



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2007년11월16일  
 (11) 등록번호 10-0776184  
 (24) 등록일자 2007년11월07일

(51) Int. Cl.  
*A61K 31/4196* (2006.01) *A61P 35/00*  
 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2002-7015026  
 (22) 출원일자 2002년11월08일  
 심사청구일자 2006년04월18일  
 번역문제출일자 2002년11월08일  
 (65) 공개번호 10-2003-0019371  
 공개일자 2003년03월06일  
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2001/004470  
 국제출원일자 2001년04월19일  
 (87) 국제공개번호 WO 2001/85144  
 국제공개일자 2001년11월15일  
 (30) 우선권주장  
 0011059.3 2000년05월08일 영국(GB)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 국제공개특허 제98/21202호  
 전체 청구항 수 : 총 8 항

(73) 특허권자  
**네르비아노 메디칼 사이언시스 에스.알.엘.**  
 이탈리아 20014 네르비아노(밀라노) 10 비알레 파스테르  
 (72) 발명자  
**제로니마리아크리스티나로사**  
 이탈리아아이-20149밀라노비아코레지오48  
**코지파올로**  
 이탈리아아이-20133밀라노비아자넬라48/5  
**베리아이탈로**  
 이탈리아아이-20014네르비아노비아에스안나16  
 (74) 대리인  
**장훈**

심사관 : 김은희

**(54) 치환된 아크릴로일 디스타마이신 유도체를 포함하는, 고수준의 글루타티온과 관련된 중앙 치료용 약제학적 조성물**

**(57) 요약**

본원 명세서에 기재된 바와 같이, R<sub>1</sub>이 브롬 또는 염소 원자이고 R<sub>2</sub>가 디스타마이신 또는 디스타마이신 유사 구조를 갖는 화학식 I의 α-할로게노아크릴로일 디스타마이신 유도체인 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 종래 항종양 요법에 대해 반응성이 약하거나 심지어 내성을 갖는 GSH/GST 시스템의 과발현에 의한 종양의 치료에서 특히 효과적인 세포독성 제제이다.

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬란드, 일본, 케냐, 키르기스스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터어키, 트리니다드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리제, 모잠비크, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도, 인도네시아, 짐바브웨, 세르비아 앤 몬테네그로, 시에라리온

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 탄자니아, 모잠비크

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기스스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스, 터어키

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우



**청구항 4**

제3항에 있어서, 세포독성 제제가 멜팔란, 클로람부실, 사이클로포스파미드, 이포스파미드 머스타드 및 BCNU를 포함하는 알킬화제; 시스플라틴, 카보플라틴 및 옥살리플라틴을 포함하는 백금 착물; 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신 및 이들의 유도체를 포함하는 안트라사이클린; 에토포시드 및 테니포시드를 포함하는 에피도필로톡신; 빈블라스틴 및 빈크리스틴을 포함하는 빈카 알칼로이드; 및 파클리탁셀 및 도세탁셀을 포함하는 타산으로부터 선택되는 약제학적 조성물.

**청구항 5**

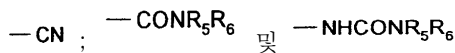
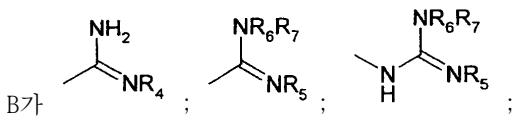
삭제

**청구항 6**

제1항에 있어서, 화학식 I의 α-할로게노아크릴로일 디스타마이신 유도체에서, R<sub>1</sub>이 브롬 또는 염소이고; R<sub>2</sub>가, r이 0이고, m이 0 또는 1이고, n이 4이고, B가 제1항에서 정의된 바와 같은, 화학식 II의 그룹인 약제학적 조성물.

**청구항 7**

제6항에 있어서, 화학식 I의 α-할로게노아크릴로일 디스타마이신 유도체에서, R<sub>1</sub>이 브롬 또는 염소이고; R<sub>2</sub>가, r이 0이고, m이 0 또는 1이고, n이 4이며, X 및 Y가 둘다 CH 그룹이며,



(여기에서, R<sub>4</sub>는 시아노 또는 하이드록시이며; R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub> 및 R<sub>7</sub>은 동일하거나 상이하며, 수소 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알킬이다)로부터 선택되는 제1항에서 정의된 바와 같은 화학식 II의 그룹인 약제학적 조성물.

**청구항 8**

제1항에 있어서, 약제학적으로 허용되는 염의 형태일 수 있는 화학식 I의 α-할로게노아크릴로일 디스타마이신 유도체가 하기 화합물로부터 선택되는 약제학적 조성물:

1. N-(5-[[[5-[[[5-[[[2-[[아미노(이미노)메틸]아미노]에틸]아미노]카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일]아미노]카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일]아미노]카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일]-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복사미드;
2. N-(5-[[[5-[[[5-[[[2-[[아미노(이미노)메틸]아미노]프로필]아미노]카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일]아미노]카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일]아미노]카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일]-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복사미드;
3. N-(5-[[[5-[[[5-[[[3-아미노-3-이미노프로필]아미노]카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일]아미노]카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일]아미노]카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일]-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복사미드;
4. N-(5-[[[5-[[[5-[[[3-아미노-3-이미노프로필]아미노]카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일]아미노]카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일]아미노]카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일]-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복사미드;
5. N-(5-[[[5-[[[5-[[[3-아미노-3-이미노프로필]아미노]카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일]아미노]카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일]아미노]카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일]-3-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-5-카복

스아미드;

6. N-(5-{(5-[(5-[(3-아미노-3-옥소프로필)아미노]카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노]카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노]카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)-3-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피라졸-5-카복스아미드;

7.

N-(5-{(5-[(5-[(2-[(아미노(이미노)메틸)아미노]에틸)아미노]카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노]카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노]카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-[(2-클로로아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복스아미드;

8. N-(5-{(5-[(3-[(아미노(이미노)메틸)아미노]프로필)아미노]카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노]카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복스아미드;

9. N-(5-{(5-[(3-아미노-3-이미노프로필)아미노]카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노]카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복스아미드 및

10. N-{5-[(5-[(3-[(아미노카보닐)아미노]프로필)아미노]카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노]카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노]카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복스아미드.

### 청구항 9

제8항에 있어서, 화학식 I의 α-할로게노아크릴로일 디스타마이신 유도체가 N-(5-{(5-[(5-[(2-[(아미노(이미노)메틸)아미노]에틸)아미노]카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노]카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노]카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복스아미드 염산염인 약제학적 조성물.

### 청구항 10

삭제

### 청구항 11

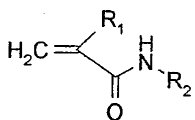
삭제

### 명세서

- <1> 본 발명은 고수준의 글루타티온 및/또는 글루타티온-S-트랜스페라제 부류와 관련된 종양의 치료에 있어서, 치환된 아크릴로일 디스타마이신 유도체, 특히 α-브로모- 및 α-클로로아크릴로일 디스타마이신 유도체의 용도에 관한 것이다.
- <2> 보다 특정적으로, 본 발명은 이하에서 GSH/GST로 언급되는 글루타티온/글루타티온-S-트랜스페라제 부류의 과발현에 의한 종양의 진단을 받은 환자를 상기 아크릴로일 디스타마이신 유도체를 사용하여 치료하는 방법에 관한 것이다.
- <3> GSH는 얼마간의 독성 상해에 의해 생기는 세포 손상에 대해 중대한 보호 역할을 한다. GSH/GST 과발현과 암 또는 화학요법에 대한 암 반응을 사이의 상호관계에 대한 전임상 및 임상 연구가 확립되었다. GSH-계 해독 시스템(GSH 및 GSH 관련 효소인 GST로 구성)의 변경은 몇몇 항종양제에 대한 다양한 반응성에 또한 관련되어 있다.
- <4> GSH 및 GST는 모두, 예를 들어 혈구, 혈장, 혈청, 순환 아세포(circulating blast) 및 병리학적(종양) 조직과 같은 인간의 몇몇 조직에 편재한다. GSH 및 GST에 대하여 일반적으로, 문헌[참조: Cancer Res. 54: 4313-4320(1994); Brit. J. Cancer 72(2): 324-326(1995); DDT 3: 113-121(1998)]을 참조한다.
- <5> GST 및 가장 중요한 GST-π는 다수의 종양 형에서 고수준으로 존재한다. 정상 조직에 비해, 예를 들어 위장관 종양(식도, 위, 결장, 간세포 및 췌장 포함), 자궁암, 난소암, 두경부암, 폐암 및 NSCL 암종(NSCL carcinoma) 뿐 아니라 결장암, 위암 및 방광암으로부터 기원한 전이성 간암을 포함하는 몇몇 종양 조직에서 GSH/GST의 활성이 증가되었음이 밝혀졌다[참조문헌: Cancer Res. 49: 5225-5229(1989); Clinical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology 27(4.5):337-386(1992)].

- <6> 세포독성 약제에 대한 종양 세포의 불활성 및/또는 내성에 대한 GSH/GST의 역할을 입증하기 위해, 두개의 주요한 실험적 연구가 뒤따랐다. 이중 하나는 GSH/GST의 증가된 수준 또는 발현 및 활성은 약제 내성의 증가된 수준과 서로 관련이 있다는 연구를 포함한다. 이러한 연구는 약제 내성을 회피하거나 역행하기 위해, 예를 들어, BSO(부티오닌 설포시딘)와 같은 GSH 억제제에 의한 GSH/GST 활성 조절을 포함한다. 트랜스펙션 연구에서 사용되는 두번째 연구는, GSH/GST가 약제 내성을 야기한다는 직접적인 작용적 증거를 제시한다.
- <7> GSH/GST가 알킬화제[예: 멜팔란(melphalan), 클로람부실(chlorambucil), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파미드 머스타드(ifosfamide mustard), BCNU] 및 백금 착물[예: 시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin)]에 대한 내성에 주요한 역할을 한다는 증거가 있다[참조문헌: Biochem. Pharmacol 35: 3405-3409(1986)]. 최근, 약제 내성에 있어서 GSH의 역할은 안트라사이클린(anthracycline)[예: 독소루비신(doxorubicin), 이다루비신(idarubicin), 에피루비신(epirubicin) 및 이들의 유도체], 에피도필로톡신(epidophyllotoxin)[예: 에토포시드(etoposide) 및 테니포시드(teniposide)], 빈카 알칼로이드(vinca alkaloid)[예: 빈블라스틴(vinblastine) 및 빈크리스틴(vincristine)] 및 타산(taxane)[예: 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel)]을 포함하는 각각 다른 세포독성에 내성을 주는 다약제 내성-관련 단백질[multi-drug resistance-associated protein (MRP)]의 활성 조절과 관련되어 있다[참조문헌: Eur. J. Cancer 32: 945-957(1996); Seminars in Oncol. 24(5): 580-591,(1997)].
- <8> 본 발명에 이르러, 널리 공지된 기타의 세포독성 디스타마이신 유도체와 상이하게, 본 발명의 목적에 따라 하기 제시된 바와 같은 α-브로모- 또는 α-클로로아크릴로일 잔기를 지닌 세포독성 디스타마이신 유도체가 GSH/GST 시스템의 과발현, 종래 항종양 요법에 대해 약하게 반응하고/반응하거나 치료적 세포독성 제제가 투여되면 내성을 유발하는 것으로 공지된 종양의 치료에 대단히 효과적이라는 사실이 밝혀졌다.
- <9> 본원에서 디스타마이신 및 디스타마이신-유사 유도체로서 언급되는 디스타마이신 A 및 이의 유사체는 항종양 치료에 있어서 세포독성 제제로서 당해 기술분야에 공지되어 있다. 디스타마이신 A는 폴리피롤 구조를 갖는 항바이러스 및 항원충(antiprotozoal) 활성을 지닌 항생물질이다[참조문헌: Nature 203: 1064(1964); J. Med. Chem. 32:774-778(1989)]. 본원 출원인의 명칭으로 모두 출원되었으며, 본원에 참조문헌으로 인용되는 국제 공개특허공보 제90/11277호, 제98/04524호, 제98/21202호, 제99/50265호 및 제99/50266호 뿐 아니라 아직 공보가 발간되지 않은 계류 중인 국제 특허출원 제PCT/EP00/11714호(2000년 11월 23일 출원되고 영국 특허원 제 9928703.9호를 우선권으로 주장)에는 아크릴로일 디스타마이신 유도체가 기재되어 있으며, 여기에서 디스타마이신의 아미디노 잔기는 임의로 질소-함유 말단 그룹(예: 시안아미디노, N-메틸아미디노, 구아니디노, 카바모일, 아미독심, 시아노 등)으로 치환되고/되거나 디스타마이신의 폴리피롤 구조 또는 이의 부분은 각종 카보사이클릭 또는 헤테로사이클릭 잔기로 대체된다.
- <10> 따라서, 본 발명의 첫번째 목적은 GSH/GST 시스템의 과발현에 의한 종양 치료용 약제의 제조에서, 하기 화학식 I의 α-할로게노아크릴로일 디스타마이신 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염의 용도이다.

**화학식 I**

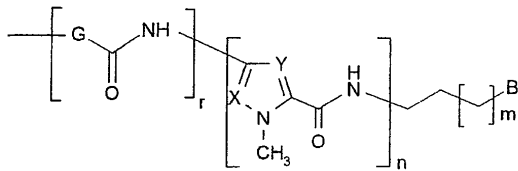


- <11>
- <12> 상기 화학식 I에 있어서,
- <13> R<sub>1</sub>은 브롬 또는 염소 원자이고,
- <14> R<sub>2</sub>는 디스타마이신 또는 디스타마이신-유사 구조이다.
- <15> 본 발명의 바람직한 실시양태에 따라, 상기 화학식 I의 화합물은 GSH/GST 시스템의 과발현에 의한 종양을 치료하는데 유용하며, 당해 종양에는 위장관 종양(식도, 위, 결장, 간세포 및 췌장 포함), 자궁암, 난소암, 두경부암, 폐암 및 NSCL 암종(NSCL carcinoma) 뿐 아니라 위암, 자궁암, 난소암 및 폐암으로부터 유래되는 전이성 간암이 포함된다.
- <16> 본 발명의 추가의 실시양태는 앞서 언급한 화학요법 치료, 예를 들어 알킬화제, 백금 유도체 또는 안트라사이클

린을 사용한 일차 화학요법 치료 결과로서 GSH/GST 시스템을 과발현시키는 종양 치료에 있어서 화학식 I의 화합물의 용도이다.

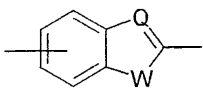
- <17> 보다 특정적으로, 앞서 언급한 화학요법 치료에는 알킬화제[예: 멜팔란, 클로람부실, 사이클로포스파미드, 이포스파미드 머스타드 및 BCNU]; 백금 착물[예: 시스플라틴, 카보플라틴 및 옥살리플라틴]; 안트라사이클린[예: 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신 및 이들의 유도체]; 에피도필로톡신[예: 에토포시드 및 테니포시드]; 빈카알칼로이드[예: 빈블라스틴 및 빈크리스틴]; 및 탁산[파클리탁셀 및 도세탁셀]이 포함될 수 있다.
- <18> 본 발명의 범주 내에는, 개별적으로 또는 혼합물로서 고려되는 화학식 I의 화합물에 포함되는 모든 가능한 이성체의 용도 뿐 아니라 화학식 I의 화합물의 대사 산물 및 약제학적으로 허용되는 생전구체(프로드럭으로도 공지됨)도 포함된다.
- <19> 화학식 I의 화합물 내에서, 달리 특정한 바가 없는 한, "디스타마이신 또는 디스타마이신-유사 구조 R<sub>2</sub>"라는 용어는, 예를 들어, 디스타마이신 및/또는 이의 폴리피롤 구조의 말단 아미디노 잔기, 또는 이의 부분을 대체시킴에 의해 디스타마이신 자체와 구조적으로 밀접하게 관련된 모든 잔기를 의미한다.
- <20> 본 발명의 바람직한 실시양태는 R<sub>1</sub>이 상기한 의미를 가지며, R<sub>2</sub>가 하기 화학식 II의 그룹인 상기 지시된 바와 같은 화학식 I의 화합물의 용도를 제공한다.

**화학식 II**

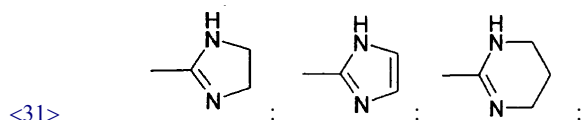
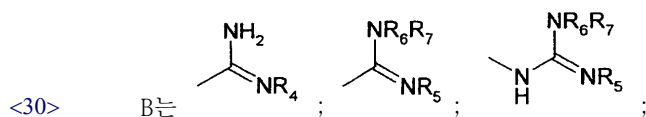


- <21>
- <22> 상기 화학식 II에 있어서,
- <23> m은 0 내지 2의 정수이고;
- <24> n은 2 내지 5의 정수이고;
- <25> r은 0 또는 1이며;
- <26> X 및 Y는 동일하거나 상이하며, 서로 독립적으로 헤테로사이클릭 환, 질소 원자 또는 CH 그룹이고;
- <27> G는 페닐렌; N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 3개의 헤테로원자를 갖는 5원 또는 6원 포화 또는 불포화 헤테로사이클릭 환, 또는 하기 화학식 III의 그룹이고;

**화학식 III**



- <28>
- <29> [화학식 III에 있어서, Q는 질소 원자 또는 CH 그룹이며, W는 산소 또는 황 원자이거나 NR<sub>3</sub> 그룹이고, 여기에서 R<sub>3</sub>은 수소 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알킬이다]

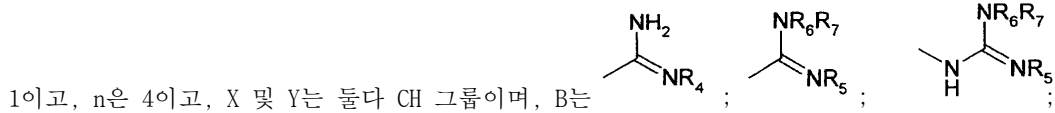


<32>  $-\text{CN}$  ;  $-\text{NR}_5\text{R}_6$  ;  $-\text{CONR}_5\text{R}_6$  및  $-\text{NHCONR}_5\text{R}_6$  로 구성되는 그룹(여기에서,  $\text{R}_4$ 는 시아노, 아미노, 하이드록시 또는  $\text{C}_1\text{-C}_4$ 알콕시이며;  $\text{R}_5$ ,  $\text{R}_6$  및  $\text{R}_7$ 은 동일하거나 상이하며, 수소 또는  $\text{C-C}_4$ 알킬이다)으로부터 선택된다.

<33> 본원 명세서에서, 다른 특정한 언급이 없는 한, " $\text{C}_1\text{-C}_4$ 알킬 또는 알콕시 그룹"이란 용어는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 이소부틸, 2급 부틸, 3급 부틸, 메톡시, 에톡시, n-프로폭시, 이소프로폭시, n-부톡시, 이소부톡시, 2급 부톡시 및 3급 부톡시로부터 선택되는 직쇄 또는 측쇄 그룹을 의미한다.

<34> 본 발명의 보다 바람직한 실시양태는,  $\text{R}_1$ 이 브롬 또는 염소이며;  $\text{R}_2$ 가 상기 화학식 II의 그룹(여기에서, r은 0이고, m은 0 또는 1이고, n은 4이며, B는 상기한 의미를 갖는다)인 상기 화학식 I의 화합물의 용도를 제공한다.

<35> 보다 더 바람직하게는,  $\text{R}_1$ 이 브롬 또는 염소이며;  $\text{R}_2$ 가 상기 화학식 II의 그룹(여기에서, r은 0이고, m은 0 또는



<36>  $-\text{CN}$  ;  $-\text{CONR}_5\text{R}_6$  및  $-\text{NHCONR}_5\text{R}_6$  [여기에서,  $\text{R}_4$ 는 시아노 또는 하이드록시이며;  $\text{R}_5$ ,  $\text{R}_6$  및  $\text{R}_7$ 은 동일하거나 상이하며, 수소 또는  $\text{C-C}_4$ 알킬이다]로부터 선택되는 화학식 I의 화합물의 용도이다.

<37> 화학식 I의 화합물의 약제학적으로 허용되는 염이라 함은, 예를 들어, 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 말론산, 시트르산, 타르타르산, 메탄설폰산, p-톨루엔설폰산 등과 같은 약제학적으로 허용되는 무기산 또는 유기산과의 염이다.

<38> GSH/GST 시스템의 과발현에 의한 종양 치료용 약제의 제조에 있어서, 임의로 약제학적으로 허용되는 염의 형태, 특히 염산과의 염의 형태일 수 있는 화학식 I의 화합물의 바람직한 예는 하기와 같다:

<39> 1. N-(5-((5-((5-((2-([아미노(이미노)메틸]아미노)에틸)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복사미드 염산염;

<40> 2. N-(5-((5-((5-((2-([아미노(이미노)메틸]아미노)프로필)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복사미드 염산염;

<41> 3. N-(5-((5-((5-((3-아미노-3-이미노프로필)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복사미드 염산염;

<42> 4. N-(5-((5-((5-((3-아미노-3-이미노프로필)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-이미다졸-2-카복사미드 염산염;

<43> 5. N-(5-((5-((5-((3-아미노-3-이미노프로필)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)-3-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피라졸-5-카복사미드 염산염;

<44> 6. N-(5-((5-((5-((3-아미노-3-옥소프로필)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)-3-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피라졸-5-카복사미드;

<45> 7. N-(5-((5-((5-((2-([아미노(이미노)메틸]아미노)에틸)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-[(2-클로로아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복사미드 염산염;



- <46> 8. N-(5-{(5-[(3-[(아미노(이미노)메틸]아미노)프로필]아미노)카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐}-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복사미드 염산염;
- <47> 9. N-(5-{(5-[(3-아미노-3-이미노프로필]아미노)카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐}-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복사미드 염산염; 및
- <48> 10. N-{5-[(5-[(3-[(아미노카보닐]아미노)프로필]아미노)카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일}아미노)카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복사미드.
- <49> 상기한 바와 같이 특정적으로 명명되거나 화학식에 의해 표기되는 상기 화학식 I의 화합물은 그 자체가 공지되어 있거나, 예를 들어, 전술한 국제 공개특허공보 제90/11277호, 제98/04524호, 제98/21202호, 제99/50265호 및 제99/50266호 뿐 아니라, 계류 중인 국제 특허출원 제PCT/EP00/11714호에서 기재된 바와 같은 공지된 방법에 따라 쉽게 제조될 수 있다.
- <50> 약리학
- <51> 본 발명에 따른 화학식 I의 화합물은 고수준의 GSH/GST와 관련된 종양의 치료에 매우 효과적이고, 종래 화학적 치료제에 거의 반응하지 않거나 심지어 종래 화학적 치료가 가능하지 않은 몇몇 종양의 치료에 적용할 수 있음이 밝혀졌다.
- <52> 화학식 I의 화합물의 세포독성 활성에 대한 GSH의 역할은, 당해 화합물을 모세포주(parental cell line)의 것보다 높은 GSH/GST의 수준을 나타내는 화학내성 종양 세포 아계(subline)에 대해 시험함으로써 조사하였다. 사용된 모델은 정상 L1210( $7.7 \text{ nmol}/10^6$  세포) 세포주에 대해 GSH( $25.8 \text{ nmol}/10^6$  세포)의 3배 증가된 양을 나타내는 멜팔란(L-PAM) 내성 마우스 백혈병(L1210/L-PAM)이다(표 1).
- <53> 화학식 I의 시험 화합물은,
- <54> N-(5-{(5-[(5-[(2-[(아미노(이미노)메틸]아미노)에틸]아미노)카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐}-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복사미드 염산염 - 내부코드 PNU 166196 및
- <55> N-(5-{(5-[(5-[(3-아미노-3-이미노프로필]아미노)카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐]-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-[(2-브로모아크릴로일)아미노]-1-메틸-1H-피롤-2-카복사미드 염산염 - 내부코드 PNU 151807이다.
- <56> 동일한 실험 조건 하에서, 탈리머스틴(tallimustine)으로 더 잘 알려진 디스타마이신 유도체 3-[1-메틸-4-[1-메틸-4-[1-메틸-4-[1-메틸-4-[N,N-비스(2-클로로에틸)아미노]벤젠카복사미도]피롤-2-카복사미도]피롤-2-카복사미도]-피롤-2-카복사미도]프로피온아미딘 및 L-PAM이 대조구로서 시험되었다.
- <57> 표 1에 기재된 데이터는 화학식 I 화합물의 세포독성이 L1210 세포에 비해 L1210/L-PAM 세포 상에서 3배 증가되었음을 명확하게 보여준다(PNU 166196 = 각각  $IC_{50}$  0.49 및  $1.62 \text{ ng}/\text{mL}$ ; PNU 151807 = 각각  $IC_{50}$  0.26 및  $0.86 \text{ ng}/\text{mL}$ ). 탈리머스틴의 세포독성은 두개의 세포주에서 서로 필적하며; 반대로 L-PAM의 세포독성은 L1210 세포 상에서보다 L1210/L-PAM 세포 상에서 더 낮다.

**표 1**

<58>

세포주	GSH( $\text{nmol}/10^6$ 세포)	세포독성 <sup>a</sup> $IC_{50}$ ( $\text{ng}/\text{mL}$ )			
		PNU 166196	PNU 151807	탈리머스틴	L-PAM
L1210	7.7	1.62	0.86	22.5	1650
L1210/L-PAM	25.8	0.49	0.26	27.4	8100

a) 세포를 화합물과 함께 48시간 동안 배양하였다. 성장 억제는 생존한 세포를 카운팅하여 측정되었다.

<59> 화학식 I의 화합물의 세포독성에 대해 GSH 수준이 관련있다는 추가적 증거는, 이의 세포독성 및 아포토시스 효

과에 대한 인체의 난소세포주인 A2780의 감수성에 대한 BSO(L-S.R 부티오닌 설펍시민)를 사용한 선행 치료의 영향을 측정함으로써 수득되었다.

<60> BSO는 GSH 생합성에서 속도 제한 단계인  $\gamma$ -글루타밀시스테인 합성효소의 유효하고 특이적인 억제제이다. BSO에 의한 세포내 GSH의 감소는 다수의 항종양제, 주로 알킬화제(예: 멜팔란 및 클로람부실) 및 백금 착물(예: 시스플라틴, 카보플라틴 및 옥살리플라틴)의 세포 독성을 현저하게 증가시킨다[참조문헌: Chemico-Biological Interactions 111: 239-254(1998)].

<61> 하기 표 2에 나타난 바와 같이, 화학식 I의 대표적인 화합물인 PNU 166196의 세포독성(성장 억제율(%)) 및 아포토시스 효과(아포토시스 형태를 갖는 세포(%))는 BSO-비처리된 세포에 비해 BSO로 전처리된 A2780 세포에서 현저하게 감소되었다.

**표 2**

처리 <sup>(a)</sup>	투여량	성장 억제율(%)	아포토시스(%)
PNU 166196	300(ng/ml)	43 ± 2.5	17.5 ± 6.5
	1000(ng/ml)	64.5 ± 14.5	49.5 ± 15.5
	3000(ng/ml)	77.5 ± 6.5	74.5 ± 15.5
PNU 166196 + BSO 0.1 mM	300(ng/ml)	31.5 ± 2.5	1.5 ± 0.5
	1000(ng/ml)	33 ± 11	5.5 ± 2.5
	3000(ng/ml)	38 ± 7	11.5 ± 5.5
BSO <sup>(b)</sup>	MM	2.5 ± 0.2	0

(a) 세포를 화합물과 함께 48 시간동안 배양시켰다. 성장 억제는 생존한 세포를 카운팅하여 측정하고, 아포토시스는 형태학적 실험에 의해 평가하였다.  
 (b) 세포를 PNU 166196로 처리하기 전 및 처리하는 동안 BSO에 24시간 노출시켰다.

<63> PNU 166196는 BSO로 비처리된 세포에 비해 BSO로 전처리된 A2780 세포에서 감소된 세포독성을 나타내었다(3000ng/ml에서 각각 38% 및 77.5% 성장 억제). BSO로 전처리된 종양 세포에서 PNU 166196의 감소된 효능은 아포토시스 형태 +/- BSO를 갖는 세포(%) 시험을 통해 또한 확인되었다(3000ng/ml에서 각각 11.5% 및 74.5%).

<64> 상기 결과는 화학식 I의  $\alpha$ -브로모- 및  $\alpha$ -클로로아크릴로일 디스타마이신 유도체의 시험관내 활성이 고수준의 GSH의 존재에 의해 크게 영향을 받으며, 결과적으로 이들 화합물이 특히 GSH/GST 과발현에 의한 종양 치료에 유용하다는 증거를 뒷받침한다.

<65> 본 발명의 화합물은 통상의 경로, 예를 들어, 정맥내 주사 또는 주입, 근육내, 피하 주사에 의한 비경구, 국부 또는 경구적으로 투여될 수 있다.

<66> 투여량은 환자의 연령, 체중 및 상태와 투여 경로에 따라 다르다. 예를 들어, 성인에게 투여하기 적절한 용량은 약 0.05 내지 약 100mg의 1회량으로, 1일 1회 내지 4회 투여한다.

<67> 약제학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제와 함께 활성 물질로서 화학식 I의 화합물의 유효량을 함유할 수 있으며, 통상적으로 하기의 종래 방법에 의해 제조된다.

<68> 예를 들어, 정맥내 주사 또는 주입용 용액은 담체로서 멸균수를 함유할 수 있거나, 바람직하게는 멸균 수성 등장 염수 용액의 형태일 수 있다. 근육내 주사용 현탁액 또는 용액은 활성 화합물과 함께 약제학적으로 허용되는 담체[예: 멸균수, 올리브유, 에틸 올레이트, 글리콜(예: 프로필렌 글리콜) 및, 경우에 따라 적절한 양의 리도카인 염산염]를 함유할 수 있다. 피부학적 치료용으로서 사용하기 위한, 예를 들어, 크림, 로션 또는 페이스트와 같은 국부 적용 형태에서 활성 성분은 종래 유성 또는 유화 부형제와 함께 혼합될 수 있다.

<69> 예를 들어, 정제 및 캡슐제와 같은 고체 경구 제형은 활성 성분과 함께 희석제(예: 락토스, 텍스트로스, 사카로스, 셀룰로스, 옥수수 전분 및 감자 전분); 운할제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산, 마그네슘 또는 칼슘 스테아레이트, 및/또는 폴리에틸렌 글리콜); 결합제(예: 전분, 아라빅 검, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 카복시메틸-셀룰로스 및 폴리비닐피롤리돈); 붕해제(예: 전분, 알긴산, 알기네이트 및 나트륨 전분 글리콜레이트); 발포 혼합물(effervescent mixture); 염료; 감미료; 습윤제(예: 레시틴, 폴리소르베이트, 라우릴설펍레이트); 및 일반적으로, 약제학적 제형에 사용되는 무독성이며 약리학적으로 불활성인 물질을 포함할 수 있다. 상기 약제학적 제제는,

예를 들어, 혼합, 과립화, 정제화, 당-제피 또는 필름-제피 공정과 같은 공지된 수단에 의해 제조할 수 있다.

<70> 또한, 본 발명에 따라, 필요로 하는 환자에게 본 발명의 조성물을 투여하는 것을 포함하는, GSH/GST 시스템의 과발현에 의한 중양의 치료방법이 제공된다.

<71> 본 발명은 하기 실시예에 의해 제한없이 더욱 상세히 예시된다.

## 실시예

<72> 실시예 1

<73> 고수준의 GSH와 관련된 중양에 대한 화학식 I의 화합물의 세포독성 활성

<74> 국제 공개특허공보 제98/04254호 및 제90/11277호에 기재된 바에 따라 각각 제조된 화합물 N-(5-((5-((5-((2-((아미노(이미노)메틸)아미노)에틸)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-((2-브로모아크릴로일)아미노)-1-메틸-1H-피롤-2-카복사미드염 산염 (PNU 166196) 및 N-(5-((5-((5-((3-아미노-3-이미노프로필)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)아미노)카보닐)-1-메틸-1H-피롤-3-일)-4-((2-브로모아크릴로일)아미노)-1-메틸-1H-피롤-5-카복사미드 염산염 (PNU 151807)을 멸균수 중에 용해시키고, 곧바로 실험용으로 사용하였다.

<75> 세포독성 활성은 L1210 마우스 림프성 백혈병 세포주 및 L-PAM 내성 세포 아계 L1210/L-PAM 상에서 측정하였다. 세포를 시험관내에서 안정화된 현탁액 배양물로서 성장시켰다. L1210 세포는 β-머캅토에탄올(10 μM)을 함유한 RPMI 1640 배지 중에 유지시켰다. L1210/L-PAM 세포는 β-머캅토에탄올(50 μM)을 함유한 RPMI 1640 배지 중에 유지시켰다. 모든 배양 배지(구입처: Biowhittaker, UK)를 10% 우태혈청(구입처: Biological Industries, Israel) 및 2mM L-글루타민(구입처: Biowhittaker, UK)으로 보충하였다.

<76> 세포독성 활성은 급격히 성장하는 세포에 대해 측정하였다. L1210 및 L1210/L-PAM 세포를, 50,000 세포/ml의 농도로 24웰-플레이트 중에 씨딩하고, 곧바로 48시간 동안 약물 처리하였다.

<77> 세포 성장의 억제제는 컬터카운터(Coulter Counter)를 사용하여 생존한 세포를 카운팅하여 평가하였다. 약물의 항증식 활성은 투여량-반응 곡선으로부터 계수하고, IC<sub>50</sub>(비처리된 대조구에 비한 처리된 배양물에서의 세포 성장을 50% 억제하는 농도)으로 나타내었다. 모든 실험은 2회씩 수행하였다.

<78> 결과는 첨부된 표 1 및 그 설명에 기재하였다.

<79> 실시예 2

<80> BSO로 전처리된 A2780 세포에 대한 PNU 166196의 세포독성 및 아포토시스 효과

<81> 화합물 PNU 166196(상기 실시예 1 참조)을 멸균수 중에 용해시키고, 곧바로 실험에 사용하였다. BSO를 멸균수 중에 용해시키고, 0.2 μm 필터로 여과시켰다.

<82> 세포독성 활성은 A2780 인체 난소 암종 세포주 상에서 측정하였다. 세포를, 10% 우태혈청(구입처: Biological Industries, Israel) 및 2mM L-글루타민(구입처: Biowhittaker, UK)으로 보충된 RPMI 1640 배지(구입처: Biowhittaker, UK) 중에 단층 배양물로서 시험관내에서 성장시켰다.

<83> 세포독성 활성은 급격히 성장하는 세포에 대해 측정하였다. A2780 세포를, 100,000 세포/ml의 농도로 6웰-플레이트 중에 2ml로 씨딩하고, 24시간 동안 GSH 억제제인 BSO를 사용하여 배양하고, 최종적으로 PNU 166196의 각각 다른 농도에 노출시켰다(비처리된 세포는 배지만을 사용하여 배양하였다).

<84> 약물로 24시간 처리 후, 세포 성장 억제는 형태학적 평가에 부유 세포를 사용하는 단층 세포 상에서 평가하였다.

<85> 아포토시스는 형광 현미경에 의해 평가하였다. 처리 말기에서, 부유 세포를 수집하고, PBS로 세척하고, 70% 빙냉 에탄올로 고정하고, 분석하기까지(최대 5일) -20℃에서 저장하였다. 이어서, 세포를 원심분리하고, 펠렛을 프로피디움 요오드화물 50 μg/ml, 0.001% Nonidet P-40 및 60U/ml Rnase로 착색하고, 어두운 곳에서 30분 동안 37℃로 저장하였다. 세포를 원심분리하고, 펠렛을 50 μM PBS 중에 재현탁시켰다. 독립적으로 제조된 2가지 도

포 표본으로부터 임의로 선택된 600개 이상의 세포를, 이의 핵 형태 변화(염색질 응축 및 DNA 단편화)에 대해 형광 현미경을 사용하여 시험하였다[참조문헌: Int. J. Cancer 65:491-497(1996)]. 모든 실험은 2회씩 수행하였다. 결과는 첨부된 표 2 및 그 설명에 기재되어 있다.