

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 2월 27일 (27.02.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2020/040582 A1

(51) 국제특허분류:
C07D 311/58 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/010731

(22) 국제출원일: 2019년 8월 23일 (23.08.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0098788 2018년 8월 23일 (23.08.2018) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) [KR/KR]; 02841 서울시 성북구 안암로 145, Seoul (KR). 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

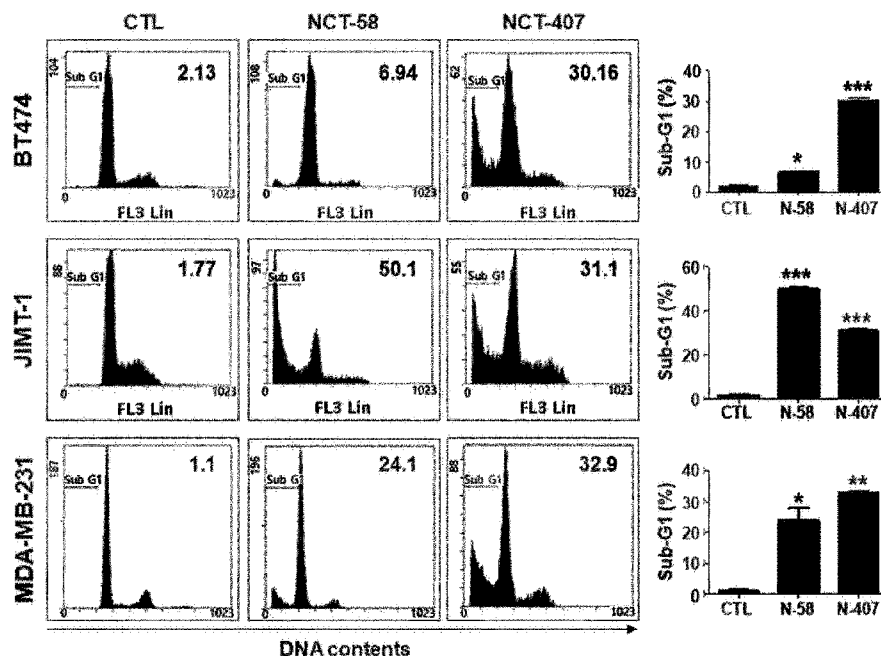
(72) 발명자: 서재홍 (SEO, Jae Hong); 13803 경기도 과천시 관문로 166 주공아파트 1018동 303호, Gyeonggi-do (KR). 김지영 (KIM, Ji Young); 08307 서울시 구로구 구로동로28길 49-2, 202호, Seoul (KR). 김윤재 (KIM, Yoon Jae); 14293 경기도 광명시 목감로 88 현진에버빌아파트 104동 807호, Gyeonggi-do (KR). 오은혜 (OH, Eun hye); 01786 서울시 노원구 노원로 331 시영3단지목련아파트 311동 1003호, Seoul (KR). 이지우 (LEE, Jee Woo); 06000 서울시 강남구 압구정로 113 미성아파트 27동 901호, Seoul (KR). 안지혜 (ANN, Jihyae); 06522 서울시 서초구 신반포로33길 30, 314동 602호, Seoul (KR). 콩트령웅웬 (CONGRUONG, Nguyen); 08826 서울시 관악구 관악로 1 서울대학교 약학대학 143동 502호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인다해 (DAHAI INTERNATIONAL PATENT & LAW FIRM); 06156 서울시 강남구 삼성로 531 고운빌딩 3층, Seoul (KR).

(54) Title: NOVEL BENZOPYRAN DERIVATIVE OR PHARMACEUTICALLY ACCEPTABLE SALT THEREOF AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING SAME AS EFFECTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: 신규한 벤조피란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물

[도4]



(57) Abstract: The present invention relates to a novel benzopyran derivative or a pharmaceutically acceptable salt thereof and a pharmaceutical composition comprising same as an effective ingredient. Having no influence on the complex structure of HSP90 and HSF-1, the compound represented by chemical formula 1, a pharmaceutically acceptable salt thereof, or a solvate thereof according to the present invention does not induce the activation of HSF-1 or the expression of HSP genes, with the consequent effective promotion of cancer cell death and, as such, can be used as an effective ingredient of an anticancer agent.

[다음 쪽 계속]

WO 2020/040582 A1

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 벤조파이란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물은 HSP90과 HSF-1의 complex 구조에 영향을 미치지 않으므로 HSF-1의 활성화나 HSP gene들의 발현을 유도하지 않아 효과적으로 암세포의 사멸을 촉진하므로, 항암제의 유효성분으로 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 신규한 벤조파이란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 벤조파이란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 Hsp90(Heat shock protein 90)의 활성을 저해하여 항암 활성을 나타내는 신규한 벤조파이란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 국내외에서 유방암은 1990년대 이후로 계속 증가되어 2000년대에서는 모든 여성의 암중 1, 2위로 높은 발병률과 사망률을 나타내고 있다. HER2 양성 유방암은 암세포 막에 존재하는 막 단백질 수용체인 HER2 (human epidermal growth factor receptor 2)가 과발현된 암으로 전체 유방암 환자의 20~30%에서 나타나고, HER2 음성인 환자보다 예후가 좋지 않아 생존율이 현저히 떨어지며, 일반적으로 상용되는 세포독성 항암제에 대한 반응성이 매우 낮다.
- [4] Hsp90의 억제제는 신생혈관형성 관련 질병의 새롭고 효과적인 치료법으로 고려될 수 있으며, Hsp90 억제제는 신생혈관형성 관련 질병의 잠재적 화학치료제이다(Eccles, S.; Massey, A.; Raynaud, F.; Sharp, S.; Box, G.; Valenti, M.; Patterson, L.; de Haven Brandon, A.; Gowan, S.; Boxall, F. NVP-AUY922: a novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res.* 2008, 68, 2850).
- [5] HER2 양성 유방암 표적치료제인 단일클론항체 트라스투주맵(trastuzumab, 상품명: ®Herceptin)과 퍼투주맵(상품명: ®Perjeta) 및 T-DM1 (상품명: ®Kadcyla) 등이 개발되었으나 고가의 가격으로 환자에게 상당한 경제적 부담을 안겨준다. Trastuzumab이 HER2 양성 유방암 환자에 1차 치료제(First-line treatment)로 사용되고 있으나, 초기치료에서 약 40~50%의 환자에서 1차 내성을 나타내며, 초기반응이 좋은 환자에서도 90% 정도는 1년 내에 2차 내성을 나타냄. 이러한 내성은 재발 및 전이의 주요한 원인이 되며 환자의 생존을 감소에 결정적 역할을 하게 된다.
- [6] HER2는 Hsp의 주요 client protein중 하나로 Hsp에 의해 kinase activity의 활성이 직접적으로 조절된다. 따라서 Hsp 억제는 궁극적으로 내성의 주요 원인이 되는 p95HER2의 활성화 및 HER2/HER3 dimerization을 직접적으로 억제 할 수 있으므로 Hsp 저해제는 HER2의 상위 표적치료제가 될 것이며 약물 내성 극복약물로서 가치가 높다. Hsp 저해제인 ansamycin에 의해 HER2의 발현 및

활성이 억제되는 것으로 처음 보고된 이후, HER2 양성 유방암에서 HER2의 활성화를 제어하기 위한 약물로 주목받아 현재까지 많은 Hsp 저해제의 유도체들이 개발되고 있는 실정이다.

- [7] 하지만 현재까지 임상시험 중인 Hsp90 저해제는 대부분 N-terminal Hsp90을 저해하는 것으로, 약리활성부족, 독성 및 Heat shock response가 유도되는 등 심각한 부작용으로 대부분 임상에 실패하거나 중단되었다.

- [8] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 본 발명의 신규한 벤조파이란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물이 C-terminal homology model 구조를 기반으로 Hsp90 C-terminal에 강력한 결합력을 부여하여 Hsp90의 활성을 억제하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[9]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명의 목적은 Hsp90(Heat shock protein 90)의 활성을 저해하여 항암 활성을 나타내는 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물을 제공하는 데 있다.
- [11] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[12]

과제 해결 수단

- [13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물을 제공한다.
- [14] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[15]

발명의 효과

- [16] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물은 HSP90과 HSF-1의 complex 구조에 영향을 미치지 않아 HSF-1의 활성화나 HSP gene들의 발현을 유도하지 않으므로 효과적으로 암세포의 사멸을 촉진할 수 있어, 항암제의 유효성분으로 사용될 수 있다.

[17]

도면의 간단한 설명

- [18] 도 1은 본 발명의 화합물을 처리한 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231의 생존율 측정한 결과이다.

- [19] 도 2는 유방암 세포주에, 본 발명의 화합물을 농도별로 처리한 후, 세포생존율을 측정한 결과이다.
- [20] 도 3은 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에, 본 발명의 화합물을 처리한 후, 세포형태 변화를 조사한 것이다.
- [21] 도 4는 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에, 본 발명의 화합물을 처리한 후, 세포사멸율을 측정한 결과이다.
- [22] 도 5는 본 발명의 화합물을 처리한 유방암 세포에서, 세포사멸 관련 인자들의 발현을 측정한 결과이다.
- [23] 도 6은 본 발명의 화합물을 처리한 후, HSP90 clients의 발현을 측정한 결과이다.
- [24] 도 7은 인간 전립선암 세포주 DU145, 대장암 세포주 HCT116, 간암 세포주 HepG2 및 난소암 세포주 SKOV-3에, 본 발명의 화합물을 처리한 후, 세포생존율을 측정한 결과이다.
- [25] 도 8 및 9는 본 발명의 화합물이 C-terminal HSP90 저해 효과가 있음을 보여주는 실험 결과이다.

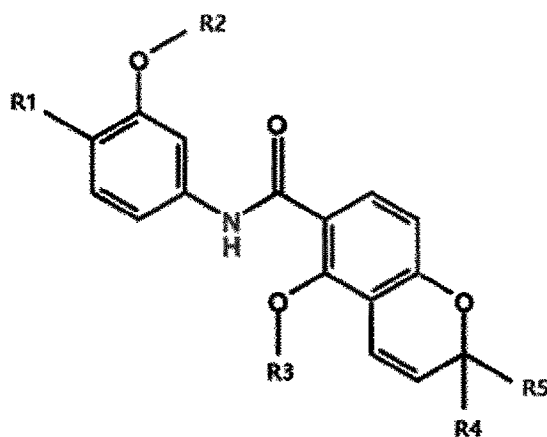
[26]

발명의 실시를 위한 형태

- [27] 본 발명에서는 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물이 casapase-3 활성을 증가시키고, EGFR, STAT3의 발현뿐만 아니라, 활성화형인 phospho-EGFR, phospho-STAT3의 발현을 현저히 감소시켰으며, AKT, ERK, Cyclin D1 및 Survivin의 발현을 현저히 억제하여 효과적으로 암세포의 사멸을 촉진하는 것을 확인하였다.
- [28] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물에 관한 것이다.

[29] [화학식 1]

[30]

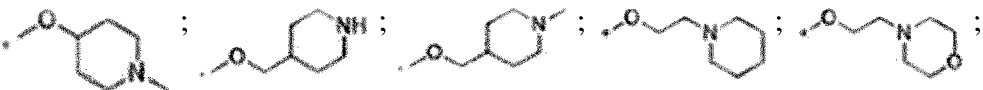
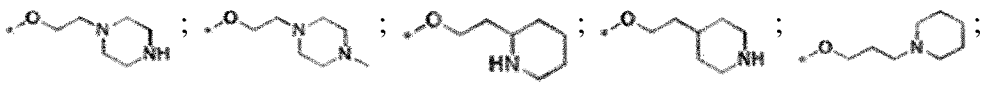


- [31] 상기 식에서, R¹은 치환 또는 비치환 알콕시기이고; R², R³, R⁴ 및 R⁵는 각각 독립적으로 수소 원자; 또는 C₁-C₂ 알킬기(alkyl)이고; 상기 R¹에서 치환 알콕시의 경우, 상기 치환기는 질소 원자; 산소 원자; 알킬기; 또는 C₁-C₆ 알킬기(alkyl)로 치환된 헤테로 고리형 알킬기(alkyl)(헤테로 원자는 질소, 산소, 황 중 하나

- 이상을 포함하며, 헤테로 고리는 5각형, 6각형 고리이다.)이다.
- [32] 본 발명에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 벤조파이란의 유도체이다.
- [33] 본 발명에서 용어 “치환(substitution)”은 화합물의 분자 중에 포함되는 원자 또는 원자단을 다른 원자 또는 원자단으로 바꾸어 놓는 반응이다.
- [34] 본 발명에서 용어 “알콕시기(alkoxy group)”는 산소와 결합된 알킬기(O-alkyl group)를 의미하는 것으로, 본 발명에서 메톡시기(C_1), 에톡시기(C_2), 프로톡시기(C_3), 부톡시기(C_4), 펜틸옥시기(C_5), 헥실옥시기(C_6), 헵틸옥시기(C_7) 및 옥틸옥시(C_8)를 포함하는 C_1 ~ C_8 알콕시기로 구성된 군에서 선택되는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [35] 본 발명에서, 용어 " C_1 - C_2 알킬"은 1 내지 2개의 탄소 원자를 갖는, 오직 탄소와 수소 원자로만 이루어진 1가 선형 탄화수소 잔기를 의미한다. 용어 " C_1 - C_6 알킬"은 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는, 오직 탄소와 수소 원자로만 이루어진 1가 선형 또는 분지형 또는 고리형 포화된 탄화수소 잔기를 의미한다. 이러한 알킬기의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, 부틸, 아이소부틸, 2급-부틸, 3급-부틸, 펜틸, n-헥실 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. "분지형 알킬"의 예는 아이소프로필, 아이소부틸, 3급-부틸 등이 있다. "고리형 알킬"은 탄소수 3 - 6 개의 고리형 알킬기이고, 그 예로는, 시클로프로필기, 시클로부틸기, 시클로펜틸기 또는 시클로헥실기 등이 있다.
- [36] 본 발명에서, 용어 "헤테로 고리"는 헤테로 사이클릴이라고 일컫으며, 탄소 원자 이외에 N, O 및 S로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 고리 헤테로원자를 포함하는, 4 내지 9개의 고리 원자의 포화되거나 부분적으로 불포화된 카보사이클릭 고리를 나타낸다. 두 고리는 2개의 공통의 고리 원자를 갖는 2개의 고리로 구성됨을 의미하는데, 즉, 두 고리를 분리하는 다리는 단일 결합이거나 1 또는 2개의 고리 원자의 쇠이다. 상기 헤테로사이클릭 고리는 본원에서 정의된 바와 같이 치환되거나 비치환될 수 있다. 예를 들어, 헤테로사이클릭은 아제티디닐, 피롤리디닐, 테트라하이드로푸라닐, 테트라하이드로-티에닐, 피라졸리디닐, 이미다졸리디닐, 옥사졸리디닐, 아이소옥사졸리디닐, 티아졸리디닐, 피페리디닐, 테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로티오피라닐, 피페라지닐, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 1,1-다이옥소-티오모르폴린-4-일, 아제파닐, 다이아제파닐, 호모피페라지닐, 옥사제파닐, 다이하이드로인돌릴, 다이하이드로푸릴, 다이하이드로이미다졸리닐, 다이하이드로옥사졸릴, 테트라하이드로피리디닐, 다이하이드로피라닐 또는 벤조다이옥솔릴이다. 한 구현예에서 헤테로사이클릭은 피페라지닐, 모르폴리닐, 벤조다이옥솔릴 또는 다이하이드로인돌릴이고, 이들은 본원에 기재된 바와 같이 각각 치환되거나 비치환될 수 있다.
- [37] 본 발명에서 용어 “고리형”이란, 유기 화합물의 골격에서 연쇄된 양단이 이어져 고리모양이 된 구조를 말한다.
- [38] 본 발명에 있어서, 상기 R^1 의 헤테로 고리형 알킬기는 피리딘, 피페리딘,

모르폴린 또는 피페라진인 것을 특징으로 할 수 있다.

- [39] 본 발명에 있어서, 상기 R¹은, 메톡시기(methoxy),
 2-메톡시-에톡시기(2-methoxy-ethoxy), 2-아미닐에톡시기(2-aminylethoxy),
 2-메틸아미닐에톡시기(2-methylaminylethoxy),
 2-디메틸아미닐에톡시기(2-dimethylaminylethoxy),
 3-아미닐프로폭시기(3-aminylpropoxy),
 3-메틸아미닐프로폭시기(3-methylaminylpropoxy),
 3-디메틸아미닐프로폭시기(3-dimethylaminylpropoxy),
 (1-메틸피페리딘-4-일)옥시기((1-Methylpiperidin-4-yl)oxy),
 (피페리딘-4-일)메톡시기((1-Methylpiperidin-4-yl)methoxy),
 (1-메틸피페리딘-4-일)메톡시기((1-Methylpiperidin-4-yl)methoxy),
 (2-피페리딘-1-일)에톡시기(2-(piperidin-1-yl)ethoxy),
 (2-모르폴린-4-일)에톡시기((2-morpholin-4-yl)ethoxy),
 (2-피페라진-1-일)에톡시기((2-piperazine-1-yl)ethoxy),
 2-(4-메틸피페라진-1-일)에톡시기(2-(4-methylpiperazine-1-yl)ethoxy),
 2-(피페리딘-2-일)에톡시기((2-piperazine-2-yl)ethoxy),
 2-(피페리딘-4-일)에톡시기((2-piperazine-4-yl)ethoxy),
 (3-피페리딘-1-일)프로폭시기(3-(piperidine-1-yl)propoxy),
 (3-피페리딘-2-일)프로폭시기(3-(piperidine-2-yl)propoxy),
 (3-피페리딘-4-일)프로폭시기(3-(piperidine-4-yl)propoxy),
 (3-피리딘-3-일)프로폭시기(3-(pyridine-3-yl)propoxy) 및
 (3-피리딘-4-일)프로폭시기(3-(pyridine-4-yl)propoxy)로 구성된 군에서 선택되는
 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.

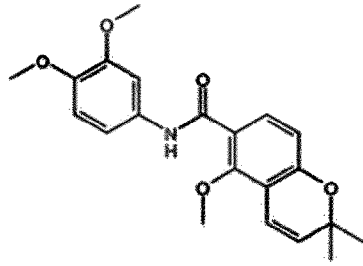
- [40] 본 발명에 있어서, 상기 R¹은  ;  ;  ;  에서 선택되는 하나인 것을

특징으로 할 수 있다.

- [41] 본 발명에 있어서, 하기 화학식 중 어느 하나로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [42] [화학식 2]

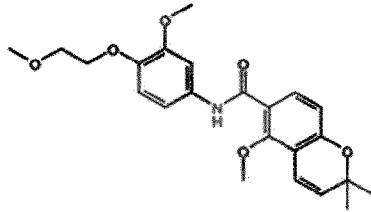
[43]



[44]

[화학식 3]

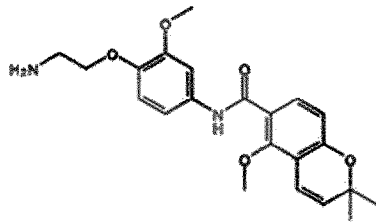
[45]



[46]

[화학식 4]

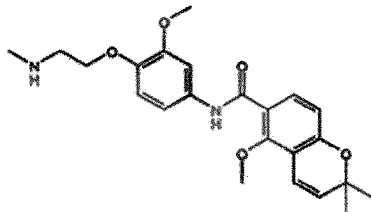
[47]



[48]

[화학식 5]

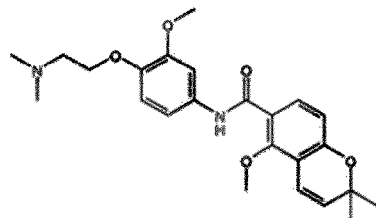
[49]



[50]

[화학식 6]

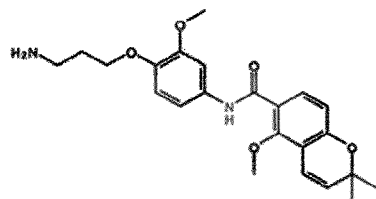
[51]



[52]

[화학식 7]

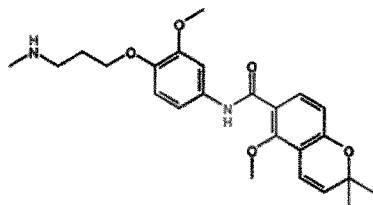
[53]



[54]

[화학식 8]

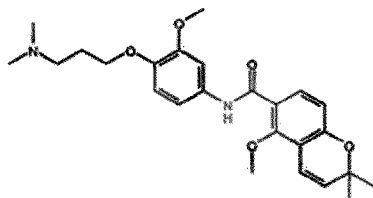
[55]



[56]

[화학식 9]

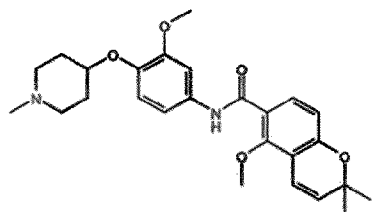
[57]



[58]

[화학식 10]

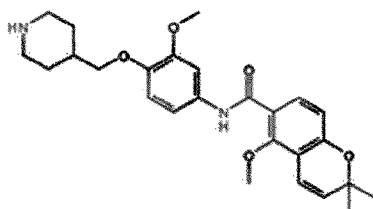
[59]



[60]

[화학식 11]

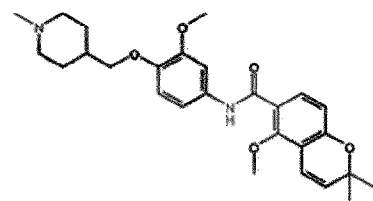
[61]



[62]

[화학식 12]

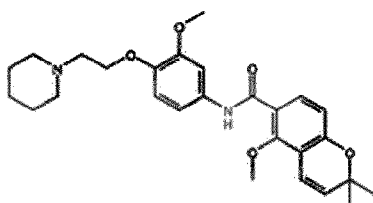
[63]



[64]

[화학식 13]

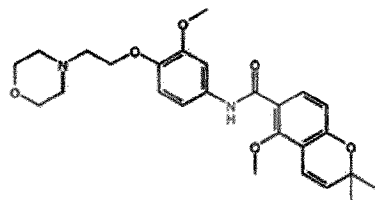
[65]



[66]

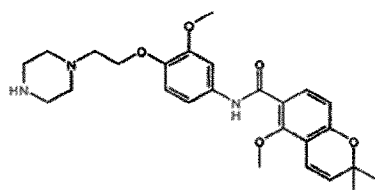
[화학식 14]

[67]



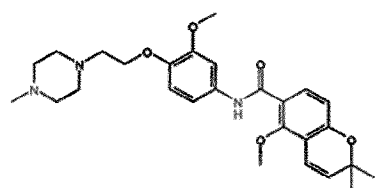
[68] [화학식 15]

[69]



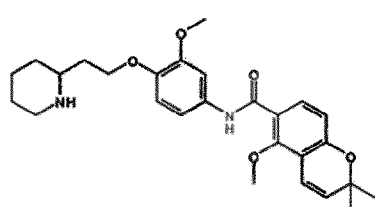
[70] [화학식 16]

[71]



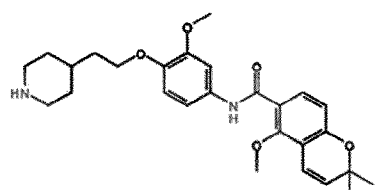
[72] [화학식 17]

[73]



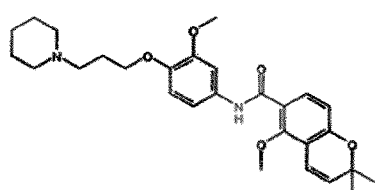
[74] [화학식 18]

[75]



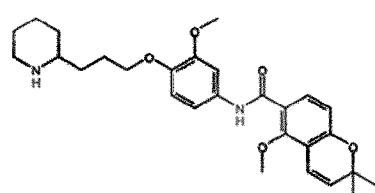
[76] [화학식 21]

[77]

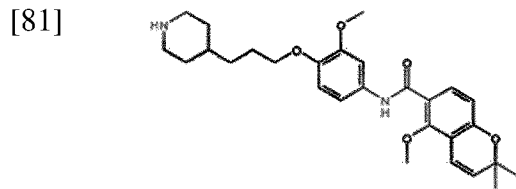


[78] [화학식 22]

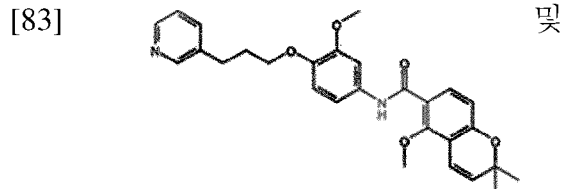
[79]



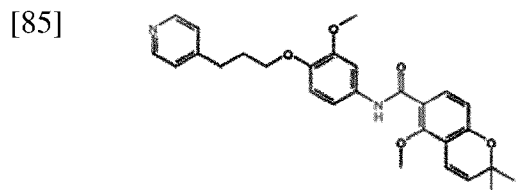
[80] [화학식 23]



[82] [화학식 24]



[84] [화학식 25]



[86] 본 발명에서, 신규한 벤조파이란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물이 C-terminal homology model 구조를 기반으로 Hsp90 C-terminal에 강력한 결합력을 부여하여 Hsp90의 활성을 억제하였다.

[87] 본 발명의 화합물은 염, 특히 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 존재할 수 있다. 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염과 같이, 당 업계에서 통상적으로 사용되는 염을 제한 없이 사용할 수 있다. 본 발명의 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"이란 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 화학식 1로 표시되는 화합물의 이로운 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 염의 모든 유기 또는 무기부가염을 의미한다.

[88] 본 발명에서, 화학식 1로 표시되는 신규한 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 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, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트,

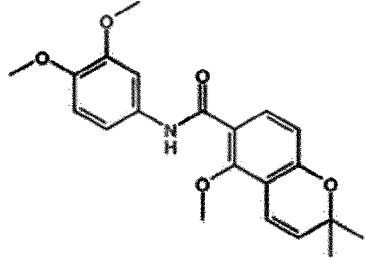
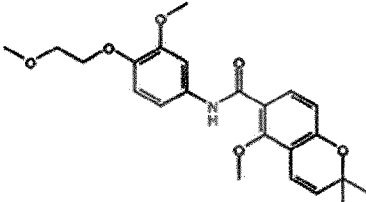
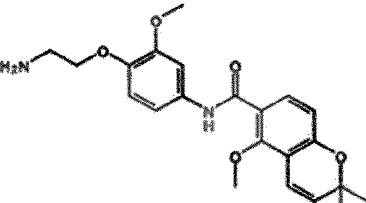
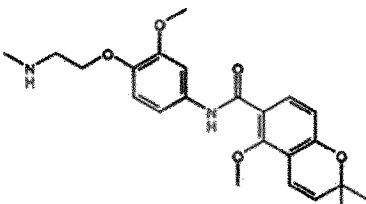
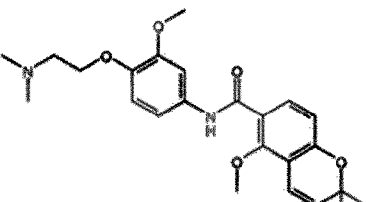
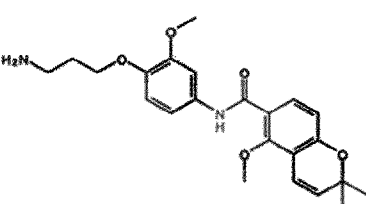
프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

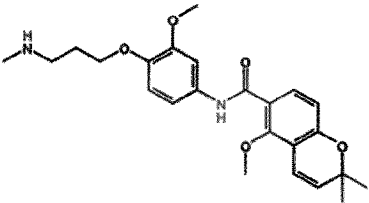
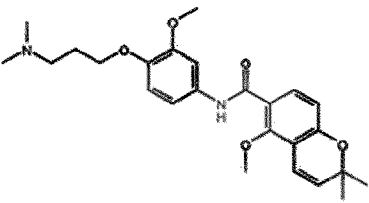
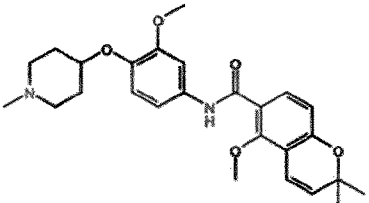
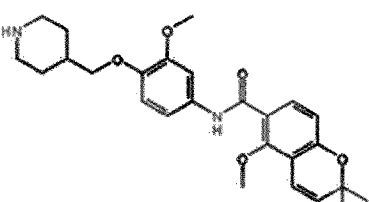
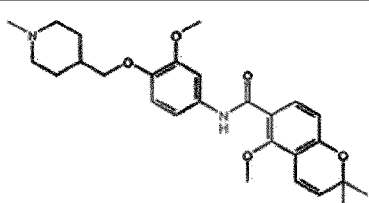
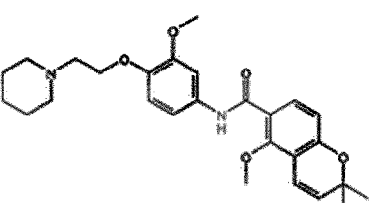
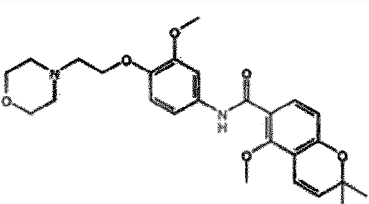
- [89] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 화학식 1로 표시되는 신규한 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 동량의 화학식 1로 표시되는 신규한 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.
- [90] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 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. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [91] 본 발명에서, 제조된 신규한 벤조파이란 유도체는 제조 후, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 분리 정제한 후 핵자기 공명에 의해 분자구조를 확인할 수 있다.
- [92] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [93] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 Hsp90을 억제하여 항암 활성을 나타내는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [94] 본 발명에 있어서, “조성물”은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [95] 본 발명에서, 열충격 단백질군(heat-shock protein families; HSPs)과 같은 분자샤페론은 ATP 의존적인 구조 변화를 통해 클라이언트 단백질의 접힘을 조절하여 초기 단백질(nascent proteins)의 활성화, 손상된 단백질의 재접힘이나 분해를 도와주는 단백질이다. 또한, 클라이언트 단백질은 분자샤페론과의 결합을 통해 집합 현상(aggregation)을 회피하며 이들의 결합은 클라이언트 단백질의 막 이동(membrane translocation)을 통해 세포내 퇴적(intracellular

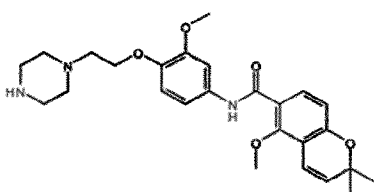
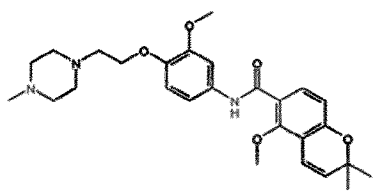
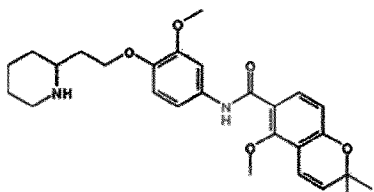
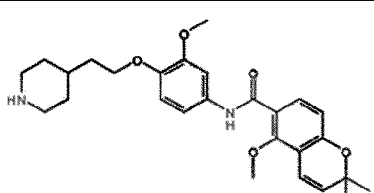
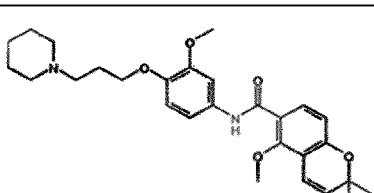
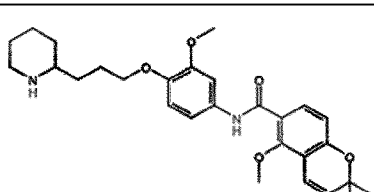
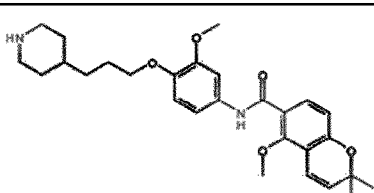
- deposition)을 도와준다.
- [96] 열충격 단백질군의 하나인 Hsp90의 분자 샤페론 기능은 세포의 신호 전달 경로에 관계 있는 다양한 클라이언트 단백질의 안정성과 활성화에 필요하다고 알려져 있다. 외부의 자극을 받지 않는 정상 조건에서 Hsp90의 양은 세포내 단백질의 1~2%를 차지하지만, 외부의 자극을 받는 조건에서는 Hsp90의 양이 두 배 정도 증가한다. 클라이언트 단백질의 암유발 돌연변이는 더 높은 수준의 Hsp90 기능을 요구하고 Hsp90의 과발현으로 이어지며, 정상 조직에 비해 과발현된 Hsp90은 암세포의 공통된 특징이다(Bagatell, R.; Whitesell, L. Altered Hsp90 function in cancer: A unique therapeutic opportunity. *Mol. Cancer Ther.* 2004, 3, 1021-1030).
- [97] ErbB2, Src, Met 티로신 키나아제, MEK 1/2(mitogen-activated protein kinase kinase), Akt, Raf-1, 사이클린 의존성 키나아제(Cyclin-dependent serine kinases), 스테로이드 호르몬 수용체, 말단소체복원효소(telomerase), 금속단백질-2(MMP-2), HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α)를 포함하는 Hsp90 클라이언트 단백질은 세포의 생존, 증식, 침범, 전이, 신생혈관형성 등을 포함하는 다양한 신호 전달 경로 상에 존재하고 악성 표현형에 기여한다고 알려져 있다(Eustace, B. K.; Sakurai, T.; Stewart, J. K.; Yimlamai, D.; Unger, C.; Zehetmeier, C.; Lain, B.; Torella, C.; Henning, S. W.; Beste, G.; Scroggins, B. T.; Neckers, L.; Ilag, L. L.; Jay, D. G. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat. Cell Biol.* 2004, 6, 507-514).
- [98] 본 발명에 있어서, 상기 암은 전립선암, 난소암, 폐암, 간암, 위암, 대장암, 췌장암, 담낭 및 담도암, 유방암, 백혈병, 식도암, 비호치킨 림프종, 갑상선암, 자궁경부암, 피부암의 원발성 암과 이로부터 기타 장기로 전이되어 유발되는 전이암 및 비정상적인 과다 세포 분열을 촉진하여 생성되는 종양성 세포 질환으로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상의 암인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [99] 본 발명에 있어서, 상기 암은 유방암인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 유방암은 삼중음성 유방암 또는 HER2 양성 유방암인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [100] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 벤조파이란 유도체 NCT-58, NCT-407 약물을 유방암 세포주에 처리하였을 때, casapase 활성이 증가하고, 삼중음성유방암의 세포 침투, 이동 및 암전이와 관련된 HSP90의 대표적 client인 EGFR, STAT3의 발현뿐만 아니라, 활성화 형인 phospho-EGFR, phospho-STAT3의 발현을 현저히 감소시켰으며, AKT, ERK, Cyclin D1 및 Survivin의 발현을 현저히 억제하여, 암세포의 사멸을 유도함을 확인하였다(도 4, 도 5 및 도 6).
- [101] 또한, NCT 44, NCT 50 및 NCT 58이 테구엘린에 비해 용해도가 우수한 것을 확인하였다.

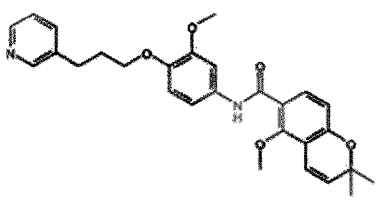
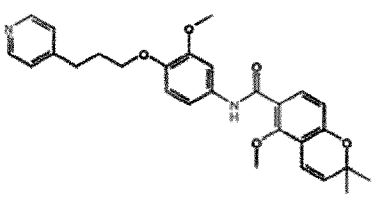
- [102] 본 발명의 약학적 조성물은 다양한 경구 또는 비경구투여 형태로 제형화할 수 있다. 경구투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유하고 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.
- [103] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 하는 약학 조성물은 비경구투여할 수 있으며, 비경구투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부내 주사를 주입하는 방법에 의한다. 이때, 비경구투여용 제형으로 제제화하기 위하여 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다. 유효성분으로서 화학식 1의 화합물은 사람을 포함하는 포유동물에 대해서 하루 0.1 내지 500mg/kg(체중), 바람직하게는 0.5 내지 100mg/kg(체중)의 양으로 1일 1회 또는 분할하여 경구 또는 비경구 경로를 통해 투여할 수 있다.
- [104] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [105] 본 발명에 따른 화학식 1의 신규한 벤조파이란 유도체의 화합물명 및 구조를 하기 표 1에 정리하였다.

[106] [표1]

	화합물명	구조
1	NCT-88	[화학식 2] 
2	NCT-368	[화학식 3] 
3	NCT-66	[화학식 4] 
4	NCT-82	[화학식 5] 
5	NCT-69	[화학식 6] 
6	NCT-96	[화학식 7] 

7	NCT-101	 [화학식 8]
8	NCT-55	 [화학식 9]
9	NCT-29	 [화학식 10]
10	NCT-375	 [화학식 11]
11	NCT-385	 [화학식 12]
12	NCT-20	 [화학식 13]
13	NCT-21	 [화학식 14]

14	NCT-43	 [화학식 15]
15	NCT-25	 [화학식 16]
16	NCT-58	 [화학식 17]
17	NCT-44	 [화학식 18]
18	-	-
19	-	-
20	NCT-364	 [화학식 21]
21	NCT-407	 [화학식 22]
22	NCT-394	 [화학식 23]

23	NCT-377		[화학식 24]
24	NCT-383		[화학식 25]

[107]

[108] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[109]

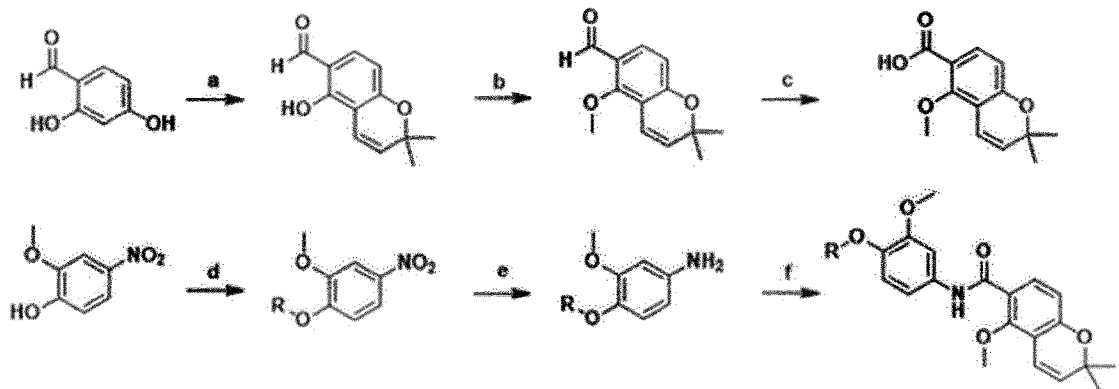
[110] 실시예 1: 화합물 제조

[111] 모든 화학 시약은 상업적으로 이용 가능한 것을 사용하였다. 실리카겔 컬럼 크로마토 그래피는 실리카겔 230-400 메쉬, Merck에서 수행하였다.

[112] ¹H NMR 스펙트럼은 JEOL JNM-LA 300(300 MHz), 400(400 MHz), 500(500 MHz)에서 기록되었다.

[113] 하기 구조식은 화합물의 제조 방법을 정리한 것이다.

[114]

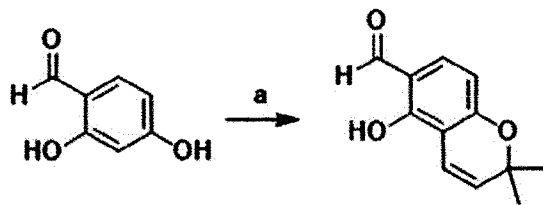


[115] 시약 및 조건은 (a) 3-methyl-but-2-enal, pyridine, 140 °C, o.n.; (b) MeI, K₂CO₃, DMF, 70°C, 2h; (c) H₂O₂, NaH₂PO₄, NaClO₂, AC, r.t., 2h; (d) K₂CO₃, DMF, 70°C, 3h; (e) 10% Pd/C, H₂; (g) DCM, r.t, 2h; (f) EDC-HCl, TEA, HOBt, DCM이다.

[116]

[117] 1.1. 5-Hydroxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carbaldehyde의 제조

[118]



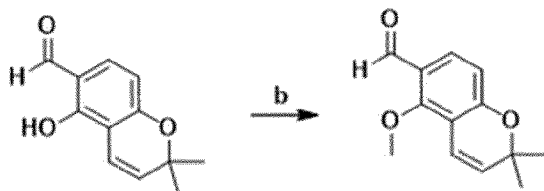
[119] 질소가 공급되는 조건에서 피리딘 (50 ml)에 2, 4-dihydroxybenzaldehyde (5.53 g, 40 mmol)를 용해시킨 혼합용액에 2, 3-methylbutenal (2 ml, 20 mmol)를 첨가 후 전열사반 (sand bath)를 이용하여 반응 온도를 140 °C로 유지시키고 24시간 교반하였다. 이후, 전열사반 제거 후 반응기를 실온으로 식히고 1N HCl로 중화시킨 뒤, EtOAc (100 ml)와 물 (100 ml)로 추출하였다. 추출된 유기층을 MgSO_4 로 건조시키고 감압 후 농축하였다. EtOAc/Hex (1:4)를 용출 용매로 실리카겔 (230-400 mesh) 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 5-Hydroxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carbaldehyde 를 수득하였다.

[120] yellow solid (1.35g, 32%). ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 11.62 (s, 1H, OH), 9.63 (s, 1H, -CHO), 7.26 (d, 1H, $J = 8.43$ Hz, H7-chromene), 6.66 (d, 1H, $J = 10.05$ Hz, H4-chromene), 6.40 (dd, 1H, $J = 8.61$ Hz, 0.72 Hz, H8-chromene), 5.58 (d, 1H, 10.08 Hz, H3-chromene), 1.49 (s, 6H, CH_3).

[121]

[122] 1.2. 5-Methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carbaldehyde 의 제조

[123]



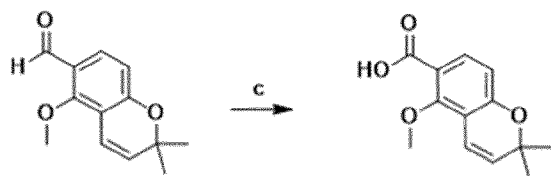
[124] DMF에 5-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carbaldehyde (1.35g, 6.6 mmol) 를 용해한 혼합용액에 포타슘카보네이트 (3.69 g, 26.7 mmol)와 iodomethane (1.24 ml, 19.9 mmol)을 첨가한 후 질소가 주입되는 조건으로 70°C에서 3시간 교반하였다. 이후 전열사반을 제거하여 반응 온도를 실온으로 낮춘 뒤 물 (20 ml)을 첨가하여 반응을 종료하였다. 혼합물질은 EtOAc (20 ml x 2) 와 brine (25 ml) 로 추출 하고 MgSO_4 로 건조 후 감압-농축하였다. EtOAc/Hex (7:3) 의 용출용매로 실리카겔 (230-400 mesh) 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 5-Methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carbaldehyde를 수득하였다.

[125] brown oil (1.05 g, 72%). ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 10.15 (s, 1H, -CHO), 7.63 (d, 1H, $J = 8.58$ Hz, H7-chromene), 6.62 (d, 1H, $J = 8.61$ Hz, H4-chromene), 6.57 (d, 1H, $J = 10.08$ Hz, H8-chromene), 5.67 (d, 1H $J = 10.08$, H3-chromene), 3.88 (s, 3H, CH_3O), 1.44 (s, 6H, CH_3).

[126]

[127] 1.3. 5-Methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carboxylic acid 의 제조

[128]



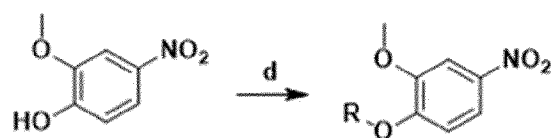
[129] 아세트나이트릴 (20 ml)에 5-Methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carbaldehyde (1.05 g, 4.81 mmol), NaH_2PO_4 (114mg, 0.95mmol), H_2O_2 (1.82ml, 3%, 4.81mmol), NaClO_2 (652.8mg, 7.22mmol)를 첨가하고 실온에서 2시간 교반하였다. 혼합물질은 EtOAc/ H_2O 로 추출 후 MgSO_4 로 건조 후 감압 농축하였다. MC/MeOH (30:1)을 용출용매로 실리카겔 (230-400 mesh) 칼럼 크로마토그래피로 혼합물질을 정제하여 5-Methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carboxylic acid 를 수득하였다.

[130] yellow solid (710.8 mg, 63%). ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 7.89 (d, 1H, $J = 8.79$ Hz, H7-chromene), 6.68 (dd, 1H, $J = 8.79$ Hz, 0.72 Hz, H4-chromene), 6.52 (dd, 1H, $J = 10.05$ Hz, 0.54 Hz, H8-chromene), 5.72 (d, 1H, $J = 9.87$ Hz, H3-chromene), 3.93 (s, 3H, CH_3O), 1.45 (s, 6H, CH_3).

[131]

[132] 1.4. 2-methoxy-4-nitrophenol의 치환 (1. Mitsunobu reaction), (2. Williamson Reaction)

[133]



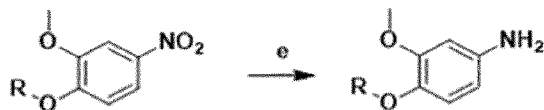
[134] (1) 2-메톡시-4-나이트로페놀의 하이드록시기의 치환은 Mitsunobu reaction 조건을 이용하였다. DCM에 4-nitroguaiacol (1eq)을 용해한 후, 0°C 에서 알코올 형태의 적합한 알킬체인 (1.1eq)과 Triphenylphosphine (1.5eq) in DMC을 첨가한 후, DEAD (40%/toluene) (1.5eq)를 적가하였다. 혼합용액을 질소가 공급되는 조건의 실온에서 15시간 교반 후 물을 첨가하여 반응으로 종료하고 EtOAc로 추출 후 MgSO_4 로 건조 후 감압-농축하였다. EtOAc/Hex (4:1)을 용출용매로 용출용매로 실리카겔 (230-400 mesh) 칼럼크로마토그래피로 혼합물질을 정제하여 원하는 화합물을 수득하였다.

[135] (2) DMF에 4-nitroguaiacol (1eq)과 K_2CO_3 (3 eq)을 용해하여 30분 교반 후, 적합한 할로-알킬화합물을 첨가하였다. 전열사반을 이용하여 반응온도 70°C 에서 3시간 교반하고 전열사반을 제거하여 실온으로 맞추는 후 물을 첨가하여 반응을 종료하였다. 혼합유기화합물은 EtOAc로 추출하고 brine으로 여러번 씻어준 뒤 MgSO_4 로 건조 후 감압-농축하였다. EtOAc/Hex (4:1)을 용출용매로 용출용매로 실리카겔 (230-400 mesh) 칼럼 크로마토그래피로 혼합물질을 정제하여 원하는 화합물을 수득하였다.

[136]

[137] 1.5. 아닐린의 제조

[138]

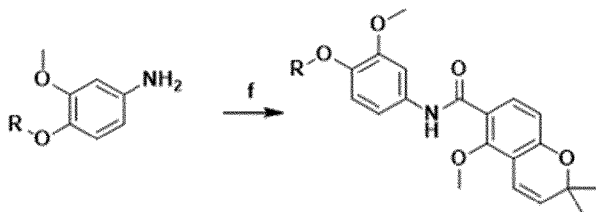


[139] 합성된 나이트로 화합물 (1 eq)를 메탄올에 용해한 후 10% Pd/C (0.1 eq)를 첨가하고 수소가스를 공급하는 조건으로 실온에서 1시간 교반하였다. TLC를 이용하여 반응이 완결된 것을 확인 후 셀라이트 필터 후 감압-농축하여 아닐린을 수득하였다.

[140]

[141] 1.6. 아마이드결합

[142]



[143] 합성한 아닐린 화합물과 카복실릭에시드 화합물을 DCM에 용해 한 후 EDC·HCl (1.5 eq)와 HOBt (1.5eq), TEA (2.5eq) 을 첨가하였다. 혼합용액은 리플릭스 조건하에 15시간 교반하였으며 반응완결 후 전열사반을 제거하여 실온으로 온도를 내리고 물을 첨가하여 반응을 종결하였다. 이후 혼합유기물질은 DCM으로 추출하고 brine으로 여러 번 씻어준 뒤 MgSO₄로 건조 후 감압-농축하였다. 합성된 화합물은 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

[144]

[145] 1.7. 신규 유도체의 분석 결과

[146] 제조한 신규한 벤조파이란 유도체를 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 분리 정제한 후 핵자기 공명에 의해 분자구조를 확인하였다.

[147] NCT-88

[148] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 9.61 (s, 1H), 7.96 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 2.37 Hz, 1H), 6.94 (dd, J = 8.43 HZ, 2.55 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.60 (d, J = 10.62 Hz, 1H), 5.73 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.88 (s, 6H), 1.47 (s, 6H).

[149]

[150] NCT-368

[151] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 9.60(s,1H), 7.93(d,J = 8.79 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 6.88 (s, 2H), 6.69 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 9.90 Hz, 1H), 5.71 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 4.14 (t, J = 5.31 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.75 (t, J = 5.31 Hz, 2H), 3.43 (s, 3H), 1.44 (s, 6H).

[152]

[153] NCT-66

[154] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.63 (s, 1H), 7.96 (d, $J = 8.79$ Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 6.91-6.89 (m, 2H), 6.72 (d, $J = 8.79$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J = 10.08$ Hz, 1H), 5.73 (d, $J = 10.08$ Hz, 1H), 4.04 (t, $J = 5.31$ Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.09 (t, $J = 5.13$ Hz, 2H), 1.47 (s, 6H).

[155]

[156] NCT-82

[157] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.63 (s, 1H), 7.95 (d, $J = 8.79$ Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.89 (s, 2H), 6.72 (d, $J = 8.79$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 9.87$ Hz, 1H), 5.73 (d, $J = 10.08$ Hz, 1H), 4.16 (t, $J = 5.13$ Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.06 (t, $J = 5.13$ Hz, 2H), 2.57 (s, 3H), 1.46 (s, 6H).

[158]

[159] NCT-69

[160] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.62 (s, 1H), 7.96 (d, $J = 8.58$ Hz, 1H), 7.64 (d, $J = 1.83$ Hz, 1H), 6.90-6.89 (m, 2H), 6.72 (d, $J = 8.58$ Hz, 1H), 6.60 (d, $J = 10.08$ Hz, 1H), 5.72 (d, $J = 9.90$ Hz, 1H), 4.13 (t, $J = 6.03$ Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 2.83 (t, $J = 6.03$ Hz, 2H), 2.40 (s, 6H), 1.46 (s, 6H).

[161]

[162] NCT-96

[163] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.62 (s, 1H), 7.95 (d, $J = 8.61$ Hz, 1H), 7.61 (d, $J = 2.19$ Hz, 1H), 6.93 (dd, $J = 8.61$ Hz, 2.37 Hz, 1H), 6.87 (d, $J = 8.61$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J = 8.61$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 9.87$ Hz, 1H), 5.73 (d, $J = 9.87$ Hz, 1H), 4.11 (t, $J = 6.03$ Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 2.99 (t, $J = 6.39$ Hz, 2H), 2.00 (quin, $J = 6.24$ Hz, 2H), 1.46 (s, 6H).

[164]

[165] NCT-101

[166] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.68 (s, 1H), 7.95 (d, $J = 8.79$ Hz, 1H), 7.69 (d, $J = 2.40$ Hz, 1H), 6.94 (dd, $J = 8.61$ Hz, 2.19 Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.58$ Hz, 1H), 6.72 (d, $J = 8.58$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 9.90$ Hz, 1H), 5.74 (d, $J = 10.08$ Hz, 1H), 4.19 (t, $J = 5.49$ Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.31 (t, $J = 5.52$ Hz, 2H), 2.80 (s, 3H), 2.25 (quin, $J = 5.49$ Hz, 2H), 1.47 (s, 6H).

[167]

[168] NCT-055

[169] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.61 (s, 1H), 7.93 (d, $J = 8.58$ Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 6.85 (br, 2H), 6.69 (d, $J = 8.79$ Hz, 1H), 6.57 (d, $J = 9.90$ Hz, 1H), 5.71 (d, $J = 10.05$ Hz, 1H), 4.06 (t, $J = 6.24$ Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 2.81 (t-like, 2H), 2.49 (s, 6H), 2.18-2.15 (m, 2H), 1.44 (s, 6H).

[170]

[171] NCT-029

[172] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ9.57 (s, 1H), 7.89 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 6.83 (s, 2H), 6.65 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.53 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 5.66 (d, J = 10.05 Hz, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.68 (m, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.13 (br, 2H), 1.90 (br, 2H), 1.80 (br, 2H), 1.40 (s, 6H).

[173]

[174] NCT-375

[175] ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ9.58 (s, 1H), 7.94 (d, J = 8.70Hz, 1H), 7.59 (d, J = 2.15Hz, 1H), 6.91 (dd, J = 8.50Hz, 2.20Hz, 1H), 6.82 (d, J = 8.60Hz, 1H), 6.70 (d, J = 8.70Hz, 1H), 6.57 (d, J = 9.95Hz, 1H), 5.70 (d, J = 10.00Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.82 (d, J = 6.65Hz, 2H), 3.16 (d, J = 12.10Hz, 2H), 2.67 (td, J = 12.15Hz, 1.95Hz, 2H), 2.01-1.97 (m, 1H), 1.89 (d, J = 12.85Hz, 2H), 1.44 (s, 6H), 1.34-1.26 (m, 2H).

[176]

[177] NCT-385

[178] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ9.53 (s, 1H), 7.88 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 2.19 Hz, 1H), 6.85 (dd, J = 8.61 Hz, 2.22 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 8.58 Hz, 1H), 6.64 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.53 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 5.66 (d, J = 9.90 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.79 (t, J = 6.24 Hz, 1H), 2.88 (d, J = 11.34 Hz, 2H), 2.25 (s, 3H), 1.96 (t, J = 10.62 Hz, 2H), 1.85-1.82 (m, 3H), 1.51-1.39 (m, 8H).

[179]

[180] NCT-20

[181] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ9.57 (s, 1H), 7.89 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 6.82 (s, 2H), 6.65 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.53 (d, J = 9.90 Hz, 1H), 5.66 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 4.14 (t, J = 6.06 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.86(t-like, 2H), 2.59 (br, 4H), 1.62 (br, 4H), 1.39 (s, 6H).

[182]

[183] NCT-21

[184] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ9.61 (s, 1H), 7.93 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 2.22 Hz, 1H), 6.92 (dd, J = 8.61 Hz, J = 2.19 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.43 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 9.90 Hz, 1H), 5.71 (d, J = 10.05 Hz, 1H), 4.13 (t, J = 6.21 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.72 (t, J = 4.56 Hz, 4H), 2.81 (t, J = 6.03, 2H), 2.57 (t, J = 4.59 Hz, 6H), 1.44 (s, 6H).

[185]

[186] NCT-43

[187] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ9.60(s, 1H), 7.93 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 2.19 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 8.79 Hz, 2.19 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 9.87 Hz, 1H), 5.70 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 4.12 (t, J = 6.21

Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 2.90 (t, J = 4.77 Hz, 4H), 2.80 (t, J = 6.21 Hz, 2H), 2.53 (t, J = 4.77 Hz, 4H), 1.44 (s, 6H).

[188]

[189] NCT-025

[190] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ9.56 (s, 1H), 7.89 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 2.01, 1H), 6.85 (dd, J = 8.43 Hz, J = 2.01 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.65 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.53 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 5.66 (d, J = 9.87 Hz, 1H), 4.07 (t, J = 6.03 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.79 (t, J = 6.21 Hz, 2H), 2.59 (br, 4H), 2.46 (br, 4H), 2.33 (s, 3H), 1.40 (s, 6H).

[191]

[192] NCT-58

[193] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ9.60 (s, 1H), 7.93 (d, J = 8.80 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 2.40 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 8.40 Hz, 2.00 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 9.60 Hz, 1H), 5.71 (d, J = 10.00 Hz, 1H), 4.14-4.04 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.08 (bd, J = 12.00 Hz, 1H), 2.80-2.72 (m, 1H), 2.66 (dt, J = 11.60 Hz, 2.80 Hz, 1H), 1.89 (dd, J = 6.80 Hz, 2.8 Hz, 1H), 1.86 (d, J = 6.40 Hz, 1H), 1.78 (bd, J = 13.60 Hz, 1H), 1.69 (bd, J = 12.40 Hz, 1H), 1.60 (bd, J = 12.40 Hz, 1H), 1.45 (s, 6H), 1.42-1.37 (m, 1H), 1.27-1.14 (m, 2H).

[194]

[195] NCT-44

[196] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ9.59 (s, 1H), 7.93 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 2.58 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 8.61 Hz, 2.40 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 9.87 Hz, 1H), 5.70 (d, J = 9.90 Hz, 1H), 4.02 (t, J = 6.39 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.12 (bd, J = 11.86, 2H), 2.68-2.60 (m, 2H), 1.76-1.69 (m, 5H), 1.44 (s, 6H), 1.22-1.14 (m, 2H).

[197]

[198] NCT-364

[199] ¹H NMR (500MHz, CD₃OD) δ7.62 (d, J = 8.60Hz, 1H), 7.48 (d, J = 2.30Hz, 1H), 7.10 (dd, J = 8.65Hz, 2.35Hz), 6.94 (d, J = 8.65Hz, 1H), 6.67 (d, J = 9.90 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 8.36Hz, 1H), 5.82 (d, J = 10.05Hz, 1H), 4.06 (t, 5.85Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 2.84 (br, 2H), 2.78 (br, 2H), 2.07 (quin, J = 7.75Hz, 2H), 1.72 (quin, J = 5.40Hz, 4H), 1.56 (br, 2H), 1.43 (s, 6H).

[200]

[201] NCT-407

[202] ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ9.59 (s, 1H), 7.93 (d, J = 8.65 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 2.25 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 8.60 Hz, 2.30 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 8.60 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 8.70 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 10.00 Hz, 1H), 5.70 (d, 10.00 Hz, 1H), 4.02-3.99 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.15 (bd, J = 11.55 Hz, 1H), 2.66 (td, J = 12.10 Hz, 2.70 Hz,

2H), 1.94-1.86 (m, 2H), 1.80 (bd, J = 12.60 Hz, 2H), 1.73 (bd, J = 13.45 Hz, 2H), 1.63 (bd, J = 13.60 Hz, 2H), 1.44 (s, 6H).

[203]

[204] NCT-394

[205] ¹H NMR (500Mhz, CDCl₃) δ 9.58 (s, 1H), 7.93 (d, J = 8.70 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 2.10 Hz, 1H), 6.91 (dd, J = 8.55 Hz, 2.25 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 8.55 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 8.70 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 10.00 Hz, 1H), 5.70 (d, J = 10.05 Hz, 1H), 3.97 (t, J = 6.75 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.14 (bd, J = 12.10 Hz, 2H), 2.62 (bd, J = 11.70 Hz, 2H), 1.82 (quin, J = 6.80 Hz, 2H), 1.74 (bd, J = 12.85 Hz, 2H), 1.44 (s, 6H), 1.43-1.37 (m, 3H), 1.25-1.19 (m, 2H).

[206]

[207] NCT-377

[208] ¹H NMR (400MHz, CD₃OD) 8.44 (s, 1H), 8.37 (d, J = 4.00 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 8.00 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 2.40 Hz, 1H), 7.36 (dd, J = 8.00 Hz, 5.20 Hz), 7.10 (dd, J = 8.40 Hz, 2.00Hz, 1H), 6.91 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 6.68 (d, J = 10.00 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 8.00 Hz, 1H), 5.82 (d, J = 9.60 Hz, 1H), 4.00 (t, J = 6.40 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 2.89 (t, J = 7.20 Hz, 2H), 2.10 (quin, J = 6.40 Hz, 2H), 1.44 (s, 6H).

[209]

[210] NCT-383

[211] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ9.60 (s, 1H), 8.50 (br, 2H), 7.93 (d, J= 8.61 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 2.19 Hz , 1H), 7.20 (br, 2H), 6.88 (dd, J = 8.43, 2.37 Hz, 1H), 6.79 (d, J = 8.67 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 9.87 Hz, 1H), 5.70 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 3.99 (t, J = 6.24 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H) 3.86 (s, 3H), 2.84 (t, J= 6.96 Hz, 2H), 2.14 (quint, J = 6.57 Hz, 2H), 1.44 (s, 6H).

[212]

[213] 실시예 2: 벤조파이란 유도체 **HSP90** 저해제 **NCT1** 13개의 합성 물질의 유방암 세포주 **BT474**, **JIMT-1** 및 **MDA-MB-231**에서 생존율 조사

[214] 인간 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231 각각은 10% fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin (100 U/ml) 및 Fungizone (0.625 μg/ml)을 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 5% CO₂, 37°C 환경으로 배양하였다.

[215] 인간 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에서 신규한 벤조파이란 유도체 **HSP90** 저해제 **NCT1** 13개의 합성 물질 (NCT-20, NCT-29, NCT-44, NCT-58, NCT-364, NCT-375, NCT-377, NCT-383, NCT-385, NCT-394, NCT-407)을 10 μM 농도로 72시간 처리한 후, MTS assay 기법으로 세포 생존율을 측정하였다. MTS assay는 96 well plate에 24시간 동안 세포를 부착시킨 후, 벤조파이란 유도체 72시간 처리하여,

MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)로 4시간 동안 발색한 뒤, Spectramax Plus384 microplate analyzer를 이용하여 490 nm에서 흡광도로 측정하였다.

- [216] 상기 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에서 13종의 벤조파이란 신규유도체 (NCT-20, NCT-29, NCT-44, NCT-58, NCT-364, NCT-375, NCT-377, NCT-383, NCT-385, NCT-394, NCT-407) 모두 세포 생존율을 유의하게 억제하였다. 대조군과 약물처리군 간의 유의성을 unpaired Students t-test로 검증 (* $p < 0.01$; DMSO control vs NCT1 series)하여 도표화하였다(도 1).

[217]

- [218] 실시예 3: 유방암 세포주에서 벤조파이란 유도체 NCT-58 및 NCT-407의 농도별 세포생존율 측정

- [219] 세가지의 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에서 HSP90 저해제 NCT-58, NCT-407을 각각 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 및 20 μM 의 다양한 농도로 72 시간 동안 처리한 후, 상기 MTS assay 기법으로 세포생존율을 측정하였다(Cell seeding numbers: 2(B), 1(J), 0.7(M) $\times 10^4$ cells / wells (confluency $\geq 25\%$)). 세가지의 유방암 세포주에서 NCT-58, NCT-407 약물 모두 농도 의존적으로 세포생존율을 유의하게 저해함을 확인하였다. 세포생존율 실험은 독립적으로 3번 수행하였으며, 유의성은 One-Way Anova, Bonferroni post-hoc test (* $p < 0.01$; DMSO control vs NCT-58 or NCT-407)로 검증하여 도 2에 각 세포주 및 약물처리군별로 그래프화하여 나타내었다.

[220]

- [221] 실시예 4: 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에서 벤조파이란 유도체 NCT-58 및 NCT-407의 세포형태 변화 조사

- [222] 상기 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에서 NCT-58, NCT-407을 10 μM 농도로 72시간 처리한 후, 약물의 의한 세포 독성 여부를 위상차 현미경을 이용하여 세포 형태 변화를 관찰하였다. 본 결과를 phase contrast microscopy로 x200 배율에서 촬영하여 도 3에 나타내었다. NCT-58, NCT-407 약물을 처리하였을 때, BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231 세포주 모두에서 세포질이 수축하는 형태 변화가 관찰 되었으며, 세포독성으로 인하여 대부분의 세포가 부유한 상태로 관찰되었다.

[223]

- [224] 실시예 5: 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에서 벤조파이란 유도체 NCT-58 및 NCT-407 약물의 세포사멸율 측정

- [225] NCT-58, NCT-407 약물이 유도하는 암세포의 사멸정도를 유세포 측정기 (Flow cytometry)를 이용한 DNA 함량분석을 통하여 측정하였다. BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에 대하여, control (DMSO), NCT-58 및 NCT-407을 각각 10 μM 의 농도로 72시간 처리한 후, 상기 세포들을 수확한 후, 24시간 동안 0.5% Tween-20을 포함하는 95% 에탄올로 고정하여, 30분 동안 propidium iodide (PI, 50

μg/ml)과 RNase (50 μg/ml)를 가지고 염색하였다. 이후, 유세포 측정기로 암세포의 사멸정도를 분석하였다.

- [226] 일반적으로 세포주기 (cell cycle)는 세포내 DNA의 함량에 따라 G1 (세포성장기)-S (세포복제기)-G2/M (세포분열기)로 나뉘어지며, 세포사멸이 유도되면 DNA의 절편현상 (DNA fragmentation)을 동반하여, 각 세포내의 DNA의 함량이 G1기 보다 현저히 적어진다. 이러한 세포사멸의 결과는 Sub G1 부위로서 세포주기상에 나타나게 되며 Sub G1의 비율을 수치로 표기하여 도 4에 각각 나타내었다.
- [227] 상기 NCT-58 및 NCT-407 두 약물 모두 BT474, JIMT-1, MDA-MB-231 유방암 세포주들에서 세포사멸 (Sub-G1 population)을 유의하게 유도함을 확인하였다. 세포사멸 실험은 독립적으로 3번 수행하였으며, 유의성은 unpaired Students t-test로 검증(*p<0.01; DMSO control vs NCT-58 or NCT-407)하여, 도 4에 각각의 세포주별로 그래프화하여 나타내었다.
- [228]
- [229] 실시예 6: 벤조파이란 유도체 NCT-58 및 NCT-407에 의한 세포사멸 관련 인자들의 발현 조사
- [230] 실시예 5의 결과에서, NCT-58 및 NCT-407에 의한 세포사멸기작을 조사하기 위해, 세포사멸 관련 인자 caspase family member의 활성화를 Western Blotting 기법을 통하여 조사하였다.
- [231] Western blotting 수행을 위하여, control (DMSO), NCT-58 및 NCT-407을 각각 10 μM의 농도로 72시간 처리한 후, 각 유방암 세포들을 phosphatase과 protease inhibitor를 포함하는 lysis buffer (30 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl; pH 7.4)에서 용해시켜 상층액에 존재하는 단백질을 수확하였다. 단백질 농도 측정은 Bradford protein assay kit를 가지고 수행하였으며, 각 약물 처리군에서 단백질 30 μg을 균등하게 취하여 SDS-Polyacrylamide gel (8~15%)에서 전기 영동하여 nitrocellulose membrane에 전기적으로 전위시켰다. 상기 멤브레인은 5% bovine serum albumin (BSA)에 희석된 일차 항체 [pro PARP (1:1000), cleaved PARP (1:2000), cleaved caspase-3 (1:1000), cleaved caspase-7 (1:1000), β-actin (1:5000)]를 가지고 4°C에서 24시간 동안 반응한 후, 2차 항체인 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit IgG (1:3000)에 2시간 상온에서 반응시켰다. 상기 단백질의 신호강도(Signal intensity)는 Enhanced Chemiluminescence Kit와 x-ray film으로 발색하였다.
- [232] BT474 및 JIMT-1 유방암 세포주에서 caspase-3의 활성화 형태인 cleaved caspase-3의 양을 Western blotting 기법으로 확인한 결과, 대조군과 비교 하여 NCT-58 및 NCT-407 처리군에서 현저히 단백질량이 증가함을 확인하였다. DNA 회복 인자인 PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase)는 caspase-3의 substrate로써, NCT-58 및 NCT-407 약물 처리에 의해 유도된 caspase-3의 활성화에 의해 분절화 됨을 pro-PARP (116 kDa)의 감소 및 cleaved-PARP (86 kDa)의 증가로 확인하였다.

상기 MDA-MB-231 세포주에서는 NCT-58 및 NCT-407 처리군에서 cleaved caspase-3 및 cleaved caspase-7이 증가함을 확인하였다. 이는 벤조파이란 유도체들이 유도하는 세포사멸이 caspase 활성이 동반됨을 증명하는 것으로 상기 결과는 도 5에 나타내었다.

[233]

[234] 실시예 7: 벤조파이란 유도체 NCT-58 및 NCT-407에 의한 HSP90 clients의 발현 조사

[235] BT474 및 JIMT-1 세포주는 HER2 양성 유방암 세포주로 HSP90의 대표적 client인 HER2, HER1 (EGFR)의 발현 및 활성화 (phosphorylation)을 HSP90 억제제인 NCT-58 및 NCT-407이 하향조절 할 수 있는지 상기 Western blotting 기법으로 조사하였다. 또한 HSP90 clients로 세포 생존에 주요한 인자들인 ERK, Cyclin D1 및 Survivin의 발현을 조사하였다. NCT-58 및 NCT-407을 각각 10 μ M의 농도로 72시간 처리하였을 때, BT474, JIMT-1 세포주들의 HER2, EGFR의 발현을 감소됨을 확인하였으며, 활성화 형인 phospho-HER2, phospho-EGFR의 발현 또한 현저히 감소되었다. 또한 두 약물 모두 세포증식 인자인 ERK, Cyclin D1 및 Survivin의 발현을 억제시킴을 확인하였다.

[236] 상기 MDA-MB-231 세포주는 삼중음성유방암(triple-negative breast cancer, TNBC) 세포주로서 유방암의 재발 및 전이율이 높은 암종이다.

삼중음성유방암의 세포 침투, 이동 및 암전이와 관련된 HSP90의 대표적 client인 EGFR, STAT3의 발현과 인산화를 측정하였으며, 생존인자인 AKT, ERK, Cyclin D1 및 Survivin의 발현을 조사하였다. NCT-58 및 NCT-407 약물 모두 삼중음성유방암 MDA-MB-231 세포주에서 EGFR, STAT3의 발현뿐만 아니라, 활성화 형인 phospho-EGFR, phospho-STAT3의 발현을 현저히 감소시켰으며, AKT, ERK, Cyclin D1 및 Survivin의 발현을 현저히 억제하였다. 상기 약물에 의한 client들의 발현 결과는 도 6에 나타내었다.

[237] 상기 Western blotting에 사용된 일차 항체는 [HER2 (1:5000), phospho-HER2 (Tyr1221/1222, 1:1000), EGFR (1:2000), phospho-EGFR (Tyr1068, 1:2000), Akt (1:2000), ERK (1:2000), phospho-ERK (Thr202/Tyr204, 1:2000), STAT3, phospho-STAT3 (Tyr705, 1:1000), Cyclin D1 (1:3000), Survivin (1:1000), β -actin (1:5000)]로 5% bovine serum albumin (BSA)에 희석하여 사용하였다.

[238]

[239] 실시예 8: 인간 전립선암 세포주 DU145, 대장암 세포주 HCT116, 간암 세포주 HepG2 및 난소암 세포주 SKOV-3에서 벤조파이란 유도체가 세포생존율에 미치는 영향 조사

[240] 전립선암 세포주 DU145, 대장암 세포주 HCT116, 간암 세포주 HepG2 및 난소암 세포주 SKOV-3에서 벤조파이란 유도체 NCT-375, NCT-394, NCT-407 약물들의 효과를 조사하였다. 각각의 약물을 10 μ M 농도로 72시간 처리한 후, 상기 MTS assay기법으로 세포생존율을 측정한 결과, 3개의 약물 모두 DU145,

HCT116, HepG2 SKOV-3 세포주들에서 세포생존율을 유의하게 억제하였다. 대조군과 약물처리군 간의 유의성을 unpaired Students t-test로 검증 (* $p < 0.01$; DMSO control vs NCT-375, NCT-394 or NCT-407)하여 도 7에 나타내었다.

[241]

[242] 실시예 9: 벤조파이란 유도체 NCT-58이 열충격 반응(Heat shock response)을 유도하지 않음을 HSF-1의 핵내 발현으로 조사

[243] 본 발명 화합물 NCT-58이 열충격 반응(heat shock response)을 유도하지 않음을 확인하기 위하여 전사 인자 HSF-1의 세포 핵내 발현을 공초점현미경 (confocal microscopy)로 조사하였다. HSF-1은 전사조절 인자로 열충격 반응 관련 유전자인 HSP70의 발현을 상향조절하는 것으로 알려져 있으며, 세포질 내에서 HSP90과 결합된 형태로 존재한다. 기존의 N-말단 HSP90 저해제가 HSP90의 N-말단 ATP 결합 사이트에 결합하게 되면 HSF-1은 HSP90으로부터 분리되어 세포질 내에서 삼량체 (trimerization)를 형성하여 인산화되어 활성을 가진다. 활성화된 HSF-1은 핵내로 유입되어 DNA의 HSE(heat shock response element)에 결합하고, HSP70, HSP40 및 HSP27 등의 열충격 반응과 관련된 HSP 유전자들의 발현을 증가시키므로 암세포의 생존, 증식 및 세포사멸이 억제되는 방어기전이 활성화시키는 것으로 알려져 있다.

[244] 본 발명의 벤조파이란 유도체인 NCT-58(N58)은 C-말단 HSP90 저해제로 HSF-1이 SKBR3 세포의 핵내로 축적되지 않음을 확인하였으며, N-말단HSP90 저해제인 geldanamycin (Gelda)은 HSF-1이 핵내에서 강하게 발현됨을 면역현광염색(Immunocytochemistry) 기법을 통하여 확인하였다. 상기 약물에 의한 HSF-1의 발현 결과는 도 8에 나타내었다.

[245] 실험은 다음과 같다: SKBR3 세포주를 챔버 슬라이드에 분주하여 NCT-58 또는 geldanamycin을 24시간 처리한 후, 세포를 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정하였다. HSF-1 일차 항체 및 Alexa-488 goat anti-rabbit IgG 이차 항체를 이용하여 면역형광염색을 수행하였으며, 세포핵은 DAPI로 염색하였다. 상기 이미지는 공초점현미경으로 500배의 배율에서 촬영하였다.

[246]

[247] 실시예 10: 벤조파이란 유도체 NCT-58이 HSP70의 발현에 미치는 영향 조사

[248] NCT-58(N58) 화합물이 열충격 반응을 유도하지 않음을 확인하기 위하여 HSP70의 발현을 조사하였다. HSF-1이 유도하는 HSP70은 세포사멸유도 인자인 caspases, death receptors, bax 등과 결합하여 궁극적으로 세포사멸이 억제되는 방어기전이 활성화시키는 것으로 알려져 있다. N-말단 HSP90 저해제인 geldanamycin (Gelda)은 HSP70의 발현을 강력하게 유도함을 면역현광염색 (Immunocytochemistry) 기법을 통하여 확인하였다. 벤조파이란 유도체인 C-말단 HSP90 저해제 NCT-58은 HSP70의 발현을 유도하지 않음을 SKBR3 및 JIMT-1 두 세포주 모두에서 증명하였다. 상기 약물에 의한 HSP70의 발현 결과는 도 9에

나타내었다.

[249] 실험방법은 다음과 같다: SKBR3 및 JIMT-1 세포주를 챔버 슬라이드에 분주하여 NCT-58 또는 geldanamycin을 24시간 처리한 후, 세포를 4% 라포름알데히드로 고정하였다. HSP70 일차 항체 및 Alexa-488 goat anti-rabbit IgG 이차 항체를 이용하여 면역형광염색을 수행하였으며, 세포핵은 DAPI로 염색하였다. 상기 이미지는 공초점현미경으로 500배의 배율에서 촬영하였다.

[250]

[251] 실시예 11: NCT 44 및 NCT 58의 용해도 측정

[252] NCT 44 및 NCT 58의 용해도를 측정하기 위하여, 표준곡선(Standard curve)은 1 mg/ml product solution을 serial dilution하여 최종 농도 100ng/ml, 200ng/ml, 500ng/ml 농도의 용액을 만든다. 이 용액을 standard로 하여 sample의 농도를 산출하였고, Serial dilution에서 이동상은 MeOH을 사용하였다.

[253] 농도 분석 샘플은 Product 3 mg을 100ul EtOH에 녹여 solution을 제조하였다(농도 = 30mg/ml). 육안으로 다 녹은 것처럼 보여도 실제로 미량의 석출이 생길 수 있으므로 원심분리하여 석출된 것을 침전시켰다. 30mg/ml의 용액을 원심분리(13,200rpm, 5 min)하고 그 상층액 50ul 만 수득하여 분석에 사용하였다(침전물은 분석이 포함하지 않음). 30mg/ml을 serial dilution 하여 최종 농도 300ng/ml이 되게 하였다(standard curve 농도 범위 안에 들어가게 희석 하여 분석). 300ng/ml의 용액을 측정하고 상기에서 standard curve를 토대로 최초 농도를 계산하였다.

[254] 그 결과, NCT 44 및 NCT 58이 테구엘린에 비해 용해도가 우수한 것을 확인하였다.

[255]

[256] [표2]

	MW	Solubility (in Ethanol)
Deguelin	394.42	50 mM
NCT 44	466.58	66 mM
NCT 58	466.58	69 mM

[257]

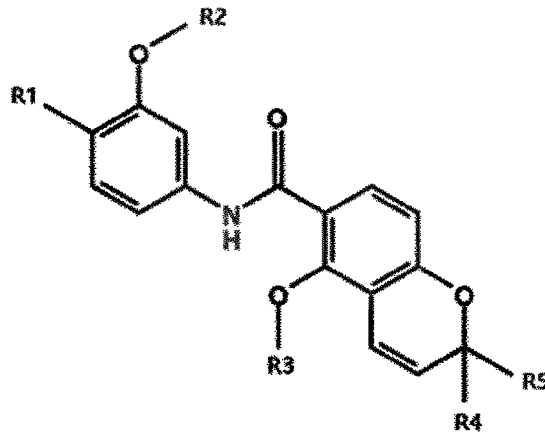
[258] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[259]

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물:

[화학식 1]



상기 식에서,

R¹은 치환 또는 비치환 알콕시기이고;

R², R³, R⁴ 및 R⁵는 각각 독립적으로 수소 원자; 또는 C₁-C₂

알킬기(alkyl)이고;

상기 R¹에서 치환 알콕시의 경우, 상기 치환기는 질소 원자; 산소 원자; 알킬기; 또는 C₁-C₆ 알킬기(alkyl)로 치환된 헤테로 고리형 알킬기(alkyl)(헤테로 원자는 질소, 산소, 황 중 하나 이상을 포함하며, 헤테로 고리는 5각형, 6각형 고리이다.)이다.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 R¹의 헤테로 고리형 알킬기는 피리딘, 피페리딘, 모르폴린 또는 피페라진인 것을 특징으로 하는 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 R¹은,

메톡시기(methoxy), 2-메톡시-에톡시기(2-methoxy-ethoxy),

2-아미닐에톡시기(2-aminylethoxy),

2-메틸아미닐에톡시기(2-methylaminylethoxy),

2-디메틸아미닐에톡시기(2-dimethylaminylethoxy),

3-아미닐프로폭시기(3-aminylpropoxy),

3-메틸아미닐프로폭시기(3-methylaminylpropoxy),

3-디메틸아미닐프로폭시기(3-dimethylaminylpropoxy),

(1-메틸피페리딘-4-일)옥시기((1-Methylpiperidin-4-yl)oxy),

(피페리딘-4-일)메톡시기((1-Methylpiperidin-4-yl)methoxy),

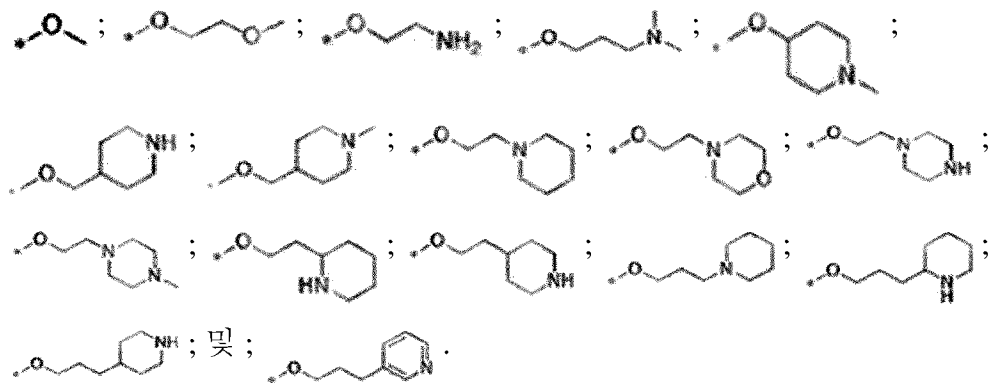
(1-메틸피페리딘-4-일)메톡시기((1-Methylpiperidin-4-yl)methoxy),

(2-피페리딘-1-일)에톡시기(2-(piperidin-1-yl)ethoxy),

(2-모르폴린-4-일)에톡시기((2-morpholin-4-yl)ethoxy),

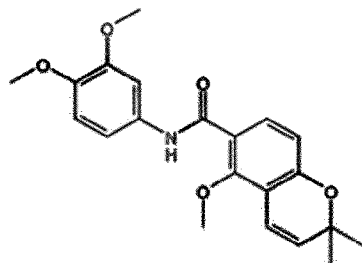
(2-피페라진-1-일)에톡시기((2-piperazine-1-yl)ethoxy),
 2-(4-메틸피페라진-1-일)에톡시기(2-(4-methylpiperazine-1-yl)ethoxy),
 2-(피페리딘-2-일)에톡시기((2-piperidine-2-yl)ethoxy),
 2-(피페리딘-4-일)에톡시기((2-piperidine-4-yl)ethoxy),
 (3-피페리딘-1-일)프로폭시기(3-(piperidine-1-yl)propoxy),
 (3-피페리딘-2-일)프로폭시기(3-(piperidine-2-yl)propoxy),
 (3-피페리딘-4-일)프로폭시기(3-(piperidine-4-yl)propoxy),
 (3-피리딘-3-일)프로폭시기(3-(pyridine-3-yl)propoxy) 및
 (3-피리딘-4-일)프로폭시기(3-(pyridine-4-yl)propoxy)로 구성된 군에서
 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 화학식 1로 표시되는 화합물
 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 R¹은 하기 그룹에서 선택되는 하나인 것인 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물:

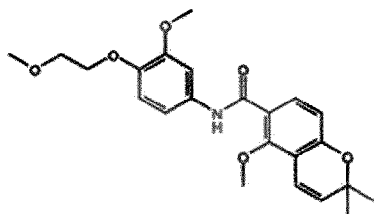


[청구항 5] 제1항에 있어서, 하기 화학식 중 어느 하나로 표시되는 것을 특징으로 하는 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물:

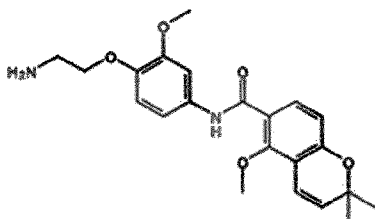
[화학식 2]



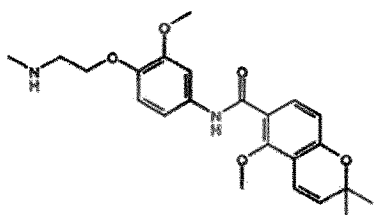
[화학식 3]



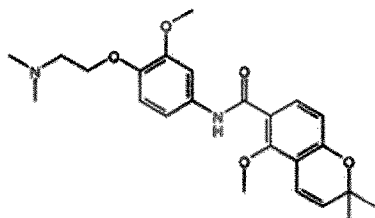
[화학식 4]



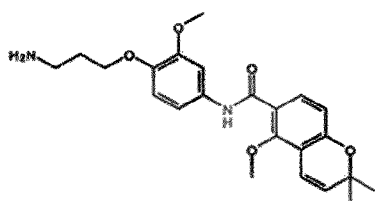
[화학식 5]



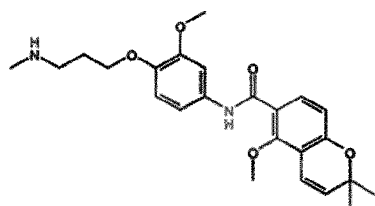
[화학식 6]



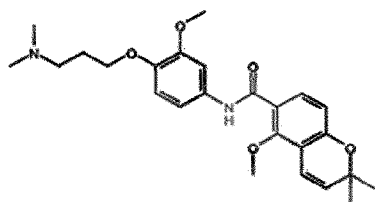
[화학식 7]



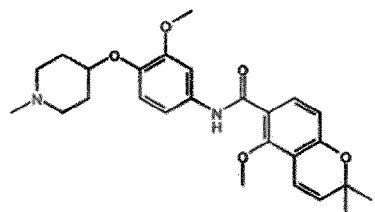
[화학식 8]



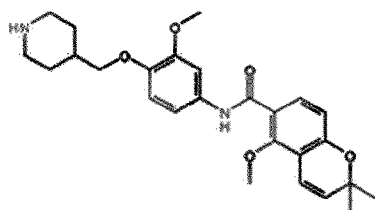
[화학식 9]



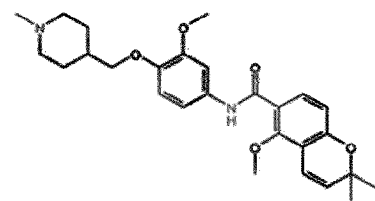
[화학식 10]



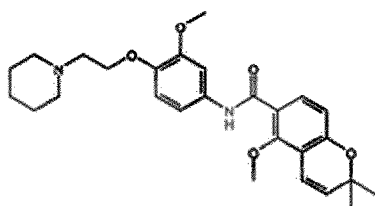
[화학식 11]



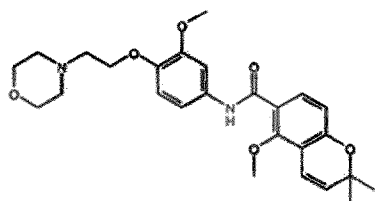
[화학식 12]



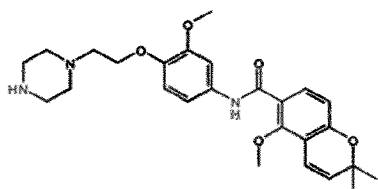
[화학식 13]



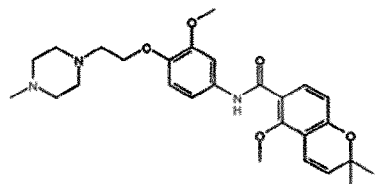
[화학식 14]



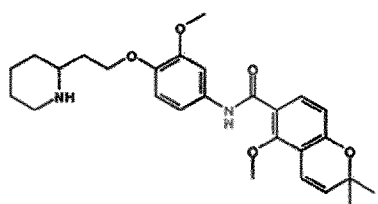
[화학식 15]



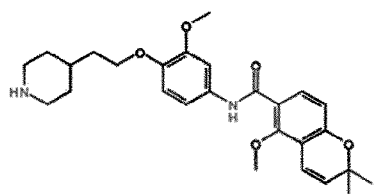
[화학식 16]



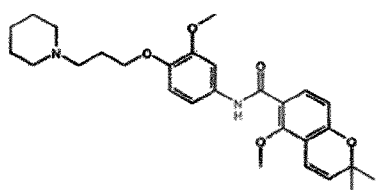
[화학식 17]



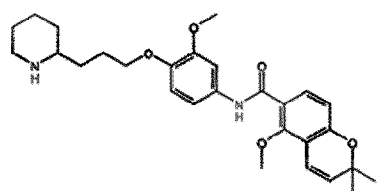
[화학식 18]



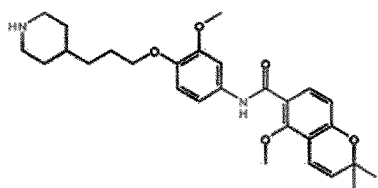
[화학식 21]



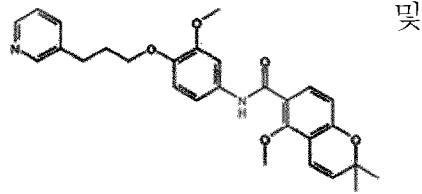
[화학식 22]



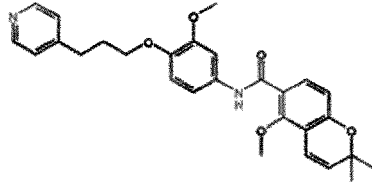
[화학식 23]



[화학식 24]

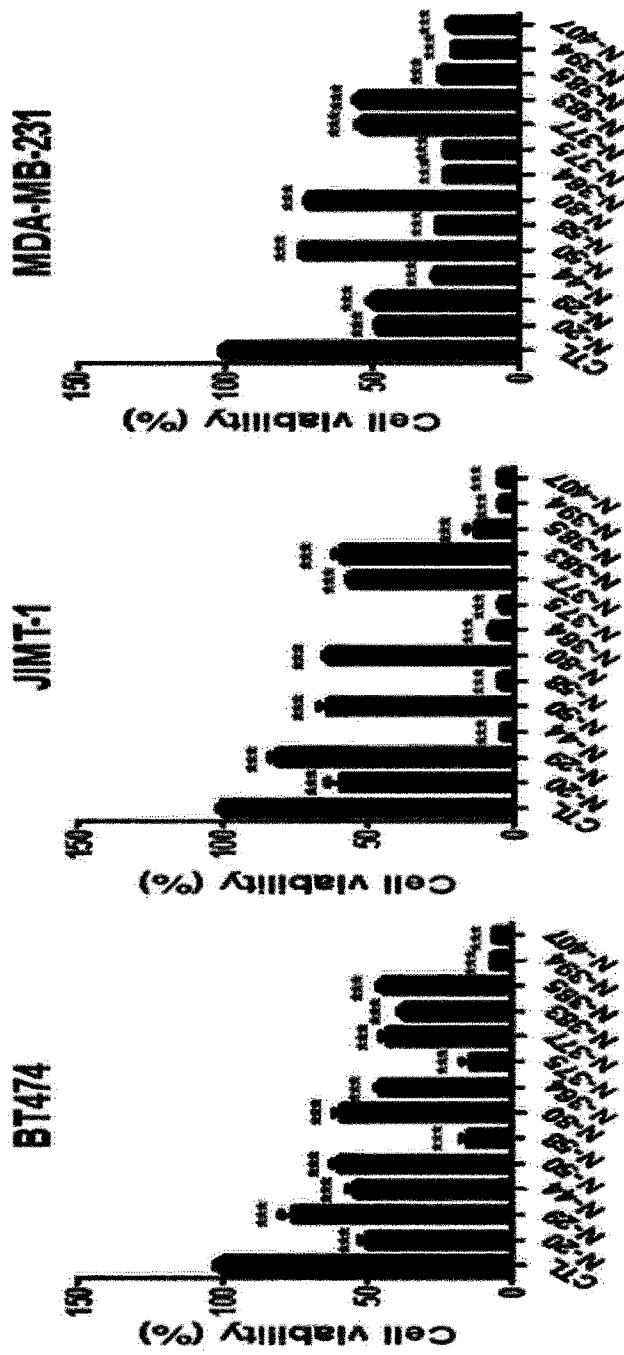


[화학식 25]

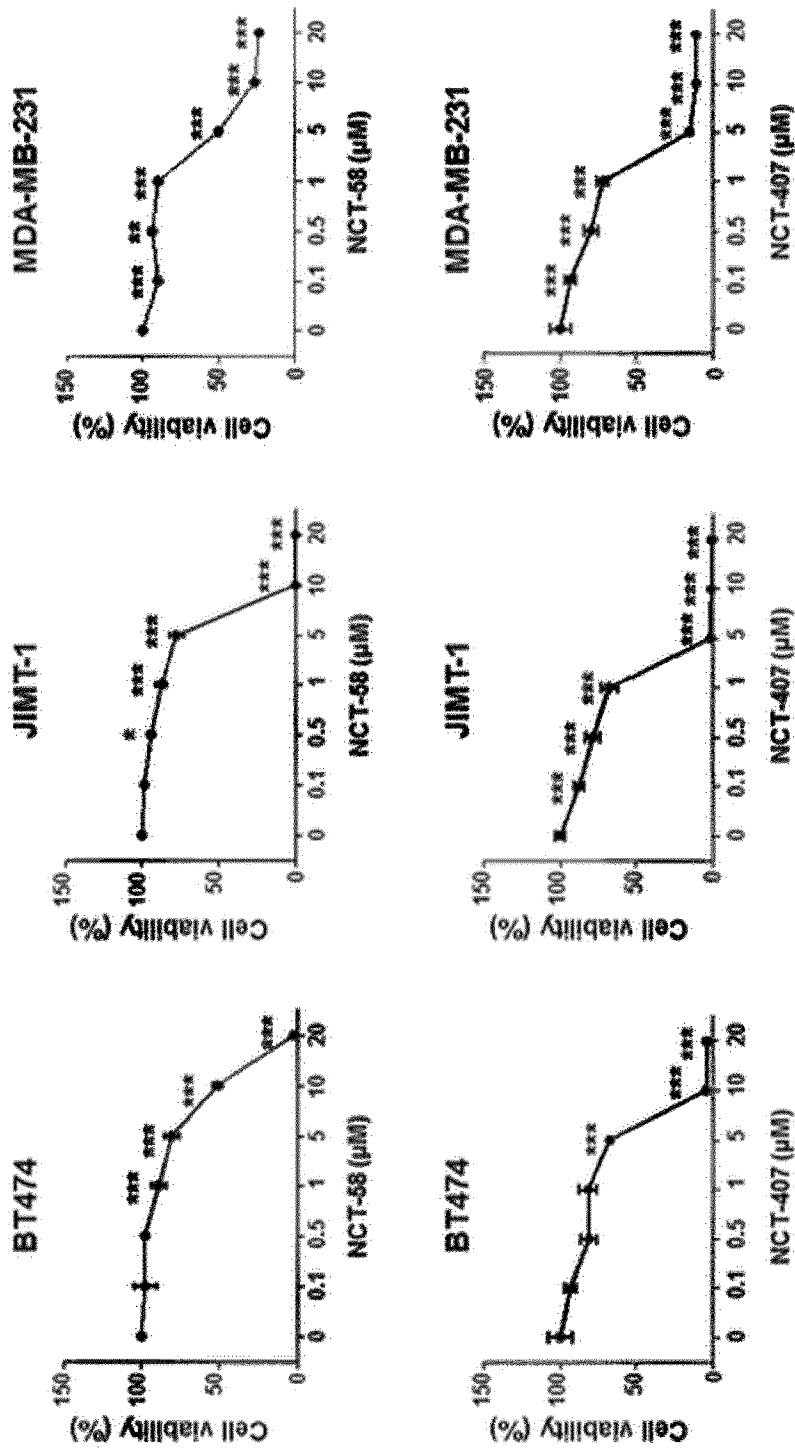


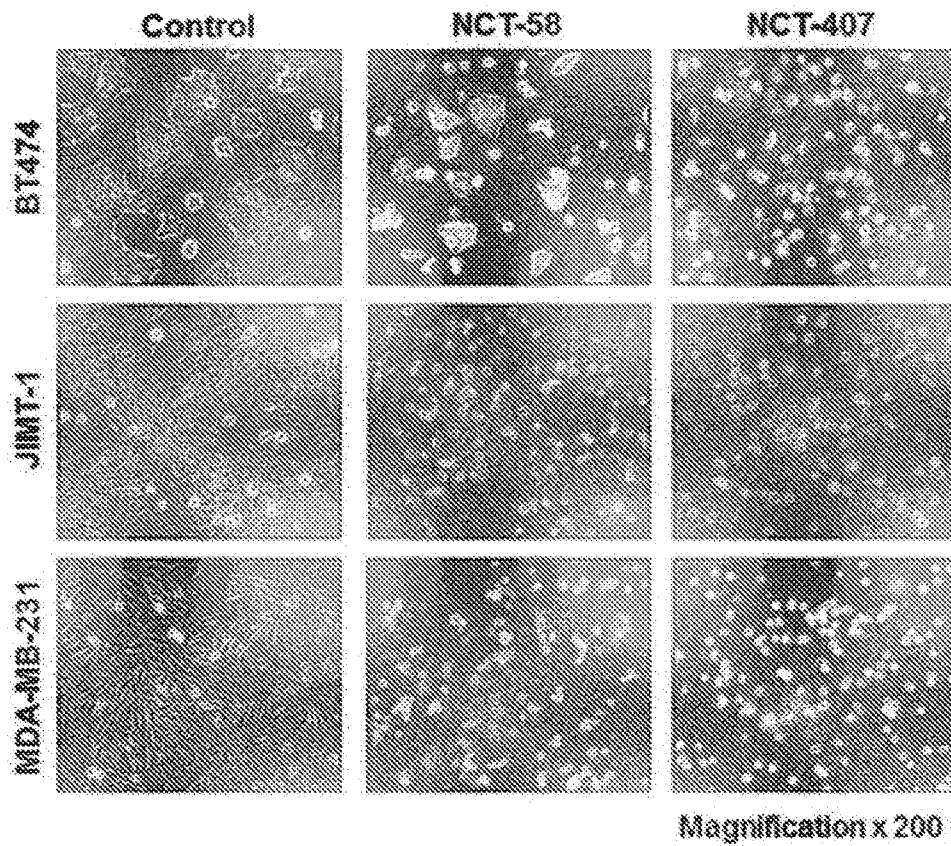
- [청구항 6] 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 조성물은 Hsp90을 억제하여 항암 활성을 나타내는 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 암은 전립선암, 난소암, 폐암, 간암, 위암, 대장암, 췌장암, 담낭 및 담도암, 유방암, 백혈병, 식도암, 비호치킨 림프종, 갑상선암, 자궁경부암, 피부암의 원발성 암과 이로부터 기타 장기로 전이되어 유발되는 전이암 및 비정상적인 과다 세포 분열을 촉진하여 생성되는 종양성 세포 질환으로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상의 암인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 암은 유방암인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 유방암은 삼중음성 유방암 또는 HER2 양성 유방암인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

[도1]

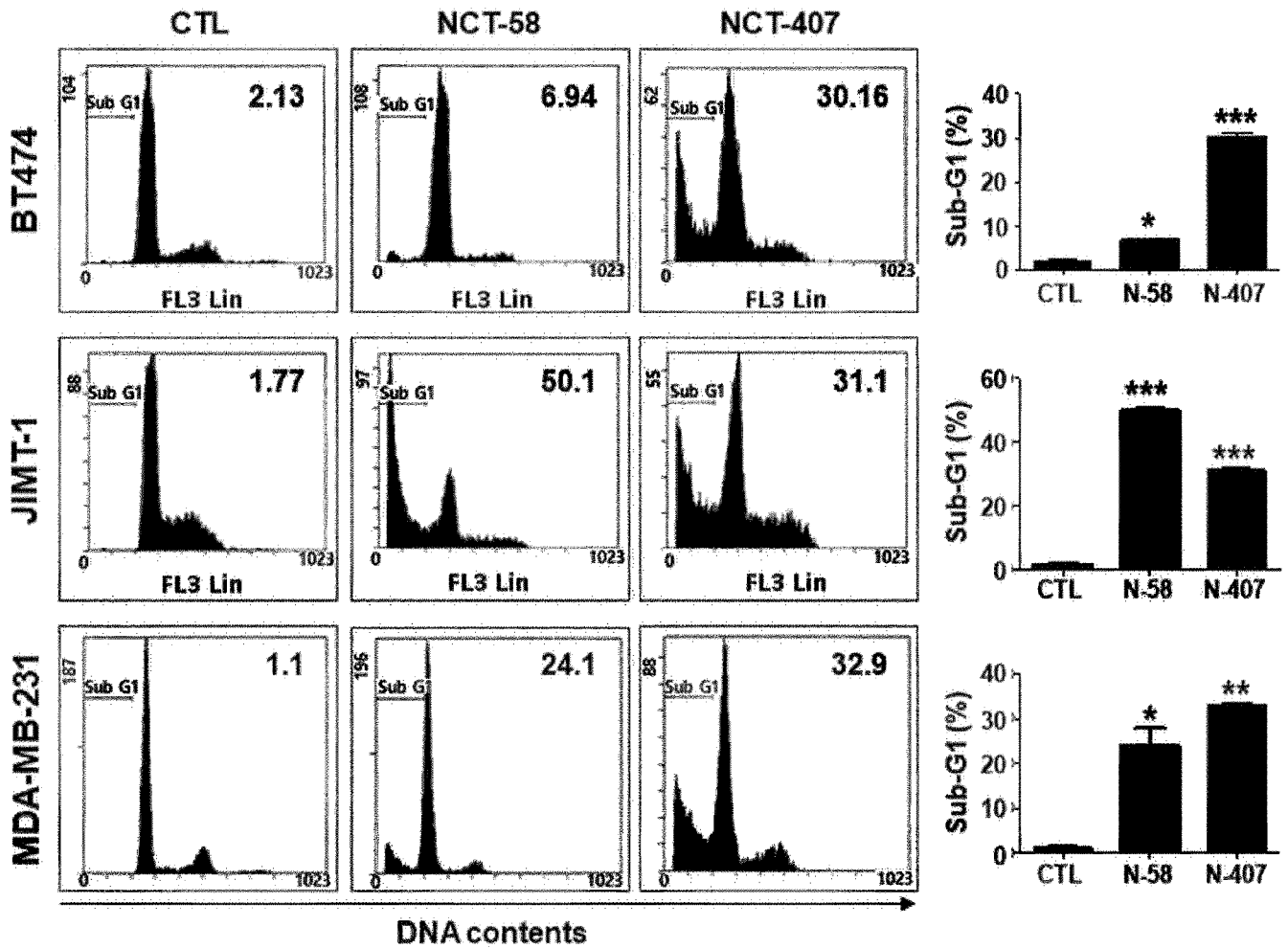


[도2]

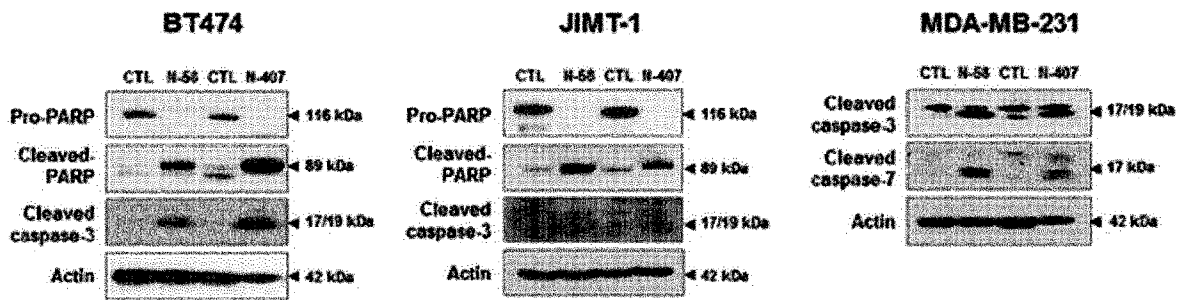




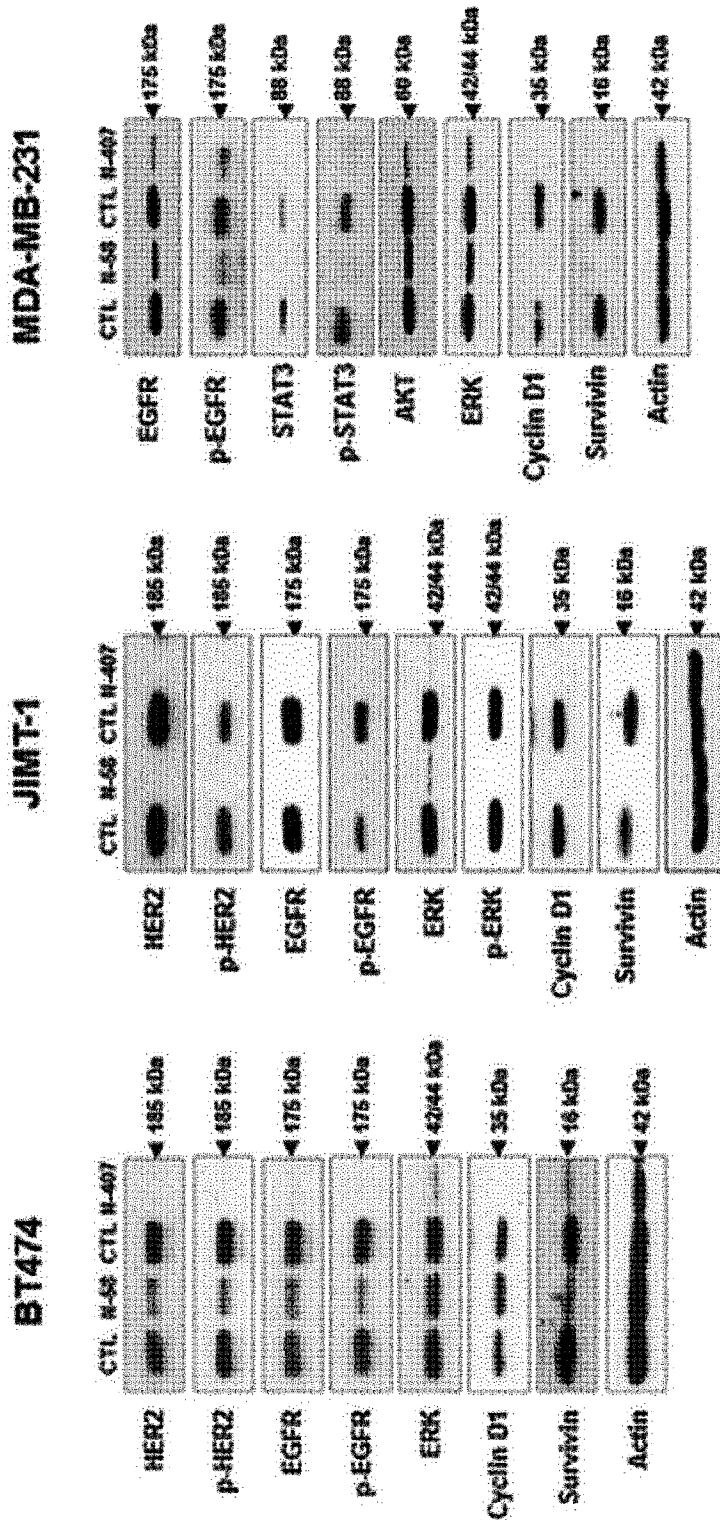
[도 4]



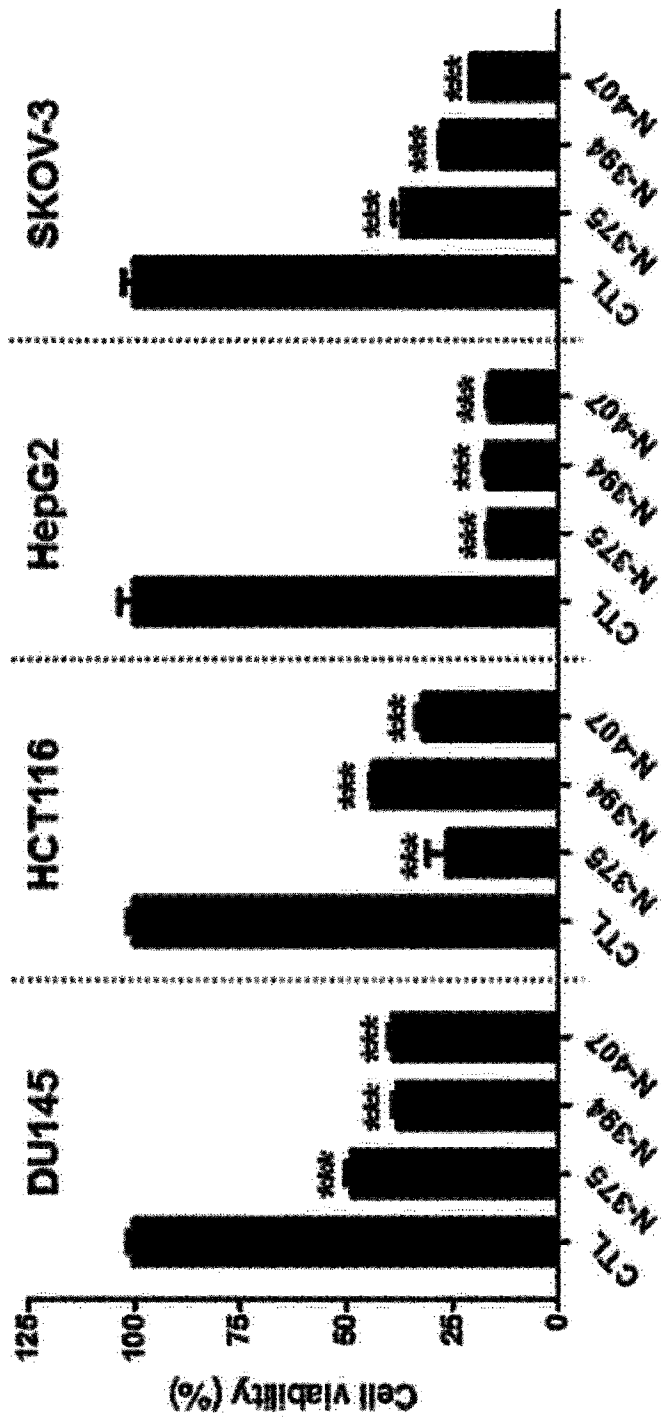
[도5]



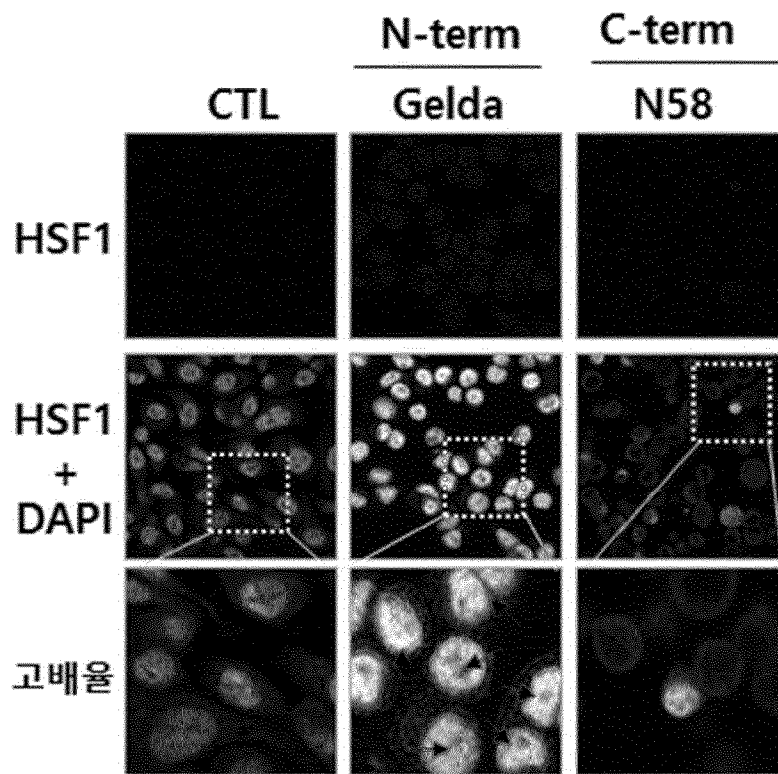
[도6]



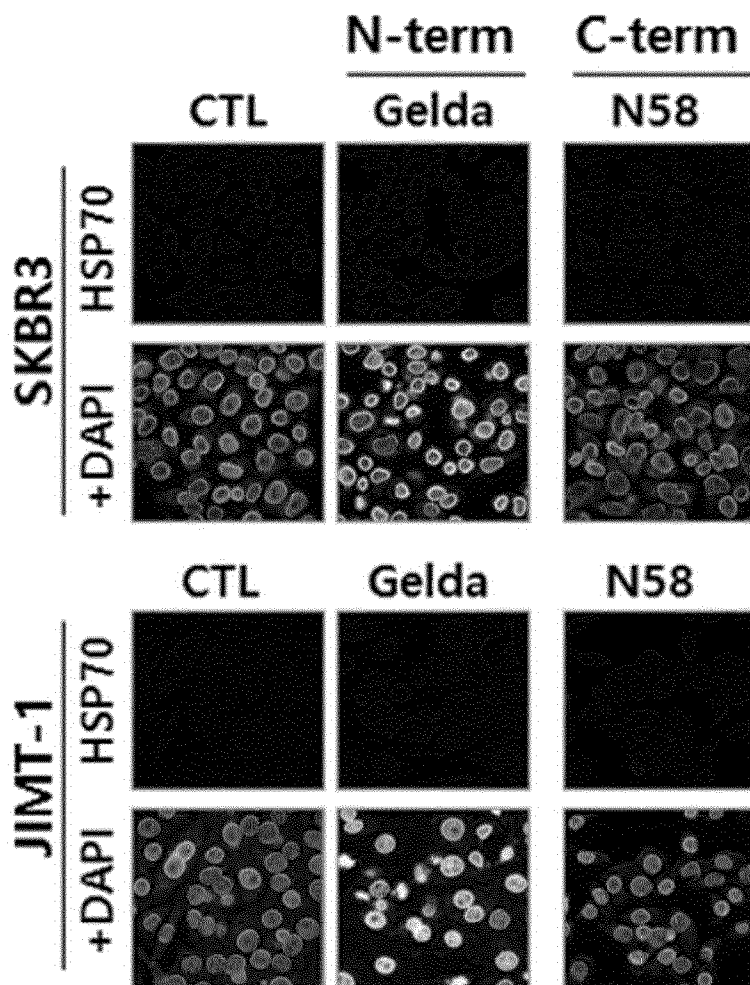
[도7]



[도8]



[도9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/010731

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 311/58(2006.01)i, A61K 31/352(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 311/58; A61K 31/35; C07D 311/64; C07D 493/04; C07D 493/14; A61K 31/352; A61P 35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, Caplus), Google & Keywords: 3,4-dialkoxyphenyl-chromene-6-carboxamide, breast cancer, Heat shock protein 90 inhibitor

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2012-0079274 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 12 July 2012 See claims 8, 10-11, 13-15; paragraph [0029]; and page 22.	1-10
X	US 2016-0340331 A1 (SNU R&DB FOUNDATION) 24 November 2016 See claims 1, 9-10; and paragraph [0617].	1-10
X	WO 02-20008 A1 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 14 March 2002 See claims 1, 12; figure 3; and figure 5A, compound 56.	1-10
A	Chemical Abstract Compound. STN express. RN 2196359-00-7 (Entered STN: 22 March 2018), RN 1388497-29-7 (Entered STN: 09 August 2012), RN 1380769-17-4 (Entered STN: 03 July 2012) See compound.	1-10
PX	KIM, H. S. et al. Investigation of B,C-ring truncated deguelin derivatives as heat shock protein 90 (HSP90) inhibitors for use as anti-breast cancer agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry. [Published online] 20 February 2019, vol. 27, no. 7, pages 1370-1381 See abstract; and formula 1, compound 9.	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 DECEMBER 2019 (04.12.2019)

Date of mailing of the international search report

04 DECEMBER 2019 (04.12.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/010731

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0079274 A	12/07/2012	KR 10-1414722 B1	04/07/2014
US 2016-0340331 A1	24/11/2016	EP 2871187 A1	13/05/2015
		EP 2871187 A4	23/09/2015
		EP 2871187 B1	20/09/2017
		US 2015-0183797 A1	02/07/2015
		US 9745280 B2	29/08/2017
		WO 2014-007412 A1	09/01/2014
WO 02-20008 A1	14/03/2002	AU 8889901 A	22/03/2002
		US 2004-0034239 A1	19/02/2004
		US 7410998 B2	12/08/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07D 311/58(2006.01)i, A61K 31/352(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07D 311/58; A61K 31/35; C07D 311/64; C07D 493/04; C07D 493/14; A61K 31/352; A61P 35/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN (Registry, Caplus), Google & 키워드: 3,4-dialkoxyphenyl-chromene-6-carboxamide, 유방암 (breast cancer), HSP90 저해제 (Heat shock protein 90 inhibitor),

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2012-0079274 A (서울대학교산학협력단) 2012.07.12 청구항 8, 10-11, 13-15; 단락 [0029]; 및 페이지 22 참조.	1-10
X	US 2016-0340331 A1 (SNU R&DB FOUNDATION) 2016.11.24 청구항 1, 9-10; 및 단락 [0617] 참조.	1-10
X	WO 02-20008 A1 (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE) 2002.03.14 청구항 1, 12; 도면 3; 및 도면 5A, 화합물 56 참조.	1-10
A	Chemical Abstract Compound, STN express. RN 2196359-00-7 (Entered STN: 2018.03.22), RN 1388497-29-7 (Entered STN:2012.08.09), RN 1380769-17-4 (Entered STN: 2012.07.03) 화합물 참조.	1-10
PX	KIM, H. S. 등, "Investigation of B,C-ring truncated deguelin derivatives as heat shock protein 90 (HSP90) inhibitors for use as anti-breast cancer agents", Bioorganic & Medicinal Chemistry, [온라인 공개] 2019.02.20, 제27권, 제7호, 페이지 1370-1381 초록; 및 도식 1, 화합물 9 참조.	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 12월 04일 (04.12.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 12월 04일 (04.12.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



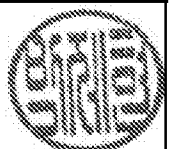
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박제현

전화번호 +82-42-481-3349



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0079274 A	2012/07/12	KR 10-1414722 B1	2014/07/04
US 2016-0340331 A1	2016/11/24	EP 2871187 A1	2015/05/13
		EP 2871187 A4	2015/09/23
		EP 2871187 B1	2017/09/20
		US 2015-0183797 A1	2015/07/02
		US 9745280 B2	2017/08/29
		WO 2014-007412 A1	2014/01/09
WO 02-20008 A1	2002/03/14	AU 8889901 A	2002/03/22
		US 2004-0034239 A1	2004/02/19
		US 7410998 B2	2008/08/12