

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일
2022 년 4 월 28 일 (28.04.2022) WIPO | PCT

WO 2022/086110 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/4184 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2021/014550

(22) 국제출원일: 2021 년 10 월 19 일 (19.10.2021)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2020-0135175 2020 년 10 월 19 일 (19.10.2020) KR
10-2021-0138673 2021 년 10 월 18 일 (18.10.2021) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION)
[KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 서재홍 (SEO, Jae Hong); 13803 경기도 과천시 관문로 166, 1018동 303호, Gyeonggi-do (KR). 남기달 (NAM, Kee Dal); 02467 서울시 동대문구 고산자로 534, 107동 803호, Seoul (KR). 김지영 (KIM, Ji Young);

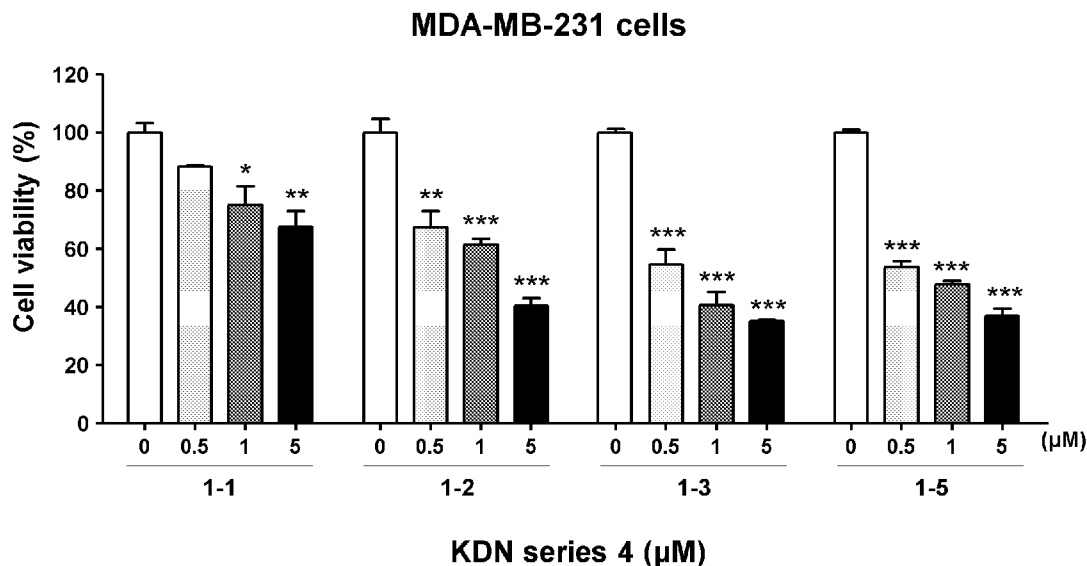
08311 서울시 구로구 구로동로28길 42, 101동 701호, Seoul (KR). 김윤재 (KIM, Yoon Jae); 10907 경기도 파주시 한빛로 11, 308동 1502호, Gyeonggi-do (KR). 박민수 (PARK, Min Su); 08298 서울시 구로구 가마산로 27길 60, 1동 902호, Seoul (KR). 강용구 (KANG, Yong Koo); 04426 서울시 용산구 이촌로 248, 26동 401호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 무한 (MUHANN PATENT & LAW FIRM); 06144 서울시 강남구 언주로 560, 8층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD,

(54) Title: THIOPENZIMIDAZOLE DERIVATIVE OR PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE SALT THEREOF AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a thiopenzimidazole derivative or a pharmaceutically acceptable salt thereof, and a composition for preventing or treating cancer, comprising the derivative as an active ingredient. The thiopenzimidazole derivative of the present invention exhibits cell toxicity by blocking the cell cycle of a cancer cell and inducing apoptosis when administered to an individual, as the derivative inhibits tubulin polymerization by being activated in the cancer cell, and, thus, the derivative can be used for prevention or treatment of cancer, desirably for prevention or treatment of triple-negative breast cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 상기 유도체를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 티오벤즈이미다졸 유도체는 암 세포에서 활성화되어 튜블린 중합(tubulin polymerization)을 저해하여, 개체에 투여 시 암 세포의 세포 주기를 차단하고 세포사멸을 유도함으로써 세포 독성을 나타내는바, 암의 예방 또는 치료, 바람직하게는 삼중음성유방암의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]

SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이의 용도 등에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 삼중음성유방암 (triple-negative breast cancer, TNBC; ER-, PR-, HER2-) 환자는 전체 유방암 환자의 10~15 %를 차지하고, 호르몬 수용체 (ER (estrogen receptor), PR (progesterone receptor)) 및 HER2 단백질이 결여되어 있어, 호르몬 치료법이나 HER2 표적치료제의 혜택을 받지 못한다. 현재 삼중음성유방암의 표준치료는 일반적인 세포독성항암제 (Taxane계 또는 Anthracycline계)에 전적으로 의존하고 있는 실정이다. 확립된 표적 치료제가 없기 때문에 다른 아형은 유방암에 비해 치료 전략이 다양하지 못하다. 더욱 심각한 것은 수술이나 항암치료 후, 대부분의 환자에서 2~3 년 이내에 재발이 나타나고, 폐, 간, 뇌 및 뼈 등의 타 기관으로 전이가 쉽게 유발되어 환자의 생존율 감소에 영향을 미친다.
- [3] 3기 (stage-III)로 진단받은 환자의 5 년 이내 생존율 (5-years overall survival)은 55 % 이하이며, 이미 암전이가 진행된 환자 (advanced-stage)는 5 년 이내 생존율이 30 % 이하로 매우 낮다. 이들 환자의 대부분은 궁극적으로 수년 내에 모두 사망에 이르게 되는 매우 심각한 질병이다.
- [4] 미세소관 (microtubule)은 세포 골격의 주요 구성요소로서, α 소단위체와 β 소단위체로 이루어진 튜불린 (tubulin) 이형중합체로 구성된다. 미세소관은 세포 내 수송, 극성 유지, 세포 내 신호 전달, 세포 이주 및 증식 등 다양한 세포의 작용을 수행한다. 세포의 유사분열 중에는 방추사를 형성하여 염색체가 세포 중심에 배열된 후 양극으로 분리되는 과정을 수행한다. 방추사가 제대로 기능하지 못하면 세포 분열이 억제되어 세포자멸사 (apoptosis)가 일어나게 되므로, 항암제의 타겟으로 주목받고 있다.
- [5] 미세소관을 타겟으로 하는 약물들은 크게 미세소관을 안정시키는 역할을 하는 약물과 미세소관을 불안정하게 만드는 약물의 두 가지 그룹으로 나뉜다. 첫째, 미세소관 안정제에는 taxane, paclitaxel (Taxol), decetaxel 등이 있으며, 미세소관이 탈중합되는 것을 막고 중합을 강화시키는 작용을 한다. 대부분의 미세소관 안정 물질들은 taxane- 결합 부위 또는 β 튜불린의 overlapping site에 결합한다. 둘째, 미세소관 탈안정제에는 콜키친 (colchicine), vinca alkaloid 등이 있는데, 콜키친 결합 부위나 vinca 결합 부위에 결합한다. 미세소관 중합체에 영향을 주는 약물보다 이들 미세소관 자체를 타겟으로 하는 약물이 더 낮은 농도에서 효과를 보이며, 결과적으로 세포 유사분열을 저해한다는 점은 동일하다. 따라서,

- 항암제로서 잠재적인 튜불린 중합 저해제를 개발하는 것이 요구되는 실정이다.
- [6] 한편, 플루벤다졸 (flubendazole), 알벤다졸 (Albendazole)은 튜불린 중합 저해제 (tubulin polymerization inhibitor)로서 구충제로 시판된 약품이나, cell cycle arrest에 의한 세포사멸 확인 가능하며, 느리게 자라는 암세포에도 사멸 효과가 확인되어 다양한 암의 치료제로서 주목받고 있다. 다만 물에 대한 낮은 용해도에 의해 체내 흡수가 어려운 한계를 보이고 있고, 다량 섭취시 간 효소 수치 상승과 같은 부작용이 나타나, 새로운 구조의 유도체의 개발이 요구되고 있다.
- [7] 이에, 본 발명자들은 신규한 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 튜불린 중합 저해제로서 암 세포의 세포주기를 중지시켜 (cell cycle arrest) 세포 사멸 (apoptosis)을 유도한다는 점을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 상세한 설명

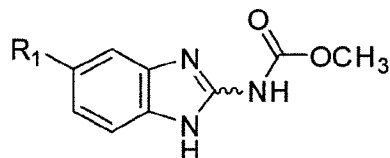
기술적 과제

- [8] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 상기 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [10] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [11] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [12] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 라세미체, 이성질체, 용매화물 또는 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

- [13] [화학식 1]

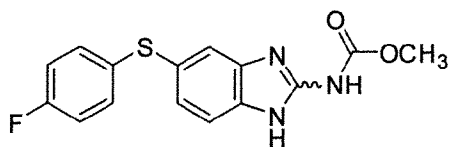


- [14] 상기 화학식 1에서,
- [15] R_1 은 $-S-R_2$ 또는 $-S-S-R_2$ 이고,
- [16] R_2 는 치환 또는 비치환된 고리형 알킬기, 헤테로시클로알킬기, 아릴기, 헤테로아릴기, 및 알킬아릴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수

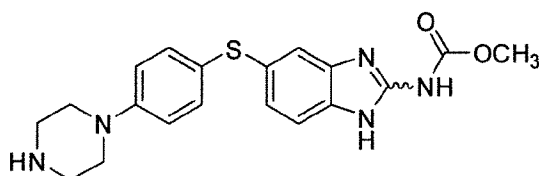
있고, 바람직하게는 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{20} 의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{20} 의 헤테로아릴기, 또는 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{20} 의 알킬아릴기일 수 있다.

- [17] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 [화학식 1]에서, 치환된 아릴기, 헤테로아릴기, 또는 알킬아릴기는 치환 또는 비치환된 알킬기, 고리형 알킬기, 헤테로시클로알킬기, 아릴기, 헤테로아릴기, 할로젠기, 하이드록시기, 알콕시기, 및 아미노기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상으로 치환될 수 있으며, 바람직하게는 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{12} 의 헤테로시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{12} 의 헤테로아릴기, 또는 할로젠기로 치환될 수 있다.
- [18] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 [화학식 1]로 표시되는 티오벤즈이미다졸 유도체는 하기 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다:

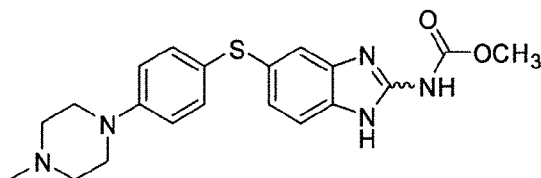
- [19] [화학식 1-1]



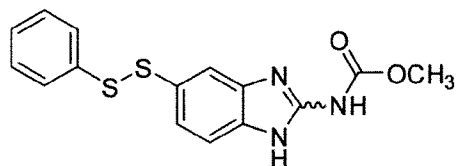
- [20] [화학식 1-2]



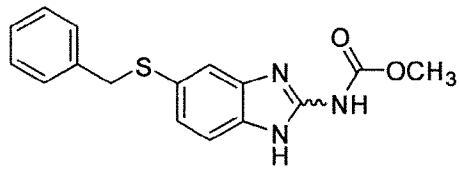
- [21] [화학식 1-3]



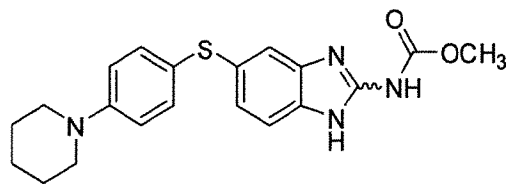
- [22] [화학식 1-4]



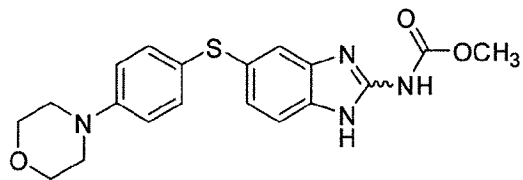
[23] [화학식 1-5]



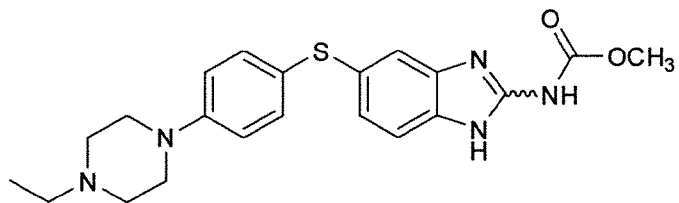
[24] [화학식 1-6]



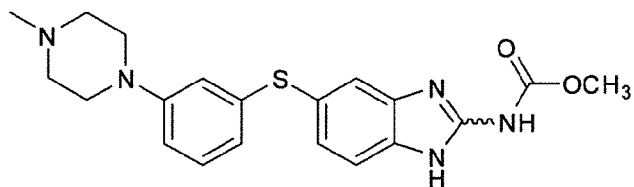
[25] [화학식 1-7]



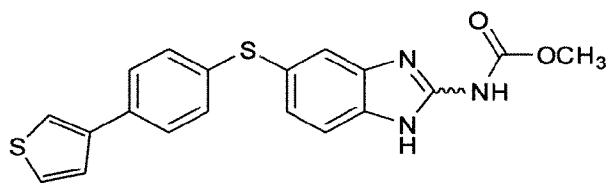
[26] [화학식 1-8]



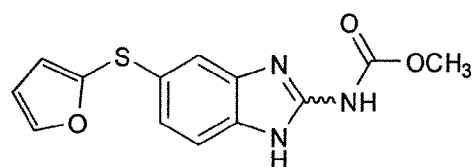
[27] [화학식 1-9]



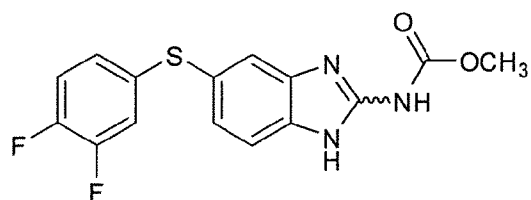
[28] [화학식 1-10]



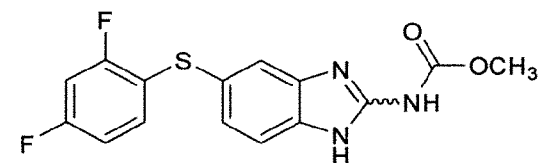
[29] [화학식 1-11]



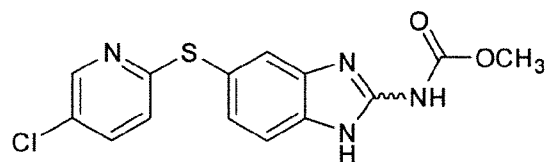
[30] [화학식 1-12]



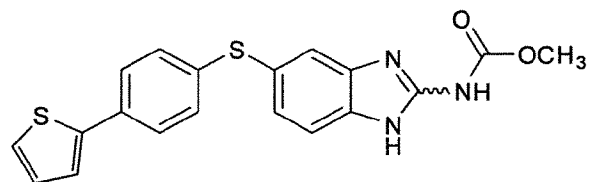
[31] [화학식 1-13]



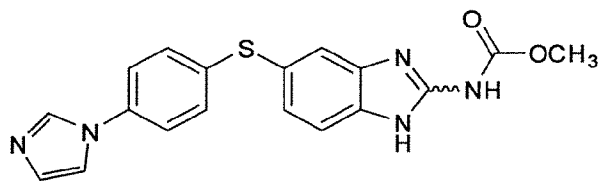
[32] [화학식 1-14]



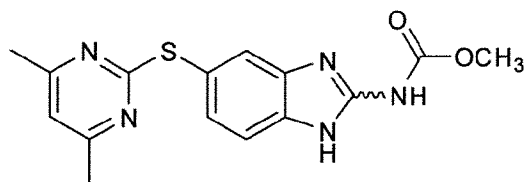
[33] [화학식 1-15]



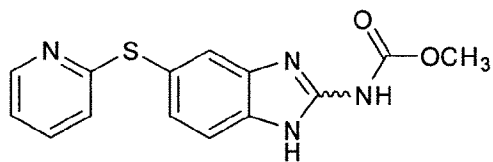
[34] [화학식 1-16]



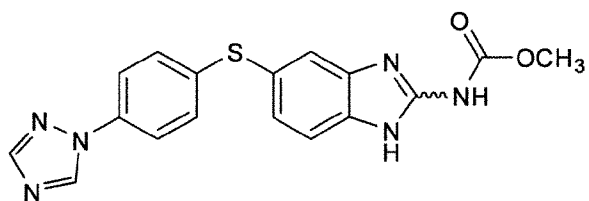
[35] [화학식 1-17]



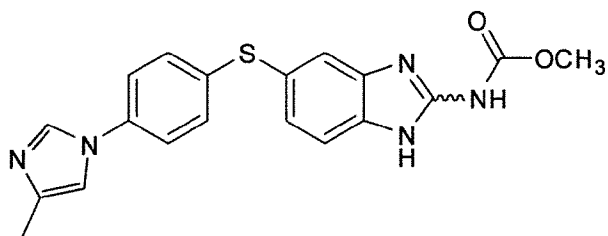
[36] [화학식 1-18]



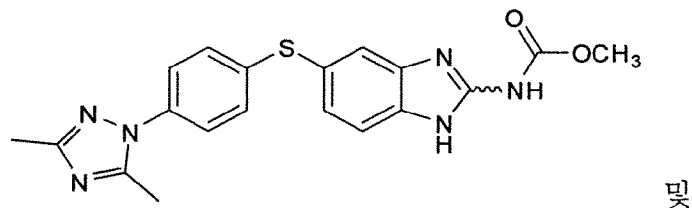
[37] [화학식 1-19]



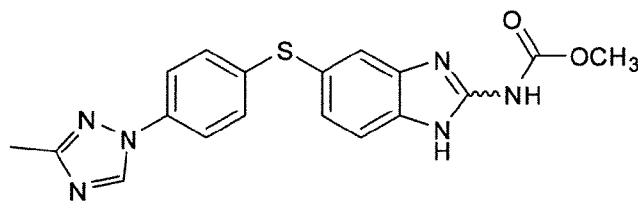
[38] [화학식 1-20]



[39] [화학식 1-21]



[40] [화학식 1-22]



[41] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 티오벤즈이미다졸 유도체는 튜블린 중합(tubulin polymerization)을 저해하는 것일 수 있다.

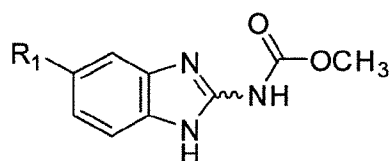
[42] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 티오벤즈이미다졸 유도체의 약학적으로 허용가능한 염은 염산염, 브롬산염, 황산염, 인산염, 질산염, 구연산염, 초산염, 젖산염, 주석산염, 말레산염, 글루콘산염, 숙신산염, 포름산염, 트리플루오로아세트산염, 옥살산염, 푸마르산염, 글루타르산염, 아디프산염, 메탄술폰산염, 벤젠술폰산염, 파라톨루엔술폰산염, 캄페술폰산염, 나트륨염, 칼륨염, 리튬염, 칼슘염, 및 마그네슘염으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 염산염일 수 있다.

[43]

[44] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 상기 티오벤즈이미다졸 유도체의 염산염의 제조방법을 제공한다.

[45] (1) 하기 [화학식 1]로 표시되는 티오벤즈이미다졸 유도체의 현탁액을 제조하는 단계;

[46] [화학식 1]



[47] (2) 상기 현탁액에 염화수소 (HCl)를 주입하고, 감압증발하는 단계;

[48] (3) 상기 (2)단계의 생성물에 이소프로필 알코올 (isopropyl alcohol)을 가하고 가열 후 냉각하는 단계; 및

- [49] (4) 상기 (3)단계의 생성물에 이소프로필 에테르 (isopropyl ether)를 가하고 교반한 후 여과하는 단계.
- [50]
- [51] 또한, 본 발명은 상기 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [52] 또한, 본 발명은 상기 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [53] 또한, 본 발명은 암의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 상기 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.
- [54] 또한, 본 발명은 상기 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 진단 방법을 제공한다.
- [55] 또한, 본 발명은 암 진단용 약제의 제조를 위한 상기 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.
- [56] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 약학적 조성물은 암 세포의 세포주기를 중지 (cell cycle arrest)시켜 세포사멸 (apoptosis)을 유도하는 것일 수 있다.
- [57] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 암은 피부암, 유방암, 자궁암, 식도암, 위암, 뇌종양, 결장암, 직장암, 대장암, 폐암, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암, 외음부암, 신장암, 혈액암, 췌장암, 전립선암, 고환암, 후두암, 두경부암, 갑상선암, 간암, 방광암, 골육종, 림프종, 백혈병, 흉선암, 요도암, 및 기관지암으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있으며, 바람직하게는 유방암, 더욱 바람직하게는 삼중음성유방암일 수 있다.

발명의 효과

- [58] 본 발명은 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 상기 유도체를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것으로서, 본 발명의 티오벤즈이미다졸 유도체는 암 세포에서 활성화되어 튜불린 중합 (tubulin polymerization)을 저해하며, 개체에 투여 시 암 세포 주기를 차단하고 세포사멸을 유도함으로써 세포 독성을 나타내는바, 암의 예방 또는 치료, 바람직하게는 삼중음성유방암의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [59] 도 1은 삼중음성유방암 (triple-negative breast cancer, TNBC) 세포주인 MDA-MB-231에서 화학식 1-1, 1-2, 1-3 및 1-5의 티오벤즈이미다졸 유도체를 처리한 후 세포 생존율 결과를 나타낸 것이다.
- [60] 도 2는 HER2 양성 유방암 (HER2 positive breast cancer, HER2+ BC) 세포주인 JIMT-1에서 화학식 1-1, 1-2, 1-3 및 1-5의 티오벤즈이미다졸 유도체를 처리한 후 세포 생존율 결과를 나타낸 것이다.

- [61] 도 3은 삼중음성유방암 (TNBC) 세포주인 MDA-MB-231에서 화학식 1-6, 1-7, 1-8, 1-10, 1-11, 1-12, 1-13 및 1-14의 티오벤즈이미다졸 유도체를 처리한 후 세포 생존율 결과를 나타낸 것이다.
- [62] 도 4는 HER2 양성 유방암 세포주인 JIMT-1에서 화학식 1-6, 1-7, 1-8, 1-10, 1-11, 1-12, 1-13 및 1-14의 티오벤즈이미다졸 유도체를 처리한 후 세포 생존율 결과를 나타낸 것이다.
- [63] 도 5는 삼중음성유방암 (TNBC) 세포주인 MDA-MB-231에서 화학식 1-15, 1-16, 1-17, 1-19, 1-20, 1-21, 및 1-22의 티오벤즈이미다졸 유도체를 처리한 후 세포 생존율 결과를 나타낸 것이다.
- [64] 도 6은 HER2 양성 유방암 세포주인 JIMT-1에서 화학식 1-15, 1-16, 1-17, 1-19, 1-20, 1-21, 및 1-22의 티오벤즈이미다졸 유도체를 처리한 후 세포 생존율 결과를 나타낸 것이다.
- [65] 도 7은 HER2 양성 유방암 세포주인 SKBR3, BT474, 및 JIMT-1에서 화학식 1-3의 티오벤즈이미다졸 유도체를 처리한 후 세포 생존율 결과를 나타낸 것이다.
- [66] 도 8는 화학식 1-3의 티오벤즈이미다졸 유도체에 의한 암세포의 사멸 유도(Sub-G1 accumulation) 및 G2/M phase 세포 주기 정체를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [67] 도 9는 화학식 1-3의 티오벤즈이미다졸 유도체에 의한 암세포의 전기 및 후기 세포사멸을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [68] 도 10은 HER2 양성 유방암 세포주인 BT474 및 JIMT-1에서 화학식 1-3의 티오벤즈이미다졸 유도체와 이의 염산염 (화합물 1-23)을 처리한 후 세포 생존율 결과를 나타낸 것이다.
- [69] 도 11은 삼중음성유방암 (TNBC) 세포주인 MDA-MB-231, BT549 및 4T1에서 화학식 1-3의 티오벤즈이미다졸 유도체의 염산염 (화합물 1-23)을 처리한 후 세포 생존율 결과를 나타낸 것이다.
- [70] 도 12는 삼중음성유방암 (TNBC) 세포주인 MDA-MB-231과 HER2 양성 유방암 세포주인 JIMT-1에서 화학식 1-3의 티오벤즈이미다졸 유도체의 염산염 (화합물 1-23)을 처리한 후 웨스턴 블롯(western blot)을 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- [71] 도 13은 혈액암 세포주인 HL-60, 대장암 세포주인 HCT116, 비소세포성폐암 세포주인 H1299 및 A549에서 화학식 1-3의 티오벤즈이미다졸 유도체의 염산염 (화합물 1-23)을 처리한 후 세포 생존율 결과를 나타낸 것이다.
- [72] 도 14는 난소암 세포주인 SKOV3, 전립선암 세포주인 Du145, 및 간암 세포주인 HepG2에서 화학식 1-3의 티오벤즈이미다졸 유도체의 염산염 (화합물 1-23)을 처리한 후 세포 생존율 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

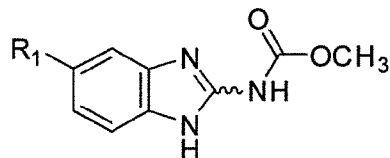
- [73] 본 발명자들은 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 대해 예의 연구한 결과, 상기 유도체의 항암 활성을 확인하여 본 발명을

완성하였다.

[74] 보다 구체적으로 상기 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이 암 세포에서 활성화되어 튜블린 중합을 저해하여 암 세포 주기를 차단하고 세포사멸을 유도함으로써 세포 독성을 나타낸다는 점을 확인하였다.

[75] 상기 결과로부터, 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공할 수 있다.

[76] [화학식 1]



[77] 상기 화학식 1에서,

[78] R_1 은 $-S-R_2$ 또는 $-S-S-R_2$ 이고,

[79] R_2 는 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{20} 의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{20} 의 헤테로아릴기, 및 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{20} 의 알킬아릴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[80] 본 발명에서, 용어 “치환”은 화합물의 분자 중에 포함되는 원자 또는 원자단을 다른 원자 또는 원자단으로 바꾸어 놓는 반응이다.

[81] 본 발명에서, 용어 “사슬형”이란, 사슬형 구조가 있는 분자를 일컬으며, 사슬형 구조는 탄소 원자가 사슬 모양으로 이어진 화학구조로, 끝은 사슬 모양의 것과 분지한 모양의 것이 있다.

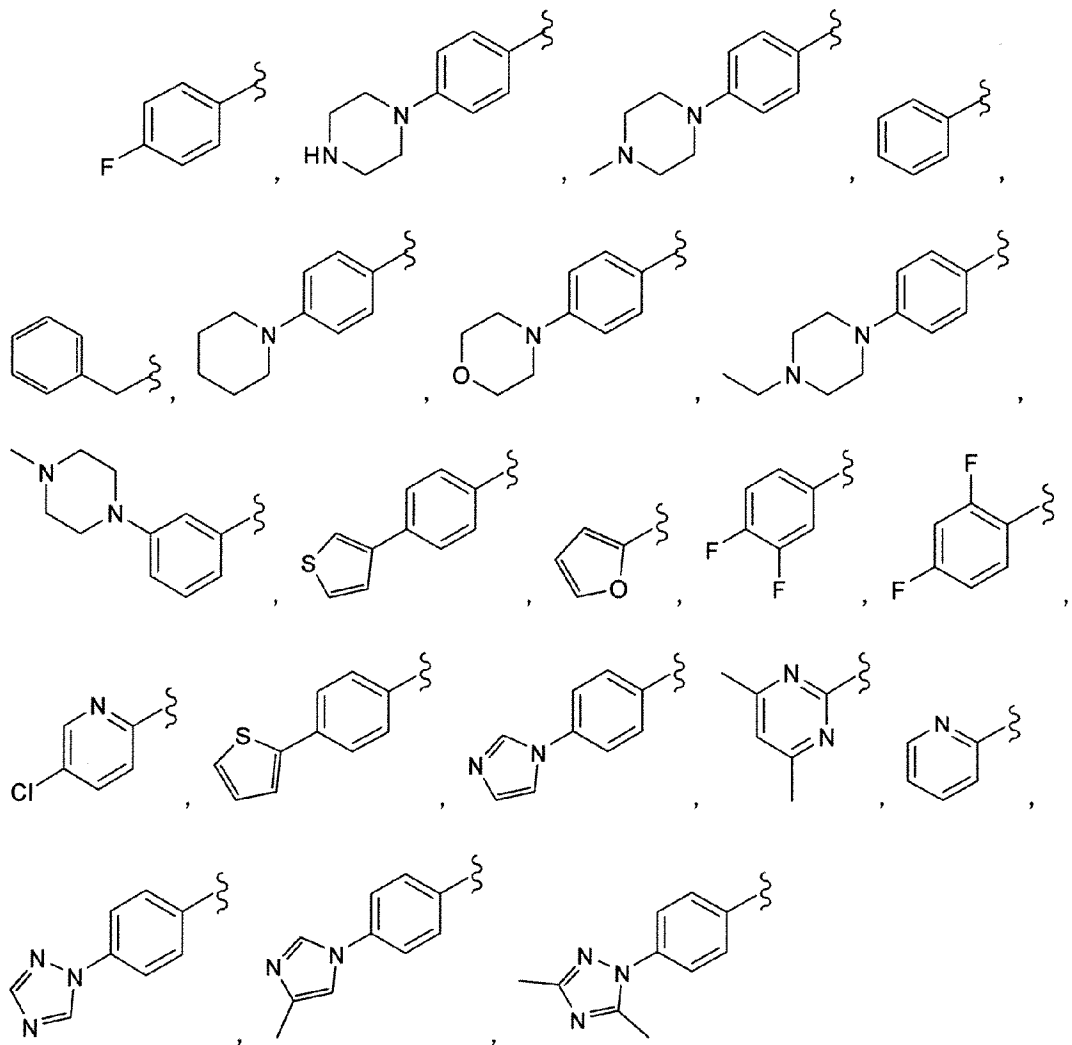
[82] 본 발명에서, 용어 “고리형”이란, 유기 화합물의 골격에서 연쇄된 양단이 이어져 고리모양이 된 구조를 말한다.

[83] 본 발명에서, 용어 “사슬형 또는 고리형 알킬기”는 1 내지 20개의 탄소 원자를 갖는, 오직 탄소와 수소 원자로만 이루어진 1가 선형 또는 분지형 또는 고리형 포화된 탄화수소 잔기를 의미한다. 이러한 알킬기의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, 부틸, 아이소부틸, 2-부틸, 3-부틸, 펜틸, n-헥실, 사이클로부틸기, 사이클로펜틸기, 사이클로헥실기 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

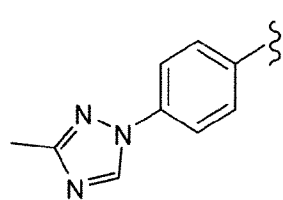
[84] 본 발명에서, 용어 “헤테로시클로알킬기”는 통상적으로 포화 또는 불포화(그러나 방향족은 아님) 시클로탄화수소 (Cyclohydrocarbon)를 지칭하고, 이는 선택적으로 비치환, 단일 치환 또는 다중 치환된 것일 수 있으며, 이의 구조에서 적어도 하나는 N, O 또는 S의 헤테로 원자로부터 선택된다.

[85] 본 발명에서, 용어 “아릴기”는 단일고리 (예를 들면 페닐) 또는 복수의 축합고리 (예를 들면 나프틸)를 갖는 탄소원자수 3 내지 12의 불포화 방향족 고리화합물을 의미한다. 이러한 아릴기의 예로는 페닐, 나프틸 등을 포함하나, 이들로 한정되지 않는다.

- [86] 본 발명에서, 용어 “헤테로아릴기”는 고리를 구성하는 원자 중 적어도 하나는 N, O 또는 S의 헤테로원자를 갖는 단일고리 또는 복수의 축합고리를 가리킨다. 이러한 헤테로아릴기의 예로는 피리딜기, 피리미디닐기, 피라지닐기, 옥사졸릴기, 푸릴기 등을 포함하나, 이들로 한정되지 않는다.
- [87] 본 발명에서, 용어 “알콕시기”는 산소와 결합된 알킬기 (-O-R)를 의미한다. 이러한 알콕시기의 예로는 메톡시기, 에톡시기, 프로폭시기, 부톡시기 등을 포함하나, 이들로 한정되지 않는다.
- [88] 본 발명에서, “할로젠기”는 플루오린 (F), 클로라이드 (Cl), 브로민 (Br), 또는 아이오딘 (I) 등일 수 있다.
- [89] 본 발명에 있어서, 상기 R₂는 보다 구체적으로,
- [90]

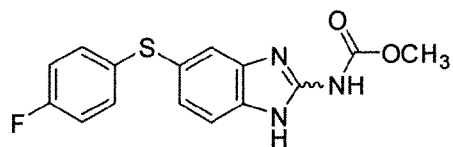


또는

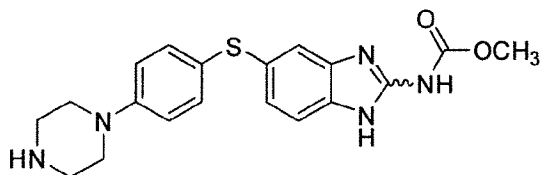


[91] 본 발명의 바람직한 구현예로서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은, 하기 화합물들로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것이 바람직하다:

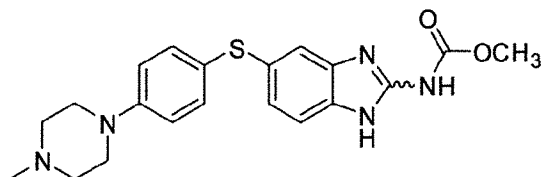
[92] [화학식 1-1]



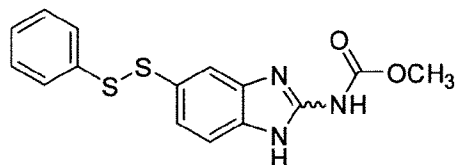
[93] [화학식 1-2]



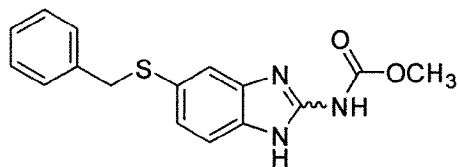
[94] [화학식 1-3]



[95] [화학식 1-4]

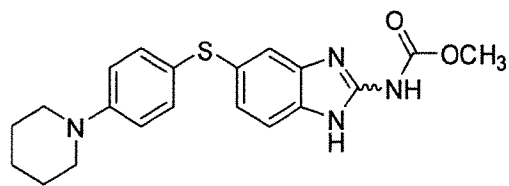


[96] [화학식 1-5]



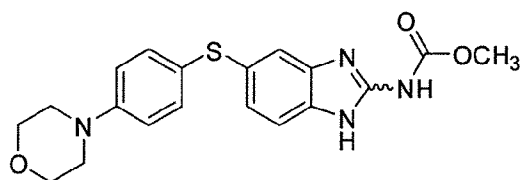
[97]

[화학식 1-6]



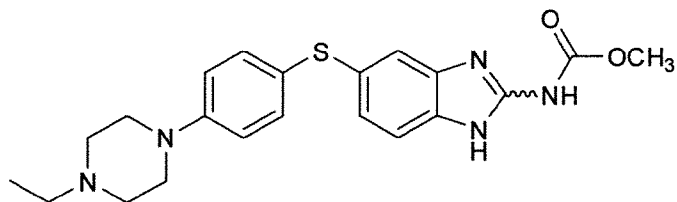
[98]

[화학식 1-7]



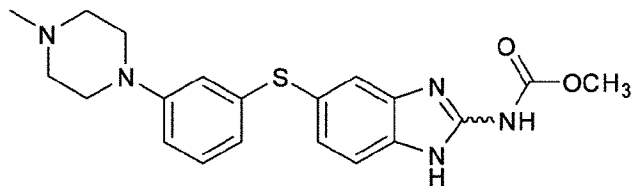
[99]

[화학식 1-8]



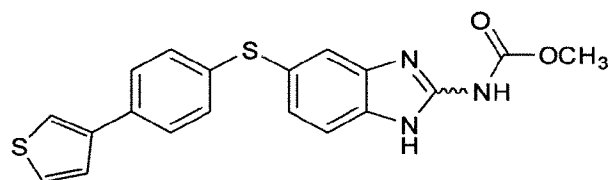
[100]

[화학식 1-9]



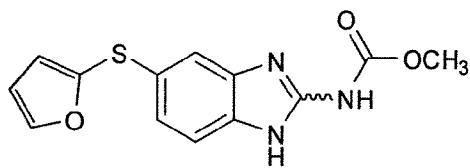
[101]

[화학식 1-10]



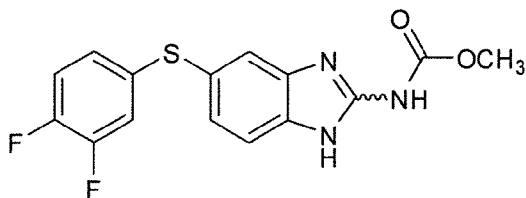
[102]

[화학식 1-11]



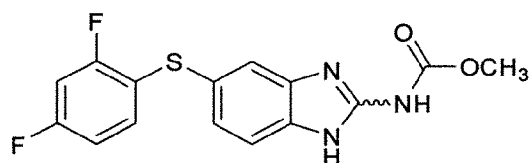
[103]

[화학식 1-12]



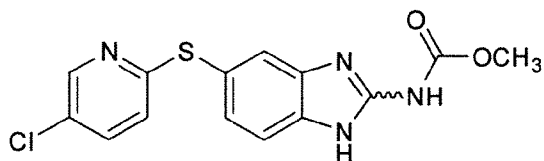
[104]

[화학식 1-13]



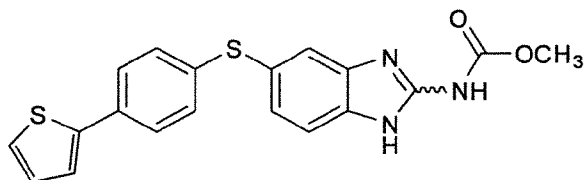
[105]

[화학식 1-14]



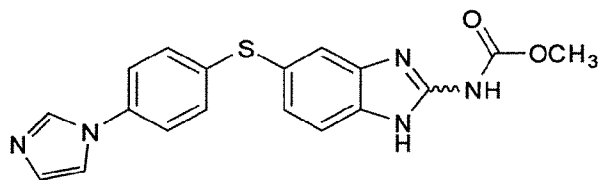
[106]

[화학식 1-15]

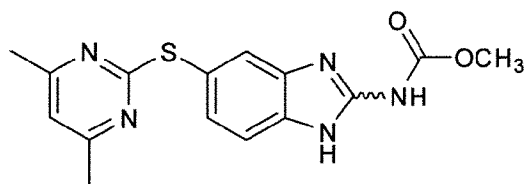


[107]

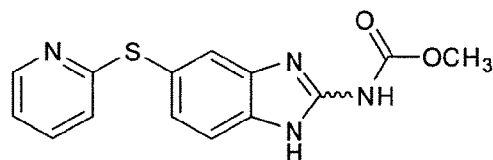
[화학식 1-16]



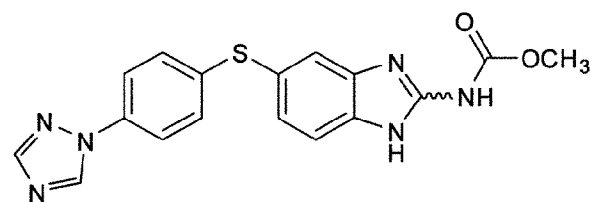
[108] [화학식 1-17]



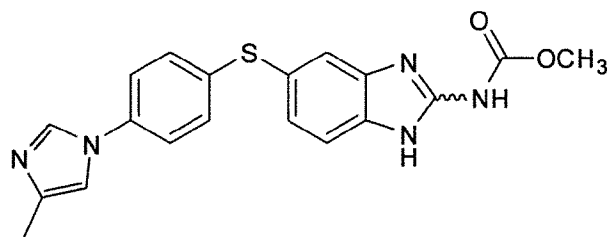
[109] [화학식 1-18]



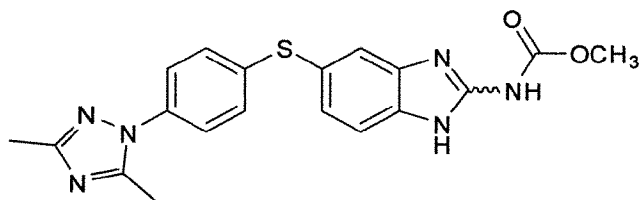
[110] [화학식 1-19]



[111] [화학식 1-20]

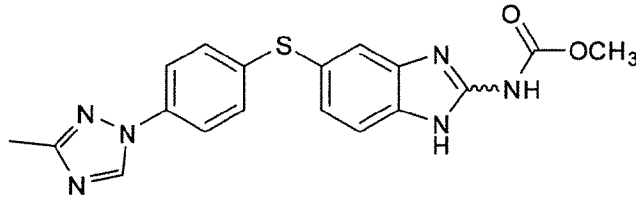


[112] [화학식 1-21]



및

[113] [화학식 1-22]



[114] 본 발명의 상기 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 암 세포 특이적으로 활성화되어 튜블린 중합을 저해하고, 세포 사멸을 유도하는바, 상기 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물로 이용될 수 있다.

[115] 본 발명에서, 용어, “약학적으로 허용 가능한 염”은 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않은 화합물의 제형을 의미한다. 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 본 발명의 화합물을 염산, 브롬산, 황산, 질산, 인산 등의 무기산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산 등의 술폰산, 타타르산, 포름산, 시트르산, 아세트산, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산, 카프릭산, 이소부탄산, 말론산, 석신산, 프탈산, 클루콘산, 벤조산, 락트산, 푸마르산, 말레인산, 살리실산 등과 같은 유기 카본산과 반응시켜 얻어질 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물을 염기와 반응시켜, 암모늄염, 나트륨 또는 칼륨염 등의 알칼리 금속염, 칼슘 또는 마그네슘 염 등의 알칼리 토금속염 등의 염, 디시클로헥실아민, N-메틸-D-글루카민, 트리스 (히드록시메틸) 메틸아민 등의 유기염기들의 염 및 아르기닌, 리신 등의 아미노산 염을 형성함으로써 얻어질 수도 있다.

[116] 또한, 상기 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함할 수 있다.

[117]

[118] 또한, 본 발명은 상기 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방, 치료, 및/또는 진단 방법을 제공할 수 있다.

[119] 본 발명에서 용어, “예방”은 본 발명의 조성물의 투여로 암의 발생, 확산 또는 재발을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”는 본 발명의 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[120] 본 발명에서 용어, “약학적 조성물”은 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의

경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

- [121] 본 발명에서, "유효성분으로 포함"은 원하는 생물학적 효과를 실현하는데 필요하거나 또는 충분한 양으로 해당 성분이 포함되는 것을 의미한다. 실제 적용에 있어서 유효 성분으로 포함되는 양의 결정은 대상 질병을 치료하기 위한 양으로서, 다른 독성을 야기하지 않는 사항을 고려해서 결정될 수 있으며, 예를 들어 치료되는 질병 또는 병태, 투여되는 조성물의 형태, 피험체의 크기, 또는 질병 또는 병태의 심각도 등과 같은 다양한 인자에 따라서 변화될 수 있다. 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 기술을 지닌 기술자라면 과도한 실험을 동반하지 않고 개별적 조성물의 유효량을 경험적으로 결정할 수 있다.
- [122] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은, 각각의 제형에 따라 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다.
- [123] 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로오스 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 하나 이상의 혼합물일 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수도 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수도 있다. 더 나아가, 당분야의 적절한 방법으로, 또는 Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수도 있다.
- [124]
- [125] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 약학적으로 유효한 양으로 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [126] 따라서, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에 투여하여 암을 예방, 치료, 및/또는 진단할 수 있으며, 상기 암은 피부암, 유방암, 자궁암, 식도암, 위암, 뇌 종양, 결장암, 직장암, 대장암, 폐암, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암, 외음부암, 신장암, 혈액암, 췌장암, 전립선암, 고환암, 후두암, 두경부암, 갑상선암, 간암, 방광암, 골육종, 림프종, 혈액암, 흉선암, 요도암, 또는 기관지암 등일 수 있으며, 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 산도가 정상세포보다 높고, 튜블린 중합 억제제에 의해 세포 독성이 저해되는 특성의 암일 수 있고, 그 비제한적인 예로서 유방암, 바람직하게는 삼중음성유방암 등이 있다.
- [127] 본 발명에서 용어, "개체"는 암의 예방, 치료, 및/또는 진단이 필요한 가축, 인간

등의 포유류라면 제한되지 아니하나, 바람직하게는 인간일 수 있다.

- [128] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에 투여를 위한 다양한 형태로 제형화 될 수 있으며, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화 될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는 예를들면 섭취형 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제 (예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신)와 활탁제 (예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 포함할 수 있다. 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 포함할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제 및/또는 감미제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [129] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 방부제, 수화제, 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제와 같은 보조제와 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 제제화 될 수 있다.
- [130] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 목적하는 효과를 상승시킬 수 있는 공지의 화합물과도 병행하여 투여할 수 있다.
- [131] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로로는 경구적으로 또는 정맥 내, 피하, 비강 내 또는 복강 내 등과 같은 비경구적으로 사람과 동물에게 투여될 수 있다. 경구 투여는 설하 적용도 포함한다. 비경구적 투여는 피하주사, 근육 내 주사 및 정맥 주사와 같은 주사법 및 점적법을 포함한다.
- [132] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 본 발명에 따른 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 총 유효량은 단일 투여량 (single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량 (multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법 (fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 통상적으로 성인을 기준으로 1회 투여시 100 μ g 내지 3,000mg의 유효용량으로 하루에 수차례 반복 투여될 수 있다. 그러나 상기 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐 만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효

투여량이 결정될 수 있다.

- [133] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지는 않으며, 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분으로서 상기 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 이외에 공지된 항암제를 추가로 포함할 수 있고, 이들 질환의 치료를 위해 공지된 다른 치료와 병용될 수 있다.

[134]

- [135] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

- [136] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[137]

- [138] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

- [139] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[140]

[141] **[실시예]**

[142] **실시예 1. 티오벤즈이미다졸 유도체의 제조**

- [143] 모든 화학 시약은 상업적으로 이용 가능한 것을 사용하였다. ¹H NMR 스펙트럼은 Bruker Avance III 400 MHz 및 Bruker Fourier 300 MHz에서 기록되었으며 TMS는 내부 표준으로 사용되었다.

- [144] LCMS는 ES (+) 또는 (-) 이온화 모드에서 작동하는 Agilent LC/MSD 1200 시리즈 (컬럼 : ODS 2000 (50 × 4.6 mm, 5 μm))의 quadrupole Mass

Spectrometer에서 촬영되었음; T = 30 °C, 유속 = 1.5 mL/min; 검출된 파장 : 214 nm.

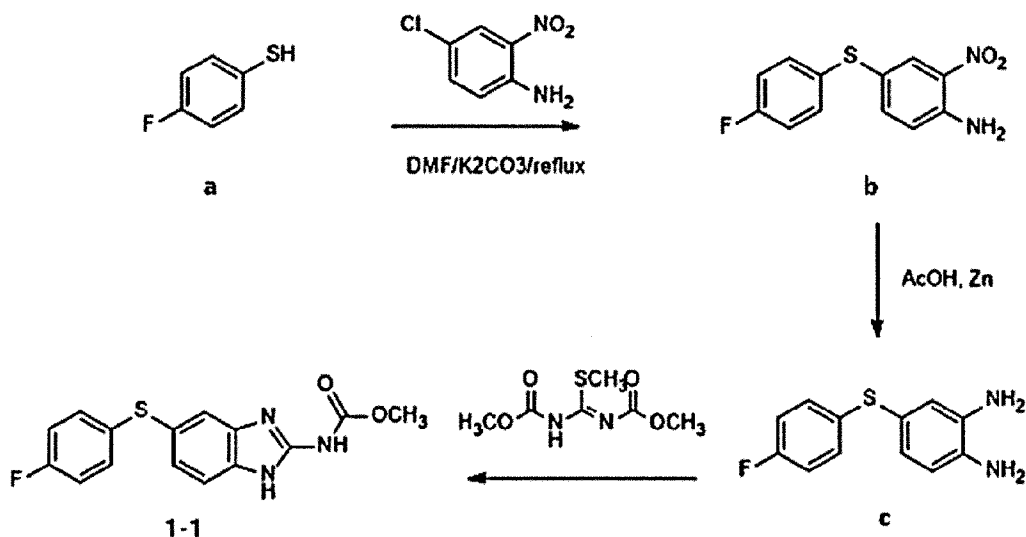
[145]

[146] **1.1 화학식 1-1의 합성**

[147] 화학식 1-1의 티오벤즈이미다졸 유도체의 합성 과정을 하기 반응식 1에 나타내었다.

[148]

[반응식 1]



[149]

[150] 1.1.1. 5-(4-fluorophenylthio)-2-nitrobenzeneamine의 합성

[151] 4-Fluorothiols (1.1 g, 8.69 mmol)을 10 mL에 녹인 후 K_2CO_3 (1.24 g, 9.01 mmol)를 첨가하였다. 그리고, 2-Nitro-5-Chloroaniline (1.5 g, 8.69 mmol)을 3 mL에 녹인 후 적가했다. 이후 90 °C에서 3 시간 교반하였다. TLC로 반응 종료를 확인 후 상온으로 냉각했다. 정제수 50 mL를 붓고 Ethyl acetate 100 mL로 추출하였다. 이를 MgSO_4 anhydrous로 건조 및 여과 후 감압 증류하여 노란색 고체를 얻었고, 이를 Ethyl acetate/n-hexane으로 재결정화를 하여 노란색 고체인 5-(4-fluorophenylthio)-2-nitrobenzeneamine (1.87 g)을 수득하였다 (수율 82 %).

[152]

R_f : 0.37 (EtOAc/n-Hexane, 1:5)

[153]

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 yield: 82 %, δ , ppm): 6.05(brs, 2H, $-\text{NH}_2$), 6.33~8.02(m, 7H, ArH)

[154]

[155] 1.1.2. 4-(4-fluorophenylthio)benzene-1,2-diamine의 합성

[156] 5-(4-fluorophenylthio)-2-nitrobenzeneamine (1.0 g, 0.378 mmol)을 Acetic acid 20 mL에 녹인 후 ice-bath하에서 Zn (1.23 g, 18.9 mmol)을 천천히 첨가하였다. 이후 10 시간 상온에서 교반한 후 TLC로 반응 종결을 확인한 후 여과했다. 여액을

감압 증류하고, 5M-NaOH용액으로 pH를 8로 보정한 후 Ethyl acetate 100 mL로 추출하였다. 이후 MgSO_4 anhydrous로 건조한 후 여과 및 감압증류 하여 진한 갈색 액체를 얻은 후 이를 컬럼하여 갈색 액체인

4-(4-fluorophenylthio)benzene-1,2-diamine (0.84 g)를 수득하였다 (수율 95.4 %).

[157] R_f : 0.06 (EtOAc/n-Hexane, 1:4)

[158] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 3.41(brs, 2H, $-\text{NH}_2$), 3.50(brs, 2H, $-\text{NH}_2$), 6.68~7.28(m, 7H, ArH)

[159]

[160] 1.1.3. Methyl 5-(4-fluorophenylthio)-1H-benzo[d]imidazol-2-ylcarbamate의 합성

[161] 4-(4-fluorophenylthio)benzene-1,2-diamine (0.7 g, 2.98 mmol)과

1,3-Bis(methoxycarbonyl)-S-methylisothiourea (1.6 g, 7.77 mmol)을 5 %-AcOH in Ethanol 10 mL에 녹인 후 4 시간 가열 환류 하였다. TLC로 반응 종결한 후 상온으로 냉각하여 생성된 침전물을 여과하였다. 여과시 MeOH로 충분히 세척하여 50 °C 진공 건조하여 흰색고체인 Methyl

5-(4-fluorophenyl-thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-ylcarbamate (화학식 1-1, 1.02 g)을 수득하였다 (수율 78 %).

[162] Melting Point: : 232-233 °C

[163] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , δ , ppm): 3.85(s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 6.95~7.69(m, 7H, ArH), 11.74(brs, 2H, $(-\text{NH})_2$)

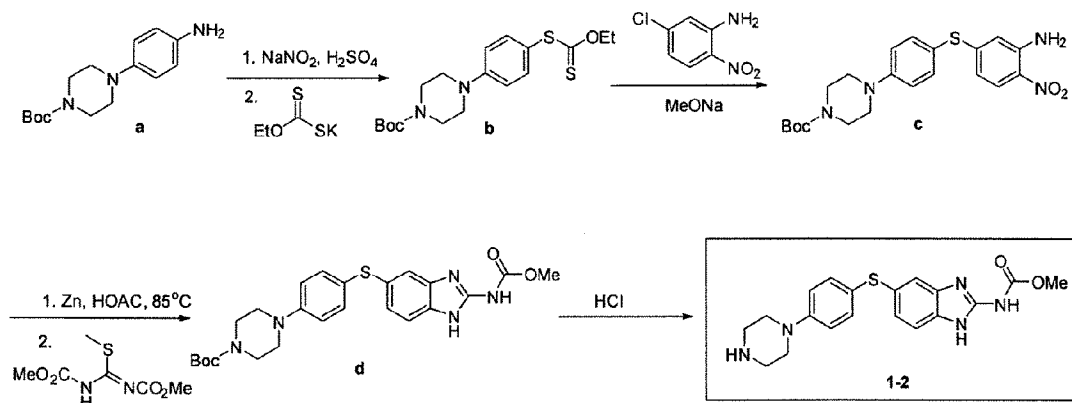
[164]

[165] **1.2 화학식 1-2의 합성**

[166] 화학식 1-2의 티오벤즈이미다졸 유도체의 합성 과정을 하기 반응식 2에 나타내었다.

[167]

[반응식 2]



[168]

[169] 1.2.1. tert-butyl 4-4-((ethoxycarbonothio)thio)phenylpiperazine-1-carboxylate의 합성

[170] THF/ H_2O (40 mL/40 mL) 중의 tert-butyl

4-(4-aminophenyl)piperazine-1-carboxylate (2.77 g, 10.2 mmol)의 용액에 H_2SO_4 (1.96 g, 20.0 mmol) 농축액을 첨가하였다. 이어서 물 (3.0 mL)에 녹인 NaNO_2 (2.10 g, 30 mmol)를 $-5^\circ\text{C} \sim 0^\circ\text{C}$ 에서 천천히 첨가하고 2 시간 동안 교반 하였다. Potassium O-ethyl carbonodithioate (9.60 g, 60 mmol)를 첨가하고 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후 혼합물을 물 (100 mL)에 붓고 EA (100 mL * 3)로 추출하였다. 유기층을 Na_2SO_4 로 건조시키고, 농축하고 역컬럼 (ACN/ H_2O)으로 정제하여 오렌지색 고체로서 2.00 g의 tert-butyl 4-(4-((ethoxycarbonothioyl)thio)phenyl)piperazine-1-carboxylate를 수득하였다 (수율 52 %).

[171]

[172] 1.2.2. tert-butyl

4-(4-((3-amino-4-nitrophenyl)thio)phenyl)piperazine-1-carboxylate의 합성

[173] THF/MeOH/ H_2O (30 mL/50 mL/10 mL) 중의 tert-butyl

4-(4-((ethoxycarbonothioyl)thio)phenyl)piperazine-1-carboxylate (1.15 g, 3.00 mmol)의 용액에 5-chloro-2-nitroaniline (520 mg, 3.00 mmol) 및 NaOH (480 mg, 12 mmol). 혼합물을 65°C 에서 16 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 AcOH로 pH = 7-8로 조정하고, 농축하여 역컬럼 (ACN/ H_2O)으로 정제하여 갈색 고체로서 600 mg의 tert-butyl 4-(4-((3-amino-4-nitrophenyl)thio)phenyl)piperazine-1-carboxylate을 얻었다 (수율 46 %).

[174]

[175] 1.2.3. tert-butyl

4-(4-((2-((methoxycarbonyl)amino)-1H-benzo[d]imidazol-6-yl)thio)phenyl)piperazine-1-carboxylate의 합성

[176] AcOH (30 mL) 중의 tert-butyl

4-(4-((3-amino-4-nitrophenyl)thio)phenyl)piperazine-1-carboxylate (500 mg, 1.16 mmol)의 용액에 1,3-bis(methoxycarbonyl)-2-methyl-2-thiopseudoeura (478 mg, 2.32 mmol) 및 Zn 분말 (603 mg, 9.28 mmol)을 첨가하였고, 혼합물을 75°C 에서 20 시간 동안 교반 하였다. 반응이 완료된 후 용매를 제거하였다. 혼합물을 MeOH (50 mL)에 용해시키고, 여과하고, 여액을 농축하고 역컬럼 (ACN/ H_2O)에 의해 정제하여 300 mg의 tert-butyl 4-(4-((2-((methoxycarbonyl)amino)-1H-benzo[d]imidazol-6-yl)thio)phenyl)piperazine-1-carboxylate를 황색 고체로서 수득하였다 (수율 53 %).

[177]

[178] 1.2.4. methyl

6-((4-(piperazin-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate의 합성

[179] 디옥산 (6 mL) 중의 tert-butyl

4-(4-((2-((methoxycarbonyl)amino)-1H-benzo[d]imidazol-6-yl)thio)phenyl)piperazine-

1-carboxylate (300 mg, 0.62 mmol)의 용액에 HCl/디옥산 (6 mL, 6 mol/L)을 첨가하였고, 혼합물을 실온에서 2 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후 용매를 제거하고 Et₃N을 첨가하였다. 혼합물을 농축하고 prep-HPLC로 정제하여 100 mg의 methyl

(6-((4-(piperazin-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate (화학식 1-2)을 회백색 고체로 얻었다 (수율 42 %).

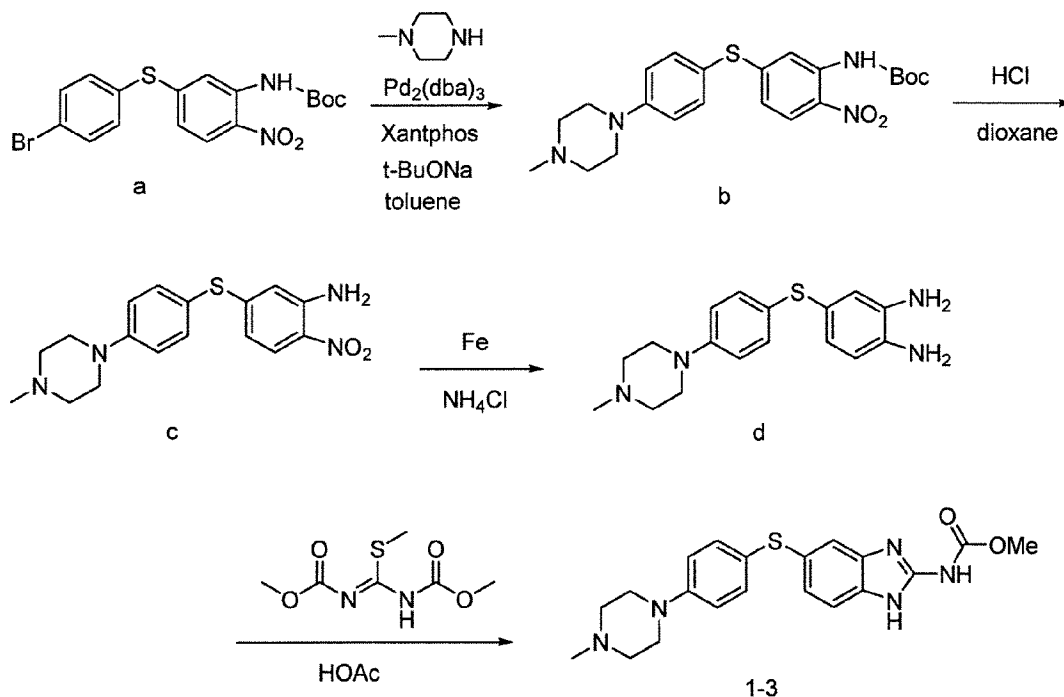
[180] ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.33 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.29 (s, 1H), 7.21 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.03-7.00 (m, 1H), 6.90 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 3.74 (s, 3H), 3.06-3.03 (m, 4H), 2.82-2.79 (m, 4H)

[181]

[182] **1.3 화학식 1-3의 합성**

[183] 화학식 1-3의 티오벤즈이미다졸 유도체의 합성 과정을 하기 반응식 3에 나타내었다.

[184] [반응식 3]



[185]

[186] 1.3.1. (5-((4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-2-nitrophenyl)carbamate의 합성

[187] tert-butyl (5-((4-bromophenyl)thio)-2-nitrophenyl)carbamate (9.0 g, 21.2 mmol, 1.0 당량)의 톨렌 (50 mL)용액에 1-methylpiperazine (4.2 g, 42.4 mmol, 2.0 당량)과 Pd₂(dba)₃ (1.9 g, 2.12 mmol, 0.1 eq)을 차례로 첨가하였다. 여기에 Xantphos (2.0 g, 4.24 mmol, 0.2 eq) 및 t-BuONa (4.1 g, 42.4 mmol, 2.0 eq)를 첨가하고, 혼합물을 100 °C에서 16 시간 동안 교반하였다. LCMS로 반응이 완료된 것을 확인한 다음, 반응물을 DCM으로 추출하고, 유기층은 TLC에 의해 농축 및 정제하여 황색

고체의 tert-butyl (5-((4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-2-nitrophenyl)carbamate (4 g)을 합성하였다 (수율 43 %).

[188]

[189] 1.3.2. 5-((4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-2-nitroaniline의 합성

[190] (5-((4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-2-nitrophenyl)carbamate (3 g, 6.75 mmol, 1.0 당량)의 HCl/디옥산 (30 mL)용액에 실온에서 2 시간 동안 교반하고, LCMS로 반응이 완료된 것을 확인하였다. NaHCO₃를 혼합물에 첨가하여 반응을 DCM으로 추출하고 유기층을 농축하고 TLC에 의해 정제하여 황색 고체 5-((4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-2-nitroaniline (2.3 g)을 얻었다 (수율 95 %).

[191]

[192] 1.3.3. 4-((4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine의 제조

[193] 5-((4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-2-nitroaniline (2.3 g, 6.68 mmol, 1.0 eq)의 EtOH(50 mL) 및 H₂O (10 mL)용액에 Fe (1.8 g, 33.4 mmol, 5.0 eq) 및 NH₄Cl (3.7 g, 66.8 mmol, 5.0 당량)을 첨가하였다. 혼합물을 80 °C에서 2 시간 동안 교반한 후, LCMS로 반응이 완료된 것을 확인한 다음, 반응물을 DCM으로 추출하고, 유기층을 농축하고 TLC로 정제하여 갈색 고체 4-((4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine (1.9 g)을 얻었다 (수율 90 %).

[194] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.03 (d, J=8.8 Hz, 2H), 6.84 (d, J=8.8 Hz, 2H), 6.56 (s, 1H), 6.46 (s, 2H), 4.57-4.66 (m, 4H), 3.06-3.08 (m, 4H), 2.40-2.42 (m, 4H), 2.19 (s, 1H)

[195]

[196] 1.3.4.

(5-((4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate의 제조

[197] 4-((4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine (800 mg, 2.54 mmol, 1.0 당량)의 CH₃COOH (20 mL) 용액에 1,3-Bis(methoxycarbonyl)-S-methylisothiourea (575 mg, 2.79 mmol, 1.1 당량)을 첨가하고 혼합물을 80 °C에서 2 시간 동안 교반하고, LCMS로 반응이 완료된 것을 확인하였다. 반응 생성 혼합물을 무수 Na₂SO₄로 건조하고 여과하였다. 여액을 농축하고 분취물을 Prep-TLC로 정제하여 백색 고체의 methyl (5-((4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate (632 mg)을 얻었다 (수율 63 %).

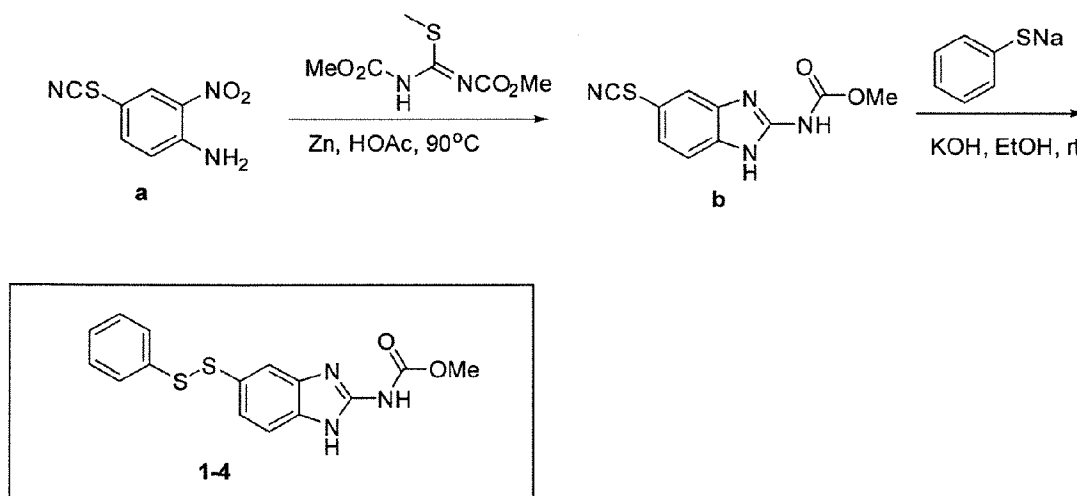
[198] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.28-7.32 (m, 2H), 7.20 (d, J=8.8 Hz, 2H), 6.99-7.01 (m, 1H), 6.91 (d, J=8.8 Hz, 2H), 3.71 (s, 3H), 3.11-3.14 (m, 4H), 2.41-2.43 (m, 4H), 2.20 (s, 3H)

[199]

[200] **1.4 화학식 1-4의 합성**

[201] 화학식 1-4의 티오벤즈이미다졸 유도체의 합성 과정을 하기 반응식 4에 나타내었다.

[202] [반응식 4]



[203]

[204] 1.4.1. methyl (5-thiocyanato-1H-benzo[d]imidazol-2-yl) carbamate의 합성

[205] AcOH (50 mL) 중의 2-nitro-4-thiocyanatoaniline (1.95 g, 10.0 mmol)의 용액에 Zn 분말 (5.00 g, 70.0 mmol) 및 1,3-bis(methoxycarbonyl)-2-methyl-2-thiopseudourea (2.70 g, 13.0 mmol). 혼합물을 90 °C에서 20 분 동안 교반 하였다. 반응이 완료된 후 혼합물을 여과하였다. 유기층을 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 역컬럼 (CH₃CN/H₂O)으로 정제하여 300 mg의 methyl (5-thiocyanato-1H-benzo[d]imidazol-2-yl) carbamate를 황색 고체로 수득 하였다.

[206]

[207] 1.4.2. methyl (5-(phenyldisulfanyl)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl) carbamate의 합성

[208] EtOH (120 mL) 중의 methyl (5-thiocyanato-1H-benzo[d]imidazol-2-yl) carbamate (300 mg, 1.20 mmol)의 용액에 PhSNa (319 mg, 2.40 mmol) 및 KOH (101 mg, 1.80 mmol)를 첨가했다. 혼합물을 실온에서 16 시간 동안 교반 하였다. 반응이 완료된 후 EtOH를 제거하였다. 잔류물을 prep-HPLC로 정제하여 90 mg의 화학식 1-4를 회백색 고체로 얻었다 (TFA 염, 수율 22 %).

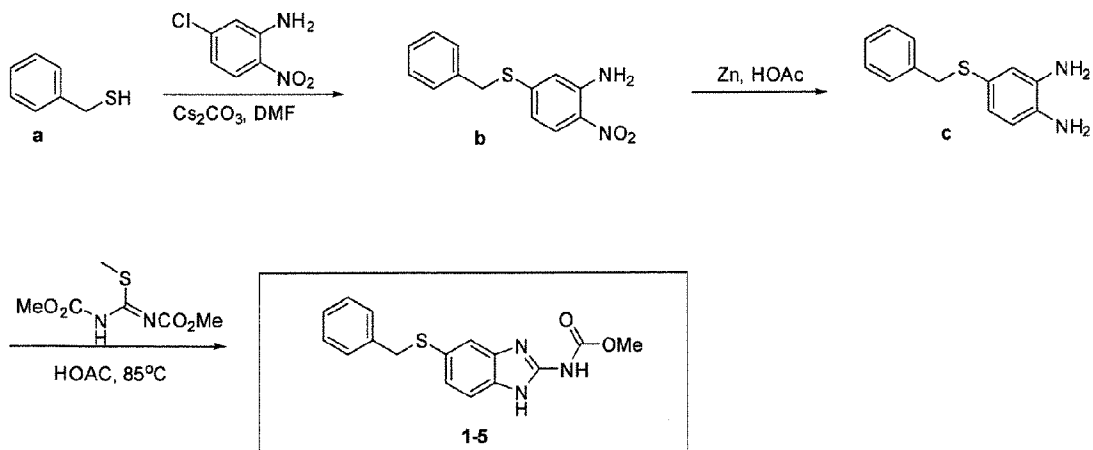
[209] ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.64 (s, 1H), 7.55-7.53 (m, 2H), 7.46-7.44 (d, 1H), 7.42-7.74 (m, 2H), 7.34-7.30 (m, 2H), 3.79 (s, 3H)

[210]

[211] **1.5 화학식 1-5의 합성**

[212] 화학식 1-5의 티오벤즈이미다졸 유도체의 합성 과정을 하기 반응식 5에 나타내었다.

[213] [반응식 5]



[214] 1.5.1. 5-(benzylthio)-2-nitroaniline의 합성

[215] DMSO (150 mL)에 녹인 phenylmethanethiol (2.40 g, 20.0 mmol)의 용액에 5-chloro-2-nitroaniline (3.40 g, 20.0 mmol) 및 Cs_2CO_3 (13.0 g, 40.0 mmol)를 첨가했고, 혼합물을 80 °C에서 16 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 물 (700 mL)에 붓고 EA (400 mL * 3)로 추출하고 Na_2SO_4 로 건조한 후, 농축하고 역컬럼 (ACN/ H_2O)으로 정제하여 붉은 오일로 6.00 g의 5-(benzylthio)-2-nitroaniline를 얻었다.

[216]

[217] 1.5.2. 4-(benzylthio)benzene-1,2-diamine의 합성

[218] AcOH (50 mL) 중의 5-(benzylthio)-2-nitroaniline (2.00 g, 7.70 mmol)의 용액에 Zn (4.00 g, 61.0 mmol)을 첨가했다. 혼합물을 90 °C에서 3 시간 동안 교반 하였다. 반응이 완료된 후 혼합물을 여과하였다; 여액을 농축하여 2.20 g의 4-(benzylthio)benzene-1,2-diamine을 갈색 오일로 얻었다.

[219]

[220] 1.5.3. methyl (5-(benzylthio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl) carbamate의 제조

[221] AcOH (40 mL) 중의 4-(benzylthio)benzene-1,2-diamine (2.00 g, 8.70 mmol)의 용액에 1,3-bis(methoxycarbonyl)-2-methyl-2-thiopseudoeura (1.50 g, 7.20 mmol)를 첨가하였다. 혼합물을 85 °C에서 16 시간 동안 교반 하였다. 반응이 완료된 후 AcOH를 제거하고 EA (50 mL * 3)로 추출하였다. 유기층을 Na_2SO_4 로 건조시키고 농축시켰다. 크루드를 prep-HPLC로 정제하여 75 mg의 methyl (5-(benzylthio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl) carbamate (화학식 1-5)를 노란색 고체로 얻었다(수율 11 %).

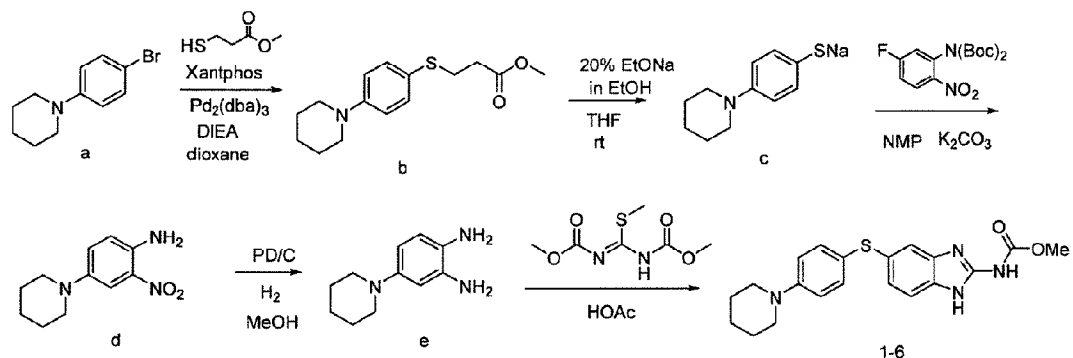
[222] $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6): δ 11.61 (s, 1H), 7.38 (s, 1H), 7.32-7.30 (m, 1H), 7.26-7.25 (m, 1H), 7.23-7.19 (m, 4H), 7.10-7.07 (m, 1H), 4.14 (s, 2H), 3.75 (s, 3H)

[223]

[224] 1.6 화학식 1-6의 합성

[225] 화학식 1-6의 티오벤즈이미다졸 유도체의 합성 과정을 하기 반응식 6에 나타내었다.

[226] [반응식 6]



[227]

[228] 1.6.1. Methyl 3-((4-(piperidin-1-yl)phenyl)thio)propanoate의 합성

[229] 화합물 1-(4-bromophenyl)piperidine (5.0 g, 20.83 mmol, 1.0 eq)의 건조 디옥산(50 ml)용액에 methyl 3-mercaptopropanoate (16.13 mL, 145.81 mmol, 7.0 eq), Xantphos (2.4 g, 4.17 mmol, 0.2 eq)를 첨가하였다. 이 혼합물에 계속하여 N,N-Diisopropylethylamine (DIEA, 10.9 mL, 62.49 mmol, 3.0 eq) 및 Pd₂(dba)₃ (1.9 g, 2.08 mmol, 0.1 eq) 첨가가 완료된 후, 반응물을 질소가스에 110 °C에서 16 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 실온으로 냉각시켰다. 반응물을 여과하고 여액을 농축하였다. 잔사를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(HE:EtOAc=40:1)로 정제하여 화합물 methyl 3-((4-(piperidin-1-yl)phenyl)thio)propanoate를 황색 오일 형태로 얻었다 (5.9 g, 수율 100 %).

[230]

[231] 1.6.2. Sodium 4-(piperidin-1-yl)benzenethiolate의 합성

[232] 화합물 methyl 3-((4-(piperidin-1-yl)phenyl)thio)propanoate (3.6 g, 12.9 mmol, 1.0 당량)의 건조 THF (60 mL) 용액에 실온에서 20% NaOEt (6.59 g, 19.355 mmol, 1.5 당량)를 첨가하였다. 반응물을 1 시간 동안 실온으로 가열하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 농축하여 화합물 sodium 4-(piperidin-1-yl)benzenethiolate을 갈색 화합물 (3.45g, 조 물질)로서 수득하였다.

[233]

[234] 1.6.3. 2-Nitro-5-((4-(piperidin-1-yl)phenyl)thio)aniline의 합성

[235] 화합물 sodium 4-(piperidin-1-yl)benzenethiolate (3.45g, 16.05 mmol, 1.0 당량), 4-fluoro-2-di(tert-butoxycarbonyl) nitroaniline (5.98g, 16.05mmol, 1.0 당량) 및 K₂CO₃ (6.65 g, 48.15 mmol, 3.0 당량)의 무수 1-Methyl-2-pyrrolidinone (NMP, 60 mL)의 용액에 질소 충전하의 130 °C에서 16 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (HE:EtOAc=20:1)로 정제하여 황색

고체의 2-nitro-5-((4-(piperidin-1-yl)phenyl)thio)aniline (630 mg)를 얻었다.

[236]

[237] 1.6.4. 4-((4-(Piperidin-1-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine의 합성

[238] 2-nitro-5-((4-(piperidin-1-yl)phenyl)thio)aniline (1-4, 450 mg, 1.37 mmol, 1.0 eq) 및 Pd/C (110 mg)의 MeOH (30 mL) 용액에 MeOH/NH₃ (10 mL)를 가하고, 대기압하의 수소 (H₂) 기류 속에서 실온으로 18 시간 동안 교반하였다. 반응물을 여과하고 여액을 농축하여 화합물 4-((4-(piperidin-1-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine을 보라색 고체 (370 mg)로서 수득하였다 (수율 90.5 %).

[239] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 7.21-7.25 (m, 2H), 6.85 (d, J = 6.8 Hz, 2H), 6.69-6.74 (m, 2H), 6.62 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.34-3.43 (m, 4H), 3.14-3.16 (m, 4H), 1.55-1.69 (m, 6H)

[240]

[241] 1.6.5. (5-((4-(Piperidin-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate의 합성

[242] 화합물 4-((4-(piperidin-1-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine (100 mg, 0.334 mmol, 1.0 당량)의 acetic acid (5 mL) 용액에 1,3-Bis(methoxycarbonyl)-S-methylisothiourea (76 mg, 0.367 mmol, 1.1 당량)를 첨가하고, 혼합물을 80 °C에서 2 시간 동안 교반 반응하였다. 반응물을 DCM으로 추출하고 포화 NaHCO₃로 세척하였다. 유기층을 무수 Na₂SO₄로 건조하고 여과하였다. 여액을 농축하고 얻어진 혼합생성물을 Prep-TLC에 의해 정제하여 백색 고체 생성물 methyl (5-((4-(piperidin-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate (화학식 1-6, 20 mg)로서 수득하였다 (수율 15.7%).

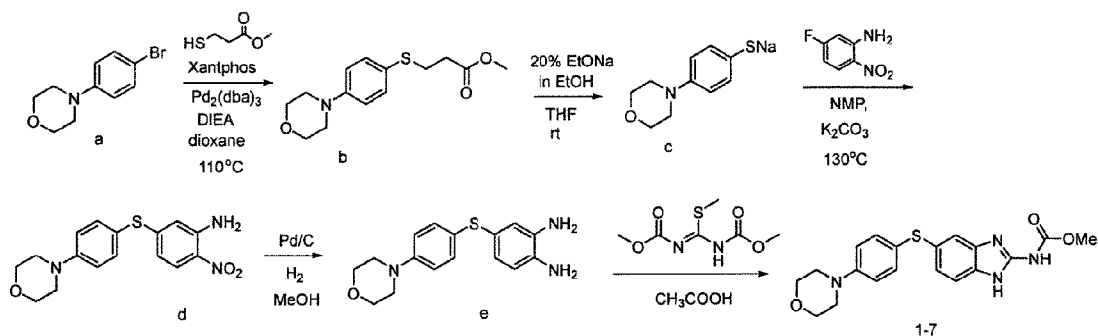
[243] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ 7.33(d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.28 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.01-7.03 (m, 1H), 6.91 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.08 (brs, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.11-3.19 (m, 4H), 1.53-1.59 (m, 6H)

[244]

[245] **1.7 화학식 1-7의 합성**

[246] 화학식 1-7의 티오벤즈이미다졸 유도체의 합성 과정을 하기 반응식 7에 나타내었다.

[247] [반응식 7]



[248]

[249] 1.7.1. methyl 3-((4-morpholinophenyl)thio)propanoate의 합성

[250] 4-(4-bromophenyl)morpholine (7.0 g, 30.9 mmol, 1.0 eq)의 건조 디옥산 (50 mL) 용액에 methyl 3-mercaptopropanoate (18.6 g, 154.9 mmol, 5.0 eq), Xantphos (3.6 g, 6.2 mmol, 0.2 eq)를 첨가하였다. 여기에 DIEA (12.2 g, 92.9 mmol, 3.0 eq) 와 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (1.4 g, 1.6 mmol, 0.05 eq)를 차례로 가한 후 반응물을 110 °C에서 16 시간 동안 교반하면서 반응하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 실온으로 냉각시켰다. 반응물을 여과하고 여액을 농축하였다. 잔사를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (HE:EtOAc=8:1)로 분리 정제하여 methyl 3-((4-morpholinophenyl)thio)propanoate (7.5 g)를 황색 오일 형태로 얻었다 (수율 91.2 %).

[251]

[252] 1.7.2. sodium 4-morpholinobenzenethiolate의 합성

[253] methyl 3-((4-morpholinophenyl)thio)propanoate (7.4 g, 26.3 mmol, 1.0 당량)의 건조 THF (100 mL) 용액에 실온에서 20 % NaOEt (10.7 g, 31.6 mmol, 1.5 당량)를 첨가하였다. 반응물을 1 시간 동안 실온에서 반응하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 농축하고 갈색 기름상의 액체 화합물 sodium 4-morpholinobenzenethiolate (5.2 g)을 얻었다 (수율 88.9 %).

[254]

[255] 1.7.3. 4-morpholino-2-nitroaniline의 합성

[256] 4-morpholinobenzenethiolate (5.2 g, 23.9 mmol, 1.0 당량)의 무수 1-Methyl-2-pyrrolidinone (60 mL) 용액에 5-fluoro-2-nitroaniline (4.5 g, 28.7 mmol, 1.2 당량)과 K_2CO_3 (9.9 g, 71.8 mmol, 3.0 당량) 질소 충전하에서 가한 다음 130 °C에서 16 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 잔류물을 컬럼크로마토그래피로 실리카 겔 (HE:EtOAc=20:1)로 정제하여 화합물 4-morpholino-2-nitroaniline의 노란색 고체 (1.2 g)로 얻었다 (수율 15.2 %).

[257]

[258] 1.7.4. 4-morpholinobenzene-1,2-diamine의 합성

[259] 4-morpholino-2-nitroaniline (1.2 g, 3.6 mmol, 1.0 당량)의 MeOH (20 mL) 용액에

Pd/C (300 mg)를 가하고, 실온에서 수소가스 (H₂) 존재 하에 18 시간 동안 교반하였다. 반응물을 여과하고 여액을 보라색 고체

4-morpholinobenzene-1,2-diamine (640 mg)를 얻었다 (수율 60.1 %).

[260] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ7.85 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.39-7.44 (m, 3H), 7.06 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.52 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.24-6.27 (m, 1H), 3.69 - 3.76 (m, 4H), 3.19-3.23 (m, 4H)

[261]

[262] 1.7.5. methyl (5-((4-morpholinophenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate의 합성

[263] 4-morpholinobenzene-1,2-diamine (100 mg, 0.332 mmol, 1.0 eq)의 초산 (5 mL) 용액에 1,3-Bis(methoxycarbonyl)-S-methylisothiourea (75 mg, 0.365 mmol, 1.1 eq)을 첨가하고, 혼합물을 80 °C에서 2 시간 동안 교반했으며, LCMS로 반응이 완료된 것을 확인하였다. 반응물을 DCM으로 추출하고 포화 중탄산수로 씻고, 유기층을 무수 Na₂SO₄로 건조하고 여과하였다. 여액을 농축하고 이 물질을 Prep-TLC로 정제하여 생성물을 백색 고체 (화학식 1-7, 30 mg)로서 수득하였다 (수율 23.6 %).

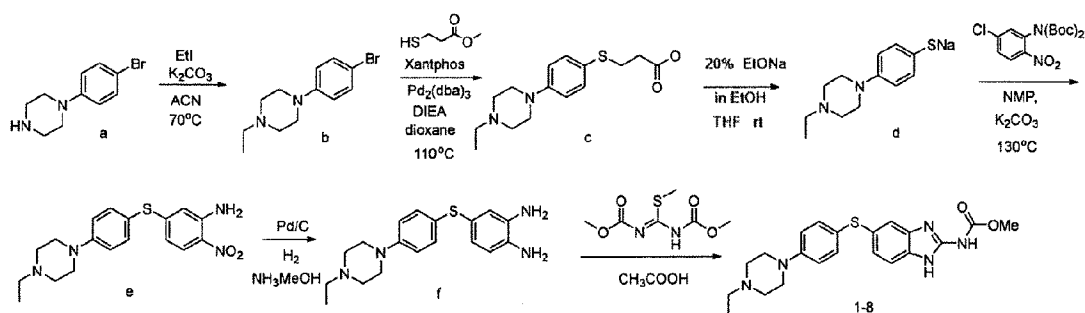
[264] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δppm 7.34 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.23 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.02-7.05 (m, 1H), 6.93 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.71-3.73 (m, 4H), 3.10-3.12 (m, 4H)

[265]

[266] **1.8 화학식 1-8의 합성**

[267] 화학식 1-8의 티오벤즈이미다졸 유도체의 합성 과정을 하기 반응식 8에 나타내었다.

[268] [반응식 8]



[269]

[270] 1.8.1. 1-(4-bromophenyl)-4-ethylpiperazine의 합성

[271] 1-(4-bromophenyl)piperazine (10.0 g, 41.83 mmol, 1.0 eq)의 무수 acetonitrile (50 mL)용액에 ethyl iodide (4.0 mL, 49.78 mmol, 1.2 eq) 및 K₂CO₃ (11.47 g, 82.96 mmol, 2.0 eq)를 첨가하였다. 첨가가 완료된 후 반응물을 N₂ 하에서 70 °C에서 2 시간 동안 교반하였다. 반응물을 여과하고 여과액을 농축하였다. 잔류물을

실리카 겔(HE:EtOAc=5:1) 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 화합물 1-(4-bromophenyl)-4-ethylpiperazine를 백색 고체 (9.84 g)로 얻었다 (수율 84.2 %).

[272]

[273] 1.8.2. methyl 3-((4-(4-ethylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)propanoate의 합성

[274] 1-(4-bromophenyl)-4-ethylpiperazine (9.4 g, 34.9 mmol, 1.0 eq)의 건조 디옥산 (50 mL)용액에 methyl 3-mercaptopropanoate (27.1 mL, 244.4 mmol, 7.0 eq), Xantphos (4.04 g, 6.98 mmol, 0.2 eq)를 첨가하였다. 여기에 DIEA (18.3 mL, 104.7 mmol, 3.0 eq) 및 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (3.2 g, 3.5 mmol, 0.1 eq) 첨가가 완료된 후, 반응물을 N_2 기류하의 110°C 에서 16 시간 동안 교반하였다. 반응물을 여과하고 농축액을 농축하였다. 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (Hexane:EtOAc=2:1)로 정제하여 황색 오일 상의 화합물 methyl 3-((4-(4-ethylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)propanoate (9.5 g)를 얻었다 (수율 88.29 %).

[275]

[276] 1.8.3. sodium 4-(4-ethylpiperazin-1-yl)benzenethiolate의 합성

[277] 3-((4-(4-ethylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)propanoate (2.81 g, 9.1 mmol, 1.0 당량)의 건조 THF (60 mL) 용액에 20 % Sodium ethoxide (4.64 g, 13.65 mmol, 1.5 당량)를 가한 다음, 반응물을 20 분 동안 실온으로 가열하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 농축하여 갈색 고체 화합물 sodium 4-(4-ethylpiperazin-1-yl)benzenethiolate (2.8 g)를 얻었다.

[278]

[279] 1.8.4. 5-((4-(4-ethylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-2-nitroaniline의 합성

[280] Sodium 4-(4-ethylpiperazin-1-yl)benzenethiolate (2.8 g, 11.5 mmol, 1.0 당량)를 건조 N-메틸피롤리딘디메틸 (60 mL)에 용해하고, tert-butyl (tert-butoxycarbonyl)(5-chloro-2-nitrophenyl)carbamate (4.29 g, 11.5 mmol, 1.0 당량) 및 K_2CO_3 (4.77 g, 34.5 mmol, 3.0 당량)를 차례로 가한 용액을 N_2 기류하에 130°C 에서 16 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후 잔류물을 실리카 겔 컬럼크로마토그래피로 (DCM:MeOH=20:1)로 정제하여 오렌지색 고체의 5-((4-(4-ethylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-2-nitroaniline (520 mg)를 얻었다.

[281]

[282] 1.8.5. 4-((4-(4-ethylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine의 합성

[283] 5-((4-(4-ethylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-2-nitroaniline (520 mg, 1.45 mmol, 1.0 당량)의 MeOH (15 mL) 및 MeOH/ NH_3 (5 mL) 용액 중에 Pd/C (150 mg)를 가하고, 이 용액에 수소 (H_2) 존재 하에 실온에서 18 시간 동안 교반하였다. 반응물을 여과하고 여액을 농축하여 보라색 고체 화합물 4-((4-(4-ethylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine (470 mg)로서 수득하였다 (수율 99.5 %).

[284]

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.22 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.82 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.73-6.78 (m, 2H), 6.64 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 3.26-3.46 (m, 8H), 2.78-2.92 (m, 4H),

1.51-1.64 (m, 2H), 1.29-1.30 (m, 3H)

[285]

[286] 1.8.6. Methyl

(5-((4-(4-ethylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate의 합성

[287] 4-((4-(4-ethylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine (100 mg, 0.305 mmol, 1.0 당량)의 초산 (5 mL)용액에 첨가하였다.

1,3-Bis(methoxycarbonyl)-S-methylisothiourea (69 mg, 0.335 mmol, 1.1 당량)

혼합물을 80 °C에서 2 시간 동안 교반하고, LCMS로 반응이 완료된 것을

확인하였다. 반응이 DCM으로 추출되고 포화된 NaHCO₃로 세척하였다. 여액을

농축하고 그 생성물을 Prep-TLC에 의해 정제하여 생성물을 백색 고체인 methyl

(5-((4-(4-ethylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate

(화학식 1-8, 44 mg)을 얻었다 (수율 32 %).

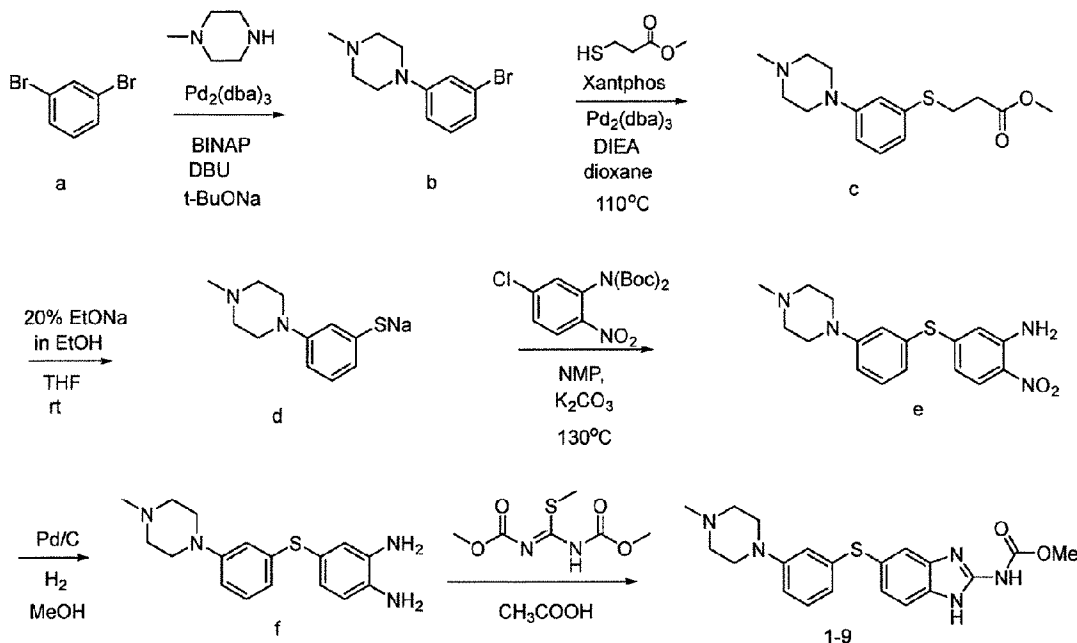
[288] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.33 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.29 (s, 1H), 7.21 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 7.00-7.03 (m, 1H), 6.92 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.13-3.15 (m, 4H), 2.46-2.48 (m, 4H), 2.32-2.37 (m, 2H), 1.01-1.04 (m, 3H)

[289]

[290] **1.9 화학식 1-9의 합성**

[291] 화학식 1-9의 티오벤즈이미다졸 유도체의 합성 과정을 하기 반응식 9에 나타내었다.

[292] [반응식 9]



[293]

[294] 1.9.1. 1-(3-bromophenyl)-4-methylpiperazine의 합성

- [295] 1,3-dibromobenzene (9.0 g, 38.5 mmol, 1.0당량)의 톨루엔 (100 mL) 용액에 1-methylpiperazine (19.2 g, 192.4 mmol, 5.0 당량), BINAP (4.8 g, 7.7 mmol, 0.2 eq), DBU (17.5 g, 115.5 mmol, 3.0 eq) 및 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (2.2 g, 1.9 mmol, 0.05 eq)를 각각 가하고, 반응 혼합물을 60 °C로 가열한 후 새로 분쇄한 sodium tert-butoxide (12.9 g, 192.4 mmol, 3.0 eq)를 한 번에 추가하였다. 반응물을 N_2 하의 60 °C에서 16 시간 동안 교반한 후에, 반응물을 농축하였다. 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 (HE:EtOAc=60:1)로 분리, 정제하여 황색 오일상의 1-(3-bromophenyl)-4-methylpiperazine (5.5 g)를 수득하였다 (수율 56.3 %).
- [296]
- [297] 1.9.2. methyl 3-((3-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)propanoate의 합성
- [298] 1-(3-bromophenyl)-4-methylpiperazine (5.5 g, 21.65 mmol, 1.0 당량)의 무수 디옥산 (50 mL)용액에 methyl 3-mercaptopropanoate (18.2 mg, 155.55 mmol, 7.0 당량)를 첨가하였다. 여기에 Xantphos (2.5 g, 4.33 mmol, 0.2 당량), DIEA (8.4 g, 64.95 mmol, 3.0 당량) 및 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (2.0 g, 2.165 mmol, 0.1 eq)를 차례로 첨가하여 완료된 후, 반응물을 N_2 하에서 110 °C에서 24 시간 동안 교반하였다. 반응물을 여과하고 여액을 농축하였다. 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (DCM:MeOH=20:1)로 정제하여 methyl 3-((3-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)propanoate을 주황색 오일 (4.5 g)로서 수득하였다 (수율 70.7 %).
- [299]
- [300] 1.9.3. sodium 3-(4-methylpiperazin-1-yl)benzenethiolate의 합성
- [301] Methyl 3-((3-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)propanoate (2.3 g, 7.82 mmol, 1.0 당량)의 건조 THF (60 mL) 용액에 20 % NaOEt (3.8 g, 11.73 mmol, 1.5 당량)을 첨가하였다. 실온의 반응물을 10 분 동안 가열하였다. 반응이 완료된 후, 혼합물을 농축하여 sodium 3-(4-methylpiperazin-1-yl)benzenethiolate의 갈색 고체 (2.05 g)를 얻었다
- [302]
- [303] 1.9.4. 5-((3-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-2-nitroaniline의 합성
- [304] Sodium 3-(4-methylpiperazin-1-yl)benzenethiolate (2.05 g, 8.91 mmol, 1.0 당량) 건조 N-메틸피롤리딘디메틸 (60 mL)용액에 tert-butyl (tert-butoxycarbonyl)(5-chloro-2-nitrophenyl)carbamate (3.3 g, 8.91 mmol, 1.0 당량) 및 K_2CO_3 (3.7 g, 26.73 mmol, 3.0 당량)를 차례로 가하고, N_2 하에 130 °C에서 16 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (DCM:MeOH=20:1)로 정제하여 5-((3-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-2-nitroaniline의 주황색 고체화합물 (3.1 g)를 얻었다.
- [305]
- [306] 1.9.5. 4-((3-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine의 합성

[307] 5-((3-(4-메틸피페라진-1-일)페닐)티오)-2-니트로아닐린 (3.1 g, 9.0 mmol, 1.0 당량) 및 Pd/C(1.0 g)의 MeOH 용액에 (60 mL) 및 MeOH/NH₃ (20 mL)를 가하고 18 시간 동안 H₂ 존재 하에서 교반하였다. 반응물을 여과하고 여액을 농축하고, 회색 고체 형태로 4-((3-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine (600 mg)를 수득하였다.

[308] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.07-7.12 (m, 1H), 6.84-6.89 (m, 2H), 6.78-6.80 (m, 1H), 6.66-6.70 (m, 2H), 6.60-6.63 (m, 1H), 3.49 (s, 2H), 3.36 (s, 2H), 3.14-3.17 (m, 4H), 2.52-2.55 (m, 4H), 2.34(d, J= 5.6 Hz, 3H)

[309]

[310] 1.9.6. methyl

(5-((3-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate의 합성

[311] 4-((3-(4-Methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine (100 mg, 0.318 mmol, 1.0 당량)의 CH₃COOH (10 mL) 용액에

1,3-Bis(methoxycarbonyl)-S-methylisothiourea (72 mg, 0.35 mmol, 1.1 eq)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 80 °C에서 2 시간 동안 교반한 후, LCMS로 반응이 완료된 것을 확인하였다. 반응물을 DCM으로 추출하고 sat. NaHCO₃ 유기층을 무수 Na₂SO₄로 건조하고 여과하였다. 여액을 농축하고 혼합물을 Prep-TLC로 정제하여 백색 고체의 methyl

(5-((3-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate (화학식 1-9, 20 mg)를 얻었다 (수율 15.87 %).

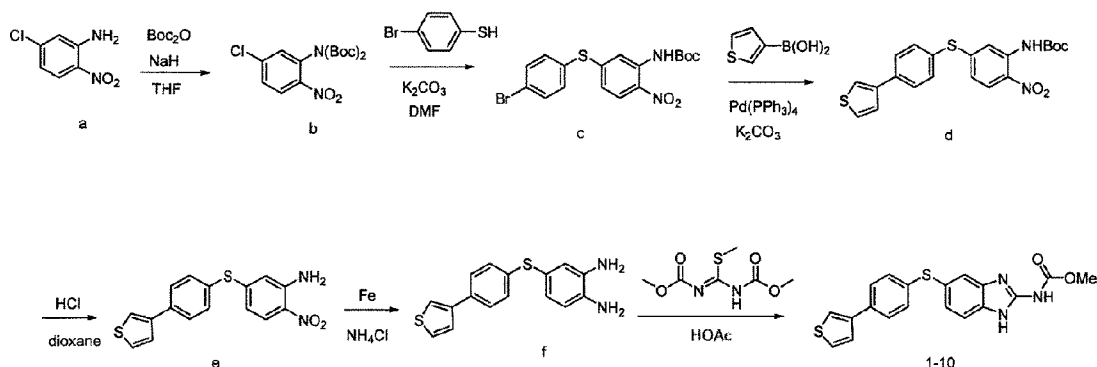
[312] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.49 (s, 1H), 7.43 (d, J= 8.0 Hz, 1H), 7.16-7.18 (m, 1H), 7.08-7.12 (m, 1H), 6.77 (d, J= 6 Hz, 2H), 6.47 (d, J=7.6 Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.04-3.07 (m, 4H), 2.38-2.40 (m, 4H), 2.19 (s, 3H)

[313]

[314] **1.10 화학식 1-10의 합성**

[315] 화학식 1-10의 티오벤즈이미다졸 유도체의 합성 과정을 하기 반응식 10에 나타내었다.

[316] [반응식 10]



[317]

[318] 1.10.1. *tert*-butyl (tert-butoxycarbonyl)(5-chloro-2-nitrophenyl)carbamate의 합성

[319] 5-chloro-2-nitroaniline (20 g, 116.2 mmol, 1.0 당량)의 THF (300 mL) 용액에 Di-*tert*-butyl decarbonate (50 g, 232.4 mmol, 2.0 당량) 및 DMAP (14 g, 116.2 mmol, 1.0 당량) 가하였다. 반응 혼합물을 70 °C에서 1 시간 동안 교반하였다. LCMS로 반응이 완료된 것을 확인하였다. 반응물을 농축하고 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (HE:EA=10:1로 용리)로 정제하여 황색 고체의 *tert*-butyl (tert-butoxycarbonyl)(5-chloro-2-nitrophenyl)carbamate (36 g)를 수득하였다 (수율 85 %).

[320]

[321] 1.10.2. *tert*-butyl (5-((4-bromophenyl)thio)-2-nitrophenyl)carbamate의 합성

[322] *tert*-butyl (tert-butoxycarbonyl)(5-chloro-2-nitrophenyl)carbamate (28 g, 75.2 mmol, 1.0 당량)의 DMF (100 mL) 용액에 4-bromobenzenethiol (21 g, 112.9 mmol, 1.5 eq) 및 K₂CO₃ (20.7 g, 150.4 mmol, 2eq)를 차례로 가하고, 반응 혼합물을 100 °C에서 16 시간 동안 교반하였다. LCMS로 반응이 완료되었음을 확인하였다. 반응물을 DCM으로 추출하고 염수로 세척하였다. 유기층을 건조시키고 농축시켜 황색 고체의 *tert*-butyl(5-((4-bromophenyl)thio)-2-nitrophenyl)carbamate (10.2 g, 수율 35 %)을 수득하였다.

[323]

[324] 1.10.3. *tert*-butyl (2-nitro-5-((4-(thiophen-3-yl)phenyl)thio)phenyl)carbamate의 합성

[325] *tert*-butyl (5-((4-bromophenyl)thio)-2-nitrophenyl)carbamate (4.3 g, 10.1 mmol, 1.0 당량)의 DMF (20 mL) 및 H₂O (4 mL) 용액에 thiophen-3-yl boronic acid (2.6 g, 20.2 mmol, 2.0 eq)을 첨가하였다. 이 혼합물에 Pd(PPh₃)₄ (1.2 g, 1.01 mmol, 0.1 eq) 및 K₂CO₃ (4.2 g, 30.3 mmol, 3.0 eq)을 차례대로 가하고 100 °C에서 16 시간 동안 교반하였다. LCMS로 반응이 완료된 것을 확인한 후, 반응을 DCM으로 추출하고 염수로 세척하였다. 유기층을 무수 Na₂SO₄로 건조하고 여과하였다. 여액을 농축하고, 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (HE:EA=3:1로 용리)로 정제하여 황색 고체의 *tert*-butyl (2-nitro-5-((4-(thiophen-3-yl)phenyl)thio)phenyl)carbamate (2.7 g)를 얻었다 (수율 62 %).

[326]

[327] 1.10.4. 2-nitro-5-((4-(thiophen-3-yl)phenyl)thio)aniline의 합성

[328] *tert*-butyl (2-nitro-5-((4-(thiophen-3-yl)phenyl)thio)phenyl)carbamate (2.6 g, 6.07 mmol, 1.0 당량)의 HCl/디옥산 (20 mL)용액을 실온에서 2 시간 동안 교반하였다. LCMS로 반응이 완료된 것을 확인한 후, 반응 혼합물을 NaHCO₃의 얼음 용액 100 mL에 부었다. 혼합물을 DCM으로 추출하고 염수로 세척하였다. 유기층을 무수 Na₂SO₄로 건조하고 여과하였다. 여과액을 농축하고 DCM:MeOH=10:1로 용리하는 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 황색 고체인

2-nitro-5-((4-(thiophen-3-yl)phenyl)thio)aniline (1.5 g)을 얻었다 (수율 78 %).

[329]

[330] 1.10.5. 4-((4-(thiophen-3-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine의 합성

[331] 2-nitro-5-((4-(thiophen-3-yl)phenyl)thio)aniline (1.3 g, 3.96 mmol, 1.0 당량)의 EtOH (20 mL) 및 H₂O (5 mL) 용액에 Fe (1.1 g, 19.8 mmol, 5.0 eq)와 NH₄Cl (1.1 g, 19.8 mmol, 5.0 eq)을 첨가하고 혼합물을 80 °C에서 2 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후 LCMS로 모니터링하여 혼합물을 DCM으로 추출하고 염수로 세척하였다. 유기층을 무수 Na₂SO₄로 건조하고 여과하였다. 여액을 농축하고 DCM:MeOH=10:1로 용리하는 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 갈색 고체인 4-((4-(thiophen-3-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine (900 mg)로 얻었다 (수율 76 %).

[332] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.77-7.78(m,1H), 7.57-7.76(m,3H), 7.47-7.49 (m,1H), 7.03-7.06 (m,2H), 6.68 (s, 1H), 6.56-6.61 (m, 2H), 4.67-4.84 (m, 4H)

[333]

[334] 1.10.6. methyl

(5-((4-(thiophen-3-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate의 합성

[335] 4-((4-(thiophen-3-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine (100 mg, 0.335 mmol, 1.0 당량)의 CH₃COOH (5 mL)용액에 1,3-Bis(methoxycarbonyl)-S-methylisothiurea (76 mg, 0.369 mmol, 1.1 당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 80 °C에서 2 시간 동안 교반하였다. LCMS로 반응이 완료된 것을 확인한 다음, 반응의 생성물을 DCM으로 추출하고 포화 용액으로 세척하였다. 유기층을 포화 NaHCO₃로 씻고, 무수 Na₂SO₄로 건조하고 여과하였다. 여액을 농축하고 이 물질을 Prep-TLC로 정제하여 백색 고체의 methyl (5-((4-(thiophen-3-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate (화학식 1-10, 50 mg)로 얻었다 (수율 39.1 %).

[336] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆):δ ppm 7.82-7.84 (m, 1H), 7.61-7.66 (m, 3H), 7.45-7.54 (m, 3H), 7.10-7.23 (m, 3H), 3.76 (s, 3H)

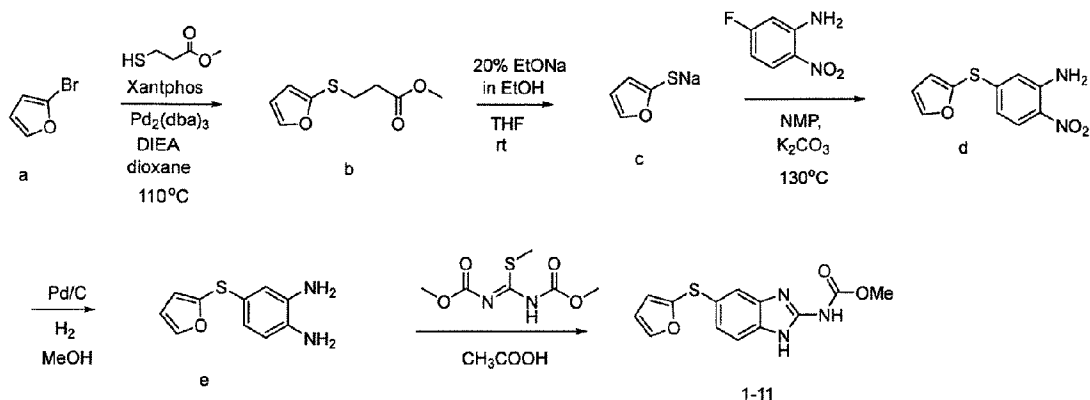
[337]

[338] **1.11 화학식 1-11의 합성**

[339] 화학식 1-11의 티오벤즈이미다졸 유도체의 합성 과정을 하기 반응식 11에 나타내었다.

[340]

[반응식 11]



[341]

[342] 1.11.1. Methyl 3-(furan-2-ylthio)propanoate의 합성

[343] 2-Bromofuran (6.0 g, 40.8 mmol, 1.0 당량)의 무수 디옥산 (50 mL)용액에 methyl 3-mercaptopropanoate (31.6 mL, 285.6 mmol, 7.0 당량), Xantphos (4.787 g, 8.16 mmol, 0.2 eq), DIEA (21.4 mL, 122.4 mmol, 3.0 eq) 및 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (3.623 g, 4.08 mmol, 0.1 eq)를 차례로 첨가하였다. 첨가가 완료된 후 반응물을 N_2 하에서 110 °C에서 16 시간 동안 교반하였다. 반응물을 여과하고 여액을 농축하였다. 얻어진 생성물을 컬럼 크로마토그래피로 실리카 겔 (HE:EtOAc=40:1)로 정제하여 황색 기름상의 액체 methyl 3-(furan-2-ylthio)propanoate를 (6.34 g)로 얻었다 (수율 83.4 %).

[344]

[345] 1.11.2. sodium furan-2-thiolate의 합성

[346] 건조 THF (60 mL) 중 methyl 3-(furan-2-ylthio)propanoate (6.34 g, 34.08 mmol, 1.0 당량)의 용액에 20 % NaOEt (14.06 g, 41.32 mmol, 1.2 당량)를 실온에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 1 시간 동안 가열하여 반응이 완료된 후, 혼합물을 농축하여 갈색 고체인 sodium furan-2-thiolate (4.61 g)를 수득하였다.

[347]

[348] 1.11.3. 5-(furan-2-ylthio)-2-nitroaniline의 합성

[349] Sodium furan-2-thiolate (4.61 g, 37.86 mmol, 1.1 당량), 5-fluoro-2-nitroaniline (5.39 g, 34.4 mmol, 1.0 당량) 및 K_2CO_3 (14.26 g, 103.2 mmol, 3.0 당량)의 무수 N-methylpyrrolidinedimethyl (60 mL)용액을 N_2 하에 130 °C에서 16 시간 동안 교반하였다. 반응이 완료된 후, 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 (HE: EtOAc= 20:1)로 정제하여 노란색 고체의 5-(furan-2-ylthio)-2-nitroaniline (860 mg)를 얻었다.

[350]

[351] 1.11.4. 4-(furan-2-ylthio)benzene-1,2-diamine의 합성

[352] MeOH (36 mL) 과 MeOH/ NH_3 (12 mL)의 혼합용매에

5-(furan-2-ylthio)-2-nitroaniline (860 mg, 3.624 mmol, 1.0 당량) 및 Pd/C (360 mg)를 가하고, 실온에서 18 시간 동안 H₂ 존재 하에서 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고 여액을 농축하여 보라색 고체상의 4-(furan-2-ylthio)benzene-1,2-diamine (750 mg)를 수득하였다 (수율 100 %).

[353] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ ppm 7.49-7.50 (m, 1H), 6.69-6.74 (m, 2H), 6.59-6.62 (m, 2H), 6.39-6.41 (m, 1H), 3.37 (brs, 4H)

[354]

[355] 1.11.5. methyl (5-(furan-2-ylthio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate의 합성

[356] CH₃COOH (5mL) 중 4-(furan-2-ylthio)benzene-1,2-diamine (100 mg, 0.485 mmol, 1.0 당량)의 용액에 1,3-Bis(methoxycarbonyl)-S-methylisothiourea (100 mg, 0.485 mmol, 1.1 당량)를 첨가하고, 혼합물을 80 °C에서 2 시간 동안 교반하였다. 반응물을 LCMS로 모니터링하여 반응이 완료된 것을 확인한 다음, DCM으로 추출하고 포화 NaHCO₃ 용액으로 세척하였다. 유기층을 무수 Na₂SO₄로 건조하고 여과하였다. 여액을 농축하고 반응 잔유물을 Prep-TLC로 정제하여 백색 고체인 methyl (5-(furan-2-ylthio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate (화학식 1-11, 20 mg)를 얻었다 (수율 14.2 %).

[357] ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ ppm 7.88-7.89 (m, 1H), 7.40 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.07-7.10 (m, 1H), 6.92-6.93 (m, 1H), 6.61-6.63 (m, 1H), 3.78 (s, 3H)

[358]

[359] **1.12 화학식 1-12의 합성**

[360] 3,4-difluorobenzenethiol를 출발물질로 사용하여 실시예 1.1의 화학식 1-1과 같은 방법으로 methyl (5-((3,4-difluorophenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate를 합성하였다 (화학식 1-12, 수율 69.2 %).

[361] ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) 3.76(s, 3H), 6.93(m, 1H), 7.17(m, 2H), 7.19(d, J=2.32 Hz, 1H), 7.23(q, 1H), 7.38(d, J=10.64 Hz), 7.55(s, 1H), 11.53(m, 1H), 12.02(m, 1H)

[362]

[363] **1.13 화학식 1-13의 합성**

[364] 2,4-difluorobenzenethiol를 출발물질로 사용하여 실시예 1.1의 화학식 1-1과 같은 방법으로 methyl (5-((2,4-difluorophenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate를 합성하였다 (화학식 1-13, 수율 75.4 %).

[365] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 3.75(s, 3H), 7.12(m, 3H), 7.33(m, 1H), 7.38(m, 1H), 7.47(s, 1H), 11.73(m, 2H)

[366]

[367] **1.14 화학식 1-14의 합성**

[368] 5-chloropyridine-2-thiol를 출발물질로 사용하여 실시예 1.1의 화학식 1-1과 같은

방법으로 methyl

(5-((5-chloropyridin-2-yl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate를 합성하였다 (화학식 1-14, 수율 75.2%).

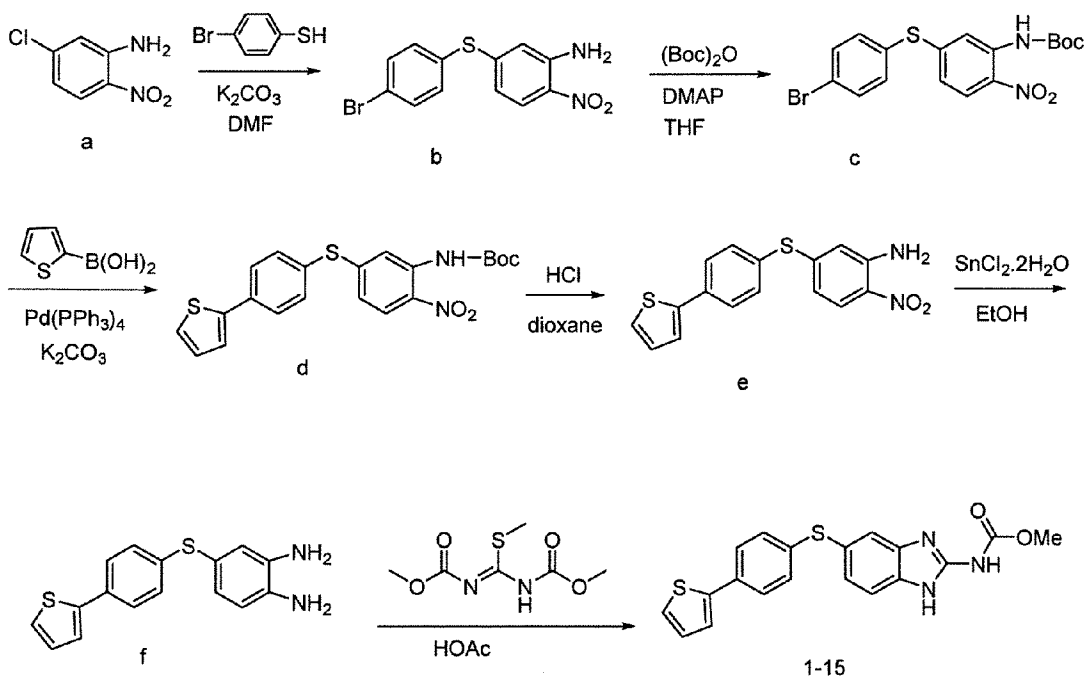
[369] ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) 3.77(s, 3H), 6.75(d, $J=8.68$ Hz, 1H), 7.31(d, $J=1.68$ Hz), 7.53(d, $J=8.2$ Hz, 1H), 7.64(s, 1H), 7.69(d, $J=2.6$ Hz), 8.44(s, 1H), 11.96(m, 2H)

[370]

[371] **1.15 화학식 1-15의 합성**

[372] 화학식 1-15의 티오벤즈이미다졸 유도체의 합성 과정을 하기 반응식 15에 나타내었다.

[373] [반응식 15]



[374]

[375] 1.15.1. 5-((4-Bromophenyl)thio)-2-nitroaniline의 합성

[376] 4-bromobenzenethiol (1.4 g, 8.7 mmol)의 DMF (10 mL)용액에 Potassium carbonate (1.24 g)을 용해하고 상온에서 미리 제조한 5-chloro-2-nitroaniline (1.49 g, 8.7 mmol)의 DMF (3 mL)용액을 가하였다. 반응 혼합물을 90 °C에서 3 시간 동안 교반 반응하고 실온으로 냉각하고 찬물 (500 mL)에 붓고 침전물을 여과하고 건조하여 노랑색 고체 생성물 5-((4-Bromophenyl)thio)-2-nitroaniline (2.8 g)을 얻었다 (수율 99 %).

[377]

[378] 1.15.2. tert-Butyl (5-((4-bromophenyl)thio)-2-nitrophenyl)carbamate의 합성

[379] 5-((4-Bromophenyl)thio)-2-nitroaniline (2.8 g, 8.7 mmol)의 THF (30 mL)용액에 Di-tert-butyl dicarbonate (5.14 g, 23.5 mmol)과 DMAP (0.146 g)를 가하고 1 시간

동안 가열 환류하며 반응하였다. TLC로 반응 완결을 확인한 다음 반응물을 상온으로 냉각하고 감압증발하여 용매를 제거하였다. 생성물을 메탄올 (30 mL)에 용해한 다음 potassium carbonate (5.2 g) 가하고 상온에서 6 시간 동안 교반한 다음 반응 후 처리하여 tert-Butyl (5-((4-bromophenyl)thio)-2-nitrophenyl)carbamate (1.48 g)를 얻었다 (수율 40 %).

[380]

[381] 1.15.3. tert-butyl (2-nitro-5-((4-(thiophen-2-yl)phenyl)thio)phenyl)carbamate의 합성

[382] tert-Butyl (5-((4-bromophenyl)thio)-2-nitrophenyl)carbamate (0.7 g, 1.6 mmol)의

DMF (5 mL)용액에 thiophen-2-ylboronic acid (0.42 g, 3.28 mmol, 2.0 eq),

Tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0.18 g, 0.16 mmol, 0.1 eq), potassium

carbonate (0.66 g, 4.80 mmol, 3 eq)를 가하고 100 °C에서 15 시간 동안 교반

반응하고 실온으로 냉각한 후 메틸렌클로라이드 용액으로 추출한 다음 Brine

용액으로 한번 씻고, 무수 황산마그네슘으로 건조하고 감압증발한 다음,

에틸아세테이트와 헥산 (7:3, v/v) 전개액으로 Silica-Gel column chromatography

분리 정제하여 연노랑색 고체 생성물 tert-butyl

(2-nitro-5-((4-(thiophen-2-yl)phenyl)thio)phenyl)carbamate (0.48 g)를 얻었다 (수율 70 %).

[383]

[384] 1.15.4. 2-nitro-5-((4-(thiophen-2-yl)phenyl)thio)aniline의 합성

[385] tert-butyl (2-nitro-5-((4-(thiophen-2-yl)phenyl)thio)phenyl)carbamate (0.48 g, 1.1 mmol)의 HCl/디옥산 (6 mL) 용액으로 상온에서 2 시간 동안 반응한 다음 찬 포화 중탄산소다 수용액 (30 mL)에 붓고, 과량의 메틸렌클로라이드 용액으로 추출하고, 무수 황산나트륨으로 건조, 여과하고 감압증발로 용매를 제거한 다음 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 정제하여

2-nitro-5-((4-(thiophen-2-yl)phenyl)thio)aniline (413 mg)를 얻었다 (수율 78 %).

[386]

[387] 1.15.5. 4-((4-(thiophen-2-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine의 합성

[388] 2-nitro-5-((4-(thiophen-2-yl)phenyl)thio)aniline (413 mg, 1.2 mmol)의 에탄올 (15 mL) 용액에 tin(II) chloride dihydrate (1.74 g, 7.7 mmol, 6.4 eq)를 가하고 3 시간 동안 가열, 환류한 다음, 상온으로 냉각하고 물 (50 mL)를 가하였다. 과량의 에틸아세테이트 용매로 추출한 다음 용매를 감압증발로 제거하여 고체상의 반응 혼합물을 얻었다. 이것을 에틸아세테이트와 헥산(1:3, v/v)용매를 사용하여 실리카 겔을 이용한 칼럼 크로마토그래피로 분리, 정제하여 4-((4-(thiophen-2-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine (0.20 g)를 얻었다 (수율 57 %).

[389]

[390] 1.15.6. Methyl

(5-((4-(thiophen-2-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate의 합성

[391] 4-((4-(thiophen-2-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine (0.1 g, 0.33 mmol)과

1,3-Bis(methoxycarbonyl)-S-methylisothiourea (0.55 g, 2.6 mmol, 8 eq)을 5 %-AcOH in Ethanol 3 ml에 녹인 후 80 °C에서 2 시간 동안 반응하였다. TLC로 반응 종결을 확인하고, 과량의 메틸렌클로라이드로 추출하고, 포화 중탄산소다수로 중화한 다음, 무수 황산나트륨으로 건조하고, 실리카 겔 칼럼 크로마토그래피로 분리하여 연갈색 고체인 Methyl

(5-((4-(thiophen-2-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate (화학식 1-15, 90 mg)을 수득하였다 (수율 72%).

[392] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 3.76(s, 3H), 7.12(m, 3H), 7.23(d, J=8.16Hz, 1H), 7.47(m, 2H), 7.51-7.58(m, 4H), 11.77(m, 2H)

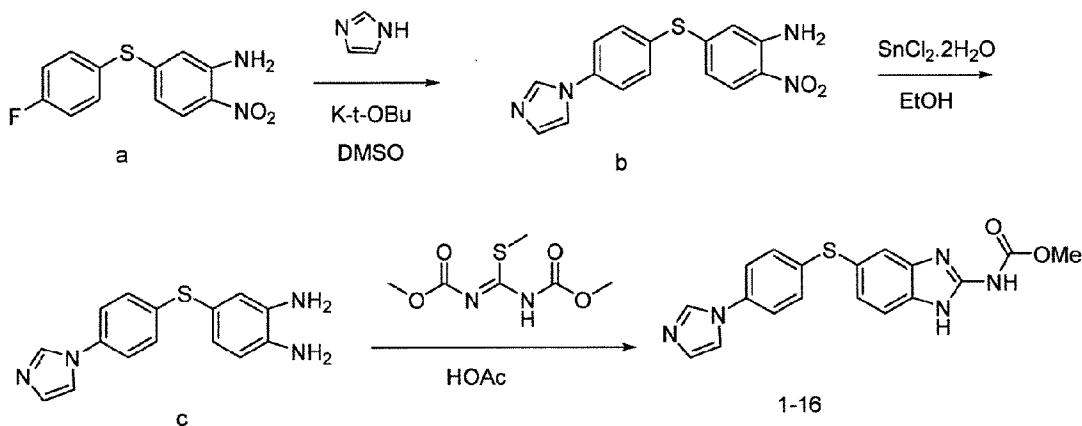
[393]

[394] **1.16 화학식 1-16의 합성**

[395] 화학식 1-16의 티오벤즈이미다졸 유도체의 합성 과정을 하기 반응식 16에 나타내었다.

[396]

[반응식 16]



[397]

[398] 1.16.1. 5-((4-(1H-imidazole-1-yl)phenylthio)-2-nitroaniline)의 제조

[399] 5-((4-(4-fluorophenyl)thio)-2-nitroaniline (0.85 g, 3.2 mmol)의 DMSO (5 mL)용액에 1H-imidazole (0.23 g, 3.3 mmol)를 가하고 5 분간 교반 후 potassium *t*-butoxide (0.36 g, 3.2 mmol)를 서서히 가한 다음 90 °C에서 2 시간 동안 반응하였다. 반응 혼합물을 에틸아세테이트로 추출하고 물로 씻어낸 다음 감압증발로 용매를 제거하여 혼합 결과물을 얻었다. 이것을 에틸아세테이트와 헥산(3:1, v/v) 용매를 사용하여 실리카 겔를 이용한 칼럼 크로마토그래피로 분리 정제하여 5-((4-(1H-imidazole-1-yl)phenylthio)-2-nitroaniline (0.32 g)를 얻었다 (수율 32 %).

[400]

[401] 1.16.2. 5-((4-(1H-imidazole-1-yl)phenylthio)-1,2-diamine)의 제조

[402] 5-((4-(1H-imidazole-1-yl)phenylthio)-2-nitroaniline (0.309 g, 1.0 mmol)의 에탄올 (10 mL) 용액에 tin chloride two hydrate (6 eq)를 가하고 4 시간 동안 가열, 환류한

다음 상온으로 냉각하고 물 (50 mL)를 가하였다. 과량의 에틸아세테이트 용매로 추출한 다음 용매를 감압증발로 제거하여 고체상의 반응 혼합물을 얻었다. 이것을 에틸아세테이트와 헥산 (3:1, v/v) 용매를 사용하여 실리카 겔을 이용한 칼럼 크로마토그래피로 분리 정제하여 5-((4-(1H-imidazole-1-yl)phenylthio)-1,2-diamine (0.30 g)를 얻었다 (수율 98 %).

[403]

[404] 1.16.3. methyl

(5-((4-(1H-imidazol-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate의 합성.

[405] 5-((4-(1H-imidazole-1-yl)phenylthio)-1,2-diamine(0.28 g, 1.0 mmol)의 5 % acetic acid의 ethanol (3.0 mL)의 용액에

1,3-Bis(methoxycarbonyl)-2-methyl-2-thiopseudourea (0.52 g, 2.5 mmol)를 넣은 후 5 시간 동안 가열, 환류하였다. 반응 혼합물을 여과하고 이때 메탄올로 충분히 씻어서 methyl

(5-((4-(1H-imidazol-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate (화학식 1-16, 0.26 g)를 얻었다 (수율 70 %).

[406] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 3.76(s, 3H), 7.18(s, 1H), 7.23(m, 3H), 7.48(m, 1H), 7.58(m, 3H), 7.68(s, 1H), 8.20(s, 1H), 11.46(m, 1H), 11.94(m, 1H)

[407]

[408] **1.17 화학식 1-17의 합성**

[409] 4,6-dimethylpyrimidine-2-thiol를 출발물질로 사용하여 실시예 1.1의 화학식 1-1과 같은 방법으로

methyl(5-((4,6-dimethylpyrimidin-2-yl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate를 합성하였다 (화학식 1-17, 수율 75.7%).

[410] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 2.25(s, 6H), 3.77(s, 3H), 6.93(s, 1H), 7.26(d, J=8.24 Hz, 1H), 7.45(d, J=8.20 Hz, 1H), 7.61(s, 1H), 11.74(m, 2H)

[411]

[412] **1.18 화학식 1-18의 합성**

[413] pyridine-2-thiol를 출발물질로 사용하여 실시예 1.1의 화학식 1-1과 같은 방법으로 methyl(5-(pyridin-2-ylthio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate를 합성하였다 (화학식 1-18, 수율 72.5%).

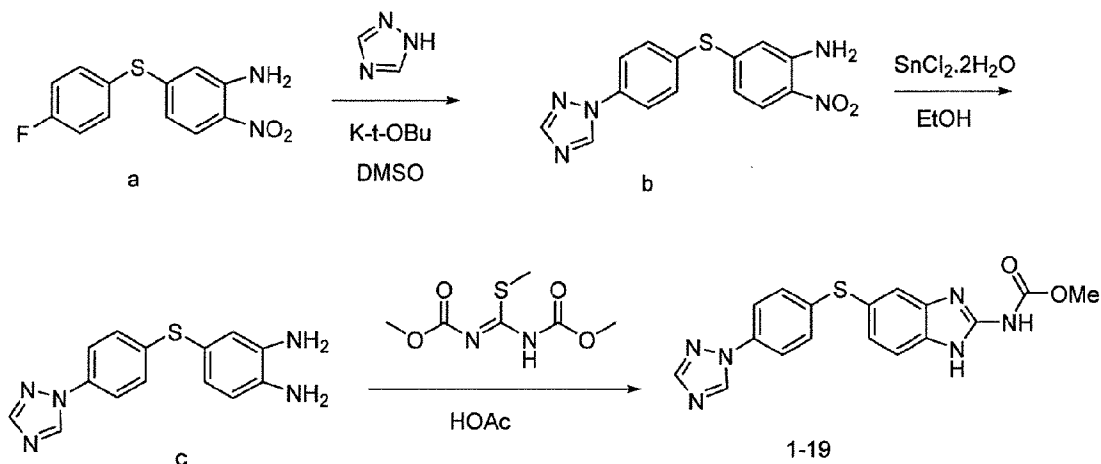
[414] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 3.77(s, 3H), 6.73(d, J=8.08, 1H), 7.08(m, 1H), 7.28(d, J=6.72 Hz, 1H), 7.55(m, 2H), 7.64(s, 1H), 8.37(d, J=3.36 Hz, 1H), 11.89(m, 2H).

[415]

[416] **1.19 화학식 1-19의 합성**

[417] 화학식 1-19의 티오벤즈이미다졸 유도체의 합성 과정을 하기 반응식 19에 나타내었다.

[418] [반응식 19]



[419]

[420] 1.19.1. 5-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)thio)-2-nitroaniline의 합성

[421] 5-((4-(4-fluorophenyl)thio)-2-nitroaniline (2.0 g, 29 mmol)의 DMSO (30 mL)용액에 1H-1,2,4-triazole (2.2 g, 32 mmol)를 가하고 5 분간 교반 후 potassium t-butoxide (3.6 g, 33 mmol)를 서서히 가한 다음 90 °C에서 4 시간 동안 반응하였다. 반응 혼합물을 에틸아세테이트로 추출하고 물로 씻어낸 다음 감압증발로 용매를 제거하여 혼합 결과물을 얻었다. 이것을 에틸아세테이트와 헥산 (3:1, v/v)용매를 사용하여 실리카 겔을 이용한 칼럼 크로마토그래피로 분리 정제하여 5-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)thio)-2-nitroaniline (0.94 g)를 얻었다 (수율 47 %).

[422]

[423] 1.19.2. 4-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine의 합성

[424] 5-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)thio)-2-nitroaniline (0.94 g, 3.0 mmol)의 에탄올 (100 mL) 용액에 SnCl₂·2H₂O (6 eq)를 가하고 5 시간 동안 가열, 환류한 다음 상온으로 냉각하고 물 (300 mL)를 가하였다. 과량의 에틸아세테이트 용매로 추출한 다음 용매를 감압증발로 제거하여 고체상의 반응 혼합물을 얻었다. 이것을 에틸아세테이트와 헥산 (3:1, v/v)용매를 사용하여 실리카 겔을 이용한 칼럼 크로마토그래피로 분리, 정제하여 4-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine (0.85 g)를 얻었다 (수율 99 %).

[425]

[426] 1.19.3. methyl

(5-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate의 합성

[427] 4-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)thio)benzene-1,2-diamine (0.85 g, 3.0 mmol)의 5

% acetic acid의 ethanol (10 mL) 용액에

1,3-Bis(methoxycarbonyl)-2-methyl-2-thiopseudourea (1.5 g, 7.7 mmol) 넣은 후 5 시간 동안 가열, 환류하였다. 반응 혼합물을 상온으로 냉각한 다음, 여과하였다.

이때 메탄올로 충분히 씻어서 methyl

(5-((4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate (화학식 1-19, 0.81 g)를 얻었다 (수율 74 %).

[428] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 3.76(s, 3H), 7.25(m, 1H), 7.28(d, J=8.6 Hz, 2H), 7.47(m, 1H), 7.57(s, 1H), 7.78(d, J=8.6 Hz, 2H), 8.21(s, 1H), 9.23(s, 1H), 11.80(m, 2H)

[429]

[430] **1.20 화학식 1-20의 합성**

[431] 4-methyl-1H-imidazole를 출발물질로 사용하여 실시예 1.19의 화학식 1-19와 같은 방법으로

methyl(5-((4-(4-methyl-1H-imidazol-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate를 합성하였다 (화학식 1-20, 수율 78.1 %).

[432] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 2.14(s, 3H), 3.76(s, 3H), 7.23(d, J=8.4 Hz, 3H), 7.37(s, 1H), 7.47(m, 1H), 7.53(d, J=8.8 Hz, 3H), 8.07(s, 1H), 11.47(m, 1H), 12.01(M, 1H)

[433]

[434] **1.21 화학식 1-21의 합성**

[435] 3,5-dimethyl-1H-1,2,4-triazole를 출발물질로 사용하여 실시예 1.19의 화학식 1-19와 같은 방법으로

methyl(5-((4-(3,5-dimethyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate를 합성하였다 (화학식 1-21, 수율 71.9%).

[436] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 2.24(s, 3H), 2.37(s, 3H), 3.76(s, 3H), 7.20(d, J=8.8 Hz, 2H), 7.28(m, 1H), 7.43(d, J=8.8 Hz, 2H), 7.15(m, 1H), 7.60(s, 1H), 11.41(m, 1H), 12.37(m, 1H)

[437]

[438] **1.22 화학식 1-22의 합성**

[439] 3-methyl-1H-1,2,4-triazole를 출발물질로 사용하여 실시예 1.19의 화학식 1-19와 같은 방법으로

methyl(5-((4-(3-methyl-1H-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate를 합성하였다 (화학식 1-22, 수율 70.4%).

[440] ¹H NMR (DMSO-d₆, 400 MHz) 2.37(s, 3H), 3.76(s, 3H), 7.26(m, 3H), 7.50(m, 1H), 7.56(s, 1H), 7.73(d, J=8.4 Hz, 2H), 9.08(s, 1H), 11.46(m, 1H), 12.04(m, 1H)

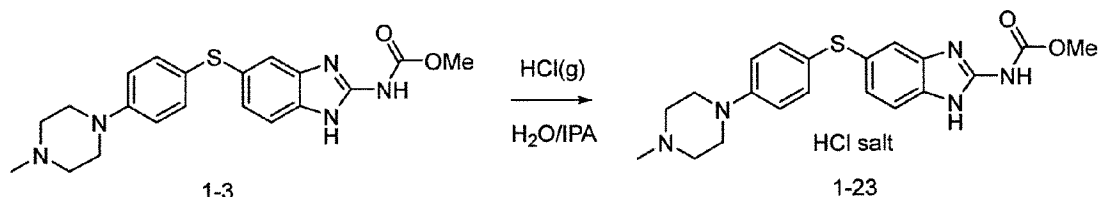
[441]

[442] 실시예 2. 티오벤즈이미다졸 유도체의 항암 활성 측정

[443] **2.1** 티오벤즈이미다졸 유도체의 세포 생존율 확인

- [444] 인간 삼중음성유방암 (triple-negative breast cancer, TNBC) 세포주인 MDA-MB-231 (Cell seeding numbers: $1(M231) \times 10^4$ cells / wells (confluency ≥ 25 %) 및 HER2 양성 유방암 (HER2 positive breast cancer, HER2+ BC) 세포주인 JIMT-1 (Cell seeding numbers: $1.2(JIMT) \times 10^4$ cells / wells (confluency ≥ 25 %))를 실험에 사용하였다.
- [445] 상기 세포주들은 각각 10 % fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin (100 U/mL) 및 Fungizone ($0.625 \mu\text{g/mL}$)을 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 5 % CO_2 , 37 °C 환경으로 배양하였다.
- [446] 상기 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231 및 JIMT-1에서 화학식 1-1, 1-2, 1-3, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-10, 1-11, 1-12, 1-13, 1-14, 1-15, 1-16, 1-17, 1-19, 1-20, 1-21, 및 1-22의 티오벤즈이미다졸 유도체를 각각 0, 0.5, 1, 5 μM 의 다양한 농도로 72 시간 동안 처리한 후, MTS assay기법으로 세포 생존율을 측정하였다. MTS assay는 96 well plate에 24 시간 동안 세포를 부착시킨 후, 상기 티오벤즈이미다졸 유도체를 72 시간 동안 처리하여, MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)로 4 시간 동안 발색한 뒤, Spectramax Plus384 microplate analyzer를 이용하여 490 nm에서 흡광도로 측정하였다.
- [447] 측정된 결과를 도 1 내지 도 6에 나타내었다. 도 1, 3, 및 5는 MDA-MB-231 세포주에 대한 세포 생존율을 확인한 것이고, 도 2, 4, 및 6은 JIMT-1 세포주에 대한 세포 생존율을 확인한 것이다.
- [448] 그 결과 상기 인간 유방암 세포주 MDA-MB-231 및 JIMT-1에서 상기 화학식 1-1, 1-2, 1-3, 1-5, 1-6, 1-7, 1-8, 1-10, 1-11, 1-12, 1-13, 1-14, 1-15, 1-16, 1-17, 1-19, 1-20, 1-21, 및 1-22의 티오벤즈이미다졸 유도체들은 대부분이 농도 의존적으로 세포 생존율을 저해하는 것이 확인되었다.
- [449] 추가적으로, Trastuzumab에 sensitive한 HER2 양성 유방암 세포주인 SKBR3 및 BT474, Trastuzumab에 resistant한 HER2 양성 유방암 세포주인 JIMT-1에 대해서 화학식 1-3의 티오벤즈이미다졸 유도체를 농도 의존적으로 72 시간 동안 처리한 결과, 상기 세 세포주에서 모두 생존 저해 효과가 나타남을 확인하였다 (도 7).
- [450]
- [451] **2.2 티오벤즈이미다졸 유도체에 의한 세포주기 중지 및 세포 사멸 확인**
- [452] 화학식 1-3의 티오벤즈이미다졸 유도체가 유도하는 암세포의 사멸정도를 유세포 측정기 (Flow cytometry)를 이용한 DNA 함량분석을 통하여 측정하였다. SKBR3, BT474 및 JIMT-1 세포주에 대하여, control (DMSO), 화학식 1-3의 유도체를 0.1, 0.25, 0.5 μM 의 농도로 72 시간 동안 처리한 후, 상기 세포들을 수확하고, 24 시간 동안 0.5 % Tween-20을 포함하는 95 % 에탄올로 고정하여, 30 분 동안 propidium iodide (PI, $50 \mu\text{g/mL}$)과 RNase ($50 \mu\text{g/mL}$)를 가지고 염색하였다. 이후, 유세포 측정기로 암세포의 사멸정도를 분석하였다.

- [453] 일반적으로 세포주기 (cell cycle)는 세포내 DNA의 함량에 따라 G1 (세포성장기)-S (세포복제기)-G2/M (세포분열기)로 나뉘어지며, 세포사멸이 유도되면 DNA의 절편현상 (DNA fragmentation)을 동반하여, 각 세포내의 DNA의 함량이 G1기 보다 현저히 적어진다. 이러한 세포사멸의 결과는 Sub G1 부위로서 세포주기상에 나타나게 되며 Sub G1의 비율을 수치로 표기하여 도 8에 나타내었다.
- [454] 그 결과, 상기 화학식 1-3의 유도체가 SKBR3, BT474, JIMT-1 유방암 세포주들에서 세포사멸 (Sub-G1 population)을 유의하게 유도하며, G2/M phase 세포 주기를 정체시킨다는 점을 확인하였다. 세포사멸 실험은 독립적으로 3번 수행하였으며, 유의성은 unpaired Students t-test로 검증 (* $p < 0.01$; DMSO control vs NCT-58 or NCT-407)하였다.
- [455] 또한, 화학식 1-3의 유도체의 세포자멸사 (apoptosis) 유도 효과를 확인하기 위하여 control (DMSO), 화학식 1-3의 유도체를 0.1, 0.25, 0.5 μM 의 농도로 72 시간동안 처리한 후 Annexin V/PI staining하여 세포사멸 정도를 확인하였다. 그 결과, 화학식 1-3의 유도체의 처리에 의해 농도의존적으로 전기 및 후기 세포자멸사 (early and late apoptosis)가 효과적으로 유도됨을 확인하였다 (도 9).
- [456]
- [457] 실시예 3. 티오벤즈이미다졸 유도체의 염산염 제조
- [458] 화학식 1-3의 티오벤즈이미다졸 유도체의 염산염인 화합물 1-23의 합성 과정을 하기 반응식 23에 나타내었다.
- [459] [반응식 23]



- [460]
- [461] methyl
- (5-((4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)methyl carbamate (370 mg, 0.93 mmol)의 메탄올 (75 mL) 현탁액에 염화수소 (HCl) 가스를 2 분 간격으로 주입하면서 pH 1 이하가 될 때까지 주입하였다. 반응물을 감압증발하여 오일형태 생성물을 얻은 후 다시 이소프로필 알코올 (Isopropyl alcohol, 37 mL)를 가하고, 가열 용해한 다음 실온으로 냉각하면 고체 부유물이 생성되었다. 이후 상기 고체 부유물에 이소프로필 에테르 (Isopropyl ether, 35 mL)를 나누어 가하면서 3 시간동안 교반한 다음 여과하였다. 이때 IPA와 IPE 혼용매로 세척하고 50 °C에서 1 시간 동안 열풍건조, 40 °C 2 시간 진공 건조하여 회백색 고체인

Methyl(5-((4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thio)-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)carbamate hydrochloric acid salt (화학식 1-23, off-white solid, 350 mg)을 얻었다 (수율 87%).

[462] ^1H NMR (D_2O , 400 MHz) δ 2.93(s, 3H), 3.08-3.14 & 3.19-3.25 (2m, 4H), 3.61(d, J = 12.5 Hz, 2H), 3.64(d, J = 12.5 Hz, 2H), 3.89(s, 3H), 7.04-7.44(m, 7H)

[463]

[464] 실시예 4. 티오벤즈이미다졸 유도체의 염산염의 항암 활성 측정

[465] 4.1 티오벤즈이미다졸 유도체의 염산염의 세포 생존율 확인

[466] Trastuzumab에 sensitive한 HER2 양성 유방암 세포주인 BT474와 Trastuzumab에 resistant한 HER2 양성 유방암 세포주인 JIMT-1에서 상기 제조한 화학식 1-3의 티오벤즈이미다졸 유도체와 이의 염산염 (화합물 1-23)을 같은 농도 (0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 μM)로 72 시간 동안 처리한 후, MTS assay기법으로 세포 생존율과 IC_{50} 을 측정하였다. 그 결과, BT474 세포주에서 상기 화학식 1-3의 유도체의 IC_{50} 은 2.184 μM , 상기 염산염 (화합물 1-23)의 IC_{50} 은 0.347 μM 으로 6 배 이상 낮은 수치를 나타냈으며, JIMT-1 세포주에서 상기 화학식 1-3의 유도체의 IC_{50} 은 0.448 μM , 상기 염산염 (화합물 1-23)의 IC_{50} 은 0.228 μM 으로 거의 절반 수준의 수치를 나타내었다 (도 10).

[467] 또한, 삼중음성유방암 세포주인 MDA-MB-231, BT549, 및 4T1에서 상기 제조한 화학식 1-3의 티오벤즈이미다졸 유도체의 염산염 (화합물 1-23)을 농도별(0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 μM)로 72 시간 동안 처리한 후, MTS assay기법으로 세포 생존율과 IC_{50} 을 측정하였다. 그 결과, 상기 세 세포주에서 각각 0.523 μM , 0.559 μM , 0.267 μM 의 낮은 IC_{50} 을 나타내었다 (도 11).

[468] 상기 결과는 염산염 (화합물 1-23)이 화학식 1-3의 유도체보다 용해도가 향상되어 세포생존율 억제능이 더욱 뛰어나다는 점을 시사한다.

[469]

[470] 4.2 티오벤즈이미다졸 유도체의 염산염의 세포 주기 중지 확인

[471] HER2 양성 유방암 세포주인 JIMT-1과 삼중음성유방암 세포주 MDA-MB-231에서 화학식 1-3의 티오벤즈이미다졸 유도체의 염산염 (화합물 1-23)을 농도별 (0, 0.1, 0.25, 0.5 μM)로 각각 72 시간동안 처리한 후, 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하였다.

[472] 그 결과, 본 발명의 염산염이 벤즈이미다졸계 구충제의 주요 표적 단백질인 β -tubulin을 감소시키고, 튜불린 합성 저해에 따라 G2/M 세포주기 표지인자인 p-Histone H3 (S10)을 증가시킨다는 점을 확인하였다 (도 12).

[473]

[474] 4.3 티오벤즈이미다졸 유도체의 염산염의 타 암세포주 항암 활성 확인

[475] 유방암 세포주 외에 혈액암 세포주인 HL-60, 대장암 세포주인 HCT116, 비소세포성폐암 세포주인 H1299 및 A549, 난소암 세포주인 SKOV3, 전립선암 세포주인 Du145, 및 간암 세포주인 HepG2에서 화학식 1-3의 티오벤즈이미다졸

유도체의 염산염 (화합물 1-23)을 농도별 (0, 0.1, 0.25, 0.5 μ M)로 각각 72 시간동안 처리한 후, 세포생존율 및 IC50을 측정한 결과, 타 암세포주에서도 우수한 세포 생존율 저해 효과가 있음을 확인하였다 (도 13 및 도 14).

[476]

[477] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

[478] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

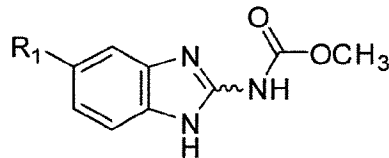
산업상 이용가능성

[479] 본 발명은 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 상기 유도체를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것으로서, 본 발명의 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 암 세포에서 활성화되어 튜불린 중합(tubulin polymerization)을 저해하며, 개체에 투여 시 암 세포 주기를 차단하고 세포사멸을 유도함으로써 세포 독성을 나타내는바, 암의 예방 또는 치료, 바람직하게는 삼중음성유방암의 예방 또는 치료분야에서 유용하게 이용될 수 있다.

청구범위

[청구항 1] 하기 [화학식 1]로 표시되는 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

R₁은 -S-R₂ 또는 -S-S-R₂ 이고,

R₂는 치환 또는 비치환된 C₃ 내지 C₂₀의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C₃ 내지 C₂₀의 헤테로아릴기, 및 치환 또는 비치환된 C₃ 내지 C₂₀의 알킬아릴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나임.

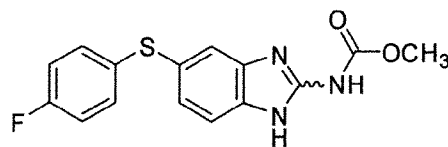
[청구항 2] 제1항에 있어서,

상기 [화학식 1]에서, 치환된 아릴기, 헤테로아릴기, 또는 알킬아릴기는 치환 또는 비치환된 C₃ 내지 C₁₂의 헤테로시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C₃ 내지 C₁₂의 헤테로아릴기, 및 할로젠기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상으로 치환된 것을 특징으로 하는 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

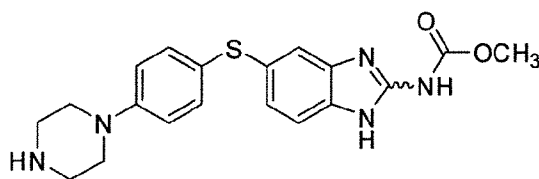
[청구항 3] 제1항에 있어서,

상기 [화학식 1]로 표시되는 티오벤즈이미다졸 유도체는 하기 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

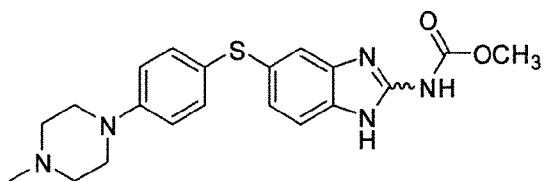
[화학식 1-1]



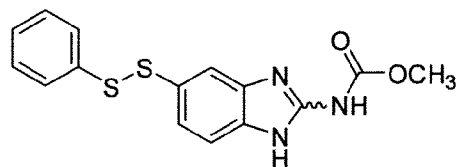
[화학식 1-2]



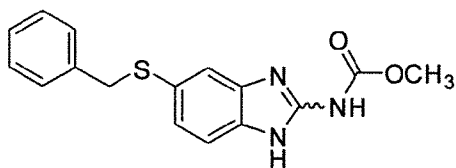
[화학식 1-3]



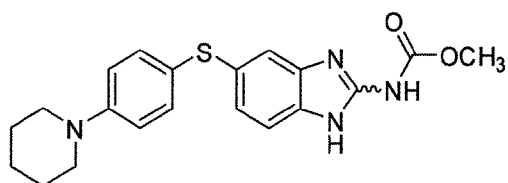
[화학식 1-4]



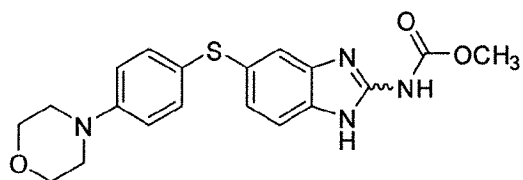
[화학식 1-5]



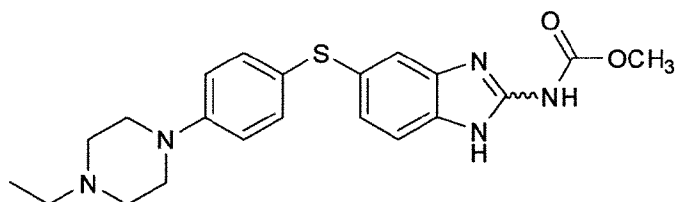
[화학식 1-6]



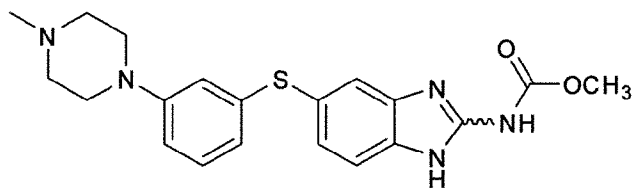
[화학식 1-7]



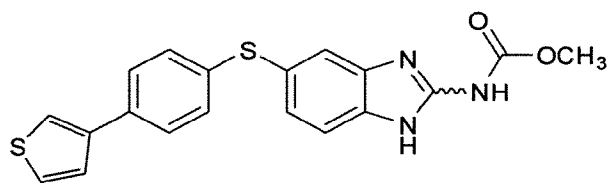
[화학식 1-8]



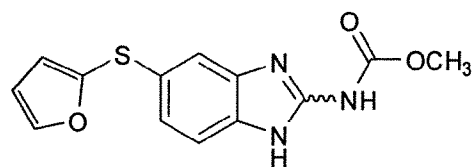
[화학식 1-9]



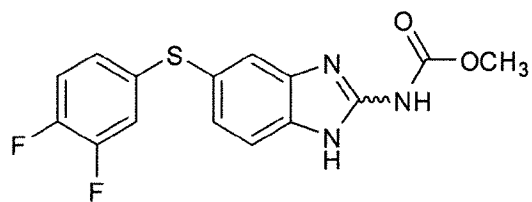
[화학식 1-10]



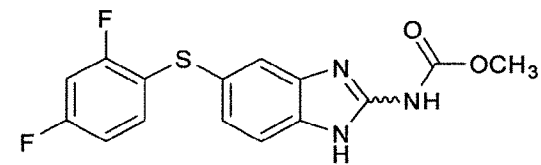
[화학식 1-11]



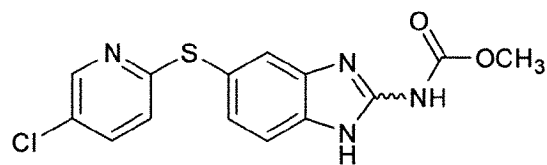
[화학식 1-12]



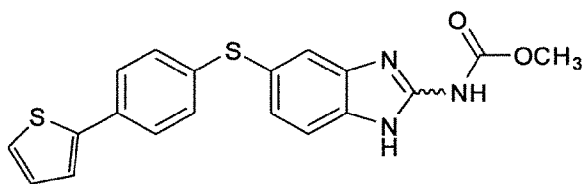
[화학식 1-13]



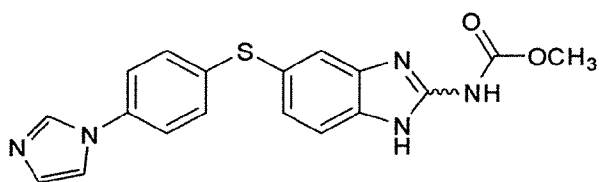
[화학식 1-14]



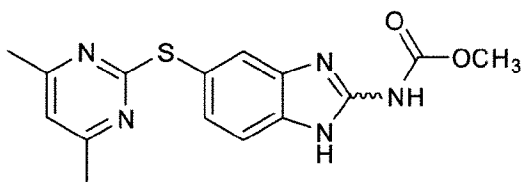
[화학식 1-15]



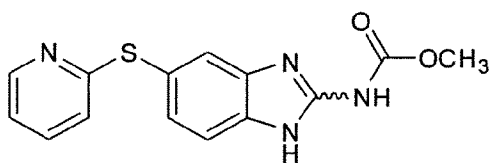
[화학식 1-16]



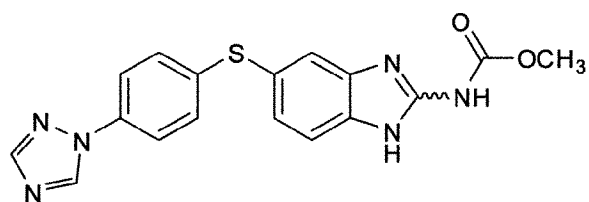
[화학식 1-17]



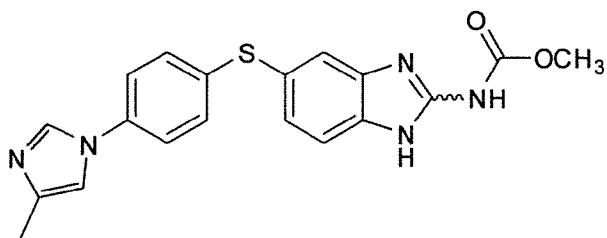
[화학식 1-18]



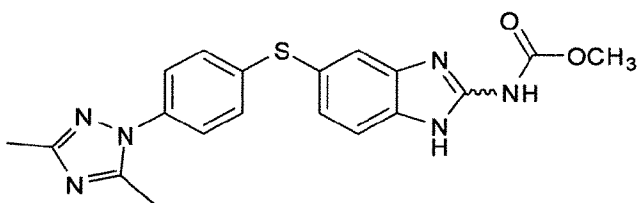
[화학식 1-19]



[화학식 1-20]

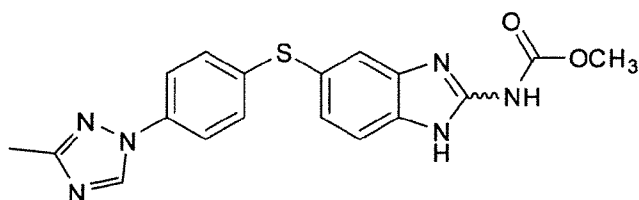


[화학식 1-21]



및

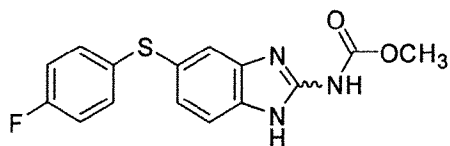
[화학식 1-22]



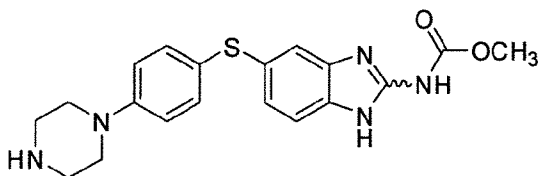
[청구항 4]

제1항에 있어서,
 상기 [화학식 1]로 표시되는 티오벤즈이미다졸 유도체는 하기
 화합물들로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는
 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

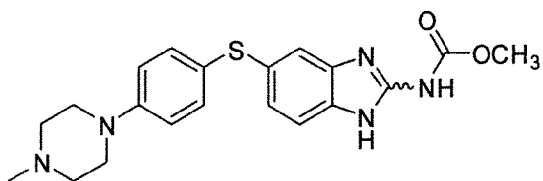
[화학식 1-1]



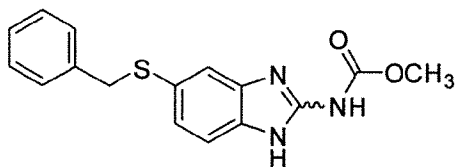
[화학식 1-2]



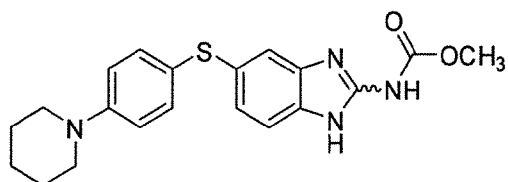
[화학식 1-3]



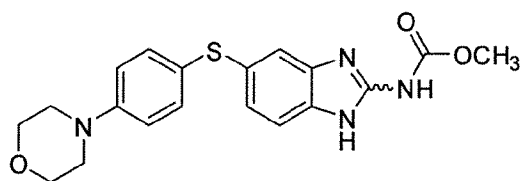
[화학식 1-5]



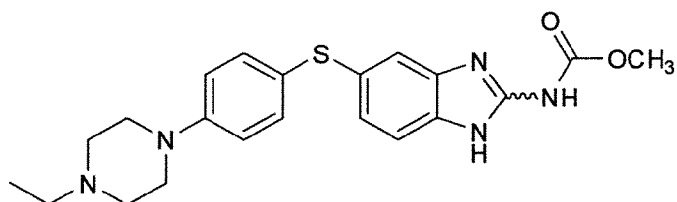
[화학식 1-6]



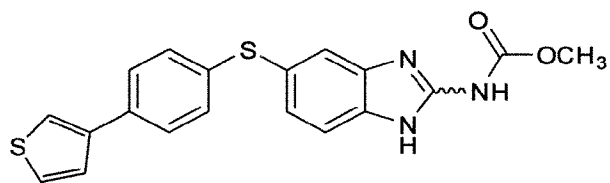
[화학식 1-7]



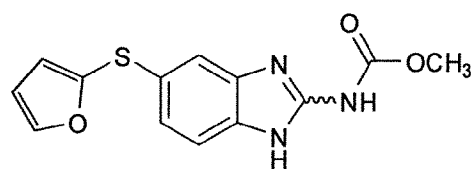
[화학식 1-8]



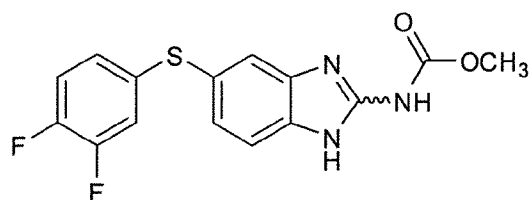
[화학식 1-10]



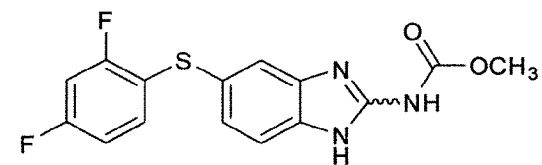
[화학식 1-11]



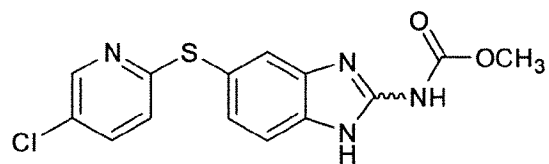
[화학식 1-12]



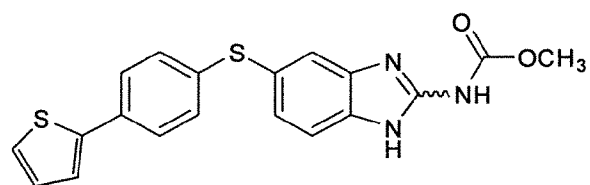
[화학식 1-13]



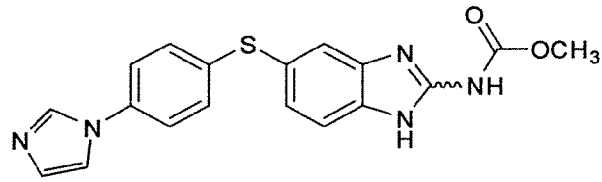
[화학식 1-14]



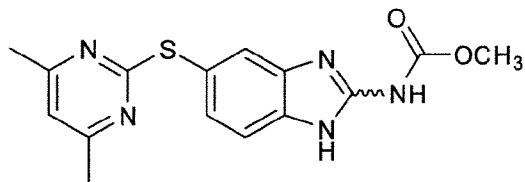
[화학식 1-15]



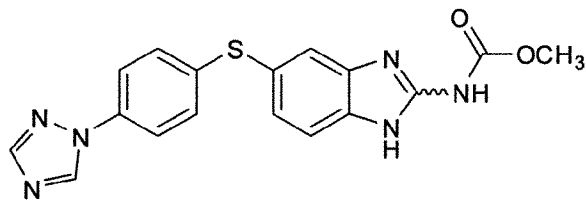
[화학식 1-16]



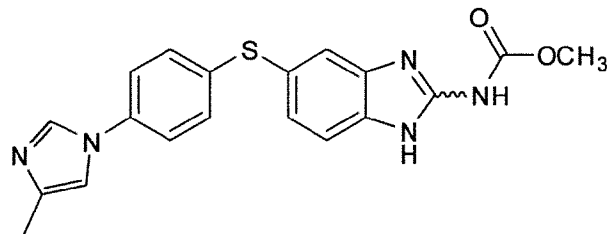
[화학식 1-17]



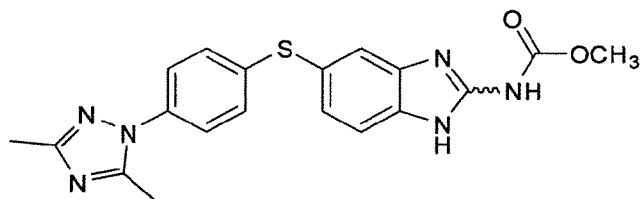
[화학식 1-19]



[화학식 1-20]

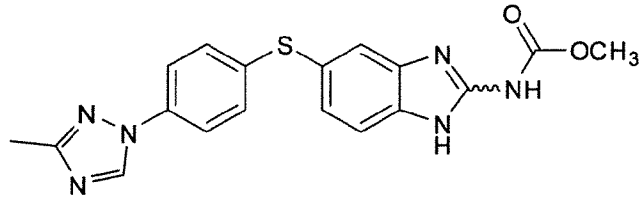


[화학식 1-21]



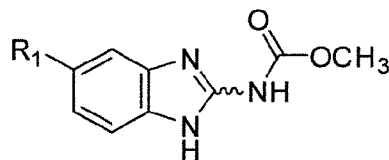
및

[화학식 1-22]



- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 티오벤즈이미다졸 유도체는 튜불린 중합 (tubulin polymerization)을 저해하는 것을 특징으로 하는 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 티오벤즈이미다졸 유도체의 약학적으로 허용가능한 염은 염산염, 브롬산염, 황산염, 인산염, 질산염, 구연산염, 초산염, 젖산염, 주석산염, 말레산염, 글루콘산염, 숙신산염, 포름산염, 트리플루오로아세트산염, 옥살산염, 푸마르산염, 글루타르산염, 아디프산염, 메탄술폰산염, 벤젠술폰산염, 파라톨루엔술폰산염, 캄페르술폰산염, 나트륨염, 칼륨염, 리튬염, 칼슘염, 및 마그네슘염으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 티오벤즈이미다졸 유도체의 약학적으로 허용가능한 염은 염산염인 것을 특징으로 하는 티오벤즈이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.
- [청구항 8] (1) 하기 [화학식 1]로 표시되는 티오벤즈이미다졸 유도체의 현탁액을 제조하는 단계;

[화학식 1]



- (2) 상기 현탁액에 염화수소 (HCl)를 주입하고, 감압증발하는 단계;
(3) 상기 (2)단계의 생성물에 이소프로필 알코올 (isopropyl alcohol)을 가하고 가열 후 냉각하는 단계; 및
(4) 상기 (3)단계의 생성물에 이소프로필 에테르 (isopropyl ether)를 가하고 교반한 후 여과하는 단계;
를 포함하는, 티오벤즈이미다졸의 염산염의 제조방법으로서,

상기 화학식 1에서,

R_1 은 $-S-R_2$ 또는 $-S-S-R_2$ 이고,

R_2 는 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{20} 의 아릴기, 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{20} 의 헤테로아릴기, 및 치환 또는 비치환된 C_3 내지 C_{20} 의 알킬아릴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 제조방법.

[청구항 9] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 티오벤즈이미다졸 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 약학적 조성물은 암 세포 주기를 중지 (cell cycle arrest)시켜 세포사멸 (apoptosis)을 유도하는 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 암은 피부암, 유방암, 자궁암, 식도암, 위암, 뇌 종양, 결장암, 직장암, 대장암, 폐암, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암, 외음부암, 신장암, 혈액암, 췌장암, 전립선암, 고환암, 후두암, 두경부암, 갑상선암, 간암, 방광암, 골육종, 림프종, 혈액암, 흉선암, 요도암, 및 기관지암으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 12] 제9항에 있어서,
상기 암은 삼중음성유방암인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

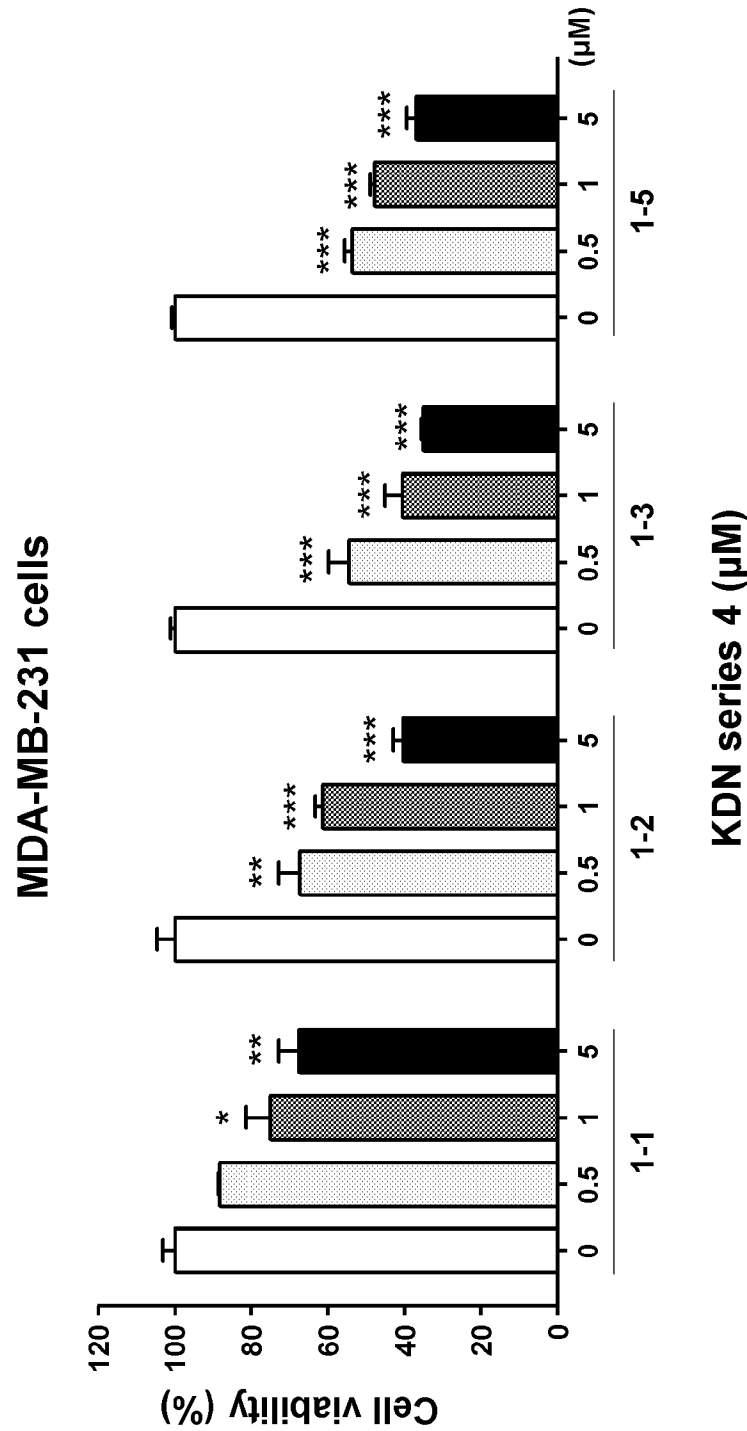
[청구항 13] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 티오벤즈이미다졸 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료방법.

[청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 벤즈이미다졸 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 암 세포 주기를 중지시켜 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료방법.

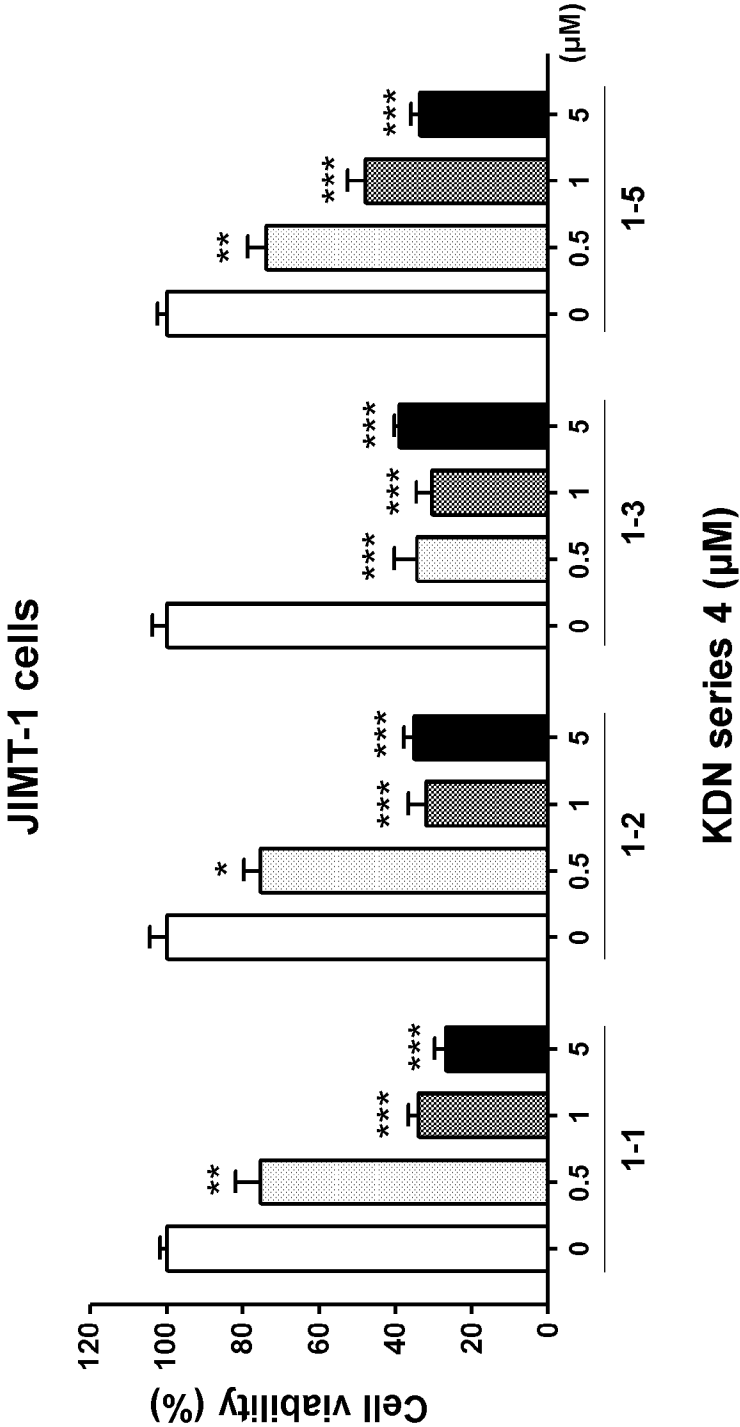
[청구항 15] 제13항에 있어서,
상기 암은 피부암, 유방암, 자궁암, 식도암, 위암, 뇌 종양, 결장암, 직장암, 대장암, 폐암, 난소암, 자궁경부암, 자궁내막암, 외음부암, 신장암, 혈액암, 췌장암, 전립선암, 고환암, 후두암, 두경부암, 갑상선암, 간암, 방광암, 골육종, 림프종, 혈액암, 흉선암, 요도암, 및 기관지암으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료방법.

[청구항 16] 제13항에 있어서,
상기 암은 삼중음성유방암인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료방법.

[51]

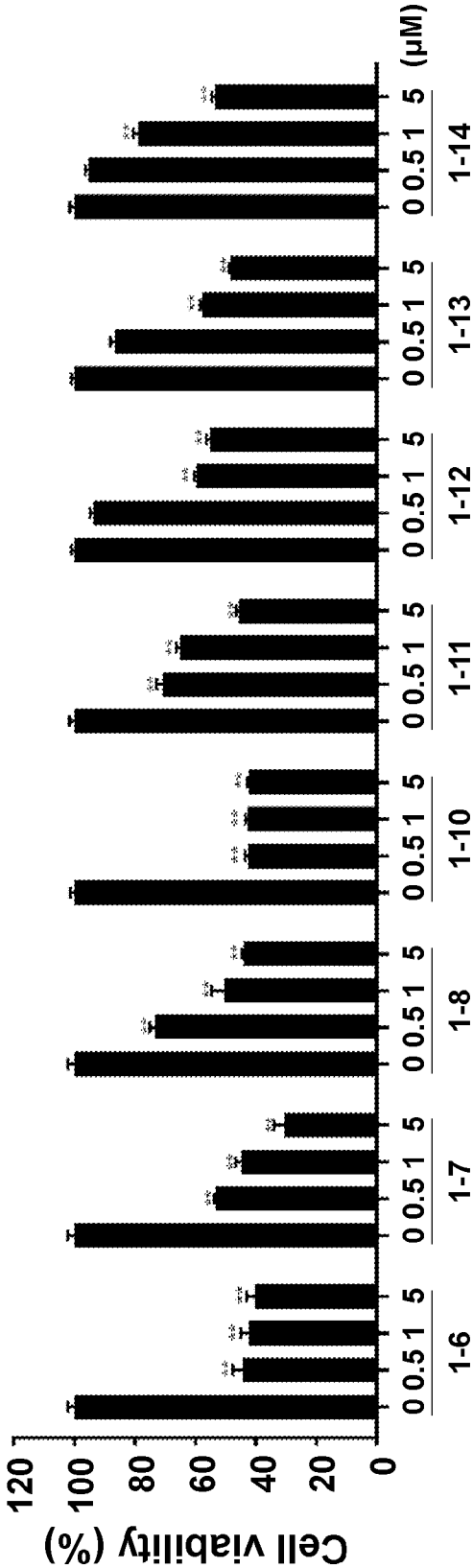


[도2]



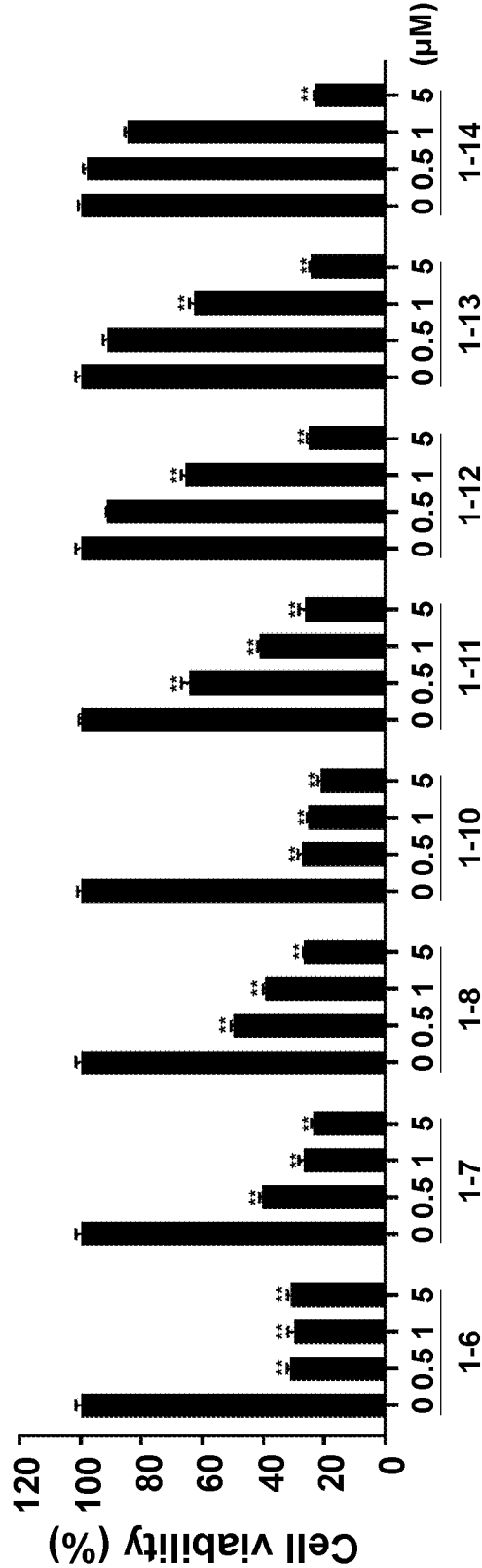
[도3]

MDA-MB-231 cells



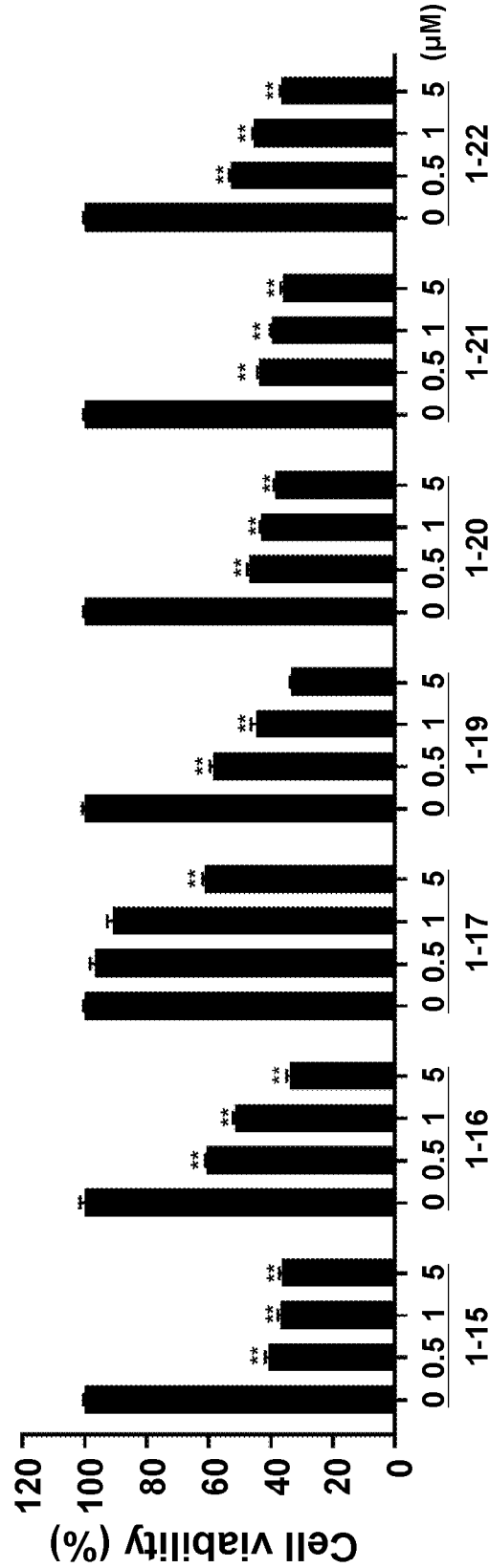
[도4]

JIMT-1 cells

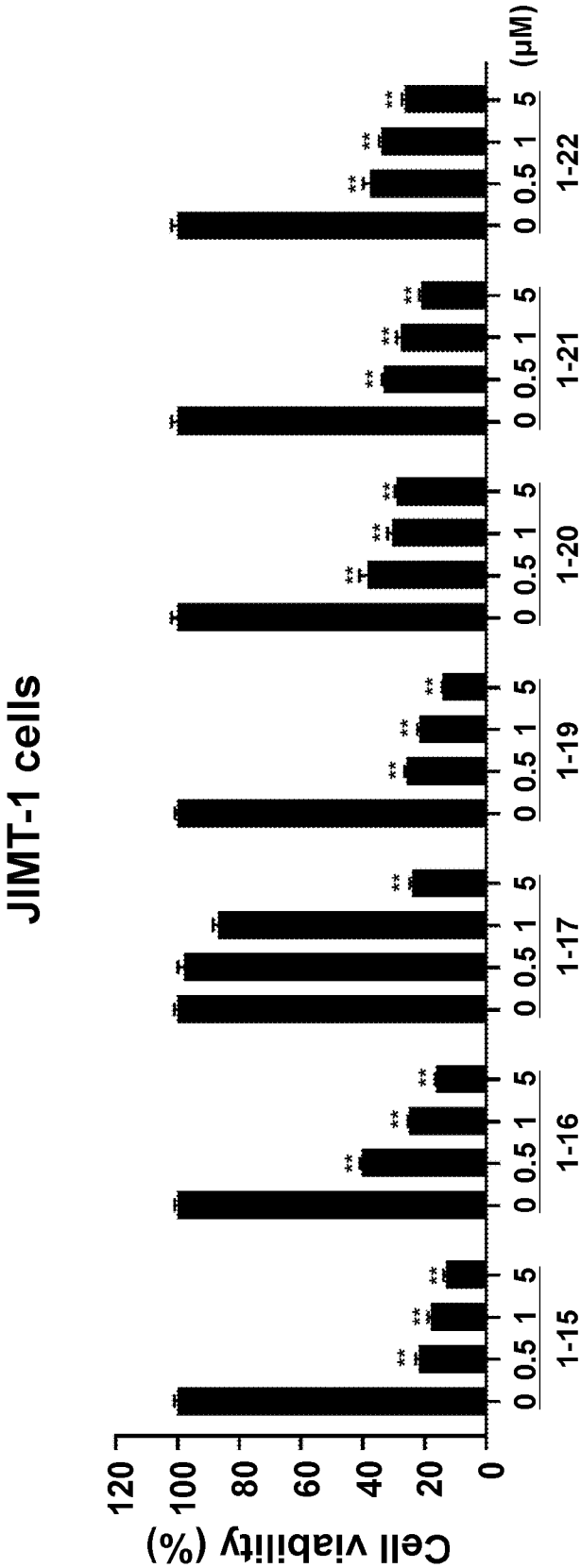


[도5]

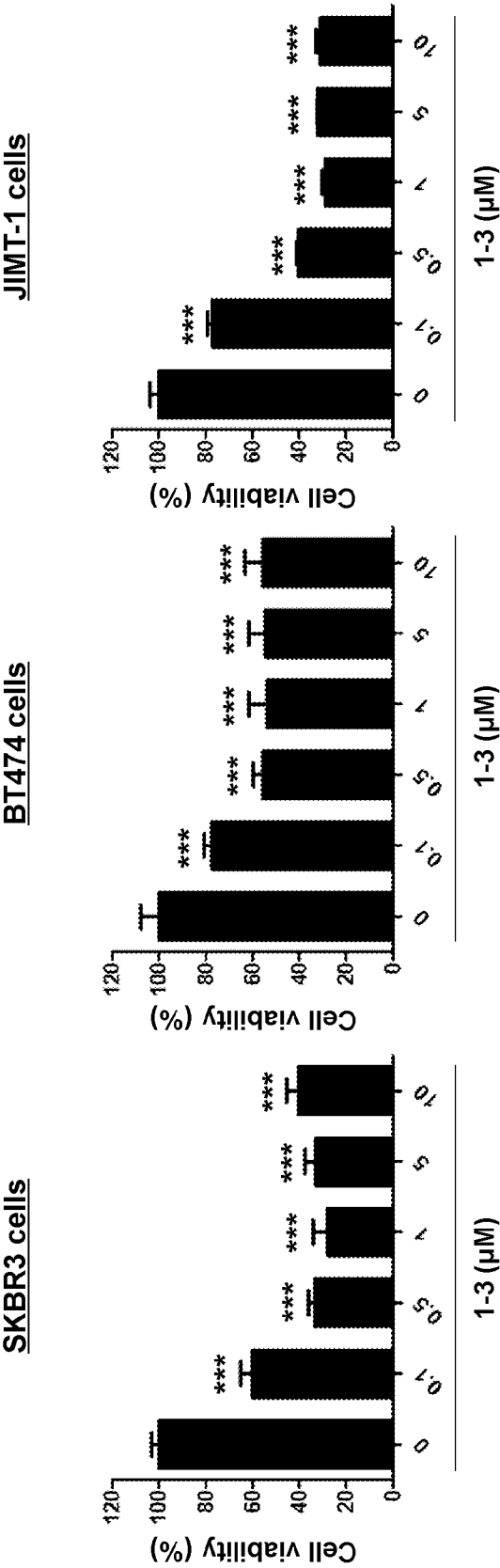
MDA-MB-231 cells



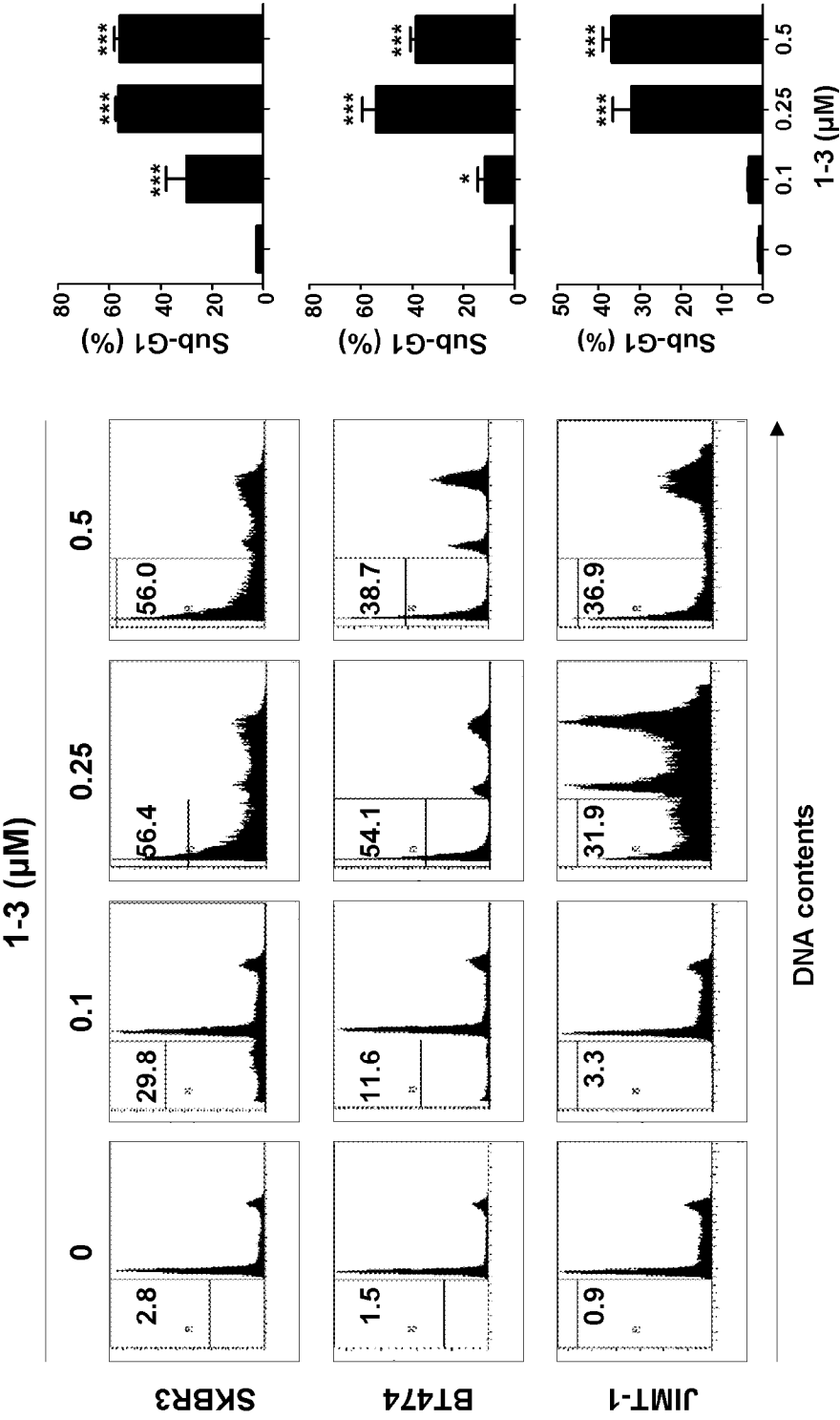
[도6]



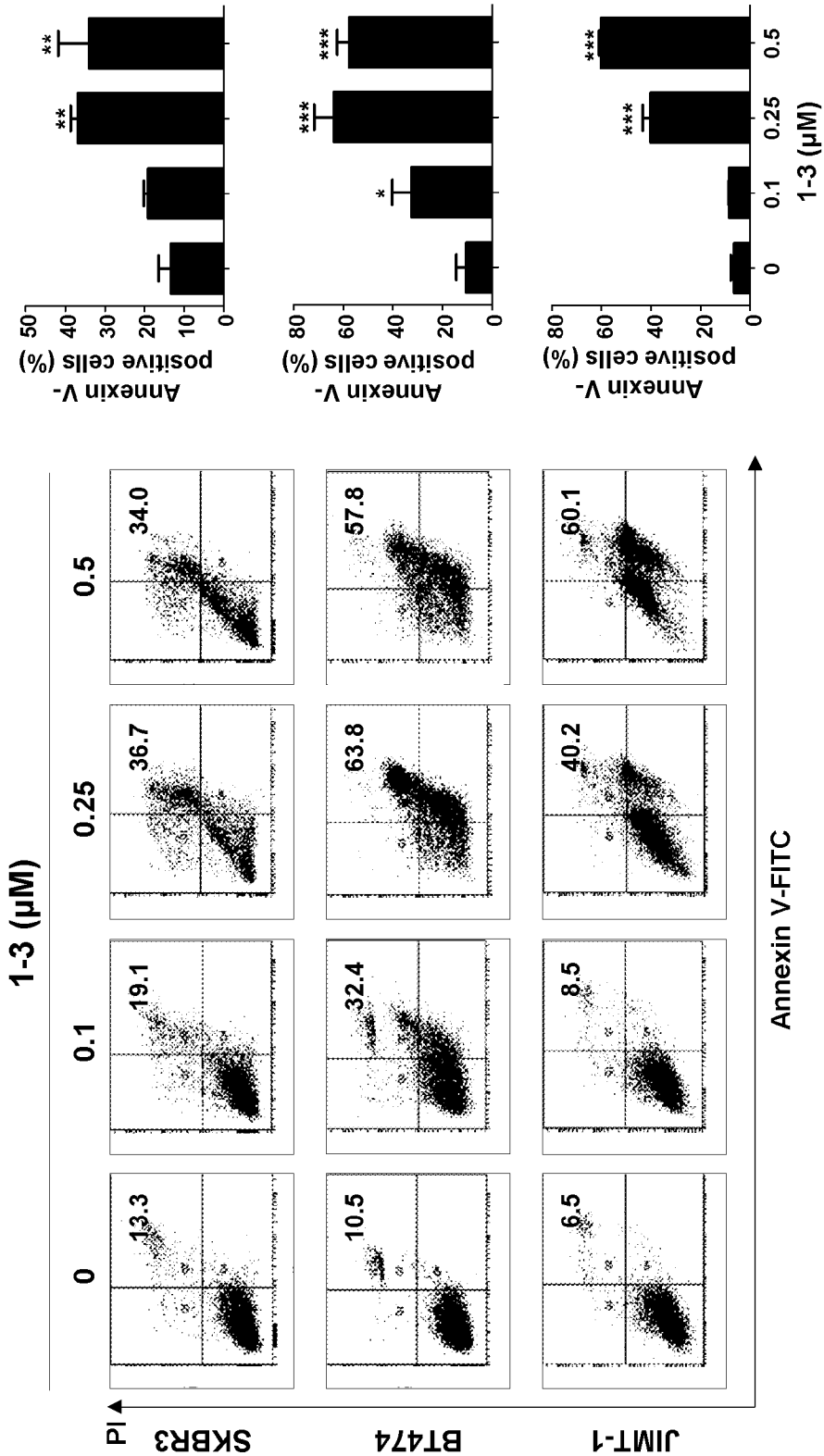
[도7]



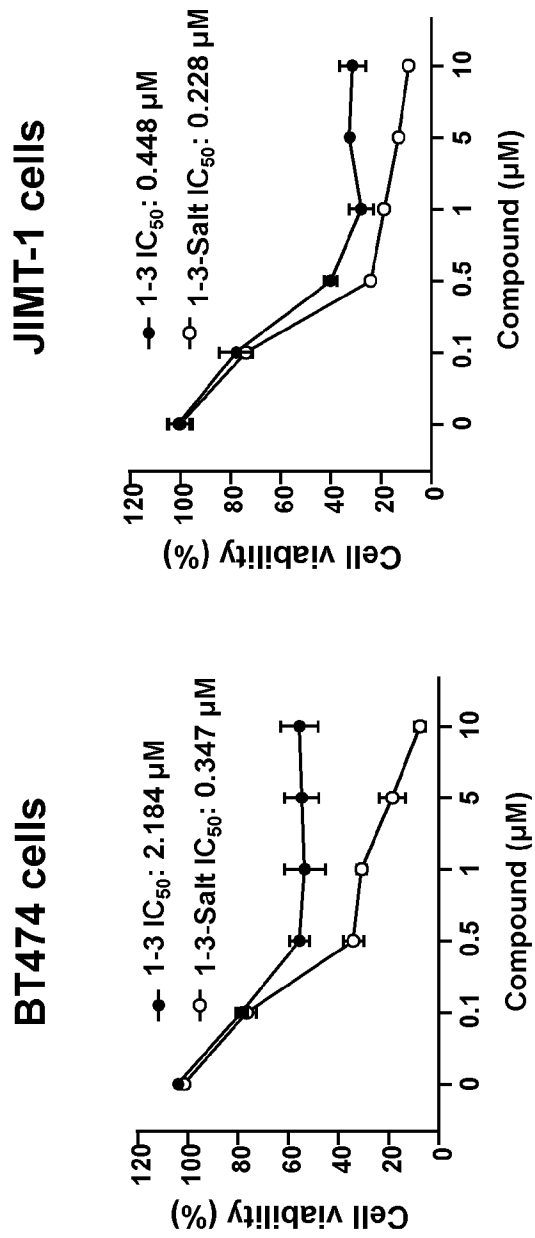
[도8]



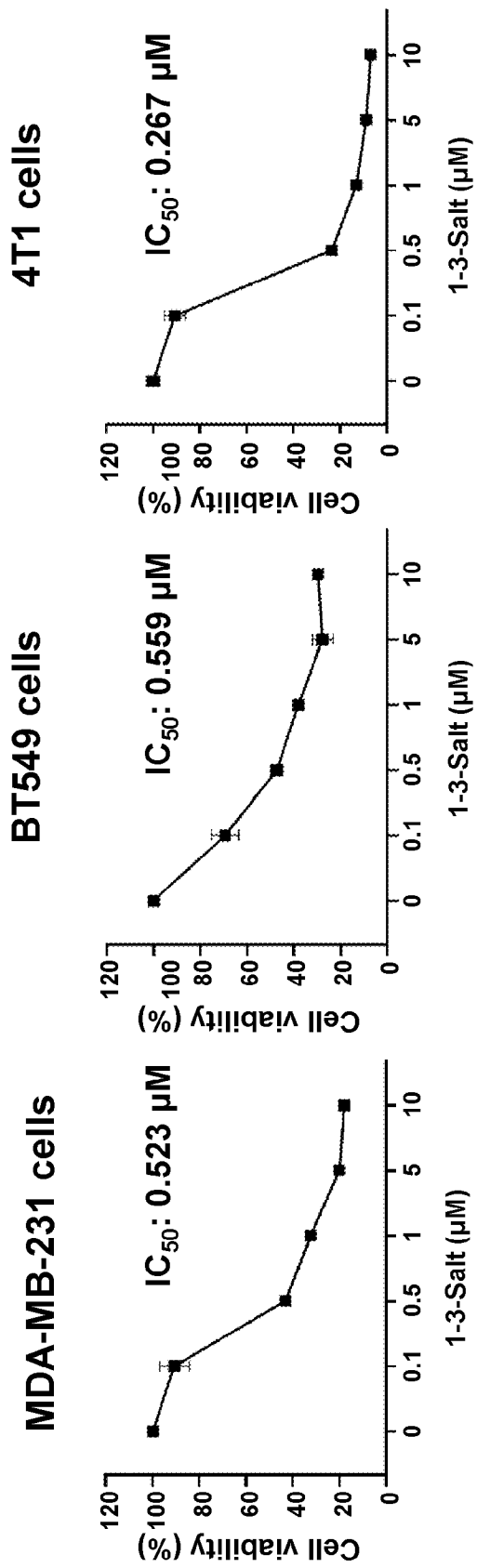
[도9]



[도10]

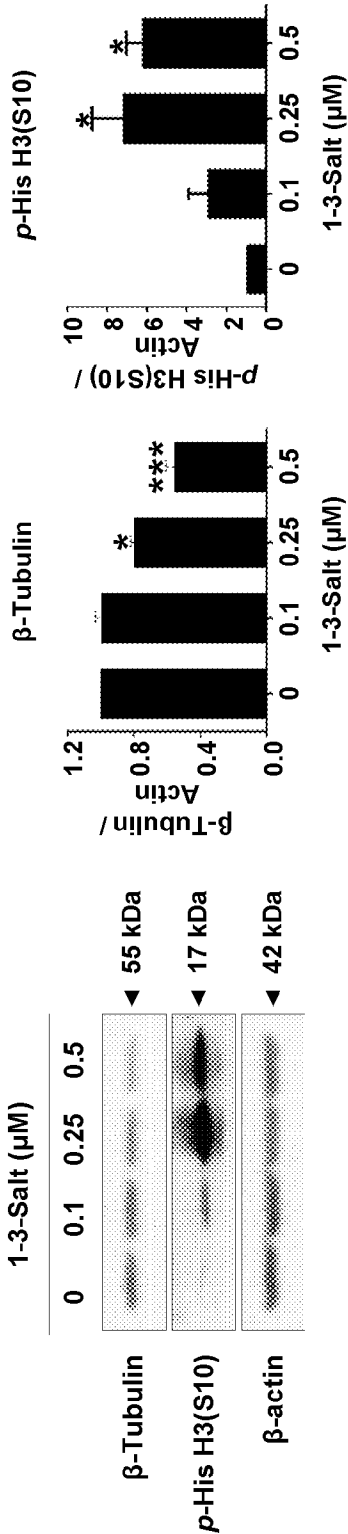


[115]

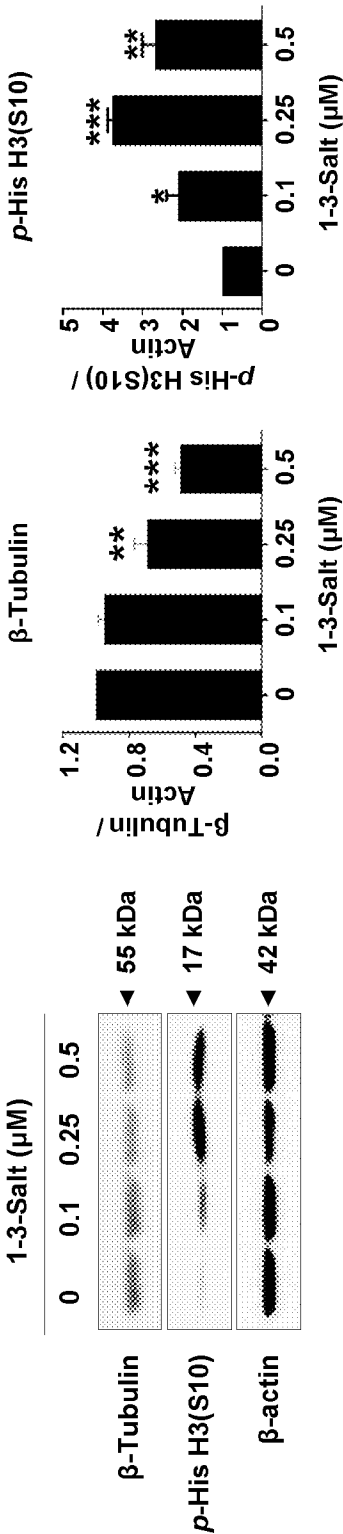


[도12]

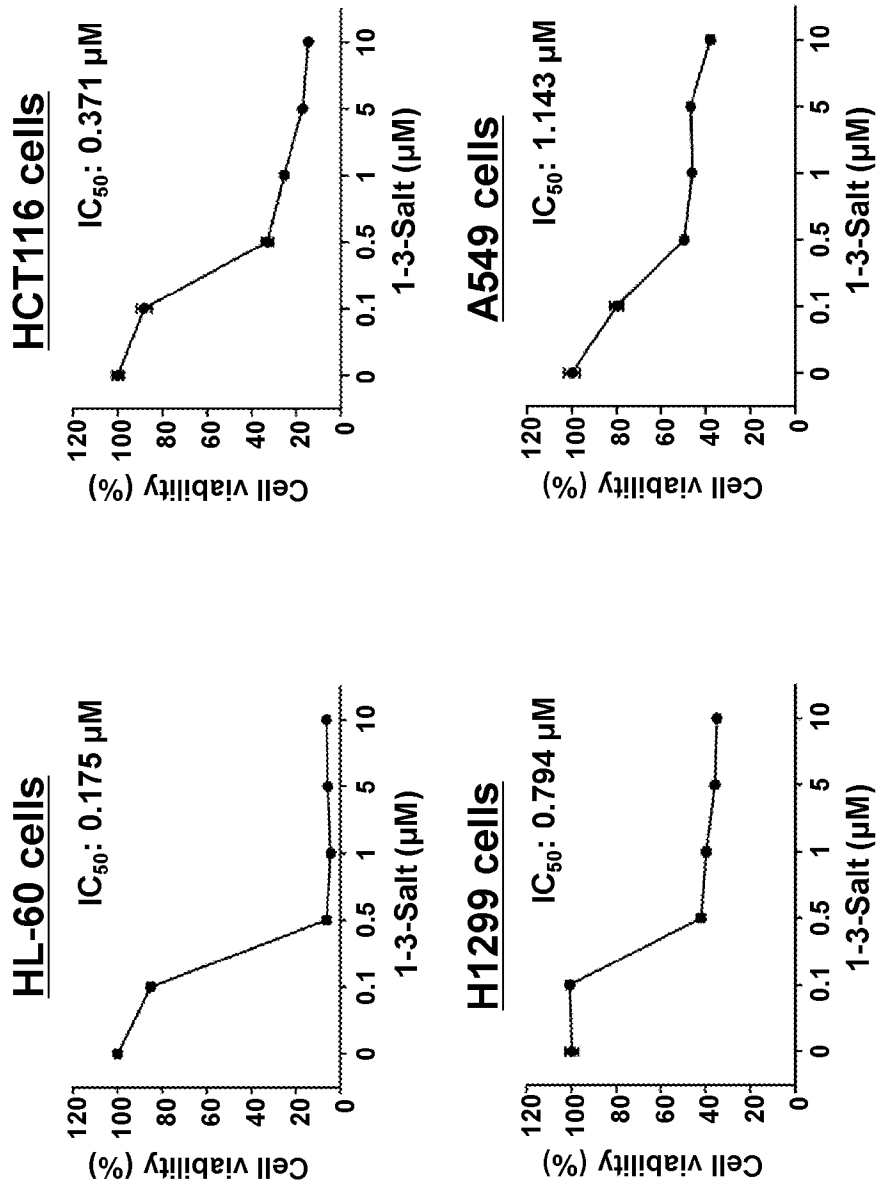
JIMT-1



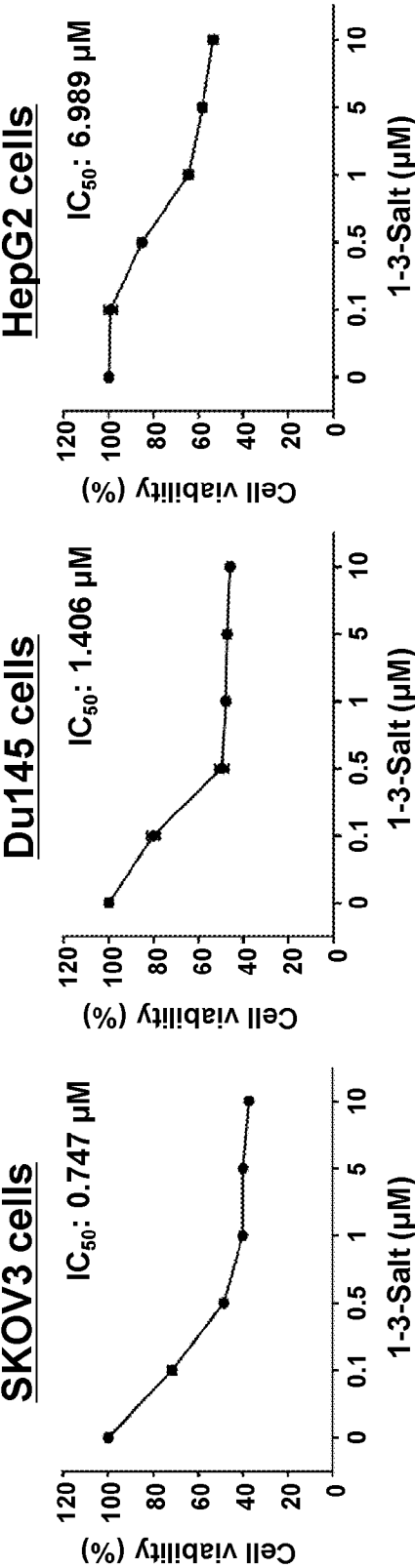
MDA-MB-231



[도13]



[도 14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/014550

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 31/4184(2006.01)i; A61K 31/496(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 31/4184(2006.01); A61K 49/00(2006.01); A61P 35/00(2006.01); A61P 35/04(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 티오벤즈이미다졸(thio benzimidazole), 펜벤다졸(fenbendazole), 유방암(breast cancer), 삼중음성유방암(triple-negative breast cancer), 튜불린 중합(tubulin polymerization)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	US 2012-0064008 A1 (ZETTER, Bruce et al.) 15 March 2012 (2012-03-15) See paragraphs [0074], [0081], [0164], [0230]-[0231] and [0257], and Fig. 14H.	1,5-7,9-11 2-4,8,12
X	WO 2020-127946 A2 (UNIVERSITÄT BASEL) 25 June 2020 (2020-06-25) See paragraphs [0037] and [0066] and claims 1-10.	1,5-7,9-11
A	KIM, Yoon-Jae et al. Flubendazole overcomes trastuzumab resistance by targeting cancer stem-like properties and HER2 signaling in HER2-positive breast cancer. Cancer Letters. 2018, vol. 412, pp. 118-130. See entire document.	1-12
A	OH, E. et al. Flubendazole elicits anti-metastatic effects in triple-negative breast cancer via STAT3 inhibition. International Journal of Cancer. 2018, vol. 143, pp. 1978-1993. See entire document.	1-12
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 24 January 2022		Date of mailing of the international search report 24 January 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/014550

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2008-0293796 A1 (CHOW, Diana Shu-Lian et al.) 27 November 2008 (2008-11-27) See entire document.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/014550

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **13-16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 13-16 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/014550

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2012-0064008	A1	15 March 2012	EP	2432451	A2	28 March 2012
				WO	2010-135534	A2	25 November 2010
				WO	2010-135534	A3	27 January 2011
WO	2020-127946	A2	25 June 2020	None			
US	2008-0293796	A1	27 November 2008	CN	102202663	A	28 September 2011
				EP	2310009	A2	20 April 2011
				EP	2310009	B1	20 December 2017
				US	2005-0038096	A1	17 February 2005
				US	2009-0048322	A1	19 February 2009
				US	2010-0310611	A1	09 December 2010
				US	7419996	B2	02 September 2008
				US	9259390	B2	16 February 2016
				US	9259391	B2	16 February 2016
				WO	2005-018623	A2	03 March 2005
				WO	2005-018623	A3	27 September 2007
				WO	2010-011289	A2	28 January 2010
				WO	2010-011289	A3	08 April 2010

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/4184(2006.01)i; A61K 31/496(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/4184(2006.01); A61K 49/00(2006.01); A61P 35/00(2006.01); A61P 35/04(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 티오벤즈이미다졸(thio benzimidazole), 펜벤다졸(fenbendazole), 유방암(breast cancer), 삼중음성유방암(triple-negative breast cancer), 튜블린 중합(tubulin polymerization)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X A	US 2012-0064008 A1 (ZETTER, BRUCE 등) 2012.03.15 단락 [0074], [0081], [0164], [0230]-[0231], [0257], Fig. 14H	1,5-7,9-11 2-4,8,12
X	WO 2020-127946 A2 (UNIVERSITÄT BASEL) 2020.06.25 단락 [0037], [0066] 및 청구항 1-10	1,5-7,9-11
A	KIM, YOON-JAE 등, Flubendazole overcomes trastuzumab resistance by targeting cancer stem-like properties and HER2 signaling in HER2-positive breast cancer, Cancer Letters, 2018년, 412권, 페이지 118-130 문헌 전체	1-12
A	OH, E. 등, Flubendazole elicits anti-metastatic effects in triple-negative breast cancer via STAT3 inhibition, International Journal of Cancer, 2018년, 143권, 페이지 1978-1993 문헌 전체	1-12
A	US 2008-0293796 A1 (CHOW, DIANA SHU-LIAN 등) 2008.11.27 문헌 전체	1-12
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2022년01월24일(24.01.2022)		국제조사보고서 발송일 2022년01월24일(24.01.2022)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **13-16**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 13-16은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 제17조 (2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2012-0064008 A1	2012/03/15	EP 2432451 A2	2012/03/28
		WO 2010-135534 A2	2010/11/25
		WO 2010-135534 A3	2011/01/27
WO 2020-127946 A2	2020/06/25	없음	
US 2008-0293796 A1	2008/11/27	CN 102202663 A	2011/09/28
		EP 2310009 A2	2011/04/20
		EP 2310009 B1	2017/12/20
		US 2005-0038096 A1	2005/02/17
		US 2009-0048322 A1	2009/02/19
		US 2010-0310611 A1	2010/12/09
		US 7419996 B2	2008/09/02
		US 9259390 B2	2016/02/16
		US 9259391 B2	2016/02/16
		WO 2005-018623 A2	2005/03/03
		WO 2005-018623 A3	2007/09/27
		WO 2010-011289 A2	2010/01/28
		WO 2010-011289 A3	2010/04/08