



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0105807
(43) 공개일자 2023년07월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07C 239/16 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61K 31/166 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07C 231/14 (2006.01) C07C 231/24 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07C 239/16 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2022-0001278

(22) 출원일자 2022년01월05일

심사청구일자 2022년01월05일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자

서영호

대구광역시 수성구 청수로 261, 1410동 1301호(황
금동, 캐슬골드파크 4단지)

(74) 대리인

특허법인태백

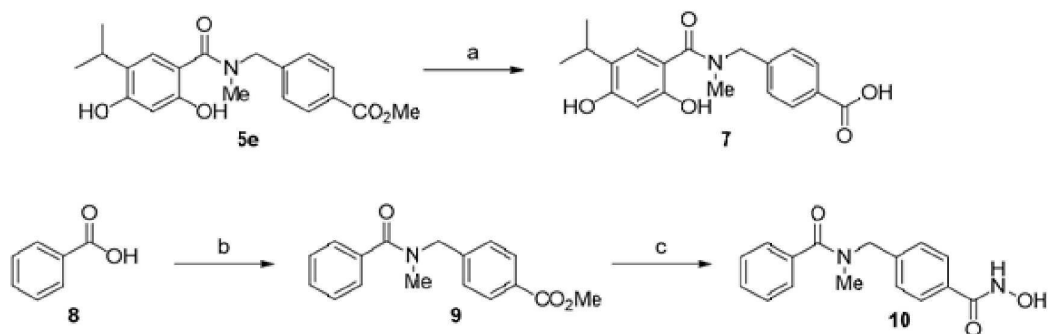
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 Hsp90 및 HDAC6 동시 억제 활성을 갖는 신규 화합물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 Hsp90 및 HDAC6 동시 억제 활성을 갖는 신규 화합물 및 이의 용도에 관한 것으로, HDAC6 억제를 통해 α -튜불린 및 Hsp90과 같은 HDAC6 기질 단백질의 아세틸화를 촉진하고, Hsp90 억제를 통해 Her2, EGFR, Met, Akt 및 HDAC6과 같은 Hsp90 클라이언트의 분해를 유도하여, 상기 신규 화합물은 우수한 IC₅₀값을 갖고 있어 HDAC6 및 Hsp90 모두에 대해 상당한 억제 활성을 나타내어, 비소세포성 폐암(NSCLC)에 대한 강력한 항 증식 효과를 제공하며, 눈에 띄는 비정상적인 거동, 체중 변화 및 명백한 안구 독성 없이 이종이식 모델에서도 상당한 종양 성장 억제효과를 나타냈다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 31/166 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07C 231/14 (2013.01)
C07C 231/24 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345342098
과제번호	2016R1A6A1A03011325
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	약학연구소
기 여 율	40/100
과제수행기관명	계명대학교 산학협력단
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345344825
과제번호	2016R1D1A1B01009559
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	여성생식기 암 치료를 위한 저분자 화합물 설계 및 합성 연구
기 여 율	60/100
과제수행기관명	계명대학교 산학협력단
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

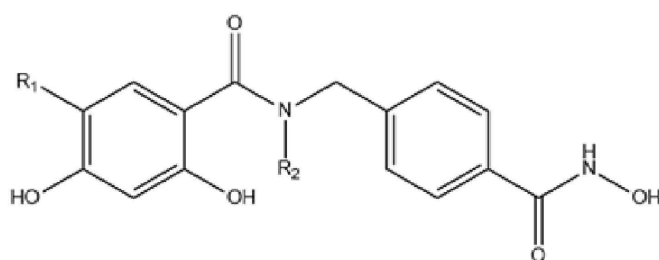
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 6로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

[화학식 6]



상기 화학식 6에서,

R₁은 염소 (Cl) 및 아이소프로필기 (*i*-Pr)로 이루어진 군에서 선택되며, R₂는 (C1~C4)알킬기로 이루어짐.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 화합물 6a 내지 6h인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

(화합물 6a) 5-클로로-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-N-메틸벤즈아마이드 (5-Chloro-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-N-methylbenzamide);

(화합물 6b) 5-클로로-N-에틸-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)벤즈아마이드 (5-Chloro-N-ethyl-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)benzamide);

(화합물 6c) 5-클로로-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-N-프로필벤즈아마이드 (5-Chloro-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-N-propylbenzamide);

(화합물 6d) N-부틸-5-클로로-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)벤즈아마이드 (N-Butyl-5-chloro-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)benzamide);

(화합물 6e) 2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-5-아이소프로필-N-메틸벤즈아마이드 (2,4-Dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-5-isopropyl-N-methylbenzamide);

(화합물 6f) N-에틸-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-5-아이소프로필벤즈아마이드 (N-Ethyl-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-5-isopropylbenzamide);

(화합물 6g) 2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-5-아이소프로필-N-프로필벤즈아마이드 (2,4-Dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-5-isopropyl-N-propylbenzamide); 및

(화합물 6h) N-부틸-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-5-아이소프로필벤즈아마이드 (N-Butyl-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-5-isopropylbenzamide).

청구항 3

청구항 1 및 청구항 2 중 어느 한 항에 따른 화합물을 유효성분으로 함유하는 Hsp90 (heat shock protein 90) 및 HDAC6 (histone deacetylase 6) 동시 억제용 시약 조성물.

청구항 4

청구항 1 및 청구항 2 중 어느 한 항에 따른 화합물을 유효성분으로 함유하는 비소세포성 폐암 (non-small cell lung cancer; NSCLC) 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 비소세포성 폐암은 제피티닙 내성 (gefitinib-resistant)이 있는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

청구항 4에 있어서, 상기 화합물은 Hsp90 (heat shock protein 90) 및 HDAC6 (histone deacetylase 6) 동시 억제하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

청구항 1 및 청구항 2 중 어느 한 항에 따른 화합물을 유효성분으로 함유하는 비소세포성 폐암 (non-small cell lung cancer; NSCLC) 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

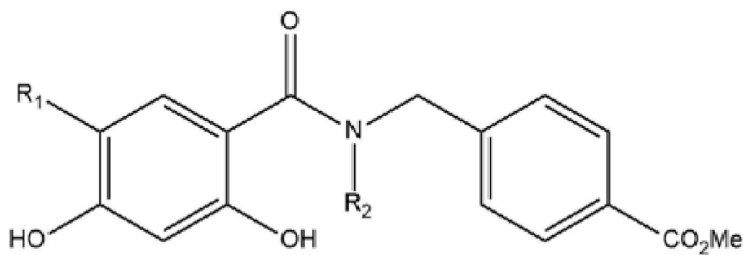
청구항 8

청구항 1 및 청구항 2 중 어느 한 항에 따른 화합물을 투여하는 단계를 포함하는 Hsp90 (heat shock protein 90) 및 HDAC6 (histone deacetylase 6)의 상호작용 억제방법.

청구항 9

- 염산 하이드록시아민 (hydroxylamine hydrochloride)을 저가알코올에 녹인 용액 및 수산화칼륨 (potassium hydroxide)을 저가알코올에 녹인 용액을 혼합한 후, -5 내지 5 °C에서 10 내지 20분 간 교반하는 단계;
- 상기 a) 단계에서 생성된 침전물을 걸러낸 후, 남은 여과물을 하기 화학식 5로 표시되는 화합물을 THF (tetrahydrofuran)에 녹인 용액과 혼합하여, -5 내지 5 °C에서 100 내지 140분 간 교반하는 단계; 및
- 상기 b) 단계의 혼합물을 중화시키고 분획한 후, 이에 따라 생성된 유기층을 건조 및 감압농축하고 정제하는 단계;를 포함하는 청구항 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조방법;

[화학식 5]



상기 화학식 5에서,

R₁은 염소 (Cl) 및 아이소프로필기 (*i*-Pr)로 이루어진 군에서 선택되며, R₂는 (C1~C4)알킬기로 이루어짐.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Hsp90 (heat shock protein 90) 및 HDAC6 (histone deacetylase 6) 동시 억제 활성을 갖는 신규 화합물 및 이의 용도를 제공한다.

배경 기술

[0002] Hsp90 (heat shock protein 90)은 "클라이언트" 단백질이라고 하는 기질 단백질의 올바른 폴딩 (folding), 안정성 및 기능을 조절하는 ATP-의존적 분자 샤페론 (chaperone)이다. 수많은 Hsp90 클라이언트는 표피 성장 인자

수용체 (EGFR/ErbB1), 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (Her2/ErbB2), 중간엽-상피 전이 인자 (Met), 역형성 림프종 키나제 (A1k), 단백질 키나제 B (Akt/PKB), 세포의 급속 가속 섬유육종 (c-Raf) 및 사이클린-의존성 키나제 4 (Cdk4)를 포함하는 종양 유전자이다. Hsp90은 암의 여러 신호 전달 경로에서 결정 단백질로서의 역할로 인해 유망한 치료 표적이 되었다. 암 세포는 정상 세포보다 2 내지 10배 더 높게 Hsp90을 과 발현하며, 이는 저산소증, 산증 및 영양 결핍과 같은 스트레스 상태에서 단백질 항상성을 유지하기 위하여 Hsp90 샤페론 기능에 대한 의존성을 반영한다. Hsp90 조절과 관련된 치료적 이점은 신규 Hsp90 억제제를 식별하는 중요성을 강조한다. 벤조퀴논 안사마이신 항생제인 젤다나마이신은 1994년에 Hsp90 억제제로서 처음 발견되었고, 상당한 수의 Hsp90 억제제가 개발되어 암 치료를 위한 전 임상 또는 임상 시험에 들어갔으나, Hsp90 억제제 중 어느 것도 다양한 독성(간, 안구 및 심장) 및 임상 시험에서 불만족스러운 효능으로 인해 아직 임상적으로 승인되지 않았다. 2015년에 가장 발전된 Hsp90 억제제인 가네테스피브 (ganetespib)는 3상 임상 시험에서 임상적 이점을 입증하지 못했다. 실패에 대한 명확한 이유는 아직 조사 중이지만, 가네테스피브에 대한 후천성 내성이 하나의 가능한 원인으로 제시되었다.

[0003] HDAC (histone deacetylase)는 기질 단백질의 라이신 잔기에서 아세틸기를 제거하는 효소 부류이며, 종양 형성, 자가면역 장애 및 신경퇴행성 질환에 중요한 역할을 한다. 인간 HDAC 동형 단백질은 서열 상동성 및 촉매 메커니즘에 따라서, 클래스 I HDAC (1, 2, 3 및 8), 클래스 IIa HDAC (4, 5, 7 및 9), 클래스 IIb HDAC (6 및 10), 시르투인 (1-7)으로 더 잘 알려진 클래스 III HDAC (1-7), 및 클래스 IV HDAC 11를 포함하는 4개의 별개의 클래스로 분류된다. 클래스 I, II 및 IV HDAC는 아연-의존성 HDAC 효소인 반면에, 클래스 III HDAC는 NAD^+ -의존성 HDAC 효소다. 클래스 IIb 효소인 HDAC6은 세포질에 국한되어 있고 2 개의 독립적 활성 촉매 도메인을 가지고 있기 때문에 독특하다. 다른 HDAC와 달리, HDAC6은 비-히스톤 기질 (α -튜불린, Hsp90, cortactin, Tau)을 탈아세틸화하며, 이에 의해 샤페론 활성화와 미세소관 역학을 조절한다. 리콜리노스타트(ACY1215), 튜바스타틴 A, 및 넥스트라스타트 A를 포함하는 HDAC6 선택적 억제제는 전 임상 및 임상 단계에서 암, 신경퇴행성 질환, 자가면역 질환, 염증, 약물 중독 및 바이러스 감염과 같은 다양한 질병의 치료를 위해 광범위하게 연구되어왔다.

[0004] 최근, 악성 암세포에서 HDAC6과 Hsp90의 상호작용이 주목받고 있다. HDAC6은 Hsp90 탈아세틸화효소이기 때문에 HDAC6의 억제는 Hsp90을 과아세틸화하고, Hsp90을 비활성화 시킨다. 이외에도, HDAC6도 Hsp90 기질 중 하나이다. 따라서, Hsp90의 억제는 유비퀴틴-프로테아좀 경로를 통해 HDAC6의 분해를 야기한다. Hsp90과 HDAC6의 상호 연결성을 고려할 때, 시너지 치료 효과를 발휘하기 위한 시도로 Hsp90과 HDAC6의 이중 억제가 제안되었다. 더욱 중요하게, 최근 문헌은 HDAC가 Hsp90 억제제의 후천성 내성을 매개한다는 것을 나타내고 있으며, 이는 Hsp90과 HDAC의 이중 억제가 약물 내성을 극복할 수도 있음을 제시하며, 이에 대한 연구가 계속 진행되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 10-2017-0090810호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 이의 제조방법을 제공하는 데에 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규 화합물을 유효성분으로 함유하는 Hsp90 (heat shock protein 90) 및 HDAC6 (histone deacetylase 6) 동시 억제용 시약 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규 화합물을 유효성분으로 함유하는 비소세포성 폐암 (non-small cell lung cancer; NSCLC) 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규 화합물을 유효성분으로 함유하는 비소세포성 폐암 (non-small cell lung cancer; NSCLC) 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

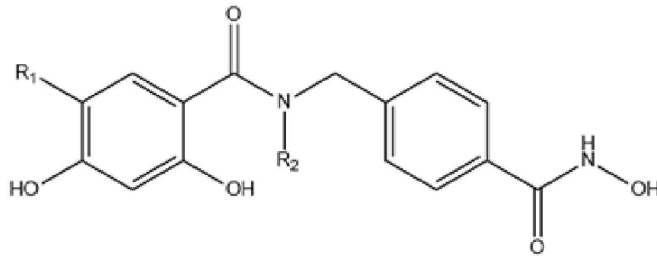
[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 신규 화합물을 투여하는 단계를 포함하는 Hsp90 (heat shock protein 90) 및

HDAC6 (histone deacetylase 6)의 상호작용 억제방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 6로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[화학식 6]



상기 화학식 6에서, R₁은 염소 (Cl) 및 아이소프로필기 (*i*-Pr)로 이루어진 군에서 선택되며, R₂는 (C1~C4)알킬기로 이루어질 수 있다.

또한, 본 발명은 상기 화합물을 유효성분으로 함유하는 Hsp90 (heat shock protein 90) 및 HDAC6 (histone deacetylase 6) 동시 억제용 시약 조성물을 제공한다.

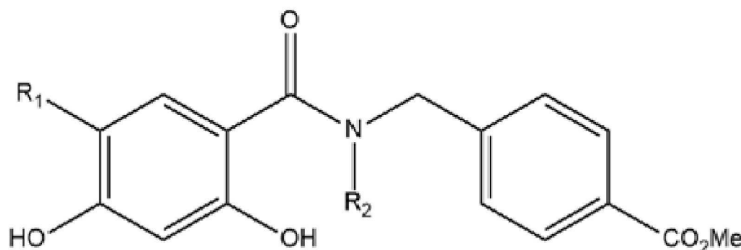
또한, 본 발명은 상기 화합물을 유효성분으로 함유하는 비소세포성 폐암 (non-small cell lung cancer; NSCLC) 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 화합물을 유효성분으로 함유하는 비소세포성 폐암 (non-small cell lung cancer; NSCLC) 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 화합물을 투여하는 단계를 포함하는 Hsp90 (heat shock protein 90) 및 HDAC6 (histone deacetylase 6)의 상호작용 억제방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 a) 염산 하이드록시아민 (hydroxylamine hydrochloride)을 저가알코올에 녹인 용액 및 수산화칼륨 (potassium hydroxide)을 저가알코올에 녹인 용액을 혼합한 후, -5 내지 5 °C에서 10 내지 20분 간 교반하는 단계; b) 상기 a) 단계에서 생성된 침전물을 걸러낸 후, 남은 여과물을 하기 화학식 5로 표시되는 화합물을 THF (tetrahydrofuran)에 녹인 용액과 혼합하여, -5 내지 5 °C에서 100 내지 140분 간 교반하는 단계; 및 c) 상기 b) 단계의 혼합물을 중화시키고 분획한 후, 이에 따라 생성된 유기층을 건조 및 감압농축하고 정제하는 단계;를 포함하는 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조방법을 제공한다.

[화학식 5]



상기 화학식 5에서, R₁은 염소 (Cl) 및 아이소프로필기 (*i*-Pr)로 이루어진 군에서 선택되며, R₂는 (C1~C4)알킬기로 이루어질 수 있다.

발명의 효과

본 발명은 Hsp90 및 HDAC6 동시 억제 활성을 갖는 신규 화합물 및 이의 용도에 관한 것으로, HDAC6 억제를 통해 α -튜불린 및 Hsp90과 같은 HDAC6 기질 단백질의 아세틸화를 촉진하고, Hsp90 억제를 통해 Her2, EGFR, Met, Akt 및 HDAC6과 같은 Hsp90 클라이언트의 분해를 유도하여, 비소세포성 폐암 (NSCLC)에 대한 강력한 항 증식 효

과를 나타내는바, 비소세포성 폐암에 대한 예방 및 개선을 위한 제약 및 건강기능식품 조성물로 활용 가능하다.

도면의 간단한 설명

도 1은 하기 화합물 6a 내지 6h의 합성 모식도를 나타낸다.

도 2는 하기 화합물 7 및 10의 합성 모식도를 나타낸다.

도 3은 Hsp90 및 HDAC에 대한 화합물 6e의 용량-의존적 억제 효과를 나타낸다.

도 4는 Hsp90 및 HDAC 효소에 대한 화합물 6e, 5e 및 10의 비교 억제 활성을 나타낸다.

도 5는 Hsp90의 아세틸화에 대한 화합물 6e의 효과 (A) 및 Hsp90 K294의 아세틸화에 대한 화합물 6e, 5e 및 10의 효과 (B)를 나타낸다.

도 6은 화합물 6e가 H1975 세포에서 아폽토시스 유도하는 것을 나타낸다.

도 7은 α -튜불린 아세틸화 상태의 형광 현미경 이미지를 나타낸다.

도 8은 Hsp90 α (PBD 코드: 2XJX) 복합체에서 화합물 6e의 예측된 결합 모델을 나타낸다.

도 9는 HDAC6 (PBD 코드: 5EF7) 복합체에서 화합물 6e의 예측된 결합 모델을 나타낸다.

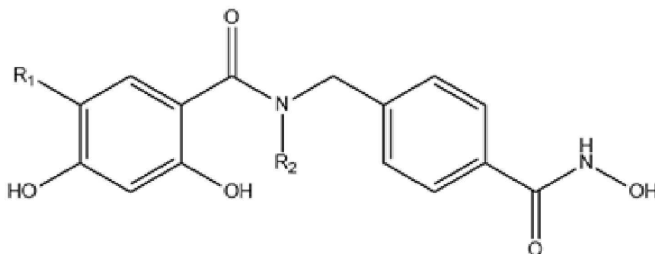
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

악성 암세포에 대한 치료를 위해 HDAC6과 Hsp90의 상호작용이 주목받고 있는바, Hsp90-HDAC6 상호작용의 중요성과 복잡성, 그리고 Hsp90 억제제의 내성 발달 매개에서 HDAC6의 역할에 대해 확립된 지식을 바탕으로 본 발명을 완성하였다.

본 발명은 하기 화학식 6로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[화학식 6]



상기 화학식 6에서, R₁은 염소 (Cl) 및 아이소프로필기 (*i*-Pr)로 이루어진 군에서 선택되며, R₂는 (C1~C4)알킬기로 이루어질 수 있다.

상기 화합물은 하기 화합물 6a 내지 6h일 수 있다.

(화합물 6a) 5-클로로-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-N-메틸벤즈아마이드 (5-Chloro-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-N-methylbenzamide);

(화합물 6b) 5-클로로-N-에틸-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)벤즈아마이드 (5-Chloro-N-ethyl-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)benzamide);

(화합물 6c) 5-클로로-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-N-프로필벤즈아마이드 (5-Chloro-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-N-propylbenzamide);

(화합물 6d) N-부틸-5-클로로-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)벤즈아마이드 (N-Butyl-5-chloro-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)benzamide);

(화합물 6e) 2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-5-아이소프로필-N-메틸벤즈아마이드 (2,4-

Dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-5-isopropyl-N-methylbenzamide)

- [0038] (화합물 6f) N-에틸-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-5-아이소프로필벤즈아마이드 (N-Ethyl-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-5-isopropylbenzamide);
- [0039] (화합물 6g) 2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-5-아이소프로필-N-프로필벤즈아마이드 (2,4-Dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-5-isopropyl-N-propylbenzamide); 및
- [0040] (화합물 6h) N-부틸-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-5-아이소프로필벤즈아마이드 (N-Butyl-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-5-isopropylbenzamide).
- [0042] 또한, 본 발명은 상기 화합물을 유효성분으로 함유하는 Hsp90 (heat shock protein 90) 및 HDAC6 (histone deacetylase 6) 동시 억제용 시약 조성물을 제공한다.
- [0044] 또한, 본 발명은 상기 화합물을 유효성분으로 함유하는 비소세포성 폐암 (non-small cell lung cancer; NSCLC) 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0045] 상기 비소세포성 폐암은 제피티닙 내성 (gefitinib-resistant)이 있을 수 있다.
- [0046] 상기 화합물은 Hsp90 (heat shock protein 90) 및 HDAC6 (histone deacetylase 6) 동시 억제할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0048] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 약학 조성물은 정맥내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.
- [0050] 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 투여량이 0.01 mg/kg 내지 200 mg/kg, 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 또한, 본 발명은 상기 화합물을 유효성분으로 함유하는 비소세포성 폐암 (non-small cell lung cancer; NSCLC) 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0053] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0054] 그밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독

립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0055] 또한, 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

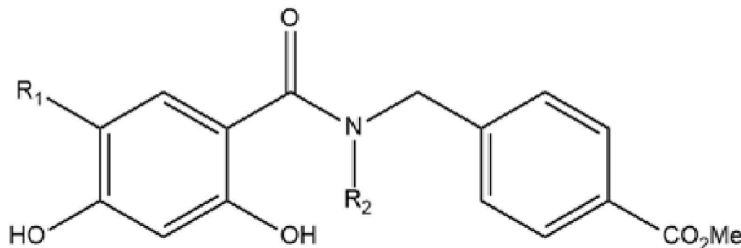
[0056] 상기 "식품첨가물공전"에 기재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고령색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[0057] 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 유효성분은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량부에 1 중량부 내지 90 중량부 포함되도록 첨가될 수 있다.

[0059] 또한, 본 발명은 상기 화합물을 투여하는 단계를 포함하는 Hsp90 (heat shock protein 90) 및 HDAC6 (histone deacetylase 6)의 상호작용 억제방법을 제공한다.

[0061] 또한, 본 발명은 a) 염산 하이드록시아민 (hydroxylamine hydrochloride)을 저가알코올에 녹인 용액 및 수산화칼륨 (potassium hydroxide)을 저가알코올에 녹인 용액을 혼합한 후, -5 내지 5 °C에서 10 내지 20분 간 교반하는 단계; b) 상기 a) 단계에서 생성된 침전물을 걸러낸 후, 남은 여과물을 하기 화학식 5로 표시되는 화합물을 THF (tetrahydrofuran)에 녹인 용액과 혼합하여, -5 내지 5 °C에서 100 내지 140분 간 교반하는 단계; 및 c) 상기 b) 단계의 혼합물을 중화시키고 분획한 후, 이에 따라 생성된 유기층을 건조 및 감압농축하고 정제하는 단계;를 포함하는 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조방법을 제공한다.

[0062] [화학식 5]



[0063]

[0064] 상기 화학식 5에서, R₁은 염소 (Cl) 및 아이소프로필기 (*i*-Pr)로 이루어진 군에서 선택되며, R₂는 (C1~C4)알킬기로 이루어질 수 있다.

[0066] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 등은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 등에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예 등은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0068] [실험예 1] 케미컬

[0069] 달리 명시되지 않는 한, 모든 반응은 오븐-건조 유리 용기 내에서 아르곤 분위기 하에 수행되었다. 구입한 모든 시약 및 용매는 추가적인 정제 없이 사용되었다. Merck 실리카겔 60 F₂₅₄플레이트를 사용하여 박층 크로마토그래피 (TLC)를 수행하였다. TLC 플레이트는 UV 광과 요오드 염색의 조합을 사용하여 시각화되었다. 컬럼 크로마토그래피는 실리카 (Merck Silica Gel 40 내지 63 mm) 상에서 중압 하에 수행하거나 실리카 컬럼 (Biotage SNAP HP-Sil) 또는 C18 컬럼 (Biotage SNAP Ultra C18) 상에서 MPLC (Biotage Isolera One 기기)로 수행하였다. NMR 분석은 제올 (Jeol) 공명에 의해 제작된 JNM-ECZ500R (500MHz)을 이용하여 수행하였다. ¹H 및 ¹³C NMR 화학적 변

동은 백만분율 (ppm)로 기록된다. 샘플 용매의 중수소 잠금 신호를 기준으로서 사용했으며, 커플링 상수 (J)는 헤르츠 (Hz)로 표시된다. 분할 패턴 약어는 다음과 같다: s, 단일항; d, 이중선; t, 삼중항; q, 4중주; dd, 이중선의 이중선; 및 m, 다중. 시험된 모든 화합물의 순도는 VP-ODS C18 컬럼 (4.6mm x 250mm, 5 μ m, Shimadzu) 이 장착된 이중 펌프 Shimadzu LC-6AD 시스템으로 수행된 HPLC 분석에 의해 95 % 이상인 것으로 확인되었다. MS 분석은 Agilent 1290 Infinity LC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)와 함께 Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS 시스템을 사용하여 수행되었다.

[실험예 2] 화합물 6a 내지 6h 합성

화합물 6a 내지 6h의 합성은 2차 아민 화합물 3a 내지 3d를 제조하여 착수하였다 (도 1). 다양한 1차 아민과 메틸 4-포르밀벤조에이트 (화합물 2)의 환원성 아민화는 81 내지 91 % 수율의 화합물 3a 내지 3d를 제공했다. 화합물 3a 내지 3d를 사용하여 카르복실산 화합물 4a 또는 4b와 2차 아민 화합물 3a 내지 3d의 EDC-매개된 아미드 커플링 반응을 원활하게 진행하여 화합물 5a 내지 5h를 34 내지 72% 수율로 제공했다. 마지막으로, 수산화칼륨의 존재 하에 하이드록실아민으로 메틸 에스테르 화합물 5a 내지 5h를 후속 처리하여 화합물 6a 내지 6h를 12 내지 49% 수율로 성공적으로 제공하였다. 이하, 자세히 서술한다.

(1) 화합물 3a 내지 3d의 합성을 위한 일반적인 절차

알킬아민 (Alkylamine; 9.14 mmol)을 메탄올 (50 mL) 중 메틸 4-포르밀벤조에이트 (4-formylbenzoate; 1.00 g, 6.09 mmol)의 용액에 첨가하였다. 상온에서 30분 동안 교반한 후, 용액을 0 $^{\circ}$ C로 냉각시키고, 수소화붕소나트륨 (sodium borohydride; 0.23 g, 6.09 mmol)을 서서히 첨가하였다. 생성된 용액을 실온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물에 물 (70 mL)을 첨가한 후, 메탄올을 감압하에 증발시키고, 생성된 수용성 상을 디클로로메탄 (CH_2Cl_2 ; 100mL)으로 추출하였다. 유기층을 무수 황산 나트륨 (Na_2SO_4)로 건조하고 감압 농축하여 목적 생성물을 수득하였다.

(화합물 3a) 메틸 4-((메틸아미노)메틸)벤조에이트 (Methyl 4-((methylamino)methyl)benzoate)

상기 제조방법으로 81 %의 수득률로 백색유를 얻었다.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.85(d, J=8.2Hz, 2H), 7.24(d, J=8.2Hz, 2H), 3.75(s, 3H), 3.64(s, 2H), 2.29(s, 3H), 1.56(s, 1H). ^{13}C NMR (101MHz, CDCl_3) δ 166.7, 145.4, 129.5, 128.6, 127.8, 55.4, 51.7, 35.8. ESI MS (m/z) 180.09 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(화합물 3b) 메틸 4-((에틸아미노)메틸)벤조에이트 (Methyl 4-((ethylamino)methyl)benzoate)

상기 제조방법으로 90 %의 수득률로 황색유를 얻었다.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.93(d, J=8.1Hz, 2H), 7.33(d, J=8.1Hz, 2H), 3.83(s, 3H), 3.77(s, 2H), 2.61(q, J=7.1Hz, 2H), 1.45(s, 1H), 1.07(t, J=7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101MHz, CDCl_3) δ 166.9, 145.9, 129.6, 128.7, 127.9, 53.5, 51.9, 43.6, 15.2. ESI MS (m/z) 194.11 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(화합물 3c) 메틸 4-((프로필아미노)메틸)벤조에이트 (Methyl 4-((propylamino)methyl)benzoate)

상기 제조방법으로 91 %의 수득률로 백색유를 얻었다.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.00(d, J=8.3Hz, 2H), 7.40(d, J=8.3Hz, 2H), 3.91(s, 3H), 3.85(s, 2H), 2.60(t, J=7.2Hz, 2H), 1.54(q, J=7.3Hz, 3H), 0.93 (t, J=7.3Hz, 3H). ^{13}C NMR (101MHz, CDCl_3) δ 167.0, 146.0, 129.7, 128.7, 127.9, 53.6, 52.0, 51.4, 23.2, 11.7. ESI MS (m/z) 208.13 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

(화합물 3d) 메틸 4-((부틸아미노)메틸)벤조에이트 (Methyl 4-((butylamino)methyl)benzoate)

[0085] 상기 제조방법으로 88 %의 수득률로 백색유를 얻었다.

[0086] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.01(d, J=8.2Hz, 2H), 7.41(d, J=8.2Hz, 2H), 3.92(s, 3H), 3.86(s, 2H), 2.64(t, J=7.1Hz, 2H), 1.76(s, 1H), 1.55-1.48(m, 2H), 1.41-1.33(m, 2H), 0.92(t, J=7.3Hz, 3H). ^{13}C NMR(101MHz, CDCl_3) δ 167.0, 145.8, 129.7, 128.7, 127.9, 77.5, 77.2, 76.8, 32.1, 20.4, 13.9. ESI MS (m/z) 222.14 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0088] (2) 화합물 5a 내지 5h의 합성을 위한 일반적인 절차

[0089] EDC (0.406 g, 2.12 mmol), HOBt (Hydroxybenzotriazole; 0.143 g, 1.06 mmol) 및 DIPEA (N,N-Diisopropylethylamine; 0.137 g, 1.06 mmol)가 있는 상태에서 카복실산 (1.06 mmol) 및 2차 아민 (1.59 mmol)의 혼합물을 DMF (dimethylformamide; 5 mL)에서 교반하였다. 혼합물은 아세트산 에틸 (80 mL)에 용해되었다. 유기층은 1N 염산 수용액 (80 mL)으로 세척하여 무수 황산나트륨 (Na_2SO_4)에 건조시킨 후, 감소된 압력으로 농축하였다. MPLC (Medium pressure liquid chromatography; Biotage SNAP HP-Sil column)로 정제하여 화합물을 수득하였다.

[0090] (화합물 5a) 메틸 4-((5-클로로-2,4-디하이드록시-N-메틸벤즈아미도)메틸)벤조에이트 (Methyl 4-((5-chloro-2,4-dihydroxy-N-methylbenzamido)methyl)benzoate)

[0091] 상기 제조방법으로 MPLC (헥산 50 %)에 의해 56 %의 수득률로 백색 고체를 얻었다.

[0092] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.07(d, J=8.3Hz, 2H), 7.38(d, J=8.1Hz, 2H), 7.29(s, 1H), 6.66(s, 1H), 4.78(s, 2H), 3.95(s, 3H), 3.11(s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 171.4, 166.8, 160.3, 155.1, 141.4, 130.3, 129.7, 128.5, 127.5, 110.5, 110.2, 105.2, 53.2, 52.3, 37.2. ESI MS (m/z) 350.07 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0093] (화합물 5b) 메틸 4-((5-클로로-N-에틸-2,4-디하이드록시벤즈아미도)메틸)벤조에이트 (Methyl 4-((5-chloro-N-ethyl-2,4-dihydroxybenzamido)methyl)benzoate)

[0094] 상기 제조방법으로 MPLC (헥산 50 %)에 의해 68 %의 수득률로 백색 고체를 얻었다.

[0095] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.08 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.25 (s, 1H), 6.68 (s, 1H), 4.79 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.52 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 1.78 (s, 1H), 1.30 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR(101MHz, CDCl_3) δ 171.4, 166.8, 160.4, 154.9, 141.8, 130.3, 129.7, 127.7, 127.1, 110.8, 110.1, 105.3, 52.2, 50.4, 43.3, 12.9. ESI MS (m/z) 364.09 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0096] (화합물 5c) 메틸 4-((5-클로로-2,4-디하이드록시-N-프로필벤즈아미도)메틸)벤조에이트 (Methyl 4-((5-chloro-2,4-dihydroxy-N-propylbenzamido)methyl)benzoate)

[0097] 상기 제조방법으로 MPLC (헥산 50 %)에 의해 55 %의 수득률로 백색 고체를 얻었다.

[0098] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.08 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.24 (s, 1H), 6.67 (s, 1H), 4.80 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.40 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 1.76-2.15 (1H), 1.72 (q, J = 7.6 Hz, 3H), 0.91 (t, J = 7.5 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 206.7, 171.5, 166.8, 160.2, 154.9, 141.8, 130.3, 129.7, 127.8, 127.1, 111.0, 110.1, 105.3, 52.3, 50.8, 50.1, 21.0, 11.1. ESI MS (m/z) 378.10 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

[0099] (화합물 5d) 메틸 4-((N-부틸-5-클로로-2,4-디하이드록시벤즈아미도)메틸)벤조에이트 (Methyl 4-((N-butyl-5-chloro-2,4-dihydroxybenzamido)methyl)benzoate)

[0100] 상기 제조방법으로 MPLC (헥산 50 %)에 의해 46 %의 수득률로 백색 고체를 얻었다.

- [0101] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.13 (s, 1H), 8.06 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.36 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.23 (s, 1H), 6.65 (s, 1H), 4.78 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.42 (t, J = 7.8 Hz, 2H), 1.71-1.63 (m, 2H), 1.33-1.26 (m, 3H), 0.91 (t, J = 7.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 171.2, 167.0, 157.2, 155.4, 142.1, 130.1, 129.3, 128.3, 127.2, 112.2, 111.1, 104.6, 52.2, 49.3, 49.1, 29.7, 19.8, 13.6. ESI MS (m/z) 392.12 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0102] (화합물 5e) 메틸 4-((2,4-디하이드록시-5-아이소프로필-N-메틸벤즈아미도)메틸)벤조에이트 (Methyl 4-((2,4-dihydroxy-5-isopropyl-N-methylbenzamido)methyl)benzoate)
- [0103] 상기 제조방법으로 MPLC (헥산 40 %)에 의해 75 %의 수득률로 백색 고체를 얻었다.
- [0104] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.20 (s, 1H), 8.09 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.06 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 4.80 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.16-3.04 (m, 4H), 0.97 (d, J = 6.6 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 173.4, 167.1, 158.8, 157.7, 142.1, 130.3, 129.4, 127.0, 126.2, 108.8, 103.9, 54.1, 54.1, 52.4, 36.6, 26.1, 22.5. ESI MS (m/z) 358.16 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0105] (화합물 5f) 메틸 4-((N-에틸-2,4-디하이드록시-5-아이소프로필벤즈아미도)메틸)벤조에이트 (Methyl 4-((N-ethyl-2,4-dihydroxy-5-isopropylbenzamido)methyl)benzoate)
- [0106] 상기 제조방법으로 MPLC (헥산 40 %)에 의해 72 %의 수득률로 백색 고체를 얻었다.
- [0107] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.07 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.04 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 4.79 (s, 2H), 3.95 (s, 3H), 3.51 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 3.09-3.02 (m, 1H), 1.29 (t, J = 7.0 Hz, 3H), 0.93 (d, J = 6.4 Hz, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 173.2, 167.1, 158.5, 157.5, 142.5, 130.3, 129.3, 126.9, 126.2, 125.5, 109.3, 103.9, 52.3, 50.9, 43.0, 26.0, 22.4, 12.7. ESI MS (m/z) 372.17 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0108] (화합물 5g) 메틸 4-((2,4-디하이드록시-5-아이소프로필-N-프로필벤즈아미도)메틸)벤조에이트 (Methyl 4-((2,4-dihydroxy-5-isopropyl-N-propylbenzamido)methyl)benzoate)
- [0109] 상기 제조방법으로 MPLC (헥산 40 %)에 의해 57 %의 수득률로 백색 고체를 얻었다.
- [0110] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.00 (s, 1H), 8.06 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.57 (s, 1H), 7.39 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.03 (s, 1H), 6.44 (s, 1H), 4.80 (s, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.39 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 3.11-3.04 (m, 1H), 1.74 (td, J = 15.2, 7.6 Hz, 2H), 0.95 (d, J = 6.1 Hz, 6H), 0.89 (t, J = 7.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 173.3, 167.2, 158.3, 157.6, 142.6, 130.2, 129.2, 126.9, 126.3, 125.5, 109.4, 103.9, 52.3, 51.3, 50.1, 26.0, 22.5, 20.8, 11.2. ESI MS (m/z) 386.19 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0111] (화합물 5h) 메틸 4-((N-부틸-2,4-디하이드록시-5-아이소프로필벤즈아미도)메틸)벤조에이트 (Methyl 4-((N-butyl-2,4-dihydroxy-5-isopropylbenzamido)methyl)benzoate)
- [0112] 상기 제조방법으로 MPLC (헥산 30 %)에 의해 34 %의 수득률로 백색 고체를 얻었다.
- [0113] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.31 (s, 1H), 8.10 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.40 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.06 (s, 1H), 6.41 (s, 1H), 4.81 (s, 2H), 3.96 (s, 3H), 3.44 (t, J = 7.9 Hz, 2H), 3.08-3.01 (m, 1H), 1.77-1.70 (m, 2H), 1.36-1.28 (m, 2H), 0.97 (d, J = 6.4 Hz, 6H), 0.94 (t, J = 7.5 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 173.2, 167.1, 158.5, 157.5, 142.6, 130.2, 129.3, 126.9, 126.1, 125.5, 109.4, 104.0, 52.3, 51.4, 48.3, 29.6, 26.1, 22.4, 20.2, 13.8. ESI MS (m/z) 400.20 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

- [0115] (3) 화합물 6a 내지 6h의 합성을 위한 일반적인 절차
- [0116] 메탄올 (8 mL) 중 하이드록실아민 염산염(hydroxylamine hydrochloride; 2.78 g, 40 mmol)의 용액을 0 °C에서 메탄올 (8 mL) 중 수산화칼륨 (2.24 g, 40 mmol)의 또 다른 용액에 첨가하였다. 혼합물을 0 °C에서 15분 동안 교반하였다. 침전된 염화칼륨을 여과하고, 여과물을 다음 반응에 사용하였다. THF (Tetrahydrofuran; 7 mL) 중 상기 화합물 5a 내지 6h (0.3 mmol)의 용액에 새로 제조된 하이드록실아민 용액 및 수산화나트륨 (0.12 g, 3 mmol)을 0 °C에서 첨가하고, 반응물을 0 °C에서 2시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 3N 염산으로 pH 7로 중화시키고, 에틸아세테이트 (ethyl acetate)로 분획하였다. 유기층을 무수 황산나트륨 (Na₂SO₄)으로 건조하고, 감압 농축하고 HPLC로 정제하여 화합물을 수득하였다.
- [0117] (화합물 6a) 5-클로로-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-N-메틸벤즈아마이드 (5-Chloro-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-N-methylbenzamide)
- [0118] 상기 제조방법으로 HPLC로 정제된 후, 42 % 수율로 흰색 고체를 얻었다.
- [0119] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.76 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.45 (s, 2H), 7.19 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.74 (s, 2H), 2.95 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 170.4, 166.5, 155.1, 153.9, 140.8, 131.3, 128.7, 127.4, 127.1, 115.7, 111.2, 103.3. Purity: 99.5% by HPLC. ESI MS (m/z) 351.07 [M+H]⁺.
- [0120] (화합물 6b) 5-클로로-N-에틸-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)벤즈아마이드 (5-Chloro-N-ethyl-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)benzamide)
- [0121] 상기 제조방법으로 HPLC로 정제된 후, 38 % 수율로 흰색 고체를 얻었다.
- [0122] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.74 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.47 (s, 2H), 7.14 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.75 (s, 2H), 3.37 (s, 2H), 1.11 (t, J = 7.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 170.2, 166.5, 154.9, 153.5, 141.3, 131.1, 128.3, 127.3, 127.0, 116.1, 111.1, 103.3, 12.0. Purity: 99.1% by HPLC. ESI MS (m/z) 365.08 [M+H]⁺.
- [0123] (화합물 6c) 5-클로로-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-N-프로필벤즈아마이드 (5-Chloro-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-N-propylbenzamide)
- [0124] 상기 제조방법으로 HPLC로 정제된 후, 41 % 수율로 흰색 고체를 얻었다.
- [0125] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.74 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.45 (s, 2H), 7.13 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.75 (s, 2H), 3.28 (s, 2H), 1.58 (s, 2H), 0.81 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CD₃OD) δ 170.5, 166.6, 154.9, 153.5, 141.2, 131.1, 128.5, 127.3, 127.0, 116.1, 111.1, 103.3, 20.6, 10.1. Purity: 96.4% by HPLC. ESI MS (m/z) 379.10 [M+H]⁺.
- [0126] (화합물 6d) N-부틸-5-클로로-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)벤즈아마이드 (N-Butyl-5-chloro-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)benzamide)
- [0127] 상기 제조방법으로 HPLC로 정제된 후, 41 % 수율로 흰색 고체를 얻었다.
- [0128] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.74 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.45 (s, 2H), 7.13 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 4.75 (s, 2H), 3.31 (s, 2H), 1.54 (s, 2H), 1.23 (s, 2H), 0.83 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CH₃OD) δ 170.4, 166.5, 154.9, 153.5, 141.2, 131.1, 128.5, 127.3, 127.0, 116.1, 111.2, 103.3, 29.5, 19.4, 12.6. Purity: 99.9% by HPLC. ESI MS (m/z) 393.11 [M+H]⁺.
- [0129] (화합물 6e) 2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-5-아이소프로필-N-메틸벤즈아마이드 (2,4-Dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbamoyl)benzyl)-5-isopropyl-N-methylbenzamide)

- [0130] 상기 제조방법으로 HPLC로 정제된 후, 43 % 수율로 흰색 고체를 얻었다.
- [0131] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 11.21 (s, 1H), 9.51 (s, 1H), 7.73 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.34 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 6.87 (s, 1H), 6.37 (s, 1H), 4.59 (s, 2H), 3.09-3.02 (m, 1H), 2.82 (s, 3H), 1.07 (d, J = 6.1 Hz, 6H). ^{13}C NMR(101MHz, CH_3OD) δ 170.4, 164.4, 156.6, 153.0, 141.4, 132.0, 127.6, 127.5, 126.0, 125.8, 114.6, 102.6, 26.2, 23.1. Purity: 99.4% by HPLC. ESI MS (m/z) 359.15 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0132] (화합물 6f) N-에틸-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-5-아이소프로필벤즈아마이드 (N-Ethyl-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbonyl)benzyl)-5-isopropylbenzamide)
- [0133] 상기 제조방법으로 HPLC로 정제된 후, 12 % 수율로 흰색 고체를 얻었다.
- [0134] ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.75 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.46 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 6.96 (s, 1H), 6.36 (s, 1H), 4.75 (s, 2H), 3.41 (s, 2H), 3.20-3.13 (m, 1H), 1.33 (d, J = 18.1 Hz, 3H), 1.14 (d, J = 4.2 Hz, 6H). ^{13}C -NMR (126 MHz, METHANOL- D_4) δ 172.4, 156.9, 141.8, 131.2, 127.3, 127.2, 127.0, 126.5, 125.9, 125.1, 120.1, 101.4, 25.6, 21.9, 12.1. Purity: 99.4% by HPLC. ESI MS (m/z) 373.17 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0135] (화합물 6g) 2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-5-아이소프로필-N-프로필벤즈아마이드 (2,4-Dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbonyl)benzyl)-5-isopropyl-N-propylbenzamide)
- [0136] 상기 제조방법으로 HPLC로 정제된 후, 38 % 수율로 흰색 고체를 얻었다.
- [0137] ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.74 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.43 (s, 2H), 6.94 (s, 1H), 6.36 (s, 1H), 4.74 (s, 2H), 3.32 (s, 2H), 3.18-3.13 (m, 1H), 1.59 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 1.13 (d, J = 6.4 Hz, 6H), 0.82 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CH_3OD) δ 173.9, 167.8, 158.1, 154.1, 142.9, 132.4, 128.6, 128.3, 128.2, 127.8, 126.6, 115.2, 103.3, 27.3, 23.1, 21.9, 11.4. Purity: 99.4% by HPLC. ESI MS (m/z) 387.18 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0138] (화합물 6h) N-부틸-2,4-디하이드록시-N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-5-아이소프로필벤즈아마이드 (N-Butyl-2,4-dihydroxy-N-(4-(hydroxycarbonyl)benzyl)-5-isopropylbenzamide)
- [0139] 상기 제조방법으로 HPLC로 정제된 후, 49 % 수율로 흰색 고체를 얻었다.
- [0140] ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.74 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.44 (s, 2H), 6.95 (s, 1H), 6.38 (s, 1H), 4.74 (s, 2H), 3.32 (s, 2H), 3.18-3.15 (m, 1H), 1.54 (s, 2H), 1.23-1.17 (m, 2H), 1.13 (d, J = 6.4 Hz, 6H), 0.81 (s, 3H). ^{13}C NMR(101MHz, CH_3OD) δ 172.6, 166.6, 156.7, 152.7, 141.4, 132.4, 127.2, 126.9, 126.5, 125.2, 113.7, 102.0, 29.6, 26.0, 21.7, 19.4, 13.4, 12.6. Purity: 97.9% by HPLC. ESI MS (m/z) 401.20 $[\text{M}+\text{H}]^+$.
- [0142] [실험예 3] 화합물 7, 9 및 10 합성
- [0143] 화합물 6e의 작용 방식을 명확히 하기 위하여, 일련의 대조 화합물 7, 9 및 10을 합성했다. 화합물 7은 하이브리드 6e와 구조적으로 유사하지만 아연-결합 그룹이 없는 Hsp90 억제제로서 설계되었다. 화합물 9는 Hsp90 결합 잔기 없는 HDAC 억제제로서 설계되었다. 도 2에 따를 때, 먼저 메탄올과 물에서 수산화리튬의 존재 하에 에스테르 화합물 6e의 가수분해 반응을 수행하여 화합물 7을 86 % 수율로 수득했다. 화합물 6들을 성공적으로 제조한 후, 본 연구자는 화합물 10의 합성위해 노력했다. 마이크로파 조사 하에 벤조산 화합물 8과 아민 화합물 3a의 EDC-매개 커플링 반응을 수행하여 화합물 9를 80 % 수율로 수득했다. 마지막으로, 하이드록실아민 및 수산화칼륨을 사용하여 메틸 에스테르 (methyl ester) 화합물 9에서 히드록삼산 (hydroxamic acid) 화합물 10을 20 % 수율로 수득했다. 이하, 각각의 화합물 제조방법을 자세히 서술한다.
- [0144] (1) (화합물 7) 4-((2,4-디하이드록시-5-아이소프로필-N-메틸벤즈아미도)메틸)벤조산 (4-((2,4-Dihydroxy-5-isopropyl-N-methylbenzamido)methyl)benzoic acid)의 합성 절차

- [0145] 메탄올 (1 mL) 및 물 (1 mL)에 상기 화합물 5e (0.05 g, 0.14 mmol) 및 수산화리튬 (0.4 g)의 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반하였다. 그 후, 6N 염산에서 pH 6으로 중화시키고, 에틸아세테이트로 3회 추출하였다. 유기층은 무수 황산나트륨 (Na₂SO₄)에서 건조시키고, 감소된 압력으로 농축시킨 후, MPLC (Biotage SNAP HP-Sil column)에 의해 정제되어 76 % 수율로 흰색 고체 화합물 7을 얻었다.
- [0146] ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 8.00 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.42 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 6.98 (s, 1H), 6.34 (s, 1H), 4.73 (s, 2H), 3.19-3.11 (m, 1H), 2.97 (s, 3H), 1.11 (d, J = 6.0 Hz, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CH₃OD) δ 173.9, 169.5, 158.5, 154.6, 143.8, 131.0, 130.8, 128.4, 127.9, 126.8, 114.5, 103.3, 27.4, 23.0. Purity: 97.3% by HPLC. ESI MS (m/z) 342.14 [M-H]⁻.
- [0148] (2) (화합물 9) 메틸 4-((N-메틸벤즈아미도)메틸)벤조에이트 (Methyl 4-((N-methylbenzamido)methyl)benzoate)의 합성 절차
- [0149] DMF (dimethylformamide; 4 mL)에 벤조산 (benzoic acid; 0.30 g, 2.46 mmol), 상기 화합물 3a (0.66 g, 3.68 mmol), EDC (0.94 g, 4.92 mmol), BOBt (0.33 g, 2.46 mmol) 및 DIPEA (0.44 mL, 2.46 mmol)의 혼합물을 120 °C에서 3시간 동안 마이크로파 조사 (Biotage Initiator) 하에 교반하였다. 혼합물을 에틸아세테이트 (50 mL)로 희석하였다. 유기층은 1N 염산(50 mL)으로 세척하여 무수 황산나트륨 (Na₂SO₄)에 건조시키고, 감소된 압력으로 농축하였다. MPLC (Biotage SNAP HP-Sil column)로 정제하여 80 % 수율로 화합물 9를 얻었다.
- [0150] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.04 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.42-7.38 (m, 6H), 7.25 (d, J = 5.1 Hz, 1H), 4.69 (d, J = 97.6 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 2.97 (d, J = 64.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 172.3, 171.7, 166.8, 142.3, 142.0, 135.9, 130.1, 129.8, 129.5, 128.5, 128.0, 127.0, 126.7, 55.0, 52.1, 50.7, 37.2, 33.4. ESI MS (m/z) 124.12 [M+H]⁺.
- [0152] (3) (화합물 10) N-(4-(하이드록시카르바모일)벤질)-N-메틸벤즈아마이드 (N-(4-(Hydroxycarbamoyl)benzyl)-N-methylbenzamide)의 합성 절차
- [0153] 0 °C에서 수산화칼륨 (1.58 g, 28.3 mmol)에 메탄올 (5.5 mL)을 첨가하였다. 혼합물은 0 °C에서 15분간 교반한 후, 침전된 염화칼륨을 걸러내고 여과물을 사용하였다. 상기 화합물 9 (0.20 g, 0.71 mmol)를 0 °C에서 제조한 히드록실아민 및 수산화나트륨 (0.75 g, 18.8 mmol)에 넣어 2 시간 동안 교반하였다. 혼합물은 3N 염산에서 pH 7로 중화시키고, 에틸아세테이트로 추출하였다. 유기층은 무수 황산나트륨 (Na₂SO₄)에 건조시키고, 감소된 압력으로 농축시킨 후, HPLC에 의해 정제되어 15 % 수율로 화합물 10을 얻었다.
- [0154] ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.81-7.76 (m, 2H), 7.49-7.45 (m, 6H), 7.29 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.71 (d, J = 87.5 Hz, 2H), 2.99 (d, J = 44.3 Hz, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CH₃OD) δ 173.2, 172.6, 166.4, 166.3, 140.8, 140.5, 135.7, 131.6, 131.4, 129.8, 128.4, 127.8, 127.4, 127.2, 126.7, 126.6, 126.4, 54.5, 50.2, 36.5, 32.5. Purity: 99.9% by HPLC. ESI MS (m/z) 285.12 [M+H]⁺.
- [0156] [실험예 4] 세포배양
- [0157] H1975 세포를 스트렙토마이신 (500 mg/mL), 페니실린 (100 units/mL) 및 10 % 소 태아 혈청(fetal bovine serum; FBS)이 보충된 L-글루타민 (L-glutamin)으로 RPMI 1640에서 성장시켰다. 세포를 가슴 분위기 (37°C, 5 % CO₂)에서 성장시켜 융합하였다.

[0159] [실험예 5] 세포 증식 분석

[0160] H1975 세포를 투명한 96웰 플레이트에 1.5×10^3 cells/well로 접종하고, 배지 부피를 100 μ L로 하여 세포를 밤새 부착하도록 하였다. 다음날, 다양한 농도의 표시된 화합물 또는 0.5 % DMSO 비히클 대조군을 웰에 첨가하였다. 그 다음, 세포를 37 $^{\circ}$ C에서 24시간, 48시간 및 72시간 동안 배양하였다. 세포 생존률은 Promega Cell Titer 96 Aqueous One Solution 세포 증식 분석을 사용하여 결정하였다. Tecan Infinite F200 Pro 플레이트 판독기에서 490 nm에서의 흡광도를 판독하고, 그 값들을 DMSO 단독으로 배양된 세포의 흡광도 백분율로 표시하였다.

[0162] [실험예 6] 웨스턴 블롯 (Western Blot)

[0163] 세포를 100 mm 배양 접시 (1×10^6 cells/dish)에 접종하고, 밤새 부착하도록 하였다. 화합물을 다양한 농도로 첨가하고, 세포를 추가 24시간 동안 배양하였다. 비교를 위하여, 세포를 DMSO (0.5 %) 또는 겔다나마이신 (geldanamycin; 1 μ M)과 함께 24시간 동안 배양했다. 세포를 빙-냉 (ice-cold) 용해 완충액 (23 mM Tris-HCl pH 7.6, 130 mM 염화나트륨, 1 % NP-40, 1 % 소듐 데옥시콜레이트 (sodium deoxycholate) 및 0.1 % SDS)에서 수득하고, 레인 당 30 μ g의 용해물을 SDS-PAGE에 의해 분리한 후, PVDF 막 (Bio-Rad)으로 옮겼다. 막을 TBST 내의 5 % 탈지유로 차단한 후, 상응하는 항체 (EGFR, Her2, Met, Akt, CDK-4, Hsp90, Hsp70, HDAC6, HDAC1, Ac-a-튜불린, a-튜불린, Ac-히스톤 H3, 히스톤 H3, PARP, 카스파제3, 절단된 카스파제3, 절단된 카스파제8, Bcl-2, Bax 또는 β -액틴)와 함께 배양하였다. 서양고추냉이 퍼옥시다제 (horseradish peroxidase)에 연결된 적절한 이차 항체를 결합한 후, 제조업체 (GE Healthcare, USA)의 지시에 따라서 ECL 화학 발광에 의해 단백질을 가시화하였다.

[0165] [실험예 7] 단백질 정제

[0166] 재조합 Hsp90을 pET-15b 플라스미드의 대장균 BL21 (DE3) 세포 내에서 발현하였다. A600이 약 0.5에 도달할 때까지 180 rpm에서 교반하면서 37 $^{\circ}$ C에서 2.5 mg/mL (500 μ L/200 mL)의 암피실린이 보충된 LB broth 배지에서 신선한 콜로니를 성장시키고, 이소프로필-1-티오-b-D-갈라토피라노사이드 (isopropyl-1-thio-b-D-galactopyranoside; 최종 농도 1 mM)의 첨가에 의해 단백질 발현을 유도하였다. 온도를 18 $^{\circ}$ C로 낮추고, 세포 배양물을 밤새 흔들려 주었다. 세포를 원심분리 (4000 rpm, 20분, 4 $^{\circ}$ C)에 의해 수득하였다. 세포 펠렛을 결합 완충액 (20 mM Tris pH 8.0 및 0.5 M NaCl)에 현탁시키고, 얼음 상에서 초음파 처리하고, 14000 rpm, 99분, 4 $^{\circ}$ C에서 원심 분리하여 정화하였다. His-tagged 단백질을 His Trap 컬럼이 있는 니켈-니트릴로아세트산 (nickel-nitriloacetic acid)으로 정제하고, 용출 완충액 (20 mM Tris pH 8.0, 0.5 M NaCl, 1 M imidazole)을 사용하여 FPLC로 분리하였다. Hsp90 단백질의 순도를 확인하기 위하여, 단백질을 SDS-PAGE로 분석하였다. 정제된 단백질은 PD10 컬럼을 이용하여 탈염하고, Vivaspin 20에서 2.4 mg/mL로 농축하여 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

[0168] [실험예 8] 형광 편광 분석

[0169] 모든 형광 편광 (fluorescence polarization; 이하, FP라함) 실험은 마이크로 플레이트 판독기를 사용하여 96웰의 검은색의 둥근 바닥 플레이트에서 수행하였다. FP 분석 실험을 위하여, 각각의 웰에, HFB 완충액 (20 mM HEPES pH 7.3, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 20 mM Na₂MoO₄, 0.01 % NP-40), 30 nM 재조합 Hsp90 α 전장 단백질, 5 nM 플루오레세인 아이소티오시아네이트 (isothiocyanate) 표지된 겔다나마이신 (geldanamycin) (GA-FITC) 억제제, 0.1 mg/mL 소 글로불린 (Bovine globulin; BGG), 2 mM 1,4-디티오테이트 (1,4-dithiothreitol; DTT) 및 다양한 농도의 화합물을 첨가하였다. 모든 웰은 HFB 버퍼에서 100 μ L의 최종 부피를 가졌다. 플레이트를 4 $^{\circ}$ C에서 14시간 동안 배양하도록 하였다. 밀리편광 단위 (mP)의 편광 값을 여기 파장 495 nm 및 방출 파장 530 nm에서 측정하였다.

[0171] [실험예 9] 면역형광 염색

[0172] 세포를 유리 커버슬립 (2×10^4 cells/well)에 접종하고, 밤새 부착하도록 하였다. 화합물 6e 및 화합물 10 (1

μM)을 24시간 동안 처리한 후, 세포를 3.7 % 포름알데히드를 사용하여 실온에서 10분 동안 고정한 후, PBS로 3회 세척하였다. 세포를 0.1 % Triton X-100으로 실온에서 10분 동안 투과한 다음, PBS로 3회 세척하였다. 실온에서 30분 동안 1 % BSA로 차단한 후, 세포를 4 °C에서 밤새 튜블린 항체의 아세틸화와 함께 배양하였다. 이어서, 세포를 실온에서 1시간 동안 Alexa Fluor 588과 함께 배양하였다. 마지막으로, 세포를 핵 염색을 위해 DAPI와 함께 배양하였다. Axio Observer A1 현미경 (Carl Zeiss, Sartouville, France)을 사용하여 이미지를 촬영하였다.

[0174] [실험예 10] 면역침전(Immunoprecipitation; IP)

[0175] 세포를 100 mm 배양 접시(1×10^6 cells/dish)에서 접종하고, 24시간 동안 부착하도록 하였다. 억제제를 지시된 농도로 첨가하고, 세포를 추가로 24시간 동안 배양하였다. 세포를 빙-냉 용해 완충액 (RIPA 완충액, 1 % 100 mM PMSF, 1 % 프로테아제 및 인산염 억제제 콕테일 (protease & phosphate inhibitor cocktail) 및 1 % 0.5 M EDTA 용액) 내에서 수득하였다. 용해물을 4 °C에서 40분 동안 16,000 g에서 원심분리하여 정화시켰다. Hsp90에 대한 항체 (Santa Cruz, sc-69703)를 상등액에 첨가하였다. 단백질 A/G PLUS-아가로제 (Santa Cruz, sc-2003)를 갖는 IP (Immunoprecipitation)를 제조업체의 지침에 따라서 수행하였다. Hsp90에 대해 항체를 갖는 IP 샘플을 Ac-Lysine (Cell Signaling, #9441) 항체로 웨스턴 블롯하였다.

[0177] [실험예 11] HDAC 효소 분석

[0178] HDAC1, 3, 6 및 7의 활성 분석은 제조업체의 프로토콜 (BPS Biosciences)에 따라서 수행하였다. 효소를 HDAC 형광 기질의 존재 하에 30분 동안 37 °C에서 상이한 농도의 화합물 및 트리코스타틴 A와 함께 배양하였다. HDAC 분석 현상액을 첨가하고, 플레이트를 실온에서 15분 동안 배양하였다. Tecan Infinite F200 Pro 플레이트 리더를 사용하여 형광 강도를 측정하였다.

[0180] [실험예 12] 아포토시스 (Apoptosis) 분석

[0181] 세포를 12웰 플레이트(1×10^5 /well)에 접종하고 밤새 부착하도록 하였다. 화합물을 표시된 농도 (0.5, 1 및 2 M)로 첨가하고, 세포를 추가로 24시간 동안 배양하였다. 1X 아넥신 V 결합 완충액 내에 현탁시킨 후, 세포를 아넥신 V로 15분 동안 염색하고, FACS 완충액 및 요오드화 프로피디움에 첨가하였다. 그 다음, 유세포 분석기인 BD FACSVerser를 사용하여 아포토시스 세포를 측정하였다.

[0183] [실험예 13] *In vivo*에서 이종이식

[0184] NOD-scid IL2R감마넬 (NSG) 마우스 (수컷, 7주령)를 잭슨 연구소 (미국)에서 구입하여 계명대학교 의과대학의 지침 안내서에 따라서 유지 관리하였다. 모든 생체 내 연구는 승인된 실험 프로토콜 (KM-2018-35)에 따라서 수행하였다. 마우스를 멸균 및 표준화된 환경 조건 (실온 $25 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대 습도 $50 \pm 10\%$, 12시간 명암 리듬) 하에 개별 환기 케이지 (IVC)에서 1주일 동안 순응시켰다. 실험 0일째에 H1975 세포 (1.0×10^6 cells)를 마우스의 왼쪽 옆구리 부위에 피하 (s.c.) 이식하였다. 마우스를 실험 그룹에 무작위로 분배했다 (그룹 당 6마리의 마우스). 이종이식 1주일 후, 마우스를 상기 화합물 6e (25 mg/kg 및 50 mg/kg) 또는 DMSO로 매일 복강 내 처리한 후, 6주 동안 주말 휴식을 취했다. 종양 크기는 주사 당시와 주사 후 일주일에 두 번 2차원 캘리퍼스 측정하였다. 개별 종양 부피 (V)는 공식 $V = (\text{길이} \times [\text{폭}]^2) / 2$ 에 의해 계산하였다.

[0186] [실험예 14] 면역조직화학 (Immunohistochemistry; IHC)

[0187] 실험 말기에 마우스의 종양 조직 및 눈을 수확하였다. 종양 조직을 10 % 포르말린으로 고정하고, 데이비슨 용액 (347 ml 탈이온수, 111 ml 아세트산, 320 ml 무수 에탄올 및 222 ml 포름알데히드 (10 % 완충된 인산염))으로 눈을 고정했다. 종양 조직과 눈을 파라핀에 매립하고 절편화하였다. 광학 현미경 검사를 위해 섹션을 H&E로 염색하였다. 아세틸화 히스톤 3 및 EGFR 염색의 평가를 위하여, 조직 절편을 PBS 내에서 투과시키고, pH 6.0의

10mM 시트르산나트륨 완충액 내에서 100 °C에서 10분 동안 배양한 다음, 1차 항체인 항-EGF 수용체 (EGFR; 1:50 희석, Cat# 4267, Cell signaling, USA) 또는 항-아세틸-히스톤 H3 (1:800 희석, Cat# 9649, Cell signaling, USA)과 함께 배양하였다. 그 다음, 섹션을 2차 항체 (1:200 희석, Cat# sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, USA)와 함께 배양한 다음, 디아미노벤지딘 발색제 (DAB; Cat# SK-4105, Vector Laboratories, USA)로 염색하고, 헤마톡실린 (Cat# S3309, Dako, 덴마크)으로 대조염색하였다. 염색된 조직 절편을 현미경 (Nikon, Japan)으로 검사하였다.

[실시예 1] Hsp90 α 에 대한 시험관내 결합 친화도 및 H1975 비소세포 폐암 세포에 대한 화합물 6a 내지 6h의 성장 억제

FP 분석을 이용하여 화합물 6a 내지 6h를 Hsp90 α 의 ATP-결합 포켓에 대한 결합 친화도에 대해 평가했다.

표 1



Compound	R ₁	R ₂	Hsp90 α (FP) ^a (IC ₅₀ ; nM)	H1975 ^b (EC ₅₀ ; μ M)
6a	Cl	Me	608	68.8
6b	Cl	Et	693	13.2
6c	Cl	Pr	>1000	73.6
6d	Cl	Bu	632.4	66.4
6e	<i>i</i> -Pr	Me	61	1.7
6f	<i>i</i> -Pr	Et	220	7.0
6g	<i>i</i> -Pr	Pr	648	23.7
6h	<i>i</i> -Pr	Bu	367.5	23.6

^a Hsp90 α 의 N-말단 도메인에 대한 결합 친화도는 FP 분석에 의해 결정.

^b H1975비소세포폐암 세포에 대한 항 증식 활성.

표 1에 따를 때, 아이소프로필-치환된 화합물 6e 내지 h는 일반적으로 염소-치환된 화합물 6a 내지 d보다 Hsp90 α 에 더 강한 결합 친화도를 나타냈으며, 화합물 6e의 결합 친화도는 염소-치환된 유사체 화합물 6a의 결합 친화도보다 약 10배 더 높았다. 또한, 메틸기-치환된 화합물 6a 및 6e가 FP 분석에서 가장 활성이 있음을 나타냈다. 부피가 더 큰 R₂ 치환체가 Hsp90 α 에 대한 결합 친화력을 방해한다는 것을 확인했으며, 이는 Asn51 및 Ser52 잔기에 의해 형성된 ATP-포켓 벽에 대한 입체 반발 때문이다. 부틸기-치환된 화합물 6d 및 6h는 부틸기가 프로필기보다 분명히 더 부피가 크지만 프로필기-치환된 화합물 6c 및 6g보다 Hsp90 α 에 대한 결합에 더 강력하였다. 전반적인 결과는 아이소프로필 치환체 (R₁=*i*-프로필) 및 N-메틸 치환체 (R₂=메틸)를 갖는 화합물 6e가 가장 강력한 Hsp90 α 결합 친화도 (IC₅₀=61 nM)를 보인다는 것을 확인했다.

MTS 비색 분석을 사용하여 H1975 비소세포성 폐암 세포의 성장에 대한 억제 효과에 대해 화합물 6a 내지 6h를

또한 평가하였다. 표 1에 따를 때, 화합물 6e는 가장 낮은 EC₅₀값이 1.7 mM으로 가장 강력한 유도체임을 확인했다. 일반적으로 아이소프로필-치환된 화합물 6e 내지 6h는 염소-치환된 화합물 6a 내지 6d보다 우수한 항암 활성을 나타냈으며, 이는 FP 분석 데이터와 일치했다. FP 분석에서 관찰된 바와 같이, R₂위치에서 부피가 가장 작은 메틸 치환체를 갖는 화합물 6e의 성장 억제 효과가 H1975 세포에 대해 가장 활성이 있는 반면에 R₂위치에서 에틸, 프로필 또는 부틸기와 같은 부피가 더 큰 치환체를 갖는 화합물 6f-h의 성장 억제 효과는 H1975 세포에 대해 덜 활성적이었다는 것에 있어서, 아이소프로필-치환된 화합물 6e 내지 6h의 Hsp90 α 결합 친화도는 세포 활성으로 양호했다. 상기의 결과로부터 화합물 6e는 가장 발달된 유도체로 확인되었다.

[실시예 2] HDAC 동형 단백질에 대한 화합물 6e의 시험관내 억제 활성

화합물 6e를 HDAC1, 3, 6 및 7 동형 단백질에 대한 억제 활성에 대해 추가로 조사하였다. FDA 승인을 받은 SAHA를 기준 약물로서 사용하였다.

표 2

Compound	Class I		Class IIb	Class IIa	Selectivity index ^a		
	HDAC1	HDAC3	HDAC6	HDAC7	HDAC1/6	HDAC3/6	HDAC7/6
6e (IC ₅₀ ; nM)	654.5	1,539	105.7	1,691	6.2	14.6	16.0
SAHA (IC ₅₀ ; nM)	219.3	107.2	49.0	61,020	4.5	2.2	1245

^a 선택도 지수: HDAC6에 대한 HDAC 하위 유형의 비율

표 2에 따를 때, 화합물 6e는 105.7 nM의 IC₅₀값으로 HDAC6 효소를 효율적으로 억제하였으며, 클래스 I (HDAC1에 대해 6.2배 및 HDAC3에 대해 14.6배) 및 클래스 IIa HDAC (HDAC7에 대해 16배)에 대한 HDAC 동형 단백질에 대해 우수한 선택도를 나타냈다. 이에 반해, 기준 약물인 SAHA는 클래스 I HDAC 동형 단백질 (HDAC1에 대해 4.5배 및 HDAC3에 대해 2.2배)에 비해 불량한 HDAC6 선택도를 보였지만, 클래스 IIa HDAC7에 대해서는 우수한 선택도 (1245배)를 나타냈다. 이러한 실험 결과를 볼 때, 화합물 6e가 HDAC1에 대한 보통의 억제 활성 (IC₅₀=654.5nM)과 함께 HDAC6 (IC₅₀=105.7nM)에 대한 우수한 억제 활성을 발휘했음을 확인했다.

[실시예 3] Hsp90 및 HDAC에 대한 화합물 6e의 용량-의존적 억제 효과

Hsp90에 의해 조절되는 신호 전달 경로에 대한 화합물 6e의 용량-의존적 효과를 조사했다. Hsp90 억제의 세포 바이오마커는 그의 코샤페론 (Co-chaperone) Hsp70의 수반 유도로 클라이언트 단백질을 분해한다는 것이 널리 알려져 있다. 도 1A에 따를 때, 화합물 6e는 H1975 세포에서 Her2, EGFR, Met 및 Akt를 용량-의존적으로 하향 조절했으며, 이 세포주는 EGFR의 T790M 돌연변이 및 Met 수용체의 과발현을 나타내는 것으로 보고되어 결과적으로 EGFR 표적 약물인 게피티닙 (gefitinib)에 대한 내성을 부여했다. 또한, Hsp70 및 Hsp90의 발현 수준을 증가시켰으나, 내부 표준물질인 β -액틴의 발현 수준은 변하지 않았다.

HDAC6은 Hsp90의 널리 알려진 기질이고, Hsp90 억제는 HDAC6의 프로테아좀 분해로 이어지기 때문에 본 연구자는 다음으로 HDAC6의 총 단백질 수준을 평가했다. 웨스턴 블롯 분석은 화합물 6e가 용량-의존적 방식으로 HDAC6의 단백질 수준을 하향 조절하는 것으로 나타냈지만, 화합물 6e는 양성 대조군 겔다나마이신 (geldanamycin; 이하, GA라함) (1 mM)에 비해 HDAC6의 분해에 대해 덜 효과적이었다. 앞서 기술한 바와 같이, 1 mM의 GA가 α -튜불린의 아세틸화를 거의 촉진하지 않는다는 점에서 1 mM의 화합물 6e는 1 mM의 GA보다 α -튜불린의 아세틸화를 더 극적으로 유도했다. 따라서, 화합물 6e에 의한 아세틸화 α -튜불린의 유도가 주로 Hsp90이 아닌 HDAC6에 대한 억

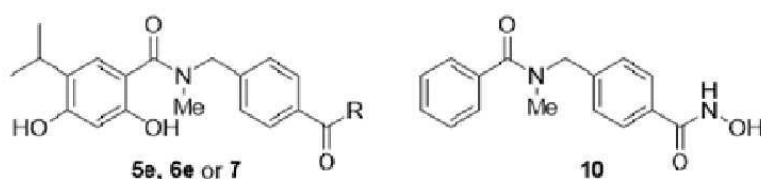
제 활성화에 기인한다는 것을 확인했다.

[0208] HDAC6에 의해 후생적으로 조절되는 α -튜불린의 아세틸화 상태에 대한 화합물 6e의 영향을 조사했다. 도 3B에 따를 때, 1 mM의 화합물 6e는 α -튜불린의 아세틸화를 현저하게 유도한 반면에, 1 mM의 GA는 α -튜불린의 아세틸화 수준을 증가시키지 않았다. 화합물 6e 및 GA는 모두 총 α -튜불린 단백질 수준에 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 화합물 6e가 HDAC6의 효소 기능을 효율적으로 억제한다는 것을 나타내며, HDAC6에 대한 화합물 6e의 억제 활성이 주로 α -튜불린의 아세틸화 증가에 책임이 있음을 확인했다.

[0210] [실시예 4] Hsp90 α , HDAC1 및 HDAC6 효소에 대한 시험관내 저해 활성과 H1975 비소세포폐암 세포에 대한 성장 저해 활성

[0211] 대조 화합물 5e, 7 및 10을 사용하여 이중 억제제 화합물 6e의 기계적 세부 사항을 조사했다. 우선 FP 분석을 사용하여 Hsp90 α 에 대한 화합물 5e, 7 및 10의 결합 친화도를 측정했다.

표 3



Compound	R	Hsp90 α (FP) ^a (IC ₅₀ ; nM)	HDAC1 ^b (IC ₅₀ ; nM)	HDAC6 ^b (IC ₅₀ ; nM)	H1975 ^c (GI ₅₀ ; μ M)
6e	NHOH	61	654.5	105.7	1.7
5e	OMe	24	ND ^c	ND	3.5
7	OH	56	ND	ND	30
10		> 1,000	342.7	30.9	8.2

[0212]

[0213] ^a Hsp90 α 의 N-말단 도메인에 대한 결합 친화도는 FP 분석에 의해 결정

[0214] ^b HDAC1 및 HDAC6의 효소적 억제

[0215] ^c 결정되지 않음

[0217] 표 3에 따를 때, Hsp90 억제제인 화합물 5e 및 7은 IC₅₀ 값이 각각 24 및 56 nM으로 Hsp90 α 에 대한 우수한 결합력을 보인 반면에, HDAC 억제제인 화합물 10은 예상대로 Hsp90 α 에 결합하지 못했다. 다음으로, HDAC1 및 HDAC6 효소에 대한 화합물 6e 및 10의 억제 활성을 조사했다. 화합물 10은 342.7 nM의 IC₅₀ 값을 갖는 HDAC1 활성보다 30.9 nM의 IC₅₀ 값을 갖는 HDAC6 활성을 우선적으로 억제하였다. 이중 억제제 6e는 654.5 nM 및 105.7 nM의 IC₅₀ 값을 갖는 HDAC1 및 HDAC6 효소를 효과적으로 억제하여 화합물 6e가 HDAC 효소뿐만 아니라 Hsp90도 억제함을 확인했다.

[0218] H1975 세포의 성장에 대한 화합물 6e, 7 및 10의 항 증식 활성을 시험했다. 시험관내 Hsp90 결합 분석에서 볼 수 있는 바와 같이, 화합물 6e는 3.5 mM의 GI₅₀ 값을 갖는 H1975 세포에 대해 우수한 성장 억제 활성을 나타냈다.

대조적으로, 시험관내 Hsp90 결합 분석에서 관찰된 화합물 7의 우수한 효소 활성은 세포 활성으로 이어지지 않았으므로, 30 mM의 GI₅₀값을 갖는 H1975 세포에 대한 열악한 항 증식 활성을 제공하였다. 이러한 불일치 결과는 화합물 7의 극성 카르복실레이트 그룹에 의해 손상된 세포 투과성 때문일 수 있다. HDAC 억제제 화합물 10은 8.2 mM의 GI₅₀값을 갖는 H1975 세포에 대해 적당한 세포 활성을 나타냈다.

[실시예 5] Hsp90 및 HDAC 효소에 대한 화합물 6e, 5e 및 10의 비교 억제 활성

이중 억제제 화합물 6e의 시너지 작용 방식을 추가로 확인하기 위하여, 화합물 6e와 동일한 코어 구조를 갖도록 구성된 Hsp90 대조군 억제제 5e 및 HDAC 대조군 억제제 10과 병행하여 화합물 6e의 생물학적 활성을 조사하였다. H1975 세포를 2 mM의 화합물 6e, 5e 및 10으로 24시간 동안 처리하고, 웨스턴 블롯 분석을 수행하여 Hsp90 및 HDAC 효소의 억제에 대한 세포 효과를 결정하였다. 도 4A에 따른 때, 화합물 6e 및 5e는 H1975 NSCLC 세포에서 Hsp90의 샤페론 기능을 효율적으로 억제하여 EGFR, Her2, Met, Akt 및 CDK-4의 하향 조절; 및 Hsp90 및 Hsp70의 상향 조절;을 야기하였다. 대조적으로, HDAC 억제제 10은 Hsp90 기능을 억제하지 않아 클라이언트 단백질인 EGFR, Her2, Met, Akt 및 CDK-4에 영향을 미치지 않았다.

다음으로, H1975 NSCLC 세포에서 HDAC 효소에 대한 화합물 6e의 억제 활성을 평가했다. 도 4B에 따른 때, 상기 표 2의 시험관내 HDAC 효소 분석 결과와 일치하게 화합물 6e 및 10은 HDAC6 및 HDAC1의 억제를 통해 α -튜불린과 히스톤 H3의 아세틸화를 촉진한 반면에, 화합물 5e는 α -튜불린과 히스톤 H3의 아세틸화를 거의 유도하지 않았다. 이러한 결과는 화합물 6e가 Hsp90 및 HDAC 효소의 이중 억제를 통해 항암 활성을 발휘함을 입증했다.

[실시예 6] Hsp90의 아세틸화 및 Hsp90 K294의 아세틸화에 대한 화합물들의 효과

화합물 6e가 HDAC6의 억제를 통해 Hsp90의 아세틸화를 유도하는지의 여부를 조사했다. 도 5A에 따른 때, Hsp90의 면역침전 후 항 아세틸-라이신 항체에 의한 면역 블롯팅은 화합물 6e가 화합물 5e 및 10에 비하여 Hsp90의 아세틸화를 현저하게 촉진하는 것을 확인했다.

화합물 6e가 Hsp90의 K294 잔류물에서 아세틸화를 촉진하였는지의 여부를 조사하였다. 도 5B에 따른 때, 화합물 6e에 의한 H1975 세포의 처리는 K297에서 Hsp90의 아세틸화를 유의하게 유도한 반면에, 화합물 5e 및 10은 K297에서 Hsp90의 아세틸화를 적절하게 증가시켰다.

이러한 결과들은 화합물 6e가 HDAC6의 억제를 통해 K294 잔류물을 비롯하여 Hsp90의 아세틸화를 촉진하였음을 알 수 있었다.

[실시예 7] 화합물 6e의 H1975 세포에서 아포토시스를 유도

화합물 6e의 항암 활성이 세포 사멸 유도와 관련이 있는지 여부를 확인하기 위하여, FACS (fluorescence-activated cell sorting)를 통해 암세포 사멸을 측정했다. H1975 세포를 표시된 농도의 이중 억제제 6e로 24시간 동안 처리하고, 아넥신 V 및 요오드화 프로피디움으로 염색하고, FACS를 사용하여 분석했다. 도 6A에 따른 때, 화합물 6e가 H1975 세포의 초기 및 후기 아포토시스를 용량-의존적 방식으로 유도하였음을 나타냄을 확인했다.

PARP, 절단된 PARP, 카스파제 3, 절단된 카스파제 3, 절단된 카스파제 8, B 세포 림프종 2(Bcl-2) 및 Bcl-2 관련 X 단백질(Bax)과 같은 세포 사멸 바이오마커 단백질의 세포 수준을 조사하였다. 도 6B에 따른 때, 화합물 6e로 H1975 세포를 처리하면 용량-의존적 방식으로 caspase 3, caspase 8 및 PARP가 절단되어 이중 억제제 6e가 H1975 세포의 세포 사멸을 유도하는 것으로 나타남을 확인했다.

[실시예 8] α -튜불린 아세틸화 상태의 형광 현미경 이미지

형광 현미경을 사용하여 α -튜불린의 아세틸화 상태 및 후속적인 미세 소관 중합에 대한 화합물 6e의 영향을 조사했다. 도 7에 따른 때, 화합물 6e 및 10과 함께 H1975 세포를 배양할 때, α -튜불린의 과아세틸화 및 후속적인 미세소관 중합이 일어났다. 대조적으로, α -튜불린의 아세틸화 및 미세소관의 중합은 H1975 세포를 화합물 6e로 처리할 때 영향을 받지 않은 채로 남아 있었다. 데이터는 화합물 6e가 HDAC6 효소를 억제하고, α -튜불린

의 아세틸화를 유도하고, H1975 세포에서 미세소관 중합을 유도한다는 것을 분명히 나타냈다.

[실시예 9] Hsp90 *a* (PBD 코드: 2XJX)와의 복합체에서 화합물 6e의 예측된 결합 모델

Hsp90 *a*에 대한 6e의 정확한 결합 모드를 평가하기 위하여, 화합물 6e를 Hsp90 *a*의 ATP-결합 포켓 (PBD 코드: 2XJX) 내로의 컴퓨터 도킹을 수행했다. 도 8에 따를 때, Hsp90 *a*의 N-말단 도메인에 있는 ATP-결합 포켓은 친수성 영역, 소수성 영역 및 진입 영역으로 특성적으로 구성되었고, 도킹 시뮬레이션은 화합물 6e의 레조르시놀 고리가 친수성 영역으로 깊숙이 투영되어 2개의 물 분자 및 D93의 카르복실산 측쇄와 3개의 수소 결합 상호작용을 형성함을 보여주었다. 또한, 화합물 6e의 카르보닐 산소는 포켓 내에서 보존된 물 분자 및 T184의 하이드록실 측쇄와 함께 이좌 배위 수소 결합 상호작용을 형성했다. 레조르시놀 고리에 있는 아이소프로필 그룹은 L107, F138, V150 및 W162 잔기의 친유성 측쇄로 구성된 소수성 영역에 단단히 고정되었다. 화합물 6e의 하이드록사메이트 OH 및 NH 그룹은 각각 N106 잔기의 아미드 측쇄 및 카르보닐 주쇄와 2개의 추가적인 수소 결합 상호작용을 형성했다.

[실시예 10] HDAC6 (PBD 코드: 5EF7)와의 복합체에서 화합물 6e의 예측된 결합 모델

HDAC6에 대한 화합물 6e의 정확한 결합 모드를 평가하기 위하여, 화합물 6e를 HDAC6의 기질 결합 포켓 (PBD 코드: 5EF7) 내로의 컴퓨터 도킹을 수행했다. 도 9에 따를 때, 도킹 시뮬레이션은 화합물 6e의 하이드록사메이트 OH 및 C=O 그룹이 이좌 배위 방식으로 Zn^{2+} 이온에 배위되는 HDAC6의 기질 결합 포켓에 화합물 6e가 결합되었음을 보여주었다. 또한, 화합물 6e의 하이드록사메이트 OH 및 C=O 그룹은 각각 H573 및 Y745와 수소 결합 상호 작용을 형성했다. 화합물 6e의 중간 페닐 고리는 HDAC6의 결합 포켓 채널에 투영되어 F583 및 F643 잔기의 친유성 측쇄와 p-p 상호작용을 형성하였다. 화합물 6e의 2,4-디하이드록시벤조일 캡핑기는 화합물 6e의 2-하이드록실 그룹이 H614 및 L712 잔기와 추가적인 수소 결합 상호작용을 형성하도록 기질 결합 포켓의 가장자리에 위치되었다. 화합물 6e의 이소프로필 잔기는 F643의 b-탄소와 근위 반 데르 발스 상호작용을 형성하였다.

[실시예 11] 화합물 6e의 물리화학적 특성

화합물 6e의 약물 유사성을 평가하기 위하여, ADMET 특성 및 소분자의 경구 생체 이용률을 예측하는데 널리 사용되는 리핀스키 (Lipinski)의 규칙 및 베버(veber)의 기준의 물리화학적 매개변수를 계산하였다.

표 4

Lipinski & Veber's Criterion ^a	Limit	6e
MW	< 500	358.4
cLogP	≤ 5	1.5
HBD	≤ 5	4
HBA	≤ 10	7
Nrot	≤ 10	10
tPSA	≤ 140	110
Sum of HBD & HBA	≤ 12	11

^a MW, 분자량; cLog, 계산된 물/옥탄올 분배 계수; HBA, 수소 결합 수용체의 수; HBD, 수소 결합 공여체의 수; Nrot, 회전 가능한 결합의 수; 및 tPSA, 토폴로지 극성 표면적.

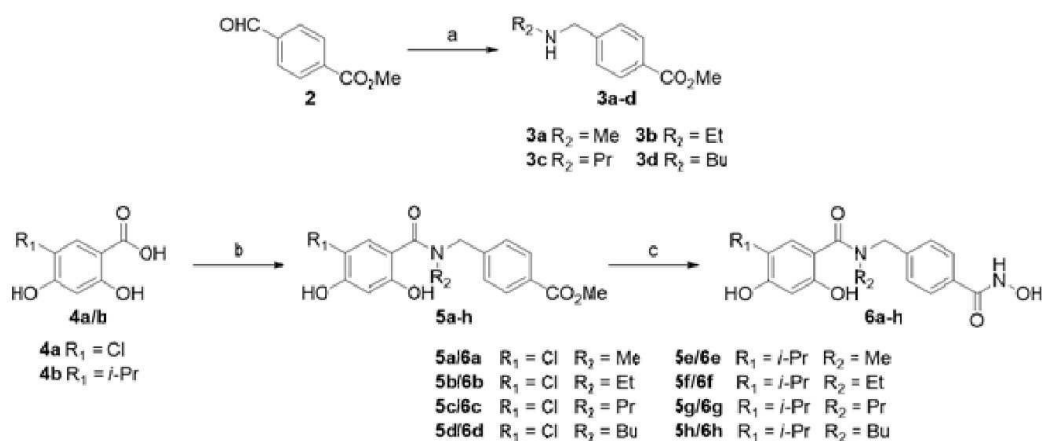
[0247] 표 4에 따를 때, 데이터는 화합물 6e이 리핀스키의 5법칙과 베버의 기준을 잘 준수하여 화합물 6e가 양호한 ADMET 프로파일 및 경구 생체이용률의 높은 가능성을 갖고 있음을 나타냈다.

[0249] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

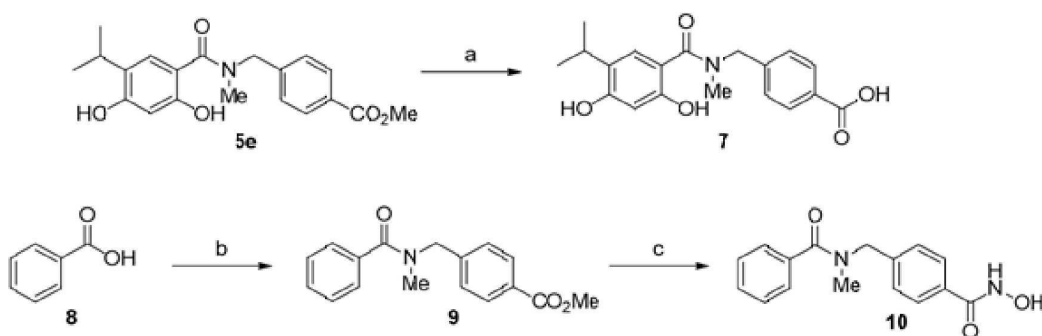
[0250] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

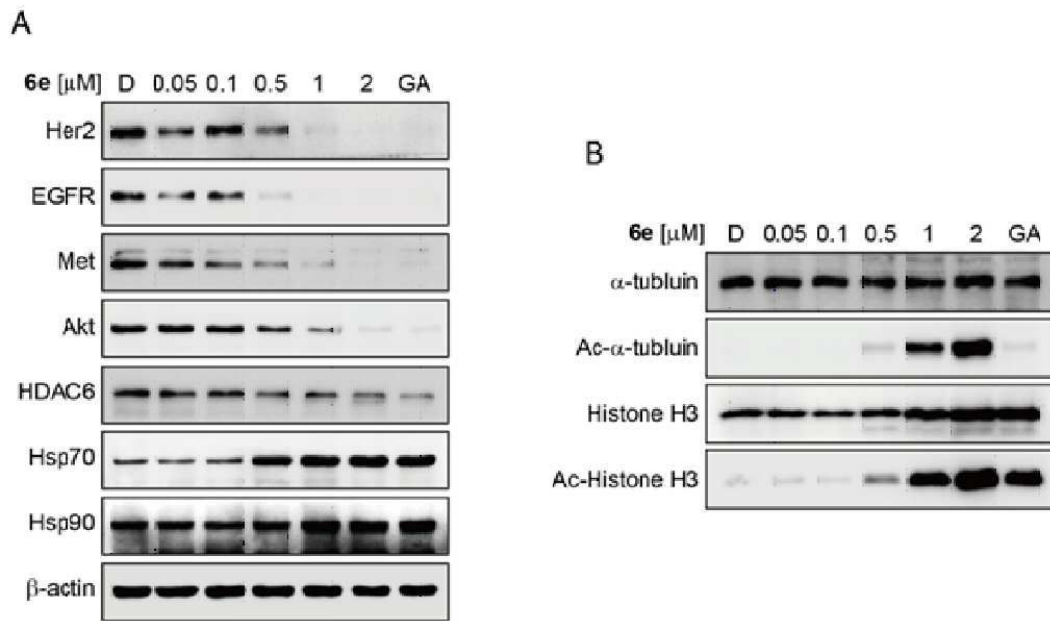
도면1



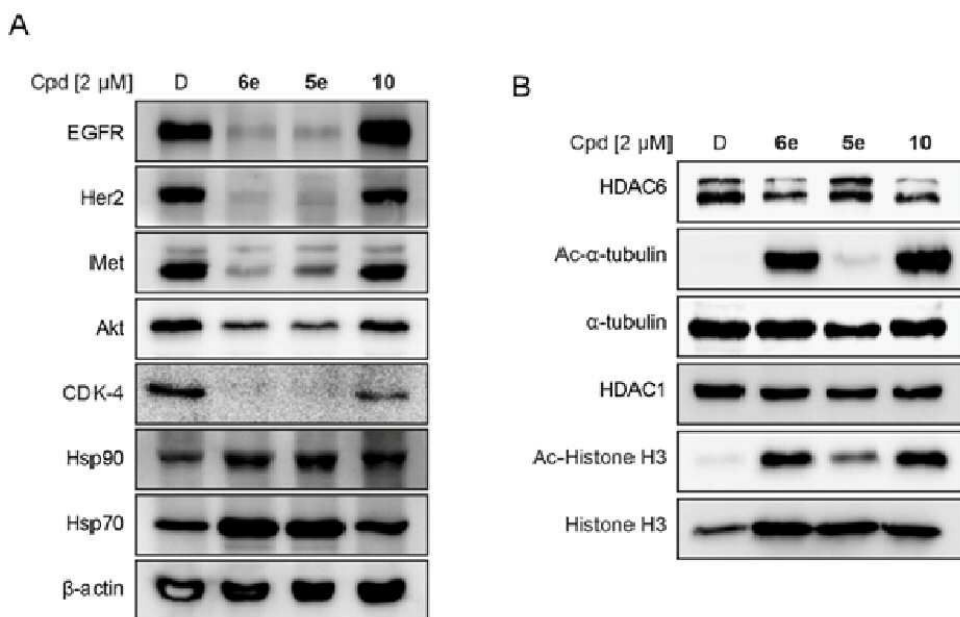
도면2



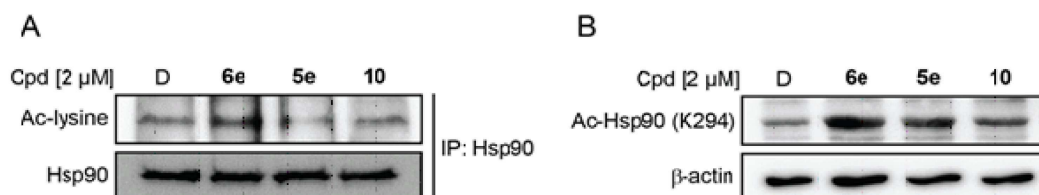
도면3



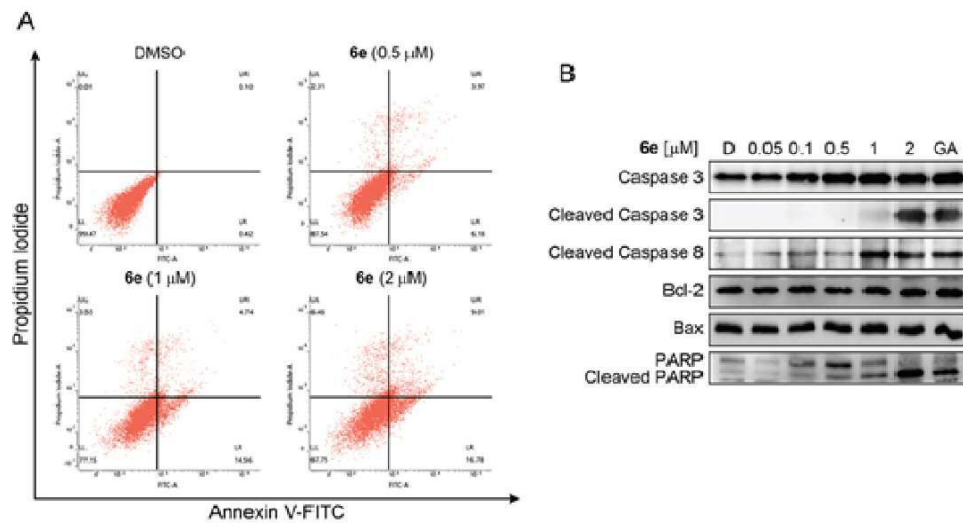
도면4



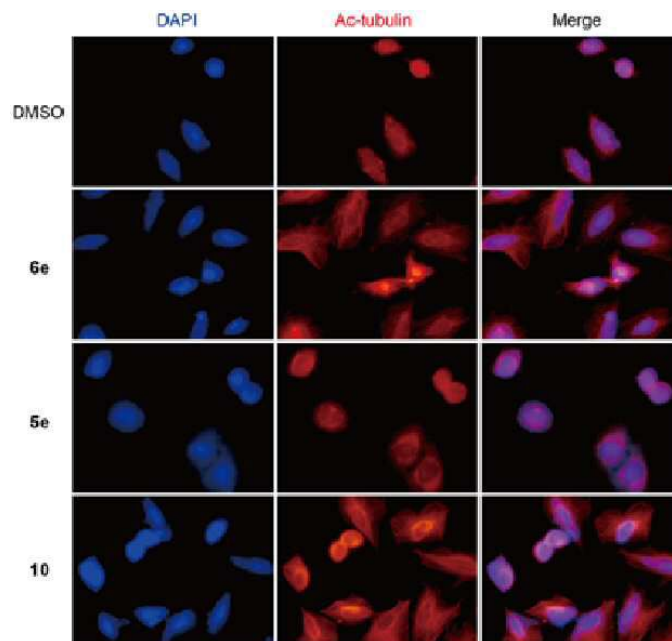
도면5



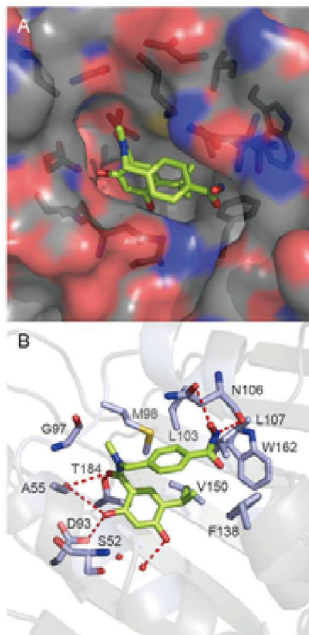
도면6



도면7



도면8



도면9

