

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0009203 (43) 공개일자 2013년01월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07D 311/86 (2006.01) A61K 31/352 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)		(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(21) 출원번호	10-2011-0070121	(72) 발명자 권영주 경기도 고양시 일산동구 백석동 1190 백송마을 507동 1403호 나영화 경기도 고양시 일산동구 백석동 1190 백송마을 507동 1403호 전규연 서울시 양천구 신정3동 신트리아파트 304동 702호
(22) 출원일자	2011년07월14일	(74) 대리인 손민
심사청구일자	2011년07월14일	

전체 청구항 수 : 총 14 항

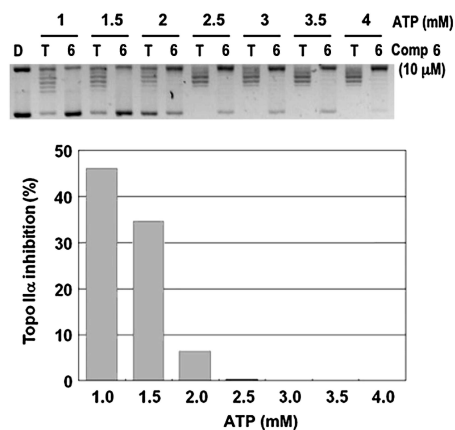
(54) 발명의 명칭 신규한 화합물, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 DNA 토포이소머라아제 II α 를 선택적으로 저해하여 암의 예방 또는 치료용 조성물로 사용할 수 있는 신규한 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 상기 신규한 화학식 1의 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

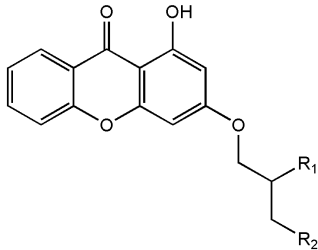
과제고유번호	2009-0066925
부처명	한국학술진흥재단
연구사업명	이공계 일반연구자 지원 신진연구지원사업
연구과제명	난치성 Her2 양성 유방암의 치료제 개발을 위한 연구
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2009.05.01 ~ 2012.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-0002646
부처명	한국연구재단
연구사업명	기초연구사업 일반연구자 지원사업-여성과학자지원사업
연구과제명	Topoisomerase II α 및 ErbB2 동시 억제제 개발연구
주관기관	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2010.05.01 ~ 2013.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]



상기 식에서,

R_1 은 하이드록시, 또는 할로젠이고;

R_2 는 NR_3R_4 , SR_3 , 또는 OR_3 이며;

R_3 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 하이드록시알킬, 또는 C_{1-4} 할로알킬이고; 및

R_4 는 수소, 또는 C_{1-4} 하이드록시알킬이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

R_1 은 하이드록시이고;

R_2 는 NR_3R_4 , 또는 SR_3 이며;

R_3 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 하이드록시알킬이고; 및

R_4 는 수소, 또는 C_{1-4} 하이드록시알킬인 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

제1항에 있어서,

R_1 은 하이드록시이고;

R_2 는 NR_3R_4 , 또는 OR_3 이며;

R_3 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬, 또는 C_{1-4} 하이드록시알킬이고; 및

R_4 는 수소, 또는 C_{1-4} 하이드록시알킬인 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

제1항에 있어서,

R_1 은 하이드록시이고;

R_2 는 NR_3R_4 이며; 및

R_3 는 C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 하이드록시알킬인 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 5

제1항에 있어서,

R_2 는 SR_3 이고; 및

R_3 는 C_{1-4} 하이드록시알킬, 또는 C_{1-4} 할로알킬인 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 6

제1항에 있어서,

R_1 은 하이드록시이고;

R_2 는 OR_3 이며; 및

R_3 는 C_{1-4} 하이드록시알킬인 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 7

제1항에 있어서,

R_1 은 하이드록시 또는 클로로이고;

R_3 는 각각 독립적으로 프로필, 하이드록시프로필, 하이드록시에틸 또는 클로로에틸이며; 및

R_4 는 수소, 또는 하이드록시에틸인 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 화학식 1의 화합물은

1) 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(3-하이드록시프로필아미노)프로폭시)-9H-잔텐-9-온;

2) 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(2-하이드록시에틸아미노)프로폭시)-9H-잔텐-9-온;

3) 3-(3-(비스(2-하이드록시에틸)아미노)-2-하이드록시프로폭시-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온;

4) 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(3-하이드록시프로필티오)프로폭시)-9H-잔텐-9-온;

5) 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(2-하이드록시에틸티오)프로폭시)-9H-잔텐-9-온;

6) 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(프로필아미노)프로폭시)-9H-잔텐-9-온;

7) 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(2-하이드록시에톡시)프로폭시)-9H-잔텐-9-온; 및

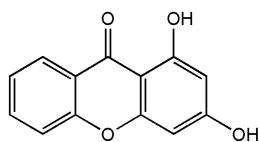
8) 3-(2-클로로-3-(2-클로로에틸티오)프로폭시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온으로 구성되는 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 9

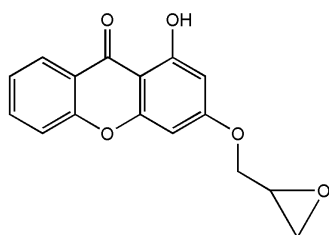
하기 화학식 2의 화합물과 에피클로로하이드린을 반응시켜 하기 화학식 3의 화합물을 제조하는 단계(단계 1); 및

하기 화학식 3의 화합물을 HR_2 와 반응시켜 하기 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계(단계 2)를 포함하는 화학식 1의 화합물 제조방법:

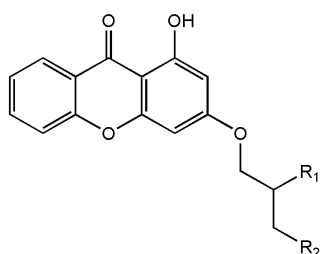
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 1]



상기 화학식 1에서

R_1 은 하이드록시이고;

R_2 는 NR_3R_4 , SR_3 , 또는 OR_3 이고;

R_3 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬, 또는 C_{1-4} 하이드록시알킬이고; 및

R_4 는 수소, 또는 C_{1-4} 하이드록시알킬이다.

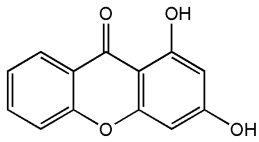
청구항 10

하기 화학식 2의 화합물과 에피클로로하이드린을 반응시켜 하기 화학식 3의 화합물을 제조하는 단계(단계 1);

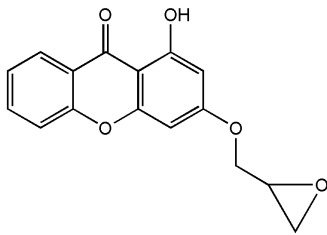
하기 화학식 3의 화합물을 HSR_3 와 반응시켜 하기 화학식 4의 화합물을 제조하는 단계(단계 2); 및

하기 화학식 4의 화합물과 티오닐 클로라이드를 디클로로메탄 용매 하에서 반응시켜 하기 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계(단계 3)를 포함하는 하기 화학식 1의 화합물 제조방법:

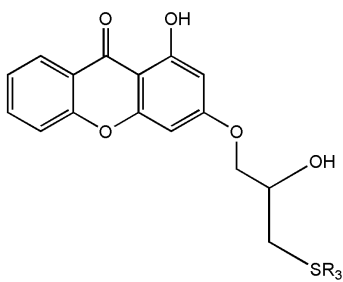
[화학식 2]



[화학식 3]



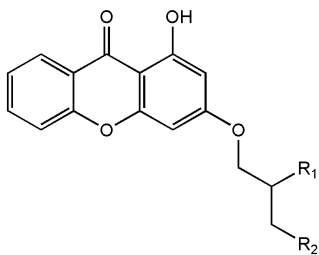
[화학식 4]



상기 화학식 4에서

R₃는 C1-4 하이드록시알킬이고,

[화학식 1]



상기 화학식 1에서

R₁은 클로로이고;

R₂는 SR₃이며; 및

R₃는 C1-4 클로로알킬이다.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 중 하나 이상의 물질을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 조성물은 토포이소머라아제 II α 의 활성을 억제하는 것인 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 14

제11항에 따른 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 인간을 제외한 동물에게 투여하여 암을 예방 또는 치료하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규한 화합물, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있는 실정이며, 우리나라의 경우, 질병 사망원인 중 제 1위의 질병으로서 연간 약 10만 명 이상이 진단되고, 약 6만 명 이상이 사망하고 있다. 이러한 암의 유발 인자인 발암물질로는 흡연, 자외선, 화학물질, 음식물, 기타 환경인자들이 있으나, 그 유발원인이 다양하여 치료제의 개발이 어려울 뿐만 아니라 발생하는 부위에 따라 치료제의 효과 또한 각기 다르다. 현재 치료제로 사용되는 물질들은 상당한 독성을 지니고 있으며, 암 세포만을 선택적으로 제거하지 못하므로, 암의 발생 후 이의 치료뿐 아니라, 암의 발생을 예방하기 위한 독성이 적고 효과적인 항암제의 개발이 절실히 필요하다.

[0003] DNA 토포이소머라아제는 DNA 가닥의 분해 및 재결합을 촉매화하며 세포의 핵 내에 존재하여 DNA의 위상 상태(topological state)를 조절하는 효소이다. 토포이소머라아제는 DNA 가닥의 절단 방식에 따라 2 가지로 분류되는데, 토포이소머라아제 I는 DNA 기질에 순간적으로 단일 가닥 닉(nick)이 생기도록 한 후 DNA의 위상을 변화시키고, 토포이소머라아제 II는 DNA 이중가닥을 모두 자른 후 DNA의 위상을 변화시킨다. 토포이소머라아제 I 및 II에는 상당한 차이점이 있지만, 가장 분명한 차이는 토포이소머라아제 I은 단합체 효소로서 결합하고 있는 금속이온이 없으며, DNA 풀림과정에 마그네슘 이온을 요구하지 않는다. 반면, 토포이소머라아제 II는 호모 다이머릭 효소로서 효소 턴-오버(turn-over) 작용 및 신속한 운송을 위해 마스네슘 및 ATP 가수분해를 필요로 한다. 포유류의 토포이소머라아제 II는 유형 II α 및 유형 II β 로 추가 분류된다. 두 이성체는 구조적 유사성이 높고 효소학적 성질도 비슷하다. 그러나 토포이소머라아제 II β 는 세포 주기에서 거의 일정량 발현하고 있는 데 반하여, 토포이소머라아제 II α 는 G2/M에서 명료하게 증대하는 점이 밝혀지면서, 세포 주기에 특이적으로 작용하는 표적으로는 토포이소머라아제 II α 가 중요하다.

[0004] 현재 토포이소머라아제는 항암제 개발에 주요한 타겟으로 보고 있는데, 이는 토포이소머라아제가 세포 증식과정에 필수적으로 필요하기 때문이고, 현재까지 독소루비신, 에토포사이드 및 캄프토테신과 같은 많은 화합물들이 보고되거나 항암 요법으로 상용화되었다. 특히 토포이소머라아제 II는 DNA 복제가 완료되는 동안 필수적으로 일어나야 하는 크로모솜의 위상학적 문제를 해결하는 유일한 효소이며 일시적인 이중 사슬 절단을 유도하는 복제된 크로모솜을 데카테네이션 하는 효소이기 때문에 토포이소머라아제 II 저해제가 항암제로서 주목을 받고 있다.

[0005] 토포이소머라아제 II 저해제는 두 군으로 나뉘는데 하나는 토포이소머라아제 II 독(poison)제제이고 다른 하나는 토포이소머라아제 II 촉매적 저해제이다. 토포이소머라아제 II 독 제제의 경우 일시적인 공유 결합의 DNA-효소 복합체를 형성하여 이를 안정화시킴으로서 DNA에 손상을 가하는 방법으로 항암활성을 나타내는데 이는 DNA 절단(truncation)에 따른 과도한 단일 DNA 가닥 형성이 일어나 심각한 세포 독성 또는 부작용을 나타내기 때문에 넓은 치료적 범위를 가지지 못하는 단점이 있다.

[0006] 반면, 토포이소머라아제 II 촉매적 저해제는 토포이소머라아제 II 독 제제와 달리 DNA 절단 전 또는 재연결 후인 촉매적 사이클의 마지막 단계에서 효소를 저해한다. 인간 토포이소머라아제 II는 N-말단자리, ATP 결합자리, 및 C-말단자리로 구성되며, 토포이소머라아제 II는 복제 완료를 위해 ATP 가수분해를 통해 에너지를 운용한다. 그러므로 토포이소머라아제 II의 ATP 결합자리에 ATP가 결합하는 것을 막는 방식으로 ATPase의 활성을 조절하는 것, 즉 ATPase 저해제는 항암치료에서 유리한 접근법이 될 수 있다. 이에 대하여 일본공개특허 제1998-203977호에서는 잔톤 유도체 및 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 하는 항종양제를 개시하고 있고, 미국공개특허 제7,868,040호는 항암 조성물로서 5,6-디메틸잔톤-4-아세트산을 개시하고 있으나, 상기 문헌 어디에도 본 발명의 신규한 화합물은 개시되어 있지 않다.

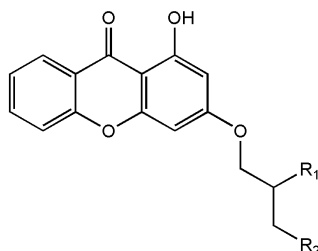
[0007] 이에 본 발명자는, 토포이소머라아제 II 촉매적 저해제에 대하여 연구하던 중, 잔톤을 코어로 가지는 신규한 화합물들을 합성하였고, 상기 신규한 화합물들이 ATPase 저해활성, 세포독성 및 토포이소머라아제 II α 의 선택적 저해활성을 가지는 것을 확인하였으며, 이를 암의 예방 및 치료용 약학적 조성물로 이용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 DNA 토포이소머라아제 II α 를 선택적으로 저해하는 신규한 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것이다.

[0009] [화학식 1]



[0010]

[0011] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 신규한 화학식 1의 화합물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 신규한 화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

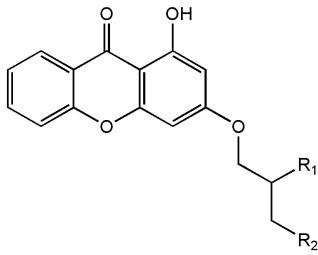
[0013] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하여 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

[0014]

과제의 해결 수단

[0015] 상기 과제를 해결하기 위하여 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0016] [화학식 1]



[0017]

[0018] 상기 식에서, R_1 은 하이드록시, 또는 할로젠이고; R_2 는 NR_3R_4 , SR_3 , 또는 OR_3 이고; R_3 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 하이드록시알킬, 또는 C_{1-4} 할로알킬이고; 및 R_4 는 수소, 또는 C_{1-4} 하이드록시알킬이다.

[0019] 구체적인 일례로서, 상기 화학식 1의 R_1 은 하이드록시이고; R_2 는 NR_3R_4 , 또는 SR_3 이고; R_3 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 하이드록시알킬이고; 및 R_4 는 수소, 또는 C_{1-4} 하이드록시알킬일 수 있다.

[0020]

[0021] 구체적인 일례로서, 상기 화학식 1의 R_1 은 하이드록시이고; R_2 는 NR_3R_4 , 또는 OR_3 이고; R_3 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬, 또는 C_{1-4} 하이드록시알킬이고; 및 R_4 는 수소, 또는 C_{1-4} 하이드록시알킬일 수 있다.

[0022] 구체적인 일례로서, 화학식 1의 R_1 은 하이드록시이고; R_2 는 NR_3R_4 이고; 및 R_3 는 C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 하이드록시알킬일 수 있다.

[0023] 구체적인 일례로서, 상기 화학식 1의 R_2 는 SR_3 이고; 및 R_3 는 C_{1-4} 하이드록시알킬, 또는 C_{1-4} 할로알킬일 수 있다.

[0024] 구체적인 일례로서, 상기 화학식 1의 R_1 은 하이드록시이고; R_2 는 OR_3 이고; 및 R_3 는 C_{1-4} 하이드록시알킬일 수 있다.

[0025] 구체적인 일례로서, 상기 화학식 1의 R_1 은 하이드록시 또는 클로로이고; R_3 는 각각 독립적으로 프로필, 하이드록시프로필, 하이드록시에틸 또는 클로로에틸이고; 및 R_4 는 수소, 또는 하이드록시에틸일 수 있다.

[0026] 구체적인 일례로서, 본 발명의 화학식 1의 화합물 중 바람직한 화합물은 하기 1) 내지 8)과 같다.

[0027] 1) 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(3-하이드록시프로필아미노)프로폭시)-9H-잔텐-9-온;

[0028] 2) 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(2-하이드록시에틸아미노)프로폭시)-9H-잔텐-9-온;

[0029] 3) 3-(3-(비스(2-하이드록시에틸)아미노)-2-하이드록시프로폭시-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온;

[0030] 4) 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(3-하이드록시프로필티오)프로폭시)-9H-잔텐-9-온;

[0031] 5) 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(2-하이드록시에틸티오)프로폭시)-9H-잔텐-9-온;

[0032] 6) 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(프로필아미노)프로폭시)-9H-잔텐-9-온;

[0033] 7) 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(2-하이드록시에톡시)프로폭시)-9H-잔텐-9-온; 및

[0034] 8) 3-(2-클로로-3-(2-클로로에틸티오)프로폭시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온.

[0035] 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물은 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 본 발명에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용가능한 염"이란, 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 화합물의 제형을 의미한다. 상기 약학적 염은, 약학적으로 허용되는 음이온을 함유하는 무독성 산부가염을 형성하는 산, 예를 들어, 염산, 황산, 질산, 인산, 브롬화수소산, 요드화수소산 등과 같은 무기산, 타타르산, 포름산, 시트르산, 아세트산, 트리클로로아세트산, 트리플로로아세트산, 글루콘산, 벤조산, 락트산, 푸마르산, 말레인산, 살리신산 등과 같은 유기 카본산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산 등과 같은 설폰산 등에 의해 형성된 산부가염이 포함된다. 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 카르복실산 염에는, 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등에 의해 형성된 금속염 또는 알칼리 토금속 염, 라이신, 아르지닌, 구아니딘 등의 아미노산 염, 디시클로헥실아민, N-메틸-D-글루카민, 트리스(히드록시메틸)메틸아민, 디에탄올아민, 콜린 및 트리에틸아민 등과 같은 유기염 등이 포함된다. 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 화합물은 당업자에게 자명한 통상적인 방법에 의해 그것의 염으로 전환시킬 수 있다.

[0036] 본 발명에서 사용된 용어 '할로겐'이란 할로젠족 원자를 나타내며, 염소, 불소, 브롬, 요오드 등의 라디칼을 포함한다.

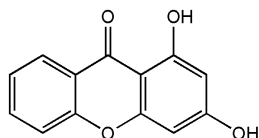
[0037] 본 발명에서 사용된 용어 '알킬'이란 탄소수 1 내지 4의 직쇄 또는 측쇄의 포화된 탄화수소 라디칼을 의미하여, 예를 들어 메틸, 에틸, n-프로필, 이소-프로필, 부틸 등을 포함한다.

[0038] 본 발명에서 사용된 용어 '하이드록시알킬'이란 탄소수 1 내지 4의 직쇄 또는 측쇄의 포화된 탄화수소 라디칼로서, 그 중 하나의 탄소의 수소가 하이드록시기로 치환된 것이고, 예를 들어 하이드록시에틸, 하이드록시프로필 등을 포함한다.

[0039] 본 발명에서 사용된 용어 '할로알킬'이란 탄소수 1 내지 4의 직쇄 또는 측쇄의 포화된 탄화수소 라디칼로서, 그 중 하나의 탄소의 수소가 할로겐으로 치환된 것이고, 예를 들어 클로로에틸, 클로로프로필, 플루오르에틸, 플루오르프로필 등을 포함한다.

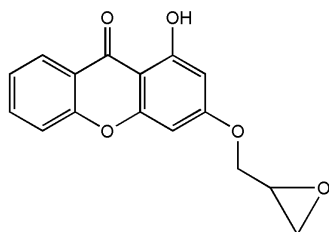
[0040] 또하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 2의 화합물과 에피클로로하이드린을 반응시켜 하기 화학식 3의 화합물을 제조하는 단계(단계 1); 및 하기 화학식 3의 화합물을 HR_2 와 반응시켜 하기 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계(단계 2)를 포함하는 화학식 1의 화합물 제조방법(제조방법 1)을 제공한다.

[0041] [화학식 2]



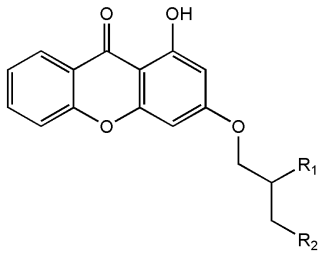
[0042]

[0043] [화학식 3]



[0044]

[0045] [화학식 1]

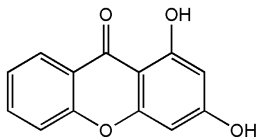


[0046]

[0047] 상기 화학식 1에서 R_1 은 하이드록시이고; R_2 는 NR_3R_4 , SR_3 , 또는 OR_3 이고; R_3 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬, 또는 C_{1-4} 하이드록시알킬이고; 및 R_4 는 수소, 또는 C_{1-4} 하이드록시알킬이다.

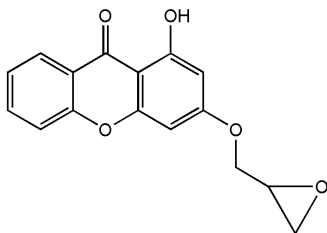
[0048] 또하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 2의 화합물과 에피클로로하이드린을 반응시켜 하기 화학식 3의 화합물을 제조하는 단계(단계 1); 하기 화학식 3의 화합물을 HSR_3 와 반응시켜 하기 화학식 4의 화합물을 제조하는 단계(단계 2); 및 하기 화학식 4의 화합물과 티오닐 클로라이드를 디클로로메탄 용매 하에서 반응시켜 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계(단계 3)를 포함하는 화학식 1의 화합물 제조방법(제조방법 2)을 제공한다.

[0049] [화학식 2]



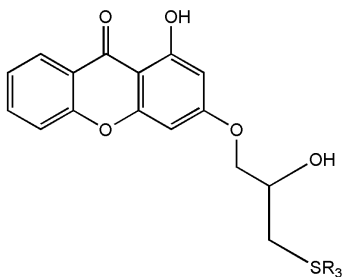
[0050]

[0051] [화학식 3]



[0052]

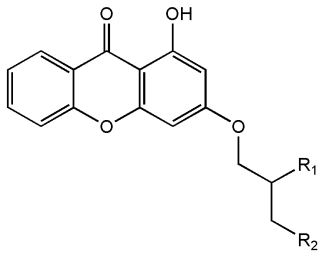
[0053] [화학식 4]



[0054]

[0055] 상기 화학식 4에서 R_3 는 C_{1-4} 하이드록시알킬이고,

[0056] [화학식 1]



[0057]

[0058] 상기 화학식 1에서 R_1 은 클로로이고; R_2 는 SR_3 이고; 및 R_3 는 C_{1-4} 클로로알킬이다.

[0059] 본 발명의 화학식 1의 화합물의 제조방법(제조방법 1 및 2)을 구체적으로 설명하면 다음과 같다:

[0060] 상기 화학식 1의 화합물의 제조방법 1 및 2에서, 화학식 2의 화합물, 에피클로로하이드린, HR_2 (R_2 는 NR_3R_4 , SR_3 , 또는 OR_3 이고; R_3 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 하이드록시알킬, 또는 C_{1-4} 할로알킬이고; 및 R_4 는 수소, 또는 C_{1-4} 하이드록시알킬), 티오닐 클로라이드 및 디클로로메탄은 상업적으로 시판되는 물질을 사용하거나 공지 방법으로 간단히 합성하여 사용할 수 있다.

[0061] 화학식 1의 제조방법 1 및 2에서, 상기 단계 1은 잔존 코어 화합물(상기 화학식 2의 화합물)에 에피클로로하이드릴 치환기를 도입하기 위한 단계이다.

[0062] 구체적으로 출발물질로 1,3-디하이드록시-9H-잔텐-9-온(화학식 2의 화합물)을 탄산칼륨 및 아세톤의 존재 하에서 에피클로로하이드린과 반응시켜 1-하이드록시-3-(옥시란-2-일메톡시)-9H-잔텐-9-온(상기 화학식 3의 화합물)을 제조한다.

[0063]

[0064] 화학식 1의 제조방법 1 및 2에서, 상기 단계 2는 단계 1에서 도입한 에피클로로하이드릴 치환기를 개환반응시키기 위한 단계이다.

[0065] 구체적으로 단계 1에서 제조된 1-하이드록시-3-(옥시란-2-일메톡시)-9H-잔텐-9-온(상기 화학식 3을 비양자성(aprotic) 용매의 존재 하에서 다양한 친핵체와 함께 친핵성 에폭사이드 개환반응을 한다. 상기 친핵체는 바람직하게 HR_2 를 사용하고 여기서 R_2 는 NR_3R_4 , SR_3 , 또는 OR_3 이고; R_3 는 각각 독립적으로 C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 하이드록시알킬, 또는 C_{1-4} 할로알킬이고; 및 R_4 는 수소, 또는 C_{1-4} 하이드록시알킬이고, 보다 바람직하게는, 1) 아미노프로판올, 2) 에탄올아민, 3) 디에탄올아민, 4) 3-말캅토프로판올, 5) 말캅토포에탄올, 6) 프로필아민 및 7) 에틸렌글리콜을 사용한다. 단계 2로 제조된 화합물은 상기 제조방법 1의 화학식 1 또는 제조방법 2의 화학식 4의 화합물이다.

[0066] 화학식 1의 제조방법 2에서, 상기 단계 3은 단계 2에서 제조한 화합물에 할로기를 도입하기 위한 단계이다.

[0067] 구체적으로 단계 2에서 화학식 3의 화합물을 HR_3 와 반응시켜 화학식 4의 화합물을 제조하고 여기서 R_3 는 C_{1-4} 하이드록시알킬이고, 제조한 화학식 4의 화합물과 티오닐 클로라이드를 디클로로메탄 하에서 반응시켜 화학식 1의 화합물을 제조한다.

[0068] 또하나의 양태로서, 본 발명은 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 중 하나 이상의 물질을 포함하는 염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0069] 구체적인 일례로서, 상기 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 중 하나 이상의 물질을 포함하는 염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 토포이소머라아제 II α 의 활성을 억제한다.

- [0070] 본 발명에서 사용된 용어 '암'이란 세포의 사멸 조절과 관련된 질병으로서, 정상적인 아폽토시스 균형이 깨지는 경우 세포가 과다 증식하게 됨으로서 생기는 질병을 일컫는다. 본 발명에서 적용할 수 있는 암의 종류로는 유방 선암, 전립선암, 골수성 백혈병, 대장암, 및 자궁경부암이며 상기 예들에 의해 암의 종류가 한정되는 것은 아니다.
- [0071] 본 발명의 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 토포이소머라아제 II α 의 선택적 저해제이다.
- [0072] DNA 토포이소머라아제 II는 DNA를 잘라서 엉켜있는 DNA를 풀어주고 다시 이어주면서 일정 부분의 DNA가 복제되거나 재조합 복구 또는 전사가 일어나게 하는 효소이다. 포유류의 토포이소머라아제 II에는 2종의 이성체(α , β)가 존재하며, 두 이성체는 구조적 유사성이 높고 효소학적 성질도 비슷하다. 그러나 토포이소머라아제 II β 는 세포 주기에서 거의 일정량 발현하고 있는 데 반하여, 토포이소머라아제 II α 는 G2/M에서 명료하게 증대하는 점이 밝혀지면서, 세포 주기에 특이적으로 작용하는 표적으로는 토포이소머라아제 II α 가 중요하다.
- [0073] 이를 표적으로 하는 공지된 약물인 에토포사이드는 DNA 토포이소머라아제 II 및 DNA와 복합체를 형성하고 DNA를 잘라서 엉킴을 풀어주나, 절단된 DNA가 다시 결합하는 것을 방해하여 항암 효과를 나타낸다. 상기와 같은 복합체의 형성에 따른 항암효과는 유의적이지만, 절단된 DNA 단일 가닥의 과도한 형성으로 인해 많은 부작용이 존재한다.
- [0074] 본 발명의 화학식 1의 화합물은 DNA 토포이소머라아제 II α 의 ATP 결합 자리에서 ATP와 경쟁적으로 결합하여 DNA 토포이소머라아제를 촉매적으로 저해하기 때문에 상기와 같은 단일 가닥의 과도한 형성에 따른 부작용이 없는 장점을 가진다.
- [0075] 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명의 화학식 1의 화합물은 토포이소머라아제 I은 거의 저해하지 않는 반면 선택적으로 토포이소머라아제 II α 는 현저하게 저해하여 기존의 토포이소머라아제 II 저해제로 알려진 에토포사이드보다 좋은 저해활성을 나타냈다.
- [0076] 구체적인 또 다른 실시예에 따르면 다섯 개의 암 세포주(유방 선암, 전립선암, 골수성 백혈병, 대장암, 자궁경부암 세포주)에 대하여 세포독성시험을 실험하였고, 표 2에서 나타나듯이 항암제로서 유의적인 결과를 확인할 수 있었다.
- [0077] 구체적인 일례로서, 본 발명에 따른 상기 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제 등을 더 포함할 수 있다.
- [0078] 약학적으로 허용 가능한 담체의 종류의 예로는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 상기 성분들 중 어느 하나의 이상의 성분을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 통상적으로 사용되는 다른 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 또는 조직 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 상기와 같은 담체, 부형제 또는 첨가제의 종류는 당업계의 통상적인 제제를 모두 포함하며, 상기 예에 의해 사용가능한 담체, 부형제 또는 첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.
- [0079] 본 발명에 따른 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상세하게는, 제형화할 경우 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제

가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위캡슐, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0080] 또하나의 양태로서, 본 발명은 화학식 1의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 중 하나 이상의 물질을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 인간을 포함하는 포유류에게 투여하여 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0081] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물의 바람직한 투여량은 이를 필요로 하는 인간을 포함하는 포유류의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 또한, 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장, 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의하여 투여될 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0082] 본 발명은 신규한 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 DNA 토포이소머라아제 II α 를 선택적으로 저해하는 특징을 가지므로, 암의 예방 또는 치료용 조성물로 사용할 수 있는 효과가 있다. 또한, 본 발명은 상기 신규한 화학식 1의 화합물을 제조하는 방법을 통해 간단하게 화학식 1의 화합물을 합성할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

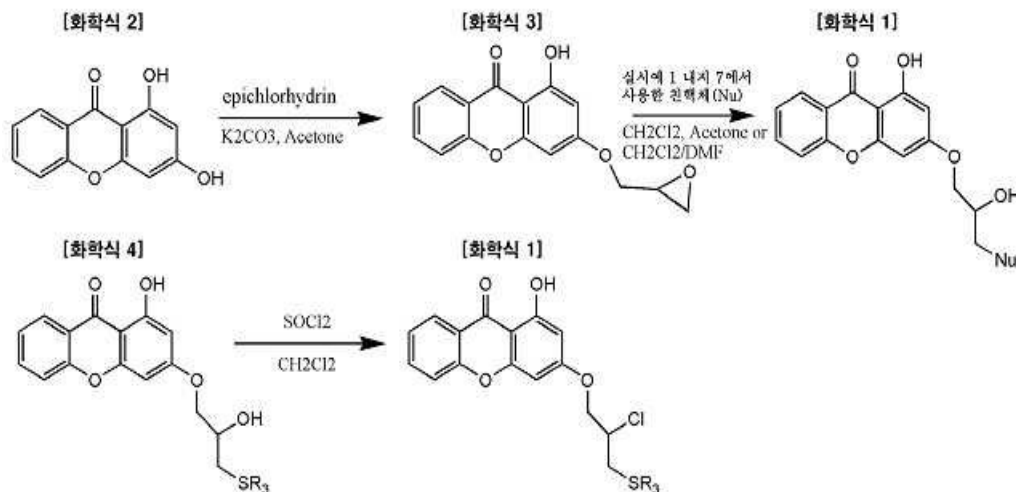
- [0083] 도 1은 실시예 1 내지 8에 따라 제조한 화합물들의 토포이소머라아제 I 저해 활성을 시험한 DNA 전기영동 결과에 대한 사진이다(레인 D는 pBR322만 있을 때, 레인 T는 pBR322 + topoisomerase I이 있을 때, 레인 C는 pBR322 + topoisomerase I + 캄프토테신이 있을 때, 및 레인 1 내지 8은 pBR322 + topoisomerase I + 실시예 1 내지 8에 따라 제조한 화합물이 있을 때의 DNA 전기영동 결과).
- 도 2는 실시예 1 내지 8에 따라 제조한 화합물들의 토포이소머라아제 II α 저해활성을 시험한 DNA 전기영동 결과에 대한 사진이다(레인 D는 pBR322만 있을 때, 레인 T는 pBR322 + topoisomerase II α 가 있을 때, 레인 C는 pBR322 + topoisomerase II α + 에토포사이드가 있을 때, 및 레인 1 내지 8은 pBR322 + topoisomerase II α + 실시예 1 내지 8에 따라 제조한 화합물이 있을 때의 DNA 전기영동 결과).
- 도 3은 실시예 6에 따라 제조한 화합물의 ATP 경쟁 시험의 DNA 전기영동 결과 및 이를 %로 환산한 그래프이다(레인 D는 pBR322만 있을 때, 레인 T는 pBR322 + topoisomerase II α 가 있을 때, 레인 6는 pBR322 + topoisomerase II α + 실시예 6에 따라 제조한 화합물이 있을 때의 DNA 전기영동 결과).
- 도 4는 ATPase 저해활성 시험에서 실시예 6에 따라 제조한 화합물의 % 저해율을 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 실시예 6에 따라 제조한 화합물의 분자 도킹시험에 대한 사진이다(a: 리본 다이어그램으로 나타낸 ATP 결합자리 토포이소머라아제 II α , b 및 c: ATP 결합자리의 확대사진).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0084] 제조예: 화합물의 합성
- [0085] 출발물질로 1,3-디하이드록시-9H-잔텐-9-온(하기 화학식 2의 화합물)을 이용하여 탄산칼륨 및 아세톤의 존재 하에서 에피클로로하이드린과 반응시켜 1-하이드록시-3-(옥시란-2-일메톡시)-9H-잔텐-9-온(하기 화학식 3의 화합물)을 제조하였다.
- [0086] 실시예
- [0087] 이하 실시예 1 내지 8에서 상기 제조한 화학식 3의 화합물을 비양자성(aprotic) 용매의 존재 하에서 다양한 친핵체와 함께 친핵성 에폭사이드 개환반응시켰다. 사용한 친핵체는 1) 아미노프로판올, 2) 에탄올아민, 3) 디에

탄올아민, 4) 3-메캅토프로판올, 5) 메캅토테탄올, 6) 프로필아민 및 7) 에틸렌글리콜이다. 상기 제조에 및 실시예의 개략적인 반응식을 도시하면 하기와 같다:

[0088] [반응식]



[0089]

[0090] 상기 반응식에서 첫째줄의 반응은 실시예 1 내지 7의 개략적인 반응식으로서, 친핵체로 1) 아미노프로판올, 2) 에탄올아민, 3) 디에탄올아민, 4) 3-메캅토프로판올, 5) 메캅토테탄올, 6) 프로필아민 및 7) 에틸렌글리콜을 사용하여 첫째줄의 화학식 1의 화합물을 합성하였다.

[0091] 실시예 8의 경우 상기 반응식의 첫째줄의 반응에 이어 둘째줄의 반응을 수행하였고, 친핵체로 메캅토테탄올을 사용하여 상기 두 번째 줄의 화학식 1의 화합물을 합성하였다.

[0092] 이하 실시예 1 내지 8에서 사용한 용매 및 반응물은 상업적으로 이용가능한 최고 순도 등급을 이용하였으며, 합성된 화합물을 확인하기 위한 TLC 및 HPLC 시험 조건은 하기와 같다:

[0093] TLC 판은 Kieselgel 60 F254(art A715, Merck)를 사용하였고, 실리카 겔 60(0.040-0.063mm ASTM, Merck)를 컬럼 크로마토그래피용으로 사용하였다. 순도는 하기 조건하에 HPLC 분석으로 평가하였다; 컬럼, μ -Bondapak C18 (물, 3.9mm i.d. x 150 mm); 이동상, A 및 B의 선형 그라디언트(A: 0.5% 아세트산을 포함하는 수중 20%의 아세토니트릴 및 B: 아세토니트릴), 실시예 2 내지 5, 7 및 8에 따라 제조된 화합물에 대하여 30분간 20~80%의 아세토니트릴의 등용매용리, 실시예 1 및 6에 따른 화합물에 대한 0.174%의 아세토니트릴을 포함하는 65%의 아세토니트릴의 등용매용리; 유량은 0.8mL/min; 검출기는 UV 검출기(Shimadzu, 254nm)로 하였다. 화합물의 순도는 %로 표시하였다. ^1H 및 ^{13}C -NMR 스펙트라는 Varian NMR AS 400 MHz 기기로 기록하였다. 화학적 이동(δ)는 내부 표준 물질인 TMS 와 비교하여 ppm으로 나타냈고, 결합상수(J 값)은 Hertz로 표시하였다. Mass spectral investigation 은 한국, 경상, 대구 대학교에 있는 전자 이온화(EI)를 장착한 GC-2010(Shimadzu, USA) 질량 분광기를 이용하여 수행하였다. 녹는점은 교정없이 Barnstead International MEL-TEMP 1202D 기기를 이용하여 측정하였다.

[0094] **실시예 1: 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(3-하이드록시프로필아미노)프로폭시)-9H-잔텐-9-온의 합성**

[0095] 상기 제조예에서 제조한 화학식 3의 화합물(109mg, 0.38mM)을 디클로로메탄/아세톤(3ml/3ml)의 존재 하에서 3-아미노프로판올($58\mu\text{l}$, 0.77mM)과 40°C에서 18시간 동안 교반시켰다. 그 후 감압으로 용매를 제거하고, 잔기는 디클로로메탄/n-헥산(1:3)으로 처리하였다. 형성된 고체를 여과하였고, 오프-화이트의 고체를 얻을 때까지 공기 중에서 건조하여 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(3-하이드록시프로필아미노)프로폭시)-9H-잔텐-9-온을 합성하였다.

[0096] HPLC: R_T 8.48 min (순도; 96.2%); m.p. 181-182°C $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 1.95 (quint, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.20-3.29 (m, 4H), 3.75 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 4.16 (d, $J = 4.8$ Hz, 2H), 4.27-4.31 (m, 1H), 6.42 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.61 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.44 (dd, $J = 8.0, 7.6$ Hz, 1H), 7.52 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.82 (ddd, $J = 8.0, 7.6, 1.2$ Hz, 1H), 8.21 (dd, $J = 7.6, 1.2$ Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CD_3OD) 28.1, 46.8, 49.9, 59.6, 65.2, 70.5, 93.2, 97.4, 103.9, 117.6, 120.5, 124.3, 125.5, 135.6, 156.3, 158.0, 163.5, 165.9, 181.0 ppm; EI-MS(m/z) 360 $[\text{M} + 1]^+$

[0097] **실시예 2: 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(2-하이드록시에틸아미노)프로폭시)-9H-잔텐-9-온의 합성**

[0098] 상기 제조예에서 제조한 화학식 3의 화합물(109mg, 0.35mM)을 디클로로메탄/아세톤(2ml/2ml)의 존재 하에서 에탄올아민(490 μl , 8.14mM)과 실온에서 16시간 동안 교반시켰다. 그 후 반응 혼합물을 물로 희석하고 EtOAc 20mL로 2번 추출하였다. 결합된 유기층은 황산나트륨으로 건조하였고, 용매는 감압으로 제거하였다. 잔기는 디클로로메탄/n-헥산(1:3)으로 처리하였다. 형성된 고체를 여과하였고, 오프-화이트의 고체를 얻을 때까지 공기중에서 건조하여 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(2-하이드록시에틸아미노)프로폭시)-9H-잔텐-9-온을 합성하였다.

[0099] HPLC: R_T 15.63 min (순도; 98.8%); m.p. 149-151°C; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 2.58-2.70 (m, 4H), 3.88-3.92 (m, 1H), 4.02 (dd, $J = 10.0, 6.4$ Hz, 1H), 4.13 (dd, $J = 10.0, 4.4$ Hz, 1H), 6.41 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 6.65 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.49 (dd, $J = 8.0, 7.2$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.88 (ddd, $J = 8.4, 7.2, 1.6$ Hz, 1H), 8.14 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H), 다른 피크들은 상기 용매 피크의 아래에 있음; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6) 52.5, 52.8, 61.1, 68.6, 72.4, 94.0, 98.2, 103.8, 118.4, 120.5, 125.3, 126.0, 136.6, 156.1, 158.0, 163.2, 166.8, 180.8 ppm; EI-MS(m/z) 346 $[\text{M} + 1]^+$

[0100] **실시예 3: 3-(3-(비스(2-하이드록시에틸)아미노)-2-하이드록시프로폭시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온의 합성**

[0101] 상기 실시예 1에서 제조한 화학식 3의 화합물(100mg, 0.35mM)을 디클로로메탄/아세톤(2ml/2ml)의 존재 하에서 디에탄올아민(336 μl , 3.50mM)과 실온에서 하룻밤동안 교반시켰다. 그 후 감압으로 용매를 제거하고, 잔기는 디클로로메탄/n-헥산(1:3)으로 처리하였다. 형성된 고체를 여과하였고, 오프-화이트의 고체를 얻을 때까지 공기중에서 건조하여 3-(3-(비스(2-하이드록시에틸)아미노)-2-하이드록시프로폭시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온을 합성하였다.

[0102] HPLC: R_T 16.03 min (순도; 99.5%); m.p. 122-123°C; Rf: 0.29 (M-OH:CHCl₃ = 1:9); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) δ 2.57-2.84 (m, 6H), 3.59-3.63 (m, 2H), 3.68-3.74 (m, 2H), 4.27-4.31 (m, 1H), 6.38 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.40 (dd, $J = 8.4, 7.6$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.75 (ddd, $J = 8.4, 7.6, 2.0$ Hz, 1H), 8.22 (dd, $J = 7.6, 2.0$ Hz, 1H), 다른 피크들은 상기 용매 피크의 아래에 있음; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) 57.4, 58.3, 59.4, 67.3, 70.8, 93.5, 97.7, 104.1, 117.8, 120.6, 124.3, 125.8, 135.4, 156.2, 158.0, 163.2, 166.1, 181.2 ppm; EI-MS(m/z) 389 $[\text{M}]^+$

[0103] **실시예 4: 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(3-하이드록시프로필티오)프로폭시)-9H-잔텐-9-온의 합성**

[0104] 상기 제조예에서 제조한 화학식 3의 화합물(35mg, 0.12mM)을 아세톤(5ml) 중 탄산칼륨(68mg, 0.48mM)의 존재 하에 3-메틸캅토프로판올(43 μl , 0.49mM)에 가하고, 60~70°C에서 1시간동안 교반시켰다. 그 후 감압으로 용매를 제거하고, 잔기는 물로 연마하였다. 형성된 고체를 여과하였고, 물 및 에테르 중 희석-MeOH로 연속적으로 세척하였다. 그리고 나서 오프-화이트의 고체를 얻을 때까지 공기중에서 건조하여 3-(3-(비스(2-하이드록시에틸)아미노)-2-하이드록시-3-(3-하이드록시프로필티오)프로폭시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온을 합성하였다.

노)-2-하이드록시프로폭시-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온을 합성하였다.

[0105] HPLC: R_T 18.46 min (순도; 95.1%); m.p. 72-74 °C; Rf: 0.10 (EtOAc:n-헥산 = 1:1); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 1.89 (quint, J = 6.4 Hz, 2H), 2.74 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.79 (dd, J = 13.2, 6.4 Hz, 1H), 2.89 (dd, J = 13.2, 4.4 Hz, 1H), 3.79 (dt, J = 6.0, 6.0 Hz, 2H), 4.12-4.19 (m, 3H), 6.37 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.47 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.39 (ddd, J = 8.0, 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.43 (dd, J = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.72 (ddd, J = 8.0, 8.0, 1.2 Hz, 1H), 8.25 (dd, J = 8.0, 1.2 Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) 29.3, 32.0, 35.9, 61.4, 68.5, 71.0, 93.3, 97.6, 104.3, 117.6, 120.7, 124.1, 125.9, 135.1, 156.1, 157.7, 163.6, 165.5, 180.9 ppm; EI-MS(m/z) 376 $[\text{M}]^+$

[0106] **실시예 5: 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(2-하이드록시에틸티오)프로폭시)-9H-잔텐-9-온의 합성**

[0107] 상기 제조예에서 제조한 화학식 3의 화합물(76mg, 0.27mM)을 아세톤(10ml) 중 탄산칼륨(74mg, 0.54mM)의 존재 하에 메틸아세탄올(73 μl , 1.07mM)에 가하고, 60~70°C에서 3시간동안 교반시켰다. 그 후 감압으로 용매를 제거하고, 잔기는 물로 연마하였다. 형성된 고체를 여과하였고, 물 및 에테르 중 회석-MeOH로 연속적으로 세척하였다. 그리고 나서 오프-화이트의 고체를 얻을 때까지 공기중에서 건조하여 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(2-하이드록시에틸티오)프로폭시)-9H-잔텐-9-온을 합성하였다.

[0108] HPLC: R_T 17.50 min (순도; 97.0%); m.p. 110°C; Rf: 0.16 (EtOAc:n-헥산 = 1:1); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 2.25 (t, J = 4.8 Hz, 1H), 2.79 (dd, J = 14.0, 7.2 Hz, 1H), 2.83 (dt, J = 5.2, 1.2 Hz, 2H), 2.93 (dd, J = 14.0, 4.8 Hz, 1H), 3.82 (dt, J = 5.2, 5.2 Hz, 2H), 4.14 (d, J = 3.9 Hz, 2H), 4.19-4.21 (m, 1H), 6.37 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.47 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 8.0, 7.6 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.72 (ddd, J = 8.0, 7.6, 1.6 Hz, 1H), 8.25 (dd, J = 8.0, 1.6 Hz, 1H), 12.87 (s, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) 35.7, 36.0, 61.2, 69.0, 70.9, 93.3, 97.5, 104.3, 117.6, 120.7, 124.1, 125.9, 135.1, 156.1, 157.7, 163.7, 165.4, 180.9 ppm; -I-MS(m/z) 362 $[\text{M}]^+$

[0109] **실시예 6: 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(프로필아미노)프로폭시)-9H-잔텐-9-온의 합성**

[0110] 상기 제조예에서 제조한 화학식 3의 화합물(78.8mg, 0.26mM)을 디클로로메탄/아세톤(2ml/2ml)의 존재 하에서 프로필아민(58 μl , 0.70mM)과 40°C에서 하룻밤동안 교반시켰다. 그 후 용매는 감압으로 제거하였다. 잔기는 디클로로메탄으로 처리하였다. 용해되지 않는 고체를 여과하였고, 회수하였다. 그리고 나서 디클로로메탄으로 세척하고 오프-화이트의 고체를 얻을 때까지 공기중에서 건조하여 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(프로필아미노)프로폭시)-9H-잔텐-9-온을 합성하였다.

[0111] HPLC: R_t 11.35분 (순도; 96.0%); m.p. 245-246°C; Rf: 0.18 (M-OH:CHCl₃ = 2:8); $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 + CD_3OD) δ 1.06 (t, J = 7.6 Hz, 3H), 1.81 (hext, J = 7.6 Hz, 2H), 3.00-3.04 (m, 2H), 3.14 (dd, J = 12.4, 9.6 Hz, 1H), 3.27 (dd, J = 12.4, 2.8 Hz, 1H), 4.11 (dd, J = 10.0, 5.6 Hz, 1H), 4.16 (dd, J = 10.0, 4.8 Hz, 1H), 4.38-4.41 (m, 1H), 6.38 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 6.54 (d, J=3.6 Hz, 1H), 7.42 (ddd, J=8.4, 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.48 (d, J=8.4 Hz, 1H), 7.78 (ddd, J = 8.0, 7.6, 1.2 Hz, 1H), 8.22 (dd, J = 8.0, 1.2 Hz, 1H); $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 + CD_3OD) 10.7, 19.5, 49.9, 50.1, 65.1, 70.2, 93.4, 97.6, 104.3, 117.8, 120.6, 124.4, 125.8, 135.6, 156.3, 158.0, 163.3, 165.6, 181.2 ppm; EI-MS(m/z) 343 $[\text{M}]^+$

[0112] **실시예 7: 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(2-하이드록시에톡시)프로폭시)-9H-잔텐-9-온의 합성**

[0113] 상기 제조예에서 제조한 화학식 3의 화합물(30mg, 0.108mM)을 트리플루오르아세트산(0.3mL)의 존재 하에 에틸렌 글리콜(1.5mL)과 함께 60℃에서 4시간동안 교반시켰고 식혔다. 물 및 EtOAc를 상기 반응 혼합물에 가했다. 유기층을 분리하고 sat-NaHCO₃ 및 브라인(brine)으로 연속적으로 세척하고, 그리고 나서 황산나트륨이 될 때까지 건조하였다. 그 후 감압으로 농축하고, 잔기는 오프-화이트의 고체를 얻기 위해 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(메탄올:클로로포름 = 1:9 에 대하여 EtOAc:n-헥산 = 2:1)로 정제하여 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(2-하이드록시에톡시)프로폭시)-9H-잔텐-9-온을 합성하였다.

[0114] HPLC: R_T 15.90 min (순도; 96.2%); m.p. 116-117℃; R_f: 0.15 (EtOAc:n-헥산 = 3:1); ¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD + CDCl₃) δ 3.61 (t, J = 4.4 Hz, 2H), 3.66 (t, J = 4.4 Hz, 2H), 3.71 (t, J = 4.4 Hz, 2H), 4.10-4.21 (m, 3H), 6.38 (d, J=1.6 Hz, 1H), 6.56 (d, J=1.6 Hz, 1H), 7.42 (dd, J=7.6, 7.2 Hz, 1H), 7.49 (d, J=8.0 Hz, 1H), 7.78 (dd, J=8.0, 7.2 Hz, 1H), 8.19 (d, J = 7.6 Hz, 1H); ¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD + CDCl₃) 60.6, 68.2, 69.5, 71.5, 72.3, 92.7, 97.0, 103.2, 117.1, 120.0, 123.7, 125.0, 134.9, 155.8, 157.5, 162.8, 166.0, 180.4 ppm; EI-MS(m/z) 346 [M]⁺

[0115] **실시예 8: 3-(2-클로로-3-(2-클로로에틸티오)프로폭시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온의 합성**

[0116] 상기 제조예에서 제조한 1-하이드록시-3-(2-하이드록시-3-(2-하이드록시에틸티오)프로폭시)-9H-잔텐-9-온(20mg, 0.055mM)을 질소 존재 하에서 디클로로메탄(5mL), 티오닐 클로라이드(12μl, 0.168mM)에 첨가하고, 반응 혼합물을 실온에서 교반하고 디클로로메탄 10mL를 더 첨가하여 희석하였다. 유기층은 sat-NaHCO₃ 및 브라인(brine)으로 연속적으로 세척하고, 그리고 나서 황산나트륨이 될 때까지 건조하였다. 그 후 감압으로 농축하고, 잔기는 오프-화이트의 고체를 얻기 위해 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(EtOAc:n-헥산 = 1:5)로 정제하여 3-(2-클로로-3-(2-클로로에틸티오)프로폭시)-1-하이드록시-9H-잔텐-9-온을 합성하였다.

[0117] HPLC: R_T 17.52분 (순도; 96.7%); m.p. 107-108 °C; R_f: 0.70 (EtOAc:n-헥산 = 1:3); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3.04 (dt, J = 7.2, 1.2 Hz, 2H), 3.33 (quint, J = 5.6 Hz, 1H), 3.70 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.88 (dd, J = 11.2, 7.2 Hz, 1H), 3.92 (dd, J = 11.2, 5.2 Hz, 1H), 4.33(dd, J = 10.0, 6.0 Hz, 1H), 4.36 (dd, J = 10.0, 5.2 Hz, 1H), 6.37 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.46 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 8.4, 8.0 Hz, 1H), 7.43 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.71 (ddd, J = 8.4, 8.0, 2.0 Hz, 1H), 8.25 (dd, J = 8.4, 2.0 Hz, 1H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) 34.5, 43.5, 44.7, 47.2, 68.6, 93.5, 97.7, 104.6, 117.8, 120.8, 124.4, 126.1, 135.4, 156.3, 157.9, 163.9, 165.3, 181.1 ppm; EI-MS(m/z) 398 [M]⁺

[0118] **실험예**

[0119] **실험예 1: DNA 토포이소머라아제 I 활성 시험**

[0120] 실시예 1 내지 8로 제조한 화합물들의 DNA 토포이소머라아제 I의 저해활성을 하기와 같은 시험을 통하여 측정하였다.

[0121]

[0122] 먼저 DNA 토포이소머라아제 I 활성시험은 초나선 DNA pBR322의 풀림을 측정하여 확인하였다. 실시예 1 내지 8로 제조한 화합물 없이 100ng의 플라스미드 pBR322 DNA 및 0.4 단위의 재조합 인간 DNA 토포이소머라아제 I (Topo-GEN INC., USA)의 혼합물을 풀림 버퍼(10mM Tris-HCl (pH 7.9), 150mM 염화나트륨, 0.1% 소혈청 알부민, 1mM 스피리딘, 5% 글리세롤) 중에서 30분동안 37℃에서 배양시켰다. 5%의 살코실, 0.0025% 브로모페놀 블루, 및 25%의 글리세롤을 함유하는 종결 용액 2.5μl의 첨가로 최종 용적 10μl에서 반응이 종결하였다. 상기 DNA 샘플

플들은 이동 버퍼로 TAE(Tris-acetate-EDTA)와 함께 7시간동안 15V의 1% 아가로스겔 상에서 전기영동시켰다. 상기 겔을 에티디움 브로마이드(0.5 μ g/mL)의 수용액 중에서 30분동안 염색하였다. 상기 DNA 밴드를 UV 광선으로 투조(transillumination)하여 가시화시켰고, AlphaImagerTM(Alpha Innotech Corporation)을 사용하여 정량하였다.

[0123] 상기 폴림 버퍼에 실시예 1 내지 8로 제조한 화합물 중 하나를 20 μ M의 농도로 첨가하여 동일한 조건으로 초나선 DNA pBR322의 폴림을 측정하여 DNA 토포이소머라아제 I 저해 활성을 확인하였다. 그 결과를 도 1 및 % 저해율로 환산하여 하기 표 1에 나타내었다.

[0124] 대조군으로 캄프토테신을 사용하여 실험예 1과 동일한 조건으로 DNA 토포이소머라아제 I의 저해 활성을 측정하였고 그 결과를 도 1 및 하기 표 1에 나타내었다.

[0125] 도 1에서 레인 D는 pBR322만 있을 때, 레인 T는 pBR322 + topoisomerase I가 있을 때, 레인 C는 pBR322 + topoisomerase I + 캄프토테신이 있을 때, 및 레인 1 내지 8은 pBR322 + topoisomerase I + 실시예 1 내지 8에 따라 제조한 화합물이 있을 때의 DNA 전기영동 결과이다. 이를 % 저해율로 환산하여 하기 표 1에 나타내었다.

[0126] 하기 표 1에서 확인할 수 있듯이, 하기 비교 실험예의 캄프토테신의 DNA 토포이소머라아제 I 저해율이 69.15%로 저해 활성이 현저히 높은데 비하여, 본 발명의 경우에 실시예 3 내지 8에 따라 제조한 화합물들의 경우 토포이소머라아제 I 저해 활성이 전혀 없거나, 실시예 1 또는 2에 따라 제조한 화합물처럼 매우 적은 정도로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[0127] 실험예 2: DNA 토포이소머라아제 II α 활성 시험

[0128] 실시예 1 내지 8로 제조한 화합물들의 DNA 토포이소머라아제 II α 의 저해활성을 하기와 같은 시험을 통하여 측정하였다.

[0129] 실시예 1 내지 8로 제조한 화합물 없이 200ng의 플라스미드 pBR322 DNA 및 1 단위의 재조합 인간 DNA 토포이소머라아제 II α (Usb Corp., USA)의 혼합물을 50mM 염화나트륨, 50mM 염화칼륨, 5mM 염화마그네슘, 1mM EDTA, 1mM ATP, 및 15 μ g/mL의 소혈청 알부민을 포함하는 시험 버퍼(10mM Tris-HCl (pH 7.9)) 중에서 30분동안 30 $^{\circ}$ C에서 배양시켰다. 7mM EDTA 3 μ l의 첨가로 최종 용적 20 μ l에서 반응이 종결하였다. 반응 생성물은 이동 버퍼로 TAE(Tris-acetate-EDTA)와 함께 4시간동안 25V의 1% 아가로스겔에서 분석하였다. 상기 겔을 에티디움 브로마이드(0.5 μ g/mL)의 수용액 중에서 30분동안 염색하였다. 상기 DNA 밴드를 UV 광선으로 투조(transillumination)하여 가시화시켰고, 상기 초나선 DNA는 AlphaImagerTM(Alpha Innotech Corporation)을 사용하여 정량하였다.

[0130] 상기 시험 버퍼에 실시예 1 내지 8로 제조한 화합물 중 하나를 다양한 농도(10 μ M, 20 μ M, 또는 100 μ M)로 첨가하여 동일한 조건으로 초나선 DNA pBR322의 폴림을 측정하여 DNA 토포이소머라아제 II α 의 저해 활성을 확인하였다. 그 결과를 도 2 및 % 저해율로 환산하여 하기 표 1에 나타내었다.

[0131] 대조군으로 에토포사이드를 사용하여 실험예 2와 동일한 조건으로 DNA 토포이소머라아제 II α 의 저해 활성을 측정하였고 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[0132] 도 2에서 레인 D는 pBR322만 있을 때, 레인 T는 pBR322 + topoisomerase II α 가 있을 때, 레인 C는 pBR322 + topoisomerase II α + 에토포사이드가 있을 때, 및 레인 1 내지 8은 pBR322 + topoisomerase II α + 실시예 1 내지 8에 따라 제조한 화합물이 있을 때의 DNA 전기영동 결과이다. 이를 % 저해율로 환산하여 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

화합물	Topo I (%저해율)	Topo II α (%저해율)		
		10 μM	20 μM	100 μM
농도	20 μM			
캄프토테신	69.15			
에토포사이드		26.04	39.11	77.07
실시예 1	3.45	38.66	62.77	100.00
실시예 2	1.08	35.51	70.27	100.00
실시예 3	0.00	17.40	45.84	100.00
실시예 4	0.00	17.46	26.11	68.00
실시예 5	0.00	26.32	49.09	63.75
실시예 6	0.00	41.23	70.01	100.00
실시예 7	0.00	23.43	43.68	89.25
실시예 8	0.00	15.80	22.24	45.33

상기 표 1에서 확인할 수 있듯이, 실시예 1 내지 8에 따라 제조한 화합물들은 DNA 토포이소머라아제 I에 대한 활성 저해율과 비교하여 DNA 토포이소머라아제 II α에서 활성 저해율이 현저히 높은 것으로 보아 DNA 토포이소머라아제 II α를 선택적으로 저해하는 화합물임을 확인하였다.

또한, 비교 실험예의 에토포사이드의 DNA 토포이소머라아제 II α의 저해 활성에 비하여 본 발명의 실시예 1 내지 3 및 5 내지 8에 따라 제조한 화합물들의 경우 DNA 토포이소머라아제 II α의 저해 활성이 더 강력함을 확인할 수 있었다.

실시예 1 내지 8에 따른 화합물의 DNA 토포이소머라아제 활성 저해율을 구체적으로 살펴보면, 잔존 측쇄의 종류에 따라 DNA 토포이소머라아제 II α 활성 저해율이 달라지는 것을 확인하였다. 낮은 농도(10 μM, 또는 20 μM)에서 실시예 1, 2 및 6에 따라 제조된 화합물은 실시예 3, 4, 5, 7, 또는 8에 따라 제조된 화합물보다 DNA 토포이소머라아제 II α의 저해 활성이 현저히 뛰어났고 그 중에서 실시예 6에 따라 제조된 화합물이 가장 뛰어난 저해활성을 갖는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 실시예 1, 2 및 6에 따라 제조된 화합물들이 NH 측쇄를 가지고 상기 NH 측쇄가 수소 주개(donor)로서 작용하여 DNA 토포이소머라아제 II α의 저해 활성이 높아짐을 의미한다. 또한, 실시예 1 및 2의 측쇄는 각각 하이드록시프로필아민 및 하이드록시에틸아민으로 농도에 상관없이 비슷한 정도로 DNA 토포이소머라아제 II α의 저해하므로 탄소수의 차이는 DNA 토포이소머라아제 II α 활성 저해에 큰 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

실험예 3: 세포독성시험

실시예 1 내지 8에 따라 제조한 화합물들의 세포 독성을 평가하기 위하여 인간 유방 선암 세포주(MDA-MB231), 인간 자궁경부암 세포주(HeLa), 인간 전립선암 세포주(DU145), 인간 대장암 세포주(HCT116) 및 인간 골수성 백혈병 세포주(HL60)를 사용하였다.

각 암 세포들은 96-well plates에 각 well 당 $2 \sim 4 \times 10^4$ 세포의 농도로 37°C, 5% CO₂ 존재 하에 10% 소태아혈청(Hyclone, USA)을 공급하는 0.1mL의 배지에서 하룻밤동안 배양하였다. 이틀째, 각 well의 배양 배지를 실시예 1 내지 8에 따라 제조한 화합물들의 농도를 함유하는 배지의 분취액(aliquote) 0.1mL으로 교환하였다. 사흘째, 세포 카운팅 키트-8 용액(Dojindo, Japan)의 5 μL를 각 well에 첨가하고 동일 조건으로 4시간 더 배양하였다. 각 well의 흡광도는 450nm에서 Automatic Elisa Reader System(BioRad 3550)을 사용하여 측정하였다. IC₅₀를 확인하기 위하여, 450nm에서 흡광도 기록을 사인자 논리 방정식(four-parameter logistic equation)에 맞도록하여, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

대조군으로 사용한 아드리아마이신, 에토포사이드 및 캄프토테신은 Sigma에서 구매하였으며, 실시예로 제조한

화합물 대신에 상기 대조군을 배양 배지에 첨가하는 것을 제외하고 상기 실험에 3과 동일한 조건으로 실험하였으며, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

	HeLa IC ₅₀ (μ M)	HCT116 IC ₅₀ (μ M)	DU145 IC ₅₀ (μ M)	MDA-MB231 IC ₅₀ (μ M)	HL60 IC ₅₀ (μ M)
아드리아마이신	1.32 $\pm$ 0.15	6.81 $\pm$ 1.43	2.47 $\pm$ 1.03	0.84 $\pm$ 0.08	0.32 $\pm$ 0.07
에토포사이드	2.36 $\pm$ 0.47	9.50 $\pm$ 1.35	2.19 $\pm$ 0.79	1.23 $\pm$ 0.38	1.28 $\pm$ 0.07
캄프토테신	1.08 $\pm$ 0.07	3.97 $\pm$ 0.76	0.31 $\pm$ 0.03	0.97 $\pm$ 0.07	0.065 $\pm$ 0.004
실시예 1	19.23 $\pm$ 0.71	31.28 $\pm$ 2.93	1.60 $\pm$ 1.09	6.97 $\pm$ 2.73	8.87 $\pm$ 2.11
실시예 2	8.43 $\pm$ 0.66	19.97 $\pm$ 2.64	4.03 $\pm$ 0.62	3.55 $\pm$ 0.52	9.87 $\pm$ 0.15
실시예 3	15.21 $\pm$ 0.46	56.69 $\pm$ 6.41	1.59 $\pm$ 0.91	14.89 $\pm$ 2.91	15.90 $\pm$ 1.16
실시예 4	12.31 $\pm$ 1.00	>100	40.94 $\pm$ 16.70	8.40 $\pm$ 1.82	27.77 $\pm$ 2.86
실시예 5	9.15 $\pm$ 2.69	23.94 $\pm$ 4.58	3.47 $\pm$ 1.80	5.13 $\pm$ 1.65	19.86 $\pm$ 2.48
실시예 6	11.62 $\pm$ 0.11	23.71 $\pm$ 1.77	0.76 $\pm$ 0.39	4.11 $\pm$ 0.57	4.15 $\pm$ 2.09
실시예 7	15.38 $\pm$ 1.04	46.70 $\pm$ 5.98	15.55 $\pm$ 2.15	10.41 $\pm$ 2.59	16.58 $\pm$ 0.64
실시예 8	4.64 $\pm$ 2.03	14.80 $\pm$ 0.26	0.004 $\pm$ 0.001	1.32 $\pm$ 0.07	3.41 $\pm$ 1.30

상기 표 2에서 확인할 수 있듯이, 실험에 2에서 가장 높은 DNA 토포이소머라아제 II α 저해 활성을 보여준 실시예 6에 따라 제조한 화합물은 DU145 세포주에 대하여 아드리아마이신 및 에토포사이드보다 더 높은 세포독성이 있음을 증명하였다. 또한 이 중 실시예 8에 따라 제조한 화합물은 모든 세포주에 대하여 가장 높은 세포독성을 보여주었고 특히 DU145에 대하여 아드리아마이신, 에토포사이드 및 캄프토테신보다 더 효과적임을 확인하였다.

실험예 4: ATP 경쟁시험

실시예 6에 따라 제조한 화합물이 ATP와 경쟁적으로 작용하는 지를 확인하기 위해 다양한 ATP 농도 조건으로 토포이소머라아제 II α 의 저해율을 시험하였다.

1.0 내지 4.0mM 농도 범위의 ATP를 이용하였으며, 그 결과를 도 3에 나타냈다.

도 3에서, DNA 전기영동 중 레인 D(Lane D)는 pBR322만 있는 것이고, 레인 T는 pBR322 + topoisomerase II, 레인 6은 pBR322 + topoisomerase II + 실시예 6에서 제조한 화합물의 DNA 전기영동 결과이다. 그 결과를 %로 환산한 그래프에서 볼 수 있듯이 ATP 농도가 증가하면서 실시예 6에 따라 제조한 화합물의 토포이소머라아제 저해 활성이 감소하는 것으로 보아 실시예 6의 화합물은 ATP 결합자리에서 ATP와 경쟁적으로 작용하여 토포이소머라아제 II α 를 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

실험예 5: ATPase 시험

인간 토포이소머라아제 II α 의 완전한 촉매적 사이클이 작동하기 위해서 ATP의 가수분해가 필수적이다. 따라서, ATP-경쟁적 결합 친화성이 ATP 가수분해를 막는지 확인하기 위하여 실시예 6에 따라 제조한 화합물의 ATPase 시험을 수행하였다.

인간 토포이소머라아제 II α 의 DNA 의존성 ATPase 활성은 말라카이트 그린 포스페이트 시험 키트(Gentaut, Belgium)과 함께 공지된 방법으로 검사하였다. 인간 토포이소머라아제 II α 0.1 단위 및 초나선 pUC18 3.4 nM을 각 400 μ M의 실시예 6에 따라 제조한 화합물의 존재 또는 부존재의 조건 하에 10mM Tris-HCl (pH 7.9), 175mM 염화칼륨, 0.1mM EDTA, 5mM 염화마그네슘, 2mM DTT, 및 2.5% 글리세롤을 포함하는 반응 버퍼에서 37 $^{\circ}$ C, 30분간 배양시켰다. 상기 시험은 ATP 400 μ M(Sigma, USA)를 첨가하여 개시하였고, 37 $^{\circ}$ C에서 추가 30분간 반응시켰다. ATP의 첨가 후에 반응 용액의 용적은 총 80 μ l였다. 그 후 말라카이트 그린 포스페이트 시험 키트에 의해 제공되는 100:1 비율의 A:B 반응물들의 20 μ l 혼합물을 반응 용액에 첨가하였다. 상기 반응 용액은 620nm에서 VERSAmax 마이크로플레이트 리더기(Molecular Devices, USA)를 이용하여 기록하였다. OD 값은 말라카이트 그린 및 산성

몰리브데이트로 복합화된 무기 포스페이트의 양으로 측정하였다. 이 때 상기 무기 포스페이트는 인간 토포이소머라아제 II α 에 의해 수행된 ATP 가수분해로부터 방출된 생산물이다. 공 OD 값은 ATP 가수분해 전에 어떤 무기 포스페이트도 존재하지 않았다는 것을 보여주는 0.1 미만이다. ATP 가수분해의 %저해율은 0%로서 상기 실시예 6에 따라 제조한 화합물의 존/부에 따른 %저해율을 계산하였고 그 결과를 도 4에 나타냈다.

[0150] 도 4에 따르면, 인간 토포이소머라아제 II α 에 의해 매개되는 ATP 가수분해에 대한 실시예 6에 따라 제조된 화합물은 ATPase를 $28.5 \pm 4.6\%$ 로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[0151] **실험예 6: 분자 도킹 시험**

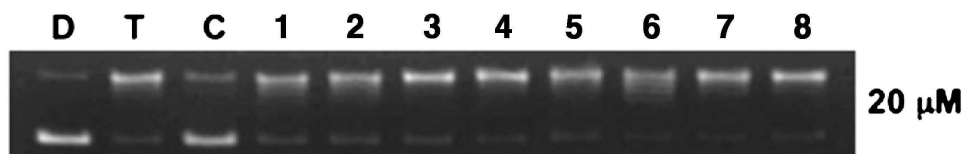
[0152] 실시예 6에 따라 제조한 화합물의 활성을 시험하기 위해 인간 토포이소머라아제 II α 의 ATP 결합 자리에 대한 분자 도킹을 시험하였다.

[0153] 인간 토포이소머라아제-II α 의 ATP-결합 자리에 대한 코오디네이트(coordinate)는 단백질 데이터 베이스(PDB code 1ZXM)에서 검색하였다. 물 분자는 제거하였고 수소 원자는 본래 결정 구조에 첨가하였다. 마그네슘 이온은 +0.9 전하를 부여하였다. 실시예 6에 따라 제조한 화합물에 대한 코오디네이트 파일은 Sybyl 8.0으로 조립하였고 Gasteiger-Huckel 전하와 함께 Tripos 포스 필드(force field)를 이용하여 효과적으로 최소화하였다. 수용체 및 리간드 파일은 본래 공표된 프로토콜에 따라 제조하였다. 리간드의 경우 각 원자의 Gasteiger 전하는 ADT에 의해 계산된 것으로 사용하였다. 도킹은 Lamarckian Genetic Algorithm을 사용하여 수행한 시뮬레이션으로 수행하였다. 도킹에 사용한 인자들은 number of generation을 270,000, 도킹 run을 50으로 사용하고 나머지는 디폴트 값을 사용하였다. 최종적으로 도킹은 가장 바람직한 도킹 모드를 관찰하기 위해서 평균 평방근 편차(rmsd) tolerance내에서 서로 2.0 내로 놓인 배향의 군집화에 의해 분석하였다. 그 결과를 도 5에 나타냈다.

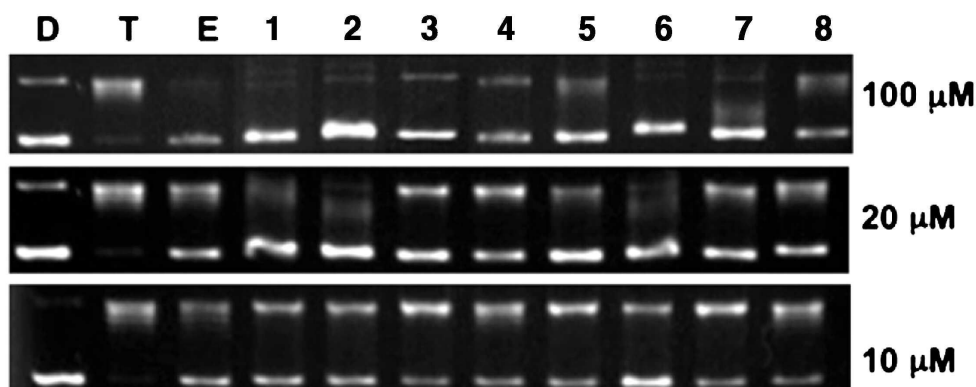
[0154] 도 5에서 확인할 수 있듯이, 실시예 6에 따라 제조한 도킹된 화합물은 ATP-결합 자리에 잘 맞는 것을 보여준다.

도면

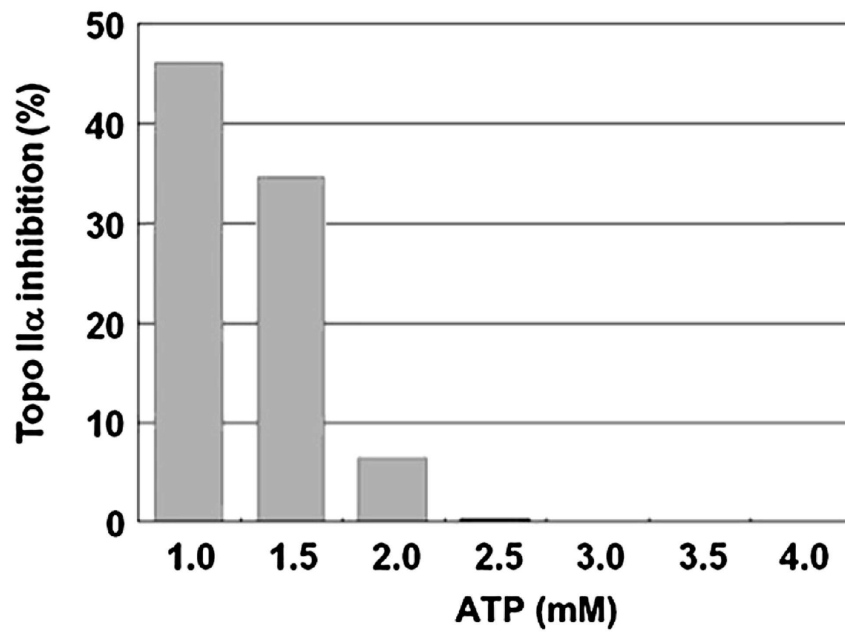
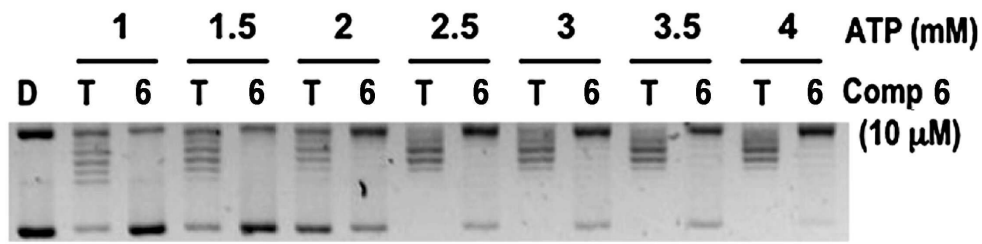
도면1



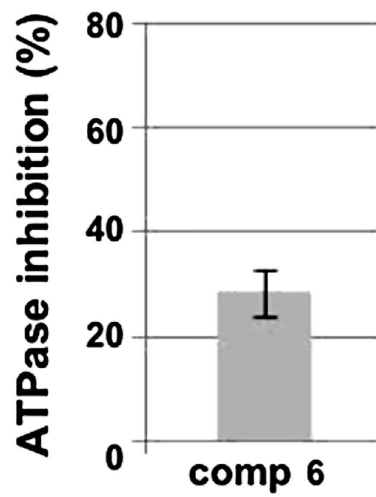
도면2



도면3



도면4



도면5

