



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년07월04일  
(11) 등록번호 10-0844131  
(24) 등록일자 2008년06월30일

(51) Int. Cl.  
C07D 409/06 (2006.01) C07D 409/14 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2007-0000624  
(22) 출원일자 2007년01월03일  
심사청구일자 2007년01월03일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020070020897 A  
KR1019900018043 A  
JP61027984 A  
KR1020070074250 A

(73) 특허권자  
한국화학연구원  
대전 유성구 장동 100번지  
(72) 발명자  
전동주  
대전 유성구 신성동 삼성한울아파트 106-503호  
김형래  
대전 유성구 송강동 208-5  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
권오식, 박창희

전체 청구항 수 : 총 5 항

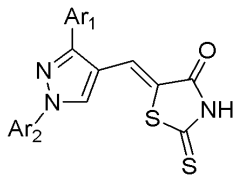
심사관 : 김경미

(54) 로다닌계 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 함유하는 항암제

(57) 요약

본 발명은 하기 화학식 1의 로다닌계 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염에 관한 것이고, 또한 하기 화학식 1의 로다닌계 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항암제 조성물에 관한 것이다. 하기 화학식 1의 로다닌계 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 세포분열주기에 결정적으로 작용하는 CDC25B 탈인산화 효소에 대한 탁월한 저해활성을 가지고 있으며 암세포에 대한 항암활성이 높다.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 Ar<sub>1</sub> 및 Ar<sub>2</sub>는 발명의 상세한 설명에서 정의한 바와 같다.

(72) 발명자

**김광록**

대전 유성구 송강동 한마을 아파트 115동 206호

**천혜경**

대전 유성구 전민동 청구나래아파트 109동 402호

**서민정**

대전 유성구 장동 100

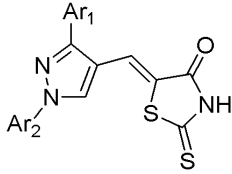
---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

하기 화학식 1의 로다닌계 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 이의 염.

[화학식 1]



상기 식에서 Ar<sub>1</sub> 및 Ar<sub>2</sub>는 독립적으로 페닐 또는 피리딘으로부터 선택되고, 상기 Ar<sub>1</sub> 및 Ar<sub>2</sub>는 C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> 알킬기, 할로겐원자, C<sub>1</sub> ~ C<sub>7</sub> 알콕시기, C<sub>3</sub> ~ C<sub>4</sub> 알케닐옥시기, C<sub>2</sub> ~ C<sub>4</sub> 아실기, 시안기 또는 니트로기로부터 선택된 하나 또는 둘 이상 치환기로 치환될 수 있다.

**청구항 2**

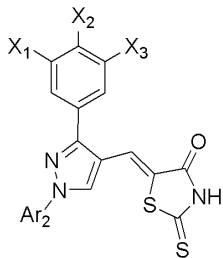
삭제

**청구항 3**

제 1 항에 있어서,

화학식 1의 화합물은 하기 화학식 1-1의 화합물인 것을 특징으로 하는 로다닌계 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 이의 염.

[화학식 1-1]



상기 식에서 X<sub>1</sub> 내지 X<sub>3</sub>은 독립적으로 수소, C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> 알킬기, 할로겐원자, C<sub>1</sub> ~ C<sub>7</sub> 알콕시기, C<sub>3</sub> ~ C<sub>4</sub> 알케닐옥시기, C<sub>2</sub> ~ C<sub>4</sub> 아실기, 시안기 또는 니트로기로부터 선택되는 치환기이고, Ar<sub>2</sub>는 청구항 1에서 정의한 바와 같다.

**청구항 4**

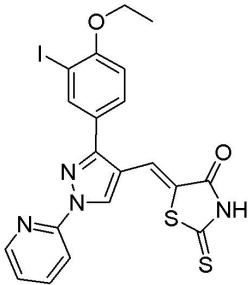
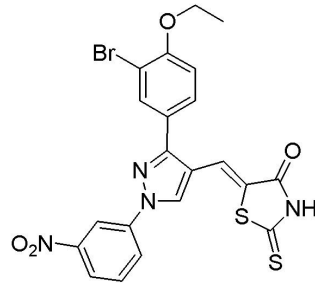
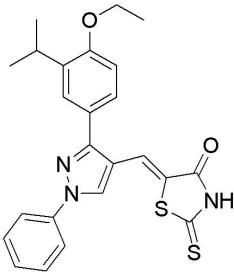
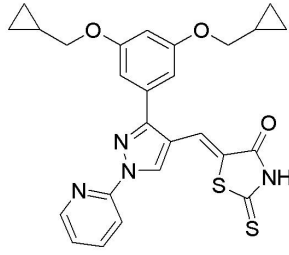
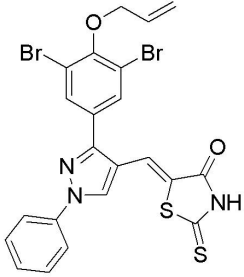
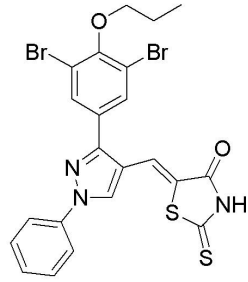
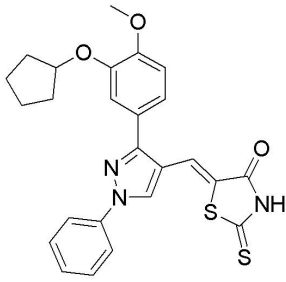
제 3 항에 있어서,

상기 X<sub>1</sub> 내지 X<sub>3</sub>은 독립적으로 수소, 이소프로필기, 3차부틸기, 브롬, 요오드, 메톡시기, 에톡시기, 프로필옥시기, 알릴옥시기 또는 니트로기로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 로다닌계 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 이의 염.

**청구항 5**

제 4 항에 있어서,

상기 화학식 1의 로다닌계 화합물은 하기 구조의 화합물로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 로다닌계 화합물 또는 약제학적으로 허용되는 이의 염.



**청구항 6**

제 1 항, 제 3 항 내지 제 5 항에서 선택되는 어느 한 항의 로다닌계 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항암제 조성물.

**청구항 7**

삭제

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

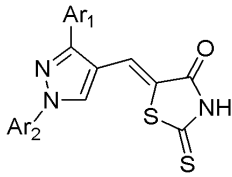
**발명의 목적**

**발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술**

<1> 본 발명은 세포분열주기에 결정적으로 작용하는 CDC25B 탈인산화효소에 대한 탁월한 저해활성을 가지고 있는 하기 화학식 1의 로다닌계 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염, 및 이를 유효성분으로 함유하는 항암제

에 관한 것이다.

<2> [화학식 1]



<3>

<4> 상기 식에서 Ar<sub>1</sub> 및 Ar<sub>2</sub>는 독립적으로 C<sub>5</sub> ~ C<sub>10</sub>의 방향족고리 또는 헤테로 방향족고리로부터 선택되고, 상기 Ar<sub>1</sub> 및 Ar<sub>2</sub>는 C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> 알킬기, 할로젠원자, C<sub>1</sub> ~ C<sub>7</sub> 알콕시기, C<sub>3</sub> ~ C<sub>4</sub> 알케닐옥시기, C<sub>2</sub> ~ C<sub>4</sub> 아실기, 시안기 또는 니트로기로부터 선택된 하나 또는 둘 이상 치환기로 치환될 수 있다.

<5> 본 발명의 화학식 1과 유사한 로다닌계 화합물에 대한 보고는 두 건의 특허가 PCT에 출원되어 있으며 Pin1-modulating 화합물로서 알려져 있다(WO 2004093803 A2, WO 2004028535 A1). 상기의 특허의 화합물들은 (1H-피라졸-4-일메틸렌)로다닌의 화학구조를 일부 포함하고 있으나 피라졸의 1-위치가 메틸로 치환되어 있으며 피라졸의 5-위치에 치환체를 갖는 점이 본 발명의 화합물과 다르다. 또 다른 유사한 화학구조는 일본특허(JP 55029804)의 화합물은 티아졸의 5-위치에 연결된 피라졸 구조가 피라졸론의 구조를 하고 있어 본 발명의 화학식 1의 화합물과 다르며 실버할라이드 감광제에서 흐려짐과 발광현상을 저해하는 염료로서 유용하다고 공지되어 있다.

<6> CDC25B는 세포분열을 하는데 있어서 G2/M 주기로의 진행을 결정하는 매우 중요한 탈인산화효소(phosphatase)로서, CDC25B의 활성을 저해하게 되면 세포분열이 저해되고 결국 세포사멸로 이어져 항암작용을 하게 된다. CDC25B는 위암(Jpn. J. Cancer Res. 1997, 88, 9947), 대장암(Exp.Cell Res. 1998, 240, 236; Lab. Invest. 2001, 81, 465), 폐암(Cancer Res. 1998, 58, 4082), 뇌암 및 후두암(Cancer Res. 1997, 57, 2366), 그리고 유방암(Cancer statistics in Japan 1997 Foundation for Promotion of Cancer Research, Tokyo, Jpn.) 등 대부분의 종양에서 과발현되는 것이 관찰되었으며, CDC25B가 과발현된 유전형질변형 생쥐(Oncogene 1999, 18, 456 1)에서 유선의 이상증식이 관찰되었으며, 카시노젠(9,10-디메틸-1,2-벤즈안트라센)을 처리 시 유방암이 매우 쉽게 발생하는 것이 보고되었다. 따라서 CDC25B는 항암제 개발에 있어서 중요한 타겟이 되며, CDC25B를 저해함과 동시에 정상세포에 대한 세포독성이 적은 새로운 항암제의 개발 가능성이 크다고 할 수 있다.

**발명이 이루고자 하는 기술적 과제**

<7> 이에, 본 발명자들은 CDC25B에 대한 선택적 저해활성을 가지는 화합물을 개발하고자 연구하였고, 그 결과 5-(3-아릴-1H-피라졸-4-일메틸렌)로다닌 유도체들이 CDC25B에 우수한 저해활성을 가지고 있고, 다른 유사한 탈인산화효소에 대한 선택성을 가진다는 것을 확인함과 동시에 여러 가지 암세포들에 대한 항암효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

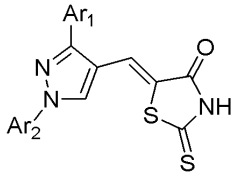
<8> 따라서, 본 발명은 CDC25B에 우수한 저해활성을 가지며 암세포들에 대한 항암효과가 높은 새로운 로다닌계 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공하는 데 목적이 있다.

<9> 또한 본 발명은 새로운 로다닌계 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항암제 또는 탈인산화효소(CDC25B) 활성억제용 약학적 조성물을 제공하는 데 또 다른 목적이 있다.

**발명의 구성 및 작용**

<10> 본 발명은 다음 화학식 1로 표시되는 새로운 로다닌계 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이고, 또한 상기 새로운 로다닌계 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항암제 및 탈인산화효소(CDC25B) 활성억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

<11> [화학식 1]



<12>  
 <13> 상기 식에서 Ar<sub>1</sub> 및 Ar<sub>2</sub>는 독립적으로 C<sub>5</sub> ~ C<sub>10</sub>의 방향족고리 또는 헤테로 방향족고리로부터 선택된다.

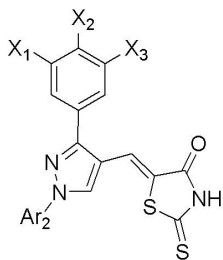
<14> 이와 같은 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

<15> 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 로다닌계 화합물이 세포분열 주기의 G2/M으로의 진행을 결정하는데 결정적인 역할을 수행하게 되는 CDC25B 탈인산화효소에 대해 저해활성을 가지고 있어 세포분열을 저해하는 특성을 가지고 있으며, 또한 인체 내의 다른 탈인산화효소들에 대해 선택성을 나타냄과 동시에 누드마우스를 이용한 실험에서 사람의 암세포를 파괴하는 효과가 있다.

<16> 상기 화학식 1로 표시되는 로다닌계 화합물에서 Ar<sub>1</sub> 및 Ar<sub>2</sub>는 독립적으로 C<sub>5</sub> ~ C<sub>10</sub>의 방향족고리 또는 헤테로 방향족고리로부터 선택되고, 상기 헤테로 방향족 고리는 방향족 고리 내에 질소, 산소 또는 황으로부터 선택되는 헤테로 원소를 포함하는 방향족 고리를 의미한다. 상기 Ar<sub>1</sub> 및 Ar<sub>2</sub>는 독립적으로 페닐 또는 피리딘으로부터 선택되는 것이 보다 바람직하고, 상기 Ar<sub>1</sub> 및 Ar<sub>2</sub>는 C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> 알킬기, 할로젠원자, C<sub>1</sub> ~ C<sub>7</sub> 알콕시기, C<sub>3</sub> ~ C<sub>4</sub> 알케닐옥시기, C<sub>2</sub> ~ C<sub>4</sub> 아실기, 시안기 또는 니트로기로부터 선택된 하나 또는 둘 이상 치환기로 치환될 수 있다. 상기 치환기 중에서 C<sub>1</sub> ~ C<sub>7</sub> 알콕시기는 C<sub>3</sub> ~ C<sub>6</sub>의 시클로알킬기를 포함할 수 있다.

<17> 상기 화학식 1의 로다닌계 화합물은 하기 화학식 1-1의 화합물로부터 선택되는 것이 더욱 바람직하다.

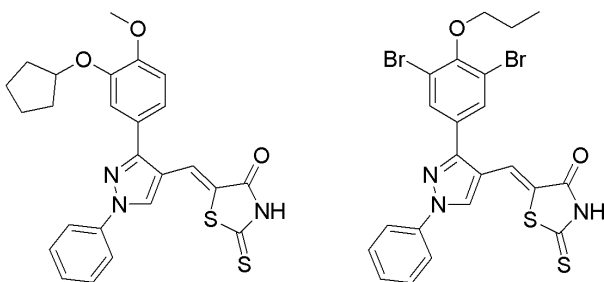
<18> [화학식 1-1]



<19>  
 <20> 상기 식에서 X<sub>1</sub> 내지 X<sub>3</sub>은 독립적으로 수소, C<sub>1</sub> ~ C<sub>4</sub> 알킬기, 할로젠원자, C<sub>1</sub> ~ C<sub>7</sub> 알콕시기, C<sub>3</sub> ~ C<sub>4</sub> 알케닐옥시기, C<sub>2</sub> ~ C<sub>4</sub> 아실기, 시안기 또는 니트로기로부터 선택되는 치환기이고, Ar<sub>2</sub>는 앞에서 정의한 바와 같다.

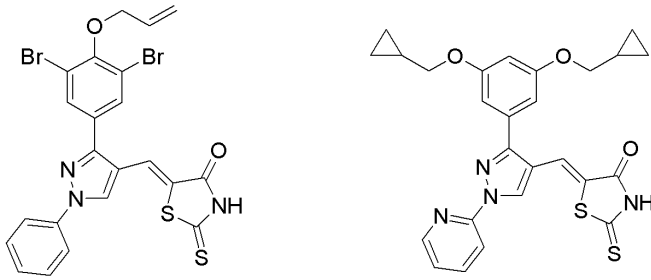
<21> 상기 화학식 1-1에서 상기 X<sub>1</sub> 내지 X<sub>3</sub>은 독립적으로 이소프로필기, 3차부틸기, 브롬, 요오드, 메톡시기, 에톡시기, 프로필옥시기, 알릴옥시기 또는 니트로기로부터 선택되는 것이 보다 더 바람직하다.

<22> 상기 화학식 1로 표시되는 로다닌계 화합물은 하기 구조의 화합물을 포함한다.

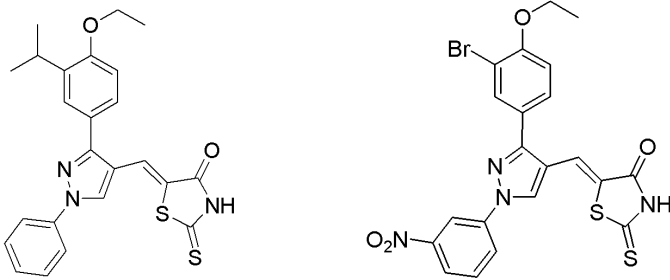


<23>

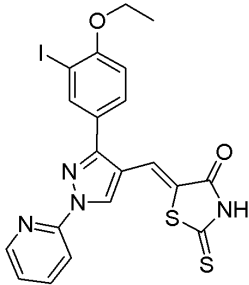
<24>



<25>



<26>



<27>

또한, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 로다닌계 화합물은 당해 기술 분야에서 통상적인 방법에 의해 약제학적으로 허용 가능한 염을 형성할 수 있다. 예를 들면, 염산, 브롬산, 황산, 인산, 아세트산, 시트르산, 푸마르산, 락트산, 말레산, 숙신산 및 타르타르산 등의 유기 또는 무기산과 함께 약제학적으로 허용 가능한 이들의 산의 염을 형성하거나, 또는 나트륨, 칼륨 등의 알칼리금속이온과 반응하여 이들의 금속염을 형성하거나, 또는 암모늄 이온과 반응하여 또 다른 형태의 약제학적으로 허용 가능한 염을 형성할 수 있다.

<28>

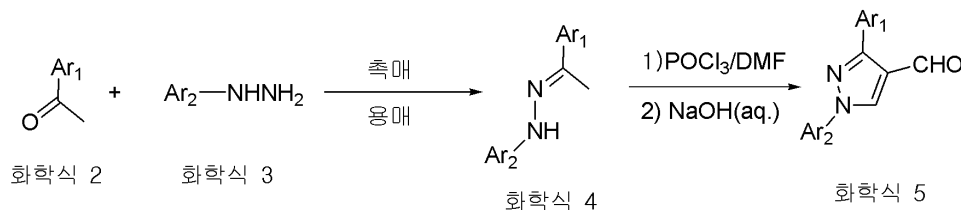
또한, 본 발명에 따른 항암제 또는 탈인산화효소(CDC25B) 활성억제용 약학적 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하고 여기에 통상의 무독성 약제학적으로 허용 가능한 담체, 보강제 및 부형제 등을 첨가하여 약제학적 분야에서 통상적인 제제 예를 들면 정제, 캡슐제, 트로키제, 액제, 현탁제 등의 경구투여용 제제로 제제화 할 수 있다. 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 인체에 대한 투여용량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70 kg인 성인환자를 기준으로 할 때 일반적으로 10 ~ 400 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

<29>

한편, 상기 화학식 1로 표시되는 로다닌계 화합물의 제조방법은 하기 반응식 1 및 반응식 2의 단계로 구분하여 설명할 수 있다. 그러나 상기 화학식 1의 화합물의 제조방법이 하기 반응식에 제한되는 것은 아니며 공지와 다른 유기합성 반응들을 사용하여 다양하게 제조할 수 있다.

<30>

[반응식 1]



<31>

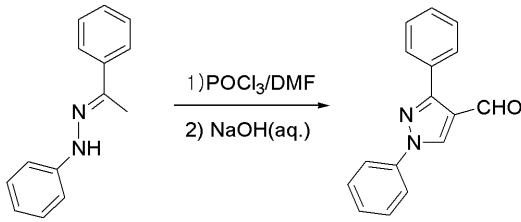
<32>

상기 반응식 1에서, Ar<sub>1</sub> 및 Ar<sub>2</sub>는 독립적으로 C<sub>5</sub> ~ C<sub>10</sub>의 방향족고리 또는 헤테로 방향족고리로부터 선택되고, 보





<43> [제조예 2] 1,3-디페닐-1H-피라졸-4-카르복실알데히드의 제조



<44>

<45> 5 mL의 무수 디메틸포름아미드에 옥시염화인 (3.73 mL, 40.00 mmol)을 넣고 0 °C에서 1 시간 동안 교반시켰다. 10 mL의 무수 디메틸포름아미드에 녹인 아세트페논의 페닐히드라존 (4.2 g, 20.00 mmol)을 천천히 적가한 다음, 온도를 70 - 80 °C로 올려 6 시간 동안 교반하였다. 얼음물로 온도를 0 °C로 냉각시키고 30% 수산화나트륨 수용액을 천천히 적가하여 pH 7 - 8로 맞추고 생성된 고체를 여과한 다음, 물 (10 mL × 3 회)로 세척하였다. 여과된 고체를 건조시키면 4.0 g (80.5%)의 목적물을 얻는다.

<46> <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.37-7.84 (m, 9H), 8.56 (s, 1H), 10.06 (s, 1H).

<47> [실시예 1-1] 5-(1,3-디페닐-1H-피라졸-4-일메틸렌)-2-티오옥소티아졸리딘-4-온(5-(1,3-Diphenyl-1H-pyrazol-4-ylmethylene)-2-thioxothiazolidin-4-one)(화합물 11)

<48> 1,3-디페닐-1H-피라졸-4-카바알데히드(1,3-Diphenyl-1H-pyrazole-4-carbaldehyde) (250 mg, 1.0 mmol)을 빙초산(glacial AcOH) 20 mL에 녹인 후 로다닌(rhodanine) (133 mg, 1.0 mmol)과 아세트산나트륨(sodium acetate) (98 mg, 1.2 mmol)을 넣고 24 시간동안 환류시켰다. 반응이 종결되면 얼음물을 넣어 생긴 고체를 여과하였다. 증류수로 3번, n-헥산(n-hexane)으로 1번 씻어주었다. 노란색의 고체를 건조하여 원하는 5-(1,3-디페닐-1H-피라졸-4-일메틸렌)2-티오옥소티아졸리딘-4-온을 300 mg 얻었다.

<49> <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.27 (s, 1H), 7.49-7.83 (m, 10H), 8.55 (s, 1H).

<50> [실시예 1-2] 5-[3-(3-시클로펜틸옥시-4-메톡시페닐)-1-페닐-1H-피라졸-4-일메틸렌]-2-티오옥소티아졸리딘-4-온(5-[3-(3-cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-ylmethylene]-2-thioxothiazolidin-4-one)(화합물 12)

<51> 3-(3-시클로펜틸옥시-4-메톡시페닐)-1-페닐-1H-피라졸-4-카바알데히드(3-(3-cyclopentyloxy-4-methoxyphenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyde) (362 mg, 1.0 mmol)을 빙초산(glacial AcOH 20 mL)에 녹인 후 로다닌(rhodanine) (133 mg, 1.0 mmol)과 아세트산나트륨(sodium acetate) (98 mg, 1.2 mmol)을 넣고 24 시간 동안 환류시켰다. 반응이 종결되면 얼음물을 넣어 생긴 고체를 여과하였다. 증류수로 3번, n-헥산(n-hexane)으로 1번 씻어주었다. 노란색의 고체를 건조하여 표제화합물 300 mg(63%)을 얻었다.

<52> <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.83 (s, 3H), 4.86 (m, 1H), 7.12-8.06 (m, 9H), 8.73 (s, 1H), 13.74 (br, 1H, NH).

<53> [실시예 1-3] 5-[3-(3,5-디브로모-4-프로필옥시-페닐)-1-페닐-1H-피라졸-4-일메틸렌]-2-티오옥소티아졸리딘-4-온(5-[3-(3,5-Dibromo-4-propyloxy-phenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-ylmethylene]-2-thioxo-thiazolidin-4-one)(화합물 13)

<54> 3-(3,5-디브로모-4-프로필옥시-페닐)-1-페닐-1H-피라졸-4-카바알데히드(3-(3,5-Dibromo-4-propyloxy-phenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyde) (0.5 g, 1.07 mmol)을 toluene 20 ml에 녹이고 로다닌 (133 mg, 1.07 mmol)와 초산(AcOH)과 피페리딘(piperidine)을 소량 가한 후 덤스탁트랩(dean stark trap)을 이용하여 물을 제거하고 환류하였다. 생성된 고체를 에틸에테르(ethyl ether)로 여과(filter)하고 고체를 데시케이터(desicator) 내에서 건조하여 노란색의 표제화합물(495 mg, 80%)을 얻었다.

<55> <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.12 (t, 3H, J = 7.3 Hz), 1.84-1.95 (m, 2H), 4.06 (t, 2H, J = 6.3 Hz), 7.40 (s, 1H), 7.49 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 7.61 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 7.97 (s, 2H), 8.08 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 8.79 (s, 1H).

<56> [실시예 1-4] 5-[3-(3,5-디브로모-4-알릴옥시-페닐)-1-페닐-1H-피라졸-4-일메틸렌]-2-티오옥소티아졸리딘-4-온

**(5-[3-(3,5-Dibromo-4-allyloxy-phenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-ylmethylene]-2-thioxo-thiazolidin-4-one)(화합물 14)**

<57> 3-(3,5-디브로모-4-알릴옥시-페닐)-1-페닐-1H-피라졸-4-카바알데히드(3-(3,5-Dibromo-4-allyloxy-phenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyde) (0.5 g, 1.08 mmol)을 톨루엔 20 ml에 녹이고 로다닌 (143 mg, 1.08 mmol)와 초산(AcOH)과 피페리딘(piperidine)을 소량 가한 후 딘스탁트랩(dean stark trap)을 이용하여 물을 제거하고 환류하였다. 생성된 고체를 에틸에테르(ethyl ether)로 여과(filter)하고 고체를 데시케이터(desicator) 내에서 건조하여 노란색의 표제화합물 (511 mg, 82%)을 얻었다.

<58> <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4.64 (d, 2H, J = 5.7 Hz), 6.12-6.29 (m, 1H), 5.37 (d, 2H, J = 10.2 Hz), 5.55 (d, 2H, J = 17.1 Hz), 7.35-8.10 (m, 8H), 8.78 (s, 1H).

**[실시예 1-5] 5-[3-(3,5-비스-시클로프로필메틸옥시-페닐)-1-페닐-1H-피라졸-4-일메틸렌]-2-티오옥소티아졸리딘-4-온(5-[3-(3,5-Bis-cyclopropylmethyloxy-phenyl)-1-pyridin-2-yl-1H-pyrazol-4-ylmethylene]-2-thioxo-thiazolidin-4-one)(화합물 15)**

<60> 3-(3,5-비스-시클로프로필메틸옥시-페닐)-1-페닐-1H-피라졸-4-카바알데히드(3-(3,5-Bis-cyclopropylmethyloxy-phenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyde) (0.5 g, 1.28 mmol)을 톨루엔 20 ml에 녹이고 로다닌 (170 mg, 1.28 mmol)와 초산(AcOH)과 피페리딘(piperidine)을 소량 가한 후 딘스탁트랩(dean stark trap)을 이용하여 물을 제거하고 환류하였다. 생성된 고체를 에틸에테르(ethyl ether)로 여과(filter)하고 고체를 데시케이터(desicator) 내에서 건조하여 노란색의 표제화합물(550 mg, 2.5 mmol, 85%)을 얻었다.

<61> <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 0.38 (t, 2H, J = 4.2 Hz), 0.64 (t, 2H, J = 4.2 Hz), 1.20-1.30 (m, 1H), 3.92 (d, 4H, J = 7.0 Hz), 6.63-8.38 (m, 7H), 8.78 (s, 1H), 13.8 (br, 1H NH).

**[실시예 1-6] 5-[3-(3-에톡시-4-이소프로필-페닐)-1-페닐-1H-피라졸-4-일메틸렌]-2-티오옥소티아졸리딘-4-온(5-[3-(3-Ethoxy-4-isopropyl-phenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-ylmethylene]-2-thioxo-thiazolidin-4-one)(화합물 16)**

<63> 3-(3-에톡시-4-이소프로필-페닐)-1-페닐-1H-피라졸-4-카바알데히드(3-(3-Ethoxy-4-isopropyl-phenyl)-1-phenyl-1H-pyrazol-4-carbaldehyde) (0.5 g, 1.50 mmol)을 톨루엔 20 ml에 녹이고 로다닌 (200 mg, 1.50 mmol)와 초산(AcOH)과 피페리딘(piperidine)을 소량 가한 후 딘스탁트랩(dean stark trap)을 이용하여 물을 제거하고 환류하였다. 생성된 고체를 에틸에테르(ethyl ether)로 여과(filter)하고 고체를 데시케이터(desicator) 내에서 건조하여 노란색의 표제화합물(560 mg, 83%)을 얻었다.

<64> <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 1.27 (d, 6H, J = 6.9 Hz), 1.44 (t, 3H, J = 6.7 Hz), 1.60-1.65 (m, 1H), 4.17 (q, 2H, J = 6.9 Hz), 7.17 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 7.45-7.65 (m, 6H), 8.09 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 8.74 (s, 1H), 13.76 (br, 1H, NH).

**[실시예 1-7] 5-[3-(3-브로모-4-에톡시페닐)-1-(3-니트로페닐)-1H-피라졸-4-일메틸렌]-2-티오옥소티아졸리딘-4-온(5-[3-(3-Bromo-4-ethoxyphenyl)-1-(3-nitrophenyl)-1H-pyrazol-4-ylmethylene]-2-thioxo-thiazolidin-4-one)(화합물 17)**

<66> 3-(3-브로모-4-에톡시페닐)-1-(3-니트로페닐)-1H-피라졸-4-카바알데히드(3-(3-Bromo-4-ethoxy-phenyl)-1-(3-nitro-phenyl)-1H-pyrazole-4-carbaldehyde) (0.5 g, 1.20 mmol)을 톨루엔 20 ml에 녹이고 로다닌 (160 mg, 1.20 mmol)와 초산(AcOH)과 피페리딘(piperidine)을 소량 가한 후 딘스탁트랩(dean stark trap)을 이용하여 물을 제거하고 환류하였다. 생성된 고체를 에틸에테르(ethyl ether)로 여과(filter)하고 고체를 데시케이터(desicator) 내에서 건조하여 노란색의 표제화합물 (0.53 g, 83%)을 얻었다.

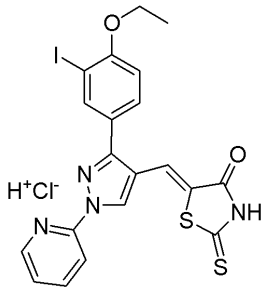
<67> <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.42 (t, 3H, J = 6.9 Hz), 4.22 (q, 2H, J = 6.9 Hz), 7.32-7.90 (m, 5H), 8.24 (d, 1H, J = 8.4 Hz), 8.52 (d, 1H, J = 8.1 Hz), 8.86 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 13.77 (br, 1H, NH).

**[실시예 1-8] 5-[3-(4-에톡시-3-아이오도페닐)-1-피리딘-2-일-1H-피라졸-4-일메틸렌]-2-티오옥소티아졸리딘-4-온(5-[3-(4-Ethoxy-3-iodo-phenyl)-1-pyridin-2-yl-1H-pyrazol-4-ylmethylene]-2-thioxo-thiazolidin-4-one)(화합물 18)**

<69> 3-(4-에톡시-3-아이오도페닐)-1-피리딘-2-일-1H-피라졸-4-카바알데히드(3-(4-Ethoxy-3-iodo-phenyl)-1-pyridin-2-yl-1H-pyrazole-4-carbaldehyde) (0.52 g, 1.24 mmol)을 톨루엔 20 ml에 녹이고 로다닌 (148 mg, 1.114 mmol)와 초산(AcOH)과 피페리딘(piperidine)을 소량 가한 후 딘스탁트랩(dean stark trap)을 이용하여 물을 제거하고 환류하였다. 생성된 고체를 에틸에테르(ethyl ether)로 여과(filter)하고 고체를 데시케이터(desicator) 내에서 건조하여 노란색의 표제화합물 (574 mg, 84%)을 얻었다.

<70> <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.42 (t, 3H, J = 6.9 Hz), 4.22 (q, 2H, J = 6.9 Hz), 7.23-8.09 (m, 7H), 8.58 (t, 1H, J = 5.4 Hz), 8.77 (s, 1H), 13.84 (br, 1H, NH).

<71> [실시예 1-9] 5-[3-(4-에톡시-3-아이오도페닐)-1-피리딘-2-일-1H-피라졸-4-일메틸렌]-2-티오옥소티아졸리딘-4-온의 염산염 (5-[3-(4-Ethoxy-3-iodo-phenyl)-1-pyridin-2-yl-1H-pyrazol-4-ylmethylene]-2-thioxo-thiazolidin-4-one · HCl salt) (화합물 19)



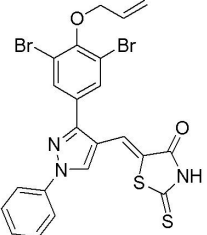
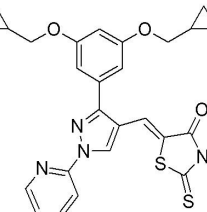
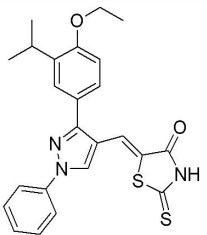
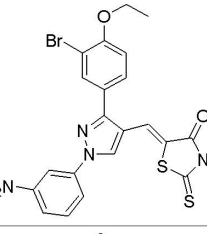
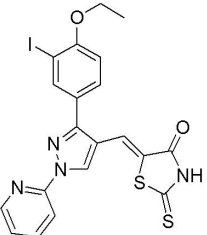
<72>

<73> 1 mL의 MeOH에 실시예 1-8에서 제조된 화합물 18 (20 mg, 0.037 mmol)을 넣은 후 0 °C하에서 HCl (3.0 M in MeOH, 37 μl)을 넣은 후 상온으로 올려 1 h 동안 교반시켰다. 용매를 감압 하에 제거한 후 건조하여 표제화합물을 얻었다.

<74> [표 1]

화합물	구조	<sup>1</sup> H NMR
11		<sup>1</sup> H NMR (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 7.27 (s, 1H), 7.49-7.83 (m, 10H), 8.55 (s, 1H)
12		<sup>1</sup> H NMR (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 3.83 (s, 3H), 4.86 (m, 1H), 7.12-8.06 (m, 9H), 8.73 (s, 1H), 13.74 (br, 1H, NH)
13		<sup>1</sup> H NMR (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 1.12 (t, 3H, J = 7.3 Hz), 1.84-1.95 (m, 2H), 4.06 (t, 2H, J = 6.3 Hz), 7.40 (s, 1H), 7.49 (d, 1H, J = 7.3 Hz), 7.61 (t, 2H, J = 7.5 Hz), 7.97 (s, 2H), 8.08 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 8.79 (s, 1H)

<75>

14		$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 4.64 (d, 2H, $J = 5.7$ Hz), 6.12-6.29 (m, 1H), 5.37 (d, 2H, $J = 10.2$ Hz), 5.55 (d, 2H, $J = 17.1$ Hz), 7.35-8.10 (m, 8H), 8.78 (s, 1H)
15		$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 0.38 (t, 2H, $J = 4.2$ Hz), 0.64 (t, 2H, $J = 4.2$ Hz), 1.20-1.30 (m, 1H), 3.92 (d, 4H, $J = 7.0$ Hz), 6.63-8.38 (m, 7H), 8.78 (s, 1H), 13.8 (br, 1H NH)
16		$^1\text{H NMR}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 1.27 (d, 6H, $J = 6.9$ Hz), 1.44 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz), 1.60-1.65 (m, 1H), 4.17 (q, 2H, $J = 6.9$ Hz), 7.17 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.45-7.65 (m, 6H), 8.09 (d, 2H, $J = 8.1$ Hz), 8.74 (s, 1H), 13.76 (br, 1H, NH)
17		$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) $\delta$ 1.42 (t, 3H, $J = 6.9$ Hz), 4.22 (q, 2H, $J = 6.9$ Hz), 7.32-7.90 (m, 5H), 8.24 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 8.52 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 8.86 (s, 1H), 8.95 (s, 1H), 13.77 (br, 1H, NH).
18		$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) $\delta$ 1.42 (t, 3H, $J = 6.9$ Hz), 4.22 (q, 2H, $J = 6.9$ Hz), 7.23-8.09 (m, 7H), 8.58 (t, 1H, $J = 5.4$ Hz), 8.77 (s, 1H), 13.84 (br, 1H, NH).

<76>

<77> [실시예 2] 제제화 예

<78> 한편, 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 다음은 본 발명에 따른 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

<79> **제제 1** : 정제(직접 가압)

<80> 활성성분 5.0 mg을 체로 친 후, 락토스 14.1 mg, 크로스포비돈(Crospovidone) USNF 0.8 mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.1 mg을 혼합하고 가압하여 정제로 만들었다.

<81> **제제 2** : 정제(습식 조립)

<82> 활성성분 5.0 mg을 체로 친 후, 락토스 16.0 mg과 녹말 4.0 mg을 섞었다. 폴리솔베이트 80 0.3 mg을 순수한 물에 녹인 후 이 용액의 적당량을 첨가한 다음, 미립화하였다. 건조 후에 미립을 체질한 후 콜로이드 실리콘 디옥사이드 2.7 mg 및 마그네슘 스테아레이트 2.0 mg과 섞었다. 미립을 가압하여 정제로 만들었다.

<83> **제제 3** : 분말과 캡슐제

<84> 활성성분 5.0 mg을 체로 친 후에, 락토스 14.8 mg, 폴리비닐 피롤리돈 10.0 mg, 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg와 함께 섞었다. 혼합물을 적당한 장치를 사용하여 단단한 No. 5 젤라틴 캡슐에 채웠다.

<85> [실시예 3] CDC25B 효소 효력검정(Enzyme assay)

<86> CDC25B의 촉매 도메인(catalytic domain)(aa 378-566)에 해당하는 부분을 GST와 결합하여 융합 단백질(fusion protein)을 만든 후 대장균(E.coli)에서 발현 생산하여 효소원으로 사용하였다. 효소 효력검정(Enzyme assay)은 96-웰 플레이트(96 well plate)상에서 웰(well)당 최종 반응 부피를 200  $\mu$ l로 맞추어서 수행하였다. 반응물에는 완충액(30 mM Tris buffer, pH 8.5, 75 mM NaCl, 0.67 mM EDTA, 1 mM DTT) 170  $\mu$ l, CDC25B 효소 20  $\mu$ l(0.2  $\mu$ g), DMSO에 녹인 시험화합물 10  $\mu$ l를 각각 첨가하며 최종 반응 농도를 1  $\mu$ g/mL CDC25B 효소, 20  $\mu$ M FDP가 되도록 맞추어 실온에서 1 시간 배양하여 측정하였다. 이 때 FDP와 DTT는 검정하기 바로 전에 완충액에 첨가하여 항상 신선한 상태에서 검정을 실시하도록 하였다. 1 시간 배양 후 효소반응에 의해 생성되는 형광(fluorescence)을 485 nm(excitation), 538 nm(emission)에서 측정하였다.

<87> 시험화합물은 먼저 최종 농도가 10  $\mu$ M이 되게 처리하여 1차 스크리닝을 한 후 우수한 억제능을 보이는 화합물을 선별하여 IC<sub>50</sub> 값을 구하였다. 1차 스크리닝으로 선별된 화합물은 일반적으로 최종 농도가 1, 2, 5, 10  $\mu$ M이 되게 처리하여 %억제율 값을 구하였으며, 억제효과가 조금 떨어지는 경우(20  $\mu$ M에서 50% 이하의 억제효과를 보이는 경우)에는 화합물의 농도를 20  $\mu$ M까지 높여 처리한 후 %억제율을 구하여 IC<sub>50</sub> 값을 얻었다.

<88> 상기 실시예 1에서 합성한 화합물들에 대하여 cdc25B에 대한 IC<sub>50</sub> 값을 다음 표 2에 열거하였다.

<89> [표 2]

실시예	화합물	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
1-1	11	>10
1-2	12	3.53
1-3	13	1.60
1-4	14	1.40
1-5	15	3.90
1-6	16	3.70
1-7	17	0.88
1-8	18	0.45
1-9	19	0.32

<90>

<91> [실시예 4] 세포독성시험(Cell cytotoxicity assay)

<92> 암세포배양

<93> 항암활성 측정에 사용한 세포들은 HeLa, HCT116이다. 이들 암세포는 모두 인간 유래의 종양 세포주들을 사용하였다. 이 세포들은 모두 배양액으로서 5% 소의 태아 혈청으로 보강된 RPMI 1640 배양액을 사용하여, 37 °C 항온 항습 5% CO<sub>2</sub>, 인큐베이터에서 배양하였다. 세포의 계대는 3 ~ 4일에 1 회씩 하였으며, 세포를 부착 면으로부터 분리하기 위하여 PBS(phosphate buffered saline) 용액에 0.25% 트립신과 3 mM 트란스-1,2-디아미노사이클로헥산-N,N,N,N-테트라아세트산(CDTA)을 용해시킨 용액을 사용하였다.

<94> 활성측정

<95> 1989년 미국의 국립암연구소에서 약물의 생체외(in vitro) 항암활성을 측정하기 위하여 개발된 SRB분석법(sulforhodamine B assay method)을 사용하였다. 즉, 계대 중인 세포들을 실험에 사용하기 위하여 트립신-EDTA 용액을 이용하여 세포들을 착면으로부터 분리시키고, 플레이트(96 well microplate, Falcon사 제품)에 웰(well)당 세포수가  $2 \times 10^3$ 이 되도록 분주하였다. 분주된 세포들은 CO<sub>2</sub> 인큐베이터내에서 24 시간 배양하여 바닥에 부착시킨 후, 아스피레이터(aspirator)로 배양액을 제거하고, 6 농도의 로그 투여량(log dose)으로 배양액에 희석된 화합물 용액들을 세포가 들어 있는 웰에 각각 100  $\mu$ l씩 3 배수로 넣어주고, 48 시간 동안 더 배양하였다. 화합물을 용해시키기 위하여 필요에 따라 디메틸설포사이드(DMSO)를 사용하였다. 또한 이렇게 희석한 화합물 용액은 세포에 가하기 전에 0.22 mL 필터로 여과하여 실험의 무균 상태를 유지하였다. 세포를 약물과 48시간 배양한 후 각 웰의 배양액을 제거하고 10% 트리클로로아세트산(TCA)를 100  $\mu$ l씩 가하여 4 °C에서 1 시간 동안 방치하여

세포들을 플레이트의 바닥면에 고정시켰다. 세포의 고정이 끝난 후 플레이트를 물로 5 ~ 6회 세척하여 남아있는 TCA용액을 완전히 제거하고, 남은 물기가 없도록 실온에서 건조시켰다. 완전히 건조된 플레이트는 웰당 100 mL의 1% 아세트산 용액에 0.4% SRB를 용해시킨 염색용액을 가하여 30 분간 세포를 염색하고, 다시 1% 아세트산 용액으로 5 ~ 6회 세척하여 세포에 결합하지 않은 SRB를 제거하였다. 이렇게 염색된 셀 플레이트(cell plate)들은 다시 실온에서 건조시킨 후 웰당 100 mL의 10 mM 완충되지 않은 트리스마 염기 용액(unbuffered trisma base solution)을 가하여 진탕기(titer plate shaker)로 10 분간 흔들어 염색약을 용출시킨 후 마이크로 플레이트 리더(microplate reader)를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 암세포들에 대한 약물의 효과를 계산하기 위하여 약물을 가할 때의 세포수(Tz)와, 약물이 들어있지 않은 배양액을 가하여 48 시간 배양하였을 때의 세포수(C) 및 각 농도의 약물과 함께 48 시간 배양했을 때의 세포수(T) 등을 측정하여 다음의 수학적식에 의하여 계산하였다.

$$\text{항암활성} = \frac{T - T_z}{C - T_z} \times 100 \quad (T_z > T \text{인 경우})$$

$$\text{항암활성} = \frac{T - T_z}{T_z} \times 100 \quad (T_z < T \text{인 경우})$$

<96>

<97>

이렇게 계산된 값들로부터 로터스 프로그램(LOTUS program)의 데이터 회귀(data regression)를 이용하여 약물이 암세포의 성장을 억제하는 정도를 % 저해농도 (% of Inhibition)으로 하여 다음 표 3에 나타내었다.

<98>

[표 3]

암세포주 화합물번호	HeLa (IC <sub>50</sub> )	HCT116 (IC <sub>50</sub> )
13	6.13	
14	6.64	
15	6.04	
16	4.80	
17		5.58

<99>

<100>

또한, 실시예 1에서 합성된 화합물들의 정상 세포에 대한 독성 시험 결과 독성을 거의 유발하지 않았으며 CDC25B 이외의 탈인산화효소에 대한 선택성 시험 결과 다른 탈인산화효소에 대해 선택성을 가지는 것을 확인하였다.

### 발명의 효과

<101>

본 발명에 따른 로다닌계 화합물 즉, 5-(1,3-디아릴-1H-피라졸-4-일메틸렌)로다닌 유도체는 CDC25B 효소에 대한 우수한 저해활성을 나타내고 있으며, 암세포들 즉, HeLa, HCT116에 대해 세포독성을 나타내고 있으므로 CDC25B 효소저해에 근거한 항암 작용이 있음이 분명하다. CDC25B는 세포분열을 하는데 있어서 G2/M 주기로의 진행을 결정하는 매우 중요한 탈인산화효소로서 이를 저해하게 되면 세포분열이 저해되고 결국 세포사멸로 이어져 항암 작용을 하게 된다. CDC25B는 위암, 폐암, 뇌암 및 후두암, 그리고 유방암 등의 종양에서 과발현되고 있으며, CDC25B의 과발현 정도가 큰 환자들이 생존률이 낮은 것으로 보아 CDC25B 효소저해 활성을 갖는 로다닌계 화합물은 암세포 억제에 매우 유용할 것으로 판단된다.

<102>

따라서, 본 발명에 따른 로다닌계 화합물은 부작용이 적은 저독성 항암제로서 사용이 가능하다.