

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0134963
(43) 공개일자 2015년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 239/84 (2006.01) A61K 31/498 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07D 239/74 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0062507
(22) 출원일자 2014년05월23일
심사청구일자 2014년05월23일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이재열
서울특별시 서대문구 세검정로3길 63, 101동 1702호 (홍제동, 태영으뜸아파트)
이경태
서울특별시 노원구 중계로 195, 103동 702호 (중계동, 신안동진아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유수미

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 및 그를 포함하는 복합제

(57) 요약

본 발명은 암세포의 증식과 성장에 필수적인 2차 신호전달물질인 칼슘 이온의 세포내 유입을 차단하여 암세포의 세포주기차단을 유도함으로써 기존 항암제의 효능을 증강시킬 수 있는 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염, 및 상기 화합물과 다른 항암제를 포함하는 복합제를 제공한다.

(72) 발명자

조세현

서울특별시 노원구 동일로 1456, 709동 802호 (상계동, 상계주공7단지아파트)

이진성

전라남도 목포시 양율로 91, 102동 705호 (산정동, 일신아파트)

신동현

서울특별시 송파구 양재대로 1218, 310동 1107호 (방이동, 율림픽션수촌아파트)

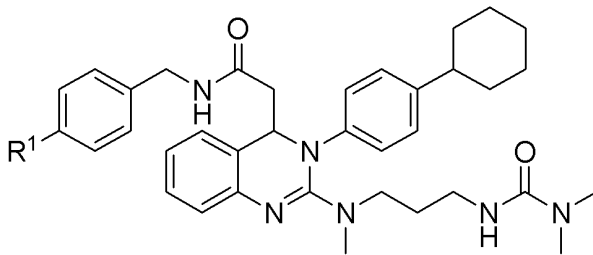
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 I의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염:

[화학식 I]



상기 식에서,

R¹은 수소, 할로젠 또는 C₁-C₆의 알콕시기이다

청구항 2

제1항에 있어서, R¹이 할로젠 또는 C₁-C₆의 알콕시기인 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 3

제1항에 있어서, 하기 화합물로부터 선택되는 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염:

4-(*N*-벤질아세트아미도)-3-(4-사이클로헥실페닐)-2-[*N*-(*N*,*N*'-다이메틸우레도프로필)-*N*-메틸]아미노-3,4-디히드로퀴나졸린(I-1);

4-[*N*-(4-플루오로벤질)아세트아미도]-3-(4-사이클로헥실페닐)-2-[*N*-(*N*,*N*'-다이메틸우레도프로필)-*N*-메틸]아미노-3,4-디히드로퀴나졸린(I-2); 및

4-[*N*-(4-메톡시벤질)아세트아미도]-3-(4-사이클로헥실페닐)-2-[*N*-(*N*,*N*'-다이메틸우레도프로필)-*N*-메틸]아미노-3,4-디히드로퀴나졸린(I-3).

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과, 항종양 백금 배위 착화합물, 안트라사이클린, 국소이성화효소(topoisomerase) 억제제 및 티로신 키나아제 억제제로 구성된 군으로부터 선택된 다른 항암제를 포함하는 복합제.

청구항 5

제4항에 있어서, 폐암, 육종, 악성 흑색종, 흉막 중피종, 방광암, 전립선암, 췌장암, 위암, 난소암, 간암, 유방암, 대장암, 신장암, 식도암, 부신암, 이하선암, 두경부암, 자궁경부암, 중피종, 백혈병 또는 림프종의 치료 또는 예방용인 복합제.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과 항종양 백금 배위 착화합물을 포함하는 위암, 방광암, 폐암, 췌장암 또는 대장암의 치료 또는 예방용 복합제.

청구항 7

제6항에 있어서, 항종양 백금 배위 착화합물이 시스플라틴인 복합제.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과 안트라사이클린을 포함하는 위암, 폐암 또는 유방암의 치료 또는 예방용 복합제.

청구항 9

제8항에 있어서, 안트라사이클린이 독소루비신인 복합제.

청구항 10

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과 국소이성화효소(topoisomerase) 억제제를 포함하는 위암, 폐암 또는 대장암의 치료 또는 예방용 복합제.

청구항 11

제10항에 있어서, 국소이성화효소 억제제가 에토포시드인 복합제.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과 티로신 키나아제 억제제를 포함하는 간암, 폐암 또는 췌장암의 치료 또는 예방용 복합제.

청구항 13

제12항에 있어서, 티로신 키나아제 억제제가 엘로티닙, 게피티닙 또는 이마티닙인 복합제.

청구항 14

제4항에 있어서, 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과, 다른 항암제가 단일의 제형에 포함되는 복합제.

청구항 15

제4항에 있어서, 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과, 다른 항암제가 별개로 제형화되어 병용 투여되는 복합제.

청구항 16

제15항에 있어서, 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과, 다른 항암제가 별개로 제형화되어 동시(同時)에 또는 이시(異時)에 투여되는 복합제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암세포의 세포주기차단을 유도하여 기존 항암제의 효능을 증강시킬 수 있는 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염 및 그를 포함하는 복합제에 관한 것이다.

배경 기술

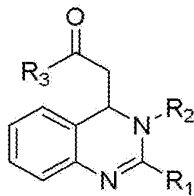
[0002] 기존 항암화학요법의 장애가 되는 요소 중의 하나는 정상세포에 대한 부작용과 항암제 내성이다. 정상세포에 대한 부작용을 극복하기 위한 방법으로 표적 항암제는 기존 항암제보다 비교적 부작용이 적으며, 일부 표적 항암제들은 진행성 대장/직장암, 유방암, 폐암 등에서 기존 항암화학요법과 병용시 생존율을 증가시키는 효과에도 불구하고, 표적 항암제는 여전히 많은 문제점을 가지고 있다.

[0003] 우선, 표적 항암제는 암이 생성되는 과정에 관여하는 특정 표적 인자만을 공격하여 같은 종류의 암이라도 특정

표적 인자가 나타나는 환자에게만 효과를 나타낸다. 그러므로 표적 항암제를 보다 효과적으로 사용하기 위해서는 표적 항암제에 대한 효과를 미리 예측할 수 있는 예측 지표를 정립하는 것이 필요하다. 또한 표적 치료제를 지속적으로 투여하다 보면 내성이 생길 수 있다. 따라서 표적 항암제의 개발에도 불구하고, 약물 내성을 극복하면서 치료 효과를 높일 수 있는 새로운 치료제가 계속 요구되고 있다.

[0004] 칼슘은 세포내 신호전달물질로서 중요한 역할을 하고 다양한 세포작용을 조절한다. 세포작용 중에서 칼슘은 세포 성장에 관여하는 것으로 알려져 있다. 실제로 세포의 유사분열과정 중 세포주기(cell cycle)의 G1단계에서 S 단계로 진행되는 과정에 칼슘신호가 필요하며, 세포내 칼슘 이온의 고갈은 세포주기를 G0/G1과 S단계의 중간과정에서 멈추게 한다. 세포내 칼슘 양의 조절은 T-형 칼슘채널을 통하여 조절되며, 이에 대한 근거로서 최근 T-형 칼슘채널 차단제가 세포분화를 억제한다는 논문이 보고되었다[참고문헌: McCalmont, W. F. 등, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 3691-3695; McCalmont, W. F. 등, *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 3821-3839]. 따라서 선택적인 T-형 칼슘채널 차단제는 비정상인 세포주기를 가진 암세포를 치료하는 새로운 약물이 될 수 있으며, 대한민국 공개특허 제10-2008-0099108호에는 하기 화학식 A의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체가 우수한 T-형 칼슘채널 차단효과와 항암 효과를 나타낸다고 개시되어 있다.

[0005] [화학식 A]



[0006]

[0007] 상기 식에서,

[0008] R_1 은 $NR_4(CH_2)_nNR_5R_6$ 이고, R_4 는 수소 또는 C_1-C_5 의 저급 알킬기이며, n 은 4 내지 6의 정수이고, R_5 및 R_6 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_1-C_5 의 저급 알킬기이거나, 결합되어 있는 질소원자와 함께 4 내지 6원의 헤테로사이클을 형성하고;

[0009] R_2 는 4-바이페닐이며;

[0010] R_3 는 벤질아미노, 4-아미노벤질아미노, 또는 4-플루오로벤젠설포아미노벤질아미노이다.

[0011] 그러나, 상기 화학식 A의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체는 암세포에 대해 직접적으로 강한 세포독성 활성을 나타내므로, 기존 항암제의 효능을 증가시키기 위한 복합제로는 연구된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명자들은 암세포에서 과발현되는 T-형 칼슘채널을 차단하고, 암세포의 세포주기를 G0/G1과 S단계의 중간단계에서 차단하여 기존 항암제의 효능을 증가시킬 수 있는 T-형 칼슘채널 차단제를 개발하고자 예의 연구 검토한 결과, 하기 화학식 I의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체가 우수한 세포주기차단(cell cycle arrest) 효과를 가짐을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

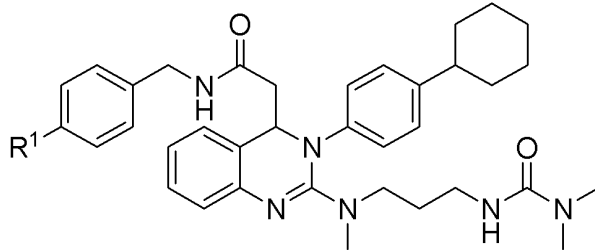
[0013] 따라서, 본 발명의 목적은 암세포의 증식과 성장에 필수적인 2차 신호전달물질인 칼슘 이온의 세포내 유입을 차단하여 암세포의 세포주기차단을 유도함으로써 기존 항암제의 효능을 증강시킬 수 있는 하기 화학식 I의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 하기 화학식 I의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과 다른 항암제를 포함하는 복합제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

본 발명은 하기 화학식 I의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염에 관한 것이다.

[화학식 I]



상기 식에서,

R¹은 수소, 할로겐 또는 C₁-C₆의 알콕시기이다.

본 명세서에서 사용되는 C₁-C₆의 알콕시기는 탄소수 1 내지 6개로 구성된 직쇄형 또는 분지형 알콕시기를 의미하며, 메톡시, 에톡시, n-프로판옥시 등이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 일 실시형태에서, 상기 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체는,

R¹이 할로겐 또는 C₁-C₆의 알콕시기인 화합물이다.

본 명세서에서 약제학적으로 허용되는 염은 무독성 무기산염 및 유기산염 모두를 포함하며, 예를 들어 염산염, 황산염, 질산염, 인산염, 아세트이트산염, 아디페이트산염, 아스파테이트산염, 벤조에이트산염, 벤젠설포네이트산염, 시트레이트산염, 캄포레이트산염, 캄포설포네이트산염, 디포스페이트산염, 에탄설포네이트산염, 푸마레이트산염, 글루타메이트산염, 말레이트산염, 락테이트산염, 메탄설포네이트산염, 숙시네이트산염, 타르트레이트산염, 피크레이트산염, 토실레이트산염 등을 포함한다.

본 발명의 화합물 중 대표적인 화합물은 하기 그룹에서 선택된다.

4-(*N*-벤질아세트아미도)-3-(4-사이클로헥실페닐)-2-[*N*-(*N*,*N*'-다이메틸우레도프로필)-*N*-메틸]아미노-3,4-디히드로퀴나졸린(I-1);

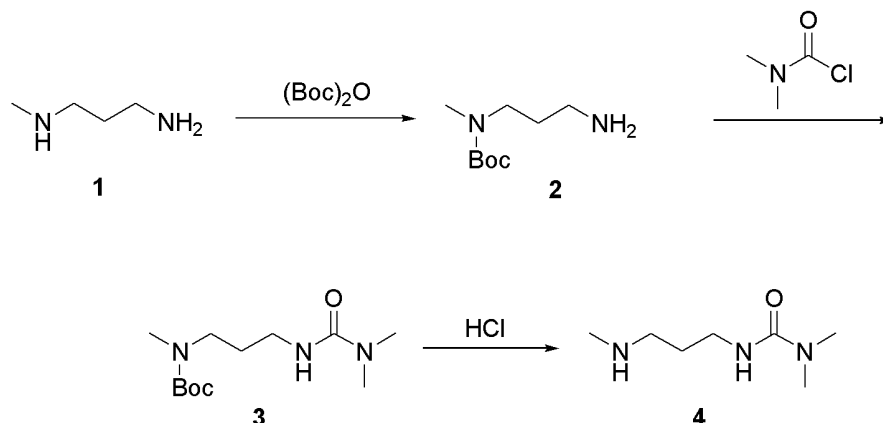
4-[*N*-(4-플루오로벤질)아세트아미도]-3-(4-사이클로헥실페닐)-2-[*N*-(*N*,*N*'-다이메틸우레도프로필)-*N*-메틸]아미노-3,4-디히드로퀴나졸린(I-2); 및

4-[*N*-(4-메톡시벤질)아세트아미도]-3-(4-사이클로헥실페닐)-2-[*N*-(*N*,*N*'-다이메틸우레도프로필)-*N*-메틸]아미노-3,4-디히드로퀴나졸린(I-3).

본 발명의 화합물의 제조방법을 하기 반응식 1 및 2에 나타내었다. 하기 반응식에 기재된 방법은 본 발명에서 대표적으로 사용된 방법을 예시한 것일 뿐 단위조작의 순서, 반응시약, 반응조건 등은 경우에 따라 얼마든지 변경될 수 있다.

[0029]

[반응식 1]



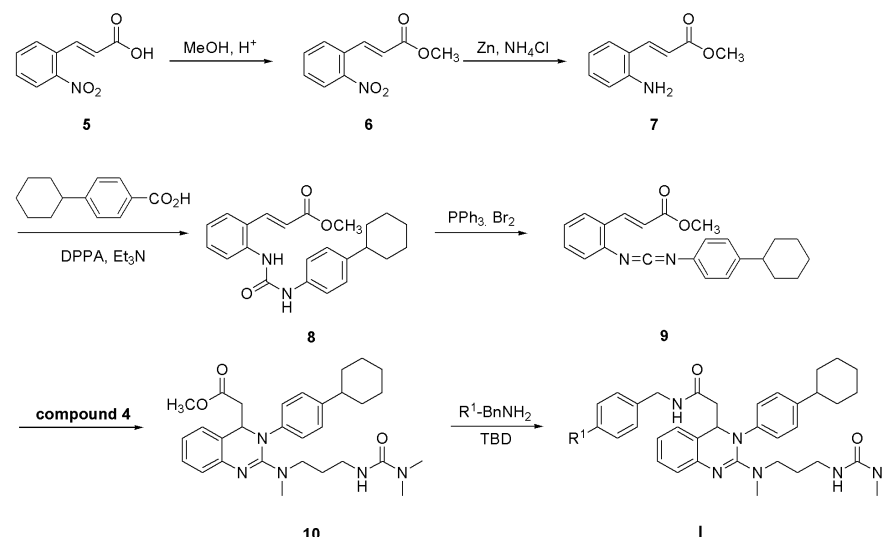
[0030]

[0031]

상기 반응식 1에 개시된 바와 같이, 1,3-디아민 화합물(1)을 1 당량의 디-*t*-부틸 디카보네이트와 반응시켜 Boc로 보호된 화합물(2)를 얻고, 다이메틸카바모일 클로라이드(dimethylcarbamoyl chloride)을 가하여 우레아 형태의 화합물(3)을 합성한다. 그런 다음, Boc기를 염산으로 처리하여 제거하고 우레이도아민 화합물(4)를 얻을 수 있다.

[0032]

[반응식 2]



[0033]

[0034]

상기 반응식 1에 개시된 방법에 따라 제조된 화합물(4)을 이용하여 본 발명의 화합물(I)를 상기 반응식 2에 개시된 바와 같이 제조할 수 있다.

[0035]

2-니트로신나믹 산(5, 2-nitrocinnamic acid)의 에스테르화 반응으로부터 얻어진 메틸 2-니트로신나메이트(6, methyl 2-nitrocinnamate)를 70℃의 온도에서 Zn/NH₄Cl로 처리하여 니트로기를 아민기로 환원시켜 아민 화합물(7)을 합성한다. 아민 화합물(7)을 반응용매에 녹인 후, 4-사이클로헥실벤조 산(4-cyclohexylbenzoic acid)과 다이페닐포스포릴 아자이드(Diphenylphosphoryl azide: DPPA)의 반응 중에서 생성되는 4-사이클로헥실페닐이소시네이트(4-cyclohexylphenyl isocyanate)를 가하고 상온에서 교반하여 우레아(urea)형태의 생성물(8)을 얻는다. 그런 다음, 상기 우레아 화합물로부터 디브로모트리페닐포스핀(dibromotriphenylphosphine)과 트리에틸아민을 이용한 탈수화 과정을 통해 카보디이미드 화합물(9, carbodiimide)을 합성한다. 상기 카보디이미드 화합물(9)에 상기 우레이도아민 화합물(4)를 반응시키면 카보디이미드 기의 중심탄소에 헤테로원자가 친핵 부가 반응을 하고, 다시 분자내 연속적인 1,4-부가반응을 통하여 에스터 화합물인 3,4-디히드로퀴나줄린(10, 3,4-dihydroquinazoline)이 합성된다. 상기 에스터 화합물(10), 다양한 벤질아민 및 1,5,7-트리아자바이사이클로[4.4.0]데크-5-엔(1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene: TBD)을 용매가 없는 조건하에서 가열하여 본 발명의

화합물(I)을 제조할 수 있다.

- [0036] 본 발명에 따른 상기 화학식 I의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 암세포의 세포주기를 차단하는 활성을 나타내며, 기존 항암제의 암세포에 대한 세포독성을 상승시키는 효과를 나타낸다(시험에 참조).
- [0037] 따라서, 본 발명은 상기 화학식 (I)의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과, 항종양 백금 배위 착화합물, 안트라사이클린, 국소이성화효소(topoisomerase) 억제제 및 티로신 키나아제 억제제로 구성된 군으로부터 선택된 다른 항암제를 포함하는 복합제에 관한 것이다.
- [0038] 본 발명의 복합제는 폐암, 육종, 악성 흑색종, 흉막 중피종, 방광암, 전립선암, 췌장암, 위암, 난소암, 간암, 유방암, 대장암, 신장암, 식도암, 부신암, 이하선암, 두경부암, 자궁경부암, 중피종, 백혈병 및 림프종과 같은 암의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다.
- [0039] 구체적으로, 본 발명의 일 실시형태는 상기 화학식 (I)의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과 항종양 백금 배위 착화합물을 포함하는 위암, 방광암, 폐암, 췌장암 또는 대장암의 치료 또는 예방용 복합제에 관한 것이다.
- [0040] 상기 항종양 백금 배위 착화합물은 시스플라틴, 옥살리플라틴, 카보플라틴, BBR3464, 사트라플라틴, 테트라플라틴, 오미플라틴 또는 이프로플라틴, 특히 시스플라틴이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 다른 실시형태는 상기 화학식 (I)의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과 안트라사이클린을 포함하는 위암, 폐암 또는 유방암의 치료 또는 예방용 복합제에 관한 것이다.
- [0042] 상기 안트라사이클린으로는 다우노루비신, 독소루비신, 에피루비신, 이다루비신, 미토잔트론, 피잔트론 또는 발루비신, 특히 독소루비신이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 본 발명의 또 다른 실시형태는 상기 화학식 (I)의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과 국소이성화효소(topoisomerase) 억제제를 포함하는 위암, 폐암 또는 대장암의 치료 또는 예방용 복합제에 관한 것이다.
- [0044] 상기 국소이성화효소 억제제로는 토포테칸, SN-38, 이리노테칸, 캄토테신, 루비테칸, 에토포시드 또는 테니포시드, 특히 에토포시드가 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 실시형태는 상기 화학식 (I)의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과 티로신 키나아제 억제제를 포함하는 간암, 폐암 또는 췌장암의 치료 또는 예방용 복합제에 관한 것이다.
- [0046] 상기 티로신 키나아제 억제제로는 엘로티닙, 소라페닙, 악시티닙, 보수티닙, 세디라닙, 다사티닙, 게피티닙, 이마티닙, 카네티닙, 라파티닙, 레스타우르티닙, 닐로티닙, 세막사닙, 수니티닙 또는 반데타닙, 특히 엘로티닙, 게피티닙 또는 이마티닙이 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명에 따른 복합제는 경구적으로(예를 들면, 복용 또는 흡입) 또는 비경구적으로(예를 들면, 주사, 침작, 이식, 좌약) 투여될 수 있으며, 주사는 예를 들면, 정맥주사, 피하주사, 근육내주사 또는 복강내주사일 수 있다. 본 발명에 따른 복합제는 투여 경로에 따라, 정제, 캡슐제, 과립제, 파인 서브틸래(fine subtile), 분제, 설하 정제, 좌약, 연고, 주사제, 유탕액제, 현탁액제, 시럽제, 분무제 등으로 제형화될 수 있다. 상기 여러 가지 형태의 본 발명에 따른 복합제는 각 제형에 통상적으로 사용되는 약제학적으로 허용되는 담체(carrier)를 사용하여 공지기술에 의해 제조될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체의 예는 부형제, 결합제, 분해제(disintegrating agent), 윤활제, 방부제, 향산화제, 등장제(isotonic agent), 완충제, 피막제, 감미제, 용해제, 기재(base), 분산제, 습윤제, 현탁화제, 안정제, 착색제 등을 포함한다.
- [0048] 본 발명에 따른 복합제는 약제의 형태에 따라 다르지만, 본 발명의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과 다른 항암제를 약 0.01 내지 95 중량%로 포함한다.
- [0049] 본 발명의 복합제의 구체적인 투여량은 치료되는 사람을 포함한 포유동물의 종류, 체중, 성별, 질환의 정도, 의사의 판단 등에 따라 다를 수 있다. 바람직하게는, 경구투여의 경우에는 하루에 체중 1kg당 활성성분 0.01 내지 50 mg이 투여되고, 비경구투여의 경우에는 하루에 체중 1kg당 활성성분 0.01 내지 10 mg이 투여된다. 상기

총 일일 투여량은 질환의 정도, 의사의 판단 등에 따라 한번에 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용되는 염과 다른 항암제는 동시(同時)에 또는 이시(異時)에 투여되기 위한 별개의 약제들로서 제공될 수 있다. 바람직하게는 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체와 다른 항암제는 이시에 투여되기 위한 별개의 약제들로서 제공된다. 별개로 그리고 이시에 투여되는 경우, 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체 또는 다른 항암제 중 하나를 먼저 투여할 수 있다. 또한, 두 가지 약물들을 같은 날 또는 다른 날 투여할 수 있고, 치료 사이클 동안 동일한 스케줄 또는 다른 스케줄을 이용하여 투여할 수 있다.

[0051] 본 발명의 복합제는 모든 성분들(약물들)을 단일의 약제학적으로 허용되는 제형에 포함할 수 있다. 또는, 이들 성분들은 별개로 제형화되어 서로 병용 투여될 수 있다. 당업자에게 잘 알려진 다양한 약제학적으로 허용되는 제형들을 본 발명에 이용할 수 있다. 또한, 복합제의 약물들은 서로 다른 투여 경로로 투약될 수도 있다. 예컨대, 약물들 중 1종은 경구 투여용으로 적합한 형태, 예를 들어 정제 또는 캡슐일 수 있고, 다른 종은 비경구 주사(정맥내, 피하, 근육내, 혈관내 또는 주입)에 적합한 형태, 예를 들어 멸균 용액, 현탁액 또는 에멀전일 수 있다. 또는, 두가지 약물 모두 동일 투여 경로로 투약될 수 있다. 본 발명에 사용하기에 적합한 제형의 선택은 투여 방식 및 성분들의 용해도 특성에 따라 당업자가 통상적으로 정할 수 있다.

[0052] 복합제의 성분들의 정확한 투여량은 특정 제형, 투여 방식 및 치료될 특정 부위, 환자 및 종양에 따라 달라질 수 있다. 연령, 체중, 성별, 식이요법, 투여 시간, 배설률, 환자의 상태, 약물 조합, 반응 민감성 및 질병의 정도와 같은 기타 인자들도 고려되어야 한다. 최대 관용 투여량 내에서 동시에 또는 주기적으로 투여를 실시할 수 있다.

발명의 효과

[0053] 본 발명의 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체는 암세포의 증식과 성장에 필수적인 2차 신호전달물질인 칼슘 이온의 세포내 유입을 차단하여 암세포의 세포주기차단(cell cycle arrest)을 유도함으로써, 현재 임상에 사용 중인 항암제와 병용 투여할 경우 기존 항암제를 단독 투여한 경우보다 항암 활성에서 강한 상승효과(synergism)를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

[0055] 제조예 1: 터트-부틸-N-(3-아미노프로필)-N-메틸카바메이트(2)의 합성

[0056] 메탄올(100 mL)에 N-메틸-1,3-다이아미노프로판(1)(3.26 g, 37.03 mmol)을 첨가한 후, 35 % 염화수소 수용액을 0 °C에서 천천히 첨가하여 교반하였다. 상온에서 30분 동안 교반한 후, 다이-터트-부틸-다이카보네이트(10.51 g, 48.14 mmol)을 영하 10 °C에서 천천히 첨가하였다. 감압 농축 후, 10 % 수산화나트륨 수용액으로 염기성화한 후, 이염화탄소로 추출하여 무수 황산마그네슘으로 건조하였다. 감압농축기로 농축 후 농축된 물질을 실리카와 이염화탄소: 메탄올: 암모니아수(100: 9: 1 부피비) 전개액으로 칼럼크로마토그래피를 수행하여 표제 화합물(2)를 수득하였다.

[0057] 수율: 3.03 g(43 %),

[0058] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 3.29 (2H, br, $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$), 2.83 (3H, s, $-\text{N}-\text{CH}_3$), 2.69 (2H, t, $J = 6$ Hz, $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.64 (2H, m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.46 (9H, s, $(\text{CH}_3)_3\text{C}-\text{O}-\text{C}=\text{O}$), 1.38 (2H, s, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$).

[0059] 제조예 2: 터트-부틸-N-[3-(N, N'-다이메틸우레도-프로필)]-N-메틸카바메이트(3)의 합성

[0060] 무수 이염화탄소(100 mL)에 터트-부틸-N-(3-아미노프로필)-N-메틸카바메이트(2)(2.19 g, 11.63 mmol)을 첨가한 혼합물을 제조한 후, 트리에틸아민(1.77 g, 17.45 mmol)을 첨가하였다. 영하 10 °C에서 다이메틸카바모일 클로

라이트(1.87 g, 17.45 mmol)을 천천히 첨가하여 4시간 동안 교반하였다. 감압 농축 후 에틸 아세테이트로 추출하여 무수 황산마그네슘으로 건조하였다. 감압농축기로 농축 후 농축된 물질을 실리카와 에틸 아세테이트: 헥산(15: 1 부피비) 전개액으로 칼럼크로마토그래피를 수행하여 표제 화합물(3)을 수득하였다.

[0061] 수율: 2.78 g(92 %),

[0062] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.85 (1H, br, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$), 3.34 (2H, s, $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 3.19 (2H, s, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-$), 2.92 (6H, s, $-\text{N}-(\text{CH}_3)_2$), 2.81 (3H, s, $-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$), 1.63 (2H, m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 1.46 (9H, s, $(\text{CH}_3)_3\text{O}-\text{C}=\text{O}$).

[0063] **제조예 3: *N,N*-다이메틸-*N'*-(3-메틸아미노프로필)우레아(4)의 합성**

[0064] 메탄올(100 mL)에 터트-부틸-*N*-[3-(*N,N*-다이메틸우레도-프로필)]-*N*-메틸카바메이트(3)(2.7 g, 10.41 mmol)을 첨가한 후, 메탄올에 0.5 M로 묶힌 염화수소를 2당량 부피(41.61 mL)로 0 °C에서 천천히 첨가하여 교반하였다. 감압 농축 후, 10 % 수산화나트륨 수용액으로 염기성화하고 이염화탄소로 추출하여 무수 황산마그네슘으로 건조하였다. 감압농축기로 농축하여 표제 화합물(4)를 수득하였다.

[0065] 수율: 1.04 g(63 %),

[0066] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.95 (1H, br, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$), 3.33 (2H, q, $J = 6$ Hz, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$), 3.05 (1H, br, $\text{CH}_3-\text{NH}-\text{CH}_2$), 2.89 (6H, s, $-\text{N}-(\text{CH}_3)_2$), 2.74 (2H, t, $J = 6$ Hz, $\text{CH}_3-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$), 2.45 (3H, s, $\text{CH}_3-\text{NH}-\text{CH}_2-$), 1.72 (2H, m, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$).

[0067] **제조예 4: 메틸 2-나이트로신나메이트(6)의 합성**

[0068] 메탄올(100 mL)에 2-나이트로신나믹 산(3.00 g, 15.53 mmol)을 첨가한 후, 포화 황산(0.25 mL)을 첨가하고 밤새 환류 교반하였다. 반응 혼합물을 농축 후 에틸아세테이트(150 mL)로 희석하고 물(100 mL)로 세척한 다음, 유기층을 무수 MgSO_4 로 건조시킨 후 감압농축기로 농축하여 표제 화합물(6)을 수득하였다. 이 생성물을 특별한 정제과정 없이 다음 반응에 그대로 사용하였다.

[0069] 수율: 3.21 g(99 %),

[0070] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.14 (1H, d, $J = 16$ Hz, $-\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-$), 8.09-7.58 (4H, m, aromatic), 6.39 (1H, d, $J = 16$ Hz, $-\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-$), 3.86 (3H, s, $-\text{OCH}_3$).

[0071] **제조예 5: 메틸 2-아미노신나메이트(7)의 합성**

[0072] 에틸 아세테이트(100 mL)에 메틸 2-나이트로신나메이트(6)(3.21 g, 15.53 mmol), 아연(5.05 g, 77.65 mmol) 및 과량의 NH_4Cl 을 첨가한 후, 반응 혼합물을 70 °C로 1시간 동안 가열하였다. 반응이 완결된 후 반응 혼합물을 상온으로 식힌 후, 반응 혼합물에 탄산수소나트륨 수용액을 첨가하였다. 혼합물을 셀라이트(삼전화학, Celite 545)를 통해 거른 후 고체 물질을 제거하고, 조생성물을 에틸 아세테이트로 추출하고 모아진 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시키고 감압 농축하여 노란색 결정인 표제 화합물(7)을 수득하였다.

[0073] 수율: 2.62 g(95 %),

[0074] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.89 (1H, d, $J = 24.0$ Hz, $-\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-$), 7.44-6.76 (4H, m, aromatic), 6.39 (1H, d, $J = 24.0$ Hz, $-\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-$), 3.83 (3H, s, $-\text{OCH}_3$).

[0075] **제조예 6: 메틸 (*E*)-2-[3-(4-사이클로헥실페닐)우레이도]신나메이트(8)의 합성**

- [0076] 톨루엔(100 mL)에 4-사이클로헥실벤조 산(3.64 g, 17.83 mmol)을 첨가한 혼합물을 제조하고, 상기 톨루엔 혼합물에 다이페닐포스포릴 아자이드(DPPA, 5.89 g, 21.40 mmol)와 트리에틸아민(3.61 g, 35.67 mmol)을 상온에서 첨가하고 3시간 동안 교반 후, 100 °C에서 3시간 동안 교반하였다. 반응물을 상온으로 냉각한 후 메틸 2-아미노신나메이트(7)(3.16 g, 17.83 mmol)을 첨가하여 12시간 동안 교반하였다. 혼합물에 메탄올을 가해 침전된 생성물을 거른 후, 메탄올로 세척하여 흰색 결정의 표제 화합물(8)을 수득하였다.
- [0077] 수율: 4.98 g(73 %),
- [0078] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (1H, d, J = 16 Hz, $-\text{C}=\text{CH}-$), 7.75-7.15 (10H, m, aromatic and $\text{Ph}-\text{NH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{Ph}-$), 6.40 (1H, d, J = 16 Hz, $-\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-$), 3.77 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 2.46 (1H, m, $-\text{Ph}-\text{CH}(\text{CH}_2)_2-$), 1.76 (4H, m, $-\text{Ph}-\text{CH}(\text{CH}_2)_2-$), 1.44-1.34 (4H, m, $-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2$), 1.30-1.23 (2H, m, $-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2$).
- [0079] **제조예 7: 메틸 (*E*)-2-(4-사이클로헥실페닐)이미노메틸렌아미노신나메이트(9)의 합성**
- [0080] 메틸 (*E*)-2-[3-(4-사이클로헥실페닐)우레이도]신나메이트(8)(2.78 g, 7.34 mmol)와 트리에틸아민(2.23 g, 22.01 mmol)을 이염화탄소(100 mL)에 첨가한 혼합물에 다이브로모트라이페닐포스핀(4.65 g, 11.01 mmol)을 0 °C에서 서서히 적가하였다. 상기 반응물을 0 °C에서 1시간 동안 교반한 후 이염화탄소로 추출하여 모아진 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨 후 감압 농축하였다. 혼합물에 메탄올을 가해 침전된 생성물을 거른 후 메탄올로 세척하여 흰색 결정의 표제 화합물(9)을 수득하였다.
- [0081] 수율: 2.12 g(80 %),
- [0082] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.17 (1H, d, J = 16 Hz, $-\text{C}=\text{CH}-$), 7.61-7.12 (8H, m, aromatic), 6.53 (1H, d, J = 16 Hz, $-\text{C}-\text{CH}=\text{CH}-$), 3.83 (3H, s, $-\text{OCH}_3$), 2.51 (1H, m, $-\text{Ph}-\text{CH}(\text{CH}_2)_2-$), 1.88 (4H, s, $-\text{Ph}-\text{CH}(\text{CH}_2)_2-$), 1.46-1.35 (4H, m, $-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2$), 1.31-1.24 (2H, m, $-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_2$).
- [0083] **제조예 8: 4-[메톡시카보닐메틸]-3-(4-사이클로헥실페닐)-2-[*N*(*N'*, *N'*-다이메틸우레도프로필)-*N*-메틸]아미노-3,4-디히드로퀴나졸린(10)의 합성**
- [0084] 메틸 (*E*)-2-(4-사이클로헥실페닐)이미노메틸렌아미노신나메이트(9)(0.61 g, 1.69 mmol)을 톨루엔(50 mL)에 첨가한 용액에 *N,N*-다이메틸-*N'*-(3-메틸아미노프로필)우레아(4)(0.27 g, 1.69 mmol)을 첨가하고 2시간 동안 교반한 후 감압 농축하였다. 이염화탄소로 추출하고 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조하여 감압농축기로 농축하였다. 실리카와 이염화탄소: 메탄올: 암모니아수(100: 9: 1 부피비) 전개액으로 칼럼크로마토그래피를 수행하여 표제 화합물(10)을 수득하였다.
- [0085] 수율: 0.87 g(99 %),
- [0086] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.28-6.92 (8H, m, aromatic), 6.37 (1H, br, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$), 5.10 (1H, dd, J = 4.8 Hz and 10.4 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{N}$), 4.09-1.21 (31H, m).
- [0087] **실시예 1: 4-[*N*-벤질아세트아미도]-3-(4-사이클로헥실페닐)-2-[*N*(*N'*, *N'*-다이메틸우레도프로필)-*N*-메틸]아미노-3,4-디히드로퀴나졸린(I-1)의 제조**
- [0088] 4-[메톡시카보닐메틸]-3-(4-사이클로헥실페닐)-2-[*N*(*N'*, *N'*-다이메틸우레도프로필)-*N*-메틸]아미노-3,4-디히드로퀴나졸린(10)(0.11 g, 0.21 mmol)와 0.3 당량의 1,5,7-트리아자바이사이클로[4.4.0]데크-5-엔 (1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene: TBD)(89 mg, 0.06 mmol)을 2.4 당량 부피의 4-벤질아민(0.06 mL)에 첨가한 후 40 °C에서 12시간 동안 교반하였다. 반응물을 감압 농축 후 농축된 물질을 실리카와 이염화탄소: 메탄올: 암모니아수(100: 9: 1 부피비) 전개액으로 칼럼크로마토그래피를 수행하여 표제 화합물(I-1)을 수득하였다.
- [0089] 수율: 90 %,

- [0090] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.22-6.83 (13H, m), 5.81 (1H, br), 5.12 (1H, dd), 4.42 (1H, dd), 4.31 (1H, dd), 4.12 (1H, br), 3.31-1.02 (28H, m).
- [0091] **실시예 2: 4-[*N*-(4-플루오로벤질)아세트아미도]-3-(4-사이클로헥실페닐)-2-[*N*(*N*,*N*-다이메틸우레도프로필)-*N*-메틸]아미노-3,4-디히드로퀴나졸린(I-2)의 제조**
- [0092] 4-[메톡시카보닐메틸]-3-(4-사이클로헥실페닐)-2-[*N*(*N*,*N*-다이메틸우레도프로필)-*N*-메틸]아미노-3,4-디히드로퀴나졸린(10)(0.11 g, 0.21 mmol)와 0.3 당량의 1,5,7-트리아자바이사이클로[4.4.0]데크-5-엔(1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene: TBD) (89 mg, 0.06 mmol)을 2.4 당량 부피의 4-플루오로벤질아민(0.06 mL)에 첨가한 후 40 °C에서 12시간 동안 교반하였다. 반응물을 감압 농축 후 농축된 물질을 실리카와 이염화탄소: 메탄올: 암모니아수(100: 9: 1 부피비) 전개액으로 칼럼크로마토그래피를 수행하여 표제 화합물(I-2)을 수득하였다.
- [0093] 수율: 96 %,
- [0094] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.69 (1H, br), 7.30-6.83 (12H, m), 5.76 (1H, br), 5.12 (1H, dd), 4.39 (1H, dd), 4.28 (1H, dd), 3.28-1.13 (31H, m).
- [0095] **실시예 3: 4-[*N*-(4-메톡시벤질)아세트아미도]-3-(4-사이클로헥실페닐)-2-[*N*(*N*,*N*-다이메틸우레도프로필)-*N*-메틸]아미노-3,4-디히드로퀴나졸린(I-3)의 제조**
- [0096] 4-[메톡시카보닐메틸]-3-(4-사이클로헥실페닐)-2-[*N*(*N*,*N*-다이메틸우레도프로필)-*N*-메틸]아미노-3,4-디히드로퀴나졸린(10)(0.11 g, 0.21 mmol)와 0.3 당량의 1,5,7-트리아자바이사이클로[4.4.0]데크-5-엔(1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene: TBD) (89 mg, 0.06 mmol)을 2.4 당량 부피의 4-메톡시벤질아민(0.06 mL)에 첨가한 후 40 °C에서 12시간 동안 교반하였다. 반응물을 감압 농축 후 농축된 물질을 실리카와 이염화탄소: 메탄올: 암모니아수(100: 9: 1 부피비) 전개액으로 칼럼크로마토그래피를 수행하여 표제 화합물(I-3)을 수득하였다.
- [0097] 수율: 97 %,
- [0098] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.67 (1H, br), 7.23-6.68 (12H, m), 6.02 (1H, br), 5.13 (1H, dd), 4.43 (1H, dd), 4.20 (1H, dd), 3.67 (3H, s), 3.25-1.18 (31H, m).
- [0099] **시험예 1: HEK 293 세포 배양법 및 전기생리학적 방법을 이용한 T-형 칼슘 채널 활성 측정법**
- [0100] 배양용액은 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum), 1% 페니실린/스트렙토마이신(v/v)을 넣어 만들어 사용하고, 세포는 95% 공기/ 5% CO_2 의 습한 조건의 인큐베이터에서 온도 36.5 °C에서 배양하였다. 배양용액은 3-4일에 한번씩 바꾸어주고 세포는 매 일주일마다 분주(sub-culture)해주며 G-418(0.5 mg/ml) 용액을 사용하여 α_{1G} T-형 칼슘채널을 발현시킨 세포(HEK 293)만을 자라게 하였다. T-형 칼슘채널 활성 측정법에 사용된 세포들은 매번 분주할 때 폴리-L-리신(0.5 mg/mL)으로 코팅 처리한 커버 슬립에 배양한 후 2-7일 후에 기록하였다. 단일세포 수준에서 T-형 칼슘채널의 전류 측정을 위해 EPC-9 증폭기(HEKA, German)를 사용하여 전기생리학적 전세포 패치 클램프 방법으로 측정하였다. T-형 칼슘 채널 활성 측정법의 용액 조성으로는 세포 외부용액으로 NaCl 140 mM, CaCl_2 2 mM, HEPES 10 mM(pH 7.4)을 사용하고, 세포 내부용액으로는 KCl 130 mM, HEPES 10 mM, EGTA 11 mM, MgATP 5 mM(pH 7.4)을 사용하였다. 낮은 전압에서 활성화되는 T-형 칼슘채널 활성 프로토콜로는 위에서 만든 세포 내부용액을 넣은 3-4 M Ω 저항의 미세유리 전극을 단일세포에 찔러 전세포 기록(whole-cell recording) 모드가 되게 한 후 세포막 전위를 -100 mV로 고정된 후 매 10초마다 -30 mV(50 ms 지속시간)로 저분극시켰을 때의 T-형 칼슘채널 활성으로 인한 내향전류의 크기를 측정하였다.
- [0101] **시험예 2: 암의 세포독성 활성 측정법**

[0102] 인체 폐암 세포인 A549 세포주와 인체 췌장암 세포인 PANC-1 세포주를 한국세포주은행(Korean cell line bank: KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 세포배양은 RPMI 1640에 열처리하여 불활성화시킨 10% 소태아 혈청(fetal bovine serum, FBS), 페니실린(100 units/ml) 및 스트렙토마이신 황산염(100 units/ml)을 첨가한 배지를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 배양하였다.

[0103] 약물의 세포독성을 확인하기 위하여 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 -diphenyltetrazolium bromide) 어세이법을 이용하여 하기와 같이 실험을 수행하였다[Armichael et al., Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemisensitivity testing. Cancer Research, 47, pp.944-946, 1987]. MTT 어세이법은 살아있는 세포의 경우 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의하여 수용성의 테트라졸륨 염(tetrazolium salt) MTT(노란색)가 포마잔 크리스탈(formazan crystals; 보라색)로 환원되는 것이 기본 원리로서, 즉 살아있는 세포의 수가 많을수록 포마잔 크리스탈 생성이 증가하여 흡광도가 높게 측정된다.

[0104] 배양한 각각의 암세포들을 96-웰 플레이트에 접종(5×10^4 cells/well)하고 5% FBS를 함유한 RPMI 배지 100 μ l에 24시간 배양시켰다. 약물을 다양한 농도(200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 μ M)로 처리하고 48시간 후, 20 μ l의 MTT 용액(5.0 mg/ml)을 각 웰에 첨가하고 추가로 4시간 더 배양시킨 다음, 상기 플레이트 상등액을 수득하고, MTT에 의해 생성된 세포내의 포마잔 결정을 200 μ l의 DMSO를 첨가하여 침전물을 용해한 후, OD값을 마이크로 플레이트 리더기(microplate reader, Molecular Devices)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다.

[0105] 시험예 3: 암의 세포주기차단 활성 측정법

[0106] 시험예 3-1: PI 염색법(staining)

[0107] 암세포의 세포사멸 정도를 정량적으로 알아보기 위해서, 세포주기 분석은 유세포분석기(Flow cytometry)를 이용하여 문헌에 기재된 방법으로 하기와 같이 실험을 진행하였다[Kim, Y. H. et al., Expression of the murine homologue of the cell cycle control protein p32cdc2 in T lymphocytes. Journal of Immunology, 149, pp.17-23, 1992].

[0108] 약물을 48시간 동안 처리한 A549 세포(1.0×10^5 cell/well)를 70% 빙냉 에탄올(ice-cold ethanol)로 고정시켜 4℃에서 하룻밤 동안 방치하고, 리보뉴클레아제(ribonuclease)(2.5 μ g/ml)와 프로피디움 요오드화물(propidium iodide)(50 μ g/ml)를 500 μ l의 PBS와 함께 넣어 섞은 후 상온, 차광상태에서 30분 동안 방치한 다음, 1시간 이내에 유세포분석기(FACScan flow cytometer; Becton Dickinson Co, Heidelberg, Germany)를 이용하여 세포주기를 분석하였다.

[0109] 시험예 3-2: 아넥신(Annexin) V-FITC/PI 이중염색 분석법(double staining assay)

[0110] 세포사멸 중에 세포막 표면으로 노출되는 포스파티딜 세린은 Annexin V-FITC와 결합하여 형광을 나타낸다. 약물을 처리한 뒤 세포를 모아 빙냉 PBS로 두 번 세척하고 100 μ l의 Annexin V 결합 완충제(10 mM 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid(HEPES)/NaOH, 140 mM NaCl, 2.5mM CaCl₂, pH 7.4)로 섞었다. 여기에 5 μ l의 FITC-결합(conjugated) Annexin V와 PI(50 μ g/ml)을 넣어주었다. 이 혼합물을 30분간 상온, 암실에서 방치한 뒤 1시간 이내에 유세포분석기(FACScan flow cytometer; Becton Dickinson Co, Heidelberg, Germany)를 이용하여 분석하였다.

[0111] 시험예 4: 복합 지수(combination index: CI) 평가

[0112] 암세포에 특정 약물을 단독 및 복합(combination) 처리하고, 암세포의 독성 또는 성장억제 효과를 상대 비교하여 이를 수식적으로 계산한 것을 복합 지수(combination index: CI)라고 한다. 이는 Paul Talalay와 Ting-Chao Chou가 공동으로 도입한 정량적인 개념으로 CalcuSyn이란 소프트웨어를 사용하여 계산된다. CI의 값에 따른 복합 처리의 효과는 다음과 같이 정의한다.

[0113] ● CI < 0.9: 상승효과(synergism)

[0114] ● CI = 0.9-1.1: 단순 부가효과(additivity)

[0115] ● CI > 1.1: 길항효과(antagonism)

[0116] 상기 시험예에 따라 측정된 본 발명의 화합물들의 T-형 칼슘채널 차단효과와 폐암 세포(A549)에 대한 세포독성 및 세포주기차단 효과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

화합물	T-형 칼슘채널 차단효과 (IC ₅₀ : μM)	세포독성	24 시간				48시간			
		A549 (IC ₅₀ : μM)	SubG1	G0/G1	S	G2/M	SubG1	G0/G1	S	G2/M
대조군	-	-	7.8	53.1	17.6	21.6	4.9	57.8	12.0	25.4
I-1	0.39±0.11	12.2	3.6	65.5	16.1	14.8	6.6	59.9	15.8	17.7
I-2	0.89±0.06	7.3	4.7	63.6	12.4	19.3	3.5	67.7	14.5	14.3
I-3	ND	8.0	3.8	71.2	9.4	15.6	4.0	67.2	16.3	12.4
미베프라딜	1.34±0.49	24.9	5.3	67.3	10.4	17.1	10.3	55.9	18.8	14.9

[0118] 상기 표 1에서 보듯이, 본 발명에 따른 3,4-디히드로퀴나졸린 유도체는 대조군 및 양성 대조물질인 미베프라딜(mibefradil)보다 암세포에서 과발현되는 T-형 칼슘채널을 차단하고, 암세포의 세포주기를 G0/G1과 S단계의 중간단계에서 차단하는 효과가 우수함을 확인할 수 있었다.

[0119] 상기 시험예에 따라 폐암 세포(A549)에 본 발명의 화합물(I-2)를 기존 항암제인 시스플라틴(Cisplatin)과 48시간 동안 복합 처리한 후, PI 염색법으로 암세포의 세포주기를 분석하고, SubG1(즉, 세포사멸) 값을 기준으로 얻은 CI 값을 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

	SubG1	G0/G1	S	G2/M	CI
대조군	1.7	68.7	16.1	12.2	
시스플라틴(20 μM)	10.5	9.0	13.1	67.5	
시스플라틴(30 μM)	17.0	14.0	15.8	52.9	
I-2(10 μM)	7.6	79.1	2.4	10.9	
시스플라틴(20 μM) + I-2(10 μM)	29.1	48.1	10.4	12.5	0.577
시스플라틴(30 μM) + I-2(10 μM)	52.3	32.4	6.1	9.4	0.371

[0121] 상기 시험예에 따라 췌장암 세포(PANC-1)에 본 발명의 화합물(I-2)를 기존 항암제인 시스플라틴(Cisplatin)과 48시간 동안 복합 처리한 후, PI 염색법으로 암세포의 세포주기를 분석하고, SubG1(즉, 세포사멸) 값을 기준으로 얻은 CI 값을 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

	SubG1	G0/G1	S	G2/M	CI
대조군	1.8	37.2	8.4	36.5	
시스플라틴(30 μM)	9.3	42	9.4	29.4	
I-2(2.5 μM)	2.5	44.7	7.2	35	
시스플라틴 + I-2	25.2	35.5	7.7	24.9	0.755

[0123] 상기 시험예에 따라 폐암 세포(A549)에 본 발명의 화합물(I-2)를 기존 항암제인 에토포시드(Etoposide)와 48시간 동안 복합 처리한 후, PI 염색법으로 암세포의 세포주기를 분석하고, SubG1(즉, 세포사멸) 값을 기준으로 얻은 CI 값을 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

[0124]

	SubG1	G0/G1	S	G2/M	CI
대조군	0.9	61.1	12.4	24.8	
에토포시드(50 μ M)	33.0	36.0	12.3	18.9	
I-2(10 μ M)	4.0	77.4	5.4	13.3	
에토포시드 + I-2	83.1	7.9	6.2	3.2	0.166

[0125]

상기 시험예에 따라 폐암 세포(A549)에 본 발명의 화합물(I-2)를 기존 항암제인 엘로티닙(erlotinib), 게피티닙(Gefitinib), 이마티닙(Imatinib) 또는 독소루비신(Doxorubicin)과 48시간 동안 복합 처리한 후, PI 염색법으로 암세포의 세포주기를 분석하고, SubG1(즉, 세포사멸) 값을 기준으로 얻은 CI 값을 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0126]

	SubG1	G0/G1	S	G2/M	CI
대조군	1.8	62.9	15.1	20.9	
I-2(10 μ M)	3.7	76.8	7.6	12.1	
엘로티닙(150 μ M)	9.6	70.6	7.2	12.9	
게피티닙(40 μ M)	11.6	72.7	4	11.8	
이마티닙(100 μ M)	2.9	72.4	10.7	14.4	
독소루비신(10 μ M)	33.5	36.7	11.9	18.3	
엘로티닙 + I-2	97.9	1.9	0.2	0.1	0.271
게피티닙 + I-2	96	3.7	0.3	0.1	0.150
이마티닙 + I-2	86.7	11.4	1.4	0.9	0.493
독소루비신 + I-2	72.1	14.7	4.9	8.4	0.101

[0127]

상기 시험예에 따라 폐암 세포(A549)에 본 발명의 화합물(I-3)을 기존 항암제인 엘로티닙(erlotinib), 게피티닙(Gefitinib), 이마티닙(Imatinib) 또는 독소루비신(Doxorubicin)과 48시간 동안 복합 처리한 후, PI 염색법으로 암세포의 세포주기를 분석하고, SubG1(즉, 세포사멸) 값을 기준으로 얻은 CI 값을 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

[0128]

	SubG1	G0/G1	S	G2/M	CI
대조군	1.8	62.9	15.1	20.9	
I-3(10 μ M)	3.7	76.8	7.6	12.1	
엘로티닙(300 μ M)	70.3	27.7	1	1.2	
게피티닙(40 μ M)	11.6	72.7	4	11.8	
이마티닙(100 μ M)	2.9	72.4	10.7	14.4	
독소루비신(10 μ M)	33.5	36.7	11.9	18.3	
엘로티닙 + I-3	98.1	1.7	0.1	0.1	0.507
게피티닙 + I-3	98.1	1.5	0.2	0.2	0.100
이마티닙 + I-3	89.2	7.5	1.5	1.9	0.448
독소루비신 + I-3	52.1	22.0	9.7	16.5	0.204

[0129]

상기 표 2 내지 6에서 보듯이, 본 발명의 화합물을 기존 항암제와 복합 처리 한 경우, 단독 처리할 때와 비교하여 CI 값이 0.100-0.755로서 강력한 상승효과 (synergism)를 보이는 것을 확인할 수 있었다.

[0130]

상기 시험예에 따라 폐암 세포(A549)의 세포사멸 중에서 아포토시스(apoptosis) 관련 초기(early) 아포토시스(AV+/PI-)와 총 AV+[초기 아포토시스(AV+/PI-) 및 후기(late) 아포토시스(AV+/PI+)]를 더함]을 확인하여 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

	AV+/PI-	CI	총 AV+	CI
대조군	1.22		5.18	
I-2(2.5 μ M)	2.4		6.08	
I-2(5 μ M)	1.88		4.78	
I-2(10 μ M)	8.8		13.14	
에토포시드(50 μ M)	19.1		31.68	
에토포시드(50 μ M) + I-2(2.5 M)	25.14	0.773	37.52	0.766
에토포시드(50 μ M) + I-2(5 M)	29.48	0.671	45.18	0.545
에토포시드(50 μ M) + I-2(10 M)	49.06	0.342	61.96	0.257

표 7에서 보듯이, 에토포시드는 본 발명의 화합물에 농도 의존적으로 시너지한 아포토시스 유도 증가를 나타냄을 확인할 수 있었다.