



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

(45) 공고일자 2020년09월25일  
(11) 등록번호 10-2160316  
(24) 등록일자 2020년09월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07J 9/00 (2006.01) A61K 31/575 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01) C07J 41/00 (2006.01)  
C07J 75/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2014-7034290  
(22) 출원일자(국제) 2013년05월07일  
심사청구일자 2018년05월04일  
(85) 번역문제출일자 2014년12월05일  
(65) 공개번호 10-2015-0013254  
(43) 공개일자 2015년02월04일  
(86) 국제출원번호 PCT/IB2013/053669  
(87) 국제공개번호 WO 2013/168096  
국제공개일자 2013년11월14일  
(30) 우선권주장  
12305518.8 2012년05월10일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
61/656,151 2012년06월06일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
Chinese Journal of Medicinal Chemistry. Vol.  
15, no. 1, pp. 12-15 (2005) 1부.\*  
W01997045440 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
베타 인노브  
프랑스 에프-75015 파리 튀 루엘르 49  
(72) 발명자  
끌레히용, 루도비크  
프랑스 에프-34980 생 젤리 뒤 페스크 튀 모리스  
하벨 71  
메르젤, 마르셀  
프랑스 에프-34080 몽펠리에 레 호 드 마싼느 튀  
드 바카레스 23 체즈 파밀레 비농 자크  
쁘띠, 디디에  
프랑스 에프-34000 몽펠리에 튀 드 포르토 3  
(74) 대리인  
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 16 항

심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 스테롤 유도체 및 형질전환된 정상세포와 관련된 질환 또는 악성 혈액병증을 치료하기 위한 그의 용도

**(57) 요약**

본 발명은 신규 스테롤 유도체, 그의 제조 방법, 그를 함유하는 제약 조성물, 및 형질전환된 정상세포와 관련된 질환 또는 악성 혈액병증을 치료하기 위한 그의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 특히 다형성 교모세포종뿐만 아니라, 다른 암, 예컨대 림프종, 신경모세포종 및 흑색종의 치료에 관한 것이다.

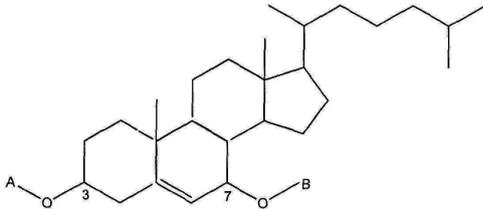
**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

7베타-히드록시스테롤 기본 구조를 갖는 하기 화학식 I의 화합물.

<화학식 I>



상기 식에서,

- A는

$-(R_1)_n-$  기를 나타내며, 여기서  $R_1$ 은 그의 C-말단에 의해 결합된 아미노산 잔기이고,  $n = 1$  또는 2이고, 각각의  $R_1$ 은 동일하거나 상이하고, 여기서 상기 아미노산의 N-말단은 아릴알콕시카르보닐 기로 치환되거나; 또는

아릴알콕시카르보닐 기로 N-말단 상에서 임의로 치환된, 글리시닐 라디칼에 연결된 알라닐 라디칼을 나타내거나; 또는

$-C(O)R_6$  기를 나타내며, 여기서  $R_6$ 은 비치환되거나 하나 이상의 선형 또는 분지형  $C_1-C_6$  알킬로 치환된, 5 내지 14개의 구성원을 포함하며 1 또는 2개의 헤테로원자를 포함하는 포화 헤테로사이클이고;

- B는  $-C(O)R_7$  기를 나타내며, 여기서  $R_7$ 은 선형 또는 분지형  $C_1-C_{12}$  알킬 또는  $C_1-C_6$  알킬이거나; 또는  $R_7$ 은  $OR_8$  을 나타내며, 여기서  $R_8$ 은 선형 또는 분지형  $C_1-C_{12}$  알킬이다.

**청구항 2**

제1항에 있어서,

- A는  $-(R_1)_n-$  기를 나타내며, 여기서  $R_1$ 은 아미노산 잔기이고,  $n = 1$  또는 2임;

- A는  $-(R_1)_n-$  기를 나타내며, 여기서  $R_1$ 은 아미노산 잔기이고,  $n = 1$  또는 2이고, 상기 아미노산의 N-말단은 아릴알콕시카르보닐 기로 치환됨;

- A는 아릴알콕시카르보닐 기로 N-말단 상에서 임의로 치환된, 글리시닐 라디칼에 연결된 알라닐 라디칼을 나타냄;

- A는 아릴알콕시카르보닐 기로 N-말단 상에서 임의로 치환된, 글리시닐 라디칼에 연결된 메티오닐 라디칼을 나타냄

의 조건 중 적어도 하나를 충족하는 화학식 I의 화합물.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 아릴알콕시카르보닐 기가 벤질옥시카르보닐인 화학식 I의 화합물.

**청구항 4**

제1항에 있어서, A가  $-C(O)R_6$  기를 나타내며, 여기서  $R_6$ 은 2,2-디메틸-1,3-디옥솔란 기인, 화학식 I의 화합물.

**청구항 5**

제1항에 있어서, B가, 알킬 기가 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>인 아실 기, 또는 알킬 기가 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>인 알콕시카르보닐 기를 나타내는 것인 화학식 I의 화합물.

**청구항 6**

제1항에 있어서, B가 아세틸인 아실기, 또는 tert-부톡시카르보닐 기인 알콕시카르보닐 기를 나타내는 것인 화학식 I의 화합물.

**청구항 7**

제1항에 있어서,

- 7-((tert-부톡시카르보닐)옥시)-10,13-디메틸-17-(6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카히드로-1H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일 2-(2-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)-아세트아미도)프로파노에이트 (분자 1.a);

- 7-아세톡시-10,13-디메틸-17-(6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카히드로-1H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일 2-(2-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)-아세트아미도)프로파노에이트 (분자 1.b);

- 7-((tert-부톡시카르보닐)옥시)-10,13-디메틸-17-(6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카히드로-1H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일 2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-카르복실레이트 (분자 2.a);

- 7-아세톡시-10,13-디메틸-17-(6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카히드로-1H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일 2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-카르복실레이트 (분자 2.b)

의 화합물로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 화학식 I의 화합물.

**청구항 8**

- 보호기로 콜레스테롤의 위치 3에서의 히드록실 관능기를 보호하는 단계,

- 위치 7에 케톤 관능기를 도입하는 단계,

- 케톤 관능기를 히드록실 관능기로 환원시키는 단계,

- B 기에 상응하는, 위치 7에서의 히드록실 관능기에 대한 보호기를 도입하는 단계, 및

- 위치 3에서의 히드록실 관능기를 탈보호하는 단계

를 포함하는 것을 특징으로 하는, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 화학식 I의 화합물의 제조 방법.

**청구항 9**

제8항에 있어서, 탈보호 후, 위치 3에서의 히드록실 관능기가 목적하는 A 기로 치환될 수 있는 것인 방법.

**청구항 10**

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 화학식 I의 하나 이상의 화합물 및 제약상 허용되는 비히클을 포함하는, 다형성 교모세포종, 악성 혈액병증, 골수 유형의 악성 혈액병증, 림프종, 신경모세포종 또는 흑색종의 치료에서 사용하기 위한 제약 조성물.

**청구항 11**

제10항에 있어서, 화학식 I의 하나 이상의 화합물을 단독으로 또는 또 다른 활성 성분과 조합하여 포함하는 리포솜으로 이루어진 것을 특징으로 하는 제약 조성물.

**청구항 12**

제10항에 있어서, 화학식 I의 하나 이상의 화합물을 단독으로 또는 또 다른 활성 성분과 조합하여 포함하는 알

콜 용액으로 이루어진 것을 특징으로 하는 제약 조성물.

**청구항 13**

제10항에 있어서, 경구 경로에 의한 투여에 적합함을 특징으로 하는 제약 조성물.

**청구항 14**

제13항에 있어서, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 용액, 에멀전, 경구 현탁액, 점적제, 시럽, 화학식 I의 화합물과 담즙 염과의 착물, 및 리포솜 또는 비-리포솜 형태의 화학식 I의 화합물과 인지질의 조합물로부터 선택된, 경구 경로에 의해 투여하기 위한 제약 조성물.

**청구항 15**

제10항에 있어서, 상기 화학식 I의 화합물이 유일한 활성 성분으로 사용되거나 또는 항암제와 조합하여 사용되는 것을 특징으로 하는 제약 조성물.

**청구항 16**

제10항에 있어서, 상기 치료가 화학식 I의 제1 화합물을 투여하는 하나 이상의 단계 및 제1 화합물과 상이한 화학식 I의 제2 화합물을 투여하는 하나 이상의 단계를 포함하는 순차 치료인 것인, 제약 조성물.

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 신규 스테롤 유도체, 그의 제조 방법, 그를 함유하는 제약 조성물, 및 암 세포로 형질전환된 정상세포와 관련된 질환, 특히 다형성 교모세포종, 또는 특히 형질전환된 골수 세포와 관련된 악성 혈액병증, 또는 림프종을 치료하기 위한 그의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 세포 형질전환은 정상 진행 세포에서 불멸화 세포 및/또는 암성 진행 세포로의 전이에 상응한다. 용어 "형질전환된 세포" 또는 "암 세포"는 이하에서 동의어로 사용될 것이다.

[0003] 등급 IV 정상세포종으로도 알려진 다형성 교모세포종 (GBM)은, 특히 등급 I, 등급 II 및 등급 III의 신경교종을 거쳐 정상세포의 암 세포로의 형질전환을 특징으로 하는 뇌 종양이다.

[0004] 종양학 분야에서의 상당한 과학적 및 치료적 진보에도 불구하고, GBM은 여전히 불치의 암이다. 기껏해야, 환자

의 평균 수명(median life)이 수개월, 최대한으로 잡아도 15개월까지 연장될 수 있는 경우 연구원들 및 의사들은 만족한다.

- [0005] GBM의 치료에서 직면하는 문제 중의 하나는 줄기 세포에 기인한 재발이다. 실제로, 심지어 기존 요법이 대부분의 종양을 근절시키는데 성공하는 경우에도, 줄기 세포는 종종 새로운 종양의 발생을 유발시킨다 (1,2).
- [0006] 현재 요법은 종양의 위치가 이를 허용한다면, 항상 종양의 절제술, 뒤이어 적절한 경우 방사선요법 및/또는 화학요법으로 이루어진다. 화학요법에서, 선두적인 치료 중 하나는 이중요법(bitherapy)이며, 이는 아바스틴(VEGF의 그의 수용체에 대한 결합의 억제) 및 이리노테칸(토포이소머라제 I의 억제제)을 투여하는 것으로 이루어진다. 프로카르바진(DNA 알킬화제), 로무스틴(CCNU; 비특이적 알킬화제) 및 빈크리스틴(미세관(microtubule) 중합의 억제)의 조합인, PCV 유형의 삼중요법(tritherapy)은, 현재 대단히 논란의 소지가 많다. 구아닌 알킬화제인 테모졸로미드는, 방사선요법과 조합하여, 특히 과메틸화된(hypermethylated) DNA를 가진 환자에 대해 평균 생존기간(median survival)의 증가를 나타낸다. 임상 시험(상 III), 실렌기티드(cilengitide)(일부 인테그린 수용체의 억제) 및 탈람파넬(talampanel)(AMPA 유형의 글루타메이트 채널의 차단)의 시험이 진행 중이다.
- [0007] 면역요법 연구 및 임상 시험은 두 유형이다:
- [0008] - 적응 면역요법으로서, 여기서 시험관내에서 활성화된 세포, 예컨대 림포카인-활성화 킬러 세포(lymphokine-activated killer cell)(LAK; 상 II 임상 시험)를 환자에게 주사하거나 세포독성 T 림프구(CTL; 상 I 임상 시험)를 두개내 주사한다. 현재는, 20개월의 생존을 나타내는 관찰 결과가 있으며, 이는 매우 미미하다.
- [0009] - 능동 면역요법으로서, 이는 백신(상 I) 및 수지상 세포(상 II)를 사용하는 것으로 이루어진다. 이는 환자 생존에서의 상당한 개선을 나타내지 않는다. 이들 시험은 중단되었다.
- [0010] 항암 잠재력(potential)을 갖는 분자의 벡터로서 아데노바이러스, 레트로바이러스 또는 홍역 바이러스를 사용하는 것으로 이루어진 유전자 요법은, 단지 6 내지 11개월의 생존에서의 개선을 나타낸다. GBM에서의 의약의 수송체로서 신경 줄기 세포의 사용을 제안하는 세포 요법은 기초 연구에서 여전히 시험 단계에 있다.
- [0011] 최근 수십 년에 다소 등한시되어 왔고, 다시 부상되는 접근법은, 당분해 및 산화적 인산화의 수준에서의 작용으로 이루어진다. 암 세포는 그의 글루코스 소비를 증가시키는데 그 이유는, 비록 산소 공급이 제한 인자가 아니더라도, 암 세포가 혐기적 대사를 향한 그의 대사를 변형시키는 경향이 있기 때문이다. 바르부르크(Warburg)(3)에 의해 관찰된 이러한 현상은 HIF(저산소 유도 인자) 및 Myc 프로-종양유전자(pro-oncogene)의 과발현으로 인한 것이다. HIF는 혐기적으로, 호기성 호흡에서 주요 효소인 피루베이트 데히드로게나제를 불활성화시킴으로써 피루베이트에서 락테이트로의 전환을 증가시킨다. Myc는 혐기성 호흡에 관여하는, 글루타민의 생합성을 자극한다(4).
- [0012] 이러한 맥락에서, 에너지 대사에 작용하는 임상 시험이 진행 중이다. 예로서 다음이 언급될 수 있다(4):
- [0013] - 메트포르민: 미토콘드리아 호흡 복합체 I의 억제제이고, 이는 결국 AMPK를 유도하고, 이는 세포 증식을 둔화시킨다;
- [0014] - 포레틴(phoretine): 글루코스 유입을 감소시키는 작용제;
- [0015] - 페닐아세테이트: 글루타민 수준을 감소시키는 작용제;
- [0016] - 디클로로아세테이트: 피루베이트 데히드로게나제의 억제제.
- [0017] 디클로로아세테이트를 제외하고 이들 모든 분자가 시험 중이고(상 II 임상 시험)이고 관찰 결과는 현재 아직 알려져 있지 않다.
- [0018] 본 발명에 이르러 GBM의 기원에서의 세포 유형인 정상세포의 에너지 대사의 특이적 측면을 표적으로 하는 스테로이드 유도체를 다형성 교모세포종을 치료하기 위해 사용할 수 있는 것으로 밝혀졌다.
- [0019] 본 발명의 원래 측면은(신경교 기원의) 정상세포의 특정의 에너지 대사를 사용하는 것으로 이루어지며, 그의 형질전환은 궁극적으로 GBM의 형성을 야기한다.
- [0020] 실제로, 정상세포는 동시에, 산화적 인산화(미토콘드리아에서 전자 수송에 커플링되는 크렙스 회로(Krebs cycle))를 통해 및 당분해를 통해, ATP의 형태로 에너지의 공급을 이용하며: 후자에서, 피루베이트는 크렙스 회로에 진입하지 않지만, 유형 5의 효소 락테이트 데히드로게나제(LDH)에 의해 락테이트로 환원된다. ATP 공급

이외에도, 정상세포는 락테이트의 생성을 통해 당분해를 이용하여, 인접 세포, 뉴런에게 신경전달물질 (글루타메이트)을 공급한다.

[0021] 하기 표에서, 정상 또는 암성 정상세포의 에너지 대사를 다른 세포의 것과 개략적으로 비교하였다:

	정상세포		다른 세포	
	미토콘드리아 호흡	당분해	미토콘드리아 호흡	당분해
정상 세포	50%	50%	90%	10%
암 세포	<b>GBM 1%</b>	<b>GBM 99%</b>	1%	99%

[0022]

[0023] 정상세포의 에너지 대사는 특수하며: 실제로, 미토콘드리아 호흡 및 당분해는 협력하여 기능한다.

[0024]

본 발명에 따른 스테롤 유도체를 제조하는 전략의 기반을 형성하는 것은, 정상 정상세포의 이러한 특이적 대사적 이중성(metabolic duality), 즉 한편으로는 미토콘드리아 호흡, 및 다른 한편으로는 당분해이다.

[0025]

실제로, 본 발명자들은 작업 가설을 제안하였고 그에 따르면 본 발명에 따른 스테롤 유도체는 당분해로부터 미토콘드리아 호흡으로의 암성 정상세포의 에너지 대사 (그의 사멸을 야기하게 될 것인 과정)를 지향할 수 있다.

[0026]

7β-히드록시콜레스테롤 (7β-OHCH), 높은 항암 잠재력을 갖는 분자 (5,6)는 불멸화 (자발적으로 형질전환된) 래트 정상세포주(astrocyte lines) (7,8) 및 "시험관내" GBM (래트주 C6) (9)에 대해 현저한 세포독성을 나타낸다. 연구들은 세포내 지방산에 의해 C3-OH에서 7β-OHCH의 에스테르화 (7β-OHCH-C3-에스테르의 형성)가 모 분자, 7β-OHCH의 독성 효과에 강하게 연루되어 있었음을 실증한다 (7, 8, 10).

[0027]

그러나, "시험관내" GBM에 대해, C3-OH에서 에스테르화되든 또는 아니든, 7β-OHCH의 작용 메카니즘은 결코 해명되지 않았다. 최근에, C6 주에 대해 수행된 연구들에 의하면 7β-OHCH가 세포 에너지 대사에서의 주요 효소인 단백질 키나제 Akt의 것을 포함하는 특정 세포 메신저의 개시 부위인 원형질막에서의 래프트(raft), 마이크로도메인의 구조 및 동역학을 조절하는 것으로 나타났다 (11). 실제로, 옥시스테롤은, 특히 정상 세포의 암 세포로의 형질전환 동안, 래프트의 구조를 교란시킴으로써, 결과적으로 Akt의 활성화에 영향을 줄 것이고: Akt는 이들 세포에서 글루코스의 캡처(capture) 및 당분해 활성을 조절한다.

[0028]

놀랍게도, 본 발명에 이르러, 위치 3에서 치환기 및 위치 7에서 보호기를 함유하는 7베타-히드록시콜레스테롤 기본 구조를 갖는 본 발명에 따른 스테롤 유도체는, 동시에 고-등급 암성 정상세포의 에너지 공급에 필수적인 당분해의 억제를 가능하게 하고, 동시에 이러한 세포에 또한 "치명적인" 미토콘드리아 호흡을 회복시킬 것으로 밝혀졌다.

[0029]

실제로, 이러한 이중 작용은 암 세포의 "과열"을 야기하며, 이는 그의 사멸을 야기한다.

[0030]

더욱이, 본 발명에 따른 스테롤 유도체는 또한 줄기 세포에 대하여 활성을 갖고, 따라서 교모세포종 세포의 전체 파괴를 가능하게 하는 것으로 확인되었다.

[0031]

교모세포종에 대하여 본 발명에 따른 스테롤 유도체의 활성은 또한 그의 사용이, 하기에서 설명되는 바와 같이, 골수 세포의 세포 대사와 정상세포의 것과의 유사성으로 인해 골수 유형(myeloid type)의 악성 혈액병종의 치료에서; 신경모세포종의 치료에서 (뉴런은 정상세포와 동일한 발생학적 및 세포 기원을 가짐); 및 흑색종의 치료에서 (멜라닌세포는 정상세포와 동일한 발생학적 기원을 갖기 때문) 구상될 수 있음을 의미한다.

[0032]

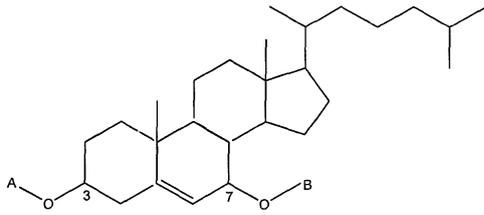
더욱이, 골수주(myeloid line) 및 멜라닌세포주(melanocytes line)가 공통 기원, 즉 다능성 조혈 줄기 세포(pluripotent haematopoietic stem cell)를 갖는다는 사실은, 또한 림프종을 치료하기 위한 본 발명에 따른 스테롤 유도체의 사용을 구상가능하게 한다.

**발명의 내용**

[0033]

따라서 본 발명은 하기 화학식 I의 화합물에 관한 것이다.

[0034] <화학식 I>



[0035]

[0036]

상기 식에서,

[0037]

- A는

[0038]

-(R<sub>1</sub>)<sub>n</sub>- 기를 나타내며, 여기서 R<sub>1</sub>은 그의 C-말단(terminal end)에 의해 결합된 아미노산 잔기이고, n = 1 또는 2이고, 각각의 R<sub>1</sub>은 동일하거나 상이하고, 여기서 상기 아미노산의 N-말단은 -C(O)-R<sub>2</sub> 기 또는 R<sub>3</sub>-C(O)-O- 또는 R<sub>3</sub>-C(O)- 기로 치환될 수 있고, 여기서 R<sub>2</sub>는 모노- 또는 폴리시클릭 C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> 아릴알킬 기이고, R<sub>3</sub>은 비치환되거나 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬이고, 여기서 R은 수소, 선형 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬 또는 비치환 C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> 아릴을 나타내거나; 또는 R<sub>3</sub>은 비치환되거나 하나 이상의 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 또는 상기 정의된 바와 같은 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된 C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> 아릴 또는 C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub> 헤테로아릴 기 이거나; 또는

[0039]

비치환되거나 하나 이상의 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬로 치환된, 동일하거나 상이할 수 있는, 1개 이상의 헤테로원자를 포함할 수 있는 모노- 또는 폴리시클릭 C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub> 헤테로아릴알킬 기; 비치환되거나 하나 이상의 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> 알킬로 치환된, 동일하거나 상이할 수 있는, 모노- 또는 폴리시클릭 C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> 아릴알킬옥시 기 또는 1개 이상의 헤테로원자를 포함할 수 있는 모노- 또는 폴리시클릭 C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub> 헤테로아릴알킬옥시 기를 나타내거나; 또는

[0040]

-C(O)-NH-R<sub>4</sub> 또는 -C(S)-NH-R<sub>4</sub> 기를 나타내며, 여기서 R<sub>4</sub>는 수소; 비치환되거나 상기 정의된 바와 같은 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬 기; 비치환되거나 하나 이상의 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 또는 상기 정의된 바와 같은 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된 C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> 아릴 기; 아실 기; 포르밀 기; 술폰닐 기; 술피닐 기이거나; 또는 R<sub>4</sub>는 알릴 기 또는 당 잔기를 나타내거나; 또는

[0041]

-C(O)-OR<sub>5</sub> 기를 나타내며, 여기서 R<sub>5</sub>는 비치환되거나 상기 정의된 바와 같은 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬이거나; 또는

[0042]

-C(O)-R<sub>6</sub> 기를 나타내며, 여기서 R<sub>6</sub>은 비치환되거나 하나 이상의 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 또는 상기 정의된 바와 같은 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된, 1 또는 2개의 헤테로원자를 포함하는 포화 C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub> 헤테로사이클이거나; 또는 R<sub>6</sub>은 비치환되거나 상기 정의된 바와 같은 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 알킬 기; 비치환되거나 하나 이상의 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 또는 상기 정의된 바와 같은 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된 C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> 아릴 기 또는 C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub> 헤테로아릴 기; 또는 당 잔기를 나타내고;

[0043]

- B는 -C(O)-R<sub>7</sub> 기를 나타내며, 여기서 R<sub>7</sub>은 수소; 비치환되거나 상기 정의된 바와 같은 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, 바람직하게는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬; 비치환되거나 하나 이상의 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 또는 상기 정의된 바와 같은 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된 C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> 아릴 기이거나; 또는 R<sub>7</sub>은 OR<sub>8</sub>을 나타내며, 여기서 R<sub>8</sub>은 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, 바람직하게는 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬이다.

- [0044] 알킬 기는 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> 기, 예컨대 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, sec-부틸, tert-부틸, 펜틸, 이소펜틸, sec-펜틸, tert-펜틸, neo-펜틸, 헥실, 이소헥실, sec-헥실, tert-헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 운데실 또는 도데실 기를 나타내고, 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 기가 바람직하다.
- [0045] 아릴 기는 불포화, 모노시클릭 또는 폴리시클릭, 카르보시클릭 C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> 기, 예컨대 페닐, 나프틸, 인데닐, 안트라세닐 기, 더욱 특히 페닐 기를 나타낸다.
- [0046] 헤테로아릴 기는 동일하거나 상이할 수 있는, 1개 이상의 헤테로원자를 포함하는, 불포화, 모노시클릭 또는 폴리시클릭 C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub> 기, 더욱 특히 퓨린 또는 피리미딘 염기를 나타낸다.
- [0047] "헤테로원자"란 산소, 질소 또는 황 원자를 의미한다.
- [0048] "당 잔기"는, 예를 들어 글루코스, 리보스 또는 아라비노스 유형의 단위를 의미한다.
- [0049] 유리한 아미노산 잔기는, 예를 들어 메티오닐, 글리시닐 또는 알라닐 단위이다.
- [0050] 화학식 I의 바람직한 화합물은 하기 조건 중 적어도 하나를 충족하는 것이다:
- [0051] - A는 -(R<sub>1</sub>)<sub>n</sub>- 기를 나타내며, 여기서 R<sub>1</sub>은 아미노산 잔기이고, n = 1 또는 2임;
- [0052] - A는 -(R<sub>1</sub>)<sub>n</sub>- 기를 나타내며, 여기서 R<sub>1</sub>은 아미노산 잔기이고, n = 1 또는 2이고, 상기 아미노산의 N-말단은 아릴알콕시카르보닐 기, 특히 벤질옥시카르보닐로 치환되거나; 또는 R<sub>3</sub>-C(O)-O- 또는 R<sub>3</sub>-C(O)- 기로 치환되고, 여기서 R<sub>3</sub>은 비치환되거나 상기 정의된 바와 같은 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬이거나; 또는 R<sub>3</sub>은 비치환되거나 하나 이상의 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 또는 상기 정의된 바와 같은 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된 C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> 아릴 또는 C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub> 헤테로아릴 기임;
- [0053] - A는 아릴알콕시카르보닐 기, 특히 벤질옥시카르보닐로 N-말단 상에서 임의로 치환된, 글리시닐 라디칼에 연결된 알라닐 라디칼을 나타냄;
- [0054] - A는 아릴알콕시카르보닐 기, 특히 벤질옥시카르보닐로 N-말단 상에서 임의로 치환된, 글리시닐 라디칼에 연결된 메티오닐 라디칼을 나타냄;
- [0055] - A는 -C(O)-R<sub>6</sub> 기를 나타내며, 여기서 R<sub>6</sub>은 2,2-디메틸-1,3-디옥솔란 기; 또는 비치환되거나 상기 정의된 바와 같은 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 기; 비치환되거나 하나 이상의 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 또는 상기 정의된 바와 같은 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된 C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> 아릴 기 또는 C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub> 헤테로아릴 기; 또는 당 잔기임.
- [0056] 유리하게는, B는 알킬 기가 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>인 아실 기, 특히 아세틸이거나, 또는 알킬 기가 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>인 알콕시카르보닐 기, 특히 tert-부톡시카르보닐 기를 나타낸다.
- [0057] B는 또한, 특히, 비치환되거나 상기 정의된 바와 같은 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 기; 또는 비치환되거나 하나 이상의 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 또는 상기 정의된 바와 같은 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된 C<sub>6</sub>-C<sub>14</sub> 아릴 기를 나타낼 수 있다.
- [0058] 화학식 I의 바람직한 화합물은 다음과 같다:
- [0059] - 7-((tert-부톡시카르보닐)옥시)-10,13-디메틸-17-(6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카히드로-1H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일 2-(2-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)-아세트아미도)프로파노에이트 (분자 1.a);
- [0060] - 7-아세톡시-10,13-디메틸-17-(6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카히드로-1H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일 2-(2-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)-아세트아미도)프로파노에이트 (분자 1.b);
- [0061] - 7-((tert-부톡시카르보닐)옥시)-10,13-디메틸-17-(6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카히드로-1H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일 2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-카르복실레이트 (분자 2.a);

- [0062] - 7-아세톡시-10,13-디메틸-17-(6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카히드로-1H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일 2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-카르복실레이트 (분자 2.b).
- [0063] 화학식 I의 화합물은 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 콜레스테롤로부터 획득될 수 있다:
- [0064] - 보호기, 예를 들어 R<sub>9</sub> 기가 치환 또는 비치환 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 또는 치환 또는 비치환 아릴 기, 특히 아릴알콕시카르보닐 기인 아실옥시 R<sub>9</sub>-C(O)- 기 등으로 콜레스테롤의 위치 3에서의 히드록실 관능기를 보호하는 단계,
- [0065] - 위치 7에 케톤 관능기를 도입하는 단계,
- [0066] - 케톤 관능기를 히드록실 관능기로 환원시키는 단계,
- [0067] - B 기, 예를 들어 아실, 아릴 또는 알콕시카르보닐 기, 또는 아실옥시 R<sub>10</sub>-C(O) 기 (여기서 R<sub>10</sub>은 치환 또는 비치환 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 비치환되거나 하나 이상의 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬로 치환된 아릴, 또는 비치환되거나 하나 이상의 선형 또는 분지형 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬 또는 상기 정의된 바와 같은 OR, NHR 및 SR로부터 선택된 하나 이상의 기로 치환된 C<sub>5</sub>-C<sub>14</sub> 헤테로아릴임) 등에 상응하는, 위치 7에서의 히드록실 관능기에 대한 보호기를 도입하는 단계,
- [0068] - 위치 3에서의 히드록실 관능기를 탈보호하는 단계.
- [0069] 위치 3에서의 히드록실 관능기를 탈보호하는 단계 후, 상기 히드록실 관능기는 목적하는 A 기로 치환될 수 있다.
- [0070] 위치 7에서 케톤 관능기의 도입은 통상의 산화 방법에 의해 수행될 수 있다.
- [0071] 선택적으로 위치 β에서 케톤 관능기를 히드록실 관능기로 환원시키는 것은, 예를 들어 염화세륨 7수화물의 존재하에 NaBH<sub>4</sub>를 사용하여 루체의 방법(Luche's method)에 의해 수행될 수 있다 (12).
- [0072] 본 발명은 또한 화학식 I의 하나 이상의 화합물 및 제약상 허용되는 비히클을 포함하는 제약 조성물 또는 의약에 관한 것이다.
- [0073] 본 발명에 따른 제약 조성물은 화학식 I의 하나 이상의 화합물을 포함하는 리포솜 제제로 이루어질 수 있다. 리포솜은 당업자에게 공지된 다양한 기법에 의해 제조될 수 있다. 리포솜을 구성하는 다양한 지질을 사용할 수 있다 [문헌 (Medical Application of Liposomes (1986) edited by Kunio Yagi, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Karger)].
- [0074] 대안으로, 상기 리포솜은 주로 40 내지 80 nm의 크기 분포를 갖고 시간 경과에 따라 안정한 조성을 갖는 소위 "개선된(improved)" 리포솜 또는 동일한 크기 분포를 갖지만 "개선된" 리포솜의 것보다 더 높은 농도, 특히 50% 더 높은 활성 분자를 포함하는 소위 "농축(concentrated)" 리포솜으로 이루어질 수 있다.
- [0075] "개선된" 리포솜은,
- [0076] - 리포솜에 포함되는 활성 분자 및 인지질을 유기 용매 중에서 접촉시키는 단계,
- [0077] - 용매를 질소 스트림하에 증발시켜 지질 박막(lipid film)을 획득하는 단계,
- [0078] - 지질 박막을 유기 용매에 용해시키는 단계,
- [0079] - 상기 용매를 질소 스트림하에 증발시키고 지질 박막을 수성 완충제에 용해시키는 단계,
- [0080] - 초음파조(ultrasonic bath)에서 초음파처리하는 단계,
- [0081] - 압출에 의해 소포(vesicle)를 획득하는 단계를 포함하는 제조 방법에 의해 획득될 수 있다.
- [0082] 바람직하게는, 초음파처리하는 약 20℃의 온도에서 1분의 10 펄스 동안 수행한다. 압출은 200 nm의 세공 크기를 갖는 PVDF-유형 막 상에서 수행할 수 있다.
- [0083] "농축" 리포솜은,
- [0084] - 리포솜에 포함되는 활성 분자 및 통상의 기법에서 사용된 것보다 더 많은 양의, 특히 통상의 양보다 2배의 인지질을 유기 용매 중에서 접촉시키는 단계,

- [0085] - 용매를 감압하에 증발시켜 지질 박막을 수득하는 단계,
- [0086] - 지질 박막을 유기 용매에 용해시키는 단계,
- [0087] - 상기 용매를 감압하에 증발시키고 지질 박막을 수성 완충제에 용해시키는 단계,
- [0088] - 초음파조에서 초음파처리하는 단계,
- [0089] - 압출에 의해 소포를 수득하는 단계를 포함하는 제조 방법에 의해 수득될 수 있다.
- [0090] 바람직하게는, 초음파처리는 약 20℃의 온도에서 1분의 20 펄스 동안 수행한다. 압출은 200 nm의 세공 크기를 갖는 PVDF-유형 막 상에서 수행할 수 있다.
- [0091] 바람직하게는, 증발은 약 3 kPa (30 mbar) 미만의 압력 및 25℃의 조(bath) 온도에서 수행한다. 바람직하게는 회전 증발기를 사용한다.
- [0092] 인지질에 대하여 활성 분자의 양은, 예를 들어 대략 15% (wt%로 표기됨)일 수 있다.
- [0093] 본 발명의 바람직한 의약은 화학식 I의 하나 이상의 화합물로 충전된 리포솜으로 이루어진다.
- [0094] 바람직하게는, 화학식 I의 화합물(들)은 특히 상기 제약 조성물이 리포솜인 경우, 본 발명에 따른 제약 조성물에 함유된 유일한 활성 성분(들)을 구성한다. 화학식 I의 하나 이상의 화합물을 포함하는 상기 리포솜은, 예를 들어 경구 경로에 의해 또는 비경구 경로에 의해 투여될 수 있다.
- [0095] 대안으로, 화학식 I의 화합물은 또 다른 활성 성분, 예를 들어 항암제, 특히 아바스틴, 이리노테칸, 테모졸로미드 또는 탁솔 유도체 등과 조합하여 사용될 수 있다.
- [0096] 본 발명에 따른 제약 조성물은, 특히 당업자에게 공지된, 주사, 주입 또는 흡입에 의해 경구 투여에 또는 비경구 투여에 임의의 적합한 형태일 수 있다.
- [0097] 특히, 상기 제약 조성물은, 단독 또는 또 다른 활성 성분과 조합된 화학식 I의 하나 이상의 화합물의 제약상 허용되는 용액, 특히 알콜 용액일 수 있고, 이는 수혈(transfusion) 또는 주입에 의해 환자에게 투여될 수 있다.
- [0098] 상기 제약 조성물은, 특히, 경구 또는 설하 경로에 의한 투여에 적합할 수 있다. 통상의 제약 형태, 예를 들어 정제, 캡슐, 분말, 과립, 용액, 에멀전, 경구 현탁액, 점적제, 시럽 등 외에도, 본 발명에 따른 경구 제약 조성물은 화학식 I의 화합물과 담즙 염(biliary salt)과의 착물, 또는 예를 들어, 리포솜 또는 비-리포솜 형태의 화학식 I의 화합물과 인지질, 예컨대 포스파티딜콜린의 조합물을 포함할 수 있다.
- [0099] 형질전환된 정상세포와 관련된 질환의 치료에서, 특히 다형성 교모세포종 또는 등급 IV 정상세포종 (GBM)의 치료에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물이 또한 본 발명의 대상이다. 특히, 화학식 I의 화합물을, 치료 부위에서, 대뇌 피질에 직접 주사할 수 있다.
- [0100] 본 발명은 또한 유효량의 화학식 I의 하나 이상의 화합물을 투여하는 것에 의한, 형질전환된 정상세포와 관련된 질환의 치료, 특히 다형성 교모세포종 또는 등급 IV 정상세포종 (GBM)의 치료에 관한 것이다.
- [0101] 본 발명은 또한 다른 암, 즉 골수 유형의 악성 혈액병증 및 림프종, 신경모세포종 및 흑색종의 치료에 관한 것이다.
- [0102] 골수 유형의 악성 혈액병증의 치료에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물이 또한 본 발명의 대상이다.
- [0103] 본 발명은 또한 유효량의 화학식 I의 하나 이상의 화합물을 투여하는 것에 의한, 골수 유형의 악성 혈액병증의 치료에 관한 것이다.
- [0104] 골수 유형의 악성 병리상태는 정상 골수 세포로부터 발생한다. 이제, 정상 상태에서, 이러한 세포 유형은 정상 세포의 것과 꽤 유사한 에너지 대사를 갖는다: 이는 미토콘드리아 호흡으로부터 및 당분해 (락테이트 경로; LDH)로부터 그의 에너지를 생산한다 (13). 골수 기원의 암의 경우에, 암 세포는 당분해로부터 그의 에너지를 생산한다. GBM의 경우, 화학식 I의 화합물의 항암 활성은 LDH (당분해)의 억제 및 결과적으로, 미토콘드리아 호흡의 고도 급증(high burst)에 기인한 세포의 과열로 인한 것일 수 있다.
- [0105] 림프종의 치료에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물이 또한 본 발명의 대상이다.
- [0106] 본 발명은 또한 유효량의 화학식 I의 하나 이상의 화합물을 투여하는 것에 의한, 림프종의 치료에 관한 것이다.

- [0107] 실제로, 골수주 및 멜라닌세포주는 다능성 조혈 줄기 세포인 공통 기원을 갖기 때문에, 골수 유형의 악성 혈액 병증에 대한 화학식 I의 화합물의 활성은 림프종을 치료하기 위한 그의 사용이 또한 구상될 수 있음을 의미한다.
- [0108] 신경모세포종의 치료에서 이를 사용하기 위한 화학식 I의 화합물이 또한 본 발명의 대상이다.
- [0109] 본 발명은 또한 유효량의 화학식 I의 하나 이상의 화합물을 투여하는 것에 의한, 신경모세포종의 치료에 관한 것이다.
- [0110] 두개외(extracranial) 교감 신경계에 주로 발병하는 신경모세포종에 관하여, 화학식 I의 화합물은 성상세포와 같이, 뉴런은 한편으로는 동일한 발생학적 기원, 즉 외배엽, 및 다른 한편으로는 동일한 세포 기원, 즉 신경상피 세포를 갖기 때문에 (14) 항종양 활성을 나타낸다. 요컨대, 성상세포 및 뉴런은 둘 다 신경 세포이고 화학식 I의 화합물에 동등하게 감수성이다.
- [0111] 흑색종의 치료에서 사용하기 위한 화학식 I의 화합물이 또한 본 발명의 대상이다.
- [0112] 본 발명은 또한 유효량의 화학식 I의 하나 이상의 화합물을 투여하는 것에 의한, 흑색종의 치료에 관한 것이다.
- [0113] 실제로, 흑색종의 기원에 있는 멜라닌세포는, 그 자체가 외배엽으로부터 유래되는 신경 능선으로부터 유래된다 (14). 성상세포 및 뉴런은 또한 외배엽으로부터 유래되고, 화학식 I의 화합물은 항-GBM 및 항-신경모세포종 활성을 나타내기 때문에, 이들 화합물은 또한 흑색종에 대하여 항암 특성을 가질 가능성이 있다.
- [0114] 대안에 따르면, 상기 치료는, 화학식 I의 제1 화합물을 투여하는 하나 이상의 단계 및 제1 화합물과 상이한 화학식 I의 제2 화합물을 투여하는 하나 이상의 단계를 포함하는 순차 치료이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

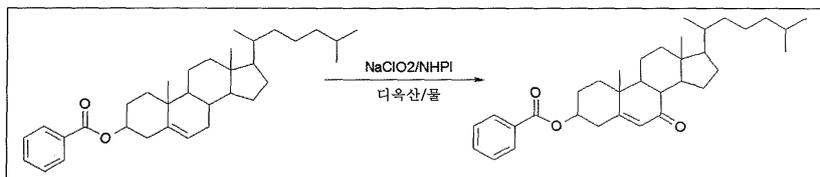
- [0115] 하기 실시예는 본 발명을 예시하지만 이를 제한하는 것은 아니다.
- [0116] 섹션 I은 화학 합성에 관한 것이다.
- [0117] 실시예 1 및 2는 화학식 I의 화합물을 제조하기 위해 사용되는 합성 중간체의 제조에 관한 것이다. 실시예 3 내지 6은 화학식 I의 화합물의 제조에 관한 것이다.
- [0118] 섹션 II는 화학식 I의 화합물의 생물학적 활성에 관한 것이다.

**I/ 화학 합성**

실시예 1: 7베타-아세틸콜레스테롤 (화합물 1.4)의 제조

반응 도표는 도 1에 도시하였다.

1) 화합물 1.1의 제조



[0123]

[0124] 하기 시약을 사용하였다:

	MW	Nb 몰	당량	질량 또는 부피
콜레스테릴 벤조에이트	490.78	100 mmol	-	50 g
아염소산나트륨	90.44	300 mmol	3 당량	28 g
N-히드록시프탈이미드	163.13	10 mmol	0.1 당량	1.7 g
디옥산/물 3/1				500 ml

[0125]

[0126] 콜레스테릴 벤조에이트, 디옥산/물 혼합물, 아염소산나트륨 및 N-히드록시프탈이미드를 그 순서로 콘텐츠가 장

착된 1-리터 3-구 플라스크에 넣었다. 이 혼합물을 6 h 동안 50°C에서 가열하였다. 헥산/Et2O 8/2 중에서 실리카 플레이트 TLC (TLC 실리카겔 60 F254, 머크(Merck))에 의해 반응의 진행을 모니터링하였다.

[0127] 형성 속도가 허용치에 이르렀을 때, 조 반응 혼합물을 아황산나트륨의 10% 용액 (500 ml)에 부은 다음, 에테르로 추출하였다. 수득된 유기 상을 탄산수소나트륨의 포화 용액으로, 그 다음 물로 그리고 마지막으로 염수로 세척하였다. 그 다음, 이러한 유기 상을 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과한 다음, 감압하에 증발시켰다.

[0128] 그 다음, 수득된 착색 오일상 잔류물을 에탄올로부터 재결정화하여 정제하였다. 수득된 백색 고체가 충분한 순도가 아니므로, 이를 실리카겔 크로마토그래피 (실리카 SDS 60A, 35-70 μm)에 의해 다시 정제하였다. 이 오일을 디클로로메탄에 용해시킴으로써 고체 침착물을 수득하였다. 98/2 헥산/에틸 아세테이트에서 90/10의 범위의 용리액 중에서 정제를 수행하였다. 백색 고체의 형태로 생성물을 수득하였다.

[0129] 수율: 23%

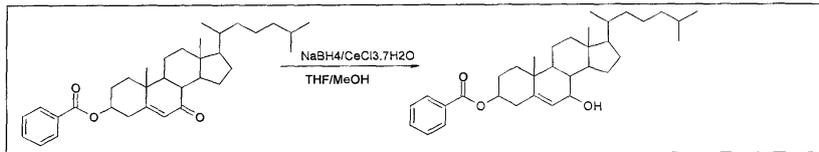
[0130] 분석: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 브루커(BRUKER) 400 MHz)에 의한 분석. HPLC 칼럼 정상 상 키랄셀(CHIRALCEL) O-DH (ODHOCE-CE026 칼럼), 용리액 9/1 헥산/iPrOH, 20 min, 파장 190 nm.

[0131] 체류 시간 6.682 min, HPLC 순도 99.2%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 0.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.89 (dd, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 0.94 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.02-2.78 (m, 26H), 1.27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.99 (m, 1H, CH), 5.76 (d, 1H, CH), 7.44-8.05 (m, 5H, CHAr).

[0132]

[0133] 2) 화합물 1.2의 제조



[0134]

[0135] 하기 시약을 사용하였다:

	MW	Nb물	당량	질량 또는 부피
케토콜레스테릴 벤조에이트	504.76	15.8 mmol	-	8 g
NaBH <sub>4</sub>	37.83	7.9 mmol	0.5 당량 + 0.5 당량	0.3 g + 0.3 g
CeCl <sub>3</sub> .7H <sub>2</sub> O	372.60	14.2 mmol	0.9당량	5.3 g
THF/MeOH 1:1				200 ml

[0136]

[0137] 케토콜레스테릴 벤조에이트, THF/MeOH 용매 혼합물 및 수화된 염화세륨을 500 ml 플라스크에 넣었다. 그 다음, 조 반응 혼합물을 얼음조를 사용하여 0°C로 냉각한 후에, 수소화붕소나트륨을 서서히 첨가하였다. 기체 방출이 관찰되었고, 얼음조를 1 h 동안 유지한 다음, 이를 18 h 동안 주위 온도에서 교반하였다. 80/20 헥산/EtOAc 용리액 중에서 TLC (TLC 실리카겔 60 F254, 머크)에 의해 진행을 모니터링하였다. 형성 속도가 불충분한 경우, 0.5 당량의 수소화붕소나트륨을 첨가하였다.

[0138] 50 ml의 물 및 200 ml의 디클로로메탄을 조 반응 혼합물에 첨가하였다. 분별 깔대기에 옮긴 후, 유기 상을 회수하였다. 수성 상을 DCM으로 다시 추출하였다. 유기 상을 합하고, 1 N 염산 용액으로, 및 그 다음 NaCl의 포화 용액으로 세척하였다.

[0139] 그 다음, 유기 상을 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과하고 감압하에 증발시켜, 약간 착색된 오일을 수득하고, 이는 자발적으로 결정화하였다.

[0140] 잔류물을 DCM에 용해시킴으로써 고체 침착물을 수득하였다. 이러한 조 생성물을 9/1 헥산/EtOAc 용리액 중에서 실리카겔 칼럼 (실리카 SDS 60A, 35-70 μm) 상에서 정제하였다. 백색 고체의 형태로 생성물을 수득하였다.

[0141] 수율: 89%

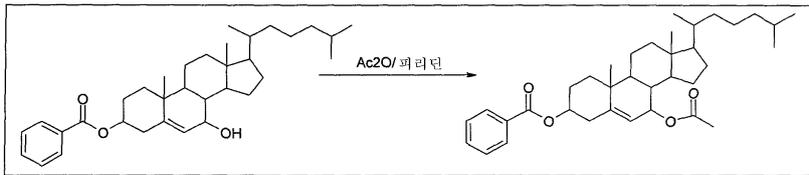
[0142] 분석: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 브루커 400 MHz)에 의한 분석. HPLC 칼럼 정상 상 키랄셀 O-DH (ODHOCE-CE026 칼럼), 용리액 9/1 헥산/iProH, 20 min, 파장 190 nm.

[0143] 체류 시간 7.076 min, HPLC 순도 98.8%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 0.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.79 (dd, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 0.85 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.89-2.43 (m, 27H), 1.04 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.81 (d, 1H, CH), 4.81 (m, 1H, CH), 5.29 (d, 1H, CH), 7.34-7.99 (m, 5H, CHAr).

[0144]

[0145] 3) 화합물 1.3의 제조



[0146]

[0147] 하기 시약을 사용하였다:

	MW	Nb 몰	당량	질량 또는 부피
7-β-히드록시콜레스테릴 벤조에이트	505.76	9.9 mmol	-	5 g
아세트산 무수물				20 ml
피리딘				20 ml

[0148]

[0149] 7-β-히드록시콜레스테릴 벤조에이트, 피리딘, 및 그 다음 아세트산 무수물을 100 ml 플라스크에 넣었다. 혼합물을 16 h 동안 주위 온도에서 교반하였다. 9/1 헥산/EtOAc 용리액 중에서 TLC (TLC 실리카겔 60 F254, 머크)에 의해 진행을 모니터링하였다.

[0150] 조 반응 혼합물을 감압하에 증발시켰다. 에틸 아세테이트로 2회 동시 증발(coevaporation)을 수행하였다. 수득된 잔류물을 에틸 아세테이트에 용해시켰다. 이렇게 수득된 유기 상을 1 N 염산으로 세척하고, 황산나트륨 상에서 건조시킨 다음, 감압하에 증발시켰다.

[0151] 수득된 백색 고체를 추가 정제 없이, 그 다음 단계에서 직접 사용하였다.

[0152] 수율: 100%

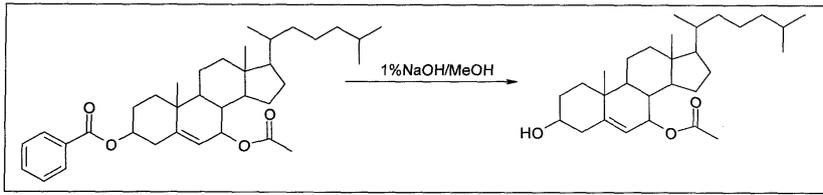
[0153] 분석: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 브루커 400 MHz)에 의한 분석. HPLC 칼럼 정상 상 키랄셀 O-DH (ODHOCE-CE026 칼럼), 용리액 9/1 헥산/iProH, 20 min, 파장 190 nm.

[0154] 체류 시간 4.972 min, HPLC 순도 99.6%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 0.63 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.79 (dd, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 0.84 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.91-2.41 (m, 26H), 1.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.95 (s, 3H, CH<sub>3</sub> 아세틸), 4.78 (m, 1H, CH), 4.99 (d, 1H, CH), 5.21 (s, 1H, CH), 7.33-7.98 (m, 5H, CHAr).

[0155]

[0156] 4) 화합물 1.4의 제조



[0157]

[0158] 하기 시약을 사용하였다:

	MW	Nb몰	당량	질량 또는 부피
7-β-아세틸콜레스테릴 벤조에이트	548.81	9.1 mmol	-	5 g
메탄올 중 1% NaOH				50 ml

[0159]

[0160] 7-β-아세틸콜레스테릴 벤조에이트 및 메탄올 중 1% 수산화나트륨 용액을 100 ml 플라스크에 넣었다. 완전히 용해될 때까지 이 혼합물을 주위 온도에서 교반하였다. 7/3 헥산/EtOAc 용리액 중에서 TLC (TLC 실리카겔 60 F254, 머크)에 의해 진행을 모니터링하였다.

[0161] 반응을 완료시키기 위해, 조 혼합물을 40℃에서 가열시킬 수 있고, 그 경우에 TLC에 의한 모니터링은 20분마다 수행한다.

[0162] 200 ml의 에틸 아세테이트 및 50 ml의 물을 첨가한 후, 분별 깔대기에 옮기고 상을 분리하였다. 수성 상을 에틸 아세테이트로 다시 추출하였다. 유기 상을 합하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과한 다음, 감압하여 증발시켜, 오일상 잔류물을 수득하였다.

[0163] 잔류물을 에틸 아세테이트에 용해시켜 고체 침착물을 제조하였다. 9/1에서 7/3의 범위의 헥산/EtOAc 용리액 중에서 실리카겔 칼럼 (실리카 SDS 60A, 35-70 μm) 상에서 정제를 수행하였다. 기대 생성물을 무색 오일의 형태로 수득하고 이는 자발적으로 결정화하여, 백색 고체를 수득하였다. 칼럼을 100% 에틸 아세테이트로 세척하여 형성된 7-β-히드록시콜레스테롤을 회수하였다.

[0164] 수율: 38%

[0165] 분석: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 브루커 400 MHz)에 의한 분석. HPLC 칼럼 정상 상 키랄셀 O-DH (ODHOCE-CE026 칼럼), 용리액 9/1 헥산/iProH, 20 min, 파장 190 nm.

[0166] 체류 시간 6.186 min, HPLC 순도 91.7%.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 0.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.78 (dd, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 0.85 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.86-2.28 (m, 27H), 1.03 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.96 (s, 3H, CH<sub>3</sub> 아세틸), 3.47 (m, 1H, CH), 4.94 (td, 1H, CH), 5.13 (t, 1H, CH).

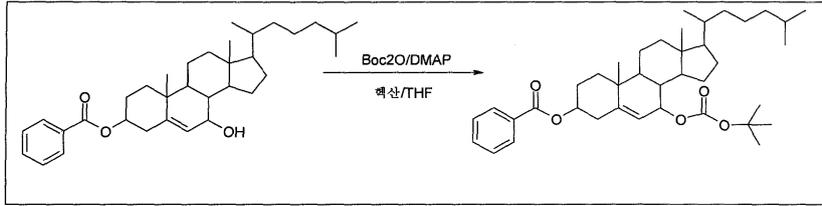
[0167]

[0168] 실시예 2: 7β타-tert-부틸옥시카르보닐콜레스테롤 (화합물 1.6)의 제조

[0169] 반응 도표는 도 2에 도시하였다.

[0170] 화합물 1.6을 실시예 1로부터의 화합물 1.2로부터 제조하였다.

[0171] 1) 화합물 1.5의 제조



[0172]

[0173] 하기 시약을 사용하였다:

	MW	Nb 몰	당량	질량 또는 부피
7-β-히드록시콜레스테릴 벤조에이트	505.76	1.29 mmol	-	0.65 g
Boc2O	218.25	2.8 mmol	2.2 당량	0.61 g
DMAP	122.17	0.13 mmol	0.1 당량	0.016 g
헥산/THF 5:2				42 ml

[0174]

[0175] 7-β-히드록시콜레스테릴 벤조에이트, 용매, 2,6-디메틸아미노피리딘 및 그 다음 tert-부틸옥시카르보닐 무수물을 100 ml 1-구 플라스크에 넣었다. 완전히 용해될 때까지 이 혼합물을 주위 온도에서 교반하였다. 8/2 헥산/EtOAc 용리액 중에서 TLC에 의해 진행을 모니터링하였다.

[0176] 50 ml의 EtOAc 및 10 ml의 물을 첨가하였다. 이렇게 수득된 유기 상을 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과한 다음, 감압하에 증발시켜, 오일상 잔류물을 수득하였다.

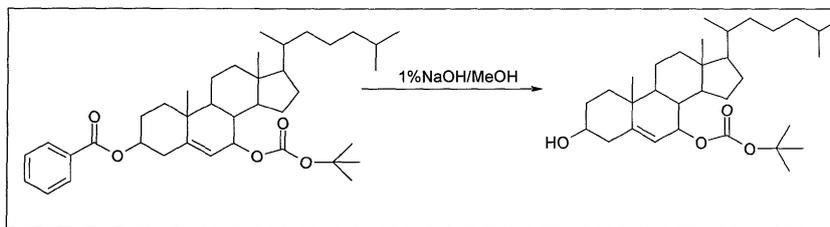
[0177] 잔류물을 EtOAc에 용해시켜 고체 침착물을 제조하였다. 95/5 헥산/EtOAc 용리액 중에서 실리카겔 칼럼 상에서 정제를 수행하였다.

[0178] 분석: CDCl<sub>3</sub> 중 <sup>1</sup>H NMR에 의한 분석.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 0.59 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.77 (dd, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 0.84 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.86-1.98 (m, 24H), 1.09 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.41 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>, t-Boc), 2.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.80 (m, 1H, CH), 4.91 (d, 1H, CH), 5.18 (s, 1H, CH), 7.34-7.97 (m, 5H, CHAr).

[0179]

[0180] 2) 화합물 1.6의 제조



[0181]

[0182] 하기 시약을 사용하였다:

	MW	Nb 몰	당량	질량 또는 부피
7-β-t-부틸옥시카르보닐 콜레스테릴 벤조에이트	606.89	1.64 mmol	-	1 g
1% NaOH MeOH				50 ml

[0183]

[0184] 7-β-t-부틸옥시카르보닐콜레스테릴 벤조에이트 및 메탄올 중 1% 수산화나트륨 용액을 50 ml 1-구 플라스크에

넣었다. 완전히 가용화될 때까지 이 혼합물을 주위 온도에서 교반하였다. 7/3 헥산/EtOAc 용리액 중에서 TLC에 의해 진행을 모니터링하였다. 반응을 완료시키기 위해, 조 혼합물을 40°C로 가열할 수 있었다.

[0185] 100 ml의 EtOAc 및 20 ml의 물을 첨가하였다. 수성상을 EtOAc로 다시 추출하였다. 유기 상을 합하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과한 다음, 감압하에 증발시켜, 오일상 잔류물을 수득하였다.

[0186] 잔류물을 EtOAc에 용해시켜 고체 침착물을 제조하였다. 9/1에서 7/3의 범위의 헥산/EtOAc 용리액 중에서 실리카겔 칼럼 상에서 정제를 수행하였다. 칼럼을 100% EtOAc로 세척하여 형성된 7-β-히드록시콜레스테롤을 회수하였다.

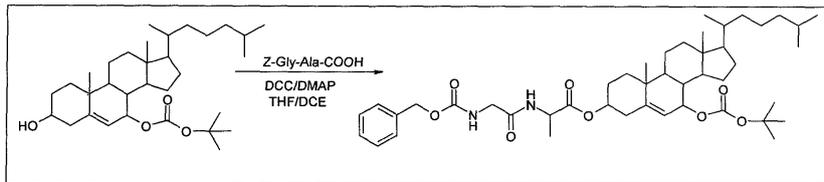
[0187] 분석: CDCl<sub>3</sub> 중 <sup>1</sup>H NMR에 의한 분석.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 0.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.78 (dd, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 0.84 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.91-2.29 (m, 27H), 0.97 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.41 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>, t-Boc), 3.47 (m, 1H, CH<sub>B</sub>), 4.77 (td, 1H, CH<sub>C</sub>), 5.17 (t, 1H, CH<sub>A</sub>).

[0188]

[0189] 실시예 3: 7-((tert-부톡시카르보닐)옥시)-10,13-디메틸-17-(6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카히드로-1H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일 2-(2-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)아세트아미도)프로파노에이트 (분자 1.a)의 제조

[0190] 약칭: 3-벤질옥시카르보닐-글리시닐-알라닐-7-β-0-tert-부틸옥시카르보닐-콜레스테롤



[0191]

[0192] 분자 1.a를 중간체 화합물 1.6으로부터 제조하였다.

[0193] 하기 시약을 사용하였다:

	MW	Nb물	당량	질량 또는 부피
7-β-t-부틸옥시카르보닐 콜레스테롤 (화합물 1.6)	502	0.16 mmol	-	80 mg
Z-Gly-Ala-COOH	280.28	0.24 mmol	1.5 당량	68 mg
DCC	206.3	0.24 mmol	1.5 당량	50 mg
DMAP	122.17	0.24 mmol	1.5 당량	30 mg
THF/DCE 1:1				6 ml

[0194]

[0195] 80 mg (0.16 mmol)의 7-β-t-부틸옥시카르보닐콜레스테롤, 68 mg (0.24 mmol, 1.5 당량)의 디펩티드, 6 ml의 용매 혼합물 (THF/DCE 1:1), 50 mg (0.24 mmol, 1.5 당량)의 DCC, 및 30 mg (0.24 mmol, 1.5 당량)의 DMAP를 10 ml 휘튼(Wheaton) 병에 넣었다. 조 반응 혼합물을 주위 온도에서 24 h 동안 교반하였다. 7/3 헥산/에틸 아세테이트 용리액 중에서 TLC에 의해 진행을 모니터링하였다.

[0196] 30 ml의 에틸 아세테이트 및 10 ml의 물을 조 반응 생성물에 첨가하였다. 유기 상을 분리하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과한 다음, 감압하에 증발시켰다. 수득된 오일상 잔류물을 에틸 아세테이트에 용해시켜 고체 침착물을 제조하였다.

[0197] 7/3, 그 다음 6/4, 헥산/에틸 아세테이트 용리액 중에서 실리카겔 칼럼 상에서 정제를 수행하였다.

[0198] 분석: CDCl<sub>3</sub> 중 <sup>1</sup>H NMR에 의한 분석.

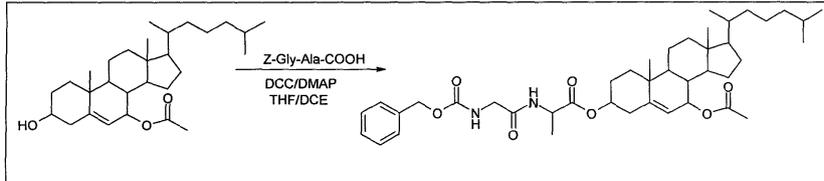
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 0.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.79 (dd, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 0.83 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.94-1.88 (m, 24H), 0.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.19 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ala), 1.40 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>, t-Boc), 2.27 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.83 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.47 (td, 1H, CH Ala), 4.47 (m, 1H, CH), 4.78 (td, 1H, CH), 5.07 (s, 2H, CH<sub>2</sub> Gly), 5.22 (t, 1H, CH), 5.23 (m, 1H, NH), 6.41 (sl, 1H, NH), 7.29 (m, 5H, CHAr).

[0199]

[0200] 실시예 4: 7-아세톡시-10,13-디메틸-17-(6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라테카히드로-1H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일 2-(2-(((벤질옥시)카르보닐)아미노)아세트아미도)프로파노에이트 (분자 1.b)의 제조

[0201]

약칭: 3-벤질옥시카르보닐-글리시닐-알라닐-7-β-0-아세틸-콜레스테롤



[0202]

[0203] 분자 1.b를 중간체 화합물 1.4로부터 제조하였다.

[0204]

하기 시약을 사용하였다:

	MW	Nb몰	당량	질량 또는 부피
7-β-아세틸콜레스테롤	444	0.18 mmol	-	80 mg
Z-Gly-Ala-COOH	280.28	0.27 mmol	1.5 당량	76 mg
DCC	206.3	0.27 mmol	1.5 당량	56 mg
DMAP	122.17	0.27 mmol	1.5 당량	33 mg
THF/DCE 1:1				6 ml

[0205]

[0206] 60 mg (0.13 mmol)의 7-β-아세틸콜레스테롤, 70 mg (0.19 mmol, 1.5 당량)의 디펩티드, 6 ml의 용매 혼합물 (THF/DCE 1:1), 42 mg (0.19 mmol, 1.5 당량)의 DCC, 및 25 mg (0.19 mmol, 1.5 당량)의 DMAP를 10 ml 휘튼 병에 넣었다. 조 반응 혼합물을 주위 온도에서 24 h 동안 교반하였다.

[0207]

7/3 헥산/에틸 아세테이트 용리액 중에서 TLC에 의해 진행을 모니터링하였다.

[0208]

30 ml의 에틸 아세테이트 및 10 ml의 물을 조 반응 생성물에 첨가하였다. 유기 상을 분리하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과한 다음, 감압하에 증발시켰다. 수득된 오일상 잔류물을 에틸 아세테이트에 용해시켜 고체 침착물을 제조하였다.

[0209]

7/3, 그 다음 6/4 헥산/에틸 아세테이트 용리액 중에서 실리카겔 칼럼 상에서 정제를 수행하였다.

[0210]

분석: CDCl<sub>3</sub> 중 <sup>1</sup>H NMR에 의한 분석.

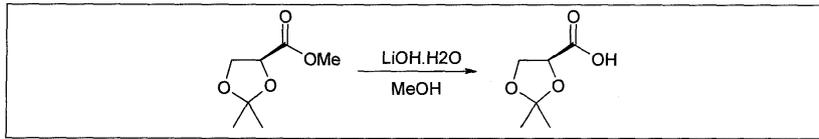
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 0.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.78 (dd, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 0.84 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.91-1.83 (m, 25H), 1.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.17 (s, 3H, CH<sub>3</sub> Ala), 1.94 (s, 3H, CH<sub>3</sub> 아세틸), 2.27 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.82 (m, 1H, CH), 4.47 (td, 1H, CH Ala), 4.56 (m, 1H, CH), 4.95 (td, 1H, CH), 5.06 (s, 2H, CH<sub>2</sub> Gly), 5.17 (sl, 1H, CH), 5.37 (t, 1H, CH), 6.49 (dl, 1H, NH), 7.24 (m, 5H, CHAr).

[0211]

[0212] 실시예 5: 7-(((tert-부톡시카르보닐)옥시)-10,13-디메틸-17-(6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라테카히드로-1H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일 2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-카르복실레이트 (분자 2.a)의 제조

[0213] 약칭: 3-(S)-2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-카르복실-7-β-O-tert-부틸옥시카르보닐-콜레스테롤

[0214] 1) 디메틸-1,3-디옥솔란-4-카르복실레이트 기의 제조



[0215]

[0216] 하기 시약을 사용하였다:

	MW	Nb몰	당량	질량 또는 부피
(-)-메틸 (S)-2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-카르복실레이트	160.17	31.2 mmol	-	5 g
LiOH.H <sub>2</sub> O	41.96	78 mmol	2.5 당량	3.3 g
메탄올				25 ml

[0217]

[0218] 아세트알, 메탄올 및 그 다음 수산화리튬을 50 ml 플라스크에 넣었다. 이 혼합물을 16 h 동안 주위 온도에서 교반하였다.

[0219] 조 반응 혼합물을 감압하에 증발시켰다. 수득된 잔류물을 75 ml의 물에 용해시켰다. 그 다음, 이러한 상을 1N 염산을 사용하여 0°C에서 pH 1로 산성화한 다음, 2 x 100 ml의 에틸 아세테이트로 추출하였다. 유기 상을 합하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과한 다음, 감압하에 증발시켜, 약간 착색된 오일 잔류물을 수득하였다.

[0220] 잔류물을 추가 정제 없이 커플링 단계에서 직접 사용하였다.

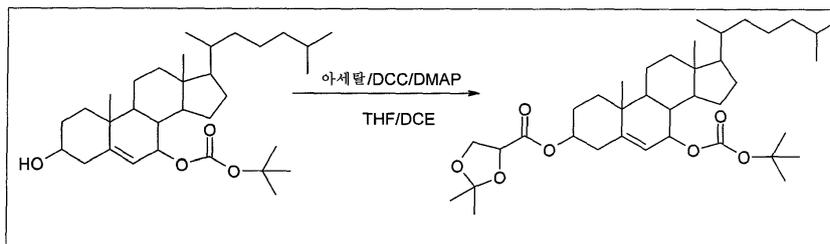
[0221] 분석: <sup>1</sup>H NMR (DMSO, 브루커 400 MHz)에 의한 분석.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 1.32 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.14 (AB, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.55 (dd, 1H, CH), 10.30 (sl, 1H, OH), 7.24 (m, 5H, CHAr).

[0222]

[0223] 수율: 94%

[0224] 2) 분자 2.a의 제조



[0225]

[0226] 분자 2.a를 중간체 화합물 1.4로부터 제조하였다.

[0227] 하기 시약을 사용하였다:

	MW	Nb몰	당량	질량 또는 부피
7-β-아세틸콜레스테롤	444	3.4 mmol	-	1.5 g
3-(S)-2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-카르복실산	146.17	10.1 mmol	3 당량	1.35 g
DCC	206.3	10.1 mmol	3 당량	2.1 g
DMAP	122.17	10.1 mmol	3 당량	1.24 mg
THF/DCE (1:1)				50 ml

[0228]

[0229] 50 mg (9.9 mmol)의 7-β-t-부틸옥시카르보닐콜레스테롤, 6 ml의 용매 혼합물 (THF/DCE 1:1), 및 16 mg (11.9 mmol, 1.2 당량)의 3-(S)-2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-카르복실산을 10 ml 휘튼 병에 넣었다.

[0230] 24.5 mg (11.9 mmol, 1.2 당량)의 DCC 및 14.5 mg (11.9 mmol, 1.2 당량)의 DMAP를 첨가한 후에, 주위 온도에서 24 h 동안 조 반응 혼합물을 교반하였다. 8/2 헥산/에틸 아세테이트 용리액 중에서 TLC에 의해 진행을 모니터링하였다. 이를 2 h 동안 50°C에서 가열하여 반응을 종료시켰다.

[0231] 30 ml의 에틸 아세테이트 및 10 ml의 물을 조 반응 생성물에 첨가하였다. 유기 상을 분리하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과한 다음, 감압하에 증발시켰다. 수득된 오일상 잔류물을 에틸 아세테이트에 용해시켜 고체 침착물을 제조하였다.

[0232] 95/5, 그 다음 9/1 헥산/에틸 아세테이트 용리액 중에서 실리카겔 칼럼 상에서 정제를 수행하였다.

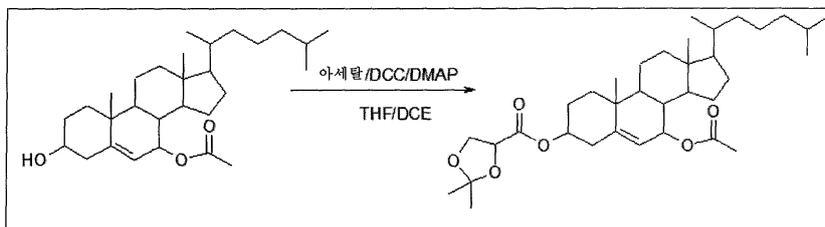
[0233] 분석: CDCl<sub>3</sub> 중 <sup>1</sup>H NMR에 의한 분석.

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz): δ 0.60 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.79 (dd, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 0.83 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.74-1.97 (m, 25H), 0.98 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub> 아세탈), 1.40 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>, t-Boc), 1.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub> 아세탈), 2.29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.08 (AB, 2H, CH<sub>2</sub> 아세탈), 4.48 (ddd, 1H, CH 아세탈), 4.63 (m, 1H, CH), 4.78 (td, 1H, CH), 5.22 (d, 1H, CH).

[0234]

[0235] 실시예 6: 7-아세톡시-10,13-디메틸-17-(6-메틸헵탄-2-일)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-테트라데카히드로-1H-시클로펜타[a]페난트렌-3-일 2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-카르복실레이트 (분자 2.b)의 제조

[0236] 약칭: 3-(S)-2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-카르복실-7-β-O-아세틸-콜레스테롤



[0237]

[0238] 분자 2.b를 중간체 화합물 1.4로부터 제조하였다.

[0239] 하기 시약을 사용하였다:

	MW	Nb몰	당량	질량 또는 부피
7-β-아세틸콜레스테롤	444	3.4 mmol	-	1.5 g
3-(S)-2,2-디메틸-1,3-디옥솔란-4-카르복실산	146.17	10.1 mmol	3당량	1.35 g
DCC	206.3	10.1 mmol	3당량	2.1 g
DMAP	122.17	10.1 mmol	3당량	1.24 mg
THF/DCE (1:1)				50 ml

[0240]

[0241] 콜레스테롤, 용매 혼합물 및 산을 100 ml 플라스크에 넣었다. DCC 및 DMAP를 첨가한 후에, 주위 온도에서 24 h 동안 조 반응 생성물을 교반하였다. 8/2 헥산/EtOAc 용리액 중에서 TLC (TLC 실리카겔 60 F254, 머크)에 의해 진행을 모니터링하였다.

[0242] 100 ml의 에틸 아세테이트 및 50 ml의 물을 조 반응 혼합물에 첨가하였다. 유기 상을 분리하고, 황산나트륨 상에서 건조시키고, 여과한 다음, 감압하에 증발시켰다.

[0243] 수득된 오일상 잔류물을 에틸 아세테이트에 용해시켜 고체 침착물을 제조하였다. 95/5, 그 다음 9/1 헥산/EtOAc 용리액 중에서 실리카겔 칼럼 (실리카 SDS 60A, 35-70 μm).

[0244] 수율: 68%

[0245] 분석: <sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> 브루커 400 MHz)에 의한 분석. HPLC 칼럼 정상 상 키랄셀 O-DH (ODHOCE-CE026 칼럼), 용리액 9/1 헥산/iProH, 20 min, 파장 190 nm.

[0246] 체류 시간 5.291 min, HPLC 순도 98.7%.

**<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400.13 MHz):** δ 0.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.79 (dd, 6H, 2CH<sub>3</sub>), 0.84 (d, 3H, CH<sub>3</sub>), 0.91-2.30 (m, 27H), 1.01 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub> 아세탈), 1.42 (s, 3H, CH<sub>3</sub> 아세탈), 1.93 (s, 3H, CH<sub>3</sub> 아세탈), 4.09 (AB, 2H, CH<sub>2</sub> 아세탈), 4.48 (dd, 1H, CH 아세탈), 4.62 (m, 1H, CH), 4.96 (td, 1H, CH), 5.18 (d, 1H, CH).

[0247]

[0248] II/ 생물학적 활성

[0249] A/ 프로토콜

[0250] 모든 실험에 대해 하기 프로토콜을 사용하였다:

[0251] 1) 세포 배양물

[0252] 세포 배양물 (시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 참조 번호 114754)용으로 처리된 플라스틱 편평 바닥의 96-웰 배양 플레이트 (눈크(NUNC), 미국)를 사용하였고; 200 μl의 배양 배지 중에서 웰당 1500개의 세포를 시딩하였다. 처리 시에, 100 μl의 순수한 배양 배지, 에탄올, 또는 리포솜을 함유하는 100 μl의 배양 배지, 또는 활성 성분을 함유하는 100 μl의 배양 배지를 웰당 첨가하였고; 따라서, 처리후, 배양 배지의 최종 부피는 모든 웰에 대해 300 μl이었다.

[0253] 배양물을 37°C에서 및 5% CO<sub>2</sub> 함유 대기 중에서 및 포화된 습도에서 산요(Sanyo) 인큐베이터 (일본, 모델 MCO-19AIC-UV)에서 인큐베이션하였다. 세포를 도립 현미경 (니콘 이클립스(Nikon Eclipse) TS100, 일본)으로 관찰하고 카메라 (c-마운트(mount)을 갖는 디지털(DIGITAL) 카메라; 라보베르(LABOVER), 프랑스)로 사진을 촬영하였다. 배양 후드(culture hood)는 미생물학적 안전성 후드 MSC (써모 사이언티픽(thermo SCIENTIFIC), 모델 헤라 세이프(HERA SAFE) KS12, 프랑스)이었다.

[0254] 세포 배가 시간(doubling time)은 하기 식을 사용하여 계산하였다:

[0255] 배가 시간 = (tb - ta) log(2) / (log(b) - log(a))

- [0256] 상기 식에서, (a) 및 (b)는 시간  $t_a$  및  $t_b$  ( $t_b > t_a$ )에서의 세포 수를 나타낸다 (15).
- [0257] 트립신 (소 채장 유형 3, 시그마, 프랑스)을 사용한 해리에 의해 전이를 수행하였다. 0.05% (w/v) 트립신을 함유하는 0.04% (w/v) 티로드(Tyrode) KCl 용액을 사용하여 30분 동안 주위 온도에서 세포 해리를 수행하였다.
- [0258] 해리 후, 세포에 적절한 배양 배지에 세포를 현탁시키고 토마 셀(THOMA cell)을 사용하여 계수하고 동일 배지에서 희석하여 웰당 1500개 세포를 수득하였다.
- [0259] a) 세포주
- [0260] 하기 교모세포종 세포를 사용하였다:
- [0261] · C6 주.
- [0262] N-메틸니트로우레아에 의해 유도된, 래트 뇌 종양으로부터 벤다(Benda) 등 (16)에 의해 유형 C6 세포주를 수득하였다. 이 세포 유형을 항-GBM 잠재력을 평가하기 위한 "시험관내" 및 "생체내" 모델로서 사용하였다. 주는 이전의 스트라스부르 신경화학 센터(Strasbourg Neurochemistry Centre) (U44 INSERM 및 UPR 416 CNRS)로부터 유래하였다.
- [0263] 배양 배지는 70% 최소 필수 배지 (MEM; 피셔 사이언티픽(Fischer Scientific), 참조 번호 61100) 및 30% 헵크스(Hanks) 용액 (시그마, 참조 번호 H 9269)로 이루어졌다. 하기를 배양 배지, 즉 5% (v/v)의 최종 농도에서 우태아 혈청(foetal calf serum) (FCS; 피셔 사이언티픽, 참조 번호 10108165), 시프로플록사신 히드로클로라이드 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 항생제 용액 (유로메덱스(EUROMEDEX), 참조 번호 UC5074) 및 훈기존(Fungizone) 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 용액 (인비트로젠(INVITROGEN), 참조 번호 15290-026)에 첨가하였다. 이 세포 유형의 배가 시간은 17 h이었다.
- [0264] · 인간 기원의 GBM 주
- [0265] 인간 교모세포종 주 (GBM, 주 U-87 MG) 및 그의 배양 배지 (이들의 최소 필수 배지(Eagle's Minimum Essential Medium) 또는 EMEM)를 ATCC (미국, 참조 번호 ATCC-HTB-14)로부터 입수하였다. ATCC의 권고에 따라 세포 배양을 시작하고 유지하였다. 이들 주는 항-GBM 잠재력을 시험하기 위한 "시험관내" 및 "생체내"에서 흔히 사용된다. 이들 주의 배가 시간은 16 h이었다.
- [0266] 인간 세포의 하기 초대 배양물을 또한 사용하였다:
- [0267] · 성장세포
- [0268] 사용된 인간 기원의 성장세포는 사이언셀(ScienCell), 미국 (참조 번호 1800)으로부터 입수하였고, 2% (v/v) FCS 혈청 (참조 번호 0010), 성장세포 성장 단백질 (AGS, 참조 번호 1852) 및 페니실린/스트렙토마이신의 용액 (참조 번호 0503)을 함유하는 기본 배지로 이루어진 그의 배양 배지도 마찬가지였다. 이들 인간 성장세포의 배가 시간은 96 h이었다.
- [0269] · 간 세포
- [0270] 인간 기원 중에서, 이들을 10% (v/v) FCS를 함유하는 배양 배지 (참조 번호 5201)와 마찬가지로 사이언셀, 미국 (참조 번호 50200)으로부터 입수하였다. 이들 세포의 배가 시간은 24 h이었다.
- [0271] · 신세포
- [0272] 인간 기원의 이들 세포를 10% (v/v) FCS를 함유하는 배양 배지 (참조 번호 4101)와 마찬가지로 사이언셀, 미국 (참조 번호 4120)으로부터 입수하였다. 배가 시간은 96 h이었다.
- [0273] · 심장 세포
- [0274] 인간 기원의 이들 세포를 10% (v/v) FCS를 함유하는 배양 배지와 마찬가지로 사이언셀, 미국 (참조 번호 6300)으로부터 입수하였다. 배가 시간은 72 h이었다.
- [0275] · 골격근 세포
- [0276] 인간 기원 중에서, 이들을 10% (v/v) FCS를 함유하는 배양 배지 (참조 번호 3501)와 마찬가지로 사이언셀, 미국 (참조 번호 3500)으로부터 입수하였다. 이들 세포의 배가 시간은 72 h이었다.
- [0277] 인간 기원의 암 세포의 하기 배양물을 또한 사용하였다:

- [0278] · 간암 세포
- [0279] 이들을 ATCC (참조 번호 ATCC-HB-8065)로부터 입수하였다. 배양 배지는 MEM (깁코(Gibco), 미국; 참조 번호 51200) 및 10% (v/v) FCS로 이루어졌다. 배양 시간은 60 h이었다.
- [0280] · 전립선암 세포
- [0281] 이들을 ATCC (참조 번호 ATCC-HTB-81)로부터 입수하였다. 배양 배지는 간암 주에 대해 사용된 것과 동일하였다. 배양 시간은 60 h이었다.
- [0282] · 유방암 세포
- [0283] 이들을 ATCC (참조 번호 ATCC-HTB-19)로부터 입수하였다. 배양 배지는 간암 주에 대해 사용된 것과 동일하였다. 배양 시간은 20 h이었다.
- [0284] · 결장암종 (주 HT29/219)
- [0285] 이들을 ECACC 콜렉션 (참조 번호 ECACC-85061109)으로부터 입수하였다. 배양 조건은 시그마-알드리치 정보 진단에서의 권고를 기반으로 하였다.
- [0286] · 신경모세포종 (주 SH-SY5Y)
- [0287] 이들을 ATCC 콜렉션 (참조 번호 ATCC-CRL-2266)으로부터 입수하였다. 배양 조건은 ATCC 정보 진단에서의 권고를 기반으로 하였다.
- [0288] · 만성 골수단핵구성 백혈병 (CMML)
- [0289] 만성 골수단핵구성 백혈병 (CMML)으로 고통 받는 환자의 혈액 샘플로부터 정제된 세포를 세인트 엘로이 병원 (Saint Eloi Hospital) (CHU 데 몽펠리에)의 임상 혈액학 센터(Clinical Haematology Centre) 및 생물 치료 센터(Biotherapy Centre)에 의해 입수하였다. 피드 층(feed layer) 상에 시딩 기법에 의해 배양을 수행하였다. 세포를 피드 층 상에 시딩하였고 이는 관심 세포에 의도된 처리에 의해 영향받지 않고 관심 세포의 생리를 크게 변경하지 않는다. CMML 세포를 인간 배아 척수 유래의 세포주 상에서 배양하였다 (17).
- [0290] 모든 이들 배양물에 대해, 공급자의 권고에 따라 배양을 시작하고 유지하였다.
- [0291] *b) 배양물의 처리*
- [0292] 활성 성분은 무수 에탄올 (아날라알(AnalaR), 노르마푸르(NORMAPUR), VWR, 프랑스)에 용해되거나 리포솜 용액의 형태, 예컨대 990  $\mu$ l에 희석된 10  $\mu$ l의 스톱 용액의 형태이었고 그 다음, 배양 웰 (200  $\mu$ l의 배양 배지)에 첨가되어 30.0, 15.0, 7.5 및 3.3  $\mu$ M의 농도 (웰 BI-GBM 당 배양 배지의 최종 부피: 300  $\mu$ l)를 제공하였다.
- [0293] 활성 성분이 에탄올 용액으로 존재하는 경우, 배양 배지는 3.3% 에탄올 (v/v)을 함유하였다.
- [0294] 2) 리포솜의 제조
- [0295] a) 기본 방법론은 베르틀레(Werthle) 등 (10)에 의해 기재되어 있다.
- [0296] 간략히, 시험되는 화합물, 즉, 본 발명에 따른 화합물 (활성 성분) 또는 7 $\beta$ -OHCH-C3-에스테르 (올레이트 기로 위치 3에서 에스테르화된 7 $\beta$ -히드록시스테롤의 유도체이며, 그의 합성은 라코토아리벨로(Rakotoarivelo) 등 (18)에 의해 기재되어 있고 대조군으로서 사용됨), 소야 포스파티딜콜린 (시그마)뿐만 아니라 콜레스테릴-3-술페이트 (시그마)를 활성 성분 및 7 $\beta$ -OHCH-C3-에스테르의 경우에 디클로로에탄, 포스파티딜콜린의 경우에 클로로포름 : 메탄올 혼합물 (9:1, v/v) 및 콜레스테릴-3-술페이트의 경우에 클로로포름으로부터 제조된 그들의 스톱 용액으로 취하였다. 물비는 포스파티딜콜린, 콜레스테릴-3-술페이트 및 7 $\beta$ -OHCH-C3-에스테르 및 활성 성분 각각의 대해 1 M/0.1 M/0.25 M이었다.
- [0297] 증발 후, PBS 염수 용액 (Ca<sup>2+</sup> 및 Mg<sup>2+</sup> 없이, pH 7.2) (바이오래드(BioRad))을 무수 화합물에 첨가하였다. 완충제의 부피 및 생성물의 질량을 조정하여 20 또는 10  $\mu$ l의 리포솜이 90  $\mu$ l의 배양 배지에 첨가되어 목적하는 최종 농도를 제공하도록 하였다. 리포솜은 리포소팩트(Liposofast) (소덱심 에스에이(Sodexim SA), 프랑스 뤼종)를 사용하여 압출 기법에 의해 형성시켰다. 용액을 폴리카르보네이트 여과 막 (100 nm)에 41회 통과시켰다. 리포솜을 22  $\mu$ m 밀리포어(Millipore) 막 상에서 여과함으로써 멸균하였다.
- [0298] "시험관내" 다른 인간 세포 유형에 대한 분자의 활성 시험을 위해, 리포솜의 제조를 상기 기재된 바와 같은 두

가지 상이한 방법으로, 즉, 한편으로는 균일 입자 크기에 대하여, 및 다른 한편으로는 활성 분자의 농도에 대하여, 최적화하였다.

- [0299] b) 동일한 크기 분포 및 시간 경과에 따라 안정한 조성을 갖는 리포솜 ("개선된 리포솜") 수득.
- [0300] 용매의 증발 후, 지질 박막을 디클로로에탄 : 에탄올 (3.3 : 1.5; v:v)에 다시 용해시키고 용액을 질소 스트림 하에 다시 증발시켰다. 1 ml의 PBS를 격렬하게 교반하면서 첨가하고, 지질 잔류물을 긁어내어 다시 용해시키고 룩 한 후, 5분 동안 격렬하게 교반한 다음, 20°C를 초과하지 않는 온도에서 1분의 10 펄스의 초음파 처리를 적용하였다 (엘마(Elma), S 60H, 엘마소닉(Elmasonic)). 용액을 단지 여과막에 2회 통과시킨 것을 제외하고는, 수득된 소포를 상기 기재된 바와 같이 압출시키고 멸균하였다.
- [0301] 이들 리포솜은 40 내지 80 nm의 크기 분포를 갖고 0.086 mg/ml의 분자 2.b를 함유하였다.
- [0302] c) 더 높은 농도의 분자 2.b를 갖는 리포솜 ("농축 리포솜") 수득.
- [0303] 지질 박막을 제조하기 위해, 포스파티딜콜린의 농도를 두배로 하였고; 다른 화합물의 농도는 개선된 리포솜에 대해 상기 기재된 것과 동일하게 유지하였다.
- [0304] 이들 리포솜을 제조하는 절차는, (1) 초음파처리가 1분의 20 펄스이고 (2) 용매를 회전 증발기 (부치(Buchi), 모델 V 850 및 R 215)를 사용하여 감압 (약 3 kPa; 30 mbar)하에 증발시킨 것을 제외하고는, 개선된 리포솜에 대해 기재된 것과 동일하였다.
- [0305] 이들 리포솜은 40 내지 80 nm의 크기 분포를 가졌고 0.133 mg/ml의 분자 2.b를 함유하였다.
- [0306] 추출 전에, 18 h 동안 40°C에서 500  $\mu$ l의 리포솜 용액을 10  $\mu$ l의 2% (v:v) 트리톤(Triton) X-100 (시그마)와 함께 인큐베이션한 것을 제외하고는, 리포솜을 구성하는 분자의 특성화, 안정성 및 리포솜의 조성물의 조사를 폴치(Folch) 등 (19)의 방법에 따라 지질 화합물의 추출 후 수행하였다.
- [0307] 통상의 기법에 따른 메틸화 후, 포스파티딜콜린을 구성하는 지방산의 분석을 질량 분석법과 커플링된 기체 크로마토그래피 (GC/MS)에 의해 수행하였다.
- [0308] 포스파티딜콜린의 콜린 기의 특성화를 레이넥케이트(Reineckate)의 방법 (20)에 따라 수행하였다.
- [0309] 분자 2.b를 상기 (화합물의 제조)에 기재된 바와 같이 HPLC에 의해 또는 하기 항목 5)에 기재된 바와 같이 실리카 박층 크로마토그래피에 의해 정량화하였다.
- [0310] 리포솜의 크기 분포를 형광 리포솜 상에서 측정하고 형태계측학적 분석은 에피형광 현미경 (엑시오베르트 (Axiovert), 차이스(Zeiss))으로 영상을 수득한 후 서트(Sert) 프로그램에 의해 수행하였다.
- [0311] 사용된 포스파티딜콜린이 개선된 리포솜의 경우에 5.0% 형광 포스파티딜콜린 (NBD-PC-올레일; 아반티(Avanti); 여기/방출 = 460 nm/534 nm) 및 농축 리포솜의 경우에 2.5%를 함유한 것을 제외하고는, 개선된 또는 농축 리포솜에 대해 기재된 포스파티딜콜린의 동일 양을 사용하여 형광 리포솜을 제조하였다.
- [0312] 리포솜을, 우선 폴리-D-리신 (시그마, 물 중 1%, w:v) 및 그 다음, 라미닌 (시그마, 물 중 0.6%)으로 코팅된 유리 배양 슬라이드 상에 침적시켰다. 리포솜 을 글루타르알데히드 (머크) (리포솜 : 글루타르알데히드 : PBS; 15 : 37.5 : 97.5, v.v.v)로 고정시킨 후에 영상을 수득하였다.
- [0313] 3) 활성 및 독성의 측정
- [0314] 두 경우 모두에 대해 동일 방법을 사용하였다. 활성의 경우, 시험 화합물의 항-GBM 잠재력을 사용하였고, 독성은, "시험관내" 유지된 인간 기원의 정상 세포에 대해 시험하였다.
- [0315] 하기 측정 방법을 사용하였다:
- [0316] a) 세포 계수
- [0317] 사진 상에서 세포 계수의 방법을 사용하였다.
- [0318] 예를 들어, 96-웰 플레이트 중의 배양물의 경우에 및 사용된 현미경의 배율의 함수로서 (대물 렌즈 x 10 또는 x 20, 접안 렌즈 x 10), 촬영한 사진은 웰의 직경의 1/5에 상당하는 직경을 갖는 시계(field of view)를 나타냈다. 따라서 웰 중 세포의 총 수는 사진당 세포의 수의 5배에 상당하였다. 이 기법을 C6 세포의 경우에 표준 기법과 비교하였다 (세포층의 트립신화, 세포의 원심분리, 생리 염수 용액 중 세포의 현탁액 및 토마 셀을

사용한 계수). 수득된 결과는 두 방법 모두에 동일하였다.

[0319] b) 단백질 검정

[0320] 배양 배지를 각각의 웰에서 회수하고 50  $\mu$ l의 라에블리(Laemmli) 완충제 (0.1 ml의 트리스, 0.8 ml의 글리세롤, 1.6 ml의 10% SDS, 8 ml의 초순수 물)를 웰당 첨가하였다.

[0321] 대조군 웰에, 10  $\mu$ l의 소 혈청 알부민 범위의 용액 (결정화된 BSA, 시그마)을 첨가하고; 범위는 웰당 0 내지 20  $\mu$ g이었다. 그 다음, 웰을 40  $\mu$ l의 라에블리 완충제로 보충하였다. 마지막으로, 200  $\mu$ l의 BCA 시약 용액 (피어스(Pierce), 미국; BCA 단백질 검정 키트; 써모사이언티픽, 프랑스)을 첨가하였다.

[0322] 배양 플레이트를 37°C에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 각각의 웰에 대한 광학 밀도를 570 nm에서 플레이트 판독기 (바이오래드, 미국, 아이마크 마이크로플레이트(iMark Microplate) 판독기 12222)에 의해 판독하고 정량화하였다.

[0323] c) 세포 생존율 (MTT 시험)

[0324] 이 시험으로 세포 호흡, 특히 미토콘드리아 호흡을 검출하는 것이 가능하였다. 테트라졸륨 염 MTT의 스톡 용액 (3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸륨 브로마이드, 시그마-알드리치, 미국, 참조 번호 M5655)을 10 mg/ml의 PBS 완충제 (인산염-완충 염수, 시그마, 참조 번호 D 1408)를 사용하여 제조하였다. 이 용액을 각각의 웰 중 배양 배지에 직접 첨가하였고; MTT의 최종 농도는 25  $\mu$ g/ml이었다. 그 다음, 플레이트를 1 h 이상 동안 37°C에서 인큐베이션하였다.

[0325] 주로 미토콘드리아 전자 수송에 의해 생성되는 블루 포르마잔 과립(blue formazan grain)이 출현된 후, 사진을 촬영하여 고밀도의 포르마잔 과립을 갖는 세포를 계수하였고; 이 기법을 U87-MG 주의 경우에 사용하였다. 그 다음, 이 주 및 다른 배양물에 대해, 배지를 제거하고, 100  $\mu$ l의 디메틸설폭사이드 (DMSO, SDS 카를로 에르바 (CARLO ERBA), 이탈리아)를 첨가하여 포르마잔 침착물을 용해시켰다.

[0326] 광학 밀도를 490 nm에서 플레이트 판독기 (바이오래드, 아이마크 마이크로플레이트 판독기)를 사용하여 판독하고 정량화하였다.

[0327] 생존율은 때때로 또한 트립판 블루 배제 기법에 의해 시험되었다.

[0328] 4) 세포의 면역표지 및 영상 수득

[0329] 항-CD133 (폴리, 아브노바(Abnova)), 항-GFAP (폴리, 시그마), 항-NFL (모노, 산타 크루즈(Santa Cruz)) 및 항-섬유모세포 (ERTR7, 산타 크루즈) 1차 항체를 처음 3개 항체의 경우에 1/100으로 희석하고 마지막 경우에는 1/50로 희석하였다.

[0330] IDH-R132H (저-등급 신경교종의 마커 (21)), 및 CD31 (내피 세포의 마커 (22))을 검출하기 위해, 사용된 1차 항체를 클리니사이언시즈(Clinisciences) (마우스, 희석 1/20)로부터 및 스프링 바이오사이언시즈(Spring Bioscience) (토끼, 희석 1/250)로부터 각각 입수하였다.

[0331] 1차 항체의 인식에 상응하는 2차 항체는 퍼옥시다제 (염소, 시그마)와 결합된 항-토끼 항체, 딜라이트(Dylight) 488 (양, 시그마)과 결합된 항-마우스, 딜라이트 488 (양, 시그마)과 결합된 항-마우스 및 FITC (토끼, 시그마)와 결합된 항-랫이었다. 희석은 각각 1/4000, 1/1000, 1/4000 및 1/400이었다.

[0332] IDH1-R132H 및 CD31을 퍼옥시다제-결합 2차 항체를 사용하여 검출하였다. 이들은 피셔 사이언티픽 (항-마우스, 희석 1/1000)으로부터 및 시그마 (항-토끼, 희석 1/500)로부터 각각 입수하였다.

[0333] PBS (피셔 사이언티픽) 중 0.1% 트리톤 X-100 (시그마)을 5분 동안 세포에 침투시켰다. 비특이적 부위를 PBS 중 2% BSA (시그마)로 차단하였다. 항-CD133, 항-GFAP, 항-NFL 및 항-섬유모세포 항체 각각에 대해, 주위 온도에서 1 h, 4°C에서 48 h, 4°C에서 24 h 및 주위 온도에서 1 h 동안 인큐베이션을 수행하였다. 2차 항체를 사용한 인큐베이션은 주위 온도에서 1 h 동안 수행하였다. CD133 양성 세포를 DAB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 시스템 (시그마)에 의해 검출하였고, 광학 현미경을 사용하여 관찰하였다.

[0334] 마커 IDH1-R132H 및 CD31의 비색 검출을 기질 노바레드(NOVARED) 백터 (유로비오(Eurobio)를 사용하여 수행하였다. 착색된 세포를 또한 광학 현미경 검사에 의해 검출하였다. 형광성을 검출하고 에피형광 현미경 (엑시오베르트, 차이스, 독일)을 사용하여 영상을 수득하였다.

- [0335] 5) 지질의 추출 및 옥시스테롤의 확인
- [0336] 세포를 0.9% NaCl로 세척하고, 기계적으로 수집하고, 트리스-HCl 완충제 (10 mM; pH 7.4)에 현탁시키고 포터 (Potter)를 사용하여 균질화하였다 (1000 r.p.m. 및 13회 반복(reciprocation)). 얼음 중에서 균질화를 수행하였다. 폴치 등 (19)에 따라 1 부피의 세포 현탁액에 대해 19 부피의 클로로포름 : 메탄올 (2:1, v/v)을 첨가한 후 4°C에서 추출을 수행하였다. 유기 상 및 수성 상을 0.2 부피의 0.74% KCl (w/v)을 첨가함으로써 분리하였다.
- [0337] 회전 증발기 (부치, R-215, 스위스)에서 유기 상의 증발 후, 지질 잔류물을 클로로포름에 용해시켰다. TLC 층을 클로로포름 : 메탄올 (1:1, v/v)에 예비세척하고 1 h 동안 100°C에서 활성화시켰다. 지질을 하기 시스템, 즉 석유 에테르 (비점: 60-70°C) : 에테르 : 아세트산 (80:20:1.3, v/v/v)으로 용리시켰다. 침착된 표준물은 콜레스테롤, 7-케토-콜레스테롤, 7베타-OHCH, 7베타-OHCH-C3-에스테르 및 분자 2.b이었다. 지질 및 표준물을 마칼라(Maccala) 시약으로 검출하였다. Rf 값은 콜레스테롤, 7-케토-콜레스테롤, 7베타-OHCH, 7베타-OHCH-C3-에스테르 및 분자 2.b 각각에 대해 0.21, 0.09, 0.08, 0.27 및 0.23이었다. 각각의 표준에 대해 0.5 내지 2 µg의 교정 범위를 별도로 수행하였다. 실리카의 현상된 박층을 스캐닝한 후, 관심 스폿(spot)의 강도를 표준물에 대해 계산하였다.
- [0338] 사용된 용매는 아날라알 또는 HPLC 등급이었다.
- [0339] 6) LDH (락테이트 데히드로게나제: EC 1.1.1.27)의 활성 및 억제제의 분석
- [0340] 통상의 억제제, 옥사메이트에 의해 LDH의 활성 및 그의 억제제의 측정 (23)을 표준으로서 락토바실루스 레이즈만니(Lactobacillus leichmannii: LL) (시그마)의 정제된 LDH를 사용하여 분광법 (24)에 의해 입증하였다.
- [0341] 그 다음, LDH 활성 및 그의 억제를 "겔내 검정" 기법 (25)에 의해 검출하였다. 사용된 활성의 공급원은 인간 GBM 주 U87-MG로부터 부분 정제된 LDH (LDH GBM) 및 LDH LL이었다. LDH LL 및 LDH GBM 샘플의 전기영동 겔 상에서의 등전점 전기영동(isoelectric focusing: IEF) 후 "겔내 검정" 검출을 수행하였다.
- [0342] a) LDH GBM의 부분 정제
- [0343] 인산염 완충제 (50 mM, Ph 7.2, Pi) 중에서 수집된 세포에 수회의 동결 (-20°C)/해동 주기를 적용하였고 세포 물질이 균질화되었다. 4°C에서 45분 동안 10,000 g에서 원심분리 후, 상청액을 수집하고 10% 글리세롤 (v:v)을 함유하는 분취액을 -80°C에서 동결시켰다. 목적하는 시간에서, 해동 후, 분취액을 Pi에서 제조된 여과 칼럼 (바이오겔(Biogel) P-60, 바이오래드) 상에서 크로마토그래피하였다. 겔의 부피는 9 ml이었고 칼럼의 내부 직경은 0.4 cm이었다. 대기압에서 용리를 수행하였다. 1.4 ml의 제1 분획을 제거하고 LDH 활성을 그 다음 2 ml에서 수집하였다. 이 분획 (LDH GBM)의 단백질 성분을 SDS PAGE 기법에 뒤이어, 질산은 염색, 또는 웨스턴 블롯(Western blot)에 의해 특성화하였다. LDH의 분자량 특성을 밝혀냈다 (서브-유닛에 대해 31 kDa, 또는 이량체 중 그의 회합에 대해 62 kDa).
- [0344] b) IEF
- [0345] 7.5 (T%) 및 2.6 (C%)의 미니-겔(mini-gel)을 Pi에 암폴린(Ampholines) (바이오래드)과 함께 부어, 냉 챔버에서 프리-포커싱(pre-focusing) 후 7 내지 5의 범위에서 pH 구배를 형성가능하게 하였다. 사용된 용기는 미니-프로테안(mini-protean) 3 유형 (바이오래드)이었다. 음극 완충제는 2.0의 pH를 갖고 양극 완충제는 10.0의 pH를 가졌다. LDH LL 및 LDH GBM 샘플은 변성없이 침착되었고 냉 챔버에서 전압을 100V 내지 300V의 범위로 증가시키면서 210분 동안 포커싱을 수행하였다.
- [0346] c) LDH 활성
- [0347] LDH 활성을 락테이트/NAD/MTT/페나진 메토술페이트 시스템에 의해 검출하였고 (IEF 겔 중 포르마잔 유형의 침전물의 형성); 이 시스템은 참고문헌 (25)에 기재되어 있다.
- [0348] 옥사메이트 (18 mM) 또는 에탄올 형태로 분자 2.b (36 mM)를 첨가하여 LDH LL 및 LDH GBM 활성의 억제제의 정도를 측정가능하게 하였다.
- [0349] B/ "시험관내" 항-GBM 활성
- [0350] B.1. 동물 모델
- [0351] C6 세포 (래트)의 배양물을 상기 (섹션 II, A)에서 언급된 조작 조건하에 사용하였다.

[0352] 실시예 7: C6 세포 (래트)의 배양물에 대한 "시험관내" 항-GBM 활성

[0353] 수득된 결과를 하기 표 1에 뿐만 아니라 도 3에도 요약하였다.

표 1

시험된 분자 (에탄올 3%)	1.a (실시예 3) 15 μm	2.a (실시예 5) 15 μm	1.a, 그 다음 2.a 15 μm +7.5 μm
생 잔류 세포	3%	100%	0%

[0354]

[0355] 도 3 (배율 20 x 10)은 분자 1.a (실시예 3)의 존재하에 또는 19일 및 35일에서 분자 1.a 및 그 다음 분자 2.a (실시예 5)로의 순차 처리 후 상기 (섹션 II, A)에서 언급된 조작 조건하에 C6 세포의 배양물의 외관을 나타낸 것이다.

[0356] 결과 (표 1)는 에탄올 형태의 분자 1.a가 처리 19일 후 세포독성이었음을 나타낸다. 15 μM의 1.a에서 및 처리 14일 후, 세포의 수, 단백질의 수준 및 MTT 검정은 30%까지 감소하였고 최소한 19일에서 97% 감소에 이르렀다. 처리 19일에, 7.5 및 3.3 μM의 1.a의 경우 용량-의존성이 또한 관찰되었고 15 μM에서 대조군 배양물에 비해 20%의 MTT/세포 비의 증가가 관찰되었다.

[0357] 잔류 세포를 제거하기 위해, 순차 처리를 사용하였다. 세포를 우선 15 μM의 분자 1.a로 처리하고 처리 제19일에, 분자 2.a를 7.5 μM의 농도에서 첨가하였다.

[0358] 도 3에 나타난 바와 같이, 어떤 생존 세포도 관찰되지 않았고; 단지 세포 "사체(cadavers)"가 세포 배양물의 고체 기관 (웰의 바닥)에 부착하였다.

[0359] 요약하면, 분자 1.a 및 그 다음 분자 2.a를 사용한 순차 처리는 이러한 세포 유형에 대해 완전한 효능을 나타냈다. 관찰 결과는 세포 파괴 이전에 세포의 전체 호흡의 증가를 나타냈다.

[0360] B.2. 인간 모델: 인간 세포 (주 U-87 GM)의 배양물에 대한 "시험관내" 항-GBM 활성

[0361] B.2.1 "시험관내" 모델 및 결과의 표기의 정의

[0362] a) 상이한 세포 유형의 특성화

[0363] U-87GM 세포를 상기 (섹션 II, A)에 기재된 조작 조건 하에 배양하였다.

[0364] 배양물은 2개의 세포 성분, 즉 정상 (비-암성) 세포로서 거동하는 세포로 이루어진 세포 층 및 GBM 유형 세포로 이루어진 세포 응집물로 구성되었다.

[0365] 도 4는 배양물의 특징인 광학 영상 (10 x 10)을 나타낸다. 세포층 (CL)을 볼 수 있으며, 그 위에 반구 형상의 세포 응집물 (CA)이 고정되었다. 도 5 (20 x 10)는, 면역표지에 의해, 인간 GBM에 기재된 CD133+ 세포 (줄기 세포)는 세포 응집물에 위치되고 CL에는 위치되지 않음을 나타낸다. 면역형광 표지는 CL 및 CA (도 6 및 7; 20 x 10)에서 GFAP, 정상 성장세포의 마커 (도 6 및 7; 20 x 10) (26) 및 CL 및 CA에서의 신경필라멘트의 존재를 나타냈다. 그러나, 섬유모세포, 증식에 대한 높은 잠재력을 가진 세포의 특이적 표지는 CA의 경우에 단지 발견되었다. 매우 소수의 IDH1-R132H-양성 세포가 CL 및 CA에서 관찰되었다. 반대로, CD31-양성 세포는 CL 및 CA에 존재하였다.

[0366] 광학 현미경 검사에 의한 관찰에 의하면 CA의 세포는 매우 급속히 분할되며 (최대한 16 h의 배가 시간), 한편 CL로 구성된 세포는 96 h의 배가 시간을 가졌다.

[0367] 이들 관찰 결과는 개발되어 온 세포 계수법 (포르마잔 과립으로 세포 표지하거나 아님)을 정당화하였으며; 실제로, 트립신화 후의 계수는 CL 및 CA의 세포를 구별할 수 없었다. 영상은 또한 단지 CA가 GBM 특성 (짧은 배가 시간, 줄기 세포 및 섬유모세포의 존재)을 가짐을 나타냈다. 따라서 수득된 결과는 시험된 분자가 CA에 미치는 영향의 결과이다.

[0368] b) 결과의 표기

- [0369] 결과를 하기 파라미터에 따라 표기하였다:
- [0370] (i) 본 발명에 따른 분자의 효능
- [0371] - 잔류 세포, 특히 줄기 세포의 정량화.
- [0372] - 시간 경과에 따른 본 발명의 따른 분자의 효능
- [0373] 본 발명에 따른 분자를 함유하는 배양 배지를 새로운 배지로 대체하고 "드 노보(de novo)" 세포 증식을 조사하였고: 어떤 "드 노보" 증식도 줄기 세포를 포함한, GBM 세포의 전체 파괴를 의미하지 않았다.
- [0374] (ii) 분자가 GBM 세포의 전체 호흡에 미치는 영향.
- [0375] (iii) 본 발명에 따른 분자를 사용하여 획득된 결과와 7β-OHCH-C3-에스테르 (대조군)를 사용하여 획득된 것과의 비교.
- [0376] B.2.2 결과
- [0377] U-87-MG (인간) 세포의 배양물을 상기 (섹션 II, A)에서 언급된 조작 조건 하에 사용하였다.
- [0378] 7베타-OHCH-C3-에스테르를 대조군으로 사용하였다.
- [0379] 실시예 8: 리포솜 형태의 분자 2.a (실시예 5)의 "시험관내" 항-GBM 활성의 연구
- [0380] 획득된 결과를 하기에 표 2에 제시하였다.

**표 2**

처리 일수	리포솜 형태의 분자 2.a (15 μM)		리포솜 형태의 7β-OHCH-C3-에스테르 (80 μM)	
	단백질	MTT/세포	단백질	MTT/세포
6	70	100	70	100
8	25	140	20	100
13	15	120	15	100
15	0	0	15	100

- [0381]
- [0382] 이들 결과는 3회 수행된 3개의 독립 실험의 평균 값이다. 결과는 대조군에 대한 백분율로서 표기되었다.
- [0383] 관찰 결과는 리포솜 형태의 15 μM의 분자 2.a가 치료 15일 후 GBM 세포 (CA)의 존재를 제로까지 감소시킨 것을 나타냈다.
- [0384] 서서히 분할되는 세포 (CL) 만이 남았다. 효과는 용량-의존성이 아니었다. 7β-OHCH-C3-에스테르는 GBM (CA)에 대해 에탄올 형태로는 작용하지 않았고 (실시예 9를 또한 참조), 리포솜 형태로만, 즉 80 μM에서 작용하였다. 그의 효능은 리포솜 형태의 7β-OHCH-C3-에스테르의 용량의 증가에 대해, 더 양호하지 않았거나, 심지어 감소하였다.
- [0385] 그러나, 처리 제13일에 7β-OHCH-C3-에스테르를 함유하는 배양 배지가 제거되고 이 약물을 함유하지 않은 새로운 배양 배지로 대체되는 경우, 세포 증식, 그리고 병행하여, 2일 후 MTT 시험에서의 증가가 관찰되었고; 이러한 증가는 40%이었다. 이는 분자 2.a의 경우에는 그렇지 않았고, 즉 이 분자의 부재하에, 어떤 세포 증식도 관찰되지 않았다.
- [0386] 표 2는 또한, 세포의 대부분이 사라졌을 때 (처리 8일) MTT/세포의 상당한 증가 (대조군에 비해 140%)를 나타냈다. 이는 리포솜성 7β-OHCH-C3-에스테르의 경우에는 그렇지 않았고, 즉 심지어 80 μM에서, MTT/세포 비는 변화하지 않았다.
- [0387] 이러한 관찰은 두 분자 사이에서 상이한 작용을 나타냈고: 전체 세포 호흡이 세포의 대량 사멸 전에 증가하였다. 이는 7β-OHCH-C3-에스테르의 경우에는 그렇지 않았다.
- [0388] 실시예 9: 에탄올 형태의 분자 2.b (실시예 6)의 "시험관내" 항-GBM 활성의 연구
- [0389] 획득된 결과를 하기에 표 3에 제시하였다.

표 3

처리 일수	에탄올 형태의 분자 2.b (30 μM)		에탄올 형태의 7β-OHCH-C3-에스테르 (30 μM)	
	단백질	MTT/세포	단백질	MTT/세포
4	100	100	100	100
6	100	100	100	100
9	90	160	100	100
15	50	130	100	100
22	0	0	100	100

[0390]

[0391]

이들 결과는 각각 3회 수행된 3개의 독립 실험의 평균 값이다. 결과는 대조군에 대한 백분율로서 표기되었다. 30 μM 초과에서, 7β-OHCH-C3-에스테르는 에탄올 중에 더 이상 가용성이 아니었다.

[0392]

관찰 결과는 분자 2.b가 에탄올 형태로 30 μM에서 완전히 효과적이고: 심지어 활성 성분을 제거한 후에도, 어떤 GBM 세포도 남지 않았음을 나타냈다. 단지 리포솜 형태의 분자 2.a에 대해서는, 세포 사멸 전에 세포 호흡이 증가하였다. 이는 에탄올성 7β-OHCH-C3-에스테르의 경우에는 그렇지 않았고, 어떤 항종양 활성도 관찰되지 않았다.

[0393]

더욱이, 제22일에 화합물 2.b를 함유하지 않은 새로운 배지로 배양 배지를 대체하는 것이 어떤 세포 증식도 야기하지 않았다.

[0394]

실시예 10: A/B 퍼옥시다제 시스템으로 CD133+ 줄기 세포의 면역표지

[0395]

상기 (섹션 II, A)에 기재된 바와 같이 면역표지를 수행하였다.

[0396]

수득된 결과를 하기에 표 4에 제시하였다.

표 4

처리 일수	CD133+ 세포		
	미처리 배양물 (대조군)	에탄올 형태의 분자 2.b (30 μM)	리포솜 형태의 7β-OHCH-C3-에스테르 (80 μM)
4	100	100	100
22	100	0	50

[0397]

[0398]

이들 결과는 각각 3회 수행된 2개의 독립 실험의 평균 값이다. 결과는 대조군에 대한 CD 133 양성 세포의 백분율로 표기되었다. 이들 실험은 실시예 8 및 9에 기재된 것과 무관하였다.

[0399]

표 2 및 3에 기재된 관찰 결과에서와 같이, 리포솜 형태의 7β-OHCH-C3-에스테르 및 에탄올 형태의 분자 2.b는 미처리 대조군 세포에 비해 단백질의 수준을 85% 및 100%까지 감소시켰다.

[0400]

결과는 줄기 세포가 분자 2.b에 의해 완전히 파괴되었음을 나타냈다. 이는 7β-OHCH-C3-에스테르의 경우에는, 심지어 리포솜 형태로 투여시에도 그렇지 않았다.

[0401]

도 9 (CD133<sup>+</sup> 세포의 면역표지)는 처리 22일 후 세포가 사라졌음을 명확하게 나타냈다. 이는 리포솜 형태의 7β-OHCH-C3-에스테르의 경우 (도 10, CD133<sup>+</sup> 세포의 면역표지)에는 그렇지 않았고; 이 경우에, CD133<sup>+</sup> 세포의 50%가 잔류 세포 중에서 여전히 존재하였다. 제22일에 화합물 2.b를 함유하지 않은 새로운 배지로 배양 배지를 대체하는 것이 CD133<sup>+</sup> 줄기 세포의 출현을 야기하지 않았다.

[0402]

실시예 11 : 인간 기원의 GBM에서 "시험관내" 에탄올 형태의 분자 2.b (실시예 6)의 거동(fate)의 연구

[0403]

에탄올 형태의 30 μM의 분자 2.b로 처리된 GBM으로부터 지질의 추출 및 분석은 처리 24 h 또는 10일 후에 7배

타-OHCH-C3-에스테르의 존재를 나타내지 않았고, 후자의 시간은 세포사가 개시된 때였다. 그러나, 7베타-OHCH로 형질전환된 분자 2.b의 0.12% 및 0.18%가 각각 처리 1일 및 10일 후에 관찰되었다. 대조군 실험은 7베타-OHCH의 이러한 매우 낮은 수준이 GBM의 어떤 사멸도 유도하지 않았음을 나타냈다.

[0404] 실시예 12: 독성의 연구

[0405] 인간 기원의 다양한 정상 세포 유형에 대한 독성을 "시험관내" 시험하였다.

[0406] a) 정상세포에 대해

[0407] 사용된 세포는 상기 (섹션 II, A)에서 언급된 인간 기원의 세포 (사이언셀, 미국, 참조 번호 1800)이었다.

[0408] 정상세포 유형은 GFAP, 정상 정상세포의 표준 마커 (도 11; 배율 x 200)의 존재에 의해 입증되었다.

[0409] 분자 2.a (리포솜 형태) 및 2.b (에탄올 형태)는 처리 30일 후, 30  $\mu$ M에서 정상 (비-암성) 인간 정상세포의 초대 배양물에 대해 독성이 아니었다.

[0410] b) 다른 세포에 대해

[0411] 사용된 세포는 상기 (섹션 II, A)에서 언급된, 인간 기원의 간 세포 (사이언셀, 미국, 참조 번호 50200), 신장 세포 (사이언셀, 미국, 참조 번호 4120), 골격근 세포 (사이언셀, 미국, 참조 번호 3500) 및 심장 세포 (사이언셀, 미국, 참조 번호 6300)이었다.

[0412] 분자 2.a (리포솜 형태) 및 2.b (에탄올 형태)는 인간 기원의 간 세포, 신장 세포, 골격근 세포 및 심장 세포의 초대 배양물에 대해, 30  $\mu$ M에서 및 처리 30일 이상 후에 독성이 아니었다.

[0413] 실시예 13: 다른 암에 대한 "시험관내" 분자 2.b (실시예 6)의 활성의 연구

[0414] 사용된 암 세포는 상기 언급된, 인간 기원의 간암 세포 (참조 번호 ATCC-HB-8065), 전립선암 세포 (참조 번호 ATCC-HTB-81), 유방암 세포 (참조 번호 ATCC-HTB-19) 및 결장암 세포 (ECACC-HT29/219)로부터였다.

[0415] 30  $\mu$ M에서 및 에탄올 형태로, 분자 2.b는 인간 기원의 간암, 전립선암 또는 유방암 세포의 세포 분할 및 호흡에 어떤 영향도 나타내지 않았다

[0416] 15  $\mu$ M에서, 개선된 리포솜 형태의 분자 2.b는 결장암 세포에 대해 독성이 아니었다.

[0417] 실시예 14. 만성 골수단핵구성 백혈병 (CMML)에 대한 "시험관내" 개선된 리포솜 형태의 분자 2.b의 활성의 연구

[0418] 백혈구를 CMML로 고통받는 환자로부터 수집된 혈액 샘플로부터 분리하였다. 백혈구를 피드 층에 시딩함으로써 배양 후 24시간에 개선된 리포솜 형태의 10  $\mu$ M의 분자 2.b로 1회 처리하였다 (17).

[0419] 결과를 도 12에 사진 (배율 20 x 10)으로 나타냈다.

[0420] 대조군은 빈(empty) 리포솜으로 처리된 세포였고: 문자 A로 표시된 좌측 상단 사진은 처리 48 h 후에 그리고 문자 B로 표시된 좌측 하단 사진은 처리 72 h 후에 촬영한 것이었다.

[0421] 2.b로 처리된 세포의 경우, 문자 C로 표시된 우측 상단 사진은 처리 48 h 후에 그리고 문자 D로 표시된 우측 하단 사진은 처리 72 h 후에 촬영한 것이었다.

[0422] 결과는 처리 72 h 후에 분자 2.b의 현저한 효과를 나타냈다. 세포 증식은 대조군에 비해 상당히 느렸고 괴사 외관을 갖는 많은 세포들이 관찰되었다.

[0423] 실시예 15. 인간 신경모세포종 (ATCC-CRL-2266)에 대한 "시험관내" 분자 1.b 및 2.b의 활성의 연구

[0424] 배양 시작 후 24 h에, 신경모세포종을 빈 리포솜 (대조군)으로 또는 분자 1.b 또는 2.b를 함유하는 리포솜으로 처리하였다. 세포를 22  $\mu$ M의 분자 1.b 또는 22  $\mu$ M의 분자 2.b로 1회 처리하였다. 리포솜 형태는 농축된 것이었다.

[0425] 결과를 도 13에서 사진 (배율 10 x10)으로 나타냈다.

[0426] 대조군 세포에 경우, 문자 A로 표시된 좌측 상단 사진은 처리 7일 후에; 문자 B로 표시된 좌측 하단 사진은 처리 28일 후에 촬영한 것이었다.

[0427] 농축 리포솜 분자 1.b로 처리된 세포의 경우, 문자 C (최상단에서, 중간에서)로 표시된 사진은 처리 7일 후에 그리고 문자 D (기저부에서, 중간에서)로 표시된 사진은 처리 28일 후에 촬영한 것이었다. 농축 리포솜 분자

2.b로 처리된 세포의 경우, 문자 E로 표시된 우측 상단 사진은 처리 7일 후에 촬영한 것이었다.

- [0428] 결과는 분자 1.b에 비해 분자 2.b의 탁월한 활성을 나타냈다. 처리 28일 후, 분자 1.b는 거의 모든 세포에 대해 독성이었다. 분자 2.b의 경우, 라디칼 독성 효과는 처리 7일 후에 이미 관찰되었고; 어떤 생존 세포도 관찰되지 않았다.
- [0429] 실시예 16. 분자 2.b에 의해 "시험관내" 인간 GBH (U87-MG 주)로부터 추출된 LDH의 활성 억제의 연구
- [0430] 이들 실험의 목적은 시리즈 2개 분자의 LDH의 효소 활성의 억제에 관한 잠재력을 입증하는 것이었다. 연구는 분자 2.b로 수행하였고 그의 억제 잠재력을 락토바실루스 레이츠만나이 (LL)로부터의 LDH 및 섹션 "A/ 프로토콜 6)"에서 상기 기재된 바와 같은 인간 GBM 주 (U87-MG)로부터의 부분 정제된 LDH에 대해 시험하였다.
- [0431] LDH의 활성을 IEF 전기영동 겔 상에서 "젤내 검정" 기법에 의해 검출하였고, 이는 섹션 "A/ 프로토콜 6)"에 기재되어 있고 (25); 이러한 기법의 정밀도는 pH의 0.2 단위였다. LDH의 활성을 LDH 활성이 위치되는 부위인 포르마잔 유형의 압착색 침전물에 의해 검출하였다.
- [0432] 도 14(A)는 pHi 6.2에서 LDH LL에 관한 그리고 pHi 6.4에서 LDH GBM에 관한 LDH 활성을 나타낸다.
- [0433] 결과는 수성 형태 (18 mM)로 옥사메이트, 또는 에탄올 형태 (36 mM)로 분자 2.b의 첨가가 LDH LL의 효소 활성을 거의 완전히 그리고 LDH GBM (B)의 효소 활성을 부분적으로 억제함을 나타냈다.
- [0434] GBM의 세포사 전에 MTT 염색의 증가와 조합되어 분자 2.b에 의한 LDH GBM의 효소 활성의 억제에 관한 잠재력 (표 2 및 3; 도 8 및 9)은 화학식 I의 화합물의 작용 메커니즘의 가설, 즉 본 발명의 분자는 LDH의 활성을 억제할 것이고, 결과적으로, 미토콘드리아 호흡의 급증을 유발할 것이라는 것을 입증하였다.

[0435] 참고문헌 목록

1. Kando T, Setoguchi T, Taga T.  
PNAS. 2004, 101 : 781-786.
2. Zhou Y, Zhou Y, Shingu T, Feng L, Chen Z, Ogasawara M, Keating MJ. .  
J. Biol. Chem. 2011, 286 : 32843-32853).
3. Warburg O.  
Biochemische Zeitschrift. 1923, 142: 317-333.
4. Tennant DA, Duran RV, Gottlieb E.  
Nature Reviews Cancer. 2010, 10: 267-277.
5. Cheng KP, Nagano H, Bang L, Ourisson G, Beck JP.  
Journal of Chemistry Research (M). 1977, 217:2501-2521.
6. Carvalho JFS, Cruz Silva MM, Moreira JN, Simoes S, Sa e Melo ML.  
Journal of Medicinal Chemistry. 2011, 54: 6375-6393.
7. Kupferberg A, Teller G, Behr P, Leray C, Urban PF, Vincendon G, Mersel M.  
Biochim Biophys Acta. 1989, 1013: 231-23.
8. Kupferberg A, Behr P, Mersel M.  
Biochim Biophys Acta. 1990, 1046: 106-109.
9. Adamczyk M, Scherrer E, Kupferberg A, Malviya AN, Mersel M.  
Journal of Neuroscience Research. 1988,53:38-50.
10. Werthle M, Bochelen D, Adamczyk M, Kupferberg A, Poulet P, Chambron J, Lutz P, Privat A, Mersel M.  
Cancer Research. 1994, 54: 998-1003.
11. Clarion L, Schindler M, de Weille J, Lolmède K, Laroche-Clary A, Uro-Coste E, Robert J, Mersel M, Bakalara N.  
12. El Kihel L et al. J. Org. Chem. 2002, : 4075-4078.
13. Yusuf RZ, Wang YH, Sccaden DT.  
Nature Medicine 2012, 18: 865-867.
14. Langman J.  
Embryologie Médicale [Medical Embryology], Publ. Masson 1974, 66-70.  
Biochemical Pharmacology. 2012, 83: 37-46.

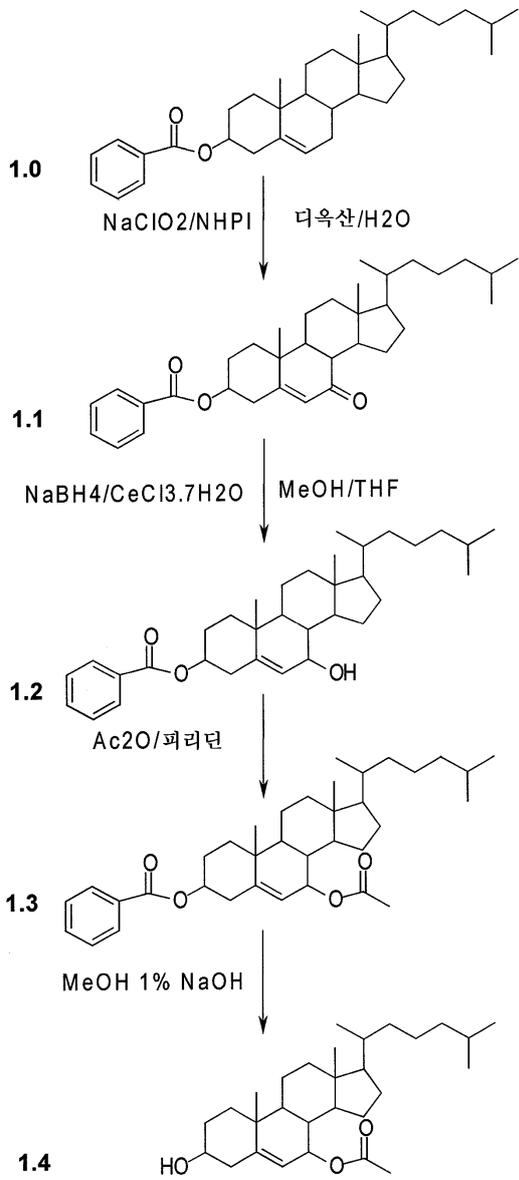
## [0436]

15. Manford K, Patterson JR.  
Methods in Enzymology. 1979, 58: 150.
16. Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W.  
Science.1968, 161: 370-371.
17. Rouleau C, Mersel M, de Weille J, Rakotoarivelo C, Fabre C, Privat A, Langley K, Petite D.  
J of Neurosc. 2000, 87 : 50-60.
18. Rakotoarivelo C, Adamczyk M, Desgeorges M, Langley K, Lorentz JG, Mann A, Ricard D, Scherrer E, Privat A, Mersel M.  
Anticancer Res. 2006, 26: 2053-2062.
19. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. J Biol Chem. 1957, 226: 5497-5509.
20. Kates M.  
Techniques of Lipidology, Work TS and Work E editors Elsevier Publishing 1975, 368-369.
21. Balss J, Meyer J, Mueller W, Korshunov A, Hartmann C, Von Deimling A.  
Acta Neuropathol. 2008, 116: 597-602.
22. Bogen SA, Baldwin HS, Watkins SC, Albelda SM, Abbas AK.  
Am J Pathol. 1992, 141: 843-854.
23. Schurr A, Payne RS.  
Neuroscience 2007, 147: 613-619.
24. Scientific Committee. Recommandations pour la mesure de la concentration catalytique de la lactate déhydrogenase dans le sérum humain à 30°C. [Recommendations for measuring the catalytic concentration of lactate dehydrogenase in human serum at 30°C].  
Ann Biol Clin 1982, 40 : 87-164.
25. Seger J., Lucotte G.  
La Pratique de l'électrophorèse appliquée à la détection des polymorphismes humains. [The electrophoresis technique applied to the detection of human polymorphisms]. Masson Ed., 1982, 68-69
26. Sensenbrenner M, Devilliers G, Bock E, Porte A.  
Differentiation, 1980, 17: 51-61.

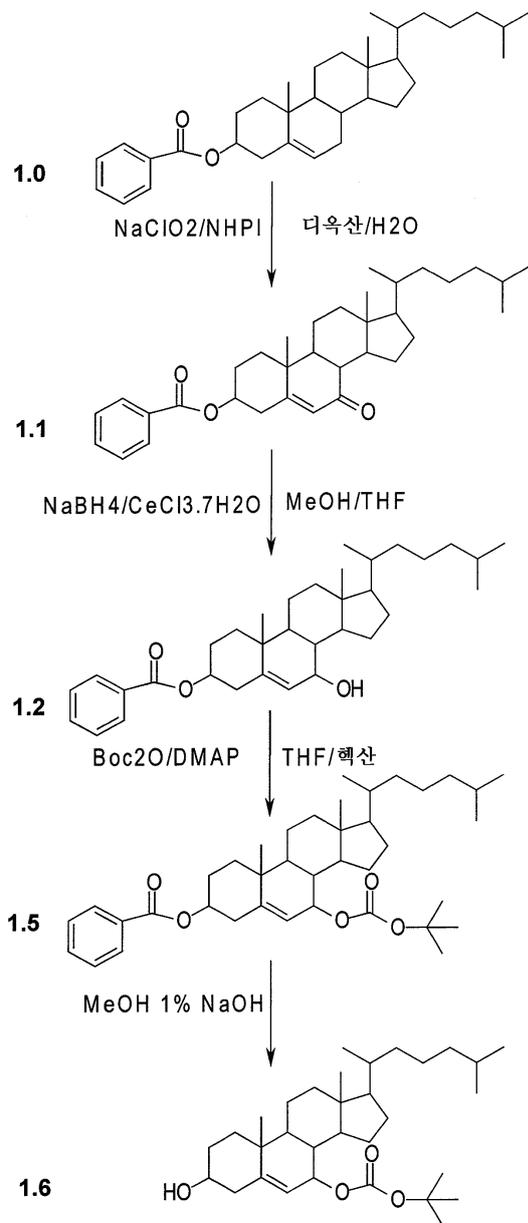
[0437]

도면

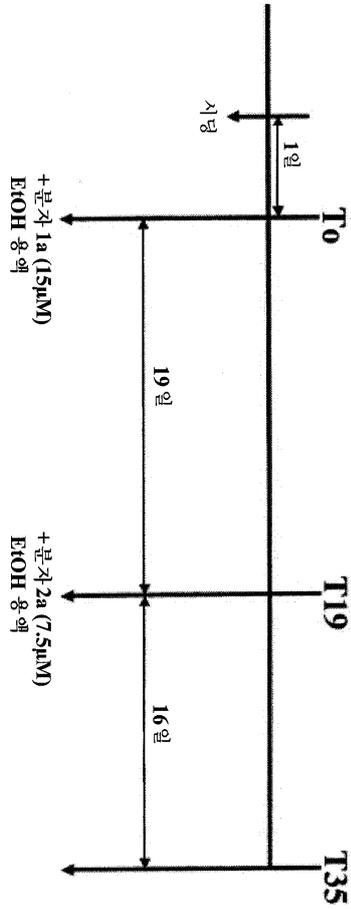
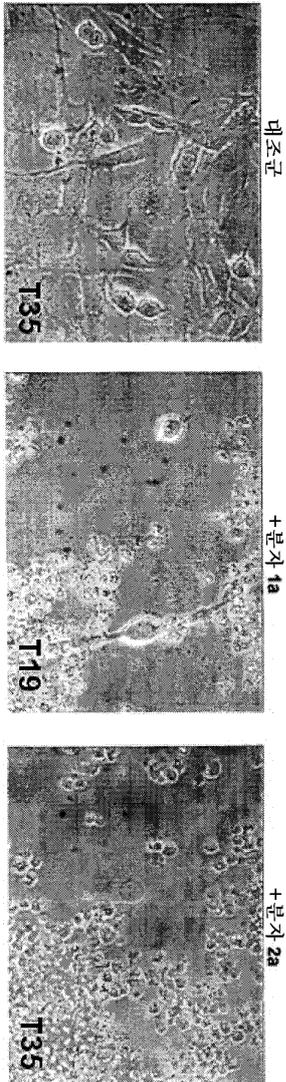
도면1



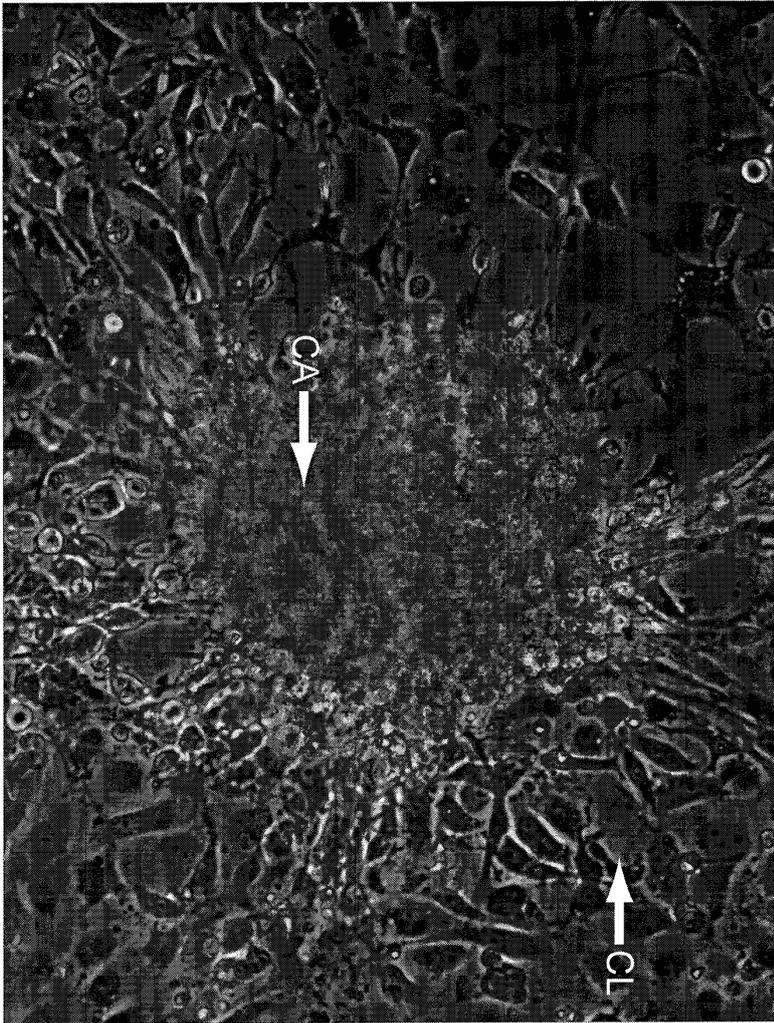
도면2



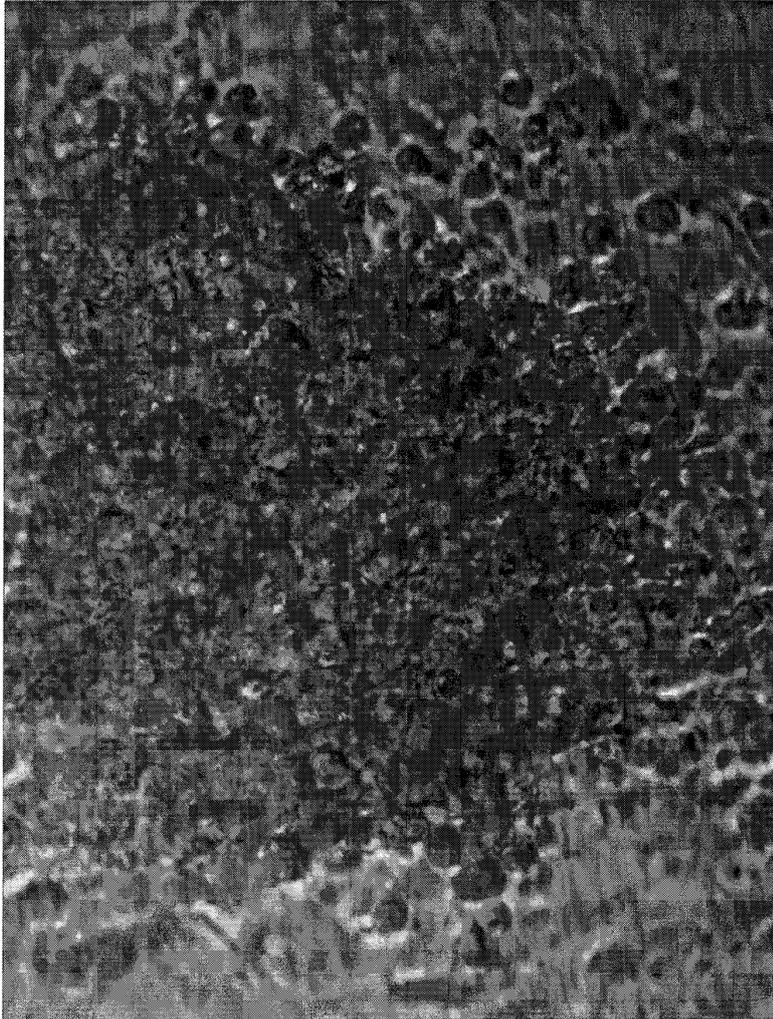
도면3



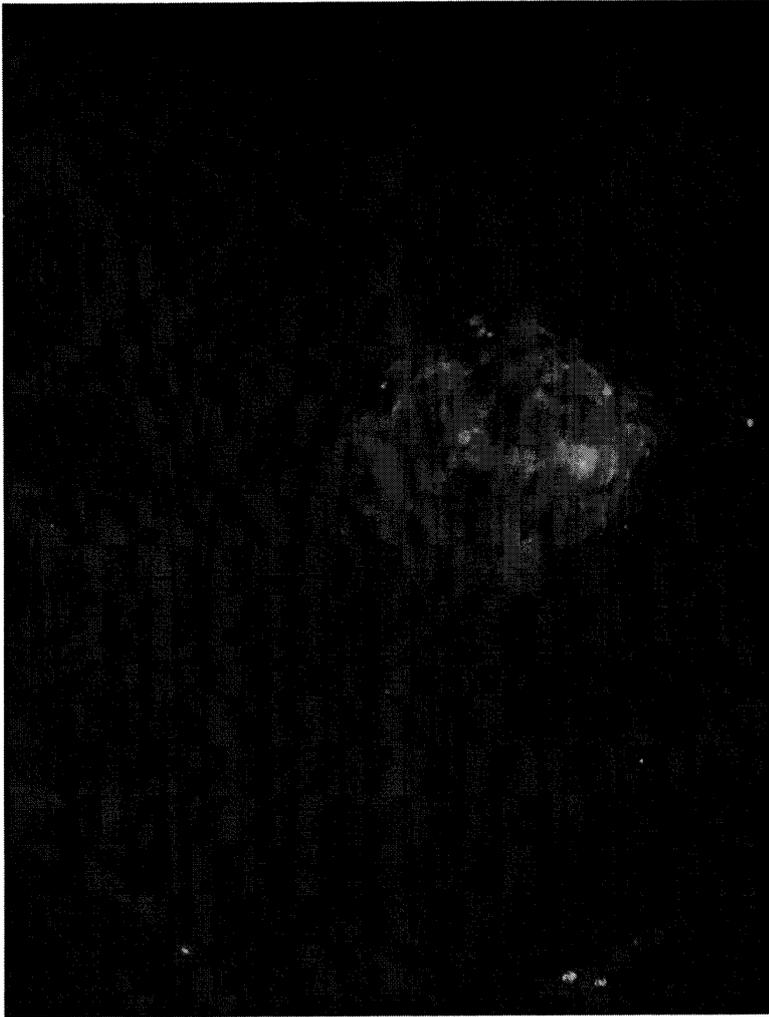
도면4



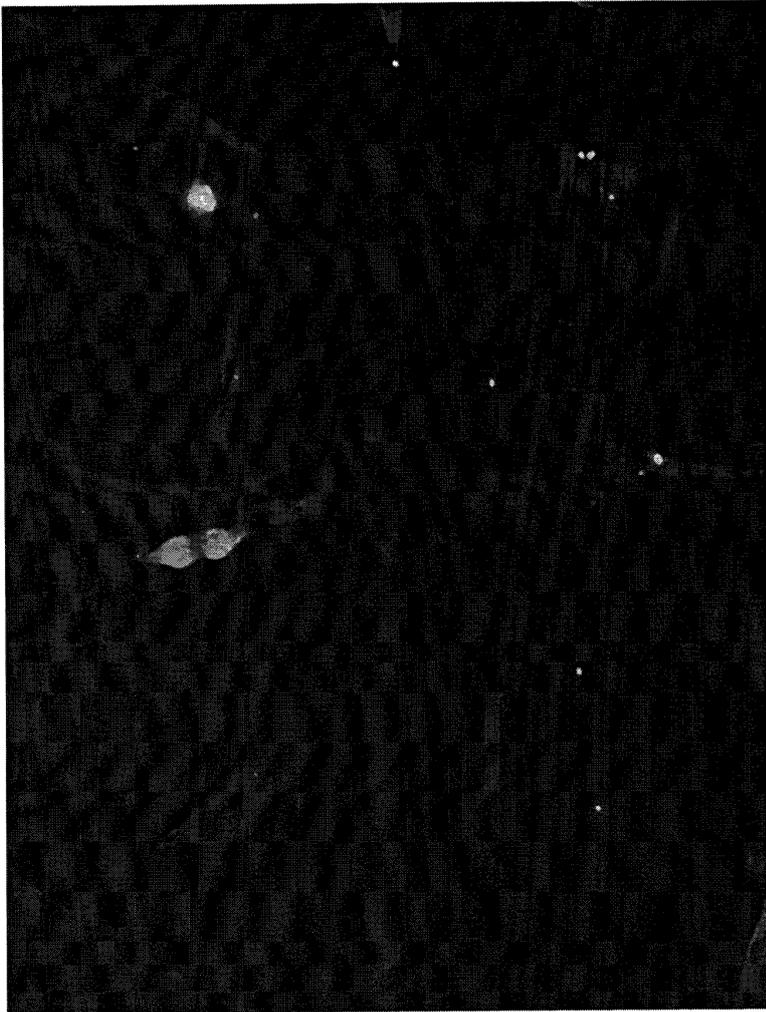
도면5



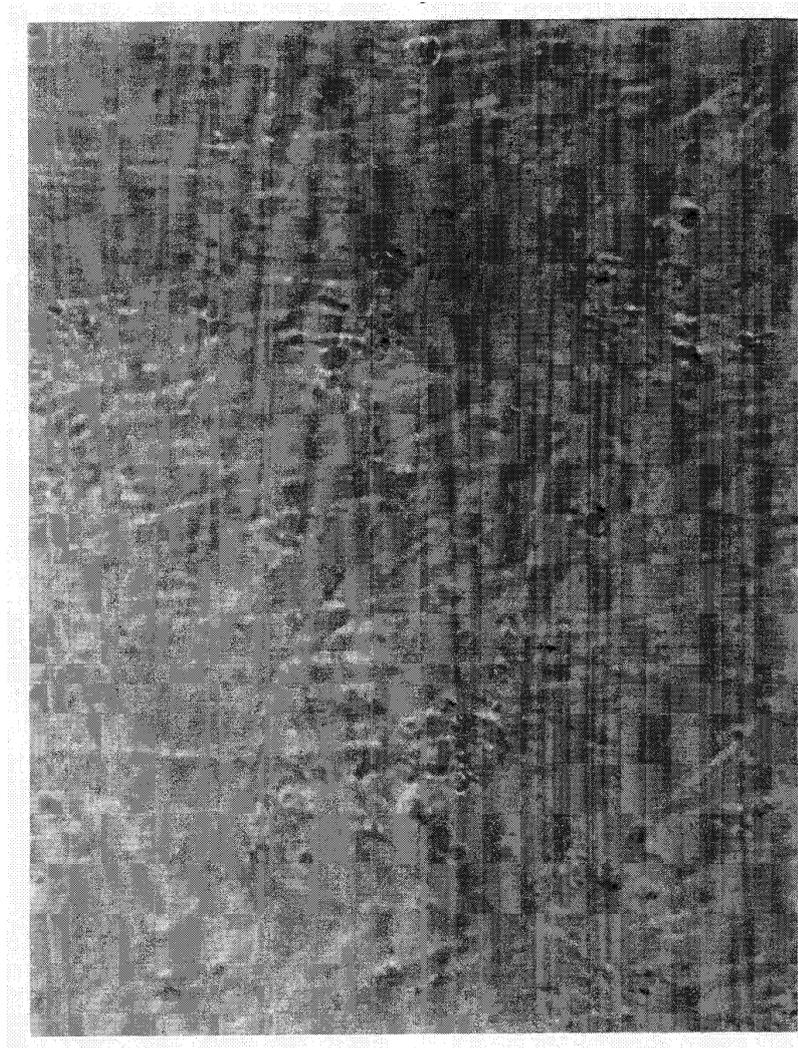
도면6



도면7



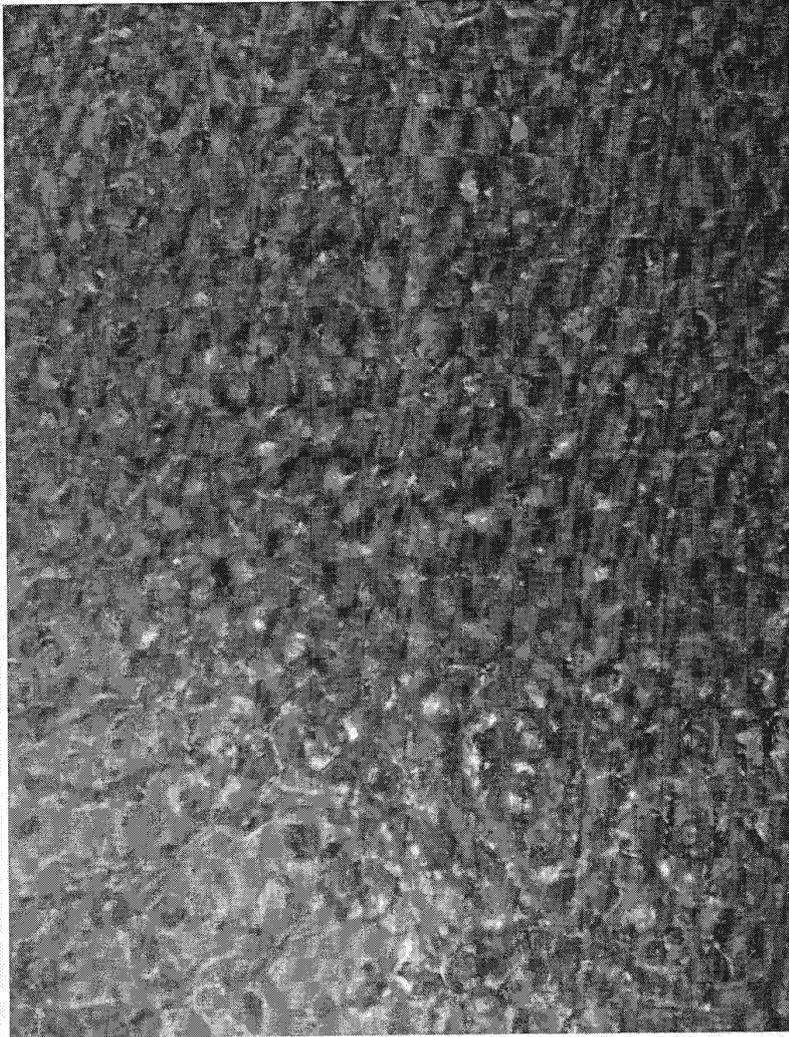
도면8



도면9



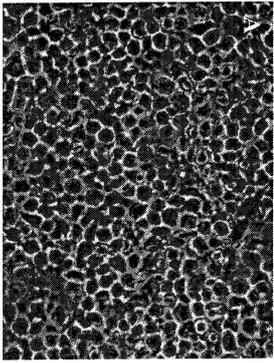
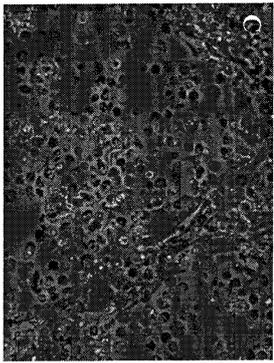
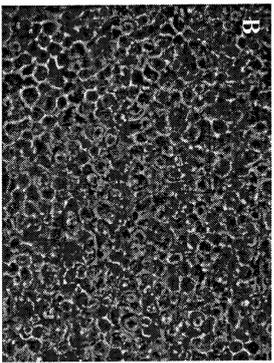
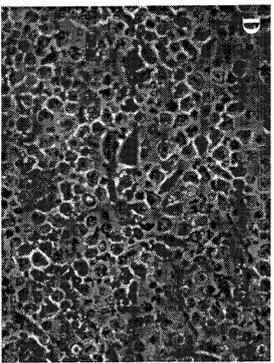
도면10



도면11



도면12

처리 시간	대조군	2.1b 10 $\mu$ M (리포솜 형태)
48hr	 <p>A</p>	 <p>C</p>
72hr	 <p>B</p>	 <p>D</p>

도면13

처리의 지속기간	대조군	1.b 22 $\mu$ M (리포솜 형태)	2.b 22 $\mu$ M (리포솜 형태)
7일	A	C	E
28일	B	D	(Blank)

도면14

