



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년09월30일
(11) 등록번호 10-2307387
(24) 등록일자 2021년09월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 211/52 (2006.01) A61K 31/136 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01) A61K 31/495 (2006.01)
C07D 213/73 (2006.01) C07D 241/20 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07C 211/52 (2013.01)
A61K 31/136 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2016-7012036
- (22) 출원일자(국제) 2014년10월08일
심사청구일자 2019년10월08일
- (85) 번역문제출일자 2016년05월04일
- (65) 공개번호 10-2016-0070784
- (43) 공개일자 2016년06월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/CA2014/050974
- (87) 국제공개번호 WO 2015/051458
국제공개일자 2015년04월16일
- (30) 우선권주장
61/887,988 2013년10월08일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
R. Godemann et al., Fragment-Based Discovery
of BACE1 Inhibitors Using Functional Assays,
Biochemistry, 2009, 48, pp.10743-10751
WO2008082487 A2
WO2006067466 A2
US20030219440 A1

- (73) 특허권자
루, 켈-빈
캐나다, 온타리오 엔투티 투브이세븐, 워터루, 우
드로우 드라이브 414
- (72) 발명자
루, 켈-빈
캐나다, 온타리오 엔투티 투브이세븐, 워터루, 우
드로우 드라이브 414
- (74) 대리인
특허법인 남앤남

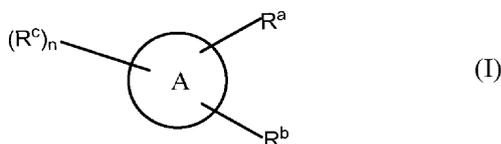
전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 박지한

(54) 발명의 명칭 표적화된 화학요법에 사용하기 위한 비-백금-기반 항암 화합물

(57) 요약

표적화된 화학요법에 유용한, 예컨대 독성을 갖지 않거나 최소의 독성을 가지면서 암 및 다른 질병의 치료를 위한 항암 효과를 발생시키는 비-백금-기반 (NPB) 항암 화합물이 본원에 기재된다. 화합물은 하기 화학식 I을 갖는다:



상기 식에서, A는 방향족 중심을 나타내고; R^a 및 R^b 중 적어도 하나는 본원에 정의된 바와 같은 전자 이동 프로 모터, 예컨대, NH₂이고; R^c 중 적어도 하나는 본원에 정의된 바와 같은 이탈기, 예컨대, 할로젠이며; 분자의 나머 지는 본원에 정의된 바와 같다. 항암 화합물을 포함하는 약학적 조성물, 방법, 용도, 키트 및 시판용 패키지가 또한 기재된다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/44 (2013.01)

A61K 31/495 (2013.01)

C07D 213/73 (2013.01)

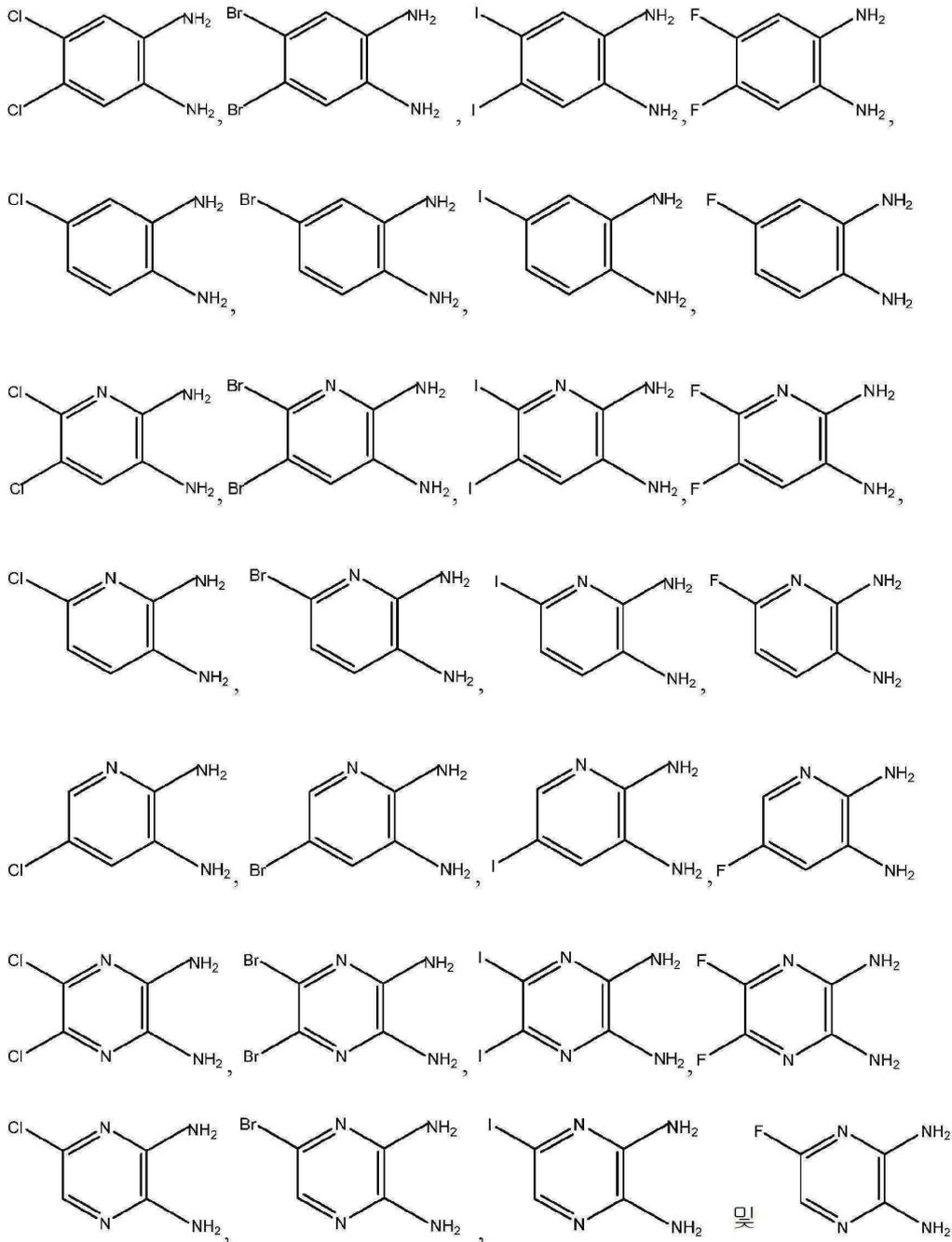
C07D 241/20 (2013.01)

명세서

청구범위

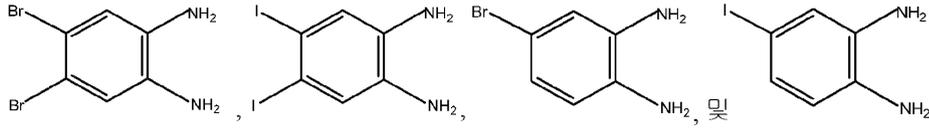
청구항 1

방사선 없이 피검체에서 백금(Pt)-기반 항암 약물에 의해 치료될 수 있는 암 또는 종양의 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물로서, 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염; 및 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 또는 희석제 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물:



청구항 2

제 1항에 있어서, 화합물이 하기로 구성된 군, 또는 이의 약학적으로 허용되는 염으로부터 선택되는 약학적 조성물:



청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 방사선을 제외시키고, 단독으로 사용하거나 다른 화학요법제 또는 암 요법과 함께 사용하기 위한 약학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 암이 고환암, 방광암, 자궁경부암, 난소암, 유방암, 전립선암, 두부암, 경부암, 폐암, 비소세포폐암, 자궁내막암, 췌장암, 카포시 육종, 부신 암종, 백혈병, 위암, 결장암, 직장암, 간암, 식도암, 신장암, 갑상선암, 자궁암, 피부암, 구강암, 뇌암, 척수암, 담낭암, 육종, 암종, 흑색종, 림프종, 골수종, 및 생식 세포종양으로 구성된 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 암이 자궁경부암, 난소암, 유방암, 폐암, 두부암, 경부암, 및 췌장암으로 구성된 군으로부터 선택되는 약학적 조성물.

청구항 6

제 3항에 따른 약학적 조성물; 및 암의 치료에서의 사용을 위한 설명서를 포함하는 시판용 패키지 또는 키트.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

- 청구항 16
- 삭제
- 청구항 17
- 삭제
- 청구항 18
- 삭제
- 청구항 19
- 삭제
- 청구항 20
- 삭제
- 청구항 21
- 삭제
- 청구항 22
- 삭제
- 청구항 23
- 삭제
- 청구항 24
- 삭제
- 청구항 25
- 삭제
- 청구항 26
- 삭제
- 청구항 27
- 삭제
- 청구항 28
- 삭제
- 청구항 29
- 삭제
- 청구항 30
- 삭제
- 청구항 31
- 삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원의 전후 참조**

[0002] 본 출원은 전문이 본원에 참조로서 포함되는, 2013년 10월 8일 출원된 미국 가특허출원 61/887,988호의 우선권의 이익을 주장한다.

배경 기술

[0003] 암은 전세계적으로 주요한 건강상 문제이고 암의 정복은 의료 과학에서의 큰 도전과제이다. 화학요법은 암 요법의 주요 양상 중 하나이고 일반적으로 하나 이상의 항암제 (화학요법제)를 사용하여 암을 치료하는 것을 의미한다. 일부 화학요법제는 또한 관절염(arthritis), 전신홍반루푸스(systemic lupus erythematosus), AL 아밀로이드증(AL amyloidosis), 강직척추염(ankylosing spondylitis), 다발경화증(multiple sclerosis), 크론병(Crohn's disease), 건선(psoriasis), 및 공피증(scleroderma)과 같은 다른 질병 및 질환을 치료하는데 사용된다.

[0004] 다수의 항암제는 유사분열을 손상시킴에 의해 작용하여, 대부분의 암 세포의 특징적인 속성인 빠르게-분열하는 세포를 표적화한다. 일부 작용제는 세포가 분열하는 것을 중단시키고 다른 작용제는 예컨대 아포토시스(apoptosis)를 촉발시킴에 의해 세포를 사멸시킨다. 새로운 특정 작용제들 (예컨대, 다양한 모노클로날 항체)이 더욱 표적화된 요법 (전통적인 화학요법과 별개의), 예를 들어 암 세포의 특정 유형에서 과발현되고 이들의 성장에 필수적인 특수한 단백질을 표적화하는 것들을 제공하기 위해 개발 중이다. 그러한 치료제는 종종 항신생물 치료 요법에서 전통적인 화학요법제와 함께 이용된다.

[0005] 화학요법은 한 번에 하나의 항암제 (단일-작용제 화학요법 또는 단일-화학요법) 또는 한 번에 여러 작용제 (조합 화학요법)를 이용할 수 있다. 방사선 요법 (이온화 방사선)에 대한 암의 방사선민감성을 향상시키는 화학작용제를 방사선민감제라고 부른다. 광에 노출시에만 세포독성 활성으로 전환되는 화학 물질 (소위 광민감제)을 이용한 치료를 광역학 요법이라고 부른다.

[0006] 다양한 항암제가 이용될 수 있지만, 거의 모두가 독성이다. 화학요법은 신장 독성, 간 독성, 심각한 구역 및 구토, 골수 억제(bone marrow depression), 골수억제(myelosuppression)/면역억제, 점막염(mucositis)(소화관의 내층의 염증), 탈모(alopecia)(모발 손실), 혈구감소증(cytopenia), 통증과 피로를 포함하는 현저하고, 종종 위험한 부작용을 일반적으로 초래한다. 추가의 부작용은 악액질(cachexia), 피부 합병증, 예컨대 과민 반응, 뿐만 아니라 신경, 폐, 심장, 생식 및 내분비 합병증을 포함할 수 있다. 항암제와 관련된 부작용은 일반적으로 그 작용제의 용량-제한적 독성 (DLT)을 정의하는 주요 인자이다. 화학요법에 의해 유도된 부작용 효과를 관리하는 것은 암 치료의 임상 관리에서 중대하며 매우 중요하다. 또한, 다수의 종양 세포는 내성이거나, 예컨대, 다중-약물 내성을 통해, 항암제에 대해 내성을 발생시킨다.

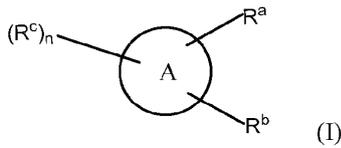
- [0007] 시스플라틴 (시스-Pt(NH₃)₂Cl₂)은 백금-기반 항신생물 약물이고 암 치료에 가장 광범하게 사용되는 약물 중 하나이다. 시스플라틴은 또한 이온화 방사선에 대한 암 세포의 방사선민감성을 향상시키는 방사선민감제로서 사용되어 왔다 [Rose et al., 1999]. 시스플라틴의 광범한 사용에도 불구하고, 이는 두 가지 주요 단점을 갖는다: 심각한 독성 부작용 및 고유 및 획득 돌 모두의 내성. 이러한 단점은 심지어 중금속 Pt-기반 항암 약물의 임상 적용을 종료시킬 필요를 야기시켰다 [Reese, 1995]. 시스플라틴 독성을 감소시키고/거나 약물 내성을 억제 또는 극복하는 덜 독성인 유사체를 식별할 필요가 남아 있다.
- [0008] 제약 회사의 비용 증가에도 불구하고, US 식품의약국 및 세계의 다른 주요 규제 기관에 의해 승인되는 진정으로 혁신적인 신약의 수는 지난 십년 동안 감소되어 왔다. 신규한 항암제의 식별은, 일반적으로 매우 많은 수의 화합물을 스크리닝하여 추가 조사를 위한 매우 소수의 잠재적인 후보 분자를 식별하는 것을 수반하는, 다소 경험적인 프로세스를 유지한다. 따라서, 신규한 항암제의 설계를 위한 보다 합리적이고 효율적인 접근법에 대한 요구가 존재한다. 결합-기반 스크리닝, 억제제-기반 스크리닝 및 구조-기반 약물 설계와 같은 다양한 약물 발견 도구가 사용될 수 있지만, 중요한 문제는 현재 사용 중이거나 임상 시험 중인 대부분의 항암 약물의 정확한 분자 작용 메커니즘에 대한 이해의 부족이었다. 특정 메커니즘적 이해 없이, 개별 요법의 성공 및 실패를 배우는 것은 어렵다. 따라서, 전통적인 방법에 의한 신규한 항암 약물의 탐색은 고가이고, 어려우며, 비효율적인 것으로 입증되었다. 궁극적으로 암을 정복하기 위해 DNA 손상/복구의 기본적인 메커니즘, 아포토시스, 종양형성, 및 분자 측면에서의 치료의 더 깊은 이해에 초점을 맞춘 혁신적인 암 연구가 강력하게 요구되며 [Varmus, 2006; Alberts, 2008, 2011], 이는 결국 암 요법에서의 돌파구가 될 수 있을 것이다.
- [0009] 분자 반응의 직접 관찰은 화학 및 생물학에서 의학까지의 다양한 분야에서 매우 중요하다. 펨토초 (fs) (1fs=10⁻¹⁵ s) 시간-분해된 레이저 분광학 (fs-TRLS)은 실시간으로 분자 반응을 시각화하는 직접적인 기법이다. 이의 중요한 장점은 많은 분자 반응이 실제로 발생하는 시간 규모의 단기간 레이저 플래시에 있다. 화학적 및 생물학적 시스템에 이를 적용시켜 펨토회학 및 펨토허물학의 새로운 분야를 발생시켰다 [Zewail, 2000].
- [0010] 지난 십년 동안, 본 발명자들은 주요 인간 질병의 기본적인 이해 및 치료를 진보시키기 위해 초고속 레이저 기법과 생물학 과학의 융합을 수반한, 신생 통학문적 한계인 펨토회약 (femtomedicine)(FMD)을 만들어 냈다 [Lu, 2010]. 실제로, 펨토회약은 주요 인간 질병, 특히 암의 치료에서 가속화 발견 및 새로운 진전의 약속을 지킨다.
- [0011] 본 발명자들에 의한 FMD 연구는 인간 질병, 특히 암과 밀접하게 관련될 수 있는, 세포에서 환원성 손상 메커니즘 [Lu et al., 2013], 및 방사선요법과 함께 항암 약물 및 방사선민감제 둘 모두로서 시스플라틴의 해리성 전자 이동 (DET) 반응 메커니즘 [Lu, 2007; Lu et al., 2007; Lu, 2010]의 발견을 이끌었다. 이러한 메커니즘적 이해는 기존 약물의 요법을 개선시키고 새로운 효과적인 약물을 개발할 기회를 제공한다.
- [0012] 방사선과 함께 사용하기 위한 방사선민감제 화합물이라는 명칭의 PCT/CA2013/051005호 (본 발명자들에 의한)는 방사선요법의 항암 효능을 향상시키기 위해, 이온화 방사선을 이용하는, 방사선 요법과 조합된 비-백금 기반 화합물의 부류를 기재하고 있다. 화합물은 이온화 방사선에 대한 암 세포의 방사선민감성을 증대시키는 것으로 나타났다 (또한, Lu, 2014를 참조하라).

발명의 내용

[0013] **발명의 개요**

[0014] 일반적으로, 본 발명은 펨토회약 접근법을 통해 발견된 비-백금-기반 항암 화합물 (이하, NPB로 줄여서 씀)의 부류에 관한 것이다. 화합물은 시험관내 및 생체내 항암 효과를 유도하며 정상 세포에 대해 독성이 거의 또는 전혀 없는 것으로 발견되었다. 화합물은 표적화된 화학요법에서 항암제로서 이용될 수 있는데, 그 이유는 이들이 정상 세포에 대해 최소의 독성을 가지면서 암 세포를 사멸시키는 능력을 갖기 때문이다. 따라서, 본 발명은 또한 암 및 화학요법에 의해 치료될 수 있는 다른 질환에 대해 표적화된 화학요법에 관한 것이다. 본원에 기재된 NPB 화합물에 관한 조성물, 투여 형태, 방법, 용도, 시판용 패키지 및 키트가 또한 본원에 기재된다.

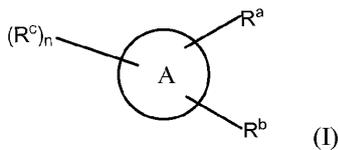
[0015] 한 양태에서, 하기 화학식 I을 갖는 NPB 향암 화합물이 제공된다:



[0016]

[0017] 상기 식에서, A는 방향족 중심을 나타내고; R^a 및 R^b 중 적어도 하나는 본원에 정의된 바와 같은 전자 이동 프로모터(electron transfer promoter)이고; R^c 중 적어도 하나는 본원에 정의된 바와 같은 이탈기이다.

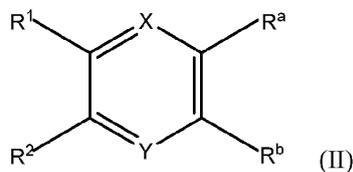
[0018] 한 양태에서, NPB 향암 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 I을 갖는다:



[0019]

[0020] 상기 식에서, A는 N, O 및 S로 구성된 군으로부터 선택되는 0-2개의 고리 헤테로원자를 함유하는 5- 또는 6-원 아릴 또는 헤테로아릴 고리이고, 나머지 고리 원자는 탄소이며; R^a 및 R^b는 독립적으로 H, OH, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴 또는 전자 이동 프로모터이고, 이 때 R^a 및 R^b 중 적어도 하나는 전자 이동 프로모터이며; R^c는 각각의 발생에 대해 독립적으로 H, OH, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴, 또는 이탈기이거나, 2개의 인접한 R^c 기는 이들이 부착된 고리 원자와 함께 취해져 N, O 및 S로 구성된 군으로부터 선택되는 0-2개의 고리 헤테로원자를 함유하고 1 내지 4개의 R^d로 치환되거나 치환되지 않을 수 있는 5- 또는 6-원의 포화, 부분 포화 또는 불포화된 고리를 형성하고; 적어도 하나의 R^c는 이탈기이고; R^d는 독립적으로 OH, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이고; n = 1-4이고, 여기서 각각의 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴 모이어티(moieties)는 치환되거나 치환되지 않는다.

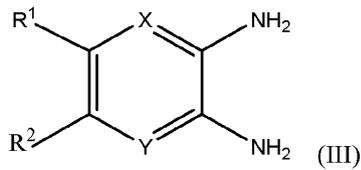
[0021] 또 다른 양태에서, 하기 화학식 II를 갖는 NPB 향암 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 제공된다:



[0022]

[0023] 상기 식에서, X 및 Y는 독립적으로 C-R³ 또는 N이고; R³은 H, OH, 할로젠, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 또는 헤테로아릴이고; R^a 및 R^b는 독립적으로, H, OH, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴 또는 전자 이동 프로모터이고, 이 때 R^a 및 R^b 중 적어도 하나는 전자 이동 프로모터이며; R¹ 및 R²는 독립적으로, H, OH, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴, 또는 이탈기이고; 여기서 R¹ 및 R² 중 적어도 하나는 이탈기이고, 여기서 각각의 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴 모이어티는 치환되거나 치환되지 않는다.

[0024] 또 다른 양태에서, 하기 화학식 III을 갖는 NPB 향암 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 제공된다:



[0025]

[0026] 상기 식에서, X 및 Y는 독립적으로 C-R³ 또는 N이고; R³은 H, OH, 할로젠, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 또는 헤테로아릴이고; R¹ 및 R²는 독립적으로, H, OH, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴, 또는 이탈기이고; 이 때 R¹ 및 R² 중 적어도 하나는 이탈기이고, 여기서 각각의 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴 모이어티는 치환되거나 치환되지 않는다.

[0027] 화학식 I 또는 II의 일부 구체예에서, 각각의 R^a 및 R^b는 전자 이동 프로모터이다. 본원에 기재된 일부 구체예에서, 전자 이동 프로모터는 -NH₂, -NHR, -NR₂, -OH, -NHCOCH₃, -NHCOR, -OCH₃, 및 -OR로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 전자 이동 프로모터는 -NH₂, -NHR, 또는 -NR₂이다. 일부 구체예에서, R은 치환되거나 치환되지 않은 알킬이다. 일부 구체예에서, R^a 및 R^b는 각각 전자 이동 프로모터이다. 일부 구체예에서, R^a 및 R^b는 인접한 고리 탄소 원자 상에 있다. 일부 구체예에서, 전자 이동 프로모터는 -NH₂이다.

[0028] 일부 구체예에서, 이탈기는 할로젠이다. 화학식 I의 일부 구체예에서, 고리 A 상의 1개 또는 2개의 R^c 기는 할로젠이다. 화학식 I의 일부 구체예에서, 고리 A 상의 2개의 R^c 기는 할로젠이다. 일부 구체예에서, 할로젠은 Cl, Br, I 또는 F이다. 일부 구체예에서, 할로젠은 Cl, Br 또는 I이다.

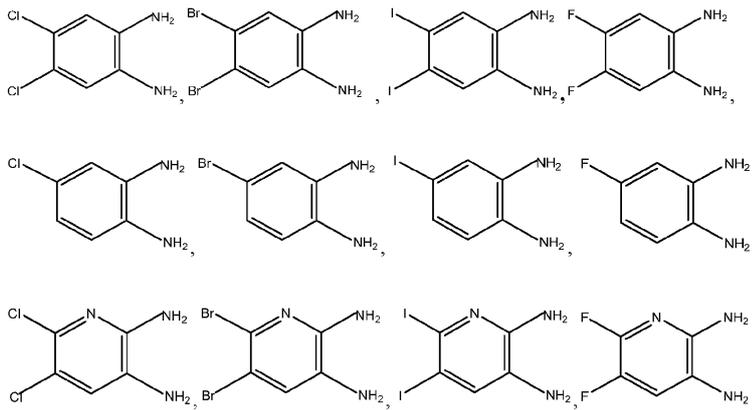
[0029] 화학식 I의 일부 구체예에서, 고리 A는 6-원 아릴 또는 헤테로아릴 고리, 예컨대 벤젠, 피리딘 또는 피라진이다. 일부 구체예에서, 고리 A는 벤젠이다.

[0030] 화학식 I의 일부 구체예에서, 고리 A는 벤젠, 피리딘 또는 피라진이고; 각각의 R^a 및 R^b는 NH₂이고; 고리 A 상의 2개의 R^c 치환기는 할로젠이고 각각은 고리 A 상의 R^a 및 R^b에 대해 메타로 정위되며; 임의의 남아 있는 R^c 기는 본원에 정의된 바와 같다. 일부 구체예에서, 고리 A는 벤젠이고, 일부 추가의 구체예에서, 고리 A 상의 남아 있는 탄소는 치환되지 않은 탄소이다. 일부 구체예에서, 고리 A는 피리딘이고, 추가의 구체예에서, 고리 A 상의 남아 있는 탄소는 치환되지 않는다. 일부 구체예에서, 고리 A는 피라진이다.

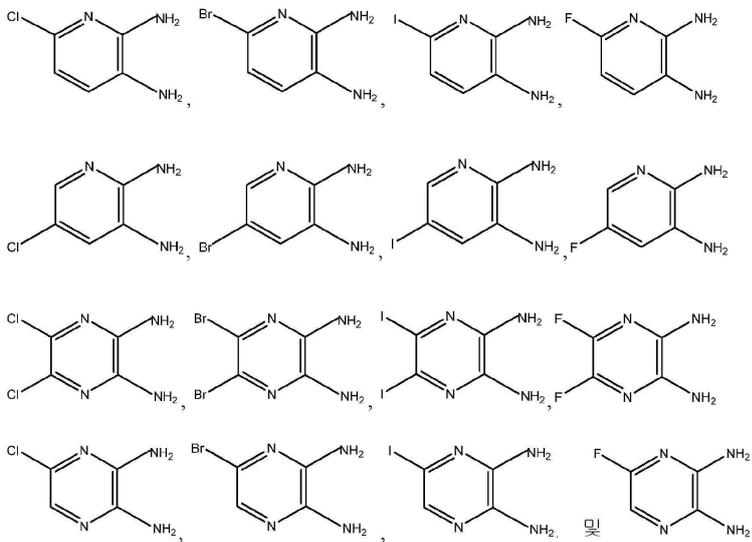
[0031] 화학식 II 또는 III의 일부 구체예에서, R¹ 및 R²는 둘 모두 이탈기, 예컨대 할로젠이다. 일부 구체예에서, 각각의 할로젠은 Cl, Br, I 또는 F로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0032] 화학식 II 또는 III의 일부 구체예에서, X 및 Y는 C-R³이다. 화학식 II 또는 III의 일부 구체예에서, X는 C-R³이고 Y는 N이다. 일부 구체예에서, R³은 H, OH, 할로젠, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 또는 헤테로아릴이다. 일부 구체예에서, 고리 탄소가 치환되지 않은 경우, R은 H이다. 화학식 II 또는 III의 일부 구체예에서, X 및 Y는 각각 N이다.

[0033] 일부 구체예에서, NPB 화합물은 하기로 구성된 군으로부터 선택되는 화합물이다:



[0034]



[0035]

[0036] 일부 구체예에서, 본원에 기재된 NPB 화합물은 0 eV 초과 전자 친화도를 갖는다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 NPB 화합물은 약 +0.0 eV 내지 +5 eV의 전자 친화도를 갖는다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 NPB 화합물은 약 +0.5 eV 내지 약 +2.5 eV의 전자 친화도를 갖는다.

[0037] 또 다른 양태에서, 암 세포를 치료하는데 사용되는 (예컨대, 암 세포에서 항암 효과를 유도하기 위한) 본원에 정의된 바와 같은 NPB 화합물이 제공된다.

[0038] 또 다른 양태에서, 피검체에서 화학요법에 의해 치료될 수 있는 질병 또는 질환을 치료하는데 사용하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 NPB 화합물이 제공된다. 상기 질병 또는 질환은 암이 아닌 질병 또는 질환일 수 있다.

[0039] 또 다른 양태에서, 피검체에서 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 NPB 화합물이 제공된다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 피검체에서의 암의 예방, 제어, 억제, 또는 완전한 치유를 위한 것일 수 있다.

[0040] 또 다른 양태에서, 피검체에서 암을 치료하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 NPB 화합물이 제공된다.

[0041] 또 다른 양태에서, 피검체에서 화학요법에 의해 치료될 수 있는 질병 또는 질환을 치료하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 NPB 화합물의 용도가 제공된다. 일부 경우에, 상기 질병 또는 질환은 본원에 달리 언급된 것과 같은 암이 아닌 질병 또는 질환일 수 있다. 일부 경우에, 질병 또는 질환은 암이다.

[0042] 또 다른 양태에서, 피검체의 암의 치료에서의 본원에 정의된 바와 같은 NPB 화합물의 용도가 제공된다. 또 다른 양태에서, 피검체에서 암을 치료하기 위한 약제의 제조에서의 본원에 정의된 바와 같은 NPB 화합물의 용도가 제공된다.

[0043] 또 다른 양태에서, 유효량의 본원에 정의된 바와 같은 NPB 화합물; 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제를

포함하는, 암 또는 화학요법에 의해 치료될 수 있는 다른 질병 또는 질환의 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물이 제공된다.

- [0044] 또 다른 양태에서, 본원에 정의된 바와 같은 NPB 화합물을 포함하는 암에 대해 표적화된 화학요법이 제공된다.
- [0045] 또 다른 양태에서, 유효량의 본원에 정의된 바와 같은 항암 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 피검체에서 암 또는 화학요법에 의해 치료될 수 있는 다른 질병 또는 질환을 치료하는 방법이 제공된다.
- [0046] 또 다른 양태에서, 유효량의 본원에 정의된 바와 같은 NPB 화합물을 암 세포에 투여하는 것을 포함하는, 암 세포에서 항암 효과를 유도하는 방법이 제공된다. 일부 구체예에서, 항암 효과는 암 세포를 사멸시키는 것이다. 일부 구체예에서, 암 세포는 종양 세포이다.
- [0047] 또 다른 양태에서, 유효량의 본원에 정의된 바와 같은 화합물을 세포에 투여하는 것을 포함하는, 암 세포에서 아폽토시스를 유도하는 방법이 제공된다.
- [0048] 또 다른 양태에서, 유효량의 본원에 정의된 바와 같은 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 피검체에서 화학치료 효과를 발생시키는 방법이 제공된다.
- [0049] 또 다른 양태에서, 유효량의 본원에 정의된 바와 같은 화합물을 피검체에 투여하고; 하나 이상의 추가적인 치료제를 피검체에 투여하는 것을 포함하는, 암 또는 화학요법에 의해 치료될 수 있는 다른 질환을 치료하기 위한 조합 요법이 제공된다. 일부 구체예에서, 치료제는 화학요법제이다.
- [0050] 또 다른 양태에서, 본원에 정의된 바와 같은 NPB 화합물; 및 화학요법에 사용하기 위한 설명서를 포함하는 시판용 패키지 또는 키트가 제공된다.
- [0051] 본원에 기재된 방법, 화합물, 조성물, 용도 및 키트의 일부 구체예에서, 치료는 방사선을 제외시킨다. 다시 말해, 화합물은 방사선민감제라기 보다 항암제로서 이용되도록 방사선의 부재하에 이용된다. 이는 피검체가 NPB 항암 활성과 상호작용하는 방식으로 방사선 치료를 받지 않음을 의미한다. 그러나 피검체는 본 발명의 화합물과 상호작용하지 않는 또 다른 시간에 방사선 치료를 받을 수 있다.
- [0052] 본원에 기재된 방법, 화합물, 조성물, 용도 및 키트의 일부 구체예에서, 암은 Pt-기반 항암 약물 (예컨대, 시스플라틴) 또는 독성 부작용을 갖는 다른 항암 약물에 민감하다. 일부 구체예에서, 암은 Pt-기반 항암 약물 (예컨대, 시스플라틴) 또는 독성 부작용을 갖는 다른 항암 약물에 내성이다.
- [0053] 본 발명의 다른 양태 및 특징은 첨부된 도면과 함께 특수한 구체예의 하기 설명을 검토할 때 당업자에게 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0054] 본 발명의 구체예는 이제 첨부된 도면을 참조로 하여, 단지 예로서, 기재될 것이다.

도 1. 12개의 예시적인 NPB 화합물의 분자 구조: A: (4,5-)디클로로-(1,2-)디아미노-벤젠 (4,5-디클로로-1,2-페닐렌디아민); B: (4,5-)디브로모-(1,2-)디아미노-벤젠 (4,5-디브로모-1,2-페닐렌디아민); C: (4,5-)디아이오도-(1,2-)디아미노-벤젠 (4,5-디아이오도-1,2-페닐렌디아민); D: 브로모-(1,2-)디아미노-벤젠; E: 클로로-(1,2-)디아미노-벤젠; F: 아이오도-(1,2-)디아미노-벤젠; G: (4,5-)디클로로-(1,2-)디아미노-피라진; H: (4,5-)디브로모-(1,2-)디아미노-피라진; I: (4,5-)디아이오도-(1,2-)디아미노-피라진; J: 브로모-(1,2-)디아미노-피라진; K: 클로로-(1,2-) 디아미노-피라진; L: 아이오도-(1,2-)디아미노-피라진.

도 2. NPB 화합물 $[B(NH_2)_2X_n, n=1,2]$ 과 약하게-결합된 전자 (e_{wb}^-)의 해리성 전자 이동 (DET) 반응에 대한 개략도. 전자-끌기 NPB 분자가 암 세포의 e_{wb}^- 주위에 있을 때, DET가 발생하여 일시적인 분자 음이온 NPB^{*-} 을 형성할 수 있고, 이는 그 후 화학적 결합 절단 (해리)을 겪어 반응성 라디칼을 형성한다: $e_{wb}^- + NPB \rightarrow NPB^{*-} \rightarrow$ 라디칼 형성. 후자는 후속하여 생물학적 효과, 예컨대 DNA 손상 및 아폽토시스 (세포 사멸)를 발생시킬 수 있다.

도 3. NPB 화합물 (화합물 B)과 약하게-결합된 전자 e_{wb}^- 의 초고속 DET 반응에서 비롯된 NPB^{*-} 의 펨토초 (fs) 레이저 분광 관찰. 여기서, e_{wb}^- 는 fs 펄스 레이저 펄스에 의해 극성 용매 분자 (예컨대, H_2O)의 2-UV 광분해에 의해 용이하게 발생한다. 발생한 전자는 약 0.5 피코초의 초단 수명으로 극성 액체에서 p-유사 여기된 (약하게

-결합된) 전구체 상태 (e_{wb}^-)를 빠르게 거치며, 그 동안 NPB 화합물과의 효과적인 DET 반응이 발생할 수 있다.

A. 350 nm에서 fs 레이저 펄스를 펌핑시키는 광범한 노출 전과 후에, NPB 용액의 정적 전자 (UV) 흡수 스펙트럼. 이들의 차이 스펙트럼은 3개의 가시적인 흡수 밴드를 나타내는데, 이는 합리적으로 각각 350-600 nm에서 안정화된 $[B(NH_2)_2X_n]^-$, 약 280 nm에서 양성자화된 탈할로겐화된 방향족 고리 및 약 200 nm에서 할로겐 음이온 때문일 수 있다. B. 순수한 용매 (에탄올)에 대한 역학적 궤도를 뺀 후, 350 nm에서 최저 및 높은 파워 (각각 0.006 및 0.07 μJ /펄스에 상응하는 3 μW 및 35 μW)로 펌핑되고 400 nm에서 프로빙된, NPB 용액의 일시적인 흡수 역학적 궤도. 최저 펌프 파워에서, $\tau_1=0.43$ ps의 급속한 붕괴를 나타내는 중성 단일-광자 여기된 상태의 NPB^* 만이 검출되었고. 둘 모두의 상태에서, NPB^* 및 NPB^{*-} ($\tau_2=6.0$ ps)가 높은 펌프 파워에서 검출되었다. C. 선형 파워 의존성을 갖는 NPB^* 상태에 대한 역학적 궤도를 뺀 후 다양한 펌프 파워에 의한 NPB^{*-} 의 역학적 궤도가 수득되었다. 실선은 e_{wb}^- 의 수명에 해당하는 약 0.56 ps의 상승 시간, 및 약 6.0 ps의 해리 수명을 제공하는, 수득된 NPB^{*-} 의 역학적 궤도에 대한 가장 좋은 핏(fit)이다. D. e_{wb}^- 를 생성하는 펌프 파워에 대한 이차 NPB^{*-} 수율 의존성을 보여주는, NPB^{*-} 피크 세기 대 펌프 파워의 제공근. 동일한 조건하에, BrdU/IdU와 e_{wb}^- 의 DET 반응은 관찰되지 않았으며, 이는 NPB 화합물의 DET 반응이 BrdU/IdU의 반응보다 훨씬 강력함을 나타냄을 주목하라.

도 4는 다양한 농도의 시스플라틴으로 72시간 처리 후에 인간 정상 세포 (GM05757)의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 이러한 결과는 시스플라틴 자체가 화학요법 약물로서 매우 독성임을 보여준다.

도 5는 다양한 농도의 화합물 A로 96시간 처리 후에 인간 정상 세포 (GM05757)의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 이러한 결과는 화합물 A 자체가 200 μM 까지 거의 독성이 없음을 나타낸다.

도 6은 다양한 농도의 화합물 B로 96시간 처리 후에 인간 정상 세포 (GM05757)의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 이러한 결과는 화합물 B 자체가 200 μM 까지 거의 독성이 없음을 나타낸다.

도 7은 다양한 농도의 화합물 C로 96시간 처리 후에 인간 정상 세포 (GM05757)의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 이러한 결과는 화합물 C 자체가 200 μM 까지 거의 독성이 없음을 나타낸다.

도 8은 다양한 농도의 화합물 D로 96시간 처리 후에 인간 정상 세포 (GM05757)의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 이러한 결과는 화합물 D 자체가 200 μM 까지 거의 독성이 없음을 나타낸다.

도 9는 다양한 농도의 화합물 A로 96시간 처리 후에 인간 자궁경부암 (HeLa) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 화합물 A에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 10은 다양한 농도의 화합물 A로 96시간 처리 후에 인간 자궁경부암 (ME-180) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 화합물 A에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 11은 다양한 농도의 화합물 A로 96시간 처리 후에 인간 유방암 (MDA-MB-231) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 화합물 A에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 12는 다양한 농도의 화합물 A로 96시간 처리 후에 인간 폐암 (A549) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 화합물 A에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 13은 다양한 농도의 화합물 A로 96시간 처리 후에 시스플라틴-내성 인간 난소암 (HTB-161) 세포의 세포 생존

율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 화합물 A에 의한 현저한 시스플라틴-내성 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 14는 다양한 농도의 화합물 B로 96시간 처리 후에 인간 자궁경부암 (HeLa) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 화합물 B에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 15는 다양한 농도의 화합물 B로 96시간 처리 후에 인간 자궁경부암 (ME-180) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 화합물 B에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 16은 다양한 농도의 화합물 B로 96시간 처리 후에 인간 유방암 (MDA-MB-231) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 화합물 B에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 17은 다양한 농도의 화합물 B로 96시간 처리 후에 인간 폐암 (A549) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 화합물 B에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 18은 다양한 농도의 화합물 B로 96시간 처리 후에 인간 시스플라틴-내성 인간 폐암 (HTB-161) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 화합물 B에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 19는 다양한 농도의 화합물 C로 96시간 처리 후에 인간 자궁경부암 (HeLa) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 화합물 C에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 20은 다양한 농도의 화합물 C로 96시간 처리 후에 인간 유방암 (MDA-MB-231) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 화합물 C에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 21은 다양한 농도의 화합물 C로 72시간 동안 처리 후에 인간 폐암 (A549) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 화합물 C에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 22는 다양한 농도의 화합물 C로 96시간 동안 처리한 후에 시스플라틴-내성 인간 난소암 (HTB-161) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 화합물 C에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 23은 다양한 농도의 화합물 D로 96시간 처리 후에 인간 자궁경부암 (HeLa) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 화합물 D에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 24는 다양한 농도의 화합물 D로 96시간 처리 후에 인간 자궁경부암 (ME-180) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 화합물 D에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 25는 다양한 농도의 화합물 D로 96시간 처리 후에 인간 유방암 (MDA-MB-231) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 화합물 D에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 26은 다양한 농도의 화합물 D로 96시간 동안 처리한 후에 인간 폐암 (A549) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 화합물 D에 의한 현저한 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 27은 다양한 농도의 화합물 D로 96시간 처리 후에 시스플라틴-내성 인간 난소암 (HTB-161) 세포의 세포 생존율을 예시한다. 96-웰 플레이트에서 세포의 생존력을 MTT 검정에 의해 측정하였다. 화합물 D에 의한 현저한 시스플라틴-내성 암 세포의 사멸이 관찰되었다.

도 28은 ME-180 세포 대 화합물 B 농도에서 DNA 이중-가닥 절단 (DSB)(γ -H2AX 세기)의 수율을 도시한다. ME-180 세포는 다양한 농도의 화합물 B로 12시간 동안 37°C, 5% CO₂에서 처리되었다. 인간 자궁경부암 (ME-180) 세포에서 이중-가닥 절단 (DSB)의 이미징을 HCS DNA 손상 키트를 이용하여 획득하였다. DNA DSB의 수율 대 화합물 B 농도를 Image J 소프트웨어를 이용하여 활성화된 γ -H2AX의 정량적 분석에 의해 획득하였다. 결과는 현

저한 양의 DNA DSB가 화합물 B로 처리된 ME-180 세포에서 관찰되었음을 나타낸다.

도 29는 형광 현미경을 이용하여 CellEvent™ 카스파제-3/7 녹색 검출 키트 (Invitrogen)에 의해 검출된, 카스파제의 활성화를 겪은 인간 자궁경부암 (ME-180) 세포 및 0-200 μM의 화합물 B를 48시간 동안 처리하여 유도된 아포토시스의 대표적인 이미지를 도시한다: A. 대조군 (0 μM); B. 50 μM; C. 100 μM; D. 200 μM. 활성화된 카스파제에 의한 아포토틱 세포는 녹색 형광으로 표시되었다. 비록 녹색 형광이 여기에 도시된 흑백 이미지에서는 보이지 않지만, 후기 아포토시스의 전형인 핵 응축은 명확하게 보여진다. 200 μM의 화합물 B가 아포토틱 세포의 상당한 집단 (≥60%)을 야기시켰음이 도시된다.

도 30은 마우스 이종이식 자궁경부암 (ME-180) 모델에서 종양 성장 지연을 도시한다. 7 mg/kg의 화합물 B가 5일 동안 매일 IP 주입에 의해 마우스에 투여되었다. 종양 성장 지연은 대조군과 처리군에 대해 종양이 500 mm³에 도달하기까지의 시간 차이를 측정할 것이다. 대조군과 화학요법 군 사이에 30일간의 성장 지연이 관찰되었고, 이는 높은 약물 효능을 나타낸다.

도 31은 5일 동안 매일 제공되는 7 mg/kg의 화합물 B로의 처리 동안 마우스 체중 변동을 도시한다. 대조군과 처리군 사이에 현저한 차이는 없었고, 이는 화합물 B가 전반적인 독성이 없음을 나타낸다.

도 32는 마우스에서 화합물 B의 생체내 독성을 도시한다. 간독성 (ALT, ALP, TBIL), 신독성 (혈중 요소, 크레아티닌), 및 전해질 (Na, K 등)을 5일 동안 매일 5 mg/kg의 화합물 B로의 치료 끝에 수집된 혈액 샘플로부터 측정하여, 급성 독성을 나타내었다. ALP = 알칼리 포스파타제, ALT = 알라닌 아미노트랜스퍼라제, TBIL = 총 빌리루빈. 결과는 대조군과 처리군 사이에 현저한 변화가 없음을 나타내었고, 이는 화합물 B에 의해 급성 독성이 유도되지 않았음을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 상세한 설명

[0056] 일반적으로, 본 발명은 펩토의약 접근법을 통해 발견된 비-백금-기반 (NPB) 항암 화합물의 부류에 관한 것이다. 화합물은 시험관내 및 생체내에서 항암 효과를 유도하고 정상 세포에 대해 거의 내지 전혀 독성을 갖지 않음이 발견되었다. 이들은 최대 200 μM의 용량에서도, 백금-함유 항암 약물, 시스플라틴 보다 정상 세포에 훨씬 덜 독성인 것이 두드러지게 발견되었다. 화합물은 정상 세포에 대해 최소 독성을 가지면서 암 세포를 사멸시키는 능력을 지니므로, 표적화된 화학요법을 위한 항암제로서 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 또한 암 및 화학요법에 의해 치료될 수 있는 다른 질환에 대한 표적화된 화학요법에 관한 것이다. 본원에 기재된 NPB 화합물과 관련된 조성물, 투여 형태, 방법, 용도, 시판용 패키지 및 키트가 또한 본원에 기재된다.

[0057] 비-백금-기반 (NPB) 항암 화합물

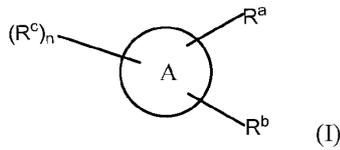
[0058] 용어 "NPB 화합물"은, 예를 들어, 암 세포의 치료에서 또는 암 또는 화학요법에 의해 치료될 수 있는 다른 질병의 치료에서, 시험관내 또는 생체내 항암 효과를 생성하는데 이용될 수 있는 본원에 정의된 바와 같은 비-백금-함유 항암 화합물을 의미한다. 화합물은 본질적으로 백금 코어가 없는 시스플라틴 유사체로 생각될 수 있다. 용어 "화합물", "분자" 및 "작용제"는 본원에서 상호교환적으로 이용될 수 있다.

[0059] 본 발명의 NPB 화합물은 최소 독성을 가지면서 항암 효과를 발생시킬 수 있다. 이론에 제한되길 원치 않으며, NPB 화합물은 암 세포의 특징적인 환원성 미세환경에서 본질적으로 풍부한, 약하게-결합된 전자와 고도로 반응성인 것으로 여겨진다. 후자는 본 발명자에 의해 최근에 밝혀졌다 [Lu et al., 2013]. 본 발명의 화합물의 일부 일반적인 특징은 이들이 하나 이상의 전자 이동 프로모터, 예컨대 NH₂ 기, 및 하나 이상의 전자-수용 이탈기, 예컨대 할로겐에 커플링된 방향족 고리 (백금 배위 이온이라기 보다)를 포함한다는 것이다.

[0060] 놀랍게도 본원에 기재된 NPB 화합물은 최대 200 μM의 매우 높은 용량에서조차 정상 세포에 무독성인 것이 입증되었고, 한편 이들은 단독으로 현저한 DNA 이중-가닥 절단 및 아포토시스를 유도할 수 있고 시험관내 또는 생체내 암 세포를 효과적으로 사멸시킬 수 있다. 화합물은, 아마도 정상 세포 내의 약하게-결합된 전자의 부족 (즉, 환원성 세포내 환경)으로 인해 정상 세포에 본질적으로 비활성이고 [Lu et al., 2013], 이에 따라 체내에서 낮은 전신 또는 급성 독성을 갖거나 독성을 갖지 않는다. 이들은 암 세포를 우선적으로 사멸시킬 수 있는 고도로 효과적인 항암제이므로 암 및 가능하게는 화학요법에 의해 치료될 수 있는 다른 질병의 천연 표적화된 화학요법에 유용하다. 기재된 화합물은 중금속 (Pt)을 함유하기 때문에 매우 독성인 시스플라틴, 및 효과적인 DET 반응을 위한 전자-이동 프로모터 (예컨대, 디아미노)가 그 구조에 결여되어 있어 [Lu, 2007, 2010] 항암제

로서 비효과적인 할로피리미딘 [Prados et al., 1999] 보다 탁월할 것으로 기대된다.

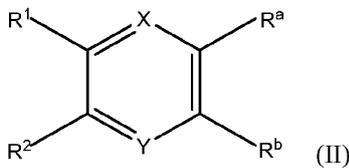
[0061] 일부 구체예에서, NPB 항암 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 I을 갖는다:



[0062]

[0063] 상기 식에서, A는 N, O 및 S로 구성된 군으로부터 선택되는 0-2개의 고리 헤테로원자를 함유하는 5- 또는 6-원 아릴 또는 헤테로아릴 고리이고, 나머지 고리 원자는 탄소이며, R^a 및 R^b는 독립적으로 H, OH, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴 또는 전자 이동 프로모터이고, 이 때 R^a 및 R^b 중 적어도 하나는 전자 이동 프로모터이며; R^c는 각각의 발생에 대해 독립적으로 H, OH, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴, 또는 이탈기이거나, 2개의 인접한 R^c 기는 이들이 부착된 고리 원자와 함께 취해져 N, O 및 S로 구성된 군으로부터 선택되는 0-2개의 고리 헤테로원자를 함유하고 1 내지 4개의 R^d로 치환되거나 치환되지 않을 수 있는 5- 또는 6-원의 포화, 부분 포화 또는 불포화된 고리를 형성하고; 적어도 하나의 R^c는 이탈기이고; R^d는 독립적으로 OH, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이고; n = 1-4이고, 여기서 각각의 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴 모이어티는 치환되거나 치환되지 않는다.

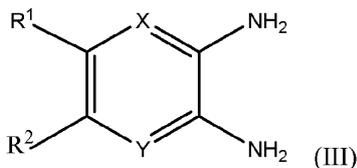
[0064] 일부 구체예에서, NPB 항암 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 II를 갖는다:



[0065]

[0066] 상기 식에서, X 및 Y는 독립적으로 C-R³ 또는 N이고; R³은 H, OH, 할로젠, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 또는 헤테로아릴이고; R^a 및 R^b는 독립적으로, H, OH, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴 또는 전자 이동 프로모터이고, 이 때 R^a 및 R^b 중 적어도 하나는 전자 이동 프로모터이며; R¹ 및 R²는 독립적으로, H, OH, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴, 또는 이탈기이고; 여기서 R¹ 및 R² 중 적어도 하나는 이탈기이고, 여기서 각각의 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴 모이어티는 치환되거나 치환되지 않는다.

[0067] 일부 구체예에서, NPB 항암 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 하기 화학식 III을 갖는다:



[0068]

[0069] 상기 식에서, X 및 Y는 독립적으로 C-R³ 또는 N이고; R³은 H, OH, 할로젠, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 또는 헤테로아릴이고; R¹ 및 R²는 독립적으

로, H, OH, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴, 또는 이탈기이고; 이 때 R^1 및 R^2 중 적어도 하나는 이탈기이고, 여기서 각각의 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴 모이어티는 치환되거나 치환되지 않는다.

[0070] 방향족 고리 시스템

[0071] 화학식 I, II 및 III 각각에서, 분자의 중심은 하나의 아릴 또는 헤테로아릴 고리로 구성될 수 있거나 (모노사이클릭), 다수의 고리로 구성될 수 있는 (폴리사이클릭) 컨쥬게이션된 또는 방향족 고리 시스템이다. 일부 경우에, 방향족 중심은 2 또는 3개의 융합된 고리를 포함하여 각각 바이사이클릭 또는 트리사이클릭 중심을 형성할 수 있다. 방향족 고리 시스템은 약하게-결합된 전자와의 반응을 통해 획득된 전자 이동 프로모터, 예컨대 NH_2 기에 의해 일시적으로 안정화된 전자를 이탈기의 부위로 이동시킬 수 있다. 분자의 일시적인 음이온이 형성될 때, 이것은 이탈기, 예컨대 안정한 음이온의 손실을 빠르게 발생시켜 고도로 반응성인 라디칼을 생성할 수 있다.

[0072] 방향족 중심은 단일한 5- 또는 6-원 방향족 고리, 예컨대 아릴 또는 헤테로아릴일 수 있다. 6-원 모노사이클릭 고리의 일부 예는 비제한적으로 벤젠, 피리딘, 및 피라진을 포함한다. 5-원 헤테로아릴 고리의 일부 예는 비제한적으로 푸란, 피롤, 티오펜 및 옥사졸을 포함한다.

[0073] 일부 구체예, 예컨대, 화학식 I, II 또는 III의 구체예에서, 화합물은 N, O 및 S로 구성된 군으로부터 선택되는 0-2개의 고리 헤테로원자를 함유하는 5- 또는 6-원 아릴 또는 헤테로아릴 고리를 포함하고, 나머지 고리 원자는 탄소이다. 일부 경우에, 중심은 N으로부터 선택되는 0, 1 또는 2개의 고리 헤테로원자를 함유하는 6-원 방향족 고리, 예컨대 벤젠 (0 N), 피리딘 (1 N), 또는 피라진 (2 N)이다. 일부 경우에, 중심은 0개의 고리 헤테로원자를 함유하는 6-원 아릴 고리, 예컨대 벤젠이다. 일부 경우에, 중심은 N으로부터 선택되는 1 또는 2개의 고리 헤테로원자를 함유하는 6-원 헤테로아릴 고리, 예컨대 피리딘 (1 N) 또는 피라진 (2 N)이다.

[0074] 일부 구체예에서, 중심 고리 상에서 서로 인접한 치환기들 (예컨대, 화학식 I에서 R^c)은 이들이 부착된 고리 원자와 함께 5- 또는 6-원의 포화, 부분 포화 또는 불포화된 고리를 형성할 수 있고, 이에 의해 폴리사이클릭 고리 시스템이 형성된다. 융합된 바이사이클릭 6-원 고리의 일부 예는 비제한적으로 나프탈렌, 퀴놀린, 이소퀴놀린, 퀴놀살린, 퀴나졸린, 신놀린 및 프탈라진을 포함한다. 융합된 트리사이클릭 6-원 고리의 일부 예는 비제한적으로 안트라센, 페난트라센, 및 아크리딘을 포함한다. 일부 경우에, 폴리사이클릭 고리 시스템은 5- 및 6-원 고리 모이어티의 조합을 포함할 수 있다. 중심이 폴리사이클릭 고리 시스템일 때, 생물학적 효과를 발생시키는 반응성 라디칼이 형성될 수 있도록 하기 위해 화합물은 전체로서 전자를 일시적으로 안정화시켜 이탈기의 부위로 이동시키는 이의 능력을 유지하는 것이 바람직하다.

[0075] 전자 이동 프로모터

[0076] 본 발명의 항암 화합물은 방향족 고리 시스템에 커플링된 하나 이상의 전자 이동 프로모터 (즉, 화학식 I 또는 II에서 R^a 및 R^b 중 하나 또는 둘 모두, 및 화학식 III에서 $-NH_2$)를 포함한다. 본원에서 사용되는 "전자 이동 프로모터"는 약하게-결합된 전자를 포집하여 일시적으로 안정화시키는 것을 보조하는 원자 또는 작용기이다. 그 후 전자는 방향족 고리 시스템을 통해 이동하여 고리 탄소 원자와 이탈기 사이에 있는 결합의 파손을 발생시킨다. 일단 이탈기가 고리에서 분리되면, 생성된 중성 라디칼은, 예컨대 DNA 손상 및 암 세포의 사멸을 발생시키는 DNA에 고도로 반응성이다. 따라서, 전자 이동 프로모터, 바람직하게는 서로 근접한 2개의 전자 이동 프로모터는 NPB 분자의 전자-끌기 능력을 향상시켜, 이것이 암 세포에 존재하는 약하게-결합된 전자와 더욱 반응성이 되도록 한다고 여겨진다.

[0077] 분자에 다수의 전자 이동 프로모터가 존재하는 경우 (예컨대, R_a 및 R_b 둘 모두가 전자 이동 프로모터이다), 전자 이동 프로모터는 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 구체예에서, 전자 이동 프로모터는 동일하다. 바람직한 구체예에서, 2개의 전자 이동 프로모터는 고리 상에서 서로 근접하게, 예컨대 인접한 고리 탄소 상에 정위된다. 이는, 특히 강력한 이탈기가 고리 상에 존재할 때, 전자를 포집하고 이동시키는데 특히 효과적인 배열이다.

[0078] 전자 이동 프로모터의 예는 비제한적으로 $-NH_2$, $-NHR$, $-NR_2$, $-OH$, $-OR$, $-O-$, $-NHCOCH_3$, $-NHCOR$, $-OCH_3$, $-OR$, $-CH_3$, $-C_2H_5$, R , 및 $-C_6H_5$ 를 포함한다.

- [0079] 예컨대 화학식 I, II 또는 III의 일부 구체예에서, 전자 이동 프로모터는 -NH₂, -NHR, -NR₂, -OH, -OR, -O-, -NHCOCH₃, -NHCOR, -OCH₃, -OR, -CH₃, -C₂H₅, R, 및 -C₆H₅로 구성된 군으로부터 선택된다. 예컨대 화학식 I, II 또는 III의 일부 구체예에서, 전자 이동 프로모터는 -NH₂, -NHR, -NR₂, -OH, -NHCOCH₃, -NHCOR, -OCH₃, 및 -OR로 구성된 군으로부터 선택된다. 예컨대 화학식 I, II 또는 III의 일부 구체예에서, 전자 이동 프로모터는 -NH₂, -NHR, -NR₂, -OH, 및 -O-로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 전자 이동 프로모터는 -NH₂, -NHR, -NR₂, 및 -OH로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 전자 이동 프로모터는 -NH₂, -NHR, -NR₂로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구체예에서, 전자 이동 프로모터 -NH₂이다. 일부 구체예에서, 전자 이동 프로모터는 -NHR이다. 일부 구체예에서, 전자 이동 프로모터는 -NR₂이다. 예컨대 화학식 I, II 또는 III의 일부 구체예에서, 전자 이동 프로모터는 -NHCOCH₃, -NHCOR, -OCH₃, 및 -OR로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0080] 상기 중 임의의 R은, 예를 들어, 치환되거나 치환되지 않은 알킬, 알콕시, 알케닐, 알킬닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알킬닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴 기일 수 있다. R²의 경우, 각각의 R은 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 구체예에서, R은 치환되거나 치환되지 않은 알킬이다.
- [0081] 예컨대 화학식 I 또는 II의 일부 구체예에서, R^a 및 R^b 중 하나는 전자 이동 프로모터이다. 일부 구체예에서, R^a 및 R^b 둘 모두는 전자 이동 프로모터이다. 일부 구체예에서, R^a 및 R^b 둘 모두는 동일한 전자 이동 프로모터이다. 일부 구체예에서, R^a 및 R^b는 인접한 고리 원자 상에 정위된다. 일부 구체예에서, 이탈기는 전자 이동 프로모터에 대해 메타, 오르토 또는 파라 위치에 있다. 일부 구체예에서, 이탈기는 전자 이동 프로모터에 대해 메타 위치에 있다. 일부 구체예에서, 이탈기는 전자 이동 프로모터에 대해 오르토 위치에 있다. 일부 구체예에서, 이탈기는 전자 이동 프로모터에 대해 파라 위치에 있다.
- [0082] 이탈기
- [0083] 본 발명의 NPB 화합물은 방향족 고리 시스템에 커플링된 하나 이상의 이탈기를 포함한다 (예컨대, 화학식 I, II 또는 III에서 R¹ 및 R² 중 하나 또는 둘 모두). 추가적인 이탈기가 또한 방향족 고리 상에 치환기로서 제공될 수 있다. 다수의 이탈기가 존재하는 경우, 이탈기는 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 구체예에서, 이탈기는 동일하다. 분자 상에 강력한 이탈기 (예컨대, 매우 산화성 원자, 예컨대 할로젠 원자)의 존재는, 특히 이탈기가 전자 이동 프로모터에 관해 작동적으로 정위될 때 (예컨대, 1, 2 또는 3개의 고리 원자 내), 분자와 암 세포에 존재하는 약하게-결합된 전자의 반응성을 향상시킬 수 있다.
- [0084] 본원에서 사용되는 이탈기는 이방성(heterolytic) 결합 절단에서 출발한 분자 단편이다. 이는 음이온 또는 중성 원자/분자일 수 있지만, 어느 경우에도, NPB 분자의 결합 파손 (해리), 즉 이탈기의 형성이 NPB 분자의 남아 있는 (고리) 부분 또는 이탈기 (예컨대, 할로젠 원자)에서 쌍을 이루지 않은 전자를 발생시키고, 다시 말해 반응성 라디칼을 형성하는 것은 중요하다. 일반적인 음이온성 이탈기는 비제한적으로 할라이드, 예컨대, Cl, Br, I 및 F (예컨대, Cl⁻, Br⁻, I⁻, F⁻), 및 설포네이트 에스테르, 예컨대 토실레이트, 노실레이트, 메실레이트 및 트리플레이트를 포함한다. 다른 이탈기는 비제한적으로 이질소, 디알킬 에테르, 알콜, 니트레이트, 포스페이트, 및 다른 무기 에스테르를 포함한다.
- [0085] 예컨대 화학식 I, II 또는 III의 일부 구체예에서, 이탈기는 음이온성 이탈기이다. 일부 구체예에서, 이탈기는 할로젠이다. 일부 구체예에서, 이탈기는 Cl, Br, I 또는 F이다. 일부 구체예에서, 이탈기는 Cl이다. 일부 구체예에서, 이탈기는 Br이다. 일부 구체예에서, 이탈기는 I이다. 일부 구체예에서, 이탈기는 F이다. 일부 구체예에서, 이탈기는 Cl, Br 및 I로 구성된 군으로부터 선택되는 할로젠이다. 일부 구체예에서, 이탈기는 이러한 이탈기 중 하나의 중성 종이다.
- [0086] 화학식 I의 일부 구체예에서, 고리 A 상의 1 또는 2개의 R^c 기는 이탈기이다. 화학식 I의 일부 구체예에서, 고리 A 상의 2개의 R^c 기는 이탈기이다.
- [0087] 화학식 I의 일부 구체예에서, 고리 A는 6-원 아릴 또는 헤테로아릴 고리, 예컨대 벤젠, 피리딘 또는 피라진이고, 각각의 R^a 및 R^b는 NH₂이고; 고리 A 상의 2개의 R^c 치환기는 할로젠이고 각각은 고리 A 상의 R^a 및

R^b 중 하나에 대해 메타 위치에 있으며; 임의의 남아 있는 R^c 기는 본원에 정의된 바와 같다. 일부 구체예에서, 고리 A는 벤젠이다. 일부 구체예에서, 고리 A가 벤젠인 경우, 고리 A 상에 남아 있는 탄소는 치환되지 않은 탄소이다. 일부 구체예에서, 고리 A는 피리딘이다. 일부 구체예에서, 고리 A가 피리딘인 경우, 고리 A 상에 남아 있는 탄소는 치환되지 않는다. 일부 구체예에서, 고리 A는 피라진이다.

[0088] 일부 구체예에서, 이탈기는 전자 이동 프로모터에 대해 오르토 (예컨대, 1개의 고리 원자 내), 메타 (예컨대, 2개의 고리 원자 내) 또는 파라 (예컨대, 3개의 고리 원자 내) 위치에 있다.

[0089] 치환기

[0090] 화학식 I, II 또는 III의 구체예에서, 탄소 원자는 달리 명시되지 않는 한 치환되지 않거나 치환될 수 있다.

[0091] 화학식 I, II 또는 III의 구체예에서, 달리 명시되지 않는 한, 고리 탄소 원자는 치환되지 않거나 치환될 수 있다. 치환기는, 예를 들어, OH, 할로겐, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴 기를 포함할 수 있다. 각각의 탄소-기반 치환기 (예컨대, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴)는 임의로 추가로 치환될 수 있다.

[0092] 화학식 I의 구체예에서, R^c 는 각각의 발생에 대해 독립적으로 H, OH, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴, 또는 이탈기이거나, 2개의 인접한 R^c 기는 이들이 부착된 고리 원자와 함께 취해져 N, O 및 S로 구성된 군으로부터 선택되는 0-2개의 고리 헤테로 원자를 함유하고 1 내지 4개의 R^d 로 치환되거나 치환되지 않을 수 있는 5- 또는 6-원의 포화, 부분 포화 또는 불포화된 고리를 형성하고; 여기서 적어도 하나의 R^c 는 이탈기이다. R^d 는 독립적으로 OH, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 또는 헤테로아릴이고; $n=1-4$ 이다 (예컨대, 1, 2, 3 또는 4). 각각의 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴 모이어티는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[0093] 화학식 I 및 II의 구체예에서, R^a 및 R^b 는 독립적으로 H, OH, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴 또는 전자 이동 프로모터이고, 이 때 R^a 및 R^b 중 적어도 하나는 전자 이동 프로모터이다. 각각의 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴 모이어티는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[0094] 화학식 II 또는 III의 구체예에서, X 및 Y는 독립적으로 $C-R^3$ 또는 N이고, R^3 은 H, OH, 할로겐, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 또는 헤테로아릴일 수 있다. 각각의 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴 모이어티는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

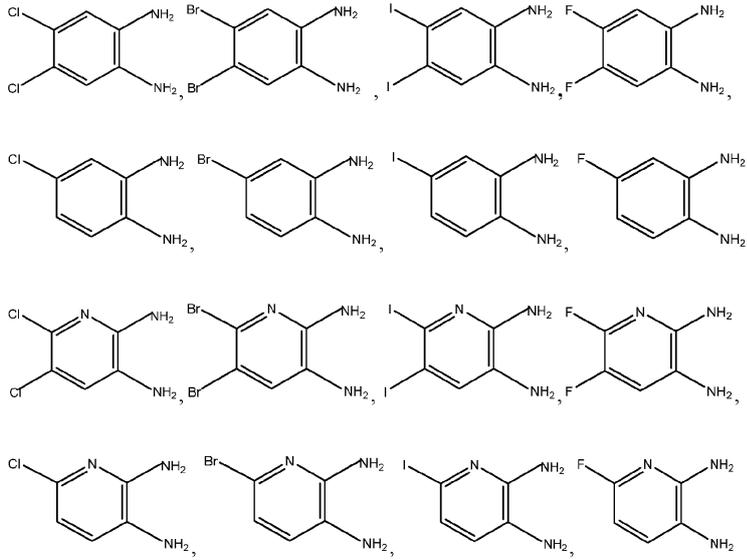
[0095] 화학식 II 또는 III의 구체예에서, R^1 및 R^2 는 독립적으로, H, OH, 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴, 헤테로아릴, 또는 이탈기이다. 각각의 알킬, 알콕시, 알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알키닐, 아릴, 헤테로사이클릴 및 헤테로아릴 모이어티는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 상기에서, R^1 및 R^2 중 적어도 하나는 이탈기이다. 일부 구체예에서, 둘 모두의 R^1 및 R^2 는 이탈기이고, 이 때 R^1 및 R^2 는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0096] 달리 명시되지 않는 한, 치환되거나 치환되지 않은 상기 탄소-기반 기는 치환기 상에 하나 이상의 작용기, 예컨대 하이드록실, 아미노, 아미도, 시아노, 니트로, 카르복실, 에스테르, 에테르, 케톤, 알데하이드, 아릴, 및 헤테로아릴, 또는 이의 조합을 포함할 수 있다.

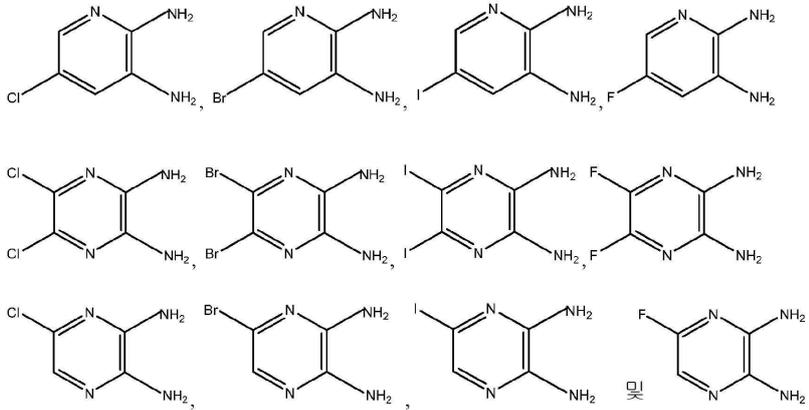
[0097] 당업자는 본 발명에 따른 수많은 향암 화합물을 생성하기 위해 본원에 기재된 NPB 화합물을 변형시킬 수 있을 것이다. 치환기를 선택할 때, 생성되는 화합물의 안정성, 수용성, 독성 및 반응성 (예컨대, 전자와의 반응성) 과 같은 인자가 고려되어야 한다.

[0098] 비제한적인 예시적인 NPB 화합물

[0099] 본 발명의 일부 예시적인 비제한적인 NPB 화합물이 하기에 도시된다:



[0100]



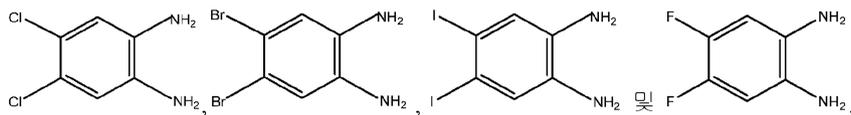
[0101]

[0102]

상기 예시적인 각각의 구체예에서, 화합물은 벤젠, 피리딘 및 피라진으로부터 선택되는 6-원 아릴 또는 헤테로 아릴 고리를 포함하고; 2개의 NH₂ 전자 이동 프로모터 기는 고리 상에 서로 인접하게 정위되고, 적어도 하나의 할로젠 이탈기는 NH₂ 기 중 하나에 대해 메타 위치에 있다. 일부 구체예에서, 할로젠 이탈기는 NH₂ 기의 각각에 대해 메타 위치에 있다. 이러한 구조를 갖는 화합물이 매우 효과적인 항암제인 것이 발견되었다. 이론에 제한되지 않으며, 그러한 구체예는 약하게-결합된 전자를 포집하고 고리를 통해 가까운 이탈기의 부위로 이를 이동시켜, DNA를 공격하고 암 세포 사멸을 초래할 수 있는 고도로-반응성 라디칼을 형성할 수 있는, 방향족 고리 시스템 상에서 서로 근접한 2개의 강력한 전자 이동 프로모터의 조합으로 인해 특히 효과적인 것으로 여겨진다.

[0103]

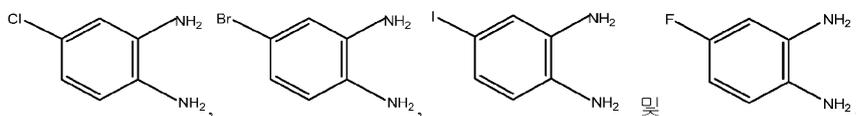
일부 구체예에서, NPB 화합물은 하기로 구성된 군으로부터 선택된다:



[0104]

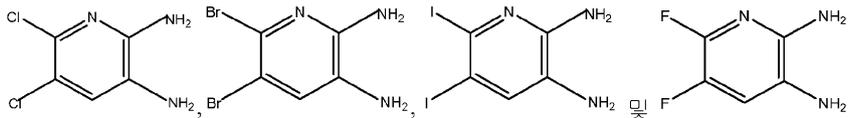
[0105]

일부 구체예에서, NPB 화합물은 하기로 구성된 군으로부터 선택된다:



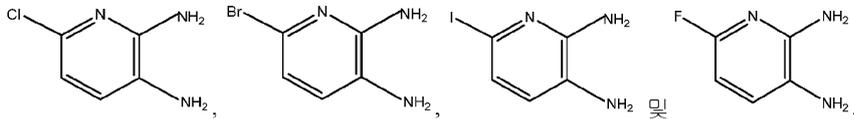
[0106]

[0107] 일부 구체예에서, NPB 화합물은 하기로 구성된 군으로부터 선택된다:



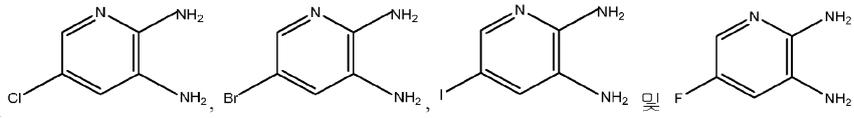
[0108]

[0109] 일부 구체예에서, NPB 화합물은 하기로 구성된 군으로부터 선택된다:



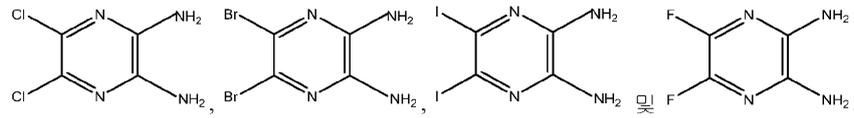
[0110]

[0111] 일부 구체예에서, NPB 화합물은 하기로 구성된 군으로부터 선택된다:



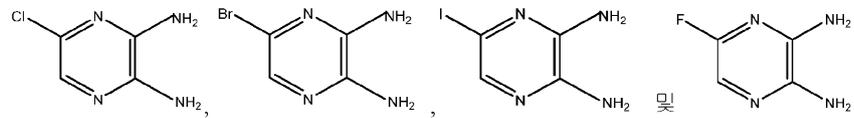
[0112]

[0113] 일부 구체예에서, NPB 화합물은 하기로 구성된 군으로부터 선택된다:



[0114]

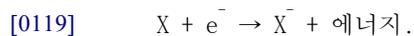
[0115] 일부 구체예에서, NPB 화합물은 하기로 구성된 군으로부터 선택된다:



[0116]

[0117] 전자 친화도

[0118] 원자 또는 분자의 전자 친화도 (E_A)는 일반적으로 전자가 중성 원자 또는 분자에 첨가되어 음성 이온을 형성할 때 에너지 변화로서 정의된다:



[0120] 양성 전자 친화도 (예컨대 > 0 eV)를 갖는 분자는 음성 전자 친화도 (예컨대 < 0.0 eV)를 갖는 분자 보다 전자를 받아들이는데 더 민감하다. 본 발명에 따르면, 양성 전자 친화도는 NPB 화합물과 암 세포에 존재하는 약하게-결합된 전자의 반응성에 관한 것이므로 바람직한 속성이다. 따라서, NPB 화합물이 0.0 eV 초과 전자 친화도를 갖는 것이 바람직하다.

[0121] 일부 구체예, 예컨대 화학식 I, II 또는 III의 구체예에서, 본원에 기재된 NPB 화합물의 전자 친화도는 양성이다 (예컨대 > 0.0 eV). 일부 구체예에서, NPB의 전자 친화도는 약 0.0 eV 내지 약 +5.0 eV, 약 0.0 eV 내지 약 +4.0 eV, 약 0.0 eV 내지 약 +3.0 eV, 또는 약 0.0 eV 내지 약 +2.5 eV이다.

[0122] 일부 구체예에서, NPB의 전자 친화도는 약 +0.2 eV 내지 약 +5.0 eV, 또는 약 +0.2 eV 내지 약 +4.0 eV, 또는 약 +0.2 eV 내지 약 +3.0, 또는 약 +0.2 eV 내지 약 +2.0 eV이다.

[0123] 일부 구체예에서, NPB의 전자 친화도는 약 +0.5 eV 내지 약 +3.0 eV, 약 +0.5 eV 내지 약 +2.5 eV, 약 +0.5 eV 내지 약 +2.0 eV, 또는 약 +0.5 eV 내지 약 +1.5 eV이다.

[0124] 분자의 전자 친화도는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0125] 방사성표지된 NPB 화합물

- [0126] 본 발명의 NPB 화합물은 방사성표지될 수 있고, 즉 상기 화합물은 자연에서 일반적으로 발견되는 원자 질량 또는 질량 수와 상이한 원자 질량 또는 질량 수를 함유하는 하나 이상의 원자를 함유할 수 있다. 수소, 탄소, 인, 불소 및 염소의 예시적인 방사성동위원소는 각각 ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{43}F 및 ^{36}Cl 을 포함한다. 방사성표지된 화합물은 일반적으로 당업자에게 널리 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다. 일부 경우에, 그러한 방사성표지된 화합물은 일반적인 합성 절차를 수행하고 비-방사성표지된 시약을 용이하게 이용가능한 방사성표지된 시약으로 치환시킴에 의해 제조될 수 있다.
- [0127] 화학적 정의
- [0128] 하기 널리 공지된 화학적 용어는 달리 명시되지 않는 한 하기 일반적인 의미를 지닌다.
- [0129] 본원에서 사용되는 용어 "아릴"은 본원에 기재되거나 예시된 분자의 그러한 아릴 기를 비제한적으로 포함하는, 모노-, 바이- 또는 트리사이클릭 방향족 고리 시스템일 수 있는, 6-14개 고리 원자 예컨대 6개 고리 원자를 갖는 치환되거나 치환되지 않은 방향족 탄화수소 고리 시스템을 의미한다. 본원에 기재된 일부 구체예에서, "아릴"은 하나 이상의 방향족 또는 비-방향족 고리에 융합되거나 융합되지 않을 수 있는 6-원 방향족 고리를 나타낸다.
- [0130] 용어 "알킬"은, 예컨대, 1 내지 10개의 탄소 원자, 예컨대 1 내지 6개의 탄소 원자 또는 1 내지 4개의 탄소 원자를 함유하는 포화된 선형 또는 분지된 탄화수소 기, 예를 들어 본원에 기재되거나 예시된 분자의 그러한 알킬 기를 비제한적으로 포함하는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, n-부틸, i-부틸, 2-부틸, t-부틸을 나타낸다. 용어 "저급 알킬"이 또한 이용될 수 있고 이는 전형적으로 1-6개의 탄소 원자를 함유하는 선형 또는 분지된 탄화수소 기 (예컨대 C₁-C₆ 알킬)를 의미한다. C₁-C₆ 알킬은 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, 및 C₆ 알킬 기를 포함한다. 더욱이, 알킬 기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0131] 용어 "알콕시"는 알킬 잔기가 상기 정의된 바와 같고, 산소 원자를 통해 부착된 기, 예컨대 메톡시 및 에톡시를 나타낸다. 알콕시는 하나 이상의 치환기로 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 예를 들어, "알콕시"는 -O-알킬 기를 의미하고, 여기서 알킬 기는 상기 정의된 바와 같다. "알콕시"의 예는 비제한적으로 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, i-프로폭시, t-부톡시, n-부톡시, s-펜톡시 등을 포함한다.
- [0132] 더욱이, 알콕시 기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0133] 용어 "알케닐"은 그 사슬에 이중 결합을 포함하는 2 내지 12개, 예컨대 2 내지 6개 탄소 원자의 탄소 사슬을 나타낸다. 예를 들어, C₂₋₆-알케닐 기는, 예컨대 에테닐, 프로펜-1-일, 프로펜-2-일, 부텐-1-일, 부텐-3-일, 펜텐-1-일, 펜텐-2-일, 펜텐-3-일, 펜텐-4-일, 헥센-1-일, 헥센-2-일, 헥센-3-일, 헥센-4-일 및 헥센-5-일을 포함한다. 더욱이, 알케닐 기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0134] 용어 "알키닐"은 사슬을 따라 임의의 안정한 지점에 발생할 수 있는 하나 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는, 선형 또는 분지된 구성의 탄화수소 사슬을 포함한다. 달리 명시되지 않는 한, "알키닐" 기는 2 내지 8개, 예컨대 2 내지 6개 탄소를 갖는 기를 의미한다. "알키닐"의 예는 비제한적으로 프로프-2-이닐, 부트-2-이닐, 부트-3-이닐, 펜트-2-이닐, 3-메틸펜트-4-이닐, 헥스-2-이닐, 헥스-5-이닐 등을 포함한다. 더욱이, 알키닐 기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0135] 용어 "사이클로알킬"은 3 내지 13개 탄소, 예컨대 3 내지 6개 탄소를 함유하는 임의의 안정한 사이클릭 또는 폴리사이클릭 탄화수소 기를 나타낸다. 다른 알킬 모이어티의 경우에서와 같이, 사이클로알킬은 하나 이상의 치환기로 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0136] 용어 "사이클로알케닐"은 고리를 따라 임의의 지점에 발생할 수 있는 하나 이상의 불포화된 탄소-탄소 이중 결합을 함유하는, 3 내지 13개 탄소 원자, 예컨대 5 내지 8개 탄소 원자의 임의의 안정한 사이클릭 또는 폴리사이클릭 탄화수소 기를 포함한다. 다른 알케닐 모이어티의 경우에서와 같이, 사이클로알케닐은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0137] 사이클로알키닐은 고리를 따라 임의의 지점에 발생할 수 있는 하나 이상의 불포화된 탄소-탄소 삼중 결합을 함유하는, 5 내지 13개 탄소 원자의 임의의 안정한 사이클릭 또는 폴리사이클릭 탄화수소 기를 포함한다. 다른 알키닐 모이어티의 경우에서와 같이, 사이클로알키닐은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.
- [0138] 용어 "헤테로사이클릴"은 5 내지 14개 고리 원자, 예컨대 5 내지 10개 고리 원자를 갖고, 여기서 하나 이상의 고리 탄소, 예컨대 1 내지 4개가 각각 N, O, 또는 S와 같은 헤테로원자로 대체되고 고리 구성원의 나머지가 탄

소 원자인 비-방향족 고리 시스템을 의미한다. 헤테로사이클릴은 독립적으로 각각의 위치에서 하나 이상의 치환기로 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

- [0139] 용어 "헤테로아릴"은 N, O, 또는 S로부터 선택되는 적어도 하나의 고리 헤테로원자를 함유하고, 고리 구성원의 나머지가 탄소 원자인, 5 내지 14개 고리 원자, 예컨대 5 또는 6개 고리 원자를 갖는 노노- 또는 폴리사이클릭 방향족 고리 시스템을 의미한다. 헤테로아릴 모이어티는 독립적으로 각각의 위치에서 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 헤테로아릴 모이어티의 예는 비제한적으로 본원에 기재되거나 예시된 분자의 것들을 포함한다.
- [0140] 용어 "지방족 기"는 예컨대, 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 할로알킬, 사이클로알킬, 사이클로알케닐, 사이클로알킬닐 또는 비-방향족 헤테로사이클릭 기를 나타낸다. 지방족 기는 하나 이상의 치환기를 함유할 수 있다.
- [0141] 용어 "아민"은 한(1) 전자 쌍을 갖는 염기 질소 원자를 함유하는 유기 화합물 또는 작용기 (즉, 아미노)를 의미할 수 있고, 일차 아민 (NR₂H), 이차 아민 (NR₁R₂H), 및 삼차 아민 (NR₁R₂R₃)을 포함한다 (여기서 각각의 R은 동일하거나 상이할 수 있다). 또한, 2개의 R 기는 고리의 구성원을 나타낼 수 있고, 예컨대, N은 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 고리의 헤테로원자이다.
- [0142] 본원에 기재된 화합물의 약학적으로 허용되는 염이 또한 본 발명의 범위 내에 포함된다.
- [0143] 본 발명의 화합물의 설명은 당업자에게 공지된 화학 결합의 원리에 의해 제한된다. 따라서, 기가 하나 이상의 치환기로 치환될 수 있는 경우, 그러한 치환은 화학 결합의 원리에 부합하고 본질적으로 불안정하지 않고/거나 수성, 중성, 및 여러 공지된 생리학적 조건과 같은 주위 조건하에 불안정하지 않을 것으로 당업자에게 공지된 화합물을 제공하도록 선택된다.
- [0144] 약학적 조성물 및 투여 형태
- [0145] 본원에 기재된 NPB 화합물은 피검체에 투여하기에 적합한 약학적 조성물, 또는 다양한 약학적 투여 형태 중 하나로 존재할 수 있다. 본 발명의 NPB 화합물을 포함하는 약학적 조성물 및 투여 형태는 표적화된 화학요법에 유용하다.
- [0146] "약학적 조성물"은 피검체로의 하나 이상의 관심 작용제 (예컨대, NPB 화합물)의 투여를 촉진시키는 성분들의 조합물을 의미한다. 약학적 조성물은 일반적으로 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 조합된 하나 이상의 관심 작용제를 포함한다. 다수의 약학적으로 허용되는 "담체" 및 "희석제"는 당업계에 공지되어 있고 이들은 일반적으로 액체 또는 고체 충전제, 희석제, 부형제, 용매, 결합제, 또는 캡슐화 물질을 포함하는 약학적으로 허용되는 물질, 조성물, 또는 비히클을 의미한다.
- [0147] 조성물 중 각각의 구성요소는 약학적 제형의 다른 성분과 상용성이라는 의미에서 "약학적으로 허용되어야" 한다. NPB 화합물을 포함하는 조성물의 각각의 구성요소는 또한 조성물이 합리적인 이익/위험 비에 상응하는, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 면역원성, 또는 다른 문제 또는 합병증 없이, 피검체의 조직 또는 장기와 접촉하기에 적합하도록 "생체적합"하여야 한다.
- [0148] 약학적 조성물에 대한 더 많은 정보에 대해서는, 예컨대 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2005; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th Edition; Rowe et al., Eds., The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association: 2005; and Handbook of Pharmaceutical Additives, 3rd Edition; Ash and Ash Eds., Gower Publishing Company: 2007; Pharmaceutical Preformulation and Formulation, Gibson Ed., CRC Press LLC: Boca Raton, FL, 2004]을 참조하라.
- [0149] 본원에 기재된 약학적 조성물은 단일-단위 및 다중-단위 투여 형태를 포함하는 임의의 적합한 투여 형태로 제형화될 수 있다. 예시적인 투여 형태는, 예를 들어, 액체, 용액, 현탁액, 에멀전, 농축물, 분말, 페이트스, 겔, 검, 점적제, 정제, 캡슐 또는 마이크로캡슐을 포함한다. 일부 구체예에서, 투여 형태는 액체이다. 일부 구체예에서, 액체는 용액, 현탁액, 또는 에멀전이다.
- [0150] 투여 경로
- [0151] NPB 화합물 및 이를 함유하는 약학적 조성물은 임의의 적합한 투여 경로에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, NPB 화합물은 국소적으로 (예컨대 종양에), 부위적으로 (예컨대 체강에) 또는 전신적으로(예컨대 혈관, 예컨대 정맥 또는 동맥) 투여된다.
- [0152] 일부 구체예에서, NPB 화합물은 소화관내 투여, 국소 투여, 비경구 투여, 또는 비내 투여를 위해 제형화된다.

소화관내 투여는, 예를 들어 경구 투여를 포함할 수 있다.

- [0153] 일부 구체예에서, NPB 화합물 또는 조성물은 비경구 투여를 위해 제형화된다. 비경구 투여는, 예를 들어, 정맥내, 동맥내, 뇌내, 복강내, 근내, 피하, 심장내, 또는 골내 투여를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 비경구 투여는 주사 또는 주입과 같은 정맥내 투여이다. 일부 구체예에서, 비경구 투여는 동맥내 투여이다. 일부 구체예에서, 비경구 투여는 복강내 투여이다.
- [0154] 일부 구체예에서, 비경구 투여는 전신적 또는 부위적이다. 일부 구체예에서, 비경구 투여는 전신적이다. 일부 구체예에서, NPB 화합물 또는 조성물은 정맥내 투여된다.
- [0155] NPB 화합물의 투여량
- [0156] NPB 화합물 또는 조성물은 당업자 (예컨대 임상의)에 의해 적절한 것으로 여겨지는 임의의 치료 요법에 따라 투여될 수 있다.
- [0157] NPB 화합물 및 이를 함유하는 약학적 조성물의 투여량 요건은 적용되는 특정 화합물 또는 조합물, 투여 경로, 암 및 다른 질병 또는 질환을 포함하는 치료되는 특정 질병 또는 질환, 및 치료하려는 환자에 따라 달라질 것이다. 치료는 일반적으로 화합물의 최적 용량 미만의 적은 투여량으로 개시될 것이다. 이후, 투여량은 그 상황에서 최적 효과에 도달할 때까지 증가한다. 일반적으로, 본 발명에 따른 NPB 화합물 및 조성물은 유해하거나 해로운 부작용을 유발하지 않으며 효과적인 결과를 제공할 정도로 투여된다. 임의의 화학요법에 관해, 어느 정도의 독성 부작용은 허용되는 것으로 간주될 수 있다.
- [0158] 일반적으로, 암 세포를 효과적으로 사멸시키기 위해 충분한 양의 NPB 화합물이 적용되어야 한다. 일반적으로, NPB 화합물의 용량은 NPB 화합물이 치료 (피검체)에 원치 않는 현저한 효과를 제공하지 않도록 선택될 것이다.
- [0159] 특정 질병 또는 질환의 예방 또는 치료 또는 억제를 위해 투여될 때, NPB 화합물의 효과적인 투여량은 사용되는 특정 화합물, 투여 방식, 질환, 및 치료되는 질환의 중증도, 뿐만 아니라 치료하려는 개체와 관련된 다양한 물리적 요인에 따라 달라질 수 있다. 많은 경우에, 화합물이 약 0.01 mg/kg 내지 약 500 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 125 mg/kg, 1 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 1 mg/kg 내지 약 25 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 15mg/kg, 또는 약 0.5 mg/kg 내지 5 mg/kg, 또는 약 5 mg/kg 내지 10 mg/kg의 매일 투여량으로 투여될 때 만족스러운 결과가 얻어질 수 있다. 일부 경우에, 피검체는 단일-용량 치료 또는 다중-용량 치료를 수용할 수 있다. 일부 구체예에서, NPB 화합물은 실질적으로 정상 세포에 무독성이므로 비교적 높은 용량 (예컨대 10 mg/kg - 약 50 mg/kg, 또는 약 10 mg/kg 내지 약 30 mg/kg)으로 용인될 수 있다. 예상된 매일 투여량은 투여 경로에 따라 달라질 것으로 예상된다. 따라서, 비경구 투여는 종종 경구 투여 수준의 약 10% 내지 20%의 수준일 것이다.
- [0160] 치료 방법
- [0161] 본 발명은 암 및 화학요법에 의해 치료될 수 있는 (또는 치료될 것으로 여겨지는) 다른 질병 및 질환을 치료하는 방법을 포함한다. 한 양태에서, 본 발명은 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 암에 대한 표적화된 화학요법에 관한 것이다. 본원에 기재된 방법 및 표적화된 화학요법은 전형적으로 암으로 진단된 개체에 투여된다. 그러나, 일부 경우에, 표적화된 화학요법은 아직 암의 임상적 징후를 보이지 않았으나 암이 발생할 위험이 있는 개체, 또는 이전에 암으로 진단되었으나 관해 기간이거나 재발의 위험이 있는 피검체에 투여될 수 있다. 이를 위해, 본 발명은 또한 암을 예방하거나 암의 발생 위험을 감소시키는 방법, 뿐만 아니라 재발을 치료하거나 관해를 연장시키는 방법에 관한 것이다.
- [0162] 한 양태에서, 유효량의 본원에 정의된 바와 같은 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 이를 필요로 하는 피검체에서 화학치료 효과를 발생시키는 방법이 제공된다. 한 양태에서, 본 발명은 유효량의 본원에 정의된 바와 같은 NPB 화합물을 피검체에 투여함에 의해 이를 필요로 하는 피검체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 상기 방법은 피검체에서 암의 예방, 제어, 억제, 또는 완전한 치유를 위한 것일 수 있다.
- [0163] 일부 구체예에서, 치료는 방사선을 제외시킨다. 다시 말해, 화합물은 방사선민감제라기 보다 항암제로서 이용되도록 방사선의 부재하에 이용된다. 이는 피검체가 NPB 항암 활성과 상호작용하는 방식으로 방사선 치료를 받지 않음을 의미한다. 그러나 피검체는 본 발명의 화합물과 상호작용하지 않는 또 다른 시간에 방사선 치료를 받을 수 있다.
- [0164] 일부 구체예에서, 암은 Pt-기반 항암 약물 (예컨대 시스플라틴) 또는 독성 부작용을 갖는 다른 암 요법에 민감한 암이다. 일부 구체예에서, 암은 Pt-기반 항암 약물 (예컨대 시스플라틴) 또는 독성 부작용을 갖는 다른 암

요법에 내성인 암이다.

- [0165] 본원에 기재된 화합물은 또한 화학요법에 의해 치료될 수 있는 다른 질병 또는 질환, 예를 들어, AL 아밀로이드증, 강직척추염, 다발경화증, 크론병, 건선, 건선 관절염, 전신홍반루푸스, 류마티스 관절염, 공피증, 자가면역 질병, 비암성 형질 세포 질환(noncancerous plasma cell dyscrasia), 삼차 신경통(trigeminal neuralgia), 청신경종(acoustic neuromas), 심각한 갑상선 눈병, 군날개(ptyerygium), 색소성 용모결절성 윤활막염(pigmented villonodular synovitis)을 치료하고, 켈로이드 흉터 성장(keloid scar growth), 혈관 재협착(vascular restenosis), 및 판곳뼈되기(heterotopic ossification)의 예방에 이용될 수 있다. NPB 화합물은 또한 골수 이식 (조혈 줄기 세포 이식)에 앞서 조절 요법에 이용될 수 있다. 따라서, 또 다른 양태에서, 유효량의 본원에 정의된 바와 같은 NPB 화합물을 피검체에 투여함에 의해 피검체에서 화학요법에 의해 치료될 수 있는 질병 또는 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 질병 또는 질환은 암이 아닌 질병 또는 질환일 수 있다. 일부 구체예에서, 질병은 암이다.
- [0166] 또 다른 양태에서, Pt-기반 약물 (예컨대, 시스플라틴) 독성을 감소시키거나 극복하는 방법이 제공되고, 상기 기재된 임의의 방법은 Pt-기반 약물 (시스플라틴) 치료에 민감한 세포 또는 암에 적용되거나, Pt-기반 약물 (시스플라틴) 치료에 민감한 세포 또는 암을 갖는 피검체에 적용된다.
- [0167] 또 다른 양태에서, Pt-기반 약물 (예컨대, 시스플라틴) 내성을 극복하는 방법이 제공되고, 상기 기재된 임의의 방법은 Pt-기반 약물 (시스플라틴) 치료에 내성인 세포 또는 암에 적용되거나, Pt-기반 약물 (시스플라틴) 치료에 내성인 세포 또는 암을 갖는 피검체에 적용된다.
- [0168] 또 다른 양태에서, 상기 방법은 치료적 유효량의 전자에 고도로 반응성인 화합물을 이를 필요로 하는 피검체에 투여하는 것을 포함한다. 바람직한 표적화 및 라디칼 형성 및 반응에서, 작용제는 전신적 또는 급성 독성 효과 없이 항암 효과를 나타낼 수 있다.
- [0169] 또 다른 양태에서, 암 세포에 유효량의 본원에 정의된 바와 같은 NPB 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 암 세포에서 항암 효과를 유도하는 방법이 제공된다. 일부 구체예에서, 항암 효과는 암 세포의 사멸이다. 일부 구체예에서, 암 세포는 종양 세포이다.
- [0170] 또 다른 양태에서, 세포에 유효량의 본원에 정의된 바와 같은 화합물을 투여하는 것을 포함하는, 암 세포에서 아포토시스를 유도하는 방법이 제공된다.
- [0171] 치료는 치료적 유효량으로 투여되는 것이다. 화학요법의 특징은 본원에 기재된 임의의 구체예에 기재된 바와 같다.
- [0172] 본원에서 사용된 용어는 단지 특수한 실시예를 설명하기 위한 것이며 제한적인 것은 아님이 이해되어야 한다. 본원에서 구체적으로 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 용어는 관련 분야의 당업자에게 공지된 것과 같은 이의 일반적으로 의미로 제공됨이 추가로 이해되어야 한다.
- [0173] 본원에서 사용되는 용어 "피검체"는 치료되는 인간 또는 동물, 특히 포유동물을 의미한다. 포유동물은, 예를 들어, 영장류, 소, 양, 염소, 말, 개, 고양이, 토끼, 래트, 또는 마우스를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 비록 본원에 기재된 화합물이 수의용으로도 유용하지만, 피검체는 인간이다. 용어 "피검체" 및 "환자"는 상호 교환적으로 이용될 수 있다.
- [0174] 용어 "질병" 및 "질환"은 본원에서 상호교환적으로 이용될 수 있고 병태를 포함할 수 있다.
- [0175] 본원에서 사용되는 용어 "암" (예컨대 신생물 질병)은 비정상적인 세포 성장, 증식 또는 분열 (예컨대 신생물)을 포함하는 질병을 의미한다. 암 세포가 성장하고 분열함에 따라, 이들은 이들의 유전적 돌연변이 및 증식 특성을 자손 세포에 전달한다. "종양" (예컨대 신생물)은 암 세포의 축적이다. 본원에 기재된 방법 및 조합물은 암, 암 세포, 종양 및/또는 이와 관련된 증상의 치료에 이용될 수 있다.
- [0176] 본 발명의 방법, 용도 및 조합물에 따라 치료될 수 있는 예시적인 유형의 암은 비제한적으로 고환암, 방광암, 자궁경부암, 난소암, 유방암, 전립선암, 두부암, 경부암, 폐암 (예컨대 비소세포폐암), 자궁내막암, 췌장암, 카포시 육종, 부신 암종, 백혈병, 위암, 결장암, 직장암, 간암, 위암, 식도암, 신장암, 갑상선암, 자궁암, 피부암, 구강암, 뇌암, 척수암, 담낭암을 포함한다. 암은, 예를 들어, 육종, 암종, 흑색종, 림프종, 골수종, 또는 생식 세포 종양을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 암은 고환암, 방광암, 자궁경부암, 난소암, 유방암, 전립선암, 두부암, 경부암, 또는 폐암 (예컨대 비소세포폐암)이다.

- [0177] "항암제"는, 예를 들어, 아포토시스를 촉발시킴에 의해 직접 또는 간접적으로 암 세포를 사멸시키거나, 암 세포의 증식을 직접 또는 간접적으로 억제, 중지 또는 감소시키는 치료제를 의미한다. 일부 경우에, "항-항신생물제"는 하나를 초과하는 치료제를 포함할 수 있다.
- [0178] 용어 "부작용"은 화학요법의 결과 중 하나, 예컨대 신장 독성, 간 독성, 심각한 구역 및 구토, 골수 억제(bone marrow depression), 골수억제(myelosuppression)/면역억제, 점막염(소화관의 내층의 염증), 탈모 (모발 손실), 혈구감소증, 통증, 피로, 악액질, 피부 합병증, 예컨대 과민 반응, 및 신경, 폐, 심장, 생식 및 내분비 합병증을 의미한다.
- [0179] 본원에서 사용되는 용어 "치료하다", "치료하는" 및 "치료"는 일반적으로 치료하려는 질병 또는 질환의 증상의 예방, 감소, 또는 근절을 포함한다. 암에 관해, 용어 "치료하다", "치료하는" 및 "치료"는, 예를 들어, 종양, 암 (종양) 세포 또는 암의 예방, 근절, 제거, 경감, 변형, 감소, 관리 또는 제어, 전이의 최소화, 예방 또는 지연, 재발의 예방 또는 개시 지연, 또는 피검체의 생존 연장을 포함할 수 있다.
- [0180] 본원에서 사용되는 용어 "전이"는 림프관 또는 혈관을 통한 종양 세포의 파종을 의미한다. 전이는 또한 장액강, 또는 지주막하 또는 다른 공간을 통한 직접 확산에 의한 종양 세포의 이동을 의미한다. 전이의 과정을 통해, 신체 다른 부위로의 종양 세포 이동은 최초 출현의 부위와 떨어진 부위에 신생물을 확립시킨다.
- [0181] 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 세포, 조직, 종양, 시스템, 또는 피검체에서 요망되는 생물학적 또는 의학적 반응을 유도시키고, 그 결과는 일반적으로 연구원, 의사, 의사 또는 다른 임상 또는 기술자에 의해 추구되는 것인, 치료 구성요소, 또는 조합 요법에서의 구성요소의 양을 의미한다. 화학요법에 투여되는 NPB 항암 화합물의 유효량을 언급할 때, 화합물의 유효량은 요망되는 항암 효과를 제공하기에 충분한 양일 수 있다.
- [0182] "항암 효과"는 비제한적으로 암 세포, 종양, 또는 암의 감소, 예방, 억제된 성장 또는 제거; 감소되거나 억제된 암 세포 증식; 암 세포의 증가되거나 증대된 사멸 또는 아포토시스; 전이의 감소 또는 예방, 및/또는 피검체의 생존 연장을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 요망되는 생물학적 또는 의학적 반응은 암의 하나 이상의 증상의 경감, 완화, 악화, 또는 제거, 또는 특정 암 치료와 관련된 하나 이상의 독성 부작용에서의 감소일 수 있다.
- [0183] 예컨대, 암 세포 증식을 "억제하는" 또는 "감소시키는" 것은, 일반적으로, 당업자에게 공지된 방법을 이용하여 측정되는 대로, 세포 증식의 양을 본 출원의 방법 및 조합물로 치료되거나 처리되지 않은 증식성 세포에 비해, 예를 들어 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 100% 만큼 지연시키거나, 감소시키거나, 예를 들어 중지시키는 것을 의미한다.
- [0184] 종양을 "감소시키는" 것은, 일반적으로, 당업자에게 공지된 방법을 이용하여 측정되는 대로, 종양의 크기를 치료 전 종양 크기에 비해 또는 본 출원의 방법 및 NPB 항암 화합물로 처리되지 않은 종양에 비해, 예를 들어 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 100% 만큼 감소시키는 것을 의미한다.
- [0185] 암 세포의 "증가"되거나 "증대된" 사멸 또는 아포토시스는, 일반적으로, 당업자에게 공지된 방법을 이용하여 측정되는 대로, 본 출원의 방법 및 NPB 항암 화합물로 치료되거나 처리되지 않은 세포에 비해, 예를 들어 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300% 또는 그 초과 만큼 사멸 또는 아포토틱 세포의 수에서의 증가를 의미한다. 세포 사멸 또는 아포토시스의 증가는 표준 세포 생존력 검정을 이용하여 측정되는 대로, 세포 생존력에서의 감소로도 측정될 수 있었다.
- [0186] 본원에서 사용되는 용어 "아포토시스"는 내재 세포 사멸 또는 자살 프로그램을 의미한다. 촉발성 자극에 반응하여, 세포는 세포 수축, 세포 막의 수포화(blebbing) 및 염색질 응축 및 단편화를 포함하는 사건의 캐스케이드를 겪는다. 이러한 사건은 이후 대식세포에 의해 포식되는 막-결합 입자 (자살체(apoptotic bodies))의 클러스터로의 세포 전환을 발생시킨다.
- [0187] 본원에서 사용되는 단수 형태는 달리 지시되지 않는 한 복수 대상을 포함한다.
- [0188] 본원에서 사용되는 "실질적으로", "약" 및 "대략"과 같은 정도의 용어는 최종 결과가 크게 변하지 않게 하는 수식된 용어의 합리적인 편차 량을 의미한다. 이러한 정도의 용어는 상기 편차가 이것이 수식된 단어의 의미를 부정하지 않는 한 수식된 용어의 적어도 $\pm 5\%$ 의 편차를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0189] 조합 요법
- [0190] 본원에 기재된 NPB 항암 화합물은 단독 요법으로 투여될 수 있거나 하나 이상의 추가 요법, 예컨대 수술 또는 약물 또는 방사선 요법과 함께 이용될 수 있다. 예를 들어, 추가 요법은, 예컨대 원발성 종양을 제거하기 위한

수술, 또는 항생제, 항염증제 또는 항암제와 같은 치료제를 포함하는 암 요법일 수 있다. 항암제는 예를 들어 고전적인 화학요법제, 뿐만 아니라 분자 표적화된 치료제, 생물학적 요법제, 및 방사선치료제를 포함할 수 있다. 본 발명의 화학요법과의 추가 조합에 이용되는 항암제는, 예를 들어, 전자-공여 작용제, 알킬화제, 대사길항제, 식물 알칼로이드 및 테르페노이드 (예컨대, 탁산), 토포아이소머라제 억제제, 항-종양 항생제, 호르몬 요법, 분자 표적화된 작용제 등을 포함하는, 당업자에게 공지된 임의의 부류로부터 선택되는 작용제를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 항암제는 알킬화제, 대사길항제, 전자-공여 작용제, 빈카 알칼로이드, 탁산, 토포아이소머라제 억제제, 항-종양 항생제, 티로신 키나제 억제제, 또는 면역억제성 매크롤리드이다. 선택된 추가 작용제는 NPB 화합물의 유효성을 현저하게 감소시키지 않거나 원치 않는 독성 부작용을 유도/증대시키지 않아야 함이 이해될 것이다.

[0191] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본원에 기재된 NPB 화합물 및 또 다른 치료제 또는 요법 (예컨대 수술 또는 방사선)을 포함하는 조합 요법을 제공한다. 바람직한 구체예에서, 상기 조합은 조합의 개개 구성요소가 단독으로 투여될 때의 항암 효과보다 큰 순(net) 항암 효과를 지닌다. 바람직하게는, 항암 효과는 독성 부작용의 동반 증가 없이 증가된다.

[0192] 한 양태에서, 유효량의 본원에 정의된 바와 같은 화합물을 피검체에 투여하고; 하나 이상의 추가적인 치료제를 피검체에 투여하는 것을 포함하는, 암 또는 화학요법에 의해 치료될 수 있는 다른 질병을 치료하기 위한 조합 요법이 제공된다. 일부 구체예에서, 치료제는 화학요법제이다.

[0193] 상승작용성 조합이 특히 바람직하다. 일부 구체예에서, 상기 조합은 상승작용성 항암 효과를 나타낸다. 용어 "상승작용성" 및 "상승효과"는 조합된 조합물의 구성요소의 효과가 개개 구성요소가 단독으로 투여될 때의 효과의 합보다 큰 것을 의미한다.

[0194] 용도

[0195] 본원에 기재된 NPB 항암 화합물은 표적화된 화학요법에 이용될 수 있고, 예컨대 치료를 받은 피검체에서 최소 독성과 함께 항암 효과를 발생시키기 위해 이용될 수 있다. 따라서, 한 양태에서, 피검체에서 화학요법의 항암 효과를 발생시키는데 사용하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 항암 화합물이 제공된다.

[0196] 또 다른 양태에서, 피검체에서 암의 치료에 사용하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 NPB 항암 화합물이 제공된다. 또 다른 양태에서, 암의 치료에서 또 다른 작용제/요법과 함께 사용하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 NPB 항암 화합물이 제공된다. 또 다른 양태에서, 암을 치료하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 NPB 항암 화합물이 제공된다. 또 다른 양태에서, 암을 치료하기 위해 또 다른 작용제/요법과 함께 사용되는 약제의 제조에 사용하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 NPB 항암 화합물이 제공된다. 또 다른 양태에서, 피검체에서 화학요법에 의해 치료될 수 있는 질병 또는 질환을 치료하는데 사용하기 위한 본원에 정의된 바와 같은 NPB 항암 화합물이 제공된다.

[0197] 일부 구체예에서, 상기 용도는 방사선을 제외시킨다.

[0198] 일부 구체예에서, 피검체는 백금-기반 작용제 (예컨대, 시스플라틴) 치료에 민감하지만 현저한 독성 효과를 갖는 암을 지닌다. 일부 구체예에서, 피검체는 백금-기반 작용제 (예컨대, 시스플라틴) 치료에 내성인 암을 지닌다.

[0199] 상기 용도에 따르면, 화학요법은 치료적 유효량을 투여하기 위한 것이다.

[0200] 본원에 기재된 NPB 항암 화합물은 항암 효과를 유도하기 위해 시험관내 또는 생체내에서 이용될 수 있다. 한 양태에서, 암 세포를 치료하는데 사용하기 위한 (예컨대 암 세포에서 항암 효과를 유도하기 위한) 본원에 정의된 바와 같은 NPB 항암 화합물이 제공된다.

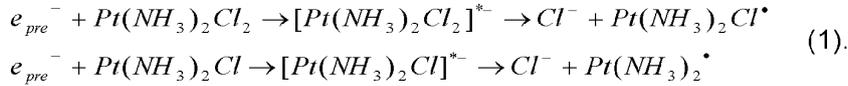
[0201] 상기 용도의 또 다른 특징은 본원에 기재된 임의의 구체예에 기재된 바와 같다.

[0202] 키트 및 시판용 패키지

[0203] 또 다른 양태에서, 화학요법에 사용하기 위한 본원에 기재된 바와 같은 NPB 항암 화합물에 관한 키트 및 시판용 패키지가 제공된다. 일부 구체예에서, 본원에 기재된 바와 같은 NPB 화합물을 포함하는 키트 또는 시판용 패키지가 제공된다. 일부 구체예에서, 설명서는 암의 치료에서 또 다른 작용제/요법과 함께 사용하기 위한 것이다.

[0204] 해리성 전자 이동 (DET) 반응

[0205] 본 발명자들은 최근에 화학요법에서 그리고 방사선요법과 함께 이용되는 시스플라틴의 분자 작용 메커니즘을 추론하였다 [Lu, 2007; 2010; Lu et al. 2007]. 시스플라틴은 널리 알려진 DNA-공격제이긴 하지만, 이의 정확한 분자 작용 메커니즘은 여전히 모호하다. 펨토초 시간-분해된 레이저 분광학 (fs-TRLS)의 이용을 통해, 시스플라틴이 약하게-결합된 전자, 예컨대, 물의 방사선분해에 의해 생성된 예비수화된 전자 (e_{pre}^-)와의 해리성-전자 이동 (DET) 반응에 매우 효과적인 분자임이 입증되었다:



[0206] 생성된 시스-Pt(NH₃)₂ 라디칼은 매우 효과적으로 DNA 가닥 절단을 발생시킨다 [Lu, 2007]. 세포에서 복구되지 않은 DSB는 DNA의 손상의 가장 치명적인 형태이고 아포토시스 및 최종 클론원성 세포 사멸과 직접 관련됨이 널리 공지되어 있다.

[0208] 본 발명자들은 놀랍게도 이제 특정 비-백금-기반 유기 분자가 암 세포 내부의 환원성 환경에서 존재할 수 있는 약하게-결합된 전자와의 DET 반응에 또한 참여하여, 근본적으로 시스플라틴 유사체로서 작용할 수 있음을 발견하였다. 본 발명의 NPB 항암 화합물의 몇몇 일반적인 특징은 이들이 하나 이상의 전자 이동 프로모터, 예컨대 NH₂ 기, 및 하나 이상의 이탈기, 예컨대 할로겐에 커플링된 방향족 고리 (백금 배위 이온이라기 보다)를 포함한다는 것이다. 그러한 화합물은 화학요법을 위한 효과적인 항-종양 화합물임이 입증된다.

[0209] 유리하게는, 그러한 화합물은 또한 Pt-기반 작용제 (예컨대, 시스플라틴)보다 정상 세포에 현저하게 덜 독성인 것이 입증된다. 사실상, 본원에 제공된 예는 예시적인 화합물이 심지어 매우 높은 용량 (200 μM)에서도, 정상 세포에 상당히 무독성임을 입증한다.

[0210] 암 세포를 시험관내 또는 생체내에서 본 발명의 비-백금-기반 NPB 항암 화합물과 접촉시키는 것은 화학요법의 항암 효능을 제공하는 것이 본원에서 입증되는 반면, 화합물 자체는 사용 가능한 용량 내에서 실질적으로 무독성이다.

[0211] 상기 기재된 시스플라틴의 추론된 해리성-전자 이동 (DET) 메커니즘에 기반하여, 비-백금-기반 항암 화합물 (NPB)은 다음과 같은 DET 반응을 통해 암 세포에서 약하게-결합된 전자 (e_{nb}^-)와 반응하는 것으로 여겨진다:



[0213] 이러한 DET 반응 메커니즘은 도 2에 개략적으로 도시된다. 생성된 라디칼은 DNA 손상 및 아포토시스 (세포 사멸), 예컨대 암 세포 또는 종양에서 DNA 손상 및 세포 사멸을 효과적으로 발생시킬 수 있다.

[0214] 상기 화합물의 DET 메커니즘을 입증하고 이들의 시험관내 및 생체내 항암 효과를 탐구하기 위한 연구가 수행되었다. 결과 중 일부가 하기에 논의된다.

[0215] NPB 항암 화합물의 FS-TRLS 연구

[0216] NPB와 약하게-결합된 전자 (e_{nb}^-)의 반응성은 실시예 1에 개요된 대로, fs-TRLS 측정에 의해 연구되었다. 도 3은 예시적인 NPB로서 화합물 B의 DET 반응이 브로모데옥시우리딘 (BrdU) 및 아이오도데옥시우리딘 (IdU)과 같은 할로피리미딘의 반응에 비해 실제로 매우 효과적이었음을 나타낸다. 잠재적인 항암제로서 시험되었지만 III기 임상 시험에서 실패한 [Prados et al., 1999] 후자는 동일한 실험 조건하에 검출되는 DET 반응을 나타내지 않았는데, 그 이유는 아마도 BrdU 및 IdU의 구조에서 전자-이동 프로모터의 결여 때문이다. 이는 본원에 기재된 NPB가 암의 화학요법을 위한 효과적인 항암제로서 매우 유망함을 제안한다.

[0217] NPB 항암 화합물의 시험관내 독성 시험

[0218] 시스플라틴 또는 NPB 항암 화합물 단독의 시험관내 독성을 실시예 2에 개요된 대로, 인간 (피부) 정상 세포 (GM05757)에서 조사하였다. GM05757 세포주는, 특히 새로운 항암제를 시험함에 있어서, 암 연구의 인간 정상 세포로서 광범하게 이용되어 왔다 [Choudhury et al. 2009]. 도 4는 정상 세포가 약 10 μM의 측정된 IC50 (여기서 세포 생존율은 미처리된 세포에 관해 50%이다)으로 용량-의존적인 방식으로 시스플라틴의 72-시간 처리에 의해 효과적으로 사멸되었음을 나타내며, 이는 시스플라틴이 화학요법 약물로서 실제로 매우 독성임을 보여

준다. 대조적으로, 도 5 내지 8에 플롯팅된 결과는 NPB 향암 화합물, 화합물 A, B, C 및 D가 최대 96시간의 처리 동안 200 μ M의 용량까지 정상 세포에 본질적으로 독성이 없었음을 나타낸다. 따라서, 이러한 NPB는 동물 및 인간에서 증금속 (Pt)-기반 화학요법 약물 (시스플라틴)과 대조적으로, 독성 부작용을 거의 또는 전혀 유도하지 않을 것으로 기대된다. 세포의 생존력은 가장 일반적으로 이용되는 세포 생존력 검정 중 하나인 MTT 검정에 의해 측정되었다. 이러한 방법은 대사적으로 활성인 세포 (살아 있는 세포)에 의한 MTT (3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드)의 불용성 포르마잔으로의 전환을 수반한다. 용해제를 이용하여, 포르마잔을 용해시키고 이의 흡광도를 측정하여, 생존하는 세포의 수에 대한 표시를 제공한다. 이는 장기간 규모의 세포 생존을 측정하는 클론원성 검정에 비해 필요한 약물 치료 시간 뿐만 아니라 총 프로토콜 시간의 관점에 있어서 신속한 널리 확립된 정량적 방법이다.

[0219] NPB 향암 화합물의 시험관내 향암 효과 시험

[0220] NPB의 시험관내 향암 효과를 인간 자궁경부암 (HeLa 또는 ME-180), 유방암 (MDA-MB-231) 및 폐암 (A549) 세포주, 뿐만 아니라 시스플라틴-내성 인간 난소암 (NIH:OVCAR-3, HTB-161) 세포주에서, 실시예 3에 개요된 대로 조사하였다. 도 9-27은 다양한 농도의 각각의 NPB로 96시간 동안 처리한 후 다양한 인간 암 세포의 세포 생존율을 도시한다. 이러한 결과는 화합물 A, B, C 및 D가 용량 의존적인 방식으로 암 세포의 효과적인 사멸을 유도하였음을 나타낸다. NPB의 현저한 향암 효과가 뚜렷하게 관찰되었다. 예를 들어, 거의 모든 자궁경부암 세포 (ME-180) 또는 유방암 세포 (MDA-MB-231)가 인간 정상 세포에 대해 독성을 나타내지 않은 약 150-200 μ M의 화합물 B 또는 C 또는 D의 존재하에 사멸되었다.

[0221] NPB 향암 화합물의 시험관내 DNA 이중-가닥 절단 및 아포토시스 시험

[0222] 예시적인 NPB 화합물로서 화합물 B에 의해 유도되는 DNA 이중-가닥 절단 (DSB) 및 아포토시스를 실시예 4 및 5에 개요된 대로 인간 자궁경부암 (ME-180) 세포주에서 조사하였다. 처리된 암 세포에서 DNA DSB 및 아포토시스를 각각 γ H2AX DNA 손상 검정 및 CellEvent™ 카스파제-3/7 녹색 검출 키트 (둘 모두는 Invitrogen으로부터 구입하였다)에 의해 검출하였다. 도 28은 화합물 B가 처리된 암 세포에서 현저한 양의 DNA DSB를 유도하였음을 나타낸 반면, 도 29는 이것이 또한 0-200 μ M의 화합물 B에 의해 처리된 암 세포에서 현저한 퍼센트의 아포토시스를 상응하게 발생시켰음을 나타낸다.

[0223] 본원에 제시된 시험관내 결과는 NPB 화합물의 존재가 암 세포에서 현저한 DNA DSB 및 아포토시스를 유도함에 의해 종양 세포를 효과적으로 사멸시켰지만 정상 세포는 사멸시키지 않았음을 두드러지게 나타낸다. 따라서, NPB는 동물 및 인간에서 최소의 독성 부작용을 유도하거나 독성 부작용을 유도하지 않으며 충분한 향암 효과를 발생시킬 것으로 기대된다.

[0224] NPB 향암 화합물의 생체내 향암 효과

[0225] 예시적인 NPB 화합물로서 화합물 B의 생체내 향암 효과를 실시예 6에 개요된 대로 인간 자궁경부암 (ME-180)의 이종이식 마우스 종양 모델에서 조사하였다. 화합물 B의 투여는 종양 모델에서 화합물을 수용하지 않은 대조군에 비해, 종양 성장을 현저하게 억제하였고, 이는 도 30에 도시된 종양 (부피) 성장 곡선으로부터 보여질 수 있다. 이러한 모든 결과는 화합물 B가 마우스에서 종양의 현저한 성장 억제 및 재성장 지연을 발생시켰음을 나타낸다. 단지 적은 매일 용량 (7 mg/kg, 마우스에서 약 50 μ M의 추정 농도에 해당)의 화합물 B를 사용하였고 화합물 B가 200 μ M의 농도까지 최소의 전체 및 급성 독성을 지닌다는 점을 감안할 때, 이러한 결과는 최대 치료 효과를 달성할 수 있도록 더 큰 화합물 용량 또는 더 잦은 빈도의 치료까지 추정될 수 있을 것으로 예측된다.

[0226] NPB 향암 화합물의 생체내 독성 연구

[0227] 전체 약물 독성을 생존 검정 및 체중 측정을 통해 6-8주 SCID 마우스에서 연구하였고, 급성 약물 독성을 다음 파라미터를 통해 측정하였다: 실시예 7에 개요된 대로, 채혈 및 조직학. 간독성 (ALT, ALP, 총 빌리루빈), 신독성 (혈중 요소, 크레아티닌), 및 전해질 (Na, K, Cl)을 생화학적 방법 또는 HPLC-질량 분광학에 의해 분석하였다. 본 연구에서, 예시적인 NPB 화합물로서 화합물 B는 시험관내 세포주 실험에서 관찰된 무독성으로 인해 의도적으로 IP 주사에 의해 마우스에 0, 및 7 mg/kg으로 5일 동안 매일 투여되었다. 임의의 물리적 독성에 대해 마우스를 관찰하였다. 연구의 끝에, 간 및 신장 독성을 평가하기 위해 전체 장기를 회수하였다. 혈액을 또한 수집하였다. 도 31은 시간에 따라 마우스의 체중에 영향이 없었음을 나타내며, 즉, 화합물 B는 물리적 독성을 나타내지 않았다. 더욱이, 도 32에서 플롯팅된 결과는 고 용량 (5일 x 7 mg/kg/일 = 35 mg/kg)으로 제공된 화합물 B조차 관찰가능한 급성 독성을 유도하지 않았고, 즉 간독성, 신독성, 및 전해질에서의 변화를 유도하지 않았음을 나타낸다.

- [0228] 본원에 제공된 실시예로부터의 시험관내 및 생체내 결과는 예시된 것들을 넘어 다른 화합물 및 조합물, 암 세포, 암 모델 및 인간 암까지 미칠 수 있는 것으로 여겨진다. 본원에 제공된 정보에 의해, 합리적인 접근법을 이용하여 화학요법에 이용될 수 있는 본원에 예시된 것들 이외의 다른 새로운 항암제를 그 항암 효과를 생성하기 위해 동정할 수 있다. 실시예에 개시된 시험관내 및 생체내 실험에서 보여질 수 있는, 특정 작용제의 효과를 평가하기 위해 당업자에게 공지된 다양한 스크리닝 검정을 이용할 수 있다. 항암 효과를 나타내는 그러한 작용제, 뿐만 아니라 Pt-기반 항암제를 이용한 치료에 비해 독성 부작용을 발생시키지 않는 작용제가 특히 바람직할 것이다. 효과적인 항암제를 동정하기 위한 이러한 합리적인 접근법은 랜덤 스크리닝 검정의 효율적이고 경제적인 대안을 나타낸다.
- [0229] 숙련된 전문가는, 예컨대 요망되는 항암 효과를 달성하는 한편 최소의 독성 부작용을 갖도록 하기 위해, 생체내 화학요법에 필요한 효과적인 양을 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 효과적인 투여량은 다른 요인 중에서도, 암의 유형 및 단계, 투여 경로, 치료 요법에 따라 달라질 수 있다. 또한 사용되어야 하는 최적 약물 용량을 결정하기 위한 연구가 숙련된 전문가에 의해 수행될 수 있다.
- [0230] 본원에 기재된 NPB의 한 가지 장점은 기재된 DET 반응 메커니즘이 종양 세포에서 우선적으로 활성이 되도록 설계된다는 것이다. 이는 NPB가 낮은 반응성을 지녀서, DET가 발생하지 않거나 환원성 세포내 환경의 결여로 인해 이의 반응 효율이 정상 조직에서 상당히 낮아질 정상 세포에서의 경우와 대조적이다 [Lu et al., 2013]. 따라서, 기재된 화합물은 자궁경부암, 난소암, 유방암, 폐암, 전립선암, 뇌암 및 척수암, 두경부암, 간암, 위암, 백혈병, 및 직장결장암을 (비제한적으로) 포함하는 많은 유형의 암의 자연적으로 표적화된 화학요법을 만들 것이다.
- [0231] NPB의 일부 요망되는 특징은 하기 중 하나 또는 이의 조합을 포함한다: (1) 생체적합성; (2) 약하게-결합된 전자와의 효과적인 반응; (3) 특정 용량이 사용될 수 있게 하는 암 세포의 효과적인 사멸; (4) 투여되는 용량에서 정상 세포에 비활성 및 이에 따라 최소의 독성 (이상적으로, 실질적으로 무독성); (5) 환원성 또는 저산소 종양 환경에서 반응성; (6) 암 세포와의 우선적인 반응성; (7) 세포 및 바람직하게는 핵에 진입할 수 있음; 및/또는 (8) 많은 유형의 종양에 대한 이용가능성.
- [0232] 본원에 기재된 원리를 이용하여, 당업자는 표적화된 화학요법의 항암 효과를 유도할 수 있는 항암 화합물을 동정할 수 있을 것이다. 따라서, 본 발명의 범위는 기재된 예시적인 NPB 화합물을 넘어서 확장된다.
- [0233] 다수의 이론, 가설, 확신 및 가정이 본원에서 논의된다. 그러한 이론, 가설, 확신 및 가정은 본 발명의 범위를 구속하거나 제한하려는 것이 아니다.
- [0234] **실시예**
- [0235] 하기 개시된 실시예는 본 발명을 예시하며 본 발명의 범위를 제한하는 것이 아니다.
- [0236] **실시예 1. 항암 화합물 (NPB)과 약하게-결합된 전자의 DET 반응의 펨토초 레이저 분광 관찰**
- [0237] **1.1 fs-TRLS 방법**
- [0238] 펨토초 (fs) 시간-분해된 레이저 분광학 (fs-TRLS)은 분자 반응의 실시간 관찰을 위한 가장 다용도의 강력한 기법이다. 이는 반응이 실제 일어나는 시간 규모까지 떨어진 그러한 단기간의 레이저 플래시를 이용한다 - 펨토초 (fs) ($1\text{fs} = 10^{-15}$ 초). 신규한 NPB 항암 화합물과 약하게-결합된 전자의 DET 반응을 이전에 입증된 fs-TRLS 방법 [Lu, 2007; 2010] 에 의해 연구하였다. 후자의 경우, 간단히 말해 본 발명자들의 fs 레이저 증폭기 시스템 (Spectra-Physics, Spitfire)은 펄스 폭이 100-120 fs인 레이저 펄스를 500 Hz의 반복율로 생성하였다. 350 nm의 강한 펌프 펄스를 이용하여, 이후 이온화되어 e_{wb}^- 를 생성하는 높은 에너지 상태 H_2O^* 로의 H_2O 분자의 2-광자 여기에 의해 약하게-결합된 전자 (e_{wb}^-)를 발생시켰고; 특정 지연에서 오는 400 nm의 프로브 펄스를 이용하여, 반응 중간 음이온 상태의 일시적인 흡광도를 검출함에 의해 전자와의 DET 반응을 모니터링하였다.
- [0239] **1.2 결과**
- [0240] 신규한 NPB 항암 화합물 (예컨대, 화합물 B)의 DEA 반응의 대표적인 fs-TRLS 관찰을 도 3에 도시한다. 그 결과는 화합물 B와 e_{wb}^- 의 DET 반응이 매우 효과적이고, 이는 브로모데옥시우리딘 (BrdU) 또는 아이오도데옥시우리딘 (IdU)의 반응보다 훨씬 강력함을 나타낸다. 후자는 전자-이동 프로모터 기(디아미노)를 갖지 않고 이의 DET 반

은 동일한 실험 조건하에 무시할 수 있는 것으로 관찰된다. 이러한 관찰은 기재된 화합물이 강력한 항암제임을 예시한다.

[0241] **1.3 논의**

[0242] 기재된 NPB 화합물 중 (모노- 또는 디-)할로겐 및 디아미노 기의 존재는 암 세포의 환원성 세포내 환경에 존재하는 약하게-결합된 전자와 이들의 DET 반응을 실제로 향상시킬 수 있다.

[0243] **실시예 2. 인간 정상 세포를 치료함에 있어서 NPB의 독성에 대한 시험관내 시험**

[0244] **2.1 재료 & 방법**

[0245] 2.1.1 화합물집 및 시약

[0246] 시스플라틴, 디클로로-디아미노-벤젠 (화합물 A), 브로모-디아미노-벤젠 (화합물 D), 인슐린, 및 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT)를 Sigma-Aldrich로부터 취득하였다. 디브로모-디아미노-벤젠 (디브로모-페닐렌디아민, 화합물 B)을 TCI-America로부터 취득하였다. 디아이오도-디아미노벤젠 (화합물 C)을 본 발명자들의 실험실에서 합성, 정제 및 결정화하고, 구조 및 순도를 NMR 및 질량 분광분석법에 의해 조사하였다. MEM 및 우태아 혈청 (FBS), 페니실린 G 및 스트렙토마이신을 Hyclone Laboratories (UT, USA)로부터 취득하였다. 시스플라틴의 원액을 초순수 또는 염수로부터 새롭게 제조하였고, 화합물 A, B, C, D의 원액을 순수한 에탄올에서 제조하였으며, 이 때 에탄올의 최종 농도는 세포에 처리할 때 ≤1%였다.

[0247] 2.1.2 세포 배양

[0248] 인간 피부 이배체 섬유모세포 (GM05757 세포주)를 Coriell Cell Repository로부터 직접 취득하였다. 우태아 혈청 (FBS)을 Hyclone Laboratories (UT, USA)로부터 취득하였다. GM05757 정상 세포를 10% FBS, 100 단위/mL 페니실린 G 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 (Hyclone)이 보충된 MEM (Hyclone)과 배양하였다. 세포를 5% CO₂를 함유하는 습윤된 대기에서 37°C로 유지시켰다.

[0249] 2.1.3 MTT에 의한 세포 생존력 측정

[0250] 세포 생존력에 대한 NPB의 독성 효과를 3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐 테트라졸륨브로마이드 (MTT) 검정에 의해 결정하였다. 세포를 96-웰 플레이트 (5 x 10³개 세포/웰)에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 신선한 배양 배지로 교체하고 약물 농도를 다양하게 하면서 72 또는 96시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후 세포 생존력의 MTT 검정을 수행하였다. 간단히, 1.2 mM MTT (sigma)를 함유하는 페놀 레드가 없는 100 µl의 새로운 배지 (즉, PBS 중 10 µl의 12 mM MTT 원액을 첨가함)를 각 웰에 첨가하고 4시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후 배지를 제거하고, 포르마잔 결정을 100 µL/웰 DMSO에 의해 용해시켰다 (또는 대안적으로 100 µl/웰 SDS에 의해 그리고 추가 4시간 동안 인큐베이션시킴). Multiskan Spectrum UV/Vis 마이크로 플레이트 판독기 (Thermo Scientific)를 이용하여 540 nm (SDS 용해의 경우 570 nm)에서의 흡광도를 측정함에 의해 생존 분획을 결정하였고, 이는 생존가능한 세포의 수에 정비례한다.

[0251] **2.2 결과**

[0252] 인간 정상 세포에 대한 NPB의 독성을 시험하기 위해, 표준 MTT 검정을 이용하였고 시스플라틴을 참조로서 이용하였다. 인간 정상 (GM05757) 세포를 다양한 약물 농도 (시스플라틴의 경우 0-50 µM 및 화합물 A/B/C/D의 경우 0-200 µM)로 처리하였다. 결과를 도 4-8에 도시한다. 먼저, 시스플라틴은 ≤30 µM의 낮은 농도에서조차 72시간 처리 동안 측정된 IC₅₀이 약 10 µM인 심각한 독성을 나타냄이 도 4로부터 명확하게 보여진다. 이러한 결과는 시스플라틴이 항암제로서 실제로 매우 독성임을 보여준다. 대조적으로, 본 발명에 기재된 NPB, 화합물 A, B, C 및 D는 200 µM의 매우 높은 농도에서 96시간 처리했을 때에도 정상 세포에 대해 본질적으로 독성이 없음이 도 5-8에서 뚜렷이 입증된다. 이러한 결과는 중금속 (Pt)-기반 화학요법 약물 (시스플라틴) 및 NPB 간의 대조적인 차이를 나타낸다. 따라서, 이러한 NPB 분자는 동물 및 인간에서 체계적인 독성 부작용이 전혀 없거나 또는 최소로 유도할 것으로 기대된다.

[0253] **2.3 논의**

[0254] 본 발명자들이 가정한 바와 같이, 환원성 세포내 환경의 결여로 인해 정상 세포는 고도로 산화성인 기재된 화합물에 대해 낮은 반응성을 지닌다. 따라서, NPB는 정상 세포에 독성이 없거나 낮은 독성을 나타낸다. 기재된 화합물은 인간 정상 세포에 높은 친화성을 갖고 고도로 독성인 임상적으로 사용되는 시스플라틴과 대조적이다.

따라서, 이러한 NPB는 탁월한 무독성 항암제의 가능성이 있다.

[0255] **실시예 3. 다양한 암 세포를 치료함에 있어서 NPB의 시험관내 항암 결과**

[0256] **3.1 재료 & 방법**

[0257] **3.1.1 화학물질 및 시약**

[0258] 시스플라틴, 디클로로-디아미노-벤젠 (화합물 A), 브로모-디아미노-벤젠 (화합물 D), 인슐린, 및 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드 (MTT)를 Sigma-Aldrich로부터 취득하였다. 디브로모-디아미노-벤젠 (디브로모-페닐렌디아민, 화합물 B)을 TCI-America로부터 취득하였다. 디아이오도-디아미노벤젠 (화합물 C)을 본 발명자들의 실험실에서 합성, 정제 및 결정화하고, 구조 및 순도를 NMR 및 질량 분석분석법에 의해 조사하였다. MEM 및 우태아 혈청 (FBS), 페니실린 G 및 스트렙토마이신을 Hyclone Laboratories (UT, USA)로부터 취득하였다. 시스플라틴의 원액을 초순수 또는 염수로부터 새롭게 제조하였고, 화합물 A, B, C, D의 원액을 순수한 에탄올에서 제조하였으며, 이 때 에탄올의 최종 농도는 세포에 처리할 때 ≤1%였다.

[0259] **3.1.2 세포 배양**

[0260] 인간 피부 이배체 섬유모세포 (GM05757 세포주)를 Coriell Cell Repository로부터 직접 취득하였고, 인간 자궁경부암 세포주 (HeLa, ATCC#: CCL-2; 또는 ME-180), 인간 유방암 세포주 (MDA-MB-231), 인간 난소암 세포주 (NIH:OVCAR-3, ATCC#: HTB-161) 및 인간 폐암 세포주 (A549, ATCC#: CCL-185™)를 RPMI 1640, F-12K, McCoy's 5A 및 L-15 배양 배지와 함께 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)(ATCC)으로부터 직접 취득하였다. 우태아 혈청 (FBS)을 Hyclone Laboratories (UT, USA)로부터 취득하였다. GM05757 정상 세포 및 HeLa 세포를 10% FBS, 100 단위/mL 페니실린 G 및 100 µg/mL 스트렙토마이신 (Hyclone)이 보충된 MEM (Hyclone)으로 배양하였다. ME-180, NIH:OVCAR-3, A549 및 MDA-MB-231 세포에 대한 완전 성장 배지는 각각 10% FBS가 보충된 ATCC-제형화 McCoy's 5A 배지, 20%를 지닌 RPMI 1640 배지, 10% FBS를 지닌 F-12K 배지, 및 10% FBS를 지닌 L-15 배지 (Leibovitz)였다. 세포를 5% CO₂를 함유하는 습윤된 대기에서 37°C로 유지시켰다.

[0261] **3.1.3 MTT에 의한 세포 생존력 측정**

[0262] 세포 생존력에 대한 NPB의 항암 효과를 3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2,5-디페닐 테트라졸륨브로마이드 (MTT) 검정에 의해 결정하였다. 세포를 96-웰 플레이트 (5 x 10³ 개 세포/웰)에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 배지를 신선한 배양 배지로 교체하고 약물 농도를 다양하게 하면서 96시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후 세포 생존력의 MTT 검정을 수행하였다. 간단히, 1.2 mM MTT (sigma)를 함유하는 페놀 레드가 없는 100 µl의 새로운 배지 (즉, PBS 중 10 µl의 12 mM MTT 원액을 첨가함)를 각 웰에 첨가하고 4시간 동안 인큐베이션시켰다. 그 후 배지를 제거하고, 포르마잔 결정을 100 µL/웰 DMSO에 의해 용해시켰다 (또는 대안적으로 100 µl/웰 SDS에 의해 그리고 추가 4시간 동안 인큐베이션시킴). Multiskan Spectrum UV/Vis 마이크로플레이트 판독기 (Thermo Scientific)를 이용하여 540 nm (SDS 용해의 경우 570 nm)에서의 흡광도를 측정함에 의해 생존 분획을 결정하였고, 이는 생존가능한 세포의 수에 정비례한다.

[0263] **3.2 결과**

[0264] 인간 자궁경부암 (HeLa 또는 ME-180), 유방암 (MDA-MB-231) 및 폐암 (A549) 세포주, 뿐만 아니라 시스플라틴-내성 인간 난소암 (NIH:OVCAR-3, HTB-161) 세포주에서 NPB의 시험관내 항암 효과를 조사하였다. 도 9-27은 다양한 농도를 갖는 NPB로 96시간 동안 처리 후에 다양한 인간 암 세포의 세포 생존율을 도시한다. 이러한 결과는 화합물 A, B, C 및 D가 인간 정상 세포에 대한 결과와 현저하게 대조적으로, 용량 의존적인 방식으로 암 세포를 사멸시켰음을 나타내다 (도 5-8). 암 세포는 NPB의 존재에 의해 효과적으로 사멸되었음이 뚜렷이 보여진다. 예를 들어, 거의 모든 자궁경부암 세포 (ME-180) 및 유방암 세포 (MDA-MB-231)가 약 200 µM의 화합물 B 또는 C 또는 D의 존재에 의해 사멸되었고, 이들은 인간 정상 세포에 대해 독성을 나타내지 않았다.

[0265] **3.3 논의**

[0266] 본원에 제시된 시험관내 결과는 도 5-27에 도시된 대로, NPB (화합물 A/B/C/D)의 존재가 종양 세포를 효과적으로 사멸시켰으나 정상 세포는 사멸시키지 않았음을 나타낸다. 따라서, NPB는 인간 및 동물에서 독성 부작용을 최소로 유도하거나 유도하지 않으며 화학요법의 현저한 항암 효능을 지닐 것으로 예상된다.

[0267] **실시예 4. NPB 화합물 (B)은 암 세포에서 DNA 이중-가닥 절단을 유도한다**

[0268] **4.1 재료 & 방법**

[0269] **4.1.1 화학물질 및 시약**

[0270] Barnstead Nanopure 워터 시스템으로부터 새롭게 취득된 > 18.2 MΩ/cm의 저항력 및 TOC<1 ppm인 생명과학용 초순수를 이용하였다. γH2AX DNA 손상 검정 키트를 Invitrogen으로부터 구입하였다.

[0271] **4.1.2 γH2AX DNA 손상 검정**

[0272] γH2AX DNA 손상 검정 (Invitrogen)을 이용하여 암 세포에서 유전체 DNA의 DSB를 검출하였다. 포스포릴화된 H2AX 부위(foci)는 DNA DSB의 바이오마커이다. DNA DSB를 핵에서 포스포릴화된 H2AX (γH2AX)의 특이적 항체-기반 검출에 의해 측정하였다. 간단히 말해, 인간 자궁경부암 (ME-180) 세포를 상기 기재된 세포 배양 조건하에 상이한 농도의 화합물 B로 12시간 동안 처리하였다. 그 후 제조사에 의해 제공된 프로토콜에 기재된 상세한 실험 절차에 따라서, 본 발명자들은 처리된 세포의 HCS DNA 손상 검정을 수행하였다. 세포의 이미지를 Nikon Eclipse TS100 형광 현미경으로 획득하고; Image J 소프트웨어를 이용하여 세포에서 활성화된 γ-H2AX의 정량적 분석 (DNA DBS 수율)을 수행하였다.

[0273] **4.2. 결과**

[0274] 도 28에 도시된 대로, 화합물 B의 처리는 자궁경부암 세포의 유전체 DNA에서 현저한 양의 DSB를 유도하였다.

[0275] **4.3. 논의**

[0276] DNA DSB는 세포가 복구하기 어려워서 세포 사멸의 강력한 유도제인 것으로 널리 공지되어 있기 때문에, 상기 결과는 특히 흥미롭다. 이는 도 9-27에 도시된 대로, 화합물 B의 요법의 세포독성에 대해 관찰된 것과 일치하며, 암 세포에서 NPB 화합물과 약하게-결합된 전자에 대해 제안된 헤리성-전자-이동 (DET) 메커니즘과 일치한다 (도 2 및 3).

[0277] **실시예 5. 화합물 B는 인간 자궁경부암 (ME-180) 세포에서 현저한 아포토시스를 유도한다**

[0278] **5.1 재료 & 방법**

[0279] **5.1.1 화학물질 및 시약**

[0280] CellEvent™ 카스파제-3/7 녹색 검출 키트를 Invitrogen으로부터 구입하였다.

[0281] **5.1.2 세포 배양**

[0282] 인간 자궁경부암 (ME-180) 세포를 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC)으로부터 구입하였다. 세포를 10% 우태아 혈청 (Hyclone), 100 단위/mL 페니실린 G 및 100 μg/mL 스트렙토마이신 (Hyclone)이 보충된 MEM (Hyclone)과 배양시켰다. 세포를 5% CO₂를 함유하는 습윤된 대기에서 37°C로 유지시켰다.

[0283] **5.1.3 형광 현미경에 의한 아포토시스 검정**

[0284] CellEvent™ 카스파제-3/7 녹색 검출 키트 (Invitrogen)를 제조사의 프로토콜에 따라 활성화된 카스파제 및 아포토틱 세포의 검출에 이용하였다. 이러한 키트는 카스파제-3 및 -7에 특이적인 카스파제의 형광 억제제 (FLICA)를 제공한다; 세포는 활성화된 카스파제-3 및 -7에 대해 녹색 형광을 나타낸다. 시약은 핵산 결합 염료에 컨쥬게이션된 4개의 아미노산 펩티드 (DEVD)로 구성된다. 이러한 세포-투과 기질은 본질적으로 비-형광성인데, 그 이유는 DEVD 펩티드가 DNA에 결합하는 염료의 능력을 억제하기 때문이다. 아포토틱 세포에서 카스파제-3 또는 카스파제-7의 활성화 후에, DEVD 펩티드가 절단되며, 이는 염료가 DNA에 결합하도록 하여 녹색 형광을 생성한다. 간단히 말해, CellEvent™ 카스파제-3/7 녹색 검출 시약을 이용하고, 기질을 완전 성장 배지에서 세포에 첨가하며, 30분 동안 인큐베이션시키고, 이미지를 획득한다. 활성화된 카스파제-3/7를 지닌 아포토틱 세포는 밝은 녹색 핵을 나타내는 반면, 활성화된 카스파제 3/7이 없는 세포는 최소의 형광 신호를 나타낸다. 이러한 강력한 검정은 카스파제-3/7 활성화에 매우 특이적이고 살아있는-세포 형광 이미지를 이용하여 카스파제-3 또는 -7 활성화를 모니터링하는데 이용될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 절단된 시약이 카스파제 3/7-양성 세포의 핵을 표지화하므로, 이러한 염색은 또한 후기 아포토시스의 전형인 응축된 핵을 포함하는, 핵 형태에 대한 정보를 제공할 수 있다. ME-180 세포를 60% 컨플루언스(confluence)까지 성장시킨 다음 0-200 μM의 화합물 B로 48시간 동안 처리하였다. 형광을 Nikon Eclipse TS100 현미경으로 검출하였다. 부착된 카메라로 이미지를 캡처하였다.

[0285] **5.2 결과**

[0286] NPB 화합물-매개된 암 세포의 사멸이 아포토시스의 유도 때문인지를 시험하기 위해, 본 발명자들은 CellEvent™ 카스파제-3/7 녹색 검출 키트를 이용하였다. 도 29의 결과는 화합물 B의 처리가 녹색 형광에서의 현저한 증대로부터 입증되는, 카스파제-3 및 -7의 현저한 활성화를 발생시켰음을 나타낸다. 더욱이, 화합물 B는 또한 처리된 암 세포에서 후기 아포토시스의 전형인 응축된 핵을 나타내는, 핵 형태에 대한 상당한 변화를 초래하였다. 이러한 결과는 세포가 0-200 μM의 화합물 B로 처리될 때 아포토시스의 상당한 유도를 나타낸다.

[0287] **5.3 논의**

[0288] 화합물 B의 세포독성 효과는 처리된 세포에 의해 나타난 활성화된 카스파제 3/7의 양에서의 증가와 상관 관계가 있었다. 이러한 결과는 화합물 B가 처리된 암 세포의 아포토시스에서의 현저한 증가를 발생시켰음을 나타낸다. 이는 도 28에 도시된 대로, 화합물 B 유도된 DNA DSB의 결과와 일치한다.

[0289] **실시예 6. 암컷 SCID 마우스에서 인간 자궁경부암 (ME-180)의 이종이식 마우스 모델에서 화합물 B의 생체내 시험**

[0290] **6.1 재료 및 프로토콜**

[0291] 6.1.1 연구 그룹

[0292] 실험의 두 그룹은 표 1에 제시된 대로, (1) 대조군 (5% EtOH/배지); (2) 5일 동안 매일 5% EtOH/배지 중 7 mg/kg의 화합물 B였다.

[0293] 표 1. 실시예 6의 연구 그룹

그룹 #	그룹 명칭	마우스 수	약물 용량	투여 경로	부피 (μL/20g)	스케줄
1	대조군	5	N/A	i.p.	200	5일 동안 매일
2	화합물 B	5	7 mg/kg	i.p.	200	5일 동안 매일

[0294]

[0295] 6.1.2 마우스 및 화합물 B 용액 제조:

[0296] 6-8주 SCID 마우스를 본 연구에 이용하였다; 예시적인 NPB로서 화합물 B를 5% EtOH: 95% 세포 배양 배지 (≈ 1:20)에 용해시켰다.

[0297] 6.1.3. 세포 제조 (s.c. 주사용):

[0298] ME-180 (인간 자궁경부암) 세포를 10% FBS가 보충된 ATCC-제형화 McCoy's 5A 배지에서 배양하였다. 플라스크에서 세포를 5% CO₂를 함유하는 습윤된 대기에서 37°C로 유지시켰다. 세포를 PBS로 세정하고, 플라스크의 바닥으로부터 탈착을 위해 트립신화하고, 신선한 성장 배지와 혼합시키고, 원심분리시켜 상층액을 제거하였다. 세포를 마우스로의 s.c. 주사를 위해 적절한 농도로 신선한 배지와 재현탁시켰다. 주사 부피는 동물 당 50 μl (1.5 × 10⁶ 개 세포)였다.

[0299] 6.1.4 S.C.에 의한 이종이식 자궁경부암 모델

[0300] ME-180 종양 세포를 암컷 SCID 마우스 (6-8주령)에 50 μL의 부피로 왼쪽 측면에 27-게이지 바늘을 이용하여 피하 주입하였다. 이는 인간 자궁경부암의 피하 (SC) 이종이식 마우스 모델로서 확립되었다.

[0301] 6.1.5 약물 용량 투여

[0302] 마우스를 개별적으로 칭량하고 상기 연구 그룹 표에 개요된 주사 농도에 대한 체중에 따라 복강내 주사하였다. 주사 부피는 20 g 마우스 당 200 μL를 기준으로 하였다. 주사 부위를 세정하기 위해 피부 표면을 70% 이소프로필 알콜로 닦아내었다.

[0303]

6.1.6 데이터 수집

[0304]

치료와 관련된 종양 성장 지연을 평가하기 위해 종양 크기를 시간의 함수로서 슬라이드 캘리퍼를 이용하여 측정하였다. 종양 측정시에 또한 동물을 칭량하였다. 마우스의 종양이 종료 전에 1000 mm³의 최대 크기로 성장하게 하였다.

[0305]

6.1.7 마우스에서 약물 유도된 스트레스의 평가

[0306]

모든 동물을 사망률과 이환율에 대해 투여 후, 및 적어도 하루에 한 번, 필요하다고 인정되는 경우 더 많이, 치료 전 및 치료 기간 동안 관찰하였다. 특히, 동물을 체중 감소, 식욕에서의 변화, 거동 변화, 예컨대 변경된 보행, 졸음증 및 스트레스의 총 소견과 같은 건강 악화의 징후에 대해 모니터하였다.

[0307]

6.2 결과

[0308]

예시적인 NPB 화합물로서 화합물 B의 생체내 항암 효과를 인간 자궁경부암 (ME-180)의 이종이식 마우스 종양 모델에서 조사하였다. 도 30에 도시된 대로, 화합물 B 단독의 투여는 종양 모델에서 치료되지 않은 대조군에 비해, 종양 성장을 현저하게 억제하였음이 뚜렷하게 보여진다. 상기 결과는 또한 화합물 B가 생체내에서 30일 초과 현저한 종양 재성장 지연을 발생시켰음을 나타낸다.

[0309]

6.3 논의

[0310]

단지 적은 용량 (7 mg/kg, 마우스에서 50 μM에 해당)의 화합물 B가 5일 동안 매일 본 실험에 이용되었고 화합물 B가 더 높은 용량 (200 μM 시험관내)에서 관찰되는 최소의 전체 및 급성 독성을 가지거나 독성을 갖지 않음을 감안할 때, 이러한 결과는 최대 치료 효과를 달성할 수 있도록 더 큰 용량 또는 더 잦은 빈도의 치료까지 추론될 수 있을 것으로 합리적으로 기대된다.

[0311]

실시예 7. SCID 마우스에서 화합물 B의 독성에 대한 생체내 시험

[0312]

7.1 재료 및 프로토콜

[0313]

7.1.1 연구 그룹

[0314]

실험의 두 그룹 (5마리의 6-8주 SCID 마우스/그룹)은 표 2에 제시된 대로, (1) 대조군 (5% EtOH/배지에서); 및 (2) 5% EtOH/배지 중 화합물 B 7 mg/kg이었다. 화합물 B를 5일 동안 매일 IP 주사하였다.

[0315]

표 2. 실시예 7의 연구 그룹

그룹 #	그룹 명칭	마우스 수	TA/CA* 용량 (mg/kg)	투여 경로	부피 (μL/20g)	스케줄 (일)
1	대조군	5	N/A	i.p.	200	5일 동안 매일
2	화합물 B	5	7	i.p.	200	5일 동안 매일

[0316]

* TA: 시험군; CA: 대조군

[0317]

[0318]

7.1.2 마우스 및 화합물 B 용액 제조:

[0319]

6-8주 SCID 마우스를 본 연구에 이용하였다; 예시적인 NPB로서 화합물 B를 5% EtOH: 95% 세포 배양 배지 (≈ 1:20)에 용해시켰다.

[0320]

7.1.3 용량 투여

[0321]

6-8주 SCID 마우스를 개별적으로 칭량하고 상기 연구 그룹 표에 개요된 주사 농도에 따라 복강내 (IP) 주사하였다. 0, 및 7 mg/kg의 화합물 B를 5일 동안 매일 IP 주사에 의해 마우스에 투여하였다. 주사 부피는 20 g 마우스 당 200 μL를 기준으로 하였다. 주사 부위를 설정하기 위해 피부 표면을 70% 이소프로필 알

콜로 닦아내었다.

[0322] 7.1.4 데이터 수집 및 분석

[0323] 마우스에서의 전체 약물 독성을 생존 검정 및 체중 측정에 의해 관찰하였고, 급성 약물 독성을 채혈 및 조직학에 의해 측정하였다. 간독성 (ALT, ALP, 총 빌리루빈), 신독성 (혈중 요소, 크레아티닌), 및 전해질 (Na, K, Cl)을 생화학적 방법 또는 HPLC-질량 분광학에 의해 분석하였다. 마우스를 임의의 물리적 독성에 대해 관찰하였다. 혈액 샘플을 약물 주사 후 다양한 시점에 큰복재정맥으로부터 수집하였다. 연구의 끝에, 전체 장기를 회수하여 간, 및 신장 독성을 평가하였다.

[0324] 7.1.5 마우스에서 약물 유도된 스트레스의 평가

[0325] 모든 동물을 사망률과 이환율에 대해 투여 후, 및 적어도 하루에 한 번, 필요하다고 인정되는 경우 더 많이, 치료 전 및 치료 기간 동안 관찰하였다. 특히, 동물을 체중 감소, 식욕에서의 변화, 거동 변화, 예컨대 변경된 보행, 줄음증 및 스트레스의 총 소견과 같은 건강 악화의 징후에 대해 모니터링하였다.

[0326] **7.2 결과**

[0327] 전체 약물 독성을 6-8주 SCID 마우스에서 생존 검정 및 체중 측정을 통해 연구하였고, 급성 약물 독성을 간독성 (ALT, ALP, 총 빌리루빈), 신독성 (혈중 요소, 크레아티닌), 및 전해질 (Na, K, Cl)의 측정에 의해 연구하였다. 도 31에 도시된 대로, 화합물 B는 시간 경과에 따라 마우스의 체중에 아무런 영향을 주지 않았고, 이는 물리적 독성이 없음을 나타낸다. 흥미롭게도, 또한 *마우스 실험 및 인간에 이용된 시스플라틴 용량의 약 5배인 높은 용량 (5일 x 7 mg/kg/일=35 mg/kg)*으로 제공된 화합물 B조차 마우스에서 관찰가능한 급성 독성, 즉 간독성, 신독성, 및 전해질에서의 변화를 유도하지 않았음이 도 32에서 뚜렷하게 보여진다.

[0328] **7.3 논의**

[0329] 도 30-32에 제시된 생체내 결과는 화합물 B가 마우스에서 최소의 독성을 유도하거나 전혀 유도하지 않고, 전체 약물 독성을 유도하지 않으며 (마우스 생존 및 체중에 효과 없음), 급성 독성을 유도하지 않음 (간독성 없음, 신독성 없음, 및 전해질에서의 변화 없음)을 명백하게 입증하였다. 이러한 결과는 인간 정상 세포 (도 5-8에 도시됨) 및 인간 암 세포 (도 9-29)에서 관찰된 시험관내 결과와 매우 잘 일치한다. 따라서, NPB로서의 화합물 B가 무독성이고 항암제로서 효과적임이 입증된다.

[0330] 치료된 어떤 동물에서도 독성 또는 건강 악화의 징후, 뿐만 아니라 전체 약물 독성 (마우스 생존 및 체중에 효과 없음), 또는 급성 독성 (간독성 없음, 신독성 없음, 및 전해질에서의 변화 없음)은 관찰되지 않았다.

[0331] 본원에 인용된 참조문헌은 전문이 참조로서 포함된다.

[0332] 상기 기재된 구체예는 단지 예를 위한 것이다. 여기에 첨부된 청구범위에 의해서만 정의되는 본 발명의 범위를 벗어나지 않으며 특정 구체예에 대한 변경, 변형 및 변화가 당업자에 의해 수행될 수 있다.

[0333] 참조문헌

1. WO/2014/094178, "RADIOSENSITIZER COMPOUNDS FOR USE IN COMBINATION WITH RADIATION" (to Q.-B. Lu; Published on June 26, 2014).
2. P. G. Rose, B. N. Bundy, E. B. Watkins, J. T. Thigpen, G. Deppe, M. A. Maiman, D. L. Clarke-Pearson, S. Insalaco. Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 340, 1144-53(1999).
3. D. M. Reese, Anticancer drugs, *Nature* 378, 532(1995).
4. H. Varmus, The New Era in Cancer Research. *Science* 312, 1162(2006).
5. B. Alberts, The Promise of Cancer Research, *Science* 320, 19(2008); The Challenge of Cancer. *Science* 331, 1491(2011).
6. A. H. Zewail, Femtochemistry: Atomic-Scale Dynamics of the Chemical bond using ultrafast lasers (*Nobel Lecture*). *Angew. Chem. Int. Ed.* 39, 2587-2631 (2000).
7. Q.-B. Lu, Effects of Ultrashort-Lived Prehydrated Electrons in Radiation Biology and Their Applications for Radiotherapy of Cancer. *Mutat. Res.: Rev. Mutat. Res.* 704, 190-199 (2010).
8. L.Y. Lu, N. Ou, & Q.-B. Lu, Antioxidant Induces DNA Damage, Cell Death and Mutagenicity in Human Lung and Skin Normal Cells. *Sci. Rep.* 3, 3169(1-11) (2013)

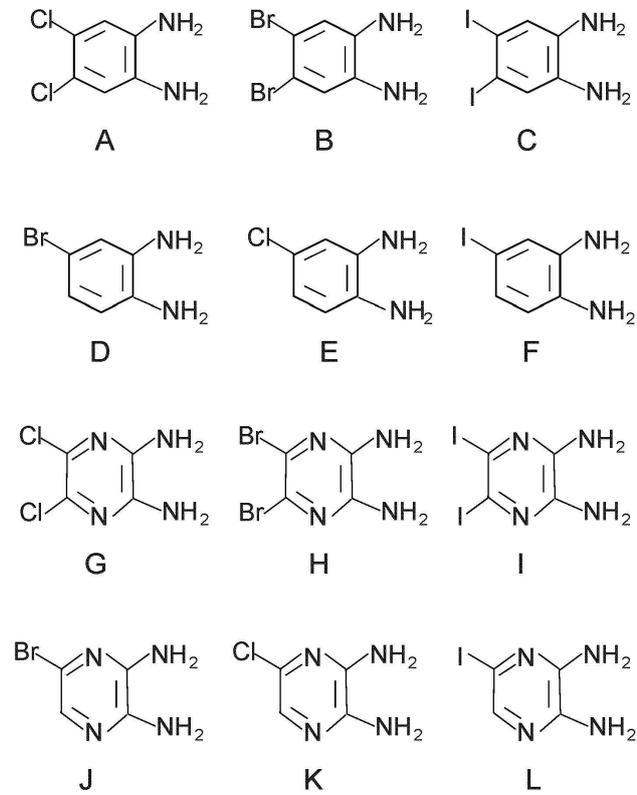
[0334]

9. Q.-B. Lu, Molecular Reaction Mechanisms of Combination Treatments of Low-Dose Cisplatin with Radiotherapy and Photodynamic Therapy, *J. Med. Chem.* 50, 2601-2604(2007).
10. Q.-B. Lu, S. Kalantari, & C.-R. Wang, Electron Transfer Reaction Mechanism of Cisplatin with DNA at the Molecular Level. *Mol. Pharmaceutics* 4, 624-628 (2007).
11. M. D. Prados et al. "A phase 3 randomized study of radiotherapy plus procarbazine, CCNU, and vincristine (PCV) with or without BUdR for the treatment of anaplastic astrocytoma: a preliminary report of RTOG 9404", *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 45, 1109(1999).
12. A. Choudhury et al., Targeting homologous recombination using imatinib results in enhanced tumor cell chemosensitivity and radiosensitivity, *Mol Cancer Ther* 8, 203-213 (2009).

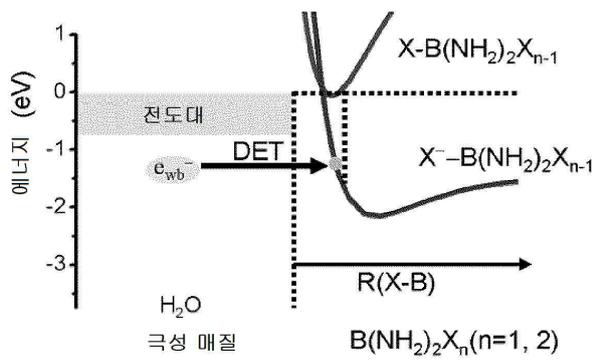
[0335]

도면

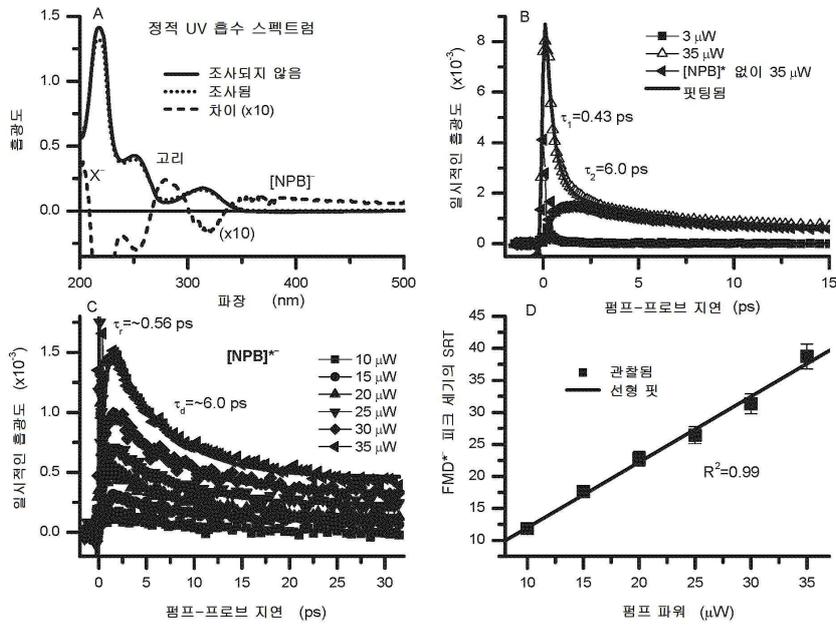
도면1



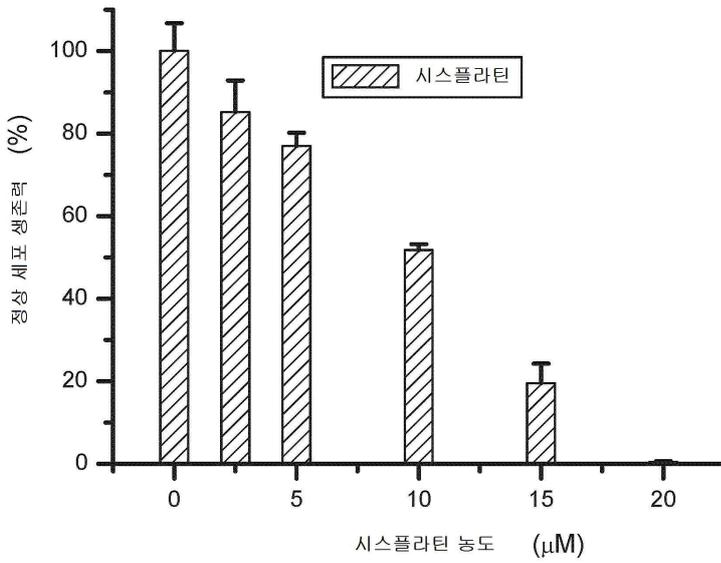
도면2



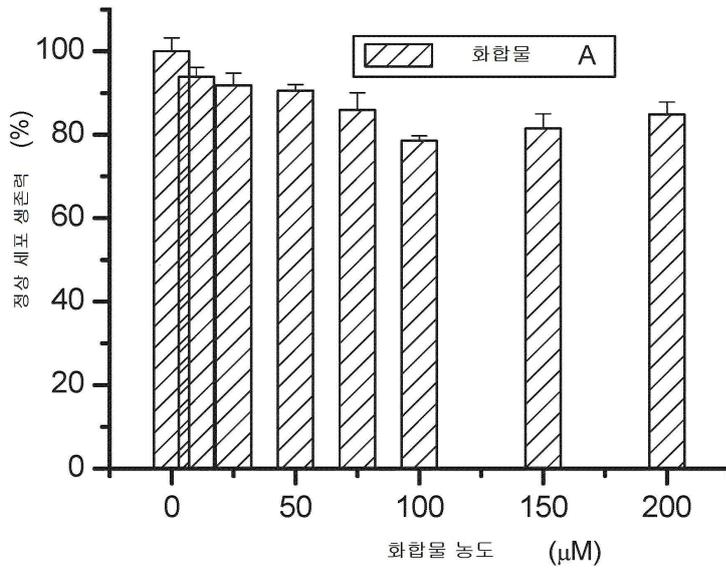
도면3



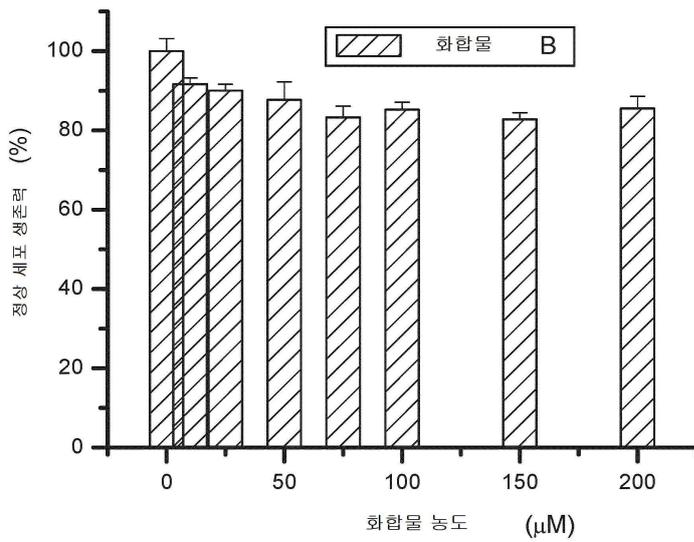
도면4



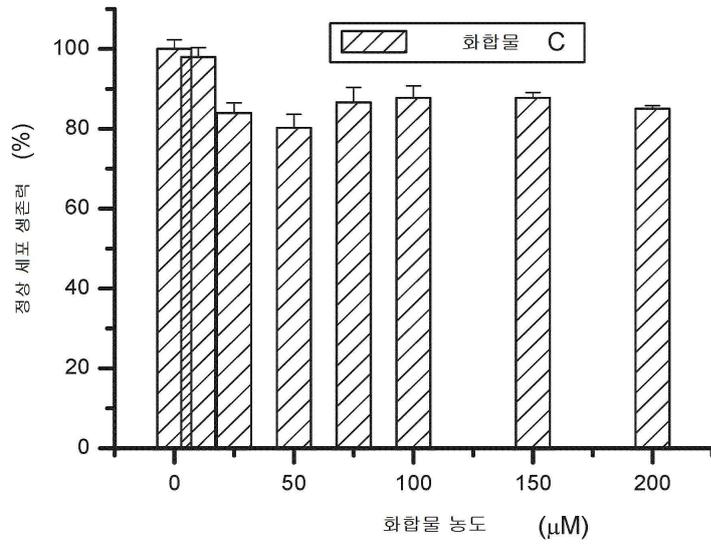
도면5



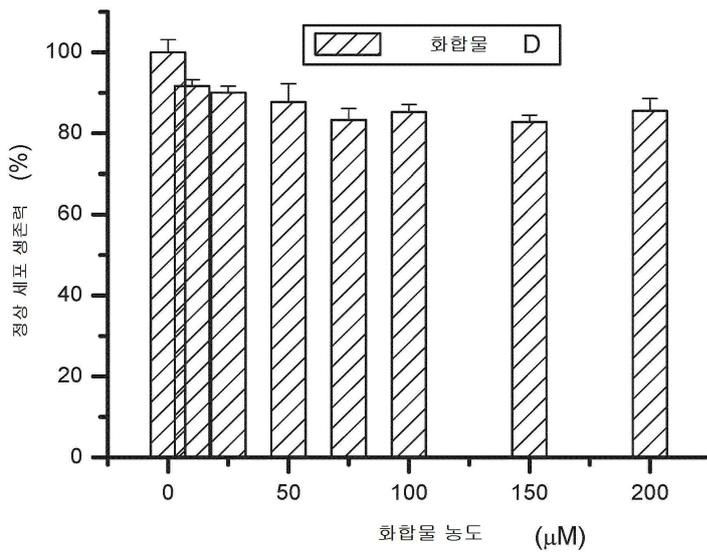
도면6



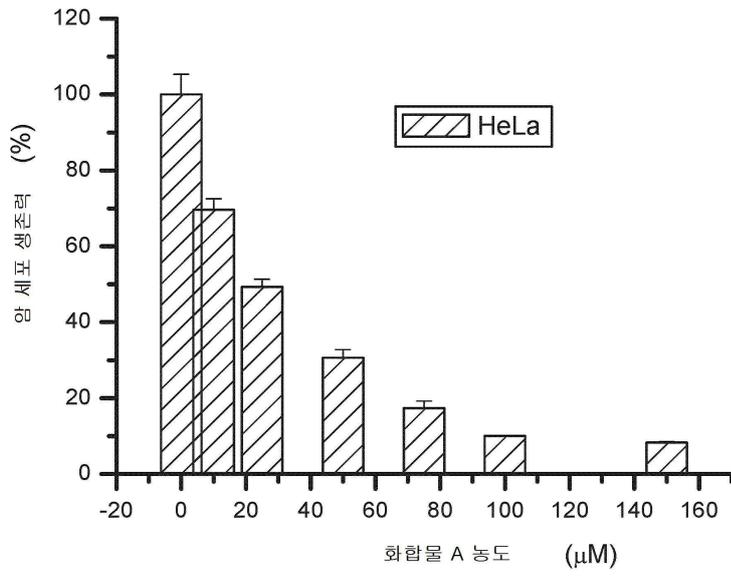
도면7



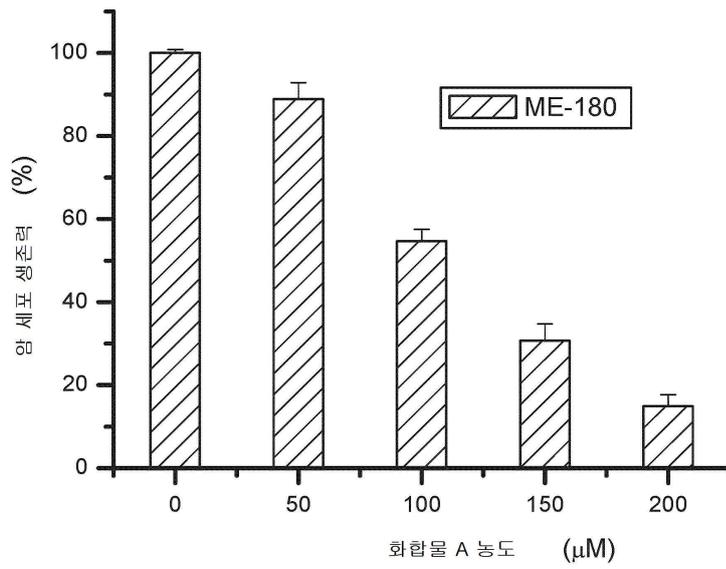
도면8



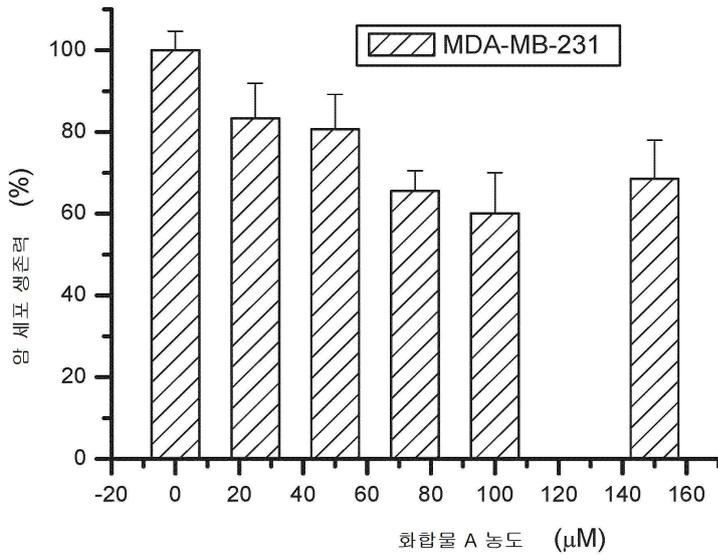
도면9



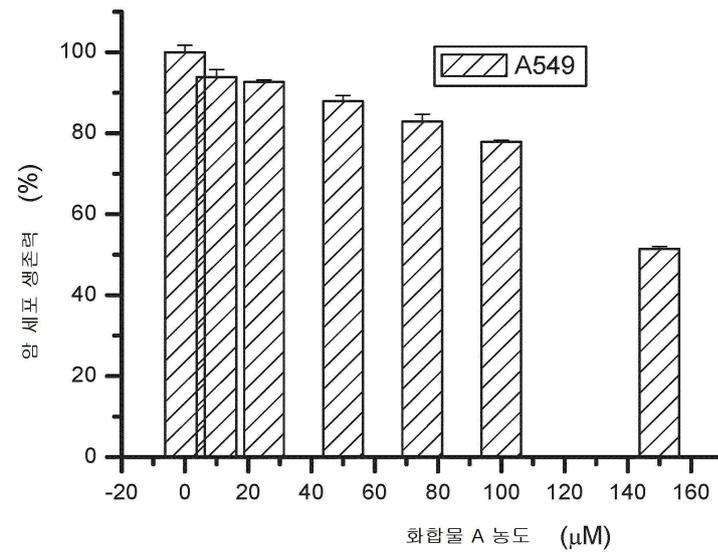
도면10



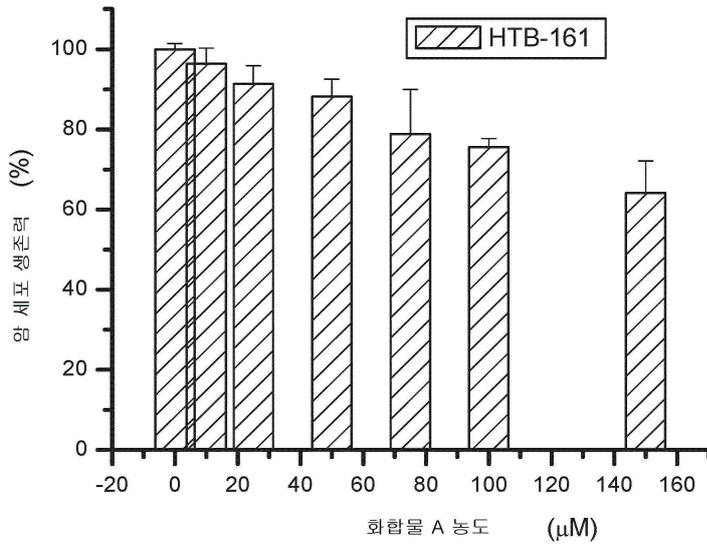
도면11



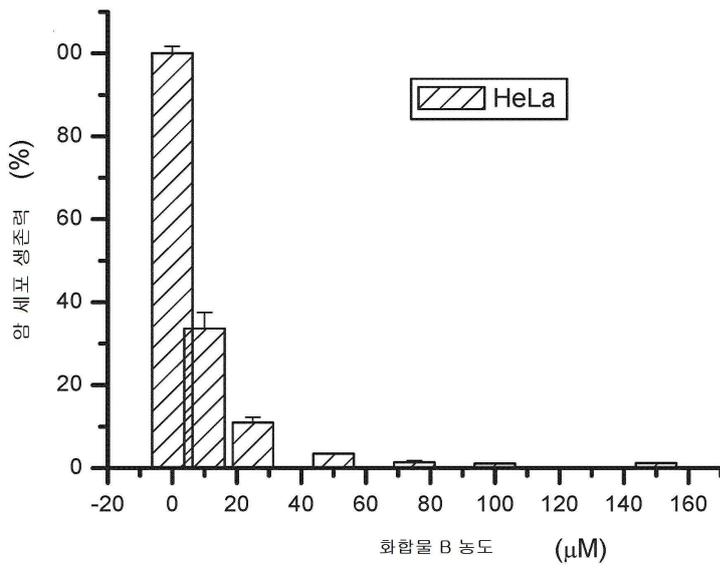
도면12



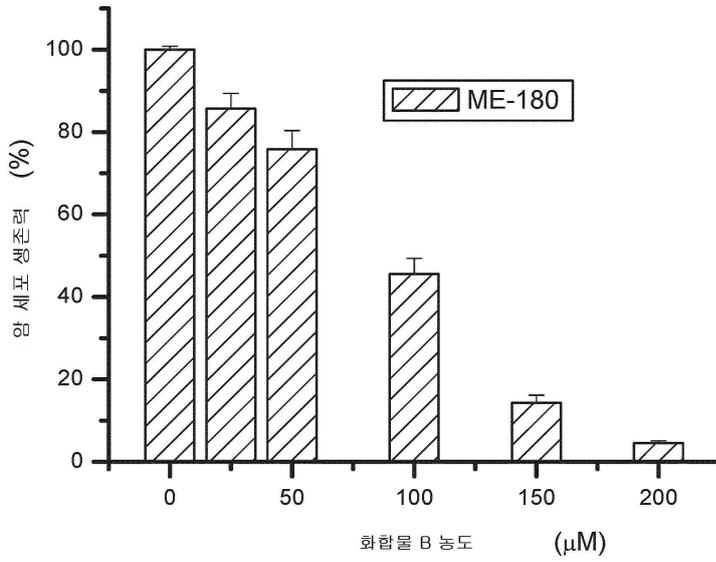
도면13



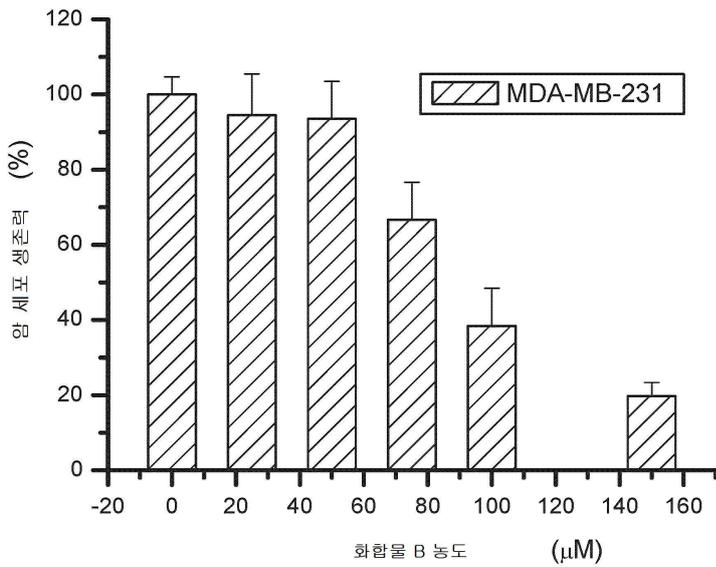
도면14



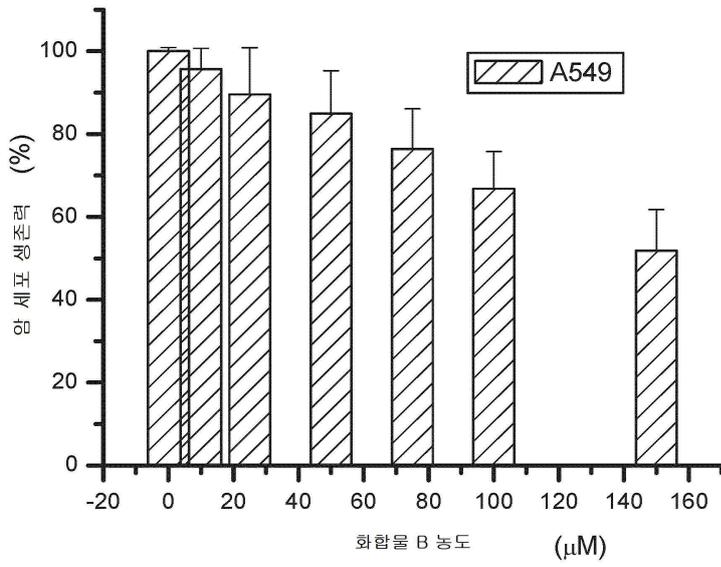
도면15



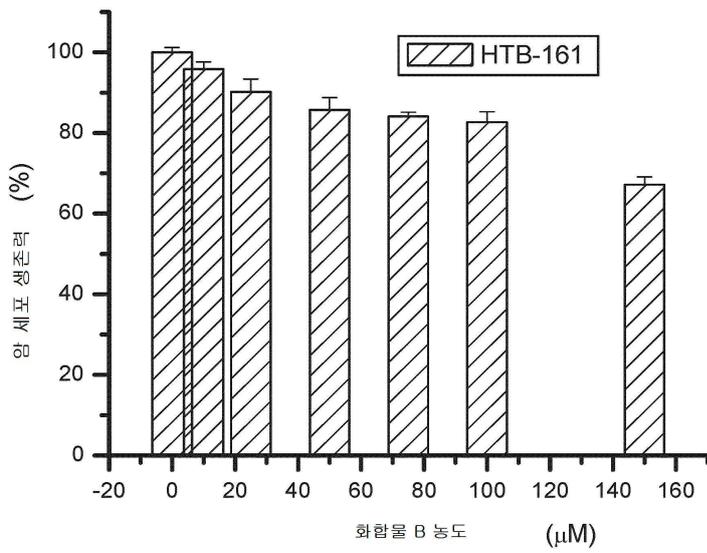
도면16



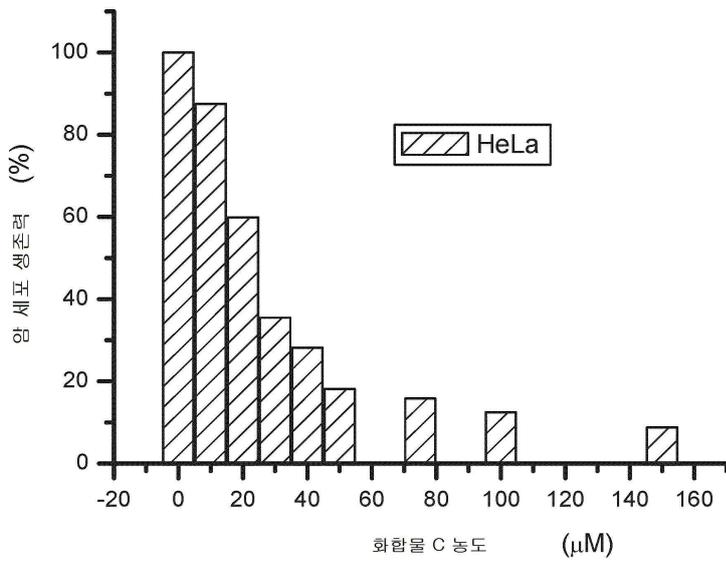
도면17



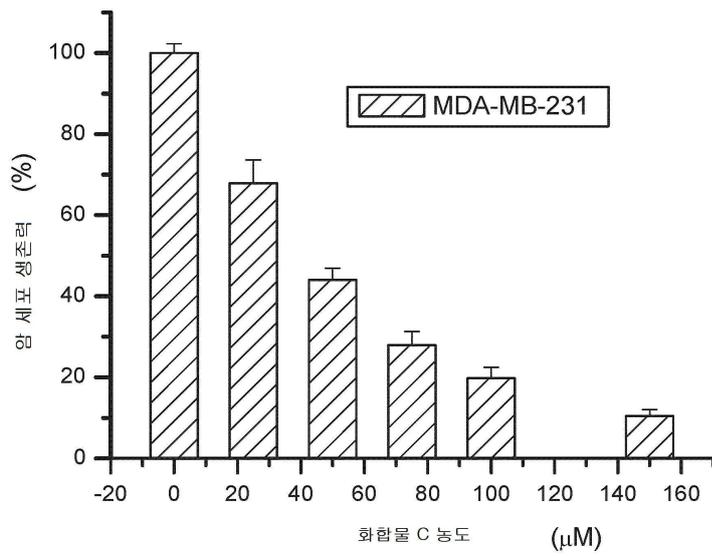
도면18



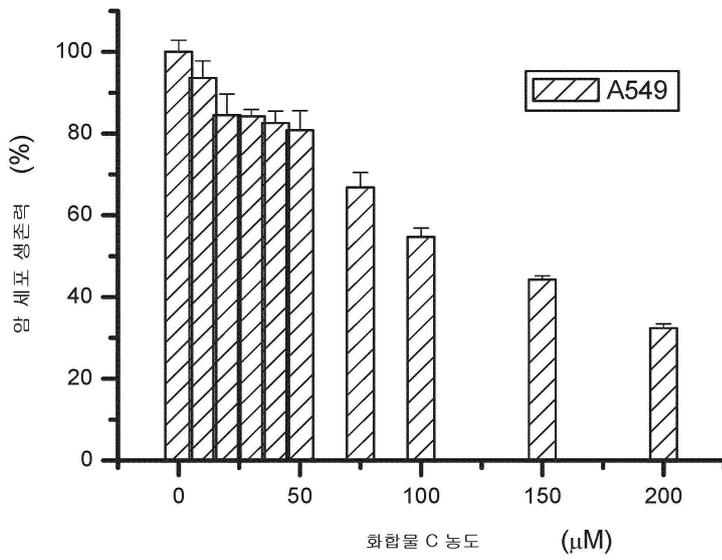
도면19



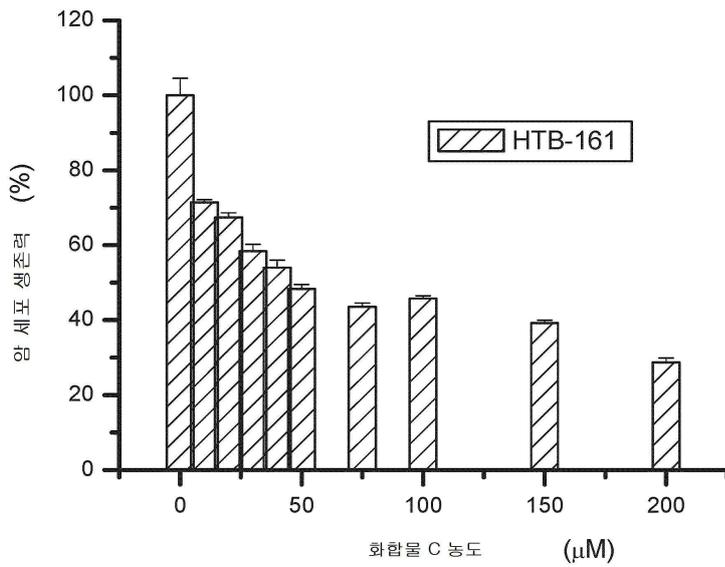
도면20



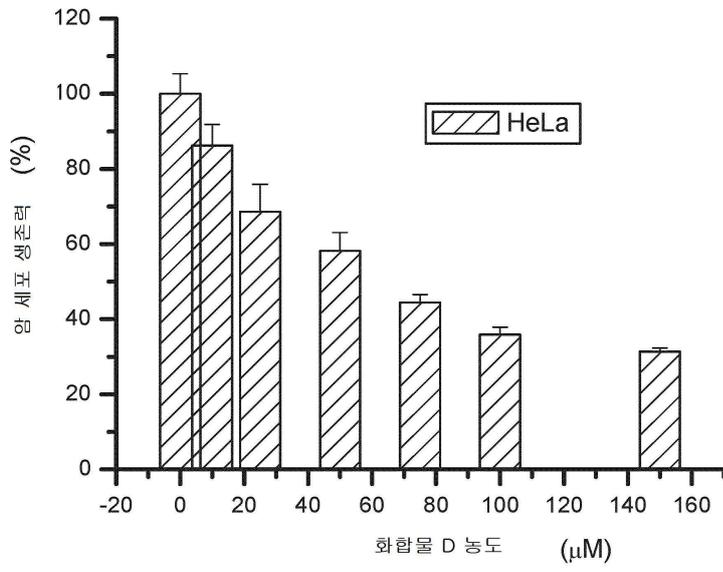
도면21



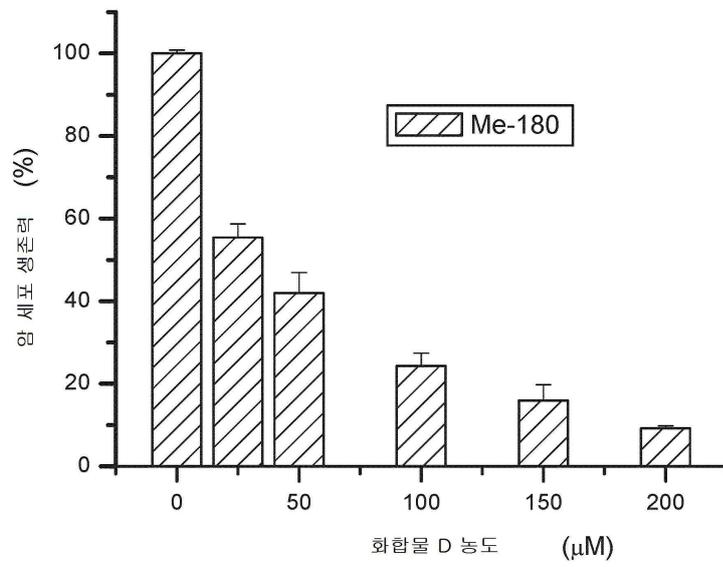
도면22



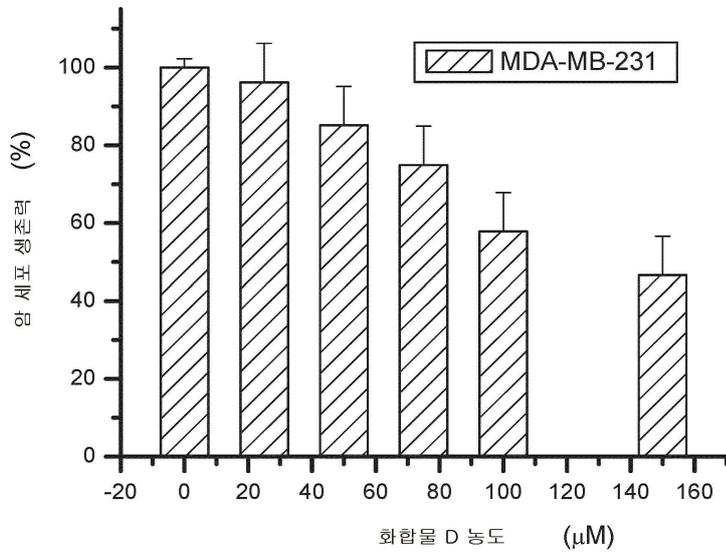
도면23



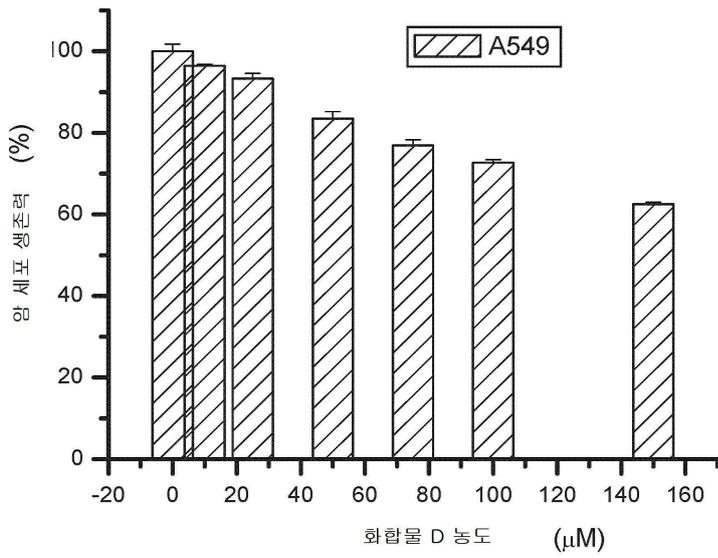
도면24



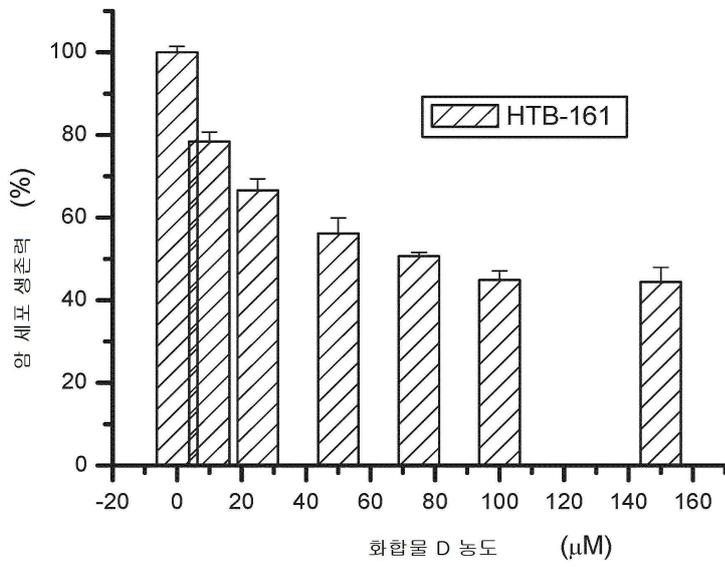
도면25



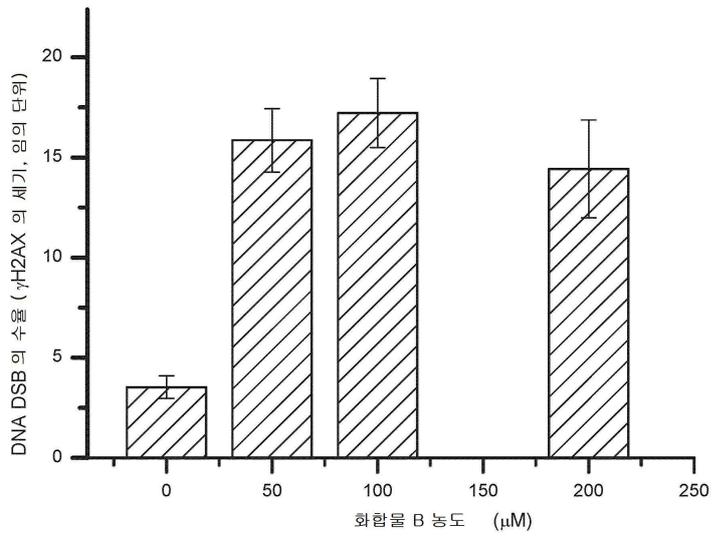
도면26



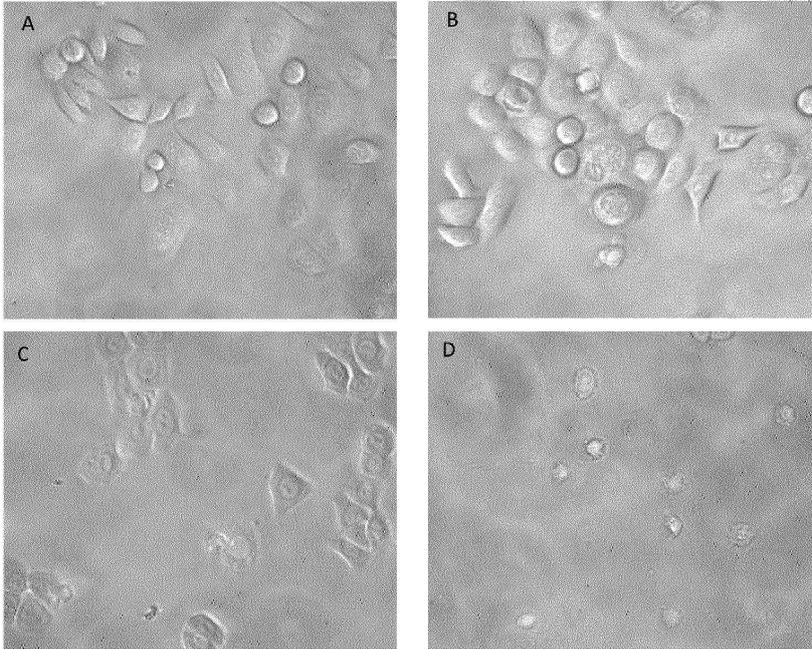
도면27



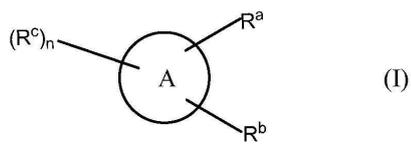
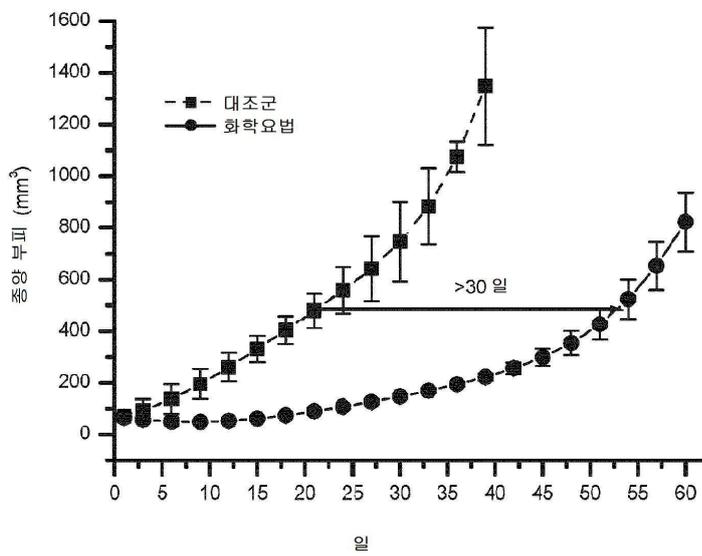
도면28



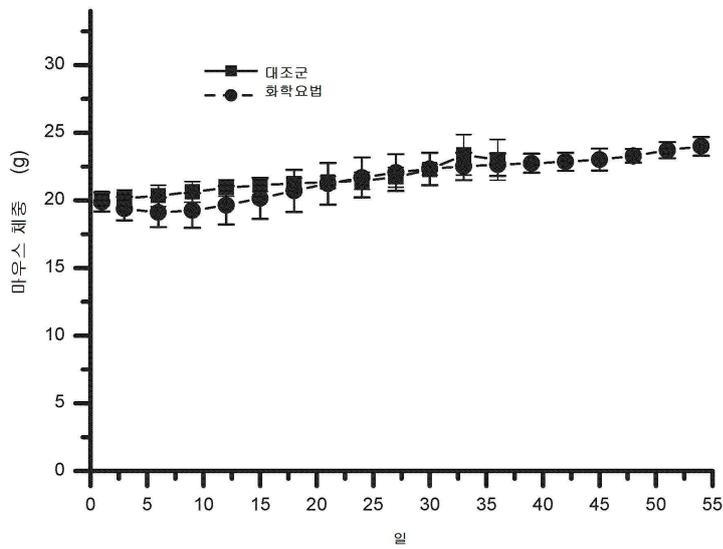
도면29



도면30



도면31



도면32

독성 시험 결과		
간독성		
	0mg/kg	7mg/kg
ALP	68 (+/-4)U/L	67 (+/-11)U/L
ALT	132(+/-64)U/L	172 (+/-88)U/L
TBIL	1 (+/-0) umol/L	1 (+/-0)umol/L
신독성		
	0mg/kg	7mg/kg
크레아티닌	6 (+/-1)umol/L	7(+/-1)umol/L
우레아	6.9 (+/-2.1)mmol/L	6.0(+/-1.1) mmol/L
전해질		
	0mg/kg	7mg/kg
클로라이드	111.7 (+/-1.5)mmol/L	110 (+/-3.0)mmol/L
포타슘	6.3 (+/-0.3)mmol/L	8.4 (+/-3.6)mmol/L
소듐	148.7 (+/-1.2)mmol/L	144.7 (+/-4.5)mmol/L