(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
*C07C 317/12* (2006.01)

(45) 공고일자 2006년05월12일
(11) 등록번호 10-0579355
(24) 등록일자 2006년05월04일

(21) 출원번호 10-2000-7003554
(22) 출원일자 2000년03월31일
번역문 제출일자 2000년03월31일
(86) 국제출원번호 PCT/US1998/020580
국제출원일자 1998년10월01일
(65) 공개번호 10-2001-0015689
(43) 공개일자 2001년02월26일
(87) 국제공개번호 WO 1999/18068
국제공개일자 1999년04월15일

(81) 지정국 국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바르바도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탐, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크맨, 터어키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 인도네시아, 시에라리온,

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 가나, 감비아, 짐바브웨,

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탐, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크맨,

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스,

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우,

(30) 우선권주장 60/060,933 1997년10월03일 미국(US)

(73) 특허권자 템플 유니버시티-오브 더 커먼웰쓰 시스템 오브 하이어 에듀케이션
미합중국 19122 펜실바니아, 필라델피아 브로드 스트리트 앤드 몽고메리 애비뉴

(72) 발명자 레디,프렘쿠마,이.
미국,피에이19085,빌라노바,애터버리로드547

레디,라마나,엠.,브이.
미국,피에이19082,위퍼다비,베벌리볼리바드354비

(74) 대리인 청운특허법인

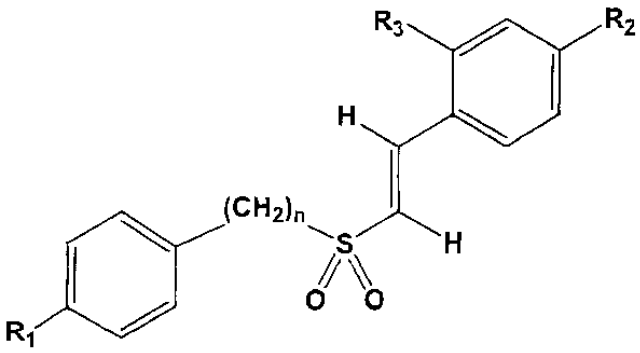
심사관 : 김용

# (54) 스티릴 설폰 항암제

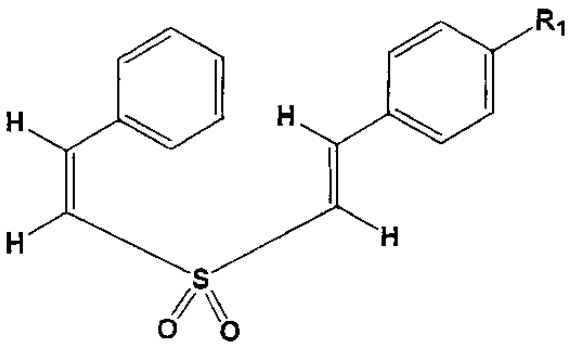
요약

본 발명의 스티릴 설폰 화합물은 유방 및 전립선 암 세포의 증식을 선택적으로 억제하며, 상기 암 세포의 고사를 유도하는 반면, 정상 세포는 유지시킨다. 유방 및 전립선 암 치료에 유용한 상기 화합물은 하기 화학식 II: 여기서, n은 0 또는 1이고; $R_1$은 수소, 염소, 불소 및 브롬으로 이루어진 군으로부터 선택되며; $R_2$는 수소, 염소, 불소, 브롬, 메틸 및 메톡시로 이루어진 군으로부터 선택되고; $R_3$은 수소, 염소 및 불소로 이루어진 군으로부터 선택되며; $R_1$ 및 $R_3$가 모두 수소이고, n이 0 또는 1이면 $R_2$은 메틸 또는 메톡시가 아니고; n이 1이면, $R_1$, $R_2$ 및 $R_3$가 모두 수소는 아니며, 또는 화학식 III: 여기서, $R_1$은 수소, 염소, 불소 및 브롬으로 이루어진 군으로부터 선택되고; 또는 화학식 IV로 표시된다: 여기서, $R_1$은 불소 및 브롬으로 이루어진 군으로부터 선택되며, $R_2$은 2-클로로페닐, 4-클로로페닐, 4-플루오로페닐 및 2-니트로페닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.

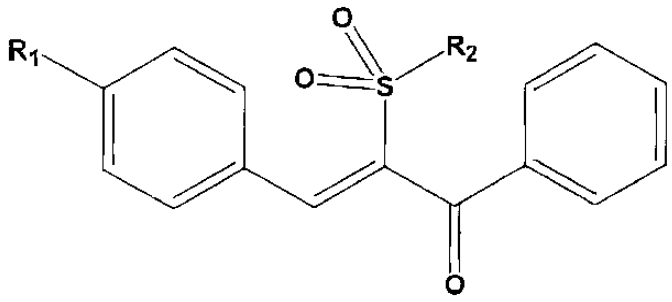
화학식 II




화학식 III




화학식 IV




색인어

스티릴, 설폰, 항암, 치료제, 성장억제

명세서

기술분야

본 발명은 암, 특히 유방암 및 전립선암을 치료하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배경기술

막 수용체 (transmembrane receptor)에서 수신된 세포외 신호는 세포 증식, 분화 또는 고사 (apoptisis)의 삽입 (Davis 등, *J. Biol. Chem.* 268:14553 (1993))와 같은 넓은 범위의 생리적 과정에 관련된 신호 전달 경로 (Pelech 등, *Science* 257: 1335 (1992))에 의해 세로내로 전달된다. 미토젠 활성화 프로테인 키나아제 (Mitogen Activated Protein Kinase, MAPK) 경로 (cascade)는 세포가 세포외 신호 (cue)를 세포내 반응으로 전달하는 주요한 신호전달 시스템이다 (Nishida 등, *Trends Biochem. Sci.* 18:128 (1993); Blumer 등, *Trends Biochem. Sci.* 19: 236 (1994)). 상기 경로의 많은 단계들은 보존되며, MAP 키나아제에 대한 유사체가 다른 종에서 발견되었다.

포유류 세포에서, 세포회-신호-조절된 키나아제 (Extracellular-Signal-Regulated Kinase, ERK), ERK-1 및 ERK-2는 상기 MAPK 군의 원형 및 가장-연구된 성분이며, 이들 모두는 상위 이중 특이성 키나아제에 의한 쓰레오닌 (threonine) 및 타이로신 (tyrosine) 잔기 상의 인산화에 의해 활성화되는 일정한 특성을 갖는다 (Posada 등, *Science* 255:212 (1992); Biggs III 등, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 89:6295 (1992); Garner 등, *Genes Dev.* 6: 1280 (1992)).

최근 연구에서는 다양한 기질 특이성을 가지며, 다양한 자극에 의해 조절되는 c-Jun NH2-터미날 키나아제 1 및 2 (JNK-1 및 JNK-2)로 알려진 MAPK의 부가적인 서브그룹을 확인하였다 (Hibi 등, *Genes Dev.* 7:2135 (1993)). JNK는 스트레스-활성 (stress-activated) 프로테인 키나아제 (SPK) 군의 일종이다. JNK는 UV 광선, 항-염증성 시토킨 (pro-inflammatory cytokine) 및 환경적 스트레스로 세포를 처리하여 활성화되는 것으로 나타났다 (Derijard 등, *Cell* 1025 (1994)). 상기 활성화된 JNK는 c-Jun 프로테인의 아미노 말단과 결합하고, ser63 및 ser73에서 이를 인산화시켜 프로테인의 전사상 활성을 증가시킨다 (Adler 등, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:5341 (1992); Kwok 등, *Nature* 370:223 (1994)).

JNK의 추정된 일차 서열의 분석은 이들이 ERK와 직접 관련됨을 나타낸다 (Davis, *Trends Biochem. Sci.* 19:470 (1994)). ERK 및 JNK는 모두 이들의 활성화를 초래하는 외부 자극에 대한 반응에서 Tyr 및 Thr상에서 인산화된다 (Davis, *Trends Biochem. Sci.* 19:470 (1994)). 활성화에 결정적인 역할을 하는 상기 인산화 (Thr 및 Tyr) 자리는 ERK와 JNK 사이에서 보존된다 (Davis, *Trends Biochem. Sci.* 19:470 (1994)). 그러나, 상기 인산화 자리는 별개의 이중 인산화 모티브 (motif)인 Thr-Pro-Tyr (JNK) 및 Thr-Glu-Tyr (ERK) 내에 위치한다. 외부 신호에 의한 MAPK 및 JNK의 인산화는 종종 몇몇 성장 인자 수용체 및 다른 신호 전달 분자를 포함하는 프로테인의 큰 군을 구성하는 프로테인 티로신 키나아제 (protein tyrosine kinase, PTK)의 활성을 포함한다 (Gille 등, *Nature* 358:414 (1992)).

프로테인 티로신 키나아제는 티로신 잔기의 인산화와 같은 잘 정의된 화학반응을 촉매하는 효소이다 (Hunter 등, *Annu Rev Biochem* 54:897 (1985)). 수용체 티로신 키나아제는 특히 이의 기질 도메인에 대한 블록커 (blocker)가 효과적이고

선택적인 항증식제를 쉽게 생산하기 때문에 약물 고안을 위한 바람직한 타겟이다. 항증식제로서 프로테인 티로신 키나아제 블록커의 주된 사용은 쿼세틴 (quercetin)이 PTK 블록커로 제안된 1981년에 알려졌다 (Graziani 등, *Eur. J. Biochem.* 135:583-589 (1983)).

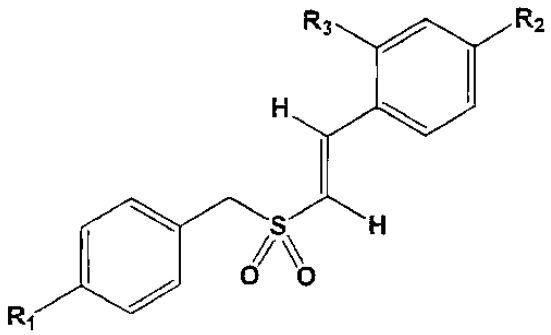
가장 잘 알려진 MAPK 경로는 Ras/Raf/MEK/ERK 키나아제 폭포를 구성하는 세포외 신호-조절된 키나아제를 포함한다 (Boudewijn 등, *Trends Biochem. Sci.* 20, 18 (1995)). 상기 경로가 다양한 자극에 의해 활성화되면, MAPK는 핵으로 이동하는 몇몇 전사 인자를 포함하는 다양한 프로테인을 인산화시키며, 유전자 전사를 활성화시킨다. 상기 경로의 음의 조절은 이러한 폭포를 억제할 수 있다.

수용체 티로신 키나아제를 타겟화하고 상기 Ras/Raf/MEK/ERK 키나아제 폭포를 억제하는 새로운 항암 화학요법제가 필요하다. 일반적으로는 옹코프로테인 (oncoprotein) 및 특정하게는 신호 전사 프로테인은 이들이 세포 증식에 필수적인 활성을 갖는 프로테인의 서브군을 대표하며, 이들이 활성이 증식성 질병에서 매우 증폭되기 때문에 화학요법을 위한 더 선택적인 목적이 되기 쉽다.

## 발명의 요약

본 발명에 따른 한 실시예에 따라, 본 발명의 신규한 화합물은 하기 화학식 I로 표시된다:

화학식 I




여기서, $R_1$ 및 $R_2$은 염소, 불소 및 브롬으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

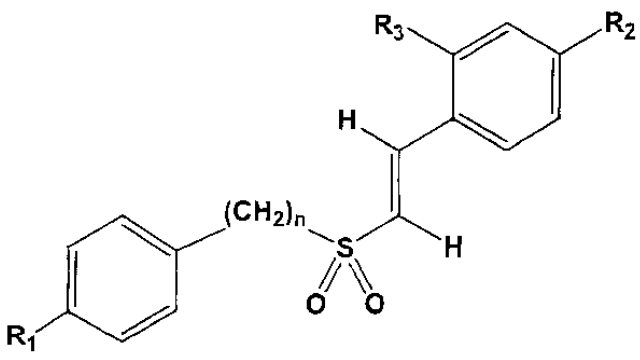
$R_3$는 수소 및 불소로 이루어진 군으로부터 선택되고;

$R_3$가 수소이면 $R_1$ 및 $R_2$은 모두 염소가 아니며;

$R_2$가 불소이고, $R_3$가 수소이면 $R_1$은 염소가 아니다.

본 발명의 또다른 실시예에 따라, 하기 화학식 II로 표시되는 화합물과 약학적으로 수용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물이 제공된다:

화학식 II



여기서, n은 0 또는 1이고;

$R_1$은 수소, 염소, 불소 및 브롬으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

$R_2$는 수소, 염소, 불소, 브롬, 메틸 및 메톡시로 이루어진 군으로부터 선택되고;

$R_3$은 수소, 염소 및 불소로 이루어진 군으로부터 선택되며;

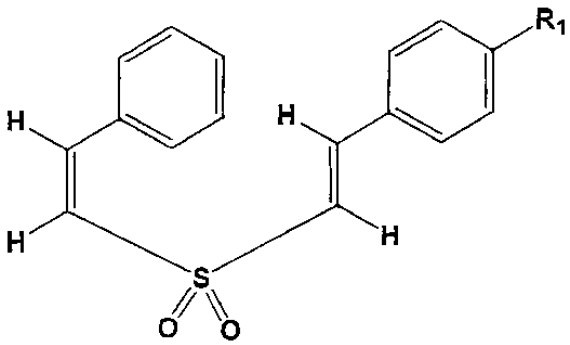
$R_1$ 및 $R_3$가 모두 수소이고, n이 0 또는 1이면 $R_2$은 메틸 또는 메톡시가 아니고;

n이 1이면, $R_1$, $R_2$ 및 $R_3$은 모두 수소가 아니다.

한 바람직한 실시예에 따라, 상기 약학 조성물은 상기 화학식 II에서 $R_3$가 수소이고, $R_1$ 및 $R_2$가 염소, 불소 및 브롬으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 화합물과 약학적으로 수용가능한 담체를 포함한다.

본 발명의 또다른 실시예에 따라, 하기 화학식 III으로 표시되는 화합물과 약학적으로 수용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물이 제공된다:

화학식 III

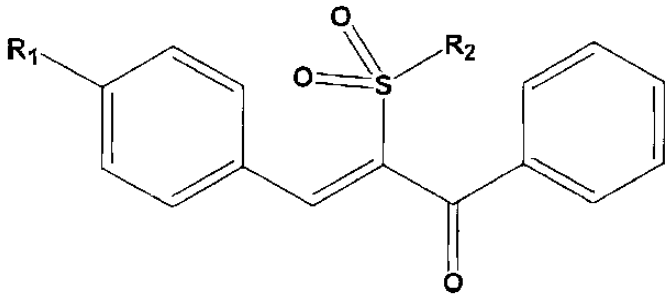



여기서, $R_1$은 수소, 염소, 불소 및 브롬으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

본 발명의 또다른 실시예에 따라, 화학식 II 또는 화학식 III에 따른 유효량의 화합물을 단독 또는 약학적으로 수용가능한 담체와 혼합하여 개체에 투여하는 단계를 포함하는 유방암 또는 전립선암에 대하여 개체를 치료하는 방법이 제공된다. 또다른 실시예에서, 화학식 III에 따른 유효량의 화합물을 단독 또는 약학적으로 수용가능한 담체와 혼합하여 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 유방암 또는 전립선암에 걸린 개체 내의 유방 또는 전립선 암세포의 성장을 저해하는 방법이 제공된다. 또한, 화학식 III에 따른 유효량의 화합물을 단독 또는 약학저긍로 수용가능한 담체와 혼합하여 개체에 투여하는 단계를 포함하는 유방암 또는 전립선암에 걸린 개체 내의 유방 또는 전립선 암세포의 고사를 유도하는 방법을 제공한다.

본 발명은 또한 약학 조성물 및 상술한 치료 방법에 관한 것으로, 여기서, 상기 화합물은 하기 화학식 IV로 표시된다:

화학식 IV




여기서, $R_1$ 은 불소 및 브롬으로 이루어진 군으로부터 선택되며, $R_2$ 은 2-클로로페닐, 4-클로로페닐, 4-플루오로페닐 및 2-니트로페닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.

## 도면의 간단한 설명

도 1A 및 도 1B는 NIH3T3, MCF7, BT-20 및 LnCaP 세포에 대하여 화합물 E-2,4-디플루오로스티릴-4-플루오로벤질 설폰 (FRI-2), E-4-플루오로스티릴 4-브로모벤질 설폰 (FRI-6), E-4-브로모스티릴 4-플루오로벤질 설폰 (FRI-7), E-4-플루오로스티릴 4-클로로벤질 설폰 (FRI-20) 및 E-4-클로로스티릴 4-클로로벤질 설폰 (FRI-22)의 영향을 나타낸 막대 그래프이다. 세포들은 2.5 μM (도 1A) 또는 5.0 μM (도 1B) 농도에서 상기 화합물로 처리하였고, 48시간 후에 트리판 블루 (Trypan blue) 추출법에 의해 세포 생존도를 결정하였다. 각 데이타 점은 세 개의 개별 실험의 평균치를 나타낸다. 표준 편차는 10%를 초과하지 않았다.

도 2A는 FRI-20의 처리에 의한 MCF7, BT20, LnCaP 및 NIH3T3 세포의 농도 의존성 저해도를 나타낸 막대 그래프이다. 세포를 0.250 nM, 500 nM, 1 μM, 2.5 μM 및 5.0 μM FRI-20으로 48시간 동안 처리하였다. 세 개의 개별 실험의 평균을 나타내었다.

도 2B는 FRI-20을 처리한 후 다양한 시간에서 MCF7, BT20, LnCaP 및 NIH3T3 세포의 생존도를 나타낸 막대 그래프이다. 모든 세포들을 FRI-20으로 2.5 μM로 처리하였고, 생존한 새포의 수를 트리판 블루 추출에 의해 12, 24, 48 및 72시간에 결정하였다. 세 개의 개별 실험의 평균을 나타내었다.

도 3A는 정상 셀 라인 (cell line) NIH3T3, HeLa 및 HFL; 에스트로겐 수용체-양성 유방암 셀라인 MCF-7 및 361; 에스트로겐 수용체-음성 유방암 셀 라인 SKBR-3, 435 및 BT-20에 대한 화합물 FRI-20의 활성을 도시한 그래프이다. 도 3B는 처리된 세포가 안드로겐 (androgen)-의존성 전립선 셀 라인 LnCaP 및 안드로겐 비의존성 전립선 셀 라인 DU-145 및 PC-3을 포함하는 것을 제외하고는 상기 도 3A와 유사하다. 모든 세포들은 2.5 및 5.0 μM 농도의 FRI-20으로 처리하였고, 트리판 블루 추출법에 의해 48시간 후 세포 생존도에 대하여 검정하였다. 세 개의 실험의 평균을 나타내었다. 편차는 10%를 초과하지 않았다.

도 4는 FRI-20-처리되거나 컨트롤-처리된 LnCaP 세포의 세포 사이클 분석의 일련의 블랏 (blot)을 포함한다. LnCaP 세포들은 120ml의 DMSO (대조구 세포) 또는 10ml의 DMSO 내의 2.5 μM FRI-20을 처리하였다. 처리 후 6, 12, 24 및 48 시간 후에 세포들을 수집하고, 프로피듐 아이오다이드 (propidium iodide)로 염색하고, 플로우 사이토메트리 (flow cytometry)로 처리하였다.

도 5는 EFK/MAPK 활성도에 대한 FRI-20의 효과를 나타낸 SDS-PAGE 자동방사선사진이다. FRI-20-처리된 LnCaP, MCF-7 및 NIH3T3 세포를 DMSO-처리된 세포 (대조구)와 함께 기질로서 마이엘린 기초 프로테인 (myelin basic protein, MBP)을 사용하여 EFK/MAPK 면역 복합체 키나아제에 대하여 수행되었다. 그 후, [$\gamma^3$ P]ATP의 존재하에서 MBP에 대한 ERK-2의 활성도를 검정하였다. 12% SDS-PAGE 상에서 인산호된 MBP를 분리하였고, 자동방사선사진으로 나타내었다.

도 6은 NIH3T3, LnCaP 및 MCF-7 세포 내의 ERK-2 및 JNK/SAPK 프로테인의 분포를 도시한 그래프이다. 100mg의 프로테인을 함유한 배양된 세포의 용해질을 각 라인에 점적하였다. 전기영동 및 폴리비닐리덴 (polyvinylidene) 막으로의 전이 후, ERK-2 및 JNK-2 폴리클로날 (polyclonal) 항체에 대하여 블랏팅하였고, 화학발광법에 의해 나타내었다.

도 7은 JNK/SAPK 활성에 대한 FRI-20의 효과를 나타낸 SDS-PAGE 자동방사선사진이다. JNK는 JNK 폴리클로날 항체를 이용하여 배양된 세포 용해질 100mg으로부터 면역침전되었고, 기질로서 GST-c-Jun(1-79)를 이용하여 면역 복합체 키나아제 검정법이 수행되었다. 인산화된 프로테인을 SDS-PAGE로부터 분리하고, 자동방사선사진으로 나타내었다. 실험은 세번 반복하였고, 유사한 결과가 나왔다.

## 발명의 상세한 설명

본 발명에 따라, 특정 스티릴 설폰 유도체들은 MAPK 신호 전달 경로에 영향을 주어 암세포 성장 및 생존도에 영향을 미친다. 상기 화합물들은 정상 세포 성장에 영향을 주지 않고, 적량-의존적 방법으로 유방 및 전립선 암세포의 성장 및 증식을 저해한다. 상게 세포 성장 저해는 ERK 및 JNK 타입의 MAPK의 조절과 연관이 있다. 상기 MAPK를 조절하고 세포 성장 정지를 유도하는 상기 스티릴 설폰의 능력은 상기 화합물 내에 존재하는 작용기의 특성 및 위치에 의해 지시된다.

본 발명의 스티릴 설폰 화합물을 유방 및 전립선 암세포에 처리하면 세포 증식이 억제되고, 고사성 세포 죽음을 유도한다. 비록 유방암 셀 라인이 실험될 때, 셀 라인 361이 스티릴 설폰에 대한 상당한 내성을 나타낼지라도, 에스트로겐 수용체 (ER) 음성 세포 뿐만 아니라 에스트로겐 수용체 양성 세포에 대하여 그 효과가 관찰된다. 세포 증식의 저해 및 고사성 세포 죽음의 유도는 또한 안드로겐-의존성 전립선 암세포가 상기 스티릴 설폰에 대하여 상당히 더 많이 민감할지라도, 안드로겐-비의존성 전립선 암세포 뿐만 아니라 의존성 전립선 암세포에 대하여 관찰된다.

본 발명의 화합물로 처리한 암세포는 세포 사이클의 G2/M 상에서 축적된다. 세포들은 G2/M 상에서 죽기 때문에, 이들은 고사를 거치는 것으로 보인다. 상기 스티릴 설폰으로 정상 세포를 처리하면 세포 사이클 진행에 유사한 효과를 만들지 못한다. 정상 세포들은 스티릴 설폰 약물의 존재 및 부재하에서 정상 세포 사이클 진행을 나타낸다.

본 발명의 스티릴 설폰 화합물로 처리한 세포 및 미처리 세포는 모두 세포내 ERK-2의 유사한 수준을 나타내지만, 기질 마이엘린 기초 프로테인 (MBP)을 인산화시키는 능력에 의해 판단한 바와 같이, ERK-2의 생화학적 활성은 미처리된 세포와 비교하여 약물-처리된 세포에서 상당히 감소된다. 전립선 암세포에서, 본 발명의 한 바람직한 화합물인 FR-20은 유사-처리된 세포와 비교하여 80%만큼 더 인산화 상태를 감소시켰다. ERK-2를 이용하여 상기 약물 및 유사-처리된 세포 용해질의 웨스턴 블랏 (western blot) 검정법은 두 용해질에서 모두 동일한 양의 프로테인을 나타내며, 이는 유사 처리된 세포 내에 더 높은 수준의 인산화된 MBP는 상기 용해질 내의 ERK-2 프로테인의 동일하지 않는 양 때문이 아님을 나타낸다. 이러한 결과는 본 발명의 스티릴 설폰이 ERK-2의 인산화 능력을 차단함을 제시한다.

본 발명의 스티릴 설폰은 유사-처리된 세포와 비교하여 c-Jun 프로테인을 인산화시키는 JNK의 능력을 강화시킨다. 특정한 이론에 의하지 않고도, 이러한 결과는 상기 스티릴 설폰이 세포 성장 저해 및 고사에 대한 원인 유전자 상에서 전환할 수 있는 JNK 경로를 활성화시키는 항-염증성 시토킨 또는 UV 광처럼 작용할 수 있음을 지시한다.

### 스티릴 설폰의 합성

본 발명의 화합물은 하나 또는 그이상의 이중 결합의 존재로부터 발생하는 시스-트랜스 이성질체에 의해 특징화된다. 상기 화합물들은 Cahn-Ingold-Prelog 시스템, IUPAC 1974 Recommendations, Section E: Stereochemistry, in Nomenclature of Organic Chemistry, Pergamon, Elmsford, NR. 1979 ("Blue Book")에 따라 명명한다. 또한, 3월, Advanced Organic Chemistry, John Wiley & Sons. Inc., 뉴욕, NY, 4판, 1992, p. 127-138을 참조하라. 이중 결합 주변의 스테아릭 (stearic) 관련도는 "Z" 또는 "E"로 표시한다.

(E)-스티릴 및 벤질 설폰은 아릴, 벤질, 스티릴 설포닐 아세트산, 페닐아실 아릴 설폰 및 설폰 및 설포닐 디아세트산과 같은 활성 메틸렌 분자와 방향족 알데히드의 크노에베나겔 (Knoevenagel) 축합반응에 의해 제조된다. 상기 방법은 Reddy 등, Acta. Chim. Hung. 115:269 (1984); Reddy 등, Sulfur Letters 13:83 (1991); Reddy 등, Synthesis 322 (1984); 및 Reddy 등, Sulfur Letters 7:43 (1987)에 기술되어 있으며, 본 명세서에 참고로 첨부한다. (Z)-벤질 및 (Z)-스티릴 설폰은 방향족 및 지방족 티올 (thiol)을 페닐 아세틸렌에 친핵성 부가반응하고, 연속적으로 그 생성물을 30% 과산화수소로 산화시켜 합성된다.

벤질설포닐 및 아릴설포닐 아세트산의 제조

아릴 및 벤질설포닐 아세트산은 (E)-스티릴 아릴 및 (E)-스티릴 벤질 설폰의 합성을 위한 출발 화합물이다. 아릴설포닐 아세트산은 알칼린 pH에서 소듐 아릴 설피네이트 (sodium aryl sulfinate)를 클로로아세트산과 축합반응시켜 제조될 수 있다. 동일한 화합물의 합성을 위한 또다른 방법은 소듐 아릴티올레이트 (sodium arylthiolate)에 의해 얻어진 생성물을 산화시키는 단계를 포함한다.

벤질설포닐 아세트산은 벤질 클로라이드와 소듐 티오글리콜레이트 (sodium thioglycollate)의 축합반응의 생성물의 30% 과산화수소 산화에 의해 합성될 수 있다. 또한, 벤질설포닐 아세트산은 벤질 티올의 소듐 염과 클로로아세트산의 축합반응의 생성물의 30% 과산화수소 산화에 의해 합성될 수 있다.

(E)-스티릴 아릴 및 (E)-벤질 설폰의 합성

(E)-스티릴 벤질 및 (E)-스티릴 벤질 설폰을 제조하기 위해, 적절한 설포닐아세트산 (예, 10mmol), 방향족 알데해드 (예, 10mmol) 및 아세트산 내의 촉매성 양의 벤질아민 (예, 15ml)의 혼합물을 2~3시간 동안 환류시킨다. 냉각시킨 후, 건조 에테르를 첨가하고, 반응 혼합물을 하룻밤동안 냉각시킨다. 상기 에테르 용액을 포화된 탄산수소나트륨 용액, 소듐 바이설파이트, 묽은 염산 및 최종적으로 물로 연속적으로 세척한다. 상기 소듐 설페이트 건조된 에테르 용액의 증발로 2-프로판올 또는 95% 에탄올로 재결정화될 수 있는 (E)-스티릴 아릴 또는 벤질 설폰의 고상 생성물을 얻는다.

(Z)-스티릴 아릴 및 (Z)-스티릴 벤질 설폰의 합성

(Z)-스티릴 아릴 및 (Z)-스티릴 벤질 설폰은 적절한 티올 (예, 10mmol) 및 수산화나트륨 (예, 20mmol)로부터 제조된 소듐 아릴티올레이트 또는 벤질티올레이트를 순수하게 증류된 페닐아세틸렌 메탄올 용액에 첨가하여 제조될 수 있다. 상기 혼합물을 24시간 동안 환류시키고, 분쇄된 얼음으로 붓는다. (Z)-스티릴 아릴 및 (Z)-스티릴 벤질 설파이드는 30% 과산화수소로 산화시켜 각각 (Z)-스티릴 아릴 및 (Z)-스티릴 벤질 설폰을 제공한다.

(E),(E)- 및 (E),(Z)-비스(스티릴)설폰의 합성

(E),(E)-비스(스티릴)설폰은 촉매로서 벤질아민의 존재하에서 방향족 알데히드와 설포닐 디아세트산을 축합반응시켜 제조될 수 있다. 상기 반응 혼합물을 빙초산에서 환류시킨다. 냉각 후, 완전 에테르를 상기 반응 혼합물에 첨가하고, 탄산나트륨, 소듐 바이설파이드, 묽은 염산 및 물로 연속적으로 세척한다. 건조된 에테르 층의 증발로 (E),(E)-비스(스티릴)설폰을 얻는다.

(Z),(E)-비스(스티릴)설폰은 빙초산 내의 (Z)-스티릴설폰 아세트산 용액과 아랄데히드 및 벤질아민의 혼합에 의해 제조될 수 있다. 상기 용액을 3시간 동안 가열한다. 상기 반응 혼합물을 냉각하고, 건조 에테르를 첨가한다. 분리된 생성물을 여과한다. 여과물을 더 많은 에테르로 희석시키고, 탄산수소나트륨 포화용액, 소듐 바이설파이트, 묽은 염산 및 물로 세척한다. 에테르 층을 분리하고 건조시키며, 증발시켜, (Z),(E)-비스(스티릴)설폰을 얻는다.

치료상 투여법

본 발명의 스티릴 설폰은 약학적으로 수용가능한 담체와 함께, 약학 조성물의 형태로 투여될 수 있다. 상기 조성물의 활성 성분은 0.1 내지 99.99중량%로 포함할 수 있다. "약학적으로 수용가능한 담체"란 수혈자에게 해롭고, 상기 조성물의 다른 성분과 상용성이 있는 용매 또는 부형제인 담체를 의미한다.

본 발명의 상기 화합물은 유방암 또는 전립선암에 걸린 개체 (동물 및 인간을 포함하는 포유류)에 투여될 수 있다. 상기 화합물은 경구 및 비경구 투여를 포함하는 경로에 의해 투여될 수 있다. 비경구 투여는 예를 들면, 정백, 근내, 동백, 복강내, 비내, 직장 또는 피하 투여를 포함한다. 바람직하게는 투여의 선택적 경로 및 표준 약학적 실용에 기초하여 선택된 약학적으로 수용가능한 담체와 함께 활성화제가 부여된다.

상기 활성화제는 약학적 제제 분야에서 표준 실시에 따라 용량 (dosage) 형으로 제조될 수 있다. Gennaro Alphonso 출판, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18판 (1990) Mack Publishing Co., Esaton, P.A.를 참조하라. 적절한 약물 형태는 정제 (tablet), 캡슐 (capsule), 용액, 비경구용 용액, 정 (troche), 좌제 (suppository) 또는 현탁액을 포함한다.

비경구 투여에 대하여, 활성화제가 물, 오일, 실란 용액, 수용성 덱스트로우즈 (글루코우즈) 및 관련 설탕 용액, 또는 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 글리콜과 같은 적절한 담체 또는 용매와 함께 혼합될 수 있다. 비경구 투여용 용액은 바람직하게는 수용성 염의 활성화제를 함유한다. 안정화제, 항산화제 및 방부제도 또한 첨가될 수 있다. 적절한 항산화제는 설파이트 (sulfite), 아스코르브산, 시트르산 및 그의 염, 및 소듐 EDTA를 포함한다. 적절한 방부제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 (paraben) 및 클로로부탄올을 포함한다.

경구 투여를 위해, 활성화제는 정제, 캡슐 또는 다른 적절한 경구 투여 형태의 제조를 위해 하나 또는 그이상의 고상의 불활성 성분과 결합될 수 있다. 예를 들면, 상기 활성화제는 카르복시메틸셀룰로우즈 칼슘, 마그네슘 스테아레이트, 만니톨 및 전분과 결합될 수 있고, 그 후, 통상적인 정제화 방법에 의해 정제로 제조될 수 있다.

물론, 치료상 이로움을 얻기 위해 본 발명에 따른 화합물의 특정한 양은 환자의 키, 몸무게, 나이 및 성별, 질병의 특성 및 단계를 포함하는 개개 환자의 특정한 상황에 의해 결정될 것이다. 예를 들면, 약 0.05 내지 약 50mg/kg/일의 일일 투여량이 사용될 수 있다. 또한, 더 높거나, 더 낮은 투여량이 고려된다.

이하 실시예를 통하여 본 발명을 좀 더 구체적으로 살펴보지만 하기 실시예에 본 발명의 범주가 한정되는 것은 아니다.

**공정 1**

**스티릴 및 벤질 아릴설폰의 합성을 위한 일반적인 방법**

메탄올 (200ml) 내의 수산화나트륨 용액 (8g, 0.2몰)에 적절한 티오페놀 또는 벤질 머캡탄 (0.1몰)을 서서히 첨가한다. 그 후, 클로로아세트산 (0.1몰)을 일부에 첨가하고, 상기 반응 혼합물을 2~3시간 동안 환류시킨다. 냉각된 내용물을 분쇄된 얼음에 붓고, 묽은 염산 (200ml)으로 중화시킨다. 결과적으로 형성된 아릴 및 벤질티오아세트산 (0.1몰)을 빙초산 (25ml) 내의 30% 과산화수소 (0.12몰)로 1~2시간 동안 환류시켜 산화시킨다. 내용물을 냉각시키고, 분쇄된 얼음에 붓는다. 분리된 고상을 뜨거운 몰로 재결정하여 순수한 아릴 및 벤질설포닐 아세트산을 얻는다.

빙초산 (15ml)내에 적절한 아릴 또는 벤질설포닐 아세트산 혼합물 (0.001몰), 방향족 알데히드 (0.001몰) 및 벤질아민 (1ml)를 2~3시간 동안 환류시킨다. 상기 내용물을 냉각하고, 건조 에테르 (50ml)로 처리한다. 분리된 특정한 생성물을 여과로 수거한다. 여과물을 에테르로 희석시키고, 소듐 바이카보네이트 (20ml), 소듐 바이설파이트 (20ml)의 포화용액, 묽은 염산 (20ml) 및 최종적으로 물(35)로 연속적으로 세척한다. 건조된 에테르 층의 증발로 많은 경우에 있어서 고상을 얻는다. 그러나, 몇몇 경우에 있어서는 시럽형 물질이 분리되며, 이는 2-프로판올로 처리하여 고형화시킨다. 상기 화합물의 순도는 TLC (실리카 겔 BDH, 헥산/에틸 아세테이트 3:1)로 확인한다.

**공정 2**

**(E)(E)- 및 (E)(Z)-비스(스티릴)설폰의 합성을 위한 일반적인 방법**

메탄올 (250ml)내에서 티오글리콜 산 (46g, 0.5몰) 및 수산화나트륨 (40g, 1몰)으로부터 제조된 소듐 티오글리콜레이트를 순수하게 증류된 페닐 아세틸렌 (51.07g, 0.5몰)에 첨가한다. 상기 혼합물을 24시간 동안 환류시키고, 냉각 후 분쇄된 얼음 (500ml)에 붓는다. 묽은 염산 (250ml)으로 중화후 제조된 스티릴티오아세트산을 여과하고, 건조시킨다: 수율 88g (90%); 녹는점 84~86℃.

그 후, 상기 스트릴티오아세트산을 다음과 같이 스티릴설포닐아세트산으로 산화시킨다. 빙초산 (35ml) 내의 스티릴티오아세트산 (5g, 25mmol) 및 30% 과산화수소 (15ml)의 혼합물을 60분간 환류,가열시키고, 상기 혼합물을 냉각후 분쇄된 얼음 (200ml)상에 붓는다. 분리된 화합물을 여과하고, 뜨거운 물로 재결정하여 흰색 결정성 편의 (Z)-스티릴설포닐아세트산을 얻었다: 수율 2.4g (41%); 녹는점 150~51℃.

빙초산 (6ml)내의 (Z)-스티릴설포닐아세트산 (2.263g, 10mmol) 용액을 방향족 알데히드 (10mmol) 및 벤질아민 (0.2ml)와 혼합하고, 3시간 동안 환류시킨다. 상기 반응 혼합물을 냉각하고, 건조 에테르 (50ml)로 처리하며, 분리된 특정 생성물을 여과하여 수거한다. 상기 여과물을 부가적인 에테르로 희석하고, 탄산수소나트륨 포화 용액(15ml), 소듐 바이설파이트 (15ml), 묽은 염산 (20ml) 및 최종적으로 물(30ml)로 연속적으로 세척한다. 상기 건조된 에테르 층을 증발시켜 (E)(Z)-비스(스티릴)설폰을 얻는다.

(E),(E)-비스(스티릴)설폰은 (Z)-스티릴설포닐아세트산 대신 설포닐디아세트산을 사용하고, 방향족 알데히드 (20mmol)의 양을 두배로 사용한 것을 제외하고는 상술한 방법과 동일하게 제조된다.

**공정 3**

**2-(아릴설포닐)-1-페닐-3-아릴-2-프로펜-1-온의 합성을 위한 일반적인 절차**

상기 화합물은 다른 반응 조건, 용매 및 촉매를 사용하는 두 개의 방법에 의해 합성된다.

**방법 1:** 순수 에탄올 (200ml) 내에서 α-브로모아세토페논 (0.05몰) 및 소듐 아릴설피네이트 (0.05몰)을 6～8시간 동안 환류시켜 펜아실 아릴설폰을 제조한다. 냉각후 분리한 생성물을 여고하고, 소듐 브로마이드를 제거하기 위해 물로 여러번 세척한다. 그 후, 상기 생성물을 에탄올로 재결정한다: 펜아실-페닐 설폰. 녹는점 90～91℃; 펜아실-p-플루오로페닐 설폰. 녹는점 148-149℃; 펜아실-p-브로모페닐 설폰. 녹는점 121～122℃; 펜아실-p-메톡시페닐 설폰. 녹는점 104-105℃; p-니트로펜아실-페닐 설폰. 녹는점 136～137℃.

아세트산 (10ml) 내의 펜아실 아릴 설폰 (0.01몰) 용액을 아랄데히드 (0.01몰) 및 벤질아민 (0.02몰)과 혼합하고, 3시간 동안 환류시킨다. 상기 용액을 냉각하고, 건조 에테르 (50ml)를 첨가한다. 에테르 용액을 묽은 염산, 10% NaOH 수용액, 포화된 $NaHSO_3$ 용액 및 물로 연속적으로 세척한다. 상기 건조된 에테르 층을 증발시켜 고상의 생성물을 얻고, 이를 재결정하여 정제한다.

**방법 2:** 건조 테트라하이드로퓨란 (200ml)을 취해 질소로 충진시킨 500ml 코니칼 플라스크 (conical flask)에 넣는다. 여기에 순수 사염화탄소 내의 티타늄 (IV) 클로라이드 (11ml, 0.01몰) 용액을 교반하면서 점적한다. 상기 플라스크의 내용물을 첨가 과정 동안 -20℃로 유지시킨다. 펜아실 아릴 설폰 (0.01몰) 및 방향족 알데히드 (0.01몰) 혼합물을 상기 반응 혼합물에 첨가하고, 테트라하이드로퓨란 (8ml) 내의 피리딘 (4ml, 0.04몰)을 1시간 동안 서서히 첨가한다. 상기 내용물을 10～12시간 동안 교반하고, 물 (50ml)로 처리한 후, 에테르 (50ml)를 첨가한다. 에테르 층을 분리하고, 10% 수산화나트륨, 소듐 바이설파이트 및 브라인 (brine)의 포화 용액 15ml로 세척한다. 건조된 에테르 층을 증발시켜 2-(아릴설포닐)1-페닐-3-아릴-2-프로펜-1-온을 얻는다.

**실시예 1**

**E-스티릴 페닐 설폰**

페닐 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 68～72%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 2**

**E-4-클로로스티릴 페닐 설폰**

페닐 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-클로로벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 78～80%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 3**

**E-2,4-디클로로스티릴 페닐 설폰**

페닐 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 2,4-디클로로벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 60～65%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 4**

**E-4-브로모스티릴 페닐 설폰**

페닐 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-브로모벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 78~80%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 5**

**E-4-클로로스티릴 4-클로로페닐 설폰**

4-클로로페닐 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-클로로벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 70~72%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 6**

**E-4-메틸스티릴 4-클로로페닐 설폰**

4-클로로페닐 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-메틸벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 60~64%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 7**

**E-4-메톡시스티릴 4-클로로페닐 설폰**

4-클로로페닐 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-메톡시벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 68~70%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 8**

**E-4-브로모스티릴 4-클로로페닐 설폰**

4-클로로페닐 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-브로모벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 80%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 9**

**E-2-클로로스티릴 벤질 설폰**

벤질 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 2-클로로벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 72%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 10**

**E-4-클로로스티릴 벤질 설폰**

벤질 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-클로로벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 78%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 11**

**E-4-플루오로스티릴 4-클로로벤질 설폰**

4-클로로벤질 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-플루오로벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 72%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 12**

**E-4-클로로스티릴 4-클로로벤질 설폰**

4-클로로벤질 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-클로로벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 80%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 13**

**E-4-플루오로스티릴 4-플루오로벤질 설폰**

4-플루오로벤질 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-플루오로벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 73%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 14**

**E-2,4-디플루오로스티릴 4-플루오로벤질 설폰**

4-플루오로벤질 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 2,4-디플루오로벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 68%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 15**

**E-4-플루오로스티릴 4-브로모벤질 설폰**

4-브로모벤질 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-플루오로벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 82%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 16**

**E-4-브로모스티릴 4-브로모벤질 설폰**

4-브로모벤질 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-브로모벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 88%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 17**

**E-4-브로모스티릴 4-플루오로벤질 설폰**

4-플루오로벤질 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-브로모벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 82%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 18**

**E-4-클로로스티릴 4-브로모벤질 설폰**

4-브로모벤질 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-클로로벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 88%의 수율로 얻어졌다.

**실시예 19**

**E-4-브로모스티릴 4-클로로벤질 설폰**

4-클로로벤질 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-브로모벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 1로 처리한다. 상기 화합물은 92%의 수율로 얻어졌다.

실시예 20

(Z)-스티릴-(E)-4-플루오로스티릴 설폰

(Z)-스티릴 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-플루오로벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 2로 처리한다. 상기 화합물은 68%의 수율로 얻어졌다.

실시예 21

(Z)-스티릴-(E)-4-브로모스티릴 설폰

(Z)-스티릴 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-브로모벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 2로 처리한다. 상기 화합물은 70%의 수율로 얻어졌다.

실시예 22

(Z)-스티릴-(E)-4-클로로스티릴 설폰

(Z)-스티릴 설포닐아세트산 (0.01몰) 및 4-클로로벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 2로 처리한다. 상기 화합물은 64%의 수율로 얻어졌다.

실시예 23

2-[(4-플루오로페닐)설포닐]-1-페닐-3-(4-플루오로페닐)-2-프로펜-1-온

펜아실-4-플루오로페닐 설폰 (0.01몰) 및 4-플루오로벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 3의 방법 1로 처리한다. 상기 화합물은 63%의 수율로 얻어졌다.

실시예 24

2-[2-클로로페닐-설포닐]-1-페닐-3-(4-플루오로페닐)-2-프로펜-1-온

펜아실-2-클로로페닐 설폰 (0.01몰) 및 4-플루오로벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 3의 방법 1로 처리한다. 상기 화합물은 58%의 수율로 얻어졌다.

실시예 25

2-[(2-클로로페닐)설포닐]-1-페닐-3-(4-브로모페닐)-2-프로펜-1-온

펜아실-2-클로로페닐 설폰 (0.01몰) 및 4-브로모벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 3의 방법 1로 처리한다. 상기 화합물은 66%의 수율로 얻어졌다.

실시예 26

2-[(4-클로로페닐)설포닐]-1-페닐-3-(4-브로모페닐)-2-프로펜-1-온

펜아실-4-클로로페닐 설폰 (0.01몰) 및 4-브로모벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 3의 방법 1로 처리한다. 상기 화합물은 60%의 수율로 얻어졌다.

실시예 27

2-[(2-니트로페닐)설포닐]-1-페닐-3-(4-브로모페닐)-2-프로펜-1-온

2-니트로페닐 설폰 (0.01몰) 및 4-브로모벤즈알데히드 (0.01몰) 용액을 공정 3의 방법 1로 처리한다. 상기 화합물은 56%의 수율로 얻어졌다.

## 실시예 28

### 스티릴 설폰에 의한 암세포 성장 억제

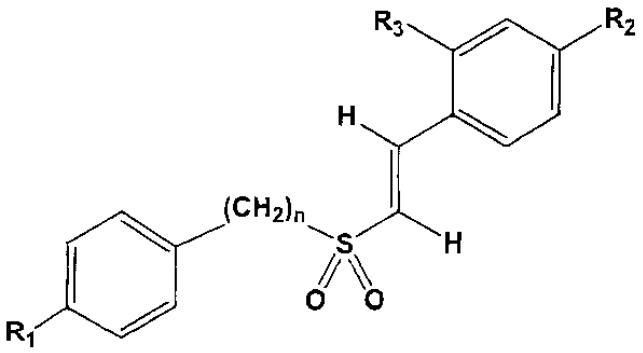
### A. 세포

네 개의 셀 라인, NIH3T3, MCF-7, BT-20 및 LnCap를 이용하여, 유방 및 전립선의 정상 및 암세포의 성장에 대한 스티릴 설폰의 영향을 실험하였다. NIH/3T3 세포는 정상의 섬유아세포를 대표하는 반면, LnCap는 안드로겐-의존성 전립선 암 셀 라인이다. MCF-7은 에스트로겐-반응성 유방암 셀 라인인 반면, BT-20은 에스트로겐-비반응성 유방암 셀 라인이다. MCF-7 및 BT-20은 페니실린 및 스트렙토마이신이 보충된 10% 태아 소 혈청을 함유하는 듈베코 변형 이글 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium, DMEM) 내에 성장되었다. LnCaP는 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유한 10% 태아 소 혈청과 함께 RPMI에서 배양되었다. NIH3T3은 페니실린 및 스트렙토마이신이 보충된 10% 송아지 혈청을 함유하는 DMEM에서 성장되었다. 모든 세포 배양은 37℃에서 5% $CO_2$의 습윤 대기하에서 유지되었다.

### B. 스티릴 설폰 처리 및 생존도 검정

2.5 μM 또는 5.0 μM 농도의 테스트 화합물을 세포에 처리하고, 48시간 후에 트리판 블루 추출법에 의해 세포 생존도를 결정하였다. 하기 표 1, 2 및 3의 화합물은 다양한 정도로 세포 성장을 억제하였고, 세포 죽음을 유도하였다. 하기 표들은 5.0μM 화합물로 처리된 LnCap 및 MCF-7 세포 생존 백분율을 나타낸 것이다.

화학식 II

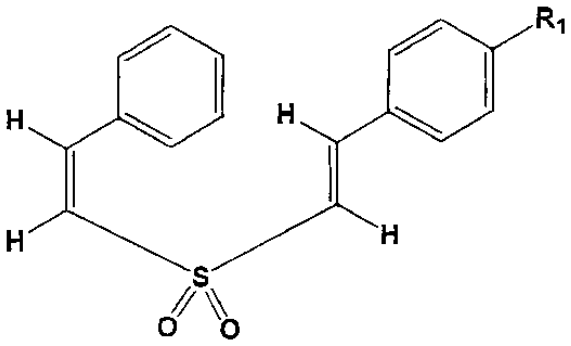



[표 1]

| 실시예 | n | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | LnCaP 및 MCF-7 세포의 % 생존율 |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0 | H | H | H | 89 |
| 2 | 0 | H | Cl | H | 90 |
| 3 | 0 | H | Cl | Cl | 88 |
| 4 | 0 | H | Br | H | 68 |
| 5 | 0 | Cl | Cl | H | 64 |
| 6 | 0 | Cl | $CH_3$ | H | 92 |
| 7 | 0 | Cl | $OCH_3$ | H | 90 |
| 8 | 0 | Cl | Br | H | 69 |
| 9 | 1 | H | H | Cl | 94 |
| 10 | 1 | H | Cl | H | 87 |
| 11 | 1 | Cl | F | H | 6 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 12 | 1 | Cl | Cl | H | 49 |
| 13 | 1 | F | F | H | 43 |
| 14 | 1 | F | F | F | 56 |
| 15 | 1 | Br | F | H | 7 |
| 16 | 1 | Br | Br | H | 51 |
| 17 | 1 | F | Br | H | 42 |
| 18 | 1 | Br | Cl | H | 7 |
| 19 | 1 | Cl | Br | H | 20 |

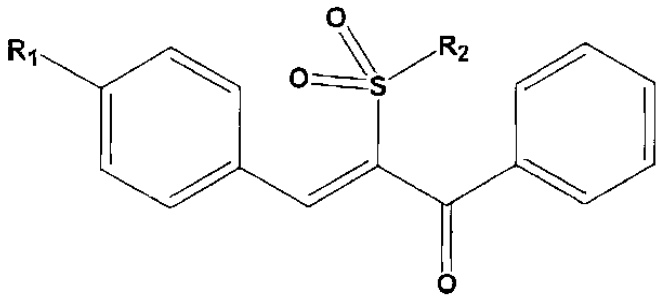
화학식 III




[표 2]

| 실시예 | $R_1$ | LnCaP 및 MCF-7 세포의 % 생존율 |
|---|---|---|
| 20 | F | 76 |
| 21 | Br | 68 |
| 22 | Cl | 72 |

화학식 IV




[표 3]

| 실시예 | $R_1$ | $R_2$ | LnCaP 및 MCF-7 세포의 % 생존율 |
|---|---|---|---|
| 23 | F | 4-플루오로페닐 | 76 |
| 24 | F | 2-클로로페닐 | 64 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 25 | Br | 2-클로로페닐 | 72 |
| 26 | Br | 4-클로로페닐 | 58 |
| 27 | Br | 2-니트로페닐 | 74 |

가장 높은 활성도를 나타낸 더 활성의 화합물 중 다섯은 FRI-2 (E-2,4-디플루오로스티릴-4-플루오로벤질 설폰), FRI-6 (E-4-플루오로스티릴 4-브로모벤질 설폰), FRI-7 (E-4-브로모스티릴 4-플루오로벤질 설폰), FRI-20 (E-4-플루오로스티릴 4-클로로벤질 설폰) 및 RFI-22 (E-4-클로로스티릴 4-클로로벤질 설폰)으로 표시하였다. 상기 화합물들은 상기 화합물을 처리 48시간 후, 2.5mM (도 1A) 및 5.0mM (도 1B)에서 LnCaP, BT-20 및 MCF-7 세포의 성장을 실질적으로 억제하고 죽음을 유도하는 것으로 관찰되었다. 동일한 조건 하에서, NIH3T3 세포는 48시간 인큐베이션 후 80% 이상이 생존하였다 (도 1A 및 1B). E-4-클로로스티릴 4-브로모벤질 설폰 및 E-4-브로모스티릴 4-클로로벤질 설폰도 또한 매우 활성이었다.

C. 적량-의존적 검정

다섯개의 가장 활성 화합물 중 하나인 FRI-20으로 세포를 처리하여 스티릴 설폰의 적량 의존도를 측정하였다. DMSO에 녹인 FRI-20을 250nM, 500nM, 1μM, 2.5μM 및 5μM의 농도로 NIH3T3, MCF-7, BT-20 및 LnCaP 세포에 처리하였고, 48시간 후에 이들의 증식 및 생존도를 검사하였다 (도 2A). 트리판 블루 추출법으로 살아있는 세포의 퍼센트를 결정하였다. 250nM의 농도에서, 48시간 후 미처리된 세포와 비교하여 MCF-7, BT-20 및 LnCaP 세포에서 약 10%의 세포가 죽었고, 세포 분열에서 약 15～20%가 억제되었다. 500nM 농도에서 세포 증식은 30～50%가 억제되었고, LnCap, BT-20 및 MCF-7 에서 25～30%의 세포가 죽었다. 상기 조건하에서, NIH3T3 세포는 두 농도에서 모두 2-3% 정도만 비-생존하였다. LnCaP, BT-20 및 MCF-7 세포 성장은 세포 생존도의 부수 손실과 함께 1μM 농도의 FRI-20에 의해 크게 저해되었다. 48시간 인큐베이션 후, LnCaP, BT-20 및 MCF-7 세포의 60～75%가 2.5mM FRI-20 농도에서 죽은 반면, NIH3T3 세포는 90% 이상 살았다 (도 2A). 5μM FRI-20으로 처리된 LnCap, BT-20 및 MCF-7 세포 (도 2A)는 거의 90%의 세포 죽음을 나타내었다. NIH3T3은 5μM 농도의 FRI-2, -6, -7, -20 또는 -22의 존재하에서 이들을 성장시키고, 80% 이상의 생존도를 유지하는 능력에 거의 또는 전혀 변화가 없었다.

D. 시간 경과 검정법

다음은 FRI-20 활성도의 시간 경과를 나타낸 것이다. NIH/3T3, MCF-7, BT-20 및 LnCap를 2.5 μM의 FRI-20으로 처리하고, 생존 세포의 수를 트리판 블루 추출법에 의해 12, 24, 48 및 72시간에 측정하였다. 세 개의 개별 실험의 평균을 도 2B에 나타내었다. 상기 시간 경과 연구는 2.5μM의 FRI-20을 처리한지 72시간 후에 95% 이상의 MCF-7, LnCaP 및 BT-20 세포가 죽었음을 나타낸다 (도 2B).

실시예 29

FRI-20에 의한 암세포 성장 억제

A. 세포.

유방 및 전립선의 암세포 및 정상 세포의 성장에 대한 FR-20의 효과를 다음 아홉개의 셀 라인을 사용하여 실험하였다: NIH/3T3 및 HFL (정상 섬유아세포 셀 라인); MCF-7 및 361 (에스트로겐-수용체 음성 유방암 셀 라인); BT-20, 435 및 SKBR-3 (에스트로겐-수용체 양성 유방암 셀 라인); LnCaP (안드로겐 민감성 전립선암 셀 라인); PC-3 및 DU-145 (안드로겐 둔감성 전립선암 셀 라인).

B. FRI-20의 처리 및 생존도 검정

실시예 22의 A와 같이 세포들을 성장시켰다. FR-20을 DMSO에 용해시키고, 2.5μM alc 5.0μM 농도로 상기 세포에 첨가하였다. 대조구 세포에는 DMSO를 상기 화합물의 최고 농도에서 존재하는 용매 (DMSO)의 부피와 동일한 양으로 첨가하였다. 상기 화합물의 활성도는 트리판 블루 추출법에 의해 48시간 후 평가되었다. NIH3T3 및 HFL 세포들은 2.5μM 및 5.0μM 농도에서 85～90%의 생존율을 유지하는 것으로 관찰되었다. FRI-20처리된 일곱개의 유방암 셀 라인 중, MCF-7, HTB126, T470 및 435 세포들은 2.5 및 5.0μM의 약물 농도에서 25% 및 10% 미만의 매우 높은 사망율을 보였다 (도 3A). 상기 화합물가 2.5μM일때, SKBR-3 및 BT-20 세포들은 거의 50% 정도가 죽었고, 5.0μM에서는 75%가 죽었다. 한

편, 361 유방암 셀 라인은 2.5 및 5.0μM 농도에서 세포들이 50~75%가 살아있었고, FRI-20에 대한 상당한 내성을 나타내었다. FRI-20은 안드로겐-비의존성 DU-145 및 PC-3 전립선 셀 라인과 비교할 때, 안드로겐-의존성 LnCaP 전립선암 셀라인의 생존도에 상당한 영향을 미쳤다. 2.5mM의 FRI-20에서, 80%의 LnCaP, 40%의 PC-3 및 20%의 DU-145 세포들이 죽었다. 5.0mM FRI-20에서, 72%의 LnCaP, 47%의 PC-3 및 40%의 DU-145가 죽었다 (도 3B).

**실시예 30**

**세포 사이클 조절에 대한 FRI-20의 효과**

실시예 22의 A와 같이 안드로겐-의존성 전립선암 셀 라인 LnCaP를 성장시키고, DMSO에 용해된 2.0μM FRI-20 또는 동등량 (10ml)의 DMSO 단독을 처리하였다. 처리 후 12, 24 및 48시간에 세포들을 수거하고, 프로피듐 아이오다이드로 염색하고, DNA 함량 검정을 위해 플로우 시토메트리 (flow cytometry, FACS)를 수행하였다. 도 4에 나타난 바와 같이, 배양액에 FR-20을 첨가하면 세포 사이클의 G2/M 상에서 세포가 축적되며, 세포들은 상기 사이클의 상을 나오면 고사를 일으켰다. DMSO 단독 처리된 세포들은 상기 세포 사이클의 G2/M 상에서 상기와 같은 억제를 나타내지 않았으며, 이는 상기 관찰된 효과가 FRI-20 첨가와 연관됨을 나타낸다. 정상 셀 라인 NIH3T3 또는 HFL을 FRI-20으로 처리하면, 세포 사이클 진행에 대하여 유사한 효과를 나타내지 않았다. NIH3T3 및 HFL은 약물의 존재 및 부재하에서 정상 세포 사이클 진행을 나타낸다.

**실시예 31**

**MPK 경로에 대한 FRI-20의 효과**

**A. 면역 복합체 ERK-2 검정.**

MAPK 경로에 대한 FRI-20의 영향을 검사하기 위해, NIH3T3, LnCaP 및 MCF-7 세포들을 2.5mM 농도의 FRI-20과 함께 48시간 동안 인큐베이션하였다. FRI-20의 존재 및 부재하에서 세포를 인큐베이션시킨 후, 20mM HEPES (pH 7.4), 50mM β-글리세로포스페이트 (glycerophosphate), 0.5% Triton X-100, 2mM $MgCl_2$, 1mM EGTA, 1mM 디티오쓰레이톨 (dithiothreitol), 2㎍/ml 로펩틴 (leupeptin), 2㎍/ml 아프로티닌 (aprotinin), 100μM 페닐메틸설포닐 플루오라이드, 및 1mM 벤즈아미딘 (benzamidine)을 함유한 ERK 용균 완충액을 이용하여 용균시켰다. 상기 용균물 단백질을 1mg의 ERK-2 폴리클로날 항체 (ERK2에 대한 항체 se-154는 Santa Cruz Biotechnology, Inc.로부터 구입)와 함께 1시간 동안 인큐베이션시킨 수, 20㎕의 프로테인 A-세파로우즈 (protein A-Sepharose, Pharmacia)와 함께 1시간 동안 추가 인큐베이션시켜 100mg의 세포 용균물 내의 ERK-2를 면역침전시켰다. 면역 복합체-결합 프로테인 A-세파로우즈 비드 (bead)를 용균 완충액으로 2번, 20mM HEPES (pH 7.4), 50mM β-글리세로포스페이트, 10mM $MgCl_2$, 1mM EGTA, 1mM 디티오쓰레이톨, 및 100mM $Na_3VO_4$를 함유한 ERK/MAPK 완충액으로 두번 세척하였다.

그 후, 상기 면역침전물을 [γ-$^{33}$P]ATP의 존재하에서 ERK-2에 대한 기질로서 마이엘린 기본 프로테인 (myelin basic protein, MBP)을 이용하는 인 비트로 (in vitro) 검정에 의해 MAP 키나아제 활성도에 대하여 테스트하였다. 따라서, 100μM [γ-$^{33}$P]ATP (5000 cpm/pmol)을 함유한 40㎕의 MAPK 완충액으로 상기 비드들을 재현탁시키고, 기질로서 5㎍의 MBP를 사용하여 30℃에서 20분간 상기 키나아제 검정을 수행하였다. 램리스 (Laemmli's) 완충액을 첨가하고, 시료를 3분간 끓여서 상기 반응을 중단시켰다. 12% SDS-PAGE 상에 프로테인을 용해시키고, 젤을 건조시킨 후, 자동방사선사진을 현상하였다. 상기 결과는 약물 처리된 및 약물 처리되지 않은 세포는 유사한 수준의 세포내 ERK-2을 나타내나, ERK-2의 생화학적 활성도는 MBP를 인산화시키는 능력으로 판단하건대, DMSO 단독으로 처리한 세포와 비교하여, 약물-처리한 세포들에서 상당히 감소하였다. 전립선 암세포에서, FRI-20은 유사-처리된 세포와 비교하여 80% 이상 MBP의 인산화 상태를 감소시켰다 (eh 5).

**B. 웨스턴 블랏 검정**

웨스턴 블랏 검정을 위해 FRI-20-처리된 세포의 세포 용균물을 다음과 같이 준비하였다. NIH3T3, LnCaP 또는 MCF-7 세포를 6-웰 플레이트 (plate)에 $2\times10^5$ 세포/웰 (well)의 밀도로 분주하고, 24시간 동안 성장시켰다. FRI-20을 처리하기 전 2시간에 신선한 배양액을 각 웰에 첨가하였다. 상기 화합물을 DMSO에 용해시켜 2mM 원액을 제조하고, 배양액 (2ml)에 첨가시켜 최종 농도가 2.5 및 5.0μM이 되게 하였다. 37℃에서 48시간 후, 세포들을 10ml의 얼음 냉각 포스페이트-완충된 살린 (saline)으로 두번 씻고, 25mM HEPES (pH 7.6), 0.1% Triton X-100, 300mM NaCl, 1.5mM $MgCl_2$, 20mM

β-글리세로포스페이트, 100μM $Na_3VO_4$, 0.2mM EDTA, 0.5mM 디티오쓰레이톨, 2㎍/ml 아프로티닌, 2㎍/ml 로펩틴, 100μM 페닐메틸설포닐 플로라이드 및 1mM 벤즈아미딘을 함유한 용균 완충액 400㎕내에서 수거하였다. 상기 용균물을 얼음상에서 30분간 유지시키고, 마이크로원심분리 (16000×g)로 10분간 원심분리하였다. 상기 용균물을 디브리스 (debris)로부터 분리하고, 단백질 함량을 표준화하였다.

약물- 및 ERK-2 항체로 유사-처리된 세포 용균물에 대하여 웨스턴 블랏 검정을 수행하였다. 동등량의 전체 단백질 (100㎍)을 SDS-PAGE 젤 (10~12%)의 각 라인에 점적하고, 이모빌론-P (Immobilon-P, Millipore, USA)로 이동시켰다. 이동 후, 3% 우유로 막을 차단하고, EFK-2 및 JNK-1 토끼 폴리클로날 항체 (Santa Cruz Biotechnology inc., Santa Cruz, CA)로 표지체(probe)화한 후, 양고추냉이 퍼옥시다아제 연결된 원숭이 항-토끼 Ig 2차 항체 (Amersham)(1:10000 희석액)로 표지체화시켰다. ECL 웨스턴 블랏팅 검정 키트 (Amersham)을 이용하여 설명서에 따라 상기 항체를 검출하였다. 상기 약물- 및 ERK-2 항체로 유사-처리된 세포 용균물의 웨스턴 블랏 검정은 두 용균물에서 동일한 양의 단백질을 나타내며, 이는 유사-처리된 세포에서 더 높은 수준의 MBP 인산화는 용균물 내에서 ERK-2 단백질의 동일하지 않은 양에 기인하지 않음을 지시한다. 이러한 결과는 FRI-20이 ERK-2의 인산화 능력을 차단함을 의미한다.

**실시예 32**

**스트레스-활성화된 단백질 활성에 대한 FRI-20이 효과**

JNK가 한 성분인 스트레스 활성화된 프로테인 키나아제 (SAPK)의 활성이 FRI-20의 존재하에서 손상되는지를 좀 더 결정하기 위해, 세포들 (NIH3T3, MCF-7 또는 lnCaP)을 DMSO에 용해된 FRI-20 또는 DMSO 단독으로 처리하였다. 48시간 경과 후, 상기 세포들을 키나아제 완충액으로 용균시키고, 상기 용균물을 JNK 폴리클로날 항체를 이용한 웨스턴 블랏 검정에 의해 각 용균물에 존재하는 JNK 양의 측정에 사용하였다. JNK의 면역침전법 후, [γ-$^{33}$P]ATP의 존재하에서 JNK에 대한 기질로서 GST-c-Jun 프로테인과 함께 인큐베이션하여 상기 FRI-20-처리된 및 유사-처리된 세포 용균물에 존재하는 JNK의 생화학적 활성도도 또한 결정하였다.

따라서, 상기 용균물을 1mg의 JNK-1 폴리클로날 항체 (Santa Cruz Biotechnology의 se)와 함께 1시간 동안 인큐베이션한 후, 20㎕의 프로테인-A-세파로우즈 (Pharmacia)와 함께 추가 1시간 동안 인큐베이션하여 세포 추출물 100mg 내의 JNK-1을 면역침전시켰다. 비드를 JNK 용균 완충액 (상술함)으로 두 번 세척한 후, JNK 반응 완충액으로 두 번 세척하였다. 상기 비드를 20mM [γ-$^{33}$P]ATP (5000 cpm/pmol)을 함유한 40㎕의 JNK 완충액으로 재현탁시키고, 기질로서 3㎍의 정제된 GST-c-Jun(1-79)을 이용하여 30℃에서 20분간 키나아제 반응을 수행하였다. 상기 반응을 종료시킨 후, 인산화된 GST-c-Jun 프로테인 내의 방사능을 정량화하였다. 그 결과로서 FRI-20의 처리는 재조합 GST-c-Jun 프로테인을 인산화시키는 JNK 능을 유사-처리된 세포와 비교하여 60~80% 정도 증가시킴을 알 수 있다 (도 7).

JNK는 UV 광선, 항-염증성 시토킨 및 환경적 스트레스를 세포에 처리하여 활성화되는 것으로 나타났다 (Derijard 등, *Cell* 1025 (1994)). 활성화된 JNK는 c-jun의 아미노 말단과 결합하고, ser63 및 ser73에서 인산화시켜 그의 전사상 활성을 증가시킨다 (Adler 등, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 89:5341 (1992); Kwok 등, *Nature* 370:223 (1994)). 다른 이론에 의하지 않고도, 본 명세서에서 나타난 상기 결과들은 FRI-20이 JNK 경로를 활성화시키는데, 항-염증성 시토킨 또는 UV 광선과 유사하게 작용하며, 바꿔 말하면, 세포 성장 억제 및 고사에 관련한 유전자를 교환할 수 있다.

**실시예 33**

**FRI-20 및 시스플라틴 (cisplatin)의 비교**

**<u>항-암 활성</u>**

안드로겐-민감성 (LnCaP) 및 안드로겐 둔감성 (DU145) 전립선 암 세포 상의 치사 효과를 광범위하게 사용되고 있는 항-전립선 암 치료제인 시스플라틴 (cis-diamminedichloroplatinum II)의 효과와 비교하였다. FRI-20 또는 시스플라틴을 DMSO에 용해시키고, 다양한 농도로 상기 세포에 첨가하였다. 72시간 후 트리판 블루 추출법으로 생존도를 결정하였다. LnCaP 및 DU145 세포를 완전히 죽이는데 필요한 FRI-20의 농도는 각각 2.5μM 및 5.0μM이었다. 동일한 조건 하에서, 시스플라틴에 의한 LnCaP 및 DU145의 완전한 치사는 각각 25μM 및 15μM이 필요하였다. 결과적으로, FRI-20은 호르몬-의존성 및 호르몬-비의존성 전립선 암 세포를 모두 사멸시키는데 시스플라틴보다 적어도 10배 더 활성이 있다.

합성, 준비 및 검정 방법에 대하여 인용된 모든 참고문헌은 본 명세서에 참고로 삽입한다.

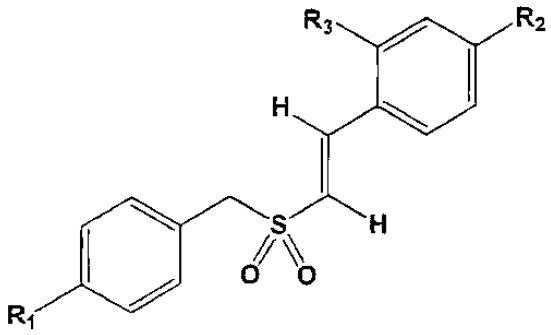
이상 본 발명을 구체적으로 살펴보았지만, 당업자라면 본 발명의 목적을 벗어나지 않고 이를 자유로이 변형할 수 있음을 알 것이다.

(57) 청구의 범위

## 청구항 1.

하기 화학식 I로 표시되는 화합물:

화학식 I




여기서, $R_1$ 및 $R_2$은 염소, 불소 및 브롬으로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되고;

$R_3$는 수소 및 불소로 이루어진 군으로부터 선택되며;

$R_3$가 수소이면, $R_1$ 및 $R_2$가 모두 염소는 아니며;

$R_2$가 불소이고, $R_3$가 수소이면, $R_1$은 염소가 아니다.

## 청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 화합물은 E-4-플루오로스티릴-4-플루오로벤질 설폰, E-2,4-디플루오로스티릴-4-플루오로벤질 설폰, E-4-플루오로스티릴-4-브로모벤질 설폰, E-4-브로모스티릴-4-브로모벤질 설폰, E-4-클로로스티릴-4-브로모벤질 설폰, E-4-브로모스티릴-4-클로로벤질 설폰, 및 E-4-브로모스티릴-4-플루오로벤질 설폰으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물.

## 청구항 3.

삭제

## 청구항 4.

삭제

## 청구항 5.

삭제

## 청구항 6.

삭제

## 청구항 7.

삭제

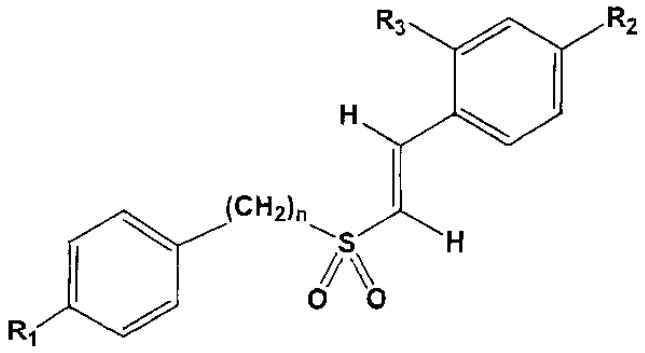
## 청구항 8.

삭제

## 청구항 9.

약학적으로 수용가능한 담체 및 하기 화학식 II로 표시되는 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 약학 조성물:

화학식 II




여기서, n은 0 또는 1이고;

$R_1$은 수소, 염소, 불소 및 브롬으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

$R_2$는 수소, 염소, 불소, 브롬, 메틸 및 메톡시로 이루어진 군으로부터 선택되고;

$R_3$은 수소, 염소 및 불소로 이루어진 군으로부터 선택되며;

$R_1$ 및 $R_3$가 모두 수소이고, n이 0 또는 1이면, $R_2$은 메틸 또는 메톡시가 아니고;

n이 1이면, $R_1$, $R_2$ 및 $R_3$가 모두 수소는 아니다.

## 청구항 10.

삭제

## 청구항 11.

삭제

## 청구항 12.

삭제

## 청구항 13.

삭제

## 청구항 14.
삭제

## 청구항 15.
삭제

## 청구항 16.
삭제

## 청구항 17.
삭제

## 청구항 18.
삭제

## 청구항 19.
삭제

## 청구항 20.
삭제

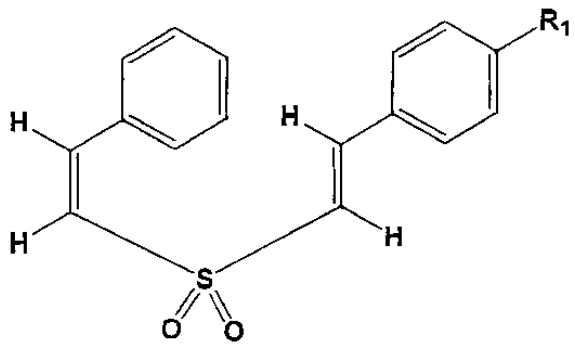
## 청구항 21.
삭제

## 청구항 22.
삭제

## 청구항 23.

약학적으로 수용가능한 담체 및 하기 화학식 III으로 표시되는 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 약학 조성물:

화학식 III

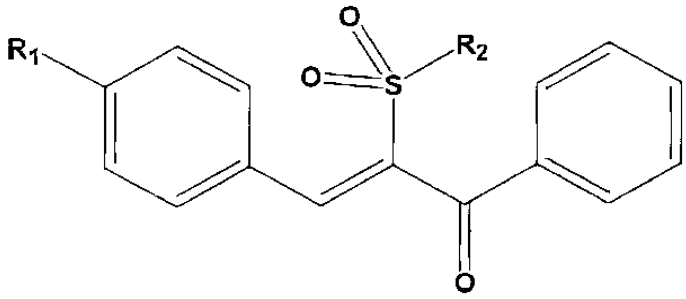



여기서, $R_1$은 수소, 염소, 불소 및 브롬으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

## 청구항 24.

약학적으로 수용가능한 담체 및 하기 화학식 IV로 표시되는 화합물을 포함하는 것을 특징으로 하는 암 치료용 약학 조성물:

화학식 IV




여기서, $R_1$은 불소 및 브롬으로 이루어진 군으로부터 선택되며, $R_2$은 2-클로로페닐, 4-클로로페닐, 4-플루오로페닐, 및 2-니트로페닐로 이루어진 군으로부터 선택된다.

**청구항 25.**
삭제

**청구항 26.**
삭제

**청구항 27.**
삭제

**청구항 28.**
삭제

**청구항 29.**
삭제

**청구항 30.**
삭제

**청구항 31.**
삭제

**청구항 32.**
삭제

**청구항 33.**
삭제

**청구항 34.**
삭제

**청구항 35.**

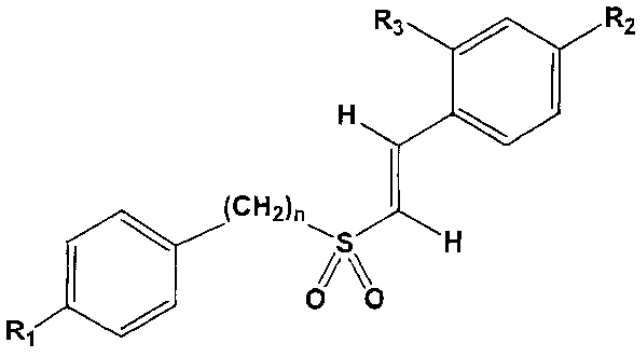
삭제

## 청구항 36.

삭제

## 청구항 37.

하기 화학식 Ⅱ로 표시되는 화합물을 사용하여 암 치료용 약물을 제조하는 방법:




여기서, n은 0 또는 1이고;

$R_1$은 수소, 염소, 불소 및 브롬으로 이루어진 군으로부터 선택되며;

$R_2$는 수소, 염소, 불소, 브롬, 메틸 및 메톡시로 이루어진 군으로부터 선택되고;

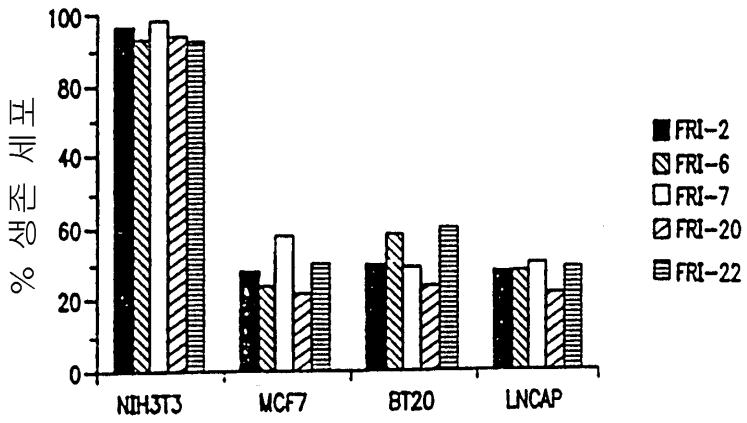
$R_3$은 수소, 염소 및 불소로 이루어진 군으로부터 선택되며;

$R_1$ 및 $R_3$가 모두 수소이고, n이 0 또는 1이면, $R_2$은 메틸 또는 메톡시가 아니고;

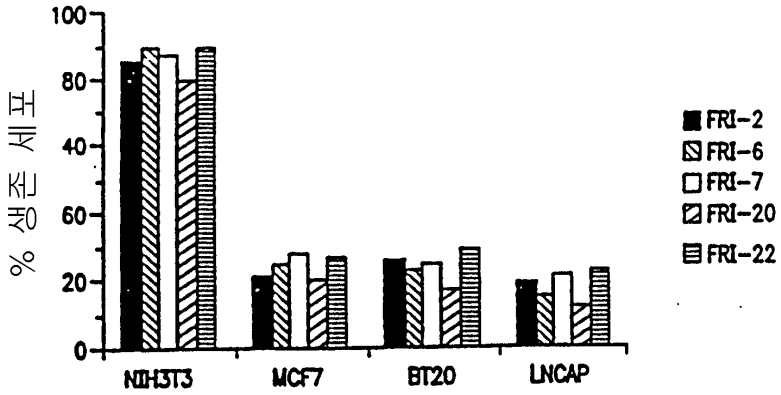
n이 1이면, $R_1$, $R_2$ 및 $R_3$가 모두 수소는 아니다.

도면

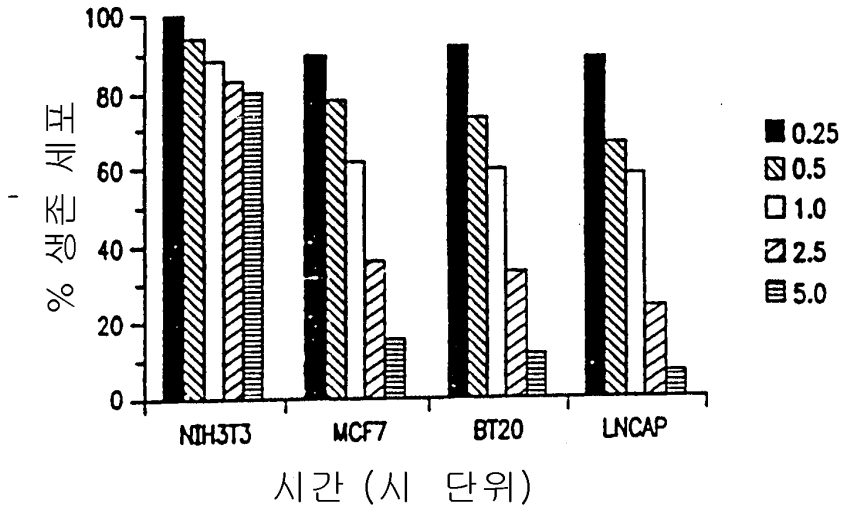
도면1a


% 생존 세포
100
80
60
40
20
0
NIH3T3
MCF7
BT20
LNCAP
FRI-2
FRI-6
FRI-7
FRI-20
FRI-22

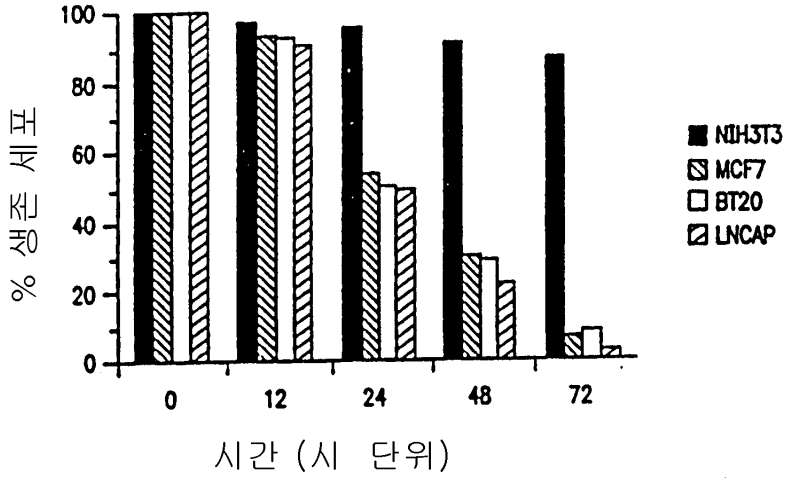
도면1b


% 생존 세포
100
80
60
40
20
0
NIH3T3
MCF7
BT20
LNCAP
FRI-2
FRI-6
FRI-7
FRI-20
FRI-22

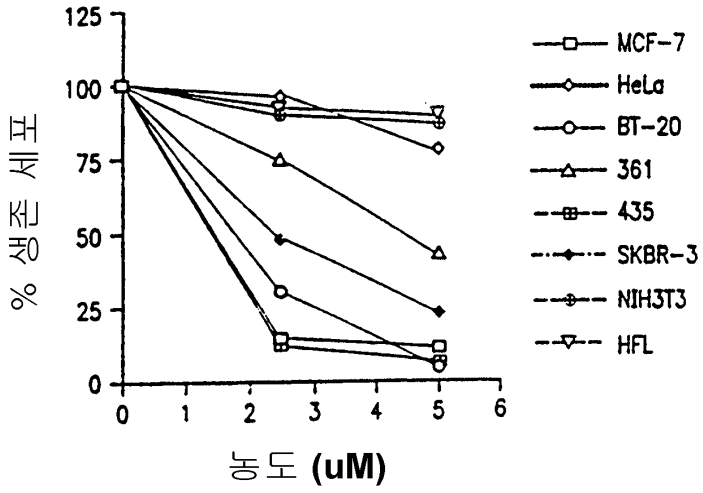
도면2a


100
80
60
40
20
0
% 생존 세포
NIH3T3
MCF7
BT20
LNCAP
시간 (시 단위)
0.25
0.5
1.0
2.5
5.0

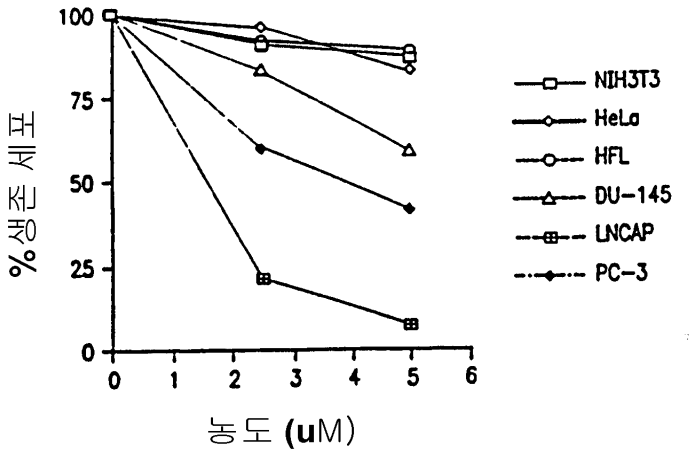
도면2b


100
80
60
40
20
0
% 생존 세포
0
12
24
48
72
시간 (시 단위)
NIH3T3
MCF7
BT20
LNCAP

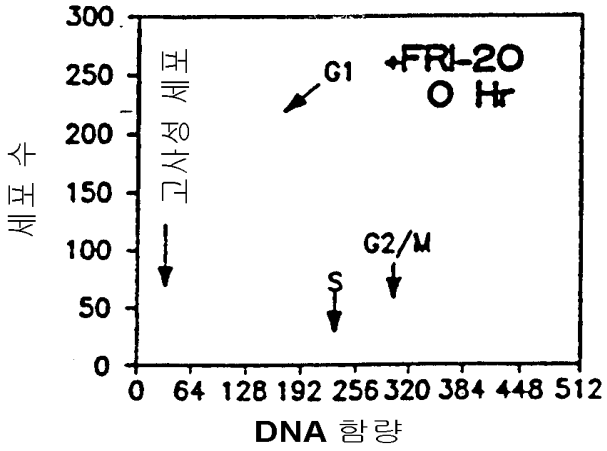
도면3a


125
100
75
50
25
0
% 생존 세포
0 1 2 3 4 5 6
농도 (uM)
MCF-7
HeLa
BT-20
361
435
SKBR-3
NIH3T3
HFL

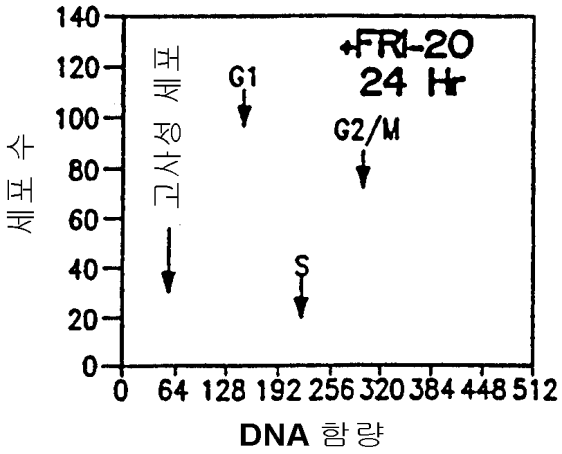
도면3b


100
75
50
25
0
% 생존 세포
0 1 2 3 4 5 6
농도 (uM)
NIH3T3
HeLa
HFL
DU-145
LNCAP
PC-3

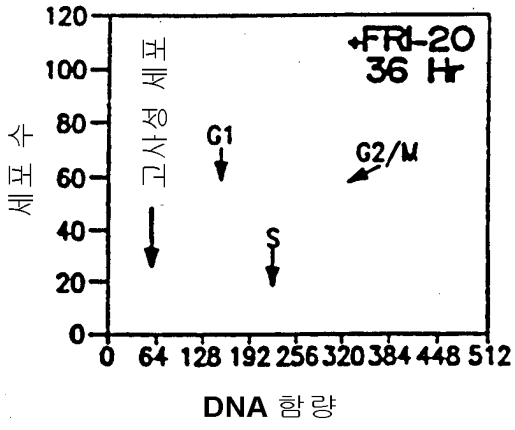
도면4a



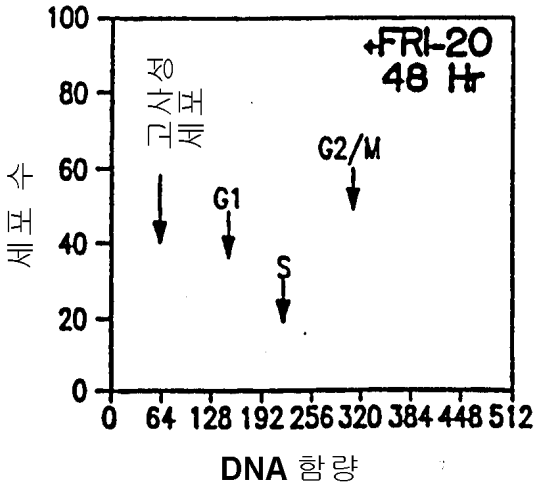

도면4b



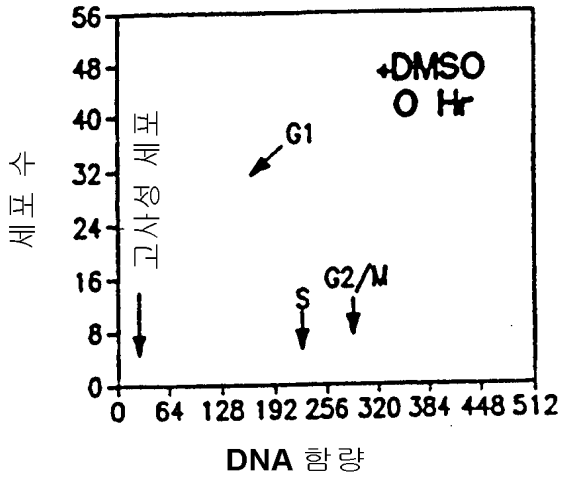

도면4c



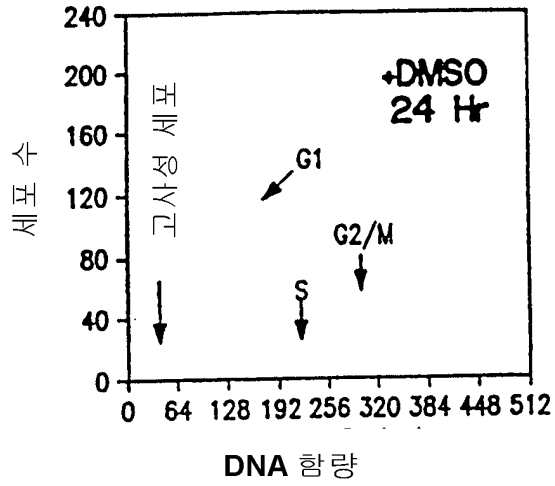
도면4d


+FRI-20
48 Hr
고사성 세포
G1
S
G2/M
세포 수
DNA 함량
0
20
40
60
80
100
0 64 128 192 256 320 384 448 512

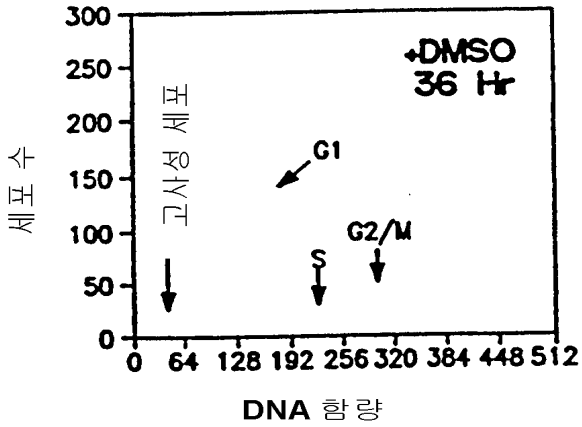
도면4e


+DMSO
0 Hr
고사성 세포
G1
S
G2/M
세포 수
DNA 함량
0
8
16
24
32
40
48
56
0 64 128 192 256 320 384 448 512

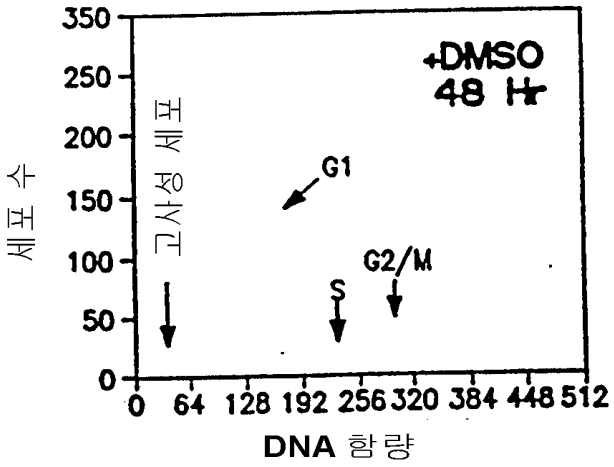
도면4f


240
200
160
120
80
40
0
세포 수
고사성 세포
+DMSO
24 Hr
G1
G2/M
S
0 64 128 192 256 320 384 448 512
DNA 함량

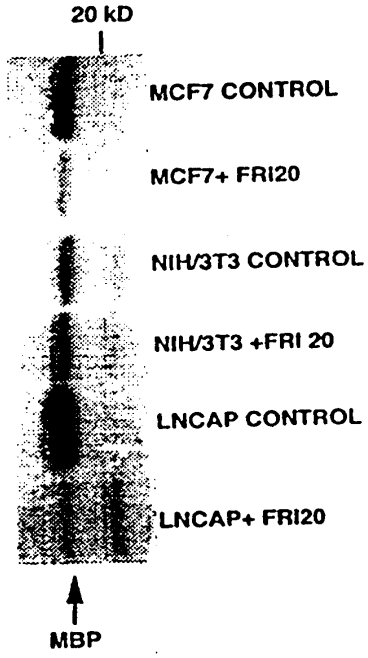
도면4g


300
250
200
150
100
50
0
세포 수
고사성 세포
+DMSO
36 Hr
G1
G2/M
S
0 64 128 192 256 320 384 448 512
DNA 함량

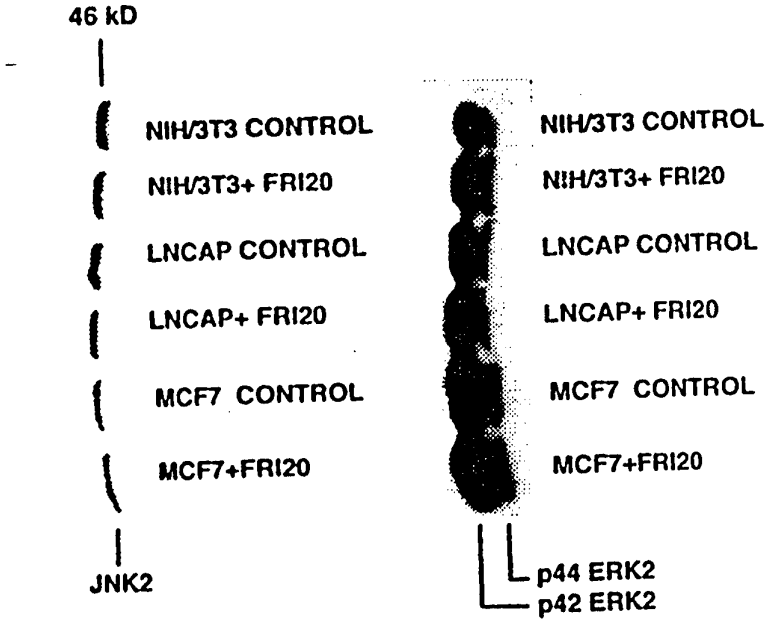
도면4h


+DMSO
48 Hr
G1
S
G2/M
고사성 세포
세포 수
350
250
200
150
100
50
0
0 64 128 192 256 320 384 448 512
DNA 함량

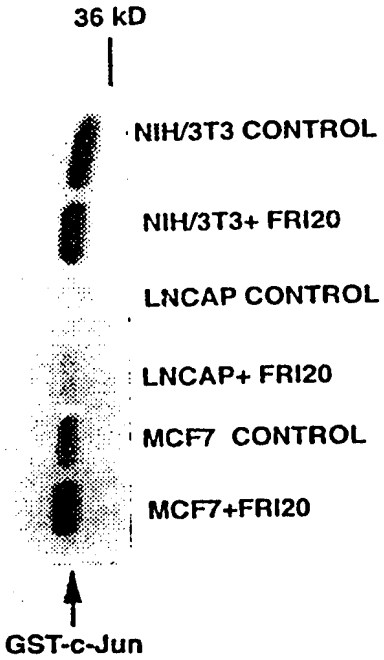
도면5


20 kD
MCF7 CONTROL
MCF7+ FRI20
NIH/3T3 CONTROL
NIH/3T3 +FRI 20
LNCAP CONTROL
LNCAP+ FRI20
MBP

도면6


46 kD
NIH/3T3 CONTROL
NIH/3T3+ FRI20
LNCAP CONTROL
LNCAP+ FRI20
MCF7 CONTROL
MCF7+FRI20
JNK2
NIH/3T3 CONTROL
NIH/3T3+ FRI20
LNCAP CONTROL
LNCAP+ FRI20
MCF7 CONTROL
MCF7+FRI20
p44 ERK2
p42 ERK2

도면7


36 kD
NIH/3T3 CONTROL
NIH/3T3+ FRI20
LNCAP CONTROL
LNCAP+ FRI20
MCF7 CONTROL
MCF7+FRI20
GST-c-Jun