



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년02월23일

(11) 등록번호 10-1494280

(24) 등록일자 2015년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C07C 233/06 (2006.01) A61K 31/16 (2006.01)  
 A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0156713

(22) 출원일자 2012년12월28일

심사청구일자 2012년12월28일

(65) 공개번호 10-2014-0086355

(43) 공개일자 2014년07월08일

(56) 선행기술조사문헌  
 KR1020050001383 A\*

KR1020110095213 A\*

WO2011102668 A3

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국화학연구원

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

(72) 발명자

민용기

대전 서구 청사로 70, 109동 804호 (월평동, 누리아파트)

김혜주

대전 유성구 송강로42번길 61, 207동 313호 (송강동, 송강청솔아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양부현

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 이선화

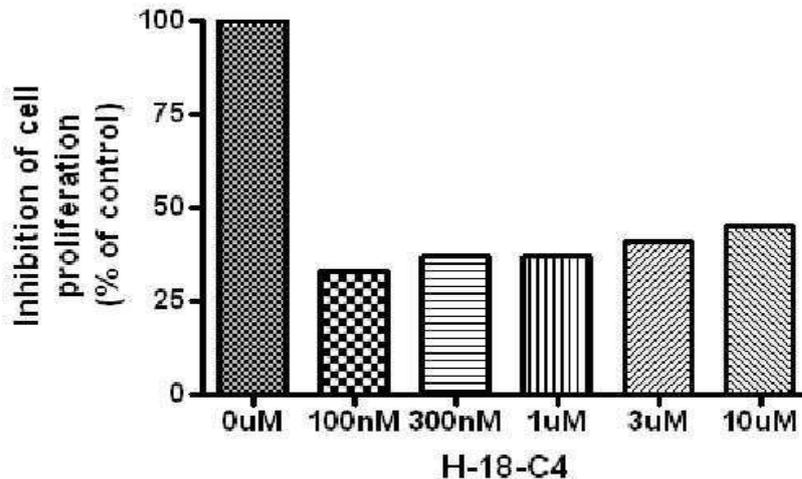
(54) 발명의 명칭 콜치신 유도체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 신규한 콜치신 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 및 이를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명의 신규한 콜치신 유도체는 Plk-1(Polo-like kinase)의 발현을 유의하게 감소시키고 p21 및 p53을 활성화시킴으로써 암세포의 증식을 현저히 억제함과 동시에 암세포의 사멸을 촉진하므로, 다양한 암에 대한 효율적인 치료 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도9



(72) 발명자

**최상운**

대전 유성구 어은로 57, 132동 104호 (어은동, 한빛아파트)

**서지희**

대전 유성구 어은로 57, 107동 603호 (어은동, 한빛아파트)

**이규양**

대전 유성구 어은로 57, 132동 605호 (어은동, 한빛아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20120001123  
 부처명 교육과학기술부  
 연구관리전문기관 한국연구재단  
 연구사업명 미래기반기술개발사업  
 연구과제명 화학유전체연구를 통한 생리활성물질 발굴  
 기여율 1/3  
 주관기관 한국화학연구원  
 연구기간 2012.03.01 ~ 2013.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1003874420110210010001164510038744201102  
 부처명 지식경제부  
 연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원  
 연구사업명 지식경제기술혁신사업  
 연구과제명 Drug Repositioning 기술을 이용한 신약개발 활용시스템 구축  
 기여율 1/3  
 주관기관 한국화학연구원  
 연구기간 2011.12.01 ~ 2013.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

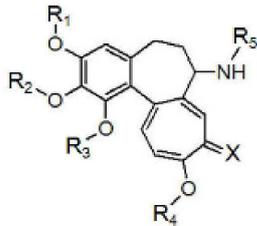
과제고유번호 KK-1203-D0  
 부처명 산업기술연구회  
 연구관리전문기관 산업기술연구회  
 연구사업명 기관고유사업  
 연구과제명 시드형 유효물질 파이프라인 구축  
 기여율 1/3  
 주관기관 한국화학연구원  
 연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

다음의 화학식 1로 표시되는 콜치신 유도체, 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 또는 이의 용매화물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

**화학식 1**



상기 화학식에서, R<sub>1</sub> 내지 R<sub>3</sub>는 각각 독립적으로 수소 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬이고, R<sub>4</sub>는 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬이며, R<sub>5</sub>는 페닐 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬, 페닐 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알콕시카르보닐, 페닐아미노카르보닐, 비사이클로[4.4.0]데크-2,4,6-에닐(bicyclo[4.4.0]dec-2,4,6-enyl) C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알콕시카르보닐 또는 플루오레닐(fluorenyl) C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알콕시카르보닐이며 X는 산소이다.

**청구항 2**

제 1 항에 있어서, 상기 화학식 1의 R<sub>1</sub> 내지 R<sub>4</sub>는 각각 독립적으로 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬이고, R<sub>5</sub>는 페닐 메틸, 페닐 메톡시카르보닐, 페닐아미노카르보닐, 비사이클로[4.4.0]데크-2,4,6-에닐(bicyclo[4.4.0]dec-2,4,6-enyl) C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알콕시카르보닐 또는 플루오레닐(fluorenyl) C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알콕시카르보닐이며, X는 산소인 것을 특징으로 하는 조성물.

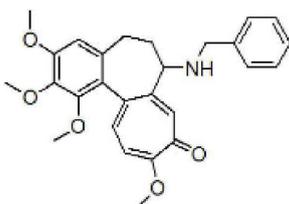
**청구항 3**

제 2 항에 있어서, 상기 화학식 1의 R<sub>1</sub> 내지 R<sub>4</sub>는 메틸인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 4**

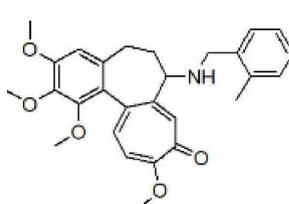
제 1 항에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 콜치신 유도체는 하기의 화학식 3 내지 12로 표시되는 화합물로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물:

**화학식 3**

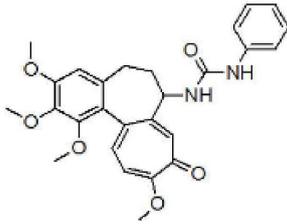


**화학식 5**

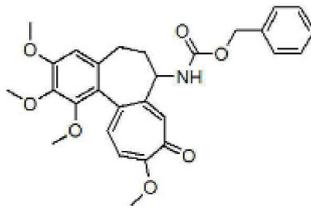
**화학식 4**



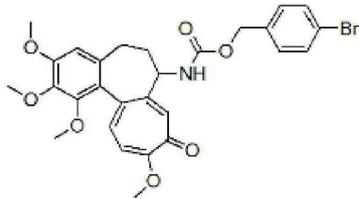
**화학식 6**



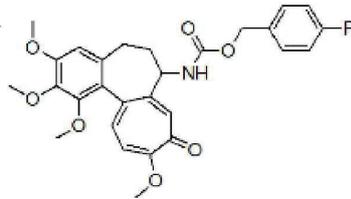
화학식 7



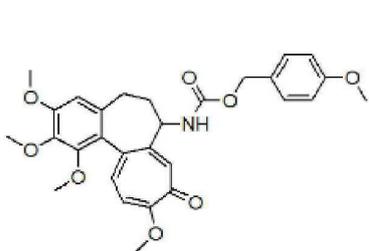
화학식 8



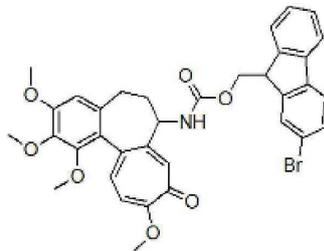
화학식 9



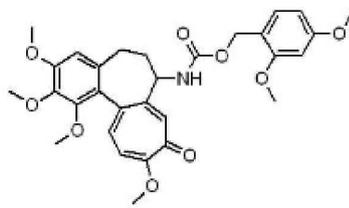
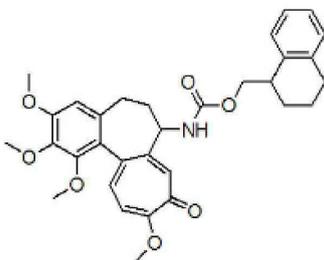
화학식 10



화학식 11



화학식 12



**청구항 5**

제 4 항에 있어서, 상기 콜치신 유도체는 상기 화학식 4로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

제 1 항에 있어서, 상기 암은 대장암 또는 폐암인 것을 특징으로 하는 조성물.

**청구항 8**

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 세포 내 Plk-1(Polo-like kinase-1)의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는

조성물.

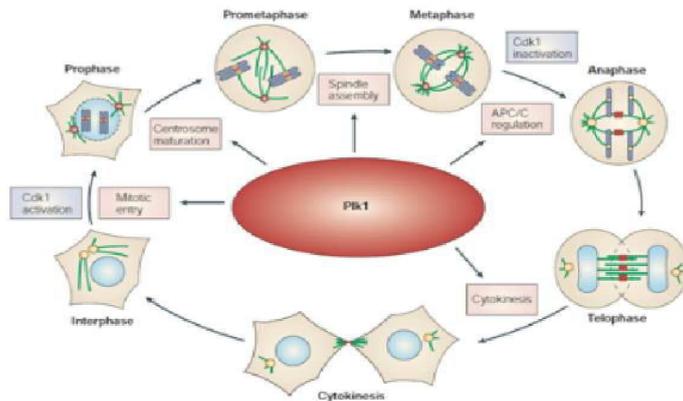
**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 신규한 콜치신 유도체를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

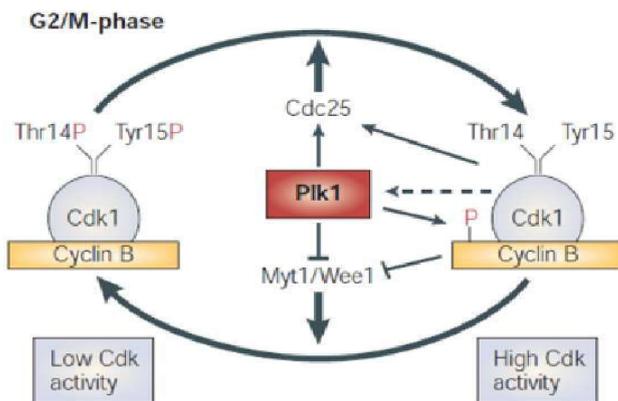
**배경기술**

[0002] Plk(Polo-like kinase)는 세포 주기에서 감수분열, 유사분열 및 세포질 분열을 주요하게 조절한다. 크게 Plk는 3가지 종류로 나뉘어 세포 주기에 작용하는데, Plk1은 유사분열 및 세포질 분열 동안에 역할을 하며, Plk2(Snk)는 DNA-손상에 대한 반응, 시냅스 가소성(synaptic plasticity) 및 G1/S 기능을 조절하는 역할을 하고, Plk3(Fnk, Pnk)는 DNA-손상에 대한 반응, 시냅스 가소성 및 G2/M 기능을 조절하는 역할을 한다. 이 중에서 Plk-1의 경우, 가장 폭 넓게 여러 종류의 암세포주에서 과발현되어 존재하여 암을 유도하는 것으로 알려져 있어, 새로운 항암 타겟으로 많은 연구가 진행되고 있다.



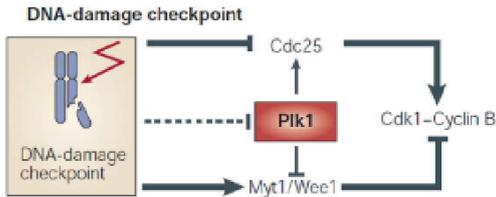
[0003]

[0004] Plk-1은 세포 주기에서 G0, G1, S 기에서는 낮은 발현양을 보이다가 G2 기에서 점차적으로 발현양이 증가되어, M 기에서 전반적인 부분에서 조절한다.



[0005]

[0006] G2/M 기에서는 cdk1과 사이클린 B 복합체에 의해서 시작부터 마지막까지 세포 주기의 신호전달이 이루어져 세포 주기가 진행된다. 유사분열이 진행되면, 활성화 되지 않았던 cdk1/사이클린 B 복합체를 Cdc25가 복합체 중 cdk1의 Thr14P/Tyr15P를 Myt1/Wee1에 의해 인산화 되어 있던 부분을 탈인산화 하여 활성화 시켜 유사분열이 진행되게 한다. 이때, Plk-1이 Cdc25의 활성화에 그리고 Myt1/Wee1에 억제에 관여한다. 이와 함께, DNA-손상 체크포인트의 활성화에도 관여한다.



[0007]

[0008]

cdk1 활성의 지연은 DNA-손상 체크 포인트를 활성화시키게 된다. 그 중, 가장 관련이 높은 종양 억제 유전자인 p53을 활성화, ATM/ATR의 활성화와 chk1/chk2의 활성화 되어 cdc25를 억제하고 동시에 Myt1/Wee1를 활성화 함으로 인해, Plk-1의 억제도 함께 일어나게 되어 G2/M 기 어레스트와 함께 p53의 활성화로 인해 세포 사멸이 일어나게 된다. 이로 인해, Plk-1의 억제는 새로운 암치료의 타겟이 될 수 있다.

[0009]

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허 문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0010]

본 발명자들은 여러 종류의 암세포주에서 과발현되어 암세포의 과도한 분열 및 증식을 야기하는 Plk-1(Polo-like kinase)의 활성을 억제하는 화합물을 발굴함으로써 이상증식성(hyperproliferative) 특징을 가지는 다양한 암을 효율적으로 예방 또는 치료하는 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 지금까지 알려지지 않은 상기 화학식 1의 콜치신 유도체가 Plk-1의 발현을 유의하게 감소시키고 p21을 활성화시킴으로써 암세포의 증식을 현저히 억제한다는 사실을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011]

따라서 본 발명의 목적은 신규한 콜치신 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 제공하는 데 있다.

[0012]

본 발명의 다른 목적은 신규한 콜치신 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013]

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

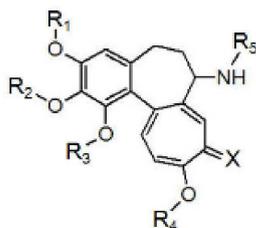
**과제의 해결 수단**

[0014]

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 화학식 1로 표시되는 콜치신 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 제공한다:

[0015]

**화학식 1**



[0016]

[0017]

상기 화학식에서, R<sub>1</sub> 내지 R<sub>4</sub>는 각각 독립적으로 수소 또는 C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬이고, R<sub>5</sub>는 페닐 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬, 페닐 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬카르보닐, 페닐 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알록시카르보닐, 비사이클로[4.4.0]데크-2,4,6-에닐(bicyclo[4.4.0]dec-2,4,6-enyl) C<sub>1</sub>-

C<sub>3</sub> 알콕시카르보닐 또는 플루오레닐(fluorenyl) C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알콕시카르보닐이며 X는 황 또는 산소이다.

[0018]

본 발명자들은 여러 종류의 암세포주에서 과발현되어 암세포의 과도한 분열 및 증식을 야기하는 Plk-1(Polo-like kinase)의 활성을 억제하는 화합물을 발굴함으로써 이상증식성(hyperproliferative) 특징을 가지는 다양한 암을 효율적으로 예방 또는 치료하는 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 지금까지 알려지지 않은 상기 화학식 1의 콜치신 유도체가 Plk-1의 발현을 유의하게 감소시키고 p21을 활성화시킴으로써 암세포의 증식을 현저히 억제한다는 사실을 발견하였다. 따라서, 본 발명의 조성물은 Plk-1에 의해 유도되는 다양한 암에 대한 효율적인 예방 및 치료제가 될 수 있다.

[0019]

본 명세서에서 용어 “알킬”은 직쇄 또는 분쇄의 포화 탄화수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소부틸, 펜틸 또는 헥실 등을 포함한다. C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬은 탄소수 1 내지 5의 알킬 유닛을 가지는 알킬기를 의미하며, C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

[0020]

본 명세서에서 용어 “페닐 알킬”은 페닐기가 치환된 알킬을 의미하며, 예를 들어 R<sub>5</sub>가 “페닐 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬”인 경우 질소 원자에 페닐기가 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬이 결합하였음을 의미한다.

[0021]

본 명세서에서 용어 “페닐 알킬카르보닐”은 페닐기가 치환된 알킬기가 결합한 카르보닐기를 의미하며, “페닐 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬 아실”은 카르보닐기에 페닐기가 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬이 결합하였음을 의미한다. 예를 들어, “페닐메틸아실”의 경우 페닐 에타노일(phenyl ethanoyl)기가 된다.

[0022]

명세서에서 용어 “알콕시”는 알코올에서 수소가 제거되어 형성된 라디칼을 의미하며, 예를 들어 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알콕시는 탄소수 1 내지 3의 알코올에서 수소가 제거되어 형성된 라디칼을 의미한다.

[0023]

본 명세서에서 용어 “페닐 알콕시카르보닐” 페닐기가 치환된 알콕시기가 결합한 카르보닐기를 의미하며, “페닐 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알콕시카르보닐”은 카르보닐에 페닐기가 치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알콕시기가 결합하였음을 의미한다.

[0024]

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 1의 R<sub>1</sub> 내지 R<sub>4</sub>는 각각 독립적으로 C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알킬이고, R<sub>5</sub>는 페닐 메틸, 페닐 메틸카르보닐, 페닐 메톡시카르보닐, 비사이클로[4.4.0]데크-2,4,6-에닐(bicyclo[4.4.0]dec-2,4,6-enyl) C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알콕시카르보닐 또는 플루오레닐(fluorenyl) C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub> 알콕시카르보닐이고, X는 산소이다.

[0025]

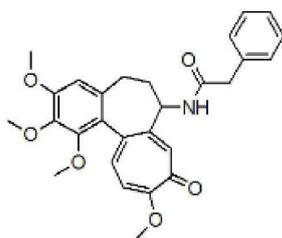
보다 바람직하게는, 상기 R<sub>1</sub> 내지 R<sub>4</sub>는 메틸이다.

[0026]

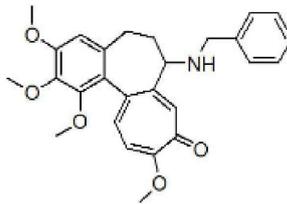
본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 콜치신 유도체는 하기의 화학식 2 내지 12로 표시되는 화합물로 구성된 군으로부터 선택된다:

[0027]

화학식 2



화학식 3

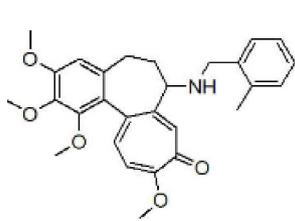


[0028]

[0029]

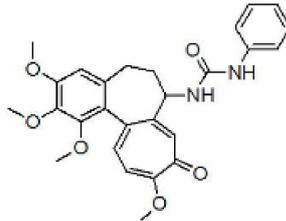
화학식 4

화학식 5



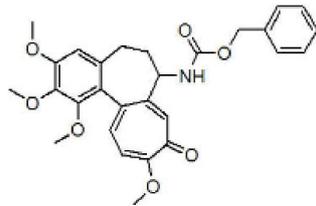
[0030]

화학식 6



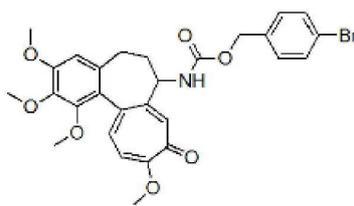
[0031]

화학식 7



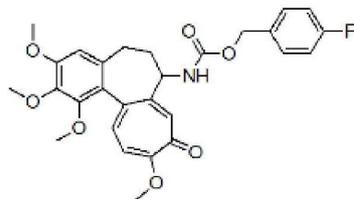
[0032]

화학식 8



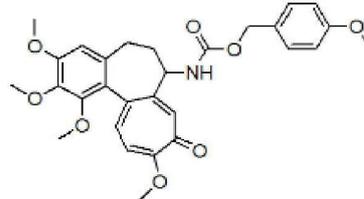
[0033]

화학식 9



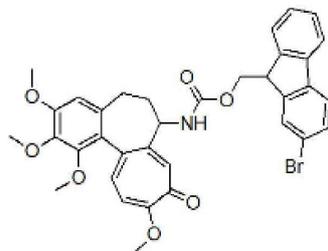
[0034]

화학식 10



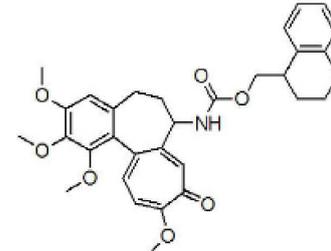
[0035]

화학식 11

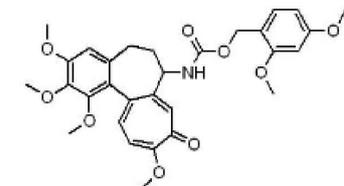


[0036]

화학식 12



[0037]



[0038]

[0039] 보다 바람직하게는, 본 발명의 콜치신 유도체는 상기 화학식 4로 표시되는 화합물이다. 본 발명에 따르면, 상기 화학식 4로 표시되는 화합물(H-18-C4)는 Plk-1 억제제를 통해 세포주기를 어레스트하고, p21을 활성화시키며, p53 활성화를 통해 암세포의 사멸을 유도함으로써 암세포의 증식을 효율적으로 억제한다.

[0040] 본 발명의 화합물은 약제학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있다.

- [0041] 바람직하게는, 본 발명의 화합물의 약제학적 허용 가능한 염은 염산염, 브롬산염, 황산염, 인산염, 구연산염, 아세트산염, 트리플루오로아세트산염, 젖산염, 주석산염, 말레인산염, 푸마린산염, 글루콘산염, 메탄설폰산염, 글리콘산염, 숙신산염, 4-톨루엔설폰산염, 글루투론산염, 엠본산염, 글루탐산염, 또는 아스파르트산염으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 다양한 무기산 및 유기산을 이용하여 형성되는 염이 모두 포함된다. 또한, 본 발명의 화합물은 용매화물(예를 들면 수화물)의 형태로도 존재할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 콜치신 유도체, 이의 약제학적 허용 가능한 염 또는 이의 용매화물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0043] 본 발명의 조성물은 이상증식 혈관 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약제학적 조성물의 형태로 제공될 수 있다. 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0044] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 예컨대 0.001-100 mg/kg이다.
- [0046] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 통상적인 제제로 제형화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 통상적인 제형이라 함은 예를 들면 경구(정제, 캡슐제, 분말제), 구강 내, 혀 밑, 직장 내, 질 내, 비강 내, 국소 또는 비경구(정맥 내, 해면체 내, 근육 내, 피하 및 관 내를 포함) 투여 제형을 일컫는다. 예를 들면, 본 발명에 따른 화합물은 전분 또는 락토오스를 함유하는 정제 형태로, 또는 단독 또는 부형제를 함유하는 캡슐 형태로, 또는 맛을 내거나 색을 띄게 하는 화학 약품을 함유하는 엘릭시르 또는 현탁제 형태로 경구, 구강 내 또는 혀 밑 투여될 수 있다. 액체 제제는 현탁제(예를 들면, 메틸셀룰로오즈, 위텍솔(witepsol)과 같은 반합성 글리세라이드 또는 행인유(apricot kernel oil)와 PEG-6 에스테르의 혼합물 또는 PEG-8과 카프릴릭/카프릭 글리세라이드의 혼합물과 같은 글리세라이드 혼합물)와 같은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제와 함께 제조된다. 또한, 비경구적으로 예를 들면, 정맥 내, 해면체 내, 근육 내, 피하 및 관내를 통하여 주사되는 경우 무균의 수용액 형태로서 사용하는 것이 가장 바람직하며, 이때 상기 용액은 혈액과의 등장성을 갖기 위하여 다른 물질들(예를 들면 염(salt) 또는 만니톨, 글루코오스와 같은 단당류)를 함유할 수도 있다.
- [0047] 본 발명의 조성물은 상술한 바와 같이, 암 세포의 성장 및 증식 억제 또는 암세포의 살상 효능을 나타내므로, 본 발명의 약제학적 조성물은 종양과 관련된 다양한 질병 또는 질환, 예컨대 위암, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 췌장암, 방광암, 결장암 및 자궁경부암 등의 치료에 이용될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물로 치료되는 암은 대장암 또는 폐암이며, 가장 바람직하게는 대장암이다.
- [0048] 본 명세서에서 용어 “예방”은 종양 세포 형성의 억제를 의미하며, 용어 “치료”는 (i) 종양 세포의 제거에 따른 종양과 관련된 질병 또는 질환의 억제; 및 (ii) 종양 세포의 제거에 따른 종양과 관련된 질병 또는 질환의 경감을 의미한다.
- [0049] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 세포 내 Plk-1(Polo-like kinase-1)의 발현을 억제한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 다양한 암세포주에서 과발현되어 암세포의 과도한 분열 및 증식을 야기하는 Plk-1의 발현량을 감소시켜 이상증식성(hyperproliferative) 특징을 가지는 다양한 암을 효율적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

**발명의 효과**

- [0050] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:¶
- [0051] (a) 본 발명은 신규한 콜치신 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염 및 이를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0052] (b) 본 발명의 조성물은 Plk-1(Polo-like kinase)의 발현을 유의하게 감소시키고 p21 및 p53을 활성화시킴으로써 암세포의 증식을 현저히 억제함과 동시에 암세포의 사멸을 촉진하므로, 다양한 암에 대한 효율적인 치료 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0053] 도 1은 인간 대장암 세포의 증식을 억제하는 화합물의 스크리닝 결과를 나타낸 그림이다. 세포들을 96 웰 플레이트에  $2 \times 10^4$ /웰로 씨딩하고 다음날 화합물(10 μM)을 처리한 뒤 37°C 5% CO<sub>2</sub>에서 48시간동안 인큐베이션하였다. 세포의 증식은 alamarBlue 분석을 통해 조사하였다(도 1a). 상기의 1차 스크리닝에서 40% 이상 억제활성을 보인 화합물 중 농도를 희석해서 100nM에서 30% 이상 효과가 있는 화합물에 대한 2차 스크리닝을 수행하였다(도 1b).
- 도 2는 선별된 화합물들이 Plk-2 및 p21 발현에 미치는 영향을 나타낸 그림이다. 세포들을 6 웰 플레이트에  $2 \times 10^5$ /웰로 씨딩하고 다음날 선별된 화합물(1 μM)들을 처리한 뒤 37°C 5% CO<sub>2</sub>에서 48시간동안 인큐베이션하였다. 세포를 수집하여 총 단백질을 추출하고 웨스턴 블롯팅으로 마커 유전자를 분석하였다.
- 도 3은 본 발명에서 선별된 화합물들이 인간 대장암 세포의 증식에 미치는 영향을 나타낸 그림이다. 세포들을 96 웰 플레이트에  $2 \times 10^4$ /웰로 씨딩하고 다음날 콜치신(100nM-1 μM)들을 처리한 뒤 37°C 5% CO<sub>2</sub>에서 48시간동안 인큐베이션하였다. 세포의 증식은 alamarBlue 분석을 통해 조사하였다
- 도 4는 콜치신에 의한 HCT116 세포에서의 PLK-1 발현억제 효과를 나타낸 그림이다. ELISA 분석을 통해 콜치신에 의해 Plk-1 농도가 감소함을 확인하였으며, 웨스턴 블롯팅 분석을 통해 콜치신이 Plk-1의 발현을 억제함을 확인하였다.
- 도 5는 콜치신이 HCT116의 세포주기에 미치는 영향을 나타낸 그림이다. FACs 분석을 통해 콜치신에 의해 G2/M기가 어레스트되는 것을 확인하였으며(도 5a), 웨스턴 블롯팅 분석을 통해 세포주기 마커 유전자인 cdk1/2와 사이클린 B1이 콜치신에 의해 감소하는 것을 확인하였다(도 5b).
- 도 6은 콜치신이 인간 대장암 세포의 사멸(apoptosis)를 유도함을 보여주는 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸 그림이다.
- 도 7은 인간 대장암 세포의 증식을 억제하는 콜치신의 유도체의 선별을 위한 스크리닝 결과를 나타낸 그림이다.
- 도 8은 선별된 콜치신 유도체 화합물들이 Plk-1 및 p21의 발현에 미치는 영향을 나타낸 그림이다.
- 도 9는 선별된 콜치신 유도체인 H-18-C4가 인간 대장암 세포의 증식에 미치는 영향을 나타낸 그림이다.
- 도 10은 H-18-C4에 의해 PLK-1 발현이 억제됨을 나타낸 그림이다. ELISA 분석을 통해 콜치신에 의해 Plk-1 농도가 감소함을 확인하였으며, 웨스턴 블롯팅 분석을 통해 콜치신이 Plk-1의 발현을 억제함을 확인하였다.
- 도 11은 H-18-C4가 HCT116의 세포주기에 미치는 영향을 나타낸 그림이다. FACs 분석을 통해 H-18-C4에 의해 G2/M기가 어레스트되는 것을 확인하였으며(도 11a), 웨스턴 블롯팅 분석을 통해 세포주기 마커 유전자인 cdk1/2와 사이클린 B1이 H-18-C4에 의해 감소하는 것을 확인하였다(도 11b).
- 도 12는 H-18-C4가 인간 대장암 세포의 사멸(apoptosis)를 유도함을 보여주는 웨스턴 블롯팅 결과를 나타낸 그림이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0055] **실시예**

[0056] **실험방법**

[0057] 대장암 세포 증식 억제하는 화합물의 선별 및 억제 효과 측정

[0058] 1) 대장암 세포 배양

[0059] HCT116은 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터에서 McCoy's 5A(10% FBD(fetal bovine serum), 100U/ml 페니실린, 100μg/ml 스트렙토마이신, 2mM L-글루타민 함유) 배지로 배양하였다.

[0060] 2) Cell proliferation assay (AlamarBlue assay)

[0061] HCT116은 96-웰 배양 플레이트에 2 x 10<sup>4</sup>/웰로 씨딩하고 24시간 후에 화합물을 처리한다. 화합물 처리 후 48시간 후에 alamarBlue 시약을 배지에 10 μl 처리한 후 4시간동안 인큐베이션을 한 뒤 530-560 nm 여기(excitation)의 조건에서 형광을 측정하였다.

[0062]

[0063] 대장암 세포 증식 억제 효과 약물에 있어 PLK-1의 억제 작용 기전 연구

[0064] 1) ELISA를 통한 PLK-1 발현수준의 검출

[0065] HCT116을 6-웰 플레이트에 2 x 10<sup>5</sup>/웰로 씨딩하고 24시간이 지난 후에 화합물을 처리하였다. 화합물을 처리 후 48시간이 지나면 세포를 SDS 용해 완충액(62.5 mM Tris-HCL(PH 6.8), 2% SDS(wt/vol), 10% 글리세롤 및 50mM 디티오프레이트 함유)으로 용해시켰다. PLK-1을 인식할 수 있는 특이적 올리고를 포함하는 키트를 사용하여 PLK-1의 발현양을 확인하였다. 추출한 단백질을 이용하여 각각의 조건에서의 제조자의 매뉴얼에 따라 실험하여 450 nm에서 Wallac EnVision 마이크로플레이트 리더(PerkinElmer, Finland)를 이용하여 확인하였다.

[0066] 2) 단백질 추출 및 웨스턴 블롯팅 분석

[0067] HCT116을 6-웰 플레이트s 6-웰 배양 플레이트에 2 x 10<sup>5</sup>/웰로 씨딩하고 24시간 후에 화합물을 처리하였다. 화합물을 처리 후 48시간이 지나면 세포를 SDS 용해 완충액(62.5mM Tris-HCL(PH 6.8), 2% SDS(wt/vol), 10% 글리세롤 및 50 mM 디티오프레이트 함유)로 용해시켰다. 파쇄물을 14000 rpm으로 15분간 원심분리 한 후 상층액을 새로운 튜브로 옮겨 단백질을 BCA 시약을 이용해 정량하였다. 단백질을(20μg)은 10% 아크릴아마이드가 포함된 SDS 폴리아크릴아마이드 겔(SDS-PAGE)을 이용하여 Mini Gel Protein 시스템(Bio-Rad)으로 분석하였다. 로딩이 끝난 단백질은 폴리비닐리덴 디플루오라이드 막(Amersham Pharmacia Biotech, Korea)에 옮겨 250mA로 전이 완충액(pH 8.3)(25mM Tris-HCl, 192mM 글라이신 및 20% 메탄올 함유)에서 전이시켰다. 전이가 끝나면 PVDF 막을 1시간 동안 상온에서 블로킹 시약(5% 무지방 건조유(Amersham Pharmacia Biotech, Korea), TBS-T)로 블로킹시키고 세척 후 1차 항체(PLK-1, p53, Cyclin B1, CDK1, p21, PARP)를 BSA/TBS-T 완충액에 1:1000 으로 희석해서 섞은 후 4℃에서 0/N으로 인큐베이션하였다. 그 후 세척을 하고 2차 항체(호스라디쉬 퍼옥시다제-접합 Ig G 2차 항체(New England Biolabs, Boston, MA))또한 BSA/TBS-T 완충액에 1:5000로 희석하여 혼합해 준 다음 상온에서 2시간 이상 인큐베이션 시켰다. 그 후 세척하고 막을 화학발광 반응(ECL plus kit, Amersham Pharmacia Biotech, KOREA)을 통해 검출하고 뒤이어 하이퍼필름 ECL(merham Pharmacia Biotech, KOREA)로 막을 노출시켰다.

[0068] 3) 세포주기 진행 분석

[0069] HCT116은 6-웰 배양 플레이트에  $2 \times 10^5$ /웰로 씨딩하고 24시간 후에 화합물을 처리하였다. 화합물 처리 후 48시간 후에 70% EtOH로 세포를 30분간 고정시키고 30분 후 PI/RNase를 500  $\mu$ L를 각각 처리하였다. 처리된 시료를 상온에서 30분 간 인큐베이션한 후 FACs로 측정하였다.

[0070] 실험결과

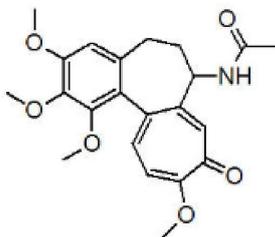
[0071] 1. 콜치신 유도체 H-18-C

[0072] 1) 콜치신(H11-G04)의 선별

[0073] 화합물 라이브러리에서 대장암 세포 증식이 억제되는 화합물을 찾기 위해서 실험을 진행하였다. 각 화합물을 대장암 세포에 10  $\mu$ M의 농도로 고정하여 처리한 후, 48시간이 지난 이후 alamarBlue 분석을 통해서 40% 이상 억제시키는 화합물을 선별하였다(도 1a). 1차 스크리닝에서 40% 이상 억제활성을 보인 화합물을 선별하여 농도를 희석해서 100nM에서 30% 이상 효과가 있는 화합물을 2차 선별하였다(도 1b). 농도에 따라서 유의적으로 대장암 세포 증식을 억제하는 것으로 선별된 화합물에서 여러 종류의 암세포에서 과발현되어 암세포 형성을 촉진하는 Plk-1을 억제하는 화합물을 최종적으로 선정하기 위해서 이들이 Plk-1의 발현을 억제하는지 여부를 확인하였다(도 2).

[0074] 선별된 화합물에서 Plk-1을 억제하고, p21을 활성화시키는 화합물을 발견하였고, 그 화합물을 확인할 결과 콜치신으로 확인되었다. 따라서 보다 구체적으로 콜치신의 Plk-1의 억제 작용기작에 대해서 확인해 보았다.

[0075] 2) 콜치신의 대장암 세포 증식 억제



<콜치신의 화학구조>

[0076]

[0077] 콜치신을 처리한 HCT116에서 세포증식이 농도에 따라 유의적으로 억제되는 효과가 나타났다(도 3).

[0078] 3) PLK-1의 세포내의 발현 억제

[0079] 콜치신에 의해서 대장암 세포 증식이 억제될 뿐만 아니라, 암세포에서 과잉 발현됨으로써 유사분열이 계속적으로 일어나 결국 암세포 형성을 촉진하는 Plk-1의 발현도 역시 억제된다는 것을 확인하였다(도 4). 아울러, Plk-1이 억제되면, G2/M 기의 어레스트가 일어날 것이고, DNA 손상 체크포인트의 신호전달 활성화가 함께 진행된다. 이를 확인하기 위해, p21의 발현양을 확인해 본 결과 농도에 따라 유의적으로 신호전달이 활성화됨을 확인하였다(도 4). 따라서 Plk-1이 억제됨으로 인한 G2/M phase의 arrest와 Plk-1에 의해서 억제되어 있던 p53이 활성화 되어 세포 사멸이 일어나는지에 대해 세포 사멸 신호 전달을 확인해 보기로 했다.

[0080] 4) 콜치신의 세포 주기 조절

[0081] Plk-1이 콜치신에 의해 억제되는 것을 관찰하였기 때문에 콜치신이 세포주기를 조절하는지를 확인하기 위해 세포주기 진행 분석(cell cycle progression assay)을 수행하였다. 콜치신에 의해 세포주기 중 유사분열에 해당하는 G2/M 기가 어레스트되는 것을 관찰하였다(도 5a). 이 결과를 통해 콜치신이 HCT116의 증식을 억제하며, 증식억제는 세포주기 중 G2/M phase의 어레스트에 의한 것임을 알 수 있었다. FACs 분석을 통해, G2/M 기가

어레스트되는 것을 확인하였고, 신호전달경로에서 이 시기의 대표적인 마커 유전자인 cdk1/2와 사이클린 B1이 콜치신에 의해 감소하는 것을 확인하였다(도 5b). 이로 인해, 콜치신에 의한 세포 증식의 억제는 세포 주기 중 G2/M 기의 어레스트에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

[0082] 5) p53의 활성화를 통한 세포 사멸 유도

[0083] 세포 사멸이 유도되는지를 확인해 본 결과, 마커 유전자인 p53의 발현량이 농도에 따라 증가되는 것을 확인하였고, 그에 비례해서 PARP 유전자에서 세포 사멸이 일어났을 때 나타나는 절단(cleavage)이 발생함을 확인하였다(도 6). 따라서 콜치신은 Plk-1 억제자로서 대장암 세포에서 작용하여, Plk-1의 억제를 통하여, 세포 증식 억제 및 세포주기에서 G2/M 기의 어레스트를 유도하며, 이와 더불어 암세포에서 Plk-1에 의해 억제되어 있던 p53을 활성화시킴으로써 세포사멸을 유도하는 것으로 확인되었다.

[0084] 2. 콜치신 유도체 H-18-C4

[0085] 1) 콜치신 유도체 H-18-C4의 선별

[0086] 콜치신이 Plk-1을 억제함으로써 인해 G2/M 기의 어레스트를 일으키며, p53을 통한 세포 사멸을 유도하는 것을 확인하였기 때문에 콜치신의 유도체를 이용하여 콜치신보다 Plk-1 억제 효과가 더 우수한 화합물이 있는지를 조사하였다. 각 화합물을 대장암 세포에 1 $\mu$ M의 농도로 고정하여 처리한 후, 48시간이 지난 이후 alamarBlue 분석을 통해서 40% 이상 억제시키는 화합물을 발견하였다(도 7a).

[0087] 1차 스크리닝에서 40% 이상 억제된 화합물을 선별해서 농도를 희석해서 100nM에서 30% 이상 효과가 있는 화합물을 2차 선별했다.

**표 1**

[0088] 인간 대장암 세포의 증식을 억제하는 콜치신 유도체의 스크리닝 결과

No	코드	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M )
1	H11-G04	4
2	H18-E03	6.3
3	H18-B04	3.7
4	H18-C04	3.7
5	H17-F11	2.8
6	H17-C11	1.5
7	H17-E11	3.2
8	H17-G11	3.7
9	H17-G12	2.6
10	H17-E12	2.9
11	H18-D04	3.7
12	H18-D05	2.6

[0089] 농도에 따라 유의적으로 대장암 세포 증식을 억제하는 것으로 선별된 화합물에서 여러 종류의 암세포에서 과잉 발현되어 암세포 형성을 촉진하는 Plk-1을 억제하는 화합물을 최종적으로 선정하기 위해서 Plk-1의 발현억제 여부를 확인하였다.

[0090] 선별된 유도체에서 Plk-1을 억제하고, p21을 활성화 시키는 화합물을 발견하였으며(도 8), 발견된 화합물들 중에서 Plk-1의 억제와 p21의 활성을 동시에 나타내는 화합물을 H-18-C4로 선정, 이 화합물이 콜치신과 비교해서 Plk-1의 억제 효과가 더 우수한지에 대한 실험을 진행하였다.

[0091] 2) 콜치신 유도체 H-18-C4의 대장암 세포 증식 억제

[0092] 콜치신의 유도체인 H-18-C4를 처리한 HCT116에서 콜치신과 동일하게 농도 의존적으로 세포증식이 유의하게 억제됨을 확인하였다(도 9).

[0093] 3) PLK-1의 세포내의 발현 억제

[0094] H-18-C4에 의해 대장암 세포 증식이 억제될 뿐만 아니라 암세포의 지속적인 유사분열을 유도함으로써 결국 암세포 형성을 촉진하는 Plk-1의 발현 또한 억제됨을 확인하였다. 또한, Plk-1이 억제되면, G2/M 기의 어레스트가 일어날 것이고, DNA 손상 체크포인트의 신호전달이 활성화가 함께 진행되므로, 이를 확인하기 위해 p21의 발현 양을 확인해 본 결과 농도에 따라 유의적으로 신호전달이 활성화됨을 확인하였다(도 10). 따라서 Plk-1이 억제됨으로 인해 G2/M 기가 어레스트되는지 여부 및 Plk-1에 의해서 억제되어 있던 p53이 활성화 되어 세포 사멸이 일어나는지 여부를 조사하기 위해 세포사멸 신호 전달을 확인해 보기로 하였다.

[0095] 4) H-18-C4의 세포 주기 조절

[0096] Plk-1이 H-18-C4에 의해 억제되는 것을 관찰하였기 때문에 콜치신과 세포주기를 조절하는지 알아보기 위해 세포 주기 진행분석을 수행하였다. H-18-C4에 의해 세포주기 중 유사분열에 해당하는 G2/M 기가 어레스트됨을 관찰하였다. 이 결과를 통해 H-18-C4이 HCT116의 증식을 억제하며, 증식억제는 세포주기 중 G2/M 기의 어레스트에 의한 것임을 알 수 있었다. FACS 분석을 통해, G2/M 기가 어레스트되는 것을 확인하였고, 신호전달경로에서 이 시기의 대표적인 마커 유전자인 cdk1/2와 사이클린 B1이 H-18-C4에 의해 감소하는 것을 확인하였다. 이로 인해, H-18-C4에 의한 세포 증식의 억제는 세포 주기 중 G2/M 기의 어레스트에 의한 것임을 확인할 수 있었다.

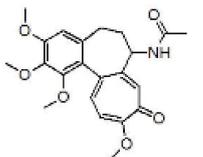
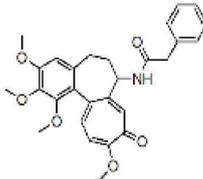
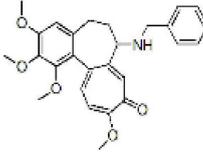
[0097] 5) p53의 활성화를 통한 세포 사멸 유도

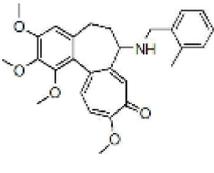
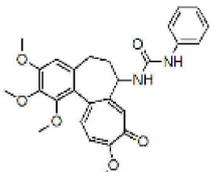
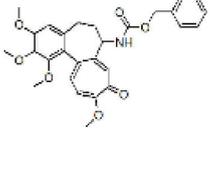
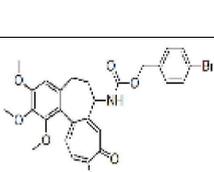
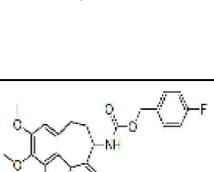
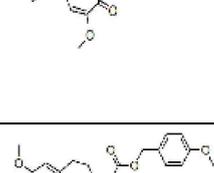
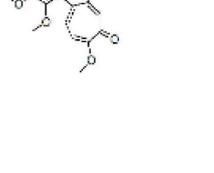
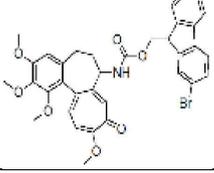
[0098] 세포 사멸이 유도되는지를 확인해 본 결과, 마커 유전자인 p53의 발현양이 H-18-C4의 농도에 따라 증가되는 것을 확인하였고, 그에 비례해서 PARP 유전자에서 세포 사멸이 일어났을 때 나타나는 절단(cleavage)이 발생함을 확인하였다(도 12). 따라서 콜치신 유도체인 H-18-C4는 Plk-1 억제자로서 대장암 세포에서 작용하여, Plk-1의 억제를 통하여, 세포 증식 억제 및 세포주기에서 G2/M 기의 어레스트를 유도하며, 이와 더불어 암세포에서 Plk-1에 의해 억제되어 있던 p53을 활성화시킴으로써 세포사멸을 유도하는 것으로 확인되었다.

표 2

콜치신 유도체 화합물의 구조 및 활성

[0099]

번호	Code	구조	data(bp/mp or NMR)	IC <sub>50</sub> (μM)
1	H11-G04		Colchicine	4
2	H18-E03		1H NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 1.68(m, 1H), 2.13(m, 1H), 2.38(m, 1H), 2.47(m, 1H), 3.68 (s, 2H), 3.73(s, 3H), 3.89(s, 3H), 3.93(s, 3H), 3.99(s, 3H), 4.62(m, 1H), 5.98(d, J= 6.9 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 6.79(d, J= 10.5 Hz, 1H), 7.32(m, 7H) MS(m/e, M <sup>+</sup> ) : 475	6.3
3	H18-B04		1H NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) δ 1.70(m, 1H), 2.20(m, 1H), 2.41(m, 2H), 3.41(d, J=12.9Hz, 1H), 3.46(m, 1H), 3.54(s, 3H), 3.72(d, J=12.9Hz, 1H), 3.90 (s, 6H), 4.00(s, 3H), 6.52(s, 1H), 6.80 (d, J=10.8Hz, 1H), 7.20(m, 6H), 7.92 (s, 1H) MS(m/e, M <sup>+</sup> ) : 447	3.7

4	H18-C04		$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 1.71(m, 1H), 2.19(m, 1H), 2.28(s, 3H), 2.41(m, 2H), 3.40(d, $J=12.9\text{Hz}$ , 1H), 3.45(m, 1H), 3.49(s, 3H), 3.63(d, $J=12.9\text{Hz}$ , 1H), 3.91(s, 3H), 3.92(s, 3H), 4.00(s, 3H), 6.53(s, 1H), 6.80(d, $J=10.8\text{Hz}$ , 1H), 7.06(m, 3H), 7.1, $J=10.8\text{Hz}$ 7.23(d, $J= 10.8\text{Hz}$ , 1H), 7.92(s, 1H) MS(m/e, M+): 461	3.7
5	H17-F11		$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 1.72(m, 1H), 2.39(m, 3H), 3.69(s, 3H), 3.91(s, 3H), 3.95 (s, 6H), 4.81(m, 1H), 6.54(s, 1H), 6.88(t, 1H), 6.95(d, $J=10.5\text{Hz}$ , 1H), 7.15(m, 3H), 7.27(m, 2H), 7.44(d, $J= 10.5 \text{ Hz}$ , 1H), 8.07(s, 1H), 8.26(s, 1H) Mass(m/e)M : 476	2.8
6	H17-C11		$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 1.74(m, 1H), 2.26(m, 1H), 2.49(m, 1H), 2.52(m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.90(s, 3H), 3.94(s, 3H), 3.98(s, 3H), 4.45(m, 1H), 4.91(d, $J=12.3 \text{ Hz}$ , 1H), 5.07 (d, $J= 12.3 \text{ Hz}$ , 1H), 5.38(d, $J= 7.2 \text{ Hz}$ , 1H), 6.53(s, 1H), 6.89(d, $J = 10.8 \text{ Hz}$ , 1H), 7.32 (m, 6H), 7.52 (s, 1H) MS(m/e, M+) : 491	1.5
7	H17-E11		$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 1.91(m, 1H), 2.39 (m, 2H), 2.52(m, 1H), 3.68(s, 3H), 3.88(s, 3H), 3.91(s, 3H), 3.95(s, 3H), 4.47(m, 1H), 4.77(d, $J=12.0\text{Hz}$ , 1H), 4.97(d, $J= 12.0 \text{ Hz}$ , 1H), 6.33(d, $J= 6.9 \text{ Hz}$ , 1H), 6.55(s, 1H), 6.80(d, $J= 10.8 \text{ Hz}$ , 1H), 7.08(d, $J = 8.4\text{Hz}$ , 2H), 7.29(d, $J= 10.8 \text{ Hz}$ , 1H), 7.39(d, $J= 8.4 \text{ Hz}$ , 2H), 7.64(s, 1H) MS(m/e, M+) : 571	3.2
8	H17-G11		$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 1.73(m, 1H), 2.27 (m, 1H), 2.41(m, 1H), 2.50(m, 1H), 3.64(s, 3H), 3.90(s, 3H), 3.94(s, 3H), 3.99(s, 3H), 4.44(m, 1H), 4.88(d, $J= 12.0\text{Hz}$ , 1H), 5.03(d, $J= 12.0 \text{ H}$ , 1Hz), 5.26(d, $J= 7.2 \text{ Hz}$ , 1H), 6.53 (s, 1H), 6.81 (d, $J= 10.8 \text{ Hz}$ , 1H), 7.02 (dd, $J=8.7\text{Hz}$ , 10.8Hz, 2H), 7.28(m, 3H), 7.48(s, 1H) MS(m/e, M+) : 509	3.7
9	H17-G12		$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 1.71(m, 1H), 2.28(m, 1H), 2.39(m, 1H), 2.49(m, 1H), 3.65 (s, 3H), 3.77(s, 3H), 3.90(s, 3H), 3.94(s, 3H), 3.98(s, 3H), 4.45(m, 1H), 4.83(d, $J=11.7 \text{ Hz}$ , 1H), 5.01(d, $J=11.7 \text{ Hz}$ , 1H), 5.35(d, $J=7.2\text{Hz}$ , 1H), 6.53(s, 1H), 6.81(d, $J=10.8 \text{ Hz}$ , 1H), 6.86(d, $J=8.7 \text{ Hz}$ , 2H), 7.22(d, $J=8.7 \text{ Hz}$ , 2H), 7.28(d, $J= 10.8 \text{ Hz}$ , 1H), 7.51(s, 1H) MS(m/e, M+) : 521	2.6
10	H17-E12		$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 1.88(m, 1H), 2.39(m, 2H), 2.54 (m, 1H), 3.66(s, 3H), 3.90(s, 3H), 3.91(s, 3H), 3.97(m, 4H), 4.21(m, 1H), 4.44(m, 2H), 5.84(m, 1H), 6.55(s, 1H), 6.78(d, $J= 10.8 \text{ Hz}$ , 1H), 7.25(m, 2H), 7.51(m, 7H) MS(m/e, M+) : 658	2.9
11	H18-D04		$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 1.78(m, 5H), 2.28(m, 1H), 2.36(m, 1H), 2.47(m, 1H), 2.73(m, 2H), 3.02(m, 1H), 3.63(s, 3H), 3.90(s, 3H), 3.94(s, 3H), 4.00(s, 3H) 4.05(m, 1H), 4.23(m, 1H), 4.46(m, 1H), 5.33(d, $J= 7.2\text{Hz}$ , 1H), 6.54(s, 1H), 6.81(d, $J= 10.8 \text{ Hz}$ , 1H), 7.16(m, 4H), 7.26(d, $J= 10.8 \text{ Hz}$ , 1H), 7.52(s, 1H) MS(m/e, M+) : 545	3.7

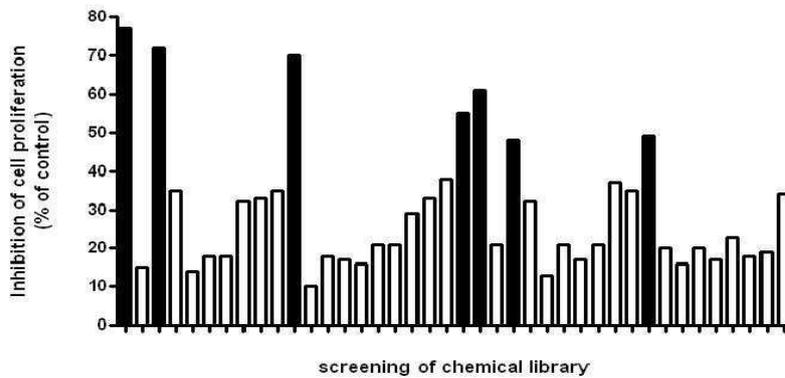
12	H18-D05		<sup>1</sup> H-NMR (300MHz, CDC13) $\delta$ 1.72(m, 1H), 2.27(m, 1H), 2.40(m, 1H), 2.48(m, 1H), 3.66 (s, 3H), 3.80(s, 6H), 3.90(s, 3H), 3.94(s, 3H), 3.99(s, 3H), 4.44(m, 1H), 5.00(m, 2H), 5.17(d, $J=7.1\text{Hz}$ , 1H), 6.45(s, 1H), 6.53(s, 1H), 6.80(d, $J=11.0\text{ Hz}$ , 1H), 7.18(d, $J=8.9\text{Hz}$ , 1H), 7.27(d, $J=11.0\text{Hz}$ , 8.9 Hz, 2H), 7.50 (s, 1H) MS(m/e, M+) : 551	2.6
----	---------	--	--	-----

[0100]

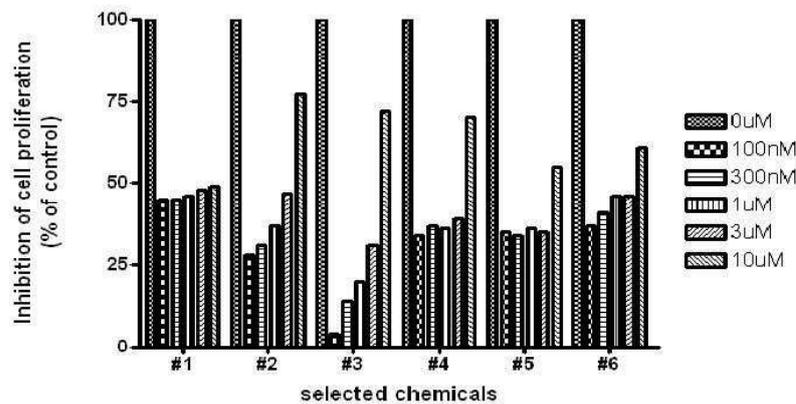
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

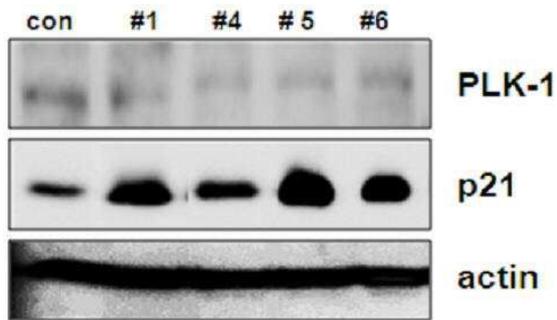
도면1a



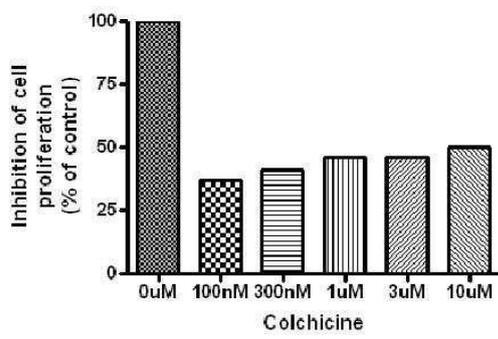
도면1b



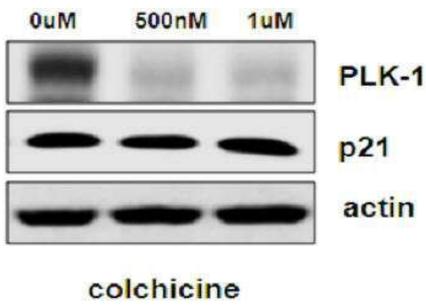
도면2



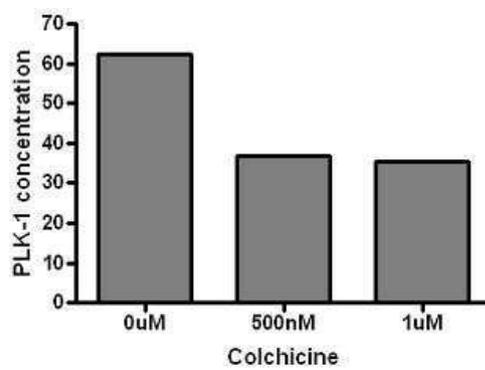
도면3



도면4a



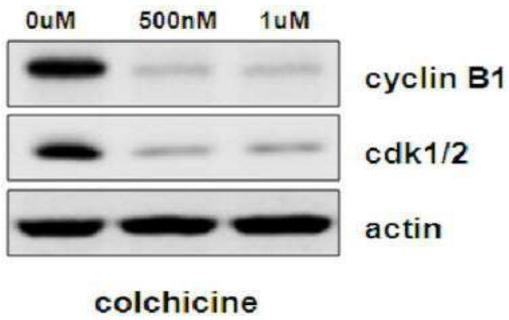
도면4b



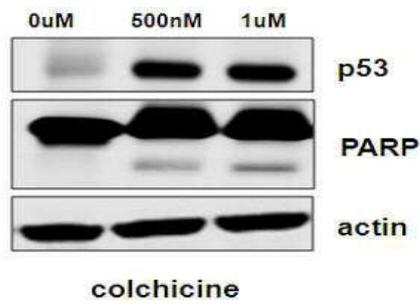
도면5a



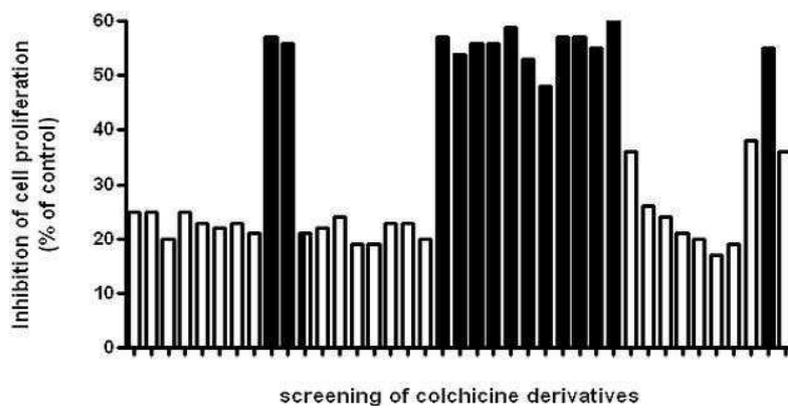
도면5b



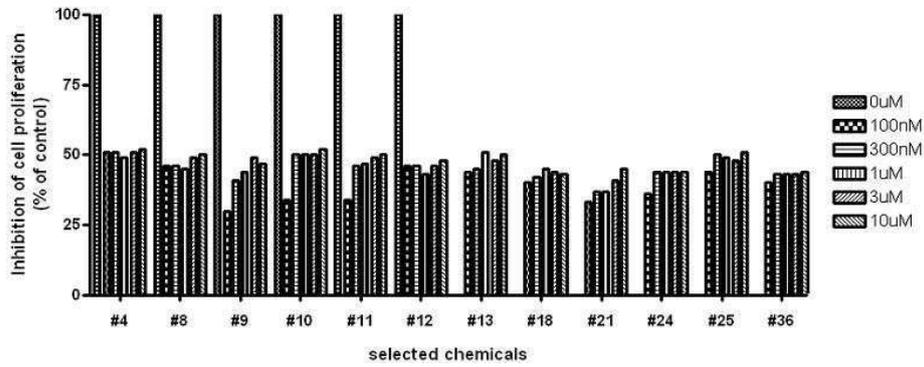
도면6



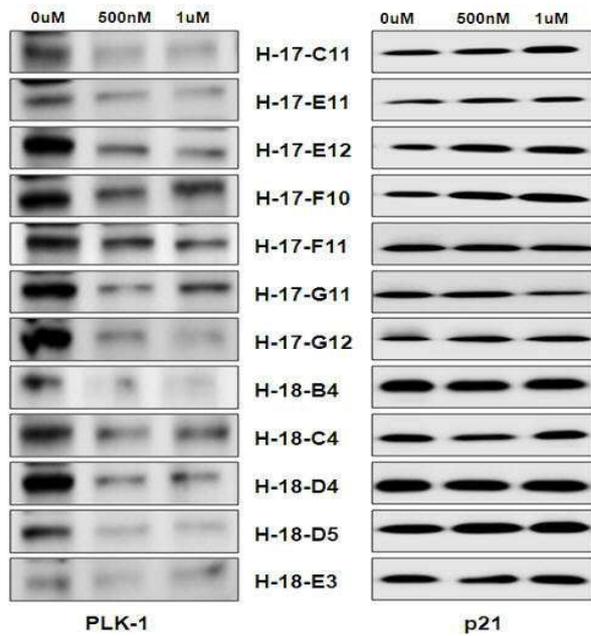
도면7a



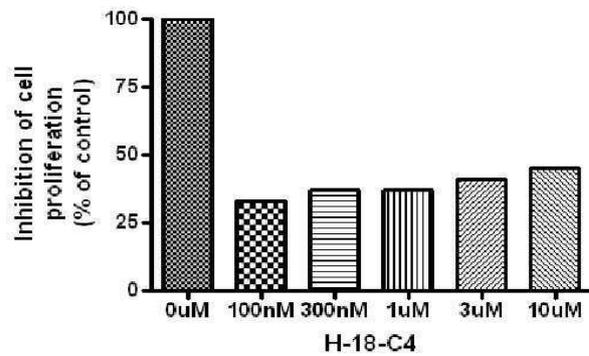
도면7b



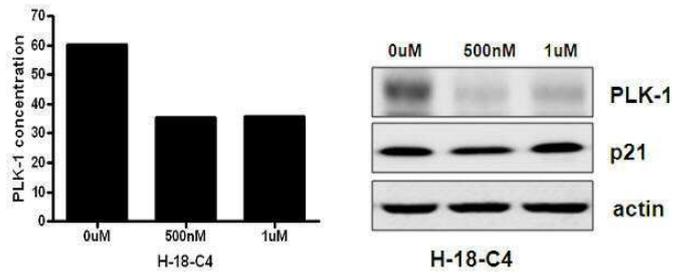
도면8



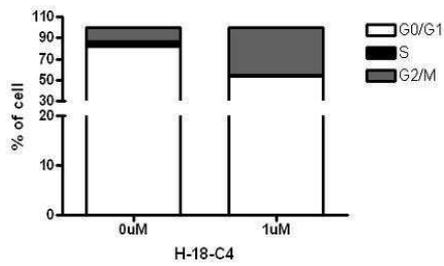
도면9



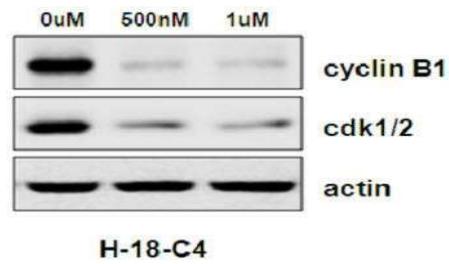
도면10



도면11a



도면11b



도면12

