



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월14일

(11) 등록번호 10-2189562

(24) 등록일자 2020년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07C 251/86 (2006.01) A61K 31/166 (2006.01)
A61K 31/381 (2006.01) A61K 31/4164 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01) C07D 233/54 (2006.01)
C07D 271/107 (2006.01) C07D 333/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-7017498

(22) 출원일자(국제) 2012년11월26일

심사청구일자 2017년11월24일

(85) 번역문제출일자 2014년06월25일

(65) 공개번호 10-2014-0112489

(43) 공개일자 2014년09월23일

(86) 국제출원번호 PCT/BR2012/000480

(87) 국제공개번호 WO 2013/075199

국제공개일자 2013년05월30일

(30) 우선권주장

PI 1107312-8 2011년11월25일 브라질(BR)

(56) 선행기술조사문헌

US20110189306 A1*

J. Med. Chem. 2010, Vol.53, pp.325-334, 1부.*

Journal of the Brazilian Chemical Society,
2010, Vol.21, No.1, pp.142-150, 1부.*

Journal of the Chinese Chemical Society,
2011, Vol.58, No.1, pp.35-40, 1부.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

유니베르시다데 페더알 데 산타 카타리나

브라질 산타 카타리나, 씨이피-88040-900, 플로리아
아노폴리스, 트리단테, 캠퍼스 유니베르시타리오
에스/엔오

(72) 발명자

누네스, 리카르도 호세

브라질 산타 카타리나 씨이피-88040-270 플로리아
노폴리스 판타날 루아 로사 에스/엔오

마스카렐로, 알레산드라

브라질 산타 카타리나 씨이피-88040-480 플로리아
노폴리스 401 트린다데 155 에이피티오. 루아 조
르날리스타 티토 카르발호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 5 항

심사관 : 방성철

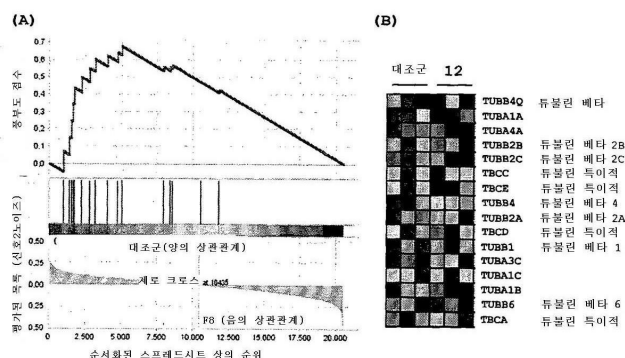
(54) 발명의 명칭 아실-하이드라존 및 옥사디아졸 화합물, 이를 포함하는 약학 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 세포 증식과 연관된 다양한 질환(예를 들어, 백혈병(급성 림프구성 백혈병(ALL)을 포함함), 종양 및 염증)의 치료를 위한 아실-하이드라존 화합물, 특히 3,4,5-트라이메톡시페닐 하이드라자이드 유도체에 관한 것이다. 실험에서 표준 물질로서 사용된 화합물(콜히친)과 유사한 활성을 가지는 아실-하이드라존을 얻었다. 본 발

(뒷면에 계속)

대표도



명에 따른 화합물의 더 우수한 선택성은 현재 임상 치료에서 사용되는 약품보다 부작용이 더 적은 것과 연관된 중요한 특성이다. 합성된 아실-하이드라존, 보다 구체적으로 화합물 02 및 07은 중요한 항백혈병 활성을 나타내었는데, 이는 약품의 원형에 대한 또는 백혈병, 특히 급성 림프구성 백혈병(ALL), 종양 및 다른 증식성 질환, 예를 들어 염증의 치료를 위한 약품에 대한 후보자로서의 02 및 07을 시사한다. 가장 활성적인 화합물의 작용 메커니즘은, 건강한 인간 림프구에서의 선택성 연구 이외에, DNA 마이크로어레이 및 칩에 의해 나타내어지는 후속 시험을 사용하여 결정하였다.

(72) 발명자

유네스, 로센도 아우구스토

브라질 씨이피-88050-005 플로리아노폴리스 3522
카사 215 카루페 로드 헤롤드 소아레스 글라반

슈툼프, 타이사 레지나

브라질 산타 카타리나 씨이피-88040-320 213 플로
리아노폴리스 판타날 루에 프로테노르 비달

릴, 파울로 세자르

브라질 산타 카타리나 씨이피 13085-420 팔료사
203 폰테 도 이마루임 286 에이피티오. 루아 비니
시우스 데 모라에스

유네스, 호세 안드레스

브라질 상파울로 씨이피-13085-420 캄피나스 넘버 74
샤카라 산타 마르가리다 루아 아빌리오 비엘라 준
쿠에이라

페레이라 데 수자 델로, 카롤리나

브라질 미나스 제라이스 씨이피-35450-000 540 콘
도미니오 아콘세고 다 세라 이타비리토 루아 알라
메다 도스 핀레이로스

카네바롤로, 라파엘 레나티노

브라질 상파울로 씨이피-13084-791 시타데 유니버
시타리아 캄피나스 11 넘버. 770 에이피티오. 에비
뉴 디알. 로메우 토르티마

도메네기니 키아라디아, 루이스

브라질 산타 카타리나 씨이피-88040-000 플로리아
노폴리스 303 판타날 320 블로코 에이-에이피티오
루아 데푸타도 안토니오 에두 비에이라

보틀리니 실베리아, 안드레

브라질 상파울로 씨이피-13085-260 자르담 도 솔
캄피나스 카사 224 148 루아 도 솔

라란제이라, 안젤로 브루넬리 알베르토니

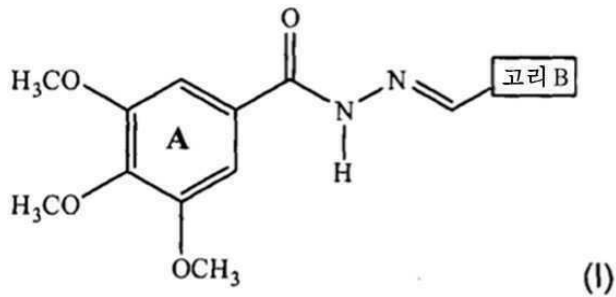
브라질 상파울로 캄피나스 13073-035 에이피티오
143 토레 5 550 에비뉴 임페라트리즈 레오폴디나

명세서

청구범위

청구항 1

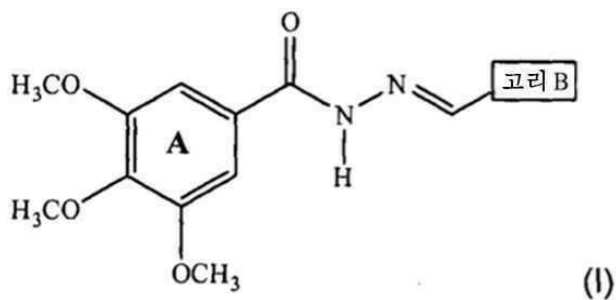
급성 림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia; ALL)의 치료에 사용하기 위한, 하기 화학식 I의 화합물 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 약학 조성물:



상기 화학식에서, 고리 B는 3-OCH₂CH₃-4-OH-페닐; 및 2-OH-4-Br-페닐을 포함하는 군으로부터 선택된 치환기이다.

청구항 2

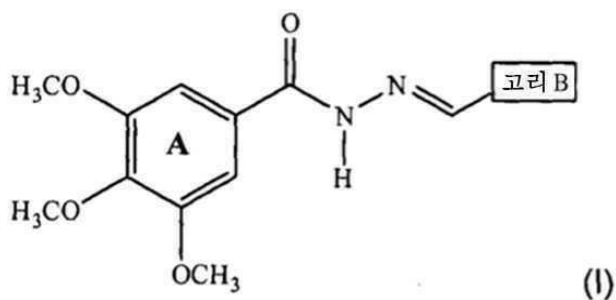
급성 림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia; ALL)의 치료에 사용하기 위한, 하기 화학식 I의 화합물 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 약학 조성물:



상기 화학식에서, 고리 B는 페닐, 4-Br-페닐, 4-NO₂-페닐; 3-OCH₃-페닐; 1-나프틸; 2-나프틸; 4-Cl-페닐; 3-OCH₂CH₃-4-OH-페닐; 및 2-OH-4-Br-페닐을 포함하는 군으로부터 선택된 치환기를 나타낸다.

청구항 3

제2항에 있어서,



상기 고리 B는 페닐, 4-Br-페닐, 4-NO₂-페닐; 3-OCH₃-페닐; 1-나프틸; 4-Cl-페닐; 3-OCH₂CH₃-4-OH-페닐; 및 2-OH-4-Br-페닐을 포함하는 군으로부터 선택된 치환기를 나타내는 것인, 급성 림프구성 백혈병(acute

lymphoblastic leukemia; ALL) 의 치료에 사용하기 위한 약학 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

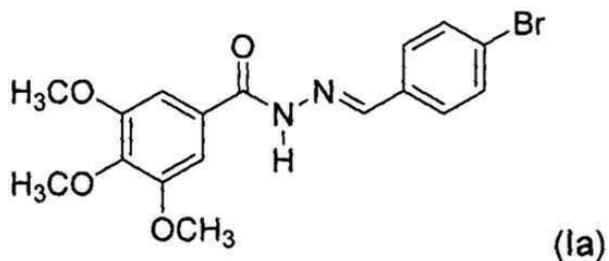
삭제

청구항 6

삭제

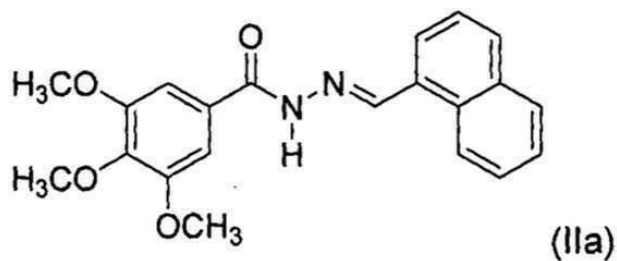
청구항 7

급성 림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia; ALL)의 치료에 사용하기 위한, 하기 화학식 Ia의 화합물 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 약학 조성물:



청구항 8

급성 림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia; ALL)의 치료에 사용하기 위한, 하기 화학식 IIa의 화합물 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 약학 조성물:



청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 세포 증식과 연관된 질환(예를 들어, 백혈병, 종양, 염증 및 다른 증식성 질환)의 치료를 위한 3,4,5-트라이메톡시페닐 하이드라자이드로부터 유도된 아실-하이드라존에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 사이클린 의존성 단백질 키나제(cyclin dependent protein kinase; CDK) 및 토포아이소머라제 I에 대하여 억제 활성을 가지며, 따라서 급성 림프구성 백혈병(acute lymphoblastic leukemia; ALL)을 치료하는데 있어서 유용할 수 있는 화합물에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라자이드로부터 신규한 아실-하이드라존 및 옥사디아졸을 얻는 것에 관한 것이다.

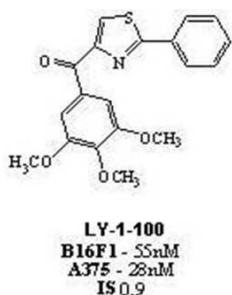
배경 기술

- [0002] 암은 신체 전체에 걸쳐서 인간 세포의 비정상적인 형태의 증식 및 제어되지 않은 확산을 특징으로 하는 질환이다. 종양성 신생 세포가 가지는 높은 침입 능력에 의해, 기능의 상실에 의해, 분화의 상실에 의해 그리고 전이하는 능력에 의해, 종양성 신생 세포 사이에서의 더 낮은 부착에 의해 종양성 신생 세포는 정상적인 세포와 상이하다(Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. *Farmacologia*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, **2004**. 703 p). 2009년에, 유방암 49,000건의 새로운 사례, 전립선암 47,000건, 폐암 27,000건, 결장 및 직장암 25,000건, 위암 23,000건, 및 자궁경부암 19,000건의 발생이 2009년에 브라질에서 추정되었으며 (INCA(Instituto Nacional do Câncer; 국립 암 연구소). 2011년 2월 23일에 접근한 <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=mapa.asp&ID=8>>에서 이용가능함), 암은 그 나라에서 2번째 주요 사망 원인이다.
- [0003] 백혈병은 여러 가지 유형의 암 중 하나이고, 단일 줄기 세포의 돌연변이로 생기는 림프구성 또는 골수성 조혈 세포(이의 자손은 백혈병 세포의 클론을 형성함)의 종양성 증식에 의해 일어난다. 보통 악성 형질전환을 위하여 다수의 유전자 변경이 일어나며, 이는 발암유전자의 부적절한 발현 및 종양 억제자 유전자의 기능 상실을 포함 하는데(Bain, B. J. *Diagnóstico em leucemias*. Rio de Janeiro: Elsevier, **2003**, Cap. 1, 01-56), 이들은 유전적 인자 또는 위험(예를 들어, 흡연, 방사선 또는 벤젠과 같은 화학 물질에의 노출)과 연관될 수 있다 (INCA(국립 암 연구소) - 백혈병 - 2011 2월 23일에 접근한 <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/leucemia/prevencao_genetica_outros_fatores_de_risco>에서 이용가능한 예방, 유전자, 다른 위험 인자; 및 IARC(International Agency for Research on Cancer; 국제 암 연구 기관). *World Cancer Report 2008*. 2011년 2월 23일에 접근한 <<http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/index.php>> 및 <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr_2008.pdf>에서 이용가능함). 백혈병은 얼마나 빠르게 질환이 진행하고 심각하게 되는지에 기초하여 추가로 세분되며, 이는 급성 또는 만성일 수 있다. 급성 백혈병은 세포 성숙에서 결함이 있어 증식과 성숙 사이에 불균형을 가져오는 것을 특징으로 하고; 세포의 백혈병 클론은 성숙 및 사멸 단계에 도달하지 않고 계속 증식하므로, 이는 백혈병 클론의 계속되는 확장과 비성숙 세포의 우세로 이어진다(INCA 2009b, Bain, B. J. *Diagnóstico em leucemias*. Rio de Janeiro: Elsevier, **2003**, Cap. 1, 01-56).
- [0004] 급성 림프구성 백혈병(ALL)은 골수에서 비성숙 림프구 전구 세포의 제어되지 않은 증식으로 인한 것으로서, 종양성 신생 세포의 매우 빠른 축적으로 이어진다(Plasschaert, S.; Van Der Kolk, D.; De Bont, E.; Vellenga, E.; Kamps, W.; De Vries, E. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) in Acute Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, **2004**, 45, 649-654). 이는 어린이에서 급성 백혈병의 경우의 80%를 차지하고(Laks, D.; Longhi, F., Bernardes, W. M.; Ramos, G. P. C. *J Pediatr*, **2003**, 79, 149-158), 모든 조혈 악성종양의 50%를 차지한다 (Downing, James R.; Shannon, Kevin M. Acute leukemia: A pediatric perspective. *Cancer Cell*, **2002**, 2, 437-445). 어른에서, ALL은 비교적 드물며, 조혈 악성종양의 2 내지 3%를 차지하지만(Downing, James R.; Shannon, Kevin M. Acute leukemia: A pediatric perspective. *Cancer Cell*, **2002**, 2, 437-445); 그러나, 급성 림프구성 백혈병은 다능성 줄기 세포에 영향을 미쳐 훨씬 더 공격적인 백혈병을 만들게 되므로, 예후는 어린이에 대한 것보다 훨씬 더 나쁘다(Greaves, M. F. Stem cell origins of leukaemia and curability. *British Journal of Cancer*, **1993**, 67, 413-423).
- [0005] 화학 요법으로서 천연 공급원으로부터의 화합물의 용도에 대한 연구는 충분하다. 일 예로는 항신생물제인 파클리탁셀(탁솔(Taxol(상표명)))이 있는데, 이는 지금까지 발견된 가장 중요한 항종양 천연 제품 중 하나로서, 1971년에 처음 보고되었으며(Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, **1971**, 93, 2325-2327), 이는 오랜 기간 후에 서야 겨우 임상 용도용으로 FDA가 승인하였다(1992년). 다른 예로는 급성 백혈병 및 다른 유형의 종양에 대한 치료에 사용되는 알칼로이드인 빈크리스틴이 있는데, 이는 튜불린에 결합하여 미세소관의 형성(중합) 또는 재구성(해중합)을 방해함으로써 파클리탁셀과 동일한 방법으로 작동한다(Goodman e Gilman. *As bases farmacológicas da terapêutica*, 10ª Ed., editora Mc Graw Hill. **2006**).
- [0006] 백혈병에 대한 현재 치료법에서 가장 일반적으로 사용되는 화학 요법제는 다우노루비신, 독소루비신, 텍사메타

손, 빈크리스틴, 메토틱렉세이트 및 머캅토프린을 포함한다(Plasschaert, S.; Van Der Kolk, D.; De Bont, E.; Vellenga, E.; Kamps, W.; De Vries, E. Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) in Acute Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, **2004**, 45, 649-654). 아포토시스의 유도 및 세포 증식의 억제에 있어서 이들 약물의 역할로 인하여 이들 약물은 치료상의 이익을 제공하지만, 또한 신체 및 정상 세포에 대하여 상당한 독성도 제공한다([Herr, I.; Debatin, K. M. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* **2001**, 98, 2603-2614]; 및 [Leszczyniecka, M.; Roberts, T.; Dent, P.; Grant, S.; Fisher, P. B. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacology & Therapeutics*, **2001**, 90, 105-156]). 항신생물제는 또한 빠르게 분열하는 세포를 가지는 정상적인 조직을 방해하며, 이는 다수의 바람직하지 않은 효과, 예를 들어 신체의 방어 세포 생성의 감소, 불량한 상처 치유, 탈모, 위장 상피 세포 손상, 불임 및 최기성을 야기할 수 있다(Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. *Farmacologia*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, **2004**. 703 p).

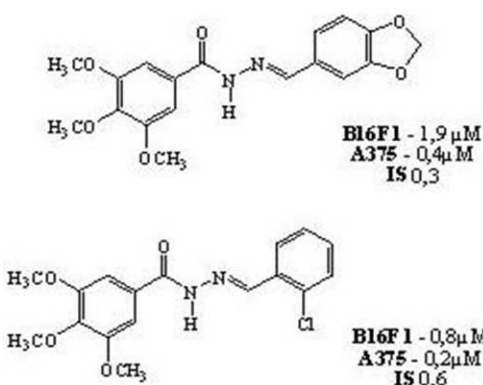
[0007] 2008년 암 연구에서 최근 진보에도 불구하고, 브라질에서 5,686건의 백혈병으로 인한 등록된 사망이 있었고, 2010년에는 예측된 9,580건의 새로운 질환 사례가 있었으며(INCA(국립 암 연구소). 2011년 2월 23일에 접근한 <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=mapa.asp&ID=8>>에서 이용가능함), 이는 꾸준히 백혈병 및 다른 종양의 치료를 위한 새로운 약물에 대한 검색의 이유가 된다.

[0008] 최근 연구에서, Wang과 동료들(Wang, Z.; Lu, Y.; Seibel, W.; Miller, D. D.; Li, W. Identifying Novel Molecular Structures for Advanced Melanoma by Ligand-Based Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2009**, 49, 1420-1427)은 화합물 LY-1-100(이는 입증된 미세소관(콜히친 결합 부위)에 대한 작용 메커니즘 및 친화성을 가지지만, 낮은 선택성을 가짐)의 구조에 기초한 새로운 항종양 화합물을 평가하였다.



[0009]

[0010] 구조는 리간드-기초 가상 스크리닝에 의해 선택되었으며, 이는 출발 화합물(LY-1-100)과 높은 구조적 유사성을 가지는 14개의 새로운 분자를 생성하였다. 연구자들에 의해 얻어진 이론상 결과는 항종양 활성을 제공하기 위하여 LY-1-100 화합물의 트라이메톡실화 고리가 유지되어야 하지만, 트라이아졸 고리는 중요한 것으로 보이지 않으며 *N*-메틸렌-하이드라진의 구조(이는 아실-하이드라존의 구조를 생성함)로 대체될 수 있음을 밝혔다. 무린에서 이들 화합물의 B16F1 및 A375 세포(시험관내)의 결과는 출발 화합물에 대하여 개선된 효능 및 선택성을 나타내지 않았지만, 이들 결과는 매우 유망하며 항흑색종 활성에 대하여 몇몇 주요한 구조적 성분을 확인하였다(Wang, Z.; Lu, Y.; Seibel, W.; Miller, D. D.; Li, W. Identifying Novel Molecular Structures for Advanced Melanoma by Ligand-Based Virtual Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, **2009**, 49, 1420-1427).



[0011]

- [0012] 이와 관련하여, 아실-하이드라존은 항종양 활성을 가지는 화합물 중 관심이 있는 부류로서 보인다. 따라서, 본 발명은 세포 증식과 연관된 질환(예를 들어, 백혈병, 종양, 염증 및 다른 증식성 질환)의 치료를 위한 아실-하이드라존, 특히 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라자이드로부터 유도된 아실-하이드라존을 얻는 것에 관한 것이다.
- [0013] 특허 출원 PI 제0112674-1호(발명의 명칭: n-[5-[[[5-alkyl-2-oxazolyl]methyl]thio]-2-tiazolyl]carboxamide inhibitors of cyclin-dependent kinases)는 증식성 질환, 예를 들어 암, 염증 및 관절염의 치료에서 유용한 단백질 키나제의 억제제로서 화합물 및 이들 화합물의 거울상이성질체, 부분입체이성질체, 용매화물 및 약학적으로 허용가능한 염을 기재한다. 합성된 화합물은 또한 알츠하이머 질환, 화학 요법으로 인한 탈모 및 심혈관계 질환의 치료에 유용할 수 있다. 출원 PI 제0112674-1호에 기재된 화합물은 본 발명 중에 제시된 것보다 더 복잡한 구조를 나타낸다.
- [0014] 참조되는 특허 출원 공개 U.S. 제20040138272호의 화합물(발명의 명칭: 1,4-Substituted cyclohexane derivatives)은, 축삭돌기의 성장 유도 및 재생에 의해 중추신경계 및 말초신경계의 수선에서 유용한 Rho 키나제를 억제함으로써 악성 질환에서 세포 증식을 방지하는데 유용할 수 있다. 공개 U.S. 제20040138272호의 화합물의 작용 메커니즘은 본 발명의 구조에 대하여 제안된 것과 상이하다.
- [0015] 세포 주기 진행을 조절하는데 유용한 사이클린-의존성 키나제(cyclin-dependent kinase; cdk)의 억제제는 특허 출원 PI 제0418095-0호(발명의 명칭: inhibitor of cyclin-dependent kinases, compositions and uses related thereto)에 제안되어 있다. 이와 같은 화합물은 과도한 세포 증식과 연관된 장애를 가지는 환자의 치료에 유용할 것이다. 더 복잡한 합성 공정을 가지는 PI 제0418095-0호에 기재된 화합물은 본 발명 중에서 제안된 것과 상이한 아실-하이드라존이다.
- [0016] 특허 출원 PI 제0508364-8호(발명의 명칭: derivatives of 4-benzimidazol-2-yl-pyridazin-3-one))에 키나제, 특히 CDK2 키나제(사이클린-의존성 키나제 2)의 억제제로서의 활성을 가지는 화합물 및 이의 생리학적으로 용인 가능한 염이 기재되어 있다. 더 복잡한 합성 공정을 가지는 PI 제0508364-8호의 화합물은 본 발명 중에 제안된 것과 상이하다.
- [0017] 미국 특허 출원 공개 U.S. 제20070066610호(발명의 명칭: Acyl-hydrazones as kinase modulators)는 세포 증식, 형태 발생 및 운동성을 조절하는 타이로신 키나제 수용체인 c-Met를 포함하는, 타이로신 키나제의 억제제로서의 아실-하이드라존을 개시한다. 더 복잡한 합성 공정을 가지는 U.S. 제20070066610호에 기재된 아실-하이드라존은 본 발명 중에 제안된 것과 상이하다. 추가적으로, 상기 기재된 화합물의 작용 표적은 본 명세서에서 제안된 것과 상이하다.
- [0018] 공개된 미국 특허 출원 제20080194562호(발명의 명칭: Pyrazole Derivatives for The Inhibition of Cdk's And Gsk's)는 사이클린-의존성 키나제(CDK) 및 키나제 글라이코겐 신타제(kinase glycogen synthase; GSK)의 활성을 억제 또는 조절하는 피라졸 화합물의 합성, 및 키나제 매개 질환 또는 병태의 치료 또는 예방에서의 상기 화합물의 용도에 관한 것이다. 상기 화합물 및 화학적 중간체를 함유하는 약학 조성물이 또한 기재되어 있다. U.S. 제20080194562호 문헌의 화합물은 본 발명 중에 제안된 것과 상이하다.
- [0019] 아실-하이드라존은 또한 이들의 명백한 살충 및 식물 성장 자극 활성용(Robinson, B. Fischer indole synthesis. *Chem. Rev.*, **1963**, 4, 373-401); 결핵의 치료용(Vigorita, M. G.; Ottana, R.; Zappala, C.; Maccari, R.; Pizzimenti, F. C.; Gabbrielli, G. Halogenated isoniazid derivatives as possible antimycobacterial and anti-HIV agents - III. *Farmaco*, **1994**, 49, 775-781)으로; 그리고 세균학적 및 정균제로서(Samus, N. M.; Tsapkov, V. I.; Kuracheva, S. A.; Burdenko, T. A. Synthesis and antimicrobial activity of coordination compounds of 3d-elements with some hydrazones derived by using 5-nitro-2-furaldehyde. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, **1994**, 28, 41-44) 문헌에 기재되어 있다.
- [0020] 상기 언급된 것을 고려하여, 연구는 새로운 화학 요법제를 개발하는 것을 목표로 하여 고리 단합의 비전형적 등배전자(bioisosterism) 전략에 의하여 수득한 아실-하이드라존 및 이의 옥사디아졸 유도체를 이용하여 수행되었다. 상기 옥사디아졸은 광범위한 생물학적 활성, 예를 들어 항바이러스, 항균, 항신생물, 살균, 및 타이로시나제 및 카텝신 K의 억제 활성이 있는 헤테로사이클릭 화합물의 중요한 부류이다(Kumar, D.; Sundaree, S.; Johnson, E. O.; Shah, K. An efficient synthesis and biological study of novel indolyl-1,3,4-oxadiazoles as potent anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2009**, 19, 4492-4494). 또한, 이들은 실질적으로 약리학적 활성의 증가에 기여할 수 있는 아미드와 에스터의 훌륭한 등배전자인

데, 이는 수용체로서 수소 결합에 참여할 수 있다(Guimaraes, C. R. W.; Boger, D. L.; Jorgensen, W. L. Elucidation of Fatty Acid Amide Hydrolase Inhibition by Potent α -Ketoheterocycle Derivatives from Monte Carlo Simulations. *Journal of the American Chemical Society*, **2005**, *127*, 17377-17384).

[0021] 따라서, 하기에 상세하게 기재된 본 발명의 공정으로부터의 특정한 아실-하이드라존 및 이의 유사체뿐만 아니라, 백혈병, 종양 및 다른 증식성 질환, 예를 들어 염증의 치료에서의 이들의 용도는 커다란 경제적 및 사회적 관심을 가진다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0022] 본 발명의 목표는 간단한 합성 경로에 의해 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라자이드로부터 유도된 합성 화합물(하이드라존 및 옥사디아졸) 및 모든 유도체 등뿐만 아니라, 세포 증식과 연관된 질환(예를 들어, 백혈병, 특히 급성 림프구성 백혈병(ALL), 종양, 염증 및 기타 증식성 질환)의 치료를 위한 이들 화합물의 용도를 얻는 것이다. 본 발명은 또한 이들 화합물의 생물학적 활성을 결정하는데 사용되는 절차를 기재한다.

과제의 해결 수단

[0023] 본 발명은 아실-하이드라존 부류, 특히 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라자이드로부터 유도된 것들뿐만 아니라, 유도체 화합물 옥사디아졸 및 다른 유사하면서 관련된 화합물, 및 세포 증식과 연관된 상이한 질환, 예를 들어 백혈병(급성 림프구성 백혈병(ALL)을 포함함), 종양 및 염증의 치료에 있어서 이들 모두의 약학적 적용에 관한 것이다. 본 발명은 또한 이들 화합물 모두의 생물학적 활성의 결정에 사용되는 절차를 기재한다.

[0024] 실험에서 표준으로서 사용된 화합물과 유사한 활성을 가지는 아실-하이드라존(콜히친)을 얻었다. 본 명세서에서 개시된 화합물의 더 높은 선택성은 임상 실시에서 현재 사용되는 약물보다 더 적은 부작용을 나타내는 것과 관련된 중요한 특성이다. 합성된 아실-하이드라존, 보다 구체적으로 화합물 02 및 07은 상당한 항백혈병 활성을 나타내었으며, 이는 백혈병, 특히 급성 림프구성 백혈병(ALL), 종양 및 다른 증식성 질환, 예를 들어 염증의 치료를 위한 약물 원형 또는 약물에 대한 후보자로서의 화합물 02 및 07을 나타낸다.

[0025] 가장 활성적인 화합물의 작용 메커니즘의 결정은, 건강한 인간 림프구에서의 선택성 연구에 더하여, 침을 통하여 나타내어지는 DNA 마이크로어레이 및 후속 시험을 사용함으로써 실행된다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 (A) 대조군 샘플 HL-60 대 화합물 07로 처리된 샘플에서 풍부도를 나타내는 "샤페로닌 튜블린 접힘 경로 후 리액툼"으로 정의되는 유전자 풍부도의 개요($p = 0.002$, FDR q -값 = 0.168) 및 (B) (A)에서 유전자 세트의 일부인 16개 유전자의 발현값을 파랑색 정사각형(더 낮은 발현) 및 빨강색 정사각형(더 높은 발현)으로 나타낸 것임.

도 2는 화합물 07이 G2/M에서 세포 주기 억류를 유도함을 나타냄. 18시간 동안 125nM 화합물 07 또는 DMSO로 처리한 주르카트(Jurkat) 세포에 대하여 프로피듐 요오드화물로 염색한 후 세포 주기 분석 및 유세포 분석을 하였다.

도 3은 125nM 화합물 07(F8) 또는 비히클(DMSO)로 처리된 주르카트 세포로부터의 다양한 세포 주기 조절자 단백질 추출물에 대한 웨스턴 블롯 분석 결과를 도시한 도면.

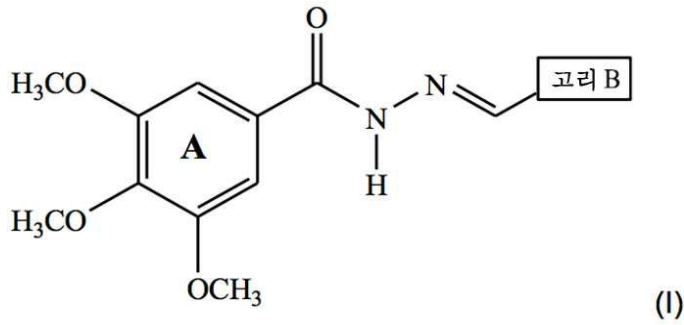
도 4는 화합물 07이 주르카트 세포에 있어서 아포토시스의 강한 유도 물질임을 나타냄. 대체로, 결과는 화합물 07이 주로 Chk2 및 Rb를 통하여 세포 주기 억류 및 아포토시스를 촉진함을 시사한다. 18시간 동안 125nM 화합물 07 또는 DMSO로 처리한 주르카트 세포는 아넥신 V / 프로피듐 요오드화물로 이중 염색하고 유세포분석기에 의해 분석하였다.

도 5는 48시간 후 인간 림프구(WBC) 및 백혈병 주르카트 및 HEK 세포에 대한 화합물 07의 영향을 나타낸 것. 정상적인 림프구의 증식은 피토헤마글루티닌으로 자극되었다. 화합물 07로 처리한 세포의 생존 백분율 대 비히클(DMSO)로 처리한 세포의 생존 백분율이 표시되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 합성 아실-하이드라존 및 이의 유사체 및 관련 화합물을 얻는 것 및 이의 작용 메커니즘을 포함하며, 이는 백혈병, 특히 급성 림프구성 백혈병(ALL), 종양 및 다른 증식성 장애, 예를 들어 염증을 치료하는데 있어서 유용할 수 있다.

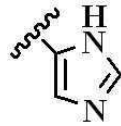
[0028] 본 발명의 양태 중 하나에 따르면, 하기 화학식 I의 구조 화합물이 기재된다:



[0029]

[0030] 상기 식에서 고리 B는 다음을 나타낸다:

[0031] 01 - 페닐



[0032] 02 - 4-Br-페닐

17 -

[0033] 03 - 4-NO₂-페닐

18 - 3-NO₂-페닐

[0034] 04 - 3-OCH₃-4-OH-5-Br-페닐

19 - 4-N(CH₃)₂-페닐

[0035] 05 - 3-OCH₃-4-OH-5-I-페닐

20 - 3-Cl-페닐

[0036] 06 - 3-OCH₃-4-OH-페닐

21 - 2,6-다이OCH₃-페닐

[0037] 07 - 1-나프틸

[0038] 08 - 2-나프틸



[0039] 09 - 4-Cl-페닐

22 -

[0040] 10 - 3,4-OCH₂O-페닐

23 - 2-COOH-페닐

[0041] 11 - 2-Cl-페닐

24 - 3-OCH₂CH₃-4-OH-페닐

[0042] 12 - 2,5-다이OCH₃-페닐

25 - 3-OCH₃-페닐

[0043] 13 - 3,4,5-트라이OCH₃-페닐

26 - 2-OH-4-Br-페닐

[0044] 14 - 2,4,5-트라이OCH₃-페닐

27 - (3-OCH₃-4-OCH₂페닐)-페닐

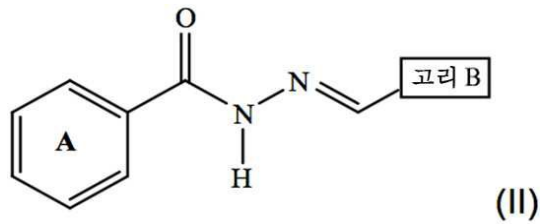
[0045] 15 - 4-O(CH₂)₃CH₃-페닐

28 - 4-CF₃-페닐

[0046] 16 - 4-CH₃-페닐

29 - 3-CF₃-4-Cl-페닐

[0047] 본 발명에 따른 화합물의 추가 군은 하기 구조 II를 가지는 화합물을 포함한다:



[0048]

[0049] 상기 식에서, 고리 B는 다음을 나타낸다:

[0050] 30 - 페닐

[0051] 31 - 3,4-OCH₂O-페닐

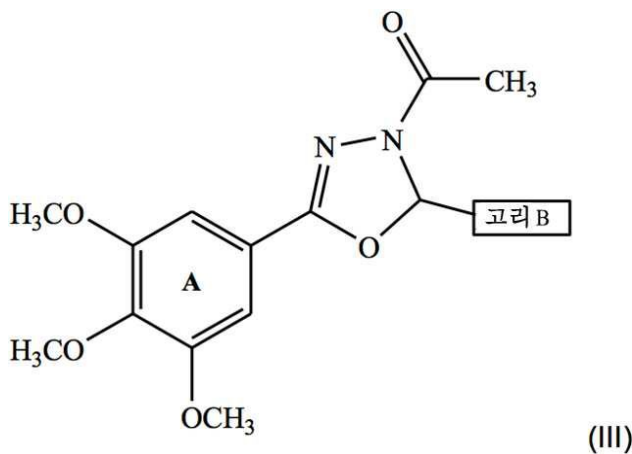
[0052] 32 - 4-Br-페닐

[0053] 33 - 4-CH₃-페닐

[0054] 34 - 1-나프틸

[0055] 35 - 2-나프틸

[0056] 추가적으로, 하기 구조 III에 따른 합성 유사체 옥사디아졸이 또한 기재되어 있다:



[0057]

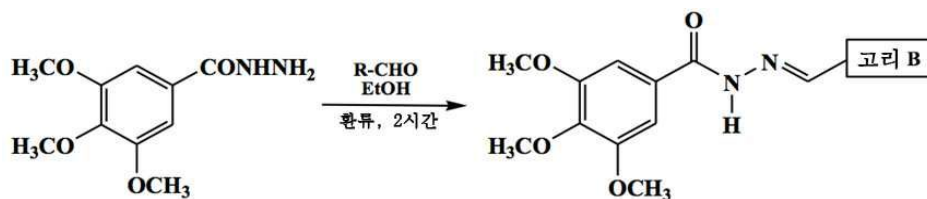
[0058] 상기 식에서, 고리 B는 다음을 나타낸다:

[0059] 36-3-OCH₃-4-OH-5-Br-페닐

[0060] 37 - 3-OCH₃-4-OH-페닐

[0061] 38 - 1-나프틸

[0062] 본 발명의 신규한 아실-하이드로존은 용매로서 에탄올을 사용하여 환류 하에서 하기 반응에 따라서 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라자이드와 상이한 알데하이드 사이의 축합 반응으로부터 얻었다:



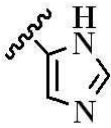
[0063]

[0064] 상기 식에서 고리 B는 다음을 나타낸다:

[0065] 02 - 4-Br-페닐*

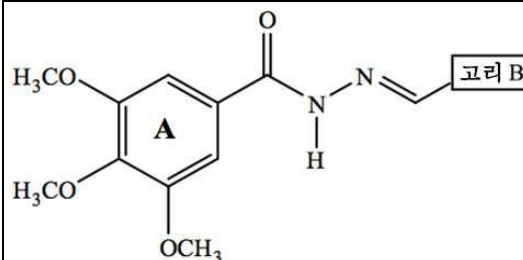
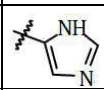
21 - 2,6-다이OCH₃-페닐

- [0066] 05 - 3-OCH₃-4-OH-5-I-페닐 26 - 2-OH-4-Br-페닐
- [0067] 07 - 1-나프틸* 29 - 3-CF₃-4-Cl-페닐

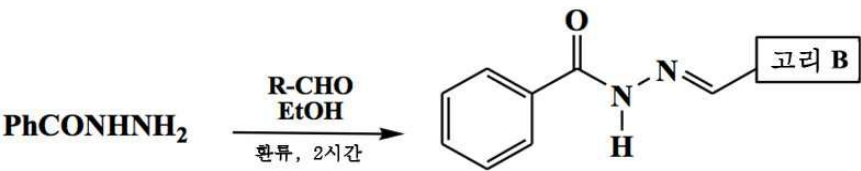


- [0068] 17 -
- [0069] 표 1은 합성에서 얻은 수율과 신규한 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라존의 실험상의 용점을 나타낸다.

표 1

합성된 신규한 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라존의 용점 및 수율.			
			
화합물 번호	고리 B	수율(%)	실험상의 용점(℃)
02*	4-Br-페닐	82	208-209
05	3-OCH ₃ -4-OH-5-I-페닐	69	247-248
07*	1-나프틸	82	229-230
17		75	230-231
21	2,6-다이OCH ₃ -페닐	93	245-246
26	2-OH-4-Br-페닐	65	206-208
29	3-CF ₃ -4-Cl-페닐	83	203-204

- [0071] 화합물 02의 구조는 옥사디아졸을 얻기 위한 반응 중간체로서 이전에 발표되었으며(Mazzone, G.; Bonina, F.; Formica, F. Some aroylhydrazones of halobenzaldehydes and halo-substituted 2,5-diaryl-1,3,4-oxadiazoles. *Farmaco, Edizione Scientifica*, **1978**, 33(12), 963-71), 화합물 07은 MAO(모노아민 옥시다제) 억제제로서 이전에 평가되었다(Mazzone, G.; Arrigo Reina, R. 3,4,5-Trimethoxybenzoyl hydrazides and their anti-MAO [monoamine oxidase] activity. *Bollettino delle Sedute della Accademia Gioenia di Scienze Naturali in Catania*, **1971**, 10(8), 689-702). 2가지 화합물(02 및 07)의 화학적 특징은 또한 이전에 트립파노소마 크루지 크루자인(*Trypanosoma cruzi cruzain*)의 억제제로서 이들 화합물 및 다른 화합물의 활성을 평가한 연구에서 본 발명자들의 연구 그룹에 의해 발표되었으나, 화합물 02 및 화합물 07은 이러한 단백질의 억제 활성을 나타내지 않았다(Borchhardt, Deise M.; Mascarello, Alessandra; Chiaradia, Louise Domeneghini; Nunes, Ricardo J.; Oliva, Glaucius; Yunes, Rosendo A.; Andricopulo, Adriano D. Biochemical evaluation of a series of synthetic chalcone and hydrazide derivatives as novel inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **2010**, 21(1), 142-150). 그러나, 백혈병의 치료를 위한 화합물 02 및 화합물 07의 용도는 종래 기술에 기재되어 있지 않으며, 본 발명의 범주에 속한다.
- [0072] 추가적인 아실-하이드라존(생물학적 테스트의 논의에서 돕기 위해 제조됨)은 상기 기재된 하이드라자이드의 제조를 위한 동일한 절차에 의해 하기 반응에 따라 알데하이드가 상이한 하이드라자이드 및 페닐 사이에서의 반응에 의해 합성되었다:



상기 식에서 고리 B는 다음을 나타낸다:

30 - 페닐

31 - 3,4-OCH₂O-페닐

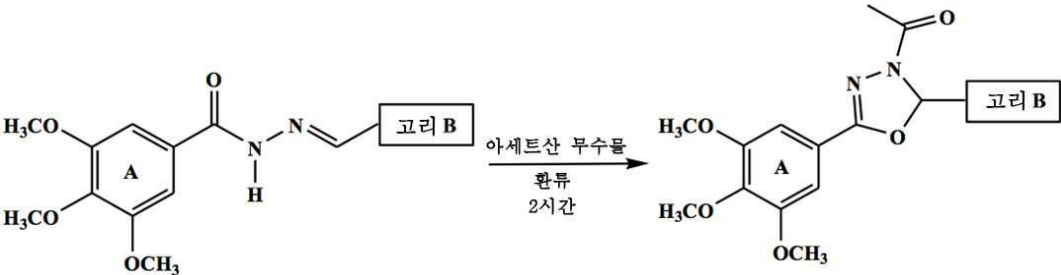
32 - 4-Br-페닐

33 - 4-CH₃-페닐

34 - 1-나프틸

35 - 2-나프틸

3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라존의 신규한 합성 옥사디아졸 유사체를 또한 하기 반응식에 따라서 아세트산 무수물과 이들의 반응으로부터 제조하였다:



상기 식에서 고리 B는 다음을 나타낸다:

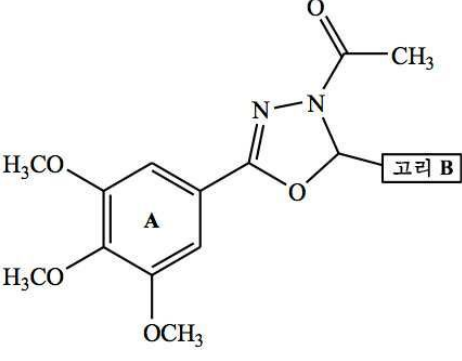
36 - 3-OCH₃-4-OH-5-Br-페닐

37 - 3-OCH₃-4-OH-페닐

38 - 1-나프틸

표 2는 옥사디아졸의 합성 및 실험상의 용융점에서 수득한 수율을 나타낸다.

표 2

신규한 합성 옥사디아졸의 수율 및 용융점.			
			
화합물 번호	고리 B	수율(%)	실험상의 용융점(° C)
36	3-OCH ₃ -4-OH-5-Br-페닐	30	177-179
37	3-OCH ₃ -4-OH-페닐	25	170-172

38	1-나프틸	35	189-192
----	-------	----	---------

- [0089] 본 발명은 또한 합성된 아실-하이드라존과 이의 유사체 및 옥사디아졸을 포함하는 유사한 화합물의 작용 메커니즘의 결정을 기재한다. 본 발명은 또한 백혈병, 특히 급성 림프구성 백혈병(ALL), 종양 및 세포 증식, 예를 들어 염증과 관련된 다른 질환의 치료를 위한, 원형 약물, 또는 약물로서 이와 같은 모든 화합물의 용도를 말한다.
- [0090] 본 명세서에 기재된 아실-하이드라존은, 실시예의 형태로 하기에 기재될 바와 같이, 선택적으로 건강한 인간 림프구에서의 활성화와 비교할 때 나노몰 수준으로 활성을 가지는 백혈병 세포에 작용한다. 테스트된 화합물에 대하여 신규한, 생물학적 결과의 관련성이 본 명세서에 표시되어 있다.
- [0091] 다른 실시형태에서, 본 발명은 부형제, 담체 및 약학적으로 허용가능한 보조제와 함께 상기 기재된 화합물을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0092] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "약학적으로 허용가능한"의 사용은 임의의 유형 또는 단지 멸균 수성 매질, 예를 들어 염수의 비독성, 불활성인 고체, 액체, 반고체 부형제, 희석제, 조제 제형을 의미한다. 약학적으로 허용가능한 담체로서 작용할 수 있는 물질의 일부 예는 설탕, 예를 들어 락토스, 글루코스 및 수크로스, 전분, 예를 들어 옥수수 전분 및 감자 전분, 셀룰로스 및 이의 유도체, 예를 들어 소듐 카복시메틸 셀룰로스, 에틸 셀룰로스 및 아세테이트 셀룰로스, 사이클로덱스트린; 오일, 예를 들어 땅콩 오일, 목화씨 오일, 해바라기 오일, 참깨 오일, 올리브 오일, 옥수수 오일 및 대두 오일; 글라이콜 예를 들어 프로필렌 글라이콜, 폴리에틸렌 글라이콜, 예를 들어 글라이세린 글라이콜, 솔비톨, 만니톨 및 폴리에틸렌; 에스테르, 예를 들어 에틸 라우레이트, 에틸 올레이트, 아가; 완충제, 예를 들어 수산화 알루미늄 및 수산화 마그네슘; 알긴산; 발열원 제거수; 등장성 염수, 링거액; 에틸 알코올 및 인산염 완충액뿐만 아니라 약학 제형에서 사용되는 다른 비독성 혼화성 물질이다.
- [0093] 특히, 본 발명의 화합물을 포함하는 약학 또는 수의학적 조성물은 임의의 유형의 투여, 특히 비경구 투여용으로 의도될 수 있다.
- [0094] 구체적으로, 본 발명의 조성물은 상기 약학 형태 중 임의의 것으로 약물의 제조에서 사용되는 임의의 유형의 부형제, 예를 들어 흡수제, 희석제, 결합제, 붕해제, 윤활제, 활택제, 가소제, 코팅제, 방출 제어를 위한 기질형성제, 용매 및 부용매, 습윤제, 유화제, 계면활성제, 증점제, 등장화제, 보습제, 연화제(levigating agent), 공기 배출제, 알칼리화제 또는 산성화제, 방부제, 산화방지제, 살균제, 정균제, 킬레이트화제, 착색제 및 감미제를 포함할 수 있다.
- [0095] 본 발명의 조성물에 적당한 흡수제는 추출물에 존재하는 물을 흡수하기 위하여 또는 임의의 휘발성 화합물을 고정시키기 위하여 첨가되는 임의의 물질, 예를 들어 에센셜 수 있다. 이와 같은 부형제의 비제한적인 예로는 인산칼슘, 카올린, 탄산마그네슘 벤토나이트 및 탈크가 있다.
- [0096] 본 발명의 조성물은 용매로서 제형에 첨가되는 임의의 불활성 물질, 예를 들어 락토스, 3염기 인산칼슘, 전분, 만니톨, 황산칼슘, 미세결정질 셀룰로스(마이크로셀(Microcel), 아비셀(Avicel)), 2염기성 인산칼슘(엔콤프레스(Encompress), 디탭(Ditab)), 산화마그네슘, 탄산마그네슘, 탈크, 카올린, 탄산칼슘, 텍스트로스 프럭토스, 락토스, 아스파탐, 셀룰로스, 말토스, 만니톨, 구아검, 솔비톨, 전분 및 수크로스(이에 한정되지 않음)를 포함하여 적절한 부피를 가지는 정제 또는 충전 캡슐을 얻을 수 있게 하고, 생산에 필수적인 유동 및 압착 특성을 제공할 수 있다.
- [0097] 본 발명의 조성물에 적당한 결합제 물질은 고체 약학 형태의 과립화 및 압착 동안 입자의 부착을 촉진시키는데 사용되는 제제일 수 있고, 또한 본 발명의 조성물에서 사용될 수 있으며, 예를 들어 카보폴, 포비돈, 잔탄 검, 아라비아검, 알긴산, 압착 설탕, CMC-Na, 에틸셀룰로스, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 포비돈(PVP), 전분, 전호화 전분 및 용액 중 액체 글루코스, 분산 또는 분말이 있다.
- [0098] 본 발명의 조성물에 적당한 붕해제 또는 붕해제는 생물학적 유체 중 약학 형태의 붕해 및/또는 용해를 가속화하는데 사용되는 임의의 성분일 수 있으며, 예를 들어 알긴산, 전분, 알긴산나트륨, CMC-Na, 미세결정질 셀룰로스, 크로스카멜로스 나트륨(Ac-Di-sol), 전분글라이콜산나트륨(엑스플로탭(Explotab)) 및 크로스포비돈(콜리돈 CL(Kollidon CL))이 있다.
- [0099] 본 발명의 조성물에 적당한 윤활제는 예를 들어 스테아르산마그네슘, 스테아르산칼슘, 스테아르산, 탈크 및 수산화 식물성 오일(예를 들어, 루브리탭(Lubritab))일 수 있다.

- [0100] 본 발명의 조성물에 적당한 활택제는 예를 들어 콜로이달 실리카(에어로실 200(Aerosil 200)) 및 탈크일 수 있다.
- [0101] 본 발명의 조성물에 적당한 가소제는 상 전이 온도를 변형하고 과립, 정제 또는 펠렛 상에서 형성되는 막의 유착을 용이하게 하는 중합체와 함께 사용될 수 있다. 이와 같은 제제의 비제한적인 예로는 글라이세린, 트라이에틸 시트레이트, 다이뷰틸 프탈레이트, 실리콘 및 PPG가 있다.
- [0102] 정제, 과립, 캡슐 또는 펠렛의 형태에서 본 발명의 코팅 조성물에 사용되는 코팅제는 예를 들어 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트, 에틸셀룰로스, 젤란검, 말토덱스트린, 메타크릴레이트, 메틸셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스, 셀락, 카라기난검, 왁스, 셀라들, 젤라틴, 셀룰로스 유도체(메틸 또는 에틸 셀룰로스, 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로스, 셀룰로스 아세테이트), 아크릴릭 에스터 및 메타크릴릭 에스터의 공중합체(특히, L100, RS 30D, RS PM, S100 유형의 유드라지트(Eudragit)), 폴리비닐 알코올(PVA) 및 폴리비닐 아세테이트일 수 있다.
- [0103] 유효 성분(들)의 방출 지속 및/또는 방출 제어를 획득하기 위하여, 본 발명의 조성물에서 이용될 수 있는 방출 제어를 위한 기질형성제는 HPMC, CMC-Na, 잔탄검, 카보폴, 다양한 유형의 유드라지트, 아가-아가, 폴리옥시에틸렌 유도체(PEO's), 임의의 성질의 사이클로덱스트린 나노스피어 및 나노입자일 수 있다.
- [0104] 용매 및 조용매, 예를 들어 특히 에탄올, 옥수수 기름, 면실유, 글라이세린, 아이소프로필 알코올, 광유, 올레산, 땅콩 기름, 정제수, 주사용 물이 또한 본 발명의 조성물에 사용될 수 있다.
- [0105] 본 발명의 조성물에 적당한 습윤제는 액체/고체 계면에서 표면 장력을 감소시키기 위하여 첨가되는 임의의 물질, 예를 들어 소듐 라우릴 설페이트(SLS), 소듐 도큐세이트 및 폴리솔베이트 20, 60, 80(트윈(Tween) 20, 60, 80)일 수 있다.
- [0106] 본 발명의 조성물에 적당한 유화제는 예를 들어 글라이세릴 모노스테아레이트, 세틸 알코올 및 젤라틴 및 조제, 예를 들어 CMC-Na, MC, 알지네이트 및 펙틴일 수 있다.
- [0107] 계면활성제, 예를 들어 벤잘코늄 클로라이드, 노녹시놀 10, 옥톡시놀 9, 폴리솔베이트 80 및 소듐 라우릴 설페이트가 또한 본 발명의 조성물에 적절하다.
- [0108] 본 발명의 조성물에 적당한 증점제는 연고의 점조도를 증가시키는데 사용되는 임의의 물질, 예를 들어 세틸 알코올, 백랍, 황납, 스테아릴 알코올, 파라핀, 미세결정질 왁스 및 세틸 에스터 왁스일 수 있다.
- [0109] 본 발명의 조성물에 적당한 등장화제는 눈, 코, 비강구 경로로 투여될 생물학적 유체와 유사한 삼투압 특징을 가지는 용액을 획득하는데 사용되는 임의의 물질, 예를 들어 NaCl(0.9%), 만니톨(5.07%) 및 텍스트로스(5.51%)일 수 있다.
- [0110] 본 발명의 조성물에 적당한 보수제(humectant)는 글라이세린, 프로필렌 글라이콜 및 솔비톨일 수 있다.
- [0111] 본 발명의 조성물에 적당한 연화제는 특히 예멸전, 오일 기재의 제조 동안 약물 입자를 감소시키는 공정에서 용이화제로서 사용되는 임의의 액체, 예를 들어 광유(유동 파라핀), 글라이세린, 프로필렌 글라이콜 공정, PEG 400, 면실유, 피마자 오일 및 폴리솔베이트 80(트윈(등록상표) 80)일 수 있다.
- [0112] 본 발명의 조성물에 적당한 공기를 배출하기 위한 제제가 밀봉형 동봉물 또는 유체 제형으로부터 공기, 예를 들어 질소(N_2) 및 이산화탄소(CO_2)를 배출하여 안정성을 증가시키는데 이용될 수 있다.
- [0113] 알칼리화제 또는 산성화제, 예를 들어 시트르산, 암모니아, 아세트산, 탄산암모늄, 푸마르산, 다이에탄올아민, 염산(HCl), 모노에탄올아민, 타르타르산, 수산화칼륨(KOH), 붕산, 수산화나트륨(NaOH), 탄산수소나트륨, 붕산나트륨, 및 트라이에탄올아민이 또한 본 발명의 조성물에 적당하다.
- [0114] 본 발명의 조성물에 사용될 수 있는 방부제는 예를 들어 항진균제, 예를 들어 벤조산, 벤조산나트륨, 소듐 뷰틸 파라벤, 메틸파라벤(니파긴(Nipagin)), 프로필파라벤(니파솔(Nipasol)), 에틸파라벤, 프로피온산 나트륨, 및 항균제, 예를 들어 벤잘코늄 클로라이드, 벤즈에토늄 클로라이드, 벤질 알코올, 세틸피리디늄, 클로로부탄올 및 페닐 클로라이드이다.
- [0115] 본 발명의 조성물에 적당한 산화방지제는 뷰틸 하이드록시아니솔(BHA), 뷰틸 하이드록시톨루엔(BHT), β -토코페롤, 아스코브산, 아스코빌 팔미테이트, 메타중아황산나트륨, 에틸렌다이아민 테트라아세트산(EDTA), 시트르산, 시스테인, 글루타티온 비타민 C, 메타중아황산나트륨, 시스테인 및 싸이오황산나트륨을 포함하는 군으로부터 선

택될 수 있다.

- [0116] 본 발명의 조성물은 완충제로서 시트르산 완충제, 인산 완충제 및 붕산 완충제를 추가로 포함할 수 있다. 착색제, 향미료 및 착향제로서, 예를 들어 바닐라, 멘톨, 계피유, 아니스유 및 코코아가 사용될 수 있다. 감미료로는 예를 들어 아스파탐, 텍스트로스(글루코스), 만니톨, 솔비톨, 사카린, 사이클라민산나트륨, 설탕, 아세설팜칼륨, 스테비오사이드 및 수크랄로스를 포함할 수 있다.
- [0117] 본 발명의 조성물은 부형제, 예를 들어 살균제, 정균제, 산화방지제, 방부제, 완충제, 안정화제, pH 조절제, 삼투압 조절제, 소포제 및 계면활성제뿐만 아니라 불활성화제 또는 항원 분획의 잔여물, 성장 배지 성분 및 약제 생성에 일반적으로 사용되는 용매를 추가로 포함할 수 있다. 이들 유형의 성분의 예는 문헌[The Handbook of Pharmaceutical Excipients, RAYMOND C. Rowe, Publisher The Pharmaceutical Press]에서 찾아볼 수 있다.
- [0118] 본 명세서에 기재된 조성물의 다양한 투여 경로가 이용가능하다. 선택되는 특정 방식은 선택되는 특정 활성 성분, 치료적 효능을 위해 필요한 투약량 및 조성물이 투여되는 환자에 따라 다를 것이다.
- [0119] 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 증식과 연관된 질환, 예를 들어 급성 림프구성 백혈병(ALL), 종양 및 염증의 치료를 위한 본 명세서에 기재된 화합물 및 조성물의 용도를 기재한다.
- [0120] 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 증식과 연관된 질환, 예를 들어 급성 림프구성 백혈병(ALL), 종양 및 염증의 치료를 위한 본 명세서에 기재된 화합물 및 조성물을 사용하여 세포 증식과 연관된 질환, 예를 들어 급성 림프구성 백혈병(ALL), 종양 및 염증을 치료하는 방법을 제공한다.
- [0121] **실시예**
- [0122] 본 발명은 이제 예시적인 실시예에 의해 설명될 것이다.
- [0123] **실시예 1. 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라존 01 내지 29의 제조를 위한 일반적인 절차**
- [0124] 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라존 01 내지 29의 합성을 위하여, 본 발명자들은 Troeberg 및 동료에 의해 기재된 방법론(Troeberg, L.; Chen, X.; Flaherty, T. M.; Morty, R. E.; Cheng, M.; Hua, H.; Springer, C.; McKerrow, J. H.; Kenyon, G. L.; Lonsdale-Eccles, J. D.; Coetzer, T. H. T.; Cohen, F. E. Chalcone, acyl hydrazide, and related amides kill cultured *Trypanosoma brucei brucei*. *Molecular Medicine*, **2000**, *6*, 660-669)을 사용하였다. 100ml/1구 반응 플라스크에 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라자이드(2mmol)를 넣고, 유기 용매, 즉 아세톤, 아세트산에틸, 에틸 에터, 에탄올, 메탄올(20ml) 및 적절한 알데하이드(2mmol) 중에서 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조한다. 혼합물을 1 내지 10시간 동안 환류시켰다. 그 다음, 용액을 여과하고 고체를 유기 용매 중에서 재결정화시켰다.
- [0125] **실시예 2. 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라존 01 내지 29를 얻는데 사용되는 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라자이드를 얻기 위한 일반적인 절차**
- [0126] 아실-하이드라존 01 내지 29의 제조에 사용되는 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라자이드의 합성을 위하여, 본 발명자들은 이미 기재된 방법론(Chida, A. S.; Vani, P. V. S. N.; Chandrasekharam, M.; Srinivasan, R.; Singh, A. K. Synthesis of 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzoquinone: a key fragment in coenzyme-Q series. *Synthetic communications*, **31**, 657-660, **2001**)을 사용하고, 2 단계로 수행하였다:
- [0127] **에스터를 획득하는 단계:** 1000ml/1구 반응 플라스크에 갈산(50g, 0.294mol)을, 에탄올, 에틸 에터, 아세트산에틸, 아세톤, 석유에터(375ml)일 수 있는 유기 용매 중 황산다이메틸(178.1g, 1.413mol), 무수 탄산칼륨(175.5g, 1.293mol) 및 TBAI(테트라부틸암모늄 요오다이드)(1g)와 함께 넣고 1 내지 12시간 동안 환류시켰다. 얻은 고체를 여과하고, 동일한 유기 용매로 세척하였다(3 x 50ml). 크림색의 비결정질 고체의 형태로 에스터를 수득하였으며, 이때 수율은 78%이고; mp는 84°C(lit. mp 82 내지 83°C)였다. NMR ¹H (CDCl₃): 1.60 (s, 3H, CH₃), 3.92 (s, 9H, OCH₃), 7.33 (s, 2H, Ar).
- [0128] **하이드라자이드를 획득하는 단계:** 1000ml/1구 반응 플라스크에 제1 단계에서 수득한 에스터(48g, 0.212mol)를, 에탄올, 아세트산에틸, 다이클로로메탄, 아세톤, 메탄올(200ml)일 수 있는 유기 용매와 99% 하이드라진 수화물(N₂H₄·H₂O)(77.6g, 1.54mol)의 용액과 함께 넣었다. 혼합물을 1 내지 5시간 동안 환류시키고, 밤새 자기 교반 하 오직 0 내지 50°C의 온도에서 유지시켰다. 얻은 고체를 여과하고, 메탄올 중에서 재결정화하여 백색 결정으로서 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라자이드를 수득하였으며, 이 때 수율은 85%이고; mp는 162 내지 163°C(lit. mp

168℃)였다. NMR ^1H (CDCl_3): 3.80 (s, 3H, OCH_3), 3.90 (s, 6H, OCH_3), 7.18 (s, 2H, Ar), 9.55 (NH).

[0129] 실시예 3. 페닐-하이드라존 30 내지 35의 제조를 위한 일반적인 절차

[0130] 페닐-하이드라존 30 내지 35의 합성을 위하여, 본 발명자들은 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라존을 얻기 위하여 기재된 바와 동일한 방법으로 Troeberg 및 동료에 의해 기재된 방법론(Troeberg, L.; Chen, X.; Flaherty, T. M.; Morty, R. E.; Cheng, M.; Hua, H.; Springer, C.; McKerrow, J. H.; Kenyon, G. L.; Lonsdale-Eccles, J. D.; Coetzer, T. H. T.; Cohen, F. E. Chalcone, acyl hydrazide, and related amides kill cultured *Trypanosoma brucei brucei*. *Molecular Medicine*, 2000, 6, 660-669)을 사용하였다.

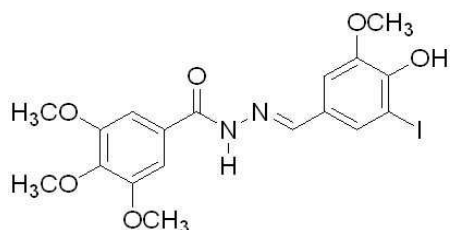
[0131] 실시예 4. 옥사디아졸 36 내지 38의 제조를 위한 일반적인 절차

[0132] 옥사디아졸 36 내지 38의 합성을 위하여, 본 발명자들은 Jin 및 동료에 의해 기재된 방법론(Jin, L.; Chen, J.; Song, B.; Chen, Z.; Yang, S.; Li, Q.; Hu, D.; Xu, R. *Bioorg Med Chem*, 2006, 16, 5036-5040)을 사용하였다. 100ml/1구 반응 플라스크에, 해당하는 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라존(1mmol) 및 아세트산 무수물(10ml)을 혼합하였다. 혼합물을 1 내지 10시간 동안 환류하고, 그 후에 설페를 첨가하여 냉각시켰으며, 0 내지 60℃의 온도에서 밤새 방치하여 생성물을 침전시켰다. 얻은 고체를 여과하고, 물로 세척하였으며, 유기 용매/물로 재결정화하였다.

[0133] 신규한 화합물의 ^1H 및 ^{13}C 의 핵자기공명(NMR) 및 적외선(IR) 스펙트럼 데이터

[0134] * .TMS에 대한 ppm, 다중도(J, 단위 Hz). 용매 CDCl_3 .

[0135] 05 - ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 3.73 (s, 3H, $p\text{-OCH}_3$), 3.86 (s, 6H, $m\text{-OCH}_3$), 3.89 (s, 3H, $m\text{-OCH}_3$), 7.22 (s, 2H, H2, H6), 7.34 (s, 1H, H6'), 7.60 (s, 1H, H2'), 8.31 (s, 1H, HC=N), 10.08 (1H, OH), 11.66 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 56.78 ($m\text{-OCH}_3$), 60.81 ($p\text{-OCH}_3$), 85.17 (C3'), 105.84 (C2, C6), 109.72 (C6'), 128.28 (C1), 129.31 (C1'), 130.75 (C2'), 141.03 (C4), 147.35 (C=N), 147.97 (C5'), 149.00 (C4'), 153.36 (C3, C5), 163.16 (C=O). IR cm^{-1} 3382 (N-H), 1636, 1228 (C=O), 1565 (C=N), 1290, 1045 (C-O), 2999, 2839, 1585, 1490, 1334, 1137, 997 (Ar) (KBr).



[0136]

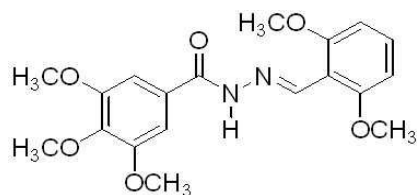
[0137] 17 - ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 3.74 (s, 3H, $p\text{-OCH}_3$), 3.88 (s, 6H, $m\text{-OCH}_3$), 7.23 (s, 2H, H2, H6), 7.53 (s, 1H, H2'), 7.66 (m, 1H, H4'), 8.02 (s, 1H, NH5'), 8.43 (s, 1H, HC=N), 11.37 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 56.76 ($m\text{-OCH}_3$), 60.81 ($p\text{-OCH}_3$), 105.71 (C2, C6), 129.51 (C1), 131.94 (C1'), 132.16 (C2'), 135.37 (C4'), 145.45 (C=N), 153.35 (C3, C5), 162.29 (C=O). IR cm^{-1} 3212 (N-H), 1623, 1234 (C=O), 1580 (C=N), 1280, 1054 (C-O), 2994, 2941, 2838, 1503, 1456, 1411, 1344, 1125, 1006, 844 (Ar) (KBr).



[0138]

[0139] 21 - ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) 3.71 (s, 3H, $p\text{-OCH}_3$), 3.79 (s, 6H, $o\text{-OCH}_3$), 3.85 (s, 6H, $m\text{-OCH}_3$), 6.72 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H3', H5'), 7.23 (s, 2H, H2, H6), 7.34 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H4'), 8.60 (s, 1H, HC=N), 11.52

(s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) 56.72 (*m*-OCH₃), 56.78 (*o*-OCH₃), 60.76 (*p*-OCH₃), 105.08 (C3', C5'), 105.76 (C2, C6), 111.75 (C1'), 129.37 (C1), 131.87 (C4'), 140.88 (C4), 143.92 (C=N), 153.31 (C3, C5), 159.38 (C2', C6'), 162.81 (C=O). IR cm^{-1} 3186 (N-H), 1644, 1240 (C=O), 1586 (C=N), 1258, 1068 (C-O), 3002, 2928, 2838, 1502, 1473, 1417, 1378, 1342, 1121, 1007, 783 (Ar) (KBr).



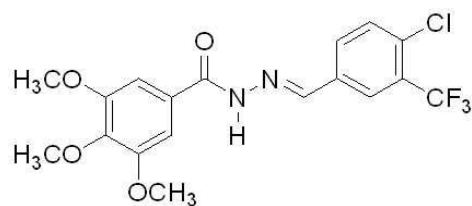
[0140]

26 - ^1H NMR (DMSO- d_6) 3.42 (s, 3H, *p*-OCH₃), 3.85 (s, 6H, *m*-OCH₃), 6.89 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H5'), 7.25 (s, 2H, H2, H6), 7.42 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H6'), 7.78 (s, 1H, H3'), 8.61 (s, 1H, HC=N), 11.26 (s, 1H, NH), 12.01 (1H, OH). IR cm^{-1} 3220 (N-H), 1653, 1228 (C=O), 1588 (C=N), 1275, 1099 (C-O), 3004, 2941, 2834, 1550, 1503, 1479, 1463, 1416, 1352, 1335, 1189, 1011, 992, 951, 839, 760 (Ar) (KBr).



[0142]

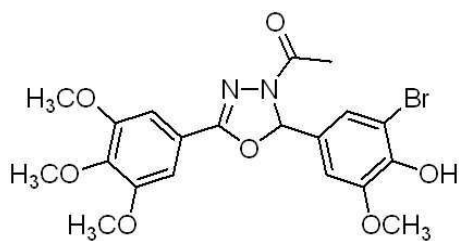
29 - ^1H NMR (DMSO- d_6) 3.72 (s, 3H, *p*-OCH₃), 3.85 (s, 6H, *m*-OCH₃), 7.22 (s, 2H, H2, H6), 7.82 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H5'), 8.02 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H6'), 8.15 (s, 1H, H2'), 8.51 (s, 1H, HC=N), 11.96 (s, 1H, NH). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) 56.65 (*m*-OCH₃), 60.73 (*p*-OCH₃), 105.96 (C2, C6), 126.29 (C2'), 127.98 (C1'), 128.88 (C1), 132.31 (CF₃), 132.91 (C4'), 133.01 (C5'), 134.82 (C6'), 141.27 (C4), 145.61 (C=N), 153.40 (C3, C5), 163.50 (C=O). IR cm^{-1} 3182 (N-H), 1655, 1242 (C=O), 1587 (C=N), 1269, 1039 (C-O), 3008, 2938, 2838, 1506, 1480, 1417, 1336, 1316, 1173, 1121, 1006, 958, 666 (Ar) (KBr).



[0144]

36 - ^1H NMR (DMSO- d_6) 2.36 (s, 3H, CH₃), 3.85 (s, 3H, *p*-OCH₃), 3.91 (s, 3H, *m*-OCH₃), 3.92 (s, 6H, *m*-OCH₃), 6.00 (s, 1H, OH), 6.99 (s, 1H, H2'), 7.06 (s, 1H, H6'), 7.11 (s, 2H, H2, H6), 7.26 (s, 1H, HC=N). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) 21.75 (CH₃), 56.56 (*m*-OCH₃), 61.25 (*p*-OCH₃), 91.52 (C=N), 104.44 (C2, C6), 117.93 (C5'), 119.37 (C2'), 122.52 (C6'), 136.02 (C1', C1), 139.24 (C4'), 141.49 (C4), 152.90 (C3'), 153.64 (C3, C5), 155.84 (C=N), 168.32 (C=O). IR cm^{-1} 1766, 1238 (C=O), 1667, 1582 (C=N), 1254, 1047 (C-O), 1177 (C-N), 3445 (OH), 1130, 621 (C-Br), 3004, 2941, 2838, 1466, 1416, 1366, 1306, 1190, 998, 858 (Ar) (KBr).

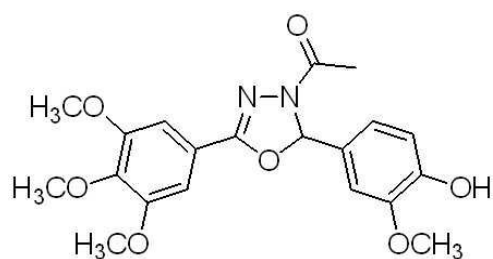
[0145]



[0146]

[0147]

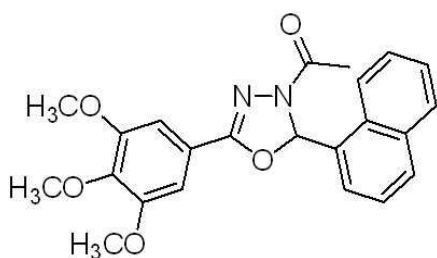
37 - ^1H NMR (DMSO- d_6) 2.35 (s, 3H, CH_3), 3.82 (s, 3H, $p\text{-OCH}_3$), 3.90 (s, 3H, $m\text{-OCH}_3$), 3.92 (s, 6H, $m\text{-OCH}_3$), 6.97 (s, 1H, H_2'), 7.06 (m, 1H, H_5'), 7.10 (s, 2H, H_2 , H_6), 7.25 (s, 1H, HC-N), 7.44 (m, 1H, H_6'); OH 기에 해당하는 신호는 관찰되지 않았음. ^{13}C NMR (DMSO- d_6) 21.54 (CH_3), 56.27 ($m\text{-OCH}_3$), 56.33 ($m\text{-OCH}_3$), 61.02 ($p\text{-OCH}_3$), 91.14 (C-N), 104.22 (C2, C6), 109.77 (C2'), 119.16 (C5'), 128.09 (C6'), 136.402 (C1', C1), 141.24 (C4'), 141.96 (C4), 151.78 (C3'), 153.42 (C3, C5), 155.60 (C=N), 168.10 (C=O). IR cm^{-1} 1767, 1243 (C=O), 1665, 1581 (C=N), 1250, 1043 (C-O), 1177 (C-N), 3445 (OH), 1129, 644 (C-Br), 2967, 2945, 2838, 1507, 1466, 1417, 1365, 1036, 1287, 1197, 1083, 997, 958, 861, 699 (Ar) (KBr).



[0148]

[0149]

38 - ^1H NMR (DMSO- d_6) 2.47 (s, 3H, CH_3), 3.87 (s, 9H, OCH_3), 7.08 (s, 2H, H_2 , H_6), 7.26 (s, 1H, HC-N), 7.26 (m, 1H, H_2'), 7.48 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_3'), 7.55 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_7' , H_8'), 7.62 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_7'), 7.76 (m, 1H, H_4'), 7.92 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_6'), 8.22 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H_9'). ^{13}C NMR (DMSO- d_6) 21.57 (CH_3), 56.28 ($m\text{-OCH}_3$), 60.98 ($p\text{-OCH}_3$), 91.17 (C-N), 104.27 (C2, C6), 119.61 (C1), 123.04 (C2'), 125.07 (C9'), 125.20 (C3'), 126.05 (C7'), 126.95 (C8'), 128.95 (C4'), 130.51 (C6'), 130.61 (C10'), 130.79 (C5'), 134.04 (C1'), 141.11 (C4), 153.29 (C3, C5), 155.83 (C=N), 168.26 (C=O). IR cm^{-1} 1731, 1243 (C=O), 1669, 1587 (C=N), 1254, 1039 (C-O), 1124 (C-N), 2997, 2941, 2827, 1509, 1465, 1416, 1369, 1332, 1191, 1006, 980, 847, 784, 699 (Ar) (KBr).



[0150]

[0151] 실시예 5. 급성 림프구성 백혈병(ALL) 세포 계통에 대한 화합물의 효과

[0152]

a) 화합물의 회석 및 저장: 모든 화합물을 저장 농도 20mM로 DMSO 중에 재현탁하고, -20°C 에서 저장하였다. 세포독성 시험을 위하여, 세포로 방출하기 직전에 배양 배지(RPMI-1640 + 10% 소태아혈청, 100IU/ml 페니실린 및 100pg/ml 스트렙토마이신) 중에 저장 용액으로부터 회석물을 만들었다.

[0153]

b) 세포의 화합물에 대한 시험관내 민감성/저항성의 MTT 방법에 의한 분석: REH 및 주르카트(Jurkat) 세포주를 10% FBS(소태아혈청), 100IU/ml 페니실린, 100pg/ml 스트렙토마이신이 있는 RPMI-1640 배지 중에서 유지하고 37°C , 5% CO_2 에서 배양하였다. 문헌에 기재된 방법에 따라 세포독성 분석을 실행하였다([Pieters, R.; *et al.* In

vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. *Blood*, **1990**, 76, 2327-2336]; [Pieters, R.; *et al.* Relation of cellular drug resistance to long-term clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, **1991**, 338, 399-403] 및 [Kaspers, G. J.; *et al.* In vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **1997**, 90, 2723]). 세포를 기재된 바와 같이 배양 배지 중에 3.75×10^5 세포수/ml의 농도로 재현탁하였다. 이 현탁액 80마이크로리터를, 상이한 농도의 화합물 또는 비히클 단독을 20 마이크로리터를 포함하는 96 등근-바닥 웰이 있는 플레이트로 과중하였다. 각각의 처리를 3중으로 실시하였다. 37°C, 5% CO₂에서 48시간 배양 후, MTT 용액 20μl를 첨가한 다음(1x PBS ml 당 5mg), 4시간 30분 동안 37°C 및 5% CO₂에서 추가로 배양하였다. 상기 4시간 30분 동안 MTT(누르스름함)를 살아있는 세포에 의하여 포마잔 염(푸르스름한 색)으로 대사시켰다. 이 다음, 100μl 소듐 도데실 설페이트(SDS) 10% + 0.1M HCl을 첨가하여 포마잔 결정을 용해하였다. 밤새 배양한 후, 570nm에서 흡광도 판독을 수행하였다. 처리 후 살아 남은 세포의 백분율을 대상 화합물의 첨가가 없는 배지 중에서 살아 남은 세포(“음성 대조군”)의 수에 대하여 계산하였다.

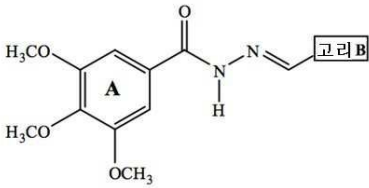
[0154] c) IC 측정: IC₅₀는 최대 억제율의 50%를 얻는 화합물의 농도로 정의된다. 흡광도의 판독 후, 생존 곡선을 그리고 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 소프트웨어를 이용하여 IC₅₀ 값을 얻었다.

[0155] **결과: B 및 T 계통 백혈병 세포(각각 HEK 및 주르카트)에 대한 아실 하이드라존 및 옥사디아졸의 작용**

[0156] Pieters *et al.*([Pieters, R.; *et al.* In vitro drug sensitivity of cells from children with leukemia using the MTT assay with improved culture conditions. *Blood*, **1990**, 76, 2327-2336]; 및 [Pieters, R.; *et al.* Relation of cellular drug resistance to long-term clinical outcome in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, **1991**, 338, 399-403]) 및 Kaspers *et al.*(Kaspers, G. J.; *et al.* In vitro cellular drug resistance and prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **1997** 90, 2723)에 의해 기재된 방법에 따른 세포 생존력 분석(MTT)에 의해 인간 백혈병 주르카트 세포 및 HEK 세포에 대한 합성 화합물의 세포독성 효과를 연구하였다. 결과는 표 3에 표시되어 있다.

표 3

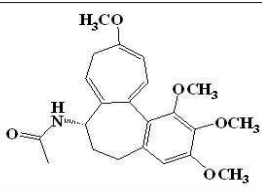
인간 백혈병 주르카트 세포 및 HEK 세포에서 0.1 DM 중 화합물 01~29의 스크리닝(가장 활성적인 화합물은 강조 표시를 함).



화합물 번호		백혈병 세포의 생존율(48시간 처리)	
		B 세포 유래 (REH)	T 세포 유래 (주르카트)
		0.1μM	0.1μM
01	페닐	92%	88%
02	4-Br-페닐	45%	30%
03	4-NO ₂ -페닐	98%	96%
04	3-OCH ₃ -4-OH-5-Br-페닐	99%	102%
05	3-OCH ₃ -4-OH-5-I-페닐	103%	103%
06	3-OCH ₃ -4-OH-페닐	99%	101%
07	1-나프틸	39%	30%
08	2-나프틸	94%	104%
09	4-Cl-페닐	68%	33%
10	3,4-OCH ₂ O-페닐	43%	30%
11	2-Cl-페닐	68%	34%
12	2,5-다이OCH ₃ -페닐	106%	122%
13	3,4,5-트라이OCH ₃ -페닐	101%	121%
14	2,4,5-트라이OCH ₃ -페닐	94%	83%
15	4-O(CH ₂) ₃ CH ₃ -페닐	88%	100%
16	4-CH ₃ -페닐	37%	17%
17		88%	115%
18	3-NO ₂ -페닐	97%	119%

[0157]

19	4-N(CH ₃) ₂ -페닐	94%	121%
20	3-Cl-페닐	100%	86%
21	2,6-다이OCH ₃ -페닐	102%	90%
22		97%	94%
23	2-COOH-페닐	96%	81%
24	3-OCH ₂ CH ₃ -4-OH-페닐	95%	86%
25	3-OCH ₃ -페닐	89%	78%
26	2-OH-4-Br-페닐	90%	79%
27	(3-OCH ₃ -4-OCH ₂ Bz)-페닐	91%	91%
28	4-CF ₃ -페닐	94%	63%
29	3-CF ₃ -4-Cl-페닐	98%	98%

콜히친		41%	18%
-----	-----------------------------------------------------------------------------------	-----	-----

[0158]

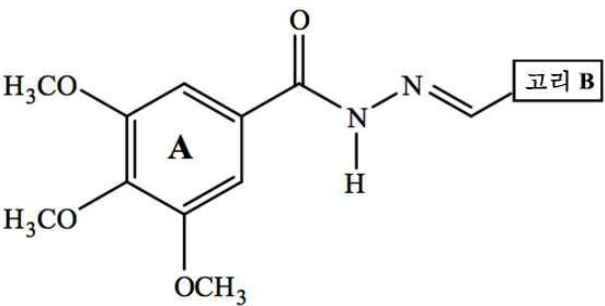
[0159] 아실-하이드라존 01 내지 29의 A 고리에서 메톡시기의 영향을 분석하기 위하여, 본 발명자들은 상보적인 아실-하이드라존(30 내지 35)의 시리즈를 시험하였다. 이 시리즈의 화합물 중 어떤 것도 실행된 스크리닝에서 세포에 대하여 활성을 나타내지 않았으며, 따라서 이는 항백혈병 활성을 위한 트라이메톡실화 고리의 필요성을 제공한 다.

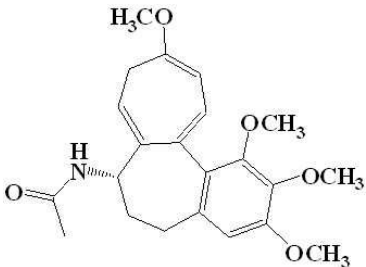
[0160] 활성적인 화합물과 상관되는 화합물에 대한 검색인 3번째 시도에서, 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라존의 사이클릭 유도체 1,3,4-옥사디아졸(36 내지 38)을 시험하였다. 상보적인 아실-하이드라존(30 내지 35)과 유사하게, 1,3,4-옥사디아졸(36 내지 38) 중 어떤 것도 활성적인 것으로 나타나지 않았다. 이러한 결과는 고리화에 의해 고리의 강성이 촉진되어 분자와 표적의 상호 작용 방지로 인한 것으로 설명될 수 있다.

[0161] 따라서, 화합물 02, 07, 09, 10, 11 및 16이 선택되어 이들 화합물의 IC₅₀을 측정하였으며; 값은 표 4에 표시되어 있다.

표 4

[0162]

백혈병 주르카트 세포 및 REH에서 가장 활성적인 화합물의 IC ₅₀			
			
화합물 번호	고리 B	IC ₅₀ (nM) - 처리 48시간 후	
		B (REH)	T (주르카트)
02	4-Br-페닐	33.7	31.4
07	1-나프틸	25.4	15.7
09	4-Cl-페닐	328.3	202.9
10	3,4-OCH ₂ O-페닐	206.2	154.5

11	2-Cl-페닐	458.7	189.4
16	4-CH ₃ -페닐	70.6	71.5
콜히친		9.5	7.7

[0163] 아실-하이드라존 02 및 07은, IC₅₀이 백혈병 주 REH에 대하여 33.7nM 및 25.4nM이고, 주르카트에 대하여 31.4nM 및 15.7nM인 우수한 결과를 나타내었다.

[0164] **실시예 6 DNA 마이크로어레이를 이용한 화합물의 작용 메커니즘을 결정하기 위한 실험:**

[0165] 세포를 실험 전 신선한 배지 중에서 12시간 동안 배양하였다. 백혈병 세포주 HL60 유래 2백만개의 세포를 3중으로 하여 125nM 용량의 화합물 07 또는 다이메틸설폭사이드(DMSO) 비히클로 6시간 동안 10% 소태아혈청이 보충된 DMEM 중에서 처리하였다. 이 기간의 말에 세포를 짧은 원심분리에 의해 회수하고, RNA스핀 미니 RNA 단리 키트(GE)의 구아니딘 용액 중에서 용해하였다.

[0166] a) 바이오티닐화 프로브의 RNA 정제 및 제조: 제조자의 지시를 따라서 RNA스핀 미니 RNA 단리 키트(GE)를 사용하여 총 RNA를 세포로부터 추출하였다. 제조자의 권고사항에 따라서 유전자칩 WT cDNA 합성 및 증폭 키트(아피메트릭스(Affymetrix))를 사용하여 총 100ng의 RNA를 cDNA 합성 후 시험관내 전사에 의한 증폭에 의해 바이오티닐화 상보성 RNA 프로브(Bio-cRNA)를 제조하는데 사용하였다.

[0167] b) 올리고뉴클레오타이드 마이크로어레이 및 혼성화 어레이: 각각의 레플리카의 cRNA 프로브를 인간 게놈 유전자칩 인간 유전자 1.0 ST 어레이(아피메트릭스)의 올리고뉴클레오타이드 마이크로어레이 중에서 혼성화하였다. 마이크로어레이의 혼성화 및 차후 세척 및 발달을 제조자의 권고사항에 따라서 실행하였다.

[0168] c) 데이터 분석: 마이크로어레이 혼성화의 결과는 아피메트릭 유전자 칩 스캐너 3000-7G(Affymetrix Gene Chip Scanner 3000-7G)에서 판독하였다. 데이터는 바이오컨덕터 플랫폼에서 분석되었다. 유전자 발현 값을 얻기 위하여, 본 발명자들은 유전자 수준에서 아피메트릭스 발현 콘솔(Affymetrix Expression Console)과 함께 이터플리에+16(iterPLIER+16) 알고리즘을 사용하였다. 화합물 07에 반응하여 차별적으로 발현된 유전자는 림마 패키지(LIMMA package)를 사용하여 회귀 분석에 의해 얻었으며, 배수 변화(Fold Change; FC) 기준은 > 1.5이었고, p는 <0.05이었다. 차별적으로 발현된 유전자의 목록은 공지된 화합물의 작용과 관련된 가능한 작용 메커니즘의 확인을 위하여 씨맵(Cmap, <http://www.broad.mit.edu/cmap/>)을 사용하여 분석하였다(Lamb, J., Crawford E.D. The Connectivity Map: Using Gene-Expression Signatures to Connect Small Molecules, Genes and Disease Science 2006, 313, 1929-1935).

[0169] 주어진 유전자 세트 화합물(유전자 세트)이 마이크로어레이 실험 데이터에서 공동 조절되는지 여부를 확립하기 위하여, 유전자 세트 발현 분석(Gene Set Expression Analysis(GSEA); <http://www.broadinstitute.org/gsea/>)을 사용하였다. GSEA 알고리즘으로, 2가지 실험 그룹(화합물 07로 처리한 그룹과 대조군) 사이에서 차별적 발현으로 배열된, 마이크로어레이 상에서 나타난 유전자의 목록을 만들었다. 이 경우, 화합물 07에 의해 억제된 유전자는 목록의 상단에 있는 반면, 유도된 유전자는 하단에 있다. 그 다음, 알고리즘으로 이 목록에서 특정 유전자 풀을 구성하는 유전자를 찾을 것이다. 이 목록 상단에서 이들 유전자가 상당히 지나치게 많으면, 전체 유전자는 화합물 07에 의해 억제된다고 말할 수 있다. 반대 상황에서는, 전체 유전자가 약물 처리에 의해 유도된다. GSEA에 의해 분석된 유전자 세트는 몇 가지 공공 데이터베이스(바이오카르타(BioCarta), 신호전달 경로 데이터베이스(Signaling Pathway Database), 신호전달 게이트웨이(Signaling Gateway), 신호 도입 지식 환경(Signal Transduction Knowledge Environment), 인간 단백질 참조 데이터베이스(Human Protein Reference Database), 진맵(GenMAPP), KEGG, 유전자 온톨로지(Gene Ontology), 시그마-알드리치 경로(Sigma-Aldrich Pathways), 유전자 어레이 바이오사이언스 코퍼레이션(Gene Arrays BioScience Corp.), 인간 암 게놈 해부 컨소시엄(Human Cancer Genome Anatomy Consortium) 및 네트아프스(NetAffx))로부터 얻을 수 있다. 동일한 유전자와 관련된 프로브 세트의 평균 발현 값은 오류 발견 비율(False Discovery Rate; FDR) q-값의 설정으로서 1000개의 순열을

사용하여 고려되었다. 요소가 5 미만이고 500 초과인 유전자 세트는 고려하지 않았다.

[0170] **결과: DNA 마이크로어레이를 이용한 연구에 의해 제안된 작용 메커니즘**

[0171] 이들 화합물의 작용 메커니즘을 결정하기 위하여, 본 발명자들은 DNA 바이오칩을 통한 유전자 발현 분석을 위하여 화합물 07을 선택하였다. 이러한 시험은 연결성 지도(씨맵)(www.broadinstitute.org/cmap) 및 GSEA 분석에 의해 추후 해석된 데이터세트(알고리즘)를 생성하였다.

[0172] 화합물 07을 이용한 HL-60 세포의 처리는 102개 유전자의 전사 억제를 가져왔고, 353개 유전자의 전사 활성화를 가져왔다($FC > 1.5$, $p < 0.05$).

[0173] 시험 화합물 07로 처리한 세포의, 마이크로어레이 유전자 발현의 분석에 의해 얻은 결과는 씨맵에서 분석하였다. 화합물 07의 작용 하에서 세포에서 차별적으로 발현된 유전자는 상이한 약물에 반응을 보이는 일련의 유전자 목록과 상호연결되었다. 이들 목록은 씨맵 데이터베이스의 일부이다. 함께 취하여져서 약물 데이터가 ATC(Anatomical Therapeutic Chemical; <http://www.whocc.no/atcddd/>) 시스템에 의해 그룹화될 때, 화합물 07의 효과는, 구충제로서 사용되는 벤즈이미다졸 유도체(예를 들어, 알벤다졸, 메벤다졸, 펜벤다졸, 티아벤다졸)인 P02CA 그룹의 약물의 효과와 가장 유사하였다. 씨맵에서 화합물 07의 분석 결과는 하기 표 5a에 표시되어 있다.

[0174] 이들 약물의 작용 메커니즘은 튜물린의 억제를 통한 것이며, 백혈병(Spagnuolo PA, et al, The antihelminthic flubendazole inhibits microtubule function through a mechanism distinct from Vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. *Blood* 2010; 115(23):4824-33) 및 고형 종양(Doudican N, et al, Mebendazole induces apoptosis via Bcl-2 inactivation in chemoresistant melanoma cells. *Mol Cancer Res* 2008; 6(8):1308-315; Gupta K, et al; antifungal antimetabolic compound benomyl inhibits brain microtubule polymerization and dynamics and cancer cell proliferation at mitosis, by binding to a novel site in tubulin. *Biochemistry* 2004; 43(21):6645-6655)의 치료를 위한 잠재적인 후보자로서 최근에 기재된 바 있다.

[0175] [표 5a]

ATC 코드에 의하여 화합물 07 과 양의 상관관계인 화합물.							
순위	ATC 코드	평균	n	풍부도	p	특이성	널 (null)이 아닌 비율 (%)
1	P02CA	0.404	16	0.511	0.00018	0.017	68
2	C01AA	0.541	10	0.63	0.00022	0.1852	80
3	N05AC	0.32	24	0.42	0.00026	0.2477	62
4	P01AX	0.415	9	0.638	0.00048	0.0194	77
5	V03AF	-0.532	5	-0.774	0.00106	0.0153	80
6	P02CX	0.585	6	0.724	0.00117	0.0884	83
7	D06BX	-0.386	5	-0.768	0.00124	0	60
8	G04BD	0.354	8	0.597	0.00279	0	62
9	S01GA	0.257	20	0.373	0.0056	0.0148	60
10	G04CB	-0.314	6	-0.642	0.00612	0.1281	50
11	P02CE	0.53	4	0.746	0.0079	0	100
12	S01EX	0.567	3	0.84	0.00803	0	100
13	P02BX	0.513	4	0.733	0.00985	0	0
14	G03CC	0.352	17	0.38	0.01053	0.05	64
15	P03AA	0.47	5	0.666	0.01093	0.1214	80
16	N05CE	-0.294	4	-0.708	0.01486	0.0423	50
17	R01AA	0.248	16	0.376	0.01544	0.016	56
18	R01AB	0.248	16	0.376	0.01544	0.016	56
19	D08AC	-0.455	5	-0.639	0.01568	0.0376	80
20	R02AA	-0.455	5	-0.639	0.01568	0.0376	80

[0176]

[0177] HL-60 세포주에 대한 데이터만을 고려하는 씨맵 플랫폼의 일부인 다른 변화의 데이터와 비교하여, 화합물 07의 효과는, Hsp90을 억제하는 약물인 타네스피마이신의 효과와 가장 유사하였다(풍부도 = 0.699, $p < 0.001$). Hsp90

은 튜불린과 상호작용하여 결합하는 샤페론이며(C Garnier, et al, Heat-shock protein 90 (hsp90) binds in vitro to tubulin dimer and inhibits microtubule formation. Biochem Biophys Res Commun 1998, 250(2):414-9; Redmond T et al; Immunofluorescence colocalization of the 90-kDa heat-shock protein and microtubules in interphase and mitotic mammalian cells. Eur J Cell Biol 1989; 50(1):66-75; Sanchez ER et al; Evidence that the 90-kilodalton heat shock protein is associated with tubulin-containing complexes in L cell cytosol and in intact PtK cells. Mol Endocrinol 1988; 2(8):756-60; Czar MJ et al; Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat-shock protein to cytoskeleton Eur J Cell Biol 1996; 70 (4) :322-30), 이는 튜불린의 변성을 방지하고 중합에 적절한 상태로 유지시킨다(F Weis et al state, The 90-kDa heat tubulin shock protein Hsp90 protects against thermal denaturation. J Biol Chem 2010; 285(13):9525-34). 결과는, 타네스피마이신과 같이 화합물 **07**이 튜불린을 회합하는 공정에 영향을 미치거나 이미 형성된 미세소관을 불안정하게 만들 수 있음을 시사한다.

[0178] [표 5b]

세포주에 대하여 화합물 07 과 양의 상관관계인 화합물.

순위	ATC 코드	평균	n	풍부도	p	특이성	널이 아닌 비율 (%)
1	켈다나마이신 MCF7	- 0.598	10	0.781	0	0.0168	90
2	타네스피마이신 MCF7	- 0.551	36	0.676	0	0.0263	80
3	트리코스타틴 A MCF7	- -0.322	92	-0.396	0	0.5347	55
4	트리코스타틴 A PC3	- -0.275	55	-0.385	0	0.5058	50
5	타네스피마이신 HL60	- 0.571	12	0.699	0.00002	0.0814	75
6	메토트렉세이트 HL60	- -0.835	2	-0.989	0.00026	0	100
7	헬베티코사이드 PC3	- 0.8	2	0.987	0.00032	0.0128	100
8	알베스피마이신 MCF7	- 0.624	7	0.703	0.0005	0.0326	85
9	0175029-0000 PC3	- 0.598	4	0.856	0.00056	0.0573	100
10	PNU-0251126 - PC3	- -0.57	4	-0.868	0.0006	0.0067	100
11	퓨로마이신 - MCF7	0.763	2	0.98	0.0007	0.0699	0
12	모노르텐 - MCF7	0.414	12	0.534	0.0009	0.0909	58
13	피나스테라이드 MCF7	- -0.628	3	-0.918	0.00096	0.019	100
14	메틸도페이트 MCF7	- -0.726	2	-0.978	0.00107	0.008	100
15	알벤다졸 - MCF7	0.765	2	0.964	0.00225	0	100
16	PHA-00745360 CF7	- -0.374	4	-0.812	0.00229	0.0073	75
17	벤드로플루메티아 지드 - MCF7	0.636	3	0.894	0.00234	0	100
18	0198306-0000 MCF7	- -0.688	2	-0.964	0.00288	0	100
19	타네스피마이신 PC3	- 0.41	12	0.496	0.00311	0.2159	66
20	CP-690334-01 PC3	- -0.431	4	-0.799	0.00318	0.0362	75

[0179]

[0180]

세포 과정의 동역학은 계속되는 세포 골격 재구성, 따라서 튜불린의 중합 및 해중합을 필요로 한다. 튜불린 억제자는 2가지 방법: (1) 튜불린 중합의 억제 또는 (2) 해중합을 억제하기 위한 방법으로 튜불린의 안정화에 작용할 수 있다. GSEA 분석은 화합물 07이 튜불린 및 튜불린-특이적 사페론(튜불린 중합을 억제하는 전형적인 화합물임)의 유전자 세트 발현의 급격한 감소를 야기한다는 것을 나타낸다(도 1). 튜불린 중합의 억제는 세포 세포질에서 유리 튜불린(중합화되지 않음)의 축적을 가져온다. 유리 세포질 튜불린은 새로운 튜불린 mRNA의 형성을 억제하고 기존 mRNA의 분해를 가속화함으로써 튜불린 mRNA 발현을 부정적으로 자가 조절한다(Caron JM, et al; autoregulation of tubulin synthesis in hepatocytes and fibroblasts. Celi J Biol 1985; 101:1763-72). 반대로, 튜불린 필라멘트를 안정화시키는 화합물은 튜불린의 발현 증가를 가져온다.

[0181]

실시예 7. 세포 주기를 통한 세포의 진행, 세포 주기 조절자의 활성화 및 아포토시스 유도에 대한 화합물 07의 효과:

- [0182] 세포를 실험 전 신선한 배지 중에서 12시간 동안 배양하였다. 주르카트 주 유래 2백만개의 세포를 125nM 농도의 화합물 07 또는 DMSO(비히클)와 함께 10% 소태아혈청(FCS) 및 0.2% 페니실린 / 스트렙토마이신(PS)이 보충된 RPMI-640 배지 중에서 12시간, 18시간, 24시간 및 30시간 동안 배양하였다.
- [0183] a) 세포 주기의 스크리닝 분석: 화합물 07로 처리 또는 처리하지 않은 세포를 2시간 동안 70% 에탄올 중에서 고정하고 PBS 중에서 세척하였으며, PBS 중 1ml의 트리톤 X-100, 0.1% 0.2mg/ml RNase 및 20μg/ml 프로피듐 요오다이드화물 중에서 15분 동안 37℃에서 배양하였다. 표준 폭 대 적색 피크 면적에 의한 임의의 세포 집합체를 제외하고, 적색 형광 정량화와 함께 FACS칼리버(FACSCalibur) 유세포 분석기 상에서 20,000건의 사건을 수집하였다. 각각의 세포 주기 단계에서 세포의 백분율을 얻는 데이터 데콘볼루션을 모드핏(ModFit) 소프트웨어 v2.0을 사용하여 실행하였다.
- [0184] b) 아넥신 V/PI 표지화가 있는 아포토시스의 정량화를 위한 분석: 화합물 07로 처리 또는 처리하지 않은 세포를 PBS 중에서 헹구고, 아넥신 V 아포토시스 분석 키트(Annexin V Apoptosis Assay kit; 인비트로젠(Invitrogen))로 표지화하였다. 간단하게, 칼슘을 포함하는 적절한 완충액 중에서 세포를 재현탁시키고, 아넥신 V-FITC 및 프로피듐 요오드화물 5μg/ml와 함께 15분 동안 배양하였다. 앞쪽 대 표준 측방 산란값에 의한 임의의 잔해를 제외하고, 녹색 및 적색 형광의 정량화와 함께 FACS칼리버 유세포 분석기 상에서 10,000건의 사건을 수집하였다.
- [0185] c) 세포 주기 조절 단백질의 발현 및 인산화의 분석을 위한 웨스턴 블롯 시험. 화합물 07로 처리 또는 처리하지 않은 세포를 50mM Tris pH 7.7, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1% 시그마 포스파타제 억제제 각테일 I, 1% 시그마 포스파타제 억제제 각테일 II, 1% 시그마 프로테아제 억제제 각테일 II, 1% 이게팔(Igepal), 0.1% SDS, 0.5% 소듐 데옥시콜레이트 및 1mM PMSF를 포함하는 완충제 중에서 용해시켰다. 얼음 상에서 30분 동안의 배양과 동결 및 해동의 3주기 후, 추출물을 10,000rpm에서 20분 동안 4℃에서 원심분리하여 막 잔해를 침전시켰다. 상청액 중, 본 발명자들은 브래드포드(Bradford) 시약(바이올라드(Biorad))에 의해 단백질 정량화를 진행하였다. 샘플을 5분 동안 끓이고 β-머캅토에탄올을 첨가하였으며, 단백질을 100μg에 대하여 SDS가 있는 아크릴아미드:비스아크릴아미드 겔 전기영동(39:1) 10%하고 0.45μm 나이트로셀룰로스 막(슐라이허 & 슈엘(Schleicher & Schuell))으로 전기이동시켰다. 면역검출을 제조자의 지시에 따라서 세포 주기 / 체크포인트 항체 샘플러 키트(Cell Cycle / Checkpoint Antibody Sampler kit) # 9917 항체(세포 신호전달 기술(Cell Signaling Technology)) 및 사이클린 의존성 키나제 억제제 항체 샘플러 키트(Cyclin Dependent Kinase Inhibitor Antibody Sampler kit) # 9867(세포 신호전달 기술)을 이용하여 막의 항은 처리에 의해 실행하였다. 결과의 현상은 슈퍼 신호 웨스트 피코 화학발광 기질 키트(Super Signal West Pico Chemiluminiscent Substrate kit; 피어스(Pierce))를 이용하여 실행한 다음 X-레이 필름에 노출시켰다.
- [0186] **결과: 화합물 07은 G2에서 세포 주기 억류 및 아포토시스에 의한 세포 사멸을 유도한다**
- [0187] 화합물 07로 처리한 주르카트 세포의 세포 주기 분석에서 튜블린의 억제와 일치하는 결과를 얻었다. 화합물 07로 처리한 주르카트 세포는 G2/M에서 세포 주기 억류를 나타내었다(도 2).
- [0188] 세포 주기를 조절하는 다양한 단백질의 발현 및 인산화 상태의 변화를 관찰하였다. 도 3에 나타난 바와 같이, 화합물 07로 처리하고 12시간 후에, Thr68에서 Chk2의 인산화를 검출할 수 있다. Thr68 잔기의 인산화는 아탁시아 텔랑기엑타시아 변이 인자(*Ataxia Telangiectasia Mutated factor(ATM)*)에 의해 실행하며, 이는 세포 주기, DNA 손상의 수선 및 DNA 손상에 응한 아포토시스의 유도를 포함하여 중요한 제어 인자(체크포인트)인 cdc25, BRCA1, p53 및 E2F Chk2의 활성화 및 다수의 하류 표적의 후속 인산화를 가져온다(Falck J, et al, The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. Nature 2001, 410(6830): 842-7; Matsuoka S, et al; Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. Science 1998, 282(5395): 1893-7; Lee JS et al; hCdsl-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. Nature 2000: 404(6774) 201-4; Hirao A et al, DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. Science 2000, 287(5459): 1824-7; C Stevens et al, Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. Nat Cell Biol 2003: 5(5): 401-9). 웨스턴 블롯에서 검출가능한 p53 결과의 부재는 (도 3) 주르카트 세포에서 낮은 p53 발현에 의해 설명될 수 있다(Vigorito E, et al; Contributions of p53 and PMA to gamma-irradiation induced apoptosis in Jurkat cells. Hematol Cell Ther 1999, 41(4):153-61).
- [0189] 화합물 07로 처리하는 것은 CDK4 발현의 억제 및 또한 CDK6의 더 적은 정도로 발현 억제를 가져오고, CDK2의 동형의 길이 감소 및 CDK9의 동형의 길이 증가를 가져온다(도 3). D/CDK4/CDK6 사이클린 및 사이클린 E/cdk2 복합체는 Rb를 인산화시켜 불활성화하여 세포 주기 억제를 가능하게 한다. 화합물 07로 처리된 세포에서 CDK2, CDK4 및 CDK6의 감소는 Rb의 불활성화를 감소시키며, 이 다음 세포 주기 진행 억제의 의무를 실행하고 아포토시스를

유도할 수 있다.

[0190] 실시예 8. 화합물 07의 선택성을 평가함으로써 해당 화합물의 건강한 인간 림프구 및 콜로니 형성에 대한 효과:
a) 화합물 07dp 대한 세포의 선택성 / 저항성의 MTT 방법에 의한 시험관내 분석: 정상적인 림프구에 대한 화합물 07의 시험에 있어서, 인간 공여체 유래의 혈액을 피콜(*ficoll*) 구배로 분리하고 단핵 세포를 T림프구의 자극을 위하여 각 웰 내 RPMI-1640(10% FBS, 100IU/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신을 포함함) 80마이크로리터 및 피토헤마글루티닌 용액(쿨티랩(Cultilab)) 20마이크로리터 중에서 200,000 세포수/웰로 배양하였다. 화합물 07을 300으로부터 1nm까지 계열 희석(50%)으로 첨가하였다. 대조군으로서, 백혈병 주르카트 및 REH 세포주 유래의 세포를 이용하여 병행 시험, 및 화합물 07과 동일한 농도의 콜히친을 이용한 실험을 실시하였다. 상기에 기재된 바와 같이 세포독성을 MTT 방법에 의해 48시간 후에 평가하였다. b) 콜로니 형성 실험: 화합물 07의 세포독성을 또한 조혈 세포의 콜로니 형성 분석으로 평가하였다. 밀테니(Miltenyi) 사의 "HSC-CFU complete with Epo" 키트(Cat # 130-091-280)를 제조자의 권고사항에 따라서 사용하였다. 건강한 공여체 유래의 골수 세포를 소태아혈청, 소혈청알부민, 상이한 성장 인자(GM-CSF, G-CSF, SCF, IL-3, IL-6, Epo) 및 화합물 07(이의 조혈 작용에 대한 작용을 평가함)이 보충된 반-고체 메틸셀룰로스 배지에서 배양하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO $_2$ 에서 2주 배양한 후, 과립구(CFU-G), 대식세포(CFU-M), 과립구/대식세포(CFU-GM), 적혈구(BFU-E 및 CFU-E) 및 혼합(CFU-GEMM) 콜로니의 개수 평가를 수행하였다.

[0191] **결과: 화합물 07의 선택성**

[0192] 화합물 07을 피토헤마글루티닌으로 자극한 건강하고 성숙한 T 림프구에 대하여 시험하여 정상적인 세포에 대한 해당 화합물의 작용을 평가하였다. 양성 대조군으로서 콜히친을 사용하였다. 결과는 표 6에 표시되어 있다.

표 6

화합물 번호	농도(nM)							
	300	150	75	37.5	18.75	9.38	4.6	0
07	95%	107%	108%	101%	105%	105%	103%	100%
콜히친	63%	69%	75%	84%	95%	110%	109%	100%

[0194] 300nM의 농도에서 화합물 07은 대조군에 비하여 5%의 독성을 가진 반면, 동일한 농도의 콜히친은 림프구 T의 생존력에 대하여 37% 억제를 야기하였다.

[0195] 피토헤마토글루티닌으로 자극된 정상적인 림프구에 비하여 백혈병 세포에 대한 화합물 07의 용량-반응 분석은 (도 5) 백혈병 세포에 대한 세포독성 용량보다 최대 10배 더 높은 농도가 피토헤마토글루티닌에 의해 유도된 정상적인 림프구에 영향을 미치지 않는 것으로 보임을 나타낸다. 이는 화합물 07이 환자의 정상적인 면역 기능에 영향을 미치지 않으면서 백혈병 세포에 작용할 수 있음을 나타낸다.

[0196] 조혈 작용에서 화합물 07의 효과를 결정하기 위하여, 성장 인자를 포함하는 반-고체 메틸셀룰로스 배지 중에서 배양한 골수 세포의 콜로니 형성에 대하여 동일한 분석으로 시험하였다. 표 7에 나타난 바와 같이, IC $_{50}$ (20nM)에 매우 근접한 농도에서 화합물 07은, 분석에서 양성 대조군으로서 사용된 PI3K 억제제에 맞먹는, 적혈구 형성에 대한 억제 활성을 나타낸다. 화합물 07은 또한, P'I3K 억제제에 비하여 강도가 낮기는 하지만, 과립구 및 대식세포에 대하여도 억제 활성을 가진다. 200nM 농도(평균 LLA 계통에 대한 IC $_{50}$ 의 10배에 해당함)에서, 화합물 07은 조혈 작용을 완전하게 억제하였다.

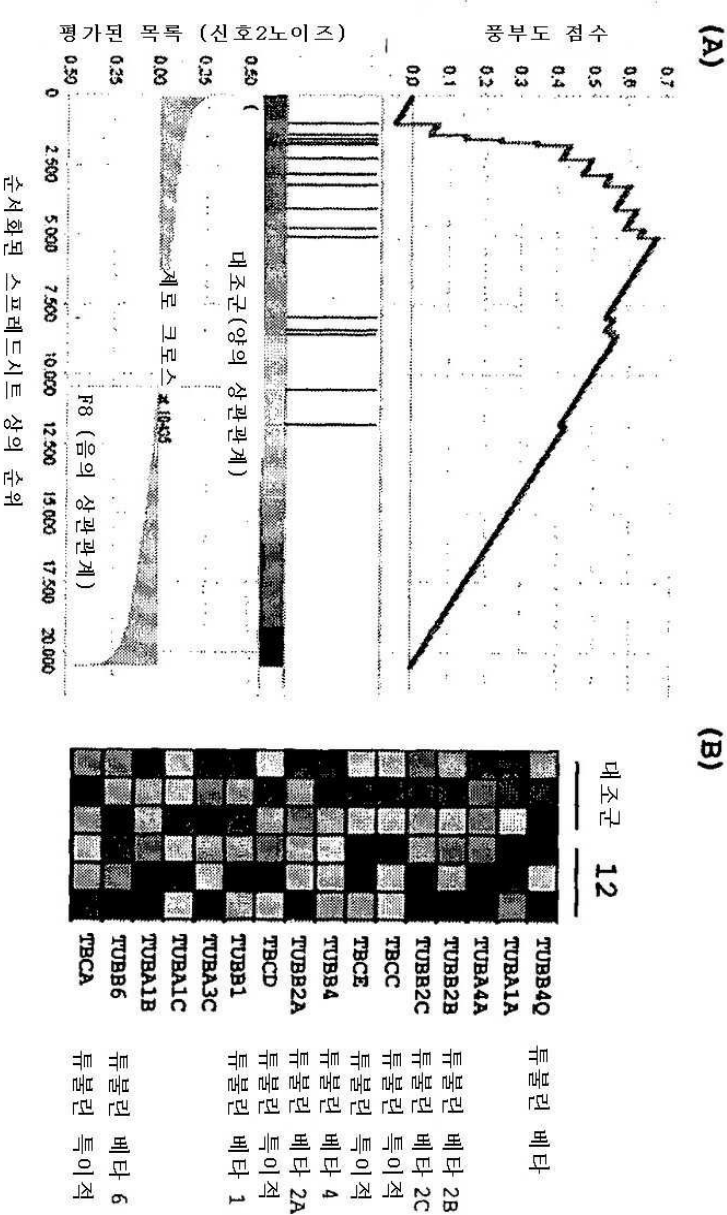
표 7

화합물 07을 사용한 골수 세포의 콜로니 형성(%)						
	BFU-E	CFU-E	CFU-G	CFU-M	CFU-GM	CFU-GEMM
음성 대조군	30.7 \pm 13.9	27.0 \pm 9.5	20.0 \pm 4.0	40.7 \pm 5.1	46.7 \pm 14.6	5.7 \pm 7.4
2nM 화합물 7	39	23	11	17	52	1
20nM 화합물 7	26	11	14	25	27	2
200nM 화합물 7	0	0	0	0	0	0
Pi3K 억제제	18	12	8	9	20	1
* 대조군에 있어서, 3개 복제물의 평균 \pm 표준 편차로 제시함.						

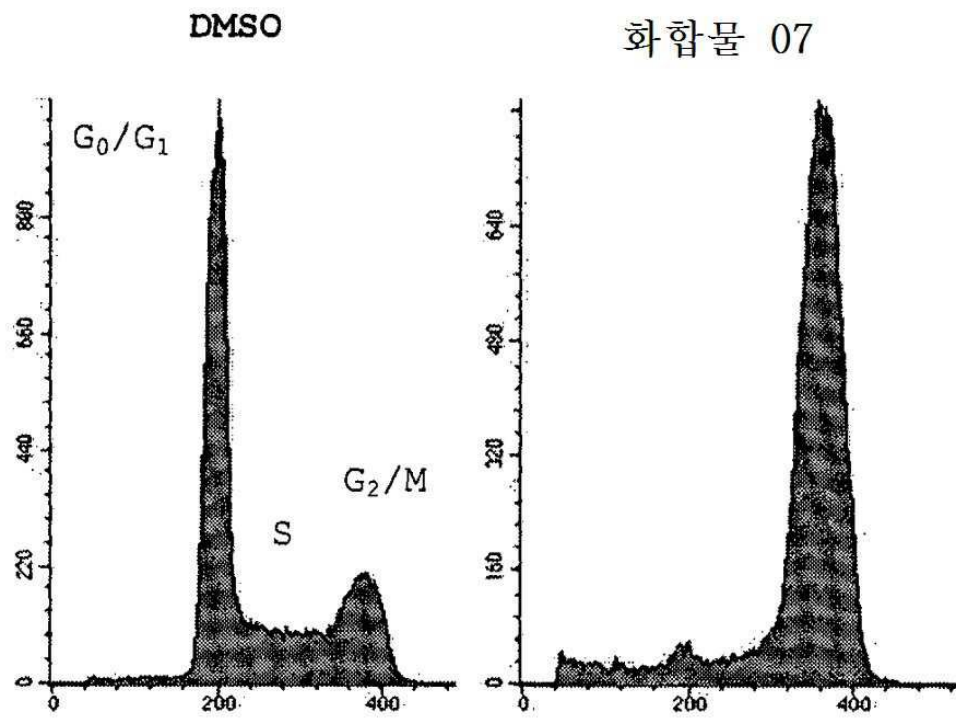
- [0198] 상기 기록한 바와 같이, 5가지의 신규한 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라존 및 3가지의 신규한 3,4-옥사디아아졸을 얻었다. 본 발명의 범주 내에서 합성되고 포함된 모든 아실-하이드라존 및 옥사디아아졸은 주르카트 및 HEK 주의 백혈병 세포에서 평가되었고, 화합물 **02** 및 **07**은 표준 화합물(콜히친)과 유사하게 우수한 항백혈병 활성을 나타내었다. 화합물 **07**의 작용 메커니즘은 DNA 마이크로레이를 사용하여 결정하였으며, 이는 Chk2 활성화 및 Rb, G2/M에서 세포 주기 억류 및 아포토시스에 의한 세포 사멸의 유도과 함께 튜불린의 억제 활성을 나타내었다. 후속 시험은 건강한 인간 림프구에서의 상기 화합물의 작용과 비교할 때, 백혈구 세포에 대한 화합물 **07**의 선택성이 약 10배 정도임을 나타내었다.
- [0199] 그러므로, 본 발명에 제시된 3,4,5-트라이메톡시페닐-하이드라존 및 관련 화합물 및 이들의 유사체(옥사디아아졸을 포함함)는, 세포 증식과 연관된 상이한 질환, 예를 들어 백혈병(급성 림프구성 백혈병(ALL)을 포함함), 종양 및 염증의 치료를 위한 약물 원형, 전구 약물 또는 약물로서 큰 잠재력을 가진다.
- [0200] 본 발명의 설명은 예시 및 장래 적용을 위한 상세 내용을 위하여 제시되었다. 그러나, 본 설명은 본 명세서에 개시된 바와 같이 기재되고 예시된 발명에 대하여 제한적인 특징을 가지는 것이 아니다. 상기 기재된 내용, 및 관련 업계의 기술 또는 지식과 양립가능한 변경 및 변형은 본 발명의 범주 내에 속한다.
- [0201] 본 발명이 범주 내에 기록한 설명 및 청구항에 따라서 동일 내용의 모든 변형 및 변이를 포함하는 것은 적법한 의도이다.

도면

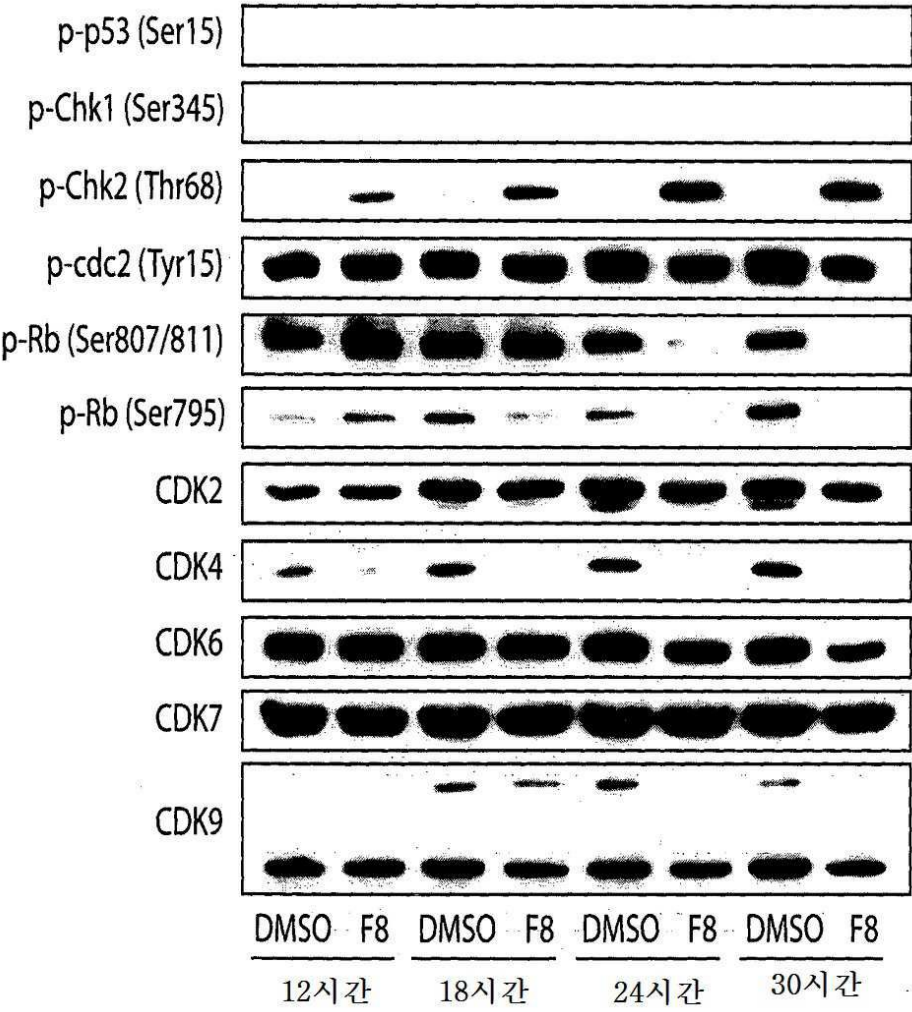
도면1



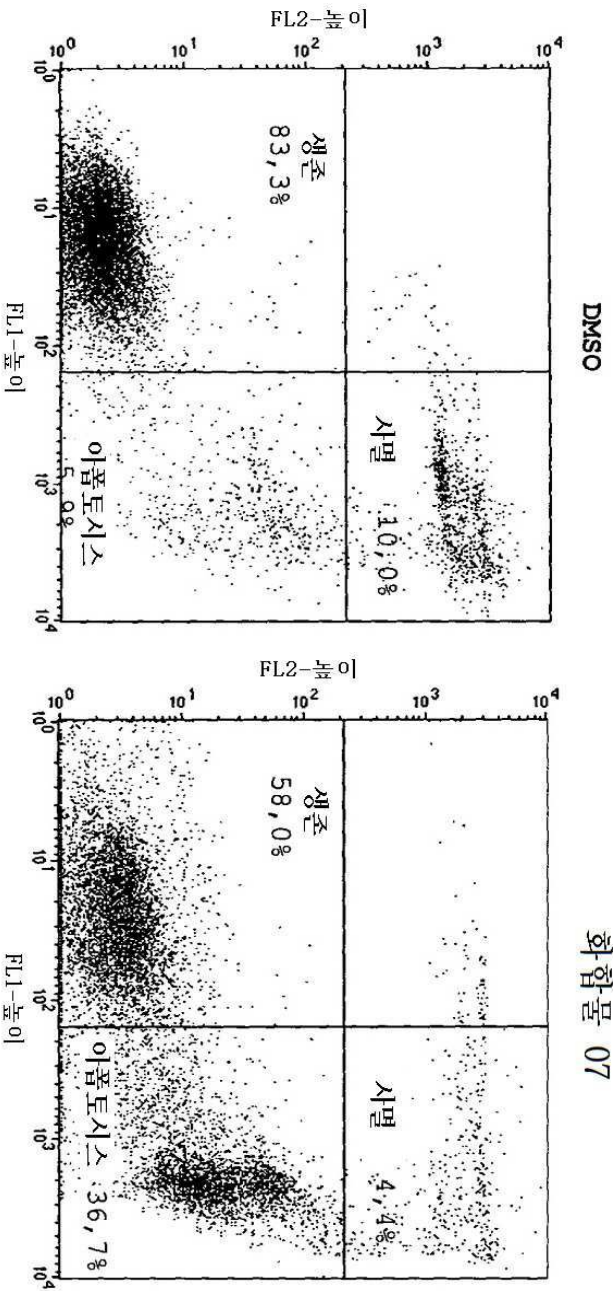
도면2



도면3



도면4



도면5

