



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2007년12월11일
(11) 등록번호 10-0784195
(24) 등록일자 2007년12월04일

(51) Int. Cl.

A61K 31/517 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0001660

(22) 출원일자 2007년01월05일

심사청구일자 2007년01월05일

(56) 선행기술조사문헌

KR 497105 B1

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 수원 캠퍼스내

(72) 발명자

이재열

서울 서대문구 홍제3동 373 태영으뜸아파트 101동 1702호

주동준

서울 강남구 압구정동 현대아파트 86동 603호

(74) 대리인

김정대

전체 청구항 수 : 총 4 항

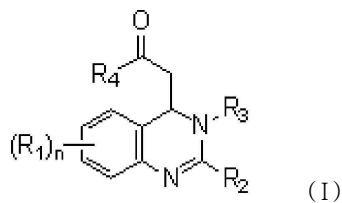
심사관 : 고태욱

(54) 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체를 포함하는 항암제 조성물

(57) 요약

본 발명은 T-형 칼슘 채널을 차단하는 3,4-디히드로퀴나졸린(3,4-dihydroquinazoline) 유도체의 신규한 용도에 관한 것으로, 본 발명은 하기 화학식 (I)로 표시되는 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물을 제공한다.

[화학식 1]

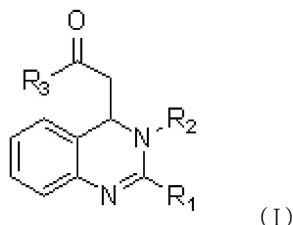


상기 식에서 치환기는 명세서 중에서 정의한 바와 같다.

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 (I)로 표시되는 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물:



상기 식에서,

R₁은 5-아미노펜틸아미노, 디메틸아미노 또는 피페리딘-1-일이고;

R₂는 4-바이페닐, 에틸 또는 페닐이고;

R₃는 메톡시, 벤질아미노, 4-아미노벤질아미노, 4-플루오로벤젠설포아미노벤질 또는 4-메틸벤젠설포아미노벤질이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 4-(메틸아세테이트)-3-바이페닐-2-(5-아미노펜틸아미노)-3,4-디히드로퀴나졸린 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 4-{N-[4-(4-메틸벤젠설포아미노)벤질]아세트아미노}-3-페닐-2-(피페리딘-1-일)-3,4-디히드로퀴나졸린 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 폐암, 결장암, 표피양암종, 악성 흑색종 및 자궁암 중에서 선택되는 암에 적용되는 항암제 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<1> 본 발명은 세포막의 칼슘채널을 효과적으로 차단하는 3,4-디히드로퀴나졸린(3,4-dihydroquinazoline) 유도체의 신규한 용도에 관한 것이다.

<2> 칼슘은 세포내 신호전달물질로서 중요한 역할을 하고 다양한 세포작용을 조절한다. 세포작용 중에서 칼슘은 세포성장에 관여하는 것으로 알려져 있다(Berridge, M. J. 등, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2003, 4, 517-529). 실제로 세포의 유사분열과정 중 세포주기(cell cycle)의 G1 단계에서 S단계로 진행되는 과정에 칼슘신호가 필요하며 세포내 칼슘 이온의 고갈은 세포주기를 G0/G1과 S단계의 중간과정에서 멈추게 한다(Clapham, D. E. Cell 1995, 80, 259-268). 세포내 칼슘 양의 조절은 T-형 칼슘채널을 통하여 조절되며 이에 대한 근거로서 최근 T-형 칼슘채널 차단제가 세포분화를 억제하는 것에 관한 논문이 보고되었다(McCalmont, W. F. 등, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2004, 14, 3691-3695; McCalmont, W. F. 등, Bioorg. Med. Chem. 2005, 13, 3821-3839).

<3> 한편, 아직 논쟁의 여지가 있지만 고혈압 치료제인 L-형 칼슘채널 차단제는 T-형 칼슘채널 차단제와 반

대로 노년층에서 암 유발의 가능성이 있고, 실례로 세포사멸의 억제를 통하여 신체에 존재하는 기존 암세포의 성장을 촉진한다는 연구결과가 보고되었다(La Vecchia, C. 등, Eur. J. Cancer 2003, 39, 7-8).

- <4> 상기와 같은 사실을 기초로 본 발명자들은 선택적인 T-형 칼슘채널 차단제가 비정상인 세포주기를 가진 암세포를 치료하는 새로운 약물이 될 수 있음에 착안하였다.
- <5> 한편, 본 발명자들은 등록특허 제0610731호에서 T-형 칼슘채널 차단제로서 유용한 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 및 그 제조방법에 대해 개시한 바 있다. 그러나 이들 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체의 인간 암 세포주 억제 활성 및 항암 용도로의 적용에 대해서는 아직 공지되거나 연구된 바 없다.
- <6> 이에 따라 본 발명자들은 선택적인 T-형 칼슘채널 차단제인 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체의 인간 암 세포주에 대한 항암 활성을 처음으로 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

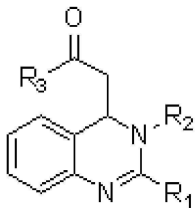
발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <7> 따라서 본 발명의 목적은 본 발명자들이 이미 개발한 선택적인 T-형 칼슘채널 차단제인 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체의 항암제로서의 신규한 용도를 제공하고자 하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <8> 본 발명은 하기 화학식 (I)로 표시되는 3,4-디히드로퀴나졸린(3,4-dihydroquinazoline) 유도체의 신규한 용도에 관한 것이다. 본 발명은 하기 화학식 (I)로 표시되는 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물을 제공한다.

- <9> [화학식 1]



<10>

- <11> 상기 식에서,

- <12> R₁은 5-아미노페틸아미노, 디메틸아미노 또는 피페리딘-1-일이고;

- <13> R₂는 4-바이페닐, 에틸 또는 페닐이고;

- <14> R₃는 메톡시, 벤질아미노, 4-아미노벤질아미노, 4-플루오로벤젠설포아미노벤질 또는 4-메틸벤젠설포아미노벤질이다.

- <15> 본 발명의 바람직한 화합물로는 다음과 같다:

- <16> 4-(메틸아세테이트)-3-바이페닐-2-(5-아미노펜틸아미노)-3,4-디히드로퀴나졸린 (KYS05044);

- <17> 4-(N-벤질아세트아미노)-3-에틸-2-(디메틸아미노)-3,4-디히드로퀴나졸린 (KYS05075);

- <18> 4-(N-벤질아세트아미노)-3-에틸-2-(피페리딘-1-일)-3,4-디히드로퀴나졸린 (KYS05074);

- <19> 4-[N-(4-아미노벤질)아세트아미노]-3-페닐-2-(피페리딘-1-일)-3,4-디히드로퀴나졸린 (KYS05040);

- <20> 4-{N-[4-(4-플루오로벤젠설포아미노)벤질]아세트아미노}-3-에틸-2-(디메틸아미노)-3,4-디히드로퀴나졸린 (KYS05071);

- <21> 4-{N-[4-(4-메틸벤젠설포아미노)벤질]아세트아미노}-3-에틸-2-(디메틸아미노)-3,4-디히드로퀴나졸린 (KYS05070);

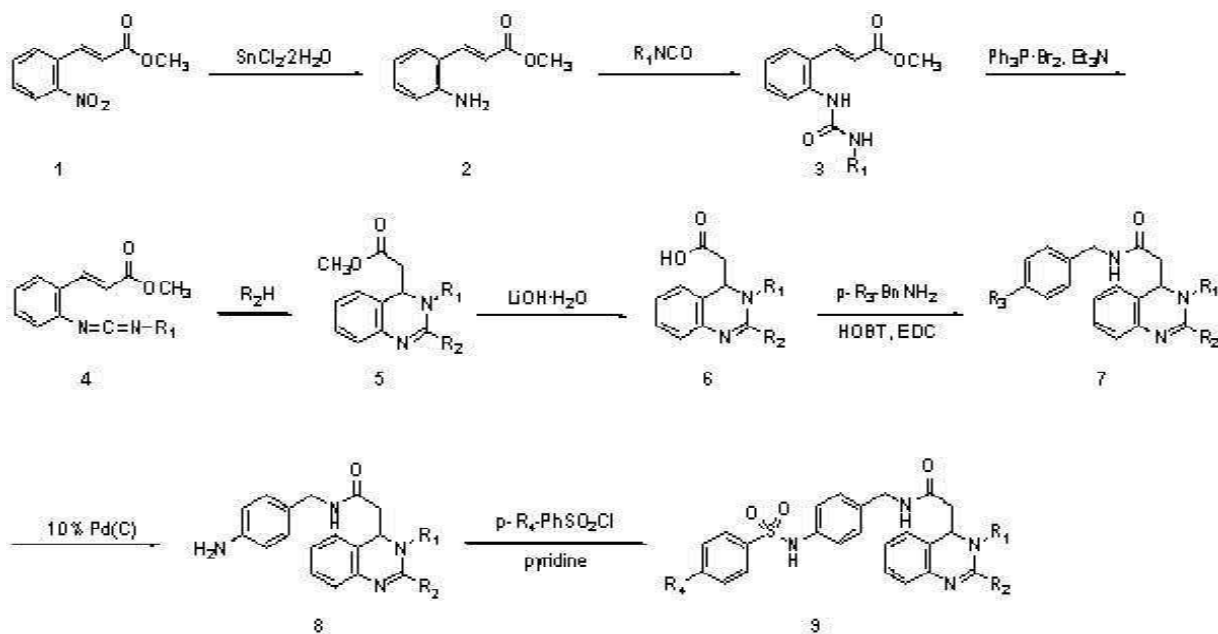
- <22> 4-{N-[4-(4-메틸벤젠설포아미노)벤질]아세트아미노}-3-페닐-2-(피페리딘-1-일)-3,4-디히드로퀴나졸린 (KYS05041);

- <23> 4-{N-[4-(4-메틸벤젠설포아미노)벤질]아세트아미노}-3-에틸-2-(피페리딘-1-일)-3,4-디히드로퀴나졸린

(KYS05064).

- <24> 상기 화학식 (I)의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체는 각종 인간 암세포주에 대하여 강한 성장 억제 활성을 나타내므로 항암제로서 유용한 약리효과를 나타내게 된다.
- <25> 본 발명에 따른 화학식 (I)의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체를 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물은 목적하는 바에 따라 비경구 투여하거나 경구 투여할 수 있다. 상기 화학식 (I)의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체는 활성성분 단독으로 또는 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 항암제 조성물로 제조할 수 있다.
- <26> 본 발명에 따른 화학식 (I)의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체를 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물에는 당업계에서 통상적으로 사용되는 부형제, 붕해제, 활택제 등을 당업자에게 통상적인 방법으로 포함시킬 수 있다.
- <27> 또한, 본 발명에 따른 화학식 (I)의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체를 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물은 당업자에게 공지된 통상적인 방법에 의해 정제, 캡셀제, 산제, 과립제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 액제 또는 비경구 투여용 제제와 같은 단위 투여형 또는 수회 투여형 제제로서 제형화할 수 있다.
- <28> 본 발명에 따른 화학식 (I)의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체를 유효성분으로 포함하는 항암제 조성물에서 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체의 유효 투여량의 범위는 예를 들어 1일당 1 내지 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이나, 이에 제한되지 않는다. 당업자라면, 임의의 특정 대상체에 대해, 개별 대상체의 필요 및 조성물을 투여하거나 조성물의 투여를 감독하는 사람의 전문가적 판단에 따라 특정 투여법이 시간에 따라 조정되어야 하고, 본원에서 제시한 투여량의 범위는 단지 예시일 뿐이고 청구된 조성물의 범위 또는 실행 범위를 제한하려는 것이 아님을 이해할 것이다.
- <29> 상기 화학식 (I)의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체는 본 발명자들의 기존특허인 한국등록특허 제0610731호에 개시된 바와 같은 제법에 의해 제조될 수 있다. 구체적으로 하기 반응식 (I)을 참조하여 설명하면 다음과 같다.
- <30> 먼저 출발물질인 메틸 2-니트로신나메이트 (1, methyl 2-nitrocinnamate)를 70℃의 바람직한 온도에서 SnCl_2 로 처리하여 니트로기를 아민기로 환원하여 화합물 (2)를 제조하였다. 아민화합물 (2)을 벤젠 용매를 사용하고 다양한 페닐이소시네이트 (phenylisocyanate)를 가하고 상온에서 교반하여 요소(urea)형태의 생성물 (3)을 용이하게 얻었다.
- <31> 그리고 이러한 요소(urea) 화합물은 디브로모트리페닐포스핀 (dibromotriphenylphosphine)과 트리에틸아민을 이용한 탈수화 과정을 통해 카보디이미드 화합물(4)을 용이하게 제조하였다.
- <32> 카보디이미드 화합물 (4)에 다양한 아민 친핵체를 반응시키면 카보디이미드 기의 중심탄소에 헤테로원자가 친핵 부가반응을 하고, 다시 분자내 연속적인 1,4-부가반응을 통하여 본 발명의 중간체 화합물인 3,4-디히드로퀴나졸린 (5, 3,4-dihydroquinazoline)을 제조하였다.
- <33> 본 발명의 중간체 화합물(5)의 메틸 에스테르기를 테트라히드로푸란(THF)과 물의 혼합용매에서 수산화리튬으로 가수분해하여 카르복산 화합물(6)을 정량적으로 얻었다. 다음으로 카르복산 화합물(6)에 1-[3-(디메틸아민)프로필]-3-에틸카보디이미드 염산 (EDC)과 1-히드록시벤조트리아졸 (HOBt)를 사용하여 다양한 아민과 반응하여 아미도 화합물 (7)을 얻었다.
- <34> 화합물 (7)의 R_3 이 니트로기(NO_2)인 경우, 팔라듐(Pd)의 금속 촉매하에서 수소화 반응을 통하여 아미노기로 환원한 후, 아민 화합물 (8)와 다양한 설포닐할라이드와 결합반응을 통하여 화합물 (9)을 제조하였다.

반응식 1



<35>

<36>

이하에서는 상기 화합물 중 4-{N-[4-(4-메틸벤젠설포아미도)벤질]아세트아미도}-3-페닐-2-(피페리딘-1-일)-3,4-디히드로퀴나졸린 (KYS05041)의 제법을 실시예를 들어 구체적으로 서술하나, 이는 본 발명을 예시하는 것이며 본 발명이 실시예로 제한되는 것은 아니다.

<37>

실시예 1: 메틸 2-아미노신나메이트 (2)의 제조

<38>

메틸 2-니트로신나메이트 (1, 0.202 g, 0.975 mmol)를 에틸 아세테이트 (20.0 ml)에 녹이고 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.11 g, 4.87 mmol)를 가하였다. 이 용액을 70 °C에서 60분 동안 가열하고, 반응이 종결되면 상온으로 냉각하였다. 포화된 중탄산나트륨(sodium bicarbonate) 수용액으로 용액을 약한 염기성이 되게 한 후, 미세한 진흙층(celite)으로 여과하였다. 물층을 에틸 아세테이트로 3번 추출하고 모아진 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 감압 하에서 용매를 제거하였다. 반응 혼합물을 관-크로마토그래피 (헥산:에틸 아세테이트 = 5:1)로 정제하여 노란색 고체의 생성물 (2) (0.161 g, 93%)를 얻었다: mp 67 °C; IR (KBr) 3365, 2364, 1704, 1622, 1330, 1198, 756 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.86 (d, $J=15.9$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Me}$), 7.40 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, aromatic), 7.19 (t, $J=7.2$ Hz, 1H, aromatic), 6.78 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, aromatic), 6.72 (d, $J=7.5$ Hz, 1H, aromatic), 6.38 (d, $J=15.9$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Me}$) 4.02 (br, 2H, $-\text{NH}_2$), 3.82 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 168.0, 145.9, 140.6, 131.6, 128.3, 120.1, 119.2, 117.9, 117.0, 51.9.

<39>

실시예 2: 메틸 3-[2-(3-페닐우레이도)페닐]아크릴레이트 (3)의 제조

<40>

메틸 2-아미노신나메이트 (2) (6.35 g, 35.8 mmol)을 벤젠 (150 ml)에 녹이고 페닐 이소시아네이트 (5.12g, 43.0 mmol)를 상온에서 천천히 적가하였다. 반응 혼합물을 12시간 동안 교반하고 생성된 고체 침전물을 에테르로 세척하였다. 흰색의 고체 화합물 (3) (10.2 g, 96%)을 얻었다: mp 184 °C; IR (KBr) 3346, 3278, 1724, 1650, 1548, 1322, 1172, 758, 672 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 8.94 (s, 1H, $-\text{NH}-\text{CO}-$) 8.49 (s, 1H, $-\text{NH}-\text{CO}-$) 7.89 (d, $J=15.9$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Me}$), 7.76 (d, $J=7.8$ Hz, 2H, aromatic), 7.46 (d, $J=8.4$ Hz, 2H, aromatic) 7.39 (t, $J=8.1$ Hz, 1H, aromatic), 7.28 (t, $J=7.8$ Hz, 2H, aromatic) 7.12 (t, $J=7.5$ Hz, 1H, aromatic) 6.97 (t, $J=7.8$ Hz, 1H, aromatic), 6.58 (d, $J=15.3$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CO}_2\text{Me}$), 3.73 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO) δ 167.4, 153.5, 140.5, 140.3, 138.5, 131.4, 129.5, 127.8, 126.8, 124.6, 124.4, 122.7, 119.5, 118.9, 52.2.

<41>

실시예 3: 메틸 3-[2-(페닐이미노메틸렌아미노)페닐]아크릴레이트 (4)의 제조

<42>

화합물 3 (6.04 g, 20.4 mmol)과 트리에틸아민 (6.19g, 61.2 mmol)을 디클로로메탄 (30.0 ml)에 녹인 용액에 디브로모트리페닐 포스핀 (dibromotriphenyl- phosphine) (12.9 g, 30.6 mmol)을 0°C 에서 천천히 가하

었다. 이 용액을 1시간 교반한 후, 디클로로메탄으로 3번 추출하였다. 모아진 유기층을 무수 황산나트륨(sodium sulfate)으로 건조시키고 감압 하에서 용매를 제거하였다. 반응 혼합물을 관 크로마토그래피(헥산:에틸 아세테이트 = 20:1)로 정제하여 흰색의 고체 화합물인 카보디이미드(carbodiimide) 생성물 (4) (4.26g, 75%)를 얻었다: mp 54 °C; IR (KBr) 2142, 1716, 1484, 1172, 756, 59 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.18 (d, *J*=16.2 Hz, 1H, -CH=CH-CO₂Me), 7.56 (d, *J*=7.8 Hz, 1H, aromatic), 7.36-7.29 (m, 3H, aromatic), 7.25 (d, *J*=7.8 Hz, 1H, aromatic), 7.20-7.13 (m, 4H, aromatic), 6.52 (d, *J*=16.2 Hz, 1H, -CH=CH-CO₂Me), 3.80 (s, 3H, -OCH₃); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 167.5, 140.5, 138.4, 138.0, 134.3, 131.3, 129.8, 129.0, 127.8, 126.1, 126.0, 125.9, 124.6, 119.6, 52.0.

<43> 실시예 4: 4-메톡시카르보닐메틸-2-(1-피페리디닐)-3-페닐-3,4-디히드로퀴나졸린 (5)의 제조

<44> 화합물 (4) (0.605 g, 2.17 mmol)를 벤젠 (20 ml)에 녹이고 피페리딘 (0.222 g, 2.60 mmol)을 상온에서 천천히 적가하였다. 반응 혼합물을 2시간 동안 교반한 후, 반응이 종결되면 물과 소금물로 세척하였다. 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 감압 하에서 용매를 제거하였다. 반응 혼합물을 관 크로마토그래피(CH₂Cl₂:MeOH=10:1)로 정제하여 흰색의 고체 화합물 (6) (0.632 g, 80%)을 얻었다: mp 109 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.28-7.17 (m, 4H, aromatic), 7.09-7.01 (m, 3H, aromatic), 6.97-6.89 (m, 2H, aromatic), 5.10 (dd, *J*=4.5 and 10.8 Hz, 1H, -CH₂-CH-N-), 3.79 (s, 3H, -OCH₃), 3.42 (s, 4H, piperidiny), 2.85 (dd, *J*=10.8 and 15.3 Hz, 1H, -CO-CH₂-), 2.52 (dd, *J*=4.7 and 15.5 Hz, 1H, -CO-CH₂-), 1.55-1.50 (m, 2H, piperidiny), 1.43-1.40 (m, 4H, piperidiny); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 172.2, 153.2, 146.3, 144.4, 129.4, 128.6, 126.1, 124.9, 124.1, 123.1, 122.6, 122.4, 61.2, 52.0, 47.0, 39.8, 25.7, 25.0; HRMS (FAB, M⁺H) Calcd for C₂₂H₂₆N₃O₂ 364.2025, found 364.2019.

<45> 실시예 5: 4-카르복시-2-(1-피페리디닐)-3-페닐-3,4-디히드로퀴나졸린 (6)의 제조

<46> 화합물 (5) (0.235g, 0.645 mmol)를 테트라히드로퓨란/물 (1:1, 10 ml)에 녹이고 수산화리튬의 수화물 (0.135 g, 3.23 mmol)을 상온에서 가한 후, 60 °C에서 2시간 교반하였다. 반응이 종결되면 pH를 3-4로 맞추고 디클로로메탄으로 3번 추출하였다. 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 감압 하에서 용매를 제거한 후, 흰색의 고체 화합물 6을 정량적으로 얻었다: mp 238 °C; ¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 7.57 (d, *J*=7.8 Hz, 1H, aromatic), 7.45-7.26 (m, 7H, aromatic), 7.19 (m, 1H, aromatic), 5.29 (dd, *J*=6.3 and 9.3 Hz, 1H, -CH₂-CH-N-), 3.36 (s, 4H, piperidiny), 2.88 (dd, *J*=9.3 and 15.0 Hz, 1H, -CO-CH₂-), 2.69 (dd, *J*=6.3 and 15.1 Hz, 1H, -CO-CH₂-), 1.46-1.23 (m, 6H, piperidiny); ¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 174.6, 153.1, 143.7, 132.7, 130.1, 129.1, 127.5, 127.3, 126.3, 125.7, 124.7, 118.0, 62.8, 49.5, 42.6, 24.6, 23.3.

<47> 실시예 6: 4-[*N*-(4-니트로벤질)아세트아미도]-2-(1-피페리디닐)-3-페닐-3,4-디히드로퀴나졸린 (7)의 제조

<48> 화합물 (6) (0.22 g, 0.63 mmol)과 1-히드록시벤조트리아졸 (HOBt) (0.13 g, 0.94 mmol)을 디클로로메탄/테트라히드로퓨란 (1:1, 20 ml)에 녹이고 0 °C에서 4-니트로벤질아민 (0.18 mg, 0.94 mmol)을 적가하였다. 같은 온도에서 1시간 동안 교반한 후, 1-[3-(디메틸아민)프로필]-3-에틸카보디이미드염산 (EDC) (0.14 g, 0.75 mmol)을 가하고 실온에서 다시 12시간 동안 교반하였다. 반응이 종결되면 감압 하에서 용매를 제거하고 반응 혼합물을 디클로로메탄에 녹였다. 그 용액을 0.5 M 염산 수용액으로 2회, 포화 NaHCO₃ 수용액으로 2회, 그리고 물로 1회 추출하고 소금물로 세척하였다. 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 감압 하에서 용매를 제거하였다. 반응 혼합물을 관 크로마토그래피(CH₂Cl₂:MeOH=10:1)로 정제하여 흰색의 고체 화합물 (7) (0.24g, 80%)을 얻었다: IR (KBr) 3192, 2932, 2848, 1668, 1552, 1486, 1430, 1344, 1282, 756 cm⁻¹; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.58 (br, 1H, -CO-NH-CH₂-), 8.15 (d, *J*=8.7 Hz, 2H, -CH₂-C₄H₄-NO₂), 7.49 (d, *J*=8.1 Hz, 2H, -CH₂-C₄H₄-NO₂), 7.27-7.20 (m, 2H, aromatic), 7.15-7.02 (m, 4H, aromatic), 6.95-6.87 (m, 3H, aromatic), 5.23 (dd, *J*=6.0 and 8.7 Hz, 1H, -CH₂-CH-N-), 4.67 (dd, *J*=6.7 and 12.1 Hz, 1H, -NH-CH₂-), 4.58 (dd, *J*=5.7 Hz and 15.3 Hz, 1H, -NH-CH₂-), 3.10 (br, 4H, piperidiny), 2.58 (dd, *J*=9.0 and 14.7 Hz, 1H, -CO-CH₂-), 2.32

(dd, $J=6.1$ and 14.2 Hz, 1H, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 1.35 (br, 2H, piperidiny), 1.13 (br, 4H, piperidiny); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 170.9, 154.3, 147.4, 146.5, 145.9, 143.1, 129.5, 129.0, 128.5, 127.0, 125.4, 124.7, 124.0, 123.1, 123.0, 122.0, 60.8, 47.5, 43.2, 41.6, 25.2, 24.6; HRMS (FAB, M+H) Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_3$ 484.2349, found 484.2341.

<49> 실시예 7: 4-[*N*-(4-아미노벤질)아세트아미도]-2-(1-피페리디닐)-3-페닐-3,4-디히드로퀴나졸린 (8)의 제조

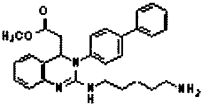
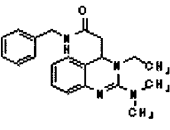
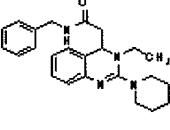
<50> 화합물 (7) (1.39 g, 2.87 mmol)과 10 % Pd(C) (0.28 g)을 메탄올 (40 ml)에 녹이고 수소 대기 하에서 2시간 동안 교반하였다. 반응이 종결되면 반응 혼합물을 Celite 545로 여과하고 감압 하에서 용매를 제거하였다. 반응 혼합물을 관 크로마토그래피 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=10:1$)로 정제하여 아민 화합물(1.26 g, 97%)을 얻었다. IR (KBr) 3218, 2930, 2850, 1648, 1550, 1480, 1430, 1350, 1282, 732 cm^{-1} ; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.26-7.22 (m, 2H, aromatic), 7.20-7.11 (m, 4H, aromatic), 7.07-7.02 (m, 3H, aromatic), 6.96-6.90 (m, 2H, aromatic), 6.60-6.56 (m, 2H, aromatic), 6.37 (br, 1H, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$), 5.17 (dd, $J=5.1$ and 9.6 Hz, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{N}-$), 4.32 (d, $J=5.7$ Hz, 2H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-$), 3.51 (br, 2H, $-\text{C}_4\text{H}_4-\text{NH}_2$), 3.26 (br, 4H, piperidiny), 2.57 (dd, $J=10.2$ and 14.1 Hz, 1H, $-\text{CO}-\text{CH}_2$), 2.31 (dd, $J=5.4$ and 14.1 Hz, 1H, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 1.43 (br, 2H, piperidiny), 1.26 (br, 4H, piperidiny); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169.7, 153.3, 145.7, 145.2, 141.0, 129.5, 129.2, 128.2, 128.1, 126.7, 124.8, 124.6, 123.2, 123.1, 121.5, 115.0, 61.2, 47.6, 43.2, 41.7, 24.8, 24.2; HRMS (FAB, M+H) Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}$ 454.2607, found 454.2654.

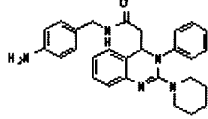
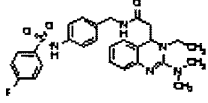
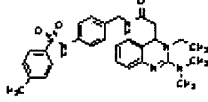
<51> 실시예 8: 4-{*N*-[4-(4-메틸벤질설폰아미도)벤질]아세트아미도}-3-페닐-2-(피페리딘-1-일)-3,4-디히드로퀴나졸린 (9: KYS05041)의 제조

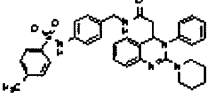
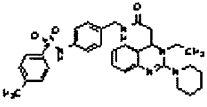
<52> 화합물 8 (0.202 g, 0.4460mmol)을 디클로로메탄 (10 ml)에 녹이고 피리딘 (0.106 g, 1.34 mmol)을 가하였다. 그리고 0 $^{\circ}\text{C}$ 에서 디클로로메탄 (5 ml)에 녹인 4-메틸벤질설폰아미드 클로라이드 (0.102 g, 0.535 mmol)을 천천히 적가하고 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 반응이 종결되면 물을 가한 후, 디클로로메탄으로 3번 추출하고 소금물로 세척하였다. 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 감압 하에서 용매를 제거한 후, 반응 혼합물을 관 크로마토그래피 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=10:1$)로 정제하여 흰색의 고체 화합물 9 (KYS05041) (0.256 g, 94%)를 얻었다: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) 7.66 (d, $J= 8.4$ Hz, 1H, aromatic), 7.58-7.73 (m, 3H, aromatic), 7.28-7.21 (m, 3H, aromatic), 7.18-6.95 (m, 12H, aromatic), 5.19 (dd, $J= 5.2$ and 10.1 Hz, 1H, $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{N}-$), 4.35 (dd, $J= 6.1$ and 14.2 Hz, 1H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-$), 4.24 (dd, $J= 5.5$ and 14.8 Hz, 1H, $-\text{NH}-\text{CH}_2-$), 3.28 (br, 4H, piperidiny), 2.82 (dd, $J=10.5$ and 14.4 Hz, 1H, $-\text{CO}-\text{CH}_2$), 2.36 (dd, $J=5.2$ and 14.0 Hz, 1H, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 2.29 (s, 3H, $-\text{SO}_2-\text{C}_4\text{H}_4-\text{CH}_3$), 1.33 (br, 2H, piperidiny), 1.20 (br, 4H, piperidiny); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) 170.4, 154.0, 144.9, 143.6, 138.9, 136.9, 136.7, 134.7, 129.8, 129.2, 129.0, 128.9, 127.3, 126.2, 125.9, 125.4, 124.4, 124.0, 121.1, 121.0, 61.7, 48.6, 43.2, 41.9, 24.8, 24.2, 21.7; HRMS (FAB, M+H) Calcd for $\text{C}_{35}\text{H}_{38}\text{N}_5\text{O}_3\text{S}$ 608.2695, found 608.2680.

<53> 상술한 제법을 이용하여 제조되는 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체의 물리·화학적 성질은 표 1에 정리하였다.

표 1

번호	구조식	광화학적 성질
1	 KYS05044	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 7.58-6.91 (13H, m, Ph), 5.10 (1H, t, J=7.1 Hz, -CO-CH ₂ -CH-N-), 3.66 (3H, s, CH ₃ O-), 3.46-3.30 (2H, m, -N-CH ₂ -CH ₂ -) 2.87 (1H, dd, J=7.1, 14.9 Hz, -CO-CH-CH-N-), 2.74-2.65 (3H, m, -CO-CH-CH-N- & -CH ₂ -CH ₂ -NH ₂), 1.78-1.27 (6H, m, -CH ₂ -C ₃ H ₆ -CH ₂ -) ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ 171.5, 147.1, 141.1, 137.0, 135.4, 129.1, 128.9, 128.5, 127.0, 126.9, 125.7, 123.3, 122.3, 115.1, 56.2, 52.1, 47.8, 41.7, 39.1, 32.3, 28.3, 25.0, 24.1 ES-MS (m/z, M+1) 457; HRMS (FAB, M+1) calcd for C ₂₈ H ₃₃ N ₄ O ₂ 457.2604, found 457.2608.
2	 KYS05075	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 8.87(1H, br, -CO-NH-CH ₂ -), 7.30-7.17 (6H, m, aromatic), 6.99-6.77 (3H, m, aromatic), 4.73 (1H, dd, J=5.0 and 8.9 Hz, -CH ₂ -CH-N-), 4.48 (1H, dd, J=5.6 and 14.3 Hz, -NH-CH ₂ -), 4.36 (1H, dd, J=5.3 and 14.6 Hz, -NH-CH ₂ -), 3.16-3.00 (2H, m, -N-CH ₂ CH ₃), 2.60 (6H, s, -NMe ₂), 2.29 (1H, dd, J=9.8 and 13.7 Hz, -CO-CH ₂ -), 1.98 (1H, dd, J=4.1 and 14.0 Hz, -CO-CH ₂ -), 0.91 (3H, t, J=6.6, -N-CH ₂ CH ₃)
3	 KYS05074	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 8.07(1H, br, -CO-NH-CH ₂ -), 7.36-7.25 (5H, m, aromatic), 7.11-6.82 (4H, m, aromatic), 4.81 (1H, dd, J=5.6 and 8.9 Hz, -CH ₂ -CH-N-), 4.53 (1H, dd, J=5.9 and 14.6 Hz, -NH-CH ₂ -), 4.41 (1H, dd, J=6.0 and 14.4 Hz, -NH-CH ₂ -), 3.35-2.97(6H, m, piperidinyll and -N-CH ₂ CH ₃), 2.33 (1H, dd, J=9.3 and 14.4 Hz, -CO-CH ₂ -), 2.10 (1H, dd, J=5.7 and 14.1 Hz, -CO-CH ₂ -), 1.43 (6H, br, piperidinyll), 1.02 (3H, t, J=7.2, -N-CH ₂ CH ₃); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ 170.1, 157.3, 142.5, 138.5, 128.5, 128.2, 128.0, 127.3, 127.1, 124.4, 123.1, 121.8, 55.3, 47.3, 43.5, 41.9, 25.7, 24.6, 14.3.

4	 KYS05040	IR (KBr) 3218, 2930, 2850, 1648, 1550, 1480, 1430, 1350, 1282, 732 cm^{-1}; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.26-7.22 (2H, m, aromatic), 7.20-7.11 (4H, m, aromatic), 7.07-7.02 (3H, m, aromatic), 6.96-6.90 (2H, m, aromatic), 6.60-6.56 (2H, m, aromatic), 6.37 (1H, br, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$), 5.17 (1H, dd, $J=5.1$ and 9.6 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{N}-$), 4.32 (2H, d, $J=5.7$ Hz, $-\text{NH}-\text{CH}_2-$), 3.51 (2H, br, $-\text{C}_4\text{H}_4-\text{NH}_2$), 3.26 (4H, br, piperidiny), 2.57 (1H, dd, $J=10.2$ and 14.1 Hz, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 2.31 (1H, dd, $J=5.4$ and 14.1 Hz, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 1.43 (2H, br, piperidiny), 1.26 (4H, br, piperidiny); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169.7, 153.3, 145.7, 145.2, 141.0, 129.5, 129.2, 128.2, 128.1, 126.7, 124.8, 124.6, 123.2, 123.1, 121.5, 115.0, 61.2, 47.6, 43.2, 41.7, 24.8, 24.2; HRMS (FAB, $\text{M}+\text{H}$) Calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_5\text{O}$ 454.2607, found 454.2654.
5	 KYS05071	^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 10.0 (1H, br, $\text{Ts}-\text{NH}-$), 8.18 (1H, br, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$), 7.91-7.79 (3H, m, aromatic), 7.51 (1H, d, $J=7.8$ Hz, aromatic), 7.30-6.95 (8H, m, aromatic), 5.02 (1H, dd, $J=4.2$ and 10.2 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{N}-$), 4.30-4.26 (2H, m, $-\text{Ph}-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 3.29 (2H, q, $J=6.9$ Hz, $-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.95 (6H, br, $\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 2.86 (1H, dd, $J=10.7$ and 14.0 Hz, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 2.35 (1H, dd, $J=4.7$ and 14.0 Hz, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 1.13 (3H, t, $J=7.1$ Hz, $-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) 169.5, 166.9, 163.5, 155.8, 136.5, 135.6, 135.2, 133.2, 130.4, 130.3, 129.4, 129.3, 128.6, 128.5, 126.6, 124.9, 121.4, 118.9, 116.5, 116.4, 116.2, 116.1, 115.5, 115.2, 56.1, 48.5, 43.0, 41.8, 40.7, 14.4; HRMS (FAB, $\text{M}+\text{H}$) Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{FN}_5\text{O}_3\text{S}$ 524.2132, found 524.2141.
6	 KYS05070	^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.51 (1H, br, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$), 7.68 (2H, d, $J=8.1$ Hz, aromatic), 7.56 (1H, d, $J=7.2$ Hz, aromatic), 7.11-6.94 (9H, m, aromatic), 4.85 (1H, m, $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{N}-$), 4.31-4.00 (2H, m, $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-$), 3.02-3.00 (2H, m, $-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.73 (6H, s, $-\text{NMe}_2$), 2.76 (1H, m, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 2.17 (3H, s, $-\text{SO}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$), 2.00 (1H, m, $-\text{CO}-\text{CH}_2-$), 0.89 (3H, t, $J=6.9$ Hz, $-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_3$); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 169.0, 155.1, 143.0, 136.3, 134.5, 132.7, 129.2, 129.0, 128.5, 127.0, 126.0, 125.7, 124.2, 120.6, 118.5, 55.6, 47.9, 42.4, 41.2, 40.3, 21.1, 13.7.

7	 KYS05041	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 7.66 (d, <i>J</i> =8.4 Hz, 1H, aromatic), 7.58-7.73 (m, 3H, aromatic), 7.28-7.21 (m, 3H, aromatic), 7.18-6.95 (m, 12H, aromatic), 5.19 (dd, <i>J</i> =5.2 and 10.1 Hz, 1H, -CH ₂ -CH-N-), 4.35 (dd, <i>J</i> =6.1 and 14.2 Hz, 1H, -NH-CH ₂ -), 4.24 (dd, <i>J</i> =5.5 and 14.8 Hz, 1H, -NH-CH ₂ -), 3.28 (br, 4H, piperidiny), 2.82 (dd, <i>J</i> =10.5 and 14.4 Hz, 1H, -CO-CH ₂ -), 2.36 (dd, <i>J</i> =5.2 and 14.0 Hz, 1H, -CO-CH ₂ -), 2.29 (s, 3H, -SO ₂ -C ₄ H ₄ -CH ₃), 1.33 (br, 2H, piperidiny), 1.20 (br, 4H, piperidiny); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ 170.4, 154.0, 144.9, 143.6, 138.9, 136.9, 136.7, 134.7, 129.8, 129.2, 129.0, 128.9, 127.3, 126.2, 125.9, 125.4, 124.4, 124.0, 121.1, 121.0, 61.7, 48.6, 43.2, 41.9, 24.8, 24.2, 21.7; HRMS (FAB, M+H) Calcd for C ₃₅ H ₃₈ N ₅ O ₃ S 608.2695, found 608.2680.
8	 KYS05064	¹ H NMR (300 MHz, CDCl ₃) δ 8.28 (t, <i>J</i> =5.5 Hz, 1H, -CO-NH-CH ₂ -), 7.72 (d, <i>J</i> =8.4 Hz, 2H, aromatic), 7.63 (d, <i>J</i> =7.8 Hz, 1H, aromatic), 7.18-7.02 (m, 9H, aromatic), 4.99 (dd, <i>J</i> =5.0 and 10.4 Hz, 1H, -CH ₂ -CH-N-), 4.22 (m, 2H, -NH-CH ₂ -), 3.38-3.22 (m, 6H, piperidiny and -N-CH ₂ CH ₃), 2.83 (dd, <i>J</i> =10.5 and 14.1 Hz, 1H, -CO-CH ₂ -), 2.29 (s, 3H, -SO ₂ -C ₄ H ₄ -CH ₃), 2.22 (dd, <i>J</i> =4.7 and 14.2 Hz, 1H, -CO-CH ₂ -), 1.45 (br, 6H, piperidiny), 1.09 (t, <i>J</i> =7.0 Hz, 3H -N-CH ₂ CH ₃); ¹³ C NMR (75 MHz, CDCl ₃) δ 169.3, 155.2, 143.3, 136.5, 136.4, 134.5, 133.8, 129.4, 128.8, 127.2, 126.4, 125.9, 124.4, 120.8, 119.1, 77.2, 55.4, 48.2, 42.6, 41.3, 25.1, 23.5, 21.4, 14.1.

<56>

<57>

생리활성검색

<58>

본 발명에 따른 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체의 T- 및 N-형 칼슘채널의 차단 효과는 본 발명자의 기존특허[한국 등록특허 제0610731호]와 공지문헌(Monteil, A. 등, J. Biol. Chem. 2000, 275, 6090-6100)에 기술한 바와 같이 T-형 칼슘채널의 유전자 중 신경세포에 주로 존재하는 α_{1G}와 N-형 칼슘채널의 유전자 중 α_{1B}만을 선택적으로 발현시킨 포유동물 HEK 293 세포주 (인간 신장 암종 세포 유래)를 각각 이용하여 전기생리학적 전세포 패치 클램프 방법을 사용하여 T-형 및 N-형 칼슘채널의 활성화에 대하여 검색하였다. 또한 본 발명에 따른 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체의 세포독성을 확인하기 위하여 세포독성 검색법인 MTT 분석법을 사용하여 세포독성을 검사하였다. 마지막으로 본 발명의 주 목적인 암세포 성장 억제 효과를 확인하기 위하여 공지의 방법 (Skehan, P. 등 J. Natl Cancer Inst. 1990, 82, 1107-1112)인 SRB 분석법을 사용하여 항암효과를 검사하였다.

<59>

시험예 1: HEK 293 cell 배양법 및 전기생리학적 방법을 이용한 T- 및 N-형 칼슘 채널 활성 측정법

<60>

배양용액은 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum), 1% 페니실린/스트렙토마이신 (v/v)을 넣어 만들어 사용하고 세포는 95% 공기/ 5% CO₂의 습한 조건의 인큐베이터에서 온도 36.5 °C에서 배양하였다. 배양용액은 3-4일에 한번씩 바꾸어주고 세포는 매 일주일마다 분주(sub-culture)해주며 G-418 (0.5 mg/ml) 용액을 사용하여 α_{1G} T-형 칼슘채널을 발현시킨 세포 (HEK 293) 만을 자라게 하였다. T-형 칼슘채널 활성 측정법에 사용된 세포들은 매번 분주할 때 폴리-L-리신 (0.5 mg/ml)으로 코팅 처리한 커버 슬립에 배양한 후 2-7일 후에 기록하였다. 단일세포 수준에서 T-형 칼슘채널의 전류 측정을 위해 EPC-9 증폭기 (HEKA, German)를 사용하여 전기생리학적 전세포 패치 클램프 방법으로 측정하였다. T-형 칼슘 채널 활성측정법의 용액조성으로는 세포 외부용액으로 NaCl 140 mM, CaCl₂ 2 mM, HEPES 10 mM (pH 7.4)을 사용하고 세포 내부용액으로는 KCl 130 mM, HEPES 10 mM, EGTA 11 mM, MgATP 5 mM (pH 7.4)을 사용하였다. 낮은 전압에서 활성화되는 T-형 칼슘채널 활성 프로토콜로는 위에서 만든 세포 내부용액을 넣은 3-4 MΩ 저항의 미세유리 전극을 단일세포에 찔러 전세포 기록(whole-cell recording) 모드가 되게 한 후 세포막 전위를 -100 mV로 고정 한 후 매 10초마다 -30 mV (50 ms 지속시간)로 저분극 시켰을 때의 T-형 칼슘채널 활성화로 인한 내향전류의

크기를 측정하였다. N-형 칼슘채널의 경우, α_{1B} N-형만을 발현하는 세포 (HEK293)를 이용하여 Ca^{2+} 전류를 측정하였다. N-형 칼슘 채널 활성측정법의 용액조성으로는 세포 외부용액으로 [151 mM TEACl, 5 mM BaCl₂, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 10 mM 글루코오스 (pH 7.4)]을 사용하고 세포 내부용액으로는 [100 mM CsCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM BAPTA, 3.6 mM MgATP, 0.1 mM GTP, 14 mM 포스포크레아틴 50 units/ml 크레아틴 포스포키나아제 (pH 7.4)]를 사용하여, 세포막 전위를 매 15초마다 -80 mV에서 0 mV (200ms duration)로 저분극 시켰을 때의 N-형 칼슘채널 활성으로 인한 내향전류의 크기를 측정하였다.

<61> 시험예 2: MTT 분석법을 이용한 T-형 칼슘채널 차단제 세포독성 검색

<62> 본 발명에 따른 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체의 세포 독성 (cytotoxicity) 여부를 측정하기 위하여, HEK 293 세포에서 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT) 분석을 시행하였다. 배양한 HEK 293 세포에 각 화합물을 10, 100 μ M 농도로 처리하고 각 분석의 음성 대조군으로 용매로 사용된 0.1% DMSO, 양성 대조군으로 세포독성이 있다고 알려진 H₂O₂ (125 μ M)를 사용하였다. 약물처리 6시간 후에 PBS에 녹인 MTT (1 mg/ml)를 50 μ l씩 직접 배양한 세포에 처리하고, 4시간 후 상층액을 제거하고 대사된 포르마잔을 DMSO 100 μ l에 용해시켰다. 자동 분광광도계 플레이트 판독기(automated spectrophotometric plate reader)를 이용하여 560 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체는 100 μ M의 농도에서 세포독성이 거의 없었다.

<63> 시험예 3: SRB 분석법을 이용한 암세포성장 억제 검색

<64> 암세포 성장억제효과는 다음과 같은 5개의 암세포주 (cancer cell line)를 사용하여 SRB 분석법 (sulforhodamine B assay)으로 측정하였다: 폐암종 [human lung carcinoma (A-549)], 결장암[human colon cancer (HCT-15)], 표피양암종 [human epidermoid carcinoma (KB)], 악성 흑색종 [malignant melanoma (SK-MEL-2)], 자궁암[human ovarian cancer (SKOV3)]. 각 암세포를 10%의 (V/V) 가열 불활성화된 소태아 혈청 (FBS)을 함유하는 RPMI 1640 (Gibco BRL)의 배양용액을 만들어 사용하고 세포는 95% 공기/ 5% CO₂의 습한 조건의 인큐베이터에서 온도 37 °C에서 배양하였다. 각 암세포를 96-웰 플레이트에 심은 후, 다양한 농도의 각 화합물을 3배수로 처리하고 5% CO₂ 조건의 온도 37 °C에서 암세포가 충분히 성장할 수 있도록 72시간 배양하였다. 배양 후, 100 μ L의 포르말린 용액을 마이크로플레이트의 각 웰에 천천히 가하고 상온에서 30분간 방치하고 수돗물로 5번 세척하였다. 100 μ L의 0.4 % SRB(sulforhodamine B) 용액을 각 플레이트의 웰에 가하고 상온에서 30분간 방치하였다. SRB 용액을 제거하고 공기건조 전에 1%의 초산으로 플레이트를 5번 세척하였다. 결합된 SRB를 10 mM 농도의 비완충 트리스 염기 용액 (Sigma) 100 μ L에 녹이고, 플레이트를 10분간 플레이트 셰이커에 방치하였다. 마이크로플레이트 판독기(Versamax, Molecular Devices)를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하고 성장 억제 농도(growth inhibition concentration)를 GI₅₀ 으로 표시하였다.

<65> 상기와 같은 시험 결과, 본 발명에 따른 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체의 T- 및 N-형 칼슘채널 차단효과와 암세포 성장억제 효과를 하기 표 2에 정리하였다.

표 2

화합물	채널 차단 효과 (억제 %) ^{a, b}		암 세포주 성장 억제: GI ₅₀ (μM) ^c				
	T-type (α _{1G})	N-type (α _{1B})	A-549 ^d	HCT-15 ^e	KB ^f	SK-MEL-2 ^g	SKOV3 ^h
KYS05044	82.5±0.7	No blocking	3.39±0.11	3.64± 0.24	3.77±0.07	3.32±0.20	3.24±0.31
KYS05075	34.4±1.4	27.6±0.5	>200	>200	>200	50.19±2.45	>200
KYS05074	59.3±1.9	9.3±0.5	95.10±19.97	74.16±9.63	108.14±24.43	42.48±0.00	77.84±12.62
KYS05040	43.5±4.5	8.9±1.8	36.60±1.19	33.86±3.86	37.08±0.82	30.73±5.97	39.32±1.28
KYS05071	62.7±2.3	No blocking	66.10±19.10	38.62±3.13	41.63±7.41	31.36±1.53	46.48±5.29
KYS05070	81.3±0.8	8.9±1.8	39.16±6.97	33.89±2.75	33.83±0.56	24.21±5.08	33.44±0.00
KYS05041	89.9±1.3	14.1±2.1	3.06±0.10	2.80±0.28	3.11±0.25	2.70±0.21	2.93±0.00
KYS05064	91.3±0.6	No blocking	23.03±0.75	25.67±8.61	22.28±1.80	3.52±0.18	22.78±5.15
시스플라틴	3.9±2.1	ND ⁱ	0.67±0.67	2.80±1.00	1.50±1.20	4.40±1.40	1.80±0.67

^a 10 μM 농도에서 HEX293 세포의 차단효과; ^b 용량-반응 곡선에서 구한 값 (3번의 반복적인 실험수행); ^c GI₅₀ 값은 용량-반응 곡선에서 구한 값 (3번의 반복적인 실험수행); ^d 폐암종 [human lung carcinoma (A-549)]; ^e 결장암 [human colon cancer (HCT-15)]; ^f 표피양암종 [human epidermoid carcinoma (KB)]; ^g 악성 흑색종 [malignant melanoma (SK-MEL-2)]; ^h 자궁암 [human ovarian cancer (SKOV3)]. ⁱ ND, 측정안함.

<66>

<67>

본 발명에 따른 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체의 항암효과를 비교하기 위하여 대조물질로서 공지 항암제인 시스플라틴(cisplatin)을 사용하였으며 그 결과를 표 2에 함께 나타내었다. 또한 N-형 채널 차단과 항암효과의 상관관계 규명을 위하여 본 발명 화합물의 N-형 채널 차단효과도 표 2에 삽입하였다.

<68>

시험 결과 표 2에 나타난 바와 같이, 대조물질인 시스플라틴은 10 μM에서 T-형 칼슘채널의 차단효과[3.9±2.1% (n = 3)]를 거의 보이지 않았다. 또한 표 2에서 보면, 일반적으로 본 발명에 따른 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체의 T-형 채널 차단효과와 암세포 성장 억제효과는 완벽한 직선관계는 아니지만 유사한 상관관계를 보였다. 즉, T-형 채널 차단효과가 가장 약한 화합물 KYS05075는 5개의 모든 암 세포주에서 성장억제 효과가 가장 약하였다. 이에 반하여 T-형 채널 차단효과가 강한 화합물 KYS05044와 KYS05041은 5개의 모든 암 세포주에서 성장억제 효과가 매우 강하였다. 한편, T-형 채널 차단효과가 강한 화합물 KYS05064는 화합물 KYS05044와 KYS05041에 비해서는 약한 성장억제 효과를 나타냈으나 악성 흑색종 세포주에서의 효과는 우수했다. 그의 화합물 KYS05074, KYS05040, KYS05071, KYS05070에 대해서도 암 세포주 성장억제 효과를 확인할 수 있었다.

<69>

한편, N-형 칼슘채널 차단효과와 항암효과의 상관성을 알아보기 위해 상기 화합물 중 KYS05075와 KYS05040, KYS05074와 KYS05071를 각각 비교해보면, N-형 칼슘채널 차단효과는 항암효과와 거의 관련이 없어 보였다. 즉, T-형 및 N-형 억제%의 합이 암세포주 성장억제 효과 증가에 기여하지 못하는 것으로 나타났다.

<70>

이상의 결과를 종합하면, 본 발명에 따른 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체는 암 세포주 성장을 억제하는 효능을 가지며, 특히 화합물 KYS05044와 KYS05041은 기존의 항암제 시스플라틴과 비교하여도 우수한 항암효과를 나타낸다. 본 발명의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체는 암의 치료에 있어서 기존 약리작용과 무관한 T-형 칼슘채널 차단을 통하여 약리효과를 나타내므로 새로운 화학적 요법제로서 광범위하게 적용될 수 있다.

발명의 효과

<71>

상기 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 화학식 (I)의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체는 각종 인간 암세포주에 대하여 강한 성장 억제 활성을 나타내므로 항암제의 활성성분으로서 유용하게 이용될 수 있다.