 장애는 췌장 세포에 영향을 미치는 모든 형태의 세포 증식 장애를 포함할 수 있다. 췌장의 세포 증식 장애는 췌장암, 췌장의 전암 또는 전암성 병태, 췌장의 과다형성증, 췌장의 형성이상증, 췌장의 양성 증식물 또는 병변, 췌장의 악성 증식물 또는 병변 및 췌장 이외의 신체 조직 및 장기의 전이성 병변을 포함할 수 있다. 췌장암은 모든 형태의 췌장암을 포함한다. 췌장암은 관선암종, 선편평암종, 다형성 거대세포암종, 점액소 선암종, 파골세포 유사 거대세포암종, 점액소 낭선암종, 세엽암종, 비분류된 대세포암종, 소세포암종, 췌장모세포종, 유두 신생물, 점액소 낭선종, 유두 낭성 신생물 및 장액 낭선종을 포함할 수 있다. 췌장암은 조직학적 및 초미세구조적 불균질성(예를 들면, 혼합된 세포 유형)을 가지는 췌장 신생물도 포함할 수 있다.

[0095] "전립선의 세포 증식 장애"는 전립선의 세포를 수반하는 세포 증식 장애이다. 전립선의 세포 증식 장애는 전립선 세포에 영향을 미치는 모든 형태의 세포 증식 장애를 포함할 수 있다. 전립선의 세포 증식 장애는 전립선암, 전립선의 전암 또는 전암성 병태, 전립선의 양성 증식물 또는 병변, 전립선의 악성 증식물 또는 병변 및 전립선 이외의 신체 조직 및 장기의 전이성 병변을 포함할 수 있다. 전립선의 세포 증식 장애는 전립선의 과다형성증, 화생 및 형성이상증을 포함할 수 있다.

[0096] "피부의 세포 증식 장애"는 피부의 세포를 수반하는 세포 증식 장애이다. 피부의 세포 증식 장애는 피부 세포에 영향을 미치는 모든 형태의 세포 증식 장애를 포함할 수 있다. 피부의 세포 증식 장애는 피부의 전암 또는 전암성 병태, 피부의 양성 증식물 또는 병변, 흑색종, 악성 흑색종 및 피부의 다른 악성 증식물 또는 병변 및 피부 이외의 신체 조직 및 장기의 전이성 병변을 포함할 수 있다. 피부의 세포 증식 장애는 피부의 과다형성증, 화생 및 형성이상증을 포함할 수 있다.

[0097] "난소의 세포 증식 장애"는 난소의 세포를 수반하는 세포 증식 장애이다. 난소의 세포 증식 장애는 난소 세포에 영향을 미치는 모든 형태의 세포 증식 장애를 포함할 수 있다. 난소의 세포 증식 장애는 난소의 전암 또는 전암성 병태, 난소의 양성 증식물 또는 병변, 난소의 악성 증식물 또는 병변 및 난소 이외의 신체 조직 및 장기의 전이성 병변을 포함할 수 있다. 난소의 세포 증식 장애는 난소의 과다형성증, 화생 및 형성이상증을 포함할 수 있다.

[0098] "유방의 세포 증식 장애"는 유방의 세포를 수반하는 세포 증식 장애이다. 유방의 세포 증식 장애는 유방 세포에

영향을 미치는 모든 형태의 세포 증식 장애를 포함할 수 있다. 유방의 세포 증식 장애는 유방암, 유방의 전암 또는 전암성 병태, 유방의 양성 증식물 또는 병변, 유방의 악성 증식물 또는 병변 및 유방 이외의 신체 조직 및 장기의 전이성 병변을 포함할 수 있다. 유방의 세포 증식 장애는 유방의 과다형성증, 화생 및 형성이상증을 포함할 수 있다.

[0099] 유방의 세포 증식 장애는 유방의 전암성 병태일 수 있다. 본 발명의 조성물은 유방의 전암성 병태를 치료하는 데에 사용될 수 있다. 유방의 전암성 병태는 유방의 비전형적인 과다형성증, 상피내관암종(DCIS), 관내암종, 상피내소엽암종(LCIS), 소엽 신생물 및 유방의 0 기 또는 0 등급 증식물 또는 병변(예를 들면, 0 기 또는 0 등급 유방암 또는 상피내암종)을 포함할 수 있다. 유방의 전암성 병태는 미국 암연합회(AJCC)에 의해 채택된 TNM 분류 체계에 따라 병기분류될 수 있고, 이때 원발성 종양(T)은 T0 또는 Tis 기로 배정되고, 국부 림프절(N)은 N0 기로 배정되고, 원위 전이(M)는 M0 기로 배정된다.

[0100] 유방의 세포 증식 장애는 유방암일 수 있다. 한 측면에서, 본 발명의 조성물은 유방암 치료에 사용될 수 있거나 이러한 목적에 적당한 후보물질을 확인하는 데에 사용될 수 있다. 유방암은 모든 형태의 유방암을 포함할 수 있다. 유방암은 원발성 상피 유방암을 포함할 수 있다. 유방암은 유방이 다른 종양, 예컨대 림프종, 육종 또는 흑색종에 의해 영향을 받는 암을 포함할 수 있다. 유방암은 유방의 암종, 유방의 관암종, 유방의 소 엽암종, 유방의 미분화된 암종, 유방의 낭육종 엽상, 유방의 혈관육종 및 유방의 원발성 림프종을 포함할 수 있다. 유방암은 I, II, IIIA, IIIB, IIIC 및 IV 기 유방암을 포함할 수 있다. 유방의 관암종은 침윤성 암종, 관내성분이 우세한 침윤성 상피내암종, 염증성 유방암 및 면포형, 점액소(콜로이드)형, 수질형, 림프구성 침윤물을 가지는 수질형, 유두형, 경화형 및 관형으로 이루어진 군으로부터 선택된 조직학적 유형을 가지는 유방의 관암종을 포함할 수 있다. 유방의 소엽암종은 상피내성분이 우세한 침윤성 소엽암종, 침윤성 소엽암종 및 침윤성 소엽암종을 포함할 수 있다. 유방암은 파게트(Paget)병, 관내암종을 가지는 파게트병 및 침윤성 관암종을 가지는 파게트병을 포함할 수 있다. 유방암은 조직학적 및 초미세구조적 불균질성(예를 들면, 혼합된 세포 유형)을 가지는 유방신생물을 포함할 수 있다.

[0101] 본 발명의 화합물은 유방암 치료에 사용될 수 있거나 이러한 목적에 적당한 후보물질을 확인하는 데에 사용될 수 있다. 치료될 유방암은 가족성 유방암을 포함할 수 있다. 치료될 유방암은 산발성 유방암을 포함할 수 있다. 치료될 유방암은 남성 대상에서 발생할 수 있다. 치료될 유방암은 여성 대상에서 발생할 수 있다. 치료될 유방암은 폐경 전 여성 대상 또는 폐경 후 여성 대상에서 발생할 수 있다. 치료될 유방암은 30세 이상의 대상 또는 30세 미만의 대상에서 발생할 수 있다. 치료될 유방암은 50세 이상의 대상 또는 50세 미만의 대상에서 발생할 수 있다. 치료될 유방암은 70세 이상의 대상 또는 70세 미만의 대상에서 발생할 수 있다.

[0102] 치료될 유방암은 BRCA1, BRCA2 또는 p53에서의 가족성 또는 자연발생적 돌연변이를 확인하기 위해 분류될 수 있다. 치료될 유방암은 HER2/neu 유전자 증폭을 가지는 유방암, HER2/neu를 과다발현하는 유방암 또는 낮은, 중간 또는 높은 수준의 HER2/neu 발현을 가지는 유방암으로서 분류될 수 있다. 치료될 유방암은 에스트로겐 수용체(ER), 프로게스테론 수용체(PR), 인간 표피 성장인자 수용체-2, Ki-67, CA15-3, CA 27-29 및 c-Met로 이루어진 군으로부터 선택된 마커에 대해 분류될 수 있다. 치료될 유방암은 ER-비공지된 유방암, ER-풍부 유방암 또는 ER-부족 유방암으로서 분류될 수 있다. 치료될 유방암은 ER-음성 유방암 또는 ER-양성 유방암으로서 분류될 수 있다. 유방암의 ER 분류는 임의의 재현가능한 수단에 의해 수행될 수 있다. 유방암의 ER 분류는 문헌[Onkologie 27: 175-179 (2004)]에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 치료될 유방암은 PR-비공지된 유방암, PR-풍부 유방암 또는 PR-부족 유방암으로서 분류될 수 있다. 치료될 유방암은 PR-음성 유방암 또는 PR-양성 유방암으로서 분류될 수 있다. 치료될 유방암은 수용체 양성 유방암 또는 수용체 음성 유방암으로서 분류될 수 있다. 치료될 유방암은 CA 15-3 또는 CA 27-29 또는 이 양자 모두의 상승된 혈중 수준과 관련되어 있는 유방암으로서 분류될 수 있다.

[0103] 치료될 유방암은 유방의 국소화된 종양을 포함할 수 있다. 치료될 유방암은 음성 감시림프절(SLN) 생검과 관련되어 있는 유방의 종양을 포함할 수 있다. 치료될 유방암은 양성 감시림프절(SLN) 생검과 관련되어 있는 유방의 종양을 포함할 수 있다. 치료될 유방암은 1개 이상의 양성 액와림프절과 관련되어 있는 유방의 종양을 포함할 수 있고, 이때 상기 액와림프절은 임의의 적용가능한 방법에 의해 병기분류되어 있다. 치료될 유방암은 림프절 음성 상태(예를 들면, 림프절 음성) 또는 림프절 양성 상태(예를 들면, 림프절 양성)를 가지는 종양으로서 분류되어 있는 유방의 종양을 포함할 수 있다. 치료될 유방암은 신체의 다른 위치로 전이되어 있는 유방의 종양을 포함할 수 있다. 치료될 유방암은 골, 폐, 간 및 뇌로 이루어진 군으로부터 선택된 위치로 전이되어 있는 유방암으로서 분류될 수 있다. 치료될 유방암은 전이성, 국소화, 국부화, 국소-국부화, 국소 진행, 원위 전이, 다심성, 양측성, 동측성, 반대측성, 신규 진단, 재발성 및 수술불가능성으로 이루어진 군으로부터 선택된 특성에 따

라 분류될 수 있다.

[0104] 본 발명의 화합물은 일반 대중에 비해 상대적으로 유방암을 발달시킬 증가된 위험을 가지는 대상에서 유방의 세포 증식 장애를 치료하거나 예방하는 데에 사용될 수 있거나, 유방암을 치료하거나 예방하는 데에 사용될 수 있거나, 이러한 목적에 적당한 후보물질을 확인하는 데에 사용될 수 있다. 일반 대중에 비해 상대적으로 유방암을 발달시킬 증가된 위험을 가지는 대상은 유방암의 가족력 또는 개인적 병력을 가지는 여성 대상이다. 일반 대중에 비해 상대적으로 유방암을 발달시킬 증가된 위험을 가지는 대상은 BRCA1 또는 BRCA2 또는 이 양자 모두에서 생식세포주 또는 자연발생적 돌연변이를 가지는 여성 대상이다. 일반 대중에 비해 상대적으로 유방암을 발달시킬 증가된 위험을 가지는 대상은 유방암의 가족력을 갖고 BRCA1 또는 BRCA2 또는 이 양자 모두에서 생식세포주 또는 자연발생적 돌연변이를 가지는 여성 대상이다. 일반 대중에 비해 상대적으로 유방암을 발달시킬 증가된 위험을 가지는 대상은 30세 초과, 40세 초과, 50세 초과, 60세 초과, 70세 초과, 80세 초과 또는 90세 초과의 연령을 가지는 여성이다. 일반 대중에 비해 상대적으로 유방암을 발달시킬 증가된 위험을 가지는 대상은 유방의 비전형적인 과다형성증, 상피내관암종(DCIS), 관내암종, 상피내소엽암종(LCIS), 소엽 신생물 또는 유방의 0 기 증식물 또는 병변(예를 들면, 0 기 또는 0 등급 유방암 또는 상피내암종)을 가지는 대상이다.

[0105] 치료될 유방암은 스카프-블룸-리차드슨(Scarff-Bloom-Richardson) 시스템에 따라 조직학적으로 등급이 매겨질 수 있는데, 이때 유방 종양은 1, 2 또는 3의 유사분열 수 점수; 1, 2 또는 3의 핵 다형성 점수; 1, 2 또는 3의 관 형성 점수; 및 3 내지 9의 총 스카프-블룸-리차드슨 점수를 배정받는다. 치료될 유방암은 유방암 치료에 대한 국제합의위원회에 따라 1 등급, 1-2 등급, 2 등급, 2-3 등급 및 3 등급으로 이루어진 군으로부터 선택된 종양 등급을 배정받을 수 있다.

[0106] 한 실시양태에서, 관련 치료가 필요한 대상에게, 유효량의 화합물 I의 히드로브로마이드를 투여하는 단계를 포함하는, 유방암 치료 방법이 본원에 제공된다.

[0107] 또 다른 실시양태에서, 관련 치료가 필요한 대상에게, 유효량의 다형 A를 투여하는 단계를 포함하는, 유방암 치료 방법이 본원에 제공된다.

[0108] 치료될 암은 미국 암연합회(AJCC) TNM 분류 시스템에 따라 병기분류될 수 있는데, 이때 종양(T)은 TX, T1, T1mic, T1a, T1b, T1c, T2, T3, T4, T4a, T4b, T4c 또는 T4d 기를 배정받고, 국부 림프절(N)은 NX, N0, N1, N2, N2a, N2b, N3, N3a, N3b 또는 N3c 기를 배정받고, 원위 전이(M)는 MX, M0 또는 M1 기를 배정받을 수 있다. 치료될 암은 미국 암연합회(AJCC) 분류에 따라 I 기, IIA 기, IIB 기, IIIA 기, IIIB 기, IIIC 기 또는 IV 기로서 병기분류될 수 있다. 치료될 암은 AJCC 분류에 따른 등급, 예컨대 GX 등급(예를 들면, 평가될 수 없는 등급), 1 등급, 2 등급, 3 등급 또는 4 등급을 배정받을 수 있다. 치료될 암은 pNX, pN0, PN0(I-), PN0(I+), PN0(mol-), PN0(mol+), PN1, PN1(mi), PN1a, PN1b, PN1c, pN2, pN2a, pN2b, pN3, pN3a, pN3b 또는 pN3c의 AJCC 병리학적 분류(pN)에 따라 병기분류될 수 있다.

[0109] 치료될 암은 약 2 cm 이하의 직경을 가지는 것으로 측정된 종양을 포함할 수 있다. 치료될 암은 약 2 cm 내지 약 5 cm의 직경을 가지는 것으로 측정된 종양을 포함할 수 있다. 치료될 암은 약 3 cm 이상의 직경을 가지는 것으로 측정된 종양을 포함할 수 있다. 치료될 암은 5 cm 초과의 직경을 가지는 것으로 측정된 종양을 포함할 수 있다. 치료될 암은 현미경관찰에 의해 확인된 외관에 의해 잘 분화된, 적절하게 분화된, 약하게 분화된 또는 미분화된 암으로서 분류될 수 있다. 치료될 암은 현미경관찰에 의해 확인된 외관에 의해 유사분열 수(예를 들면, 세포 분열의 양) 또는 핵 다형성(예를 들면, 세포의 변화) 면에서 분류될 수 있다. 치료될 암은 현미경관찰에 의해 확인된 외관에 의해 괴사 영역(예를 들면, 사멸하거나 퇴행하는 세포의 영역)과 관련된 암으로서 분류될 수 있다. 치료될 암은 비정상적인 핵형을 가지는 암, 비정상적인 염색체 수를 가지는 암 또는 외관에서 비정상적인 1개 이상의 염색체를 가지는 암으로서 분류될 수 있다. 치료될 암은 홀배수체, 삼배수체 또는 사배수체 암으로서 분류될 수 있거나 변경된 배수성을 가지는 암으로서 분류될 수 있다. 치료될 암은 염색체 전위, 전체 염색체의 결실 또는 중복 또는 염색체의 일부의 결실, 중복 또는 증폭 영역을 가지는 암으로서 분류될 수 있다.

[0110] 치료될 암은 DNA 세포분석, 유세포분석 또는 이미지 세포분석에 의해 평가될 수 있다. 치료될 암은 세포 분열의 합성 단계(예를 들면, 세포 분열의 S 기)에서 세포의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%를 가지는 암으로서 분류될 수 있다. 치료될 암은 낮은 S 기 분율 또는 높은 S 기 분율을 가지는 암으로서 분류될 수 있다.

[0111] 본원에서 사용되는 "정상 세포"는 "세포 증식 장애"의 부분으로서 분류될 수 없는 세포이다. 정상 세포는 원치 않는 병태 또는 질환의 발생을 야기할 수 있는 비조절된 또는 비정상적인 성장, 또는 이 양자 모두가 결여되어

있다. 바람직하게는, 정상 세포는 정상적으로 작용하는 세포 주기 확인점 조절 기작을 보유한다.

[0112] 본원에서 사용되는 "세포를 접촉시키는"은 화합물 또는 다른 물질 조성물이 세포와 직접적으로 접촉하고 있거나 세포에서 원하는 생물학적 효과를 유도할 정도로 충분히 가깝게 있는 상태를 의미한다.

[0113] 본원에서 사용되는 "후보 화합물"은 화합물이 세포, 조직, 계, 동물 또는 인간에서 연구원 또는 임상의에 의해 추구되는 요망되는 생물학적 또는 의학적 반응을 도출할 가능성이 있는지를 확인하기 위해 1개 이상의 시험관내 또는 생체내 생물학적 검정에서 시험되거나 시험될 본 발명의 화합물(즉, 화합물 I의 히드로브로마이드뿐만 아니라 다형 A)을 지칭한다. 후보 화합물은 본 발명의 화합물이다. 상기 생물학적 또는 의학적 반응은 암의 치료일 수 있다. 상기 생물학적 또는 의학적 반응은 세포 증식 장애의 치료 또는 예방일 수 있다. 생물학적 반응 또는 효과는 시험관내에서 또는 동물 모델에서 일어나는 세포 증식 또는 성장의 변화뿐만 아니라 시험관내에서 관찰될 수 있는 다른 생물학적 변화도 포함할 수 있다. 시험관내 또는 생체내 생물학적 검정은 효소 활성 검정, 전기영동에서의 이동성 변동 검정, 리포터 유전자 검정, 시험관내 세포 생존능 검정 및 본원에 기재된 검정을 포함할 수 있으나 이들로 국한되지 않는다.

[0114] 본원에서 사용되는 "단일요법"은 단일 활성 또는 치료 화합물을 관련 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 의미한다. 바람직하게는, 단일요법은 치료 유효량의 활성 화합물의 투여를 포함할 것이다. 예를 들면, 암 단일요법은 본 발명의 화합물(즉, 화합물 I의 히드로브로마이드뿐만 아니라 다형 A) 중 하나를 암의 치료가 필요한 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 단일요법은 다수의 활성 화합물들의 조합물을 바람직하게는 치료 유효량으로 존재하는 상기 조합물의 각각의 성분과 함께 투여하는 병용요법과 대조될 수 있다. 한 측면에서, 원하는 생물학적 효과를 유도함에 있어서, 본 발명의 화합물을 사용하는 단일요법은 병용요법보다 더 효과적이다.

[0115] 본원에서 사용되는 "치료하는" 또는 "치료하다"란, 질환, 병태 또는 장애에 대항하는 것을 목적으로 하는 환자의 관리 및 보호를 기술하고 본 발명의 화합물(즉, 화합물 I의 히드로브로마이드뿐만 아니라 다형 A)을 투여하여 질환, 병태 또는 장애의 증상 또는 합병증을 완화시키거나 상기 질환, 병태 또는 장애를 제거하는 것을 포함한다. 용어 "치료하다"란, 시험관내에서의 세포 치료 또는 동물 모델에서의 세포 치료도 포함할 수 있다.

[0116] 본 발명의 화합물(즉, 화합물 I의 히드로브로마이드뿐만 아니라 다형 A)은 질환, 병태 또는 장애를 예방하는 데에 사용될 수 있거나 그러한 목적에 적당한 후보물질을 확인하는 데에 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 "예방하는" 또는 "예방한다"는 이러한 질환, 병태 또는 장애의 증상 또는 합병증의 시작을 감소시키거나 제거하는 것을 기술한다.

[0117] 본원에서 사용되는 용어 "완화시킨다"는 장애의 징후 또는 증상의 중증도가 감소되는 과정을 기술하기 위한 것이다. 중요하게는, 징후 또는 증상은 제거되지 않고 완화될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여는 징후 또는 증상의 제거를 야기할 수 있으나, 제거가 요구되는 것은 아니다. 유효 용량은 징후 또는 증상의 중증도를 감소시킬 것으로 예측되어야 한다. 예를 들면, 다수의 위치들에서 발생할 수 있는 장애, 예컨대 암의 징후 또는 증상은 암의 중증도가 다수의 위치들 중 1개 이상의 위치 내에서 감소되는 경우 완화된다.

[0118] 본원에서 사용되는 용어 "중증도"는 전암성 또는 양성 상태로부터 악성 상태로 형질전환되는 암의 잠재력을 기술하기 위한 것이다. 대안적으로 또는 추가로, 중증도는 예를 들면, (국제암연맹(UICC) 및 미국 암연합회(AJCC)에 의해 채택된) TNM 시스템에 따라 또는 당분야에서 인정된 다른 방법으로 암 병기를 기술하기 위한 것이다. 암 병기는 인자, 예컨대 원발성 종양의 위치, 종양 크기, 종양의 수 및 림프절 관련성(림프절 내로의 암의 퍼짐)에 기초한 암의 정도 또는 중증도를 의미한다. 대안적으로 또는 추가로, 중증도는 당분야에서 인정된 방법(국립 암연구소(www.cancer.gov) 참조)으로 종양 등급을 기술하기 위한 것이다. 종양 등급은 암 세포가 현미경하에 얼마나 비정상적으로 보이는지 및 종양이 얼마나 신속히 성장하고 퍼질 가능성이 있는지의 면에서 암 세포를 분류하는 데에 사용되는 시스템이다. 종양 등급을 결정할 때 세포의 구조 및 성장 패턴을 포함하는 많은 인자들이 고려된다. 종양 등급을 결정하는 데에 사용된 특정 인자는 암의 각각의 유형에 따라 달라진다. 또한, 중증도는 얼마나 많은 종양 세포들이 동일한 조직 유형의 정상 세포와 유사한지를 의미하는, 분화로도 지칭되는 조직학적 등급을 기술한다(국립 암연구소(National Cancer Institute), www.cancer.gov 참조). 나아가, 중증도는 종양 세포의 핵의 크기 및 형태 및 분열하는 종양 세포의 백분율을 의미하는 핵 등급을 기술한다(국립 암연구소, www.cancer.gov 참조).

[0119] 본 발명의 또 다른 측면에서, 중증도는 종양이 성장인자를 분비하거나, 세포외 매트릭스를 분해하거나, 혈관을 형성하게 되거나, 나란히 놓여 있는 조직에의 접착을 상실하거나 전이되는 정도를 기술한다. 또한, 중증도는 원발성 종양이 전이되어 있는 위치의 수를 기술한다. 마지막으로, 중증도는 다양한 유형 및 위치의 종양을 치료하

는 어려움을 포함한다. 예를 들면, 수술불가능한 종양, 다수의 신체 시스템에 더 잘 접근하는 암(혈액 종양 및 면역학적 종양) 및 전통적인 치료에 대한 가장 높은 저항성을 가지는 암이 가장 심각한 것으로 간주된다. 이들 상황들에서, 대상의 기대 수명을 연장시키고/시키거나 통증을 감소시키고, 암 세포의 비율을 감소시키거나 세포를 한 시스템에 국한시키고, 암 병기/종양 등급/조직학적 등급/핵 등급을 개선하는 것이 암의 징후 또는 증상을 완화시키는 것으로 간주된다.

[0120] 본원에서 사용되는 용어 "증상"은 질환, 질병, 손상 또는 신체 내에서 무언가가 알맞지 않다는 것의 표시로서 정의된다. 증상은 이 증상을 경험하는 개체에 의해 감지되거나 인식되지만, 다른 개체들에 의해 용이하게 인식될 수 없다. 상기 다른 개체들은 건강관리 비전문가로서 정의된다.

[0121] 본원에서 사용되는 용어 "징후"도 신체 내에서 무엇인가가 알맞지 않다는 것의 표시로서 정의된다. 그러나, 징후는 의사, 간호사 또는 다른 건강관리 전문가에 의해 관찰될 수 있는 것으로서 정의된다.

[0122] 암은 거의 임의의 징후 또는 증상을 야기할 수 있는 질환의 한 군이다. 징후 및 증상은 암이 존재하는 위치, 암의 크기, 및 암이 근처 장기 또는 구조에 얼마나 많은 영향을 미치는지에 의존할 것이다. 암이 퍼지는(전이되는) 경우, 증상은 신체의 상이한 부분들에서 나타날 수 있다.

[0123] 암은 성장함에 따라 근처 장기, 혈관 및 신경을 압박하기 시작한다. 이 압력은 암의 징후 및 증상의 일부를 생성한다. 암이 중요한 영역, 예컨대 뇌의 일부 부분에 존재하는 경우, 가장 작은 종양조차도 초기 증상을 야기할 수 있다.

[0124] 그러나, 경우에 따라 암은 암이 꽤 크게 성장할 때까지 임의의 증상을 야기하지 않는 위치에서 시작한다. 예를 들면, 췌장암은 통상적으로 신체의 외부로부터 감지될 정도로 충분히 크게 성장하지 않는다. 몇몇 췌장암들은 이들이 근처 신경 주변에서 성장하기 시작할 때까지(이는 요통을 야기함) 증상을 야기하지 않는다. 다른 췌장암들은 담관 주변에서 성장하여 담즙의 유동을 차단하고 황달로서 공지된 피부의 황색화를 유발한다. 췌장암이 이들 징후들 또는 증상들을 야기할 때까지 췌장암은 통상적으로 진행된 병기에 도달한다.

[0125] 암은 발열, 피로 또는 체중 손실과 같은 증상을 야기할 수도 있다. 이것은 암 세포가 신체의 에너지 공급의 대부분을 사용하거나 신체의 대사를 변화시키는 물질을 방출하기 때문일 수 있다. 혹은, 암은 면역계가 이들 증상들을 생성하는 방식으로 반응하게 할 수 있다.

[0126] 경우에 따라, 암 세포는 통상적으로 암으로부터 발생되는 것으로 생각되지 않는 증상을 야기하는 물질을 혈류 내로 방출한다. 예를 들면, 몇몇 췌장암들은 혈괴가 다리의 정맥에서 발달하게 하는 물질을 방출할 수 있다. 몇몇 폐암들은 혈중 칼슘 수준에 영향을 미쳐 신경 및 근육에 영향을 미치고 쇠약 및 현기증을 야기하는 호르몬 유사 물질을 만든다.

[0127] 암은 각종 하위형의 암 세포들이 존재할 때 발생하는 여러 일반적인 징후 또는 증상을 제공한다. 암을 가지는 대부분의 사람들은 그들의 질환의 어느 시점에서 체중을 손실할 것이다. 10 파운드 이상의 설명되지 않는(비의도적) 체중 손실은 암, 특히 췌장암, 위암, 식도암 또는 폐암의 첫 번째 징후일 수 있다.

[0128] 발열은 암에서 매우 흔하지만, 진행된 질환에서 더 빈번히 관찰된다. 암을 가지는 거의 모든 환자들은 특히, 암 또는 이의 치료가 면역계에 영향을 미치고 신체가 감염에 대항하기에 더 어렵게 만드는 경우 어느 시점에서 발열을 가질 것이다. 덜 빈번하게는, 발열은 암, 예컨대 백혈병 또는 림프종의 초기 징후일 수 있다.

[0129] 피로는 암이 진행됨에 따라 중요한 증상일 수 있다. 그렇지만, 피로는 암, 예컨대 백혈병에서 초기에 발생할 수 있거나 몇몇 결장암들 또는 위암들에서와 같이 암이 계속된 혈액 손실을 야기하는 경우 초기에 발생할 수 있다.

[0130] 통증은 몇몇 암들, 예컨대 골암 또는 정소암에서 초기 증상일 수 있다. 그러나, 가장 빈번한 통증은 진행된 질환의 증상이다.

[0131] 피부암(다음 단락 참조)과 함께, 몇몇 내부 암들은 관찰될 수 있는 피부 징후를 야기할 수 있다. 이들 변화는 더 어둡게 보이는 피부(과다색소침착), 황색으로 보이는 피부(황달) 또는 적색으로 보이는 피부(홍반); 소양증;또는 과도한 모발 성장을 포함한다.

[0132] 대안적으로 또는 추가로, 암 하위형은 특정 징후 또는 증상을 제공한다. 배변 습관 또는 방광 기능의 변화는 암을 표시할 수 있다. 장기간 변비, 설사 또는 대변 크기의 변화는 결장암의 징후일 수 있다. 배뇨 통증, 소변 중의 혈액 또는 방광 기능의 변화(예컨대, 보다 더 빈번한 또는 보다 덜 빈번한 배뇨)는 방광암 또는 전립선암과 관련될 수 있다.

[0133] 피부 상태의 변화 또는 새로운 피부 상태의 출현은 암을 표시할 수 있다. 피부암은 출혈을 야기할 수 있고 치유할 수 없는 욕창처럼 보인다. 특히, 흡연하거나, 담배를 씹거나 알코올을 빈번하게 마시는 환자에서 오래 지속되는 구강내 욕창은 구강암일 수 있다. 음경 또는 질 상의 욕창은 감염 또는 초기 암의 징후일 수 있다.

[0134] 비통상적인 출혈 또는 분비물은 암을 표시할 수 있다. 비통상적인 출혈은 초기 또는 진행된 암에서 발생할 수 있다. 객담(점액질) 중의 혈액은 폐암의 징후일 수 있다. 대변 중의 혈액(또는 어두운 또는 흑색 대변)은 결장암 또는 직장암의 징후일 수 있다. 자궁경부 또는 자궁내막(자궁의 내층)의 암은 질 출혈을 야기할 수 있다. 소변 중의 출혈은 방광암 또는 신장암의 징후일 수 있다. 유두로부터의 혈액 분비물은 유방암의 징후일 수 있다.

[0135] 유방 또는 신체의 다른 부분에서의 비후화 또는 종괴는 암의 존재를 표시할 수 있다. 많은 암들이 주로 유방, 고환, 림프절(샘) 및 신체의 연조직에서 피부를 통해 감지될 수 있다. 종괴 또는 비후화는 암의 초기 또는 후기 징후일 수 있다. 임의의 종괴 또는 비후화는 특히 새로 형성된 것이거나 크기에서 성장하는 경우 암을 표시할 수 있다.

[0136] 소화불량 또는 삼키기 곤란함은 암을 표시할 수 있다. 이들 증상들은 통상적으로 다른 원인을 갖지만, 소화불량 또는 삼키는 문제는 식도암, 위암 또는 인두(인후)암의 징후일 수 있다.

[0137] 사마귀 또는 모반의 최근 변화는 암을 표시할 수 있다. 색채, 크기 또는 형태에서 변화되거나 그의 명확한 경계를 상실한 임의의 사마귀, 모반 또는 주근깨는 암의 잠재적 발달을 표시한다. 예를 들면, 상기 피부 병변은 흑색종일 수 있다.

[0138] 지속적인 기침 또는 쉰소리는 암을 표시할 수 있다. 사라지지 않는 기침은 폐암의 징후일 수 있다. 쉰소리는 후두(성대)암 또는 갑상선암의 징후일 수 있다.

[0139] 상기 나열된 징후들 및 증상들이 암에서 관찰된 보다 흔한 징후들 및 증상들이지만, 덜 흔하고 여기에 나열되어 있지 않은 많은 다른 징후들 및 증상들이 존재한다. 그러나, 암의 당 기술로 인식되는 모든 징후 및 증상도 고려되고, 본 발명에 포괄된다.

[0140] 암의 치료는 종양 크기의 감소를 유발할 수 있다. 종양 크기의 감소는 "종양 퇴행"으로서도 지칭될 수 있다. 바람직하게는, 치료 후, 종양 크기는 치료 전 그의 크기에 비해 상대적으로 5% 이상 감소될 것이고, 보다 바람직하게는, 종양 크기는 10% 이상 감소되고, 보다 바람직하게는 20% 이상 감소되고, 보다 바람직하게는 30% 이상 감소되고, 보다 바람직하게는 40% 이상 감소되고, 훨씬 보다 바람직하게는 50% 이상 감소되고, 가장 바람직하게는 75% 이상 감소된다. 종양의 크기는 임의의 재현가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 종양의 크기는 종양의 직경으로서 측정될 수 있다.

[0141] 암의 치료는 종양 부피의 감소를 유발할 수 있다. 바람직하게는, 치료 후, 종양 부피는 치료 전 그의 크기에 비해 상대적으로 5% 이상 감소될 것이고, 보다 바람직하게는, 종양 부피는 10% 이상 감소되고, 보다 바람직하게는 20% 이상 감소되고, 보다 바람직하게는 30% 이상 감소되고, 보다 바람직하게는 40% 이상 감소되고, 훨씬 보다 바람직하게는 50% 이상 감소되고, 가장 바람직하게는 75% 이상 감소된다. 종양 부피는 임의의 재현가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다.

[0142] 암의 치료는 종양 수의 감소를 유발할 수 있다. 바람직하게는, 치료 후, 종양 수는 치료 전 종양 수에 비해 상대적으로 5% 이상 감소될 것이고, 보다 바람직하게는, 종양 수는 10% 이상 감소되고, 보다 바람직하게는 20% 이상 감소되고, 보다 바람직하게는 30% 이상 감소되고, 보다 바람직하게는 40% 이상 감소되고, 훨씬 보다 바람직하게는 50% 이상 감소되고, 가장 바람직하게는 75% 이상 감소된다. 종양의 수는 임의의 재현가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 종양의 수는 육안으로 볼 수 있거나 특정된 배율에서 볼 수 있는 종양을 계수함으로써 측정될 수 있다. 바람직하게는, 상기 특정된 배율은 2배, 3배, 4배, 5배, 10배 또는 50배이다.

[0143] 암의 치료는 원발성 종양 부위로부터 멀리 떨어져 있는 다른 조직 또는 장기에서 전이성 병변의 수의 감소를 유발할 수 있다. 바람직하게는, 치료 후, 전이성 병변의 수는 치료 전 전이성 병변의 수에 비해 상대적으로 5% 이상 감소될 것이고, 보다 바람직하게는, 전이성 병변의 수는 10% 이상 감소되고, 보다 바람직하게는 20% 이상 감소되고, 보다 바람직하게는 30% 이상 감소되고, 보다 바람직하게는 40% 이상 감소되고, 훨씬 보다 바람직하게는 50% 이상 감소되고, 가장 바람직하게는 75% 이상 감소된다. 전이성 병변의 수는 임의의 재현가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 전이성 병변의 수는 육안으로 볼 수 있거나 특정된 배율에서 볼 수 있는 전이성 병변을 계수함으로써 측정될 수 있다. 바람직하게는, 상기 특정된 배율은 2배, 3배, 4배, 5배, 10배 또는 50배이다.

[0144] 암의 치료는 담체만을 제공받은 집단에 비해 치료된 대상 집단의 평균 생존 시간의 증가를 유발할 수 있다. 바

람직하게는, 상기 평균 생존 시간은 30일 초과, 보다 바람직하게는 60일 초과, 보다 바람직하게는 90일 초과, 가장 바람직하게는 120일 초과의 수준까지 증가될 것이다. 집단의 평균 생존 시간의 증가는 임의의 재현가능한 수단에 의해 측정될 수 있다. 집단의 평균 생존 시간의 증가는 예를 들면, 활성 화합물을 사용한 치료의 개시 후 집단에 대해 평균 생존 시간을 계산함으로써 측정될 수 있다. 집단의 평균 생존 시간의 증가는 예를 들면, 활성 화합물을 사용한 제1차 치료의 완결 후 집단에 대해 평균 생존 시간을 계산함으로써 측정될 수도 있다.

[0145] 암의 치료는 비치료된 대상 집단에 비해 치료된 대상 집단의 평균 생존 시간의 증가를 유발할 수 있다. 바람직하게는, 상기 평균 생존 시간은 30일 초과, 보다 바람직하게는 60일 초과, 보다 바람직하게는 90일 초과, 가장 바람직하게는 120일 초과의 수준까지 증가될 것이다. 집단의 평균 생존 시간의 증가는 임의의 재현가능한 수단에 의해 측정될 수 있다. 집단의 평균 생존 시간의 증가는 예를 들면, 활성 화합물을 사용한 치료의 개시 후 집단에 대해 평균 생존 시간을 계산함으로써 측정될 수 있다. 집단의 평균 생존 시간의 증가는 예를 들면, 활성 화합물을 사용한 제1차 치료의 완결 후 집단에 대해 평균 생존 시간을 계산함으로써 측정될 수도 있다.

[0146] 암의 치료는 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 전구약물, 대사물질, 유사체 또는 유도체가 아닌 약물을 사용한 단일요법을 제공받은 집단에 비해 치료된 대상 집단의 평균 생존 시간의 증가를 유발할 수 있다. 바람직하게는, 상기 평균 생존 시간은 30일 초과, 보다 바람직하게는 60일 초과, 보다 바람직하게는 90일 초과, 가장 바람직하게는 120일 초과의 수준까지 증가될 것이다. 집단의 평균 생존 시간의 증가는 임의의 재현가능한 수단에 의해 측정될 수 있다. 집단의 평균 생존 시간의 증가는 예를 들면, 활성 화합물을 사용한 치료의 개시 후 집단에 대해 평균 생존 시간을 계산함으로써 측정될 수 있다. 집단의 평균 생존 시간의 증가는 예를 들면, 활성 화합물을 사용한 제1차 치료의 완결 후 집단에 대해 평균 생존 시간을 계산함으로써 측정될 수도 있다.

[0147] 암의 치료는 담체만을 제공받은 집단에 비해 치료된 대상 집단의 사망률의 감소를 유발할 수 있다. 암의 치료는 비치료된 집단에 비해 치료된 대상 집단의 사망률의 감소를 유발할 수 있다. 암의 치료는 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염, 전구약물, 대사물질, 유사체 또는 유도체가 아닌 약물을 사용한 단일요법을 제공받은 집단에 비해 치료된 대상 집단의 사망률의 감소를 유발할 수 있다. 바람직하게는, 상기 사망률은 2% 초과, 보다 바람직하게는 5% 초과, 보다 바람직하게는 10% 초과, 가장 바람직하게는 25% 초과의 수준까지 감소될 것이다. 치료된 대상 집단의 사망률의 감소는 임의의 재현가능한 수단에 의해 측정될 수 있다. 집단의 사망률의 감소는 예를 들면, 활성 화합물을 사용한 치료의 개시 후 집단에 대해 단위 시간 당 질환 관련 사망의 평균 수를 계산함으로써 측정될 수 있다. 집단의 사망률의 감소는 예를 들면, 활성 화합물을 사용한 제1차 치료의 완결 후 집단에 대해 단위 시간 당 질환 관련 사망의 평균 수를 계산함으로써 측정될 수도 있다.

[0148] 암의 치료는 종양 성장률의 감소를 유발할 수 있다. 바람직하게는, 치료 후, 종양 성장률은 치료 전 종양 성장률에 비해 상대적으로 5% 이상 감소될 것이고, 보다 바람직하게는, 종양 성장률은 10% 이상 감소될 것이고, 보다 바람직하게는 20% 이상 감소될 것이고, 보다 바람직하게는 30% 이상 감소될 것이고, 보다 바람직하게는 40% 이상 감소될 것이고, 훨씬 보다 바람직하게는 50% 이상 감소될 것이고, 훨씬 보다 바람직하게는 50% 이상 감소될 것이고, 가장 바람직하게는 75% 이상 감소될 것이다. 종양 성장률은 임의의 재현가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 종양 성장률은 단위 시간 당 종양 직경의 변화에 따라 측정될 수 있다.

[0149] 암의 치료는 종양 재성장의 감소를 유발할 수 있다. 바람직하게는, 치료 후, 종양 재성장은 5% 미만일 것이고, 보다 바람직하게는, 종양 재성장은 10% 미만, 보다 바람직하게는 20% 미만, 보다 바람직하게는 30% 미만, 보다 바람직하게는 40% 미만, 훨씬 보다 바람직하게는 50% 미만, 가장 바람직하게는 75% 미만일 것이다. 종양 재성장은 임의의 재현가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 종양 재성장은 예를 들면, 치료 후 일어나는 선행 종양 수축 후 종양 직경의 증가를 측정함으로써 측정될 수 있다. 종양 재성장의 감소는 치료가 중단된 후 종양 재발의 실패에 의해 표시된다.

[0150] 세포 증식 장애의 치료 또는 예방은 세포 증식률의 감소를 유발할 수 있다. 바람직하게는, 치료 후, 세포 증식률은 5% 이상, 보다 바람직하게는 10% 이상, 보다 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 보다 바람직하게는 40% 이상, 훨씬 보다 바람직하게는 50% 이상, 가장 바람직하게는 75% 이상 감소될 것이다. 세포 증식률은 임의의 재현가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 세포 증식률은 예를 들면, 단위 시간 당 조직 샘플 중의 분열 세포의 수를 측정함으로써 측정된다.

[0151] 세포 증식 장애의 치료 또는 예방은 증식 세포의 비율의 감소를 유발할 수 있다. 바람직하게는, 치료 후, 증식 세포의 비율은 5% 이상, 보다 바람직하게는 10% 이상, 보다 바람직하게는 20% 이상, 보다 바람직하게는 30% 이상, 보다 바람직하게는 40% 이상, 훨씬 보다 바람직하게는 50% 이상, 가장 바람직하게는 75% 이상 감소될 것이

다. 증식 세포의 비율은 임의의 재현가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 바람직하게는, 증식 세포의 비율은 예를 들면, 조직 샘플 중의 비분열 세포의 수에 비해 상대적으로 분열 세포의 수를 정량함으로써 측정된다. 증식 세포의 비율은 유사분열 지수와 동등할 수 있다.

[0152] 세포 증식 장애의 치료 또는 예방은 세포 증식 영역 또는 대역의 크기의 감소를 유발할 수 있다. 바람직하게는, 치료 후, 세포 증식 영역 또는 대역의 크기는 치료 전 그의 크기에 비해 상대적으로 5% 이상 감소될 것이고, 보다 바람직하게는 10% 이상 감소될 것이고, 보다 바람직하게는 20% 이상 감소될 것이고, 보다 바람직하게는 30% 이상 감소될 것이고, 보다 바람직하게는 40% 이상 감소될 것이고, 훨씬 보다 바람직하게는 50% 이상 감소될 것이고, 가장 바람직하게는 75% 이상 감소될 것이다. 세포 증식 영역 또는 대역의 크기는 임의의 재현가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 세포 증식 영역 또는 대역의 크기는 세포 증식 영역 또는 대역의 직경 또는 폭으로서 측정될 수 있다.

[0153] 세포 증식 장애의 치료 또는 예방은 비정상적인 외관 또는 형상을 가지는 세포의 수 또는 비율의 감소를 유발할 수 있다. 바람직하게는, 치료 후, 비정상적인 형상을 가지는 세포의 수는 치료 전 그의 수에 비해 상대적으로 5% 이상 감소될 것이고, 보다 바람직하게는 10% 이상 감소될 것이고, 보다 바람직하게는 20% 이상 감소될 것이고, 보다 바람직하게는 30% 이상 감소될 것이고, 보다 바람직하게는 40% 이상 감소될 것이고, 훨씬 보다 바람직하게는 50% 이상 감소될 것이고, 가장 바람직하게는 75% 이상 감소될 것이다. 비정상적인 세포 외관 또는 형상은 임의의 재현가능한 측정 수단에 의해 측정될 수 있다. 비정상적인 세포 형상은 현미경관찰, 예를 들면 도립 조직 배양 현미경의 이용을 통해 측정될 수 있다. 비정상적인 세포 형상은 핵 다형성의 형태를 취할 수 있다.

[0154] 본원에서 사용되는 용어 "선택적으로"는 또 다른 집단에서보다 한 집단에서 보다 높은 빈도로 일어나는 경향을 의미한다. 비교된 집단은 세포 집단일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 화합물(즉, 화합물 I의 히드로브로마이드뿐만 아니라 다형 A)은 암 세포 또는 전암성 세포에 선택적으로 작용할 수 있으나 정상 세포에는 작용하지 않는다. 바람직하게, 본 발명의 화합물은 한 분자 표적(예를 들면, 표적 단백질 메틸트랜스퍼라제)을 선택적으로 조절하는 작용을 할 수 있으나 또 다른 분자 표적(예를 들면, 비표적 단백질 메틸트랜스퍼라제)을 유의하게 조절하지 않는다. 본 발명은 효소, 예컨대 단백질 메틸트랜스퍼라제의 활성을 선택적으로 억제하는 방법도 제공한다. 바람직하게는, 사건이 집단 B에 비해 집단 A에서 2배 초과의 수준으로 더 빈번하게 일어나는 경우 상기 사건은 집단 B에 비해 집단 A에서 선택적으로 일어난다. 사건이 집단 A에서 5배 초과의 수준으로 더 빈번하게 일어나는 경우 상기 사건은 선택적으로 일어난다. 사건이 집단 B에 비해 집단 A에서 10배 초과의 수준, 보다 바람직하게는 50배 초과의 수준, 훨씬 더 바람직하게는 100배 초과의 수준, 가장 바람직하게는 1000배 초과의 수준으로 더 빈번하게 일어나는 경우 상기 사건은 선택적으로 일어난다. 예를 들면, 세포 사멸이 정상 세포에 비해 암 세포에서 2배 초과의 수준으로 빈번하게 일어나는 경우 상기 세포 사멸은 암 세포에서 선택적으로 일어난다고 기재될 것이다.

[0155] 본 발명의 화합물은 분자 표적(예를 들면, 표적 단백질 메틸트랜스퍼라제)의 활성을 조절할 수 있다. 조절은 분자 표적의 활성을 자극하거나 억제하는 것을 의미한다. 바람직하게는, 본 발명의 화합물은 상기 화합물의 존재만이 결여되어 있다는 점을 제외하고 동일한 조건 하에서의 분자 표적의 활성에 비해 상대적으로 상기 분자 표적의 활성을 2배 이상 자극하거나 억제하는 경우 상기 분자 표적의 활성을 조절한다. 보다 바람직하게는, 본 발명의 화합물은 상기 화합물의 존재만이 결여되어 있다는 점을 제외하고 동일한 조건 하에서의 분자 표적의 활성에 비해 상대적으로 상기 분 자 표적의 활성을 5배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 50배 이상 또는 100배 이상 자극하거나 억제하는 경우 상기 분자 표적의 활성을 조절한다. 분자 표적의 활성은 임의의 재현가능한 수단에 의해 측정될 수 있다. 분자 표적의 활성은 시험관내에서 또는 생체내에서 측정될 수 있다. 예를 들면, 분자 표적의 활성은 효소 활성 검정 또는 DNA 결합 검정에 의해 시험관내에서 측정될 수 있거나, 분자 표적의 활성은 리포터 유전자의 발현의 검정에 의해 생체내에서 측정될 수 있다.

[0156] 본 발명의 화합물(즉, 화합물 I의 히드로브로마이드뿐만 아니라 다형 A)은 상기 화합물의 첨가가 상기 화합물의 존재만이 결여되어 있다는 점을 제외하고 동일한 조건 하에서의 분자 표적의 활성에 비해 상대적으로 상기 분자 표적의 활성을 10% 초과의 수준까지 자극하거나 억제하지 않는 경우 상기 분자 표적의 활성을 유의하게 조절하지 않는다.

[0157] 본원에서 사용되는 용어 "동종효소(isozyme) 선택적"이란, 효소의 제2 동형체에 비해 효소의 제1 동형체의 우세한 억제 또는 자극(예를 들면, 단백질 메틸트랜스퍼라제 동종효소 베타에 비해 단백질 메틸트랜스퍼라제 동종효소 알파의 우세한 억제 또는 자극)을 의미한다. 바람직하게는, 본 발명의 화합물은 생물학적 효과를 달성하는 데에 요구되는 용량에서 최소 4배 차이, 바람직하게는 10배 차이, 보다 바람직하게는 50배 차이를 나타낸다. 바

람직하게는, 본 발명의 화합물은 억제 범위에 걸쳐 이 차이를 나타내고, 상기 차이는 관심 있는 분자 표적에 대한 IC_{50}, 즉 50% 억제로 예시된다.

[0158] 본 발명의 화합물을 관련 치료가 필요한 세포 또는 대상에게 투여하면, 관심 단백질 메틸트랜스퍼라제의 활성의 조절(즉, 자극 또는 억제)이 유발될 수 있다.

[0159] 암 또는 세포 증식 장애의 치료는 세포 사멸을 유발할 수 있고, 바람직하게는 세포 사멸은 집단 내의 세포 수의 10% 이상의 감소를 유발할 것이다. 보다 바람직하게는, 세포 사멸은 20% 이상의 감소, 보다 바람직하게는 30% 이상의 감소, 보다 바람직하게는 40% 이상의 감소, 보다 바람직하게는 50% 이상의 감소, 가장 바람직하게는 75% 이상의 감소를 의미한다. 집단 내의 세포 수는 임의의 재현가능한 수단에 의해 측정될 수 있다. 집단 내의 세포 수는 형광 활성화된 세포 분류(FACS), 면역형광 현미경관찰 및 광학 현미경관찰에 의해 측정될 수 있다. 세포 사멸을 측정하는 방법은 문헌[Li et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 100(5)]에 나타낸 바와 같다. 한 측면에서, 세포 사멸은 아포프토시스(apoptosis)에 의해 일어난다.

[0160] 바람직하게는, 유효량의 본 발명의 화합물은 정상 세포에 대한 유의한 세포독성을 나타내지 않을 것이다. 치료 유효량의 화합물은 치료 유효량의 상기 화합물의 투여가 10% 초과의 정상 세포에서 세포 사멸을 유도하지 않는 경우 정상 세포에 대한 유의한 세포독성을 나타내지 않는다. 치료 유효량의 화합물은 치료 유효량의 상기 화합물의 투여가 10% 초과의 정상 세포에서 세포 사멸을 유도하지 않는 경우 정상 세포의 생존능에 유의한 영향을 미치지 않는다. 한 측면에서, 세포 사멸은 아포프토시스에 의해 일어난다.

[0161] 세포와 본 발명의 화합물의 접촉은 암 세포에서 세포 사멸을 선택적으로 유도할 수 있거나 활성화시킬 수 있다. 본 발명의 화합물을 관련 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하여 암 세포에서 세포 사멸을 선택적으로 유도할 수 있거나 활성화시킬 수 있다. 세포와 본 발명의 화합물의 접촉은 세포 증식 장애에 의해 영향을 받은 1개 이상의 세포에서 세포 사멸을 선택적으로 유도할 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 화합물을 관련 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하여 세포 증식 장애에 의해 영향을 받은 1개 이상의 세포에서 세포 사멸을 선택적으로 유도할 수 있다.

[0162] 본 발명은 본 발명의 화합물(즉, 화합물 I의 히드로브로마이드뿐만 아니라 다형 A)을 암의 치료 또는 예방이 필요한 대상에게 투여함으로써 암(예를 들면, 그 경과는 EZH2 매개 단백질 메틸화의 조절에 의해 영향을 받을 수 있음)을 치료하거나 예방하는 방법에 관한 것으로서, 이때 본 발명의 화합물의 투여는 하기 중 한 가지 이상을 유발한다: 세포 주기의 1개 이상의 단계(예를 들면, G1, G1/S, G2/M)에서의 세포의 축적에 의한 암 세포 증식의 예방, 세포 노화의 유도 또는 종양 세포 분화의 촉진; 정상 세포에서의 유의한 양의 세포 사멸 없이 세포독성, 괴사 또는 아포프토시스를 통한 암 세포에서의 세포 사멸의 촉진; 및 동물에서 2 이상의 치료 지수를 가지는 항종양 활성. 본원에서 사용되는 "치료 지수"는 허용되는 최대 용량을 유효 용량으로 나눈 값이다. 또한, 본 발명은 암의 치료 또는 예방에 적당한 후보물질을 확인하는 데에 이용되는 방법에 관한 것이다.

[0163] 당업자는 본원에 논의되어 있는 공지된 기법들 또는 등가 기법들의 상세한 설명을 위해 일반 참고교재들을 참조할 수 있다. 이들 교재들은 문헌[Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (2005)]; 문헌[Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3^{rd} edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2000)]; 문헌[Coligan et al., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, N.Y.]; 문헌[Enna et al., Current Protocols in Pharmacology, John Wiley & Sons, N.Y.]; 문헌[Fingl et al., The Pharmaceutical Basis of Therapeutics (1975)]; 및 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18^{th} edition (1990)]을 포함한다. 물론, 이들 교재들은 본 발명의 양태를 만들거나 이용하는 데에 있어서 참조될 수도 있다.

[0164] 예시

[0165] **재료 및 방법**

[0166] 분말 X-선 회절

[0167] 모든 샘플에 대한 PXRD를 리가쿠 멀티플렉스(Rigaku MultiFlex) 상에 취하였다(표적: Cu; 관 전압: 40 kV; 관 전류: 30 mA).

[0168] 시차 주사 열량법

[0169] 모든 샘플에 대한 DSC를 메틀러-톨레도(Mettler-Toledo) DSC 1/700 상에 취하였다(수행 조건: 초기 온도 35℃,

최종 온도 325℃, 가열 속도 30℃/분).

[0170] X-선 결정학

[0171] 매우 소량의 파라톤 오일을 이용하여, 0.28×0.22×0.06 mm의 치수를 가지는 무색 플레이트 결정을 나일론(Nylon) 루프에 탑재하였다. 173 K에서 작동하는 옥스포드 크리오스트림(Oxford Cryostream) 저온 장치가 장착된 회절분석기에 기초한 브루커(Bruker) CCM(전하 결합 소자)을 사용하여 데이터를 수집하였다. 데이터를 45초 동안 프레임 당 0.5° 의 오메가 및 파이 스캔을 사용하여 측정하였다. 이미지의 총 수는 중복도(redundancy)가 4.0일 것으로 예상되고 0.83Å에 100%로의 완전도가 예상되는 프로그램 COSMO로부터의 결과에 기초하였다. APEX II 소프트웨어를 이용하여 세포 파라미터를 검색하고, SAINT를 이용하여 모든 관찰된 반사에 대해 가공하였다. Lp에 대해 보정하는, SAINT 소프트웨어를 사용하여 데이터 감축을 수행하였다. 죠지 쉘드릭(George Sheldrick)에 의해 공급되는 SADABS 멀티-스캔 기법을 이용하여, 스케일링 및 흡수 보정을 적용하였다. 구조를 SHELXS-97 프로그램을 사용하는 직접 방법에 의해 해석하고, SHELXTL-PC V 6.10에 도입된, F^2, SHELXL-9에서 최소자승법으로 가공하였다.

[0172] 도 11에 나타낸 구조는, 공간군(space group) $P2_1/c$(# 14)에서 해석하였다. 모든 비-수소 원자를 비등방성으로 가공하였다. 수소를 기하학적 방법에 의해 계산하고, 라이딩 모델로서 가공하였다. 회절 연구에 사용된 결정은 데이터 수집 도중에 분해를 나타내지 않았다. 모든 도면은 50% 타원체로 행해진다.

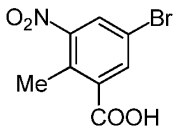
[0173] 동적 증기 흡착

[0174] VTI 모델 SGA-100 시스템에서 DVS를 측정하였다. 측정 방법: 상대 습도(RH)를, 비중 증착계를 이용하여 5% 단계로 5.0%에서 95.0%로, 이에 이어 다시 5.0%로 조절 방식으로 변화시켰고, 각 단계에서의 샘플의 중량 변화율(중량%)을 측정하였다.

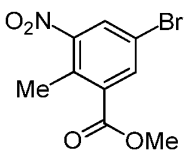
[0175] HPLC

[0176] 인-라인 탈기기(degasser)와 함께, 저압 혼합의 아질런트(Agilent) 1200 HPLC 4차 펌프에서 HPLC를 수행하였다. 분석 방법 조건: 8 μL 샘플(대략 0.4 mg/mL 용액을 제공하도록 50 mL의 메탄올로 희석된 20 mg의 ER-581982-06)을 아질런트 조르박스 에클립스(Agilent Zorbax Eclipse) XDB-C18 (4.6×150 mm, 3.5 um)에 주입하였다. 크로마토그래피 조건: 이동상 A, 5 mM 포름산암모늄을 가지는 물; 이동상 B, 50/45/5 아세토니트릴/메탄올/물 중의 5 mM 포름산암모늄; 유속, 1.5 ml/분; 구배: 0분에서 3분까지 10% B로 등용매; 3분에서 7분까지 70% B로 선형 증가; 7분에서 12분까지 70% B로 등용매; 12분에서 15분까지 100% B로 선형 증가, 및 15분에서 20분까지 100% B로 선형 증가; 칼럼 온도, 35℃; 검출, UV 230 nm, 화합물 I의 대략적 체류 시간=10.7 min.

[0177] 다형 A의 합성

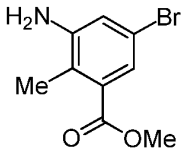
[0178] 

[0179] **5-브로모-2-메틸-3-니트로벤조산:** 실온에서 진한 H_2SO_4(400 mL) 중의 2-메틸-3-니트로벤조산(100 g, 552 mmol)의 교반 용액에 1,3-디브로모-5,5-디메틸-2,4-이미다졸리딘디온(88 g, 308 mmol)을 조금씩 나누어 첨가한 후, 반응 혼합물을 5시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 빙수에 붓고, 석출된 고체를 여과하며, 물로 세정하고, 진공 하에 건조시켜, 목적 화합물을 고체(140 g, 98%)로서 제공하였다. 단리된 화합물을 다음 단계에 직접 취하였다. ^1H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 8.31 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 2.43 (s, 3H).

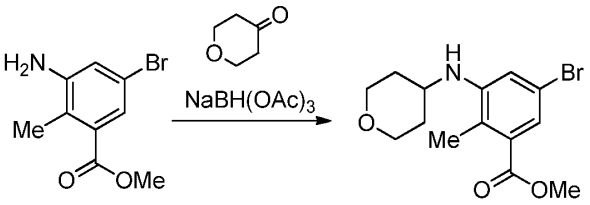
[0180] 

[0181] **메틸 5-브로모-2-메틸-3-니트로벤조에이트:** 실온에서 DMF(2.8 L)중의 5-브로모-2-메틸-3-니트로벤조산(285 g, 1105 mmol)의 교반 용액에 탄산나트륨(468 g, 4415 mmol)을 첨가한 후, 요오드화메틸(626.6 g, 4415 mmol)을

첨가하였다. 생성되는 반응 혼합물을 8시간 동안 60℃로 가열하였다. 완료 후(TLC에 의해 모니터링함), 반응 혼합물을 여과하고(이에 따라 탄산나트륨을 제거함), 아세트산에틸(1 L×3)로 세정하였다. 조합된 여과액을 물(3 L×5)로 세정하고, 수성상을 다시 아세트산에틸(1 L×3)로 추출하였다. 조합된 유기층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하며, 감압 하에 농축시켜, 표제 화합물을 고체(290 g, 97% 수율)로서 제공하였다. 단리된 화합물을 직접 다음 단계에 취하였다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 8.17 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.59 (s, 3H).

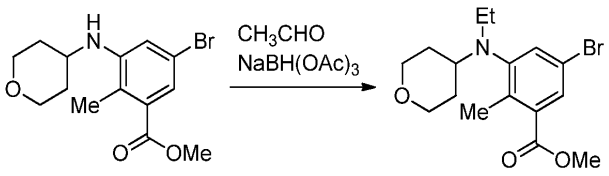
[0182] 

[0183] **메틸 3-아미노-5-브로모-2-메틸벤조에이트(1):** 에탄올(1.5 L) 중의 메틸 5-브로모-2-메틸-3-니트로벤조에이트(290 g, 1058 mmol)의 교반 용액에 수성 염화암모늄(283 g, 5290 mmol, 1.5 L 물 중에 용해됨)을 첨가하였다. 생성되는 혼합물을 80℃에서 교반하고, 여기에 철 분말(472 g, 8451 mmol)을 조금씩 나누어 첨가하였다. 생성되는 반응 혼합물을 12시간 동안 80℃에서 가열하였다. TLC에 의해 결정 시에 완료될 때, 반응 혼합물을 셀라이트(celite)®로 고온 여과하고, 셀라이트 층을 메탄올(5 L)로 세정한 후, DCM(5 L) 중 30% MeOH로 세정하였다. 조합된 여과액을 진공 농축하고, 수득된 잔류물을 중탄산나트륨 수용액(2 L)으로 희석하고, 아세트산에틸(5 L×3)로 추출하였다. 조합된 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하며, 감압 하에 농축하여, 표적 화합물을 고체(220 g, 85%)로서 제공하였다. 화합물을 직접 다음 단계에 취하였다. ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 7.37 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.80 (bs, 2H), 2.31 (s, 3H).

[0184] 

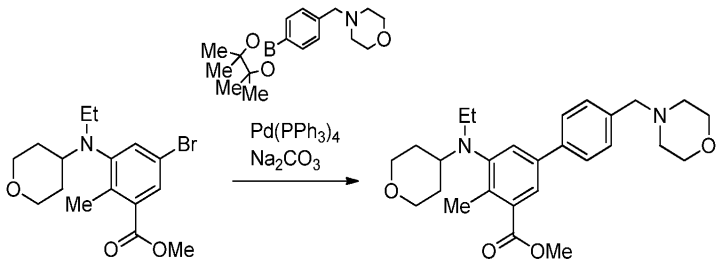
[0185] **메틸 5-브로모-2-메틸-3-((테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노) 벤조에이트(2):** 반응기에 메틸 3-아미노-5-브로모-2-메틸벤조에이트(455.8 g, 1.87 mol), 1,2-디클로로에탄(4.56 L) 및 아세트산(535 ml, 9.34 mol)을 충전하였다. 내부 온도를 40℃ 미만으로 유지하면서, 혼합물에 디히드로-2H-피란-4(3H)-온(280 g, 2.80 mol) 및 나트륨 트리아세톡시보로히드리드(594 g, 2.80 mol)를 첨가하였다. 혼합물을 2.5시간 동안 25℃에서 교반한 후, 반응을 물(5.61 L) 중 수산화나트륨(448 g, 11.20 mol)을 켄칭하였다. 상온에서 20분 동안 교반한 후, 유기 층을 분리하고, 수성 층을 아세트산에틸(3.65 L)로 추출하였다. 유기 층을 조합하고, 염수(1.5 L)로 세정하고, 진공 농축하였다.

[0186] 잔류물을 아세트산에틸(1.8 L)로 처리하고, 65 내지 70℃로 가열하였다. 혼합물을 15분 동안 65 내지 70℃에서 교반하여, 투명 용액을 수득한 후, 온도를 60 내지 70℃로 유지하면서, n-헵탄(7.3 L)으로 처리하였다. 일단 헵탄을 용액에 완전히 첨가하면, 혼합물을 15분 동안 65 내지 70℃에 유지시킨 후, 3시간에 걸쳐 18 내지 22℃로 냉각시켰다. 생성되는 현탁액을 4시간 동안 18 내지 22℃에서 교반하고, 1시간에 걸쳐 0 내지 5℃로 냉각시키며, 2시간 동안 0 내지 5℃에 유지시켰다. 침전물을 여과하고, n-헵탄(1.4 L)으로 2회 세정하고, 진공 건조시켜, 표제 화합물(540 g, 88%)을 수득하였다. 이 화합물의 XRPD 패턴이 도 17에 나와 있다.

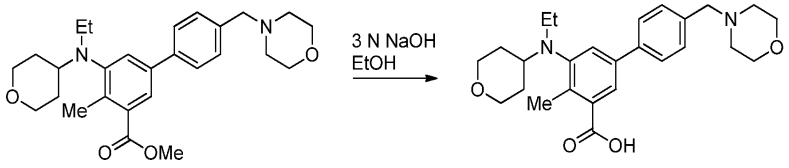
[0187] 

[0188] **메틸 5-브로모-3-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-2-메틸벤조에이트(3):** 디클로로에탄(150 mL) 중의 메틸 5-브로모-2-메틸-3-((테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노) 벤조에이트(14 g, 42.7 mmol)의 교반 용액에 아

세트알데히드(3.75 g, 85.2 mmol) 및 아세트산(15.3 g, 256 mmol)을 첨가하였다. 생성되는 반응 혼합물을 15분 동안 실온에서 교반하였다. 혼합물을 0℃로 냉각시키고, 나트륨 트리아세톡시보로히드리드(27 g, 128 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 3시간 동안 실온에서 교반하였다. TLC에 의해 결정 시에 반응이 완료될 때, pH 7 내지 8이 수득될 때까지 반응 혼합물에 중탄산나트륨 수용액을 첨가하였고, 유기 상을 분리하고, 수성 상을 아세트산에틸로 추출하였다. 조합된 유기 층을 무수 황산나트륨으로 건조시키고, 여과하며, 감압 농축하였다. 조 화합물을 아세트산에틸:헥산으로 용출하는 칼럼 크로마토그래피(100-200 메쉬 실리카 겔)에 의해 정제하여, 목적 화합물을 점성 액체(14 g, 93%)로서 제공하였다. ^{1}H NMR (DMSO-d_6, 400 MHz) δ 7.62 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 3.80 (bs, 5H), 3.31 (t, 2H), 2.97-3.05 (m, 2H), 2.87-2.96 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 1.52-1.61 (m, 2H), 1.37-1.50 (m, 2H), 0.87 (t, 3H, J=6.8 Hz).

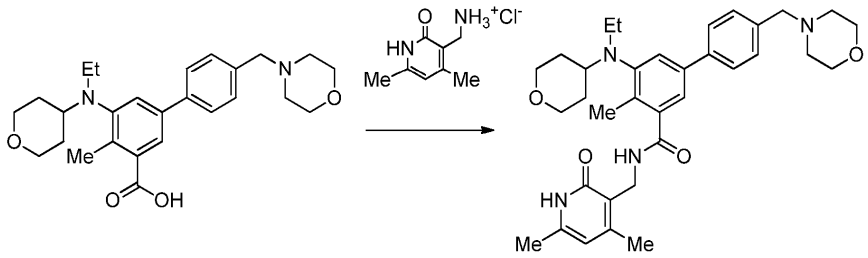
[0189] 

[0190] **메틸 5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실레이트(4):** 메틸 5-브로모-3-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-2-메틸벤조에이트(580 g, 1.63 mol), 4-(4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)벤질)모르폴린(592 g, 1.95 mol), 1,4-디옥산(3.86 L), 탄산나트륨(618 g, 5.83 mol) 및 물(771 ml)의 혼합물을 20분 동안 20℃에서 혼합물을 통해 질소를 버블링하여 탈기하고, 테트라키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0)(14.11 g, 12.21 mmol)으로 처리하였다. 생성되는 혼합물을 부가적 20분 동안 탈기한 후, 17시간 동안 87 내지 89℃로 가열하였다. 20℃로 냉각시킨 후, 혼합물을 아세트산에틸(5.80 L), 및 물(2.320 L) 중의 (R)-2-아미노-3-머캅토프로피온산(232 g)의 용액으로 세정하였다. 20℃에서 1시간 동안 교반한 후, 유기 층을 분리하고, 물(2.320 L) 중의 (R)-2-아미노-3-머캅토프로피온산(232 g)의 용액으로 다시 세정하였다. 수성 층을 조합하고, 아세트산에틸(5.80 L)로 추출하였다. 유기 층을 조합하고, 물(2.32 L) 중의 수산화나트륨(93 g) 용액으로 세정하며, 35℃에서 진공 농축하여, 표제 화합물을 오렌지색 오일(1.21 kg, 164% 수율)로서 수득하였다.

[0191] 

[0192] **5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실산(5):** 메틸 5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실레이트(69.0 g, 152.5 mmol)(전 단계로부터 이론적 수율에 기초함)를 에탄올(380 mL)에 현탁하고, 물(207 mL) 중의 수산화나트륨(24.84 g, 621.0 mmol) 용액으로 처리하였다. 혼합물을 18시간 동안 40℃에서 교반하였다. 0 내지 5℃로 냉각시킨 후, 온도를 25℃ 미만으로 유지하면서 1 N 염산(580 mL)을 이용하여 혼합물을 pH 6.5로 중화하였다. 이어서, 혼합물을 디클로로메탄(690 mL) 및 메탄올(69.0 mL)의 혼합물로 2회 추출하였다. 유기 층을 조합하고, 진공 농축하여, 조 생성물을 황색 고체(127 g)로서 수득하였다.

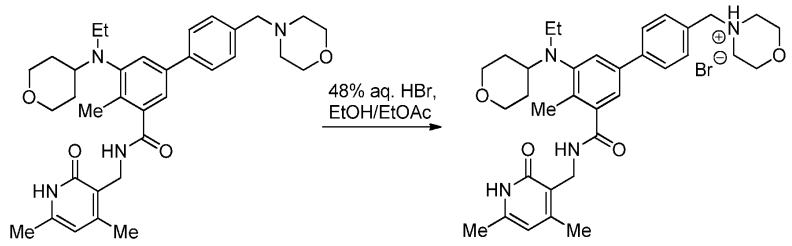
[0193] 조 생성물을 70℃에서 2-메틸테트라히드로푸란(656 mL)에 용해시킨 후, IPA(828 mL)로 처리하였다. 혼합물을 3 내지 4시간에 걸쳐 냉각시킨 후, 실온에서 하룻밤 동안 교반하였다. 침전물을 여과하고, IPA(207 mL)로 2회 세정하며, 진공 건조시켜, 표제 화합물을 회백색 고체(53.54 g, 80%)로서 수득하였다. 이 화합물의 XRPD 패턴이도 9에 나와 있다.



[0194]

[0195] **N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드(화합물 I):** 5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복실산(540 g, 1.23 mol) 및 3-(아미노메틸)-4,6-디메틸-디히드로-피리딘-2(1H)-온 히드로클로라이드(279 g, 1.48 mol)의 혼합물을 DMSO(2.70 L)에 현탁시킨 후, 트리에틸아민(223 ml, 1.60 mol)으로 처리하였다. 혼합물을 30분 동안 25℃에서 교반하고, EDC-HCl(354 g, 1.85 mol) 및 HOBT 수화물(283 g, 1.85 mol)로 처리하였다. 반응 혼합물을 16시간 동안 실온에서 교반하였다. 트리에틸아민(292 ml, 2.09 mol)을 첨가한 후, 혼합물을 15℃로 냉각시키고, 온도를 30℃ 미만으로 유지하면서 물(10.1 L)로 희석하고, 4시간 동안 19 내지 25℃에서 교반하였다. 생성되는 침전물을 여과하고, 물(2.70 L)로 2회 세정하고, 진공 건조시켜, 조 생성물(695 g, wt-wt 분석=78%)을 수득하였다.

[0196] 생성물을 추가 정제하기 위해, 재결정화를 수행하였다. 조 생성물(20.00 g, 34.92 mmol)을 에탄올(190 ml) 및 물(10.00 ml)의 혼합물에 현탁시키고, 투명 용액이 수득될 때까지 75℃로 가열하였다. 용액을 하룻밤 동안 실온으로 냉각시켰다. 침전물을 여과하고, 에탄올(30.0 ml) 및 물(30.0 ml)의 혼합물로 2회 세정하며, 35℃에서 진공 건조시켜, 표제 화합물 회백색 고체(14.0 g, 조 물질로부터의 70% 회수율 및 wt-wt 검정에 기초 시, 90% 수율)로서 수득하였다.



[0197]

[0198] **4-((3'-(((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)카르바모일)-5'-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4'-메틸-[1,1'-비페닐]-4-일)메틸)모르폴린-4-이움 브롬화물(다형 A):** 조 N-((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)-5-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4-메틸-4'-(모르폴리노메틸)-[1,1'-비페닐]-3-카르복사미드(595 g, wt-wt 검정에 기초 시, 464 g, 810.3 mmol)를 에탄올(3.33 L)에 현탁시켰다. 70℃로 가열한 후, 혼합물을 48% 수성 HBr(97 ml, 850.8 mmol)로 처리하고, 30분 동안 70℃에서 교반하였다. 온도를 60℃ 초과로 유지하면서, 생성되는 오렌지색-적색 용액을 아세트산에틸(3.33 L)로 처리하였다. 혼합물을 18시간에 걸쳐 천천히 실온으로 냉각시켰다. 혼합물을 1시간에 걸쳐 0℃로 냉각시키고, 5.5시간 동안 그 온도에서 교반하였다. 생성되는 침전물을 여과하고, 아세트산에틸(1.39 L)로 2회 세정하고, 진공 건조시켜, 표제 화합물을 회백색 고체(515 g, 97% 수율)로서 수득하였다.

[0199] **다형 A의 재결정화:** 4-((3'-(((4,6-디메틸-2-옥소-1,2-디히드로피리딘-3-일)메틸)카르바모일)-5'-(에틸(테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)-4'-메틸-[1,1'-비페닐]-4-일)메틸)모르폴린-4-이움 브롬화물(0.50 g, 0.77 mmol; HPLC에 의한 경우, 95.6% 순도)을 에탄올(3.0 mL)에 현탁시키고, 투명 용액이 수득될 때까지 80℃로 가열하였다. 용액에 MTBE(5.0 mL)를 천천히 첨가하였다. 생성되는 용액을 3시간에 걸쳐 18 내지 22℃로 냉각시키고, 15시간 동안 18 내지 22℃에서 교반하였다. 침전물을 여과하고, MTBE(2 mL)로 2회 세정하며, 진공 건조시켜, 0.45 g의 표제 화합물(89% 회수율, HPLC에 의한 96.6% 수율). 다형 A(모노히드로브로마이드)의 X-선 분말 회절 패턴이 도 1에 나와 있다. 이하 표 1은 가장 유의적인 피크들을 열거한다.

표 1

피크 (도 2-쎄타)
3.9
10.1
14.3
17.5
18.7
20.6
20.9
21.8
22.0
23.3
23.6

[0200]

[0201] **화합물 I의 히드로브로마이드 및 다형 A의 평가**

[0202] 히드로클로라이드, 히드로브로마이드, 헤미술페이트, 나트륨, 포스페이트, 질산염, 말레에이트 및 L-타르타레이트를 비롯한 다수의 상이한 염 형태들을 제조하고, 선별하였다. 이들 중, 히드로브로마이드(HBr) 염이 제조 용이성 및 흡습성의 관점에서 가장 유리한 물리화학적 성질을 가졌다.

[0203] 화합물 I의 유리 염기 및 이 화합물의 HCl 염의 상세한 연구를 수행하였다. XRD 및 DSC를 이용하여 예비 다행 선별하는 동안, 유리 형태의 화합물 I로부터 5개 이상의 상이한 결정 형태들을 검출하였다. 유리 형태의 결정화 동안 관찰되는 가변도가 커서, 다른 염의 결정 형태가 모색되었다. 선별된 염들 중, 모노히드로클로라이드, 모노히드로브로마이드, 헤미술페이트, 포스페이트, 말레에이트, L-타르타레이트 및 나트륨 염 형태가 결정성이었다. 포스페이트 및 말레에이트 염이 매우 흡습성이었고, L-타르타레이트는 낮은 결정화도를 가졌다.

[0204] 화합물 I의 HCl 염으로부터의 높은 정도의 결정화도를 얻는 것은 어려웠다. 결정화 조건에 상관없이 결정성 물질 및 비정형 물질의 혼합물을 수득하였다. 도 8에 나와 있는 바와 같이, 화합물 I의 모노히드로클로라이드 염의 DSC 데이터는, 190.5℃에서 흡열의 경우의 어느 정도의 비결정화도를 가리킨다. 또한, 화합물 I의 모노히드로클로라이드 염에 대한 동적 증기 흡착(DVS) 데이터를 수득하였고, 이는 약간의 흡습성을 나타내는 것으로 밝혀졌다: 다시 4 내지 6% 중량이 25℃에서 75% 상대 습도(RH)에서 관찰되었다(도 18B). 이는 어느 정도의 모노히드로클로라이드 염의 비결정성 성질에 기인한 것일 수 있다. 예를 들면, 비정형 트리히드로클로라이드 화합물 I을 보여주는 도 18A를 참조한다. 결정화도 수준이 조절가능하지 않기 때문에, HCl 염에 대한 추가 개발이 고려되지 않았다.

[0205] 도 6에 나와 있는 바와 같이, 화합물 I의 나트륨 염의 DVS 분석은 유의적 흡습성을 나타냈고: 다시 대략 15% 중량이 25℃에서 75% 상대 습도(RH)에서 관찰되었다. 도 7에서 보는 바와 같이, 화합물 I의 헤미술페이트 염은 중간 정도로 높은 흡습성을 나타냈고: 9 내지 11% 중량이 25℃에서 75% 상대 습도(RH)에서 관찰되었다. 이는, 헤미술페이트 염의 DSC 데이터가 명확한 흡열이 없이 매우 높은 정도의 비결정화도를 가리키기 때문에, 화합물의 높은 비결정성 성질에 기인한 것일 수 있다.

[0206] 이들 결정성 화합물 중, 모노히드로브로마이드가 결정성이 가장 크고 흡습성이 제일 작다(도 1, 3 및 4 참조). 또한, 모노히드로브로마이드가 매우 안정적이고, 불순물의 발생에 저항한다(도 5는 상승된 온도에서 3일에 걸친 다형 A의 HPLC 분석을 나타내고, 다형 A는 100℃에서 3일간에 걸쳐 최소의 불순물을 생성시켰다). 흥미롭게도, 화합물 I의 디-HBr 염이 주로 비정형인 것으로 나타났다(도 2).

[0207] 화합물 I의 모노히드로브로마이드의 2가지 상이한 결정 형태(다형 A 및 B)가 상이한 용매계로부터 수득되었고, XRD, DSC 및 TGA-DSC 분석을 이용하여 특징분석되었다. 화합물 I의 각각의 배치로부터의 상기 2가지 상이한 결정 형태에 대한 데이터가 도 1, 도 3 및 도 10에 나와 있다. 다형 B는 8.5, 10.9, 16.7, 17.4, 20.9, 22.1 및 25.7±0.2도 2 쎄타에 피크가 있는 분말 XRD 패턴을 그 특징으로 한다(도 10 참조). 이들 둘 사이에서, 다형 A는 본래 더욱 결정성인 것으로 나타났다. 동적 증기 흡착(DVS) 연구는 다형 A거 비흡습성임을 보여주었다(도 4). 열 분석에서, 하나의 흡열 피크가 대략 251℃의 개시 온도로 관찰되었다. 또한, DSC 분석으로부터, 다형 A의 재결정화는 물질의 결정화도를 증가시킴을 알 수 있다(도 3 참조).

[0208] 다중 실험실 규모 수행에서, 다형 A는 재현가능하게 수득되었고, 결정화 조건의 약간의 변화는 상이한 결정 형

태를 유발하지 않았다.

[0209] 야생형 및 돌연변이체 PRC2 효소 검정

[0210] **일반 재료.** S-아데노실메티오닌(SAM), S-아데노실호모시스테인(SAH), 비신(bicine), KCl, 트윈(Tween) 20, 다이메틸설폭사이드(DMSO) 및 소 피부 젤라틴(BSG)을 가능한 가장 높은 순도로 시그마-알드리히(Sigma-Aldrich)로부터 구입하였다. 다이티오트레이톨(DTT)을 EMD로부터 구입하였다. 비활성이 80 Ci/mmol인 ^{3}H-SAM을 어메리칸 레디오레이블드 케미칼즈(American Radiolabeled Chemicals)로부터 구입하였다. 384-웰 스트렙타비딘 플래쉬플레이트(Flashplate)를 퍼킨엘머(PerkinElmer)로부터 구입하였다.

[0211] **기질.** 21st 센터리 바이오케미칼스(21st Century Biochemicals)는 C 말단 G(K-바이오틴) 링커-친화성 태그 모티프 및 C 말단 아미드 캡을 사용하여 비변경된 라이신 27(H3K27me0) 또는 다이메틸화된 라이신 27(H3K27me2)을 함유하는 인간 히스톤 H3 잔기 21 내지 44를 대표하는 펩티드들을 합성하였다. 상기 펩티드들을 95% 초과의 순도까지 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 정제하고 액체 크로마토그래피 질량 분광측정(LC-MS)으로 확인하였다. 서열이 하기 나열되어 있다:

[0212] H3K27me0: ATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGGK(바이오틴)-아미드(서열 번호 1)

[0213] H3K27me2: ATKAARK(me2)SAPATGGVKKPHRYRPGGK(바이오틴)-아미드(서열 번호 2)

[0214] 확립된 절차에 따라 닭 적혈구 올리고뉴클레오좀을 닭 혈액으로부터 정제하였다.

[0215] **재조합 PRC2 복합체.** 바큘로바이러스 발현 시스템을 사용하여 스포도프테라 프루기페르다(Spodoptera frugiperda)(sf9) 세포에서 함께 발현된 4-성분 효소 복합체로서 인간 PRC2 복합체를 정제하였다. 발현된 서브유닛은 야생형 EZH2(NM_004456) 또는 야생형 EZH2 구축물로부터 발생된 EZH2 Y641F, N, H, S 또는 C 돌연변이체, EED(NM_003797), Suz12(NM_015355) 및 RbAp48(NM_005610)이었다. EED 서브유닛은 sf9 세포 용해물로부터 전체 4-성분 복합체를 정제하는 데에 사용되는 N 말단 FLAG 태그를 함유하였다. 상기 복합체의 순도는 SDS-PAGE 및 아질런트 바이오분석기(Agilent Bioanalyzer) 분석에 의해 측정되었을 때 95 이상이었다. 소 혈청 알부민(BSA) 표준물에 대한 브래드포드(Bradford) 검정을 이용하여 효소 저장액(stock) 농축물의 농도(일반적으로 0.3 내지 1.0 mg/mL)를 측정하였다.

[0216] **펩티드 기질에 대한 PRC2 효소 검정에 대한 일반 절차.** 사용 당일에 제조된, 20 mM 비신(bicine)(pH=7.6), 0.5 mM DTT, 0.005% BSG 및 0.002% 트윈 20으로 구성된 완충제에서 모든 검정들을 수행하였다. 384-채널 피펫 헤드를 갖춘 플레이트메이트(Platemate) 2×3(써모((Thermo))을 이용하여 100% DMSO 중의 화합물(1 μL)을 폴리프로필렌 384-웰 V-바닥 플레이트(그레이너(Greiner)) 내로 스폿팅하였다. DMSO(1 μL)를 최대 신호 대조군용으로 컬럼 11, 12, 23 및 24의 A 내지 H열에 첨가하였고, PRC2의 공지된 생성물이면서 억제제인 SAH(1 μL)를 최소 신호 대조군용으로 컬럼 11, 12, 23 및 24의 I 내지 P열에 첨가하였다. 야생형 PRC2 효소 및 H3K27me0 펩티드 또는 Y641 돌연변이체 효소들 중 임의의 효소 및 H3K27me2 펩티드를 함유하는 칵테일(40 μL)을 멀티드롭 콤비(Multidrop Combi)(써모)로 첨가하였다. 화합물을 25℃에서 PRC2와 함께 30분 동안 항온처리한 후, 비방사성 SAM과 ^{3}H-SAM의 혼합물을 함유하는 칵테일(10 μL)을 첨가하여 반응을 개시하였다(최종 부피=51 μL). 모든 경우, 최종 농도는 다음과 같았다: 야생형 또는 돌연변이체 PRC2 효소는 4 nM이었고, 최소 신호 대조군 웰에서의 SAH는 1 mM이었고, DMSO 농도는 1%이었다. 나머지 성분들의 최종 농도는 하기 표 2에 표시되어 있다. 비방사성 SAM(10 μL)을 600 μM의 최종 농도로 첨가하여 ^{3}H-SAM을 펩티드 기질 내로의 그의 도입이 더 이상 검출될 수 없는 수준까지 희석함으로써 검정을 중단하였다. 그 다음, 384-웰 폴리프로필렌 플레이트 내의 50 μL 반응물을 384-웰 플래쉬플레이트로 옮기고 바이오티닐화된 펩티드를 1시간 이상 동안 스트렙타비딘 표면에 결합시킨 후, 바이오텍(Biotek) ELx405 플레이트 세정제 중의 0.1% 트윈 20으로 3회 세정하였다. 그 다음, 상기 플레이트를 퍼킨엘머 탑카운트(TopCount) 플레이트 판독기 내에서 판독하여, 대안적으로 분 당 카운트(cpm)로서도 지칭되는 분 당 붕괴(dpm)로서 측정되는, 플래쉬플레이트 표면에 결합된 ^{3}H-표지된 펩티드의 양을 측정하였다.

표 2

EZH2 실체(야생형 또는 Y641 돌연변이체 EZH2)에 기초한 각 검정 변동에 대한 성분의 최종 농도

PRC2 효소 (EZH2 실체에 의해 나타냄)	펩티드 (nM)	비방사능 SAM (nM)	^{3}H-SAM (nM)
	185	1800	150
Y641F	200	850	150
Y641N	200	850	150
Y641H	200	1750	250
Y641S	200	1300	200
Y641C	200	3750	250

[0217]

[0218] **올리고뉴클레오좀 기질에 대한 야생형 PRC2 효소 검정에 대한 일반 절차.** 사용 당일에 제조된, 20 mM 비신(pH=7.6), 0.5 mM DTT, 0.005% BSG, 100 mM KCl 및 0.002% 트윈 20으로 구성된 완충제에서 모든 검정들을 수행하였다. 384-채널 피펫 헤드를 갖춘 플레이트메이트 2×3(써모)을 이용하여 100% DMSO 중의 화합물(1 μL)을 폴리프로필렌 384-웰 V-바닥 플레이트(그레이너) 내로 스폿팅하였다. DMSO(1 μL)를 최대 신호 대조군용으로 컬럼 11, 12, 23 및 24의 A 내지 H열에 첨가하였고, PRC2의 공지된 생성물이면서 억제제인 SAH(1 μL)를 최소 신호 대조군용으로 컬럼 11, 12, 23 및 24의 I 내지 P열에 첨가하였다. 야생형 PRC2 효소 및 닭 적혈구 올리고뉴클레오좀을 함유하는 칵테일(40 μL)을 멀티드롭 콤비(써모)로 첨가하였다. 화합물을 25℃에서 PRC2와 함께 30분 동안 항온처리한 후, 비방사성 SAM과 3H-SAM의 혼합물을 함유하는 칵테일(10 μL)을 첨가하여 반응을 개시하였다(최종 부피=51 μL). 최종 농도는 다음과 같았다: 야생형 PRC2 효소는 4 nM이었고, 비방사성 SAM은 430 nM이었고, 3H-SAM은 120 nM이었고, 닭 적혈구 올리고뉴클레오좀은 120 nM이었고, 최소 신호 대조군 웰에서의 SAH는 1 mM이었고, DMSO 농도는 1%이었다. 비방사성 SAM(10 μL)을 600 μM의 최종 농도로 첨가하여 ^{3}H-SAM을 닭 적혈구 올리고뉴클레오좀 기질 내로의 그의 도입이 더 이상 검출될 수 없는 수준까지 희석함으로써 검정을 중단하였다. 그 다음, 384-웰 폴리프로필렌 플레이트 내의 50 μL 반응물을 384-웰 플래쉬플레이트로 옮기고 닭 적혈구 올리고뉴클레오좀을 상기 플레이트의 표면에 고정시킨 후, 상기 플레이트를 바이오텍 ELx405 플레이트 세정제 중의 0.1% 트윈 20으로 3회 세정하였다. 그 다음, 상기 플레이트를 퍼킨엘머 탑카운트 플레이트 판독기 내에서 판독하여, 대안적으로 분 당 카운트(cpm)로서도 지칭되는 분 당 붕괴(dpm)로서 측정되는, 플래쉬플레이트 표면에 결합된 ^{3}H-표지된 닭 적혈구 올리고뉴클레오좀의 양을 측정하였다.

[0219] **% 억제 계산**

$$\%\ \text{inh} = 100 - \left(\frac{\text{dpm}_{\text{cmpd}} - \text{dpm}_{\text{min}}}{\text{dpm}_{\text{max}} - \text{dpm}_{\text{min}}} \right) \times 100$$

[0220]

[0221] 상기 식에서, dpm은 분 당 붕괴이고, cmpd는 검정 웰에서의 신호이고, min 및 max는 각각의 최소 신호 대조군 및 최대 신호 대조군이다.

[0222] **4-파라미터 IC_{50} 피트**

$$Y = \text{하부} + \frac{(\text{상부} - \text{하부})}{1 + \left(\frac{X}{IC_{50}}\right)^{\text{힐 계수}}}$$

[0223]

[0224] 상기 식에서, 상부 및 하부는 정상적으로 변동되도록 하나, 3-파라미터 피트에서 각각 100 또는 0으로 고정될 수 있다. 힐 계수(Hill Coefficient)는 정상적으로 변동되지만, 3-파라미터 피트에서 1로 고정될 수도 있다. Y는 % 억제이고, X는 화합물 농도이다.

[0225] 펩티드 기질(예를 들면, EZH2 야생형 및 Y641F)에 대한 PRC2 효소 검정에 대한 IC_{50} 값이 하기 표 3에 제시되어 있다.

[0226] **WSU-DLCL2 메틸화 검정**

[0227] WSU-DLCL2 현탁 세포를 DSMZ(독일 미생물 및 세포 배양물 수집 기관(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures), 독일 브라운슈베이그 소재)로부터 구입하였다. RPMI/글루타맥스 배지, 페니실린-스트렙토마이신, 열 불활성화된 태아 소 혈청 및 D-PBS를 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)(미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재)로부터 구입하였다. 추출 완충제 및 중화 완충제(5×)를 액티브 모티프(Active Motif)(미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)로부터 구입하였다. 토끼 항-히스톤 H3 항체를 애브캄(Abcam)(미국 매사추세츠주 캠브리지 소재)으로부터 구입하였다. 토끼 항-H3K27me3 및 HRP-접합된 항-토끼-IgG를 셀 시그날링 테크놀로지(Cell Signaling Technology)(미국 매사추세츠주 댄버스 소재)로부터 구입하였다. TMB "초민감성" 기질을 바이오에프엑스 레이보레이토리스(BioFX Laboratories)(미국 매릴랜드주 오윙스 밀스 소재)로부터 공급받았다. IgG 비함유 소 혈청 알부민을 잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch)(미국 펜실베니아주 웨스트 그로브 소재)로부터 구입하였다. 트윈을 가지는 PBS(10×PBST)를 케이피엘(KPL)(미국 매릴랜드주 게이더스버그 소재)로부터 구입하였다. 황산을 리카 케미칼(Ricca Chemical)(미국 텍사스주 알링톤 소재)로부터 구입하였다. 이뮬론(Immulon) ELISA 플레이트를 써모(미국 뉴욕주 로체스터 소재)로부터 구입하였다. V-바닥 세포 배양 플레이트를 코닝 인코포레이티드(Corning Inc.)(미국 뉴욕주 코닝 소재)로부터 구입하였다. V-바닥 폴리프로필렌 플레이트를 그레이너 바이오-원(Greiner Bio-One)(미국 노쓰캐롤라이나주 몬로 소재)으로부터 구입하였다.

[0228] WSU-DLCL2 현탁 세포를 성장 배지(10% 부피/부피 열 불활성화된 태아 소 혈청 및 100 유닛/mL 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 RPMI 1640)에서 유지하고 5% CO_2 하에 37℃에서 배양하였다. 검정 조건 하에, 세포를 5% CO_2 하에 37℃에서 플레이트 진탕기 상의 검정 배지(20% 부피/부피 열 불활성화된 태아 소 혈청 및 100 유닛/mL 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 RPMI 1640)에서 항온처리하였다.

[0229] 검정 배지 중의 WSU-DLCL2 세포를 웰 당 200 μL씩 96-웰 V-바닥 세포 배양 플레이트에 mL 당 50,000개 세포의 농도로 씨딩하였다. 96-웰 공급원 플레이트로부터의 화합물(1 μL)을 V-바닥 세포 플레이트에 직접적으로 첨가하였다. 플레이트를 5% CO2 하에 37℃에서 타이터-플레이트 진탕기 상에서 96시간 동안 항온처리하였다. 4일 동안의 항온처리 후, 플레이트를 241×g에서 5분 동안 회전시키고 세포 펠렛을 교란시키지 않으면서 세포 플레이트의 각각의 웰로부터 배지를 주의하여 흡입하였다. 펠렛을 200 μL의 DPBS에 재현탁하고 플레이트를 241×g에서 5분 동안 다시 회전시켰다. 상청액을 흡입하고 냉각시켰다(4℃). 추출 완충제(100 μL)를 웰마다 첨가하였다. 플레이트를 4℃에서 오비탈 진탕기 상에서 2시간 동안 항온처리하였다. 플레이트를 3427×g×10분으로 회전시켰다. 상청액(웰 당 80 μL)을 96-웰 V-바닥 폴리프로필렌 플레이트의 각각의 웰로 옮겼다. 중화 완충제(5X)(웰 당 20 μL)를, 상청액을 함유하는 V-바닥 폴리프로필렌 플레이트에 첨가하였다. 미정제 히스톤 제제(CHP)를 함유하는 V-바닥 폴리프로필렌 플레이트를 오비탈 진탕기 상에서 5분 동안 항온처리하였다. 미정제 히스톤 제제를, 100 μL의 코팅 완충제(1X PBS + BSA 0.05%(중량/부피))를 함유하는 이중 96-웰 ELISA 플레이트내의 각각의 웰에 첨가하였다(웰 당 2 μL). 플레이트를 밀봉하고 4℃에서 하룻밤 동안 항온처리하였다. 다음날, 플레이트를 웰 당 300 μL의 1X PBST로 3회 세정하였다. 웰을 웰 당 300 μL의 ELISA 희석제(PBS(1X) BSA(2%(중량/부피)) 및 트윈 20(0.05%(부피/부피)))로 차단하였다. 플레이트를 1X PBST로 3회 세정하였다. 히스톤 H3 검출 플레이트의 경우, ELISA 희석제 중에 1:10,000으로 희석된 항-히스톤-H3 항체(애브캄, ab1791)를 웰 당 100 μL씩 첨가하였다. H3K27 트라이메틸화 검출 플레이트의 경우, ELISA 희석제 중에 1:2000으로 희석된 항-H3K27me3을 웰 당 100 μL씩 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 90분 동안 항온처리하였다. 플레이트를 웰 당 300 μL 1X PBST로 3회 세정하였다. 히스톤 H3 검출의 경우, ELISA 희석제 중에 1:6000으로 희석된 HRP-접합된 항-토끼 IgG 항체를 웰 당 100 μL씩 첨가하였다. H3K27me3 검출의 경우, ELISA 희석제 중에 1:4000으로 희석된 HRP-접합된 항-토끼 IgG 항체를 웰 당 100 μL씩 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 90분 동안 항온처리하였다. 플레이트를 웰 당 300 μL의 1X PBST로 4회 세정하였다. TMB 기질을 웰 당 100 μL씩 첨가하였다. 히스톤 H3 플레이트를 실온에서 5분 동안 항온처리하였다. H3K27me3 플레이트를 실온에서 10분 동안 항온처리하였다. 반응을 1 N 황산(웰 당 100 μL)으로 중단하였다. 각각의 플레이트에 대한 흡광도를 450 nm에서 판독하였다.

[0230] 먼저, 각각의 웰에 대한 비를 $\left(\frac{\text{H3K27 me3 OD450 값}}{\text{히스톤 H3 OD450 값}}\right)$ 에 의해 구하였다.

[0231] 각각의 플레이트는 DMSO만으로 처리된 8개의 대조군 웰(최소 억제)뿐만 아니라 최대 억제에 대한 8개의 대조군 웰(배경 웰)도 포함하였다.

[0232] 각각의 대조군 유형에 대한 비 값의 평균을 계산하고 이를 사용하여 플레이트에서 각각의 시험 웰에 대한% 억제를 측정하였다. 25 μM부터 시작하여 총 10개 시험 농도를 위해 시험 화합물을 DMSO로 연속 3배 희석하였다. %

억제를 측정하고, 화합물의 농도 당 이중 웰을 사용하여 IC_{50} 곡선을 발생시켰다. 이 검정에 대한 IC_{50} 값은 하기 표 3에 제시되어 있다.

[0233] $$억제율\ (\%) = 100 - \left(\left(\frac{(개별\ 시험\ 샘플\ 비) - (배경\ 평균\ 비)}{(최소\ 억제\ 비) - (배경\ 평균\ 비)} \right) * 100 \right)$$

[0234] **세포 증식 분석**

[0235] WSU-DLCL2 현탁 세포를 DSMZ(독일 미생물 및 세포 배양물 수집 기관, 독일 브라운슈베이그 소재)로부터 구입하였다. RPMI/글루타맥스 배지, 페니실린-스트렙토마이신 및 열 불활성화된 태아 소 혈청을 라이프 테크놀로지스(미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재)로부터 구입하였다. V-바닥 폴리프로필렌 384-웰 플레이트를 그레이너 바이오-원(미국 노쓰캐롤라이나주 몬로 소재)으로부터 구입하였다. 세포 배양 384-웰 백색 불투명 플레이트를 퍼킨엘머(미국 매사추세츠주 왈쌈 소재)로부터 구입하였다. 세포-타이터 글로(Cell-Titer Glo)®를 프로메가 코포레이션(Promega Corporation)(미국 위스콘신주 매디슨 소재)으로부터 구입하였다. 스펙트라맥스(SpectraMax) M5 플레이트 판독기를 몰레큘라 디바이시스 엘엘씨(Molecular Devices LLC)(미국 캘리포니아주 서니베일 소재)로부터 구입하였다.

[0236] WSU-DLCL2 현탁 세포를 성장 배지(10%(부피/부피) 열 불활성화된 태아 소 혈청으로 보충된 RPMI 1640)에서 유지하고 5% CO_2 하에 37℃에서 배양하였다. 검정 조건 하에, 세포를 5% CO_2 하에 37℃에서 검정 배지(20%(부피/부피) 열 불활성화된 태아 소 혈청 및 100 유닛/mL 페니실린-스트렙토마이신으로 보충된 RPMI 1640)에서 항온처리하였다.

[0237] WSU-DLCL2 세포주의 증식에 대한 화합물의 효과를 평가하기 위해 기하급수적으로 성장하는 세포를 최종 부피 50 μl의 검정 배지 중의 1250개 세포/mL의 밀도로 384-웰 백색 불투명 플레이트에 플레이팅하였다. 10 mM에서 시작하여 DMSO로 삼중 9-점 3배 연속 희석을 수행함으로써 화합물 공급원 플레이트를 제조하였다(검정에서 화합물의 최종 최고 농도는 20 μM이었고 DMSO는 0.2%이었다). 화합물 저장액 플레이트로부터의 100 nl 분취액을 세포 플레이트의 각각의 웰에 첨가하였다. 100% 억제 대조군은 200 nM 최종 농도의 스타우로스포린(staurosporine)으로 처리된 세포로 구성되었고, 0% 억제 대조군은 DMSO로 처리된 세포로 구성되었다. 화합물의 첨가 후, 검정 플레이트를 37℃, 5% CO_2 및 90% 초과의 상대 습도에서 6일 동안 항온처리하였다. 세포 배양물에 존재하는 ATP를 정량하고 35 μl의 세포-타이터 글로® 시약을 세포 플레이트에 첨가함으로써 세포 생존능을 측정하였다. 발광도를 스펙트라맥스 M5에서 판독하였다. 표준화된 용량 반응 곡선의 4-파라미터 피트를 이용하여 세포 생존능을 50%까지 억제하는 농도를 측정하였다. 이 검정에 대한 IC_{50} 값도 하기 표 3에 제시되어 있다.

표 3

[0238]

	EZH2 IC50 퀜티드 v2	Y641F IC50	WSU prolif IC50	WSU ELISA IC50
화합물 I (유리 염기)	0.01299	0.01107	0.369	0.29

[0239] 생체내 연구- SUDHL10 인간 림프종 세포주

[0240] **마우스**

[0241] 암컷 폭스 체이스(Fox Chase) SCID® 마우스(CB17/Icr-Prkdcscid/IcrIcocrl, 베이징 바이탈리버 라보라토리 애니멀 컴퍼니 리미티드(Beijing Vitalriver Laboratory Animal Co., LTD))는 6 내지 8주령이었고 연구 D1일에 16.0 내지 21.1 g 범위 내의 체중(BW)을 가졌다. 상기 동물들에게 물(무균수) 및 방사선 무균화 건조 과립 사료를 임의 공급하였다. 20 내지 22℃(68 내지 72°F) 및 40 내지 60% 습도에서 12시간 명주기를 이용하여 정적 미세절연체에서 옥수수 속대 깔개 위에서 마우스를 사육하였다. 모든 절차는 규제, 축산, 수술 절차, 사료 및 유체 조절 및 수의학적 관리에 대한 실험 동물의 보호 및 사용에 대한 지침서(Guide for Care and Use of Laboratory Animals)의 권장사항을 따랐다.

[0242] **종양 세포 배양액**

[0243] 인간 림프종 세포주 SUDHL10을 DSMZ로부터 입수하여, 100 유닛/mL 페니실린 G 나트륨 염, 100 g/mL 스트렙토마이신 및 10% 우태 혈청을 함유하는 RPMI-1640 배지에서 현탁 배양액으로서 CRO에서 유지시켰다. 세포를 5% CO_2 및 95% 공기의 대기 하에 37℃에서 가습 항온처리기 내의 조직 배양 플라스크에서 배양하였다. 이식을 위해 단지 12 계대 미만의 배양액만을 사용하였다.

[0244] **생체내 종양 이식**

[0245] 중간 대수기 성장 동안 SUDHL10 인간 림프종 세포주를 수거하고, 50% 매트리겔(Matrigel)™(비디 바이오사이언시스(BD Biosciences))이 있는 PBS에 재현탁하였다. 각 마우스는 우측 옆구리에서 1×10^7개 세포(0.2 mL 세포 현탁액)를 피하로 제공받았다. 종양을 2 차원에서 칼리퍼스로 측정하여, 원하는 80 내지 120 mm^3 범위에 도달된 평균 부피로서 성장을 모니터링하였다. 종양 크기(mm^3)를 하기 수학식으로부터 계산하였다:

[0246] $$\text{종양 부피} = \frac{w^2 \times l}{2}$$

[0247] 상기 식에서, w는 종양의 폭(mm)이고 l은 종양의 길이(mm)이다. 1 mg이 1 mm^3의 종양 부피와 동등하다고 가정하여 종양 중량을 추정할 수 있다. 10일 후, 72 내지 256 mm^3의 종양을 가지는 마우스를 평균 종양 부피가 173 내지 179 mm^3인 4개 군(군 당, n=16)으로 분류하였다.

[0248] **시험 물품**

[0249] 화합물 I의 히드로브로마이드를 실온에서 저장하고, 광으로부터 보호하였다. 각 치료일에, 분말을 탈이온수 중의 0.5% 나트륨 카르복시메틸셀룰로스(NaCMC) 및 0.1% 트윈® 80에 현탁함으로써 새로운 화합물 제형을 제조하였다. 탈이온수 중의 비히클, 0.5% NaCMC 및 0.1% 트윈® 80을 사용하여 동일한 스케줄로 대조군을 처리하였다. 투여 전, 제제를 4℃에서 광으로부터 떨어진 장소에 저장하였다.

[0250] **치료 계획**

[0251] 경구 위관영양에 의해 28일 동안 125 내지 500 mg/kg의 화합물 I의 히드로브로마이드의 용량으로 또한 BID(12시간마다 1일 2회) 스케줄로 치료하였다. 각 용량은 0.2 mL/20 g 마우스(10 mL/kg)의 부피로 전달되었고, 개별 동물의 마지막 기록된 체중에 대해 조절되었다. 25일째에, 군 당 가장 작은 종양을 가진 8마리의 마우스를 종양 성장 지연 종점(60일까지 관찰)을 위해 선택하였다. 제28일에 종양 수집을 위해 마지막 투약 후 3시간에 잔류 동물을 안락사시켰다.

[0252] **중간 종양 부피(MTV) 및 종양 성장 억제(TGI) 분석**

[0253] 마지막 치료일에 치료 효능을 측정하였다. 마지막 날에 평가될 수 있는 MTV(n), 즉 동물의 수(n)에 대한 중간 종양 부피를 각각의 군에 대해 측정하였다. % 종양 성장 억제(%TGI)는 여러 방식으로 정의될 수 있다. 먼저, 지정된 대조군의 MTV(n)와 약물 치료군의 MTV(n) 사이의 차이는 대조군의 MTV(n)의 백분율로서 표현된다:

[0254] $$\%TGI = \left(\frac{MTV(n)_{\text{대조군}} - MTV(n)_{\text{치료군}}}{MTV(n)_{\text{대조군}}}\right) \times 100$$

[0255] %TGI를 계산하는 또 다른 방식은 n이 마지막 치료일일 때 1일부터 n일까지 종양 크기의 변화를 고려하는 것이다.

[0256] $$\%TGI = \left(\frac{\Delta MTV_{\text{대조군}} - \Delta MTV_{\text{대조군}}}{\Delta MTV_{\text{대조군}}}\right) \times 100$$

$$\Delta MTV_{\text{대조군}} = MTV(n)_{\text{대조군}} - MTV(1)_{\text{대조군}}$$

$$\Delta MTV_{\text{치료군}} = MTV(n)_{\text{치료군}} - MTV(1)_{\text{치료군}}$$

[0257] **종양 성장 지연 분석**

[0258] 종양 성장 지연 분석을 위해 8마리의 마우스를 마지막 치료일 후에 살아있는 상태로 유지하였다. 종양을 칼리퍼스로 주 당 2회 측정하였고, 시험 동물의 신생물이 2000 mm^3의 종점 부피에 도달한 때 또는 소정의 연구 최종일 중 임의의 빠른 시점에 각 시험 동물을 안락사시켰다. 카플란-메이에르(Kaplan-Meier) 생존 분석을 수행하였다.

[0259] **독성**

[0260] 1일째 날부터 5일째 날까지 동물들의 체중을 매일 측정한 후, 연구 완결 시까지 주 당 2회 측정하였다. 문서화될 수 있는 임의의 불리한 치료 관련 부작용의 명시적 징후에 대해 마우스를 빈번하게 검사하였다. 최대 내인용량(maximum tolerated dose; MTD)에 대한 허용되는 독성은 시험 동안 20% 미만의 군 평균 BW 손실 및 TR 사망으로 인한 10% 이하의 사망률로서 정의되었다. 사망이 임상 징후 및/또는 부검에 의해 입증된 치료 부작용에 기인할 수 있거나 투약 기간 동안 비공지된 원인으로 인한 것인 경우 상기 사망은 TR로서 분류되었다. 사망이 치료 부작용과 관련되지 않는다는 증거가 존재하는 경우 상기 사망은 NTR로서 분류되었다. 투약 기간 동안의 NTR 사망은 전형적으로 (우연 또는 인간 오류로 인한) NTRa 또는 (부검으로 확인된 침윤 및/또는 전이에 의한 종양 퍼짐으로 인한) NTRm으로서 분류될 것이다. 투약 기간 동안 비공지된 원인으로 인해 사망하는 경구 치료된 동물들은 군 성능이 TR 분류 및 부검을 뒷받침하지 않는 경우 투약 오류(실현가능하지 않음)를 배제하기 위해 NTRu로서 분류될 수 있다.

[0261] **샘플링**

[0262] 28일째에 최대 종양을 가지는 8마리의 마우스를 소정의 방식으로 샘플링하여, 종양에서의 표적 억제를 평가하였다. RNAse 부재 조건 하에 특정된 마우스로부터 종양을 수거하고 이등분하였다. 각 동물로부터의 동결 종양 조직을 액체 N_2 중에 급속 동결시키고, 막자사발과 막자로 분쇄하였다.

[0263] **통계 및 그래픽 분석**

[0264] 윈도우용 프리즘 3.03(그래프패드)을 사용하여 모든 통계 및 그래픽 분석을 수행하였다. 전체 치료 기간 과정에 걸쳐 대조군과 치료군 사이의 통계적 유의성을 검정하기 위해, 반복 측정 ANOVA 시험 및 이에 이은 던넷(Dunnets) 다중 비교 사후 시험을 이용하였다. 프리즘은 결과를 $P > 0.05$에서 비유의한(ns) 결과, $0.01 < P < 0.05$에서 유의한 결과(부호 "*"로 표시됨), $0.001 < P < 0.01$에서 매우 유의한 결과("**") 및 $P < 0.001$에서 극도로 유의한 결과("***")로서 보고한다. 연구의 종양 성장 지연 팔에 대해, 연구에서 남아있는 각 군 내의 동물의 백분율 대 시간을 카플란-메이에르(Kaplan-Meier) 생존 도표로 제시하였다.

[0265] **히스톤 추출**

[0266] 히스톤 단리를 위해, 60 내지 90 mg의 종양 조직을 1.5 ml의 핵 추출 완충제(10 mM 트리스-HCl, 10 mM $MgCl_2$, 25 mM KCl, 1% 트리톤 X-100, 8.6% 수크로스 및 로슈 프로테아제 억제제 정제 1836145)에서 균질화하고, 얼음 상에서 5분 동안 항온처리하였다. 4℃에서 600 g로 5분 동안 원심분리하여 핵을 수집하고 PBS로 1회 세정하였다. 상청액을 제거하고 15분마다 볼텍싱하면서 0.4 N의 냉각된 황산을 사용하여 히스톤을 1시간 동안 추출하였다. 4℃에서 10000 g로 10분 동안 원심분리하여 추출물을 정화하고 10배 부피의 빙냉 아세톤을 함유하는 새로운 미세원심분리기 튜브로 옮겼다. 히스톤을 -20℃에서 2시간 동안 내지 하룻밤 동안 석출시키고 10000 g로 10분 동안 원심분리하여 펠렛화하고 물에 재현탁하였다.

[0267] **ELISA**

[0268] 히스톤을 코팅 완충제(PBS+0.05% BSA)에서 동등한 농도로 제조하여 0.5 ng/μl의 샘플을 발생시키고, 100 μl의 샘플 또는 표준물을 2개의 96-웰 ELISA 플레이트(써모 랩시스템스(Thermo Labsystems), 이뮬론 4HBX #3885)에 이중으로 첨가하였다. 플레이트를 밀봉하고 4℃에서 하룻밤 동안 항온처리하였다. 다음 날, 플레이트를 바이오텍 플레이트 세정제 상에서 300 μl/웰 PBST(PBS + 0.05% 트윈 20; 10X PBST, KPL #51-14-02)로 3회 세정하였다. 플레이트를 300 μl/웰의 희석제(PBS + 2% BSA + 0.05% 트윈 20)로 차단하고 실온에서 2시간 동안 항온처리하고 PBST로 3회 세정하였다. 모든 항체들을 희석제로 희석하였다. 100 μl/웰의 항-H3K27me3(CST #9733, 50% 글리세롤 저장액 1:1,000) 또는 항-총 H3(애브캄 ab1791, 50% 글리세롤 1:10,000)을 각각의 플레이트에 첨가하였다. 플레이트를 실온에서 90분 동안 항온처리하고 PBST로 3회 세정하였다. 100 μl/웰의 항-Rb-IgG-HRP(셀 시그날링 테크놀로지, 7074)를 H3K27Me3 플레이트에 1:2,000으로 첨가하고 H3 플레이트에 1:6,000으로 첨가하고 실온에서 90분 동안 항온처리하였다. 플레이트를 PBST로 4회 세정하였다. 검출을 위해, 100 μl/웰의 TMB 기질

(바이오에프엑스 레이보레이토리스(BioFx Laboratories), #TMBS)을 첨가하고 플레이트를 실온에서 암실 내에서 5분 동안 항온처리하였다. 반응을 100 μl/웰의 1 N H_2SO_4으로 중단시켰다. 450 nm에서의 흡광도를 스펙타맥스 M5 마이크로플레이트 판독기 상에서 판독하였다.

[0269] **결과:**

[0270] SUDHL10 종양 이종이식을 가지는 마우스를, 500 mg/kg BID의 최대 내인 용량 및 MTD(½ 및 ¼ MTD)의 분율로 화합물 I의 히드로브로마이드로 치료하였다. 어떠한 유의적 체중 손실 없이 28일 동안 모든 용량을 잘 견뎠다. 투약 오차로 인해 15일째에 500 mg/kg 군에서 한 비치료 관련 사망이 있었다. 모든 용량들은 28일째에 비히클에 비해 종양 성장 억제를 유발하였고(표 4), 250 mg/kg 및 500 mg/kg BID 군은 퇴행을 유도하였다(TGI > 100%).

표 4

SUDHL10 이종이식에서의 화합물 I의 히드로브로마이드에 의해 유도되는 종양 성장 억제 값의 요약

[0271]

군	1일째로부터의 TGI %	8일째로부터의 TGI %
125 mg/kg BID	54	57
250 mg/kg BID	101	113
500 mg/kg BID	104	115

[0272] 도 12A는 상이한 처리 군들에 대한 경시적 SUDHL10 이종이식 종양의 성장을 도시한다. 125 mg/kg BID 군은 반복 측정 ANOVA 및 던넷 사후 시험에 의해 비히클과 통계적으로 상이하지 않았으나, 28일째의 평균 말단 종양 크기는 비히클 군에서의 것보다 유의적으로 더 작았다(본페로니(Bonferroni) 사후 시험과 함께 2원 ANOVA, $p<0.0001$). 28일 동안의 화합물 I의 히드로브로마이드의 250 mg/kg BID 및 500 mg/kg BID의 투약은, 28일째의 최종 종양 중량이 그 2개 군의 것과 유사한 바, 필적하는 퇴행을 유도하였다.

[0273] 28일째에 (마지막 투약 후 3시간에) 수거된 종양으로부터 단리된 히스톤을 전반적 H3K27me3 수준에 대해 ELISA 분석에 적용하였다. 도 13은 화합물 I의 히드로브로마이드에 의한 처리를 이용한 H3K27me3 메틸 마크의 명료한 용량 의존적 하향 제어를 도시한다. 이 도면은 28일 동안 화합물 I의 히드로브로마이드로 처리한 마우스로부터의 SUDHL10 종양에서의 전반적 H3K27me3 메틸화를 도시한다.

[0274] 25일째에, 최소의 종양을 가진 군 당 8마리의 마우스를 28일째의 투약 중단 후 종양의 재성장을 평가하기 위한 종양 성장 지연 연구를 위해 선택하였다. 그 종양이 2000 mm^3의 종점 부피에 도달한 때 또는 60일째(이 중 임의의 빠른 시점)에 마우스를 안락사시켰다. 이 데이터를 사용하여, 카플란-메이에르 생존 분석을 수행하였다. 도 14A는 종양 재성장이 명료히 용량 의존적이고 28일 동안 500 mg/kg BID의 최고 용량으로 치료한 모든 마우스들은 60일까지 생존하였다. 60일째 전에 250 mg/kg 군에서 단지 2마리의 마우스만을 안락사시켰다. 125 mg/kg 군 내의 마우스들은 15.5일의 평균 생존율 증가율로, 비히클 처리 군에 비해 명료한 생존 이익을 가졌다(도 14B).

[0275] 화합물 I의 히드로브로마이드의 파이퍼(Pfeiffer) 인간 미만 대형 B-세포 림프종 마우스 이종이식 모델에 대한 항암 효과

[0276] 화합물 I의 모노히드로브로마이드를 인간 미만 대형 B-세포 림프종 이종이식 모델인 파이퍼 마우스 이종이식 모델에서의 그 항암 활성에 대해 시험하였다. 5주령 NSG 마우스(잭슨 랩스(Jackson Labs), 미국 메인주 바 하버 소재)의 암컷에 20 내지 25 mg 종양 단편을 피하 이식하였다. 평균 종양이 대략 365 mm^3에 도달한 때인, 종양 이식 후 대략 31일 시점에 치료를 시작하였다. 치료 스킴이 표 5에 기재되어 있다.

표 5

투약 스킴

군	동물의 수	처리	경로 및 스케줄
A	9	비히클 (0.5% 메틸 셀룰로스, 0.1% 트윈-80)	PO; qdx28
B	9	34.2 mg/kg 화합물 I (HBr 염)	PO; qdx28
C	9	114 mg/kg 화합물 I (HBr 염)	PO; qdx28
D	9	342 mg/kg 화합물 I (HBr 염)	PO; qdx28
E	9	1140 mg/kg 화합물 I (HBr 염)	PO; qdx12[§]

§ 화합물 내인성 문제로 인해, 이 군에 대해 단지 12회 일일 용량만을 투입하였다.

[0277]

[0278] 실험 내내 종양 부피를 추적하였다. 실험 개시 후 주 당 2회 종양 부피를 측정하였다. 장형 타원체(prolate ellipsoid)의 부피에 대한 식 $(L\times W^2)/2$(여기서, L 및 W는 각기 직교 길이 값(mm) 및 폭 측정값(mm)임)에 의해 캘리퍼스 측정으로부터 종양 부담($mg=mm^3$)을 계산하였다.

[0279] 1일은 첫 치료 일자이고, 28일은 최종 치료 일자이다. 마지막 투약 후 36일째에 상기 연구를 종료하여, 64일은 연구 종료 일자이다. 이 연구에서 효능을 평가하기 위해 사용되는 원발성 종점은 완전 종양 퇴행(CR), 군들 간의 종양 크기 및 연구 종료 시의 종양 억제율 %이다. 완전 반응은 연구 종료 시에 종양 크기가 검출불가능한 크기(<20 mm^3)로 감소되는 것으로 정의되었다. 종양 억제율 %에 대한 값을 식 $[1-(\Delta T/\Delta C)]\times 100$(여기서, ΔT 및 ΔC는 각 처리군(T) 및 비히클 대조군(C)에 대한 평균 종양 부피의 변화(Δ 성장)임)으로부터 계산하였다. T_0 및 C_0(첫 번째 투약하기 하루 전 날)를 출발 종양 부피에 사용하였다. 또한, 마지막 투약으로부터 하루 후에 취한 종양 부피(T_{29} 및 C_{29})를 ΔT 및 ΔC의 억제를 위해 사용하였다. 그 값이 100% 초과이면, 그것은 100%인 것으로 결론내렸다. 종양 억제율 % 계산에 사용되는 식이 이하에 나와 있다.

[0280] $$\text{종양 억제율 \%} = \left[1 - \frac{T_{29} - T_0}{C_{29} - C_0}\right] \times 100\ \%$$

[0281] 처리 기간 중에, 동물은 1142 mg/kg 화합물 I의 히드로브로마이드의 일일 처리를 인내할 수 없고, 이 군(군 E) 내의 3마리의 동물은 20% 초과의 기준선 체중 손실로 인해 처리 첫 째 주 후 안락사를 필요로 함이 밝혀졌다. 그러므로, 12 투약 후에 이 군에 대한 약물 투여를 중단하였다. 군 D 내의 한 동물(342 mg/kg 화합물 I의 히드로브로마이드)을 제외한 다른 세 투약 군 내의 동물들은 모두 최소의 체중 손실만 있고 28일 처리를 잘 견뎠다. 상대적 마우스 체중에 대한 그래프가 도 15에 나와 있다. 0일째에 얻어진 동물 체중을 그래프의 기준선 체중으로 사용하였다.

[0282] 화합물 I의 히드로브로마이드는 4개의 투약 군 중 3개 군에서 100%의 CR 속도로 파이퍼 모델에 있어 강하고 오래 지속되는 항암 활성을 나타냈다(표 6). 또한, 처리 중지 후 36일에도 종양 재성장이 관찰되지 않았다. 이는 종양 세포가 처리 도중에 사멸되었음을 제시한다. 최저 용량을 가지는 군(군 B, 34.2 mg/kg)에서 종양 재성장이 관찰되었으나, 처리 도중에 명료한 종양 정체 활성이 관찰되었다(도 16). 종양은 단지 처리 중지 시에 성장하기 시작했다(도 16). 이 결과도 또한 군 B에서 관찰되는 종양 정체 활성이 실제로 시험 물품-유도 활성임을 제시한다.

표 6

결과 요약 표

군	처리	CR	TV (평균 ± 표준편차)	종양 억제율 %	P 값: €
A	비히클	0	2882±2190	n/a	n/a
B	34.2 mg/kg 화합물 1 (HBr)	0	497±287	93%	P<0.05
C	114 mg/kg 화합물 1 (HBr)	9	0	100%	P<0.05
D	342 mg/kg 화합물 1 (HBr)	8£	0	100%	P<0.05
E	1140 mg/kg 화합물 1 (HBr)	6¥	0	100%	P<0.05

€ 분산의 일원 분석(ANOVA) 및 이에 이은 던넷 다중 비교 시험
(프리즘(Prism) 소프트웨어 버전 5.02, 미국 캘리포니아 레이크 포레스트 소재)

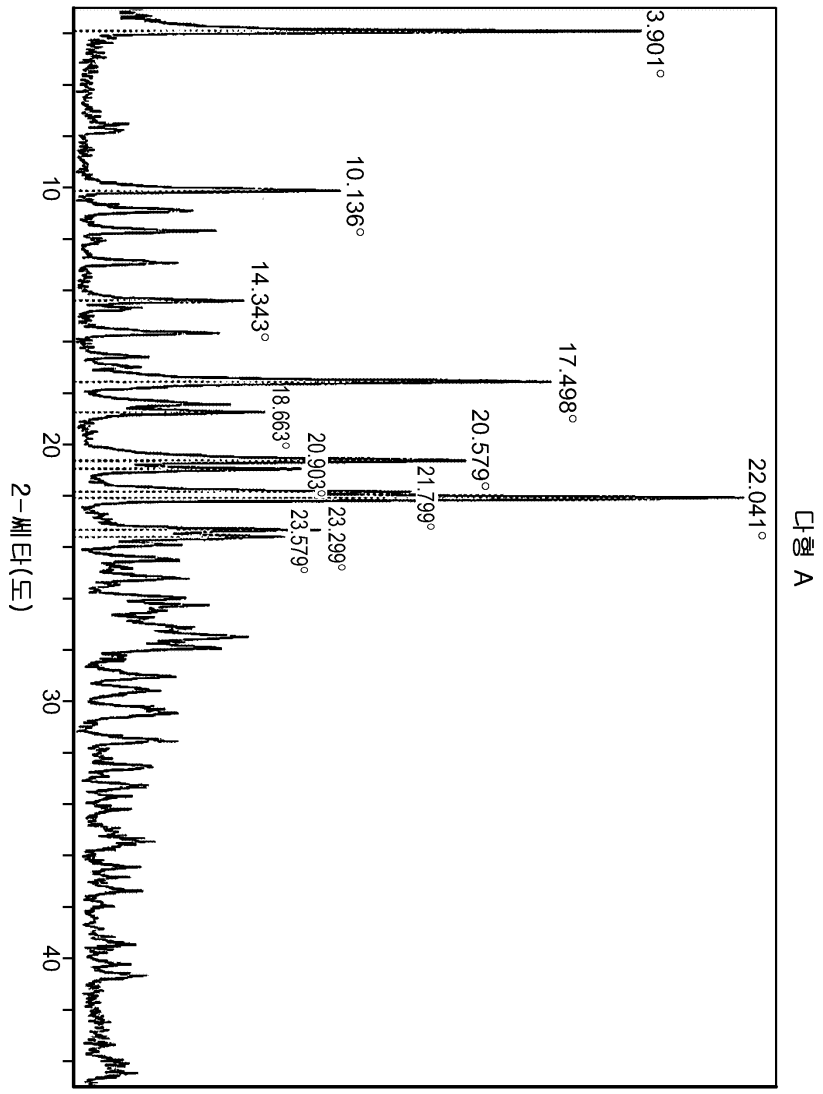
£ 저체중으로 인해 36일째에1동물을 안락사시켰다.

¥ 개별적으로 저체중으로 인해 7, 9 및 11일째에3동물을 안락사시켰다.

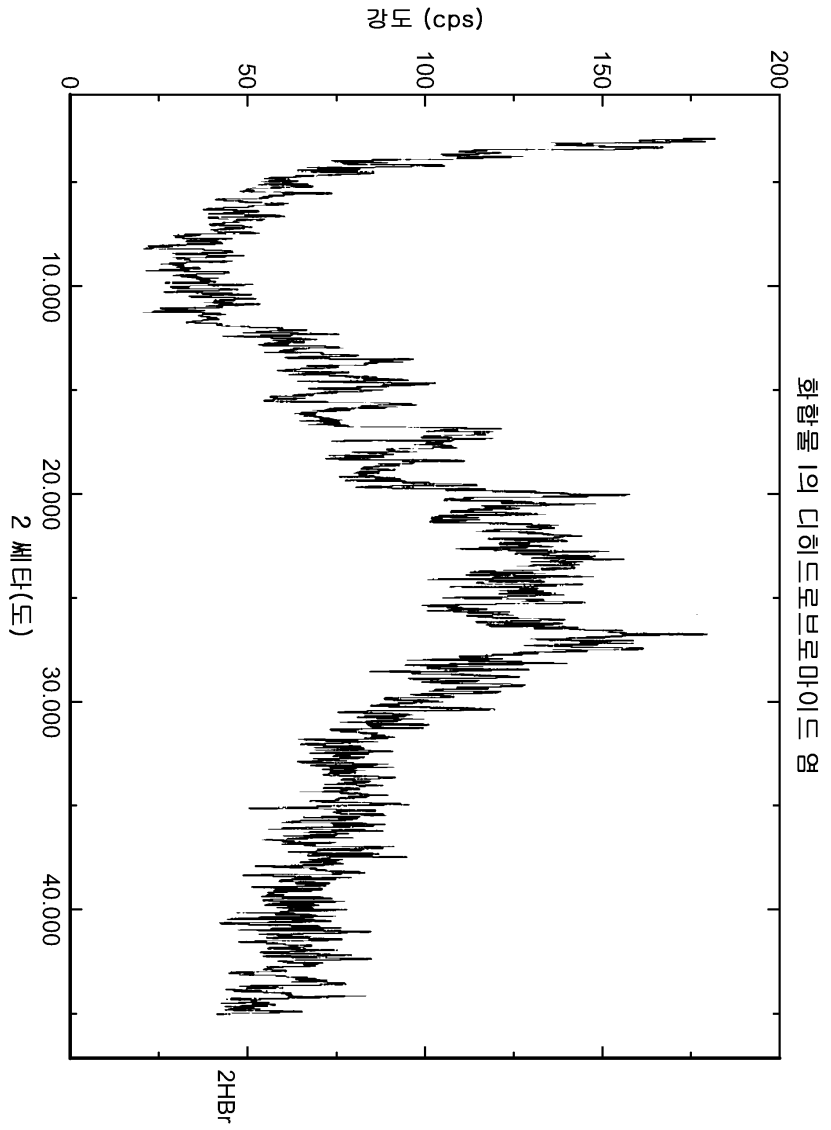
[0283]

도면

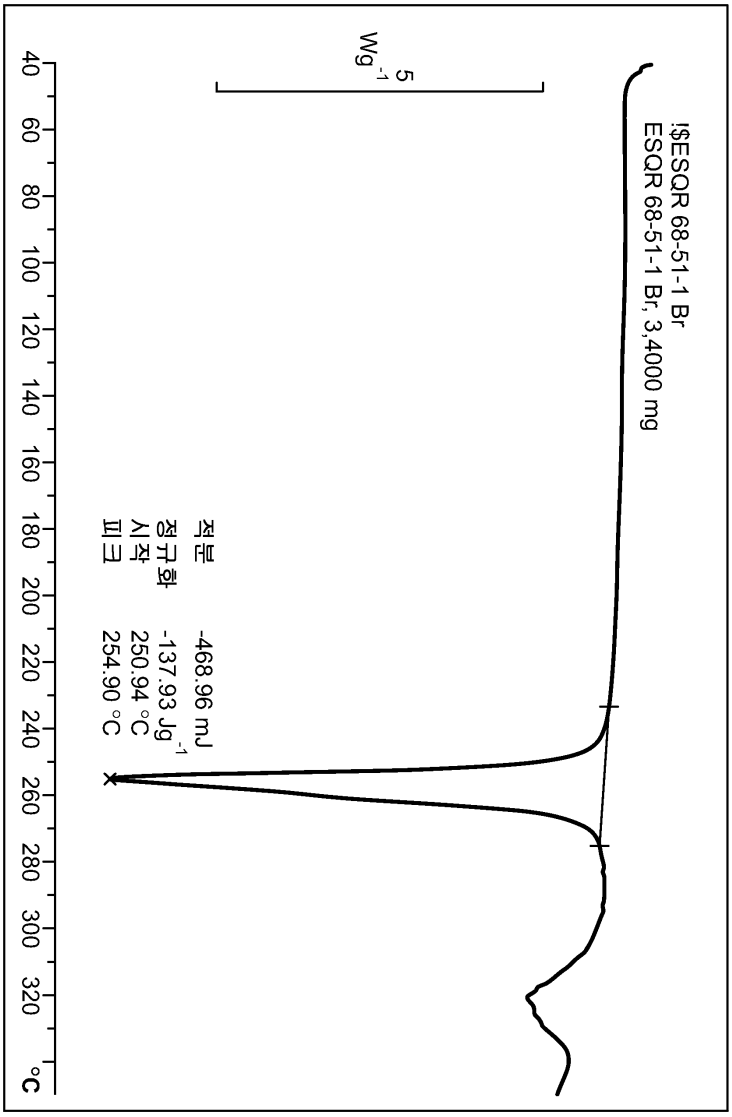
도면1


3.901°
10.136°
14.343°
17.498°
18.663°
20.579°
20.903°
21.799°
22.041°
23.299°
23.579°
10
20
30
40
2-세타(도)
다형 A

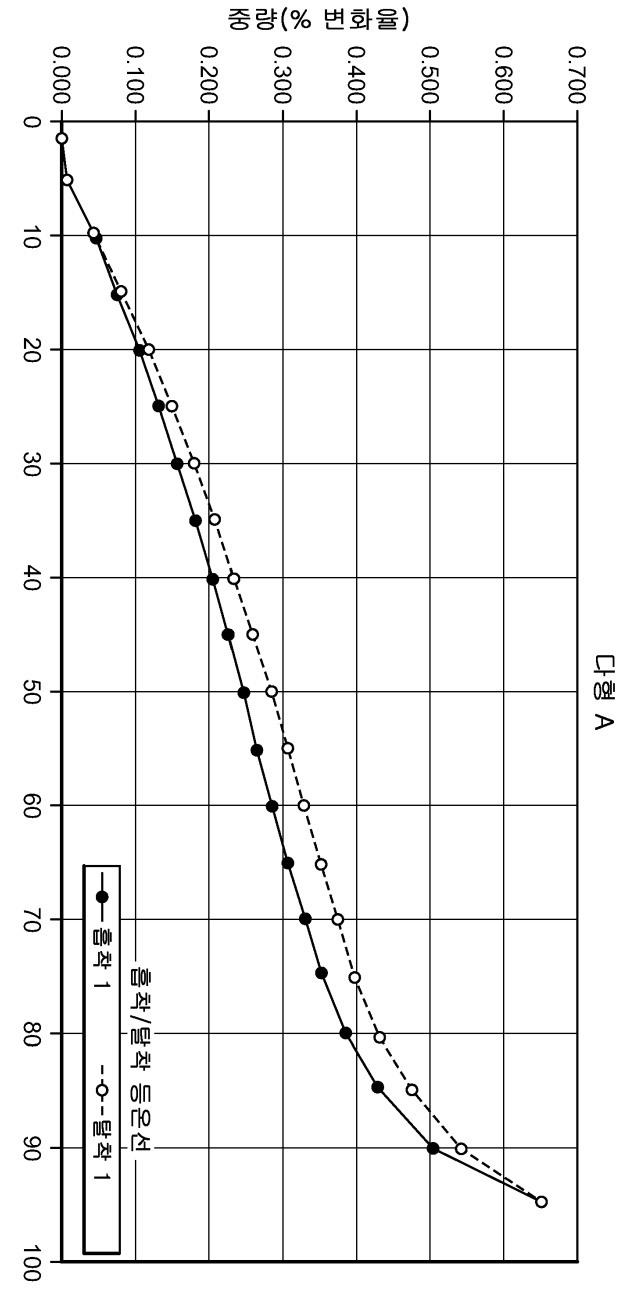
도면2


강도 (cps)
0
50
100
150
200
10.000
20.000
30.000
40.000
2 세타(도)
2HBr
화합물 I의 디히드로브로마이드 염

도면3


!$ESQR 68-51-1 Br
ESQR 68-51-1 Br, 3,4000 mg
5
Wg-1
적분 -468.96 mJ
정규화 -137.93 Jg-1
시작 250.94 °C
피크 254.90 °C
다형 A
40 60 80 100 120 140 160 180 200 220 240 260 280 300 320
°C

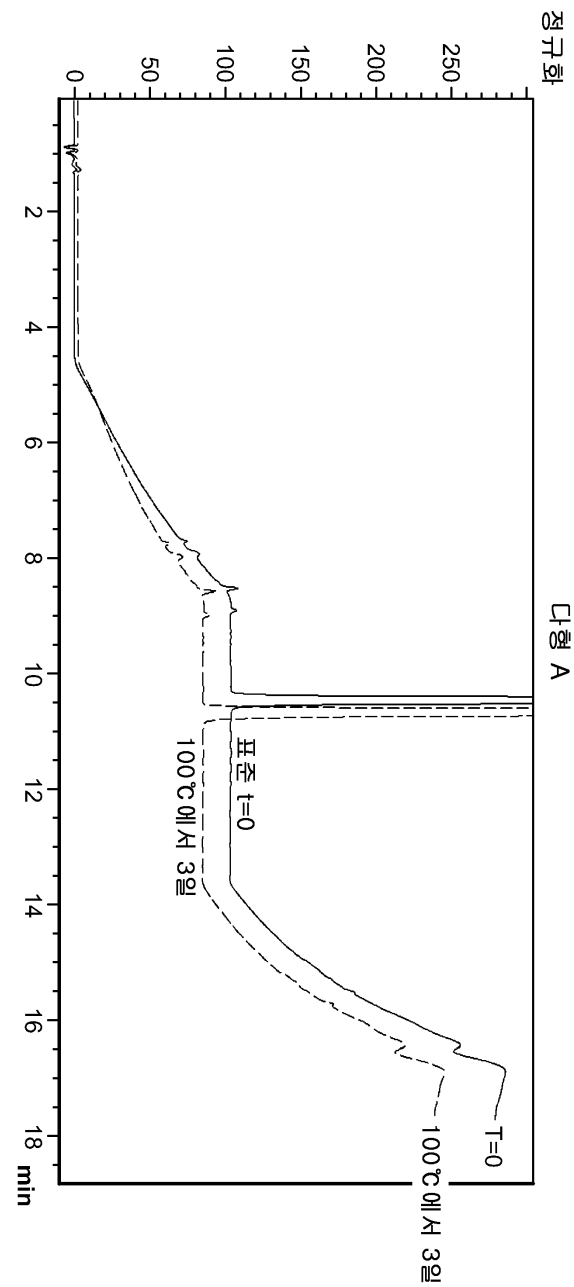
도면4


중량(% 변화율)
0.000
0.100
0.200
0.300
0.400
0.500
0.600
0.700
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
다형 A
흡착/탈착 등온선
흡착 1
탈착 1

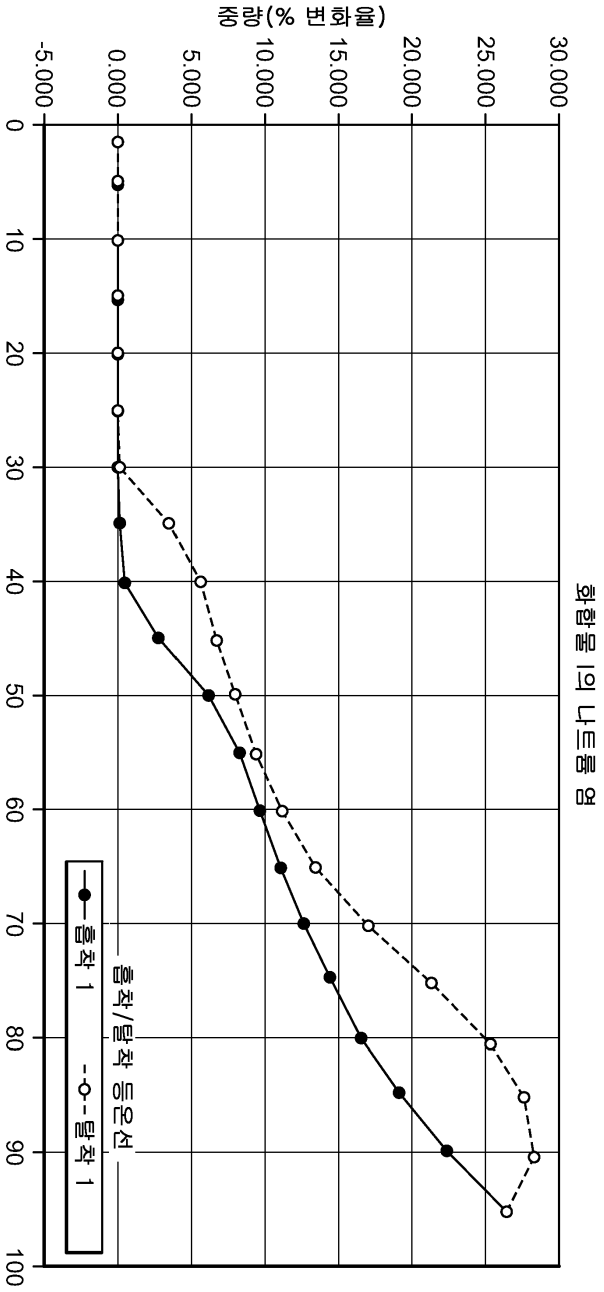
도면5

시간	t=0	t=16 h	t=24 h	t=3 일
유리 엽기 중량%	100.0	98.6	97.5	94.0
HBr 중량%	100.0	99.1	97.7	98.3

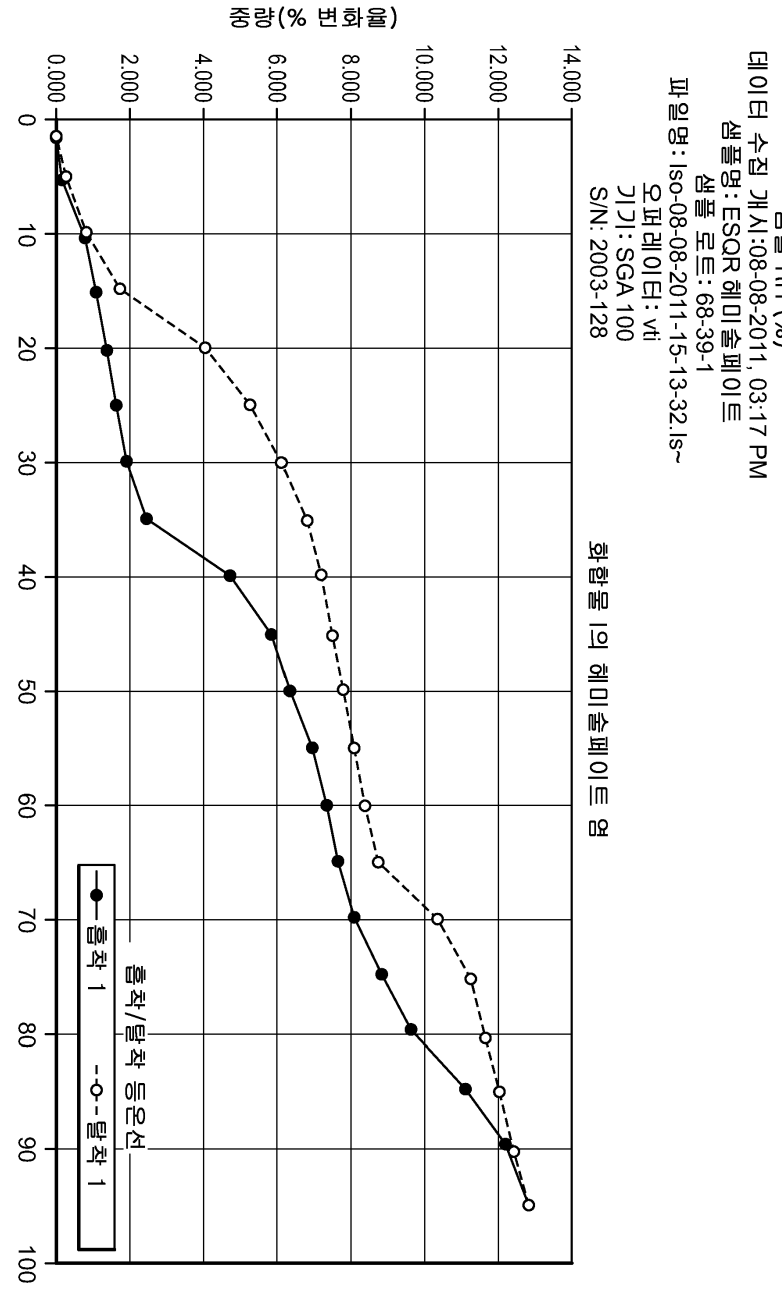
시간	t=0	t=16 h	t=24 h	t=3 일
유리 엽기 중량%	98.3	97.9	97.9	97.3
HBr 면적%	98.8	98.6	98.5	98.5



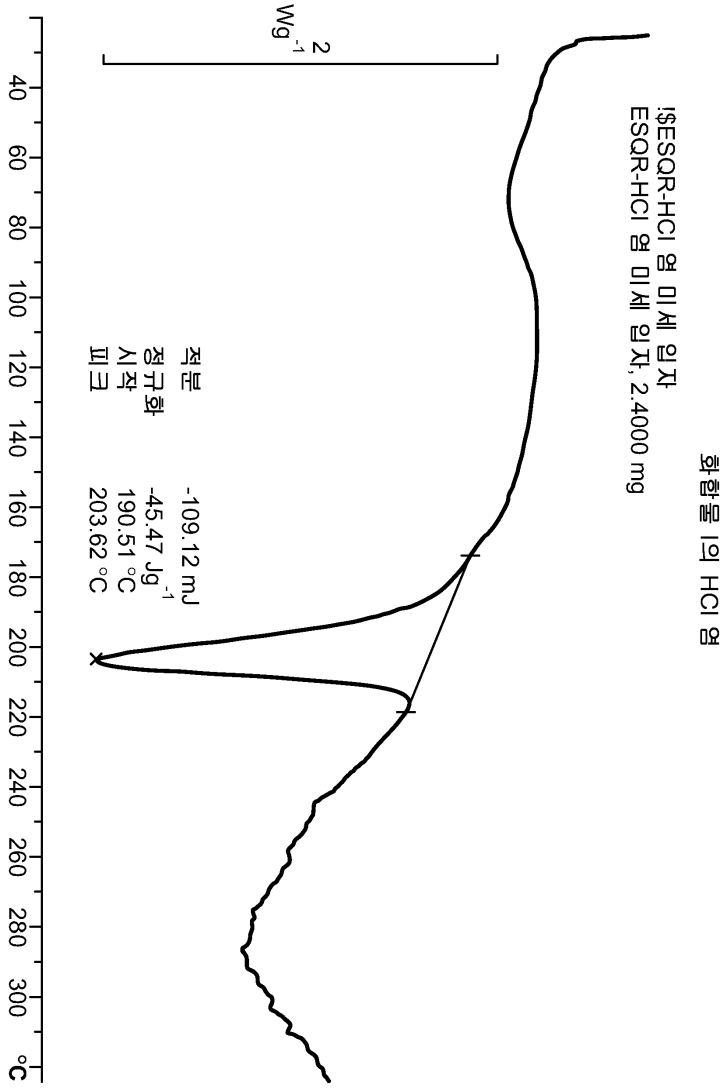
도면6


중량(% 변화율)
-5.000
0.000
5.000
10.000
15.000
20.000
25.000
30.000
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
화합물의 나트륨염
흡착/탈착 등온선
흡착 1
탈착 1

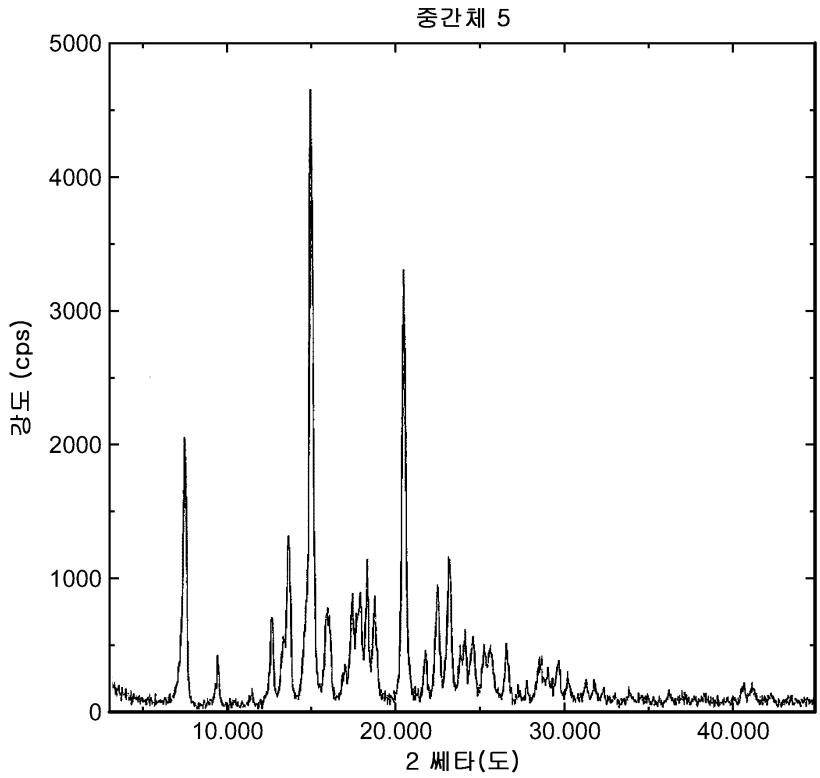
도면7


샘플 RH (%)
데이터 수집 개시:08-08-2011, 03:17 PM
샘플명: ESQR 헤미셀룰페이트
샘플 로트: 68-39-1
파일명: Iso-08-08-2011-15-13-32.Is~
오퍼레이터: vti
기기: SGA 100
S/N: 2003-128
화합물 I의 헤미셀룰페이트 염
중량(% 변화율)
0.000
2.000
4.000
6.000
8.000
10.000
12.000
14.000
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
흡착/탈착 등온선
흡착 1
탈착 1

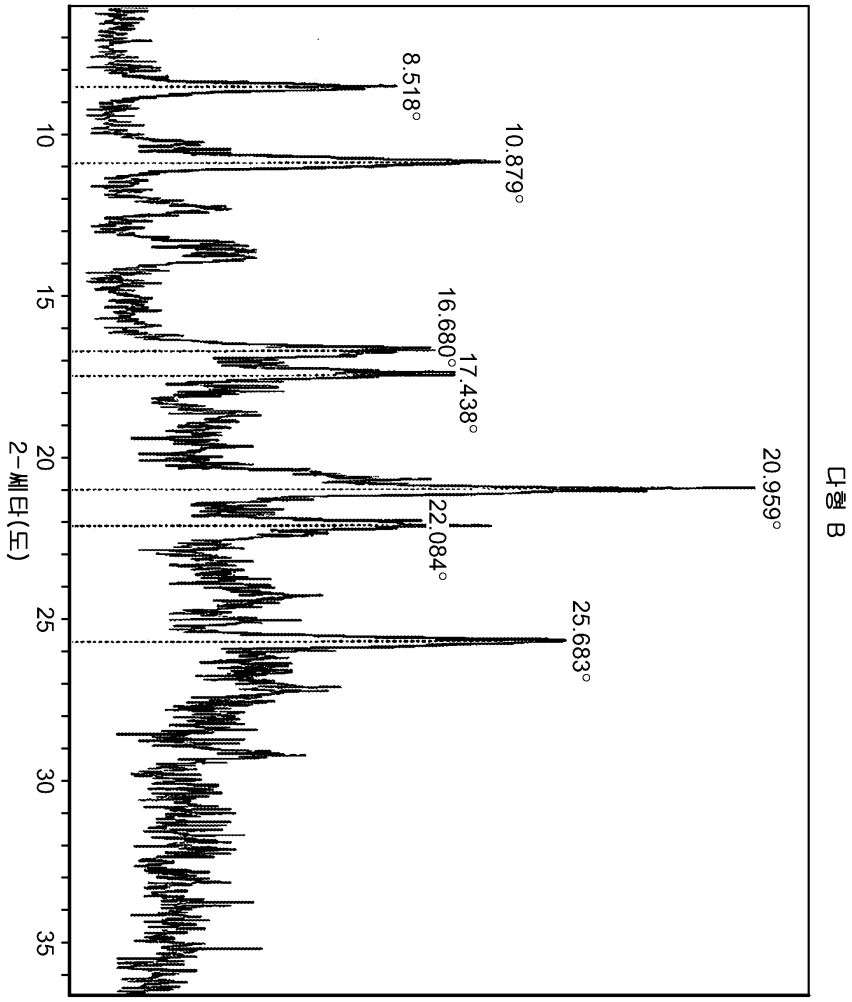
도면8


화합물 I의 HCl 염
!$ESQR-HCl 염 미세 입자
ESQR-HCl 염 미세 입자, 2.4000 mg
2
Wg-1
적분
정규화
시작
피크
-109.12 mJ
-45.47 Jg-1
190.51 °C
203.62 °C
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
260
280
300
°C

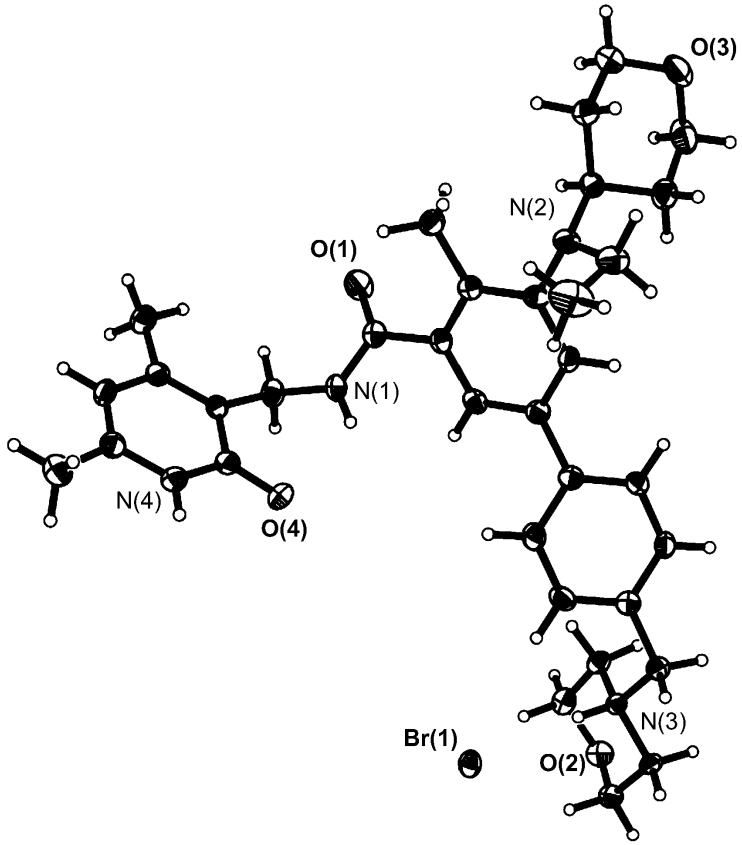
도면9


중간체 5
5000
4000
3000
2000
1000
0
강도 (cps)
10.000
20.000
30.000
40.000
2 쎄타(도)

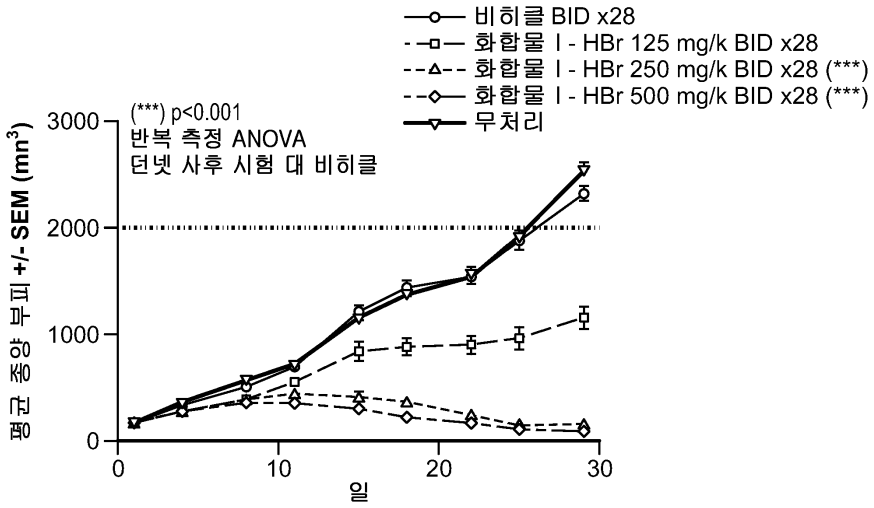
도면10


다형 B
8.518°
10.879°
16.680°
17.438°
20.959°
22.084°
25.683°
10
15
20
25
30
35
2-세타(도)

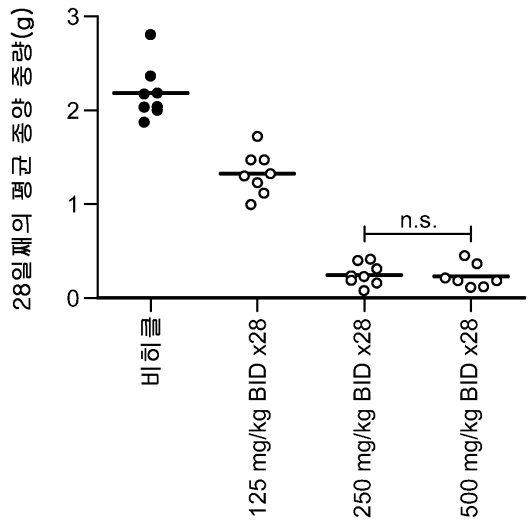
도면11


O(3)
N(2)
O(1)
N(1)
N(4)
O(4)
N(3)
Br(1)
O(2)

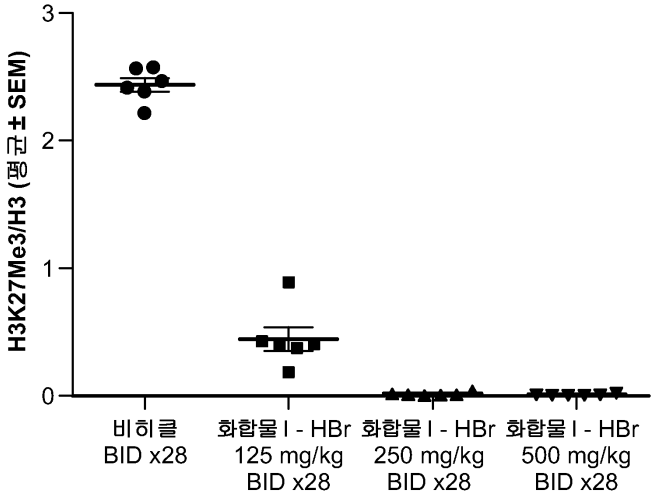
도면12a


비히클 BID x28
화합물 I - HBr 125 mg/k BID x28
화합물 I - HBr 250 mg/k BID x28 (***)
화합물 I - HBr 500 mg/k BID x28 (***)
무처리
(***) p<0.001
반복 측정 ANOVA
던넷 사후 시험 대 비히클
평균 중앙 부피 +/- SEM (mm3)
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
일

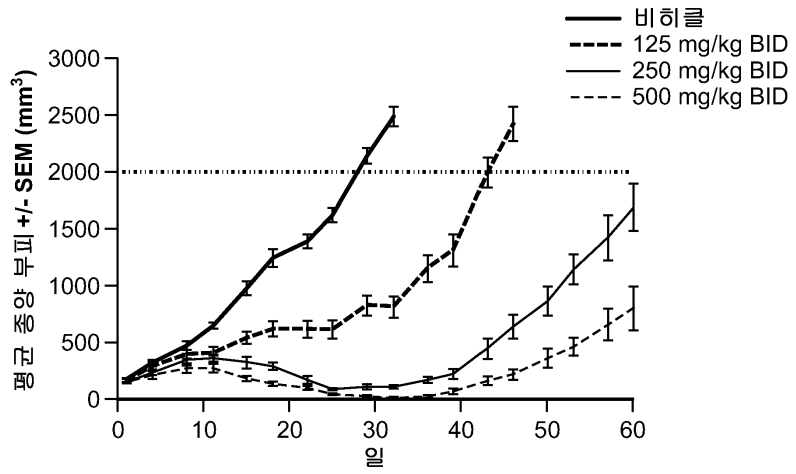
도면12b


28일째의 평균 종양 중량(g)
3
2
1
0
n.s.
비히클
125 mg/kg BID x28
250 mg/kg BID x28
500 mg/kg BID x28

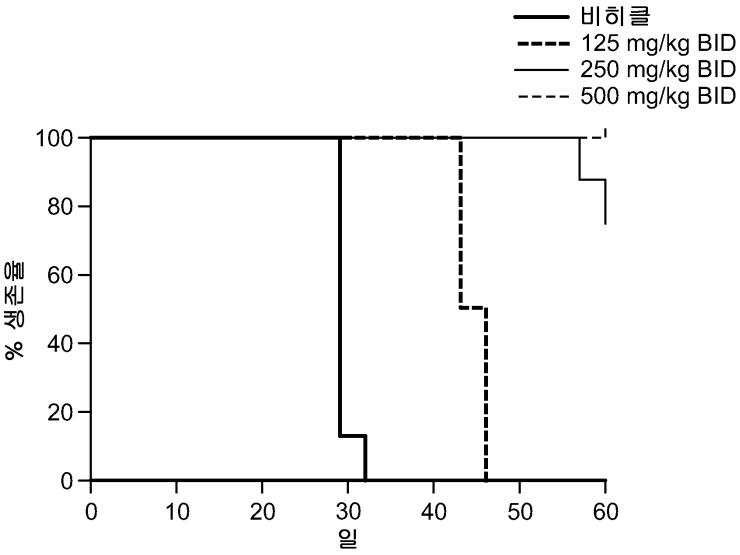
도면13


H3K27Me3/H3 (평균 ± SEM)
3
2
1
0
비히클
BID x28
화합물 I - HBr
125 mg/kg
BID x28
화합물 I - HBr
250 mg/kg
BID x28
화합물 I - HBr
500 mg/kg
BID x28

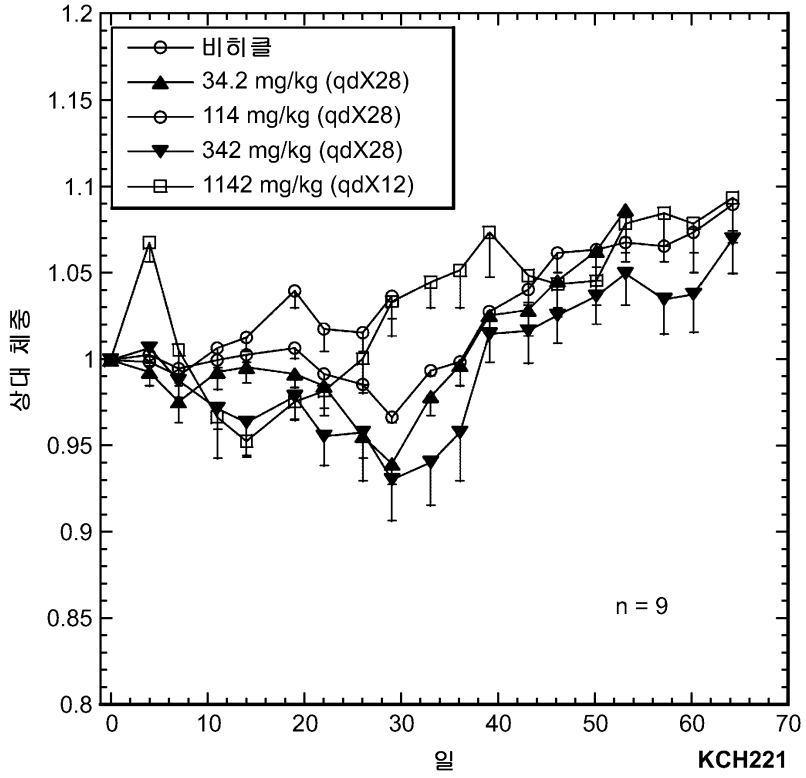
도면14a


비히클
125 mg/kg BID
250 mg/kg BID
500 mg/kg BID
평균 종양 부피 +/- SEM (mm3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
일

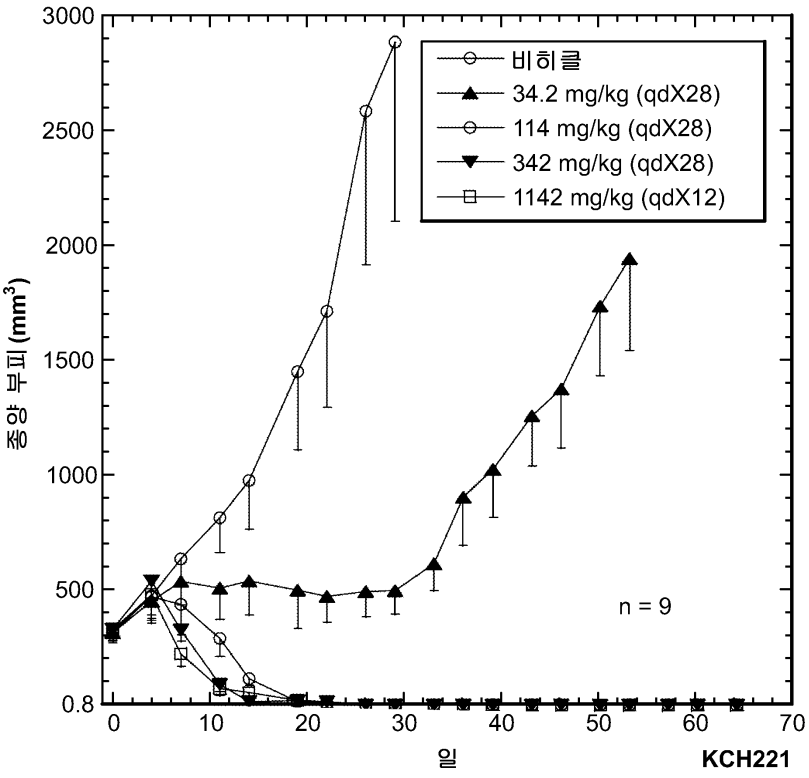
도면14b


비히클
125 mg/kg BID
250 mg/kg BID
500 mg/kg BID
% 생존율
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
일

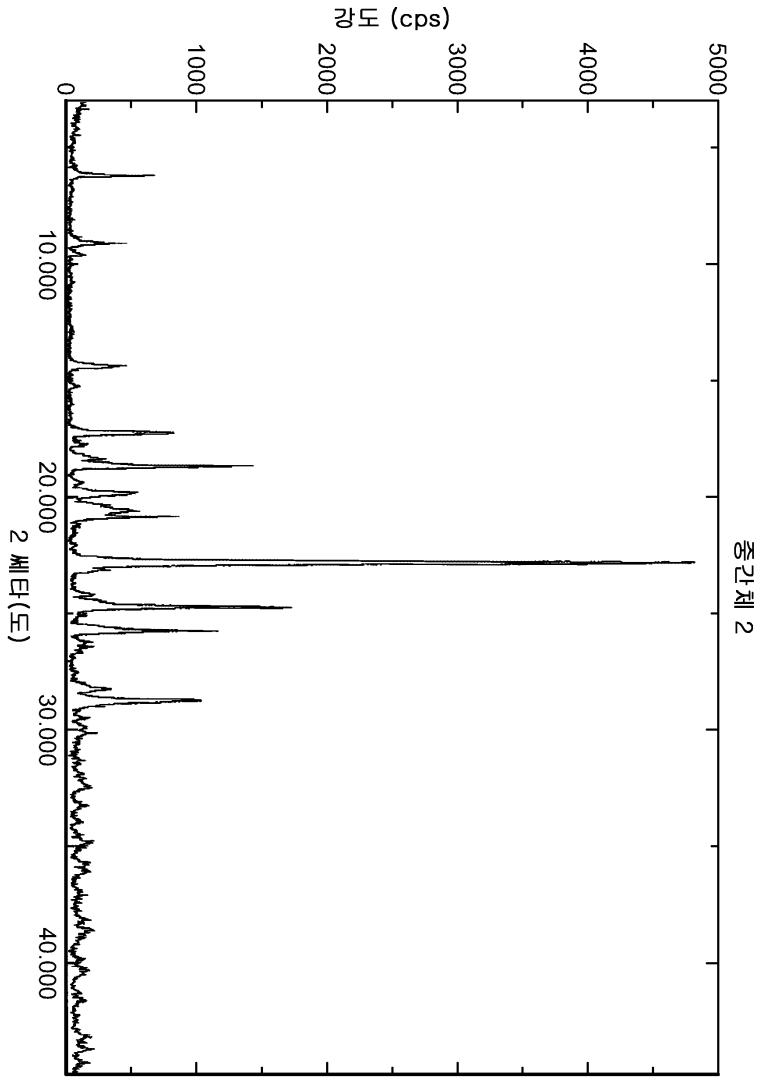
도면15


비히클
34.2 mg/kg (qdX28)
114 mg/kg (qdX28)
342 mg/kg (qdX28)
1142 mg/kg (qdX12)
상대 체중
일
n = 9
KCH221

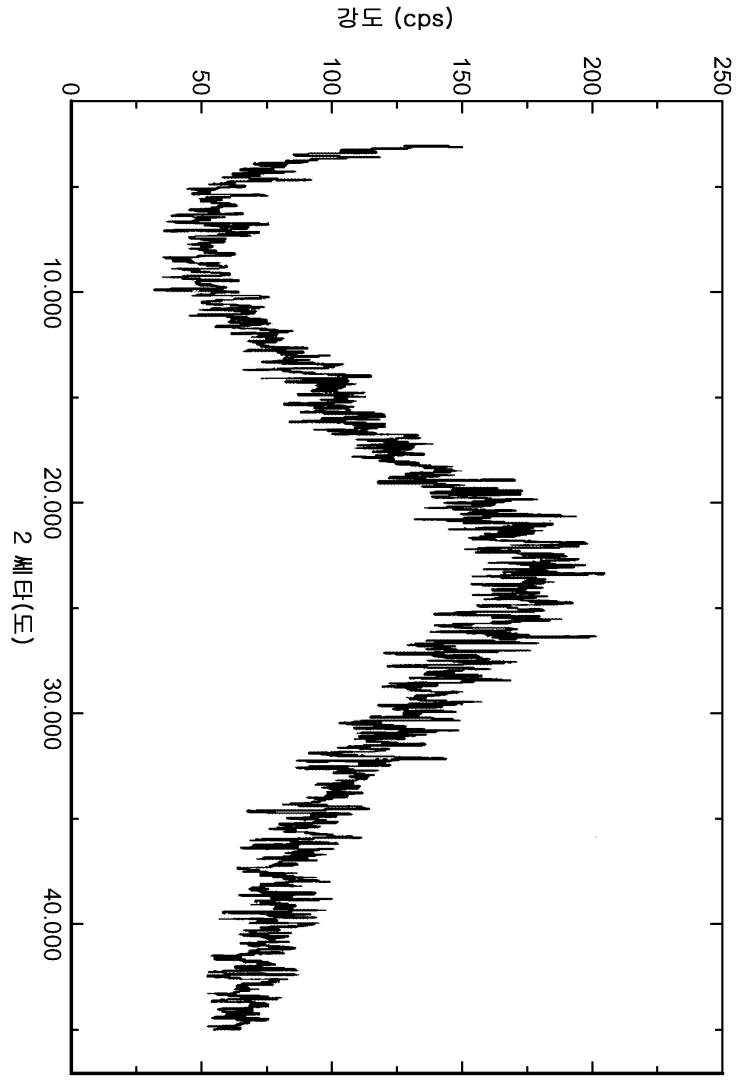
도면16


비히클
34.2 mg/kg (qdX28)
114 mg/kg (qdX28)
342 mg/kg (qdX28)
1142 mg/kg (qdX12)
종양 부피 (mm3)
일
n = 9
KCH221

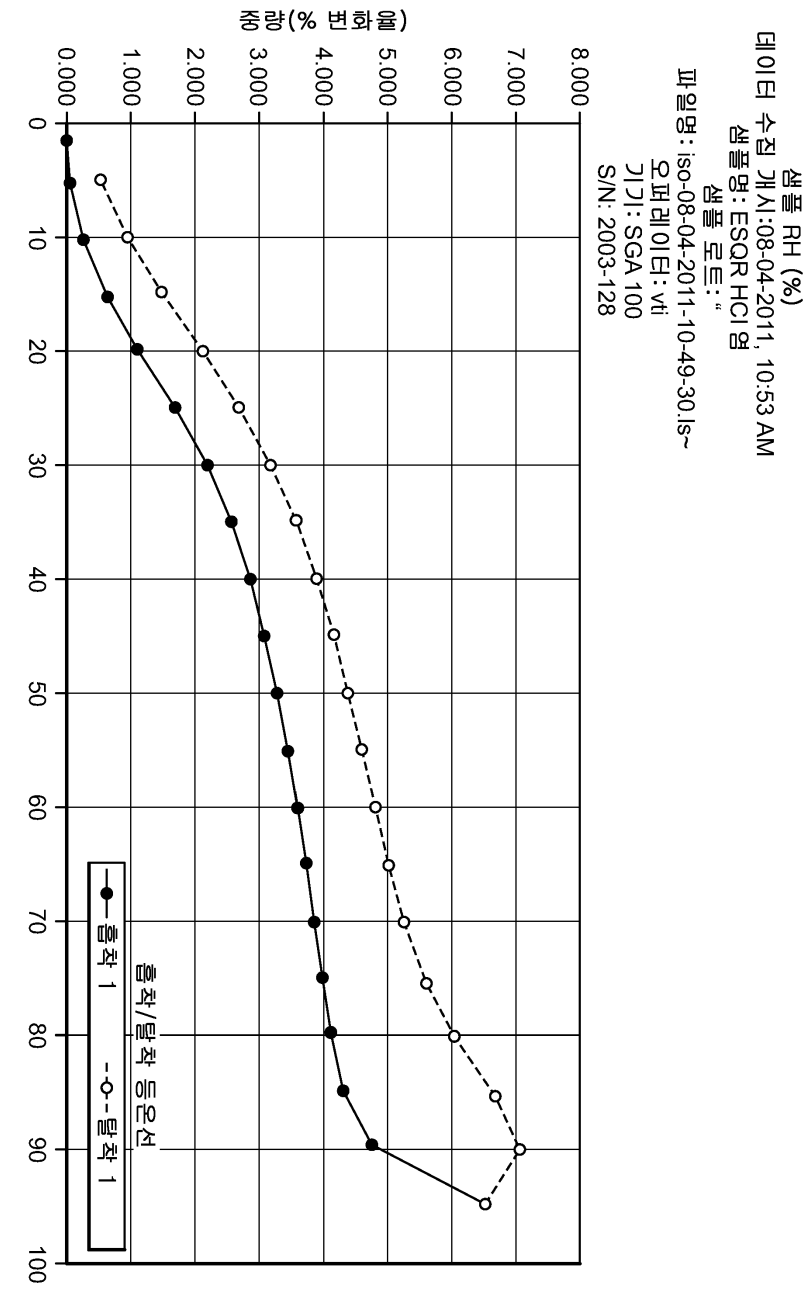
도면17


강도 (cps)
0
1000
2000
3000
4000
5000
10.000
20.000
30.000
40.000
2 세타(도)
중간체 2

도면18a



도면18b


샘플 RH (%)
데이터 수집 개시:08-04-2011, 10:53 AM
샘플명: ESQR HCl 염
샘플 로트: “
파일명: iso-08-04-2011-10-49-30.ls~
오퍼레이터: vti
기기: SGA 100
S/N: 2003-128
중량(% 변화율)
0.000
1.000
2.000
3.000
4.000
5.000
6.000
7.000
8.000
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
흡착/탈착 등온선
흡착 1
탈착 1