



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0014720
 (43) 공개일자 2010년02월10일

(51) Int. Cl.
C07D 231/12 (2006.01) *C07D 301/00* (2006.01)
A61K 31/415 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2009-7020516
 (22) 출원일자 2008년03월14일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2009년09월30일
 (86) 국제출원번호 PCT/GB2008/050180
 (87) 국제공개번호 WO 2008/110846
 국제공개일자 2008년09월18일
 (30) 우선권주장
 0704932.3 2007년03월14일 영국(GB)
 60/894,752 2007년03월14일 미국(US)

(71) 출원인
아스텍스 테라퓨틱스 리미티드
 영국, 캠브리지 씨비4 0큐에이, 밀턴 로드, 436
 캠브리지 싸이언스 파크
**디 인스티튜트 오브 캔서 리서치:로얄 캔서 하스
 피틀**
 영국 런던 에스더블유7 3알피 올드 브롬프톤 로드
 123
캔서 리서치 테크놀로지 리미티드
 영국 런던 더블유씨2에이 3엔엘 사디니아 스트리
 트 사디니아 하우스
 (72) 발명자
우드헤드 스티븐 존
 영국 씨비4 0큐에이 캠브리지 캠브리지샤이어 밀
 턴 로드 캠브리지 싸이언스 파크 436
리스 데이비드 찰스
 영국 씨비4 0큐에이 캠브리지 캠브리지샤이어 밀
 턴 로드 캠브리지 싸이언스 파크 436
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 김성기, 김진희

전체 청구항 수 : 총 62 항

(54) 단백질 키나아제의 조절제로서 (S)-2-아미노-1-(4-클로로페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올을 포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 (R) 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올을 실질적으로 포함하지 않거나 또는 (S) 거울상 이성질체가 우세한 (S) 및 (R) 거울상 이성질체의 혼합물을 포함하는, (S) 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올을 포함하는 조성물을 제공한다. 또한 (S) 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 제조 방법, 신규한 공정 중간체 및 신규한 공정 중간체의 제조 방법을 제공한다.

(72) 발명자

프레드릭슨 마틴

영국 씨비4 0큐에이 캠프리지 캠프리지셔라이어 밀턴
로드 캠프리지 사이언스 파크 436

그림쇼 카일라 메리엄

영국 씨비4 0이와이 캠프리지 캠프리지셔라이어 밀턴
로드 캠프리지 사이언스 파크 23 이노베이션 센터
스위트 7

특허청구의 범위

청구항 1

(S) 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올을 포함하는 조성물로서, 실질적으로 (R) 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올을 포함하지 않거나, 또는 (S) 거울상 이성질체가 우세한 (S) 및 (R) 거울상 이성질체의 혼합물을 포함하는 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 75% 이상이 S-거울상 이성질체 형태인 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 포함하는 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올은 거울상 이성질체의 순도가 80% 이상인 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올은 거울상 이성질체의 순도가 85% 이상, 또는 90% 이상, 또는 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99.5% 이상인 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올은 거울상 이성질체의 순도가 98%보다 큰 것인 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 99.9% 이상이 S-거울상 이성질체 형태인 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, (R)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올은 실질적으로 조성물 내에 존재하지 않는 것인 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 하나의 항에 있어서, (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물인 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 실질적으로 순수한 형태의 (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올로 이루어진, 즉 불순물을 0.5% 미만, 더욱 바람직하게는 0.1% 미만, 가장 바람직하게는 0.01% 미만으로 포함하는 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 단일 불순물은 0.2% 초과, 더욱 바람직하게는 0.1% 초과, 양으로 존재하지 않는 것인 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 단일 불순물이 알려진 경우, 기지의 단일 불순물은, 0.5% 초과, 또는 0.4% 초과, 또는 0.3% 초과, 또는 0.2% 초과, 또는 0.1% 초과, 또는 0.05% 초과, 또는 0.01% 초과, 양으로 존재하지 않는 것인 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 하나의 항에 있어서, (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올은 유리 염기의 형태인 조성물.

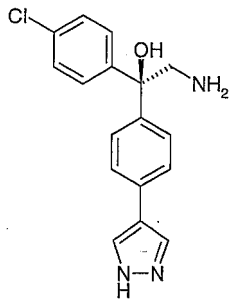
청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 하나의 항에 있어서, (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올은 산 부가 염의 형태인 조성물.

청구항 14

실질적으로 순수한 형태인 하기 화학식 I의 화합물 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물:

[화학식 I]



청구항 15

제14항에 있어서, 유리 염기 또는 이의 염, 용매화물 또는 호변체의 형태인 화학식 I의 화합물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 있어서, 의약으로 사용하기 위한 것인 조성물 또는 화합물.

청구항 17

단백질 키나아제 B에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물.

청구항 18

단백질 키나아제 B에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하는 약제를 제조하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물의 용도.

청구항 19

단백질 키나아제 B에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상의 예방 또는 치료가 필요한 피험체에게 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 단백질 키나아제 B에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 20

포유동물에서 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사를 포함하거나 이로부터 기인하는 질병 또는 증상을 치료하는데 사용하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물.

청구항 21

포유동물에서 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사를 포함하거나 이로부터 기인하는 질병 또는 증상을 치료하는 약제를 제조하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물의

용도.

청구항 22

포유동물에서 비정상인 세포 성장을 포함하거나 이로부터 기인하는 질병 또는 증상을 치료하는 방법으로서, 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사를 억제하는데 유효한 양으로 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물을 상기 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법.

청구항 23

포유동물에서 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사를 포함하거나 이로부터 기인하는 질병 또는 증상의 발생을 완화 또는 감소시키는 방법으로서, 비정상인 세포 성장을 억제하는데 유효한 양으로 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물을 상기 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는 완화 또는 감소 방법.

청구항 24

포유동물에서 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사를 포함하거나 이로부터 기인하는 질병 또는 증상을 치료하는 방법으로서, 단백질 키나아제 B의 활성을 억제하는데 유효한 양으로 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물을 상기 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법.

청구항 25

단백질 키나아제 B를 억제하는데 사용하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물.

청구항 26

키나아제를 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 키나아제 억제 조성물 또는 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는 단백질 키나아제 B의 억제 방법.

청구항 27

단백질 키나아제 B 및/또는 단백질 키나아제 A의 활성을 억제시킴으로써 세포 과정(예, 세포 분열)을 조절하는데 사용하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물.

청구항 28

단백질 키나아제 B 및/또는 단백질 키나아제 A의 활성을 억제시킴으로써 세포 과정(예, 세포 분열)을 조절하는 약제를 제조하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물의 용도.

청구항 29

제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물을 사용하여 단백질 키나아제 B 및/또는 단백질 키나아제 A의 활성을 억제시킴으로써 세포 과정(예, 세포 분열)을 조절하는 방법.

청구항 30

단백질 키나아제 A에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물.

청구항 31

단백질 키나아제 A에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하는 약제를 제조하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물의 용도.

청구항 32

단백질 키나아제 A에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상의 예방 또는 치료가 필요한 피험체에게 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 단백질 키나아제 A에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 33

포유동물에서 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사를 포함하거나 이로부터 기인하는 질병 또는 증상을 치료하는 방법으로서, 단백질 키나아제 A 활성을 억제하는데 유효한 양으로 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물을 상기 포유동물에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법.

청구항 34

단백질 키나아제 A를 억제하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물.

청구항 35

키나아제를 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 키나아제 억제 조성물 또는 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는 단백질 키나아제 A의 억제 방법.

청구항 36

제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물을 사용하여 단백질 키나아제 A의 활성을 억제시킴으로써 세포 과정(예, 세포 분열)을 조절하는 방법.

청구항 37

비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사로부터 기인하는 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하는 약제를 제조하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물의 용도.

청구항 38

제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 39

의약으로 사용하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물.

청구항 40

제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 개시된 질병 상태 또는 증상 중 어느 하나를 예방 또는 치료하는 약제를 제조하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물의 용도.

청구항 41

제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 개시된 질병 상태 또는 증상 중 어느 하나를 치료 또는 예방하기 위한 방법으로서, 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 화합물 또는 조성물의 화합물(예, 치료적 유효량)을 환자(예, 상기 치료 또는 예방이 필요한 환자)에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 또는 예방 방법.

청구항 42

제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 개시된 질병 상태 또는 증상의 발생을 완화 또는 감소시키는 방법으로서, 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 화합물 또는 조성물의 화합물(예, 치료적 유효량)을 환자(예, 상기 완화 또는 감소가 필요한 환자)에게 투여하는 단계를 포함하는 완화 또는 감소 방법.

청구항 43

(i) 환자가 앓고 있거나 앓을 수 있는 질병 또는 증상이 단백질 키나아제 B에 대한 활성을 갖는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 것인지 여부를 결정하기 위해 환자를 선별하는 단계; 및 (ii) 이에 따라 환자의 질병 또는 증상이 감수성인 것으로 나타나는 경우, 이후 상기 환자에게 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 단백질 키나아제 B에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 진단 및 치료하는 방법.

청구항 44

단백질 키나아제 B에 대한 활성을 갖는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 질병 또는 증상을 앓거나 이를 앓을

위험이 있는 것으로 선별되고 결정된 환자에서 질병 상태 또는 증상을 치료 또는 예방하는 약제를 제조하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물의 용도.

청구항 45

단백질 키나아제 B에 대한 활성을 갖는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 질병 또는 증상을 앓거나 이를 앓을 위험이 있는 것으로 선별되고 결정된 환자에서 질병 상태 또는 증상을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물.

청구항 46

(i) 환자가 앓고 있거나 앓을 수 있는 질병 또는 증상이 단백질 키나아제 A에 대한 활성을 갖는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 것인지 여부를 결정하기 위해 환자를 선별하는 단계; 및 (ii) 이에 따라 환자의 질병 또는 증상이 감수성인 것으로 나타나는 경우, 이후 상기 환자에게 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 단백질 키나아제 A에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 진단 및 치료하는 방법.

청구항 47

단백질 키나아제 A에 대한 활성을 갖는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 질병 또는 증상을 앓거나 이를 앓을 위험이 있는 것으로 선별되고 결정된 환자에서 질병 상태 또는 증상을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물.

청구항 48

단백질 키나아제 A에 대한 활성을 갖는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 질병 또는 증상을 앓거나 이를 앓을 위험이 있는 것으로 선별되고 결정된 환자에서 질병 상태 또는 증상을 치료 또는 예방하는 약제를 제조하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물의 용도.

청구항 49

단백질 키나아제 B 및/또는 단백질 키나아제 A의 조절제(예, 억제제)로 사용하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물.

청구항 50

단백질 키나아제 B 및/또는 단백질 키나아제 A 조절용(예, 억제용) 약제를 제조하기 위한 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물의 용도.

청구항 51

단백질 키나아제 B 및/또는 단백질 키나아제 A를 (예를 들어, 세포 환경 내 - 예, 생체내에서) 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는 단백질 키나아제 B 및/또는 단백질 키나아제 A의 조절(예, 억제) 방법.

청구항 52

2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 (S) 및 (R) 거울상 이성질체의 혼합물을 부분적으로 또는 완전하게 분리시키는 단계를 포함하는 제1항 내지 제15항 중 어느 하나의 항에 정의된 조성물 또는 화합물의 제조 방법.

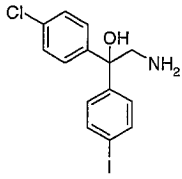
청구항 53

제52항에 있어서, (S) 및 (R) 거울상 이성질체는 키랄 크로마토그래피를 사용하여 분리하는 것인 제조 방법.

청구항 54

하기 화학식(12)의 화합물 또는 이의 산 부가 염:

[화학식 12]



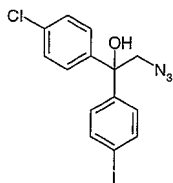
청구항 55

제54항에 있어서, 4-톨루엔설포산 염인 산 부가 염.

청구항 56

하기 화학식(17)의 화합물:

[화학식 17]



청구항 57

극성 비양성자성 용매 중에서 제56항에 정의된 화학식(17)의 화합물을 트리페닐포스핀과 같은 3차 포스핀과 반응시킨 후 수성 산으로 처리하는 것을 포함하는 제54항에 정의된 화학식(12)의 화합물의 제조 방법.

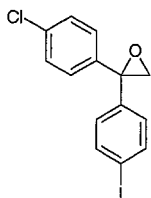
청구항 58

제57항에 있어서, 수성 산은 메탄설포산, 에탄설포산, 벤젠설포산, 톨루엔설포산 및 캄포르설포산, 가장 바람직하게는 4-톨루엔설포산에서 선택된 알킬- 또는 아릴설포산을 포함하는 제조 방법.

청구항 59

극성 용매 중에서 하기 화학식(11)의 에폭시드 화합물을 알칼리 금속 아지드화물 및 트리메틸실릴 아지드화물에서 선택된 아지드화물과, 바람직하게는 가열하면서 반응시키는 것을 포함하는 제56항에 정의된 화학식(17)의 화합물의 제조 방법:

[화학식 11]



청구항 60

제59항에 있어서, 아지드화물은 알칼리 금속 아지드화물인 제조 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 알칼리 금속 아지드화물은 아지드화나트륨인 제조 방법.

청구항 62

제59항 내지 제61항 중 어느 하나의 항의 방법을 실시한 후 제57항 또는 제58항의 방법을 실시하는 것을 포함하는 제54항에 정의된 화학식(12)의 화합물의 제조 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 단백질 키나아제 B(PKB), 단백질 키나아제 A(PKA), ROCK 키나아제 또는 p70S6K 키나아제의 활성을 억제 또는 조절하는 피라졸 함유 아릴-알킬아민 화합물, 상기 키나아제에 의해 매개되는 질병 상태 또는 증상의 치료 또는 예방에서의 상기 화합물의 용도, 및 상기 화합물을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는, 본 발명은 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 단일 거울상이성질체, 이를 포함하는 약학 조성물 및 이의 치료적 용도와, 이의 제조 방법 및 신규한 과정 중간체에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 단백질 키나아제는 세포 내 광범위하게 다양한 신호 전달 과정의 제어를 담당하는 구조적으로 관련된 효소의 거대한 패밀리를 구성한다(Hardie, G. and Hanks, S. (1995) *The Protein Kinase Facts Book. I and II*, Academic Press, San Diego, CA). 키나아제는 이것이 인산화하는 기질(예, 단백질-티로신, 단백질-세린/트레오닌, 지질 등)에 의해 패밀리로 분류될 수 있다. 일반적으로 이들 키나아제 패밀리 각각에 상응하는 서열 모티프가 동정된 바 있다(예, Hanks, S.K., Hunter, T., *FASEB J.*, 9:576-596 (1995); Rnighton 등, *Science*, 253:407-414 (1991); Hiles 등, *cell*, 70:419-429 (1992); Kunz 등, *cell*, 73:585-596 (1993); Garcia-Bustos 등, *EMBO J.*, 13:2352-2361 (1994)).

[0003] 단백질 키나아제는 이의 조절 기전을 특징으로 할 수 있다. 상기 기전은, 예를 들어 자가인산화(autophosphorylation), 다른 키나아제에 의한 인산전달반응(transphosphorylation), 단백질-단백질 상호작용, 단백질-지질 상호작용, 및 단백질-폴리뉴클레오티드 상호작용을 포함한다. 개별 단백질 키나아제는 하나 이상의 기전에 의해 조절될 수 있다.

[0004] 키나아제는 포스페이트 기를 표적 단백질에 첨가함으로써, 비제한적인 예로서 증식, 분화, 세포사멸, 운동성, 전사, 번역 및 기타 신호전달 과정을 포함하는 다수의 상이한 세포 과정을 조절한다. 이러한 인산화 사건은 표적 단백질의 생물학적 기능을 조정 또는 조절할 수 있는 분자 온/오프 스위치로서 작용한다. 표적 단백질의 인산화는 다양한 세포의 신호(호르몬, 신경전달물질, 성장 및 분화 인자 등), 세포 주기 사건, 환경 또는 영양 스트레스 등에 대해 반응하여 발생한다. 적절한 단백질 키나아제는, 예를 들어 대사 효소, 조절 단백질, 수용체, 세포골격 단백질, 이온 채널 또는 펌프, 또는 전사 인자를 (직접 또는 간접적으로) 활성화 또는 불활성화시키는 신호전달 경로에서 작용한다. 단백질 인산화의 제어 결함으로 인한 비제어된 신호전달은, 예를 들어 염증, 암, 알러지/천식, 면역계의 질병 또는 증상, 중추신경계의 질병 및 증상, 및 혈관형성을 비롯한 수많은 질병과 관련되어 왔다.

[0005] 세포사멸 또는 세포예정사(programmed cell death)는 더이상 유기체에 필요하지 않은 세포를 제거하는 중요한 생리적 과정이다. 이 과정은 세포 성분의 비괴사(non-necrotic) 제어 파괴, 제거 및 회복을 가능하게 하면서 조기 태아 성장 및 발달에 중요하다. 또한 세포사멸에 의한 세포 제거도 성장하는 세포 집단의 염색체 및 게놈의 완전성의 유지에 중요하다. DNA 손상 및 게놈의 완전성이 신중하게 모니터링되는 세포 성장 주기에서의 공지된 체크포인트가 여러개 존재한다. 그러한 체크포인트에서 이형(anomaly) 검출에 대한 반응은 그러한 세포의 성장을 정지시키고 수복 과정을 개시하는 것이다. 손상 또는 이형이 수복될 수 없는 경우, 손상된 세포에 의해 세포사멸이 개시되어 과실 및 오류의 진행을 방지한다. 암성 세포는 이의 염색체 DNA에서 다수의 돌연변이, 오류 또는 재배열을 일관되게 포함한다. 이것은 부분적으로는 대부분의 종양이 세포사멸 과정의 개시에 관여하는 과정 중 하나 이상에서 결함을 갖기 때문에 발생하는 것으로 널리 여겨진다. 정상의 제어 기전은 암성 세포를 죽일 수 없고 염색체 또는 DNA 코딩 오류는 계속해서 전파된다. 그 결과, 이러한 프로-세포사멸(pro-apoptotic) 신호를 복원하거나 비조절된 생존 신호를 억제하는 것은 암 치료의 매력적인 수단이 된다.

[0006] **PKB**

[0007] 그 중에서도 효소 포스파티딜이노시톨 3-키나아제(PI3K), PDK1 및 PKB를 포함하는 신호 전달 경로는 많은 세포에서의 세포사멸 또는 생존 반응에 대한 증가된 내성을 매개하는 것으로 오랫동안 알려져 왔다. 이러한 경로는

세포사멸을 억제하는 수많은 성장 인자에 의해 사용된 중요한 생존 경로라는 것을 나타내는 상당량의 데이터가 존재한다. PI3K 패밀리의 효소는 일정 범위의 성장 및 생존 인자, 예를 들면 EGF, PDGF에 의해 그리고 폴리포스파티딜이노시톨의 생성을 통해 활성화되며, 키나아제 PDK1 및 akt로서도 공지된 단백질 키나아제 B(PKB)의 활성을 비롯한 하류 신호전달 사건의 활성화를 개시한다. 또한, 이는 숙주 조직, 예를 들면 신생물 뿐 아니라, 혈관 내피 세포에서도 그러하다. PKB는 N-말단 PH 도메인 및 C-말단 조절 도메인과 함께 키나아제 도메인을 포함하는 단백질 ser/thr 키나아제이다. 효소 PKB_α(akt1) 그 자체는 PDK1에 의해 Thr 308 상에서 그리고 라파마이신의 표적(TOR) 키나아제 및 이의 관련 단백질 릿터(rictor)로 구성되는 것으로 현재 여겨지는 'PDK2'에 의해 Ser 473 상에서 인산화된다. 완전 활성화는 두 부위에서 인산화를 필요로 하는 반면, PIP3과 PH 도메인 사이의 결합은 기질에 최적의 접근을 제공하는 지질 막의 세포질 면에 효소를 고정하는 것을 필요로 한다.

[0008] 미토겐-활성화된 단백질(MAP), 키나아제-활성화된 단백질 키나아제-2(MK2), 인테그린-결합된 키나아제(ILK), p38 MAP 키나아제, 단백질 키나아제 C알파(PKC알파), PKC베타, NIMA-관련 키나아제-6(NEK6), 라파마이신의 포유동물 표적(mTOR), 이중 가닥 DNA-의존성 단백질 키나아제(DNK-PK) 및 모세혈관확장성 운동실조증 돌연변이(ATM: ataxia telangiectasia mutated) 유전자 산물을 비롯한 10개 이상의 키나아제가 Ser 473 키나아제로서 작용하는 것으로 제안되어 왔다. 입수 가능한 데이터에 의하면, 복수의 시스템이 PKB의 활성화를 조절하기 위하여 세포에 사용될 수 있다는 점을 시사한다. PKB의 완전 활성화는 두 부위에서의 인산화를 필요로 하는 반면, PIP3과 PH 도메인 사이의 결합은 기질의 최적의 접근을 제공하는 지질 막의 세포질 면에 효소를 고정하는 것을 필요로 한다. PH 도메인 돌연변이는 최근 보고된 바 있다. 저자는 구조적, 생화학적 및 생물학적 연구를 통해 인간 암에서 AKT1의 연관성에 대한 직접적인 증거를 제공하고 Akt1의 E17K 돌연변이의 종양유전자 잠재성을 입증한다. 이 돌연변이는 유방암 61명 중 5명(8%), 결장암 51명 중 3명(6%) 및 난소암 50명 중 1명(2%)에서 동정되었다(*Nature* **448**, 439-444 (26 July 2007) doi:10.1038/nature05933; Received 8 March 2007; Accepted 11 May 2007; Published online 4 July 2007 A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of Akt1 in cancer).

[0009] 최근, PI3K 촉매 서브유닛, PIK3CA의 체세포 돌연변이는 결장암, 위암, 유방암, 난소암 및 고등 뇌 종양 중에서 일반적인(25-40%) 것으로 보고되어 있다. PIK3CA 돌연변이는 방광 발암에서 조기 발생할 수 있는 일반적인 사건이다. 침윤성 유방 암종에서는, PIK3CA 변형이 주로 소엽 및 도관 종양에서 주로 발견된다. PI3K 경로는 자궁내막 암종에서 광범위하게 활성화되며, PIK3CA/PTEN 변형의 조합은 이들 종양의 발생에서 중요한 역할을 할 수 있다. PI3 키나아제의 돌연변이 및 PTEN의 손실에 의해 활성화된 종양은 PKB의 활성화를 지속시키며, 그 결과 PKA/PKB 억제제에 의한 억제에 대해 불균일하게 민감하게 된다.

[0010] 활성화된 PKB는 전체 생존 반응에 기여하는 일정 범위의 기질을 차례대로 인산화한다. PKB 의존성 생존 반응을 매개하는데 참여하는 인자 전부를 이해하는 것은 명확하지 않을 수 있지만, 일부 중요한 작용은 프로-세포사멸 인자 BAD 및 카스파아제 9의 인산화 및 불활성화, 포크헤드(Forkhead) 전사 인자, 예를 들면 핵으로부터의 배제를 초래하는 FKHR의 인산화, 및 연쇄반응의 상류 키나아제의 인산화에 의한 NfκB 경로의 활성화인 것으로 여겨지고 있다.

[0011] PKB 경로의 안티-세포사멸 및 프로-생존 작용 이외에, 그 효소는 또한 세포 증식을 촉진하는데 있어서 중요한 역할을 한다. 다시, 이러한 작용은 몇몇 작용을 통하여 쉽게 매개되며, 이의 일부는 p21^{Cip1/WAF1}의 사이클린 의존성 키나아제 억제제의 인산화 및 불활성화, 및 세포 크기, 성장 및 단백질 번역의 여러 측면을 제어하는 키나아제인 mTOR의 인산화 및 활성화인 것으로 생각된다.

[0012] 폴리포스파티딜이노시톨을 탈인산화 및 불활성화시키는 인산분해효소 PTEN은 PI3K/PKB 생존 경로를 조절하도록 정상적으로 작용을 하는 핵심 종양 억제제 단백질이다. 종양형성에서의 PI3K/PKB 경로의 중요성은 PTEN이 인간 종양에서의 돌연변이의 가장 일반적인 표적 중 하나라는 고찰로부터 판단할 수 있으며, 이러한 인산분해효소에서의 돌연변이는 흑색종(Guldberg et al., 1997, *Cancer Research* 57, 3660-3663) 및 진행된 전립선암(Cairns et al., 1997 *Cancer Research* 57, 4997)의 ~50% 이상에서 발견된다. 이러한 고찰 등은 광범위한 종양 유형이 성장 및 생존에 대한 증가된 PKB 활성화에 의존하며, PKB의 적절한 억제제에 대하여 치료적으로 반응한다는 것을 시사한다.

[0013] 알파, 베타 및 감마로 불리우는 PKB의 3 가지 밀접하게 관련된 이소형(isoform)(AKT1 2 및 3)이 존재하며, 이들은 유전적 연구에 의하면 뚜렷하지만 중복되는 기능을 갖는다는 점을 시사한다. 증거에 의하면, 이들은 암에서 모두 독립적으로 역할을 할 수 있다는 것을 보여준다. 예를 들면 PKB 베타는 난소암 및 췌장암의 10~40%에서 과발현 또는 활성화되는 것으로 밝혀졌으며(Bellacosa et al., 1995, *Int. J. Cancer* 64, 280-285; Cheng et

al., 1996, PNAS 93, 3636-3641; Yuan et al., 2000, Oncogene 19, 2324-2330), PKB 알파는 인간 위암, 전립선암 및 유방암에서 증폭되며(Staal 1987, PNAS 84, 5034-5037; Sun et al., 2001, Am. J. Pathol. 159, 431-437), 증가된 PKB 감마 활성은 스테로이드 독립적 유방 및 전립선 세포주에서 관찰되었다(Nakatani et al., 1999, J. Biol. Chem. 274, 21528-21532).

[0014] 또한, PKB 경로는 정상 조직의 성장 및 생존에 작용하며, 세포 및 조직 작용을 제어하기 위하여 정상의 생리 중에 조절될 수 있다. 따라서, 정상 세포 및 조직의 바람직하지 못한 증식 및 생존과 관련된 질환은 PKB 억제제를 사용한 치료로부터 치료적 이점을 지닐 수 있다. 이러한 질환의 예로는 연장되거나 또는 상향 조절된 면역 반응을 초래하는 세포 집단의 연장된 확대 및 생존과 관련된 면역 세포의 질환이다. 예를 들면 동족(cognate) 항원 또는 성장 인자, 예컨대 인터페론 감마에 대한 T 및 B 림프구 반응은 PI3K/PKB 경로를 활성화시키고, 면역 반응 중에 항원 특이성 림프구 클론의 생존을 유지하는 것에 관여한다. 림프구 및 기타 면역 세포가 부적절한 자가 항원 또는 이종 항원에 반응하거나, 또는 다른 비정상인 연장된 활성화를 초래하는 조건 하에서, PKB 경로는 면역 반응이 활성화된 세포 집단의 세포사멸을 통하여 종결되는 정상의 기전을 방해하는 중요한 생존 신호에 기여한다. 자가면역 증상, 예컨대 다발성 경화증 및 관절염에서 자가 항원에 반응하는 림프구 집단의 확대를 입증하는 증거가 상당량 존재한다. 이종 항원에 부적절하게 반응하는 림프구 집단의 확대는 또다른 일련의 증상, 예컨대 알러지 반응 및 천식의 특징이 된다. 요컨대, PKB의 억제는 면역 질환에 대한 이로운 치료를 제공한다.

[0015] PKB가 역할을 할 수 있는 정상 세포의 부적절한 확대, 성장, 증식, 과형성 및 생존의 다른 비제한적 예로는 아테롬성동맥경화증, 심근증 및 사구체신염을 포함한다.

[0016] 세포 성장 및 생존에서의 역할 이외에, PKB 경로는 인슐린에 의한 포도당 대사의 제어에 작용한다. PKB의 알파 및 베타 이소형이 결핍된 마우스로부터 입수 가능한 증거에 의하면, 이러한 작용은 베타 이소형에 의해 주로 매개된다는 것을 시사한다. 그 결과, PKB 활성의 조절제는 또한 포도당 대사 및 에너지 저장의 기능이상, 예컨대 당뇨병, 대사 질환 및 비만이 존재하는 질환에서의 용도를 발견할 수 있다.

[0017] **PKA**

[0018] 환형 AMP-의존성 단백질 키나아제(PKA)는 광범위한 기질을 인산화하는 세린/트레오닌 단백질 키나아제이며, 세포 성장, 세포 분화, 이온-채널 전도도, 유전자 전사 및 신경전달물질의 시냅스 방출을 비롯한 다수의 세포 과정의 조절에 관여한다. 불활성 형태에 있어서, PKA 전효소는 2개의 조절 서브유닛 및 2개의 촉매 서브유닛을 포함하는 사량체이다.

[0019] PKA는 G-단백질 매개된 신호 전달 사건과 이것이 조절하는 세포 과정 사이의 연결로서 작용한다. 막횡단 수용체에 대한 글루카곤과 같은 호르몬 리간드의 결합은 수용체-결합된 G-단백질(GTP-결합 및 가수분해 단백질)을 활성화시킨다. 활성화시, G 단백질의 알파 서브유닛은 분해되고, 아데닐레이트 시클라제에 결합하여 그 시클라제를 활성화시키고, 이어서 ATP를 환형-AMP(cAMP)로 전환시킨다. 따라서, 이어 생성된 cAMP는 PKA의 조절 서브유닛에 결합되어 결합된 촉매 서브유닛의 분해를 유도한다. 조절 서브유닛과 결합될 때 불활성인 PKA의 촉매 서브유닛은 분해시 활성이 되며, 다른 조절 단백질의 인산화에 참여한다.

[0020] 예를 들면 PKA의 촉매 서브유닛은 포도당을 방출하기 위해 글리코겐을 분해하는데 참여하는 효소인 인산화효소의 인산화에 관여하는 키나아제 인산화효소 키나아제를 인산화한다. 또한, PKA는 글리코겐 합성효소를 인산화 및 탈활성화시킴으로써 포도당 농도의 조절에 관여한다. 따라서, PKA 활성의 조절제(조절제는 PKA 활성을 증가 또는 감소시킬 수 있음)는 포도당 대사 및 에너지 저장의 기능이상인 존재하는 질병, 예컨대 당뇨병, 대사 질환 및 비만의 치료 또는 관리에 유용할 수 있다.

[0021] 또한, PKA는 T 세포 활성화의 급성 억제제로서 정립되어 있다. Anndahl 등은 HIV-감염된 환자로부터 유래된 T 세포가 cAMP의 농도를 증가시키며, 정상 T 세포보다 cAMP 유사체에 의한 억제에 더 민감하다는 점에 기초하여 HIV-유도된 T 세포 기능이상에서 PKA 유형 I의 가능한 역할을 연구 조사하였다. 이 연구로부터, 연구자들은 PKA 유형 I의 증가된 활성화가 HIV 감염에서의 진행성 T 세포 기능이상의 원인이 될 수 있으며, 이에 따라 PKA 유형 I이 면역조절 치료에 대한 잠재적 표적이 될 수 있다는 결론을 내렸다. 문헌[Aandahl, E. M., Aukrust, P., Skalhogg, B. S., Mueller, F., Froland, S. S., Hansson, V., Tasken, K. *Protein Kinase A Type I antagonist restores immune responses of T cells from HIV-infected patients. FASEB J.* 12, 855-862 (1998)].

[0022] 또한, PKA의 조절 서브유닛에서의 돌연변이는 내분비 조직에서의 과활성화를 초래할 수 있는 것으로 인식되어 왔다.

- [0023] 세포 조절에서의 메신저로서 PKA의 다양성 및 중요성으로 인하여, cAMP의 비정상 반응은 이로부터 유래하는 각종 인간 질환, 예컨대 불규칙 세포 성장 및 증식을 초래할 수 있다(Stratakis, C.A.; Cho-Chung, Y. S.; Protein Kinase A and human diseases. *Trends Endrocri. Metab.* 2002, 13, 50-52). PKA의 과발현은 난소암, 유방암 및 결장암 환자를 비롯한 각종 인간 암 세포에서 발견된다. 따라서, PKA의 억제제는 암의 치료에 대한 접근법이 된다(Li, Q.; Zhu, G-D.; *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2002, 2, 939-971).
- [0024] 인간 질환에서의 PKA 역할에 대한 검토에 대해서는, 예를 들면 문헌[*Protein Kinase A and Human disease*, Edited by Constantine A. Stratakis, Annals of the New York Academy of Sciences, Volume 968, 2002, ISBN 1-57331-412-9]을 참조할 수 있다.
- [0025] **ROCK 키나아제**
- [0026] ROCK 키나아제 패밀리는 ROCK1 및 ROCK2의 2개의 공지된 구성원을 포함한다:
- [0027] **ROCK1.** 유사어: Rho-관련된 단백질 키나아제 1; p160 ROCK; P160 ROK; p160 ROCK-1, Rho-관련, 고리화 고리(coiled-coil) 함유 단백질 키나아제1; Rho 키나아제 1; ROK 베타.
- [0028] **ROCK2.** 유사어: Rho-관련된 단백질 키나아제 2; p164 ROCK; p164 ROK; p164 ROCK-2; Rho-관련, 고리화 고리 함유 단백질 키나아제 2, Rho 키나아제 2; ROK 알파.
- [0029] 전이 과정은 세포골격의 재구조화 뿐 아니라 세포가 종양 덩어리로부터 이탈하고, 국부 조직을 침윤시키고, 궁극적으로는 몸 전체에 퍼질 수 있도록 세포-세포 및 세포-매트릭스 접착을 수반한다. 세포 형태 및 접착에 있어 이러한 효과는 Rho GTP아제 패밀리의 구성원에 의해 조절된다.
- [0030] 활성화된 RhoA는 ROCK 키나아제 ROCK1 및 ROCK2를 비롯한 여러 작동자(effecter) 단백질을 방해할 수 있다. ROCK1 및 ROCK2는 물리적 결합을 통해 RhoA-GTP복합체에 의해 활성화될 수 있다. 활성화된 ROCK는 수많은 기질을 인산화시키고 중추적인 세포 작용에 중요한 역할을 한다. ROCK을 위한 기질은 미오신 경쇄 인산분해효소의 미오신 결합 서브유닛(MBS, 또한 MYPT1로 언급됨), 애두신, 모에신, 미오신 경쇄(MLC), LIM 키나아제, 및 전사 인자 FHL을 포함한다. 이들 기질의 인산화는 단백질의 생물학적 활성을 조절하고 외부 자극에 대한 세포의 반응을 변경시키는 수단을 제공한다.
- [0031] 상승된 RhoA 및 RhoC와, Rho 작동자 단백질 ROCK1 및 ROCK2의 발현은, 고환 생식 세포 종양의 진행, 전이성 능력을 지닌 작은 유방 암종, 방광암의 침윤 및 전이, 난소 암종에서의 종양 진행을 비롯하여 인간 암에서 공통적으로 관찰된다.
- [0032] 종양의 침윤성 및 전이성 형태로의 진행은 종양 세포가 극적인 형태 변화인 Rho GTP아제에 의해 조절되는 과정을 겪는 것을 필요로 한다. 액토미오신 수축성은 세포가 이의 환경에 대한 운동력을 나타내는 기전이다. 작은 GTP아제 Rho의 신호전달 하류는 미오신-II 경쇄(MLC2) 인산화의 ROCK-매개된 조절을 통해 수축성을 증가시킨다.
- [0033] ROCK 키나아제는 병소 유착 및 스트레스성 섬유를 유도하는데 참여하고 미오신의 조절 경쇄의 인산화를 향상시킴으로써 평활근 수축의 칼슘 감작을 매개하는 것으로 생각된다.
- [0034] 또한 생체내 연구에 따르면, ROCK 억제제는 여러 종양 세포주의 침윤성을 감소시키는 것으로 제시된 바 있다. ROCK 억제제, 예컨대 Y-27632 또는 WF-536은 일부 연구에서 이러한 성질을 입증하는데 사용되었다.
- [0035] ROCK의 억제제는 각종 질병들의 치료에 사용되는 것이 제안되었다. 이는 심혈관성 질환, 예컨대 고혈압, 만성 및 울혈성 심부전, 심근 비대, 재협착, 만성 신부전 및 아테롬성동맥경화증을 포함한다. 또한, 이의 근육 이완성질로 인해, 억제제는 또한 천식, 남성 발기 부전, 여성 성기능 이상 및 과활성 방광 제1 증후군에 적당할 수 있다.
- [0036] ROCK 억제제는 항염증성을 보유하는 것으로 여겨져 왔다. 따라서, 이들은 신경염증성 질병, 예컨대 발작, 다발성 경화증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측색 경화 및 염증성 통증과, 다른 염증성 질병, 예컨대 류마티스 관절염, 과민성 장 증후군, 및 염증성 장 질환에 대한 치료에 사용할 수 있다. 이의 신경 돌기 파생 유도 효과를 기초로, ROCK 억제제는 새로운 축삭돌기의 성장과 CNS 내 병소를 가로지르는 축삭돌기 재감기를 유도하는 뉴런 재생에 유용한 약물이 될 수 있다. 따라서, ROCK 억제제는 CNS 질환, 예컨대 척수 손상, 급성 신경 손상(발작, 외상성 뇌 손상), 파킨슨병, 알츠하이머병 및 다른 신경변성 질환의 재생 치료에 유용할 것 같다. ROCK 억제제가 세포 증식 및 세포 이동을 감소시키기 때문에, 이들은 암 및 종양 전이를 치료하는데 유용할 수 있다. 마지막으로, ROCK 억제제는 바이러스 침윤시 세포골격 재배열을 억제하고, 이에 따라 또한 항바이러스 및 항균

적용에 잠재적 치료 가치를 갖는다는 것을 시사하는 증거가 존재한다. ROCK 억제제는 또한 인슐린 내성 및 당뇨병의 치료에 유용하다.

- [0037] **ROCK 억제제 Y-27632**
- [0038] 종양 세포의 숙주 세포층으로의 접촉과 이어지는 세포횡단 이동은 암 침윤 및 전이의 중추 단계이다. 작은 GTP 아제 Rho는 액틴 세포골격의 재조직화 및 액토미오신 수축성의 조절을 통해 세포 접촉 및 운동성을 제어한다. 배양된 래트 MM1 간종양 세포는 시험관내 증피의 세포 단일층을 통해 혈청-의존성, Rho-매개된 방식으로 이동한다. Rho의 추정 표적 분자로 단리된 여러 단백질 중에서, ROCK 키나아제는 배양된 세포 내 병소 유착 및 스트레스성 섬유를 유도하는데 참여하고, 미오신의 조절 경로의 인산화를 향상시킴으로써 평활근의 칼슘 감각을 매개하는 것으로 생각된다. ROCK의 우성 활성 돌연변이체를 코딩하는 cDNA를 갖는 MM1 세포의 형질감염은 혈청 및 Rho의 독립적인 침윤성 활성을 부여하였다. 대조적으로, 우성 음성인 키나아제-결합성 ROCK 돌연변이체의 발현은 실질적으로 침윤성 표현형을 약화시켰다.
- [0039] 특정한 ROCK 억제제(Y-27632)는 액토미오신의 Rho-매개된 활성과 상피 세포의 침윤성 활성을 차단하였다. 또한, 삼투 펌프를 이용한 이 억제제의 연속적인 전달은 공동유전자(syngenic) 래트의 복막강으로 이식된 MM1 세포의 파종을 유의적으로 감소시켰다. 상기 결과에 따르면, ROCK는 종양 세포 침윤에 중요한 역할을 하는 것으로 보이며, 암 침윤과 전이의 예방을 위한 치료적 표적으로서의 잠재성을 입증하고 있다.
- [0040] VEGF는 RhoA의 활성을 유도하고 인간 EC의 세포막에 RhoA를 동원하였다. RhoA 활성의 증가는, 우성-음성 RhoA의 아데노바이러스 형질감염에 의해 입증된 바와 같이, F-액틴 세포골격의 VEGF-유도된 재조직화에 필요하다. Rho 키나아제의 특정 억제제인 Y-27632의 사용에 의해 입증된 바와 같이, Rho 키나아제는 RhoA의 효과를 매개하였다. Rho 키나아제의 억제는 물리적 손상에 대해 반응하여 VEGF-향상된 EC의 이동을 예방하지만, 기초적인 EC의 이동에는 영향을 미치지 못했다. 또한, 혈관형성에 대한 시험관내 모델에 있어서, RhoA 또는 Rho 키나아제의 억제는 3차원 섬유소 매트릭스에서 EC의 VEGF-매개된 내성장을 약화시켰다.
- [0041] 결론: EC 내 VEGF-유도된 세포골격의 변화는 RhoA와 Rho 키나아제가 필요하며, RhoA/Rho 키나아제 신호전달의 활성화는 VEGF-유도된 시험관내 EC의 이동 및 혈관형성에 관여한다.
- [0042] Y-21632는 평활근을 이완시키고 혈관 혈류를 증가시킬 수 있다. Y-27632는 세포를 진입할 수 있는 작은 분자이고 10일간 30 mg/kg을 경구 투여한 후에도 래트에 독성이 아니다. 이 화합물을 사용하기 위한 유효량은 대략 30 μM이다. 이는 고혈압 래트의 혈압은 감소시키지만, 정상 래트의 혈압에는 영향을 미치지 않는다. 그 결과, 고혈압 치료에 있어 Rho 신호전달 길항제가 동정되었다(Somlyo, 1997 Nature 389:908; Uehata et al, 1997 Nature 389:990).
- [0043] ROCK의 특정 억제제인 Y-27632의 사용(Uehata, et al, Nature, 389, 990-994, 1997, Davies, et al., Biochemical Journal, 351, 95-105, 2000, 및 Ishizaki, et al., Molecular Pharmacology., 57, 976-983, 2000)은, 혈관(Uehata, et al., Nature., 389, 990-994, 1997), 기도(Ilikuka et al., European Journal of 30 Pharmacology., 406, 273-279, 2000) 및 생식기(Chitale et al., Nature Medicine., 7(1), 119- 122, 2001) 평활근을 비롯한 다수의 조직에서 Ca²⁺ 독립적 수축 조절에 있어서 상기 효소의 역할을 입증하였다. 또한, 문헌[Jeziro et al. British Journal of Pharmacology., 134, 78-87, 2001]에 따르면, Y-27632는 단리된 토끼 비뇨기 35 방광 평활근에서 베타네콜-유도된 수축을 약화시킨다는 것을 보여주었다.
- [0044] Rho 키나아제 억제제 Y-27632는 하기 질병 분야에서 테스트되었다:
- [0045] - 고혈압(Uehata 등, 1997 IBID; Chitale 등, 2001a IBID; Chrissobolis 및 15 Sobey, 2001 C. Circ. Res 88:774)
- [0046] - 천식 (Iizuka 등, 2000 Eur. J. Pharmacol 406:273; Nakahara 등 Eur. J. Pharmacol 389:103, 2000)
- [0047] - 폐혈관수축 (Takamura 등, 2001 Hepatology 33:577)
- [0048] - 혈관성 질병(Miyata 등, 2000 Thromb Vase Biol 20:2351; Robertson 등, 2000 Br. J. Pharmacol 131:5)
- [0049] - 음경 발기 부전(Chitale 등, 2001b Nature Medicine 7:119; Mills 등, 2001 J. Appl. Physiol. 91: 1269; Rees 등, Br. J. Pharmacol 133:455 2001)
- [0050] - 녹내장(Honjo 등, 2001 Methods Enzymol 42:137; Rao 등, 2001 Invest. Ophthalmol. Urs. Sci. 42:1029)

- [0051] - 세포 형질전환(Sahai 등, 1999 Curr. Biol. 9:136-5)
- [0052] - 전립선암 전이(Somlyo 등, 2000 BBRC 269:652)
- [0053] - 간세포 암종 및 전이(Imamura 등, 2000; Takamura 등, 2001)
- [0054] - 간 섬유증(Tada 등, 2001 J. Hepatol 34:529; Wang 등, 2001 Am. J. Respir. 세포 Mol Biol. 25:628)
- [0055] - 신장 섬유증(Ohlci 등, J. Heart Lung Transplant 20:956 2001)
- [0056] - 심장보호 및 동종이식편 생존(Ohlci 등, 2001 IBID)
- [0057] - 뇌혈관경련(Sato 등, 2000 Circ. Res 87: 195).

[0058] **ROCK 키나아제 및 심혈관성 질병**

[0059] ROCK, 즉 작은 구아노신 트리포스페이트-결합 단백질 Rho의 즉각적인 하류 표적은 심혈관성 질병의 원인이 될 수 있다는 증거가 늘어나고 있다. ROCK는 다양한 세포의 기능, 예컨대 평활근 수축, 스트레스성 섬유의 형성 및 세포의 이동과 증식에 주요 역할을 한다. ROCK의 과활성은 뇌허혈, 관상동맥 혈관경련, 고혈압, 혈관 염증, 동맥경화증 및 아테롬성동맥경화증에서 관찰된다. 따라서, ROCK는 심혈관성 질병에서 중요하며 여전히 비교적 비개척된 치료 표적이 될 수 있다. 최근 ROCK 억제제, 예컨대 Y-27632 및 파스틸을 이용한 실험 및 임상 연구에 따르면, 태아 발생, 염증 및 종양형성에 있어 ROCK가 중요한 역할을 하는 것이 밝혀졌다. 이러한 검토는 세포 기능에서 ROCK의 잠재적 역할에 초점을 맞추고 심혈관성 질병의 떠오르는 치료법으로서 ROCK 억제제의 전망을 논의할 것이다.

[0060] 비정상 평활근의 수축성은 병태, 예컨대 고혈압의 주원인이 될 수 있으며, 이 과정을 조절하는 평활근 이완은 치료적으로 유용할 것이다. 평활근 수축은 시트졸 Ca^{2+} 의 농축 및 근필라멘트의 Ca^{2+} 감도에 의해 조절되고: 전자는 미오신 경쇄 키나아제를 활성화시키고 후자는 미오신 인산분해효소의 억제에 의해 부분적으로 실현된다.

[0061] 혈관성 평활근 세포 내 Rho 신호전달 경로는 고혈압, 재협착 손상 및 아테롬성동맥경화증을 비롯한 각종 혈관성 질병과 관련된 병태에서 고도로 활성화된다. 고혈압은 증가된 말초 내혈관성 및/또는 혈관 구조 리모델링을 특징으로 하는 심혈관성 질환이다. 최근 들어, 고혈압 동물 모델로부터 신속하게 늘어나는 증거에 따르면, 작은 GTP아제 Rho 및 이의 하류 작동자인 Rho-키나아제는 고혈압의 발병에 중요한 역할을 하는 것을 시사하고 있다. Rho/Rho-키나아제 경로의 활성화는 고혈압에서 평활근 수축성에 중요하다. 더 높아진 RhoA의 발현 및 향상된 RhoA 활성화는 고혈압 래트, 예컨대 유전적 자연적인 고혈압 래트의 대동맥 및 N(오메가)-니트로-1-아르기닌 메틸 에스테르-유도된 고혈압에서 관찰되었다.

[0062] **ROCK 키나아제 및 신경계 질병**

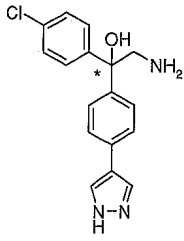
[0063] Rho/ROCK 경로의 비정상 활성화는 중추신경계의 다양한 질환들에서 관찰되었다. 성인 척추동물의 뇌 및 척수에 대한 손상은 ROCK를 활성화시켜서, 신경 돌기의 성장 및 발아를 억제한다. ROCK의 억제 결과, 포유동물에서 척수 손상 후의 재생이 가속화되고 기능 회복이 향상되며, Rho/ROCK 경로의 억제는 또한 발작, 염증 및 수초과과성 질병, 알츠하이머병 및 신경병증성 통증을 앓는 동물 모델에 효능이 있는 것으로 입증되었다. 따라서, ROCK 억제제는 각종 신경계 질환에서 신경변성을 막고 신경재생을 자극하는데 잠재성을 갖는다.

[0064] 뉴런의 발생은 이의 근원지로부터의 이동 및 과정 파생의 억제로 시작하고, 궁극적으로는 분화 및 적절한 표적과 소통할 수 있도록 하는 연결을 형성하는 일련의 단계를 필요로 한다. 과거 수년에 걸쳐, GTP아제의 Rho 패밀리 및 관련된 분자들은 뉴런 발생, 신경 돌기 파생 및 분화, 축삭돌기 길잡이(pathfinding), 및 수지상 척추 형성 및 유지를 비롯한 뉴런 발생의 다양한 측면에 중요한 역할을 하는 것이 명확해졌다.

[0065] 신경 돌기 파생 억제 및 신경 돌기 반발을 위한 하나의 공통 분모는 성장 원뿔 내 액틴 재배열이다. 뉴런 및 비뉴런 세포에서 액틴 세포골격의 조절에 중심이 되는 것은 작은 GTP아제의 Rho 패밀리이다. Rho 패밀리 구성원은 불활성 GDP-결합형 및 활성 GTP-결합형 사이에서 순환한다. 여러 증거들에 따르면, Rho GTP아제의 활성 상태를 조작하는 것은 성장 원뿔 붕괴 및 신경 돌기 파생 억제를 조절할 수 있다는 것을 시사한다.

[0066] 더욱 최근에서는, 양상적으로, Rho 경로의 불활성은 운동성의 신속한 회복 및 전지-후지 배위의 점진적 회복을 유도할 수 있다. 이러한 발견은 Rho 신호전달 경로가 척추 손상 후 치료적 중재를 위한 잠재적 표적이라는 증거를 제공한다.

- [0067] **p70S6K 키나아제**
- [0068] 70 kDa의 리보솜 단백질 키나아제인 p70S6K(또한 SK6, p70/p85 S6 키나아제, p70/p85 리보솜 S6 키나아제 및 pp70s6k로도 공지됨)는 단백질 키나아제의 AGC 하위 패밀리의 구성원이다. p70S6K는 포스파티딜이노시톨 3 키나아제(PBK)/AKT 경로의 구성성분인 세린-트레오닌 키나아제이다. p70S6K는 PBK의 하류이며, 수많은 미토겐, 호르몬 및 성장 인자에 대해 반응하여 다수의 부위에서 인산화를 통해 활성화가 일어난다. 특별히 리보솜 단백질을 코딩하는 상기 mRNA의 번역을 하향조절한 결과로, 라파마이신은 p70S6K 활성을 억제하도록 작용하고 단백질 합성을 차단하기 때문에 이 반응은 mTOR의 제어 하에 일어날 수 있다. p70S6K는 또한 PBK 및 이의 하류 표적 AKT에 의해 조절된다. 워트만닌 및 라파마이신은 PBK 경로의 의존적인 부위에서 p70S6K 인산화로 감소를 유발한다. 돌연변이체 p70S6K는 워트만닌에 의해 억제되지만 라파마이신에 의해서는 억제되지 않는데, 이는 PI3K 경로가 mTOR 활성의 조절에 독립적인 p70S6K 상의 효과를 제시할 수 있는 것을 시사하고 있다.
- [0069] 효소 p70S6K는 S6 리보솜 단백질의 인산화에 의해 단백질 합성을 조절한다. S6 인산화는 증가된 발현이 세포 성장 및 증식에 중요한 리보솜 단백질 및 번역 신장 인자를 비롯한 번역 장치의 mRNA 코딩 성분의 증가된 번역과 서로 관련된다. 상기 mRNA는 이의 5' 전사 출발(5'TOP으로 명명됨)에서 올리고피리미딘 트랙을 포함하는데, 이는 번역 수준에서 이의 조절에 중요한 것으로 보여졌다.
- [0070] 번역에서의 연관성 이외에도, p70S6K 활성화는 또한 세포 주기 제어, 뉴런 세포 분화, 세포 운동성의 조절 및 종양 전이, 면역 반응 및 조직 수복에 중요한 세포 반응에도 연관되어 있었다. p70S6K에 대한 항체는 래트 섬유아세포를 S기로 진입하게 하는 미토겐 반응을 폐지시키는데, 이는 p70S6K 기능이 세포 주기에서 G1기부터 S기까지의 진행에 중요하다는 것을 의미한다. 또한, p70S6K의 과인산화되고 활성화된 형태 생산의 억제 결과로, 라파마이신에 의한 세포 주기의 G1기부터 S기에서 세포 주기 증식이 억제되는 것이 확인되었다.
- [0071] 종양 억제제 LKB1은 AMPK를 활성화시켜 mTOR/p70S6K 경로 내에서 TSC 1/2 복합체를 인산화시키고, 이에 따라 PKB 독립적 경로를 통해 p70S6K로 공급된다. LKB1 내 돌연변이는 포이즈 예거 증후군(PJS)을 유발하고, 여기서 PJS 환자는 일반적인 집단보다 암의 발달이 15배인 것 같다. 또한, 폐 선암의 1/3은 불활성화 LKB1 돌연변이를 갖고 있다.
- [0072] 종양 세포 증식 및 세포사멸로부터의 세포 보호에서 p70S6K의 역할은 종양 조직에서 성장 인자 수용체 신호 전달, 과발현 및 활성화에의 참여에 기초하여 지지된다. 예를 들어, 노던 및 웨스턴 분석에 따르면, PS6K 유전자의 증폭은 각각 mRNA 및 단백질 발현시 상응한 증가에 의해 동반되었음이 밝혀졌다(Cancer Res. (1999) 59: 1408-11 - Localization of PS6K to Chromosomal Region 17q23 and Determination of Its Amplification in Breast Cancer).
- [0073] 염색체 17q23은 원발성 유방 종양 최대 20%, BRC A2 돌연변이를 포함하는 유방 종양 87% 및 BRCA1 돌연변이를 포함하는 종양 50%와, 다른 암 유형 예컨대 췌장, 방광 및 신경아세포종에서 증폭된다(문헌[M Barlund, O Monni, J Kononen, R Cornelison, J Torhorst, G Sauter, O-P Kallioniemi and Kallioniemi A, Cancer Res., 2000, 60:5340-5346] 참조). 유방암 내 17q23 증폭은 PAT1, RAD51C, PS6K, 및 SIGMA1B 유전자와 관련되는 것으로 제시되었다(Cancer Res. (2000): 60, pp. 5371-5375).
- [0074] p70S6K 유전자는 이 영역에서 증폭 및 과발현의 표적으로서 동정되었고, 증폭과 좋지 않은 예후 사이에서 통계적으로 유의적인 관련성이 관찰되었다.
- [0075] p70S6K 활성화의 임상적 억제는 상류 키나아제 mTOR의 억제제인 CCI-779(라파마이신 에스테르)로 치료된 신장 암종 환자에서 관찰되었다. 질병의 진행과 p70S6K 활성의 억제 사이에서의 유의적인 선형 관련성이 보고되었다.
- [0076] p70S6K는 대사 질병 및 질환에 연관되어 있다. p70S6의 부재는 인슐린 감도를 향상시키는 반면 노화에서 유도되고 일상식품에서 유도된 비만을 보호하는 것으로 보고되었다. 대사 질환 및 질환, 예컨대 비만, 당뇨병, 대사 증후군, 인슐린 내성, 고혈당, 과아미노산혈증, 및 고지혈증에서 p70S6K의 역할은 관찰을 기초로 지지된다.
- [0077] **PKB 및 PKA 억제 활성을 갖는 피라졸 화합물**
- [0078] 여러 부류의 화합물들은 PKA 및 PKB 억제 활성을 갖는 바와 같이 개시되었다. 예를 들어, WO 2005/061463(Astex)은 PKB 및 PKA 억제 활성을 갖는 피라졸 화합물을 개시하고 예시된 하나의 특정 화합물은 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올이다. 하기 제시된 구조의 이 화합물은 별모양으로 표시된 탄소 원자에서 키랄 중심을 갖는다.



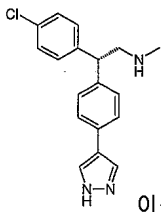
[0079]

[0080]

WO 2005/061463의 실시예 84에 기술된 화합물은 2개의 가능한 거울상 이성질체의 라세미 혼합물이다. 실시예 106 및 107에 따르면, 실시예 84의 화합물은 각 경우에 각각의 시험관내 PKA 및 PKB 분석에서 1 μM 미만의 IC₅₀ 값을 갖는다.

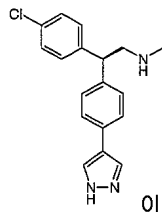
[0081]

WO 2005/061463은 또한 다음의 다수의 개별 거울상 이성질체를 개시하고 예시한다:



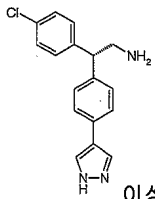
이성질체 A

WO 2005/061463 - 실시예 22



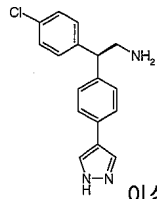
이성질체 B

WO 2005/061463 - 실시예 23



이성질체 C

WO 2005/061463 - 실시예 30



이성질체 D

WO 2005/061463 - 실시예 31

[0082]

[0083]

이성질체 A 및 B는 거울상 이성질체의 한 쌍을 구성하고 이성질체 C 및 D는 거울상 이성질체의 또다른 쌍을 구성한다.

[0084]

본 발명의 출원인에 의해 수행된 테스트에 따르면, 이성질체 A는 결합 검정에서 이의 거울상체 이성질체 B보다 PKB에 대해 10배 이상 활성임을 입증하였다. 유사하게, 이성질체 C는 결합 검정에서 이의 거울상체 이성질체 D보다 약 10배 더 활성이다. 하지만, 기전 세포 ELISA 분석에서, 이성질체 C 및 D는 본질적으로 동등하였다.

발명의 상세한 설명

[0085]

발명의 개요

[0086]

상기 기술된 이성질체 A, B, C 및 D의 활성을 기초로, WO 2005/061463에서 실시예 84의 화합물의 각 거울상 이성질체는 또한 활성에서 비교적 적은 차이를 보여줄 것을 예상할 수 있었다.

[0087]

하지만, 예상외로 이하에서 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 S-거울상 이성질체는 해당 R-거울상 이성질체보다 PKB에 대하여 100배 더 활성(방사계수측정 결합 검정에 의해 결정됨)임을 발견하였다. 또한, 상기 이성질체 C 및 D가 기전 세포 검정에서 본질적으로 동등한 반면, 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 S-거울상 이성질체는 이 검정에서 탁월한 활성을 갖고, R-거울상 이성질체는 측정가능한 활성이 없었다. 상기 공지된 각 거울상 이성질체 A, B, C 및 D의 성질과 비교하였을 때, 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 S-거울상 이성질체와 R-거울상 이성질체 사이의 활성 차이는 매우 놀라우며 예측될 수 없었다.

[0088]

상기에 따르면, 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 S-거울상 이성질체는 이의 거울상체인 R-이성질체에 비해 실질적인 이점을 갖는다.

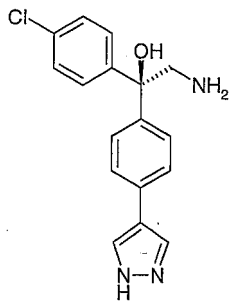
[0089]

따라서, 제1 측면에 있어서, 본 발명은 (S) 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올을

포함하는 조성물로서, 실질적으로 (R)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올을 포함하지 않거나 (S) 및 (R) 거울상 이성질체의 혼합물(이때, (S) 거울상 이성질체가 우세함)을 포함하는 조성물을 제공한다.

- [0090] 본 발명은 또한 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 포함하는 조성물을 제공하며, 이의 75% 이상은 S-거울상 이성질체 형태이다.
- [0091] 본원에 사용된 용어 "조성물"은 청구 대상의 조성물을 지칭하며 단독으로 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올과, 추가의 성분을 포함하는 조성물로 이루어진 조성물을 포함한다. 본 발명에 따르면, 조성물 내 존재하는 전체 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올 중 75% 이상은 S-거울상 이성질체 형태이어야 한다. 상기 조성물은 편의상 "본 발명의 조성물" 또는 "본원에 정의된 조성물" 또는 "조성물"로 본원에서 지칭될 수 있다.
- [0092] 조성물 내 존재하는 거울상 이성질체 형태 양자의 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 총량과 비교하여 제시된 조성물에 존재하는 (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 양은 "거울상 이성질체의 순도"로 표현될 수 있다. 예를 들면, 조성물 내 존재하는 전체 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올 중 75%가 S-거울상 이성질체의 형태로 존재하는 경우, 거울상 이성질체의 순도는 75%이다.
- [0093] 바람직하게는, (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올은 거울상 이성질체의 순도가 80% 이상, 더욱 바람직하게는 85% 이상, 또는 90% 이상, 또는 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99.5% 이상이다.
- [0094] 바람직한 구체예에서, 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올 중 98% 이상은 S-거울상 이성질체 형태이다.
- [0095] 또다른 구체예에서, 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올 중 99.9% 이상은 S-거울상 이성질체 형태이다.
- [0096] 바람직하게는, 실질적으로 (R)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올은 조성물 내에 존재하지 않는다. 본원에 사용된 용어 "실질적으로 (R)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올은 조성물 내에 존재하지 않는다"란 R-거울상 이성질체가 본원에 기술된 분석적 방법을 사용하여 검출할 수 없다는 것을 의미한다.
- [0097] 일 구체예에서, 조성물은 (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물이다.
- [0098] 또다른 구체예에서, 조성물은 실질적으로 순수한 형태로, 즉 불순물 0.5% 미만, 더욱 바람직하게는 0.1% 미만, 가장 바람직하게는 0.01% 미만을 포함하는 (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물로 이루어진다.
- [0099] 바람직한 구체예에서, 단일 불순물은 조성물 내에서 0.2 중량% 초과, 바람직하게는 0.1 중량% 초과, 양으로 존재하지 않는다.
- [0100] 또다른 구체예에서, 불순물의 동정을 공지하는 경우, 불순물이 조성물 내 0.5% 초과량, 또는 0.4% 초과량, 또는 0.3% 초과량, 또는 0.2% 초과량, 또는 0.1% 초과량, 또는 0.05% 초과량, 또는 0.01% 초과량으로 존재하지 않는 것이 바람직하다.
- [0101] (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올은 하기 화학식 I로 표시되며, 본원에서 "화학식 I의 화합물" 또는 "S-거울상 이성질체"로 지칭될 수 있다.

화학식 I



- [0102]
- [0103] (R)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올은 본원에서 "R-거울상 이성질체"로 편의상 지칭될 수 있다.
- [0104] 본원에 사용된 용어 "R" 및 "S"는 Cahn, Ingold 및 Prelog에 의해 개발된 "R 및 S" 명칭으로 지칭된다(문헌 [Advanced Organic Chemistry by Jerry March, 4th Edition, John Wiley & Sons, New York, 1992, pages 109-114], 및 또한 문헌[Cahn, Ingold & Prelog, Angew. Chem. Int. Ed. Engl, 1966, 5, 385-415] 참조).
- [0105] 본 발명의 조성물은, 예를 들어 하기 기술된 바와 같이 키랄 크로마토그래피를 사용하여 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 (S)와 (R) 거울상 이성질체의 혼합물을 부분적 또는 완전하게 분리시킴으로써 제조할 수 있다.
- [0106] (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올(즉, 화학식 I의 화합물)은 단백질 키나아제 B(PKB) 및/또는 단백질 키나아제 A(PKA)의 억제 또는 조절 활성을 가져서, 이에 따라 PKB 및/또는 PKA에 의해 매개되는 질병 상태 또는 증상을 예방하거나 치료하는데 유용하다.
- [0107] 또다른 측면에서, 본 발명은 실질적으로 순수한 형태로, 즉 불순물 0.5% 미만, 더욱 바람직하게는 0.1% 미만, 가장 바람직하게는 0.01% 미만을 포함하는 화학식 I의 화합물, 즉 (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 제공한다.
- [0108] 일 구체예에서, 화합물은 N-산화물 이외의 것이고 유리 염기 또는 이의 염, 용매화물 또는 호변체로부터 선택된다.
- [0109] 또다른 구체예에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 호변체는 유리 염기의 형태이다.
- [0110] 추가 구체예에서, 화학식 I의 화합물 또는 이의 호변체는 염의 형태이다. 본 발명에 따라 제조된 하나의 특정 염은 염산으로 형성된 염이다.
- [0111] 추가 측면에서, 본 발명은 다음을 제공한다:
- [0112] - 단백질 키나아제 B에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물.
- [0113] - 단백질 키나아제 B에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.
- [0114] - 단백질 키나아제 B에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 방법으로서, 이를 필요로 하는 피험체에게 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0115] - 포유동물에서 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사를 포함하거나 이로부터 야기되는 질병 또는 증상을 치료하는데 사용하기 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물.
- [0116] - 포유동물에서 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사를 포함하거나 이로부터 야기되는 질병 또는 증상을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.

- [0117] - 포유동물에서 비정상인 세포 성장을 포함하거나 이로부터 야기되는 질병 또는 증상을 치료하는 방법으로서, 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사를 억제하는데 유효한 양으로 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0118] - 포유동물에서 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사를 포함하거나 이로부터 야기되는 질병 또는 증상의 발생을 완화시키거나 감소시키는 방법으로서, 비정상인 세포 성장을 억제시키는데 유효한 양으로 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0119] - 포유동물에서 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사를 포함하거나 이로부터 야기되는 질병 또는 증상을 치료하는 방법으로서, 단백질 키나아제 B 활성을 억제시키는데 유효한 양으로 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 포유동물에 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0120] - 단백질 키나아제 B를 억제시키는데 사용하기 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물.
- [0121] - 키나아제를 본원에 정의된 키나아제 억제 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물과 접촉시키는 단계를 포함하는 단백질 키나아제 B의 억제 방법
- [0122] - 단백질 키나아제 B 및/또는 단백질 키나아제 A의 활성을 억제시킴으로써 세포 과정(예, 세포 분열)을 조절하는데 사용하기 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물.
- [0123] - 단백질 키나아제 B 및/또는 단백질 키나아제 A의 활성을 억제시키기 위해 세포 과정(예, 세포 분열)을 조절하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.
- [0124] - 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 사용하여 단백질 키나아제 B 및/또는 단백질 키나아제 A의 활성을 억제시킴으로써 세포 과정(예, 세포 분열)을 조절하는 방법.
- [0125] - 단백질 키나아제 A에 의해 매개되는 질병 상태 또는 증상의 예방 또는 치료에 사용하기 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물.
- [0126] - 단백질 키나아제 A에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.
- [0127] - 단백질 키나아제 A에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 방법으로서, 이를 필요로 하는 피험체에 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0128] - 포유동물에서 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사를 포함하거나 이로부터 야기되는 질병 또는 증상을 치료하는 방법으로서, 포유동물에 단백질 키나아제 A 활성을 억제시키는데 유효한 양으로 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0129] - 단백질 키나아제 A를 억제하기 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물.
- [0130] - 키나아제를 본원에 정의된 키나아제 억제 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물과 접촉시키는 단계를 포함하는 단백질 키나아제 A의 억제 방법.
- [0131] - 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 사용하여 단백질 키나아제 A의 활성을 억제시킴으로써 세포 과정(예, 세포 분열)을 조절하는 방법.
- [0132] - 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사로부터 야기되는 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체

또는 N-산화물의 용도.

- [0133] - 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물.
- [0134] - 의약으로 사용하기 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물.
- [0135] - 본원에 개시된 질병 상태 또는 증상 중 어느 하나를 예방 또는 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.
- [0136] - 본원에 개시된 질병 상태 또는 증상 중 어느 하나를 예방 또는 치료하기 위한 방법으로서, 환자(예, 이를 필요로 하는 환자)에게 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 화합물(예, 치료적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0137] - 본원에 개시된 질병 상태 또는 증상의 발생을 완화 또는 감소시키기 위한 방법으로서, 환자(예, 이를 필요로 하는 환자)에게 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 화합물(예, 치료적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0138] - 단백질 키나아제 B에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 진단 및 치료하는 방법으로서, (i) 환자가 겪고 있거나 겪을 수 있는 질병 또는 증상이 단백질 키나아제 B에 대해 활성을 갖는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 것인지 여부를 측정하기 위해 환자를 선별하는 단계; 및 (ii) 이에 따라 환자가 감수성인 질병 또는 증상을 나타내는 경우, 이후 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0139] - 단백질 키나아제 B에 대해 활성을 갖는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 질병 또는 증상을 겪고 있거나 겪을 위험이 있는 것으로 선별되고 측정된 환자에서 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.
- [0140] - 단백질 키나아제 B에 대해 활성을 갖는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 질병 또는 증상을 겪고 있거나 겪을 위험이 있는 것으로 선별되고 측정된 환자에서 질병 상태 또는 증상을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물.
- [0141] - 단백질 키나아제 A에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 진단 및 치료하는 방법으로서, (i) 환자가 겪고 있거나 겪을 수 있는 질병 또는 증상이 단백질 키나아제 A에 대해 활성을 갖는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 것인지 여부를 측정하기 위해 환자를 선별하는 단계; 및 (ii) 이에 따라 환자가 감수성인 질병 또는 증상을 나타내는 경우, 이후 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0142] - 단백질 키나아제 A에 대해 활성을 갖는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 질병 또는 증상을 겪고 있거나 겪을 위험이 있는 것으로 선별되고 측정된 환자에서 질병 상태 또는 증상을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물.
- [0143] - 단백질 키나아제 A에 대해 활성을 갖는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 질병 또는 증상을 겪고 있거나 겪을 위험이 있는 것으로 선별되고 측정된 환자에서 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.
- [0144] - 단백질 키나아제 B 및/또는 단백질 키나아제 A의 조절제(예, 억제제)로 사용하기 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물.
- [0145] - 단백질 키나아제 B 및/또는 단백질 키나아제 A를 조절(예, 억제)하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.
- [0146] - 단백질 키나아제 B 및/또는 단백질 키나아제 A를 조절(예, 억제)하는 방법으로서, 단백질 키나아제 B 및/또는 단백질 키나아제 A(예, 세포 환경 - 예컨대 생체내에서)를 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.
- [0147] - (a) ROCK 키나아제의 조절(예, 억제)을 나타내는 질병 또는 증상의 예방 또는 치료; 및/또는 (b) ROCK 키나아제의 조절(예, 억제)을 나타내는 피험체 또는 환자 집단의 치료에 사용하기 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화

학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물.

- [0148] - (a) ROCK 키나아제의 조절(예, 억제)을 나타내는 질병 또는 증상의 예방 또는 치료; 및/또는 (b) ROCK 키나아제의 조절(예, 억제)을 나타내는 피험체 또는 환자 집단의 치료에 사용하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.
- [0149] - ROCK 키나아제에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 방법으로서, 이를 필요로 하는 피험체에게 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0150] - 포유동물에서 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사를 포함하거나 이로부터 야기되는 질병 또는 증상을 치료하는 방법으로서, 포유동물에게 ROCK 키나아제 활성을 억제시키는데 유효한 양으로 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0151] - 키나아제를 본원에 정의된 키나아제 억제 조성물 또는 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는 ROCK 키나아제의 억제 방법.
- [0152] - 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 사용하여 ROCK 키나아제의 활성을 억제함으로써 세포 과정(예, 세포 분열)을 조절하는 방법.
- [0153] - ROCK 키나아제에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하는데 사용하기 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물.
- [0154] - ROCK 키나아제에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.
- [0155] - ROCK 키나아제에 의해 매개된 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사로부터 야기된 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.
- [0156] - ROCK 키나아제에 의해 매개된 포유동물에서 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사를 포함하거나 이로부터 야기된 질병 또는 증상의 발생을 완화 또는 감소시키기 위한 방법으로서, 포유동물에게 비정상인 세포 성장을 억제시키는데 유효한 양으로 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0157] - 본원에 개시된 질병 상태 또는 증상 중 어느 하나를 예방 또는 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.
- [0158] - 본원에 개시된 질병 상태 또는 증상 중 어느 하나를 예방 또는 치료하기 위한 방법으로서, 환자(예, 이를 필요로 하는 환자)에게 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물(예, 치료적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0159] - 본원에 개시된 질병 상태 또는 증상의 발생을 완화 또는 감소시키기 위한 방법, 환자(예, 이를 필요로 하는 환자)에게 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물(예, 치료적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0160] - ROCK 키나아제에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 진단 및 치료하는 방법으로서, (i) 환자가 겪고 있거나 겪을 수 있는 질병 또는 증상이 ROCK 키나아제에 대해 활성을 갖는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 것인지 여부를 측정하기 위해 환자를 선별하는 단계; 및 (ii) 이에 따라 환자가 감수성인 질병 또는 증상을 나타내는 경우, 이후 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0161] - ROCK 키나아제에 대해 활성을 갖는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 질병 또는 증상을 겪고 있거나 겪을 위험이 있는 것으로 선별되고 측정된 환자에서 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.
- [0162] - (a) 단백질 키나아제 p70S6K의 조절(예, 억제)을 나타내는 질병 또는 증상의 예방 또는 치료; 및/또는 (b) 단백질 키나아제 p70S6K의 조절(예, 억제)을 나타내는 피험체 또는 환자 집단의 치료에 사용하기 위한 본원에 정

의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물.

- [0163] - (a) 단백질 키나아제 p70S6K의 조절(예, 억제)을 나타내는 질병 또는 증상의 예방 또는 치료; 및/또는 (b) 단백질 키나아제 p70S6K의 조절(예, 억제)을 나타내는 피험체 또는 환자 집단의 치료에 사용하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.
- [0164] - 단백질 키나아제 p70S6K에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 방법으로서, 이를 필요로 하는 피험체에게 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0165] - 포유동물에서 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사를 포함하거나 이로부터 야기되는 질병 또는 증상을 치료하는 방법으로서, 포유동물에게 단백질 키나아제 p70S6K 활성을 억제시키는데 유효한 양으로 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0166] - 키나아제를 본원에 정의된 키나아제 억제 조성물 또는 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는 단백질 키나아제 p70S6K의 억제 방법.
- [0167] - 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 사용하여 단백질 키나아제 p70S6K의 활성을 억제함으로써 세포 과정(예, 세포 분열)을 조절하는 방법.
- [0168] - 단백질 키나아제 p70S6K에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하는데 사용하기 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물.
- [0169] - 단백질 키나아제 p70S6K에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.
- [0170] - 단백질 키나아제 p70S6K에 의해 매개된 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사로부터 야기된 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.
- [0171] - 단백질 키나아제 p70S6K에 의해 매개된 포유동물에서 비정상인 세포 성장 또는 비정상적으로 정지된 세포사를 포함하거나 이로부터 야기된 질병 또는 증상의 발생을 완화 또는 감소시키기 위한 방법으로서, 포유동물에게 비정상인 세포 성장을 억제시키는데 유효한 양으로 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0172] - 본원에 개시된 질병 상태 또는 증상 중 어느 하나를 예방 또는 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.
- [0173] - 본원에 개시된 질병 상태 또는 증상 중 어느 하나를 예방 또는 치료하기 위한 방법으로서, 환자(예, 이를 필요로 하는 환자)에게 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물(예, 치료적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0174] - 본원에 개시된 질병 상태 또는 증상의 발생을 완화 또는 감소시키기 위한 방법, 환자(예, 이를 필요로 하는 환자)에게 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물(예, 치료적 유효량)을 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0175] - 단백질 키나아제 p70S6K에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상을 진단 및 치료하는 방법으로서, (i) 환자가 겪고 있거나 겪을 수 있는 질병 또는 증상이 단백질 키나아제 p70S6K에 대해 활성을 갖는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 것인지 여부를 측정하기 위해 환자를 선별하는 단계; 및 (ii) 이에 따라 환자가 감수성인 질병 또는 증상을 나타내는 경우, 이후 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.
- [0176] - 단백질 키나아제 p70S6K에 대해 활성을 갖는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 질병 또는 증상을 겪고 있거나 겪을 위험이 있는 것으로 선별되고 측정된 환자에서 질병 상태 또는 증상을 예방 또는 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 본원에 정의된 조성물 또는 화학식 I의 화합물, 또는 이의 염, 용매화물, 호변체 또는 N-산화물의 용도.

- [0177] 본 발명은 또한 하기 청구범위에 제시된 바와 같은 조합, 용도, 방법, 화합물 및 방법을 추가로 제공한다.
- [0178] **일반적인 선호예 및 정의**
- [0179] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "조절"은, 키나아제의 활성화에 적용될 때, 단백질 키나아제의 생물학적 활성의 수준의 변화를 정의하도록 의도된 것이다. 따라서, 조절은 관련 단백질 키나아제 활성화에서의 증가 또는 감소를 실시하는 생리적 변화를 포함한다. 후자의 경우, 조절은 "억제"로서 설명될 수 있다. 조절은 직접적으로 또는 간접적으로 발생할 수 있으며, 예를 들면 유전자 발현(예컨대 전사, 번역 및/또는 번역후 변형을 포함함)의 수준에서, 키나아제 활성화의 수준에 직접적으로 또는 간접적으로 작용하는 조절 요소를 코딩하는 유전자의 발현 수준에서를 비롯한 임의의 생리적 수준에서 그리고 임의의 기전에 의해 매개될 수 있다. 따라서, 조절은 돌연변이(들)에 의한 ((탈)활성화 비롯한) 단백질 키나아제(들)의 과활성(또는 저활성) 및 (탈)활성화뿐 아니라, 전사 효과에 의한 증가되거나 또는 감소된 발현 및/또는 유전자 증폭(즉, 다중 유전자 카피)를 비롯하여 키나아제의 상승 또는 억제된 발현 또는 상승된/억제된 발현을 의미할 수 있다. 따라서, 용어 "조절된", "조절하는" 및 "조절하다"가 그에 따라 해석되어야 한다.
- [0180] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "매개된"은, 예를 들면 본 명세서에 기재된 바와 같은 키나아제와 관련하여 사용될 때(그리고 예를 들면 다양한 생리적 과정, 질환, 상태, 증상, 요법, 치료 또는 중재(intervention)에 적용될 때), 그 용어가 적용되는 각종 과정, 질환, 상태, 증상, 치료 및 중재가, 키나아제가 생물학적 역할을 하는 것이 되도록 제한적으로 작용하도록 의도된 것이다. 그 용어가 질병, 상태 또는 증상에 적용되는 경우, 키나아제에 의한 생물학적 역할은 직접적이거나 또는 간접적일 수 있으며, 질환, 상태 또는 증상의 징후(또는 이의 병인 또는 진행)에 대한 필수적이고/이거나 충분리 수 있다. 따라서, 키나아제 활성화(및 특히 키나아제 활성화의 비정상적 수준, 예를 들면, 키나아제 과발현)은 반드시 질환, 상태 또는 증상의 근접한 원인일 필요는 없으며, 그 보다는 키나아제 매개된 질환, 상태 또는 증상은 해당 키나아제가 부분적으로만 관련되어 있는 다인성 병인 및 복합 진행을 갖는 것을 포함하는 것으로 고려된다. 그 용어가 치료, 예방 또는 중재에 적용되는 경우, 키나아제에 의한 역할은 직접적이거나 또는 간접적일 수 있으며, 치료, 예방 또는 중재 결과의 작업에 필수적이고/이거나 충분리 수 있다. 따라서, 키나아제에 의해 매개된 질병 상태 또는 증상은 임의의 특정한 약 약물 또는 치료에 대한 내성의 발달을 포함한다.
- [0181] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "ROCK 키나아제(들)" 및 "ROCK(들)"은 ROCK 키나아제 패밀리의 모든 구성원을 포함하는 동일한 총칭이며, 이에 따라 속 내의 종과 같은 ROCK1 및 ROCK2 양자를 포함한다. ROCK 키나아제 억제제, ROCK 키나아제 조절 및 ROCK 키나아제 활성화가 이에 따라 해석되는 것이 특히 바람직하다.
- [0182] 용어 "Rho 단백질"은 Rho A 및 RhoC를 비롯한 액틴 조직화의 구성에 관련된 거대한 GTP-결합 단백질 패밀리를 정의하는데 사용되는 당업계 용어이다.
- [0183] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "Rho 신호전달 경로"는 Rho 단백질 중 하나 이상의 구성원이 연관된 임의의 세포 신호전달 경로를 정의한다.
- [0184] 특히 본 발명과 관련된 것은 ROCK 키나아제(예, ROCK1 및/또는 ROCK2)가 하나 이상의 Rho 단백질(들)을 위한 근접함 작동자(예, 결합 파트너)인 Rho 신호전달 경로이고, 그러한 Rho 신호전달 경로는 특히 Rho 신호전달 경로를 참조하여 정의된 본 발명의 구체예에 바람직하다.
- [0185] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "조절"은, 본원에 기술된 ROCK에 적용될 때, ROCK의 생물학적 활성의 수준의 변화를 정의하도록 의도된 것이다. 따라서, 조절은 ROCK 활성화에서의 증가 또는 감소를 실시하는 생리적 변화를 포함한다. 후자의 경우, 조절은 "억제"로서 설명될 수 있다. 조절은 직접적으로 또는 간접적으로 발생할 수 있으며, 예를 들면 유전자 발현(예컨대 전사, 번역 및/또는 번역후 변형을 포함함)의 수준에서, ROCK 활성화의 수준에 직접적으로 또는 간접적으로 작용하는 조절 요소를 코딩하는 유전자의 발현 수준에서, 또는 효소(예, ROCK) 활성의 수준(예컨대, 알로스테릭 기전, 경쟁 억제, 활성 부위 불활성화, 피드백 억제 경로의 동요 등)에서를 비롯한 임의의 생리적 수준에서 그리고 임의의 기전에 의해 매개될 수 있다. 따라서, 조절은 돌연변이(들)에 의한 ((탈)활성화 비롯한) ROCK의 과활성(또는 저활성) 및 (탈)활성화뿐 아니라, 전사 효과에 의한 증가되거나 또는 감소된 발현 및/또는 유전자 증폭(즉, 다중 유전자 카피)를 비롯하여 ROCK의 상승 또는 억제된 발현 또는 상승된/억제된 발현을 의미할 수 있다. 따라서, 용어 "조절된" 및 "조절하다"가 그에 따라 해석되어야 한다.
- [0186] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "매개된"은, 본 명세서에 기재된 바와 같은 ROCK와 관련하여 사용될 때(그리고 예를 들면 다양한 생리적 과정, 질환, 상태, 증상, 요법, 치료 또는 중재에 적용될 때), 그 용어가 적용되는 각종 과정, 질환, 상태, 증상, 치료 및 중재가, ROCK가 생물학적 역할을 하는 것이 되도록 제한적으로 작용하도록

의도된 것이다. 그 용어가 질병, 상태 또는 증상에 적용되는 경우, ROCK에 의한 역할은 직접적이거나 또는 간접적일 수 있으며, 질환, 상태 또는 증상의 징후(또는 이의 병인 또는 진행)에 대한 필수적이고/이거나 충분리 수 있다. 따라서, ROCK 활성화(및 특히 ROCK 활성화의 비정상적 수준, 예를 들면, ROCK 과발현)은 반드시 질환, 상태 또는 증상의 근접한 원인일 필요는 없으며, 그보다는 ROCK 매개된 질환, 상태 또는 증상은 ROCK이 부분적으로만 관련되어 있는 다인성 병인 및 복합 진행을 갖는 것을 포함하는 것으로 고려된다. (예를 들어, 본 발명의 "ROCK 매개된 치료" 및 "ROCK 매개된 예방"에서) 그 용어가 치료, 예방 또는 중재에 적용되는 경우, ROCK에 의한 역할은 직접적이거나 또는 간접적일 수 있으며, 치료, 예방 또는 중재 결과의 작업에 필수적이고/이거나 충분리 수 있다. 본 발명의 다수의 ROCK에 의해 매개된 생리학적 과정, 질병 상태, 증상, 요법, 치료 또는 중재는 (본원에 정의된) Rho 신호전달 경로와 관련되며, 이에 따라 연장에 의해 "Rho-매개된" 생리학적 과정, 질병, 상태, 증상, 요법, 치료 또는 중재로 부를 수 있다.

[0187] 용어 "나타내는"은 질병, 증상, 피험체 또는 환자 집단과 관련하여 특정 중재의 임상적 바람직함 또는 필연성을 전달하기 위한 질병, 증상, 피험체 또는 환자 집단과 관련하여 본원에 사용된 당업계의 용어이다. 따라서, ROCK 키나아제의 조절(예, 억제)을 나타내는" 질병, 증상, 피험체 또는 환자 집단에 대한 본원의 언급은 ROCK 키나아제의 조절이 임상적으로 바람직하거나 필수적인 상기 질병 등을 정의하려는 의도이다. 예를 들면, ROCK 키나아제의 조절이 경감적, 예방적 또는 (적어도 부분적으로는) 치유적인 경우일 수 있다.

[0188] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "조절"은, 본원에 기술된 단백질 키나아제 P70S6K에 적용될 때, P70S6K의 생물학적 활성의 수준의 변화를 정의하도록 의도된 것이다. 따라서, 조절은 P70S6K 활성화에서의 증가 또는 감소를 실시하는 생리적 변화를 포함한다. 후자의 경우, 조절은 "억제"로서 설명될 수 있다. 조절은 직접적으로 또는 간접적으로 발생할 수 있으며, 예를 들면 유전자 발현(예컨대 전사, 번역 및/또는 번역후 변형을 포함함)의 수준에서, P70S6K 활성화의 수준에 직접적으로 또는 간접적으로 작용하는 조절 요소를 코딩하는 유전자의 발현 수준에서, 또는 효소(예, P70S6K) 활성화의 수준(예컨대, 알로스테릭 기전, 경쟁 억제, 활성 부위 불활성화, 피드백 억제 경로 등)에서를 비롯한 임의의 생리적 수준에서 그리고 임의의 기전에 의해 매개될 수 있다. 따라서, 조절은 돌연변이(들)에 의한 ((탈)활성화 비롯한) P70S6K의 과활성(또는 저활성) 및 (탈)활성화뿐 아니라, 전사 효과에 의한 증가되거나 또는 감소된 발현 및/또는 유전자 증폭(즉, 다중 유전자 카피)를 비롯하여 P70S6K의 상승 또는 억제된 발현 또는 상승된/억제된 발현을 의미할 수 있다. 따라서, 용어 "조절된" 및 "조절하다"가 그에 따라 해석되어야 한다.

[0189] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "매개된"은, 본 명세서에 기재된 바와 같은 P70S6K와 관련하여 사용될 때(그리고 예를 들면 다양한 생리적 과정, 질환, 상태, 증상, 요법, 치료 또는 중재에 적용될 때), 그 용어가 적용되는 각종 과정, 질환, 상태, 증상, 치료 및 중재가, P70S6K가 생물학적 역할을 하는 것이 되도록 제한적으로 작용하도록 의도된 것이다. 그 용어가 질병, 상태 또는 증상에 적용되는 경우, P70S6K에 의한 역할은 직접적이거나 또는 간접적일 수 있으며, 질환, 상태 또는 증상의 징후(또는 이의 병인 또는 진행)에 대한 필수적이고/이거나 충분리 수 있다. 따라서, P70S6K 활성화(및 특히 P70S6K 활성화의 비정상적 수준, 예를 들면, P70S6K 과발현)은 반드시 질환, 상태 또는 증상의 근접한 원인일 필요는 없으며, 그보다는 P70S6K 매개된 질환, 상태 또는 증상은 P70S6K이 부분적으로만 관련되어 있는 다인성 병인 및 복합 진행을 갖는 것을 포함하는 것으로 고려된다. (예를 들어, 본 발명의 "P70S6K 매개된 치료" 및 "P70S6K 매개된 예방"에서) 그 용어가 치료, 예방 또는 중재에 적용되는 경우, P70S6K에 의한 역할은 직접적이거나 또는 간접적일 수 있으며, 치료, 예방 또는 중재 결과의 작업에 필수적이고/이거나 충분리 수 있다.

[0190] 용어 "중재"는 임의의 수준에서 생리학적 변화를 실시하는 임의의 작용을 정의하는데 사용되는 당업계의 용어이다. 따라서 중재는 임의의 생리학적 과정, 사건, 생화학적 경로 또는 세포/생화학적 사건의 유도 또는 억제를 포함할 수 있다. 본 발명의 중재는 통상 질병 또는 증상의 치유, 치료 또는 예방을 실시한다(또는 이에 기여한다).

[0191] 본원에 달리 나타내지 않는 한, 본원에서 (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올, 또는 화학식 I의 화합물 또는 S-거울상 이성질체에 대한 언급은, 예컨대 하기 논의된 바와 같이 유리 염기와, 이의 이온형, 염, 용매화물, N-산화물, 호변체형 및 보호형을 포함한다.

[0192] 화합물은 N-산화물 이외의 것일 수 있다. 예를 들면, 일 구체예에서, 화학식 I의 화합물은 N-산화물 이외의 것이고 유리 염기의 형태이다.

[0193] 또다른 구체예에서, 화학식 I의 화합물은 N-산화물 이외의 것이고 염의 형태이다.

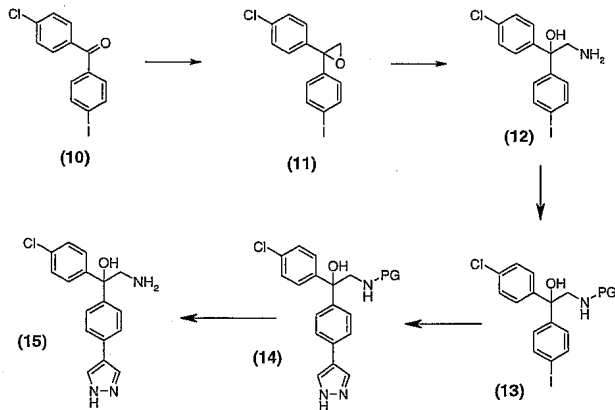
- [0194] 염 형태는 선택될 수 있고 문헌[*Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002]에 기술된 방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들면, 산 부가 염은 제시된 염 형태가 불용성이거나 용해성이 좋지 않은 유기 용매 중에 유리 염기를 용해시킨 후 적당한 용매 중에 필요한 산을 첨가함으로써 염을 용액으로부터 침전 시킴으로써 제조할 수 있다.
- [0195] 산 부가 염은 광범위하게 다양한 산, 무기 산 및 유기 산 모두에 의해 형성시킬 수 있다. 산 부가 염의 예로는 아세트산, 2,2-디클로로아세트산, 아디프산, 알긴산, 아스코르브산(예, L-아스코르브산), L-아스파르트산, 벤젠설포산, 벤조산, 4-아세트아미도벤조산, 부탄산, (+) 캄포산, 캄포-설포산, (+)-(1S)-캄포-10-설포산, 카프르산, 카프로산, 카프릴산, 신남산, 시트르산, 시클람산, 도데실황산, 에탄-1,2-디설포산, 에탄설포산, 2-히드록시에탄설포산, 포름산, 푸마르산, 갈락타르산, 겐티스산, 글루코헵탄산, D-글루콘산, 글루쿠론산(예컨대, D-글루쿠론산), 글루탐산(예컨대, L-글루탐산), α -옥소글루타르산, 글리콜산, 힌푸르산, 브롬화수소산, 염산, 요오드화수소산, 이젠티온산, 락트산(예컨대, (+)-L-락트산 및 (\pm)-DL-락트산), 락토비온산, 말레산, 말산, (-)-L-말산, 말론산, (\pm)-DL-만델산, 메탄설포산, 나프탈렌설포산(예컨대, 나프탈렌-2-설포산), 나프탈렌-1,5-디설포산, 1-히드록시-2-나프토산, 니코틴산, 질산, 올레산, 오르트산, 옥살산, 팔미트산, 파모산, 인산, 프로피온산, L-피로글루탐산, 살리실산, 4-아미노-살리실산, 세바크산, 스테아르산, 숙신산, 황산, 탄닌산, (+)-L-타르타르산, 티오시안산, 툴루엔설포산(예, *p*-톨루엔설포산), 운데실렌산 및 발레르산으로 이루어진 군에서 선택된 산 뿐만 아니라 아실화된 아미노산 및 양이온 교환 수지에 의해 형성된 염을 포함한다.
- [0196] 산 부가 염의 하나의 구체적인 군은 염산, 요오드화수소산, 인산, 질산, 황산, 시트르산, 락트산, 숙신산, 말레산, 말산, 이젠티온산, 푸마르산, 벤젠설포산, 툴루엔설포산, 메탄설포산, 에탄설포산, 나프탈렌설포산, 발레르산, 아세트산, 프로판산, 부탄산, 말론산, 글루쿠론산 및 락토비온산에 의해 형성된 염을 포함한다. 상기 염 군 내에서, 염의 서브세트는 염산 또는 아세트산으로 형성된 염으로 이루어진다.
- [0197] 산 부가 염의 또다른 군은 아세트산, 아디프산, 아스코르브산, 아스파르트산, 시트르산, DL-락트산, 푸마르산, 글루콘산, 글루쿠론산, 힌푸르산, 염산, 글루탐산, DL-말산, 메탄설포산, 세바크산, 스테아르산, 숙신산 및 타르타르산을 포함한다.
- [0198] 화학식 I의 화합물은 염이 형성되는 산의 pKa에 따라 모노-염, 또는 디-염으로서 존재할 수 있다. 강산에서, 염 기성 피라졸 질소 뿐만 아니라 아미노기 내 질소 원자는 염 형성에 참여할 수 있다. 예컨대, 산이 약 3 미만의 pKa를 보유하는 경우(예, 염산, 황산 또는 트리플루오로아세트산과 같은 산), 화학식 I의 화합물은 통상적으로 산 2 몰 당량을 지닌 염을 형성할 것이다.
- [0199] 화학식 I의 화합물의 염 형태는 통상적으로 약학적으로 허용되는 염이며, 약학적으로 허용되는 염의 예는 문헌[Berge et al., 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts," *J Pharm. Sci.*, Vol. 66, pp. 1-19]에 논의되어 있다. 하지만, 약학적으로 허용가능하지 않은 염은 차후에 약학적으로 허용되는 염으로 전환될 수 있는 중간체 형태로서 제조될 수 있다. 예를 들면, 화학식 I의 화합물의 정제 또는 분리에서 유용할 수 있는 이와 같은 비-약학적으로 허용되는 염 형태는 또한 본 발명의 일부를 형성한다.
- [0200] 화학식 I의 화합물은 또한 N-산화물을 포함할 수 있고 상기 N-산화물은 화학식 I의 화합물의 정의의 범위 내에 있다.
- [0201] 일반적인 일 구체예에서, 화학식 I의 화합물은 N-산화물이 아니다.
- [0202] N-산화물은 모 아민을 산화제, 예컨대 과산화수소 또는 과-산(예, 퍼옥시카르복실산)으로 처리하여 형성될 수 있으며, 예를 들면 문헌[*Advanced Organic Chemistry*, by Jerry March, 4th Edition, Wiley Interscience, pages]을 참조할 수 있다. 더욱 특히, N-산화물은 아민 화합물을, 예를 들어 불활성 용매, 예컨대 디클로로메탄 중에서 *m*-클로로퍼옥시벤조산(MCPBA)과 반응시키는 L. W. Deady(*Syn. Comm.* 1977, 7, 509-514)의 절차에 의하여 생성될 수 있다.
- [0203] 화학식 I의 화합물은 키랄 크로마토그래피(키랄 지지체 상의 크로마토그래피)와 같은 적당한 분리 기법에 의해 *S*-거울상 이성질체와 *R*-거울상 이성질체의 라세미 혼합물로부터 제조할 수 있고 이 기법은 당업자에게 잘 공지되어 있다.
- [0204] 키랄 크로마토그래피의 대안으로서, 거울상 이성질체는 키랄 산, 예컨대 (+)-타르타르산, (-)- 피로글루탐산, (-)-디-톨루로일-1-타르타르산, (+)-만델산, (-)-말산, 및 (-)-캄포르설포산을 이용하여 부분입체이성질체 염을

형성하고, 우선 결정화에 의해 부분입체이성질체를 분리시킨 후, 염을 해리시켜 유리 염기의 개별 거울상 이성질체를 얻음으로써 분리시킬 수 있다.

- [0205] 화학식 I의 화합물은 하나 이상의 동위원소 치환을 갖는 변형체를 포함하며, 특정의 원소에 대한 언급은 본 발명의 범위 내에서 원소의 모든 동위원소를 포함한다. 예를 들면, 수소에 대한 언급은 본 발명의 범위 내에서 ^1H , $^2\text{H(D)}$ 및 $^3\text{H(T)}$ 를 포함한다. 유사하게, 탄소 및 산소에 대한 언급은 각각 본 발명의 범위내에서 ^{12}C , ^{13}C 및 ^{14}C 및 ^{16}O 및 ^{18}O 를 포함한다.
- [0206] 동위원소는 방사성 또는 비-방사성일 수 있다. 본 발명의 하나의 구체예에서, 화합물은 방사성 동위원소를 포함하지 않는다. 이러한 화합물은 치료적 용도에 바람직하다. 하지만, 또다른 구체예에서, 화합물은 하나 이상의 방사성동위원소를 포함할 수 있다. 이러한 방사성동위원소를 포함하는 화합물은 진단 분야에서 유용할 것이다.
- [0207] 또한, 화학식 I은 화합물의 임의의 다형태, 화합물의 용매화물(예, 수화물), 화합물의 착체(예, 시클로텍스트린과 같은 화합물과의 착체 또는 포접 또는 금속과의 착체를 포함) 및 화합물의 프로드러그이다. "프로드러그"라는 것은 예를 들면 본원에 정의된 바와 같이 생체내에서 생물학적으로 활성인 조성물로 전환되는 임의의 화합물을 의미한다.
- [0208] 예를 들면, 일부 프로드러그는 활성 화합물의 에스테르(예, 생리적으로 허용되는 대사 불안정성 에스테르)이다. 대사 중에, 에스테르 기($-\text{C}(=\text{O})\text{OR}$)는 분해되어 활성 약물을 산출한다. 이러한 에스테르는, 예를 들면 적절하게는 모 화합물에 존재하는 임의의 다른 반응성 기의 사전 보호와 함께, 모 화합물에서의 임의의 히드록실 기($-\text{C}(=\text{O})\text{OH}$)를 에스테르화시킨 후, 필요할 경우 탈보호시켜 형성될 수 있다.
- [0209] 이러한 대사 불안정성 에스테르의 예로는 화학식 $-\text{C}(=\text{O})\text{OR}$ 의 것이 포함되며, 여기서 R은 C_{1-7} 알킬(예, $-\text{Me}$, $-\text{Et}$, $-\text{nPr}$, $-\text{iPr}$, $-\text{nBu}$, $-\text{sBu}$, $-\text{iBu}$, $-\text{tBu}$); C_{1-7} 아미노알킬(예, 아미노에틸; 2-(N,N-디에틸아미노)에틸; 2-(4-모르폴리노)에틸); 및 아실옥시- C_{1-7} 알킬(예, 아실옥시메틸; 아실옥시에틸; 피발로일옥시메틸; 아세톡시메틸; 1-아세톡시에틸; 1-(1-메톡시-1-메틸)에틸-카르보닐옥시에틸; 1-(벤조일옥시)에틸; 이소프로폭시-카르보닐옥시메틸; 1-이소프로폭시-카르보닐옥시에틸; 시클로헥실-카르보닐옥시메틸; 1-시클로헥실-카르보닐옥시에틸; 시클로헥실옥시-카르보닐옥시메틸; 1-시클로헥실옥시-카르보닐옥시에틸; (4-테트라히드로피라닐옥시)카르보닐옥시메틸; 1-(4-테트라히드로피라닐)카르보닐옥시에틸; (4-테트라히드로피라닐)카르보닐옥시메틸; 및 1-(4-테트라히드로피라닐)카르보닐옥시에틸)이다.
- [0210] 또한, 일부 프로드러그는 효소 활성화되어 활성 화합물 또는 추가의 화학 반응시 활성 화합물을 생성하는 화합물(예를 들면 항체 지향성 효소-프로드러그 치료법(ADEPT), 유전자 지향성 효소-프로드러그 치료법(GDEPT), 중합체 지향성 효소-프로드러그 치료법(PDEPT), 리간드 지향성 효소-프로드러그 치료법(LIDEPT) 등)에서와 같이)을 산출한다. 예를 들면 프로드러그는 당 유도체 또는 기타의 글리코시드 콘쥬게이트가 될 수 있거나 또는, 아미노산 에스테르 유도체가 될 수 있다.
- [0211] **합성 방법**
- [0212] 따라서, 화학식 I의 화합물과 이의 R-거울상 이성질체 및 이의 혼합물은 하기 반응식 1에 제시된 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0213] 반응식 1에서, 치환된 벤조페논(10)은 염기(예, 수소화물 염기, 예컨대 수소화나트륨)의 존재 하에 디메틸설폭사이드 중에서 트리메틸설포늄 요오다이드와 반응함으로써 에폭시드(11)로 전환된다. 이후 에폭시드(11)는 통상 가열하면서 알콜 용매, 예컨대 메탄올 중에서 암모니아와 반응시켜 R-거울상 이성질체와 S-거울상 이성질체의 라세미 혼합물로 아민(12)을 얻는다.
- [0214] 아민(12)은 스즈키 커플링 조건 하에서 팔라듐 촉매(예, 테트라키스트리페닐포스핀 팔라듐(0))의 존재 하에 피라졸 보로네이트(예, 4-(4,4,5,5-테트라메틸-[1,3,2]디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸)와 직접 반응시켜 라세미 화합물(15)을 얻을 수 있다. 하지만, 스즈키 커플링 조건 하에서 비보호된 아민을 반응시키는 것은 비교적 불량한 생성물 수율을 얻고 이 생성물은 낮은 용해도로 인해 정제시키는 것이 비교적 어렵다는 것을 발견하였다. 이 문제는 아미노 기(예, Boc 기를 가진(이때, PG = Boc))를 우선 보호시켜 보호된 중간체(13)를 얻은 후 중간체(13)에 스즈키 커플링을 실시하여 보호된 화합물(14)을 얻음으로써 극복한다. 이후 보호된 화합물(14)은 잘 공지된 방법(예, PG = Boc일 경우, 에테르/메탄올 중 HCl을 사용)에 의해 탈보호되어 라세미 혼합물로서 생성물(1

5)을 얻는다.

반응식 1



[0215]

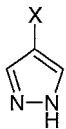
[0216] 라세미 혼합물(15)은, 예를 들어 키랄 크로마토그래피 방법 및 본원에 기술된 다른 방법을 사용하여 당업자에게 잘 공지된 방법에 의해 분리시킬 수 있다.

[0217] 또다른 측면에서, 본 발명은 화학식(15)의 화합물의 제조 방법으로서, 화학식(14)의 화합물로부터 보호기 PG를 제거한 후 경우에 따라 화합물(15)의 광학 이성질체를 분리시키고 이의 S-거울상 이성질체를 단리시키는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 상기 공정에 의해 제조가능한 화합물과, 상기 공정에 의해 제조되는 화학식(15)의 화합물을 제공한다.

[0218] 추가 측면에서, 본 발명은

[0219] (i) 화학식(13)의 화합물을 하기 화학식(16)의 피라졸 유도체와 반응시켜 화학식(14)의 화합물을 얻는 단계:

[0220] [화학식 16]



[0221]

[0222] (상기 식에서, X는 스즈키 커플링 조건 하에서 팔라듐 촉매(예, 테트라키스트리페닐포스핀 팔라듐(0))의 존재 하에 B(OH)₂기 또는 보로네이트 에스테르기(예, 4,4,5,5-테트라메틸-[1,3,2]디옥사보롤란-2-일 기)임);

[0223] (ii) 화학식(14)의 화합물로부터 보호기 PG를 제거하는 단계; 및 이후

[0224] (iii) 경우에 따라 화합물(15)의 광학 이성질체를 분리하고 이의 S-거울상 이성질체를 단리시키는 단계를 포함하는 화학식(15)의 화합물의 제조 방법을 제공한다.

[0225] 특히 PG가 Boc 기인 화학식(13)의 중간체는 본 발명의 추가 측면을 구성한다.

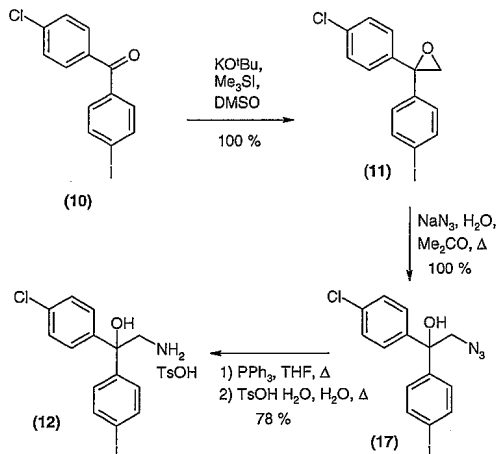
[0226] PG가 2-카르복시-벤조일기 이외의 것인 신규한 화학식(14)의 중간체는 또한 본 발명의 추가 측면을 형성한다.

[0227] 바람직한 중간체(14)는 PG가 Boc기인 화합물이다.

[0228] 상기 기술되고 반응식 1에 예시된 방법에 대안으로서, 화학식 I의 화합물은 WO 2005/061463(Astex)의 실시예 84에 기술된 방법에 따른 후 상기 기술되고 본원에 기술된 분리 방법을 사용하여 S-거울상 이성질체를 단리시킴으로써 제조할 수 있다.

[0229] 중간체 화합물(12)의 개선된 제조 방법은 하기 반응식 2에 예시된다.

반응식 2



[0230]

[0231]

반응식 2에서, 치환된 벤조페논(10)은 수소화나트륨 염기를 칼륨 tert-부톡시드로 대체한 것을 제외하고는, 상기 반응식 1에 기술된 바와 같이 염기의 존재 하에 디메틸설폭시드 중에서 트리메틸설포늄 요오다이드와 반응시킴으로써 에폭시드(11)로 전환된다. 칼륨 tert-부톡시드는 통상 실온에서 벤조페논(10)과 트리메틸설포늄 요오다이드의 급속 교반된 혼합물에 첨가된다. 수소화나트륨 대신에 염기로서 칼륨 tert-부톡시드를 사용하는 것은 유의적인 이점을 부여한다. 우선, 염기를 DMSO와 반응시킴으로써 덩실 음이온을 형성한 후 다른 반응물을 첨가하는 대신에, 수소화나트륨이 염기로 사용되는 경우, tert-부톡시드를 벤조페논(10), 트리메틸설포늄 요오다이드와 디메틸설폭시드의 예비형성된 혼합물에 첨가할 수 있는 경우와 같다. 이는 덩실 음이온이 형성된 후 매우 신속하게 소비되고 이에 따라 임의의 소정 시간에 반응 혼합물 내에는 극소량의 덩실 음이온만이 존재한다는 것을 의미한다. 따라서, 칼륨 tert-부톡시드의 사용은 비교적 점성이 있고 다소 유해한 덩실 나트륨의 높은 농축물의 형성을 피하도록 한다. 공정의 안전을 개선시키는 것 이외에, 점성 덩실 나트륨의 고농축의 부재는 반응 혼합물이 더 쉽게 교반되어 반응물을 혼합시키는데 보다 효율적이 되고 미반응되거나 불완전하게 반응된 재료가 국소화된 고립지역(pocket)을 피할 수 있다는 것을 의미하며, 이의 이점은 반응 동안 형성된 tert-부탄올이 반응물 및 생성물에 탁월한 용매라는 사실에 의해 향상된다. 이러한 이점은 (예를 들어 에폭시드(11) 50 g 이상의 양을 준비하기 위한) 대규모로 반응을 수행하는 경우 특히 분명한데, (염기로서 수소화나트륨을 사용한 반응과 비교하였을 때) 칼륨 tert-부톡시드를 사용하면 에폭시드(11)의 수율과 순도가 실질적으로 더 양호하게 발생된다는 것을 발견하였다.

[0232]

반응식 1에 제시된 반응 결과에서, 에폭시드(11)를 메탄올과 같은 알콜 용매 중에서 가열하면서 암모니아와 반응시켜 아민(12)을 얻는다. 이러한 유형의 반응은 통상 압력 하에서 마이크로파 반응기 내에서 수행할 수 있고 비교적 소규모 반응시 탁월한 수율 및 순도를 얻는다.

[0233]

하지만, (예를 들어, 50 g 이상의 아민(12) 양을 생성하기 위한) 대규모 반응의 경우, 에폭시드(11)를 아지드화나트륨과 반응시킨 후 아지드화물 중간체(17)를 아민(12)으로 환원시키는 것이 더 양호한 수율과 탁월한 순도를 얻는다는 것을 발견하였다. 에폭시드(11)를 아지드화나트륨과 반응시키는 것은 통상 극성 용매, 예를 들어 물 및 아세트산과 같은 수산화성 용매를 포함하는 수성 용매 중에서 수행된다. 반응은 통상 예를 들어 용매계의 환류 온도로 가열하면서 수행된다.

[0234]

아지도 알콜(17)의 아미노 알콜(12)로의 전환은 트리페닐 포스핀과 반응 후 수성 산 및 특히 치환된 설포산, 바람직하게는 알킬- 또는 아릴설포산, 예컨대 메탄설포산, 에탄설포산, 벤젠설포산, 톨루엔설포산 또는 캄포르설포산의 수용액으로 처리함으로써 실현될 수 있다. 4-톨루엔설포산을 사용하는 것이 특히 바람직하다. 임의의 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니지만, 반응은 초기 고리화에 의해 진행되어 아지리딘을 형성한 후 산의 존재 하에 개환되어 아미노 알콜을 얻는 것으로 생각된다. 산(특히, 4-톨루엔설포산)을 사용함으로써, 아미노-알콜은 염을 취급하기에 안정하고 용이하게 단리시킬 수 있고 쉽게 정제시킬 수 있다. 캄포르설포산(예, d-캄포르설포산)의 광학 활성 형태를 사용하는 경우, 염의 분별 결정화를 수행하여 아미노 알콜(12)의 2개의 거울상 이성질체의 개별 염을 분리시킬 수 있다. 이후 염기로 염을 처리하면 아미노 알콜(12)의 개별 거울상 이성질체를 얻는다.

- [0235] 아지드화물 화합물(17), 아미노-알콜(12) 및 이의 개별 거울상 이성질체 및 아미노-알콜(12)의 산 부가 염 및 이의 거울상 이성질체는 신규한 것으로 생각되며, 이에 따라 본 발명의 추가 측면을 형성한다.
- [0236] 따라서, 일 구체예에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같이 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-요오도-페닐]-에탄올 및 이의 산 부가 염을 제공한다.
- [0237] 또다른 구체예에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같이 (R) 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-요오도-페닐]-에탄올, 및 이의 산 부가 염을 제공한다.
- [0238] 추가 구체예에서, 본 발명은 본원에 정의된 바와 같이 (S) 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-요오도-페닐]-에탄올, 및 이의 산 부가 염을 제공한다.
- [0239] 상기 3개의 구체예 중 각각에서, 바람직한 산 부가 염은 메탄설포산, 에탄설포산, 벤젠설포산, 톨루엔설포산 또는 캄포르설포산(예, d-캄포르설포산)으로 형성된 염이다. 특히 바람직한 염은 4-톨루엔설포산으로 형성된 염이다.
- [0240] 합성 중간체로 유용한 것 이외에, 화학식(12)의 화합물 및 이의 산 부가 염은 키나아제 PKB에 대한 활성을 가지며, 이에 따라 화학식 I의 화합물에 관해 본원에 기술된 바와 같이 치료, 및 특히 용도(예, 항암 용도)에 유용해야 한다. 본원에 정의된 화학식(12)의 화합물 또는 이의 산 부가 염 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학 조성물, 및 화학식(12)의 화합물 또는 이의 산 부가 염의 치료적 용도는 본 발명의 추가 측면을 구성한다.
- [0241] 또다른 측면에서, 본 발명은 화학식(12)의 화합물의 광학적 활성 형태의 제조 방법으로서, 화학식(12)의 화합물의 산 부가 염의 분별 결정화를 포함하고, 여기서 염은 광학 활성 산(예, d-캄포르설포산)에서 유래되는 것인 방법을 제공한다.
- [0242] 또다른 측면에서, 본 발명은 실온 이상의 온도(예, 용매의 환류 온도)에서 극성 비양성자성 용매, 예컨대 트라히드로푸란 중에서 화학식(17)의 화합물을 트리페닐포스핀과 같은 3차 포스핀과 반응시킨 후 수성 산, 예컨대 치환된 설포산, 예컨대 4-톨루엔설포산으로 처리하는 단계를 포함하는, 본원에 정의된 화학식(12)의 화합물의 제조 방법을 제공한다.
- [0243] 트리페닐포스핀에 대한 대안으로서, 다른 3차 포스핀을 사용할 수 있고 이는 다른 트리아릴포스핀, 예컨대 트리톨릴포스핀, 트리알킬포스핀, 예를 들어 트리부틸포스핀, 트리시클로알킬 포스핀, 예컨대 트리시클로헥실포스핀, 및 아릴 및/또는 알킬 및/또는 시클로알킬 기의 혼합물을 포함하는 3차 포스핀을 포함한다. 하지만, 트리페닐포스핀이 바람직하다.
- [0244] 4-톨루엔설포산에 대한 대안으로서, 상기 기술된 바와 같이 다른 치환된 설포산, 예컨대 알킬- 및 아릴설포산, 예컨대 메탄설포산, 에탄설포산, 벤젠설포산, 및 캄포르설포산을 사용할 수 있다.
- [0245] 또다른 측면에서, 본 발명은 바람직하게는 (예를 들어 용매의 환류 온도로) 가열 하에 극성 용매(예, 수성 아세트산과 같은 수성 유기 용매) 중에서 화학식(11)의 에폭시드 화합물을 알칼리 금속 아지드화물(예, 아지드화나트륨) 또는 트리메틸실릴아지드화물(TMS-아지드화물)과 반응시키는 단계를 포함하는, 화학식(17)의 화합물의 제조 방법을 제공한다.
- [0246] 추가 측면에서, 본 발명은
- [0247] (a) 본원에 정의된 화학식(11)의 화합물을 알칼리 금속 아지드화물(예, 아지드화나트륨) 또는 트리메틸실릴 아지드화물과 반응시켜 화학식(17)의 화합물을 형성하는 단계;
- [0248] (b) 화학식(17)의 화합물을 (i) 3차 포스핀, 예컨대 트리페닐포스핀 후, (ii) 산, 예컨대 치환된 설포산, 바람직하게는 알킬- 또는 아릴설포산, 예컨대 메탄설포산, 에탄설포산, 벤젠설포산 또는 톨루엔설포산, 가장 바람직하게는 4-톨루엔설포산과 반응시키는 단계를 포함하는 화학식(12)의 화합물의 제조 방법을 제공한다.
- [0249] 를 포함하는 화학식(12)의 화합물의 제조 방법을 제공한다.
- [0250] 아지드화물의 사용과 관련된 상기 방법 중 각각에서, 알칼리 금속 아지드화물(예, 아지드화리튬, 아지드화칼륨 및 아지드화나트륨)이 바람직하고 아지드화나트륨이 가장 바람직하다.
- [0251] 또다른 측면에서, 본 발명은 화학식(15)의 화합물, 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 제조 방법으로서,

- [0252] (1) 본원에 정의된 방법에 의해 화학식(12)의 화합물을 제조하는 단계;
- [0253] (2) 본원에 정의된 방법에 의해 화학식(12)의 화합물의 아미노기를 보호하여 화학식(13)의 화합물을 얻는 단계;
- [0254] (3) 스즈키 커플링 조건 하에서 팔라듐 촉매(예, 테트라키스트리페닐포스핀 팔라듐(0))의 존재 하에 화학식(13)의 화합물을 본원에 정의된 화학식(16)의 피라졸 유도체와 반응시켜 화학식(14)의 화합물을 얻는 단계;
- [0255] (4) 화학식(14)의 화합물로부터 보호기 PG를 제거하는 단계; 및
- [0256] (5) 이후 경우에 따라, 화합물(15)의 광학 이성질체를 분리시키고 이의 S- 거울상 이성질체를 단리시키는 단계를 포함하는 제조 방법을 제공한다.
- [0257] 를 포함하는 제조 방법을 제공한다.
- [0258] **약학 조제물**
- [0259] 화학식 I의 화합물은 단독으로 투여될 수 있지만, 본 발명의 조성물은 화학식 I의 화합물을 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 보조제, 부형제, 희석제, 충전제, 완충제, 안정화제, 보존제, 유회제, 또는 당업자에게 잘 공지된 재료 및 경우에 따라 다른 치료적 또는 예방적 제제와 함께 포함하는 약학 조성물(예, 조제물)인 것이 바람직하다.
- [0260] 따라서, 본 발명은 본원에 정의한 바와 같은 약학 조성물, 및 본원에 기술된 바와 같은 화학식 I의 화합물을 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 완충제, 보조제, 안정화제 또는 기타 물질과 혼합하는 단계를 포함하는 약학 조성물의 제조 방법을 추가로 제공한다
- [0261] 본원에 사용된 용어 "약학적으로 허용되는"이란, 안전한 의학적 판단의 영역 내에서, 이득/위험 비율에 합당하게 과도한 독성, 과민, 알러지 반응, 또는 기타 문제 또는 합병증 없이 피험체(예, 인간)의 조직과 접촉하여 사용하기에 적당한 화합물, 재료, 조성물, 및/또는 제형을 의미한다. 각 담체, 부형제 등은 또한 제제의 다른 성분들과 상용성이 있다는 의미에서 "허용가능"해야 한다.
- [0262] 본원에 정의된 조성물을 포함하는 약학 조성물은 기존의 기법에 따라 조제될 수 있고, 예를 들어 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA, USA]을 참조한다.
- [0263] 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 약학 조성물의 형태로 본원에 정의된 조성물을 제공한다.
- [0264] 약학 조성물은 경구, 비경구, 국소, 비강내, 눈, 귀, 직장, 질내, 또는 경피 투여에 적당한 임의의 형태일 수 있다. 조성물이 비경구 투여용으로 의도된 경우, 이는 정맥내, 근육내, 복강내, 설하 투여용으로 제형화될 수 있거나 주사, 주입 또는 다른 전달 수단에 의해 표적 기관 또는 조직으로 직접 전달용으로 제형화될 수 있다. 전달은 볼루스 주사, 단기 주입 또는 장기 주입에 의한 것일 수 있고 수동적 전달에 의해 또는 적당한 주입 펌프의 사용을 통할 수 있다.
- [0265] 비경구 투여용에 적합한 약학 조제물은 항산화제, 완충제, 정균제, 보조 용매, 유기 용매 혼합물, 시클로덱스트린 복합제, 유화제(유화 조제물을 형성하고 안정화시키기 위함), 리포솜 형성용 리포솜 성분, 중합체 겔 형성용 겔화가능한 중합체, 동결건조 보조제 및 특히 가용성 형태로 활성 성분을 안정화시키고 제제가 의도된 수용자의 혈액과 등장성을 갖도록 하는 제제의 조합을 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 주사액을 포함한다. 비경구 투여용 약학 조제물은 또한 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액의 형태를 취할 수 있다(R. G. Strickly, Solubilizing Excipients in oral and injectable formulations, Pharmaceutical Research, Vol 21(2) 2004, p 201-230).
- [0266] 리포솜은 외부는 지질 이중층 막, 내부는 수성 중심부로 구성되며 전체 직경이 < 100 μm인 폐쇄된 구형 소낭이다. 소수성의 정도에 따라, 중간 정도의 소수성 약물은, 약물이 캡슐화되거나 리포솜 내 층간 삽입되는 경우 리포솜에 의해 가용화될 수 있다. 소수성 약물은 또한 약물 분자가 지질 이중층 막의 일체부가 되는 경우 리포솜에 의해 가용화될 수도 있고, 이 경우, 소수성 약물은 지질 이중층의 지질 부분에 용해된다.
- [0267] 제형은 일회-용량 또는 다회-용량 용기, 예컨대 밀봉된 앰플 및 바이알 내에 존재할 수 있고, 사용하기 직전에 주사액에 멸균된 액체 담체, 예컨대 물을 첨가하는 것만을 필요로 하는 동결-건조된(동결건조된) 상태로 저장될 수 있다.
- [0268] 약학 조제물은 화학식 I의 화합물을 동결건조함으로써 제조할 수 있다. 동결건조는 조성물을 동결-건조하는 절차를 지칭한다. 동결-건조 및 동결건조는 따라서 동의어로서 본원에 사용된다.

- [0269] 즉석 주사액 및 현탁액은 멸균 분말, 과립체 및 정제로부터 제조될 수 있다.
- [0270] 비경구 주사용 본 발명의 약학 조성물은 또한 약학적으로 허용되는 멸균 수용액 또는 비수용액, 분산액, 현탁액 또는 유화액과, 사용 직전 멸균 주사가능액 또는 분산액으로 재구성하기 위한 멸균 분말을 포함할 수 있다. 적당한 수성 및 비수성 담체, 희석제, 용매 또는 매개체의 예는 물, 에탄올, 폴리올(예, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 등), 카르복시메틸셀룰로스 및 이의 적당한 혼합물, 식물유(예, 올리브유), 및 주사가능한 유기 에스테르, 예컨대 에틸 올리에이트를 포함한다. 적당한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅 재료의 사용에 의해, 분산액의 경우에 필요한 입도의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다.
- [0271] 본 발명의 조성물은 또한 보조제, 예컨대 보존제, 습윤제, 유화제, 및 분산제를 포함할 수 있다. 각종 항균제 및 항진균제, 예컨대 과라벤, 클로로부탄올, 페놀 소르브산 등을 주입함으로써 미생물의 활동을 예방할 수 있다. 또한 당류, 염화나트륨 등과 같은 등장성 제제를 포함하는 것이 바람직할 수 있다. 주사가능한 약학 형태의 연장된 흡수는 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수를 지연시키는 제제의 주입에 의해 초래될 수 있다.
- [0272] 본 발명의 바람직한 일 구체예에서, 약학 조성물은, 예를 들어 주사 또는 주입에 의한 정맥내(i.v.) 투여에 적당한 형태이다. 정맥내 투여용의 경우, 용액은 투여 전에 주입 백(약학적으로 허용되는 부형제, 예컨대 0.9% 식염수 또는 5% 텍스트로스를 함유)으로 주사되거나 주사될 수 있는 용량일 수 있다.
- [0273] 또다른 바람직한 구체예에서, 약학 조성물은 피하(s.c.) 투여에 적당한 형태이다. 경구 투여에 적당한 약학 제형은 정제, 캡슐, 카플릿, 알약, 로젠즈, 시럽, 용액, 분말, 과립체, 엘릭시르 및 현탁액, 설하 정제, 웨이퍼 또는 패치 및 흡착 패치를 포함한다.
- [0274] 따라서, 정제 조성물은 불활성 희석제 또는 담체, 예컨대 당류 또는 당류 알콜, 예컨대 유당, 자당, 소르비톨 또는 만니톨; 및/또는 희석제 유도된 비당류, 예컨대 탄산나트륨, 인산칼슘, 탄산칼슘, 또는 셀룰로스 또는 이의 유도체, 예컨대 메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로스, 및 전분, 예컨대 옥수수 전분과 함께 활성 화합물의 단위 용량을 포함할 수 있다. 정제는 또한 폴리비닐피롤리돈, 붕해제(예, 팽창성 가교된 중합체, 예컨대 가교된 카르복시메틸셀룰로스), 윤활제(예, 스테아레이트), 보존제(예, 과라벤), 산화방지제(예, BHT), 완충제(예, 인산염 또는 구연산염 완충제), 및 비등성제, 예컨대 구연산염/중탄산염 혼합물과 같은 결합제 및 과립화제로서 상기 표준 성분을 포함할 수 있다. 상기 부형제는 잘 공지되어 있으므로 본원에서 상세하게 논의될 필요는 없다.
- [0275] 캡슐 제형은 경질 젤라틴 또는 연질 젤라틴 다양성을 가질 수 있고 고체, 반고체, 또는 액체형의 활성 성분을 포함할 수 있다. 젤라틴 캡슐은 이의 등가물에서 유도된 동물 젤라틴 또는 합성 또는 식물로부터 형성될 수 있다.
- [0276] 고체 제형(예, 정제, 캡슐 등)은 코팅되거나 비코팅될 수 있지만, 통상 코팅, 예컨대 보호용 막 코팅(예, 왁스 또는 마니쉬) 또는 방출 조작용 코팅을 갖는다. 코팅(예, EudragitTM형 중합체)은 위장관 내 바람직한 위치에서 활성 성분을 방출하도록 고안될 수 있다. 따라서, 코팅은 위장관 내에서 특정 pH 조건 하에 분해되어, 위장 또는 회장 또는 십이지장에서 화합물을 선택적으로 방출하도록 선택될 수 있다.
- [0277] 코팅 대신에, 또는 코팅 이외에, 약물은 위장관에서 산성 또는 알칼리성을 변화시키는 조건 하에서 화합물을 선택적으로 방출하는데 적합할 수 있는 방출 지연제와 같은 방출 조절제를 포함하는 고체 매트릭스 내에 존재할 수 있다. 대안적으로, 매트릭스 재료 또는 방출 지연 코팅은 위장관을 통해 통과하는 제형으로서 실질적으로 연속적으로 침식되는 침식가능한 중합체(예, 말레산 무수물 중합체)의 형태를 취할 수 있다. 추가의 대안으로서, 활성 화합물은 화합물의 방출의 삼투 조절을 제공하는 전달 시스템에서 조절될 수 있다. 삼투 방출 및 다른 지연된 방출 또는 유지된 방출 제형은 당업자에게 잘 공지된 방법에 따라 제조할 수 있다.
- [0278] 약학 조성물은 활성 성분 대략 1%~대략 95%, 바람직하게는 대략 20%~대략 90%를 포함한다. 본 발명에 따른 약학 조성물은, 예를 들어 앰플, 바이알, 좌제, 당의정, 정제 또는 캡슐의 형태와 같은 단위 제형일 수 있다.
- [0279] 경구 투여용 약학 조성물은 활성 성분을 고체 담체와 합하고, 필요에 따라 생성 혼합물을 과립화시키고, 필요에 따라, 적당한 부형제를 정제, 당의정 중심부 또는 캡슐에 첨가한 후 혼합물을 가공함으로써 얻을 수 있다. 또한 활성 성분이 측정된 양으로 확산되거나 방출되도록 플라스틱 담체에 도입할 수 있다.
- [0280] 본 발명의 조성물은 또한 고체 분산물로 조제될 수 있다. 고체 분산물은 2개 이상의 고체의 균질한 극도의 미세

분산 상이다. 고체 용액(분자 분산 시스템), 한 고체 분산물의 유형은 약학 기법에 사용하는 것으로 잘 공지되어 있고(문헌(Chiou and Riegelman, J. Pharm. Sci., 60, 1281-1300 (1971) 참조) 불량한 수용성 약물의 용해 속도를 증가시키고 생체이용성을 증가시키는데 유용하다.

[0281] 본 발명은 또한 상기 기술된 고체 용액을 포함하는 고체 제형을 제공한다. 고체 제형은 정제, 캡슐 및 씹을 수 있는 정제를 포함한다. 기존의 부형제는 고체 용액과 혼합되어 바람직한 제형을 제공할 수 있다. 예를 들면, 캡슐은 (a) 봉해제 및 윤활제, 또는 (b) 봉해제, 윤활제 및 계면활성제와 혼합된 고체 용액을 포함할 수 있다. 정제는 하나 이상의 봉해제, 윤활제, 계면활성제, 및 유동화제와 혼합된 고체 용액을 포함할 수 있다. 씹을 수 있는 정제는 팽화제, 윤활제, 및 필요에 따라 추가의 감미제(예, 인공 감미료), 및 적당한 풍미제와 혼합된 고체 용액을 포함할 수 있다.

[0282] 약학 조제물은 단일 패키지, 통상 발포제 팩으로 치료의 전체 과정을 포함하는 "환자용 팩"으로 환자에게 제공될 수 있다. 환자용 팩은 전형적인 처방전에 비해 유리한데, 여기서 약제사는 통상 환자 처방전에서 놓치는 환자 팩 내에 존재하는 패키지 삽입체에 환자가 항상 접촉할 수 있다는 점에서 벌크 공급으로부터 약학적 환자 공급을 나눈다. 패키지 삽입체의 포함은 담당의의 지시와 함께 환자 허용치를 향상시켜주는 것으로 나타났다.

[0283] 국소 사용을 위한 조성물은 연고, 크림, 스프레이, 팻치, 젤, 액체 점적 및 삽입체(예, 안구내 삽입체)를 포함한다. 그러한 조성물은 기존 방법에 따라 조제될 수 있다.

[0284] 직장 또는 질내 투여용 조제물의 예는, 예를 들어 활성 화합물을 포함하는 성형 가능하거나 유연한 재료로부터 형성될 수 있는 패서리 및 좌제를 포함한다.

[0285] 흡입에 의한 투여용 조성물은 흡입가능 분말 조성물 또는 액체 또는 분말 스프레이의 형태를 취할 수 있고, 분말 흡입기 장치 또는 에어로졸 분산 장치를 사용한 표준 형태로 투여될 수 있다. 상기 장치는 잘 공지되어 있다. 흡입에 의한 투여 경우, 분말화된 제형은 통상 유당과 같은 불활성 고체 분말화된 희석제와 함께 활성 화합물을 포함한다.

[0286] 조성물은 통상 단위 제형에 존재하며, 이에 따라 생물학적 활성의 바람직한 수준을 제공하기 위한 충분한 화합물을 포함할 것이다. 예를 들면, 제형은 활성 성분 1 ng~2 g, 예를 들어 활성 성분 1 ng~2 mg을 포함할 수 있다. 이 범위 내에서, 특정한 화합물의 아범위는 활성 성분 0.1 mg~2 g(더욱 통상적으로는 10 mg~1 g, 예컨대 50 mg~500 mg), 또는 1 µg~20 mg(예, 활성 성분 1 µg~10 mg, 예를 들어 0.1 mg~2 mg)이다.

[0287] 경구 조성물의 경우, 단위 제형은 활성 화합물 1 mg~2 g, 더욱 통상적으로는 10 mg~1 g, 예를 들어 50 mg~1 g, 예컨대 100 mg~1 g을 포함할 수 있다.

[0288] 활성 화합물은 충분한 양으로 이를 필요로 하는 환자(예, 인간 또는 동물 환자)에게 투여하면 바람직한 치료적 효과를 실현할 것이다.

[0289] **단백질 키나아제 억제 활성**

[0290] 단백질 키나아제 A 및 단백질 키나아제 B의 억제제로서 화학식 I의 화합물의 활성은 하기 실시예에 제시되는 분석을 사용하여 측정할 수 있으며 제시된 화합물에 의해 나타난 활성 수준은 IC₅₀값에 의해 정의될 수 있다.

[0291] **치료 용도**

[0292] 증식성 장애의 예방 또는 치료

[0293] 화학식 I의 화합물은 단백질 키나아제 A 및 단백질 키나아제 B의 억제제이다. 따라서, 그 화합물은 종양형성의 성장을 예방하거나 또는 종양형성의 세포사멸을 유도하는 수단을 제공하는데 유용할 것이다. 그러므로, 본 발명의 조성물은 증식성 장애, 예컨대 암을 치료하거나 예방하는데 유용할 것으로 기대된다. 특히, (T 세포 림프구) TCL-1 유전자에서 PTEN 발현 또는 재배열의 손실 또는 PTEN의 결손 또는 불활성화 돌연변이를 지닌 종양은 PKB 억제제에 매우 민감할 수 있다. 상향조절된 PKB 경로 신호를 유도하는 다른 이상을 보유하는 종양은 또한 PKB의 억제제에 특히 민감할 수 있다. 그러한 이상의 예로는 하나 이상의 PI3K 서브유닛의 과다발현, 하나 이상의 PKB 이소형의 과다발현, 또는 PI3K, PDK1 또는 PKB의 돌연변이를 들 수 있지만 이에 국한되는 것이 아니며, 이러한 이상들은 해당 효소의 기본 활성 증가, 또는 성장 인자 수용체, 예컨대 상피 성장 인자 수용체(EGFR), 피브로블라스트 성장 인자 수용체(FGFR), 혈소판 유도 성장 인자 수용체(PDGFR), 인슐린 유사 성장 인자 1 수용체(IGF-1R) 및 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR) 패밀리로부터 선택된 성장 인자 수용체의 상향조절 또는 과다발현 또는 돌연변이성 활성화의 증가를 유도한다.

- [0294] 본 발명의 조성물은 또한 증식 또는 생존에 있어서 장애로부터 결과로 초래되는 다른 증상, 예컨대 바이러스성 감염, 및 신경변성 질환 등의 치료시에 유용할 것이다. PKB는 면역 반응 동안 면역 세포의 생존을 유지하는 데 중요한 역할을 하므로, PKB 억제제는 자가면역 증상을 비롯한 면역 이상에 특히 유리할 수 있다.
- [0295] 따라서, PKB 억제제는 증식, 세포사멸 또는 분화의 장애와 관련된 질환의 치료시에 유용할 수 있다.
- [0296] PKB 억제제는 또한 인슐린 내성 및 비민감성으로부터, 그리고 포도당, 에너지 및 지방 저장의 붕괴로부터 결과적으로 초래되는 질환, 예컨대 대사 질환 및 비만에 유용할 수 있다.
- [0297] 억제될 수 있는 암의 예로는, 암종, 예컨대 방광 암종, 유방 암종, 결장암종(예컨대, 결장직장 암종, 예컨대 결장 선암종 및 결장 선종), 신장 암종, 상피암종, 간 암종, 폐암종, 예컨대 선암종, 소세포 폐암 및 비소세포 폐암종, 식도 암종, 담낭 암종, 난소 암종, 췌장 암종, 예컨대 외분비 췌장 암종, 위 암종, 자궁 경부 암종, 자궁 내막 암종, 갑상선 암종, 전립선 암종, 또는 피부 암종, 예컨대 편평(편평상피) 세포 암종; 림프구양 계통의 조혈 종양, 예컨대 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, B-세포 림프종, 다발성 골수종, T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 유모 세포 림프종 또는 버키트 림프종; 골수양 계통의 조혈 종양, 예컨대 급성 및 만성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군 또는 전골수구 백혈병; 골수증식성 증후군; 갑상선 여포암; 간엽 기관의 종양, 예컨대 섬유육종 또는 횡문근육종(횡문근육종); 증추 및 말초 신경계의 종양, 예컨대 성상교세포종, 신경아세포종, 신경교종 또는 슈반종; 흑색종; 정상피종; 기형암종; 골육종; 색소성 건피증; 각화극세포종; 갑상선 여포암; 또는 카포시 육종을 들 수 있지만, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0298] 따라서, 약학 조성물에 있어서, 이상 세포 성장을 포함하는 질환 또는 증상을 치료하기 위한 본 발명의 용도 및 방법에 사용할 수 있으며, 한 구체예에 있어서 상기 비정상인 세포 성장을 포함하는 질환 또는 증상은 암이다.
- [0299] 암의 구체적인 부분집합은 유방 암, 난소 암, 결장암, 전립선 암, 식도 암, 편평 세포 암 및 비소세포 폐암종을 포함한다.
- [0300] 암의 추가 부분집합은 유방 암, 난소 암, 전립선 암, 자궁내막암 및 신경교종을 포함한다.
- [0301] 본 발명의 조성물은 또한 다른 항암제와 조합하여 사용될 수도 있다. 그러한 조합의 예는 하기에 제시한다.
- [0302] **면역 질환**
- [0303] 본 발명의 조성물이 유리할 수 있는 면역 이상으로는 자가면역 증상 및 만성 염증 질환, 예컨대 전신성의 홍반성 루프스, 자가면역 매개된 사구체신염, 류마티스 관절염, 건선, 염증성 장 질환, 및 자가면역 진성 당뇨병, 습진 과민감성 반응(Eczema hypersensitivity reaction), 천식, COPD, 비염, 및 상부 호흡관 질환을 들 수 있지만, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0304] **기타 치료 용도.**
- [0305] PKB는 세포사멸, 증식, 분화에 중요한 역할을 하므로, 화학식 I의 화합물은 또한 암 및 면역 이상기능과 관련된 암을 제외한 다음 열거된 질환: 바이러스성 감염, 예컨대 헤르페스 바이러스, 폭스(pox) 바이러스, 에피스테인-바르(Epstein-Barr) 바이러스, 신드비스(Sindbis) 바이러스, 아테노바이러스, HIV, HPV, HCV 및 HCMV; HIV-감염된 개체에서 AIDS 발생; 심혈관 질환, 예컨대 심장 비대증, 재협착증, 아테롬성동맥경화증; 신경변성 질환, 예컨대 알츠하이머병, AIDS-관련된 치매, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증, 망막색소변성증, 척수성 근위축증 및 소뇌 변성; 사구체신염; 골수이형성 증후군, 허혈성 손상 관련된 심근 경색증, 뇌졸중 및 재관류 손상; 근골격계의 변성 질환, 예컨대 골다공증 및 관절염, 아스피린-만감성 비부비동염, 낭포성 섬유증, 다발성 경화증, 신장 질환의 치료 또는 예방에 유용할 수 있다.
- [0306] **ROCK 키나아제 억제 활성과 관련되거나 이 활성에서 기인한 용도**
- [0307] 화학식 I의 화합물은 ROCK 키나아제의 활성을 조절(예, 억제)한다. 따라서, 화합물은 (a) ROCK 키나아제의 조절(예, 억제)이 나타나는 질병 또는 증상의 치료 또는 예방; 및/또는 (b) ROCK 키나아제의 조절(예, 억제)가 나타나는 피험체 또는 환자 집단의 치료; 및/또는 (c) Rho 신호전달 경로의 조절(예, 억제)이 나타나는 질병 또는 증상의 치료 또는 예방; 및/또는 (d) Rho 신호전달 경로의 조절(예, 억제)이 나타나는 피험체 또는 환자 집단의 치료에 있어서의 분야를 나타낸다.
- [0308] 따라서, 본 발명은 (a) 종양 전이; (b) 종양 침윤; (c) 종양 진행; (d) 종양 점착(예, 종양 세포 점착); (e) 액티노마이신 수축성-의존 종양 전이, 침윤 또는 진행; (f) 세포 형질전환; (g) ROCK-매개된 종양 전이, 침윤, 진행 또는 점착; (h) ROCK-매개된 액티노마이신 수축성-의존 종양 전이, 침윤 또는 진행; (i) ROCK-매개된 세포

형질전환에서 선택된 질병 및 증상과 관련된 분야를 나타낸다.

- [0309] 본 발명은 또한 (a) 고환 생식 세포 종양; (b) 전이 능력을 가진 작은 유방 암; (c) 방광 암; (d) 난소 암; (e) 전립선암; 및 (f) 간세포 암종에서 선택되는, 암(예, ROCK-매개된 암)과 관련된 분야를 나타낸다.
- [0310] 다른 적용가능한 질병 및 증상은 본원에 정의된 임의의 암의 침윤, 전이 및 종양 진행을 포함한다.
- [0311] 본 발명은 또한 심혈관성 질병 또는 증상, 특히 (a) 고혈압; (b) 심장 이상(예, 만성 및 울혈성 심부전); (c) 심근 비대; (d) 재협착; (e) 직장 이상(예, 만성 신부전); (f) 아테롬성동맥경화증 (동맥경화증); (g) 심장보호; (h) 동종이식편 생존; (i) 뇌허혈; (j) 관상동맥 혈관경련; 및 (k) 혈관 염증에서 선택된 것과 관련된 분야를 나타낸다.
- [0312] 다른 적용가능한 질병 및 증상은, 예를 들어 (a) 천식; (b) 음경 발기 부전; (c) 여성 성기능 이상; (d) 과활성 방광 제1 증후군; 및 (e) 평활근 이상(예, 고혈압 관련)에서 선택된 근육(예, 평활근) 이상을 포함한다.
- [0313] 기타 적용가능한 질병 및 증상은, 예를 들어 (a) 류마티스 관절염; (b) 과민성 장 증후군; (c) 염증성 장 질환; (d) 혈관 염증, 및 (e) 신경염증성 질병 또는 증상을 포함하거나 이에 의해 분명히 나타나는 염증을 포함한다.
- [0314] 신경염증성 질병 또는 증상과 관련된 구체예에 있어서는, (a) 발작; (b) 다발성 경화증; (c) 알츠하이머병; (d) 파킨슨병; (e) 근위축성 측색 경화; 및 (f) 염증성 통증에서 선택될 수 있다.
- [0315] 기타 적용가능한 질병 및 증상은 (a) 척수 손상 또는 외상; (b) 뇌 손상 또는 외상; (c) 급성 신경 손상(예, 발작 또는 외상성 뇌 손상); (d) 파킨슨병; (e) 알츠하이머병; (f) 신경변성 증상 또는 질병; (g) 발작(예, 고혈압 관련); (h) 뇌혈관경련; (i) 신경 돌기의 성장 및 발아 억제; (j) 억제된 신경 돌기 재생; (k) 저하된 외상 후 기능 회복; (l) 수초과과성 질병 또는 질환; (m) 염증 CNS 질병 또는 질환; (n) 신경병증성 통증; 및 (o) 신경변성에서 선택된 것을 비롯한 CNS 질병 또는 증상을 포함한다.
- [0316] 기타 적용가능한 CNS 질병 또는 증상은 다운 증후군 및 β -아밀로이드 맥관병증, 비제한적인 예로서 대뇌 아밀로이드 맥관병증, 유전성 뇌출혈, 인지 장애 관련 장애, 예컨대 MCI("경도 인지 장애"), 알츠하이머병, 기억 손실, 알츠하이머병 관련 주의 결핍 증후군, 알츠하이머병과 같은 질병과 관련된 신경변성 또는 혼합된 혈관 및 변성 기원의 치매를 비롯한 치매, 예비노인성 치매, 노인성 치매 및 파킨슨병 관련 치매, 진행성 핵상 마비 또는 대뇌 피질 기저 변성, 파킨슨병, 파킨슨형 전두측두엽 치매, 괄(Guam)의 파킨슨 치매 복합증, HIV 치매, 신경원섬유 농축체 병리와 관련된 질병, 투사형 치매, 근위축성 측색 경화, 피질기저핵 변성, 다운 증후군, 헌팅턴병, 뇌염후(postencephalic) 파킨슨증, 진행성 핵상 마비, 피크 병(Pick's Disease), 니만-피크 병(Niemann-Pick's Disease), 발작, 두부 외상 및 기타 만성 신경변성 질병, 양극성 장애, 정동 장애, 우울증, 불안, 정신분열증, 인지 장애, 탈모, 피임제 투약, 치매전(predemented) 상태, 노화 관련 기억 장애, 노화 관련 인지력 저하, 치매를 수반하지 않는 인지 장애, 경도 인지력 저하, 경도 신경인지력 저하, 노년형 건망증, 기억 장애 및 인지 장애, 혈관성 치매, 루이 소체 치매, 전두측두엽 치매 및 안드로젠성 탈모(androgenetic alopecia)에서 선택된 것을 포함한다.
- [0317] 또 다른 적용가능한 질병 및 증상은 (a) 인슐린 내성; (b) 이식편 보호 (예, 심혈관성 또는 염증 이식편 보호); (c) 당뇨병; (d) 천식; (e) 폐혈관수축; (f) 녹내장; 및 (g) 섬유증 (예, 간 섬유증 및 신장 섬유증)를 포함한다.
- [0318] 다른 적용가능한 질병 및 증상은 후생동물, 원생동물, 진균류, 프리온, 바이러스 또는 세균의 체내침투, 질병 또는 감염을 비롯한 감염성 질병 또는 증상을 포함한다. 상기 구체예에서, 감염성 질병 또는 증상은 병원체-매개된 세포골격 재배열을 포함할 수 있다.
- [0319] 증식성 질환(암 포함): 본 발명은 또한 종양형성의 성장 방지 또는 종양형성의 세포사멸 유도의 수단으로서 적용한다. 따라서 이는 본 발명이 암과 같은 증식성 질환을 치료하거나 예방하는데 유용한 것을 증명할 것으로 기대된다. 그러한 이상의 예는 비제한적 예로서 하나 이상의 Rho 신호전달 경로 구성원의 과발현, 또는 ROCK 키나아제(들) 또는 Rho 신호전달 경로의 기저 활성을 증가시키는 상기 구성원 내 돌연변이를 포함한다(예컨대, 성장 인자 수용체, 예컨대 표피세포 성장 인자 수용체(EGFR), 섬유아세포 성장 인자 수용체(FGFR), 혈소관 유도된 성장 인자 수용체(PDGR), 인슐린형 성장 인자 1 수용체(IGF-IR) 및 혈관 내피세포 성장 인자 수용체(VEGFR) 패밀리로부터 선택된 성장 인자의 상향조절 또는 과발현 또는 돌연변이 활성화와 관련된 수 있음).
- [0320] 또한 본 발명은, 예를 들어 증식 또는 생존에 있어서의 질환, 예컨대 바이러스성 감염, 및 신경변성 질병을 초

래하는 기타 증상을 치료하는데 유용할 것임을 제시하고 있다.

- [0321] 따라서, 본 발명은 증식, 세포사멸 또는 분화의 질환이 존재하는 질병의 치료에 광범위하게 적용된다.
- [0322] 억제될 수 있는 암의 예는, 비제한적 예로서, 암종, 예컨대 암종, 예컨대 방광 암종, 유방 암종, 결장암종(예, 결장직장 암종, 예컨대 결장 선암 및 결장 선종), 신장 암종, 포피세포 암종, 간 암종, 폐 암종, 예컨대 선암, 소세포 폐암 및 비소세포 폐 암종, 식도 암종, 당뇨병 암종, 난소 암종, 췌장 암종, 예컨대 외분비 췌장 암종, 위 암종, 자궁경부 암종, 자궁내막암종, 갑상선 암종, 전립선 암종, 또는 피부 암종, 예컨대 편평상피 세포 암종; 림프성 계통의 조혈 종양, 예컨대 백혈병, 급성 림프성 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 모발상 세포 림프종, 또는 버켓 림프종; 골수성 계통의 조혈 종양, 예컨대 급성 및 만성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군, 또는 전골수성 백혈병; 갑상선 난포기 암; 중간엽 기원의 종양, 예컨대 섬유육종 또는 횡문근육종; 중추신경계 또는 말초신경계의 종양, 예컨대 별아교세포종, 신경아세포종, 신경교종 또는 신경초종; 흑색종; 고환종; 기형암종; 골육종; 색소성 건피증; 각질가시세포종; 갑상선 난포기 암; 또는 카포시 육종을 포함한다.
- [0323] 림프성 계통의 조혈 종양의 추가예는 다발성 골수종이다.
- [0324] 암의 특정 서브세트는 유방암, 난소암, 결장암, 전립선암, 식도암, 편평상피암 및 비소세포 폐 암종을 포함한다. 암의 추가의 세브세트는 유방암, 난소암, 전립선암, 자궁내막암 및 신경교종을 포함한다.
- [0325] 증식 질환의 또 다른 예는 골수증식성 증후군이다.
- [0326] 면역 질환: 본 발명이 유리할 수 있는 면역 질환은 비제한적 예로서 자가면역 증상 및 만성 염증 질병, 예컨대 전신성 홍반성 루프스, 자가면역 매개된 사구체신염, 류마티스 관절염, 건선, 염증성 장 질환, 및 자가면역 당뇨병, 습진 과민감성 반응, 천식, COPD, 비염, 및 상부 호흡관 질환을 포함한다.
- [0327] 기타 치료적 용도: ROCK-매개된 생리적 과정은 세포사멸, 증식, 분화에서 역할을 하고, 이에 따라 본 발명은 또한 암 이외의 다음의 질병 및 면역 기능장애와 관련된 것의 치료에 유용할 수도 있다; 바이러스성 감염, 예컨대 헤르페스 바이러스, 수두 바이러스, 엡스타인바 바이러스, 신드비스 바이러스, 아데노바이러스, HIV, HPV, HCV 및 HCMV; HIV-감염된 개체 내 AIDS의 발달 방지; 심혈관성 질병, 예컨대 심근 비대, 재협착, 아테롬성동맥경화증; 신경변성 질환, 예컨대 알츠하이머병, AIDS-관련 치매, 파킨슨병, 근위축성 측색경화증, 망막세포 변성, 척수성 근위축증 및 소뇌 변성; 사구체신염; 골수이형성 증후군, 허혈 관련 심근 경색, 발작 및 재관류 손상, 근골격계의 변성 질병, 예컨대 골다공증 및 관절염, 아스피린-과민성 부비강염, 당뇨병, 다발성 경화증, 신장 질환.
- [0328] 본 발명은 또한 인슐린 내성 및 불감성을 초래하는 질병, 및 포도당, 에너지 및 지방 저장의 붕괴, 예컨대 대사 질환 및 비만에 유용할 수 있다.
- [0329] 본 발명은 임의의 유형의 ROCK-매개된 중재, 치료 또는 예방을 고려한다. 따라서, 본 발명은 (a) ROCK 키나아제의 조절(예, 억제); 또는 (b) ROCK 키나아제의 활성 농도에서의 중재; 또는 (c) Rho 신호전달 경로의 농도(예, RhoA 및/또는 RhoC의 농도)에서의 중재를 포함하는 치료 또는 예방과 관련하여 적용된다.
- [0330] 기타 적용가능한 방법은 (a) 근육(예, 평활근) 이완; (b) 혈관 근육 이완(예, 혈관 혈류의 증가); (c) 신경 세포 조절; (d) 세포 증식의 감소; (e) 세포 이동의 감소; (f) 병원체 침윤 또는 감염시 세포골격 재배열 억제; (g) 조직 재생의 가속; 및 (h) 외상성후 기능 회복의 향상에 영향을 주는 중재를 포함한다.
- [0331] 상기 구체예에서, 신경 세포 조절은 (a) 뉴런 재생; (b) 새로운 축색돌기의 성장 유도; (c) CNS 내 병소를 가로지르는 축색돌기의 재감기; (d) 신경 돌기 파생; (e) 신경 돌기 분화; (f) 축색돌기 길잡이; (g) 수지상 척추 형성; (h) 수지상 척추 유지; (i) 신경 돌기 성장 원뿔 붕괴의 조절; 및 (j) 신경 돌기 파생 역제의 조절을 포함할 수 있다.
- [0332] 기타 적용가능한 치료는 이식 요법(예, 이식편 보호를 포함)을 포함한다. 또 다른 적용가능한 방법은 (i) 환자를 선별하여 이 환자가 앓고 있거나 앓을 수 있는 질병 또는 증상이 ROCK 키나아제에 대하여 활성을 가지는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 것인지 여부를 결정하는 단계; 및 (ii) 이에 따라 환자가 감수성인 질병 또는 증상을 나타내는 경우, 이후 환자에게 본 발명에 따른 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 질병 상태 또는 증상의 진단 및 치료 방법을 포함한다.
- [0333] 피험체 또는 환자 집단은 (a) ROCK 키나아제에 이상(예, 과잉활성)이 있는 것; 및 (b) ROCK 이상(예, ROCK 과활

성)에 대한 진단상 테스트를 실시하는 것; (c) Rho 신호전달 경로에 이상 있는 것; 및 (d) Rho 신호전달 경로 이상에 대한 진단상 테스트를 실시하는 것에서 선택될 수 있다.

- [0334] **p70S6K 키나아제 억제 활성 관련 또는 이로부터 야기된 용도**
- [0335] 화학식 I의 화합물은 단백질 키나아제 p70S6K의 활성을 조절(예, 억제)한다. 따라서 화합물은 (a) 단백질 키나아제 p70S6K의 조절(예, 억제)을 나타내는 질병 또는 증상의 치료 또는 예방; 및/또는 (b) 단백질 키나아제 p70S6K의 조절(예, 억제)을 나타내는 피험체 또는 환자 집단의 치료에 적용된다.
- [0336] 따라서, 본 발명은 (a) 암(예, p70S6K-매개된 암); (b) 종양 전이; (c) 면역 기능장애; (d) 조직 손상(예, 염증에서 기인함); (e) 염색체 17q23 증폭 (또는 이로부터 기인하거나 이와 관련된 증상); (f) 포이즈-에거 증후군 (또는 이로부터 기인하거나 이와 관련된 증상); (g) LKB 1 돌연변이(들) (또는 이로부터 기인하거나 이와 관련된 증상); (h) BRCA1 돌연변이(들) (또는 이로부터 기인하거나 이와 관련된 증상); (i) BRCA2 돌연변이(들) (또는 이로부터 기인하거나 이와 관련된 증상); (j) 이상성 세포사멸 프로그램; (k) 성장 인자 수용체 신호 전달, 종양 조직 내 과발현 및 활성화; (l) 대사 질병 또는 질환; (m) 이상 세포 증식 및/또는 대사와 관련된 것; 및 (n) 뉴런성 질환에서 선택된 증상과 관련하여 적용된다.
- [0337] 상기 구체예에서, 염색체 17q23 증폭에서 기인하거나 이와 관련된 질병 또는 증상은 (a) 원발성 유방 종양; (b) BRCA2 돌연변이를 포함한 종양(예, 유방 종양); (c) BRCA1 돌연변이를 포함한 종양(예, 유방 종양); (d) 췌장 종양; (e) 방광 종양; 및 (f) 신경아세포종에서 선택될 수 있다.
- [0338] LKB1 돌연변이(들)에서 기인하거나 이와 관련된 질병 또는 증상은 LKB1 돌연변이(들)(예, LKB1 돌연변이(들)를 불활성화시킴)를 포함한 폐 선암일 수 있다.
- [0339] BRCA 1/2 돌연변이(들)에서 기인하거나 이와 관련된 질병 또는 증상은 유방암일 수 있다.
- [0340] 대사 질병 또는 질환은 (a) 비만(예, 노화 유도 비만 또는 식이 유도 비만); (b) 당뇨병; (c) 대사 증후군; (d) 인슐린 내성; (e) 고혈당; (f) 과아미노산혈증; 및 (g) 고지혈증에서 선택될 수 있다.
- [0341] 증식성 질환(암 포함): 본 발명은 또한 종양형성의 성장 방지 또는 종양형성의 세포사멸 유도의 수단으로서 적용한다. 따라서 이는 본 발명이 암과 같은 증식성 질환을 치료하거나 예방하는데 유용한 것을 증명할 것으로 기대된다. 그러한 이상의 예는 비제한적 예로서 p70S6K의 과발현 (또는 본원에 기술된 기타 증후군)을 포함한다.
- [0342] 또한 본 발명은, 예를 들어 증식 또는 생존에 있어서의 질환, 예컨대 바이러스성 감염, 및 신경변성 질병을 초래하는 기타 증상을 치료하는데 유용할 것임을 제시하고 있다.
- [0343] 따라서, 본 발명은 증식, 세포사멸 또는 분화의 질환이 존재하는 질병의 치료에 광범위하게 적용된다.
- [0344] 억제될 수 있는 암의 예는, 비제한적 예로서, 암종, 예컨대 암종, 예컨대 방광 암종, 유방 암종, 결장암종(예, 결장직장 암종, 예컨대 결장 선암 및 결장 선종), 신장 암종, 표피세포 암종, 간 암종, 폐 암종, 예컨대 선암, 소세포 폐암 및 비소세포 폐 암종, 식도 암종, 담낭 암종, 난소 암종, 췌장 암종, 예컨대 외분비 췌장 암종, 위 암종, 자궁경부 암종, 자궁내막암종, 갑상선 암종, 전립선 암종, 또는 피부 암종, 예컨대 편평상피 세포 암종; 림프성 계통의 조혈 증양, 예컨대 백혈병, 급성 림프성 백혈병, B-세포 림프종, T-세포 림프종, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, 모발상 세포 림프종, 또는 버켓 림프종; 골수성 계통의 조혈 증양, 예컨대 급성 및 만성 골수성 백혈병, 골수이형성 증후군, 또는 전골수성 백혈병; 갑상선 난포기 암; 중간엽 기원의 증양, 예컨대 섬유육종 또는 횡문근육종; 중추신경계 또는 말초신경계의 증양, 예컨대 별아교세포종, 신경아세포종, 신경교종 또는 신경초종; 흑색종; 고환종; 기형암종; 골육종; 색소성 건피증; 각질가시세포종; 갑상선 난포기 암; 또는 카포시 육종을 포함한다.
- [0345] 림프성 계통의 조혈 증양의 추가예는 다발성 골수종이다.
- [0346] 암의 특정 세트는 유방암, 난소암, 결장암, 전립선암, 식도암, 편평상피암 및 비소세포 폐 암종을 포함한다. 암의 추가의 세트는 유방암, 난소암, 전립선암, 자궁내막암 및 신경교종을 포함한다.
- [0347] 증식 질환의 또 다른 예는 골수증식성 증후군이다.
- [0348] 면역 질환: 본 발명이 유리할 수 있는 면역 질환은 비제한적 예로서 자가면역 증상 및 만성 염증 질병, 예컨대 전신성 홍반성 루프스, 자가면역 매개된 사구체신염, 류마티스 관절염, 건선, 염증성 장 질환, 및 자가면역 당뇨병, 습진 과민감성 반응, 천식, COPD, 비염, 및 상부 호흡관 질병을 포함한다.

- [0349] 기타 치료적 용도: p70S6K-매개된 생리적 과정은 세포사멸, 증식, 분화에서 역할을 하고, 이에 따라 본 발명은 또한 암 이외의 다음의 질병 및 면역 기능장애와 관련된 것의 치료에 유용할 수도 있다; 바이러스성 감염, 예컨대 헤르페스 바이러스, 수두 바이러스, 엡스타인바 바이러스, 신드비스 바이러스, 아데노바이러스, HIV, HPV, HCV 및 HCMV; HIV-감염된 개체 내 AIDS의 발달 방지; 심혈관성 질병, 예컨대 심근 비대, 재협착, 아테롬성동맥 경화증; 신경변성 질환, 예컨대 알츠하이머병, AIDS-관련 치매, 파킨슨병, 근위축성 측색경화증, 망막세포 변성, 척수성 근위축증 및 소뇌 변성; 사구체신염; 골수이형성 증후군, 허혈 관련 심근 경색, 발작 및 재관류 손상, 근골격계의 변성 질병, 예컨대 골다공증 및 관절염, 아스피린-과민성 부비강염, 낭성 섬유증, 다발성 경화증, 신장 질병.
- [0350] 본 발명은 또한 인슐린 내성 및 불감성을 초래하는 질병, 및 포도당, 에너지 및 지방 저장의 붕괴, 예컨대 대사 질병 및 비만에 유용할 수 있다.
- [0351] 본 발명은 임의의 유형의 p70S6K-매개된 중재, 치료 또는 예방을 고려한다. 따라서, 본 발명은 (a) 단백질 키나아제 p70S6K의 조절(예, 억제); 또는 (b) 단백질 키나아제 p70S6K의 활성 농도에서의 중재; (b) 생체내 세포 주기의 G1기에서 S기까지의 진행 억제; (c) 생체내 세포 주기의 G1기에서 S기까지의 세포 증식의 억제; (d) 라파마이신 대리체로서 화학식 I의 화합물의 사용; (f) 적당한 세포사멸 프로그램의 재설립; (g) 중앙 조직 내 성장 인자 수용체 신호 전달, 과발현 및 활성화의 억제; (h) 뉴런성 세포 분화의 조절; (i) 세포 운동성의 조절; (j) 세포 반응(들)의 조절; 및 (k) 인슐린 민감성 향상을 포함하는 치료 또는 예방과 관련하여 적용된다.
- [0352] 치료 또는 예방은 또한 (i) 환자를 선별하여 이 환자가 앓고 있거나 앓을 수 있는 질병 또는 증상이 단백질 키나아제 p70S6K에 대하여 활성을 가지는 화합물을 이용한 치료에 감수성인 것인지 여부를 결정하는 단계; 및 (ii) 이에 따라 환자가 감수성인 질병 또는 증상을 나타내는 경우, 이후 환자에게 본원에 정의된 화학식 I의 화합물을 투여하는 단계를 포함하는, 질병 상태 또는 증상의 진단 및 치료 방법을 포함한다.
- [0353] 피험체 또는 환자 집단은 (a) 단백질 키나아제 p70S6K에 이상(예, 과잉활성)이 있는 것; 및 (b) p70S6K 이상(예, p70S6K 과활성)에 대한 진단상 테스트를 실시하는 것; (c) 염색체 17q23이 증폭되는 것; 및 (d) 염색체 17q23의 증폭에 대한 진단상 테스트를 실시하는 것; (e) BRCA1 돌연변이(들)가 존재하는 것; (f) BRCA1 돌연변이(체)에 대한 진단상 테스트를 실시하는 것; (g) BRCA2 돌연변이(들)가 존재하는 것; (h) BRCA2 돌연변이(들)에 대한 진단상 테스트를 실시하는 것; (i) LKB1 돌연변이(들)가 존재하는 것; (j) LKB1 돌연변이(들)에 대한 진단상 테스트를 실시하는 것; 및 (k) 본원에 정의된 바와 같이 선별된 것에서 선택될 수 있다.
- [0354] **본 발명의 조성물 이점**
- [0355] 잠재적으로, 본 발명의 조성물은 경구 노출에 적당한 물리화학적인 성질을 갖는다.
- [0356] 본원에 정의된 조성물은 종래기술분야 화합물과 비교하여 경구 생체이용성이 향상된 것으로 나타나야 한다. 경구 생체이용성은 경구 경로에 의해 투여되는 경우 화합물의 혈장 노출 대 정맥내(i.v.) 경로에 의해 투여되는 경우 화합물의 혈장 노출의 비(F)로 정의될 수 있으며, 백분율로 표시될 수 있다. 경구 생체이용성(F값)이 30% 이상, 더욱 바람직하게는 40% 이상인 조성물은, 비경구 투여보다 오히려 경구 투여될 수 있거나, 비경구 투여뿐 아니라 경구 투여될 수 있다는 것이 특히 유리하다.
- [0357] 또한, 화학식 I의 화합물은 상이한 키나아제에 대하여 이의 활성에 더욱 강력하고 더욱 감수성이고, 특히 PKB에 대하여 향상된 감수성과 효과를 입증한다.
- [0358] 화학식 I의 화합물은 시험관내 및 세포내 PKB를 억제함에 있어 이의 R-거울상 이성질체보다 더욱 유의적으로 강력하다. 시험관내 방사계수측정 분석에서 단리된 PKB 효소에 대한 화학식 I의 화합물의 IC₅₀은 R-거울상 이성질체의 0.96 μM과 비교하였을 때 0.01 μM이다. 또한 GSK3β의 인산화, PKB의 직접 하류 기질을 측정하는 세포 기저 기전 검정에서는 효능에서 대략 100배 차가 관찰된다. 화학식 I의 화합물은 >50 μM의 R-거울상 이성질체 값과 비교하였을 때 1.1 μM의 IC₅₀을 나타낸다.
- [0359] 2개의 거울상 이성질체 사이에서 추가적 차이점은 밀접하게 관련된 키나아제 PKA에 대한 이의 효능이며, 여기서 화학식 I의 화합물은 0.25 μM에서 PKA를 억제하는 R-거울상 이성질체와 비교하였을 때 0.03 μM에서 44%로 단리된 효소를 억제한다.
- [0360] 화학식 I의 화합물은 P450 효소에 상이한 민감성을 가지고 약물 대사 및 약력학적 성질과 관련하여 향상을 제시한다는 점에서 종래기술 화합물에 비해 유리하다. 예를 들어, 화학식 I의 화합물은 시토크롬 P450 효소 1A2,

2C9, 2C19, 3A4 및 2D6의 각각에 대해 IC₅₀값이 10 μm 이상이다.

[0361] 또한, 화학식 I의 화합물은 감소된 투여 필요량을 제시하여야 한다.

[0362] 화학식 I의 화합물은 종래기술 화합물보다 잠재적으로 독성이 덜하다.

[0363] **hERG**

[0364] 1990년대 후반에, 미국 FDA가 승인하였던 다수의 화합물은 심장 기능장애로 인한 사망과 관련된 것으로 밝혀져 미국에서의 시판을 중지하여야만 했었다. 그 후, 이들 약물의 부작용은 심장 세포에서의 hERG 채널의 차단으로 인한 부정맥의 발생인 것으로 밝혀졌다. hERG 채널은 1980년대 후반에 돌연변이체 노랑초파리(*Drosophila melanogaster* fruitfly)에서 동정된 제1의 구성원인 칼륨 이온 채널의 패밀리 중 하나이다(Jan, L.Y. and Jan, Y.N. (1990). A Superfamily of Ion Channels. *Nature*, 345(6277):672 참조). hERG 칼륨 이온 채널의 생물리학적 성질은 문헌[Sanguinetti, M.C, Jiang, C, Curran, M.E. and Keating, M.T. (1995). A Mechanistic Link Between an Inherited and an Acquired Cardiac Arrhythmia: HERG encodes the Ikr potassium channel. *Cell*, 81:299-307 and Trudeau, M.C., Warmke, J.W., Ganetzky, B. and Robertson, G.A. (1995). HERG, a Human Inward Rectifier in the Voltage-Gated Potassium Channel Family. *Science*, 269:92-95]에 기재되어 있다.

[0365] hERG 차단 활성의 배제는 임의의 신규한 약물의 개발에서 중요한 고려 사항으로 남아 있다.

[0366] 화학식 I의 화합물은 경미한 hERG 이온 채널 차단 활성을 갖는다.

[0367] **치료 방법**

[0368] 본원에 정의된 바와 같은 조성물은 단백질 키나아제 A 및/또는 단백질 키나아제 B 및/또는 ROCK 키나아제 및/또는 p70S6K 키나아제에 의해 매개된 일정 범위의 질병 상태 또는 증상의 예방 또는 치료에 유용할 것이다. 상기 질병 상태 및 증상의 예는 상기에 제시되어 있다.

[0369] 조성물은 일반적으로 투여를 필요로 하는 피험체, 예를 들면 인간 또는 동물 환자, 바람직하게는 인간에게 투여한다.

[0370] 조성물은 통상적으로 치료적 또는 예방적으로 유용하며, 일반적으로 비독성인 함량으로 투여된다. 하지만, 특정의 상황에서(예를 들면 생명을 위협하는 질병의 경우), 상기 정의된 조성물 투여의 이점은 임의의 독성 효과 또는 부작용의 단점보다 더 중요할 수 있으며, 이러한 경우 독성 정도와 관련한 함량으로 화합물을 투여하는 것이 바람직한 것으로 간주할 수 있다.

[0371] 조성물은 이로운 치료적 효과를 유지하기 위하여 장기간에 걸쳐 투여될 수 있거나 또는 단기간 동안만 투여될 수도 있다. 대안으로, 박동적(pulsatile) 또는 연속적 방식으로 투여될 수 있다.

[0372] 화학식 I의 화합물의 통상의 1일 투약량은 체중 1 kg당 100 pg 내지 100 mg, 보다 통상적으로 5 ng 내지 25 mg, 보다 일반적으로 10 ng 내지 15 mg(예, 10 ng 내지 10 mg, 보다 통상적으로 1 μg 내지 20 mg, 예를 들면 1 μg 내지 10 mg)이지만, 필요에 따라서 투약량이 더 많거나 또는 더 낮게 투여될 수도 있다. 본원에 정의된 조성물은 1일 기준으로 또는 예를 들면 2일, 또는 3일, 또는 4일, 또는 5일, 또는 6일, 또는 7일, 또는 10일 또는 14일, 또는 21일, 또는 28일 마다의 반복 기준으로 투여될 수 있다.

[0373] 화학식 I의 화합물은 예를 들면 1 내지 1,500 mg, 2 내지 800 mg 또는 5 내지 500 mg, 예를 들면 2 내지 200 mg 또는 10 내지 1,000 mg 범위의 투약량으로 경구 투여될 수 있으며, 투약량의 특정의 예는 10, 20, 50 및 80 mg이 있다. 화합물은 매일 1회 또는 1회 이상 투여될 수 있다. 화합물은 연속으로(즉, 치료 섭생의 기간 동안 쉬지 않고 매일) 투여될 수 있다. 대안으로, 화합물은 치료 섭생의 전체 기간에 걸쳐 간헐적으로, 즉 소정 기간, 예컨대 1주일 동안 연속으로 투여한 후, 일정 기간, 예컨대 1주일간 중지한 후, 또다른 기간, 예컨대 1주일간 연속 투여하는 등이 될 수 있다. 간헐적 투여를 비롯한 치료 섭생의 예로는 하나 이상의 주기, 예를 들면 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 또는 그 이상의 주기 동안 1주일 투여하고 1주일 쉬는 주기; 또는 2주일 투여하고 1주일 쉬는 주기; 또는 3주일 투여하고 1주일 쉬는 주기; 또는 2주일 투여하고 2주일 쉬는 주기; 또는 4주일 투여하고 2주일 쉬는 주기; 또는 1주일 투여하고 3주일 쉬는 주기로 투여하는 섭생이 포함된다.

[0374] 하나의 특정한 투약 스케줄에서는, 환자에게 10일 이하 동안, 특히 1주일 중 최대 5일 동안 매일 1시간 상기 정의된 조성물의 주입물을 투여하고, 이 치료를 소정의 간격으로, 예컨대 2주 내지 4주, 특히 매 3주마다 반복한다.

- [0375] 보다 구체적으로는, 환자에게 5일간 매일 1시간 동안 상기 정의된 조성물의 주입물을 투여하고, 이 치료를 매 3주마다 반복한다.
- [0376] 또다른 특정의 투약 스케줄에서는, 환자에게 30분 내지 1시간에 걸쳐 주입물을 투여하고, 이어서 가변의 기간, 예를 들면 1시간 내지 5시간, 예를 들면 3시간 동안 유지한다.
- [0377] 추가의 특정의 투약 스케줄에서, 환자에게 12시간 내지 5일의 기간 동안, 특히 24시간 내지 72시간의 기간 동안 연속적 주입물을 투여한다.
- [0378] 그러나, 궁극적으로 투여한 화합물의 양 및 사용한 조성물의 유형은 질병의 성질 또는 치료하고자 하는 생리적 상태에 따르며, 주치의의 판단에 따른다.
- [0379] 화학식 I의 화합물은 단독 치료제로서 투여될 수 있거나 또는 특정의 질병 상태, 예를 들면 중앙형성 질환, 예컨대 상기 정의된 바와 같은 암의 치료를 위한 하나 이상의 기타 화합물과의 병행 치료로 투여될 수 있다. (동시에 투여하든 또는 상이한 시간 간격으로 투여하든) 화학식 I의 화합물과 함께 투여될 수 있는 기타 치료제 또는 치료의 예로는, 비제한적인 예로서, 다음을 포함한다:
- [0380] · 토포이소머라제 I 억제제
 - [0381] · 항대사물질
 - [0382] · 튜블린 표적화제
 - [0383] · DNA 결합제 및 토포이소머라제 II 억제제
 - [0384] · 알킬화제
 - [0385] · 단일클론 항체
 - [0386] · 항-호르몬
 - [0387] · 신호 전달 억제제
 - [0388] · 프로테아좀 억제제
 - [0389] · DNA 메틸 전이효소
 - [0390] · 시토카인 및 레티노이드
 - [0391] · 크로마틴 표적화 치료
 - [0392] · 방사선치료, 및
 - [0393] · 기타 치료 또는 예방 제제; 예를 들면 화학요법과 관련된 일부 부작용을 감소시키거나 또는 완화시키는 제제. 이러한 제제의 특정한 예로는 항구토제 및 화학요법 관련 호중구감소 기간을 방지 또는 감소시키고, 적혈구 세포 또는 백혈구 세포의 수치가 감소된 것으로부터 야기되는 합병증, 예를 들면 적혈구생성인자(EPO), 과립구 대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF) 및 과립구-콜로니 자극 인자(G-CSF)를 예방하는 제제. 또한, 골 재흡수를 억제하는 제제, 예컨대 비스포스포네이트 제제, 예를 들면 졸레드론네이트, 파미드론네이트 및 이반드론네이트, 염증성 반응을 억제시키는 제제(예, 텍사메타존, 프레드니손 및 프레드니솔론) 및, 천연 호르몬 소마토스타틴의 것을 모사하는 약력학적 성질을 갖는 지속성 옥타펩티드인 옥트레오티드 아세테이트를 포함하는 예컨대 뇌 호르몬 소마토스타틴의 합성 형태와 같은 말단비대증 환자에서의 성장 호르몬 및 IGF-I의 혈중 수치를 감소시키는데 사용되는 제제도 포함된다. 추가로, 엽산 또는 폴린산 그 자체의 수치를 감소시키는 약물에 대한 해독제로서 사용되는 제제, 예컨대 류코보린, 부종 및 혈전색전성 에피소드를 비롯한 부작용의 치료에 사용할 수 있는 제제, 예컨대 메게스트롤 아세테이트가 포함된다.
 - [0394] 본 발명의 조합에 존재하는 화합물 각각은 개별적으로 다양한 투약 스케줄 및 상이한 경로를 통해 제공될 수 있다.
 - [0395] 화학식 I의 화합물이 1, 2, 3, 4개 또는 그 이상(바람직하게는 1 또는 2개, 더욱 바람직하게는 1개)의 기타 치료제와 함께 병행 치료로 투여될 경우, 화합물은 동시적으로 또는 순차적으로 투여될 수 있다. 순차적으로 투여될 경우, 이는 매우 좁은 시간 간격으로(예를 들면 5 내지 10분에 걸쳐) 또는 더 긴 간격으로(예를 들면 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의 시간 간격으로 심지어 필요할 경우 더 긴 시간 간격으로) 투여될 수 있으며, 정확한 투약

섭생은 치료제(들)의 성질에 따른다.

- [0396] 또한, 화학식 I의 화합물은 비-화학요법 치료, 예컨대 방사선요법, 광역동요법, 유전자 요법, 수술 및 조절된 식이와 함께 투여될 수 있다.
- [0397] 또다른 화학요법제와의 병행 요법에 사용하기 위하여, 본원에 정의된 조성물 및 1, 2, 3, 4 또는 그 이상의 기타 치료제는, 예를 들면 2, 3, 4 또는 그 이상의 치료제를 포함하는 투약 제형으로 함께 제제화될 수 있다. 대안으로, 개개의 치료제는 별도로 제제화될 수 있으며, 임의로 그 사용 설명서를 지닌, 키트의 형태로 함께 제공될 수 있다.
- [0398] 당업자라면 통상의 일반적인 지식을 통하여 사용하고자 하는 투약 요법 및 조합 요법을 숙지할 수 있을 것이다.
- [0399] **진단 방법**
- [0400] 본원에 정의된 조성물을 투여하기 전에, 환자는 환자가 앓고 있거나 앓을 수 있는 질병 또는 증상이 특정 표적 키나아제(예, 단백질 키나아제 A 및/또는 단백질 키나아제 B 및/또는 ROCK 키나아제 및/또는 P70S6K 키나아제)에 대한 활성을 갖는 화합물의 치료에 감수성인 것인지 여부를 결정하기 위해 선별할 수 있다.
- [0401] 예를 들면, 환자로부터 채취한 생물학적 샘플은, 환자가 앓고 있거나 또는 앓을 수 있는 증상 또는 질병, 예컨대 암이 PKA 및/또는 PKB의 상향 조절 또는 정상의 PKA 및/또는 PKB 활성으로의 경로의 감작화를 초래하거나 또는 PKB, PI3K, GF 수용체 및 PDK 1 & 2의 경우에서와 같이 PKA 및/또는 PKB의 상류 신호 전달 성분의 상향조절을 초래하는 유전적 비정상 또는 비정상 단백질 발현을 특징으로 하는지의 여부를 결정하기 위하여 분석할 수 있다.
- [0402] 대안으로, 환자로부터 채취한 생물학적 샘플은 PKB 경로, 예컨대 PTEN의 음성 조절자 또는 억제자의 손실에 대하여 분석할 수 있다. 본 명세서에서, 용어 "손실"은 조절자 또는 억제자를 코딩하는 유전자의 결실, 유전자의 절두(예를 들면 돌연변이에 의한), 유전자의 전사된 생성물의 절두, 또는 전사된 생성물의 (점 돌연변이에 의한) 불활성화 또는 또다른 유전자 산물의 분리를 포함한다.
- [0403] 대안으로, 또는 추가적으로, 환자는 ROCK 활성 내 이상(예, ROCK 유전자 또는 ROCK 유전자 조절 성분 내 상승된 또는 상향조절된 ROCK 발현, 돌연변이) 또는 (본원에 기술된) Rho 신호전달 이상에 대하여 스크리닝될 수 있다.
- [0404] 용어 상향조절은 유전자 증폭(즉, 복수의 유전자 카피)을 비롯한 증가된 발현 또는 과발현, 및 전사 효과 및 과활성 및 돌연변이에 의한 활성화를 비롯한 활성화에 의한 증가된 발현을 포함한다. 따라서 환자는 키나아제(예, PKA 및/또는 PKB 및/또는 ROCK 키나아제 및/또는 P70S6K 키나아제)의 상향조절의 특징인 마커를 검출하기 위하여 진단 테스트를 실시할 수 있다. 용어 진단은 스크리닝을 포함한다. 마커에 의해, 본 발명자들은, 예를 들면 키나아제(예, PKA 및/또는 PKB 및/또는 ROCK 키나아제 및/또는 P70S6K 키나아제)의 돌연변이를 동정하기 위하여 DNA 조성의 측정을 비롯한 유전자 마커를 포함한다. 또한, 용어 마커는 키나아제(예, PKA 및/또는 PKB 및/또는 ROCK 키나아제 및/또는 P70S6K 키나아제)의 상향조절 및/또는 효소 활성, 효소 농도, 효소 상태(예, 인산화되거나 또는 인산화되지 않음) 및 전술한 단백질의 mRNA 농도를 비롯한 관련 경로의 상향조절을 초래하는 기타의 요인을 특징으로 하는 마커를 포함한다.
- [0405] 상기 진단 테스트 및 스크리닝은 통상적으로 종양 생검 샘플, 혈액 샘플(분계(shed) 종양 세포의 분리 및 농축), 변 생검, 가래, 염색체 분석, 흉수, 복수, 골수 또는 소변으로부터 선택된 생물학적 샘플에 실시한다.
- [0406] PKA 및/또는 PKB에서의 돌연변이 또는 TCL-1의 재배열 또는 PTEN 발현의 손실을 지니는 개체의 동정은 환자가 PKA 및/또는 PKB 억제제를 사용한 치료에 특히 적절하다는 것을 의미할 수 있다. 종양은 치료전 PKA 및/또는 PKB 변이체의 존재에 대하여 우선적으로 스크리닝될 수 있다. 스크리닝 방법은 통상적으로 직접적 서열분석, 올리고뉴클레오티드 마이크로어레이 분석 또는 돌연변이 특이성 항체를 포함한다.
- [0407] 단백질의 동정 방법, 변이 및 상향조절의 분석은 당업자에게 공지되어 있다. 스크리닝 방법의 예로는 표준 방법, 예컨대 역전사 효소 증합효소 연쇄 반응(RT-PCR) 방법 또는 계내 하이브리드화 방법이 포함되지만, 이에 국한되는 것은 아니다.
- [0408] RT-PCR에 의한 스크리닝에서, 종양에서의 mRNA의 농도는 mRNA의 cDNA 카피를 생성한 후, PCR에 의한 cDNA의 증폭에 의하여 평가한다. PCR 증폭 방법, 프라이머의 선택 및 증폭을 위한 조건은 당업자에게 공지되어 있다. 핵산 조작 및 PCR은 예를 들면 문헌[Ausubel, F.M. et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology, 2004, John Wiley & Sons Inc.] 또는 문헌[Innis, M.A. et al., eds. PCR Protocols: a guide to methods and

applications, 1990, Academic Press, San Diego]에 기재된 바와 같이 표준 방법에 의하여 실시한다. 핵산 기법을 포함한 반응 및 조작은 문헌[Sambrook et al., 2001, 3rd Ed, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press]에 기재되어 있다. 대안으로, RT-PCR에 대한 시판중인 키트(예, 로쉬 몰레큘라 바이오케미칼즈) 또는, 미국 특허 제4,666,828호, 제4,683,202호, 제4,801,531호, 제5,192,659호, 제5,272,057호, 제5,882,864호 및 제6,218,529호에 기재되어 있는 바와 같은 방법을 사용할 수 있으며, 이들 문헌 및 특허는 본 명세서에서 참고로 인용한다.

- [0409] mRNA 발현을 평가하기 위한 계내 하이브리드화 기법의 예는 형광 계내 하이브리드화(FISH) 방법이 있다. 문헌 [Angerer, 1987 *Meth. Enzymol.*, 152: 649].
- [0410] 일반적으로, 계내 하이브리드화 방법은 하기와 같은 주요한 단계를 포함한다: (1) 분석하고자 하는 조직을 고정하는 단계; (2) 표적 핵산의 접근 가능성을 증가시키기 위하여 그리고 비특이성 결합을 감소시키기 위하여 샘플을 예비 하이브리드화 처리하는 단계; (3) 생물학적 구조체 또는 조직에서 핵산 혼합물을 핵산으로 하이브리드화하는 단계; (4) 하이브리드화에서 결합되지 않은 핵산 분절을 제거하기 위하여 하이브리드화후 세정하는 단계 및 (5) 하이브리드화된 핵산 분절을 검출하는 단계. 통상 이와 같은 적용에 사용된 프로브는, 예를 들면 방사성 동위원소 또는 형광 리포터를 사용하여 표지화한다. 바람직한 프로브는 엄격한 조건하에서 표적 핵산(들)과의 특이적 하이브리드화를 가능하게 하게 하도록, 예를 들면 약 50, 100 또는 200 개의 뉴클레오티드 내지 약 1,000 또는 그 이상의 뉴클레오티드 정도로 충분히 길다. FISH를 실시하기 위한 표준 방법은 문헌[Ausubel, F.M. et al., eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2004, John Wiley & Sons Inc.] 및 문헌 [Fluorescence In Situ Hybridization: Technical Overview by John M.S. Bartlett in *Molecular Diagnosis of Cancer, Methods and Protocols*, 2nd ed.; ISBN: 1-59259-760-2; March 2004, pps. 077-088; Series: *Methods in Molecular Medicine*]에 기재되어 있다.
- [0411] 대안으로, mRNA로부터 발현된 단백질 생성물은 종양 샘플의 면역조직화학, 미량역가 평판을 사용한 면역분석, 웨스턴 블로팅, 2-차원 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동, ELISA, 유세포분석 및 특이성 단백질의 검출을 위한 당업계에 공지된 기타의 방법에 의해 분석할 수 있다. 검출 방법은 부위 특이적 항체의 사용을 포함한다. 당업자라면, 키나아제(예, PKB 및/또는 PKA 및/또는 ROCK 키나아제 및/또는 P70S6K 키나아제)의 상향조절의 검출 또는 키나아제 변이체의 검출을 위한 그러한 모든 공지된 기법은 본 발명의 경우에 적용 가능하다는 것을 인지할 수 있을 것이다.
- [0412] 따라서, 이와 같은 모든 기법은 PKA 및/또는 PKB 및/또는 ROCK 키나아제 및/또는 P70S6K 키나아제 억제제를 사용한 처리에 특히 적절한 농양을 확인하는데 사용될 수 있다.
- [0413] 예를 들면, 상기에서 명시한 바와 같이, PKB 베타는 10 내지 40%의 난소암 및 췌장암에서 상향조절되는 것으로 밝혀졌다(Bellacosa et al., 1995, *Int. J. Cancer* 64, 280-285; Cheng et al., 1996, *PNAS* 93, 3636-3641; Yuan et al., 2000, *Oncogene* 19, 2324-2330). 따라서, PKB 억제제, 특히 PKB 베타의 억제제는 난소암 및 췌장암을 치료하는데 사용될 수 있는 것으로 판단된다.
- [0414] PKB 알파는 인간 위암, 전립선암 및 유방암에서 증폭된다(Staal 1987, *PNAS* 84, 5034-5037; Sun et al., 2001, *Am. J. Pathol.* 159, 431-437). 따라서, PKB 억제제, 특히 PKB 알파의 억제제는 인간 위암, 전립선암 및 유방암을 치료하는데 사용될 수 있는 것으로 판단된다.
- [0415] 증가된 PKB 감마 활성은 스테로이드 독립성 유방 및 전립선 세포주에서 관찰되었다(Nakatani et al., 1999, *J. Biol. Chem.* 274, 21528-21532). 따라서, PKB 억제제, 특히 PKB 감마의 억제제는 스테로이드 독립성 유방암 및 전립선암을 치료하는데 사용될 수 있는 것으로 판단된다.
- [0416] ROCK의 검출은 mRNA 또는 단백질 수준에서 수행될 수 있다. Rho 및 ROCK의 농도가 임상 샘플에서 측정되는 방법의 특징에는 다음을 포함한다:
- [0417] · 문헌[American Journal of Pathology. 2002;160:579-584]. 이 문헌은 인간 유방 조직에서 RhoC 발현을 특화시키기 위해 포르말린 고정된 조직 상에 수행되는 면역조직화학을 기술한다.
- [0418] · 문헌[Clinical Cancer Research Vol. 9, 2632-2641, July 2003]. 이 문헌은 방광암을 앓는 107개의 연속되는 일본인 환자로부터의 한쌍의 종양 및 비종양 외과 샘플 내에서 Rho 및 ROCK 단백질 발현을 평가하기 위한 웨스턴 블롯의 사용을 기술한다.
- [0419] · 문헌[Pancreas. 24(3):251-257, April 2002]. 이 문헌은 면역블로팅 및 면역조직화학에 의해 인간의 췌장

조직 내에서 ROCK-1의 발현을 기술한다.

- [0420] · 문헌[World J Gastroenterol 2003 September;9(9): 1950-1953]. 이 문헌은 간세포 암종(HCC)에서 역전자 증합효소 연쇄 반응(RT-PCR)에 의해 RhoC 유전자의 mRNA 발현 농도의 조사를 기술한다.
- [0421] 상기 언급된 공보들에 포함된 Rho 및/또는 ROCK 활성 또는 발현의 수준의 평가와 관련된 관련 방법론적 개시물은 본원에 참고 인용된다.
- [0422] p70S6K의 검출은 mRNA 또는 단백질 수준에서 수행될 수 있다. 예시적 방법은, 예를 들어 문헌[J Natl Cancer Inst (2000): 92, pp.1252-9 (이는 게놈 하이브리드화(CGH) 및 cDNA 분석과 비교하였을 때 상보성 DNA 및 조직 마이크로어레이 분석 사용에 의해 리보솜 단백질 S6 키나아제의 활성화를 검출하여 증폭되고 과발현된 유전자를 동정하는 것을 기술함)]에 기술된다.
- [0423] 과발현된 p70S6K의 검출은 문헌[Int J Oncol (2004): 24 (4), pp. 893-900]에 기술된다. 이 문헌은 종양 감도에 대하여 높은 p70S6K, AKT 발현을 비교하였을 때 면역조직화학을 사용하여 일반적인 인간 종양에서 PI3K/PTEN-Akt-mTOR 경로의 약리학적게놈 프로파일링을 기술한다.

실시예

- [0424] 본 발명은 이하 다음의 절차 및 실시예에 기술된 특정 구체예를 참고하여 예시하지만, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0425] 하기 기술된 절차의 각 출발 재료는 달리 언급하지 않는 한 구입 가능한 것이다.
- [0426] 양자 자기 공명(¹H NMR) 스펙트럼은 달리 언급되지 않는 한 27°C에서 Me-d₃-OD로 400.13 MHz에서 작동하는 Bruker AV400 기기 상에 기록되었고 다음과 같이 기록된다: 화학적 이동 δ/ppm (양자 수, 다중도, 여기서 s=단일 피크, d=이중 피크, t=삼중 피크, q=사중 피크, m=다중 피크, br=넓음). 잔류 양성자성 용매 MeOH(δ_H = 3.31 ppm)는 내부 기준으로 사용되었다.
- [0427] 예에서, 제조된 화합물은 하기 제시된 시스템을 사용하고 조건을 작용시켜 액체 크로마토그래피 및 질량 분석법에 의해 특징화되었다. 염소가 존재하는 경우, 화합물에 인용된 질량은 ³⁵Cl이다. 사용된 작동 조건은 하기 기술된다.

플랫폼 시스템

- [0429] HPLC 시스템: 워터스 2795
- [0430] 질량 분석 검출기: 마이크로매스 플랫폼 LC
- [0431] PDA 검출기: 워터스 2996 PDA
- [0432] 산성 분석 조건 2:
- [0433] 용리액 A : H₂O(0.1% 포름산)
- [0434] 용리액 B : CH₃CN(0.1% 포름산)
- [0435] 구배: 3.5분에 걸쳐 용리액 B 5~95%
- [0436] 흐름: 0.8 ml/분
- [0437] 컬럼: Phenomenex Synergi 4 μ Max-RP 80A, 50 x 2.0 mm
- [0438] 염기성 분석 조건 5:
- [0439] 용리액 A: H₂O (NH₄OH를 이용하여 pH=9.2로 조정된 10 mM NH₄HCO₃ 완충제)
- [0440] 용리액 B: CH₃CN
- [0441] 구배: 3.5분에 걸쳐 용리액 B 05~95%
- [0442] 흐름: 0.8 ml/분

[0443] 컬럼: Phenomenex Gemini 5 μ 2.0 x 50 mm

[0444] MS 조건:

[0445] 모세관 전압: 3.5 kV 또는 3.6 kV

[0446] 원뿔 전압: 30 V

[0447] 원천 온도: 120 $^{\circ}$ C

[0448] 스캔 범위: 165-700 amu

[0449] 이온화 방식: 전기분무 -, + 또는 + & -

[0450] 하기 실시예에서, 다음의 키는 사용된 LCMS 조건을 확인하는데 사용된다:

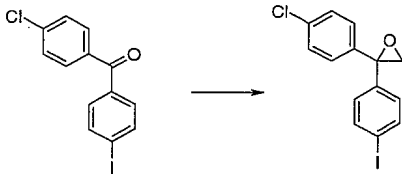
[0451] PS-A2 플랫폼 시스템 - 산성 분석 조건 2

[0452] PS-B5 플랫폼 시스템 - 염기성 분석 조건 5

[0453] **실시예 1**

[0454] (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 제조

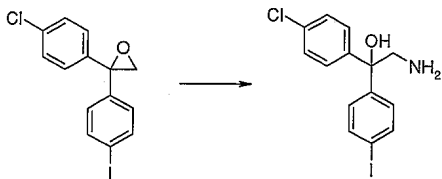
[0455] 1A. 2-(4-클로로-페닐)-2-(4-요오도-페닐)-옥시란



[0456]

[0457] 수산화나트륨(유중 60% 분산액, 128 mg, 3.2 mmol)을 N₂ 하에 배치한 후 DMSO(5 ml)를 첨가하였다. 트리메틸실 포늄 요오다이드(0.66g, 3.2 mmol)를 15분 후 고체로 첨가한 후, 추가 30분 후 (4-클로로-페닐)-(4-요오도-페닐)-메탄올(1 g, 2.9 mmol)을 첨가하였다. 이 혼합물을 24시간 동안 실온에서 교 반한 후 에틸 아세테이트로 희석시키고 1:2 물/염수, 물 및 염수($\times 2$)로 세척하였다. 유기상을 건조(MgSO₄)시키고, 여과 및 농축시켜 표제 화합물(1.01 g, 97%)을 얻고, 추가 정제 없이 사용하였다. LCMS (PS-A2) R_t 4.07분 [M-H]⁻ 355.

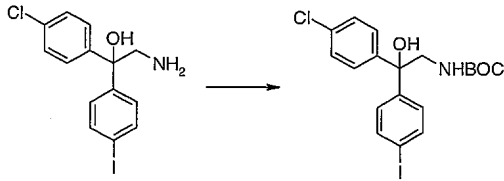
[0458] 1B. 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-요오도-페닐]-에탄올(에폭시드 개환 반응)



[0459]

[0460] 메탄올(5 ml, 10.0 mmol) 중의 2 M NH₃에서 2-(4-클로로-페닐)-2-(4-요오도-페닐)-옥시란(500 mg, 1.40 mmol)을 용해시키고 용액을 60분 동안 130 $^{\circ}$ C에서 마이크로파로 가열하였다. 냉각시, 용매를 진공으로 제거하여 목적하는 생성물을 제공하였다. 3회의 동일한 반응을 수행하여 1.55 g(98%)의 생성물 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-요오도-페닐]-에탄올을 얻었다. 미정제 생성물은 순수하였으며 다음 단계에서 정제 없이 사용되었다.

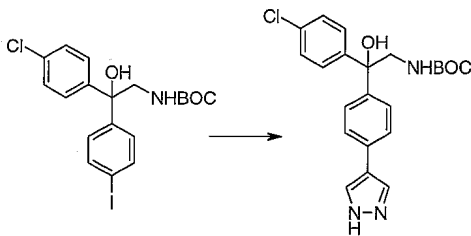
[0461] 1C. [2-(4-클로로-페닐)-2-히드록시-2-(4-요오도-페닐)-에틸]-카르복산 tert-부틸 에스테르(BOC 보호)



[0462]

[0463] 단계 1B의 아미노 알콜 생성물(9.55 g, 25.56 mmol)을 1,4-디옥산(220 ml) 중에 현탁시키고 2 M NaOH를 첨가하였다(16.6 ml, 33.24 mmol). 혼합물이 균질해질 때까지 강하게 교반하였다. 디-tert-부틸 디카르보네이트(6.14 g, 28.11 mmol)를 첨가하고 반응 혼합물을 20시간 동안 45°C에서 교반하였다. 냉각시, 반응 혼합물을 농축시키고 EtOAc(150 ml) 및 물(150 ml) 사이에 분리시켰다. 유기층을 분리하고 염수(150 ml)로 세척하고, 건조(MgSO₄)시키고 농축시켜 황색 오일(14.08 g)을 얻었다. 미정제 생성물을 에틸 아세테이트-헥스란(5%~40% EtOAc 구배)로 용출한 Biotage SP4 (65i 컬럼)을 이용하여 플래시 크로마토그래피로 정제시켜 표제 화합물을 백색 고체(10.0g, 83%)로서 얻었다. R_t 3.73분 [M+H] 473.96

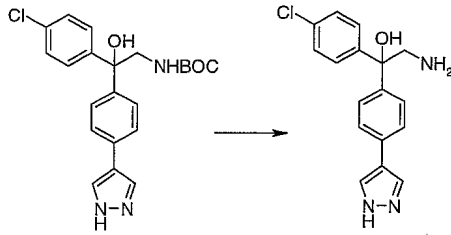
[0464] 1D. [2-(4-클로로-페닐)-2-히드록시-2-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에틸]-카르복산 tert-부틸 에스테르 (스즈키 커플링 반응)



[0465]

[0466] 둥근 바닥 플라스크에서 [2-(4-클로로-페닐)-2-히드록시-2-(4-요오도-페닐)-에틸]-카르복산 tert-부틸 에스테르 (5 g, 10.6 mmol)를 4-(4,4,5,5-테트라메틸-[1,3,2]디옥사보롤란-2-일)-1H-피라졸(4.1 g, 21.11 mmol) 및 인산 칼륨(3염기, 7.88 g, 37.10 mmol)과 합하였다. 이어서 1:1:1 에탄올, 메탄올, 톨루엔 및 물의 용매 혼합물(각 용매 33 ml) 중에 고체를 용해시켰다. 질소로 용액에서 기체를 제거하고 테트라키스트리페닐포스핀 팔라듐(0)(0.612 g, 0.53 mmol)을 첨가하였다. 질소로 혼합물에서 기체를 제거한 후 2시간 동안 질소 하에 85°C에서 가열하였다. 이후 반응 혼합물을 실온으로 냉각시켰다. 추가의 시약 배치를 첨가하였다: 인산칼륨(7.88 g, 37.10 mmol) 및 피라졸 보로네이트(4.1 g, 21.11 mmol). 질소로 반응 혼합물에서 기체를 제거하고 추가의 테트라키스트리페닐포스핀 팔라듐(0) 배치(0.101 g, 0.087 mmol)를 첨가하였다. 반응 혼합물에서 기체를 제거한 후 17시간 동안 질소 하에 85°C에서 가열하였다. 추가의 시약 배치(상기 양)를 다시 첨가하고 추가의 6.5시간 동안 질소 하에 85°C에서 가열을 계속하였다. 이후 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고 진공 하에 증발시켜 유기 용매를 제거하였다. 잔류 수성층을 수성 2 N NaOH 용액(150 ml)으로 희석시킨 후 에틸 아세테이트(150 ml)로 추출하였다. 유기층을 분리하고 수성 2 N NaOH 용액(150 ml)으로 세척한 후 염수(150 ml)로 세척하였다. 유기층을 분리하고, 건조시키고(MgSO₄) 진공 하에 농축시켰다. 잔류물을 디에틸 에테르로 분쇄하였다. 진공 하에 고체를 여과시킨 후 건조시켜 백색 고체로서 표제 화합물(2.55 g, 58%)을 얻었다. LC/MS: (PS-B5) R_t 3.05 [M+H]⁺ 414.18. ¹H NMR (Me-d₃-OD) 7.95 (2H, br s), 7.55 (2H, d), 7.48-7.41 (4H, m), 7.31 (2H, d), 3.87 (2H, q), 1.35 (9H, s).

[0467] 1E. 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올(BOC 탈보호 단계)



[0468]

[0469] Et₂O(50 ml) 및 메탄올(50 ml) 중 포화된 HCl에서 BOC 아민(2.55g, 6.16 mmol)의 현탁액을 20시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시키고 2 M NaOH(150 ml)로 희석시키고 EtOAc(200 ml)로 추출하였다(NB - 고체 배합물을 완전하게 용해시키기 위해 장시간의 진탕이 요구됨). 유기층을 1 N HCl(100 ml)로 세척하였다. 이후 수성층을 분리시키고 2 M NaOH를 이용하여 pH 12로 염기화시켰다. 목적하는 생성물을 용액으로부터 침전시킨 후 진공 여과로 수집하고 수일 동안 건조시켰다(1.89 g, 98%). ¹H NMR (Me-d₃-OD) δ 3.29-3.38 (2H, m), 7.32 (2H, d), 7.41-7.46 (4H, m), 7.55 (2H, d), 7.94 (2H, s).

[0470] 1F. 개별 거울상 이성질체의 키랄 분리

[0471] 하기 기술된 키랄 LC 방법을 사용하여, 화합물 (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올을 R-거울상 이성질체로부터 분리시켰다.

[0472] 키랄 분석 조건:

[0473] 용리액: 실온에서 MeOH + 0.1% DEA

[0474] 흐름: 0.7 ml/분

[0475] 총 시간: 25분

[0476] 주입 부피: 5 μl

[0477] 샘플 농도: 1 mg/ml(이동상 내)

[0478] 컬럼: DAICEL Chiralpak AD-H; 250 x 4.6 mm

[0479] 파장: 230 또는 257 nm

[0480] 키랄 제조 조건:

[0481] 용리액: 실온에서 MeOH + 0.1% DEA

[0482] 흐름: 13 ml/분

[0483] 총 시간: 29분

[0484] 주입 부피: 250 μl

[0485] 샘플 농도: 100 mg/ml(이동상 내)

[0486] 컬럼: DAICEL Chiralpak AD-H; 250 x 20 mm

[0487] 파장: 230 또는 257 nm

[0488] 생성된 (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올을 편광측정법, 키랄 크로마토그래피 및 결정학에 의해 특정화시켰다.

[0489] 편광측정법

[0490] AA-10 자동 편광계(한정된 광학 활성)를 사용하여 S 거울상 이성질체 및 R 거울상 이성질체의 광학 활성을 측정하였다.

[0491] S-거울상 이성질체

[0492] 22.42 mg 화합물을 2 ml의 MeOH 중에 용해시킴, 세포 길이 = 20 cm, 관독 = +0.31,

[0493] $[\alpha]_D^{20} = +13.8^\circ$

[0494] **R-거울상 이성질체**

[0495] 20.14 mg을 10 ml의 MeOH 중에 용해시킴(편광계 세포 내 버블 문제로 인한 더 많은 희석), 관독 = -0.03, 세포 길이 = 10 cm

[0496] $[\alpha]_D^{20} = -14.8^\circ$

[0497] **키랄 크로마토그래피**

[0498] 상기 기술된 키랄 분석 조건 및 5 μ l의 주입 부피를 사용하여, S-거울상 이성질체는 체류 시간이 15.283분이었다.

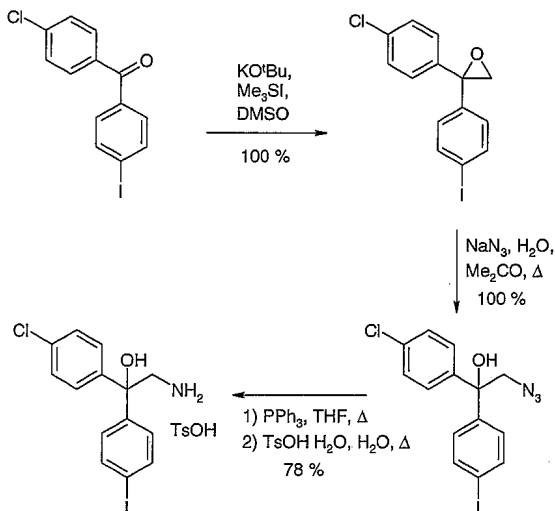
[0499] **결정화**

[0500] bPKA-PKB 내 S-거울상 이성질체의 결정화 분석은 문헌[Thomas G. Davies et al. "A Structural Comparison of Inhibitor Binding to PKB, PKA and PKA-PKB Chimera," *J Mol. Biol.* 9 January 2007 : 17275837]에 기술된 방법을 사용하여 수행되었다. 이 분석은 단백질과 결합된 S-거울상 이성질체의 존재를 나타내었다.

[0501] **실시예 2**

[0502] 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-요오도-페닐]-에탄올의 대안적인 합성

[0503] 본 실시예는 실시예 1의 2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-요오도-페닐]-에탄올인 중간체 화합물 1B의 제조를 기술하고 있다.



[0504]

[0505] 2A. (RS)-2-(4-클로로페닐)-2-(4-요오도페닐)옥시란

[0506] 칼륨 *tert*-부톡시드(18.48 g, 165.0 mmol)를 디메틸설폭시드(200 ml) 중의 4-클로로-4'-요오도벤조페논(51.38 g, 150.0 mmol) 및 트리메틸설포늄 요오다이드(33.66 g, 165.0 mmol)의 신속하게 교반된 현탁액에 첨가하고 생성된 혼합물을 3시간 동안 실온에서 교반하였다. 혼합물을 에틸 아세테이트(500 ml)로 희석시키고, 물(3 x 500 ml)로 세척한 후 염수(500 ml)로 세척하였다. 유기층을 분리시키고 진공 하에 용매를 제거하여 담황색 오일로 (RS)-2-(4-클로로페닐)-2-(4-요오도페닐)옥시란(53.48 g, 100%)을 얻었고 이를 정치 하에 고체화시켜 희백색 고체를 얻었다. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 7.76 (2H, d), 7.45 (2H, d), 7.34 (2H, d), 7.12 (2H, d), 3.32 (2H, m). MS: $[M-H]^-$ 355.

[0507] 2B. (RS)-2-아지도-1-(4-클로로페닐)-1-(4-요오도페닐)에탄올

- [0508] 아지드화나트륨(13.86 g, 213.2 mmol)을 아세톤(400 ml) 중의 (RS)-2-(4-클로로페닐)-2-(4-요오도페닐)옥시란(50.66 g, 142.1 mmol) 및 물(40 ml)의 혼합물에 첨가하고 이 혼합물을 교반하고 4일 동안 환류에서 유지하였다. 실온으로 냉각시, 아세톤을 진공 하에 제거하고, 잔류물을 에틸 아세테이트(500 ml) 중에서 용해시키고, 물(250 ml)로 세척한 후 염수(250 ml)로 세척하고, 유기층을 분리하고 진공 하에 용매를 제거하여 담황색 오일로 (RS)-2-아지도-1-(4-클로로페닐)-1-(4-요오도페닐)에탄올(56.77 g, 100%)을 얻고, 이를 정치 하에 서서히 고체화시켜 회백색 고체를 얻었다. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 7.68 (2H, d), 7.44 (2H, d), 7.38 (2H, d), 7.24 (2H, d), 6.38 (1H, br s), 3.99 (2H, s). MS: [M-H]⁻ 398.
- [0509] 2C. (RS)-2-암모니오-1-(4-클로로페닐)-1-(4-요오도페닐)에탄올 톨루엔-4-설포네이트
- [0510] 트리페닐포스핀(31.44 g, 120.0 mmol)을 테트라히드로퓨란(400 ml) 중의 (RS)-2-아지도-1-(4-클로로페닐)-1-(4-요오도페닐)에탄올(47.94 g, 120.0 mmol)의 용액에 첨가하고 이 혼합물을 교반하고 5시간 동안 환류에서 유지시키고 톨루엔-4-설포산 일수화물(22.8 g, 120.0 mmol) 및 물(40 ml)을 첨가하고 혼합물을 교반하고 추가 16시간 동안 환류에서 유지시켰다. 실온으로 냉각시, 혼합물을 진공 하에 증발 건조시켰다. 에틸 아세테이트(600 ml)를 첨가하고 이 혼합물을 30분 동안 실온에서 신속하게 교반하여 고체를 재현탁시켰다. 흡입 여과를 통해 고체를 수집하고, 에틸 아세테이트(3 x 250 ml)로 씻어내고, 감압 하에 흡입건조시키고 진공 오븐 하에 50°C에서 밤새 건조시켜 (RS)-2-암모니오-1-(4-클로로페닐)-1-(4-요오도페닐)에탄올 톨루엔-4-설포네이트(51.37 g, 78%)를 무색 고체로 얻었다. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) 7.73 (2H, d), 7.68 (3H, br s), 7.47 (4H, m), 7.43 (2H, d), 7.28 (2H, d), 7.12 (2H, d), 6.60 (1H, br s), 3.67 (2H, s), 2.30 (3H, s). MS: [M+H]⁺ 374.
- [0511] 실시예 2C의 생성물을 실시예 1C의 방법(수산화나트륨의 추가 등가물을 사용하여 톨루엔 설포산 염을 고려함)에 의해 N-Boc 유도체로 전환시킨 후 스즈키 커플링 반응을 실시하고 이후 실시예 1D 및 실시예 1E에 기술된 Boc 보호기를 제거하여 거울상 이성질체의 생성된 혼합물을 실시예 1F의 방법으로 분리하여 (S)-2-아미노-1-(4-클로로페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올을 얻을 수 있다.
- [0512] 생물학적 활성
- [0513] 화학식 I의 화합물의 생물학적 활성은 다음의 실시예에 기술되어 있다. 또한, 화학식 I의 화합물의 생물학적 성질은 문헌[John F. Lyons et al, page 3512s, Poster Session B, Abstract B251, AACR-NCI-EORTC International Conference: Molecular Targets and Cancer Therapeutics, October 22-26, 2007, San Francisco, CA](copy available on the Astex Therapeutics 웹사이트: www.astex-therapeutics.com 또는 www.astex-therapeutics.com/investorsandmedia/publications에서 카피본 입수 가능)에 기술되어 있다.
- [0514] 실시예 3
- [0515] PKA 키나아제 억제 활성의 측정(IC₅₀)
- [0516] 화학식 I의 화합물은 기질로서 Upstate Biotechnology(#14-440)로부터의 PKA 촉매 도메인 및 또한 Upstate Biotechnology(#12-257)로부터의 9 잔류 PKA 특이적 펩티드(GRTGRRNSI)를 사용하여 PK 억제 활성에 대해 테스트할 수 있다. 1 nM 효소의 최종 농도를 20 mM MOPS pH 7.2, 40 μM ATP/γ³³P-ATP 및 50 mM 기질을 포함하는 완충제로 사용한다. 화합물을 디메틸설포사이드(DMSO) 용액 중에 첨가하고 최종 DMSO 농도는 2.5%였다. 반응을 20분 동안 진행한 후 과잉 오르소인산을 첨가하여 활성을 쉐딩하였다. 이후 비도입된 γ³³P-ATP를 Millipore MAPH 필터 평판 상에서 인산화된 단백질로부터 분리시켰다. 이 평판을 세척하고, 섬광체를 첨가한 후 평판에서 Packard Topcount 상의 계수를 실시하였다.
- [0517] PKA 활성의 억제율(%)을 계산하고 플롯팅하여 PKA 활성의 50%(IC₅₀)를 억제하는데 필요한 테스트 화합물의 농도를 측정하였다.
- [0518] 상기 기술된 프로토콜 후, (S)-2-아미노-1-(4-클로로페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올은 0.03 μM의 농도에서 PKA가 44%의 억제율을 제공하는 것으로 밝혀졌고, 반면에 (R)-2-아미노-1-(4-클로로페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 IC₅₀값은 0.25 μM였다. 결론적으로, S-거울상 이성질체는 PKA 분석에서 R-거울상 이성질체보다 상당히 더욱 강력하다는 것이 입증되었다.

- [0519] **실시예 4**
- [0520] PKB 키나아제 억제 활성(IC₅₀)의 측정
- [0521] 화합물에 의한 단백질 키나아제 B(PKB) 활성의 억제는 PKB-PIF로 기술된 용합 단백질을 사용하지만 Andjelkovic 등(Mol. Cell. Biol. 19, 5061-5072 (1999)에 의해 기술된 바와 같이, 그리고 Yang 등(Nature Structural Biology 9, 940-944 (2002))에 의해 완전하게 기술된 바와 같이 본질적으로 측정될 수 있다. Yang 등에 의해 기술된 바와 같이 단백질을 정제하고 PDK1로 활성화시켰다. Calbiochem(#123900)으로부터 얻은 펩티드 AKTide-2T (H-A-R-K-R-E-R-T-Y-S-F-G-H-H-A-OH)를 기질로 사용하였다. 0.6 nM 효소의 최종 농도는 20 mM MOPS pH 7.2, 30 μM ATP/γ³³P-ATP 및 25 μM 기질을 포함하는 완충제로 사용된다. 화합물을 DMSO 용액 중에 첨가하여 최종 DMSO 농도는 2.5%였다. 반응은 20분 동안 진행된 후 과잉 오르소인산을 첨가하여 활성을 쉐딩하였다. 반응 혼합물을 펩티드가 결합된 포스포셀룰로스 필터 평판으로 옮기고 미사용된 ATP를 세척하였다. 세척 후, 섬광체를 첨가시키고 비도입된 활성을 섬광 계수를 통해 측정하였다. PKB 활성의 억제율(%)을 계산하고 플롯팅하여 PKB 활성의 50%(IC₅₀)를 억제하는데 필요한 테스트 화합물의 농도를 측정하였다.
- [0522] 상기 기술된 프로토콜 후, (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 IC₅₀값은 0.01 μM이 되는 것으로 밝혀진 반면, (R)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 IC₅₀값은 0.96 μM이었다. 결론적으로, S-거울상 이성질체는 PKB 검정에서 R-거울상 이성질체보다 대략 100배 더 강력하다는 것이 입증되었다.
- [0523] **실시예 5**
- [0524] hERG 활성
- [0525] hERG K⁺ 이온 채널에 대한 화학식 I의 화합물의 활성은 문헌[M. H. Bridgland-Taylor *et al.*, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 54 (2006), 189-199]에 의해 기술된 검정을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0526] **실시예 6**
- [0527] 시토크롬 P450에 대한 효과의 측정
- [0528] 시토크롬 P450(CYP450) 효소 1A2, 2C9, 2C19, 3A4 및 2D6에 대한 실시예 1의 화합물의 효과는 Invitrogen(영국 페이지즐리 소재)에서 입수 가능한 Pan Vera Vivid Cyp450 스크리닝 키트를 사용하여 측정하였다. CYP450은 CYP450 및 NADPH 환원효소를 포함하는 바큘로솜(baculosome)의 형태로 공급되며 사용된 기질은 형광 비비드 기질이었다. 최종 반응 혼합물은 다음과 같았다:
- [0529] **1A2**
- [0530] 100 mM 인산칼륨, pH 8, 1% 아세트니트릴, 2 μM 1A2 블루 비비드 기질, 100 μM NADP⁺, 4 nM CYP450 1A2, 2.66 mM 포도당-6-포스페이트, 0.32 U/ml 포도당-6-포스페이트 탈수소효소.
- [0531] **2C9**
- [0532] 50 mM 인산칼륨, pH 8, 1% 아세트니트릴, 2 μM 그린 비비드 기질, 100 μM NADP⁺, 8 nM CYP450 2C9, 2.66 mM 포도당-6-포스페이트, 0.32 U/ml 포도당-6-포스페이트 탈수소효소.
- [0533] **2C19**
- [0534] 50 mM 인산칼륨, pH 8, 1% 아세트니트릴, 8 μM 블루 비비드 기질, 100 μM NADP⁺, 4 nM CYP450 2C19, 2.66 mM 포도당-6-포스페이트, 0.32 U/ml 포도당-6-포스페이트 탈수소효소.
- [0535] **3A4**
- [0536] 100 mM 인산칼륨, pH 8, 1% 아세트니트릴, 10 μM 3A4 블루 비비드 기질, 100 μM NADP⁺, 2.5 nM CYP450 3A4, 2.66 mM 포도당-6-포스페이트, 0.32 U/ml 포도당-6-포스페이트 탈수소효소.
- [0537] **2D6**

- [0538] 100 mM 인산칼륨, pH 8, 1% 아세토니트릴, 5 μ M 2D6 블루 비비드 기질, 100 μ M NADP⁺, 16 nM CYP450 2D6, 2.66 mM 포도당-6-포스페이트, 0.32 U/ml 포도당-6-포스페이트 탈수소효소.
- [0539] Fluoroskan 형광 평판 판독기 상에 30초 간격으로 20분 동안 형광을 모니터링하였다. 여기 및 발광 파장은 1A2, 2C19 및 3A4의 경우 390 nm and 460 nm이고, 2D6의 경우 390 nm 및 485 nm이고 2C9의 경우 485 nm 및 530 nm였다. 초기 속도를 진행 곡선으로부터 측정되었다.
- [0540] 테스트 화합물은 아세토니트릴로 구성되고 10 μ M의 농도에서 CYP450에 대하여 테스트하였다.
- [0541] 실시예 1의 화합물은 1A2, 2C9, 2C19, 3A4 및 2D6에 대하여 IC₅₀이 10 μ M 이상이다.
- [0542] **실시예 7**
- [0543] pSer9 GSK3 β 에 대한 세포계 포스포-Ser9 Gsk3 β ELISA 검정
- [0544] U87MG 세포에서 PKB를 억제하는 효과는 화합물의 능력에 의해 측정되어 세린 9 상의 직접 하류 기질 GSK3 β 의 인산화를 억제된다. 세포를 96웰 평판에 배치시키고 밤새 회수한 후 1시간 동안 억제제 화합물을 첨가하였다. 1시간 후, 세포를 고정시키고 3% 파라포름알데히드, 0.25% 글루터랄데히드, 0.25% Triton X100 및 TBS-T 내 5% Marvel로 블로킹하였다. 이후 4°C에서 밤새 GSK3 β (세포 신호전달)의 인산화된 형태에 직접적인 1차 항체와 세포를 항온처리하였다. 세척 후, 1시간 동안 DELFIA 시약(Eu-N1 항-토끼 IgG 항체)을 사용하는 2차 항체와 세포를 항온처리한 후, 시간-분리된 형광 판독기 상에서 340 nm의 여기 및 640 nm의 발광에서 항상 평판을 판독하였다. 모든 세포를 ECACC(European Collection of Cell Cultures)로부터 얻었다.
- [0545] 프로토콜
- [0546] 1. 96웰 평판에서 160 μ l의 매질/웰로 12,500 세포/웰에서 U87MG 세포를 평판배양.
- [0547] 2. 37°C에서 24시간 동안 항온처리
- [0548] 3. 억제제 및 DMSO 조절로 세포 처리
- [0549] 4. 37°C에서 1시간 동안 항온처리
- [0550] 5. 종이 상에 평판 및 블롯으로부터 튄 매질
- [0551] 6. 100 μ l의 **고정 용액**을 각 웰에 첨가(3% 파라포름알데히드, 0.25% 글루터랄데히드, 0.25% Triton X100)
- [0552] 7. 37°C에서 30분 동안 항온처리
- [0553] 8. 물/0.1% Tween20을 이용하여 1회 세척
- [0554] 9. 100 μ l의 5% 우유/TBS-T를 이용한 **블로킹**
- [0555] 10. 37°C에서 30분 동안 항온처리
- [0556] 11. 5% 우유/TBS-T로 희석된 **1차 항체** 100 μ l를 각 웰에 첨가(1:250에서 사용된 CST #9336 포스포-Ser9 GSK3 β 항체)
- [0557] - 1개의 항체도 없는 컬럼 대조군 포함 - 단지 5% 우유/TBS-T
- [0558] - 또한 Zymed 토끼 IgG의 컬럼 포함할 수 있음(02-6102 - 5 mg/ml)
- [0559] 필요한 경우 포스포-Ser9 GSK3 β 와 동일한 농도로 5% 우유/TBS-T에 희석된 대조군
- [0560] 12. 4°C에서 밤새 항온처리
- [0561] 13. 물/0.1% Tween20으로 3회 세척
- [0562] 14. Delfia 검정 완충제로 희석된 **2차 항체** 100 μ l를 각 웰에 첨가(Delfia Eu-N1 항-토끼 IgG 항체는 0.30 μ g/ml 최종 농도에서 사용됨)
- [0563] 15. 37°C에서 1시간 동안 항온처리
- [0564] 16. 물/0.1% Tween20으로 3회 세척

- [0565] 17. 100 μ l의 Delfia Enhancement 용액을 각 웰에 첨가
- [0566] 18. 15분 동안 평균 진탕기 상에서 진탕
- [0567] 19. Delfia 프로그램 상에서 판독(여기 340 nm - 발광 640 nm) = Europium 계수
- [0568] 20. 물/0.1% Tween20으로 1회 세척
- [0569] 21. 200 μ l의 BCA 용액을 웰 당 첨가(1:50 황산구리 II를 함유한 BCA)
- [0570] 22. 37°C에서 30분 동안 항온처리
- [0571] 23. 562 nm의 흡광도에서 판독 = 단백질 농도
- [0572] 화합물 (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올은 상기 기전적 검정에서 IC₅₀이 1.1 μ M인 것을 발견한 반면, (R)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올의 IC₅₀값은 >50 μ M이었는데, 즉 R-거울상 이성질체는 본질적으로 불활성이었다.
- [0573] **실시예 8**
- [0574] ROCK-II(h) 검정 프로토콜
- [0575] 화합물 (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올을 하기 제시된 ROCK-II 검정으로 테스트하였다.
- [0576] 최종 반응 부피 25 μ l에서, ROCK-II (h) (5~10 mU)를 50 mM Tris pH 7.5, 0.1 mM EGTA, 30 μ M KEAKEKRQEIQIAKRRRLSSLRASTKSGGSQK, 10 mM Mg아세테이트 및 [γ -³³P-ATP] (특이적 활성 대략 500 cpm/pmol, 요구된 농도)와 항온처리하였다. 이 반응은 MgATP 혼합물의 첨가로 개시되었다. 실온에서 40분 동안 항온처리 후, 3% 인산 용액 5 μ l를 첨가함으로써 반응을 중지시켰다. 10 μ l의 반응은 이후 P30 필터패트 상에 일치시키고 5분 동안 3회 75 mM 인산 그리고 1회 메탄올 중에 세척한 후건조시켜 섬광 계수하였다.
- [0577] 상기 검정에서, (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올은 상기 검정에서 IC₅₀이 10 nM 미만, 즉 검정의 한계 이하인 것을 발견하였다.
- [0578] **실시예 9**
- [0579] p70S6K 방사계수측정 검정
- [0580] 화합물 (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올을 하기 기술된 p70S6K 방사계수측정 검정으로 테스트하였다.
- [0581] 개관
- [0582] P70S6 효소는 Upstate에서 입수되며 검정에서 2 nM로 사용된다.
- [0583] 기질 S6 각테일(AKRRRLSSLRA)은 25 μ M에서 사용된다(Km은 측정되지 않았음). 포스포릴 이동 반응에서, ATP로부터의 ³³P- γ 포스페이트를 세린 잔류물로 옮겼다. 반응 혼합물을 펩티드가 결합한 포스포셀룰로스 필터 평균으로 옮기고 미사용된 ATP를 세척해냈다. 세척 후, 섬광체를 첨가하고 미도입된 활성은 섬광 계수를 통해 측정하였다.
- [0584] 시약
- [0585] Upstate(#14-486)로부터의 P70S6 키나아제(T412E) 활성
- [0586] Upstate (#20-122)로부터의 S6 키나아제 기질 각테일
- [0587] 검정 완충제 10 mM MOPS pH 7.0
- [0588] 0.1 mg/ml BSA
- [0589] 0.001% Brij-35
- [0590] 0.5% 글리세롤 0.2 mM EDTA

- [0591] 10 mM MgCl₂
- [0592] 0.01% β-머캅토에탄올
- [0593] 10× 스탁으로 제조됨(2 ml 분액으로 2°C에서 보관)
- [0594] 15 μM ATP
- [0595] ATP(10 mM 스탁)를 농축된 스탁으로부터 새롭게 첨가하였다. ATP는 경시적으로 분해되고, 가능한 길게 얼음에 놓여지고 스탁이 새로울 수 있도록 적은 분액을 사용하였다.
- [0596] ³³P-ATP APBiotech (BF1000)
- [0597] 12.5% 오르소인산
- [0598] 0.5% 오르소인산
- [0599] Microscint 20 (Packard)
- [0600] 검정 준비
- [0601] 효소 혼합(1 ml 당 - 100 검정 포인트):
- [0602] 743.75 μl H₂O
- [0603] 250 μl 10× 검정 완충제
- [0604] 3.75 μl 10 mM ATP
- [0605] 2.5 μl 효소
- [0606] 기질 혼합(1 ml 당 - 100 검정 포인트):
- [0607] 250 μl S6 각테일 기질
- [0608] 750 μl H₂O
- [0609] 3.5 μl ³³P-ATP (APBiotech로부터의 BF1000)
- [0610] 첨가된 ³³P-ATP의 양은 이의 참조 일자 상에서 평가된다. 정확한 양은 시간으로 조정되는 것이 필요하다.
- [0611] 화합물 - 폴리프로필렌 96웰 평판 중 DMSO에서 40× 최종 검정 농도로 희석 곡선을 준비(최종 DMSO 2.5%).
- [0612] 물로 1:8 희석(5μl의 화합물을 35 μl의 물에 첨가하면 충분함).
- [0613] 검정 셋업
- [0614] 폴리프로필렌 96웰 평판에서,
- [0615] 5 μl 화합물
- [0616] 10 μl 기질 혼합
- [0617] 10 μl 효소 혼합
- [0618] 의 순서로 첨가하였다.
- [0619] 최종 ATP 농도는 대략 15 μM이다. ATP에 대한 KM은 방사계수측정 47 uM으로 계산되었다. 대조군은 "화합물 불포함"(DMSO) 및 "효소 불포함"(10 μl의 효소 혼합 사용 후 효소 첨가)이다. 평판 셀(TopSeal A - Packard) 또는 필터 평판의 플라스틱 뚜껑으로 덮었다(중간 정도의 방사선 배리어). 온건한 진탕으로 혼합시켰다. 50분 동안 실온에서 항온처리하였다. 20 μl의 2% 오르소인산을 첨가하여 반응을 중지시켰다.
- [0620] 여과 단계
- [0621] 50 μl의 0.5% 오르소인산 세척 완충제로 Millipore MAPH NOB 평판의 벽을 미리 적셨다. Millipore 진공 여과 유닛을 통해 액체를 여과시켰다. 중지된 반응물 전체를 벽으로 옮겼다. 이를 여과시켰다. 200 μl의 0.5% 오르소

인산 세척 완충제로 2회 세척하였다. 거의 진공건조시켰다. 평판 지지체를 제거하고 티슈 상에서 추가로 필터를 건조시켰다. Packard TopCount에서 어댑터로 평판을 작동시켰다. 20 μ l의 Microscint 20 섬광체를 첨가하고, Topseal A 시트로 밀봉하고 30초 동안 TopCount 상에서 계수하였다.

[0622] 검정에서, (S)-2-아미노-1-(4-클로로-페닐)-1-[4-(1H-피라졸-4-일)-페닐]-에탄올은 IC₅₀이 12 nM임을 발견하였다.

[0623] **약학 조제물**

[0624] **실시예 10**

[0625] (i) 정제 제조

[0626] 본원에 정의된 조성물을 포함하는 정제 조성물은 50 mg의 화합물을 희석제로서 197 mg의 유당(BP) 및 운할제로서 3 mg의 스테아린산마그네슘과 혼합시키고, 공지된 방식으로 정제를 형성하기 위해 압축시킴으로써 제조하였다.

[0627] (ii) 캡슐 제조

[0628] 캡슐 제조는 본원에 정의된 100 mg의 조성물을 100 mg의 유당과 혼합시키고 생성된 혼합물을 표준 불투명한 경질 젤라틴 캡슐에 충전시킴으로써 제조하였다.

[0629] (iii) 주사가능한 조제물 I

[0630] 주사 투여용 비경구 조성물은 10% 프로필렌 글리콜을 포함하는 물 중에서 본원에 정의된 조성물(예, 염 형태)을 용해시켜 활성 화합물 1.5 중량%의 농도를 얻음으로써 제조될 수 있다. 이후 용액을 여과 멸균시키고, 앰플에 충전하여 밀봉하였다.

[0631] (iv) 주사가능한 조제물 II

[0632] 주사용 비경구 조성물은 물에서 본원에 정의된 조성물(예, 염 형태)(2 mg/ml) 및 만니톨(50 mg/ml)을 용해시키고, 이 용액을 멸균 여과시키고 밀봉가능한 1 ml 바이알에 충전시켰다.

[0633] v) 주사가능한 조제물 III

[0634] 주사 또는 주입에 의한 정맥(i.v.) 전달을 위한 조제물은 20 mg/ml에서 수중 화학식 I의 화합물(예, 염의 형태)을 용해시킴으로써 제조될 수 있다. 이후 바이알을 밀봉하고 오토클레이브로 멸균시켰다.

[0635] vi) 주사가능한 조제물 IV

[0636] 주사 또는 주입에 의한 정맥(i.v.) 전달을 위한 조제물은 20 mg/ml에서 완충제(예, 0.2 M 아세트이트 pH 4.6)를 포함하는 물 중에 화학식 I의 화합물(예, 염의 형태)을 용해시킴으로써 제조될 수 있다. 이후 바이알을 밀봉하고 오토클레이브로 멸균시켰다.

[0637] (vii) 설하 주사 조제물

[0638] 피하 투여용 조성물은 본원에 정의된 조성물을 약학 등급 옥수수유와 혼합시켜 5 mg/ml 농도를 얻음으로써 제조하였다. 조성물을 멸균시키고 적당한 용기에 충전하였다.

[0639] viii) 동결건조된 조제물

[0640] 조제된 화학식 I의 화합물의 분액을 50 ml 바이알에 분주하고 동결건조하였다. 동결건조 동안, -45°C에서 1단계 동결 프로토콜을 사용하여 조성물을 동결시켰다. 어닐링을 위해 온도를 -10°C로 높인 후 냉동을 위해 -45°C로 낮추고 이후 대략 3400분 동안 +25°C에서 1차 건조시키고, 50°C 온도일 때 증가된 단계로 2차 건조시켰다. 1차 2차 건조 동안 압력은 80 ml에서 설정되었다.

[0641] **등가물**

[0642] 상기 예들은 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 제시되었으며 본 발명의 범위에 대하여 한정시키려는 것으로 이해해서는 안된다. 다수의 변형 및 변경은 상기 기술된 본 발명의 특정 구체예로 만들어질 수 있고 본 발명의 근원적인 원칙에서 벗어남 없이 실시예에 예시될 수 있다는 것은 쉽게 알 수 있다. 모든 그러한 변형 및 변경은 본 명세서에 의해 포함되는 것으로 간주한다.