



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0005107
(43) 공개일자 2012년01월16일

(51) Int. Cl.

C07D 403/12 (2006.01) *A61K 31/4166* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0065682

(22) 출원일자 2010년07월08일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

주식회사 제이팜

대전광역시 유성구 대학로 99, 약학대학 106호 (가동, 충남대학교)

(72) 발명자

이기철

대전광역시 동구 은어송로 117, 310동 1302호 (가오동, 은어송마을3단지)

(74) 대리인

백경업

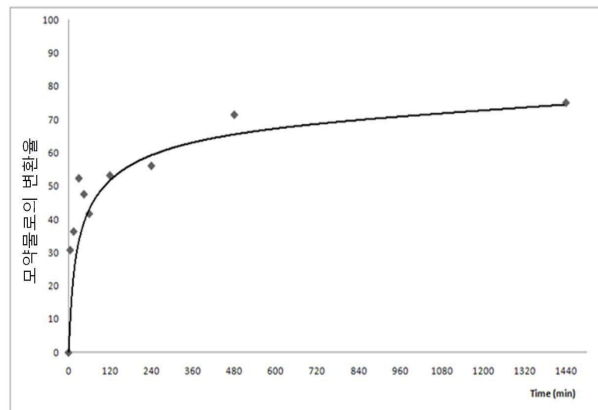
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 신규한 아릴설폰닐이미다졸론 유도체 및 이를 함유하는 항암제 조성물

(57) 요약

본 발명은 항암 표적성이 높고, 기존보다 제조공정이 단축되었으면서도 체내 안정성이 증가된 아릴설폰닐이미다졸론계 유도체 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 그의 제조방법 및 이를 함유하는 항암제 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2

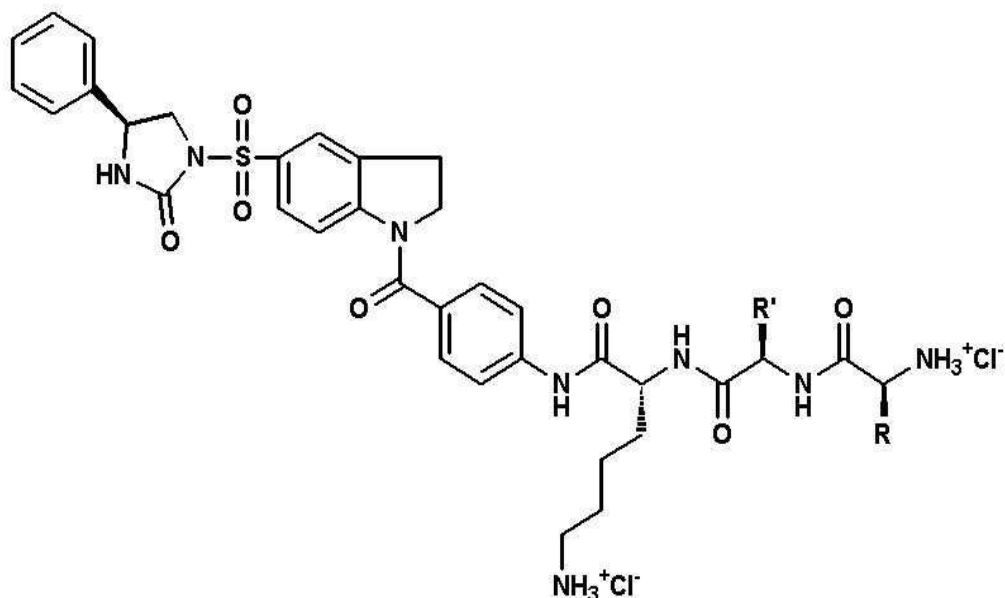


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 I의 아릴설폰닐이미다졸론 유도체.

[화학식 I]



상기 화학식 I에서,

$$R \text{은 } \text{CH}(\text{CH}_3)_2 \text{ 또는 } \text{CH}_3$$
$$R' \text{ 은 } CH_2CH(CH_3)_2 \text{ 또는 } CH_2Ph$$

청구항 2

제 1항에 있어서,

R이 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 이고, R' 은 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 인 아릴설폰닐이미다졸론 유도체.

청구항 3

제 1항에 있어서,

R이 CH₃이고, R' 은 CH₂Ph인 아릴설포닐이미다졸론 유도체.

청구항 4

제 1항에 따른 화학식 I의 유도체를 포함하는,

폐암, 대장암, 직장암, 결장암, 유방암, 자궁경부암, 자궁내막암, 나팔관암종, 난소암, 질암종, 음문암종, 간암, 위암, 식도암, 소장암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 방광암, 요도암, 음경암, 전립선암, 고환암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 비소세포성폐암, 골암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색 종, 호치킨병, 내분비선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 중추신경계 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교 종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 그룹에서 선택된 질환의 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 암은 기존 항암제 내성을 갖는 암세포로 인한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 암세포 표적성이 높으면서도 제조공정이 기존보다 단축된 아릴설폰닐이미다졸론 유도체 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 그의 제조방법 및 이를 함유하는 항암제 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 설폰닐우레아 화합물은 저혈당 작용, 제조제, 항진균제 등 다양한 생리적 활성을 나타낸다. 특히 디아릴설폰닐우레아(diarylsulfonylurea, DSU)는 항암활성을 나타내는 것으로 보고되었다. 이 화합물은 기존 항암제에 의해 치료가 잘 되지 않는 고형암 모델에 대해서도 현저한 활성을 발현하여, 이 후 상기 화합물의 구조를 변형시켜 더욱 뛰어난 설폰페누어(sulofenur, LY186641, J. Med. Chem., 1990, 33, 2393)가 개발되었다. 이들 디아릴설폰닐우레아 유도체 화합물은 대장암 이중 조직 이식 등에 탁월한 항암효과를 발휘하였으나, 메트헤모글로빈혈증(methemoglobinemia)이나 용혈성빈혈(hemolytic anemia)같은 부작용으로 인하여 항암제로의 개발이 중단되었는데, 이 부작용의 원인은 DSU계 물질의 대사산물인 p-클로로아닐린(p-chloroaniline) 유도체 때문인 것으로 밝혀졌다.

[0003] 미국등록특허 제5,929,103호는 상기 설폰페누어보다 항암활성이 뛰어나고 전술한 부작용의 원인이 되는 아닐린 계열의 대사체를 생성하지 않는 새로운 아릴설폰닐이미다졸론계 화합물을 개시한 바 있다. 이들 아릴설폰닐이미다졸론계 화합물은 미세소관형성(tubuline polymerization)을 저해, 세포주기를 G2/M기에 휴지시킴으로써 독성을 발현하는 항세포분열제(antimitotic agent)로서, 본 발명인에 의해 수행된 연구에 따르면, 다양한 암세포(HCT116, A-549, NCI-H460)에 대하여 우수한 세포독성을 나타내며, 일부 유도체는 현재 임상에서 사용되고 있는 파클리탁셀이나 빈카 알칼로이드계 항암제가 가지고 있는 다재내성을 발현하지 않은 것으로 밝혀졌다(한국공개특허 제2009-87697호 참조). 본 발명인은 이들 중 특히 우수한 항암효과를 나타내는 하기 화학식 II의 화합물 1을 대상으로 전임상시험을 수행한 결과, 투여약물의 상당부분이 실험동물의 장에 침착되어 독성을 나타내는 문제가 있음을 발견하고 이에 따라 신약으로의 개발이 중단된 바 있다. 또한, 물에 대한 용해도도 23 µg/ml로 매우 낮아 정맥주사제로서의 사용이 불가능하고, 장내 약물의 용해와 흡수가 원활하지 않아 장독성이 심화되는 등의 문제점을 확인하였다.

[0004] 한편, 암치료에 사용되는 항암 물질들은 암세포는 물론 정상세포에까지 세포독성을 나타내어 부작용들을 나타낸다. 따라서 항암제의 암세포에 대한 선택성을 높임으로써 부작용을 최소화하고, 그 항암활성은 더욱 극대화하려는 연구가 이루어지고 있다.

[0005] 이에 대해 본 발명자는 한국공개특허 제2009-87697호에 공지된 아릴설폰닐이미다졸론 화합물에 PABA(p-amino benzyl alcohol)를 링커로 트리펩타이드 그룹(D-Val-Leu-Lys- 과 D-Ala-Phe-Lys-)의 결합을 형성하는 전구약물(prodrug)을 합성하여 신규 아릴설폰닐이미다졸론 유도체 화합물을 제조한 바가 있으며(특허출원 제10-2010-0034507호), 이를 개선하여 링커가 없어도 유사한 효과를 나타내면서도 제조공정을 단축시킨 아릴설폰닐이미다졸론 유도체 화합물을 제조하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

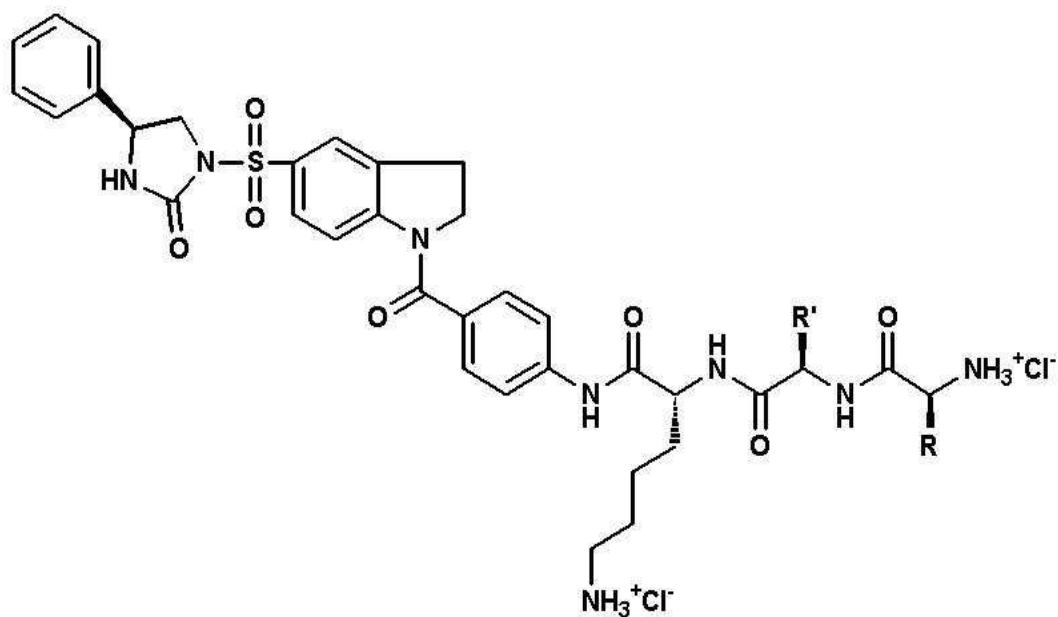
[0006] 본 발명의 목적은 정맥 투여가 가능하고, 장독성 위험이 없으며, 암세포에 대한 표적성이 극대화되어 부작용이 최소화된 아릴설폰닐이미다졸론 유도체 화합물을 제공하는 데에 있다.

[0007] 본 발명의 또다른 목적은 기존의 PABA(p-amino benzyl alcohol)를 링커로 트리펩타이드 그룹과 결합된 형태의 아릴설폰닐이미다졸론 유도체 화합물보다 제조공정이 단축되어 제조비용이 절감되면서도 체내 안정성이 증가된 신규한 아릴설폰닐이미다졸론 유도체 화합물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 하기 화학식 I의 아릴설폰닐이미다졸론 유도체 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염, 그의 제조방법 및 이를 활성 성분으로 함유하는 항암제 조성물에 관한 것이다.

[0009] [화학식 I]



[0010]

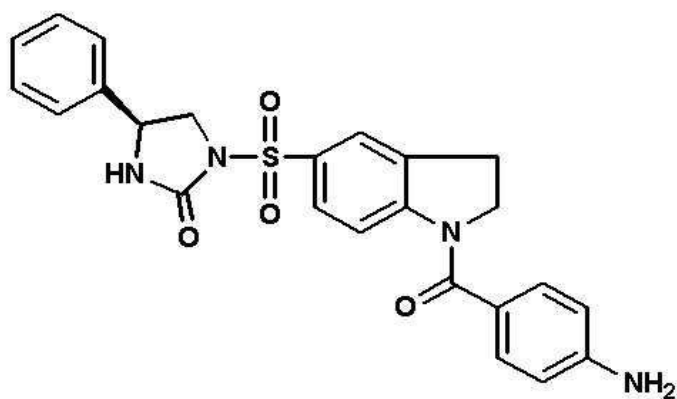
[0011] 상기 화학식 I에서,

[0012] R은 $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 또는 CH_3 이고, R' 은 $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 또는 CH_2Ph 이다.

[0013] 본 발명의 화합물은 하기 반응식 I에 따라 제조되며, 구체적으로 하기 화학식 II의 화합물 1(모약물)에 트리펩 타이드 그룹인 D-Val-Leu-Lys- 또는 D-Ala-Phe-Lys-와 직접 아마이드(amide) 결합을 형성하는 전구약물(prodrug)을 합성하여 제조한다.

[0014] 이렇게 제조된 본 발명의 화학식 I의 화합물은 체내 투여시, 암세포에 특이적으로 발현하는 프로테아제의 하나인 플라스민(plasmin)에 의해 항암활성을 나타내는 모약물인 화학식 II의 화합물 1로 효율적으로 변환되어 암세포에 대한 표적성이 증가된다.

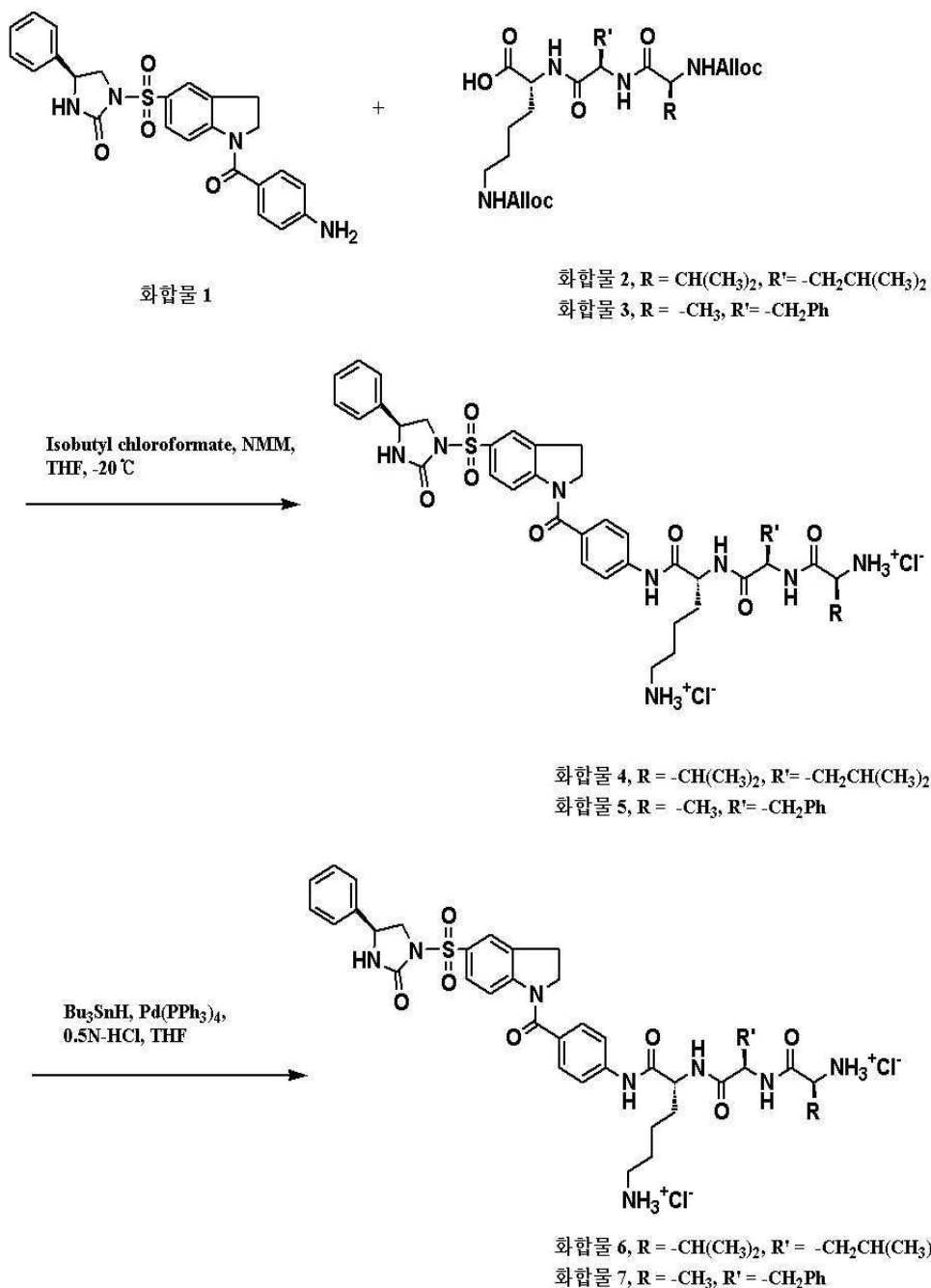
[0015] [화학식 II]



화합물 1

[0016]

[0017] [반응식 I]



[0018]

[0019] 본 발명의 화학식 I의 화합물은 모약물인 화학식 II의 화합물 1에 비하여 그 수용성이 70~150배로 현저히 상승하며, 1.7mg/ml 이상의 물에 대한 높은 수용성을 나타내어 용이하게 주사제로 제형화될 수 있다.

[0020] 상기 화합물들의 수용성은 특허출원 제 10-2010-0034507호보다는 약간 낮은 수용성을 갖지만 이는 정맥투여가 가능한 주사제로 이용될 수 있는 충분한 수용성을 가지며 경구투여 등으로 인한 장독성의 문제가 효율적으로 해결될 수 있다.

[0021] 또한 특허출원 제10-2010-0034507호와 달리 PABA(p-amino benzyl alcohol)를 링커로 사용하지 않아도 수용성, 세포독성, 모약물로의 변환율 등에 있어 유사한 효과를 나타냄으로 약물의 제조공정을 단축할 수 있다.

[0022] 이상과 같이 전구약물(prodrug)의 형태로 제조하는 것은 생체 내에서의 용해도나 친유성과 같은 물리 화학적 한계나, 생체 이용률 같은 생물학적 한계를 극복하는데 유용한 방법이다. 전구약물의 설계에 있어서, 목적하는 전구약물은 합성이 용이하고, 상온이나 생체 외에서 반감기 등이 우수하여 양호한 안정성을 가지며, 생체 내에서는 적절한 조건에서 완벽하게 모약물(parent drug)로 변환할 수 있도록 해야한다. 또한, 전구약물은 상기한 조

건을 모두 만족시키기 위해 보통 생체 내에서 효소 반응에 의해서만 생성되도록 하여야 한다.

- [0023] 본 발명의 화학식 I의 화합물은 암 세포에 특이적으로 발현하는 프로테아제 중 하나인 플라스민에 의해 선택적으로 분해된다. 플라스민은 체내에서 대부분 불활성형 자이모겐 형태인 플라스미노겐으로 존재하며, 체내에 존재하는 α_2 -항플라스민과 α_2 -마크로글로불린에 의해서 빠르게 억제되고, 암세포에서 과발현되는 u-PA에 의해서 국소적으로 활성화되는 효소이다.
- [0024] 본 발명의 화학식 I의 화합물은 혈중 내에서보다 암세포 내 플라스민에 의해 더욱 잘 분해되므로, 혈중에서는 비교적 비활성의 전구약물의 형태로 존재하다가, 암세포 내에서 모약물인 화학식 II의 화합물로 변환되며, 화학식 II의 화합물은 암세포 내에서 강력한 항암활성을 나타내어, 결과적으로 본 발명의 화합물은 암세포에 대한 선택성이 현저히 증가되며 부작용이 감소된다.
- [0025] 본 발명의 화합물은 폐암, 대장암, 직장암, 결장암, 유방암, 자궁경부암, 자궁내막암, 나팔관암종, 난소암, 질암종, 음문암종, 간암, 위암, 식도암, 소장암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 방광암, 요도암, 음경암, 전립선암, 고환암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 비소세포성폐암, 골암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 호치킨병, 내분비선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 중추신경계 종양, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종과 같은 암의 치료를 위해 사용될 수 있으며, 바람직하게는 폐암, 대장암, 직장암, 자궁암, 난소암, 또는 백혈병의 치료를 위해 사용될 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명의 화합물은 기존 항암제에 내성을 갖는 암세포로 인한 모든 암질환의 치료를 위해서도 사용될 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명의 화합물은 플라스민을 발현하는 암세포로 인한 암질환의 치료에 특히 효과적이다.
- [0028] 본 발명에서 ‘약제학적으로 허용가능한 염’이란 염산염, 브롬화 수소산염, 요오드화 수소산염, 불화 수소염, 황산염, 설푼산염, 시트르산염, 캄포린산염, 말레산염, 아세트산염, 락트산염, 니키틴산염, 질산염, 숙신산염, 인산염, 말론산염, 말린산염, 살리실산염, 페닐아세트산염, 스테아르산염, 팔미트산염, 피리딘, 암모늄, 피페라진, 디에틸아민, 니코틴아미드, 포른산염, 푸마르산염, 우레아, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 아연, 리튬, 신남산염, 메틸아미노, 메탄설푼산염, 피크린산염, p-톨루엔설푼산염, 나프탈렌설푼산염, 타르타르산염, 트리에틸아미노, 디메틸아미노 및 트리(하이드록시메틸)아미노메탄과 같은 제약분야에서 통상 사용되는 염을 말하며, 특히 염산염이 바람직하다.
- [0029] 본 발명의 화합물에는 하나 이상의 비대칭 탄소원자가 존재하므로, 거울상이성질체 또는 부분입체이성질체를 포함한다는 것은 당업자들에게 알려져 있다. 부분입체이성질체 혼합물은 공지된 방법, 예를 들어, 크로마토그래피, 재결정 또는 분별결정 등의 방법에 의해 그들의 물리화학적 차이를 기준으로 개별적 부분입체이성질체로 분리될 수 있으며, 거울상이성질체는 거울상이성질체 혼합물을 적절한 광학 활성 화합물과 반응시켜 부분입체이성질체 혼합물로 전환시키고, 부분입체이성질체를 분리하고 각각의 부분입체이성질체를 상응하는 순수 거울상이성질체로 전환시키는 통상적인 방법으로 분리할 수 있다. 부분입체이성질체, 거울상이성질체 및 그들의 혼합물은 본 발명의 일부로 간주되며, 화학식 I에서, 이미다졸리디논에 페닐이 붙은 위치는 S 배열(S configuration)이고, 아미노산은 모두 L-아미노산인 것이 바람직하다.
- [0030] 본 발명의 조성물은 수용액 또는 분말 그 자체일 수 있거나, 필요에 따라 부형제, 결합제 또는 윤활제 같은 공지된 첨가제를 사용하여 제조된 적절한 제형의 의약 조성물일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일 예로, 주사제 제조시, 화학식 I의 화합물을 유효성분으로 포함하는 분말은 증류수 또는 염화나트륨 및 당류(예:글루코스, 만니톨, 이노시톨 등)를 사용하여 제조한 수성 등장액에 용이하게 용해된다. 용해 후, 유효성분을 함유하는 주사제는 치료될 질환에 대해 생체 내에서 유효한 약물 농도로 기관에 정맥 내, 근육 내 피하 투여되거나 종양 등의 병소 또는 종양 절단부에 직접 투여될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 다른 예로서, 경구제 제조시, 정제, 캡슐제, 과립제, 미립제, 포함제, 액제 등으로 제조할 수 있다. 이들 제제의 제조시, 제약상 허용되는 담체를 비롯한 불활성 성분을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용된 ‘제약상 허용된 담체’란 구체적으로 의약 조성물의 활성 물질을 제외한 성분을 지칭하는 용어이다. 제약상 허용되는 담체의 예로는 결합제, 붕해제, 희석제, 충전제, 활택제, 부형제, 윤활제, 분산제, 안정제, 착색제, 흡수 개선제, 가용화제 또는 유화제 및 염이 포함된다.
- [0033] 또한, 수득된 분말의 특성(저장용기의 밀봉정도나 용량 등)을 개선하기 위해, 당류, 방부제, 안정제, 정전기 방지제 등을 가할 수 있다.

[0034] 상기 분말은 또한 통상의 방법에 따라 주사제 또는 경구제 이외의 제제로 제형화될 수도 있다. 이런 제제의 예로는 코, 구강, 설하부, 직장, 질 또는 자궁 등의 점막에 투여되는 제제, 경피제 및 이식제가 있다. 상기 각 제제는 각종 제어방출제 또는 표적 치료제로 성형될 수 있으며, 본 발명의 조성물은 이런 제제의 원료로 사용될 수 있다.

[0035] 상기한 바와 같이, 본 발명의 화학식 I의 화합물은 종래의 아릴설폰닐이미다졸론계 화합물의 물에 대한 난용성 문제를 해결하여, 정맥 투여가 가능하다. 따라서 정맥 투약 후 바로 전신순환기계를 통한 신속한 약물 전달을 가능하게 하며, 장독성을 발현하지 않고, 특히 암세포에 대한 표적성이 증대되어 부작용이 최소화되므로 생체에 비교적 안전하다. 따라서, 각종 제형, 예를 들어 주사제, 경구제, 구강에 투여되는 제제(트로키제, 구강제 등), 설하제, 점안제, 시럽제, 피부에 투여되는 외용제, 경비제, 폐를 통해 투여되는 제제, 직장 좌제 또는 점막에 도포되는 제제로 약물 조성물 또는 수의학적 조성물에 매우 유용하고, 사람 또는 사람 이외의 포유동물(원숭이, 소 개 등)에 사용되는 항암제로서 유용하다.

발명의 효과

[0036] 본 발명의 신규한 아릴설폰닐이미다졸론 화합물은 수용성이 높아 정맥투여가 가능한 주사제로 제조할 수 있어, 종래 이 계통 항암제의 문제점인 장내독성의 우려를 피할 수 있고, 상체 내에서 암 특이적 발현 효소인 플라스민에 의해 선택적으로 변환되어 암세포에 대한 표적성이 높아 부작용이 최소화되며 우수한 항암효과를 발휘할 수 있다.

[0037] 또한 기존에 제조되었던 PABA(p-amino benzyl alcohol) 링커로 트라이펩타이드에 연결된 아릴설폰닐이미다졸론 화합물에 비해 링커를 포함하지 않고 직접 트라이펩타이드에 연결되어 제조공정이 단축되어 제조비용이 절감되고 체내 안정성이 증가되는 효과를 가져올 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 본 발명의 아릴설폰닐이미다졸론 유도체 화합물 7이 인간 혈장 내에서 모약물인 화합물 1로 변환되는 변환율을 나타낸 것이다.

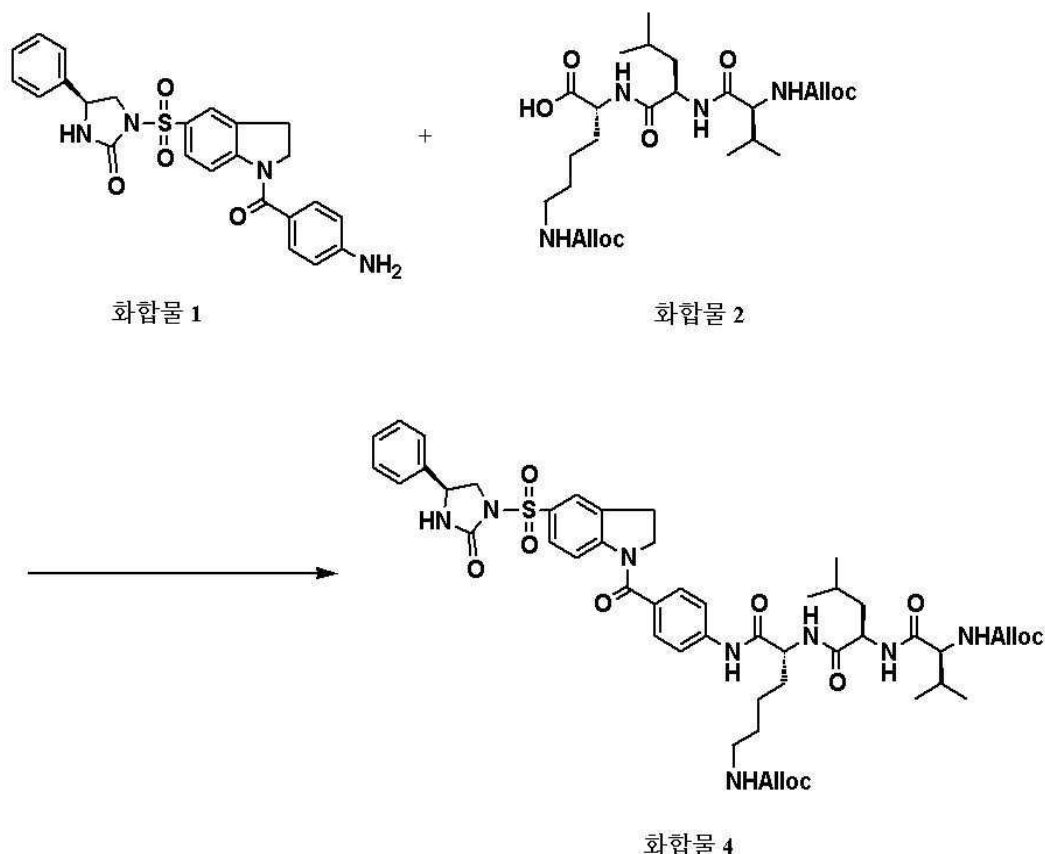
도 2는 본 발명의 아릴설폰닐이미다졸론 유도체 화합물 7이 인간 플라스민 내에서 모약물인 화합물 1로 변환되는 변환율을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.

[0040] <실시예 1. 아릴설폰닐이미다졸론 유도체의 합성>

[0041] 1-1. 화합물 4의 합성



Reagents and Conditions; NMM, *i*-BuOCOC1

[0042]

[0043] 화합물 1은 [Bioorg. Med. Chem. Lett. 1988, 8, 1547-1550]에 따라 합성하였다.

[0044] 화합물 2는 [J. Med. Chem. 1999, 43, 3093-3102]에 따라 합성하였다.

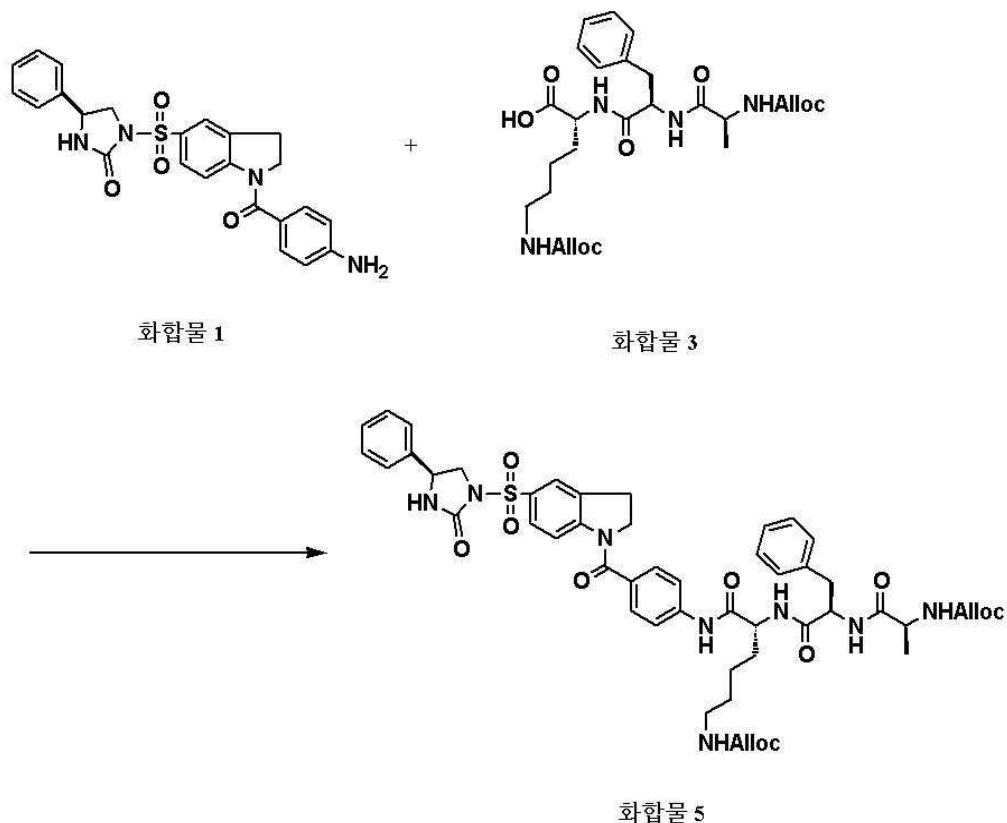
[0045] 질소기체 하에서, 화합물 2(Alloc-D-Val-Leu-Lys(Alloc)-OH, 360mg, 0.68mM)를 건조 THF 30mℓ에 녹인 후 -20℃에서 30분간 교반하였다. 이 혼합용액에 아이소부틸 클로로포메이트(isobutyl chloroformate, 98μℓ, 0.75mM)와 N-메틸모르포린(N-methylmorpholine, 84μℓ, 0.75mM)을 적가한 후 -20℃에서 3시간 동안 교반하였다. 이 혼합용액에 화합물 1(396mg, 0.85mM)과 N-메틸모르포린(96μℓ, 0.85mM)을 건조 THF 5mℓ에 녹인 후 서서히 적가하였다. 적가 후 서서히 온도를 상승시켜 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 완결 후 감압 하에 농축하고 CH₂Cl₂(50 mℓ)로 희석한 후 포화 NaHCO₃(30mℓ), 0.5N KHSO₄(30mℓ), 함수(brine, 30mℓ)로 각 3회씩 세척하였다. 이 후, 유기층을 무수망초로 탈수하고 감압 하에서 농축하였다. 이렇게 얻은 조생성물을 Si-gel 컬럼에서 n-HX : EtOAc = 1:1 → n-HX : EtOAc : MeOH = 10 : 10 : 1의 혼합용매로 분리하여 백색 고체 (110mg, 16.8%)를 얻었다.

[0046]

mp 128.0-129.0℃, ; FT-IR (cm⁻¹,) 3313, 2957, 1653, 1539, 1374, 1219, 1157; ¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.92 -1.06 (m, 12H), 1.46-2.10 (m, 10H), 3.19 (m, 4H), 3.62 (q, J=7.8Hz, 9.2Hz, 1H), 3.80 (m, 1H), 4.15-4.54 (m, 10H), 4.74 (t, J=8.0Hz, 1H), 5.03-5.32 (m, 4H), 5.60 (m, 1H), 5.79 (m, 1H), 5.91 (m, 1H), 6.42 (m, 1H), 7.23-7.40 (m, 7H), 7.52 (d, J=8.8Hz, 2H), 7.68 (d, J=9.2Hz, 1H), 7.77 (d, J=7.6Hz, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.95 (d, J=8.4Hz, 2H), 8.39 (m, 1H), 8.89 (s, 1H).

[0047]

1-2. 화합물 5의 합성



Reagents and Conditions; NMM, *i*-BuOCOCI

[0048]

[0049]

화합물 3은 [J. Med. Chem. 2000, 42, 5277-5283]에 따라 합성하였다.

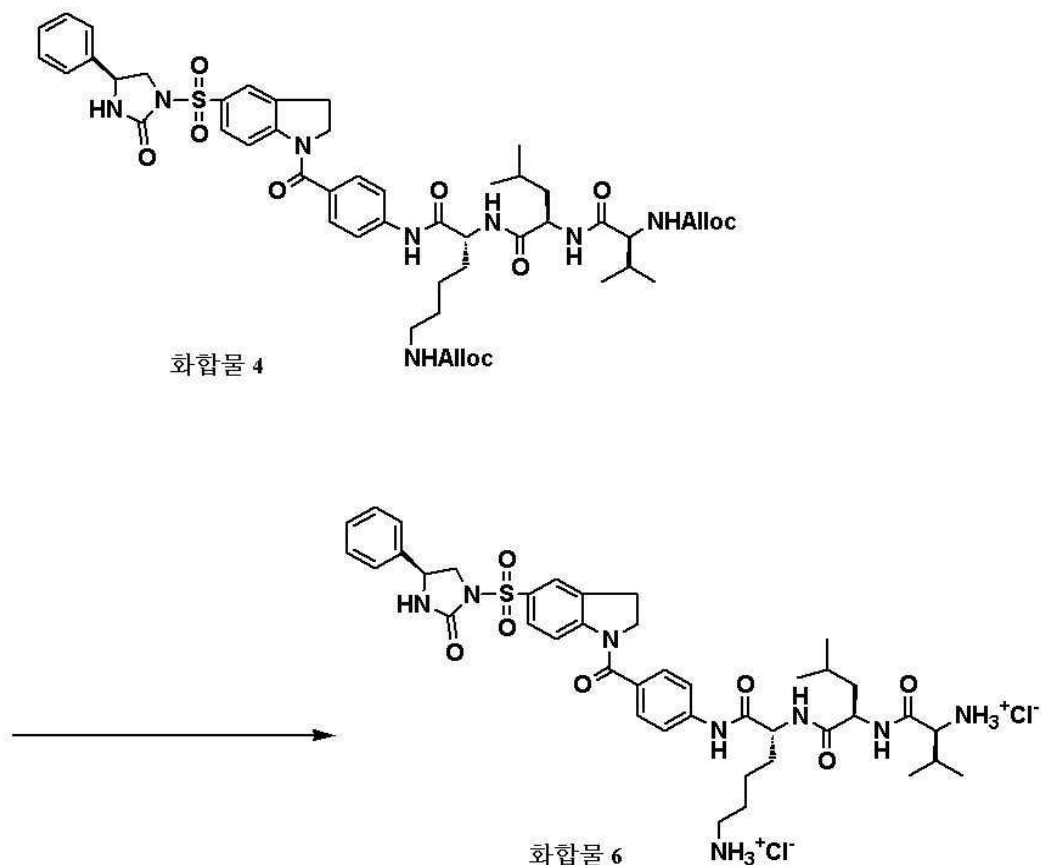
[0050]

질소기체 하에서, 화합물 3(362mg, 0.68mM)을 건조 THF 30ml에 녹인 후 -20℃에서 30분간 교반하였다. 이 혼합 용액에 아이소부틸 클로로메이트(98 μ l, 0.75mM)와 N-메틸모르포린(84 μ l, 0.75mM)을 적가한 후 -20℃에서 3시간 동안 교반하였다. 이 혼합용액에 화합물 1(396mg, 0.85mM)과 N-메틸모르포린(96 μ l, 0.85mM)을 건조 THF 5ml에 녹인 후 서서히 적가하였다. 적가 후 서서히 온도를 상승시켜 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응 완결 후 감압 하에 농축하고 CH₂Cl₂(50ml)로 희석한 후 포화 NaHCO₃(30ml), 0.5N KHSO₄(30ml), 함수(30ml)로 각 3회씩 세척하였다. 이 후 유기층을 무수망초로 탈수하고 감압 하에서 농축하였다. 이렇게 얻은 조생성물을 Si-gel 컬럼에서 n-HX : EtOAc = 1 : 1 → n-HX : EtOAc : MeOH = 10 : 10 : 1의 혼합용매로 분리하여 백색 고체(188mg, 28.7%)를 얻었다.

[0051]

mp 152.0-153.0℃; FT-IR (cm⁻¹) 3277, 1684, 1636, 1522, 1375, 1247; ¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.97 (d, J=7.2Hz, 3H), 1.23-1.78 (m, 6H), 2.80-2.98 (m, 3H), 3.08-3.16 (m, 3H), 3.50 (m, 1H), 4.02 (m, 2H), 4.14 (t, J=8.0Hz, 2H), 4.27 (t, J=8.8Hz, 1H), 4.38-4.56 (m, 6H), 4.80 (t, J=7.2Hz, 1H), 5.13-5.26 (m, 4H), 5.86 (m, 3H), 7.18-7.25 (m, 8H), 7.32-7.39 (m, 4H), 7.61 (m, 2H), 7.77 (m, 6H), 8.20 (m, 2H).

[0052] 1-3. 화합물 6의 합성



Reagents and Conditions; Bu₃SnH, Pd(PPh₃)₄, 0.5M HCl in MeOH

[0053]

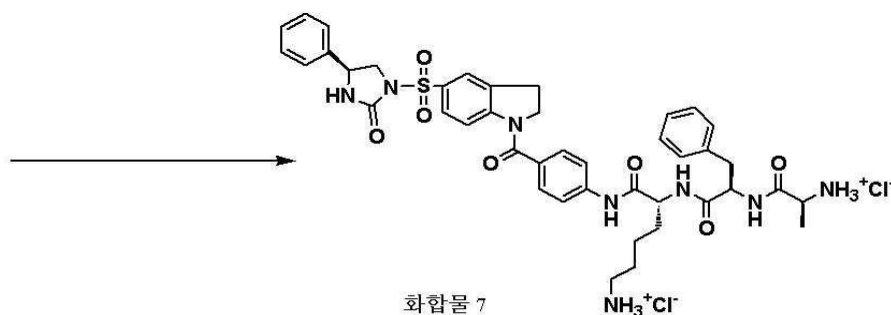
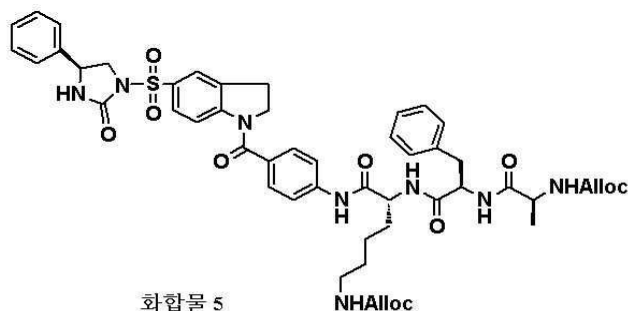
[0054]

질소기체 하에서, 화합물 4(100mg, 0.1mM)를 건조 THF에 녹인 후 실온에서 교반하였다. 이 혼합용액에 아세트산 (acetic acid, 30 μ l, 0.5mM), 트라이부틸틴하이드라이드(tributyltinhydride, 85 μ l, 0.3mM), Pd(PPh₃)₄(10mg)를 적가한 후 실온에서 1시간 동안 교반하고, 트라이부틸틴하이드라이드(85 μ l, 0.3mM)를 더 적가한 후 다시 2시간 동안 교반하였다. 이 혼합용액에 메탄올을 용매로 하는 1.25M HCl(2ml)을 서서히 적가한 후 3시간 동안 교반하고, 감압 하에 농축하였다. 농축된 조성물을 에테르(ether)로 결정화하여 얻은 물질은 다시 증류수에 녹인 후 원심분리(3000rpm, 10분)하여 상등액을 동결 건조하여 미황색의 고체(38mg, 41.5%)를 얻었다.

[0055]

mp 169.0-170.0 $^{\circ}$ C, ; FT-IR (cm⁻¹,) 3269, 2957, 1652, 1521, 1375, 1218, 1158, 1074; ¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 0.85-0.96 (m, 12H), 1.10-1.64 (m, 10H), 2.09 (m, 1H), 2.78 (m, 2H), 3.17 (t, J =8.4Hz, 2H), 3.62 (q, J =6.0Hz, 9.6Hz, 1H), 3.68 (m, 1H), 4.13 (t, J =8.0Hz, 1H), 4.28 (t, J =8.8Hz, 1H), 4.79 (m, 2H), 4.81 (t, J =6.8Hz, 1H), 7.24 (d, J =6.8Hz, 2H), 7.35 (m, 4H), 7.62 (m, 3H), 7.79 (m, 4H), 8.25 (s, 1H), 8.64 (m, 1H).

[0056] 1-4. 화합물 7의 합성



Reagents and Conditions; Bu_3SnH , $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, 0.5M HCl in MeOH

[0057]

[0058]

질소기체 하에서, 화합물 5(100mg, 0.1mM)를 건조 THF에 녹인 후 실온에서 교반하였다. 이 혼합용액에 아세트산 ($30\mu\text{l}$, 0.5mM), 트라이부틸티나이드($85\mu\text{l}$, 0.3mM), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (10mg)를 적가한 후 실온에서 1시간 동안 교반하고, 트라이부틸티나이드($85\mu\text{l}$, 0.3mM)를 더 적가한 후 다시 2시간 동안 교반하였다. 이 혼합용액에 메탄올을 용매로 하는 1.25M HCl(2ml)을 서서히 적가한 후 3시간 동안 교반한 후 감압 하에 농축하였다. 농축된 조성물은 에테르로 결정화하였고, 얻은 물질을 다시 증류수에 녹인 후 원심분리(3000rpm, 10분)하였으며 상등액을 동결 건조하여 미황색의 고체(61mg, 67.1%)를 얻었다.

[0059]

mp $174.0\text{--}175.0^\circ\text{C}$, ; FT-IR (cm^{-1}) 3271, 1653, 1521, 1375, 1244, 1156; $^1\text{H-NMR}$ (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 0.99 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 3H), 1.23-1.60 (m, 6H), 2.78 (m, 3H), 3.17 (m, 3H), 3.50 (m, 1H), 4.14 (m, 2H), 4.28 (m, 1H), 4.44 (m, 1H), 4.80 (m, 1H), 7.23-7.38 (m, 8H), 7.62 (m, 2H), 7.81 (m, 8H), 8.25 (s, 1H), 8.75 (m, 1H).

[0060]

<실시예 2. 아릴설폰닐이미다졸론 유도체 화합물의 용해도 테스트>

[0061]

본 발명의 아릴설폰닐이미다졸론 유도체 화합물을 모약물인 화합물 1과 대비하여 물(distilled water)에 대한 용해도를 측정하였다. 용해도는 Casini 등의 방법에 의해 측정되었다(Casini, A.; Scozzafava, A.; Mincione, F.; Menabuoni, L.; Ilies, M. A.; Supuran, C. T. Carnonic Anhydrase Inhibitors: Water-Soluble 4-Sulfamoylphenylthioureas as Topical Intraocular Pressure-Lowering Agents with Long-Lasting Effects. *J. Med. Chem.* 2000, 43, 4884-92).

[0062]

정확히 측량된 각 물질 1mg을 HPLC용 MeOH(1ml)에 완전히 녹여 표준시료(standard sample solution)를 만든 후, 이 표준시료에 대한 UV 최대 흡광도 (UV absorption maxium, λ_{max} in UV spectrophotometer Mini 1240, Shimadzu, Japan)를 결정하였다. 소량의 증류수($250\mu\text{l}$)를 사용하여 각 물질에 대한 포화 수용액을 만든 후, 불용물은 $0.45\mu\text{m}$ 주사기필터(PVDF syringe filter, Whatman, USA)를 통과시켜 제거하였다. 이렇게 준비된 포화 수용액은 표준시료를 이용하여 정해진 각 물질의 최대 흡수파장에서 스캔하여 그 흡광도를 정하였다. 각 물질의 물에 대한 용해도(aqueous solubility)는 다음 식에 의해 결정하였다.

[0063] $C' = (A' \times C) \div A$

[0064] 여기에서 C는 표준용액의 농도(mg/ml), A는 표준용액의 흡광도, A' 은 포화용액의 흡광도, C' 은 수용액의 농도(mg/ml)를 나타낸다.

표 1

[0065]

화합물	용해도(mg/ml)
화합물 6	1.73
화합물 7	3.32
화합물 1(대조군)	0.024

[0066] 표 1의 결과로, 본 발명의 화합물 6 및 화합물 7은 모약물인 화합물 1(대조군)과 대비시, 약 70~150배의 현격한 용해도 상승효과를 나타내었으며, 이와 같은 실험결과를 통하여 플라즈민에 의해 활성화된 전구약물은 주사제로 제형화될 수 있는 형태임을 확인하였다.

[0067] <실시예 3. 생체 외 인간 암세포에 대한 세포독성 확인 - 플라즈민에 의한 표적성 확인>

[0068] 본 발명의 아릴설포닐이미다졸론 유도체 화합물의 인간 유방암 세포에 대해 특히 플라즈민을 많이 발현하는 MDA-MB-231(human breast cancer cell line)과 플라즈민을 적게 발현하는 MCF-7(human breast cancer cell line)을 대상으로 그 세포독성을 확인하였다. 상기 세포주들은 생명공학연구소에서 분양받아 사용하였으며, MTT 분석방법에 의해 IC₅₀(μ M)를 측정하였다.

[0069] 배양액은 멸균 주사용 증류수에 L-글루타민이 포함된 DMEM 배지 한 봉지, 60℃ 수조에서 30분간 열처리에 의해 불활성화시킨 우혈청(FBS) 100ml, NaHCO 33.7g, 페니실린(10000unit/ml), 스트렙토마이신(10mg/ml)을 넣어 용해시킨 후, 0.1N 염산으로 pH를 조절하여 전체를 1ℓ 가 되게 하고 여과하여 제조하였으며, 4℃ 에서 보관하면서 사용하였다. 세포는 3일에 한번씩 계대배양하면서 유지하였으며, 세포를 부착면으로부터 분리하기 위하여 PBS(phosphate buffered saline) 용액에 트립신(2.5g/ℓ)과 EDTA(0.38g/ℓ)를 녹인 용액을 사용하였다.

[0070] 실험에 사용할 세포들을 트립신-EDTA 용액으로 부착면으로부터 분리시키고 96웰 플레이트의 웰당 5×10^3 개의 세포를 넣어 5% CO₂ 배양기(37℃)에서 24시간 배양하였다. 시료는 DMSO(dimethylsulfoxide)에 녹여 실험에 필요한 농도까지 실험용 배지 또는 3차 증류수로 희석하여 최종 DMSO의 농도가 0.2% 이하가 되도록 단계별로 희석하였다. 96웰 플레이트의 각 웰에 단계별 농도로 희석한 시료를 각각 2ml씩 넣어준 후, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 72 시간 동안 배양하였다. 배양이 마치면 웰당 20ml MTT 용액(Thiazolyl blue tetrazolium bromide: 5mg/ml in PBS, Sigma M2128)을 가하여 4시간을 더 배양한 후 모든 배지를 제거하였다. 각각의 웰에는 다시 세포용해버퍼(10% SDS in 0.01N HCl) 100 μ l씩을 첨가하여 하룻밤 동안 세포를 사멸(overnight cell lysis)하여 생성된 포마잔(formazan)을 완전히 용해시킨 후 마이크로플레이트 해독기(570nm, Tecan A-5082, Salzburg, Austria)를 사용하여 각 웰의 O.D.(optical density)값을 측정하였다. 이 값을 이용하여 각 물질의 암세포에 대한 IC₅₀(50% inhibitory dose)값을 확인하였다. 모든 실험은 상기 기재된 바와 같이 MTT 분석법에 약간의 변경을 가하여 적어도 3번씩 수행되었다. 또한 세포는 1ml당 400KIU(kallikrein inhibitor units)의 아프로티닌(시그마 알드리치사, 플라즈민의 세린 프로테아제에 대한 억제제) 존재 또는 비존재하에 배양되었다.

표 2

[0071]

화합물	아프로티닌	IC ₅₀ (μ M)	
		MDA-MB-231	MCF-7

화합물 6	-	0.274	7.021
	+	5.253	8.959
화합물 7	-	0.316	5.991
	+	4.329	7.314
화합물 1(대조군)		0.265	1.268

[0072] 상기 표 2로부터 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 아릴설폰아미다졸론 유도체 화합물은 플라스민을 많이 발현하는 MDA-MB-231 세포에서 아프로티닌 미포함시 대조군인 화합물 1($IC_{50}=0.265 \mu M$)과 비슷한 세포독성을 나타내었다. 반면 아프로티닌 포함시에는 그 세포독성값(IC_{50})이 각각 화합물 6은 $5.253 \mu M$, 화합물 7은 $4.329 \mu M$ 로서, 아프로티닌의 플라스민 억제 작용으로 모약물인 대조화합물에 비해 16~20배 정도 활성이 감소하였다. 플라스민이 적게 발현되는 MCF-7 세포에서는 아프로티닌 미포함시 화합물 6과 화합물 7이 각각 7.021, $5.991 \mu M$ 로 대조군과 비교하여 약 5~6배 정도 활성이 감소하였고, 아프로티닌 포함시 화합물 6 및 화합물 7의 세포독성값은 $8.959 \mu M$, $7.314 \mu M$ 로 모두 대조군과 비교하여 약 5~7배 정도 활성이 감소하였다. MCF-7 세포에서는 아프로티닌의 여부와 상관없이 플라스민이 적게 발현하여 전구약물 형태의 화합물 6 및 화합물 7이 모약물인 화합물 1 형태로 변환되지 못하여 활성이 낮아진 것으로 사료된다. 이 실험결과를 통하여 본 발명의 아릴설폰아미다졸론 유도체 화합물은 암세포의 플라스민에 의해 선택적으로 활성을 나타내며, 플라스민이 발현하는 암세포에서는 모약물인 화합물 1(대조군)만큼 강력한 세포독성을 나타내는 것으로 확인할 수 있다.

[0073] <실시예 4. 인간 혈장 및 인간 플라스민 내에서의 모약물 변환 실험>

[0074] 본 발명의 아릴설폰아미다졸론 유도체 화합물 7에 대하여, 인간 혈장 및 플라스민 내에서의 모약물인 화합물 1로의 변환율을 동력학 실험으로 확인하였다.

[0075] 4-1. 인간혈장

[0076] 실험에 사용된 인간 혈장은 충남 국립대학교 병원에서 공급받아 사용하였으며, 인간 혈장 중 변환 테스트 조건은 다음과 같았다.

[0077] 차가운 인간 혈장 $450 \mu l (0^\circ C)$ 에 미리 준비된 화합물 7의 1mM 용액(0.1M Tris/HCl buffer, pH 7.3) 중 $50 \mu l$ 를 섞은 후, 이 혈장 현탁액을 바로 $37^\circ C$ 의 배양기로 옮겨 반응시켰다. 이 후, 정해진 시간(0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24시간)에 이를 $50 \mu l$ 씩 수거한 후 얼음에서 냉각된 인간 혈장 $450 \mu l$ 를 가하였다. 다시 여기에 $250 \mu l$ 의 아세톤을 가한 후 강하게 혼합하였고, $-80^\circ C$ 에 보관하였다. 24시간의 반응이 완료된 시료들은 각각 $750 \mu l$ 씩을 수성 아연 설페이트용액(aqueous zinc sulfate 70%) $50 \mu l$ 와 혼합하고 10분간 볼텍싱하여 원심분리(4000g, 15분)하였다. 분리된 상등액은 질소 증발로 건조한 후 다시 증류수 $125 \mu l$ 로 희석하여 $2 \mu M$ 농도로 만든 후 HPLC를 이용하여 모약물의 함량을 측정하였다. 화합물이 모약물로 완전히 변환될 때의 함량에 대한 각 시간대 별 모약물 함량을 % 비율로 산출하였고 그 결과를 하기 표 3 및 도 1에 나타내었다.

표 3

화합물	시간(시간)	평균 피크 면적	함량(μM)	변환비율(%)
화합물 7 (모약물로 변환 가능한 최대 농도 : 13.11μM)	0.25	1507	0.27	2.03
	0.5	3454	0.61	4.65
	1	2929	0.52	3.94
	2	3699	0.65	4.98
	4	5015	0.89	6.75
	8	4722	0.83	6.36
	24	7906	1.40	10.64
화합물 1(모약물)	평균 피크 면적			함량
	113325			20 μM

표 3과 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 아릴설폰아미다졸론 유도체 화합물 7은 24시간 동안 반응으로 10.64% 정도의 변환율을 나타내었다. 이로 인해 화합물 7이 인간혈장에서의 모약물로의 변환율이 낮아 암세포에 영향을 받지 않은 환경에서는 약물반응을 나타내지 않는 특이성을 가지며, 이는 기존에 출원된 링커가 있는 화합물보다 낮은 변환율을 가지는 것으로 링커가 없는 본 발명의 화합물이 암세포에 대한 더 강한 특이성을 갖는 것으로 확인되었다.

4-2. 인간 플라스민

실험에 사용된 인간 플라스민은 시그마에서 구매하여(Plasmin from human plasma, EC 3. 4. 21. 7., ≥2.0 units/mg protein) 사용하였다.

차가운 0.1M Tris/HCl buffer, pH7.3 983μl(0℃)에 미리 준비된 화합물 7의 1mM(in 0.1M Tris/HCl buffer, pH7.3) 용액 중 5μl와 플라스민 용액(1mg/ℓ in 0.1M Tris/HCl buffer, pH 7.3) 중 12μl를 섞은 후, 이 플라스민 혼합용액을 바로 37℃ 배양기로 옮겨 반응시켰다. 이 후, 정해진 시간(0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24시간)에 이를 50μl씩 수거한 후 얼음에서 냉각된 인간 혈장 450μl를 가였다. 다시 여기에 250μl의 아세톤을 가한 후 강하게 혼합하였고, -80℃에서 보관하였다. 24시간의 반응이 완료된 시료들은 각각 750μl씩을 수성 아연 설페이트 용액(aqueous zinc sulfate 70%) 50μl와 혼합하고 10분간 볼텍싱하여 원심분리(4000g, 15분)하였다. 분리된 상등액은 질소 증발로 건조한 후 다시 증류수 125μl로 희석하여 2μM 농도로 만든 후 HPLC를 이용하여 모화합물의 함량을 측정하였다. 그 결과는 표 4 및 도 2에 나타내었다.

표 4

[0083]

화합물	시간(분)	평균피크면적	함량(μM)	변환비율(%)
화합물 7 (모약물로 변환 가능한 최대 농도 : $1.05 \mu\text{M}$)	5	1828	0.32	30.75
	15	2159	0.38	36.32
	30	3108	0.55	52.29
	45	2824	0.50	47.51
	60	2476	0.44	41.66
	120	3160	0.55	53.16
	240	3331	0.588	56.04
	480	4242	0.75	71.37
	1440	4456	0.79	74.97
화합물 1(모약물)	평균피크면적			함량
	11333			$2 \mu\text{M}$

[0084]

상기 표 4 및 도 2의 결과로, 본 발명의 아릴설폰아미다졸론 유도체 화합물 7은 인간 플라스민과 혼합한 24시간 후, 모약물인 화합물 1로의 변환율이 74.97%로 매우 높게 나타났다.

[0085]

이를 통해 본 발명의 아릴설폰아미다졸론 유도체 화합물은 인간 플라스민에 의해 매우 빠르게 모약물인 화합물 1로 변환되는 것을 확인할 수 있다.

[0086]

앞서 시행한 인간 혈장 내 변환 결과와 종합적으로 비교하여 고찰하였을 때, 본 발명의 아릴설폰아미다졸론 유도체 화합물은 인간 플라스민에 의해 더욱 선택적으로 절단되어 신속하게 모약물인 화합물 1로 변환되어 암세포에 대한 표적성이 기존보다 높아졌다.

[0087]

<실시예 5. 생체 내 항암 활성의 확인>

[0088]

본 발명의 아릴설폰아미다졸론 유도체 화합물 7을 모약물인 화합물 1과 대비하여 그 생체 내 항암활성을 확인하였다.

[0089]

종양모델로서, 인간 결장 샘암종 세포 SW620(Human colorectal adenocarcinoma, SW620)를 사용하였고, 실험 동물에 사용된 동물은 (주)오리엔트 바이오(Seongman, Korea)에서 공급하는 7주령 암컷 Balb/c nu/nu 마우스를 사용하였다. 동물은 1주간 순화기간을 두고 시험에 사용하였으며 22°C 에서 무균상태로 사육하였다.

[0090]

종양세포 SW620는 마우스 한 마리당 2×10^6 개씩 마우스에 피하주사로 이식하여 종양이 일정 크기로 성장할 때까지 사육하였다. 종양이 $50 \sim 100 \text{mm}^3$ 으로 성장하게 되면, 평균 종양 부피가 일정하도록 분리하여 대조군으로는 모약물인 화합물 1을 경구 투여하였고, 화합물 6 및 화합물 7은 정맥 투여하였다. 경구 투여 방법은 화합물 1을 70mg/kg 을 2일에 1회, 총 5회 투여하는 것으로 하였다. 정맥 투여 방법은 화합물 6과 화합물 7을 멸균식염수에 녹여 정맥투여로 35mg/kg 을 1일에 1회씩 6일간 연속 투여하는 것으로 하였다.

[0091]

종양의 크기와 동물의 체중은 매주 2회씩 측정하였고, 종양 크기 계산식은 아래와 같으며 약물 투여 개시일을 기준으로 1차(300mm^3), 2차(700mm^3), 3차(1500mm^3)로 성장하면 시험을 종료하였다.

[0092] 종양부피(mm^3) = [길이 $\times$ (너비 ^{2})] $\div$ 2

표 5

[0093]

화합물	투여개시후 10일째의 종양성장 억제율
화합물 6 (정맥투여)	90%
화합물 7 (정맥투여)	87%
화합물 1 (대조군, 경구투여)	48%

[0094]

상기 표 5를 통해, 본 발명의 아릴설폰닐이미다졸론 유도체 화합물은 투여개시 10일 경과 후 종양 성장 억제율이 화합물 6은 90%, 화합물 7은 87%으로, 경구투여된 대조화합물의 종양성장 억제율 48%와 대비시 매우 뛰어난 억제율을 나타내었다.

[0095]

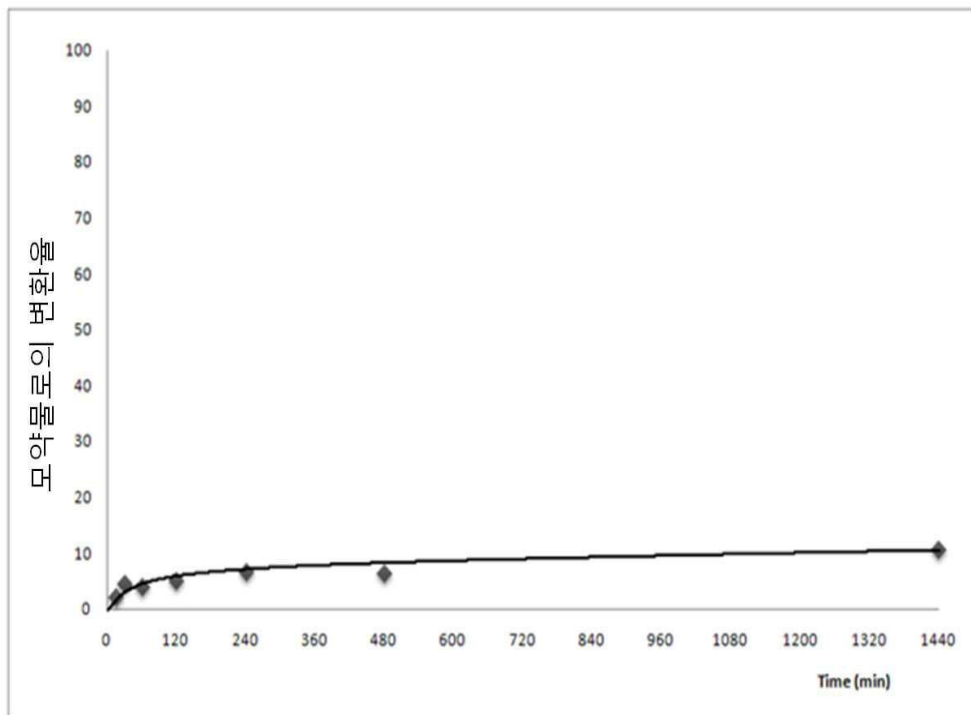
또한 이 외에도 본 발명의 아릴설폰닐이미다졸론 유도체 화합물 7의 정맥투여시 체내효소에 의한 가수분해시간이 기존의 링커가 있는 화합물에 비해 3배 이상 증가하여 약물이 암세포에 전달되기 전까지 안정적인 전구약물 상태로 존재하여 암세포에 도달하면서부터 모약물로 변환되기 시작하여, 체내 안정성도 증가하는 것으로 확인되었다. 이는 링커 결합부위의 안정성이 직접적인 아미드 결합보다 낮은 것에서 기인한다.

[0096]

이를 통해 본 발명의 아릴설폰닐이미다졸론 유도체 화합물은 정맥주사를 통해 투여되어 대조화합물에 비해 암세포에 보다 선택적으로 표적화되고, 증가된 항암 활성을 나타내며, 체내 안정성이 증가하는 것으로 확인할 수 있었다.

도면

도면1



도면2

