

명세서

발명의 명칭: 신규한 화합물 및 이의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 ANO1(Anoctamin 1) 및 EGFR(epidermal growth factor receptor)을 동시에 억제할 수 있는 신규한 화합물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.
- [2] 본 발명은 2023년 06월 09일에 출원된 대한민국 특허출원 제10-2023-0073989호 및 2024년 06월 05일에 출원된 대한민국 특허출원 제10-2024-0074031호에 기초한 우선권을 주장하며, 상기 출원들의 명세서 및 도면에 개시된 모든 내용은 본 출원에 인용된다.

[3]

배경기술

- [4] 교모세포종은 성인에서 발생하는 원발성 악성 뇌종양으로 진단 후 치료를 하지 않으면 3 내지 6개월 내에 사망하고 각종 치료방법을 모두 동원하더라도 평균 생존기간이 12-14개월에 불과한, 악성도가 매우 높은 질환이다. 대한민국에서는 매년 약 12,000명 정도의 뇌종양이 발생하는데, 9,000여 명은 뇌수막종 또는 뇌하수체 선종과 같은 양성 종양에 해당하고, 2,000여 명은 악성 종양으로 진단된다. 매년 악성 종양 환자 중 630명 정도가 교모세포종으로 진단되고 있다.
- [5] 뇌조직의 신경교세포에서 기원하는 교모세포종은 주위 뇌조직으로 침습적 성장을 하므로 종양의 경계가 불분명하고 방사선학적 검사나 수술 시 실제 육안으로 관찰되는 경계보다 멀리까지 퍼져 있다. 교모세포종은 뇌의 기능상 수술적 제거가 불가능한 부위에 위치한 경우가 많으며, 방사선치료로 완전 관해가 되지 않고, 뇌-혈관 장벽 때문에 항암제의 뇌 침투가 용이하지 않으므로 효과적인 항암제가 드물어 치료가 매우 어려워 나쁜 예후를 보이는 난치병이다. 현재 교모세포종의 기본치료제인 테모졸로마이드가 사용되고 있으나 장기간 치료할 때 그에 따른 부작용과 내성이 발생하여 지속적인 치료가 쉽지 않으며 현대의 많은 의학 발전과 신약개발에도 불구하고 새로운 치료제가 아직까지 나오지 않은 상태이다.
- [6] 교모세포종 환자에서 빈번하게 유전적 변형이 일어나는 발암 유전자 중 하나는 EGFR (epidermal growth factor receptor, 표피 성장 인자 수용체)이다. EGFR은 생리학적인 중요성을 가지고 있으며, 환자의 절반 이상에서 EGFR의 돌연변이가 관찰된다. EGFR에 EGF 나 TNF-alpha가 결합하면 세포 내에서 다양한 신호전달이 이루어진다. 하지만 EGFR의 과발현 또는 과활성 돌연변이는 세포의 과도한 증식 등을 유발하여 결국 암으로 발전하게 된다. EGFR 돌연변이 중 EGFRvIII는 6 내지 273번 아미노산이 결여되어 있는 것을 특징으로 하는 돌연변이로서, 암세포에서만 특이적으로 발현되는 단백질이다. EGFRvIII는 교모세포종에서 처음 발견되었으나, 다른 조직 암에서도 발견되고 있다.

- [7] 교모세포종 세포의 이동과 전이과정에서 들어 아노원 (Anoctamin1, ANO1), CLC (chloride channel) family 등과 같은 염화이온통로 단백질에 의한 암세포의 볼륨조절이 중요하다는 것이 보고되고 있다. 아노원 단백질은 여러 생리학적 기능 (통증 조절, 혈압 조절, 뇌신경 발달, 수분분비 조절 등)에 관여하는데, 특히, 다양한 암세포 (유방암, 두경부암, 전립선암, 췌장암, 폐암 등)에서의 항암효과에 대해 보고되어 왔다. 유방암에서의 아노원 단백질의 저해는 CaMK2 신호전달을 통해 항암효과를 발휘하였다. 그리고, 정상 뇌에서의 아노원 발현 수준은 현저히 낮으나 교모세포종에서는 아노원 단백질이 과발현이 되고, 아노원 활성을 억제했을 때에 교모세포종의 세포 이동과 전이가 억제되며, 동물모델에서 암성장이 억제됨이 보고된 바 있다. 또한, 교모세포종 줄기세포에서 아노원을 억제하면 표피성장 인자 수용체 돌연변이 3 (EGFRvIII) 단백질 분해를 유도한다는 것이 보고되었다. 상기와 같은 연구들은 아노원 단백질의 저해가 교모세포종 등을 포함한 다양한 EGFR 돌연변이 관련 암의 치료전략이 될 수 있음을 시사하고 있다.
- [8] 이와 같이, ANO1 단백질 및 EGFR은 모두 항암 치료 타겟으로서의 잠재성을 가지고 있다. 그러나, 아직까지 ANO1 단백질 및 EGFR의 이중억제를 통해 우수한 항암효과를 발휘할 수 있는 물질은 발굴되고 있지 않다.

[9]

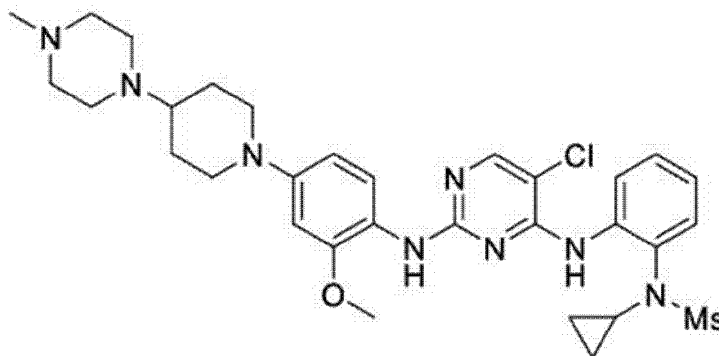
발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명은 신규한 Anoctamin 1 (ANO1) 억제성 화합물 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 상기 화합물이 칼슘의존성 클로라이드 채널인 ANO1 및 티로신 키나아제인 EGFR을 동시에 억제하여 우수한 항암효과를 발휘할 수 있음을 확인하여 완성된 것이다.
- [11] 따라서, 본 발명의 목적은 하기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하는 것이다.

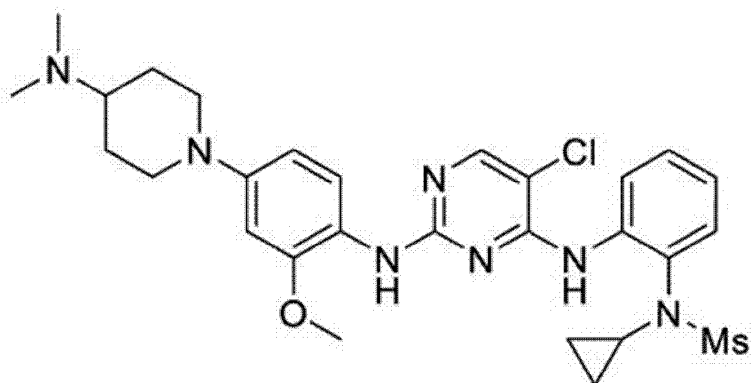
[12] [화학식 1]

[13]



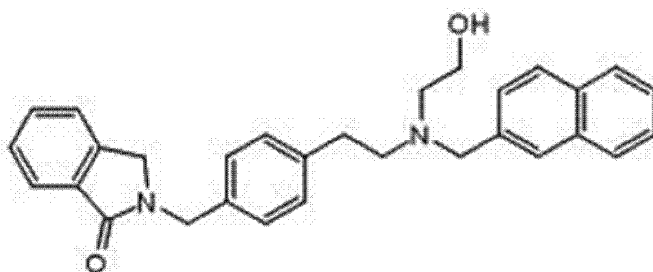
[14] [화학식 2]

[15]



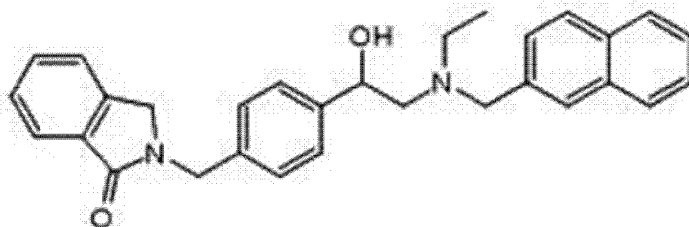
[16] [화학식 3]

[17]



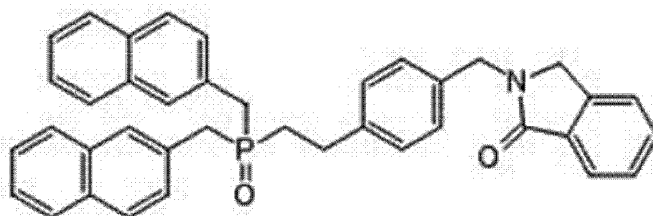
[18] [화학식 4]

[19]



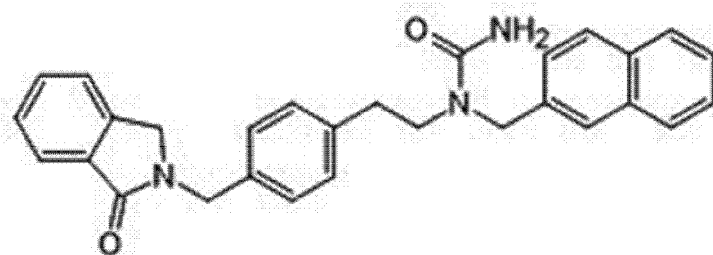
[20] [화학식 5]

[21]



[22] [화학식 6]

[23]



[24] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[25] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[26] 본 발명의 또 다른 목적은 (i) 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 (ii) EGFR에 대한 표적항암제를 유효성분으로 포함하는, 뇌종양의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[27] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 항암제의 항암효과 증진용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[28]

[29] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

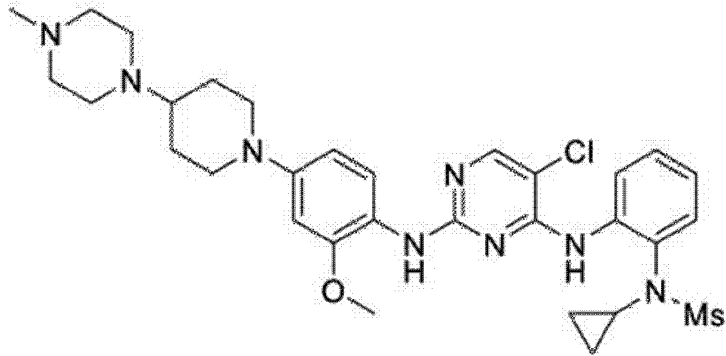
[30]

과제 해결 수단

[31] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 하기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다:

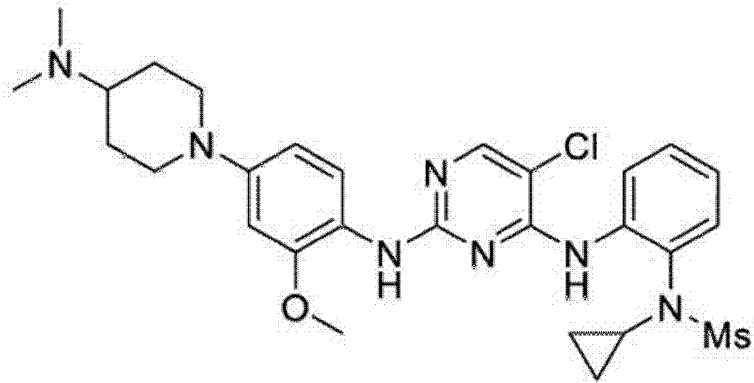
[32] [화학식 1]

[33]



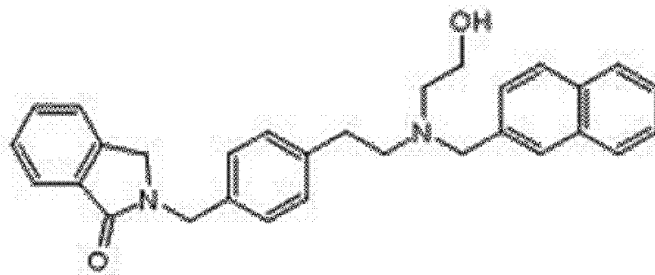
[34] [화학식 2]

[35]



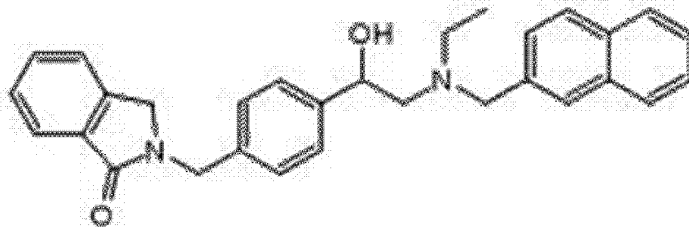
[36] [화학식 3]

[37]



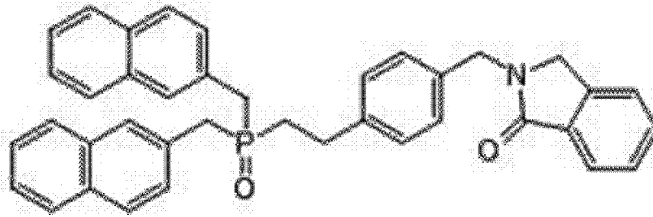
[38] [화학식 4]

[39]



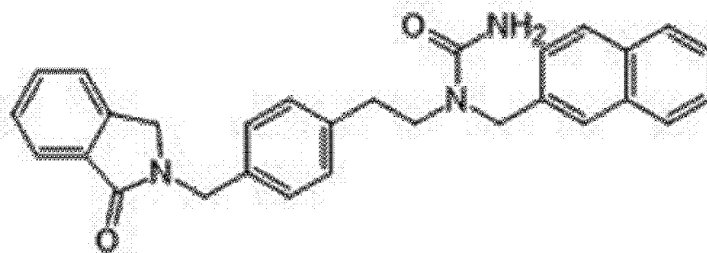
[40] [화학식 5]

[41]



[42] [화학식 6]

[43]

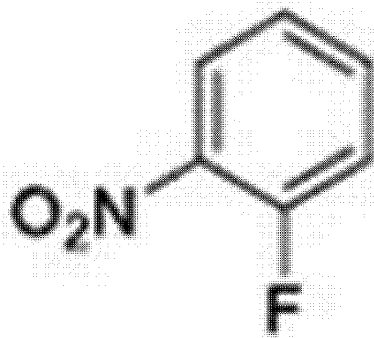


[44] 또한, 본 발명은 (S1A) 하기 화학식 7로 표시되는 화합물과 메탄설포닐클로라이드(MsCl) 및 사이클로프로필아민을 염기의 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 제조하는 단계; 또는

[45] (S1B) 하기 화학식 9로 표시되는 화합물과 하기 화학식 10 또는 화학식 11로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시키는 단계를 포함하는, 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:

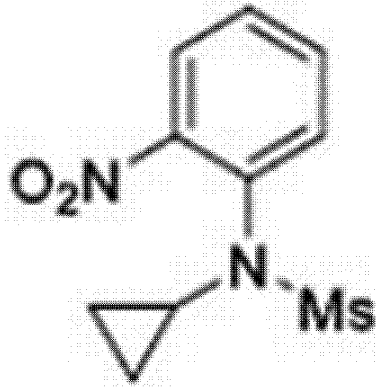
[46] [화학식 7]

[47]



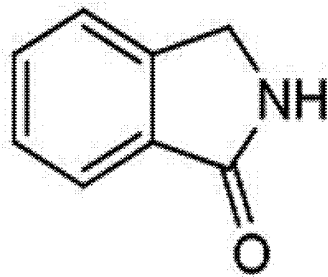
[48] [화학식 8]

[49]



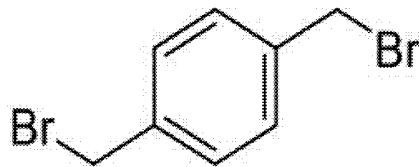
[50] [화학식 9]

[51]



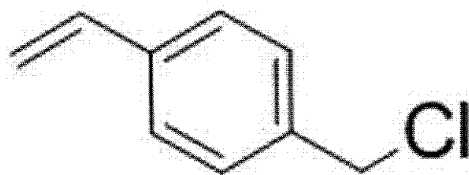
[52] [화학식 10]

[53]



[54] [화학식 11]

[55]



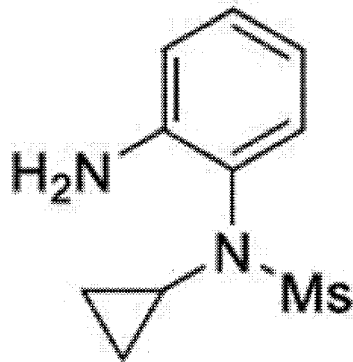
[56] 본 발명의 일 구현예로, 상기 (S1A) 단계는 하기의 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[57] (S1A-1) 상기 화학식 8로 표시되는 화합물(의 니트로기)을 염화암모늄의 존재 하에 아연으로 처리하여 환원시켜 하기 화학식 12로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;

- [58] (S1A-2) 상기 화학식 12로 표시되는 화합물과 2, 4, 5-트리클로로피리미딘을 염기의 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 13으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계; 및
- [59] (S1A-3) 상기 화학식 13으로 표시되는 화합물과 하기 화학식 14 또는 화학식 15으로 표시되는 화합물을 산의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 제조하는 단계.

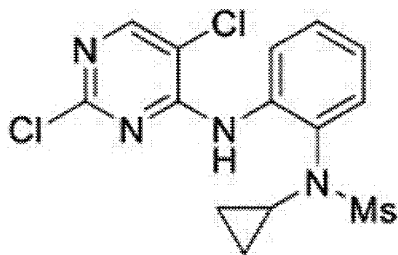
[60] [화학식 12]

[61]



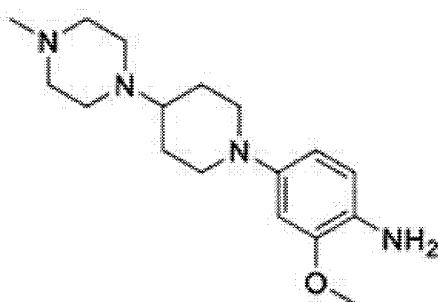
[62] [화학식 13]

[63]



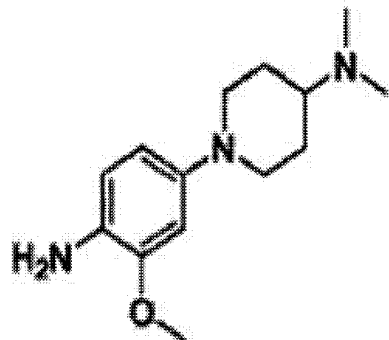
[64] [화학식 14]

[65]



[66] [화학식 15]

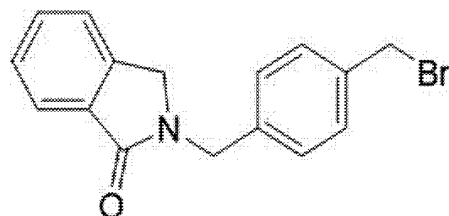
[67]



[68] 본 발명의 다른 구현으로, 상기 (S1B) 단계에서 상기 화학식 9로 표시되는 화합물과 상기 화학식 10으로 표시되는 화합물이 염기의 존재 하에 반응한 경우, 하기 화학식 16으로 표시되는 화합물이 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[69] [화학식 16]

[70]



[71] 본 발명의 또 다른 구현으로, 상기 (S1B) 단계는 하기의 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[72] (S1B-1) 상기 화학식 16으로 표시되는 화합물과 트리메칠시아나이드 (Trimethylsilyl cyanide)를 염기의 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 17로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;

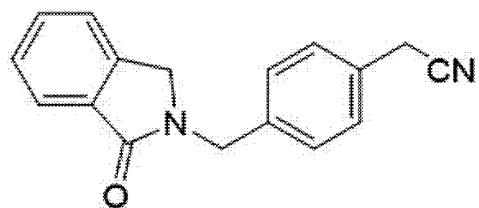
[73] (S1B-2) 상기 화학식 17로 표시되는 화합물을 금속 촉매의 존재 하에 수소화 반응시켜 하기 화학식 18로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;

[74] (S1B-3) 상기 화학식 18로 표시되는 화합물과 하기 화학식 19로 표시되는 화합물을 환원제 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 20으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계; 및

[75] (S1B-4) 상기 화학식 20으로 표시되는 화합물과 NCO를 반응시켜 상기 화학식 6으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계; 또는 상기 화학식 20으로 표시되는 화합물과 하기 화학식 21으로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 22로 표시되는 화합물을 제조하는 단계.

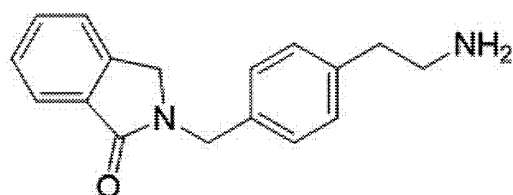
[76] [화학식 17]

[77]



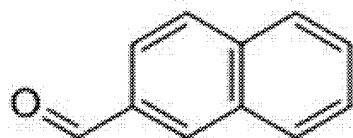
[78] [화·학·식 18]

[79]



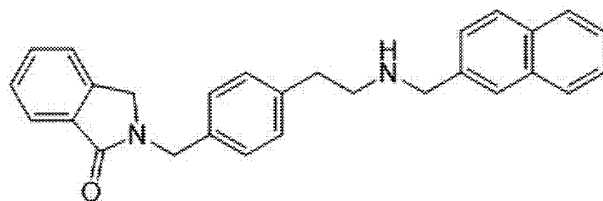
[80] [화·학·식 19]

[81]



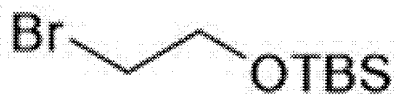
[82] [화·학·식 20]

[83]



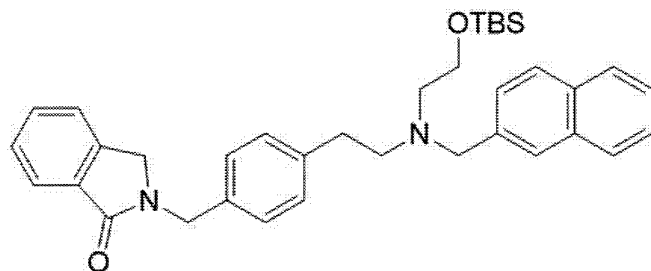
[84] [화·학·식 21]

[85]



[86] [화·학·식 22]

[87]



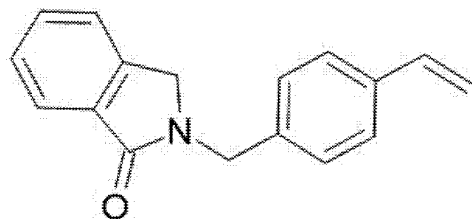
[88] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 (S1B-4) 단계는 상기 화학식 22로 표시되는 화합물을 산의 존재 하에 가수분해 반응시켜 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[89] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 금속 촉매는 백금족, 로듐, 팔라듐 카본, 및 라니크켈(Raney-Ni)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[90] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 (S1B) 단계에서 상기 화학식 9로 표시되는 화합물과 상기 화학식 11로 표시되는 화합물이 염기의 존재 하에 반응한 경우, 하기 화학식 23으로 표시되는 화합물이 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[91] [화학식 23]

[92]



[93] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 (S1B) 단계는 하기의 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[94] (S1Ba-1) 상기 화학식 23으로 표시되는 화합물과 과산화물을 반응시켜 하기 화학식 24로 표시되는 화합물을 제조하는 단계, 및

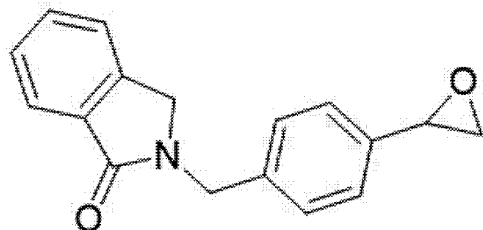
[95] (S1Ba-2) 상기 화학식 24로 표시되는 화합물과 하기 화학식 25로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계; 또는

[96] (S1Bb-1) 상기 화학식 23으로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 인산화(phosphorylation)시켜 하기 화학식 26으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계, 및

[97] (S1Bb-2) 상기 화학식 26으로 표시되는 화합물과 하기 화학식 27로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 5로 표시되는 화합물을 제조하는 단계.

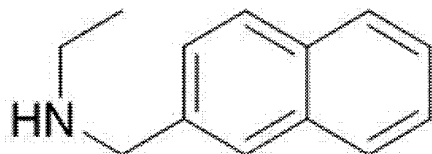
[98] [화학식 24]

[99]



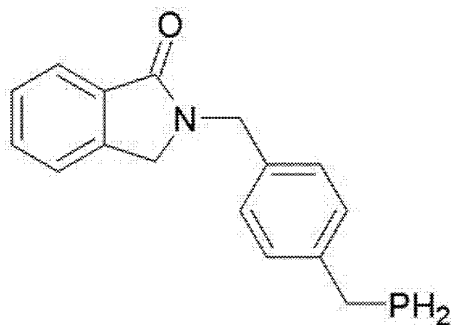
[100] [화학식 25]

[101]



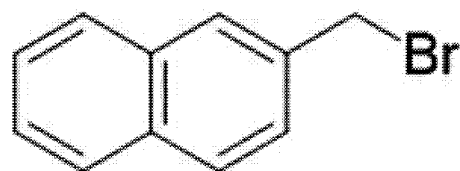
[102] [화학식 26]

[103]



[104] [화학식 27]

[105]

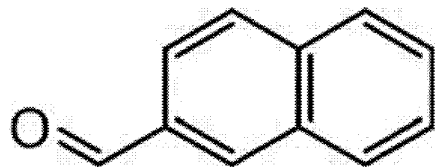


[106] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 과산화물은 m-CPBA(meta-chloroperoxybenzoic acid), H_2O_2 , DMDO(dimethyldioxirane), 및 옥손(oxone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[107] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 화학식 25로 표시되는 화합물은 하기 화학식 28로 표시되는 화합물과 에틸아민을 환원제 존재 하에 반응시켜 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[108] [화학식 28]

[109]



- [110] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 환원제는 소듐시아노보로하이드라이드(NaBH_3CN), 소듐트리아세톡시보로하이드라이드($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$), 및 소듐보로하이드라이드(NaBH_4)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [111] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 산은 피발산(PivOH), 아세트산(AcOH), 트리플루오로메탄설포산(TfOH), 파라톨루엔설포산(TsOH), 벤조산(Benzoic acid), 브롬화아연(ZnBr_2), 염화수소(HCl), 및 트리플루오로아세트산(TFA ; trifluoroacetic acid)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [112] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 염기는 탄산칼륨(K_2CO_3), 탄산나트륨(Na_2CO_3), 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 탄산수소칼륨(KHCO_3), 브롬화제이구리(CuBr_2), 탄산세슘(Cs_2CO_3), 수산화리튬(LiOH), 수소화나트륨(NaH), 수소화칼륨(KH), 수산화칼륨(KOH), 트리에틸아민(TEA ; triethylamine), N,N -다이이소프로필에틸아민(DIPEA ; N,N -diisopropylethylamine), 피리딘, 및 피페리딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [113] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 제조방법은 유기용매, 물, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 용매에서 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [114] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 유기용매는 디클로로메탄(DCM), 디클로로에탄(DCE), 1,4-다이옥산, 테트라하이드로퓨란(THF), 톨루엔, 헥산, 벤젠, 자일렌, 클로로벤젠, 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH), t -아밀알콜($t\text{-AmOH}$), 트리플루오로에탄올(TFE), 헥사플루오로이소프로판올(HFIP), 아세토니트릴(ACN), 디메틸포름아마이드(DMF), 나이트로메탄, 트리메톡시메탄($\text{CH}(\text{OMe})_3$), 아세트산, 이소프로판올(IPA), 및 클로로포름으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [115] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 포함하는, 뇌종양의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [116] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 뇌종양의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

- [117] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의 뇌종양 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [118] 뿐만 아니라, 본 발명은 뇌종양 치료용 약제의 제조를 위한, 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물의 용도를 제공한다.
- [119] 본 발명의 일 구현예로, 상기 뇌종양은 EGFR (Epidermal growth factor receptor) 및 ANO1 (Anoctamin 1)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 돌연변이와 연관된 뇌종양일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [120] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 EGFR 및 ANO1을 동시에 억제할 수 있으나 (예를 들어, 발현 및/또는 활성 억제), 이에 한정되지 않는다. 달리 말하면, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 EGFR 및 ANO1을 모두 타겟으로 하는 이중 억제제일 수 있다.
- [121] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 하기로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 특성을 만족할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다:
- [122] (a) 종양의 전이를 억제함; 및
- [123] (b) 암의 항암제에 대한 내성을 억제함.
- [124] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 항암제는 티로신 키나아제 (Tyrosine kinase)에 대한 표적항암제일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [125] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 티로신 키나아제는 EGFR (epidermal growth factor receptor), ALK(anaplastic lymphoma kinase), ROS1 (ROS Proto-Oncogene 1), BRAF (B-Raf Proto-Oncogene), HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), RET (Ret Proto-Oncogene), NTRK1 (Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1), MET (Mesenchymal-Epithelial Transition factor), 및 NRG1 (Neuregulin 1)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [126] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약학적 조성물은 티로신 키나아제에 대한 표적항암제와 조합으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [127] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 약학적 조성물은 상기 표적항암제와 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [128] 또한, 본 발명은 (i) 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 (ii) EGFR에 대한 표적항암제를 유효성분으로 포함하는, 뇌종양의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [129] 뿐만 아니라, 본 발명은 (i) 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한

염; 및 (ii) EGFR에 대한 표적항암제를 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 뇌종양의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

- [130] 뿐만 아니라, 본 발명은 (i) 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 (ii) EGFR에 대한 표적항암제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 뇌종양의 예방 또는 치료용도를 제공한다.
- [131] 뿐만 아니라, 본 발명은 뇌종양 치료용 약제의 제조를 위한 (i) 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 (ii) EGFR에 대한 표적항암제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다.
- [132] 본 발명의 일 구현예로, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 상기 EGFR에 대한 표적항암제에 대한 뇌종양세포의 내성을 억제할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [133] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 조성물은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 상기 EGFR에 대한 표적항암제가 혼합된 혼합제 형태일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [134] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 상기 EGFR에 대한 표적항암제가 각각 제제화되어 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여되는 형태일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [135] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양 항암제의 항암효과 증진용 약학적 조성물을 제공한다.
- [136] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 뇌종양 항암제의 항암효과 증진 방법을 제공한다.
- [137] 뿐만 아니라, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 또는 이를 유효성분으로 포함하는 조성물의 뇌종양 항암제의 항암효과 증진 용도를 제공한다.
- [138] 뿐만 아니라, 본 발명은 뇌종양 항암제의 항암효과 증진용 제제의 제조를 위한, 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도를 제공한다.
- [139] 뿐만 아니라, 본 발명은 뇌종양세포의 뇌종양 항암제에 대한 내성 억제제의 제조를 위한, 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 용도를 제공한다.

- [140] 본 발명의 일 구현예로, 상기 뇌종양 항암제는 티로신 키나아제에 대한 표적항암제일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [141] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 티로신 키나아제는 EGFR (epidermal growth factor receptor), ALK(anaplastic lymphoma kinase), ROS1 (ROS Proto-Oncogene 1), BRAF (B-Raf Proto-Oncogene), HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), RET (Ret Proto-Oncogene), NTRK1 (Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1), MET (Mesenchymal-Epithelial Transition factor), 및 NRG1 (Neuregulin 1)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [142] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 상기 뇌종양 항암제와 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[143]

발명의 효과

- [144] 본 발명은 신규한 Anoctamin 1 (ANO1) 억제성 화합물에 관한 것으로, 신규 화합물이 칼슘의존성 클로라이드 채널인 ANO1의 발현 내지 활성을 억제하여 뇌종양을 억제할 수 있음을 확인하여 완성된 것이다.
- [145] 따라서, 본 발명에 따르면, ANO1 저해제로 사용할 수 있는 신규한 화합물을 제공할 수 있다. 뿐만 아니라, 본 발명의 화합물은 뇌종양세포에서 ANO1 및 EGFR을 동시에 억제할 수 있는 바, ANO1 및 EGFR의 이중 타겟 항암제로 사용될 수 있으며, EGFR 표적치료의 병용제제로도 활용 가능하므로, 뇌종양의 예방 및 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

[146]

도면의 간단한 설명

- [147] 도 1은 본 발명에 따른 화합물 AON-MG23-01, 및 AON-MG23-02의 명칭, 구조식, 및 기본 정보를 나타낸 것이다.
- [148] 도 2는 인간 교모세포종 세포에 대한 화합물 AON-MG23-01, 및 AON-MG23-02의 세포성장 억제 효과를 확인하기 위해, 인간 교모세포종 세포주에 본 발명의 화합물 AON-MG23-01, 또는 AON-MG23-02를 다양한 농도로 처리한 후 CCK assay를 수행한 결과를 나타낸 것이다.
- [149] 도 3은 인간 교모세포종 세포에 대한 본 발명의 화합물 AON-MG23-01, 및 AON-MG23-02의 세포이동 억제 효과를 확인하기 위해, 인간 교모세포종 세포주에 본 발명의 화합물 AON-MG23-01, 또는 AON-MG23-02를 다양한 농도로 처리한 후 시간에 따른 세포이동 정도를 촬영하고 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [150] 도 4는 본 발명의 화합물 AON-MG23-01, 및 AON-MG23-02의 교모세포종 전이 억제 효과를 확인하기 위해, 매트릭젤 상에서 배양 중인 인간 교모세포종 세포주에 본 발명의 화합물 AON-MG23-01, 또는 AON-MG23-02를 다양한 농도로 처리한 후 세포의 매트릭젤 침투 정도를 촬영하고 분석한 결과를 나타낸 것이다.

- [151] 도 5는 화합물 AON-MG23-01, 및 AON-MG23-02가 교모세포종에서 EGFR 및 ANO1 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해, 인간 교모세포종 세포주에 본 발명의 화합물 AON-MG23-01 또는 AON-MG23-02를 다양한 농도로 처리한 후 웨스턴 블롯을 수행한 결과이다. 좌측은 웨스턴 블롯으로 검출한 단백질 밴드의 이미지이고, 우측은 EGFR 및 ANO1 단백질 수준을 정량화한 것이다.
- [152] 도 6a 및 6b는 본 발명의 화합물 AON-MG23-01, 및 AON-MG23-02가 교모세포종에서 ANO1의 활성을 억제하는지 확인하기 위해, 인간 교모세포종 세포주에 본 발명의 화합물 AON-MG23-01, 또는 AON-MG23-02를 처리하여 전-세포 패치 클램프 실험을 수행한 결과를 나타낸 것으로, 도 6a는 -100 mV 내지 +100 mV의 칼슘-의존적 염화 이온통로 전류를 측정된 결과를 나타낸 것이고, 도 6b는 도 6a의 +80 mV에서의 전류/전압 (I/V) 플롯을 나타낸 것이다.
- [153] 도 7a 및 도 7b는 본 발명의 화합물 AON-MG23-02와 EGFR 저해제, ANO1 저해제의 인간 교모세포종에서의 전이 억제 효과를 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- [154] 도 8a 및 도 8b는 본 발명의 화합물 AON-MG23-02와 EGFR 저해제, ANO1 저해제의 교모세포종 세포주에서의 ANO1, EGFR, 및 pEGFR 단백질 발현 저해 효과를 비교한 결과를 나타낸 것이다.
- [155] 도 9a 내지 도 9d는 본 발명의 화합물 AON-MG23-02의 유도체인 AON-MG23-05, AON-MG23-06, AON-MG23-07, 및 AON-MG23-08가 교모세포종에서 EGFR 및 ANO1 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해, 인간 교모세포종 세포주에 본 발명의 화합물 유도체인 AON-MG23-05, AON-MG23-06, AON-MG23-07, 또는 AON-MG23-08을 다양한 농도로 처리한 후 웨스턴 블롯을 수행한 결과로, 도 9a는 AON-MG23-05, 도 9b는 AON-MG23-06, 도 9c는 AON-MG23-07, 및 도 9d는 AON-MG23-08를 처리한 후 ANO1, 및 EGFR 단백질의 발현을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과이다.
- [156] 도 10a 및 도 10b는 본 발명의 화합물 AON-MG23-02의 유도체인 AON-MG23-05, AON-MG23-06, AON-MG23-07, 및 AON-MG23-08의 교모세포종 전이 억제 효과를 확인하기 위해, 매트릭셀 상에서 배양 중인 인간 교모세포종 세포주에 본 발명의 화합물 유도체인 AON-MG23-05, AON-MG23-06, AON-MG23-07, 또는 AON-MG23-08를 다양한 농도로 처리한 후 세포의 매트릭셀 침투 정도를 촬영하고 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- [157] 도 11은 본 발명의 화합물 AON-MG23-02의 유도체인 AON-MG23-05의 ¹H NMR 데이터를 나타낸 것이다.
- [158] 도 12 본 발명의 화합물 AON-MG23-02의 유도체인 AON-MG23-06의 ¹H NMR 데이터를 나타낸 것이다.
- [159] 도 13 본 발명의 화합물 AON-MG23-02의 유도체인 AON-MG23-07의 ¹H NMR 데이터를 나타낸 것이다.
- [160] 도 14 본 발명의 화합물 AON-MG23-02의 유도체인 AON-MG23-08의 ¹H NMR 데이터를 나타낸 것이다.

[161]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[162]

본 발명은 Anoctamin 1 (ANO1) 억제 효과를 갖는 신규한 화합물에 관한 것으로서, 상기 화합물이 칼슘의존성 클로라이드 채널인 ANO1의 발현 내지 활성을 저해하여 뇌종양세포의 성장과 전이를 억제할 수 있음을 확인하여 완성된 것이다. 특히, 본 발명의 화합물은 뇌종양세포에서 ANO1과 함께 EGFR의 발현을 효과적으로 저해하는 것으로 확인된 바, 종래의 ANO1 또는 EGFR의 단독 저해제에 비해 더욱 강력한 항암효과를 발휘할 것으로 기대되며, 나아가 뇌종양세포의 EGFR 표적치료제에 대한 내성 발달을 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

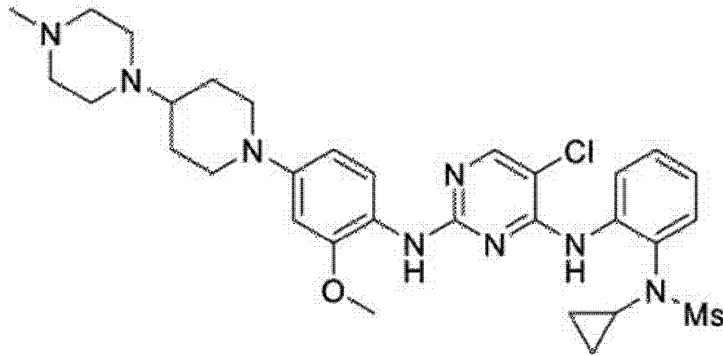
[163]

따라서, 본 발명의 목적은 하기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공하는 것이다.

[164]

[화학식 1]

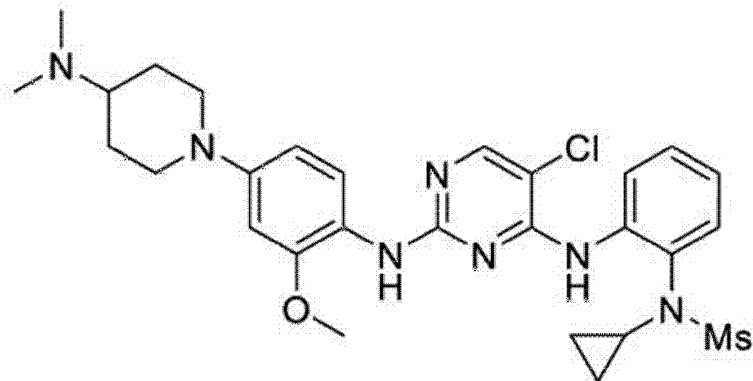
[165]



[166]

[화학식 2]

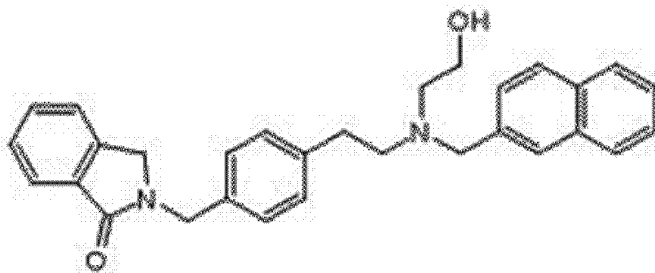
[167]



[168]

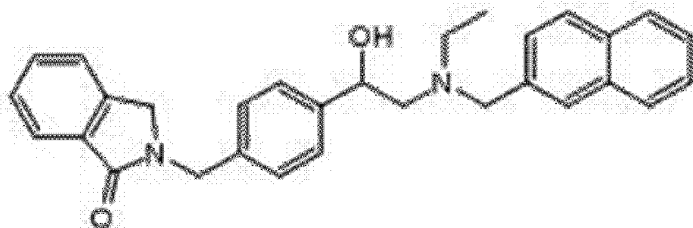
[화학식 3]

[169]



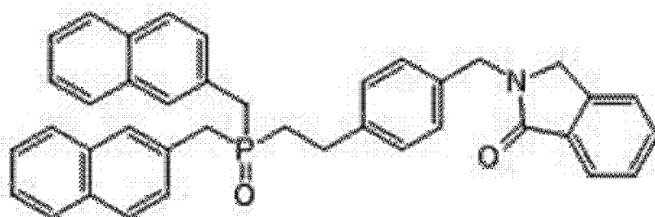
[170] [화학식 4]

[171]



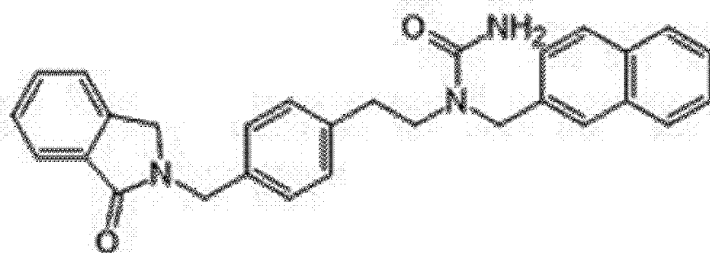
[172] [화학식 5]

[173]



[174] [화학식 6]

[175]



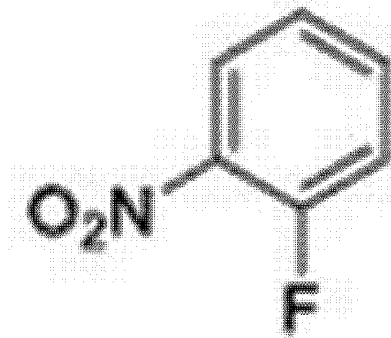
[176] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 "N-(2-((5-클로로-2-((2-메톡시-4-(4-(4-메틸피페라진-1-일)피페리딘-1-일)페닐)아미노)피리미딘-4-일)아미노)페닐)-N-싸이클로프로필메탄설폰아마이드" 또는 "AON-MG23-01"로 지칭될 수 있다. 또한, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 "N-(2-((5-클로로-2-((4-(4-(디메틸아미노)피페리딘-1-일)-2-메톡시페닐)아미노)피리미딘-4-일)아미노)페

- 닐)-N- 싸이클로프로필메탄설폰아마이드" 또는 "AON-MG23-02"로 지칭될 수 있다.
- [177] 본 명세서에서 사용된 용어 "Ms"는 메틸설폰닐(Methylsulfonyl), 즉, $-\text{SO}_2(\text{CH}_3)$ 를 의미한다.
- [178] 또한, 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물은 "2-(4-(2-((2-hydroxyethyl)(naphthalen-2-ylmethyl)amino)ethyl)benzyl)isoindolin-1-one(2-(4-(2-((2-히드록시에틸)(나프탈렌-2-일메틸)아미노)에틸)벤질)이소인돌린-1-온)", "AON-MG23-05", 또는 "Target A"로 지칭될 수 있다.
- [179] 상기 화학식 4로 표시되는 화합물은 "2-(4-(2-(ethyl(naphthalen-2-ylmethyl)amino)-1-hydroxyethyl)benzyl)isoindolin-1-one(2-(4-(2-(에틸(나프탈렌-2-일메틸)아미노)-1-하이드록시에틸)벤질)이소인돌린-1-온)", "AON-MG23-06", 또는 "Target B"로 지칭될 수 있다.
- [180] 상기 화학식 5로 표시되는 화합물은 "2-(4-(2-(bis(naphthalen-2-ylmethyl)phosphoryl)ethyl)benzyl)isoindolin-1-one(2-(4-(2-(비스(나프탈렌-2-일메틸)포스포릴)에틸)벤질)이소인돌린-1-온)", "AON-MG23-07", 또는 "Target C"로 지칭될 수 있다.
- [181] 상기 화학식 6으로 표시되는 화합물은 "1-(naphthalen-2-ylmethyl)-1-(4-((1-oxoisoindolin-2-yl)methyl)phenethyl)urea(1-(나프탈렌-2-일메틸)-1-(4-((1-옥소이소인돌린-2-일)메틸)페네틸)우레아)", "AON-MG23-08", 또는 "Target D"로 지칭될 수 있다.
- [182] 이하에서 별도의 설명이 없는 한, 용어 "본 발명의 화합물" 또는 "화학식 1 내지 28로 표시되는 화합물" 등은, 상기 화학식 1 내지 28로 표시되는 화합물 그 자체, 이의 염, 및 이의 이성질체 등을 모두 포함하는 개념으로 사용된다.
- [183] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용 가능한 염"이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염 등을 모두 포함한다.
- [184] 본 명세서에서 사용된 용어, "약학적으로 허용 가능한"이라는 용어는 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 기타 문제점이나 합병증 없이 이득/위험 비가 합리적이어서 대상체(예를 들어, 인간)의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하며, 건전한 의학적 판단의 범위 이내인 화합물 또는 조성물을 의미한다.
- [185] 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 요오드화수소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, (+)-L-타르타르산, 디 L-타르타르산, 아세트산, 트리클로로아세트산 또는 트리플루오로아세트산, 2,2-다이클로로아세트산, 아실화된 아미노산, 아디프산, 알긴산, 아스코르브산, L-아스파르트산, 4-아세트아미도벤조산, (+)-캄포산, 캄포설폰산, (+)-(1S)-캄포설폰산, 카프린산, 카프로산, 카프릴산, 신남산, 사이클람산, 도데실설퍼릭산, 에탄-1,2-다이설폰산, 에탄설폰산, 2-히드록시에탄설폰산, 갈락타르산, 겐티진산, 글루코헵탄산, D-글루콘산, D-글루쿠론산, L-글루탐산, a-옥소-글루타르산, 히푸르산, (+)-L-락트산, (+)-DL-락트산, 락토비온산, (-)-L-말

산, (+)-DL-만델산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 글루콘산, 나프탈렌-2-설폰산, 나프탈렌-1,5-다이설폰산, 벤젠설폰산, 1-히드록시-2-나프토산, 니코틴산, 올레산, 오로트산, 옥살산, 디-옥살산, 팔미트산, 팜산, L-파이로글루탐산, 살리실산, 4-아미노-살리실산, 세바식산, 스테아르산, 탄닌산, 티오시안산, 캄실산, 및 운데실산 등을 들 수 있다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

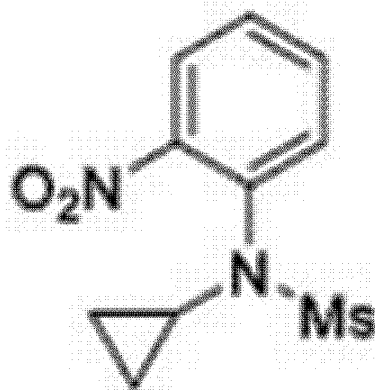
- [186] 본 발명의 화합물의 범위에는 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 이성질체, 수화물 및 용매화물이 모두 포함될 수 있다.
- [187] 본 발명에 있어서, 용어 "이성질체 (Isomer)"는 분자식은 같지만 분자 내에 있는 구성 원자의 연결 방식이나 공간 배열이 상이한 화합물을 말한다. 이성질체는 예를 들면, 구조 이성질체 (Structural Isomers), 및 입체이성질체 (Stereoisomer)를 포함한다. 상기 입체이성질체는 부분입체 이성질체 (Diastereomer) 또는 거울상 이성질체 (Enantiomer)일 수 있다. 거울상 이성질체는 왼손과 오른손의 관계처럼 그 거울상과 겹쳐지지 않는 이성질체를 말하고, 광학 이성질체 (Optical Isomer)라고도 한다. 거울상 이성질체는 키랄 중심 탄소에 4개 이상의 치환기가 서로 다른 경우 R (Rectus: 시계방향) 및 S (Sinister: 반시계 방향)로 구분한다. 부분입체이성질체는 거울상 관계가 아닌 입체 이성질체를 말하고, 원자의 공간 배열이 달라 생기 시스 (cis)-트랜스 (trans) 이성질체로 나뉠 수 있다.
- [188]
- [189] 또한, 본 발명은 (S1A) 하기 화학식 7로 표시되는 화합물과 메탄설폰닐클로라이드(MsCl) 및 사이클로프로필아민을 염기의 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 2); 또는
- [190] (S1B) 하기 화학식 9로 표시되는 화합물과 하기 화학식 10 또는 화학식 11로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시키는 단계(반응식 7 또는 13)를 포함하는, 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:
- [191] [화학식 7]

[192]



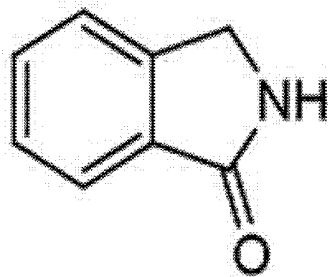
[193] [화·학·식 8]

[194]



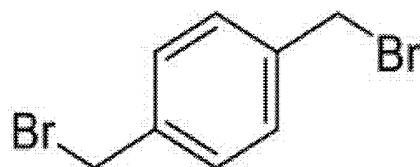
[195] [화·학·식 9]

[196]



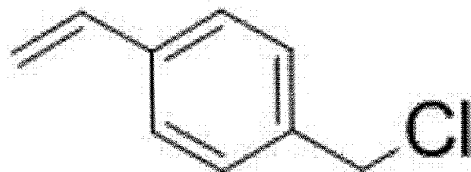
[197] [화·학·식 10]

[198]



[199] [화·학·식 11]

[200]



[201] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 (S1A) 단계 또는 (S1B) 단계에서 염기는 Cs_2CO_3 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[202] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 (S1A) 단계는 하기의 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

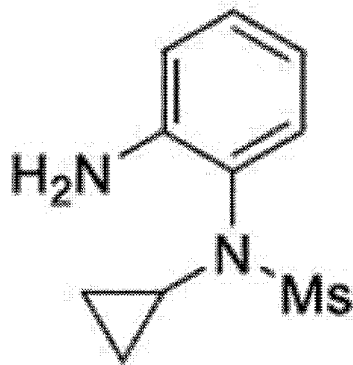
[203] (S1A-1) 상기 화학식 8로 표시되는 화합물(의 니트로기)을 염화암모늄의 존재 하에 아염으로 처리하여 환원시켜 하기 화학식 12로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 3);

[204] (S1A-2) 상기 화학식 12로 표시되는 화합물과 2, 4, 5-트리클로로피리미딘을 염기의 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 13으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 4); 및

[205] (S1A-3) 상기 화학식 13으로 표시되는 화합물과 하기 화학식 14 또는 화학식 15으로 표시되는 화합물을 산의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 5 또는 6).

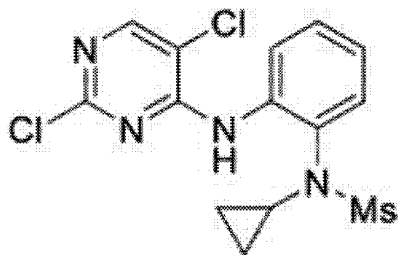
[206] [화학식 12]

[207]



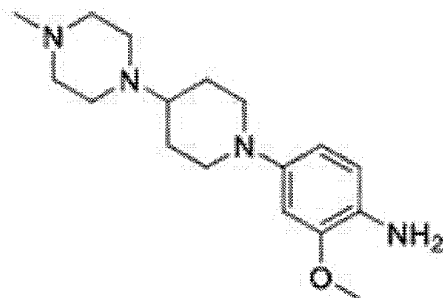
[208] [화학식 13]

[209]



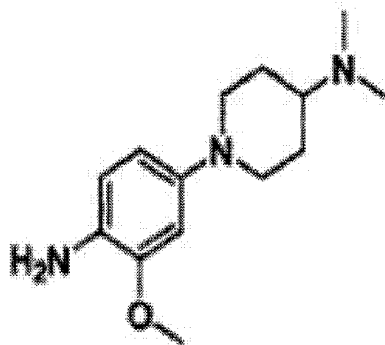
[210] [화학식 14]

[211]



[212] [화학식 15]

[213]



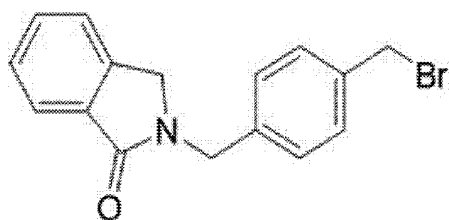
[214] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 (S1A-3) 단계에서 상기 화학식 13으로 표시되는 화합물과 상기 화학식 14로 표시되는 화합물을 산의 존재 하에 반응시키는 경우, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 제조되고(반응식 5),

[215] 상기 화학식 13으로 표시되는 화합물과 상기 화학식 15로 표시되는 화합물을 산의 존재 하에 반응시키는 경우, 상기 화학식 2로 표시되는 화합물이 제조될 수 있으며(반응식 6), 구체적으로, 상기 (S1A-3) 단계는 상기 화학식 13으로 표시되는 화합물이 상기 화학식 14 또는 화학식 15로 표시되는 화합물의 아미노기와 반응하는 것일 수 있다.

- [216] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 (S1A-2) 단계에서 염기는 DIPEA(N,N-diisopropylethylamine)이고, 상기 (S1A-3) 단계에서 산은 TFA(trifluoroacetic acid)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [217] 본 발명에 있어서, 상기 (S1B) 단계에서 상기 화학식 9로 표시되는 화합물과 상기 화학식 10으로 표시되는 화합물이 염기의 존재 하에 반응한 경우, 하기 화학식 16으로 표시되는 화합물이 제조될 수 있으나(반응식 7 또는 19), 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 염기는 Cs_2CO_3 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

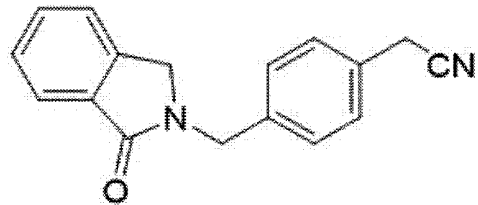
[218] [화학식 16]

[219]



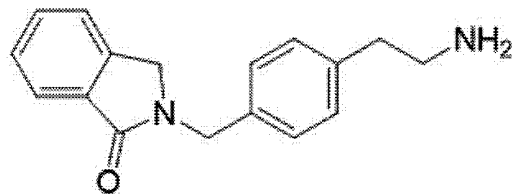
- [220] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 (S1B) 단계는 하기의 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [221] (S1B-1) 상기 화학식 16으로 표시되는 화합물과 트리메칠시아나이드 (Trimethylsilyl cyanide)를 염기의 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 17로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 8 또는 20);
- [222] (S1B-2) 상기 화학식 17로 표시되는 화합물을 금속 촉매의 존재 하에 수소화 반응시켜 하기 화학식 18로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 9 또는 21);
- [223] (S1B-3) 상기 화학식 18로 표시되는 화합물과 하기 화학식 19로 표시되는 화합물을 환원제 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 20으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 10 또는 22); 및
- [224] (S1B-4) 상기 화학식 20으로 표시되는 화합물과 NCO를 반응시켜 상기 화학식 6으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 23); 또는 상기 화학식 20으로 표시되는 화합물과 하기 화학식 21으로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 22로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 11). 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 (S1B-1) 단계에서 염기는 Cs_2CO_3 이고, 상기 (S1B-4) 단계에서 염기는 K_2CO_3 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [225] [화학식 17]

[226]



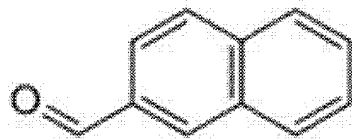
[227] [화·학·식 18]

[228]



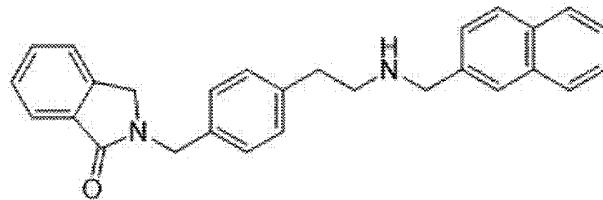
[229] [화·학·식 19]

[230]



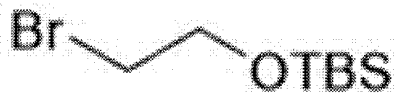
[231] [화·학·식 20]

[232]



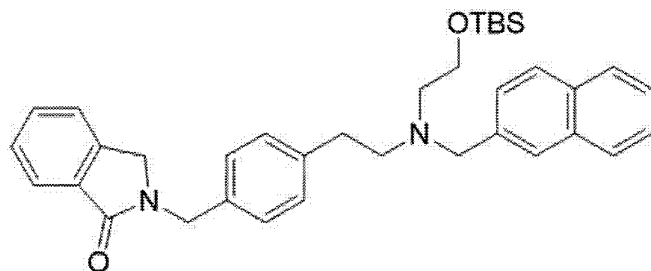
[233] [화·학·식 21]

[234]



[235] [화·학·식 22]

[236]



[237] 본 발명에 있어서, 상기 (S1B-4) 단계는 상기 화학식 22로 표시되는 화합물을 산의 존재 하에 가수분해 반응시켜 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나(반응식 12), 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 (S1B-4) 단계에서 산은 염화수소(HCl)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

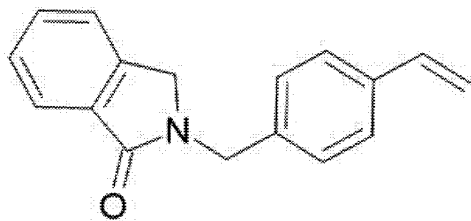
[238] 본 발명에 있어서, 상기 금속 촉매는 백금족, 로듐, 팔라듐 카본, 및 라니크켈(Raney-Ni)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 금속 촉매는 라니크켈(Raney-Ni)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[239] 본 발명에 있어서, 상기 환원제는 소듐시아노보로하이드라이드(NaBH_3CN), 소듐트리아세톡시보로하이드라이드($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$), 및 소듐보로하이드라이드(NaBH_4)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 (S1B-3) 단계에서 환원제는 소듐시아노보로하이드라이드(NaBH_3CN)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[240] 본 발명에 있어서, 상기 (S1B) 단계에서 상기 화학식 9로 표시되는 화합물과 상기 화학식 11로 표시되는 화합물이 염기의 존재 하에 반응한 경우, 하기 화학식 23으로 표시되는 화합물이 제조될 수 있으나(반응식 13), 이에 제한되지 않는다.

[241] [화학식 23]

[242]



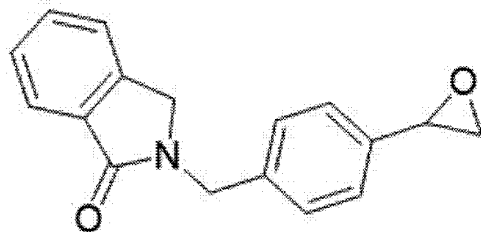
[243] 본 발명에 있어서, 상기 (S1B) 단계는 하기의 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[244] (S1Ba-1) 상기 화학식 23으로 표시되는 화합물과 과산화물을 반응시켜 하기 화학식 24로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 14), 및

- [245] (S1Ba-2) 상기 화학식 24로 표시되는 화합물과 하기 화학식 25로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 16); 또는
- [246] (S1Bb-1) 상기 화학식 23으로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 인산화(phosphorylation)시켜 하기 화학식 26으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계로서, 구체적으로, β -알킬스티렌 인산화 반응을 통해 하기 화학식 26으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 17), 및
- [247] (S1Bb-2) 상기 화학식 26으로 표시되는 화합물과 하기 화학식 27로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 5로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 18).
- [248] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 (S1Ba-2) 단계에서 염기는 DIEA (N,N-Diisopropylethylamine)이고, 상기 (S1Bb-1) 단계에서 염기는 KOH이고, 상기 (S1Bb-2) 단계에서 염기는 NaH일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

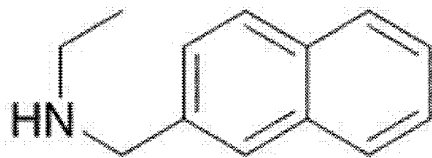
[249] [화학식 24]

[250]



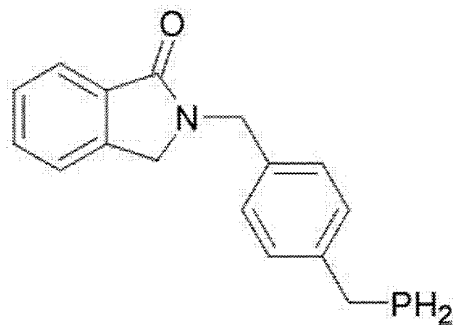
[251] [화학식 25]

[252]



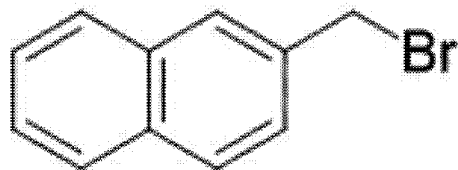
[253] [화학식 26]

[254]



[255] [화학식 27]

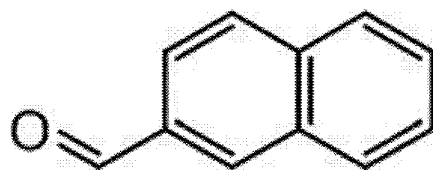
[256]



[257] 본 발명에 있어서, 상기 화학식 25로 표시되는 화합물은 하기 화학식 28로 표시되는 화합물과 에틸아민을 환원제 존재 하에 반응시켜 제조할 수 있으며(반응식 15), 본 발명의 일 실시예 따르면, 상기 환원제는 소듐트리아세톡시보로하이드라이드($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[258] [화학식 28]

[259]



[260] 본 발명에 있어서, 상기 과산화물은 m-CPBA(meta-chloroperoxybenzoic acid), 과산화수소(H_2O_2), 디메틸디옥시란(DMDO; dimethyldioxirane), 및 옥손(oxone)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 과산화물은 m-CPBA(meta-chloroperoxybenzoic acid)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[261] 본 발명에 있어서, 상기 산은 피발산(PivOH), 아세트산(AcOH), 트리플루오로메탄설폰산(TfOH), 파라톨루엔설폰산(TsOH), 벤조산(Benzoic acid), 브롬화아연(ZnBr_2), 염화수소(HCl), 트리플루오로아세트산(TFA; trifluoroacetic acid)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[262] 본 발명에 있어서, 상기 염기는 탄산칼륨(K_2CO_3), 탄산나트륨(Na_2CO_3), 탄산수소나트륨(NaHCO_3), 탄산수소칼륨(KHCO_3), 브롬화제이구리(CuBr_2), 탄산세슘(Cs_2CO_3), 수산화리튬(LiOH), 수소화나트륨(NaH), 수소화칼륨(KH), 수산화칼륨(KOH), 트리에틸아민(TEA; triethylamine), N,N-다이이소프로필에틸아민(DIPEA; N,N-diisopropylethylamine), 피리딘, 및 피페리딘으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[263] 본 발명에 있어서, 상기 제조방법은 유기용매, 물, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 용매에서 이루어질 수 있으며, 상기 유기용매는 디클로로메탄(DCM), 디클로로에탄(DCE), 1,4-다이옥산, 테트라하이드로퓨란(THF), 톨루엔, 헥산, 벤젠, 자일렌, 클로로벤젠, 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH), t-아밀알콜(t-AmOH), 트리플루오로에탄올(TFE), 헥사플루오로이소프로판올(HFIP), 아세토니트릴(ACN), 디메틸포름아마이드(DMF), 나이트로메탄, 트리메톡시메탄($\text{CH}(\text{OMe})_3$), 아세트산(아세트산 무수물, 아세트산, 또는 아세트산

무수물과 아세트산의 혼합물), 및 클로로포름으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [264] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:
- [265] (a) 상기 화학식 7로 표시되는 화합물과 메탄설폰닐클로라이드(MsCl) 및 사이클로프로필아민을 염기의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 8로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 2);
- [266] (b) 상기 화학식 8로 표시되는 화합물(의 니트로기)을 염화암모늄의 존재 하에 아연으로 처리하여 환원시켜 상기 화학식 12로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 3);
- [267] (c) 상기 화학식 12로 표시되는 화합물과 2, 4, 5-트리클로로피리미딘을 염기의 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 13으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 4); 및
- [268] (d) 상기 화학식 13으로 표시되는 화합물과 하기 화학식 14로 표시되는 화합물을 산의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 5).
- [269] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 화학식 2로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:
- [270] (a) 상기 화학식 7로 표시되는 화합물과 메탄설폰닐클로라이드(MsCl) 및 사이클로프로필아민을 염기의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 8로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 2);
- [271] (b) 상기 화학식 8로 표시되는 화합물(의 니트로기)을 염화암모늄의 존재 하에 아연으로 처리하여 환원시켜 상기 화학식 12로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 3);
- [272] (c) 상기 화학식 12로 표시되는 화합물과 2, 4, 5-트리클로로피리미딘을 염기의 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 13으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 4); 및
- [273] (d) 상기 화학식 13으로 표시되는 화합물과 하기 화학식 15로 표시되는 화합물을 산의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 6).
- [274] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 화학식 3으로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:
- [275] (a) 상기 화학식 9로 표시되는 화합물과 상기 화학식 10으로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시켜 화학식 16으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 7);
- [276] (b) 상기 화학식 16으로 표시되는 화합물과 트리메틸시아나이드($\text{Trimethylsilyl cyanide}$)를 염기의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 17로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 8);

- [277] (c) 상기 화학식 17로 표시되는 화합물을 금속 촉매의 존재 하에 수소화 반응시켜 상기 화학식 18로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 9);
- [278] (d) 상기 화학식 18로 표시되는 화합물과 상기 화학식 19로 표시되는 화합물을 환원제 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 20으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 10);
- [279] (d) 상기 화학식 20으로 표시되는 화합물과 상기 화학식 21으로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 22로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 11); 및
- [280] (e) 상기 화학식 22로 표시되는 화합물을 산의 존재 하에 가수분해 반응시켜 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 12).
- [281] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 화학식 4로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:
- [282] (a) 상기 화학식 9로 표시되는 화합물과 상기 화학식 11로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 23으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 13);
- [283] (b) 상기 화학식 23으로 표시되는 화합물과 과산화물을 반응시켜 상기 화학식 24로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 14);
- [284] (c) 상기 화학식 24로 표시되는 화합물과 상기 화학식 25로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 16).
- [285] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 화학식 5로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:
- [286] (a) 상기 화학식 9로 표시되는 화합물과 상기 화학식 11로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 23으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 13);
- [287] (b) 상기 화학식 23으로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 인산화(phosphorylation)시켜 상기 화학식 26으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계로서, 구체적으로, β -알킬스티렌 인산화 반응을 통해 상기 화학식 26으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 17); 및
- [288] (c) 상기 화학식 26으로 표시되는 화합물과 상기 화학식 27로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 5로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 18).
- [289] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 화학식 6으로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:
- [290] (a) 상기 화학식 9로 표시되는 화합물과 상기 화학식 10으로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시켜 화학식 16으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 19);

- [291] (b) 상기 화학식 16으로 표시되는 화합물과 트리메틸실시아나이드(Trimethylsilyl cyanide)를 염기의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 17로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 20);
- [292] (c) 상기 화학식 17로 표시되는 화합물을 금속 촉매의 존재 하에 수소화 반응시켜 상기 화학식 18로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 21);
- [293] (d) 상기 화학식 18로 표시되는 화합물과 상기 화학식 19로 표시되는 화합물을 환원제 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 20으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 22);
- [294] (d) 상기 화학식 20으로 표시되는 화합물과 NCO를 반응시켜 상기 화학식 6으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(반응식 23).
- [295]
- [296] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 뇌종양의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [297] 본 발명에 따른 화합물은 칼슘-의존성 클로라이드 채널인 Anoctamin 1 (ANO1)의 저해제로서, 뇌종양의 예방, 개선, 및/또는 치료 용도로 사용될 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 화합물은 EGFR 및 ANO1의 발현 또는 활성을 동시에 억제함으로써 우수한 항암효과를 발휘하는 것을 특징으로 한다. 상기 뇌종양의 예방 및/또는 치료 효과는 뇌종양세포의 성장을 억제하는 효과뿐만 아니라, 이동(migration), 침습(invasion), 전이(metastasis) 등으로 인한 뇌종양의 진행 내지 악화 상태를 억제하는 효과를 포함한다.
- [298] 본 발명에 있어서, "EGFR (epidermal growth factor receptor)"은 단백질 키나아제 슈퍼패밀리 (protein kinase superfamily)의 구성원인 막관통 당단백질로, 표피성장인자패밀리 (epidermal growth factor family) 단백질들의 수용체이다. EGFR은 세포 성장의 주요 조절인자인데, 리간드인 표피성장인자 (epidermal growth factor, EGF)가 EGFR에 결합하면 상기 수용체가 이합체화 및 티로신 자가인산화를 일으키며 세포 증식을 유도한다. EGFR의 과발현 (증폭) 또는 과활성은 항문암, 두경부암, 교모세포종 등 다양한 암에서 빈번하게 관찰되는데, EGFR과 관련된 체세포 돌연변이는 EGFR의 지속적인 활성화를 일으켜 통제되지 않은 세포분열을 유도한다. 특히, EGFR 유전자 재배열 및 EGFR 유전자 증폭은 다양한 암에서 관찰되는 양상이다. 이중 가장 흔한 세포외 도메인 돌연변이는 EGFRvIII이다. EGFRvIII 돌연변이는 EGFR 유전자의 2번 내지 7번 엑손에 해당하는 801여개의 염기가 결실된 것을 특징으로 하며, 이로부터 발현된 EGFR 단백질은 세포외 도메인에 해당하는 267개 아미노산이 결실되어 있다. 리간드가 결합해야만 활성화되는 정상 EGFR과 달리, 상기 돌연변이 EGFR은 지속적으로 활성화 상태를 유지한다 (PCT gain of function mutation). 상기 EGFRvIII는 특히 교모세포종에서 흔히 관찰된다.

- [299] 본 발명에 있어서, "Anoctamin 1 (ANO1, 아노원)"은 "transmembrane protein 16A (TMEM16A)"라고 지칭되기도 하는, 칼슘-활성화 염화 이온통로 (Cl⁻ 채널)이다. ANO1은 상피세포, 평활근 세포, 혈관 내피세포, 뉴런 등을 포함한 다양한 정상세포에서 발현되며, 체액 분비, 근육 수축, 통각 등을 조절하여 다양한 생리학적 역할을 수행한다. ANO1은 그러나 교모세포암종 등을 포함한 뇌종양에서 암의 침습성 및 나쁜 예후와 연관이 있는 것으로도 알려져있다. 실제로 ANO1의 과발현은 암세포에서 증식 및 이동을 자극하는 신호전달 경로를 촉진하며, ANO1의 억제제는 암세포의 이동 및 성장을 억제하는 것으로 보고된 바 있다. ANO1의 과발현은 EGFR 및 STAT3의 과발현과도 연관이 있는 것으로 보이며, 또한, ANO1의 억제는 EGFR/HER2 표적 요법에 대한 두경부 편평상피세포암의 반응을 개선할 수 있는 것으로 알려졌다. 따라서 ANO1은 암 치료를 위한 타겟으로 주목 받고 있으나, 실제로 우수한 항암효과를 발휘하는 ANO1 저해제는 아직까지 발굴되지 않고 있다. 본 발명에 따른 화합물은 뇌종양세포에서 ANO1의 발현을 효과적으로 억제하며, 종래 알려진 ANO1 저해제보다 더욱 강력하게 뇌종양세포의 이동, 증식, 전이 등을 억제하는 것으로 확인된 바, 뇌종양의 예방, 치료, 및 전이억제를 위한 용도로 사용될 수 있다. 나아가, ANO1 억제에 따른 EGFR/HER2 표적치료의 효과 개선에 관한 이전의 연구 내용들은 본 발명에 따른 화합물이 ANO1 저해효과를 통해 EGFR/HER 표적치료에 대한 뇌종양세포의 반응성을 높이고, 내성의 발달을 억제할 수 있음을 시사한다.
- [300] 특히, 본 발명에 따른 화합물은 뇌종양세포에서 ANO1과 함께 EGFR의 발현을 동시에 억제하는 바, ANO1 및 EGFR의 동시 억제를 통해 더욱 강력한 항암효과를 발휘할 수 있다. ANO1과 EGFR의 연관성은 잘 알려져 있는데, ANO1의 상향조절은 EGFR의 신호전달 경로와 관련이 있으며, 표피성장인자 (EGF) 자극 후 인산화된 프로테오솜의 리모델링에 중대한 영향을 미치는 것으로 보고된 바 있다. 또한, 암세포에서 ANO1은 EGFR과 기능적 복합체를 형성하여 세포증식을 공동으로 조절할 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물을 이용하여 EGFR 및 ANO1을 동시에 억제하는 경우 뇌종양의 성장을 더욱 효과적으로 저해할 수 있다.
- [301] 한편, ANO1은 암세포에서 과발현되어 암세포의 이동 및 종양 전이에 기여하는 것으로 알려져 있으며, EGFR에 의한 신호전달 역시 종양 전이에 도움이 되는 종양미세환경을 생성한다고 알려져 있다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 ANO1 및 EGFR의 동시 억제를 통해 뇌종양의 전이를 효과적으로 억제할 수 있다. 상기 "전이(metastasis)"는 악성 종양이 발병한 장기에서 떨어진 다른 조직으로 전파한 상태를 말한다. 따라서, 본 발명에 따른 조성물은 뇌종양의 전이를 억제하여 뇌종양이 전신에 퍼지는 것을 예방 및 치료할 수 있다.
- [302] 본 발명에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 다양한 암의 예방 또는 치료 용도로 사용될 수 있다.
- [303] 본 발명에 있어서, "종양 (tumor)"은 "암 (cancer)"와 동일한 의미로 사용되며, 전형적으로 통제되지 않는 세포 성장, 이동, 및 증식을 특징으로 하는 상태를 지칭

한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 암은 뇌종양이다. 본 발명에 따른 암은 원발성 및 재발성 암을 포함하며, 양성 및 악성 종양을 모두 포함한다. 본 발명에 있어서, 상기 뇌종양은 두개골 내에 생기는 모든 종양으로서, 구체적인 종류에 한정되지 않고, 뇌 및 뇌 주변 구조물에서 발생하는 모든 종양을 포함한다. 본 발명에 있어서, 상기 뇌종양은 원발성 뇌종양, 재발성 뇌종양, 전이성 뇌종양을 모두 포함한다. 또한, 상기 뇌종양은 정상세포종, 악성정상세포종, 교모세포종, 뇌수막종, 뇌하수체 선종, 신경초종, 청신경초종, 및 두개인두종 등을 모두 포함하며, 특정 종류로 한정되는 것은 아니다.

- [304] 특히, 본 발명에 따른 암은 ANO1 및 EGFR을 동시에 저해함으로써 개선 내지 치료가 기대되는 뇌종양일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 암은 EGFR (Epidermal growth factor receptor) 및 ANO1 (Anoctamin 1)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 돌연변이와 연관된 뇌종양일 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 암은 EGFR 및/또는 ANO1의 돌연변이를 갖는 뇌종양일 수 있다. 상기 EGFR 및/또는 ANO1의 돌연변이란, EGFR 및/또는 ANO1의 유전자의 증폭, 단백질의 과발현, 단백질의 과활성, 및 단백질의 지속적 활성화 등을 포함한다. 즉, 본 발명에 따른 암은 정상세포 대비 EGFR 및/또는 ANO1의 발현 또는 활성이 더 높은 뇌종양일 수 있다. 혹은, 본 발명에 따른 암은 EGFR 및/또는 ANO1의 활성화 상태가 지속되는 뇌종양일 수 있다. 본 발명에 따른 화합물은 ANO1 및 EGFR의 발현 및 활성을 동시에 억제할 수 있으므로, EGFR 및/또는 ANO1의 돌연변이를 수반하는 뇌종양에 대해 특히 우수한 항암효과를 발휘할 수 있다.
- [305] 또는, 본 발명에 따른 암은 EGFRvIII (The epidermal growth factor receptor variant III) 돌연변이를 수반하는 뇌종양일 수 있다. 상기 EGFRvIII 돌연변이는 EGFR의 6 내지 273번 아미노산이 결실 (혹은, 2번 내지 7번 엑손의 결실)된 형태의 돌연변이로서, 리간드 (EGF)의 결합 없이도 활성화 상태가 지속되는 것을 특징으로 한다. EGFRvIII는 암세포에서만 특이적으로 발현되며, 교모세포종의 약 30%에서 발견된다.
- [306] 본 발명에 따른 화합물은 하기로 이루어진 군에서 하나 이상의 효과를 발휘할 수 있다:
- [307] (a) 뇌종양세포의 증식, 또는 성장을 억제함;
- [308] (b) 뇌종양세포의 이동을 억제함;
- [309] (c) 뇌종양의 전이를 억제함;
- [310] (d) 뇌종양의 항암제에 대한 내성을 억제함; 및
- [311] (e) 항암제에 대한 뇌종양세포의 반응성을 증진시킴.
- [312] 본 발명자들은 구체적인 실시예를 통해 본 발명에 따른 화합물이 처리된 뇌종양세포는 증식, 이동, 및 전이 (침투성)가 억제되는 것을 확인하였으며, 상기 화합물의 항암효과는 종래 알려진 ANO1 저해제 (CaCCinh-A01)에 비해 강력한 것으로 나타났다.

- [313] 나아가, 본 발명에 따른 화합물은 ANO1 및 EGFR을 동시에 억제할 수 있으므로 (즉, 이중 억제), ANO1 또는 EGFR의 단독 저해제에 비해 더욱 우수한 항암효과를 발휘할 수 있으며, 특히 ANO1 억제를 통해 항암제에 대한 암세포의 내성 발달을 억제하고, 상기 항암제의 항암효과를 증진시킬 수 있다. 예컨대, 본 발명자들은 실험을 통해 본 발명의 화합물의 ANO1 억제 효과가 종래 ANO1 저해제 CaCCinh-A01에 비해 우수할 뿐만 아니라, 항암 효과가 ANO1 저해제 CaCCinh-A01, EGFR 저해제 Osimertinib, 및 Osimertinib과 CaCCinh-A01의 조합에 비해 우수한 것을 확인하였다.
- [314] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 (d) 및 (e)에 기재된 항암제는 티로신 키나아제 (Tyrosine kinase)에 대한 표적항암제일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명에서 "표적항암제"는 암 세포나 암 조직에서 특이적으로 변화되는 단백질이나 유전자를 표적으로 하여, 암의 성장 및 발생에 관여하는 분자 활동을 방해함으로써 항암효과를 나타내는 제제를 의미한다. 바람직하게는, 상기 티로신 키나아제는 EGFR (epidermal growth factor receptor), ALK(anaplastic lymphoma kinase), ROS1 (ROS Proto-Oncogene 1), BRAF (B-Raf Proto-Oncogene), HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), RET (Ret Proto-Oncogene), NTRK1 (Neurotrophic Receptor Tyrosine Kinase 1), MET (Mesenchymal-Epithelial Transition factor), 및 NRG1 (Neuregulin 1)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 더욱 바람직하게는, 상기 티로신 키나아제는 EGFR일 수 있다. 상기 EGFR은 정상 EGFR 및 돌연변이 EGFR (예컨대, EGFRvIII)을 포함한다.
- [315] 상기 (e)에서 항암제에 대한 암세포의 반응성이 증진되는 것은, 항암제에 의한 암세포의 성장 억제 및 이동 억제 등이 더욱 증진되는 것을 의미한다.
- [316] 본 발명에 있어서, "항암효과를 증진"시킨다는 것은, 결과적으로 항암제의 기능을 강화할 수 있는 모든 효과를 이르는 것으로서, 종양의 성장 억제, 종양의 전이 억제, 종양의 재발 억제 등과 같은 항암제의 항암효과를 증진시키는 것은 물론, 항암제에 대한 암세포의 저항 내지 내성 형성을 억제함으로써 결과적으로 항암효과를 증진시키는 것까지 모두 포함하는 개념이다.
- [317] 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 뇌종양 항암제의 항암효과를 증진시키기 위한 목적으로, 공지된 항암제 (바람직하게는, 티로신 키나아제에 대한 표적 항암제)의 병용투여용 화합물로서 사용될 수 있다.
- [318] 예컨대, 본 발명은 (i) 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 (ii) EGFR에 대한 표적항암제를 유효성분으로 포함하는, 암 (바람직하게는, 뇌종양)의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [319]
- [320] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효

성분으로 포함하는, 항암제 (바람직하게는, 뇌종양 항암제)의 항암효과 증진용 약학적 조성물을 제공한다.

- [321] 본 발명에 따른 상기 조성물은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 상기 EGFR에 대한 표적항암제가 혼합된 혼합제 형태로서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 상기 EGFR에 대한 표적항암제의 동시 (simultaneous) 투여를 위한 형태일 수 있다.
- [322] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 상기 EGFR에 대한 표적항암제가 각각 제제화되어 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여되는 형태일 수 있다. 이 경우, 상기 조성물은 유효성분으로 상기 화합물 또는 이의 염의 약학적 유효량을 포함하는 제1 약학적 조성물; 및 유효성분으로 상기 EGFR에 대한 표적항암제의 약학적 유효량을 포함하는 제2 약학적 조성물을 포함하는, 동시 또는 순차적 투여를 위한 병용투여용 약학적 조성물일 수 있다. 이 때, 순차적 투여의 경우 투여 순서에 제한되는 것은 아니며, 환자의 상태 등에 따라 투여 요법은 적절하게 조절될 수 있다.
- [323] 즉, 상기 약학적 조성물이 순차적 투여를 위한 병용투여용 약학적 조성물인 경우, 상기 조성물은 상기 화합물 또는 이의 염 ("제1 성분")이 먼저 투여된 후 상기 EGFR에 대한 표적항암제 ("제2 성분")이 투여되는 것일 수 있으며, 그 반대 순서도 가능하다.
- [324] 또한, 본 발명에 따른 화합물이 항암제와 병용되는 경우 상기 화합물은 항암제와 동시에(simultaneously), 별도로(separately), 또는 순차적(sequentially)으로 투여될 수 있으며, 항암제와 순차적으로 투여되는 경우에도 투여 순서에 제한되는 것은 아니나, 암의 종류 및 항암제의 종류, 환자의 상태 등에 따라 투여 요법은 적절하게 조절될 수 있다.
- [325] 본 발명의 조성물 내의 상기 화합물의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 또는 0.001 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.
- [326] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [327] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틱크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될

수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.

- [328] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [329] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [330] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수 전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제라놀린, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젯산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무 (Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 붕해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 4000, PEG 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골 (Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리코유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

- [331] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로수, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에칠렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.
- [332] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.
- [333] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.
- [334] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메틸셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.
- [335] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9% 염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이트 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소듐비설파이트 0.1%, 소듐포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소듐비설파이트와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.
- [336] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텟솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스팬, 임하우스젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 테고-G(Buetyrum Tego-G), 세베스파마 16(Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈

(Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M, Fs), 테제스티 트리글리세라이드 기제 (TG-95, MA, 57)와 같은 기제가 사용될 수 있다.

- [337] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [338] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [339] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [340] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [341] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.
- [342] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다. 구체적으로, 본 발명에 따른 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1 kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투

여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 질환의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

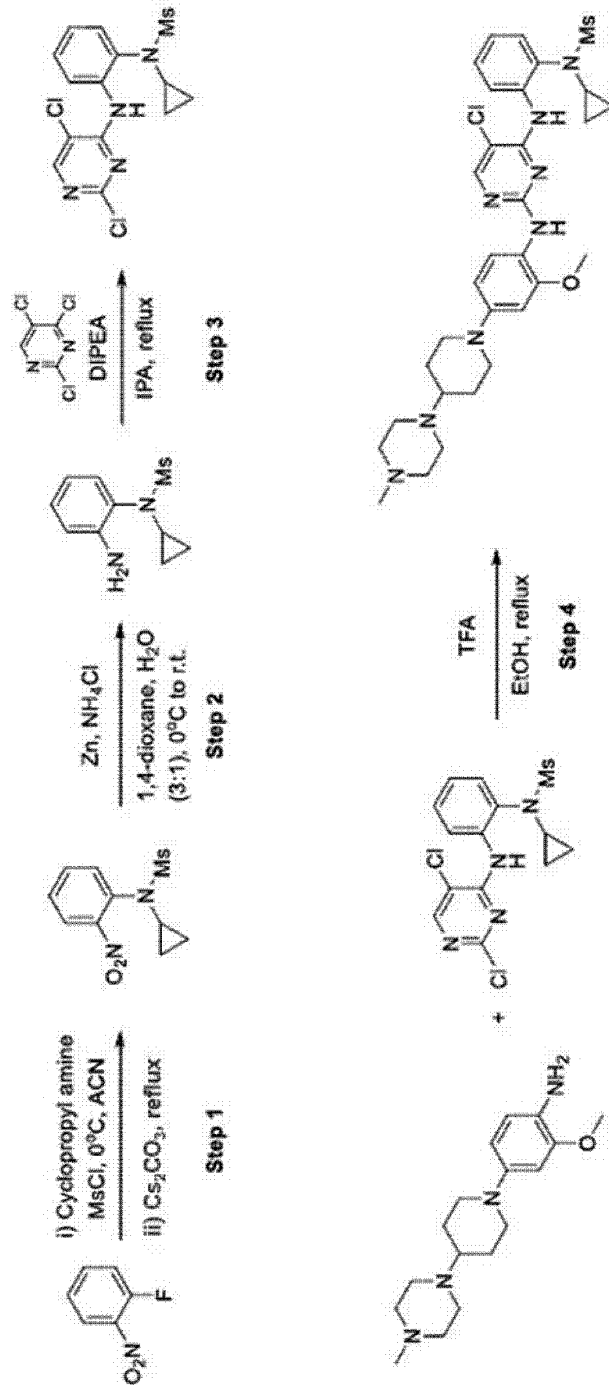
- [343] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐 (mouse), 쥐 (rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [344] 본 발명에서 "투여"란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [345] 본 발명에서 "예방"이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, "개선"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [346] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 약학적 조성물을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 키트를 제공한다.
- [347] 본 발명에 따른 키트는 상기 화합물 및 표적항암제 등 외에도 암의 예방 또는 치료에 통상적으로 필요한 다른 구성성분, 조성물, 용액, 장치 등을 제한 없이 포함할 수 있으며, 특히 본 발명에 따른 화합물의 적합한 사용 및 보관 등을 지시하는 설명서 등을 포함할 수 있다.
- [348]
- [349] 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[350]

발명의 실시를 위한 형태

- [351] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [352]
- [353] [실시예]
- [354] 실시예 A. 신규한 화합물 AON-MG23-01 및 AON-MG23-02
- [355] 1. 본 발명에 따른 화합물의 제조
- [356] 1-1. N-(2-((5-chloro-2-((2-methoxy-4-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)amino)phenyl)-N-cyclopropylmethanesulfonamide(AON-MG23-01)의 제조
- [357] [반응식 1]

[358]

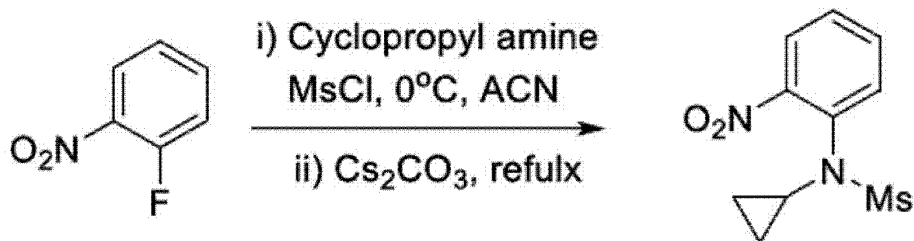


[359] 상기 반응식 1을 통해 AON-MG23-01 화합물을 제조하였다. 구체적인 제조 방법은 다음과 같다:

[360] <Step 1> N-사이클로프로필-N-(2-나이트로페닐)메탄설포나마이드의 합성

[361] [반응식 2]

[362]

**Step 1**

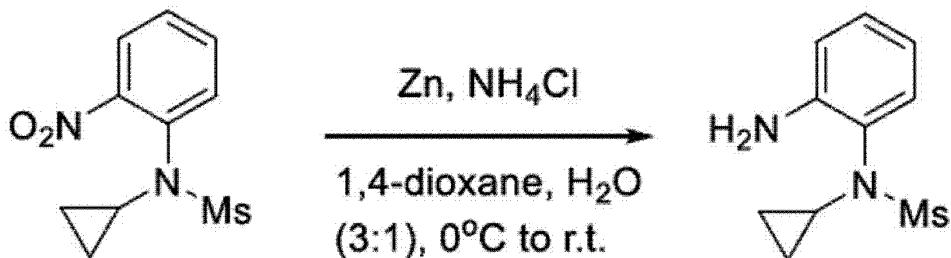
[363] 1-플루오로-2-나이트로벤젠(1-Fluoro-2-nitrobenzene, 1.00eq) 및 사이클로프로필 아민(cyclopropyl amine, 1.00eq)을 아세토니트릴(ACN)에 녹이고 메탄설폰닐클로라이드(MsCl, 1.0eq)를 0°C에서 천천히 첨가한 후, 같은 온도에서 1시간 교반하였다. 그런 다음, 같은 온도에서 세슘카보네이트(Cs₂CO₃, 5.00eq)를 첨가한 후, 환류하여 밤새 교반하였다. 반응 종결 후, 실온으로 온도를 낮추고 에틸아세테이트와 물을 사용하여 추출하였다. 유기층을 무수소듐설페이트를 넣고 교반한 후, 여과기를 사용하여 여과하고 여액을 감압농축하였다. 농축잔사를 컬럼크로마토그래피(헥산:에틸아세테이트=3:1)로 정제하여 연한 노란색 고체의 N-사이클로프로필-N-(2-나이트로페닐)메탄설포아마이드를 합성하였으며, 수율은 36%였다.

[364]

[365] <Step 2> N-(2-아미노페닐)-N-사이클로프로필메탄설포아마이드의 합성

[366] [반응식 3]

[367]

**Step 2**

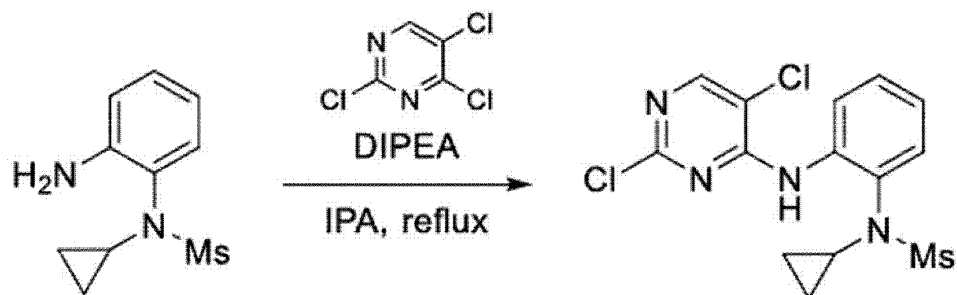
[368] Step 1에서 합성한 N-사이클로프로필-N-(2-나이트로페닐)메탄설포아마이드 (1.00eq)를 1,4-다이옥산(dioxane), 물 (3:1)에 넣고 교반한 다음, 반응기를 0°C로 냉각하고 아연(Zn, 10.0eq), 암모늄클로라이드(NH₄Cl, 10.0eq)를 첨가하였다. 그런 다음, 온도를 서서히 올리면서 4시간 동안 교반하였다. 반응 종결 후, 셀라이트를 사용하여 여과하고, 여액을 에틸아세테이트와 물로 추출하였다. 유기층을 무수소듐설페이트를 넣고 교반한 후, 여과기를 사용하여 여과하고 여액을 감압농축하였다. 농축잔사는 별도의 정제과정 없이 Step 3에서 사용하였다.

[369]

[370] <Step 3> N-사이클로프로필-N-(2-((2,5-다이클로로피리미딘-4-일)아미노)페닐)메탄설포나마이드의 합성

[371] [반응식 4]

[372]



Step 3

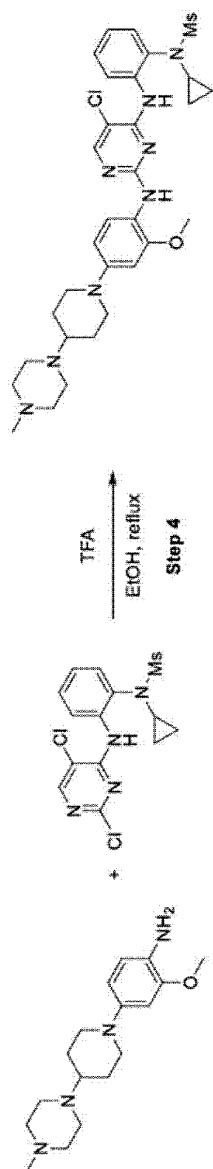
[373] Step 2에서 합성한 N-(2-아미노페닐)-N-사이클로프로필메탄설포나마이드 (1.00eq)를 이소프로필알콜(IPA)에 넣고 2,4,5-트리클로로피리미딘(1.1eq)과 N,N-다이이소프로필에틸아민(DIPEA, 2.5eq)를 실온에서 첨가한 후, 환류하여 밤샘 교반하였다. 반응 종결 후, 감압 증발하고 물과 디클로로메탄을 사용하여 추출하였다. 유기층을 2N 염산을 사용하여 세척하고, 유기층을 무수소듐설페이트를 넣고 교반하였다. 그런 다음, 여과기를 사용하여 여과하고 여액을 감압농축하였다. 농축잔사를 컬럼크로마토그래피(헥산:에틸아세테이트=3:1)로 정제하여 연한 노란색 고체의 N-사이클로프로필-N-(2-((2,5-다이클로로피리미딘-4-일)아미노)페닐)메탄설포나마이드를 합성하였으며, 수율은 58.9%였다.

[374]

[375] <Step 4> N-(2-((5-클로로-2-((2-메톡시-4-(4-(4-메틸피페라진-1-일)피페리딘-1-일)페닐)아미노)피리미딘-4-일)아미노)페닐)-N-사이클로프로필메탄설포나마이드의 합성

[376] [반응식 5]

[377]



[378] Step 3에서 합성한 N-사이클로프로필-N-(2-((2,5-다이클로로피리미딘-4-일)아미노)페닐)메탄설포아마이드(1.00 eq)를 에탄올(EtOH)에 넣고 2-메톡시-4-(4-(4-메틸피페라진-1-일)피페리딘-1-일)아닐린(1.00eq)과 트리플루오로아세트산(TFA, 1.95eq)을 실온에서 첨가한 후 환류하여 밤새 교반하였다. 반응 종결 후, 1N 수산화나트륨 용액으로 중성화하고, 물과 에틸아세테이트로 추출하였다. 유기층을 무수소듐설페이트를 넣고 교반한 후, 여과기를 사용하여 여과하고 여액을 감압농축하였다. 농축잔사를 컬럼크로마토그래피(헥산:에틸아세테이트 =3:1)로 정제하여 노란색 고체의 N-(2-((5-chloro-2-((2-methoxy-4-(4-methylpiperidin-1-yl))piperidin-1-yl)aniline-1-yl)pyrimidin-4-yl)amino)phenyl)-N-methylcyclopropylmethanesulfonamide를 얻었다.

iperazin-1-yl)piperidin-1-yl)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)amino)phenyl)-N-cyclopropylmethanesulfonamide(AON-MG23-01)를 합성하였으며, 수율은 14%였다.

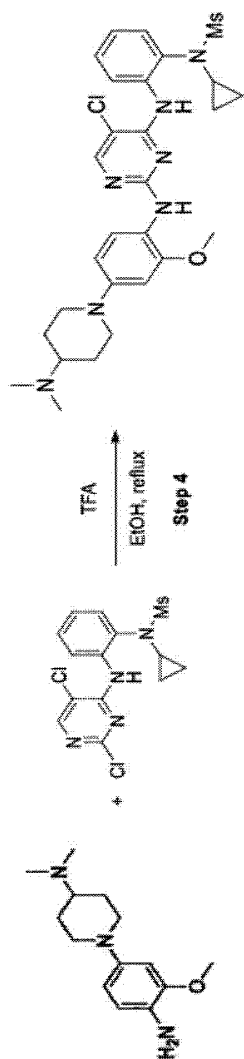
[379] ¹H NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 8.33 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.62 (dd, J = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.23 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.15 (td, J = 7.6, 1.5 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.47 (dd, J = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 3.75 - 3.71 (m, 5H), 3.25 - 3.22 (m, 4H), 2.67 (td, J = 12.2, 2.4 Hz, 2H), 2.55 - 2.44 (m, 4H), 2.38 - 2.27 (m, 4H), 2.15 (s, 3H), 1.85 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 1.52 (qd, J = 12.1, 3.9 Hz, 2H), 1.01 - 0.93 (m, 2H), 0.55 - 0.49 (m, 1H), 0.17 - 0.12 (m, 1H). HRMS: 640.2708, cal: 640.2711

[380]

[381] **1-2. N-(2-((5-chloro-2-((4-(4-(dimethylamino)piperidin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)pyrimidin-4-yl)amino)phenyl)-N-cyclopropylmethanesulfonamide(AON-MG23-02)의 제조**

[382] [반응식 6]

[383]



[384] AON-MG23-01 화합물과 Step 1, 2, 3는 동일하게 진행하였으며, Step 4에서 2-메톡시-4-(4-(4-메틸피페라진-1-일)피페리딘-1-일)아닐린 대신 1-(4-아미노-3-메톡시페닐)-N,N-다이메틸피페리딘-4-아민을 사용하여 합성을 진행하였다.

[385] 구체적으로, Step 3에서 합성한 N-사이클로프로필-N-(2-((2,5-다이클로로피리미딘-4-일)아미노)페닐)메탄설폰아마이드(1.00 eq)를 에탄올(EtOH)에 넣고 1-(4-아미노-3-메톡시페닐)-N,N-다이메틸피페리딘-4-아민(1.00eq)과 트리플루오로아세트산(TFA, 1.95eq)을 실온에서 첨가한 후 환류하여 밤새 교반하였다. 반응 종결 후, 1N 수산화나트륨 용액으로 중성화하고, 물과 에틸아세테이트로 추출하였다. 유기층을 무수소듐설페이트를 넣고 교반한 후, 여과기를 사용하여 여과하고 여액을 감압농축하였다. 농축잔사를 컬럼크로마토그래피 (헥산:에틸아세테이트=3:1) 로 정제하여 노란색 고체의 N-(2-((5-chloro-2-((4-(4-(dimethylamin

o)piperidin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)pyrimidin-4-yl)amino)phenyl)-N-cyclopropylmethanesulfonamide(AON-MG23-02)를 합성하였으며, 수율은 25%였다.

[386] ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 8.33 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.62 (dd, J = 7.8, 1.6 Hz, 1H), 7.35 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.22 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.15 (td, J = 7.6, 1.6 Hz, 1H), 6.63 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.48 (dd, J = 8.7, 2.5 Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.72 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 3.23 (m, 4H), 2.68 (td, J = 12.1, 2.5 Hz, 2H), 2.22 (s, 6H), 1.86 (d, J = 12.4 Hz, 2H), 1.51 (qd, J = 12.0, 3.9 Hz, 2H), 1.04 - 0.92 (m, 2H), 0.55 - 0.49 (m, 1H), 0.17 - 0.14 (m, 1H). HRMS: 585.2294, cal: 585.2289.

[387]

[388] 상기 단계들을 통해 본 발명에 따른 화합물들을 제조하였으며, 이들의 구조식을 하기 표 1 및 도 1에 나타냈다.

[389]

[390] [표1]

구분	명칭	구조
AON-MG23-01	N-(2-((5-chloro-2-((2-methoxy-4-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)amino)phenyl)-N-cyclopropylmethanesulfonamide	
AON-MG23-02	N-(2-((5-chloro-2-((4-(4-(dimethylamino)piperidin-1-yl)-2-methoxyphenyl)amino)pyrimidin-4-yl)amino)phenyl)-N-cyclopropylmethanesulfonamide	

[391]

[392] 2. 본 발명의 화합물의 인간 교모세포종 세포에 대한 세포증식 억제 효과 확인

[393] 96 well plate에 인간 교모세포종 세포주 U87-MG 세포를 1×10^4 cells/well의 밀도로 씨딩하고 24시간 동안 배양한 후, 대조군인 DMSO 및 본 발명의 화합물 AON-MG23-01, 또는 AON-MG23-02를 각각 처리한 후 48시간 동안 배양하였다. 본 발명의 화합물은 0, 1, 2, 4 μM 의 다양한 농도로 처리하였다. CCK 시약을 10 μl 씩 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 다음, 450 nm 흡광도에서 측정하였다.

[394] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 화합물 AON-MG23-01, 또는 AON-MG23-02가 U87-MG 세포의 증식을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

[395]

- [396] **3. 본 발명의 화합물의 인간 교모세포종 세포에 대한 세포이동 억제 효과 확인**
- [397] SPLScar Block (SPL) plate에 인간 교모세포종 세포주 U87-MG 세포를 8×10^4 cells/well의 밀도로 씨딩하고 24시간 동안 배양한 후, 24시간 뒤 Block을 제거함과 동시에 본 발명의 화합물 AON-MG23-01, 또는 AON-MG23-02를 각각 처리한 후 CO_2 인큐베이터 내 37°C 에서 24시간 배양하였다. 본 발명의 화합물은 각각 0, 1, 2, 4 μM 의 농도로 처리하였다. 배양 전후의 사진을 각각 촬영하여 Image J software를 통해 세포의 이동 거리를 측정하였고, 그 결과를 바탕으로 세포의 이동이 억제되었는지 분석하였다.
- [398] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 화합물 AON-MG23-01, 또는 AON-MG23-02가 4 μM 의 농도로 처리되었을 때 미처리 대조군에 비해 세포이동이 65% 이상 억제된 것으로 나타났다.
- [399]
- [400] **4. 본 발명의 화합물의 인간 교모세포종의 전이 억제 효과 확인**
- [401] 메트리젤이 코팅된 필터 (Transwell invasion chambers, Corning) 상부에 인간 교모세포종 세포주 U87-MG를 8×10^4 cells/well의 밀도로 씨딩한 다음, 본 발명의 화합물 (AON-MG23-01, 또는 AON-MG23-02; 0, 1, 2, 4 μM)을 각각 처리하여 24시간 동안 CO_2 인큐베이터 내 37°C 에서 배양하였다. 배양을 마친 후, Diff-Quick stain Kit (Sysmex, Kobe, Japan)을 사용하여 세포 고정 및 염색을 수행하였다. 염색된 세포는 현미경으로 이미지를 촬영하고, Image J software를 통해 세포를 계수한 후 통계분석을 수행하였다.
- [402] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 화합물 AON-MG23-01, 또는 AON-MG23-02가 처리된 그룹은 미처리 대조군에 비해 메트리젤에 대한 침투 정도가 감소한 바, 암세포의 전이력이 억제되었음을 확인할 수 있었다.
- [403]
- [404] **5. 본 발명의 화합물이 교모세포종 세포주의 ANO1 및 EGFR 단백질 발현에 미치는 영향 확인**
- [405] 본 발명의 화합물이 교모세포종 세포주의 ANO1 및 EGFR 단백질 발현에 영향을 미치는지 확인하였다. 60 mm dish에 인간 교모세포종 세포주 U87-MG를 1×10^6 cells 밀도로 씨딩하여 24시간 동안 배양한 후, 본 발명의 화합물 (AON-MG23-01, 또는 AON-MG23-02; 0, 1, 2, 4 μM)을 각각 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양을 마친 세포를 회수하고, 웨스턴 블롯을 수행하기 위해 회수된 세포를 용해시켰다. 웨스턴 블롯을 위한 항체로, 항-ANO1 항체 (Abcam, ab53212), 항-pEGFR 항체 (Cell Signaling, #4407S), 항-EGFR 항체 (Cell Signaling, #4267S), 및 항- α Tubulin 항체 (Santacruz, #SC-5286)를 사용했다. 단백질 농도는 BSA 방법 (Protein Quantitation Assay, Bovine serum albumin assay) (Pierce, Cat.23225)을 통해 정량하였다. 세포를 용해시킨 후, 이로부터 수득한 단백질을 동일한 양 (10 μg)으로 10% SDS-PAGE를 수행하여 단백질을 분자량 별로 분리하였으며, PVDF

멤브레인 (Bio-rad)으로 트랜스퍼 후 블로킹 버퍼 (5% Skim milk in Tris-buffered saline(TBS) buffer containing 0.1% Tween 20, TBS-T)를 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 이어서 1차 항체를 PVDF 멤브레인에 처리하여 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 PVDF 멤브레인은 TBS-T로 3차례 워싱하였다. 이어서 Horseradish peroxidase로 표지된 2차 항체로 PVDF 멤브레인을 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후, ECL kit (Bio-rad)를 사용하여 멤브레인을 시각화하였다. Image J software를 통해 각 단백질 양을 수치화 시켜 분석하였다.

[406] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 미처리 대조군 대비 본 발명의 화합물이 처리된 세포는 ANO1 및 EGFR의 단백질 수준이 크게 억제되었으며, 이와 같은 단백질 발현 억제 효과는 화합물의 처리 농도에 의존적이었다.

[407]

[408] **6. 교모세포종 세포주에서 본 발명의 화합물에 의한 ANO1 활성 억제 효과 확인**

[409] 패치 클램프를 이용하여 본 발명의 화합물에 의한 칼슘 의존 염화 이온통로 활성을 측정하여 ANO1 이온통로 활성 억제 효과를 확인하였다. 이를 위해, ANO1이 발현되는 U87-MG 세포에서 패치 클램프를 수행했다. Pipette solution은 146 CsCl, 5 Ca-EGTA-NMDG, 8 HEPES, 2 MgCl₂, 10 sucrose (pH 7.3), Bath solution은 50 NaCl, 10 HEPES, 3 KCl, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5.5 glucose (pH 7.3)으로 조성하였다. 커버슬립에서 U87-MG 세포를 4시간 동안 배양한 다음, AON-MG23-01 또는 AON-MG23-02를 각각 1 시간 동안 처리하였다 (각각 0, 4, 8μM의 농도로 처리함). 이때, 400 mM ATP와 고농도 칼슘을 이용하여 염화 이온통로를 활성화시켰으며, -100 mV 내지 +100 mV 범위의 칼슘 의존 염화 이온통로 전류를 측정했다.

[410] 그 결과, 도 6a에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 화합물이 처리된 그룹은 미처리 대조군에 비해 ANO1 활성이 확연히 감소한 것으로 나타났다. 특히, 도 6b에 나타낸 바와 같이, +80 mV의 막전위에서 본 발명의 화합물이 처리된 그룹은 미처리 대조군과 비교하여 전류밀도가 50% 이상 감소한 것으로 나타났다. 상기 결과는 본 발명의 화합물이 교모세포종 세포주 U87-MG 세포에서 칼슘 의존 염화 이온통로인 ANO1의 활성을 억제할 수 있음을 보여준다.

[411]

[412] **7. 본 발명의 화합물과 EGFR 저해제, ANO1 저해제의 인간 교모세포종에서의 전이 억제 효과 비교**

[413] 메트리젤이 코팅된 필터 (Transwell invasion chambers, Corning) 상부에 인간 교모세포종 세포주 U87-MG를 6X10⁴ cells/well의 밀도로 씨당한 다음, 본 발명의 화합물 AON-MG23-02 4μM, EGFR 저해제 Osimertinib 4μM, ANO1 저해제 CaCCinh-A01 100μM, Osimertinib 4μM과 CaCCinh-A01 100μM을 조합하여 세포에 처리 후 16시간 동안 CO₂ 인큐베이터 내 37°C에서 배양하였다. 배양을 마친 후, Diff-Quick stain Kit (Sysmex, Kobe, Japan)을 사용하여 세포 고정 및 염색을 수행

하였다. 염색된 세포는 현미경으로 이미지를 촬영하고, Image J software를 통해 세포를 계수한 후 통계분석을 수행하였다.

- [414] 그 결과, 도 7a 및 도 7b에 나타난 바와 같이, 본 발명의 화합물 AON-MG23-02 처리된 그룹은 미처리 대조군, EGFR 저해제 처리군, ANO1 저해제 처리군에 비해 매트릭셀에 대한 침투 정도가 감소하였고, EGFR 저해제와 ANO1 저해제 조합 처리군과 전이 억제 효과가 비슷하였다.

[415]

- [416] **8. 본 발명의 화합물과 EGFR 저해제, ANO1 저해제의 교모세포종 세포주에서 ANO1, EGFR, 및 pEGFR 단백질 발현 저해 효과 비교**

- [417] 본 발명의 화합물 AON-MG23-02와 EGFR 저해제 Osimertinib, ANO1 저해제 CaCCinh-A01의 교모세포종 세포주에서 ANO1, EGFR, 및 pEGFR 단백질 발현 저해 효과를 비교하였다. 60 mm dish에 인간 교모세포종 세포주 U87-MG를 100×10^4 cells/dish의 밀도로 씨딩하여 24시간 동안 배양한 후, AON-MG23-02 4 μ M, EGFR 저해제 Osimertinib 2 μ M, ANO1 저해제 CaCCinh-A01 100 μ M, Osimertinib 2 μ M과 CaCCinh-A01 100 μ M을 조합하여 처리 후 48시간 동안 배양하였다. 배양을 마친 세포를 회수하고, 웨스턴 블롯을 수행하기 위해 회수된 세포를 용해시켰다. 웨스턴 블롯을 위한 항체로, 항-ANO1 항체 (Abcam, ab53212), 항-pEGFR 항체 (Cell Signaling, #4407S), 항-EGFR 항체 (Cell Signaling, #4267S), 및 항-ACTIN 항체 (sigma, #A2066)를 사용했다. 단백질 농도는 BSA 방법 (Protein Quantitation Assay, Bovine serum albumin assay) (Pierce, Cat.23225)을 통해 정량하였다. 세포를 용해시킨 후, 이로부터 수득한 단백질을 동일한 양 (10 μ g)으로 10% SDS-PAGE를 수행하여 단백질을 분자량 별로 분리하였으며, PVDF 멤브레인(Bio-rad)으로 트랜스퍼 후 블로킹 버퍼 (5% Skim milk in Tris-buffered saline(TBS) buffer containing 0.1% Tween 20, TBS-T)를 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 이어서 1차 항체를 PVDF 멤브레인에 처리하여 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 PVDF 멤브레인은 TBS-T로 10분간 3차례 워싱하였다. 이어서 Horseradish peroxidase로 표지된 2차 항체로 PVDF 멤브레인을 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후, 다시 TBS-T로 10분간 3차례 워싱하였다. 워싱이 끝난 PVDF 멤브레인에 ECL kit(Thermo, West Pico Plus)를 처리하여 반응시키고 다빈치-Q(영인랩플러스) 기기를 사용하여 시각화하였다. Image J software를 통해 각 단백질 양을 수치화 시켜 분석하였다.

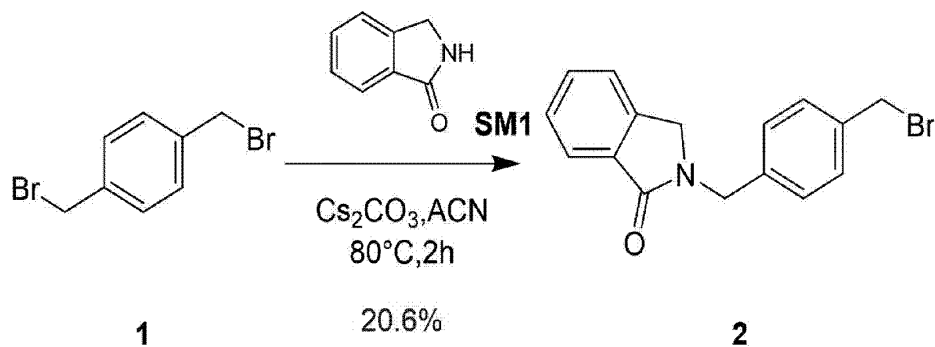
- [418] 그 결과, 도 8a 및 도 8b에 나타난 바와 같이, 본 발명의 화합물 AON-MG23-02가 미처리 대조군, EGFR 저해제 처리군, ANO1 저해제 처리군, EGFR 저해제와 ANO1 저해제 조합 처리군과 비교하여 ANO1, EGFR, 및 pEGFR 단백질 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[419]

- [420] **실시예 B. 신규한 화합물 AON-MG23-02의 유도체**

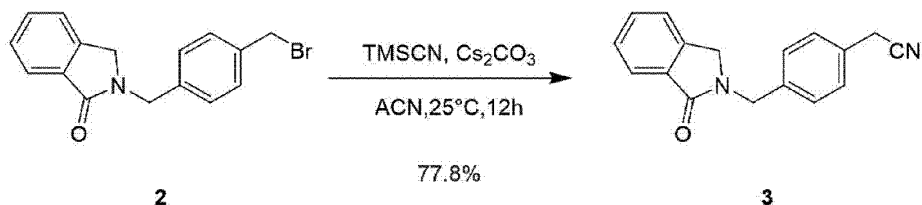
- [421] **1. AON-MG23-02의 유도체 제조**

- [422] **1-1. AON-MG23-05**
 [423] **1-1-A. 화합물 2의 제조**
 [424] [반응식 7]
 [425]



- [426]
 [427] 아세트니트릴(ACN) (10.0 mL)에 화합물 1 (3.00 g, 11.3 mmol, 1.00 eq), 화합물 SM1 (756 mg, 5.68 mmol, 0.500 eq), Cs₂CO₃ (2.96 g, 9.09 mmol, 0.800 eq)을 혼합하였으며, 해당 혼합물을 탈기하고 N₂로 3회 퍼징한 후, 질소 가스 (N₂) 내 80 °C로 2시간 동안 교반하였다. TLC (석유에테르: 에틸 아세테이트 = 1: 1, R_f = 0.49) 분석에 따르면, 화합물 SM1이 완전히 소진되고 많은 양의 새로운 반점들이 생성되었다. 반응 혼합물은 감압 하에 농축되었다. 잔여물은 물 6.00 mL로 희석한 후, EtOAc 6.00 mL (6.00 mL * 3)로 추출하였다. 혼합 유기 상층액은 소금물 9.00 mL (9.00 mL * 1)로 세척되었으며, Na₂SO₄로 건조 후, 여과 과정을 거쳤고 감압 하에 농축 과정을 통해 잔류물을 얻었다. 잔류물은 칼럼 크로마토그래피 (SiO₂, 석유에테르: 에틸 아세테이트 = 20: 1에서 0: 1)로 정제하였다. 황색 고체의 화합물 2 (900 mg, 2.35 mmol, 수율 20.6%, 순도 82.4%)를 수득하였다.

- [428]
 [429] **1-1-B. 화합물 3의 제조**
 [430] [반응식 8]
 [431]



- [432]

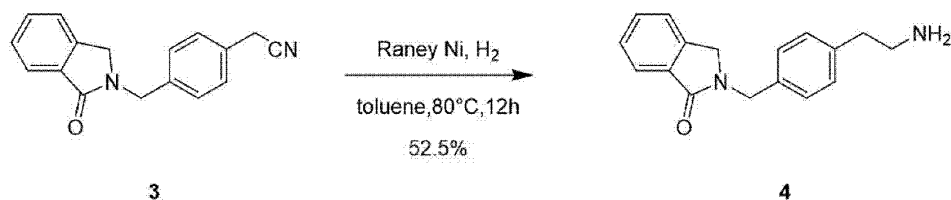
[433] ACN (10.0 mL)에 용해된 화합물 2 (900 mg, 2.85 mmol, 1.00 eq) 용액에 TMSCN (Trimethylsilyl cyanide, 338 mg, 3.42 mmol, 427 μ L, 1.20 eq)과 Cs_2CO_3 (1.11 g, 3.42 mmol, 1.20 eq)을 첨가하였다. 혼합물은 25 $^\circ\text{C}$ 에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS 분석 결과, 화합물 2는 완전히 소진되었고, 42.0%의 원하는 질량이 검출되었다. 반응 혼합물을 감압 하에 농축하고, 잔여물은 물 2.00 mL로 희석한 후 EtOAc 3.00 mL (3.00 mL * 3)로 추출하였다. 결합된 유기 상층액은 소금물 4.00 mL (4.00 mL * 1)로 세척하였고, Na_2SO_4 로 건조 및 여과시킨 후 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물은 칼럼 크로마토그래피 (SiO_2 , 석유에테르: 에틸 아세테이트 = 10: 1에서 0: 1)로 정제하였다. 황색 고체의 화합물 3 (600 mg, 2.22 mmol, 수율 77.8%, 순도 96.9%)을 수득하였다.

[434]

[435] **1-1-C. 화합물 4의 제조**

[436] [반응식 9]

[437]



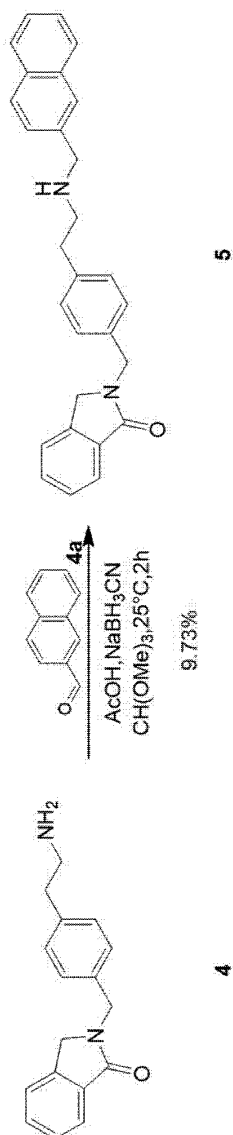
[438] 톨루엔 (6.00 mL)에 화합물 3 (600 mg, 2.29 mmol, 1.00 eq)과 Raney-Ni (19.6 mg, 228 μ mol, 0.100 eq)을 용해하고, 탈기 및 N_2 로 퍼징 과정을 거친 후, 해당 현탁액을 진공 상태에서 탈기하고 수소를 이용해 퍼징하였다. 해당 혼합물은 80 $^\circ\text{C}$ 의 H_2 (40 psi) 환경에서 12시간 동안 여러 번 교반하였다. LC-MS 분석 결과, 화합물 3은 완전히 소비되고, 54.8%의 원하는 물질이 검출되었다. 혼합물은 여과 및 농축하였다. 미정제 산물(crude product)은 역상 HPLC로 정제하였다 (칼럼: Phenomenex luna C18 150*40mm*15 μ m; 이동상: [물 (FA)-ACN]; 그라디언트: 15분 이상 2%-32% B). 흰색 고체의 화합물 4 ([4-(2-aminoethyl) phenyl] methyl] isoindoli-1-one, 320 mg, 1.20 mmol, 수율 52.5%, 순도 100%)를 수득하였다.

[439]

[440] **1-1-D. 화합물 5의 제조**

[441] [반응식 10]

[442]



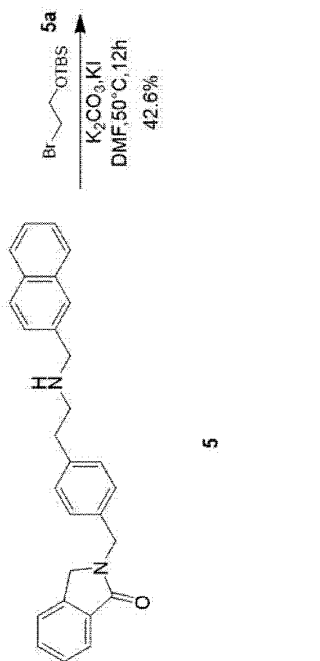
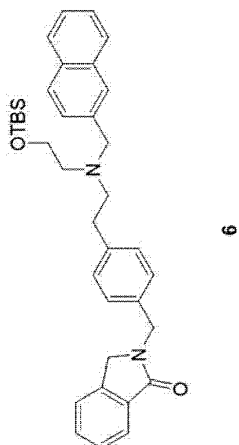
[443] CH(OMe)₃ (2.00 mL)에 화합물 4 (200 mg, 750 μmol, 1.00 eq)와 화합물 4a (117 mg, 750 μmol, 1.00 eq)을 용해한 혼합물은 탈기 및 N₂를 이용한 퍼징 과정을 3 회 거쳤으며, N₂ 기체 내 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. 해당 혼합물에 AcOH (45.0 mg, 750 μmol, 42.9 μL, 1.00 eq)와 NaBH₃CN (14.1 mg, 225 μmol, 0.300 eq)를 첨가하였다. 이어, N₂ 가스에서 25°C에 1시간 동안 교반하였다. TLC (디클로로메탄: 메탄올 = 10: 1; R_f = 0.7)에 따르면 화합물 4가 완전히 소진되고 새로운 두 개의 스팟이 형성되었다. 반응 혼합물은 감압 하에 농축하였다. 잔류물은 물 5.00 mL로 희석되고 EtOAc 4.00 mL (4.00 mL * 3)로 추출되었다. 결합된 유기층은 소금물 5.00 mL (5.00 mL * 1)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조되었으며, 여과 및 감압 하에

농축되어 잔류물을 얻었다. 잔류물은 칼럼 크로마토그래피 (SiO_2 , 디클로로메탄: 메탄올 = 60:1에서 10:1)로 정제하였다. 황색 오일의 화합물 5 (34.0 mg, 73.1 μmol , 수율 9.73%, 순도 87.4%)를 수득하였다.

[444]

[445] **1-1-E. 화합물 6의 제조**[446] **[반응식 11]**

[447]



[448] 화합물 5 (54.0 mg, 132 μmol , 1.00 eq) 를 DMF (Dimethylformamide, 0.600 mL)에 용해한 혼합물에 K_2CO_3 (36.7 mg, 265 μmol , 2.00 eq), KI (4.41 mg, 26.5 μmol , 0.200 eq), 화합물 5a (38.1 mg, 159 μmol , 1.20 eq)를 첨가하였다. 혼합물은 50°C에서 12

시간 동안 교반하였다. TLC (디클로로메탄: 메탄올 = 10:1, $R_f = 0.70$) 결과, 화합물 5는 남아 있었으며, 하나의 주요 새로운 스팟이 검출된 것으로 나타났다. 잔류물은 물 2.00 mL로 희석한 후 EtOAc 2.00 mL (2.00 mL * 3)로 추출하였다. 결합된 유기층은 소금물 3.00 mL (3.00 mL * 1)로 세척하였으며, Na_2SO_4 로 건조 및 여과 후 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물은 prep-TLC (SiO_2 , 디클로로메탄: 메탄올 = 10:1)로 정제하였다. 황색 오일의 화합물 6 (32.0 mg, 56.6 μmol , 수율 42.6%, 순도 100%)을 수득하였다.

[449]

[450] **1-1-F. AON-MG23-05의 제조**

[451] **[반응식 12]**

6

OTBS

HCl/MeOH
↓
MeOH, 25°C, 0.5 h

Target A
10 mg, 95%

78.3%

[453] 화합물 6 (29.0 mg, 51.3 μ mol, 1.00 eq)을 MeOH (0.500 mL)에 용해시킨 혼합물에 HCl/MeOH (2.00 M, 1.54 mL, 60.0 eq)를 첨가했다. 혼합물은 25°C에서 0.5 시간 동안 교반하였다. LC-MS 결과, 화합물 6은 완전히 소비되었고 98.7%의 원하는 물량이 감지되었다. 반응 혼합물은 감압 하에 농축하였다. 혼합물에 NaHCO₃를 첨가했다 (PH>7). 잔류물은 DCM 3.00 mL (3.00 mL * 3)로 추출하였다. 결합된 유기층은 소금물 2.00 mL (2.00 mL * 1)로 세척한 후 Na₂SO₄로 건조하였으며, 여과 후 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물은 prep-TLC (SiO₂, Ethyl acetate: Methanol = 10:1)로 정제하였다. 회백색(off-white) 고체의 Target A(AON-MG23-05)(18.2 mg, 40.2 μ mol, 수율 78.3%, 순도 99.6%)를 수득하였다.

[454] AON-MG23-05의 ¹H NMR 데이터는 도 11에 나타냈다.

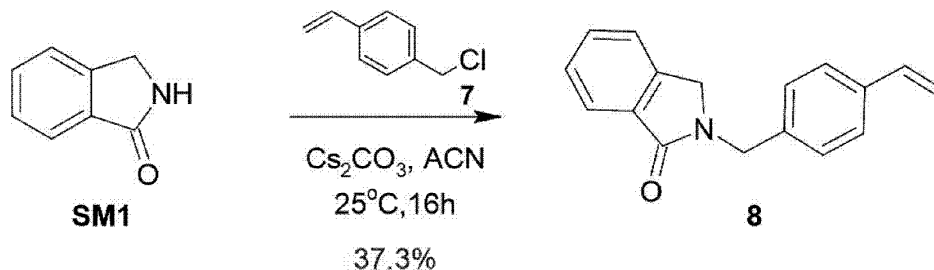
[455]

[456] **1-2. AON-MG23-06의 제조**

[457] **1-2-A. 화합물 8의 제조**

[458] [반응식 13]

[459]



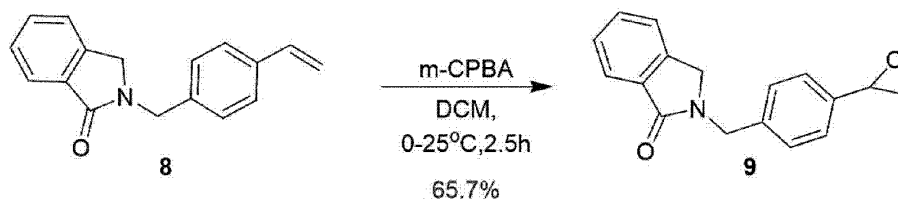
[460] 화합물 SM1 (3.00 g, 22.5 mmol, 1.00 eq)과 화합물 7 (4.13 g, 27.0 mmol, 3.81 mL, 1.20 eq), Cs₂CO₃ (11.0 g, 33.8 mmol, 1.50 eq)를 ACN (30 mL)에 혼합 및 탈기하였으며, 25 °C에서 16시간 동안 교반하였다. LC-MS 결과, 화합물 SM1의 20%가 잔류하는 것으로 나타났다. LC-MS에는 여러 개의 새로운 피크가 나타났으며, 60%의 원하는 화합물이 감지되었다. 반응 혼합물에 H₂O 30 mL을 첨가하여 소멸시키고, EA(Ethyl acetate) 30 mL (30 mL * 2)을 추출했다. 결합된 유기층은 소금물 30 mL (30 mL * 2)로 세척 후 Na₂SO₄로 건조하였으며, 여과 후 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물은 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, Petroleum ether: Ethyl acetate = 20:1 to 15:1) 및 TLC(Petroleum ether: Ethyl acetate = 3:1, R_f = 0.43)로 정제하였다. 흰색 고체의 화합물 8 (2.10 g, 8.42 mmol, 수율 37.3%)을 수득하였으며, LC-MS 및 HNMR으로 확인하였다.

[461]

[462] **1-2-B. 화합물 9의 제조**

[463] [반응식 14]

[464]



[465] 화합물 8 (200 mg, 802 μmol, 1.00 eq)을 DCM (Dichloromethane, 0.200 mL)에 용해시킨 혼합물에 m-CPBA (meta-Chloroperoxybenzoic acid, 651 mg, 3.21 mmol, 85.0% 순도, 4.00 eq)를 0 °C에서 0.5 시간동안 한 방울씩 첨가하였다. 첨가 후 혼합물은 25°C에서 2시간 동안 교반하였다. TLC(Petroleum ether: Ethyl acetate = 2:1,

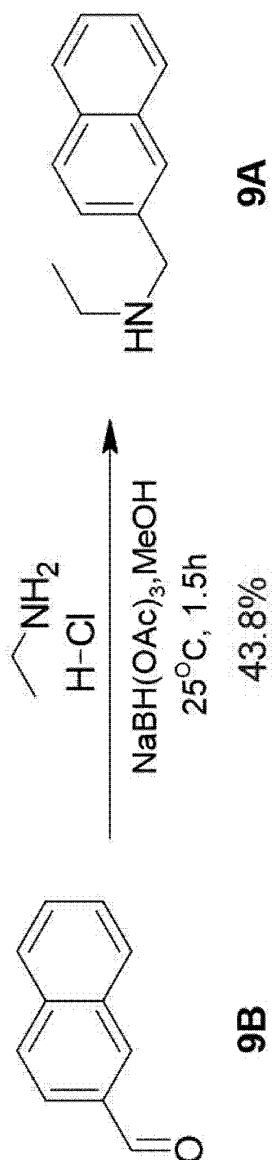
$R_f = 0.33$) 결과, 화합물 8이 완전히 소진되었고 하나의 새로운 스팟이 형성되었다. 반응 혼합물에 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 20mL을 25 °C에서 첨가하여 소멸시키고, DCM 30 mL (30 mL *2)로 추출했다. 결합된 유기층은 소금물 30 mL (30 mL *2)로 세척하였으며, Na_2SO_4 로 건조 및 여과 후 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물은 prep-TLC (SiO_2 , Petroleum ether: Ethyl acetate = 2:1)로 정제하였다. 갈색 고체의 화합물 9 (580 mg, 1.65 mmol, 수율 62.4%)를 수득하였으며, HPLC 및 HNMR로 확인되었다. 또한, 황색 오일의 화합물 9 (140 mg, 527 μmol , 수율 65.7%)를 수득하였으며, LC-MS 및 HNMR로 확인하였다.

[466]

[467] **1-2-C. 화합물 9A의 제조**

[468] [반응식 15]

[469]



[470] MeOH (10 mL)에 에탄아민 (626 mg, 7.68 mmol, 909 μL , 1.20 eq, HCl)과 TEA (Triethylamine, 777 mg, 7.68 mmol, 1.07 mL, 1.2 eq) 용해한 용액을 25°C에서 0.5시간 동안 교반하였으며, 화합물 9B (1.00 g, 6.40 mmol, 1.00 eq), sodium; triacetoxyborohydride (NaBH(OAc)_3 , 2.04 g, 9.60 mmol, 1.50 eq)과 AcOH (3.85 mg, 64.0 μmol , 3.67 μL , 0.01 eq)를 25°C에서 첨가하였다. 결과 혼합물은 25°C에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS 결과, 화합물 9B가 완전히 소비되었고, 원하는 m/z값을 가진 한 개의 주요 피크가 감지되었음을 나타냈다. 반응 혼합물에 Na_2CO_3 10 mL을 첨가하여 소멸시킨 후, H_2O 20 mL로 희석하였으며, EA

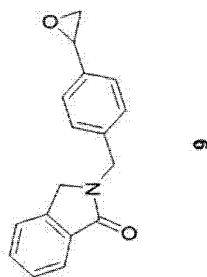
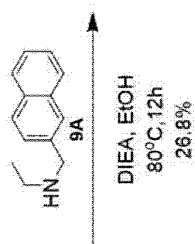
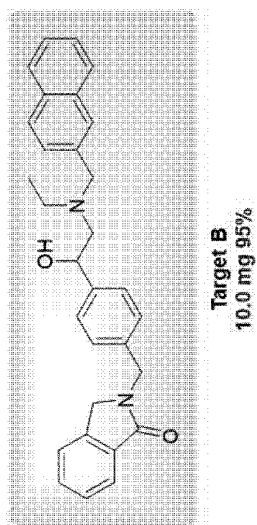
30 mL (30 mL * 2)를 추출하였다. 결합된 유기층은 소금물 30 mL (30 mL * 1)로 세척하였으며 Na_2SO_4 로 건조 후, 여과 및 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물은 컬럼 크로마토그래피 (SiO_2 , Petroleum ether: Ethyl acetate = 0: 1부터 Dichloromethane: Methanol = 20: 1까지)로 정제하였다. 흰색 고체의 화합물 9A (520 mg, 2.81 mmol, 수율 43.8%)를 수득하였으며, HNMR 및 LC-MS로 확인하였다.

[471]

[472] **1-2-D. AON-MG23-06의 제조**

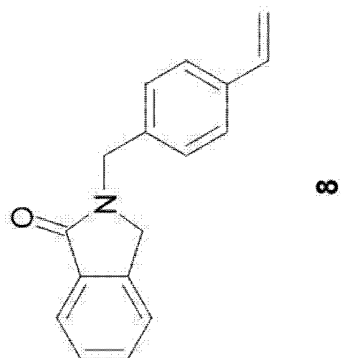
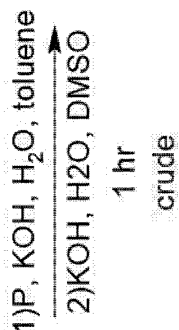
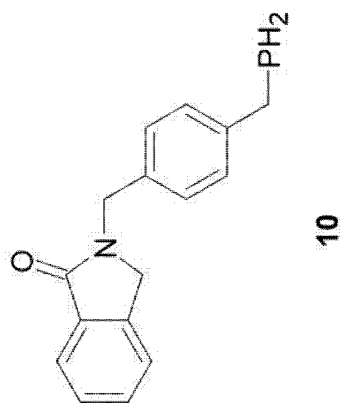
[473] [반응식 16]

[474]



- [475] 에탄올 (0.1 mL)에 화합물 9 (65.0 mg, 245 μ mol, 1.00 eq), 화합물 9A (54.4 mg, 294 μ mol, 1.20 eq), DIPEA (N,N-Diisopropylethylamine, 94.9 mg, 735 μ mol, 128 μ L, 3.00 eq)를 용해시킨 혼합물을 탈기하고 N₂로 3회 퍼징한 다음, N₂ 가스 내 80°C 조건에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS 결과, 화합물 9가 완전히 소비되었고 원하는 m/z 값을 가진 주요 피크 하나가 감지되었다. 반응 혼합물에 H₂O 10 mL을 첨가하여 소멸시킨 후, EA 5 mL (5 mL * 2)로 추출하고 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물은 prep-HPLC로 정제하였다 (FA 조건: Phenomenex luna C18 150*25mm*10 μ m; 이동상: [물(FA)-ACN]; 그래디언트: 15%-45% B, 1분 이상). 이후 prep-HPLC로 정제하였다 (중성 조건: Waters Xbridge 150*25mm*5 μ m; 이동상: [물(NH₄HCO₃)-ACN]; 그래디언트: 45%-75% B 15분 이상). 흰색 고형의 AON-MG23-06(Target B)(29.7 mg, 65.7 μ mol, 수율 26.8%, 순도 99.8%)를 수득하였으며, LC-MS, HPLC, HNMR 및 특수 NMR 로 확인하였다.
- [476] AON-MG23-06의 H NMR 데이터는 도 12에 나타냈다.
- [477]
- [478] **1-3. AON-MG23-07의 제조**
- [479] **1-3-A. 화합물 10의 제조**
- [480] [반응식 17]

[481]



[482] KOH (675.1 mg, 12.0 mmol, 3.00 eq), DMSO (Dimethyl sulfoxide, 10.0 mL), 톨루엔 (7.50 mL) 및 H₂O (2.00 mL)의 현탁액을 아르곤으로 불어넣고, P (5.00 g, 147.0 mmol, 36.6 eq)로 포화시켰다. 화합물 8 (1.00 g, 4.01 mmol, 1.00 eq)을 넣은 DMSO 용액을 70°C에서 30분간 교반시켰으며, 연속해서 인화 가스가 통과되도록 한 방울씩 첨가하였다. 반응 혼합물을 포스핀 흐름을 유지하며 30분 동안 추가로 가열하였다(70°C). TLC (PE: EA=3:1, R_f = 0.38)결과, 화합물 8이 완전히 소비되었고, 한 개의 새로운 스팟이 형성되었다. 혼합물을 아르곤으로 통과시키고 냉각한 후 물 20 mL로 희석하고 톨루엔 (10 mL*2)로 추출하였다. 톨루엔 추출물은 소금물

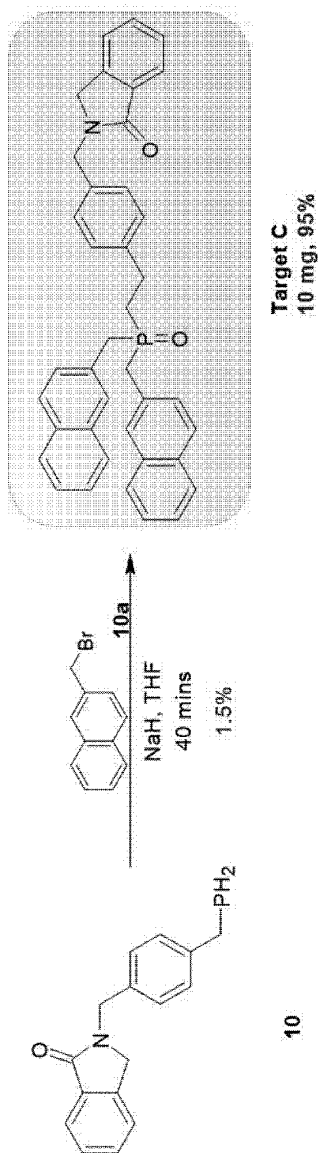
(10 mL*1)로 세척한 후 Na_2SO_4 로 건조시켰으며, 여과 후 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 흰색 고체의 화합물 10 (1.10 g, 원료(crude))을 수득하였다.

[483]

[484] **1-3-B. AON-MG23-07의 제조**

[485] [반응식 18]

[486]



[487] 화합물 10 (1.10 g, 3.88 mmol, 1.00 eq)을 THF (Tetrahydrofuran, 10.0 mL)에 용해시킨 용액에 0°C의 N_2 기체 환경 속에서 NaH (465.9 mg, 11.6 mmol, 순도 60.0%, 3.00 eq)를 첨가하였다. 혼합물은 0°C에서 30분간 교반하였다. 그 후, 화합물 10a (858.4 mg, 3.88 mmol, 1.00 eq)가 섞인 THF 용액을 0°C에서 한 방울씩 첨가했다.

혼합물은 0°C에서 10분 동안 교반하였다. LC-MS 결과, 화합물 10이 완전히 소비되었으며 원하는 질량이 검출된 것으로 나타났다. 0°C의 N₂ 기체 내에서 NH₄Cl 20 mL를 첨가하여 반응 혼합물을 퀀칭한 후, H₂O 20.0 mL로 희석하고 EA 40.0 mL (20.0 mL * 2)를 추출하였다. 결합된 유기층은 소금물 30.0 mL (30.0 mL * 1)로 세척한 후 Na₂SO₄로 건조되었으며, 여과 후 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물은 prep-HPLC (FA 조건; 칼럼: Phenomenex luna C18 150*40mm*15um; 이동상: [water (FA)-ACN]; 그라디언트: 52%-82% B 15분 이상)로 정제하였다. 잔류물은 prep-HPLC (FA 조건; 칼럼: Welch Xtimate C18 150*25mm*5um; 이동상: [water (FA)-ACN]; 그라디언트: 58%-78% B 15분 동안)로 추가 정제하였다. 회백색의 AON-MG23-07(Target C)(35.0 mg, 58.5 µmol, 수율 1.51%, 순도 97.0%)를 수득하였다.

[488] AON-MG23-07의 H NMR 데이터는 도 13에 나타냈다.

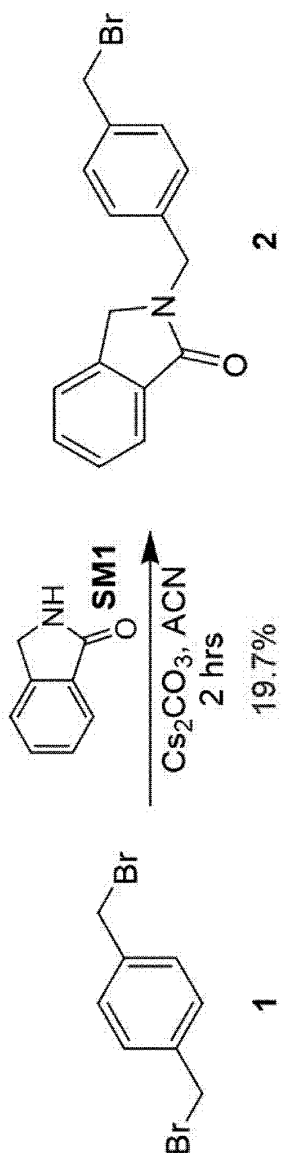
[489]

[490] **1-4. AON-MG23-08의 제조**

[491] **1-4-A. 화합물 2의 제조**

[492] [반응식 19]

[493]



[494] 화합물 1 (5.00 g, 18.9 mmol, 1.00 eq), 화합물 SM1 (1.26 g, 9.47 mmol, 0.50 eq), Cs_2CO_3 (4.94 g, 15.1 mmol, 0.80 eq)를 ACN (15.0 mL)에 용해한 혼합물은 탈기 및 N_2 가스 처리를 3회 거치고, N_2 가스 내에서 80°C 에서 2시간 동안 교반하였다. LC-MS (EW47929-30-P1A1) 결과, 화합물 SM1이 완전히 소진되고 원하는 질량이 감지된 것으로 나타났다. 반응 혼합물을 H_2O 30.0 mL로 희석하고, EA 40.0 mL (20.0 mL * 2)을 추출했다. 결합된 유기층은 소금물 30.0 mL (30.0 mL * 1)로 세척한 후 Na_2SO_4 로 건조하였으며, 여과 후 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물은 컬럼 크로마토그래피 (SiO_2 , Petroleum ether/Ethyl acetate=20/1 to 5/1,

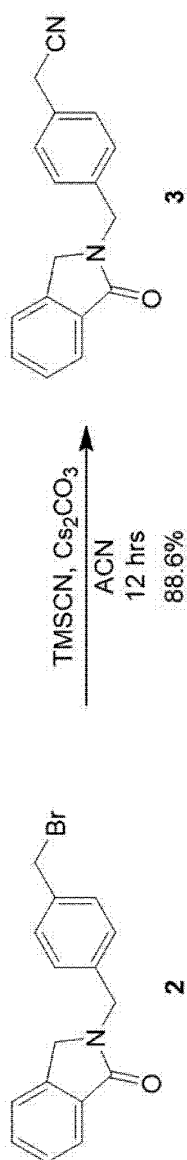
TLC, PE:EA=3:1, R_f =0.22)로 정제하였다. 노란색 고체의 화합물 2 (1.18 g, 3.73 mmol, 수율 19.7%)를 수득하였다.

[495]

[496] **1-4-B. 화합물 3의 제조**

[497] [반응식 20]

[498]



[499] 화합물 2 (1.1 g, 3.48 mmol, 1.00 eq) 를 ACN (16.0 mL)에 용해시킨 용액에 Cs_2CO_3 (1.36 g, 4.17 mmol, 1.20 eq) 및 TMS-CN (414.1 mg, 4.17 mmol, 522 μL , 1.20 eq) 을 첨가하였다. 혼합물을 25°C에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS 분석 결과, 화합물 2는 완전히 소진되었으며 원하는 질량이 검출된 것으로 나타났다. 반응

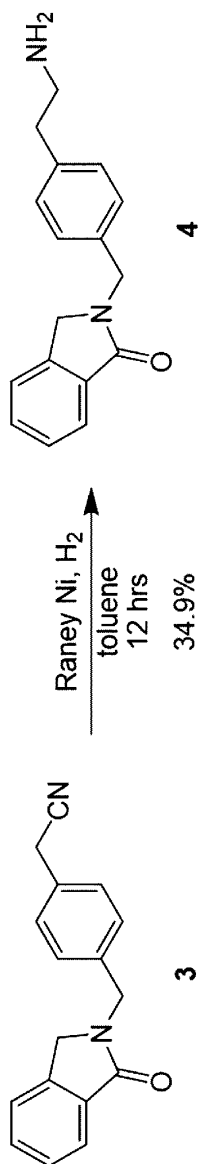
혼합물은 용매 제거를 위해 감압 하에 농축하였다. 잔류물은 H₂O 20.0 mL로 희석하였고, EA 40.0 mL (20.0 mL * 2)가 추출되었다. 결합된 유기층은 소금물 20.0 mL로 세척하였고, Na₂SO₄로 건조 후 여과하였으며, 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물은 컬럼 크로마토그래피 (SiO₂, Petroleum ether/Ethyl acetate=5/1 to 3/1, PE: EA=5:1, R_f = 5:1, R_f=0.47)로 정제하였다. 노란색 고체의 화합물 3 (825 mg, 3.08 mmol, 수율 88.6%, 순도 98.0%)을 수득하였다.

[500]

[501] **1-4-C. 화합물 4의 제조**

[502] [반응식 21]

[503]



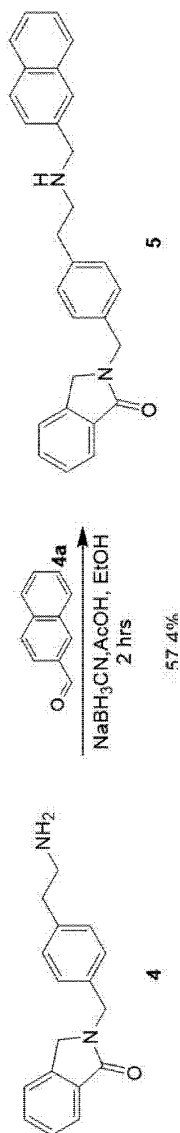
[504] 톨루엔 (8.00 mL) 내에 화합물 3 (825 mg, 3.15 mmol, 1.00 eq)과 Raney-Ni (26.9 mg, 314 μ mol, 0.10 eq)를 혼합한 후, 혼합물을 진공 처리하여 N_2 로 3회 제거하고, 이후 진공 상태에서 H_2 로 여러 번 처리하여 혼합물을 제거하였다. 혼합물을 80°C에서 H_2 (40 psi) 분위기에서 12시간 동안 교반하였다. LC-MS 결과, 화합물 3이 완전히 소비되고 원하는 물질이 검출되었다. 반응 혼합물은 여과 및 저압 하에서 농축하여 잔류물을 얻었다. 이후, 잔류물은 prep-HPLC (FA 조건; 컬럼: Phenomenex luna C18 15040mm 15um; 이동상: [water(FA)-ACN]; 그래디언트: 8%-38% B, 15분 동안)로 정제하였다. 흰색 고체의 화합물 4 (300 mg, 1.10 mmol, 34.9% 수율, 97.5% 순도)를 수득하였으며, HNMR 와 LC-MS로 확인하였다.

[505]

[506] **1-4-D. 화합물 5의 제조**

[507] [반응식 22]

[508]



[509] 화합물 4 (300 mg, 1.13 mmol, 1.00 eq)를 에탄올(EtOH) 5.00 mL 에 용해시킨 용액에 화합물 4a (175 mg, 1.13 mmol, 1.00 eq)를 첨가하였다. 혼합물은 25°C에서 N_2 분위기에서 1시간 동안 교반하였다. 이후, NaBH_3CN (42.4 mg, 675 μmol , 0.60 eq) 및 AcOH(67.6 mg, 1.13 mmol, 64.4 μL , 1.00 eq)을 25°C에서 첨가하고, N_2 분위기에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS 결과, 화합물 4의 2%가 완전히 소비되고 원하는 물질이 검출된 것으로 나타났다. 잔류물은 H_2O 10 mL로 희석하고 EA 20 mL (10 mL * 2)로 추출하였다. 유기 상을 결합한 후, 소금물 10 mL (10 mL * 1)로 세척하고 $[\text{Na}_2\text{SO}_4]$ 로 건조한 후 여과하여 저압 하에서 농축하여 잔류물을 얻었다. 이후, 잔류물은 칼럼 크로마토그래피 (SiO_2 , DCM/MeOH=20/1에서 15/1로), TLC,

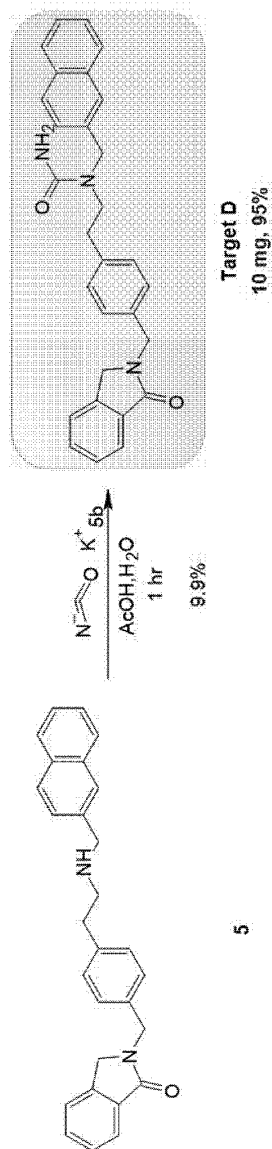
DCM:MeOH=10:1, $R_f = 0.46$)로 정제하였다. 흰색 고체의 화합물 5 (293 mg, 647 μmol , 57.4% 수율, 100% 순도, FA)를 수득하였으며, LC-MS 와 HNMR 로 확인하였다.

[510]

[511] **1-4-E. AON-MG23-08의 제조**

[512] [반응식 23]

[513]



[514] 화합물 5 (100 mg, 245 μmol , 1.00 eq) 를 AcOH (0.30 mL)에 용해시킨 용액에 화합물 5b (99.7 mg, 1.23 mmol, 48.5 μL , 5.00 eq)과 H₂O (1.50 mL)를 첨가하였다. 혼합물은 25 °C에서 1시간 동안 교반하였다. LC-MS 분석 결과, 약 10%의 화합물 5

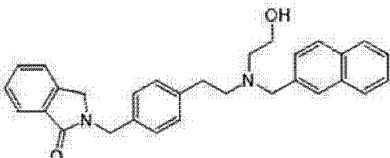
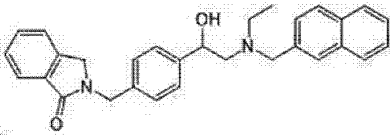
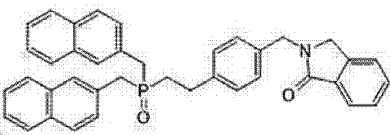
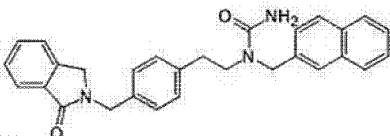
가 남아 있으며 원하는 질량이 검출된 것으로 나타났다. pH가 8에 도달할 때 까지 포화된 수산화나트륨 용액을 천천히 첨가하여 반응을 종료한 후, DCM 40 mL (20 mL * 2)로 추출하였다. 결합된 유기층은 소금물 40.0 mL (20.0 mL * 2)로 세척하였으며, Na₂SO₄로 건조시킨 후, 여과 및 감압 하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물은 prep-TLC (SiO₂, DCM: MeOH = 15:1)로 정제하였다. 잔류물은 prep-HPLC (기본 조건; 컬럼: Waters Xbridge 150*25mm*5um; 이동상: [water (암모니아 수산화 v/v)-ACN]; 그라디언트: 25%-55% B, 10분 이상)로 정제하였다. 흰색 고체의 AON-MG23-08(Target D)(11.0 mg, 24.4 µmol, 95% 수율, 100% 순도)를 수득하였다.

[515] AON-MG23-08의 H NMR 데이터는 도 14에 나타냈다

[516]

[517] 상기와 같은 방법으로 AON-MG23-02의 유도체를 제조하였으며, 이들의 구조식을 하기 표 2에 나타냈다.

[518] [표2]

구분	명칭	구조
AON-MG23-05	2-(4-(2-((2-hydroxyethyl)(naphthalen-2-ylmethyl)amino)ethyl)benzyl)isoindolin-1-one	
AON-MG23-06	2-(4-(2-(ethyl(naphthalen-2-ylmethyl)amino)-1-hydroxyethyl)benzyl)isoindolin-1-one	
AON-MG23-07	2-(4-(2-(bis(naphthalen-2-ylmethyl)phosphoryl)ethyl)benzyl)isoindolin-1-one	
AON-MG23-08	1-(naphthalen-2-ylmethyl)-1-(4-((1-oxoisoin-2-yl)methyl)phenethyl)urea	

[519]

[520] **2. AON-MG23-02의 유도체 4종의 교모세포종 세포주에서 ANO1, EGFR 단백질 발현 저해 효과 비교**

- [521] AON-MG23-02의 유도체 AON-MG23-05, AON-MG23-06, AON-MG23-07, AON-MG23-08의 교모세포종 세포주에서 ANO1, EGFR 단백질 발현 저해 효과를 비교하였다. 60 mm dish에 인간 교모세포종 세포주 U87-MG를 100×10^4 cells/dish의 밀도로 씨딩하여 24시간 동안 배양한 후, AON-MG23-05, AON-MG23-06, AON-MG23-07, AON-MG23-08 유도체 각각 0, 8, 16, 32 μ M 씩 처리 후 48시간 동안 배양하였다. 배양을 마친 세포를 회수하고, 웨스턴 블롯을 수행하기 위해 회수된 세포를 용해시켰다. 웨스턴 블롯을 위한 항체로, 항-ANO1 항체 (Abcam, ab53212), 항-pEGFR 항체 (Cell Signaling, #4407S), 항-EGFR 항체 (Cell Signaling, #4267S), 및 항-ACTIN 항체 (sigma, #A2066)를 사용했다. 단백질 농도는 BSA 방법 (Protein Quantitation Assay, Bovine serum albumin assay) (Pierce, Cat.23225)을 통해 정량하였다. 세포를 용해시킨 후, 이로부터 수득한 단백질을 동일한 양 (10 μ g)으로 10% SDS-PAGE를 수행하여 단백질을 분자량 별로 분리하였으며, PVDF 멤브레인(Bio-rad)으로 트랜스퍼 후 블로킹 버퍼 (5% Skim milk in Tris-buffered saline(TBS) buffer containing 0.1% Tween 20, TBS-T)를 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 이어서 1차 항체를 PVDF 멤브레인에 처리하여 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 반응을 마친 PVDF 멤브레인은 TBS-T로 10분간 3차례 워싱하였다. 이어서 Horseradish peroxidase로 표지된 2차 항체로 PVDF 멤브레인을 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후, 다시 TBS-T로 10분간 3차례 워싱하였다. 워싱이 끝난 PVDF 멤브레인에 ECL kit(Thermo, West Pico Plus)를 처리하여 반응시키고 다빈치-Q(영인랩플러스) 기기를 사용하여 시각화하였다. Image J software를 통해 각 단백질 양을 수치화 시켜 분석하였다.
- [522] 그 결과, 도 9a 내지 도 9d에 나타낸 바와 같이, 유도체 AON-MG23-05 및 AON-MG23-08이 미처리 대조군과 비교하여 ANO1, EGFR 단백질의 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.
- [523]
- [524] **3. AON-MG23-02의 유도체 4종의 인간 교모세포종에서의 전이 억제 효과 비교**
- [525] 메트리젤이 코팅된 펠터 (Transwell invasion chambers, Corning) 상부에 인간 교모세포종 세포주 U87-MG를 8×10^4 cells/well의 밀도로 씨딩한 다음, 본 발명의 화합물 유도체 AON-MG23-05, AON-MG23-06, AON-MG23-07, AON-MG23-08 각각 0, 8, 16, 32 μ M 씩 세포에 처리 후 24시간 동안 CO₂ 인큐베이터 내 37°C에서 배양하였다. 배양을 마친 후, Diff-Quick stain Kit (Sysmex, Kobe, Japan)을 사용하여 세포 고정 및 염색을 수행하였다. 염색된 세포는 현미경으로 이미지를 촬영하고, Image J software를 통해 세포를 계수한 후 통계분석을 수행하였다.
- [526] 그 결과, 도 10a 및 10b에 나타낸 바와 같이, 유도체 AON-MG23-05, AON-MG23-06, AON-MG23-07, 및 AON-MG23-08이 처리된 그룹은 미처리 대조군에 비해 메트리젤에 대한 침투 정도가 감소하여, 인간 교모세포종에서의 전이를 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

[527]

[528] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

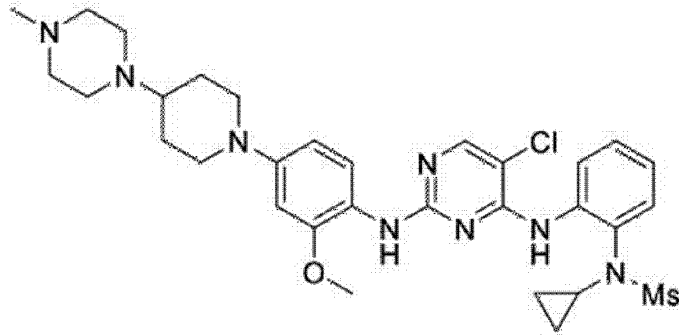
산업상 이용가능성

[529] 본 발명의 신규한 화합물은 ANO1 저해제로 사용할 수 있을 뿐만 아니라 뇌종양세포에서 ANO1 및 EGFR을 동시에 억제할 수 있는 바, ANO1 및 EGFR의 이중 타겟 항암제로 사용될 수 있으며, EGFR 표적치료의 병용제제로도 활용 가능하므로, 뇌종양의 예방 및 치료 분야에서 다양하게 활용될 수 있어 산업상 이용가능성이 있다.

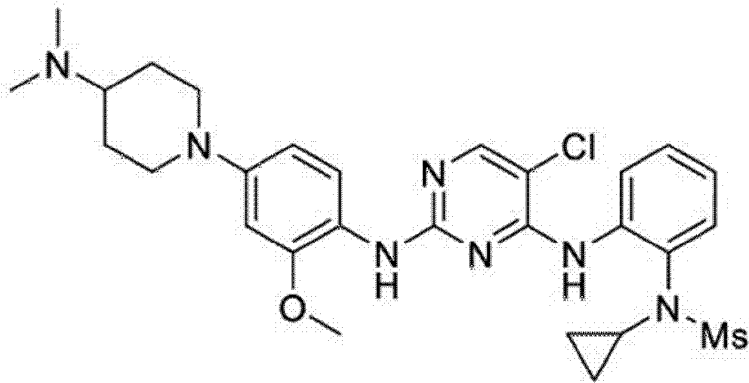
청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

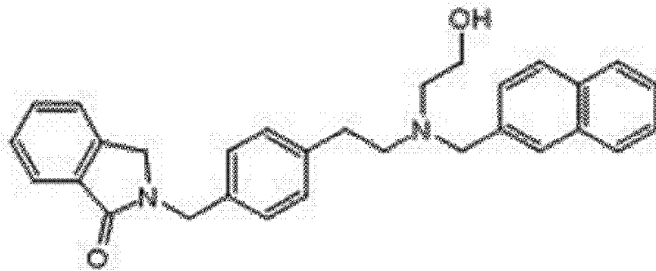
[화학식 1]



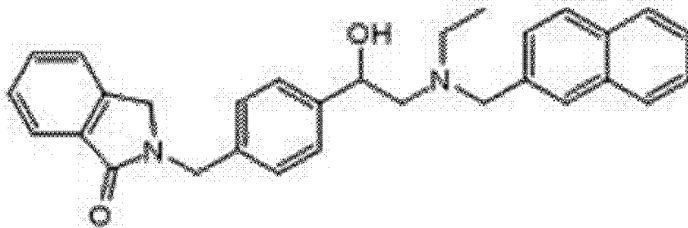
[화학식 2]



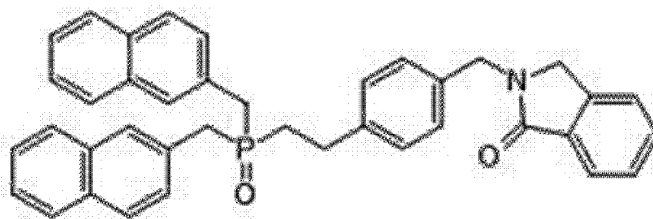
[화학식 3]



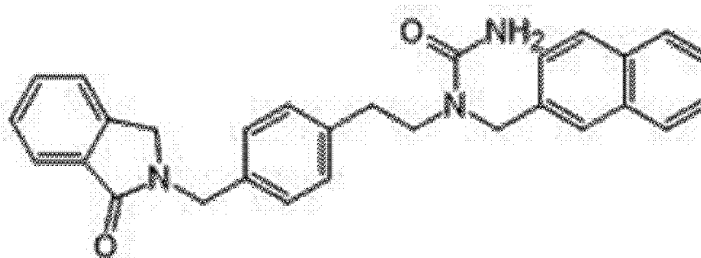
[화학식 4]



[화학식 5]



[화학식 6]

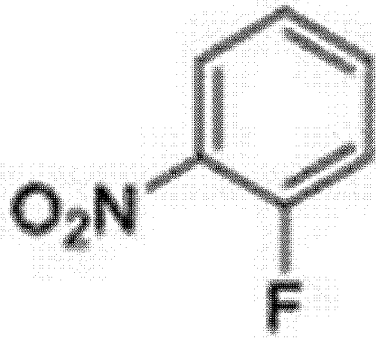


[청구항 2]

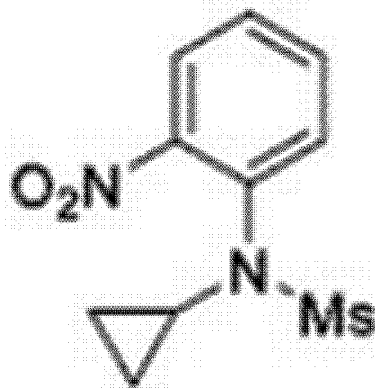
(S1A) 하기 화학식 7로 표시되는 화합물과 메탄설폰닐클로라이드(MsCl) 및 사이클로프로필아민을 염기의 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 8로 표시되는 화합물을 제조하는 단계; 또는

(S1B) 하기 화학식 9로 표시되는 화합물과 하기 화학식 10 또는 화학식 11로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시키는 단계를 포함하는, 제 1항의 화합물의 제조방법.

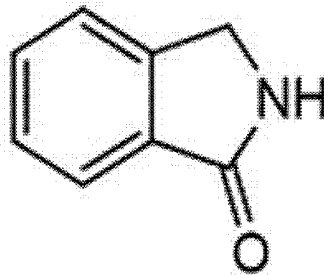
[화학식 7]



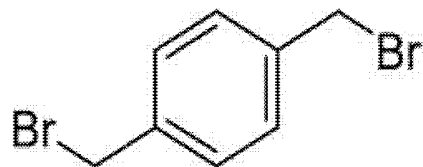
[화학식 8]



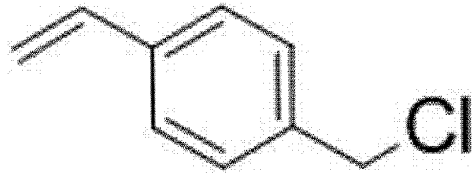
[화학식 9]



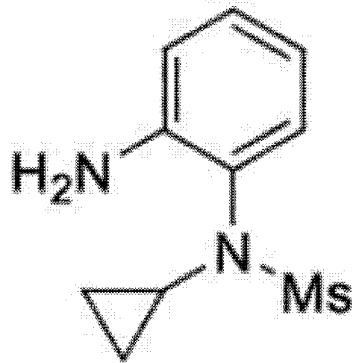
[화학식 10]



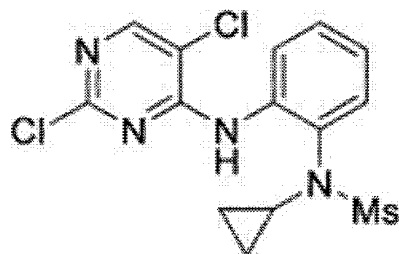
[화학식 11]



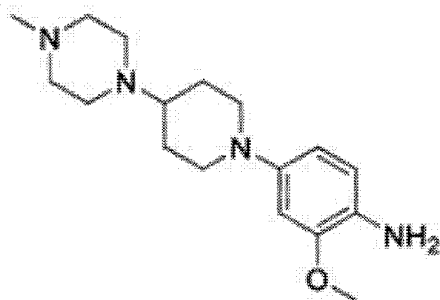
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
 상기 (S1A) 단계는 하기의 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 화합물의 제조방법:
 (S1A-1) 상기 화학식 8로 표시되는 화합물을 염화암모늄의 존재 하에 아연으로 처리하여 환원시켜 하기 화학식 12로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;
 (S1A-2) 상기 화학식 12로 표시되는 화합물과 2, 4, 5-트리클로로피리미딘을 염기의 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 13으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계; 및
 (S1A-3) 상기 화학식 13으로 표시되는 화합물과 하기 화학식 14 또는 화학식 15으로 표시되는 화합물을 산의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 제조하는 단계.
- [화학식 12]



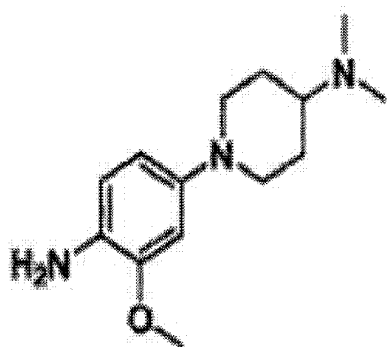
[화학식 13]



[화학식 14]



[화학식 15]

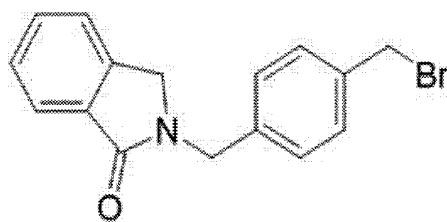


[청구항 4]

제2항에 있어서,

상기 (S1B) 단계에서 상기 화학식 9로 표시되는 화합물과 상기 화학식 10으로 표시되는 화합물이 염기의 존재 하에 반응한 경우, 하기 화학식 16으로 표시되는 화합물이 제조되는 것을 특징으로 하는, 화합물의 제조방법.

[화학식 16]



[청구항 5]

제4항에 있어서,

상기 (S1B) 단계는 하기의 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 화합물의 제조방법:

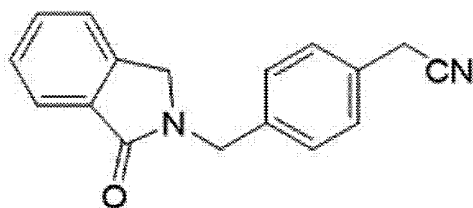
(S1B-1) 상기 화학식 16으로 표시되는 화합물과 트리메틸시아나이드 (Trimethylsilyl cyanide)를 염기의 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 17로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;

(S1B-2) 상기 화학식 17로 표시되는 화합물을 금속 촉매의 존재 하에 수소화 반응시켜 하기 화학식 18로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;

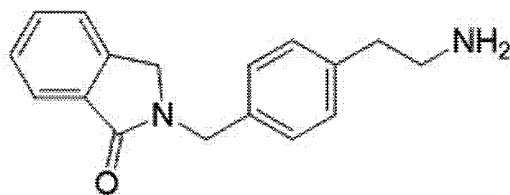
(S1B-3) 상기 화학식 18로 표시되는 화합물과 하기 화학식 19로 표시되는 화합물을 환원제 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 20으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계; 및

(S1B-4) 상기 화학식 20으로 표시되는 화합물과 NCO를 반응시켜 상기 화학식 6으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계; 또는 상기 화학식 20으로 표시되는 화합물과 하기 화학식 21으로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시켜 하기 화학식 22로 표시되는 화합물을 제조하는 단계.

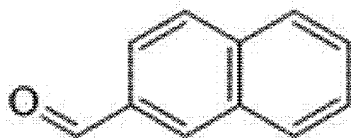
[화학식 17]



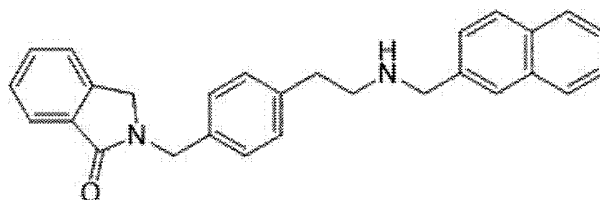
[화학식 18]



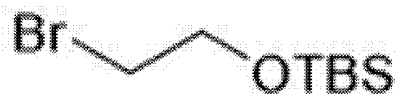
[화학식 19]



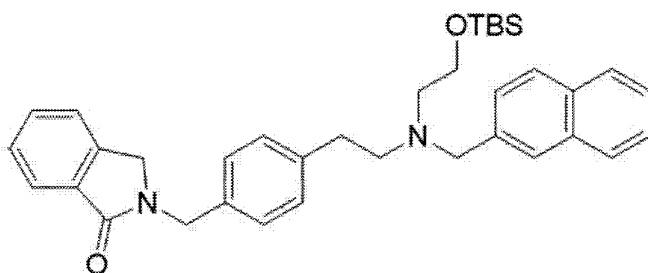
[화학식 20]



[화학식 21]



[화학식 22]

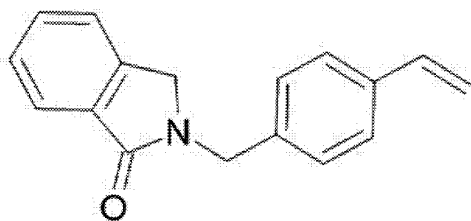


[청구항 6] 제5항에 있어서,
상기 (S1B-4) 단계는 상기 화학식 22로 표시되는 화합물을 산의 존재 하에 가수분해 반응시켜 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 화합물의 제조방법.

[청구항 7] 제5항에 있어서,
상기 금속 촉매는 백금족, 로듐, 팔라듐 카본, 및 라니닉켈(Raney-Ni)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 화합물의 제조방법.

[청구항 8] 제2항에 있어서,
상기 (S1B) 단계에서 상기 화학식 9로 표시되는 화합물과 상기 화학식 11로 표시되는 화합물이 염기의 존재 하에 반응한 경우, 하기 화학식 23으로 표시되는 화합물이 제조되는 것을 특징으로 하는, 화합물의 제조방법.

[화학식 23]



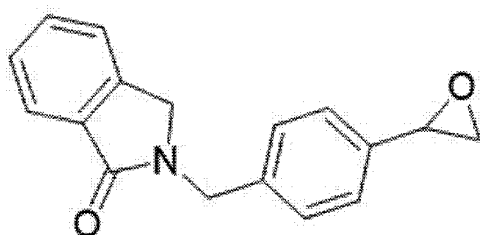
[청구항 9] 제8항에 있어서,
상기 (S1B) 단계는 하기의 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 화합물의 제조방법:
(S1Ba-1) 상기 화학식 23으로 표시되는 화합물과 과산화물을 반응시켜 하기 화학식 24로 표시되는 화합물을 제조하는 단계, 및

(S1Ba-2) 상기 화학식 24로 표시되는 화합물과 하기 화학식 25로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계; 또는

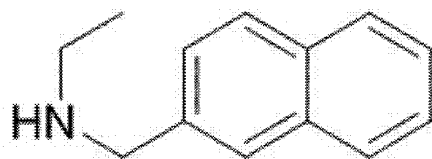
(S1Bb-1) 상기 화학식 23으로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 인산화(phosphorylation)시켜 하기 화학식 26으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계, 및

(S1Bb-2) 상기 화학식 26으로 표시되는 화합물과 하기 화학식 27로 표시되는 화합물을 염기의 존재 하에 반응시켜 상기 화학식 5로 표시되는 화합물을 제조하는 단계.

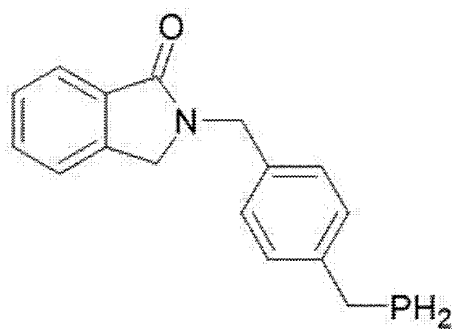
[화학식 24]



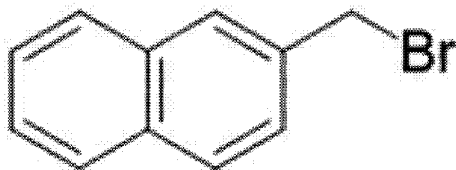
[화학식 25]



[화학식 26]



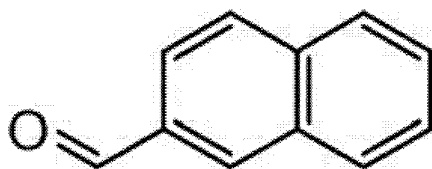
[화학식 27]



[청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 과산화물은 m-CPBA(meta-chloroperoxybenzoic acid), H_2O_2 ,
DMDO(dimethyldioxirane), 및 옥손(oxone)으로 이루어진 군으로부터 선택
되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 화합물의 제조방법.

[청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 화학식 25로 표시되는 화합물은 하기 화학식 28로 표시되는 화합물
과 에틸아민을 환원제 존재 하에 반응시켜 제조하는 것을 특징으로 하는,
화합물의 제조방법.

[화학식 28]



[청구항 12] 제5항 또는 제11항에 있어서,
상기 환원제는 소듐시아노보로하이드라이드($NaBH_3CN$), 소듐트리아세
톡시보로하이드라이드($NaBH(OAc)_3$), 및 소듐보로하이드라이드($NaBH_4$)
로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 화합
물의 제조방법.

[청구항 13] 제3항 또는 제6항에 있어서,
상기 산은 피발산(PivOH), 아세트산($AcOH$), 트리플루오로메탄설포산
($TfOH$), 파라톨루엔설포산($TsOH$), 벤조산(Benzoic acid), 브롬화아연
($ZnBr_2$), 염화수소(HCl), 및 트리플루오로아세트산(TFA ; trifluoroacetic
acid)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하
는, 화합물의 제조방법.

[청구항 14] 제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 염기는 탄산칼륨(K_2CO_3), 탄산나트륨(Na_2CO_3), 탄산수소나트륨
($NaHCO_3$), 탄산수소칼륨($KHCO_3$), 브롬화제이구리($CuBr_2$), 탄산세슘(Cs_2
 CO_3), 수산화리튬($LiOH$), 수소화나트륨(NaH), 수소화칼륨(KH), 수산화칼
륨(KOH), 트리에틸아민(TEA ; triethylamine), N,N-다이이소프로필에틸아
민($DIPEA$; N,N-diisopropylethylamine), 피리딘, 및 피페리딘으로 이루어진

군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 화합물의 제조방법.

[청구항 15] 제2항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 제조방법은 유기용매, 물, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 용매에서 이루어지는 것을 특징으로 하는, 화합물의 제조방법.

[청구항 16] 제15항에 있어서,
상기 유기용매는 디클로로메탄(DCM), 디클로로에탄(DCE), 1,4-다이옥산, 테트라하이드로퓨란(THF), 톨루엔, 헥산, 벤젠, 자일렌, 클로로벤젠, 메탄올(MeOH), 에탄올(EtOH), t-아밀알콜(t-AmOH), 트리플루오로에탄올(TFE), 헥사플루오로이소프로판올(HFIP), 아세토니트릴(ACN), 디메틸포름아마이드(DMF), 나이트로메탄, 트리메톡시메탄(CH(OMe)₃), 아세트산, 이소프로판올(IPA), 및 클로로포름으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 화합물의 제조방법.