



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0072230  
(43) 공개일자 2010년06월30일

(51) Int. Cl.

C07D 405/04 (2006.01) A61K 31/341 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7007252

(22) 출원일자(국제출원일자) 2008년09월25일  
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2010년04월02일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/077669

(87) 국제공개번호 WO 2009/042766  
국제공개일자 2009년04월02일(30) 우선권주장  
60/975,437 2007년09월26일 미국(US)

(71) 출원인

마운트 시나이 스쿨 오브 메디신 오브 뉴욕 유니버시티

미국, 뉴욕 10029, 뉴욕, 원 구스타브 레비 플레이스

(72) 발명자

실버맨 루이스

미국 10591 뉴욕주 슬리피 할로우 프레몬트 로드 48

홀런드 제임스

미국 15083 뉴욕주 스카스데일 마마로넥 로드 31

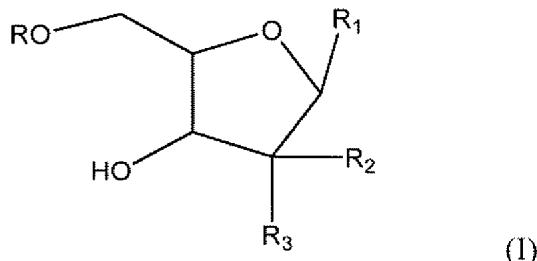
(74) 대리인  
김성기, 김진희

전체 청구항 수 : 총 15 항

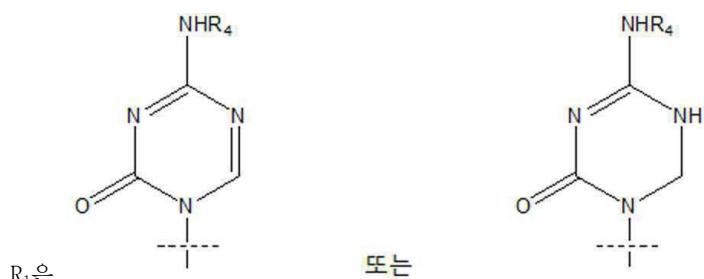
(54) 아자시티딘 유사체 및 이의 용도

**(57) 요 약**

본 발명은 하기 화학식(I)에 따르는 화합물 또는 이의 약제학적 염에 관한 것이다:



상기 식에서,

R은 H, R<sub>5</sub>C(O)이고;

이며, 여기에서 교차 사선은 R<sub>1</sub>을 화학식(I)의 분

자에 연결시켜서 생성되는 결합을 나타내고,

R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>는 독립적으로 OH 또는 H이며, 단, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>는 동시에 OH가 아니고,

R<sub>4</sub>는 H 또는 R<sub>5</sub>C(O)이며, 단, R 및 R<sub>4</sub>는 동시에 H가 아니고,

R<sub>5</sub>는 C<sub>3</sub>-C<sub>26</sub> 알케닐이다.

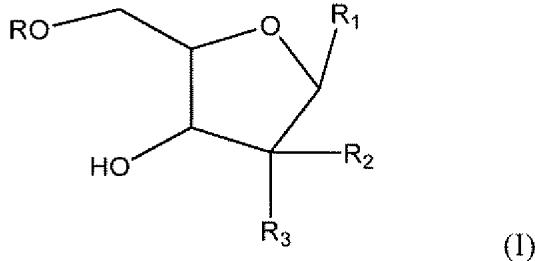
이들 화합물을 제조하고 사용하는 방법이 또한 기술되어 있다.

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

하기 화학식(I)에 따르는 화합물 또는 이의 약제학적 염:

[화학식 I]



상기 식에서,

R은 H,  $R_5C(O)$ 이고;



자에 연결시켜서 생성되는 결합을 나타내고,

$R_2$  및  $R_3$ 는 독립적으로 OH 또는 H이며, 단,  $R_2$  및  $R_3$ 는 동시에 OH가 아니고,

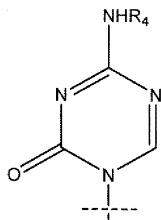
$R_4$ 는 H 또는  $R_5C(O)$ 이며, 단, R 및  $R_4$ 는 동시에 H가 아니고,

$R_5$ 는  $C_3-C_{26}$  알케닐이다.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기  $R_5$ 가  $C_9-C_{26}$  알케닐인, 화합물.

### 청구항 3



제1항에 있어서, 상기 R은  $R_5C(O)$ 이고,  $R_1$ 은  $CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7$ 인, 화합물.

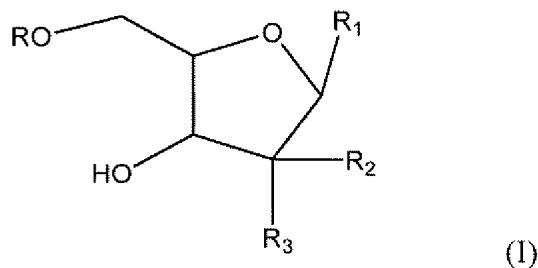
이고,  $R_2$ 는 H이고,  $R_3$ 는 OH이고,  $R_4$ 는 H이며,  $R_5$ 는

**청구항 4**

제1항의 화합물 및 약제학적 부형제, 희석제 및/또는 담체를 포함하는 약제 조성물.

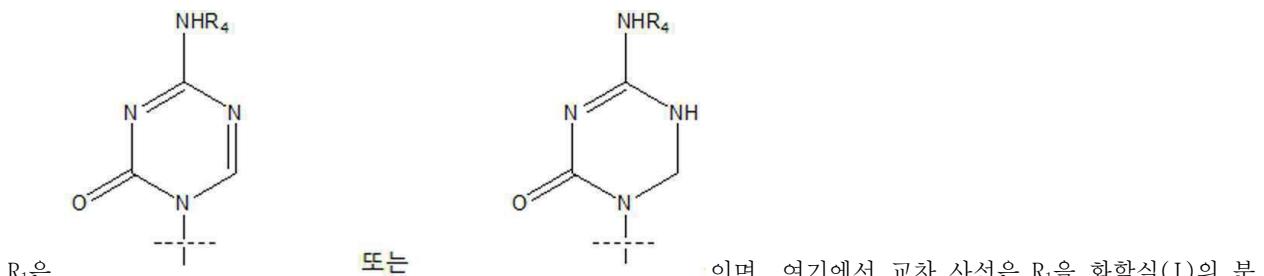
**청구항 5**

신생물성 질환에 걸린 환자를 선택하고, 환자의 신생물성 질환을 치료하기에 효과적인 조건 하에 하기 화학식(I)의 화합물 및 이의 약제학적 염을 환자에게 투여하는 것을 포함하여, 신생물성 질환에 걸린 환자를 치료하는 방법:



상기 식에서,

R은 H, R<sub>5</sub>C(O)이고;



자에 연결시켜서 생성되는 결합을 나타내고,

R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>는 독립적으로 OH 또는 H이며, 단, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>는 동시에 OH가 아니고,

R<sub>4</sub>는 H 또는 R<sub>5</sub>C(O)이며, 단, R 및 R<sub>4</sub>는 동시에 H가 아니고,

R<sub>5</sub>는 C<sub>3</sub>-C<sub>26</sub> 알케닐이다.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 상기 R<sub>5</sub>가 C<sub>9</sub>-C<sub>26</sub> 알케닐인, 방법.

**청구항 7**

제5항에 있어서, 상기 신생물성 질환이 암 질환이인, 방법.

**청구항 8**

제7항에 있어서, 상기 암 질환이 고형 종양 또는 혈액암 또는 악성 종양인, 방법.

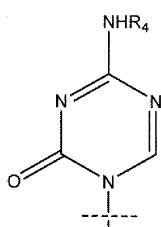
청구항 9

제7항에 있어서, 상기 암 질환이 백혈병, 림프종, 다발성 골수종 또는 척수이형성 증후군인, 방법.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 고형 종양이 유방, 난소, 전립선, 뇌, 방광 및 폐로 이루어진 군으로부터 선택되는 조직의 암인, 방법.

청구항 11

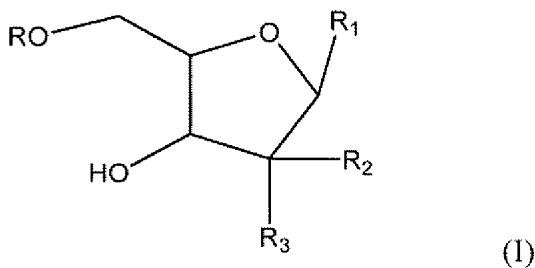


제1항에 있어서, 상기 R은  $R_5C(O)$ 이고,  $R_1$ 은  $\text{---}^{\text{---}}\text{---}$ 이고,  $R_2$ 는 H이고,  $R_3$ 은 OH이고,  $R_4$ 는 H이며,  $R_5$ 는  $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_7-\text{CH=CH}-(\text{CH}_2)_7$ 인, 방법.

청구항 12

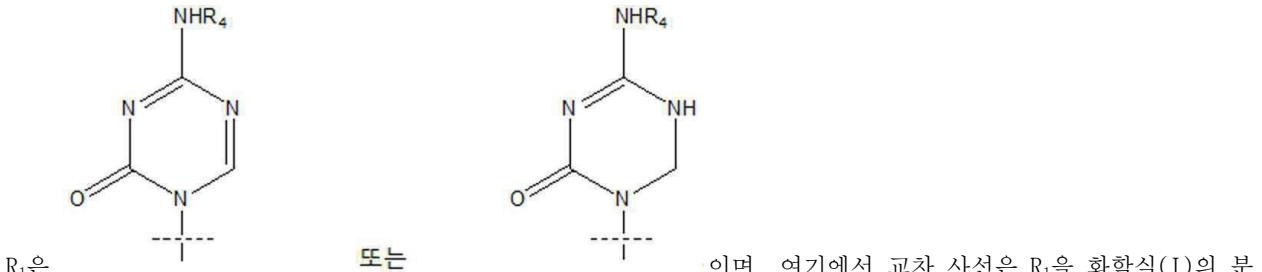
염증 질환에 걸린 환자를 선택하고, 환자의 염증 질환을 치료하기에 효과적인 조건 하에 하기 화학식(I)의 화합물 및 이의 약제학적 염을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, 염증 질환에 걸린 환자를 치료하는 방법:

[화학식 I]



상기 식에서,

$R$ 은  $H$ ,  $R_5C(0)$ 이고;



자에 연결시켜서 생성되는 결합을 나타내고,  
 $R_2$  및  $R_3$ 는 독립적으로 OH 또는 H이며, 단,  $R_2$  및  $R_3$ 는 동시에 OH가 아니고,  
 $R_4$ 는 H 또는  $R_5C(O)$ 이며, 단, R 및  $R_4$ 는 동시에 H가 아니고,  
 $R_5$ 는  $C_3-C_{26}$  알케닐이다.

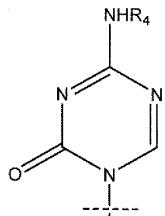
### 청구항 13

제12항에 있어서, 상기  $R_5$ 가  $C_9-C_{26}$  알케닐인, 방법.

### 청구항 14

제12항에 있어서, 상기 염증 질환이 폐, 결합 조직, 위장관 또는 맥관의 염증 상태인, 방법.

### 청구항 15



제12항에 있어서, 상기 R은  $R_5C(O)$ 이고,  $R_1$ 은  $CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7$ 인, 방법.  
 이고,  $R_2$ 는 H이고,  $R_3$ 는 OH이고,  $R_4$ 는 H이며,  $R_5$ 는

## 명세서

### 기술 분야

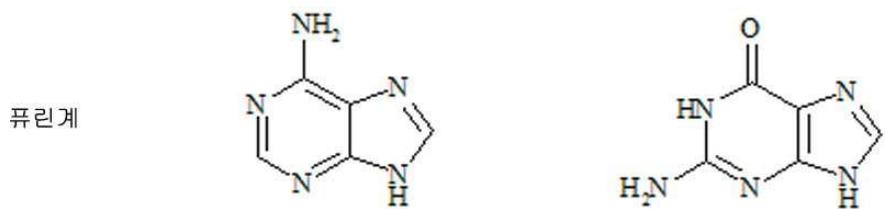
[0001] 본 발명은 아자시티딘 유사체 및 이의 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

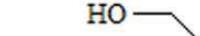
[0002] DNA 및 RNA의 기초 단위로서 밝혀진 천연 뉴클레오시드의 유도체인 뉴클레오시드 유사체는 초기에 이러한 화합물이 항결핵제로서 평가되기는 하였지만 인간의 암 또는 바이러스성 질환의 임상 치료에 효과적이다. 이러한 화합물은 40년 넘게 시장에 등록되었으며, 약 35가지의 제품이 현재 매일 사용되고 있다. 하기의 표 1에 예시된 천연 뉴클레오시드는 2가지 부류의 질소 염기, 즉 푸린 (아데닌 및 구아닌에 의해 예시됨) 및 피리미딘 (티미딘, 우라실 및 시토신에 의해 예시됨) 및 단당류 리보오스 및 테옥시리보오스로부터 구성된다.

[0003]

[豆 1]

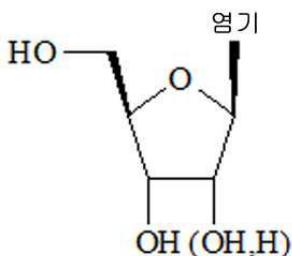


피리미딘계 		
<b>티민</b> <chem>CN1C=CC2=C1C(=O)NC2=O</chem>	<b>우라실</b> <chem>O=C1C=CC2=C1C(=O)NC2=O</chem>	<b>시토신</b> <chem>CN1C=CC2=C1C(=O)N(C)C2=O</chem>

<span style="font-size: 2em;">단당류</span>	 <p style="margin-top: 10px;">리보스</p>	 <p style="margin-top: 10px;">2-데옥시-리보스</p>
--	--	---

[0004]

[0005] 천연 뉴클레오시드는 모두 하기의 표 A에 예시된 바와 같이 이른바  $\beta$ -D 배열로 존재한다. 당 고리 상의 질소 염기 및 히드록시-메틸 측쇄는 둘 모두 당 고리의 평면의 동일한 측면 (시스) 상에 있다.



식 A

[0006]

항암 또는 항바이러스 활성을 갖는 뉴클레오시드 유도체를 얻기 위해, 질소 염기 및/또는 단당류 중 어느 하나에서 화학적 변형이 수행되었다. 예를 들어, 질소 염기에서, 할로겐 원자 또는 다른 작용기의 첨가, 부가적 질소 원자의 삽입 또는 리보오스로부터 아라비노오스로의 단당류 고리에서의 입체화학적 변화 또는 데옥시리보오스로의 히드록실기의 제거는 잠재적 치료적 잇점이 있는 생성물을 유도할 수 있다. 많은 생성물에서, 단당류 고리는 보존되며, 반면에 나머지에서는 당 고리가 사슬로 변화되었다. 뉴클레오시드 유사체는 탁월한 수용해도에 적합한 작은 분자이다.

[0008]

작용 메카니즘의 지식 및 이해를 진지하는 세계적인 유행성 AIDS로 인해 뉴클레오시드 유사체의 영역으로 전용

된 폭넓은 연구 및 개발 노력, 화학적 변형으로 인한 활성 프로필의 변경 등이 또한 암 치료 분야에 적합하다.

[0009] 뉴클레오시드 유사체를 포함하는 많은 약제의 일반적 약점은 당해의 급성 질환의 치료에 대한 저활성 및 하급 특이성이다. 이들 문제점 중 일부는 약제 성분 자체의 고유 활성에 관련될 수 있으며, 일부는 특정 저항성 메카니즘 (환자에게서 고유하거나 치료 동안에 획득되며, 예를 들어 암 치료에서 다중 약제 저항성(MDR)임)에 관련될 수 있다. 일부 문제점은 특정한 하급 운반 또는 세포 흡수 및 활성화 메카니즘에 관련될 수 있다. 일부 문제점은 약제의 빠른 비활성화 및/또는 배출에 관련될 수 있다.

[0010] 뉴클레오시드 유사체의 효능은 천연 뉴클레오시드를 모방하기 위한 이들의 능력에 크게 의존하여, 바이러스 및/ 또는 세포 효소와 상호작용하고 핵산의 대사에서 임계 공정과 상호작용하거나 이를 억제한다. 이들의 항바이러스 또는 항암 활성을 발휘하도록, 뉴클레오시드 유사체는 이들의 모노- 및 디-포스페이트를 경유하여 바이러스 및/ 또는 세포 키나아제의 작용을 통해 상응하는 트리-포스페이트로 변형되어야 한다. 일반적으로, 트리-포스페이트는 활성제이지만, 일부 생성물, 예를 들어 켐시타빈에 대해서는, 디-포스페이트도 임상적으로 현저한 효과를 발휘할 수 있다.

[0011] 병에 걸린 암성 또는 바이러스 감염 세포 또는 조직을 탈성하기 위해, 장내 또는 비경구적 투여 후에, 뉴클레오시드 유사체는 바람직한 약동학적 특징을 갖는다. 투여된 약제의 빠른 배출 이외에, 많은 뉴클레오시드 유사체는 혈류 및 조절 둘 모두에서 탈활성화될 수 있다. 예를 들어, 모노-포스페이트 수준에서도 시토신 유도체는 탈아미노 효소로서 불리우는 한 부류의 효소의 작용을 통해 비활성 우라실 유사체로 빠르게 탈아미노화될 수 있다. 많은 뉴클레오시드 유사체의 세포 흡수 및 그에 따른 우수한 치료 효능은 막 결합 뉴클레오시드 운반 단백질 (농축 및 평형 뉴클레오시드 운반체로 불리움)에 크게 의존한다. 따라서, 이러한 특이적 흡수 메카니즘에 의존하지 않는 화합물이 추구된다. 특히 항암 분야에서, 또 다른 활성 제한 인자는 세포 회복 메카니즘이다. 항암 뉴클레오시드 유사체 모노-포스페이트가 세포 DNA 내로 혼입되는 경우에, 이는 p53 단백질과 연관된 엑소뉴클레오아제 활성으로 인해 암세포 DNA로부터 제거되지 않아야 한다. 그러나, 약제의 부작용을 제한하기 위해 건강한 세포의 DNA로부터의 뉴클레오시드 유사체의 제거가 바람직하다.

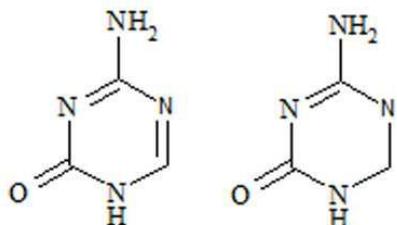
[0012] 수년에 걸쳐, 일부 또는 많은 활성 제한 특징을 크게 극복하는 많은 뉴클레오시드 유사체가 개발되어 왔다. 예를 들어, 아시클로비르 (ACV)는 특이성이 큰 화합물을 예시하도록 제공될 수 있다. ACV-모노-포스페이트는 단지 바이러스 키나아제에 의해 생성될 수 있으며, 이는 ACV가 비감염 세포에서는 활성화될 수 없음을 의미한다. 이러한 사실에도 불구하고, ACV는 특별히 활성인 화합물이 아니다. 뉴클레오시드 유사체의 활성화에서 빈번한 제한 단계를 방해하기 위해, 뉴클레오시드 유사체 모노-포스페이트, 시도포비르(cidofovir)와 같은 수가지 포스포네이트 또는 심지어는 모노-포스페이트 생성물이 개발되어 왔다. 경구 흡수를 용이하게 하기 위해 또는 체내에서 바람직한 약제 배치를 보장하기 위해, 헵세라(Hepsera)와 같은 특정 프로드러그가 제조되어 왔다.

[0013] 향상된 임상적 유용성을 용이하게 하기 위해 뉴클레오시드 유사체에 대해 이루어진 구조적 변화 이외에, 활성을 개선시키기 위해 추가의 변형이 이루어져 왔다. 지질 부분의 첨가로부터 유발되는 변형된 뉴클레오시드 유사체의 수가지 예가 있다 (미국 특허 6,153,594호, 6,548,486호, 6,316,425호 및 6,384,019호; 유럽 특허 출원 EP-A-56265 및 EP-A-393920; 및 WO 99/26958). 이는 예를 들어 에스테르, 아미드, 카보네이트 또는 카르바메이트 결합을 통한 지방산의 결합에 의해 달성될 수 있다. 뉴클레오시드 유사체의 인지질 유도체와 같은 더욱 복잡한 생성물이 제조될 수 있다 [참조: Eur J Pharm Sci 11b Suppl 2: 15-27 (2000); 유럽 특허 545966호; 카나다 특허 2468099호; 및 미국 특허 6,372,725호 및 6,670,341호]. 이러한 유사체는 DNA, RNA 또는 레트로바이러스에 의해 유발되는 감염의 치료 및 예방에 특히 적합한 항바이러스 활성을 갖는 것으로 기술되어 있다. 이들은 또한 악성 종양의 치료에 적합하다. 뉴클레오시드 유사체 지질 유도체는 수가지 용도로 사용될 수 있다. 이들은 탈아미노 효소에 대한 기질이 아닌 프로드러그로서 간주될 수 있어서, 뉴클레오시드 유사체를 혈류 중에서의 운반 동안 탈활성화로부터 보호한다. 지질 유도체는 또한 세포막을 가로질러 더욱 효과적으로 운반되어, 뉴클레오 유사체의 향상된 세포내 농축을 결과할 수 있다. 지질 유도체는 또한 피부 제조물, 경구용 생성물 (참조: 미국 특허 6,576,636호 및 WO 01/18013), 또는 종양 표적화를 위해 계획된 리포좀과 같은 특정 제형 (참조: 미국 특허 5,223,263호)에 사용하기에 더욱 적합하다.

[0014] 단당류 고리의 보존된  $\beta$ -D 배열을 갖는 뉴클레오시드 유사체에 대해 또는 비고리형 측쇄를 갖는 뉴클레오시드 유사체에 대해, 항바이러스 또는 항암 활성은 단일 불포화  $\omega$ -9 C18 및 C20 지방산의 지질 유도체를 통해 가장 효율적으로 개선될 수 있음이 입증되었다 [참조: Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol., 53-61 (1999); Cancer Research 59: 2944-2949 (1999); Gene Therapy, 5: 419-426 (1998); Antiviral Research, 45: 157 -167 (2000); and Biochemical Pharmacology, 67: 503-511 (2004)]. 바람직한 단일 불포화 유도체는 다불

포화 카운터파트보다 더 활성일 뿐만 아니라 더 결정질이고 지질 사슬의 산화에 대해 화학적으로 안정하다. 따라서, 이들은 화학적 및 약제학적 제조 관점으로부터 더욱 바람직한 화합물이다. 단일 불포화  $\omega$ -9 C18 및 C20 지방산이 많은 비-뉴클레오시드 생물학적 활성 화합물의 치료 활성의 개선을 위해 적합함이 또한 입증되었다 [유리 특허 0977725호].

[0015] 뉴클레오시드 유사체의 비교적 새로운 아군은 이른바 아자-C 유도체이다. 상가 부류의 화합물에서, 피리미딘 염기 중의 5 위치에 있는 CH 기는 하기 화학식 B로 나타낸 바와 같이 질소 원자와 교환된다.



### 식 B

[0016] 비정상 DNA 메틸화에 의해 잠복된 종양 억제제 유전자는 이들 신규 화학치료제에 의한 재활성화에 대한 가능한 표적이다. DNA 메틸화의 가능한 억제제 및 항백혈병제인 아자시티딘 및 5-아자-2'-데옥시시티딘 유도체 (5-아자-C, 5-아자-CdR, 데시타빈)이 잠복 종양 억제제 유전자를 재활성화시킬 수 있다. 고농도에서, 화합물은 세포 독성이지만, 더 낮은 농도에서는, 하이포메틸화가 세포주의 분화를 유도한다. 화합물은 데옥시시티딘 키나아제의 대사성 활성화를 필요로 하며, DNA 메틸트랜스퍼라아제의 억제를 발생시킨다. 이들 유도체의 치료 잠재성에 대한 하나의 장애는 시티딘 탈아미노 효소 (CD)에 의한 이들의 빠른 생체내 비활성화이다. 수용액 중에서의 불안정성 및 이들의 부작용 프로필은 이들의 임상적 활성을 제한한다.

[0018] 본 발명은 당분야에서의 이들 및 다른 결점을 해결하는 것에 관한 것이다.

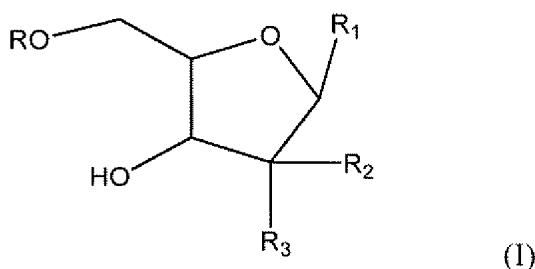
### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0019] 발명의 요약

[0020] 본 발명의 한 일면은 하기 화학식(I)에 따르는 화합물 또는 이의 약제학적 염에 관한 것이다:

[0021] [화학식 I]



[0022]

[0023] 상기 식에서,

[0024] R은 H,  $R_5C(O)$ 이고;



[0025]  $R_1$ 은  $R_1$ 은  $R_1$ 을 화학식(I)의 분자에 연결시켜서 생성되는 결합을 나타내고,

[0026]  $R_2$  및  $R_3$ 는 독립적으로 OH 또는 H이며, 단,  $R_2$  및  $R_3$ 는 동시에 OH가 아니고,

[0027]  $R_4$ 는 H 또는  $R_5C(O)$ 이며, 단,  $R$  및  $R_4$ 는 동시에 H가 아니고,

[0028]  $R_5$ 는  $C_3-C_{26}$  알케닐이다.

[0029] 본 발명의 또 다른 일면은 화학식(I)의 화합물, 약제학적 부형제, 희석제 및/또는 담체를 포함하는 약제 조성물에 관한 것이다.

[0030] 본 발명의 추가의 일면은 신생물성 질환에 걸린 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다. 방법은 신생물성 질환에 걸린 환자를 선택하고, 환자의 신생물성 질환을 치료하기에 효과적인 조건하에서 환자에게 상기 기술된 바와 같은 화학식(I)의 화합물 또는 이의 약제학적 염을 투여하는 것을 포함한다.

[0031] 본 발명의 추가의 일면은 염증 질환에 걸린 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다. 방법은 염증 질환에 걸린 환자를 선택하고, 환자의 염증 질환을 치료하기에 효과적인 조건하에서 환자에게 상기 기술된 바와 같은 화학식(I)의 화합물 또는 이의 약제학적 염을 투여하는 것을 포함한다.

[0032] 완충제 및 혈장 중의 아자-C의 불안정성은 널리 공지되어 있다 (참조: 본원에 참고문헌으로 인용된 문헌 [Israeli et al., Cancer Research 36, 1453-1461 (1976); Rudek et al., J Clin Oncol, 23:17, 3906-3911 (2005); Rustum et al., J Chromat, 421:12, 387-91 (1987); Zhao et al., J Chromat B, 813, 81-88 (2004)]). 임상적 혈장 샘플 중의  $1.50 \pm 2.30$  시간의 평균 종말 반감기가 아자-C에 대해 보고되었다 (참조: 본원에 참고문헌으로 인용된 문헌 [Rudek et al., J Clin Oncol, 23:17, 3906-3911 (2005)]). 생체내에서,  $-60^{\circ}\text{C}$ 에서도 아자-C의 20% 손실이 4.5일 저장 후에 기록되었으며, 실온에서 저장할 때에는 0.5시간 내에 10% 손실이 기록되었다 (참조: 본원에 참고문헌으로 인용된 문헌 [Zhao et al., J Chromat B, 813, 81-88 (2004)]). 아자-C의 초기 불안정성은 포름산의 후속 제거와 함께 5-아자-피리미딘 고리의 빠른 (제1단계는 가역성임) 고리 개방으로 인한 것으로 여겨진다 (참조: 본원에 참고문헌으로 인용된 문헌 [Chan et al., J Pharma Sci, 68;7, 807-12 (1979)]). 다른 분해 경로는 위치 4 아미노기의 탈아미노 및 D-리보오스 및 5-아자시토신을 수득하기 위해 결합된 글리코사이드의 가수분해인 것으로 여겨진다. 놀랍게도, 바람직한 아자-C 지질 유도체는 아자-C 자체보다 현저히 우수한 혈장 안정성 프로필을 갖는 것으로 밝혀졌다. 화합물은 실험 조건 하에 4시간 이상동안 실온에서 바탕 인간 혈장 매트릭스 중에서 안정하며 (초기의 잔류 %  $\geq 94\%$ ), 혈장 단백질의 석출 후 후추출 상등액 중에서 현저한 분해 생성물을 관찰되지 않았다. 바람직한 지질 화합물의 혈장 안정성이  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 저찰할 경우에 추가로 시험되었다. 지질 측쇄가 아자-C에 결합되는 경우에 아자-부분의 고리 개방 또는 화합물의 다른 분해가 현저히 감소되는 것으로 입증되었다.

[0033] 아자-C의 빠른 분해는 아자-C의 임상적 사용에 대한 단점이다. 아자-C 자체 이상으로 지질 유도체의 향상된 혈장 안정성은 지질 유도체의 높고 지속적인 환자 혈장 수준을 제공할 수 있다. 이는 더 우수한 조직/기관/종양 분포 및 첫 번째 손에서 아자-C 자체에 대해서 보다 약제에 대한 세포 노출 및 흡수, 및 후속적으로 아자-C-5'-에스테르 결합의 세포내 가수분해 후의 아자-C에 대한 더 우수한 종양 세포 DNA 노출을 유도할 수 있다.

[0034] 본 발명의 구현은, 아자시티딘 및 데옥시시티딘 (예를 들어, 5-아자-2'-데옥시시티딘)의 변형으로 통해, 아자시티딘 및 데옥시시티딘 (예를 들어, 5-아자-2'-데옥시시티딘)과 비교하여 놀랍게도 여러 가지 특성을 갖는 신규 분자를 생성시킨다. 이는 혈액암으로 제한된 아자시티딘 및 데옥시시티딘 (예를 들어, 5-아자-2'-데옥시시티딘)의 항암 활성 이상으로 상당히 확대된 활성을 갖는 일련의 화합물을 생성시킨다. 이들 신규 화합물은 유방암 및 자궁암을 포함하는 고형 종양의 넓은 배열에 대한 항암 효능을 갖는다. 화합물은 또한 놀랍게도 치료에 대해 저항성인 암에 대해 활성이며, 따라서 현재의 치료 선택이 제한되는 고형 종양에서 치

료적 잇점을 제공할 수 있다. 본 발명의 구현은 선택 및 효능이 여전히 제한되고 충족되지 않은 요구를 성취하는 경우에 암을 치료하기 위한 치료 용도를 갖는다.

[0035] 이들 화합물은 제한된 노출 후에 활성의 더 이른 개시를 나타내고, 따라서, 임상적 세팅에서 치료의 짧은 지속 기간 후에만 효과적일 수 있다. 이는 근원 약제와 비교하여 더 짧고 더 적은 빈번한 치료 노출 및 약제 관련 특성의 감소로 변환된다. 이는 향상된 치료 지수를 제공한다.

[0036] 지질 (에스테르 및 아미드 둘 모두 포함) 성분의 첨가에 의한 구조의 변형은 아졸 시티딘 고리 및 그에 따른 유전자 메카니즘에 대한 분자의 효과를 보존한다. 유전자 조작은 암 및 염증에서 유전자 발현을 변형시키기 위한 중요한 메카니즘을 제공한다. 이들 신규 화합물은 아자시티딘보다 더 낮은 농도에서 활성을 가지며, 그에 따라 더욱 효과적이다. 변형된 범위의 활성을 갖는 이들 화합물은 고형 종양 및 염증 질환에서 유전자 표적을 조절 할 수 있다.

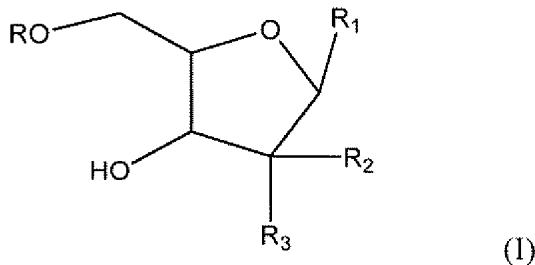
[0037] 유전자 메카니즘은 폐, 결합 조직, 위장관 및 맥관의 염증 상태를 포함하지만 이들로 제한되지는 않는 친염증 상태에서 중요하다. 이들 화합물은 유전자 메카니즘을 표적화시킴으로써 이들 질환에 대해 반응성인 염증 과정을 감소시키거나 회복시킬 수 있다.

### 과제의 해결 수단

[0038] 발명의 상세한 설명

[0039] 본 발명의 한 일면은 하기 화학식(I)에 따르는 화합물 또는 이의 약제학적 염에 관한 것이다:

[0040] [화학식 I]



[0041]

[0042] 상기 식에서,

[0043]

R은 H, R<sub>5</sub>C(O)이고;



[0044] R<sub>1</sub>은

또는

이며, 여기에서 교차 사선은 R<sub>1</sub>을 화학식(I)의 분

자에 연결시켜서 생성되는 결합을 나타내고,

[0045]

R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>은 독립적으로 OH 또는 H이며, 단, R<sub>2</sub> 및 R<sub>3</sub>는 동시에 OH가 아니고,

[0046]

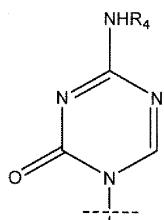
R<sub>4</sub>는 H 또는 R<sub>5</sub>C(O)이며, 단, R 및 R<sub>4</sub>는 동시에 H가 아니고,

[0047]

R<sub>5</sub>는 C<sub>3</sub>-C<sub>26</sub> 알케닐이다.

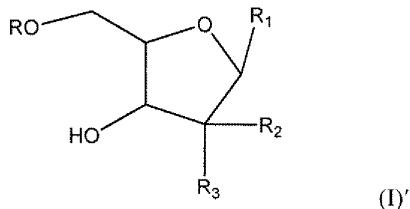
[0048]

특정 구현에서, R<sub>5</sub>는 C<sub>9</sub>-C<sub>26</sub> 알케닐이다.



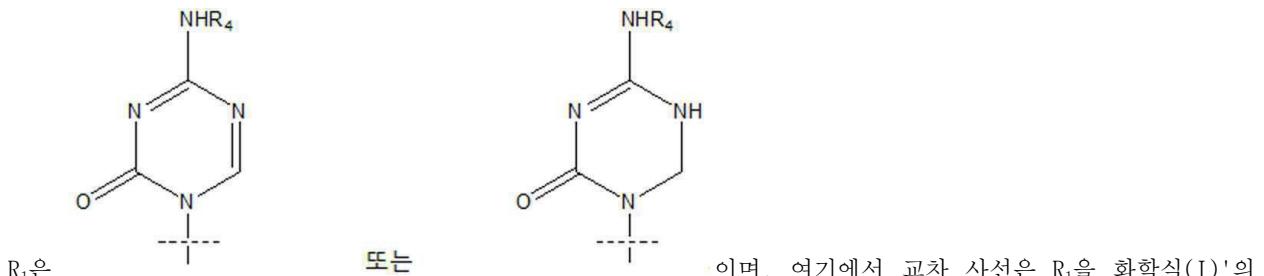
[0049] 특정 구현에서, R은  $R_5C(O)$ 이고,  $R_1$ 은 이고,  $R_2$ 는 H이고,  $R_3$ 는 OH이고,  $R_4$ 는 H이며,  $R_5$ 는  $CH_3-(CH_2)_7-CH=CH-(CH_2)_7$ 이다.

[0050] 본 발명의 더 넓은 일면은 하기 화학식(I)'에 따르는 화합물 또는 이의 약제학적 염에 관한 것이다.



[0051] 상기 식에서,

[0053] R은 H,  $R_5C(O)$ ,  $R_5CH_2OC(O)$  또는  $R_5CH_2NHC(O)$ 이고,



[0054]  $R_1$ 은 이며, 여기에서 교차 사선은  $R_1$ 을 화학식(I)'의 분자에 연결시켜서 생성되는 결합을 나타내고,

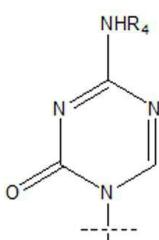
[0055]  $R_2$  및  $R_3$ 은 독립적으로 OH 또는 H이며, 단,  $R_2$  및  $R_3$ 는 동시에 OH가 아니고,

[0056]  $R_4$ 는 H,  $R_5C(O)$ ,  $R_5CH_2OC(O)$  또는  $R_5CH_2NHC(O)$ 이며, 단,  $R_2$  및  $R_3$ 는 동시에 OH가 아니고,

[0057]  $R_4$ 는 H 또는  $R_5C(O)$ 이며, 단, R 및  $R_4$ 는 동시에 H가 아니고,

[0058]  $R_5$ 는  $C_3-C_{26}$  알케닐이다.

[0059] 화학식(I)'에 따르는 화합물의 바람직한 구현에서, k는 7이고, n은 7이다.



[0060] 특정 구현에서,  $R_1$ 은 이며, 여기에서 교차 사선은  $R_1$ 을 화학식(I)'의 분자에 연결시켜서 생성되는 결합을 나타낸다. 일부 구현에서,  $R_4$ 는 H일 수 있다. 특정 구현에서, R은  $R_5C(O)$ 이고, m은 0이고, n은 7이고,  $R_2$ 는 H이고,  $R_3$ 는 OH이다. 특정 구현에서,  $R_5$ 는  $C_3-C_{26}$  알케닐이다.

[0061] 본 발명의 또 다른 일면은 화학식(I)의 화합물 및 약제학적 부형제, 희석제 및/또는 담체를 포함하는 약제 조성물에 관한 것이다.

- [0062] 본 발명의 제제는 경구적, 비경구적, 예를 들어 피하, 정맥내, 근육내, 복강내, 비내 적하에 의해, 또는 코, 목 및 기관지 튜브의 점막과 같은 점막에 대한 도포에 의해 투여될 수 있다. 이들은 단독으로 또는 적합한 약제학적 담체와 함께 투여될 수 있으며, 정제, 캡슐, 분말, 용액, 혼탁액 또는 에멀션과 같은 고체 또는 액체 형태로 존재할 수 있다.
- [0063] 본 발명의 활성제는 예를 들어 비활성 희석제 또는 동화할 수 있는 식용 담체와 함께 경구적으로 투여될 수 있거나, 경질 또는 연질 셀 캡슐 내에 내포될 수 있거나, 정제로 압축될 수 있거나, 식이 식품에 직접 혼입될 수 있다. 경구 치료적 투여를 위해, 이들 활성제는 부형제에 혼입되고, 정제, 캡슐, 엘리시르, 혼탁액, 시럽 등의 형태로 사용될 수 있다. 이러한 조성물 및 제조물은 0.1% 이상의 활성제를 하유하여야 한다. 이들 조성물 중의 제제의 비율은 물론 변동할 수 있으며, 편의상 단위의 중량의 약 2% 내지 약 60%일 수 있다. 이러한 치료적으로 유용한 조성물 중의 활성제의 양은 적합한 투여량이 얻어질 정도의 양이다. 본 발명에 따르는 바람직한 조성물은 경구 투여 단위가 약 1 내지 250 mg의 활성제를 함유하도록 제조된다.
- [0064] 정제, 캡슐 등은 또한 트라가칸트 겹, 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴과 같은 결합제; 인산이칼슘과 같은 부형제; 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산과 같은 봉해제; 스테아르산마그네슘과 같은 유후제; 및 슈크로오스, 락토오스 또는 사카린과 같은 감미제를 함유할 수 있다. 투여 단위 형태가 캡슐인 경우, 이는 상기 유형의 재료 이외에, 지방유와 같은 액체 담체를 함유할 수 있다.
- [0065] 코팅제로서 또는 투여 단위의 물리적 형태를 변형시키기 위해 다양한 다른 재료가 존재할 수 있다. 예를 들어, 정제는 셀락, 당 또는 이들 모두로 피복될 수 있다. 시럽은 활성 성분 이외에, 감미제로서 슈크로오스, 방부제로서 메틸 및 프로필라라벤, 염료, 및 체리 또는 오렌지 향과 같은 방향제를 함유할 수 있다.
- [0066] 이들 활성제는 또한 비경구적으로 투여될 수 있다. 이들 활성제의 용액 또는 혼탁액은 히드록시프로필셀룰로오스와 같은 계면활성제와 적합하게 혼합된 물 중에서 제조될 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 오일 중의 이들의 혼합물 중에서 제조될 수 있다. 예증적 오일은 석유, 동물, 식물 또는 합성 공급원의 오일, 예를 들어 땅콩유, 대두유 또는 광유이다. 일반적으로, 물, 식염수, 수성 텍스트로오스 및 관련된 당 용액, 및 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 글리콜이 특히 주사 용액에 대한 바람직한 액체 담체이다. 통상적인 저장 및 사용 조건하에, 이들 제조물은 미생물의 성장을 방지하기 위한 방부제를 함유한다. 주사용으로 적합한 약제 형태는 무균 주사 용액 또는 분산액의 즉시 제조를 위해 무균 수용액 또는 수성 분산액 및 무균 분말을 포함한다. 모든 경우에, 형태는 살균되어야 하고, 쉬운 주사성이 존재할 정도로 유체이어야 한다. 이는 제조 및 저장 조건 하에 안정해야 하고, 박테리아 및 균류와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 방부되어야 한다. 담체는 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜), 이들의 적합한 혼합물 및 식물유를 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다.
- [0067] 본 발명의 제제는 또한 에어로졸의 형태로 기도에 직접 투여될 수 있다. 에어로졸로서 사용하기 위해, 용액 또는 혼탁액 중의 본 발명의 제제는 적합한 추진제, 예를 들어 통상적인 애쥬번트를 갖는 프로판, 부탄 또는 이소부탄과 같은 탄화수소 추진제와 함께 압축 에어로졸 용기 내에 포장될 수 있다. 본 발명의 재료는 또한 분무기 또는 살포기에서와 같이 비압축 형태로 투여될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 추가의 일면은 신생물성 질환에 걸린 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다. 방법은 신생물성 질환에 걸린 환자를 선택하고, 환자의 신생물성 질환을 치료하기에 효과적인 조건 하에 상기 기술된 바와 같은 화학식(I)의 화합물 또는 이의 약제학적 염을 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0069] 특정 구현에서, 신생물성 질환은 암 질환이다. 암 질환은 고형 종양 또는 혈액암 또는 악성 종양일 수 있다. 암 질환은 백혈병, 림프종, 다발성 골수종 또는 척수이형성 증후군일 수 있다.
- [0070] 특정 구현에서, 고형 종양은 유방, 난소, 전립선, 뇌, 방광 및 폐조직과 같은 조직의 암일 수 있다.
- [0071] 본 발명의 추가의 일면은 염증 질환에 걸린 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다. 방법은 염증 질환에 걸린 환자를 선택하고, 환자의 염증 질환을 치료하기에 효과적인 조건 하에 상기 기술된 바와 같은 화학식(I)의 화합물 또는 이의 약제학적 염을 환자에게 투여하는 것을 포함한다.
- [0072] 특정 구현에서, 염증 질환은 폐, 결합 조직, 위장관 또는 맥관의 염증 상태이다.
- [0073] 본원에 다른식으로 규정하지 않는 한은, 본 출원과 관련하여 사용된 과학적 및 기술적 용어는 당업자들에게 공통적으로 이해되는 의미를 갖는다. 추가로, 문맥상 다른식으로 요구되지 않는 한은, 단수 용어는 복수를 포함하고, 복수 용어는 단수를 포함한다.

## 도면의 간단한 설명

[0074]

도 1A-B는 백혈병 및 고형 종양 세포주에 대한 5-아자시티딘 5'-엘라이데이트 (CP) 및 5-AzaC의 비교 세포독 활성의 그래프를 도시한 도면이다. 세포독성은 WST-1 검정에서 결정된다. IC<sub>50</sub>은 칼시신(CalcySyn) 소프트웨어를 사용하여 계산된다. 세포는 24시간 동안 처리되거나 (도 1A), 세포는 24시간, 48시간 및 72시간 동안 처리된다 (도 1B).

도 2A-B는 백혈구에서 5-아자시티딘 5'-엘라이데이트에 의한 아포토시스 유도의 그래프를 도시한 도면이다. 도 2A에서, HL60, K562 및 U937 세포는 비처리되거나 24시간 동안 5-아자시티딘 5'-엘라이데이트 (CP) (0.5-4 μM)로 처리된다. 아포토시스 세포의 비율은 아크리딘 오렌지 및 에티듐 브롬화물로 염색한 후에 형광 현미경의 도움으로 결정된다. 도 2B에서, HL60 및 K562 둘 모두는 비처리되거나 24시간 동안 5-아자시티딘 5'-엘라이데이트 (1, 2 또는 4 μM)로 처리된다. 아포토시스 세포의 비율은 아넥신-V (Annexin-V) 및 PI 염색을 사용하여 유세포분석기에 의해 결정된다.

도 3은 세포 주기에 대한 5-아자시티딘 5'-엘라이데이트 (CP) 노출의 효과의 그래프를 도시한 도면이다. 세포는 유세포분석기에 의한 DNA 함량의 분석을 위해 처리되기 전에 제시된 시간 동안 배양된다. 평면에서의 수치는 서브-G1 DNA 함량을 갖는 케이트 세포군을 나타낸다.

도 4A-B는 5-아자시티딘 5'-엘라이데이트 및 5-AzaC의 효과를 포함하는 분화의 그래프를 도시한 도면이다. K562 및 U937은 14일 동안 5-아자시티딘 5'-엘라이데이트 (CP) 또는 5-AzaC (0.125-1 μM)에 노출된다. 0일째에 초기 처리 후에, 세포는 4일, 7일 및 10일째에 약제의 새로운 부분에 노출된다. 분화는 NBT (U937) (도 4A) 또는 벤지딘 염색 (K562) (도 4B)에 의해 평가된다.

도 5는 아자-C 또는 5'-아자-C-5'-엘라이드산 에스테르에 노출된 U937 세포에서 측정된 지질단백질 (LPS) 자극 NF κB 루시퍼라아제 활성을 도시한 그래프이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075]

실시예

[0076]

실시예 1 - 시약, 세포주 및 세포 배양액

[0077]

5-아자시티딘 5'-엘라이데이트 (CP 또는 CP-4200)를 클라비스 파아마 에이에스 컴파니 (Clavis Pharma AS Company)로부터 입수하고, 세포 증식 시약 WST-1을 로쉐 어플라이드 사이언스 (Roche Applied Science) (독일, 만하임)으로부터 입수하고, PI 및 아넥신 V-FITC 아포토시스 키트을 캘리포니아 팔로 알토 (Palo Alto)의 비디 바이오사이언시스 (BD Biosciences)로부터 구입하고, 5-아자시티딘 (5-AzaC), 에티듐 브롬화물 (EB), 아크리딘 오렌지 (AO), 니트로 블루 테트라졸리움 (NBT), 포르볼 12-미리스테이트 (TPA)를 시그마 케미칼 컴파니 (Sigma Chemical Co) (미주리, 세인트루이스)로부터 구입하였다.

[0078]

인간 전골수구 백혈병 세포주 HL60, 인간 조직구 림프종 U937, 인간 만성 골수 백혈병 K562, 인간 급성 T 세포주르캇 (Jurkat), 유방 선암종 MCF-7, 방광 암종 5637, 전립선 암종 DU-145를 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection)으로부터 구입하였다. 주르캇을 제외한 모든 세포주를 37°C에서 5% CO<sub>2</sub>의 분위기 중에서 10% 열-비활성화 소태아 혈청 (FCS), 100 U/ml의 페니실린 및 100 mg/ml의 스트렙토마이신으로 보충한 RPMI 1640 배지 (영국, 글라스고우의 기브코(Gibco)) 중에서 유지시켰다. 주르캇 세포를 1.5 g/L의 종탄산나트륨, 4.5 g/L의 글루코오스, 10 mM의 피루브산나트륨 및 10% FCS, 100 U/ml의 페니실린 및 100 mg/ml의 스트렙토마이신으로 보충한 RPMI 1640 배지 중에서 배양하였다.

[0079]

실시예 2 - 세포독성 검정

[0080]

5-아자시티딘 지질의 세포독성을 생세포 중의 미토콘드리아 털수소효소에 의한 테트라졸리움염 WST-1 (4-[3-(4-요오도페닐)-2-(4-니트로페닐)-2H-5-테트라졸리오]-1,3-벤젠 디솔포네이트)의 분열에 근거한 비색 검정에 의해 결정하였다. 세포를 96-웰 평평 바닥 마이크로플레이트 중의 다양한 농도의 5-아자시티딘 지질의 존재 또는 부재하의 배지 중에  $1 \times 10^6/\text{ml}$  (HL60 세포) 또는  $1.25 \times 10^5/\text{ml}$  (U937, K562 및 주르캇)의 초기 농도로 뿐리고 24

내지 72시간 동안 배양하였다. MCF-7, DU-145 및 5637 세포 ( $1 \times 10^4/\text{ml}$ )를 평판 배양하고, 접착시키고 24시간 동안 펼쳤다. 다양한 농도의 5-아자시티딘 지질을 첨가하고, 배양액을 추가로 24 내지 72시간 동안 유지시켰다. 배양액을 1시간 동안 WST-1 시약으로 배양했다. 포르마잔의 생성을 650 nm의 기준 파장과 함께 450 nm에서 소판 판독기 (바이오-테크 인스트루먼츠 (Bio-Tek Instruments), EIx 800)에 의해 측정하였다. 성장 억제를 비거리 세포와 비교하여 결정하였다 (%). IC<sub>50</sub> 값을 캘쿠신 (CalcuSyn) 소프트웨어 (바이오소프트 (Biosoft))를 사용하여 계산하였다.

#### [0081] 실시예 3 - 아포토시스 세포의 정량화

아포토시스 세포를 아넥신 V-FITC로 염색한 후에 형태적 기준 및 형광 활성화 세포 분류 (FACS)를 사용하여 규정하였다. 형태적 분석을 위해, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 AO 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 EB를 함유하는 1 $\mu\text{l}$ 의 원액을 2 $\mu\text{l}$ 의 세포 혼탁액에 첨가하였다. 아포토시스 세포 및 아포토시스 몸체를 형광 현미경을 사용하여 분석하였다. 아포토시스 세포의 비율을 총 300개의 세포를 계수한 후에 계산하였다. FACS 분석을 위해,  $2 \times 10^5$  내지  $5 \times 10^6$  개의 세포를 PBS로 세척한 후, 제조업자에 의해 제공되는 아넥신 V-FITC 아포토시스 검출 컷 설명서에 따라 배지 결합 시약 중에서 아넥신 V-FICS 및 요오드화프로피odium (PI)로 표지화시켰다. FITC 및 PI의 형광 신호를 FACSCAN (캘리포니아 산호세의 벡톤 디킨슨 (Becton Dickinson)) 상에서 518 nm 및 620 nm에서 각각 검출하였다. 아넥신 V-FITC 형광의 로그를 X-축으로 나타내고, PI 형광의 로그를 Y-축으로 나타내었다. 데이터를 셀퀘스트 (CellQuest) 프로그램 (벡톤 디킨슨)에 의해 분석하였다. 각각의 분석을 위해, 10,000개의 세포 이벤트가 기록되었다.

#### [0083] 실시예 4 - 세포 주기

세포를 원심분리에 의해 펠릿화시키고, PBS로 2회 세척하고, 70% (v/v) 냉각 에탄올 (-20°C)로 고착시키고, 24시간 이상 동안 4°C에서 저장하였다. 세포를 PBS 중에서 세척하였다. 세포 펠릿을 PI/RNase 염색 용액으로 염색하였다. 세포 혼탁액을 30분 동안 실온에서 암실에서 배양했다. DNA 함량을 FACSCalibur 유동 세포 분석법을 사용하여 결정하였다 (캘리포니아 마운트뷰의 벡톤 디킨슨). 세포 주기의 서브-G<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, S 및 G<sub>2</sub>/M 단계 중의 세포의 비율을 DNA 히스토그램 피팅 프로그램 (벡톤 디킨슨)을 사용하여 결정하였다. 샘플당 최소 10,000개의 이벤트가 기록되었다.

#### [0085] 실시예 5 - 아자-C-5'-올레산 에스테르의 합성

올레산 (1.77 mmol, 500 mg)을 툴루엔 (3 ml) 중에 용해시켰다. DMF (10 $\mu\text{l}$ )를 첨가한 후, 실온에서 10분 이상 염화옥살릴 (3.6 mmol, 457 mg)을 첨가하였다. 3시간 후에, 툴루엔을 진공하에 제거하였다.

아자-C (1.75 mmol, 427 mg)을 DMA (6 ml) 중에 혼탁시키고, HCl (Et<sub>2</sub>O 중의 1 M, 2.0 mmol, 2.0 ml)를 첨가하고, 실온에서 5분 후에, Et<sub>2</sub>O를 진공하에 제거하였다. 생성된 혼탁 용액을 얼음을 배쓰 내에서 냉각시키고, DMA (2 ml) 중에 용해시킨 산염화물을 2시간 이상 첨가하였다. 반응 혼합물을 온도를 서서히 실온에 도달시키면서 밤새 교반시킨 후, 2시간 동안 30°C에서 가열하였다. 실온으로 냉각시킨 후에, 반응 혼합물을 포화된 수성 NaHCO<sub>3</sub>와 EtOAc (각각 25 ml) 사이에서 분배시켰다. 수성 상을 또 다른 3×25 ml EtOAc로 추출하였다. 유기 상을 모으고, 염수로 세척하고, 건조시켰다 (MgSO<sub>4</sub>). 진공 하의 용매의 제거 후에, 미정제 유성 생성물을 속성 크로마토그래피 (2.5, 5 및 10% MeOH와 함께 SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)에 의해 정제하였다. 수율: 110 mg (13%).

#### [0088] 실시예 6 - 5-아자시티딘 5'-엘라이드산 에스테르의 합성

5-아자시티딘 (4.1 mmol, 1.00 g)을 DMA (15 ml) 중에 혼탁시키고, 디에틸 에테르 중의 HCl의 용액 (4.9 mmol, 1 M, 4.9 ml)을 실온에서 서서히 첨가하여 맑은 용액을 수득하였다. 에테르를 진공 하에 제거하여 약간 혼탁한 용액을 수득하였다. 건조 DMA (8 ml) 중의 엘라이도일 염화물의 용액 (4.8 mmol, 1.44 g)의 용액을 실온에서 1시간 이상 첨가하였다. 반응 혼합물을 30°C에서 밤새 가열하고, 실온으로 냉각시키고, 메탄올 (0.05 ml)로 급

냉시켰다. 1시간 이상 후에, 반응 혼합물을 약  $10^{-2}$  mbar에서 농축시키고, 잔류물을 포화된 수성 NaHCO<sub>3</sub>와 에틸 아세테이트 사이에서 분배시켰다. 수성 상을 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기 상을 모으고, 세척하고 (염수), 건조시키고 (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 진공 하에 농축시켰다. 속성 크로마토그래피 (0 - 10% 메탄올과 함께 SiO<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)에 의한 정제로 0.9 g (43%)의 생성물을 수득하였다.

#### [0090] 실시예 7 - 종양 세포에 대한 5-아자시티딘 5'-엘라이데이트의 생체외 효과

[0091] 백혈병 및 고형 종양 세포주에 대한 5-아자시티딘 5'-엘라이데이트 및 5-AzaC의 세포독 활성을 비교하였다. 5-AzaC와 비교하여, 5-아자시티딘 5'-엘라이데이트의 세포독성 효과는 연구한 모든 세포주에서 더 높다. 고형 종양과 비교하여, 백혈병 세포주는 5-아자시티딘 5'-엘라이데이트 (CP) 및 5-AzaC 둘 모두에 대해 더 감수성이었다. 참조: 하기의 표 2 및 도 IA-B.

[0092] [표 2]

[0093] 백혈병 및 고형 종양 세포주에 대한 5-아자시티딘 5'-엘라이데이트 (CP) 및 5-AzaC의 비교 세포독 활성 ( $IC_{50}$  값). 세포를 24시간, 48시간 및 72시간 동안 처리하고, 세포독성을 WST-1 검정으로 결정하였다.  $IC_{50}$ 을 캘쿠션 소프트웨어를 사용하여 계산하였다.

		24 시간 ( $\mu M$ )	48 시간 ( $\mu M$ )	72 시간 ( $\mu M$ )
<b>U937</b>	<b>CP</b>	0.44	0.60	0.87
	<b>5-AzaC</b>	1.63	2.37	4.77
<b>K562</b>	<b>CP</b>	1.26	0.92	0.42
	<b>5-AzaC</b>	8.27	15.51	5.83
<b>HL60</b>	<b>CP</b>	3.19	3.60	2.68
	<b>5-AzaC</b>	7.28	4.92	4.71
<b>Jurkat</b>	<b>CP</b>	1.19	0.88	0.84
	<b>5-AzaC</b>	9.5	5.32	4.77
<b>MCF-7</b>	<b>CP</b>	19.10	9.32	9.99
	<b>5-AzaC</b>	>160	93.7	53.00
<b>DU145</b>	<b>CP</b>	6.79	6.31	5.88
	<b>5-AzaC</b>	20.94	7.11	7.20
<b>5637</b>	<b>CP</b>	9.39	5.95	3.52
	<b>5-AzaC</b>	24.56	6.72	5.21

[0094]

[0095] 아자시티딘에서 관찰되지 않은 5-아자시티딘 5'-엘라이데이트에 대한 활성의 초기 개시는 놀라운 결과이다.

#### [0096] 실시예 8 - 백혈구에서의 아포토시스 유도

[0097] HL60, K562 및 U937 세포를 비처리하거나 24시간 동안 5-아자시티딘 5'-엘라이데이트 (0.5-4  $\mu M$ )으로 처리하였

다. 아포토시스 세포의 비율을 아크리딘 오렌지 및 에티듐 브롬화물로 염색한 후에 형광 현미경을 사용하여 결정하였다 (도 2A 참조). 나머지 세트의 실험에서는, HL60 및 K562를 비처리하거나 24시간 동안 5-아자시티딘 5'-엘라이테이트 (1, 2 또는 4  $\mu\text{M}$ )으로 처리하였다. 아포토시스 세포의 비율을 아넥신-V 및 PI 염색을 사용하여 유동 세포 분석법에 의해 결정하였다. 두 방법 모두 5-아자시티딘 5'-엘라이테이트가 아포토시스 세포의 수의 농도-의존성 증가를 유도함이 입증되었다 (도 2A 및 2B 참조).

#### [0098] 실시예 9 - 세포 주기 진행

세포 주기에 대해 5-아자시티딘 5'-엘라이테이트에 대한 노출의 효과를 연구하였다. 세포를 유동 세포 분석법에 의한 DNA 함량의 분석을 위해 처리하기 전에 제시된 시간 동안 배양하였다. 평면에서 수치 값은 서브-G1 DNA 함량을 갖는 게이트 세포군을 나타낸다. 가장 현저한 변화가 24시간 처리 후에 관찰되었다. 대조군 (8.3%)와 비교하여, 서브-G1 단계에서의 비율 (아포토시스 세포)은 5-아자시티딘 5'-엘라이테이트 2  $\mu\text{M}$ 로 처리한 세포에서 33.6% 까지 증가하였으며, G1, S 및 G2/M 단계에서는 감소하였다. 결과를 도 3 및 하기의 표 3에 요약하였다. 이를 결과로 5-아자시티딘 5'-엘라이테이트에 의한 아포토시스 유도가 확인되었으며, 5-아자시티딘 5'-엘라이테이트가 농도-의존성 방식으로 세포 주기에 영향을 줌이 입증되었다.

[표 3]

세포 주기에 대한 5-아자시티딘 5'-엘라이테이트 (CP)의 효과. 세포를 유동 세포 분석법에 의한 DNA 함량의 분석을 위해 처리하기 전에 제시된 시간 동안 배양하였다. 나타낸 수는 다양한 단계에서의 세포 비율이다.

<b>24 시간</b>		<b>투여량(<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b>서브 G1</b>	<b>G1</b>	<b>S</b>	<b>G2/M</b>
<b>1</b>	<b>대조군</b>	<b>0</b>	<b>8.26</b>	<b>38.61</b>	<b>33.35</b>	<b>12.7</b>
<b>2</b>	<b>cp</b>	<b>0.5</b>	<b>9.41</b>	<b>43.66</b>	<b>28.15</b>	<b>11.05</b>
<b>3</b>		<b>1</b>	<b>21.02</b>	<b>36.17</b>	<b>18.98</b>	<b>8.82</b>
<b>4</b>		<b>2</b>	<b>33.59</b>	<b>23.45</b>	<b>9.14</b>	<b>2.64</b>
<b>48 시간</b>						
<b>1</b>	<b>대조군</b>	<b>0</b>	<b>4.8</b>	<b>41.1</b>	<b>31.14</b>	<b>18.34</b>
<b>2</b>	<b>cp</b>	<b>0.5</b>	<b>15.14</b>	<b>34.79</b>	<b>42.96</b>	<b>2.53</b>
<b>3</b>		<b>1</b>	<b>14.34</b>	<b>28.07</b>	<b>30.06</b>	<b>17.91</b>
<b>4</b>		<b>2</b>	<b>24.34</b>	<b>22.51</b>	<b>15.62</b>	<b>7.78</b>
<b>72 시간</b>						
<b>1</b>	<b>대조군</b>	<b>0</b>	<b>9.28</b>	<b>47.72</b>	<b>27.39</b>	<b>14.64</b>
<b>2</b>	<b>cp</b>	<b>0.25</b>	<b>10.88</b>	<b>40.14</b>	<b>28.13</b>	<b>18.25</b>
<b>3</b>		<b>0.5</b>	<b>10.54</b>	<b>38.72</b>	<b>29.18</b>	<b>18.82</b>
<b>4</b>		<b>1</b>	<b>10.75</b>	<b>40.67</b>	<b>28.77</b>	<b>18.26</b>

[0102]

#### [0103] 실시예 10 - 분화 유도

세포 분화를 형태학적으로 연구하였다. 단일 노출 (96시간)이 효과를 갖지 않기 때문에, 세포를 11시간 (HL60 세포) 또는 14일 (U937 및 K562 세포) 동안 5-아자시티딘 5'-엘라이테이트 또는 5-AzaC에 노출시켰다. 0일째에 초기 처리 후에, 세포를 4일, 7일 및 10일째에 약제의 새로운 부분에 노출시켰다. 분화를 NBT 감소 검정 (U937

및 HL60)에 의해 또는 벤지딘 염색 (K562)에 의해 평가하였다. 5-아자시티딘 5'-엘라이드산은 약간 더 효과적이지만, 제제 둘 모두는 현저한 분화를 유도하지 않았다. 도 4A-B 참조.

[0105] 실시예 11 - 푸울링된 인간 혈장 중의 5-아자-5'-엘라이드산 에스테르의 대사 안정성

5-아자-C-5'-엘라이드산 에스테르를 5가지 최종 농도 수준 (각각, 0.1, 1, 3, 10 및 30  $\mu\text{M}$ )으로 푸울링된 인간 혈장 내로 소량첨가하였다 (spiked). 혼합물을 37°C에서 진탕 수조 중에서 배양했다. 인큐베이션 용액의 분취액 ( $100\mu\text{l}$ )을 계획된 인큐베이션 기간 (0, 15, 30, 60 및 120 분)에서 삼중으로 배출시키고 ( $n=3$ ), 혈장 단백질을 0.1% 포름산을 함유하는 아크릴로니트릴 ( $300\mu\text{l}$ )을 사용하여 즉시 침전시켰다. 네거티브 대조군을 하나의 농도의 인큐베이션 ( $1 \mu\text{M}$ )에서 검정 완충제 (PBS, pH 7.4) 중에서 시험 화합물 및 Aza-C를 사용하여 제조하였다. 배열 후에, 상등액을 LC-MS-MS 분석을 위해 직접 도입하였다. 표 4 참조.

[표 4]

푸울링된 인간 혈장 중의 5-아자-5'-엘라이드산 에스테르의 대사 안정성

농도 ( $\mu\text{M}$ )	초기의 잔류 % (평균 $\pm$ SD, $n = 3$ )					반감기 (분)
	0 분	15 분	30 분	60 분	120 분	
0.1	100	95.8 $\pm$ 3.0	95.0 $\pm$ 2.0	92.1 $\pm$ 3.4	59.0 $\pm$ 1.6	161
1	100	93.3 $\pm$ 1.1	88.9 $\pm$ 1.1	79.8 $\pm$ 2.6	52.5 $\pm$ 3.1	130
3	100	99.0 $\pm$ 3.5	96.0 $\pm$ 3.0	85.4 $\pm$ 3.4	56.6 $\pm$ 1.6	141
10	100	96.0 $\pm$ 2.0	93.1 $\pm$ 0.0	77.1 $\pm$ 3.1	39.1 $\pm$ 1.7	86
30	100	97.7 $\pm$ 3.5	90.4 $\pm$ 2.6	78.5 $\pm$ 1.7	47.4 $\pm$ 1.1	109

[0109]

[0110] 실시예 12 - 아자-C 및 5-아자-C-5'-엘라이드산의 세포독성

아자-C 및 5-아자-C-5'-엘라이드산의 세포독성을 유방암 세포계 MT-3 및 아드리아블라스틴 저항성 세포주 MT-3/ADR에서 결정하였다. MT-3/ADR은 MDR-1/p-당단백질을 과발현시켰다. 세포를 2 mM 글루타민 및 10% FBS를 갖는 RPMI 1640 배지 중에서 웰당  $5 \times 10^3$  개 세포로 96-웰 플레이트에 뿐렸다. 세포를 24시간 동안 배양했다. 시험 화합물을 DMSO 중에 용해시키고, 사용 직전에 배지 중에서 추가로 희석시켰다. 시험 농도당 6개의 웰을 사용하였다. 세포를 24시간 동안 시험 화합물과 배양했다.  $20\mu\text{l}$ 의 새로 제조한 MTT 용액을 각각의 웰에 첨가하고, 4시간 동안 배양했다. IC<sub>50</sub> 값을 0.01  $\mu\text{M}$  내지 100  $\mu\text{M}$ 의 8가지 상이한 농도에 균거하여 그래프로 제공한 성장 곡선으로부터 결정하였다. 결과를 표 5에 나타내었다. MT-3 유방 암종 세포주에서 아자-C 및 5-아자-C-5'-엘라이드산에 대해 유사한 활성이 관찰되었지만, MT-3/ADR 저항성 세포주에서는 아자-C의 활성이 손실되었다. 100  $\mu\text{M}$  이하에서 시험한 농도 범위에서는 활성이 관찰되지 않은 반면, 5-아자-C-5'-엘라이드산은 저항성 세포주 및 비저항성 MT-3 세포주에서 유사한 IC<sub>50</sub> 값을 갖는 활성이었다. 이는 저항성 암의 치료에서 중요할 수 있다. 표 5 참조.

[표 5]

다중 약제 저항성의 존재 또는 부재하의 유방 암종 세포주 MT-3 중의 5-아자-C-5'-엘라이드산의 세포독 활성		
	아자-C IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	5-Aza-C-5'-엘라이드산 IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )
MT-3 유방 암종	$12.62 \pm 2.35$	$17.03 \pm 15.75$
MT-3/ADR 저항성 유방 암종	$>100$	$14.82 \pm 12.76$

[0113]

[0114] 실시예 13 - 뉴클레오시드 운반 억제 아자-C 및 5-아자-C-5'-엘라이드산의 의 영향

[0115] 세포독 활성을 대한 뉴클레오시드 운반 억제의 영향을 아자-C 및 5-아자-C-5'-엘라이드산에 대해 헬라 돌여변이 자궁 암종 세포에서 평가하였다. 디피리다몰을 평형 뉴클레오시드 운반체 hENT1 및 hENT2의 억제제로서 사용하였다. 세포를 2 mM 글루타민 및 10% FBS를 갖는 RPMI 1640 배지 중에서 웨일당  $5 \times 10^3$  개 세포로 96-웰 플레이트에 뿐렸다. 세포를 24시간 동안 사전 배양했다. 디피리다몰 ( $10 \mu\text{M}$ )을 시험 화합물의 첨가 30분 전에 세포에 첨가하였다. 시험 화합물을 DMSO 중에 용해시키고, 사용 직전에 배지 중에서 추가로 희석시켰다. 시험 농도당 6개의 웰을 사용하였다. 세포를 72시간 동안 시험 화합물과 배양했다.  $20 \mu\text{l}$ 의 새로 제조한 MTT 용액을 각각의 웰에 첨가하고, 4시간 동안 배양했다.  $\text{IC}_{50}$  값을 0.01 내지  $100 \mu\text{M}$ 의 8가지 상이한 농도에 근거하여 그레프로 제공한 성장 곡선으로부터 결정하였다. 결과를 표 6에 나타내었다. 아자-C의 활성은 뉴클레오시드 운반 억제제 디피리다몰의 첨가에 의해 3배 감소하였으며, 이는 아자-C의 유입 및 유출이 뉴클레오시드 운반체 hENT1 및 hENT2에 부분적으로 의존함을 제시하는 것이다. hENT1 및 hENT2 뉴클레오시드 운반체를 디피리다몰의 사용에 의해 차단할 경우에, 5-아자-C-5'-엘라이드산의 세포독 활성은 유지될 뿐만 아니라 50배 증가된다. 뉴클레오시드 운반체가 디피리다몰에 의해 차단되는 경우의 세포의 증가된 활성은 놀라운 것이며, 뉴클레오시드 운반체의 결핍에 의해 유발되는 치료에 대한 저항성을 갖는 환자에 있어서 훨씬 더 높은 활성을 나타낼 수 있다. 표 6 참조.

[0116] [표 6]

뉴클레오시드 운반 억제제의 첨가 또는 첨가 없이 헬라 자궁 암종 세포에서의 아자-C 및 5-아자-C-5'-엘라이드산의 세포독 활성		
	아자시티딘 $\text{IC}_{50} (\mu\text{M})$	5-아자-C-5'-엘라이드산 $\text{IC}_{50} (\mu\text{M})$
헬라	4.32	12.00
디피리다몰을 갖는 헬라	12.77	0.23

[0117]

[0118] 실시예 14 - 핵전이 인자 -  $\kappa$ B (NF  $\kappa$ B)의 활성화

[0119] 핵전이 인자 -  $\kappa$ B (NF  $\kappa$ B)의 활성화를 염증에 대한 영향을 평가하기 위해 평가하였다. NF  $\kappa$ B를 많은 면역 및 염증 반응, 발달 과정, 세포 성장 및 아포토시스의 조절에 수반시켰다.

[0120] NF  $\kappa$ B -루시퍼라아제 리포터 유전자를 사용하여 3개의 NF  $\kappa$ B 결합 자리를 함유하는 루시퍼라아제 리포터로 안정하게 형질감염된 인간 단구 세포주 U937에서 NF  $\kappa$ B 유도 루시퍼라아제 활성에 대한 아자-C 및 5-아자-C-5'-엘라이드산의 영향을 결정하였다. NF  $\kappa$ B의 유도를  $10 \text{nM}$ 의 농도로 아자-C 또는 5-아자-C-5'-엘라이드산을 배지에 첨가하기 전에 30분 동안  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 지질다당류 (LPS)를 사용하여 수행하였다. 세포를 10% 소태아 혈청을 포함하는 RPMI 1640 배지 중에서 배양시켰다. LPS에 의한 자극 전에, 세포를 2% 소태아 혈청만을 포함하는 배지에 옮겼다. 루시퍼라아제 활성을 1시간, 3시간 또는 6시간 후에 IVIS 이미징 시스템 100 (미국의 크세노젠 코포레이션 (Xenogen Corp.))에서 이미지화에 의해 측정하였다. LPS 자극은 DMSO 처리 대조군 세포에서 후속되는 6시간 이상 시간에 따라 증가하였다.  $10 \text{nM}$  아자-C에 대한 노출은 DMSO 처리 대조군과 비교하여 LPS 유도 NF  $\kappa$ B 활성화를 추가로 증가시켰다. 5-아자시티딘-5'-엘라이드산은 LPS 자극 NF  $\kappa$ B 활성에서 DMSO 대조군과 상이하지 않았다. 일반적으로, 아자시티딘에 대해 관찰된 바와 같은 NF  $\kappa$ B의 포지티브 자극은 명백하지 않고, LPS 자극이 5-아자-C-5'-엘라이드산에 의해 추가로 증가되 않는 점은 명백하다. 도 5 참조.

[0121] 실시예 15 - 아자시티딘 또는 5-아자시티딘 5'-엘라이드산에 의한 처리 후의 유방암 세포주에서의 에스트로겐 수용체  $\beta$  (ER $\beta$ )의 유전자 발현

[0122] 에스트로겐 수용체 베타의 유전자 발현 (RNA 수준으로 결정함)을 정량적 실시간 PCR (타크만(TaqMan))에 의해 결정하였다. MCF-7 유방 암종 세포를 에스트로겐 결핍 배지 (2% 글루타민 및 10% 채콜-텍스트란 처리 소태아 혈청을 갖는 폐놀-레드 비함유 RPMI) 중에서 성장시켰다. 세포를  $25 \text{cm}^2$  플라스크 내로 뿐리고,  $1 \mu\text{M}$ 의 아자시

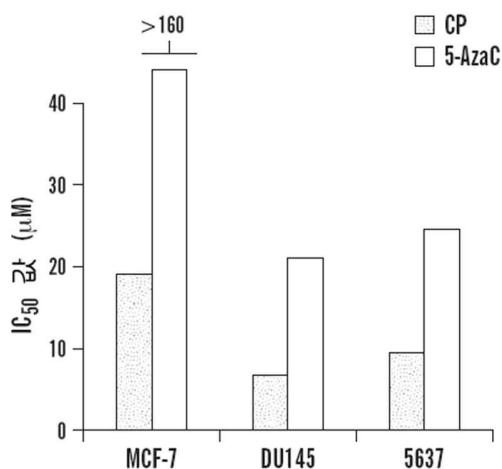
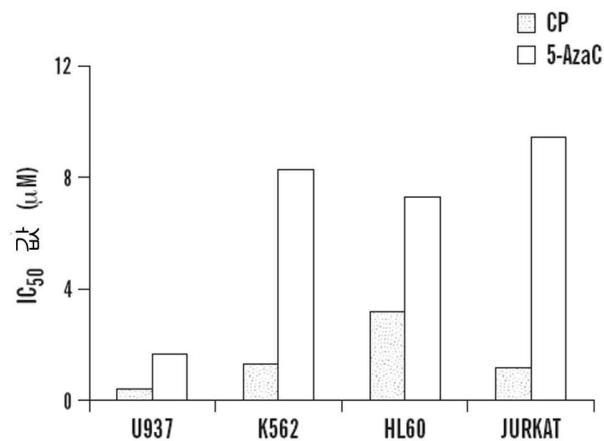
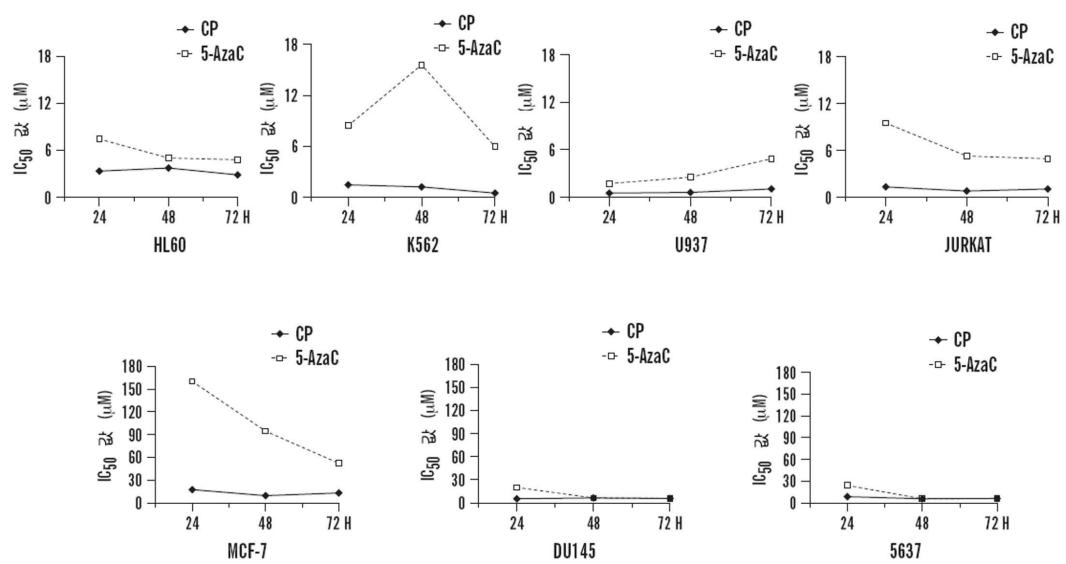
티딘 또는 5-아자시티딘 5'-엘라이데이트로 처리하기 전 24시간 동안 접착시켰다. 하나의 비처리 대조군을 대조군으로서 포함시켰다. 세포를 화합물에 대한 노출 5일 후에 수득하고; 이들을 트립신화에 의해 수득하고, 세척하고 액체 질소 중에서 충격 동결시켰다.

[0123] 총 RNA를 약 10<sup>6</sup>개의 충격 동결 MCF-7 세포로부터 추출하였다. RNA 농도 및 순도를 측정하고, RNA를 TaqMan 역전사 시약 (N808-0234)를 사용하여 cDNA로 전사시켰다. 실시간 정량화를 표준 프로토콜 및 사전혼합된 PCR 시약을 사용하여 수행하였다. 프라이머-프로브 혼합물, 즉 ERβ (ID Hs00230957\_m1) 및 관리 유전자 히드로실메틸-빌레인 (hydrocylmethyl-bilane) 합성 효소 (ID Hs00609297\_m1)를 어플라이드 바이오시스템즈로부터 주문하였다. 유전자 발현을 비교 델타-델타 Ct 방법을 사용하여 계산하였다. ERβ의 발현의 유도는 아자시티딘에 대한 노출 후의 단지 2.51배와 비교하여 5-아자시티딘 5'-엘라이데이트에 대한 노출 후에 5.26배이었다. 표 7 참조. 이는 호르몬 민감성이 회복될 수 있는 경우에 호르몬 치료 불응성 종양에서 고도로 관련될 수 있다. 표 7 참조.

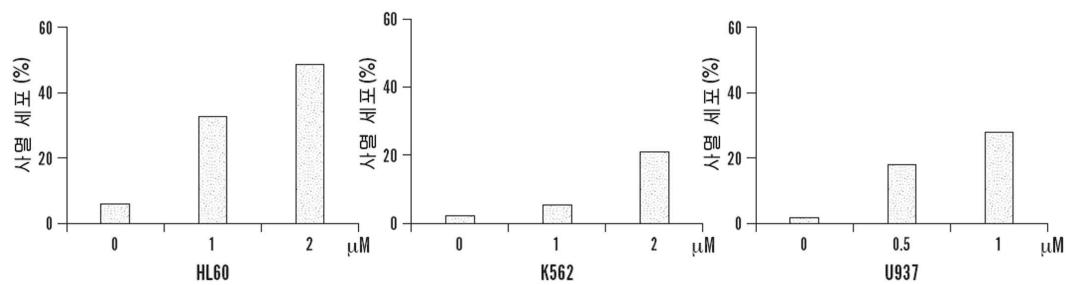
[표 7]

	Ct ER $\beta$	Ct HMBS	델타	델타 델타	ER $\beta$ 유전자의 x 배 유도
미처리	35.36	25.91	9.45		
1 $\mu$ M 5-아자-C-5'-엘라이드산	32.97	25.92	7.06	-2.40	5.26
1 $\mu$ M 아자-C	34.31	26.18	8.13	-1.32	2.51

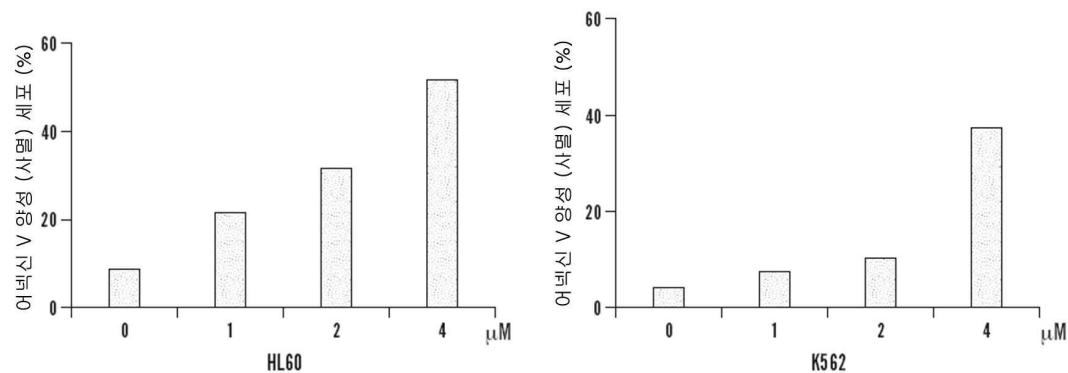
[0125] 바람직한 구현이 본원에서 상세히 서술되고 기술되었지만, 발명의 사상으로부터 벗어나지 않으면서 다양한 변형, 첨가, 대체 등이 이루어질 수 있으며 따라서 이들이 하기의 특허청구의 범위에 규정된 바와 같이 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 고려됨이 당업자들에게 명백해질 것이다.

**도면****도면1a****도면1b**

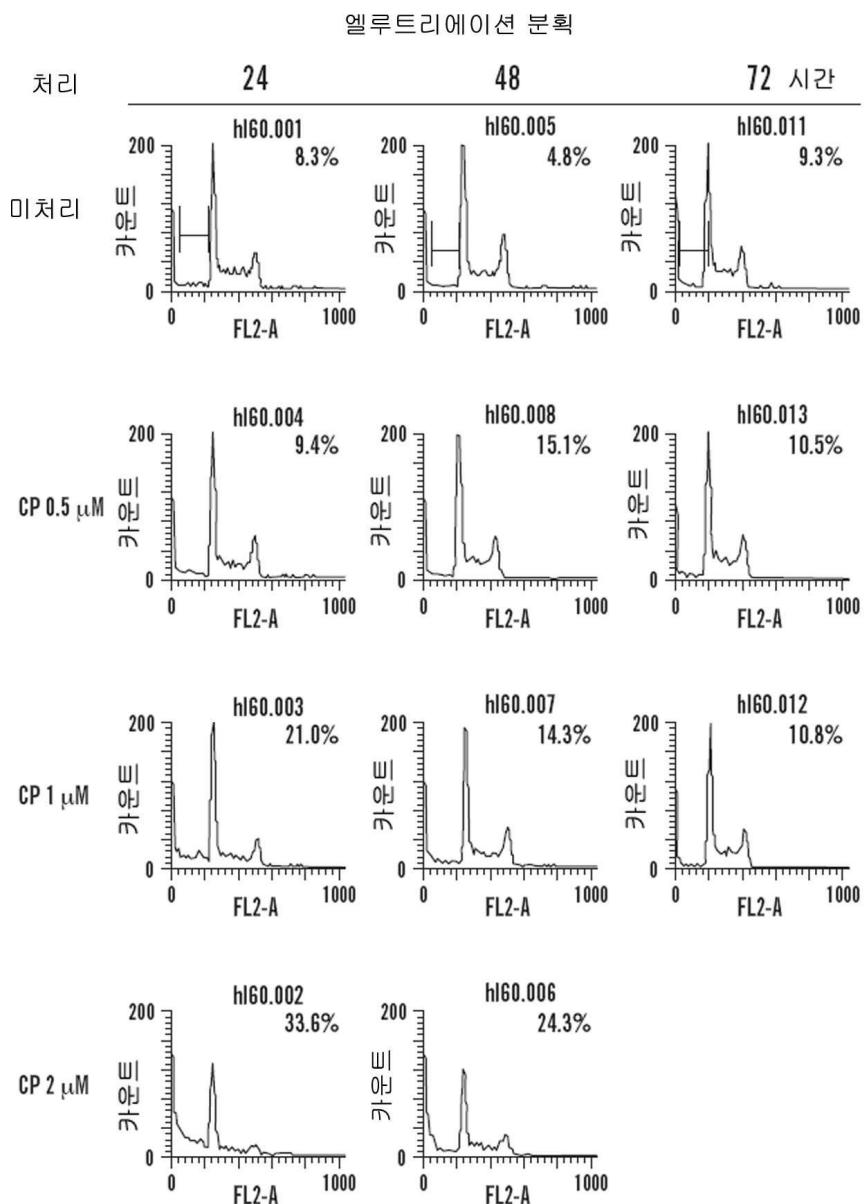
도면2a



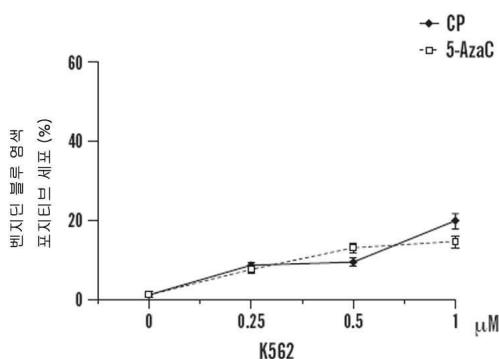
도면2b



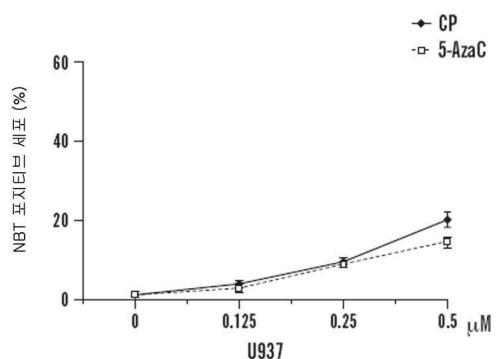
## 도면3



## 도면4



도 4A



도 4B

## 도면5

