



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월23일

(11) 등록번호 10-2605163

(24) 등록일자 2023년11월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/4725 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 35/04 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 31/4725 (2013.01)  
A61P 35/00 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2021-0070823
- (22) 출원일자 2021년06월01일  
심사청구일자 2021년06월01일
- (65) 공개번호 10-2022-0162397
- (43) 공개일자 2022년12월08일
- (56) 선행기술조사문헌  
Caldwell, R. D. 등, Journal of Medicinal Chemistry, 2019, 제62권, 페이지 7643-7655  
Lee, E. 등, International Journal of Molecular Sciences, 2020, 제21권, 페이지 8006
- (73) 특허권자  
연세대학교 산학협력단  
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)  
숙명여자대학교산학협력단  
서울특별시 용산구 청파로47길 100 (청파동2가, 숙명여자대학교)
- (72) 발명자  
강석구  
경기도 수원시 영통구 광고호수공원로 277, 101동202호(중흥에스클래스)  
이동규  
경기도 성남시 분당구 중앙공원로 53, 125동1304호(시범단지삼정.한신아파트)  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
파도특허법인유한회사

전체 청구항 수 : 총 11 항

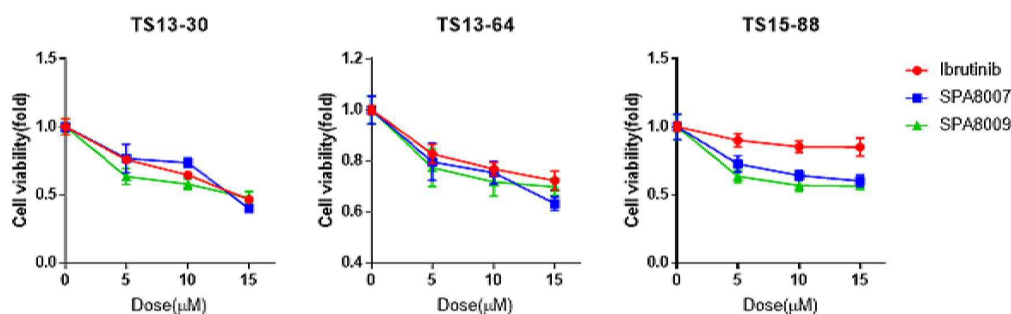
심사관 : 강태현

(54) 발명의 명칭 뇌암의 예방 또는 치료용 조성물

### (57) 요약

본 발명에서 제공하는 화합물은 브루톤 티로신 키나제(Bruton's tyrosine kinase; BTK) 억제제로서, 암 중에서도 특히 뇌암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

**A61P 35/04** (2018.01)

(72) 발명자

**오유정**

서울특별시 종로구 세검정로 252-8 월드캐슬빌라  
5동 202호

**전라옥**

서울특별시 강남구 선릉로 120, 13동 905호(  
대치동, 개포우성아파트)

**이다경**

서울특별시 용산구 청파로47길 100, 행정관 204호  
(숙명여자대학교)

**조혜원**

서울시 용산구 청파로47길 100, 행정관 204호 (숙  
명여자대학교)

**이은**

서울시 용산구 청파로47길 100, 행정관 204호 (숙  
명여자대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711112182
과제번호	NRF-2019R1A2C3004155
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업-중견연구자지원사업
연구과제명	교모세포종 발암 기원세포의 특이적 신호전달체계 규명 및 치료 표적 발굴
기 여 율	1/4
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711121356
과제번호	2020M2D9A2092372
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원자력연구개발사업-첨단방사선융합치료기술개발
연구과제명	난치성 뇌암의 방사선치료 병합 약물 발굴을 위한 다중 모니터링 시스템 개발
기 여 율	1/4
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.07.31 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119610
과제번호	NRF-2020M3E5E2037960
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신약분야원천기술개발(R&D)
연구과제명	신경교종 발암기원세포를 표적으로 하는 혁신 신약 타겟 검증 및 유효성 평가 시스

템 구축

기 여 율	1/4
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2020.07.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711043145
과제번호	2014R1A2A1A11052761
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	면역 매개 염증질환 치료제 개발의 신규전략으로서 BTK 제해제의 발굴
기 여 율	1/4
과제수행기관명	숙명여자대학교 산학협력단
연구기간	2016.11.01 ~ 2017.10.31

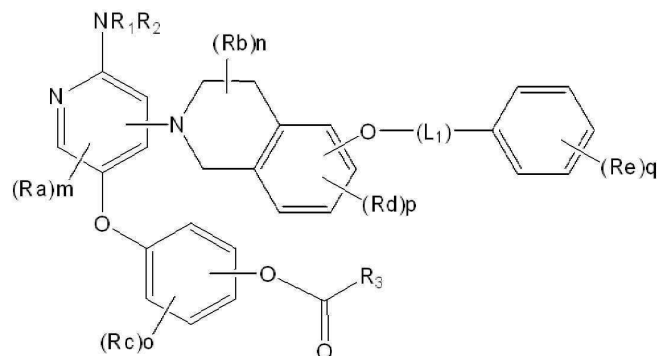
## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 광학이성질체, 수화물 및 용매화물로부터 선택되는 화합물을 유효 성분으로 포함하는 뇌압의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

$R_1$  및  $R_2$ 는 각각 독립적으로 수소,  $C_{1-6}$ 알킬 또는  $C_{3-6}$ 사이클로알킬이고;

$R_3$ 는 수소,  $C_{1-6}$ 알킬 또는  $C_{1-6}$ 알케닐이며;

$L_1$ 은 직접결합 또는  $C_{1-6}$ 알킬렌이고;

$m$ 은 0 내지 2의 정수이며;

$n$  및  $p$ 는 각각 독립적으로 0 내지 3의 정수이고;

$o$ 는 0 내지 4의 정수이며;

$q$ 는 0 내지 5의 정수이고;

$R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_c$  및  $R_d$  및  $R_e$ 는 각각 독립적으로 할로겐,  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{3-6}$ 사이클로알킬기 및  $C_{1-6}$ 알콕시로 이루어진 군에서 선택되며;

상기  $R_1$  및  $R_2$ 의 알킬 및 사이클로알킬과,  $R_3$ 의 알킬 및 알케닐과,  $L_1$ 의 알킬렌과,  $R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_c$  및  $R_d$  및  $R_e$ 의 알킬, 사이클로알킬 및 알콕시는 각각 독립적으로 할로겐,  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{3-6}$ 사이클로알킬기 및  $C_{6-14}$ 아틸로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 치환기에 의해 치환되거나 비치환될 수 있다.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기  $R_1$  및  $R_2$ 는 각각 독립적으로 수소 또는  $C_{1-6}$ 알킬인, 약학적 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기  $R_3$ 는  $C_{1-6}$ 알케닐인, 약학적 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기  $L_1$ 은  $C_{1-6}$ 알킬렌인, 약학적 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

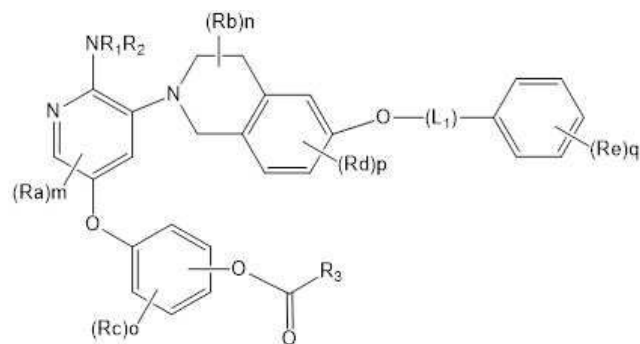
상기  $Re$ 는  $C_{1-6}$ 알킬 또는  $C_{1-6}$ 알콕시인, 약학적 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인, 약학적 조성물:

[화학식 2]



상기 화학식 2에서,

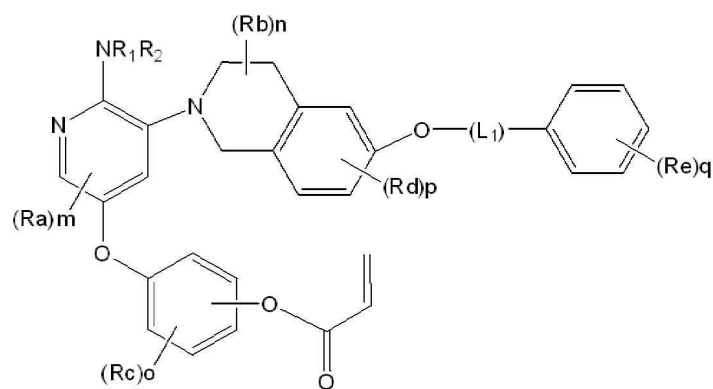
$R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $L_1$ ,  $m$ ,  $n$ ,  $o$ ,  $p$ ,  $q$ ,  $Ra$ ,  $Rb$ ,  $Rc$ ,  $Rd$  및  $Re$  각각의 정의는 제1항에서 정의된 바와 같다.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물인, 약학적 조성물:

[화학식 3]



상기 화학식 3에서,

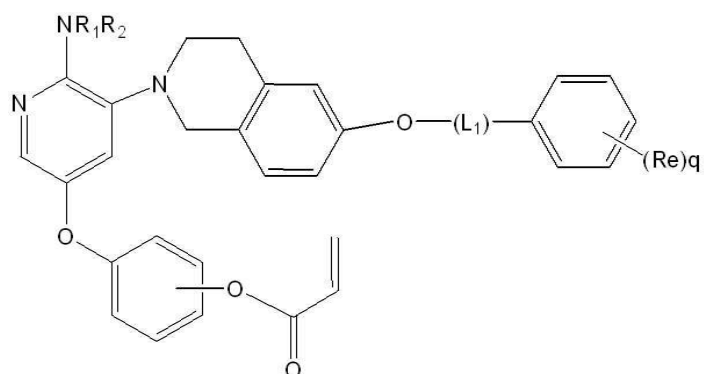
$R_1$ ,  $R_2$ ,  $L_1$ ,  $m$ ,  $n$ ,  $o$ ,  $p$ ,  $q$ ,  $Ra$ ,  $Rb$ ,  $Rc$ ,  $Rd$  및  $Re$  각각의 정의는 제1항에서 정의된 바와 같다.

#### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화학식 4로 표시되는 화합물인, 약학적 조성물:

[화학식 4]



상기 화학식 4에서,

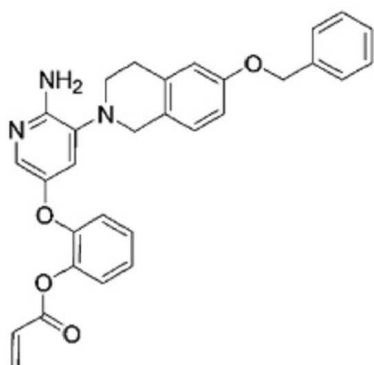
R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, L<sub>1</sub>, q 및 Re 각각의 정의는 제1항에서 정의된 바와 같다.

### 청구항 9

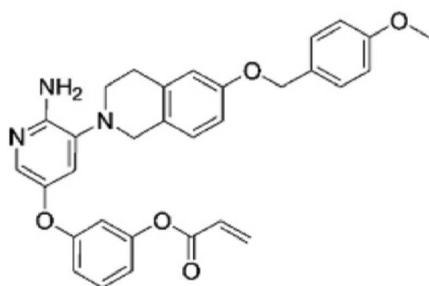
제1항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화학식 5 또는 6으로 표시되는 화합물인, 약학적 조성물:

[화학식 5]



[화학식 6]



### 청구항 10

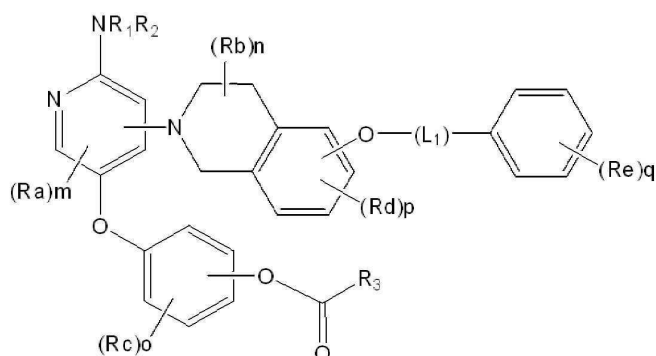
삭제

### 청구항 11

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 광학이성질체, 수화물 및 용매화물로부터

선택되는 화합물을 유효 성분으로 포함하는 너암의 침윤성 또는 전이성 억제용 약학적 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

$R_1$  및  $R_2$ 는 각각 독립적으로 수소,  $C_{1-6}$ 알킬 또는  $C_{3-6}$ 사이클로알킬이고;

$R_3$ 는 수소,  $C_{1-6}$ 알킬 또는  $C_{1-6}$ 알케닐이며;

$L_1$ 은 직접결합 또는  $C_{1-6}$ 알킬렌이고;

$m$ 은 0 내지 2의 정수이며;

$n$  및  $p$ 는 각각 독립적으로 0 내지 3의 정수이고;

$o$ 는 0 내지 4의 정수이며;

$q$ 는 0 내지 5의 정수이고;

$R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_c$  및  $R_d$  및  $R_e$ 는 각각 독립적으로 할로젠,  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{3-6}$ 사이클로알킬기 및  $C_{1-6}$ 알콕시로 이루어진 군에서 선택되며;

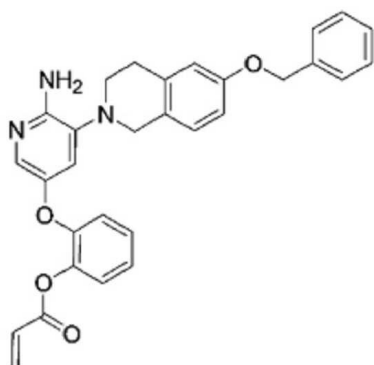
상기  $R_1$  및  $R_2$ 의 알킬 및 사이클로알킬과,  $R_3$ 의 알킬 및 알케닐과,  $L_1$ 의 알킬렌과,  $R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_c$  및  $R_d$  및  $R_e$ 의 알킬, 사이클로알킬 및 알콕시는 각각 독립적으로 할로젠,  $C_{1-6}$ 알킬,  $C_{3-6}$ 사이클로알킬기 및  $C_{6-14}$ 아릴로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 치환기에 의해 치환되거나 비치환될 수 있다.

## 청구항 12

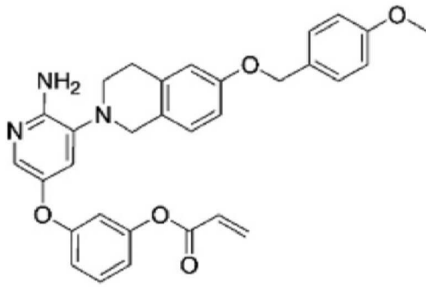
제11항에 있어서,

상기 화합물은 하기 화학식 5 또는 6으로 표시되는 화합물인, 약학적 조성물:

[화학식 5]



[화학식 6]



### 청구항 13

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 암 중에서도 특히 뇌암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 암이란 개체의 필요에 따라 규칙적이고 질제 있는 증식과 억제할 수 있는 정상 세포와 달리 조직 내에서 필요한 상태를 무시하고 무제한의 증식을 하는 미분화 세포로 구성된 세포 덩어리로서 종양이라고도 한다. 이러한 무제한의 증식을 하는 암 세포는 주위의 조직으로 침투하고 더 심각한 경우는 신체의 다른 기관으로 전이가 되어 심각한 고통을 수반하고 결국 죽음을 초래하는 난치병이다.

[0003] 미국 암 협회(American Cancer Society) 자료에 따르면 2007년 한해 세계적으로 새로이 암 진단을 받은 환자는 1200만 명 이상이며 사망자는 760만 명으로 매일 약 2만 명씩 암으로 사망하는 것으로 보고되었다. 우리나라의 경우 2006년 통계청 보고에 따르면 암으로 인한 사망이 사망원인 1위를 차지하였다. 따라서, 암 발생 및 투병으로 인한 정신적, 육체적 고통의 감소와 삶의 질 향상을 위해 치료 효과가 우수한 종양 치료제의 개발이 절실히 요구된다.

[0004] 그러나 많은 노력에도 아직까지 정상 세포가 어떠한 기전을 거쳐 암 세포로 형질전환이 되는 지에 대해서는 정확하게 규명되지는 않았으나, 환경 요인, 화학 물질, 방사선, 바이러스 등 외적 요인 및 유전 인자, 면역학적 요인 등의 내적 요인 등이 복잡하게 얽혀 결과적으로 암이 발생한다. 암의 발생에 관련되는 유전자에는 종양형성 유전자(oncogenes)와 종양억제 유전자(tumor suppressor genes)가 있는데, 이들 사이의 균형이 위에서 설명한 내적 혹은 외적 요인들에 의해 무너지면 암이 발생하게 된다.

[0005] 암은 혈액암과 고형암으로 크게 분류되며, 폐암, 위암, 유방암, 구강암, 간암, 자궁암, 식도암, 피부암 등 신체의 거의 모든 부위에서 발생하며, 이들의 치료방법으로 최근 글리벡 또는 허셉틴과 같은 소수의 표적 치료제가 특정암의 치료에 이용되고 있으나 현재까지는 수술이나 방사선 요법 및 세포증식을 억제하는 화학요법제를 이용한 항암제 치료가 주된 방법이다. 그러나 표적 치료제가 아니기 때문에 기존 화학요법제의 가장 큰 문제는 세포독성으로 인한 부작용과 약제 내성으로써, 항암제에 의한 초기의 성공적인 반응에도 불구하고 결국에는 치료가 실패하게 되는 주요 요인이다. 따라서, 이러한 화학요법제의 한계를 극복하기 위해서는 항암작용 기전이 명확한 표적 치료제 개발이 지속적으로 필요하다.

[0006] 한편, 신경교종(glioma)은 원발성 뇌 종양(primary brain tumor)의 60%를 차지하는 종양으로서, 발생 빈도가 높고 치료가 어려워, 현재까지도 방사선 치료 외엔 특별한 치료법이 없는 악성 종양에 해당한다. 그 중 가장 악성으로 분류되고 있는 교모세포종(glioblastoma, GBM)의 경우, 다른 암과 비교하였을 때 방사선 및 항암제 치료에 대한 저항성이 매우 높아 일단 진단되면 생존 기간이 1년에 불과하므로, 각 환자의 발생 기원과 과정에 대한 적절한 진단 및 이해가 중요하다.

[0007] 또한, 상기 뇌 종양의 경우, 뇌혈관 장벽(Brain Blood Barrier)이 존재하기 때문에 치료를 위한 약물 전달이 목적하는 뇌 부위로 전달되기 어려울 뿐만 아니라, 상대적으로 뇌신경 생물학에 대한 이해가 부족하여 치료제 개

발이 활발하지 못한 것이 현실이다. 더욱이, 교모세포종은 다른 뇌 종양과 비교해볼 때 공격적 변이(aggressive variant)를 나타내어, 이를 빠른 시일 내에 치료하지 않으면 몇 주 이내에 치명적인 결과를 초래할 수 있다.

- [0008] 따라서, 교모세포종의 치료에는 외과적 처치 이외에 방사선 치료 및 화학 약물 치료가 함께 수행되고 있으나, 상기 치료는 내성 변이의 발생, 종양줄기세포에 의한 재발 등의 원인으로 인하여 완벽한 치료법이 없다. 따라서, 보다 효과적으로 교모세포종을 치료할 수 있는 약물이 요구되고 있는 실정이다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

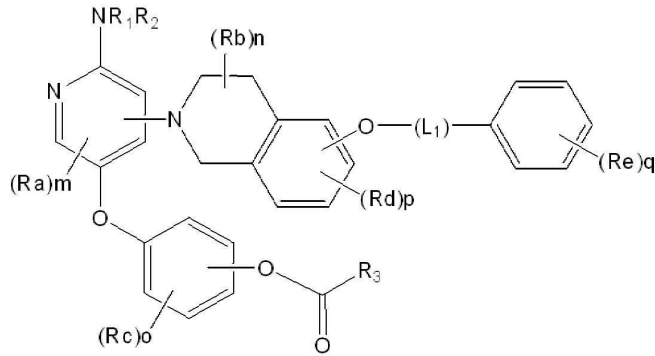
- [0009] 본 발명의 일 목적은 암 중에서도 특히 뇌암을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 암 중에서도 특히 뇌암을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 항암제의 감수성을 증진시킬 수 있는 조성물을 제공하고자 한다.
- [0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0012] 본 명세서에 사용되는 용어 '할로젠'은 다른 언급이 없으면, 플루오르, 염소, 브롬 또는 요오드를 의미한다.
- [0013] 본 명세서에 사용되는 용어 ' $C_{1-6}$ 알킬'은 다른 언급이 없으면, 탄소수 1 내지 6개의 직쇄형 또는 분지형의 탄화수소 잔기를 의미한다. 이의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, n-부틸, sec-부틸, t-부틸, n-펜틸, n-헥실 등을 들 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0014] 본 명세서에 사용되는 용어 ' $C_{3-7}$ 사이클로알킬'은 다른 언급이 없으면, 탄소수 3 내지 7개의 고리형의 탄화수소 잔기를 의미한다. 이의 예로는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 사이클로헵틸 등을 들 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 본 명세서에서 사용되는 용어 ' $C_6 \sim C_{14}$ 의 아릴'은 다른 언급이 없으면, 융합 또는 비-융합된 하나 이상의 방향족 고리를 갖는, 탄소수 6 내지 14개의 모노- 또는 폴리-시클릭 카르보시클릭 고리 시스템을 지칭하고, 아릴의 예로는 페닐, 나프틸, 테트라하이드로나프틸, 인데닐 및 안드라세닐 등을 들 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 본 명세서에 사용되는 용어 ' $C_{1-6}$ 알콕시'는 다른 언급이 없으면, 산소와 연결된 탄소수 1 내지 6개의 직쇄형 또는 분지형의 탄화수소 잔기를 의미한다. 이의 예로는 메톡시, 에톡시, 프로톡시, 이소부톡시, n-부톡시, sec-부톡시, t-부톡시, 펜톡시, 헥소키 등을 들 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 본 명세서에 사용되는 용어 ' $C_{1-6}$ 알킬렌'은 탄소수 1 내지 6개의 직쇄형 또는 분지형의 탄화수소 사슬로부터 유도되는 2가의 잔기를 의미한다. 상기 알킬의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, n-부틸, sec-부틸, t-부틸, n-펜틸 및 n-헥실 등을 들 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 브루톤 티로신 키나제(Bruton's tyrosine kinase; BTK) 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 암의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 브루톤 티로신 키나제(BTK) 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 암의 침윤성 또는 전이성 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명에서 상기 BTK 억제제로는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 약학적으로 허용 가능한 염, 광학이성질체, 수화물 및 용매화물로부터 선택되는 화합물일 수 있다:



[0022] [화학식 1]



[0023]

[0024] 상기 화학식 1에서,

[0025] R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 독립적으로 수소, C<sub>1-6</sub>알킬 또는 C<sub>3-6</sub>사이클로알킬이고;

[0026] R<sub>3</sub>는 수소, C<sub>1-6</sub>알킬 또는 C<sub>1-6</sub>알케닐이며;

[0027] L<sub>1</sub>은 직접결합 또는 C<sub>1-6</sub>알킬렌이고;

[0028] m은 0 내지 2의 정수이며;

[0029] n 및 p는 각각 독립적으로 0 내지 3의 정수이고;

[0030] o는 0 내지 4의 정수이며;

[0031] q는 0 내지 5의 정수이고;

[0032] Ra, Rb, Rc 및 Rd 및 Re는 각각 독립적으로 할로젠, C<sub>1-6</sub>알킬, C<sub>3-6</sub>사이클로알킬기 및 C<sub>1-6</sub>알콕시로 이루어진 군에서 선택되며;

[0033] 상기 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>의 알킬 및 사이클로알킬과, R<sub>3</sub>의 알킬 및 알케닐과, L<sub>1</sub>의 알킬렌과, Ra, Rb, Rc 및 Rd 및 Re의 알킬, 사이클로알킬 및 알콕시는 각각 독립적으로 할로젠, C<sub>1-6</sub>알킬, C<sub>3-6</sub>사이클로알킬기 및 C<sub>6-14</sub>아릴로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상의 치환기에 의해 치환되거나 비치환될 수 있다.

[0034] 본 발명에서 상기 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 각각 독립적으로 수소 또는 C<sub>1-6</sub>알킬이거나 바람직하게는 수소일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명에서 상기 R<sub>3</sub>는 C<sub>1-6</sub>알케닐일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명에서 상기 L<sub>1</sub>은 C<sub>1-6</sub>알킬렌일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에서 상기 m은 0 또는 1의 정수일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명에서 상기 n은 0 내지 2의 정수이거나 바람직하게는 0 또는 1의 정수일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

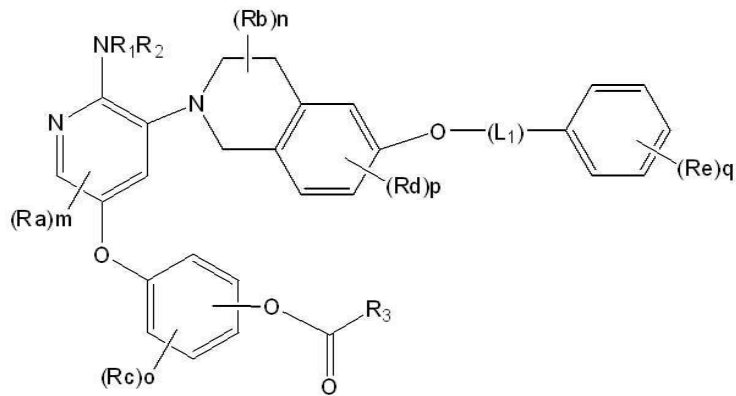
[0039] 본 발명에서 상기 o는 0 내지 2의 정수이거나 바람직하게는 0 또는 1의 정수일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명에서 상기 p는 0 내지 2의 정수이거나 바람직하게는 0 또는 1의 정수일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 본 발명에서 상기 Re는 C<sub>1-6</sub>알킬 또는 C<sub>1-6</sub>알콕시일 수 있거나 바람직하게는 C<sub>1-6</sub>알콕시일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명에서 상기 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[0043] [화학식 2]



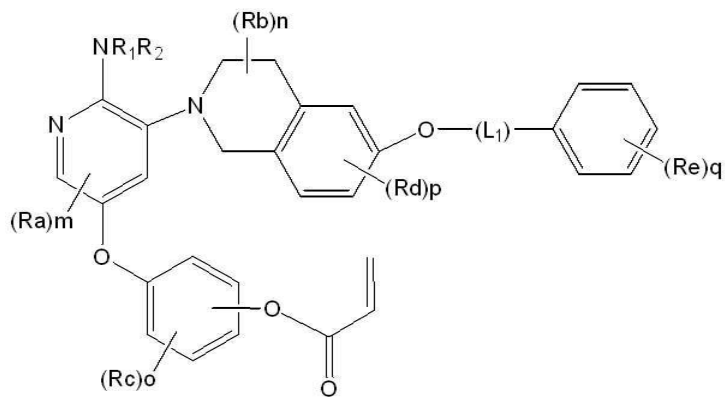
[0044]

[0045] 상기 화학식 2에서,

[0046]  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $L_1$ ,  $m$ ,  $n$ ,  $o$ ,  $p$ ,  $q$ ,  $R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_c$ ,  $R_d$  및  $R_e$  각각의 정의는 상기 화학식 1에서 정의된 바와 같다.

[0047] 본 발명에서 상기 화합물은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[0048] [화학식 3]



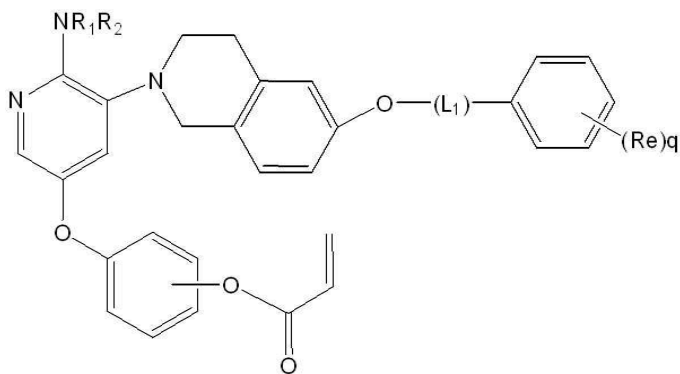
[0049]

[0050] 상기 화학식 3에서,

[0051]  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $L_1$ ,  $m$ ,  $n$ ,  $o$ ,  $p$ ,  $q$ ,  $R_a$ ,  $R_b$ ,  $R_c$ ,  $R_d$  및  $R_e$  각각의 정의는 상기 화학식 1에서 정의된 바와 같다.

[0052] 본 발명에서 상기 화합물은 하기 화학식 4로 표시되는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[0053] [화학식 4]



[0054]

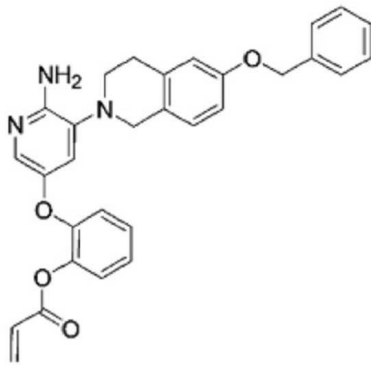
[0055] 상기 화학식 4에서,

[0056]  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $L_1$ ,  $q$  및  $R_e$  각각의 정의는 상기 화학식 1에서 정의된 바와 같다.

[0057] 본 발명에서 상기 화합물은 하기 화학식 5 또는 6으로 표시되는 화합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니

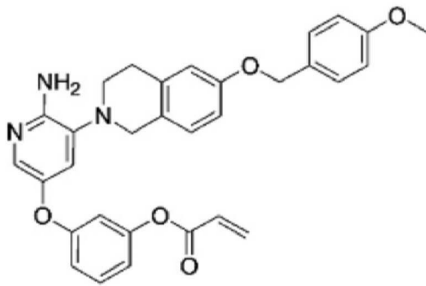
다:

[0058] [화학식 5]



[0059]

[0060] [화학식 6]



[0061]

[0062] 본 발명에서 상기 약학적으로 허용되는 염은, 의학적 적용에 적합한 것으로 당업자에 의해 일반적으로 간주되는 염(예를 들어 이러한 염이 상기 염으로 치료될 수 있는 대상체에게 유해하지 않기 때문임), 또는 각각의 치료 내에서 허용 가능한 부작용을 야기하는 염이다. 일반적으로, 상기 약학적으로 허용되는 염은 미국 식품 의약국(FDA), 유럽 의약청(EMA), 또는 일본 후생성의 의약품 의료기기 종합기구(PMDA)와 같은 규제 당국에 의해 허용되는 것으로 간주되는 염이다. 그러나, 본 발명은 원칙적으로, 예를 들어 본 발명에 따른 화합물 또는 그의 생리학적으로 작용성인 유도체의 제조에서의 중간체, 또는 본 발명에 따른 화합물의 약학적으로 허용되는 염 또는 그의 생리학적으로 작용성인 유도체의 제조에서의 중간체로서, 그 자체로는 약학적으로 허용되지 않는 본 발명에 따른 화합물의 염을 또한 포함한다. 상기 염은 수불용성 염을 포함하고, 특히, 수용성 염을 포함한다.

[0063] 각각의 경우에, 당업자는 본 발명에 따른 특정 화합물 또는 그의 생리학적으로 작용성인 유도체가 염을 형성할 수 있는지 여부, 즉, 상기 본 발명에 따른 화합물 또는 그의 생리학적으로 작용성인 유도체가, 예를 들어 아미노기, 카르복실산기 등과 같은 전하를 띌 수 있는 기를 가지는지 여부를 쉽게 결정할 수 있다.

[0064] 본 발명의 화합물의 예시적인 염은 산 부가 염 또는 염기와의 염, 특히 약학적으로 허용되는 무기산 및 유기산 부가 염 및 약학에서 통상적으로 사용되는 염기와의 염이며, 이는 수불용성 또는 특히 수용성 산 부가 염이다. 본 발명의 화합물의 치환기에 따라 염기와의 염이 또한 적합할 수 있다. 산 부가 염은, 예를 들어, 본 발명의 화합물의 용액을 염산, 황산, 푸마르산, 말레산, 석신산, 아세트산, 벤조산, 시트르산, 타르타르산, 탄산 또는 인산과 같은 약학적으로 허용되는 산의 용액과 혼합함으로써 형성될 수 있다. 마찬가지로, 약학적으로 허용되는 염기 부가 염은 알칼리 금속염(예를 들어, 나트륨 또는 칼륨 염); 알칼리 토금속 염(예를 들어, 칼슘 또는 마그네슘 염); 및 적합한 유기 리간드로 형성된 염(예를 들어, 할라이드, 하이드록사이드, 카복실레이트, 설페이트, 포스페이트, 니트레이트, 알킬 설포네이트 및 아릴 설포네이트와 같은 반대 음이온을 사용하여 형성된 암모늄, 4차 암모늄 및 아민 양이온)을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 염의 예시적인 예로는 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 아르기네이트, 아스코르베이트, 아스파테이트, 벤젠설포네이트, 벤조에이트, 바이카르보네이트, 바이설페이트, 바이타르타레이트, 보레이트, 브로마이드, 부티레이트, 칼슘 에테데이트, 캄포레이트, 캄포설포네이트, 캄실레이트, 카르보네이트, 클로라이드, 시트레이트, 디글루코네이트, 디하이드로클로라이드, 도데실설페이트, 에테데이트, 에디실레이트, 에탄설포네이트, 포르메이트, 푸마레이트, 갈락테이트,

갈락투로네이트, 글루코네이트, 글루타메이트, 글리세로포스페이트, 헤미셀페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 헥실레스르시네이트, 하이드로브로마이드, 하이드로클로라이드, 하이드로요오다이드, 2-하이드록시-에탄설포네이트, 하이드록시나프토에이트, 요오다이드, 이소부티레이트, 이소티오네이트, 락테이트, 라우레이트, 라우릴 셀페이트, 말레이트, 말레에이트, 말로네이트, 만델레이트, 메탄설포네이트(메실레이트), 메틸셀페이트, 2-나프탈렌설포네이트, 니코티네이트, 니트레이트, 올레에이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 판토테네이트, 펙티네이트, 피셀페이트, 3-페닐프로피오네이트, 포스페이트/디포스페이트, 프탈레이트, 피크레이트, 피발레이트, 폴리갈락투로네이트, 프로피오네이트, 살리실레이트, 스테아레이트, 셀페이트, 수베레이트, 석시네이트, 탄네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 운테카노에이트, 발레레이트 등이 포함되지만 이로 한정되지 않는다.

[0065] 본 발명에서 약학적으로 허용되지 않으며, 예를 들어, 산업적 규모로 본 발명에 따른 화합물을 제조하는 동안 공정 생성물로서 수득될 수 있는 염이 또한 본 발명에 포함되고, 요망되는 경우, 이는 당업자에게 알려진 방법에 의해 약학적으로 허용되는 염으로 전환될 수 있다.

[0066] 한편, 본 발명에 따른 화합물들은 비대칭 탄소 중심을 가질 수 있으므로 R 또는 S 이성질체 또는 라세믹 화합물로서 존재할 수 있으며 이들 모든 광학이성질체 및 혼합물은 본 발명의 범위에 포함될 수 있다.

[0067] 그 외에도, 본 발명의 화합물뿐만 아니라 그의 염은, 예를 들어 결정질 형태로 분리될 때, 다양한 양의 용매를 함유할 수 있다. 따라서, 본 발명의 화합물의 용매화물, 특히 수화물뿐만 아니라 본 발명의 화합물의 염의 용매화물, 특히 수화물이 본 발명의 범위에 포함될 수 있다. 더욱 특히, 본 발명은, 화학량론에 대하여 1개, 2개 또는 1/2개의 물 분자를 포함하는, 본 발명에 따른 화합물, 염 및/또는 생리학적으로 작용성인 유도체의 수화물을 포함할 수 있다.

[0068] 본 발명의 화합물을 사용하는 경우 암 세포 또는 암 줄기세포의 증식을 억제하여 암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있을 뿐만 아니라, 상기한 암 세포 또는 암 줄기세포의 침윤성 또는 전이성 또한 효과적으로 억제할 수 있다.

[0069] 본 발명에서 상기 "암 줄기세포"란 줄기세포 특유의 능력인 자가재생이나 분화능력을 가지고 있는 포괄적인 의미의 암 세포를 의미한다.

[0070] 본 발명에서 상기 "암"은 포유류에서 전형적으로 조절되지 않는 세포 성장으로 특징지어진 생리적 상태를 나타내거나 가리킨다.

[0071] 본 발명에서 상기 암은 브루톤 타이로신 키나제(Bruton's tyrosine kinase; BTK)의 발현 수준이 정상 조직에 비하여 증가된 암일 수 있다.

[0072] 본 발명에서 상기 암은 그 발생 부위에 따라 뇌암, 유방암, 자궁암, 나팔관암, 난소암, 위암, 직장암, 대장암, 소장암, 직장암, 식도암, 임파선암, 담낭암, 폐암, 피부암, 신장암, 방광암, 혈액암, 췌장암, 전립선암, 갑상선암, 내분비선암, 구강암, 간암 등 일 수 있으나, 바람직하게는 뇌암일 수 있으며, 종양의 분화 및/또는 증식 등 암의 진행이 본 발명에서 기술하는 암 줄기세포에 의존적인 암의 종류라면 이에 제한되지 않는다.

[0073] 이러한 암 세포로 분화할 수 있는 암 줄기세포는 악성 종양 조직 내에 1 ~ 2% 정도로 존재하며 정상줄기세포의 특성인 자가복제 능력 (self-renewal)과 다른 세포로 분화할 수 있는 전분화능 (pluripotent)을 가지고 있으나 자가 조절 기능에 이상이 있어 세포분열 활성화로 세포 수를 증가하게 되고 스스로 악성 종양 세포로 분화하는 것으로 보고되었다.

[0074] 1997년 백혈병에서 암 줄기세포(cancer stem cell)의 존재가 밝혀진 이래로 (Blood, 1997), 유방암 (PNAS, 2003), 뇌종양 (Nature, 2004), 전립선암 (Cancer Res, 2005), 대장암 (Nature, 2007), 흑색종 (Nature, 2008)에서도 암 줄기세포가 존재한다는 증거들이 제시되었고, 종양에 포함되어있는 소수의 암 줄기세포가 종양의 악성화, 항암저항성 및 재발의 주된 원인으로 부각되었다.

[0075] 암 줄기세포들은 다른 암 세포들과 구별되는 표지 인자(marker)가 존재하며, 암 줄기세포의 표지 인자(cancer stem cell marker)로는 하기 표 1과 같이 다양한 암 종 특이적인 암 줄기세포 표지 인자가 알려져 있다.

표 1

암종	암 줄기세포 표지인자	출처
교모세포종	CD133	

신장암	CD105, CD133	Contemp Oncol (Pozn). 2015; 19(1A): A44-A51
갑상선암	ABCG2, MRP1, LRP 및 CXCR4	J Clin Pathol. 2014 Feb;67(2):125-33
급성골수성백혈병 (AMM)	CD34+/CD38-	
다발성골수종 (multiple myeloma)	CD133-	
유방암	CD44+/CD24-/low	Breast Cancer Res. 2007; 9(3): 303
대장암	CD133+	
전립선암	CD44+/α2β1hi/CD133+	
흑색종 (melanoma)	ABCB5+	

- [0077] 상기한 암 줄기세포들은 끊임없이 자기 재생(self-renewal)을 하며, 실험동물 모델에서 천개 미만의 적은 세포 수로도 종양을 만들 수 있으며 악성 종양 세포로서의 능력을 보유하고 있다. 또한, 암 치료법인 항암제 치료와 방사선 치료에 놀라울 정도로 저항성을 가지고 있어, 암 줄기세포의 제거는 암 치료의 성패를 가늠할 수 있는 바로미터로 점차 인식되고 있다. 최근에는 수술, 방사선 치료, 항암화학요법 등 기존의 여러 치료방법을 이용해 암 세포들을 사멸시키더라도 암 줄기세포들을 모두 사멸시키지 못한다면 남아있는 암 줄기세포들로부터 다시 암이 재발할 수 있다는 것으로 인식되고 있다. 이러한 암의 재발을 방지하기 위하여 종양을 재생성할 수 있는 능력을 가진 암 줄기세포를 타겟으로 하는 화학요법 및 이를 바탕으로 암을 치료하고자 하는 치료프로토콜 개발에 관심이 높아지고 있다.
- [0078] 정상 조직에서의 줄기세포는 자가 재생 (self-renewal) 기전에 의해 세포 성장과 분화를 조절하지만, 암 줄기세포는 종양세포 주변의 종양 미세환경 인자에 영향을 받아 비정상적인 자가분열(Self-renewal) 및 유지 (maintenance) 경로를 활성화하여 급격히 집적됨으로써 악성화되고 항암치료에 대한 저항성을 획득하게 되며 궁극적으로 암의 재발을 야기한다고 제시되고 있다. 그러나 아직까지 암 줄기세포의 집적 및 유지를 조절하는 종양 미세 환경 인자의 실체와 상호작용에 대한 구체적인 기전 연구는 진행되지 못하고 있다.
- [0079] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 암 증상을 차단하거나, 암 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0080] 본 발명에서, "개선" 또는 "치료"는 본 발명의 약학적 조성물을 조사하여 암 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.
- [0081] 본 발명에 있어서, 상기 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0082] 본 발명의 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.
- [0083] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0084] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다.

[0085] 본 발명에서, "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0086] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 징식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 증증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

### 발명의 효과

[0087] 본 발명에 따른 화합물을 이용하는 경우 암 세포 또는 암 줄기세포의 증식을 억제하고, 줄기세포능(stemness)을 억제하여, 암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있을 뿐만 아니라, 더 나아가 상기 암 세포 또는 암 줄기세포의 침윤성 또는 전이성 또한 효과적으로 억제할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0088] 도 1은 실험에 1에서 정상 뇌 조직 세포, 정상 성상 세포(NHA), 교모세포종 세포(GBM) 및 교모세포종 종양구 세포(TS)에서 BTK 발현 수준을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 실험에 1에서 다양한 교모세포종 종양구에 대하여 BTK 발현 수준을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 실험에 2에서 교모세포종 종양구(TS13-30, TS13-64 및 TS15-88)에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리하고, 대조군으로는 이브루티닙(Ibrutinib)을 처리한 뒤 세포 생존율의 변화를 측정하여 그 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 실험에 2에서 교모세포종 종양구(TS13-30, TS13-64 및 TS15-88)에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리하고, 대조군으로는 이브루티닙(Ibrutinib)을 처리한 뒤 ATP 수준의 변화를 측정하여 그 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 5는 실험에 3에서 교모세포종 종양구(TS13-30, TS13-64 및 TS15-88)에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리하고, 대조군으로는 이브루티닙(Ibrutinib)을 처리한 뒤 BTK 및 세포 증식 관련 마커의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 실험에 4에서 교모세포종 종양구 TS13-30에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리하고, 대조군으로는 이브루티닙(Ibrutinib)을 처리한 뒤 세포를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 7은 실험에 4에서 교모세포종 종양구 TS13-64에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리하고, 대조군으로는 이브루티닙(Ibrutinib)을 처리한 뒤 세포를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 8은 실험에 4에서 교모세포종 종양구 TS15-88에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리하고, 대조군으로는 이브루티닙(Ibrutinib)을 처리한 뒤 세포를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 9는 실험에 4에서 교모세포종 종양구(TS13-30, TS13-64 및 TS15-88)에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리하고, 대조군으로는 이브루티닙(Ibrutinib)을 처리한 뒤 신경구 형성능을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 실험에 4에서 교모세포종 종양구(TS13-30, TS13-64 및 TS15-88)에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리하고, 대조군으로는 이브루티닙(Ibrutinib)을 처리한 뒤 종양구의 반경 변화를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 실험에 5에서 교모세포종 종양구(TS13-30, TS13-64 및 TS15-88)에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리하고, 대조군으로는 이브루티닙(Ibrutinib)을 처리한 뒤 줄기세포능 관련 마커의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 실험에 6에서 교모세포종 종양구(TS13-30, TS13-64 및 TS15-88)에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조



예 2의 SPA8009 화합물을 처리하고, 대조군으로는 이브루티닙(Ibrutinib)을 처리한 뒤 세포의 침윤성 변화를 현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 13은 실험예 6에서 교모세포종 종양구(TS13-30, TS13-64 및 TS15-88)에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리하고, 대조군으로는 이브루티닙(Ibrutinib)을 처리한 뒤 처리 시간에 따른 세포의 침윤 면적의 변화를 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 실험예 7에서 교모세포종 종양구(TS13-30, TS13-64 및 TS15-88)에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리하고, 대조군으로는 이브루티닙(Ibrutinib)을 처리한 뒤 침윤성 관련 마커의 발현 수준의 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 실험예 8에서 교모세포종 종양구 TS13-30의 정위 이식 마우스 모델에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물, 대조군으로는 이브루티닙(Ibrutinib)을 투여한 뒤 시간에 따른 종양 크기 변화를 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 16은 실험예 8에서 교모세포종 종양구 TS13-30의 정위 이식 마우스 모델에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물, 대조군으로는 이브루티닙(Ibrutinib)을 투여한 뒤 각 처리에 따른 마우스의 생존 기간의 변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0089] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

### [0091] 실시예

[0093] [제조예 1] SPA8007 화합물(아크릴산 2-[6-아미노-5-(6-벤질옥시-3,4-다이하이드로-1H-아이소퀴놀린-2-일)피리딘-3-일옥시]페닐 에스터)의 준비

[0094] 3,5-다이클로로-2-나이트로피리딘을  $K_2CO_3$ , 톨루엔, 60 °C 조건에서 10시간 동안 6-(벤질옥시)-1,2,3,4-테트라하이드로아이소퀴놀린과 반응한 후,  $K_2CO_3$ , DMSO, 18-crown-6, 100 °C 조건에서 10시간 동안 카테콜과 반응하고, 상온에서 TEA, DCM 조건 하에 1시간 동안 아크릴로일클로라이드와 반응하였다. 그 다음  $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ , EtOH를 이용하여 상온에서 1시간 동안 반응시켜 나이트로그룹을 아민으로 전환하여 상기 화학식 5로 표시되는 아크릴산 2-[6-아미노-5-(6-벤질옥시-3,4-다이하이드로-1H-아이소퀴놀린-2-일)피리딘-3-일옥시]페닐 에스터(Acrylic acid 2-[6-amino-5-(6-benzyloxy-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-yl)pyridin-3-yloxy]phenyl ester)를 제조하였다.

[0095] 아이보리색 고체 (수율 23%); IR (neat,  $cm^{-1}$ ) 2980.65, 2888.60, 1735.13, 1610.91, 1461.97, 1380.75, 1239.82, 1150.48, 1015.44, 969.35;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  7.68 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz), 7.42 (2H, d,  $J = 7.5$  Hz), 7.38 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz), 7.31 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz), 7.15 (2H, t,  $J = 7.5$  Hz), 7.07 (1H, t,  $J = 7.5$  Hz), 7.01 (1H, d,  $J = 2.5$  Hz), 6.97 (1H, d,  $J = 8.5$  Hz), 6.88 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz), 6.81-6.77 (2H, m), 6.57 (1H, dd,  $J = 1.0, 17.0$  Hz), 6.31 (1H, dd,  $J = 10.5, 17.0$  Hz), 5.98 (1H, dd,  $J = 1.0, 10.5$  Hz), 5.04 (2H, s), 4.72 (2H, br s), 3.98 (2H, s), 3.17 (2H, t,  $J = 5.5$  Hz), 2.95 (2H, t,  $J = 5.5$  Hz);  $^{13}C$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  164.1, 159.8, 157.6, 154.5, 151.4, 150.2, 145.7, 140.7, 137.2, 135.1, 135.1, 133.7, 132.9, 130.2, 128.7, 128.1, 127.5, 127.5, 127.1, 126.9, 123.6, 123.2, 119.8, 117.9, 114.7, 113.2, 70.2, 52.7, 48.7, 30.0; LCMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $C_{30}H_{27}N_3O_4$ , 493.20; Found 494.20 [M + H]<sup>+</sup>

[0097] [제조예 2] SPA8009 화합물(아크릴산 3-{6-아미노-5-[6-(4-메톡시벤질옥시)-3,4-다이하이드로-1H-아이소퀴놀린-2-일]피리딘-3-일옥시}페닐 에스터)의 준비

[0098] 3,5-다이클로로-2-나이트로피리딘을  $K_2CO_3$ , 톨루엔, 60 °C 조건에서 10시간 동안 6-((4-메톡시벤질)옥시)-1,2,3,4-테트라하이드로아이소퀴놀린과 반응한 후,  $K_2CO_3$ , DMSO, 18-crown-6, 100 °C 조건에서 10시간 동안 레조르시놀과 반응하고, 상온에서 TEA, DCM 조건 하에 1시간 동안 아크릴로일클로라이드와 반응하였다. 그 다음  $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ , EtOH를 이용하여 상온에서 1시간 동안 반응시켜 나이트로그룹을 아민으로 전환하여 상기 화학식

6으로 표시되는 아크릴산 3-{6-아미노-5-[6-(4-메톡시벤질옥시)-3,4-다이하이드로-1H-아이소퀴놀린-2-일]피리딘-3-일옥시}페닐 에스터(Acrylic acid 3-{6-amino-5-[6-(4-methoxybenzyloxy)-3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-yl]pyridin-3-yloxy}phenylester)를 제조하였다.

[0099] 노란색 고체 (수율 42%); IR (neat, cm<sup>-1</sup>) 3345.48, 2980.40, 2970.51, 2930.34, 1740.92, 1609.63, 1513.79, 1462.81, 1400.63, 1379.59, 1304.07, 1241.82, 1153.82, 1025.10, 1001.88; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDC13) δ 7.70 (1H, d, J = 2.5 Hz), 7.33 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.28 (1H, t, J = 8.0 Hz), 7.03 (1H, d, J = 2.5 Hz), 6.96 (1H, d, J = 8.5 Hz), 6.90 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.82-6.77 (3H, m), 6.76 (1H, d, J = 2.0 Hz), 6.73 (1H, t, J = 2.5 Hz), 6.57 (1H, dd, J = 1.0, 17.5 Hz), 6.27 (1H, dd, J = 10.5, 17.5 Hz), 5.98 (1H, dd, J = 1.0, 10.5 Hz), 4.95 (2H, s), 4.82 (2H, br s), 4.00 (2H, s), 3.78 (3H, s), 3.18 (2H, t, J = 6.0 Hz), 2.95 (2H, t, J = 6.0 Hz); <sup>13</sup>C NMR (500 MHz, CDC13) δ 164.4, 159.8, 159.6, 157.7, 151.7, 151.7, 145.0, 135.3, 135.1, 134.4, 132.9, 130.2, 129.3, 129.2, 127.9, 127.5, 126.8, 120.6, 115.6, 114.8, 114.2, 114.2, 113.3, 110.4, 70.0, 55.5, 52.8, 48.8, 29.9; LCMS (ESI) m/z calcd for C<sub>31</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>, 523.21; Found 524.22 [M + H]<sup>+</sup>.

[0101] [실험예 1] 교모세포종에서의 BTK 발현 수준의 확인

[0102] 정상 뇌 조직 세포, 정상 성상 세포(NHA), 교모세포종 세포(GBM) 및 교모세포종 종양구 세포(TS)를 준비한 뒤, 마이크로어레이를 통해 이들 세포에서의 BTK 발현 수준을 측정하여 그 결과를 도 1에 나타내었다. 또한, 다양한 종류의 교모세포종 종양구에 대하여도 BTK 발현 수준을 측정하여 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0103] 도 1에서 보는 바와 같이, 정상 뇌 조직 세포에 비하여 교모세포종 세포에서는 BTK 발현 수준이 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0104] 또한, 도 2에서 보는 바와 같이 교모세포종 종양구 중에서도 TS13-30에서 BTK 발현 수준이 매우 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0105] 이하의 실험에서는 BTK 발현이 높은 TS13-30과, 일반적으로 실험에 많이 사용되는 TS15-88 및 TS13-64를 사용하였다.

[0107] [실험예 2] 교모세포종의 사멸 효과 확인

[0108] 흑색 또는 백색의 96 웰 플레이트의 각각의 웰에 완전 배지(100 μl)를 사용하여 TS13-30, TS13-64 및 TS15-88을 각각 10<sup>4</sup> 개의 세포로 접종하였다. 상기 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 50 μl의 완전 배지에 희석하여 5, 10, 15, 20, 50 또는 100 μl의 완전 배지에 희석하여 각 웰에 처리하였다. 72시간 배양 후 백색의 96 웰 플레이트에 세포 계수 키트 8(Cell Counting Kit 8)을 사용하여 WST를 측정하여 그 결과를 도 3에 나타내었다. 흑색의 96 웰 플레이트에 CellTiter-Glo® 발광 세포 생존율 어세이 키트(Luminescent Cell Viability Assay kit)를 사용하여 ATP를 측정하여 그 결과를 도 4에 나타내었다. 단, 양성 대조군으로는 BTK 억제제인 이브루티닙(Ibrutinib)을 사용하였다.

[0109] 도 3에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구에 본 발명에 따르는 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리한 경우 농도 의존적으로 세포 사멸율이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, TS13-30, TS13-64 및 TS15-88 종양구 모두에서 우수한 사멸 효과를 보였지만, 특히 BTK 발현이 높은 TS13-30 종양구에 대한 사멸 효과가 현저히 뛰어난 것을 볼 수 있었다.

[0110] 또한, 도 4에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구에 본 발명에 따르는 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리한 경우 농도 의존적으로 ATP 수준이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, TS13-30, TS13-64 및 TS15-88 종양구 모두에서 ATP 수준의 감소 효과를 보였지만, 특히 BTK 발현이 높은 TS13-30 종양구에 대한 ATP 수준의 억제 효과가 현저히 뛰어난 것을 볼 수 있었다.

[0112] [실험예 3] BTK 및 세포 증식 관련 마커의 발현 수준의 변화 확인

[0113] 교모세포종 종양구 TS13-30, TS13-64 및 TS15-88에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 각각 10 μM의 농도로 처리한 뒤 세포 용해물(cell lysates)을 10% 트리스-글리세린 겔(Tris-glycine gels)에서 SDS-PAGE를 진행하였다. 전기 영동된 단백질은 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membranes)에 옮겨지고, p-BTK (Cell Signaling Technology); BTK (Cell Signaling Technology); p-mTOR (Cell Signaling Technology); mTOR (Cell Signaling Technology); p-AKT (Cell Signaling Technology); AKT (Cell Signaling Technology);



Technology); GAPDH (Santa Cruz Biotechnology)의 1차 항체를 처리하였다. 2차 항체를 처리한 후, 웨스턴 라이트닝 플러스-강화된 화학발광 시약(Western Lightning Plus-enhanced chemiluminescence reagent (PerkinElmer, Waltham))과 함께 호스래디시 페록시다제-결합된(horseradish peroxidase-conjugated) IgG (Santa Cruz Biotechnology)를 처리하였다. ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare Life Sciences)로 이미지 촬영을 하여 그 결과를 도 5에 나타내었다. 단, 양성 대조군으로는 BTK 억제제인 이브루티닙(Ibrutinib)을 사용하였다.

[0114] 도 5에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구에 본 발명에 따르는 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리한 경우 BTK 수준과 세포 증식에 관련된 마커의 발현 수준이 모두 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0116] [실험예 4] 줄기세포능의 억제 확인

[0117] 96 웰 플레이트를 사용하여 교모세포종 종양구 TS13-30, TS13-64 및 TS15-88를 10 단일 세포/웰로 접종하였다. 세포를  $9.6 \times 10^3$  개로 계수하여 1 ml로 희석한 뒤  $9.6 \times 10^3$  세포/ml의 세포 100  $\mu$ l ( $9.6 \times 10^2$  개 세포)와 배지 9.6 ml를 섞어 10 세포/100  $\mu$ l로 만들어 주었다. 96 웰에 웰당 100  $\mu$ l씩 넣고 가장자리 웰에 증류수 200  $\mu$ l씩 넣었다. 오버나이트(overnight) 후 약물을 알맞은 용액에 녹여서 분취(aliquot) 해놓았다. 약물을 농도에 맞게 희석하여 50  $\mu$ l씩 각 웰에 넣었다. 각 처리 후 세포를 촬영한 사진을 도 6 내지 8에 나타내었다. 또한, 신경구 형성능은 총 웰당 스피어가 형성된 웰의 비율로 측정하여 그 결과를 도 9에 나타내었다. 이때 스피어가 형성된 웰을 양성(positive), 스피어가 형성되지 않은 웰을 음성(negative)으로 측정하였다. 각 처리 후 스피어의 크기 변화는 스피어의 반경으로 측정하여 그 결과는 도 10에 나타내었다. 단, 양성 대조군으로는 BTK 억제제인 이브루티닙(Ibrutinib)을 사용하였다.

[0118] 도 6 내지 8에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구에 본 발명에 따르는 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리한 경우 세포의 크기가 현저히 감소하는 것을 볼 수 있었다.

[0119] 또한, 도 9 및 10에서 보는 바와 같이 각 교모세포종 종양구에 본 발명에 따르는 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리한 결과 스피어의 형성능이 감소하고, 스피어의 크기가 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0121] [실험예 5] 줄기세포능 관련 마커의 발현 수준의 변화 확인

[0122] 교모세포종 종양구 TS13-30, TS13-64 및 TS15-88에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 각각 10  $\mu$ M의 농도로 처리한 뒤 세포 용해물(cell lysates)을 10% 트리스-글리세린 겔(Tris-glycine gels)에서 SDS-PAGE를 진행하였다. 전기 영동된 단백질은 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membranes)에 옮겨지고, CD133 (Cell Signaling Technology); Sox2 (Abcam); PDPN (Santa Cruz Biotechnology); Oct3/4 (Santa Cruz Biotechnology); Nestin (Abcam); GAPDH (Santa Cruz Biotechnology)의 1차 항체를 처리하였다. 2차 항체를 처리한 후 웨스턴 라이트닝 플러스-강화된 화학발광 시약(Western Lightning Plus-enhanced chemiluminescence reagent (PerkinElmer, Waltham))과 함께 호스래디시 페록시다제-결합된(horseradish peroxidase-conjugated) IgG (Santa Cruz Biotechnology)를 처리하였다. ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare Life Sciences)로 이미지 촬영을 하여 그 결과를 도 11에 나타내었다. 단, 양성 대조군으로는 BTK 억제제인 이브루티닙(Ibrutinib)을 사용하였다.

[0123] 도 11에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구에 본 발명에 따르는 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리한 경우 줄기세포능과 관련된 마커의 발현 수준이 모두 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0125] [실험예 6] 침윤성의 변화 확인

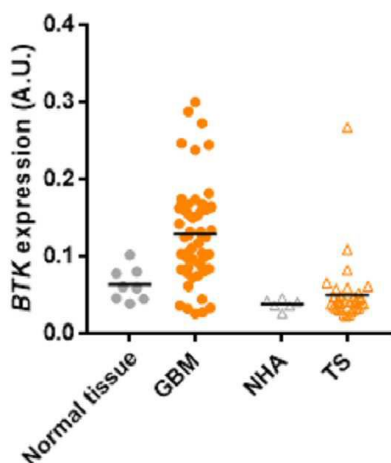
[0126] 96 웰 플레이트에 매트릭젤, 콜라겐 I형(Corning Incorporated), 및 TS 완전 배지를 채우고 각 웰에 교모세포종 종양구 TS13-30, TS13-64 또는 TS15-88의 한 개의 세포를 접종하였다. 매트릭스가 적당히 굳으면 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 10  $\mu$ M의 농도가 되도록 용해시킨 TS 완전 배지를 첨가하여 72 시간 동안 관찰한 뒤 상기 화합물 첨가 전과 비교하여 침윤 면적의 변화를 측정해 그 결과를 도 12 및 13에 나타내었다. 단, 양성 대조군으로는 BTK 억제제인 이브루티닙(Ibrutinib)을 사용하였다.

[0127] 도 12 및 13에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구에 본 발명에 따르는 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리한 경우 상기 종양구의 침윤성이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다.

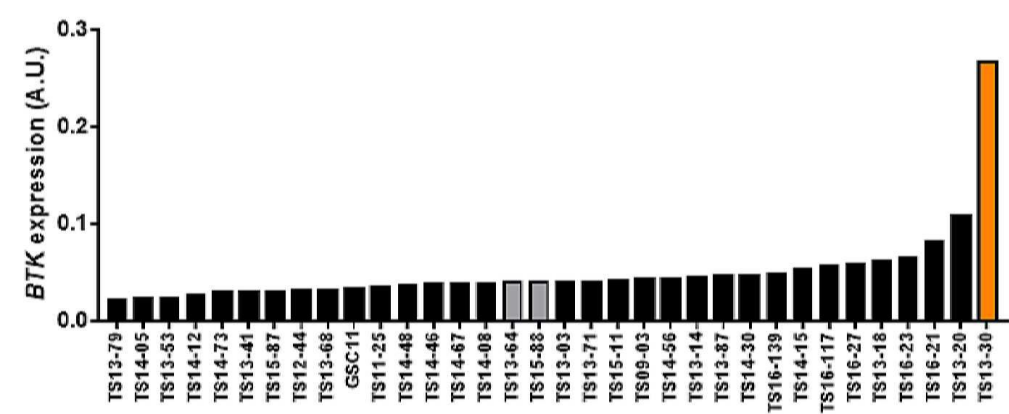
- [0129] [실험예 7] 침윤성 관련 마커의 발현 수준의 변화 확인
- [0130] 교모세포종 종양구 TS13-30, TS13-64 및 TS15-88에 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 각각 10  $\mu$ M의 농도로 처리한 뒤 세포 용해물(cell lysates)을 10% 트리스-글리세린 겔(Tris-glycine gels)에서 SDS-PAGE를 진행하였다. 전기 영동된 단백질은 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membranes)에 옮겨지고,  $\beta$ -catenin (BD Biosciences); N-cadherin (R&D Systems); Zeb1 (Sigma-Aldrich); CD44 (Cell Signaling Technology); GAPDH (Santa Cruz Biotechnology)의 1차 항체를 처리하였다. 2차 항체를 처리한 후 웨스턴 라이팅 플러스-강화된 화학발광 시약(Western Lightning Plus-enhanced chemiluminescence reagent (PerkinElmer, Waltham))과 함께 호스래디시 페록시다제-결합된(horseradish peroxidase-conjugated) IgG (Santa Cruz Biotechnology)를 처리하였다. ImageQuant LAS 4000 mini (GE Healthcare Life Sciences)로 이미지 촬영을 하여 그 결과를 도 14에 나타내었다. 단, 양성 대조군으로는 BTK 억제제인 이브루티닙(Ibrutinib)을 사용하였다.
- [0131] 도 14에서 보는 바와 같이, 교모세포종 종양구에 본 발명에 따르는 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리한 경우 침윤성과 관련된 마커의 발현 수준이 모두 감소한 것을 확인할 수 있었다.
- [0133] [실험예 8] 인-비보에서의 종양 억제 효과 확인
- [0134] 수컷의 무흉선 누드 마우스(6주령; Central Lab. Animal Inc.)를 사용하여 실험하며 실험 전 1주간 빛, 온도, 습도가 조절되고 멸균된 상태에서 순화 기간을 가졌다. 교모세포종 종양구 TS13-30 (마우스 당  $5 \times 10^5$  세포)를 마우스의 우측 전두엽에 가이드-스크류 시스템을 사용하여 4.5 mm 깊이에 이식하였다. 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 50mg/kg의 용량으로 IP(intraperitoneal) 투여하며 동물 체중의 최대치에서 15% 이상 감소하게 되면 안락사를 진행하였다. 각 처리에 따른 마우스의 종양의 크기 변화를 확인하여 그 결과를 도 15에 나타내었고, 각 처리에 따른 마우스의 생존 기간을 비교하여 그 결과를 도 16에 나타내었다. 단, 양성 대조군으로는 BTK 억제제인 이브루티닙(Ibrutinib)을 사용하였다.
- [0135] 도 16에서 보는 바와 같이, 교모세포종 정위이식 마우스에 본 발명에 따르는 제조예 1의 SPA8007 화합물과 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리한 경우 마우스의 생존 기간이 현저히 증가하여 치료 효과가 있음을 알 수 있었고, 특히 제조예 2의 SPA8009 화합물을 처리한 경우 인-비보에서 치료 효과가 매우 뛰어남을 알 수 있었다.
- [0137] 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

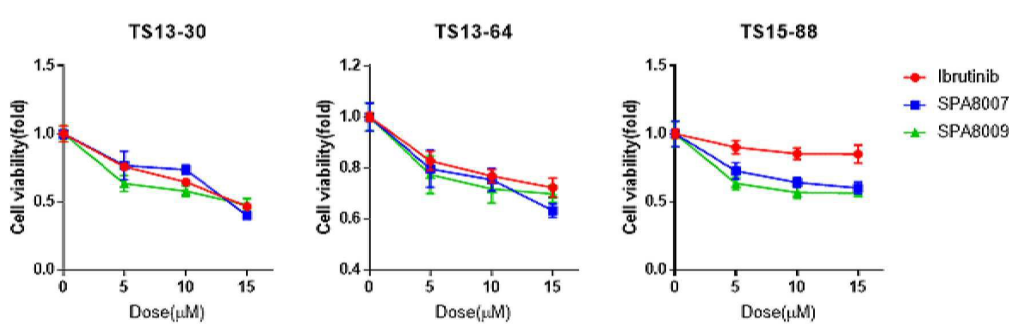
### 도면1



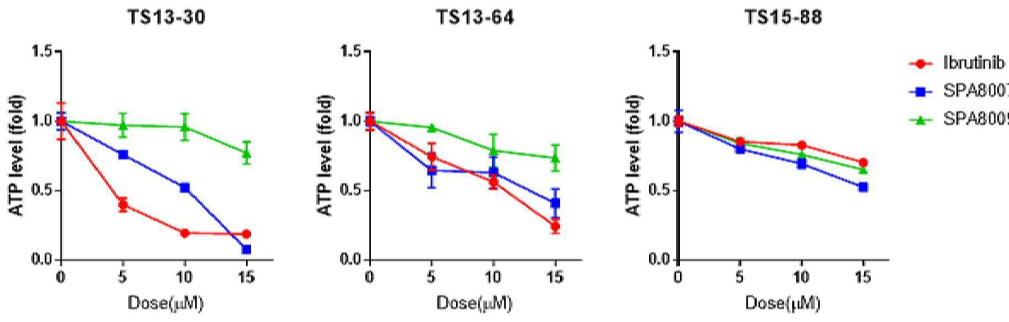
도면2



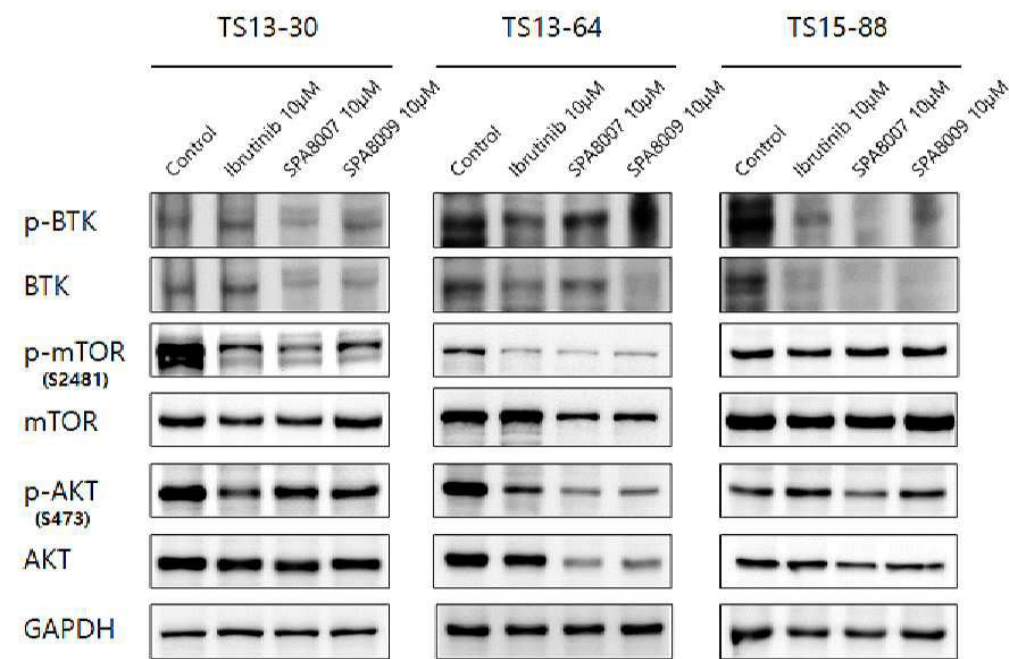
도면3



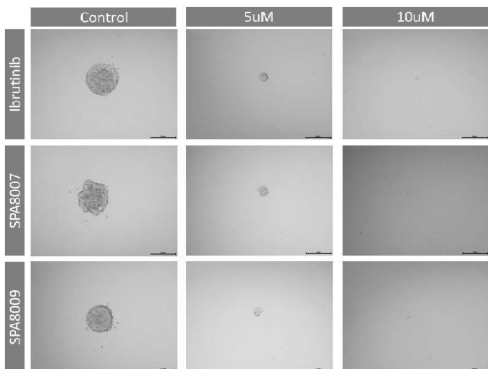
도면4



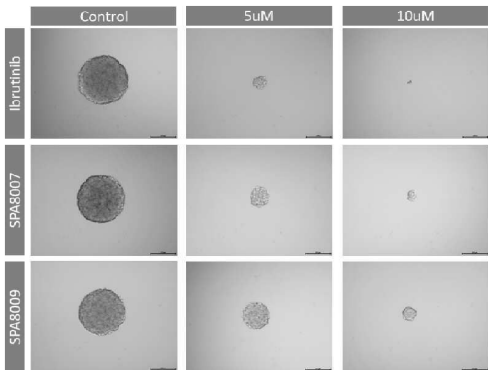
도면5



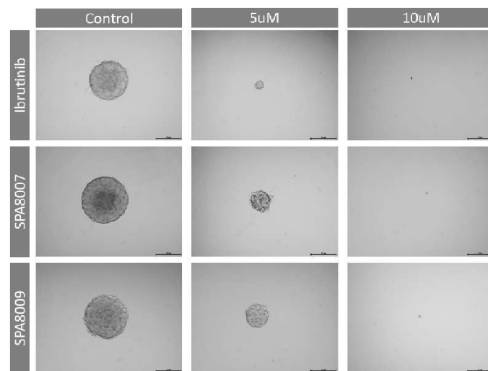
도면6



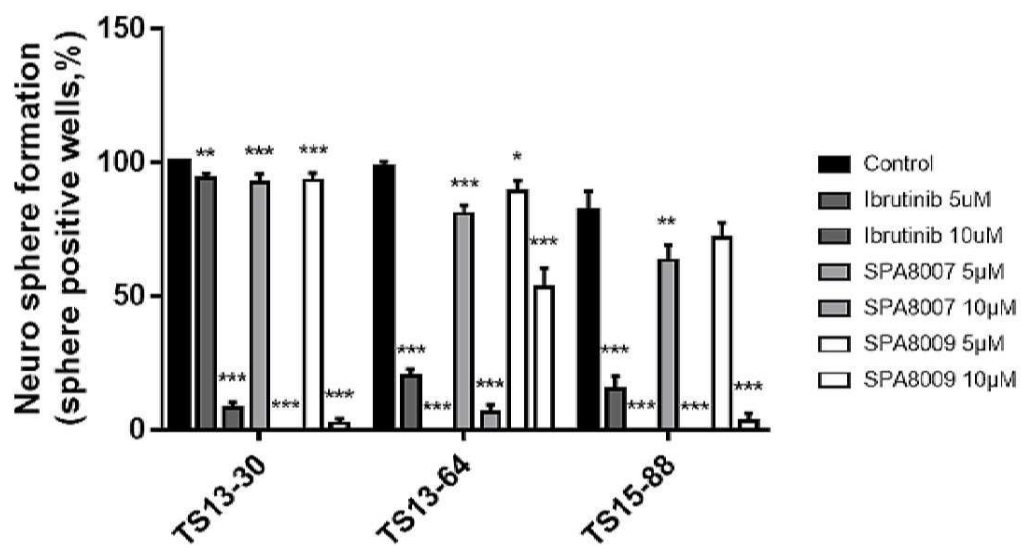
도면7



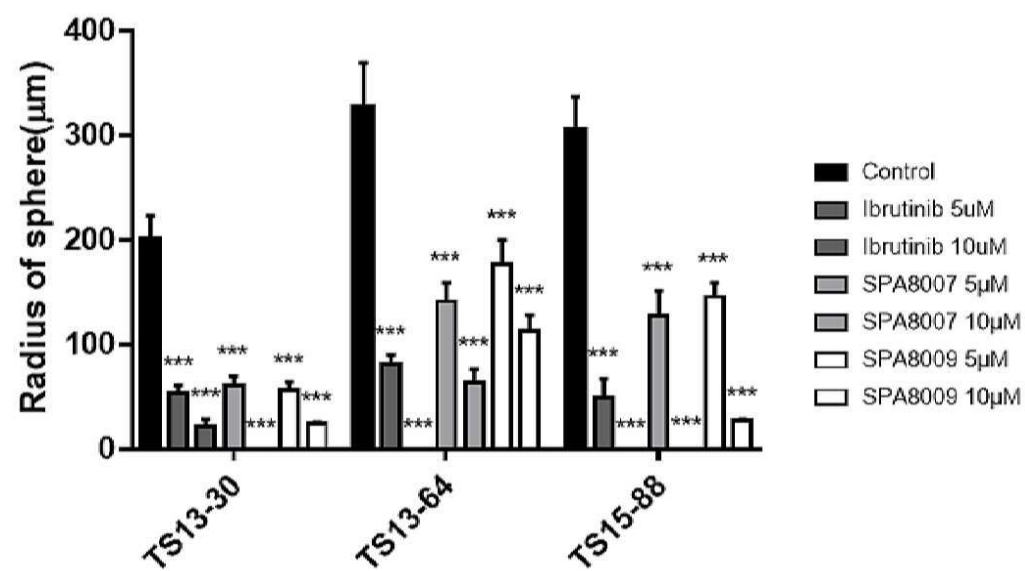
도면8



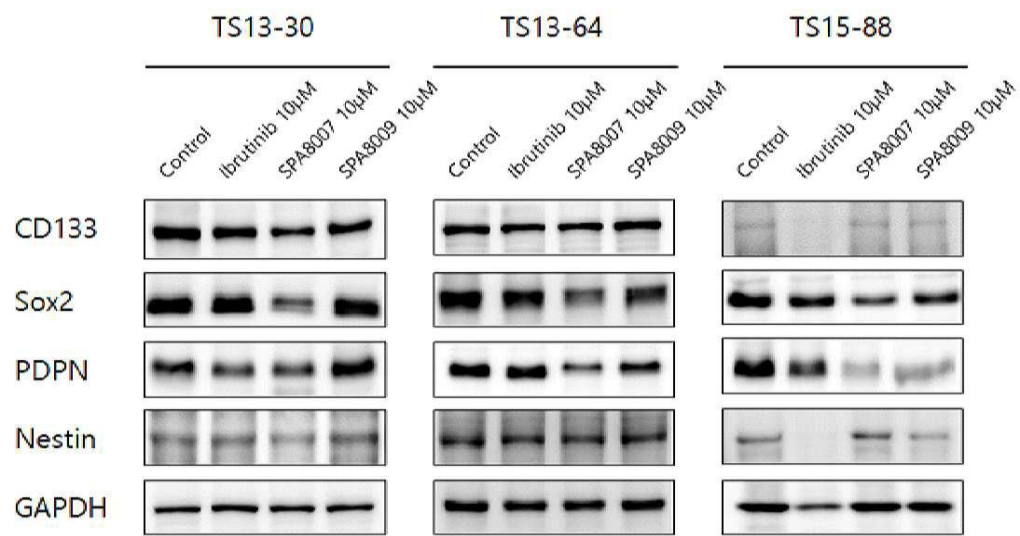
도면9



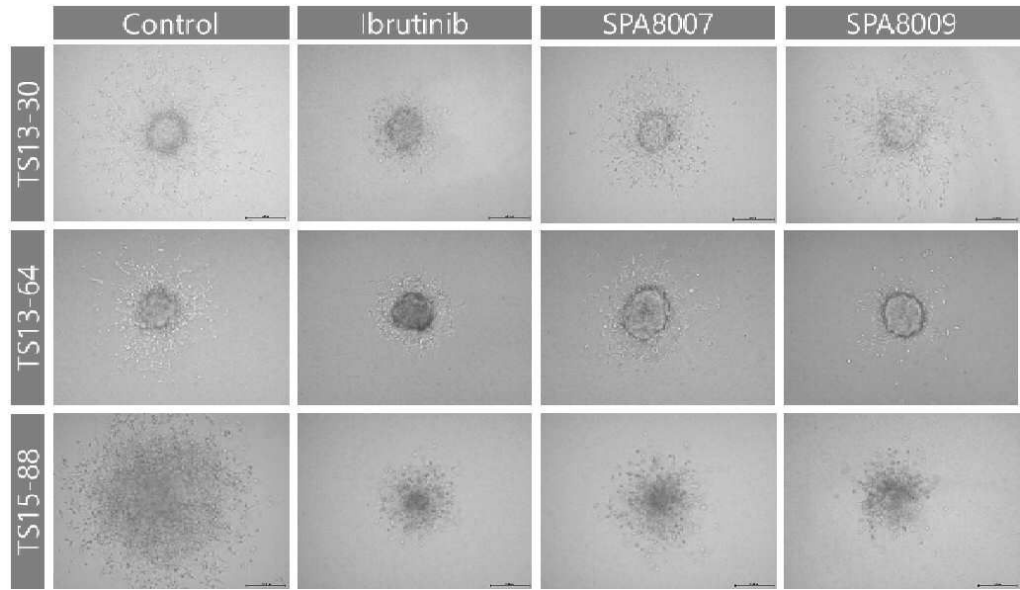
도면10



도면11

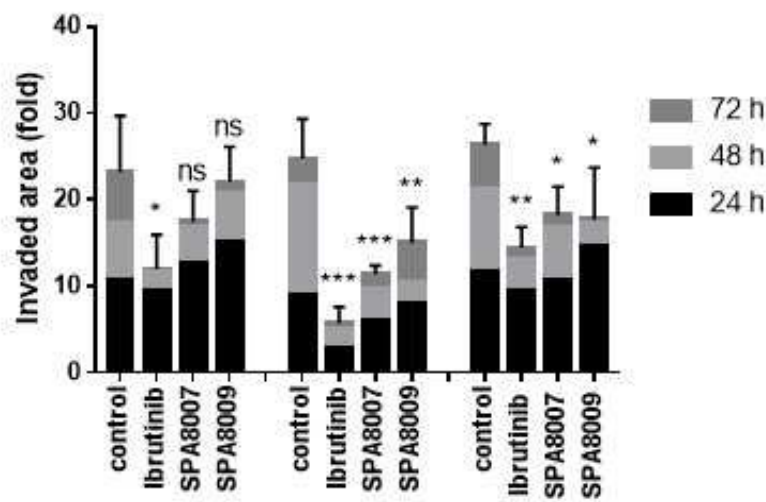


도면12

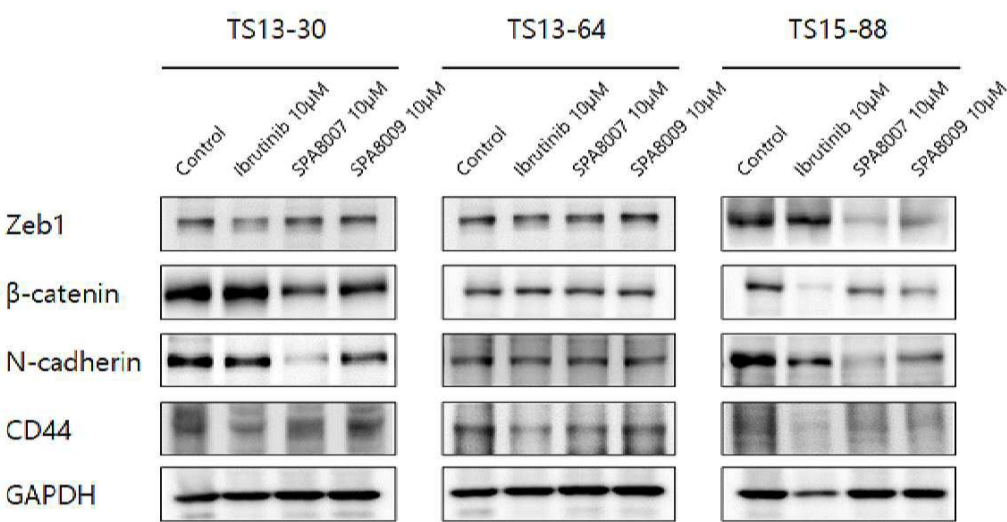




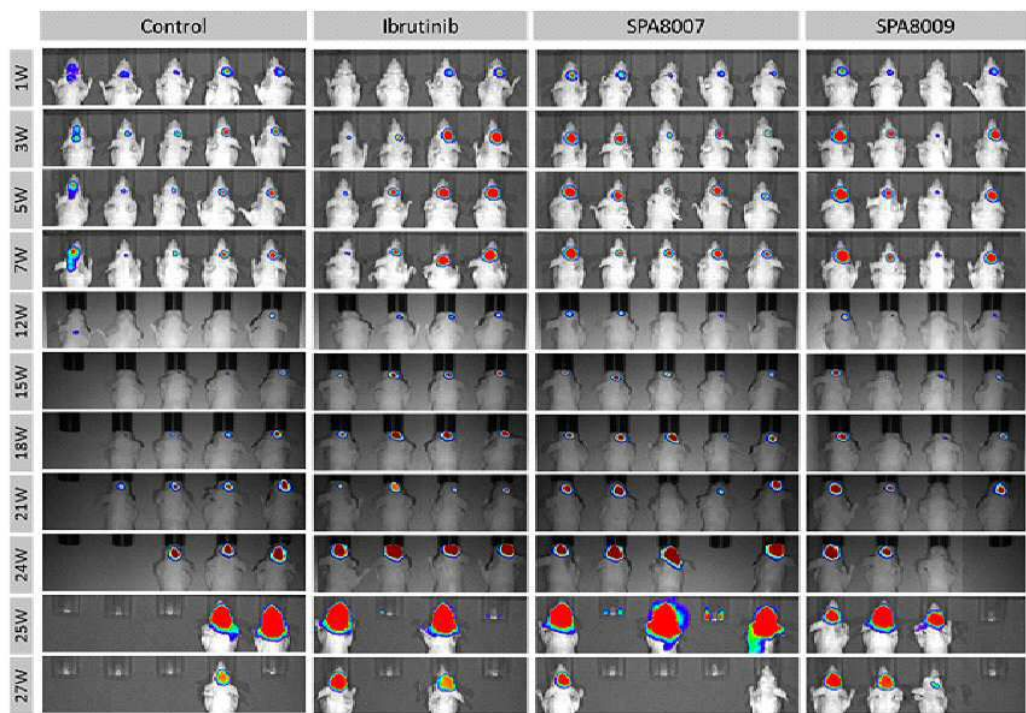
도면13



도면14



도면15



도면16

