

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

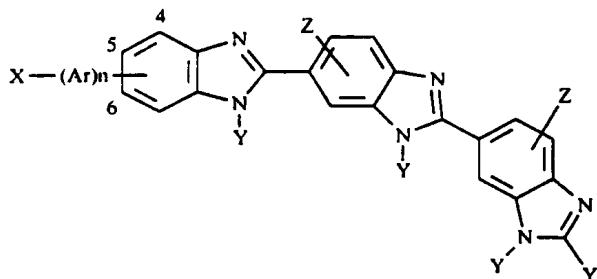
(51) Int. Cl.⁶
C07D 235/18(11) 공개번호 특2000-0070359
(43) 공개일자 2000년 11월 25일

(21) 출원번호	10-1999-7006592
(22) 출원일자	1999년 07월 21일
번역문제출일자	1999년 07월 21일
(86) 국제출원번호	PCT/US1998/01005
(86) 국제출원출원일자	1998년 01월 21일
(81) 지정국	AP ARIP0특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 가나 감비아 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐 스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투 칼 스웨덴 핀란드 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카 메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이 잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나 다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북 한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽 고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 슬로베니아 슬로바키아 타지키 스탄 투르크메니스탄 터키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 미 국 우즈베키스탄 베트남 폴란드 포르투칼 루마니아 러시아 수단 스 웨덴 싱가포르 가나 기네비쓰 인도네시아 시에라리온 유고슬라비아 감비아 짐바브웨
(30) 우선권주장	8/786,629 1997년 01월 21일 미국(US)
(71) 출원인	루트거스, 더 스테이트 유니버시티 오브 뉴 저지
(72) 발명자	미국 뉴 저지 08903 뉴브런스윅 써머셋 앤드 조지 스트리츠 올드 퀸스 빌딩 라보아 에드몬드 제이 미국 뉴저지주 08550 프린스톤 정션 길포드 코트 3 리우 리로이 풍 미국 뉴저지주 08807 브릿지워터 페어에이커스 드라이브 5 순 쿤 중국 체지앙 311200 샤오 산 레미앙 로드 201 아파트먼트 22 이병호
(74) 대리인	

심사청구 : 없음**(54) 의학치료에 유용한 태르벤즈이미다졸(토포이소머라제 억제제)****요약**

본 발명은 의학적 치료(예: 진균성 감염 또는 암의 치료)에 사용하기 위한 일반식 1의 토포이소머라제 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 제공한다.

화학식 I



상기식에서,

Ar은 아릴 또는 질소-, 황- 또는 산소-함유 헤테로방향족 그룹이고;

X는 H, CN, CHO, OH, 아세틸, CF_3 , $O(C_1-C_4)$ 알킬, NO_2 , NH_2 , 할로겐 또는 할로(C_1-C_4)알킬이고;

각각의 Y는 H, (C_1-C_4)알킬 또는 아르알킬이고;

Y'는 폐닐 또는 메톡시페닐이고;

각각의 Z는 개별적으로 H, (C_1-C_4)알킬, 할로겐 또는 할로(C_1-C_4)알킬이고;

n은 0 또는 1이다.

또한 본 발명은 신규한 화학식 I의 화합물, 화학식 I의 화합물을 포함하는 약제학적 조성물 및 하나 이상의 화학식 I의 화합물을 투여함에 의해 진균성 감염 또는 암의 치료를 포함하는 치료학적 방법을 제공한다.

대표도

도1

색인어

테르벤즈이미다졸, 토포이소머라제 억제제, 토포이소머라제 I, 토포이소머라제 II, 캄프토텍신, 진균성 감염

명세서

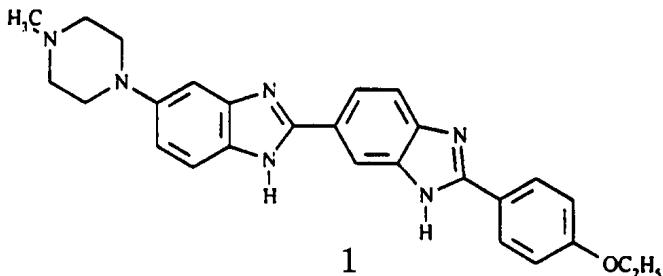
배경기술

본 발명은 미국 연구기관(Health Grant CA 39962)의 지원으로 수행되었다. 미국 정부는 본 발명에 특정 권리를 갖는다.

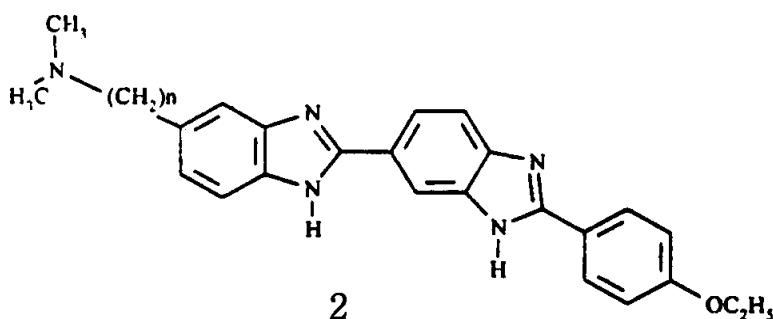
DNA 토포이소머라제는 DNA 본쇄의 절단 및 재결합을 동시에 촉매함으로써 DNA의 형태학적 상태를 조절하고 변형시키는 핵 효소이다[참조문헌: D'Arpa et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 989, 163(1989)]. 토포이소머라제 II 효소는 DNA의 이본쇄를 절단시킴으로써 DNA의 형태학적 상태를 변형시킨다. DNA 토포이소머라제의 절단/재결합 반응을 차단하는 다수의 제제가 이들 효소를 완전한 DNA 절단 효소로 전환시켜 효과적으로 세포를 사멸시키는 것으로 나타났다[문헌참조: L.F.Liu, in *Topoisomerases: topoisomerase targeting drugs*, *Adv. in Pharmacol.*, 29B(1994); L.K.Wang et al., *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 813(1993)]. 따라서, 포유동물 토포이소머라제 II는 화학적 암 치료제를 개발하기 위해 효과적인 약리학적 표적이 된다[A.Y.Chen et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 34, 191(1994)]. 토포이소머라제 II 억제제로서 인지되어 사용중인 임상학적 제제로서는 에토포시드(VP-16), 테니포시드(VM-26), 미톡산트론, m-AMSA, 아드리아마이신(독소루비신), 엘립티신 및 다우노마이신이 있다.

토포이소머라제 II 억제제와 비교하여 토포이소머라제 I 억제제는 상대적으로 거의 공지되지 않았다. 캄프토텍신은 가장 광범위하게 연구된 포유동물 토포이소머라제 I 억제제이다[참조문헌: R. C. Gallo et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, 46, 789(1971) and B.C. Giovanella et al., *Cancer Res.*, 51, 3052(1991)]. 캄프토텍신으로 토포이소머라제 I의 절단/재결합 반응을 차단하여 공유 중간체가 축적되어 토포이소머라제 I는 가역학적으로 절단된 상태로 유지되고 이를 절단성 복합체로서 칭한다[문헌참조: Y.-H. Hsiang et al., *J. Biol. Chem.*, 260, 14873(1985); S.E. Porter et al., *Nucl. Acids Res.*, 17, 8521(1989); C. Jaxel et al., *J. Biol. Chem.*, 266, 20418(1991)]. 캄프토텍신에 대해 관찰되는, 광범위한 스펙트럼의 강력한 항신생물성 활성이 포유동물 토포이소머라제 I를 효과적으로 독성화시킬 수 있는 또 다른 제제를 동정하기 위한 추가의 노력을 촉진시켰다.

최근에, 훅스트 33342(1), 2'-(4-에톡시페닐)-5-(4-메틸-1-피페라지닐)-2,5'-비-1H-벤즈이미다졸이 토포이소머라제 I의 억제제인 것으로 입증되었다.



상기 제제는 DNA의 마이너 그루브에 결합하여 DNA 및 토포이소머라제 I로부터 유래된 가역적인 절단성 복합체를 유지시켜 고도로 특이적인 제한된 수의 일본쇄 DNA를 절단시킨다[참조문헌: A.Y. Chen et al., Cancer Res., 53, 1332(1993) and A. Chen et al., PNAS, 90, 8131(1993)]. 항암제로서 훅스트 33342의 한계는 MDR1을 과발현하는 종양 세포주에 대해 효과적이지 못하다는 것으로 이미 보고된 바 있다. 대략 9nM의 IC₅₀값을 나타내면서 훅스트 33342는 KB 3-1 세포에 대해 매우 민감한 것으로 공지된 반면에 상기 화합물은 MDR 1을 과발현하는 것으로 공지된 KB V-1 세포에 대해 130배 적은 세포 독성을 나타낸다. 최근에, 상기 비스벤즈이미다졸의 몇몇 동족체가 합성되어 포유동물 토포이소머라제 I 억제제 및 이와 관련된 세포독성으로서의 이의 효능과 연관된 구조 활성 관계를 조사하였다. 문헌[참조: Q.Sun et al., Biorg and Med. Chem. Lett., 4, 2871(1994)]은 하기 화학식의 비스-벤즈이미다졸의 제조방법을 기술하고 있다.



(여기서, n은 0 내지 3이다)

그러나, 이들 화합물은 훅스트 33342 보다 적은 세포독성을 나타내는 것으로 밝혀졌다.

보다 최근에, 문헌[참조: Q. Sun et al., in Abstract 2688, Scientific Proceedings-86th Annual Meeting of the AACR(Toronto, CA, March 18-22, 1995)]은 트리스벤즈이미다졸 유도체인 5-(2-피리딜)-2-[2'-(벤즈이미다졸-5'-일)-벤즈이미다졸-5'-일]-벤즈이미다졸이 훅스트 33342와 유사하게 사람 토포이소머라제 I의 억제제로서의 효능을 갖는다고 기술하고 있다.

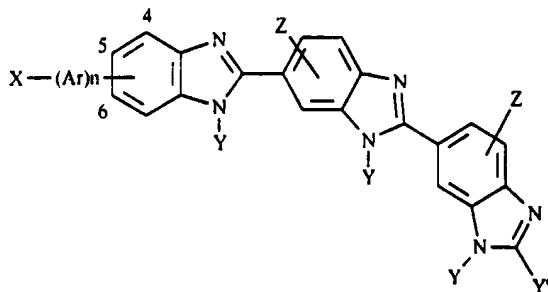
진균성 감염은 최근 20년간 날로 중요하게 대두되고 있으며 이는 이식 수용자 및, 암 및 AIDS 환자와 같은 면역질충된 환자에게 높은 치사율을 나타낸다. 증가하는 환자 인구 및 현재 항진균 화학요법에서의 몇몇 현존하는 문제점으로 인해 날로 증가하고 있는 중요한 부류의 기회 감염 치료를 위해 보다 효과적이고 안전한 항진균제를 요구하게 되었다. 사카로마이세스 세르비지애(Saccharomyces cerevisiae) 및 캔디다 알비칸스(Candida albicans)에서의 연구를 토대로 핵 진균성 토포이소머라제 I는 항진균제에 대한 분자 표적으로서 전망을 보여준다[문헌참조: J.M. Fostel et al., Antimicrob. Agents Chemother., 39, 586(1995); J.M. Fostel et al., Antimicrob. Agents Chemother., 36, 2131(1992)]. 에스. 세레비지애에서의 연구는 캄프토텍신에 대한 살진균성 표적으로서 토포이소머라제 I를 지목하였다[참조: J. Nitiss et al., PNAS USA, 85, 7501(1988)]. 씨. 알비칸스에서의 연구는 아미노카텍콜 A-3253에 대한 사람 및 캔디다 토포이소머라제 I의 민감성 차이를 입증하였다[참조: J.M. Fostel(1995) cited above].

아스퍼질러스 푸미가투스(Aspergillus fumigatus) 및 에이. 나이거(A. niger)는 2개의 중요한, 생명을 위협하는 전신성 사람 병원체이다. 이들 기회 감염을 앓는 환자의 치료를 위해 보다 효과적인 항진균제가 긴히 요구되고 있다.

발명의 요약

본 발명은 진균성 감염, 특히 전신 진균성 감염을 앓는 포유동물에게 유효량의 항진균성 화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 투여함을 포함하여 진균성 감염의 치료를 위한 치료학적 방법을 제공한다.

화학식 1



상기식에서,

Ar은 아릴 또는 질소-, 황- 또는 산소-함유 헤테로방향족 그룹이고;

X는 H, CN, CHO, OH, 아세틸, CF₃, O(C₁-C₄)알킬, NO₂, NH₂, 할로겐 또는 할로(C₁-C₄)알킬이고;

각각의 Y는 H, (C₁-C₄)알킬 또는 아르알킬이고;

Y'는 H, (C₁-C₄)알킬, 폐닐 또는 메톡시페닐이고;

각각의 Z는 개별적으로 H, (C₁-C₄)알킬, 할로겐 또는 할로(C₁-C₄)알킬이고;

n은 0 또는 1이다.

바람직하게, Ar은 폐닐과 같은 (C₆-C₁₂)아릴, 또는 1 내지 3개의 N, S 또는 비(non)-퍼옥사이드 0를 포함하는 5 내지 12원 헤테로아릴 그룹, 가장 바람직하게는 5 내지 6원 헤테로아릴 그룹이고, 이때 각각의 N은 비치환되거나 H, (C₁-C₄)알킬 또는 벤질로 치환된다. Ar은 나타낸바와 같이 벤조환의 4,5,6 또는 7번 위치, 바람직하게는 5번 위치에 존재할 수 있고 X는 Ar상에 임의의 가용한 위치에 존재할 수 있다. 4번, 7번 위치 및 5번, 6번 위치는 Y가 H인 경우 동등하다. 한 양태에 따라, Ar은 폐닐이고 X는 Cl 또는 Br이고 바람직하게는 파라 위치에 존재한다. 도식된 바와 같이 Z는 벤조 잔기상의 임의의 위치에 존재할 수 있다. Z는 바람직하게 H, 할로겐, CH₃ 또는 CF₃이다.

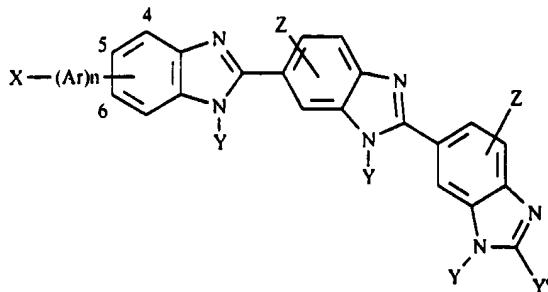
또 다른 양태에 따라, n은 0이고 X는 할로겐, 예를 들어, F, Br, Cl 또는 I, 바람직하게는 Cl 또는 Br이고, 바람직하게는 벤조잔기의 5번 위치에 존재할 수 있다. Y는 바람직하게 H 또는 CH₃이고, Y'는 바람직하게 H, CH₃, 에틸 또는 4-메톡시페닐이다.

니티딘 및 코랄린을 포함하는 사람 토포이소머라제 I의 다수의 공지된 억제제는 진균성 토포이소머라제 I에 대해 비효과적인 것으로 밝혀진 반면에 화학식 1의 화합물은 아스퍼질러스 토포이소머라제 I의 존재하에 DNA 절단을 촉진시키는 이의 능력에 의해 입증된 바와 같이 진균성 토포이소머라제 I의 억제제이다. 여기에 기술된 바와 같이, 예상치 않게 아스퍼질러스 효소가 니티딘 및 코랄린과 같은 가장 강력한 사람 토포이소머라제 I 독성제중 일부 및 덜 강력한 모노-벤즈이미다졸 사람 토포이소머라제 I 독성제에 대해 완전한 내성이 있는 것으로 밝혀졌다. 사람 또는 효모 토포이소머라제 I를 발현하는 효모를 사용한 연구는 효모 토포이소머라제 I가 이들 화합물에 대해 유사한 내성을 가지고 있다고 제안한다. 이것은 진균성 효소가 이의 약제 민감성에 있어서 사람 효소와는 실질적으로 상이함을 나타낸다.

추가로, 화학식 1의 화합물은 또한 캄프토텍신 민감성 및 캄프토텍신-내성 종양 세포 및 P-당단백질의 발현으로 인한 다중 약제 내성을 나타내는 종양 세포주를 포함하여 포유동물 종양 세포에 대해 세포독성이다. 따라서, 본 발명은 항암성 유효량의 화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포유동물(예: 사람)에게 투여함을 포함하여 암의 치료를 위한 치료학적 방법을 제공한다.

또한 본 발명은 신규한 화학식 1의 화합물을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 제공한다.

화학식 1



상기식에서,

Ar은 (C_6-C_{12})아릴 또는 1 내지 3개의 N, S 또는 비-퍼옥사이드 0를 포함하는 (5- 내지 12-원)헤테로아릴이고, 이때 N은 비치환되거나 H, (C_1-C_4)알킬 또는 벤질로 치환되고;

X는 H, CN, CHO, OH, 아세틸, CF_3 , O(C_1-C_4)알킬, NO_2 , NH_2 , 할로겐 또는 할로-(C_1-C_4)알킬이고;

각각의 Y는 H, (C_1-C_4)알킬 또는 아르알킬이고;

Y'는 페닐 또는 메톡시페닐이고;

각각의 Z는 개별적으로 H, (C_1-C_4)알킬, 할로겐 또는 할로-(C_1-C_4)알킬이고;

n은 0 또는 1이다.

바람직한 화합물은 Y'가 메톡시페닐인 화학식 1의 화합물이다. 또 다른 바람직한 화합물은 n이 1인 화학식 1의 화합물이다. 또 다른 바람직한 화합물은 X가 CN, CHO, OH, 아세틸, CF_3 , O(C_1-C_4)알킬, NO_2 , NH_2 , 할로겐 또는 할로-(C_1-C_4)알킬이고 n이 0인 화학식 1의 화합물이다. 또 다른 바람직한 화합물은 하나 이상의 Z가 할로겐 또는 할로-(C_1-C_4)알킬이고 n이 0인 화학식 1의 화합물이다.

본 발명은 또한 약제학적으로 허용되는 비하클과 배합된 하나 이상의 화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 전신 및 국부적 투여를 위해 사용되는 약제학적 조성물을 제공한다.

본 발명은 또한 진균성 감염을 치료하거나 암을 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 용도 뿐만 아니라 의학 치료(예: 진균성 감염 또는 암의 치료)에 사용하기 위한 화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 제공한다.

도면의 간단한 설명

도 1은 화합물 10 내지 16의 합성방법을 도식적으로 묘사하고 있다.

도 2는 본 발명의 화합물을 제조하기 위해 사용되는 중간체 4 내지 8의 제조방법을 도식적으로 묘사하고 있다.

도 3은 중간체 9의 제조방법을 도식적으로 묘사하고 있다.

도 4는 화합물 JSKIV-68, -37 및 -47의 합성방법을 도식적으로 묘사하고 있다.

도 5는 중간체 JSKIV-44의 제조방법을 도식적으로 묘사하고 있다.

도 6은 중앙 벤즈이미다졸 잔기상에서 변형된 동족체의 제조방법을 도식적으로 묘사하고 있다.

도 7은 Z 및 Y'가 상기 정의한 바와 같은 말단 벤즈이미다졸 잔기상에서 변형된 동족체의 제조 방법을 도식적으로 묘사하고 있다.

도 8은 사람 및 아스파질러스 토포이소머라제 1에 대한 다양한 제제의 활성을 요약하고 있다. 사람(H 칼럼) 및 아스파질러스(A 칼럼)에 대한 다양한 약제의 독성 활성은 질적으로 +(활성) 또는 -(비활성)으로 나타낸다. DM/11/33은 아스파질러스 토포이소머라제 1에 대해 매우 약한 활성을 나타내고 *로서 나타낸다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 화합물에 유용한 아릴 그룹(Ar)은 (C_6-C_{18})아릴, 바람직하게는 (C_6-C_{14})아릴, 예를 들어, 방향족 환을 포함하는 시스템을 포함하고 이때 시스템은 총 6 내지 12개의 탄소원자를 포함한다. 따라서, 본 원에 사용된 바와 같이 용어 '아릴'은 모노- 또는 비스-(C_1-C_4)알킬-치환된 아릴, 예를 들어 툴릴 및 크실릴; 아르(C_1-C_4)알킬, 예를 들어, 벤질 또는 펜에틸; 및 알크아르알킬을 포함한다. 바람직하게 아릴은 페닐, 벤질 또는 나프틸이다.

해테로방향족 환은 30이하의 환 해테로원자, 예를 들어, N, S 또는 비-페록사이드 0, 및 120이하의 환 원자를 포함하는 방향족 환을 포함한다. 대표적인 방향족 환은 티오펜, 벤조티오펜, 나프토티오펜, 트리안트렌, 푸란, 벤조푸란, 이소벤조푸란, 피란, 크로멘, 산텐, 페녹사티인, 피롤, 이미다졸, 피라졸, 피리딘, 피라진, 트리아졸, 테트라졸, 피라진, 트리아진, 피리미딘, 피리다진, 인돌리진, 이소인돌, 인돌, 인다졸, 퓨린, 퀴놀리진, 이소퀴놀린, 퀴놀린, 프탈라진, 나프티리딘, 퀴녹살린, 퀴나졸린, 신놀린, 프테리딘, 카르바졸, 카르볼린, 페난트리딘, 아크리딘, 펜안트롤린, 펜아진, 이소티아진, 페노티아진, 옥사졸, 이속사졸, 푸라잔 및 페녹사진등을 포함한다. 바람직한 해테로방향족 환은 5- 또는 6-원 해테로방향족 환을 가질수 있고 이것은 벤조 환, 예를 들어, 바람직한 2-, 3- 또는 4-피리딜 치환체와 같은 방향족 환과 융합되거나 융합되지 않을 수 있다.

용어 '알킬'은 직쇄 또는 측쇄 알킬 뿐만 아니라 사이클로알킬 및 (사이클로알킬)알킬, 예를 들어, 메틸, 에틸, i-프로필, 사이클로프로필 또는 사이클로프로필메틸을 포함한다.

메톡시페닐은 2-, 3-, 또는 4-메톡시페닐을 포함한다.

약제학적으로 허용되는 염은 유기산 또는 무기산과 염기성 NH와의 산 부가염, 예를 들어, 염화수소, 탄산염, 황산염, 중탄산염, 아세테이트, 포스페이트, 타르타레이트, 시트레이트, 말레이트, 말리에이트 및 프로피오네이트염등을 포함한다.

대표적인 치환된 트리스벤즈이미다졸의 제조 방법은 도 1에 명시되어 있다. 시판되고 있는 페닐렌디아민을 제외하고, 적절히 치환된 페닐렌디아민은 각각의 o-니트로아닐렌 유도체의 촉매적 수소화에 의해 합성된다. 이들 페닐렌디아민을 150°C에서 5-포밀-2-(벤즈이미다조-5'-일)벤즈이미다졸 9와 함께 니트로벤젠 중에서 가열시켜 이들을 커플링시킴으로써 다양한 트리스벤즈이미다졸 10 내지 16을 수득하고 이의 수율은 43 내지 96%이며 문헌[참조: M.P.Singh et al., *Chem. Res. Toxicol.*, 5, 597(1992) and Y. Bathini et al., *Synth Comm.*, 20, 955(1990)]의 일반적인 방법을 사용한다.

시판되고 있는 화합물 3을 제외하고 도 1에 명시된 바와 같은 요구되는 니트로아닐린은 4-브로모-2-니트로아닐린 17로부터 합성된다. 화합물 17은 브롬화제로서 2,4,4,6-테트라브로모-2,5-사이클로헥사디에논을 사용하여 우수한 수율인 94%로 o-니트로아닐린으로부터 제조된다[참조문헌: G.J.Fox et al., *Org. Syn.*, 55, 20(1973)]. 알릴트리부틸린 및 페닐트리부틸린이 시판되고 있는 반면에 피리딜트리부틸린 유도체는 각각 트리부틸린 클로라이드 및 2-, 3-, 및 4-브로모피리딘으로부터 제조된다[참조문헌: D. Peters et al., *Heterocyclic Chem.*, 27, 2165(1990)]. 이들 트리부틸린 유도체를 도2에 명시된 바와 같이 촉매로서 $PdCl_2(PPh_3)_2$ 를 사용하여 4-브로모-2-니트로아닐린과 커플링시켜 각각 화합물 4, 5, 6, 7 및 8을 수득하고 이것은 문헌[M. Iwao et al., *Heterocycles*, 36, 1483(1993)]의 방법에 따른다. 이러한 방법은 일반적으로 상응하는 브로모니트로아닐린으로부터 3-, 4-, 5- 또는 6-아릴- 및 해테로아릴-치환된 2-니트로아닐린을 제조하기 위해 적용될 수 있다.

5-포르밀-2-(벤즈이미다조-5'-일)벤즈이미다졸 9는 도 3에 명시된 바와 같이 제조된다. 5-벤즈이미다졸 카복실산의 5-하이드록시메틸벤즈이미다졸로의 환원은 $LiAlH_4$ 를 사용하여 수행된다. 수득한 조 벤질 알콜을 테트라프로필암모늄 퍼루테네이트(TPAP) 및 N-메틸모르폴린 N-옥사이드를 사용하여 2단계로 산화시켜 총 수율 32%로 목적하는 5-포밀벤즈이미다졸을 수득한다[참조문헌: A. Cherif et al., *J. Med. Chem.*, 35, 3208(1992)]. 5-포르밀벤즈이미다졸을 4-시아노-1,2-페닐렌디아민과 커플링시켜 5-시아노-2-(벤즈이미다조-5'-일)벤즈이미다졸 19를 수득하고 수성 포름산의 존재하에 $Ni-Al$ 촉매를 사용하여 처리되는 경우 5-포르밀-2-(벤즈이미다조-5'-일)벤즈이미다졸 9가 수율 65%로 수득된다[참조문헌: J.R.Pipier et al., *J. Med. Chem.*, 31, 2164(1988)].

본 발명의 화합물은 약제학적 조성물로서 제형화될 수 있고 선택된 투여 경로에 따라 다양한 형태, 예를 들어, 경구적으로 또는 비경구적으로, 정맥내, 근육내, 국소적 또는 피하 경로로 전신성 또는 국부적 진균성 감염을 앓는 면역억제된 사람 환자와 같은 포유동물 숙주에 투여된다.

따라서, 본 발명의 화합물은 불활성 희석제 또는 동화성 식용 담체와 같은 약제학적으로 허용되는 비히클과 배합되어 전신적으로, 예를 들어, 경구적으로 투여될 수 있다. 이들은 경질 또는 연질 쉘 젤라틴 캡셀내에 함유될 수 있고 정제로 압착될 수 있거나 직접 환자의 음식물에 혼입될 수 있다. 경구적인 치료학적 투여를 위해, 활성 화합물은 하나 이상의 부형제와 배합될 수 있고 소화성 정제, 부くる 정제, 트로키제, 캡슐제, 엘릭시르제, 혼탁제, 시럽 및 웨이퍼등의 형태로 사용될 수 있다. 상기 조성물 및 제제는 0.1% 이상의 활성 화합물을 포함해야만 한다. 조성물 및 제제의 %는 물론 다양할 수 있고 간편하게 주어진 단위 투여 형태의 중량당 약 2 내지 60%일 수 있다. 상기 치료학적으로 유용한 조성물에서 활성 화합물의 양은 유효 투여 농도가 수득되는 양이다.

정제, 트로키, 환제 및 캡슐제등은 또한 하기의 성분을 포함할 수 있다: 결합제, 예를 들어, 겔 트라가칸트, 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴; 부형제, 예를 들어, 인산이칼슘; 봉해제, 예를 들어, 옥수수 전분, 감자 전분 및 알긴산등; 윤활제, 예를 들어, 마그네슘 스테아레이트; 및 감미제, 예를 들어, 슈크로스, 락토스 또는 사카린; 또는 방향제, 예를 들어, 페퍼민트, 원터그린 오일 또는 체리향이 첨가될 수 있다. 단위 투여 형태가 캡슐제인 경우, 상기 유형의 물질 뿐만 아니라 식물성 오일 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 액상 담체를 포함할 수 있다. 다양한 또 다른 물질이 제피제로서 존재하거나 이와는 달리 고체 단위 투여 형태의 물리적 형태를 개질시키기 위해 존재할 수 있다. 예를 들어, 정제, 환제 또는 캡슐제가 젤라틴, 왁스, 헬락 또는 슈거등을 사용하여 코팅될 수 있다. 시럽 또는 엘릭시르는 활성 화합물, 감미제로서 슈크로스, 방부제로서 메틸 및 프로필파라벤, 체리 또는 오렌지 향의 향제 및 염료를 포함할 수 있다. 물론, 임의의 단위 투여 형태를 제조하기 위해 사용되는 임의의 물질은 사용되는 양에서 약제학적으로 허용되어야만 하고 실질적으로 비독성이어야만 한다. 추가로, 활성 화합물은 서방성 제제 및 장치에 혼입될 수 있다.

활성 화합물은 또한 주입 또는 주사에 의해 정맥내 또는 복강내로 투여될 수 있다. 활성 화합물 또는 이의 염의 용액은 물중에서 경우에 따라 비독성 계면활성제와 혼합되어 제조될 수 있다. 분산제는 또한 글리세롤, 액상 폴리에틸렌 글리콜, 트리아세틴 및 이의 혼합물 및 오일중에서 제조될 수 있다. 저장 및

사용을 위한 통상적인 조건하에서 이들 제제는 방부제를 포함하여 미생물의 증식을 예방한다.

주사 또는 주입에 적합한 약제학적 투여 형태는 살균된 주사용 또는 주입용 용제 또는 분산제의 임시 제조를 위해 사용되고 경우에 따라 리포좀 내에서 캡슐화되는 활성 성분을 포함하는 살균된 수성 용제 또는 분산제 또는 살균된 산제를 포함할 수 있다. 모든 경우에, 궁극적인 투여 형태는 살균되어야만 하고 제조 및 저장 조건하에서 유동성이 안정해야만 한다. 수성 담체 또는 비히클은 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액상 폴리에틸렌 글리콜등), 식물성 오일, 비독성 글리세릴 에스테르 및 적합한 이의 혼합물을 포함하는 용매 또는 액상 분산 매질일 수 있다. 적당한 유동성은 예를 들어, 리포좀의 형성, 분산제의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지 또는 계면활성제의 사용으로 유지될 수 있다. 미생물 작용은 다양한 항세균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산 및 티머로살등을 사용하여 예방될 수 있다. 많은 경우에, 등장제, 예를 들어, 슈거, 완충제 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직하다. 흡수를 자연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 겔라틴을 조성물에 사용함으로써 주사용 조성물의 흡수를 자연시킬 수 있다.

살균된 주사용 용제는 요구되는 양의 활성 화합물을 요구되는 바와 같이 상기 열거된 다양한 또 다른 활성 성분과 함께 적당한 용매중에 혼입시키고 필터로 살균시킴으로써 제조된다. 살균된 주사용 용제의 제조를 위한 살균된 산제의 경우에 바람직한 제조 방법은 진공 건조 및 동결 건조 기술이며 이것은 이전에 살균 여과된 용액중에 존재하는 임의의 추가의 목적하는 성분 및 활성 성분의 산제를 수득케한다.

국부적 투여를 위해, 본 발명의 화합물은 예를 들어, 이들이 액체인 경우 순수한 형태로 투여될 수 있다. 그러나 일반적으로 이들을, 고체 또는 액체일 수 있는, 피부학적으로 허용되는 담체와 배합하여 조성물 또는 제제로서 피부에 투여하는 것이 바람직하다.

유용한 고체 담체는 미분된 고체, 예를 들어, 탈크, 점토, 미세결정질 셀룰로즈, 실리카 및 알루미나등을 포함한다. 유용한 액체 담체는 물, 알콜 또는 글리콜 또는 물-알콜/글리콜 혼합물을 포함하고 이때 본 발명의 화합물은 경우에 따라 비독성 계면활성제 보조제와 함께 효과적인 농도에서 용해되거나 분산될 수 있다. 향제 및 추가의 항미생물제와 같은 애쥬반트가 첨가되어 주어진 용도에 대한 특성을 최적화시킬 수 있다. 수득한 액체 조성물은 흡수용 패드로 적용될 수 있고 밴드 및 또 다른 드레싱에 사용되거나 펌프형 또는 에어로졸 분무기를 사용하여 영향받은 영역상에 분무될 수 있다. 액체 조성물은 또한 점안액, 구강 청정제 및 관주액으로서 사용될 수 있다. 항세균제로 미리 포화된 와이프는 문헌[참조: Anderson(미국 특허 제4,896,768호)]에 기술되어 있다.

합성 중합체, 지방산, 지방산염 및 에스테르, 지방 알콜, 개질된 셀룰로즈 또는 개질된 미네랄 물질과 같은 증점제는 또한 사용자의 피부에 직접 적용시키기 위해 액체 담체와 함께 사용되어 분산성 호상제, 겔, 연고제 및 비누등을 형성할 수 있다.

화학식 I의 화합물을 피부에 전달하는데 사용될 수 있는 유용한 피부학적 조성물의 또 다른 예는 문헌[참조: Jacquet et al(미국 특허 제4,608,392호), Geria(미국 특허 제4,992,478호), Smith et al(미국 특허 제4,559,157호) 및 Wortzman(미국 특허 제4,820,508호)]에 기술되어 있다.

화합물 1의 유용한 투여량은 동물 모델에서 시험관내 활성과 생체내 활성을 캄프토텍신[문헌참조: B.C. Giovannella et al., Cancer Res., 51, 3052(1991)] 또는 퀘스트 33342[문헌참조: A. Y. Chen et al., Cancer Res., 53, 1332(1993)]의 동일 투여량의 활성과 비교하여 결정될 수 있다. 마우스 및 또 다른 동물에서의 유효 투여량을 사람에게 외삽하기 위한 방법은 당해 기술분야에 공지되어 있다[문헌참조: 미국 특허 제4,938,949호].

일반적으로, 로션과 같은 액상 조성물중에 화학식 I의 화합물의 농도는 약 0.1 내지 25중량%, 바람직하게는 약 0.5 내지 10중량%이다. 겔 또는 산제와 같은 반고체 또는 고체 조성물의 농도는 약 0.1 내지 5중량%, 바람직하게는 약 0.5 내지 2.5중량%이다. 주사용, 주입용 또는 소화용 단일 투여량은 일반적으로 50 내지 1500mg이고 예를 들어, 성인에 대해 하루 1 내지 3회, 약 0.5 내지 50mg/kg의 농도로 투여될 수 있다.

본 발명의 테르벤즈이미다졸은 특히 전신 진균성 감염 또는 '디프 마이코스(deep mycoses)'를 치료하는데 유용하다. 상기 감염은 콕시디오아이디즈진균증, 크로모블라스토마이코시스증, 효모균증, 전신성 모닐리아증, 히스토플라스마증, 국균증, 로도토콜라증, 스포로트리콤증, 파라콕시디오이드증, 조균증, 분아진균증 및 칸디다증을 포함한다. 민감한 진균류는 캔디다(모닐리아) 알비칸스를 포함하고 이는 호흡기, 위장 및 여성 생식기 점막의 정상적인 세균군(*flora*)의 일원이다. 이들 및 또 다른 위치에서 이것은 우세하게 됨에 따라 병리학적 증상과 연관될 수 있다. 때때로 이것은 쇠약해지거나 면역억제된 환자에서 전신의 진행성 질환을 발병시킨다. 캔디다는 혈류 감염, 혈전 정맥염, 심내막염 또는 정맥내(튜빙, 바늘, 과영양, 마약중독등)로 도입되는 경우 눈 및 또 다른 기관의 감염을 일으킬 수 있다. 또 다른 효모[토콜로프시스 글라브라타(*torulopsis glabrata*)]는 유사한 환경하에서 병원체 일 수 있다.

본 발명의 화합물은 또한 크립토코커스 네오포르만스(*cryptococcus neoformans*) 감염에 대해 사용될 수 있다. 진균류는 흙에 자유 서생하고 있으며 흔히 비둘기 배설물에서 발견된다. 남성에게서 주요 폐 감염을 일으켜 때때로 치명적인 뇌막염을 일으킬 수 있다.

블라스토마이세스(아이엘로마이세스)더마티티디스 감염은 또한 억제될 수 있다. 상기 진균류는 만성 육아종증 질환, 북아메리카 분아진균증을 일으킬 수 있고 이것은 피부 또는 폐에 국한되거나 신체에 광범위하게 분포할 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 중앙 남부 아메리카 분아진균증(파라콕시디오이드 육종)을 일으키는 블라스토마이세스 브라질리엔시스(*Blastomyces brasiliensis*)에 대해 사용되거나 보통 호흡기를 통해 발생하여 임상의 폐렴 및 만성 질환이 될 수 있는, 에이춰. 캡슐라툼(*H. capsulatum*)에 의한 감염을 치료하는데 사용될 수 있다.

열, 권태감, 감기, 동통, 통증 및 발한 증세를 보이는 인플루엔자형 질환을 일으키고 콕시디오드 육종으로 불리우는 매우 치명적인 상태로 진행할 수 있는 콕시디오아이드 이미티스(*Coccidioides immitis*)에 의한 감염도 치료될 수 있다. 상기 화합물은 또한 기관지, 폐 및 점막의 감염으로 인한 지오토리쿰증을 일으

키는 효모형 진균류인 지오토리쿰 캔디덤(*Geotrichum candidum*), 동물 및 사람에게 있어서 피부, 림프관 및 또 다른 조직의 만성 육아육종 감염으로 인한 스포로ком증을 일으키는 진균류인 스포로트릭스(스포로트리쿰) 스켄키[*Sporothrix(Sporotrichum)schenkii*]에 대해 효과적이다. 본 발명의 화합물은 또한 리조푸스 종(*Rhizopus sp.*), 피알 뮤코종(*pr. Mucor sp.*)에 의해 유발되는 크로모블라스토진균증, 마두라진균증 및 조균증을 치료하는데 사용될 수 있다.

본 발명의 화합물은 특히 아스퍼질러스 종에 대해 효과적이다. 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*) 및 또 다른 아스퍼질러스 종(*Aspergillus sp.*)은 변형된 숙주에서 전신성 진균류 감염의 주요 원인이 되고 있다. 백혈병 또는 림프종을 앓는 환자, 면역억제된 사람(특히 AIDS 환자 또는 기관 이식을 받은 환자) 및 집중적인 코르티코이드 치료를 받은 환자가 특히 아스퍼질러스증에 민감하다. 진입구는 호흡기이고 대부분의 아스퍼지로시스증의 경우에 폐 발현은 주로 괴사성 기관지폐렴, 출혈성 폐 경색 또는 육종(아스퍼지로마종)을 일으킨다.

또한 본 발명의 화합물은 애완동물, 농장 동물 및 동물원 동물과 같은 동물 및 사람의 피부상에서 효모를 포함하는 진균류의 증식을 억제시키는데 유용하다. 상기 그람-양성 미생물은 사람 보통 여드름을 일으키는 주요 병원체인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)를 포함한다. 두부백선, 완백선(조크양진), 체부백선(윤선), 족부백선(운동선수의 발) 및 손톱백선을 포함하는, 동물 및 사람의 진균성 피부 감염도 치료될 수 있다. 피부사상균증과 연관된 진균류는 티. 멘타그로피테스(*T. mentagrophytes*), 엠. 아우데비니(*M. audevinii*), 티. 루브럼(*T. rubrum*), 이. 플로카섬(*E. floccosum*) 및 엠. 펠리네움(*M. pellineum*)을 포함한다.

본 발명의 화합물은 또한 체강막 감염과 연관된 진균류에 대해 효과적이다. 상기 감염은 백반창, 질염 및 손톱주위염을 포함한다[문헌참조: R.T. Yousef et al., *Mykosen*, 21, 190(1978) and H. Gershon, *J. Pharm. Sci.*, 68, 82(1979)]. 본 발명의 화합물은 또한 화장품 및 피부-세정 조성물(예: 비누, 샴푸, 방취제) 및 피부-연화 로션에 사용될 수 있고 이들은 예를 들어, 피부상에 냄새-원인 세균을 억제시키기 위해 방취제로서 작용할 수 있다. 본 발명의 화합물은 또한 샴푸, 린스 및 또 다른 모발 보호 상품에서 피티로스포룸 오발(*Pityrosporum ovale*)(면역억제된 환자의 피부 병변인 비듬)을 억제시키기 위해 사용될 수 있다.

본 발명의 동족체는 버키트 종양, 만성 임파구성 백혈병, 다발성 골수종, 판상 세포 및 거대 세포 퇴행성 암, 폐의 선암, 유월 육종, 비호지킨 임파종, 유방 종양, 결장 종양, 위종양, 귀리-세포 기관지원성 암, 경부의 판상 세포 암, 난소 종양, 방광 종양, 정소 종양, 자궁내막 종양, 악성 흑색종 및 급성 임파구성 백혈구 및 전립선암을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 토포이소머라제 I 억제제에 민감한 것으로 공지된 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물은 단일 제제 또는 이들 암을 치료하는데 일반적으로 사용되는 항신생물성 약제와 배합되어 투여될 수 있다.

본 발명은 추가로 하기의 상세한 실시예를 참조로하여 기술되며 여기서, 융점은 토마스-후버 유니멜트 모세혈관 융점 장치(Thomas-Hoover unimelt capillary melting point apparatus)를 사용하여 결정된다. 적외선 스펙트럼 데이터(IR)는 퍼킨-엘머 1600 푸리어 트랜스폼 분광광도계(Perkin-Elmer 1600 Fourier transform spectrophotometer)상에서 수득되고 cm^{-1} 로 기록된다. 프로톤(^1H NMR) 및 탄소(^{13}C NMR) 핵 자기 공명은 버라이언 제미니-200 푸리어 트랜스폼 분광계(Varian Gemini-200 Fourier Transform spectrometer)상에서 기록된다. NMR 스펙트럼($200\text{MHz}^1\text{H}$ 및 $50\text{MHz}^{13}\text{C}$)은 테트라메틸실란(TMS)으로부터 δ 단위 다운필드로 기록되는 화학 전이를 사용하여 CDCl_3 (또 다른 언급이 없는 경우)로 기록된다. 커플링 상수는 헤르츠로 기록된다. 질량 스펙트럼은 네브라스카-링컨 대학의 화학부에 속하는 미드웨스트 센터 포 매스 스펙트로메트리(Midwest Center for Mass Spectrometry)로부터 수득된다. 발광분석은 연구기관(Atlantic Microlabs, Inc., Norcross, GA)에 의해 분석되고 $\pm 0.04\%$ 범위내에 있다. THF는 사용전에 나트륨 및 벤조페논으로부터 새롭게 증류된다. 알릴트리부틸린 및 페닐트리부틸린은 제조원(Aldrich Chemical Company)로부터 구입한다.

아스퍼질러스 니둘란스 균주 R21(*pabaA1, yA2*)은 실시예 전반에 걸쳐 사용된다. 비벤즈이미다졸 퀼스트 염료 33342(Ho33342), 캄프토텍신 및 베레닐은 제조원(Sigma Chemical Co.)으로부터 구입한다. 모노벤즈이미다졸(QS/II/9, 48, 50, 51 및 59A), 테르벤즈이미다졸(11 및 13) 및 프로토베르베린(코랄린, DMII/33) 및 니티딘은 하기에 기술된 바와 같이 합성된다[참조문헌: Q. Sun et al., *Biorg. & Med. Chem. Lett.*, 4, 2871(1994). and J. Med. Chem., 38, 3638(1995); Kim et al., *Biorg. & Med. Chem. Lett.*, 4, 62(1996); J. Med. Chem., 39, 992(1996); D. Makhey et al., *Med. Chem. Res.*, 5, 1(1995); *Biorg. & Med. Chem. Lett.*, 4, 781(1996)](구조에 관한 도 8 참조). 모든 약제는 디메틸 셀록사이드(제조원: Sigma Chemical Co)중에 1, 5 또는 $10\text{mg}/\text{ml}$ 의 농도로 용해시키고 -20°C 에서 적정액으로 동결된 상태로 유지한다.

실시예 1

주석 화합물과 4-브로모-2-니트로아닐린(13)과의 $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ -촉매된 커플링 반응을 위한 일반적인 방법

(A) 4-페닐-2-니트로아닐린(5).

DMF(15ml)중의 4-브로모-2-니트로아닐린 17(1.0g, 4.67mmol), 트리부틸페닐 주석(2.2g, 6.07mmol), 비스(트리페닐포스핀)팔란듐(II) 클로라이드(164mg, 0.234mmol) 및 트리페닐포스핀(613mg, 2.34mmol)을 120°C 에서 끌새 가열시킨다. 용액을 실온으로 냉각시킨후에 반응 혼합물을 직접 2 내지 5% $\text{EtOAc}/\text{Hexane}$ 으로 용출시키는 실리카 겔상에서 크로마토그래프하여 황색 고체로서 화합물 5 752mg(75%)를 수득한다: 융점 169 내지 171°C

IR(CHCl_3) 3517, 3398, 3022, 1635, 1525, 1250;

^1H NMR δ 8.38(1H, d, $J=2.2$), 7.66(1H, dd, $J=8.7, 2.2$), 7.59–7.54(2H, m), 7.49–7.34(3H, m),

6.90(1H, d, $J=8.8$), 6.13(NH, brs), ^{13}C NMR δ 144.2, 139.3, 135.0, 130.9, 129.5, 127.8, 126.8, 124.4, 119.8, 112.8;

$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ 에 대한 분석치:

계산치: C, 67.28; H, 4.70; N, 13.08.

실측치: C, 67.38, H, 4.76; N, 13.01.

(B) 4-알릴-2-니트로아닐린(4).

이것은 화합물 5에 대해 상기 기술된 바와 같이 96%의 수율로 황색 고체로서 4-브로모-2-니트로아닐린 17(1.70g, 7.84mmol) 및 알릴트리부틸린(3.38g, 10.2mmol)으로부터 제조된다: 융점 29 내지 31°C

IR(KBr) 3490, 3374, 1638, 1518, 1341, 1253;

^1H NMR δ 7.90(1H, d, $J=2.0$), 7.19(1H, dd, $J=8.5, 2.0$), 6.77(1H, d, $J=8.5$), 6.05(NH, brs), 6.00 – 5.80(1H, m), 5.11(1H, dd, $J=1.4, 1.4$), 5.04(1H, ddd, $J=6.6, 3.0, 1.5$), 3.28(1H, d, $J=6.6$); ^{13}C NMR δ 143.81, 137.13, 129.34, 125.59, 119.49, 116.95, 39.18;

$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ 에 대한 HRMS(EI) 계산치: 178.0742, 실측치: 178.0746.

(C) 4-(2'-피리딜)-2-니트로아닐린(6).

이것은 화합물 5에 대해 상기 기술된 바와 같이 52%의 수율로 황색 고체로서 4-브로모-2-니트로아닐린 17(597mg, 2.75mmol) 및 2-트리부틸스타닐피리딘(1.01g, 2.75mmol)으로부터 제조된다: 융점 146 내지 148°C

IR(CHCl_3) 3516, 3397, 3020, 1634, 1524, 1341, 1250; ^1H NMR δ 8.74(1H, d, $J=2.2$), 8.63(1H, dd, $J=4.9, 1.5$), 8.13(1H, dd, $J=8.8, 2.1$), 7.78–7.66(2H, m), 7.20(1H, ddd, $J=4.8, 4.7, 1.9$), 6.92(1H, d, $J=8.8$), 6.37(NH, brs); ^{13}C NMR δ 155.6, 150.1, 145.6, 137.4, 134.5, 129.1, 124.7, 122.4, 119.8, 119.7;

$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ 에 대한 분석치:

계산치: C, 61.39; H, 4.21; N, 19.53.

실측치: C, 61.29; H, 4.23; N, 19.43.

(D) 4-(3'-피리딜)-2-니트로아닐린(7).

이것은 화합물 5에 대해 상기 기술된 바와 같이 32%의 수율로 황색 고체로서 4-브로모-2-니트로아닐린 17(1.42g, 6.53mmol) 및 3-트리부틸스타닐피리딘(3.60g, 9.79mmol)으로부터 제조된다: 융점 177 내지 179°C

IR(CHCl_3) 3515, 3399, 3052, 2983, 1638, 1524, 1341, 1259; ^1H NMR δ 8.68(1H, d, $J=1.7$), 8.42(1H, dd, $J=4.8, 1.5$), 8.22(1H, d, $J=2.2$), 7.74(1H, ddd, $J=7.9, 2.4, 1.6$), 7.50(1H, dd, $J=8.7, 2.2$), 7.23(1H, ddd, $J=8.0, 4.8, 0.8$), 6.92(1H, d, $J=8.8$), 6.56(NH, brs); ^{13}C NMR δ 148.7, 147.8, 145.4, 135.0, 134.4, 133.8, 126.5, 124.4, 124.0, 120.4;

$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ 에 대한 분석치:

계산치: C, 61.39; H, 4.21; N, 19.53.

실측치: C, 61.28; H, 4.16; N, 19.40.

(E) 4-(4'-피리딜)-2-니트로아닐린(8).

이것은 화합물 5에 대해 상기 기술된 바와 같이 25%의 수율로 황색 고체로서 4-브로모-2-니트로아닐린 17(165mg, 0.76mmol) 및 4-트리부틸스타닐피리딘(280mg, 0.76mmol)로 부터 제조된다. 융점: 230 내지 232°C

IR(CHCl_3) 3518, 3398, 3032, 1636, 1528, 1344; ^1H NMR(CD_3OD) δ 8.55(2H, d, $J=6.3$), 8.52(1H, d, $J=2.3$), 7.84(1H, dd, $J=8.9, 2.3$), 7.71(2H, d, $J=6.4$), 7.13(1H, d, $J=8.9$); ^{13}C NMR(CD_3OD) δ 149.4, 133.4, 124.0, 120.7, 120.0; $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2$ 에 대한 HRMS(EI) 계산치: 215.0695, 실측치: 215.0698.

실시예 2

5-포르밀-2-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸(9)

5-시아노-2-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸 19(148mg, 0.57mmol), Ni-Al 촉매(500mg), 포름산(7ml) 및 물(3ml)의 혼합물을 4시간동안 N₂하에 가열하여 환류시킨다. 고온의 반응 혼합물을 즉시 셀리트 플러그를 통하여 여과시키고 증발시켜 황색 고체를 수득한다. 황색 고체를 고온의 물(5ml)중에 용해시키고 용액을 2N NaOH를 사용하여 pH 9로 중성화시킨다. 침전된 고체를 흡입 여과에 의해 수거하고 추가로 실리카겔(15% MeOH/EtOAc)상에서 성광 크로마토그래피로 정제하여 백색 고체로서 화합물 9 142mg(95%)을 수득한다. 융점 > 275°C

IR(KBr) 3106, 2835, 1685, 1618, 1432, 1293; ¹H NMR(CD₃OD) δ 10.01(1H, s), 8.39(1H, s), 8.35(1H, s), 8.13(1H, s), 8.06(1H, dd, J=8.6, 1.6), 7.83(1H, dd, J=8.4, 1.4), 7.77(1H, d, J=8.5), 7.71(1H, d, J=8.3);

C₁₅H₁₁N₄O에 대한 HRMS(FAB) 계산치: 263.0933, 실측치: 263.0932.

실시예 3

5-치환된 트리스벤즈이미다졸을 제조하기 위한 일반적인 방법.

(A) 2-[2'-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸-5'-일]벤즈이미다졸(10)

니트로벤젠(8ml)중의 5-포르밀-2-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸 9(121mg, 0.46mmol) 및 페닐렌디아민(60mg, 0.55mmol)을 N₂하에 150°C에서 밤새 가열한다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고 실리카겔(0 내지 20% MeOH/EtOAc)상에서 크로마토그래피하여 고체로서 화합물 10 155mg(96%)을 수득한다: 융점 > 275°C

IR(KBr) 3400, 3157, 1630, 1542, 1438, 1294; ¹H NMR(DMSO-d₆ + 3 drops of CF₃COOH) δ 9.71(1H, s), 8.75(1H, s), 8.65(1H, d, J=1.1), 8.48(1H, dd, J=8.7, 1.5), 8.21(1H, dd, J=8.6, 1.6), 8.14(1H, d, J=8.8), 8.08(1H, d, J=8.7), 7.90(2H, dd, J=6.2, 3.1), 7.61(2H, dd, J=6.1, 3.1); ¹³C NMR(DMSO-d₆ + 3 drops of CF₃COOH) δ 154.4, 149.8, 133.2, 132.0, 131.7, 126.2, 125.5, 125.4, 123.9, 123.6, 116.3, 115.9, 114.23, 114.17, 114.13;

C₂₁H₁₅N₆O에 대한 HRMS(FAB) 계산치: 351.1358, 실측치: 351.1367.

(B) 5-시아노-2-[2'-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸-5'-일]벤즈이미다졸(11).

화합물 3(70mg, 0.43mmol)을 EtOAc(10ml)중에서 10% Pd-C(30mg)을 사용하여 1시간동안 실온에서 40psi H₂에서 수소화시킨다. 반응 혼합물을 여과시키고 진공 농축시켜 고체를 수득한다. 니트로벤젠(5ml)중의 상기 고체 및 화합물 9(87mg, 0.33mmol)의 용액을 N₂하에 150°C에서 밤새 가열시킨다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고 직접 실리카겔(0 내지 10% MeOH/EtOAc)상에서 크로마토그래피하여 고체로서 화합물 11 107mg(86%)을 수득한다.; 융점 > 280°C

IR(KBr) 3416, 3148, 2222, 1626, 1553, 1441, 1292, ¹H NMR(DMSO-d₆ + 3 드롭 CF₃COOH) δ 8.50(1H, s), 8.46(1H, s), 8.40(1H, s), 8.18-8.11(3H, m), 7.81-7.75(3H, m), 7.62(1H, dd, J=8.3, 1.5);

C₂₂H₁₃N₇O에 대한 HRMS(FAB) 계산치: 376.1310, 실측치: 376.1309.

(C) 5-프로필-2-[2'-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸-5'-일]벤즈이미다졸 (12).

이것은 화합물 11에 대해 상기 기술한 바와 같이 고체로서 79%의 수율로 4-알릴-2-니트로아닐린 4(312mg, 1.75mmol) 및 5-포르밀-2-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸 9(121mg, 0.46mmol)로부터 제조된다: 융점 > 270°C

IR(KBr) 3421, 3068, 2957, 1434; ¹H NMR(DMSO-d₆ + 3 드롭 CF₃COOH) δ 9.66(1H, s), 8.73(1H, s), 8.59(1H, s), 8.48(1H, dd, J=8.7, 1.5), 8.13(1H, dd, J=8.7, 1.4), 8.11(1H, d, J=8.7), 8.02(1H, d, J=8.5), 7.79(1H, d, J=8.4), 7.66(1H, s), 7.45(1H, dd, J=8.5, 1.3), 2.80(2H, t, J=7.0), 1.70(2H, m), 0.96(3H, t, J=7.2); ¹³C NMR(DMSO-d₆ + 3 드롭 CF₃COOH) δ 153.84, 149.74, 141.64, 141.01, 139.37, 133.10, 132.26, 131.99, 130.34, 127.08, 126.26, 125.14, 141.64, 141.01, 139.37, 133.10, 132.26, 131.99, 130.34, 127.08, 126.26, 125.14, 122.91, 117.52, 116.32, 116.06, 115.76, 113.78, 112.99, 37.45, 24.73, 13.74.

(D) 5-페닐-2-[2'-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸-5'-일]벤즈이미다졸(13).

이것은 화합물 11에 대해 상기 기술한 바와 같이 고체로서 89% 수율로 4-페닐-2-니트로아닐린 5(247mg, 1.15mmol) 및 5-포밀-2-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸 9(201mg, 0.77mmol)로부터 제조된다: 융점 262 내지 164°C(분해)

IR(KBr) 3402, 3104, 1627, 1552, 1442, 1290; ¹H NMR(DMSO-d₆ + 3 드롭 CF₃COOH) δ 9.66(1H, s), 8.74(1H, s), 8.65(1H, s), 8.50(1H, dd, J=8.8, 1.1), 8.21(1H, dd, J=8.7, 1.4), 8.12(1H, d, J=8.8),

8.06(1H, s), 8.05(1H, d, $J=8.4$), 7.97(1H, d, $J=8.7$), 7.89(1H, dd, $J=8.7, 1.5$), 7.80(2H, d, $J=7.0$), 7.61–7.47(3H, m); $C_{27}H_{19}N_6$ 에 대한 HRMS(FAB) 계산치: 427.1671, 실측치: 427.1666.

(E) 5-(2-피리딜)-2-[2'-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸-5'-일]벤즈이미다졸 (14).

이것은 화합물 11에 대해 상기 기술한 바와 같이 고체로서 84%의 수율로 4-(2'-피리딜)-2-니트로아닐린 6(110mg, 0.50mmol) 및 5-포르밀-2-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸 9(51mg, 0.25mmol)로 부터 제조된다; 융점 > 275°C.

IR(KBr) 3411, 3157, 1630, 1593, 1432; 1H NMR(CD₃OD) δ 8.59(1H, d, $J=4.8$), 8.35(1H, s), 8.31–8.25(2H, m), 8.10(1H, s), 8.04–7.94(2H, m), 7.85–7.77(3H, m), 7.72(1H, d, $J=8.6$), 7.68(1H, d, $J=8.7$), 7.64(1H, d, $J=8.7$), 7.30(1H, m); $C_{26}H_{18}N_7$ 에 대한 HRMS(FAB) 계산치: 428.1624, 실측치: 428.1611.

(F) 5-(3-피리딜)-2-[2'-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸-5'-일]벤즈이미다졸 (15).

이것은 화합물 11에 대해 상기 기술한 바와 같이 고체로서 46%의 수율로 4-(3'-피리딜)-2-니트로아닐린 7(183mg, 0.85mmol) 및 5-포르밀-2-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸 9로부터 제조한다; 융점 > 275°C.

IR(KBr) 3400, 3070, 2836, 1438, 1289; 1H NMR(CD₃OD) δ 8.83(1H, d, $J=1.6$), 8.49(1H, dd, $J=4.9, 1.5$), 8.38(1H, d, $J=1.1$), 8.31(1H, d, $J=1.1$), 8.29(1H, s), 8.11(1H, ddd, $J=8.0, 2.3, 1.6$), 8.05(1H, dd, $J=8.5, 1.6$), 8.00(1H, dd, $J=8.5, 1.6$), 7.81(1H, d, $J=1.1$), 7.77–7.68(3H, m), 7.55–7.47(2H, m);

$C_{26}H_{18}N_7$ 에 대한 HRMS(FAB) 계산치: 428.1624, 실측치: 428.1612.

(G) 5-(4-피리딜)-2-[2'-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸-5'-일]벤즈이미다졸 (16).

이것은 화합물 11에 대해 상기 기술한 바와 같이 고체로서 43%의 수율로 4-(4'-피리딜)-2-니트로아닐린 8(35mg, 0.16mmol) 및 5-포르밀-2-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸 9(50mg, 0.19mmol)로부터 제조된다; 융점 > 280°C.

IR(KBr) 3411, 3118, 1600, 1552, 1439, 1290; 1H NMR(CD₃OD) δ 8.51(2H, d, $J=6.2$), 8.33(1H, d, $J=1.1$), 8.27(1H, s), 8.25(1H, d, $J=1.1$), 8.01(1H, dd, $J=8.6, 1.7$), 7.96(1H, dd, $J=8.9, 2.0$), 7.87(1H, d, $J=1.0$), 7.74–7.56(6H, m); $C_{26}H_{18}N_7$ 에 대한 HRMS(FAB) 계산치: 428.1624, 실측치: 428.1625.

실시예 4

4-브로모-2-니트로아닐린(17)

CH_2Cl_2 (100mL) 중의 2-니트로아닐린(5g, 36.2 mmol)의 용액을 -10°C로 냉각시키고 5개의 분획으로 90%의 2,4,4,6-테트라브로모-2,5-사이클로헥사디에논(19.8g, 43.5mmol)으로 처리한다. 혼합물을 1시간동안 -10°C 내지 0°C에서 교반시킨다. 실온으로 가온시킨후에 반응 혼합물을 2N NaOH(60mL) 및 염수(50mL)로 세척하고 Na_2SO_4 로 건조시키고 증발시킨다. 실리카 겔(5% EtOAc/헥산)상에서 성광 크로마토그래피하여 황색 고체로서 화합물 17 7.40g(94%)를 수득한다; 융점: 109 내지 110(1lit, 융점 112 내지 113°C)

1H NMR δ 8.27(1H, d, $J=2.3$), 7.43(1H, dd, $J=8.9, 2.4$), 6.73(1H, d, $J=8.8$), 6.09(NH, brs).

실시예 5

5-포르밀벤즈이미다졸(18).

무수 THF(50mL) 중의 5-벤즈이미다졸카복실산(1.57g, 9.7mmol)의 혼탁액을 N_2 하에 -78°C로 냉각시키고 $LiAlH_4$ (736mg, 19.4mmol)로 처리한다. 첨가후에, 혼합물을 서서히 실온으로 가온시킴에 이어서 밤새 실온에서 교반시킨다. 혼합물을 MeOH 및 H_2O 로 주의깊게 켄칭시키고 10% MeOH/EtOAc로 용출시키는, 짧은 실리카 겔 칼럼에 통과시킨다. 용출물을 농축시켜 고체로서 조 알콜 876mg를 수득한다. 조 알콜(876mg)을 DMF (3mL), THF(10mL) 및 CH_2Cl_2 (40mL)의 혼합물에 용해시킨다. 4-메틸모르폴린 N-옥사이드(2.25g, 19.2mmol), 4Å 분자체(5g) 및 TPAP(169mg, 0.48mmol)를 이어서 조 알콜 용액에 첨가한다. 혼합물을 실온에서 밤새 교반시킨다 10% MeOH/EtOAc로 용출시키는 실리카 겔의 패드에 여과시킨다. 용출물을 농축시키고 추가로 0 내지 10% MeOH/EtOAc로 용출시키는 실리카 겔상에서 성광 크로마토그래피로 정제하여 백색 고체로서 화합물 17 452mg(32%, 2단계)을 수득한다; 융점: 164 내지 166°C

IR(KBr) 3087, 2818, 1690, 1292; 1H NMR(CD₃OD) δ 9.95(1H, s), 8.34(1H, s), 8.08(1H, d, $J=1.5$), 7.74(1H, dd, $J=8.4, 1.5$), 7.63(1H, d, $J=8.4$); ^{13}C NMR(CD₃OD) δ 194.2, 146.0, 143.0, 139.8, 133.6,

124.9, 120.7, 116.6:

$C_8H_6N_2O$ 에 대한 분석치:

계산치: C, 65.75; H, 4.14; N, 19.17.

실측치: C, 65.60, H, 4.17; N, 19.08.

실시예 6

5-시아노-2-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸(19)

니트로벤젠(10ml)중의 5-포르밀벤즈이미다졸 18(211mg, 1.44mmol) 및 4-시아노-1,2-페닐렌디아민(230mg, 1.73mmol)의 혼합물을 N_2 하에 150°C에서 밤새 가열시킨다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고 0 내지 15% MeOH/EtOAc로 용출시키는 실리카 걸상에서 직접 크로마토그래피하여 고체로서 화합물 18 244mg(65%)을 수득한다; 융점: > 270°C

IR(KBr) 3110, 2826, 2224, 1627, 1426, 1294; 1H NMR(CD_3OD) δ 8.41(1H, s), 8.33(1H, s), 8.07(1H, dd, $J=8.6, 1.5$), 7.98(1H, s), 7.78(1H, d, $J=8.4$), 7.73(1H, d, $J=8.4$), 7.56(1H, dd, $J=8.4, 1.5$); ^{13}C NMR($DMSO-d_6 + 3$ 드롭 CF_3COOH) δ 153.4, 140.4, 138.3, 132.9, 131.6, 127.0, 125.8, 125.3, 120.8, 119.8, 116.0, 115.8, 113.9, 105.5;

$C_{15}H_{10}N_5$ 에 대한 HRMS(FBA) 계산치: 260.0936, 실측치: 260.0935.

실시예 7

(A) 5-브로모-2-[2'-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸-5'-일]-벤즈이미다졸(JSK IV-37).

니트로벤젠(5ml)중의 5-포르밀-2-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸 (118.8mg, 0.45mmol) 및 5-브로모페닐렌디아민(169.6mg, 0.90mmol)의 혼합물을 N_2 하에 150°C에서 밤새 가열한다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고 0 내지 10% 메탄올/에틸 아세테이트를 사용하여 크로마토그래피하여 황갈색 고체 127.3mg(66%)을 수득한다; 융점 > 280°C

IR(KBr) 3101, 1626, 1547, 1440; 1H NMR($DMSO-d_6$) δ 7.34(dd, 1H, $J=7.0, 2.0$), 7.57(d, 1H, $J=9.0$), 7.71-7.80(m, 3H), 8.04-8.18(m, 2H), 8.39(s, 2H), 8.50(s, 1H); ^{13}C NMR($DMSO-d_6 + 3$ 드롭 CF_3COOH) δ 114.1, 115.8, 116.2, 116.4, 117.0, 118.6, 123.5, 125.3, 126.2, 128.7, 128.9, 131.8, 132.0, 132.3, 133.1, 134.4, 138.3, 140.6, 151.1, 153.4.

(B) 5-클로로-2-[2'-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸-5'-일]-벤즈이미다졸(JSK IV-68).

니트로벤젠(5ml)중의 5-포르밀-2-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸(160mg, 0.61mmol) 및 5-클로로페닐렌디아민(174mg, 1.22mmol)을 N_2 하에 150°C에서 밤새 가열시킨다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고 0 내지 10% 메탄올/에틸 아세테이트를 사용하여 크로마토그래피를 하고 황갈색 고체 167mg(71%)을 수득한다. 융점 > 280°C

IR(KBr) 3103, 2826, 1427, 1293; 1H NMR($DMSO-d_6$) δ 7.24(dd, 1H, $J=8.5, 2.0$), 7.60-7.81(m, 4H), 8.07-8.17(m, 2H), 8.40(s, 2H), 8.50(s, 1H); ^{13}C NMR($DMSO-d_6 + 3$ 드롭 CF_3COOH) δ 114.3, 114.4, 115.3, 115.5, 115.6, 116.2, 118.5, 123.1, 125.4, 125.5, 125.6, 129.4, 132.4, 132.9, 133.0, 135.2, 138.9, 140.9, 151.8, 153.5.

(C) 5-(p-클로로페닐)-2-[2'-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸-5'-일]-벤즈이미다졸(JSK IV-47)

니트로벤젠(5ml)중의 5-포르밀-2-(벤즈이미다졸-5'-일)벤즈이미다졸(99mg, 0.38mmol) 및 5-(p-클로로페닐)페닐렌디아민(154mg, 0.71mmol)의 혼합물을 N_2 하에 150°C에서 밤새 가열시킨다. 혼합물을 실온으로 냉각시키고 0 내지 10% 메탄올/에틸 아세테이트를 사용하여 크로마토그래피하고 황갈색 고체 85mg(49%)을 수득한다; 융점 > 280°C.

IR(KBr) 3046, 2820, 1426, 1282; 1H NMR($DMSO-d_6 + 3$ 드롭 CF_3COOH) δ 7.56(d, 2H, $J=8.5$), 7.82(d, 2H, $J=8.5$), 7.88-8.21(m, 6H, 8.48(d, 1H, $J=8.8$), 8.63(s, 1H), 8.72(s, 1H), 9.69(s, 1H); ^{13}C NMR($DMSO-d_6 + 3$ 드롭 CF_3COOH) δ 111.8, 113.8, 114.7, 115.8, 116.1, 117.7, 123.0, 124.1, 125.2, 125.3, 129.2, 129.3, 131.9, 132.1, 133.0, 133.1, 137.2, 138.5, 139.3, 141.6, 150.8, 153.8.

(D) 4-브로모페닐렌디아민(JSK IV-35)

무수 에탄올(20ml)중의 2-니트로-5-클로로아닐린(340mg, 1.57mmol)에 $SnCl_2$ (1.50g, 7.91mmol)을 가하고 밤

새 환류시킨다. 반응 혼합물을 이어서 2N NaOH를 사용하여 pH 11로 염기성화하고 에테르로 추출하여 산물을 275mg(94%)을 수득한다. 상기 산물을 추가의 정제없이 JSK IV-37의 합성을 위해 사용한다.

(E) 4-클로로페닐렌디아민(JSK IV-67)

무수 에탄올(20ml)중의 2-니트로-5-클로로아닐린(304mg, 1.76mmol)에 SnCl_2 (1.68g, 8.86mmol)을 가하고 밤새 환류시킨다. 반응 혼합물을 이어서 2N NaOH를 사용하여 pH 11로 염기성화하고 에테르로 추출하여 산물을 250mg(정량수율)을 수득한다. 상기 산물을 추가의 정제없이 JSK IV-68의 합성을 위해 사용한다.

(F) p-클로로트리부틸페닐린(JSK IV-42)

4-브로모클로로벤젠(3.2g, 16.62mmol)을 무수 THF(20ml)중에 용해시킨다. 반응 온도를 아세톤/무수 빙욕조를 사용하여 -78°C로 저하시킨후에 nBuLi(15.58mL, 1.6M, 1.5당량)를 서서히 첨가하고 30분동안 -78°C에서 교반시킨다. 트리부틸린클로아이드(6.77ml, 1.5당량)를 첨가하고 반응물을 실온으로 하면서 밤새 교반시킨다. THF를 증발시킨후에 1시간동안 공기중에서 개방된 반응 플라스크를 진탕시키면서 반응 혼합물을 켄칭시킨다. 100% 헥산으로 용출시키는 퀵 실리카 겔 칼럼을 통하여 혼합물을 통과시킨후에 오일로서 산물을 수득한다(7.35g, 97%).

(G) 2-니트로-5-(p-클로로페닐)아닐린(JSK IV-44)

DMF(18ml)중의 JSK IV-42(2.02g, 5.04mmol) 및 2-니트로-4-브로모아닐린(730mg, 3.36mmol)에 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (117.9mg, 0.17mmol) 및 PPh_3 (440.2mg, 1.70mmol)를 첨가하고 120°C에서 밤새 교반시킨다. DMF를 회전증발시키고 혼합물을 5 내지 10% 에틸아세테이트/헥산으로 용출시키는 실리카 겔 칼럼상에서 분리하여 적색 고체 270mg(32%)을 수득한다.

(H) 4-(p-클로로페닐)페닐렌디아민(JSK IV-46)

JSK IV-44(190mg, 0.77mmol)을 에틸 아세테이트(100ml)중에 용해시키고 10% Pd-C(40mg)를 첨가한후에 수소화(45psi)하여 환원시킨다. 산물(정량 수율)을 추가의 정제없이 JSK IV-47에 사용한다.

실시예 8

생분석

A. 토포이소머라제 I-매개된 DNA 절단 분석

DNA 토포이소머라제 I를 이전에 문헌[참조: B.D. Halligan et al., J. Biol. Chem., 260, 2475(1985)]에 보고된 바와 같이 송아지 흉선으로부터 정제한다.

플라스미드 YEpG는 또한 문헌[참조: T. Mariatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs, NY(1982) at page 149 - 185]에 기술된 바와 같이 알카리 가수분해 방법에 이어서 페놀 탈단백질화 및 CsCl /에티듐 이소피크닉 원심분리하여 정제한다. 플라스미드의 말단을 이전에 문헌[참조: L.F.Liu et al., J. Biol. Chem., 258, 15365(1983)]에 보고된 바와 같이 라벨링한다. 절단 분석은 이전에 문헌[참조: A.Y.Chen et al., Cancer Res., 53, 1332(1993)]에 보도된 바와 같이 수행한다. 사람 토포이소머라제 I는 T7 발현 시스템을 사용하여 재조합 융합 단백질로서 분리한다.

B. 세포독성 분석

세포독성은 문헌[참조: F.Denizot et al., J. Immunol. Methods, 89, 271(1986); J. Carmichael et al., Cancer Res., 47, 936(1987) and T.J. Mosmann et al., Immunol. Methods, 65, 55(1983)]의 방법에 따라 MTT-미세역가 플레이트 테트라졸룸 세포독성 분석(MTA)을 사용하여 결정한다. 사람 림프아세포 RPMI 8402 및 이의 캄프도텍신-자항성 변이 세포주인 CPT-K5는 토시요 안도호(Toshiwo Andoh)(Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya, Japan)에 의해 제공된다[참조: T.Andoh et al., Adv. Pharmacol., 29B, 93(1994)]. 세포독성 분석은 96-웰 미세역가 플레이트를 사용하여 수행한다. 세포를 5% CO_2 중의 37°C에서 혼탁액중에서 증식시키고 10% 열 불활성화된 태아 소 혈청, L-글루타민(2mM), 페니실린(100U/ml) 및 스트렙토마이신(0.1mg/ml)으로 보충된 RPMI 배지에서 정규적으로 계대하여 유지한다. IC_{50} 값을 결정하기 위해 세포를 계속적으로 다양한 농도의 약제 농도에 노출시키고 MTT 분석을 4일째 되는 날에 수행한다. 약제 민감성 사람 표피세포 암인 KB3-1 세포주[문헌참조: S. Aliyama et al., Somatic Cell Mol. Genet., 11, 117(1985)]는 마이클 고테스만(National Cancer Institute, Bethesda, MD)에 의해 제공된다. 이를 세포를 5% CO_2 의 단일층 배양에서 증식시키고 열 불활성화된 태아 소 혈청으로 보충된 둘베코 최소필수 배지로 정규적으로 계대시켜 유지한다. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 빈블라스틴의 존재하에 증식시키는 것을 제외하고는 KBV-1 세포를 유사하게 유지시킨다.

C. 결과

표 1에 나타낸 바와 같이 토포이소머라제 I의 억제제로서 훼스트 33342(1)과 함께 화합물 10 내지 16 및 할로 동족체 JSKIV-37, 47 및 68를 비교함으로써 여러개의 이들 트리스벤즈이미다졸이 유사하거나 보다

큰 효능이 있다는 것을 입증하였다.

[표 1]

비스- 및 트리스벤즈이미다졸의 토포이소머라제 I-매개된 DNA 절단 및 세포독성

화합물	토포 I-매개된 DNA 절단 ^b	세포독성 IC ₅₀ ^a (μM)			
		세포주			
		RPMI	CPT-K5	KB3-1	KBV-1
헥스트 33342	1	0.03	0.9	0.01	1.2
10	1.1	14	28	N.D.	N.D.
11	1	>25 ^c	>25 ^c	N.D.	N.D.
12	100	7.6	20	N.D.	N.D.
13	2	0.09	0.58	0.58	0.35
14	3.3	0.16	5.8	0.05	0.09
15	2	0.035	2.5	0.02	0.02
16	2	0.035	2.5	0.02	0.01
19	1000	> 25 ^c	N.D.	N.D.	N.D.
JSKIV-37	1	1.40	1.40		
JSKIV-47	10	0.09	0.02		
JSKIV-68	1	1.04	0.65		

a) IC₅₀은 연속적인 약제 노출 4일후에 계산된다. N.D.= 결정되지 않음
b) 토포이소머라제 I 절단값은 REC, 상대 효과 농도, 예를 들어, 헥스트 33342와 상대적인 농도, 이의 값은 임의로 1로서 가정하고 이의 상대 효과 농도는 송아지 흉선 토포이소머라제 I의 존재하에 플라스미드 DNA상에 동일한 절단을 일으킬 수 있다. 절단은 가장강한 헥스트 특이적 밴드의 강도로부터 계산된다.
c)분석된 가장 높은 투여량 보다 실질적으로 큰 IC₅₀값은 세포독성이 없는 것으로 여겨진다.

화합물 10 및 11은 헥스트 33342에서 관찰된 바와 같이 토포이소머라제 I의 억제에 있어서 유사한 효능을 나타내는 반면에 이들 화합물 모두는 사람 임파아세포주인 RPMI 8402에 대해 상당한 세포독성을 나타내지 않는다. 그러나 이것은 순수한 화합물이 표적 세포를 침투하지 못한다는 사실에 기인할 수 있으며 이것은 리포좀과 같은 적합한 담체를 선택하여 극복될 수 있다. 5-페닐 치환된 트리스벤즈이미다졸 13은 토포이소머라제 I 억제제로서 헥스트 33342의 효능에 대략 절반의 효능을 갖는다. 그러나 화합물 10 및 11과 대조적으로, 사람 임파아세포주인 RPMI 8402 세포에 대해 상당한 세포독성을 나타낸다. 헥스트 33342에서 관찰된 바와 같이 화합물 13은 또한 캄프토텍신 저항성 CPT-K5 세포에 대해 효과적이다. 헥스트 33342와 화합물 13의 상대적 저항성은 저항성 세포주 대 약제 민감성 세포주의 IC₅₀값의 비율로서 나타내고 문헌[참조: A.Y.Chen et al., Cancer Res., 53, 1332(1993)]에 보고된 바와 같이 2,500배인 캄프토텍신의 상대적 저항성과 비교하여 대략적으로 30배이다. 유사한 효과가 또 다른 쌍의 세포주에서 관찰되는 데 화합물 13은 캄프토텍신-저항성에 대해 선택되고 돌연변이된 캄프토텍신 저항성 토포이소머라제 I를 포함하는 것으로 공지된 A2780의 변이체인 CPT-2000에서 IC₅₀이 0.03μg/ml인것에 비해 사람 난소 종양 세포주인 A2780에서는 IC₅₀값이 0.015μg/ml이다. 5-n-프로필 트리스벤즈이미다졸 유도체 12는 토포이소머라제 I의 억제제로서 화합물 10, 11 또는 13보다 매우 적은 활성이다. 토포이소머라제 I 억제제로서 이의 약한 활성은 이의 약한 세포독성과 연관이 있다. 다양한 이들 화합물의 활성은 또한 재조합 사람 토포이소머라제 I를 사용하여 평가된다. 다양한 이들 동족체는 송아지 흉선에서 분리된 토포이소머라제 I에서 관찰된 것과 비교된 바와 같이 사람 토포이소머라제 I의 존재하에 유사한 DNA 절단을 유도한다.

헥스트 33342 및 화합물 13의 세포독성 활성은 또한 KB 3-1 및 KB V-1 세포에 대해 평가된다. 이들 세포주에서의 주요 차이는 사람 MDR 1(P-당단백질)이 발현되는 정도이다. 최근 연구는 생리적 pH에서 양이온성인 항신생물제가 MDR1에대해 기질로서 작용할 수 있는 가능성이 크고 따라서 P-당단백질을 발현하는 세포에 대해 적은 효과를 나타낼 것이라는 것을 입증하였다. 헥스트 33342가 생리적 pH에서 양성자화된다는 사실로 비추어, 문헌[참조: A.Y.Chen et al., Adv. Pharmacol., 245, 29B(1994)]에 보고된 바와 같이 IC₅₀값이 KB V-1 세포와 비교하여 KB 3-1에 대해 2배정도의 차이를 갖는다는 것은 놀라운일이 아니다. 헥스트 33342와 대조적으로 이들 2개의 세포주에서 화합물 13에 대해 관찰된 IC₅₀간에 거의 차이를 나타내지 않는다. 따라서 화합물 13은 사람 MDR 1에 대한 기질이 아닌 것으로 나타난다. 이 데이터는 이들 트리스벤즈이미다졸 유도체가 헥스트 33342 또는 피벤즈이콜(헥스트 33258), 2'-(4-하이드록시페닐)-5-(4-메틸-1-피페라지닐)-2,5'-비-1H-벤즈이미다졸과 비교하여 화학치료학적으로 상당한 잇점을 가질수 있다는 것을 지적한다.

이들 데이터는 5-Ar 치환제를 사용한 이들 트리스벤즈이미다졸의 치환이, 토포이소머라제 I 억제제로서 활성이고 종양 세포에 대해 세포독성인 유도체를 생성할 수 있다는 것을 지적한다. 2-, 3-, 또는 4-피리딜 그룹중 하나로 5-위치에서 치환된 트리스벤즈이미다졸 14 내지 16은 토포이소머라제 I 억제제로서의 이의 효능과 표 1에 요약된 세포독성에 대해 평가된다. 화합물 13과 유사한 이들 동족체는 토포이소머라제 I의 억제제로서 활성이거나 유사한 세포독성을 나타내는 것으로 보인다.

제 1 억제제로서의 활성을 갖는다. 3- 및 4-피리딜 동족체, 화합물 15 및 16은 토포이소머라제 I 억제제로서 뿐만 아니라 세포독성제로서 2-피리딜 유도체보다 다소 높은 활성을 나타낸다. 화합물 13에 대해 관찰된 바와 같이 이들 피리딜-치환된 트리벤즈이미다졸이 MDR 1을 과발현하는 KBV-1 세포 뿐만 아니라 KB 3-1에 대해 유사한 세포독성을 갖는다. 퀄스트 33342에 대해 비교된 바와 같이 이들 해테로아릴 치환된 트리스벤즈이미다졸의 주요 잇점은 MDR1을 발현하는 세포주에 대해 효능을 나타낸다는 것이다.

실시예 9

아스퍼질러스 니듈란스로부터 토포이소머라제 I의 부분적 정제

2리터의 YG 배지(0.5% 효모 추출물 및 2% 글루코스)에 약 5×10^8 구균/ml을 접종한다. 37°C에서 16시간 동안 증식시킨후에 균사체를 수거하고 완충액 I(50mM 트리스-HCl, pH 7.7, 1mM EDTA, 10% 글리세롤, 1mM 페닐메틸설포닐 플루오라이드 및 1mM 2-머캅토에탄올)으로 세척하여 액체 질소에 신속히 동결시킨다. 동결된 균사체(약 20g)를 분쇄하여 분말로 만들고 완충액 1의 300ml에 재현탁시킨다. 용균물을 소르발 HB3 로터(Sorval HB3 Rotor)로 10K rpm에서 15분동안 원심분리하여 세포 파쇄물을 제거한다. 폴리에틸렌 글리콜(v/v) 및 1M NaCl중에 6%의 상등액을 제조한다. 빙상에서 1시간동안 약간 교반시킨후에 용액을 소르발 로터로 14K rpm에서 30분동안 원심분리하여 핵산을 제거한다.

후속의 정제 단계는 문헌[참조: B. Gatto et al., Cancer Res., 56, 2795(1996)]에 기술된 재조합 사람 DNA 토포이소머라제 I의 정제와 동일하다. 간략하게, 상등액은 하이드록시애파티아트 바이오-겔 HTP(BioRad Laboratories, Richmond, CA) 칼럼상에서 직접 크로마토그래피한다. 이완 활성을 포함하는 분획을 풀화시키고 희석하여 이어서 바이오렉스 70 칼럼(BioRad Laboratories, Richmond, CA)상에 로딩한다. 칼럼을 0.2 내지 1M KCl로 선형 농도 구배한다. 피크 분획물을 풀화시키고 4°C에서 30mM 인산칼슘, 50% 글리세롤(v/v), 0.5mM EDTA 및 1mM DTT에 대해 밤새 투석한다. 재조합 사람 토포이소머라제 I를 이전에 문헌[참조: Gatto et al., Cancer Res., 56, 2795(1996)]에 기술된 바와 같이 PET1B를 함유하는 에스케리치아 콜리(Escherichia coli)BL21(DE3)로부터 정제한다.

실시예 10

DNA에서 토포이소머라제 I로의 ^{32}P 방사능활성의 공유적인 전이

상기 인산-전달 방법은 이전에 문헌[참조: T.C. Rowe et al., J. Biol. Chem., 259, 9177(1984)]에 기술된 방법의 변형이다. 간략하게, 지적된 농도에서 10mM 트리스-HCl, pH 7.5, 1mM MgCl₂, 0.5mM 디티오트레이톨, 소 혈청 알부민 30μg/ml, 약제(캄프토텍신 또는 퀄스트 33342), 무작위 프라미머 방법(Random Primed Labeling Kit, Boehringer Mannheim)에 의해 ^{32}P dATP로 표지된 YEpG DNA 50ng 및 사람 또는 아스퍼질러스 토포이소머라제 I의 300유니트를 10분동안 37°C에서 항온처리한다. 상기 반응을 0.18M의 NaOH 및 2.5mM의 EDTA를 첨가함으로써 종결시킨다. 반응물을 미리 계산된 양의 트리스-HCl로 중화시킨후에 0.1M CaCl₂ 9μl 및 20% SDS 7.5μl를 첨가하고 용적을 H₂O를 사용하여 300μl로 조정한다.

Ba131 뉴클레아제 5유니트(New England, BioLabs)를 첨가하고 샘플을 25°C에서 1시간동안 분해시킨다. 반응을 1용적의 폐놀로 추출하여 종결시킨다. 폐놀상을 취하고 등용적의 10mM 트리스-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA으로 1회 역추출한다. 10용적의 빙냉 아세톤을 첨가하고 빙상에서 10분동안 방치함으로써 단백질-올리고뉴클레오타이드 복합체를 폐놀상으로부터 첨전시킨다. 펠렛을 SDS 샘플 완충액에 용해시키고 SDS-PAGE로 분석한다. 겔 건조 및 자기 방사선법을 문헌[참조: Hsiang et al., J. Biol. Chem., 260, 14873(1985)]에 기술된 바와 같이 수행한다.

실시예 11

토포이소머라제 I 이완 활성

이완 분석을 문헌[참조: L.F. Liu et al., PNAS USA, 78, 3487(1981)]에 기술된 바와 같이 수행한다. 간략하게, 각각의 반응 혼합물(20μl)은 이완되고 슈퍼코일된 YEpG DNA(각각 150ng) 및 다양한 정도로 희석된 아스퍼질러스 또는 사람 토포이소머라제 I 1μl의 혼합물을 포함한다. 15분동안 23 또는 37°C에서 배양한후에 미리 가온된 스톰 용액(5% 사르코실, 25% 슈크로즈, 50mM EDTA 및 0.05 mg/ml 브롬페놀 블루)을 첨가하여 반응을 종결시킨다. DNA 샘플을 이어서 TPE(90mM 트리스-포스페이트, 2mM EDTA, pH 8.0)전기영동 용액중의 1% 아가로스 겔을 사용하여 분석한다.

실시예 12

토포이소머라제 I 절단 분석

DNA 토포이소머라제 I 절단 분석은 문헌[참조: Y.-H. Hsiang et al., J. Biol. Chem., 260, 14873(1985)]에 기술된 바와 같이 수행한다. YEpG DNA는 BamH1으로 선형화되고 이어서 클리노우(Klenow) 폴리머제 및 α [- ^{32}P]dCTP로 3'말단을 라벨링시킨다. 이어서 폐놀로 추출하고 에탄올로 첨전시킨후에 라벨링된 DNA를 10mM 트리스, pH 8.0 및 1 mM EDTA중에 재현탁시킨다. DNA 절단 분석은 40mM 트리스-HCl, pH 7.8, 100mM KCl, 10mM MgCl₂, 0.5mM 디티오트레이톨, 0.5mM EDTA, 소 혈청 알부민 30μg/ml, 라벨링된 YEpG DNA 20ng을 포함하는 반응 혼합물(20μl) 및 다양한 정도로 희석된 아스퍼질러스 또는 사람 토포이소머라제 I 1ml중에서 수행한다. 23°C에서 15분동안 배양시킨후에 SDS(최종 농도 1%) 및 프로테인아제 K(최종 농도 200μg/ml)를 첨가하여 반응을 종결시킨다. 37°C에서 추가로 1시간동안 프로테인아제 K로 계속 처리를 한

다. 종결된 반응물을 알카리 변성에 이어서 중성 TPE 전기영동 용액의 1% 아가로스 겔상에 로딩(알카린로딩)되거나 중성 로딩 완충액(중성 로딩)을 직접 상기 겔상에 직접 로딩한다. 겔 건조 및 자기 방사선법을 상기 인용된 시양등(Hsiang et al)에 의해 기술된 바와 같이 수행한다.

실시예 13

효모 세포 독성 분석

생체내 토포이소머라제 I-특이적 세포독성 분석은 문헌[참조: A.M. Knab et al., *J. Biol. Chem.*, 268, 22322(1993)]에서 사용된 바와 같다. 상기 시스템에서, 1 카피 효모 플라스미드 벡터(YCpGAL1; Knab et al., cited above)로 클론된 다양한 토포이소머라제 I 유전자 또는 cDNAs를 에스. 세레비지애의 JN2-134 균주내에서 GAL 1 프로모터의 조절하에 발현시킨다[참조문헌: MAT, rad52 Leu2, trpl, ade2-1, his7, ura3-52, isel, top1-1 and leu2; M.A.Bjornsti et al., *Cancer Res.*, 49, 6318(1989)]. 벡터내의 토포이소머라제 I 유전자 또는 cDNA 작제물은 각각 야생형 효모 토포이소머라제 I 유전자[YCpGAL-SctOP1; Kim & Wang, need cite(1989)], 비작용성 토포이소머라제 I 유전자(여기서, 활성 부위 타이로신-727은 폐닐알라닌으로 돌연변이된다)[YCpGAL1-Sctop 1Y727; A.M.Knab et al., *J.Biol. Chem.*, 268, 22322(1993)], 및 야생형 사람 토포이소머라제 I cDNA[YCp-GAL-hTOP1; M.A.Bjornsti et al., *Cancer Res.*, 49, 6318(1989)]이다.

약제의 세포독성 및 토포이소머라제 I 특이성을 정량적으로 테스트하기 위해 특정화된 플라스미드를 포함하는 효모 세포를 우라실, 2% 갈락토즈, 및 테트스릴 약제로 보충된 드롭아웃(dropout) 배지에서 배양시킨다. 이것은 토포이소머라제 I 기능이 제거된 경우에 효모가 생존할 수 있고 토포 I 독성이 단지 작용성 토포이소머라제 I를 갖는 세포만을 사멸시킬 수 있도록 설정되었다. 따라서, 다양한 약제의 존재하에 각각의 테스트 균주의 증식과 대조군(약제 없음) 플레이트내의 증식의 상대적인 증식 정도를 다음과 같이 비교한다: (a) 약제가 효모상에 임의의 세포독성 효과를 갖는지의 여부; (b) 세포독성이 토포이소머라제 I-특이적인가의 여부; 및 (c) 사람 토포이소머라제 I와 비교하여 효모에 대해 약제가 어떠한 상이한 특이성을 갖는지의 여부.

실시예 14

아스퍼질러스 니듈란스로부터 토포이소머라제 I의 특징화

플라스미드 이완 활성을 사용하여 정제동안에 아스퍼질러스 토포이소머라제 I를 검색한다. 아스퍼질러스 세포내 이완 활성을 갖는 추출물은 이. 콜리로부터 재조합 사람 DNA 토포이소머라제 I의 정제를 위해 고안된 방법을 통해 정제한다[문헌참조: B. Gatto et al., *Cancer Res.*, 56, 2795(1996)]. 여러 방면의 증거가 부분적으로 정제된 아스퍼질러스 효소가 효모를 포함한 또 다른 진핵 미생물에서 동정되고 특징화된 주요 핵 토포이소머라제 I이라는 것을 입증한다. 첫번째로, 정제된 효소는 고도로 활성이고 아스퍼질러스 세포 추출물에서 주요 DNA 이완 활성을 나타낸다. 2리터의 배양물에서, 토포이소머라제 I 이완 활성의 30,000 유니트를 수득한다. 사람 토포이소머라제 I와 마찬가지로 아스퍼질러스 효소는 플라스미드 DNA를 완전히 이완시키고 Mg(II) 또는 에너지 보조 인자를 필요로하지 않는다. 두번째로, 정제된 아스퍼질러스 효소는 음성 및 양성적으로 슈퍼코일된 DNA 모두를 이완시키고 이의 특성은 모든 진핵 핵 DNA 토포이소머라제 I에 의해 공유된다. 세째로, 아스퍼질러스 효소는 사람 핵 토포이소머라제 I를 억제(독성)시키는 것으로 공지된 캄프토텍신 및 퀘스트 33342(Ho33342)에 의한 억제에 민감하다.

캄프토텍신 및 퀘스트 33342에 대한 아스퍼질러스 효소의 민감성은 대략적으로 효소의 저하된 분자량을 결정하기 위해 고안된 포스페이트 전이 실험에 의해 초기에 지적된다. 상기 실험에서, ³²P-라벨링된 DNA를 아스퍼질러스 토포이소머라제 I와 반응시켜 공유적인 단백질-DNA 복합체를 형성한다. 토포이소머라제 I-DNA의 공유 복합체를 Bst131로 분해하고 토포이소머라제 I와 공유적으로 결합된 라벨링된-올리고뉴클레오파이드의 크기를 감소시킨다.

상기 포스페이트-전이 방법을 사용하여, 아스퍼질러스 토포이소머라제 I는 재조합 사람 토포이소머라제 I(100kDa)보다 약간 큰 105 kDa 단백질로서 동정된다. 대략 75kDa 위치에서의 보다 낮은 밴드는 100kDa 사람 토포이소머라제 I의 단백질 분해 산물인 것으로 공지되어 있다. 토포이소머라제 I의 이동성에 대한 잔여 올리고뉴클레오파이드의 효과는 명백하게 무시할만하다. 흥미롭게도 캄프토텍신(100mM) 및 Ho33342(1mM) 모두는 105kDa 아스퍼질러스 토포이소머라제 I의 증가된 라벨링에 의해 입증된 바와 같이 포스페이트 전이를 자극시킨다.

보다 높은 Ho33342의 농도에서, 포스페이트 전이는 점진적으로 억제된다. 캄프토텍신 및 Ho33342에 대한 상기 효과는 하기에서 논의된다.

실시예 15

캄프토텍신 및 Ho33342는 아스퍼질러스 토포이소머라제 I의 강력한 억제제이다.

포스페이트 전이 실험은 캄프토텍신 및 Ho33342 모두가 독성 기작에 의해 아스퍼질러스 토포이소머라제를 억제할 수 있다고 제안한다. 이러한 가능성을 테스트하기 위해 아스퍼질러스 토포이소머라제 I는 다양한 약제의 존재하에 DNA 절단 반응에 사용된다. 캄프토텍신(CPT) 및 Ho33342(HOE) 모두는 아스퍼질러스 토포이소머라제 I의 강력한 억제제이다. 광범위한 DNA 절단은 캄프토텍신 및 Ho33342 각각에 대해 1.0 및 0.1mg/ml과 같은 낮은 농도에서 관찰된다.

흥미롭게도, 사람 DNA 토포이소머라제 I의 고도로 강력한 억제제인 것으로 공지된 니티딘 및 코르알린은 아스퍼질러스 토포이소머라제 I를 상당한 정도로 억제시키지 못한다. 사람 DNA 토포이소머라제 I의 또 다른 고도로 강력한 억제제인 DM/11/33은 아스퍼질러스 토포이소머라제 I에 대해 단지 약한 억제를 나타낸다. 아스퍼질러스 토포이소머라제 I에 대해 불활성인 베레닐은 또한 아스퍼질러스 토포이소머라제 I에

대해 불활성이다.

이들 결과는 사람 및 아스퍼질러스 토포이소머라제 I가 다양한 효소 억제제에 대해 이의 민감성 측면에서 실질적으로 상이함을 지적한다. 또한 Ho33342의 가장 높은 농도(10mg/ml)에서 토포이소머라제 I-매개된 DNA 절단이 급격히 억제된다는 것을 주지한다는 것은 흥미롭다. 억제제의 보다 높은 농도에서 상기 절단-억제제 효과는 다수의 삽입제(intercalators) 및 DNA 마이너 그루브 결합 리간드에 대해 문헌[참조:A.Y.Chen et al., PNAS USA, 90, 8131(1993)]에 기술되어 있고 DNA 주형에 결합하는 효소의 억제에 기인한다[참조:K.M. Tewey et al., Science, 226, 466(1985)]. 아스퍼질러스 토포이소머라제 I에 대한 포스페이트-전이에 대한 Ho33342의 억제 효과는 따라서 유사하게 설명될 수 있다.

실시예 16

비- 및 테르-벤즈이미다졸에 대한 아스퍼질러스 토포이소머라제 I에 대한 선택적 민감성

이전의 연구는 포유동물 DNA 토포이소머라제 I의 효능적인 억제제(독성제)로서 다수의 모노-, 비-, 및 테르-벤즈이미다졸을 동정하였다. 아스퍼질러스 토포이소머라제 I가 또한 이들 벤즈이미다졸에 대한 억제효과에 민감한지를 테스트하기 위해 다수의 화합물을 절단 분석을 사용하여 검색한다. 아스퍼질러스 토포이소머라제 I(60유니트/반응)는 화합물 13 및 11에 의해 강하게 억제되고(독성화되고) 이의 모두는 테르-벤즈이미다졸이다. QS/II/50, QS/II/51, QS/II/59A, QS/II/9를 포함하는 모노-벤즈이미다졸의 어떠한 것도 아스퍼질러스 토포이소머라제 I에 대해 억제 효과를 나타내지 않는다. 이전의 연구는 QS/II/50을 제외한 모든 이들 모노-벤즈이미다졸이 포유동물 DNA 토포이소머라제 I의 억제제(독성제)인 것을 확립하였다. 모노-벤즈이미다졸을 제외한 비- [예: Ho33342 및 화합물 2(여기서, n은 3이다)] 및 테르- (예: 화합물 13 및 11)에 대한 아스퍼질러스 토포이소머라제 I의 선택적 민감성은 사람과 아스퍼질러스 효소간의 억제 민감성에 있어서 차이가 있음을 지적한다.

실시예 17

사람과 아스퍼질러스 토포이소머라제 I간의 절단 특이성에 있어서의 차이

사람과 아스퍼질러스 토포이소머라제 I간의 억제 민감성의 차이뿐만 아니라 절단 특이성에 있어서 추가의 차이점은 사람과 아스퍼질러스 토포이소머라제 I간에 관찰된다. 사람(라벨링된 hTOP1, 150유니트/반응)과 아스퍼질러스(라벨링된 AnTOP1, 60유니트/반응)의 절단 패턴은 비벤즈이미다졸 Ho33342(HOE)의 존재하에 급격히 상이하다. HOE 존재하에 다수의 절단부위 및 아스퍼질러스 토포이소머라제 I에 의해 보여지는 큰 정도의 절단은 이해되지 못한다. 덜 명백하다 할지라도 사람 및 아스퍼질러스 효소의 절단 패턴은 또한 캄프토텍신(CPT)의 존재하에 상이하다.

아스퍼질러스 토포이소머라제 I 효소 제제에서 토포이소머라제 II에 의한 오염이 절단 패턴에 기인할 있다는 가능성을 배제하기 위해 샘플의 일부는 또한 가능한 이본쇄 절단에 대해 검정된다. DNA 샘플이 알카린 로딩보다는 중성 로딩에 의해 분석되는 경우 어떠한 이본쇄 DNA 절단이 관찰되지 않는다. 또한 이러한 실험으로부터 아스퍼질러스 토포이소머라제 I가 사람 효소보다는 CPT에 대해 덜 민감하다는 것이 명백하다.

사람(150유니트/반응) 및 아스퍼질러스(60유니트/반응) 효소간의 절단 특이성에 있어서의 차이는 또한 테르-벤즈이미다졸(화합물 13 및 11)이 0.1, 1.0 및 10 μ g/ml에서 사용되는 경우 명백하다. 추가로, 아스퍼질러스 효소는 사람 효소보다 화합물 13에 대해 실질적으로 보다 민감한 것으로 나타났다.

실시예 18

효모 및 아스퍼질러스 토포이소머라제 I 효소는 유사한 억제 민감성/저항성을 나타낸다.

동일한 조건하에서 사람 또는 효모 토포이소머라제 I를 발현하는 효모 탑 1 결실 균주를 사용하여 사람 및 효모 효소의 상이한 억제 민감성을 평가한다[문헌참조: J. Nitiss et al., PNAS USA, 85, 7501(1988); B. Gatto et al., Cancer Res., 56, 2795(1996)]. 효모 토포이소머라제 I를 발현하는 효모 세포가 캄프토텍신 민감성이라 할지라도 이들은 사람 토포이소머라제 I를 발현하는 효모 세포 보다 캄프토텍신에 대해 10배 이상 민감하다. 니티딘, DM-11/33 및 QS/II/9는 사람 토포이소머라제 I중 하나를 발현하는 효모 세포에 대해 고도로 세포독성이지만 작용성 또는 비작용성 효모 토포이소머라제 I중 하나를 발현하는 효모 세포에 대해서는 독성을 나타내지 않는다. 이들 결과는 효모 및 아스퍼질러스 토포이소머라제 I가 사람 토포이소머라제 I를 독성화시키는 동일한 억제(예: 니티딘, 프로토베르베린 DM-11-33 및 모노-벤즈이미다졸 QS-11-9)에 대해서 저항성임을 지적한다.

따라서 사람 토포이소머라제 I와 같은 아스퍼질러스 토포이소머라제 I가 캄프토텍신, 비벤즈이미다졸 Ho33342 및 테르-벤즈이미다졸(화합물 11 및 13)의 독성 활성에 민감하다. 캄프토텍신 캄프토텍신 효소보다 아스퍼질러스에 대해 덜 활성인 것으로 나타났다 할지라도 테르-벤즈이미다졸 11은 사람 효소보다 아스퍼질러스에 대해 보다 큰 활성인 것으로 드러났다. 아스퍼질러스 토포이소머라제 I에 대한 테르-벤즈이미다졸의 효과는 화합물 11 및 화합물 13에 제한되지 않고, 화학식 I의 테르-벤즈이미다졸(여기서, n은 10이고, X는 H이며, Ar은 5-페닐이고, Y는 H이고 Y'는 에틸 또는 4-메톡시페닐이다) 및 화합물 13의 4-페닐-이성체는 또한 시험관내 진균성 효소에 대해 효과적이다. 테르-벤즈이미다졸에 대한 아스퍼질러스 토포이소머라제 I의 일반적으로 높은 민감성은 이해되지 않는다. 그러나, 보다 높은 정도의 절단 및 절단의 보다 약한 서열 특이성으로부터 판단되는 바와 같이 아스퍼질러스 토포이소머라제 I가 이들 DNA 결합 리간드의 억제 효과에 대해 덜 민감할 수 있다고 논의될 수 있다. 또 다른 말로, 아스퍼질러스 토포이소머라제 I는 사람 효소보다 높은 특이성과 함께 DNA와 결합할 수 있고 따라서 이들 DNA 결합 리간드의 억제 효과에 대해 덜 민감하다.

본 발명은 다양한 특정 바람직한 양태 및 기술을 언급하면서 기술하고 있다. 그러나 본 발명의 취지 및

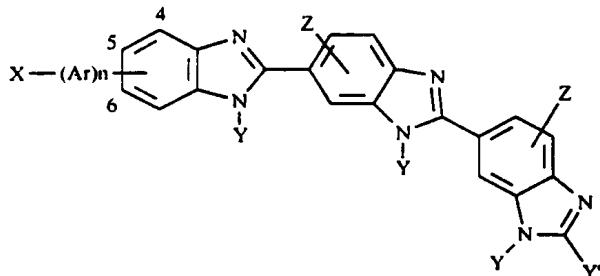
범위내에서 많은 다양함과 변형이 이루어질 수 있는 것으로 이해되어야만 한다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

의학 치료에 사용하기 위한 화학식 |의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

화학식 |



상기식에서,

Ar은 (C_6 - C_{12})아릴 또는 1 내지 3개의 N, S 또는 비-퍼옥사이드 O를 포함하는 (5- 내지 12-원)헤테로아릴이고, 이때 N은 비치환되거나 H, (C_1 - C_4)알킬 또는 벤질로 치환되고;

X는 H, CN, CHO, OH, 아세틸, CF_3 , $\text{O}(\text{C}_1\text{--C}_4)$ 을 클, NO_2 , NH_2 , 할로겐 또는 할로-($\text{C}_1\text{--C}_4$)을 클이고;

각각의 Y 는 H , (C_1-C_4) 알킬 또는 아르알킬이고;

Y'는 페닐 또는 메톨시페닐이고;

각각의 Z 는 개별적으로 H , (C_1-C_4) 알킬, 할로겐 또는 할로(C_1-C_4)알킬이고;

n 은 0 또는 1이다.

청구항 2

제1항에 있어서, Ƴ'가 메톨시페닐인 환합물.

청구항 3

제1항에 있어서 n이 1인 한함을

첨구항 4

제1항에 있어서, X가 CN, CHO, OH, 아세틸, CF_3 , $\text{O}(\text{C}_1\text{--C}_4)$ 알킬, NO_2 , NH_2 , 할로겐 또는 할로- $(\text{C}_1\text{--C}_4)$ 알킬이고 n이 0인 화합물.

첨구항 5

제1항에 있어서. 하나 이상의 Z 가 할로겐 또는 할로(C_1-C_4)알킬이고 n 이 0인 화합물.

첨구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서 의학적 치료가 친구성 감염의 치료인 학합물

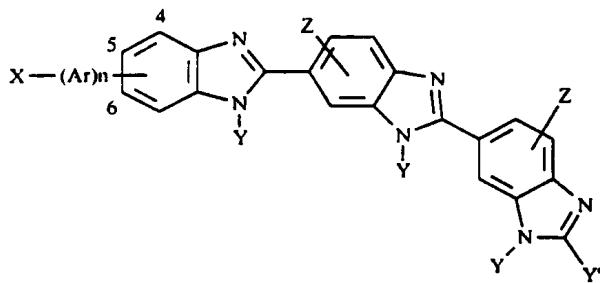
첨구학 7

제1항 내지 제5항중 어느 한 항에 있어서 의학적 치료가 암의 치료인 학합물

첨구항 8

진균성 감염 치료용 약물을 제조하기 위한 화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 용도.

화학식 1



상기식에서,

Ar은 (C_6 – C_{12})아릴 또는 1 내지 3개의 N, S 또는 비-퍼옥사이드 0를 포함하는 (5- 내지 12-원)헤테로아릴이고, 이때 N은 비치환되거나 H, (C_1 – C_4)알킬 또는 벤질로 치환되고;

X는 H, CN, CHO, OH, 아세틸, CF_3 , $O(C_1$ – $C_4)$ 알킬, NO_2 , NH_2 , 할로겐 또는 할로-(C_1 – C_4)알킬이고;

각각의 Y는 H, (C_1 – C_4)알킬 또는 아르알킬이고;

Y'는 폐닐 또는 메톡시페닐이고;

각각의 Z는 개별적으로 H, (C_1 – C_4)알킬, 할로겐 또는 할로-(C_1 – C_4)알킬이고;

n은 0 또는 1이다.

청구항 9

제8항에 있어서, Y'가 메톡시페닐인 용도.

청구항 10

제8항에 있어서, n이 1인 용도.

청구항 11

제8항에 있어서, X가 CN, CHO, OH, 아세틸, CF_3 , $O(C_1$ – $C_4)$ 알킬, NO_2 , NH_2 , 할로겐 또는 할로-(C_1 – C_4)알킬이고 n이 0인 용도.

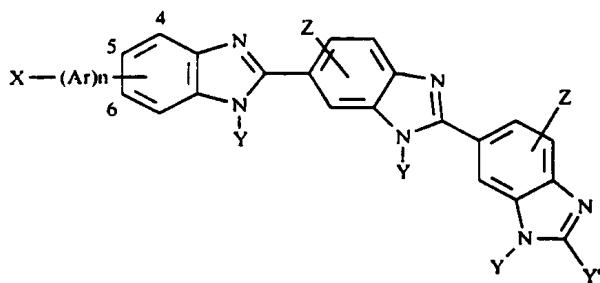
청구항 12

제8항에 있어서, 하나 이상의 Z가 할로겐 또는 할로-(C_1 – C_4)알킬이고 n이 0인 용도.

청구항 13

암 치료용 약물을 제조하기 위한 화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 용도.

화학식 1



상기식에서,

Ar은 (C_6 – C_{12})아릴 또는 1 내지 3개의 N, S 또는 비-퍼옥사이드 0를 포함하는 (5- 내지 12-원)헤테로아릴이고, 이때 N은 비치환되거나 H, (C_1 – C_4)알킬 또는 벤질로 치환되고;

X는 H, CN, CHO, OH, 아세틸, CF_3 , $O(C_1$ – $C_4)$ 알킬, NO_2 , NH_2 , 할로겐 또는 할로-(C_1 – C_4)알킬이고;

각각의 Y는 H, (C_1 – C_4)알킬 또는 아르알킬이고;

Y'는 폐닐 또는 메톡시페닐이고;

각각의 Z는 개별적으로 H, (C_1 – C_4)알킬, 할로겐 또는 할로-(C_1 – C_4)알킬이고;

n은 0 또는 1이다.

청구항 14

제13항에 있어서, Y'가 메톡시페닐인 용도.

청구항 15

제13항에 있어서, n이 1인 용도.

청구항 16

제13항에 있어서, X가 CN, CHO, OH, 아세틸, CF₃, O(C₁–C₄)알킬, NO₂, NH₂, 할로겐 또는 할로-(C₁–C₄)알킬이고 n이 0인 용도.

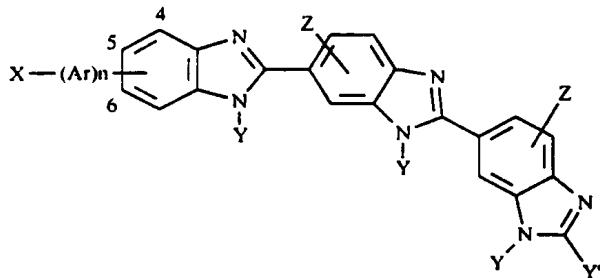
청구항 17

제13항에 있어서, 하나 이상의 Z가 할로겐 또는 할로-(C₁–C₄)알킬이고 n이 0인 용도.

청구항 18

화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

화학식 1



상기식에서,

Ar은 (C₆–C₁₂)아릴 또는 1 내지 3개의 N, S 또는 비-퍼옥사이드 0를 포함하는 (5– 내지 12–원)헤테로아릴이고, 이때 N은 비치환되거나 H, (C₁–C₄)알킬 또는 벤질로 치환되고;

X는 H, CN, CHO, OH, 아세틸, CF₃, O(C₁–C₄)알킬, NO₂, NH₂, 할로겐 또는 할로-(C₁–C₄)알킬이고;

각각의 Y는 H, (C₁–C₄)알킬 또는 아르알킬이고;

Y'는 메톡시페닐이고;

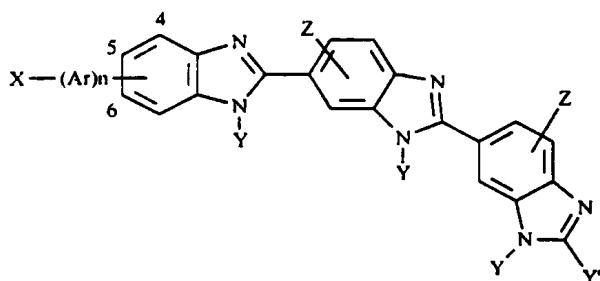
각각의 Z는 개별적으로 H, (C₁–C₄)알킬, 할로겐 또는 할로-(C₁–C₄)알킬이고;

n은 0 또는 1이다.

청구항 19

화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

화학식 1



상기식에서,

Ar은 (C₆–C₁₂)아릴 또는 1 내지 3개의 N, S 또는 비-퍼옥사이드 0를 포함하는 (5– 내지 12–원)헤테로아릴이고, 이때 N은 비치환되거나 H, (C₁–C₄)알킬 또는 벤질로 치환되고;

X는 H, CN, CHO, OH, 아세틸, CF₃, O(C₁–C₄)알킬, NO₂, NH₂, 할로겐 또는 할로-(C₁–C₄)알킬이고;

각각의 Y는 H, (C₁–C₄)알킬 또는 아르알킬이고;

Y'는 폐닐이고;

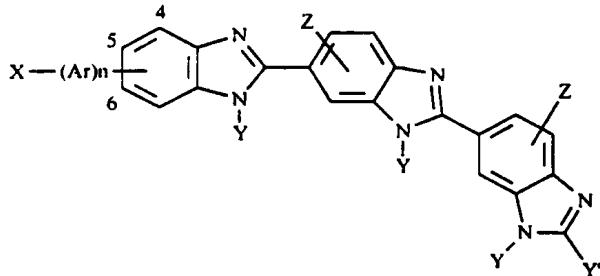
각각의 Z는 개별적으로 H, (C₁–C₄)알킬, 할로겐 또는 할로(C₁–C₄)알킬이고;

n은 10이다.

청구항 20

화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

화학식 I



상기식에서,

X는 CN, CHO, OH, 아세틸, CF₃, O(C₁–C₄)알킬, NO₂, NH₂, 할로겐 또는 할로-(C₁–C₄)알킬이고;

각각의 Y는 H, (C₁–C₄)알킬 또는 아르알킬이고;

Y'는 폐닐이고;

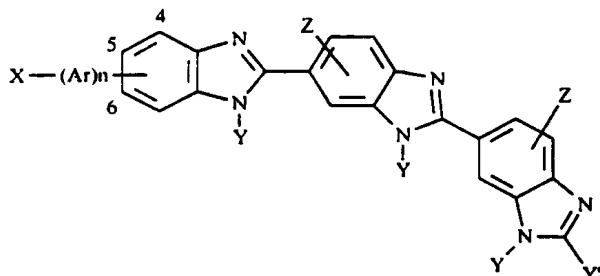
각각의 Z는 개별적으로 H, (C₁–C₄)알킬, 할로겐 또는 할로(C₁–C₄)알킬이고;

n은 0이다.

청구항 21

화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

화학식 I



상기식에서,

X는 H, CN, CHO, OH, 아세틸, CF₃, O(C₁–C₄)알킬, NO₂, NH₂, 할로겐 또는 할로-(C₁–C₄)알킬이고;

각각의 Y는 H, (C₁–C₄)알킬 또는 아르알킬이고;

Y'는 폐닐이고;

각각의 Z는 개별적으로 H, (C₁–C₄)알킬, 할로겐 또는 할로(C₁–C₄)알킬이고, 단 하나 이상의 Z는 할로겐 또는 할로(C₁–C₄)알킬이고;

n은 0 또는 1이다.

청구항 22

제18항에 있어서, n이 1인 화합물.

청구항 23

제19항 또는 제22항에 있어서, Ar이 5번 위치에 있는 화합물.

청구항 24

제19항 또는 제22항에 있어서, Ar이 페닐인 화합물.

청구항 25

제19항 또는 제22항에 있어서, Ar이 2-피리딜인 화합물.

청구항 26

제18항 내지 제22항중 어느 한 항에 있어서, X가 할로겐인 화합물.

청구항 27

제26항에 있어서, X가 Cl인 화합물.

청구항 28

제24항에 있어서, X-Ar-O-p-클로로페닐인 화합물.

청구항 29

제28항에 있어서, 각각의 Y가 H이고 각각의 Z가 H인 화합물.

청구항 30

제18항에 있어서, n이 0인 화합물.

청구항 31

제30항에 있어서, X가 Cl인 화합물.

청구항 32

제30항에 있어서, X가 Br인 화합물.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, Y'가 4-메톡시페닐이고 각각의 Y가 H이고 각각의 Z가 H인 화합물.

청구항 34

제18항 내지 제20항중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 Z가 할로겐 또는 할로(C₁-C₄)알킬인 화합물.

청구항 35

제34항에 있어서, 하나 이상의 Z가 F 또는 CF₃인 화합물.

청구항 36

제19항 또는 제22항에 있어서, Ar이 벤조인 화합물.

청구항 37

제36항에 있어서, Ar이 4,5-벤조인 화합물.

청구항 38

제36항에 있어서, Ar이 5,6-벤조인 화합물.

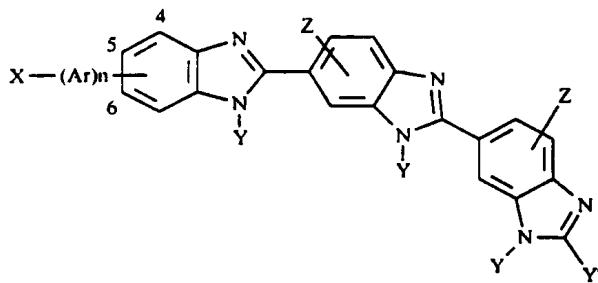
청구항 39

제18항 내지 제22항중 어느 한 항에 따른 화합물 및 이의 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 40

화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 유효량을 포유동물에게 투여하여 진균성 감염을 치료함을 포함하는 치료학적 방법.

화학식 1



상기식에서,

Ar은 (C_6-C_{12})아릴 또는 1 내지 3개의 N, S 또는 비-퍼옥사이드 O를 포함하는 (5- 내지 12-원)헤테로아릴이고, 이때 N은 비치환되거나 H, (C_1-C_4)알킬 또는 벤질로 치환되고;

X는 H, CN, CHO, OH, 아세틸, CF_3 , O(C_1-C_4)알킬, NO_2 , NH_2 , 할로겐 또는 할로-(C_1-C_4)알킬이고;

각각의 Y는 H, (C_1-C_4)알킬 또는 아르알킬이고;

Y'는 폐닐 또는 메톡시페닐이고;

각각의 Z는 개별적으로 H, (C_1-C_4)알킬, 할로겐 또는 할로-(C_1-C_4)알킬이고;

n은 0 또는 1이다.

청구항 41

제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 따른 화합물의 유효량을 포유동물에게 투여하여 진균성 감염을 치료함을 포함하는 치료학적 방법.

청구항 42

제40항에 있어서, 포유동물이 사람인 방법.

청구항 43

제40항에 있어서, 진균성 감염이 전신성 감염인 방법.

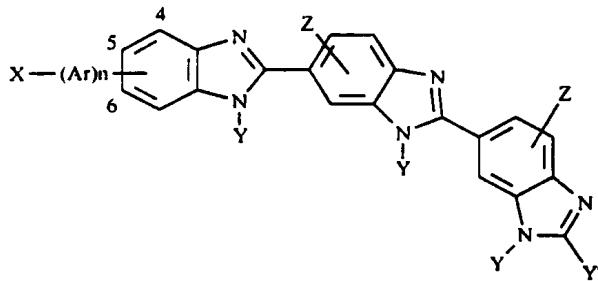
청구항 44

제40항에 있어서, 화합물을 약제학적으로 허용되는 비히클과 배합하여 투여하는 방법.

청구항 45

화학식 1의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 유효량을 포유동물에게 투여하여 암을 치료함을 포함하는 치료학적 방법.

화학식 1



상기식에서,

Ar은 (C_6-C_{12})아릴 또는 1 내지 3개의 N, S 또는 비-퍼옥사이드 O를 포함하는 (5- 내지 12-원)헤테로아릴이고, 이때 N은 비치환되거나 H, (C_1-C_4)알킬 또는 벤질로 치환되고;

X는 H, CN, CHO, OH, 아세틸, CF_3 , O(C_1-C_4)알킬, NO_2 , NH_2 , 할로겐 또는 할로-(C_1-C_4)알킬이고;

각각의 Y는 H, (C_1-C_4)알킬 또는 아르알킬이고;

Y'는 폐닐 또는 메톡시페닐이고;

각각의 Z는 개별적으로 H, (C₁-C₄)알킬, 할로겐 또는 할로(C₁-C₄)알킬이고;

n은 0 또는 1이다.

청구항 46

제18항 내지 제22항중 어느 한 항의 화합물의 유효량을 포유동물에게 투여하여 암을 치료함을 포함하는 치료학적 방법.

청구항 47

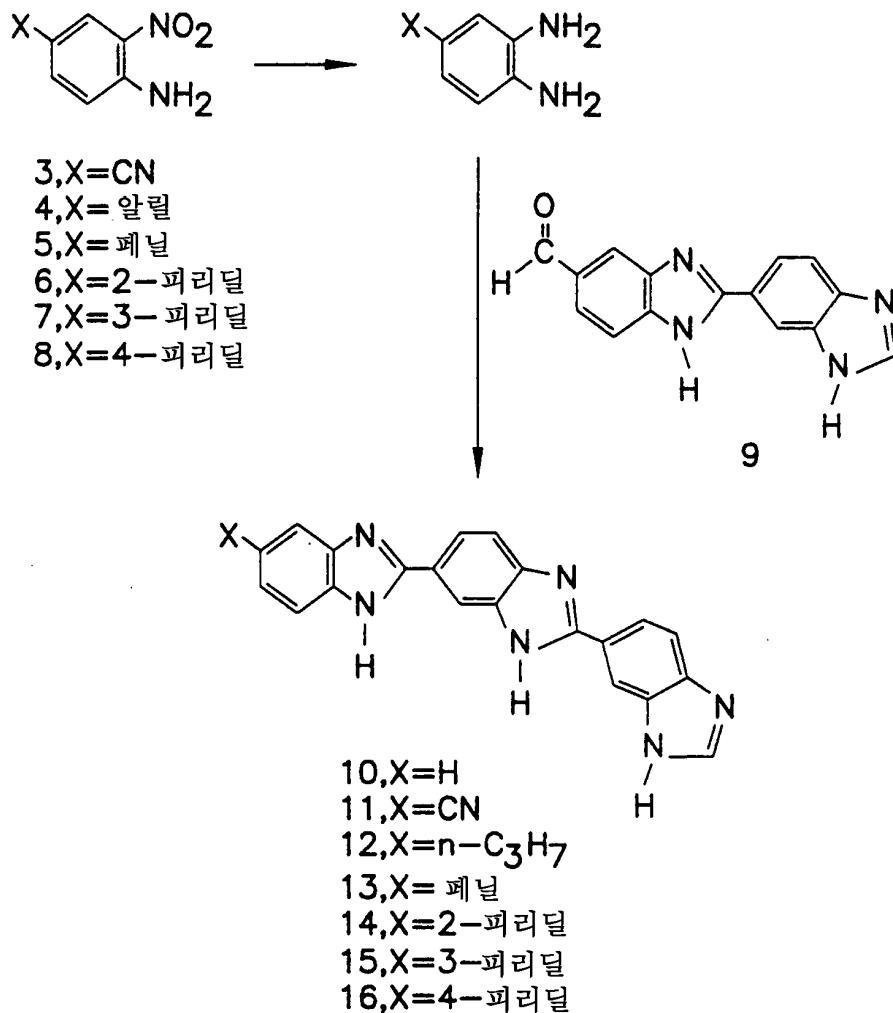
제45항에 있어서, 포유동물이 사람인 방법.

청구항 48

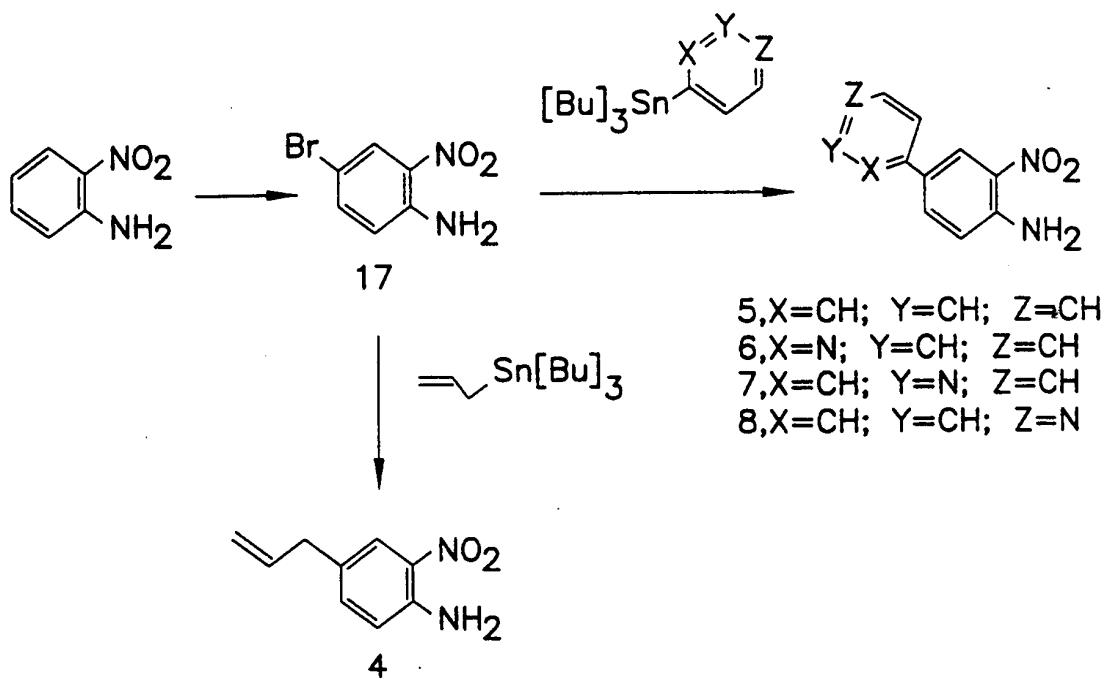
제45항에 있어서, 화합물을 약제학적으로 허용되는 비히클과 배합하여 투여하는 방법.

도면

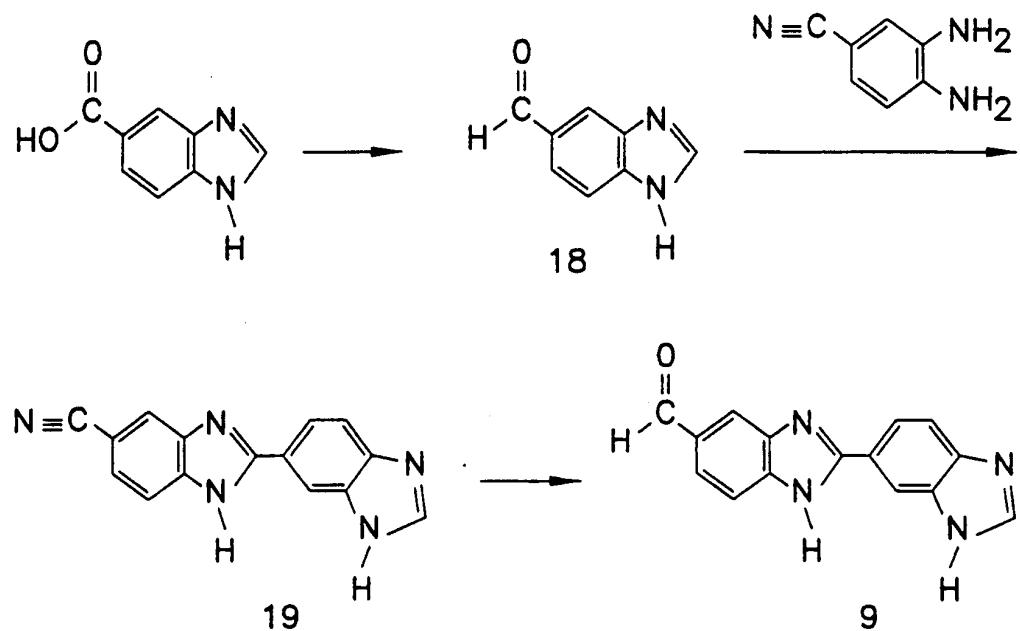
도면1



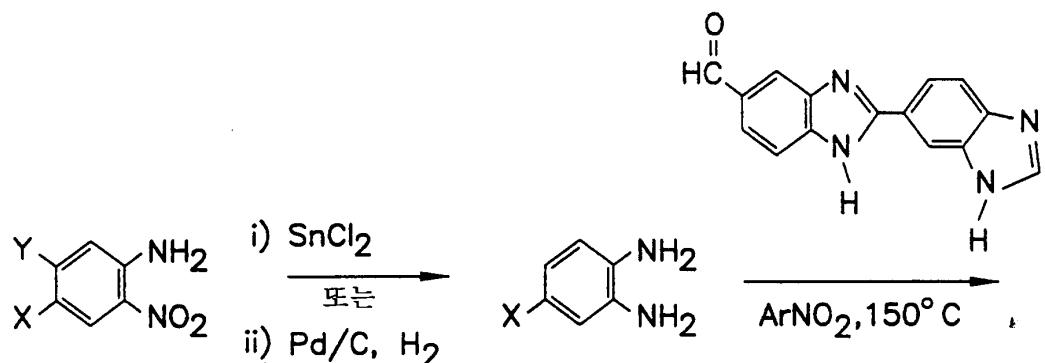
도면2



도면3

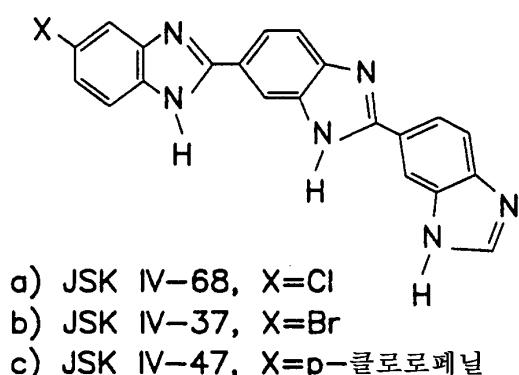


도면4



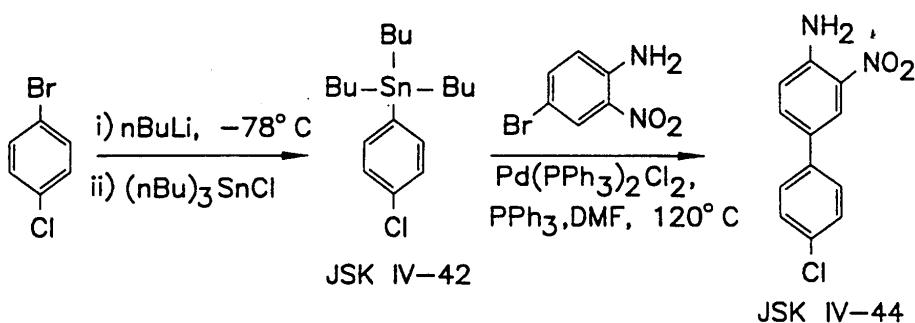
- a) X=H, Y=Cl
b) X=Br, Y=H
c) JSK IV-44

- a) JSK IV-67, i), X=Cl
b) JSK IV-35, i), X=Br
c) JSK IV-46, ii), X=p-클로로페닐

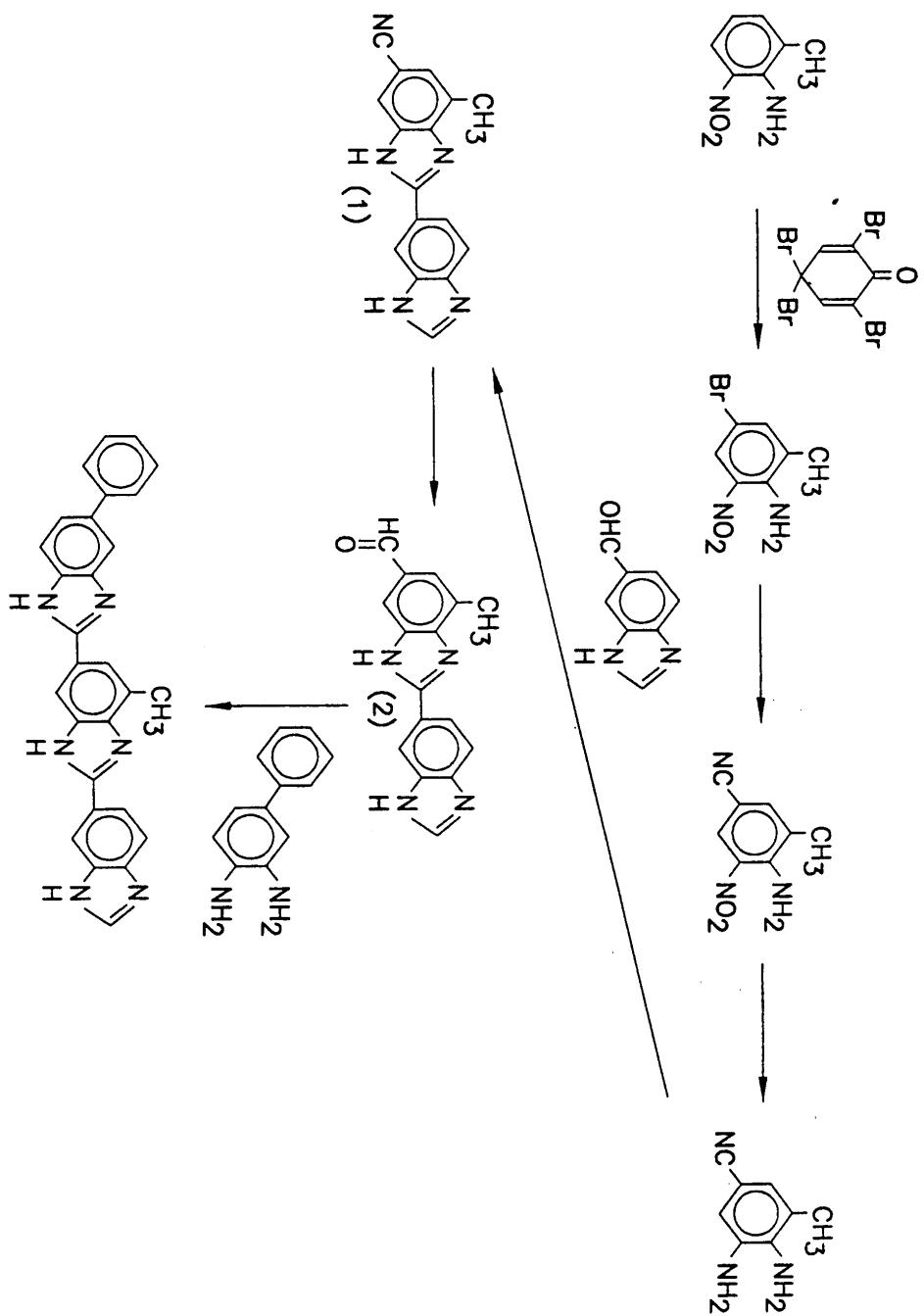


- a) JSK IV-68, X=Cl
b) JSK IV-37, X=Br
c) JSK IV-47, X=p-클로로페닐

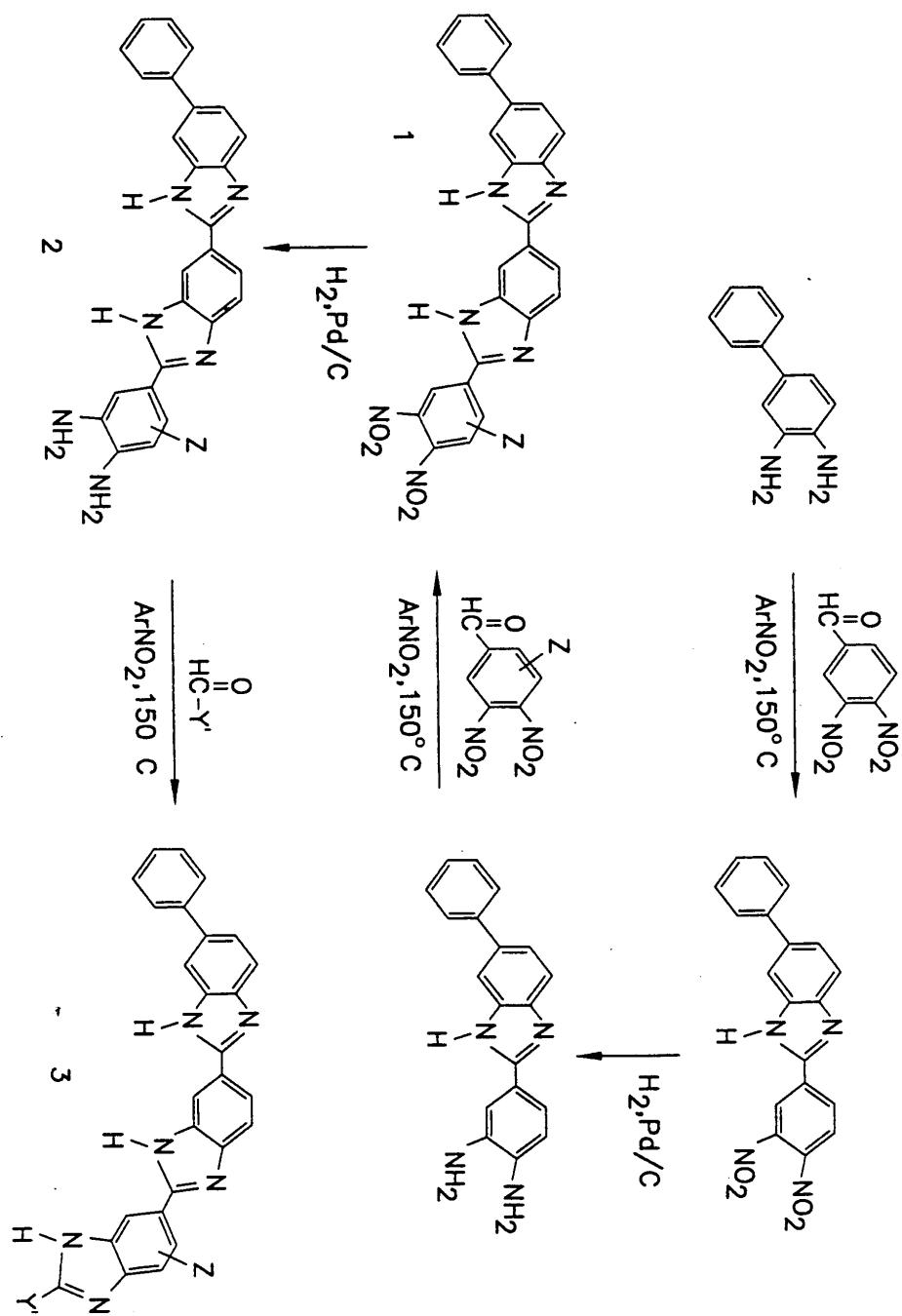
도면5



도면6



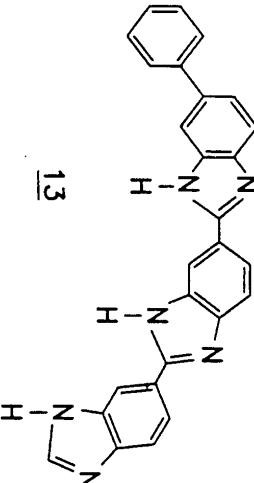
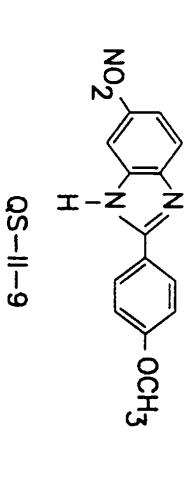
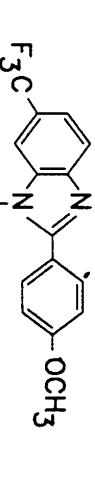
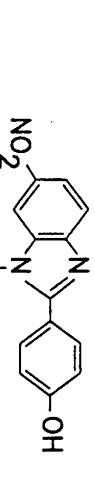
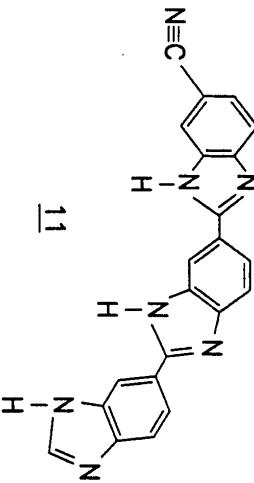
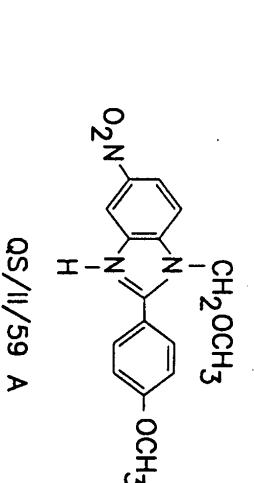
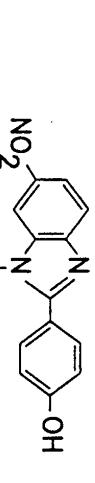
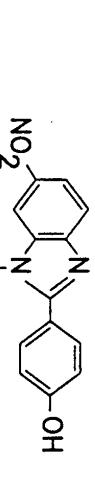
도면7



도면8A

	H	A	H	A
김프로텍신		+		+
나티린		+		+
코랄린(DM/I/170)		+		-
페레닐		+		-*
Ho33342		+		+

도면8B

 <p>13</p>	 <p>QS-II-9</p>		H	A
			-	-
 <p>11</p>	 <p>QS-II-59 A</p>		+	-
			-	-