



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2010년10월25일
(11) 등록번호 10-0989029
(24) 등록일자 2010년10월14일

(51) Int. Cl.

C07D 513/04 (2006.01) C07D 471/04 (2006.01)

C07D 471/14 (2006.01) C07D 513/14 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7008765

(22) 출원일자(국제출원일자) 2005년09월16일

심사청구일자 2007년10월31일

(85) 번역문제출일자 2007년04월17일

(65) 공개번호 10-2007-0085264

(43) 공개일자 2007년08월27일

(86) 국제출원번호 PCT/US2005/033323

(87) 국제공개번호 WO 2006/034113

국제공개일자 2006년03월30일

(30) 우선권주장

11/149,007 2005년06월09일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

US06821969 B2

US07141565 B1

WO1992003136 A1

전체 청구항 수 : 총 40 항

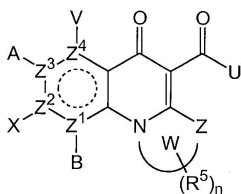
심사관 : 여경숙

(54) 세포 증식 억제제로서의 퀴놀론 동족체

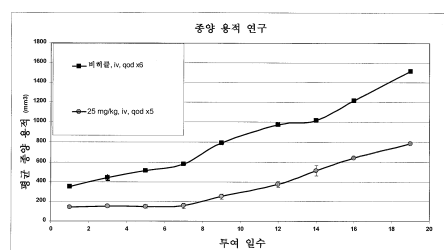
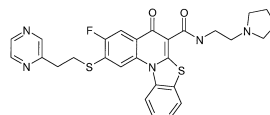
(57) 요약

본 발명은 세포 증식을 억제하고/거나 세포 아포토시스를 유도할 수 있는 화학식 1의 퀴놀론 동족체에 관한 것이다. 본 발명은 또한 퀴놀론 동족체의 제조방법 및 이의 사용방법에 관한 것이다.

화학식 1



대표도 - 도1



(72) 발명자

레간 콜린

미국 캘리포니아주 92155 산 디에고 #56 콜우드 웨이 5046

슈웨브 마이클

미국 캘리포니아주 92130 산 디에고 캐리 레인 13933

이안니코우로스 조지 페트로스

미국 사우스캐롤라이나주 29505 플로렌스 브리가둔 레인 1864

정 마이클

미국 캘리포니아주 90064 로스 앤젤레스 만닝 애브뉴 2335

나가사와 조니 와이

미국 캘리포니아주 92126 산 디에고 레벨스톡 웨이 8976

추아 피터

미국 캘리포니아주 92129 산 디에고 시에라 메사 로드 13102

(30) 우선권주장

60/611,030 2004년09월17일 미국(US)

60/638,603 2004년12월22일 미국(US)

60/688,796 2005년06월09일 미국(US)

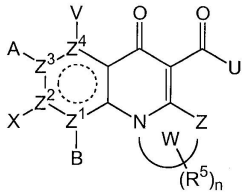
60/688,986 2005년06월09일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

화학식 1의 화합물 및 약제학적으로 허용되는 이의 염.

화학식 1



위의 화학식 1에서,

Z^1 및 Z^3 은 각각 독립적으로 C 또는 N이고;

Z^2 및 Z^4 는 둘 다 C이며;

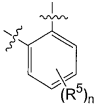
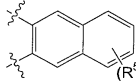
Z^3 이 N인 경우 A는 부재이고 Z^3 이 C인 경우 A는 H, 할로, SR^2 또는 NR^1R^2 이고;

Z^1 이 N인 경우 B는 부재이고 또는 Z^1 이 C인 경우 B는 H 또는 할로이며;

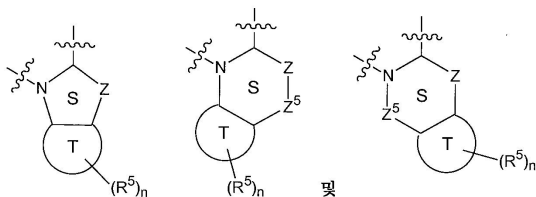
V는 H, 할로 또는 NR^1R^2 이고;

X는 H, 할로, SR^2 또는 NR^1R^2 이며;

Z는 O, S 또는 NR^1 이고;

W는 N 및 Z와 함께  및  로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아릴환에 융합되는 5 또는 6 원의 환을 형성하거나;

W가 N 및 Z와 함께



로 이루어진 그룹으로부터 선택된 환을 형성하고,

여기서, Z는 O, S 또는 NR^1 이고;

각각의 Z^5 는 CR^6 또는 $C=O$ 이고;

각각의 R^1 이 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

R^6 가 H, 또는 하이드록실, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, 할로, 아미노 또는 아미도이고;

환 S가 5-6원 환이고 환 T가 페닐환이며;

U는 NR^1R^2 , 또는 $NR^1-(CR^1_2)_n-NR^3R^4$ 이고;

단, U가 NH₂인 경우, Z¹ 및 Z³ 중 하나 이상은 N이고;

각각의 NR¹R²에서, R¹ 및 R²는 N와 함께, 비치환되거나 하이드록실, C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 알콕시, 할로, 아미노, 아미도, C₁₋₄ 아실 또는 6원 아릴 또는 5-6원 헤테로아릴 환으로 치환되는 5-6원 헤테로사이클릭 환을 형성할 수 있고;

NR³R⁴에서, R³ 및 R⁴는 N과 함께, 비치환되거나 하이드록실, C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 알콕시, 할로, 아미노, 아미도, 또는 C₁₋₄ 아실로 치환되는 5-6원 헤테로사이클릭 환을 형성할 수 있으며;

R¹ 및 R³은 독립적으로 H 또는 C₁₋₆ 알킬이고;

각각의 R²는 H, 또는 비치환되거나, 5 내지 6원 카보사이클릭 환, N, O 또는 S 중 하나 이상을 함유하는 5 내지 6원 헤테로사이클릭 환, 6원 아릴 환 또는 5 내지 6원 헤테로아릴 환으로 치환된 C₁₋₁₀ 알킬이고, 여기서 각각의 환은 비치환되거나, 하이드록실, C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 알콕시, 할로, 아미노, 아미도, 또는 C₁₋₄ 아실로 치환되고;

R⁴는 H 또는 C₁₋₁₀ 알킬이고;

각각의 R⁵는 환 W 또는 환 T 상에 존재하고, H, OR², 아미노, C₁₋₄ 알콕시, 아미도, 할로젠, 또는 시아노이고; 또는 R⁵는 비치환되거나 각각 할로, 카보닐 또는 하나 이상의 인접하지 않은 N, O 및 S 중에서 선택된 헤테로원자로 치환된 C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐 또는 -CONHR¹이고;

n은 1 내지 6이다.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, W가 N 및 Z와 함께 페닐에 융합된 5 또는 6원의 환을 형성하는 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서,

U가 NR¹R²이고,

R¹이 H이고, R²가 비치환되거나 6원 아릴, 또는 하나 이상의 N, O 또는 S를 함유하는 5 내지 6원의 헤테로사이클릭 환으로 치환된 C₁₋₁₀ 알킬인 화합물.

청구항 5

제4항에 있어서, R²가 모르폴린, 티오모르폴린, 피롤리딘, 피페라진, 또는 피페리딘 환으로 치환된 C₁₋₁₀ 알킬이고, 이때 각각의 환은 비치환되거나, 하이드록실, C₁₋₄ 알킬, C₁₋₄ 알콕시, 할로, 아미노, 아미도, 또는 C₁₋₄ 아실로 치환되는 화합물.

청구항 6

제1항에 있어서,

U가 NR¹-(CR₂¹)_n-NR³R⁴이고;

n이 1 내지 4이고;

NR^3R^4 에서 R^3 및 R^4 가 함께, 비치환되거나 하이드록실, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, 할로, 아미노, 아미도, 또는 C_{1-4} 아실로 각각 치환된 피페리딘, 피롤리딘, 피페라진, 모르폴린 또는 티오모르폴린을 형성하는 화합물.

청구항 7

제1항에 있어서, U가 $NH-(CH_2)_n-NR^3R^4$ 이고, 여기서 R^3 및 R^4 는 N과 함께, 비치환되거나 하이드록실, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, 할로, 아미노, 아미도, 또는 C_{1-4} 아실로 치환된 피롤리딘 환을 형성하는 화합물.

청구항 8

제1항에 있어서, U가 2-(N-메틸피롤리딘-2-일)에틸아미노 또는 (2-피롤리딘-1-일)에탄아미노인 화합물.

청구항 9

제1항에 있어서, A 및 X가 독립적으로 할로 또는 SR^2 이고, 여기서 R^2 는 비치환되거나, 6원 아릴 또는 5 내지 6원 헤테로아릴 환으로 치환된 C_{1-10} 알킬인 화합물.

청구항 10

제9항에 있어서, R^2 가 페닐 또는 피라진으로 치환된 C_{1-10} 알킬인 화합물.

청구항 11

제1항에 있어서, 각각의 Z^1 , Z^2 , Z^3 및 Z^4 가 C인 화합물.

청구항 12

제1항에 있어서, Z^1 및 Z^3 중 1개가 C이고, 나머지 하나가 N인 화합물.

청구항 13

제1항에 있어서, Z^1 및 Z^3 이 N인 화합물.

청구항 14

삭제

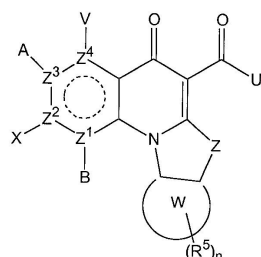
청구항 15

제1항에 있어서, Z^1 이 N인 화합물.

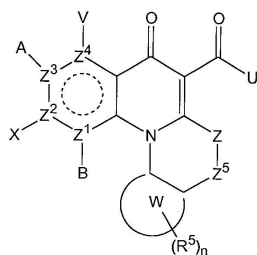
청구항 16

제1항에 있어서, 화학식 2A 또는 2B의 화합물.

화학식 2A



화학식 2B



위의 화학식 2A 및 2B에서,

A, B, V, X, U, Z, Z¹, Z², Z³, Z⁴ 및 n은 상기 기재된 바와 같고;

Z⁵는 CR⁶ 또는 C=O이고;

R⁶은 H, C₁₋₄ 알킬, 하이드록실, C₁₋₄알콕시, 할로, 아미노 또는 아미도이고;

W는 페닐 환이고;

각각의 R⁵는 환 W 상에 존재하고, H, OR², 아미노, C₁₋₄ 알콕시, 아미도, 할로겐 또는 시아노이거나, R⁵는 C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, C₂₋₆ 알키닐 또는 -CONHR¹이고, 이들 각각은 비치환되거나 할로, 카보닐, 또는 N, O 및 S 중에서 선택된 하나 이상의 인접하지 않은 헤테로원자에 의해 치환되며;

n은 1 내지 4이다.

청구항 17

제1항에 있어서, Z가 NR¹이고, R¹이 C₁₋₆ 알킬인 화합물.

청구항 18

제17항에 있어서, R¹이 메틸인 화합물.

청구항 19

제1항에 있어서, B, A, X 및 V 중 하나 이상이 할로이고, 상응하는 인접한 Z¹ 내지 Z⁴가 C인 화합물.

청구항 20

제1항에 있어서, V가 H인 화합물.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

제1항의 화합물의 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 시스템 또는 대상체에서 종양 또는 암을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

제1항의 화합물의 유효량 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 시스템 또는 대상체에서 미생물 감염증을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 27

삭제

청구항 28

제26항에 있어서, 미생물 감염증이 바이러스성, 박테리아성 또는 진균성 감염증인 약제학적 조성물.

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

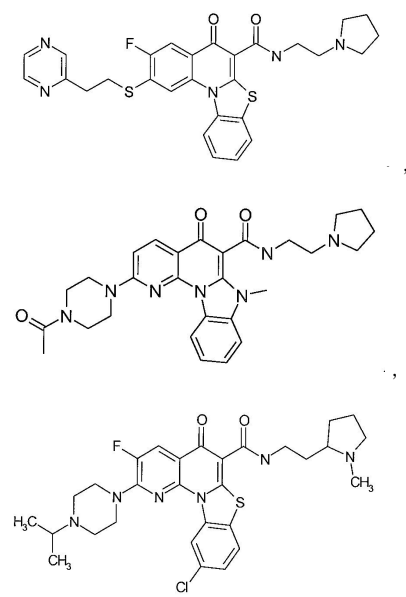
삭제

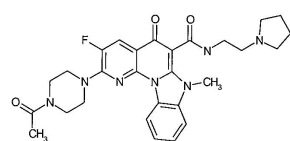
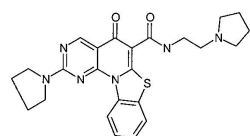
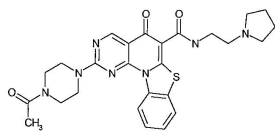
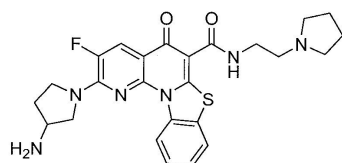
청구항 32

삭제

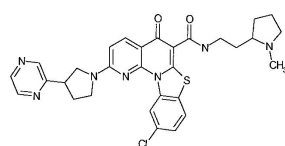
청구항 33

화학식





또는



의 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 이의 염.

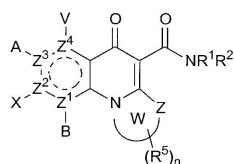
청구항 34

제23항 또는 제26항에 있어서, 화학식 1의 화합물이 제33항의 화합물인 약제학적 조성물.

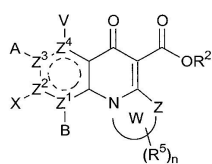
청구항 35

화학식 3의 에스테르, 화학식 NHR^1R^2 의 아민, 및 BL_3 , AlL_3 , FeL_3 , GaL_3 , SbL_5 , InL_3 , ZrL_4 , SnL_4 , TiL_4 , TiL_3 , AsL_3 , 및 SbL_3 로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 루이스산(여기서, L은 할로 또는 C_{1-4} 알킬이다)을 접촉시킴을 포함하는 화학식 1의 화합물의 제조방법.

화학식 1



화학식 3



위의 화학식 1 및 3에서,

Z^1 및 Z^3 은 각각 독립적으로 C 또는 N이고;

Z^2 및 Z^4 는 둘 다 C이며;

Z^3 이 N인 경우 A는 부재이고 Z^3 이 C인 경우 A는 H, 할로, SR^2 또는 NR^1R^2 이고;

Z^1 이 N인 경우 B는 부재이고 또는 Z^1 이 C인 경우 B는 H 또는 할로이며;

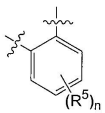
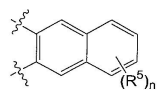
V는 H, 할로 또는 NR^1R^2 이고;

X는 H, 할로, SR^2 또는 NR^1R^2 이며;

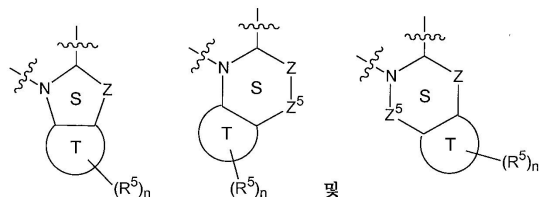
Z는 O, S 또는 NR^1 이고;

각각의 R^1 은 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

각각의 R^2 는 H, 또는 비치환되거나 5 내지 6원 카보사이클릭 환, N, O 및 S 중 하나 이상을 함유하는 5 내지 6원 헤테로사이클릭 환, 6원 아릴 또는 5 내지 6원 헤테로아릴 환으로 치환되는 C_{1-10} 알킬이고, 여기서 각각의 환은 비치환되거나, 하이드록실, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, 할로, 아미노, 아미도, 또는 C_{1-4} 아실로 치환되고;

각각의 W는 N 및 Z와 함께  및  로 이루어진 그룹 중에서 선택되는 아릴 또는 헤테로아릴 환과 융합된 5 또는 6원의 환을 형성하거나,

W가 N 및 Z와 함께



로 이루어진 그룹으로부터 선택된 환을 형성하고,

여기서, Z는 O, S 또는 NR^1 이고;

각각의 Z^5 는 CR^6 또는 $C=O$ 이고;

각각의 R^1 이 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;

R^6 가 H, 또는 하이드록실, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, 할로, 아미노 또는 아미도이고;

환 S가 5-6원 환이고 환 T가 페닐환이며;

각각의 R^5 는 환 W 또는 환 T 상에 존재하고, H, OR^2 , 아미노, C_{1-4} 알콕시, 아미도, 할로젠 또는 시아노이거나;

R^5 는 C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐 또는 $-CONHR^1$ 이고, 이들은 각각 비치환되거나 할로, 카보닐 또는 N, O 및 S 중에서 선택된 하나 이상의 인접하지 않은 헤테로원자로 치환되며;

n은 1 내지 6이다.

청구항 36

제35항에 있어서, 에스테르, 아민 및 루이스산이 실온에서 접촉되는 방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 에스테르와 아민을 유기 용매 중에서 접촉시켜 용액을 형성하고, 당해 용액을 루이스산과 접촉시킴을 포함하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 유기 용매가 염화메틸렌인 방법.

청구항 39

제35항에 있어서, 에스테르에 비해 과량의 아민이 사용되는 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 에스테르 대 아민의 비율이 1:2, 1:1.5 또는 1:1.25인 방법.

청구항 41

제35항에 있어서, 아민에 대해 동일한 몰량의 루이스산이 사용되는 방법.

청구항 42

제35항에 있어서, 화학식 1의 화합물을 분리하고, 화학식 1의 분리된 화합물을 정제하거나 정제하지 않음을 추가로 포함하는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 분리된 화합물을 컬럼 크로마토그래피, 재결정화 또는 컬럼 크로마토그래피 및 재결정화로 정제하는 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 분리된 화합물의 순도가 90 내지 99% 또는 90 내지 95%인 방법.

청구항 45

제35항에 있어서, 에스테르를 화학식 NHR^1R^2 의 아민과 접촉하는 방법으로서,

아민의 화학식에서 R^1 이 $(\text{CR}_2^3)_n$ 그룹이고,

R^2 가 NR^3R^4 이고,

R^3 이 H 또는 C_{1-6} 알킬이고,

n 이 1 내지 6이고,

R^4 가 H, 또는 C_{1-10} 알킬이거나;

NR^3R^4 에서, R^3 및 R^4 가 N과 함께, 치환되지 않거나 하이드록실, C_{1-4} 알킬, C_{1-4} 알콕시, 할로, 아미노, 아미도 또는 C_{1-4} 아실로 치환된 5 내지 6원 헤테로사이클릭 환을 형성할 수 있는 방법.

청구항 46

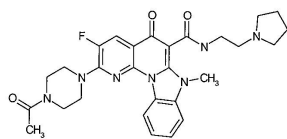
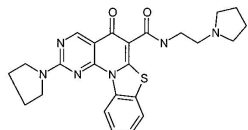
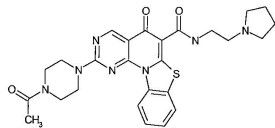
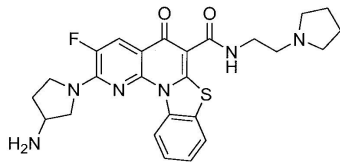
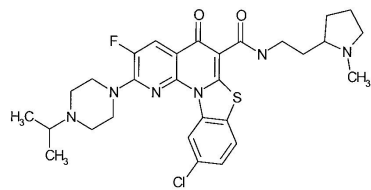
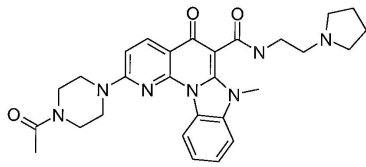
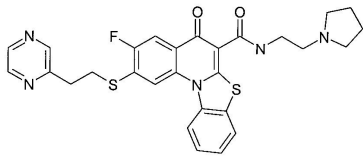
삭제

청구항 47

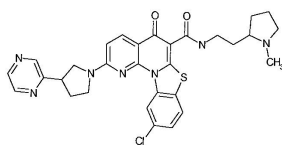
제35항에 있어서, 루이스산이 염화알루미늄인 방법.

청구항 48

제35항에 있어서,



및



로 이루어진 그룹으로부터 선택된 화합물을 제조하기 위한 방법.

청구항 49

제23항에 있어서, 치료법, 화학요법제 또는 이들 둘 다와 함께 사용되는 약제학적 조성물.

청구항 50

제26항에 있어서, 항미생물제와 함께 사용되는 약제학적 조성물.

청구항 51

제49항에 있어서, 화학요법제가 젬시타빈인 약제학적 조성물.

청구항 52

제49항에 있어서, 치료법이 방사능요법 또는 외과적 수술인 약제학적 조성물.

명세서

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 각각의 전문이 본원에 참조로서 인용되는 2005년 6월 9일에 출원된 미국 특허원 제11/149,007호, 2004년 9월 17일에 출원된 미국 가특허원 제60/611,030호, 2005년 6월 9일에 출원된 미국 가특허원 제60/688,986호, 2004년 12월 22일에 출원된 미국 가특허원 제60/638,603호 및 2005년 6월 9일에 출원된 미국 가특허원 제60/688,796호에 관한 것이다.

기술분야

[0003] 본 발명은 퀴놀론 동족체 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 또한 퀴놀론 동족체의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

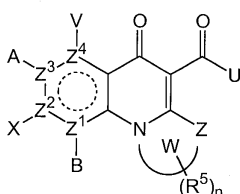
[0004] 생체내에서 염색체의 소립 말단 및 발암유전자 조절 영역을 포함하는 게놈의 특정한 영역에 4중 가닥 구조가 존재할 수 있다는 증거가 제안되었다[참조: Han, et al., Trends Pharm. Sci.(2000) 21:136-142]. 4중 가닥 구조는 핵산의 퓨린-풍부한 가닥(strand)에서 형성될 수 있다. 2중 핵산에서, 특정한 퓨린 풍부 가닥은 전형적인 2중 나선 구조 사이의 느린 평형 및 비나선 및 비-B-형태 영역에 관여할 수 있다. 이들 비나선 및 비-B 형태는 "평행 구조"로서 지칭될 수 있다. 일부 형태는 S1 뉴클레아제 분해에 대한 선택성과 관련이 있고, 이는 "뉴클레아제 과민감성 요소" 또는 "NHEs"로 설명될 수 있다. 4중 가닥은 평행 구조 중 하나의 타입이고, 특정한 NHEs는 4중 가닥 구조를 채택할 수 있다.

[0005] 발명의 개요

[0006] 본 발명은 세포 증식을 억제하고/거나 세포 아포토시스를 유발할 수 있는 퀴놀론 동족체를 제공한다. 본 발명은 또한 퀴놀론 동족체의 제조방법 및 이의 사용방법을 제공한다.

[0007] 하나의 국면에서, 본 발명은 화학식 1의 화합물 및 약제학적으로 허용되는 이의 염, 에스테르 및 전구약물을 제공한다.

화학식 1



[0008]

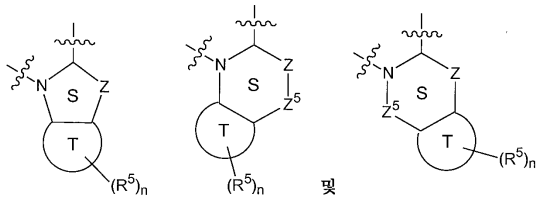
[0009] 위의 화학식 1에서,

[0010] B, X, A 또는 V는 Z^2 , Z^3 또는 Z^4 가 각각 N인 경우 존재하지 않고, Z^2 , Z^3 또는 Z^4 가 각각 C인 경우, 독립적으로 H, 할로, 아지도, R^2 , CH_2R^2 , SR^2 , OR^2 또는 NR^1R^2 이거나;

- [0011] A 및 V, A 및 X 또는 X 및 B는 사이클릭 환으로 임의로 치환되고/거나 사이클릭 환에 융합될 수 있는 카보사이클릭 환, 헤테로사이클릭 환, 아릴 또는 헤테로아릴을 형성할 수 있고;
- [0012] Z는 O, S, NR^1 , CH_2 또는 C=O 이고;
- [0013] Z^1 , Z^2 , Z^3 및 Z^4 는 C 또는 N이고, 단 임의의 2개의 N은 인접하지 않고;
- [0014] W는 N 및 Z와 함께 임의로 치환된 포화 또는 불포화 환에 융합된 임의로 치환된 5 또는 6원의 환을 형성하고; 상기 포화 또는 불포화 환은 헤테로원자를 함유할 수 있고, 모노사이클릭이거나 단일 또는 다중 카보사이클릭 또는 헤테로사이클릭 환에 융합되고;
- [0015] U는 R^2 , OR^2 , NR^1R^2 , $\text{NR}^1-(\text{CR}^1_2)_n-\text{NR}^3\text{R}^4$ 또는 $\text{N}=\text{CR}^1\text{R}^2$ 이고, 여기서 $\text{N}=\text{CR}^1\text{R}^2\text{R}^1$ 및 R^2 은 C와 함께 환을 형성할 수 있고,
- [0016] 단, U는 H가 아니고, U가 OH, OR^2 또는 NH_2 인 경우 Z^1 내지 Z^4 중 하나 이상은 N이고;
- [0017] 각각의 NR^1R^2 에서, R^1 및 R^2 은 N와 함께 임의로 치환된 환을 형성할 수 있고;
- [0018] NR^3R^4 에서, R^3 및 R^4 은 N과 함께 임의로 치환된 환을 형성하고;
- [0019] R^1 및 R^3 은 독립적으로 H 또는 C_{1-6} 알킬이고;
- [0020] 각각의 R^2 은 H, 또는 각각 할로젠, 하나 이상의 인접하지 않은 헤테로원자, 카보사이클릭 환, 헤테로사이클릭 환, 아릴 또는 헤테로아릴로 임의로 치환된 C_{1-10} 알킬 또는 C_{2-10} 알케닐이고, 여기서 각각의 환은 임의로 치환되고; 또는 R^2 은 임의로 치환된 카보사이클릭 환, 헤테로사이클릭 환, 아릴 또는 헤테로아릴이고;
- [0021] R^4 는 H; N, O 및 S로부터 선택된 하나 이상의 인접하지 않은 헤테로원자를 임의로 함유하고 카보사이클릭 또는 헤테로사이클릭 환으로 임의로 치환된 C_{1-10} 알킬 또는 C_{2-10} 알케닐이고; 또는 R^3 및 R^4 은 N과 함께 임의로 치환된 환을 형성할 수 있고;
- [0022] 각각의 R^5 는 환 W 상의 임의의 위치의 치환체이고; H, OR^2 , 아미노, 알콕시, 아미도, 할로젠, 시아노 또는 무기 치환체이고; 또는 R^5 는 각각 할로, 카보닐 또는 하나 이상의 인접하지 않은 헤테로원자로 임의로 치환된 C_{1-6} 알킬, C_{2-6} 알케닐, C_{2-6} 알키닐 또는 $-\text{CONHR}^1$ 이고; 또는 2개의 인접한 R^5 는 연결되어 추가의 임의로 치환된 카보사이클릭 또는 헤테로사이클릭 환에 융합될 수 있는 5 또는 6원의 임의로 치환된 카보사이클릭 또는 헤테로사이클릭 환을 형성하고;
- [0023] n은 1 내지 6이다.
- [0024] 상기 화학식 1에서, B는 Z^1 이 N인 경우 존재하지 않거나, Z^1 이 C인 경우, H 또는 할로젠이다.

[0031] n 및 R^5 는 상기 기재된 바와 같다.

[0032] 기타 양태에서, W 는 N 및 Z 와 함께



[0033] 로 이루어진 그룹으로부터 선택된 환을 형성하고,

[0034] 여기서, Z 는 O , S , CR^1 , NR^1 또는 $C=O$ 이고;

[0035] 각각의 Z^5 는 CR^6 , NR^1 또는 $C=O$ 이고, 단, Z 및 Z^5 가 인접한 경우, 둘 다 NR^1 이 아니고;

[0036] 각각의 R^1 은 H , C_{1-6} 알킬, COR^2 또는 $S(O)_pR^2$ 이고, 여기서 p 는 1 또는 2이고;

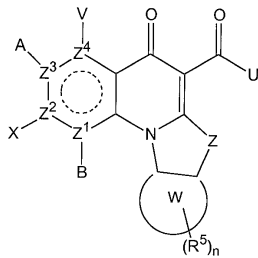
[0037] R^6 은 H , 또는 이로써 제한되지는 않지만, 하이드록실, 알킬, 알콕시, 할로, 아미노 또는 아미도를 포함하는 당해 분야에 공지된 치환체이고;

[0038] 환 S 및 환 T 는 포화되거나 불포화될 수 있다.

[0039] 일부 양태에서, W 는 N 및 Z 과 함께 페닐에 융합된 5 또는 6원의 환을 형성한다. 기타 양태에서, U 가 NR^1R^2 이고 NH_2 가 아닌 경우, W 는 N 및 Z 과 함께 또 다른 환에 임의로 융합된 5 또는 6원의 환을 형성한다. 특정한 양태에서, U 가 NR^1R^2 (예, NH_2)인 경우, W 는 N 및 Z 과 함께 또 다른 환에 융합되지 않은 5 또는 6원의 환을 형성한다.

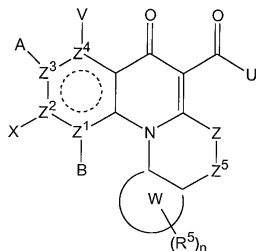
[0040] 또 다른 양태에서, 본 발명의 화합물은 화학식 2A 또는 2B의 화합물을 제공한다.

화학식 2A



[0041]

화학식 2B



[0042]

[0043] 위의 화학식 2A 및 2B에서,

[0044] A , B , V , X , U , Z , Z^1 , Z^2 , Z^3 , Z^4 및 n 은 상기 기재된 바와 같고;

- [0045] Z^5 는 O, NR^1 , CR^6 또는 $C=O$ 이고;
- [0046] R^6 은 H, C_{1-6} 알킬, 하이드록실, 알콕시, 할로, 아미노 또는 아미도이고;
- [0047] Z 및 Z^5 는 임의로 이중 결합을 형성한다.
- [0048] 상기 화학식 1, 2A 및 2B에서, U는 NR^1R^2 일 수 있고, 여기서 R^1 은 H이고, R^2 는 헤테로원자, C_{3-6} 사이클로알킬, 아릴, 또는 하나 이상의 N, O 또는 S를 함유하는 5 내지 14원의 헤테로사이클릭 환으로 임의로 치환된 C_{1-10} 알킬이다. 예를 들면, R^2 는 임의로 치환된 모르폴린, 티오모르폴린, 이미다졸, 아미노디티아다졸, 피롤리딘, 피페라진, 피리딘 또는 피페리딘으로 치환된 C_{1-10} 알킬일 수 있다. 다른 예에서, R^1 및 R^2 는 N과 함께 임의로 치환된 피페리딘, 피롤리딘, 피페라진, 모르폴린, 티오모르폴린, 이미다졸 또는 아미노디티아다졸을 형성한다.
- [0049] 기타 양태에서, U는 $NR^1-(CR^1_2)_n-NR^3R^4$ 이고; n은 1 내지 4이고; NR^3R^4 에서 R^3 및 R^4 는 함께 임의로 치환된 피페리딘, 피롤리딘, 피페라진, 모르폴린, 티오모르폴린, 이미다졸 또는 아미노디티아다졸을 형성하였다. 일부 예에서, U는 $NH-(CH_2)_n-NR^3R^4$ 이고, 여기서 R^3 및 R^4 는 피롤리딘 환의 임의의 위치에서 $(CH_2)_n$ 에 연결될 수 있는 N과 함께 임의로 치환된 피롤리딘을 형성한다. 일부 양태에서, R^3 및 R^4 는 N과 함께 N-메틸 치환된 피롤리딘. 일부 양태에서, U는 2-(1-메틸피롤리딘-2-일)에틸아미노 또는 (2-피롤리딘-1-일)에탄아미노이다.
- [0050] 상기 화학식 1, 2A 및 2B에서, Z는 S 또는 NR^1 일 수 있다. 일부 양태에서, 하나 이상의 B, X 또는 A는 할로이고, Z^1 , Z^2 및 Z^3 은 C이다. 기타 양태에서, Z^2 및 Z^3 이 C인 경우, X 및 A는 각각 H가 아니다. 상기 화학식 1, 2A 및 2B에서, V는 H일 수 있다. 특정한 양태에서, U는 OH이다.
- [0051] 하나의 양태에서, 각각의 Z^1 , Z^2 , Z^3 및 Z^4 는 C이다. 또 다른 양태에서, 3개의 Z^1 , Z^2 , Z^3 및 Z^4 는 C이고, 나머지 하나는 N이다. 예를 들면, Z^1 , Z^2 및 Z^3 은 C이고, Z^4 는 N이다. 대안적으로, Z^1 , Z^2 및 Z^4 는 C이고, Z^3 은 N이다. 기타 예에서, Z^1 , Z^3 및 Z^4 는 C이고, Z^2 는 N이다. 기타 예에서, Z^2 , Z^3 및 Z^4 는 C이고, Z^1 은 N이다.
- [0052] 또 다른 양태에서, 2개의 Z^1 , Z^2 , Z^3 및 Z^4 는 C이고, 나머지 2개는 인접하지 않은 질소이다. 예를 들면, Z^1 및 Z^3 은 C이고, Z^2 및 Z^4 는 N일 수 있다. 대안적으로, Z^1 및 Z^3 은 N이고, Z^2 및 Z^4 는 C일 수 있다. 기타 예에서, Z^1 및 Z^4 는 N이고, Z^2 및 Z^3 은 C이다. 특정한 예에서, W는 N 및 Z와 함께 페닐에 융합된 5 또는 6원의 환을 형성한다.
- [0053] 일부 양태에서, 각각의 B, X, A 및 V는 H이고, Z^1 내지 Z^4 는 C이다. 많은 양태에서, 하나 이상의 B, X, A 및 V는 H이고, 상응하는 인접한 Z^1 내지 Z^4 원자는 C이다. 예를 들면, 2개의 B, X, A 및 V는 H일 수 있다. 하나의 예에서, V 및 B는 둘 다 H일 수 있다. 기타 예에서, 임의의 3개의 B, X, A 및 V는 H이고, 상응하는 인접한 Z^1 내지 Z^4 원자는 C이다.
- [0054] 특정한 양태에서, 하나의 B, X, A 및 V는 할로젠(예, 불소) 및 상응하는 인접한 Z^1 내지 Z^4 는 C이다. 기타 양태에서, 2개의 X, A 및 V는 할로젠 또는 SR^2 이고, 여기서 R^2 는 헤테로원자, 카보사이클릭 환, 헤테로사이클릭 환, 아릴 또는 헤테로아릴로 임의로 치환된 C_{0-10} 알킬 또는 C_{2-10} 알케닐이고; 상응하는 인접한 Z^2 내지 Z^4 는 C이다. 예를 들면, 각각의 X 및 A는 할로젠일 수 있다. 기타 예에서, 각각의 X 및 A는, 존재하는 경우, SR^2 일 수 있고, 여기서 R^2 는 페닐 또는 피라진으로 치환된 C_{0-10} 알킬이다. 다른 실시예에서, V, A 및 X는 알킬닐, 플루오르화된 알킬, 예를 들면, CF_3 , CH_2CF_3 , 플루오르화된 알킬 등; 시아노, 니트로, 아미드, 설폰일 아미드 또는 카보닐 화합물, 예를 들면, COR^2 이다.

- [0055] 각각의 상기 화학식에서, U, X, V 및 A는, 존재하는 경우, 독립적으로 NR^1R^2 일 수 있고, 여기서 R^1 은 H이고, R^2 는 헤테로원자로 임의로 치환된 C_{1-10} 알킬, C_{3-6} 사이클로알킬, 아릴, 또는 하나 이상의 N, O 또는 S를 함유하는 5 내지 14원의 헤테로사이클릭 환이다. 상기 하나 이상의 화학식에 따른 화합물에서 A 및 U가 둘 다 NR^1R^2 인 것 경우와 마찬가지로 하나 이상의 NR^1R^2 잔기가 본 발명의 화합물에 존재하는 경우, 각각의 R^1 및 각각의 R^2 는 독립적으로 선택된다. 하나의 예에서, R^2 는 임의로 치환된 5 내지 14원의 헤테로사이클릭 환으로 치환된 C_{1-10} 알킬이다. 예를 들면, R^2 는 모르폴린, 티오모르폴린, 이미다졸, 아미노디티아다졸, 피롤리딘, 피페라진, 피리딘 또는 피페리딘로 치환된 C_{1-10} 알킬이다. 대안적으로, R^1 및 R^2 는 N과 함께 하나 이상의 N, O 또는 S를 함유하는 임의로 치환된 헤테로사이클릭 환을 형성할 수 있다. 예를 들면, R^1 및 R^2 는 N과 함께 피페리딘, 피롤리딘, 피페라진, 모르폴린, 티오모르폴린, 이미다졸 또는 아미노디티아다졸을 형성할 수 있다.
- [0056] 임의로 치환된 헤테로사이클릭 환의 예는, 이로써 제한되지는 않지만, 테트라하이드로푸란, 1,3-디옥솔란, 2,3-디하이드로푸란, 테트라하이드로피란, 벤조푸란, 이소벤조푸란, 1,3-디하이드로-이소벤조푸란, 이속사졸, 4,5-디하이드로이속사졸, 피페리딘, 피롤리딘, 피롤리딘-2-온, 피롤, 피리딘, 피리미딘, 옥타하이드로-피롤로[3,4-b]피리딘, 피페라진, 피라진, 모르폴린, 티오모르폴린, 이미다졸, 아미노디티아다졸, 이미다졸리딘-2,4-디온, 벤즈이미다졸, 1,3-디하이드로벤즈이미다졸-2-온, 인돌, 티아졸, 벤조티아졸, 티아디아졸, 티오펜, 테트라하이드로-티오펜 1,1-디옥사이드, 디아제핀, 트리아졸, 디아자바이사이클로[2.2.1]헵탄, 2,5-디아자바이사이클로[2.2.1]헵탄 및 2,3,4,4a,9,9a-헥사하이드로-1H-J-카볼린을 포함한다.
- [0057] 하나의 양태에서, 본 발명은
- [0058] 각각의 A, V 및 B가 존재하는 경우 독립적으로 H 또는 할로젠(예, 클로로 또는 플루오로)이고;
- [0059] X가 $-(R^5)R^1R^2$ 이고, 여기서 R^5 는 C 또는 N이고, 각각의 $-(R^5)R^1R^2$, R^1 및 R^2 는 함께 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴 환을 형성하고;
- [0060] Z이 NH 또는 N-알킬(예, N-CH₃)이고;
- [0061] W가 N 및 Z과 함께 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴 환에 융합된 임의로 치환된 5 또는 6원의 환을 형성하고;
- [0062] U가 $-R^5R^6-(CH_2)_n-CHR^2-NR^3R^4$ 이고, 여기서 R^6 은 H 또는 C_{1-10} 알킬이고, 여기서 $-CHR^2-NR^3R^4$ 잔기에서 각각의 R^3 또는 R^4 는 C와 함께 임의로 치환된 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 환을 형성할 수 있거나 $-CHR^2-NR^3R^4$ 잔기에서 각각의 R^3 또는 R^4 는 N과 함께 임의로 치환된 카보사이클릭, 헤테로사이클릭, 아릴 또는 헤테로아릴 환을 형성하는 화학식 1, 2A 또는 2B의 화합물을 제공한다.
- [0063] 또 다른 양태에서, 본 발명은
- [0064] A가 존재하는 경우 H 또는 할로젠(예, 클로로 또는 플루오로)이고;
- [0065] X가 존재하는 경우 $-(R^5)R^1R^2$ 이고, 여기서 R^5 는 C 또는 N이고, 각각의 $-(R^5)R^1R^2$ 에서 R^1 및 R^2 는 함께 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴 환을 형성할 수 있고;
- [0066] Z가 NH 또는 N-알킬(예, N-CH₃)이고;
- [0067] W가 N 및 Z과 함께 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴 환에 융합된 임의로 치환된 5 또는 6원의 환을 형성하고;
- [0068] U가 $-R^5R^6-(CH_2)_n-CHR^2-NR^3R^4$ 이고, 여기서 R^6 은 H 또는 알킬이고, $-CHR^2-NR^3R^4$ 잔기에서 각각의 R^3 또는 R^4 는 C와 함께 임의로 치환된 헤테로사이클릭 또는 헤테로아릴 환을 형성할 수 있거나, $-CHR^2-NR^3R^4$ 잔기에서 각각의 R^3 또는 R^4 는 N과 함께 임의로 치환된 카보사이클릭, 헤테로사이클릭, 아릴 또는 헤테로아릴 환을 형성하는 화학식 1, 2A 또는 2B의 화합물을 제공한다.

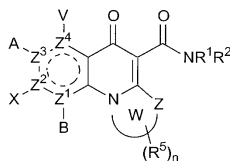
- [0069] 상기 각각의 화학식에서, 각각의 임의로 치환된 잔기는 하나 이상의 할로, OR^2 , NR^1R^2 , 카바메이트, C_{1-10} 알킬, C_{2-10} 알케닐(각각의 할로, $C=O$, 아릴 또는 하나 이상의 헤테로원자로 임의로 치환된다); 무기 치환체, 아릴, 카보사이클릭 또는 헤테로사이클릭 환으로 치환될 수 있다. 기타 치환체는, 이로써 제한되지는 않지만, 알킬닐, 사이클로알킬, 플루오르화된 알킬, 예를 들면, CF_3 , CH_2CF_3 , 퍼플루오르화된 알킬 등; 산소화되고 플루오르화된 알킬, 예를 들면, OCF_3 또는 CH_2CF_3 등; 시아노, 니트로, COR^2 , NR^2COR^2 , 설폰일 아마이드; NR^2SOOR^2 ; SR^2 , SOR^2 , $COOR^2$, $CONR^2_2$, $OCOR^2$, $OCOOR^2$, $OCONR^2_2$, $NRCOOR^2$, $NRCONR^2_2$, $NRC(NR)(NR^2_2)$, $NR(CO)NR^2_2$ 및 $SOONR^2_2$ 를 포함하고, 여기서 각각의 R^2 는 화학식 1에서 정의된 바와 같다.
- [0070] 본 발명은 또한 하나 이상의 상기 화학식의 화합물 및 약제학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다. 하나의 예에서, 조성물은 버퍼 용액 중에 하나 이상의 상기 화학식의 화합물, 폴리에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜을 포함한다.
- [0071] 또한, 본 발명은 하나 이상의 상기 화학식의 화합물 또는 이의 약제학적 조성물의 유효량을 임의로 화학요법제와 병용하여 시스템에 접촉함으로써 상기 시스템에서 세포 증식을 감소시키고/거나 세포 사멸, 예를 들면, 아포토시스 또는 아포토시스성 세포 사멸을 유도함을 포함하는, 세포 증식을 감소시키고/거나 세포 사멸을 유도하는 방법에 관한 것이다. 시스템은 세포 또는 조직일 수 있다. 하나의 양태에서, 시스템은 체장 세포, 예를 들면, 대상체 또는 배양된 세포(예, 시험관내 또는 생체외)로부터의 세포를 포함한다. 특정한 양태에서, 시스템은 체장 암 세포를 포함한다. 하나의 양태에서, 시스템은 세포주, 예를 들면, PC3, HCT116, HT29, MIA Paca-2, HPAC, Hs700T, Panc 10.05, Panc 02.13, PL45, SW 190, Hs 766T, CFPAC-1 및 PANC-1이다.
- [0072] 본 발명은 또한 하나 이상의 상기 화학식의 화합물 또는 이의 약제학적 조성물의 유효량을 화학요법제와 임의로 배합하여 치료가 필요한 환자에게 투여함으로써 상기 세포 증식 질병을 완화시킴을 포함하는, 세포 증식 질병의 완화 방법을 제공한다. 예를 들면, 세포 증식이 감소될 수 있고/거나 세포 사멸, 예를 들면, 아포토시스 또는 아포토시스성 세포 사멸이 유도될 수 있다. 세포 증식 질병은 인간 또는 동물 대상체의 종양 또는 암일 수 있다. 특정한 양태에서, 암은 비-내분비 및 내분비 종양을 포함하는 체장암이다. 비-내분비 종양은, 이로써 제한되지는 않지만, 선암종, 포상세포암종, 선편평세포암종, 거대세포암종, 선관내 유두상 점액성 종양, 점액성 낭성종양, 체장세포종, 장액성 난선종, 고형 및 가유두상 종양을 포함한다. 내분비 종양은 체장 섬세포종일 수 있다.
- [0073] 상기 세포 증식을 감소시키고/거나 세포 사멸을 유도하는 방법은 또한 방법과 병행되고/거나 화학요법제와 배합되어 수행될 수 있다. 본 발명의 방법과 병행되어 사용될 수 있는 과정의 예는, 이로써 제한되지는 않지만, 방사능요법 또는 수술을 포함한다. 특정한 양태에서, 본 발명의 화합물은 겐시타빈(gemcitabine)과 함께 투여될 수 있고, 세포 증식을 감소시키고/거나 세포 사멸을 유도하고/거나 세포 증식 질병을 완화시키는데 사용된다.
- [0074] 또한, 본 발명은 하나 이상의 상기 화학식의 화합물 또는 이의 약제학적 조성물의 유효량을 임의로 항미생물제와 배합하여 시스템에 접촉시켜 미생물 역가를 감소시킴을 포함하는, 미생물 역가를 감소시키는 방법을 제공한다. 대상체는 인간 또는 동물일 수 있다. 미생물 역가는 바이러스, 박테리아 또는 진균류 역가일 수 있다.
- [0075] 본 발명은 또한 a) 경쟁분자의 부재하에 화합물을 4중 가닥 구조를 형성할 수 있는 3개 이상의 핵산과 접촉시키고, 여기서 각 핵산은 말단소립 핵산이 아니고; b) 화합물과 상기 3개 이상의 핵산 사이의 직접적인 상호작용을 측정하고; c) 상호작용의 측정을 비교하여 상호작용 선택성을 측정함을 포함하는, 하나 이상의 상기 화학식의 화합물과 4중 가닥 구조를 형성할 수 있는 핵산 사이의 상호작용 선택성을 측정하는 방법에 관한 것이다. 3개 이상의 핵산은 발암유전자 뉴클레오티드 서열의 5'에 위치한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 발암유전자는 MYC, HIF, VEGF, ABL, TGF, PDGF α , MYB, SPARC, HER, VAV, RET, H-RAS, EGF, SRC, BCL-1, BCL-2, DHFR 또는 HMGA일 수 있다. 상호작용 선택성을 측정함에 있어서, 화합물은 상이한 용기 중의 3개 이상의 핵산 각각과 별개로 접촉될 수 있다. 또한, 상호작용 선택성은 IC_{50} 수치에 비례하여 측정될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 화합물은 4중 가닥 구조를 형성할 수 있는 DNA 영역과 상호작용하거나 상호작용하지 않을 수 있다. 특정한 양태에서, 본 발명의 화합물은 프로펠라 4중 가닥과 결합하고/거나 이를 안정화시킬 수 있다. 프로펠라 4중 가닥의 예는, 이로써 제한되지는 않지만, H-RAS, RET, BCL-1, DHFR, TGF- β , HIF-1 α , VEGF, c-Myc 또는 PDGF α 를 포함한다. 또 다른 양태에서, 화합물은 체어-엘러(chair-eller) 또는 바스켓 4중 가닥과 결합하고/거

나 이를 안정화시킬 수 있다. 예를 들면, 화합물은 BCL-2와 결합하고/거나 이를 안정화시킨다.

[0077] 본 발명은 또한 상기 화학식의 화합물의 유효량 또는 이의 약제학적 조성물과 화학요법제를 임의로 배합하여 치료가 필요한 시스템 또는 대상체에 투여함을 포함하는, 세포 사멸, 예를 들면, 아포토시스성 세포 사멸(아포토시스)를 유도하는 방법을 제공한다. 본 발명은 또한 상기 화학식의 화합물의 유효량 또는 이의 약제학적 조성물과 화학요법제를 임의로 배합하여 치료가 필요한 시스템 또는 대상체에 투여함을 포함하는, 발암유전자의 과발현, 예를 들면, c-Myc 과잉발현에 의해 매개된 장애의 치료 또는 완화 방법을 제공한다. 대상체는 인간 또는 동물일 수 있고, 시스템은 세포 또는 조직일 수 있다.

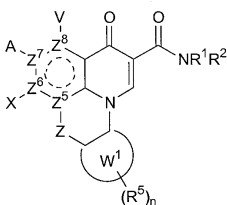
[0078] 또 다른 양태에서, 본 발명은 에스테르, NHR^1R^2 및 루이스산과 접촉시킴을 포함하는 화학식 3 또는 4의 화합물의 제조방법을 제공하고, 여기서 상기 에스테르는 화학식 5 또는 6의 화합물이다.

화학식 3



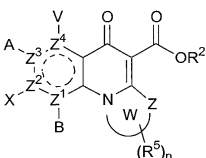
[0079]

화학식 4



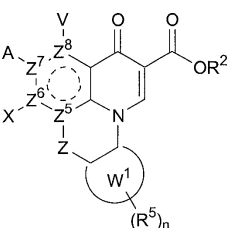
[0080]

화학식 5



[0081]

화학식 6



[0082]

[0083] 위의 화학식 3, 4, 5 및 6에서,

[0084] A, B, V, X, R¹, R², R⁵, Z, Z¹, Z², Z³, Z⁴ 및 n은 상기 화학식 1에서 정의된 바와 같고,

[0085] W는 N 및 Z과 함께 임의로 치환된 아릴 또는 헤테로아릴에 융합된 임의로 치환된 5 또는 6원의 환을 형성하고, 여기서 상기 아릴 또는 헤테로아릴은 모노사이클릭이거나 단일 또는 다중 환에 융합될 수 있고, 여기서 상기 환은 임의로 헤테로 원자를 함유하고;

[0086] W¹은 모노사이클릭이거나 단일 또는 다중 환에 융합될 수 있고 임의로 헤테로원자를 함유하는 임의로 치환된 아

릴 또는 헤테로아릴이고;

[0087] Z^5 는 C 또는 N이고, 단, Z이 O, S 또는 NR^1 인 경우, Z^5 는 C이고, Z^5 가 N인 경우, Z 및 Z^6 는 N이 아니고;

[0088] Z^6 , Z^7 및 Z^8 은 독립적으로 C 또는 N이고, 단, 2개의 N은 인접하지 않는다.

[0089] 본 발명의 화학식 3의 화합물의 제조방법은 루이스산, 예를 들면, 염화알루미늄의 존재하에 에스테르를 아민과 아마이드 커플링시킴을 포함한다. 적합한 루이스산은, 하기 기재된 바와 같이, 시험 반응을 수행하고 제조된 반응 생성물의 양을 관찰함으로써 선택할 수 있다. 본 발명은 아마이드 커플링 전에 에스테르를 카복실산으로 가수분해시킬 필요가 없다. 따라서, 본 발명의 방법은 더 단순하다. 실시예 29에 기재된 바와 같이, 본 발명의 방법은 에스테르를 산으로 가수분해시킴을 필요로 하는 기존의 방법(실시예 30) 보다 높은 수율 및 순도를 제공한다.

[0090] 하나의 양태에서, 루이스산은 화학식 ML_n 를 갖고, 여기서 L은 할로젠 원자 또는 유기 라디칼이고, n은 3 내지 5이고, M은 III족 원소 원자, IV족 원소 원자, As, Sb, V 또는 Fe이다.

[0091] 상기 방법에서, 접촉 단계는 실온에서 수행될 수 있다. 대안적으로, 에스테르, 아민 및 루이스산은 실온보다 낮은 온도 및 높은 온도에서 수행될 수 있고, 이는 당해 분야의 숙련가가 결정할 수 있다.

[0092] 하나의 예에서, 접촉 단계는 유기 용매 중에서 에스테르 및 아민을 접촉시켜 용액을 형성하고, 당해 용액을 루이스산과 접촉시킴을 포함한다. 하나의 예에서, 유기 용매는 염화메틸렌이다. 반응을 또한 당해 분야에 공지된 기타 적합한 용매를 사용하여 수행할 수 있다.

[0093] 하나의 양태에서, 에스테르에 비해 과량의 아민을 사용할 수 있다. 예를 들면, 에스테르 대 아민의 비율은 1:2, 1:1.5 또는 1:1.25일 수 있다.

[0094] 또 다른 양태에서, 아민과 동일한 물량의 루이스산이 사용될 수 있다. 대안적으로, 루이스산의 사용량은 아민보다 많거나 적을 수 있다.

[0095] 상기 방법은 상기 화학식 중 하나의 화합물을 분리함을 추가로 포함한다. 분리된 화합물을 당해 분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 추가로 정제할 수 있다. 예를 들면, 분리된 화합물을 컬럼 크로마토그래피, 재결정화 또는 둘 다로 정제할 수 있다.

[0096] 상기 방법에서, 분리된 화합물의 순도는 90 내지 99%일 수 있다. 예를 들면, 분리된 화합물은 90 내지 95%의 순도를 가질 수 있다.

[0097] 상기 방법에서, 에스테르를

[0098] R^1 이 $(CR^3_2)_n$ 그룹이고,

[0099] R^2 가 NR^3R^4 이고,

[0100] R^3 이 H 또는 C_{1-6} 알킬이고,

[0101] n이 1 내지 6이고,

[0102] R^4 가 H, 또는 N, O 및 S로부터 선택된 하나 이상의 인접하지 않은 헤테로원자를 함유하고, 카보사이클릭 또는 헤테로사이클릭 환으로 임의로 치환된 C_{1-10} 알킬 또는 C_{2-10} 알케닐이고;

[0103] NR^3R^4 에서, R^3 및 R^4 가 임의로 치환된 환을 형성하는 화학식 NHR^1R^2 의 아민과 접촉시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0104] 도 1 내지 10은 HCT-116 결장암 이종이식 모델에서의 본 발명의 예시 화합물의 활성을 나타낸다.

[0105] 정의

[0106] 본원에서, 용어 "알킬"은 탄소 함유 화합물을 의미하고, 하나 이상의 헤테로원자를 함유하는 화합물을

포함한다. 용어 "알킬"은 또한, 이로써 제한되지는 않지만, OR^1 , 아미노, 아미도, 할로, =O, 아릴, 헤테로사이클릭 그룹 또는 무기 치환체를 포함하는 하나 이상의 치환체로 치환된 알킬을 포함한다.

[0107] 본원에서, 용어 "카보사이클"은 환에 오직 탄소 원자만을 함유하는 사이클릭 화합물을 의미하는 반면, "헤테로사이클"은 헤테로원자를 함유하는 사이클릭 화합물을 의미한다. 카보사이클릭 및 헤테로사이클릭 구조는 모노사이클릭, 바이사이클릭 또는 다중 환 시스템을 포함한다.

[0108] 본원에서, 용어 "아릴"은 다중불포화, 전형적으로 방향족인 탄화수소 치환체를 의미하는 반면, "헤테로아릴" 또는 "헤테로방향족"은 헤테로원자를 함유하는 방향족 환을 의미한다. 아릴 및 헤테로아릴 구조는 모노사이클릭, 바이사이클릭 또는 다중 환 시스템을 갖는 화합물을 포함한다.

[0109] 본원에서, 용어 "헤테로원자"는 탄소 또는 수소가 아닌 원자, 예를 들면, 질소, 산소 또는 황을 의미한다.

[0110] 헤테로사이클의 예는, 이로써 제한되지는 않지만, 테트라하이드로푸란, 1,3-디옥솔란, 2,3-디하이드로푸란, 피란, 테트라하이드로피란, 벤조푸란, 이소벤조푸란, 1,3-디하이드로-이소벤조푸란, 이속사졸, 4,5-디하이드로이속사졸, 피페리딘, 피롤리딘, 피롤리딘-2-온, 피롤, 피리딘, 피리미딘, 옥타하이드로-피롤로[3,4-b]피리딘, 피페라진, 피라진, 모르폴린, 티오모르폴린, 이미다졸, 이미다졸리딘-2,4-디온, 1,3-디하이드로벤즈이미다졸-2-온, 인돌, 티아졸, 벤조티아졸, 티아디아졸, 티오펜, 테트라하이드로-티오펜 1,1-디옥사이드, 디아제핀, 트리아졸, 구아니딘, 디아자바이사이클로[2.2.1]헵탄, 2,5-디아자바이사이클로[2.2.1]헵탄, 2,3,4,4a,9,9a-헥사하이드로-1H-J-카볼린, 옥시란, 옥세탄, 테트라하이드로피란, 디옥산, 락톤, 아지리딘, 아제티딘, 피페리딘 및 락탐을 포함하고, 또한 헤테로아릴을 포함할 수 있다. 헤테로아릴의 기타 예는, 이로써 제한되지는 않지만, 푸란, 피롤, 피리딘, 피리미딘, 이미다졸, 벤즈이미다졸 및 트리아졸을 포함한다.

[0111] 본원에서, 용어 "무기 치환체"는 탄소를 함유하지 않거나 수소 이외에 원소에 결합된 탄소(예, 원소 탄소, 일산화탄소, 이산화탄소 및 카보네이트)를 함유하지 않는 치환체이다. 무기 치환체의 예는, 이로써 제한되지는 않지만, 니트로, 할로젠, 설포닐, 설피닐, 포스페이트 등을 포함한다.

[0112] 여기에서 사용된 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료효과"는 세포 증식률을 감소시키거나 멈추는 것(예컨대, 종양성장을 느리게 하거나 또는 멈춤), 또는 증식하는 암세포들의 수를 감소시키는 것(예컨대, 종양의 일부 또는 전부를 제거)을 언급한다. 이들 용어들은 또한 미생물로 감염된 시스템(즉, 세포, 조직, 또는 대상)에 있는 미생물의 역할을 감소시키는 것, 미생물의 번식율을 감소시키는 것, 미생물 감염증과 관련된 증상의 수 또는 증상의 효과를 감소시키는 것 및/또는 시스템으로부터 검출가능한 양의 미생물을 제거하는 것에 적용할 수 있다. 미생물의 예는 바이러스, 박테리아 및 진균류를 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0113] 본원에서, 용어 "화학요법제"는 세포 증식 질병, 예를 들면, 종양 또는 암을 치료하거나 완화시키는데 사용될 수 있는 치료제를 의미한다. 화학요법제의 예는, 이로써 제한되지는 않지만, 항신생물제, 알킬화제, 식물체 알칼로이드, 항미생물제, 설폰아미드, 항바이러스제, 백금제 및 기타 당해 분야에 공지된 항암제를 포함한다. 화학요법제의 특정한 예는, 이로써 제한되지는 않지만, 시스플라틴, 카보플라틴, 부술판, 메토크렉세이트, 다우노루비신, 독소루비신, 사이클로포스포아미드, 메팔란, 빈크리스틴, 빈플라스틴, 클로람부실, 파클리탁셀, 젠시타빈 및 당해 분야에 공지된 기타 물질을 포함한다[참조: Goodman & Gilman's, The Pharmacological Basis of Therapeutics(9th Ed)(Goodman, et al., eds.)(McGraw-Hill)(1996); and 1999 Physician's Desk Reference(1998)].

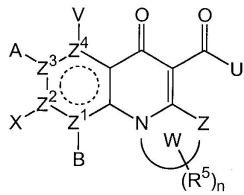
[0114] 본원에서, 용어 "아포토시스"는 고유한 세포 자가-파괴 또는 자살 프로그램을 의미한다. 자극에 대한 반응으로, 세포는 세포 수축, 세포 막의 수포 형성 및 염색체 축합 및 단편화를 포함하는 일련의 사건을 겪는다. 당해 사건은 세포에서 막-결합 입자의 붕괴를 야기하고, 따라서 대식세포에 의해 감싸여진다.

[0115] 발명의 설명

[0116] 본 발명은 화학식 1, 2A 및 2B의 퀴놀론 화합물 및 약제학적으로 허용되는 염, 에스테르 및 전구약물에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 예를 들면, 스크리닝 및 치료에서 본원에 기재된 화합물의 사용방법에 관한 것이다. 본 발명의 화합물은 4중 가닥을 형성할 수 있는 DNA 영역과 상호작용하거나 하지 않을 수 있다.

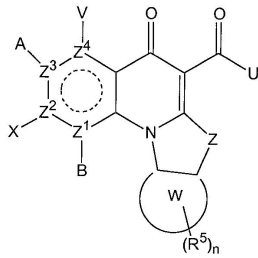
[0117] 본 발명의 화학식 1, 2A 및 2B의 화합물은 하기와 같다.

[0118] 화학식 1



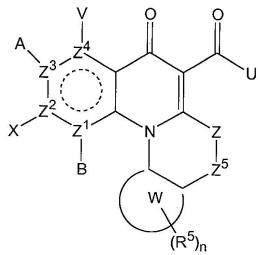
[0119]

[0120] 화학식 2A



[0121]

[0122] 화학식 2B



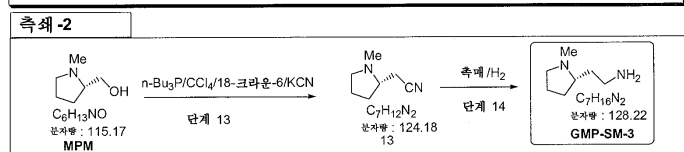
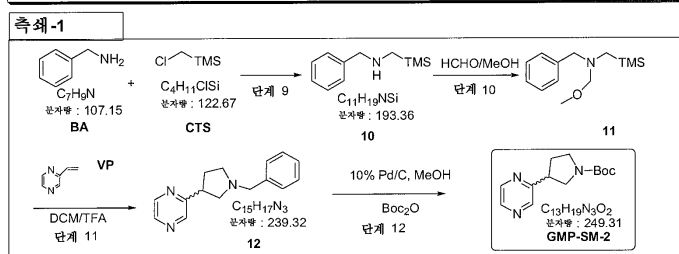
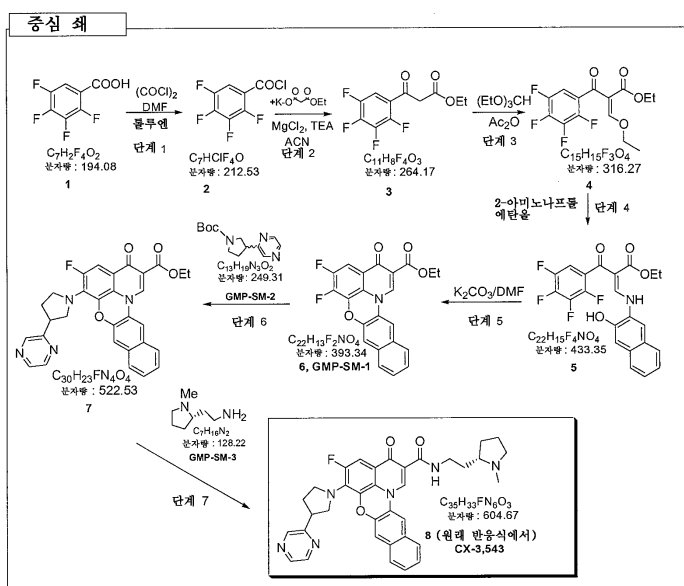
[0123]

[0124] 화학식 1, 2A 및 2B에서,

[0125] A, B, V, X, U, Z, Z¹, Z², Z³, Z⁴, X² 및 n은 상기 정의된 바와 같다.

[0126] 본 발명의 화합물의 제조를 위한 합성 과정을 반응식 1 및 실시예에서 설명한다. 당해 분야의 숙련가에 의해 변형되 공지된 합성 방법이 또한 본 발명의 화합물을 제조하는데 사용될 수 있다. 예를 들면, 다양한 보호 그룹을 측쇄 1에 설명된 중간체의 제조에 사용할 수 있다(실시예 31 참조).

반응식 1



[0127]

[0128]

본 발명의 화합물은 키랄일 수 있다. 본원에서, 키랄 화합물은 거울상과 상이한 화합물이고, 에난티오머를 갖는다. 또한, 화합물은 라세미, 또는 분리된 에난티오머 또는 입체이성체일 수 있다. 키랄 화합물의 합성 및 에난티오머의 라세미 혼합물 분할 방법은 당해 분야의 숙련가에게 공지되어 있다[참조: March, "Advanced Organic Chemistry," John Wiley and Sons, Inc., New York, (1985)].

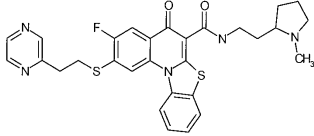
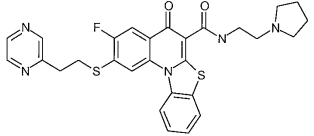
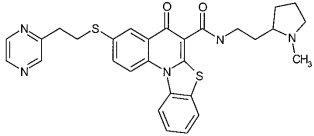
[0129]

본 발명의 화합물을 본원에 기재된 바와 같은 스크리닝 분석을 사용하여 시험한다. 도 1 내지 10은 HCT-116 결장암 이중иск 모델에서 본 발명의 예시 화합물의 활성을 나타낸다. 일부 화합물은 제공된 용량으로 활성을 나타내지 않았다.

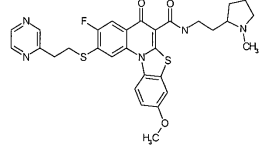
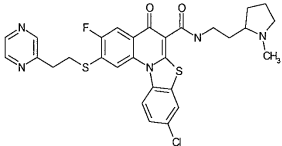
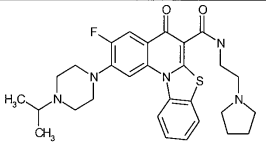
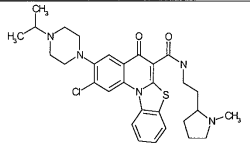
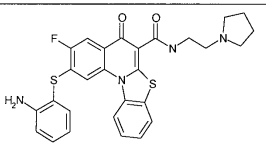
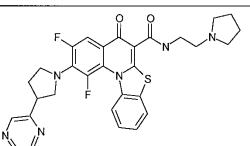
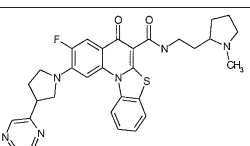
[0130]

상기 화학식의 화합물의 예를 표 1(A-C) 및 실시예에 나타낸다. 본 발명은 또한 표 1(A-C) 및 실시예에 예시된 치환체로부터 독립적으로 선택된 치환체 U, A, X, V 및 B를 포함하는 화학식 1, 2A 및 2B의 화합물을 포함한다. 예를 들면, 표 1A의 2개 이상의 화합물의 이소프로필 치환체는 아세틸 치환체로 교체될 수 있거나, 융합된 환의 N-CH₃은 NH 그룹으로 교체될 수 있다. 또한, 플루오로 그룹은 H로 교체될 수 있다. 따라서, 본 발명은 다양한 하기 양태에 설명된 치환체의 특정한 조합으로 제한되지 않는다.

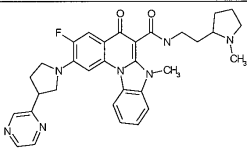
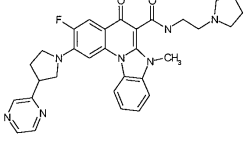
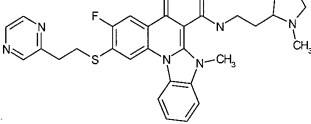
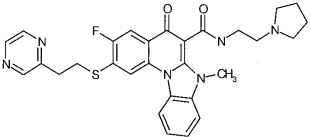
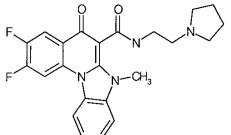
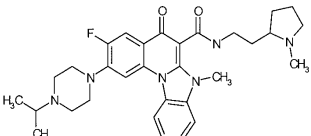
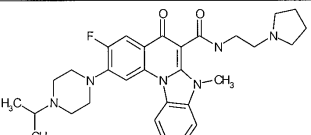
[0131] 표 1A

| 분자구조 | STOP μ M | HCT-116 MTS μ M |
|---|--------------|---------------------|
|  | 7.2 | 1.1 |
|  | 5.8 | 0.57 |
|  | 10 | 6.1 |

[0132]

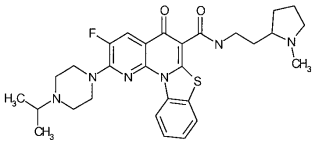
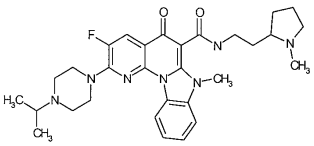
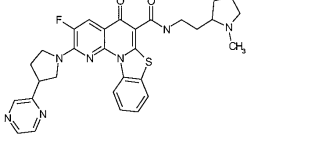
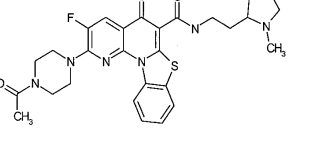
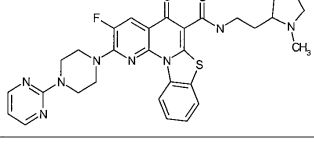
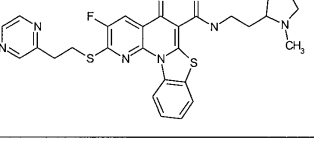
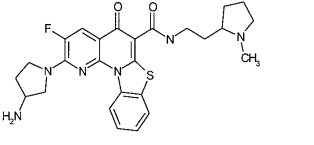
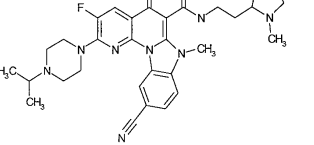
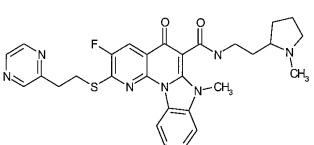
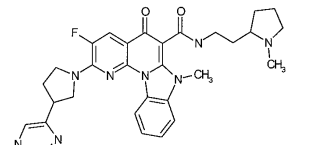
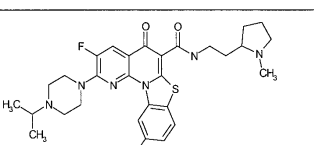
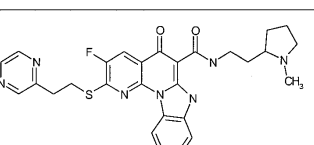
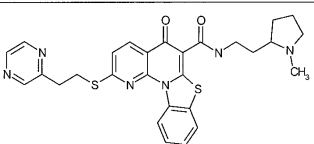
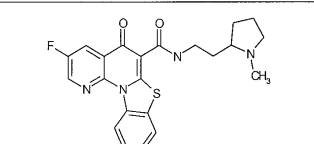
| 분자구조 | STOP μ M | HCT-116 MTS μ M |
|---|--------------|---------------------|
|  | 9.3 | 5.7 |
|  | 1.7 | 3.57 |
|  | 9 | 0.3 |
|  | > 15 | |
|  | 15 | 2.4 |
|  | 11.6 | 3.5 |
|  | 1.3 | 3.4 |

[0133]

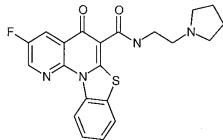
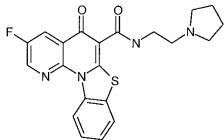
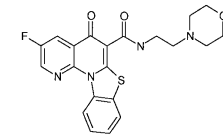
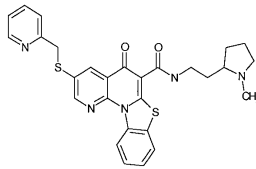
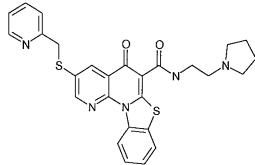
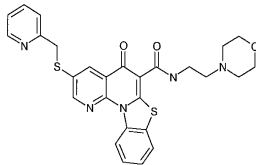
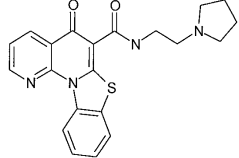
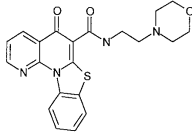
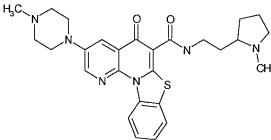
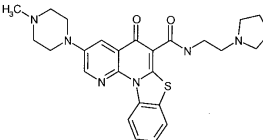
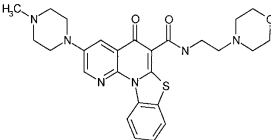
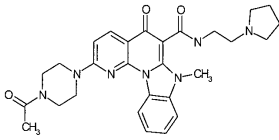
| 분자구조 | STOP uM | HCT-116 MTS uM |
|---|---------|----------------|
|  | 10.5 | 0.7 |
|  | 8.2 | 0.1 |
|  | 15 | 2.3 |
|  | 15 | 0.3 |
|  | 15 | 0.3 |
|  | 15 | 0.3 |
|  | > 15 | |

[0134]

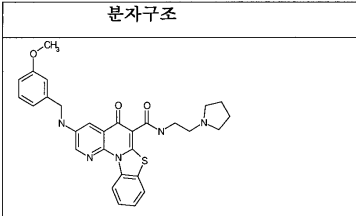
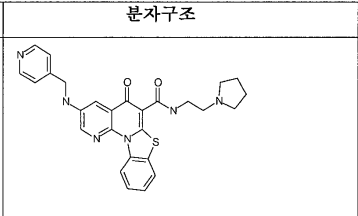
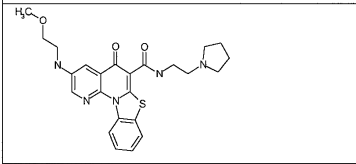
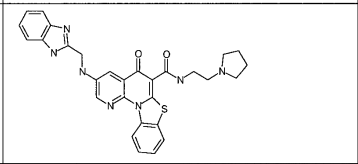
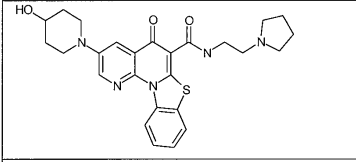
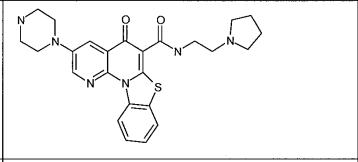
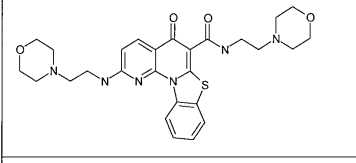
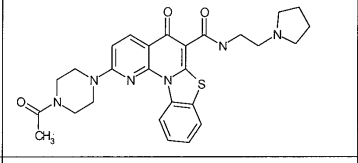
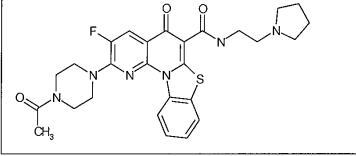
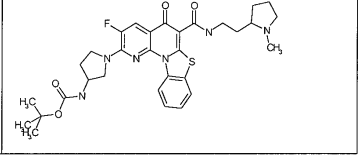
[0135] 표 1B

| 분자구조 | 분자구조 |
|---|---|
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

[0136]

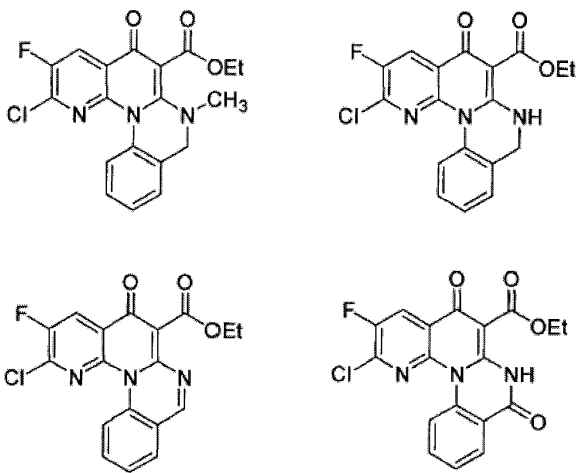
| 분자구조 | 분자구조 |
|---|---|
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

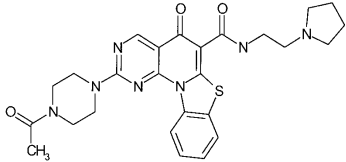
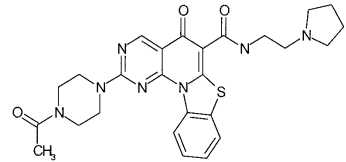
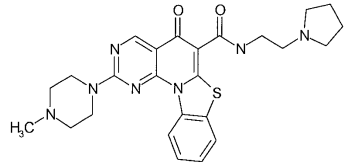
[0137]

| 분자구조 | 분자구조 |
|--|--|
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |
|  |  |

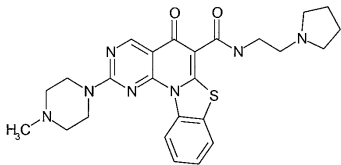
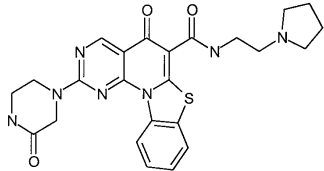
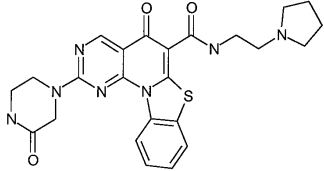
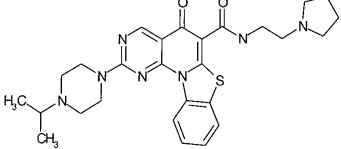
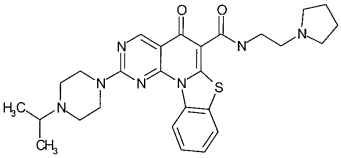
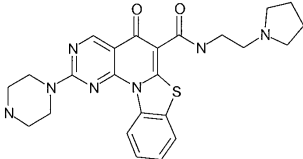
[0138]

[0139] 표 1C

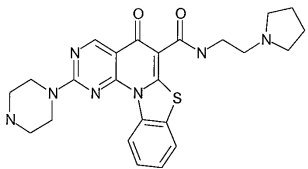
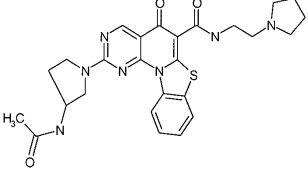
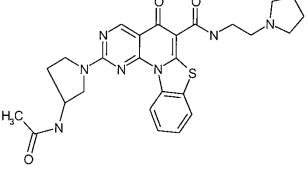
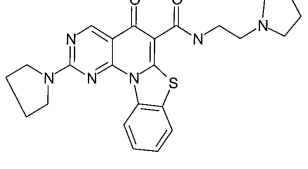
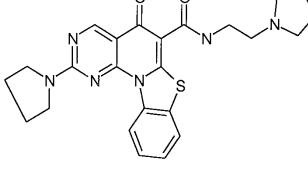
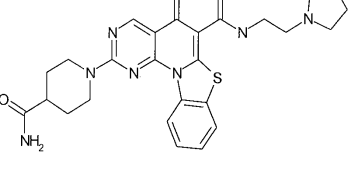


| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.03 |
|  | Miapaca | 0.02 |
|  | HCT-116 | 0.02 |

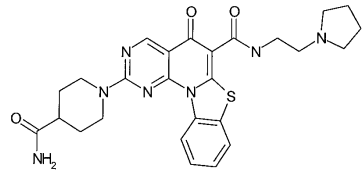
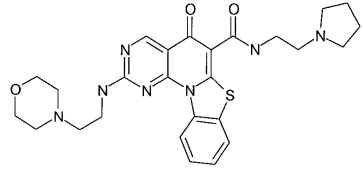
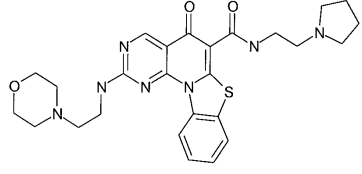
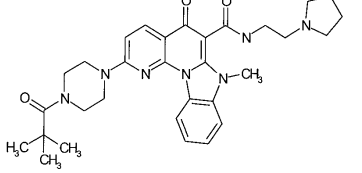
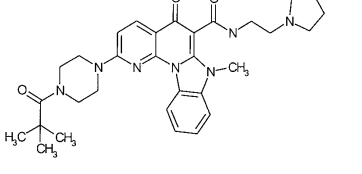
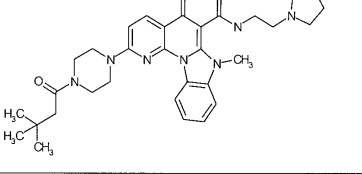
[0140]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | Miapaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | 0.16 |
|  | Miapaca | 0.17 |
|  | HCT-116 | <0.01 |
|  | Miapaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | <0.01 |

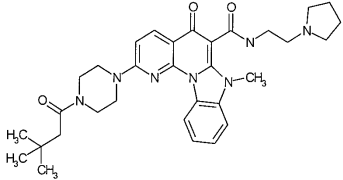
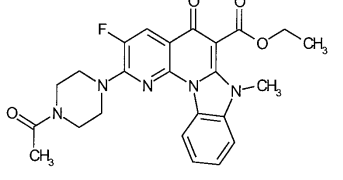
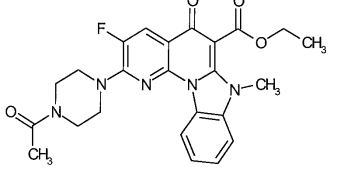
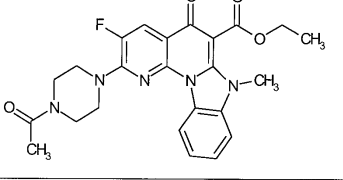
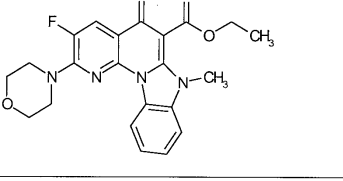
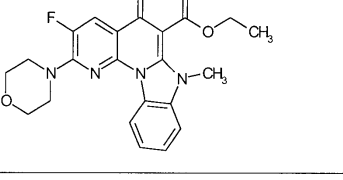
[0141]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | Miapaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | 0.03 |
|  | Miapaca | 0.02 |
|  | HCT-116 | 0.25 |
|  | MiaPaca | 0.1 |
|  | HCT-116 | 0.06 |

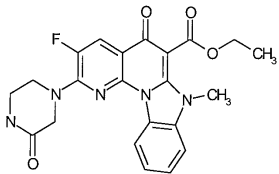
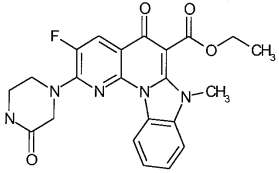
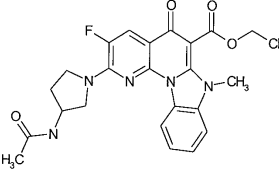
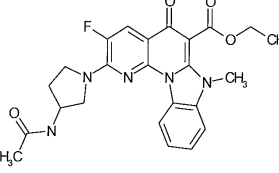
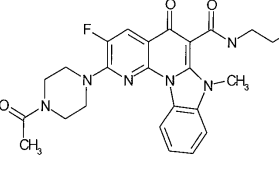
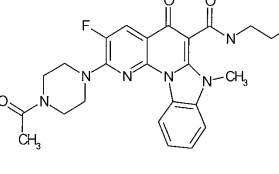
[0142]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | Miapaca | 0.03 |
|  | HCT-116 | 0.03 |
|  | Miapaca | 0.02 |
|  | HCT-116 | 0.32 |
|  | Miapaca | 0.24 |
|  | HCT-116 | 0.18 |

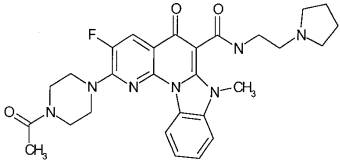
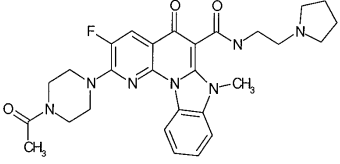
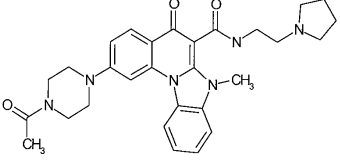
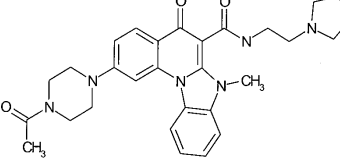
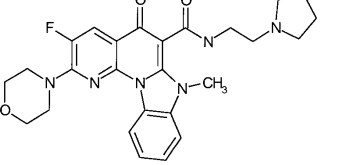
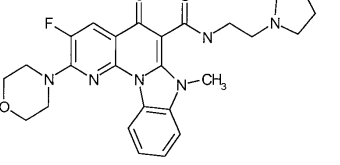
[0143]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.06 |
|  | HCT-116 | 0.28 |
|  | Miapaca | 0.27 |
|  | Miapaca | 0.38 |
|  | HCT-116 | >10 |
|  | Miapaca | >10 |

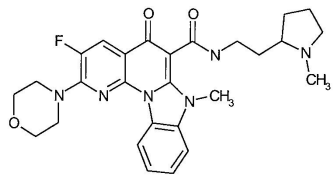
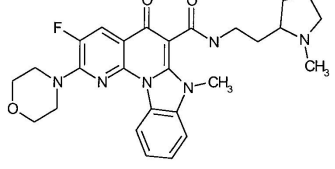
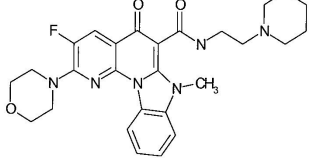
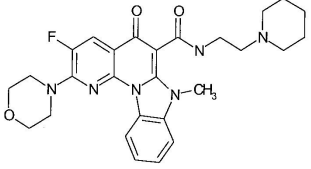
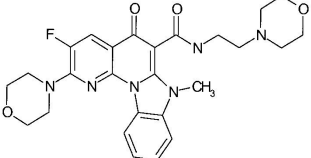
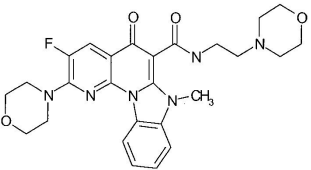
[0144]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 3.00 |
|  | Miapaca | 2.45 |
|  | HCT-116 | >10 |
|  | Miapaca | >10 |
|  | HCT-116 | 0.11 |
|  | HCT-116 | 0.1 |

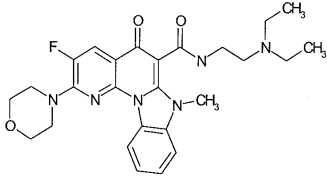
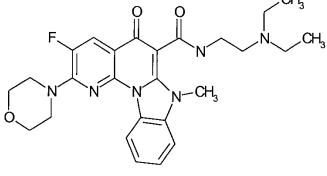
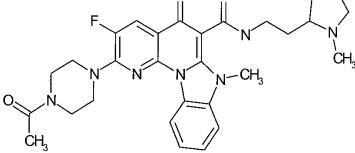
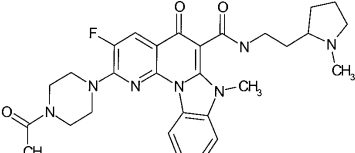
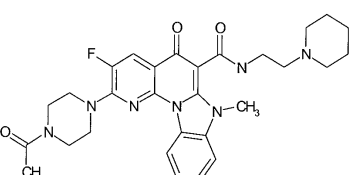
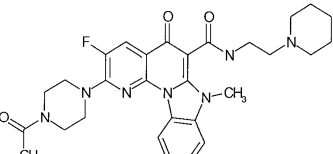
[0145]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | 0.03 |
|  | HCT-116 | 0.1 |
|  | HCT-116 | 4.20 |
|  | Miapaca | 3.00 |
|  | HCT-116 | 0.17 |
|  | Miapaca | 0.13 |

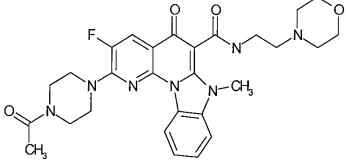
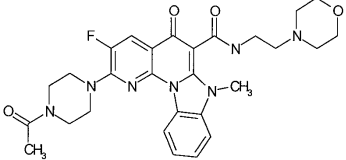
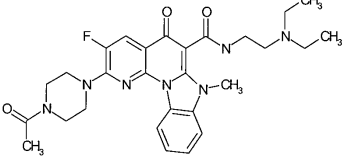
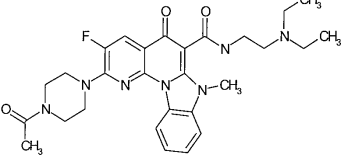
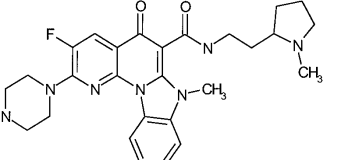
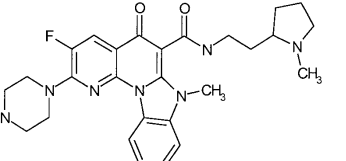
[0146]

| 분자구조 | M 세포 | M 레이타 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.28 |
|  | Miapaca | 0.3 |
|  | HCT-116 | 0.28 |
|  | Miapaca | 0.18 |
|  | HCT-116 | 1.8 |
|  | Miapaca | 1.55 |

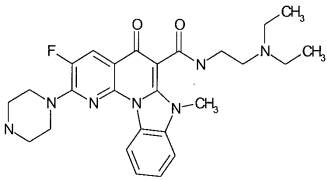
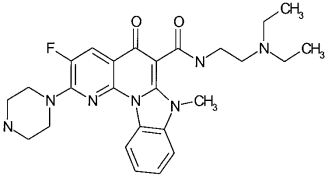
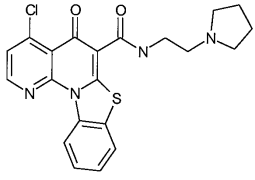
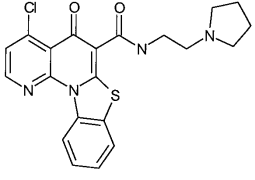
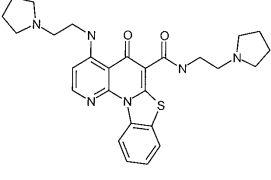
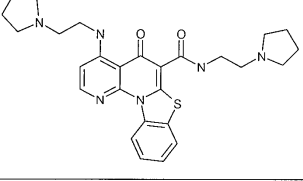
[0147]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.31 |
|  | Miapaca | 0.16 |
|  | HCT-116 | 0.27 |
|  | Miapaca | 0.15 |
|  | HCT-116 | 0.04 |
|  | Miapaca | 0.12 |

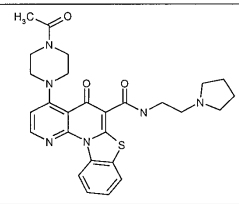
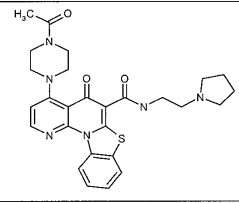
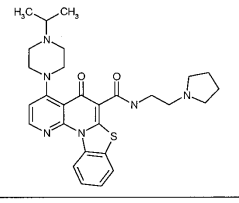
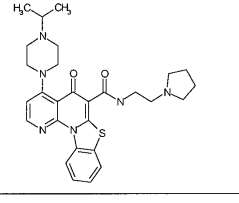
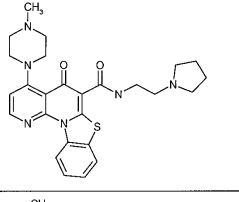
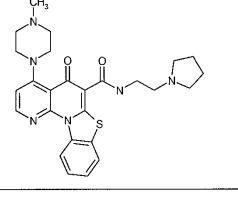
[0148]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.09 |
|  | Miapaca | 0.2 |
|  | HCT-116 | 0.1 |
|  | Miapaca | 0.34 |
|  | HCT-116 | 0.03 |
|  | Miapaca | 0.08 |

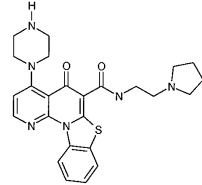
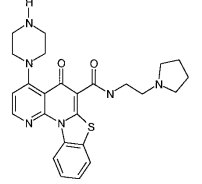
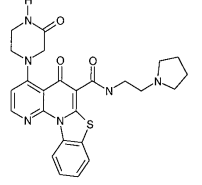
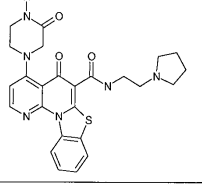
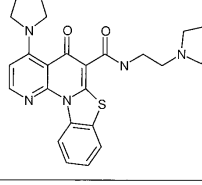
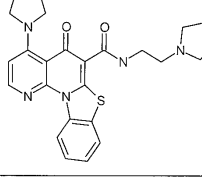
[0149]

| 분자구조 | M 세포 | M 레이타 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.03 |
|  | Miapaca | 0.03 |
|  | HCT-116 | 1.75 |
|  | Miapaca | 1 |
|  | HCT-116 | 0.03 |
|  | Miapaca | 0.02 |

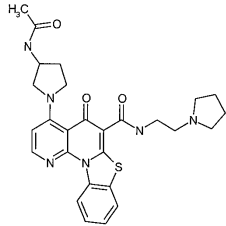
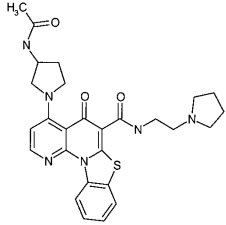
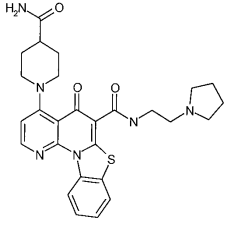
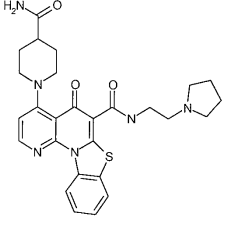
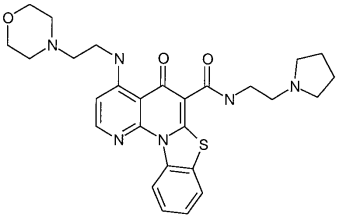
[0150]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.26 |
|  | Miapaca | 0.23 |
|  | HCT-116 | 3.3 |
|  | MiaPaca | 0.3 |
|  | HCT-116 | 3.7 |
|  | MiaPaca | 0.2 |

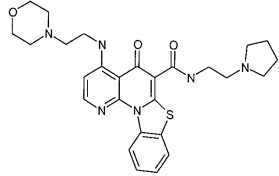
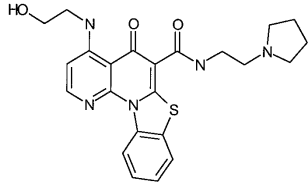
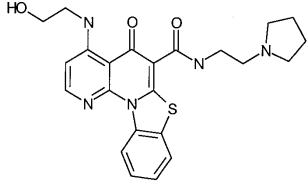
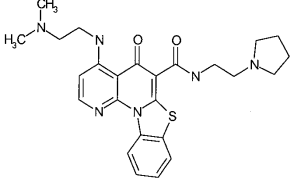
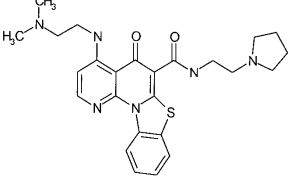
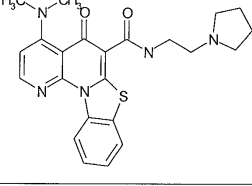
[0151]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 4.1 |
|  | MiaPaca | 0.3 |
|  | HCT-116 | 3.4 |
|  | MiaPaca | 0.4 |
|  | HCT-116 | 3.5 |
|  | MiaPaca | 2.3 |

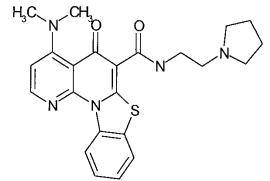
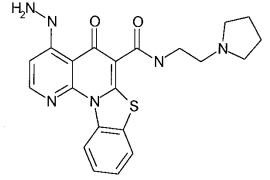
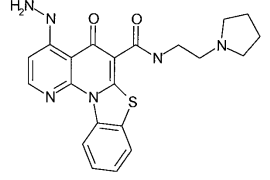
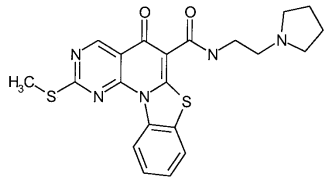
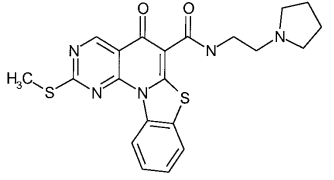
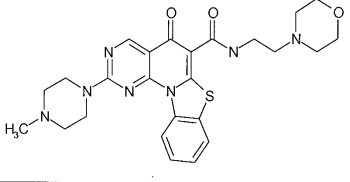
[0152]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 3.4 |
|  | MiaPaca | 0.7 |
|  | HCT-116 | 3.7 |
|  | MiaPaca | 0.2 |
|  | HCT-116 | 0.3 |

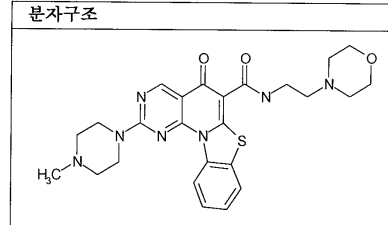
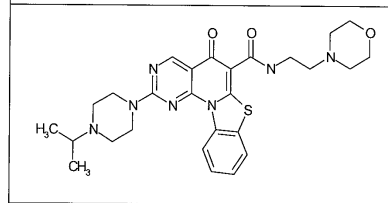
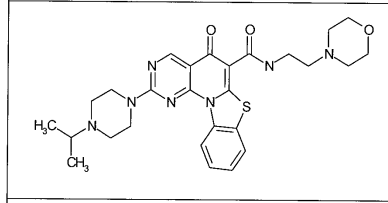
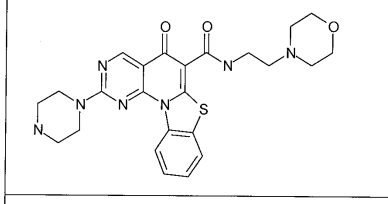
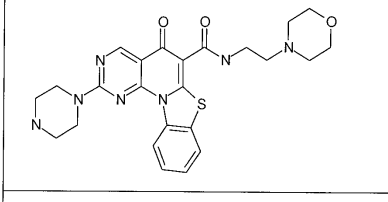
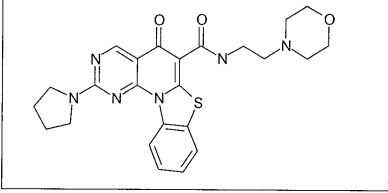
[0153]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | 0.2 |
|  | HCT-116 | 0.3 |
|  | MiaPaca | 0.1 |
|  | HCT-116 | 0.2 |
|  | MiaPaca | 0.0 |
|  | HCT-116 | 3.5 |

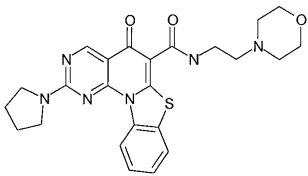
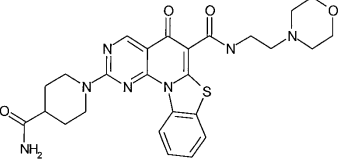
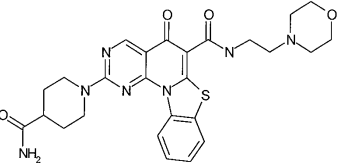
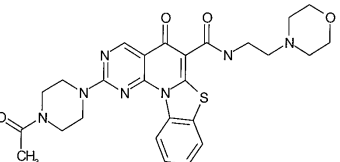
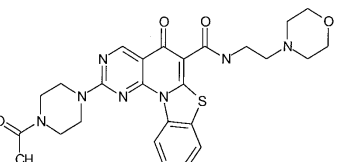
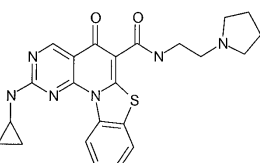
[0154]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | 3.2 |
|  | HCT-116 | 0.3 |
|  | MiaPaca | 0.2 |
|  | HCT-116 | 0.04 |
|  | MiaPaca | 0.02 |
|  | HCT-116 | 0.04 |

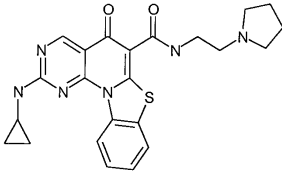
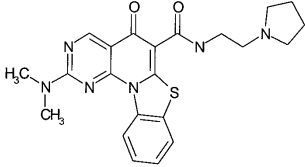
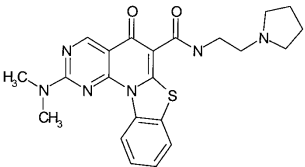
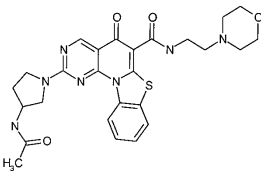
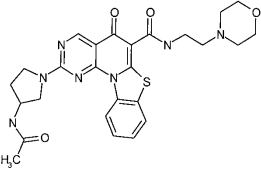
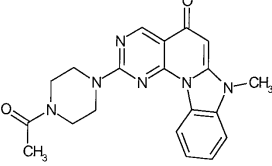
[0155]

| 분자구조 | M 세포 | M 레이트 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | 0.02 |
|  | HCT-116 | 0.04 |
|  | MiaPaca | 0.03 |
|  | MiaPaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | <0.01 |
|  | HCT-116 | 3.4 |

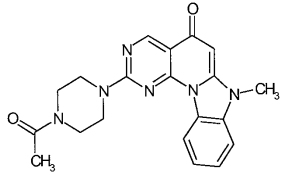
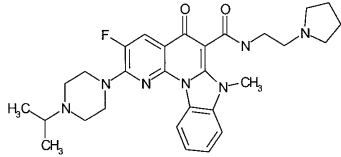
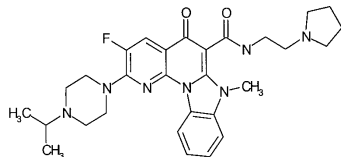
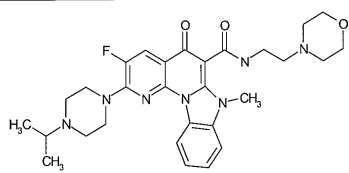
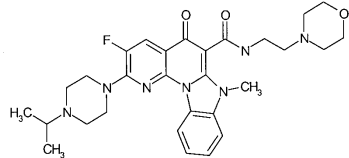
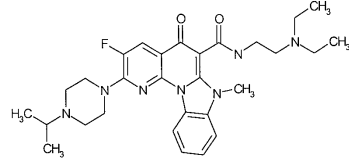
[0156]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | 2.3 |
|  | HCT-116 | 0.7 |
|  | MiaPaca | 0.5 |
|  | HCT-116 | 0.2 |
|  | MiaPaca | 0.2 |
|  | HCT-116 | 0.2 |

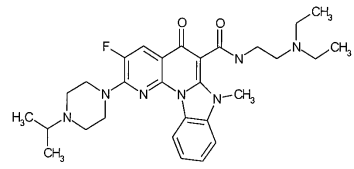
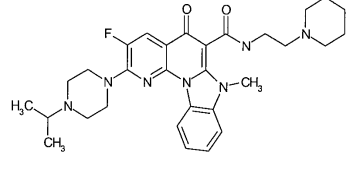
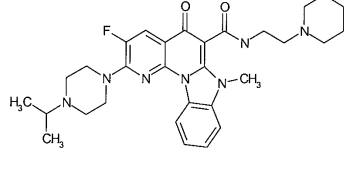
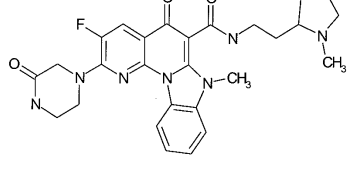
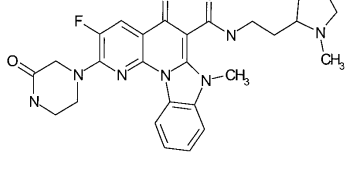
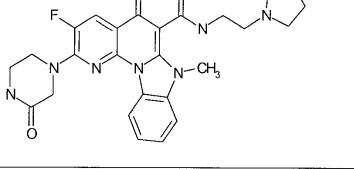
[0157]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | 0.03 |
|  | HCT-116 | 0.3 |
|  | MiaPaca | 0.02 |
|  | HCT-116 | 0.2 |
|  | MiaPaca | 0.2 |
|  | HCT-116 | 2.8 |

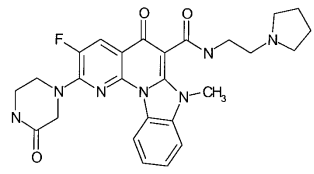
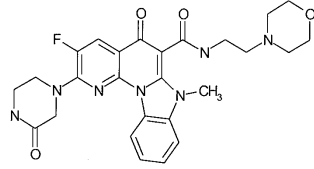
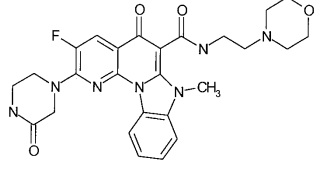
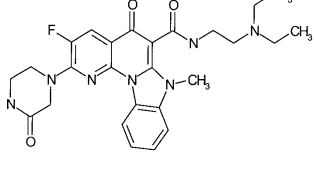
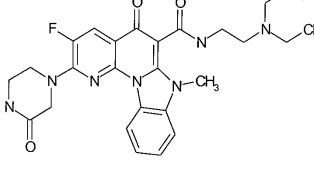
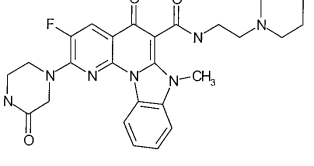
[0158]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | 2.1 |
|  | HCT-116 | 0.04 |
|  | MiaPaca | 0.02 |
|  | HCT-116 | 0.2 |
|  | MiaPaca | 0.05 |
|  | HCT-116 | 0.04 |

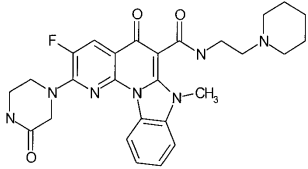
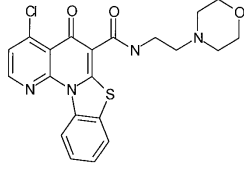
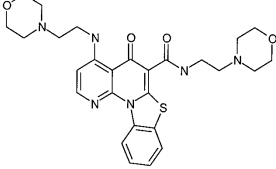
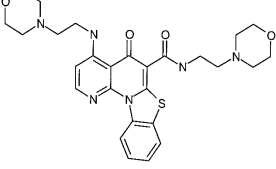
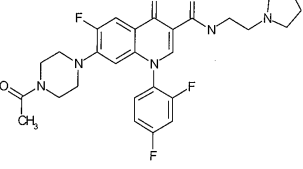
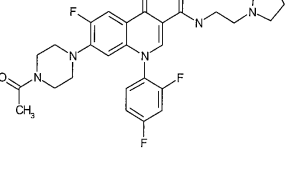
[0159]

| 분자구조 | M 세포 | M 레이타 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | 0.01 |
|  | HCT-116 | 0.04 |
|  | MiaPaca | 0.02 |
|  | HCT-116 | >10 |
|  | MiaPaca | 3.9 |
|  | HCT-116 | 1.2 |

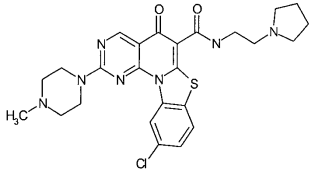
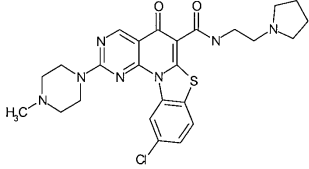
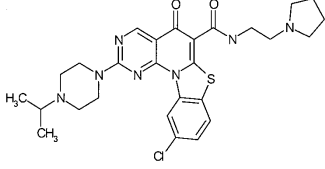
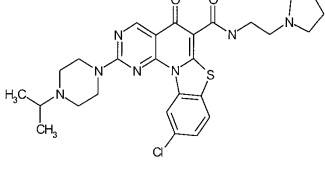
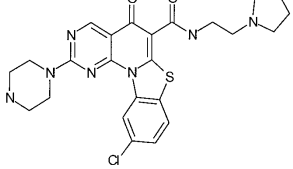
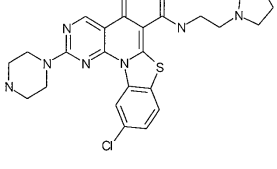
[0160]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | 2.3 |
|  | HCT-116 | >10 |
|  | MiaPaca | 2.5 |
|  | HCT-116 | 2.8 |
|  | MiaPaca | 1.8 |
|  | HCT-116 | 4.2 |

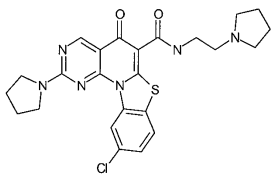
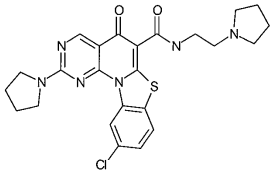
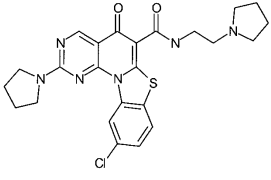
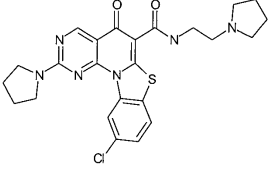
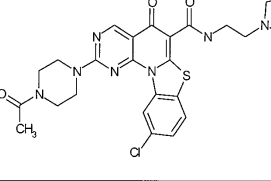
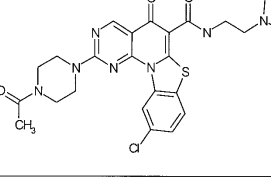
[0161]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | 1.4 |
|  | HCT-116 | 3.5 |
|  | HCT-116 | 3.4 |
|  | MiaPaca | 4 |
|  | HCT-116 | >10 |
|  | MiaPaca | 10 |

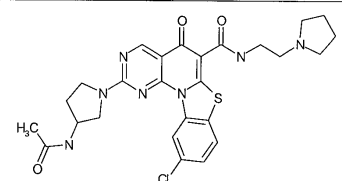
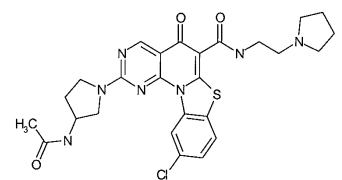
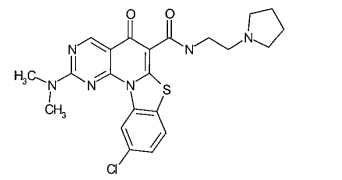
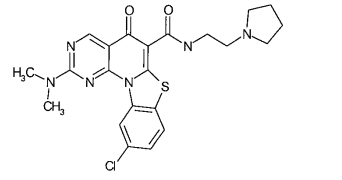
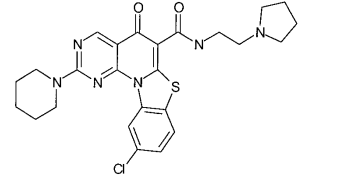
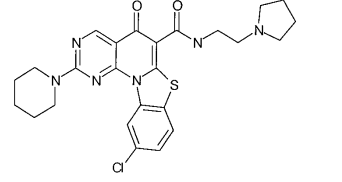
[0162]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | 0.024 |
|  | HCT-116 | 0.03 |
|  | MiaPaca | 0.03 |
|  | MiaPaca | 0.03 |
|  | HCT-116 | 0.02 |

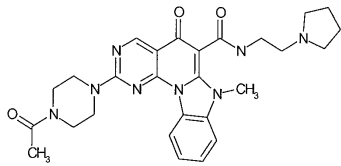
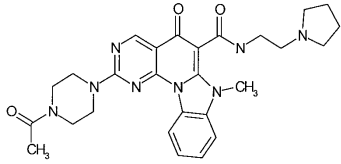
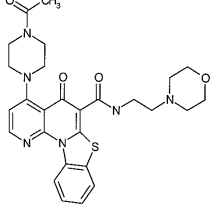
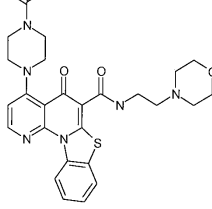
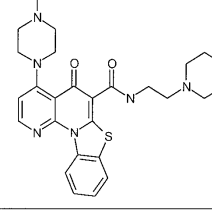
[0163]

| 분자구조 | M 세포 | M 테이타 |
|---|---------|-------|
|  | Miapaca | 0.05 |
|  | HCT-116 | 0.21 |
|  | MiaPaca | 0.3 |
|  | HCT-116 | 2.40 |
|  | MiaPaca | 0.02 |
|  | HCT-116 | 0.02 |

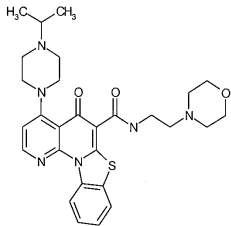
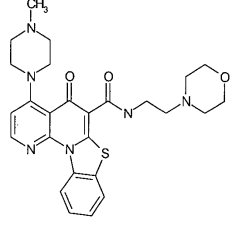
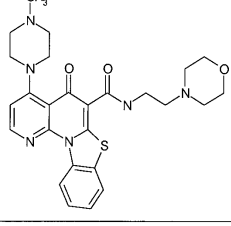
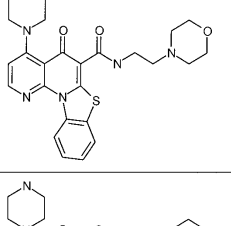
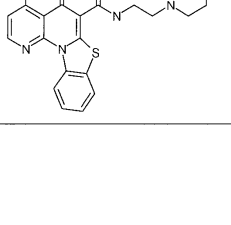
[0164]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | 0.03 |
|  | HCT-116 | 0.11 |
|  | MiaPaca | 0.12 |
|  | HCT-116 | 0.16 |
|  | MiaPaca | 0.3 |
|  | HCT-116 | 0.28 |

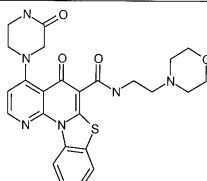
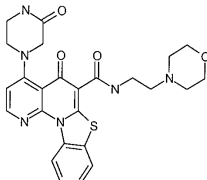
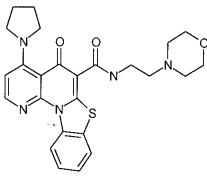
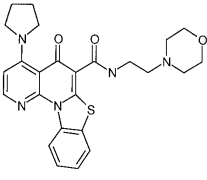
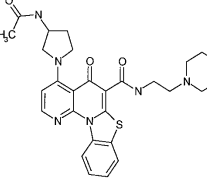
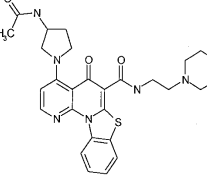
[0165]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.22 |
|  | MiaPaca | 0.39 |
|  | MiaPaca | >10 |
|  | HCT-116 | 10 |
|  | HCT-116 | 10 |

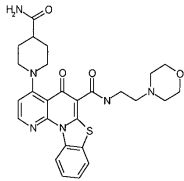
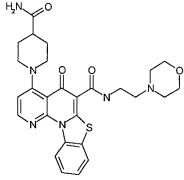
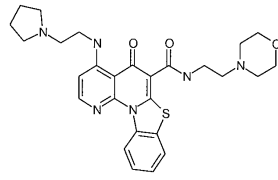
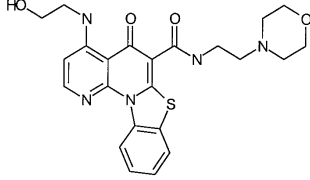
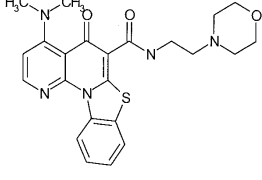
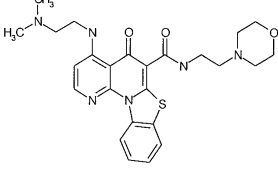
[0166]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | 4 |
|  | HCT-116 | 10 |
|  | MiaPaca | 4.2 |
|  | HCT-116 | 3.0 |
|  | MiaPaca | 3.9 |

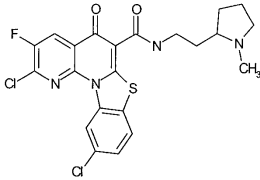
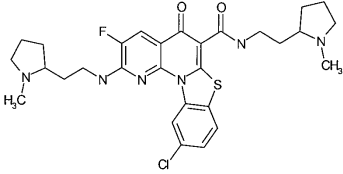
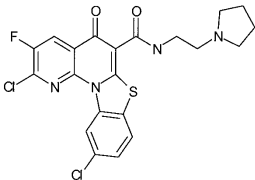
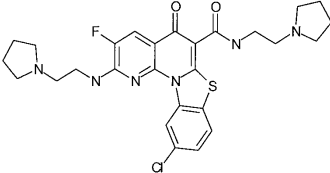
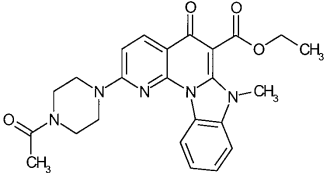
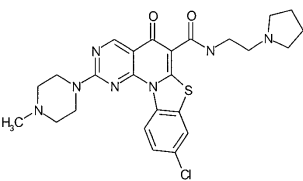
[0167]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 4.5 |
|  | MiaPaca | 6.6 |
|  | HCT-116 | 3.5 |
|  | MiaPaca | >10 |
|  | HCT-116 | 10 |
|  | MiaPaca | 4.3 |

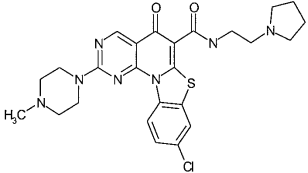
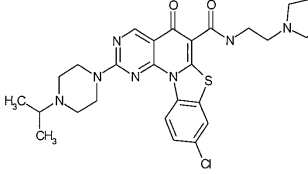
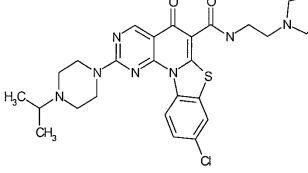
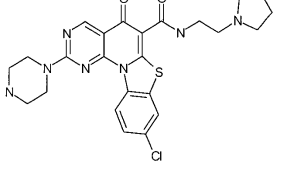
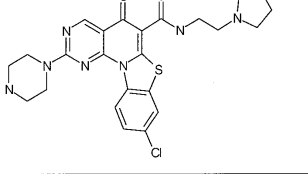
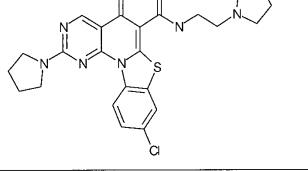
[0168]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | >10 |
|  | MiaPaca | >10 |
|  | HCT-116 | 0.25 |
|  | HCT-116 | 10 |
|  | HCT-116 | >10 |
|  | HCT-116 | 0.28 |

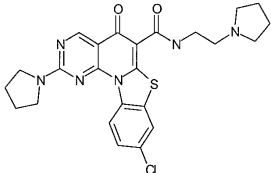
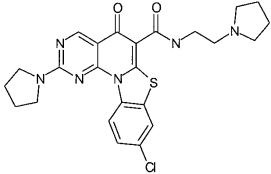
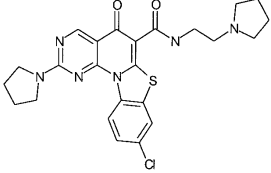
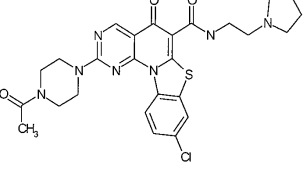
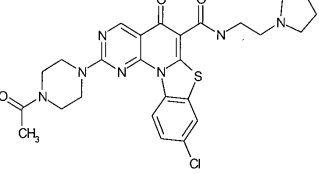
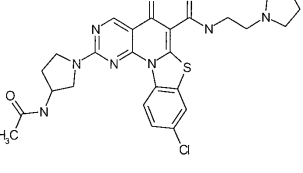
[0169]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | | |
|  | HCT-116 | 0.03 |
|  | HCT-116 | 2.10 |
|  | HCT-116 | 0.02 |
|  | HCT-116 | 2.30 |
|  | HCT-116 | <0.01 |

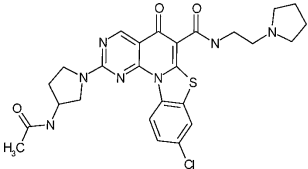
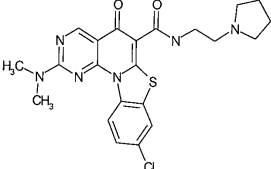
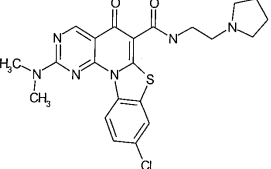
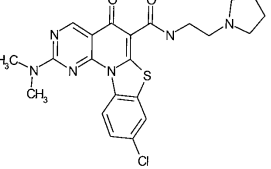
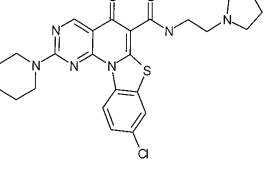
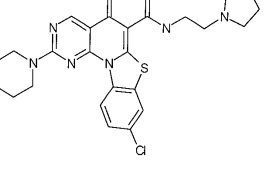
[0170]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | <0.01 |
|  | MiaPaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | 0.02 |
|  | MiaPaca | 0.01 |
|  | HCT-116 | 0.115 |

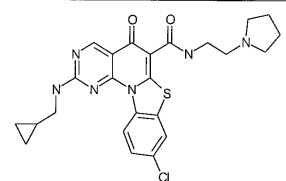
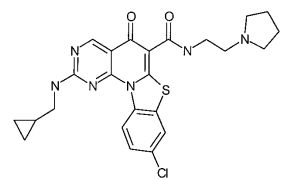
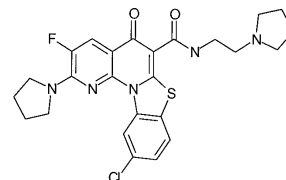
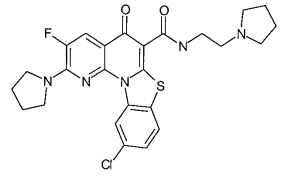
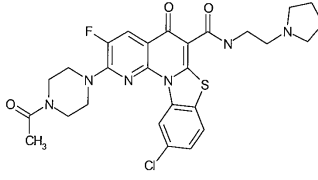
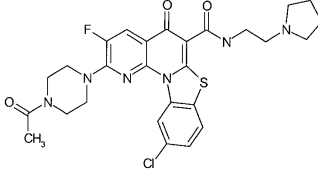
[0171]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | 0.03 |
|  | Miapaca | 0.65 |
|  | HCT-116 | 1.3 |
|  | HCT-116 | <0.01 |
|  | MiaPaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | <0.01 |

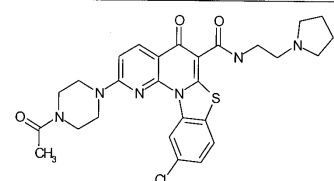
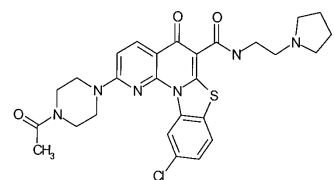
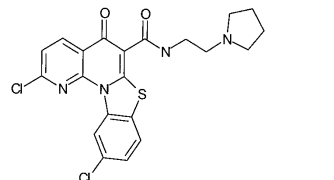
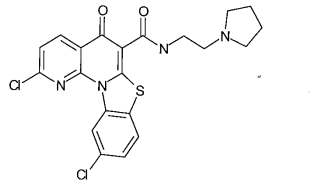
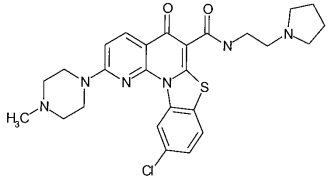
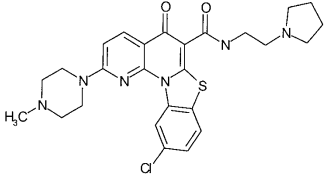
[0172]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | 0.03 |
|  | MiaPaca | 0.04 |
|  | Miapaca | 0.01 |
|  | HCT-116 | 0.16 |
|  | MiaPaca | 0.08 |

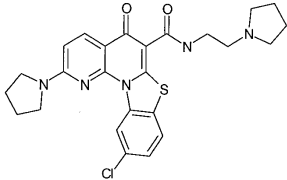
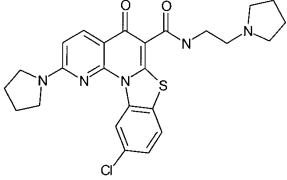
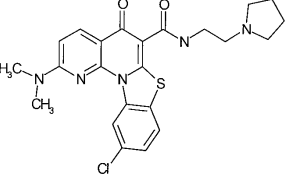
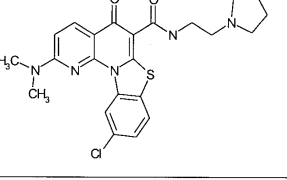
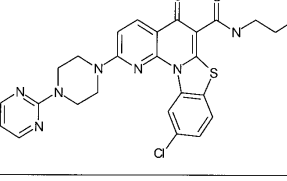
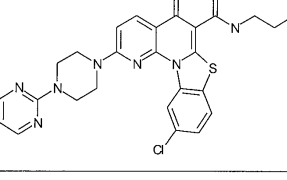
[0173]

| 분자구조 | M 세포 | M 테이타 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.04 |
|  | MiaPaca | 0.02 |
|  | HCT-116 | 0.34 |
|  | MiaPaca | 0.73 |
|  | HCT-116 | 0.01 |
|  | MiaPaca | <0.01 |

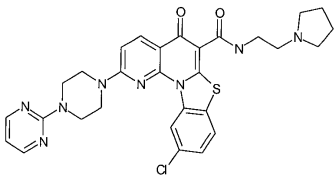
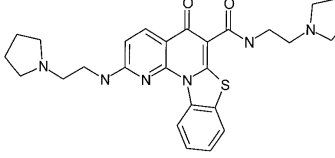
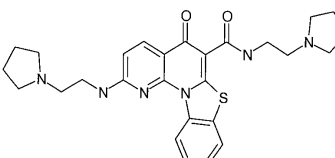
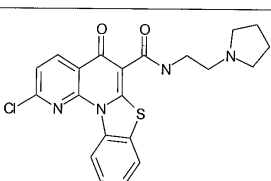
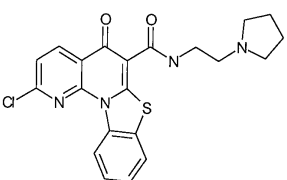
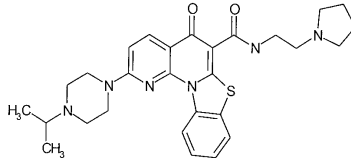
[0174]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | 0.03 |
|  | HCT-116 | 0.34 |
|  | MiaPaca | 0.48 |
|  | MiaPaca | 0.04 |
|  | HCT-116 | 0.10 |

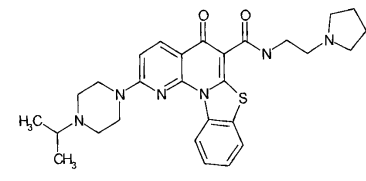
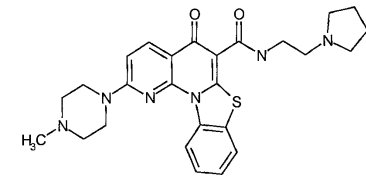
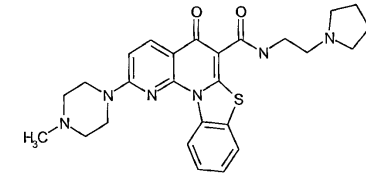
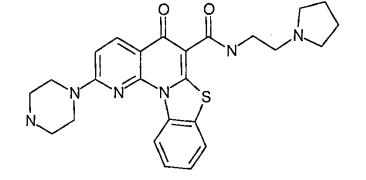
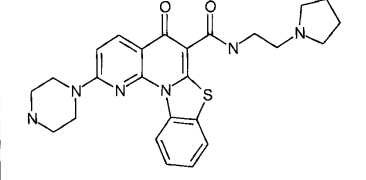
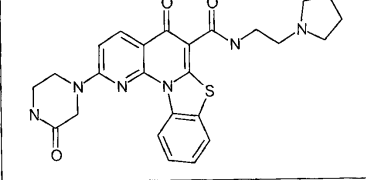
[0175]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.24 |
|  | Miapaca | 0.17 |
|  | HCT-116 | 0.2 |
|  | MiaPaca | 0.45 |
|  | HCT-116 | 0.33 |
|  | MiaPaca | 2.50 |

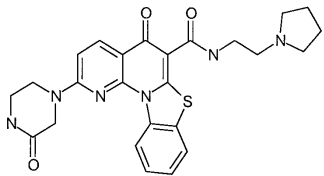
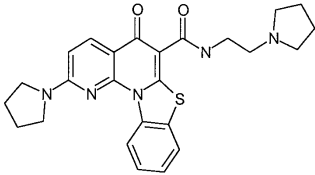
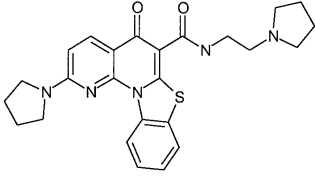
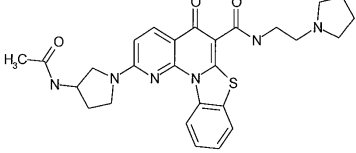
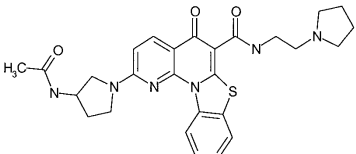
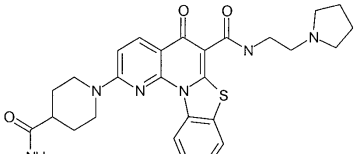
[0176]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-126 | 0.34 |
|  | MiaPaca | 0.02 |
|  | HCT-116 | 0.01 |
|  | HCT-116 | 0.35 |
|  | Miapaca | 0.43 |
|  | MiaPaca | <0.01 |

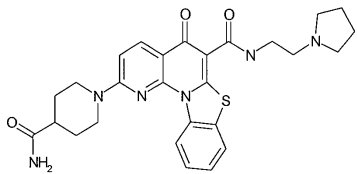
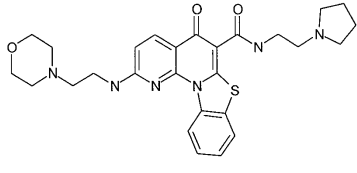
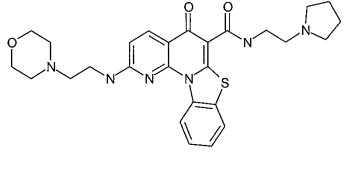
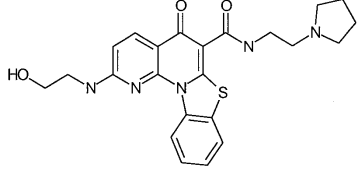
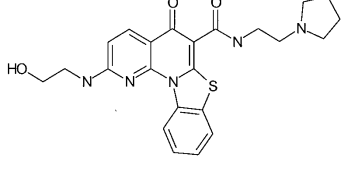
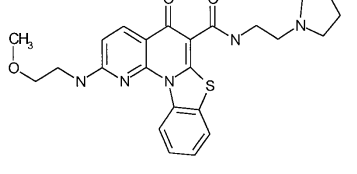
[0177]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | <0.01 |
|  | MiaPaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | <0.01 |
|  | MiaPaca | 0.01 |
|  | HCT-116 | <0.01 |
|  | MiaPaca | 0.17 |

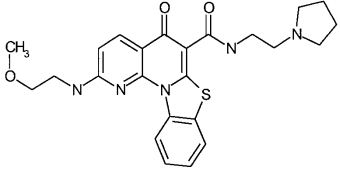
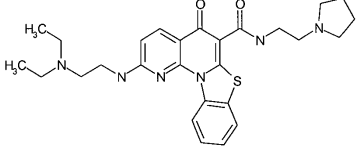
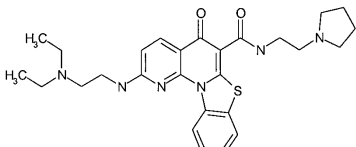
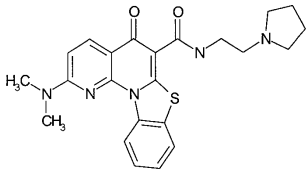
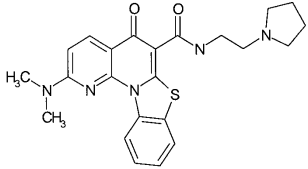
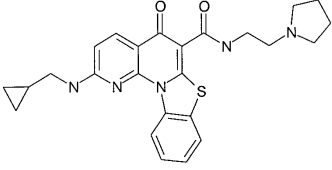
[0178]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.22 |
|  | MiaPaca | 0.2 |
|  | HCT-116 | 0.11 |
|  | MiaPaca | 0.03 |
|  | HCT-116 | 0.01 |
|  | MiaPaca | 0.05 |

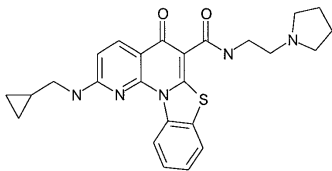
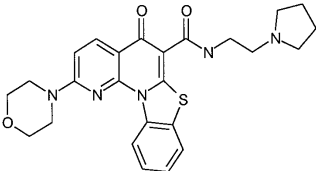
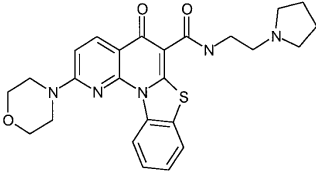
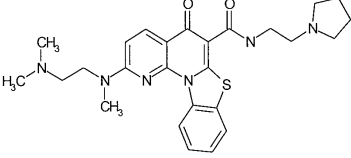
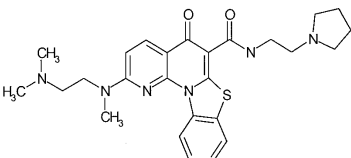
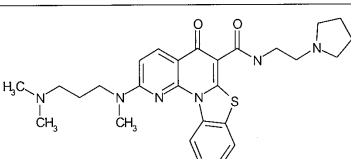
[0179]

| 분자구조 | M 세포 | M 레이타 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.02 |
|  | MiaPaca | 0.03 |
|  | HCT-116 | 0.02 |
|  | MiaPaca | 0.04 |
|  | HCT-116 | 0.02 |
|  | MiaPaca | 0.05 |

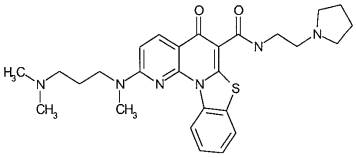
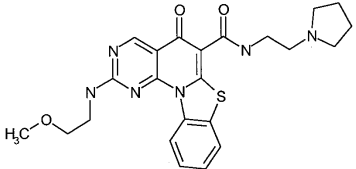
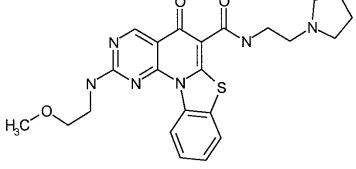
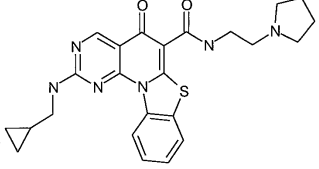
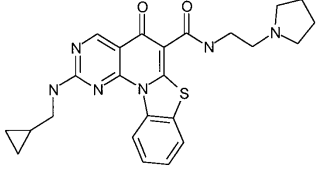
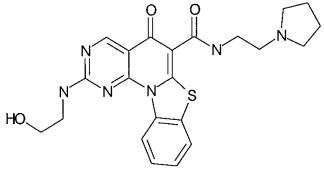
[0180]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.03 |
|  | MiaPaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | 0.02 |
|  | MiaPaca | 0.07 |
|  | HCT-116 | 0.03 |
|  | MiaPaca | 0.24 |

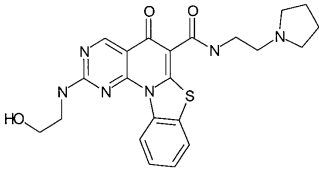
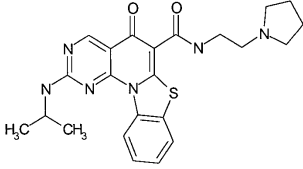
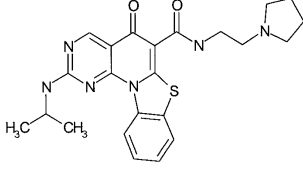
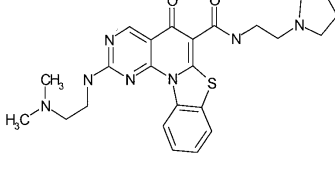
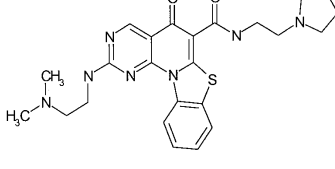
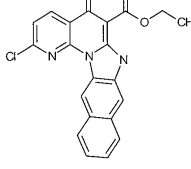
[0181]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.16 |
|  | MiaPaca | 0.03 |
|  | HCT-116 | 0.01 |
|  | MiaPaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | <0.01 |
|  | MiaPaca | 0.03 |

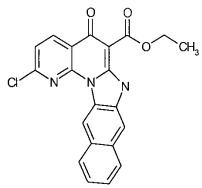
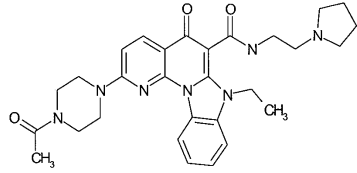
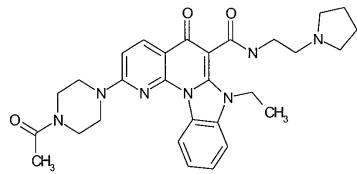
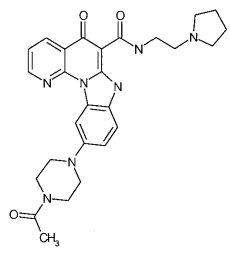
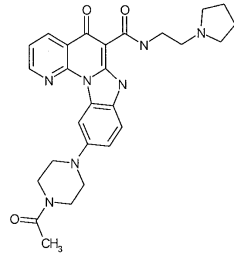
[0182]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.01 |
|  | MiaPaca | 0.04 |
|  | HCT-116 | 0.02 |
|  | MiaPaca | 0.05 |
|  | HCT-116 | 0.03 |
|  | MiaPaca | 0.04 |

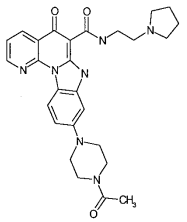
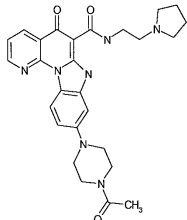
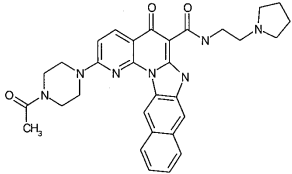
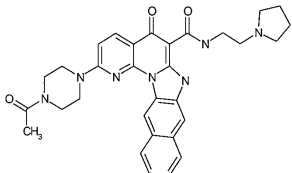
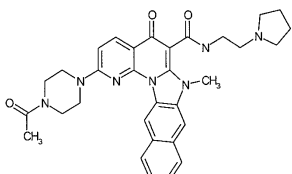
[0183]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.04 |
|  | MiaPaca | 0.11 |
|  | HCT-116 | 0.03 |
|  | MiaPaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | <0.01 |
|  | MiaPaca | >10 |

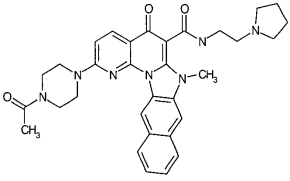
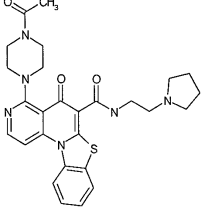
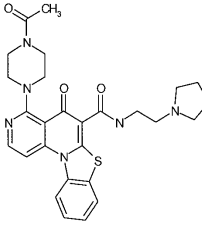
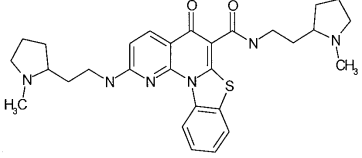
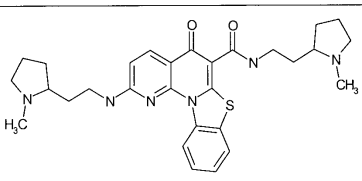
[0184]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 6.00 |
|  | MiaPaca | 0.27 |
|  | HCT-116 | 0.26 |
|  | MiaPaca | 0.3 |
|  | HCT-116 | 0.32 |

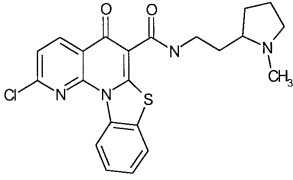
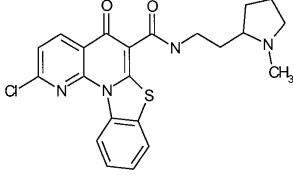
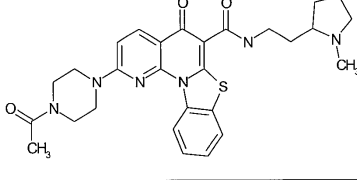
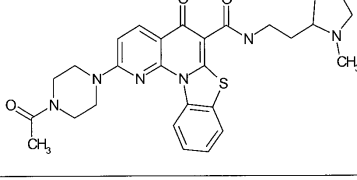
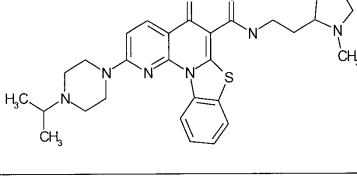
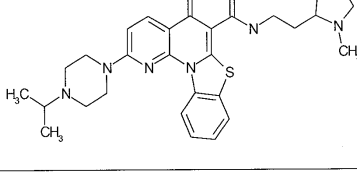
[0185]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | MiaPaca | 0.27 |
|  | HCT-116 | 0.26 |
|  | HCT-116 | 0.07 |
|  | Miapaca | 0.04 |
|  | MiaPaca | 0.08 |

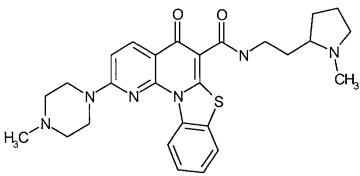
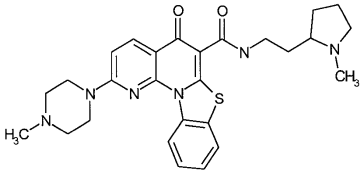
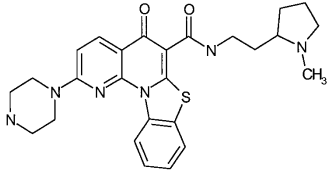
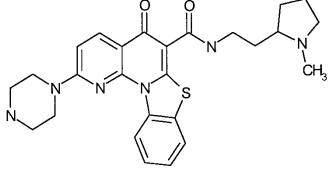
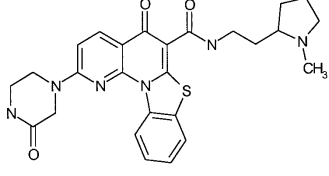
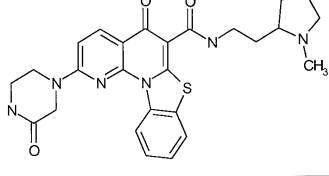
[0186]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.04 |
|  | Miapaca | 0.37 |
|  | HCT-116 | 0.27 |
|  | Miapaca | 0.02 |
|  | HCT-116 | 0.03 |

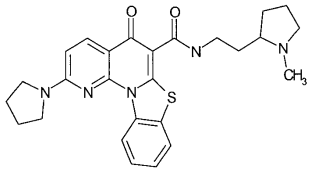
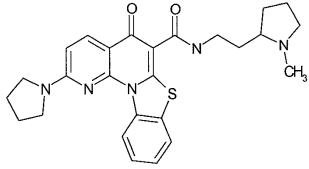
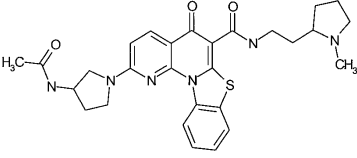
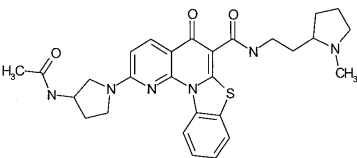
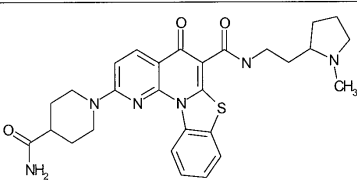
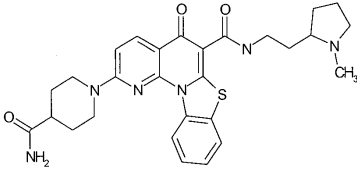
[0187]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | Miapaca | 0.52 |
|  | HCT-116 | 0.18 |
|  | Miapaca | 0.04 |
|  | HCT-116 | 0.04 |
|  | Miapaca | 0.01 |
|  | HCT-116 | <0.01 |

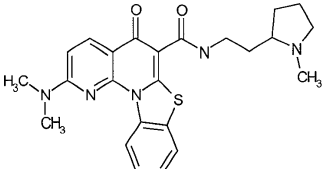
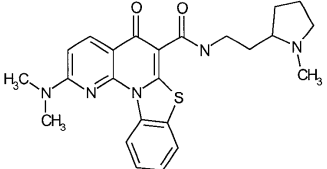
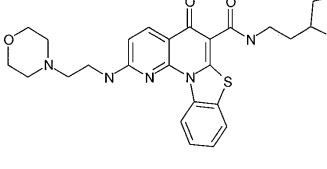
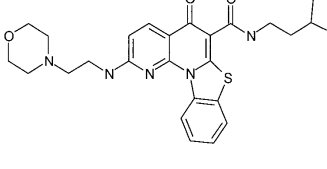
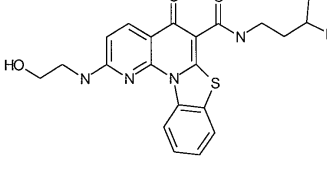
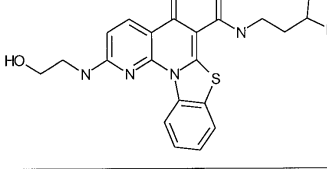
[0188]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | Miapaca | 0.03 |
|  | HCT-116 | 0.03 |
|  | Miapaca | 0.01 |
|  | HCT-116 | <0.01 |
|  | Miapaca | 0.20 |
|  | HCT-116 | 0.14 |

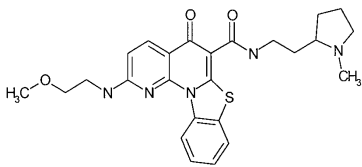
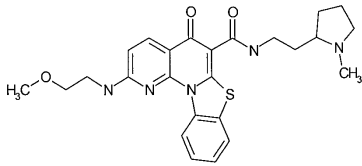
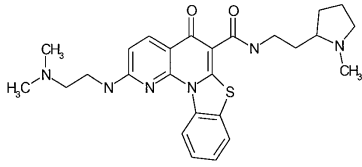
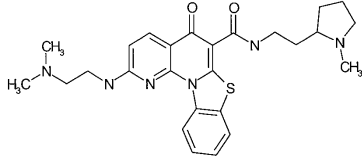
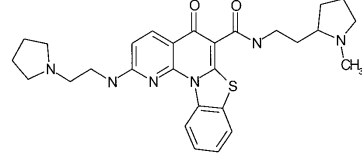
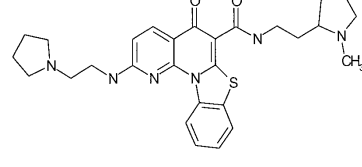
[0189]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | Miapaca | 0.70 |
|  | HCT-116 | 0.10 |
|  | Miapaca | 0.03 |
|  | HCT-116 | 0.03 |
|  | Miapaca | 0.04 |
|  | HCT-116 | 0.04 |

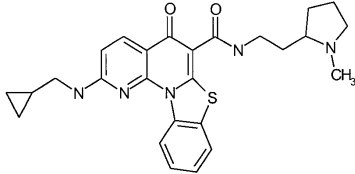
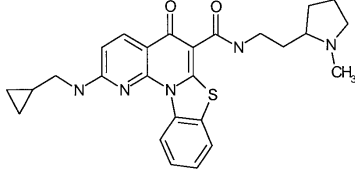
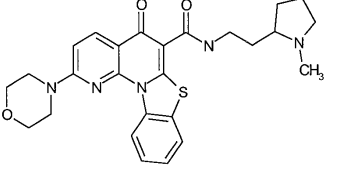
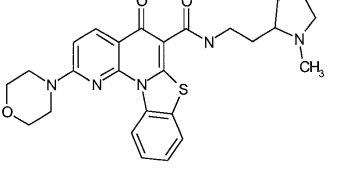
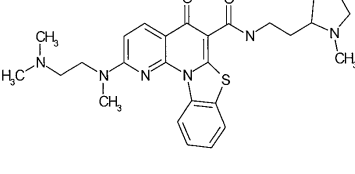
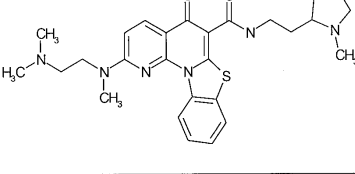
[0190]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | Miapaca | 0.37 |
|  | HCT-116 | 0.98 |
|  | Miapaca | 0.04 |
|  | HCT-116 | 0.05 |
|  | Miapaca | 0.04 |
|  | HCT-116 | 0.08 |

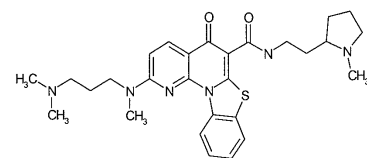
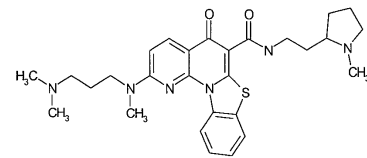
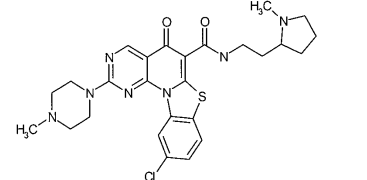
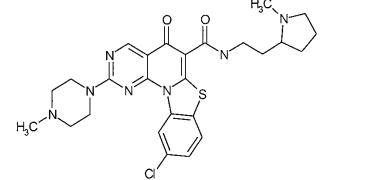
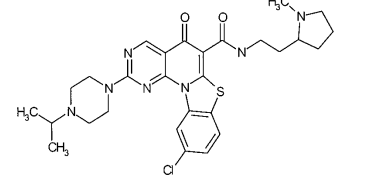
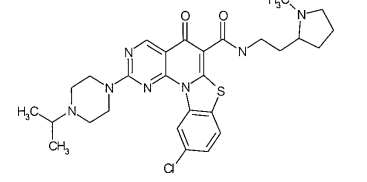
[0191]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | Miapaca | 0.15 |
|  | HCT-116 | 0.11 |
|  | Miapaca | 0.01 |
|  | HCT-116 | 0.01 |
|  | Miapaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | <0.01 |

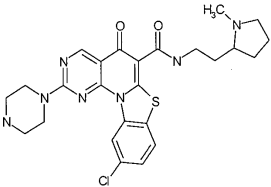
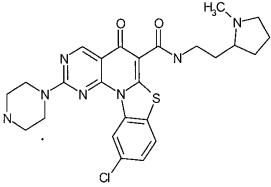
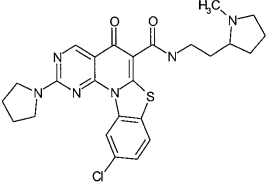
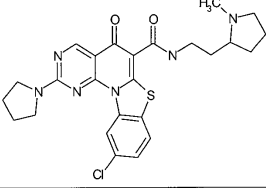
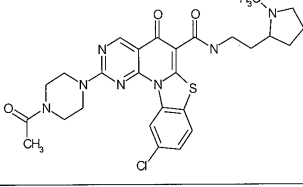
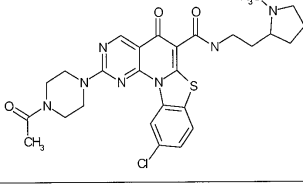
[0192]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | Miapaca | 0.34 |
|  | HCT-116 | 0.19 |
|  | Miapaca | 0.05 |
|  | HCT-116 | 0.07 |
|  | Miapaca | 0.02 |
|  | HCT-116 | 0.02 |

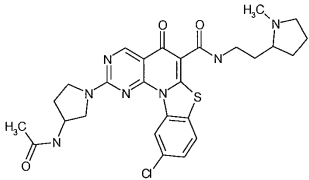
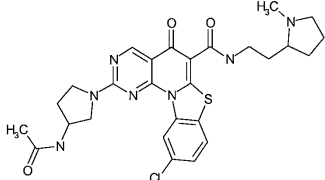
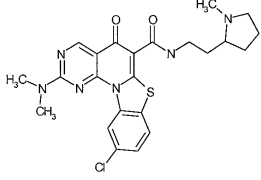
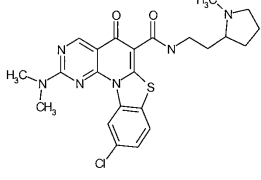
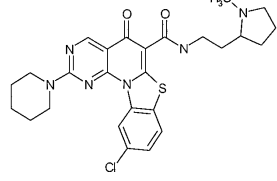
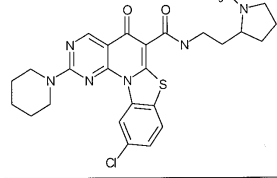
[0193]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | Miapaca | 0.02 |
|  | HCT-116 | 0.02 |
|  | Miapaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | 0.02 |
|  | Miapaca | 0.03 |
|  | HCT-116 | 0.02 |

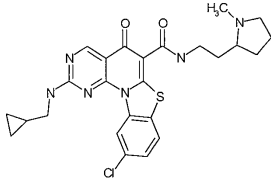
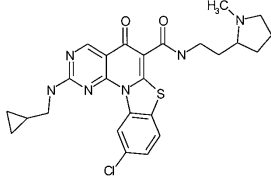
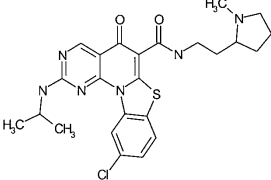
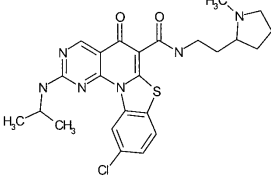
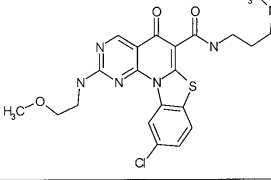
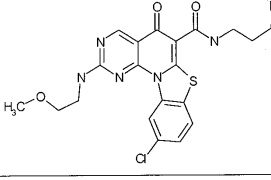
[0194]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | Miapaca | <0.01 |
|  | HCT-116 | <0.01 |
|  | Miapaca | 0.73 |
|  | HCT-116 | 2.45 |
|  | Miapaca | 0.02 |
|  | HCT-116 | 0.04 |

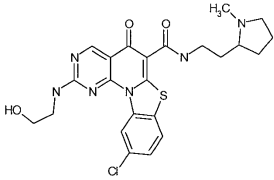
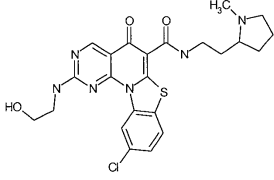
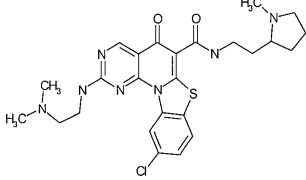
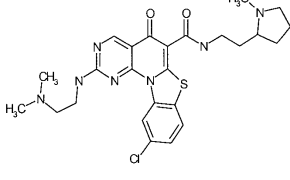
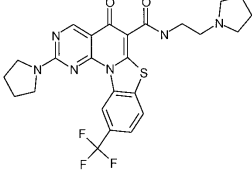
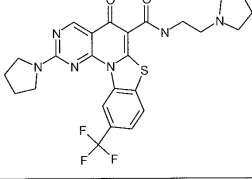
[0195]

| 분자구조 | M 세포 | M 레이타 |
|---|---------|-------|
|  | Miapaca | 0.04 |
|  | HCT-116 | 0.02 |
|  | Miapaca | 0.16 |
|  | HCT-116 | 1.7 |
|  | Miapaca | 1.50 |
|  | HCT-116 | 0.3 |

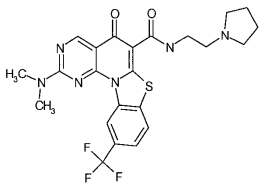
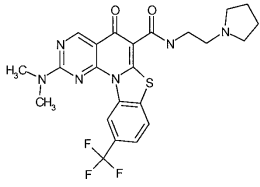
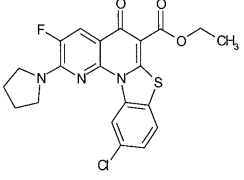
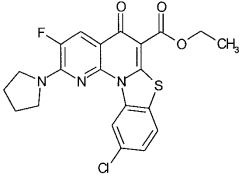
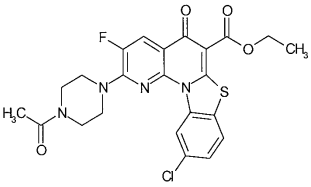
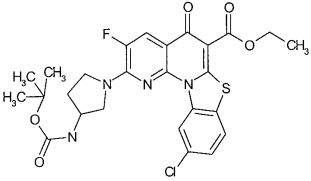
[0196]

| 분자구조 | M 세포 | M 레이라 |
|---|---------|-------|
|  | Miapaca | 2.00 |
|  | HCT-116 | 0.38 |
|  | Miapaca | 0.43 |
|  | HCT-116 | 0.27 |
|  | Miapaca | 0.04 |
|  | HCT-116 | 0.15 |

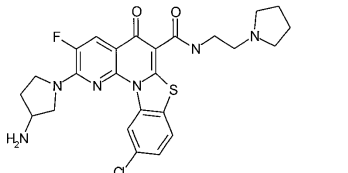
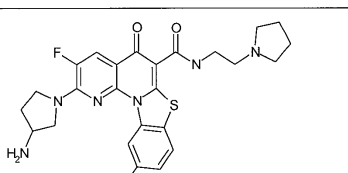
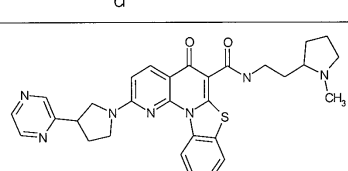
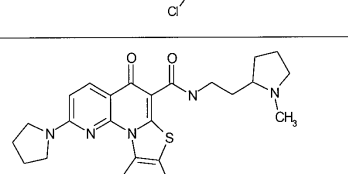
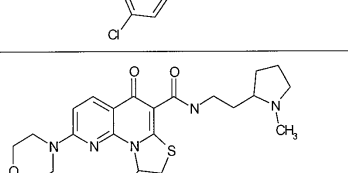
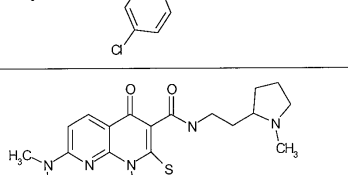
[0197]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | Miapaca | 0.07 |
|  | HCT-116 | 0.16 |
|  | Miapaca | 0.01 |
|  | HCT-116 | 0.01 |
|  | HCT-116 | >10 |
|  | Miapaca | 4.00 |

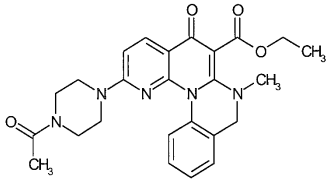
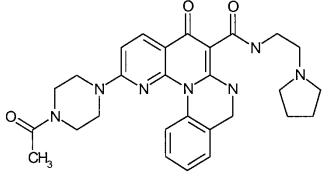
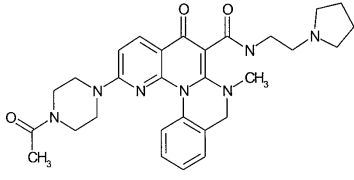
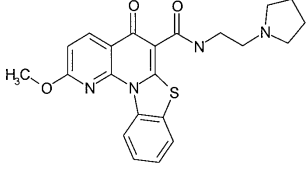
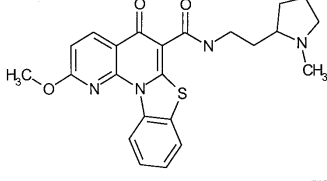
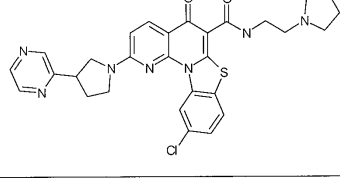
[0198]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.82 |
|  | Miapaca | 0.16 |
|  | HCT-116 | >10 |
|  | Miapaca | 6.50 |
|  | HCT-116 | 0.07 |
|  | HCT-116 | >10 |

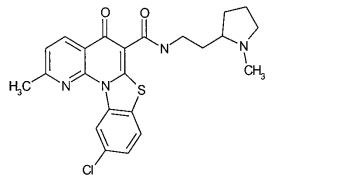
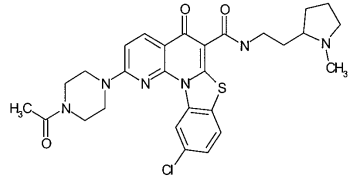
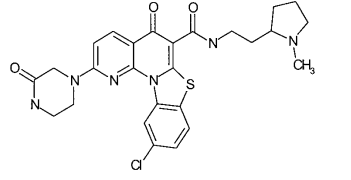
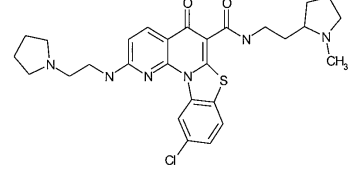
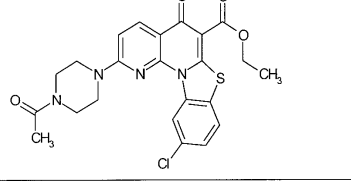
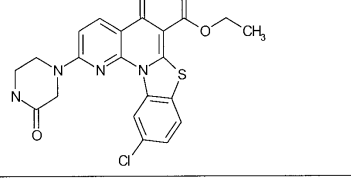
[0199]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 0.02 |
|  | Miapaca | 0.01 |
|  | HCT-116 | 1.2 |
|  | HCT-116 | 0.19 |
|  | HCT-116 | 0.57 |
|  | HCT-116 | 0.15 |

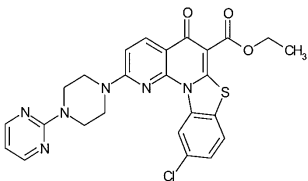
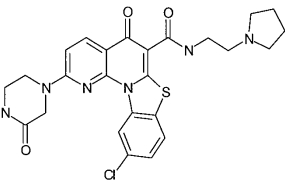
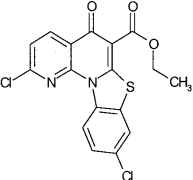
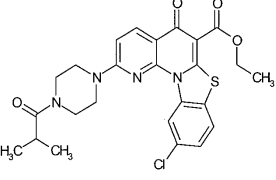
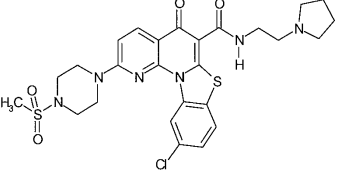
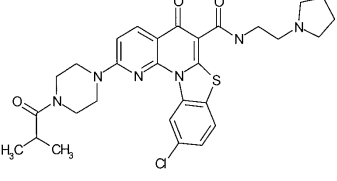
[0200]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | >10 |
|  | HCT-116 | >10 |
|  | HCT-116 | >10 |
|  | HCT-116 | 0.04 |
|  | HCT-116 | 0.31 |
|  | HCT-116 | 3.6 |

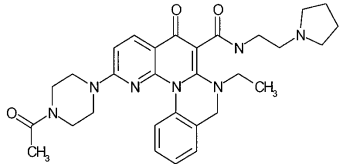
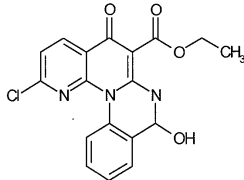
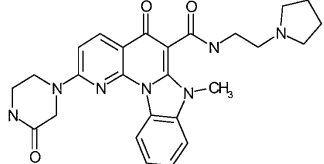
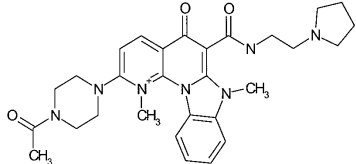
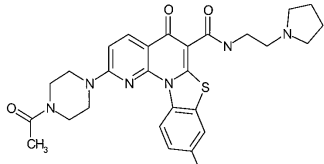
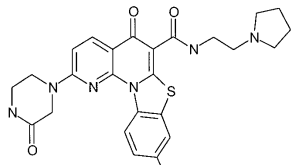
[0202]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-116 | 2.9 |
|  | HCT-116 | 0.45 |
|  | HCT-116 | 0.42 |
|  | HCT-116 | 0.16 |
|  | HCT-116 | 0.23 |
|  | HCT-117 | 0.2 |

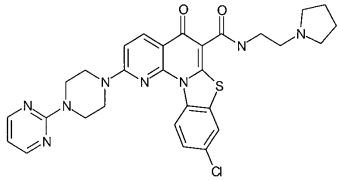
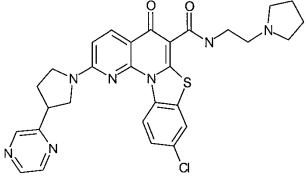
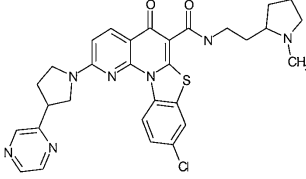
[0203]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-118 | 0.75 |
|  | HCT-119 | 0.17 |
|  | HCT-121 | >10 |
|  | HCT-122 | 0.07 |
|  | HCT-123 | 0.03 |
|  | HCT-124 | 0.03 |

[0204]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|---------|-------|
|  | HCT-117 | >10 |
|  | HCT-118 | 3.5 |
|  | | |
|  | | |
|  | | |
|  | | |

[0205]

| 분자구조 | M 세포 | M 데이터 |
|---|------|-------|
|  | | |
|  | | |
|  | | |

[0206]

[0207]

본원에 기재된 화합물은 4중 가닥을 형성할 수 있는 핵산 영역과 상호작용할 수 있다. 4중 가닥을 형성할 수 있는 DNA의 영역들은 종양형성 유전자의 전사, 4중 가닥 조절물과 같은 생물학적 방법들의 조절기이기 때문에, 생물학적 활성은 암 치료법으로서 사용될 수 있다. 4중 가닥을 형성할 수 있는 DNA 영역과 상호작용하는 분자들은 어떤 세포 증식 질병들과 관련 조건하에서 치료 효과를 발휘할 수 있다. 특히, 비정상적으로 증가된 종양형성 유전자의 발현은 세포 증식 질병들을 야기할 수 있고, 4중 가닥가닥 구조들은 일반적으로 종양형성 유전자의 발현을 낮게 조절할 수 있다. 종양형성 유전자들의 예는 MYC, HIF, VEGF, ABL, TGF, PDGFA, MYB, SPARC, HUMTEL, HER, VAV, RET, H-RAS, EGF, SRC, BCL1, BCL2을 포함하지만, 이것에 한정되지 않고, 다른 종양형성 유전자들은 당업자들에게 공지되어 있다. 또한, 본원에 기재된 화합물은 세포 사멸(예, 아포토시스)을 유도할 수 있고, 4중 가닥을 형성할 수 있는 DNA의 영역과 상호작용하지 않을 수 있다.

[0208]

4중 가닥을 형성할 수 있는 DNA의 영역과 결합하는 분자들은 다른 메커니즘에 따라 생물학적 효과를 발휘할 수 있고, 이는 예컨대, 원래의 4중 가닥 구조를 안정화시키고, 사슬 분해를 방해함으로써 원래의 4중 가닥을 2중 가닥 DNA로 전환하는 것을 방해하고, 4중 가닥-불안정한 뉴클레오타이드 치환과 특정 상호작용을 하는 다른 서열들을 갖는 원래의 4중 가닥 구조를 안정화시키는 것을 포함한다. 따라서, 여기에 기술되어 있는 4중 가닥을 형성할 수 있는 DNA의 영역들과 결합하는 화합물들은, 종양형성 유전자의 전사를 낮게 조절할 목적으로 세포들, 조직들, 또는 유기체들에 투여될 수 있고, 그것에 의해 세포 증식 질병들이 치료된다.

[0209]

4중 가닥을 형성할 수 있는 원래의 DNA의 생물학적인 활성이 세포, 조직 또는 유기체들에서 조절되는지 여부의 결정은, 4중 가닥의 생물학적인 활성을 모니터링함으로써 이루어질 수 있다. 4중 가닥을 형성하는 DNA의 생물학적인 활성 영역은 예컨대, 분자와 4중 가닥을 형성하는 DNA를 접촉하는 것에 따른 유전자 전사의 감소 또는 증가를 발견함으로써, 세포들, 조직들 또는 유기체들에서 모니터링될 수 있다. RNA 전사를 직접 관찰하거나, 유전 정보에 의해 번역된 폴리펩타이드를 관찰함으로써 전사가 발견될 수 있고, 이는 당업계에 공지되어 있는 방법이다.

[0210]

4중 가닥 형성 DNA와 상호작용하고, 4중 가닥 형성 핵산과 상호작용하는 분자들은, 많은 세포 증식 질병들을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 세포 증식 질병들은, 예컨대 결장암 및 조혈 종양 질병(즉, 골수계, 림프계 또는 적혈구계, 또는 그것의 전구체 세포들로부터 생성되는 것과 같은 조혈원의 증식/종양 세포들을 포함하는 질병들)을 포함한다. 질병들은 약간 차이가 있는 급성 백혈병, 예컨대, 적혈모구 백혈병 및 급성 거대핵세포모구 백혈병으로부터 생길 수 있다. 추가적인 골수 질병들은 급성 전골수 백혈병(APML), 급성 골수 백혈병(AML) 및 만성 골수 백혈병(CML)[참조: Vaickus, Crit. Rev. in Oncol./Hematol.11:267-297 (1991)]을 포함하지만, 이들에 한정되지 않는다. 림프 악성종양은 B-계통 모두 그리고 T-계통 모두를 포함하는, 급성 림프모구 백혈병(ALL), 만성 림프구 백혈병(CLL), 전림프구 백혈병(PLL), 털세포 백혈병(HLL) 및 왈덴스트롬의 마크로글로불린혈증(WM)을 포함하지만, 이들에 한정되지 않는다. 추가적인 악성 림프종 형태들은 비-호킨스 림프종 및 그것의 변형, 말초 T 세포 림프종, 성인 T 세포 백혈병/림프종(ATL), 피부 T-세포 림프종(CTCL), 거대과립 림프구 백

혈병(LGF), 호킨스 질병(Hodgkin's disease) 및 리드-스텐베르그 질병(Reed-Sternberg disease)을 포함하지만, 이들에 한정되지 않는다. 세포 증식 질병들은 또한 결장 직장, 유방, 폐, 간, 이장, 림프결절, 결장, 전립선, 뇌, 머리 및 목, 피부, 간장, 신장 및 흉부의 암을 포함한다. 4중 가닥을 형성할 수 있는 DNA의 영역들과 상호작용하는 화합물들은 또한 대상에게서 혈관형성 인자를 억제함으로써, 증가된 혈관형성 인자와 같이 우리가 표적으로 삼는 암 질환에 사용될 수 있다.

[0211] 본 발명은 세포 증식을 감소시키는 방법 또는 치료방법 또는 세포 증식 질병들을 완화시키는 방법을 제공하는데, 이는 상기 화합물 중 하나를 갖는 화합물로 4중 가닥을 형성할 수 있는 DNA를 갖는 시스템에 접촉하는 것으로 이루어진다. 시스템은 세포들 또는 하나 이상의 조직들의 군일 수 있다. 하나의 구체적인 예에 있어서, 시스템은 세포 증식 질병의 치료를 필요로 하는 대상(예컨대, 마우스, 쥐, 원숭이, 또는 인간과 같은 포유류)이다. 본 발명은 또한, c-MYC 4중 가닥을 형성하는 영역과 상호작용하는 화합물을, 그것을 필요로 하는 대상에게 투여함으로써, 결장 직장 암세포 증식을 감소시켜서 결장 직장 암을 치료하는 방법을 제공한다. 게다가, 본 발명은 혈관형성을 억제하고, 혈관형성 관련 암을 선택적으로 치료하는 방법을 제공하는데, 이는 이것을 필요로 하는 대상에게 근육 내피성장인자(VEGF)의 4중 가닥을 형성하는 영역과 상호작용하는 화합물을 투여함으로써, 혈관형성을 감소시키고, 혈관형성 관련 암을 선택적으로 치료하는 것을 포함한다.

[0212] DNA의 4중 가닥 형성 영역과 상호작용하는 화합물들은 또한 바이러스 감염과 같은 미생물 감염증을 감소시키는 데 사용될 수 있다. 레트로바이러스는 치료의 목적이 된 G-4중 가닥을 위한 중요한 타겟을 많이 제공한다. G-4중 가닥 구조들은 HIV, 다이머 링커 구조(DLS) 및 중심 DNA 플랩(CDF)에 있는 바이러스 RNA 또는 DNA의 어느 하나에 의해 형성된 적어도 두 개의 2차 구조들에 기능성 성분으로서 포함되어 있다. 또한, 분자간 또는 분자내 4중 가닥 구조들 중 어느 하나를 채택할 수 있는 DNA 아프타머들은 바이러스 복제를 억제할 수 있다. 하나의 예에 있어서, DNA 아프타머들은 막 글리코단백질을 (추정적으로) 표적화함으로써 바이러스 복제를 억제할 수 있다. 다른 예에 있어서, DNA 아프타머들은 HIV-인테그라제를 각각 표적화함으로써, 인테그라제 효소와 상호작용하는 원래의 4중 가닥 구조들과 관련되어 바이러스 복제를 억제할 수 있다.

[0213] 모든 레트로바이러스에 대해서 일반적인 다이머 링커 구조들은, 두 개의 바이러스 RNA 서열들의 두 개의 5 말단들의 사이에서 비공유결합을 함으로써, 바이러스 게놈의 두 개의 카피들이 서로 결합할 수 있게 한다. 게놈 다이머는 성숙한 바이러스 입자들 중에 있는 개구기 단백질에 고정되어 연결되어 있다. HIV의 경우에 있어서, 이러한 비공유 결합의 기원은, 적어도 두 개의 연속적인 구아닌의 몇 가지 배열(시험관 내에 있는 RNA 다이머들의 형성을 위한 3' 을 포함하는 98 염기쌍 서열의 결과일 수 있다. 시험관 내에 있는 다이머의 형성과 안정성에 대한 관찰된 양이온(칼륨) 의존성, 그 이외에 효율적으로 다이머화될 수 있는 안티센스 서열의 실패는, 분자내 G-4중 가닥에 대한 결합 구조로서 대부분 나타난다.

[0214] 호스트 게놈으로 통합되기 전에, 역전사된 바이러스 DNA는 적어도 두 개의 주요한 바이러스 단백질, 인테그라제 및 역전사효소와 프리 인터그레이션 복합체(PIC)를 형성하고, 이는 연속적으로 핵으로 운반된다. 바이러스 2중 가닥 DNA의 중심 가까이에서 발생하는, 중심 DNA 플랩(CDF)은 +사슬의 99-염기 길이의 단일 사슬 테일을 언급하고, 이는 PIC의 핵 진입의 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. CDF의 올리고뉴클레오타이드 모조체들은 세포-비침투 시스템에서는 분자내 G-4중 가닥 구조들을 형성하는 것으로 나타나 있다.

[0215] 그러므로, 4중 가닥 형성 영역을 인식하는 화합물들은, 다이머 링커 구조를 안정화시키고 두 개의 RNA 사슬들의 디커플링을 방지하기 위해서 사용될 수 있다. 또한, CDF에 의해 형성된 4중 가닥 구조를 결합함으로써, PIC의 핵수송을 위한 단백질 확인 및/또는 결합 발생은 방해받을 수 있다. 둘 중의 어느 하나의 경우에 있어서도, 다른 항바이러스 치료방법에 비해 실질적인 이점이 존재할 수 있다. 현존하는 높은 활성의 안티-레트로바이러스 치료(HAART) 방식들은 HIV 프로테아제 및 HIV 인테그라제를 타겟으로 하는 약들의 복합 사용에 의존한다. 다수-약물 방식에 대한 필요조건은 저항의 발생을 최소화하는 것으로, 이는 일반적으로 약제들이 따로 사용되는 경우 빠르게 개선된다. 그러한 빠른 저항의 원인은 역전사효소의 불신으로, 이는 모든 10,000 염기쌍들에 대해서 대략 하나의 돌연변이를 발생시킨다. 단백질 타겟에 대해서 바이러스 4중 가닥 구조들을 표적화하는 것의 이점은, 저항의 개선을 느리게 하거나 또는 불가능하게 하는 것이다. 타겟 4중 가닥의 점 돌연변이는, 4중 가닥 구조의 본래의 상태를 손상시킬 수 있어 당해 바이러스의 비-기능성 복사체가 초래될 수 있다. 이 개념에 근거한 단일 치료제는 감소된 비용 및 해로운 약품/약품의 상호작용들의 제거를 수반하는 이점과 함께, 현재 사용되고 있는 복합 약물 방식을 대체할 수 있다.

[0216] 본 발명은 시스템내에서 미생물 역가를 감소시키는 방법을 제공하는데, 이는 상기 화학식 중 하나를 갖는 화합물로 원래의 DNA 4중 가닥 형성 영역을 갖는 시스템에 접촉하는 것을 포함한다. 시스템은 하나 이상의 세포들

또는 조직들일 수 있다. 미생물 역가의 예들은 바이러스, 박테리아 또는 균류 역가를 포함하지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 특정 양태에서, 시스템은 바이러스 감염에 대한 치료가 필요한 대상이다(예를 들면, 마우스, 쥐, 원숭이 또는 인간과 같은 포유류). 바이러스 감염의 예들은 간염 바이러스(예를 들면, 간염 B 또는 C), 인체 면역결핍 바이러스(HIV), 리노 바이러스, 대상포진 바이러스(VZV), 단순헤르페스 바이러스(예를 들면, HSV-1 또는 HSV-2), 거대세포 바이러스(CMV), 우두 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 뇌염 바이러스, 한타 바이러스, 아르보 바이러스, 웨스트 나일(West Nile) 바이러스, 인간 유두종 바이러스(HPV), 엡스테인-바(Epstein-Barr) 바이러스 및 호흡기 세포융합 바이러스에 의한 감염을 포함한다. 본 발명은 또한 상기 화학식 중 하나를 화합물을 그것을 필요로 하는 대상에게 투여함으로써, HIV 감염을 감소시키므로써 HIV 감염을 치료하는 방법을 제공한다.

[0217] DNA의 4중 가닥 형성 영역에 결합할 수 있는 화합물들의 확인

[0218] 여기에 기술된 화합물들은 DNA의 4중 가닥 형성 영역과 결합할 수 있는 화합물들로 확인되고, 여기에서 화합물을 포함하는 시스템에서 생성된 "신호"로서 종종 표시되는, 이 영역의 생물학적인 활성은, 화합물을 포함하지 않는 시스템 중에서 생성된 신호와는 구별이 된다. 배경 신호들이 매 시간 평가될 수 있는 경우, 새로운 분자가 분석 과정에서 발견되고, 배경 신호의 검출이 매 시간 필요하지 않는 경우, 새로운 분자가 분석된다.

[0219] 4중 가닥 형성 뉴클레오타이드 서열들의 예들은 다음의 표 2에 나타나 있다:

[0220] 표 2:

| 서열 | 서열 ID NO | 기원 |
|--|----------|-----------------|
| TG ₄ AG ₃ TG ₄ AG ₃ TG ₄ AAGG | 1 | CMYC |
| GGGGGGGGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGAGGGGC | 2 | PDGFA |
| G ₈ ACGC ₃ AGCTG ₅ AG ₃ CTTG ₄ CCAG ₃ CG ₄ CGCTTAG ₅ | 3 | PDGFB/c-sis |
| AGGAAGGGGAGGGCCGGGGGAGGTGGC | 4 | CABL |
| AGGGGCGGGCGGGGCGGGGC | 5 | RET |
| AG ₄ CG ₃ CGCGGAGGAAGGGGGCGGGAGCGGGGCTG | 6 | BCL-2 |
| GGGGGGCGGGGGCGGGCGCAGGGGGAGGGGGC | 7 | Cyclin D1/BCL-1 |
| CGGGGCGGGGCGGGGCGGGGC | 8 | H-RAS |
| AGAGGAGGAGGAGGTACGGAGGAGGAGGAGAAGGAGGAGGAGGAA AGAGGAGGAGGAGGACACGGAGGAGGAGGAGAAGGAGGAGGAGGAA (GGA) ₄ | 또는 9 | CMYB |
| AGAGAAGAGGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGC | 10 | VAV |
| GGAGGGGGAGGGG | 11 | HMGA2 |
| AGGAGAAGGAGGAGGTGGAGGAGGAGG | 12 | CPIM |
| AGGAGGAGGAGAATGCGAGGAGGAGGAGGAGA | 13 | HER2/neu |
| GGGGCGGGCGGGGGCGGGGTCCCGGGCGGGGCGGAG | 14 | EGFR |
| CGGGAGGAGGAGGAAGGAGGAAGCGCG | 15 | VEGF |
| | 16 | CSRC |

[0222] 시험 분자 또는 시험 핵산이 다른 신호를 일으키는지를 결정하는 것에 추가하여, 핵산과 화합물 사이에서의 상호작용의 친화도는 정량화될 수 있다. IC₅₀, K_d, 또는 K_i 경계값은 각각의 상호작용에 대한, 측정된 IC₅₀ 또는 K_d 값에 비교될 수 있고, 이것에 의해 시험 분자를 4중 가닥 상호작용 분자로서, 또는 시험 핵산을 4중 가닥 형성 핵산으로서 확인할 수 있다. 예를 들면, 10 μM 이하, 1 μM 이하, 그리고 100nM 이하의 IC₅₀ 또는 K_d 경계값이 종종 사용된다. 다른 예에 있어서, 10nM 이하, 1nM 이하, 100pM 이하, 그리고 10pM 이하의 경계값이 4중 가닥 상호작용 분자 및 4중 가닥 형성 핵산을 확인하는데 사용될 수 있다.

[0223] 많은 분석들이 DNA의 4중 가닥 형성 영역과 친화력을 갖는 화합물들에 유용하다. 이들 분석들의 일부에 있어서, 생물학적인 활성은 화합물들에 결합하는 4중 가닥 핵산이고, 결합은 신호로서 측정된다. 다른 분석에 있어서, 생물학적인 활성은 4중 가닥의 폴리머라제 정지기능이고, 정지의 정도는 신호를 감소시키는 것으로 측정된다. 어떤 분석에 있어서, 생물학적인 활성은 전사이고, 전사레벨은 신호로서 측정될 수 있다. 다른 분석에 있어서, 생물학적인 활성은 세포 사망이고, 세포 사망을 겪는 세포들의 수는 정량된다. 다른 분석은 암세포들의 증식률을 모니터한다. 분석의 예들은 형광 결합 분석들, 겔 이동성 변화 분석[참조: Jin & Pike, Mol.

Endocrinol.(1996) 10:196-205], 폴리머라제 정지 분석, 전사 리포터 분석, 암세포 증식 분석 및 아포프토시스 분석[참조: Amersham Biosciences(Piscataway, New Jersey)]이고, 그리고 그러한 분석예의 구체적인 예들은 이후에 기술되어 있다. 또한, 국소이성화효소 분석은, 분자들과 상호작용하는 4중 가닥이 국소이성화효소 경로 활성을 갖는지 여부를 결정하기 위해 사용될 수 있다[참조: TopoGEN, Inc.(Columbus, Ohio)]

[0224] 겔 전기영동 이동성 변화 분석(EMSA)

[0225] EMSA는 핵산이 4중 가닥을 형성하는지, 그리고 뉴클레오타이드 서열이 4중 가닥을 불안정하게 하는지 여부를 결정하는데 유용하다. EMSA는 최소의 변형만으로 이전에 기술된 바와 같이[참조: Jin & Pike, Mol. Endocrinol.10: 196-205(1996)] 움직였다. 일반적으로, 합성 단일사슬 올리고뉴클레오타이드는 [K-32P] ATP(1,000mCi/mmol, Amersham Life Science)의 존재하에서 T4-키나아제로 5'-터미널에 라벨되었고, 세파텍스 컬럼을 통해서 정제되었다. 그리고 나서 32P-라벨 올리고뉴클레오타이드(약 30,000cpm)를 10mM 트리스 pH 7.5, 100mM KCl, 5mM 디티오프레이톨, 0.1mM EDTA, 5mM MgCl₂, 10% 글리세롤, 0.05% 노네디트(Nonedit) P-40 및 폴리(dI-dC)(Pharmacia) 0.1mg/ml를 포함하는 완충제 20 μ l 중에서 다양한 농도의 시험 화합물의 존재 또는 부재하에서 배양한다. 실온에서 20분 동안 배양한 후에, 결합 반응물에 0.25 x 트리스 보레이트-EDTA 완충제 (89mM 트리스-보레이트는 0.25 x TBE, 1 x TBE, pH 8.0, 1mM EDTA이다) 중에 있는 5% 폴리아크릴아미드 겔을 첨가한다. 겔을 건조시키고 각각의 밴드를 포스포이메이저(phosphoimager)를 사용하여 정량한다.

[0226] DMS 메틸화 보호 분석

[0227] 화학적 풋프린팅 분석은 4중 가닥 구조를 평가하는데 유용하다. 4중 가닥 구조는 시약에 대해서, 각각 영향 받기 어렵거나 또는 영향받기 쉬운 결과로서 화학적 변형으로부터 보호되는 또는 보호되지 않는 핵산 중에 있는 뉴클레오타이드가 어느 것인지를 결정함으로써 평가된다. DMS 메틸화 분석은 화학 풋프린팅 분석의 일례이다. 그러한 분석에 있어서, EMSA로부터 밴드들은 분리되고, DMS-유도된 사슬 분열이 일어나게 된다. 목적으로 하는 각각의 밴드를 전기영동 이동성 변화 겔로 절단하고, 4 °C에서 6시간 동안 100mM KCl 용액(300 μ l)에 담근다. 용액들을 여과하고(마이크로원심분리기), 30,000 cpm(반응당)의 DNA 용액을 0.1X TE 중의 100mM KCl로 더 희석하여, 전체 부피가 70 μ l(반응당)가 되도록 하였다.

[0228] 1 μ l의 연어(salmon) 정액 DNA(0.1 μ g/ μ l)를 추가하고 나서, 반응 혼합물을 일정 시간 동안 1 μ l의 DMS 용액(DMS: 에탄올; 4:1; v:v)으로 배양한다. 각각의 반응물을 18 μ l의 정지 완충제(b-메르캅토아타놀:물:NaOAc(3M); 1:6:7; v:v:v)로 원치한다. 에탄올 침전물(2회)과 피페리딘을 분열시키고, 반응물을 예비 겔(16%)상에서 분리시키고 포스포이메이저로 가시화한다.

[0229] 폴리머라제 정지 분석

[0230] 정지 분석은 주형 핵산을 포함하고, 이는 4중 가닥 형성 서열 및 4중 가닥-형성 서열의 주형 핵산 5'를 혼성화하는 프라이머 핵산으로 이루어질 수 있다. 프라이머는 폴리머라제(예를 들면, Taq 폴리머라제)에 의해 연장되고, 이는 주형 핵산을 따라 프라이머로부터 나아간다. 이 분석에 있어서, 4중 가닥 구조는 효소의 진행을 방해하거나 정지시킬 수 있어, 전사 단편들을 더 짧게 만들 수 있다. 또한, 정지 분석은 45°C 및 60°C를 포함하는 다양한 온도에서 그리고 다양한 이온 농도에서 수행될 수 있다.

[0231] Taq 폴리머라제 정지 분석의 예는 문헌[참조: Han et al., Nucl. Acids Res.(1999) 27:537-542]에 기술되어 있고, 이는 문헌[참조: Weitzmann et al., J. Biol. Chem.(1996) 271:20958-20964]에서 사용된 것의 변형이다. 요약해서, 주형 DNA(50nM), Tris·HCl(50mM), MgCl₂(10mM), DTT(0.5mM), EDTA(0.1mM), BSA(60ng) 및 5'-말단-라벨 4중 가닥 핵산(~18nM)의 반응 혼합물을 5분 동안 90°C까지 가열하고, 30분에 걸쳐 주변온도까지 냉각시킨다. Taq 폴리머라제(1 μ l)를 반응 혼합물에 첨가하고, 반응물을 30분 동안 일정 온도에서 유지한다. 10 μ l의 정지 완충제(포름아미드(20 ml), 1M NaOH(200 μ l), 0.5M EDTA(400 μ l) 및 브로모페놀 블루 10mg)를 첨가하고 나서, 반응물을 예비 겔(12%)상에서 분리시키고 포스포이메이저로 가시화한다. 아데닌 염기순서분석(겔의 정상에 있는 "A"에 의해 지시됨)은 라이프 테크놀로지스(Life Technologies)의 2중 사슬 DNA 싸이클 염기순서분석 시스템을 사용하여 분석된다. 주형 사슬에 대한 일반적인 서열은 TCCAACATGTATAC- INSERT -TTAGCGACACGCAATTGCTATAGTGAGTCGTATTA이고, 여기에서 "INSERT"는 4중 가닥을 형성하는 서열을 포함하는 핵산 서열을 언급한다(예를 들면, 표 2 참조). 더 느린 운동성을 나타내는 겔상의 밴드들은 4중 가닥의 형성을 나타낸다.

[0232] 높은 처리량의 폴리머라제 정지 분석

[0233] 높은 처리량의 폴리머라제 정지 분석이 개발되었다. 분석은 종종 DNA인 프라이머로 주형 핵산, 종종 DNA를 접

촉하는 단계; 여기에 기술된 화합물(또한 "시험 화합물"로서 언급된다)과 프라이머/주형 복합체를 접촉하는 단계; 폴리머라제로 프라이머/주형 복합체를 접촉하는 단계; 및 반응 생성물을 분리하는 단계로 이루어진다. 분석은 종종 프라이머/주형 복합체 혼합물을 변성시키고 나서 복합체를 재생시키는 단계를 포함하고, 이는 종종 시험 분자가 시스템에 첨가되기 전에 실행된다. 다중의 분석들이 종종 예를 들면, IC50 값이 얻어질 수 있는 다양한 농도의 시험 화합물을 사용하여 실행된다. 반응 생성물들은 종종 다른 길이의 연장된 프라이머들을 포함한다. 시험 화합물이 주형에 있는 4중 가닥 구조와 두드러지게 상호작용을 하지 않는 경우에, 프라이머는 종종 주형의 말단까지 연장된다.

[0234] 시험 화합물이 주형에 있는 4중 가닥 구조와 두드러지게 상호작용을 하는 경우에, 프라이머는 종종 주형에 있는 4중 가닥 구조까지만 연장되고 그 이상 연장되지 않는다. 따라서, 시험 화합물이 주형에 있는 4중 가닥 구조와 상호작용을 할 때, 반응 혼합물은 종종 적어도 두 개의 반응 생성물들에 있어서, 완전히 연장된 프라이머를 갖는 하나와, 불완전하게 연장된 프라이머를 갖는 하나를 포함하고, 이들 두 개의 반응 생성물들은 분리된다. 생성물들은 하나의 양태에서, 질량분석법과 모세관전기이동과 같은 종래의 분리 방법중 어느 하나를 사용하여 분리될 수 있다.

[0235] 반응 생성물들은 종종 프라이머에 결합된 검출 라벨을 검출함으로써 확인된다. 검출 라벨은 프라이머의 5' 말단에 비공유 결합될 수 있다(예를 들면, 검출 라벨에 연결된 아비딘 분자와 비공유 결합된 프라이머의 5' 말단에 공유결합된 비오틴 분자). 때때로 프라이머가 시스템에 첨가되기 전에, 프라이머가 연장된 후에, 또는 생성물들이 분리된 후에, 분석의 어느 단계에서도 검출 라벨은 프라이머에 연결될 수 있다. 검출 라벨은 종종 검출 라벨에 있는 화학기들의 성질을 기초로 하여 선택된 방법을 사용하여 프라이머에 공유결합된다.

[0236] 검출 라벨의 숙신이미달-에스테르 유도체에 대해서 알릴아민-유도된 뉴클레오타이드를 화학적으로 커플링하고 나서, 라벨된 뉴클레오타이드를 사용하여 프라이머를 생성하는, 핵산에 대해서 검출 라벨들을 공유결합하는 많은 방법들이 유용하다[참조: Nature Biotech(2000) 18:345-348 and [http address info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/n_coupling.html](http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/n_coupling.html)]. (종종 5-16 탄소원자 길이 사이에 있는) 스페이서가 때때로 검출 라벨과 뉴클레오타이드 사이에 통합된다. 때때로 사용되는 방사성 동위원소(예를 들면, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ³²P, ¹⁴C 또는 ³H); 광분산 라벨(예를 들면, 구형 금 또는 은 라벨; 제니콘 사이언스 코퍼레이션(Genicon Sciences Corporation, San Diego, CA) 및 미국 특허출원 제6,214,560호); 효소 또는 단백질 라벨(예를 들면, GFP 또는 퍼록시다제); 또는 다른 발색성 라벨 또는 염료들을 포함하는 종래의 다른 검출 라벨이 사용될 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다. 종종, 형광 라벨(예를 들면, 아미노-메틸 쿠마린(AMCA); 디에틸 아미노메틸 쿠마린(DEAC); 캐스케이드 블루(CB); 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC); 오레곤 그린(OG); 알렉사 488(A488); 로다민 그린(RGr); 란타니드 킬레이트(예를 들면, 유로퓸), 카복시-로다민 6G(R6G); 테트라메틸 로다민(TAMRA); 텍사스 레드(TxR); Cy3; Cy3.5; Cy5, Cy5.5 및 카복시나프토플루오레세인(CNF), 디옥시제닌(DIG); 및 2,4-디니트로페닐(DNP))이 사용된다. 다른 플루오로폰 여기 및 수반여기 및 발산 과정들은 문헌[참조: Anantha et al., Biochemistry(1998) 37:2709-2714 and Qu & Chaires, Methods Enzymol(2000) 321:353-369]에 기술되어 있다.

[0237] 구체적인 예에 있어서, 형광 라벨에 공유결합된 프라이머 올리고뉴클레오타이드는 주형 DNA와 접촉한다. 생성된 복합체는 시험 분자와 접촉하고 나서, 프라이머를 연장시킬 수 있는 폴리머라제와 접촉한다. 그 후에 반응 생성물은 모세관전기이동에 의해 분리되고 검출된다. 좀더 긴 프라이머 서열이, 프라이머가 비공유-결합된 플루오로포어를 포함하지 않거나, 또는 모세관전기이동이 분리에 사용되지 않는 구체적인 예들과 비교하여 상기 구체적인 예를 실시하는데 사용되었다. 디옥시뉴클레오타이드가, 종종 프라이머가 주형 DNA와 접촉할 때, 분리 전에 분석의 어느 단계에서 첨가되었다. 주형 DNA/프라이머 복합체는 종종 시험 화합물이 첨가되기 전에 변성되고(예를 들면, 시스템의 온도를 높이므로써) 그 다음에 재생된다(예를 들면, 시스템을 냉각시킴으로써).

[0238] 4중 가닥 결합 분석

[0239] 일반적으로, 5'-형광-라벨된(FAM) 프라이머(P45, 15nM)를 10mM MgCl₂, 0.1mM EDTA 및 0.1mM 혼합된 디옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트(dNTP's)를 포함하는 Tris-HCL 완충제(15mM Tris, pH 7.5) 중에서 주형 DNA(15nM)와 혼합했다. FAM-P45 프라이머(5'-6FAM-AGTCTGACTGACTGTACGTAGCTAATACGACTCACTATAGCAATT-3')(서열 ID NO. 17) 및 주형 DNA(5'-TCCAACATATGTATACTGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGAAGGTTAGCGACACGCAATTGCTATAGTGAGTCGTATTAGCTACGTACAGTCAGTCAGACT-3')(서열 ID NO. 18)는 합성되었고 어플라이드 바이오시스템(Applied Biosystems)에 의해 HPLC 정제되었다.

혼합물을 5분 동안 95℃에서 변성하였고, 실온까지 냉각시킨 후에, 15분 동안 37℃에서 배양하였다.

[0240] 실온까지 냉각시킨 후에, 1mM KCl_2 및 시험 화합물(다양한 농도)을 첨가했고, 혼합물을 실온에서 15분 동안 배양했다. 10mM KCl과 Taq DNA 폴리머라제(2.5U/반응, Promega)를 첨가하고 30분 동안 70℃에서 배양함으로써 프라이머를 연장시켰다. 1 μ l의 반응 혼합물을 혼합된 10 μ l의 Hi-Di 포름아미드와 표준 사이즈의 0.25 μ l의 LIZ120에 첨가함으로써 반응을 멈추었다. Hi-Di 포름아미드와 표준사이즈의 LIZ120은 어플라이드 바이오시스템으로부터 구입했다. 부분적으로 연장된 4중 가닥 정지 생성물의 길이는 61 또는 62 염기길이 사이이고, 생성물의 연장된 전체 길이는 99 염기 길이이다. 모세관전기이동을 사용해서 생성물들을 분리하고 분석했다. 모세관 전기이동은 ABI PRISM 3100-Avant 지네틱 아날라이저(Genetic Analyzer)를 사용하여 수행되었다. 상기 기술된 화합물들을 사용하여 분석이 수행되었고, 결과들은 표 1에 나타나있다. 표 1에 기록된 μ M 농도는, 50%의 DNA에서 분석이 정지된 농도이다(즉, 전체 길이로 연장된 DNA에 대한 좀더 짧게 부분적으로 연장된 DNA(정지된 DNA)의 비율은 1:1이다).

[0241] 전사 리포터 분석

[0242] 전사 리포터 분석에 있어서, 시험 4중 가닥 DNA는 리포터 시스템에 커플링되고, 그와 같은 4중 가닥 구조의 형성 또는 안정화는 리포터 신호를 조절할 수 있다. 그러한 시스템의 예는 루시페라제 또는 그린 형광 단백질(GFP)과 같은, 폴리펩타이드 중에 있는 리포터 발현 시스템이고, 핵산을 형성하는 전위 4중 가닥에 실시가능하게 연결된 유전자에 의해 발현되고, 폴리펩타이드의 발현이 검출될 수 있다. 여기에 사용된 바와 같이, 용어 "실시가능하게 연결된"은 뉴클레오타이드 서열이 핵산을 형성하는 전위 4중 가닥을 포함하는 서열에 의해 조절된다는 것을 언급한다. 서열은 4중 가닥 DNA와 같은 동일 핵산 위에 또는 다른 핵산 위에 있을 때 실시가능하게 연결될 수 있다. 예시적인 루시페라제 리포터 시스템은 여기에 기술되어 있다.

[0243] 문헌[참조: He et al., Science(1998) 281:1509-1512]에 기술되어 있는 루시페라제 프로모터 분석은 4중 가닥 형성의 연구를 위해서 사용된다. 특히, 분석에 사용된 벡터는 11개의 He 외의 문헌에 참고로 나타나 있다. 이러한 분석에 있어서, HeLa 세포들은 0.1 μ g의 pRL-TK(레닐라 루시페라제 리포터 플라스미드) 및 0.9 μ g의 4중 가닥-형성 플라스미드 세포를 사용하는, 제조 프로토콜에 따른 리포펙타민 2000-기초 시스템(인비트로젠)을 사용하여 감염된다. 개뿔벌레 및 레닐라 루시페라제 활성은 제조 프로토콜에 따라서 96-웰 플레이트 형식으로 이중 루시페라제 리포터 분석 시스템(프로메가)을 사용하여 분석된다.

[0244] 원편광 이색성 분광 분석

[0245] 원편광 이색성 분광 분석(CD)은 다른 분자가 4중 가닥 핵산과 상호작용하는지 여부를 결정하기 위해 사용된다. CD는 PNA 또는 PNA-펩타이드 켈레가 생체 밖에서 4중 가닥 핵산과 혼성화되는지 여부를 결정하는데 부분적으로 유용하다. PNA 탐침들을 10mM 인산칼륨(pH 7.2) 및 10 또는 250mM KCl를 포함하는 완충제 중의 4중 가닥 DNA(각각 5 μ M)에 37℃에서 첨가하고 나서, 스펙트럼을 기록하기 전에 동일한 온도에서 5분 동안 방치해둔다. CD 스펙트럼들은 열전기적으로 조절된 단일세포 홀더가 장착된 자스코(Jasco) J-715 분광편광계상에 기록된다. CD 강도는 보통 220nm 내지 320nm에서 검출되고, 4중 가닥 DNA 단독, PNA 단독, 그리고 PNA를 갖는 4중 가닥 DNA에 대한 상대적인 스펙트럼들이 상호작용의 존재 또는 부재를 결정하기 위해서 생성된다[참조: Datta et al., JACS(2001) 123:9612-9619]. 스펙트럼들은 100nM/min 에서 기록된 8개의 스캔들의 평균을 나타내기 위해서 배열된다.

[0246] 형광 결합 분석

[0247] 형광 결합 분석의 예는 4중 가닥 핵산, 단일분자 및 시험 분자를 포함하는 시스템이다. 신호 분자는 4중 가닥 핵산(예를 들면, N-메틸메소포피린 IX(NMM))에 결합될 때 형광 신호를 발생시키고, 시험 화합물이 4중 가닥 핵산에 결합하기 위한 단일 분자들과 경쟁할 때 신호가 변경된다. 시험 화합물이 존재하지 않는 경우에 비교하여 시험 분자가 존재하는 경우에, 신호중의 변화는 4중 가닥과 상호작용하는 화합물로서 시험 화합물을 확인한다.

[0248] 4중 가닥을 형성할 수 없는 4중 가닥 핵산 또는 핵산 50 μ l를 96-웰 플레이트에 첨가한다. 시험 화합물을 또한 다양한 농도로 첨가한다. 일반적인 분석이 20mM HEPES 완충제, pH 7.0, 140mM NaCl 및 100mM KCl 100 μ l에서 실행된다. 최종 농도가 3 μ M 가 되도록 50 μ l의 신호 분자 NMM를 첨가한다. NMM은 프런티어 사이언티픽 인코포레이티드(Frontier Scientific Inc., Logan, Utah)로부터 얻어진다. 형광은 플루로스타(FluroStar) 2000 형광계(비엠쥐 랩테크놀로지스(BMG Labtechnologies, Durham, NC))를 사용하여 420nm의 여기 파장과 660nm의 배기 파장에서 측정한다. 형광은 종종 시험 화합물 또는 4중 가닥-타겟의 핵산 농도의 함수로서 도시화되고, NMM의

최대 형광 신호들은 이들 분자들 없이 평가된다.

[0249] 세포 증식 분석

[0250] 암세포 증식 분석에 있어서, 세포 증식률은 세포 배양 배지에 첨가된 시험 화합물들의 다른 농도의 함수로서 평가되었다. 어떤 암세포 타입도 분석에 사용될 수 있다. 하나의 구체적인 예에 있어서, 결장 암세포들을 시험관 내에서 배양하고, 시험 화합물들을 다양한 농도의 배양 배지에 첨가한다. 유용한 결장 선암종 세포주는 콜로320이고, 이것은 승인번호가 JCRB0225인 국립보건원(National Institutes of Health)에 기탁된 결장선암종 세포주이다. 그러한 세포들을 사용하기 위한 파라미터들은 인터넷 웹사이트[<http://cellbank.nihs.go.jp/cell/data/jcrb0225.htm>]에서 유용하다.

[0251] 화합물들의 제형화

[0252] 여기에서 사용된, 용어 "약제학적으로 허용가능한 염, 에스테르 및 아미드"는 그들의 양쪽성이온의 형태들 뿐만 아니라 화합물들의 카복시산염, 아미노산 첨가염, 에스테르 및 아미드를 포함하지만 이들에 한정되지 않고, 이는 인간과 동물들에 사용되기에 적당한 것으로 당업자들에게 공지되어 있다[참조: Gerge, S.M. et al., Pharmaceutical Salts, J. Pharm. Sci.(1977) 66:1-19].

[0253] 여기에 기술된 화합물들의 적당한 제제가 제조될 수 있다. 화합물들이 안정한 비독성 산 또는 염기성 염들을 형성하기 위해서 충분한 염기성 또는 산성인 경우, 염으로서의 화합물의 투여가 적합할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 염들의 예들은 예를 들면, 토실레이트, 메탄설포네이트, 아세테이트, 시트레이트, 말로네이트, 타르타레이트, 숙시네이트, 벤조에이트, 아스코르베이트, α -케토글루타레이트 및 α -글리세로포스페이트와 같이 생리학적으로 허용가능한 음이온을 형성하는 산과 함께 형성된 유기산 추가염들이다. 염산염, 황산염, 질산염, 이산화탄산염 및 탄산염을 포함하는 적당한 무기염들 또한 사용될 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 염들은, 예를 들면 아민과 같은 염기성 화합물을 생리학적으로 허용가능한 음이온을 제공하는 적당한 산과 충분히 반응시키는 당업계에 공지된 표준 방법을 사용하여 얻어진다. 카복실산들의 알칼리금속(예를 들면, 나트륨, 칼륨 또는 리튬) 또는 알칼리토금속(예를 들면, 칼슘) 또한 만들어진다.

[0254] 화합물은 약제학적 조성물로서 제제화되고 치료를 필요로 하는 포유류 숙주에 투여될 수 있다. 하나의 구체적인 예에 있어서, 포유류 숙주는 인간이다. 구강, 비경구, 정맥, 근육내, 국소 및 피하 경로를 포함하는 투여의 어느 적당한 경로가 사용될 수 있지만, 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0255] 하나의 구체적인 예에 있어서, 화합물은 비활성 희석제 또는 동화할 수 없는 식용 보균자와 같은 약제학적으로 허용가능한 매개체와 결합하여 조직적으로(예를 들면, 구강으로) 투여된다. 화합물들은 단단하거나 또는 부드러운 젤 젤라틴 캡슐로 싸여지고, 타블렛으로 압축되거나 또는 환자의 식이요법의 음식에 직접 혼합될 수 있다. 구강 치료용 투여를 위해서, 활성 화합물은 하나 이상의 첨가제와 결합될 수 있고, 섭취가능한 타블렛, 구강 타블렛, 정제, 캡슐, 엘릭시르, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다. 그와 같은 조성물들과 제조물들은 0.1% 이상의 활성 화합물을 포함해야 한다. 조성물들과 제조물들의 퍼센트는 변화할 수 있고, 편리하게도 약 2 내지 60%의 주어진 단위 용량일 수 있다. 이와 같이 약제학적으로 유용한 조성물들에 있어서 활성 화합물의 양은 효과적인 용량의 수준에 이를 수 있는 정도이다.

[0256] 정제, 트로키제, 환약, 캡슐 등은 또한 트라가칸트 고무, 아카시아, 옥수수 녹말 또는 젤라틴과 같은 결합제; 인산이칼슘과 같은 첨가제; 옥수수 녹말, 감자 녹말, 아르긴산 등과 같은 분해제; 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제; 및 슈크로오스, 프룩토오스, 락토오스 또는 아스파탐과 같은 감미제를 함유할 수 있고, 페퍼민트, 노루발폴의 오일, 또는 체리향의 향신료가 첨가될 수 있다. 단위 용량 형태가 캡슐인 경우, 상기 타입의 물질들에 추가하여, 식물성 오일 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 액체 담체를 포함할 수 있다. 다양한 다른 물질들이 코팅제로서 존재할 수 있고, 그렇지 않으면 고체 단위 용량 형태의 물리적인 형태로 변형시킬 수 있다. 예를 들면, 타블렛, 환약, 또는 캡슐은 젤라틴, 왁스, 셀라 또는 설탕 등으로 코팅할 수 있다. 시럽 또는 엘릭시르는 활성화합물, 감미제인 슈크로오스 또는 프룩토오스, 방부제인 메틸 및 프로필파라벤, 체리향 또는 오렌지향의 염료 및 향신료를 포함할 수 있다. 단위 용량 형태를 제조하는데 사용되는 물질은 어느 것이나 약제학적으로 허용가능하고, 적용되는 양에 있어서 실질적으로 비독성이다. 추가로, 활성 화합물은 서방성 제형 및 장치들에 도입될 수 있다.

[0257] 활성 화합물은 또한 주입 또는 주사에 의해서 정맥내로 또는 복막내로 투여될 수 있다. 활성 화합물 또는 이의 염들의 용액은 비독성 계면활성제와 선택적으로 혼합된 완충액, 종종 인산염 완충 식염수에서 제조될 수 있다. 분산제들은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 트리아세틴 및 이의 혼합물 및 오일 중에서 제조될 수 있다.

다. 일반적인 저장 및 사용 조건하에, 이들 제형은 미생물의 성장을 방해하는 보존제를 포함한다. 때때로 화합물은 그러한 투여를 위한 폴리매트릭스-포함 제제로서 제조된다(예를 들면, 리포솜 또는 마이크로솜). 리포솜들은 예를 들면 미국특허 제 5,703,055호(Felgner et al.) 및 문헌[참조: Gregoriadis, Liposome Technology vols. I ~ III(2판, 1993)]에 기술되어 있다.

[0258] 주사 또는 주입에 적당한 약제학적인 용량 형태들은 리포솜에서 선택적으로 캡슐로 싸여지고, 무균으로 주사가 가능한 또는 주입가능한 용액들 또는 분산제의 즉석 제조에 적용되는 활성 성분을 포함하는 무균의 수용액 또는 분산제 또는 무균 분말을 포함할 수 있다. 모든 경우들에 있어서, 최종 용량 형태는 제조조건 및 저장조건하에서 무균이고, 유효성이 있고 안정해야 한다. 액체 담체 또는 매개체는 예를 들면, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들면, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 식물성 오일, 비독성 글리세릴 에스테르 및 이의 적당한 혼합물을 포함하는 용매 또는 액체 분산제 배지일 수 있다. 예를 들면, 리포솜을 형성하고, 분산의 경우에 입자 사이즈를 유지하고, 또는 계면활성제를 사용함으로써, 적당한 유효성을 유지할 수 있다. 예를 들면, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 여러가지 항균제 및 항진균제에 의해서 미생물의 활동에 방해가 일어날 수 있다. 많은 경우에 있어서, 설탕, 완충제 또는 염화나트륨과 같은 등장제(isotonic agent)를 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가 가능한 조성물들은 예를 들면, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수 지연제 조성물을 사용함으로써 흡수를 연장할 수 있다.

[0259] 무균의 주사가 가능한 용액들은 필요로 하는, 상기에서 열거된 여러가지 다른 성분들과 함께 적당한 용매 중에서 필요량의 활성 화합물을 통합하고 나서, 여과살균하여 제조된다. 무균의 주사가 가능한 용액들의 제조에 있어서 무균 분말의 경우에, 바람직한 제조방법은 진공 건조기술 및 동결 건조기술이고, 활성 성분에 이전에 무균-여과된 용액들에 존재하는 바람직한 성분들을 추가로 가한 분말을 제공하는 것이다.

[0260] 국부 투여를 위해서, 본 화합물들은 액상 형태로 적용될 수 있다. 화합물들은 종종 피부과학적으로 받아들일 수 있는 담체와 결합하여, 조성물 또는 제제로서 투여되는데, 이는 고체 또는 액체일 수 있다. 피부에 대한 운반 화합물들로 사용되는 피부과학적인 조성물들의 유용한 예들은 공지되어 있다[참조: Jacquet 외(미국 특허출원 제4,608,392호), Geria(미국 특허출원 제 4,992,478호), Smith 외(미국 특허출원 제 4,559,157호) 및 Wortzman(미국 특허출원 제820,508호)]

[0261] 화합물들은 고체 담체와 제제화될 수 있는데, 이는 탈크, 클레이, 미결정 셀룰로오스, 실리카, 알루미늄 등과 같은 미세하게 분리된 고체들을 포함한다. 유용한 액체 담체들은 물, 알코올, 또는 글리콜 또는 물-알코올/글리콜 혼합물을 포함하는데, 여기에 있어서 본 화합물들은 비-독성 계면활성제의 선택적인 도움으로, 효과적인 레벨에서 분해되거나 분산될 수 있다. 방향제와 같은 보조약 및 추가적인 항균제가 주어진 용도 특성을 최고로 활용하기 위해서 첨가될 수 있다. 생성된 액체 조성물은 주입 봉대 및 다른 드레싱에 사용된 흡수 밴드로부터 적용될 수 있고, 또는 펌프-타입 스프레이 또는 에어로솔 스프레이를 사용하여 감염된 영역에 분무할 수 있다. 합성 폴리머라제, 지방산, 지방산염 및 에스테르, 지방알코올, 변형 셀룰로오스 또는 변형 광물질과 같은 침전제들은 또한 사용자의 피부에 직접적으로 적용하기 위해서, 도포가능한 페이스트, 겔, 연고, 비누 등을 형성하기 위해서 액체 담체로 적용될 수 있다.

[0262] 일반적으로, 액체 조성물 중의 화합물의 농도는 종종 약 0.1중량% 내지 약 25중량%이고, 때때로 약 0.5중량% 내지 약 10중량%이다. 겔 또는 분말과 같은 반고체 또는 고체 조성물의 농도는 종종 약 0.1중량% 내지 약 5중량%이고, 때때로 약 0.5중량% 내지 약 2.5중량%이다. 복합 조성물은 단위 용량 형태로 제조될 수 있는데, 이는 약제학 공업 분야에 공지된 통상의 기술에 따라 제조된다. 일반적으로, 그러한 기술들은, 액체 형태 또는 미세하게 분리된 고체 형태로 약제학적 담체(들) 및/또는 첨가제(들)와 결합된 화합물을 생성하고, 그 후에 필요하다면 생성물이 형태를 이루는 것을 포함한다.

[0263] 표 3은 본원에 기재된 화합물을 사용한 제형의 예를 나타낸다. 예를 들면, 화합물은 본원에서 제형화를 사용하여 10mg/mL 내지 20mg/mL 용액으로부터 투여량을 갖도록 제형화될 수 있다. 표 3에서, 약칭 "D5W"는 5% 덱스트로스를 함유하는 탈이온수이다. 각 제형의 각 성분은 화합물의 활성에 영향을 주지 않고 다양할 수 있다. 하나의 예에서, 화합물은 버퍼 용액 중에 폴리에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜을 포함하는 용액, 예를 들면, 인산 버퍼 중에 제형화된다.

[0264] 표 3

[0265]

| | 제형 | % (w/w) | 화합물(mL) + 플라시보 용액(mL) | 플라시보 용액의 pH | 제형화된 용액 (10mg/mL)의 pH |
|----|---------------------------------|---------|-----------------------------|-------------------|-----------------------------|
| 1. | 만니톨 | 4 | 35ml + 35mL | 6.1 | 6.1 |
| | 슈크로오스 | 0.5 | | | |
| | 5% D5W 용액 | 95.5 | | | |
| 2. | 만니톨 | 4 | 35ml + 35mL | 6 | 5.8 |
| | 50mM PO ₄ 버퍼, pH=6.0 | 96 | | | |
| 3. | 만니톨 | 4 | 35ml + 35mL | 5 | 5 |
| | 50mM 시트레이트 버퍼, pH=5.0 | 96 | | | |
| 4. | 만니톨 | 4 | 35ml + 35mL | 6 | 6 |
| | 5% D5W | 96 | | | |
| 5. | 시험 화합물(20mg/mL) | 1 | 35ml + 35mL | 6.4 | 6.1 |
| | 5% D5W | 99 | | | |
| 6. | PEG 300 | 7 | 5ml + 5mL | N/A | 5.80 |
| | 프로필렌 글리콜 | 9 | | | |
| | 5% D5W | 84 | | | |
| 7. | PEG 300 | 7 | 5ml + 5mL | N/A | 5.8 |
| | 프로필렌 글리콜 | 9 | | | |
| | 50mM PO ₄ 버퍼, pH=6.0 | 84 | | | |
| 8. | 만니톨 | 4 | 5ml + 5mL | N/A | 5.7 |
| | PEG 300 | 20 | | | |
| | 50mM PO ₄ 버퍼, pH=6.0 | 76 | | | |
| 9. | 만니톨 | 4 | 5ml + 5mL | N/A | 5.8 |
| | 프로필렌 글리콜 | 10 | | | |
| | 50mM PO ₄ 버퍼, pH=6.0 | 86 | | | |

[0266]

화합물 조성물은 정제, 캡슐, 젤 캡슐, 액체 시럽, 소프트 젤, 좌약 및 관장액과 같은 어떤 투여 형태로 제제화될 수 있다. 조성물들은 또한 수용성, 비-수용성, 또는 혼합 배지에서 현탁액으로서 제제화될 수 있다. 수용성 현탁액들은 또한 예를 들면, 나트륨 카복시메틸 셀룰로오스, 소르비톨 및/또는 텍스트란을 포함하는 점도를 증가시키는 물질들을 더 포함할 수 있다. 현탁액은 또한 하나 이상의 안정화제를 포함할 수 있다. 치료의 사용에 필요한 화합물, 또는 그것의 활성염 또는 유도체의 양은 선택된 특정염 뿐만 아니라 투여 경로, 치료될 수 있는 조건의 특징 및 환자의 나이와 상태 및 궁극적으로 내과 주치의사 또는 임상 주치의사의 결정에 따라 달라질 것이다.

[0267]

용량

[0268]

유용한 화합물의 용량은 종종 세포 또는 조직 시스템에서의 시험관내 활성 및/또는 동물 시스템에서의 생체내 활성을 평가함으로써 결정된다. 예를 들면, 인간에 대한 마우스와 다른 동물들의 유효 용량을 추론하는 방법들이 당업계에 공지되어 있다[참조: 미국 특허출원 제 4,938,949호]. 그러한 시스템들은 화합물의 LD50(모집단의 50%에 대한 치명적인 용량)와 ED50(모집단의 50%에 있어서의 치료상으로 유효한 용량)을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 복용 비율은 치료상의 지표이고, 이는 ED50/LD50비율로서 나타내어질 수 있다. 화합물의 용량은 종종 ED50무독성과 거의 또는 전혀 관련되지 않는 경우 순환하는 농도의 범위 이내에 놓여져 있다. 용량은 적용되는 복용 형태 및 사용된 투여 경로에 따라 이 범위 이내에서 다양할 수 있다. 여기에 기술된 방법에 사용된 어느 화합물에 있어서, 치료상으로 유효한 용량은 세포 배양 분석으로부터 초기에 평가될 수 있다. 용량은 때때로 생체 밖에서의 분석으로 결정된 IC50(즉, 증상들의 최대-절반을 억제하는 시험 화합물의 농도)를 망라하는, 순환하는 혈장 농도 범위를 이루기 위해서 공식화되는데, 그 이유는 그러한 정보가 종종 인간에게 유용한 용량을 좀더 정확하게 결정하기 위해서 사용된다. 혈장의 레벨은 예를 들면, 고성능 액체 크로마토그래피 처리를 함으로써 측정될 수 있다.

[0269]

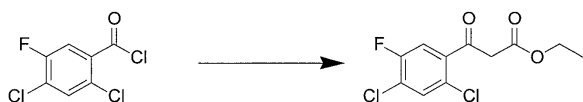
대상에 대한 유효 용량 결정의 다른 예는, 시험 대상의 혈청 중에 있는 "유리" 및 "결합" 화합물의 레벨을 직접 분석하는 능력이다. 그러한 분석들은 분자 각인 기술들에 의해 생성된 항체 모방자들 및/또는 "바이오센서"를 사용할 수 있다. 화합물은 주형 또는 촉매제와 중합하기 전에 중합가능한 모노머들을 공간적으로 체제화하는

"각인 분자"로서 사용된다. 각인된 분자를 연속적으로 제거하여 화합물의 반복된 "음성상"을 갖는 폴리머 매트릭스를 남기고, 생물학적 분석 조건하에서 선택적으로 분자를 재결합할 수 있다[참조: Ansell et al., Current Opinion in Biotechnology(1996) 7:89-94 and Shea's Trends in Polymer Science(1994) 2:166-173]. 그러한 "각인된" 친화성 매트릭스들은 리간드-결합 분석을 받을 수 있고, 그것에 의해 고정된 단일클론의 항체 성분은 적당하게 각인된 매트릭스에 의해 치환된다[참조: Vlatakis et al., Nature(1993) 361:645-647]. 동위원소-라벨링을 사용해서, 화합물의 "유리" 농도는 쉽게 모니터링될 수 있고, IC50의 측정에 사용될 수 있다. 그러한 "각인된" 친화력 매트릭스들은 또한 디자인되어, 광자 방사능이 화합물의 위치와 선택성 결합에 따라 측정 가능하게 변화하는 형광기들을 포함할 수 있다. 이들 변화들은 적당한 굴곡장치들을 사용하여 실시간으로 쉽게 분석될 수 있고, 차례대로 시험 대상에 있어서의 용량을 개별적인 IC50를 기초로 빠르게 최대한으로 활용할 수 있다. 그러한 "바이오센서"의 예는 문헌[참조: Kriz et al., Analytical Chemistry(1995) 67:2142-2144]에 논의되어 있다.

[0270] 예시적인 용량은 대상 또는 샘플 중량의 킬로그램당 화합물의 밀리그램 또는 마이크로그램 양, 예를 들면 킬로그램당 1 마이크로그램 내지 킬로그램당 500밀리그램, 킬로그램당 약 100 마이크로그램 내지 킬로그램당 약 5밀리그램, 또는 킬로그램당 약 1 마이크로그램 내지 킬로그램당 약 50 마이크로그램을 포함한다. 작은 분자의 적당한 용량은, 조절될 수 있는 발현 또는 활성에 관련된 작은 분자의 효능에 따라 달라진다고 이해된다. 여기에 기술된 폴리펩티드 또는 핵산의 발현 또는 활성을 조절하기 위해서, 하나 이상의 이들 작은 분자들이 동물(예를 들면, 인간)에 투여될 때, 내과 의사, 의사, 또는 연구원이 예를 들면, 처음에는 상대적으로 낮은 용량을 처방하고, 적당한 반응이 얻어질때까지 용량을 점진적으로 증가시킬 수 있다. 또한, 어떤 특별한 동물 대상에 대한 특정 용량 레벨은, 사용된 특정 화합물의 활성, 대상의 나이, 체중, 일반적인 건강상태, 성별 및 식이요법, 투여시간, 투여경로, 분비율, 일정한 약물 결합 및 조절될 수 있는 발현 또는 활성의 정도를 포함하는 다양한 인자들에 따라 달라질 것이다.

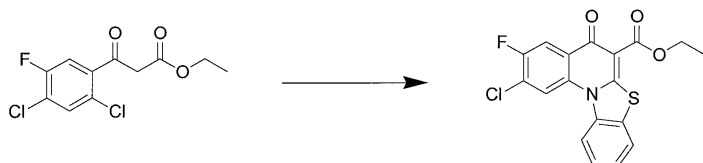
[0271] 다음의 실시예들이 제안되지만, 본 발명은 이것에 한정되는 것은 아니다.

[0272] 실시예 1



[0273]

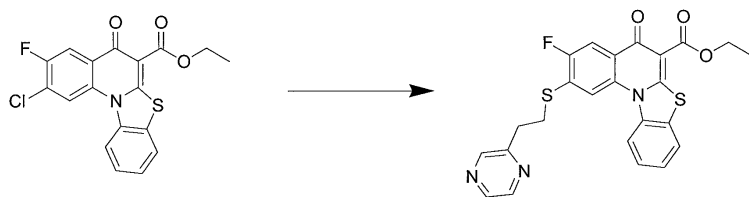
[0274] 0℃에서 무수 아세트니트릴(100ml) 중의 염화마그네슘(6.74g, 70.8mmol) 및 칼륨 에틸 말로네이트(6.78g, 39.8mmol) 용액에 2,4-디클로로-5-플루오로벤조일 클로라이드(5.0g, 22.1mmol)를 적가하고, 그 동안 내부 온도를 5℃ 이하로 유지하였다. 혼합물을 추가 30분 동안 교반하고, 트리에틸 아민(6.1ml, 44.25mmol)을 적가하고, 다시 온도를 5℃ 이하로 유지하고, 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. 혼합물을 진공하에 농축시키고, 톨루엔(250ml)으로 희석하고, 1N HCl(100ml)을 가하고, 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 층을 분리하고, 유기 층을 1N HCl(100ml) 및 염수(200ml)로 1회 이상 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시켰다. 그 다음, 유기 층을 여과하고, 진공하에 농축시키고, 실리카겔(1:10 에틸 아세테이트/헥산) 상에서 정제하여 케토에스테르를 정제시키고 고체화되는 오일로서 수득하였다(5.02g, 81%).



[0275]

[0276] 디글림(50ml) 중의 케토에스테르(5.0g, 18mmol) 용액에 2-클로로벤조티아졸(3.66g, 21.6mmol) 다음, 수소화나트륨(1.52g, 39.6mmol, 오일 중 60%)을 10분 동안 적가하였다. 반응물을 160℃에서 24시간 동안 가열하고, 실온으로 냉각되도록 하였다. 물(250ml)을 조심스럽게 가해 혼합물을 퀀칭시키고, 수득된 갈색 침전물을 여과로 제거하고, 물로 세척하였다. 그 다음, 생성물을 염화메틸렌(300ml)에 용해시키고, 염수로 세척하고, 셀라이트를 통해 여과하였다. 수득된 유기 층을 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축시켰다. 생성물을 실리카겔(헥산 중의 7% 에틸 아세테이트)로 정제하여 환형화된 물질(1.76g, 26%)을 고체로서 수득하였다.

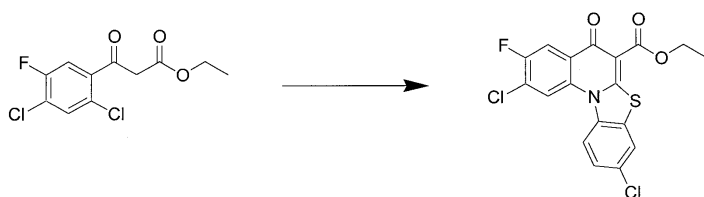
[0277] 실시예 2



[0278]

[0279] N-메틸피롤리디논(NMP, 2ml) 중의 클로로에스테르(250mg, 0.66mmol) 용액에 2-피라진에탄티올(81ml, 0.66mmol) 및 탄산칼륨(182mg, 1.32mmol)을 가하고, 혼합물을 100℃에서 2시간 동안 가열하였다. 혼합물을 실온으로 냉각 되도록 하고, 물(50ml)을 가하고, 밤새 교반하였다. 조악한 생성물을 여과로 수집하고, 예비용 TLC(염화메틸렌 중의 2% 메탄올)로 정제하여 조악한 생성물을 갈색 플로피 고체(122mg, 38%)로서 수득하였다.

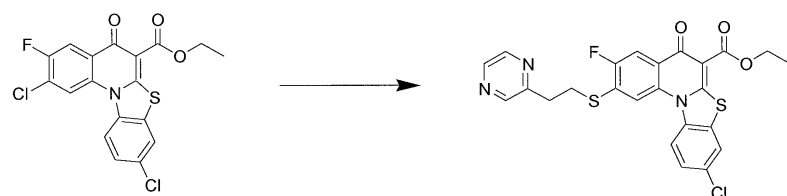
[0280] 실시예 3



[0281]

[0282] 디글림(20ml) 중의 케토에스테르(2.0g, 7.2mmol) 용액에 2,6-디클로로벤조티아졸(1.76g, 8.63mmol)을 가한 다음, 수소화나트륨(0.63g, 15.8mmol, 오일 중 60%)을 10분 동안 나누어 가하였다. 반응물을 160℃에서 24시간 동안 가열하고, 실온으로 냉각되도록 하였다. 혼합물을 물(200ml)로 조심스럽게 쿼칭시키고, 수득된 갈색 침전물을 여과로 제거하고, 물로 세척하였다. 그 다음, 생성물을 염화메틸렌(30ml) 중에 용해시키고, 염수로 세척하고, 셀라이트를 통해 여과하였다. 수득된 유기층을 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축시켰다. 생성물을 실리카겔(헥산 중의 5% 에틸 아세테이트)로 정제하여 환형화된 물질(0.55g, 18.8%)을 고체로서 수득하였다.

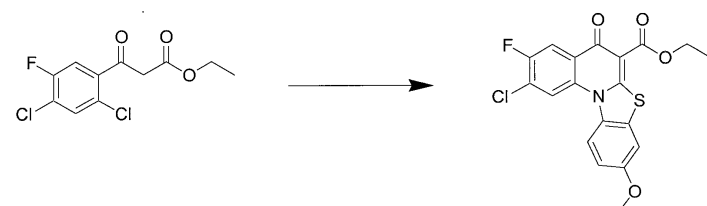
[0283] 실시예 4



[0284]

[0285] N-메틸피롤리디논(NMP, 2ml) 중의 클로로에스테르(250mg, 0.61mmol) 용액에 2-피라진에탄티올(75ml, 0.61mmol) 및 탄산칼륨(170mg, 1.2mmol)을 가하고, 혼합물을 100℃에서 2시간 동안 가열하였다. 혼합물을 실온으로 냉각 되도록 하고, 물(50ml)을 가하고, 밤새 교반하였다. 조악한 생성물을 여과로 수집하고, 예비용 TLC(2% 염화메틸렌 중의 메탄올)로 정제하여 순수한 생성물을 갈색 플러피(fluffy) 고체(125mg, 40%)로서 수득하였다.

[0286] 실시예 5

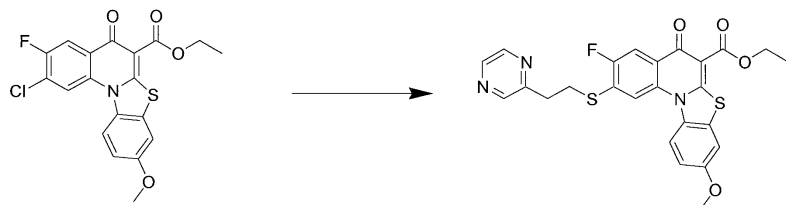


[0287]

[0288] 디글림(20ml) 중의 케토에스테르(2.0g, 7.2mmol) 용액에 2-클로로-6-메톡시벤조티아졸(1.73g, 8.63mmol) 다음, 수소화나트륨(0.63g, 15.8mmol, 오일 중 60%)을 10분 동안 나누어 가하였다. 반응물을 160℃에서 24시간 동안 가열하고, 실온으로 냉각되도록 하였다. 혼합물을 물(200ml)로 조심스럽게 쿼칭시키고, 수득된 갈색 침전물을

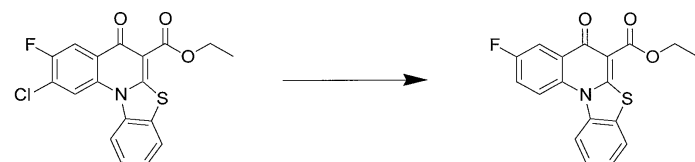
여과로 제거하고, 물로 세척하였다. 그 다음, 생성물을 염화메틸렌(30ml) 중에 용해시키고, 염수로 세척하고, 셀라이트를 통해 여과하였다. 수득된 유기층을 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축시켰다. 생성물을 실리카겔(헥산 중의 5% 에틸 아세테이트)로 정제하여 환형화된 물질을 고체로서 수득하였다(0.23g, 7.6%).

[0289] 실시예 6



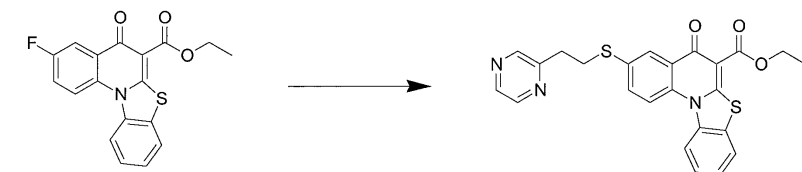
N-메틸피롤리디논(NMP, 2ml) 중의 클로로에스테르(220mg, 0.54mmol) 용액에 2-피라진에탄티올(66ml, 0.54mmol) 및 탄산칼륨(150mg, 1.1mmol)을 가하고, 혼합물을 100℃에서 2시간 동안 가열하였다. 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하고, 물(50ml)을 가하고, 밤새 교반하였다. 조악한 생성물을 여과로 수집하고, 예비용 TLC(염화메틸렌 중의 2% 메탄올)로 정제하여 순수한 생성물을 갈색 플러피 고체로서 수득하였다(75mg, 28%).

[0292] 실시예 7



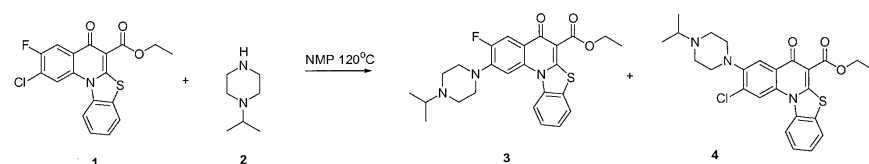
빙초산(5ml) 중의 클로로에스테르(0.25g, 0.67mmol) 현탁액에 암모늄 포르메이트(0.6g, 4.0mmol)를 가하고, 혼합물을 2분 동안 아르곤으로 탈기체화시켰다. 그 다음, 차콜 상 팔라듐(10% 데구사(degussa) 타입, 0.6g)을 가하고, 혼합물을 60℃에서 1시간 동안 가열하였다. 추가의 암모늄 포르메이트(0.1 g) 및 촉매(0.1g)를 가하고, 밤새 계속 가열하였다. 최종적으로, 추가의 암모늄 포르메이트 및 촉매(각각 150mg)를 가하고, 1.5시간 동안 가열하였다. 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하고, 셀라이트를 통해 여과하고, 용매를 진공하에 제거하고, 염화메틸렌(100ml)으로 교체하였다. 유기물을 물(100ml) 및 염수(100ml)로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시켰다. 용매를 진공하에 제거하여 벤조티아졸을 갈색 고체(153mg, 67%)로서 수득하였다.

[0295] 실시예 8



N-메틸피롤리디논(NMP, 0.5ml) 중의 플루오로에스테르(50mg, 0.15mmol) 용액에 2-피라진에탄티올 126ml, 1.0mmol 및 탄산칼륨(40mg, 0.3mmol)을 가하고, 혼합물을 100℃에서 2시간 동안 가열하였다. 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하고, 물(50ml)을 가하고, 밤새 교반하였다. 조악한 생성물을 여과로 수집하고, 예비용 TLC(염화메틸렌 중의 2% 메탄올)로 정제하여 순수한 생성물을 갈색 플러피 고체(17mg, 25%)로서 수득하였다.

[0298] 실시예 9



화합물(1)(1.0당량, 399mg, 1.06mmol) 및 1-이소프로필 피페라진(2)(5.0당량, 0.76ml, 5.31mmol)을 N-메틸피롤

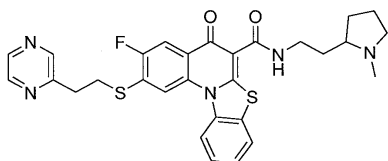
리디논(NMP, 5mℓ) 중에 용해시켰다. 수득된 혼합물을 120℃에서 3일 동안 교반하였다. LC 모니터링은 동량의 두 주요 생성물(3) 및 (4)가 형성됨을 나타내었다. 용액을 물에 붓고, 수득된 침전물을 여과로 분리하였다. 2개의 화합물을 SiO₂(구배 CH₂Cl₂ 중의 MeOH 0.5 내지 7%) 상의 플래시 크로마토그래피로 분리하여 화합물 (3)(135mg, 수율 27%) 및 (4)(135mg, 26%)를 수득하였다.

[0301] 3: R_f = 0.40(SiO₂, CH₂Cl₂ 중의 5% MeOH), LCMS(ES): 순도 95%, m/z 468 [M+H]⁺.

[0302] 4: R_f = 0.26(SiO₂, CH₂Cl₂ 중의 5% MeOH), LCMS(ES): 순도 95%, m/z 484 [M]⁺, 486 [M+2]⁺.

[0303] 실시예 10

[0304] 당해 실시예는 2개의 특정한 화합물의 활성 데이터를 제공한다:



[0305]

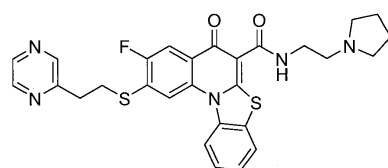
[0306] 4중 가닥 결합 친화도 K_m 5.5 uM

[0307] 종양 세포 평균 시간 생존(IC₅₀)(Alamar Blue Stain)

[0308] HeLa 2.8 uM

[0309] PC3 2.7 uM

[0310] HCT-116 1.1 uM



[0311]

[0312] 4중 가닥 결합 친화도 K_m 4.5 uM

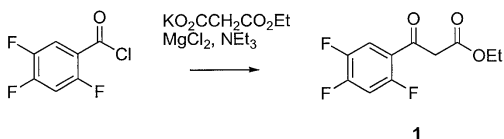
[0313] 종양 세포 평균 시간 생존(IC₅₀)(Alamar Blue Stain)

[0314] HeLa 2.7 uM

[0315] PC3 0.52 uM

[0316] HCT-116 0.57 uM

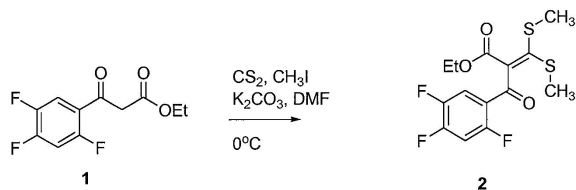
[0317] 실시예 11



[0318]

[0319] 질소 흡입구가 장착된 3구 플라스크에서, 칼륨 에틸말로네이트(1.5당량, 32.8g, 0.192mol) 및 MgCl₂(1.5당량, 18.4g, 0.193mol)를 기계 교반하에 아세토니트릴(120mℓ) 중에 현탁시켰다. 현탁액을 빙욕으로 냉각시켰다. 아세토니트릴(60mℓ) 중의 2,4,5-트리플루오로벤조일 클로라이드(1.0당량, 25g, 0.128mol) 용액을 적가하였다. 아세토니트릴(50mℓ) 중의 트리에틸아민(2.0당량, 36mℓ, 0.258mol) 용액을 30분 동안 가하면서, 빙염 혼합물로 외부를 냉각시켜 내부 온도를 10℃ 이하로 유지하였다. 이로써 수득된 매우 점성이 있는 슬러리를 실온으로 가온 되도록 하였다. 과량의 아세토니트릴(150mℓ)을 가하여 슬러리를 적절하게 교반하였다. 반응물을 2일 동안 교반하고, 휘발성 물질을 진공하에 제거하였다. 10% HCl 수용액 및 EtOAc를 가하고, 혼합물을 3시간 동안 교반하

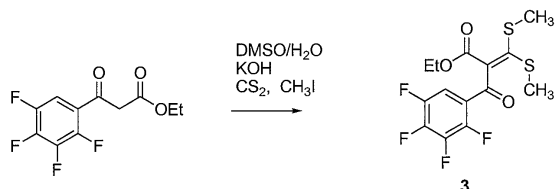
였다. 물질을 EtOAc(3x)로 추출하였다. 배합된 추출물을 염수로 세척하고, Na₂SO₄ 상에 건조시켰다. 진공하에 용매를 증발시킨 다음, 물질을 10% 물/EtOH 혼합물 중에서 재결정화시켜 화합물(1)을 백색 결정질 물질(17.8g, 56% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 269 [M+23]⁺, 두 토오토머 이성체의 혼합물.



[0320]

[0321]

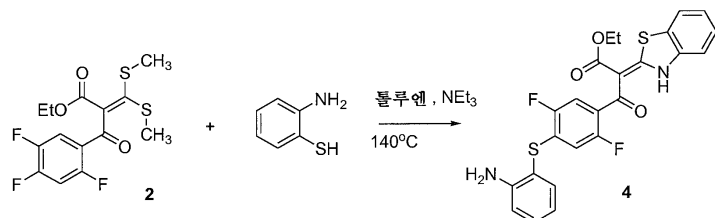
화합물(1)(1.0당량, 3.27g, 13.29mmol)을 무수 DMF(30ml) 중에 용해시켰다. 용액을 얼음으로 냉각시킨 다음, K₂CO₃(3.0당량, 5.51g, 39.87mmol)를 가하고, 용액을 15분 동안 교반하였다. 수득된 백색 슬러리에 빠르게 이황화탄소(1.5당량, 1.20ml, 19.86mmol)를 가하고, 혼합물 0°C에서 5분 동안 교반하였다. 요오드화메틸(3.0당량, 2.5ml, 40.2mmol)을 주사기를 통해 적가하고, 반응물을 0°C에서 2시간 동안 교반하였다. 빙수를 가한 다음, 화합물을 EtOAc(3x)로 추출하였다. 배합된 추출물을 물(1x) 및 염수(2x)로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 휘발성 물질을 진공하에 제거하였다. 헥산 및 소량의 EtOAc를 가해, 화합물의 결정화를 개시하였다. 조악한 물질을 여과로 분리하고, 헥산 중에 재결정화시켜 백색 결정질 고체(3.27g, 70% 수율)를 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 373 [M+23]⁺, 351 [M+1]⁺.



[0322]

[0323]

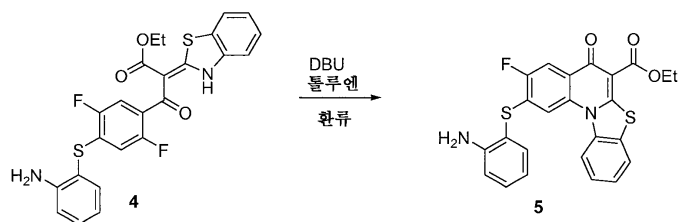
에틸 3-옥소-3-(2,3,4,5-테트라플루오로페닐)프로판오에이트(1.0당량, 5.77g, 21.84mmol)를 DMSO(55ml) 및 물(12ml) 혼합물에 용해시켰다. 물(25ml) 중의 KOH(2.3당량, 2.82g, 50.26mmol) 용액을 적가하면서, 빙욕을 사용하여 15°C 이하로 내부 온도를 유지하였다. 15분 동안 교반한 다음, 이황화탄소(3.2당량, 4.2ml, 69.50mmol) 및 요오드메탄(3.8당량, 5.2ml, 83.35mmol) 혼합물을 빠르게 가하고, 수득된 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 물을 가한 다음, 물질을 EtOAc(2x)로 추출하였다. 배합된 추출물을 물로 세척하고, Na₂SO₄ 상에 건조시키고, 용매를 진공하에 제거하였다. 화합물을 실리카겔(헥산 중의 EtOAc 5 내지 15% 구배) 상에 플래시 크로마토그래피로 정제하여 황색 오일(1.69g, 21% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 323 [M+1-EtO]⁺; ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 1.15(t, J = 7.0, 3H), 2.40(br s, 6H), 4.18(q, J = 7.2, 2H), 7.54-7.60(m, 1H) ppm.



[0324]

[0325]

화합물 2(1.0당량, 993mg, 2.84mmol), 2-아미노티오펜올(5.0당량, 1.52ml, 14.2mmol) 및 NEt₃(4.0당량, 1.59ml, 11.0mmol)을 무수 톨루엔(10ml) 중에 혼합하였다. 혼합물을 수 시간 동안 환류하에 교반하였다. 진공하에 용매를 제거한 다음, 물질을 EtOAc/헥산 중에서 소니케이션으로 정제하여 고체(724mg, 53% 수율)를 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 485 [M+1]⁺.



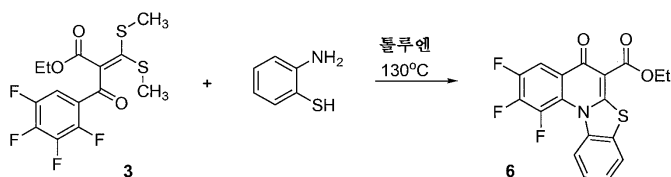
[0326]

[0327]

화합물(4)(1.0당량, 70mg, 0.144mmol)을 톨루엔(1.5ml) 중의 DBU(4.0당량, 65ml, 0.43mmol)와 혼합하였다. 용액을 용액을 45분 동안 환류하에 교반하였다. 화합물을 실리카겔(CH_2Cl_2 중의 1% MeOH) 상의 플래시 크로마토그래피로 정제하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 465 $[\text{M}+1]^+$.

[0328]

실시예 12



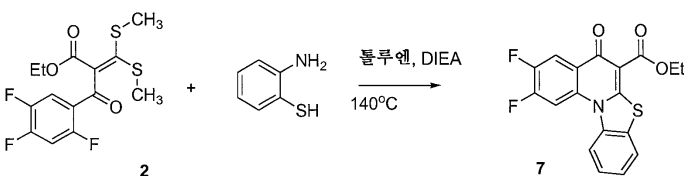
[0329]

[0330]

화합물(3)(1.0당량, 347mg, 0.942mmol) 및 2-아미노티오펜올(1.0당량, 0.10ml, 0.934mmol)을 톨루엔(1ml) 중에서 혼합하고, 130°C에서 14시간 동안 교반하였다. 냉각시킨 다음, 일부 고체 불순물을 여과로 제거하였다. 톨루엔 용액을 실리카겔 컬럼 상에 부었다. 톨루엔을 헥산으로 용리시켜 먼저 제거하였다. 그 다음, 컬럼을 헥산 중의 EtOAc 10 내지 30% 구배로 용리시켜 예상 화합물을 수득한다. 휘발성 물질을 증발시킨 다음, EtOAc/헥산을 사용하는 재결정화로 고체를 추가로 정제하고, 화합물(6)을 회색 고체(62mg, 18% 수율)로서 분리하였다. LCMS(ES): 90% 순도, m/z 378 $[\text{M}+1]^+$.

[0331]

실시예 13



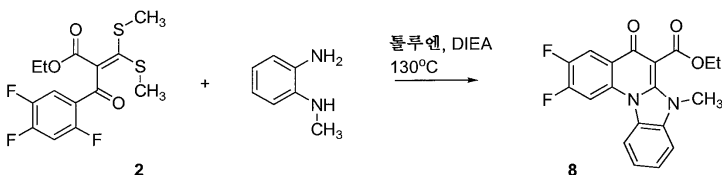
[0332]

[0333]

화합물(2)(1.0당량, 3.15g, 8.99mmol) 및 2-아미노티오펜올(1.1당량, 1.06ml, 9.91mmol)을 톨루엔(150ml) 중에서 혼합하였다. 질소 기체를 10분 동안 용액 중에 발포시켰다. 반응물을 환류(오일 욕, $T = 140^\circ\text{C}$)하에 30시간 동안 교반하였다. 휘발성 물질을 진공하에 제거하고, CH_2Cl_2 를 가하였다. 고체 불순물을 여과로 제거하였다. 물질을 실리카겔(헥산 중의 EtOAc 10 내지 50% 구배) 상에서 플래시 크로마토그래피로 정제하여 화합물(7)을 회색 분말(576mg, 18% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): 90% 순도, m/z 360 $[\text{M}+1]^+$.

[0334]

실시예 14

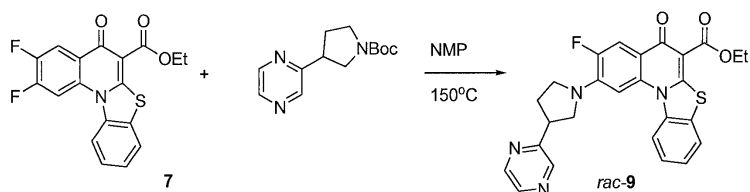


[0335]

[0336]

화합물(2)(1.0당량, 2.52g, 7.20mmol)을 톨루엔(10ml) 중의 N-메틸벤젠-1,2-디아민(1.2당량, 0.98ml) 및 DIEA(1.2당량, 1.5ml)과 혼합하고, 반응물을 1일 동안 120°C에서 교반하였다. 화합물(8)을 여과로 분리한 다음, 반응 혼합물을 냉각시킨 다음 여과로서 분리하였다(679mg, 26% 수율). LCMS(ES): 95% 순도, m/z 358 $[\text{M}+1]^+$.

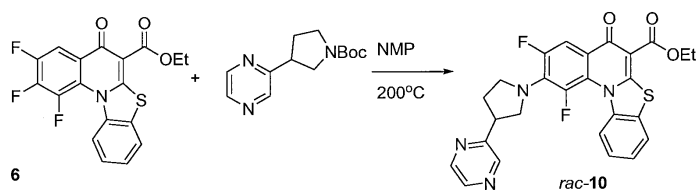
[0337] 실시예 15



[0338]

[0339] 화합물(7)(1.0당량, 392mg, 1.09mmol) 및 라세미 3급-부틸 3-(피라진-2-일)피롤리딘-1-카복실레이트(1.6당량, 436mg, 1.74mmol)를 NMP 1mℓ 중에 현탁하였다. 혼합물을 150℃의 마이크로웨이브에서 20분 동안 가열하였다. 물을 가하고, 수득된 고체를 여과로 분리하였다. 플래시 크로마토그래피로 정제하여 화합물(9)(265mg, 50% 수율)을 고체로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 489 [M+1]⁺.

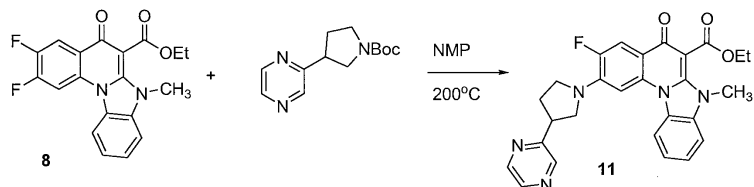
[0340] 실시예 16



[0341]

[0342] 화합물(6)(1.0당량, 66mg, 0.175mmol) 및 라세미 3급-부틸 3-(피라진-2-일)피롤리딘-1-카복실레이트(3.8당량, 165mg, 0.661mmol)를 NMP(0.5mℓ)와 혼합하였다. 혼합물을 200℃에서 23시간 동안 교반하였다. 물을 가한 다음, 형성된 고체를 여과로 제거하였다. 실리카겔(CH₂Cl₂ 중의 MeOH 1 내지 4% 구배) 상에 플래시 크로마토그래피로 정제하여 화합물(10)을 갈색 고체(70mg, 79% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): 90% 순도, m/z 507 [M+1]⁺.

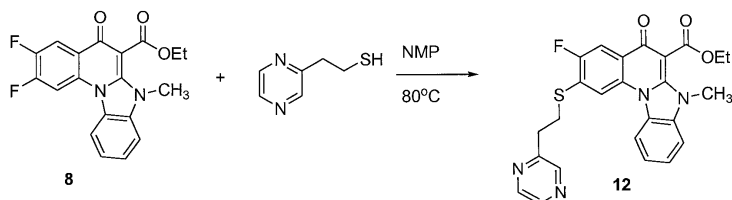
[0343] 실시예 17



[0344]

[0345] 화합물(11)을 화합물(10)에 사용한 방법에 따라 제조하였다. 화합물을 실리카겔(CH₂Cl₂ 중의 MeOH 1 내지 10% 구배) 상의 플래시 크로마토그래피로 정제하여 고체(220mg, 47%)를 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 486 [M+1]⁺.

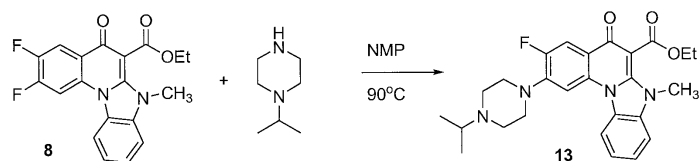
[0346] 실시예 18



[0347]

[0348] 화합물(8)(1.0당량, 202mg, 0.56mmol)을 NMP 중의 2-(피라진-2-일)에탄티올(1.05당량, 76mℓ) 및 K₂CO₃(1.2당량, 94mg)과 혼합하였다. 혼합물을 3시간 동안 80℃에서 교반하였다. 물을 가한 다음, 고체를 여과하고, 건조시켜 화합물(12)(202mg, 85% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 477 [M+1]⁺.

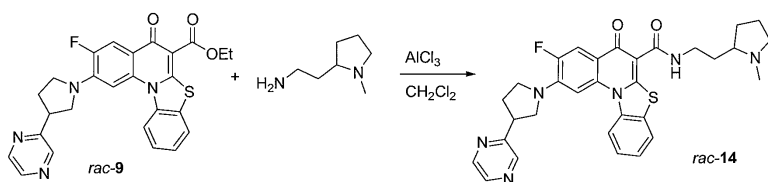
[0349] 실시예 19



[0350]

[0351] 화합물(8)(313mg)을 NMP 중의 N-이소프로필 피페라진(1.5당량, 188ml)과 혼합하고, 혼합물을 수 시간 동안 90℃에서 교반하였다. 화합물을 물을 가한 다음, 여과로 분리하였다. 실리카겔(MeOH/CH₂Cl₂) 상의 플래시 크로마토그래피로 정제하여 순수한 화합물(13)(222mg, 54% 수율)을 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 465 [M+1]⁺.

[0352] 실시예 20



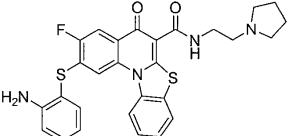
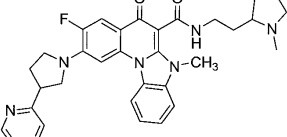
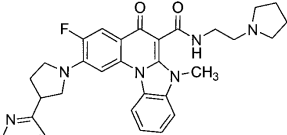
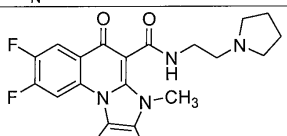
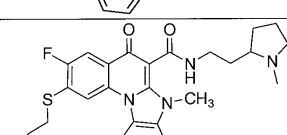
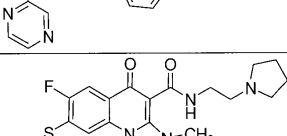
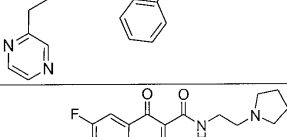
[0353]

[0354] 화합물(9)(1.0당량, 181mg, 0.370mmol) 및 라세미(2)(1-메틸피롤리딘-2-일)에탄아민(4.0당량, 0.21ml, 1.449mmol)을 CH₂Cl₂(1.5ml) 중에 혼합하였다. AlCl₃(2.9당량, 142mg, 1.06mmol)을 가하고, 용액 22시간 동안 교반하였다. 진공하에 CH₂Cl₂를 제거한 다음, 수득된 슬러리를 포화 수성 타르타르산 용액(약 1ml)으로 처리하고, 모든 고체가 사라질 때까지(가수분해가 완료될 때까지 약 1시간 동안) 교반하였다. 물을 가하고, NaOH를 가해 pH를 14로 조절하였다. 물질을 CH₂Cl₂(3x)로 추출하고, 배합된 추출물을 물로 세척하였다(2x). Na₂SO₄로 건조시킨 다음, 휘발성 물질을 진공하에 제거하였다. 물질을 알루미늄(CH₂Cl₂ 중의 MeOH 0.1 내지 1% 구배) 상의 플래시 크로마토그래피로 정제하였다. CH₂Cl₂/MeOH 용액을 진공하에 농축시켰다. EtOAc를 가해 화합물(14)를 황색 고체(93mg, 44% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 571 [M+1]⁺.

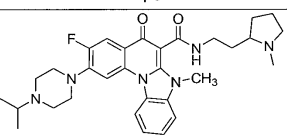
[0355] 하기 화합물을 적절한 아민 및 퀴놀론 에틸 에스테르를 사용하여 동일한 방법으로 제조하였다.

| 구조 | 분자량 | LCMS (ES) m/z |
|----|--------|------------------------|
| | 574.20 | 575 [M+1] ⁺ |

[0356]

| 구조 | 분자량 | LCMS (ES) m/z |
|---|--------|------------------------|
|  | 532.65 | 533 [M+1] ⁺ |
|  | 567.66 | 568 [M+1] ⁺ |
|  | 553.63 | 554 [M+1] ⁺ |
|  | 424.44 | 425 [M+1] ⁺ |
|  | 558.67 | 559 [M+1] ⁺ |
|  | 544.64 | 545 [M+1] ⁺ |
|  | 532.65 | 533 [M+1] ⁺ |

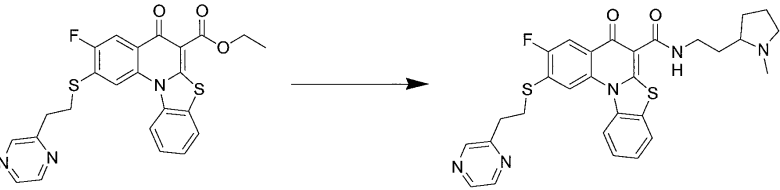
[0357]

| 구조 | 분자량 | LCMS (ES) m/z |
|---|--------|------------------------|
|  | 546.68 | 547 [M+1] ⁺ |

[0358]

[0359]

실시예 21



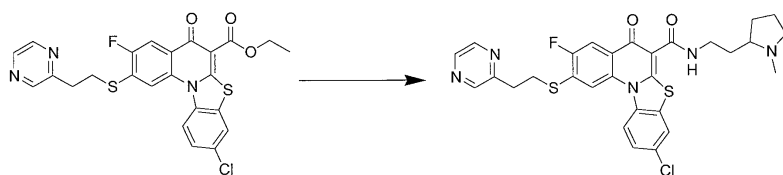
[0360]

[0361]

염화메틸렌(1.0ml) 중의 퀴놀론 에스테르(60mg, 0.13mmol) 및 2-(2-아미노에틸)-1-메틸 피롤리딘(30μl, 0.19mmol) 용액에 염화알루미늄(25mg, 0.19mmol)을 가하고, 반응 혼합물을 30분 동안 실온에서 교반하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 포화 L-타르타르산(1.0ml)를 가하고, 고체가 모두 용해될 때까지 45분 동안 교반하였다. 수용액을 염화메틸렌(1.0ml)으로 세척하고, 1N NaOH로 염기성화시키고, 염화메틸렌으로 추출하였다. 수득

된 추출물을 염수로 세척하고, 황산나트륨으로 건조시켰다. 여과시키고, 용매를 진공하에 제거하였다. 수득된 황색 물질을 예비용 TLC(알루미나, CH₂Cl₂ 중의 2% 메탄올)로 정제하여 황색 고체로서 생성물을 수득하였다(30mg, 43%).

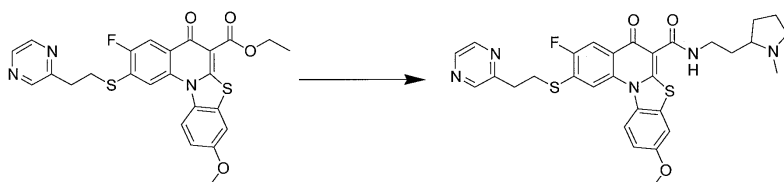
[0362] 실시예 22



[0363]

[0364] 염화메틸렌(1.0ml) 중의 퀴놀론 에스테르(60mg, 0.11mmol) 및 2-(2-아미노에틸)-1-메틸 피롤리딘(25μl, 0.17mmol) 용액에 염화알루미늄(23mg, 0.17mmol)을 가하고, 반응 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 포화된 L-타르타르산(1.0ml)을 가하고, 고체가 모두 용해될 때까지 45분 동안 교반하였다. 수용액을 염화메틸렌(1.0ml)로 세척하고, 1N NaOH로 염기성화시키고, 염화메틸렌으로 추출하였다. 수득된 추출물을 염수로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 진공하에 제거하였다. 수득된 황색 물질을 예비용 TLC(알루미나, CH₂Cl₂ 중의 2% 메탄올)로 정제하여 황색 고체로서 생성물을 수득하였다(30mg, 46%).

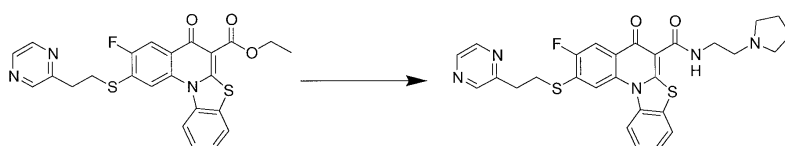
[0365] 실시예 23



[0366]

[0367] 염화메틸렌(1.0ml) 중의 퀴놀론 에스테르(75mg, 0.15mmol) 및 2-(2-아미노에틸)-1-메틸 피롤리딘(32μl, 0.22mmol) 용액에 염화알루미늄(29mg, 0.22mmol)을 가하고, 반응 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 포화 L-타르타르산(1.0ml)을 가하고, 모든 고체가 용해될 때까지 45분 동안 교반하였다. 수용액을 염화메틸렌(1.0ml)으로 세척하고, 1N NaOH로 염기성화시키고, 염화메틸렌으로 추출하였다. 수득된 추출물을 염수로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 진공하에 제거하였다. 수득된 황색 물질을 예비용 TLC(알루미나, CH₂Cl₂ 중의 2% 메탄올)로 정제하여 황색 고체로서 생성물을 수득하였다(30mg, 34%).

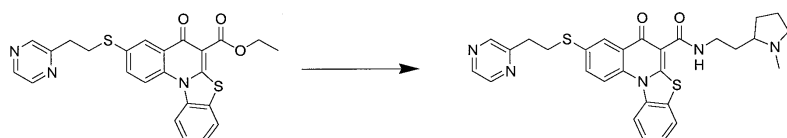
[0368] 실시예 24



[0369]

[0370] 염화메틸렌(1.0ml) 중의 퀴놀론 에스테르(34mg, 0.7mmol) 및 1-(2-아미노에틸) 피롤리딘(15μl 0.11mmol) 용액에 염화알루미늄(15mg, 0.11mmol)을 가하고, 반응 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 포화 L-타르타르산(1.0ml)을 가하고, 모든 고체가 용해될 때까지 45분 동안 교반하였다. 수용액을 염화메틸렌(1.0ml)으로 세척하고, 1N NaOH로 염기성화시키고, 염화메틸렌으로 추출하였다. 수득된 추출물을 염수로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 진공하에 제거하였다. 수득된 황색 물질을 예비용 TLC(알루미나, CH₂Cl₂ 중의 2% 메탄올)로 정제하여 황색 고체로서 생성물을 수득하였다(28mg, 73%).

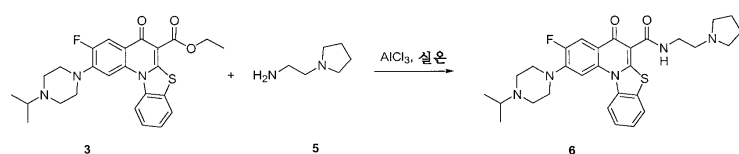
[0371] 실시예 25



[0372]

[0373] 염화메틸렌(1.0ml) 중의 퀴놀론 에스테르(146mg, 0.65mmol) 및 2-(2-(아미노에틸)-1-메틸 피롤리딘(1mmol) 용액에 염화알루미늄(1mmol)을 가하고, 반응 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 포화 L-타르타르산(1.0ml)을 가하고, 모든 고체가 용해될 때까지 45분 동안 교반하였다. 수용액을 염화메틸렌(1.0ml)으로 세척하고, 1N NaOH로 염기성화시키고, 염화메틸렌으로 추출하였다. 수득된 추출물을 염수로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고, 용매를 진공하에 제거하였다. 수득된 황색 물질을 예비용 TLC(알루미늄, CH₂Cl₂ 중의 2% 메탄올)로 정제하여 황색 고체로서 생성물을 수득하였다(1.7mg, 5%)

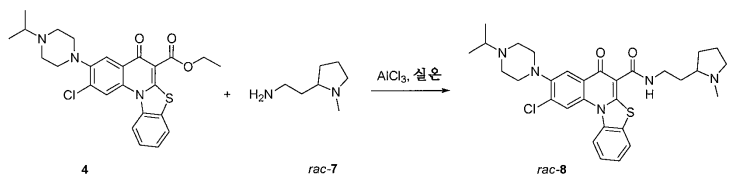
[0374] 실시예 26



[0375]

[0376] 화합물(3)(1.0당량, 126mg, 0.27mmol) 및 아민(5)(2.0당량, 68μl 0.54mmol)을 무수 CH₂Cl₂(1ml)에 가하였다. AlCl₃(2.0당량, 72mg, 0.54mmol)을 가하고, 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 휘발성 물질을 진공하에 제거하였다. 수득된 슬러리를 포화 타르타르산 수용액(10ml)으로 처리하고, 모든 고체가 사라질 때까지(가수분해가 완료되기까지 약 1시간) 교반하였다. 용액을 1N NaOH(pH = 14에 도달)로 중화시키고, 화합물 CH₂Cl₂(4x)로 추출하였다. 유기 상을 농축 수성 나트륨 칼륨 타르트레이트 용액 및 물(2x)로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. CH₂Cl₂ 용액을 농축시켰다. AcOEt를 가해 예상 화합물의 재결정화를 유도하였다. 여과한 다음, 화합물(6)을 담황색 플러피 고체로서 분리하였다(76mg, 53% 수율). LCMS(ES): 95% 순도, m/z 536 [M+H]⁺; ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 1.12(d, J= 6.6, 6H), 1.80(br s, 4H), 2.62(br s, 4H), 2.79(m, 7H), 3.36(m, 4H), 3.67(q, J= 6.0, 2H), 7.45(t, J= 7.2, 1H), 7.53(td, J= 7.3, J= 1.3, 1H), 7.84(dd, J= 7.8, J= 1.2, 1H), 7.89(d, J= 6.9, 1H), 8.16(d, J= 13.1, 1H), 8.23(d, J= 8.5, 1H), 10.46(br t, 1H) ppm.

[0377] 실시예 27

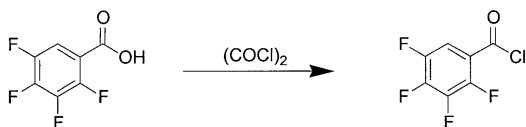


[0378]

[0379] 화합물(4)(101mg, 0.21mmol) 및 (7)로부터 출발하여 화합물을 실시예 26에 사용된 과정에 따라 제조하여 화합물(8)을 백색 플러피 고체로서 수득하였다(37mg, 31% 수율). LCMS(ES): 95% 순도, m/z 566 [M]⁺, 568 [M+2]⁺; ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 1.13(d, J= 6.5, 6H), 1.57(m 물 신호와 겹침, 2H), 1.71(m, 1H), 1.81(m, 1H), 2.04-2.18(m, 4H), 2.34(s, 3H), 2.78(m, 5H), 3.06(br t, J= 8.6, 1H), 3.27(br s, 4H), 3.52-3.59(m, 2H), 7.47(t, J= 7.3, 1H), 7.57(td, J= 8.4, J= 1.1, 1H), 7.84(d, J= 7.8, 1H), 8.19(s, 1H), 8.27(d, J= 8.4, 1H), 8.57(s, 1H), 10.38(br t, J= 5.6, 1H) ppm.

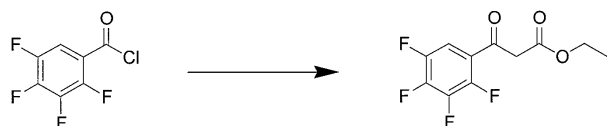
[0380] 실시예 28

[0381] 실시예 28은 아민을 갖는 상응하는 에스테르와 염화알루미늄의 반응으로부터 치환된 벤족사진 동족체를 제조하는 방법을 설명한다.



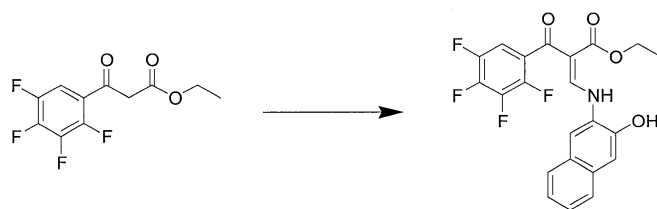
[0382]

[0383] 염화메틸렌(0.5 l) 중의 2,3,4,5-테트라플루오로벤조산(100g, 510mmol) 용액에 옥살릴 클로라이드(68g, 540mmol) 및 DMF(약 3방울)를 가하고, 반응 혼합물을 실온에서 밤새 교반하여 생성된 기체를 빠져나가게 하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 용기를 고압하에(약 0.5mmHg) 2시간 동안 위치시켜 산 클로라이드를 점성이 있는 오일(105g)로서 수득하고, 이를 추가의 정제없이 후속적인 반응 중에 사용하였다.



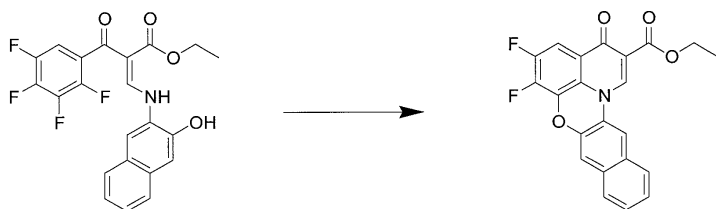
[0384]

[0385] 아세토니트릴 중의 칼륨 에틸 말로네이트(97g, 570mmol) 및 염화마그네슘(55g, 570mmol) 현탁액을 0℃로 차게 만들었다. 당해 현탁액에 5분 동안 조약한 2,3,4,5-벤조일 클로라이드(105g, 520mmol)를 가하였다. 10℃ 이하의 반응 온도를 유지하면서 트리에틸아민을 천천히 가하고, 혼합물을 실온으로 가온되도록 하고, 밤새 교반하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 톨루엔(300ml)으로 교체하고, 1N HCl(500ml)를 가하고, 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. 유기 층을 분리하고, 1N HCl(100ml) 및 염수(100ml)로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 실리카겔(50 X 100mm) 패드로 여과하고, 에틸 아세테이트로 용출시켰다. 용매를 진공하에 제거하고, 수득된 오일을 에탄올/물(9:1) 중에 용해시키고, 밤새 결정화시켰다. 수득된 결정을 여과로 분리하고, 에탄올/물(8:2)로 세척하여 케토에스테르(43.75g, 166mmol)를 백색 결정 고체로서 수득하였다.



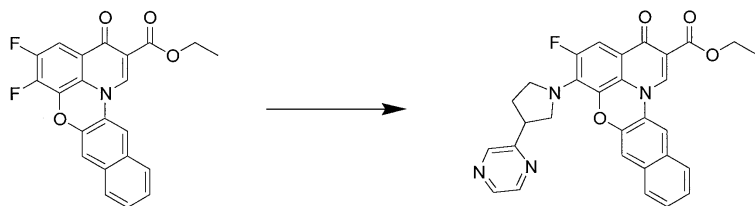
[0386]

[0387] 250ml들이 둥근바닥 플라스크에 테트라플루오로케토에스테르(10.0g, 37.9mmol), 트리에틸오르토포르메이트(8.6 ml, 56.8mmol) 및 무수아세트산(7.15ml, 75.8mmol)을 가하고, 반응 혼합물을 145℃에서 2시간 동안 가열하였다. 반응물을 실온으로 냉각되도록 하고, 고압하에(약 0.5mmHg) 1시간 동안 위치시켰다. 수득된 오일을 에탄올(100 ml) 중에 용해시키고, 2-아미노-1-나프톨(6.02g, 37.9mmol)을 실온에서 가하고, 용액이 간단하게 투명하게 변한 다음 생성물이 침전되기 시작하였다. 반응물을 2시간 동안 교반한 다음 및 여과하고, 에탄올(100ml)로 세척하여 엔아민을 황색 고체(12.5g, 28.9mmol)로서 수득하였다.



[0388]

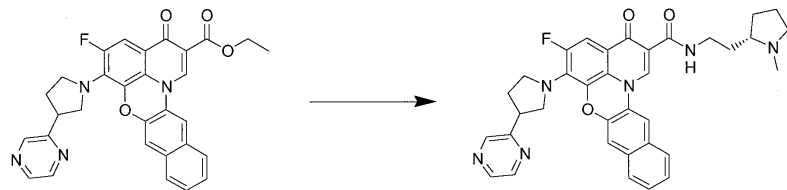
[0389] 무수 DMF(50ml) 중의 엔아민(12.13g, 27.95mmol) 용액에 탄산칼륨(4.24g, 1.1당량)을 가하고, 혼합물을 일정하게 교반하면서 2시간 동안 90℃로 가열하였다. 혼합물을 교반하지 않고 실온으로 냉각되도록 하고, 실온에서 추가 1시간 동안 정치시켰다. 결정질 고체를 여과로 수집하고, 물로 세척하였다. THF로 재결정화시켜 디플루오로에스테르를 백색 결정질 고체(9.3g, 23.6mmol)로서 수득하였다.



[0390]

[0391]

NMP(10ml) 중의 디플루오로에스테르(1.0g, 2.5mmol) 용액에 N-Boc-3-(2-피라지노)피롤리딘(870mg, 3.5mmol)을 가하고, 혼합물을 환류하에 3시간 동안 가열하였다. 그 다음, 반응 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하고, 생성물을 여과로 수집하였다. THF로부터 결정화시켜 피라진 에스테르를 황색 고체(910mg, 1.74mmol)로서 수득하였다.



[0392]

[0393]

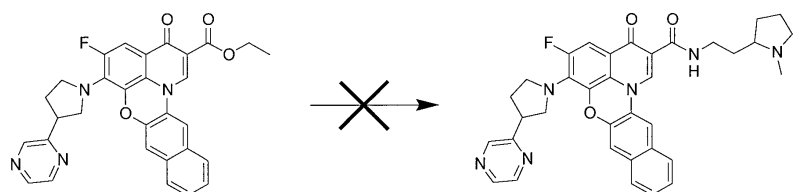
염화메틸렌 중의 피라진 에스테르(250mg, 0.48mmol) 및 2-(2-아미노에틸)-1-메틸피롤리딘(80mg, 0.63mmol) 용액에 실온에서 염화알루미늄(83mg, 0.63mmol)을 가하고, 반응 혼합물을 2시간 동안 교반하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 포화 L-타르타르산(5ml)을 가하고, 혼합물을 1시간 동안 교반하였다. 그 다음, 염화메틸렌(10ml)을 가하고, 혼합물을 1N NaOH로 염기성화시켰다. 유기 층을 분리하고, 로셀 염의 포화 용액 및 염수로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시켰다. 용매를 진공하에 제거하고, 수득된 고체를 THF 중에 용해시키고, 여과하고, 용매를 다시 제거하였다. 조약한 고체를 에틸 아세테이트 중에서 결정화시켜 아미드를 황색 고체(225mg, 0.37mmol, 98.5% 순도)로서 수득하였다.

[0394]

실시예 29

[0395]

실시예 29에 기재된 바와 같이, 염화아연이 루이스산으로 사용된 상응하는 에스테르로부터의 아미드 커플링은 작은 반응을 야기하거나 반응이 전혀 야기하지 않는다.



[0396]

[0397]

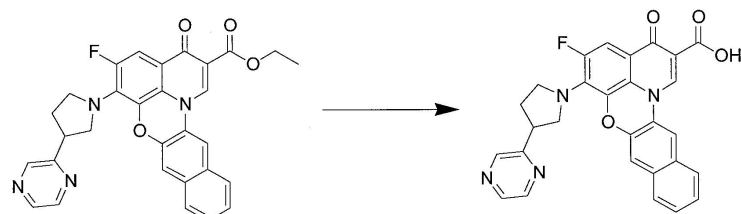
실온에서 염화메틸렌 중의 에스테르(100mg, 0.19mmol) 및 2-(2-아미노에틸)-1-메틸피롤리딘(80mg, 0.63mmol) 용액에 염화아연(86mg, 0.63mmol)을 가하고, 반응 혼합물을 밤새 교반하였다. LCMS는 반응이 진행되지 않음을 나타내었고, 반응은 정지되었다.

[0398]

실시예 30

[0399]

실시예 30은 상응하는 카복실산을 아민과 반응시켜 치환된 벤족사진 동족체를 제조하는 방법을 설명한다.

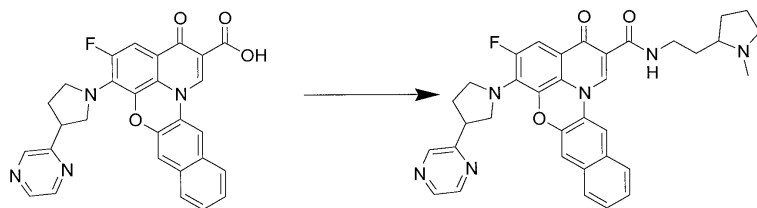


[0400]

[0401]

피라진 에스테르(2.0g, 3.8mmol)를 에탄올(100ml) 중에 용해시키고, 농축 HCl(20ml)을 가하고, 혼합물을 밤새 환류시켰다. 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하고, 고체를 진공 여과로 수집하고, 에탄올로 세척하여 피라진산

을 담갈색 분말(1.6g, 3.2mmol)로서 수득하였다.



[0402]

[0403]

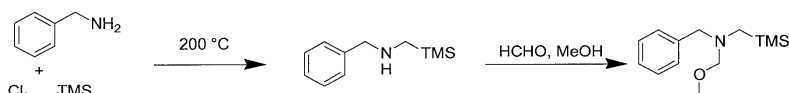
NMP(20ml) 중의 플루오로아미노산(1.6g, 3.2mmol) 및 HBTU(2.0g, 5.3mmol) 혼합물에 N,N-디이소프로필-N-에틸아민(1.0ml, 6mmol)을 가하고, 혼합물을 실온에서 아르곤 기체하에 1시간 동안 교반하였다(용액이 투명해졌다). (S)-2-(2-아미노에틸)-1-메틸피롤리딘[참조: Mizuno, A.; Hamada, Y.; Shioiri, T., Synthesis, 1980, 12 1007](1.0ml, 6.9mmol)을 가하고, 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 물(200ml)을 가하고, 수득된 고체를 진공 여과로 수집하고, 물로 세척하고, 건조시켜 피라진을 황색 고체로서 수득하였다. 황색 고체를 실리카겔 상에서 정제하였다(10% MeOH/CH₂Cl₂ 제1 분순물 용리 후, 5% NH₄OH/15% MeOH/CH₂Cl₂ 용리). 배합된 분획을 증발시켜 화합물을 황색 고체로서 수득하였다(1.2g, 2.0mmol, 85% 순도).

[0404]

실시예 31

[0405]

실시예 31은 벤족사진 및 벤조티아졸 화합물의 제조에서 사용된 중간체를 사용하여 Boc-보호된 피롤리딘 시약을 제조하는 방법을 설명한다.



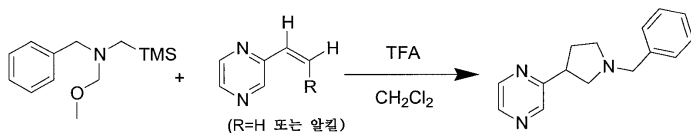
[0406]

[0407]

벤질 아민(90g, 841mmol) 및 클로로메틸트리메틸실란(30g, 246mmol) 혼합물을 200℃에서 2.5시간 동안 가열하였다. 일반적으로, 트리메틸실릴 그룹을 -SiR¹R²R³ 잔기로 교체할 수 있고, R¹, R² 및 R³은 독립적으로 알킬 또는 치환된 알킬이다. 벤질 그룹은 또한 기타 적합한 보호 그룹으로 교체될 수 있다.

[0408]

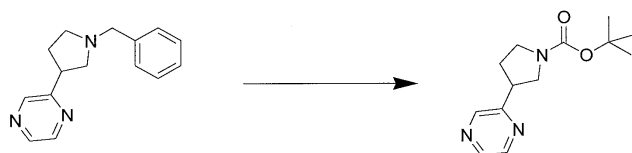
혼합물을 실온으로 냉각되도록 하고, 교반하에 1N 수산화나트륨(250ml) 및 에테르(200ml)로 처리하였다. 수성 층을 에테르(3 X 100ml)로 추출하고, 배합된 유기 추출물을 염수로 세척하고, 황산마그네슘 상에 건조시키고, 실리카겔(70 X 50mm) 패드 상에 여과하고, 에테르로 용리시켰다. 용매를 진공하에 제거하고, 수득된 오일을 진공 증류시켜(bp = 70℃, 약 1mmHg) 아민을 다량의 벤질 아민을 함유하는 무색 오일(60.8g)로서 수득하였다. 그 다음, 수득된 오일을 에틸 아세테이트로 용리되는 싱글 바이오타지(biotage) 컬럼(90g, 실리카겔, ANALOGIX) 상에서 크로마토그래피하였다. 용매를 진공하에 제거하여 순수한 아민을 무색 오일(43.55g, 225mmol)로서 수득하였다. 그 다음, 수득된 아민을 37% 포르말린(25ml)에 가하고, 혼합물을 실온에서 10분 교반한 다음, 메탄올(25 ml) 및 탄산칼륨(20g)을 가하였다. 수득된 혼합물을 밤새 교반한 다음, 염화메틸렌으로 추출하고(3 X 100ml) 및 배합된 유기 추출물을 황산나트륨으로 건조시켰다. 용매를 진공하에 제거하고, 수득된 오일을 진공 증류시켜(bp = 80℃, 약 1mmHg) 아민을 무색 액체(39.9g, 168mmol)로서 수득하였다.



[0409]

[0410]

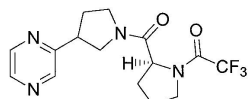
염화메틸렌(200ml) 및 트리플루오로아세트산(2ml) 중의 비닐피라진(10g, 94.3mmol) 용액에 4시간 동안 염화메틸렌(100ml) 중의 용해된 실릴화된 아민 에테르(24.33g, 102.7mmol) 용액을 적가하고, 1N HCl(3 X 75ml)로 추출하였다. 그 다음, 수성 층을 NaOH로 염기성화시키고, 염화메틸렌으로 추출하고(3 X 100ml), 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 에틸 아세테이트로 용리되는 실리카겔(30 X 150mm) 패드로 여과하였다. 용매를 증발시켜 벤질화된 피라진노피롤리딘(26.19g)을 갈색 투명 액체로서 수득하였다. 일반적으로, 피라진 헤테로사이클은 적합한 헤테로사이클릭 그룹으로 교체할 수 있다.



[0411]

[0412]

메탄올(35ml) 중의 벤질 피롤리딘(7.0g, 29.3mmol) 및 디-3급-부틸디카보네이트(44.7g, 205mmol) 용액에 10% Pd/C(테구사 타입, 습윤성)를 가하고, 용기를 진탕하면서 수소(50 PSI)로 가압하였다. 용기를 조절된 압력으로 3회 통풍시켰다. 5시간 후, 반응이 완료되고 혼합물을 여과하고, 용매를 진공하에 제거하였다. 수득된 물질을 실리카겔(1:1 헥산/에틸 아세테이트) 상에서 크로마토그래피하여 Boc 보호된 피롤리딘을 담황색 오일(2.3g, 9.2mmol)로서 수득하였다.



[0413]

[0414]

에난티오머 비율은 TPC(N-트리플루오로메틸아세틸-L-프롤릴 클로라이드, Regis #440001)를 제조하고, 피노메닉스 제브론(Phenomenex Zebron) 모세관 컬럼(ZB-50, 50% 페닐, 50% 디메틸폴리실록산, 30M X 0.25mm, 0.25μm 필름 두께) 상의 GCMS(HP 6890N/5973 MSD)를 사용함으로써 측정할 수 있다. 크로마토그래피 조건: 1ml 주사 스플릿 50:1. 일정한 유속 He = 1.0ml/분. 오븐; 100℃ 5분, 5℃/분, 300℃에서 8분 정치. 화합물은 39.08 및 39.31분에 도달하지만, 용융은 우수하다.

[0415]

실시예 32

[0416]

실시예 32는 아마이드 커플링에 사용된 키랄 아민 시약의 제조를 설명한다.



[0417]

[0418]

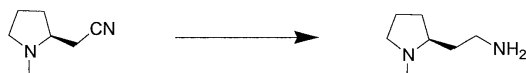
염화메틸렌(1ℓ) 중의 하이드록시메틸 피롤리딘(50g, 434mmol) 용액에 트리페닐포스핀(148g, 564mmol) 용액을 가한 다음, 탄소 테트라브로마이드(187g, 564mmol)를 실온에서 조심스럽게 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 물을 가하고, 유기 층을 염수로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 용매를 진공하에 제거하였다. 수득된 오일을 실리카겔 크로마토그래피(1:1 헥산/에틸 아세테이트)로 정제하여 브로마이드를 투명 오일(35g, 197mmol)로서 수득하였다.



[0419]

[0420]

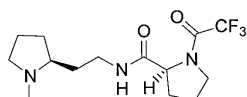
아세트ونی트릴 및 물(75:15, 200ml) 중의 브로마이드(23.0g, 129mmol) 용액에 시안화칼륨(12.6g, 194mmol) 및 18-크라운-6(340mg, 1.3mmol)를 가하고, 반응물을 밤새 실온에서 교반하였다. 그 다음, 진공하에 용적을 50ml로 감소시키고, 염화메틸렌(2 X 200ml)으로 2회 추출하였다. 수득된 추출물을 배합하고, 염수로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 용매를 조심스럽게 진공하에 제거하여 시아나이드를 투명 오일(17g)로서 수득하였다.



[0421]

[0422]

메탄올(90ml) 중의 시아나이드(17g, 137mmol) 용액에 라니 니켈(2.0g, 물 용액) 및 혼합물을 24시간 동안 진탕시키면서 수소(60 PSI)로 가압하였다. 용액을 여과하고, 용매를 진공하에 제거하였다. 순수한 아민을 증류(BP = 50℃, 약 10mmHg)로 투명 오일(7.54g, 58.9mmol)로 분리시켰다.



TPC 아미드

[0423]

[0424]

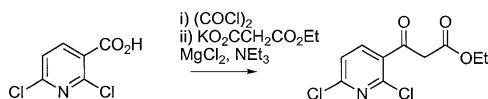
에난티오머 비율은 TPC(N-트리플루오로메틸아세틸-L-프롤린 클로라이드, Regis #440001)을 제조하고, 피노메닉스 제브론 모세관 컬럼(ZB-50, 50% 페닐, 50% 디메틸폴리실록산, 30M X 0.25mm, 0.25μm 필름 두께) 상의 GCMS(HP 6890N/5973 MSD)를 사용함으로써 측정할 수 있다. 크로마토그래피 조건: 1ml 주사 스플릿 50:1. 일정한 유속 He = 1.0ml/분. 오븐: 100℃ 5분, 5℃/분, 300℃에서 8분 정지. 화합물은 28.51 및 28.68분에 도달하지만, 용융은 우수하다.

[0425]

상기 상세한 설명 및 실시예는 설명을 위함이고, 이로써 본 발명의 범위를 제한하지 않음이 이해된다. 공지된 양태의 다양한 변화 및 변형이 당해 분야의 숙련자들에게 명백할 것이다. 본 발명의 화학 구조, 치환체, 유도체, 중간체, 합성, 제형 및/또는 사용방법에 대한 제한없이, 이러한 변화 및 변형은 본 발명의 취지 및 범위에 속할 수 있다. 본원에 참조된 미국 특허 및 문헌은 참조로서 인용된다.

[0426]

실시예 33



1

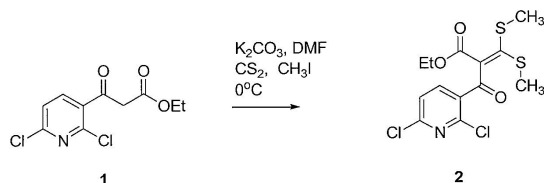
[0427]

[0428]

염화메틸렌(500ml) 중의 2,6-디클로로니코틴산(1.0당량, 31.24g, 162.7mmol) 용액에 옥살릴 클로라이드(1.2당량, 23.7g, 187.5mmol)를 가한 다음, DMF 3방울을 가하고, 혼합물을 밤새 실온에서 교반하였다. 그 다음, 용매를 진공하에 제거하여 조악한 산 클로라이드를 오일로서 수득하였다. 분리 플라스크에서 아세트니트릴(500ml)에 칼륨 에틸 말로네이트(1.5당량, 41.5g, 244mmol)를 용해시키고, 혼합물을 5℃로 냉각시켰다. 그 다음, 염화마그네슘(1.5당량, 23.4g, 245.8mmol)을 5분 동안 가하면서 25℃ 이하의 온도를 유지하였다. 그 다음, 조악한 산 클로라이드를 아세트니트릴(50ml) 중에 용해시키고, 적가 깔대기를 30분 동안 5℃ 이하의 온도로 유지하면서 가하였다. 그 다음, 트리에틸아민(2.0당량, 42.8ml, 325mmol)을 10℃ 이하의 온도로 유지할 때까지 가능하면 빠르게 가하였다. 첨가가 완료된 후, 반응물을 실온으로 가온되도록 하고, 밤새 일정하게 교반하였다. 용매를 진공하에 제거하고, 에틸 아세테이트로 교체하였다. 1N HCl(500ml)를 가하고, 혼합물을 추가 30분 동안 교반하였다. 유기 층을 분리하고, 염수로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 용매를 진공하에 제거하여 케토에스테르를 오렌지색 오일(35.04g)로서 수득하였다. 생성물을 10% 물/메탄올로부터 재결정화시켜 순수한 케토에스테르(1)를 백색 결정질 고체(31.21g, 74%)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, 2 피크로서 용리, m/z 216, 262.

[0429]

실시예 34



1

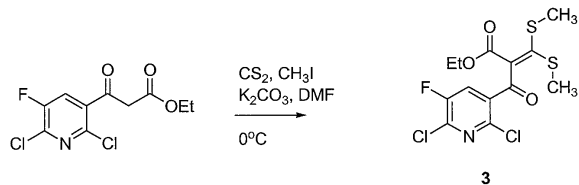
2

[0430]

[0431]

케토에스테르(1)(1.0당량, 11.45g, 43.87mmol)를 DMF(60ml) 중에 용해시키고, 혼합물을 얼음 욕조에서 0℃로 냉각시켰다. 그 다음, 요오드화메틸(3.0당량, 8.2ml, 132mmol)을 가하고, 혼합물을 -5℃로 냉각시켰다. 그 다음, 이황화탄소(1.5당량, 4.0ml, 65.8mmol)를 가한 다음, 탄산칼륨(2.0당량, 12.1g, 88mmol)을 가하면서, 온도를 5℃ 이하로 유지하였다. 혼합물을 2시간 동안 교반하면서 실온으로 가온되도록 한 다음, 에틸 아세테이트(5 X 100ml)로 추출하고, 황산나트륨 상에서 건조시켰다. 용매를 진공하에 제거하고, 수득된 오일을 실리카겔 크로마토그래피(10% 에틸 아세테이트/헥산)로 정제하여 비스티오에테르(2)를 황색 오일(70% 수율)을 수득하였다. LCMS(ES): 90% 순도, m/z 388 [M+22]⁺, 320 [M+1 -OEt]⁺.

[0432] 실시예 35

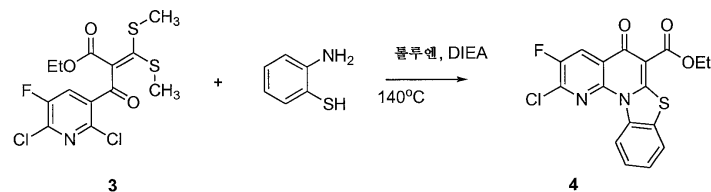


[0433]

[0434]

에틸 2,6-디클로로-5-플루오로-3-피리딘-β-케토 프로피오네이트(1.0당량, 31.79g, 0.113mol)를 DMF(180ml) 중에 용해시켰다. 용액을 얼음-염 혼합물을 사용하여 냉각시켰다. 요오드메탄(3.0당량, 21ml, 0.887mol) 및 이 황화탄소(1.5당량, 10.3ml, 0.170mol)를 가하고, 혼합물을 내부 온도가 T = -2℃에 도달할 때까지 교반하였다. K₂CO₃(2.0당량, 31.4g, 0.227mmol)을 매우 빠르게(2 내지 3분 동안) 가하여 내부 온도가 T = 12℃가 되도록 유도하였다. 혼합물을 빙욕에서 5시간 동안 교반하였다. 물 및 염수를 가한 다음, 화합물을 EtOAc(3x)로 추출하였다. 배합된 추출물을 염수로 세척하고(2x), Na₂SO₄ 상에 건조시키고, 휘발성 물질을 진공하에 제거하였다. 실리카겔(헥산 중의 EtOAc 5 내지 30% 구배) 상의 플래시 크로마토그래피로 정제하여 화합물(3)을 두꺼운 황색 오일(22.86g, 52% 수율)로서 수득하였다. R_f = 0.14(헥산 중의 10% EtOAc) ; LCMS(ES): 95% 순도, m/z 384 [M]⁺, 338 [M-EtOH]⁺, 340 [M+2-EtOH]⁺, 342 [M+4-EtOH]⁺ ; ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 1.16(t, J = 7.4, 3H), 2.43(s, 6H), 4.18(q, J = 7.4, 2H), 7.86(dd, J = 0.6, J = 7.4, 1H) ppm.

[0435] 실시예 36

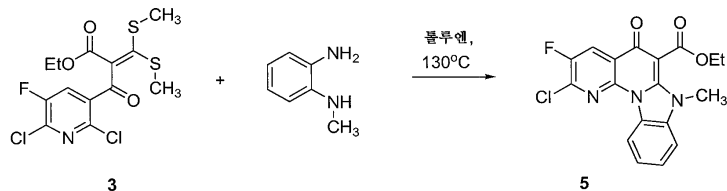


[0436]

[0437]

화합물(3)(1.0당량, 18.93g, 49.18mmol)을 톨루엔(400ml) 중에 용해시켰다. 용액을 조심스럽게 10분 동안 질소를 발포하여 탈기체화시켰다. 2-아미노티오펜올(0.9당량, 4.7ml, 43.92mmol)을 가한 다음, 혼합물을 130 내지 140℃에서(오일 욕 온도) 6시간 동안 질소를 반응 내부로 계속 발포하면서 교반하였다. DIEA(1.0당량, 8.6ml, 49.37mmol)를 가하고, 혼합물을 140℃에서 밤새 교반하였다. 냉각시키면서, 화합물(4)은 침전되기 시작하였다. 고체를 여과하고, 소량의 톨루엔으로 세척하였다. 물질을 MeOH 중에 현탁시키고, 몇 분 동안 소니케이션시켰다. 여과 및 건조 후, 화합물(4)을 갈색 고체(9.19g, 56% 수율)로서 분리하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 377 [M+1]⁺, 379 [M+3]⁺, 331 [M+1-EtOH]⁺, 333 [M+3-EtOH]⁺ ; ¹H NMR(CDCl₃, 500 MHz) δ 1.50(t, J = 7.0, 3H), 4.53(d, J = 7.0, 2H), 7.52(td, J = 0.9, J = 7.1, 1H), 7.63(td, J = 1.4, J = 6.0, 1H), 7.84(dd, J = 1.2, J = 7.9, 1H), 8.62(d, J = 7.4, 1H), 9.49(d, J = 8.6, 1H) ppm.

[0438] 실시예 37



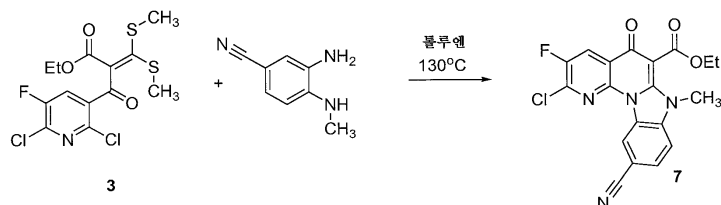
[0439]

[0440]

바이알에서, 화합물(3)(1.0당량, 202mg, 0.526mmol) 및 N-메틸-벤젠-1,2-디아민(1.0당량, 60ml, 0.528mmol)을 130℃에서 무수 톨루엔(5ml) 중에서 16시간 동안 교반하였다. 휘발성 물질을 진공하에 제거한 다음, 조악한 혼합물을 실리카겔(CH₂Cl₂ 중의 구배 0.5 내지 3% MeOH) 상의 플래시 크로마토그래피로 정제하였다. MeOH를 수득된 오일에 첨가한 다음, 순수한 화합물(5)가 침전되었다. 물질을 여과하고, 건조시켜 화합물(5)을 황색 고체(29mg, 15% 수율)로서 수득하였다. R_f = 0.26(CH₂Cl₂ 중의 5% MeOH) ; LCMS(ES): 95% 순도, m/z 374 [M+1]⁺,

376 $[M+3]^+$, 328 $[M+1-EtOH]^+$, 330 $[M+3-EtOH]^+$; 1H NMR($CDCl_3$, 500 MHz) δ 1.47(t, J = 7.0, 3H), 3.70(s, 3H), 4.50(q, J = 7.0, 2H), 7.37(dd, J = 8.1, J = 1.0, 1H), 7.44-7.51(m, 2H), 8.55(d, J = 7.6, 1H), 8.94(dd, J = 1.1, J = 8.1, 1H) ppm.

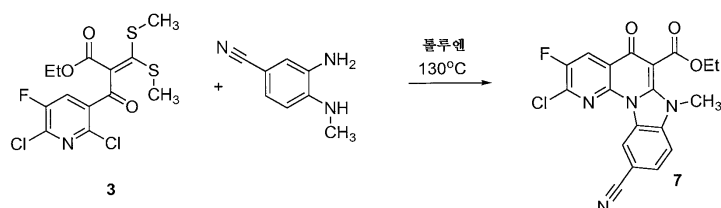
[0441] 실시예 38



[0442]

[0443] 바이알에서, 화합물(3)(1.0당량, 221mg, 0.575mmol) 및 2-아미노페놀(1.1당량, 70mg, 0.641mmol)을 130°C에서 무수 톨루엔(5ml) 중에서 6시간 동안 교반하였다. 혼합물을 냉각시킨 다음, 형성된 갈색 침전물을 여과하였다. 당해 물질을 CH_2Cl_2 중에 용해시키고, 용액 셀라이트 패드로 여과하였다. 톨루엔 중에 재결정화시켜 화합물(6)(48mg, 24% 수율)을 베이지색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 361 $[M+1]^+$, 363 $[M+3]^+$, 315 $[M+1-EtOH]^+$, 317 $[M+3-EtOH]^+$; 1H NMR($CDCl_3$, 500 MHz) 80% 순도, δ 1.46(t, J = 7.0, 3H), 4.50(q, J = 7.3, 2H), 7.48-7.54(m, 2H), 7.65(dd, J = 1.4, J = 7.9, 1H), 8.57(d, J = 7.4, 1H), 8.68(dd, J = 1.4, J = 7.9, 1H) ppm.

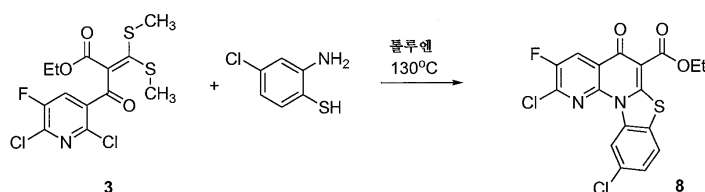
[0444] 실시예 39



[0445]

[0446] 바이알에서, 화합물(3)(1.0당량, 266mg, 0.692mmol) 및 3-아미노-4-(메틸아미노)벤조니트릴(1.0당량, 100mg, 0.689mmol)을 130°C에서 무수 톨루엔(5ml) 중에서 2일 동안 교반하였다. 용매를 증발시킨 다음, 조악한 혼합물을 실리카겔 컬럼(CH_2Cl_2 중의 MeOH 0.5 내지 3% 구배)으로 통과시켰다. 실리카겔(1mm, 2개의 플레이트, CH_2Cl_2 중의 4% MeOH) 상의 예비용 TLC로 정제하여 화합물(7)을 황색 고체(32mg, 12% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 399 $[M+1]^+$, 401 $[M+3]^+$, 353 $[M+1-EtOH]^+$, 355 $[M+3-EtOH]^+$; 1H NMR($CDCl_3$, 500 MHz) δ 1.47(t, J = 7.1, 3H), 3.72(s, 3H), 4.51(q, J = 7.3, 2H), 7.42(d, J = 8.4, 1H), 7.79(dd, J = 1.5, J = 8.4, 1H), 8.55(d, J = 7.3, 1H), 9.22(d, J = 1.4, 1H) ppm.

[0447] 실시예 40

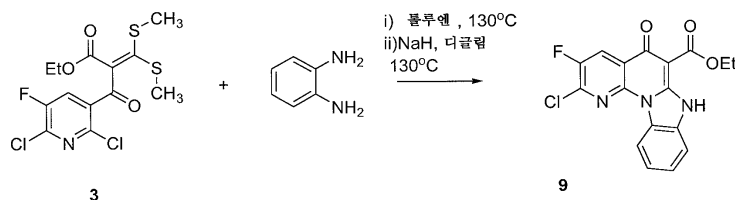


[0448]

[0449] 바이알에서, 화합물 3(1.0당량, 288mg, 0.749mmol) 및 2-아미노-4-클로로 벤젠티올(1.0당량, 120mg, 0.752mmol)을 130°C에서 무수 톨루엔(5ml) 중에서 2일 동안 교반하였다. 반응 중 형성된 고체를 여과하고, MeOH 및 CH_2Cl_2 혼합물(200ml)에 용해시켰다. 수득된 회색 용액을 셀라이트 패드로 여과하였다. 휘발성 물질을 증발시킨 다음, 물질을 실리카겔(CH_2Cl_2 다음, CH_2Cl_2 중의 0.5% MeOH) 상의 플래시 크로마토그래피로 정제하였다. 화합물(8)을 황색 고체(20mg, 6% 수율)로서 분리하였다. LCMS(ES): >85% 순도, m/z 411 $[M]^+$, 413

$[M+2]^+$, 415 $[M+4]^+$, 365 $[M-EtOH]^+$, 367 $[M+2-EtOH]^+$, 369 $[M+4-EtOH]^+$.

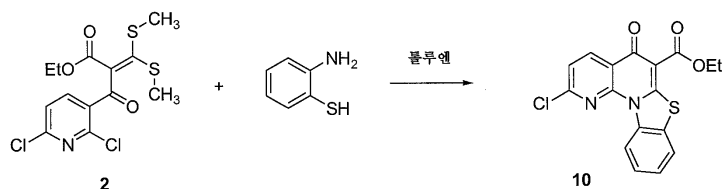
[0450] 실시예 41



[0451]

[0452] 바이알에서, 화합물(3)(1.0당량, 255mg, 0.664mmol) 및 벤젠-1,2-디아민(1.0당량, 72mg, 0.666mmol)을 130°C에서 무수 톨루엔(5ml) 중에 5시간 동안 교반하였다. 휘발성 물질을 진공하에 제거하고, 물질을 디글림(2ml)에 용해시켰다. 오일(1.0당량, 26mg, 0.63mmol) 중의 NaH 60% 현탁액을 가하고, 혼합물을 130°C에서 3시간 동안 교반하였다. 수득된 침전물을 여과하고, 물로 세척하였다. MeOH 중에서 분쇄하고, 여과한 다음, 화합물(9)을 갈색 고체(91mg, 38% 수율)로서 분리하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 360 $[M+1]^+$, 362 $[M+3]^+$; 1H NMR($CDCl_3$, 500 MHz) δ 1.44(t, J = 7.1, 3H), 4.44(q, J = 7.1, 2H), 7.40-7.46(m, 2H), 7.49(m, 1H), 8.50(d, J = 7.7, 1H), 8.81(d, J = 6.8, 1H) ppm.

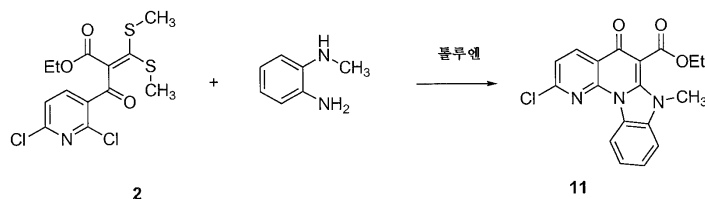
[0453] 실시예 42



[0454]

[0455] 톨루엔(300ml) 중의 비스티오에테르(2)(1.0당량, 10.14g, 27.7mmol) 용액에 2-아미노티오페놀(1.1당량, 3.81g, 30.5mmol) 및 혼합물을 일정한 질소 탈기체화하면서 밤새 환류시켰다. 그 다음, 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하고, 디이소프로필 에틸아민(1.5당량, 7.0ml, 41.55mmol)을 가하고, 혼합물을 가열하여 3시간 동안 환류시켰다. 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하고, 생성물을 여과로 수집하여 환형화된 에스테르(10)를 갈색 고체(6.6g, 66% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 359 $[M+1]^+$.

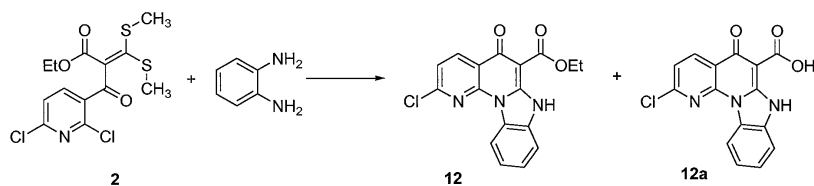
[0456] 실시예 43



[0457]

[0458] 톨루엔(150ml) 중의 비스티오에테르(2)(1.0당량, 5.0g, 13.66mmol) 용액에 N-메틸-1,2-페닐렌디아민(1.2당량, 2.0g, 16.4mmol) 및 혼합물을 질소 탈기체화하면서 밤새 환류시켰다. 그 다음, 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하고, 디이소프로필 에틸아민(1.5당량, 3.5ml, 20.75mmol)을 가하고, 혼합물을 가열하여 3시간 동안 환류시켰다. 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하고, 메탄올을 가하였다. 회전 증발기로 용적을 약 100ml로 감소시키고, 2일 동안 정치시켰다. 생성물을 여과로 수집하고, 에탄올로부터 재결정화시켜 환형화된 에스테르(11)를 갈색 고체(2.6g, 53% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 356 $[M+1]^+$.

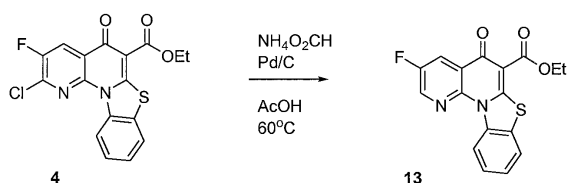
[0459] 실시예 44



[0460]

[0461] 톨루엔(300ml) 중의 비스티오에테르(2)(1.0당량, 10.14g, 27.7mmol) 용액에 1,2-페닐렌디아민(1.1당량, 3.3g, 30.5mmol)을 가하고, 혼합물을 질소 탈기체화하면서 밤새 환류시켰다. 그 다음, 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하고, 디이소프로필 에틸아민(1.5당량, 7.0ml, 41.55mmol)을 가하고, 혼합물을 가열하여 3시간 동안 환류시켰다. 혼합물을 실온으로 냉각되도록 하고, 생성물을 여과로 수집하여 환형화된 산(12a)을 갈색 고체(3.5g, 11.2mmol, 40% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 314 [M+1]⁺. 수득된 여과물을 진공하에 농축시키고, 에테르(100ml)로 분쇄하였다. 생성물을 여과로 수집하여 환형화된 에스테르(12)를 갈색 고체(3.5g, 10.3mmol, 37% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 342 [M+1]⁺.

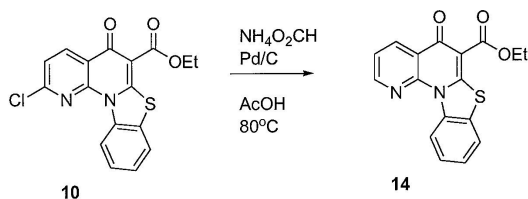
[0462] 실시예 45



[0463]

[0464] 화합물(4)(1.0당량, 1.57g, 4.17mmol)을 아세트산(15ml)에 현탁시켰다. 현탁액에 질소를 10분 동안 탈기체화시켰다. 암모늄 포르메이트(10당량, 2.63g, 41.6mmol) 및 Pd/C(10% 습윤성 데구사 타입, 2.5g)를 가하고, 혼합물을 60°C에서 3시간 동안 힘차게 교반하였다. 혼합물을 셀라이트 패드로 여과하였다. 탄소를 CH₂Cl₂, MeOH 및 아세트산의 뜨거운 혼합물로 수회 처리하여 예상된 물질의 완전한 회수를 달성하였다. 배합된 여과물을 증발시키고, CH₂Cl₂를 가하였다. 유기 상을 물로 세척하고(2x), Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 용매를 진공하에 제거하였다. 수득된 고체를 EtOAc 및 헥산 혼합물 중에서 소니케이션시키고, 여과하고, 건조시켜 순수한 화합물(13)을 회색 고체(1.11g, 78% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 343 [M+1]⁺.

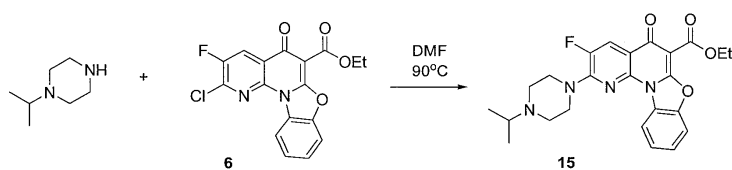
[0465] 실시예 46



[0466]

[0467] 화합물(14)을 더 높은 온도(80°C)와 더 긴 반응시간을 사용하여 생성물(13)을 위해 사용한 방법에 따라 제조하였다. 더 많은 양의 시약을 수회 가하여 변형을 완료시켰다. 화합물을 회색 고체(41mg, 15% 수율)로서 분리하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 325 [M+1]⁺.

[0468] 실시예 47



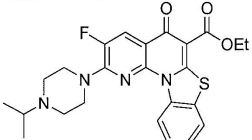
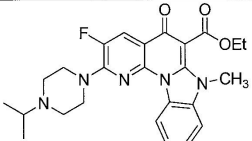
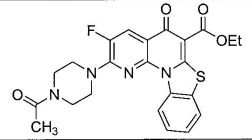
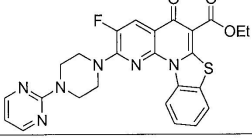
[0469]

[0470] 바이알에서, 화합물(6)(1.0당량, 13mg, 0.0360mmol) 및 N-이소프로필 피페라진(4.0당량, 21ml, 0.147mmol)을

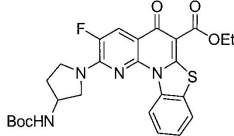
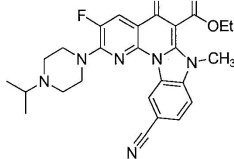
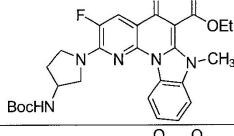
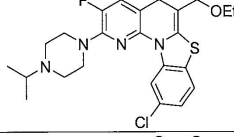
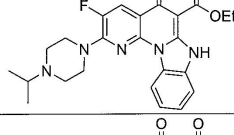
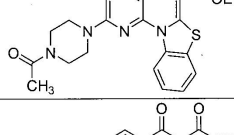
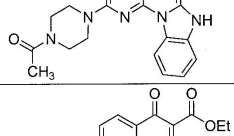
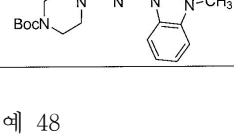
DMF(0.1ml) 중에서 90℃에서 4.5시간 동안 교반하였다. 물을 가한 후, 침전물을 여과하고, 건조시켰다. 생성물(15)을 AcOEt/헥산로 침전시켜 정제하여 베이지색 고체(7mg, 43% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): >90% 순도, m/z 453 [M+1]⁺.

[0471]

하기 동족체를 적절한 아민 및 클로로-아자벤조플루오렌온을 사용하여 동일한 방법으로 제조하였다.

| 구조 | 분자량 | LCMS (ES) m/z |
|---|--------|------------------------|
|  | 468.54 | 469 [M+1] ⁺ |
|  | 465.52 | 466 [M+1] ⁺ |
|  | 468.50 | 469 [M+1] ⁺ |
|  | 504.54 | 505 [M+1] ⁺ |

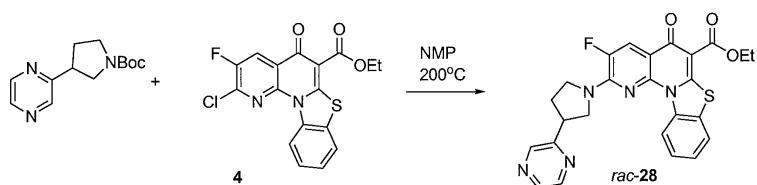
[0472]

| 구조 | 분자량 | LCMS (ES) m/z |
|---|--------|------------------------|
|  | 526.58 | 527 [M+1] ⁺ |
|  | 490.53 | 491 [M+1] ⁺ |
|  | 523.56 | 524 [M+1] ⁺ |
|  | 502.99 | 503 [M+1] ⁺ |
|  | 451.49 | 452 [M+1] ⁺ |
|  | 450.51 | 451 [M+1] ⁺ |
|  | 433.46 | 434 [M+1] ⁺ |
|  | 505.57 | 506 [M+1] ⁺ |

[0473]

[0474]

실시예 48

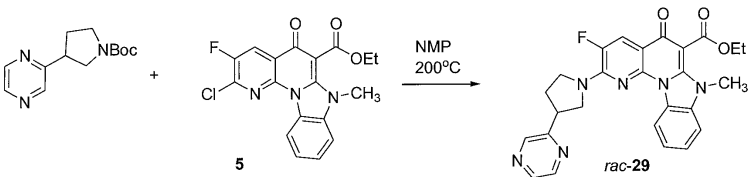


[0475]

[0476]

바이알에서, 화합물(4)(1.0당량, 14mg, 0.0372mmol) 및 라세미 3급-부틸 3-(피라진-2-일)피롤리딘-1-카복실레이트(4.0당량, 50mg, 0.160mmol)를 무수 NMP(0.2mℓ) 중에서 200℃에서 1시간 동안 교반하였다. 물을 가한 다음, 침전물을 여과하고, 건조시켰다. 당해 물질을 실리카겔(1mm 플레이트, CH₂Cl₂ 중의 4% MeOH로 2회 용리) 상의 예비용 TLC로 정제하였다. 화합물(28)을 갈색 고체(9mg, 50% 수율)로서 분리하였다. LCMS(ES): 90% 순도, m/z 490 [M+1]⁺.

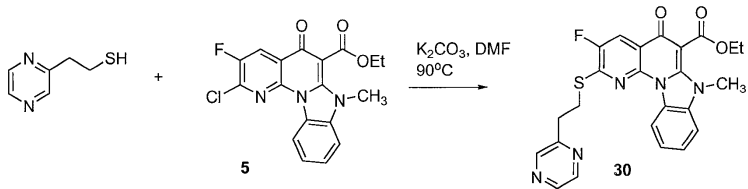
[0477] 실시예 49



[0478]

[0479] 바이알에서, 화합물 5(1.0당량, 21mg, 0.0562mmol) 및 라세미 3급-부틸 3-(피라진-2-일)피롤리딘-1-카복실레이트(4.0당량, 56mg, 0.225mmol)를 무수 NMP(0.2ml) 중에서 200℃에서 3시간 동안 교반하였다. 물을 가한 다음, 침전물을 여과하고, 건조시켰다. 당해 물질을 실리카겔(1mm 플레이트, CH₂Cl₂ 중의 5% MeOH으로 2회 용리) 상의 예비용 TLC를 사용하고 CH₂Cl₂/헥산으로 침전시켜 정제시켰다. 화합물(29)을 베이지색 고체(15mg, 55% 수율)로서 분리하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 487 [M+1]⁺.

[0480] 실시예 50



[0481]

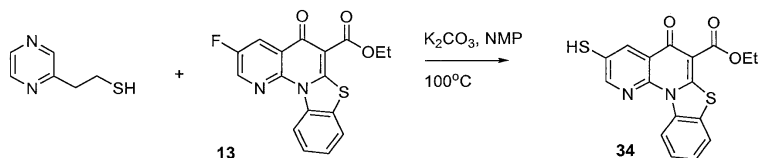
[0482] 바이알에서, 화합물(5)(1.0당량, 21mg, 0.0562mmol), 2-(피라진-2-일)에탄티올(1.1당량, 8ml, 0.0652mmol) 및 K₂CO₃(1.2당량, 9mg, 0.0651mmol)을 무수 DMF(0.2ml) 중에서 혼합하였다. 혼합물을 90℃에서 3시간 동안 교반하였다. 물을 가한 다음, 침전물을 여과하고, 건조시켰다. 당해 물질을 MeOH 중에서 분쇄하고, 여과하였다. 화합물(30)을 황색 고체(19mg, 71% 수율)로서 분리하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 478 [M+1]⁺.

[0483] 하기 동족체를 적절한 클로로-아자벤조플루오렌온을 사용하여 동일한 방법으로 제조하였다.

| 구조 | 분자량 | LCMS (ES) m/z |
|----|--------|------------------------|
| | 480.53 | 481 [M+1] ⁺ |
| | 463.58 | 464 [M+1] ⁺ |
| | 462.54 | 463 [M+1] ⁺ |

[0484]

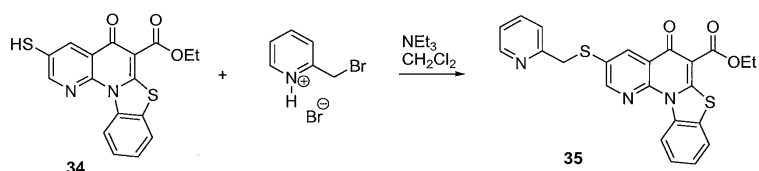
[0485] 실시예 51



[0486]

[0487] 화합물(13)(1.0당량, 266mg, 0.777mmol)을 무수 NMP(3ml) 중에 현탁시켰다. 질소를 수분 동안 혼합물 중에 발포시켰다. 2-(피라진-2-일)에탄티올(5.0당량, 0.48ml, 3.91mmol) 및 K₂CO₃(10.0당량, 1.0g, 7.23mmol)을 가하고, 반응 혼합물을 100℃에서 1시간 동안 힘차게 교반하였다. 물을 가해 모든 물질을 용해시켰다. pH를 3N 수성 HCl 용액을 가해 1 내지 2로 조절하였다. 수득된 오렌지색 침전물을 여과하고, 소량의 MeOH 중에 현탁시키고, 2회 여과하였다. 조악한 화합물(34)을 오렌지색-갈색 고체로서 분리하고, 임의의 추가 정제없이 다음 단계에서 사용하였다(188mg, 68% 수율). LCMS(ES): 80-90% 순도, m/z 357 [M+1]⁺.

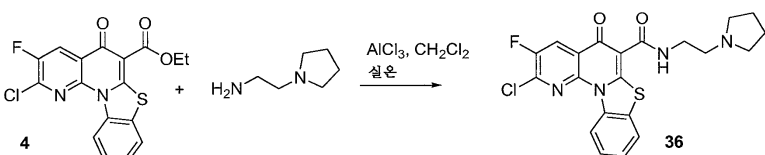
[0488] 실시예 52



[0489]

[0490] 화합물(34)(1.0당량, 188mg, 0.527mmol)을 CH₂Cl₂(4ml) 중에 현탁시켰다. 트리에틸아민(2.2당량, 0.16ml, 1.148mmol) 및 2-(브로모메틸)피리딘 브로마이드(1.2당량, 160mg, 0.6325mmol)를 가하고, 혼합물을 실온에서 15분 동안 교반하였다. 포화 수성 NaHCO₃을 가한 다음, 물질을 CH₂Cl₂(3x)로 추출하였다. 배합된 추출물을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 용매를 진공하에 제거하였다. 화합물을 예비용 HPLC로 정제하였다. 수득된 용액을 농축시키고, pH를 수성 NaOH를 가해 10으로 만들었다. 화합물(35)을 여과하고, CH₂Cl₂/헥산 혼합물 중에서 분쇄하고, 여과하여 담갈색 고체(59mg, 25%수율)를 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 448 [M+1]⁺.

[0491] 실시예 53

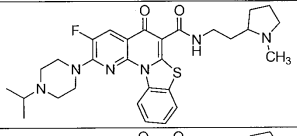
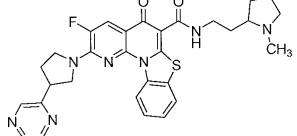


[0492]

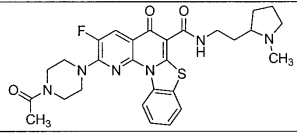
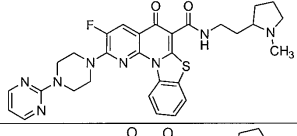
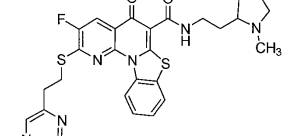
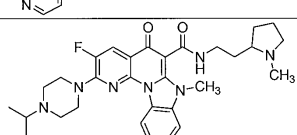
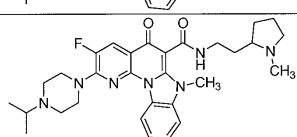
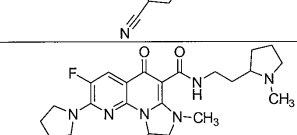
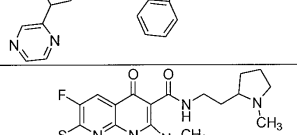
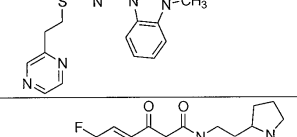
[0493] 둥근 바닥 플라스크에서, 화합물(4)(1.0당량, 1.28g, 3.397mmol) 및 2-(피롤리딘-1-일)에탄아민(2.0당량, 0.86ml, 6.786mmol)을 CH₂Cl₂(50ml) 중에서 혼합하였다. AlCl₃(1.5당량, 680mg, 5.10mmol)을 가하고, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 힘차게 교반하였다. CH₂Cl₂를 진공하에 제거한 다음, 수득된 슬러리를 포화 수성 타르타르산 용액(약 20ml)으로 처리하고, 모든 고체가 사라질 때까지(가수분해가 완료될 때까지 약 1시간 동안) 교반하였다. 물을 가하고, pH를 NaOH를 가해 14로 조절하였다. 황색 침전물을 여과하고, 물로 세척하였다. 고체를 다량의 CH₂Cl₂/MeOH 혼합물에 용해시키고, 탁한 용액 셀라이트 패드로 여과하였다. 휘발성 물질을 진공하에 제거하고, 고체 물질을 뜨거운 MeOH로 분쇄하였다. 여과하고 건조시켜 화합물(36)(1.09g, 72% 수율)을 황색 고체로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 445 [M+1]⁺; ¹H NMR(CDCl₃, 400 MHz) δ 1.84(m, 4H), 2.65(m, 4H), 2.80(t, J = 7.2, 2H), 3.68(t, J = 7.2, 2H), 7.52(td, J = 1.2, J = 7.2, 1H), 7.62(td, J = 1.2, J = 8.4, 1H), 7.81(dd, J = 0.8, J = 8.0, 1H), 8.62(d, J = 7.2, 1H), 9.49(d, J = 8.8, 1H) ppm.

[0494] 하기 화합물을 적절한 아민 및 아자벤조플루오렌온 에틸 에스테르를 사용하여 당해 방법으로 제조하였다. 당해 화합물을 대안적으로 염기성 수용액으로부터 CH₂Cl₂로 추출하여 분리하였다. 일부 화합물을 알루미늄(CH₂Cl₂ 중

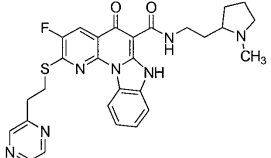
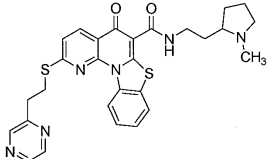
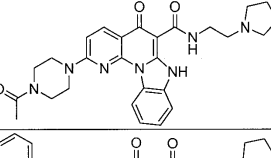
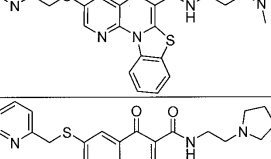
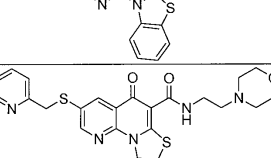
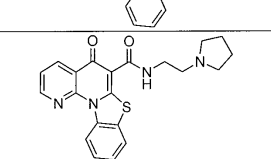
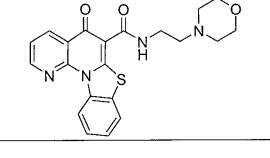

의 1 내지 5% MeOH로 용리) 상의 예비용 TLC, 예비용 HPLC 또는 EtOAc 또는 CH₂Cl₂/헥산 혼합물 중의 분획으로 정제하였다.

| 구조 | 분자량 | LCMS (ES) m/z |
|---|--------|------------------------|
|  | 550.69 | 551 [M+1] ⁺ |
|  | 571.67 | 572 [M+1] ⁺ |

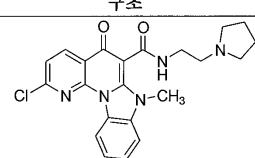
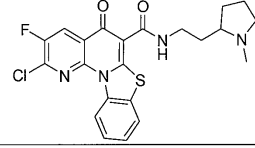
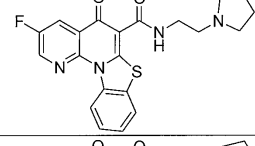
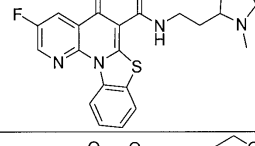
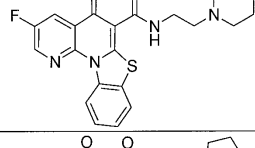
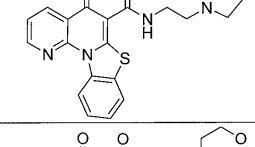
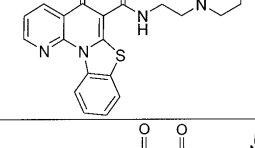
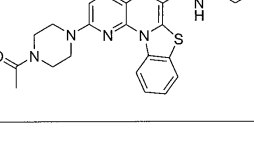
[0495]

| 구조 | 분자량 | LCMS (ES) m/z |
|---|--------|---|
|  | 550.65 | 551 [M+1] ⁺ |
|  | 586.68 | 587 [M+1] ⁺ |
|  | 562.68 | 563 [M+1] ⁺ |
|  | 547.67 | 548 [M+1] ⁺ |
|  | 572.68 | 573 [M+1] ⁺ |
|  | 568.64 | 569 [M+1] ⁺ |
|  | 559.66 | 560 [M+1] ⁺ |
|  | 585.14 | 585 [M] ⁺ , 587 [M+2] ⁺ |

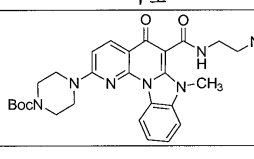
[0496]

| 구조 | 분자량 | LCMS (ES) m/z |
|---|--------|------------------------|
|  | 545.63 | 546 [M+1] ⁺ |
|  | 544.69 | 545 [M+1] ⁺ |
|  | 501.58 | 502 [M+1] ⁺ |
|  | 529.68 | 530 [M+1] ⁺ |
|  | 515.65 | 516 [M+1] ⁺ |
|  | 531.65 | 532 [M+1] ⁺ |
|  | 392.47 | 393 [M+1] ⁺ |
|  | 408.47 | 409 [M+1] ⁺ |

[0497]

| 구조 | 분자량 | LCMS (ES) m/z |
|---|--------|------------------------|
|  | 423.90 | 424 [M+1] ⁺ |
|  | 458.94 | 459 [M+1] ⁺ |
|  | 410.46 | 411 [M+1] ⁺ |
|  | 424.49 | 425 [M+1] ⁺ |
|  | 426.46 | 427 [M+1] ⁺ |
|  | 392.47 | 393 [M+1] ⁺ |
|  | 408.47 | 409 [M+1] ⁺ |
|  | 518.63 | 519 [M+1] ⁺ |

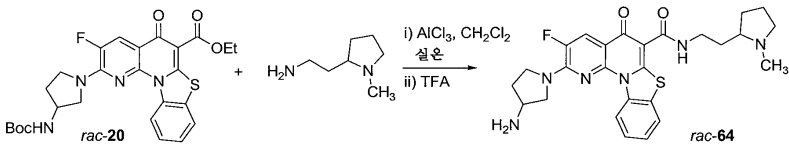
[0498]

| 구조 | 분자량 | LCMS (ES) m/z |
|---|--------|------------------------|
|  | 573.70 | 574 [M+1] ⁺ |

[0499]

[0500]

실시예 54



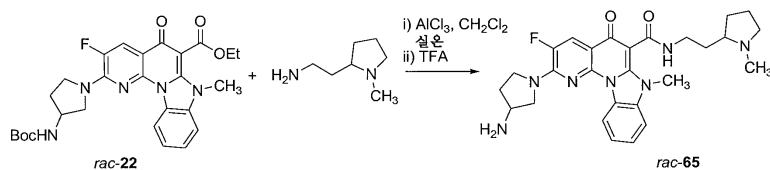
[0501]

[0502]

Boc 그룹으로 보호된 화합물(64)을 생성물(36)을 위해 사용한 과정에 따라 제조하였다. 조악한 boc-아민을 무수 트리플루오로아세트산(0.5ml)으로 45분 동안 처리하였다. 산을 중화시킨 다음, 물을 가하고, pH를 1N NaOH를 14로 조절하였다. CH₂Cl₂(4x)로 추출하고, 추출물을 물로 세척하고(1x) Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 라세미 화합물(64)을 알루미늄(1.5mm 플레이트, CH₂Cl₂ 중의 4% MeOH로 3회 추출) 상의 예비용 TLC로 정제하여 황색 고

체(6mg, 37% 수율)를 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 509 $[M+1]^+$.

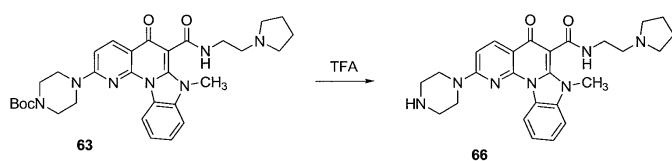
[0503] 실시예 55



[0504]

화합물(65)을 생성물(64)을 사용하는 과정에 따라 제조하였다. 화합물(65)을 알루미늄(1.5mm 플레이트, CH_2Cl_2 중의 4% MeOH 2회 용리 및 CH_2Cl_2 중의 5% MeOH 4회 용리) 상의 예비용 TLC로 정제하고, CH_2Cl_2 /헥산로부터 침전시켜 황색 고체(2.7mg, 12% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): >85% 순도, m/z 506 $[M+1]^+$.

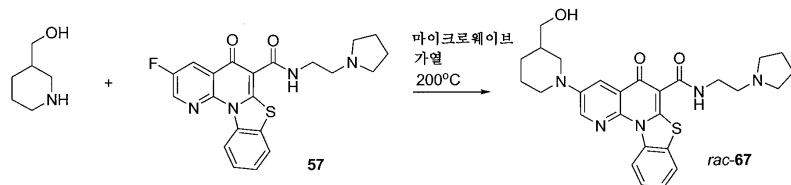
[0506] 실시예 56



[0507]

화합물(63)(300mg, 0.523mmol)을 무수 트리플루오로아세트산(2ml)에 현탁시켰다. 혼합물을 약 50℃에서 수분 동안 교반하고, 휘발성 물질을 진공하에 제거하였다. MeCN(5ml)을 가하고, 물질을 Et_2O (200ml)로 분쇄하였다. 화합물(66)을 예비용 HPLC로 정제하고, 더블 TFA 염으로 증발시켰다(215mg, 59% 수율). LCMS(ES): >95% 순도, m/z 474 $[M+1]^+$.

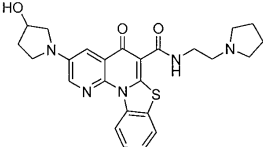
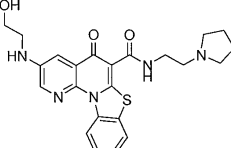
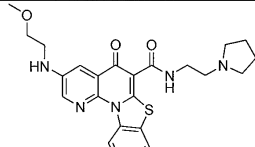
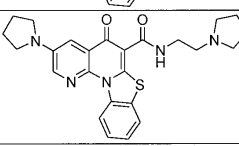
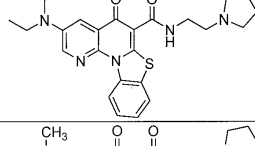
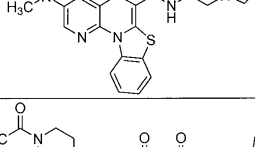
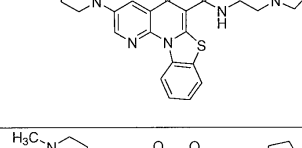
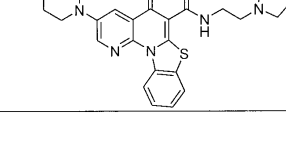
[0509] 실시예 57



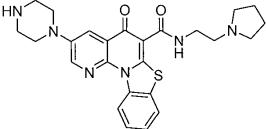
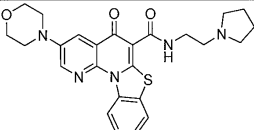
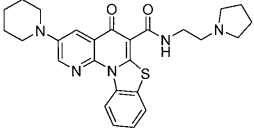
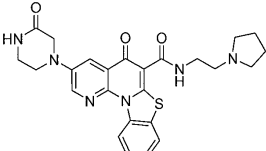
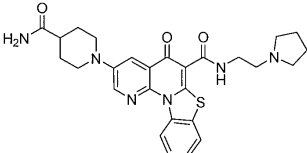
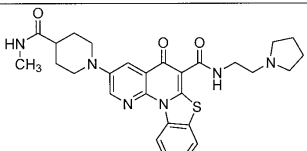
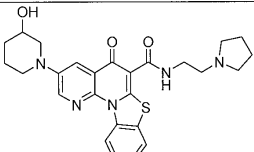
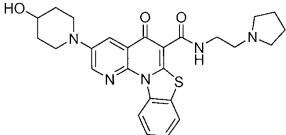
[0510]

화합물(57)(20mg)을 NMP(0.2ml) 및 라세미 피페리딘-3-일메탄올(0.2ml) 중에 현탁시켰다. 혼합물을 200℃의 마이크로웨이브에서 15분 동안 가열하였다. 예비용 HPLC로 정제한 다음, 화합물(67)의 H_2O /MeCN 용액을 진공하에 농축시키고, 포화 $NaHCO_3$ 로 pH를 9로 조절하고, 화합물 CH_2Cl_2 (4x)로 추출하였다. 배합된 추출물을 Na_2SO_4 상에 건조시키고, 용매를 진공하에 제거하였다. 수득된 고체를 $EtOAc$ /헥산 중에 분쇄하여 라세미(67)를 갈색 고체(13mg, 54% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): >95% 순도, m/z 506 $[M+1]^+$.

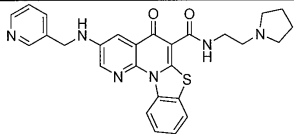
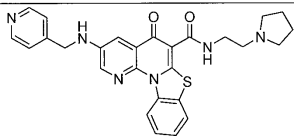
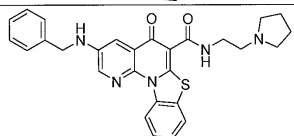
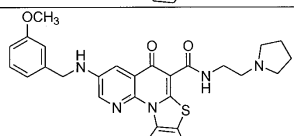
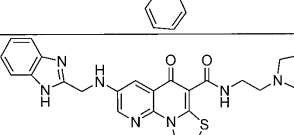
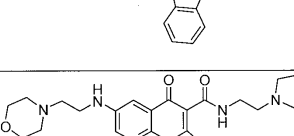
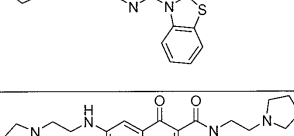
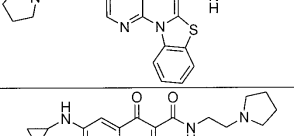
[0512] 하기 화합물을 적절한 아민 및 플루오로 아자벤조플루오렌온을 사용하여 동일한 방법으로 제조하였다. 더 작은 반응성의 아민을 사용하는 경우, 반응을 220℃에서 20분 동안 수행하였다.

| 구조 | 분자량 | LCMS (ES) m/z |
|---|--------|------------------------|
|  | 477.58 | 478 [M+1] ⁺ |
|  | 451.17 | 452 [M+1] ⁺ |
|  | 465.57 | 466 [M+1] ⁺ |
|  | 461.58 | 462 [M+1] ⁺ |
|  | 463.60 | 464 [M+1] ⁺ |
|  | 435.54 | 436 [M+1] ⁺ |
|  | 518.63 | 519 [M+1] ⁺ |
|  | 490.22 | 491 [M+1] ⁺ |

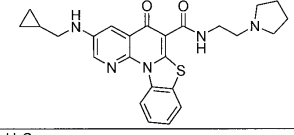
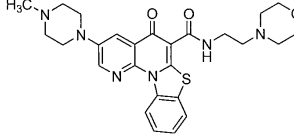
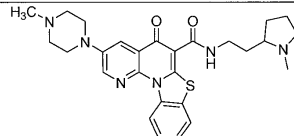
[0513]

| 구조 | 분자량 | LCMS (ES) m/z |
|---|--------|------------------------|
|  | 476.59 | 477 [M+1] ⁺ |
|  | 477.58 | 478 [M+1] ⁺ |
|  | 475.61 | 476 [M+1] ⁺ |
|  | 490.58 | 491 [M+1] ⁺ |
|  | 518.63 | 519 [M+1] ⁺ |
|  | 532.66 | 533 [M+1] ⁺ |
|  | 491.61 | 492 [M+1] ⁺ |
|  | 491.61 | 492 [M+1] ⁺ |

[0514]

| 구조 | 분자량 | LCMS (ES) m/z |
|---|--------|------------------------|
|  | 498.60 | 499 [M+1] ⁺ |
|  | 498.60 | 499 [M+1] ⁺ |
|  | 497.61 | 498[M+1] ⁺ |
|  | 527.64 | 528 [M+1] ⁺ |
|  | 537.64 | 538 [M+1] ⁺ |
|  | 520.65 | 521 [M+1] ⁺ |
|  | 504.65 | 505 [M+1] ⁺ |
|  | 447.55 | 448 [M+1] ⁺ |

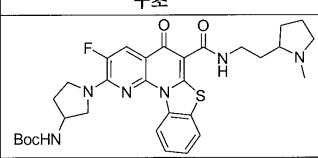
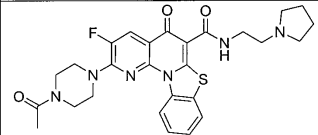
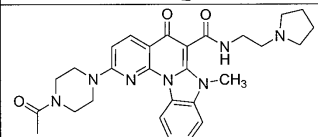
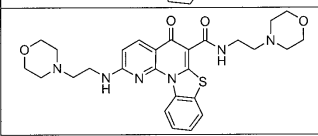
[0515]

| 구조 | 분자량 | LCMS (ES) m/z |
|---|--------|------------------------|
|  | 461.58 | 462 [M+1] ⁺ |
|  | 506.62 | 507 [M+1] ⁺ |
|  | 504.65 | 505 [M+1] ⁺ |

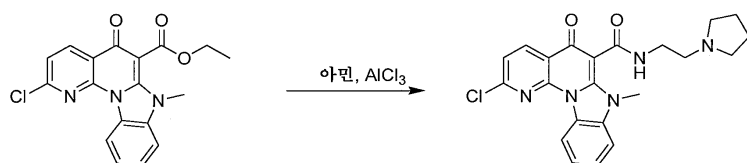
[0516]

[0517]

하기 화합물을 적절한 아민 및 클로로 아자벤조플루오렌온을 사용하여 동일한 방법으로 제조하였다. 100℃의 오븐에서 5분 동안 또는 150℃의 오븐에서 3분 동안 가열하여 수행하였다.

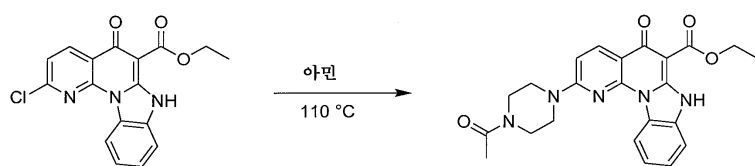
| 구조 | 분자량 | LCMS (ES) m/z |
|---|--------|------------------------|
|  | 608.73 | 609 [M+1] ⁺ |
|  | 536.62 | 537 [M+1] ⁺ |
|  | 515.61 | 516 [M+1] ⁺ |
|  | 536.65 | 537 [M+1] ⁺ |

실시예 58



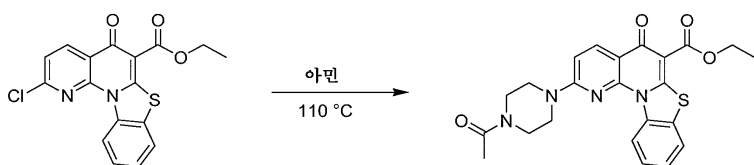
염화메틸렌(20ml) 중의 클로로에스테르(1.0g, 2.81mmol) 및 1-(2-아미노에틸) 피롤리딘(0.50g, 4.4mmol) 용액에 염화알루미늄(585mg, 4.4mmol)을 가하고, 반응물을 4시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음, 반응물을 로셀 염의 포화 용액으로 킁치고 1N NaOH으로 염기성으로 유지시키고, 추가 1시간 동안 교반하였다. 혼합물을 염화메틸렌으로 추출하고, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 용매를 진공하에 제거하였다. 수득된 조악한 고체를 에틸 아세테이트로 분쇄하여 클로로아미드를 갈색 고체(0.5g, 1.1mmol)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 437 [M+1]⁺.

실시예 59



N-메틸피롤리딘(10ml) 중의 클로로에스테르(1.0g, 2.81mmol) 용액에 N-아세틸피페라진(540mg, 4.2mmol)을 가하고, 혼합물을 110°C에서 4시간 동안 가열하였다. 물을 가하고, 조악한 생성물을 여과로 수집하였다. 수득된 고체를 염화메틸렌에 용해시키고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 용매를 진공하에 제거하였다. 수득된 조악한 고체를 에틸 아세테이트로 분쇄하여 아미노에스테르를 갈색 고체(0.70g, 1.62mmol)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 434 [M+1]⁺.

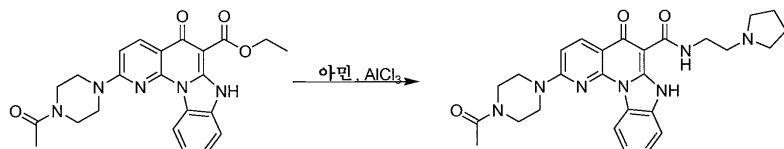
실시예 60



N-메틸피롤리딘(10ml) 중의 클로로에스테르(1.0g, 2.81mmol) 용액에 N-아세틸피페라진(540mg, 4.2mmol)을 가

하고, 혼합물을 110℃에서 4시간 동안 가열하였다. 물을 가하고, 조악한 생성물을 여과로 수집하였다. 수득된 고체를 염화메틸렌 중에 용해시키고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 용매를 진공하에 제거하였다. 수득된 조악한 고체를 에틸 아세테이트로 분쇄하여 아미노에스테르를 갈색 고체(0.75g, 1.67mmol)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 451 $[M+1]^+$.

[0528] 실시예 61

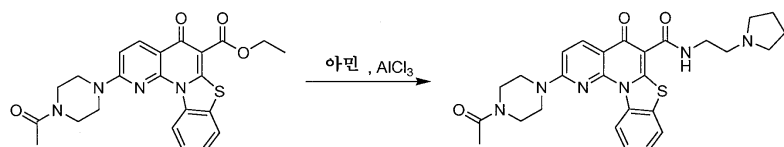


[0529]

[0530] 하기 방법을 동족체 라이브러리를 야기하는데 사용하였다.

[0531] 염화메틸렌(3mL) 중의 아미노에스테르(200mg, 0.46mmol) 및 1-(2-아미노에틸) 피롤리딘(80mg, 1.5당량) 용액에 염화알루미늄(100mg, 1.5당량)을 가하고, 반응물을 4시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음, 반응물을 로셀 염의 포화 용액으로 킨칭시키고, 1N NaOH로 염기성을 유지하고, 추가 1시간 동안 교반하였다. 혼합물을 염화메틸렌으로 추출하고, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 용매를 진공하에 제거하였다. 수득된 조악한 고체를 질량 선택성 LCMS로 정제하여 아미드를 백색 고체(71mg, 0.14mmol)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 502 $[M+1]^+$.

[0532] 실시예 62

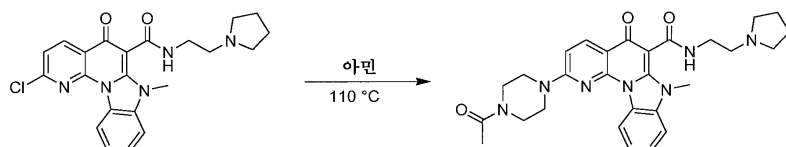


[0533]

[0534] 하기 방법을 동족체 라이브러리를 야기하는데 사용하였다.

[0535] 염화메틸렌(3mL) 중의 아미노에스테르(200mg, 0.46mmol) 및 1-(2-아미노에틸) 피롤리딘(80mg, 1.5당량) 용액에 염화알루미늄(100mg, 1.5당량)을 가하고, 반응물을 4시간 동안 실온에서 교반하였다. 그 다음, 반응물을 로셀 염의 포화 용액으로 킨칭시키고, 1N NaOH로 염기성을 유지하고, 추가 1시간 동안 교반하였다. 혼합물을 염화메틸렌으로 추출하고, 황산마그네슘 상에서 건조시키고, 용매를 진공하에 제거하였다. 수득된 조악한 고체를 질량 선택성 LCMS로 정제하여 아미드를 백색 고체(200mg, 0.38mmol)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 519 $[M+1]^+$.

[0536] 실시예 63

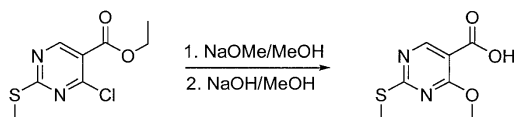


[0537]

[0538] 하기 방법을 동족체 라이브러리를 야기하는데 사용하였다.

[0539] N-메틸피롤리딘(2mL) 중의 클로로아미드(350mg, 0.83mmol) 용액에 N-아세틸피페라진(160mg, 1.24mmol)을 가하고, 혼합물을 110℃에서 4시간 동안 가열하였다. 물을 가하고, 조악한 생성물을 여과로 수집하였다. 수득된 고체를 염화메틸렌 중에 용해시키고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 용매를 진공하에 제거하였다. 수득된 조악한 고체를 에틸 아세테이트로 분쇄하여 아미드를 백색 고체(200mg, 0.4mmol)로서 수득하였다. LCMS(ES): 98% 순도, m/z 516 $[M+1]^+$.

[0540] 실시예 64

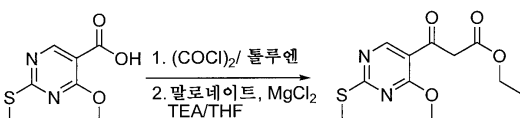


[0541]

[0542] 4-메톡시-2-(메틸티오)피리미딘-5-카복실산

[0543] MeOH(125mℓ) 중의 에틸 4-클로로-2-(메틸티오)피리미딘-5-카복실레이트(24.40g, 104.9mmol) 용액에 고체 나트륨 메톡사이드(11.40g, 211.0mmol)를 실온에서 가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 5시간 동안 교반한 다음, H₂O(100mℓ) 중의 NaOH(17.70g, 315.5mmol)로 처리하였다. 그 다음, 동일한 온도에서 추가 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 용적의 반으로 농축시킨 다음, HCl(6N)로 pH = 4로 조절하였다. 반응물을 EtOAc(5 x 200mℓ)로 추출하고, 유기 층을 염수로 세척하고(200mℓ), Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 농축시켜 목적하는 생성물을 백색 고체(19.28g, 92%)로서 수득하였다. MS(m/z): 201(MH⁺). ¹H NMR(DMSO-d⁶) δ: 8.72(s, 1H), 3.98(s, 3H), 2.54(s, 3H).

[0544] 실시예 65

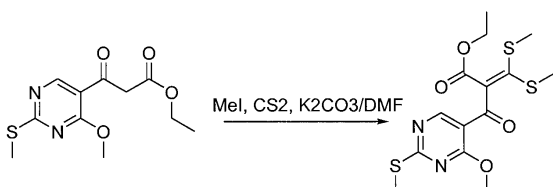


[0545]

[0546] 에틸 3-(4-메톡시-2-(메틸티오)피리미딘-5-일)-3-옥소프로판오에이트

[0547] 톨루엔(100mℓ) 중의 4-메톡시-2-(메틸티오)피리미딘-5-카복실산(10.92g, 54.6mmol) 및 옥살릴 클로라이드(19.0 mℓ, 217.8mmol) 용액을 100℃에서 1시간 동안 가열하였다. 용매를 감압하에 제거하고, 조악한 산 클로라이드를 다음 단계에서 정제없이 사용하였다. THF(100mℓ) 중의 MgCl₂(7.80g, 81.9mmol) 및 에틸 마그네슘 말로네이트(14.10g, 82.6mmol) 용액에 THF(100mℓ) 중의 상기 산 클로라이드를 가한 다음, TEA(15.0mℓ, 107.6mmol)를 가하였다. 반응 혼합물을 0℃에서 30분 동안 및 실온에서 2시간 동안 교반하였다. EtOAc(200mℓ) 및 H₂O(100mℓ)를 가하고, 추가 30분 동안 교반하였다. 층을 분리하고, 유기 층을 염수(100mℓ)로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 조악한 물질을 플래시 크로마토그래피(15% EtOAc/헥산)로 정제하여 목적하는 화합물을 백색 고체로서 수득하였다(7.73g, 52%). MS(m/z): 271(MH⁺). ¹H NMR(CDCl₃) δ: 12.65(s, 1Hx2/3), 8.85(s, 1Hx1/3), 8.84(s, 1Hx2/3), 6.03(s, 1Hx2/3), 4.26(q, 2Hx2/3), 4.19(q, 2Hx1/3), 4.10(s, 3Hx2/3), 4.09(s, 3Hx1/3), 3.92(s, 2Hx1/3), 2.60(s, 3Hx1/3), 2.59(s, 3Hx2/3), 1.34(t, 3Hx2/3), 1.26(3Hx1/3).

[0548] 실시예 66



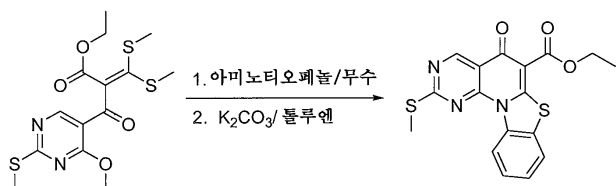
[0549]

[0550] 에틸 2-(4-메톡시-2-(메틸티오)피리미딘-5-카보닐)-3,3-비스(메틸티오)아크릴레이트

[0551] DMF(85mℓ) 중의 에틸 3-(4-메톡시-2-(메틸티오)피리미딘-5-일)-3-옥소프로판오에이트 용액에 요오드화메틸(5.3 mℓ, 85.1mmol), 이황화탄소(2.6mℓ, 43.0mmol)를 -5℃에서 가하였다. 내부 온도를 -3℃로 유지하면서 고체 K₂CO₃를 천천히 가하였다. 반응 혼합물을 -5℃에서 1시간 동안 및 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 이를 EtOAc(300mℓ)로 희석하고, H₂O(2x200mℓ)로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 용매를 감압하에 제거하고, 조악한 물질을 플래시 크로마토그래피(20% EtOAc/헥산)로 정제하여 목적하는 생성물을 황색 오일(7.60g, 71%)로서 수득하였다. MS(m/z): 375(MH⁺). ¹H NMR(CDCl₃) δ: 8.82(s, 1H), 4.16(q, 2H), 4.03(s, 3H), 2.61(s, 3H),

2.51(br s, 3H), 2.28(br s, 3H), 1.15(t, 3H).

[0552] 실시예 67

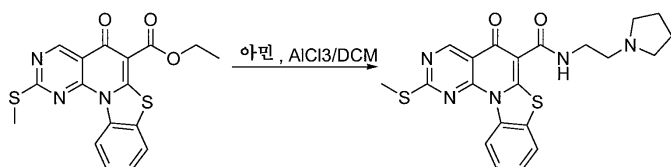


[0553]

2-메틸설파닐-5-옥소-5H-7-티아-1,3,11b-트리아자-벤조[c]플루오렌-6-카복실산 에틸 에스테르

[0554] 톨루엔(5ml) 중의 에틸 2-(4-메톡시-2-(메틸티오)피리미딘-5-카보닐)-3,3-비스(메틸티오)아크릴레이트(475mg, 1.27mmol) 및 2-아미노벤젠티올(200mg, 1.60mmol) 용액을 건조물로 가열하고, 무수 상태로 140℃에서 1시간 동안 가열하였다. 톨루엔(30ml) 및 K₂CO₃(350mg, 2.53mmol)를 반응물에 가하고, 이를 추가 1시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시키고, EtOAc(100ml) 및 H₂O(50ml)를 가하였다. 층을 분리하고, 유기 층을 (100ml)염수로 세척하고, Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 농축시켰다. 조약한 고체를 Et₂O 중에서 분쇄하여 목적하는 생성물을 황색 고체(260mg, 55%)로서 수득하였다. MS(m/z): 372(MH⁺). ¹H NMR(DMSO-d⁶) δ: 9.37(d, 1H), 9.30(s, 1H), 8.06(m, 1H), 7.65(m, 1H), 7.54(m, 1H), 4.35(q, 2H), 2.78(s, 3H), 1.34(t, 3H).

[0556] 실시예 68

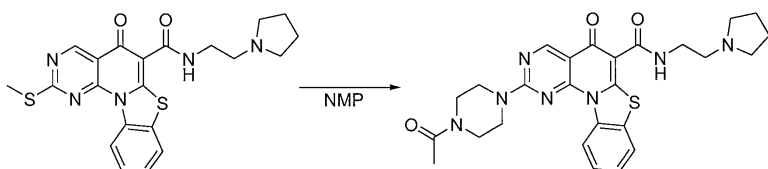


[0557]

2-메틸설파닐-5-옥소-5H-7-티아-1,3,11b-트리아자-벤조[c]플루오렌-6-카복실산(2-사이클로펜틸-에틸)-아미드

[0558] DCM(15ml) 중의 2-메틸설파닐-5-옥소-5H-7-티아-1,3,11b-트리아자-벤조[c]플루오렌-6-카복실산 에틸 에스테르(230mg, 0.619mmol) 및 2-(피롤리딘-1-일)에탄아민(0.24ml, 1.854mmol) 용액에 고체 AlCl₃(250mg, 1.875mmol)을 실온에서 가하였다. 반응물을 1시간 동안 실온에서 교반하고, DCM(100ml)로 희석하고, 농축 나트륨 칼륨 타르트레이트(30ml) 및 NaOH(6N, 10ml)를 가하였다. 혼합물을 15분 동안 교반하고, 층을 분리하였다. 수성 층을 DCM(50ml)로 추출하고, 배합된 유기층을 염수(50ml)로 세척하였다. 조약한 반응 혼합물을 Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 농축시켜 목적하는 생성물을 황색 고체(250mg, 92%)로서 수득하였다. MS(m/z): 440(MH⁺). ¹H NMR(CDC1₃) δ: 10.26(br, 1H), 9.61(s, 1H), 9.55(m, 1H), 7.77(m, 1H), 7.57(m, 1H), 7.50(m, 1H), 3.67(q, 2H), 2.81(s, 3H), 2.77(t, 2H), 2.63(m, 4H), 1.82(m, 4H).

[0560] 실시예 69

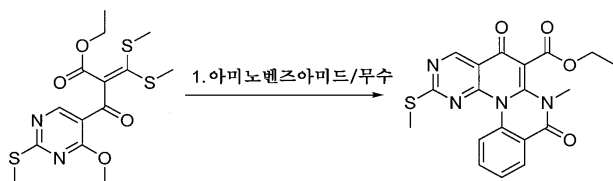


[0561]

2-(4-아세틸-피페라진-1-일)-5-옥소-5H-7-티아-1,3,11b-트리아자-벤조[c]플루오렌-6-카복실산(2-피롤리딘-1-일-에틸)-아미드

[0562] NMP(1.0ml) 중의 2-메틸설파닐-5-옥소-5H-7-티아-1,3,11b-트리아자-벤조[c]플루오렌-6-카복실산(2-사이클로펜틸-에틸)-아미드(25mg, 0.057mmol) 및 1-(피페라진-1-일)에탄온(75mg, 0.585mmol) 용액을 20분 동안 200℃의 마이크로웨이브에서 가열하였다. 조약한 반응 혼합물을 역상 HPLC로 정제하였다. MS(m/z): 520(MH⁺).

[0564] 실시예 70

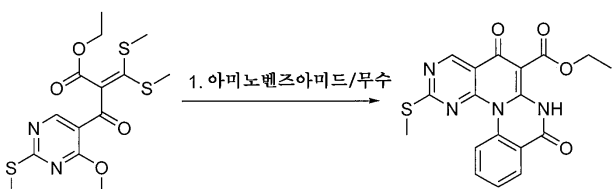


[0565]

[0566] 7-메틸-2-메틸설파닐-5,8-디옥소-7,8-디하이드로-5H-1,3,7,12b-테트라아자-벤조[c]페난트렌-6-카복실산 에틸 에스테르

[0567] 톨루엔(5mL) 중의 에틸 2-(4-메톡시-2-(메틸티오)피리미딘-5-카보닐)-3,3-비스(메틸티오)아크릴레이트(775mg, 2.069mmol) 및 2-아미노-N-메틸벤즈아미드(475mg, 3.163mmol) 용액을 질소 스트림하에 가열하여 톨루엔을 증발시키고, 무수 상태로 140℃에서 밤새 계속 가열하였다. 실온으로 냉각시키고, DCM(10mL)로부터 형성된 침전물을 여과하였다. 모액 용매를 감압하에 제거하고, Et₂O(10mL)로부터의 침전 과정으로 반복하였다. 메탄올(10mL) 중에서 분해하여 목적하는 생성물을 황색 고체(30mg, 4%)로서 수득하였다. MS(m/z): 397(MH⁺). ¹H NMR(CDCl₃) δ: 9.37(s, 1H), 8.37(d, 1H), 8.26(dd, 1H), 7.70(m, 1H), 7.49(m, 1H), 4.46(q, 2H), 3.61(s, 3H), 2.60(s, 3H), 1.43(t, 3H).

[0568] 실시예 71

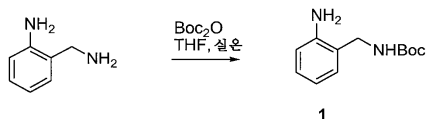


[0569]

[0570] 2-메틸설파닐-5,8-디옥소-7,8-디하이드로-5H-1,3,7,12b-테트라아자-벤조[c]페난트렌-6-카복실산 에틸 에스테르

[0571] DCM(5mL) 중의 에틸 2-(4-메톡시-2-(메틸티오)피리미딘-5-카보닐)-3,3-비스(메틸티오)아크릴레이트(250mg, 0.668mmol) 및 2-아미노벤즈아미드(118mg, 0.867mmol) 용액을 질소 스트림 상에서 가열하여 DCM을 증발시키고, 무수로 140℃에서 밤새 계속 가열하였다. 잔여물을 DMF(7mL) 중에 용해시킨 다음, 실온으로 냉각시키고, NaH(60mg, 1.500mmol)로 처리하였다. 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반하고, DCM(20mL) 및 H₂O(20mL)로 희석하였다. 층을 분리하고, DCM를 감압하에 제거하였다. 조약한 물질을 Et₂O(10mL) 중에서 분해하여 목적하는 생성물을 황색 고체(50mg, 20%)로서 수득하였다. MS(m/z): 383(MH⁺). ¹H NMR(CDCl₃) δ: 13.58(br s, 1H), 9.43(s, 1H), 8.60(d, 1H), 8.33(dd, 1H), 7.79(m, 1H), 7.59(m, 1H), 4.48(q, 2H), 2.62(s, 3H), 1.46(t, 3H).

[0572] 실시예 72

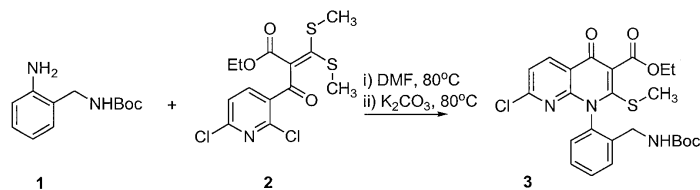


[0573]

[0574] 물질을 문헌의 방법을 살짝 변형하여 제조하였다[참조: J. Med. Chem. 2003, 46, 1661-1669]. 질소 기체하에, 2-아미노벤질아민(2.0당량, 2.45g, 20.05mmol)을 THF(25mL) 중에 용해시켰다. TFH(25mL) 중의 디-3급-부틸디카보네이트(1.0당량, 2.19g, 10.03mmol) 용액을 주사기 펌프를 통해 천천히 30분 동안 가하였다. 수분 후, THF(25mL)를 가해 점성이 있는 현탁액을 효과적으로 교반하였다. 실온에서 밤새 교반하고, 형성된 백색 고체를 여과하였다. 여과물을 진공하에 농축시키고, 실리카겔 컬럼 위 부분에 붓고, 크로마토그래피로 정제하였다(헥산 중의 10 내지 20% 구배 EtOAc). 수득된 고체를 EtOAc/헥산 중에 재결정화시켜 백색 결정질 고체(Boc₂O에 대하여 1.95g, 87% 수율)를 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 224 [M+H]⁺, 245 [M+Na]⁺; ¹H NMR(CDCl₃, 400

MHz) δ 1.44(s, 9H), 4.23(d, J = 6.0, 2H), 4.2(br s, 2H), 4.80(br s, 1H), 6.68(t, J = 7.6, 2H), 7.02(d, J = 6.8, 1H), 7.10(dt, J = 8.0, J = 1.6, 1H) ppm.

[0575] 실시예 73



[0576]

[0577] DMF(10ml) 중의 화합물(1)(1.22g, 5.49mmol) 및 (2)(2.01g, 5.49mmol) 혼합물을 80°C에서 5시간 동안 교반하고, 질소를 용액에 발포하였다. K_2CO_3 (1.2당량, 910mg, 6.58mmol)를 가하고, 혼합물을 80°C에서 40분 동안 교반하였다. 물을 가하고, 수득된 진득한 물질을 CH_2Cl_2 (3x)로 추출하였다. 배합된 추출물을 물로 세척하고 (1x), Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 휘발성 물질을 진공하에 제거하여 점성이 있는 오일(용매 함유 물질 3.2g, >100% 수율)을 수득하였다. 수득된 물질의 순도는 85% 이상이고, 추가의 정제 없이 다음 단계에서 사용하였다. 소량을 특성화를 위하여 예비용 HPLC로 정제하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 504 $[M]^+$, 506 $[M+2]^+$; 1H NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.38(s, 9H), 1.40(m, 3H), 2.32(s, 3H), 3.93(dd, J = 15.2, J = 5.5, 1H), 4.24(dd, J = 14.8, J = 4.2, 1H), 4.43(m, 2H), 4.84(br t, 1H), 7.15(m, 1H), 7.29(m, 1H), 7.45(m, 1H), 7.57(m, 2H), 8.61(d, J = 8.8, 1H) ppm.

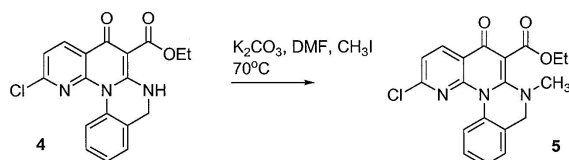
[0578] 실시예 74



[0579]

[0580] 화합물(3)(1.5g, 2.98mmol)을 트리플루오로아세트산 5ml 중에 용해시켰다. 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반 하였다. 휘발성 물질을 진공하에 제거하고, 수득된 점성이 있는 오일을 진공하에 히트 건으로 가열하였다. 당해 작용을 환형화에 의한 화합물(4)의 형성이 완료(LCMS 모니터링)될 때까지 수행하였다. 화합물을 플래시 실리카 겔(헥산 중의 30 내지 80% 구배 EtOAc) 상의 크로마토그래피로 정제하였다. 용매를 농축시켜 침전된 고체를 여과하고, 건조시켜 화합물(4)을 백색 미세결정질 고체(434mg, 41% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 356 $[M+H]^+$, 378 $[M+Na]^+$, 310 $[M+1-EtOH]^+$; 1H NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.43(t, J = 6.8, 3H), 4.40(q, J = 7.2, 2H), 4.46(d, J = 2.4, 2H), 7.24-7.40(m, 4H), 7.69(d, J = 8.4, 1H), 8.62(d, J = 8.0, 1H), 10.74(br s, 1H) ppm.

[0581] 실시예 75

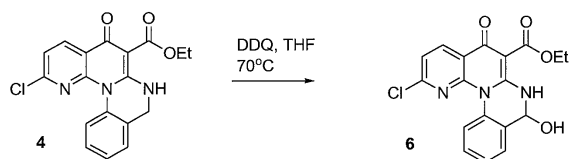


[0582]

[0583] 화합물(4)(1.0당량, 198mg, 0.556mmol) 및 K_2CO_3 (2.0당량, 154mg, 1.11mmol)을 DMF(1.5ml) 중에 현탁시켰다. 요오드메탄(1.4당량, 0.05ml, 0.80mmol)을 가하고, 혼합물을 70°C에서 45분 동안 교반하였다. 물을 가하고, 물질을 CH_2Cl_2 (3x)로 추출하였다. 배합된 추출물을 물로 세척하고, Na_2SO_4 상에 건조시키고, 휘발성 물질을 진공하에 제거하였다. 실리카겔(헥산 중의 40 내지 80% 구배 EtOAc) 상의 플래시 크로마토그래피로 정제하여, 화합물(5)을 회색 고체(181mg, 88% 수율)로서 분리하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 370 $[M+H]^+$, 324 $[M+1-EtOH]^+$; 1H NMR($CDCl_3$, 400 MHz) δ 1.41(t, J = 7.2, 3H), 3.17(s, 3H), 4.29(s, 2H), 4.41(q, J = 7.2, 2H), 7.27(d,

$J = 7.2$, 1H), 7.33(t, $J = 7.6$, 1H), 7.36(d, $J = 8.4$, 1H), 7.39(td, $J = 7.2$, $J = 1.2$, 1H), 7.57(d, $J = 8.4$, 1H), 8.61(d, $J = 8.4$, 1H) ppm.

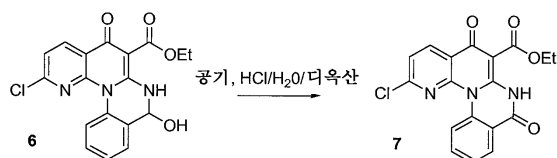
[0584] 실시예 76



[0585]

[0586] 화합물(4)(1.0당량, 104mg, 0.29mmol)을 THF 중에 현탁시켰다. THF(1mL) 중의 DDQ(1.1당량, 73mg, 0.32mmol) 용액에 적가하고, 수득된 혼합물을 70°C에서 24시간 동안 교반하였다. 1N NaOH 수용액을 가하고, 용액을 CH_2Cl_2 (4x)로 추출하였다. 배합된 추출물을 포화 NaHCO_3 수용액으로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 용매를 진공하에 제거하였다. 화합물을 예비용 HPLC(MeCN/물)로 정제하였다. MeCN을 증발시키고, NaHCO_3 을 가하고, 물질을 CH_2Cl_2 로 추출하였다. 배합된 추출물을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 용매를 진공하에 제거하여 화합물(6)을 회색 고체(18mg, 17% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 372 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 326 $[\text{M}+1-\text{EtOH}]^+$; ^1H NMR(CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.44(t, $J = 6.8$, 3H), 4.42(q, $J = 7.2$, 2H), 6.01(d, $J = 4.4$, 1H), 7.4-7.55(m, 4H), 7.98(d, $J = 8.8$, 1H), 8.64(d, $J = 8.4$, 1H), 11.53(br s, 1H) ppm.

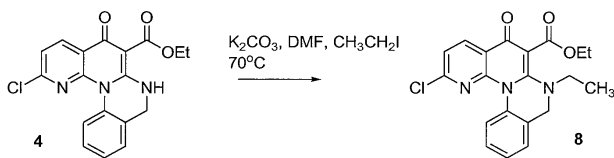
[0587] 실시예 77



[0588]

[0589] 화합물(6)(8mg, 0.021mmol)을 디옥산(0.5mL) 중에 현탁시켰다. 농축된 수성 HCl를 가하고, 수득된 황색 용액을 실온에서 교반하였다. 2시간 후, 농축된 HCl 추가 한 방울을 가하고, 공기를 용액에 발포하였다. 용액을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 용매를 진공하에 제거하고, NMP를 가하고, 화합물을 예비용 HPLC(MeCN/물)로 정제하였다. 아세트니트릴을 증발시키고, 생성물을 CH_2Cl_2 (3x)로 추출하고, 배합된 추출물을 Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. 용매를 제거하고 화합물(7)을 고체(5mg, 62% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 370 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 392 $[\text{M}+23]$, 324 $[\text{M}+1-\text{EtOH}]^+$; ^1H NMR(CDCl_3 , 400 MHz) δ 1.46(t, $J = 7.2$, 3H), 4.48(q, $J = 7.2$, 2H), 7.52(d, $J = 8.0$, 1H), 7.58(t, $J = 6.8$, 1H), 7.81(dt, $J = 6.8$, $J = 1.6$, 1H), 8.33(dd, $J = 7.6$, $J = 1.2$, 1H), 8.56(d, $J = 8.8$, 1H), 8.70(d, $J = 8.0$, 1H), 13.58(br s, 1H) ppm.

[0590] 실시예 78

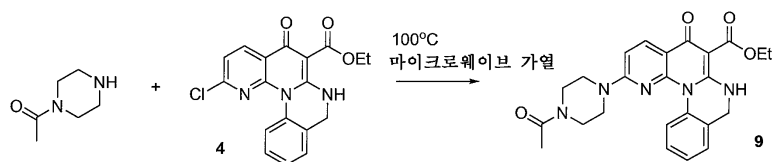


[0591]

[0592] 화합물(4)(1.0당량, 218mg, 0.613mmol) 및 K_2CO_3 (2.0당량, 169mg, 1.22mmol)을 DMF(1.5mL) 중에 현탁시켰다. 요오드메탄(1.2당량, 0.059mL, 0.74mmol)을 가하고, 혼합물을 70°C에서 35분 동안 교반하였다. 물을 가하고, 물질을 CH_2Cl_2 (4x)로 추출하였다. 배합된 추출물을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 휘발성 물질을 진공하에 제거하였다. 예비용 HPLC로 정제한 다음, 수득된 MeCN/물 용액의 pH를 NaHCO_3 을 가해 조절하고, MeCN을 증발시켰다. 물질을 CH_2Cl_2 로 추출하고, 배합된 추출물을 Na_2SO_4 상에서 건조시켰다. CH_2Cl_2 /헥산으로 침전시켜 화합물(8)을 회색 고체(77mg, 33% 수율)로서 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 384 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 406 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 338 $[\text{M}+1-$

EtOH]⁺.

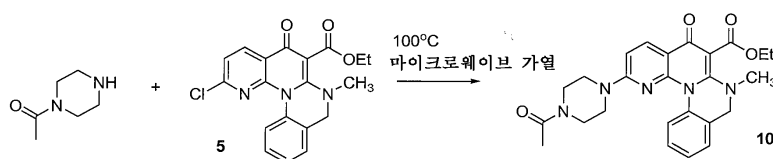
[0593] 실시예 79



[0594]

[0595] 화합물(4)(1.0당량, 110mg, 0.309mmol) 및 N-아세틸 피페라진(4.0당량, 158mg, 1.233mmol)을 NMP(0.3ml) 중에 혼합하고, 수득된 용액을 100℃의 오븐에서 5분 동안 가열하였다. EtOAc 및 헥산 혼합물을 가하고, 수득된 고체 여과하고, 건조시켰다. 화합물(9)을 회색 고체(145mg, 100% 수율)로서 분리하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 448 [M+H]⁺.

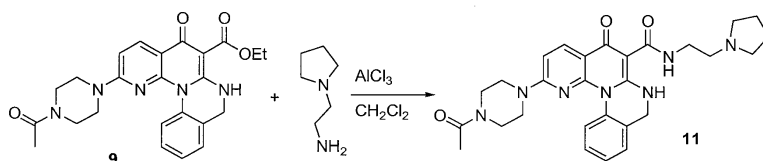
[0596] 실시예 80



[0597]

[0598] 화합물(10)을 화합물(9)의 제조에 사용한 방법에 따라 제조하였다. 화합물(10)을 회색 고체(147mg, 70% 수율)로서 분리하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 462 [M+H]⁺, 416 [M+H-EtOH]⁺.

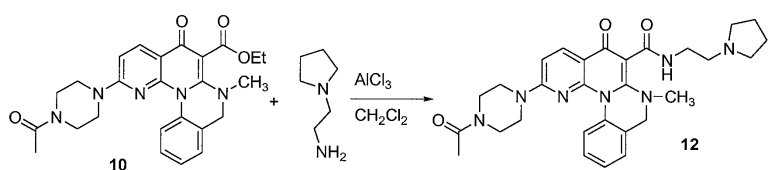
[0599] 실시예 81



[0600]

[0601] 화합물(9)(1.0당량, 131mg, 0.293mmol) 및 1-(2-아미노에틸)피롤리딘(1.5당량, 0.05ml, 0.394mmol)을 CH₂Cl₂(5ml) 중에 혼합하였다. AlCl₃(2.0당량, 80mg, 0.60mmol)을 가하고, 수득된 용액을 실온에서 험차게 교반하였다. 3시간 후, 추가의 1-(2-아미노에틸)피롤리딘 0.1ml 및 CH₂Cl₂ 2ml를 가하고, 반응물을 밤새 교반하였다. 진공하에 CH₂Cl₂를 제거한 다음, 수득된 슬러리를 포화 수성 타르타르산 용액으로 처리하고, 모든 고체가 사라질 때까지(가수분해에 약 1시간 소요) 교반하였다. 물을 가하고, NaOH를 가해 pH를 14로 조절하였다. 생성물을 CH₂Cl₂(4x)로 추출하였다. 배합된 추출물을 염수로 세척하고(1x) 및 Na₂SO₄ 상에서 건조시켰다. 용매를 제거한 다음, 조악한 물질을 NMP 및 트리플루오로아세트산 혼합물 중에 용해시키고, 예비용 HPLC(MeCN, 물)로 정제하였다. NaOH로 pH를 조절하고, MeCN로 증발시킨 다음, 물질을 CH₂Cl₂로 추출하였다. Na₂SO₄ 상에서 건조시키고, 휘발성 물질을 증발시킨 다음, 화합물(11)을 EtOAc/헥산으로 침전시키고, 여과하고, 건조시켜 백색 고체(60mg, 40% 수율)를 수득하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 516 [M+H]⁺.

[0602] 실시예 82

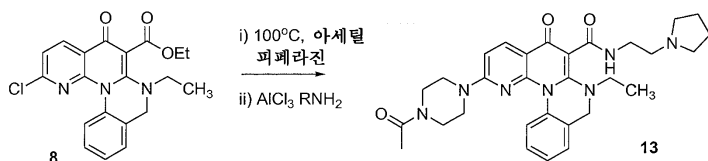


[0603]

[0604] 화합물(12)을 화합물(11)의 제조에 사용한 방법에 따라 제조하였다. 화합물(12)을 회색 고체(28mg, 17% 수율)

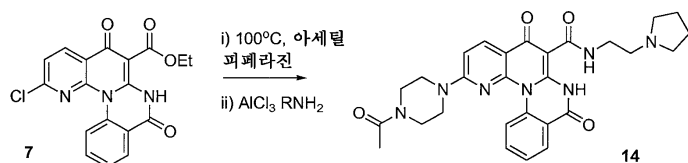
로서 분리하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 530 $[M+H]^+$.

[0605] 실시예 83



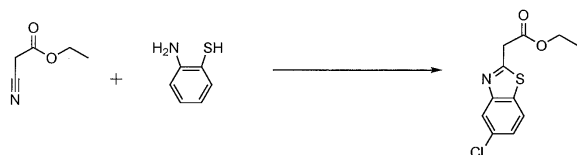
화합물(8)(1.0당량, 77mg, 0.201mmol) 및 N-아세틸 피페라진(4.0당량, 103mg, 0.803mmol)을 NMP(0.5ml) 중에서 혼합하고, 100℃의 오븐에서 10분 동안 가열하였다. 물 및 염수를 가하고, 끈적한 고체를 여과로 분리하였다. 당해 조악한 물질을 CH_2Cl_2 중에 용해시키고, 용액을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 휘발성 물질을 진공하에 제거하였다. 그 다음, 최종 반응 단계를 화합물(11)의 제조에 사용한 과정에 따라 조악한 에스테르 상에서 수행하였다. 화합물(13)을 회색 고체(7mg, 6% 수율)로서 분리하였다. LCMS(ES): 95% 순도, m/z 544 $[M+H]^+$.

[0608] 실시예 84



화합물(14)를 실시예 83에 기재된 화합물(13)의 제조방법에 따라 제조하였다. 화합물(14)를 회색 고체로서 분리하였다. LCMS(ES): 91% 순도, m/z 530 $[M+H]^+$.

[0611] 실시예 85

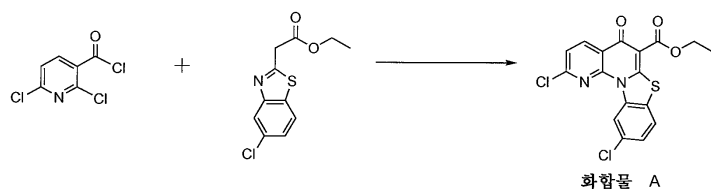


에틸 2-(4-클로로-벤조티아졸-2-일)아세테이트를 문헌[참조: Abbotto, Bradamante et. al., J. Org. Chem. 2002, 16, 5753]의 방법에 따라 제조하였다. 4-클로로-2-아미노티오펜올(6.36g, 40mmol) 및 에틸 시아노아세테이트(6.8g, 60mmol)의 무수 혼합물을 125℃에서 2시간 동안 가열하고, 이 때 TLC 분석은 반응이 완료되었음을 출발 물질의 사라짐으로 판단하였다. 혼합물을 디에틸 에테르 및 헥산으로 분쇄하여 황색 결정 7.91g을 제1 배치에서 수득하고, 결정 0.75g을 제2 배치에서 수득하여, 총 8.66g(85%)을 수득하였다. LCMS: 256.2($M+H$)⁺.



[0614]

[0615] 2,6-디클로로피콜린산(1.80g, 9.5mmol)을 디클로로메탄(10ml) 중에 현탁시키고, 옥살릴 클로라이드(1.53g, 12.0mmol)로 처리하였다. 혼합물을 빙욕에서 냉각시키고, 2 방울의 디메틸포름아미드를 가하였다. 초기 험하게 기체가 발생한 다음, 빙욕을 제거하고, 용액을 18시간 동안 실온에서 교반하였다. 분취량을 메탄올로 킨칭하고, LCMS로 분석한 결과, 모든 산이 산 클로라이드로 전환됨을 알 수 있었다. 용액을 회전 증발기에서 농축시켜 산 클로라이드를 담갈색 결정질 고체로서 수득하고, 이를 추가의 정제없이 다음 단계에서 사용하였다. LCMS: 206.2(메틸 에스테르 $M+H$)⁺.



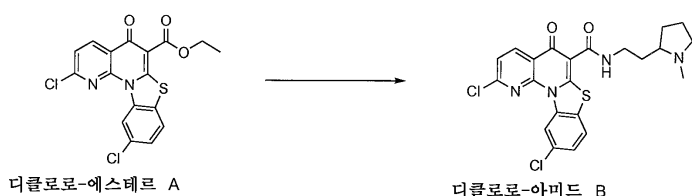
[0616]

[0617]

테트라하이드로푸란(25ml)을 이전 단계에서 수득한 에틸 2-(4-클로로-벤조티아졸-2-일)아세테이트(2.2g, 8.6mmol), 염화마그네슘(1.19g, 12.9mmol) 및 2,6-디클로로피콜리닐 클로라이드 혼합물에 가하였다. 수득된 현탁액을 빙욕에서 냉각시키고, 트리에틸아민(2.4g, 17.2mmol)을 내부 열전쌍 프로브로 측정하여 내부 온도가 10℃ 이상으로 상승하지 않는 속도로 적가하였다. 첨가가 완료된 다음, 빙욕을 제거하고, 혼합물을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 디메틸포름아미드 및 탄산칼륨(1.19g, 8.6mmol)으로 희석하고, 80℃에서 1시간 동안 가온하고, 이 때 LCMS는 반응이 완료됨을 나타내었다. 반응물을 물로 희석하고, 여과하였다. 당해 고체를 디클로로메탄 및 클로포름 혼합물에 용해시킨 다음, 물로 세척하고, 유기 상을 황산나트륨 상에서 건조시켰다. 회전 증발기에서 농축시킨 다음, 생성물을 디에틸 에테르로 정제하여 디클로로-에스테르 2.5g(74%)을 베이지색 고체로서 수득하였다. LCMS: 393.2(M+H)⁺.

[0618]

실시예 86



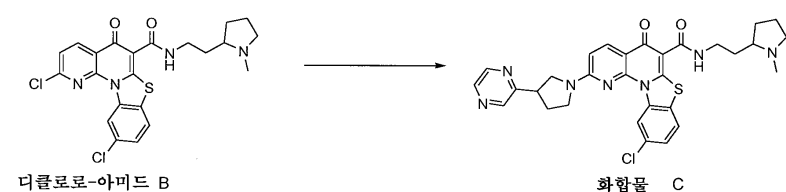
[0619]

[0620]

디클로로메탄(5ml) 중의 2-(1-메틸피롤리딘-2-일)에틸아민(295mg, 2.3mmol) 용액을 트리메틸알루미늄(0.99ml, 헥산 중의 25%, 2.37mmol)으로 처리하였다. 당해 용액을 디클로로-에스테르 A(600mg, 1.53mmol) 및 디클로로메탄(10ml)을 함유하는 용액에 내부 온도가 10℃를 넘지않는 속도로 가하였다. 용액을 18시간 동안 교반하고, 이 때 반응이 완료됨을 LCMS으로 알 수 있다. 반응물을 로셀 염으로 처리하고, 디클로로메탄으로 3회 추출하였다. 당해 유기 추출물을 황산나트륨 상에서 건조시켜 잔여물을 수득하고, 이를 디클로로메탄 및 디에틸 에테르로 분쇄하여 디클로로-아미드(B) 450mg(62%)을 베이지색 고체로서 수득하였다. LCMS: 475.5(M+H)⁺.

[0621]

실시예 87



[0622]

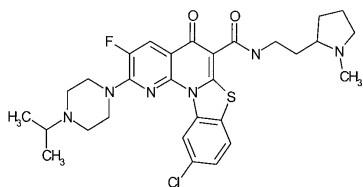
[0623]

boc-아민(250mg, 1.0mmol) 혼합물을 트리플루오로아세트산(1ml) 및 디클로로메탄(1ml)으로 50℃에서 2시간 동안 처리하여 탈보호화시켰다. 수득된 잔여물을 회전증발기에서 농축시킨 다음, 고 진공 상태에서 농축시켰다. 당해 잔여물에 디클로로-아미드(B)(200mg, 0.42mmol) 및 N-메틸 피롤리디논(0.8ml) 및 디이소프로필에틸아민(0.5ml)를 가하였다. 혼합물을 80℃에서 72시간 동안 교반하고, 이 때 LCMS는 반응이 완료되었음을 나타내었다. 혼합물을 물(10% 트리플루오로아세트산 함유)로 희석하고, 예비용 HPLC로 정제하여 화합물(C) 286mg(97%)을 상응하는 트리플루오로아세트산 염으로서 수득하였다. LCMS: 588.3(M+H)⁺.

[0624]

실시예 88

[0625] 당해 실시예는 정맥내로 투여된 시험 화합물의 활성을 평가한다,



[0626]

[0627] 방법론

[0628] 6주 된 암컷 nu/nu 마우스를 타코닉 팜스(Taconic Farms, Germantown NY)로부터 구입하였다. 이들의 오른쪽 옆구리에 5×10^6 HCT116 세포 SQ를 주사하였다. 종양의 크기가 연구에 유효한 크기에 도달할 때, 이들을 무작위로 그룹으로 나누었다.

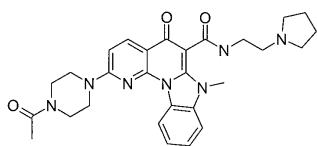
[0629] 비히클: 242.9 mm^3

[0630] 시험 화합물: 251.0 mm^3

[0631] 동물에 연속 5일 동안 옆 꼬리 정맥을 통해 볼루스 주사-IV를 투여하였다. 칼리퍼 측정을 1, 4 및 6일에 수행하였다. 도 3은 역효과가 관찰되지 않은 25 mg/kg 투여량의 시험 화합물 활성을 나타낸다.

[0632] 실시예 89

[0633] 당해 실시예는 정맥내로 투여된 시험 화합물의 활성을 평가한다.



[0634]

[0635] 방법론

[0636] 6주 된 암컷 nu/nu 마우스를 시몬센 랩스(Simonsen Labs, Gilroy, CA)로부터 구입하였다. 이들의 오른쪽 옆구리에 5×10^6 HCT116 세포 SQ를 주사하였다. 종양의 크기가 연구에 유효한 크기에 도달할 때, 이들을 무작위로 그룹으로 나누었다.

[0637] 비히클: 101.9 mm^3

[0638] 시험 화합물: 152.8 mm^3

[0639] 동물에 연속 14일 동안 옆 꼬리 정맥을 통해 볼루스 주사-IV를 투여하였다. 칼리퍼 측정을 1, 3, 5, 7, 10, 12, 14 및 18일에 수행하였다. 도 4은 역효과가 관찰되지 않은 12.5 mg/kg 투여량의 시험 화합물 활성을 나타낸다.

[0640] 실시예 90

[0641] 당해 실시예는 상이한 용량 수치로 정맥내로 투여된 실시예 89의 시험 화합물의 활성을 평가한다.

[0642] 방법론

[0643] 6주 된 암컷 nu/nu 마우스를 시몬센 랩스로부터 구입하였다. 이들의 오른쪽 옆구리에 5×10^6 HCT116 세포 SQ를 주사하였다. 종양의 크기가 연구에 유효한 크기에 도달할 때, 이들을 무작위로 그룹으로 나누었다.

[0644] 비히클: 114.6 mm^3

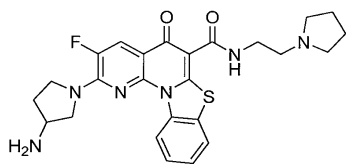
[0645] 시험 화합물: 106.1 mm^3

[0646] 시험 화합물: 84.1mm³

[0647] 동물에 연속 14일 동안 옆 꼬리 정맥을 통해 볼루스 주사-IV를 투여하였다. 칼리퍼 측정을 1, 4, 6, 8, 12 및 15일에 수행하였다. 도 5는 역효과가 관찰되지 않은 용량 의존 활성을 나타낸다.

[0648] 실시예 91

[0649] 당해 실시예는 정맥내로 투여된 시험 화합물의 활성을 평가한다.



[0650]

[0651] 방법론

[0652] 6주 된 암컷 nu/nu 마우스를 타코닉 팜스로부터 구입하였다. 이들의 오른쪽 옆구리에 5x10⁶ HCT116 세포 SQ를 주사하였다. 종양의 크기가 연구에 유효한 크기에 도달할 때, 이들을 무작위로 그룹으로 나누었다.

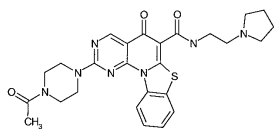
[0653] 비히클: 242.9mm³

[0654] 시험 화합물: 252.1mm³

[0655] 동물에 연속 5일 동안 옆 꼬리 정맥을 통해 볼루스 주사-IV를 투여하였다. 칼리퍼 측정을 1, 4 및 6일에 수행하였다. 도 6은 역효과가 관찰되지 않은 25mg/kg 투여량의 시험 화합물 활성을 나타낸다.

[0656] 실시예 92

[0657] 당해 실시예는 정맥내로 투여된 시험 화합물의 활성을 평가한다.



[0658]

[0659] 방법론

[0660] 6주 된 암컷 nu/nu 마우스를 타코닉 팜스로부터 구입하였다. 이들의 오른쪽 옆구리에 5x10⁶ HCT116 세포 SQ를 주사하였다. 종양의 크기가 연구에 유효한 크기에 도달할 때, 이들을 무작위로 그룹으로 나누었다.

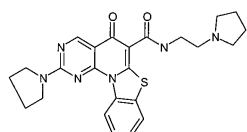
[0661] 비히클: 242.9mm³

[0662] 시험 화합물: 236.1mm³

[0663] 동물에 연속 5일 동안 옆 꼬리 정맥을 통해 볼루스 주사-IV를 투여하였다. 칼리퍼 측정을 1, 4 및 6일에 수행하였다. 도 7은 역효과가 관찰되지 않은 25mg/kg 투여량의 시험 화합물 활성을 나타낸다.

[0664] 실시예 93

[0665] 당해 실시예는 정맥내로 투여된 시험 화합물의 활성을 평가한다.



[0666]

[0667] 방법론

[0668] 6주 된 암컷 nu/nu 마우스를 타코닉 팜스로부터 구입하였다. 이들의 오른쪽 옆구리에 5×10^6 HCT116 세포 SQ를 주사하였다. 종양의 크기가 연구에 유효한 크기에 도달할 때, 이들을 무작위로 그룹으로 나누었다.

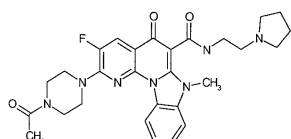
[0669] 비히클: 242.9 mm^3

[0670] 시험 화합물: 254.7 mm^3

[0671] 동물에 연속 5일 동안 옆 꼬리 정맥을 통해 볼루스 주사-IV를 투여하였다. 칼리퍼 측정을 1, 4 및 6일에 수행하였다. 도 8은 역효과가 관찰되지 않은 25 mg/kg 투여량의 시험 화합물 활성을 나타낸다.

[0672] 실시예 94

[0673] 당해 실시예에는 정맥내로 투여된 시험 화합물의 활성을 평가한다.



[0674]

[0675] 방법론

[0676] 6주 된 암컷 nu/nu 마우스를 타코닉 팜스로부터 구입하였다. 이들의 오른쪽 옆구리에 5×10^6 HCT116 세포 SQ를 주사하였다. 종양의 크기가 연구에 유효한 크기에 도달할 때, 이들을 무작위로 그룹으로 나누었다.

[0677] 비히클: 112.7 mm^3

[0678] 시험 화합물: 113.1 mm^3 25 mg/kg

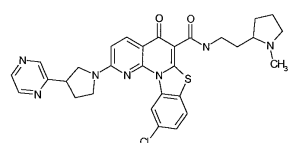
[0679] 시험 화합물: 110.1 mm^3 12.5 mg/kg

[0680] CPT11: 109.4 mm^3

[0681] 동물에 연속 9일 동안 옆 꼬리 정맥을 통해 볼루스 주사-IV를 투여하였다. 칼리퍼 측정을 1, 3, 5, 7 및 9일에 수행하였다. 도 9는 고 용량에서 제한된 활성을 나타내었고, 역효과가 관찰되지 않는 중간 용량에서는 활성을 나타내지 않았다.

[0682] 실시예 95

[0683] 당해 실시예에는 정맥내로 투여된 시험 화합물의 활성을 평가한다.



[0684]

[0685] 방법론

[0686] 6주 된 암컷 nu/nu 마우스를 타코닉 팜스로부터 구입하였다. 이들의 오른쪽 옆구리에 5×10^6 HCT116 세포 SQ를 주사하였다. 종양의 크기가 연구에 유효한 크기에 도달할 때, 이들을 무작위로 그룹으로 나누었다.

[0687] 비히클: 112.7 mm^3

[0688] 시험 화합물: 107.1 mm^3 25 mg/kg

[0689] 시험 화합물: 108.9 mm^3 12.5 mg/kg

[0690] CPT11: 109.4 mm^3

- [0691] 동물에 연속 7일 동안 옆 꼬리 정맥을 통해 볼루스 주사-IV를 투여하였다. 칼리퍼 측정을 1, 3, 5 및 7일에 수행하였다. 도 10은 최소량 의존으로 탁월한 활성을 나타내었다. 역효과는 관찰되지 않았다.
- [0692] 실시예 96
- [0693] 세포 증식 및/또는 세포독성 분석
- [0694] 본 발명의 화합물의 항증식성 효과를 하기 기재된 바와 같은 프로토콜에 따른 세포 증식 및/또는 세포독성 분석을 사용하여 시험할 수 있다.
- [0695] 세포 배양
- [0696] 인간 경부 상피 세포(HeLa 세포)를 미국 미생물 보존센터(American Type Culture Collection, Manassas, VA)로부터 획득하였다. 세포를 습윤화된 5% CO₂ 대기 및 37°C에서 2mM 글루타민, 0.1mM 비필수 아미노 산, 1mM Na 피루베이트, 1.5g/L NaHCO₃, 50mg/L 젠타미신 및 10% 소태아혈청(Hyclone, USA)으로 보충된 이글스 최소 필수 배지(MEM, Hyclone, Utah)에서 배양하였다.
- [0697] MTS 분석
- [0698] 항암 약물의 항증식성 효과를 가시 세포의 수를 측정하기 위한 색채계 분석인 세포 티터(Titer) 96 수성 분석(Promega, WI)으로 시험한다[참조: Wang, L., et al., Methods Cell Sci(1996) 18:249-255]. 일반적으로, 세포(2,000 내지 5,000 세포/웰)를 0일에서 임의의 항암 약물없이 배양 배지 100 μ l의 96 웰 보텀 플레이트(Corning, NY)에 접종하고, 배양 배지를 1일에 다양한 농도의 항암 약물을 함유하는 것으로 교환한다. 정상 성장 조건하에 3일 동안 배양한 다음(4일), 단층을 PBS로 1회 세척하고, 배지를 96 웰 플레이트 각각에서 PBS 100 μ l로 교환한다. MTS 및 PMS를 20:1 비율로 혼합한 다음, MTS/PMS 용액 20 μ l를 각 96 웰 플레이트에 가하고 4시간 동안 습윤화된 5% CO₂ 및 37°C에서 배양한다. FLUOstar 갤럭시 96 웰 플레이트 리더(비엠헤 랩테크놀로지스, 독일)를 사용하여, 490nm에서 흡수가 관찰된다.
- [0699] 실시예 97
- [0700] 세포 분석 중 mRNA 수치의 측정
- [0701] 실시간 정량 PCR(QPCR) 방법을 타겟 c-myc 및 동일한 튜브의 내인성 참조 GAPDH 유전자 사본의 변화를 검출하기 위해 사용할 수 있다. 일반적으로, 세포(15,000 세포/웰)를 96 웰 플랫 보텀 플레이트(Corning, NY)에 접종하고, 정상 성장 조건하에 밤새 배양한다. 다음 날, 배양 배지를 다양한 농도의 항암 약물을 함유하는 것으로 교환하고, 습윤화된 5% CO₂ 대기하에 37°C에서 4시간 동안 배양한다. 총 RNA(tRNA)를 RNeasy 96 Kit(QIAGEN, CA)를 사용하여 추출한다. tRNA 농도를 RiboGreen RNA 정량 시약(Molecular Probes, OR)으로 측정한다.
- [0702] 역전사(reverse-transcription: RT) 반응을 1 x TaqMan RT 버퍼, 2.5uM 랜덤 헥사머, 5.5mM MgCl₂, 0.5mM 각각의 데옥시뉴클레오사이드 트리포스페이트(dNTP), 30U 멀티스크립 리버스 트랜스크립타제(MultiScribe Reverse Transcriptase) 및 10U RNase 억제제를 함유하는 반응물 25 μ l 중에서 각 웰로부터의 tRNA 50ng을 사용하여 수행할 수 있다. RT 반응물을 10분 동안 25°C에서 배양하고, 30분 동안 48°C에서 역전사시키고, 5분 동안 95°C에서 활성화시키고, 4°C에 놓는다. 모든 RT 시약은 어플라이드 바이오시스템(CA)에서 구입할 수 있다.
- [0703] 실시간 QPCR 반응을 cDNA 5 μ l, 1x Universal PCR Master Mix, 1x c-myc 프리-디벨롭트 프라이머스(Pre-Developed Primers) 및 프로브 세트, 및 0.8 x GAPDH 프리-디벨롭트 프라이머스 및 프로브 세트를 함유하는 반응물 50 μ l 중에서 수행할 수 있다. HeLa의 GAPDH 유전자의 상대적인 방해로 인해, GAPDH 프라이머 및 프로브 농도를 일부 튜브에서 두 유전자 모두를 위한 정확한 발단 사이클(threshold cycle)(C_T)를 획득하기 위해 조절할 수 있다. 발단 사이클(C_T)은 증폭된 타겟의 양이 고정된 발단에 도달하는 분획화된 사이클 수를 나타낸다. 그렇게 함으로써, GAPDH 증폭은 c-myc의 증폭화시킬 수 있는 일반적인 반응물을 제한할 수 있기 전에 정지된다. Δ Rn 수치는 정상화된 리포터 신호로부터 기선 신호를 차감하여 나타낸다. Δ Rn은 반응이 평평한 상태에 도달할 때까지 증폭 카피 수로서 PCR 동안 증가된다.
- [0704] c-myc 프로브는 6FAMTM dye-MGB로 라벨링되고, GAPDH 프로브는 VICTM dye-MGB로 라벨링된다. 전배양을 2분 동안 50°C에서 수행하여 AmpErase UNG 효소를 활성화시킨 다음, 10분 동안 95°C에서 수행하여 AmpliTaq DNA 폴리머라제를 활성화시킨다. DNA를 95°C에서 15초 동안 및 60°C에서 1분 동안 40 사이클 증폭시킨다. 인간 c-myc 및

GAPDH cDNA를 증폭시키고, 검출하고, 실시간으로 6-FAM 및 VIC 리포터 염료를 동시에 검출하도록 설정된 ABI Prism 7000 서열 검출 시스템(어플라이드 바이오시스템, CA)을 사용하여 정량한다.

[0705] 데이터를 ABI PRISM 서열 검출 시스템 및 마이크로소프트 엑셀을 사용하여 분석한다. 상대적인 정량을 표준 커브 및 경쟁적인 C_T 방법을 동시에 사용하여 수행하고, 두 방법은 동일한 결과를 나타내었다. 증폭 플롯이 C_T 를 가로지르는 사이클은 상대적인 mRNA 수치를 정확하게 반영하는 것으로 알려져 있다[참조: Heid, et al., Genome Res.(1996) 6:986-994; Gibson, et al., Genome Res.(1996) 6:995-1001]. QPCR 반응을 각 cDNA 시료에 대해 3배로 설정하고, 3배의 C_T 수치의 평균값을 구한다. 프리-디벨롭트 프라이머 및 프로브 세트를 포함하는 모든 시약은 어플라이드 바이오시스템(CA)로부터 구입할 수 있다.

[0706] 실시예 98

[0707] 시험관내 특성화

[0708] 본 발명의 화합물의 시험관내 특성화를 위하여 다양한 방법을 사용할 수 있고, 이는, 이로써 제한되지는 않지만, i) 정지 분석; ii) 4중 가닥/2중 경쟁 분석; iii) 쿼드롬(quadrome) 풋프린트(footprint) 및 iv) 경쟁 분자의 부재하의 직접적인 분석을 포함한다.

[0709] 정지 분석

[0710] 정지 분석은 높은 처리량의 타겟 G-4중 가닥과 결합하고 이를 안정시키는 약물을 검출하는 제1-통과 스크린이다. 일반적으로, 목적하는 약물 스크리닝에 대한 "타겟" 4중 가닥의 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 DNA 주형 올리고뉴클레오타이드가 생성된다. 그 다음, 형광 라벨링된 프라이머 DNA를 주형 DNA의 3' 말단에 대해 푼다. 그 다음, DNA 폴리머라제, 예를 들면, Taq 폴리머라제를 형광 라벨링된 프라이머로부터 확장함으로써 DNA 주형 가닥의 합성을 유도한다. Taq 폴리머라제 과정이 방해받지 않는 경우, 이는 주형의 전장(full-length) 사본을 합성한다. 2중 DNA와 결합하지만 4중 가닥 부위와는 선택적으로 결합하지 않는 시험 약물의 첨가는 전장 생성물의 합성이 감소하고 다양한 길이의 DNA 카피는 증가시키는 부수적인 결과를 야기한다. 그러나, 시험 약물이 4중 가닥과 선택적으로 결합하거나 이를 안정화시키는 경우, 폴리머라제 과정은 오직 4중 가닥에 대해 정지되고, 특성화된 "정지 생성물"을 합성한다.

[0711] 화합물을 단일 농도로 먼저 스크리닝하고, "히트"를 투여량 범위에 대해 다시 분석하여 IC_{50} 수치(즉, 1:1 비율의 정지 생성물/전장 생성물을 제조하기 위해 필요한 약물 농도)를 측정한다. 이들 생성물을 모세판 전기영동으로 가시화한다.

[0712] 4중 가닥/2중 경쟁 분석

[0713] 2중 DNA에 비해 타겟 4중 가닥 서열에 대한 화합물의 선택성을 경쟁 분석(즉, "선택적인 스크리닝")을 사용하여 측정할 수 있다. 당해 선택도 스크린을 약물과 결합하기 위해 DNA 주형에서 형성된 타겟 4중 가닥 구조와 경쟁하는 외부적으로 가해진 DNA 서열의 상대적인 능력을 측정하기 위해 리포터 시스템으로써 정지 시스템을 사용한다. 예를 들면, 경쟁자는 주형 DNA에 존재하는 4중 가닥 서열과 동일한 c-myc 4중 가닥 서열, 또는 컴플렉스 계층 2중 DNA의 모조인 플라스미드 DNA이다. 각 경쟁자가 용액 중의 약물에 성공적으로 "흡수"되는 정도는 정지 생성물의 합성을 감소시키는 정량을 반영한다. 당해 방법으로, 타겟 4중 가닥 및 2중 DNA에 대한 약물의 상대적인 결합 친화력을 측정한다.

[0714] 쿼드롬 풋프린트

[0715] 화합물에 대해 또한 상이한 발암유전자 범위를 조절하는 4중 가닥 조절 요소를 포함하여 생물학적 관련성의 기타 네이티브 4중 가닥 구조와 결합할 수 있는 능력을 평가할 수 있다. 수득된 데이터를 쿼드롬 풋프린트를 생성하는데 사용한다.

[0716] 직접적인 상호작용 분석

[0717] 화합물을 핵산이 말단 소립 핵산이 아닌 4중 가닥 구조를 형성할 수 있는 핵산과 직접적으로 상호작용하는 능력을 평가할 수 있다. 당해 분석은 동일하거나 상이한 용기에서 수행할 수 있다. 예를 들면, 화합물은 동일한 용기에서 각 핵산과 접촉할 수 있다. 대안적으로, 화합물은 상이한 용기에서 시험되는 각 핵산과 별개로 접촉할 수 있다. 본원에서 사용되는 말단 소립 핵산은 염색체 말단에서 고 반복성 핵산 영역을 나타낸다. 본원에서, 직접적인 상호작용은 경쟁적 핵산의 부재하에 측정된다.

- [0718] 화합물과 핵산 사이의 상호작용은, 예를 들면, 결합 및/또는 4중 가닥 안정화를 나타내는 IC₅₀ 수치를 계산함으로써 측정할 수 있다. 상호작용의 선택도는, 예를 들면, 계산된 IC₅₀ 수치를 비교함으로써 측정될 수 있다. 예를 들면, 제일 낮은 IC₅₀ 수치는 화합물과 핵산과의 강한 상호작용을 나타내고, 가장 높은 IC₅₀ 수치는 불량한 상호작용을 나타내고, 따라서 이로써 상호작용의 선택도를 나타낸다. 반응 생성물을 모세관 전기영동으로 특성화할 수 있다.
- [0719] 실시예 99
- [0720] 직접적인 상호작용 분석
- [0721] 일반적으로, 5'-형광-라벨링된(FAM) 프라이머(P45, 15nM)를 10mM MgCl₂, 0.1mM EDTA 및 0.1mM 혼합된 데옥시뉴클레오타이드 트리포스페이트(dNTP's)를 함유하는 트리스-HCL 버퍼(15mM 트리스, pH 7.5) 중에서 주형 DNA(15nM)와 혼합한다. 혼합물을 95℃에서 5분 동안 변성시키고, 실온으로 냉각시킨 다음, 37℃에서 15분 동안 배양한다. 실온으로 냉각시킨 다음, 1mM KCl₂ 및 시험 화합물(다양한 농도)를 가하고 혼합물을 15분 동안 실온에서 배양한다.
- [0722] 프라이머 연장을 13mM KCl 및 Taq DNA 폴리머라제(2.5U/반응, Promega)를 가해 수행하고, 70℃에서 20분 동안 배양한다. 반응을 Hi-디 포름아미드 10μl와 혼합된 반응 혼합물 1μl를 가해 정지시키고, LIZ120 0.25μl를 가해 크기를 표준화시킨다. 당해 방법을 제1 단계에서 프라이머 및 주형 서열과 함께 경쟁 핵산의 다양한 농도를 첨가하여 반복한다. G-4중 가닥 결합 리간드를 1:1 비율의 정지된 생성물과 전장 생성물을 제조하기 위해 미리 측정된 농도로 가한다. 각 핵산 경쟁자를 위한 CC50를 정지 생성물 대 전장 생성물의 비율이 1:1에서 1:2로 변화하기 위하여 필요한 경쟁자의 농도로서 정의한다. 당해 분석을 위해 사용할 수 있는 4중 가닥 핵산 서열을 표 4에 기재한다.
- [0723] 표 4(정지 주형)
- [0724] TGFB3-81
- [0725] TATACGGGGTGGGGAGGGAGGGATTAGCGACACGCAATTGCTATAGTGAGTCGTATTAGCTACGTACAGTCAGTCAGACT
- [0726] HRAS-85
- [0727] TATACCGGGCGGGGCGGGGCGGGGCTTAGCGACACGCAATTGCTATAGTGAGTCGTATTAGCTACGTACAGTCAGTCAGACT
- [0728] BCL2-97(전장)
- [0729] TAGGGGCGGGCGCGGGAGGAAGGGGCGGGAGCGGGGCTGTTAGCGACACGCAATTGCTATAGTGAGTCGTATTAGCTACGTACAGTCAGTCAGACT
- [0730] HMGA-97
- [0731] TTAGAGAAGAGGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGCTTAGCGACACGCAATTGCTATAGTGAGTCGTATTAGCTACGTACAGTCAGTCAGACT
- [0732] MYC99
- [0733] TCCAATATGTATACTGGGGAGGGTGGGGAGGGTGGGAAGGTTAGCGACACGCAATTGCTATAGTGAGTCGTATTAGCTACGTACAGTCAGTCAGACT
- [0734] IMOTIF99
- [0735] TCCAATATGTATACCTTCCCCACCCTCCCCACCCTCCCCATTAGCGACACGCAATTGCTATAGTGAGTCGTATTAGCTACGTACAGTCAGTCAGACT
- [0736] Humtel-95
- [0737] TCATATATGACTACTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGGTTACTGCCACGCAATTGCTATAGTGAGTCGTATTAGCTACGTACAGTCAGTCAGACT
- [0738] SRC89
- [0739] ATGATACCGGGAGGAGGAGGAAGGAGGAAGCGCGCTGCCACGCAATTGCTATAGTGAGTCGTATTAGCTACGTACAGTCAGTCAGACT
- [0740] 프라이머:
- [0741] (45 MER)
- [0742] AGTCTGACTGACTGTACGTAGCTAATACGACTCACTATAGCAATT

- [0743] 실시예 100
- [0744] 시토크롬 P450(CYP450) 억제 분석
- [0745] 본 발명의 화합물의 시토크롬 P450 이소엔자임에 대한 강력한 억제 활성을 평가할 수 있다. 일반적으로, 50mM 인산칼륨, pH 7.4, 2.6mM NADP+, 6.6mM 포도당 6-포스페이트, 포도당 6-포스페이트 데하이드로나제/mL 0.8U 및 시험 화합물의 1:6 연속 희석물을 함유하는 용액 100mL를 함유하는 6개의 반응 튜브를 적합한 양성 대조군 억제제의 1:6 연속 희석물 튜브 6개와 함께 제조한다. 반응 튜브에 미리 가온된 효소/기질 용액 100mL를 가해 반응을 개시할 수 있다. 시간 0점 대조군 반응을 효소를 불활성화시키는 공인자 용액 100mL에 아세토니트릴 50mL를 가해 제조한 다음, 효소/기질 용액 100mL를 가한다. 억제제를 함유하지 않은 대조군 반응물을 또한 제조할 수 있다. 37℃에서 적합하게 배양한 다음, 아세토니트릴 50mL를 가해 반응을 종결시킬 수 있다. LC/MS/MS를 사용하여 프로브 기질의 대사물질 형태를 위해 반응을 분석할 수 있다.
- [0746] 실시예 101
- [0747] 종양 억압에 대한 화합물의 효능 평가
- [0748] 인간 암종의 무흉선 누드 마우스 모델에서 본 발명의 화합물의 효능을 평가하기 위한 대표적인 실험을 하기와 같이 설계할 수 있다. 연령이 5 내지 6주이고 20g 이상의 체중을 갖는 숫컷 또는 암컷 동물(마우스, Sim)(NCR, nu/nu)을 사용할 수 있다. 동물은 고의로 사육시키고, 연구 개시 시점에서 실험적으로 투약당하지 않은 것일 수 있다. 종양은 주사된 세포 또는 종양 조직의 계대로부터 증식시킨다. 사용되는 세포주는, 이로써 제한되지는 않지만, Paca-2, HPAC, Hs700T, Panc10.05, Panc 02.13, PL45, SW 190, Hs 766T, CFPAC-1 및 PANC-1를 포함한다.
- [0749] 세포 이식
- [0750] 매트릭젤(Matrigel)(콜라보레이티드 바이오메디칼 프로덕트, 인코포레이티드(Collaborative Biomedical Product, Inc, Bedford, MA))을 함유하거나 함유하지 않는 배양 배지 0.1mL 중에 현탁시킨 1,000,000 내지 10,000,000개의 세포를 60마리의 동물의 오른쪽 옆구리에 경피적으로 접종한다. 동물 당 1회 주사만 한다. 주사 후 7 내지 14일 동안 종양은 약 1.0cm³의 연구 사용 크기로 발달한다. 작은 하위 세트(10/60 미만)의 동물을 고려한다. 일련의 이식을 위해 사용하기 위하여 공여자 및 종양을 10 내지 28일 동안 1.5cm³로 성장시킨다.
- [0751] 단편 이식
- [0752] 공여자 동물을 안락사시키고, 종양을 수술적으로 절개하여 무균 기술을 사용하여 2mm³ 크기 단편으로 자른다. 이식될 동물을 이소플루란으로 가볍게 마취시킨다. 이식될 부위를 70% 알코올 및 베타딘으로 세정한다. 그 다음, 단일 단편을 투관침을 사용하여 이식한다.
- [0753] 효능 연구
- [0754] 50 내지 60마리의 종양 함유 동물 그룹을 무작위로 나눈다. 예를 들면, 대표적인 연구에서, 표 5에 기재된 바와 같이 동물을 각각 7마리를 함유하는 3 내지 8개의 그룹으로 무작위로 나눈다.

[0755] 표 5

[0756]

| 그룹 번호 | 숫컷/ 암컷 수 | 용량 수치 | 용량 용적(μ L) | 용량 용액 농도(mg/mL) | 28 내지 42일에 안락사된 수 |
|----------|-------------------|--|--|--|----------------------|
| 1 | N = 7 | 음성 대조군 * | 250 | | 모두 |
| 2 | N = 7 | 양성 대조군 ** | 10 - 400 IP 10 - 250 IV 125 - 500 PO | 2 내지 5 IP 2.5 내지 5 IV ≤ 10 PO | 모두 |
| 그룹 3 - 8 | N = 7/그룹 <56 총 | 시험 화합물 1 내지 25 IP 1 내지 50 IV 50 내지 200 PO | 10 - 400 IP 10 - 250 IV 125 - 500 PO | 2.5 내지 5 IP 2.5 내지 5 IV 10 PO | 모두 |

- [0757] * 비히클/희석제
- [0758] ** 이로써 제한되지는 않지만, 탁솔(Taxol), CPT11 및 켄시타빈을 포함하는 시중에서 구입할 수 있는 항암 화합물을 양성 대조군으로 사용할 수 있다.
- [0759] 투여 과정
- [0760] 화합물을 QD, QOD, Q3D 또는 IP를 통해 주1회, IV(옆 꼬리 정맥) 또는 PO로 투여한다. 투여 시간이 모든 그룹에 대해 유사하도록 분산하기 위하여 동물에 체계적으로 투여한다. 볼루스 IP 및 PO 투여를 위하여, 동물을 손으로 자제시킨다. IV 볼루스 투여 또는 단기간 IV 주입(1분)을 위하여, 동물을 기계적으로 차분하게 자제시킨다. 일회용 무균 주사기를 각 동물/투여에 사용한다. 약 10 내지 100mg/kg(예, 약 40mg/kg) 화학요법제, 예를 들면, 켄시타빈과 배합된 시험 화합물을 정상적으로 주 1회 IP 투여로 시험할 수 있다.
- [0761] 실시예 102
- [0762] 최대 허용 투여량의 평가
- [0763] 본 발명의 화합물의 최대 허용 투여량(MTD)을 평가하기 위한 대표적인 실험을 하기와 같이 설계한다. 동물 모델의 선택은 실시예 101에 기재된 바와 같다.
- [0764] 급성 독성 연구
- [0765] 단일 투여 후 MTD를 측정하기 위한 대표적인 연구에서, 6마리의 실험 당하지 않은 동물을, 예를 들면, 10마리(숫컷 5마리 및 암컷 5마리)를 포함하는 그룹으로 무작위로 나누고, 2개의 경로를 통한 하나의 화합물 또는 단일 경로를 통한 2개의 화합물을 받도록 한다. 단일 50mg/kg IV 용량은 허용됨을 나타내고, 예비적인 낮은 용량 수치로서 사용된다. 경구 연구를 위한 낮은 용량은 계획된 허용성을 기준으로 하고, 경우에 따라, 하향 조절될 수 있다. 용량 수치, 용량 용적 및 용량 용액 농도의 대표적인 설계를 표 6에 기재한다.

[0766] 표 6

| 그룹 번호 | 숫컷 및 암컷의 수 | 용량 수치 (mg/kg) | 용량 용적 (μ l) | 용량 용액 농도 (mg/mL) | 7일에 마취된 수 |
|-------|--------------------|-------------------------------|------------------|------------------|-----------|
| 1 | N = 5 M N = 5 F | 시험 화합물 #1 50IV 100 PO | 250 IV 500 PO | 5 IV 5 PO | 모두 |
| 2 | N = 5 M N = 5 F | 시험 화합물 #1 75IV 200 PO | 250 IV 500 PO | 8.25 IV 10 PO | 모두 |
| 3 | N = 5 M N = 5 F | 시험 화합물 #1 100 IV 300 PO | 250 IV 500 PO | 10 IV 15 PO | 모두 |
| 4 | N = 5 M N = 5 F | 시험 화합물 #2 50IV 100 PO | 250 IV 500 PO | 5 IV 5 PO | 모두 |
| 5 | N = 5 M N = 5 F | 시험 화합물 #2 75IV 200 PO | 250 IV 500 PO | 8.25 IV 10 PO | 모두 |
| 6 | N = 5 M N = 5 F | 시험 화합물 #2 100 IV 300 PO | 250 IV 500 PO | 10 IV 15 PO | 모두 |

- [0768] 아만성(SubChronic) 연구
- [0769] 반복되는 투여에 따라 용량-반응 관계를 특성화하는 대표적인 연구에서, 25마리의 실험되지 않은 동물을, 예를 들면, 표 7에 기재된 바와 같이 각각 5마리의 동물을 함유하는 그룹으로 무작위로 나눈다. 각각의 2주 연구는 이전 급성 독성 연구에서 수집된 데이터로부터 유출된 최적의 용량으로 투여하는 단일 경로로 오직 하나의 화합물을 시험한다.

[0770] 표 7

| 그룹 수 | 숫컷 또는 암컷의 수 | 용량 수치 (mg/kg) | 용량 용적 (μl) | 용량 용액 농도 (mg/mL) | 14일에서 마취된 수 |
|----------|-------------|-------------------------|-------------------------|------------------|-------------|
| 1 | N = 5 | 음성 대조군 | 250 IV 500 PO | 용량 수치에 의 존 | 모두 |
| 2 QD | N = 5 | MTD 연구에서 측정 한 시험 화합물 | 250 IV 500 PO | 용량 수치에 의 존 | 모두 |
| 3 QOD | N = 5 | MTD 연구에서 측정 한 시험 화합물 | 250 IV 500 PO | 용량 수치에 의 존 | 모두 |
| 4 Q3D | N = 5 | MTD 연구에서 측정 한 시험 화합물 | 250 IV 500 PO | 용량 수치에 의 존 | 모두 |
| 5 Q7D | N = 5 | MTD 연구에서 측정 한 시험 화합물 | 250 IV 500 PO | 용량 수치에 의 존 | 모두 |

[0772] 투여 과정

[0773] 화합물을 IV(옆 꼬리 정맥) 또는 PO를 통해 QD, QOD, Q3D 또는 Q7D로 투여한다. 투여 시간이 모든 그룹에 대해 유사하도록 분산하기 위하여 동물에 체계적으로 투여한다. 볼루스 IP 및 PO 투여를 위하여, 동물을 손으로 자제시킨다. IV 볼루스 투여 또는 단기간 IV 주입(1분)을 위하여, 동물을 기계적으로 차분하게 자제시킨다. 일회용 무균 주사기를 각 동물/투여에 사용한다.

[0774] 실시예 103

[0775] 약동학 특성의 평가

[0776] 본 발명의 화합물의 약동학 특성을 평가하기 위한 대표적인 약동학 연구를 하기와 같이 설계한다. 숫컷 동물(마우스 Balb/c 또는 랫트, SD)는 5 내지 6주이다. 랫트 모델에서, 200g 이상의 체중을 갖는 랫트를 사용한다. 대표적인 연구에서, 20마리의 동물을, 예를 들면, 표 8에 나타난 바와 같이 4개의 그룹으로 무작위로 나눈다. 처리되지 않고 시료가 사용되지 않은 하나의 그룹을 기선으로 사용한다. 기타 3개의 그룹을 정맥내 투여로 화합물의 단일 용량으로 투여한다.

[0777] 표 8

| 그룹 번호 | 동물 수 | 주사 후 시간(h) |
|-------|------|------------|
| 1 | 2 | 처리되지 않음 |
| 2 | 6 | .25, 2, 8 |
| 3 | 6 | .5, 4, 12 |
| 4 | 6 | 1, 6, 24 |

[0779] 투여 과정

[0780] 화합물을 IV(옆 꼬리 정맥), IP 또는 PO를 통해 투여한다. 투여 시간이 모든 그룹에 대해 유사하도록 분산하기 위하여 동물에 체계적으로 투여한다. 볼루스 IP 및 PO 투여를 위하여, 동물을 손으로 자제시킨다. IV 볼루스 투여 또는 단기간 IV 주입(1분)을 위하여, 동물을 기계적으로 차분하게 자제시킨다. 일회용 무균 주사기를 각 동물/투여에 사용한다.

[0781] 제1 용량의 말단 혈액 시료(0.5mL)를 상기 차트에 따른 시간점당 그룹당 2개의 동물로부터 심장 찌르기를 통해 수집하기 전에, 심장 찌르기를 통해 혈액 약 0.5mL를 처리되지 않은 동물로부터 수집한다. 모든 시료를 항응고제로서 리튬 헤파린을 함유하고 전도에 의해 즉시 혼합되는 튜브 중에 넣는다. 이들을 원심 분리하고, 혈장 플라스마를 액체 질소로 냉각시키고, -70°C 이상에서 저장시키고, 약물 수치를 분석한다.

[0782] 실시예 104

[0783] 간세포의 시험관내 대사 안정성 측정

[0784] 시험관내 배양에서 간세포(인간, 랫트, 개, 원숭이)의 존재하에 신규한 화학적 존재의 안정성을 측정하기 위한 대표적인 프로토콜을 하기와 같이 설계할 수 있다. 시험 물질을 간세포 및 적합한 배지와 함께 다양한 시간 동안

안 37℃에서 배배양한다. 반응 혼합물을 추출하고 모 화합물 및 예상되는 대사물질에 대해 LC/MS/MS로 분석한다. 경우에 따라, 시험 물질의 소비에 대한 반감기를 계산할 수 있다. 대사 대조군은 시험 물질에 대해 수득되는 반감기의 비교로 수행한다. 대사 대조군은 생체내에서 각각 세정 수치를 낮추고, 완화시키고, 높이는데 상응하는 약동학을 갖는 톨부트아미드, 데시프라민 및 날록손일 수 있다.

[0785] 대사 안정성 연구

[0786] 일반적으로, 시험 화합물의 용액을 효소 활성 참조를 제공하도록 의도된 대사 대조군의 각테일 용액과 함께 제조한다. 간세포 현탁액을 함유하는 예비 가온된 용액과 배지 대조군 용액을 배합함으로써 반응이 개시된다. 대조군 무함유 용액을 개시 후 즉시 이들 반응물로부터 취한다. 추가 시료를 적절한 시간점에서 취한다. 각각의 시료를 용액(IS를 함유하는 산성화된 MeCN)을 종결하는데 넣어 반응을 정지시킨다. 간세포 무함유 현탁액 및 시험 화합물 표준 용액을 제조한다.

[0787] 적절한 블랭크로서의 웰로서의 시험 화합물을 위한 시료 및 표준을 통상적인 시료 제조 과정으로 수행하고, 직렬 질량 측정기와 커플링된 HPLC를 사용하여 시험 화합물의 모 및/또는 대사 형태를 분석한다. 대사 대조군을 위한 시료 및 표준을 본원에 기재된 분석적 방법으로 수행한다. 크랩스 헨셀레이트(Krebs Henseleit) 버퍼를 가하고, 최종 농도 0.2% w/v로 BSA를 가하기 전, 버퍼에 5% CO₂ 공기를 실온에서 5 내지 10분 동안 발포한다. 종결 용액의 용적 및 시료 제조 방법은 방법 발달 중 시험 물질을 위해 결정될 수 있다.

[0788] 시험 물질/배지 용액

[0789] 시험 물질 용액을 공기 중 5% CO₂로 평형화된 크랩스 헨셀레이트 버퍼 중의 0.2% BSA 스톱 용액의 적절한 용적을 가함으로써 제조한다. 최종 농도를 5 μM 내지 20 μM로 하고, 반응 초기의 최종 분석 농도는 1 μM 내지 10 μM이다.

[0790] 대사 대조군/배지 용액

[0791] 톨부트아미드, 데시프라민 및 날록손 용액을 공기 중 5% CO₂로 평형화된 크랩스 헨셀레이트 버퍼 중의 0.2% BSA 용액에 각각 10mM의 스톱 용액의 적절한 용적을 가함으로써 제조한다. 최종 용적은 각 대사 대조군에서 20 μM일 수 있고, 최종 분석 농도는 반응 개시에서 10 μM이다.

[0792] 간세포 현탁액 용액

[0793] 간세포를 녹이고, 벤도르(vendor)(인비트로테크, 인코포레이티드(Invitrotech, Inc.)) 설명에 따라 분리한다. 과정의 최종 단계 중, 세포의 생존도를 트리판 블루 배제법을 사용하여 측정한다. 그 다음, 간세포를 공기 중 5% CO₂로 평형화된 크랩스 헨셀레이트 버퍼 중의 0.2% BSA에 재현탁시켜, 최종 농도가 500,000 생존 세포/mL가 되도록 한다. 반응 초기 농도는 250,000 생존 세포/mL이다.

[0794] 시험 물질 배양 개시

[0795] 동일한 용적의 단계 2.1.3에서 제조한 시험 물질 용액을 4개의 폴리프로필렌 섬광 바이알로 분산한다. 바이알을 5 내지 10분 동안 37℃에서 95% 습도 및 5% CO₂에서 미리 가온한다. 동일한 용적의 5% CO₂ 공기로 평형화된 크랩스 헨셀레이트 버퍼 중의 0.2% BSA를 2개의 바이알에 가하고, 완전히 혼합한다. 반응을 개시하자마자, 타이머를 작동시키고, 시료 100 μl를 각 바이알로부터 제거하고, 종결 용액의 적합한 양을 함유하는 1.7mL의 원심 분리 튜브에 넣는다. 이들 시료를 비효소 분해 및 용기 중의 비특이적 결합을 확인하기 위한 배지 대조군으로서 제공한다.

[0796] 상기와 같이 제조된 동량의 간세포 현탁액을 2개의 바이알에 가하고, 완전히 혼합한다. 반응을 개시하자마자, 타이머를 작동시키고, 시료 100 μl를 각 바이알로부터 제거하고, 종결 용액의 적합한 양을 함유하는 1.7mL의 원심 분리 튜브에 넣는다. 모든 바이알을 37℃, 95% 습도 및 5% CO₂로 유지되는 배양기에 넣는다.

[0797] 대사 대조군 배양 개시

[0798] 동일한 용적의 대사 대조군을 2개의 폴리프로필렌 섬광 바이알로 분산한다. 바이알을 5 내지 10분 동안 37℃에서 95% 습도 및 5% CO₂에서 미리 가온한다. 동일한 용적의 5% CO₂ 공기로 평형화된 크랩스 헨셀레이트 버퍼 중의 0.2% BSA를 2개의 바이알에 가하고, 완전히 혼합한다. 상기와 같이 제조된 동량의 간세포 현탁액을 2개의 바이알에 가하고, 완전히 혼합한다. 반응을 개시하자마자, 타이머를 작동시키고, 시료 100 μl를 각 바이알로부터

터 제거하고, 종결 용액의 적합한 양을 함유하는 1.7mL들이 원심분리 튜브에 넣는다. 모든 바이알을 37℃, 95% 습도 및 5% CO₂로 유지되는 배양기에 넣는다.

[0799] 시료 수집

[0800] 바이알을 부드럽게 진탕시키고 시료(100μL)를 제거하고, 하기의 스케줄에 따라 종결 용액의 적절한 용적을 함유하는 1.7mL들이 원심분리 튜브에 넣는다: 시험 물질 시료를 5, 10, 15, 30, 60, 90 및 120분 후에 취하고; 대사 대조군 시료를 30, 60, 90 및 120분 후 취한다. 시료를 제거하자 마자, 마지막 시료가 수집될 때까지 배양기로 다시 넣는다.

[0801] 블랭크 제조

[0802] 간세포 현탁액 시료(100μL)를 크랩스 헨셀레이트 버퍼 중의 0.2% BSA의 동일한 용적에 가하고, 완전히 혼합한다. 당해 용액의 100μL 시료를 시험 물질 반응에 사용된 종결 용액의 동일한 용적을 함유하는 1.7mL들이 원심분리 튜브에 넣는다. 배양 배지(크랩스 헨셀레이트 버퍼 중의 0.2% BSA) 시료를 시험 물질 반응에 사용된 종결 용액의 동일한 용적을 함유하는 1.7mL들이 원심분리 튜브에 넣는다.

[0803] 시료 제조 및 분석

[0804] 모든 바이알을 3분 동안 16,000g으로 원심분리한다. 상등액을 폴리프로필렌 오토샘플러 바이알에 넣고, 분석 전까지 4℃(<1일) 또는 -70℃(>1일)에 저장한다. 시험 물질 용액을 표준 방법에 따라 HPLC/MS/MS 조건을 사용하여 분석한다. 하나의 예에서, 하기 HPLC 조건을 사용한다: 컬럼(Phenomenex Synergi Hydro-RP, 100.0 x 2.0mm, 5μM); 가드 컬럼(Phenomenex C18, 4.0 x 2.0mm, 5μM); 유속(0.3mL/분); 컬럼 온도 45℃; 주사 용적 10μL 및 상온의 오토샘플러 온도

[0805] 실시예 105

[0806] 마이크로솜에서의 시험관내 대사 안정성 측정

[0807] 시험관내 배양에서 간 마이크로솜(인간, 랫트, 개, 원숭이)의 존재하에 신규한 화학적 존재의 안정성을 측정하기 위한 대표적인 프로토콜을 하기와 같이 설계할 수 있다. 시험 물질을 마이크로솜 및 적합한 배지와 함께 다양한 시간 동안 37℃에서 배양한다. 반응 혼합물을 추출하고 모 화합물 및 예상되는 대사물질에 대해 LC/MS/MS로 분석한다. 경우에 따라, 시험 물질의 소비에 대한 반감기를 계산할 수 있다. 대사 대조군은 시험 물질에 대해 수득되는 반감기의 비교로 수행한다. 대사 대조군은 생체내에서 각각 세정 수치를 낮추고, 완화시키고, 높이는데 상응하는 약동학을 갖는 톨부트아미드, 데시프라민 및 날록손일 수 있다.

[0808] 대사 안정성 연구

[0809] 일반적으로, 50mM 인산칼륨, pH 7.4, 2.6mM NADP⁺, 6.6mM 포도당 6-포스페이트, 포도당 6-포스페이트 데하이드로나제 0.8U/mL 및 시험 화합물 1, 10 또는 50μM을 함유하는 용액 100μL를 함유하는 미리 가온된 반응 바이알 6개를 제조한다. 낮고(톨부트아미드) 중간이고(데시프라민) 높은(테스토스테론) 세정 화합물을 대표하는 대사 대조군과 유사한 반응을 동일한 효소 용액으로 동시에 수행한다. 반응을 미리 가온된 효소 용액 100μL를 가함으로써 개시하고, 37℃에서 배양한다. 0시간점 반응물을 아세토니트릴(내부표준물질 함유) 50μL를 효소 용액에 가하기 전 시험 화합물/공인자 용액에 가함으로써 제조한다. 15, 30, 60, 90 및 120분 후, 반응 튜브를 수욕으로부터 제거하고 반응을 내부표준물질을 함유하는 아세토니트릴 50μL로 종결시킨다. 반응물을 추출하고, 시료를 시험 화합물의 모형태 및 하나의 대사물질을 위해 MS/MS 검출 C18 컬럼을 사용하여 분석한다. 각각의 분석을 2회 수행한다.

[0810] 보조인자/시험 화합물 용액 농도

[0811] 10mM NCE의 스톡 용액을 10% DMSO(v/v) 중에 제조한다. 모든 분석을 위해, 시험 물질의 2, 20 또는 100μM 용액을 50mM 인산칼륨, pH 7.4, 2.6mM NADP⁺, 6.6mM 포도당 6-포스페이트 및 0.8 U/mL의 포도당 6-포스페이트 데하이드로나제(보조인자 용액) 중에서 제조한다.

[0812] 보조인자/대사 대조군 용액 농도

[0813] 대사 대조군(톨부트아미드, 데시프라민 및 테스토스테론)의 스톡 용액을 단계에 설명된 공인자 용액 중의 대사 대조군의 6μM 용액을 제조하기 위해 사용한다.

- [0814] 효소 용액 농도
- [0815] 효소 용액을 간 마이크로솜을 50mM 인산칼륨, pH 7.4에 가함으로써 최종 농도 1mg/mL로 제조한다. 모든 마이크로솜은 제노테크(XenoTech) 또는 인비트로테크 인코포레이티드로부터 구입하였다.
- [0816] 반응 개시
- [0817] 모든 반응 튜브를 37°C에서 수욕에서 약 3 내지 5분 동안 가온한다. 0시간점 대조군 반응을 15.9 μ M 네불라린(nebularine)(내부표준물질)을 함유하는 아세토니트릴 50 μ l를 공인자 용액 100 μ l에 가하여 각각을 복사함으로써 제조하고, 효소를 불활성화시킨 다음, 보텍스 혼합을 수행한다. 반응을 각 튜브에 효소 용액 100 μ l를 가함으로써 개시하고, 보텍스 혼합을 수행한다. 0시간 점 대조군을 포함하여 모든 튜브는 37°C 수욕에서 배양한다. 반응이 개시된 후, 튜브 중 모든 성분의 최종 농도는 50mM 인산칼륨, pH 7.4, 1.3mM NADP⁺, 3.3mM 포도당 6-포스페이트, 0.4 U/mL의 포도당 6-포스페이트 데하이드로나제, 0.5mg/mL 간 마이크로솜 및 1, 10 또는 50 μ M 시험 물질이다.
- [0818] 반응의 종결 및 추출
- [0819] 37°C에서 15, 30, 60, 90 및 120분 후, 반응을 15.9 μ M 네불라린(내부표준물질)을 함유하는 아세토니트릴 150 μ l를 가해 종결시킨다. 0시간점 대조군을 120분 동안 수욕으로부터 제거한다. 모든 바이알을 3분 동안 16,000g로 원심분리한다. 상등액을 폴리프로필렌 오토샘플러 바이알에 넣고, 분석 전까지 4°C(<1일) 또는 -70°C(>1일)에서 저장한다.
- [0820] 시험 물질 용액의 분석
- [0821] 시험 물질 용액을 실시예 39에 기재된 바와 같은 표준 방법에 따른 HPLC/MS/MS 조건을 사용하여 분석한다.
- [0822] 실시예 106
- [0823] 박테리아 변이유발성 시험
- [0824] 당해 변이유발성 평가 분석(Ames 분석)은 시험 미생물의 계능에서 염기 변화 또는 프레임시프트 변이로 인한 티피뮤리움 종(*S. typhimurium*)에서의 히스티딘(his) 역전(his-에서 his+로) 또는 이 콜라이(*E. coli*)에서의 트립토판(trp) 역전(trp-에서 trp+로)를 유도하는 시험 물질 추출의 능력을 평가한다. 일반적으로, 플레이트 도입 분석은 5종의 살모넬라 티피뮤리움(*Salmonella typhimurium*)(TA97a, TA98, TA100, TA102 및 TA1535) 및 1종의 에스케리키아 콜리(*Escherichia coli*)(WP2-uvrA⁻)를 사용하여 외인성 포유동물 활성 시스템(S9)의 존재 및 부재하에 수행된다. 시험 물질을 5% 텍스트로스에 용해시킨다. 그 다음, 시험 직전 무균 상태에서 연속 희석물을 제조한다. 범위 찾기 연구(Range Finding Study)를 또한 한정적인 변이유발성 측정을 위한 적절한 용량을 측정하기 위한 당해 분석을 위해 수행할 수 있다.
- [0825] 시험 물질 제조
- [0826] 시험 물질의 스톡 용액을 하기에 따라 20.0mg/mL로 제조한다: 시험 물질 1.0g을 0.1 HCl 15.0mL에 1분 동안 가한다. 시험 물질을 15분 실온에서 교반한다. 다음, 탈이온수 33.0mL를 가하고 30분 동안 교반한다. 그 다음, pH를 3.53로 조절한다. 더 낮은 용량을 사용 전 당해 용액으로부터 5% 텍스트로스 중에 희석하여 제조할 수 있다. 분해 변화를 최소화하기 위하여, 시험 물질 용액을 제조 후, 투여 과정 직전까지 얼음 중에 유지한다. 시험 물질을 시험 시스템과 혼화성인 용매를 통해 시험관내로 투여한다.
- 시험 균주의 유전형 특성화
- [0827] 삭제
- [0828] 시험 균주의 워킹 스톡에 대한 유전형 마커 및 허용되는 자발적인 역전율을 확인한다. 모든 워킹 스톡을 히스티딘 또는 트립토판(이 콜라이만 적용)이 필요함을 증명하여야 한다. 추가로, 적절한 각 분석을 위해 하기를 확인할 수 있다: rfa 윌 변이로 인한 크리스탈 바이올렛에 대한 민감성; uvrB 유전자(이콜라이에서 uvrA)의 삭제로 인한 자외선에 대한 민감성; pKM101 플라스미드의 존재로 인한 암피실린에 대한 내성 및 pAQ1 플라스미드의 존재로 인한 테트라사이클린에 대한 내성. 균주의 자발적인 역전율을 음성 대조군을 사용하여 측정할 수 있다.

- [0829] 수용성인 시험 물질을 등장성 식염수 또는 기타 적합한 용매 중에 용해시킨다. 불용성 시험 물질을 디메틸설폭사이드(DMSO) 또는 기타 적합한 용매에 용해시킨다. DMSO는 시험 물질과 역반응을 유발할 수 있기 때문에, 시험 물질을 카복시메틸셀룰로오스에 현탁한다. 용해를 돕기 위하여, 가열, 격렬한 와동 또는 대안적인 용매를 사용할 수 있다.
- [0830] 시험 시스템
- [0831] 당해 분석을 Ames의 본래의 문헌[참조: Ames et al., Mutation Research(1975) 31:347-364] 및 마론(Maron) 및 아메스(Ames)의 개정된 문헌[참조: Maron et al., Mutation Research(1983) 113:173-215]에 기재된 플레이트 도입 방법에 따라 수행할 수 있다. 당해 분석은 역사적으로 히스티딘 의존 균주를 제조하기 위해 필요한 히스티딘 필요 균주의 유전자의 변이를 검출하고, 이와 같이, 트립토판 의존 균주를 제조하기 위해 필요한 트립토판 필요 균주의 유전자의 변이를 검출하는데 사용되어 왔다. 또한, 역효과와 관련된 타입의 상속되는 DNA 변이를 제조하는 화학적 MUTAGEN의 다양한 분류를 검출하기 위해 사용되어 왔다.
- [0832] 당해 분석을 위해 사용한 살모넬라 티피뮤리움 균주인 TA97a, TA98, TA100 및 TA102는 문헌[참조: Maron and Ames, supra; Green et al., Mutation Research(1976) 38:33-42]; and Brusick et al., Mutation Research(1980) 76:169-190]]에 기재되어 있다. S. 티피뮤리움 균주 TA1535 및 이콜라이 균주 Wp2-uvrA⁻를 미국 미생물 보존센터(American Type Culture Collection, Manassas, VA)로부터 수득한다(ATCC 번호: 각각 29629 및 49979). 시험 균주의 모든 위킹 스톱의 유전형 마커 및 허용되는 역전율을 확인한다. 위킹 스톱은 히스티딘 또는 트립토판(오직 이콜라이의 경우만)의 필요성을 입증하여야 한다.
- [0833] 실험 방법
- [0834] 시험 균주의 마스터 플레이트를 냉동된 위킹 스톱으로부터 제조한다. 분석에 사용되는 각 박테리아 균주를 위한 위킹 배지를 만들기 위하여, 단일 콜로니를 마스터 플레이트로부터 옥소이드 영양 브로쓰로 옮기고, 진탕하면서 37±2℃에서 0.6 내지 1.6의 광학적 밀도(650nm)가 도달될 때까지 배양한다. 이러한 밤새 배양을 변이 유발성 시험 및 유전형 확인을 위해 사용하였다. 유전형 시험을 프로토콜에 기재된 바와 같이 수행한다.
- [0835] 투여 범위 및 변이유발성 시험을 위해, 0.5% NaCl 중의 0.6% Difco 아가로 구성된 탐 아가를 용융시키고, 0.5mM L-히스티딘/0.5mM 비오틴 또는 0.5mM L-트립토판 용액을 용융된 탐 아가에 100ml 아가 당 10ml로 가한다. 보충된 아가를 튜브 당 2ml로 분취하고, 45 내지 47℃에 둔다. 처리를 위한 탐 아가의 제조를 위하여, 시험 물질 또는 대조군 0.1ml, 박테리아 배지 0.1ml 및 인완충 식염수 0.5ml를 용융된 아가에 가한다. 혼합물을 간단하게 보텍싱하고, 실온에서 최소 포도당 아가 플레이트(1.5% Difco agar, 2% 포도당, Vogel-Bonner 배지 E)에 붓는다. 대사 활성을 PBS 대신 S9 mix 0.5ml를 가함으로써 제공한다. 플레이트를 굳게한 다음, 48 내지 72시간 동안 37±2℃에서 배양한다. 모든 플레이트를 자동 화상 분석 시스템을 사용하여 계수한다. 음성 대조군 및 플레이트로 처리된 시험 물질을 박테리아 로운(lawn)의 존재하에 실험할 수 있다.
- [0836] 외인성 대사 활성화
- [0837] 당해 분석에서 사용되는 시험관내 대사 활성화 시스템은 Sprague Dawley 랫트 간 효소 및 공인자 풀을 포함한다. 효소를 아로클로르(Arochlor)로 처리된 랫트로부터의 간 마이크로솜(S9 분획)에 함유시켜 보다 활성인 형태로 화학물질을 변형할 수 있는 효소의 생성을 유도한다. 사용 직전에, S9를 넣고, 보조인자 풀과 혼합하여 pH 7.4의 포스페이트 버퍼 200mM 중의 5% S9, 5mM 포도당 6-포스페이트, 4mM 니코틴-아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트, 8mM MgCl₂ 및 33mM KCl를 함유한다.
- 용량 수준 및 복제
- [0838] 삭제
- [0839] 시험 물질은 5개의 용량 수준(20.0, 10.0, 5.0, 2.5 및 1.25mg/mL)으로 적절한 비히클(5% 텍스트로스) 및 양성 대조군과 함께 용량 범위 분석에서 3배로 시험한다. 이는 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 및 0.125mg/플레이트와 동일하다.
- [0840] 정확한 분석을 위하여, 3개의 용량 수준(10.0, 10.0 및 5.0mg/mL)을 선택하고, 이는 2.0, 1.0 및 0.5mg/플레이트와 동일하다. 음성 및 양성 대조군을 포함하는 모든 처리는 대사 활성화의 존재 및 부재하에 시험 균주

TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535 및 WP2-uvrA⁻에 대해 3배로 플레이팅한다. 당해 용량은 시험 물질의 독성의 유도 및 적용된 용량의 최대화를 기준으로 선택된다.

[0841] 대조군 성분

[0842] 표 9에 기재된 바와 같은 대조군 성분을 제조하고 변이유발성 분석에 사용한다.

[0843] 표 9

| 대조군 | 균주 | 농도 |
|-------------------------|-----------------------|-------------------|
| ICR-191 아크리딘 (Acridine) | TA97a | 1.0 μ g/플레이트 |
| 2-니트로플루오렌 | A98 | 10.0 μ g/플레이트 |
| 나트륨 아지드 | TA100 및 TA1535 | 1.5 μ g/플레이트 |
| 1-메틸-3-니트로-1-니트로 소그나닌 | WP2-uvrA ⁻ | 4.0 μ g/플레이트 |
| 2-아미노안트라센 | 모든 균주(TA1535 제외) | 10.0 μ g/플레이트 |
| 2-아미노안트라센 | TA1535 | 1.6 μ g/플레이트 |

[0845] 음성(비히클) 대조군

[0846] 시험 균주를 S9를 함유하거나 함유하지 않고 반응하는 최대 농도(0.1ml)로 처리되지 않은 텍스트로스 용액에 플레이팅한다. 당해 플레이트는 음성 대조군으로서 제공되고, 배경 공간 및 복귀변이 콜로니 형성으로 여겨지는 정보를 제공한다.

[0847] 용량 범위 분석

[0848] 초기 용량 범위 분석은 2.0mg/플레이트의 최대 농도로 시작한다. 1:2 연속 희석으로 4개의 낮은 용량이 시험된다.

[0849] 역 변이 분석

[0850] S9를 함유하거나 하지 않는 각각의 분리된 박테리아 균주를 자신과 동시에 양성 및 비히클 대조군과 함께 분리 실험으로 고려된다. 모든 플레이트를 자동 콜로니 계수로 측정하고, 데이터를 출력한다. 양성 대조군은 직접-활성 유사제 및 유사제 필요 대사 변형으로 구성된다. 2배 이상 증가된 역전율이 적절한 대조군을 갖는 모든 균주로부터 관찰될 수 있다. 각각의 균주에 대한 음성 대조군 물질 역전율은 실험 역사 데이터로부터 예상된 수치 이내거나 좀 더 낮아야 한다. 임의의 균주에 대해 유도된 양성 결과는 음성 대조군 수치에 비해 플레이트당 복귀변이 수에 있어 2배 이상 증가시키는 것으로 입증된다.

[0851] 실시예 107

[0852] CHO 세포 중의 시험관내 염색체 변이 분석

[0853] 염색체 변이 분석을 이의 잠재적인 유전자 독성을 위한 물질을 스크리닝하기 위하여 사용할 수 있는 몇개의 시험관내 시험 중 하나일 수 있다. 염색체 변이는 발암과 관련된 변이이다. 따라서, 염색체 변이 분석은 강력한 유사제 및 발암물질을 시험하는 것과 관련이 있다[참조: Galloway et al., Environ. Mut.(1985) 7:1-51; Galloway et al., Environ. Mut.(1987) 10:1-175]. 당해 염색체 변이 분석은 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO)에서 손상을 유도하는 시험 물질 추출물의 능력을 평가한다. 당해 시험은 3개의 처리 기간 동안 외인성 포유동물 활성화 시스템(S9)의 존재 및 부재 중에 수행될 수 있다. 모든 음성 대조군 처리된 제형은 정상적인 수치의 동시적으로 발생하는 변이를 입증하는 반면, 양성 대조군 처리된 배지는 변이 염색체에서 극적인 용량 의존성을 나타낸다.

[0854] 시험 물질이 클래스토젠성(clastogenic)인 경우, 즉, 염색체를 분해할 수 있는 능력을 갖는지 여부를 측정하는 대표적인 분석은 하기와 같이 설계된다. 클래스토젠성은 특정한 발암유전자(예, myc)가 활성화되고 특정한 종양 억제 유전자(예, 레티노블라스토마를 억제하는 것들)를 불활성화시키는 중요한 엔드포인트이다. 당해 시험에서, 포유동물 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포를 시험 물질에 노출시키고, 스피들 독소를 사용하여 중기(metaphase) 중에 블록킹시킨다. 염색체의 가시화를 하이포텐 스웰링, 고정화 및 처리된 CHO 세포의 염색을 통해 현미경적으로 수행할 수 있다. 염색체 분해를 유도할 수 있는 제제는 발암물질이 될 높은 확률을 갖고, 또한 상속가능한 염색체 결함을 유도할 수 있는 가능성을 갖는다.

- [0855] CHO-K₁ 세포주(ATCC 번호: CCL-61)는 20개의 지정 염색체 수를 갖는 프롤린 옥소트로프(auxotroph)이고, 10 내지 14시간 동안 이중으로 인구수가 증가한다. 당해 시스템은 다양한 화합물질의 클래스토젠 활성화에 대한 민감성을 나타낸다[참조: Preston et al., Mutation Res.(1981) 87:143-188]. CHO 세포를 성장시키고, 10% 소태아혈청, 1% L-글루타민(2mM), 페니실린(100units/mL) 및 스트렙토마이신(100μg/mL)으로 보충된 맥코이 5A 배지에서 유지한다. 배지를 37±2℃에서 습윤화된 배양기 중에 느슨한 캡을 갖는 5 내지 7% CO₂ 중에서 배양한다.
- [0856] 시험 과정
- [0857] 스톡 용액을 5mg/mL로 제조한다. 사용 직전 당해 스톡으로부터 5% 덱스트로스 중으로 희석하여 더 낮은 용량을 제조한다. 분해 변화를 최소화하기 위하여, 시험 물질 용액을 제조 후, 투여 과정 직전까지 얼음 중에 유지한다. 세포를 처리 1일 전 10mL의 신선한 배지 중에 75cm² 조직 배양 플라스크당 1 내지 1.5 x 10⁶ 세포로 접종한다. 처리를 위하여, 소비된 배지를 신선한 성장 배지로 교체하고, 시험 물질 추출물, 음성 또는 양성 대조군을 각 플라스크에 가한다. 양성 대조군을 비히클 독성을 최소화하는 0.1mL 용적으로 투여할 수 있다. 시험 물질 희석물 및 음성 대조군을 1mL 용적으로 투여한다. 신선한 배지를 가해 총 용적을 10mL로 만든다. 대사 활성화된 시험 부분을 위해, S9 변형 혼합물을 혈청 무함유 배지에 최종 농도 1.5%(v/v)로 가한다. 모든 처리를 2배수로 수행한다. 세포를 시험 물질 추출물, S9 반응 혼합물(대사 활성화 부분의 연구에만) 및 성장 배지의 존재하에 37±2℃로 배양한다. 분석을 2개의 처리 기간으로 나눈다: 3시간, S9 활성화 3시간 및 20시간.
- [0858] 처리 시간 후, 모든 플라스크를 인산완충식염수(PBS)로 세척한다. 10% 소태아혈청(FBS)을 함유하는 정상 성장 배지를 새로 세척한 세포에 가하고, 플라스크를 배양기에서 다시 14.5 내지 15.5시간 동안 배양한다. 현미경 평가는 수확 직전에 수행한다. 수확 2시간 전, 모든 플라스크에 콜세미드 1μg을 가해(최종 농도 0.1μg/mL) 세포 분리를 계산한다. 시험 물질 추출물을 6개의 용량 수치(배지 중 최종 농도 0.5, 0.16, 0.05, 0.016, 0.005 및 0.0016mL/mL)로 적절한 비히클 및 양성 대조군과 함께 2배수로 시험한다.
- [0859] 대사 활성화 시스템
- [0860] 대사 활성화 시스템의 사용은 일부 화합물을 프로뮤타젠 상태로만 존재하기 때문에 시험 물질의 평가를 위한 중요한 측면이다. 즉, 이들은 외부 대사 공급원에 의해 뮤타젠으로 활성화된다. 시험관내 시험 시스템은 외부 시스템, 예를 들면, S9가 가해지지 않으면 화합물 대사작용 능력이 부족하다.
- [0861] 당해 분석에서 사용되는 시험관내 대사 활성화 시스템은 스프라그 다울리(Sprague Dawley) 랫트 간 효소 및 이들 기능(NADP 및 등장액; 코어 반응 혼합물)에 필요한 에너지 생산 시스템을 포함할 수 있다. 효소를 아로클로르(Arochlor)로 처리된 랫트로부터의 간 마이크로솜(S9 분획)에 함유시켜 보다 활성인 형태로 화합물질을 변형할 수 있는 효소의 생성을 유도한다. S9는 몰톡스(Moltox, Boone, NC)로부터 구입하고, 사용 전까지 -70℃ 이하에서 보관한다. 당해 S9 분획을 사용 전 즉시 넣어 코어 반응 혼합물에 가한다.
- [0862] 세포 고정화, 염색 및 계수
- [0863] 중기 세포를 유사분열 셰이크 오프로 수집하고, 75mM KCl로 부풀리고, 메탄올 : 빙초산(3:1 v/v)로 고정화시킨다. 세포를 신선한 고정화제 중에 재현탁시킨 다음, 유리 슬라이드 상에 피펫팅하고, 공기 건조시킨다. 슬라이드를 블라인드 코드로 라벨링시킨다. 3개의 슬라이드를 각 치료 플라스크로부터 제조할 수 있다. 슬라이드를 지엠사(Giemsa)로 염색하고, 영구적으로 마운팅시킨다. 변리 빈도를 확인하기 위해 먼저 평가해야 하는 고용량의 양성 대조군을 제외하고 모든 슬라이드를 블라인드 코드하에 리딩한다. 용량당 200개의 세포(2배수 플라스크 각각 100개)를 각 용량으로부터 리딩한다. 100개의 세포를 하기 정의에 따라 고용량 양성 대조군으로부터 리딩하고, 이와 같이 계수한다.
- [0864] 염색분체 타입
- [0865] TG(염색분체 갭): "티드 갭". 하나의 염색분체에서 비염색성(염색되지 않는) 영역이고, 이의 크기는 염색 분체의 넓이와 동일하거나 이보다 작다. 이들이 모두 진짜 브레이크는 아니기 때문에, 최종 총 변이에 포함되지 않음을 주의한다.
- [0866] IG(동위염색분체 갭): "염색체 갭". 갭은 시스터 염색분체 중의 동일한 장소에 존재한다. 이들이 모두 진짜 브레이크는 아니기 때문에, 최종 총 변이에 포함되지 않음을 주의한다.
- [0867] TB(염색분체 브레이크): 염색분체의 넓이보다 큰 하나의 염색분체의 비염색성 영역이다. 연관 단편은 부분적

으로 또는 완전하게 추방되거나 소실된다.

- [0868] ID(염색분체 삭제): 짧은 염색분체 또는 염색분체의 캡 이외에 작은 단편 또는 환을 야기하는 염색분체 중간에서 염색분체 길이의 "컷".
- [0869] TR(삼방선): 세 방향의 배열을 야기하는 2개의 염색체 사이의 변화. 중심이 없는 단편과 관련이 있을 수 있다.
- [0870] QR(사방선): 삼방선과 동일하지만, 네 방향의 배열을 야기한다.
- [0871] CR(복잡한 재배열): 몇 개의 브레이크와 변화를 야기하는 2개 이상의 염색체에서 발생하는 변화.
- [0872] TI(염색분체 교환): 2개의 방향을 포함하는 염색체 내의 변화
- [0873] 염색체 타입
- [0874] SB(염색체 브레이크): 말단 삭제. 염색체는 위치가 지정되지 않은 중심이 없는 단편을 갖는 비정상(삭제된) 염색체를 형성하는 투명 브레이크를 갖고, 연관되어 남거나 세포 임의의 영역에 존재할 수 있다.
- [0875] DM(이중 미세 단편): 염색체 틸 삭제. 이는 작은 이중 "점"으로 나타나거나 쌍 환일 수 있다. 일부 경우, 이들은 교환 또는 말단 삭제를 야기하는 중심이 없는 단편과 구별되지 않는다.
- [0876] D(2중심): 2개의 중심을 갖는 염색체를 야기하는 2개의 염색체 사이의 교환. 이는 종종 단편 2중심(DF)으로 분리되는 중심이 없는 단편과 연관이 있다.
- [0877] MC(다중심 염색체): 2개 이상의 중심을 갖는 염색체를 야기하는 염색체 중의 교환.
- [0878] R(환): 중심을 함유하는 서클을 형성하는 염색체. 이는 종종 중심이 없는 단편과 연관이 있고, 이 경우, 환 단편(RF)으로 분류된다. 중심이 없는 환은 또한 당해 카테고리에 포함된다.
- [0879] Ab(비정상 단중심 염색체): 이는 형태학적으로 핵형이 비정상인 염색체이고, 종종 전좌 또는 근점 역전으로서 야기된다. 비정상적으로, 예를 들면, 상호간의 전좌로 설명되지 않을 경우, 사용되는 분류.
- [0880] T(전좌): 2개의 비정상 염색체를 야기하는 2개의 염색체 사이의 물질의 명백한 이동. 확인가능한 경우, "2 Ab"가 아닌 "T"로 기록된다.
- [0881] 기타
- [0882] SD(심각하게 손상된 세포): 10개 이상의 임의의 타입의 변이를 갖는 세포. 심하게 손상된 세포는 변이의 타입을 확인하기 위해 분석되거나, 예를 들면, 3중심과 관련된 것들과 같은 다중 단편으로 인해 10개 이상의 변이를 갖을 수 있다.
- [0883] PU(분쇄된 염색체): 파괴되거나 또는 단편화된 염색체. 이는 염색체 축합의 상이한 상태에서 단순히 존재할 수 있다.
- [0884] P(+ 분쇄된 세포): 전체 핵에서 하나 이상의 염색체가 "분쇄된다".
- [0885] PP(폴리플로이드 세포): 염색체 수의 반의 다중 카피를 갖는 세포. 폴리플로이드 세포는 때때로 정상 골수 또는 세포 배지에서 관찰된다. 이들은 구조적 변이의 총 수에 포함되지 않는다.
- [0886] 대조군 물질
- [0887] 대조군 물질을 공지된 문헌에 기재된 바와 같이 제조하고 당해 분석에서 사용한다. 사용될 수 있는 양성 대조군: 사이클로포스포아미드 - 고용량 15 μ g/mL; 사이클로포스포아미드 - 저용량 5 μ g/mL; 미토마이신 C - 고용량 1.0 μ g/mL; 및 시토마이신 C - 저용량 0.25 μ g/mL. 음성(비히클) 대조군을 위해, CHO 세포를 S9 활성화되거나 되지 않은 5% 텍스트로스 음성 대조군으로 처리한다. 이들 처리는 변이 세포의 배경수에 대한 정보를 제공한다.
- [0888] 분석 유효성 평가 및 통계적 분석
- [0889] 용매 대조군 배지(들)의 총 변이수(%CA)는 1 내지 14%로 떨어진다. 고용량 양성 대조군을 통계적 분석으로 측정한 결과, 95% 확신 수치($p < 0.05$)로서 변이 수의 통계학적으로 뚜렷한 증가를 생산한다. 다양 분석(ANOVA)을 양성 및 음성 대조군 그룹 또는 시험 물질 및 음성 대조군 그룹 사이의 뚜렷한 차이를 확인하기 위하여 사용할

수 있다. 수득된 p 수치가 0.05 이하인 경우, 상이한 것으로 간주된다.

[0890] 실시예 108

[0891] 개에서의 안전성과 허용성 측정

[0892] 연속 5일 동안 비글 개에 1일 1회 정맥내로 용량 수치로 화합물의 안전성 및 허용성을 측정하는 연구를, 예를 들면, 하기와 같이 설계할 수 있다. 안전성 파라미터를 관찰, 임상 병리학 및 조직 병리학 분석으로 모니터링한다.

[0893] 실험 설계

[0894] 표 10은 대표적인 연구를 요약한다. 예를 들면, 연구는 3개의(3) 시험 물질 및 하나의(1) 대조군 물질 그룹으로 수행된다. 대조군 물질은 투여 전 시험 물질을 희석하는데 사용되는 용액(물 중 5% 텍스트로스)이고, 고용량으로서 동일한 용적으로 투여된다. 당해 연구를 위한 시험 물질 용량 수치는 약 12, 3.8 및 1.2mg/kg이다. 시험 및 대조군 물질은 연속 5일 동안 약 1시간에 걸쳐 정맥내(IV) 주입으로 투여된다.

[0895] 시험 물질 혈액 수치 분석을 위한 혈액 시료를 하기와 같이 취한다(즉, pk/tk 샘플링). 혈액 약 1.0ml를 저용량 그룹의 3마리의 암컷 개로부터 주입 시작한 후 약 20분 및 40분에 취한 다음, 제1 투여 및 제5 투여 후 주입(0점) 끝 및 5, 10, 15 및 30분 및 1, 2, 4, 8, 12 및 24시간에 취한다. 또한, 모든 동물에서 용량 1 및 용량 5 직전과 직후 및 검사 전에, 리드 II 배열로 약 5 내지 10초의 ECG 트랙싱이 관찰된다. 동물을 일(1) 또는 마지막 투여 15일 후 사망시킨다. 안락사시키기 전 검사와 화학 분석을 위한 혈액에 예비 용량을 넣는다. 안락사 시킨 다음, 현미경 평가를 위한 주요 기관 수집을 포함하여 검사를 수행한다.

[0896] 표 10

| 그룹 번호 | 물질* | 투여량(mg/kg) | 초기 동물수 (숫컷/암컷) | 회복(15일) 동물수(숫컷/암컷) |
|-------|-------|------------|-------------------|-----------------------|
| 1 | 대조군 | 0.0 | 3/3 | 1/1 |
| 2 | 시험 물질 | 12.0 | 3/3 | 1/1 |
| 3 | 시험 물질 | 3.8 | 3/3 | 1/1 |
| 4 | 시험 물질 | 1.2 | 3/3 | 1/1 |

[0898] *약 1시간 주입으로 전달

[0899] 시험 방법

[0900] 대표적인 연구에서, 동물을 하기와 같이 그룹으로 할당한다: 하나의 성별에서 가장 무거운 개를 그룹 1로 할당하고, 그 다음으로 해당 성별의 무거운 개를 그룹 2로 할당하고, 그 다음 무거운 개를 그룹 3으로, 그 다음 무거운 개를 그룹 4로 할당하고, 이와 같이 그룹 2, 3, 4 및 1으로 할당한 다음, 그룹 3, 4, 1 및 2로 할당하고, 이처럼 반복하여 각각의 그룹을 동물로 채운다. 시험 및 대조군 물질을 두개 및 복재 정맥으로 정맥내 주입으로 각 투여량으로 약 1시간 동안 투여한다.

[0901] 동물을 검사 전과 투여 전 매일 체중을 측정한다. 모든 동물의 약동학 활성의 징후, 행동 변화 및 투여 한 시간 이내 즉각적인 독성을 관찰한다. 회복된 동물은 또한 회복 기간 동안 매일 1회 관찰한다. 모든 동물에서 투여 1 및 5 직전과 직후에, 회복된 동물들은 검사 전에, 납 II 배열에서 약 5초 ECG 트랙싱이 관찰된다. 이러한 트랙싱은 QRS-컴플렉스 및 T-웨이브의 리듬 및 진폭 변화의 해석을 위한 데이터를 제공하고 트랙싱당 시그먼트 수(약 5 내지 10)에 대한 QT 간격을 측정하기 위해 사용한다.

[0902] 혈액 수집

[0903] PK/TK. 시험 물질 혈액 수치 분석을 위한 혈액 시료를 하기와 같이 취한다. 혈액 약 1ml를 저용량 그룹의 3마리의 숫컷 및 3마리의 암컷으로부터 주입 시작한 후 약 20분 및 40분에 취한 다음, 제1 투여 및 제5 투여 후 주입(0점) 끝 및 5, 10, 15 및 30분 및 1, 2, 4, 8, 12 및 24시간에 취한다. 혈장(리튬 헤파린 항응고제) 시료를 분석을 위해 제조한다.

[0904] 임상 병리학

밤새 금식 후, 제1 투여 전(기선; 모든 동물) 각 검사 전에, 혈액 시료를 혈액학 및 임상 화학을 위해 취한다. 혈액학 분석을 위해, 기선 및 검사 전(금식)에 수집된 혈액을 적혈구수, 헤마토크리트(hematocrit), MCH, 백혈

구 수, 분화 WC, MCHC, 헤모글로빈, MCV, 혈소판 수, PT 및 APTT를 위해 분석한다. 임상 화학 분석을 위해, 기선 및 검시(금식) 전에 수집한 혈액을 아스파르테이트 아미노트랜스페라제(ASP), 글로불린 & A/G 비율, 알라닌 아미노트랜스페라제(ALT), 나트륨, 알칼린 포스파타제, 칼륨, 감마 글루타밀트랜스페라제(GGT), 클로라이드, 포도당, 칼슘, 혈액 유레아 질소(BUN), 총 빌리루빈, 크레아티닌, 무기 포스포루스, 총 단백질, 콜레스테롤, 알부민 및 트리글리세라이드를 위해 분석한다.

[0905] 검시

[0906] 혈액 시료 수집 후, 제1 치료 및 회복 그룹 동물을 각 종결 시간에 사망시키고, 검시한다. 주요 기관을 수집하고, 체중을 측정하고, 현미경 관찰을 위해 보존한다. 검시는 두개, 흉부, 복부 및 골반 강, 이의 내장, 조직, 기관 및 뼈의 시험을 포함한다.

[0907] 통계학적 방법

[0908] 임상 화학 및 혈액학 수치, 기관 및 체중 데이터의 통계학적 분석을 시험 물질과 대조군을 비교하기 위하여 수행한다. 데이터에 사용되는 통계학적 방법은 적절하게 선택된다: 파라미터 데이터는 다양성의 1방향 분석을 사용하여 분석되고, 비-파라미터 데이터는 쿠라스카이-왈리스(Kurskai-Wallis) 시험을 사용하여 분석된다. 페어드 t-시험은 각 동물을 위한 기선 및 후 치료 임상 화학 및 혈액학 수치를 비교하기 위해 사용된다. 0.05 미만의 확률(p) 값은 모든 통계학적 시험에서 유의적인 것으로 고려된다.

[0909] 실시예 109

[0910] 랫트에서의 안전성 및 허용성

[0911] 연속 5일 동안 랫트에 1일 1회 정맥내로 3개의 용량 수치로 화합물의 안전성 및 허용성을 측정하는 연구를, 예를 들면, 하기와 같이 설계할 수 있다. 안전성 파라미터를 관찰, 임상 병리학 및 조직 병리학 분석으로 모니터링한다. 선택된 동물들에 대해 또한 약동학적/독성동학적 평가를 위해 혈액 시료 수집이 수행된다.

[0912] 실험 방법

[0913] 표 11은 대표적인 연구를 요약한다. 예를 들면, 연구는 3개의(3) 시험 물질 및 하나의(1) 대조군 물질 그룹으로 수행된다. 각각 28마리의 동물들로 이루어진 고용량 및 저용량 시험 물질 그룹 및 대조군 그룹은 허용성 실험을 위해 사용된다. 중간 시험 물질 그룹은 64마리로 구성되고, 28마리는 허용성을 평가하기 위해 사용되고, 36마리는 연구의 PK/TK 부분에서 제1 및 제5 투여 후 다양한 시간점에서 혈액의 시험 물질 수치를 측정하기 위해 사용된다. 대조군 물질은 투여 전 시험 물질을 희석하는데 사용되는 용액(물 중 5% 텍스트로스)이고, 고용량 시험 물질 그룹으로서 동일한 용적으로 투여된다. 당해 연구를 위한 시험 물질 용량 수치는 약 24, 7.6 및 2.4mg/kg이다. 시험 및 대조군 물질은 연속 5일 동안 약 1시간에 걸쳐 정맥내(IV) 주입으로 투여된다.

[0914] 시험 물질 혈액 수치 분석을 위한 혈액 시료를 하기와 같이 취한다. 혈액 약 0.3 내지 0.5ml를 저용량 그룹의 3마리의 암컷 랫트로부터 제1 투여 및 제5 투여 후 주입(0점) 끝 및 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 및 24시간에 취한다. 허용성 시험 동물이 사망하면, 혈액학 및 임상 화학 분석을 위한 혈액을 안락사 전 과 후에 취한다. 현미경 평가를 위한 주요 기관의 수집을 포함하여, 검시를 수행한다. 시험 물질의 수치를 측정하기 위해서 pk/tk 혈액 샘플링을 위한 동물을 최종 혈액 시료를 추가의 샘플링 또는 관찰 없이 수집한 후 안락사시킨다.

[0915] 표 11

| 그룹 번호 | 물질* | 투여량(mg/kg) | 초기 동물수 (숫컷/암컷) | 회복(15일) 동물수(숫컷/암컷) |
|-------|-------|------------|-------------------|-----------------------|
| 1 | 대조군 | 0.0 | 3/3 | 1/1 |
| 2 | 시험 물질 | 12.0 | 3/3 | 1/1 |
| 3 | 시험 물질 | 3.8 | 3/3 | 1/1 |
| 4 | 시험 물질 | 1.2 | 3/3 | 1/1 |

[0917] *약 1시간 주입으로 전달

[0918] 시험 방법

[0919] 시험 및 대조군 물질을 약 1분 동안 꼬리 정맥으로 정맥내 주입으로서 각 투여량을 투여한다. 동물의 체중을

투여 전과 검시 전에 매일 측정한다. 모든 동물의 약동학 활성의 징후, 행동 변화 및 투여 한 시간 이내 즉각적인 독성을 관찰한다. 회복된 동물은 또한 회복 기간 동안 매일 1회 관찰한다. 대조군 동물은 D5W 약 6ml/kg으로 투여할 수 있다. 고용량, 중간 용량 및 저용량 시험 물질 동물은 각각 약 24mg/kg, 7.6mg/kg 및 2.4mg/kg의 투여량으로 투여된다.

[0920] 혈액 수집

[0921] PK/TK

시험 물질 혈액 수치 분석을 위한 혈액 시료를 하기와 같이 취한다. 중간 용량 동물 18마리의 숫컷 및 18마리의 암컷을 사용하여, 혈액 0.3 내지 0.5ml를 투여 전 각각의 샘플링 시간점 및 주입(0점) 후, 제1 투여 및 제5 투여 후 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 및 24시간에서 취한다. 혈액 샘플링은 동물 종결 시료를 위한 레트로-오비탈 블리딩 또는 심장 찌르기일 수 있다. 혈장(리튬 헤파린 항응고제) 시료를 분석을 위해 제조한다. 화학 병리학, 검시 및 조직병리학 뿐만 아니라 통계학적 방법, 예를 들면, 상기 기재된 바와 같은 것들을 위한 일반적인 방법을 수행한다.

[0922] 실시예 110

[0923] 인산화 및 총 p53 분석 프로토콜

[0924] 인산화 및 총 p53 분석 프로토콜을 하기와 같이 설계한다. 1일에, 세포를 2×10^6 세포/10cm 디쉬/10ml 배지에 접종한다. 2일에, 세포를 하기와 같이 처리한다: 대조군 = 0.05% DMSO(5 μ l DMSO 스톡/10ml 배지); 1 μ M 시험 화합물(1 μ l 스톡(10mM)/10ml 배지); 2 μ M 시험 화합물(2 μ l 스톡(10mM)/10ml 배지); 3 μ M 시험 화합물(3 μ l 스톡(10mM)/10ml 배지); 4 μ M 시험 화합물(4 μ l 스톡(10mM)/10ml 배지) 및 5 μ M 시험 화합물(5 μ l 스톡(10mM)/10ml 배지).

[0925] 3일에, 세포를 수확하고, 부탁하고, 부유된 세포를 수집한다. 세포를 PBS로 2회 세척하고, 계수하고, 4×10^6 세포/시료로 수집한다. 세포 펠렛을 추가의 사용없이 -80℃에서 냉각시킨다. 동일한 날 또는 4일에, 세포를 세포 추출 버퍼(3ml 세포 추출 버퍼, 300 μ l 프로테아제 억제제 및 10 μ l 0.3M PMSF)를 사용하여 추출한다. 각각의 시료에 버퍼 200 μ l를 가하고, 용액을 보텍싱하고, 30분 동안 얼음으로 셋팅하고, 10분 마다 연속적으로 보텍싱한다. 용액을 10분 동안 13,000rpm으로 원심분리하고, 상등액 100 μ l를 분취하고, -80℃에서 저장한다.

[0926] 분석 제제(5일)

항-래킷 IgG HRP 용액을 각각의 8-웰 스트립에 HRP 희석액 1ml를 100배 농축 용액 10 μ l를 희석함으로써 제조한다. 세척 버퍼 용액을 ax1 용액을 물로 희석하여 원래 바이알의 희석물을 제조한다(x25). p53 표준 용액 또는 p53 총 용액의 희석물을 표 12의 대표적인 파라미터에 따라 제조할 수 있다. 완전한 재구성을 확실히하기 위하여, 표준 1을 부드럽게 혼합하고, 10분 동안 실온에서 교반한다.

[0927] 표 12

| | 농도 | 표준 용액 | 희석 버퍼 |
|------|---------------|---------------------|-------------|
| 표준 1 | 100 Units/ml | 표준 희석 버퍼의 재구성 1 바이알 | 위쓰 0.7ml |
| 표준 2 | 50 Units/ml | 표준 1 250 μ l | 250 μ l |
| 표준 3 | 25 Units/ml | 표준 2 250 μ l | 250 μ l |
| 표준 4 | 12.5 Units/ml | 표준 3 250 μ l | 250 μ l |
| 표준 5 | 6.25 Units/ml | 표준 4 250 μ l | 250 μ l |
| 표준 6 | 3.12 Units/ml | 표준 5 250 μ l | 250 μ l |
| 표준 7 | 1.6 Units/ml | 표준 6 250 μ l | 250 μ l |
| 표준 8 | 0 | | 250 μ l |

[0929] 시험 방법

모든 용액을 사용 전 실온에서 도달하게 하고 부드럽게 혼합한다. 꺼내서, 삼입 8-웰 스트립을 삼입한다. 표준 희석 버퍼 100 μ l를 표준 8 웰(0ng/ml/웰 또는 0 Units/웰)에 가한다. 크로모젠 블랭크 웰에는 아무것도 가하지 않는다. 표준 또는 희석된 시료 100 μ l를 적절한 마이크로티터 웰에 가한다. 일반적으로, 시료는 표준 희석 버퍼로 1:10 이상으로 희석하여야 한다. 각각의 시료를 2배수로 수행한다. 플레이트의 사이클을 부드럽게 탭핑하여 완전하게 혼합한다. 플레이트 커버로 플레이트를 덮고, 2시간 동안 실온에서 또는 o/n 4℃에서 배양한

다. 웰을 워킹 워싱 버퍼 400 μ l로 4회 세척한다. 15내지 30초에 흡수되도록 한 다음, 액체를 아스피레이팅한다. 세척한 다음, 플레이트를 역전시키고, 조직 흡수 상에 무수 상태로 탭핑한다. 항-p53[pS15] 또는 항-p53(총)(검출 항체) 100 μ l를 크로모젠 블랭크를 제외한 각각의 웰에 가한다. 부드럽게 탭핑하여 혼합하고, 플레이트를 덮고, 실온에서 1시간 동안 배양한다. 웰로부터의 용액을 완전하게 아스피레이팅한다.

[0930] 웰을 워킹 워싱 버퍼 400 μ l로 4회 세척한다. 15 내지 30초 동안 흡수시킨 다음, 액체를 아스피레이팅한다. 세척한 다음, 플레이트를 역전시키고, 흡수 조직을 상에서 탭핑을 시도한다. 항-래빗 IgG HRP 워킹 용액 100 μ l를 크로모젠 블랭크를 제외한 각각의 웰에 가한다. 플레이트를 덮고, 30분 동안 실온에서 배양한다. 웰을 워킹 워싱 버퍼 400 μ l로 4회 세척한다. 15내지 30초에 흡수되도록 한 다음, 액체를 아스피레이팅한다. TMB(안정화된 크로모젠 기질) 100 μ l를 각각의 웰에 가하고, 30분 동안 교반한다. 실온에서 암실에 둔다. 색이 청색으로 변한다. 100 μ l 정지 용액을 가한다. 탭 플레이트를 부드럽게 혼합한다. 색이 황색으로 변한다. 플레이트를 블랭크로서 크로모젠 블랭크(= TMB 100 μ l + 정지 용액 100 μ l)로 셋팅하여 A450nm에서 리딩한다. 분석 완료 2시간 동안 흡광도를 리딩한다.

[0931] 실시예 111

[0932] 카스파제-3/7 분석 프로토콜

[0933] 대표적인 카스파제-3/7 분석 프로토콜을 하기와 같이 설계할 수 있다. 1일에서, 0.015 x 10⁶ HCT-116 세포/50 μ l/웰에 접종한다. 37℃에서 CO₂ 배양기에서 o/n에서 배양한다. 2일에, 웰로부터 배지 25 μ l를 제거한다. HCT-116 세포를 1, 3 및 5 μ M 시험 화합물로 처리한다. 양성 대조군 그룹을 스타우로스포린 0.01, 0.1, 1 μ M으로 처리한다. 오직 배지로만 처리한 6개의 음성 대조군 웰을 유지한다(적절한 웰에 희석 시료 25 μ l를 가한다). 24시간 동안 37℃의 CO₂ 배양기에서 배양한다. 3일 동안, 10 μ l 시약/1ml 버퍼에서 Apo-온 균질 카스파제-3/7 분석 시약(Promega)을 제조한다. 희석 시약 50 μ l를 가한다. 1시간 동안 실온에서 배양한다. 485/520에서 형광을 측정한다.

[0934] 실시예 112

[0935] 아넥신(Annexin) V-알렉사(V-Alexa) 488 염색 프로토콜

[0936] 대표적인 아넥신 V-알렉사 488 염색 프로토콜을 하기와 같이 설계한다. 1.5 내지 2.0 x 10⁶ HCT-116 세포/10cm 디쉬/10ml 배지에 접종한다. o/n 또는 24시간 이하 동안 37℃의 CO₂ 배양기에서 배양한다. 다음 날, 세포를 1, 2, 3, 4 및 5 μ M 시험 화합물로 처리한다. 1 또는 2개의 비처리된 플레이트(배지만)를 대조군 플레이트로 유지한다. 하기 대조군을 사용한다: 비처리된 시료(알렉사 또는 요오드화프로피디늄이 아님), 요오드화프로피디늄 또는 알렉사 488로 처리된 대조군 및 알렉사 488 및 요오드화프로피디늄 둘 다로 처리된 대조군. 세포를 수확한다(웰에 부착된 세포 뿐만 아니라 부유한 세포도 수집한다). 세포를 차가운 PBS로 2회 세척한다. 1x 아넥신 결합 버퍼 중에 세포를 재현탁한다.

[0937] 세포를 계수하고, 1x 아넥신 결합 버퍼 약 1 x 10⁶ 세포/0.1ml로 희석하고, 분석당 100 μ l의 충분한 용적을 제조한다. 아넥신 V 5 μ l를 각각의 세포 현탁액 100 μ l에 컨주게이트시킨다. 요오드화 프로피디늄 용액(스톡 = 1mg/ml) 4 μ l를 각각의 세포 현탁액 100 μ l에 가한다. 시료를 실온에서 15분 동안 배양한다. 아넥신 결합 버퍼 400 μ l를 가하고, 부드럽게 혼합하고, 얼음 위에 시료를 유지한다. 염색된 세포를 유동 사이토메트리로 즉시 분석한다.

[0938] 실시예 113

[0939] DNA 세포 주기 분석 프로토콜

[0940] 대표적인 DNA 세포 주기 분석 프로토콜을 하기와 같이 설계한다. 1.5 내지 2.0 x 10⁶ 세포/10cm 디쉬에 접종한다(1개의 추가 디쉬는 염색되지 않은 세포를 접종한다). 세포를 37℃의 습윤화된 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한다. 세포 정지를 제조하기 위한 낮은 성장 상태의 세포의 동시화를 위하여, 배지를 제거하고, 혈청 무함유 배지를 1회 행구고, 혈청 무함유 배지 10ml를 각각의 디쉬에 가한다. 세포를 37℃의 습윤화된 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한다. 배지를 제거하고, 처리물(혈청 함유 배지 중에 희석, 10ml)인 1 내지 5 μ M 시험 화합물 및 대조군을 가한다. 세포를 37℃의 습윤화된 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한다.

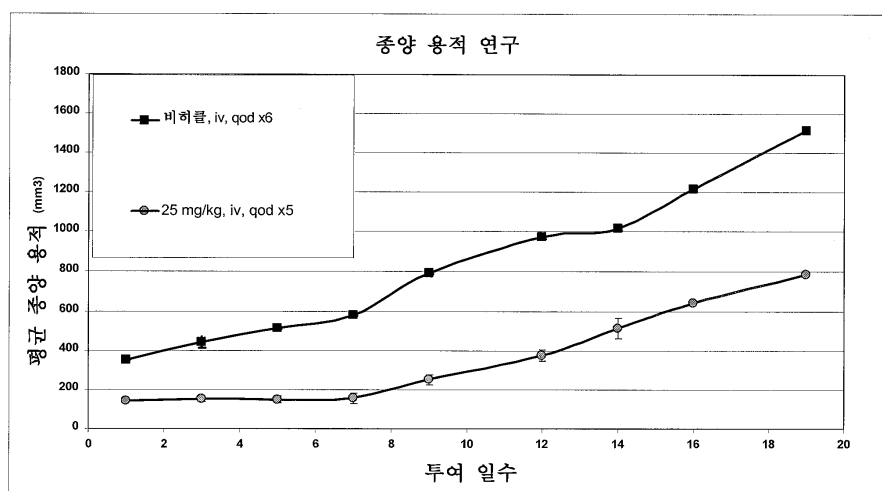
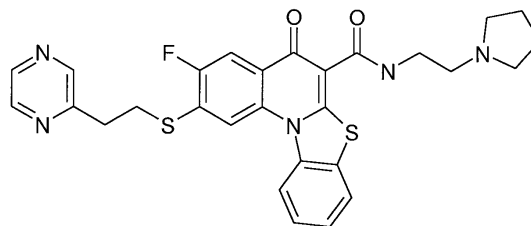
[0941] 세포를 트립신 처리/분리하기 위하여, 처리를 제거한다. 트립신/EDTA 용액 3ml를 가한다. 세포를 부유하게 하고, 부착된 세포와 배합한다. 5분 동안 37℃의 습윤화된 5% CO₂ 배양기에서 배양한다. 배지(FBS 함유) 3ml를 가하고, 원심분리로 피펫팅한다. 1000rpm으로 5분 동안 원심분리한다. 상등액을 가만히 따라내고, 2 내지 3ml의 PBS 중 펠렛을 재현탁시킨다. 세포를 계수하고, 2 x 10⁶ 세포/튜브에 넣어 세포를 세척하고, 2ml PBS를 가하고, 1000rpm으로 5분 동안 원심 분리한다. 0.3ml의 차가운 PBS 중에 펠렛 세포를 재현탁시킨다.

[0942] 세포를 고정하기 위하여, 얼음으로 냉각한 70% 에탄올 0.7ml를 PBS 중의 세포 현탁액 0.3ml를 함유하는 튜브에 와동시키며 적가한다. 1시간 동안 얼음에 둔다(또는 수일 동안 4℃에 둔다). 1000rpm으로 5분 동안 원심분리한다. 차가운 PBS(1-2ml)로 1회 세척한다. 1000rpm으로 5분 동안 원심분리한다. 세포 펠렛을 차가운 PBS 0.25ml에 재현탁시키고, 10mg/ml RNase A(최종 농도 0.2 내지 0.5mg/ml) 5 μ l를 가한다. 탈이온수(최종 농도 10 μ l/ml) 중의 요오드화프로피디움 1mg/ml 10 μ l를 가하고, 분석 전까지 암실에서 4℃에서 보관한다. 488nm에서 사이토미터 상에서 리딩하여 FACS를 분석한다. 세포를 분석과 동일한 날에 요오드화프로피디움으로 염색할 수 있다.

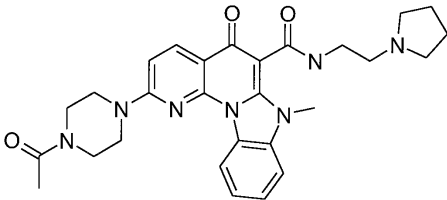
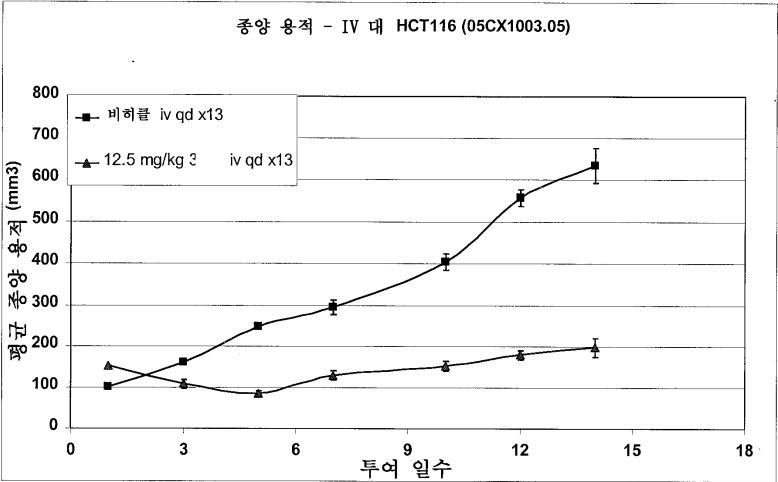
[0943] 상기 상세한 설명 및 수반된 실시예는 설명하기 위한 것이고, 이로써 본 발명의 범위를 제한하지 않음이 이해되어야 한다. 기재된 양태에 대한 다양한 변화 및 변형이 당해 분야의 숙련가에게 명백할 것이다. 이로써 제한되지는 않지만, 화학 구조, 치환체, 유도체, 중간체, 합성, 제형화 및 또는 본 발명의 사용방법을 포함하는 이러한 변화 및 변형은 본 발명의 취지 및 범위에 속한다. 미국 특허 및 참조 문헌은 본원에서 참조로서 인용된다.

도면

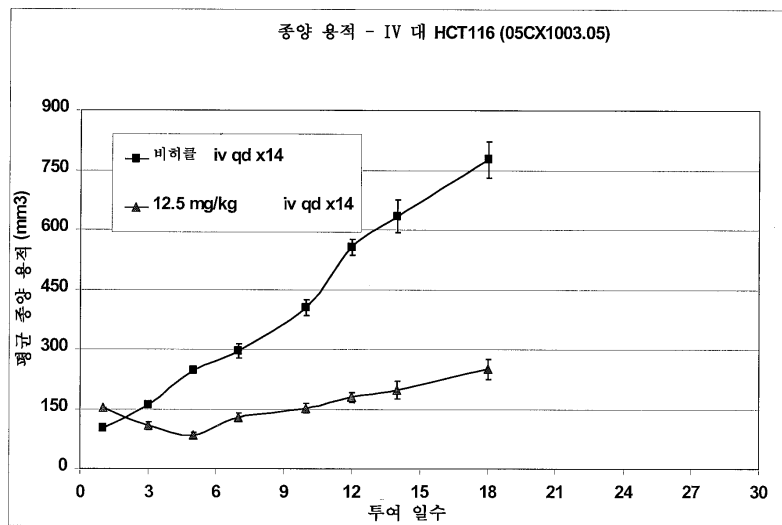
도면1



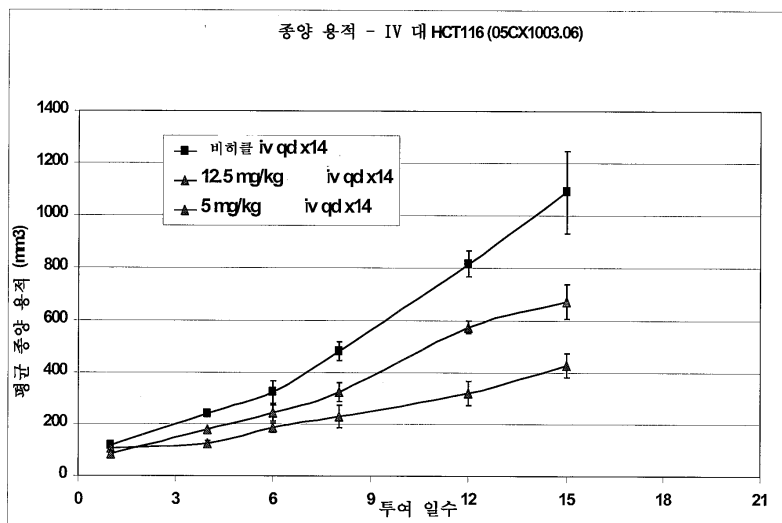
도면2



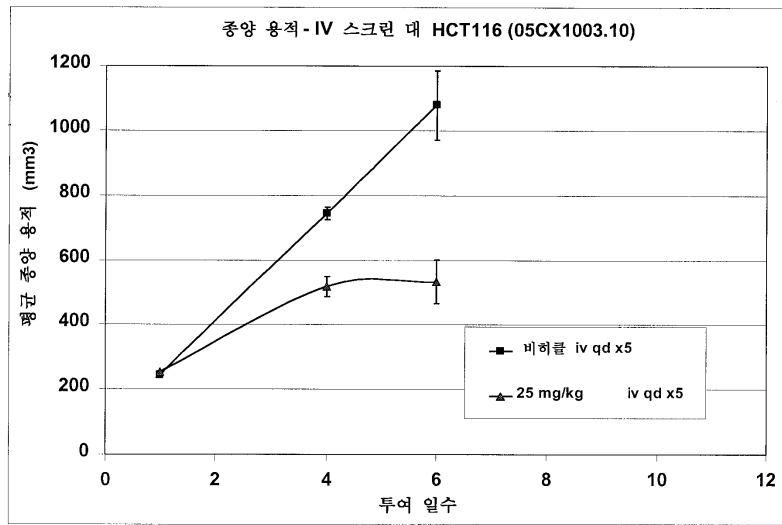
도면4



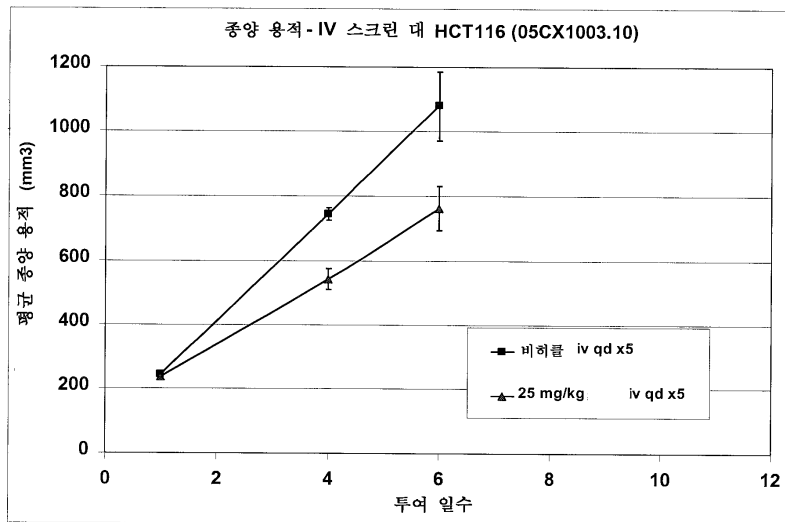
도면5



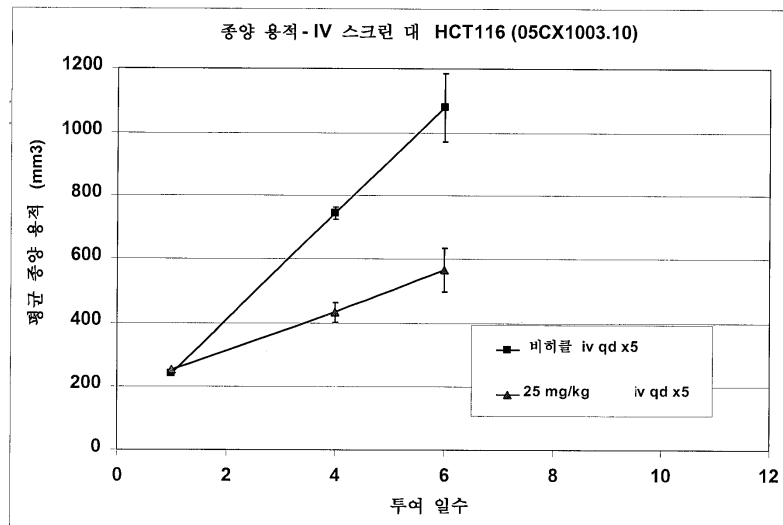
도면6



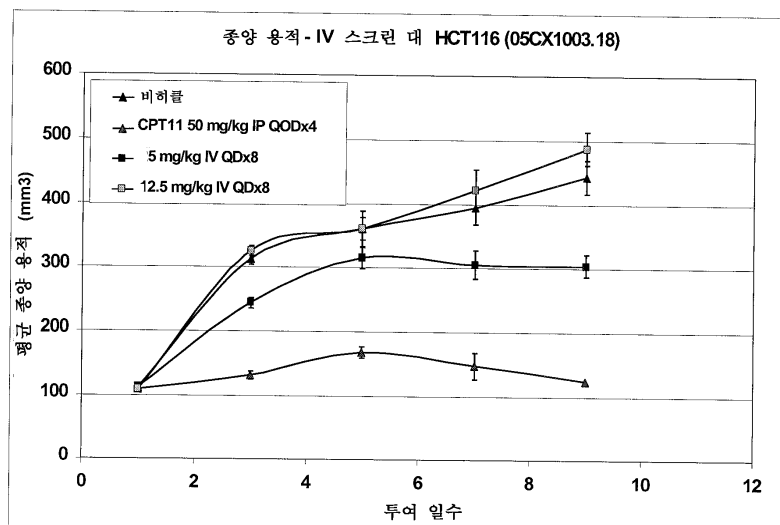
도면7



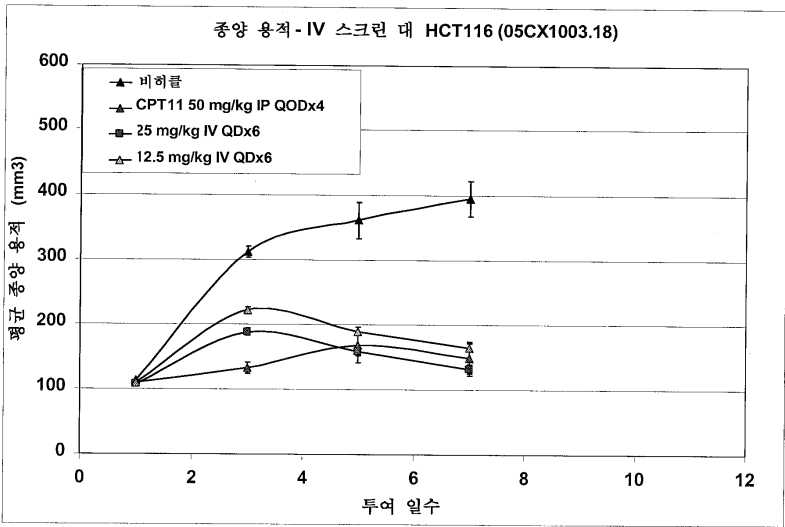
도면8



도면9



도면10



서열 목록

<110> CYLENE PHARMACEUTICALS, INC.
<120> Quinolone analogs as cell proliferation inhibitors

<130> 532232001849

<150> US 11/149,007
<151> 2005-06-09

<150> US 60/611,030
<151> 2004-09-17

<150> US 60/638,603
<151> 2004-12-22

<150> US 60/688,986
<151> 2005-06-09

<150> US 60/688,796
<151> 2005-06-09

<160> 29

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 tggggagggt ggggagggtg gggaagg 27

<210> 2
 <211> 37
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 gggggggggg gggcgggggc gggggcgggg gaggggc 37

<210> 3
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 ggggggggac gcgggagctg ggggagggt tggggccagg gcggggcgct taggggg 57

<210> 4
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 aggaagggga gggccggggg gaggtggc 28

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 aggggcgggg cggggcgggg gc 22

<210> 6
 <211> 25
 <212> DNA

| | |
|--|----|
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 6 gggaggaagg gggcgggagc ggggc | 25 |
| <210> 7 <211> 32 <212> DNA <213> Homo sapiens | |
| <400> 7 ggggggcggg ggcgggcgca gggggagggg gc | 32 |
| <210> 8 <211> 23 <212> DNA <213> Homo sapiens | |
| <400> 8 cggggcgggg cgggggcggg ggc | 23 |
| <210> 9 <211> 46 <212> DNA <213> Homo sapiens | |
| <400> 9 agaggaggag gaggtcacgg aggaggagga gaaggaggag gagga | 46 |
| <210> 10 <211> 12 <212> DNA <213> Homo sapiens | |
| <400> 10 ggaggaggag ga | 12 |
| <210> 11 <211> 38 <212> DNA <213> Homo sapiens | |
| <400> 11 agagaagagg ggaggaggag gaggagagga ggaggcgc | 38 |

<210> 12
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 ggagggggag ggg 13

<210> 13
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 aggagaagga ggaggtggag gaggagg 27

<210> 14
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 aggaggagga gaatgcgagg aggagggagg aga 33

<210> 15
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 ggggcgggcc gggggcgggg tcccgccggg gcggag 36

<210> 16
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 cgggaggagg aggaaggagg aagcgcg 27

<210> 17
 <211> 45
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Primer

<400> 17

agtctgactg acgtacgta gctaatacga ctactatag caatt 45

<210> 18

<211> 99

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Primer

<400> 18

tcctaactatg tatactgggg aggggtgggga ggggtgggga ggtagcgac acgcaattgc 60
tatagtgagt cgtattagct acgtacagtc agtcagact 99

<210> 19

<211> 15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

tcctaactatg tatac 15

<210> 20

<211> 35

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 20

ttagcgacac gcaattgcta tagtgagtcg tatta 35

<210> 21

<211> 80

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

tatacggggt gggggaggga gggattagcg acacgcaatt gctatagtga gtcgtattag 60
ctacgtacag tcagtcagac 80

<210> 22
 <211> 86
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 ttataccggg gcggggcggg ggcgggggct tagcgacacg caattgctat agtgagtcgt 60
 attagctacg tacagtcagt cagact 86

<210> 23
 <211> 97
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 taggggcggg cgcgaggagga agggggcggg agcggggctg ttagcgacac gcaattgcta 60
 tagtgagtcg tattagctac gtacagtcag tcagact 97

<210> 24
 <211> 97
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 ttagagaaga ggggaggagg aggaggagag gaggaggcgc ttagcgacac gcaattgcta 60
 tagtgagtcg tattagctac gtacagtcag tcagact 97

<210> 25
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 tccaactatg tatactgggg aggggtggga ggggtgggaa ggtagcgac acgcaattgc 60
 tatagtgagt cgtattagct acgtacagtc agtcagact 99

<210> 26
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 tccaactatg tatacccttc cccaccttc ccacctccc cattagcgac acgcaattgc 60
 tatagtgagt cgtattagct acgtacagtc agtcagact 99

<210> 27
 <211> 95
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 tcatatatga ctacttaggg ttagggtag ggtaggggtt actgccacgc aattgctata 60
 gtgagtcgta ttagctacgt acagtcagtc agact 95

<210> 28
 <211> 89
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 atgatcacgc ggaggaggag gaaggaggaa gcgcgctgcc acgcaattgc tatagtgagt 60
 cgtattagct acgtacagtc agtcagact 89

<210> 29
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Primer

<400> 29
 agtctgactg actgtacgta gctaatacga ctcactatag caatt 45