

특허증

CERTIFICATE OF PATENT



특허

Patent Number

제 10-1957613 호

출원번호

Application Number

제 10-2017-7003085 호

출원일

Filing Date

2017년 02월 03일

등록일

Registration Date

2019년 03월 06일

발명의 명칭 Title of the Invention

아릴 아민 치환된 퀴옥살린의 항암 약물로서 용도

특허권자 Patentee

등록사항란에 기재

발명자 Inventor

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



특허청

Korean Intellectual
Property Office

2019년 03월 06일

특허청장

COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

박원주



QR코드로 현재기준
등록사항을 확인하세요

등 록 사 항

특 허

Patent Number

등록 제 10-1957613 호

특허권자 Patentees

첸 쿠엔펑

대만 타이페이 시티 10002 종쟁 디스트릭트 종산 에스 로드 넘버 7

시아우 청와이

대만 타이페이 시티 112 베이토우 디스트릭트 리농 스트리트 섹션 2 넘버 155

발명자 Inventors

첸 쿠엔펑

대만 타이페이 시티 10002 종쟁 디스트릭트 종산 에스 로드 넘버 7

시아우 청와이

대만 타이페이 시티 112 베이토우 디스트릭트 리농 스트리트 섹션 2 넘버 155

첸 치홍

대만 신추 카운티 31062 주동 타운쉽 캉주앙 스트리트 레인 109 넘버 72



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월12일

(11) 등록번호 10-1957613

(24) 등록일자 2019년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 241/44 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)

A61K 31/44 (2006.01) A61K 31/498 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07D 241/44 (2013.01)

A61K 31/337 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-7003085

(22) 출원일자(국제) 2015년07월07일

심사청구일자 2017년02월03일

(85) 번역문제출일자 2017년02월03일

(65) 공개번호 10-2017-0024107

(43) 공개일자 2017년03월06일

(86) 국제출원번호 PCT/CN2015/083466

(87) 국제공개번호 WO 2016/004856

국제공개일자 2016년01월14일

(30) 우선권주장

62/021,214 2014년07월07일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2002020463 A2*

Tetrahedron Letters, 2012, vol. 53,
pp.6059-6066.*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

첸 쿠옌펑

대만 타이페이 시티 10002 종쟁 디스트릭트 종산
에스 로드 넘버 7

시아우 청와이

대만 타이페이 시티 112 베이토우 디스트릭트 리
농 스트리트 섹션 2 넘버 155

(72) 발명자

첸 쿠옌펑

대만 타이페이 시티 10002 종쟁 디스트릭트 종산
에스 로드 넘버 7

시아우 청와이

대만 타이페이 시티 112 베이토우 디스트릭트 리
농 스트리트 섹션 2 넘버 155

첸 치홍

대만 신추 카운티 31062 주둥 타운쉽 kangzhang 스트
리트 라인 109 넘버 72

(74) 대리인

김경희

전체 청구항 수 : 총 8 항

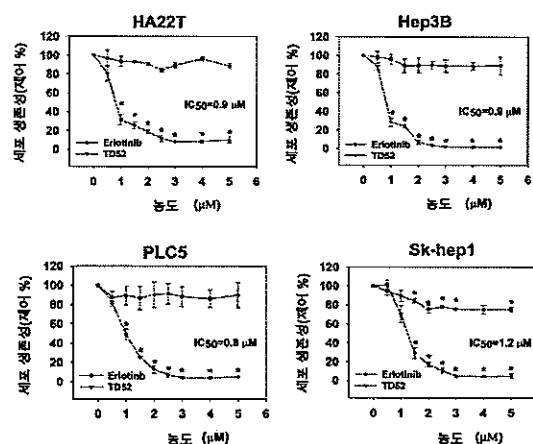
심사관 : 한정희

(54) 발명의 명칭 아릴 아민 치환된 퀴놀살린의 항암 약물로서 용도

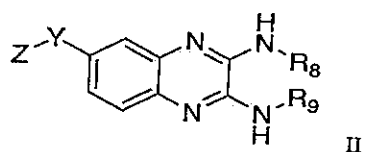
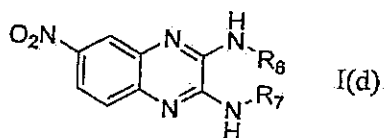
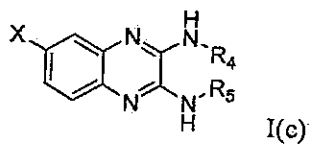
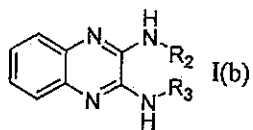
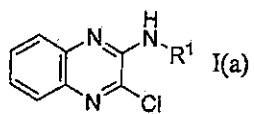
(57) 요약

본 발명은 화학식 I(a)-I(d) 및 II의 신규 화합물을 제공한다. 상기 화합물은 단백질 포스페이트 2A의 암 억제제
(뒷면에 계속)

대표도 - 도1a



(CIP2A)를 억제할 수 있고, 단백질 포스페이트 2A (PP2A) 촉진제 및 종양단백질 SET 길항제로서 사용될 수 있고, 또 암을 효과적으로 치료할 수 있다.



(52) CPC특허분류

A61K 31/44 (2013.01)

A61K 31/498 (2013.01)

명세서

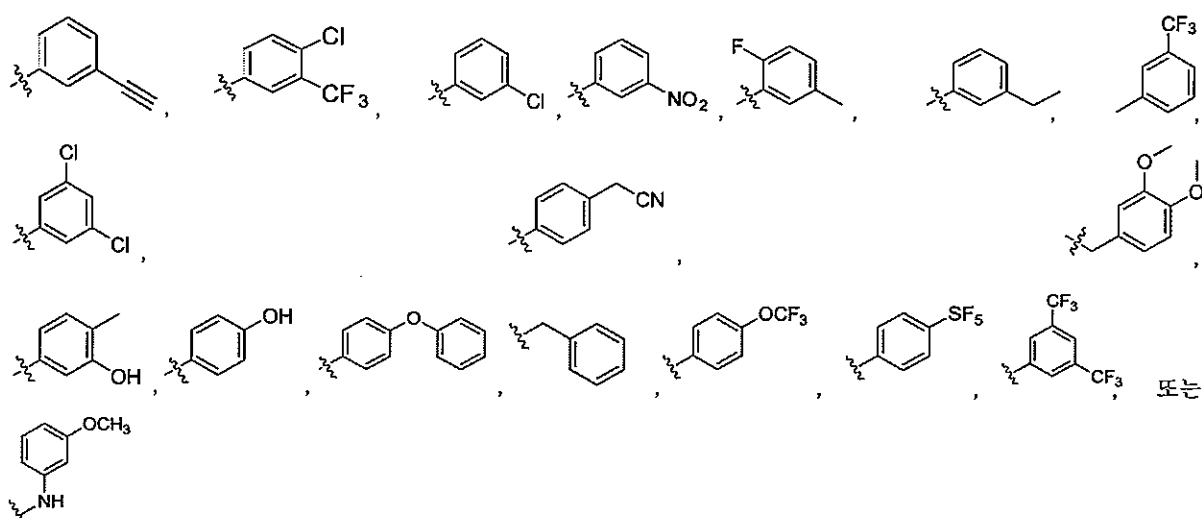
청구범위

청구항 1

하기 화학식 I(a) 또는 화학식 I(b)으로 표시되는 아릴 아민 치환된 퀴놀살린:



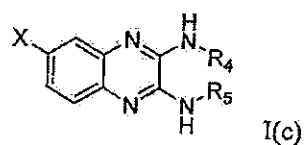
식 중, R¹, R² 및 R³은 동일하거나 상이한 치환된 페닐기이고, 치환된 페닐기는 각각



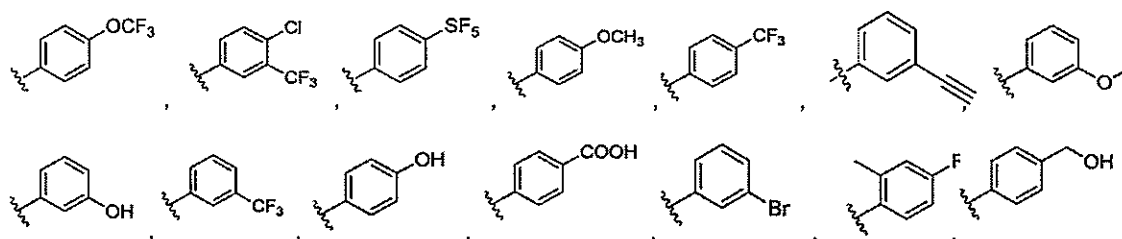
임.

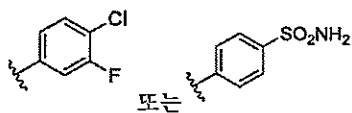
청구항 2

하기 화학식 I(c)으로 표시되는 아릴 아민 치환된 퀴놀살린:



식 중, R⁴ 및 R⁵는 동일하거나 상이한 치환된 페닐기이고, 치환된 페닐기는 각각



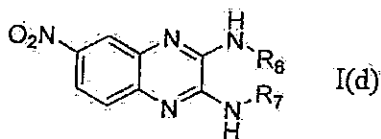


이고; 및

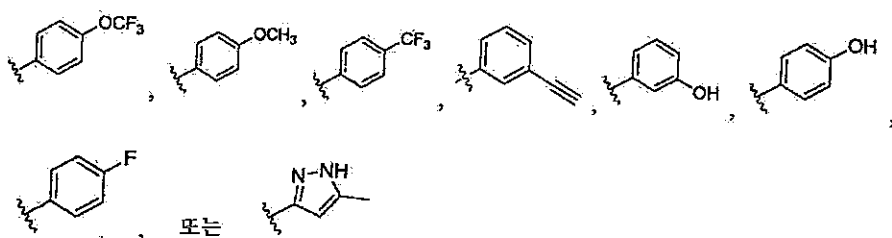
X는 할로겐, 탄소수 1의 할로알킬, 메톡시, 니트로, 아미노, 아마이드, 카복실, 벤조페논 또는 메톡시카보닐임.

청구항 3

하기 화학식 I(d)으로 표시되는 아릴 아민 치환된 퀴놀살린:

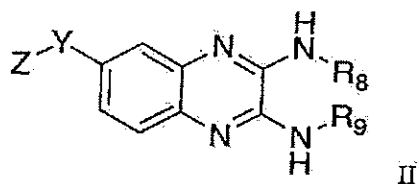


식 중, R⁶ 및 R⁷은 동일하거나 상이한 치환된 페닐기이고, 치환된 페닐기는 각각

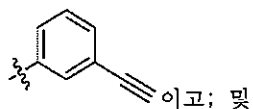


청구항 4

하기 화학식(II)으로 표시되는 화합물:



식 중, R⁸ 및 R⁹은 동일하거나 상이한 치환된 페닐기이고, 치환된 페닐기는 각각



Y는 CO 또는 (CH₂)_n이며, n=1-3이고; Z= COOR¹⁰, 또는 페닐기이며, R¹⁰은 탄소수 6의 아릴 또는 탄소수 1의 알킬임.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재된 화합물 및 약리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 항암 약물을 더 포함하는 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 항암 약물이 소라페닙(sorafenib) 또는 파클리탁셀(paclitaxel)인 암 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

제5항에 있어서, 상기 암은 간암, 폐암, 백혈병, 유방암, 신장암, 갑상선암, 대장암, 머리암 및 목암으로 구성되는 그룹으로부터 선택되는 약학적 조성물.

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아릴 아민 치환된 퀴놀살린을 갖는 신규 화합물 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단백질 포스파타제 2A의 암 억제제(cancerous inhibitor of protein phosphatase 2A: CIP2A로 약칭)의 과발현은 급성 백혈병, 전립선암, 비-소세포(non-small cell) 폐암, 위암, 머리암 또는 목암, 대장암 및 유방암을 비롯한 몇 개의 일반적 인간 암에서 발견되고 있고 또 종양에서 임상적 침습성 및 암세포의 악성 성장의 증진과 관련되어 있다. CIP2A는 전사인자 c-Myc와 직접 연관되고 또 c-Myc의 PP2A 탈인산화를 억제함으로써, 발암성 c-Myc를 분해로부터 안정화시킨다.

[0003] 단백질 포스파타제 2A (PP2A로 약칭)는 세린 또는 트레오닌 잔기에 대한 단백질 키나제의 탈인산화에 의한 세포 증식의 중요한 조절제이다. PP2A는 기질 특이성, 세포내 위치 및 효소 활성을 조절하는 3개의 서브유닛으로 구성된다. 예컨대, PP2A는 세린 473에서 p-Akt를 탈인산화하고 또 세포 성장을 감소시킨다. 따라서, CIP2A-PP2A-Akt 신호 캐스케이드는 암에서 중요한 생존 조절제로 여겨진다. 또한, SET는 PP2A의 다른 강력한 억제제로 밝혀졌고, 또 SET의 발현은 상이한 인간 악성 질병의 종양 조직에서 발견되어 왔고, SET의 발현 수준은 세포 성장 속도와 밀접하게 관련되어 있다.

[0004] 따라서, PP2A를 억제하는 SET 또는 CIP2A를 암세포에서 반응성 PP2A에 대하여 길항할 수 있으므로 종양 세포 사멸을 유도하기 위한 p-Akt 암 신호 캐스케이드를 감소시킬 수 있는 화합물을 개발할 필요가 있고, 상기 화합물은 새로운 항암 전략일 수 있다.

한국등록특허공보 제1374500호(공고일 2014.03.13)에는 PP2A(Protein Phosphatase 2A)를 활성화시키는 기작을 통해 항암 활성을 가지는 화합물에 관하여 개시되어 있으나, PP2A 및 SET의 결합능을 억제할 수 있고, 또 단백질 포스파타제 2A의 암 억제제(CIP2A) 및 p-Akt 암 억제제 발현을 효과적으로 억제할 수 있는 화합물에 대해서는 개시되어 있지 않다.

발명의 내용

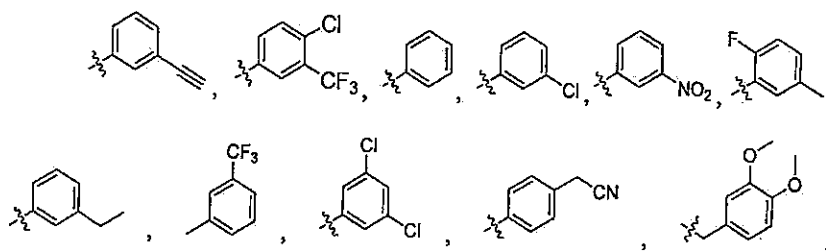
[0005] 발명의 요약

[0006] 본 발명은 PP2A 및 SET의 결합능을 억제할 수 있고, 또 단백질 포스파타제 2A의 암 억제제(CIP2A) 및 p-Akt 암 억제제 발현을 효과적으로 억제할 수 있는 신규 화합물을 제공한다. 이 화합물은 단백질 포스페이트 2A (PP2A) 촉진제 및 종양단백질(oncoprotein) SET 길항제로서 사용될 수 있고 또 암을 효과적으로 치료할 수 있다.

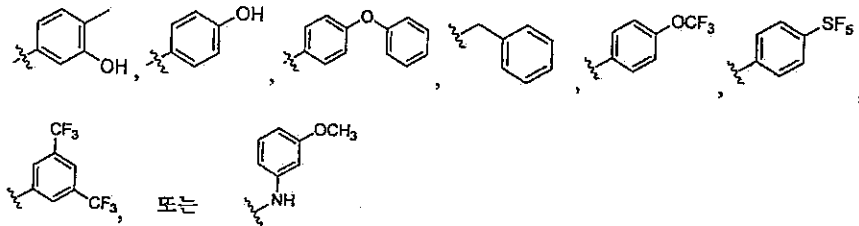
[0007] 본 발명의 일개 목적은 하기 화학식 I(a) 또는 화학식 I(b)으로 표시되는 아릴 아민 치환된 퀴놀살린을 제공하는 것이다:



[0008] 식 중, R¹, R² 및 R³은 동일하거나 상이한 치환된 페닐기이고 또 독립적으로 원자 또는 기에 의해 치환된 페닐, 방향족 헤테로시클릭기이며, 또 상기 치환된 페닐기는 각각



[0010]

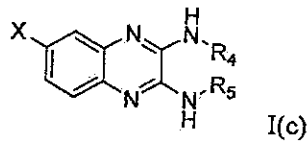


[0011]

이다.

[0012]

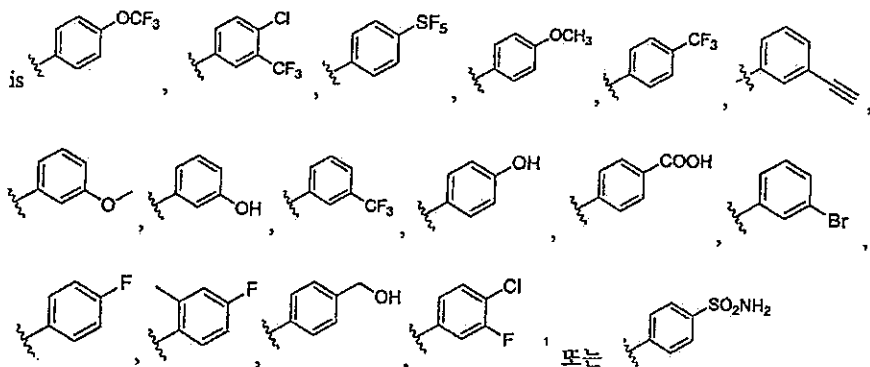
본 발명의 다른 목적은 하기 화학식 I(c)으로 표시되는 아릴 아민 치환된 퀴놀린을 제공하는 것이다:



[0013]

[0014]

식 중, R⁴ 및 R⁵는 동일하거나 상이한 치환된 페닐기이고 또 독립적으로 원자 또는 기에 의해 치환된 페닐, 방향족 헤테로시클릭기이고, 또 상기 치환된 페닐기는 각각



[0015]

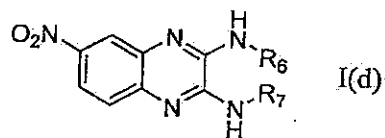
이고; 또

[0016]

X는 할로겐, 할로알킬, 메톡시, 니트로, 아미노, 아마이드, 카복실, 산, 벤조페논 또는 메톡시카보닐임.

[0017]

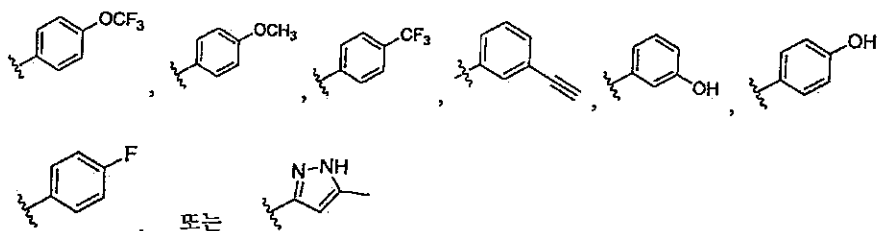
본 발명의 다른 목적은 하기 화학식 I(d)으로 표시되는 아릴 아민 치환된 퀴놀린을 제공하는 것이다:



[0018]

[0019]

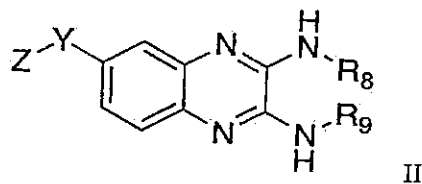
식 중, R⁶ 및 R⁷는 동일하거나 상이한 치환된 페닐기이고 또 독립적으로 원자 또는 기에 의해 치환된 페닐, 방향족 헤테로시클릭기이고, 또 상기 치환된 페닐기는 각각



[0020]

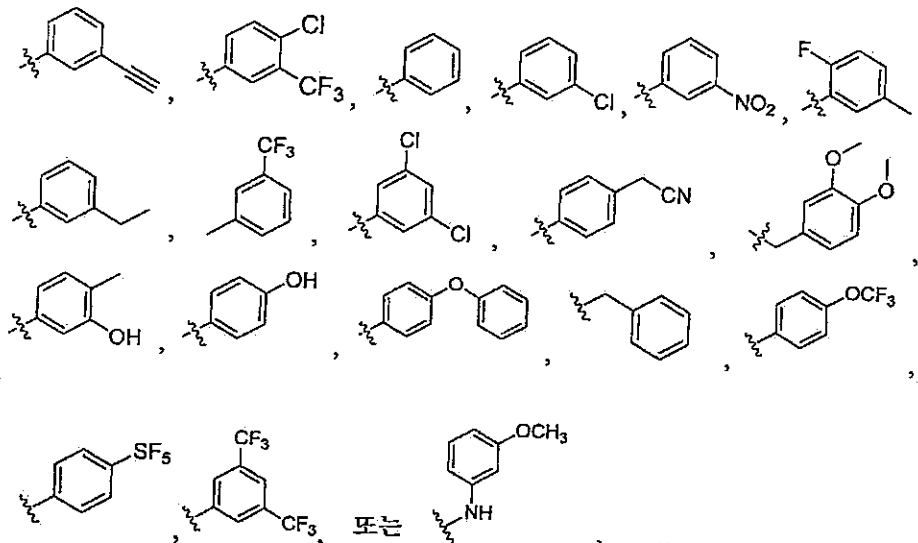
임.

[0021] 본 발명의 다른 목적은 하기 화학식(II)으로 표시되는 아릴 아민 치환된 퀴놀살린을 제공하는 것이다:



[0022]

[0023] 식 중, R⁸ 및 R⁹는 동일하거나 상이한 치환된 페닐기이고 또 독립적으로 원자 또는 기에 의해 치환된 페닐이며 또 상기 치환된 페닐기는 각각



[0024]

[0025] 이고; 또

[0026] Y는 CO 또는 (CH₂)_n이고, n=1-3; Z= COOR¹⁰, 또는 작용기에 의해 치환된 페닐이며, R¹⁰은 아릴 또는 알킬임.

[0027] 본 발명의 다른 목적은 상기 기재된 화합물 및 약리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0028] 본 발명의 다른 목적은 단백질 포스파타제 2A (CIP2A) 억제제의 종양단백질 SET 길항제 또는 암 억제제로서 사용되는, 세포에서 단백질 포스파타제 2A (PP2A) 활성을 향상시키고 또 종양단백질 SET 및 단백질 포스파타제 2A (PP2A) 사이의 결합을 파괴하는, 상기 기재된 화합물 및 약리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0029] 본 발명의 다른 목적은 불활성 단백질 포스파타제 2A (PP2A), 종양단백질 SET 발현 증가 또는 단백질 포스파타제 2A의 암 억제제(CIP2A)의 발현 증가를 특징으로 하는 질병 또는 상태를 치료하기 위한, 상기 기재된 화합물 및 약리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0030] 본 발명의 일 실시양태에서, 상기 약학적 조성물은 항암 약물을 더 포함하고, 상기 항암 약물은 소라페닙 또는 파클리탁셀이다.

[0031] 본 발명의 다른 목적은 불활성 단백질 포스파타제 2A (PP2A), 종양단백질 SET 발현 증가, 단백질 포스파타제 2A의 암 억제제(CIP2A)의 발현 증가를 특징으로 하는 질병 또는 상태를 치료하기 위한 상기 기재된 화합물을 비롯한 약물의 제조 방법을 제공하는 것이다

[0032] 본 발명의 다른 목적에서, 불활성 단백질 포스파타제 2A (PP2A), 종양단백질 SET 발현 증가, 단백질 포스파타제 2A의 암 억제제(CIP2A)의 발현 증가를 특징으로 하는 질병 또는 상태는 간암, 폐암, 백혈병, 유방암, 신장암, 갑상선암, 대장암, 머리암 및 목암이다.

[0033] 본 발명에 대한 상세한 기술 및 상기 바람직한 실시양태는 당업자들이 특허청구범위의 특징을 잘 실시할 수 있도록 첨부한 도면을 참조하여 이하의 설명에 기재되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0034]

도 1a 내지 1g는 본 발명의 에르로티닙(erlotinib) 유도체인 TD-52가 에르로티닙에 비하여 더 우수한 HCC(hepatocellular carcinoma) 세포 세포사멸촉진(pro-apoptotic) 효과를 가짐을 도시한다. 도 1a는 HCC 세포에서 MTT 에세이에 의한 TD-52 및 에르로티닙의 세포사멸촉진 효과를 도시한다. 상이한 세포에서 TD-52의 IC₅₀이 예시되어 있다. 점수, 평균; 막대, S.D. (n=3). 도 1b는 유세포분석기(flow cytometry)에 의한, HCC 세포에서 세포 사멸에 대한 TD-52 및 에르로티닙의 투여량 의존 효과를 도시한다. 막대, 평균; 에러바(error bar), S.D. (n=3). 도 1c는 아넥신-V/PI 이중 염색 에세이에 의한 암 세포의 사멸 및 괴사의 비율을 도시한다. 도 1d는 카스파제-3, 카스파제-9의 발현 및 뒤이은 폴리 (ADP-리보오스) 중합효소 (PARP)의 분해에 대한 웨스턴 블롯을 도시한다. 도 1e는 TD-52 처리 후 DNA 단편화 시험(n=6)을 도시한다. 도 1f는 TD-52에 의해 유도된 세포사멸촉진 효과가 z-VAD-fmk와의 공동처리에 의해 감소되고, 세포는 웨스턴 블롯(상부 패널) 및 유세포분석기 (하부 패널)에 의해 분석됨을 도시한다. 도 1g는 TD-52가 웨스턴 블롯팅에 의해 에르로티닙보다는 적은 EGFR 인산화 활성을 나타냄을 도시한다.

도 2a 내지 2h는 CIP2A의 억제에 의한 p-Akt 하향조절(downregulation)이 HCC 세포에서 사멸에 대한 TD-52의 효과를 결정함을 도시한다. 도 2a는 TD-52가 HCC 세포에서 CIP2A 단백질 발현을 투여량 의존적 방식으로 하향조절하고, HCC 세포는 지시된 농도의 TD-52에 의해 24시간 동안 처리됨을 도시한다; 세포 용해물(lysate)은 웨스턴 블롯에 의한 CIP2A, P-Akt, Akt 단백질 발현 분석을 위해 수집하였다. 도 2b는 TD-52가 HCC 세포에서 CIP2A 단백질 발현을 시간 의존적 방식으로 하향조절함을 도시하고, HCC 세포는 지시된 시간에서 1 μ M TD-52에 의해 처리하였다; 세포 용해물은 웨스턴 블롯에 의한 CIP2A, P-Akt, Akt 단백질 발현 분석을 위해 수집하였다. 도 2c는 TD-52에 의한 처리 후 HCC 세포에서 PP2A 활성이 향상됨을 도시하고, 세포 용해물은 PP2A 포스포타제 활성을 측정하기 위해 제조한다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3). 도 2d는 PP2A의 단백질 발현에 대한 TD-52의 효과를 도시하며, PP2A의 서브유닛의 발현은 웨스턴 블롯에 의해 결정된다. 도 2e는 CIP2A-myc의 이소성(ectopic) 발현이 PLC5 세포에서 사멸에 대한 TD-52의 효과를 제거함을 도시하고, 이는 유세포분석기 (우측 패널) 및 웨스턴 블롯 (좌측 패널)에 의해 각각 분석되었다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3). 도 2f는 PP2A 억제제인 OA에 의한 공동처리가 사멸에 대한 TD-52의 효과를 감소시킴을 도시하고, 이는 유세포분석기 (우측 패널) 및 웨스턴 블롯 (좌측 패널)에 의해 각각 결정된다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3). 도 2g는 siRNA에 의한 PP2A-C 하향조절이 PLC5 세포에서 TD-52의 세포사멸촉진 효과를 약화시킴을 도시하며, 세포 사멸은 유세포분석기 (우측 패널)에 의해 분석되며 또 P-Akt, PP2A 및 PARP의 발현은 웨스턴 블롯(좌측 패널)에 의해 분석되었다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3). 도 2h는 myc-태깅된(tagged) Akt1의 이소성 발현이 PLC5 세포에서 사멸에 대한 TD-52의 효과를 없앤다는 것을 도시하며, 이는 유세포분석기 (우측 패널) 및 웨스턴 블롯 (좌측 패널)에 의해 각각 분석되었다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3)

도 3a 내지 3d는 TD-52가 Elk-1 작용을 방해하는 것을 통하여 CIP2A의 전사를 하향조절함을 도시한다. 도 3a는 TD-52가 투여량- 및 시간-의존적 방식으로 CIP2A의 전사에 영향을 준다는 것을 도시한다. PLC5 세포를 지시된 투여량(좌측 상부 패널) 및 시간(좌측 하부 패널)으로 TD-52에 의해 처리하였다; CIP2A mRNA는 역전사-PCR에 의해 정량된다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3), TD-52 존재하 (우측 하부 패널) 또는 부재하(우측 상부 패널)에서 세포를 시클로헥시미드와 지시된 시간동안 처리한 후, 전체 세포 용해물에서 CIP2A 단백질의 발현은 웨스턴 블롯에 의해 평가한다. 도 3b는 TD-52 (n=3, *P<0.05, 막대, 평균; 에러바, S.D. NS, nonsignificant)에 의해 영향을 받은 CIP2A 근위 프로모터 영역의 확인을 도시한다. 도 3c는 TD-52가 전사 인자 Elk-1의 단백질 발현을 억제하고 또 PLC5 세포의 세포질에서 CIP2A의 단백질 발현을 억제함을 도시한다. PLC5 세포를 용해시키고 또 전체 세포 추출물, CIP2A 및 Elk-1의 발현을 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. Tubulin 및 lamin B는 로딩 대조용으로 사용되었다. 도 3d는 CIP2A 프로모터에 대한 Elk-1의 결합의 억제가 PLC5 세포에서 TD-52의 효과를 결정함을 도시한다. ChIP 에세이를 실시하여 CIP2A 프로모터 영역의 추정 결합 부위에 대한 Elk-1의 결합능을 평가하며, PCR 산물은 겔 전기영동에 의해 분석하였다(좌측 패널). 우측 패널, Elk-1의 이소성 발현은 PLC5 세포에서 TD-52의 세포사멸촉진 효과를 감소시켰다 (우측 상부 및 우측 하부 패널). 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3)

도 4a 내지 4d는 임상적 HCC 샘플 및 생체내 PLC5 누드 마우스 모델에서 CIP2A-PP2A-p-Akt 시그널링 경로를 입증한다. 도 4a는 TD-52-, 소라페닙- 및 DMSO (부형제)- 처리된 누드 마우스에서 PLC5 이종이식(xenograft) 종양의 성장 곡선을 도시한다. * P<0.05; 점수, 평균; 막대, S.D. (n=6). 도 4b는 PLC5 이종이식 종양에서 CIP2A, p-Akt 및 Akt1의 발현 수준을 웨스턴 블롯에 의해 분석함을 도시한다. 도 4c는 TD-52- 또는 DMSO (부형

제)-처리된 누드 마우스에서 PLC5 이종이식 종양의 PP2A 활성의 분석을 도시한다. * $P < 0.05$; 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3). 도 4d는 PLC5 세포에서 세포 생존성에 대한 소라페닙 및 TD-52의 투여량 의존적 효과를 도시한다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3). 도 4e는 HCC 세포에서 TD-52의 세포사멸촉진 효과를 설명하는 시그널링 경로의 도식이다. 도 4f는 임상적 HCC 샘플에서 p-Akt 핵 발현 및 CIP2A 세포질 발현의 면역조직화학적 화상이다.

도 5a 내지 5f는 HCC에 걸린 환자의 종양 조직에서 SET 과발현을 도시한다. 도 5a는 HCC 종양 조직 및 쌍을 이룬 인접 정상 조직에서 SET의 면역조직화학적 염색의 대표 화상이다. 도 5b는 임상적 HCC 샘플의 종양 및 비-종양 조직에서 SET 발현의 수준을 도시한다. 막대: 평균; 에러바, S.D. (n=294). 도 5c는 쌍을 이룬 비-종양 조직에 대한 종양 조직의 발현비율을 도시한다. 점수: 개별 환자(n=147)의 평균 발현비율; 짧은 막대, 이 집단(cohort)의 평균 비율. 도 5d, 좌측 패널은 개별 환자에서 SET 및 p-Akt의 면역조직화학적 염색의 대표 화상이다. 우측 패널은 SET 및 p-Akt의 공동 발현에 의한 HCC 제거한 시점으로부터 재발이 없는 생존을 도시한다. 도 5e는 SET (n=6)의 녹다운을 가하고 또 녹다운 없이 PLC5 세포의 콜로니 형성의 대표적 화상 및 정량 분석이다. 도 5f는 SET(n=6)의 녹다운을 가하고 또 녹다운 없이 Hep3B 세포의 헤파토스피어(hepatosphere) 형성의 대표적 화상 및 정량 분석이다.

도 6a 내지 6f는 본 발명의 에르로티닙 유도제(EMQA)가 HCC 세포의 사멸을 유도하는 SET 길항제일 수 있음을 도시한다. 도 6a는 EMQA가 MTT 에세이에 의해 HCC의 생존성을 억제함을 도시한다. 점수, 평균; 막대, S.D. (n=3). 도 6b는 EMQA에 의해 처리된 HCC의 사멸의 투여량 의존적 증진이 유세포분석기에 의해 분석됨을 도시한다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3). 도 6c는 EMQA에 의해 처리된 HCC의 사멸의 투여량 의존적 증진이 DNA 단편화 시험에 의해 분석됨을 도시한다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3). 도 6d는 p-Akt의 EMQA 유도된 하향조절 및 HCC 세포의 시간 의존적 방식의 사멸이 유세포분석기(상부 패널) 및 웨스턴 블롯(하부 패널)에 의해 분석됨을 도시한다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3) CF: 분해된 형태. 도 6e는 EMQA- 및 부형제-처리된 누드 마우스에서 PLC5 이종이식 종양의 성장 곡선을 도시한다. 점수, 평균; 막대, S.D. (n=10). 도 6f는 웨스턴 블롯에 의해 분석된 PLC5 이종이식 종양 용해물에서 p-Akt 및 Akt1의 발현 (좌측 패널) 및 PP2A 활성 (우측 패널)을 도시한다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=10).

도 7a 내지 7f는 SET를 표적화하는 것에 의해 PP2A-매개된 p-Akt 하향조절의 향상이 EMQA의 항-종양 효과를 결정함을 도시한다. 도 7a는 Akt-myc의 이소성 발현이 PLC5 세포에서 사멸에 대한 EMQA의 효과를 제거함을 도시하며, 이는 유세포분석기 및 웨스턴 블롯에 의해 분석된다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3). 도 7b는 PP2A 억제제인 오카다딘산 (OA)을 사용한 공동처리가 p-Akt에 대한 EMQA의 효과 및 사멸을 감소시킴을 도시하며, 이는 유세포분석기 및 웨스턴 블롯에 의해 분석된다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3). 도 7c는 siRNA에 의한 PP2Ac 하향조절이 PLC5 세포에서 EMQA의 세포사멸촉진 효과를 감소시킴을 도시하며, 이는 유세포분석기 및 웨스턴 블롯에 의해 분석된다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3). 도 7d는 EMQA가 PI3K, PTEN 및 PDK1의 발현에 영향을 주지 않고 p-Akt 발현을 하향조절함을 도시하며, 이는 웨스턴 블롯에 의해 분석된다. 도 7e는 SET-myc의 이소성 발현이 Hep3B 세포에서 사멸에 대한 EMQA의 효과를 제거함을 도시하며, 이는 유세포분석기 및 웨스턴 블롯에 의해 분석된다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3). 도 7f는 EMQA의 SET 길항제 효과(좌측 패널)를 결정하기 위하여 SET 단백질의 전장(full length) SET, 즉 N-말단 단편(SET_{NTF} , 1-227 a.a.) 및 C-말단(SET_{CTF} , 76-277 a.a.)을 코딩하는 벡터에 의해 Sk-Hep1 세포가 형질감염되는 것을 도시하며, 이는 표면 플라스몬 공명(surface plasmon resonance) (SPR, 좌측 패널) 및 공동면역침강(co-IP, 우측 패널)에 의해 분석된다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3). 웨스턴 블롯 분석은 EMQA가 전장 SET-PP2Ac 및 SET_{CTF} 결합을 현저히 감소시킨 한편, SET_{NTF} -PP2Ac 결합은 영향을 받지 않음을 도시한다(우측 패널).

도 8a 내지 8e는 소라페닙 및 EMQA의 조합이 시험관내 및 생체내 항-HCC 효과의 상승작용을 나타냄을 도시한다. 도 8a는 소라페닙 및 EMQA의 조합 인덱스가 상승작용을 제시함을 도시한다. 상이한 HCC 세포주를 소라페닙 및 EMQA의 조합에 노출시키고 또 MTT에 의해 분석하며, 결과는 CalcuSyn 소프트웨어 (Biosoft, Cambridge, U.K.)에 의해 산출하였다. 도 8b는 EMQA가 HCC에서 소라페닙의 세포사멸촉진 효과를 현저히 향상시킴을 도시하며, 이는 유세포분석기 및 웨스턴 블롯에 의해 분석된다. 도 8c는 종양의 성장 곡선이며, 이는 EMQA 및 소라페닙에 의한 조합처리가 HCC 종양 성장을 현저히 억제함(n=10)을 나타낸다. 점수, 평균, * $P < 0.05$. 도 8d는 종양 크기의 막대 차트이며, 이는 EMQA 및 소라페닙과 조합 처리가 HCC 종양 성장을 현저히 억제함을 나타낸다. 막대, 평균; 에러바, S.D., * $P < 0.05$. 도 8e는 부형제 및 EMQA와 소라페닙 요법 조합 처리된 누드 마우스에서 PLC5 이종이식 종양의 PP2A 활성을 도시한다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=10) (상부 패널). PLC5 이종이식 종양 용해물에

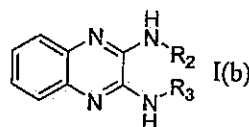
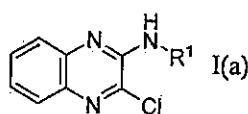
서 p-Akt, Akt1 및 SET의 발현은 웨스턴 블롯 (하부 패널)에 의해 분석하였다.

도 9a 내지 9d는 p-Akt의 하향조절이 EMQA 및 파클리탁셀 조합 처리의 상승작용을 결정함을 도시한다. 도 9a는 EMQA 및 파클리탁셀 조합 처리가 p-Akt의 하향조절을 유도함을 도시하며, EMQA 및/또는 파클리탁셀에 노출된 3 개의 상이한 비-소세포 폐암 (NSCLC) 세포주는 웨스턴 블롯에 의해 분석한다. 도 9b는 A549 세포에서 p-Akt 및 폴리 (ADP-리보오스) 중합효소 (PARP)에 대한 EMQA 및 파클리탁셀 조합 처리의 시간 의존적 효과를 도시한다. 도 9c는 A549 세포에서 p-Akt 및 PARP에 대한 EMQA 및 파클리탁셀 조합 처리의 투여량 의존적 효과를 도시한다. 도 9d는 Akt-myc의 이소성 발현이 A549 세포에서 사멸에 대한 EMQA 및 파클리탁셀 조합 처리의 효과를 감소시킴을 도시하며, 이는 유세포분석기 및 웨스턴 블롯에 의해 분석된다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3).

도 10a 내지 10e는 파클리탁셀 및 EMQA 조합 처리의 생체내 항-종양 효과를 도시한다. 도 10a는 부형제, 파클리탁셀 및/또는 EMQA로 처리된 누드 마우스에서 A549 이종이식된 종양의 성장 곡선을 도시한다. 점수, 평균, *P < 0.05 (각 치료 암에서 n=10). 도 10b는 부형제, 파클리탁셀 및/또는 EMQA 처리에 노출된 후 절제된 A549 이종 이식된 종양의 평균 종양 중량을 도시한다. 막대, 평균; 에러바, S.D. 도 10c는 PP2A 활성을 도시한다. 막대, 평균; 에러바, S.D. (n=3). 도 10d는 A549 이종이식된 종양 용해물에서 p-Akt 및 Akt의 발현의 웨스턴 블롯 화상을 도시한다. 도 10e는 지시된 처리에 노출된 누드 마우스의 체중의 변화를 도시한다. 점수, 평균.

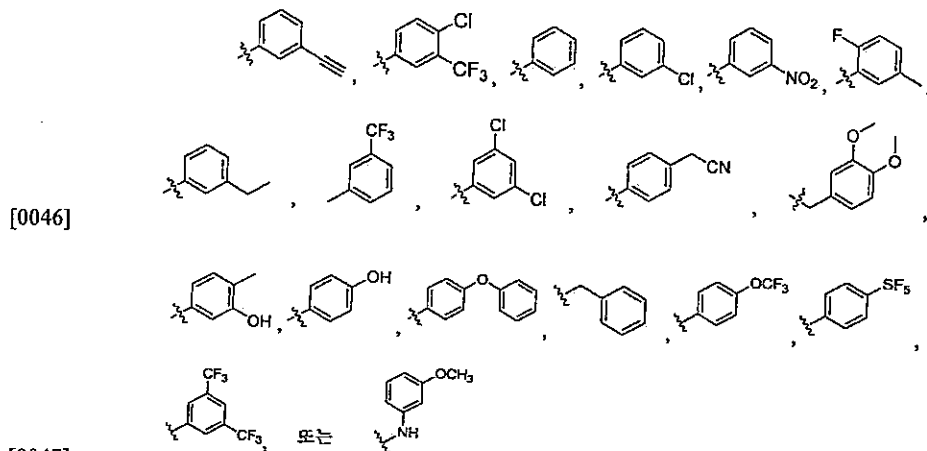
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 바람직한 실시양태의 상세한 설명
- [0036] 다르게 정의하지 않는 한, 본 발명에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당해 분야의 숙련 된 기술을 가진 사람에게 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 발명에서 언급된 모든 문헌은 문헌이 인용된 것과 관련된 방법 및/또는 재료를 개시하고 설명하는 것으로 언급하는 것에 의해 본 발명에 포함 된다.
- [0037] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 단수 형태 “하나”, “하나의”, 및 “상기”는 특별히 다르게 나타내지 않는 한 복수를 포함하는 것이다. 따라서, 예컨대, “샘플”에 대한 언급은 이러한 샘플의 복수 및 당업자에게 공지 된 그의 등가물을 포함한다.
- [0038] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 “EMQA”는 에트로티닙 유도체를 지칭하며, TD-52 내지 TD-95, ITRI TD-627, ITRI TD-602 내지 ITRI TD-605, ITRI TD-607, ITRI TD-608, ITRI TD-612 내지 ITRI TD-626, ITRI TD-628 내지 ITRI TD-631 및 TD-632 화합물을 포함한다.
- [0039] 용어 “카복실”은 -C(O)OR 기를 나타내고, 여기서 R은 발명에 정의된 바와같은 수소, 저급 알킬, 치환된 저급 알킬, 아릴, 치환된 아릴 등이다.
- [0040] 용어 “할로알킬”은 할로젠 원자에 의해 치환된 하나 이상의 수소 원자를 갖는 알킬을 의미하며, 트리플루오로 메틸을 포함하고, 이에 한정되지 않는다.
- [0041] 용어 “할로젠”은 플루오린, 염소, 브롬, 요오드, 및 아스타틴을 의미한다.
- [0042] 본 발명은 생활성을 갖는 에트로티닙 구조 관계를 연구하는 것이다. 본 발명은 에트로티닙, 소라페닙 및 파클리 탁셀과 같은 전통적 항암 약물보다 더 강력한 치료 효과를 갖는 에트로티닙 유도체를 개발하는 것으로, 본 발명 의 화합물은 일부 질병, 예컨대 암에 대하여 강력한 치료 효과를 갖는다. 본 발명에서, 신규 화합물은 SET 길항 제로서 사용될 수 있고, 또 간암, 폐암, 백혈병, 유방암, 신장암, 갑상선암, 대장암, 머리암 또는 목암과 같은 증가된 SET 발현을 특징으로 하는 질병 또는 상태를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물은 활성 PP2A에 대한 SET-PP2A 결합을 파괴할 수 있어, 암 세포 사멸 효과를 초래한다. 따라서, 본 발명의 화합물은 신 규 표적 메커니즘에 의한 대체 암 요법을 제공하며, 이는 전통적인 약에 내성인 환자에 아주 유용하다.
- [0043] 일 요지로서, 본 발명은 하기 화학식 I(a) 또는 화학식 I(b)으로 표시되는 아릴 아민 치환된 퀴놀살린을 제공한다:



[0044]

[0045] 식 중, R^1 , R^2 및 R^3 은 동일하거나 상이한 치환된 페닐기이고 또 독립적으로 원자 또는 기에 의해 치환된 페닐, 방향족 헤테로시클릭기이며, 또 상기 치환된 페닐기는 각각



[0048] 일 실시양태에서, 화학식 I(a)의 화합물은 하기 표 1에 수록된 화합물 중의 하나에 포함되지만, TD-70 내지 TD-82 에 한정되지 않는다.

표 1

No.	R	No.	R
TD-70		TD-77	
TD-71		TD-78	
TD-72		TD-79	
TD-73		TD-80	
TD-74		TD-81	
TD-75		TD-82	
TD-76			

[0049]

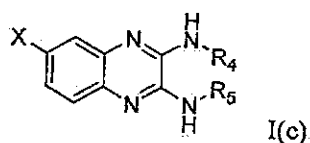
[0050] 일 실시양태에서, 화학식 I(b)의 화합물은 하기 표 2에 수록된 화합물 중의 하나에 포함되지만, TD-52 내지 TD-69 및 ITRI TD-627에 한정되지 않는다.

표 2

No.	R	No.	R	No.	R
TD-52		TD-59		TD-66	
TD-53		TD-60		TD-67	
TD-54		TD-61		TD-68	
TD-55		TD-62		TD-69	
TD-56		TD-63		ITR/ TD-627	
TD-57		TD-64			
TD-58		TD-65			

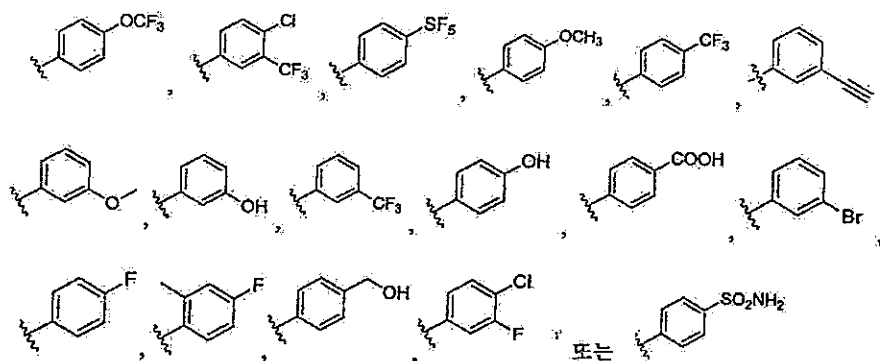
[0051]

[0052] 다른 요지로서, 본 발명은 화학식 I(c)으로 표시되는 아릴 아민 치환된 퀴놀살린을 제공한다:



[0053]

[0054] 식 중, R⁴ 및 R⁵는 동일하거나 상이한 치환된 페닐기이고 또 독립적으로 원자 또는 기에 의해 치환된 페닐, 방향족 헤테로시클릭기이고, 또 상기 치환된 페닐기는 각각



[0055] 이고; 및

[0056] X는 할로젠, 할로알킬, 메톡시, 니트로, 아미노, 아미도, 카복실, 산, 벤조페논 또는 메톡시카보닐임.

[0057] 일 실시양태에서, 화학식 I(c)의 화합물은 하기 표 3에 수록된 화합물 중의 하나에 포함되지만, TD-83 내지 TD-

95, ITRI TD-602 내지 ITRI TD-604, ITRI TD-607 내지 ITRI TD-608, ITRI TD-613 내지 ITRI TD-618, ITRI TD-620 내지 ITRI TD-624 및 ITRI TD-629에 한정되지 않는다.

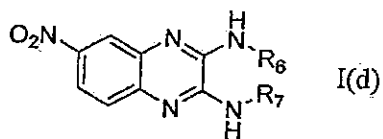
표 3

화학식 I(c)의 화합물

번호	X	R ⁴ /R ⁵	번호	X	R ⁴ /R ⁵	번호	X	R ⁴ /R ⁵
TD-83	F		TD-93	NO ₂		ITRI TD-620	NO ₂	
TD-84	F		ITRI TD-602	NO ₂		ITRI TD-621	NO ₂	
TD-85	Cl		ITRI TD-603	NO ₂		ITRI TD-623	NO ₂	
TD-86	Cl		ITRI TD-604	NO ₂		ITRI TD-624	NO ₂	
TD-87	CF ₃		ITRI TD-608	NO ₂		ITRI TD-629	NO ₂	
TD-88	CF ₃		ITRI TD-613	NO ₂		ITRI TD-607	NH ₂	
TD-89	OCH ₃		ITRI TD-615	NO ₂		ITRI TD-614	NH ₂	
TD-90	OCH ₃		ITRI TD-616	NO ₂		ITRI TD-622	NH ₂	
TD-91	NO ₂		ITRI TD-617	NO ₂		TD-94	COOCH ₃	
TD-92	NO ₂		ITRI TD-618	NO ₂		TD-95	COOCH ₃	

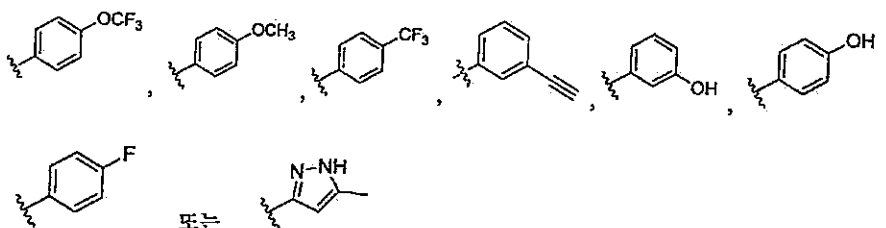
[0058]

[0059] 다른 요지로서, 본 발명은 화학식 I(d)으로 표시되는 아릴 아민 치환된 퀴놀살린을 제공한다:



[0060]

[0061] 식 중, R⁶ 및 R⁷은 동일하거나 상이한 치환된 페닐기이고 또 독립적으로 원자 또는 기에 의해 치환된 페닐, 방향족 헤테로시클릭기이고, 또 상기 치환된 페닐기는 각각

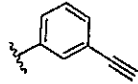
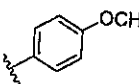
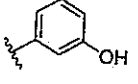
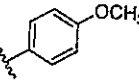
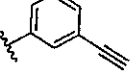
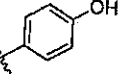
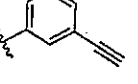
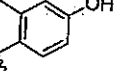
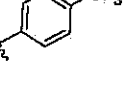
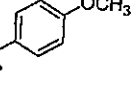
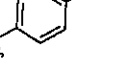
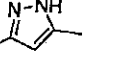
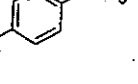
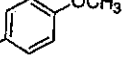
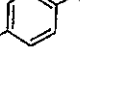
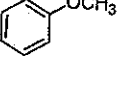


[0062]

임.

[0063] 일 실시양태에서, 화학식 I(d)의 화합물은 하기 표 4에 수록된 화합물 중의 하나에 포함되지만, ITRI TD-605, ITRI TD-612, ITRI TD-619, ITRI TD-625, ITRI TD-626, ITRI TD-628, ITRI TD-630, ITRI TD-631에 한정되지 않는다.

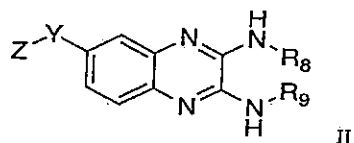
표 4

화학식 I(d)의 화합물		
번호	R ⁶	R ⁷
ITRI TD-605		
ITRI TD-612		
ITRI TD-619		
ITRI TD-625		
ITRI TD-626		
ITRI TD-628		
ITRI TD-630		
ITRI TD-631		

[0064]

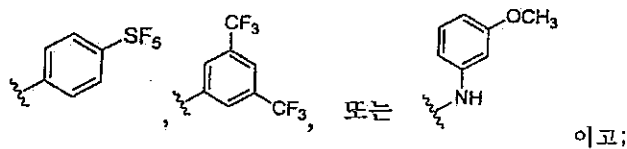
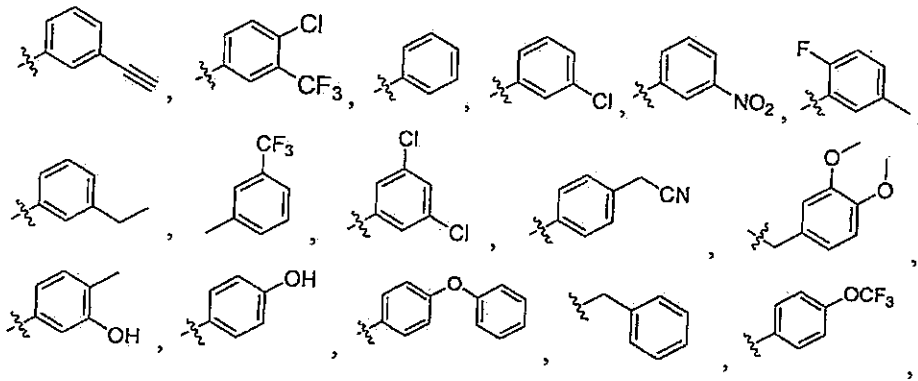
[0065]

[0066] 다른 요지로서, 본 발명은 하기 화학식(II)으로 표시되는 아릴 아민 치환된 퀴놀살린을 제공한다:



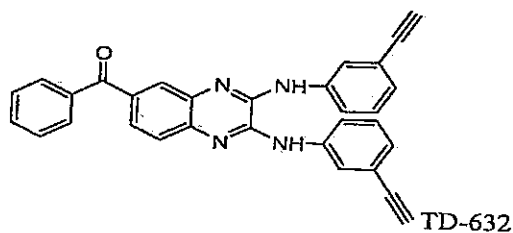
[0067]

[0068] 식 중, R⁸ 및 R⁹는 동일하거나 상이한 치환된 페닐기이고 또 독립적으로 원자 또는 기에 의해 치환된 페닐이며 또 상기 치환된 페닐기는 각각



[0071] Y는 CO 또는 $(CH_2)_n$ 이며, $n=1-3$ 이고; Z= $COOR^{10}$, 또는 작용기에 의해 치환된 페닐이며, R^{10} 은 아릴 또는 알킬임.

[0072] 일 실시양태에서, 화학식 II의 화합물은 하기에 나타낸다:



[0073]

[0074] 따라서 합성된 본 발명의 화합물은 크로마토그래피 또는 결정화 또는 당해 분야에 공지된 기타 종래 방법에 의해 더 정제될 수 있다.

[0075] 본 발명은 하나 이상의 상기 기재한 화합물 및 약리학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 약학적 조성물은 단백질 포스파타제 2A (PP2A)와 종양단백질 SET 사이의 결합을 파괴하여 세포에서 PP2A의 생물학적 활성을 증가시키기 위하여 또는 불활성 PP2A 또는 CIP2A 및 SEP 과발현을 특징으로 하는 질병 또는 상태를 치료하기 위하여 사용될 수 있다. 또한, 세포 또는 종양단백질 SET 길항제에서 PP2A를 활성화하기 위하여, 또는 본 발명에 기재된 바와 같이 불활성 PP2A 또는 SET 과발현을 특징으로 하는 질병 또는 상태를 치료하고 또 이를 치료하기 위한 의약을 제조하기 위한 상기 기재된 화합물의 용도도 본 발명의 범위 내에 포함된다.

[0076] 본 발명은 세포를 본 발명에 기재된 바와 같은 유효량의 화합물 또는 약학적 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는, 세포에서 PP2A를 증가시키거나 또는 세포에서 종양단백질 SET 발현 수준 또는 생물학적 활성을 감소시키는 방법을 제공한다. 본 발명은 본 발명에 기재된 바와 같이 대상자에게 유효량의 화합물 또는 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상자에서 불활성 PP2A 또는 SET 과발현을 특징으로 하는 질병 또는 상태를 치료하는 방법을 또한 제공한다.

[0077] 본 발명의 화합물은 불활성 PP2A 또는 종양단백질 SET 과발현을 특징으로 하는 질병 또는 상태의 치료를 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 화합물은 인간 환자에 그자체로 또는 약학적 조성물로서 투여될 수 있고, 이때 상기 화합물은 PP2A 발현 또는 종양단백질 SET 과발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 다양한 상태를 치료 또는 경감시키기 위한 투여량으로 적합한 담체 또는 부형제와 혼합된다. 인자(예컨대 PP2A)의 증가되거나 감소된 발현 수준 또는 생물학적 활성은 대상자로부터 얻은 샘플(예컨대 혈액 또는 생검 조직)에서 단백질 또는 RNA와 같은 인자의 유전자 산물에 의해 용이하게 검출될 수 있고 또 효소 결합 면역흡착 에세이 (ELISA), 웨스턴 블롯팅 및 노던 블롯팅과 같은 당해 분야에 공지된 검출 방법을 이용하여, 발현된 단백질 등의 RNA 수준, 구조 및/또는 활성에 대해 시험관 내에서 에세이할 수 있다. 본 발명에 따른 불활성 PP2A, 또는 종양단백질 SET 및 CIP2A 과발

현을 특징으로 하는 질병 또는 상태의 특정 예는, 비제한적으로, 암(예컨대 간암, 백혈병, 폐암, 유방암, 신장암) 및 골다공증을 포함한다.

[0078] 용어 “치료”는 특정 질병 또는 상태의 예방, 또는 특정 질병 또는 상태와 관련된 증상의 완화 및/또는 상기 증상의 방지 또는 제거를 포함한다.

[0079] “대상자”는 특히 인간과 같은 포유류를 포함하지만, 본 발명에 기재된 바와 같이 치료를 필요로 하는 일반 반려 동물 (예컨대, 개, 고양이 등), 농장 동물(예컨대, 소, 양, 돼지, 말 등) 또는 실험실 동물(예컨대, 쥐, 마우스, 기니아 피그 등)일 수 있다.

[0080] 본 발명에 사용된 바와 같이 “유효량”은 단독 또는 하나 이상의 다른 활성제와 조합된, 대상자에 대한 치료 효과를 부여하는데 필요한 활성제의 양을 지칭한다. 유효량은, 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 투여 경로, 부형제 용도 및 다른 활성제와의 공동사용에 따라서 달라진다.

[0081] 적합한 투여 경로는 예컨대, 경구, 직장, 정맥주 또는 장 투여; 근육내, 피하, 척수내 주사뿐만 아니라 척추강내, 직접 심실내, 정맥내, 복강내, 비강내, 또는 안구내 주사를 비롯한 비경구 전달, 및 경우에 따라 데포(depot) 또는 서방성 제형을 포함한다.

[0082] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 분야에 공지된 방식, 예컨대, 통상의 혼합, 용해, 유화, 캡슐화, 트랩핑(trapping) 또는 동결건조 방법에 의하여 제조될 수 있다. 본 발명에 따라 사용되는 약학적 조성물은 약학적으로 사용될 수 있는 부형제 및/또는 보조제를 포함하는 하나 이상의 생리학적으로 허용되는 담체를 사용하여 통상의 방식으로 제형화될 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, “허용가능한”은 상기 담체가 조성물의 활성 성분과 상용성이어야 하고(또 바람직하게는, 활성 성분을 안정화할 수 있는) 또 치료될 대상자에게 유해하지 않아야 한다. 적합한 제형은 선택된 투여 경로에 따라 달라진다.

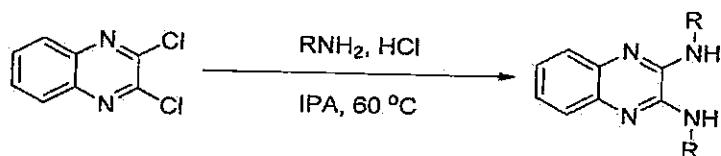
[0083] 특히, 주사의 경우, 본 발명의 화합물은 헥스액, 링거액, 또는 생리학적 식염수와 같은 예컨대, 생리학적으로 상용성 완충액에 제형화될 수 있다. 경구 투여의 경우, 본 발명의 화합물은 활성 화합물을 락토오스, 수크로오스, 만니톨, 소르비톨, 옥수수 녹말, 밀 녹말, 쌀 녹말, 감자 녹말, 젤라틴, 트라가칸트 검, 메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필메틸-셀룰로오스, 소듐 카복시메틸셀룰로오스, 및/또는 폴리비닐 피롤리돈(PVP)과 같은 당해 분야에 공지된 약학적으로 허용되는 담체와 조합하여 제형화되어 본 발명의 화합물이 정제, 환약, 드라제, 캡슐, 액체, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁액 등으로 제형화될 수 있다. 흡입에 의해 투여하는 경우, 본 발명의 화합물은 적합한 추진제, 예컨대, 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로메탄, 이산화탄소 또는 기타 적합한 가스를 사용하여 가압 팩 또는 네블라이저(nebulizer)로부터 에어로졸 분무 제형 형태로 제형화될 수 있다.

[0084] 실시예 1

[0085] 화학적 합성

[0086] 특히, 하기와 같은 도식 I 내지 V에 도시된 과정은 본 발명의 특정 화합물의 합성을 예시한다.

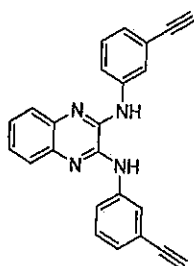
[0087] 1.1 합성 도식 I



[0088]

[0089] 본 발명의 화합물은 상기 합성 도식 I로부터 얻을 수 있고, 상세한 합성 도식은 이하에 기재한다. 합성 도식 I에서, 2,3-디클로로퀴놀옥살린 (1 당량) 및 페닐아민 유사체 (2.3 당량)를 이소프로필 알코올 (3 내지 5 ml)에 부가한 다음, 2 방울의 농축된 HCl을 부가하였다. 상기 혼합물을 철야로 60℃로 가열하고 또 백색 또는 황색 고체를 수득할 것으로 기대되었다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 여과하고, 또 상기 고체를 이소프로필 알코올에 의해 세정하여 이-치환된 퀴놀옥살린 유도체를 수득하며, 이는 에틸 아세테이트/헥산을 용리제로 사용하여 정상 크로마토그래피에 의해 더 정제되어 ID-52 내지 ID69 및 ITRI ID-627 화합물을 생성하였다.

[0090] 1.1.1 N^2, N^3 -비스(3-에틴일페닐)퀴옥살린-2,3-디아민 (TD-52)

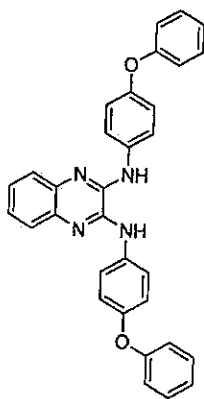


TD-52

[0091]

[0092] ^1H NMR (400 MHz, MeOH- d_4) δ 3.47 (s, 1H) 7.16 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 7.29-7.33 (m, 2H), 7.56 (dd, J = 3.4, 6.4 Hz, 1H), 7.84 (dd, J = 8.0, 1.2 Hz, 1H), 7.96 (s, 1H).

[0093] 1.1.2 N^2, N^3 -비스(4-페녹시페닐)퀴옥살린-2,3-디아민 (TD-53)

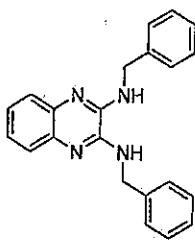


TD-53

[0094]

[0095] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.02 (d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.08-7.13 (m, 3H), 7.32 (s, 1H), 7.38 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.92 (d, J = 8.4 Hz, 2H).

[0096] 1.1.3 N^2, N^3 -디벤질퀴옥살린-2,3-디아민 (TD-54)

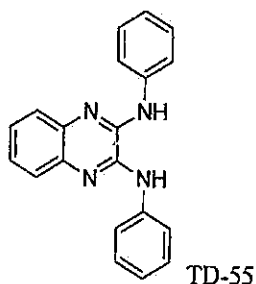


TD-54

[0097]

[0098] ^1H NMR (400 MHz, MeOH- d_4) δ 4.72 (s, 2H), 7.18-7.24 (m, 2H), 7.29 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.52 (dd, J = 3.4, 6.4 Hz, 1H).

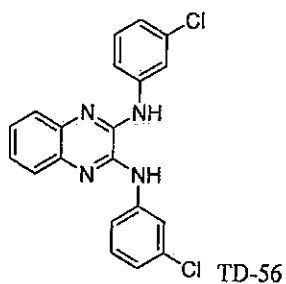
[0099] 1.1.4 N^2, N^3 -디페닐퀴옥살린-2,3-디아민 (TD-55)



[0100]

[0101] ^1H NMR (400 MHz, MeOH- d_4) δ 7.10 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.34 (dd, J = 3.4, 6.4 Hz, 1H), 7.39 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.58 (dd, J = 3.4, 6.4 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 8.0 Hz, 2H).

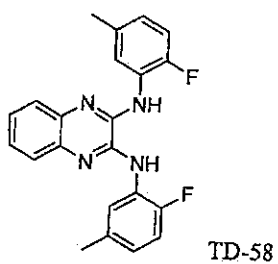
[0102] 1.1.5 N^2, N^3 -비스(3-클로로페닐)퀴옥살린-2,3-디아민 (TD-56)



[0103]

[0104] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 7.14 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.38-7.43 (m, 2H), 7.60 (dd, J = 3.2, 6.0 Hz, 1H), 8.02 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.24 (s, 1H).

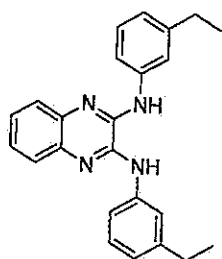
[0105] 1.1.6 N^2, N^3 -비스(2-플루오로-5-메틸페닐)퀴옥살린-2,3-디아민 (TD-58)



[0106]

[0107] ^1H NMR (400 MHz, MeOH- d_4) δ 2.42 (s, 3H), 7.23 (s, 1H), 7.25 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 7.43 (dd, J = 3.4, 6.4 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.61 (dd, J = 3.4, 6.4 Hz, 1H).

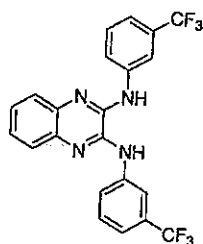
[0108] 1.1.7 N^2, N^3 -비스(3-에틸페닐)퀴옥살린-2,3-디아민 (TD-59)



[0109] TD-59

[0110] ^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOH}-d_4$) 1.23 (t, $J = 7.6$ Hz, 3H), 2.61 (q, $J = 7.6$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.21 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.54-7.56 (m, 2H), 7.62 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H).

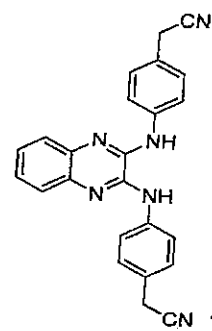
[0111] 1.1.8 N^2, N^3 -비스(3-(트리플루오로메틸)페닐)퀴옥살린-2,3-디아민 (TD-60)



[0112] TD-60

[0113] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 7.40 (t, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.58 (dd, $J = 3.6, 5.6$ Hz, 1H), 7.62 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.19 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.34 (s, 1H), 9.33 (s, 1H).

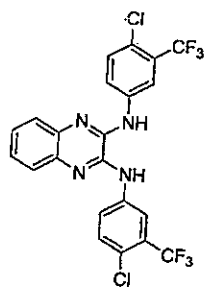
[0114] 1.1.9 2,2'-((퀴옥살린-2,3-디일비스(아잔디일))비스(4,1-페닐렌))디아세토니트릴 (TD-62)



[0115] TD-62

[0116] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 4.03 (s, 2H), 7.35-7.39 (m, 3H), 7.58 (dd, $J = 3.4, 6.4$ Hz, 1H), 7.99 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H).

[0117] 1.1.10 N^2, N^3 -비스(4-클로로-3-(트리플루오로메틸)페닐)퀴옥살린-2,3-디아민 (TD-63)

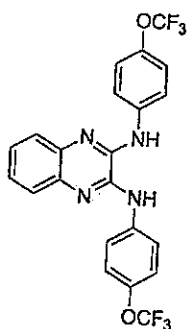


TD-63

[0118]

[0119] ^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOH}-d_4$) 7.28 (dd, $J = 3.6, 6.0$ Hz, 1H), 7.45 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.48 (dd, $J = 3.4, 6.4$ Hz, 1H), 8.03 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H), 8.34 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H).

[0120] 1.1.11 N^2, N^3 -비스(4-(트리플루오로메톡시)페닐)퀸옥살린-2,3-디아민 (TD-65)

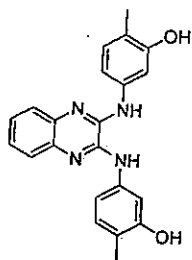


TD-65

[0121]

[0122] ^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOH}-d_4$) 7.26 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.32 (dd, $J = 3.2, 6.0$ Hz, 1H), 7.57 (dd, $J = 3.2, 6.0$ Hz, 1H), 7.90 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H).

[0123] 1.1.12 5,5'-(퀸옥살린-2,3-디일비스(아잔디일))비스(2-메틸페놀)(TD-66)

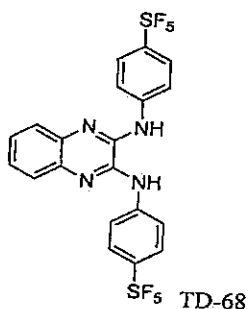


TD-66

[0124]

[0125] ^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOH}-d_4$) 2.24 (s, 3H), 7.03 (dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.26 (s, 1H), 7.44 (dd, $J = 3.4, 6.0$ Hz, 1H), 7.67 (dd, $J = 3.4, 6.0$ Hz, 1H).

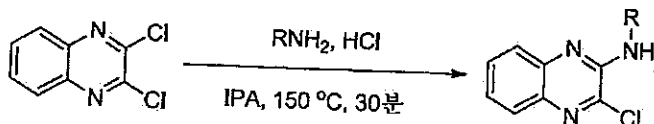
[0126] 1.1.13 N^2, N^3 -비스(4-(펜타플루오로티오)페닐)퀴옥살린-2,3-디아민 (TD-68)



[0127]

[0128] ^1H NMR (400 MHz, $\text{MeOH}-d_4$) 7.41 (dd, $J = 3.6, 6.0$ Hz, 1H), 7.67 (dd, $J = 3.4, 6.4$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H), 8.03 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H).

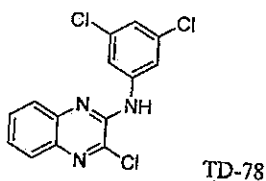
[0129] 1.2 합성 도식 II



[0130]

[0131] 본 발명의 화합물은 상기 합성 도식 II로부터 얻을 수 있고, 자세한 합성 도식은 하기에 기재한다. 합성 도식 II에서, 2,3-디클로로퀴옥살린 (1 당량) 및 페닐아민 유사체 (1 당량)를 이소프로필 알코올 (3 내지 5 ml)에 부가한 다음, 한 방울의 농축된 HCl을 부가한다. 상기 혼합물을 마이크로파 기기에 의해 30분간 150℃로 가열하였다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물을 IPA에 의해 여과하여 백색 고체를 수득하며, 이는 에테르 또는 에틸 아세테이트에 의해 세정하여 일-치환된 퀴옥살린 유도체 TD-70 내지 TD-82 화합물을 수득하였다.

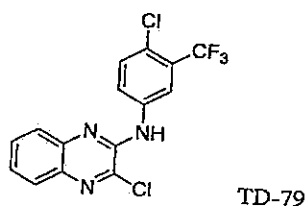
[0132] 1.2.1 3-클로로-N-(3,5-디클로로페닐)퀴옥살린-2-아민 (TD-78)



[0133]

[0134] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 7.20-7.28 (m, 4H), 7.52 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 8.35 (s, 2H), 9.82 (s, 1H).

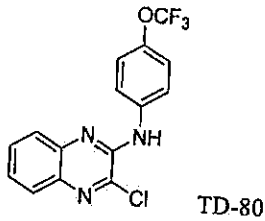
[0135] 1.2.2 3-클로로-N-(4-클로로-3-(트리플루오로메틸)페닐)퀴옥살린-2-아민 (TD-79)



[0136]

[0137] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 7.21-7.26 (m, 3H), 7.47 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.47 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 8.89 (s, 1H), 9.97 (s, 1H).

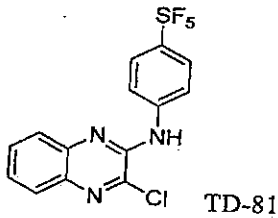
[0138] 1.2.3 3-클로로-N-(4-(트리플루오로메톡시)페닐)퀴옥살린-2-아민(TD-80)



[0139]

[0140] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 7.19-7.20 (m, 3H), 7.34 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 8.28 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 9.65 (s, 1H).

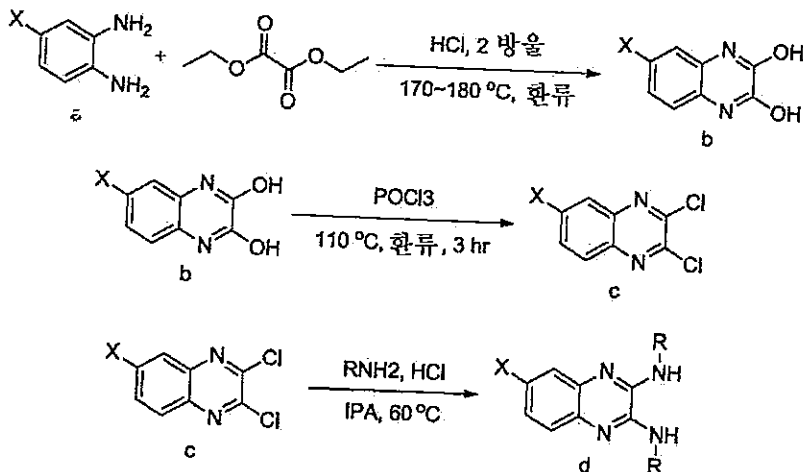
[0141] 1.2.4 3-클로로-N-(4-(펜타플루오로티오)페닐)퀴옥살린-2-아민 (TD-81)



[0142]

[0143] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 7.22-7.27 (m, 3H), 7.54 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 7.84 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 8.38 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 9.90 (s, 1H).

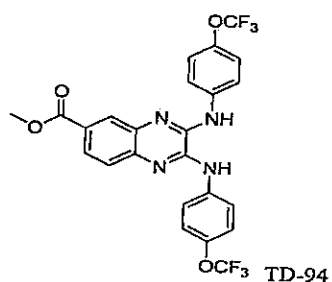
[0144] 1.3 합성 도식 III



[0145]

[0146] 본 발명의 화합물은 상기 합성 도식 III으로부터 수득할 수 있고, 자세한 합성 도식은 아래에 기재한다. 합성 도식 III에서, 4 위치 (a)에서 변형된 페닐렌디아민을 2 ml의 농축된 HCl을 갖는 디에틸옥살레이트에 용해시키고 또 철야로 180°C로 가열하였다. 이 혼합물을 물에 의해 여과하고 건조시켜 석출 중간체 b를 수득하였다. 중간체 b를 POCl₃에 용해시키고 110°C로 3시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 실온으로 냉각시킨 후, 그 혼합물을 빙수에 부어 생성물의 석출을 초래하고, 이를 오븐에서 건조시켜 중간체 c를 얻었다. 페닐아민 및 중간체 c를 IPA에 용해시킨 다음 2 방울의 농축된 HCl을 부가하고 이어 철야로 60°C로 가열하였다. 이 혼합물을 IPA에 의해 여과하고 그 석출물을 크로마토그래피에 의해 더 정제하여 TD-83 내지 TD-95, ITRI TD-602 내지 ITRI TD-604, ITRI TD-607, ITRI TD-608, ITRI TD-613 내지 ITRI TD-618, ITRI TD-620 내지 ITRI TD-624, ITRI TD-629를 수득하였다.

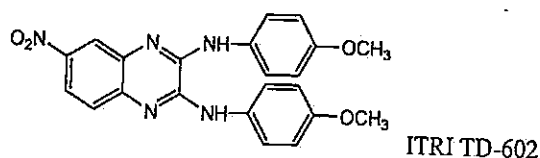
[0147] 1.3.1 메틸 2,3-비스((4-(트리플루오로메톡시)페닐)아미노)퀴옥살린-6-카복실레이트 (TD-94)



[0148] .

[0149] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 3.84 (s, 3H), 7.38 (dd, $J = 4.4, 8.0$ Hz, 4H), 7.56 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 7.83 (dd, $J = 8.6, 1.6$ Hz, 1H), 8.10 (d, $J = 1.2$ Hz, 1H), 8.18 (t, $J = 8.8$ Hz, 4H).

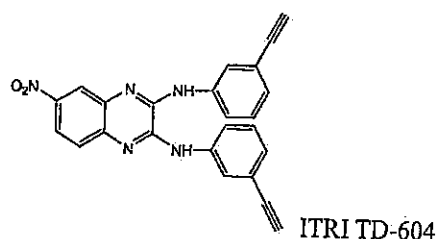
[0150] 1.3.2 N^2, N^3 -비스(4-메톡시페닐)-6-니트로퀴옥살린-2,3-디아민 (ITRI TD-602)



[0151] .

[0152] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 3.79 (s, 6H), 7.00 (dd, 4H), 7.56 (d, 1H), 7.89 (dd, 4H), 8.03 (d, 1H), 8.23 (s, 1H), 10.0(b, 2H).

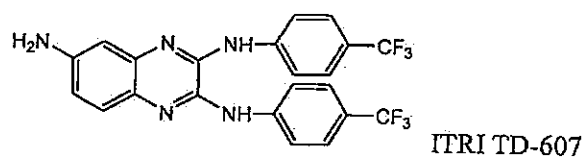
[0153] 1.3.3 N^2, N^3 -비스(3-에틴일페닐)-6-니트로퀴옥살린-2,3-디아민 (ITRI TD-604)



[0154] .

[0155] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 4.19 (s, 1H), 4.20(s, 1H) 7.23 (dd, 2H), 7.42 (m, 3H), 7.64 (d, 1H), 8.11 (b, 4H), 8.23 (s, 1H), 10.1(b, 2H).

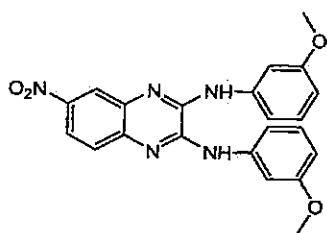
[0156] 1.3.4 N^2, N^3 -비스(4-(트리플루오로메틸)페닐)퀴옥살린-2,3,6-트리아민 (ITRI TD-607)



[0157] .

[0158] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 7.71 (d, 1H), 7.77 (m, H), 8.1(m, 5H), 9.66 (s, 1H), 9.80 (s, 1H) .

[0159] 1.3.5 N^2, N^3 -비스(3-메톡시페닐)-6-니트로퀴옥살린-2,3-디아민 (ITRI TD-608)

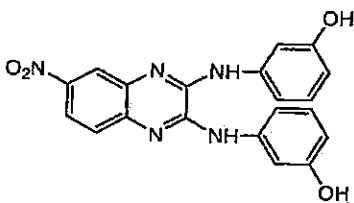


ITRI TD-608

[0160]

[0161] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 3.98 (s, 3H), 3.97(s, 3H), 6.68 (dd, 2H), 7.27 (t, 2H), 7.43 (d, 1H), 7.44 (d, 1H), 7.61 (s, 1H), 7.62(m, 2H), 8.05(d, 1H), 8.25(s, 1H), 9.28(s, 1 H), 9.35,(s, 1H).

[0162] 1.3.6 3-(2-(3-히드록시페닐아미노)-6-니트로퀴놀옥살린-3-일아미노)페놀 (ITRI TD-613)

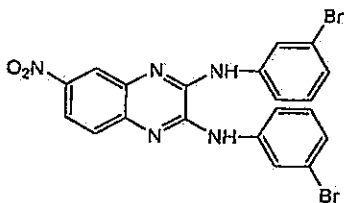


ITRI TD-613

[0163]

[0164] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 6.68 (dd, 2H), 7.09 (m, 2H), 7.18 (m, 2H), 7.58 (d, 1H), 7.61 (d, 1H), 7.70(d, 1H), 8.10(d, 1H), 8.31(s, 1 H), 9.60-10.1,(b, 4H).

[0165] 1.3.7 N^2, N^3 -비스(3-브로모페닐)-6-니트로퀴놀옥살린-2,3-디아민 (ITRI TD-618)

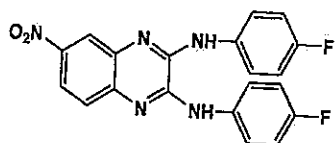


ITRI TD-618

[0166]

[0167] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 7.00 (dd, 1H), 7.19 (m, 2H), 7.30 (m, 1H), 7.58 (d, 1H), 7.39 (dd, 2H), 7.62(d, 1H), 8.05(m, 3H), 8.38(s, 1 H), 10.2-10.6,(b, 2H).

[0168] 1.3.8 N^2, N^3 -비스(4-플루오로페닐)-6-니트로퀴놀옥살린-2,3-디아민 (ITRI TD-620)

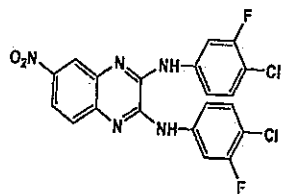


ITRI TD-620

[0169]

[0170] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.25 (m, 4H), 7.59 (d, 1H), 7.88 (m, 4H), 8.06 (d, 1H), 8.26 (s, 1H), 9.34(s, 1H), 9.51(s, 1H).

[0171] 1.3.9 N^2, N^3 -비스(4-클로로-3-플루오로페닐)-6-니트로퀴놀옥살린-2,3-디아민 (ITRI TD-624)

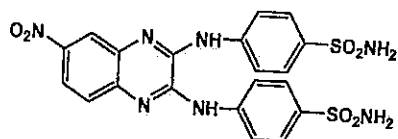


ITRI TD-624

[0172]

[0173] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.41 (dd, 2H), 7.68 (m, 3H), 7.95 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 8.10 (d, 1H), 8.30 (s, 1H), 10.0 (b, 2H).

[0174] 1.3.10 N^2, N^3 -비스(4-페닐설폰아미드)-6-니트로퀴놀살린-2,3-디아민 (ITRI TD-629)



ITRI TD-629

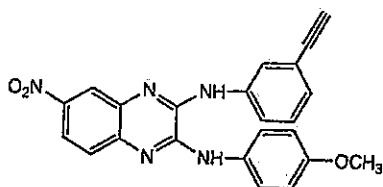
[0175]

[0176] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7.29 (b, 4H), 7.74 (d, 1H), 7.88 (d, 4H), 8.20 (m, 5H), 8.42 (s, 1H), 10.14 (s, 1H), 10.30 (b, 1H).

[0177] 1.4 합성 도식 IV

[0178] 본 발명의 화합물은 상기 합성 도식 IV로부터 수득할 수 있고, 자세한 합성 도식은 아래에 기재한다. 합성 도식 IV에서, 4-(2-클로로-7-니트로퀴놀살린-3-일아미노)페놀, 3-클로로-N-(4-메톡시페닐)-6-니트로퀴놀살린-2-아민, 4-(2-클로로-7-니트로퀴놀살린-3-일아미노)-3-메틸페놀 또는 3-클로로-N-(5-메틸-1H-피라졸-3-일)-6-니트로퀴놀살린-2-아민 (1 당량) 및 페닐아민 유사체 (1.2 당량)를 DMF (3 내지 5 ml)에 부가하였다. 그 혼합물을 3시간 동안 110°C로 가열하였다. 반응이 완료된 후, 물을 반응 혼합물에 부가하고, 그 반응 혼합물을 에틸 아세테이트를 사용하여 추출한 다음 에틸 아세테이트에 의해 세정하였다. 건조 후, 감압하에서 농축 및 건조시켜 조 생성물을 얻었다. 이 조 생성물을 에틸 아세테이트/헥산을 사용하여 정상 크로마토그래피에 의해 더 여과하여 ITRI TD-605, ITRI TD-612, ITRI TD-619, ITRI TD-625, ITRI TD-626, ITRI TD-628, ITRI TD-630, ITRI TD-631 화합물을 수득하였다.

[0179] 1.4.1 N^3 -(3-에틸일페닐)- N^2 -(4-메톡시페닐)-6-니트로퀴놀살린-2,3-디아민 (ITRI TR-605)

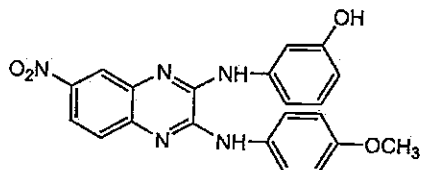


ITRI TR605

[0180]

[0181] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) s, 4.21 (s, 1H), 7.00 (d, 2H), 7.21 (d, 1H), 7.42 (t, 1H), 7.59 (d, 1H), 8.01 (dd, 2H), 8.02 (d, 2H), 8.07 (d, 1H), 8.26 (s, 1H), 9.34 (s, 1H), 9.41 (s, 1H).

[0182] 1.4.2 3-(2-(4-메톡시페닐아미노)-6-니트로퀴놀살린-3-일아미노)페놀 (ITRI TD-612)

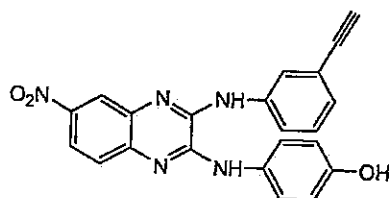


ITRI TD-612

[0183]

[0184] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) s, 6.51(d, 1H), 7.02 (dd, 2H), 7.17 (t, 1H), 7.24 (d, 1H), 7.56(d, 1H), 7.68 (s, 1H), 7.77(dd, 2H), 8.06(d, 1H), 8.30(s, 1H), 9.16(s, 1H), 9.45(s, 1H), 9.47(s, 1H).

[0185] 1.4.3 4-(2-(3-에틴일페닐아미노)-7-니트로퀴옥살린-3-일아미노)페놀(ITRI TD-619)

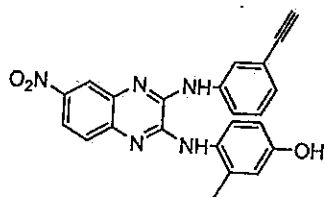


ITRI TD-619

[0186] .

[0187] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) s, 6.81(dd, 2H), 7.20 (d, 1H), 7.22 (t, 1H), 7.54 (d, 1H), 7.60(dd, 2H), 8.00 (d, 2H), 8.05(d, 1H), 8.23(s, 1H), 9.31(b, 2H), 9.39(b, 1H).

[0188] 1.4.4 4-(2-(3-에틴일페닐아미노)-7-니트로퀴옥살린-3-일아미노)-3-메틸페놀 (ITRI TD-625)

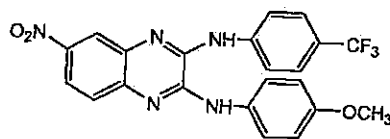


ITRI TD-625

[0189] .

[0190] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) s, 4.21(s, 1H), 6.65(d, 1H), 6.67 (s, 1H), 7.13 (d, 1H), 7.21(d, 1H), 7.42 (m, 2H), 8.05(d, 1H), 8.05(m, 2H), 8.26(s, 1H), 9.10(s, 1H), 9.25(s, 1H), 9.39(s, 1H).

[0191] 1.4.5 N^3 -(4-(트리플루오로메틸)페닐)- N^2 -(4-메톡시페닐)-6-니트로퀴옥살린-2,3-디아민 (ITRI TD-626)

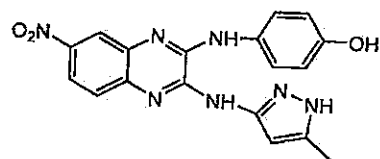


ITRI TD-626

[0192] .

[0193] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) s, 7.00(d, 2H), 7.59 (d, 1H), 7.77 (m, 4H), 8.11(d, 1H), 8.17 (d, 2H), 8.36(s, 1H), 9.47(s, 1H), 9.56(s, 1H).

[0194] 1.4.6 4-(2-(5-메틸-1H-피라졸-3-일아미노)-6-니트로퀴옥살린-3-일아미노)페놀 (ITRI TD-628)

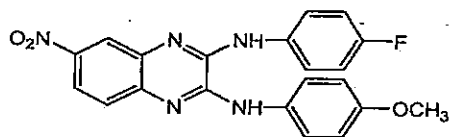


ITRI TD-628

[0195] .

[0196] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) s, 6.80(d, 2H), 6.88 (s, 1H), 7.64 (d, 1H), 7.65(d, 2H), 8.03 (d, 1H), 8.21(s, 1H), 9.28(s, 1H), 9.30(s, 1H), 10.2(s, 1H).

[0197] 1.4.7 N^3 -(4-플루오로페닐)- N^2 -(4-메톡시페닐)-6-니트로퀴옥살린-2,3-디아민 (ITRI TD-631)



ITRI TD-631

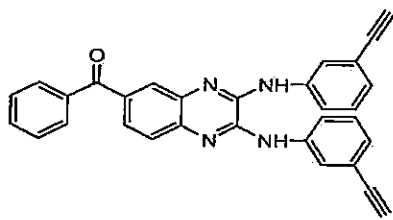
[0198]

[0199] ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) s, 7.00(d, 2H), 7.26 (t, 2H), 7.57 (d, 1H), 7.93(d, 2H), 7.92 (dd, 2H), 8.07(d, 1H), 8.25(s, 1H), 9.31(s, 1H), 9.40(s, 1H).

[0200] 1.5 합성 도식 V

[0201] 본 발명의 화합물은 상기 합성 도식 V로부터 수득할 수 있고, 자세한 합성 도식 아래에 기재한다. 합성 도식 V에서, 2,3-디클로로퀴놀옥살린-6-일)(페닐)메탄은 (1 당량) 및 3-에틴일벤젠아민 (1.2 당량)을 IPA에 넣고 5시간 동안 가열 환류시킨 다음, 냉각시켜 고체를 추출하며, 상기 고체를 IPA에 의해 세정하고 건조시켜 TD-632 (화합식 II)를 수득하였다.

[0202] 1.5.1 2,3-비스(3-에틴일페닐아미노)퀴놀옥살린-6-일)(페닐)메탄은 (TD-632)



TD-632

[0203]

[0204] ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) 4.2 (s, 1H), 4.1(s, 1H), 7.24 (d, 1H), 7.25 (d, 1H), 7.56 (d, 2H), 7.40 (m, 2H), 7.6 (m, 3H), 7.64 (m 3H), 7.79 (m 2H), 7.82 (s 1H), 8.15(b, 2H), 9.25(b, 2H).

[0205] 실시예 2

[0206] 바이오에세이

[0207] 2.1 재료 및 방법

[0208] 2.1.1 시약 및 항체

[0209] 소라페닙 (Nexavar), 에르로티닙 (Tarceva) 및 파클리탁셀은 바이엘 파마슈티컬스(미국 필라델피아 피츠버그 소재) 및 로체 파마슈티컬스(스위스 바젤 소재)에 의해 각각 공급받았다. 오카다익산 (OA)은 카이만 케미컬(미국 미시건 앤 아버 소재)로부터 구입하였고 또 z-VAD-fmk는 시그마(미국 미주리 세인트루이스 소재)로부터 입수하였다. 시험관내 연구를 위해, 다양한 농도의 약물을 디메틸 설펝사이드(DMSO)에 용해시키고 또 5% 우태아 혈청 (FBS)을 함유하는 돌베코 변형된 이글 배지(DMEM) 또는 로스웰 파크 미모리얼 인스티튜트(RPMI) 중의 세포에 부가하였다.

[0210] 시험관내 연구의 경우, 최종 DMSO 농도는 배지 부가 후 0.1%이었다. 항-CIP2A, 항-Akt1, 항-PARP, 항-PP2A-C, 항-PP2A-A, 항-PP2A-B55 및 항-E1k-1을 비롯한 면역블로팅용 항체는 산타크루즈 바이오테크놀로지(미국 캘리포니아 샌디에고 소재)로부터 구입하였다. 항-카스파제-3 및 항-P-Akt (Ser473)와 같은 다른 항체는 셀 시그널링 (미국 매사추세츠, 덴버 소재)로부터 입수하였다.

[0211] 2.1.2 세포 배양

[0212] Sk-Hep1, PLC/PRF/5 (PLC) 및 Hep3B 세포주는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (American Type Culture Collection: ATCC)(미국 버지니아 마나사스 소재)로부터 입수하였다. Huh-7 HCC 세포주는 헬쓰 사이언스 리서치 리소시스 뱅크(Health Science Research Resources Bank: HSRB)(일본 오사카 소재; JCRB0403)로부터 입수하였다. 세포는 공기 중 5% CO_2 분위기에서 37°C 가습 배양기 내에 있는, 10% FBS가 보충된 DMEM에서 유지시켰다. 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(미국 버지니아 마나사스 소재)로부터 입수한 비-소세포 폐암 세포 예컨대 H358, H460 및 A549를 비롯한 다른 세포주 및 인간 편평세포 암종 세포 예컨대 NCI-1703, H2170, H520, SW900 및 NCI-H226는 이하에 기재한 에세이에 제공하였다.

- [0213] 2.1.3 사멸 분석
- [0214] DMSO, 본 발명의 소라페닙 또는 에르로티닙 유도체로 처리한 후의 사멸 세포 수는 유세포분석기(sub-G1)에 의해 평가하였다. 아넥신-V/프로파idium 아이오다이드(PI) 이중 염색 에세이를 이용하여 사멸 및 괴사 세포의 수를 결정하였다. 상기 2개 에세이의 경우, HCC 세포는, 본 발명의 에르로티닙 유도체로 처리하고 sub-G1 에세이의 경우 PI 단독으로 또 아넥신-V-FITC과 조합하여 배양한 후 수집하였다. 세포 조성의 분석은 유세포분석기에 의해 실시하였다. 본 발명의 에르로티닙 유도체-유도된 사멸 세포 치사는 활성화된 카스파제 및 분해된 PARP의 웨스턴 블롯 분석 및 세포질 히스톤-관련 DNA 단편에 대한 세포 치사 효소 결합 면역흡착 에세이 (ELISA)에 의해 평가하였다(Roche, 미국 인디애나 인디애나폴리스 소재). 본 발명의 에르로티닙 유도체 및 카스파제 억제제인 z-VAD-fmk의 공동처리의 효과는 웨스턴 블롯 분석 및 유세포분석기에 의해 평가하였다.
- [0215] 2.1.4 웨스턴 블롯 분석
- [0216] 세포를 일정 시간 동안 카스파제-3, PARP, P-Akt, Akt, CIP2A 등으로 처리하였다. 세포 용해물은 웨스턴 블롯 분석에 의해 분석하였다.
- [0217] 2.1.5 siRNA를 사용한 유전자 녹다운
- [0218] 대조 시약 (D-001810-10) 및 PP2A-C (L-001810-01)를 비롯한 스마트-풀(smart-pool) siRNA(small interfering RNA)는 다르마콘(미국 일리노이 시카고 소재)으로부터 입수하였다. 제조자의 추천에 따라서, 세포는 먼저 Dharma-FECT4 형질감염 시약 (Dharmacon)을 사용하여 6-웰 플레이트 중의 siRNA (최종 농도, 100 nM)에 의해 48시간 동안 형질감염시켰다. 그 후, 배지를 교체하고 세포를 본 발명의 에르로티닙 유도체 (2 μM, 48 시간 동안)로 처리한 다음 웨스턴 블롯 분석 및 사멸 분석을 위해 유세포분석기에 의해 수집하였다.
- [0219] 2.1.6 일시적 형질감염(Transient transfection)
- [0220] CIP2A cDNA (KIAA1524) 및 Elk-1 cDNA는 오리진(Origene) (RC219918 및 RG208921; 미국 메릴랜드 록빌 소재)로부터 입수하였다. 48시간 동안의 형질감염 후, 세포를 본 발명의 에르로티닙 유도체로 소정 시간 동안 처리한 다음 추가의 분석을 위해 수집하였다.
- [0221] 2.1.7 PP2A 포스포타제 활성
- [0222] 각 세포 용해물에서 단백질 포스포타제 활성은 제조자(업스테이트 바이오테크놀로지, 미국 뉴욕 레이크 플라스이드 소재)에 의해 기재된 바와 같이 말라카이트 그린-포스페이트 착물 에세이를 이용하여 트레오닌 포스포펩티드로부터 유리 포스페이트 생성을 측정하는 것에 의해 결정하였다. 요컨대, HCC 세포 용해물을 먼저 저급 세제 용해 완충액 중에서 제조하였다. 포스포타제 에세이는 750 μM 포스포펩티드 기질을 함유하는 PP2A-특이적 반응 완충액(밀리포어, 미국 매사추세츠 빌레리카 소재) 중에서 실시하였다. 30℃에서 10분간 배양한 후, 말라카이트 염료를 부가하고 또 유리 포스페이트를 650 nm에서 광학 밀도에 의해 측정하였다. 샘플 사이의 면역침강 단백질의 양의 차이에 기인하는 변화를 피하기 위하여, 포스포타제 활성은 면역침강된 PP2A의 양에 표준화(normalized)시켰고, 이를 검출하고 각 처리군에 대하여 면역블롯 분석에 의해 정량하였다.
- [0223] 2.1.8 CIP2A 프로모터 및 5' 검출 분석을 위한 루시페라제 리porter 작제물(construct)
- [0224] CIP2A 프로모터 함유 엑손 1의 상류 영역(-2000 bp 내지 -1 bp)은 이전의 연구에 따라 PLC5 세포의 게놈 DNA로부터 PCR에 의해 증폭시키고 또 리porter 벡터인 만덱볼 벡터(pGL4.17, 프로메가, 미국 위스콘신 마디슨 소재)에 *KpnI* 및 *Bg/II* 제한 부위에 클로닝하였다. PCR 증폭된 프로모터 영역 -1000/-1, -400/-1, -300/-1, -150/-1, -110/-1을 pGL4-기본 벡터의 *KpnI* 및 *Bg/II* 제한 부위에 클로닝하였다. 상기 클론들의 뉴클레오타이드 서열은 서열분석에 의해 확인하였다.
- [0225] 2.1.9 크로마틴 면역침강 (ChIP) 에세이
- [0226] ChIP 키트는 노부스 바이오로지컬스(Novus Biologicals) (NBPI-71709; 미국 컬럼비아 리틀톤 소재)로부터 구입하였다. ChIP는 1×10^7 PLC5 세포를 사용하여 실시하며, 상기 세포는 본 발명의 에르로티닙 유도체에 의해 16 시간 처리된 다음 37% 포름알데히드(시그마, F1635)로 1% 최종 농도 및 v/v로 10분간 실온에서 처리되어 단백질을 DNA에 교차결합시킨다. 교차결합 후, 세포는 프로테아제 억제제 카테일을 함유하는 1 x 빙냉 PBS에 의해 2회 세정하였다. 상기 세포를 수집하고 800 x g에서 5분간 원심분리하고, 프로테아제 억제제 카테일을 갖는 400 μl의 용해 완충액에 재현탁시켰다. 상기 세포를 6펄스 동안 초음파처리시키고, 각 펄스에서 15초간 50% 아웃풋, 펄스 사이에는 60-초 얼음 정치. 세포 용해물을 4℃에서 12500 × g로 5분간 원심분리시켰다. 면역침

강은 음성 대조군으로서 Elk1 또는 토끼 IgG 항체를 부가함으로써 실시하였다. 면역복합체는 25 μ l 단백질 A/G 자성 비드와 함께 4°C에서 1시간 동안 배양하는 것에 의해 침강되었다. 단백질-DNA 복합체는 200 μ l 용리 완충액을 사용하여 비드로부터 용출되었다. 단백질-DNA의 교차결합 반응은 8 μ l의 5M NaCl를 95°C에서 15분간 부가하는 것에 의해 역전되었다. DNA는 스핀 컬럼을 이용하여 정제하며 또 CIP2A 프로모터 영역 (-139/-16bp)의 증폭을 위한 세미-PCR에는 2 μ l의 DNA를 사용하였다.

[0227] 2.1.10 이중이식 종양 성장

[0228] 음성 NCr 흉선제거(athymic) 누드 마우스 (5-7 주령)는 내셔널 라보라토리 애니멀 센터(National Laboratory Animal Center)(타이완 타이페이 소재)로부터 입수하였다. 이들 마우스를 사용한 모든 실험 과정은 국립 타이완 대학의 연구실험 동물 관리 및 사용 위원회에 의해 승인된 수법에 따라서 실시하였다. 각 마우스는 50% 마트 리젤을 함유하는 무혈청 배지(BD Biosciences, 미국 매사추세츠 베드포드 소재)에 현탁된 1×10^6 PLC5 또는 A549 세포에 의해 옆구리에 피하 접종되었다. 종양이 100-150 mm³에 도달하면, 마우스는 소라페닙, 본 발명의 에르로티닙 유도체, 또는 부형제 (대조군)에 의해 10 mg/kg/일로 매일 경구 위관영양법으로 4주간 처리되었다.

[0229] 2.1.11 면역조직화학적 염색

[0230] 폴리-L-리신-코팅된 슬라이드 상의 파라핀-매립된 HCC 조직 부분 (4-mm)은 파라핀제거처리시키고 또 10mM 트리스-HCl (pH 7.4) 및 150mM 염화 나트륨으로 행구었다. 퍼옥시다제는 메탄올 및 3% 과산화수소에 의해 정지시켰다. 이어 슬라이드를 가압된 가열 챔버 내 10mM 시트레이트 완충액(pH 6.0) 중, 100°C에서 20분간 위치시켰다. 1:200 희석의 p-Akt1/2/3 (Thr 308)-R 항체 (ab8805, Abcam, Cambridge, UK) 및 1:100 희석의 CIP2A 항체 (ab84547, Abcam)와 함께 실온에서 1시간 동안 배양한 후, 슬라이드를 PBS에 의해 3회 완전히 세정하였다. 결합된 항체는 EnVision 검출 시스템 퍼옥시다제/DAB, 토끼/마우스 키트 (Dako, Glostrup, Denmark)를 사용하여 검출하였다. 이어 상기 슬라이드를 헤마톡실린을 사용하여 대비염색시켰다. 제조자의 테이더시트에 기재된 바와 같이, 마우스 신장 조직 및 인간 대장 암종의 파라핀-매립된 부분을 p-Akt1/2/3 및 CIP-2A에 대한 양성 대조군으로 각각 사용하였다. 음성 대조군은 PBS에 의해 대체된 일차 항체를 가졌다. p-Akt1/2/3 및 CIP-2A의 발현은 면허가 있는 병리학자에 의해 염색 세기를 기본으로 하여 반정량적으로 평가되었다. 염색 세기는 음성, 약함, 중등 및 강함으로서 점수를 매겼다.

[0231] 2.2.12 표면 플라스몬 공명 (SPR)

[0232] 전장(full length) SET 및 절단된(truncated) SET의 PP2Ac에 대한 결합 친화성 및 SET 및 PP2Ac 파괴에 대한 본 발명의 에르로티닙 유도체의 효과를 분석하였다. PP2Ac-GST 재조합 단백질은, GST-포획 항체에 의해 미리 코팅된 CM5 칩에 결합되었다. 고정 농도의 SET 재조합 단백질과 혼합된 몇 개 농도의 본 발명의 에르로티닙 유도체, 또는 고정 투여량의 EMQA 중의 상이한 농도의 절단된 SET 단백질의 혼합물을 주입하는 것에 의해 센소그램(sensogram)을 생성하였다. 이 실험에 사용된 PP2Ac-GST 재조합 단백질은 Abnova (H00005515)로부터 구입하였고 또 SET-His 재조합 단백질은 Genway (GWB-ATG319)로부터 입수하였다.

[0233] 2.2.13 통계적 분석

[0234] 종양 성장 데이터 점수는 평균 종양 부피 $\pm$ S.E로서 보고하고 또 독립적 샘플 t-시험에 의해 비교하였다. 임상적 샘플의 특징은 χ^2 -시험에 의해 비교하였다. P-값<0.05은 양측검정에서 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다. 모든 통계적 분석은 윈도우 소프트웨어 (버전 17.0; SPSS, Inc., 미국 일리노이 시카고 소재)용 SPSS를 이용하여 컴퓨터로 계산되었다.

[0235] 결과

[0236] 2.2.1 본 발명의 에르로티닙 유도체는 HCC 세포 사멸을 증가시킨다.

[0237] 본 발명은 HCC 세포에 대한 본 발명의 에르로티닙 유도체, TD-52, 및 에르로티닙의 항종양 활성을 비교하였다. 본 발명은 TD-52 또는 에르로티닙에 48시간 동안 노출된 후 세포 생존성을 평가하기 위하여 MTT 에세이를 이용하였다. 도 1a에 도시된 바와 같이, TD-52는 모든 HCC 세포주(HA22T, Hep3Bm PLC5 및 Hep3B 포함)에서 에르로티닙보다 세포 생존성에서 현저한 감소를 유발하였고, HA22T (IC₅₀=0.9 μ mol/l), Hep3B (IC₅₀=0.9 μ mol/l), PLC5 (IC₅₀=0.8 μ mol/l) 및 Sk-Hep1 (IC₅₀=1.2 μ mol/l)를 나타내었다. 상기 처리에 의해 유발된 세포 사멸을 또한 평가하기 위하여, 모든 4개 세포주를 지시된 농도의 TD-52 및 에르로티닙에 의해 24시간 동안 처리하고 sub-G1 세포의 비율을 유세포분석기에 의해 측정하였다(도 1b). sub-G1 분석의 결과는 MTT 에세이에서 관찰된 발견을 반

항하며, 즉 이들은 TD-52가 에르로티닙보다 더욱 강력한 HCC 세포에 대한 항종양 효과를 가지고 있음을 보여준다.

[0238] TD-52의 항종양 특성을 더욱 잘 특징화하기 위하여, 아넥신-V/프로피듐 아이오다이드(PI) 이중 염색 에세이, 웨스턴 블롯 분석, 세포 사이클 분석 및 DNA 단편화 에세이를 실시하였다(도 1c-1e.). 투여량 증가하면서, 암 세포의 사멸 및 괴사 비율은 아넥신-V-FITC/PI 이중 염색 에세이에 의해 분석하였다. 2 μ M 이상의 투여량으로 TD-52 와 48시간 배양한 후, 사멸 및 괴사 치사를 비롯한 암 세포 치사 정도는 4개의 상이한 HCC 세포에서 50% 이상이었다(도 1c). Hep3B 세포는 TD-52-유도된 괴사성 세포 치사에 대하여 더욱 민감한 반면, 사멸 세포 치사는 동일 투여량 범위에서 HA22T, PLC5 및 Sk-Hep1 세포에서 더 많은 비율의 세포 치사를 담당하고 있었다. 웨스턴 블롯팅 결과로부터 분명한 바와 같이, TD-52 처리는 카스파제-9, 카스파제-3의 활성화에 이어 폴리 (ADP-리보오스) 중합효소 (PARP)의 분해를 투여량-의존적 방식으로 유발하였다(도 1d). 또한, TD-52 (2 μ M) 및 판-카스파제 억제제인 z-VAD-fmk의 공동처리를 48시간 실시한 후, TD-52의 세포사멸촉진 효과가 감소되었다(도 1f). 또한, 암세포의 DNA 단편화는 비교적 낮은 농도 (1 μ mol/l, 24 시간; 도 1e)에서 TD-52에 의해 유도되었다. 그러나, TD-52는, 에르로티닙이 나타낸 바와 같은, 표피 성장 인자 리셉터 (EGFR) 키나제 억제제 능력은 가지고 있지 않았다(도 1g). 따라서, 이들 결과는 본 발명의 에르로티닙 유도체가 에르로티닙에 비하여 더욱 강력한 항종양 활성을 나타내고, 또 이러한 활성이 EGFR 키나제 억제와는 독립적이라는 것을 나타낸다.

[0239] 또한, 본 발명은 인간 편평 세포 암종 세포 예컨대 NCI-1703, H2170, H520, SW900 및 NCI-H226, 비-소세포 폐암 세포 예컨대 A549, H358의 세포 생존성 및 IC₅₀을 검출하기 위하여 1 μ M 및 10 μ M의 에르로티닙 유도체를 각각 사용하였다. 결과를 하기 표 5에 나타내며, 이는 본 발명의 에르로티닙 유도체가 효과적으로 암세포 치사를 유도함을 입증한다.

[0240] 2.2.2 CIP2A의 억제에 의한 PP2A의 향상은 본 발명의 에르로티닙 유도체의 세포사멸촉진 효과를 결정한다

[0241] 이어 본 발명은 TD-52와 연관된 분자 메커니즘을 조사하였고, 특히 단백질 포스파타제 2A (CIP2A)-단백질 포스파타제 2A (PP2A)-p-Akt 시그널링 경로의 암 억제제에 대해 집중하였다. 도 2a 및 2b에 도시된 바와 같이, TD-52는 투여량 및 시간 의존적 방식으로 CIP2A 및 p-Akt의 단백질 발현을 하향조절하였다. 또한, PP2A 활성은 HCC 세포가 1 μ l TD-52에 의해 24시간 처리된 후에 향상(도 2c)된 반면, PP2A-관련된 서브유닛인 PP2A-A, PP2A-B5 및 PP2A-C 서브유닛의 발현 수준은 영향을 받지 않았다. 이들 결과로부터, PP2A 활성은 TD-52 처리에 의해 CIP2A의 발현 억제를 통하여 향상되었고, 이는 이후에 p-AKT 및 HCC 세포 사멸의 하향조절을 초래하였다 (도 2d).

[0242] TD-52에 의한 사멸 유도를 매개함에 있어서 CIP2A/PP2A/p-Akt 경로의 역할을 확인하기 위하여, myc-태깅된 CIP2A의 이소성 과발현을 갖는 PCL5 세포를 48 시간 동안 형질감염시킨 후 (도 2e), 세포를 2 μ M의 TD-52에 의해 24시간 동안 처리하였다. 야생형 세포와 비교하여, p-AKT의 발현 수준은 CIP2A-과발현 세포에서 상향조절되었다(upregulated). 또한, sub-G1 분석을 이용하여, TD-52의 사멸 효과는 이들 CIP2A-과발현 PLC5 세포에서 현저하게 감소되었다. 이어, 본 발명은 2개 전략, 즉 RNA를 침묵(silencing)(siRNA)시키는 것에 의한 PP2A의 녹다운, 및 PP2A 억제제인 오카다익산(OA)을 사용한 공동처리에 의한 HCC 세포에 대한 TD-52의 효과를 매개함에 있어서 PP2A의 역할을 조사하였다(도 2f 및 2g). PLC5 세포를 100nM OA에 의해 처리했을 때, p-Akt의 발현수준은 향상되었고 또 TD-52-유도된 HCC 종양 세포 사멸은 감소되었다 (도 2f). 유사하게, PP2A가 PP2A의 siRNA에 의해 녹다운되었을 때, p-Akt의 발현은 증가하였고 또 TD-52의 항종양 효과는 반대로 되었다. 본 발명은 일시적 형질감염에 의해 Akt-과발현 PLC5 세포를 또한 생성하였고 또 HCC 세포의 TD-52-유도된 사멸이 현저히 감소된 것을 발견하였다(도 2h). 이들 결과는 HCC 세포에서 TD-52의 효과를 매개함에 있어서 CIP2A/PP2A/p-Akt 시그널링 경로의 중요한 역할을 입증한다.

[0243] 2.2.3 본 발명의 에르로티닙 유도체는 CIP2A-PP2A-p-Akt 시그널링 경로를 통하여 세포 사멸을 유도한다

[0244] TD-52가 CIP2A-PP2A-p-Akt 시그널링 경로에 영향을 주는 방식을 더 잘 이해하기 위하여, 본 발명은 단백질 합성 억제제 시클로헥시미드에 의해 번역이 차단되었을 때 CIP2A의 제거(분해)가 TD-52에 의해 영향을 받는지 여부를 조사하였다. 도 3a에 도시된 바와 같이, CIP2A 단백질 분해에 필요한 시간은 TD-52에 의해 현저히 영향을 받지 않았지만, RT-PCR에 의해 검출된 mRNA 발현은 TD-52 처리에 의해 억제되었다. 이 결과는 TD-52가 CIP2A의 전사를 억제함을 제시하므로, 본 발명은 CIP2A 프로모터가 작용 메커니즘을 결정하는지 여부를 조사하였다. CIP2A 유전자의 프로모터가 루시페라제 리포터에 연결되었을 때, TD-52는 투여량 의존적 방식으로 루시페라제 활성을 억제하였다(도 3b, 상부 패널). CIP2A 유전자 프로모터 영역의 어떤 요소가 TD-52의 효과에 중요한지를 더 확인하기 위하여, 일련의 PCR 결실 클론을 pGL4 루시페라제 벡터 내에 작성하였다. 도 3b에 도시된 바와 같이,

TD-52 처리는 -110/-1 작제물(construct)을 갖는 세포 중에서 루시페라제 활성화에 영향을 주지 않았다. 이러한 발견은 -110 과 -150 사이의 영역이 CIP2A 발현을 위한 결합 부위를 함유함을 제시한다. 이전의 보고들은 Elk-1 이 상기 영역에 결합할 수 있는 것이라고 제안하였다. Elk-1은 경부 및 자궁내막 암에서 CIP2A의 발현 수준을 다른 전사 인자, Ets1과 함께 조절하였다. 따라서, 본 발명은 HCC 세포에서 CIP2A-PP2A-p-Akt 시그널링 경로의 조절을 매개함에 있어서 Elk-1의 역할을 시험하였다. PLC5 세포 처리에서, Elk-1 및 CIP2A의 발현은 웨스턴 블롯에 의해 검출될 수 있었다; 한편 Elk-1의 발현은 핵 용해물에 특히 우세하였고, CIP2A의 발현은 주로 세포질 용해물에서 확인되었다. 그러나, TD-52 처리 후, PLC5 세포에서 CIP2A 및 Elk-1의 발현은 현저히 억제되었다(도 3c). Elk-1과 CIP2A 사이의 상호작용을 더 설명하기 위하여, 본 발명은 크로마틴 면역침강 (ChIP) 분석 및 정량적 PCR을 이용하여 Elk1과 CIP2A 프로모터 유전자의 직접적 관계를 평가하였다(도 3d). 미처리 세포에서, Elk-1 발현은 교차결합된 단백질-DNA 복합체에서 검출되었고, 이는 CIP2A 유전자의 프로모터 영역에 대한 Elk-1의 직접적 결합을 지지하였다. 또한, 세포가 TD-52에 노출되었을 때, Elk-1의 발현은 두어량 의존적 방식으로 감소하였다. 이들 결과는 Elk-1과 CIP2A 프로모터 사이의 결합을 방해하는 것에 의해 TD-52가 CIP2A를 하향조절하고, 따라서 CIP2A의 전사 감소를 초래함을 나타낸다. CIP2A가 억제됨에 따라서, PP2A가 활성화되어, Akt의 탈인산화 및 암 세포 사멸을 초래하였다. 또한, Elk-1의 이소성 과발현은 CIP2A의 TD-52-유도된 하향조절 및 암 세포 사멸을 감소시켰다 (도 3d, 우측 패널).

[0245] 2.2.4 PLC5 이종이식 종양 모델 상에서 본 발명의 에르로티닙 유도체의 생체내 항종양 효과

[0246] 본 발명은 생체내 TD-52의 효과를 평가하기 위하여 PLC5 이종이식 마우스 모델을 이용하였다. 본 발명은 비교 처리군의 하나로써 소라페닙을 선택한다. 종양을 갖는 마우스에게 소라페닙 (10 mg/kg), TD-52 (10 mg/kg) 또는 DMSO (부형제, 대조용)를 투여하였다. 4주간의 처리 후, 소라페닙 및 TD-52를 투여받은 마우스의 종양 크기는 대조군의 종양 크기보다 작았다. 또한, 소라페닙과의 대조에서, TD-52 처리는 보다 강력한 생체내 종양 성장 억제 및 시험관내 세포 생존성($P < 0.05$; 도 4a 및 4d)을 나타내었다. 본 발명은 TD-52 및 부형제를 투여받은 마우스로부터 취한 이종이식된 종양을 더 조사하여 종양 조직 내의 분자 거동을 확인하였다. 도 4b 및 4c에 도시된 바와 같이, TD-52는 PP2A 활성을 향상시켰고 또 생체내 종양 샘플 중에서 CIP2A 및 p-Akt의 발현 수준을 하향조절하였고, 이는 시험관내에서 분자 거동이 생겼음을 반영한다. 요컨대, TD-52는 Elk-1과 CIP2A 유전자의 프로모터 사이의 결합을 방해하여, CIP2A의 전사의 하향조절 및 PP2A 활성 증가를 초래하는 것으로 밝혀졌다. PP2A 활성이 TD-52에 의해 향상되었을 때, Akt는 탈인산화되어(dephosphorylated), HCC 세포 사멸을 증진하였다.

[0247] 2.2.5 HCC에 걸린 환자로부터 간 종양 조직의 검출

[0248] p-Akt와 CIP2A의 임상적 관련성을 입증하기 위하여, 본 발명은 HCC에 걸린 147명의 환자로부터 얻은 종양 샘플을 분석하고 이들의 임상적 특징을 분석하였다. 도 4f에서, CIP2A는 조사된 종양 샘플의 55.5%에서 높게 발현된다. 또한, p-Akt에 대한 면역조직화학적 염색은 CIP2A에 대한 세포질 염색과 현저하게 관련되어 있음을 나타내었다.

[0249] 2.2.6 종양단백질 SET는 종양 조직에서 과발현된다

[0250] 본 발명은 SET가 HCC 종양 조직에서 과발현되고 또 SET와 p-Akt의 공동발현이 HCC 환자에서 수술 후 재발 위험이 높은 것을 예측함을 확인한다. 본 발명자들은 먼저 147명의 HCC 환자를 포함하는 세트에서 종양 조직 및 인접 정상 조직으로부터 수집한 쌍을 이루는 샘플을 사용하여 종양단백질 SET의 이상 발현을 확인하였다(도 5a 내지 5c). 종양 조직에서 SET의 발현은 정상 조직에서 관찰된 발현보다 현저하게 높았다. 294개의 HCC 종양 샘플 (환자 당 한쌍의 샘플)에서 SET 발현의 평균 H 점수는 종양 조직에서 170.8이었고, 또 비-종양 조직에서 86.7이었다 ($p=86.8$) (도 5b). 종양에서 SET 발현의 특이성은 동일 환자로부터 얻은 쌍을 이루는 정상 조직을 갖는 종양에서 SET의 발현 수준을 비교할 때 또한 드러났다. 도 5c에 도시된 바와 같이, 본 발명자의 집단 내의 거의 모든 환자는 종양 조직에서 현저하게 높은 SET 발현을 나타냈고, 종양 대 비-종양 SET 발현의 평균 비율은 2.2이었다. 분명히, 높은 수준의 SET 발현은 발전적 임상 단계 및 불량한 분화를 비롯한 불량한 임상 특징과 현저하게 관련되었다. SET는 종양 억제제 포스파타제 PP2A의 강력한 억제제이기 때문에, 본 발명은 SET의 이상 발현이 HCC에서 PP2A의 기능이상과 관련되는지 여부를 조사하였다. 다르게는, 고수준의 SET 발현은 PP2A에 의해 조절된 중요한 발암성 시그널링 경로 중의 하나인 Akt 시그널링의 활성화와 현저하게 관련되었다(도 5d). 중요하게는, 높은 SET 및 p-Akt의 공동발현은 수술 후 HCC의 더 높은 재발 위험을 예측하였다(도 5d, 하부 패널). HCC에서 SET의 발암 가능성을 조사하기 위하여, 본 발명은 특정 shRNA를 사용한 세포 성장에 대한 SET 침묵의 효과를 평가하였다. 도 5e에 도시된 바와 같이, SET에 대비해 shRNA에 의해 형질감염된 PLC5 세포의 성장 속도는 음성 대조군 shRNA에 의해 형질감염된 세포와 비교하여 현저하게 감소되었다. 따라서, SET 침묵은 Hep3B 세포의

헤파토스피어(hepatosphere) 형성능의 현저한 감소를 초래하였다(도 5f). 종합하면, 이들 결과는 SET의 이상 발현이 간암 발생 증가에서 공통된 사건임을 나타낸다. 또한, 본 발명은 NSCLC를 갖는 환자로부터 NSCLC A549 세포주 및 조직을 검출하는 것에 의해 SET가 폐암에서 중요한 발암 역할을 하고 또 SET와 PP2Ac(촉매적 도메인)의 결합이 PP2A 활성 향상을 유도함을 입증하였다(데이터 없음).

[0251] 2.2.7 PP2A는 Akt의 하향조절 및 HCC 세포의 사멸을 촉진한다

[0252] 본 발명은 이어 SET-PP2A 표적화가 항-HCC 전략 가능성이 있는지 여부를 조사하였다. 먼저, 본 발명은 지시된 투여량의 본 발명의 에르로티닙 유도체(EMQA)에 48 시간 노출된 후 HCC 세포의 세포 생존성을 평가하기 위한 MTT 에세이를 이용하였다. 도 6a에 도시된 바와 같이, EMQA는 PLC5, HuH7, Hep3B 및 Sk-Hep1를 비롯한 시험한 모든 HCC 세포주에서 세포 생존성의 현저한 감소를 초래하였다. 상기 처리에 의해 유도된 세포사멸촉진 효과를 조사하기 위하여, 모든 4개 HCC 세포주를 지시된 농도의 EMQA에 24시간 동안 노출시키고 유세포분석기, 세포 치사 ELISA 및 웨스턴 블롯에 의해 분석하였고, 또 DMSO-처리된 것을 부형제로 사용하였다. 유세포분석기에 의해 검출된 sub-G1 세포의 %는 EMQA 처리의 높은 투여량 및 긴 지속시간에 대응하여 증가하였다(도 6b 및 도 6d, 상부 패널). 세포 치사 ELISA에 의해 밝혀진 DNA 단편화 정도는 더 높은 투여량의 EMQA 처리에 의해 현저하게 증가하였다(도 6c). 분명하게는, HCC 세포의 EMQA-유도된-사멸은 시간- 및 투여량-의존적 방식으로 p-Akt 시그널링의 하향조절에 상응한다(도 6d). 또한, 본 발명은 EMQA의 생체내 항-HCC 효과를 평가하기 위하여 PLC5 이중이식된 마우스 모델을 이용하였다. 부형제 투여된 마우스와 비교하여, EMQA 10 mg/kg/day 투여된 종양을 갖는 마우스는 종양 성장이 현저히 감소되었다(도 6e). 종양 조직에서 생긴 분자 거동을 확인하기 위하여, EMQA 및 부형제를 투여받은 마우스로부터의 이중이식된 종양은 웨스턴 블롯 및 PP2A 활성 에세이에 의해 분석하였다. 시험 관내에서 관찰된 데이터와 일치하게, p-Akt 발현은 훨씬 더 낮았고 또 PP2A 활성은 부형제 보다는 EMQA 처리를 받은 마우스로부터 취한 종양 용해물에서 현저하게 더 높았다(도 6f).

[0253] 2.2.8 SET/PP2A/p-Akt 시그널링의 억제는 본 발명의 에르로티닙 유도체의 세포사멸촉진 효과를 결정한다

[0254] 이어 본 발명은 EMQA의 항-HCC 효과 매개에 있어서 Akt가 중요한지 여부를 조사하였다. myc-태깅된 Akt의 이소성 발현을 갖는 PLC5 세포는 일시적 형질감염에 의해 생성하고 또 이들을 5 μ M EMQA에 의해 24시간 동안 처리하였다. 도 7a에 도시된 바와 같이, 야생형 세포와 비교하여, EMQA 처리 후의 sub-G1 세포 및 분해된 형태의 PARP의 비율(%)은 Akt 과발현 PLC5 세포에서 현저하게 감소되었고, 이는 Akt가 EMQA의 세포사멸촉진 효과를 결정함을 나타낸다. 이어, 본 발명은 3개의 상이한 전략을 이용하여 EMQA-매개된 Akt 하향조절에 관련된 PP2A의 역할을 입증하고자 하였다. 먼저, PP2A 억제제인 오키다익산(OA)을 사용하여 PP2A 활성을 억제하였다. 도 7b에 도시된 바와 같이, EMQA 처리에 의해 유도된 p-Akt 발현 및 세포사멸촉진 효과의 하향조절은 5 μ M EMQA 및 100 nM OA를 사용한 공동처리에 의해 현저하게 반대로 되었다. 이어, 본 발명은 PP2Ac를 더욱 특이적으로 녹다운하기 위하여 siRNA를 사용하였다. 야생형 PLC5 세포와 비교하여, siRNA에 의해 PP2Ac가 녹다운되었을 때 p-Akt의 발현은 향상되었다(도 7c). 또한, MQA-유도된 사멸 세포의 비율은 이들 PP2Ac-녹다운-PLC5 세포에서 현저히 감소되었다. PP2A 외에, PI3K, PTEN 및 PDK1를 비롯한 다른 단백질 키나제가 Akt 시그널링의 활성화 조절에 관여하는 것으로 보고되어 있다. 따라서, 본 발명은 EMQA-처리된 HCC 세포 용해물에서 이들 단백질의 발현을 확인하였다. 도 7d에 도시된 바와 같이, EMQA 처리는 p-Akt의 발현을 현저하게 억제하였지만, PI3K, PTEN 및 PDK1의 발현은 영향을 받지 않았다. 이들 데이터는 PP2A가 EMQA-유도된 Akt 하향조절을 매개함에 있어서 주요 역할을 담당함을 나타낸다.

[0255] EMQA는 SET-PP2Ac의 결합을 파괴하는 것에 의해 PP2A를 재활성화한다. SET의 역할을 입증하기 위하여, 본 발명은 myc-태깅된 SET의 일시적 형질감염에 의한 이소성 발현을 갖는 Hep3B 세포를 생성하였다. 이들 SET-과발현 세포에서, EMQA 처리-유도된 p-Akt의 하향조절 및 사멸 효과도 또한 감소되었다(도 7e). EMQA의 표적 부위를 밝히기 위하여, 본 발명은 2개의 절단된 SET 단백질, 즉 N-말단 단편(SET_{NTR}, a.a. 1-227) 및 C-말단 단편(SET_{CTR}, a.a. 76-277)을 생성하여 이들을 체외 SPR 시스템(도 7f, 좌측 패널) 및 세포계 시스템(도 7f, 우측 패널)에서 시험하였다. CM 칩 상에 코팅된 고정량의 PP2Ac를 사용하여, 본 발명은 SPR 시스템에서 상이한 비율의 전장 및 절단된(truncated) 형태의 SET 단백질의 방해에 대한 고정 투여량의 EMQA의 효과를 시험하였다. 도 7f에 도시된 바와 같이, EMQA의 효과는 SET_{NTR}의 비율을 증가시키는 것에 의해 영향을 받지 않았다. 대조적으로, SET_{NTR} 및 전장 SET를 함유하는 SET 단백질 복합체의 PP2Ac에 대한 결합 친화성은 SET_{NTR}의 비율이 높아짐에 따라서 증가하였다. 상기 체외 시스템의 발견을 입증하기 위하여, 본 발명은 일시적 형질감염에 의해 상기 2개의 절단된 형태의 플레그-태깅된 SET 단백질의 이소성 과발현을 갖는 세포를 생성하였다. SPR의 결과와 상응하게, EMQA는 전장 SET 및 SET_{CTR}의 PP2Ac에 대한 결합을 감소시켰지만, SET_{NTR}는 PP2Ac에 대한 결합을 감소시키지 않았다(도 7f,

우측 패널). 종합하면, 본 발명은 폐암 A549 세포주에서 동일 결과를 입증하며 (데이터 없음), 이러한 결과는 EMQA가 SET 단백질의 C-말단을 특이적으로 표적화함을 제시한다.

[0256] 2.2.9 본 발명의 에르로티닙 유도체에 의해 향상된 PP2A 작용은 시험관내 및 생체내에서 소라페닙에 대한 HCC 세포의 감수성을 개선한다

[0257] 지금까지, 소라페닙은 HCC에 걸린 환자에 대한 유일한 승인된 표적 요법이다. 제한된 무진행 생존 및 고 수준의 치료관련 독성으로 인하여, HCC 환자에서 소라페닙의 약물 감수성을 개선할 필요가 있다. PP2A를 재활성화하는 것이 소라페닙의 효과를 개선할 수 있는지 여부를 시험하기 위하여, 본 발명은 먼저 EMQA 및 소라페닙을 조합하는 효과를 시험하는 MTT 에세이를 이용하였다. 4개의 상이한 HCC 세포주에서, 항-종양 효과는 EMQA 및 소라페닙이 1:5의 비율로 조합되어 사용될 때 현저하게 개선되었다. 모든 HCC 세포주의 조합 지수는 MTT의 결과에 의해 결정되었고, 이는 상승작용을 제시한다(도 8a). 이 조합 처리의 세포사멸촉진 효과는 sub-G1 에세이 및 웨스턴 블롯팅에 의해 더욱 특징화되었다. 상기 처리를 소라페닙 단독과 비교하면, 유세포분석기에 의해 검출된 sub-G1 세포 및 절단된 형태의 PARP의 비율은, Hep3B 및 PLC5 세포에서 EMQA를 소라페닙에 추가하였을 때, 현저하게 증가하였다(도 8b). 현재, 소라페닙은 종양이 흔히 거대하고 다른 국소 치료에 적절하지 않은 발전된 HCC를 갖는 환자용으로만 지시된다. 이러한 임상 시나리오를 모방하기 위하여, 본 발명은 더 큰 PLC5 이종이식된 종양을 갖는 마우스를 생성하여 소라페닙 및 EMQA 조합 처리의 효과를 시험하였다. 도 8c에 도시된 바와 같이, 종양 성장 비율은 EMQA 또는 소라페닙 단독 투여된 마우스에 비교하여 조합 투여시 현저하게 억제되었다. 처리 말기에 얻은 종양의 평균 종양 중량은 조합 처리시의 평균 종양 중량보다 현저하게 낮았다(도 8d). 또한, 이 조합 처리는 PP2A 활성을 향상시켰고 (도 8e, 상부 패널) 또 종양에서 p-Akt 발현을 억제하였다.

[0258] 2.2.10 본 발명의 에르로티닙 유도체 및 파클리탁셀을 사용한 공동처리는 p-Akt의 발현을 하향조절하고 또 NSCLC의 사멸 처사를 증진시킨다.

[0259] 본 발명은 파클리탁셀 및/또는 EMQA에 의해 처리된 세포 용해물을 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. 도 9a에 도시된 바와 같이, p-Akt의 발현은 EMQA 및 파클리탁셀에 의해 처리된 모든 폐암 세포주에서 현저하게 감소되었다. 또한, 공동처리-유도된 p-Akt 하향조절은 투여량 및 시간 의존적 방식으로 나타났다(도 9b 및 9c). 중요하게는, PARP 시그널링의 활성화는 p-Akt의 하향조절에 상응한다. Akt의 역할을 더욱 입증하기 위하여, 본 발명은 myc-태깅된(tagged) Akt의 일시적 형질감염에 의한 이소성 발현을 갖는 A549 세포를 생성하였고 또 이들을 1 μ l EMQA 및 10 nM 파클리탁셀로 처리하였다. 도 9d에 도시된 바와 같이, 공동처리의 효능은 Akt과발현된 세포에서 현저하게 감소되었다. 따라서, Akt 시그널링의 억제는 NSCLC 세포에서 EMQA 및 파클리탁셀의 상승작용적 효과를 결정한다.

[0260] 2.2.11 본 발명의 에르로티닙 유도체 및 파클리탁셀의 생체내 상승작용적 항-암 효과

[0261] EMQA와 파클리탁셀 조합의 생체내 항-종양 효과를 시험하기 위하여, 본 발명은 A549 이종이식된 마우스 모델을 생성하고 또 이들 마우스를 부형제, 파클리탁셀 및/또는 EMQA로 처리하였다. EMQA 또는 파클리탁셀 단독 처리된 마우스와 비교하여, 파클리탁셀 및 EMQA 처리된 마우스의 종양 성장 비율은 현저하게 감소하였다(도 10a). 조합 처리된 마우스의 연구 마지막에 측정된 평균 종양 중량은 다른 처리 군에서 마우스보다 훨씬 적었다(도 10b). 확실히, 상이한 처리에 노출된 마우스의 체중에서는 분명한 차이가 없었다(도 10c). 본 발명은 또한 웨스턴 블롯 및 PP2A 활성 에세이에 의해 종양 용해물을 분석하였다. 이전의 결과에 따르면, 조합 요법을 받은 마우스로부터 얻은 종양에서 PP2A 활성은 부형제 처리된 마우스에서보다 현저하게 높았고(도 10c), 또 이들의 p-Akt 발현은 하향조절되었다; 본 발명은 A549 이종이식된 종양 용해물에서 p-Akt 및 Akt의 발현의 웨스턴 블롯에 의해 종양 용해물을 분석하였다(도 10d).

[0262] 따라서, 본 발명의 에르로티닙 유도체는 종양 세포에서 이들의 신규 치료 메카니즘, 즉, CIP2A 억제에 의한 PP2A-의존적 p-Akt 하향조절의 향상을 나타낸다. 이들 결과는 PP2A의 활성을 증가시키는 본 발명의 에르로티닙 유도체가 암 요법일 수 있음을 나타낸다. 또한, 본 발명은 SET 과발현이 진행된 암 및 불량한 예후를 지닌 환자와 관련되어 있음을 입증한다. 따라서, 본 발명은 SET-PP2A 결합이 암 요법을 위한 새로운 전략일 수 있고, 또 본 발명의 에르로티닙 유도체와 소라페닙 또는 파클리탁셀의 조합이 소라페닙의 치료 효과를 향상시킬 수 있고 또 종양 성장을 억제할 수 있음을 제시한다. 본 발명은 대체 암 요법을 제공하며, 이는 전통적인 약 요법에 내성이 있는 환자에 아주 유용하다.

한글

표 5 본 발명의 에르로티닙 유도체는 암 세포 치사를 효과적으로 증진한다

화합물	NCI-1703 세포 생존성(%)			NCI-H226 세포 생존성(%)			A549 세포 생존성(%)			H358 세포 생존성(%)			H2170 세포 생존성(%)		
	1 (uM)	10 (uM)	IC50	1 (uM)	10 (uM)		1 (uM)	10 (uM)		1 (uM)	10 (uM)		1 (uM)	10 (uM)	
TD52	84.7±2.5	10.1±0.1	3.8	79.5±6.9	5.3±0.1		71.5±6.0	9.7±0.9		99.8±3.8	11.2±0.7		100.46±3.21	7.84±9.49	
TD53	68.4±1.4	46.7±0.2	7.4	86.2±5.7	56.8±2.7		99.4±6.9	82.7±9.9		119.5±9.2	41.9±3.9		99.71±6.00	59.19±1.25	
TD54	127.2±2.0	96.7±4.2		120.0±4.9	110.9±0.8								100.24±4.93	79.08±7.69	
TD55	64.2±5.3	49.9±4.8	8.3	106.5±17.3	96.4±7.4		100.1±7.2	36.5±5.9		109.5±14.2	42.1±0.6		102.73±0.73	94.80±6.05	
TD56	49.9±4.7	28.8±2.3		115.4±0.8	19.0±2.0								95.00±0.91	32.46±14.08	
TD57	48.1±4.5	31.4±2.6		90.0±1.5	33.6±1.7								93.86±1.12	67.41±3.86	
TD58	126.7±2.9	98.9±1.1		123.2±3.6	74.9±1.5								92.85±2.03	83.02±3.41	
TD59	113.6±7.4	26.4±0.7		121.7±2.6	32.5±2.5		164.6±0.1	24.1±3.9		117.3±12.1	19.0±1.5		88.41±2.01	8.96±1.43	
TD60	51.9±2.9	26.1±0.8		92.5±1.7	13.9±1.0		91.3±4.0	21.8±1.4		55.3±1.9	18.1±1.3		72.32±0.89	0.41±0.65	
TD61	31.1±1.6	8.5±0.3	0.3	52.5±3.4	20.9±2.8		39.1±5.8	18.6±1.2		39.9±1.2	20.6±1.5		96.17±2.24	32.37±13.01	
TD62	111.6±3.6	65.2±0.6		86.0±2.0	90.1±8.2		165.6±23.1	120.1±2.9		121.3±2.2	97.4±8.1		92.55±1.41	85.34±4.56	
TD63	54.5±5.5	28.8±7.9		99.9±4.3	19.6±0.4		79.2±7.8	21.9±2.2		66.8±8.5	16.2±1.3		78.45±1.28	9.13±0.63	
TD64	85.2±1.3	81.5±10.4		95.6±4.9	89.3±3.6		107.3±10.8	92.3±8.1		69.1±9.0	57.0±11.9		109.11±1.85	99.92±3.86	
TD65	53.2±2.3	26.3±1.0		46.2±2.5	14.1±1.3		66.4±6.9	27.7±2.0		27.1±1.2	18.3±3.0		77.88±3.48	0.26±0.10	
TD66	84.5±2.3	10.1±0.2		71.2±1.2	4.7±0.1		55.5±5.1	11.1±0.6		96.6±0.9	14.9±3.0		101.50±0.48	3.70±1.37	
TD67	22.3±4.2	11.2±0.0		88.3±2.4	7.3±0.7		94.7±5.9	20.9±2.3		115.9±23.4	26.4±2.5		113.64±2.52	33.63±0.16	
TD68	48.6±2.0	33.3±7.1		40.2±0.3	14.8±0.3		57.3±19.1	32.9±4.0		22.4±1.8	16.7±0.8		69.39±0.67	0.17±0.16	
TD69	52.2±4.5	15.5±0.4	1	69.0±1.0	28.0±1.5		71.4±6.3	9.9±0.7		102.9±5.2	12.7±0.4		116.44±6.86	89.28±2.49	
TD70	73.2±5.1	59.7±7.4	> 10	106.1±5.7	123.4±13.1		103.3±22.8	91.9±21.8		131.7±4.3	116.6±6.4		92.42±3.67	86.44±5.11	
TD71	85.1±5.6	47.0±8.6	8.6	118.3±14.6	112.5±8.5		97.6±8.2	96.9±9.3		123.3±6.1	114.0±1		110.87±9.77	104.21±3.99	

[0264]

화합물	HS20 세포 생존성 (%)		SW900 세포 생존성 (%)		BA (%)	SET-PP2Ac 결합 파괴를 위한 최소 농도 (nM)		PP2A 활성화를 위한 최소 농도 (nM)
	1 (uM)	10 (uM)	1 (uM)	10 (uM)		(nM)		
TD52	95.77 ± 1.26	13.96 ± 0.14	107.22 ± 13.13	77.91 ± 11.33	87			100-200
TD53	101.65 ± 0.34	10.57 ± 0.58	121.06 ± 9.01	-8.01 ± 1.03				
TD54	118.31 ± 3.00	101.71 ± 1.46	125.42 ± 27.03	126.15 ± 10.56				
TD55	89.92 ± 1.02	59.20 ± 15.85	100.49 ± 6.69	88.29 ± 1.29				
TD56	98.40 ± 6.37	4.76 ± 0.24	117.78 ± 5.41	1.46 ± 3.60	22			50-100
TD57	98.29 ± 8.33	83.14 ± 2.22	101.58 ± 1.03	97.75 ± 34.24				
TD58	96.23 ± 1.22	95.63 ± 4.66	111.41 ± 1.54	91.75 ± 9.78				
TD59	88.29 ± 1.50	0.41 ± 0.32	109.77 ± 1.80	-2.91 ± 4.12				
TD60	21.80 ± 1.52	0.36 ± 0.18	19.30 ± 6.18	-1.27 ± 6.44				
TD61	54.05 ± 6.39	1.71 ± 0.60	107.77 ± 9.78	-4.00 ± 2.57				
TD62	103.35 ± 1.70	100.47 ± 2.46	128.34 ± 1.80	127.79 ± 6.18				
TD63	28.54 ± 0.58	0.45 ± 0.14	54.79 ± 3.35	3.28 ± 4.63				
TD64	112.59 ± 7.51	91.41 ± 5.43	87.67 ± 3.31	57.86 ± 12.36				
TD65	18.49 ± 1.23	0.47 ± 0.06	0.73 ± 1.32	-1.61 ± 3.75				
TD66	103.95 ± 8.53	51.71 ± 20.46	112.64 ± 4.64	77.37 ± 20.53				
TD67	92.11 ± 4.86	1.10 ± 0.28	71.44 ± 12.58	9.16 ± 1.77		5.1		
TD68	10.08 ± 0.85	0.47 ± 0.11	3.38 ± 4.64	0.57 ± 0.22				
TD69	51.72 ± 2.99	13.13 ± 3.12	108.90 ± 18.32	42.40 ± 1.10				
TD70	102.17 ± 1.21	93.55 ± 2.61	105.93 ± 5.74	86.58 ± 5.30	50			< 50
TD71	100.50 ± 1.82	92.95 ± 4.48	112.17 ± 1.32	106.87 ± 21.63				

[0265]

화합물	NCL-1703	세포 생존성(%)	IC50	NCL-H226	세포 생존성 (%)	A549	세포 생존성(%)	H358	세포 생존성(%)	H2170	세포 생존성(%)
	1 (nM)	10 (nM)		1 (nM)	10 (nM)	1 (nM)	10 (nM)	1 (nM)	10 (nM)	1 (nM)	10 (nM)
TD72	87.9±3.9	92.7±7.1		95.7±2.5	93.0±1.6	101.4±3.4	108.5±5.6	120.7±21.3	123.1±5.5	115.40±0.54	107.57±1.15
TD73	112.5±2.9	60.9±2.5		90.4±1.8	76.6±1.5	66.0±43.1	70.8±11.2	122.1±4.6	105.8±9.1	92.13±4.47	79.46±3.93
TD74	82.9±4.4	64.6±2.5		93.0±3.8	84.2±1.9	92.3±11.5	69.6±25.0	133.6±2.4	111.1±6.6	84.02±0.67	84.02±0.67
TD75	125.4±1.1	48.3±1.8		101.9±4.2	86.8±2.8	91.2±8.7	90.2±18.4	111.1±3.6	92.0±11.1	113.46±2.27	90.21±2.39
TD76	101.9±8.4	63.5±3.6		134.3±1.2	49.9±7.4	96.5±19.7	74.7±20.3	109.4±13.4	83.2±0.4	94.39±1.84	78.26±1.47
TD77	108.1±3.6	90.5±2.3		126.0±13.0	119.7±6.6	86.4±3.2	81.1±6.0	105.2±6.8	95.0±6.4	96.01±4.18	100.58±0.54
TD78	70.6±8.2	73.2±14.1		117.6±2.2	110.6±12.9	77.6±5.8	94.7±11.3	98.7±4.6	90.8±7.4	110.84±1.69	93.09±0.66
TD79	123.7±0.9	64.8±4.5		130.6±14.3	125.3±10.5	96.5±4.4	71.6±10.1	113.8±2.4	87.7±1.8	98.50±1.56	101.56±5.66
TD80	106.3±5.2	52.3±2.4		103.1±10.7	87.8±9.3	109.6±6.0	83.4±16.4	118.9±3.7	89.4±11.9	91.56±5.42	87.56±0.78
TD81	82.7±5.0	85.8±0.1		100.3±4.1	92.0±3.8	95.6±15.9	69.4±3.4	115.7±5.9	75.5±3.9	100.24±6.20	82.69±2.44
TD82	74.0±7.0	97.8±1.6		102.5±7.8	105.3±18.3	113.0±4.3	71.3±4.4	112.8±2.2	73.6±1.6	90.60±3.88	85.66±0.75
TD83	25.1±2.2	24.9±5.0	0.1	32.9±0.2	6.8±0.2	58.3±3.7	12.3±0.6	13.6±0.8			
TD84	28.6±2.7	20.8±3.3	0.02	24.9±1.2	9.5±0.1	22.0±16.0	19.2±7.6	11.5±1.0			
TD85	31.7±2.2	13.9±0.3		21.5±2.8	11.6±2.0			20.4±8.1	11.2±1.9		
TD86	33.9±0.6	13.0±0.3		23.5±2.0	10.5±1.2			34.7±2.0	9.1±1.2		
TD87	28.7±4.6	13.6±1.1		20.1±1.3	10.6±1.0			18.8±7.8	8.7±0.7		
TD88	49.4±3.6	12.7±0.8		21.1±4.0	11.2±2.3			44.7±3.7	9.1±1.2		
TD89	34.9±3.8	27.3±10.1	0.4	46.0±2.1	7.4±0.2	62.9±6.8	12.4±0.3	25.5±2.9	11.6±0.4		
TD90	31.2±6.0	21.0±3.8	0.1	32.7±0.1	7.1±0.4	59.6±7.1	10.7±0.2	12.6±0.7	12.1±3.6		
TD91	48.1±3.7	21.2±2.4	0.9	45.6±2.4	8.5±0.4	85.5±6.0	13.6±0.5	58.0±1.4	13.1±2.5		
TD92	27.7±7.8	20.0±0.5	0.1	10.3±0.4	7.8±0.2	15.3±1.9	13.5±2.1	14.9±0.7	14.4±4.2		

화합물	H520 세포 생존성 (%)		SW900 세포 생존성 (%)		BA (%)	SET-PP2Ac 결합 과피를 위한 최소 농도 (nM)	PP2A 활성화를 위한 최소 농도 (nM)
	1 (uM)	10 (uM)	1 (uM)	10 (uM)			
TD72	105.38 ± 0.83	102.66 ± 0.89	111.71 ± 7.28	115.30 ± 2.21		> 200	> 200
TD73	106.85 ± 2.40	79.72 ± 39.07	106.56 ± 6.62	99.06 ± 20.75		> 200	> 200
TD74	93.57 ± 2.50	84.57 ± 5.22	105.15 ± 3.75	79.55 ± 15.23		> 200	> 200
TD75	103.56 ± 0.55	75.25 ± 5.50	104.84 ± 6.40	73.15 ± 3.09		> 200	> 200
TD76	107.85 ± 0.74	73.10 ± 2.56	107.10 ± 18.96	63.88 ± 6.02			
TD77	110.04 ± 1.20	103.58 ± 0.78	113.72 ± 4.68	94.79 ± 1.12		100- 200	> 200
TD78	108.50 ± 0.14	108.14 ± 2.23	101.58 ± 6.69	84.07 ± 1.12			
TD79	96.63 ± 5.57	99.01 ± 6.01	98.90 ± 3.79	88.17 ± 19.85			
TD80	104.50 ± 1.30	92.22 ± 4.42	99.84 ± 11.82	88.01 ± 13.38		> 200	> 200
TD81	103.39 ± 0.14	72.38 ± 11.34	86.91 ± 7.36	60.25 ± 11.15		> 200	> 200
TD82	98.76 ± 2.64	101.58 ± 8.73	100.47 ± 10.48	103.79 ± 19.18		> 200	> 200
TD83							
TD84							
TD85							
TD86							
TD87							
TD88							
TD89							
TD90							
TD91							
TD92							

[0266]

[0267]

화합물	NCI-1703 세포 생존성(%)		NCI-H226 세포 생존성(%)		A549 세포 생존성(%)		H358 세포 생존성(%)		H2170 세포 생존성(%)	
	1 (uM)	10 (uM)	1 (uM)	10 (uM)	1 (uM)	10 (uM)	1 (uM)	10 (uM)	1 (uM)	10 (uM)
TD93	24.9±0.4	26.0±12.7	0.2	27.1±2.5	19.3±1.1	11.1±1.2	13.5±0.8	12.3±0.5		
TD94	29.9±6.8	19.5±1.1	0.1	32.1±2.7	49.0±6.5	10.8±0.9	13.0±0.2	15.7±5.9		
TD95	28.3±0.6	17.9±0.3	1.2	43.3±0.7	29.9±5.4	11.8±0.5	13.7±1.2	11.7±0.3		
TD601	46.3±2.4	12.5±0.3		73.4±5.2	113.7±10.7	116.0±13.3	126.8±5.7	124.2±7.1	98.16 ± 1.93	6.46 ± 1.78
TD602	42.0±1.1	9.8±0.0		98.1±5.9	47.4±2.4	10.0±0.8	58.3±9.2	12.0±0.5	112.07 ± 3.97	7.14 ± 4.42
TD603	16.2±0.6	8.5±0.2		11.3±0.4	14.2±0.6	9.8±0.7	16.5±0.6	12.4±0.6	52.09 ± 21.88	9.95 ± 0.27
TD604	15.2±0.5	12.5±0.3	0.6	40.3±1.7	116.6±7.2	132.0±5.1	114.7 ± 9.0	116.3 ± 8.5	74.71 ± 6.38	2.06 ± 0.66
TD605	20.8±0.4	13.8±0.2	0.5	53.1±1.9	83.7±7.0	113.2±18.3	100.7 ± 13.6	113.3 ± 12.0	107.80 ± 3.88	5.53 ± 0.81
TD606	27.5±3.0	10.3±0.4	1.1	88.8±5.4	53.3±11.5	9.3±1.4	106.0±7.5	14.1±0.5	99.65 ± 2.43	0.76 ± 0.16
TD607	49.7±2.7	13.4±1.6	1.3	105.8±2.6	100.5±5.9	9.5±0.6	116.1±15.5	12.1±0.3	103.88 ± 14.19	1.34 ± 0.93
TD608	52.8±4.5	12.7±0.9		103.5±2.5	71.5±3.5	10.3±3.5	109.9±44.0	31.7±33.3	112.60 ± 8.63	4.71 ± 0.24
TD609	61.0±1.7	83.1±2.5		66.8±13.8	105.7±17.0	105.4±15.9	102.6±5.1	107.3 ± 5.7	99.46 ± 1.32	100.46 ± 2.73
TD610	74.8±3.5	46.8±2.5		63.1±9.9	96.8±16.8	94.3±10.1	102.9 ± 1.7	106.5 ± 3.8	96.15 ± 1.40	82.13 ± 6.62
TD611	77.7±3.4	10.3±0.3		71.3±5.8	113.6±15.7	123.2±8.8	108.8 ± 5.3	111.0 ± 3.9	100.51 ± 1.32	49.18 ± 41.74
TD612	82.7±2.4	13.4±0.7		69.4±6.8	90.6±18.2	10.3±1.2	97.3±13.4	12.8±0.4	106.93 ± 4.84	22.51 ± 11.80
TD613	86.0±0.5	24.8±2.0		75.5±7.9	105.0±3.4	9.5±0.7	69.9±60.7	12.0±0.5	108.50 ± 1.99	11.62 ± 1.38
TD614	116.3±15.1	9.8±1.0		79.4±11.6	113.6±1.6	12.4±0.7	115.6±7.0	12.8±0.1	115.88 ± 5.96	31.88 ± 41.63
TD615	40.4±0.7	30.3±1.0		47.2±0.6	50.4±2.4	20.9±2.7	31.2±3.5	24.4±2.6		
TD616	116.2±3.9	35.3±4.6		117.0±6.3	118.2±2.2	24.7±5.0	94.6±10.5	27.9±2.8		
TD617	127.4±0.5	121.6±6.0		116.9±8.6	122.8±5.5	133.4±13.3	113.5±5.6	110.6±7.3		

[0268]

화합물	H520 세포 생존성 (%)		SW900 세포 생존성 (%)		BA (%)	SET-PP2Ac 결합 파괴를 위한 최소 농도 (nM)	PP2A 활성화를 위한 최소 농도 (nM)
	1 (uM)	10 (uM)	1 (uM)	10 (uM)			
TD93							
TD94							
TD95							
TD601	96.72 ± 1.57	86.28 ± 7.70	103.31 ± 2.01	114.98 ± 15.39	87		
TD602	103.52 ± 2.31	0.89 ± 0.41	119.56 ± 5.80	2.05 ± 2.45			
TD603	14.03 ± 1.57	0.97 ± 0.45	68.77 ± 13.38	3.94 ± 2.45			
TD604	30.51 ± 13.94	0.99 ± 0.02	86.12 ± 22.75	0.00 ± 1.34	57		
TD605	89.11 ± 6.09	0.78 ± 0.39	87.07 ± 27.21	2.21 ± 1.34		50-100	< 50
TD606	103.72 ± 12.53	0.84 ± 0.31	99.15 ± 0.40	-0.24 ± 3.00		100-200	100-200
TD607	63.40 ± 53.69	-0.06 ± 0.00	85.86 ± 10.40	0.61 ± 5.00		> 200	> 200
TD608	96.95 ± 19.84	1.77 ± 1.70	114.00 ± 2.60	39.77 ± 51.18		> 200	> 200
TD609	108.66 ± 0.59	111.95 ± 4.77	101.70 ± 3.20	105.66 ± 5.20		> 200	> 200
TD610	109.73 ± 3.66	103.24 ± 4.23	105.37 ± 8.80	85.58 ± 6.00		> 200	> 100
TD611	109.24 ± 1.61	40.91 ± 38.61	119.79 ± 6.80	10.23 ± 10.20			> 100
TD612	107.19 ± 2.62	12.91 ± 1.20	104.95 ± 3.40	64.66 ± 4.00			> 100
TD613	99.45 ± 0.50	18.78 ± 0.22	115.83 ± 7.20	80.91 ± 3.80			< 100
TD614	106.57 ± 2.92	0.32 ± 0.31	111.03 ± 2.00	0.61 ± 1.80	11.2		
TD615						> 200	
TD616							> 200
TD617							

[0269]

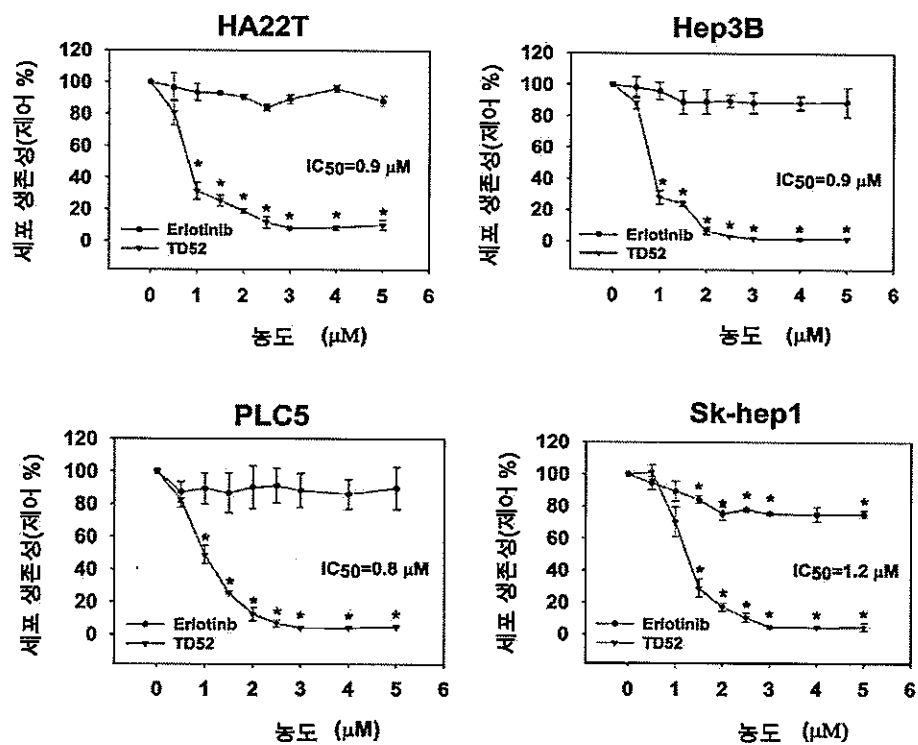
화합물	NCI-1703 세포 생존성(%)		NCI-H226 세포 생존성(%)		A549 세포 생존성(%)		H358 세포 생존성(%)		H2170 세포 생존성(%)	
	1 (uM)	10 (uM)	IC50	1 (uM)	10 (uM)	1 (uM)	10 (uM)	1 (uM)	10 (uM)	1 (uM)
TD618	48.3±4.8	31.9±5.0		49.6±9.4	16.7±1.1	53.2±6.3	26.9±7.0	36.6±1.6	20.4±3.5	
TD619	118.8±11.2	33.6±5.4		109.8±18.2	19.5±0.7	105.2±19.5	20.9±1.7	87.5±3.6	22.1±0.6	
TD620	26.2±0.6	21.0±1.7	0.3	132.2±5.0	17.9±0.6	48.7±8.4	7.8±0.4	24.2±1.4	12.6±0.7	
TD621	42.0±2.7	33.6±0.3	7.4	117.0±6.6	71.5±3.7	56.1±6.3	80.0±9.8	39.4±3.4	43.3±3.8	
TD622	101.7±6.5	48.7±2.7		103.4±6.6	105.2±6.4	113.5±3.8	54.1±6.0	63.0±3.6	62.0±1	
TD623										
TD624	90.8±4.8			15.7±0.8		14.3±3.6		11.9±1.0		
TD625	223.5±7.0			115.4±7.2		73.7±3.0		92.6±7.4		
TD626	111.2±1.3			39.0±2.2		40.4±0.8		24.3±3.6		
TD627										
TD628	146.8±4.5			151.9±1.7		121.6±7.1		140.0±7.3		
TD629	132.8±1.0			140.2±1.6		118.4±1.2		113.4±3.6		
TD630	40.9±0.7			48.4±1.1		50.3±2.1		24.3±1.0		
TD631	42.5±2.8			35.8±6.9		58.9±3.1		40.4±1.9		

[0270]

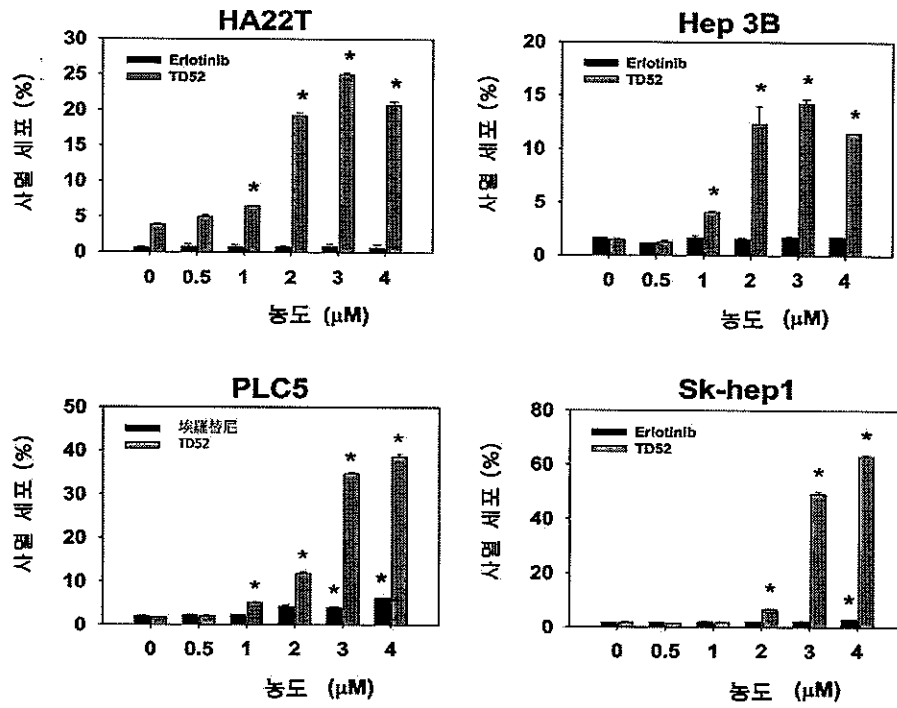
화합물	H520 세포 생존성 (%)		SW900 세포 생존성 (%)		SET-PP2Ac 결합 효과를 위한 최소 농도 (nM)	PP2A 활성화를 위한 최소 농도 (nM)
	1 (uM)	10 (uM)	1 (uM)	10 (uM)		
TD618						
TD619						
TD620						
TD621						
TD622						
TD623						
TD624						
TD625						
TD626						
TD627						
TD628						
TD629						
TD630						
TD631					62	> 200

도면

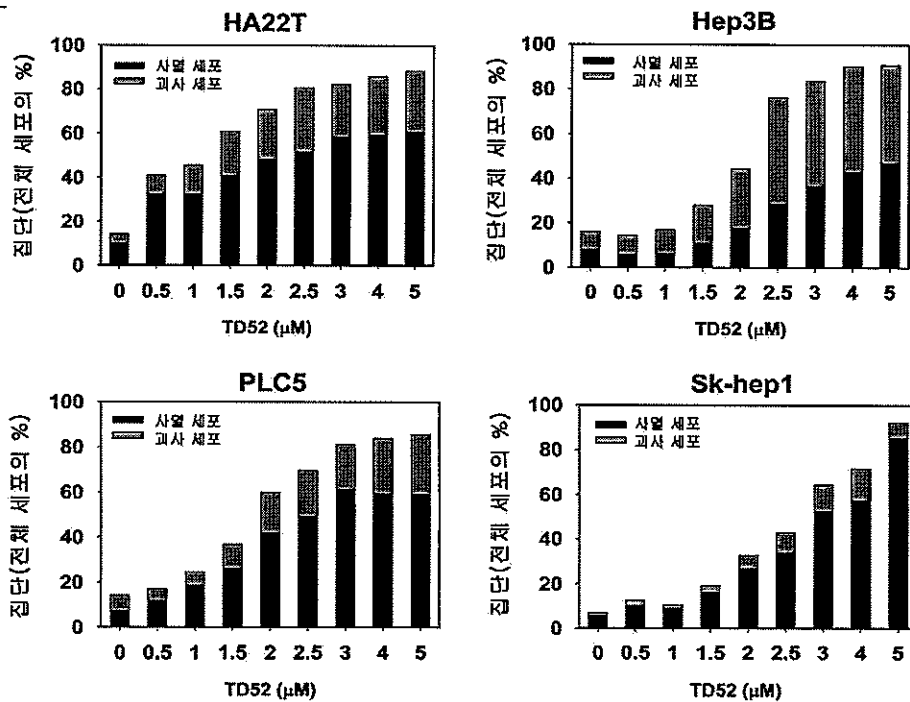
도면1a



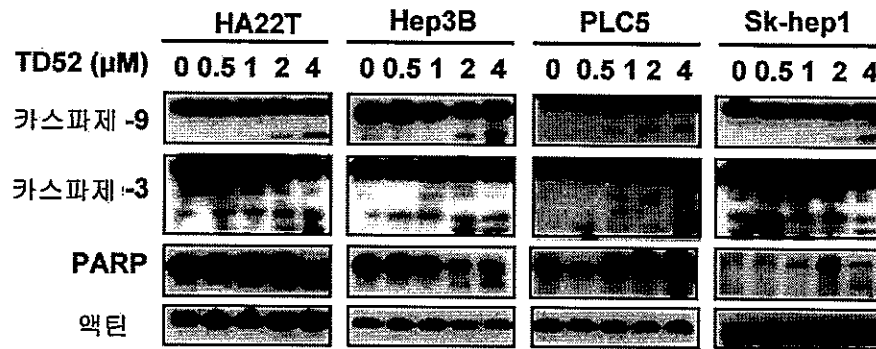
도면1b



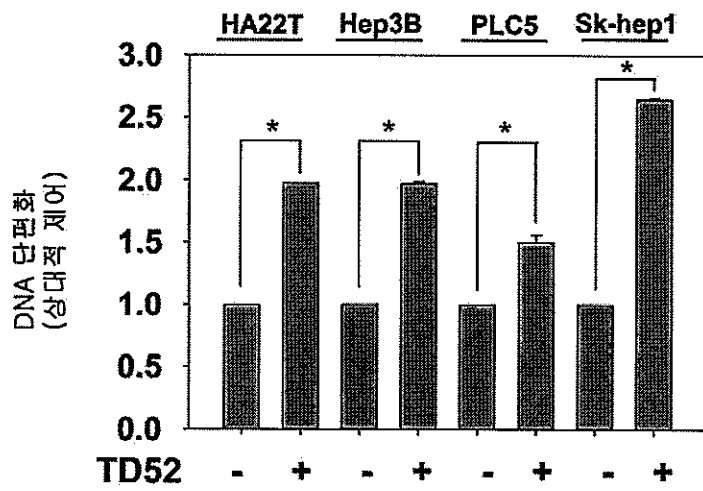
도면1c



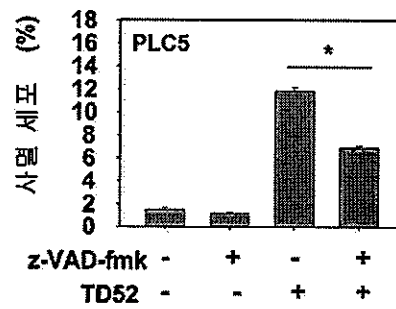
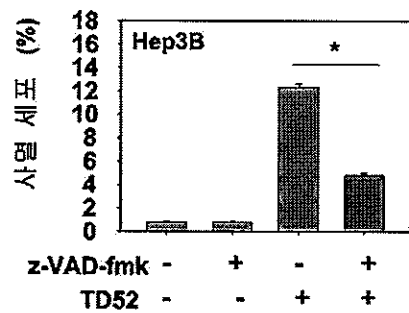
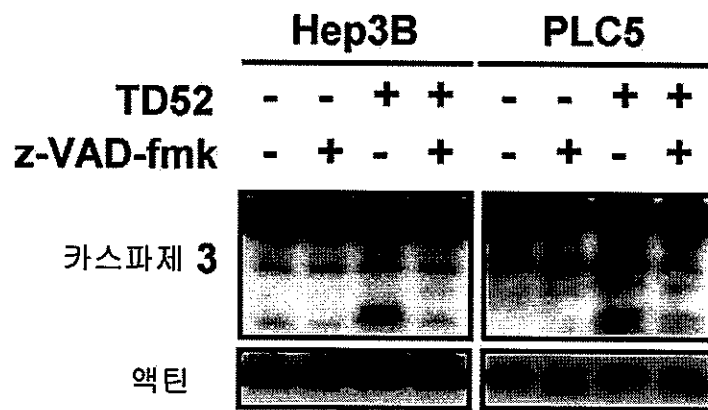
도면1d



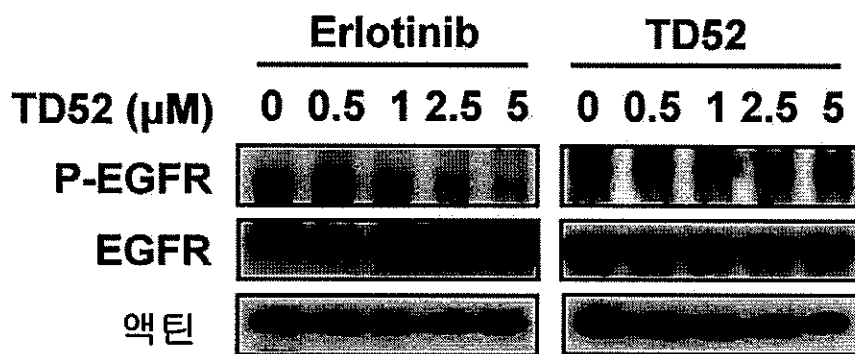
도면1e



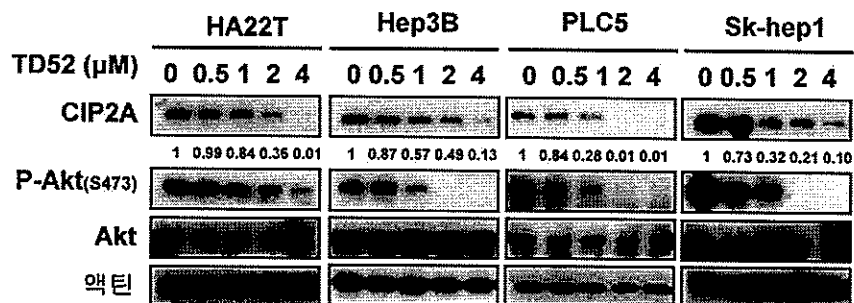
도면1f



도면1g



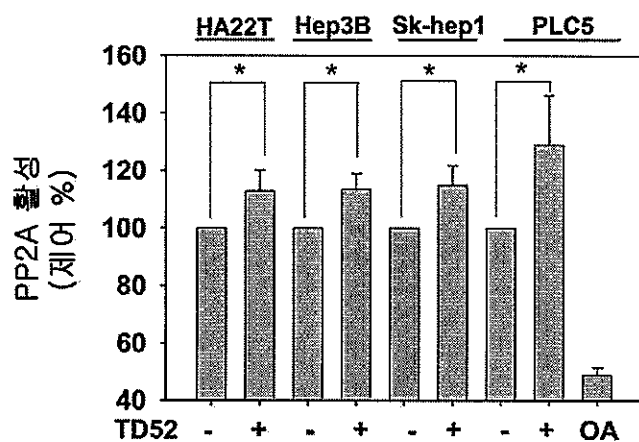
도면2a



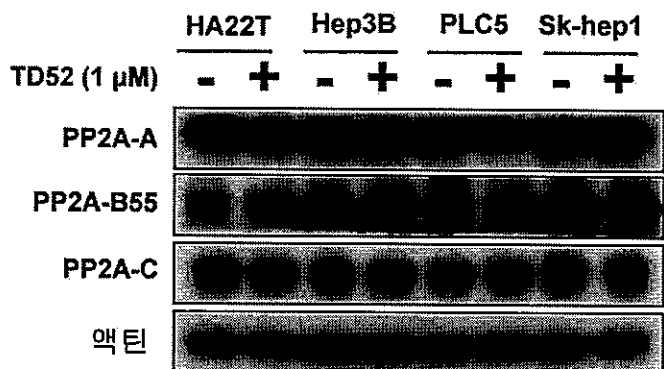
도면2b



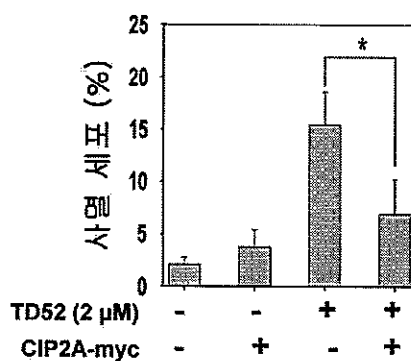
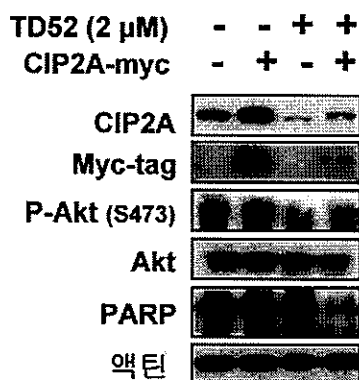
도면2c



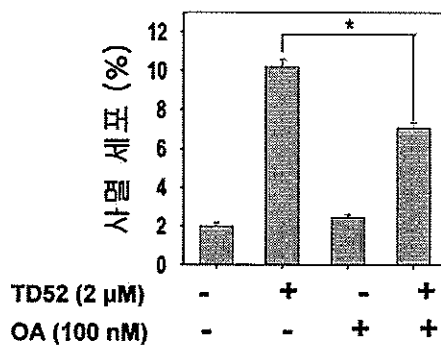
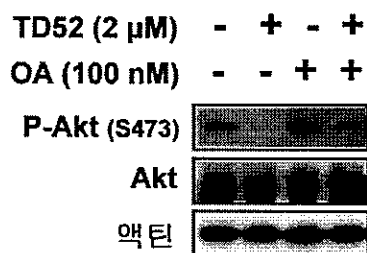
도면2d



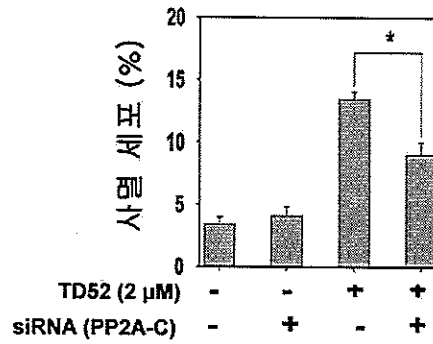
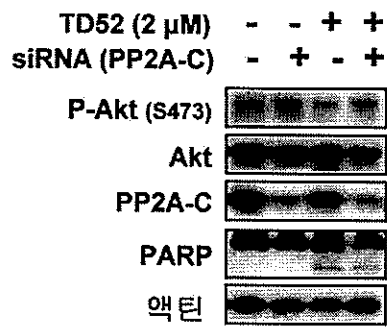
도면2e



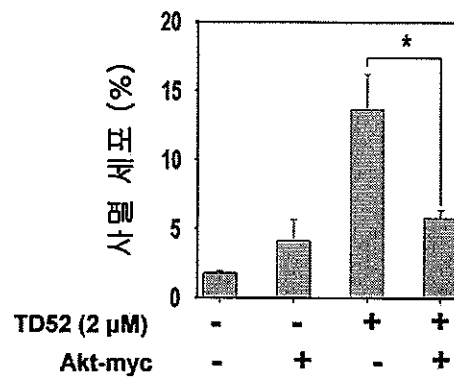
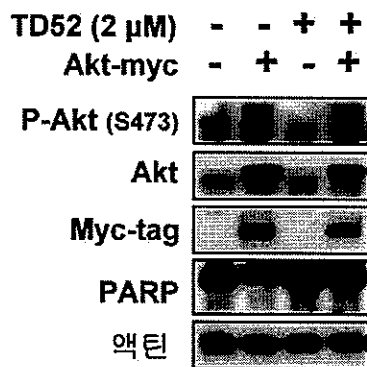
도면2f



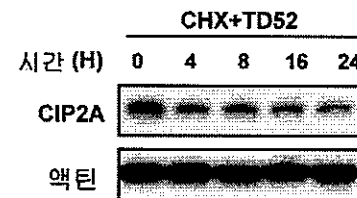
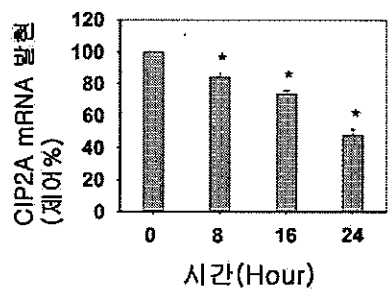
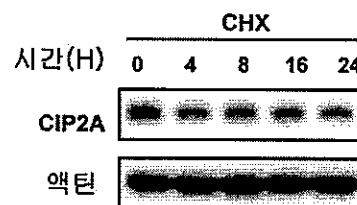
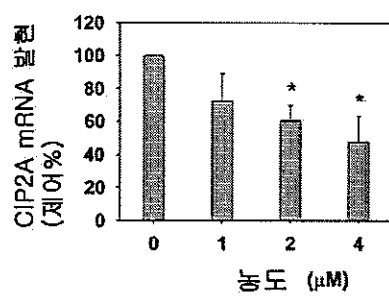
도면2g



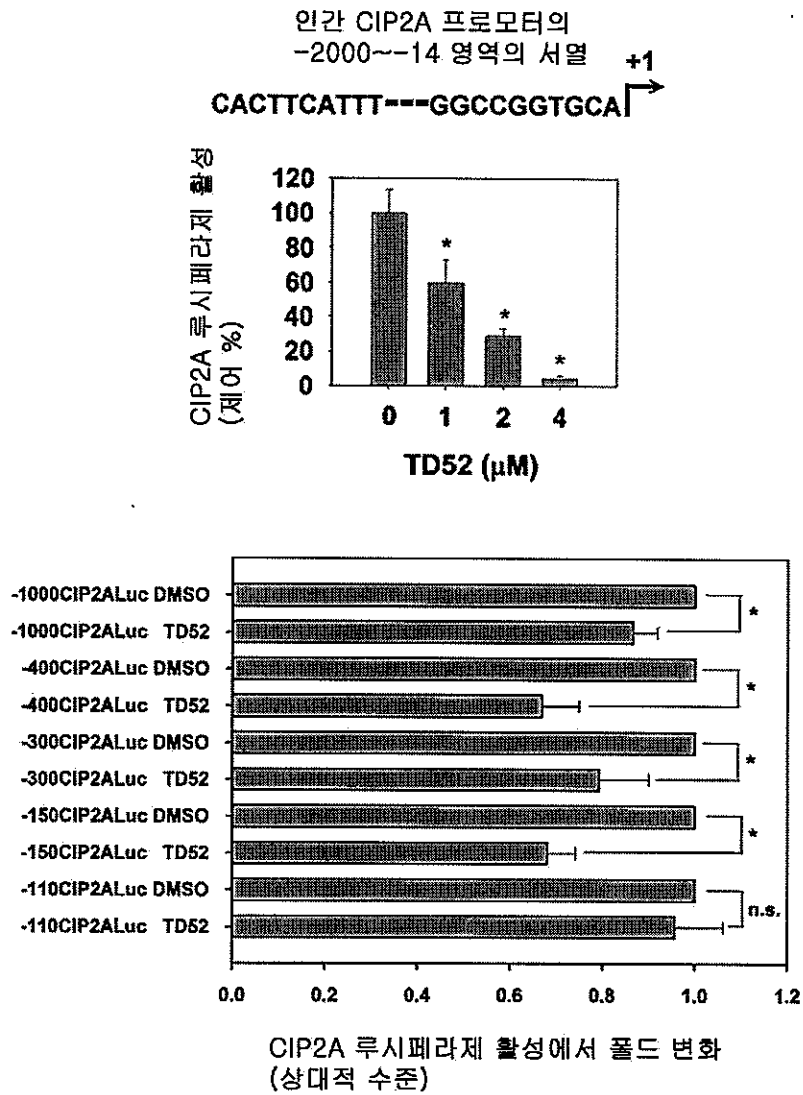
도면2h



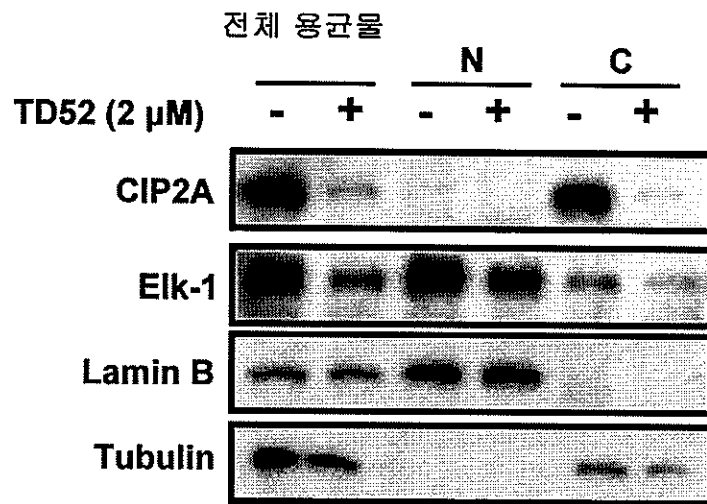
도면3a



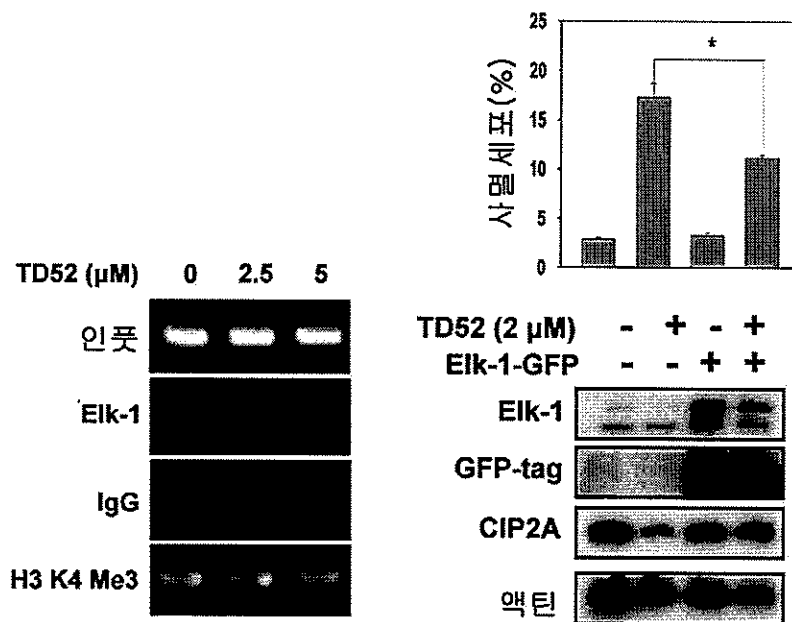
도면3b



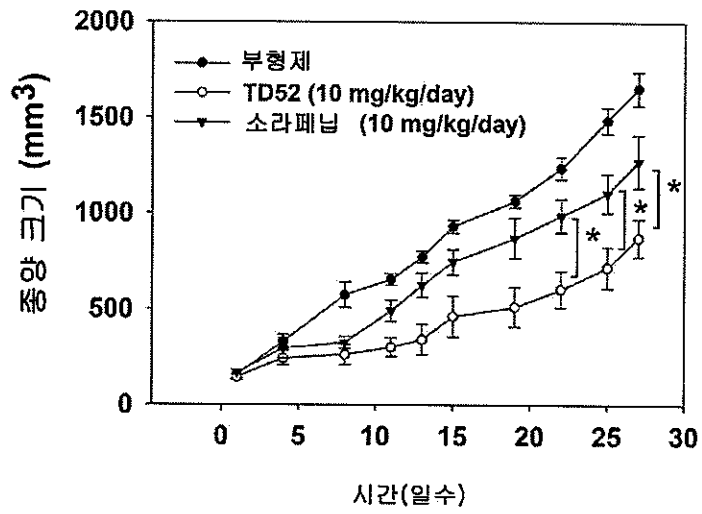
도면3c



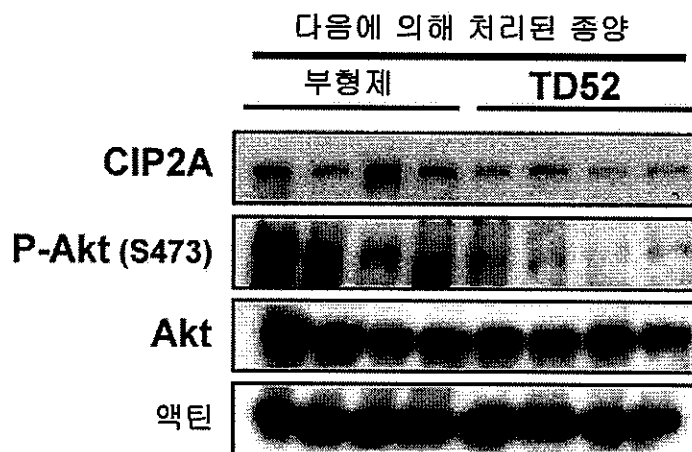
도면3d



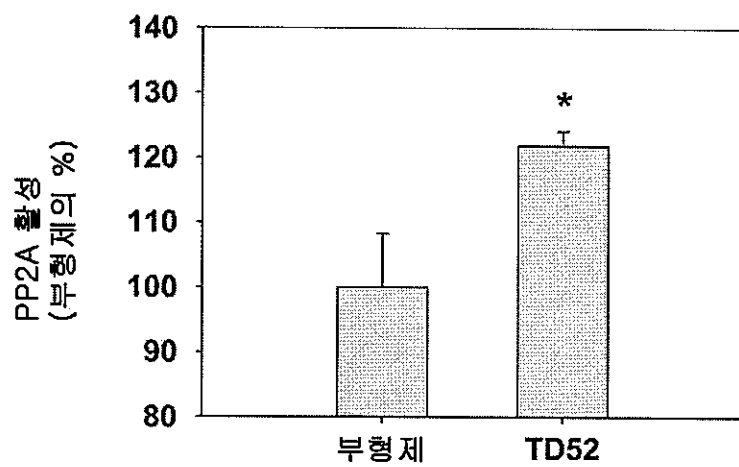
도면4a



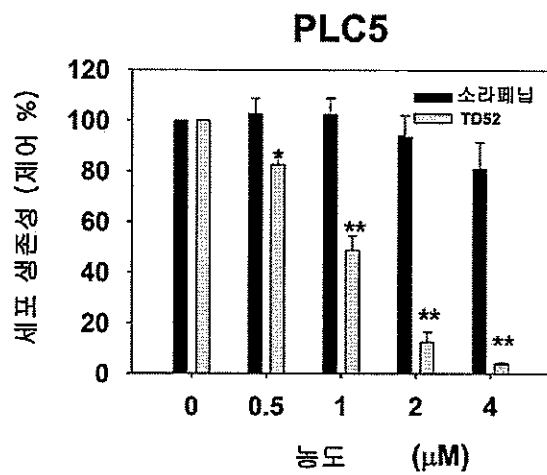
도면4b



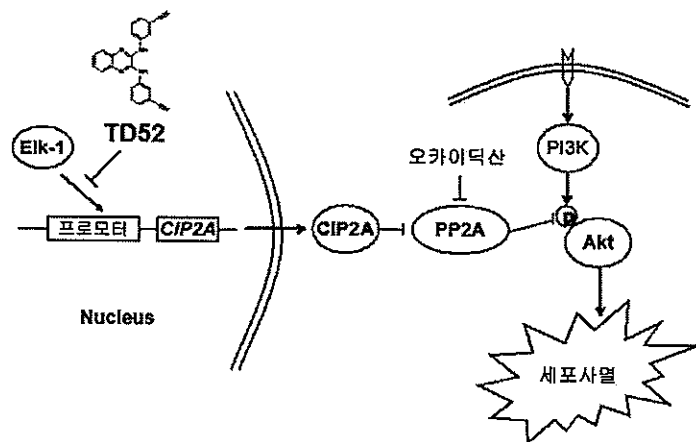
도면4c



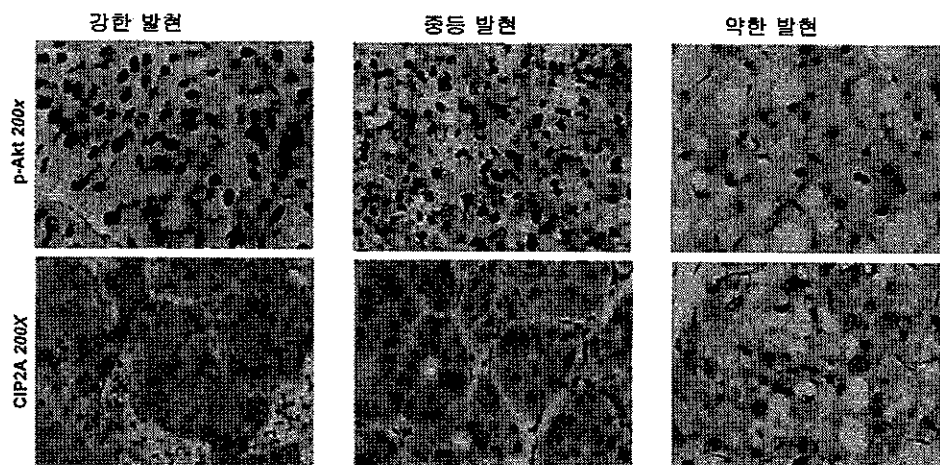
도면4d



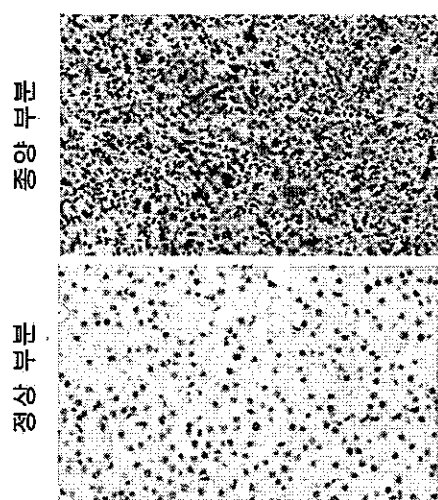
도면4e



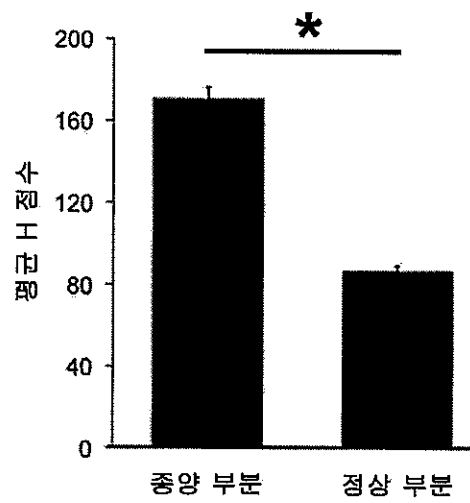
도면4f



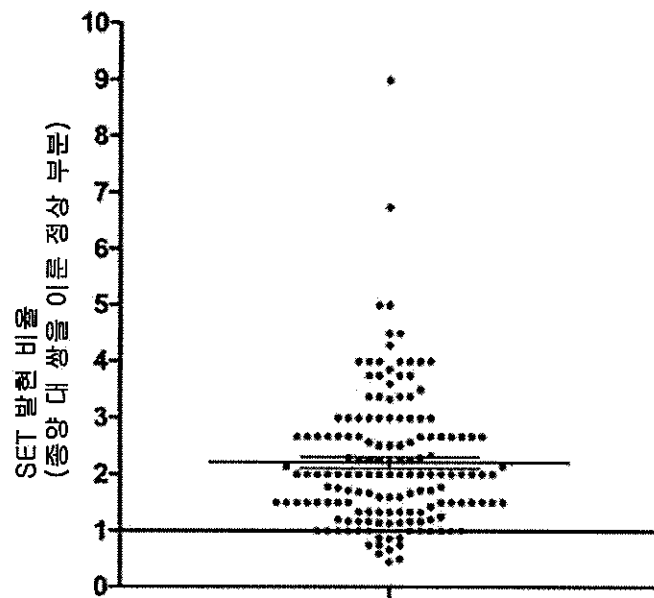
도면5a



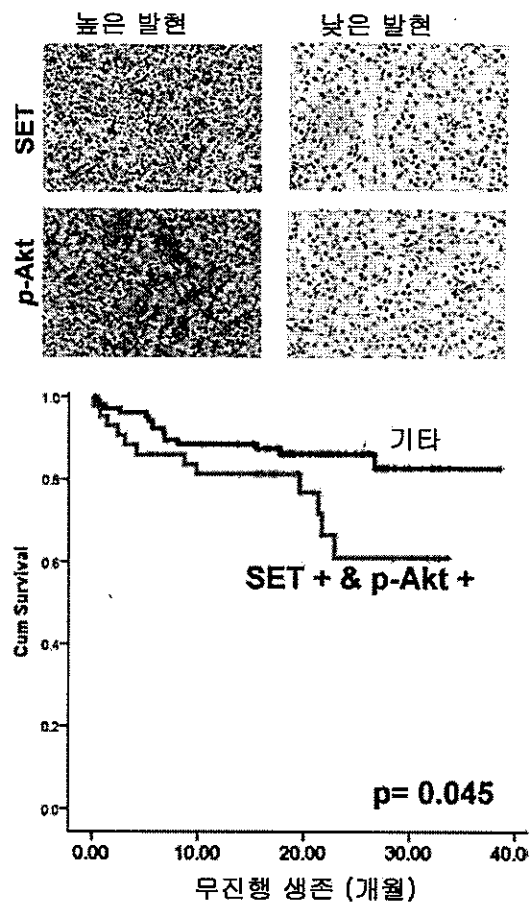
도면5b



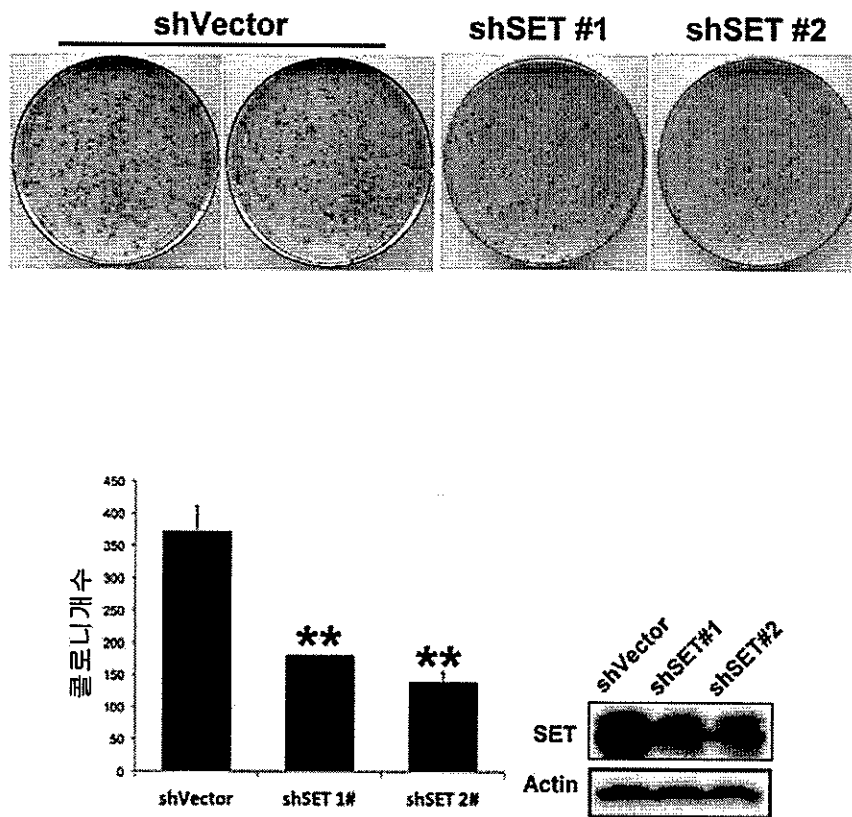
도면5c



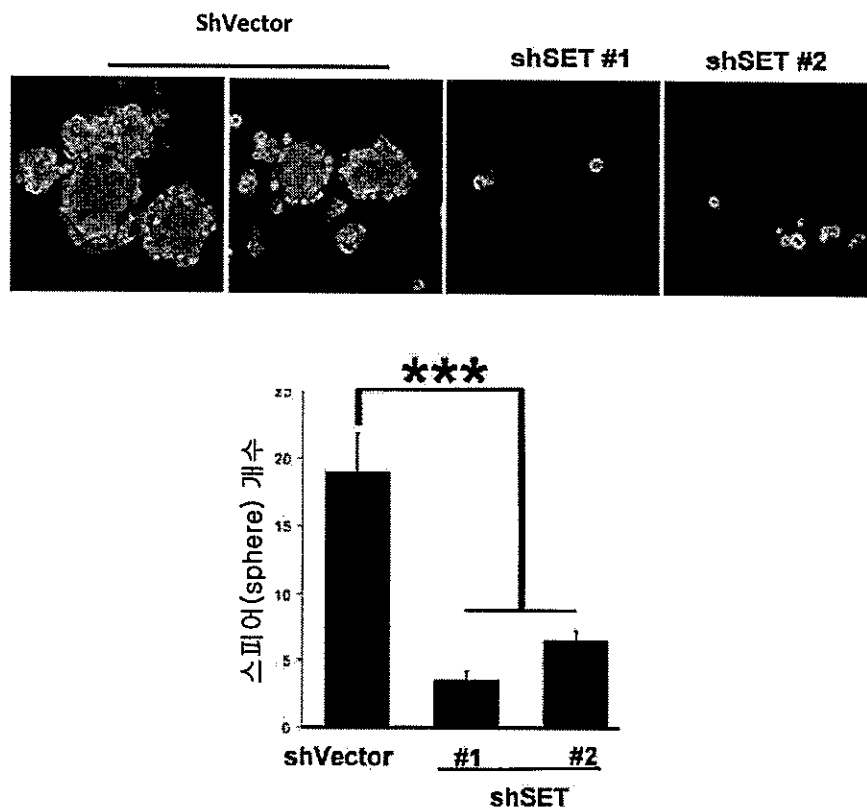
도면5d



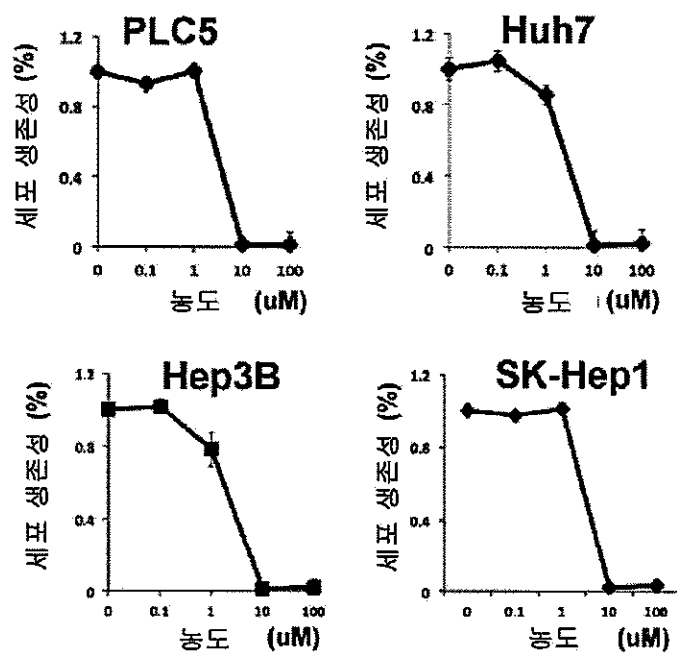
도면5e



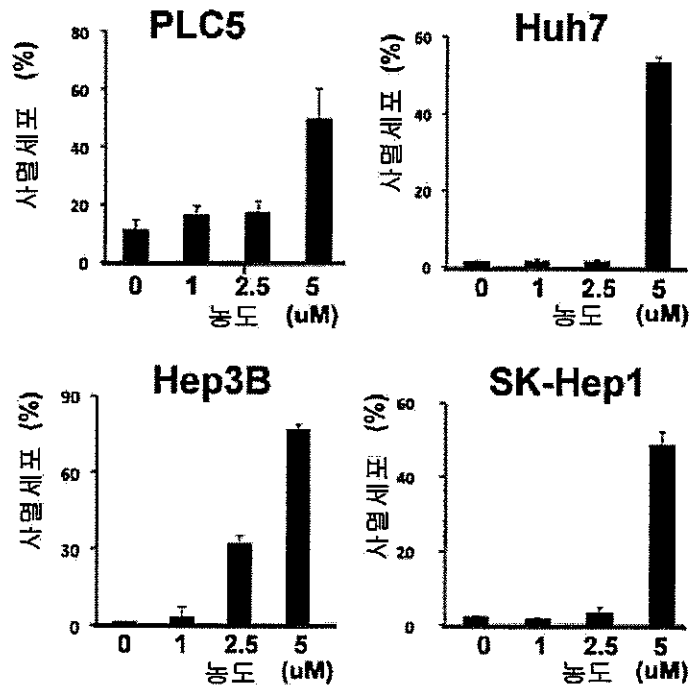
도면5f



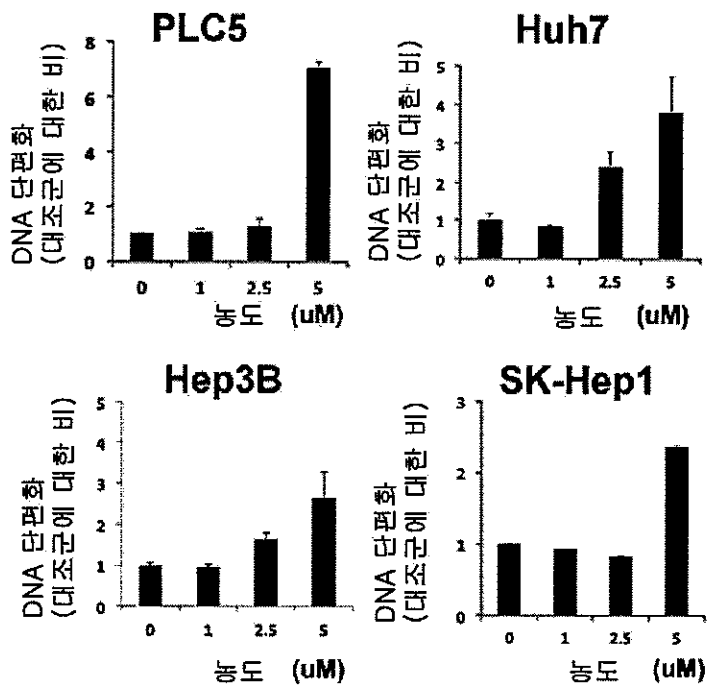
도면6a



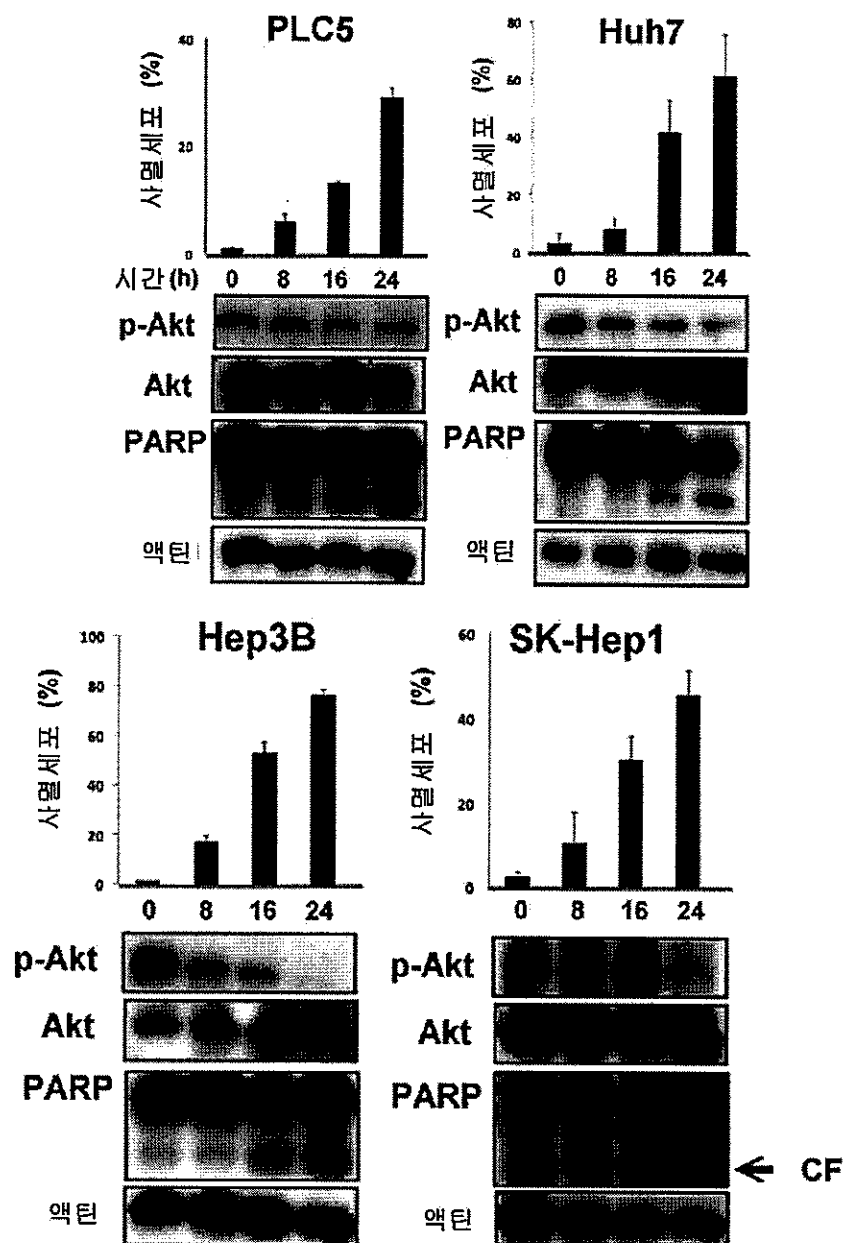
도면6b



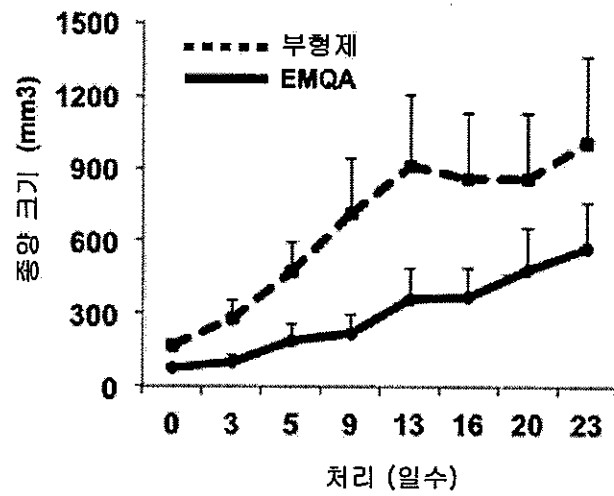
도면6c



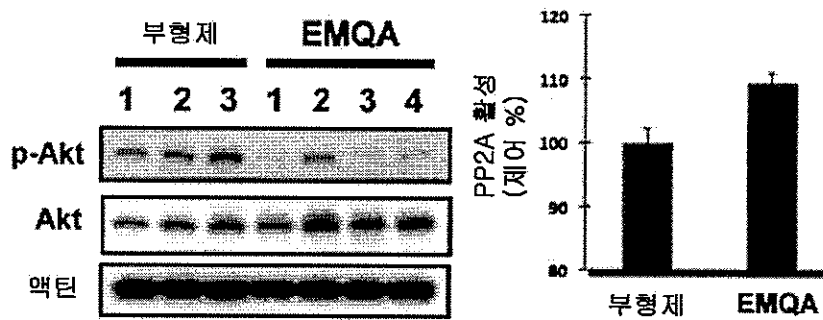
도면6d



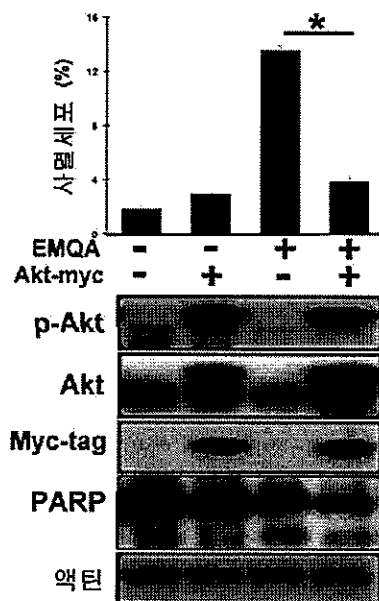
도면6e



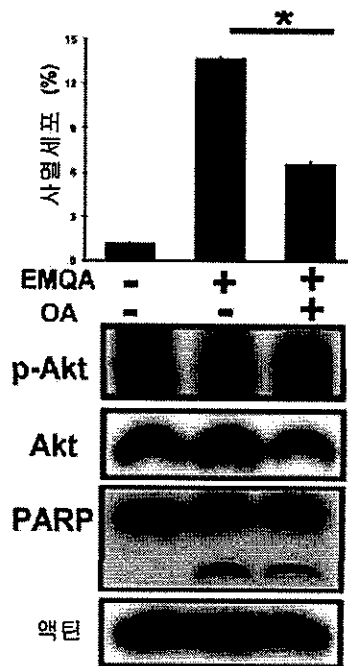
도면6f



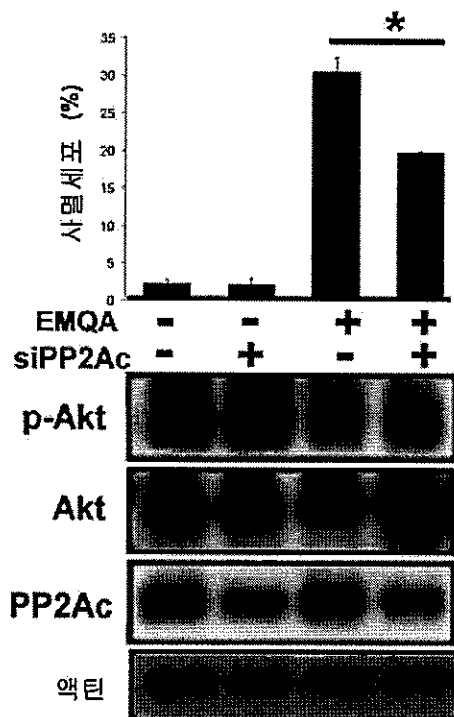
도면7a



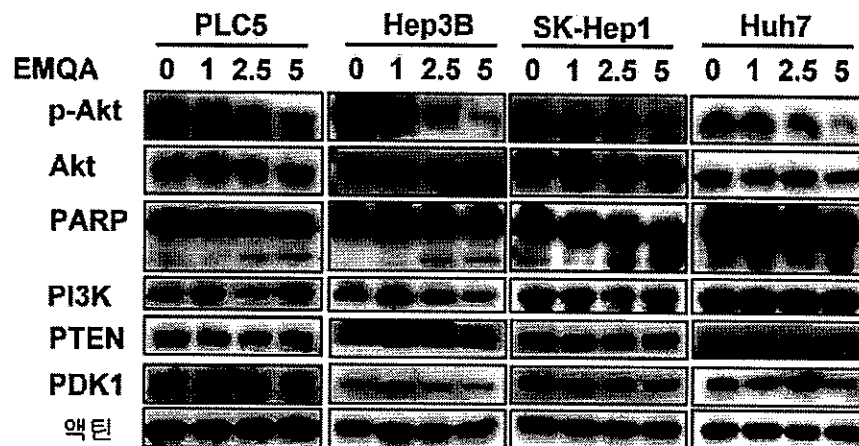
도면7b



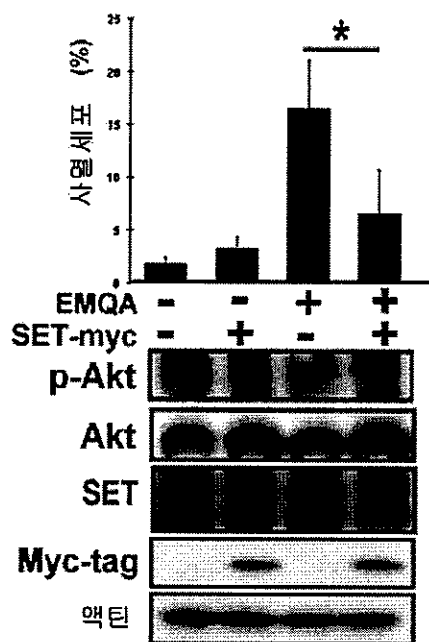
도면7c



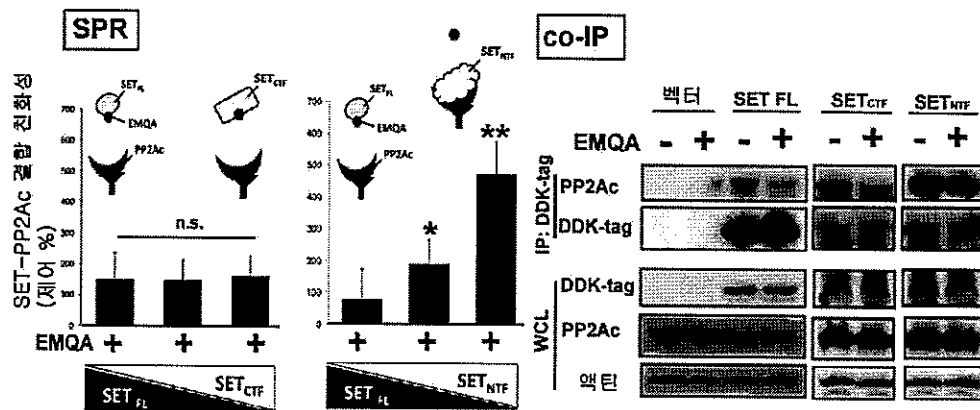
도면7d



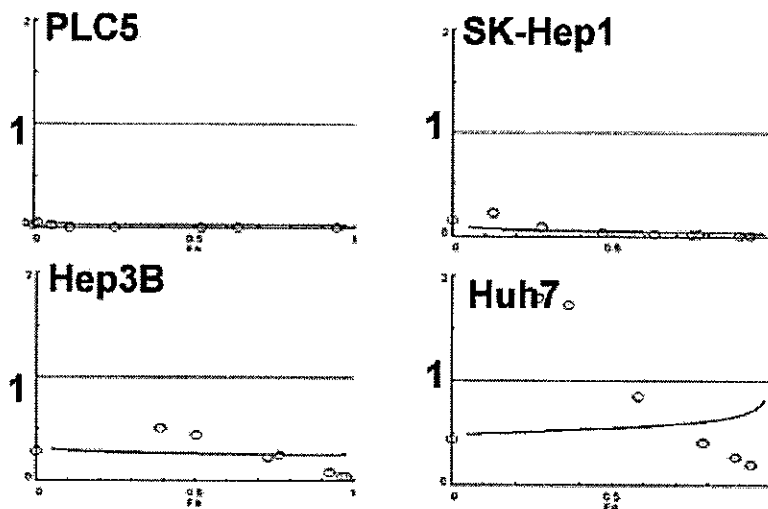
도면7e



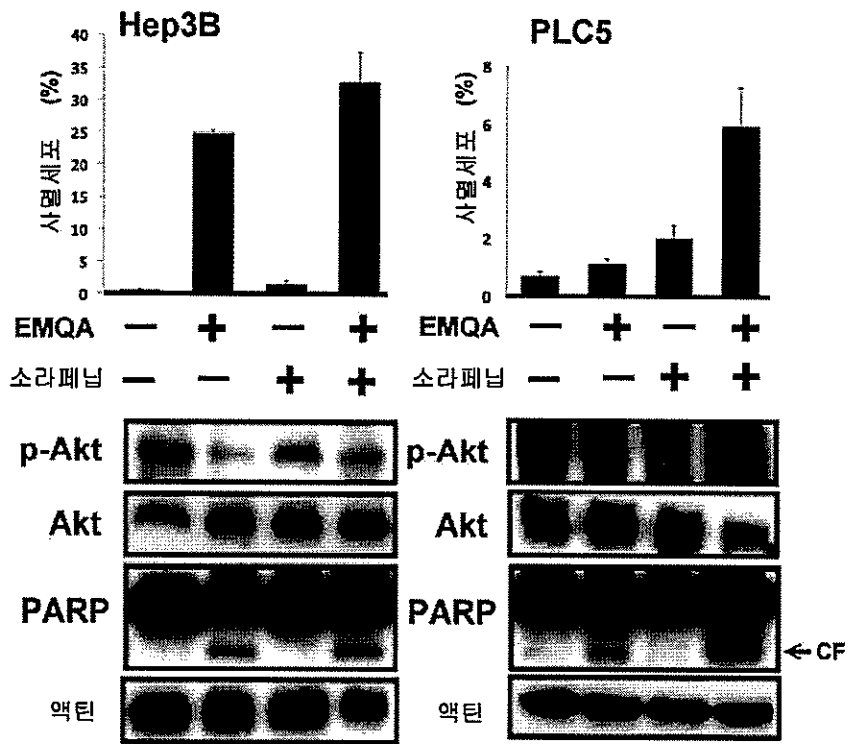
도면7f



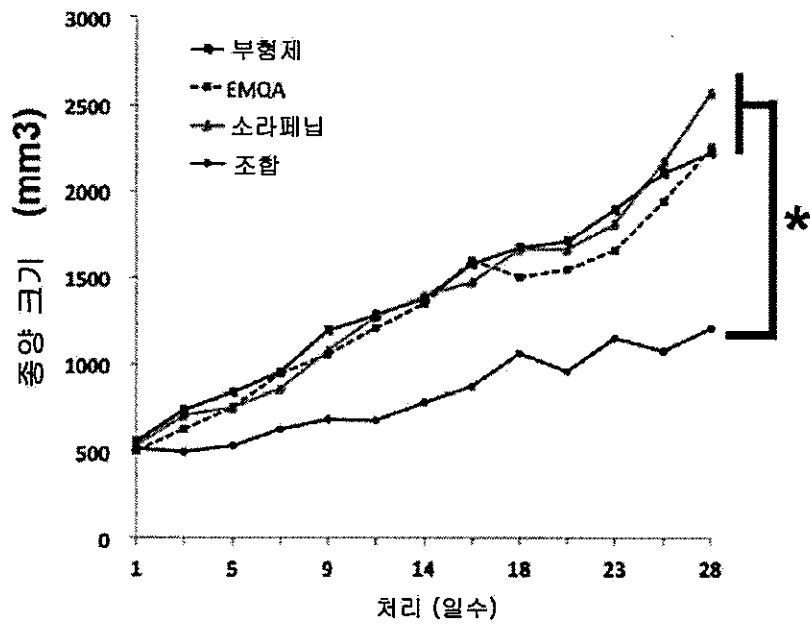
도면8a



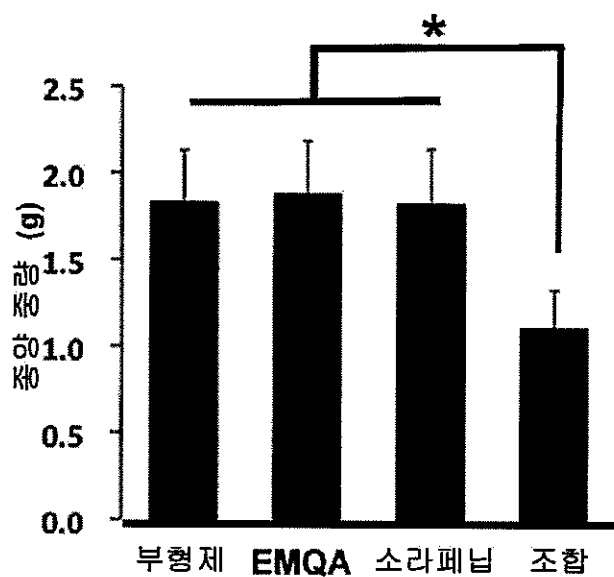
도면8b



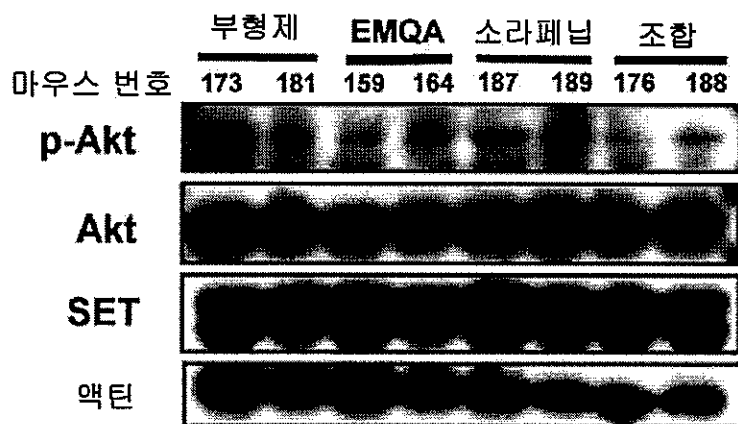
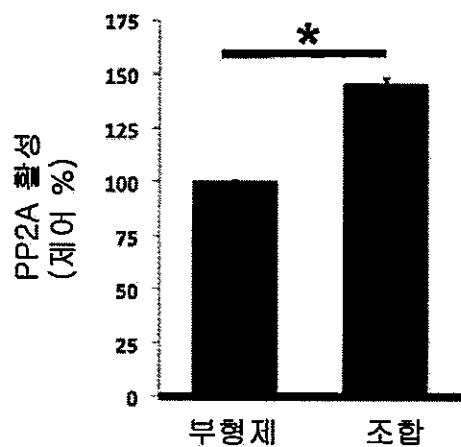
도면8c



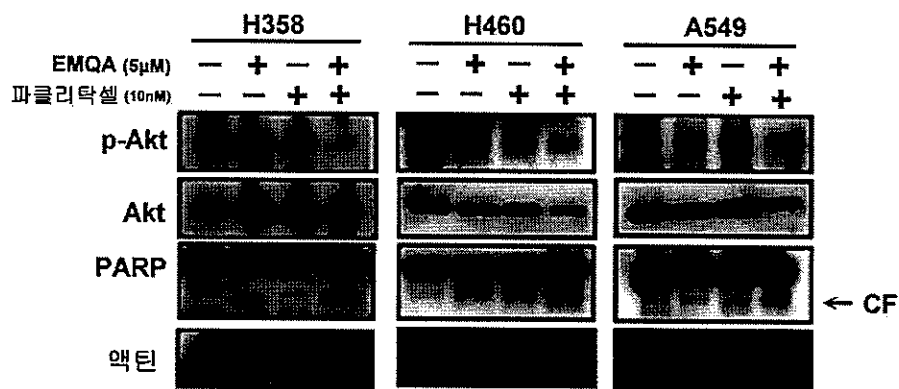
도면8d



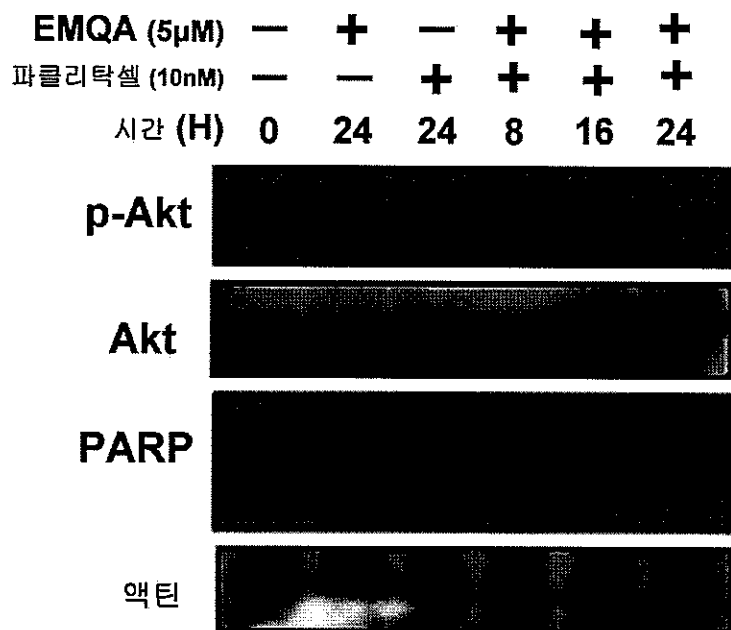
도면8e



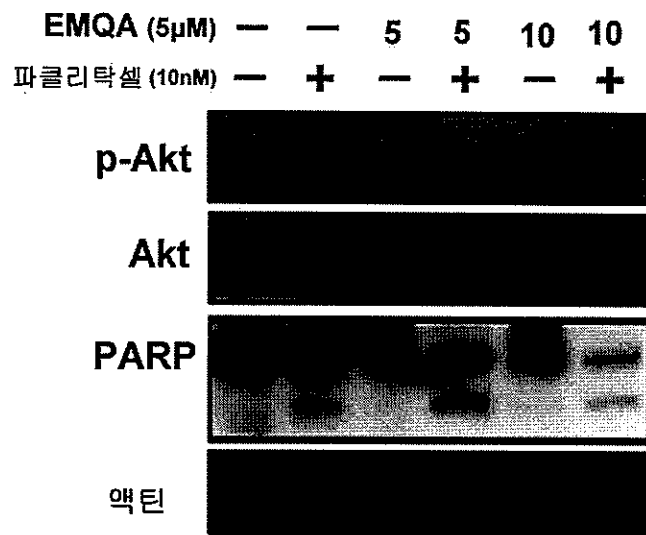
도면9a



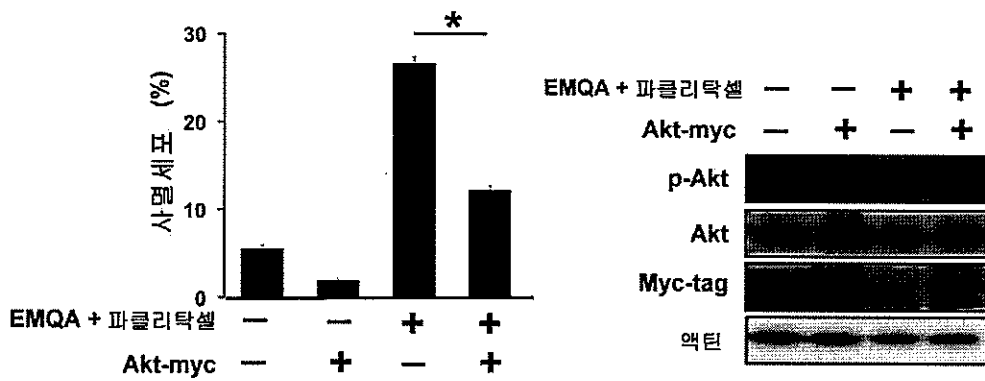
도면9b



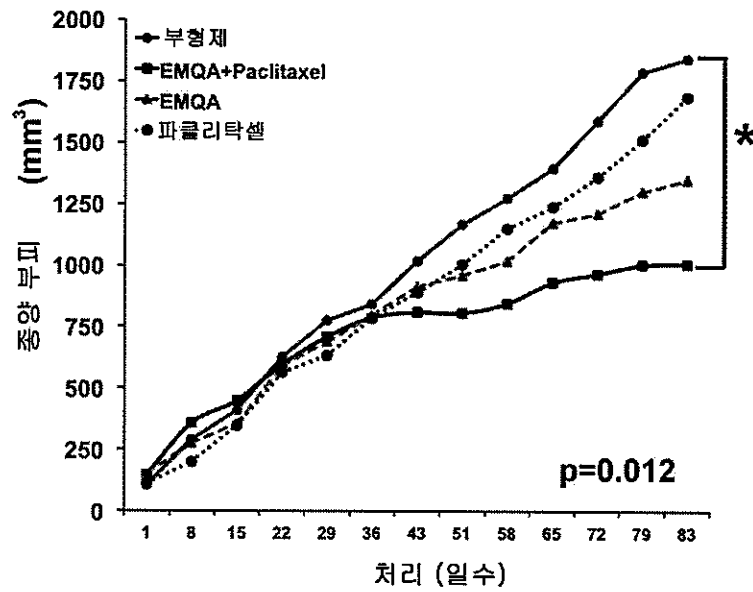
도면9c



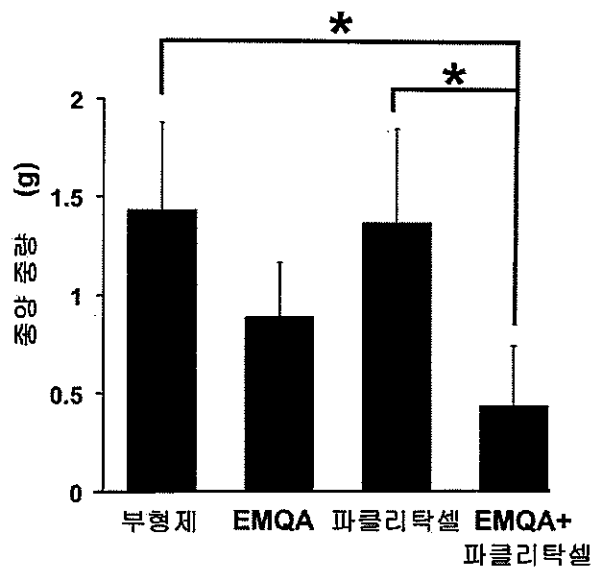
도면9d



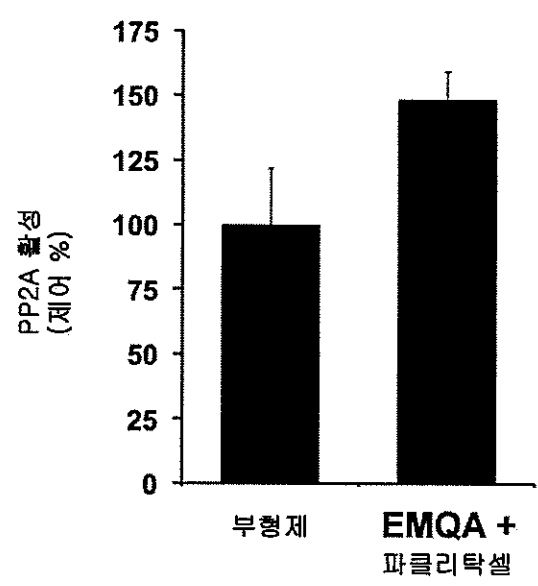
도면10a



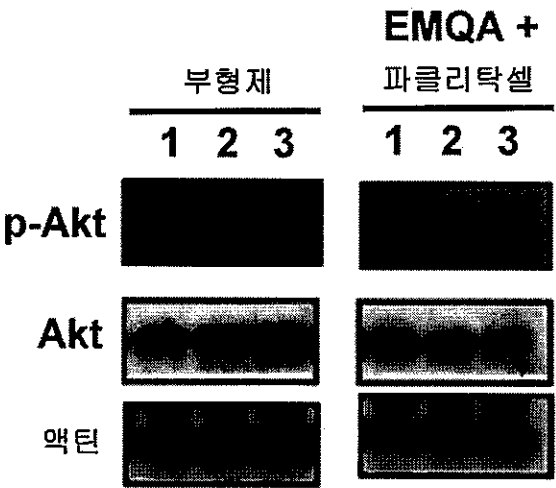
도면10b



도면10c



도면10d



도면10e

