



등록특허 10-2455529



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년10월20일

(11) 등록번호 10-2455529

(24) 등록일자 2022년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 493/04 (2006.01) A61K 31/357 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07D 493/04 (2013.01)

A61K 31/357 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0003012

(22) 출원일자 2020년01월09일

심사청구일자 2020년01월09일

(65) 공개번호 10-2021-0089893

(43) 공개일자 2021년07월19일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020090124229 A

KR1020200022759 A

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김익연

서울특별시 마포구 마포대로24길 16, 109동 202호 (아현동, 공덕자이 아파트)

남궁완

인천광역시 연수구 원인제로 124, 103동 1905호 (동춘동, 한양1차아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 6 항

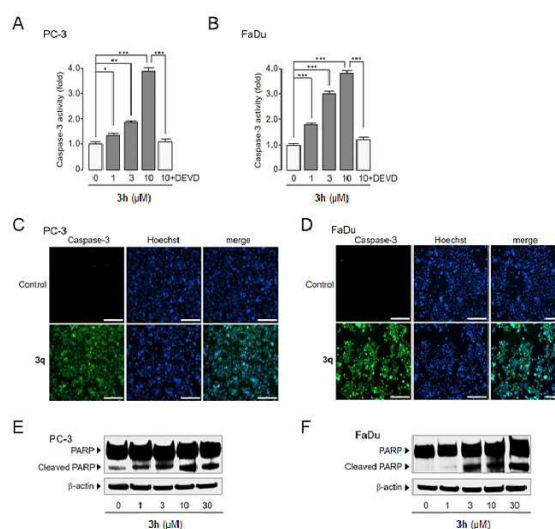
심사관 : 서희민

(54) 발명의 명칭 새로운 벤조피란 유도체 제조방법 및 이를 포함하는 항암제 조성물

## (57) 요약

본 발명은 ANO1 (Anoctamin 1) 저해 활성을 갖는 신규한 벤조피란 유도체 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 신규 벤조벤조피란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 ANO1에 대한 우수한 저해 활성을 나타내는 바, ANO1이 과발현된 암인 전립선암, 대장암, 식도편평상피세포암, 췌장암, 두경부암 및 유방암의 예방 또는 치료에 있어서, 보다 근본적으로 접근하여 타겟 치료할 수 있을 것으로 기대된다.

## 대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

**A61P 35/00** (2018.01)

(72) 발명자

**서요한**

전라북도 부안군 부안읍 봉신길 19, 104동 402호  
(부안현대아파트)

**이정화**

인천광역시 연수구 송도과학로27번길 15, 103동  
4705호 (송도동, 송도아메리칸타운아이파크)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2017R1A2A2A05069364
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	생리활성 천연물 기반 신규 골격 라이브러리 구축(3/4)
기 여 율	4/10
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2018R1A6A1A03023718
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	정부-교육부-한국연구재단-기초연구기반구축사업-대학중점연구소지원사업(이공)
연구과제명	Ezbaro_난치성 질환 치료를 위한 트랜스포톤 제어 기술 개발 (2/3,1단계)
기 여 율	3/10
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019R1I1A1A01061117
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	창의도전연구기반지원
연구과제명	새로운 ANO1 단백질 분해제 발굴 및 전립선암 치료제 개발 가능성 규명
기 여 율	3/10
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.06.01 ~ 2022.05.31

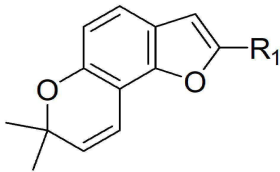
## 명세서

### 청구범위

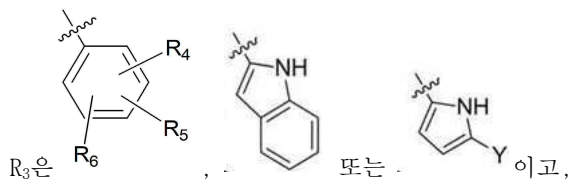
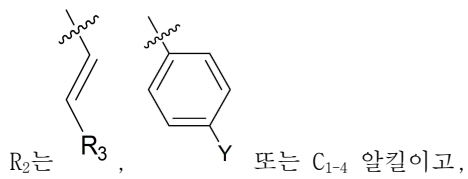
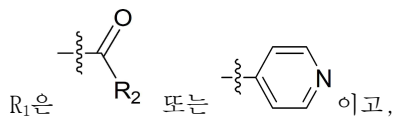
#### 청구항 1

하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,



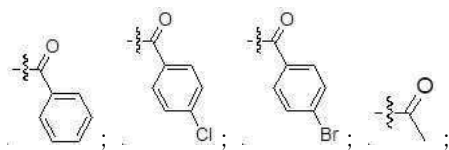
$R_4$ ,  $R_5$  및  $R_6$ 는 각각 독립적으로, 수소 원자,  $C_{1-4}$  할로알콕시 또는  $C_{1-4}$  알콕시이고,

여기에서  $Y$ 는 할로겐 원자 또는 수소 원자이다.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서,

$R_1$ 은





상기 화학식 1의 화합물은,

- (7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)(페닐)메타논;  
 (4-클로로페닐)(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)메타논;  
 (4-브로모페닐)(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)메타논;  
 1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)에탄-1-온;  
 (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-페닐프로프-2-엔-1-온;  
 (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(2-메톡시페닐)프로프-2-엔-1-온;  
 (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(3-메톡시페닐)프로프-2-엔-1-온;  
 (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(4-메톡시페닐)프로프-2-엔-1-온;  
 (E)-3-(2,4-디메톡시페닐)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)프로프-2-엔-1-온;  
 (E)-3-(3,5-디메톡시페닐)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)프로프-2-엔-1-온;  
 (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(3,4,5-트리메톡시-페닐)프로프-2-엔-1-온;  
 (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(1H-피롤-2-일)프로프-2-엔-1-온;  
 (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(퓨란-2-일)프로프-2-엔-1-온;  
 (E)-3-(5-브로모퓨란-2-일)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)프로프-2-엔-1-온;  
 (E)-3-(5-브로모티오펜-2-일)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)프로프-2-엔-1-온;  
 (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(1H-인돌-2-일)프로프-2-엔-1-온;  
 (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(티오펜-2-일)프로프-2-엔-1-온;  
 (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(2-(트리플루오로메톡시)페닐)프로프-2-엔-1-온;  
 (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(2,4,5-트리메톡시페닐)프로프-2-엔-1-온; 또는  
 4-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)피리딘인 화합물

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 전립선암, 대장암, 식도편평상피세포암, 췌장암, 두경부암, 유방암, 신경교종, 폐암, 위암 및 구강편평세포암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 암 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 6

제5항에 있어서

상기 암 질환은 ANO1 과발현에 의한 것인, 약학적 조성물.

#### 청구항 7

삭제

#### 발명의 설명

#### 기술 분야

본 발명은 새로운 벤조피란 유도체 제조방법 및 이를 포함하는 항암제 조성물에 관한 것이다.

[0001]

## 배경 기술

- [0003] 아노타민1 (Anoctamin1, ANO1)은 칼슘에 의해서 활성화 되는 염소이온통로 (CaCC)로서, 다양한 세포와 조직에 발현하며 세포의 성장과 이동, 감각신경 신호전달, 평활근 수축, 상피세포 체액 분비와 같은 다양한 생리학적 기능을 수행한다. 많은 연구를 통해 칼슘 의존적 염소이온 통로(calcium-activated chloride channel)인 TMEM16A/ANO1의 억제제가 항암효과가 있음이 입증되었으며, 두경부암, 식도평평상피세포암, 대장암, 유방암, 전립선암, 췌장암 등과 같은 여러 종류의 종양세포에 ANO1이 과발현되어 있고 암세포의 성장과 전이, 암세포화 그리고 암발달에 관여함이 보고되었다.
- [0004] 아노타민2(Anoctamin2, ANO2)는 ANO1과 62% 구조적 유사성을 갖는 염소이온통로로서 시상피질과 해마 CA1 뉴런에서 스파이크 생성 감소에 관여하고 있으며 ANO2 녹아웃 마우스의 경우 실행 및 운동 기능의 손상이 있음이 보고되었다. 따라서 ANO2를 억제하지 않고 ANO1만 특이적으로 억제하는 화합물 개발이 필요하다. ANO1 염소이온채널 활성화와 발현을 특이적으로 억제하는 것은 암세포의 세포예정사(Apoptosis)를 유발시키며 암세포의 성장과 암발달을 억제할 수 있다. 예를 들어, 전립선암 세포(PC-3)에는 ANO1 단백질이 과발현되어 있고 ANO1의 발현을 억제할 경우 세포의 성장, 전이, 침투, 종양 발달이 억제되는 것이 밝혀졌다. 염소이온의 이동과 세포의 부피 조절 기능을 하는 ANO1은 안드로겐 비의존적 전립선암에서 주요한 마커로 인식된다. 따라서 ANO1 억제제는 전립선암, 식도암을 비롯한 ANO1이 과발현된 암 중에서 좋은 약물표적이 될 수 있다.
- [0005] 현재까지 여러가지 ANO1 억제제들이 보고되었는데, 디갈산(diagallic acid), T16A<sub>inh</sub>-A01, 벤즈브로마론(benzbromarone), 타닌산(tannic acid), CaCC<sub>inh</sub>-A01, MONNA, Ani9 등이 있지만 모두 초기 신약개발 단계에서 머물고 있기 때문에 선택적으로 ANO1 채널의 기능을 억제하고 단백질 발현을 강하게 감소시키는 약물 개발이 필요하다.
- [0006] 본 발명자들은 항암제, 진통제, 천식 치료제, 장운동 저하제, 다한증 치료제 등으로 개발 가능성이 높은 새로운 저분자 화합물 ANO1 억제제를 개발하였다. 새로운 ANO1 억제제는 ANO1과 가장 유사한 이온통로인 ANO2에 대한 선택성이 매우 높은 특성을 보인다
- [0007] ANO1을 과발현하는 PC3 세포(전립선암세포), HT-29 세포(대장암세포), FaDu 세포(두경부암세포), MCF7 세포(유방암세포) 등에서 새로운 ANO1 억제제는 농도 의존적으로 이들 암세포의 성장을 억제하는 효과가 있음을 규명하였다.
- [0008] 따라서 새로운 ANO1 억제제는 ANO1을 과발현하는 암세포의 성장을 억제할 수 있는 약물 또는 ANO1 관련 질환의 치료제로 개발될 가능성을 가진다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

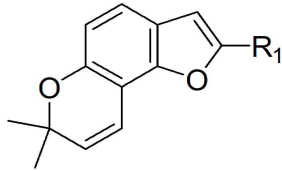
- [0010] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명자들은 항암을 목적으로 하는 ANO1 억제제로 사용 가능한 신규 물질을 찾고자 예의 연구한 결과, ANO1 억제 활성을 나타내는 신규한 벤조피란 유도체를 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0011] 이에, 본 발명의 목적은, ANO1 억제 활성을 갖는 신규한 벤조피란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은, ANO1 억제 활성을 갖는 신규한 벤조피란 유도체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 벤조피란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 벤조피란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 전립선암, 대장암, 두경부암 및 유방암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 벤조피란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 전립선암세포, 대장암세포, 두경부암세포 및 유방암세포에서 과발현되는 ANO1을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0017] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다

른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

### 과제의 해결 수단

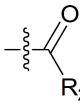
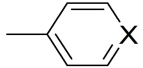
[0019] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은, 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

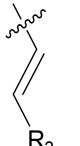
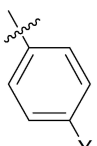
[0020] [화학식 1]

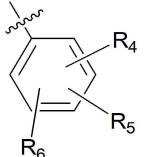
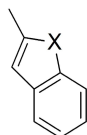
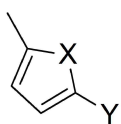


[0021]

[0022] 상기 화학식 1에서,

[0023]  $R_1$ 은  및  이고,

[0024]  $R_2$ 는 ,  및  $C_{1-4}$  알킬이고,

[0025]  $R_3$ 은 ,  및  이고,

[0026]  $R_4$ ,  $R_5$  및  $R_6$ 는 각각 독립적으로, 수소,  $C_{1-4}$  할로알콕시 및  $C_{1-4}$  알콕시이고,

[0027] 여기에서 X는 질소, 산소, 탄소 및 황 이고, Y는 할로젠 및 수소이다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 전립선암, 대장암, 식도편평상피세포암, 췌장암, 두경부암 및 유방암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0030] 또한, 상기 암은 ANO1이 과발현된 것인, 약학적 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물은 ANO1의 활성을 저해할 수 있다.

### 발명의 효과

[0033] 본 발명에 따른 신규 벤조피란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 ANO1에 대한 우수한 표적으로 저해 활성을 나타내는데, 상기 유도체를 포함하는 약학적 조성물은 ANO1이 과발현된 암인 전립선암, 대장암, 식도편평상피세포암, 췌장암, 두경부암 및 유방암의 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

### 도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은, 본 발명의 벤조피란 유도체인 **3h** 화합물의 ANO1 활성을 선택적으로 억제하는 특이성 규명 실험 결과를 나타낸 그래프이다(A: ANO1과 YFP를 발현하는 FRT 세포에서 **3h**가 용량의존적으로 ANO1 채널의 활성을 억제하는

그래프, B: **3h**가 ANO1과 단백질 구조가 유사한 ANO2의 활성을 억제하는지 측정한 그래프, C: **3h**가 ANO1 및 ANO2를 용량의존적으로 억제하는 크기를 나타낸 dose-response curve, D: **3h**가 염소이온채널인 CFTR의 활성을 억제하는지 측정한 그래프, E: **3h**가 세포안의 칼슘농도에 미치는 영향을 측정한 그래프).

도 2는, 본 발명의 벤조피란 유도체인 **3h** 화합물의 ANO1 단백질 분해를 통한 세포생존율 감소효과 규명 실험 결과를 나타낸 그래프이다(A, B: PC-3(전립선암세포)와 FaDu(식도암세포)에서 **3h** 화합물에 의한 ANO1 단백질 분해 정도를 측정한 웨스턴 블롯 그리고 ANO1 유전자를 제거한 PC-3 세포와 FaDu 세포의 ANO1 단백질 수준을 나타낸 블롯, C, D: ANO1을 발현하는 그리고 ANO1 유전자를 제거하여 ANO1을 발현하지 않는 PC-3와 FaDu 세포에 **3h** 화합물을 처리하고 세포생존율을 측정한 그래프).

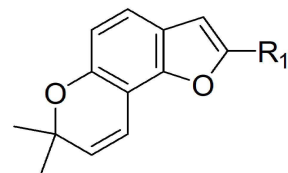
도 3은, 본 발명의 벤조피란 유도체인 **3h** 화합물의 세포예정사(Apoptosis)를 통한 항암 효과 규명 실험 결과를 나타낸 그래프이다(A, B: ANO1을 발현하는 PC-3, FaDu 세포에 농도별 **3h**를 처리하고 Caspase-3의 활성화를 나타내는 형광을 측정한 그래프, C, D: ANO1을 발현하는 PC-3, FaDu 세포에서 **3h** 화합물을 처리하고 caspase-3 활성화를 통해 세포예정사가 일어난 세포를 관찰한 사진, E, F: 농도별 **3h**를 PC-3, FaDu 세포에 처리하고 PARP 단백질과 절단된 PARP 단백질을 측정하여 세포예정사(Apoptosis)가 일어났는지 웨스턴 블롯으로 확인한 그림).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

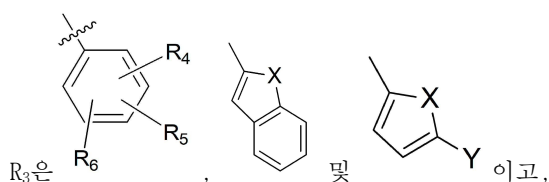
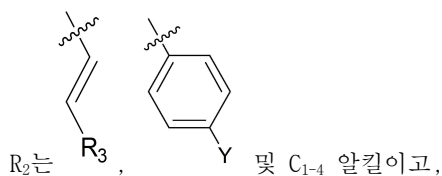
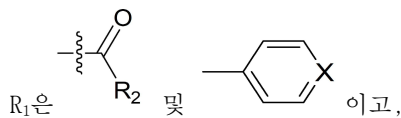
이하, 본 발명을 상세히 설명하기로 한다.

본 발명은, 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,



R<sub>4</sub>, R<sub>5</sub> 및 R<sub>6</sub>는 각각 독립적으로, 수소, C<sub>1-4</sub> 할로알콕시 및 C<sub>1-4</sub> 알콕시이고,

여기에서 X는 질소, 산소, 탄소 및 황 이고, Y는 할로젠 및 수소이다.

여기에서, "알킬"은 일반적으로 명시된 수의 탄소원자 (예컨대, 1 내지 12개의 탄소원자)를 갖는 선형 및 분지형 포화 탄화수소 기를 의미한다. 알킬기의 예는 제한 없이 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, sec-부틸, tert-부틸, n-펜틸, n-헥실 및 n-헵틸 등을 포함한다. 알킬은 부착이 원자가 필요조건을 위반하지 않는다면 임의의 고리 원자에서 부모 기(parent group) 또는 기재(substrate)에 부착될 수 있다. 마찬가지로, 알킬기 또는 알케닐기는, 부착이 원자가 요구조건을 위반하지 않는다면 하나 이상의 비수소 치환기

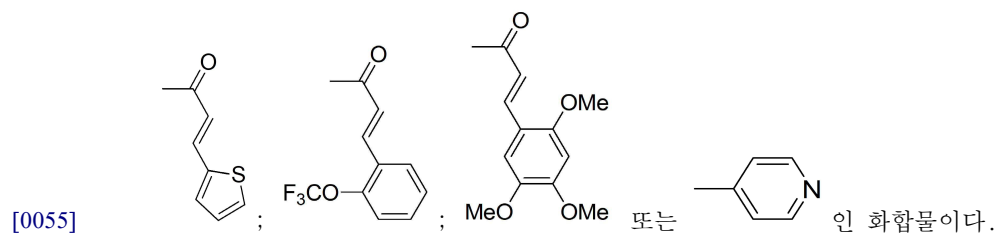
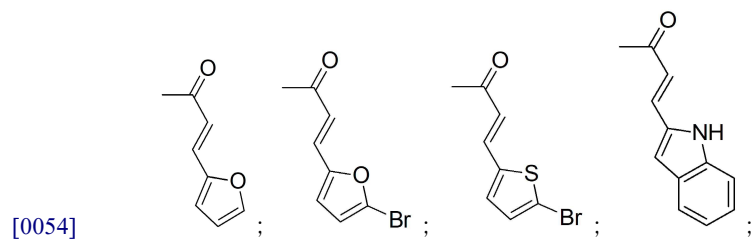
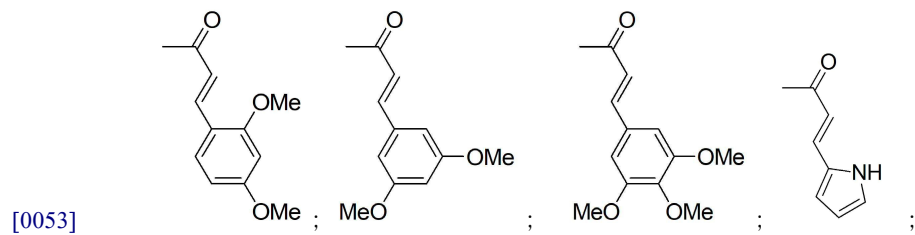
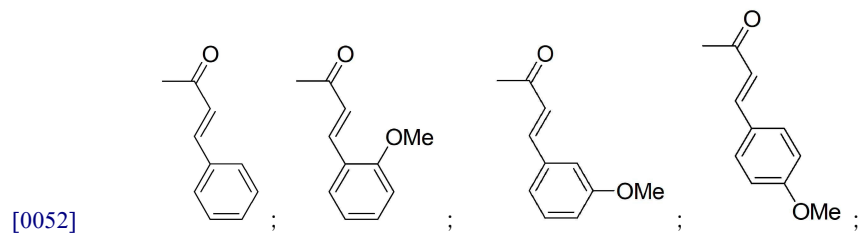
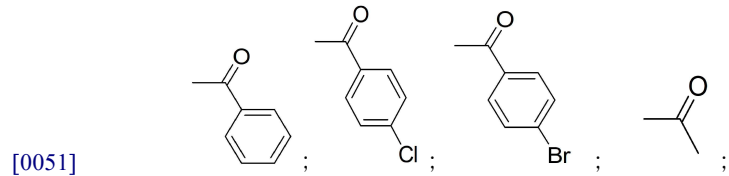


를 포함할 수 있다.

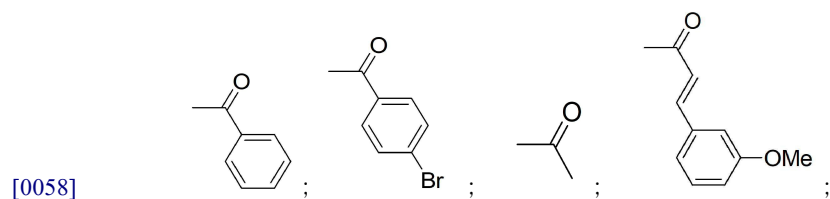
[0048] "알콕시"는 산소와 결합된 알킬기이다. (R-O)알콕시기의 범위는 매우 크며, 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 부톡시, 펜틸옥시, 헥실옥시가 있다.

[0049] "할로알콕시"는 알콕시의 수소원자를 할로겐원소로 치환한 화합물을 말하며 부착이 원자가 필요조건을 위반하지 않는다면 임의의 고리 원자에서 부모 기(parent group) 또는 기재(substrate)에 부착될 수 있다.

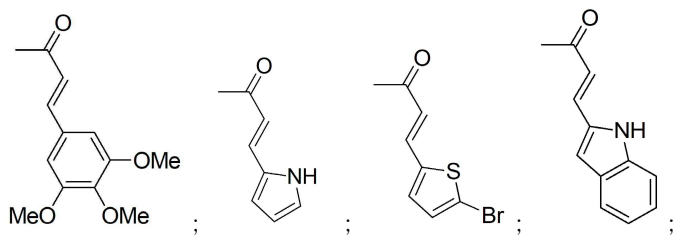
[0050] 본 발명의 또 다른 구현 예로서, 상기 화학식들에서 R<sub>1</sub>은



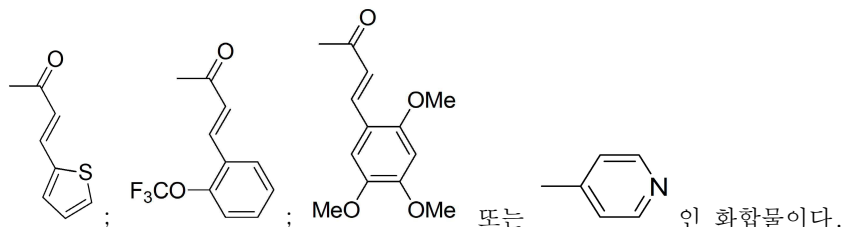
[0057] 본 발명의 또 다른 구현 예로서, 상기 화학식들에서 R<sub>1</sub>은



[0059]



[0060]



[0061]

본 발명의 또 다른 구현 예로서, 화학식 1의 벤조피란 유도체는 (7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)(페닐)메탄은;

[0062]

(4-클로로페닐)(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)메탄은;

[0063]

(4-브로모페닐)(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)메탄은;

[0064]

1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)에탄-1-온;

[0065]

(E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-페닐프로프-2-엔-1-온;

[0066]

(E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(2-메톡시페닐)프로프-2-엔-1-온;

[0067]

(E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(3-메톡시페닐)프로프-2-엔-1-온;

[0068]

(E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(4-메톡시페닐)프로프-2-엔-1-온;

[0069]

(E)-3-(2,4-디메톡시페닐)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)프로프-2-엔-1-온;

[0070]

(E)-3-(3,5-디메톡시페닐)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)프로프-2-엔-1-온;

[0071]

(E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(3,4,5-트리메톡시-페닐)프로프-2-엔-1-온;

[0072]

(E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(1H-피롤-2-일)프로프-2-엔-1-온;

[0073]

(E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(퓨란-2-일)프로프-2-엔-1-온;

[0074]

(E)-3-(5-브로모퓨란-2-일)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)프로프-2-엔-1-온;

[0075]

(E)-3-(5-브로모티오펜-2-일)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)프로프-2-엔-1-온;

[0076]

(E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(1H-인돌-2-일)프로프-2-엔-1-온;

[0077]

(E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(티오펜-2-일)프로프-2-엔-1-온;

[0078]

(E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(2-(트리플루오로메톡시)페닐)프로프-2-엔-1-온;

[0079]

(E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(2,4,5-트리메톡시페닐)프로프-2-엔-1-온; 또는

[0080]

4-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)피리딘인 화합물이다.

[0081]

또한, 본 발명에서의 화합물은 하기 반응식 1에 표시된 바와 같이, 1번 화합물과 여러 개의  $\alpha$ -브로모케톤을 이용하여 2번 화합물을 제조하는 단계 (단계 1);

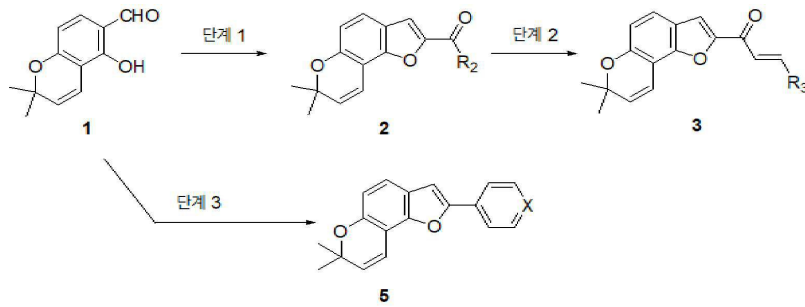
[0082]

상기 단계 1에서 제조된 2번 화합물과 아릴알데히드를 이용하여 클라이젠-슈미트 알돌 반응으로 3번 화합물을 제조하는 단계 (단계 2); 및

[0083]

1번 화합물과 클로로메틸 피리딘을 이용하여 5번 화합물을 제조하는 단계 (단계 3)를 포함하는 방법으로 제 1항의 벤조피란 유도체를 제조할 수 있으며, 이 예에 한정되는 것은 아니다.

[0084] [반응식 1]



[0085]

[0086] 한편, 본 발명의 상기 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다.

[0087] 본 발명에서 사용되는 용어 “염”은 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부탄-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0088] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0089] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수도 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면, 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염 (예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0090] 또한, 본 발명의 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 이성질체, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.

[0091] 이에, 본 발명은 상기 화학식 1의 벤조피란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, ANO1이 과발현된 암인 전립선암, 대장암, 두경부암 및 유방암등의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 상기 질환의 치료를 위한 상기 화학식 1의 이미다졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도, 및 치료상 유효량의 상기 화학식 1의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 상기 질환의 치료 방법을 제공한다.

[0092] 본 발명에서 사용되는 용어, “예방”이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 ANO1이 과발현된 암인 전립선암, 대장암, 두경부암 및 유방암등을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0093] 본 발명에서 사용되는 용어, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 ANO1이 과발현된 암인 전립선암, 대장암, 두경부암 및 유방암등에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0094] 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약제학적으로

로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0095] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간 에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

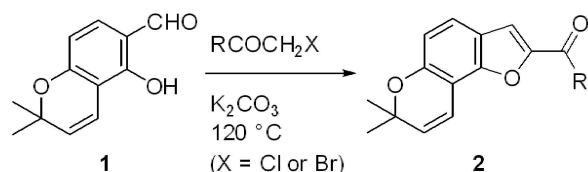
[0096] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 “약학적으로 유효한 양” 은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수 준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명 에 다른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래 의 치료제와 는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부 작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이 하게 결정될 수 있다.

[0097] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성을 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1kg 당 0.0001 내지 1000mg, 바람직하게는 0.001 내지 500mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감 될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0098] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.

[0100] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽 게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0102] <실시예 1> 2번 화합물의 기본적인 합성 방법

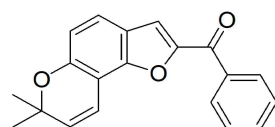


[0103]

[0104] 아세트니트릴(2 mL) 중 1 (30 mg, 0.15 mmol)로 채운 바이알에 실온에서 2-브로모아세트페논 (35.1 mg, 1.2 당 량) 및 탄산 칼륨 (60.9 mg, 3 당량)을 첨가 하였다. 120 °C에서 4 시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 감압하 에 농축시키고, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL)로 추출하고, H<sub>2</sub>O (5 mL)로 세척 하였다. 물층을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL)로 2 회 이상 추출 하였다. 유기층을 MgSO<sub>4</sub>상에서 건조시키고, 여과하고, 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 컬럼크로마토 그 래피(n-헥산 : 에틸아세테이트 : 디클로로메탄 = 30 : 1 : 2)로 정제하여 100%의 수율로 2a를 수득 하였다.

[0105] 상기 실시예 1의 방법으로 하기 실시예 2 내지 5의 화합물을 수득하였다.

[0107] <실시예 2> (7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)(페닐)메탄은 (2a)

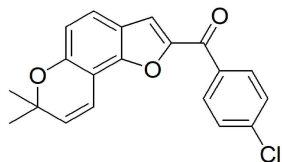


[0108]

[0109] Yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.00 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.61 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 7.52 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.43-7.40 (m, 2H), 6.90 (d, J = 10.0 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 5.72 (d, J = 9.6

Hz, 1H), 1.49 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  184.0, 154.0, 152.8, 152.0, 137.8, 132.7, 130.5, 129.4, 128.6, 122.8, 120.8, 118.0, 115.8, 115.0, 106.7, 77.3, 28.0; **HRMS** (ESI-QTOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{NaO}_3$  327.0992, found 327.0968.

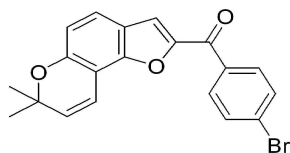
[0111] <실시예 3> (4-클로로페닐)(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)메탄논 (2b)



[0112]

[0113] Yellow solid, mp: 88.3-90.8 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.95 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.47 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.42-7.38 (m, 2H), 6.85-6.80 (m, 2H), 5.70 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 1.47 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  182.6, 154.2, 151.9, 139.2, 136.0, 130.9, 130.7, 129.0, 125.8, 122.9, 120.7, 117.9, 115.7, 115.2, 106.7, 77.4, 28.0; **HRMS** (ESI-QTOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{ClNaO}_3$  361.0602, found 361.0655.

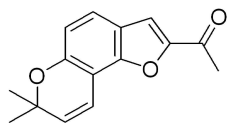
[0115] <실시예 4> (4-브로모페닐)(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)메탄논 (2c)



[0116]

[0117] brown solid, mp: 136.1-136.9 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.90 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2H), 7.67 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 7.45 (s, 1H), 7.42 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.89-6.83 (m, 2H), 5.73 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 1.50 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  182.7, 154.2, 152.8, 151.8, 136.4, 131.9, 131.0, 130.6, 127.8, 122.9, 120.6, 117.9, 115.6, 115.2, 106.6, 77.4, 28.0; **HRMS** (ESI-QTOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{BrNaO}_3$  405.0097, found 405.0148.

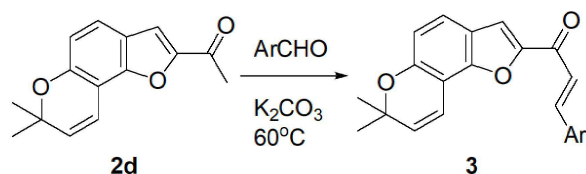
[0119] <실시예 5> 1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)에탄-1-온 (2d)



[0120]

[0121] Yellow solid, mp: 107.9-109.8 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.42 (s, 1H), 7.39 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.85 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 6.81 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 5.71 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 2.57 (s, 3H), 1.48 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  188.0, 153.9, 152.5, 152.4, 130.6, 122.7, 120.7, 115.7, 114.9, 114.3, 106.7, 77.3, 28.0, 26.4; **HRMS** (ESI-QTOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{NaO}_3$  265.0835, found 265.0796.

[0123] <실시예 6> 3번 화합물의 기본적인 합성 방법

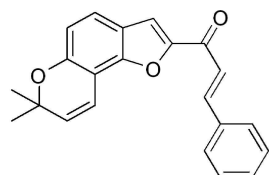


[0124]

[0125] 에탄올 (1 mL) 중 2d (30 mg, 0.12 mmol) 및 벤즈 알데하이드 (1.2 당량) 를 넣은 바이알에 실온에서 탄산 칼륨 (1 당량)을 첨가하였다. 60 °C에서 3 시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물을 감압하에 농축시키고, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL)로 추출하고, H<sub>2</sub>O (5 mL)로 세척하였다. 물층을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL)로 2 회 이상 추출하였다. 유기층을 MgSO<sub>4</sub>상에 서 건조시키고, 여과하고, 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (n-헥산 : 아세트산에 틸 : 디클로로메탄 = 50 : 1 : 2)로 정제하여 96%의 수율로 38.1 mg의 3a를 얻었다.

[0126] 상기 실시예 6의 방법으로 하기 실시예 7 내지 19의 화합물을 수득하였다.

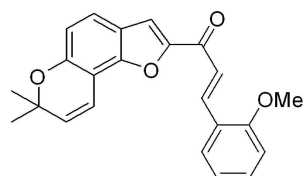
[0128] <실시예 7> (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-페닐프로프-2-엔-1-온 (3a)



[0129]

[0130] Yellow solid, mp: 98.1-99.6 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.92 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.69-7.67 (m, 2H), 7.58 (s, 1H), 7.53 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.44-7.42 (m, 4H), 6.93 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.73 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 1.50 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 179.1, 154.0, 153.6, 152.6, 144.1, 134.9, 130.8, 130.5, 129.1, 128.7, 122.8, 121.5, 121.0, 115.8, 115.0, 114.5, 106.7, 77.3, 28.0; HRMS (ESI-QTOF) *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>22</sub>H<sub>18</sub>NaO<sub>3</sub> 353.1148, found 353.1122.

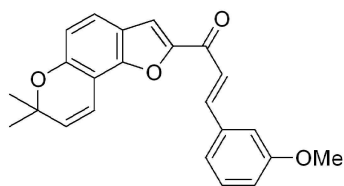
[0132] <실시예 8> (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(2-메톡시페닐)프로프-2-엔-1-온 (3b)



[0133]

[0134] Yellow solid, mp: 143.3-144.2 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.24 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 7.68 (dd, *J* = 1.2, 7.6 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.43-7.37 (m, 2H), 7.00 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.94 (t, *J* = 10.0 Hz, 2H), 6.82 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 5.73 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 1.49 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 179.7, 159.1, 153.9, 153.8, 152.5, 139.6, 132.0, 130.5, 129.4, 123.9, 122.7, 122.2, 121.1, 120.8, 115.9, 114.8, 114.2, 111.4, 106.7, 77.2, 55.7, 28.0; HRMS (ESI-QTOF) *m/z* [M+Na]<sup>+</sup> calcd for C<sub>23</sub>H<sub>20</sub>NaO<sub>4</sub> 383.1254, found 383.1251.

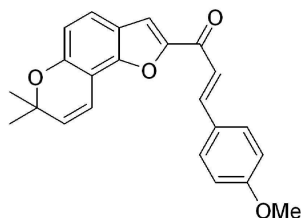
[0136] <실시예 9> (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(3-메톡시페닐)프로프-2-엔-1-온 (3c)



[0137]

[0138] Yellow solid, mp: 103.6-104.8 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.88 (d,  $J$  = 16.0 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.50 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H), 7.42 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.35 (t,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 7.27 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 1H), 7.18 (s, 1H), 6.97 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 6.92 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 6.83 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 5.73 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 1.49 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179.0, 160.1, 154.0, 153.6, 152.6, 144.0, 136.3, 130.5, 130.1, 122.8, 121.7, 121.3, 121.0, 116.5, 115.8, 115.0, 114.6, 113.8, 106.7, 77.3, 55.5, 28.0; HRMS (ESI-QTOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{NaO}_4$  383.1254, found 383.1235.

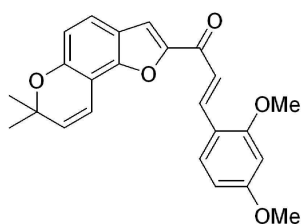
[0140] <실시예 10> (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(4-메톡시페닐)프로프-2-엔-1-온 (3d)



[0141]

[0142] Yellow solid, mp: 138.8-139.3 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.89 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H), 7.64 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.44 (s, 1H), 7.41 (d,  $J$  = 5.2 Hz, 1H), 6.94 (t,  $J$  = 9.6 Hz, 3H), 6.83 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 5.73 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 1.49 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.1, 160.9, 152.8, 151.5, 142.9, 129.5, 129.5, 126.6, 121.6, 120.0, 118.1, 114.8, 113.8, 113.5, 113.0, 105.7, 102.8, 76.2, 54.5, 27.0; HRMS (ESI-QTOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{NaO}_4$  383.1254, found 383.1213.

[0144] <실시예 11> (E)-3-(2,4-디메톡시페닐)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)프로프-2-엔-1-온 (3e)

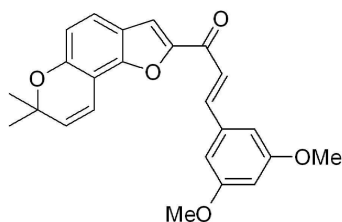


[0145]

[0146] Yellow solid, mp: 121.4-123.1 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.17 (d,  $J$  = 16.0 Hz, 1H), 7.61 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.55-7.51 (m, 2H), 7.41 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 6.92 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H), 6.81 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.54 (dd,  $J$  = 2.0, 10.0 Hz, 1H), 6.48-6.48 (m, 1H), 5.72 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 1.49 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179.8, 163.3, 160.7, 154.1, 153.6, 152.4, 139.7, 131.2, 130.4, 122.6, 121.1, 119.8, 117.2, 115.9, 114.7, 113.7, 106.7, 105.6, 98.5, 77.4, 55.7, 55.6, 28.0; HRMS (ESI-QTOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{NaO}_5$  413.1359, found 413.1295.



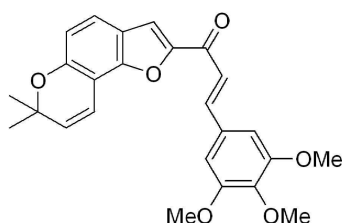
[0148] <실시예 12> (*E*)-3-(3,5-디메톡시페닐)-1-(7,7-디메틸-7*H*-퓨로[2,3-*f*]크로멘-2-일)프로프-2-엔-1-온 (3f)



[0149]

[0150] Yellow solid, mp: 74.5–75.5 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.82 (d,  $J$  = 16.0 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 7.48–7.40 (m, 2H), 6.91 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 6.83–6.81 (m, 3H), 6.53 (s, 1H), 5.72 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 3.84 (s, 6H), 1.49 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.9, 161.2, 154.0, 153.5, 152.6, 144.1, 136.7, 130.5, 122.8, 121.9, 121.0, 115.7, 115.0, 114.6, 106.6, 106.6, 102.9, 77.3, 55.6, 28.0; **HRMS** (ESI-QTOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{NaO}_5$  413.1359, found 413.1319.

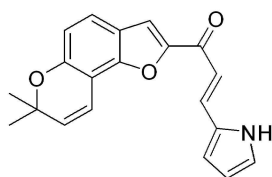
[0152] <실시예 13> (*E*)-1-(7,7-디메틸-7*H*-퓨로[2,3-*f*]크로멘-2-일)-3-(3,4,5-트리메톡시-페닐)프로프-2-엔-1-온 (3g)



[0153]

[0154] Yellow solid, mp: 137.9–138.4 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.85 (d,  $J$  = 16.0 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 7.44–7.38 (m, 2H), 6.93–6.90 (m, 3H), 6.83 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 5.74 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 3.95 (s, 6H), 3.91 (s, 3H), 1.50 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.9, 154.0, 153.6, 152.6, 144.3, 140.7, 130.6, 130.4, 129.0, 122.8, 121.0, 120.7, 115.8, 115.0, 114.5, 106.7, 106.0, 77.3, 61.2, 56.4, 28.0; **HRMS** (ESI-QTOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{NaO}_6$  443.1465, found 443.1431.

[0156] <실시예 14> (*E*)-1-(7,7-디메틸-7*H*-퓨로[2,3-*f*]크로멘-2-일)-3-(1*H*-피롤-2-일)프로프-2-엔-1-온 (3h)

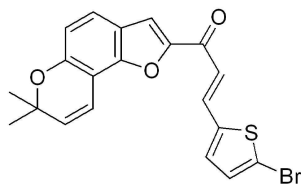


[0157]

[0158] Brown solid, mp: 116.2–117.1 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.49 (s, 1H), 7.88 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H), 7.49 (s, 1H), 7.30 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.22 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.81–6.76 (m, 3H), 6.34 (s, 1H), 5.66 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H), 1.46 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179.3, 153.9, 153.7, 152.4, 134.0, 130.5, 129.5, 123.8, 122.6, 121.1, 116.0, 115.7, 115.1, 114.8, 113.8, 111.7, 106.6, 77.2, 28.0; **HRMS** (ESI-QTOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_3$  320.1281, found 320.1234.



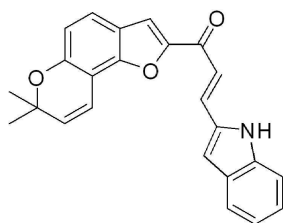
[0160] <실시예 15> (E)-3-(5-브로모티오펜-2-일)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)프로프-2-엔-1-온 (3i)



[0161]

[0162] Yellow solid, mp: 140.9-141.3 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.86 (d,  $J$  = 15.2 Hz, 1H), 7.53 (s, 1H), 7.40 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.17 (d,  $J$  = 15.2 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.88 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 6.81 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 5.71 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 1.48 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.2, 154.0, 153.4, 152.5, 141.9, 135.3, 132.6, 131.5, 130.5, 122.7, 120.9, 120.5, 116.7, 115.7, 115.0, 114.5, 106.6, 77.3, 28.0; **HRMS** (ESI-QTOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{BrO}_3\text{S}$  414.9998, found 414.9941.

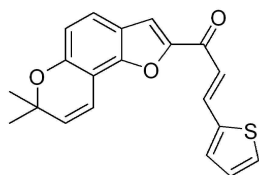
[0164] <실시예 16> (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(1H-인돌-2-일)프로프-2-엔-1-온 (3j)



[0165]

[0166] Dark yellow solid, mp: 239.9-240.4 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.54 (s, 1H), 7.94 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H), 7.65 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.58 (s, 1H), 7.42 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.41 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.35 (d,  $J$  = 16.0 Hz, 1H), 7.30 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 7.14 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.92 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H), 6.83 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 5.73 (d,  $J$  = 1.0 Hz, 1H), 1.50 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.4, 153.8, 153.6, 152.4, 138.0, 134.0, 133.5, 130.4, 128.6, 125.1, 122.6, 121.8, 120.9, 120.8, 118.6, 115.6, 114.9, 114.0, 111.2, 110.5, 106.5, 106.5, 27.8; **HRMS** (ESI-QTOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{NO}_3$  370.1438, found 370.1521.

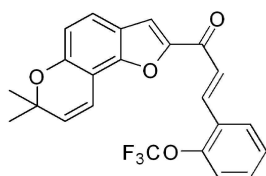
[0168] <실시예 17> (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(티오펜-2-일)프로프-2-엔-1-온 (3k)



[0169]

[0170] Yellow solid, mp: 121.4-122.1 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.03 (d,  $J$  = 15.2 Hz, 1H), 7.56 (s, 1H), 7.37-7.46 (m, 3H), 7.31 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H), 7.08-7.13 (m, 1H), 6.93 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 6.83 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 5.73 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H), 1.49 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.5, 153.8, 153.4, 152.4, 140.2, 136.3, 132.3, 130.4, 129.0, 128.4, 122.6, 120.9, 120.2, 115.6, 114.8, 114.2, 106.5, 27.8; **HRMS** (ESI-QTOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{O}_3\text{S}$  337.0893, found 337.0925.

[0172] <실시예 18> (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(2-(트리플루오로메톡시)페닐)프로프-2-엔-1-온 (3l)



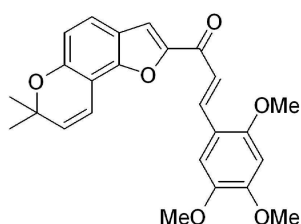
[0173]

[0174]

Light yellow solid, mp: 91.7-92.6 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.11 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H), 7.81 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 7.54-7.64 (m, 2H), 7.41-7.49 (m, 2H), 7.32-7.41 (m, 2H), 6.90 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H), 6.83 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 5.73 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H), 1.49 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.7, 153.9, 153.3, 152.5, 148.1, 148.0, 136.7, 131.5, 130.4, 128.9, 128.1, 127.1, 124.5, 122.7, 121.3, 120.8, 115.5, 114.9, 114.7, 106.5, 27.9; **HRMS** (ESI-QTOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{F}_3\text{NaO}_4$  437.0971, found 437.0961.

[0176]

<실시예 19> (E)-1-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)-3-(2,4,5-트리메톡시페닐)프로프-2-엔-1-온 (3m)



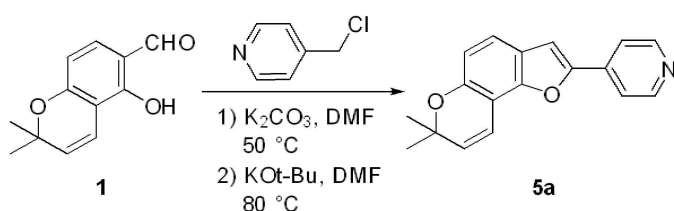
[0177]

[0178]

Yellow solid, mp: 142.5-143.2 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.22 (d,  $J$  = 16.0 Hz, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.45 (d,  $J$  = 16.4 Hz, 1H), 7.42 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 7.16 (s, 1H), 6.92 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 6.82 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.73 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 3.96 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 3.93 (s, 3H), 1.49 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179.5, 154.9, 153.9, 153.5, 152.7, 152.2, 143.2, 139.3, 130.3, 122.4, 120.9, 119.5, 117.6, 115.7, 115.4, 114.6, 113.6, 111.6, 106.5, 96.7, 56.6, 56.3, 56.1, 27.9; **HRMS** (ESI-QTOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{O}_6$  421.1646, found 421.1688.

[0181]

<실시예 20> 5번 화합물의 기본적인 합성방법



[0184]

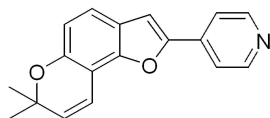
[0185]

무수 N,N-디메틸포름아미드 (1.1 mL) 중의 화합물 1 (60 mg, 0.30 mmol)의 용액에 실온에서 4-(클로로메틸)피리딘 염산염 (49.6 mg, 1 당량) 및 탄산 칼륨 (125.3 mg, 3 당량)을 첨가하였다. 50 °C에서 11 시간 동안 교반 한 후, 반응 혼합물을 물 (5 mL)로 켄칭시키고 에틸 아세테이트 (2 mL)로 추출하였다. 물층을 에틸 아세테이트 (1 mL)로 5 회 이상 추출하였다. 유기층을  $\text{MgSO}_4$ 상에서 건조시키고, 여과하고, 진공하에 농축시켜 미정제 잔류 물을 수득하였다. 무수 N,N-디메틸포름아미드 (1 mL) 중 잔류물로 채운 바이알에 실온에서 칼륨 tert-부톡사이드 (43.3 mg, 1.5 당량)를 첨가하였다. 80 °C에서 16 시간 동안 교반 한 후, 반응 혼합물을 물 (5 mL)로 켄칭시키고 에틸 아세테이트 (2 mL)로 추출하였다. 물층을 에틸 아세테이트 (1 mL)로 5 회 이상 추출하였다. 유기층을  $\text{MgSO}_4$ 상에서 건조시키고 여과하고 진공하에 농축시켰다. 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (n-헥산 : 에틸 아세테이트 : 디클로로 메탄 = 10 : 1 : 2)로 정제하여 71%의 수율로 5a 를 얻었다.

[0187]

상기 실시예 20의 방법으로 하기 실시예 21의 화합물을 수득하였다.

[0189] <실시예 21> 4-(7,7-디메틸-7H-퓨로[2,3-f]크로멘-2-일)피리딘 (5a)

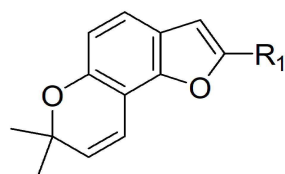


[0190]

[0191] Yellow solid, mp: 98.3-99.1 °C;  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.64 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 2H), 7.64-7.63 (m, 2H), 7.32 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.14 (s, 1H), 6.86 (d,  $J$  = 9.6 Hz, 1H), 6.78 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 5.74 (d,  $J$  = 10.0 Hz, 1H), 1.49 (s, 6H);  $^{13}\text{C NMR}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  152.2, 151.8, 151.5, 150.4, 137.7, 130.8, 122.1, 120.9, 118.3, 115.9, 113.8, 106.5, 105.5, 76.8, 27.9; **HRMS** (ESI-QTOF)  $m/z$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NNaO}_2$  300.0995, found 300.0934.

[0193] 실험예 1. ANO1 억제활성 측정

[0194] 본 발명에 따른 하기 표 1의 벤조피란 유도체 처리에 의한 ANO1 채널 활성 억제 효력을 측정하였다.

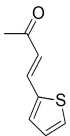
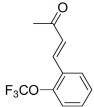
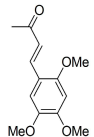
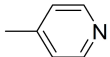


[0195]

표 1

[0197]

실시예	화합물 번호	R <sub>1</sub>	ANO1의 IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ )	ANO1의 분해 (%)
2	2a		NA <sup>b</sup>	~60
4	2c		NA	~70
5	2d		NA	~70
9	3c		NA	~80
13	3g		NA	~50
14	3h		1.23	~50
15	3i		NA	~80
16	3j		NA	~60

17	3k		NA	~80
18	3l		NA	~80
19	3m		NA	~85
21	5a		8.64	~60
<sup>a</sup> IC <sub>50</sub> 값은 ANO1을 발현하는 FRT 세포에서 YFP 형광 켜짐 분석을 사용하여 결정되었다. (평균 ± S.E., n = 3). <sup>b</sup> 억제율이 20% 미만인 경우 NA.				

[0198] ANO1과 YFP를 발현하는 FRT 세포에서 벤조피란 유도체들의 ANO1 채널활성을 억제하는 IC<sub>50</sub> 그리고 ANO1 단백질 분해도를 측정된 값이다.

#### [0200] IC<sub>50</sub> 측정 방법

[0201] ANO1과 YFP를 발현하고 있는 흰쥐갑상선세포(FRT)세포를 DMEM/Ham's F12 배양액으로 96 well micro plate에 48 시간 배양 한 후 배양액을 제거한 다음 Regular solution(140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose D(+), pH7.4)을 well당 100 μl를 넣고 농도별로 화합물을 처리하였다. 37 °C에서 20분 간 배양한 후 NaI solution (140 mM NaI, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose D(+), pH7.4)과 ATP(100 μM)을 처리한 뒤 세포 안으로 들어간 요오드 이온에 의한 YFP 형광감소를 0.4초 간격으로 5초간 측정하였다.

#### [0203] ANO1 단백질 분해 측정 방법

[0204] ANO1을 높은 수준으로 발현하는 PC-3 세포를 6-well plate에 배양하고 3 μM의 농도로 화합물을 24시간 동안 처리하고 웨스턴 블롯 기법을 이용하여 ANO1 단백질의 양을 측정하였다.

[0205] 표2에 표기된 화합물의 ANO1 채널 활성 억제효력을 측정된 결과 2,2-dimethyl-2H-chromene motif를 가지는 화합물 (3h, 5a)은 IC<sub>50</sub> < 10.2 μM 로 ANO1 채널활성을 강하게 억제하였으며 3h 의 IC<sub>50</sub> 값이 1.23 μM로, 가장 강하게 ANO1 채널활성을 억제하였다. 또한 ANO1 단백질을 유의하게 감소시키는 2,2-dimethyl-2H-chromene motif 가진 화합물들은 (2a, 2c, 2d, 3c, 3g, 3h, 3i, 3j, 3k, 3l, 3m, 5a)이며, ANO1 단백질을 50% 이상 분해하였다.

#### [0207] 실험예 2. 3h 화합물의 ANO1 활성을 선택적으로 억제하는 특이성 규명

[0208] 3h 화합물이 ANO1 활성을 선택적으로 억제하는 특이성을 규명하기 위해, 다음과 같은 실험을 하여 도 1에 그래프로 나타내었다.

[0209] (A) ANO1과 YFP를 발현하고 있는 흰쥐 갑상선세포(FRT)를 DMEM/Ham's F12 배양액으로 96 well micro plate에 48시간 배양한 후 배양액을 제거한 다음 Regular solution(140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose D(+), pH7.4)을 well당 100 μl를 넣고 농도별로 3h를 처리함. 37 °C에서 20분간 배양한 후 NaI solution (140 mM NaI, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose D(+), pH7.4)과 ATP(100 μM)을 처리한 뒤 세포 안으로 들어간 요오드 이온에 의한 YFP 형광감소를 0.4초 간격으로 5초간 측정하였다.

[0210] (B) 도 3A와 유사한 방법으로 mouse ANO2와 YFP를 발현하는 FRT 세포에 농도별 3h를 처리하고 20분 후 ATP와

iodide를 처리하여 세포 내 칼슘을 증가시켜 ANO2 활성을 통해 시간별로 감소되는 YFP 형광을 측정하였다.

- [0211] (C) 농도별 **3h**의 ANO1, ANO2 활성을 통한 YFP 형광 감소를 억제하는 크기를 dose response curve로 나타내었다.
- [0212] (D) CFTR과 YFP를 발현하는 FRT 세포에 농도별 **3h**를 처리하고 20분 후 포스콜린(Forskolin)과 요오드화물(Iodide)을 처리하여 세포 내 cAMP를 증가시켜 CFTR 활성을 통해 시간별로 감소되는 YFP 형광을 측정하였다. 10  $\mu$ M CFTR<sub>inh</sub>-172를 처리하여 CFTR을 완전히 억제하였다.
- [0213] (E) ANO1을 높은 수준으로 발현하는 PC-3 세포를 RPMI1640 배양액으로 96 well micro plate에 48시간 배양한 후 배양액을 제거한 다음 Fluo-4 ( $\text{Ca}^{2+}$  dye)가 함유된 Calcium assay buffer을 well당 100  $\mu$ l를 넣고 1시간 차광상태에서 반응시킨 후 농도별 (0, 1, 3, 10  $\mu$ M) **3h** 화합물을 처리하였다. 20분 후 micro plate reader에 plate를 장착하고 P2Y 수용체 활성제인 ATP를 처리하여 세포내 칼슘 농도를 측정하였다.
- [0214] **3h** 화합물은 농도별로 ANO1의 채널활성을 억제하였으며 전립선암세포(PC-3)에서 ATP에 의해 증가되는 세포내 칼슘은 억제하지 않았다. 또한 **3h**는 ANO1과 단백질 구조가 유사한 ANO2보다 ANO1의 채널활성을 144배 이상 강하게 억제하였고 포스콜린(Forskolin)에 의해 활성화되는 CFTR의 활성을 30  $\mu$ M의 농도까지 전혀 억제하지 않았다. 따라서 **3h**는 특이적으로 ANO1의 활성을 억제하는 새로운 ANO1 채널활성 억제제임을 규명하였다.
- [0216] **실험예 3. 3h의 ANO1 단백질 분해를 통한 세포생존율 감소효과 규명**
- [0217] **3h** 화합물의 ANO1 단백질 분해를 통한 세포의 생존율을 감소시키는 효과를 규명하기 위해, 다음과 같은 실험을 하여 도 2에 그래프로 나타내었다.
- [0218] (A, B) ANO1을 높은 수준으로 발현하는 PC-3, FaDu 세포에 그림에 지시된 바와 같이 농도별 **3h**를 24시간 처리하고 ANO1 단백질 발현량의 변화를 웨스턴 블롯으로 측정하였다. 또한 CRISPR-Cas9 (크리스퍼 유전자 가위)를 이용해 ANO1 유전자를 제거한 PC-3, FaDu 세포의 ANO1 단백질 발현량을 대조군으로 측정하였다.
- [0219] (C, D) ANO1을 높은 수준으로 발현하는 PC-3, FaDu 세포와 ANO1 유전자를 제거한 PC-3, FaDu 세포를 96-well plate에 약 2\*10<sup>3</sup>개씩 배양하고 **3h**를 농도별로 24시간에 1회, 총 48시간 동안 처리하였다. 그 다음, MTS solution을 각 well 당 20  $\mu$ l씩 넣어 37 °C에서 30분 동안 5% CO<sub>2</sub>에서 배양한 후 micro plate reader기로 490 nm의 흡광도를 측정하였다 (평균  $\pm$  S.E., n = 3).
- [0220] **3h**는 용량의존적으로 ANO1 단백질을 강하게 분해 시켰다. 또한 ANO1을 높은 수준으로 발현하는 PC-3 세포와 FaDu 세포에서 **3h**는 농도별로 세포생존율을 감소시켰으나 ANO1 유전자를 제거한 PC-3 세포와 FaDu 세포에서의 세포생존율은 약하게 감소시켰다. 이는 **3h**가 선택적으로 ANO1 단백질을 분해하여 유의하게 PC-3, FaDu 세포의 생존율 감소를 일으킨다는 결과이다.
- [0222] **실험예 4. 3h의 세포예정사(Apoptosis)를 통한 항암 효과 규명**
- [0223] **3h** 화합물의 세포예정사를 통한 항암 효과를 규명하기 위해, 다음과 같은 실험을 하여 도 3에 그래프로 나타내었다.
- [0224] (A, B) 96-well plate에 배양한 PC-3, FaDu 세포에 농도별 **3h**를 24시간 동안 처리하고 PBS 로 2번 세척 하고 200  $\mu$ L의 PBS를 남긴 다음, 1  $\mu$ M Caspase-3 substrate를 처리하고 30분 동안 상온에서 반응하였다. 그 다음, Micro plate reader에 plate를 장착하고 ex/em: 485/515 nm 필터를 이용하여 형광을 측정하였다. 10  $\mu$ M Ac-DEVD-CHO는 caspase-3 활성 특이적 억제제이며, 10  $\mu$ M **3h**를 처리한 세포에 함께 처리하였다 (평균  $\pm$  S.E., n = 3, \*P < 0.05 \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001).
- [0225] (C, D) ANO1을 높은 수준으로 발현하는 PC-3, FaDu세포를 96-well plate에 배양하고 10  $\mu$ M **3h**를 24시간 처리하였다. PBS 로 2번 세척 하고 200  $\mu$ L의 PBS를 남긴 다음, 1  $\mu$ M Caspase-3 substrate를 처리하고 30분 동안 상온에서 반응하였다. 그 다음 Lionheart™ FX Automated Microscope에 세포를 장착하고 ex/em: 485/515 nm 필터를 이용하여 caspase-3에 의해 형광을 띄는 세포를 관찰하였다. 또한 세포의 핵을 염색하기 위해 1  $\mu$ M Hoechst 33342를 세포에 처리하고 15분 동안 상온에서 반응하고 ex/em: 346/460 nm 필터를 이용하여 핵이 염색된 세포를 관찰하였다. 두 사진을 병합하여 전체 세포 개수 중에 얼마만큼의 세포가 세포예정사(apoptosis)가 일어났는지 관찰하였다.
- [0226] (E, F) ANO1을 높은 수준으로 발현하는 PC-3, FaDu 세포를 6-well plate에 배양하였음. 그리고 농도별 **3h**를 세

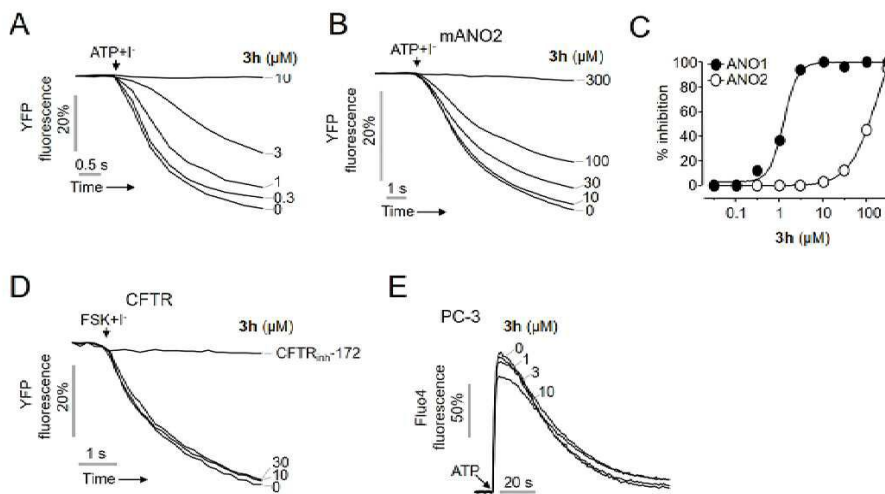
포에 24시간 동안 처리하고 웨스턴 블롯 기법을 이용하여 PARP 단백질과 절단된 PARP 단백질의 양을 측정하였다.

[0227] ANO1을 높은 수준으로 발현하는 PC-3, FaDu 세포에 3h를 농도별로 처리했을 때 Caspase-3 활성은 농도별로 유의하게 증가하였으며 Caspase-3 활성 억제제인 Ac-DEVD-CHO에 의해 유의하게 억제되었다. 또한 농도별 3h는 두 가지 세포에서 PARP 단백질을 농도의존적으로 절단시켰다. 따라서 3h가 Caspase-3를 활성화시키고 PARP 단백질의 절단을 일으켜 세포예정사(apoptosis)가 일어남을 규명하였다.

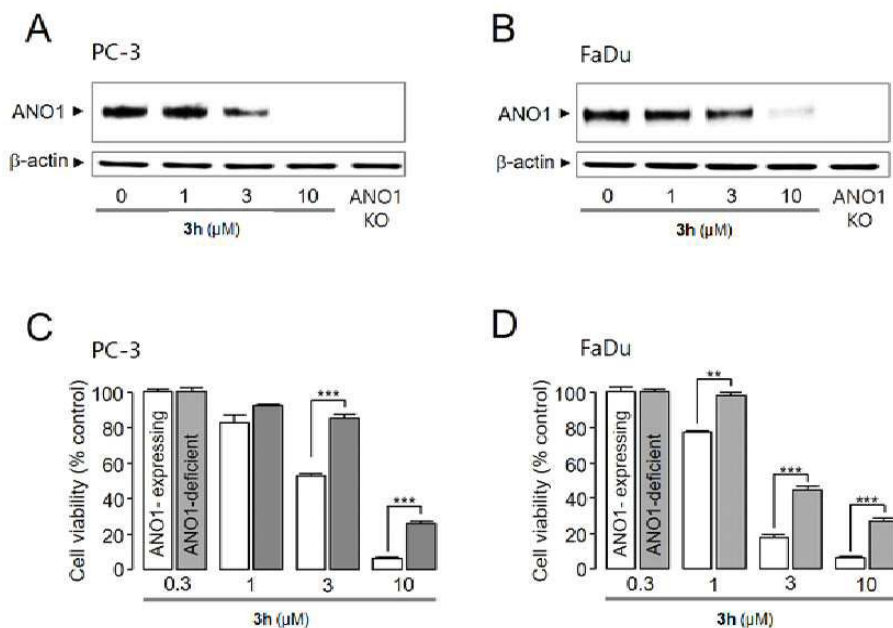
[0228] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

## 도면

### 도면1



### 도면2



도면3

