(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0029384
(43) 공개일자 2020년03월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 295/096 (2006.01) *A61K 31/495* (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C07D 213/53 (2006.01) *C07D 295/155* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 295/096 (2013.01)
A61K 31/495 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7034039
(22) 출원일자(국제) 2018년04월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년11월18일
(86) 국제출원번호 PCT/SG2018/050194
(87) 국제공개번호 WO 2018/194520
국제공개일자 2018년10월25일
(30) 우선권주장
1706162.3 2017년04월19일 영국(GB)

(71) 출원인
싱가포르국립대학교
싱가포르 119077, 싱가포르 로어 켄트리지로드 21
방갈로르 유니버서티
인도 560001 방갈로르, 팰리스 로드, 센트럴 칼리지 캠퍼스
마이소르대학교
인도 570006 마이소르, 마나사간고트리
(72) 발명자
로비, 피터 에드워드
싱가포르, 119077 싱가포르, 로어 켄트 리지 로드 21, 싱가포르국립대학교, 싱가포르 암 과학 연구소 내
판데이, 비제이 쿠마르
싱가포르, 119077 싱가포르, 로어 켄트 리지 로드 21, 싱가포르국립대학교, 싱가포르 암 과학 연구소 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이희숙, 김석만

전체 청구항 수 : 총 21 항

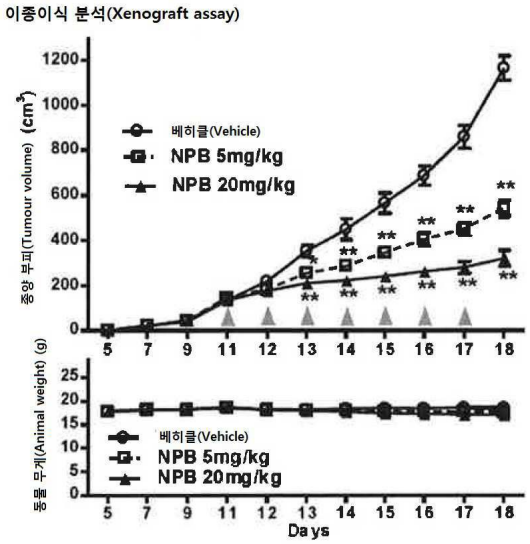
(54) 발명의 명칭 **BCL-2-관련된 데스 프로모터(BAD) 인산화의 소분자 억제제**

(57) 요 약

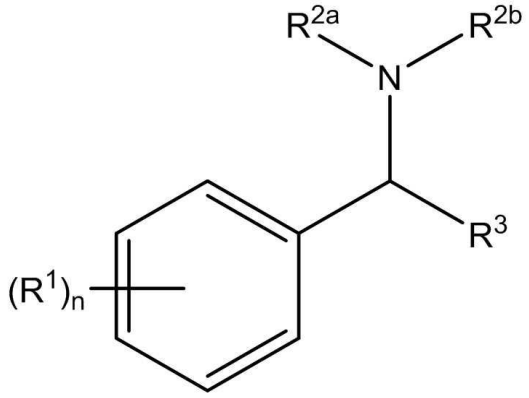
본 발명은 화학식 1의 화합물에 관한 것이다:

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도17a



[화학식 1]



상기 R^1, n, R^{2a}, R^{3b} 및 R^3는 본원에 기재된 바와 같다.

상기 화합물은 항-아포토시스 활성을 가지며 암, 특히 유방암, 자궁내막암, 난소암, 간암, 대장암, 전립선암, 또는 췌장암의 치료에 유용하다.

(52) CPC특허분류
A61K 31/496 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07D 213/53 (2013.01)
C07D 295/155 (2013.01)

(72) 발명자
칸추가라코팔 서브베고다, 랑가파
인도, 570006 마이소르, 마나사간고트리, 마이소르 대학교, 화학과 내
살룬디, 바사파
인도, 560001 방갈로르, 팰러스 로드, 센트럴 칼리지 캠퍼스, 방갈로르 유니버서티, 화학과 내
차크랍하비 단자야, 모한
인도, 570006 마이소르, 마나사간고트리, 마이소르 대학교, 화학과 내
랑가파, 쇼비츠
인도, 570006 마이소르, 마나사간고트리, 마이소르 대학교, 화학과 내
벤카타챠라이아, 스리니바사
인도, 560001 방갈로르, 팰러스 로드, 센트럴 칼리지 캠퍼스, 방갈로르 유니버서티, 화학과 내

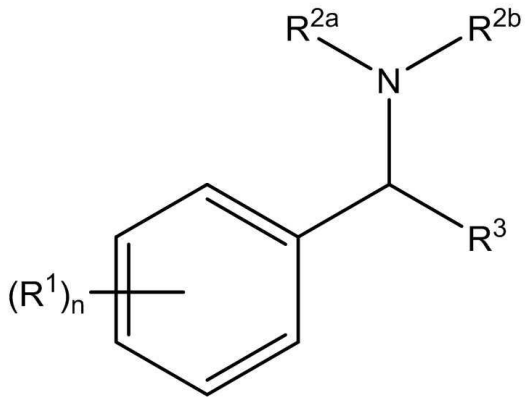
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 화합물 또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체:

[화학식 1]



상기 각각의 R^1은 독립적으로 할로(halo), OH, 시아노(cyano), 니트로(nitro), $NR^{10}R^{11}$, $C(O)R^{10}$, $C(O)OR^{10}$, $C(O)NR^{10}R^{11}$, $-S(O)_qNR^{10}R^{11}$, C_{1-6} 알킬(alkyl), C_{1-6} 할로알킬(haloalkyl), $-O(C_{1-6}$ 알킬), $-O(C_{1-6}$ 할로알킬), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl), -O-아릴(-O-aryl) 또는 -O-헤테로아릴(-O-heteroaryl)이며,

상기 각 R^{10} 및 R^{11}은 H 또는 OH, 할로, 시아노, NH_2, 아릴 또는 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬로부터 독립적으로 선택되고;

알킬 및 할로알킬 그룹 R^1은 OH, 시아노, $-S(O)_pNR^4R^5$, $-C(O)NR^4R^5$, 아릴, 헤테로아릴, -O-아릴 또는 아릴 또는 $-O(C_{1-6}$ 할로알킬)로 임의로 치환된 -O-헤테로아릴-$O(C_{1-6}$알킬)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되고;

아릴 또는 헤테로아릴 그룹 R^1은 할로, OH, 시아노, 니트로, $-NR^4R^5$, $-S(O)_pNR^4R^5$, $-C(O)NR^4R^5$, $-C(O)R^4$, $-C(O)OR^4$ 또는 $-C_{1-6}$ 알킬 또는 $-O(C_{1-6}$ 알킬)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되고, 이들 중 하나는 OH, 할로, 아릴, 헤테로아릴, $-O(C_{1-6}$ 알킬), $O(C_{1-6}$ 할로알킬), -O-아릴 또는 -O-헤테로아릴로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되고;

p는 1 또는 2 이고;

각각의 R^4 및 R^5는 H 또는 C_{1-4} 알킬로부터 독립적으로 선택되거나, R^4 및 R^5는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 O, N 및 S로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 헤테로 원자를 임의로 함유하는 3- 또는 8-원 헤테로사이클릭 고리를 형성할 수 있고;

n은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이며;

R^{2a} 및 R^{2b}는 각각 독립적으로 할로, OH, 아릴 또는 헤테로아릴로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬이거나;

R^{2a} 및 R^{2b}는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 O, N 또는 S로부터 선택되고 하나 이상의 치환기 R^6로 임의로 치환된 하나 이상의 추가 헤테로 원자를 함유하는 5- 또는 6-원 헤테로사이클릭 고리를 형성할 수 있으며;

각각의 R^6는 독립적으로 아릴, 헤테로아릴, -O-아릴, -O-헤테로아릴, 카르보사이클릴(carbocyclyl), 헤테로사이클릴(heterocyclyl), -O-카르보사이클릴, -O-헤테로사이클릴, R^{12}, OR^{12}, $C(O)R^{12}$, $C(O)OR^{11}$, $C(O)NR^{11}R^{12}$, CN, OH로 이루어진 군으로부터 선택되고,

각 R^{11} 및 R^{12}는 독립적으로 H 또는 C_{1-4} 알킬이고, 이들 중 하나는 하나 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 그룹으로 치환될 수 있고, 상기 아릴 및 헤테로아릴 그룹은 할로, OH, 시아노, 니트로, $-NR^4R^5$, $-S(O)_pNR^4R^5$, $-C(O)NR^4R^5$, $-C(O)R^4$, $-C(O)OR^4$ 또는 $-C_{1-6}$ 알킬 또는 $-O(C_{1-6}$ 알킬)로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 치환된 것이며, 이들 중 하나는 OH, 할로, 아릴, 헤테로아릴, $-O(C_{1-6}$ 알킬), $O(C_{1-6}$ 할로알킬), -O-아릴 또는 -O-헤테로아릴로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되고;

상기 R^4 및 R^5는 상기 정의된 바와 같고; 또는 R^{11} 및 R^{12}는 이들이 부착된 질소 원자와 결합하여 N, O 및 S로부터 선택된 하나 이상의 추가 헤테로원자를 임의로 함유하는 3 내지 8-원 헤테로사이클릭 고리를 형성하며, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬 또는 할로로 임의로 치환되고;

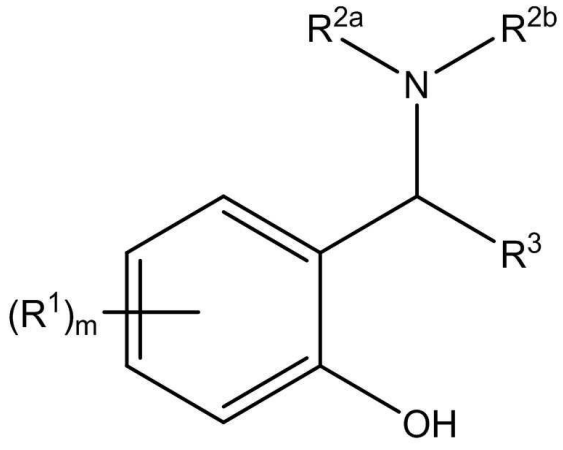
R^3는 아릴, 헤테로아릴, 카르보사이클릴 또는 헤테로사이클릴이고, 이들 중 임의의 것은 할로, 아릴로 임의로 치환된 $-C_{1-4}$ 알킬, 아릴, $-C_{1-4}$ 할로알킬, $-O(C_{1-4}$ 할로알킬) 또는 $-C(O)NR^8R^9$-로 임의로 치환된 $-O(C_{1-4}$ 알킬)로부터 선택된 하나 이상의 치환기 R^7으로 임의로 치환되며;

각각 R^8 및 R^9는 독립적으로 H, C_{1-4} 알킬 또는 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나, R^8 및 R^9는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 헤테로 원자를 임의로 함유하는 5- 또는 6-원 헤테로사이클릭 고리를 형성할 수 있다.

청구항 2

하기 화학식 1A의 화합물 또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체:

[화학식 1A]



상기 각 R^1은 독립적으로 할로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 할로알킬, 아릴 또는 헤테로 아릴이며, 아릴 또는 헤테로아릴 그

룹은 할로, OH, 시아노, 니트로, $-S(O)_pR^4R^5$, $-C(O)NR^4R^5$, 아릴로 임의로 치환된 $-C_{1-6}$ 알킬, $-C_{1-6}$ 할로알킬, 아릴 또는 $-O(C_{1-6}$ 할로알킬)로 임의로 치환된 $-O(C_{1-6}$ 알킬)로 이루어진 군에서 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되며;

p는 0, 1, 또는 2이고;

각각의 R^4 및 R^5는 H 또는 C_{1-4} 알킬로부터 독립적으로 선택되거나, R^4 및 R^5는 이들이 부착된 질소 원자와 함께 O, N 및 S 로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 헤테로원자를 임의로 함유하는 5- 또는 6-원 헤테로사이클릭 고리를 형성할 수 있고;

m은 0, 1, 2, 3 또는 4이며;

R^{2a} 및 R^{2b}는 각각 독립적으로 할로, OH, 아릴 또는 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬이거나;

R^{2a} 및 R^{2b}는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 O, N 및 S로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 헤테로원자를 임의로 함유하는 5- 또는 6-원 헤테로사이클릭 고리를 형성할 수 있고 하나 이상의 치환기 R^6로 임의로 치환되며;

각각의 R^6는 독립적으로 아릴, 헤테로 아릴, -O-아릴, -O-헤테로아릴 또는 하나 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 그룹으로 치환된 C_{1-4} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 아릴 및 헤테로아릴 그룹은 할로, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, $-O(C_{1-4}$ 알킬) 또는 $-O(C_{1-4}$ 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 치환되고;

R^3는 아릴, 헤테로아릴, 카르복사이클릴 또는 헤테로사이클릴이고 이들 중 임의의 것은 할로, 아릴로 임의로 치환된 C_{1-4} 알킬, 아릴로 임의로 치환된 $-O(C_{1-4}$ 알킬), $-C_{1-4}$ 할로 알킬, $-O(C_{1-4}$ 할로알킬) 또는 $-C(O)NR^8R^9$로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기 R^7로 임의로 치환될 수 있으며;

각각의 R^8 및 R^9는 H, C_{1-4} 알킬 또는 C_{3-6} 사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되거나, R^8 및 R^9는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 O, N 및 S로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 헤테로원자를 임의로 함유하는 5- 또는 6-원 헤테로사이클릭 고리를 형성할 수 있다.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 n은 1 또는 2 이며 적어도 하나 이상의 R^1 그룹은 OH이며, 상기 m은 0 또는 1인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서, 상기 m은 0 이외이고, R^1은 제2항에 기재된 바와 같이 임의로 치환된 할로 또는 아릴 또는 헤테로아릴 그룹인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체.

청구항 5

제4항에 있어서, R^1은 할로, OH, 시아노, 니트로, $-SO_2NH_2$, $-C(O)NR^4R^5$, 아릴로 임의로 치환된 C_{1-4} 알킬, $-C_{1-4}$

할로알킬, 아릴로 임의로 치환된 -O(C_{1-4} 알킬), 또는 -O(C_{1-4} 할로알킬)로 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴 그룹이며, 상기 R^4 및 R^5는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 피페리딘(piperidine) 또는 피롤리딘(pyrroldine) 고리를 형성하는 것을 특징으로 하는 화합물 또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 R^1은 클로로(chloro), 플루오로(fluoro), 메틸(methyl), 에틸(ethyl), 트리플루오로메틸(trifluoromethyl), 벤질(benzyl), 메톡시(methoxy), 에톡시(ethoxy), 벤질옥시(benzyloxy), 트리플루오로메톡시(trifluoromethoxy) 및 피페리딘-1-카르보닐(piperidine-1-carbonyl)로 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴 그룹인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체.

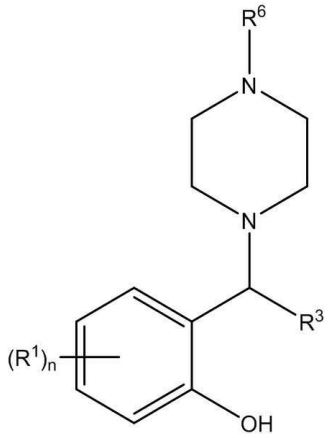
청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R^{2a} 및 R^{2b}는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 하나 이상의 치환기 R^6로 임의로 치환된 6-원 헤테로사이클릭 고리를 형성하는 것을 특징으로 하는 화합물 또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 R^{2a} 및 R^{2b}는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 피페라진(piperazine) 4-포지션에서 단일 R^6 치환기에 의해 치환된 피페라진 고리를 형성하여 화학식 1의 화합물이 하기 화학식 1B의 화합물이며, R^1, n, R^3 및 R^6는 제2항에 기재된 바와 같은 것을 특징으로 하는 화합물 또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체.

[화학식 1B]



청구항 9

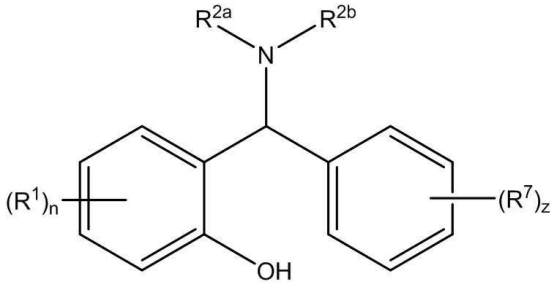
제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 R^6는 페닐 (phenyl), 헤테로아릴(heteroaryl), -O-페닐(-O-phenyl), -O-헤테로아릴, 벤질(benzyl), -CH(페닐)$_2$, -CH_2-헤테로아릴 및 -CH(헤테로아릴)$_2$이며, 상기 헤테로아

릴 그룹은 피리디닐(pyridinyl), 인돌일(indolyl), 이소인돌일(isoindolyl), 벤조옥사조일(benzoxazolyl) 및 벤지스옥사졸일(benzisoxazolyl)로부터 선택되며, 상기 임의의 R^6는 제1항에 기재된 바와 같이 치환될 수 있는 것을 특징으로 하는 화합물 또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 화학식 1의 화합물이 하기 화학식 1C의 화합물이 되도록 상기 R^3은 하나 이상의 치환기 R^7로 임의로 치환된 페닐인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체:

[화학식 1C]



상기 R^1, n, R^{2a}, R^{2b} 및 R^7은 일반적인 화학식 1로 정의된 바와 같고 z는 0 내지 5이다.

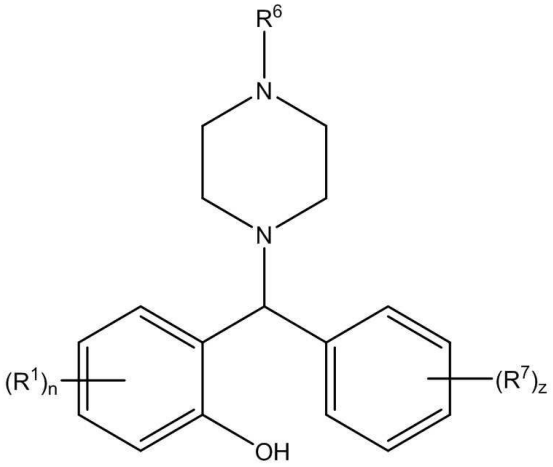
청구항 11

제10항에 있어서, 상기 z는 0, 1 또는 2이며, R^7은 존재하지 않거나(즉, z는 0이다) R^7은 할로, $-C_{1-4}$ 알킬, 벤질, $-O(C_{1-4}$ 알킬) 벤질옥시, $-C_{1-4}$ 할로알킬, $-O(C_{1-4}$ 할로알킬) 또는 $-C(O)NR^8R^9$이며, R^8 및 R^9는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 피페리디닐(piperidinyl) 고리를 형성하거나, 상기 R^8은 H이며 R^9는 C_{3-7} 사이클로알킬인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 하기 화학식 1D의 화합물인 것을 특징으로 하는 화합물;

[화학식 1D]



상기 R^1, n, R^6, R^7 및 z는 상기 기재된 바와 같다.

청구항 13

제1항에 있어서,

2-((2-클로로페닐)(4-(4-메톡시페닐)피페라진-1-일)메틸)페놀(2-((2-chlorophenyl)(4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol)(화합물 1);

2-((4-클로로페닐)(4-(4-메톡시페닐)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((4-chlorophenyl)(4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 2);

2-((4-(벤질옥시)-3-플루오로페닐)(4-(4-메톡시페닐)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((4-(benzyloxy)-3-fluorophenyl)(4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 3);

(4-((2-하이드록시페닐)(4-(4-메톡시페닐)피페라진일)메닐)페닐)(피페리딘-1-일)메탄온 ((4-((2-hydroxyphenyl)(4-(4-Methoxyphenyl)piperazinyl)methyl)phenyl)(piperidin-1- yl)methanone) (화합물 4);

3-((5-클로로-2-하이드록시페닐)(4-(4-메톡시페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((5-chloro-2-hydroxyphenyl)(4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 5);

2-((4-(벤질옥시)-3-플루오로페닐)(4-(4-메톡시페닐)피페라진-1-일)메틸)-4-클로로페놀 (2-((4-(benzyloxy)-3-fluorophenyl)(4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)methyl)-4-chlorophenol) (화합물 6);

2-((4-(벤질옥시)-3-플루오로페닐)(4-(6-플루오로벤조[d]이소옥사졸-3-일)피페리딘-1-일)메틸)페놀 (2-((4-(benzyloxy)-3-fluorophenyl)(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 7);

2-((4-(2, 3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(o-톨릴)메틸)페놀 (2-((4-(2, 3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(o-tolyl)methyl)phenol) (화합물 8);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(2-하이드록시페닐)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(2-hydroxyphenyl)methyl)benzamide) (화합물 9, NPB);

2-((4-(벤질옥시)-3-플루오로페닐)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((4-(benzyloxy)-3-fluorophenyl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 10);

2-((4-((4-클로로페닐)(페닐)메틸)피페라진-1-일)(페닐)메틸)페놀 (2-((4-((4-chlorophenyl)(phenyl)methyl)piperazin-1-yl)(phenyl)methyl)phenol) (화합물 11);

2-((4-((4-클로로페닐)(페닐)메틸)피페라진-1-일)(p-톨릴)메틸)페놀 (2-((4-((4-chlorophenyl)(phenyl)methyl)piperazin-1-yl)(p-tolyl)methyl)phenol) (화합물 12);

2-((4-클로로페닐)(4-((4-클로로페닐)(페닐)메틸)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((4-chlorophenyl)(4-((4-

chlorophenyl)(phenyl)methyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 13);

2-((4-((4-클로로페닐)(페닐)메틸)피페라진-1-일)(4-에틸페닐)메틸)페놀 (2-((4-((4-chlorophenyl)(phenyl)methyl)piperazin-1-yl)(4-ethylphenyl)methyl)phenol) (화합물 14);

(4-((4-((4-클로로페닐)(페닐)메틸)피페라진-1-일)(2-하이드록시페닐)메틸)페닐) (피페리딘-1-일)메탄온 ((4-((4-((4-chlorophenyl)(phenyl)methyl)piperazin-1-yl)(2-hydroxyphenyl)methyl)phenyl) (piperidin-1-yl)methanone) (화합물 15);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 16);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-2'-메틸-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-2'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 17);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-3'-메틸-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-3'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 18);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-4'-메틸-[1,1'-비페닐]-3-일)메틷)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-4'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 19);

3-((2'-클로로-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((2'-chloro-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 20);

3-((3'-클로로-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((3'-chloro-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 21);

3-((4'-클로로-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((4'-chloro-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 22);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4'-에틸-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4'-ethyl-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 23);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페틸)피페라진-1-일)(4-하이드록시-4'-(피페리딘-1-카르보닐)-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-4'-(piperidine-1-carbonyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 24);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-4'-메톡시-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-4'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 25);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(2'-에틸-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(2'-ethyl-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 26);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(2'-플루오로-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(2'-fluoro-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 27);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(3'-플루오로-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(3'-fluoro-4-hydroxy-[1,1'-

biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 28);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4'-플루오로-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4'-fluoro-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 29);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-3'-니트로-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-3'-nitro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 30);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-3'-술파모일-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-3'-sulfamoyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 31);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-2'-(트리플루오로메틸)-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-2'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 32);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-3'-(트리플루오로메틸)-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-3'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 33);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-4'-(트리플루오로메틸)-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-4'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 34);

3-((2'-시아노-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((2'-cyano-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 35);

3-((3'-시아노-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((3'-cyano-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 36)

3-((4'-시아노-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((4'-cyano-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 37);

3-((2'-클로로-4-하이드록시-4'-(트리플루오로메틸)-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((2'-chloro-4-hydroxy-4'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 38);

N-사이클로펜틸-3-((2',4'-디클로로-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐) 피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((2',4'-dichloro-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)benzamide) (화합물 39);

3-((4'-클로로-2',4-디하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드(3-((4'-chloro-2',4-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 40);

3-((4-(4-클로로페닐)피페라진-1-일)(2-하이드록시페닐)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)(2-hydroxyphenyl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 41, NCK1);

2-((4-클로로페닐)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((4-chlorophenyl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 42, NCK2);

2-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(3-메톡시페닐)메틸)페놀 (2-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(3-methoxyphenyl)methyl)phenol) (화합물 43, NCK3);

1-(5-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(2-하이드록시페닐)메틸)티오펜-2-일)에탄온 (1-(5-((4-(2,3-

dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(2-hydroxyphenyl)methyl)thiophen-2-yl)ethanone) (화합물 44, NCK4);

2-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(나프탈렌-1-일)메틸)페놀 (2-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(naphthalen-1-yl)methyl)phenol) (화합물 45, NCK5);

5-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(2-하이드록시페닐)메틸)퓨란-2-카르발데하이드 (5-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(2-hydroxyphenyl)methyl)furan-2-carbaldehyde) (화합물 46, NCK6);

2-((4-(5,6-디클로로사이클로헥사-1,5-디엔-1-일)피페라진-1-일)(2-플루오로-3-메틸피리딘-4-일)메틸)페놀 (2-((4-(5,6-dichlorocyclohexa-1,5-dien-1-yl)piperazin-1-yl)(2-fluoro-3-methylpyridin-4-yl)methyl)phenol) (화합물 47, NCK7);

2-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-(트리플루오로메틸)페닐)메틸)페놀 (2-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-(trifluoromethyl)phenyl)methyl)phenol) (화합물 48, NCK8);

2-((6-클로로-5-메틸피리딘-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((6-chloro-5-methylpyridin-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 49, NCK9);

2-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(피리딘-3-일)메틸)페놀 (2-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(pyridin-3-yl)methyl)phenol) (화합물 50, NCK10);

1-(5-((4-(4-클로로페닐)피페라진-1-일)(2-하이드록시페닐)메틸)티오펜-2-일)에탄온 (1-(5-((4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)(2-hydroxyphenyl)methyl)thiophen-2-yl)ethanone) (화합물 51, NCK14);

3-((4-(4-클로로페닐)피페라진-1-일)(4-(디에틸아미노)-2-하이드록시페닐)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-(diethylamino)-2-hydroxyphenyl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 52, NCK16);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-(디에틸아미노)-2-하이드록시페닐)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-(diethylamino)-2-hydroxyphenyl)methyl)benzamide) (화합물 53, NCK18);

N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(2-하이드록시-4,6-디메톡시페닐)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)methyl)benzamide) (화합물 54, NCK19);

2-((4-클로로페닐)(4-(4-클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((4-chlorophenyl)(4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 55, NCK20);

2-((4-(4-클로로페닐)피페라진-1-일)(6-메틸피리딘-3-일)메틸)페놀 (2-((4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)(6-methylpyridin-3-yl)methyl)phenol) (화합물 56, NCK21);

2-(o-톨릴(4-(p-톨릴)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-(o-tolyl(4-(p-tolyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 57, SG1)

2-((4-(p-톨릴)피페라진-1-일)(4-(트리플루오로메틸)페닐)메틸)페놀 2-((4-(p-tolyl)piperazin-1-yl)(4-(trifluoromethyl)phenyl)methyl)phenol (화합물 58, SG2);

N-사이클로펜틸-4-((2-하이드록시페닐)(4-(p-톨릴)피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-4-((2-hydroxyphenyl)(4-(p-tolyl)piperazin-1-yl)methyl)benzamide) (화합물 59, SG3);

2-((4-클로로페닐)(4-(p-톨릴)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((4-chlorophenyl)(4-(p-tolyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 60, SG4);

2-((3-메톡시페닐)(4-(p-톨릴)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((3-methoxyphenyl)(4-(p-tolyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 61, SG5);

5-((2-하이드록시페닐)(4-(p-톨릴)피페라진-1-일)메틸)퓨란-2-카르발데하이드 (5-((2-hydroxyphenyl)(4-(p-tolyl)piperazin-1-yl)methyl)furan-2-carbaldehyde) (화합물 62, SG6);

2-((6-메틸피리딘-3-일)(4-(p-톨릴)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((6-methylpyridin-3-yl)(4-(p-tolyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 63, SG7);

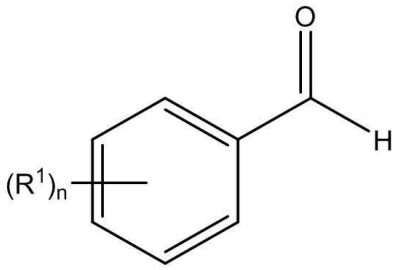
또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소 변이체.

청구항 14

i 또는 ii 단계를 포함하고, 팔라듐 촉매(palladium catalyst)의 존재 하에 스즈키 커플링 반응(Suzuki coupling reaction)을 통해 R^1이 R^{1a}인 화학식의 화합물을 수득하는 제1항 내지 제13항에 따른 화합물의 제조 방법:

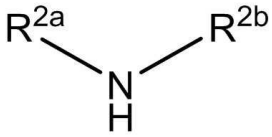
i. 하기 화학식 2의 알데하이드를 화학식 3의 화합물 및 화학식 4의 보론산(boronic acid)으로 반응시키는 단계;

[화학식 2]



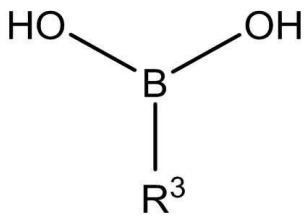
상기 R^1 및 n은 제1항에 정의된 바와 같다.

[화학식 3]



상기 R^{2a} 및 R^{2b}는 제1항에 정의된 바와 같다.

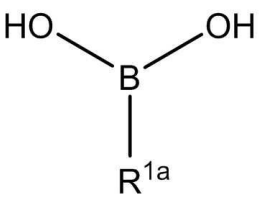
[화학식 4]



상기 R^3는 제1항에 정의된 바와 같다. 또는

ii. R^1이 할로인 화학식 1의 화합물과 하기 화학식 5의 화합물을 반응시키는 단계:

[화학식 5]



상기 R^{1a}는 제1항에 R^{1}에 대해 정의된 바와 같이 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴이다.

청구항 15

의약품으로 사용하기 위한 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 화합물.

청구항 16

암 치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체 화합물.

청구항 17

암 치료용 제제를 제조하기 위한 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체의 용도.

청구항 18

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체의 유효량을 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법.

청구항 19

제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암이 BAD 인산화(BAD phosphorylation)가 존재하는 암으로, 예를 들어 유방암(breast cancer), 자궁내막암(endometrial cancer), 난소암(ovarian cancer), 간암(liver cancer), 대장암(colon cancer), 전립선암(prostate cancer) 또는 췌장암(pancreatic cancer) 또는 BAD가 인산화되는 임의의 다른 상피 유래된 암(epithelial derived cancer)인 것을 특징으로 하는 화합물, 용도 또는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체, 또는 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 복강 내 투여(intraperitoneal administration), 간문맥 투여(hepatoportal administration), 정맥 내 투여(intravenous administration), 관절 내 투여(intra articular administration), 췌장 십이지장 동맥 투여(pancreatic duodenal artery administration) 또는 근육 내 투여(intramuscular administration), 또는 이의 임의의 조합의 투여를 위해 제형화된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규 화합물, 특히 암 세포에서 Bcl-2-관련된 사멸 프로모터(Bcl-2-associated death promoter, BAD)의 억제제인 화합물, 암의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 화합물 및 상기 화합물을 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 아포토시스(Apoptosis) 또는 프로그래밍된 세포 사멸은 자가-반응 면역 세포(auto-reactive immune cells), 노화 세포(aged cells) 및 회복할 수 없는 DNA 손상을 갖는 세포의 제거에 중추적으로 관연하는 조절 메커니즘이다[1]. 아포토시스는 척추동물에서 외인성(extrinsic) 및 내인성(intrinsic) 경로로 두 가지 메커니즘에 의해 실행된다[2]. 상기 내인성 경로는 심각한 게놈 손상 후, 산화 스트레스 또는 성장 인자 감소(growth factor depletion) 후 저산소 조건 하에서 활성화된다[3]. BCL-2 패밀리 단백질은 내인성 아포토시스 경로를 조절하는데 중추적인 역할을 한다[4]. 20개 이상의 BCL-2 패밀리 구성원을 확인하였고, 항-아포토시스(anti-apoptotic), 프로-아포토시스(pro-apoptotic), 및 BH3-전용 단백질로 광범위하게 분류되었다. BCL-2, BCL-xL 및 BCL-w는 항-아포토시스; BAK 및 BAX는 프로-아포토시스; 및 BAD, BIM, PUMA, NOXA는 우세한 프로-아포토시스 BH3 전용단백질이다[5-7]. 따라서, BCL-2 패밀리의 구성원은 이들 사이에 유지된 평형을 갖는 프로- 및 항-아포토시스 기능을 제공하고, 프로-아포토시스 BH3 전용 단백질은 보통 항상성을 보장하기 위해 억제된다[8].

[0003] 아포토시스의 억제는 부적절한 세포 생존 및 암 발생 및/또는 진행에 기여한다[9-11]. 대부분 악성 종양에서, 항-아포토시스 단백질의 발현이 증가하여 아포토시스에 대한 내성의 발달을 야기한다. Bcl-2 관련된 사멸 프로모터(Bcl-2 associated death promoter, BAD)는 Bcl-2, Bcl-xL 및 Bcl-w와 상호작용함으로서 아포토시스를 조절하는 데 중요한 역할을 한다. 인간 BAD는 p44/42 MAP 키나아제에 의한 Ser75(동등한 뮤린(murine) 잔기는 Ser112) 및 AKT/p70S6K에 의한 Ser99(동등한 뮤린 잔기는 Ser136)에서 인산화된다[13]. 세린 잔기들은 또한 아포토시스를 예방하기 위해 Pim 패밀리 키나아제(Pim family kinases)에 의해 인산화된다[14]. 이들 잔기 중 하나에서 BAD의 인산화는 BCL-xL 또는 BCL-2와 이종이량체화(heterodimerize)하는 hBAD의 능력의 손실을 초래한다[15]. 인산화된 BAD 단백질은 14-3-3 단백질로 이종이량체화되고 세포질에 격리된다[16]. 아포토시스가 시작되면, BAD는 탈인산화를 겪고, BCL-2, BCL-xL 또는 BCL-w로 이종이량체화 되어 BAK 및 BAX가 내인성 아포토시스 경로의 후속 촉진(subsequent promotion)으로 세포질에 대한 시토크롬 C(cytochrome C)의 방출을 촉진할 수 있게 한다[17]. BAD는 또한 세포 내에서 다른 단백질 및 기능적 상호작용을 갖는 것으로 보고되었다. 예를 들어, BAD 발현은 p53 및 p53과 BAD 복합체에 의해 조절되어 아포토시스를 촉진한다[18]. Bad는 p53에 의해 상향-조절되고 미토콘드리아에서 Bad/p53 복합체를 형성하여 아포토시스를 유도한다[18]. 임상적으로, 높은 BAD 발현은 전립선 암에서 높은 Gleason 점수와 관련되며[15] BAD 인산화는 난소 암의 전반적인 생존률이 불량한 것으로 예측되고[19] 시스플라틴(cisplatin)에 대한 내성과 관련된 것으로 보고되었다[19]. 또한, 인산화된 BAD는 유방암에서 CD44 양성 암 줄기 세포(cancer stem cell, CSC) 집단의 80% 이상에서 관찰되고 BAD 인산화는 CSC 생존에 필수적인 것으로 보고되었다[20].

발명의 내용

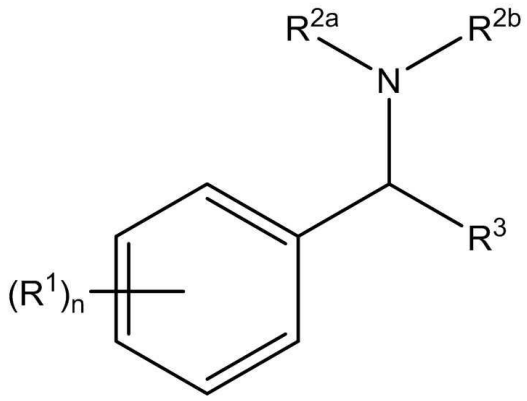
해결하려는 과제

[0004] 프로그래밍된 세포 사멸의 많은 소분자 조절제(small molecule modulators)가 개발되어, 다양한 인간 악성종양에 대한 치료용 표적화 BCL-2 패밀리 단백질을 사용한다[21-23]. BAD와 같은 BH3-전용 단백질의 소분자 조절제는 오늘날까지 보고된 바가 없다. 따라서, 상류 사건(upstream events)에 영향을 미치지 않으며, BAD 인산화를 얼제하는 것으로서 암을 관리하기 위하여 더 우수하고 효율적인 화합물/치료요법을 개발할 필요가 있다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명에서 하기 화학식 1의 화합물 또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체를 제공한다:

[0006] [화학식 1]



[0007]

[0008] 상기 각각의 R^1은 독립적으로 할로(halo), OH, 시아노(cyano), 니트로(nitro), $NR^{10}R^{11}$, $C(O)R^{10}$, $C(O)OR^{10}$, $C(O)NR^{10}R^{11}$, $-S(O)_qNR^{10}R^{11}$, C_{1-6} 알킬(alkyl), C_{1-6} 할로알킬(haloalkyl), $-O(C_{1-6}$ 알킬), $-O(C_{1-6}$ 할로알킬), 아릴(aryl), 헤테로아릴(heteroaryl), -O-아릴(-O-aryl) 또는 -O-헤테로아릴(-O-heteroaryl)이며,

[0009] 상기 각 R^{10} 및 R^{11}은 H 또는 OH, 할로, 시아노, NH_2, 아릴 또는 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬로부터 독립적으로 선택되고;

[0010] 알킬 및 할로알킬 그룹 R^1은 OH, 시아노, $-S(O)_pNR^4R^5$, $-C(O)NR^4R^5$, 아릴, 헤테로아릴, -O-아릴 또는 아릴 또는 $-O(C_{1-6}$ 할로알킬)로 임의로 치환된 -O-헤테로아릴-$O(C_{1-6}$알킬)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되고;

[0011] 아릴 또는 헤테로아릴 그룹 R^1은 할로, OH, 시아노, 니트로, $-NR^4R^5$, $-S(O)_pNR^4R^5$, $-C(O)NR^4R^5$, $-C(O)R^4$, $-C(O)OR^4$ 또는 $-C_{1-6}$ 알킬 또는 $-O(C_{1-6}$ 알킬)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되고, 이들 중 하나는 OH, 할로, 아릴, 헤테로아릴, $-O(C_{1-6}$ 알킬), $O(C_{1-6}$ 할로알킬), -O-아릴 또는 -O-헤테로아릴로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되고;

[0012] p는 1 또는 2 이고;

[0013] 각각의 R^4 및 R^5는 H 또는 C_{1-4} 알킬로부터 독립적으로 선택되거나, R^4 및 R^5는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 O, N 및 S로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 헤테로 원자를 임의로 함유하는 3- 또는 8-원 헤테로사이클릭 고리를 형성할 수 있고;

[0014] n은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이며;

[0015] R^{2a} 및 R^{2b}는 각각 독립적으로 할로, OH, 아릴 또는 헤테로아릴로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬이거나;

[0016] R^{2a} 및 R^{2b}는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 O, N 또는 S로부터 선택되고 하나 이상의 치환기 R^6로 임의로 치환된 하나 이상의 추가 헤테로 원자를 함유하는 5- 또는 6-원 헤테로사이클릭 고리를 형성할 수 있으며;

[0017] 각각의 R^6는 독립적으로 아릴, 헤테로아릴, -O-아릴, -O-헤테로아릴, 카르보사이클릴(carbocyclyl), 헤테로사이클릴(heterocyclyl), -O-카르보사이클릴, -O-헤테로사이클릴, R^{12}, OR^{12}, $C(O)R^{12}$, $C(O)OR^{11}$, $C(O)NR^{11}R^{12}$, CN, OH로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0018] 각 R^{11} 및 R^{12}는 독립적으로 H 또는 C_{1-4} 알킬이고, 이들 중 하나는 하나 이상의 아릴 또는 헤테로아릴 그룹으로

치환될 수 있고, 상기 아릴 및 헤테로아릴 그룹은 할로, OH, 시아노, 니트로, $-NR^4R^5$, $-S(O)_pNR^4R^5$, $-C(O)NR^4R^5$, $-C(O)R^4$, $-C(O)OR^4$ 또는 $-C_{1-6}$ 알킬 또는 $-O(C_{1-6}$ 알킬)로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 치환된 것이며, 이들 중 하나는 OH, 할로, 아릴, 헤테로아릴, $-O(C_{1-6}$ 알킬), $O(C_{1-6}$ 할로알킬), -O-아릴 또는 -O-헤테로아릴로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되고;

[0019] 상기 R^4 및 R^5는 상기 정의된 바와 같고; 또는 R^{11} 및 R^{12}는 이들이 부착된 질소 원자와 결합하여 N, O 및 S로부터 선택된 하나 이상의 추가 헤테로원자를 임의로 함유하는 3 내지 8-원 헤테로사이클릭 고리를 형성하며, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬 또는 할로로 임의로 치환되고;

[0020] R^3는 아릴, 헤테로아릴, 카르보사이클릴 또는 헤테로사이클릴이고, 이들 중 임의의 것은 할로, 아릴로 임의로 치환된 $-C_{1-4}$ 알킬, 아릴, $-C_{1-4}$ 할로알킬, $-O(C_{1-4}$ 할로알킬) 또는 $-C(O)NR^8R^9$-로 임의로 치환된 $-O(C_{1-4}$ 알킬)로부터 선택된 하나 이상의 치환기 R^7으로 임의로 치환되며;

[0021] 각각 R^8 및 R^9는 독립적으로 H, C_{1-4} 알킬 또는 C_{3-6} 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나, R^8 및 R^9는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 O, N 및 S로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 헤테로원자를 임의로 함유하는 5- 또는 6-원 헤테로사이클릭 고리를 형성할 수 있다.

[0022] 일반 화학식 1의 화합물은 이것의 상류 키나아제에 영향을 미치지 않으며 사이트-특이적 BAD 인산화(site-specific BAD phosphorylation)를 억제하므로 다중 암-유래된 세포에서 아포토시스를 촉진하는데 사용된다.

[0023] 본원에서, 표현 언어 또는 필요한 의미로 인해 문맥상 다르게 요구되는 경우를 제외하고, 용어 “포함하다(comprises)”, 또는 “포함하다(comprises)” 또는 “포함하는(comprising)”과 같은 변형은 포괄적인 의미로 사용되며, 즉, 언급된 특징의 존재를 특정하나 본 발명의 다양한 실시양태에서 추가 특징의 존재 또는 추가를 배제하지는 않는다.

[0024] 본원에서 상기 용어 “C_{1-6} 알킬(C_{1-6} alkyl)”은 1 내지 6개 탄소 원자를 갖는 완전한 포화 직선형 또는 분지형 탄화수소 사슬을 의미한다. 예를 들어, 메틸(methyl), 에틸(ethyl), n-프로필(n-propyl), 이소프로필(isopropyl), t-부틸(t-butyl), n-헥실(n-hexyl)을 포함한다.

[0025] 상기 용어 “C_{1-4} 알킬(C_{1-4} alkyl)”은 유사한 의미를 갖지만 1 내지 4 탄소 원자를 갖는 알킬기를 의미한다.

[0026] 상기 용어 “C_{1-6} 할로알킬(C_{1-6} haloalkyl)”은 하나 이상의 수소 원자가 할로 원자로 대체된 상기 정의된 바와 같은 C_{1-6} 알킬기를 의미한다.할로알킬 그룹은 1 내지 할로 당 치환된(perhalo substituted) 임의의 수의 할로 치환기를 가질 수 있다. 실시예는 클로로메틸(chloromethyl), 트리플루오로메틸(trifluoromethyl), 1-브로모에틸(1-bromoethyl), 1,1,2,2-테트라플루오로에틸(1,1,2,2-tetrafluoroethyl) 등을 포함한다.

[0027] 용어 “카르보사이클릴(carbocyclyl)”은 3 내지 7 탄소 원자를 갖고 하나 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 선택적으로 함유하는 비-방향족 탄화수소 고리를 의미한다. 실시예는 사이클로프로필(cyclopropyl), 사이클로부틸(cyclobutyl), 사이클로펜틸(cyclopentyl), 사이클로헥실(cyclohexyl) 및 사이클로헵틸(cycloheptyl) 및 사이클로헥세닐(cyclohexenyl)과 같은 사이클로케닐(cycloalkenyl) 그룹과 같은 C_{3-7} 사이클로 알킬 그룹을 포함한다.

[0028] 용어 “헤테로사이클릴(heterocyclyl)”은 5 내지 7 탄소 원자를 가지며 N, O 및 S로부터 선택된 하나 잇앙의 고리 헤테로원자를 갖는 비-방향족 고리를 의미한다. 실시예는 피페라지닐(piperazinyl), 피페리디닐(piperidinyl), 모르폴리닐(morpholinyl), 피롤리디닐(pyrrolidinyl) 및 이미다졸리닐(imidazolinyl)을 포함한다.

[0029] 본원에서, “할로(halo)”는 플루오로(fluoro), 클로로(chloro), 브로모(bromo) 또는 요오드(iodo)를 의미한다.

[0030] 본원의 문맥에서 용어 “아릴(aryl)”은 달리 명시되지 않는 한 5 내지 14개 고리 탄소 원자를 가지며 최대 3개의 고리를 함유하는 방향족 특성을 가는 고리 시스템을 의미한다. 아릴 그룹이 하나 이상의 고리를 함유하는 경

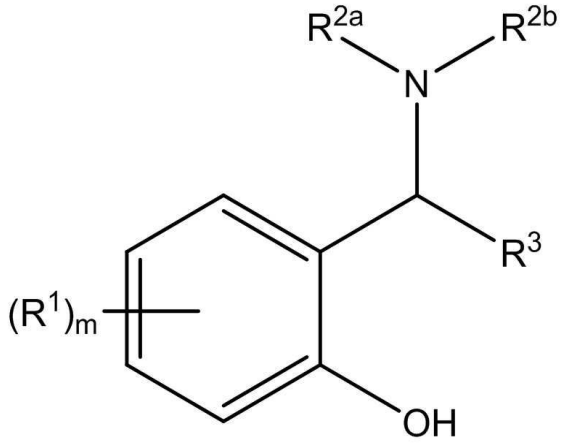
우, 모든 고리가 특성상 완전한 방향족이어야 하는 것은 아니다. 방향족 모이어티의 예는 벤젠(benzene), 나프탈렌(naphthalene), 인단(indane) 및 인덴(indene)이다.

[0031] 본원의 문맥에서 용어 "헤테로아릴(heteroaryl)"은 5 내지 14개의 고리 원자(특별히 언급되지 않는 한)를 가지며, 이들 중 하나 이상이 N, O 및 S로부터 선택된 헤테로 원자이고, 최대 3개의 고리를 함유하는 방향족 특성을 갖는 고리시스템을 의미한다. 헤테로알킬 그룹이 하나 이상의 고리를 함유하는 경우, 모든 고리가 특성상 완전한 방향족이어야 하는 것은 아니다. 헤레토아릴 그룹의 예는 피리딘(pyridine), 피리미딘(pyrimidine), 인돌(indole), 이소인돌(isoindole), 벤조푸란(benzofuran), 벤즈이미단졸(benzimidazole), 벤즈옥사졸(benzoxazole), 벤즈이소옥사졸(benzisoxazole) 및 인돌렌(indolene)을 포함한다.

[0032] 화학식 1의 화합물에서, n은 적절하게는 2 또는 3이며, 예를 들어 2이다. 적어도 하나 이상의 R^1 그룹은 OH일 수 있다. 이 경우에, 상기 OH 그룹은 $-CH(R^3)NR^{2a}R^{2b}$ 그룹에 인접한 위치에 적절하다.

[0033] 적합하게는, 화학식 1의 화합물은 화학식 1A의 화합물이다:

[0034] [화학식 1A]



[0035]

[0036] 상기 R^1, R^{2a}, R^{2b} 및 R^3는 상기 정의된 바와 같고 m은 0, 1, 2, 3 또는 4이다.

[0037] 적절하게는, 화학식 1 및 1A의 화합물에서:

[0038] 상기 각 R^1은 독립적으로 할로, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 할로알킬, 아릴 또는 헤테로 아릴이며, 아릴 또는 헤테로아릴 그룹은 할로, OH, 시아노, 니트로, $-S(O)_pR^4R^5$, $-C(O)NR^4R^5$, 아릴로 임의로 치환된 $-C_{1-6}$ 알킬, $-C_{1-6}$ 할로알킬, 아릴 또는 $-O(C_{1-6}$ 할로알킬)로 임의로 치환된 $-O(C_{1-6}$ 알킬)로 이루어진 군에서 하나 이상의 치환기로 임의로 치환되며;

[0039] p는 0, 1, 또는 2이고;

[0040] 각각의 R^4 및 R^5는 H 또는 C_{1-4} 알킬로부터 독립적으로 선택되거나, R^4 및 R^5는 이들이 부착된 질소 원자와 함께 O, N 및 S 로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 헤테로원자를 임의로 함유하는 5- 또는 6-원 헤테로사이클릭 고리를 형성할 수 있고;

[0041] R^{2a} 및 R^{2b}는 각각 독립적으로 할로, OH, 아릴 또는 헤테로아릴로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬이거나;

[0042] R^{2a} 및 R^{2b}는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 O, N 및 S로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 헤테로원자를 임의로 함유하는 5- 또는 6-원 헤테로사이클릭 고리를 형성할 수 있고 하나 이상의 치환기 R^6로 임의로 치환되며;

[0043] 각각의 R^6는 독립적으로 아릴, 헤테로 아릴, -O-아릴, -O-헤테로아릴 또는 하나 이상의 아릴 또는 헤테로아릴

그룹으로 치환된 C_{1-4} 알킬로 이루어진 군으로부터 선택되며, 상기 아릴 및 헤테로아릴 그룹은 할로, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 할로알킬, -O(C_{1-4} 알킬) 또는 -O(C_{1-4} 할로알킬)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 치환되고;

[0044] R^3는 아릴, 헤테로아릴, 카르복사이클릴 또는 헤테로사이클릴이고 이들 중 임의의 것은 할로, 아릴로 임의로 치환된 C_{1-4} 알킬, 아릴로 임의로 치환된 -O(C_{1-4} 알킬), -C_{1-4} 할로 알킬, -O(C_{1-4} 할로알킬) 또는 -C(O)NR^8R^9로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 치환기 R^7로 임의로 치환될 수 있으며;

[0045] 각각의 R^8 및 R^9는 H, C_{1-4} 알킬 또는 C_{3-6} 사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되거나, R^8 및 R^9는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 O, N 및 S로부터 선택된 하나 이상의 추가적인 헤테로원자를 임의로 함유하는 5- 또는 6-원 헤테로사이클릭 고리를 형성할 수 있고;

[0046] 또는 모든 입체 이성질체를 포함하는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 용매화물 또는 수화물 또는 이의 중수소화 또는 삼중수소화 변이체일 수 있다.

[0047] 화학식 1A의 일부 적절한 화합물에서, m은 0이고, R^1 그룹은 존재하지 않는다.

[0048] 다른 적절한 화합물에서, m은 1 또는 2이나, 보다 일반적으로 1이다.

[0049] 이러한 경우에, R^1은 적합하게 할로, 구체적으로는 클로로 또는 플루오로이거나; 대안적으로 R^1은 상기 기재된 바와 같이 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴그룹이다. 보다 일반적으로, R^1은 클로로, 플루오로, 또는 상기 기재된 바와 같이 임의로 치환된 아릴이다.

[0050] R^1이 아릴 또는 헤테로아릴 그룹인 경우, 페닐 고리의 4-위치에 적절하다(OH 그룹으로 치환된 탄소는 위치 1로 지정됨).

[0051] 아릴 또는 헤테로아릴 그룹 R^1에 대한 적절한 치환기는 할로, OH, 시아노, 니트로, -SO_2NH_2, -C(O)NR^4R^5, 아릴로 임의로 치환된 -C_{1-4} 알킬, -C_{1-4} 할로알킬, 아릴 또는 -O(C_{1-4} 할로알킬)로 임의로 치환된 -O(C_{1-4} 알킬)을 포함하며, R^4 및 R^5는 부착되어 있는 질소 원자와 함께 피페리딘(piperidine) 또는 피롤리딘(pyrrolidine) 고리를 형성한다.

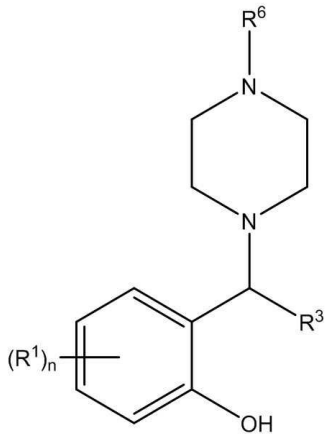
[0052] 아릴 또는 헤테로아릴 그룹 R^1에 대한 보다 적절한 치환기는 클로로, 플루오로, 메틸, 에틸, 트리프루오로메틸(trifluoromethyl), 벤질(benzyl), 메톡시(methoxy), 에톡시(ethoxy), 벤질옥시(benzyloxy), 트리플루오로메톡시(trifluoromethoxy) 및 피페리딘-1-카르보닐(piperidine-1-carbonyl)을 포함한다.

[0053] 본 발명의 일부 적절한 화합물에서, R^{2a} 및 R^{2b}는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 O, N 및 S로부터 선택된 하나 이상의 추가 헤테로 원자를 임의로 함유하고 하나 이상의 치환기 R^6로 임의로 치환된 5- 또는 6-원 헤테로사이클릭 고리를 형성하며, R^6는 상기 정의된 바와 같다.

[0054] 보다 적절하게, R^{2a} 및 R^{2b}는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 하나 이상의 치환기 R^6로 임의로 치환된 6-원 헤테로사이클릭 고리를 형성한다.

[0055] 보다 더 적절하게, R^{2a} 및 R^{2b}에 의해 형성된 6-원 고리는 피페리딘 또는 피페라진 고리이며, 가장 적절하게는 피페라진 고리이다. R^{2a} 및 R^{2b}가 피페라진 고리를 형성하는 경우, 상기 정의된 바와 같이 하나 이상의 R^6 치환기로 임의로 치환될 수 있으나, 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 피페라진(piperazine) 4-포지션에서 단일 R^6 치환기에 의해 적절하게 치환하여 화학식 1의 화합물이 하기 화학식 1B의 화합물이다:

[0056] [화학식 1B]



[0057]

[0058] R^1, n, R^3 및 R^6는 화학식 1 및 1A에 기재된 바와 같다.

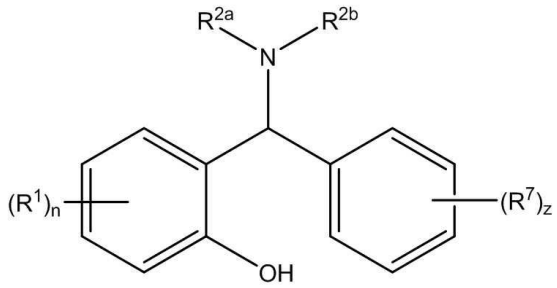
[0059] 특히, 적절한 치환기 R^6는 아릴, 헤테로 아릴, -O-아릴, -O-헤테로아릴 또는 한 개 또는 두 개 아릴 또는 헤테로아릴 그룹으로 치환된 메틸을 포함하며; 상기 아릴 및 헤테로아릴 그룹은 할로, 메틸, 에틸, 트리플루오로메틸, 메톡시, 에톡시 또는 트리플루오로메톡시로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 치환된다.

[0060] 보다 적절한 치환기 R^6는 페닐 (phenyl), 헤테로아릴(heteroaryl), -O-페닐(-O-phenyl), -O-헤테로아릴, 벤질(benzyl), -CH(페닐)$_2$, -CH_2-헤테로아릴 및 -CH(헤테로아릴)$_2$을 포함하며, 상기 헤테로아릴 그룹은 피리디닐(pyridinyl), 인돌일(indolyl), 이소인돌일(isoindolyl), 벤조옥사조일(benzoxazolyl) 및 벤지스옥사졸일(benzisoxazolyl)로부터 선택되며, 상기 임의의 R^6는 상기 기재된 바와 같이 치환될 수 있으나, 보다 적절하게는 할로, 메틸 에틸 및 트리플루오로메틸로부터 선택된 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있다.

[0061] 화학식 1 및 1A의 보다 적절한 화합물에서, R3는 상기 기재된 바와 같이 하나 이상의 R^7으로 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴이다.

[0062] 가장 적절하게, 화학식 1의 화합물이 하기 화학식 1C의 화합물이 되도록 R^3은 하나 이상의 치환기 R^7로 임의로 치환된 페닐이다:

[0063] [화학식 1C]



[0064]

[0065] 상기 R^1, n, R^{2a}, R^{2b} 및 R^7은 일반적인 화학식 1 또는 1A로 정의된 바와 같고 z는 0 내지 5이다.

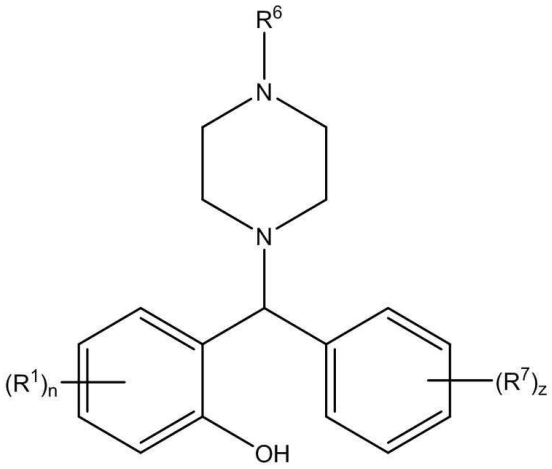
[0066] 가장 적절하게, z는 0, 1, 2 또는 3이며, 가장 적절하게는 0, 1 또는 2이다.

[0067] R^7은 존재하지 않거나(즉, z는 0이다) R^7은 할로, -C_{1-4} 알킬, 벤질, -O(C_{1-4} 알킬) 벤질옥시, -C_{1-4} 할로알킬, -O(C_{1-4} 할로알킬) 또는 -C(O)NR^8R^9이며, R^8 및 R^9는 이들이 부착되어 있는 질소 원자와 함께 피페리디닐(piperidinyl) 고리를 형성하거나, 상기 R^8은 H이며 R^9는 C_{3-7} 사이클로알킬이다.

[0068] 보다 적절하게, R^7이 존재하지 않거나 각각의 R^7은 독립적으로 할로, 특히 클로로 또는 플루오로, 메틸, 에틸, 벤질, 메톡시, 에톡시, 벤질옥시, -C(O)-피페리디닐 또는 -C(O)NH-C_{3-7} 시클로알킬이다.

[0069] 본 발명의 일부 특히 적절한 화합물은 하기 화학식 1D의 화합물이다:

[0070] [화학식 1D]

[0071] 

[0072] 상기 R^1, n, R^6, R^7 및 z는 화학식 1, 1A, 1B 및 1D에 대해 상기 기재된 바와 같다.

[0073] 화학식 1의 화합물의 실시예는 하기를 포함한다.

[0074] 2-((2-클로로페닐)(4-(4-메톡시페닐)피페라진-1-일)메틸)페놀(2-((2-chlorophenyl)(4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol)(화합물 1);

[0075] 2-((4-클로로페닐)(4-(4-메톡시페닐)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((4-chlorophenyl)(4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 2);

[0076] 2-((4-(벤질옥시)-3-플루오로페닐)(4-(4-메톡시페닐)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((4-(benzyloxy)-3-fluorophenyl)(4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 3);

[0077] (4-((2-하이드록시페닐)(4-(4-메톡시페닐)피페라진일)메닐)페닐)(피페리딘-1-일)메탄온 ((4-((2-hydroxyphenyl)(4-(4-Methoxyphenyl)piperazinyl)methyl)phenyl)(piperidin-1- yl)methanone) (화합물 4);

[0078] 3-((5-클로로-2-하이드록시페닐)(4-(4-메톡시페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((5-chloro-2-hydroxyphenyl)(4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 5);

[0079] 2-((4-(벤질옥시)-3-플루오로페닐)(4-(4-메톡시페닐)피페라진-1-일)메틸)-4-클로로페놀 (2-((4-(benzyloxy)-3-fluorophenyl)(4-(4-methoxyphenyl)piperazin-1-yl)methyl)-4-chlorophenol) (화합물 6);

[0080] 2-((4-(벤질옥시)-3-플루오로페닐)(4-(6-플루오로벤조[d]이소옥사졸-3-일)피페리딘-1-일)메틸)페놀 (2-((4-(benzyloxy)-3-fluorophenyl)(4-(6-fluorobenzo[d]isoxazol-3-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 7);

[0081] 2-((4-(2, 3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(o-톨릴)메틸)페놀 (2-((4-(2, 3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(o-tolyl)methyl)phenol) (화합물 8);

[0082] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(2-하이드록시페닐)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(2-hydroxyphenyl)methyl)benzamide) (화합물 9, NPB);

[0083] 2-((4-(벤질옥시)-3-플루오로페닐)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((4-(benzyloxy)-3-fluorophenyl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 10);

[0084] 2-((4-((4-클로로페닐)(페닐)메틸)피페라진-1-일)(페닐)메틸)페놀 (2-((4-((4-chlorophenyl)(phenyl)methyl)piperazin-1-yl)(phenyl)methyl)phenol) (화합물 11);

[0085] 2-((4-((4-클로로페닐)(페닐)메틸)피페라진-1-일)(p-톨릴)메틸)페놀 (2-((4-((4-

chlorophenyl)(phenyl)methyl)piperazin-1-yl)(p-tolyl)methyl)phenol) (화합물 12);

[0086] 2-((4-클로로페닐)(4-((4-클로로페닐)(페닐)메틸)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((4-chlorophenyl)(4-((4-chlorophenyl)(phenyl)methyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 13);

[0087] 2-((4-((4-클로로페닐)(페닐)메틸)피페라진-1-일)(4-에틸페닐)메틸)페놀 (2-((4-((4-chlorophenyl)(phenyl)methyl)piperazin-1-yl)(4-ethylphenyl)methyl)phenol) (화합물 14);

[0088] (4-((4-((4-클로로페닐)(페닐)메틸)피페라진-1-일)(2-하이드록시페닐)메틸)페닐) (피페리딘-1-일)메탄온 ((4-((4-((4-chlorophenyl)(phenyl)methyl)piperazin-1-yl)(2-hydroxyphenyl)methyl)phenyl) (piperidin-1-yl)methanone) (화합물 15);

[0089] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 16);

[0090] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-2'-메틸-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-2'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 17);

[0091] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-3'-메틸-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-3'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 18);

[0092] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-4'-메틸-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-4'-methyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 19);

[0093] 3-((2'-클로로-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((2'-chloro-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 20);

[0094] 3-((3'-클로로-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((3'-chloro-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 21);

[0095] 3-((4'-클로로-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((4'-chloro-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 22);

[0096] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4'-에틸-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4'-ethyl-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 23);

[0097] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페틸)피페라진-1-일)(4-하이드록시-4'-(피페리딘-1-카르보닐)-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-4'-(piperidine-1-carbonyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 24);

[0098] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-4'-메톡시-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-4'-methoxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 25);

[0099] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(2'-에틸-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(2'-ethyl-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 26);

[0100] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(2'-플루오로-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(2'-fluoro-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 27);

[0101] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(3'-플루오로-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(3'-fluoro-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 28);

[0102] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4'-플루오로-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4'-fluoro-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 29);

[0103] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-3'-니트로-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-3'-nitro-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 30);

[0104] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-3'-술파모일-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-3'-sulfamoyl-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 31);

[0105] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-2'-(트리플루오로메틸)-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-2'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 32);

[0106] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-3'-(트리플루오로메틸)-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-3'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 33);

[0107] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-하이드록시-4'-(트리플루오로메틸)-[1,1'-비페닐]-3-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-hydroxy-4'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)methyl)benzamide) (화합물 34);

[0108] 3-((2'-시아노-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((2'-cyano-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 35);

[0109] 3-((3'-시아노-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((3'-cyano-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 36)

[0110] 3-((4'-시아노-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((4'-cyano-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 37);

[0111] 3-((2'-클로로-4-하이드록시-4'-(트리플루오로메틸)-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((2'-chloro-4-hydroxy-4'-(trifluoromethyl)-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 38);

[0112] N-사이클로펜틸-3-((2',4'-디클로로-4-하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐) 피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((2',4'-dichloro-4-hydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)benzamide) (화합물 39);

[0113] 3-((4'-클로로-2',4-디하이드록시-[1,1'-비페닐]-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드(3-((4'-chloro-2',4-dihydroxy-[1,1'-biphenyl]-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 40);

[0114] 3-((4-(4-클로로페닐)피페라진-1-일)(2-하이드록시페닐)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)(2-hydroxyphenyl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 41, NCK1);

[0115] 2-((4-클로로페닐)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((4-chlorophenyl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 42, NCK2);

[0116] 2-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(3-메톡시페닐)메틸)페놀 (2-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-

yl)(3-methoxyphenyl)methyl)phenol) (화합물 43, NCK3);

[0117] 1-(5-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(2-하이드록시페닐)메틸)티오펜-2-일)에탄온 (1-(5-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(2-hydroxyphenyl)methyl)thiophen-2-yl)ethanone) (화합물 44, NCK4);

[0118] 2-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(나프탈렌-1-일)메틸)페놀 (2-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(naphthalen-1-yl)methyl)phenol) (화합물 45, NCK5);

[0119] 5-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(2-하이드록시페닐)메틸)퓨란-2-카르발데하이드 (5-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(2-hydroxyphenyl)methyl)furan-2-carbaldehyde) (화합물 46, NCK6);

[0120] 2-((4-(5,6-디클로로사이클로헥사-1,5-디엔-1-일)피페라진-1-일)(2-플루오로-3-메틸피리딘-4-일)메틸)페놀 (2-((4-(5,6-dichlorocyclohexa-1,5-dien-1-yl)piperazin-1-yl)(2-fluoro-3-methylpyridin-4-yl)methyl)phenol) (화합물 47, NCK7);

[0121] 2-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-(트리플루오로메틸)페닐)메틸)페놀 (2-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-(trifluoromethyl)phenyl)methyl)phenol) (화합물 48, NCK8);

[0122] 2-((6-클로로-5-메틸피리딘-3-일)(4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((6-chloro-5-methylpyridin-3-yl)(4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 49, NCK9);

[0123] 2-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(피리딘-3-일)메틸)페놀 (2-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(pyridin-3-yl)methyl)phenol) (화합물 50, NCK10);

[0124] 1-(5-((4-(4-클로로페닐)피페라진-1-일)(2-하이드록시페닐)메틸)티오펜-2-일)에탄온 (1-(5-((4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)(2-hydroxyphenyl)methyl)thiophen-2-yl)ethanone) (화합물 51, NCK14);

[0125] 3-((4-(4-클로로페닐)피페라진-1-일)(4-(디에틸아미노)-2-하이드록시페닐)메틸)-N-사이클로펜틸벤즈아미드 (3-((4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-(diethylamino)-2-hydroxyphenyl)methyl)-N-cyclopentylbenzamide) (화합물 52, NCK16);

[0126] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(4-(디에틸아미노)-2-하이드록시페닐)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(4-(diethylamino)-2-hydroxyphenyl)methyl)benzamide) (화합물 53, NCK18);

[0127] N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(2-하이드록시-4,6-디메톡시페닐)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(2-hydroxy-4,6-dimethoxyphenyl)methyl)benzamide) (화합물 54, NCK19);

[0128] 2-((4-클로로페닐)(4-(4-클로로페닐)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((4-chlorophenyl)(4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 55, NCK20);

[0129] 2-((4-(4-클로로페닐)피페라진-1-일)(6-메틸피리딘-3-일)메틸)페놀 (2-((4-(4-chlorophenyl)piperazin-1-yl)(6-methylpyridin-3-yl)methyl)phenol) (화합물 56, NCK21);

[0130] 2-(o-톨릴(4-(p-톨릴)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-(o-tolyl(4-(p-tolyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 57, SG1)

[0131] 2-((4-(p-톨릴)피페라진-1-일)(4-(트리플루오로메틸)페닐)메틸)페놀 2-((4-(p-tolyl)piperazin-1-yl)(4-(trifluoromethyl)phenyl)methyl)phenol (화합물 58, SG2);

[0132] N-사이클로펜틸-4-((2-하이드록시페닐)(4-(p-톨릴)피페라진-1-일)메틸)벤즈아미드 (N-cyclopentyl-4-((2-hydroxyphenyl)(4-(p-tolyl)piperazin-1-yl)methyl)benzamide) (화합물 59, SG3);

[0133] 2-((4-클로로페닐)(4-(p-톨릴)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((4-chlorophenyl)(4-(p-tolyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 60, SG4);

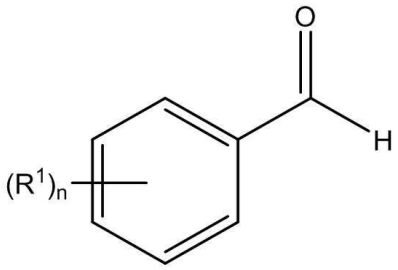
[0134] 2-((3-메톡시페닐)(4-(p-톨릴)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((3-methoxyphenyl)(4-(p-tolyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 61, SG5);

[0135] 5-((2-하이드록시페닐)(4-(p-톨릴)피페라진-1-일)메틸)퓨란-2-카르발데하이드 (5-((2-hydroxyphenyl)(4-(p-tolyl)piperazin-1-yl)methyl)furan-2-carbaldehyde) (화합물 62, SG6);

[0136] 2-((6-메틸피리딘-3-일)(4-(p-톨릴)피페라진-1-일)메틸)페놀 (2-((6-methylpyridin-3-yl)(4-(p-tolyl)piperazin-1-yl)methyl)phenol) (화합물 63, SG7).

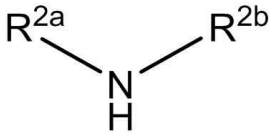
[0137] 화학식 1의 화합물은 화학식 2의 알데하이드를 화학식 3의 화합물 및 화학식 4의 보론산(boronic acid)으로 반응시키는 단계로 제조할 수 있다:

[0138] [화학식 2]

[0139] 

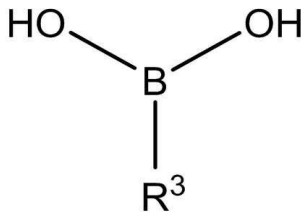
[0140] 상기 R^1 및 n은 화학식 1에 정의된 바와 같다.

[0141] [화학식 3]

[0142] 

[0143] 상기 R^{2a} 및 R^{2b}는 화학식 1에 정의된 바와 같다.

[0144] [화학식 4]

[0145] 

[0146] 상기 R^3는 화학식 1에 정의된 바와 같다.

[0147] 상기 반응은 페타시스 반응(Petasis reaction)이며, 잠재적인 친핵성(nucleophilic) 종으로서 화학식 4의 보론산을 사용하는 3-성분 보로닉 만니치-유형 반응(3-component boronic mannich- type reaction)이며, 화학식 2의 살리실알데하이드 유도체(salicylaldehyde derivative) 및 화학식 3의 아민을 반응시켜 새로운 탄소-탄소 결합을 형성한다. 상기 페타시스 반응은 보론산과 반응하여 3차 아민(tertiary amine)을 생성하는 이미늄(iminium) 종의 형성을 통해 진행된다.

[0148] 적절한 반응 용매는 유기 용매, 예를 들어 디옥산(dioxane)과 같은 시클릭 에테르(cyclic ether)를 포함한다.

[0149] 적절하게는, 상기 프로세스는

[0150] i. 화학식 2의 화합물을 화학식 3의 화합물과 반응시켜 중간체 이미늄 종을 포함하는 혼합물을 형성하는 단계;

[0151] ii. i 단계의 생성물과 화학식 4의 화합물을 반응시키는 단계를 포함한다.

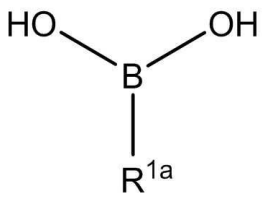
[0152] 적절하게는 ii 단계는 상승된 온도, 예를 들어 50 내지 100℃, 예를 들어, 용매의 환류 온도에서 수행된다. 상기 용매가 디옥산인 경우, 이는 약 85 내지 95℃이며, 전형적으로 약 90℃이다.

[0153] 상기 생성물을 에틸 아세테이트(ethyl acetate)와 같은 제2 용매로 추출할 수 있고, 실시예에서 하기 기재된 바와 같이 표준 방법을 사용하여 건조 및 정제할 수 있다.

[0154] 화학식 2, 3 및 4의 화합물은 공지되어 있고 산업적으로 이용가능하거나 공지된 방법으로 제조될 수 있다.

[0155] 화학식 1의 화합물은 또한 화학식 1의 다른 화합물로부터 제조될 수 있다. 예를 들어, R^1은 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴인 화학식 1의 화합물은 화학식 5의 화합물로 반응에 의해 R^1이 할로인 화학식 1의 화합물로부터 제조될 수 있다:

[0156] [화학식 5]

[0157] 

[0158] 상기 R^{1a}는 화학식 1에 R^1에 대해 정의된 바와 같이 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴이다.

[0159] 상기 반응은 팔라듐 촉매(palladium catalyst) 상에서 스즈키 커플링 반응(Suzuki coupling reaction)을 사용하여 수행되었다.

[0160] 화학식 5의 화합물은 공지되어 있고 산업적으로 이용가능하거나 공지된 방법으로 제조될 수 있다.

[0161] 화학식 1의 화합물을 제조하는 방법은 본 발명의 추가 양태를 나타낸다.

[0162] 화학식 1의 화합물은 Bcl-2 관련된 사멸 프로모터(Bcl-2 associated death promoter, BAD) 단백질을 저해/하향조절/억제할 수 있고, 특히 암 세포에서 Bcl-2 관련된 사멸 프로모터(BAD) 단백질의 인산화를 저해/하향조절/억제할 수 있다. 상기 BAD의 저해/하향조절/억제는 Akt/단백질 키나아제 B(protein kinase B, PKB)라 불리는 상류 Ser/Thr 키나아제에 영향을 미치지 않고 발생한다. 따라서, 화학식 1의 화합물은 우선적으로 BAD의 인산화를 저해/하향조절/억제한다.

[0163] BAD의 저해/하향조절은 Bcl-2/BAD의 단백질-단백질 인터페이스(interface)내에서 소수성 그루브(groove)를 차지하는 화학식 1의 화합물에 의해 수행된다. 추가적으로, 화학식 1의 화합물은 디클로로페닐 모이어티(dichlorophenyl moiety)를 갖는 인간 단백질의 Leu-97, Trp-144, 및 Phe-198의 측면-사슬에 의해 형성된 인터페이스 내에 추가적인 소수성 측면 포켓(hydrophobic side pocket)을 차지한다.

[0164] 화학식 1의 화합물은 암 세포, 특히 유방암, 자궁내막암, 난소암, 간암, 대장암, 전립선암 및 췌장 암 세포에서 BAD의 강력한 저해제/하향조절제이며, BAD 인산화의 하향 조절/저해로 인한 아포토시스를 유도한다. 상기 화합물은 암세포의 세포 독성을 향상시키고, 상류 키나아제에 영향을 미치지 않으며 BAD 인산화의 표적 특이적 하향조절/저해를 수행한다.

[0165] 화학식 1의 화합물은 MCF7 세포에 대한 항암 활성에 대해 스크리닝 하였고, MPB(화합물 9)가 가장 강력한 화합물인 것을 발견하였다. 이어서 NPB는 정상 불멸화된 유방 상피 세포(mammary epithelial cells)(MCF10A 및 MCF12A), 정상 간세포(hepatocytes)(LO2), 유방암(mammary carcinoma)(BT549, MDA-MB-231, MCF7, T47D, BT474), 자궁내막암(이시카와(Ishikawa), Ecc1, RL95-2, AN3), 난소암(SK-OV-3, OVCAR-2, Caov-3, HEY C2, Ovca433), 간암(Hep3B, H2P, H2M), 대장암(HCT116, DLD-1, Caco-2), 전립선암(PC3, LNCaP, DU145) 및 췌장암(AsPC-1, BxPC-3) 세포의 패널에 대해 평가하였다. NPB는 모든 검사된 암세포주에서 아포토시스를 유의하게 향상시켰고, NPB는 정상 간세포 및 불멸화된 유방 상피 세포에 대해 실질적인 활성이 나타나지 않았다. Laplacian-modified Naive Bayes classifier를 사용하여, NPB를 BAD 단백질로 NPB의 인간 표적을 예측하는 인실리코(in silico) 분석으로 처리하였다.

[0166] NPB는 암 세포의 범위에서 아포토시스 세포 사멸을 유도하는 것으로 밝혀졌으나 정상(불멸화된) 상피 세포에 세포 독성 효과가 없었다.

[0167] 아포토시스를 겪는 세포의 전형적인 특징은 포스파티딜세린 외부화(externalization), 카스파아제 활성 및 게놈 DNA 단편화다. 하나의 실시양태에서, NPB는 FITC-아넥신-V 및 요오드화 프로피듐 염색을 사용하여 MCF7 세포에 대한 아포토시스를 나타낸다. FITC-아넥신-V 염색은 막 완전성의 손실을 확인하고 PI 염색은 후기 아포토시스 사건을 확인하며, 이러한 결과는 카스파아제 3/7 활성과 관련이 있다.

[0168] 따라서, 본 발명의 추가 양태에서, 의약품으로 사용하기 위한 화학식 1의 화합물이 제공된다.

[0169] 화학식 1의 화합물은 암, 적절하게는 BAD 인산화가 있는 암 치료에 특히 사용된다.

[0170] 추가 양상에서, 따라서, 암 치료에 사용하기 위한 화학식 1의 화합물을 제공한다.

[0171] 추가로, 암 치료용 제제를 제조하기 위한 화학식 1의 화합물의 용도를 제공한다.

[0172] 또한 암의 치료 방법이 제공되고, 상기 방법은 치료를 필요로 하는 환자에게 화학식 1의 유효량을 투여하는 단계를 포함한다.

[0173] 상기 화합물은 특히 BAD 인산화가 존재하는 암 치료에 유용하며, 예를 들어 상기 암은 유방암, 자궁내막암, 난소암, 간암, 대장암, 전립선암, 또는 췌장암 또는 다른 BAD가 인산화된 상피-유래된 암일 수 있다.

[0174] 화학식 1의 화합물은 약제학적 조성물로 적절하게 투여되며, 본 발명의 추가 양태에서, 화학식 1의 화합물 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[0175] 상기 약제학적으로 허용가능한 부형제는 보조제, 희석제, 담체, 과립화제, 결합제, 윤활제, 붕해제, 감미제, 활택제, 항-접착제, 대전 방지제(anti-static agent), 계면활성제, 항-산화제, 검, 코팅제, 착색제, 향미제, 코팅제, 가소제, 보존제, 현탁제, 유화제, 식물성 셀룰로오스 물질, 구형화제, 다른 통상적으로 공지된 약제학적으로 허용가능한 부형제 또는 이들 부형제의 임의의 조합물일 수 있다.

[0176] 다른 실시양태에서, 본 발명의 약학적 조성물은 복강 내 투여(intraperitoneal administration), 간문맥 투여(hepatoportal administration), 정맥 내 투여(intravenous administration), 관절 내 투여(intra articular administration), 췌장 십이지장 동맥 투여(pancreatic duodenal artery administration) 또는 근육 내 투여(intramuscular administration), 또는 이의 임의의 조합의 투여를 위해 제형화된다.

[0177] 본 발명은 실시예 및 도면을 참조하여 보다 상세하게 설명될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0178] 도 1(a) 및 도 1(b)는 화합물 1의 ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 2는 화합물 2의 ^{13}C-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 3a 및 도 3b는 화합물 3의 ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 4a 및 도 4b는 화합물 4의 ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 5a 및 도 5b는 화합물 5의 ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 6은 화합물 6의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 7a 및 7b는 화합물 7의 ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 8은 화합물 8의 ^{13}C-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 9a 및 9b는 화합물 9의 ^{1}H-NMR 및 LCMS 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 10은 화합물 10의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 11: 종양 세포주의 범위에서 NPB의 IC50값이다.

도 12: NPB는 암 세포주에서 세포 생존력을 억제하고 아포토시스를 촉진한다.

유방, 자궁내막, 난소, 간, 대장, 전립선 및 췌장 암 세포주를 포함하는 암 세포주 생존력에 대한 NPB(5μM)의 효과. (A) 세포 생존력 (B) 카스파제 3/7 활성(caspase 3/7 activities) 및 (C) 세포독성은 방법론에 기재된 바와 같이 ApoTox-Glo™ 삼중 분석 키트(Triplex Assay Kit)를 사용하여 평가하였다. 통계적 유의성(Statistical significance)은 GraphPad Prism 5를 사용하여 unpaired two-tailed Student's t-test로 평가하였다. 상기 열(column)은 삼중 결정(triplicate determinations)의 평균을 나타낸다; 막대(bar), ±SD. **P <

0.001, *P < 0.05. 참고: RFU, 상대적 형광 단위(relative fluorescence unit); RLU, 상대적 발광 단위(relative luminescence unit), #; 비-변형된, 불멸화된 상피 세포(immortalized epithelial cells); MB-231, MDA-MB-231.

도 13: NPB는 MCF7 세포에서 아포토시스 세포 사멸을 자극한다.

(A) MCF7 세포의 아포토시스 세포 사멸은 10μM NPB를 처리한 후 유세포 분석법을 사용하여 측정된다. 아넥신 V-FITC 염색은 X-축에 표시되고 PI 염색은 Y-축에 표시된다. 왼쪽 하단 사분면은 살아 있는 세포를 나타내고, 오른쪽 하단 사분면은 초기 아포토시스 세포를 나타내고, 왼쪽 상단 사분면은 괴사 세포(necrotic cell)를 나타내며, 오른쪽 상단 사분면은 후기 아포토시스 세포를 나타낸다. 아넥신 V 및 PI 데이터의 획득은 각 사분면에서 백분율(%)로 표시되었다. (B) MCF7 세포의 세포 주기 분석은 10μM NPB를 처리한 후 유세포 분석법을 사용하여 측정된다. (C) NPB 또는 DMSO에 노출된 후 AlamarBlue® 생존력 분석을 사용하여 3D Matrigel에서 14일 동안 배양된 MCF7 세포에 의해 생성된 콜로니의 세포 생존력. (D) NPB 또는 DMSO에 노출된 후 AlamarBlue® 생존력 분석(viability assay)을 사용하여 소프트 아가(Soft agar)에서 배양된 MCF7 세포에 의해 생성된 콜로니의 세포 생존력. (E) NPB 또는 DMSO에 노출된 후, MCF7 세포에 의해 생성된 초점 콜로니(foci colonies)의 크리스탈 바이올렛 염색. 모든 분석은 방법론에 기재된 바와 같이 수행되었다. 통계적 유의성(Statistical significance)은 GraphPad Prism 5를 사용하여 unpaired two-tailed Student's t-test로 평가하였다. 상기 열(column)은 삼중 결정(triplicate determinations)의 평균을 나타낸다; 막대(bar), ±SD. **P < 0.001, *P < 0.05.

도 14: 화학정보 및 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 분석은 BAD 단백질과 NPB 화합물의 상호작용을 예측한다.

(A) BAD 단백질 서브유닛과 NPB의 SPR 분석에 의해 수득된 센서그램(Sensorgrams). 상기 BAD 단백질 서브유닛은 CM5 센서 칩(sensor chip)의 표면에 고정시켰다. 다양한 농도(20-100μM)에서 NPB 용액을 주입하여 시간(초)의 함수로서 기록된 결과 결합 반응(result binding responses (RU))을 생성하였다. 상기 결과는 BIA 평가 3.1(BIA evaluation 3.1)을 사용하여 분석하였다. (B) 웨스턴 블랏(western blot, WB) 분석을 사용하여 NPB로 처리한 후 MCF7 세포에서 BAD의 Ser99 인산화 수준을 평가하였다. (하단) 미국, NIH 로부터 ImageJ 소프트웨어(http://imagej.nih.gov/ij/)를 사용하여 나타낸 바와 같이 BAD 인산화(Ser99), BAD 및 β-ACTIN에 대한 용량-반응(dose-reponse)으로부터 NPB의 계산된 IC_{50}. (C) WB 분석을 사용하여 NPB로 처리한 후 MCF7 세포에서 BAD의 상류와 관련된 다중 단백질의 수준을 평가하였다. (D) WB 분석을 사용하여 NPB로 처리한 후 MCF7 세포에서 세포 생존 및 세포 증식과 관련된 다중 단백질의 수준을 평가하였다. WB 분석을 위해, 가용성 전체 세포 추출물을 SDS-PAGE에서 작동시키고 방법론에 기재된 바와 같이 면역 블롯팅하였다. β-ACTIN(ACTB)은 세포 용해물에 대한 입력 대조군으로 사용하였다. kDa에서 검출된 단백질 밴드의 크기는 왼쪽에 나타나 있다.

도 15: AKT 신호에 독립적인 암 세포 주에서 NPB는 특이적으로 BAD의 인산화(Ser99에서)를 억제한다.

(A) WB 분석은 NPB(5μM)로 처리 후 유방암, 난소암, 췌장암, 자궁내막암, 간세포암, 대장암 및 전립선암을 포함하는 암 세포주의 범위에서 인산화된 인간 BAD(Ser75 및 Sdr99에서) 및 BAD 단백질의 수준을 평가하였다. 총 BAD는 세포 용해물의 입력 대조군으로 사용하였다. (B) WB 분석을 사용하여, pBAD(Ser99) 및 pAKT(Ser473), MCF7, Caov-3, 이시카와(Ishikawa), 및 AsPC-1 세포에서 AKT 및 BAD의 수준을 평가하였다. 세포를 처리하기 위해 AKT 억제제(IV) 및 NPB 각각의 5μM을 사용하였다. AKT 발현의 소모는 방법론에 기재된 바와 같이 AKT 전사체에 대한 짧은 헤어핀(short hairpin, sh)-RMA (1&2)의 일시적인-형질전환(transient-transfection)을 사용하여 달성되었다. β-ACTIN을 세포 용해물에 대한 입력 대조군으로 사용하였다. WB 분석을 위해, 가용성 전체 세포 추출물을 SDS-PAGE에서 작동시키고 물질 방법론에 기재된 바와 같이 면역 블로팅하였다. kDa에서 검출된 단백질 밴드의 크기는 왼쪽에 나타나 있다. 참고: #; 비-변형된 불멸화된-세포 주.

도 16: BAD 발현의 siRNA-매개된 감소는 암 세포주에서 NPB의 효과를 방지한다.

(A) WB 분석을 사용하여 5μM NPB를 처리한 후, MCF7, BT474, Caov-3, 이시카와, AsPC-1, 및 DLD-1 세포에서 pBAD(Ser99) 활성 및 BAD 단백질의 수준을 평가하였다. BAD 발현의 감소는 BAD 전사체에 직접적인 작은 간섭(small interfering, si)-RNA의 일시적인-전사체를 사용하여 달성되었다. 가용성 전체 세포 추출물을 SDS-PAGE에서 작동시키고 물질 및 방법에 기재된 바와 같이 면역 블로팅하였다. β-ACTIN은 입력 대조군으로 사용되었다. MCF7, BT474, Caov-3, Ishikawa, AsPC-1, 및 DLD-1 세포에서 NPB(5μM)의 효과. (B) 세포 생존력 및 (C) 카스파제(caspase) 3/7 활성은 ApoTox-Glo™ 삼중 분석 키트(Triplex Assay Kit)를 사용하여 평가하였다. 모든 분석은 방법론에 기재된 바와 같이 수행되었다. 통계적 유의성은 GraphPad Prism 5를 사용하여

unpaired two-tailed Student's t-test(P < 0.05는 유의한 것으로 고려됨)로 평가하였다. 상기 열(column)은 삼중 결정(triplicate determinations)의 평균을 나타낸다; 막대(bar), ±SD. **P < 0.001, *P < 0.05. 참고: RFU, 상대적 형광 단위; RLU, 상대적 발광 단위.

도 17: NPB는 유방암에서 BAD Ser99의 인산화를 억제하고 종양 성장을 억제한다.

(A) 물질 및 방법에 기재된 바와 같이 BALB/c-nu 암컷 마우스에서의 종양 부피 측정. 동물(n=5 각 그룹)은 베히클(vehicle), 5mg/kg NPB 또는 20mg/kg NPB로 처리하였고, 상대적 종양 버든(relative tumour burden)을 기록하였다. 동물 무게를 실험 기간 동안 매일 측정하였다. (B) NPB 치료 요법(treatment regime) 후 종양을 절제하고 무게를 측정하였다. 대표적인 절제된 종양이 오른쪽에 나타나 있다. (C) p-BAD(Ser99) 및 BAC의 수준을 결정하기 위한 종양 조직의 WB. 가용성 전체 세포 추출물을 SDS-PAGE에서 작동시키고 방법론에 기재된 바와 같이 면역 블로팅하였다. β-ACTIN은 입력 대조군으로서 사용되었다. kDa에서 검출된 단백질 밴드의 크기는 왼쪽에 나타나 있다. (D) 인산-BAD(phospho-BAD), BAD, Ki67 및 TUNEL 염색의 조직학적 분석. 종양 조직 섹션을 염소 항-pBAD(Ser 136) 폴리클로날 항체(Santa Cruz Biotechnology), 마우스 항-BAD 모노클로날(Santa Cruz Biotechnology) 및 항-Ki67 항체(Abcam, ab15580)으로 면역표지하였고 헤마톡실린(hematoxylin)으로 염색하였다. 방법론에 기재된 바와 같이, TUNEL Apoptosis Detection Kit (Gen Script USA Inc.)를 사용하여 아포토시스 DNA를 검출하였다. 통계적 유의성은 GraphPad Prism 5를 사용하여 unpaired two-tailed Student's t-test(P < 0.05는 유의한 것으로 고려됨)로 평가하였다. 상기 열(column)은 삼중 결정(triplicate determinations)의 평균을 나타낸다; 막대(bar), ±SD. **P < 0.001, *P < 0.05.

도 18:

(A) 웨스턴 블랏 분석을 사용하여 NPB(10μM) 처리 기간이 증가한 후 MCF7 세포에서 pBAD, BAD, pAKT 및 AKT의 BAD Ser99 인산화의 수준을 평가하였다. 가용성 전체 세포 추출물을 SDS-PAGE에서 작동시키고 방법론에 기재된 바와 같이 면역블로팅하였다. kDa에서 검출된 단백질 밴드의 크기는 왼쪽에 표시되어 있다. (B) 키나아제 및 인산화된 기질은 웨스턴 블랏 분석(Proteome Profiler Human Phospho-Kinase Array Kit)을 사용하여 검출되었다. 세포 용해물의 제조 전에 37℃에서 12시간 동안 NPB(10μM) 또는 DMSO로 처리된 MCF7 세포. 평균 픽셀 밀도는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 분석되었으며 하기에 나타내었다.

도 19는 화합물 NCK5의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 20은 화합물 NCK16의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 21은 화합물 NCK18의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 22A, 22B, 22C, 22D 및 22E: 암 세포주에서 NPB 구조-기반 유사체(structure-based analogues)의 IC_{50} 값.

참조: NV, 값 없음.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0179] **본 발명의 실시예를 실행하는데 사용된 물질**

[0180] 세포 배양 및 시약

[0181] 인간 불멸화된 유방 상피 세포주, MCF10A 및 MCF12A; 및 불멸화된 간 세포주, LO2는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)로부터 획득하였고 ATCC 지침(propagation instructions)에 따라 배양하였다. MC 세포주, MCF7, T47D, BT474, BT549, 및 MDA-MB-231 (MB-231로 표시됨); 자궁 내막 암 세포주 이시카와(Ishikawa), ECC1, RL95-2 및 AN3; 간세포 암 세포주, Hep3B, H2P, 및 H2M; 대장암 세포주, HCT116, DLD-1, 및 Caco-2; 및 전립선 암 세포주, PC3, LNCaP, DU145는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)로부터 획득하였다. 난소 암 세포주, SK-OV-3, OVCAR-2, Caov-3, HEY C2, 및 Ovca433은 싱가포르 국립 대학교(NUS), 싱가포르 암 과학 연구소의 Dr Ruby Huang 실험실에서 획득하였다. 췌장 암 세포주는 싱가포르 국립 대학교(NUS), 싱가포르 암 과학 연구소의 Prof. H. Phillip Koeffler 실험실에서 획득하였다. 모든 암 세포주를 ATCC 지침에 따라 배양하였다. AKT 억제제 IV는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. BAD 지정 스텔스(stealth) (sh)-RNA-BAD(shRNA-BAD1, 5'-GCUCCGCACCAUGAGUGACGAGUUU-3' 및 shRNA-BAD2, 5'AAACUCGUCACUCAUCCUCCGGAGC3')는 Life Technologies (Singapore)에서 구입하였다. AKT 지정 shRNA(shRNA-AKT1, 5'-CCGGCGCGTGACCATGAACGAGTTTCTCGAGAAACTCGTTCATGGTCACGCGTTTTTG-3' 및 shRNA2-AKT, 5

’-CCGGGGACTACCTGCACTCGGAGAACTCGAGTTCTCCGAGTGCAGGTAGTCCTTTTTG-3’)는 Life Technologies (Singapore)로부터 구입하였고, PLKO.1 벡터(Sigma, Singapore)에서 클로닝하였다.

[0182] 세포를 24시간 동안 FuGENE HD (Promega)를 사용하여 20nM shRNA (AKT 또는 BAD) 또는 일반적인 음성 대조군(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 일시적-형질전환시킨 다음 추가 분석을 수행하였다. 알라닌 트랜스 아미나아제(Alanine transaminase, ALT), 아스파르테이트 트랜스아미나아제(aspartate transaminase, AST), 락테이트 디하이드로게나아제(lactate dehydrogenase, LDH), 크레아틴 키나아제(creatine kinase, CK), 혈액 우레아 질소(blood urea nitrogen, BUN) 상업용 키트는 AGAPPE Diagnostics Ltd.(Kerala, India)로부터 구입하였다.

[0183] **실시예 1**

[0184] **화학식 1 화합물의 합성 및 특성**

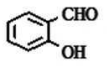
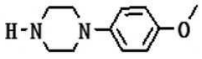
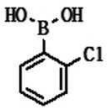
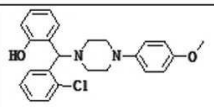
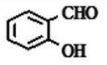
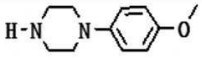
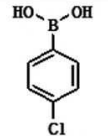
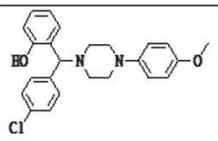
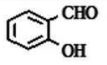
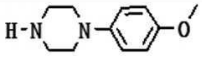
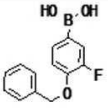
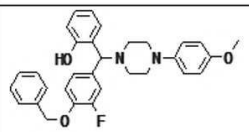
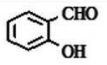
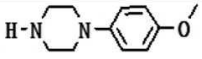
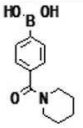
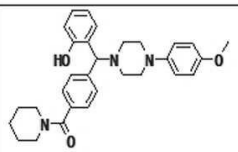
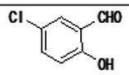
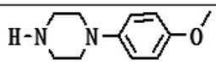
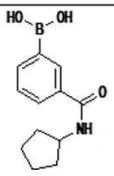
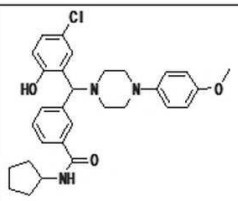
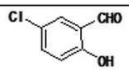
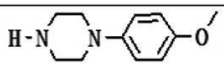
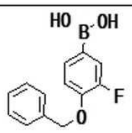
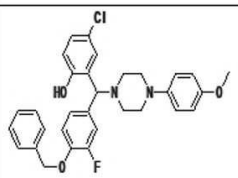
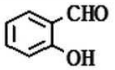
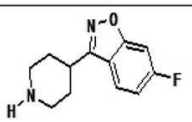
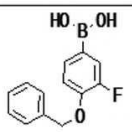
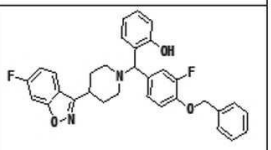
[0185] 화학식 1의 화합물의 일반적인 합성

[0186] 피페라진(Piperazine)(0.8 mmol) 및 살리실알데하이드(salicylaldehyde)(0.8 mmol)를 RBF에 넣고 용매로서 디옥산(Dioxane)을 사용하여 약 10분 동안 교반하였다. 약 10분 후, 아릴 보론산(aryl boronic acid)(0.8 mmol)을 상기 혼합물에 첨가하고 약 90℃에서 유지되는 열판(hot plate)에서 용매로서 디옥산을 사용하여, 약 8시간 동안 연속적 교반하면서 환류시켰다. 약 8시간 후, 에틸 아세테이트(ethyl acetate) 및 물을 반응 혼합물에 첨가하고, 에틸 아세테이트 층은 분리 깔데기를 사용하여 분리하였고 무수 소듐 설페이트(anhydrous sodium sulfate)로 건조시킨다. 에틸 아세테이트를 증발시켜 생성물(product)을 획득하였다. 목적하는 페놀 화합물 생성물을 컬럼 크로마토그래피(column chromatography)를 사용하여 분리하는 것으로 획득한다.

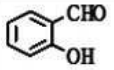
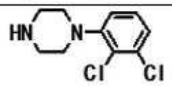
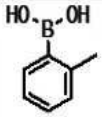
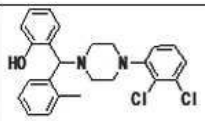
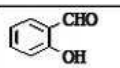
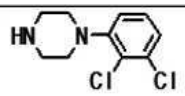
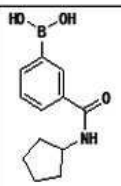
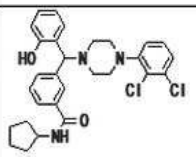
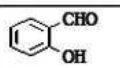
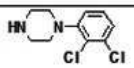
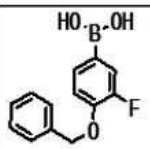
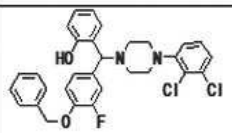
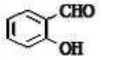
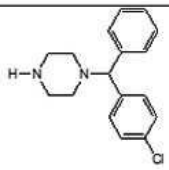
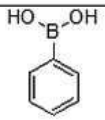
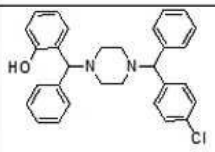
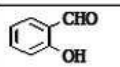
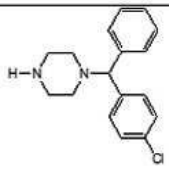
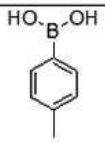
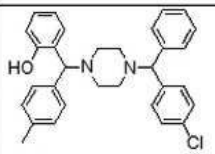
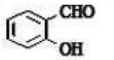
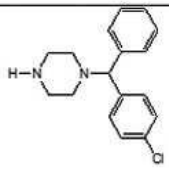
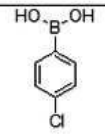
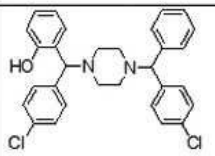
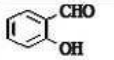
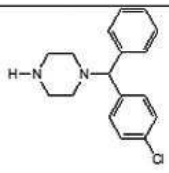
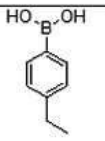
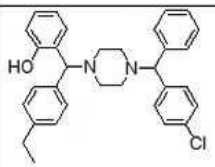
[0187] 화합물 1 내지 15 및 41 내지 63을 획득하기 위해 사용된 특정한 시약은 하기 표 1에 제공된다.

표 1

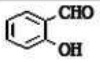
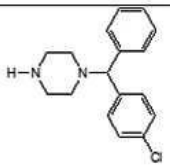
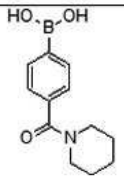
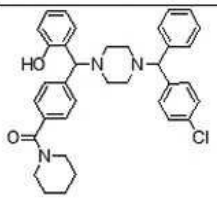
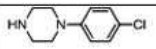
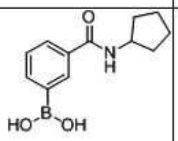
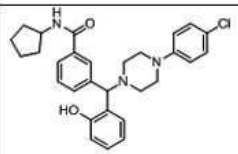
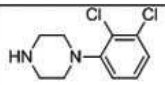
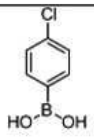
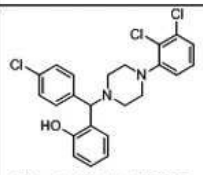
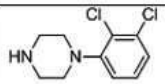
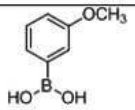
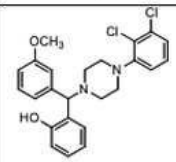
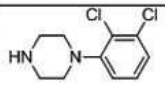
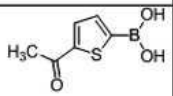
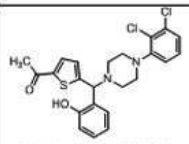
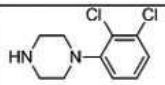
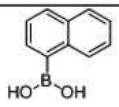
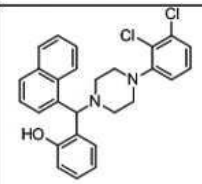
[0188]

번호 (No)	살리실알데하이드 (Salicylaldehyde)	피페라진 (Piperazine)	아릴 보론산 (Aryl boronic acid)	생성물(Product)
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				

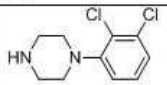
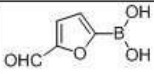
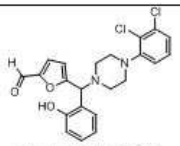
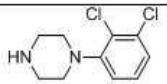
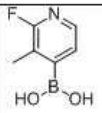
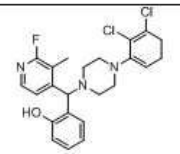
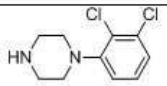
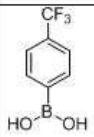
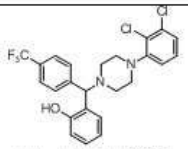
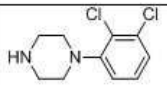
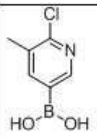
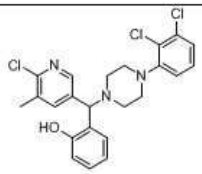
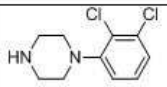
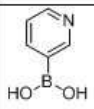
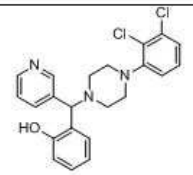
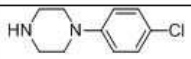
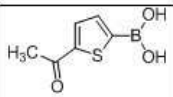
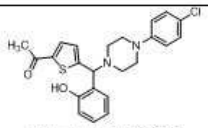
[0189]

번호 (No)	살리실알데하이드 (Salicylaldehyde)	피페라진 (Piperazine)	아릴 보론산 (Aryl boronic acid)	생성물(Product)
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				

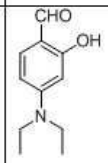
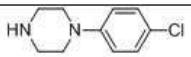
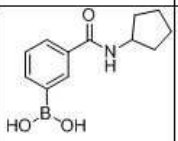
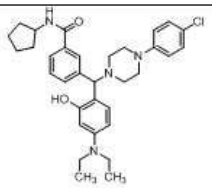
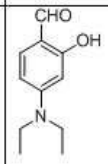
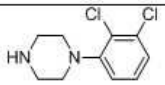
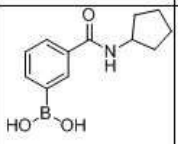
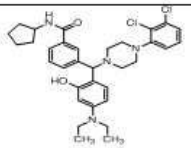
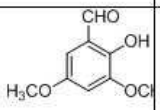
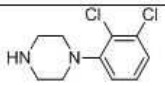
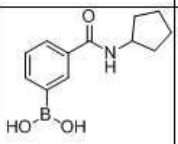
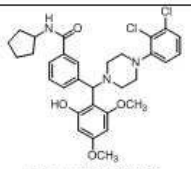
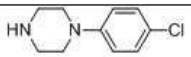
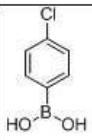
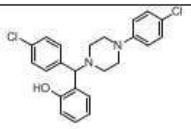
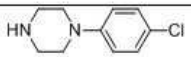
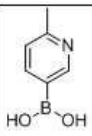
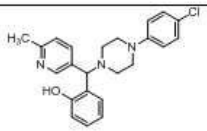
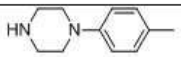
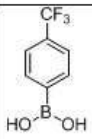
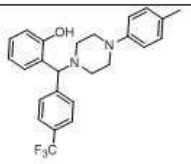
[0190]

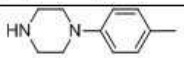
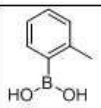
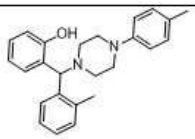
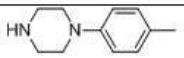
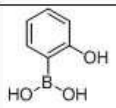
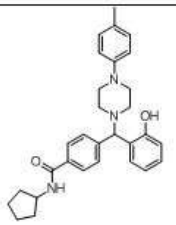
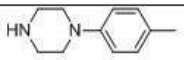
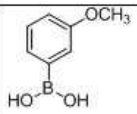
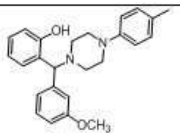
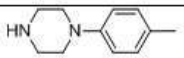
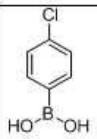
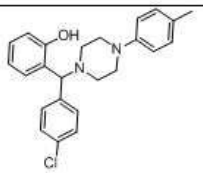
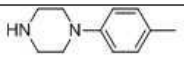
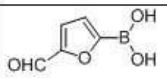
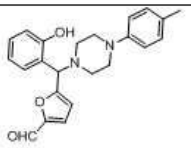
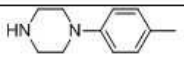
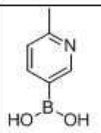
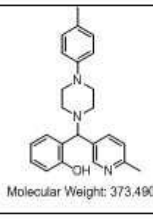
번호 (No)	살리실알데하이드 (Salicylaldehyde)	피페라진 (Piperazine)	아릴 보론산 (Aryl boronic acid)	생성물(Product)
15				
41				 Molecular Weight: 490.0363
42				 Molecular Weight: 447.7846
43				 Molecular Weight: 443.3656
44				 Molecular Weight: 461.4040
45				 Molecular Weight: 463.3983

[0191]

번호 (No)	살리실알데하이드 (Salicylaldehyde)	피페라진 (Piperazine)	아릴 보론산 (Aryl boronic acid)	생성물(Product)
46				 Molecular Weight: 431.3118
47				 Molecular Weight: 448.3606
48				 Molecular Weight: 481.338
49				 Molecular Weight: 462.7993
50				 Molecular Weight: 414.3276
51				 Molecular Weight: 426.9589

[0192]

번호 (No)	살리실알데하이드 (Salicylaldehyde)	피페라진 (Piperazine)	아릴 보론산 (Aryl boronic acid)	생성물(Product)
52				 Molecular Weight: 561.16
53				 Molecular Weight: 595.60
54				 Molecular Weight: 584.53
55				 Molecular Weight: 413.34
56				
58				 Molecular Weight: 426.4740

번호 (No)	살리실알데하이드 (Salicylaldehyde)	피페라진 (Piperazine)	아릴 보론산 (Aryl boronic acid)	생성물(Product)
57				 Molecular Weight: 372.5026
59				
61				 Molecular Weight: 388.5020
60				 Molecular Weight: 392.9211
62				 Molecular Weight: 364.4806
63				 Molecular Weight: 373.4907

[0193]

[0194] 표 2에 나타난 화합물은 반응식 1에 나타난 바와 같이 팔라듐 촉매화된 스즈키 커플링 반응을 사용하여 보론산과 NPB 브롬(표 2의 1 열 참조)을 수득하였다.

[0195] 반응식 1

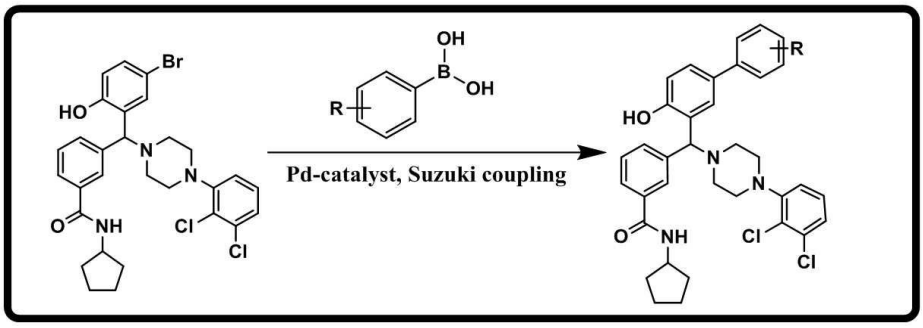
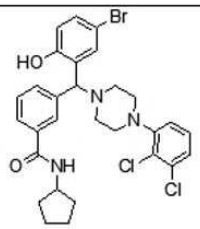
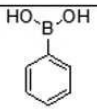
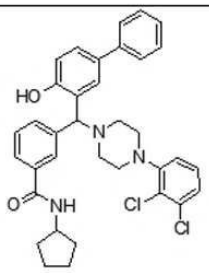
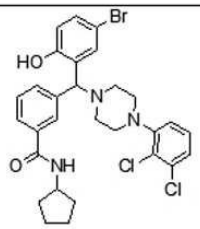
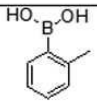
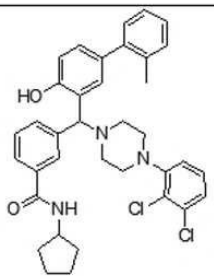
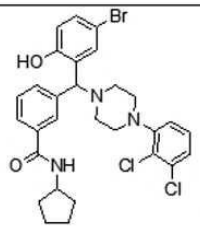
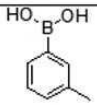
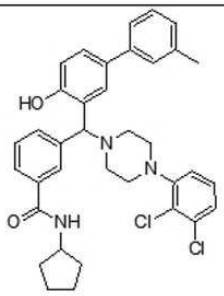
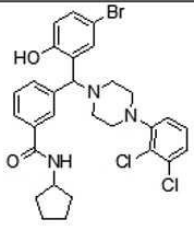
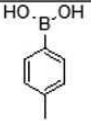
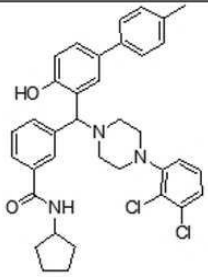
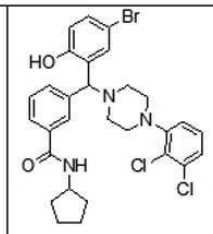
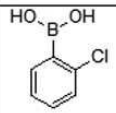
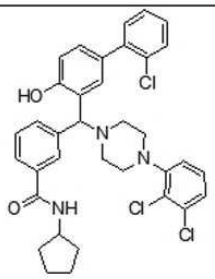
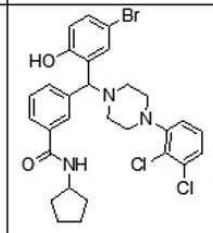
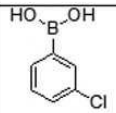
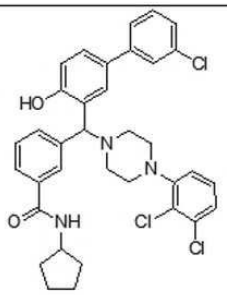
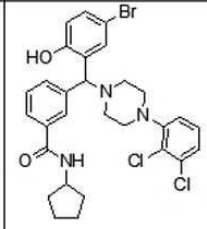
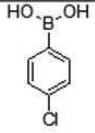
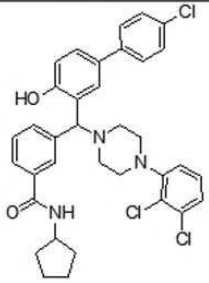
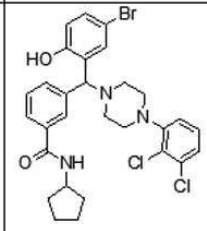
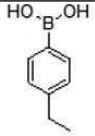
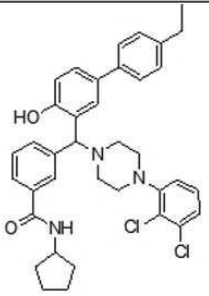
[0196] 

표 2

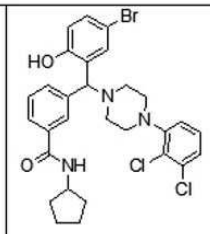
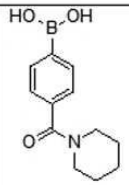
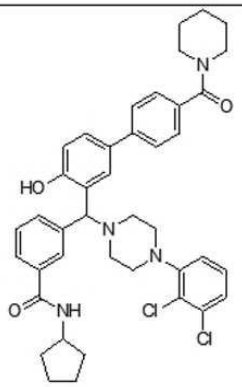
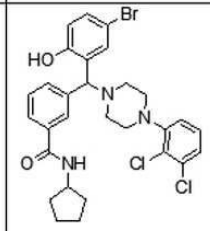
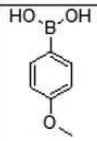
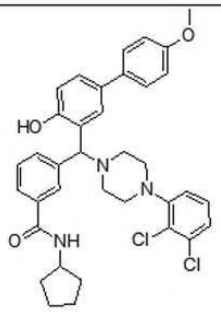
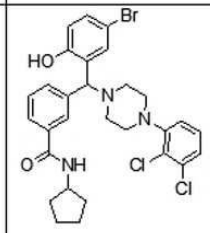
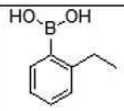
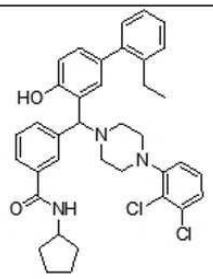
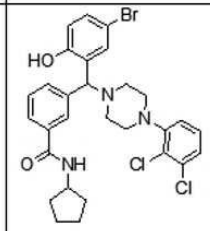
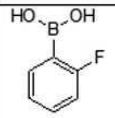
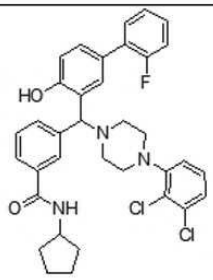
	NPB-Br	보론산 (Boronic acid)	생성물 (Product)
16			
17			
18			
19			

[0197]

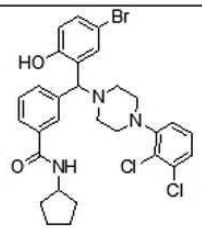
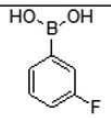
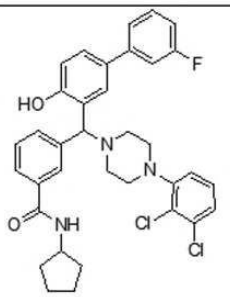
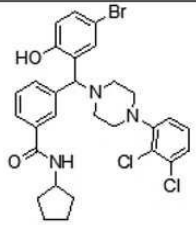
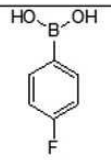
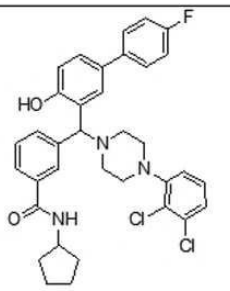
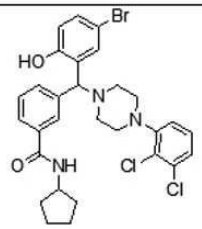
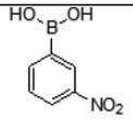
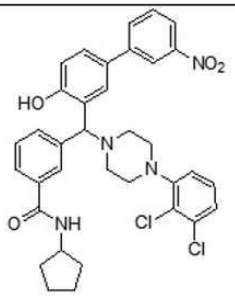
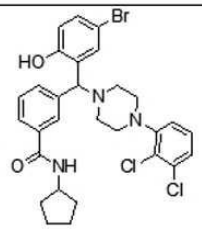
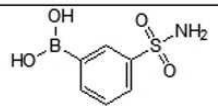
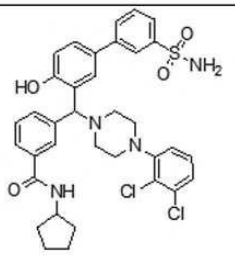
[0198]

20			
21			
22			
23			

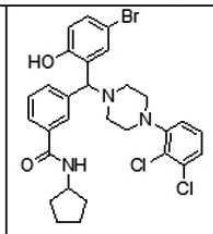
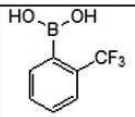
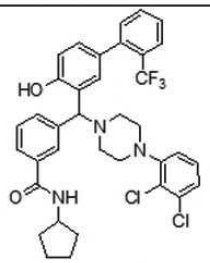
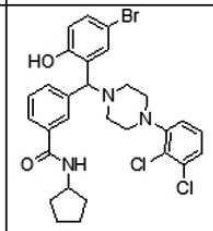
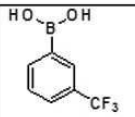
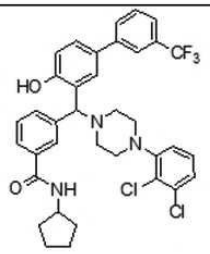
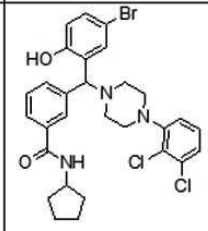
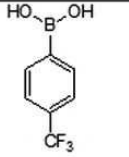
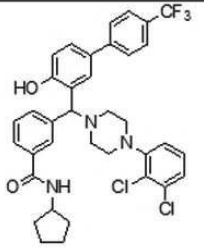
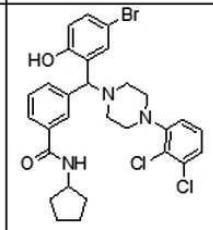
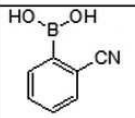
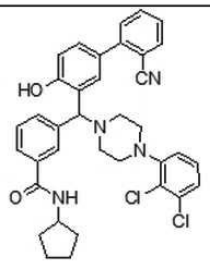
[0199]

24			
25			
26			
27			

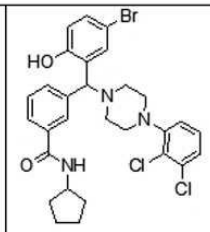
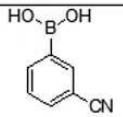
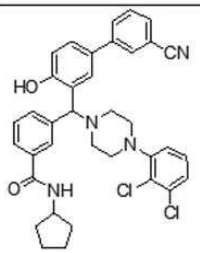
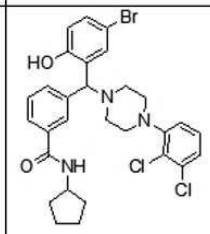
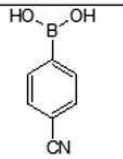
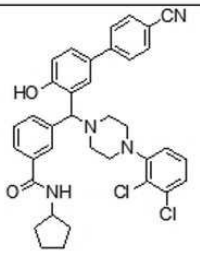
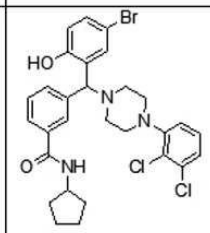
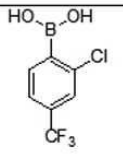
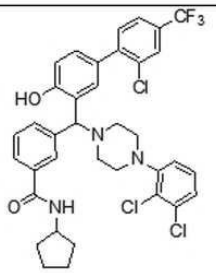
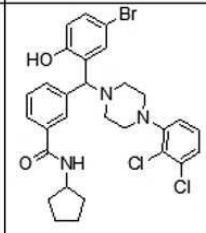
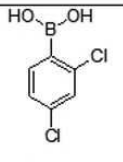
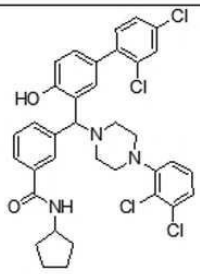
[0200]

28			
29			
30			
31			

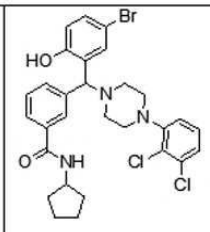
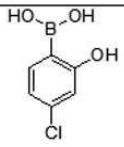
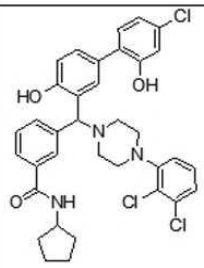
[0201]

32			
33			
34			
35			

[0202]

36			
37			
38			
39			

[0203]

40			

[0204] 화합물 1의 특성:

[0205] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) δ: 3.691(s, 3H), 5.303(s, 1H, C-H), 1.184-3.691(m, 8H-피페라진 양성자(piperazine protons)), 7.597-7.615(d,1H, J=7.2Hz), 7.341-7.323(d, 1H, J=7.2Hz), 7.060-7.189(m, 4H-ArH), 6.555-6.815(m, 5H-ArH), 6.956-6.974, (d,1H, J=7.2Hz)11.85(s, 1H-OHbrdpeak); ^{13}C NMR(400MHz, CDC13) δ: 50.854, 55.521, 69.50, 114.45, 117.17, 118.44, 119.547, 122.05, 127.78, 128.83, 129.01, 129.19, 129.84, 129.93, 133.89, 145.11, 156.60; 녹는점 120-124℃.**(도 1)**

[0206] 화합물 2의 특성:

[0207] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) δ: 2.539-3.065(m, 8H), 3.674(s, 3H),4.359(s,1H), 6.651(m, 1H), 6.740-6.804(m, 5H) ,6.855-6.872(d, 1H, J=6.8Hz), 7.086(m, 1H), 7.165(m, 2H), 7.280(m, 1H), 7.361(m, 1H); ^{13}C

NMR(400MHz, CDCl3)δ: 50.74, 51.76, 55.52, 75.86, 114.49, 117.24, 118.43, 119.62, 124.41, 126.58, 128.28, 128.54, 128.92, 129.20, 130.28, 134.66, 141.63, 145.07, 154, 156.18; 녹는점 85-89℃.**(도 2)**

[0208] 화합물 3의 특성:

[0209] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz)δ: 1.194-3.079(m, 8H), 3.689(s, 3H), 4.336(s, 1H), 5.041(s, 2H), 6.672-6.702(m, 1H), 6.781-6.819(m, 5H), 6.863-6.867(m, 2H), 7.026-7.082(m, 2H), 7.196(m, 1H), 7.279-7.348(m, 5H); ^{13}C NMR(400MHz, CDCl3)δ: 50.770, 55.52, 71.26, 75.36, 114.46, 115.46, 117.16, 118.42, 119.54, 124.82, 127.34, 128.14, 128.62, 128.76, 129.14, 145.04, 156.14; 녹는점 72-76℃.**(도 3)**

[0210] 화합물 4의 특성:

[0211] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz)δ: 1.183-2.469(m, 10H), 2.557-3.684(m, 8H), 3.684(s, 3H), 4.412(s, 1H), 6.631(m, 2H), 6.745-6.813(m, 4H), 7.059-7.095(m, 1H), 7.191-7.216(m, 1H), 7.261-7.269(m, 2H), 7.351-7.409(m, 2H); ^{13}C NMR(400MHz, CDCl3)δ: 24.51, 26.525, 29.68, 43.60, 48.73, 50.71, 51.80, 55.51, 76.04, 114.45, 117.134, 118.366, 119.198, 119.52, 124.75, 126.74, 127.50, 128.04, 128.50, 128.79, 129.29, 136.18, 141.02, 145, 154, 156.2, 169.79(C=O); 녹는점 78-82℃.**(도 4)**

[0212] 화합물 5의 특성:

[0213] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz)δ: 1.186-1.650(m, 8H), 1.978-3.633(m, 8H), 3.689(s, 3H), 4.298-4.345(m, 1H), 4.421(s, 1H), 5.979-5.992(s, 1H) 6.736-6.803(m, 5H), 6.860(m, 1H), 7.192(s, 1H), 7.737(s, 1H), 7.304-7.339(m, 1H), 7.540-7.557(m, 2H); ^{13}C NMR(400MHz, CDCl3)δ: 23.79, 33.18, 50.67, 51.83, 55.51, 67.06, 75.06, 114.46, 118.45, 118.58, 124.02, 126.11, 126.42, 128.72, 128.87, 129.39, 139.39, 144.89, 154.19, 154.95, 166.68; 녹는점 102-106℃.**(도 5)**

[0214] 화합물 6의 특성:

[0215] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz)δ: 1.179-3.620(m, 8H), 3.676(s, 3H), 4.261(s, 1H), 5.029(s, 2H), 6.716-6.791(m, 5H), 6.823(m, 1H), 6.862-6.882(m, 1H), 6.973-7.015(m, 2H), 7.110-7.139(m, 1H), 7.243-7.258(m, 2H), 7.280-7.317(m, 1H), 7.331-7.350(m, 2H); ^{13}C NMR(400MHz, CDCl3)δ: 50.70, 51.59, 55.52, 71.27, 74.93, 114.48, 115.52, 118.58, 123.97, 124.39, 126.3, 127.3, 128.2, 128.8, 132.1, 136.27, 144.96, 146.74, 154.19, 154.93; 녹는점 60-64℃.**(도 6)**

[0216] 화합물 7의 특성:

[0217] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz)δ: 2.648-3.820(m, 8H) 4.245(s, 1H), 5.009(s, 1H), 5.651(s, 2H), 7.276(s, 1H), 7.436-7.485(m, 3H), 7.606-7.682(m, 3H), 7.797(m, 2H), 7.876-7.954(m, 5H), 8.185(s, 1H); ^{13}C NMR(400MHz, CDCl3)δ: 30.972, 50.76, 67.60, 71.79, 75.85, 98.16, 100.9, 104.9, 113.16, 115.97, 117.65, 119.96, 122.84, 125.4, 127.8, 128.6, 129.1, 129.6, 133.2, 136.8, 157.06, 160.87, 164.51, 165.86; 녹는점 58-62℃.**(도 7)**

[0218] 화합물 8의 특징:

[0219] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz)δ: 2.479(s, 3H), 4.927(s, 1H), 2.260-3.063(m, 8H), 6.533-6.551(d, 1H, J=7.2Hz), 6.631-6.692(m, 2H), 6.739-6.758(d, 1H, J=7.6Hz), 6.789-6.809(d, 1H, J=8Hz), 6.864(m, 3H), 7.092-7.183(m, 1H), 7.281-7.297(m, 1H), 7.537-7.552(d, 1H, J=6Hz); ^{13}C NMR(400MHz, CDCl3)δ: 20.92, 51.16, 51.42, 73.44, 116.07, 116.96, 117.14, 118.716, 119.27, 119.83, 124.965, 125.24, 126.445, 127.12, 127.545, 128.266, 128.729, 129.260, 130.869, 134.072, 138.171, 150.600, 156.443 녹는점 108-112℃.**(도 8)**

[0220] 화합물 9의 특성 (**NPB**):

[0221] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) δ: 1.183-1.647(m, 8H), 2.019-3.067(m, 8H), 4.509(s, 1H), 4.312-4.327(m, 1H, NH), 5.965(s, 1H), 6.668(m, 1H), 6.801-6.896(m, 3H), 7.073-7.190(m, 3H), 7.305(m, 1H), 7.527-7.542(m, 2H), 7.770(s, 1H); ^{13}C NMR(400MHz, CDCl3) δ: 23.78, 33.18, 51.22, 51.78, 76.10, 117.14, 118.59, 119.67, 124.69, 124.98, 126.22, 127.53, 128.85, 129.29, 131.08, 134.08, 135.53, 140.28, 150.5, 156.1, 166.73; m/z(M+2, 526.2, 527.2) 녹는점 174-178℃.**(도 9)**

[0222] 화합물 10의 특성:

[0223] ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 400MHz) δ: 1.183-3.074(m, 8H), 4.361(s, 1H), 5.034(s, 2H), 6.658-6.694(t, 1H, J=7,2Hz), 6.768(m, 1H), 6.856-6.873(m, 3H), 7.023(m, 1H), 7.055-7.094(m, 3H), 7.164(m, 1H), 7.231(m, 1H), 7.266(m, 1H), 7.304(m, 1H), 7.322-7.355(m, 2H); ^{13}C NMR(400MHz, CDCl3) δ: 51.264, 71.260, 75.434, 117.15, 118.6, 119.6, 124.8, 124.9, 127.3, 127.5, 128.1, 128.6, 128.8, 129.18, 150.5, 156.09; 녹는점 75-80℃.**(도 10)**

[0224] **실시예 2**

[0225] **다양한 암 세포의 세포 생존력을 감소시키는 화학식 1의 화합물**

[0226] 발암성 분석(Oncogenicity Assay)

[0227] 초기에 AlamarBlue® 세포 생존력 분석을 사용하여 MCF7 세포(ER+MC 세포)에 대해 새롭게 합성된 소분자 화합물의 효과를 조사하였다. 신규 소분자 화합물의 시리즈 중, NPB는 베히클(DMSO) 처리된 세포와 비교하여 MCF7 세포의 생존력을 감소시키는 효과적인 소분자 화합물로 확인되었다.

[0228] 상기 화합물 중, 화합물 9 N-사이클로펜틸-3-((4-(2,3-디클로로페닐)피페라진-1-일)(2-하이드록시페닐)메틸)벤즈아마이드(N-cyclopentyl-3-((4-(2,3-dichlorophenyl)piperazin-1-yl)(2-hydroxyphenyl)methyl)benzamide)(NPB)는 6.5μM의 IC_{50}인 가장 강력한 항증식성 화합물(antiproliferative compound)로 확인되었다. ER- 유방암(BT549, MDA-MB-231), ER+ 유방암(MCF7, T47D, 및 BT474), 자궁내막암(Ishikawa, ECC-1, RL95-2, 및 AN3), 난소암(SK-OV-3, OVCAR-2, Caov-3, HEY C2, 및 OVCA433), 간세포암(Hep3B, H2P, 및 H2M), 대장암(HCT116, DLD-1, 및 Caco-2), 전립선암(PC3, LNCaP, 및 DU145) 및 췌장암(AsPC-1, BxPC-3)으로부터 유래된 것들을 포함하는 광-범위한 암 세포에서 NPB의 억제 농도 50%(IC_{50})를 결정하였다. 일반적인 세포 대조군으로서, 세포주의 패널에 불멸화된 유방 상피 세포(MCF10A 및 MCF12A) 및 불멸화된 간세포(LO2)를 또한 포함시켰다. 암 세포주에서 NPB에 대한 IC_{50} 값은 도 11에 표로 기재되어 있다.

[0229] **실시예 3**

[0230] **NPB는 암 세포주의 범위에서 아포토시스 세포 사멸을 유도한다**

[0231] 또한, NPB를 몇몇 암-유래된 세포주에 대해 평가하여, 제조사의 지침에 따라 ApoTox-Glo™ Triplex Assay Kit(Promega, Singapore)를 사용하여 전체 세포 생존력, 아포토시스, 및 세포 독성에 미치는 영향을 결정한다(도 12). 요약하면, 세포를 흑색 불투명 96-웰 플레이트(Corning®, Singapore)에 시딩하였다. 세포를 밤새 배양한 후, 배지를 지시된 NPB 농도로 변경한다. 약 48시간의 배양 후, GF-AFC 기질 및 bis-AAF-R110 기질 모두를 함유하는 생존력/세포 독성 시약이 공급자에 의해 제안된 바와 같이 세포에 첨가된다. 약 37℃에서 약 45분 배양한 후, 형광(Tecan, Singapore)에 대한 Tecan 마이크로 플레이트 리더(microplate reader)를 사용하여 생존력에 대한 400 nm 자극(excitation)/505 nm 방출(emission) 및 세포 독성에 대한 485 mn 자극/520 nm 방출에서 형광을 기록하였다. 카스파아제-글로(Caspase-Glo) 3/7 시약을 세포에 추가로 첨가하고 실온에서 약 25분 배양한 후, 발광을 Tecan 마이크로플레이트 리더를 사용하여 기록한다. 생존, 세포 독성 및 아포토시스 세포의 수는 3회 측정된다.

[0232] **아넥신 V 및 요오드화 프로피듐(Annexin V and propidium iodide, Annexin V-PI) 아포토시스 분석**

[0233] 포스파티딜세린(phosphatidylserine) 노출 및 세포 사멸은 아넥신-V-FLUOS 염색 키트(Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Life Technologies, Singapore)) 및 PI-염색 세포를 사용하여 FACS 분석에 의해 평가된다. 간략하게, 1×10^5 MCF cells/well (190μL/well)을 6-웰 플레이트에 시딩하였고 약 24시간 동안 NPB의 상이한 농도

로 배양하고 DMSO 처리된 샘플을 대조군으로 사용하였다. 그 다음, 아넥신 V 결합 버퍼(10mM HEPES/NaOH, pH7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$)로 세포를 세척하고, 암실 실온에서 약 30분 동안 아넥신 V FITC로 염색한 다음 세척하였고 PI를 함유하는 아넥신 V 결합 버퍼로 재-현탁하였다. 샘플은 BD FACSAria Cell Sorter (BD Biosciences, San Jose, CA)에서 즉시 분석하였다.

[0234] 플라즈마 막(plasma membrane)의 외부 리플릿(outer leaflet)으로의 막 온전성(memebrane integrity) 손실 및 포스파티딜세린(phosphatidylserine)의 전좌(translocation)는 FITC 컨쥬게이트된 아넥신-V 및 요오드화 프로피듐 염색을 사용하여 검출될 수 있는 아포토시스의 초기 사건이다. NPB는 FITC-아넥신 V 및 요오드화 프로피듐을 사용하여 MCF7 세포에서 아포토시스를 유도하는 것으로 관찰되었다. NPB로 처리할 때, 초기(PI 음성, FITC-아넥신 V 양성) 및 후기 아포토시스 세포(PI 양성, FITC-아넥신 V 양성)은 도 13A에 나타난 봐와 같이 용량 의존적 방식으로 관찰된다.

[0235] **실시예 4**

[0236] **재조합 BAD 단백질과 NPB의 분자 상호작용**

[0237] 가장 유망한 후보인, BAD에 대한 NPB 결합 친화도의 분자 상호작용을 제공하기 위해, 분석물(analyte)로서 NPB를 사용하여 고정화된 BAD 서브 유닛으로 표면 플라즈몬 공명(SPR) 측정을 수행하였다. BAD가 시험관 내(in vitro) BAD 서브유닛에 결합할 수 있다는 것을 알고 있다. 따라서, BIAcore 시스템을 사용하여 상기 상호작용을 분석하였다. 상기 재조합 BAD는 CM5 센서 칩(CM5 sensor chip)에 고정시켰다. 연관 및 해리 곡선을 결정하기 위해, NPB의 다양한 농도를 BAD로 코팅된 센서 칩의 표면에 개별적으로 주입하였다. 도 14에 나타난 오버레이된 센서그램(overlaid sensorgrams)을 집합적으로 분석하였다. NPB에 대한 BAD의 직접적이 결합이 입증되었다(도 14A). NPB와 BAD의 상호작용에 대한 키네틱 파라미터(kinetic parameter)의 계산은 37.12μM의 해리 평형 상수(Kd)를 산출한 결합 친화도의 $(1.4\pm.4)x10^3\ M^{-1}S^{-1}$의 연관 속도 상수 및 $(5.4\pm0.38)x10^3\ S^{-1}$의 해리 속도 상수를 나타냈다. 이러한 키네틱 파라미터는 BAD 구조 NPB의 상호작용에 대한 친화력 지지체를 나타낸다.

[0238] 표면 플라즈몬 공명 분석(Surface plasmon resonance analysis)

[0239] 분자 상호작용을 BIAcore-2000 시스템(BIAcore AB, Uppsala, Sweden)을 사용하여 표면 플라즈몬 공명에 기초하여 분석하였다. 인간 재조합 BAD 단백질(Catalog No.MBS143012, MyBiosource, USA)은 제조사 프로토콜에 설명된 바와 같이 센서 칩 상에 고정시켰다. BAD와 NPB의 상호작용을 조사하기 위해, 러닝 버퍼(HBS-EP, pH 7.4, BIAcore AB)중 다양한 농도의 NPB (20 내지 100 μM)를 제조사의 지침에 따라 15 μl/min의 유속으로 BAD-고정화된 센서 칩의 표면 상에 주입하였다. NPB는 각각 연관 및 해리를 위해 2분 동안 BAD 서브유닛과 상호작용하도록 허용되었고, 그 후, 다음 주입 전에 2분 동안 1M NaCl을 주입하여 상기 센서 칩을 재생시켰다. BIA 평가 소프트웨어 4.1(BIAcoere, AB)을 사용하여, 상기 키네틱 파라미터는 질량 전달을 갖는 1:1 결합 모델을 사용한 연관 및 해리 속도 상수(ka 및 kd), 해리 평형 상수(Kd)와 같은 것이다.

[0240] **실시예 5**

[0241] **BAD 인산화에 대한 NPB 효과는 Ser99(인간)에 특이적이다.**

[0242] 잔기 Ser-75 (마우스 BAD 세린 잔기 112) 및 Ser-99(마우스 BAD 세린 잔기 136)의 인산화는 항-아포토시스 단백질의 BCL-2 패밀리의 활성을 조절하는데 중요하다[15]. Ser-75 또는 Ser99 (또는 마우스 BAD에 잔기에 상응하는)에서 hBAD 인산화는 BCL-xL 또는 BCL-2와 이종이량체(heterodimerize)하는 hBAD의 능력의 손실을 야기한다[15]. 예측된 표적을 추가로 확인하기 위해, 웨스턴 블롯 분석에 의해 Ser99에서 hBAD의 인산화에 대한 NPB의 효과를 먼저 분석하였다. NPB와 함께 MCF7 세포의 처리는 전체 hBAD 단백질의 상당한 변화 없이 hBAD Ser99의 인산화의 용량 의존적 감소를 생성하였다(도 14B). NPB에 의한 BAD Ser99 인산화의 억제에 대하여 계산된 EC_{50}은 0.41±0.21μM이다.

[0243] 7개 상이한 유형의 암으로부터 유래된 25개 암 세포주에서 웨스턴 블롯 분석으로 Ser75 및 Ser99에서 hBAD의 인산화에 대한 NPB의 효과를 분석하였다. NPB는 모든 검사된 암 세포주에서 Ser99 사이트에서 BAD의 인산화를 크게 억제하는 것으로 관찰되었다; 그러나, NPB는 hBAD의 Ser99에서 인산화를 특이적으로 억제된 것을 나타내는 동일한 세포에서 Ser75 사이트에서 hBAD의 인산화에 대하여 효과를 나타내지 않는 것으로 관찰되었다(도 15).

[0244] **BAD 발현의 siRNA-매개된 소모는 암 세포주에서 NPB의 효과를 되돌린다.**

[0245] BAD 단백질에 대한 NPB의 기능적 특이성을 확인하기 위해, 추가로 6개 암 세포주(MCF7, BT474, Caov-3,

Ishikawa, AsPC-1 및 DLD-1)에서 BAD 발현의 siRNA-매개된 소모 후에 NPB의 노출을 추가로 검사하였다. BAD 전사체에 대한 siRNA와 함께 상이한 암 세포의 일시적-형질감염은 BAD 발현을 감소시키고 웨스턴 블롯 분석에 의해 관찰된 바와 같이 이의 대조군 세포(스크램블된 올리고(scrambled oligo)로 형질 감염됨)와 비교하여 포스포-Ser99 BAD의 수준을 감소시킨다. 세포 생존력 또는 아포토시스는 이전에 보고된 바와 같이 BAD의 siRNA 매개된 소모에서 상당히 변경되었다[26]. 상기 기재된 바와 같이, 대조군 형질감염된 암 세포주의 NPB 처리는 베히클-처리된 세포와 비교하여 BAD 인산화(Ser99)를 감소시켰다. 부수적으로, NPB에 동일한 암 세포주의 노출은 베히클-노출된 세포와 비교하여 세포 생존력을 감소시키고 카스파아제(caspase) 3/7 활성을 증가시킨다. 대조적으로, NPB는 BAD의 발현이 소모된 암 세포주에서 세포 생존력 또는 카스파아제 3/7 활성에 영향을 미치지 않았다(도 16B 및 C).

[0246] **실시예 6**

[0247] **NPB는 암 세포주에서 AKT 신호와 독립적으로 BAD 인산화를 억제한다**

[0248] 상류(upstream) AKT Ser/Thr 키나아제는 Ser99에서 hBAD의 인산화를 조절한다[13]. 따라서, NPB가 웨스턴 블롯 분석을 사용하여 AKT의 활성(Ser473의 인산화로 표시됨)의 조절을 통해 hBAD의 인산화(Ser99)를 억제하는지 여부를 결정하였다. 4개의 상이한 암 세포주(MCF7, Caov-3, Ishikawa, 및 AsPC-1)를 10μM NPB에 노출시킨 후 pAKT의 수준 또는 전체 AKT 단백질의 수준의 변화가 관찰되지 않았다. 그러나, 모든 NPB 처리된 암 세포주(MCF7, Caov-3, Ishikawa, 및 AsPC-1)는 Ser99 사이트에서 BAD 인산화의 억제를 나타내었고 전체 BAD 단백질의 수준에는 변화가 없었다(도 15B). 추가적으로, 두 개의 독립적인 shRNA 표적 AKT 발현 또는 상이한 암 세포주에서 양성 대조군으로서 AKT 억제제 IV를 갖는 AKT 활성의 억제를 사용하여 AKT의 소모 후에 BAD 인산화를 검사하였다. 암 세포주에서 AKT의 소모된 발현은 대조군과 비교하여 pAKT(Ser474) 및 pBAD(Ser99) 수준에서 수반되는 감소와 관련되는 것을 관찰하였다; BAD Ser99 인산화는 모든 시험된 암-유래 세포주에서 AKT 의존적이고 다른 것에서 이전에 공개된 바와 같은 것으로 나타났다[13, 15, 24-29]. NPB는 따라서 상류 키나아제(AKT)의 활성에 영향을 주지 않으며 Ser99에서 BAD 인산화를 특이적으로 억제한다[29]. 이러한 결과는 SPR에 의해 관찰된 BAD에 대한 인 실리코(in silico) 표적 예측 및 NPB 결합과 일치한다. 이에, NPB는 상류 (AKT) 키나아제와 독립적으로 Ser99에서 BAD의 인산화를 특이적으로 억제한다.

[0249] **실시예 7**

[0250] 5 내지 6주령 BALB/c-nu 암컷 마우스 목의 스크러프(scruff)에 60일 동안 0.72mg/펠렛(pellet)으로 17β-에스트라디올 펠렛(17β-estradiol pellets)(Innovative Research of America)을 피하 이식하였고, 3일 후 마우스의 오른쪽 옆구리에 100μl 세포 현탁액($1x10^7$ 세포)을 피하 주사하였다. 캘리퍼스(callipers)를 사용하여 종양 크기를 측정함으로서 종양 성장을 모니터링하였다. 이식 후 약 12일 째에, 7일 동안 매일 복강 내 주사에 의해 200μl의 NPB(5% DMSO, 50% PEG400 및 45% 물에 용해됨. pH 5.0)를 투여한 치료에 따라, 마우스를 무작위로 분류하고 3개 그룹(각 그룹, n=8)으로 나누었다. 마우스의 제1 그룹은 베히클로 처리였고, 제2 그룹은 5mg/kg 용량의 NPB로 처리하였고, 제3 그룹은 20mg/kg 용량의 NPB로 처리하였다. 동물 체중 및 종양 부피를 매일 측정하였다. 완료 후, 종양을 절제하여, 사진을 찍고, 무게를 측정하였고, 이후 분석을 위해 액체 질소에 고정 또는 저장하였다. 조직학적 분석은 상기 기재된 바와 같이 수행되었다(30-32).

[0251] MC의 이종이식(MCF7)에서 NPB의 생체 내(in vivo) 효능을 검사하였다. 미리 형성된 종양(부피~$150cm^3$)을 갖는 무작위로 그룹화된 마우스에 베히클 또는 NPB를 5mg/kg 또는 20mg/kg으로 복강 내 주사하였다. 이의 베히클-처리된 대응물(vehicle-treated counterparts)과 비교하는 것으로서 NPB-처리된 마우스에서 종양 부피의 현저한 감소가 관찰되었다(도 17A). 이 기간 동안, 동물 무게는 그룹들 사이에 유의한 차이가 없었다(도 17A, 하단). 그러나, NPB-처리된 동물의 종양 무게는 베히클-처리된 마우스와 비교 및 용량-의존적 방법으로 감소하였다(도 17B). WB 분석을 사용하여 종양 조직에서 hBAD Ser99 인산화 수준에 대한 NPB의 효과를 추가로 분석하였다(도 17C). NPB 처리는 대조군 표본과 비교하여 종양에서 BAD의 인산화(Ser99에서)를 유의하게 억제하였다. 처리된 NPB 및 대조군 처리된 종양 사이의 BAD 단백질의 전체 수준에서 변화가 관찰되지 않았다.

[0252] NPB로 처리된 동물로부터 절제된 종양 표본의 조직학적 분석은 베히클-처리된 종양(도 17D)와 비교하여 p-BAD(Ser99)가 유의하게 감소된 것으로 나타난 반면, BAD 단백질은 상기 그룹들 사이에서 유의하게 상이하지 않았다. NPB로 처리된 동물은 종양에서 Ki67 양성 세포의 백분율이 유의하게 감소하였고 베히클-처리된 것과 비교하여 TUNEL 양성이 유의하게 증가하였다(도 17D).

[0253] **실시예 8**

[0254] NPB가 키나아제 활성의 조절에 의해 hBAD Ser99 인산화를 감소시키는 가능성을 설명하기 위해, R&D 시스템의 인간 인산-키나아제 항체 어레이 키트(Human Phospho-Kinase Antibody Array Kit)를 사용하여 다양한 키나아제에 대한 NPB의 효과를 평가하였다. 동일한 추출물에서 hBAD Ser99 인산화의 NPB 억제에도 불구하고, DMSO에 노출된 세포와 비교하여 NPB에 노출된 MCF7 세포에서 키나아제 활성 또는 인산화된 기질에서 유의한 변화가 관찰되지 않았다(도 18).

[0255] **실시예 9**

[0256] 청구된 화학적 템플릿에 따라 NPB의 유사체(도 19, 20, 21)를 추가로 생성하였고 NPB보다 더 나은 약동학적 프로파일(pharmacokinetic profiles)을 나타낼 수 있다. IC50에 의해 결정된 바와 같이 이의 구조 및 시험관 내 효능은 도 22에 나타나 있다.

[0257] **참고문헌**

[0258] 1. Rakesh KS, Jagadish S, Vinayaka AC, Hemshekhar M, Paul M, Thushara RM, Sundaram MS, Swaroop TR, Mohan CD and Sadashiva MP. A New Ibuprofen Derivative Inhibits Platelet Aggregation and ROS Mediated Platelet Apoptosis. PloS one. 2014; 9(9):e107182.

[0259] 2. Krautwald S, Ziegler E, Rolver L, Linkermann A, Keyser KA, Steen P, Wollert KC, Korf-Klingebiel M and Kunzendorf U. Effective blockage of both the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis in mice by TAT-crmA. The Journal of biological chemistry. 2010; 285(26):19997-20005.

[0260] 3. Riedl SJ and Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2004; 5(11):897-907.

[0261] 4. Hardwick JM and Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins. Cold Spring Harbor perspectives in biology. 2013; 5(2).

[0262] 5. Czabotar PE and Lessene G. Bcl-2 family proteins as therapeutic targets. Current pharmaceutical design. 2010; 16(28):3132-3148.

[0263] 6. Anilkumar U and Prehn JH. Anti-apoptotic BCL-2 family proteins in acute neural injury. Frontiers in cellular neuroscience. 2014; 8:281.

[0264] 7. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P. Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Science; 2008. Classic textbook now in its 5th Edition. 2010.

[0265] 8. Hutt KJ. The role of BH3-only proteins in apoptosis within the ovary. Reproduction (Cambridge, England). 2015; 149(2):R81-r89.

[0266] 9. Ambrosini G, Adida C and Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nature medicine. 1997; 3(8):917-921.

[0267] 10. Keerthy HK, Mohan CD, Siveen KS, Fuchs JE, Rangappa S, Sundaram MS, Li F, Girish KS, Sethi G and Bender A. Novel synthetic biscoumarins target tumor necrosis factor-α in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. Journal of Biological Chemistry. 2014; 289(46):31879-31890.

[0268] 11. Smith AJ, Karpova Y, D'Agostino R, Jr., Willingham M and Kulik G. Expression of the Bcl-2 protein BAD promotes prostate cancer growth. PloS one. 2009; 4(7):e6224.

[0269] 12. Doerflinger M, Glab JA and Puthalakath H. BH3-only proteins: A 20-year stock-take. The FEBS journal. 2015.

[0270] 13. Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Kanda Y, Hisamoto K, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Kanzaki T and Murata Y. Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. Cancer research. 2000; 60(21):5988-5994.

[0271] 14. Macdonald A, Campbell DG, Toth R, McLauchlan H, Hastie CJ and Arthur JS. Pim kinases phosphorylate

multiple sites on Bad and promote 14-3-3 binding and dissociation from Bcl-XL. BMC cell biology. 2006; 7:1.

[0272] 15. Fang X, Yu S, Eder A, Mao M, Bast RC, Jr., Boyd D and Mills GB. Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. Oncogene. 1999; 18(48):6635-6640.

[0273] 16. Masters SC, Yang H, Datta SR, Greenberg ME and Fu H. 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. Molecular pharmacology. 2001; 60(6):1325-1331.

[0274] 17. Harada H, Becknell B, Wilm M, Mann M, Huang LJ-s, Taylor SS, Scott JD and Korsmeyer SJ. Phosphorylation and inactivation of BAD by mitochondria-anchored protein kinase A. Molecular cell. 1999; 3(4):413-422.

[0275] 18. Jiang P, Du W, Heese K and Wu M. The Bad guy cooperates with good cop p53: Bad is transcriptionally up-regulated by p53 and forms a Bad/p53 complex at the mitochondria to induce apoptosis. Molecular and cellular biology. 2006; 26(23):9071-9082.

[0276] 19. Marchion DC, Cottrill HM, Xiong Y, Chen N, Bicaku E, Fulp WJ, Bansal N, Chon HS, Stickles XB, Kamath SG, Hakam A, Li L, Su D, Moreno C, Judson PL, Berchuck A, et al. BAD phosphorylation determines ovarian cancer chemosensitivity and patient survival. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2011; 17(19):6356-6366.

[0277] 20. Sastry KSR, Al-Muftah MA, Li P, Al-Kowari MK, Wang E, Ismail Chouchane A, Kizhakayil D, Kulik G, Marincola FM, Haoudi A and Chouchane L. Targeting proapoptotic protein BAD inhibits survival and self-renewal of cancer stem cells. Cell death and differentiation. 2014; 21(12):1936-1949.

[0278] 21. Anderson MA, Huang D and Roberts A. Targeting BCL2 for the treatment of lymphoid malignancies. Seminars in hematology. 2014; 51(3):219-227.

[0279] 22. Oltersdorf T, Elmore SW, Shoemaker AR, Armstrong RC, Augeri DJ, Belli BA, Bruncko M, Deckwerth TL, Dinges J and Hajduk PJ. An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. Nature. 2005; 435(7042):677-681.

[0280] 23. Keerthy HK, Garg M, Mohan CD, Madan V, Kanojia D, Shobith R, Nanjundaswamy S, Mason DJ, Bender A and Rangappa KS. Synthesis and characterization of novel 2-amino-chromene-nitriles that target Bcl-2 in acute myeloid leukemia cell lines. PloS one. 2014; 9(9):e107118.

[0281] 24. Bruncko M, Oost TK, Belli BA, Ding H, Joseph MK, Kunzer A, Martineau D, McClellan WJ, Mitten M, Ng SC, Nimmer PM, Oltersdorf T, Park CM, Petros AM, Shoemaker AR, Song X, et al. Studies leading to potent, dual inhibitors of Bcl-2 and Bcl-xL. Journal of medicinal chemistry. 2007; 50(4):641-662.

[0282] 25. Petros AM, Nettesheim DG, Wang Y, Olejniczak ET, Meadows RP, Mack J, Swift K, Matayoshi ED, Zhang H, Thompson CB and Fesik SW. Rationale for Bcl-xL/Bad peptide complex formation from structure, mutagenesis, and biophysical studies. Protein science : a publication of the Protein Society. 2000; 9(12):2528-2534.

[0283] 26. Boisvert-Adamo K and Aplin AE. Mutant B-RAF mediates resistance to anoikis via Bad and Bim. Oncogene. 2008; 27(23):3301-3312.

[0284] 27. Seow HF, Yip WK, Loh HW, Ithnin H, Por P and Rohaizak M. Immunohistochemical detection of phospho-Akt, phospho-BAD, HER2 and oestrogen receptors alpha and beta in Malaysian breast cancer patients. Pathology oncology research : POR. 2010; 16(2):239-248.

[0285] 28. Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, Shimada M, Takahashi M, Kamazawa S, Sato S, Akeshima R and Terakawa N. Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2001; 7(4):892-895.

[0286] 29. Datta SR, Brunet A and Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. Genes & development.

1999; 13(22):2905-2927.

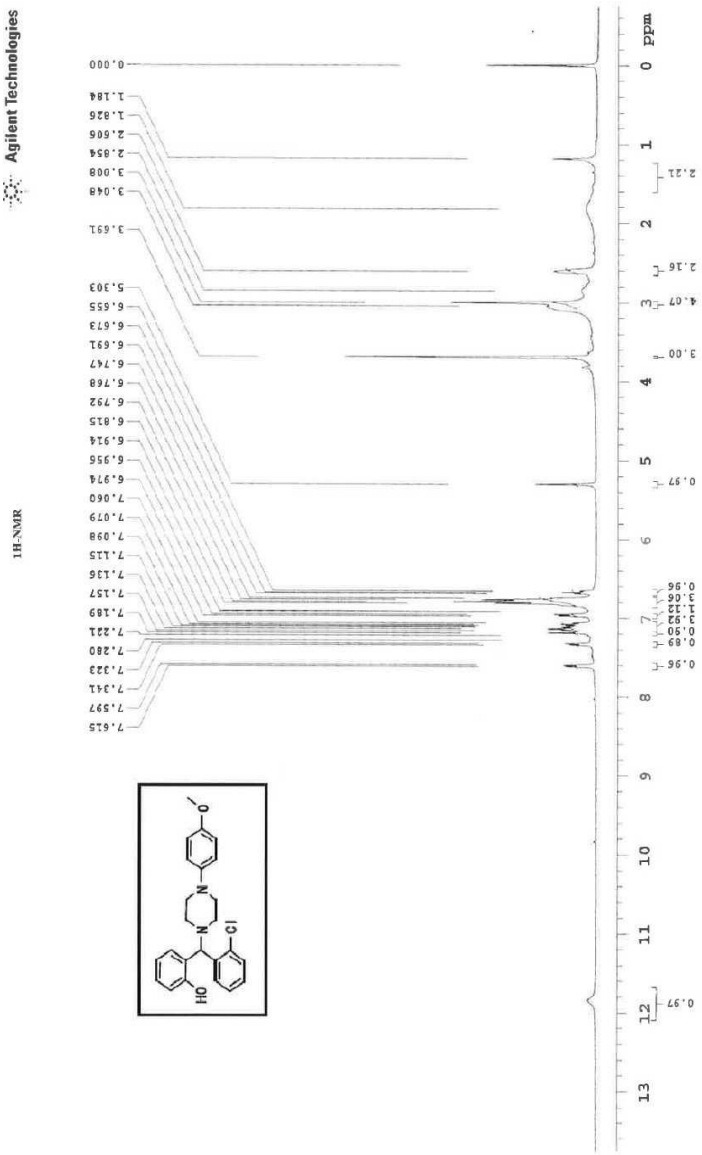
[0287] 30. Pandey V, Wu ZS, Zhang M, Li R, Zhang J, Zhu T, et al. Trefoil factor 3 promotes metastatic seeding and predicts poor survival outcome of patients with mammary carcinoma. Breast Cancer Res. 2014;16(5):429.

[0288] 31. Wang XN, Wang SJ, Pandey V, Chen P, Li Q, Wu ZS, et al. Trefoil factor 3 as a novel biomarker to distinguish between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Medicine (Baltimore). 2015;94(20):e860.

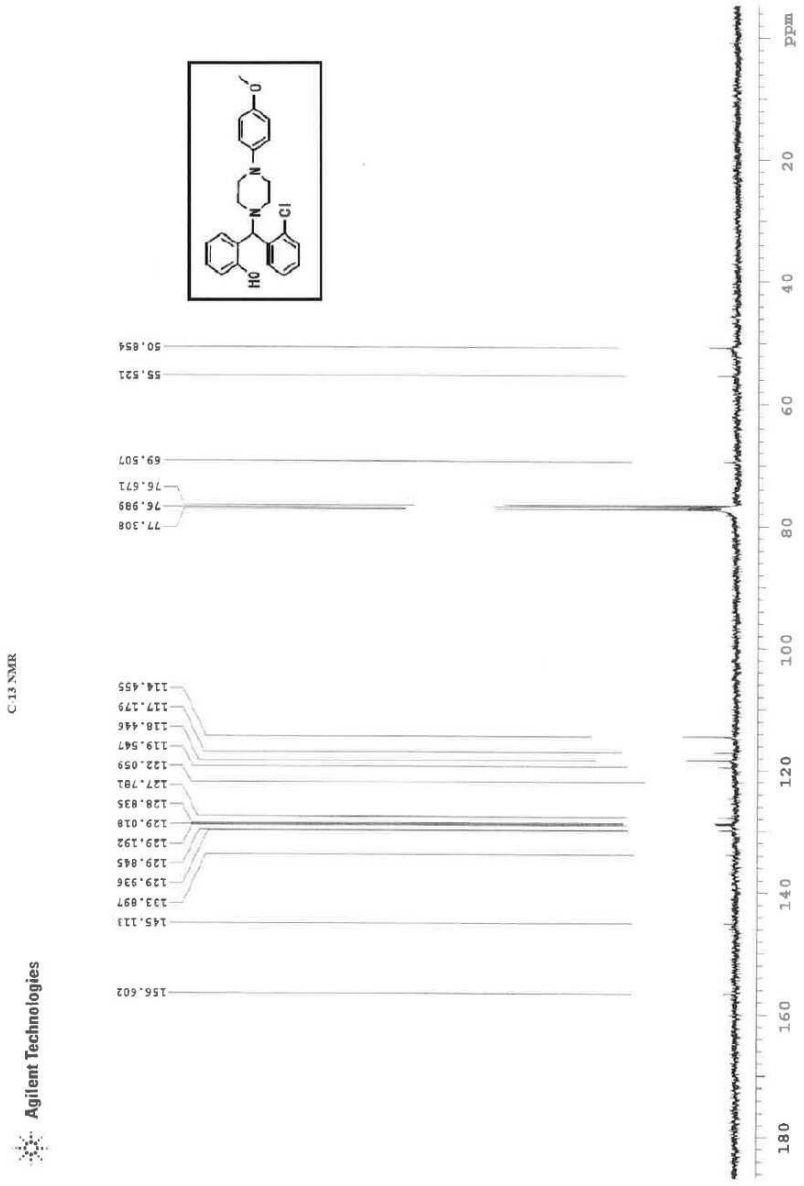
[0289] 32. You M, Chen Y, Chong Q, Wu M, Pandey V, Chen R, et al. Trefoil factor 3 mediation of oncogenicity and chemoresistance in hepatocellular carcinoma is AKT-BCL-2 dependent. Oncotarget. 2017.

도면

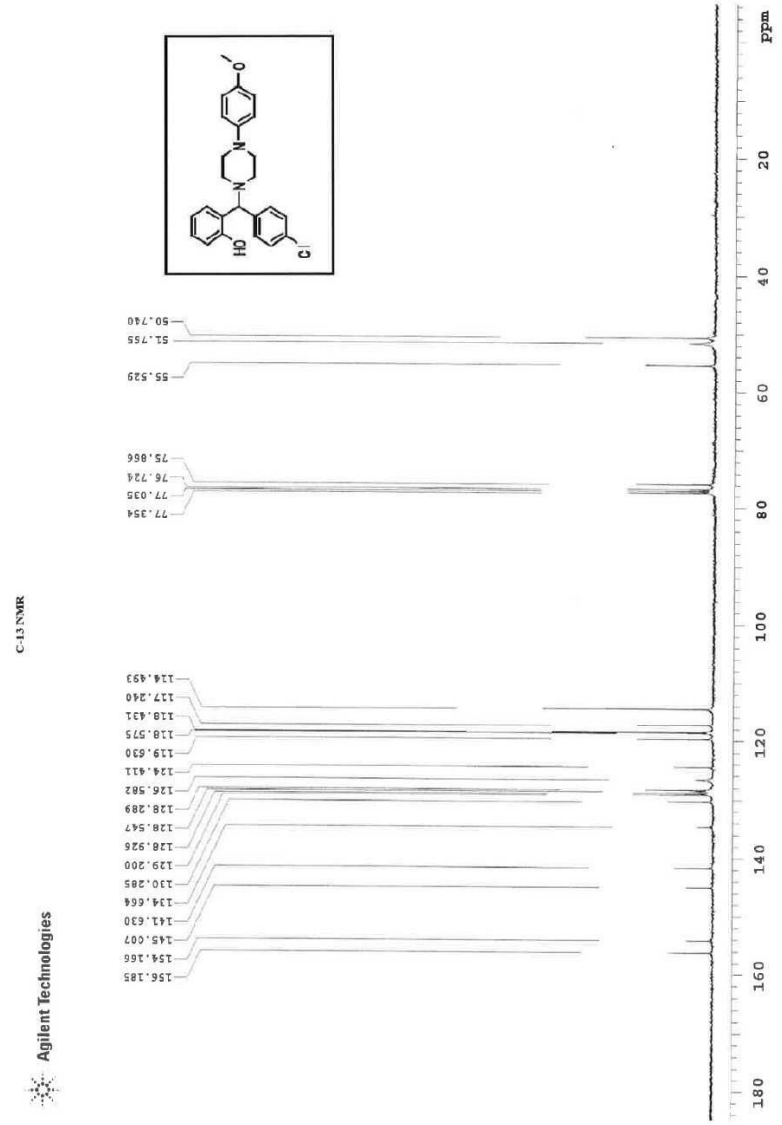
도면1a



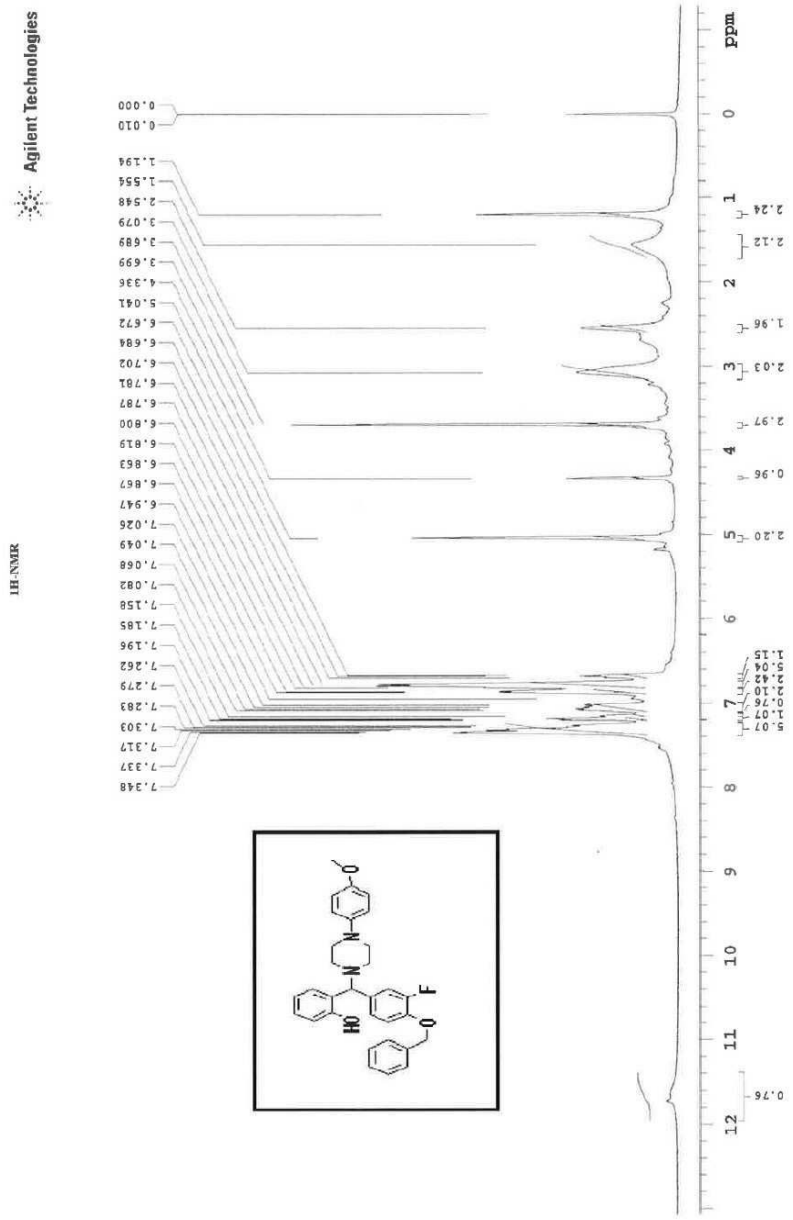
도면1b


C 13 NMR
Agilent Technologies
ppm
20
40
60
80
100
120
140
160
180
50.854
55.521
69.507
76.671
76.989
77.308
114.455
117.179
118.446
119.547
122.059
127.781
128.835
129.018
129.192
129.845
129.936
133.097
145.113
156.602
HO
Cl
N
O

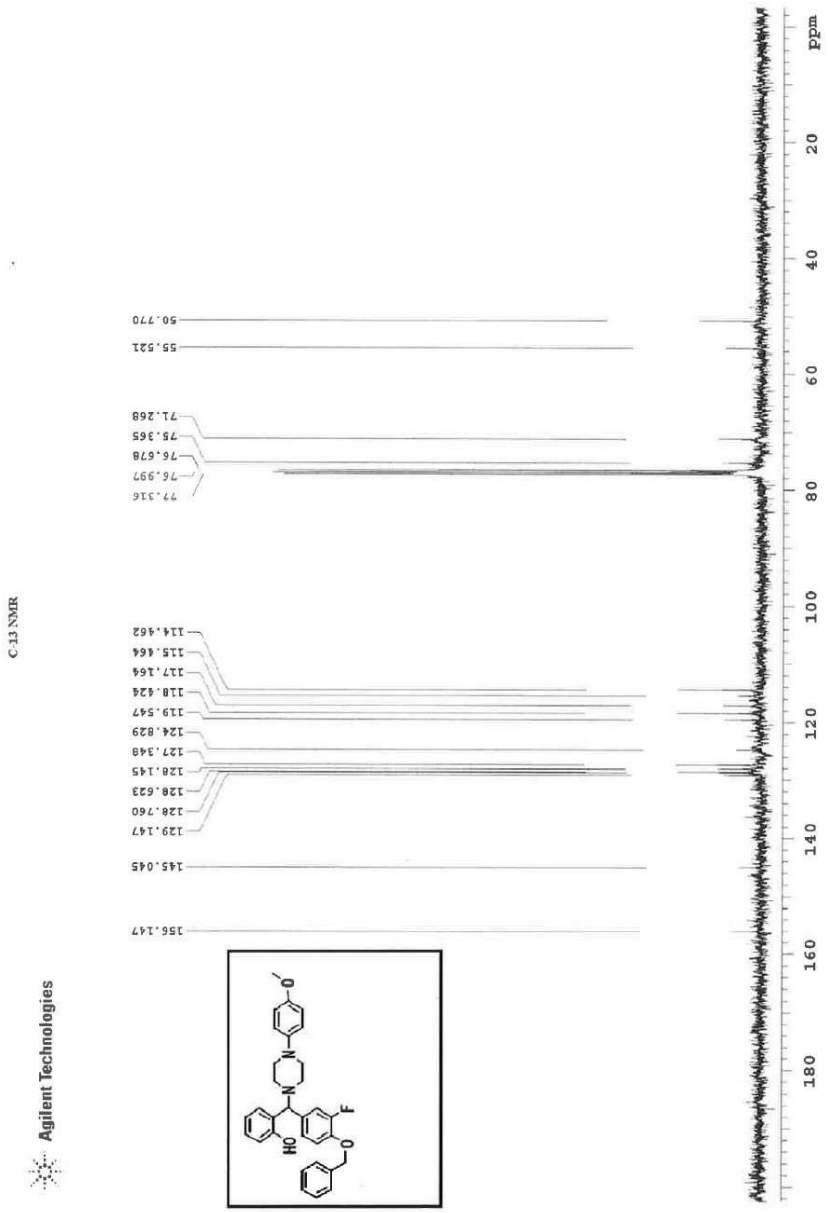
도면2


C-13 NMR
Agilent Technologies
ppm
20
40
60
80
100
120
140
160
180
50.740
51.755
55.529
75.866
76.724
77.035
77.354
114.493
117.240
118.431
118.575
119.630
124.411
126.582
128.289
128.547
128.926
129.200
130.285
134.664
141.630
145.007
154.166
156.185
O
N
N
OH
Cl

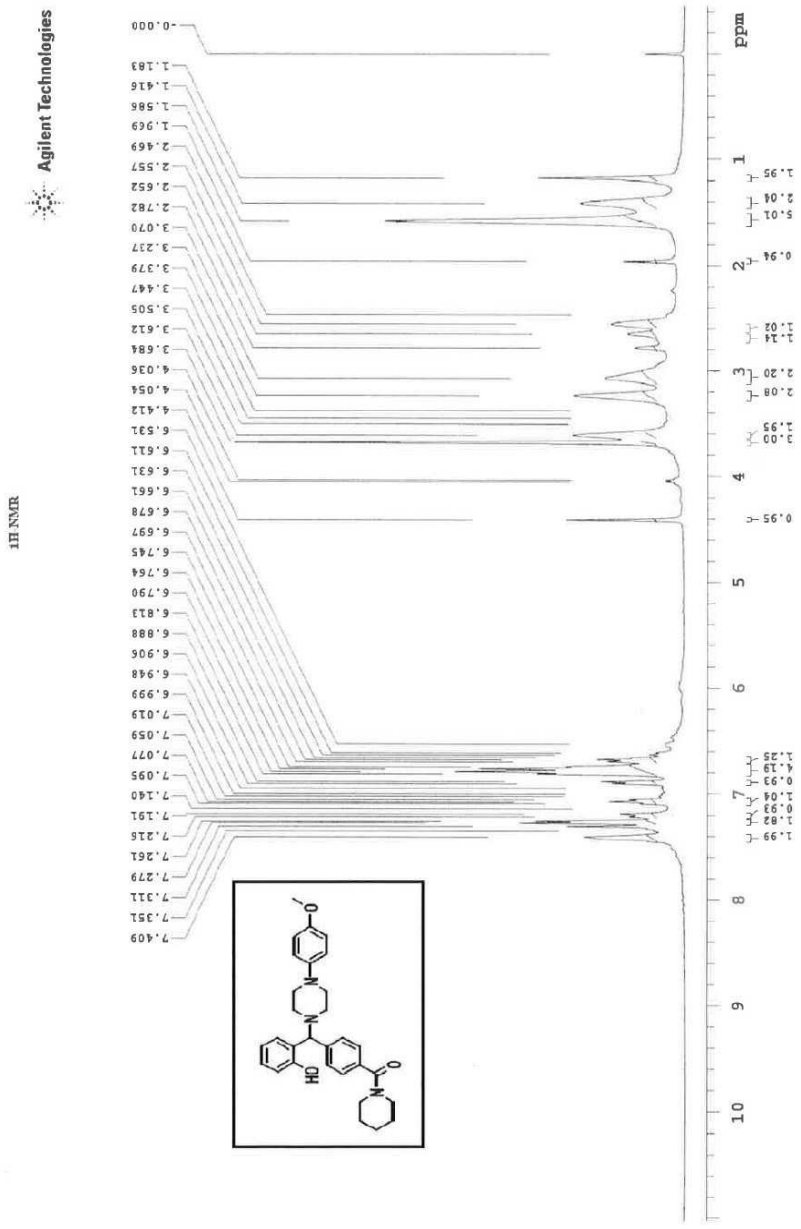
도면3a



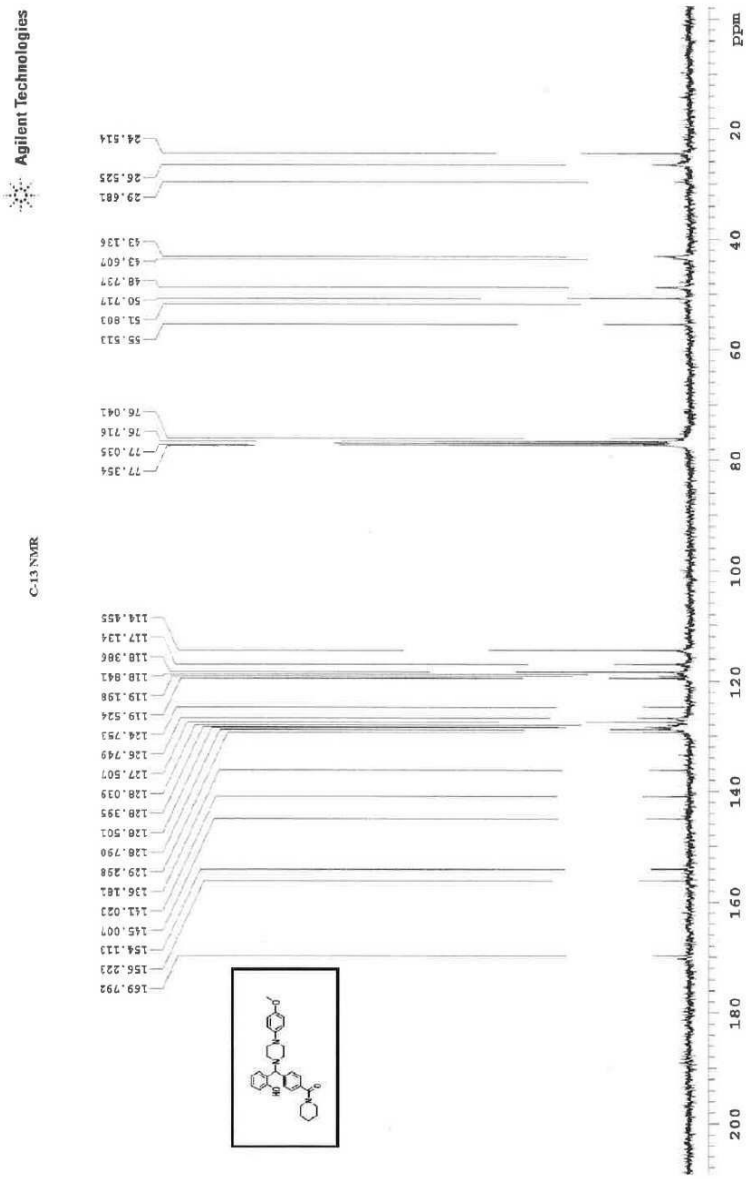
도면3b


C 13 NMR
Agilent Technologies
ppm
20
40
60
80
100
120
140
160
180
50.770
55.521
71.268
75.365
76.678
76.997
77.316
114.462
115.464
117.164
118.424
119.547
124.829
127.348
128.145
128.623
128.760
129.147
145.045
156.147
F
O
HO
N

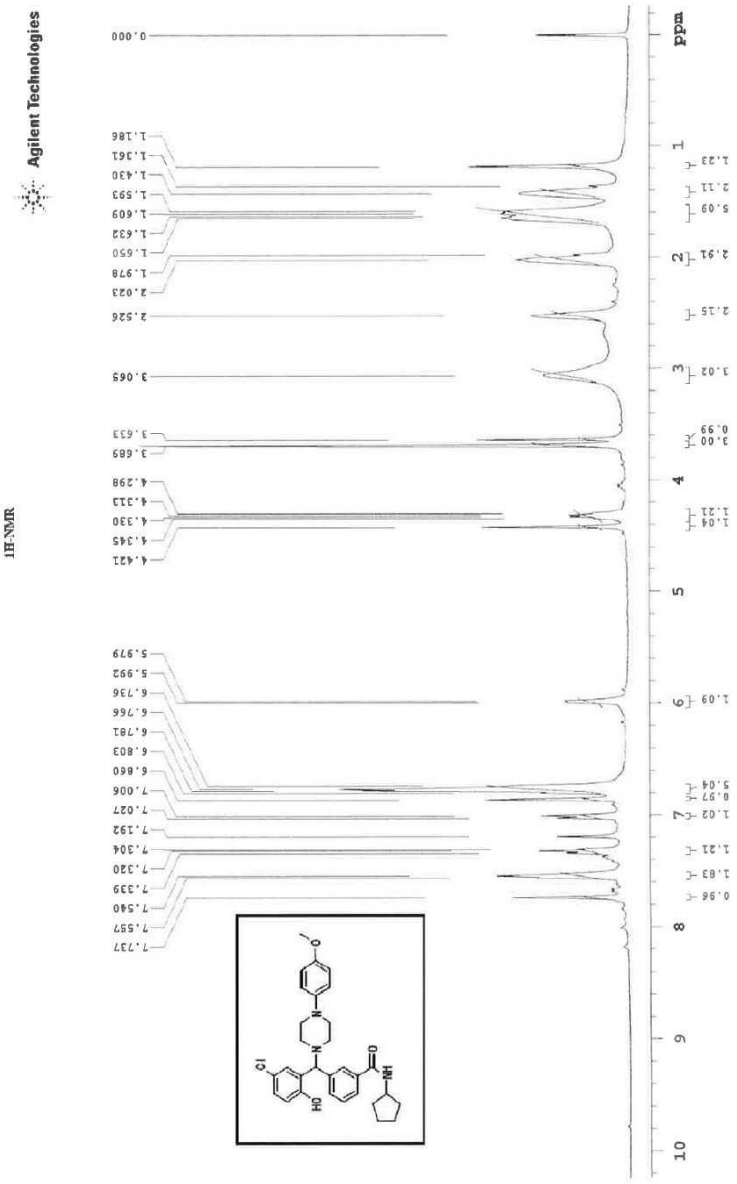
도면4a



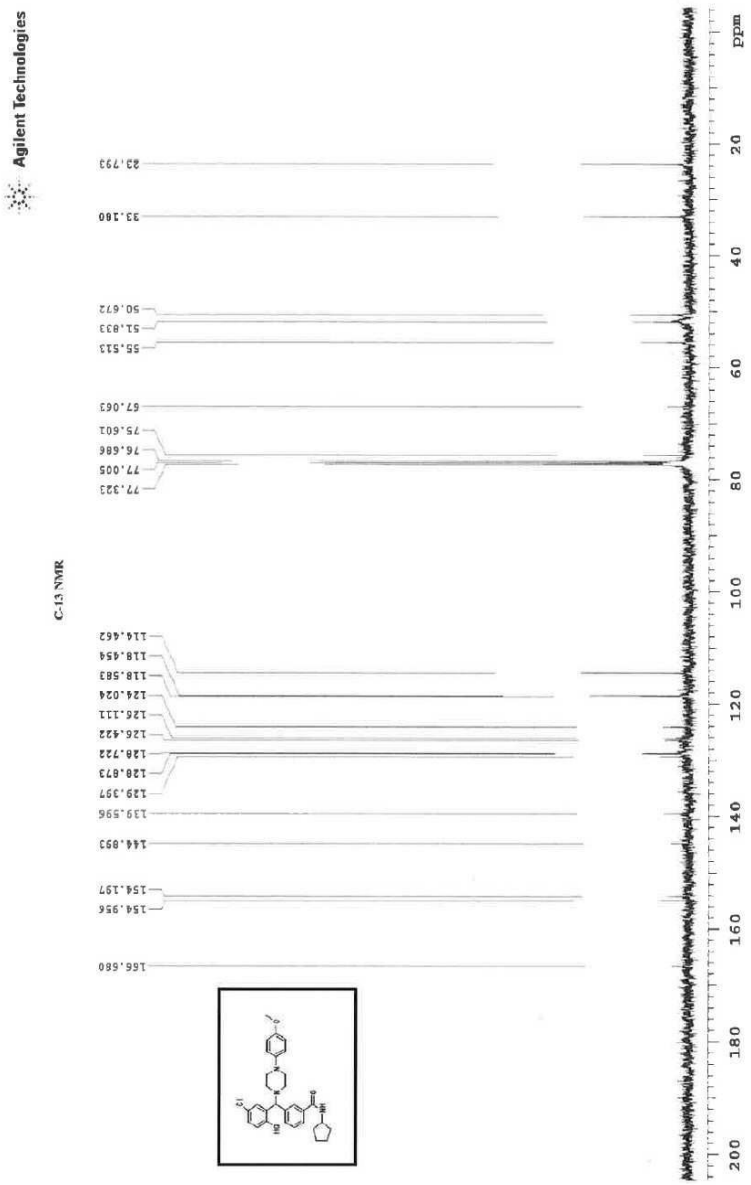
도면4b


Agilent Technologies
C-13 NMR
24.514
26.525
29.681
43.136
43.607
48.737
50.717
51.803
55.513
76.041
76.716
77.035
77.354
114.455
117.134
118.386
118.841
119.198
119.524
124.753
126.749
127.507
128.039
128.395
128.501
128.790
129.358
136.181
141.023
145.007
154.113
156.223
159.792
ppm
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200

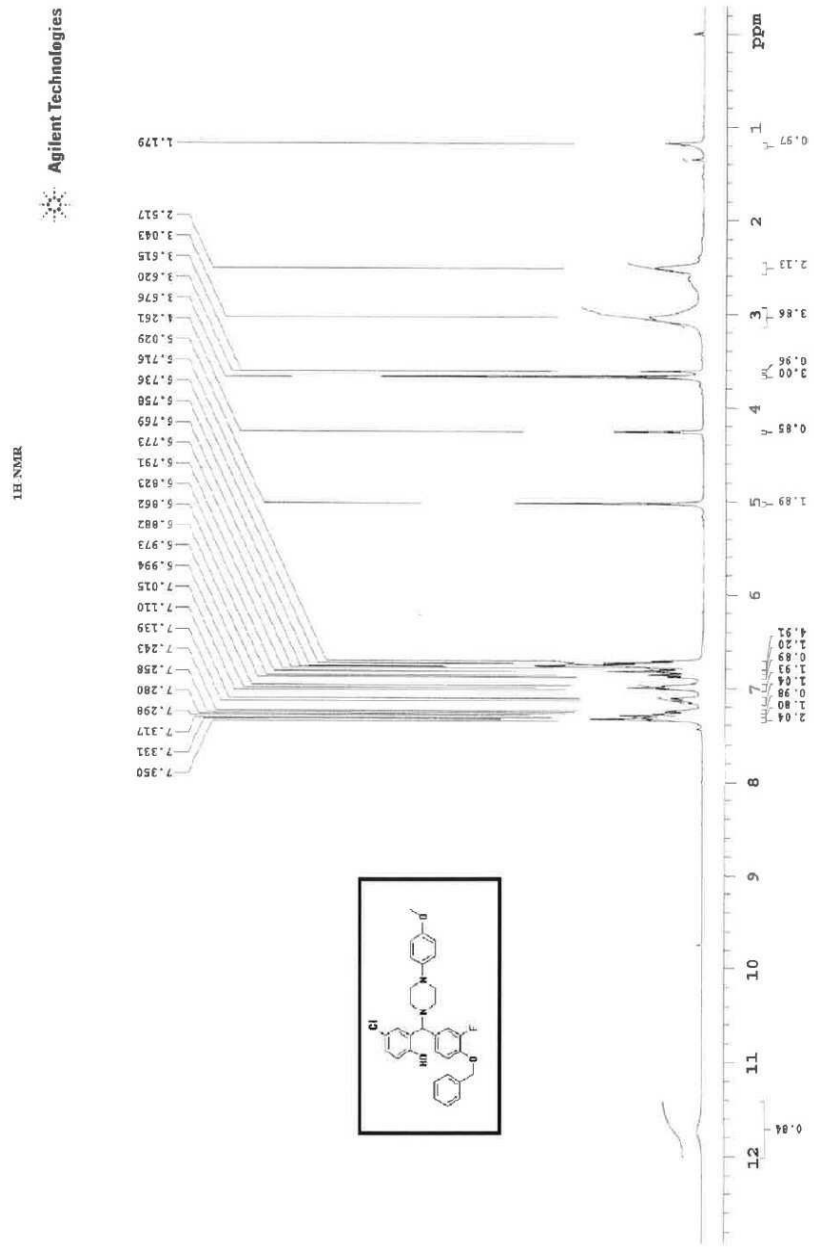
도면5a


Agilent Technologies
1H-NMR
ppm
0.000
1.186
1.361
1.430
1.593
1.609
1.632
1.650
1.978
2.023
2.526
3.065
3.633
3.689
4.298
4.313
4.330
4.345
4.421
5.979
5.992
6.736
6.766
6.781
6.803
6.860
7.006
7.027
7.192
7.304
7.320
7.339
7.540
7.557
7.737
1.23
2.11
5.09
2.91
2.15
3.02
3.00
0.99
1.04
1.21
1.09
5.04
0.97
1.02
1.21
1.83
0.96
Cl
HO
O
NH
N

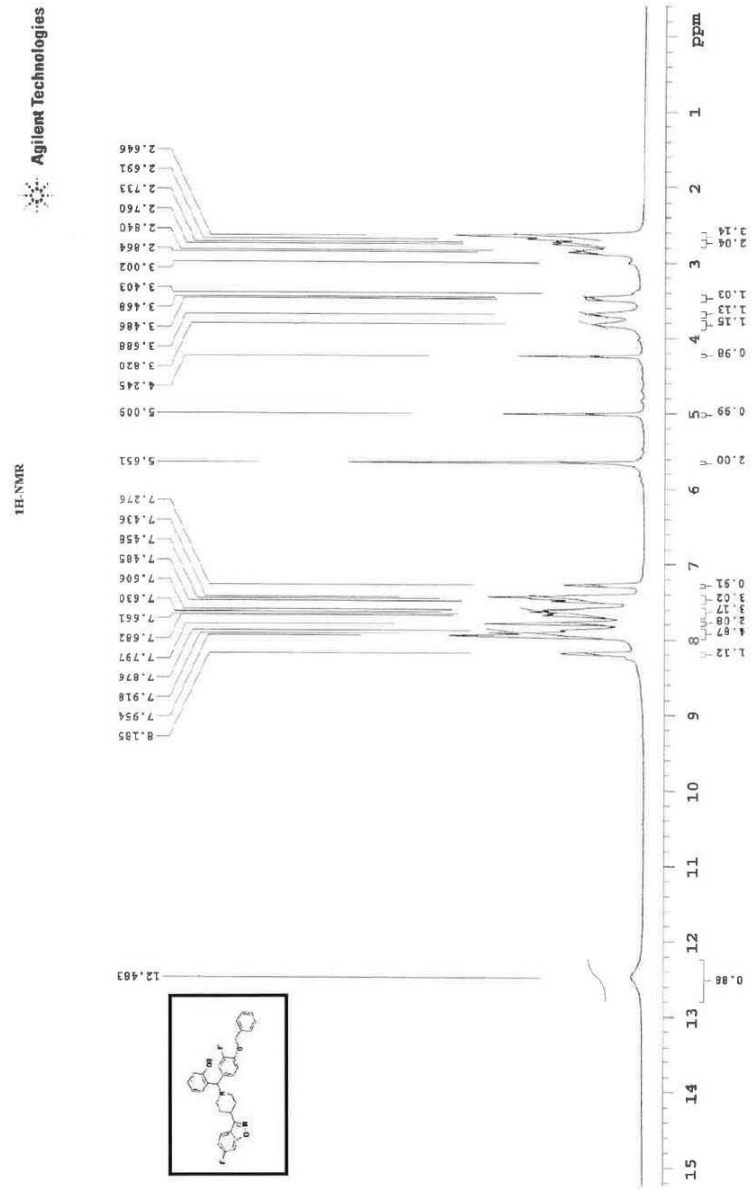
도면5b


Agilent Technologies
C-13 NMR
ppm
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
33.793
33.180
50.672
51.833
55.513
67.063
75.603
76.686
77.005
77.323
116.462
118.454
118.583
126.024
126.111
126.422
128.723
128.873
129.397
139.596
144.093
154.197
154.956
166.680

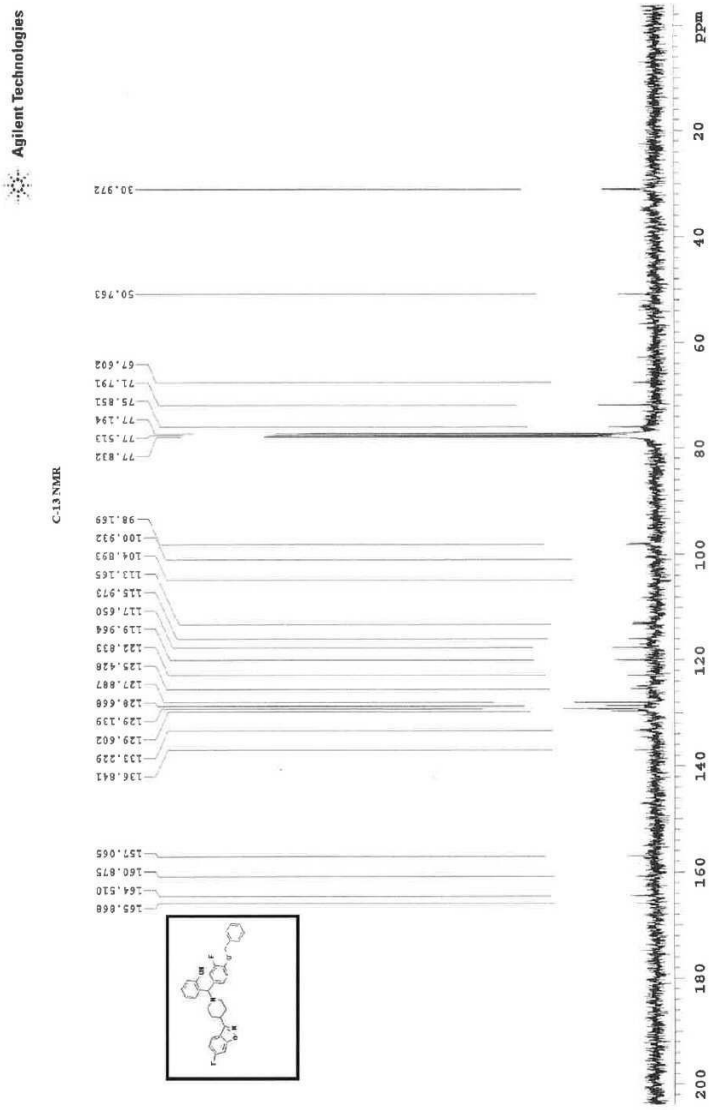
도면6



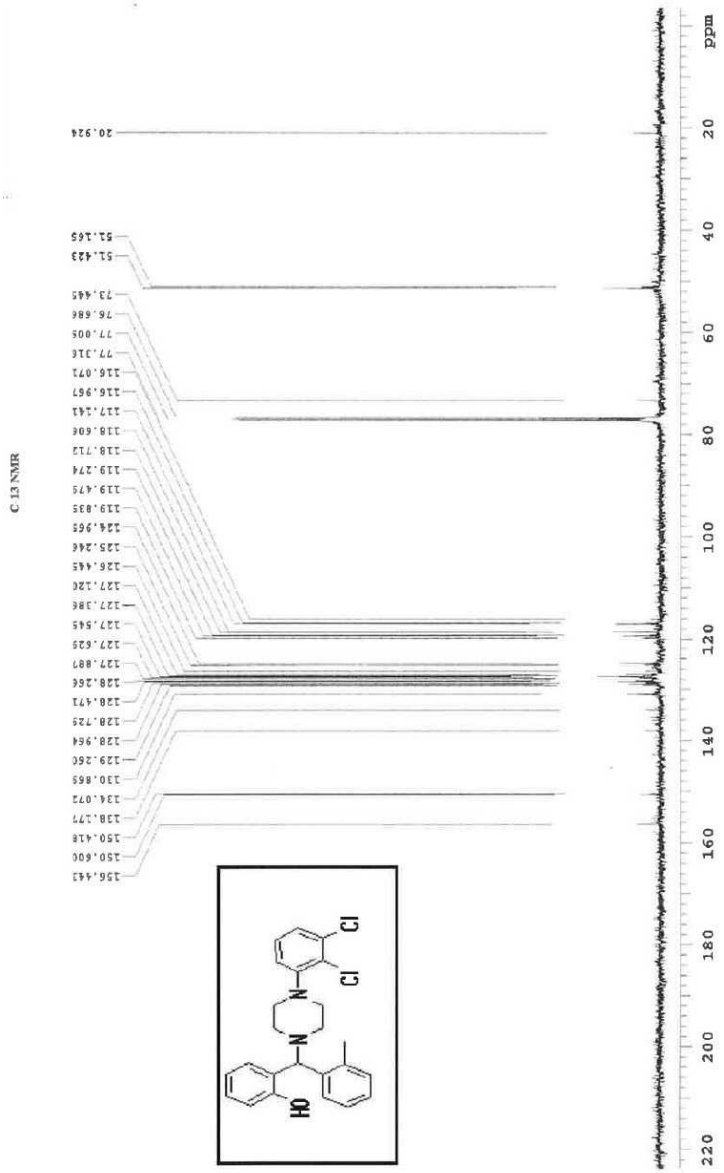
도면7a



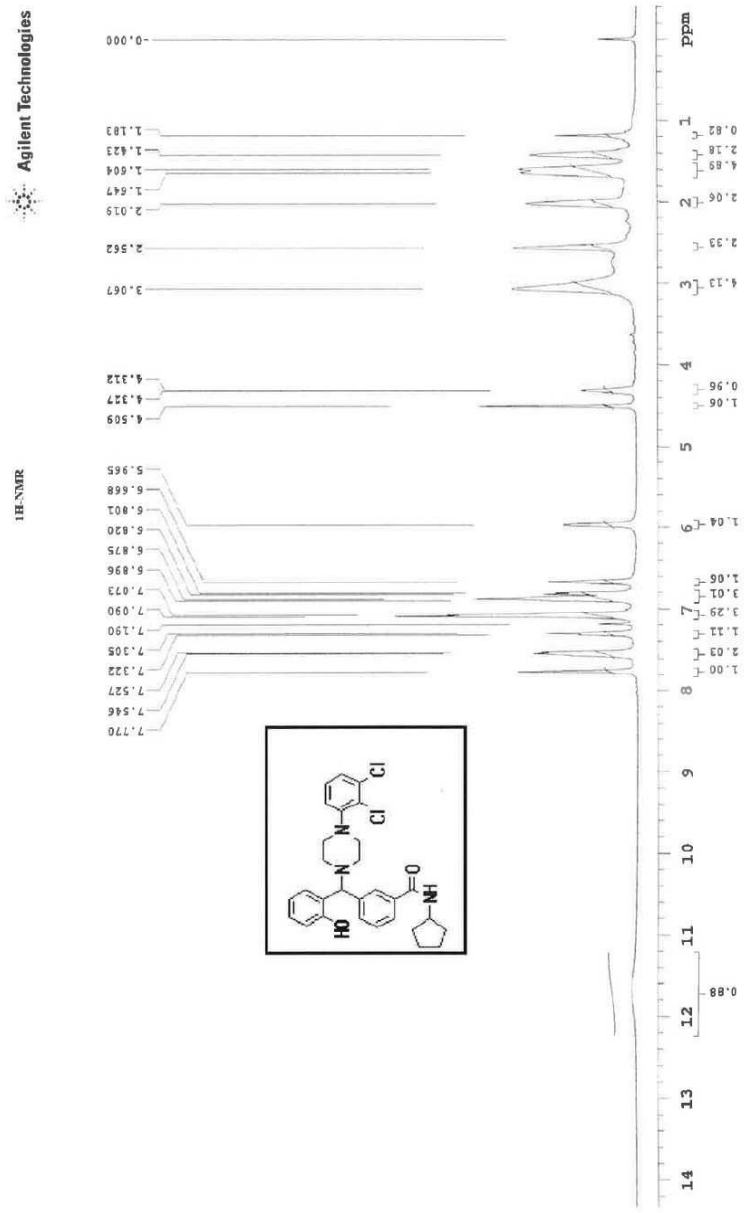
도면7b



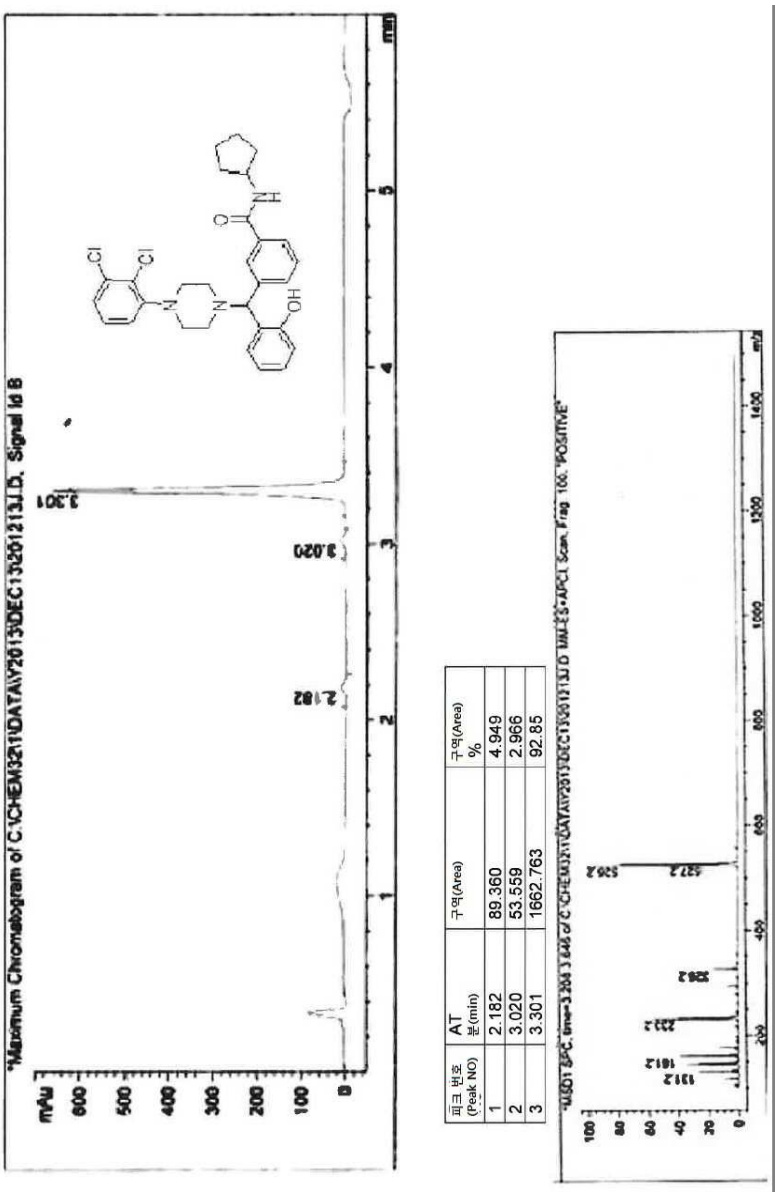
도면8



도면9a

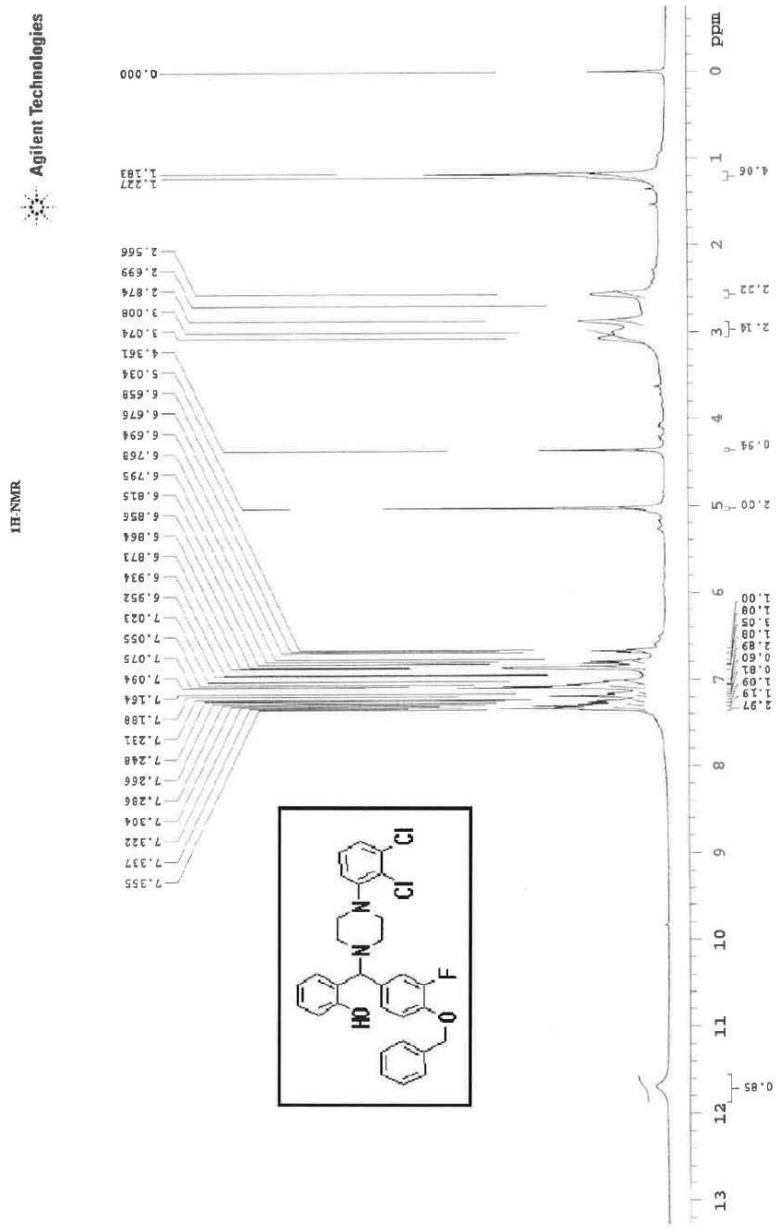


도면9b



피크 번호 (Peak NO)	AT 분(min)	구역(Area)	구역(Area) %
1	2.182	89.360	4.949
2	3.020	53.559	2.966
3	3.301	1662.763	92.85

도면10



도면11

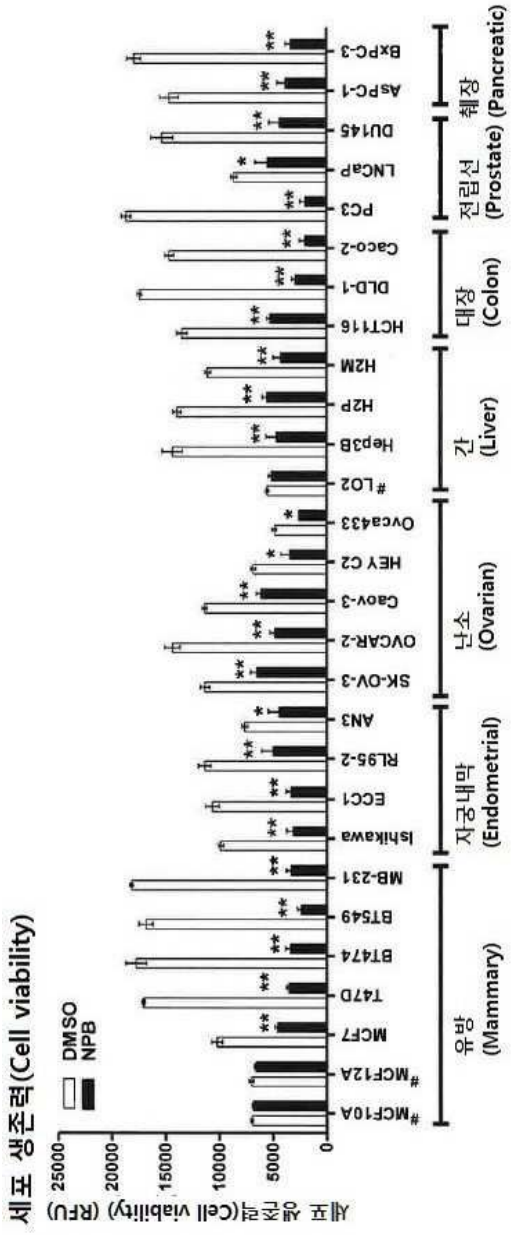
암 세포주의 범위에서 NPB의 IC_{50} 값

세포주의 패널(Panel of cell lines)		NPB (μM)	
조직(Tissue)	세포(Cells)	IC_{50}^	±SD
유방 (Mammary)	#MCF10A	NV	NV
	#MCF12A	NV	NV
	MCF7	6.5	1.06
	T47D	7.24	1.91
	BT474	5.31	2.04
	BT549	4.88	1.31
	MDA-MB-231	6.94	1.86
자궁내막 (Endometrial)	Ishikawa	7.51	2.08
	ECC1	2.61	0.97
	RL95-2	6.38	1.85
	AN3	11.37	2.61
난소 (Ovarian)	SK-OV-3	7.34	2.03
	OVCAR-2	4.21	1.74
	Caov-3	3.95	0.93
	HEY C2	6.82	1.94
	Ovca433	9.79	2.48
간세포 (Hepatocellular)	#LO2	NV	NV
	Hep3B	6.94	1.07
	H2P	4.18	0.83
	H2M	5.57	2.61
대장 (Colon)	HCT116	7.29	2.02
	DLD-1	2.46	0.91
	Caco-2	3.08	0.76
전립선 (Prostate)	PC3	3.77	1.51
	LNCaP	8.02	3.3
	DU145	6.99	1.72
췌장 (Pancreatic)	AsPC-1	3.83	1.14
	BxPC-3	7.25	2.09

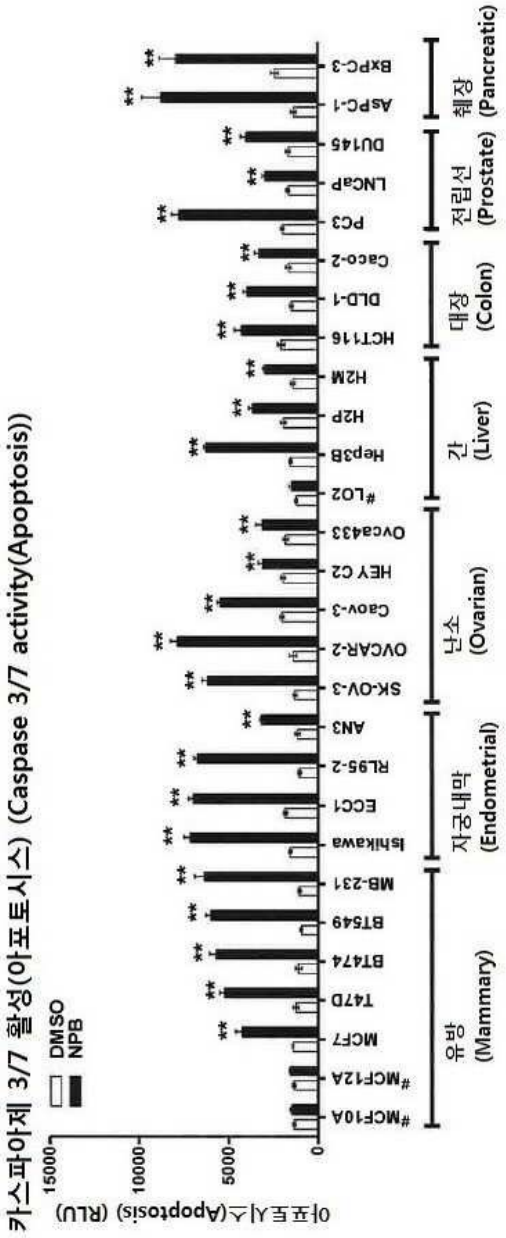
주석(Note): NV, 값 없음(No value); #, 정상 세포;

^IC_{50} 값은 GraphPad Prism 소프트웨어(5.0 버전)를 사용하여 계산된다. 세포 생존력은 AlamarBlue® 세포 생존력 분석을 사용하여 측정된다.

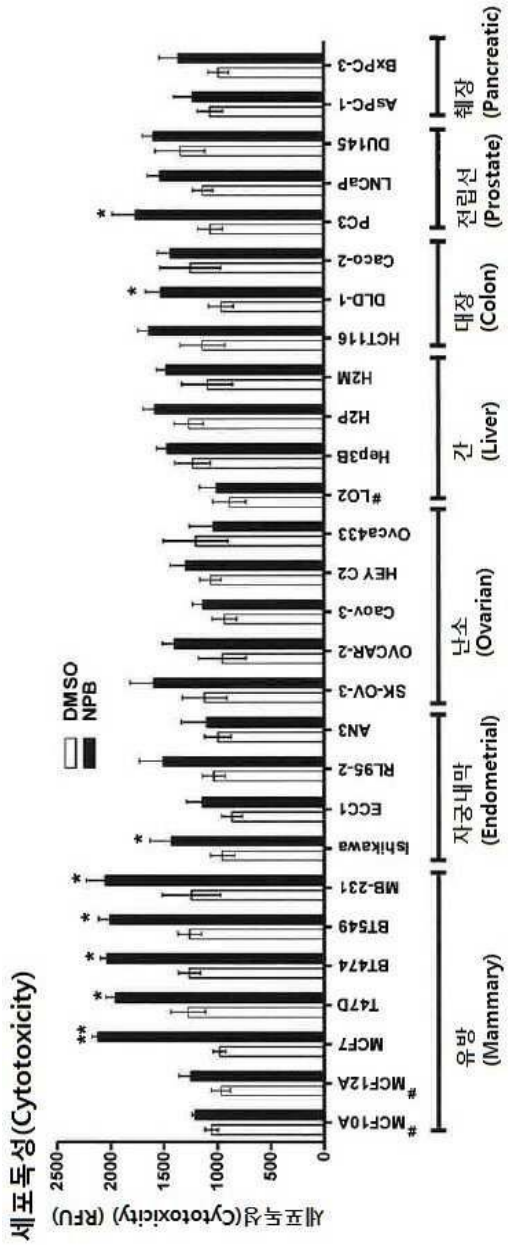
도면12a


세포 생존력(Cell viability)
DMSO
NPB
25000
20000
15000
10000
5000
0
#MCF10A
#MCF12A
MCF7
T47D
BT474
BT549
MB-231
Ishikawa
ECC1
RL95-2
AN3
SK-OV-3
OVCAR-2
Caov-3
HEY C2
Ovca433
#LO2
Hep3B
H2P
H2M
HCT116
DLD-1
Caco-2
PC3
LNCaP
DU145
AsPC-1
BxPC-3
유방 (Mammary)
자궁내막 (Endometrial)
난소 (Ovarian)
간 (Liver)
대장 (Colon)
전립선 (Prostate)
췌장 (Pancreatic)

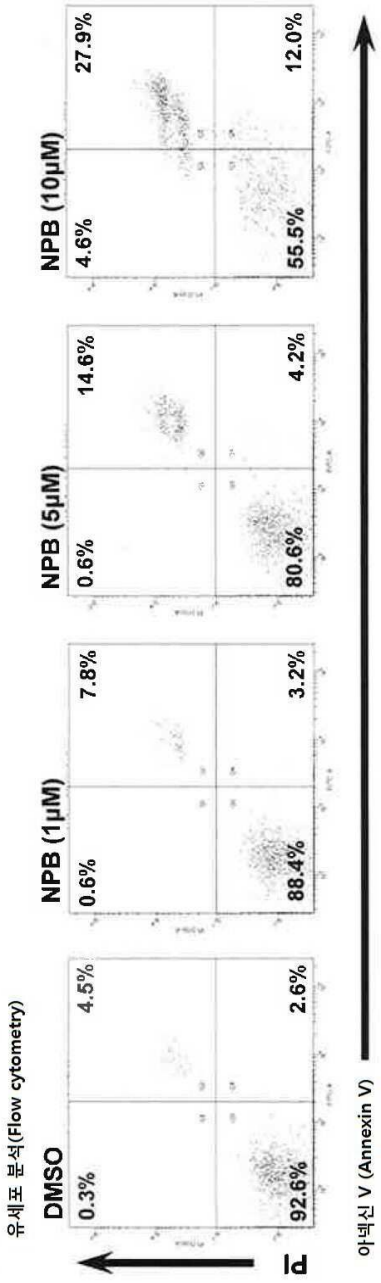
도면12b


카스파아제 3/7 활성(아포토시스) (Caspase 3/7 activity(Apoptosis))
DMSO
NPB
아포토시스(Apoptosis) (RLU)
15000
10000
5000
0
#MCF10A
#MCF12A
MCF7
T47D
BT474
BT549
MB-231
Ishikawa
ECC1
RL95-2
AN3
SK-OV-3
OVCAR-2
Caov-3
HEY C2
Ovca433
#LO2
Hep3B
H2P
H2M
HCT116
DLD-1
Caco-2
PC3
LNCaP
DU145
AsPC-1
BxPC-3
유방 (Mammary)
자궁내막 (Endometrial)
난소 (Ovarian)
간 (Liver)
대장 (Colon)
전립선 (Prostate)
췌장 (Pancreatic)

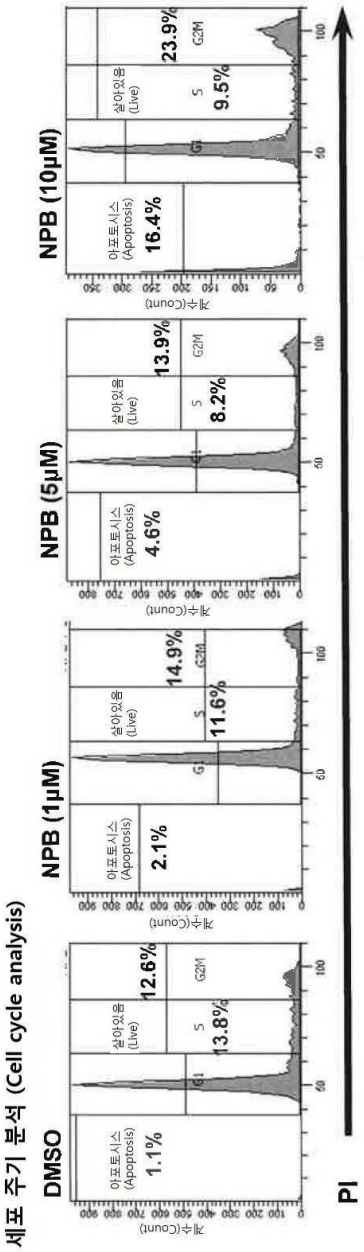
도면12c


세포독성(Cytotoxicity)
세포독성(Cytotoxicity) (RFU)
2500
2000
1500
1000
500
0
DMSO
NPB
#MCF10A
#MCF12A
MCF7
T47D
BT474
BT549
MB-231
Ishikawa
ECC1
RL95-2
AN3
SK-OV-3
OVCAR-2
Caov-3
HEY C2
Ovca433
#LO2
Hep3B
H2P
H2M
HCT116
DLD-1
Caco-2
PC3
LNCaP
DU145
AsPC-1
BxPC-3
유방 (Mammary)
자궁내막 (Endometrial)
난소 (Ovarian)
간 (Liver)
대장 (Colon)
전립선 (Prostate)
췌장 (Pancreatic)

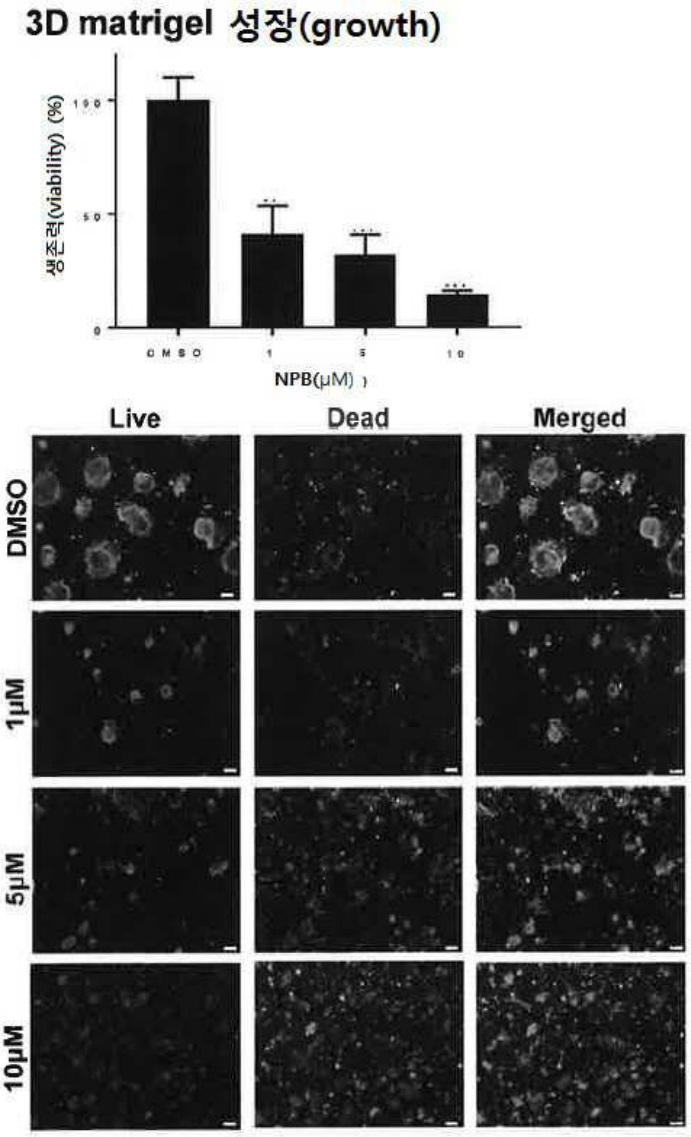
도면13a


유세포 분석(Flow cytometry)
DMSO
NPB (1μM)
NPB (5μM)
NPB (10μM)
0.3%
4.5%
92.6%
2.6%
0.6%
7.8%
88.4%
3.2%
0.6%
14.6%
80.6%
4.2%
4.6%
27.9%
55.5%
12.0%
PI
아넥신 V (Annexin V)

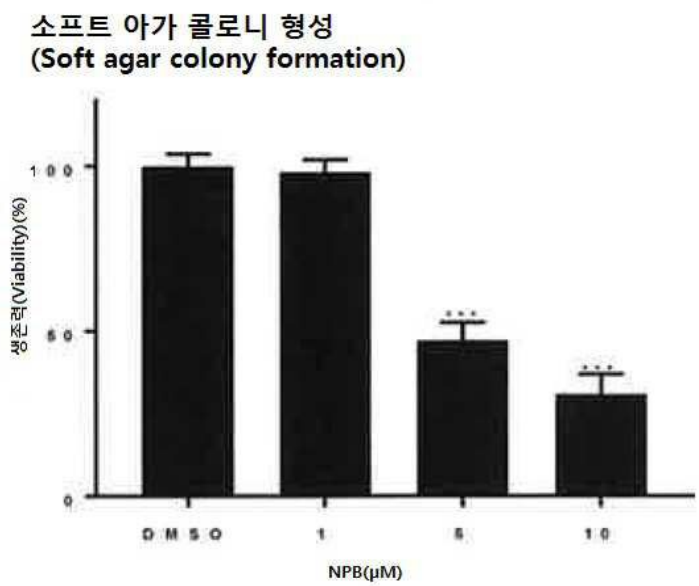
도면13b


세포 주기 분석 (Cell cycle analysis)
DMSO
NPB (1μM)
NPB (5μM)
NPB (10μM)
아포토시스 (Apoptosis)
1.1%
2.1%
4.6%
16.4%
살아있음 (Live)
12.6%
14.9%
13.9%
23.9%
G1
S
G2M
13.8%
11.6%
8.2%
9.5%
세포수(Count)
PI

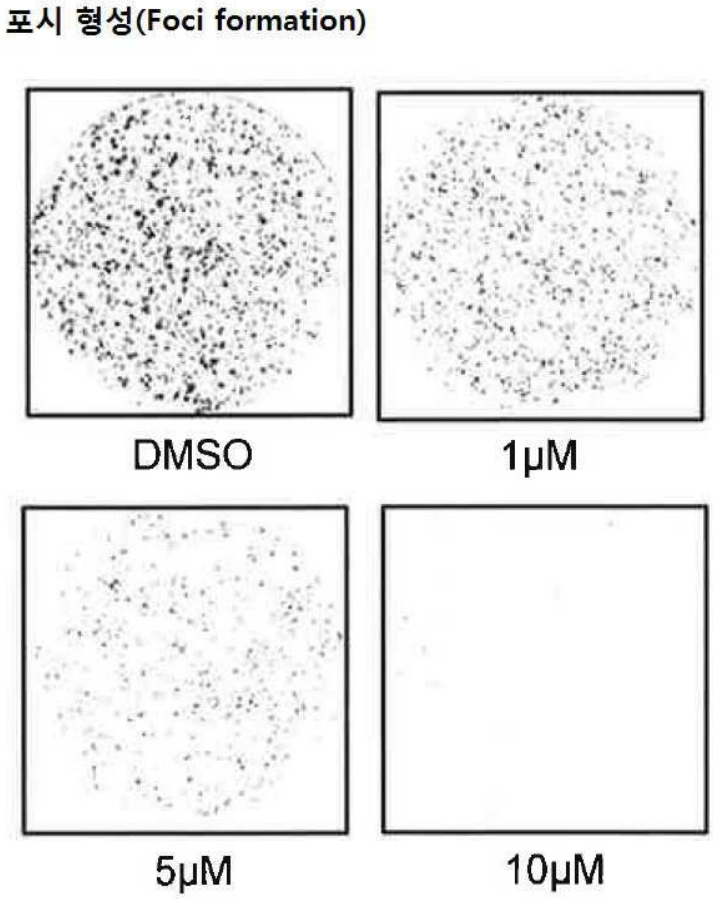
도면13c


3D matrigel 성장(growth)
생존력(viability) (%)
100
50
0
DMSO
1
5
10
NPB(μM)
Live
Dead
Merged
DMSO
1μM
5μM
10μM

도면13d

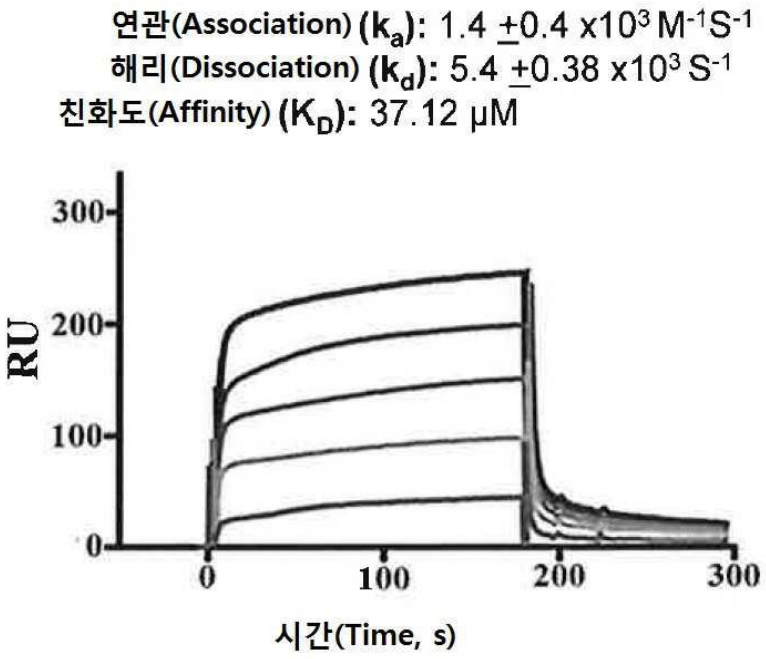

소프트 아가 콜로니 형성
(Soft agar colony formation)
생존력(Viability)(%)
100
50
0
***
***
DMSO
1
5
10
NPB(μM)

도면13e


포시 형성(Foci formation)
DMSO
1μM
5μM
10μM

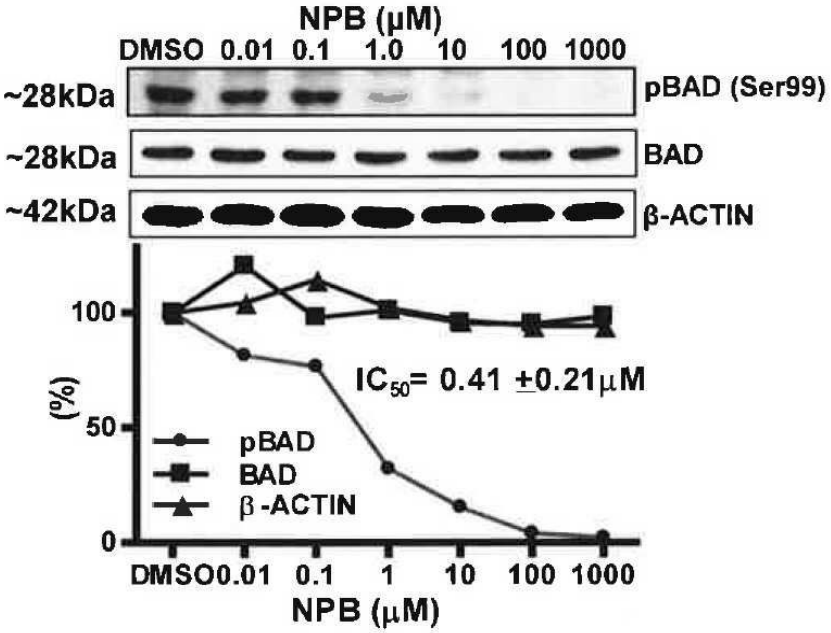
도면14a

표면 플라즈몬 공명(Surface Plasmon Resonance, SPR)



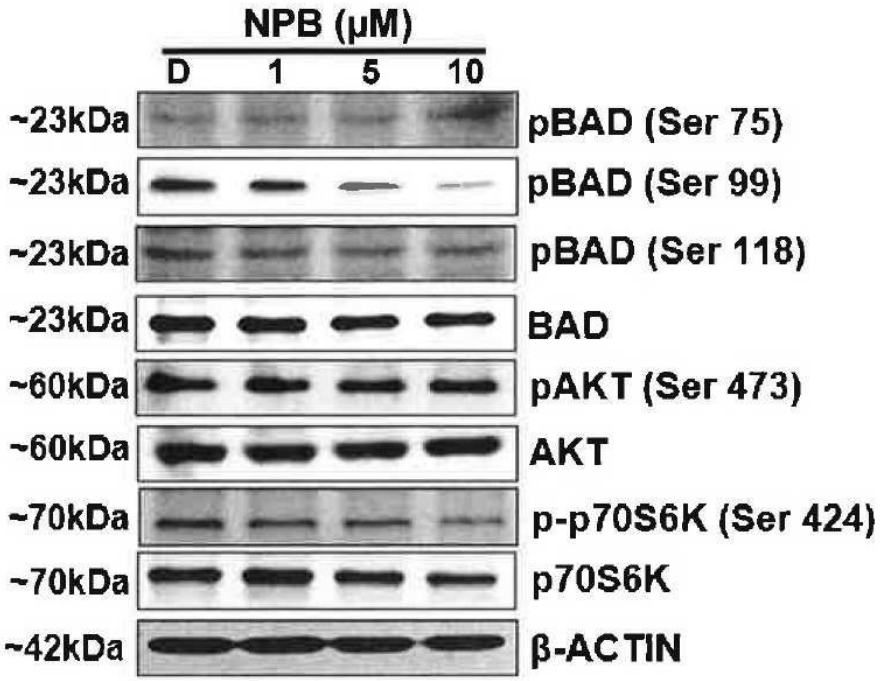
도면14b

웨스턴 블롯(Western blot)



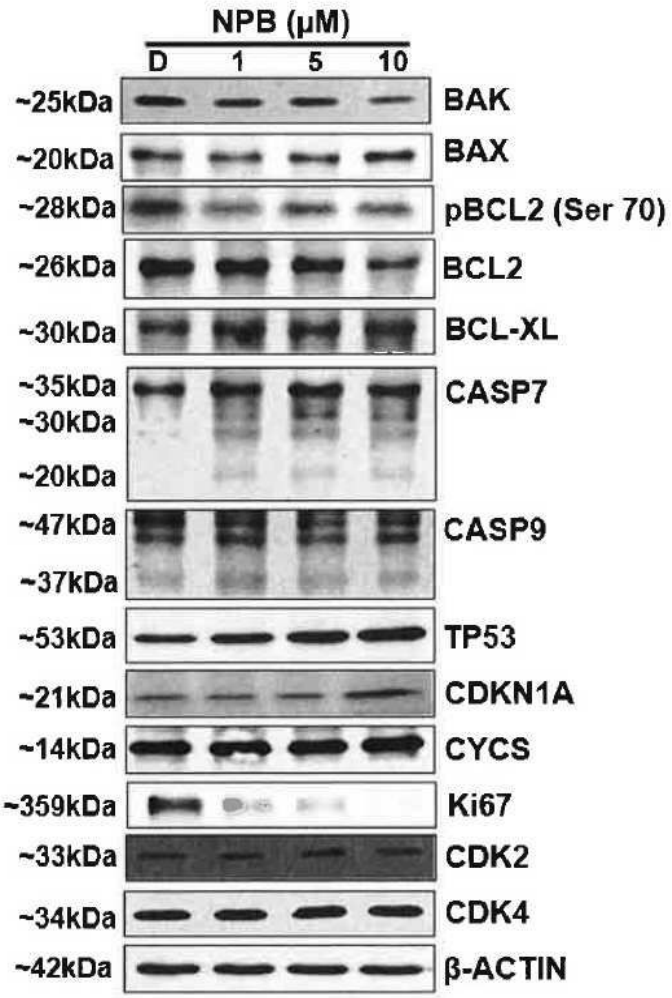
도면14c

웨스턴 블롯(Western blot)

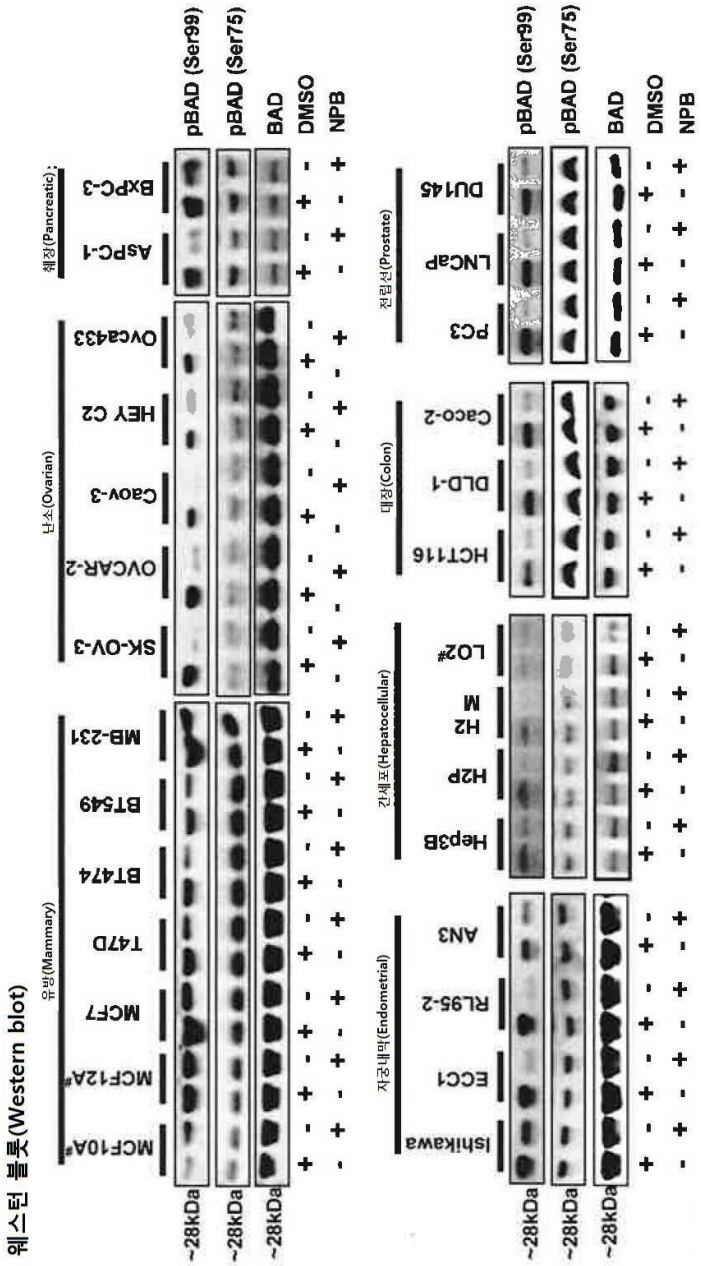


도면14d

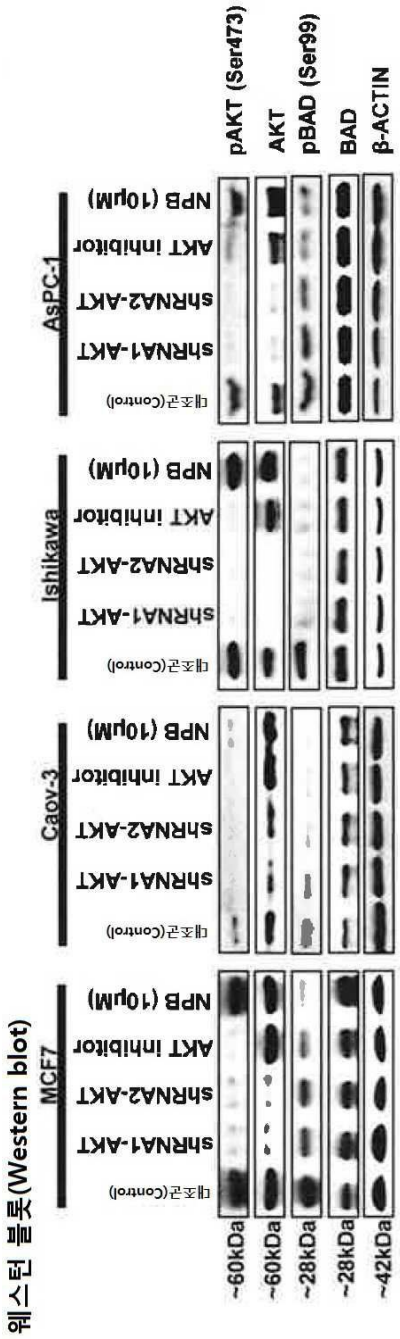
웨스턴 블롯(Western blot)



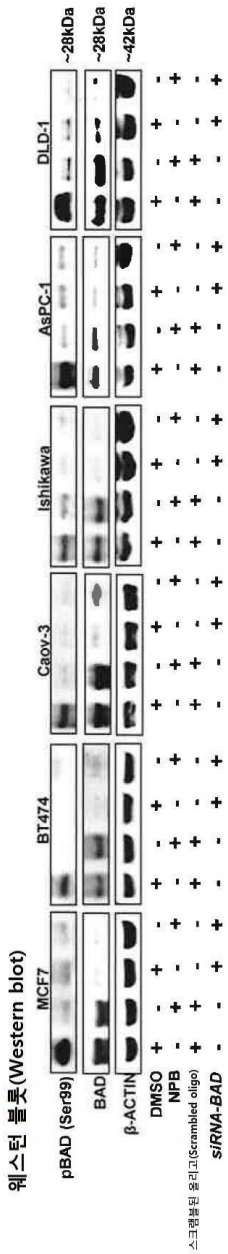
도면15a


웨스턴 블롯(Western blot)
유방(Mammary)
MCF10A*
MCF12A*
MCF7
T47D
BT474
BT549
MB-231
난소(Ovarian)
SK-OV-3
OVCAR-2
Caov-3
HEY C2
OVCA433
췌장(Pancreatic)
AsPC-1
BxPC-3
자궁내막(Endometrial)
Ishikawa
ECC1
RL95-2
AN3
간세포(Hepatocellular)
Hep3B
H2P
H2
M
LO2*
대장(Colon)
HCT116
DLD-1
Caco-2
전립선(Prostate)
PC3
LNCaP
DU145
~28kDa
pBAD (Ser99)
pBAD (Ser75)
BAD
DMSO
NPB

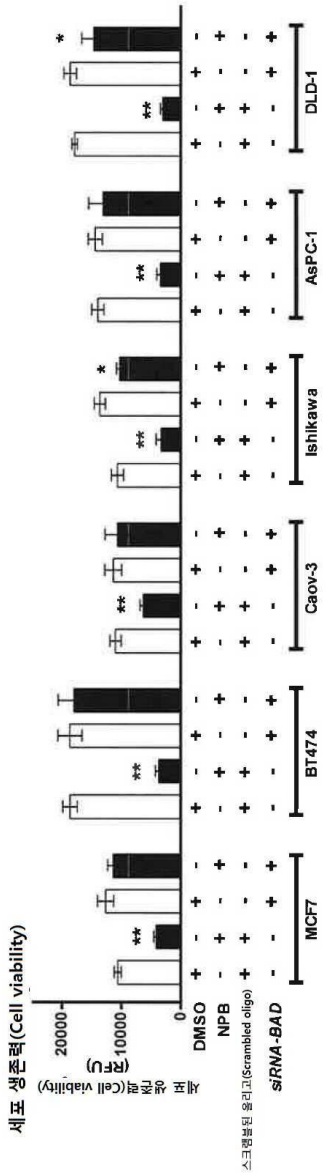
도면15b


웨스턴 블롯(Western blot)
MCF7
Caov-3
Ishikawa
AsPC-1
대조군(Control)
shRNA1-AKT
shRNA2-AKT
AKT inhibitor
NPB (10μM)
pAKT (Ser473)
AKT
pBAD (Ser99)
BAD
β-ACTIN
~60kDa
~60kDa
~28kDa
~28kDa
~42kDa

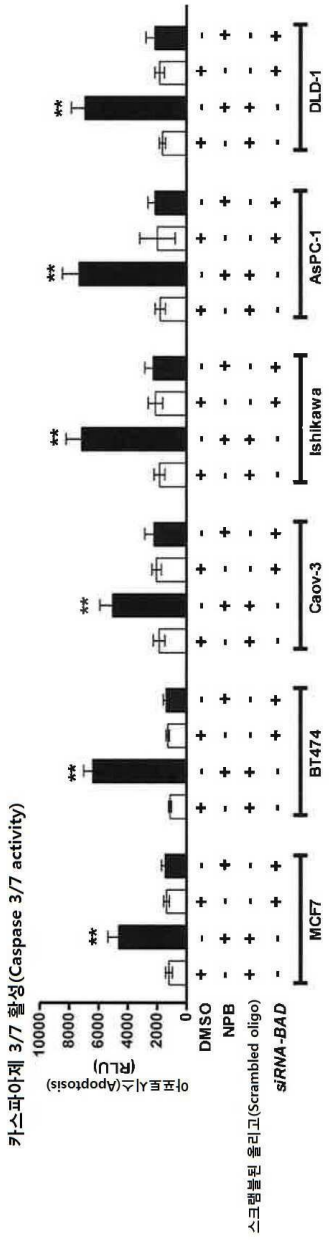
도면16a


웨스턴 블롯(Western blot)
MCF7
BT474
Caov-3
Ishikawa
AsPC-1
DLD-1
pBAD (Ser99)
BAD
β-ACTIN
~28kDa
~28kDa
~42kDa
DMSO
NPB
스크램블링 올리고(Scrambled oligo)
siRNA-BAD

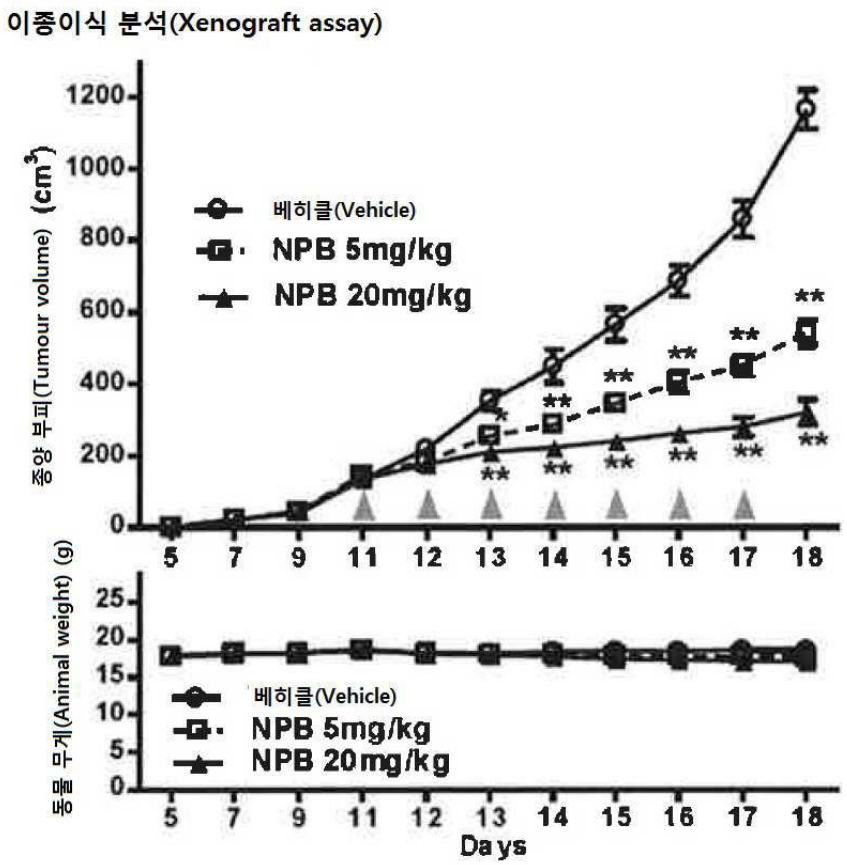
도면16b


세포 생존력(Cell viability)
20000
10000
0
세포 생존력(cell viability) (RFU)
DMSO
NPB
스크램블된 올리고(Scrambled oligo)
siRNA-BAD
MCF7
BT474
Caov-3
Ishikawa
AsPC-1
DLD-1

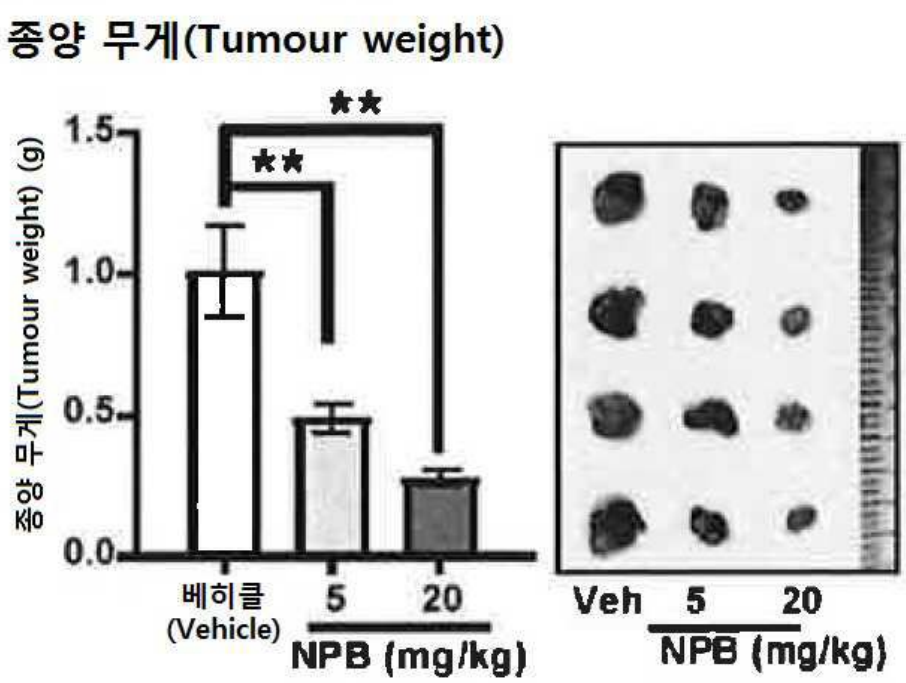
도면16c


카스파아제 3/7 활성(Caspase 3/7 activity)
약물로서스(Apoptosis)
(RLU)
10000
8000
6000
4000
2000
0
**
DMSO
NPB
스크램블된 올리고(Scrambled oligo)
siRNA-BAD
MCF7
BT474
Caov-3
Ishikawa
AsPC-1
DLD-1

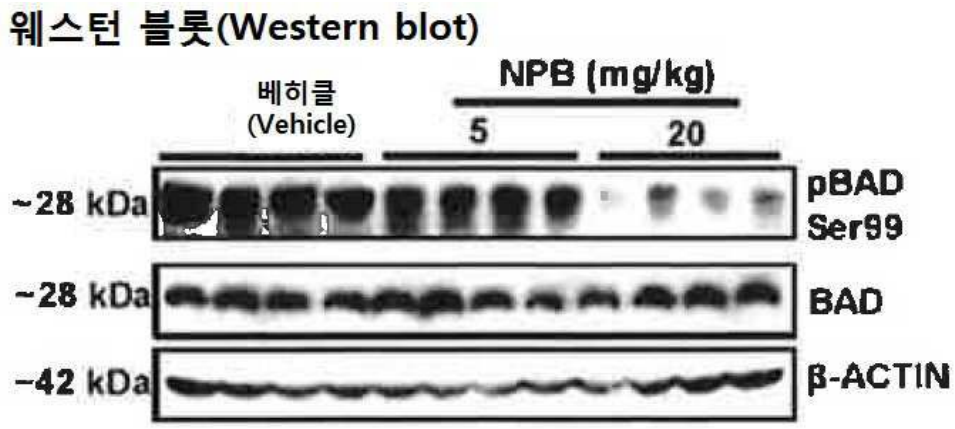
도면17a


이종이식 분석(Xenograft assay)
종양 부피(Tumour volume) (cm³)
베히클(Vehicle)
NPB 5mg/kg
NPB 20mg/kg
동물 무게(Animal weight) (g)
Days

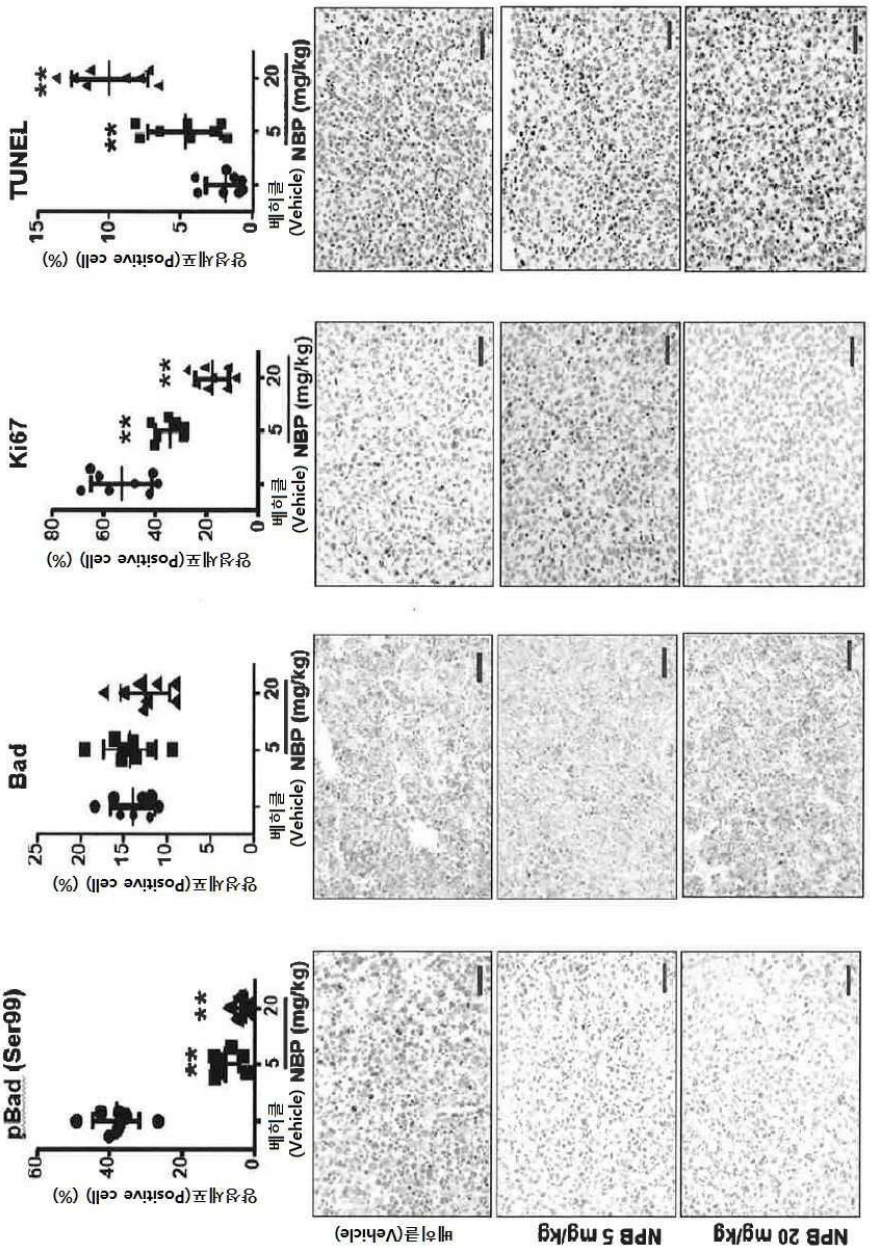
도면17b


종양 무게(Tumour weight)
종양 무게(Tumour weight) (g)
베히클
(Vehicle)
NPB (mg/kg)
Veh
NPB (mg/kg)

도면17c

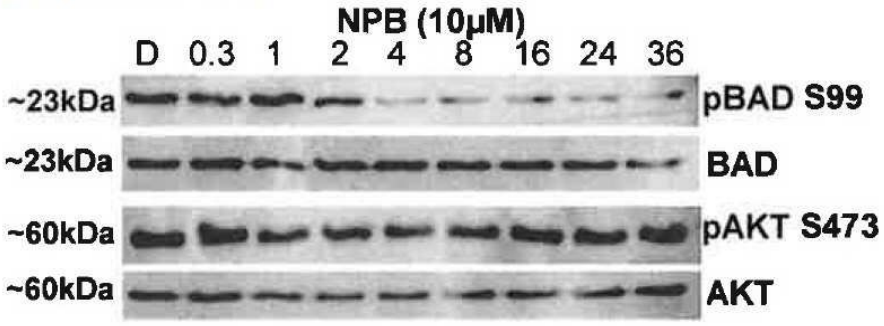

웨스턴 블롯(Western blot)
베히클
(Vehicle)
NPB (mg/kg)
5
20
~28 kDa
pBAD
Ser99
~28 kDa
BAD
~42 kDa
β-ACTIN

도면17d


TUNEL
Ki67
Bad
pBad (Ser99)
양성세포(Positive cell) (%)
베히클 (Vehicle)
NBP (mg/kg)
베히클(Vehicle)
NPB 5 mg/kg
NPB 20 mg/kg

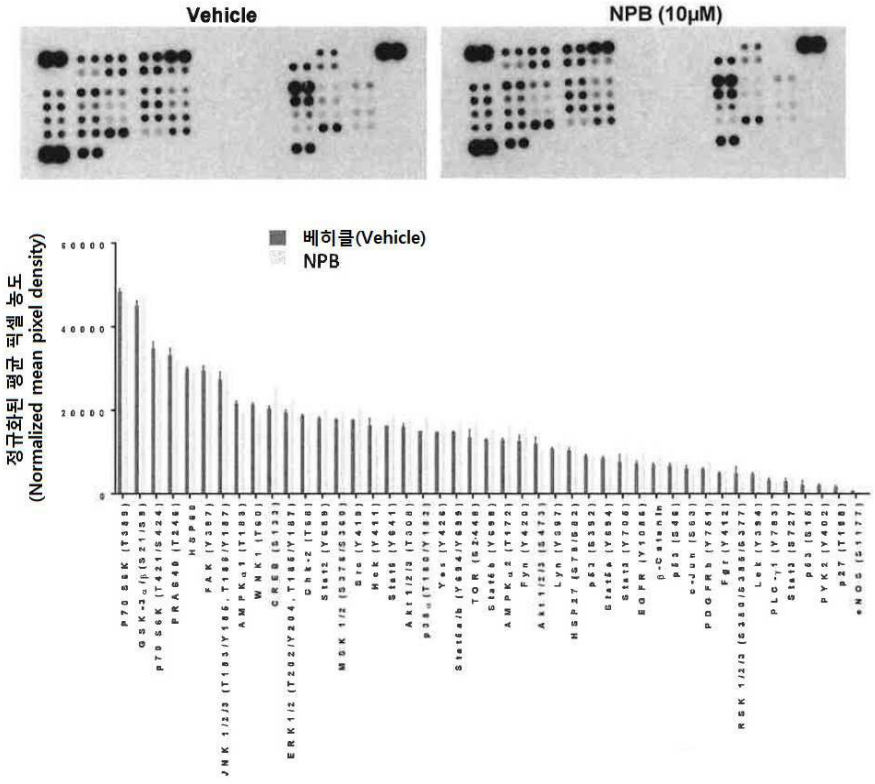
도면18a

웨스턴 블롯(Western blot)

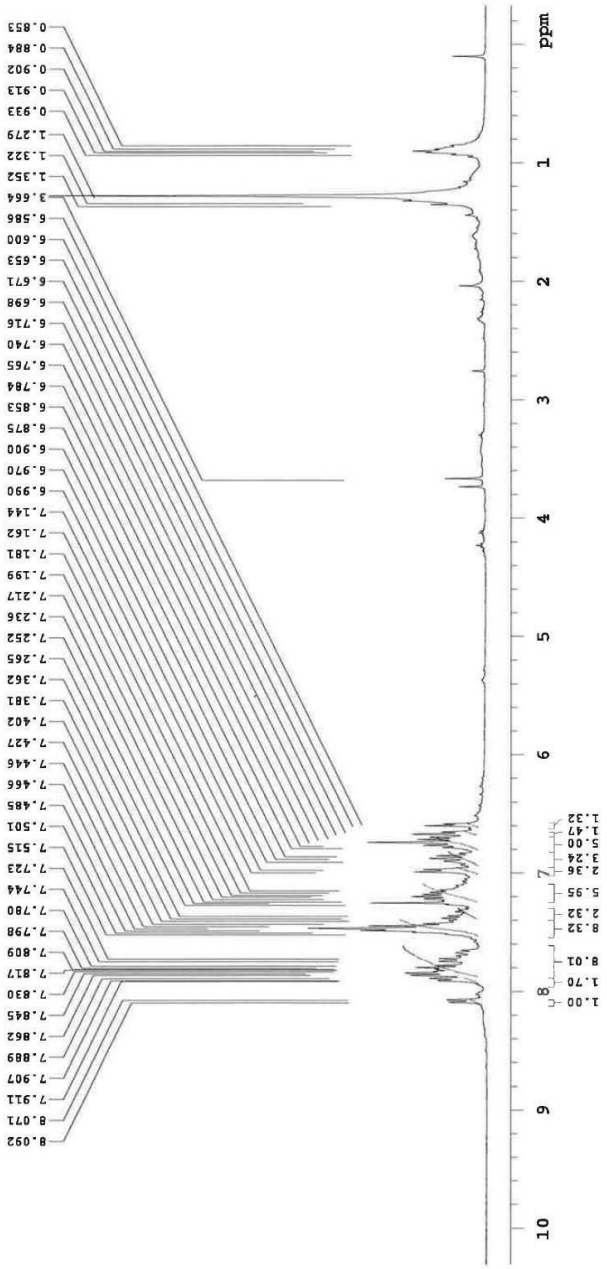


도면18b

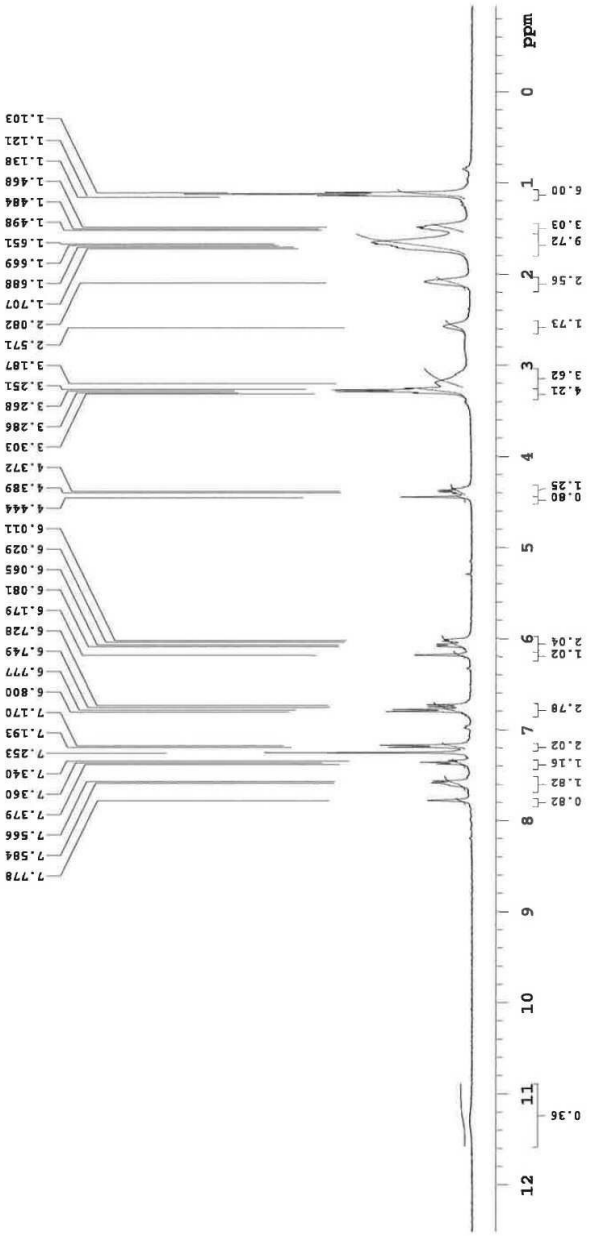
키나아제 어레이(Kinase array)



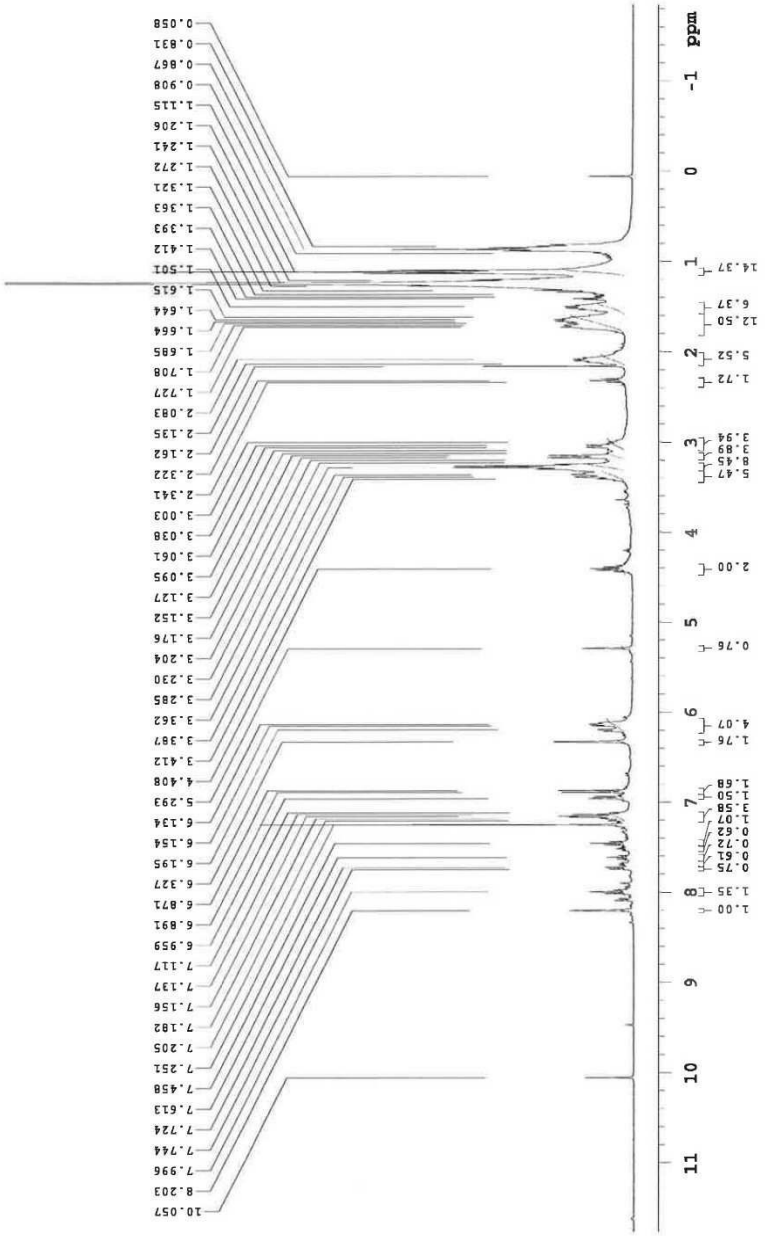
도면19


0.853
0.884
0.902
0.913
0.933
1.279
1.322
1.352
3.664
6.586
6.600
6.653
6.671
6.698
6.716
6.740
6.765
6.784
6.853
6.875
6.900
6.970
6.990
7.144
7.162
7.181
7.199
7.217
7.236
7.252
7.265
7.362
7.381
7.402
7.427
7.446
7.466
7.485
7.501
7.515
7.723
7.744
7.780
7.798
7.809
7.817
7.830
7.845
7.862
7.889
7.907
7.911
8.071
8.092
ppm
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
1.32
1.47
5.00
3.24
2.36
5.95
2.32
8.32
8.01
1.70
1.00

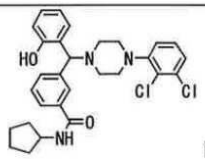
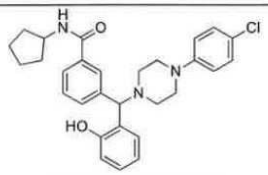
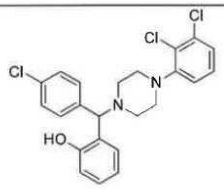
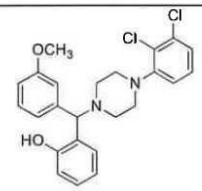
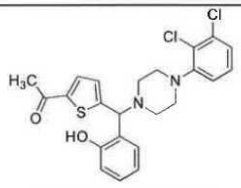
도면20


ppm
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
6.00
3.03
9.72
2.56
1.73
3.62
4.21
0.80
1.25
1.02
2.04
2.78
2.02
1.16
1.82
0.82
0.36
1.103
1.121
1.138
1.468
1.484
1.498
1.651
1.669
1.688
1.707
2.082
2.571
3.187
3.251
3.268
3.286
3.303
4.372
4.389
4.444
6.011
6.029
6.065
6.081
6.179
6.728
6.749
6.777
6.800
7.170
7.193
7.253
7.340
7.360
7.379
7.566
7.584
7.778

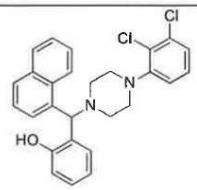
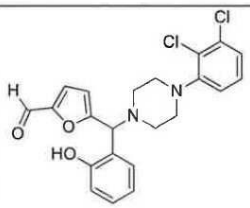
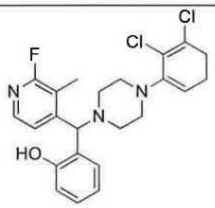
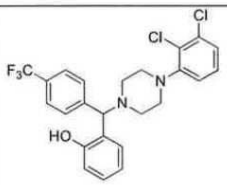
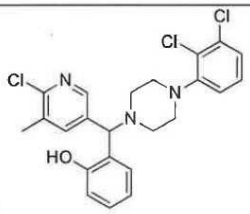
도면21



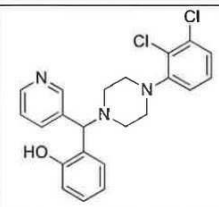
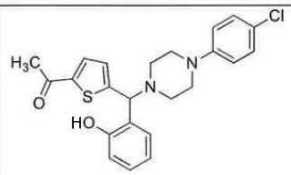
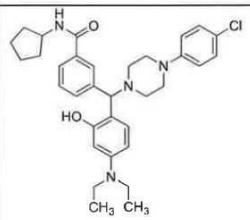
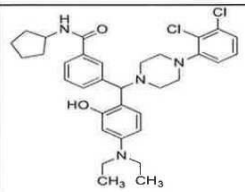
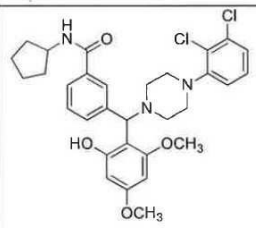
도면22a

유사체 (Analogues)	구조 (Structure)	MCF7 IC_{50}	A2780 IC_{50}
NPB	 MW: 523	9.52	5.33
NCK1	 Molecular Weight: 490.0363	NV	26.63
NCK2	 Molecular Weight: 447.7846	NV	19.74
NCK3	 Molecular Weight: 443.3656	NV	50.82
NCK4	 Molecular Weight: 461.4040	NV	NV

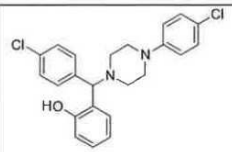
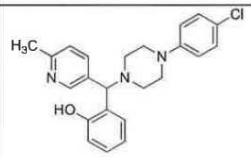
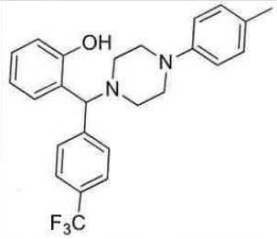
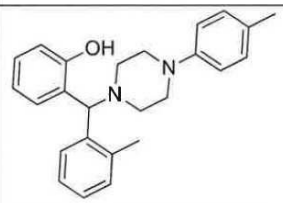
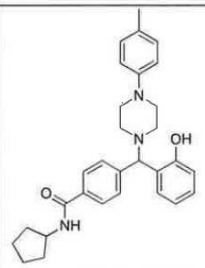
도면22b

NCK5	 Molecular Weight: 463.3983	5.907	27.39
NCK6	 Molecular Weight: 431.3118	3.114	6.68
NCK7	 Molecular Weight: 448.3606	47.28	38.74
NCK8	 Molecular Weight: 481.338	59.52	23.66
NCK9	 Molecular Weight: 462.7993	NV	16.06

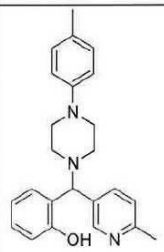
도면22c

NCK10	 Molecular Weight: 414.3276	24.83	35.86
NCK14	 Molecular Weight: 426.9589	NV	23.26
NCK16	 Molecular Weight: 561.16	23.35	9.53
NCK18	 Molecular Weight: 595.60	20.93	2.97
NCK19	 Molecular Weight: 584.53	NV	48.02

도면22d

NCK20	 Molecular Weight: 413.34	253.8	8.395
NCK21		20.91	21.90
SG2	 Molecular Weight: 426.4740	155.6	89.69
SG1	 Molecular Weight: 372.5026	NV	NV
SG3	 Molecular Weight: 469.6178	56.47	20.69

도면22e

SG7		49.87	41.61
SG 4, 5, 및 6	실험하지 않음 (NOT TESTED)		