



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0045781
(43) 공개일자 2018년05월04일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 31/519 (2006.01) A61K 31/36 (2006.01)
 C07D 317/46 (2006.01) C07D 487/04 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 A61K 31/519 (2013.01)
 A61K 31/36 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2017-0092983
 (22) 출원일자 2017년07월21일
 심사청구일자 2017년07월21일</p> <p>(30) 우선권주장
 1020160140260 2016년10월26일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
 울산과학기술원
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50</p> <p>(72) 발명자
 강병현
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
 박혜경
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 유미특허법인</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 8 항

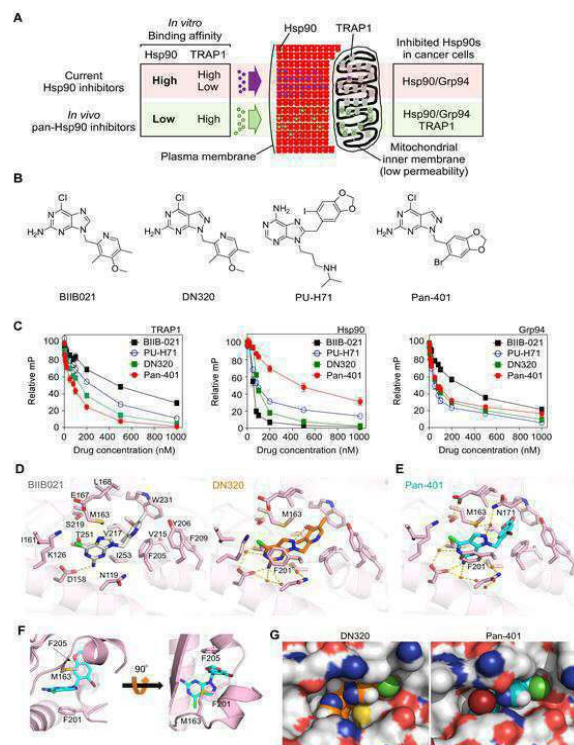
(54) 발명의 명칭 **TRAP1 저해제로서 유용한 화합물 및 이를 포함하는 항암용 조성물**

(57) 요약

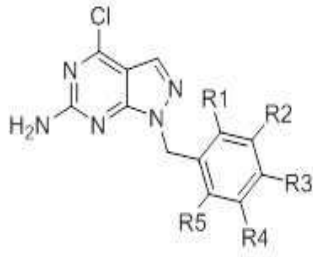
본 발명은 열 충격 단백질(heat shock protein) Hsp90 및 TRAP1과 같은 Hsp90 상동단백질을 동시에 저해하는 화합물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 하기 화학식 I의 구조를 갖는 Hsp90 및 이의 상동단백질 저해제로서 유용한 화합물 및 이를 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다:

(뒷면에 계속)

대표도 - 도6



[화학식 I]



(52) CPC특허분류

C07D 317/46 (2013.01)

C07D 487/04 (2013.01)

(72) 발명자

이창욱

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

강수성

인천광역시 연수구 원인재로 180, 204동 2303호 (연수동, 연수우성2차아파트)

이지훈

서울특별시 용산구 우사단로10라길 17-14(한남동)

홍기범

대구광역시 수성구 고산로 50, 236동 305호(신매동, 신매태성맨션)

김다롱

대구광역시 수성구 노변공원로 22, 105동 902호(시지동, 노변동서우방타운)

이원석

서울특별시 마포구 마포대로24길 16, 109동 403호(아현동, 공덕자이 아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 9991005878

부처명 범부처사업

연구관리전문기관 (재)범부처신약개발사업단

연구사업명 범부처전주기신약개발

연구과제명 미토콘드리아 TRAP1을 약물타겟으로 하는 항암 선도물질 개발

기 여 율 1/1

주관기관 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2014.02.25 ~ 2014.12.31

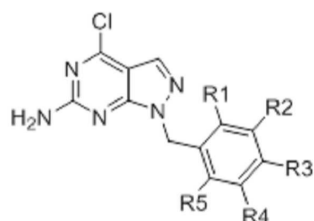
명세서

청구범위

청구항 1

TRAP1 억제 활성을 나타내는, 하기 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 I]



상기 식에서, R1, R2, R3, R4 및 R5는 독립적으로, H, 할로(Halo), C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, 시아노, OR6, SR6 또는 NHR6이거나,

R1, R4 및 R5는 독립적으로, H, 할로(Halo), C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, 시아노, OR, SR 또는 NHR이고, R2 및 R3는 함께 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 또는 2의 헤테로원자를 포함하는 4원 내지 7원의 헤테로사이클을 형성할 수 있고;

R6는 H 또는 C₁₋₆ 알킬이며,

상기 C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐은 선택적으로 할로 또는 C₁₋₆ 알킬로 치환될 수 있다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 R1, R2, R3, R4 및 R5는 독립적으로, H, F, Cl, Br, I, C₁₋₄ 알킬, C₂₋₄ 알케닐, 시아노, OR, SR 또는 NHR이거나, R1, R4 및 R5는 독립적으로, H, F, Cl, Br, I, C₁₋₄ 알킬, C₂₋₄ 알케닐, 시아노, OR6, SR6 또는 NHR6이고, R2 및 R3는 함께 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 또는 2의 헤테로원자를 포함하는 5원 또는 6원의 헤테로사이클을 형성할 수 있고;

상기 R6는 H 또는 C₁₋₄ 알킬이고;

상기 C₁₋₄ 알킬 또는 C₂₋₄ 알케닐은 F, Cl, Br, 또는 메틸로 선택적으로 치환될 수 있는 것인, 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 R1, R2, R3, R4 및 R5는 독립적으로, H, F, Cl, Br, I, 메틸, 에틸, 프로필, 에테닐, 시아노, OCH₃, OCF₃, SCH₃ 또는 NH₂이거나, R1, R4 및 R5는 독립적으로, H, F, Cl, Br, I, 메틸, 에틸, 프로필, 에테닐, 시아노, OCH₃, OCF₃, SCH₃ 또는 NH₂이고, R2 및 R3는 함께 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 또는 2의 헤테로원자를 포함하는 5원 또는 6원의 헤테로사이클을 형성할 수 있는 것인, 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 화학식 I의 화합물은 하기 화합물들로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

- (1) 1-((6-브로모벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)메틸)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (Pan-401);
- (2) 1-벤질-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (N200219-1);
- (3) 1-(벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일메틸)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN200263-1);
- (4) 4-클로로-1-(3,4-디클로로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN200318-1);
- (5) 4-클로로-1-((6-클로로벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)메틸)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN202782-1);
- (6) 4-클로로-1-((6-아이오도벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)메틸)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN202961-1);
- (7) 4-클로로-1-((6-메틸벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)메틸)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203143-1);
- (8) 4-클로로-1-(3-메톡시벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203372-1);
- (9) 4-클로로-1-(3-메틸벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203373-1);
- (10) 1-(4-브로모벤질)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203374-1);
- (11) 4-클로로-1-(4-클로로-3-플루오로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203375-1);
- (12) 1-(2-브로모-5-메톡시벤질)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203376-1);
- (13) 1-(2-브로모벤질)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203377-1);
- (14) 4-클로로-1-(2-클로로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203378-1);
- (15) 4-클로로-1-(3,4-디플루오로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203379-1);
- (16) 4-클로로-1-(4-비닐벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203381-1);
- (17) 3-((6-아미노-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-yl)메틸)벤조나이트릴 (DN203487-1);
- (18) 4-클로로-1-(4-(트리플루오로메틸)벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203488-1);
- (19) 4-클로로-1-(2,6-디플루오로-3-메톡시벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203489-1);
- (20) 4-클로로-1-(2-클로로-4-플루오로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203490-1);
- (21) 4-클로로-1-(4-메틸벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203491-1);
- (22) 4-클로로-1-(2-메톡시-4-(트리플루오로메틸)벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203492-1);
- (23) 4-클로로-1-(4-(트리플루오로메톡시)벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203493-1);
- (24) 1-(2-브로모-3-플루오로벤질)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203494-1);
- (25) 1-(4-브로모-2-플루오로벤질)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203495-1);
- (26) 4-클로로-1-(5-플루오로-2-메톡시벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203633-1);
- (27) 4-클로로-1-(2-플루오로-5-메틸벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203634-1); 및
- (28) 4-클로로-1-(4-(메틸티오)벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203635-1).

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염과 함께 약학적으로 허용가능한

첨가제를 더 포함하는 것인, 항암제 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 암은 TRAP1의 활성과 관련된 암인 것인, 항암제 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 암은 유방암, 난소암, 자궁경부암, 전립선암 및 간암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것인, 항암제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 열 충격 단백질(heat shock protein) Hsp90 및 이의 상동 단백질을 저해하는 화합물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 모든 Hsp90 상동 단백질 (Hsp90, TRAP1, Grp94), 특히 TRAP1을 동시에 억제하는 저해제로서 유용한 화합물 및 이를 포함하는 항암용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

90kDa의 열 충격 단백질(Hsp90)은 세포 내에서 이들의 클라이언트 단백질이라 불리는 불안정 상태 단백질의 안정성 및 활성을 조절하는 ATP-driven 분자 샤페론으로 악성종양으로 발달해 가는 과정에서 과발현된다(Karagoz and Rudiger, 2015, Hsp90 interaction with clients. Trends in biochemical sciences 40, 117-125; Lee, 2014, Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. Nature reviews Cancer 14, 263-276). 이들의 클라이언트 단백질들은 종양생성의 다단계 과정 내에 관여하는 다양한 발암유발단백질을 포함하고, 항암제 개발에 대하여 가장 활발하게 조사되고 있는 단백질 중의 하나로 Hsp90이 있다(Neckers, L., and Workman, P. (2012). Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 18, 64-76; Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G., and Neckers, L. (2010). Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. Nat Rev Cancer 10, 537-549; Whitesell, L., and Lindquist, S. L. (2005). HSP90 and the chaperoning of cancer. Nature reviews Cancer 5, 761-772). 많은 Hsp90 억제제들이 이미 Hsp90-샤페론의 다중 종양 생성 시그널 경로를 손상시키기 위해 개발되어왔고, 이들중 몇몇은 이미 암의 치료제로서 임상 시험 중에 있다(Neckers, L., and Trepel, J. B. (2014). Stressing the development of small molecules targeting HSP90. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 20, 275-277).

[0003]

94 kDa의 글루코오스-조절 단백질(glucose-regulated protein, Grp94) 및 TNF 수용체 관련 단백질 1 (TRAP1)은 세포소기관, 소포체, 및 미토콘드리아 내에서 발견된 Hsp90 상동 단백질이다(Chen, B., Piel, W. H., Gui, L., Bruford, E., and Monteiro, A. (2005). The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. Genomics 86, 627-637). 상기 세포소기관 상동 단백질은 세포질 Hsp90와 유사한 구조를 가지며, 특히 N-말단 도메인(NTD)에 위치하고 있는 ATP 결합 포켓은 더욱 큰 유사성을가지고 있다.(Dollins, D. E., Warren, J. J., Immormino, R. M., and Gewirth, D. T. (2007). Structures of GRP94-nucleotide complexes reveal mechanistic differences between the hsp90 chaperones. Mol Cell 28, 41-56; Lavery, L. A., Partridge, J. R., Ramelot, T. A., Elnatan, D., Kennedy, M. A., and Agard, D. A. (2014). Structural asymmetry in the closed state of mitochondrial Hsp90 (TRAP1) supports a two-step ATP hydrolysis mechanism. Mol Cell 53, 330-343; Lee, C., Park, H. K., Jeong, H., Lim, J., Lee, A. J., Cheon, K. Y., Kim, C. S., Thomas, A. P., Bae, B., Kim, N. D., et al. (2015). Development of a Mitochondria-Targeted Hsp90 Inhibitor Based on the Crystal Structures of Human TRAP1. Journal of the American Chemical Society 137, 4358-4367). 따라서, Hsp90 NTD의 ATP 포켓을 표적화하는 저해제들은 인 비트로에서 Grp94 및 TRAP1에 대한 저해 활성을 가질 수 있고, 따라서, 이들은 종종 판-Hsp90 패밀리 단백질 저해제로 불린다 Kang, B. H., and Altieri, D. C. (2009). Compartmentalized cancer drug discovery targeting mitochondrial Hsp90 chaperones. Oncogene 28, 3681-3688; Patel, P. D., Yan, P., Seidler, P. M., Patel, H. J., Sun, W., Yang, C., Que, N. S., Taldone, T., Finotti, P., Stephani, R. A., et al. (2013). Paralog-selective Hsp90 inhibitors define tumor-specific regulation of HER2. Nat Chem Biol 9, 677-

684.). 그러나, 본 발명자들은 최근 판-Hsp90 저해제들은 이러한 약물들의 비효율적인 미토콘드리아 내의 축적 때문에, 미토콘드리아 저항성의 TRAP1을 불활성화하지 못하는 것을 확인하였다. (Kang, B. H., Plescia, J., Song, H. Y., Meli, M., Colombo, G., Beebe, K., Scroggins, B., Neckers, L., and Altieri, D. C. (2009). Combinatorial drug design targeting multiple cancer signaling networks controlled by mitochondrial Hsp90. *J Clin Invest* 119, 454-464; Lee, C., Park, H. K., Jeong, H., Lim, J., Lee, A. J., Cheon, K. Y., Kim, C. S., Thomas, A. P., Bae, B., Kim, N. D., *et al.* (2015). Development of a Mitochondria-Targeted Hsp90 Inhibitor Based on the Crystal Structures of Human TRAP1. *Journal of the American Chemical Society* 137, 4358-4367). 따라서, 기존 Hsp90 저해제들의 세포독성효과는 세포질 및 ER에 위치한 Hsp90 패밀리 단백질의 불활성화에 기원하는 것으로 예상된다.

[0005] 본 발명자들은 서로 다른 세포소기관에 위치한 모든 Hsp90 패밀리 단백질들을 동시에 불활성화할 때 증강된 세포독성 활성을 나타냄을 확인하였다. 나아가, 이는 심지어 기존 Hsp90 저해제가 가지고 있는 문제점으로 제시된 Hsp70의 증가와 같은 열 충격 반응의 유도를 억제함을 확인하였다. 이러한 데이터는 Hsp90 저해제의 항암활성이 미토콘드리아 투과성을 높인 저해제의 개발에 의해 현저하게 개선될 수 있다는 것을 나타낸다. 따라서, 본 발명자들은 소분자 미토콘드리아 투과성 Hsp90 저해제의 개발에 예의 노력한 결과, 인비보에서 Hsp90 상동단백질들을 동시에 억제할 수 있는 저해제인, 판보티닙-401(panvotinib-401 (Pan-401) 및 이의 유사체들을 개발하였고, 이는 미토콘드리아에 투과가능하고 인 비보에서 세포질, ER, 미토콘드리아에 존재하는 Hsp90 상동단백질 모두, 특히 TRAP1를 비활성화시킬 수 있어 종래 Hsp90 저해제들에 비해 탁월하게 암-선택적 세포독성 활성을 증강시킴을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

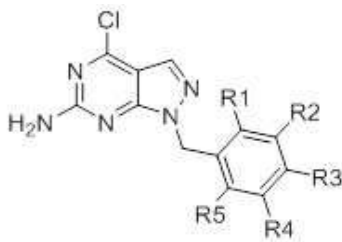
[0006] 본 발명은 상기한 문제점들을 해결하기 위한 것으로, 종양세포에서 증가하는 Hsp90 및 Hsp90 상동단백질, 바람직하게 TRAP1에 대한 억제 활성을 나타내는 신규한 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 Hsp90 상동단백질 및 Hsp90 상동단백질, 바람직하게 TRAP1에 대한 억제 활성을 나타내는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 항암용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 Hsp90 및 이의 상동단백질 억제 활성을 나타내는, 하기 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다:

[0009] [화학식 I]



[0010]

[0011] 상기 식에서, R1, R2, R3, R4 및 R5는 독립적으로, H, 할로(Halo), C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, 시아노, OR6, SR6 또는 NHR6이거나,

[0012] R1, R4 및 R5는 독립적으로, H, 할로(Halo), C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐, 시아노, OR, SR 또는 NHR이고, R2 및 R3는 함께 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 또는 2의 헤테로원자를 포함하는 4원 내지 7원의 헤테로사이클을 형성할 수 있고;

[0013] R6는 H 또는 C₁₋₆ 알킬이며,

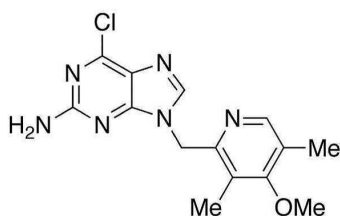
- [0014] 상기 C₁₋₆ 알킬, C₂₋₆ 알케닐은 선택적으로 할로 또는 C₁₋₆ 알킬로 치환될 수 있다.
- [0015] 바람직하게, 상기 R1, R2, R3, R4 및 R5는 독립적으로, H, F, Cl, Br, I, C₁₋₄ 알킬, C₂₋₄ 알케닐, 시아노, OR, SR 또는 NHR이거나,
- [0016] R1, R4 및 R5는 독립적으로, H, F, Cl, Br, I, C₁₋₄ 알킬, C₂₋₄ 알케닐, 시아노, OR, SR 또는 NHR이고, R2 및 R3는 함께 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 또는 2의 헤테로원자를 포함하는 5원 또는 6원의 헤테로사이클을 형성할 수 있고;
- [0017] 상기 R6는 H 또는 C₁₋₄ 알킬이고;
- [0018] 상기 C₁₋₄ 알킬 또는 C₂₋₄ 알케닐은 F, Cl, Br, 또는 메틸로 선택적으로 치환될 수 있다..
- [0019] 더욱 바람직하게, 상기 R1, R2, R3, R4 및 R5는 독립적으로, H, F, Cl, Br, I, 메틸, 에틸, 프로필, 에테닐, 시아노, OCH₃, OCF₃, SCH₃ 또는 NH₂이거나,
- [0020] R1, R4 및 R5는 독립적으로, H, F, Cl, Br, I, 메틸, 에틸, 프로필, 에테닐, 시아노, OCH₃, OCF₃, SCH₃ 또는 NH₂이고, R2 및 R3는 함께 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 또는 2의 헤테로원자를 포함하는 5원 또는 6원의 헤테로사이클을 형성할 수 있다.
- [0021] 더욱 바람직한 양태에서, 본 발명은 하기 구체적인 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 화합물일 수 있다:
- [0022] (1) 1-((6-브로모벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)메틸)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (Pan-401);
- [0023] (2) 1-벤질-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN200219-1);
- [0024] (3) 1-(벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일메틸)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN200263-1);
- [0025] (4) 4-클로로-1-(3,4-디클로로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN200318-1);
- [0026] (5) 4-클로로-1-((6-클로로벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)메틸)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN202782-1);
- [0027] (6) 4-클로로-1-((6-아이오도벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)메틸)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN202961-1);
- [0028] (7) 4-클로로-1-((6-메틸벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)메틸)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203143-1);
- [0029] (8) 4-클로로-1-(3-메톡시벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203372-1);
- [0030] (9) 4-클로로-1-(3-메틸벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203373-1);
- [0031] (10) 1-(4-브로모벤질)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203374-1);
- [0032] (11) 4-클로로-1-(4-클로로-3-플루오로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203375-1);
- [0033] (12) 1-(2-브로모-5-메톡시벤질)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203376-1);
- [0034] (13) 1-(2-브로모벤질)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203377-1);
- [0035] (14) 4-클로로-1-(2-클로로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203378-1);
- [0036] (15) 4-클로로-1-(3,4-디플루오로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203379-1);
- [0037] (16) 4-클로로-1-(4-비닐벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203381-1);
- [0038] (17) 3-((6-아미노-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)메틸)벤조나이트릴 (DN203487-1);
- [0039] (18) 4-클로로-1-(4-(트리플루오로메틸)벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203488-1);
- [0040] (19) 4-클로로-1-(2,6-디플루오로-3-메톡시벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203489-1);
- [0041] (20) 4-클로로-1-(2-클로로-4-플루오로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203490-1);

- [0042] (21) 4-클로로-1-(4-메틸벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203491-1);
- [0043] (22) 4-클로로-1-(2-메톡시-4-(트리플루오로메틸)벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203492-1);
- [0044] (23) 4-클로로-1-(4-(트리플루오로메톡시)벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203493-1);
- [0045] (24) 1-(2-브로모-3-플루오로벤질)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203494-1);
- [0046] (25) 1-(4-브로모-2-플루오로벤질)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203495-1);
- [0047] (26) 4-클로로-1-(5-플루오로-2-메톡시벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203633-1);
- [0048] (27) 4-클로로-1-(2-플루오로-5-메틸벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203634-1); 및
- [0049] (28) 4-클로로-1-(4-(메틸티오)벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203635-1).

[0051] 본 발명에서, 상기 용어 "약학적으로 허용가능한 염"이란 이 분야에서 일반적으로 사용되고 있는 염 화합물 형태를 의미하며, 산 부가염 또는 염기 부가염일 수 있다. 구체적으로, 화학식 I에 따른 화합물의 약학적으로 허용가능한 염의 예로는, 염산, 브롬산, 인산 또는 황산과 같은 무기산과의 염; 아세트산, 트리플루오로아세트산, 구연산, 말레인산, 수산, 호박산, 벤조산, 주석산, 푸마르산, 만델산, 아스코르브산 또는 말산과 같은 유기 카르복실산이나, 메탄설폰산 또는 파라-톨루엔설폰산과 같은 설폰산과의 염; 나트륨, 칼륨 또는 리튬과 같은 알칼리 금속과의 염; 혹은 기타 약제학적으로 허용 가능한 염을 형성할 수 있는 것으로 알려진 다양한 산과의 염 등을 들 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

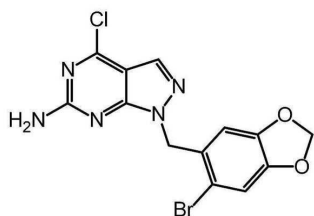
[0052] 구체적인 일 실시 양태에서, 본 발명자들은 퓨린 스캐폴드를 갖는 하기 화학식 II의 구조를 갖는 BIIB-021(6-클로로-9-[(4-메톡시-3,5-디메틸-2-피리딘일)메틸]-9H-퓨린-2-아민; CAS No. 848695-25-0)로부터 본 발명에 따른 화학식 Ia의 구조를 갖는 판보티닙(Pan-401) 화합물 등을 비롯한 다수의 화합물(화합물 1 내지 28)을 제조하였다.

[0053] [화학식 II]



[0054]

[0056] [화학식 Ia]



Pan-401

[0057]

[0058] 분자 샤페론(molecular chaperone)인 Hsp90은 암세포를 작동하게 하는 기구(machinery)의 핵심 구성요소로서, 암세포의 성장과 생존을 촉진하는 여러 가지 돌연변이성 또는 과다발현성 신호전달 단백질이 기능을 발휘하는데 필요하다. 이는 Hsp90 저해제가 상당히 다양한 암에 대하여 효과를 가질 수 있음을 의미한다. 더욱이 Hsp90은 종양세포에서 특이적으로 활성화될 뿐 아니라 고친화적 형태로 존재하므로, 상기 화학식 I의 화합물과 같은 Hsp90 및 TRAP1과 같은 Hsp90 상동단백질 저해제는 종양세포에 대해 높은 선택성을 나타낼 수 있다.

[0059] 특히, 본 발명에 따른 화학식 I의 화합물은 종래 알려진 BIIB-021이나 PU-H71과 같은 퓨린 스캐폴드 억제제와는

달리 피라졸로피리미딘 스캐폴드를 가지면서 이러한 피라졸로피리미딘 환의 1번 위치의 N에 연결된 치환기가 브로모벤조디옥솔이라는 구조적인 특징을 가짐으로 인해, 미토콘드리아를 투과하여 TRAP1을 효과적으로 억제할 수 있고, 동시에 Hsp90 단백질 및 Grp94를 억제함으로써, in vivo pan-Hsp90 저해제 활성을 가짐. 이로 인해 탁월한 항암 활성을 나타낼 수 있으며, 특히, Hsp90 저해제의 가장 큰 단점으로 제시된 열 충격 인자 1(heat shock factor 1, HSF1)의 활성화를 수반하지 않는다.

[0060]

또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 I의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 암 치료용 (더 넓은 의미로는 예방용) 약제, 즉 항암제 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 항암제 조성물은 모든 종류의 암세포의 Hsp90를 타겟으로 할 수 있고, 구체적으로 암종은 이에 제한되는 것은 아니나, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 간암, 폐암, 혈액암, 뇌종양, 및 전립선암으로 이루어진 군에서 선택되는 암일 수 있다. 본 발명의 항암제 조성물은 활성 성분으로서 본 발명의 화합물 또는 약학적으로 허용가능한 이들의 염을 치료학적으로 유효한 양만큼 함유하고, 1종 이상의 무기 또는 유기 고체 또는 액상의 약학적으로 허용가능한 첨가제를 포함하거나 혼합하는 혼합물이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 포유동물(특히, 인간)에게 경구 또는 비경구(예를 들어, 근육 내 또는 정맥 내 주사)로 투여할 수 있다. 활성 성분의 투여량 및 투여횟수는 포유동물의 종, 체중, 연령 및 개개의 상태에 따라 달라진다. 본 발명의 화합물 또는 제약상 허용가능한 이들의 염을 포유동물, 예를 들어 대략 70kg 체중의 인간에게 투여할 때, 1인당 1일 투여량은 바람직하게는 대략 1000mg 내지 대략 7 g이다. 본 발명의 항암제 조성물은 활성 성분(본 발명의 화합물)을 대략 95% 내지 대략 99.9% 포함한다. 본 발명에 따른 제약 조성물은 앰플, 바이알, 좌제, 당제, 정제 또는 캡슐제 형태 등 과 같은 단위 투여 형태일 수 있다. 본 발명의 항암제는 공지된 방식인 통상적인 용해, 동결건조, 혼합, 과립화 또는 당제화 공정 등을 통해 제조될 수 있고, 시판되는 것을 구입해서 사용할 수도 있다. 본 발명의 항암제에 포함되는 첨가제로, 예를 들어, 부형제, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 가용화제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충액, 결합제, 희석제, 활택제 등을 포함할 수 있다. 본 발명의 항암제 조성물이 주사 형태로 제형화되는 경우, 멸균 조건하에서 통상적인 방식으로 제조될 수 있으며, 상기 조성물을 앰플 또는 바이알에 도입하고 용기를 밀폐할 때에도 통상적인 방법을 사용할 수 있다. 본 발명의 항암제 조성물이 경구 투여용으로 제형화되는 경우, 정제는 활성 성분을 고체 담체와 배합하고, 필요하다면 생성된 혼합물을 과립화하며, 필요에 따라서는 적절한 부형제를 첨가한 후에 상기 혼합물을 가공하여 제조할 수 있다. 본 발명의 경구 투여용 항암제로서 캡슐제는 젤라틴으로 제조된 건조-충진된 캡슐제 및 젤라틴과 가소제(예를 들어, 글리세롤 또는 소르비톨)로 제조된 연질 밀봉된 것을 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0061]

이상과 같이, 본 발명에 따른 화학식 I의 화합물은 Hsp90 패밀리 단백질들에 대한 최적화된 활성으로 인해 미토콘드리아에 대한 효과적인 투과능을 가져, TRAP1과 같은 Hsp90 패밀리 단백질의 세포질, 소포체, 및 미토콘드리아 풀 모두를 불활성화 시켜 억제할 수 있어, 종래의 Hsp90 저해제들에 비해 새로운 기전으로 작용하면서 탁월한 암-선택적 세포 독성 활성을 증강시켜 항암제로서 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0062]

도 1은 Hsp90 억제제와 TRAP1 억제제인 개미트리닙을 병용한 경우의 인간 암 세포주에서의 상승 효과를 확인한 데이터이다.

도 2는 DMAG와 개미트리닙간의 병용요법 기전 및 인비보효능을 분석한 결과이다.

도 3는 약물의 병용 투여가 DMAG에 의해 유도된 생존신호인 HSF1을 칼시뉴린 효소를 활성화하여 억제한다는 것을 확인한 도면이다.

도 4는 약물병용투여가 세포질의 칼슘농도를 높이고 미토콘드리아가 조각나도록 함을 확인한 결과이다.

도 5는 약물병용투여가 Hsp90 client의 발현 감소 및 미토콘드리아 기능교란으로 암세포를 효과적으로 죽임을 보여주는 결과이다.

도 6는 판보티닙의 작용기전 및 화학구조식과 인비트로에서의 활성을 제시한 결과이다.

도 7은 유사 저해물질과 TRAP1 및 Hsp90간의 결합구조를 나타낸 도면이다.

도 8은 판보티닙의 작용기전이 Hsp90 저해제와 TRAP1 저해제를 병용처리하였을때와 동일함을 규명한 결과이다.

도 9은 인비보에서의 판보티넵 활성을 규명한 결과이다.

도 10은 인비보에서 종양 및 정상조직에 대한 Pan-401(화학식 Ia의 화합물 1)의 효과분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 내용을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하고자 하나, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

본 실시예에서 사용되는 약어는 다음과 같다

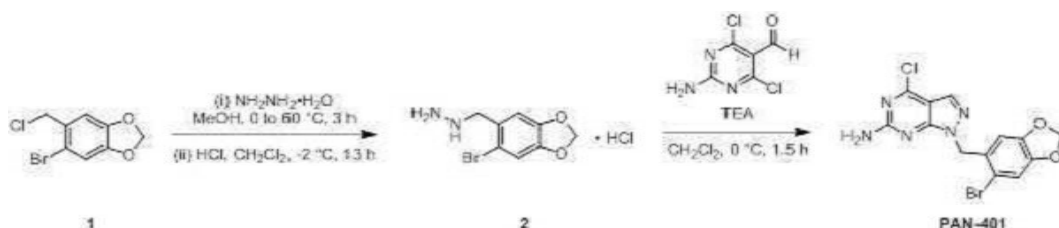
- [0065] CNB, calcineurin regulatory subunit B;
- [0066] CypD, cyclophilin D;
- [0067] DMAG, 17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin;
- [0068] ER, endoplasmic reticulum;
- [0069] Drp1, dynamin-related protein 1;
- [0070] GAPDH, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase;
- [0071] Grp94, 94 kDa glucose-regulated protein;
- [0072] HSF1, heat shock factor 1;
- [0073] Hsp90, 90 kDa heat shock protein;
- [0074] MTT, 3(4,5-dimethyl-thiazolyl-2-yl)2,5 diphenyltetrazolium bromide;
- [0075] NTD, N-terminal domain;
- [0076] RyR, ryanodine receptor;
- [0077] SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis;
- [0078] TPP, triphenylphosphonium;
- [0079] TRAP1, tumor necrosis factor receptor-associated protein 1;
- [0080] TRAP1-NM, C-terminal deleted TRAP1;
- [0081] CNB, calcineurin regulatory subunit B.

제조예 1: Pan-40 (화학식 Ia, 화합물 1)화합물의 제조

1-1) Hsp90 inhibitor의 준비

PU-H71, BIIB021, 17-AAG, AUY922, 및 17-DMAG는 Tocris, Toronto Research Chemicals, 또는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다. DN320는 W02005028434에 개시된 방법에 따라 제조하였다.

1-2) Pan-401 합성을 위한 Scheme 및 실험 공정



[0090] (1) ((6-브로모벤조[d][1.2]다이옥솔-5-일)메틸)하이드라진 하이드로클로라이드 의 제조

[0091] Hydrazine monohydrate (6.33 mL, 130 mmol)를 5-bromo-6-(chloromethyl)benzo[d][1,3]dioxole (1) (2.5 g, 130 mmol)의 메탄올 용액(40 mL) 내에 부가하였고, 이를 0° C에서 30분간 교반하였다. 제조된 혼합물은 60° C 까지 가열한 후 같은 온도에서 2.5 시간 동안 교반하였다. 이후, 상기 혼합물들을 상온으로 냉각시키고, 물 24mL를 부가하였다. 용매를 감압하에서 약 55 mL 까지 증발시키고, 수득한 잔사에 2 N NaOH (aq. 160 mL)를 부가하였다. 이에 CH₂Cl₂을 첨가하여 유기 물질 층을 분리하였고, 이를 Na₂SO₄ 에서 건조시키고, 여과한 후 감압 하에서 농축시켰다. 결과적으로 생산된 잔사는 CH₂Cl₂ (100 mL)에 용해시키고, 이를 -2° C로 냉각시켰다. 순차 적으로 디옥산 내의 4 N HCl (38 mL, 150 mmol)를 용액에 부가하고, 그 혼합물을 -2° C에서 13 시간동안 교반하였다. 생성된 침전물을 여과로 수집하고, CH₂Cl₂, 이소프로필에테르(isopropyl ether), 및 CH₂Cl₂ 로 세척하였고 마지막으로 건조시켜 ((6-브로모벤조[d][1.2]다이옥솔-5-y)메틸)하이드라진 하이드로클로라이드(2) 를 흰색 고체로 수득하였다(2.3 g, 82%).

[0092] ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 7.21 (s, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.07 (s, 2H), 5.74 (br, 3H), 4.03 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, d₆-DMSO) 148.3, 147.6, 128.2, 114.2, 112.9, 110.7, 102.6, 52.9; MS (ESI, m/z) calculated for C₈H₁₀BrN₂O₂ [M+1]⁺ 246.08, found 246.50.

[0093] (2) 1-((6-브로모벤조[d][1.2]다이옥솔-5-일)메틸)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (Pan-401)의 제조

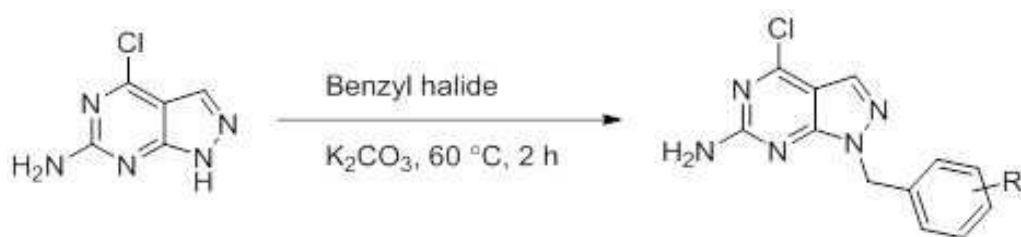
[0094] CH₂Cl₂ (3.0 mL)에 녹아있는 트리에틸아민 용액A solution (1.2 mL, 8.4 mmol)을 ((6-브로모벤조[d][1.2]다이옥솔-5-일)메틸)하이드라진 하이드로클로라이드 (2) (0.8 g, 2.5 mmol) 및 CH₂Cl₂ (10 mL) 중의 2-amino-4,6-dichloropyrimidien-5-carbaldehyde (0.4 g, 2.1 mmol) 혼합용액에 0° C 에서 약 15분 동안 적가하였다. 생성 되는 혼합물을 1.5 시간동안 0° C에서 교반하였다. 반응 후에, 0.2 N HCl (aq)를 상기 혼합물에 붓고, 이 혼합 물을 CH₂Cl₂ (×3)로 추출하였다. 결합된 유기층을 브라인으로 세척하고 이후 MgSO₄로 건조하였다. 생산된 잔사는 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 정제하였고(CH₂Cl₂ to 1:4 EtOAc/CH₂Cl₂) 그 결과 목적 화합물인 Pan-401 를 흰색 고체로 수득하였다(0.79 g, 99%).

[0095] ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ 8.04 (s, 1H), 7.39 (s, 2H), 7.25 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.04 (s, 2H), 5.32 (s, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, d₆-DMSO) δ 161.4, 155.9, 153.5, 147.7, 147.2, 132.8, 128.6, 112.5, 112.3, 108.9, 106.0, 102.0, 49.49; MS (ESI, m/z) calculated for C₁₃H₁₀BrClN₅O₂ [M+1]⁺ 383.6, found 384.0.

[0097] 제조예 2 내지 28: 화합물 2 내지 28의 제조

[0098] 하기의 일반적인 제조 공정에 따라 화합물 2 내지 28을 제조하였다.

[0100] <일반적인 제조 공정>

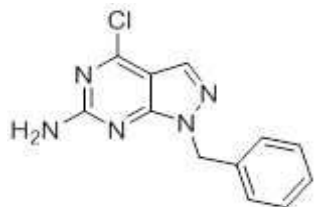


[0101]

[0102] 4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-일아민 (0.5 mmol), 다양하게 R 치환된 벤질할라이드(0.5 mmol), 및 and K₂CO₃ (1 mmol) 를 건조된 DMF (3 mL)에 넣고 12시간 동안 60° C에서 교반하였다. 이후 이를 상온으로 냉각 시킨 후, 제조된 반응혼합물을 AcOEt (20 mL)로 희석시키고, 이후 이를 브라인(brine) 20mL 로 2회 세척하였다.

유기층은 무기 $MgSO_4$ 를 사용하여 건조시킨 후 여과하였다. 용매의 제거 후에, 잔사를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 목적 화합물을 수득하였다. 상기 벤질 할라이드는 1 내지 4개의 R로 치환되는 것으로, 이때 R은 R1, R2, R3 또는 R4를 의미한다.

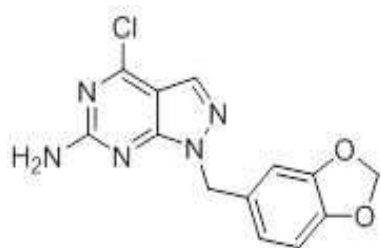
[0104] 제조예 2: 1-벤질-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN200219-1, 화합물 2)



[0105]

[0106] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 78%, ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.90 (s, 1H), 7.36 - 7.26 (m, 5H), 5.44 (s, 2H), 5.30 (s, 2H); MS calcd for $C_{12}H_{10}ClN_5$ (M+H) $^+$: 259.06, found 260.15

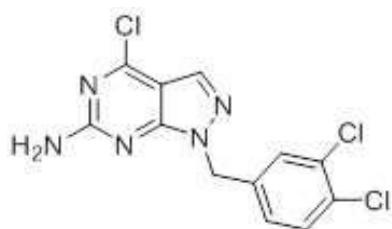
[0108] 제조예 3: 1-(벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일메틸)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN200263-1, 화합물 3)



[0109]

[0110] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 57%, ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.88 (s, 1H), 6.83 (d, J = 9.7 Hz, 2H), 6.74 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 5.92 (s, 2H), 5.33 (s, 2H), 5.22 (s, 2H)W; MS calcd for $C_{13}H_{10}ClN_5O_2$ (M+H) $^+$: 303.05, found 304.10

[0112] 제조예 4: 4-클로로-1-(3,4-디클로로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN200318-1, 화합물 4)

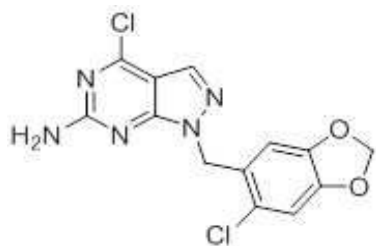


[0113]

[0114] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 53%, ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.96 (s, 1H), 7.48 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.20 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 5.43 (s, 2H); MS calcd for $C_{12}H_8ClN_5$ (M+H) $^+$: 328.58 found 328.05

[0116] 제조예 5: 4-클로로-1-((6-클로로벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)메틸)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민

(DN202782-1, 화합물 5)



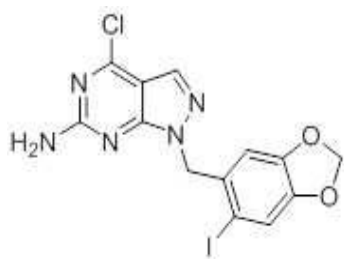
[0117]

[0118]

상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 60%, ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.97 (s, 1H), 6.93 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 5.97 (s, 2H), 5.45 (s, 2H); MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_5\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 337.01, found 338.20

[0120]

제조예 6: 4-클로로-1-((6-아이오도벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)메틸)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN202961-1, 화합물 6)



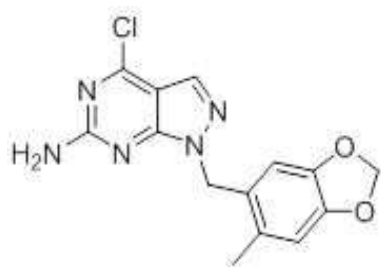
[0121]

[0122]

상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 62%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.95 (s, 1H), 7.27 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 5.93 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 5.29 (s, 2H); MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{ClI}\text{N}_5\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 429.60, found 430.00

[0124]

제조예 7: 4-클로로-1-((6-메틸벤조[d][1,3]다이옥솔-5-일)메틸)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203143-1, 화합물 7)



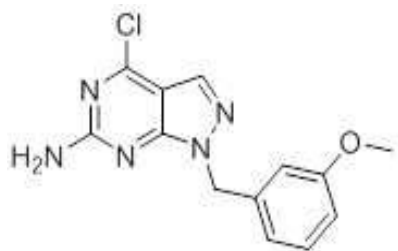
[0125]

[0126]

상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 50%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.91 (s, 1H), 6.66 (s, 1H), 6.61 (s, 1H), 5.89 (s, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.33 (s, 2H), 2.35 (s, 3H); MS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{Cl}\text{N}_5\text{O}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 317.06, found 318.30

[0127]

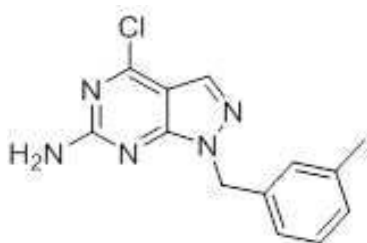
[0128] 제조예 8: 4-클로로-1-(3-메톡시벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203372-1, 화합물 8)



[0129]

[0130] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 51%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (s, 1H), 7.23 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 6.85 - 6.78 (m, 2H), 5.41 (s, 2H), 5.31 (s, 2H), 3.77 (s, 3H); MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{ClN}_5\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 289.07, found 290.00

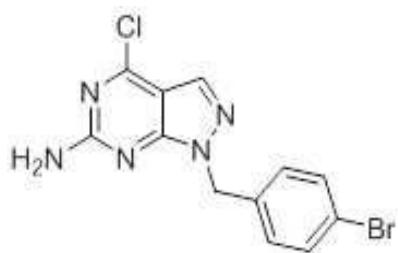
[0132] 제조예 9: 4-클로로-1-(3-메틸벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203373-1, 화합물 9)



[0133]

[0134] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 59%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (s, 1H), 7.23 - 7.17 (m, 1H), 7.09 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 5.41 (s, 2H), 5.40 (s, 2H), 2.31 (s, 3H); MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{ClN}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 273.07, found 274.05

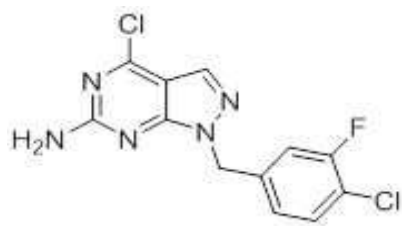
[0136] 제조예 10: 1-(4-브로모벤질)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203374-1, 화합물 10)



[0137]

[0138] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 58%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (s, 1H), 7.44 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.18 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 5.38 (s, 2H), 5.29 (s, 2H); MS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{BrClN}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 338.59, found 339.90

[0140] 제조예 11: 4-클로로-1-(4-클로로-3-플루오로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203375-1, 화합물 11)



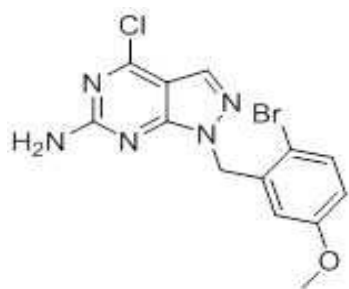
[0141]

[0142]

상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 65%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.91 (s, 1H), 7.34 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.12 - 7.01 (m, 2H), 5.39 (s, 2H), 5.30 (s, 2H); MS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{FN}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 311.01, found 311.95

[0144]

제조예 12: 1-(2-브로모-5-메톡시벤질)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203376-1, 화합물 12)



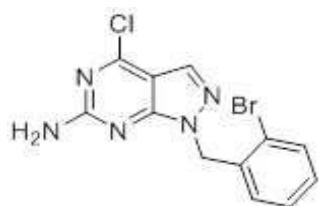
[0145]

[0146]

상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 61%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.97 (s, 1H), 7.47 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.70 (dd, J = 8.8, 3.0 Hz, 1H), 6.35 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 5.50 (s, 2H), 5.31 (s, 2H), 3.68 (s, 3H); MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{BrClN}_5\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 368.61, found 369.85

[0148]

제조예 13: 1-(2-브로모벤질)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203377-1, 화합물 13)

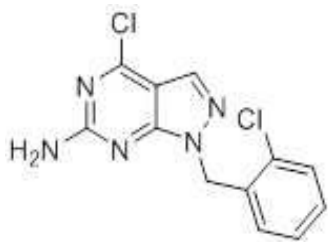


[0149]

[0150]

상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 67%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.97 (s, 1H), 7.59 (dd, J = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.22 (td, J = 7.5, 1.2 Hz, 1H), 7.15 (td, J = 7.7, 1.7 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 5.55 (s, 2H), 5.29 (s, 2H); MS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{BrClN}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 336.97, found 337.90

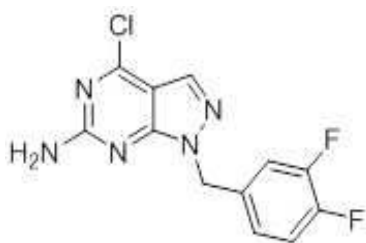
[0152] 제조예 14: 4-클로로-1-(2-클로로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203378-1, 화합물 14)



[0153]

[0154] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 65%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.96 (s, 1H), 7.40 (dd, J = 7.9, 1.2 Hz, 1H), 7.23 (dd, J = 7.8, 1.7 Hz, 1H), 7.17 (td, J = 7.5, 1.3 Hz, 1H), 6.91 - 6.85 (m, 1H), 5.58 (s, 2H), 5.26 (s, 2H); MS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 293.02, found 293.95

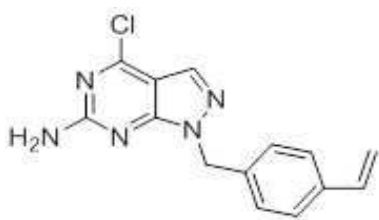
[0156] 제조예 15: 4-클로로-1-(3,4-디플루오로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203379-1, 화합물 15)



[0157]

[0158] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 60%, ^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ 7.83 (s, 1H), 7.11 (ddd, J = 16.6, 9.1, 5.3 Hz, 2H), 7.04 - 6.92 (m, 1H), 5.30 (s, 2H); MS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{ClF}_2\text{N}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 295.04, found 296.00

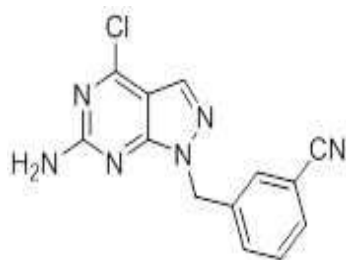
[0160] 제조예 16: 4-클로로-1-(4-비닐벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203381-1, 화합물 16)



[0161]

[0162] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 62%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.90 (s, 1H), 7.35 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.30 - 7.22 (m, 2H), 6.67 (dd, J = 17.6, 10.9 Hz, 1H), 5.75 - 5.65 (m, 1H), 5.42 (s, 2H), 5.33 (s, 2H), 5.23 (d, J = 10.9 Hz, 1H); MS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{ClN}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 285.07, found 286.05

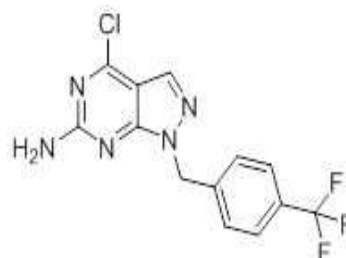
[0164] 제조예 17: 3-((6-아미노-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일)메틸)벤조나이트릴 (DN203487-1, 화합물 17)



[0165]

[0166] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 55%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.92 (s, 1H), 7.56 (d, J = 15.5 Hz, 3H), 7.44 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 5.46 (s, 2H), 5.28 (s, 2H); MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{ClN}_6$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 284.05, found 285.05

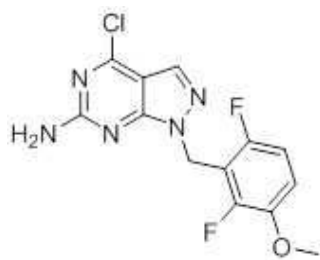
[0168] **제조예 18: 4-클로로-1-(4-(트리플루오로메틸)벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203488-1, 화합물 18)**



[0169]

[0170] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 68%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.92 (s, 1H), 7.58 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 5.49 (s, 2H), 5.37 (s, 2H); MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{ClF}_3\text{N}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 327.69, found 327.95

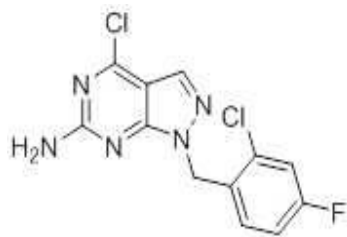
[0172] **제조예 19: 4-클로로-1-(2,6-디플루오로-3-메톡시벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203489-1, 화합물 19)**



[0173]

[0174] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 58%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.87 (s, 1H), 6.88 (dq, J = 26.5, 8.8 Hz, 2H), 5.51 (s, 2H), 5.33 (s, 2H), 3.85 (s, 3H); MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{ClF}_2\text{N}_5\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 325.05, found 325.95

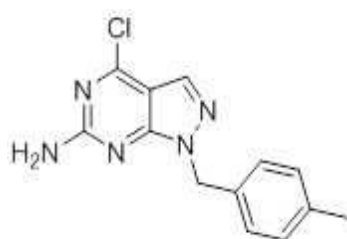
[0176] **제조예 20: 4-클로로-1-(2-클로로-4-플루오로벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203490-1, 화합물 20)**



[0177]

[0178] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 58%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (s, 1H), 7.16 (d, J = 6.5 Hz, 1H), 7.00 - 6.86 (m, 2H), 5.52 (s, 2H), 5.29 (s, 2H); MS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{FN}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 311.01, found 311.95

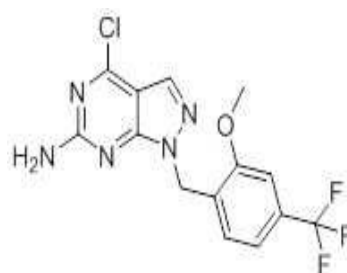
[0180] 제조예 21: 4-클로로-1-(4-메틸벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203491-1, 화합물 21)



[0181]

[0182] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 56%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.89 (s, 1H), 7.21 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.12 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 5.39 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 2.31 (s, 3H); MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{ClN}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 273.07, found 274.05

[0184] 제조예 22: 4-클로로-1-(2-메톡시-4-(트리플루오로메틸)벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203492-1, 화합물 22)



[0185]

[0186] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 65%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.95 (s, 1H), 7.12 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.91 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 5.51 (s, 2H), 5.33 (s, 2H), 3.91 (s, 3H); MS calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClF}_3\text{N}_5\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 357.06, found 358.00

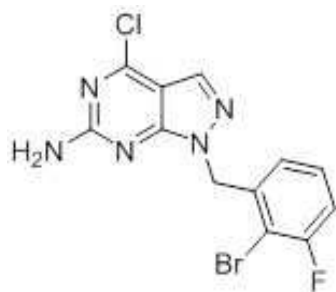
[0188] 제조예 23: 4-클로로-1-(4-(트리플루오로메톡시)벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203493-1, 화합물 23)



[0189]

[0190] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 53%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.91 (s, 1H), 7.34 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.16 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 5.43 (s, 2H), 5.24 (s, 2H); MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{ClF}_3\text{N}_5\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 343.04, found 344.00

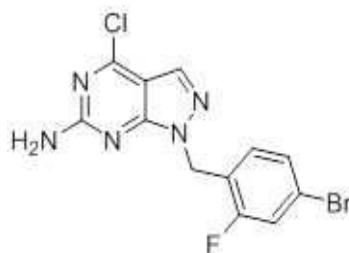
[0192] 제조예 24: 1-(2-브로모-3-플루오로벤질)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203494-1, 화합물 24)



[0193]

[0194] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 55%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.96 (s, 1H), 7.19 (dd, J = 13.3, 7.9 Hz, 1H), 7.06 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 6.60 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 5.57 (s, 2H), 5.24 (s, 2H); MS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{BrClFN}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 354.96, found 355.85

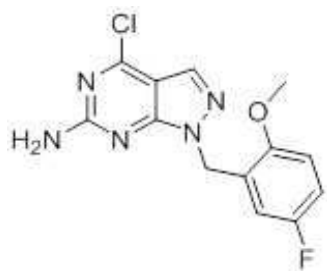
[0196] 제조예 25: 1-(4-브로모-2-플루오로벤질)-4-클로로-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203495-1, 화합물 25)



[0197]

[0198] 상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 60%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.91 (s, 1H), 7.22 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.02 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 5.45 (s, 2H), 5.27 (s, 2H); MS calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_8\text{BrClFN}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 354.96, found 355.90

[0200] 제조예 26: 4-클로로-1-(5-플루오로-2-메톡시벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203633-1, 화합물 26)



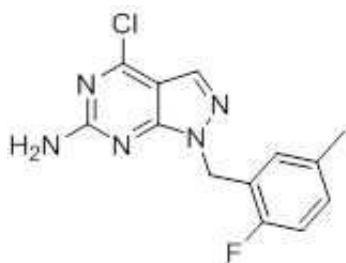
[0201]

[0202]

상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 65%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (s, 1H), 6.92 (td, J = 8.5, 3.0 Hz, 1H), 6.81 (dd, J = 9.0, 4.3 Hz, 1H), 6.55 (dd, J = 8.8, 2.9 Hz, 1H), 5.46 (s, 2H), 5.25 (s, 2H), 3.84 (s, 3H); MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ClFN}_5\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 307.06, found 308.00

[0204]

제조예 27: 4-클로로-1-(2-플루오로-5-메틸벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203634-1, 화합물 27)



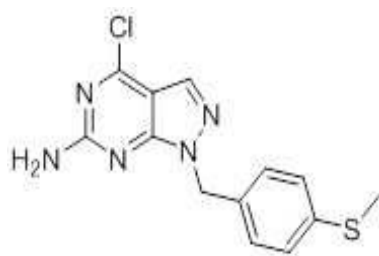
[0205]

[0206]

상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 66%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.92 (s, 1H), 7.09 - 7.02 (m, 1H), 6.96 (d, J = 9.1 Hz, 1H), 6.94 - 6.83 (m, 1H), 5.46 (s, 2H), 5.37 (s, 2H), 2.24 (s, 3H); MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{ClFN}_5$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 291.71, found 292.05

[0208]

제조예 28: 4-클로로-1-(4-(메틸티오)벤질)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-6-아민 (DN203635-1, 화합물 28)



[0209]

[0210]

상기 일반 제조 공정에 따라 반응을 수행하여, 흰색 고체 형태의 표제 화합물을 수득하였다. 수율: 65%, ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.89 (s, 1H), 7.24 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.19 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.39 (s, 2H), 5.28 (s, 2H), 2.44 (s, 3H); MS calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{ClN}_5\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 305.05, found 305.95

[0212]

실시예 1: 사용되는 물질 및 방법

[0213]

1-1) 화학물질, 플라스미드 및 항체

[0214]

MitoTracker 및 Fura-2는 Molecular Probes로부터 구입하였고, 다른 모든 화학물질들은 Sigma로부터 구입하였다. HSF1-GFP 융합 구축물은 Addgene (Plasmid #:32538; Wang, X., Grammatikakis, N., Siganou, A., and

Calderwood, S. K. (2003). Regulation of molecular chaperone gene transcription involves the serine phosphorylation, 14-3-3 epsilon binding, and cytoplasmic sequestration of heat shock factor 1. *Molecular and cellular biology* 23, 6013-6026)으로부터 구입하였다. Anti-CHOP, anti-prohibitin, 및 anti-caspase3 는 Cell Signaling; anti-calcineurin subunit B 는 Sigma; anti-RyR, anti-Akt, anti-Grp94, anti-Chk1, anti-lamin B, 및 anti-PARP1는 Santa Cruz Biotechnology; anti-cyclophilin D (CypD)는 Calbiochem; anti-eIF2 α [pS52] 는 Invitrogen; anti- β -actin 는 MP Biomedicals, 및 anti-TRAP1, anti-HSF1, anti-Drp1, 및 anti-Hsp70 는 BD Biosciences로부터 각각 구입하거나 제공받았다.

[0216] 1-2) 세포 및 배양 조건

[0217] 자궁경부(HeLa), 유방(MDA-MB-231), 난소(SK-OV3), 간(SK-HEP-1), 뇌 (T98G), 폐(H460), 및 전립선 (PC3 and 22Rv1)의 인간 암 세포들은 American Type Culture Collection (ATCC)로부터 구입하였고, 공급자의 매뉴얼에 따라 유지하였다. 세포들은 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO) 및 1% penicillin/streptomycin (GIBCO)을 함유하는 DMEM 또는 RPMI 배지에서 (GIBCO) 37° C, 5% CO₂의 humidified atmosphere에서 배양하였다. 인간 각막 세포는 ATCC로부터 구입하였고, 이를 ATCC corneal medium (ATCC)에서 제조사의 매뉴얼에 따라 배양하였다. Primary hepatocyte는 8주령의 BALB/c 마우스로부터 선행문헌에 개시된 방법에 따라 (Lee et al., 2015) 분리하였고, 이를 10% FBS 를 함유하는 M199/EBSS medium (Hyclone) 에서 37° C, 5% CO₂ 의 humidified atmosphere 에서 배양하였다.

[0219] 1-2) 세포 칼시뉴린 활성 분석

[0220] 세포 칼시뉴린 활성은 칼시뉴린 포스파테이트 어세이 키트 (ENZO Life Sciences)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다. Colorimetric assay는 620nm의 파장에서 microplate spectrophotometer (TECHAN Infinite M200)를 사용하여 수행하였다. 흡광도 수치는 단백질 농도로 정규화되었고, 칼시뉴린 활성은 DMSO-처리된 샘플에 비교하여 나타내었다.

[0222] 1-3) siRNA 처리

[0223] TRAP1, RyR2, IP3R, 및 CHOP 에 대한 Small interfering RNAs (siRNA) Genolution (Korea)에서 선행문헌에서 설명한 바에 따라 제작되었다 (Park et al., 2014). cyclophilin D (CypD) 및 calcineurin regulatory subunit B (CNB)를 표적화하는 siRNA들은 다음과 같은 서열을 사용하여 Genolution (Korea)에서 합성하였다: CypD-#1 5'-GGCAGATGTCGT-CCCAAAG-3' and CypD-#2 5'-GATAAGGGCTTCGGCTACA-3'; CNB-#1 5'-GCCTGAGTTA-CAACAGAATCCTTTA-3' 및 CNB-#2 5'-GGAACAATCTGAAAGATACAGTT-3'; control 5'-ACUCUAUCGCACGCUGAC-3'.

[0224] 세포들은 6-웰 플레이트에 50 내지 75%의 컨플루언스가 될때까지 배양하였고, 이를 48 시간 동안 G-Fectin (Genolution) 과 혼합된 20 nM siRNA 를 사용하여 형질감염시켰다. 이후, 약물을 사용하여 나타낸 바와 같이 처리하였다.

[0226] 1-4) 세포 생존율 및 아포토시스 유도 분석

[0227] 세포 생존율은 Cell viability was determined using 3(4,5-dimethyl-thyzoil-2-yl)2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) 어세이를 사용하여 결정하였고, 이를 595 nm에서 Infinity M200 microplate reader (TECAN)을 사용하여 테트라졸륨 다이의 흡광도를 측정하여 정량화하였다. 흡광도 수치는 DMSO control에 대하여 정규화하였고, 데이터는 퍼센트 생존율로 나타내었다. 아포토시스 유도를 측정하기 위해, DNA 내용물(propidium iodide) 및 세포의 카스파제 활성 (DEVDase activity)을 CaspaTag *in situ* apoptosis detection kits (Millipore)를 사용하여 측정하였다. 레이블링된 세포들은 FACS Calibur™ system (BD Biosciences)을 사용하여 정량화하였다. 데이터는 FlowJo software (TreeStar)를 사용하여 프로세싱하였다.

[0229] 1-5) 간세포 이미징

[0230] 세포질내 칼슘 농도는 선행문헌에서 설명된 방법에 따라 결정되었다 (Park et al., 2014). 간단하게, HeLa 세포들을 5 μ M Fura-2 를 사용하여 30분간 레이블링 하였고, 이를 154 mM NaCl, 5.6 mM KCl, 3.2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, 10 mM glucose, 및 0.2 mM EGTA (pH 7.4)를 함유하는, 칼슘 비함유 Locke's solution 에서 37° C, 5% CO₂하에서 배양하였다. 약물을 처리한 후에, 형광의 변화를 340 nm 및 380 nm에서 이중 여기(dual excitation)하는 510 nm의 방사과장에서 IX81 ZDC microscope (Olympus)를 사용하여 5분 마다 측정하였다. 340/380 형광 비율 이미지는 Xcellence software package (Olympus)를 사용하여 생성 및 분석하였다. HSF-GFP localization을 관찰하기 위해, HeLa 세포들은 리포펙타민 형질감염 시약(Invitrogen) 및 HSF-GFP plasmid를 사용하여 제조사의 지침에 따라 형질감염시켰다. 24 시간 동안 형질감염시킨 후에, 세포들을 표기된 약물로 처리하고, IX81 ZDC (Olympus)를 사용하여 분석하였다. 미토콘드리아 구조를 가시화하기 위해, HeLa 세포들은 20 분 동안 200 nM MitoTracker를 사용하여 염색하였고, 이를 약물을 사용하여 처리하고, 이후 LSM 780 공초점 현미경(Zeiss)을 사용하여 분석하였다.

[0232] 1-6) RNA 추출 및 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)

[0233] 총 RNA는 RNeasy mini kits (QIAGEN)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 배양된 세포들로부터 준비하였고 cDNA를 oligo(dT) primer 및 ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs)를 사용하여 생산하였다. PCR 반응은 Mastercycler PCR machine (Eppendorf) 에서 다음과 같은 올리고뉴클레오타이드 프라이머 세트를 사용하여 수행하였다:

[0234] GAPDH, 5'-CGGGAAGCTTGTCATCAATGG-3' 및 5'-GGCAGTGATGGCATGGACTG-3'(서열번호 1, 2);

[0235] Hsp27, 5'-GAGTGGTCGCAGTGGTTAGG-3' 및 5'-ACAGGGAGGAGGAACTTGG-3'(서열번호 3, 4);

[0236] Hsp40, 5'-GGAAAGAGCATTCGAAACGA-3' 및 5'-ATGCCAGGCTGATAACATC-3'(서열번호 5, 6);

[0237] Hsp70, 5'-CCAGCTGAAGAAGGGTCAAG-3' 및 5'-TTTCTGCTGGTGTCTGCTG-3'(서열번호 7, 8);

[0238] Hsp90, 5'-CTGGGTTTCTCAGG AT-3' 및 5'-TACCGGATTTGTCCAATGC-3'(서열번호 9 및 10).

[0240] 1-7) 재조합 단백질 제조 및 형광 편광 분석

[0241] 재조합 TRAP1 및 Hsp90 를 선행문헌에 기술된 바와 같이 제조하였다 (Lee et al., 2015). 인간 Grp94 (residues 22-804)는 N-말단에서 glutathione S-transferase (GST)와 융합되어 *E. coli* BL21(DE3)세포 내에서 발현되었다. 수득된 박테리아 세포들은 이후 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 및 5 mM MgCl₂ (pH 7.4)를 함유하는 lysis buffer 내에서 초음파 처리하였고, 분해가능한 분획은 glutathione-sepharose 4B (GE Healthcare Life Sciences)를 사용하여 혼합하였다. GST-Grp94 융합 단백질은 이후 50 mM Tris-HCl 및 20 mM의 환원된 글루타치온 (pH 7.4)을 포함하는 elution buffer를 사용하여 유출시키고, 이후 추가적으로 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 정제하였다.

[0242] 형광 편광 분석을 위해, 형광 프로브 PU-H71-FITC3를 선행문헌에서 기술한 바에 따라 합성하였고 (Taldone et al., 2011), 10 nM PU-H71-FITC2 및 100 nM 의 단백질을 24 시간동안 10 nM PU-H71-FITC2 및 100 nM 의 단백질을 24 시간 동안 4° C 에서 135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, 1 mM DTT, 2 mM MgCl₂, 0.1 mg/mL BSA, 및 0.05% NP40 (pH 7.3)를 함유하는 FP buffer 내의 저해제를 다양한 농도로 하여 배양하였다. 형광 편광은 최종적으로 SYNERGY NEO microplate reader (BioTek Instruments, Inc.)를 사용하여 측정하였다.

[0244] 1-8) 결정화 및 구조 결정

[0245] C-말단 도메인 결손 인간 TRAP1 (residues 60-561, hTRAP1-NM) 단백질 제조는 선행문헌에 기술된대로 수행하였다 (Jeong et al., 2014; Lee et al., 2015). hTRAP1-NM 및 저해제 복합체를 결정화하기 위해, 20 mg/ml의 정제된 hTRAP1 도메인 50 μ l 를 DMSO 중의 10 mM의 저해제 3.7 μ l와 얼음 상에서 1시간 동안 혼합하였고, DMSO 농도를 4% 감소시키기 위해 25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, and 5 mM DTT를 함유하는 완충액을 사용하여 최종 부피가 90 μ l 되도록 조절하였다. 복합체들은 이후 상온에서 단백질 1 μ l 와 1 μ l 의 reservoir buffer 를 혼합하는 것에 의해 현적 확산법(hanging drop diffusion method)를 사용하여 결정화하였다. TRAP1-

DN320 복합체의 결정은 100 mM sodium cacodylate (pH 6.76), 14%-16% 8K polyethylene glycol (PEG), 및 100 mM calcium acetate를 포함하는 reservoir buffer 내에서 성장시켰다. 가장 심하게 회절되는 TRAP1-Pan-401 복합체의 결정은 8K PEG 대신 14%-16% 20K PEG를 포함하는 reservoir buffer 내에서 수득되었다. 결정들은 이후 30% glycerol이 부가된 결정화 용액 내에서 냉각시켜 보호되었고, 액체 질소 내에서 급속 냉각되었다. X-ray 회절 데이터는 Pohang Accelerator laboratory (PAL)의 5C beamline에서 수집되었고, 데이터들은 HKL2000 software (Otwinowski and Minor, 1997)를 사용하여 가공되었다. 양 결정들은 TRAP1-PU-H71 complex crystal에 관하여 선행문헌에서 보고된 바와 같이 (Lee et al., 2015) 모두 거의 동일한 스페이스 그룹 ($P4_12_12$) 및 유닛 셀 ($a = b = 69.5 \text{ \AA}$, $c = 253.0 \text{ \AA}$)을 가지고 있었다. 저해제들의 전자 밀도는 TRAP1-PU-H71 (PDB 4Z1F; Lee, C., Park, H. K., Jeong, H., Lim, J., Lee, A. J., Cheon, K. Y., Kim, C. S., Thomas, A. P., Bae, B., Kim, N. D., et al. (2015). Development of a Mitochondria-Targeted Hsp90 Inhibitor Based on the Crystal Structures of Human TRAP1. *Journal of the American Chemical Society* 137, 4358-4367)로부터 리간드가 없는 TRAP1 구조를 사용한 Fourier 법을 사용하여 계산되었고, 순차적으로 Coot (Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 486-501)를 사용하여 잔여 전자 밀도를 구축하였다. Final models for TRAP1-Pan-401 및 TRAP1-DN320 에 대한 최종 모델은 Phenix (Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., et al. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66, 213-221)를 사용하여 2.4 및 2.7 Å 해상도로 각각 가공되었다. 결정학적 통계를 하기 표 1에 표기하였다.

표 1

데이터 수집 및 가공된 통계(Refinement Statistics)		
Ligands	Pan-401	DN320
Data set:	Native	Native
PDB accession #:		
Space group:	$P4_12_12$	$P4_12_12$
Cell parameters a, b, c (Å)	69.4, 69.4, 252.2	69.5, 69.5, 253.0
데이터 가공		
Wavelength (Å)	0.9796	0.9999
Resolution (Å)	50-2.4	30-2.7
R_{merge} (%) ^a	7.0 (65.0)*	5.0 (53.3)
I/σ	40.0 (3.3)	31.9 (3.5)
Completeness (%)	99.1 (100.0)	99.3 (100.0)
Redundancy	6.2 (6.4)	5.3 (5.6)
가공된 통계		
Data range (Å)	35-2.4	30-2.7
Reflections	24955	17371
Nonhydrogen atoms	3527	3512
Water molecules	52	35
R.m.s. Δ bonds (Å) ^b	0.005	0.003
R.m.s. Δ angles (°) ^c	0.557	0.582
R-factor (%) ^c	20.5	21.6
R_{free} (%) ^{c, d}	26.5	27.2

*가장 높은 해상도 셀은 괄호로 나타내었다.

^a $R_{\text{merge}} = 100 \times \frac{\sum |I_i(h) - \langle I(h) \rangle|}{\sum I(h)}$, 이때, $I_i(h)$ 는 i th 측정치이고 $\langle I(h) \rangle$ 는 Miller indices h 에 대한 $I(h)$ 의 모든 측정치의 가중 평균이다.

[0250] ^b target geometries로부터의 Root-mean-squared deviation (r.m.s. Δ)

[0251] ^c R-factor = 100 × |F_P - F_{P(calc)}| / F_P.

[0252] ^d R_{free} 는 데이터의 5%를 사용하여 계산되었다.

[0254] 모든 구조적인 그림은 PyMOL (<http://www.pymol.com>)을 사용하여 그렸다.

[0256] 1-9) 종양 이종이식 시험

[0257] 동물을 비롯한 모든 실험은 UNIST (IACUC-12-003-A)에 승인을 받았다. 암세포(7×10^6 22Rv1 또는 1×10^7 PC3)는 200 μl 의 PBS에 현탁하고, 6주령의 BALB/c nu/nu 웅성 마우스(Charles River Laboratories)의 양쪽 옆구리에 피하 주사하였다. 종양은 이후 약 100 mm³ 의 크기가 될때까지 성장시켰고, 동물은 무작위로 그룹을 지었다 (two tumors/mouse, five mice/group). 계속해서, vehicle (DMSO), DMAG, 및 gamitrinib을 PBD 내의 20% Cremophor EL (Sigma)에 용해시켰고, 10 mg/kg의 DMAG 및/또는 gamitrinib을 하루 걸러 복강내 투여하였다. Pan-401의 인 비보 항종양 효과를 평가하기 위해, 상기 약물을 프로필렌글리콜 및 DMSO (1:1)에 용해시키고, 매일 복강 내 투여하였다(30 mg/kg). 종양들은 캘리퍼스를 이용하여 측정하였고, 종양 크기는 다음의 식에 따라 계산하였다.

[0258] $V = 1/2 \times (\text{너비})^2 \times \text{길이}$.

[0260] 실험 마지막에 동물들을 마취시켰고, 뇌, 심장, 신장, 간, 비장, 위 및 종양을 비롯한 기관들을 조직학적 분석 및 웨스턴 블리팅을 위해 수집하였다. 수집한 기관 표본들은 10% 포르말린으로 고정시켰고, 이를 조직학적 분석을 위해 파라핀 내에 매립하였다. 간략하게, 각 섹션들은 (5 μm) 고점착성 슬라이드 상에 놓고 H&E를 사용하여 염색하고 이를 Dotslide system (Olympus)을 사용하여 20× 배로 확대하여 관찰하였다. 웨스턴 블랏 분석을 위해, 조직 샘플들은 magnification. For Western blot analyses, tissue samples were homogenized in RIPA buffer containing 50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 및 0.25% N-deoxycholate를 포함하는 RIPA 완충액 내에서 균질화되었고, 프로테아제 저해제 및 포스파타제 저해제 콕테일(Calbiochem), 및 용해가능한 분획들을 선행문헌 (Park, H. K., Lee, J. E., Lim, J., and Kang, B. H. (2014). Mitochondrial Hsp90s suppress calcium-mediated stress signals propagating from mitochondria to the ER in cancer cells. *Mol Cancer* 13, 148)에 개시된 바에 따라 분석하였다.

[0262] 1-10) 통계적 분석

[0263] MTT 시험은 중복하여 시험하였고, 각각 최소한 3번에 걸쳐 수행하였다. 통계적인 분석은 Prism 5.0 (GraphPad) 프로그램을 사용하여 수행하였다. 편차는 unpaired t-tests를 사용하여 확인하였고, $p < 0.05$ 인 때에 유의적인 것으로 판단하였다.

[0265] 실시예 2: 결과

[0266] 2-1) 패럴로그(paralog)의 동시적 비활성화에 의한 세포사의 상승적 증가

[0267] 미토콘드리아성 TRAP1 저해제, 가미트리닙 (Kang, B. H. (2012). TRAP1 regulation of mitochondrial life or death decision in cancer cells and mitochondria-targeted TRAP1 inhibitors. *BMB Rep* 45, 1-6; Lee, C., Park, H. K., Jeong, H., Lim, J., Lee, A. J., Cheon, K. Y., Kim, C. S., Thomas, A. P., Bae, B., Kim, N. D., *et al.* (2015). Development of a Mitochondria-Targeted Hsp90 Inhibitor Based on the Crystal Structures of Human TRAP1. *Journal of the American Chemical Society* 137, 4358-4367)과 세포질 및 ER 에 위치한 Hsp90 패밀리 단백질을 비활성화 하기 위한 대표적 Hsp90 저해제들(Patel, P. D., Yan, P., Seidler,

P. M., Patel, H. J., Sun, W., Yang, C., Que, N. S., Taldone, T., Finotti, P., Stephani, R. A., *et al.* (2013). Paralog-selective Hsp90 inhibitors define tumor-specific regulation of HER2. *Nat Chem Biol* 9, 677-684; Taldone, T., Gomes-DaGama, E. M., Zong, H., Sen, S., Alpaugh, M. L., Zatorska, D., Alonso-Sabadell, R., Guzman, M. L., and Chiosis, G. (2011). Synthesis of purine-scaffold fluorescent probes for heat shock protein 90 with use in flow cytometry and fluorescence microscopy. *Bioorg Med Chem Lett* 21, 5347-5352)의 병용 치료는 아폽토시스의 유도를 통해(도 1C 및 도 2A) 다양한 암세포에서 개선된 세포독성을 나타낸다(도 1A 및 B). 이러한 약물의 조합은 22Rv1 s.c. implanted 누드 마우스에서 효과적으로 종양 성장을 저해한다(도 1D 및 도 2B). 상기 약물 조합은 조직학적 분석에서 유의적인 체중 감소(도 2C) 및 기관 독성(도 2D) 없이도 아폽토시스 유도를 증가시켰다(도 1E, 도 2B).

[0269]

2-2) 칼시뉴린 활성화에 의한 HSF1의 억제

[0270]

약물 상승효과의 메커니즘을 이해하기 위해, Hsp90 억제에 의해 촉발되는 클라이언트 단백질 분해 및 열 충격 반응을 분석하였다 (Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G., and Neckers, L. (2010). Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 537-549). 종래 보고된 바와 같이 (Kang, B. H., Plescia, J., Song, H. Y., Meli, M., Colombo, G., Beebe, K., Scroggins, B., Neckers, L., and Altieri, D. C. (2009). Combinatorial drug design targeting multiple cancer signaling networks controlled by mitochondrial Hsp90. *J Clin Invest* 119, 454-464), DMAG는 클라이언트 단백질 분해 및 Hsp70 증가를 유도하였으나, 이에 반해 가미트리닙은 이들 중 어느 것에도 영향을 미치지 않았다 (도 3A). DMAG 및 가미트리닙의 병용 치료는 클라이언트 단백질을 분해시키나, 놀랍게도 열 충격 단백질의 발현을 증가시키지 않았고(도 3A 및 B), 이는 Hsp90 저해제-촉발된 열 충격 반응의 부재를 나타낸다 (Sittler, A., Lurz, R., Lueder, G., Priller, J., Lehrach, H., Hayer-Hartl, M. K., Hartl, F. U., and Wanker, E. E. (2001). Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. *Human molecular genetics* 10, 1307-1315; Zou, J., Guo, Y., Guettouche, T., Smith, D. F., and Voellmy, R. (1998). Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 94, 471-480). Hsp90 저해제들은 열 충격 반응을 전사인자인 열 충격 인자 1(HSF1)의 활성화를 통해 촉발시킴이 알려져 있는데 (Chen et al., 2013; Zou et al., 1998), 이들의 비활성화는 Hsp90 저해제에 대해 암세포가 감작된다는 것을 나타낸다 (Home et al., 2015; Neckers, L., and Workman, P. (2012). Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 64-76; Zaarur et al., 2006). DMAG 치료는 종래 보고된 바와 같이 HSF1의 핵국재화(nuclear localization)를 증가시키는 반면에, DMAG-가미트리닙의 조합은 HSF1이 세포질에 위치하도록 하였다(도 3C 및 D). 게다가 약물들의 병용치료는 약간 빠르게 이동하는 HSF1(slightly fast-migrating HSF1)을 겔 내에서 생성하였고(도 3D), 이는 종래 보고된 번역 후 수식(posttranslational modification)을 시사하는 것이다 (Akerfelt, M., Morimoto, R. I., and Sistonen, L. (2010). Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 545-555). 본 발명자들은 인산화 및 칼슘 의존적인 포스포타제 칼시뉴린의 HSF1 조절 내에서의 기여를 조사하였고, 그 결과 칼시뉴린 저해제인 FK506이 약물 병용 후의 HSF1의 번역 후 수식 및 핵국재화를 증가시키는데 활성이 있음을 확인하였다(도 3D). 칼슘의 증가만으로도 DMAG에 의한 Hsp70발현증가용 억제할수 있었고 (도 3E), 실제 병용치료로 세포질내의 칼슘증가를 확인하였다 (도 3F). 이러한 발견과 일치하게, 칼시뉴린 활성은 약물의 병용에 의해 현저하게 증가하였다(도 3G). Hsp70 발현상의 약물 병용의 억제적 효과는 siRNA에 의한 칼시뉴린 조절 서브유닛 B(CNB)의 녹다운에 의해 차단되었다 (도 3H). 약물 병용의 상승적인 세포독성은 또한 칼시뉴린 siRNA 치료에 의해 저해되었다(도 3I).

[0272]

2-3) 세포질 칼슘 증가가 칼시뉴린을 활성화시키고 미토콘드리아 fission을 촉진한다

[0273]

가미트리닙 및 DMAG 병용은 세포질 칼슘 농도를 증가시켰다(도 4A). 가미트리닙과 Grp94 특이적 저해제인 PU-WS13 (Patel et al., 2013), 또는 siRNA와의 병용 치료는 비교가능한 세포질 칼슘 증가를 보여주기에 충분하였고 (도 3A, 3B, 및 도 5A), 이는 ER 및 미토콘드리아의 Hsp90, Grp94 및 TRAP1 이 칼슘 흐름에 원인이 있는 것을 시사한다. 종래에, 본 발명자들은 TRAP1이 사이클로필린 D(CypD) 및 리아노딘 수용체 의존적으로 미토콘드리아 및 ER 칼슘 분비(Calcium discharge)에 의해 세포적 스트레스를 넘어 세포사 한계점을 설정할 수 있다는

점을 제안하였다 (Park et al., 2014). 마찬가지로, 세포질 칼슘 증가는 HeLa 세포에서 미토콘드리아의 CypD 또는 ER 리아노딘 수용체 2 (RyR2)의 유전적 녹다운에 의해 저해될 수 있다(도 4C, 4D).

[0274] 게다가, CypD 또는 RyR2의 결여에서 약물의 병용에 의한 Hsp70의 발현이 전혀 감소되지 않았다는 것을 고려하면, 미토콘드리아 및 ER로부터 연관된 칼슘 분비는 열 충격 반응의 억제에서 중요하다(도 4E, 4F). Inactivation of Grp94 및 TRAP1과 PU-WS13/가미트리닙 조합의 비활성화는 세포사 유도를 증강시키기는 하지만(도 3D 및 3E), DMAG-가미트리닙 조합에 의한 세포질, ER, 미토콘드리아의 Hsp90 비활성화가 ER 및 미토콘드리아의 Hsp90 억제를 할 경우와 비교하여 더욱 강력한 세포사를 촉발한다(도 5A, 도 5B). 이는 아마도 생명유지에 필수적인 암 세포의 Hsp90 클라이언트 단백질의 분해 때문인 것으로 판단된다(도 5C). 칼시뉴린 활성화는 미토콘드리아 fragmentation을 유도하는 Drp1을 활성화 시킬수 있는데, 실제 미토콘드리아 fragmentation이 약물 병용처리시 관찰되었으며 (도 5D), Drp1 선택적인 억제제인 Mdivi-1을 처리하게 되면 미토콘드리아 fragmentation이 억제 되었다 (도 4H). 더불어 칼시뉴린을 siRNA로 억제한 경우에도 약물병용에 의한 미토콘드리아 fragmentation을 억제하였다 (도 4I).

[0276] 2-4) 인 비보 판-Hsp90 억제제, 판보티닙-401의 개발

[0277] 본 발명자들의 시험에 따르면 고효능 Hsp90 저해항암약물 개발을 위해서는 TRAP1에 대한 저해활성을 끌어올려야 한다는 것을 알 수 있었다. 이를 실현하고자, TRAP1 결합력은 극대화하고, 반면에 Hsp90 억제활성을 적정한 수준으로 낮춰서, 세포질에 과량으로 존재하는 (전체 단백질의 2~3%수준) Hsp90에 의해 trap되어 미토콘드리아로 까지 도달하지 못하는 Hsp90 저해제의 근본적인 문제를 해결하고자 (도6A), 판보티닙-401(간단히, Pan-401)로 명명한 피라졸로피리미딘 스캐폴드를 개발하였다(도 6B). 판보티닙의 paralog 선택성은 TRAP1, Hsp90, Grp94에 대한 각각의 IC50값은 약 80nM, 76 nM, 524 nM로써, 강한 TRAP1/Grp94 결합력을 확보하였고 상대적으로 Hsp90 저해능은 낮추었다 (도 6C).

[0278] 첫 번째로, 본 발명자들은 BIIB-021(6-클로로-9-[(4-메톡시-3,5-디메틸-2-피리딘일)메틸]-9H-퓨린-2-아민)로부터 유래된 피라졸로피리미딘 화합물인 DN320을 합성하였고(도 6C), DN320은 BIIB-021에 비해 더욱 탁월한 저해활성을 나타내었다(도 6C). DN320은 Phe201을 안정화시키고, Met163 측쇄의 입체 배치를 변경시키고, TRAP1 활성 자리 내에서의 Asn171의 아마이드를 갖는 피라졸 N-2의 수-매개성 수소 결합을 구축한다(도 6D 및 E, F). 대조적으로 퓨린 스캐폴드 BIIB-021은 Phe 측쇄 또는 물 분자 어느 쪽과도 안정적으로 반응하지 않고, TRAP1 내의 Met의 서로 다른 측쇄 기원을 나타내었으며, 다른 퓨린 스캐폴드 억제제인 PU-H71과 마찬가지로 Hsp90과 함께 몇몇 복잡한 구조 내에서 지속적으로 발견되었다 (도 7). 그러나, DN320은 Hsp90에 대한 결합력이 여전히 강하였기 때문에, 다음으로 본 발명자들은 DN320에 비해 더욱 개선된 TRAP1 저해 활성 및 낮은 Hsp90 억제활성을 가지는 Pan-401를 합성하였다. Pan-401은 DN320의 피리딘을 브로모벤조디옥솔로 치환하였으며(도 6B), 그 결과 이 화합물은 TRAP1 및 Hsp90에 대한 결합력이 원하는 수준으로 개선되었다 (도 6C). Pan-401의 브로모벤조디옥솔은 TRAP1 활성 자리의 소수성 포켓 내에 DN320의 피리딘보다 더 잘 맞아서(도 6G) 억제제의 TRAP1에 대한 결합을 개선시킨다.

[0280] 2-5) Pan-401의 작용 원리

[0281] Pan-401의 작용 원리를 확인하기 위해, 미토콘드리아의 Hsp90 (TRAP1)에 대한 억제 활성을 우선 확인하였다. Pan-401은 즉시 미토콘드리아 막 전위의 손실 및 cytochrome c의 방전(discharge)을 촉발하였고(도 8A, B), 이는 미토콘드리아-축정되는 Hsp90 억제제에 대한 종래의 보고와 합치한다 (Kang et al., 2009; Lee et al., 2015). 미토콘드리아의 ROS는 Pan-401 처리 4 시간 내에 증가하였고(도 8C), 이는 ROS 생산에서 억제적 TRAP1의 역할에 상응한다 (Hua, G., Zhang, Q., and Fan, Z. (2007). Heat shock protein 75 (TRAP1) antagonizes reactive oxygen species generation and protects cells from granzyme M-mediated apoptosis. The Journal of biological chemistry 282, 20553-20560; Im, C. N., Lee, J. S., Zheng, Y., and Seo, J. S. (2007). Iron chelation study in a normal human hepatocyte cell line suggests that tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) regulates production of reactive oxygen species. Journal of cellular biochemistry 100, 474-486; Voloboueva, L. A., Duan, M., Ouyang, Y., Emery, J. F., Stoy, C., and Giffard, R. G. (2008). Overexpression of mitochondrial Hsp70/Hsp75 protects astrocytes against ischemic injury in vitro. J Cereb Blood Flow Metab 28, 1009-1016). TRAP1 비활성화는 미토콘드리아의 펼쳐

진 단백질 반응을 촉발시키고, CHOP 발현을 유도하는 것으로 보고되고 있다 (Park et al., 2014; Siegelin, M. D., Dohi, T., Raskett, C. M., Orlowski, G. M., Powers, C. M., Gilbert, C. A., Ross, A. H., Plescia, J., and Altieri, D. C. (2011). Exploiting the mitochondrial unfolded protein response for cancer therapy in mice and human cells. *J Clin Invest* 121, 1349-1360). 이와 유사하게, Pan-401 치료는 CHOP 발현을 증가시켰다(도 8D). Pan-401과 대조적으로, 미토콘드리아 막의 탈분극, cytochrome *c* 방전, CHOP 발현, 및 ROS 과생산은 Hsp90 억제제 AUY922의 24시간 동안의 처리 후에 유도되지 않았고(도 8A-D), 따라서, Pan-401은 기존의 TRAP1억제제인 개미트리넵과 유사하게 미토콘드리아 TRAP1을 억제함을 확인할 수 있었다. 그 다음, 세포질 Hsp90의 억제 활성을 확인하기 위해 클라이언트 단백질 분해 및 Hsp70 발현 증가를 조사하였다. Pan-401은 다른 Hsp90 억제제들과 유사한 수준으로 Hsp90 클라이언트 단백질을 분해시켰으나, 기존 Hsp90 저해제들과 달리 Hsp70의 발현을 증가시키지는 않았다(도 8D, E). 더불어, Pan-401을 처리하여, 기존 Hsp90 저해제들이 유도하는 Hsp70 발현을 억제할 수 있는 것을 확인하여 (도 8F), Hsp70 발현이 Pan-401에 의해 적극적으로 억제되고 있음을 규명하였다. Pan-401을 처리하는 것은 개미트리넵 및 DMAG를 병용처리할 때와 유사하게 세포질 칼슘 농도를 증가시켰고(도 8G), 칼시뉴린 활성을 증가시켰다(도 8H). siRNA로 칼시뉴린을 선택적으로 억제하였을 때, Hsp70 발현 억제도 저해시켰고(도 8I), 미토콘드리아 fragmentation도 억제하였다 (도 8J).

[0283] **2-6) Pan-401의 강력한 항암 활성**

[0284] Pan-401은 기존의 Hsp90 저해제와 비교하였을 때, 더욱 강한 세포독성 활성을 간암세포, 전립선암, 자궁경부암, 폐암, 뇌종양 세포들에 대해서 나타내었고 (도 9A), 이런 세포죽음 유도기전은 아포토시스를 통한 것으로 확인하였다 (도9B). 모든 정상 인간 각막 및 마우스 간세포 모두에서 기존 Hsp90 저해제와 비교하여 세포독성이 현저하게 낮음을 확인하였다 (도 9C). 실험쥐를 활용한 전립선암 xwnograft 실험에서 Pan-401은 현저한 종양성장 억제효능이 있음을 확인하였다 (도 9D). 이때, Pan-401이 처리된 종양조직에서 아포토시스에 의한 세포죽음을 확인하였다 (도 9E, 도 10A). Pan-401에 의한 실험쥐의 몸무게 변화는 전혀 없고 (도 9F), 조직학적인 기관 독성 증상도 확인할 수 없어서 (도 10B) 실험쥐에 대한 독성도 없는 것으로 확인하였다. 반면에, 실험쥐의 종양조직에서는 인비트로에서와 동일한 Hsp90 client 단백질의 감소, Hsp70 발현증가의 억제와 CHOP 발현증가를 확인하여 (도 9G), 종양모델 실험쥐에서의 약물 작용기전도 암세포를 활용한 실험과 동일함을 규명하였다.

[0286] **실시예 3: 화합물 2-28의 TRAP1 억제 활성 확인**

[0287] 상기 제조예 2 내지 28에서 제조된 화합물 2 내지 28의 TRAP1 억제 효과를 확인하기 위하여 다음과 같이 시험하였다.

[0289] **TRAP1 ATPase 활성분석.**

[0290] ATPase 활성은 PiColorLock Gold Phosphate Detection Kit (Innova Bioscience)를 사용하여 측정하였다. 간단히 설명하면, 200 nM TRAP1을 다양한 농도의 화합물과 assay buffer (100 mM Tris, 20 mM KCl, and 6 mM MgCl₂, pH 7.0)에서 30 분 37° C에서 incubation한 후, 0.2 mM ATP와 3 시간 반응시켰다. 20 μL의 Pi Color Lock Gold reagent와 100:1비율의 accelerator를 80 μL의 TRAP1-ATP 반응물과 섞어 5분간 25° C에서 발색반응을 유도하였고, 10 μL stop solution을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 최종반응물들은 620 nm에서 Infinity M200 microplate reader (Tecan)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

[0292] **Fluorescence polarization (FP) 분석**

[0293] FP 분석을 위한 형광 probe인 PU-H71-FITC3은 기존의 보고를 참조하여 합성하였다 (Bioorg. Med. Chem. Lett. 2011, 21, 5347-5352). 10 nM PU-H71-FITC3, 100 nM TRAP1(Hsp90)를 다양한 농도의 저해제와 함께 FP buffer (135 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, 1 mM DTT, 2 mM MgCl₂, 0.1 mg/mL BSA, and 0.05% NP40 (pH 7.3))에서 24 시간동안 4° C에서 incubation 하였다. FP는 SYNERGY NEO microplate reader (BioTek Instruments, Inc.)를 이용하여 측정하였다.

[0295] 그 결과, 화합물 2 내지 28의 TRAP1 억제효과를 하기 표 2에 기재하였다.

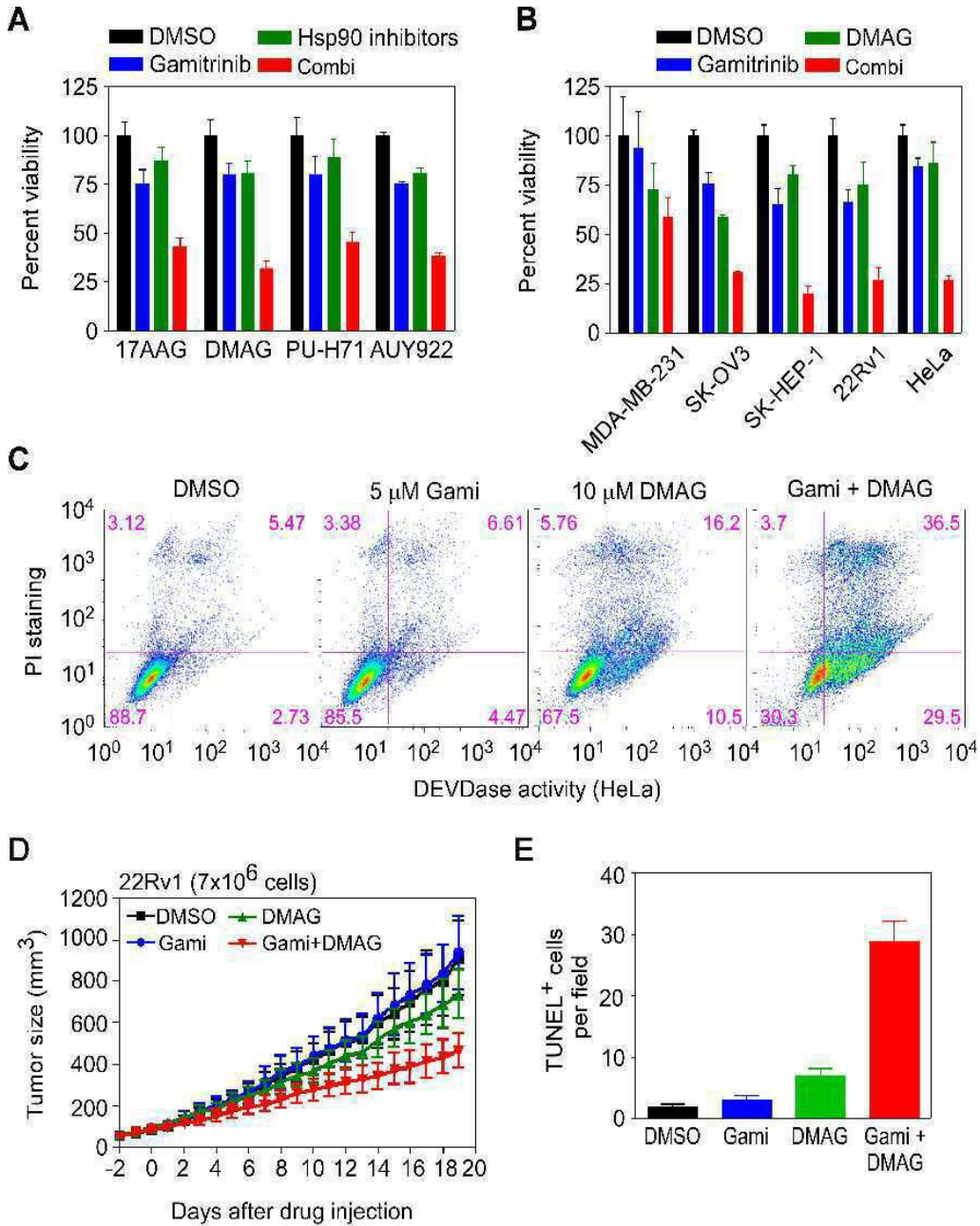
표 2

[0297] 화합물 2 내지 28의 TRAP 1 억제효과

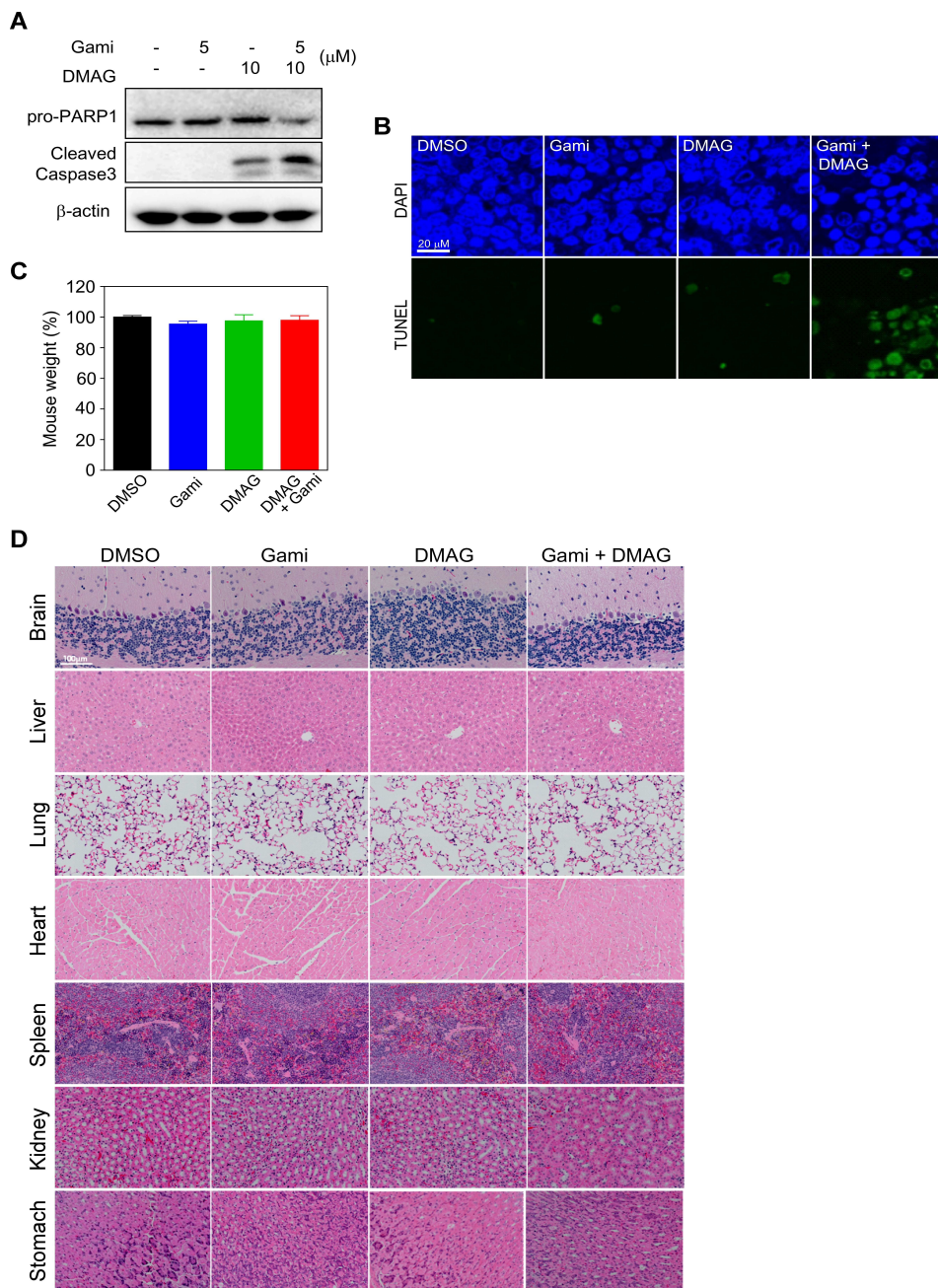
		TRAP1 ATPase activity IC50 (nM)	TRAP1 FP IC50 (nM)
2	DN200219-1	>20,000	>20,000
3	DN200263-1	2,000	500
4	DN200318-1	20,000	20,000
5	DN202782-1	500~1,000	~4,000
6	DN202961-1	500~1,000	500~1,000
7	DN203143-1	1,500	5,000
8	DN203372-1	12,000	20,000
9	DN203373-1	10,000	19,000
10	DN203374-1	2,000	5000
11	DN203375-1	2,000	6000
12	DN203376-1	5,000	10,000~20,000
13	DN203377-1	>20,000	~20000
14	DN203378-1	>20,000	~20000
15	DN203379-1	~20,000	>20,000
16	DN203381-1	4000	~20,000
17	DN203487-1	>20,000	>20,000
18	DN203488-1	>20,000	>20,000
19	DN203489-1	1,000	2,000
20	DN203490-1	>20,000	>20,000
21	DN203491-1	2,000	7,000
22	DN203492-1	5,000	10,000
23	DN203493-1	>20,000	>20,000
24	DN203494-1	12,000	>20,000
25	DN203495-1	1,000	2,000
26	DN203633-1	>20,000	<20,000
27	DN203634-1	7,500	6,500
28	DN203635-1	3,000	5,000

도면

도면1

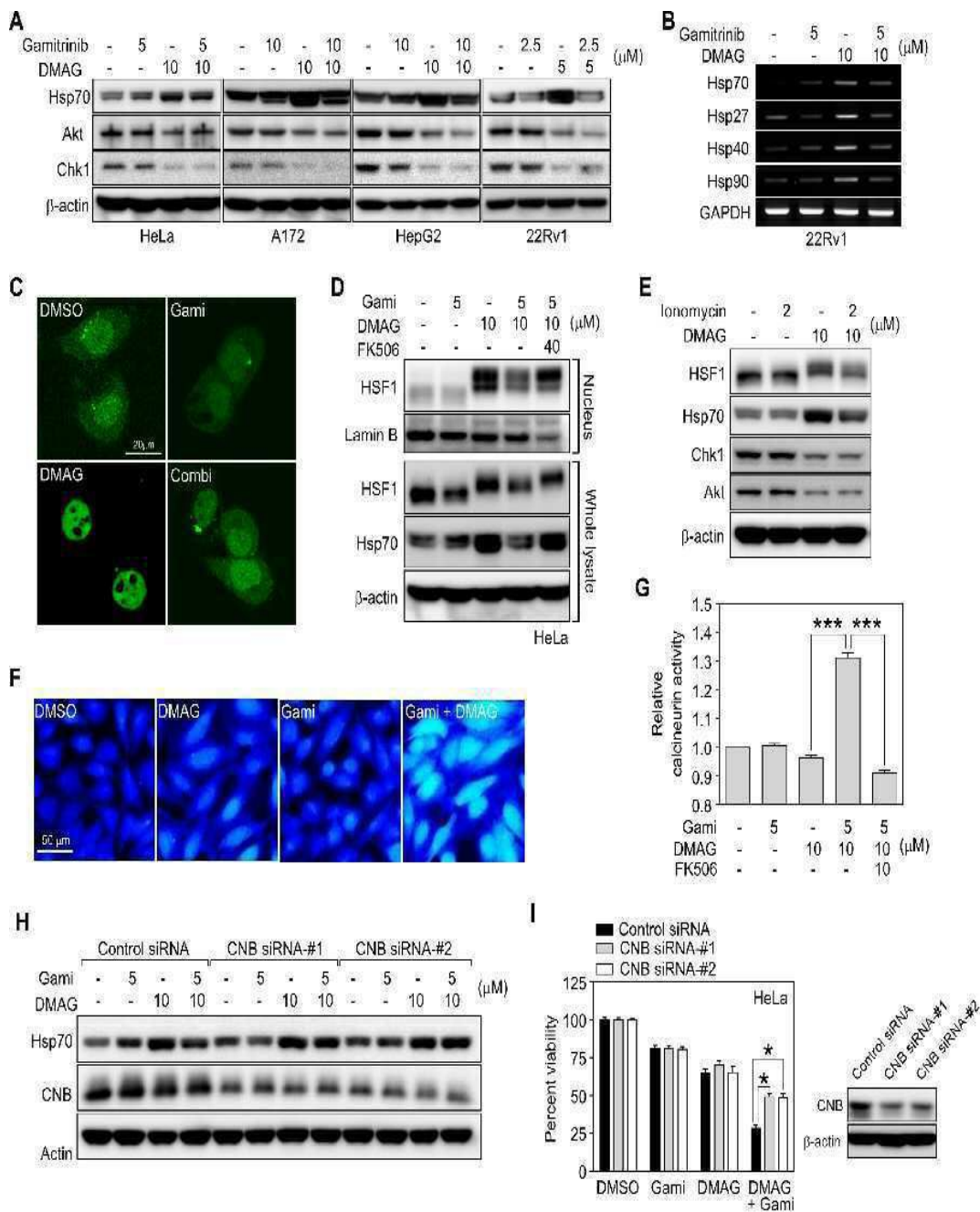


도면2

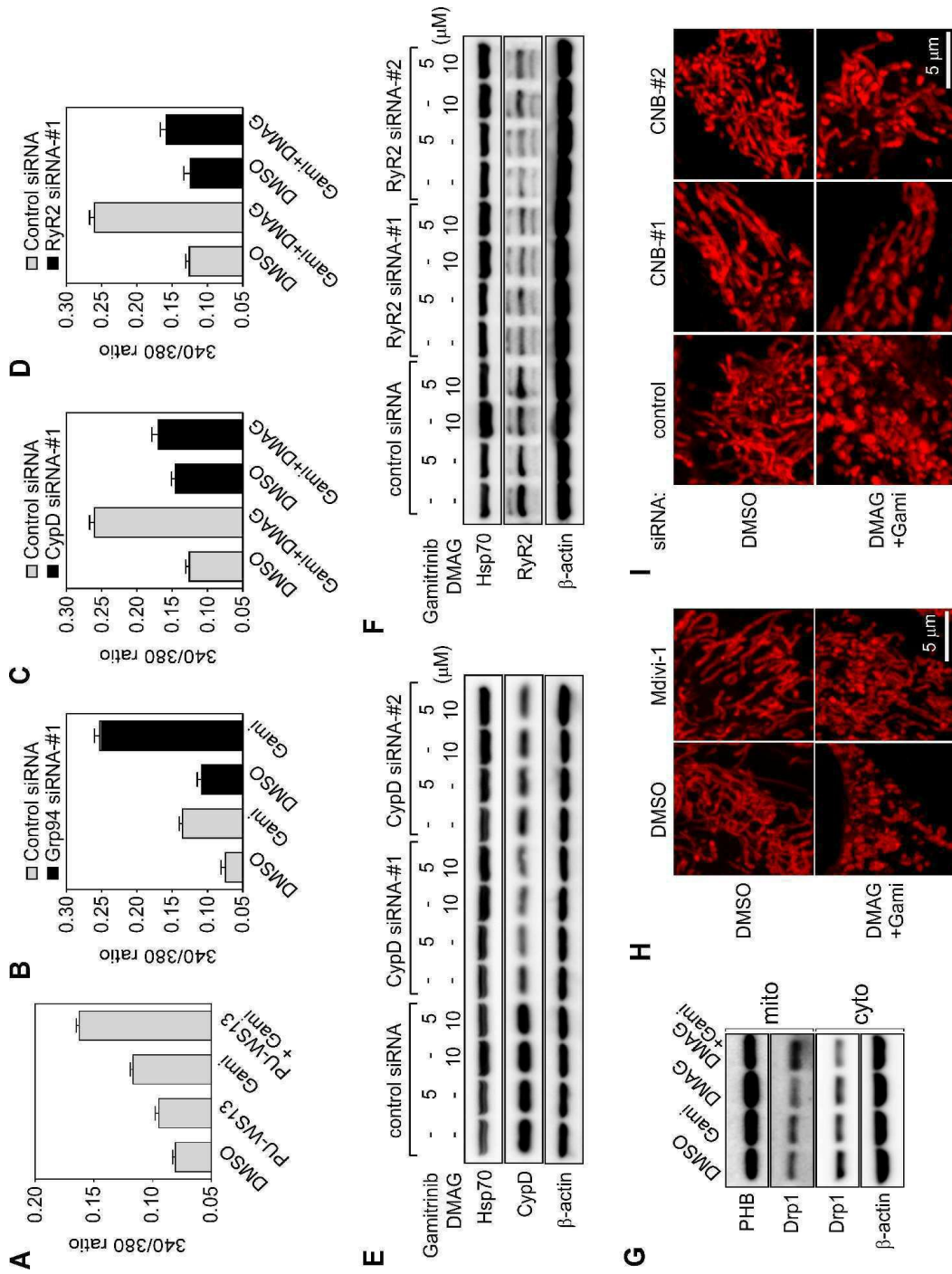


Supplementary Figure 1

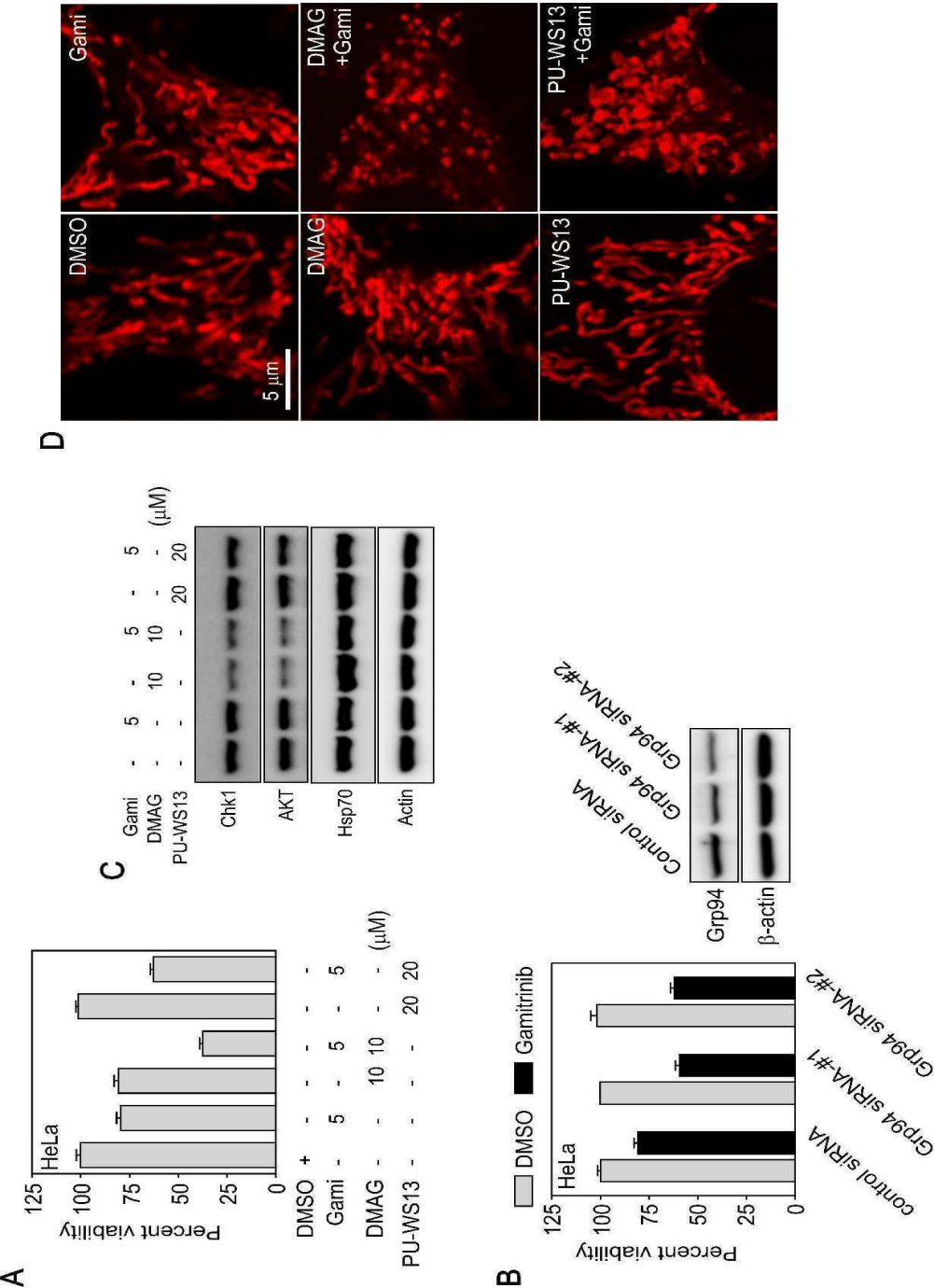
도면3



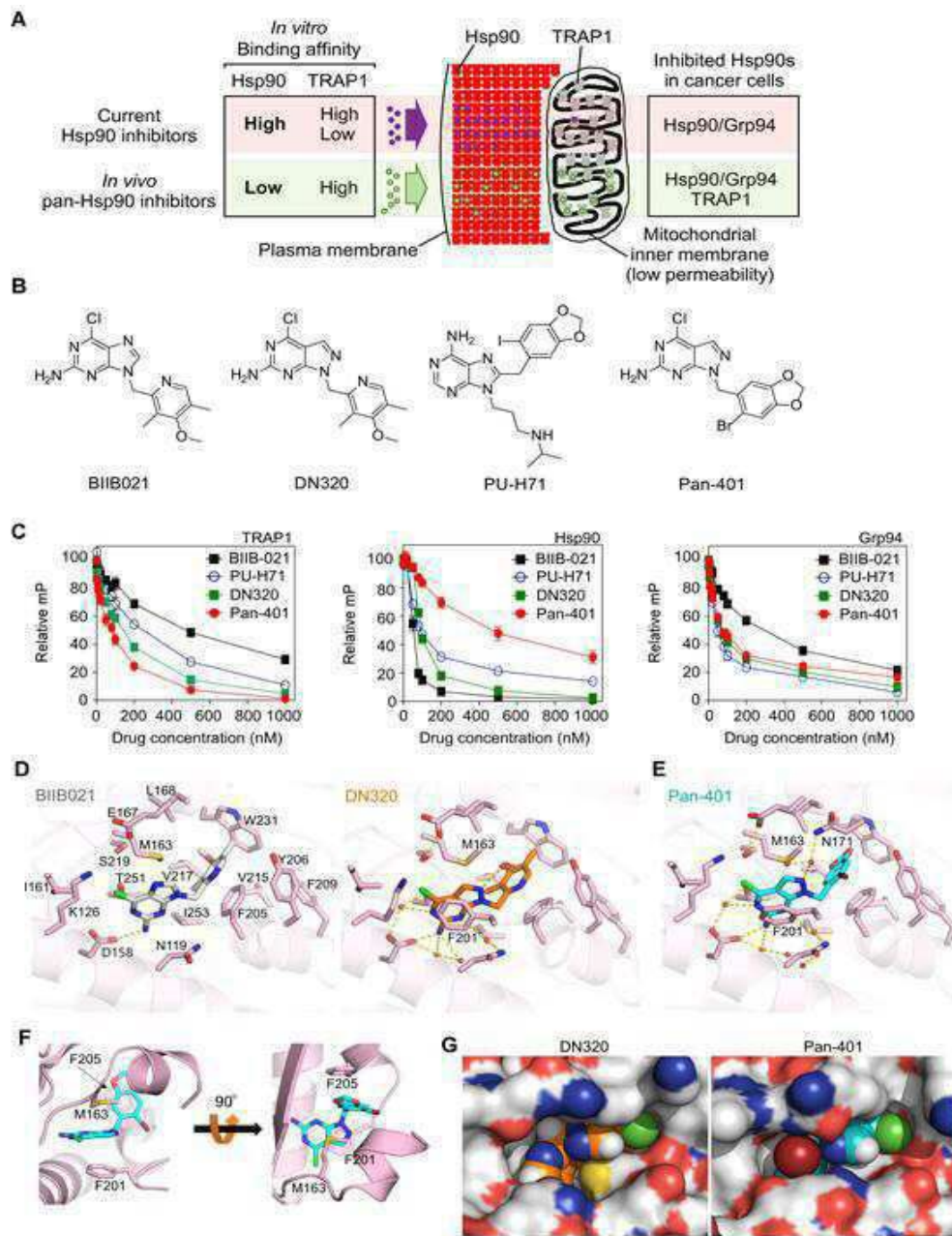
도면4



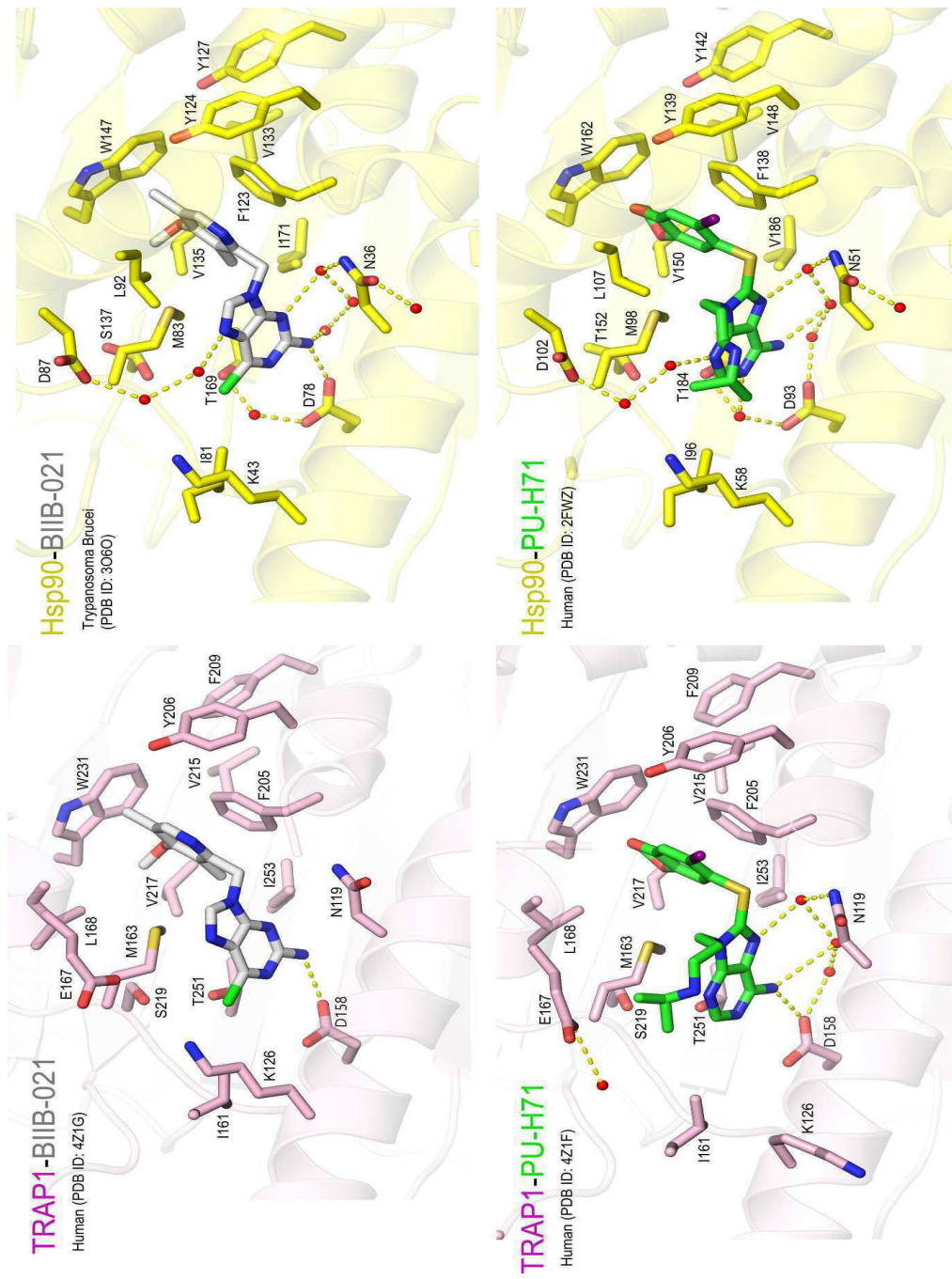
도면5



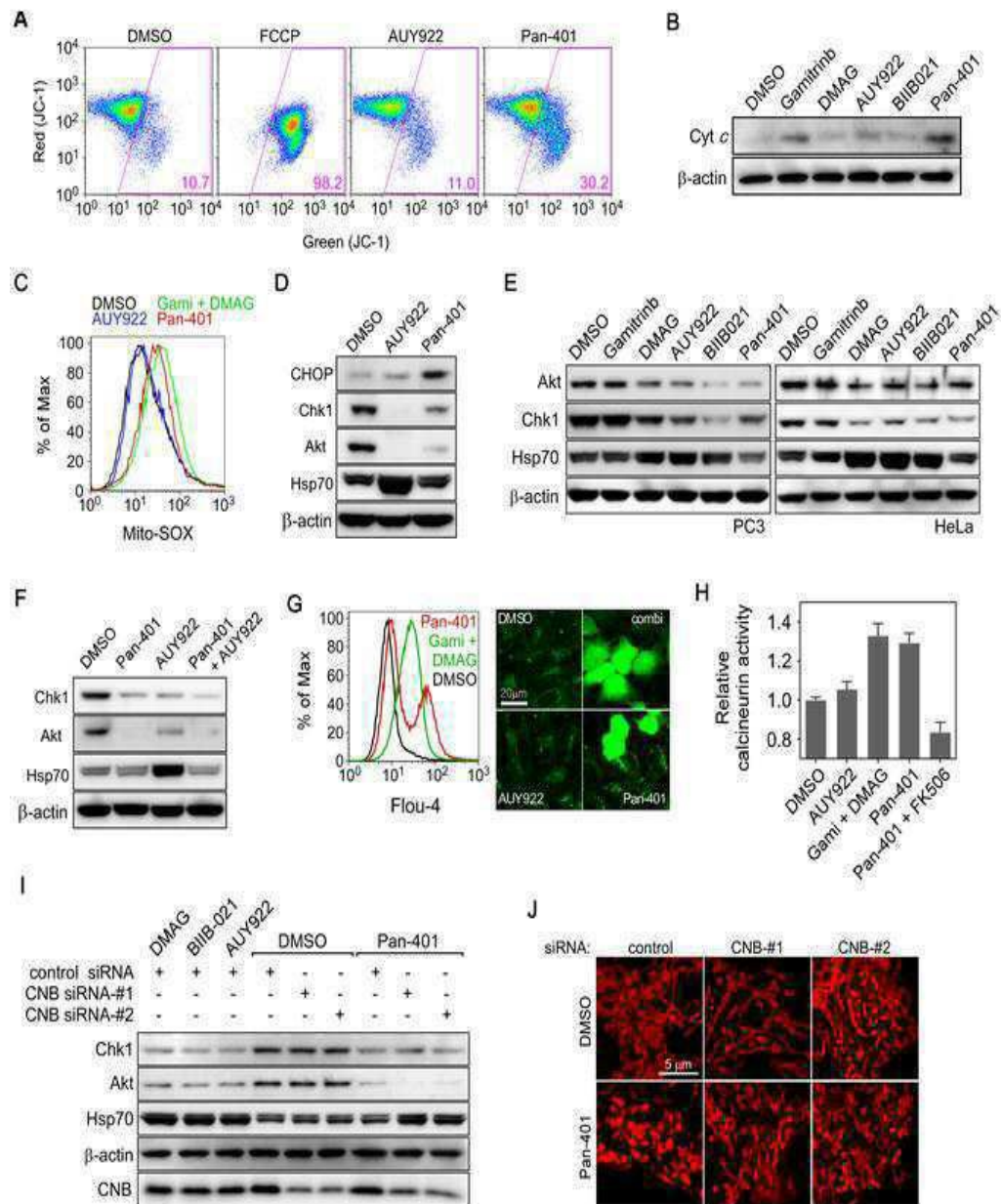
도면6



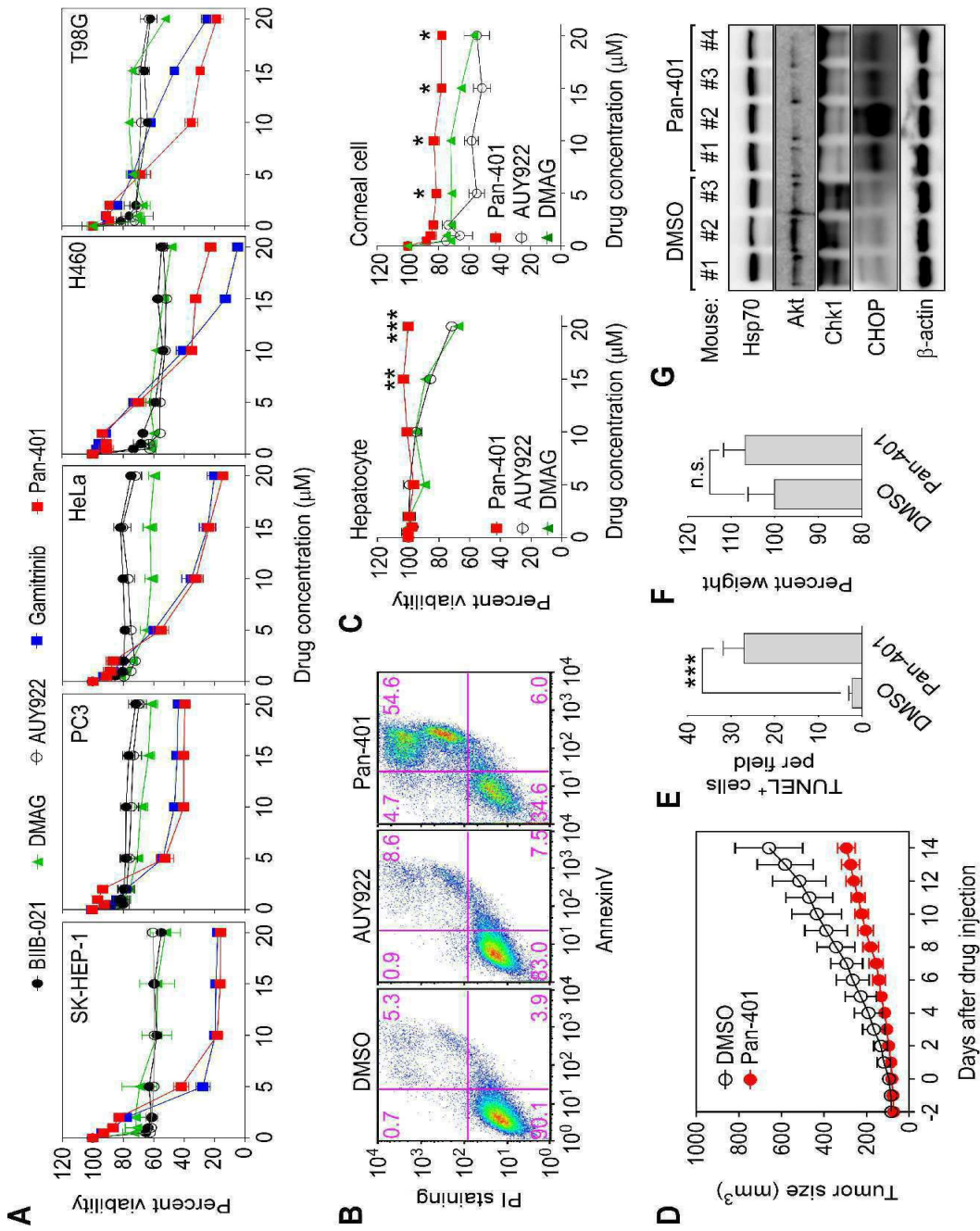
도면7



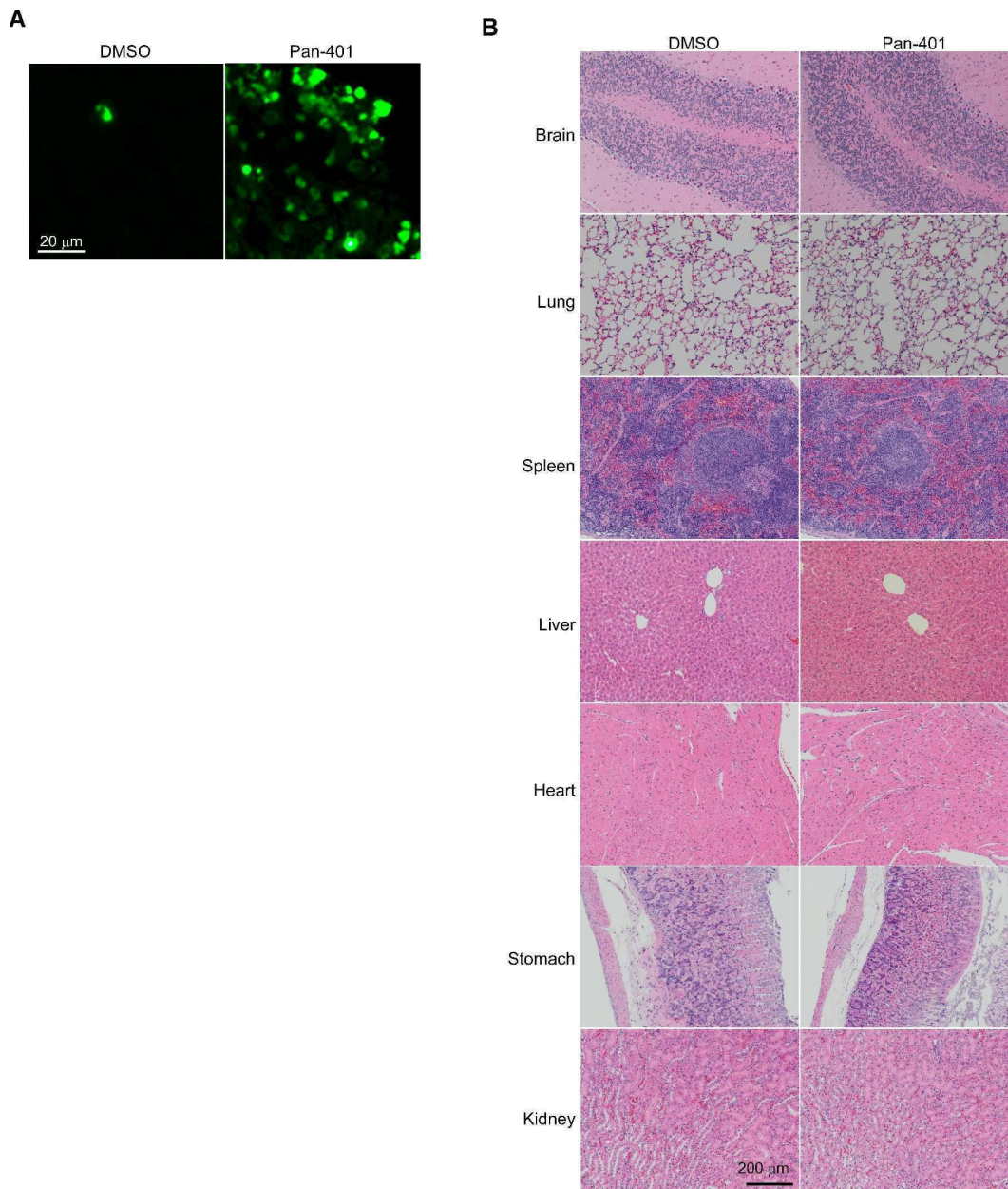
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
- <120> Compound as TRAP1 inhibitor and pharmaceutical composition for anticancer comprising the same
- <130> DPP20173093KR
- <150> KR10-2016-0140260
- <151> 2016-10-26
- <160> 10
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer for amplifying GAPDH
 <400> 1
 cgaggagctt gtcacaaatg g 21
 <210> 2

 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer for amplifying GAPDH
 <400> 2
 ggacgtgatg gcatggactg 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer for amplifying Hsp27
 <400> 3
 gagtgggtcgc agtggtagg 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer for amplifying Hsp27

 <400> 4
 acaggagagga ggaaacttgg 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer for amplifying Hsp40
 <400> 5

ggaaagagca ttcgaaacga	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer for amplifying Hsp40	
<400> 6	
atgccaggcc tgataacatc	20
<210>	
> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer for amplifying Hsp70	
<400> 7	
ccagctgaag aagggtcaag	20
<210> 8	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer for amplifying Hsp70	
<400> 8	
ttttctgctg gtgtctgctg	20
<210> 9	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer for amplifying Hsp90	
<400> 9	
ctgggtttcc tcaggat	17
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> Primer for amplifying Hsp90

<400> 10

taccggattt tgtccaatgc

20