

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 3월 23일 (23.03.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/048069 A1

- (51) 국제특허분류:
C07D 405/04 (2006.01) A61K 31/4155 (2006.01)
C07D 403/04 (2006.01) A61K 31/415 (2006.01)
C07D 409/04 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/010363
- (22) 국제출원일: 2016년 9월 13일 (13.09.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0130335 2015년 9월 15일 (15.09.2015) KR
- (71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWha UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 권영주 (KWON, Young Joo); 10419 경기도 고양시 일산동구 강촌로 114, 507 동 1403 호, Gyeonggi-do (KR). 라만아이 애프 엠 모터 (RAHMAN, A. F. M. Motiur); 11451 리야드 킹사우드 대학교 약학대학 약화학과, Riyadh (SA). 카디아드난 에이 (KADI, Adnan A.); 11451 리야드 킹사우드 대학교 약학대학 약화학과, Riyadh (SA). 나영화 (NA, Young Hwa); 10419 경

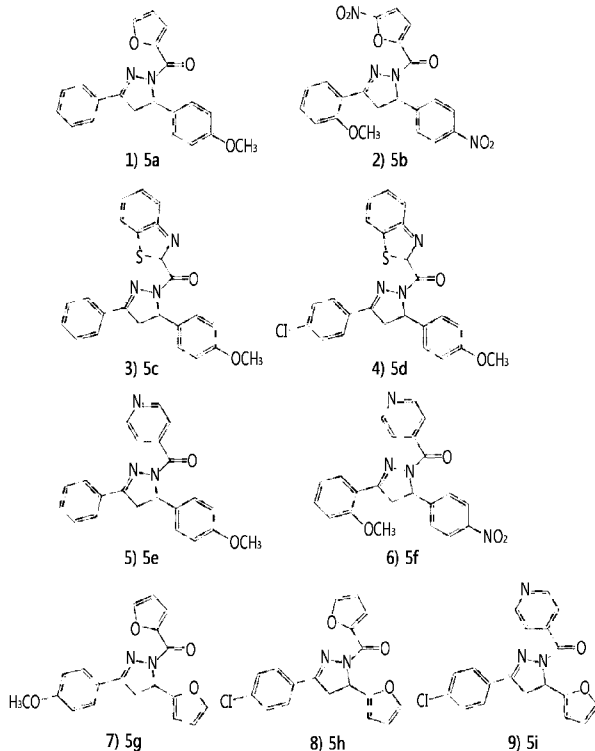
기도 고양시 일산동구 강촌로 114, 507 동 1403 호, Gyeonggi-do (KR).

- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재대로 163 6층 한일국제특허사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NOVEL PYRAZOLINE DERIVATIVE AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 신규한 피라졸린 유도체 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to: a novel pyrazoline derivative compound; a pharmaceutically acceptable salt thereof; and a pharmaceutical composition for preventing or treating cancer and a food composition for preventing or alleviating cancer, both compositions containing, as an active ingredient, the pyrazoline derivative compound or the pharmaceutically acceptable salt thereof. The pyrazoline derivative compound represented by chemical formula 1, of the present invention, or the pharmaceutically acceptable salt thereof inhibits the activity of topoisomerase II and/or HER2, thereby being usable in the prevention or treatment of cancer and applicable to the treatment of cancer exhibiting resistance to Herceptin, which is an agent for treating HER2-positive cancer.

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 피라졸린 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 상기 피라졸린 유도체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 화학식 1로 표시되는 피라졸린 유도체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 토포이소머라제 II, HER2 또는 둘 다의 활성을 억제함으로써 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있으며, 또한 HER2 양성 암의 치료제인 허셉틴(Herceptin)에 내성을 나타내는 암의 치료에 적용할 수 있다.



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 신규한 피라졸린 유도체 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 피라졸린 유도체 화합물, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 및 상기 피라졸린 유도체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 전 세계적으로 암 발생률 및 사망률은 꾸준히 증가하는 추세에 있으며 국내에서도 사망 원인 1위를 차지하는 중대 질환으로 암을 정복하기 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다. 암에 대한 기존의 치료법으로는 수술, 화학요법 및 방사선 치료 등이 있으며, 이 중에서 항암제를 이용한 화학요법은 현재 암 치료를 위해 폭넓게 사용되고 있으며, 비교적 잘 확립된 치료방법 중 하나이다. 그러나 대부분의 항암제는 특정 표적인자만을 선택적으로 억제하여 항암 활성을 나타내므로, 매우 복잡한 경로로 발전하는 암에 있어서 항암제의 장기 투여에 의하여 내성이 생기는 문제점이 있으며 특정 유전자의 돌연변이 상태에 따라 선택적인 치료효과를 나타내는 단점이 있다. 이러한 문제점을 극복할 수 있는 항암제 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이며, 항암제에 대한 내성을 극복할 수 있는 효과적인 항암제 개발의 중요성 또한 증가하고 있다.
- [4] 암세포는 여러 종류의 펩타이드성 호르몬들을 생산하는데 이러한 호르몬들은 세포벽에 있는 수용체를 자극하여 세포의 정상적인 성장과 암 발생에 관여한다. 성장과 관련이 있는 인자 중 상피세포 성장인자(epidermal growth factor; EGF)가 대표적으로 알려져 있으며, 상피세포 성장인자 수용체(EGFR)는 다양한 암종에서 발현되는 HER(human epidermal growth factor receptor) 패밀리의 하나이다. HER 패밀리는 EGFR, HER2, HER3 및 HER4로 구성되는, 암세포 증식과 관련된 인자들로, 이 중에 HER2는 유방암, 난소암, 폐암, 위암, 자궁암, 직장암, 췌장암, 방광암 등의 암환자에서 과다발현되어 있으며, 암의 발병, 진행 및 전이에도 관여하는 것으로 알려져 있다(Ellina MI et al., *Biochem Biophys Acta.*, 2014, 1840, 2651-61).
- [5] 한편, 토포이소머라제는 DNA의 과도한 감김(overwinding) 또는 덜 감김(underwinding)을 조절하는 효소로, 전사 및 복제 과정에 있어서 이중나선구조의 서로 얽히는 성질(intertwined nature)에 기인하는 위상적 장애(topological hurdle)를 해결하는 중요한 인자 중 하나이다. 암치료의 임상 적용에 있어서, 많은 약물이 토포이소머라제의 억제를 통해 효능을 나타내며 토포이소머라제를 표적하는 다양한 항암제를 개발하기 위한 연구가 진행되고

있다.

[6]

[7] 이에 본 발명자들은 토포이소머라제 또는 HER2의 활성을 효과적으로
저해하여 암의 예방 또는 치료 효과를 제공할 수 있는 소분자 화합물을 개발하기
위해 예의 연구노력한 결과, 신규한 피라졸린 유도체 화합물이 토포이소머라제,
HER2 또는 둘 다의 활성을 저해할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[8]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명의 하나의 목적은 신규한 피라졸린 유도체 화합물을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 산조건 하에서 칼콘 유도체와 하이드라지드 유도체를
반응시키는 단계를 포함하는 상기 피라졸린 유도체의 제조방법을 제공하는
것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 피라졸린 유도체 화합물 또는 이의 약학적으로
허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암질환의 예방 또는 치료용 약학적
조성물을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 피라졸린 유도체 화합물 또는 이의 약학적으로
허용가능한 염을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는,
개체에서 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

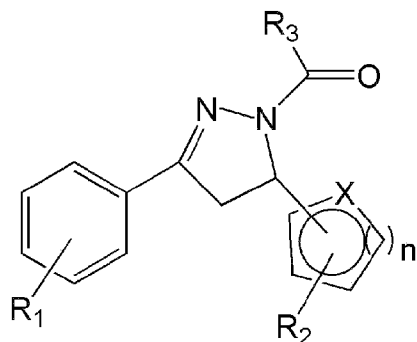
[13]

과제 해결 수단

[14] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 하기 화학식 1로
표시되는 피라졸린 유도체 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을
제공한다:

[15] [화학식 1]

[16]



[17] 상기 식에서,

[18] n은 1 또는 2이고;

[19] X는 탄소, 산소, 질소 및 황으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[20] R₁ 및 R₂는 동일하거나 상이하며, 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C₁-C₆ 알킬, C₃-C₈ 사이클로알킬, C₁-C₆ 할로알킬, C₁-C₆ 알콕시, 아미노, 시아노 및 니트로로

이루어진 군으로부터 선택되고;

[21] R_3 은 C_3 - C_{12} 헤테로아릴이고, 상기 R_3 은 니트로로 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[22]

[23] 상기 R_1 및 R_2 는 동일하거나 상이할 수 있으며, 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_1 - C_6 알콕시 또는 니트로일 수 있다. 구체적으로, 상기 R_1 및 R_2 는 동일하거나 상이할 수 있으며, 각각 독립적으로 수소, 클로로, 메톡시 또는 니트로일 수 있다.

[24] 보다 구체적으로, 상기 R_1 은 수소, 클로로 또는 메톡시일 수 있으며, 상기 R_2 는 수소, 클로로, 메톡시 또는 니트로일 수 있다.

[25]

[26] 또한, 상기 R_3 은 퓨릴, 피리디닐 또는 벤조티아졸릴일 수 있고, 상기 R_3 은 니트로로 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[27]

[28] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물들로 이루어진 군에서 선택되는 화합물일 수 있다.

[29] 1)

퓨란-2-일(5-(4-메톡시페닐)-3-페닐-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)메타논[Furan-2-yl(5-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)methanone]

[30] 2)

(3-(2-메톡시페닐)-5-(4-니트로페닐)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)(5-니트로퓨란-2-일)메타논[(3-(2-Methoxyphenyl)-5-(4-nitrophenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)(5-nitrofuran-2-yl)methanone]

[31] 3)

벤조[d]티아졸-2-일(5-(4-메톡시페닐)-3-페닐-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)메타논[Benzo[d]thiazol-2-yl(5-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)methanone]

[32] 4)

벤조[d]티아졸-2-일(3-(4-클로로페닐)-5-(4-메톡시페닐)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)메타논[Benzo[d]thiazol-2-yl(3-(4-chlorophenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)methanone]

[33] 5)

(5-(4-메톡시페닐)-3-페닐-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)(피리딘-4-일)메타논[(5-(4-Methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)(pyridin-4-yl)methanone]

[34] 6)

(3-(2-메톡시페닐)-5-(4-니트로페닐)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)(피리딘-4-일)메타논[(3-(2-Methoxyphenyl)-5-(4-nitrophenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)(pyridin-4-yl)methanone]

[35] 7)

퓨란-2-일(5-(퓨란-2-일)-3-(4-메톡시페닐)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)메타논[Furan-2-yl(5-(furan-2-yl)-3-(4-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)methanone]

[36] 8)

(3-(4-클로로페닐)-5-(퓨란-2-일)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)(퓨란-2-일)메타논[(3-(4-Chlorophenyl)-5-(furan-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)(furan-2-yl)methanone]

[37] 9)

(3-(4-클로로페닐)-5-(퓨란-2-일)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)(피리딘-4-일)메타논[(3-(4-Chlorophenyl)-5-(furan-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)(pyridin-4-yl)methanone]

[38]

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

[40] 산부가염은 통상의 방법, 예를 들어 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고, 이어서 상기 혼합물을 증발시켜 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

[41] 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 요오드화수소산(hydroiodic acid) 등을 사용할 수 있으며, 이들에 제한되지 않는다.

[42] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들어 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해시키고, 비용해 화합물 염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 특히 나트륨, 칼륨, 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하나 이들에 제한되는 것은

아니다. 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.

- [43] 상기 화학식 1의 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 화학식 1의 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성 기의 염을 포함한다. 예를 들어, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼륨 및 칼슘염 등이 포함될 수 있고, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브롬화물, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄술포네이트(메실레이트) 및 p-톨루엔술포네이트(토실레이트) 염 등이 있으며, 당 업계에 알려진 염의 제조방법을 통하여 제조될 수 있다.

[44]

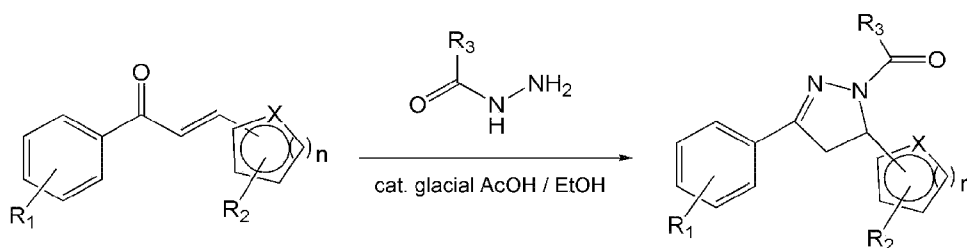
- [45] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 산조건 하에서 칼콘 유도체와 하이드라지드 유도체를 반응시키는 단계를 포함하는 화학식 1로 표시되는 피라졸린 유도체의 제조방법을 제공한다. 구체적으로, 상기 칼콘 유도체와 하이드라지드 유도체의 반응은 산을 포함하는 알콜용매에 상기 반응물을 혼합하고 10 내지 24시간 동안 환류하여 수행할 수 있다. 상기 산으로는 빙초산을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 알콜용매로는 에탄올을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[46]

- [47] 상기 반응은 하기 반응식 1로 표시될 수 있다.

[48] [반응식 1]

[49]



[50]

- [51] 상기 칼콘 유도체 화합물은, 클라이젠-슈미트 반응(Claisen-Schmidt reaction)을 통해 아세토펜 유도체 및 방향족 알데히드를 염기를 포함하는 알콜용매 하에서 반응시켜 제조할 수 있다. 또한, 상기 하이드라지드 유도체 화합물은 상업적으로 구매하거나 방향족 카르복실산 모노 에스테르와 하이드라진 수화물(hydrazine hydrate)을 알콜용매 조건하에서 반응시켜 제조할 수 있다.

[52]

- [53] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 방법은 여과, 건조, 세척, 정제하는 단계 또는 이들의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 상기 여과, 건조, 세척, 및 정제하는 단계는 당업계에서 공지된 방법을 제한 없이 이용하여 수행할 수 있다.

[54]

[55] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 피라졸린 유도체 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 구체적으로, 상기 조성물은 토포이소머라제 II, HER2(human epidermal growth factor receptor 2) 또는 둘 다의 활성을 저해하는 것이 특징이다.

[56]

[57] 본 발명에서 용어 "토포이소머라제"는 DNA의 과도한 감김(overwinding) 또는 덜 감김(underwinding)을 조절하는 효소로, 전사 및 복제 과정에 있어서 위상적 장애(topological hurdle)를 해결하는 중요한 인자 중 하나이다. DNA의 감김 문제는 이중나선구조의 서로 얽히는 성질(interwinded nature)에 기인한다. 예컨대, DNA 복제과정 동안 DNA는 복제포크(replication fork) 앞에서 과하게 감긴다. 이러한 과도한 감김이 저하되지 않고 남아있다면 이러한 장력은 결과적으로 DNA 복제를 중단시킨다. 이와 유사한 현상은 전사과정에서도 일어날 수 있다. 이와 같은 이중나선에 의해 야기되는 위상문제를 극복하기 위하여 토포이소머라제는 단일가닥 또는 이중가닥 DNA에 결합하여 DNA의 인산골격을 절단한다. 이러한 중간절단(intermediate break)은 DNA를 풀어지도록 하여 과정의 마지막에서 DNA 골격은 다시 봉해진다.

[58]

토포이소머라제는 제1형과 제2형으로 구분된다. 토포이소머라제 I(Top I)은 단가닥 절단 및 초나선 염색체(supercoiled chromosome)의 DNA 이중나선(duplex)의 단일 가닥의 재결합을 유발하며, 토포이소머라제 II(Top II)는 Mg (II) 와 ATP를 소모하여 DNA 두 가닥을 잘라 DNA 가닥이 받게 되는 긴장감에 의해 발생될 수 있는 DNA 손상을 완화 시키는 역할을 한다. 암치료의 임상 적용에 있어서, 많은 약물이 토포이소머라제의 억제를 통해 효능을 나타내며 토포이소머라제를 표적하는 다양한 항암제를 개발하기 위한 연구가 진행되고 있다. 토포이소머라제 저해제는 활성 모드에 따라 토포이소머라제 독(poison)과 Top II 축매억제제로 그룹화된다. 토포이소머라제 독은 '절개가능 복합체(cleavable complex)'로 알려진 일시적으로 형성된 토포이소머라제-DNA 복합체를 안정화하는 화합물로, 절단된 DNA 가닥의 재결합을 억제하여 원하지 않는 잘라진 DNA 축적을 유도한다. 토포이소머라제 축매억제제로서 토포이소머라제 I 기능에 작용하는 알려진 항암제로 이리노테칸(irinotecan), 토포테칸(topotecan) 및 캄토테신(camptothecin)이 있고, 독소루비신(doxorubicin) 및 에토포시드(etoposide)는 토포이소머라제 II를 표적으로 하는 항암제로 알려져 있으며, 이외에도 토포이소머라제 효소를 억제할 수 있는 화합물이 개발되고 있다.

[59]

[60] 본 발명에서 용어 "HER2" 유전자는 세포의 증식, 분열, 수복을 조절하며 티로신 키나아제 활성을 갖는 HER2 단백질을 생산한다. HER2 단백질은 세포막

상에서 수용체 기능을 하며 세포의 호르몬에 의해 활성화되면 세포의 증식과 분열을 촉진하는 역할을 한다. HER 패밀리는 4개의 수용체인 상피세포 성장인자 수용체(EGFR), HER2, HER3 및 HER4로 구성되며, 다른 수용체들과 이합체를 형성하여 도달된 신호를 증폭하여 전달하는 역할을 담당한다. 상기 HER 패밀리는 모두 암세포 증식과 관련되어 있으며, 특히 HER2는 유방암, 난소암, 폐암, 위암, 자궁암, 직장암, 대장암, 방광암 등의 암환자에서 과발현되어 있고, 유전자 변이에 의해 HER2 수용체가 과잉 생산되어 암세포가 급격하게 증식하는 것으로 보고된 바 있다. 특히, 과발현된 HER2는 리간드와 결합하지 않은 상태에서도 동종 및 이종이합체를 형성하여 여러 암유전자의 전사를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. HER2 단백질의 과발현을 컨트롤하는 표적 치료제로 허셉틴(Herceptin), 티커브(Tykerb) 등이 알려져 있으나, 두 약물 모두 과발현된 HER2만을 타겟으로 하며, 내성을 유발함으로써 인해 상기 약물에 의한 치료 예후가 좋지 않은 것으로 알려져 있다.

[61]

[62] 상기와 같이 암의 발병 또는 진행에 주요하게 관여하는 토포이소머라제 II 또는 HER2의 활성을 효과적으로 저해하는 본 발명의 화합물은 암의 예방 또는 치료효과를 제공할 수 있다. 또한, HER2 및 토포이소머라제 II α 유전자는 염색체 상에서 인접하여 위치하고 있어, 다양한 암에서의 HER2 과발현은 토포이소머라제 II α 증폭(amplification) 및 삭제(deletion)의 이상(abnormality) 현상과 직접적으로 연관된다. 따라서, 토포이소머라제 II 및 HER2를 동시에 타겟으로 하는 본 발명의 화합물은 보다 우수한 암의 예방 또는 치료효과를 가져올 수 있다.

[63]

[64] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 치환기의 종류에 따라 정도의 차이는 있으나, 합성된 대부분의 피라졸린 유도체 화합물은 토포이소머라제 II 저해효과와 더불어 대표적인 암세포주인 HCT15(인간 HER2 양성 직장암 세포주), BT474(인간 HER2 양성 유방암 세포주) 및/또는 T47D(인간 HER2 음성 유방암 세포주)에 대한 세포독성을 나타냄을 확인하였다(실시예 2 및 3).

[65] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 피라졸린 유도체 화합물이 HER2 유전자 발현을 유도하는 ESX-Sur2 상호작용에 대한 높은 억제활성을 나타낼 뿐만 아니라 HER2 과발현 세포의 성장을 저해하는 효과도 우수함을 확인하였다(실시예 8 및 9). 특히, 화합물 4)의 경우, HER2 저해활성과 더불어 *in vivo* 시스템에서 항암활성을 나타냄을 확인하였다(실시예 10 내지 13).

[66]

[67] 본 발명의 용어 "예방"이란 본 발명의 조성물의 투여로 암의 발생, 확산 및 재발을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명의 조성물의 투여로 암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

- [68] 본 발명의 약학적 조성물에 의해 예방 또는 치료될 수 있는 암은 유방암, 난소암, 폐암, 위암, 자궁암, 직장암, 췌장암 및 방광암 등을 포함한다. 특히, 본 발명의 약학적 조성물은 토포이소머라제 II, HER2 또는 둘 다로 인해 발병하는 암의 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [69]
- [70] 본 발명의 조성물은 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사 용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥내, 복강내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다. 이러한 조성물에 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [71] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토즈, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크와 같은 윤활제가 사용될 수 있다.
- [72] 경구용 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [73] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 한편, 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.
- [74] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.
- [75] 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 암의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별

치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[76] 구체적으로, 본 발명의 조성물에서 화합물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg 당 1 내지 10 mg, 바람직하게는 1 내지 5 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[77] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[78]

[79] 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 피라졸린 유도체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[80] 본 발명의 용어 "개체"란, 상기 암이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여함으로써 상기 질환들을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 기존의 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[81] 본 발명의 용어 "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를

포함할 수 있다.

[82] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 피라졸린 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 양을 의미한다.

[83] 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분으로서 피라졸린 유도체, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 이외에 공지된 항암제를 추가로 포함할 수 있고, 이들 질환의 치료를 위해 공지된 다른 치료와 병용될 수 있다. 다른 치료에는 화학요법, 방사선 치료, 호르몬 치료, 골수 이식, 줄기-세포 대체치료, 다른 생물학적 치료, 면역치료 등이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[84]

[85] 또 다른 양태로서, 본 발명은 암의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물의 제조를 위한, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 피라졸린 유도체 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 제공한다.

[86]

발명의 효과

[87] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 피라졸린 유도체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 토포이소머라제 II, HER2 또는 둘 다의 활성을 억제함으로써 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있으며, 또한 HER2 양성 암의 치료제인 허셉틴(Herceptin)에 내성을 나타내는 암의 치료에 적용할 수 있다.

[88]

도면의 간단한 설명

[89] 도 1은 본 발명에 따른 9종의 신규한 피라졸린 유도체의 화학구조식을 나타낸 도이다.

[90] 도 2는 본 발명에 따른 피라졸린 유도체 화합물 5a-i의 제조합 토포이소머라제 I 저해 활성을 나타낸 도이다. 최종 농도 100 μ M (A) 및 20 μ M (B)로 사용하였다. 레인D: pBR322 DNA 단독; 레인T: pBR322 DNA + 토포이소머라제 I; 레인C: pBR322 DNA + 토포이소머라제 I + 캄토테신; 레인 5a-i: pBR322 DNA + 토포이소머라제 I + 피라졸린 유도체 화합물 5a-i.

[91] 도 3은 본 발명에 따른 피라졸린 유도체 화합물 5a-i의 제조합 토포이소머라제 II 저해 활성을 나타낸 도이다. 최종 농도 100 μ M (A) 및 20 μ M (B)로 사용하였다. 레인D: pBR322 DNA 단독; 레인T: pBR322 DNA + 토포이소머라제 II; 레인E: pBR322 DNA + 토포이소머라제 II α + 에토포시드; 레인 5a-i: pBR322 DNA + 토포이소머라제 II + 피라졸린 유도체 화합물 5a-i.

[92] 도 4a 내지 도 4c는 본 발명에 따른 피라졸린 유도체 가운데 화합물 5d의 분자 도킹 시험 결과를 나타낸 도이다. 상기 화합물 5d는 인간 토포이소머라제 II α 의 ATPase 도메인 내의 ATP 결합 포켓에 강하게 결합하였다. 도 4a는 토포이소머라제 II α 의 ATPase 도메인의 활성부위에 결합한 화합물 5d(R-5d:

마젠타, S-5d: 시안)의 확대된 그림을 나타낸다. ATP 결합 포켓의 투명한 채널 표면이 관찰되었으며 정전기적 전위(electrostatic potential)에 의해 색을 나타내었다(적색: 양성, 보라색: 음성). 도 4b는 화합물 5d 및 AMP-PNP의 오버레이된 그림을 나타낸 도이다(화합물 5d: 마젠타, AMP-PNP: 회색). 도 4c는 토포이소머라제 II α 의 ATP 결합 포켓의 확대 그림을 나타낸다. 반데르발스 힘을 가진 토포이소머라제 II α ATP-결합 도메인의 잔기 및 인접한 R-화합물 5d를 스틱으로 나타내었다. 복합체의 스틱은 원자 타입에 따른 색을 나타낸다(R-5d: 마젠타).

[93] 도 5a 내지 5d는 본 발명에 따른 피라졸린 유도체 가운데 화합물 5d의 ATP-경쟁적 토포이소머라제 II 촉매 저해제로서의 활성을 평가한 결과를 나타낸 도이다. 도 5a는 ATPase 시험 결과를 나타낸 도이며, ATP 탈수소효소 반응을 통해 토포이소머라제 II-기반의 ATPase 시험을 수행하였다. 제조합 인간 토포이소머라제 II α 의 가수분해 반응에 의해 생성된 유리 포스페이트는 말라카이트 그린 포스페이트 시험 시약을 이용하여 실온에서 30분간 배양하여 검출하였다. 가수분해 반응량은 그린 복합체의 흡광도를 측정하여 분석하였으며, 상기 그린 복합체는 말라카이트 그린 및 몰리브데이트와 유리 포스페이트 사이에서 형성되며, 형성된 그린 복합체의 흡광도는 ELISA 마이크로-플레이트 리더를 이용하여 620 nm의 파장에서 측정하였다. 도 5b는 ATP 경쟁 시험 결과를 나타낸 도이다. ATP 농도 이외에는, DNA 토포이소머라제 II-기반의 DNA 완화 시험과 동일한 과정으로 수행하였다. ATP의 최종 농도는 1 mM 및 2 mM로 사용하였다. 에토포시드는 양성 대조군으로 사용하였다. 도 5c는 상기 도 5b의 정량적 결과를 나타낸다. 도 5d는 절개 복합체 시험 결과를 나타낸 도이다. 100 ng/ μ L의 초나선 DNA pBR322를 3 유닛(unit)의 제조합인간 DNA 토포이소머라제 II α 와 5분간 배양한 후 본 발명에 따른 화합물 5d를 첨가하였다. 반응 생성 혼합물은 에티듐 브로마이드 수용액(0.5 μ g/mL)을 포함하는 0.8% 아가로스 겔을 이용하여 TAE 버퍼에서 전기영동을 수행하였으며, Alpha Tech Imager를 이용하여 가시화하였다. 선상의 DNA는 화살표로 나타내었다.

[94] 도 6은 본 발명에 따른 피라졸린 유도체 가운데 화합물 5d의 내생의 토포이소머라제-기반의 DNA 완화에 있어서의 활성을 나타낸 도이다. 상기 화합물 5d 및 에토포시드를 24시간 동안 처리한 후 제조한 HCT15 세포의 핵 용해물(nuclear lysate)은 100 ng의 pBR322 플라스미드와 37°C에서 30분간 배양하였다.

[95] 도 7은 본 발명에 따른 피라졸린 유도체 가운데 화합물 5d(BTCP)의 ESX-Sur2 상호작용에 대한 저해활성을 나타낸 도이다. (A)는 SEAP 리포터 유전자 시험 결과를 나타낸다. 본 발명에 따른 피라졸린 유도체 화합물을 HEK293T 세포에 12시간 동안 처리하였으며, 상기 처리는 GAL4 DNA-결합 도메인과 융합된 ESX 발현 플라스미드 및 5개의 GAL4 부위를 보유한 SEAP 프로모터 리포터 플라스미드를 동시에 트랜스펙션(co-transfection)한 후에 수행하였다. SEAP

유전자 활성화를 통한 발광 강도는 본 발명에 따른 화합물의 ESX-Sur2 결합의 저해활성에 비례하여 역으로 나타났다. 막대 그래프는 본 발명에 따른 화합물 각각에 의해 유도된 SEAP 활성의 저해%를 나타낸다. 각 데이터의 점은 3회 반복실험으로부터 나타난 결과의 평균값을 나타낸다. 수직 오차(Vertical error)는 표준편차를 나타낸다. 리포터 유전자 시험과 동시에 수행한 세포독성 시험의 결과는 세포생존률로서 흑색 삼각형(5 μ M 처리)으로 그래프화하였다. CI1033 (pan-HER 저해제) 및 제피티닙(HER1 저해제)은 대조군으로 사용하였다. (B)는 면역침강 시험 결과를 나타낸 도이다. 레인 IgG: 화합물 5d(BTCP)를 첨가하지 않고 항-Sur2 항체(anti-Sur2 antibody)를 첨가하지 않은 시험구; Mock: 화합물 5d(BTCP)를 첨가하지 않은 HCT15 세포; BTCP: 화합물 5d(BTCP) 처리 HCT15 세포. 10 μ M의 화합물 5d(BTCP)를 16시간 동안 처리한 시험구만 항-Sur2 항체에 의한 ESX 면역침강이 저해되었다.

- [96] 도 8a 및 8b는 본 발명에 따른 피라졸린 유도체 가운데 화합물 5d(BTCP)의 HER2 유전자 전사 및 HER2 리포터 단백질 발현에 대한 활성을 나타낸 도이다. 도 8a는 화합물 5d(BTCP)를 다양한 농도로 16시간 동안 처리한 후에 정량적 RT-PCR을 이용하여 분석한 HCT15 세포의 mRNA 레벨을 나타낸 결과이다. 도 8b는 화합물 5d(BTCP)를 다양한 농도로 16시간 동안 처리한 세포 용해물(cell lysate)의 단백질 레벨을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. 모든 시험은 3회 반복시험으로 수행하였다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs 대조군).
- [97] 도 9는 본 발명에 따른 피라졸린 유도체 가운데 화합물 5d(BTCP)의 HCT15 세포에 있어서의 HER1, HER2 및 HER4, 및 HER2-기반의 세포내 시그널 전달의 인산화 과정에 대한 저해활성을 나타낸 도이다. 화합물 5d(BTCP) 및 제피티닙을 16시간 동안 처리한 후에 HCT15 세포 용해물(cell lysate)을 웨스턴 블롯으로 분석하였다. HER1, p-HER1(Y1068), p-HER2(Y877, Y1248), HER4, p-HER4(Y1284), MAPK, p-MAPK (T201/T204), Akt 및 p-Akt(S473)의 레벨을 분석하였고 β -액틴을 로딩 대조군으로 이용하였다.
- [98] 도 10a 내지 10c는 본 발명에 따른 피라졸린 유도체 가운데 화합물 5d(BTCP)의 HCT15 세포에 있어서의 세포 주기 및 세포 사멸 유도에 대한 활성을 나타낸 도이다. 도 10a는 화합물 5d(BTCP)를 8시간 동안 처리한 HCT15 세포의 세포 주기 분포를 FACS를 이용하여 분석한 결과이다. 도 10b 및 10c는 화합물 5d(BTCP)를 16시간 동안 처리한 HCT15 세포용해물을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이다. PARP, caspase-3, p27^{kip1}, 사이클린(cyclin) D1, 절개된(cleaved) PARP 및 절개된 caspase-3가 검출되었으며, β -액틴을 로딩 대조군으로 관찰하였다. 컬럼 및 오차 막대는 3회 반복시험의 평균 $\pm$ 표준편차를 나타낸다(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs 대조군).
- [99] 도 11a 내지 11g는 본 발명에 따른 피라졸린 유도체 가운데 화합물 5d(BTCP)의 *in vivo* 항암활성을 나타낸 도이다. 도 11a는 HCT15의 단일-세포 현탁액(5×10^6 세포)을 누드 마우스에 주사하였으며, 종양의 부피가 500 mm³가 되었을 때,

마우스 당 50 μ L의 화합물 5d(BTCP, 25 mg/kg)를 3일 간격으로 15일 동안 종양내 주입하였다(적색 화살표로 표시). 각 그룹당 3마리의 마우스를 사용하였다. 종양 부피(mm^3)는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 도 11b는 대조군 및 화합물 5d(BTCP)-처리 마우스로부터 적출한 종양을 나타낸 사진이다(오른쪽 사진). 각 그룹의 종양 무게는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 도 11c 및 11d는 대조군 및 화합물 5d(BTCP)-처리 시료의 종양부분을 면역조직화학적 분석을 수행한 결과를 나타낸다. 건본들은 Ki-67, cleaved caspase-3, CD31, HER2, p-HER2, HER1, 및 p-HER1을 이용하여 염색되었다. 도, 11e, 11f, 및 11g는 마우스의 동결 균질화된 절반의 종양샘플에 대한 면역 블롯의 결과를 대조군과 비교하여 나타내었다.

[100] 도 12는 본 발명에 따른 피라줄린 유도체 가운데 화합물 5d(BTCP)의 HCT15 세포에 있어서의 뉴레굴린 1(NRG1)-기반의 HER3 인산화에 대한 저해활성을 나타낸 도이다. 화합물 5d(BTCP) 또는 트라스트주맵(허셉틴)을 16시간 동안 처리한 후, HCT15 세포는 뉴레굴린 1을 이용하여 10분간 활성화하였으며 HCT15 세포 용해물은 웨스턴 블롯을 통해 분석하였다. HER3 및 p-HER3(Y1289)의 레벨을 검출하였으며 β -액틴을 로딩 대조군으로 관찰하였다. 막대 그래프는 화합물을 처리하지 않은 대조군에 대한 p-HER3의 상대적인 양을 나타낸 결과이며, 3회 반복시험의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. *는 대조군에 대해 $p < 0.001$ (basal)을, #은 대조군에 대해 $p < 0.05$ (뉴레굴린 1(NRG1)-기반)를 나타낸다.

[101] 도 13a 내지 13c는 본 발명에 따른 피라줄린 유도체 가운데 화합물 5d(BTCP)의 트라스트주맵-내성 HCT15(HCT15/R) 세포에서의 활성을 나타낸 도이다. 도 13a는 0.687 μ M의 트라스트주맵을 4달 동안 처리하여 제조한 트라스트주맵-내성 HCT15 세포에 대한 도이며, HER2 인산화의 레벨을 웨스턴 블롯으로 분석하여 세포내 내성 형성을 확인하였다. 도 13b는 HCT15/R 세포에서의 화합물 5d(BTCP), 제피티닙 및 트라스트주맵의 활성을 분석한 결과를 나타낸 도이며, 최종농도 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 및 25 μ M의 화합물을 72시간 동안 처리한 후의 IC₅₀ 값을 테이블 곡선 2D 프로그램(Table Curve 2D program)을 이용하여 분석한 결과를 나타낸다. 도 13c는 10 μ M의 화합물 5d(BTCP) 및 제피티닙을 HCT15/R 세포에 처리한 후의 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 도이다. HER2 인산화 및 MAPK 및 Akt를 포함한 HER2-기반의 하류 시그널에서의 화합물 5d(BTCP)의 영향을 분석한 결과를 나타낸다.

[102]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[103] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[104]

[105] 재료 및 기기

[106] 화합물 및 용매는 시약용 등급을 사용하였고, 추가 정제 없이 사용하였다. 화합물 4a, 4d, 4e 및 4f는 상업적으로 구입하여 사용하였다. 얇은 막 컬럼크로마토그래피(TLC) 분석은 유리판 TLC 실리카 플레이트(실리카겔 60 F₂₅₄, 0.25 mm)로 수행하였으며 형광 지시약(Merck art. 1.05554)으로 확인하였다. 컬럼 크로마토그래피는 60-120 메쉬의 Merck사의 실리카겔로 수행하였다. 용융점은 Fisher Scientific™사의 용융점 기기(모델번호 IA9100)로 측정하였다. 적외선 스펙트럼(IR)은 고체 및 액체 상태의 KBr 펠렛을 사용하여 Perkin Elmer사의 Spectrum BX FT-IR 분광계로 측정하였다. 핵자기 공명(NMR) 스펙트럼은 500 MHz의 Avance Bruker Ultra Shield™ 분광계를 이용하여 측정하였으며 테트라메틸실란(tetramethylsilane)을 내부 표준물질로 하여 ppm(parts per million) 단위로 기록하였다. ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR (δ)에서의 화학적 이동은 ppm으로 기록하였다. ¹H-작동 주파수(working frequency) 및 ¹³C-작동 주파수는 각각 500 MHz 및 125 MHz이었다. CDCl₃ 및 DMSO-*d*₆를 내부 표준물질로 사용하였으며, ¹H-NMR에서는 7.24 및 2.49 ppm, ¹³C-NMR에서는 77 및 39.5 ppm에서 각각의 신호가 관측되었다. 짝지음 상수 *J*(coupling constants *J*)는 헤르츠(Hertz; Hz)로 기록하였다. 피크는 폭넓은 시그널(broad signals; br), 싱글렛(singlet; s), 더블렛(doublet; d), 더블렛 오브 더블렛(doublets of doublets; dd), 더블렛 오브 더블렛 오브 더블렛(doublets of doublets of doublets; ddd), 트리플렛(triplets; t) 및 멀티플렛(multiplets; m), 더블렛 오브 트리플렛(doublets of triplets; dt), 트리플렛 오브 더블렛(triplets of doublets; td)으로 나타내었다. 질량분석 스펙트럼은 ESI 이온화 소스가 장착된 이온 트랩 질량분석기(Ion Trap mass spectrometer; Agilent 6320)가 연결된 Agilent사의 HPLC 1200을 이용하여 포지티브 및/또는 네거티브 모드에서 수행하였다. 원소 분석(Elemental Analysis)은 PerkinElmer 2400 CHN 분석기를 이용하여 수행하였다.

[107]

[108] 세포주, 세포배양 및 시약

[109] HEK293(인간 신장 배아 세포주; ATCC CRL-1573), BT474(인간 HER2 양성 유방암 세포주; ATCC HTB-20), T47D(인간 HER2 음성 유방암 세포주; ATCC HTB-133), NCI-N87(인간 HER2 양성 위암 세포주; ATCC CRL-5822), SNU638(인간 HER2 음성 위암 세포주), HCT15(인간 HER2 양성 직장암 세포주; ATCC CCL-225) 및 HCT116(인간 HER2 음성 직장암 세포주; ATCC CCL-247)은 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였다. HEK293은 Dulbecco's modified Eagle's 배지(DMEM, Welgene, Korea)에서 배양하였고, BT474, T47D, NCI-N87, SNU638, HCT15 및 HCT116은 RPMI 1640 배지(Welgene, Korea)를 이용하여 37°C로 유지된 습한 5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 상기 각각의 배지에는 10% 소태아혈청(FBS; HyClone, USA) 및 1% 페니실린(Sigma,

USA)을 첨가하였다. 모든 배지는 2-3일마다 교환하였으며, 세포는 1:5로부터 1:10까지 계대배양하였다.

- [110] 트라스투주맵(Trastuzumab)은 Roche(Roche, Swiss)로부터 제공받아 사용하였다. 트라스투주맵-내성 HCT15 세포주(HCT15/R)는 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 트라스투주맵을 4개월 동안 연속적으로 처리하여 제조하였다. 내성 세포를 제조하는 과정 중에 배지는 2-3일마다 교체하였다. HER2, p-HER2(Y877), p-HER2(Y1248), MAPK, p-MAPK(T202/204), Akt, p-Akt(S473), HER1, p-HER1(Y1068), HER4, p-HER4(Y1284), caspase-3, PARP, β -actin 및 Anti-IgG의 항체는 Cell Signaling Technology Inc.(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. 상피세포-특이적인 ETS 전사 인자(ESX)의 항체는 Thermo scientific(Runcorn, UK)에서 구입하였으며, 인간 매개자 복합체(human mediator complexes; Sur2)의 후생동물-특이적인 서브유닛(metazoan-specific subunit)의 항체는 Santa Cruz Inc.(Dallas, USA)에서 구입하였다. 아드리아마이신(adriamycin), 에토포시드(etoposide), 캄토테신(camptothecin) 및 제피티닙(gefitinib)은 시그마-알드리치(St. Louis, USA)에서 구입하였다. 본 발명에 사용된 모든 화합물은 DMSO(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)에 용해하여 10 mM의 스톡 용매를 제조한 후 사용시까지 -20°C에 보관하였다.

[111]

[112] 통계학적 분석

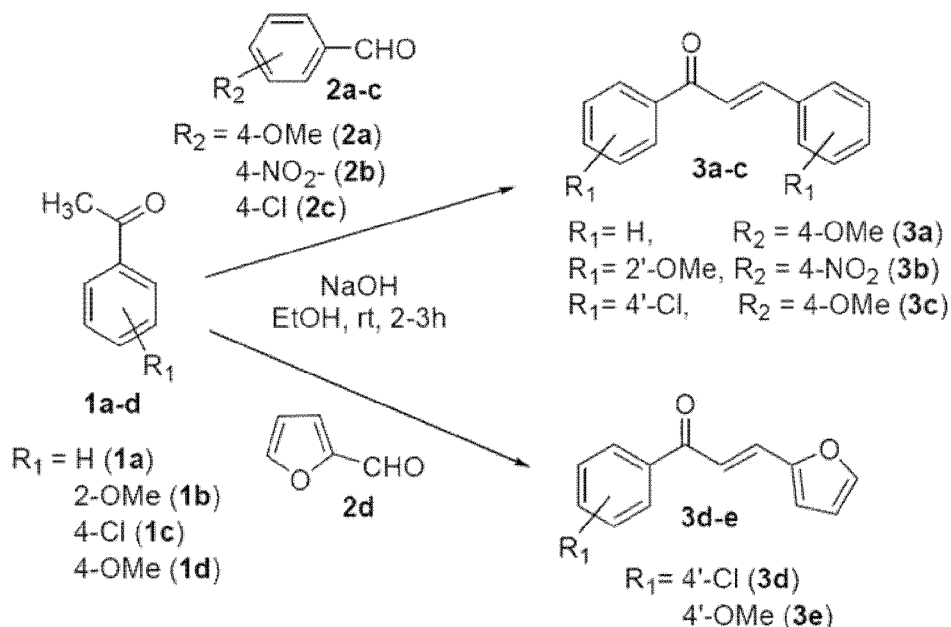
- [113] 하기 실시예의 시험은 최소 3회 수행하였고 모든 데이터는 평균값 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 통계는 GraphPad InStat version 3.1(GraphPad Software, USA)을 이용하여 스튜던트 t-검정(student t-test)으로 유의성을 측정하였으며, 두가지 값 사이의 차이는 p value가 <0.05 일 경우에 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[114]

[115] 제조예 1 : 칼콘 유도체(Chalcone; 3a-e)의 제조

[116]

[117]



[118]

[119] 클라이젠-슈미트(Claisen-Schmidt) 반응에 따라 아세트페논 유도체 및 방향족 알데히드를 반응시켜 정량적 수율(90% 이상)로 칼콘 유도체를 합성하였으며, 합성된 칼콘 유도체의 구조는 핵자기 공명 분석(NMR) 및 질량분석(MS) 데이터를 통해 해석하고 종래 보고된 스펙트럼 데이터와 비교하였다. 구체적으로, 당량물의 (치환된)-아세트페논 및 (치환된)-벤즈알데히드 혼합물이 용해된 에탄올 용액을 알칼성 수산화나트륨(10%)의 존재하에서 2-3시간 동안 교반하였다. 교반한 혼합물을 냉각수에 첨가한 후 고체상의 침전물을 여과하고 오픈된 공기하에서 건조하여 정량적 수율의 칼콘 화합물(3a-d)을 수득하였다. 에탄올로 결정화하여 순수한 칼콘을 수득하였으며, 스펙트럼 데이터는 문헌상의 값과 일치하였다. 기록되어 있지 않은 화합물의 스펙트럼 데이터는 하기에 나타내었다.

[120]

[121] (E)-3-(4-메톡시페닐)-1-페닐프로프-2-엔-1-온[(E)-3-(4-methoxyphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-one; **3a**]

[122] 백색 고체(CAS no. 959-33-1, 98 %); 녹는점 = 61°C [lit. mp. = 60-63°C];

[123] ESI mass (m/z) 238.9 [$\text{M}+\text{H}$]⁺, 260.9 [$\text{M}+\text{Na}$]⁺ (calculated exact mass 238.1).

[124]

[125] (E)-1-(2-메톡시페닐)-3-(4-니트로페닐)프로프-2-엔-1-온[(E)-1-(2-methoxyphenyl)-3-(4-nitrophenyl)prop-2-en-1-one; **3b**]

[126] 황색 고체(96 %); 녹는점 = 71-72°C;

[127] ¹H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 8.17 (d, $J = 8.5$ Hz 2H), 7.65 (d, $J = 8.5$ Hz 2H), 7.61-7.56 (overlapped, 2H), 7.48-7.42 (overlapped, 2H), 6.98 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.95 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H), 3.86 (s, 3H) ppm;

[128] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 190.64, 157.45, 147.31, 140.52, 138.18, 132.71, 129.70, 129.63, 127.80, 127.52, 123.11, 119.95, 110.70 및 54.79 ppm

[129] ESI mass (m/z) 284.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 305.9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculated exact mass 283.1)

[130]

[131] (E)-1-(4-클로로페닐)-3-(4-메톡시페닐)프롭-2-엔-1-온[(E)-1-(4-chlorophenyl)-3-(4-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one; **3c**]

[132] 백색 고체(98 %); 녹는점 = 117-118°C [lit. mp. = 117°C];

[133] ESI mass (m/z) 273.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 294.9 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculated exact mass 272.1)

[134]

[135] (E)-1-(4-클로로페닐)-3-(퓨란-2-일)프롭-2-엔-1-온[(E)-1-(4-chlorophenyl)-3-(furan-2-yl)prop-2-en-1-one; **3d**]

[136] 백색 고체(CAS no. 114570-70-6, 95 %);

[137] ESI mass (m/z) 232.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 254.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculated exact mass 233.0)

[138]

[139] (E)-1-(4-메톡시페닐)-3-(퓨란-2-일)프롭-2-엔-1-온[(E)-1-(4-methoxyphenyl)-3-(furan-2-yl)prop-2-en-1-one; **3e**]

[140]

[141] *125백색 고체(98 %); 녹는점 = 68-69°C [lit. mp. = 68°C];

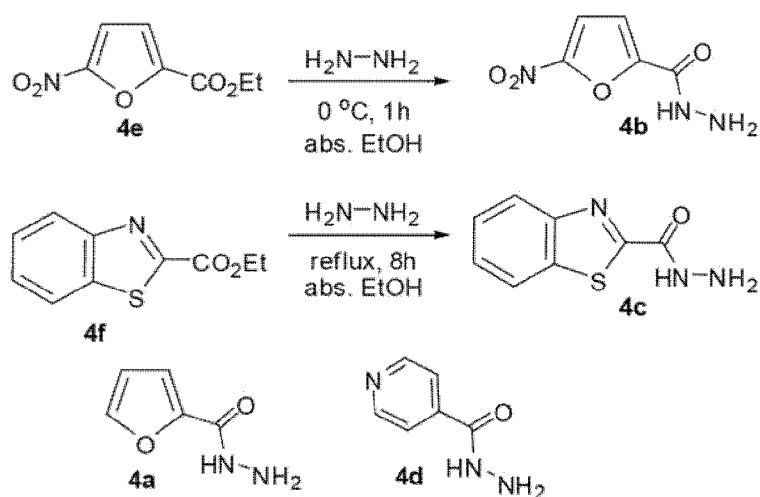
[142] ESI mass (m/z) 228.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 250.8 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculated exact mass 228.0)

[143]

[144] 제조예 2 : 하이드라지드 유도체(Hydrazide; 4a-d)의 제조

[145]

[146]



[147]

[148] 퓨란-2-카르보하이드라지드[Furan-2-carbohydrazide; **4a**]

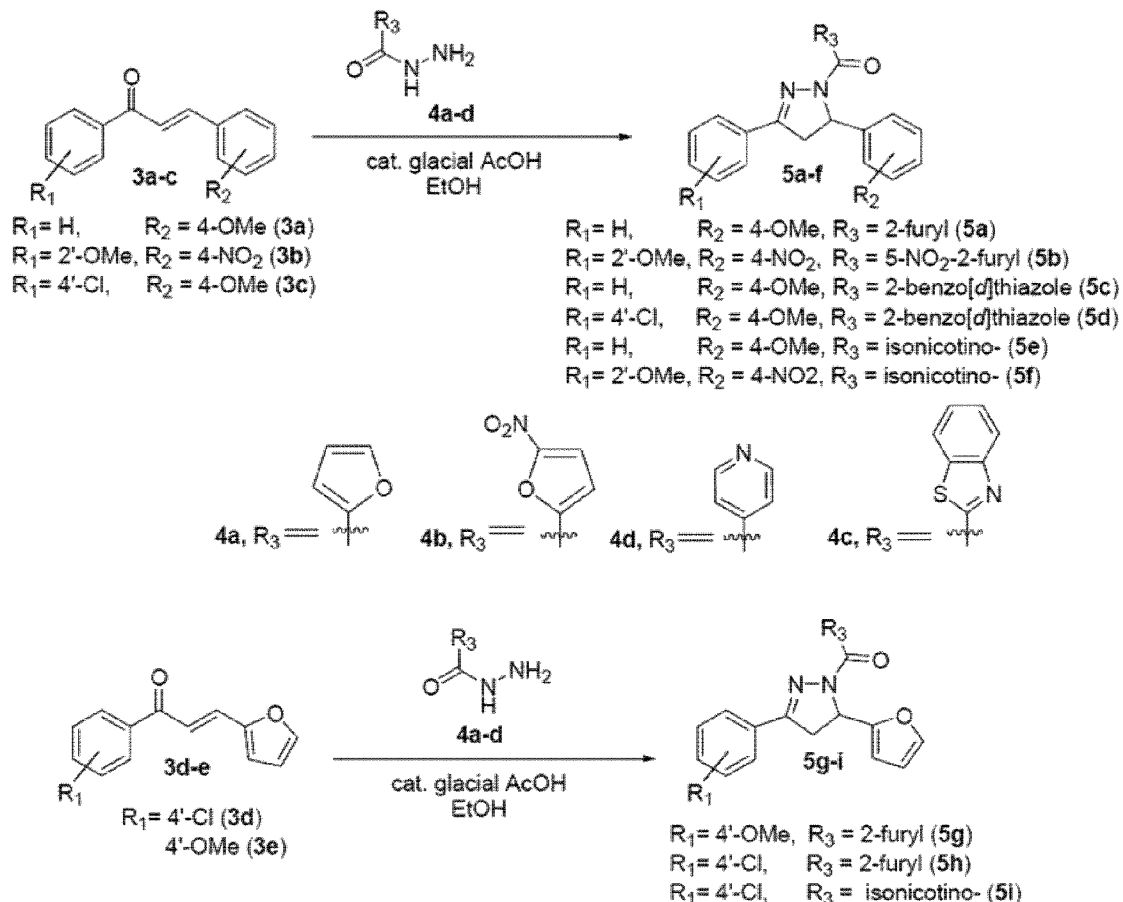
[149] 상업적으로 구입(CAS no. 3326-71-4); 녹는점 = 77-79°C;

[150] ESI mass (m/z) 126.9 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculated for 129.1)

[151]

- [152] 5-니트로퓨란-2-카르보하이드라지드[5-Nitrofuran-2-carbohydrazide; 4b]
- [153] 하이드라진 수화물(11 mmol) 및 에틸 5-니트로퓨란-2-카르복실레이트(10 mmol; 4e)가 용해된 에탄올 용액(100 mL)을 0°C에서 1시간 동안 교반한 후, 실온에서 1시간 동안 추가로 교반하였다. 생성된 고체를 여과하고 에탄올로 세척한 후 흡인하여 건조하였다. 메탄올로 결정화하여 연한 황색 바늘형상의 5-니트로퓨란-2-카르보하이드라지드(4b)를 수득하였다(수율 73%).
- [154] 녹는점 = 171-172°C [lit. mp. = 171-172°C];
- [155] ESI mass (*m/z*) 171.8 [M+H]⁺ (calculated exact mass 171.0); CAS no. 5469-78-3.
- [156]
- [157] 벤조[d]티아졸-2-카르보하이드라지드[Benzo[d]thiazole-2-carbohydrazide; 4c]
- [158] 하이드라진 수화물(22 mmol) 및 에틸 벤조[d]티아졸-2-카르복실레이트(10 mmol; 4f)가 용해된 에탄올 용액(50 mL)을 1시간 동안 환류하였다. 생성된 고체를 여과하고 에탄올로 세척한 후 건조하였다. 에탄올로 결정화하여 연한 황색 결정의 벤조[d]티아졸-2-카르보하이드라지드(4c)를 90% 수율로 수득하였다.
- [159] 녹는점 = 175-176°C [lit. mp. 175-176°C];
- [160] ESI mass (*m/z*) 193.8 [M+H]⁺ (calculated exact mass 193.0); CAS no. 28891-34-1.
- [161]
- [162] 이소니코티노하이드라지드[Isonicotinohydrazide; 4d]
- [163] 상업적으로 구입(CAS no. 54-85-3);
- [164] ESI mass (*m/z*) 137.9 [M+H]⁺ (calculated exact mass 137.0)
- [165]
- [166] 실시예 1 : 피라졸린 유도체(Pyrazoline; 5a-i)의 제조
- [167]

[168]



[169]

[170]

상기 제조예 1에서 제조한 칼콘 유도체(1 당량) 및 상기 제조예 2에서 제조한 하이드라지드 유도체(1.2 당량)의 혼합물을 에탄올에 용해한 후 촉매량의 빙초산(1-3 방울) 존재하에서 밤새도록 환류하였다. 과량의 용매를 증발시킨 후 반응 혼합물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 통과시켰으며, 에틸아세테이트 및 n-헥산을 이동상으로 사용하였다. 제조한 피라졸린 유도체 5a-i의 구조는 하기의 스펙트럼 데이터를 통해 분석하였다: KBr 펠렛 상의 IR 스펙트럼은 1510-1612 cm⁻¹에서 C=N 신축진동(stretching), 1626-1704 cm⁻¹에서 아미드카르보닐기(N-C=O) 신축진동(stretching)의 흡수 밴드를 나타내었다. NMR 분석 결과, 피라졸린 유도체 5a-i의 특정 메틸렌 양성자(4-H_a 및 4-H_β)가 나타났으며, 3.52-4.04 ppm에서 4-H_a, 및 3.13-3.50 ppm에서 4-H_β에 해당하는 더블 더블렛 피크가 관찰되었고, 이때의 커플링 상수 'J'는 4-H_a에 대해 18.0 및 11.5 Hz이었으며, 4-H_β에 대해 18.0 및 4.5 Hz이었다. 또 다른 특정 인접 메틴(vicinal methine)의 양성자 5-H는 5.68-5.92 ppm에서 더블 더블렛으로 관찰되었으며, 커플링 상수는 11.5 및 4.5 Hz이었다. 제조된 피라졸린 유도체는 질량 분석을 통해 분석하였으며, 포지티브 모드에서는 분자 질량에 양성자가 첨가된 [M+H]⁺ 및/또는 나트륨이 결합된 [M+Na]⁺ 값을, 네거티브 모드에서는 분자 질량에서 양성자가 제거된 [M-H]⁻ 값으로 나타내었다. 또한, 제조한

피라졸린 유도체의 구조는 탄소, 수소 및 질소(CHN) 백분율로 측정되는 원자 분석(Elemental analysis)을 통해 추가로 확인하였다. 이외의 기록되지 않은 화합물의 스펙트럼 데이터를 하기에 나타내었다.

[171]

[172] 화합물 1:

퓨란-2-일(5-(4-메톡시페닐)-3-페닐-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)메타논[Furan-2-yl(5-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)methanone; 5a]

[173] 연한 갈색 고체(94 %); 녹는점 = 243-244°C;

[174] IR (KBr, cm⁻¹): 3116, 3062, 2953, 1648, 1611, 1560, 1512, 1472, 1429, 1246, 1174, 1036 cm⁻¹;[175] ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 7.23-7.16 (m, 2H), 7.59 (d, *J* = 2.5 Hz 1H), 7.53 (s, 1H), 7.39-7.37 (m, 3H), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.76 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.48 (t, *J* = 1.5 Hz, 1H), 5.68 (dd, *J* = 11.5, 4.0 Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 3.66 (overlapped, 1H), 3.13 (dd, *J* = 18.0, 4.0 Hz, 1H) ppm;[176] ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 159.11, 155.86, 155.40, 146.37, 145.37, 133.67, 131.39, 130.56, 128.87, 127.13, 126.81, 118.94, 114.25, 111.52, 60.58, 55.30 및 41.26 ppm;[177] ESI mass (*m/z*) 347.1 [M+H]⁺ (calculated exact mass 346.1);[178] *Anal.* Calculated for C₂₁H₁₈N₂O₃: C, 72.82; H, 5.24; N, 8.09. Found: C, 72.03; H, 5.24; N, 7.87.

[179]

[180] 화합물 2:

(3-(2-메톡시페닐)-5-(4-니트로페닐)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)(5-니트로퓨란-2-일)메타논[(3-(2-Methoxyphenyl)-5-(4-nitrophenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)(5-nitrofuran-2-yl)methanone; 5b]

[181] 황색 고체(92 %); 녹는점 = 140-141°C;

[182] IR (KBr, cm⁻¹): 3326, 3106, 3060, 2949, 1704, 1596, 1513, 1470, 1257, 1031 cm⁻¹;[183] ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 7.82 (s, 2H), 7.69 (s, 1H), 7.63 (s, 1H), 7.49 (m, 2H), 7.25 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.86 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.58 (s, 1H), 5.80 (dd, *J* = 11.5, 4.0 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.77 (overlapped, 1H), 3.24 (dd, *J* = 18.0, 4.0 Hz, 1H) ppm;[184] ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 159.13, 155.86, 155.36, 146.39, 145.36, 133.68, 131.41, 130.55, 128.86, 127.14, 126.80, 118.91, 114.26, 111.50, 60.58, 55.30 및 41.25 ppm;[185] ESI mass (*m/z*) 434.5 [M-H]⁻ (calculated exact mass 436.0);[186] *Anal.* Calculated for C₂₁H₁₆N₄O₇: C, 57.80; H, 3.70; N, 12.84. Found: C, 57.69; H, 3.77; N, 12.95.

[187]

[188] 화합물 3:

벤조[d]티아졸-2-일(5-(4-메톡시페닐)-3-페닐-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)메타논[Benzo[d]thiazol-2-yl(5-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)methanone; 5c]

- [189] 미색(off-white) 고체(92%); 녹는점 = 199-200°C;
- [190] IR (KBr, cm^{-1}): 3062, 2957, 1646, 1610, 1513, 1469, 1417, 1249, 1184, 1036 cm^{-1} ;
- [191] ^1H NMR (DMSO-d_6 , 500 MHz): δ 8.29 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 8.21 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 7.96 (s, 2H), 7.63-7.56 (m, 5H), 7.25 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.93 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 5.83-5.81 (m, 1H), 4.01 (dd, $J = 18, 11.5$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.34 (overlapped, 1H) ppm;
- [192] ^{13}C NMR (DMSO-d_6 , 125 MHz): δ 158.69, 157.46, 155.05, 151.41, 136.76, 133.19, 131.06, 130.54, 128.99, 127.35, 127.16, 127.15, 126.88, 124.43, 122.53, 114.14, 60.65, 55.10 및 41.57 ppm;
- [193] ESI mass (m/z) 414.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 436.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculated exact mass 413.1);
- [194] *Anal.* Calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$: C, 69.71; H, 4.63; N, 10.16. Found: C, 68.81; H, 4.76; N, 10.21.

[195]

[196] 화합물 4:

벤조[d]티아졸-2-일(3-(4-클로로페닐)-5-(4-메톡시페닐)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)메타논[Benzo[d]thiazol-2-yl(3-(4-chlorophenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)methanone; 5d]

- [197] 백색 고체(94%); 녹는점 = 139-140°C;
- [198] IR (KBr, cm^{-1}): 3012, 1918, 1648, 1593, 1515, 1430, 1400, 1333, 1252, 1178, 1031 cm^{-1} ;
- [199] ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 8.74 (m, 2H), 7.80 (m, 2H), 7.62 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.39 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.25 (d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 6.88 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 5.75 (dd, $J = 11.5, 4.0$ Hz, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.76 (overlapped, 1H), 3.21 (dd, $J = 18.0, 4.5$ Hz, 1H) ppm;
- [200] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 171.12, 164.25, 159.32, 154.90, 149.70, 141.74, 136.76, 133.19, 130.00, 129.47, 128.09, 127.09, 123.65, 114.43, 60.92, 55.29 및 41.60 ppm;
- [201] ESI mass (m/z) 448.3 $[\text{M}(^{35}\text{Cl})+\text{H}]^+$, 450.3 $[\text{M}(^{37}\text{Cl})+\text{H}]^+$, 470.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculated exact mass 447.08);
- [202] *Anal.* Calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{18}\text{ClN}_3\text{O}_2\text{S}$: C, 64.35; H, 4.05; N, 9.38. Found: C, 67.19; H, 4.82; N, 10.61.

[203]

[204] 화합물 5:

(5-(4-메톡시페닐)-3-페닐-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)(피리딘-4-일)메타논[(5-(4-Methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)(pyridin-4-yl)methanone;

5e]

- [205] 백색 고체(93%); 녹는점 = 187-188°C;
- [206] IR (KBr, cm⁻¹): 3028, 2947, 1641, 1593, 1516, 1454, 1439, 1339, 1244, 1182, 1034 cm⁻¹;
- [207] ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 8.76 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.86 (d, *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.73 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.46 (overlapped, 1H), 7.46 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 5.77 (dd, *J* = 16.5 Hz, 1H), 3.83 (overlapped, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.28 (dd, *J* = 18.0, 4.5 Hz, 1H) ppm;
- [208] ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 164.17, 159.29, 156.04, 149.62, 141.90, 133.37, 130.94, 130.83, 128.88, 127.14, 126.87, 123.78, 114.42, 60.80, 55.31 및 41.68 ppm;
- [209] ESI mass (*m/z*) 458.0 [M+H]⁺, 480.0 [M+Na]⁺ (calculated exact mass 457.14);
- [210] *Anal.* Calculated for C₂₂H₁₉N₃O₂: C, 73.93; H, 5.36; N, 11.76. Found: C, 73.88; H, 5.06; N, 11.65.

[211]

[212] **화합물 6:**

(3-(2-메톡시페닐)-5-(4-니트로페닐)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)(피리딘-4-일)메타논 [(3-(2-Methoxyphenyl)-5-(4-nitrophenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)(pyridin-4-yl)methanone; **5f**]

- [213] 백색 크림상의 고체(white creamy solid; 93%); 녹는점 = 156-157°C;
- [214] IR (KBr, cm⁻¹): 3041, 2937, 1701, 1625, 1599, 1516, 1490, 1428, 1340, 1245, 1122, 1024 cm⁻¹;
- [215] ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 8.77 (dd, *J* = 4.5, 1.5 Hz, 2H), 8.24 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.89 (dd, *J* = 4.5, 1.5 Hz, 2H), 7.84 (dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.53 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.46 (td, *J* = 7.5, 1.5 Hz, 1H), 7.04 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 5.82 (dd, *J* = 11.5, 5.0 Hz, 1H), 4.04 (dd, *J* = 18.0, 12.0 Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.42 (dd, *J* = 18.0, 5.0 Hz, 1H) ppm;
- [216] ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 164.18, 158.47, 155.99, 149.68, 148.54, 147.50, 141.28, 132.47, 129.33, 126.86, 124.40, 123.80, 121.08, 119.37, 117.2, 60.79, 55.53 및 44.66 ppm;
- [217] ESI mass (*m/z*) 403.1 [M+H]⁺, 425.0 [M+Na]⁺ (calculated exact mass 402.13);
- [218] *Anal.* Calculated for C₂₂H₁₈N₄O₄: C, 65.64; H, 4.51; N, 13.92. Found: C, 65.04; H, 4.48; N, 13.93.

[219]

[220] **화합물 7:**

퓨란-2-일(5-(퓨란-2-일)-3-(4-메톡시페닐)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)메타논 [Furan-2-yl(5-(furan-2-yl)-3-(4-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)methanone; **5g**]

- [221] 백색 고체(90 %); 녹는점 = 159-160°C;

- [222] IR (KBr, cm^{-1}): 3141, 3120, 3007, 2968, 2836, 1636, 1607, 1558, 1473, 1435, 1331, 1246, 1148, 1040, 1018 cm^{-1} ;
- [223] ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.77 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.65 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 15.5 Hz, 2H), 7.00 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.92 (dd, J = 11.0, 3.5 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.60 (dd, J = 17.5, 11.5 Hz, 1H), 3.50 (dd, J = 16.5, 3.5 Hz, 1H) ppm;
- [224]
- [225] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 161.56, 155.78, 155.35, 151.66, 146.27, 145.34, 141.96, 128.45, 123.86, 118.98, 114.27, 111.51, 110.63, 108.15, 55.45, 54.33 및 37.19 ppm;
- [226] ESI mass (m/z) 337.0 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 359.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculated exact mass 336.1);
- [227] *Anal.* Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$: C, 67.85; H, 4.79; N, 8.33. Found: C, 67.62; H, 4.38; N, 8.21.
- [228]
- [229] 화합물 8:
(3-(4-클로로페닐)-5-(퓨란-2-일)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)(퓨란-2-일)메타논
none; 5h]
- [230] 미 색(off-white) 고체(96 %); 녹는점 = 186-187°C;
- [231] IR (KBr, cm^{-1}): 33131, 3110, 2962, 1635, 1597, 1557, 1470, 1439, 1400, 1329, 1226, 1152, 1011 cm^{-1} ;
- [232] ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.66 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.54 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.21 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 6.35 (s, 1H), 6.18 (s, 1H), 5.84 (dd, J = 17.5, 11.5 Hz, 1H), 3.52 (dd, J = 17.5, 11.5 Hz, 1H), 3.41 (dd, J = 17.5, 4.5 Hz, 1H) ppm;
- [233] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 155.91, 154.41, 151.29, 146.04, 145.57, 142.08, 136.60, 129.77, 129.15, 128.02, 119.13, 111.58, 110.69, 108.31, 54.60 및 36.99 ppm;
- [234] ESI mass (m/z) 341.1 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 363.0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (calculated exact mass 340.13);
- [235] *Anal.* Calculated for $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_3$: C, 63.44; H, 3.85; N, 8.22. Found: C, 62.99; H, 4.39; N, 8.31.
- [236]
- [237] 화합물 9:
(3-(4-클로로페닐)-5-(퓨란-2-일)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)(피리딘-4-일)메타논
ethanone; 5i]
- [238] 연한 갈색 고체(96 %); 녹는점 = 156-157°C;
- [239] IR (KBr, cm^{-1}): 3041, 2925, 1626, 1542, 1441, 1335, 1214, 1146, 1092, 1010 cm^{-1} ;
- [240] ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 8.76 (s, 2H), 8.04 (s, 2H), 7.55 (d, J = 8.0 Hz, 2H),

- 7.35(d, $J = 8.0$ Hz, 2H), 7.29 (s, 1H), 6.42 (s, 1H), 6.31 (s, 1H), 5.84 (dd, $J = 17.5$, 10.5 Hz, 1H), 3.60 (dd, $J = 17.5$, 11.5 Hz, 1H), 3.49 (dd, $J = 17.5$, 4.0 Hz, 1H) ppm;
- [241] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 157.16, 150.95, 145.05, 139.80, 137.37, 132.18, 124.05, 123.54, 122.93, 120.30, 105.56, 103.76, 49.58 및 32.43 ppm;
- [242] ESI mass (m/z) 352.0 [$\text{M} (^{35}\text{Cl})+\text{H}$] $^+$, 354.0 [$\text{M} (^{37}\text{Cl})+\text{H}$] $^+$ (calculated exact mass 351.08);
- [243] *Anal.* Calculated for $\text{C}_{19}\text{H}_{14}\text{ClN}_3\text{O}_2$: C, 64.87; H, 4.01; N, 11.94. Found: C, 64.08; H, 4.17; N, 10.58.
- [244]
- [245] 실시예 2 : DNA 토포이소머라제 I 및 토포이소머라제 II 기반의 *in vitro* 완화 시험(DNA topo I and II mediated relaxation assay in vitro)
- [246] *Cancer Res.*에 공지된 방법에 따라 본 발명 화합물의 DNA 토포이소머라제 I 저해 활성을 확인하였다(Riou JF et al., *Cancer Res.*, 1993, 53, 5987-5993). 상기 실시예 1에서 제조한 분석대상 화합물을 DMSO에 용해시켜 20 mM 농도의 스톱 용매를 제조하였다. DNA 토포이소머라제 I 활성은 초나선 DNA pBR322(supercoiled DNA pBR322; Fermentas, USA)의 완화(relaxation) 정도를 측정하여 분석하였다. 100 ng의 pBR322 DNA 및 1 유닛(unit)의 제조합된 인간 DNA 토포이소머라제 I(TopoGEN INC., USA)의 혼합물을 상기에서 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가하거나 첨가하지 않은 조건에서 30분간 37°C에서 배양하였다. 상기 배양은 완화 버퍼(10 mM Tris-HCl, pH 7.9), 150 mM 염화나트륨, 0.1% 소혈청알부민, 1 mM 스페르미딘(spermidine), 5% 글리세롤이 함유된 조건에서 수행하였다. 배양액의 최종 부피 10 μL 에 대해 5% 사코실(sarcosyl), 0.0025% 브로모페놀 블루(bromophenol blue) 및 25% 글리세롤을 함유한 반응정지액 2.5 μL 를 첨가하여 반응을 종료하였다. 반응종료 후, DNA 시료는 0.8% 아가로스 겔 상에서 TAE(Tris-acetate-EDTA)의 러닝 버퍼를 이용하여 60 V에서 1시간 동안 전기영동을 수행하였다. 전기영동이 종료된 후, 겔은 에티뮴 브로마이드 수용액(0.5 $\mu\text{g/mL}$)에서 30분간 염색하였다. DNA 밴드는 UV 광선을 투과시켜 가시화하였으며, AlphaImager™(Alpha Innotech Corporation)를 이용하여 정량화하였다.
- [247] 또한, 상기 실시예 1에서 제조한 화합물의 DNA 토포이소머라제 II 억제 활성은 하기와 같은 방법으로 측정하였다. 100 ng의 초나선 pBR322 플라스미드 DNA(Fermentas, USA) 및 1 유닛(unit)의 인간 DNA 토포이소머라제 II(Usb Corp., USA)의 혼합물을 상기에서 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가하거나 첨가하지 않은 조건에서 30분간 37°C에서 배양하였다. 상기 배양은 50 mM 염화나트륨, 5 mM 염화마그네슘, 1 mM EDTA, 1 mM ATP 및 15 $\mu\text{g/mL}$ 소혈청알부민을 함유한 분석 버퍼(10 mM Tris-HCl, pH 7.9)를 이용하여 수행하였다. 배양액의 최종 부피 10 μL 에 대해 3 μL 의 EDTA(7 mM)를 첨가하여 반응을 종료하고, 반응 생성물을 DNA 토포이소머라제 I 기반의 *in vitro* 완화 시험(relaxation assay)에 이용하였다.

[248]

[249] 토포이소머라제 I 및 II 완화 시험을 통해 상기 실시예 1에서 제조한 화합물의 DNA 토포이소머라제 I 및 II 억제 활성을 측정하였으며, 토포이소머라제 I 및 II의 저해제로 알려져 있는 캄토테신 및 에토포시드를 양성 대조군으로 사용하였다. 저해활성은 모든 화합물에서 100 μ M의 농도로 평가하였으며, 중간이상의 높은 활성을 나타낸 화합물만 20 μ M의 농도로 추가 실험을 수행하였다.

[250]

[251] 토포이소머라제 I의 저해활성 분석 결과, 화합물 5h 이외의 화합물들에서는 100 μ M의 농도에서 토포이소머라제 I 저해 활성을 나타내지 않은 반면, 화합물 5h는 100 μ M의 농도에서 97%의 매우 강한 토포이소머라제 I 저해 활성(캄토테신의 경우, 74%)을 나타내었으며, 20 μ M의 농도에서 4%의 약한 토포이소머라제 I 저해 활성(캄토테신의 경우, 25%)을 나타내었다(도 2 및 표 1).

[252] 한편, 토포이소머라제 II의 저해활성 분석 결과, 화합물 5a-i 모두 100 μ M의 농도에서 90-94%의 높은 저해활성(에토포시드의 경우, 96%)을 나타내었으나, 20 μ M의 농도에서는 불활성 또는 매우 약한 활성을 나타내었으며, 화합물 5b 및 5h의 경우에만 각각 3% 및 1%의 토포이소머라제 II 저해활성(에토포시드의 경우, 41%)을 나타내었다(도 3 및 표 1). 상기 결과로부터 화합물 5h는 토포이소머라제 I 및 II에 이중으로 저해활성을 나타내고, 나머지 화합물은 토포이소머라제 II에 특이적인 저해활성을 보임을 확인하였다.

[253] [표1]

화합물	토포이소머라제 I(% 저해)		토포이소머라제 II(% 저해)	
	100 μ M	20 μ M	100 μ M	20 μ M
캄토테신	73.6	24.6	-	-
에토포시드	-	-	95.9	41.1
5a	0.0	-	91.6	0.0
5b	0.0	-	92.6	2.9
5c	0.0	-	91.2	0.0
5d	0.0	-	89.7	0.0
5e	0.0	-	92.5	0.0
5f	0.0	-	92.8	0.0
5g	0.0	-	94.1	0.0
5h	96.8	4.0	93.1	1.3
5i	0.0	-	76.0	0.0

[254]

[255] 실시예 3 :세포생존율 분석(Cell viability assay)

[256] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물의 다양한 암 세포주에서의 항증식 활성(anti-proliferative activity)을 분석하기 위해, 세포 계수 키트(Cell Counting Kit; CCK-8, Dojindo Laboratories; Japan)를 이용하여 미토콘드리아 탈수소효소 활성을 측정하여 세포생존율을 분석하였다. HCT15(인간 직장암 세포), BT474(인간 유방암 세포주) 및 T47D(인간 HER2 음성 유방암 세포주)는 웰(well) 당 10^4 의 세포 밀도로 96-웰 플레이트에 접종하였고 37에서 24시간 동안 배양한 후 72시간 동안 화합물을 처리하였다. CCK-8($10 \mu\text{L}$)을 각 웰에 첨가하고 37°C에서 추가로 4시간 동안 배양한 후, ELISA Microplate Reader(VersaMax, Molecular Devices)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. IC_{50} 값을 분석하기 위해, 450 nm에서의 흡광도를 4-변수 로지스틱 방정식(four-parameter logistic equation)에 적용하였다. 아드리아마이신, 에토포시드 및 캄토테신을 시그마(USA)에서 구입하여 양성 대조군으로 사용하였다.

[257]

[258] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 5a-i를 이용하여 세포독성(cytotoxicity)을 평가하였으며, 인간 암세포주에 대한 세포 증식 저해 활성의 측정 결과를 IC_{50} 값으로 하기 표 2에 나타내었다.

[259] [표2]

화합물	IC_{50} (μM)		
	HCT15	BT474	T47D
아드리아마이신	23.0 ± 7.6	3.2 ± 0.1	2.9 ± 0.1
에토포시드	6.9 ± 1.1	6.6 ± 0.1	6.4 ± 0.3
캄토테신	7.1 ± 2.3	7.0 ± 1.2	4.1 ± 0.1
5a	3.9 ± 0.3	>50	27.3 ± 2.2
5b	>50	>50	>50
5c	1.9 ± 0.8	6.3 ± 0.1	>50
5d	4.1 ± 0.01	7.2 ± 0.03	6.6 ± 0.8
5e	10.4 ± 1.1	>50	>50
5f	2.6 ± 1.2	7.2 ± 1.1	>50
5g	4.3 ± 0.1	>50	7.5 ± 1.1
5h	>50	>50	>50
5i	3.1 ± 0.2	6.5 ± 0.1	7.9 ± 0.8

[260]

- [261] 대부분의 화합물은 HCT15 세포에 대해 강한 세포 독성을 나타내었으며, 이때 IC_{50} 값은 1.9-10.4 μM 이었다. 반면, 대조군으로 사용된 아드리아마이신, 에토포시드 및 캄토테신의 IC_{50} 값은 각각 23.0, 6.9 및 7.1 μM 이었다.
- [262] 한편, 화합물 5c, 5d, 5f 및 5i의 경우, BT474 세포에 대해 강한 세포독성을 나타내었으며, 이 경우의 IC_{50} 값은 6.3-7.2 μM 로 나타났다. 반면, 대조군으로 사용된 아드리아마이신, 에토포시드 및 캄토테신의 IC_{50} 값은 각각 3.2, 6.6 및 7.0 μM 이었다.
- [263] 인간 유방 상피조직 암세포주(T47D)의 경우에는 화합물 5a, 5d, 5g 및 5i에서 보통이상의 강한 세포독성이 관찰되었다.
- [264]
- [265] 실시예 4 : 분자 도킹 시험(Molecular docking study)
- [266] AMP-PNP와 복합체를 형성한 인간 토포이소머라제 II α 의 ATPase 도메인의 결정 구조는 Brookhaven 단백질 데이터 은행(PDB entry 1ZXM)에서 검색하였다. 소프트웨어 패키지 Sybyl-X-2.0(Tripos Associates Inc., St. Louis, MO)을 이용하여 물분자 및 리간드는 제거하고 수소 원자를 첨가하였다. 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 5a-i의 코디네이트(coordinate)를 준비하고 Gasteiger-Huckel 전하를 적용한 트리포스 역장(Tripos force field)을 이용하여 에너지적으로 최소화하였다. 리셉터 및 리간드 파일은 기존의 알려진 프로토콜에 따라 준비하였다. 도킹은 Lamarckian Genetic Algorithm을 이용하여 시뮬레이션으로 수행하였다. 270,000 및 50 도킹 런(docking run)의 집단 크기(population size)를 제외하고는 기본 탐색 파라미터(default search parameter)가 사용되었다. 최종적으로, 도킹은 평균 제곱근 편차(root-mean square deviation; rmsd) 공차한계(tolerance)에서 2.0 Å 내에 위치한 오리엔테이션(orientation)을 집단화하여 분석하였으며, 이를 통해 가장 적절한 도킹 모드를 나타내었다.
- [267]
- [268] 상기 실시예 2의 결과로부터, 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 5a-i는 화합물 5h를 제외하고는 토포이소머라제 I 보다는 토포이소머라제 II를 특이적으로 저해함을 확인하였다.
- [269] 토포이소머라제는 토포이소머라제 I에 의한 DNA 단일 가닥 절단 및 토포이소머라제 II에 의한 DNA 이중 가닥 절단을 통해, DNA 복제, 전사, 재조합, 회복 및 염색질 조립(chromatin assembly) 과정 중에 발생하는 DNA 토폴로지 문제를 해결한다. DNA의 단일 가닥 절단 또는 이중 가닥 절단의 차이점 이외에, 토포이소머라제 II는 ATP가 ATPase 도메인에 결합하는 점에서 토포이소머라제 I과 구별된다. 이에 따라, 본 발명자들은 먼저 화합물 5a-i가 ATPase 도메인에 결합하는지를 분자 도킹 시험을 통해 분석하였다. 상기 분자 도킹 시험은 인간 토포이소머라제 II의 ATP-결합 도메인에 결합된 아데노신 5'-(β, γ -이미도) 트리포스페이트 테트라리튬염 수화물(AMP-PNP)의 결정체 구조로 종래에 보고된 코디네이트(PDB entry 1ZXM)를 이용하여 수행하였다. AMP-PNP는

토포이소머라제 II의 ATP-결합 포켓에 유사한 결합 친화력(binding affinity)를 가지는, ATP와 구조적으로 유사한 아날로그이나, 가수분해될 수 없으며 토포이소머라제 II와 결정화될 수 있다. AMP-PNP를 참고 리간드(reference ligand)로 사용하여 활성부위를 확인하였으며 re-docking을 통해 본 발명의 도킹 과정을 검증하였다.

[270]

[271] 분자 도킹 시험 결과, 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 5a-i는 5b>5f>5d의 순서로 ATP-결합 도메인에의 결합 활성을 나타내었다. 한편, 상기 실시예 1에서 제조한 화합물은 모두 피라졸린 환에 키랄 센터를 보유하고 있다. 이에, 모든 화합물의 R 및 S 이성질체를 제조하고 모든 이성질체에 대해 분자 도킹 시험을 수행하였다.

[272] 그 결과, 화합물 5d의 두 입체이성질체는 동일한 결합 부위에 결합하기 위해 플립(flip)되었다. 화합물 5d는 공간-채움 모드(space-filled mode)로 그려진 ATP-결합 부위에 잘 들어맞았으며(도 4a), AMP-PNP와 오버레이(overlay)되었다(도 4b). 화합물 5d는 Arg162 및 Gly164 잔기와 수소 결합을 형성하였으며, 토포이소머라제 II의 ATP-결합 포켓의 Asn91, Asn95, Asn120, Ile141, Phe142, Thr147, Ser148, Ser149, Arg162, Asn163, Gly164, Tyr165, Gly166, Ala167, Gln376 및 Lys378과 소수성 상호작용을 나타내었다(도 4c).

[273] 상기 화합물 5d를 본원 화합물의 대표적인 화합물로 선정하였으며, 이하에서는 상기 화합물 5d를 이용하여 ATP와 경쟁하는지 및 ATP 가수분해를 저해하여 토포이소머라제 II의 촉매 활성을 저해하는지에 대하여 분석하였다.

[274]

[275] 실시예 5 : ATP 경쟁 시험 및 ATPase 시험(ATP competition assay and ATPase assay)

[276] ATP 경쟁 시험은 ATP 농도가 상이한 것을 제외하고는 DNA 토포이소머라제 II 저해활성 시험과 동일하게 수행하였다. ATP 농도는 1 mM 및 2 mM이었다. 에토포시드(etoposide)를 양성 대조군으로 사용하였다. 또한, 인간 토포이소머라제 II α 의 DNA-의존적인 ATPase 활성은 말라카이트 그린 포스페이트 실험 키트(malachite green phosphate assay kit; Gentaur, Belgium)를 이용하여 공지된 방법에 따라 분석하였다. 0.1 유닛(unit)의 인간 토포이소머라제 II α 및 3.4 nM의 초나선 pUC18을 10 mM Tris-Cl(pH 7.5), 175 mM 염화칼륨, 0.1 mM EDTA, 5 mM 염화마그네슘, 2 mM DTT 및 2.5% 글리세롤이 함유된 반응 버퍼 내에서 배양하였다. 상기 배양은 400 μ M의 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 또는 노보비오신(novobiocin)을 첨가하거나 첨가하지 않은 조건에서 37°C에서 30분간 수행하였다. 반응은 400 μ M의 ATP(Sigma, USA)를 첨가하여 개시하였으며 37°C에서 30분간 배양하였다. ATP 첨가 후의 반응 용액의 부피는 80 μ L이었다. 말라카이트 그린 포스페이트 실험 키트의 시약 A 및 B의 혼합물(A:B = 100:1) 20 μ L를 상기 반응 용액에 첨가하였다. 반응 용액의 흡수는

VERSAmax microplate reader(Molecular Devices, USA)를 이용하여 620 nm에서 측정하였다. OD 값은 말라카이트 그린 및 산성 몰리브데이트와 복합체를 형성한 무기 인산염의 양으로 계산하였다. 무기 인산염은 인간 토포이소머라제 II α 에 의해 진행된 ATP 가수분해에 의해 생성된 생성물이다. 블랭크(blank)의 OD 값은 0.1 미만이었으며, 이는 무기 인산염이 ATP 가수분해 이전에 존재하지 않을 경우에 나타나는 수치이다. ATP 가수분해의 저해 정도(%)는 화합물을 첨가하지 않은 대조군을 0% 저해로 설정하여 계산하였다.

[277]

[278]

[279] *261ATPase 시험 결과, 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 5d는 경쟁적 토포이소머라제 II 촉매 저해제로 알려진 노보비오신(novobiocin)과 유사한 범위에서 농도의존적으로 토포이소머라제 II의 ATP 가수분해를 저해하였다(도 5a).

[280] 한편, ATP 경쟁 시험 결과, 화합물 5d는 ATP 농도-의존적인 형태로 토포이소머라제 II의 활성을 저해한 반면(도 5b 및 5c), 에토포시드는 ATP 농도 증가에 따라 활성이 변화하지 않았다(도 5c의 막대그래프). 상기 결과는 화합물 5d가 ATP-경쟁적인 저해제로서 작용하나, 에토포시드는 작용하지 않음을 나타낸다.

[281]

[282] 실시예 6 : DNA-토포이소머라제 절개가능 복합체 시험(DNA-topo IIa cleavable complex assay)

[283] 절개가능 복합체 시험은 기존의 보고된 방법에 따라 수행하였다. 간략하게, 125 ng의 초나선 DNA pBR322(Fermentas, USA)를 기질로 사용하여 3 유닛(unit)의 인간 DNA 토포이소머라제 II α (USB, USA)와 함께 10분간 전배양한 후, 상기 실시예 1에서 제조한 화합물을 첨가하여 총 부피 10 μ L의 반응 용액을 추가로 20분간 37°C에서 배양하였다. 1 μ L의 10% SDS를 첨가하여 반응을 종료하고, 단백질을 분해효소 K로 절단한 후 45°C에서 30분간 배양하였다. 로딩 버퍼를 첨가한 후, 70°C에서 2분간 가열하였다. 전기영동은 에티듐 브로마이드 수용액(0.5 μ g/mL)을 포함하는 0.8% 아가로스 겔을 이용하여 TAE 버퍼에서 수행하였으며, 겔은 증류수로 20분간 탈색하였다. DNA 밴드는 UV 광선을 투과시켜 가시화하였으며, AlphaImager™(Alpha Innotech Corporation)를 이용하여 정량화하였다.

[284]

[285] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 5d가 일시적으로 형성되는 DNA-토포이소머라제 II α 절개 가능 복합체를 안정화시켜 일시적으로 절개된 DNA가 재연결(relegation)되는 것을 억제하여 선상의 DNA가 축적되도록 하는 토포이소머라제 II α 독으로서의 기능을 수행하는지를 평가하였다. 상기 절개가능 복합체 시험에서는, 먼저 토포이소머라제 II α 의 첨가에 의해 pBR322

플라스미드의 완화가 일어난 후에 화합물 5d를 처리하였다.

- [286] 그 결과, 기존에 알려진 토포이소머라제 II α 저해제인 에토포시드와 달리, 화합물 5d를 300 μ M 농도까지 처리한 경우, 전상의 DNA는 형성되지 않았으며, 이는 효소-DNA 절개가능 복합체가 안정화되지 않았음을 나타낸다(도 5d). 상기 결과로부터, 화합물 5d는 ATP-경쟁적인 촉매 저해제로서 작용함을 재확인하였다.

[287]

- [288] 실시예 7 : 내생 토포이소머라제 저해 시험(Endogenous topo inhibition assay)

- [289] 세포내 토포이소머라제 기능을 저해하는데 있어서의 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 5d의 활성을 평가하기 위해, HCT 세포에 50 및 100 μ M의 화합물 5d를 24시간 동안 처리한 후 수확하였다. 각 세포주의 핵 용해물(nuclear lysate)은 핵/시토졸 분리 키트(nuclear/cytosol fraction kit; BioVision, USA)를 이용하여 상기 키트의 제조사에서 제공한 프로토콜에 따라 제조하였다. 각 핵 추출물에서의 단백질 농도는 Bradford 시험으로 측정하였다. 토포이소머라제 반응은 100 μ g의 핵 용해물의 단백질, 100 ng의 기질로서의 pBR322 플라스미드 및 1x반응 버퍼(200 mM Tris-Cl, pH 7.5, 100 mM 염화마그네슘, 10 mM ATP, 10 mM EDTA, 10 mM 디티오프레이톨(dithiothreitol), 1.5 mM 염화칼륨 및 300 g/mL 소혈청알부민)를 이용하여 수행하였다. 각 튜브의 최종 반응 부피를 동일하게 하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 용해물을 포함하지 않는 pBR322 플라스미드를 대조군으로 이용하여 상기와 유사한 반응을 수행하여 반응 버퍼의 효과를 분석하였다. 배양 후, 정해진 양의 모든 시료를 에티뉼 브로마이드를 포함하는 0.9% 수평식 아가로스 겔 전기영동 장치에 로딩하고 15-20 V로 4-5시간 동안 전기영동을 수행하였다. 전기영동 후, 가시화하고 AlphaImager™(Alpha Innotech Corporation)를 이용하여 정량화하였다.

[290]

- [291] 세포 내생의 토포이소머라제-기반의 DNA 완화에 있어서의 화합물 5d의 효능을 확인하였으며, 화합물을 처리하지 않은 핵 추출물을 네거티브 대조군으로 사용하여 내생의 토포이소머라제가 초나선 pBR322 플라스미드를 완화시키는지 확인하였다(도 6의 2nd 라인). 그 결과, 화합물 5d는 세포 내생의 토포이소머라제-기반의 pBR322 플라스미드 완화작용을 저해하였으며, 에토포시드보다 높은 활성을 나타내었다. 구체적으로, 화합물 5d의 DNA 완화 저해율은 50 μ M의 농도에서 $78.0 \pm 4.7\%$ 이었으며, 같은 농도의 에토포시드의 저해율은 $36.0 \pm 1.7\%$ 로 나타났다(도 6).

[292]

- [293] 실시예 8 : 리포터 유전자 시험(Reporter gene assay)

- [294] *Cancer Lett.*에 공지된 방법에 따라 분비성 알칼라인 포스파타아제(Secreted alkaline phosphatase; SEAP) 시험을 수행하였다(Kim HL et al., *Cancer Lett.* 2012, 325, 72-79). SEAP는 GAL4-ESX 융합 단백질 및 내인성 Sur2 사이의 상호작용을

통한 생리학적 HER2 발현을 모방한다. HEK293T 인간 신장 세포를 96-웰 마이크로플레이트(SPL, Korea)에 웰당 5×10^3 의 세포 밀도로 접종하고 밤새도록 배양하였다. 배양 후, 100 ng의 각 플라스미드 및 트랜스펙션(transfection) 최적화 배지(TOM, Welgene, Korea)를 이용하여 일시적으로 동시에 트랜스펙션(co-transfection)하였다. 동시에 트랜스펙션된 플라스미드는 SEAP 리포터 유전자(pG5IL2SX) 및 GAL4-ESX 발현벡터(pBJ GAL4-ESX)이었다. 세포는 WelFectQ (Welgene, Korea)로 3시간 동안 배양하여 트랜스펙션하였으며, 배양 후 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 또는 절단된(truncated) Sur2 단백질 컨스트럭트(pcDNA_Sur2₃₅₂₋₆₂₅)를 처리하고 12시간 동안 배양하였다. 상기 화합물을 37°C의 5% CO₂ 인큐베이터에서 처리한 후, 플레이트를 밀봉 필름(Simport, Canada)으로 밀봉하고 65°C에서 3시간 동안 배양하여 SEAP 이외의 효소들은 불활성화하였다. 25 µL의 불활성화된 배지 및 75 µL의 이중 증류수 혼합물을 100 µL의 기질 용액에 첨가하였다. 기질 용액은 1.19 µL의 0.1 M 4-methylumbelliferyl phosphate (4-MUP, Sigma, USA) 및 98.81 µL의 2 M 디에탄올아민(DEA, pH 10), Sigma, USA)으로 제조하였다. 상기 혼합 용액을 37°C에서 밤새도록 배양한 후, 형광계(SPECTRAMax GEMINIEM, Molecular Devices, USA)를 이용하여 여기 360 nm 및 방출 440 nm의 파장에서 형광 강도를 측정하였다. 시그널 감소가 세포 사멸에 의한 것이 아닌 ESX-Sur2 상호작용에 대한 화합물의 저해 활성에 의한 것인지를 확인하기 위해, 10 µL의 EZ-CYTOX(DaeilLabService, Korea)를 SEAP 시험에 사용된 분액(aliquot)을 제거한 후의 세포 배양액이 남아있는 각 웰에 첨가하였다. 상기 용액은 최소한 2시간 동안 37°C에서 배양하였다. 배양 후, 각 웰의 흡광도는 Automatic Elisa Reader System(Bio-Rad 3550, USA)을 이용하여 450 nm의 파장에서 측정하였다.

[295]

[296] 토포이소머라제 II α 를 선택적으로 저해하는 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 5a-i의 ESX-Sur2 상호작용의 저해활성을 분석한 결과, 상기 화합물은 ESX-Sur2 상호작용에 대해 강력한 저해활성을 나타내었다(도 7A).

[297] 상기 결과로부터, 본 발명의 화합물은 토포이소머라제 II α 뿐만 아니라 ESX-Sur2 상호작용에 대해 저해활성을 나타냄을 확인하였다. 상기 화합물 중에서 화합물 5d(BTCP)를 토포이소머라제 II α 및 ESX-Sur2 상호작용에 대해 저해활성을 나타내는 이중저해제(dual inhibitor)로 선정하여 별도의 시험에 이용하였다.

[298]

[299] 또한, 면역침강 시험(immunoprecipitation analysis)을 통해 HCT15 세포에 있어서의 내생 ESX 및 Sur2의 상호작용에 대한 화합물 5d(BTCP)의 저해활성을 분석한 결과, 화합물 5d(BTCP)는 내생 ESX-Sur2 상호작용을 강하게 저해하였으며, 이는 상기 SEAP 시험 결과와 일치하였다(도 7B).

[300]

- [301] 실시예 9 : HER2 양성 세포 및 HER2 음성 세포에서의 세포생존을 시험(Cell viability assay of compounds with diverse HER2 positive- and negative-cells)
- [302] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물의 다양한 HER2 양성 또는 음성 세포주에서의 항증식 활성(anti-proliferative activity)을 측정하기 위해 EZ-CYTOX를 이용하였다. 세포는 웰당 1.0×10^4 의 밀도로 96-웰 플레이트에 접종하였다. 접종 1일 후, 무-FBS 배지(FBS free medium)에서 4시간 동안 배양한 다음, 각 웰의 배양 배지는 등급별 농도의 화합물을 함유한 배지로 교체하고 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μ L의 EZ-CYTOX를 각 웰에 첨가하였다. 37°C에서 2시간 동안 추가로 배양한 후, 각 웰의 흡광도는 ELISA Microplate Reader(VersaMax, Molecular Devices, USA)를 이용하여 450 nm의 파장에서 측정하였다. IC₅₀ 값을 분석하기 위해, Table Curve 2D program(SPSS Inc, USA)을 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 4-변수 로지스틱 방정식(four-parameter logistic equation)에 적용하였다.
- [303]
- [304] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 5d(BTCP)의 ESX-Sur2상호작용에 대한 저해활성이 HER2-과발현 세포에서의 세포 성장 저해를 유도하는지에 대하여 분석하였다. 그 결과, 화합물 5d(BTCP)는 HER2-양성 HCT15 세포의 세포성장($10.9 \pm 0.32 \mu\text{M}$)을 HER2-음성 HCT16 세포($22.5 \pm 0.89 \mu\text{M}$)에 비해 2배 정도 강하게 저해하였다(표 3).
- [305] [표3]

화합물 5d(BTCP)의 IC ₅₀ (μM)					
HCT15	HCT16	BT474	T47D	NCI-N87	SNU638
10.9 ± 0.32	22.5 ± 0.89	13.9 ± 0.03	10.7 ± 0.02	11.6 ± 0.34	10.6 ± 0.02

- [306]
- [307] 실시예 10 : RNA 추출 및 RT-PCR 분석(RNA extraction and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis)
- [308] 세포는 각 접시당 5×10^5 세포 밀도로 60 mm 접시에 접종하고 80%의 세포포화상태(confluence)가 될 때까지 배양하였다. 세포는 무-FBS 배지로 세척한 후, 도면 레전드에 나타난 농도로 각각의 화합물을 16시간 동안 처리하고 PBS로 두번 세척하였다. 세척 후, 세포는 4°C에서 3분간 3200 rpm으로 원심분리하여 수확하였다. 총 RNA는 RNeasy Kit(Fuji Photo Film Co., LTD., Japan)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 세포로부터 추출하였다. cDNA는 추출한 RNA를 이용하여 다음의 방법으로 합성하였다: 4 μ L의 5X RT buffer, 2 μ L의 2.5 mM dNTP, 2 μ L의 랜덤 프라이머($0.1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$), 0.5 μ L의 RNase 저해제(Promega Corp., USA), 0.25 μ L의 M-MLV 역전사효소(Promega Corp., USA) 및 2.0 μg 의 추출한 RNA를 첨가한 후, 25°C에서 5분간 합성한 후, 42°C에서

1시간 동안 합성하고 70°C에서 15분간 추가로 합성하였다. 상기와 같이 합성된 cDNA는 사용시까지 -70°C에 보관하였다.

[309] 각각의 합성된 DNA는 PCR을 이용하여 증폭하였으며, 다음의 PCR cocktail을 이용하였다: 38.5 μ L의 증류수, 5 μ L의 10X 반응버퍼, 3 μ L의 10 mM dNTP, 0.5 μ L의 Taq DNA polymerase, 2 μ L의 cDNA 및 0.5 μ L의 각 정방향/역방향 프라이머를 첨가하여 최종 반응 용액의 부피를 50 μ L로 제조하였다. PCR은 94°C에서 1분간 초기 변성을 수행하고 94°C, 1분간의 변성 사이클을 28 사이클 수행한 후 55°C에서 30초간 annealing하고 70°C에서 90초간 신장반응을 수행한 다음 70°C에서 10분간 최종 신장반응을 수행하여 종료하였다. PCR 산물은 1.2% 아가로스 겔 상에서 전기영동을 수행하여 각 유전자의 발현 레벨을 분석하였다.

[310] HER2 프라이머 : 정방향 5'-GAGCACCCAAGTGTGCAC(서열목록 1), 역방향 5'-TTGGTTGTGAGCGATGAG(서열목록 2)

[311] GAPDH 프라이머 : 정방향 5'-GAGCCAAACGGGTCATCA(서열목록 3), 역방향 5'-CATATTTCTCGTGGTTCACACC(서열목록 4)

[312]

[313] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 5d(BTCP)의 ESX-Sur2상호작용에 대한 저해활성이 HER2 유전자 증폭에 영향을 주는지 분석한 결과, 화합물 5d(BTCP)는 농도의존적으로 HCT15 세포에서의 HER2 mRNA 레벨을 상당히 감소시켰다(도 8a). 또한, 화합물 5d(BTCP)(0.5, 2, 10 및 25 μ M, 16시간)를 처리한 HCT15 세포의 면역블롯팅 시험(Immunoblotting analysis) 결과, HER2 단백질 레벨이 농도의존적으로 감소하였다(도 8b). 상기 결과는, 화합물 5d(BTCP)에 의한 HER2 유전자 전사 속도의 감소가 HER2 리포터 단백질 발현의 하향 조절(down-regulation)을 유도하였음을 시사한다.

[314]

[315] 실시예 11 : 웨스턴 블롯(Western blot) 및 면역침강반응(Immunoprecipitation)

[316] HCT15 세포는 각 접시당 5×10^5 세포 밀도로 60 mm 접시에 접종하고 80%의 세포포화상태(confluence)가 될 때까지 배양하였다. 무-FBS 배지내의 세포에 도면 레전드에 나타낸 농도로 상기 실시예 1에서 제조한 화합물을 처리하였다. 상기 화합물을 처리한 후, 세포는 냉각된 PBS(pH 7.4)로 세척하고, 2000 rpm으로 5분간 원심분리하여 수확하였다. 세포 펠렛을 세포용해 버퍼(lysis buffer)에 현탁시켰으며, 이때 사용된 세포용해 버퍼는 다음과 같다:

[317] i) HER2: 50 mM Tris-Cl(pH 7.4), 상기 버퍼는 150 mM 염화나트륨, 1 mM EDTA, 1% Triton-X, 2 mM 소듐 오르소바나(sodium orthovanate), 1 mM NaF, 0.25% 데옥시콜레이트(deoxycholate), 100 μ g/mL 페닐메탄설폰닐 플루오라이드(PMSF) 및 1% 단백질 분해효소 저해제 각테일을 포함한다.

[318] ii) PARP, caspase-3, p27, cyclin D1: 50 mM Tris-HCl 용액(pH 8.0), 상기 버퍼 용액은 150 mM 염화나트륨, 0.1% SDS, 0.5% 소듐 데옥시콜레이트(sodium deoxycholate), 1% NP-40, 100 μ g/mL 페닐메탄설폰닐 플루오라이드(PMSF) 및 1%

단백질 분해효소 저해제 콕테일을 포함한다.

- [319] 세포 용해물(cell lysate)은 4°C에서 20분간 14,000 rpm으로 원심분리하였다. 총 단백질량은 BCA™ Protein Assay Kit(Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하여, 화합물을 처리하지 않은 세포 용해물(대조군) 및 화합물을 처리한 세포 용해물을 모두 표준화(normalization)하였다. *Eur J Pharm Sci.*에 공지된 방법에 따라, 세포 용해물 시료를 12% SDS-PAGE 겔에 적용시킨 후에 임모빌론 멤브레인(Immobilon membrane; Millipore, USA)으로 이동시켰다(Nam JM et al., *Eur J Pharm Sci.*, 50, 181-190). 단백질을 이동시킨 후에 0.05% Tween 20이 포함된 PBS 용액(TBST)에 희석시킨 5% 스킴밀크(skim milk)를 이용하여 1시간 동안 블락킹(blocking)한 후, TBST로 세척하였다. 세척 후, 1:1000의 비율로 1차 항체(primary antibody)를 첨가하고 5% 소혈청알부민이 포함된 TBST에서 4°C로 밤새도록 배양한 후 TBST로 세척하였다. 블롯(blots)은 1:2000 비율의 anti-rabbit IgG horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체를 실온에서 2시간 동안 반응시키고 향상된 화학발광계(enhanced chemiluminescence; PowerOpti-ECL, Animal Genetics Inc., Korea)를 이용하여 가시화하였다. 단백질 함량은 LAS-3000 film(Fuji photo film Co., Ltd., Japan)을 이용하여 측정하였으며 Multi-Gauge 소프트웨어(Fuji Photo Film Co. Ltd., Japan)로 분석하였다. 면역침강반응(immunoprecipitation)을 위해, 세포 용해물은 pre-clearing을 제외하고는 웨스턴 블롯과 동일한 과정으로 준비하였다. 500 µg의 세포 용해물은 RIPA 버퍼로 준비하였으며, 50 µL의 normal IgG 및 20 µL의 단백질 A-아가로스 비드(protein A-agarose beads; Santa Cruz, CA)을 첨가하여 4°C에서 15분간 서서히 교반하면서 배양한 후 4°C에서 10분간 12000 rpm으로 원심분리하였다. 상층액만을 모아서 4°C의 회전기(rotator) 상에서 밤새도록 배양하면서 anti-Sur2와 혼합하였다. 단백질 A-아가로스 비드를 첨가하고 1시간 동안 회전시킨 후 4°C에서 10분간 12000 rpm으로 원심분리하였다. 원심분리하여 생성된 세포 펠렛(cell pellet)을 수거하고 RIPA 버퍼로 두차례 세척하였다. 면역 복합체(immune complexes)는 30 µL의 2 x SDS 로딩 버퍼에 재현탁하고 93°C에서 5분간 가열한 후 SDS-PAGE 전기영동으로 분리하였다.

[320]

- [321] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 5d(BTCP)에 의한 ESX-Sur2 상호작용의 저해가 HER2-기반의 하류 시그널 전달에 영향을 주는지 확인하기 위해 화합물 5d(BTCP) 및 선택적 HER1 (EGFR) 저해제로 알려진 제피티닙을 HCT15 세포에 처리하였다.

- [322] 그 결과, 25 µM의 화합물 5d(BTCP)는 HER2 Y1248 및 HER2 Y877에서의 인산화를 강력하게 억제하였다(도 9). HER2 Y1248는 Ras-MAP 키나아제 시그널 전달 경로 중의 HER2에서의 주요 자동인산화 부위이며, HER2 Y877은 Ras-MAP 키나아제 및 PI3k/Akt 시그널 전달 경로에 포함된다. 세포 증식 및 세포 사멸의 조절에 있어서 중요한 역할을 수행하는 MAPK 시그널 전달 경로는

미토겐(mitogen), 성장 인자 및 사이토카인(cytokine)을 포함한 다양한 세포외 자극제를 통한 T202/T204 잔기의 인산화에 의해 활성화된다. Akt 시그널 전달 경로는 세포 생존 및 세포 사멸(apoptosis)과 같은 세포 과정에 포함되며 S473의 인산화를 통해 활성화된다. phospho-MAPK 및 phospho-Akt와 같은 HER2 하류 시그널 단백질의 레벨도 25 μ M의 화합물 5d(BTCP) 및 10 μ M의 제피티닙의 처리에 의해 상당히 감소하였다. 또한, HER1 Y1068 및 HER4 Y1284에서의 인산화는 화합물 5d(BTCP) 및 제피티닙의 처리에 의해 감소한 반면, HER1 및 HER4 발현은 영향을 받지 않았다(도 9). HER1 Y1068는 인산화 부위 중의 하나로 보고되었으며 성장인자 수용체-결합 단백질 2의 SH2 도메인의 결합을 유도하여 Ras-시그널 경로를 통해 MAPK를 활성화시킨다. HER4는 리간드뉴레굴린 결합(ligand neuregulin binding,)으로 HER2와 호모다имер 또는 헤테로다имер를 형성하여, 자동인산화반응 및 활성화를 유도한다. HER4 Y1284는 HER4의 자동인산화반응 부위이다.

[323]

[324] 실시예 12 : 키나아제 저해활성 시험(Kinase inhibition assay)

[325] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물의 키나아제 저해 활성은 HER1, HER4, ICF1R, MAPK1 및 MAPK2 키나아제에 대한 밀리포어 키나아제 프로파일링 서비스를 이용하여 평가하였다. 상기 활성 평가는 키나아제 프로파일러 서비스 시험 프로토콜에 따라 최종 농도 10 μ M 및 25 μ M로 수행하였다. 각 반복시험으로부터의 값(scintillation value)은 대조군에 대한 키나아제 활성의 저해(%)로 계산하였다.

[326]

[327] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 5d(BTCP)에 의한 HER1, HER2, HER4, MAPK 및 Akt 의 인산화 감소가 HER2 발현 감소의 결과로 유도되었는지, 또는 HER 패밀리 멤버의 키나아제 활성을 블록킹하여 촉진된 것인지 검증하기 위해 키나아제 저해활성을 분석한 결과, 화합물 5d(BTCP)는 IGF1R, MAPK1 및 MAPK2 키나아제를 저해하지 않았으나, 25 μ M의 농도에서 HER1 및 HER4를 상당히 저해하였다(표 4). 상기 결과는, 화합물 5d(BTCP)의 활성이 HER1 및 HER4 키나아제를 저해할 뿐만 아니라 ESX-Sur2 상호작용을 저해하여 HER2 하류시그널을 조절하고 있음을 나타낸다. HER2 자체 또는 다른 HER 패밀리 멤버와의 이량체 형성에 영향을 주어 결과적으로 HER2 시그널 캐스케이드(HER2 signal cascade)을 감소시킴을 시사한다.

[328] [표4]

키나아제	저해 %	
	10 μ M	25 μ M
HER1	58	98
HER4	18	33
IGF1R	0	0
MAPK1	0	21
MAPK2	0	0

[329]

[330] 실시예 13 : 세포 주기 분석(Cell cycle analysis)

[331] HCT15 세포는 각 접시당 5×10^5 세포 밀도로 60 mm 접시에 접종하고 배양하였다. 세포가 80%의 세포포화상태(confluence)에 도달하였을 때, 세포에 도면 레전드에 나타난 화합물을 처리한 후, 냉각된 PBS(pH 7.4)로 세척하고, 2000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 세포 펠렛(cell pellet)은 70% 에탄올로 고정하고 4°C에서 1일 동안 보관하였다. 3200 rpm으로 2분간 원심분리하여 에탄올을 제거하고 최종 세포 펠렛을 1 mL의 PBS에 재현탁하였다. 이때 상기 PBS는 10 μ L의 propidium iodide solution(5 mg/mL, Sigma, USA) 및 10 μ L의 RNase(10 mg/mL, Sigma, USA)를 함유한다. 상기 재현탁한 세포 펠렛은 37°C에서 30분간 배양한 후 형광활성 세포 분리 분석(Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS; BD Biosciences, USA)을 이용하여 분석하였다. 각 시료 당 최소 5000개의 세포가 측정되었다.

[332]

[333] 토포이소머라제는 세포주기와 밀접하게 관련되어 있으며, HER2 과발현은 세포주기의 G1-기(G1-phase) 및 초기 S-기(S-phase)의 감소를 유도하여 세포 증식 및 세포 성장의 메커니즘을 부적절하게 조절한다. 이에, HCT15 세포에서의 세포 주기 조절에 있어서의 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 5d(BTCP)의 영향을 조사하였다.

[334] 그 결과, 세포주기의 G1-기 부분은 화합물 5d(BTCP)의 농도의존적으로 증가하였다(도 10a). 화합물 5d(BTCP)에 의한 G1-기 정지(G1 arrest)는, 화합물 5d(BTCP)가 MAPK (T201/T204) 및 Akt (S473)의 인산화를 저해하는 결과(도 9)와 유사한 결과로 여겨진다.

[335]

[336] 세포 주기에서 G1-기로부터 S-기로의 전환은 CDKs(사이클린(Cyclin)-의존적인 키나아제), 특히 사이클린 D1 및 E의 상향조절(up-regulation) 및 CDK 저해제 중의 하나인 p27^{kip1}의

하향조절(down-regulation)에 의해 조절된다. 또한, Akt의 활성화는 사이클린 D1의 상향조절 및 p27^{kip1}의 하향조절을 통해 세포 주기를 조절한다. 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 5d(BTCP)는 phospho-MAPK 및 phospho-Akt를 감소시켰으며 사이클린 D1의 하향조절 및 p27^{kip1}의 상향조절을 유도하였다(도 10b).

[337] 한편, 세포사멸 단백질에서의 화합물 5d(BTCP)의 영향을 분석한 결과, 세포사멸 단백질의 cleaved PARP 및 cleaved caspase-3 발현량은 화합물 5d(BTCP)의 처리에 의해 증가하였다(도 10c). 상기 결과는 화합물 5d(BTCP)가 HCT15 세포에 있어서 G1-기 정지(G1 arrest) 및 세포 사멸을 유도함을 나타낸다.

[338]

[339] 실시예 14 : 누드 마우스의 종양 이종이식 시험(Tumor Xenografts in Nude Mice) 및 적출한 종양의 웨스턴 블롯(Western blot) 시험

[340] 95% 이상의 생존율을 나타내는 HCT15의 단일-세포 현탁액(5×10^6 세포)을 5주령 BALB/c-nu/nu 누드 마우스(SLC Inc., Hamamatsu, Japan)의 좌측에 피하 주사하였다. 각 마우스에 100 μ L를 주사하여 누출(leakage) 현상을 피하고 주사시마다 상이한 부분에 주사하였다. 종양의 부피가 500 mm³가 되었을 때, 마우스를 랜덤으로 그룹화하여 각 그룹당 3마리로 그룹화하였다.

[341] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물을 염류 용액(saline solution)에 희석된 20% DMSO에 용해시키고, 상기 용해된 화합물을 15일 동안 3일 간격으로 종양내 주입(intratumoral injection)을 수행하였다(최종 주입량 25 mg/kg). 염류 용액(saline solution)에 희석된 20% DMSO를 주입한 마우스 그룹을 대조군으로 이용하였다. 종양 이종이식 시험에 포함된 모든 프로토콜은 국립암센터 연구소의 동물실험윤리위원회의 승인을 받았다. 화합물을 처리한 후, 종양 부피는 화학식 $(L \times l^2) / 2$ 에 따라 계산하였으며, 종양 길이(L) 및 넓이(l)는 캘리퍼(caliper)로 측정하였다. 측정 후 마우스는 치사시키고 종양의 무게를 측정하였으며, 종양의 절반은 추후 사용을 위하여 -80 °C로 냉동시키고 나머지 절반은 10% NBF로 고정하여 면역조직화학(immunohistochemistry) 시험을 위한 파라핀 블록 부분(paraffin block section)을 제조하였다. Ki67, caspase-3, CD31, HER2, p-HER2, HER1, 및 p-HER1의 항체(Abcam, Cambridge, UK)는 자동화 면역조직화학 염색 기기(Ventana, Tucson, AZ)와 배양하였다. IHC는 0 (0% 양성), 1(1~25% 양성), 2(25 ~ 50% 양성), 3(51 ~ 75% 양성), 또는 4(76 ~ 100 % 양성)로 매겼으며, 모든 면역화학적 분석은 Axiophot 2 apparatus (Carl Zeiss MicroImaging Inc., Thornwood, NY)을 사용하여 수행하였다. 종양 조직의 면역블롯 분석을 위하여, 나머지 절반의 냉동 종양은 얼음처럼 차가운 용해 버퍼에서 균질화하고, 얼음에서 배양하고, 2시간 동안 4°C를 유지하며 저온 후, 원심분리(4°C, 12,000 rpm, 20 분)하였다. 단백질 농도를 결정하기 위하여 Bradford 단백질 분석법을 수행하였다. 다음으로, 20- μ g의 표본 단백질을 SDS-PAGE 전기영동 겔에 적용시킨 후 웨스턴 블롯 분석을 표준 방법으로

하였다.

[342]

[343] 상기 실시예를 통해 분석한 ESX-Sur2, HER1, HER2 및 토포이소머라제 II에 대한 화합물 5d(BTCP)의 저해작용이 *in vivo* 시스템에서 항암활성과 일치하는지 조사하였다.

[344]

그 결과, 화합물 5d(BTCP)를 처리한 종양의 부피 및 중량은 대조군에 비해 상당히 감소하였다(도 11A 및 도 11B). 화합물 5d(BTCP)가 처리된 종양 및 대조군의 종양을 세포 증식 마커(cell proliferative marker)인 Ki-67, 괴사의 마커(apoptosis marker)인 cleaved caspase-3, 종양혈관형성 마커(tumor angiogenesis marker)인 CD31, 그리고 HER2 신호 관련 마커인 HER1, p-HER1, HER2, 및 p-HER2로 염색하였다. 화합물 5d(BTCP) 처리 그룹에서의 Ki-67 및 CD31의 발현 레벨은 대조군에 비해 상당히 낮게 나타났으며, cleaved caspase-3의 발현은 대조군에 비해 증가하였다(도 11c). 게다가, 화합물 5d(BTCP)의 처리는 통계적으로 유의한 HER2의 하향조절을 보여주었다. 우리는 또한 HER2 인산화, HER1 발현, 및 HER1 인산화가 감소된 경향을 관측하였다(도 11d). 상기 결과는 화합물 5d(BTCP)의 암세포에서 나타난 항증식 활성과 일치하며, *in vivo* 시스템에서 항암활성을 나타낼 것이라는 추측을 입증한다.

[345]

상기 내용을 보다 구체적으로 확인하기 위하여 전술한 방법의 면역블롯을 수행하였다. HCT15 암세포에서와 동일한 경향이 잘라낸 종양 샘플에서도 관찰되었다: 첫째로, 화합물 5d(BTCP)가 명료하게 HER2 발현의 수준을 감소하지는 않았으나, HER1 및 HER2 인산화의 뚜렷한 감소가 관측되어, 결과적으로 MAKPK, ERK, PI3K, Akt, 및 GSK-3 β 와 같은, HER1 및 HER2의 시그널 캐스케이드 분자 하류의 하향 조절이 있었다(도 9 및 11e). 둘째로, 화합물 5d(BTCP)를 처리한 군에서 cyclin D1 및 CDK4의 하향조절과 p21(CDK의 억제제)의 상향조절 즉, G1 세포 주기 정지를 위해 요구되는 변화가 꾸준히 관찰되었다(도 10b 및 11f). Cyclin D1 및 CDK4는 중요한 역할을 하고, p21의 불활성화와 협력하여 증식하는 암세포에서 가장 먼저 활성화된다. 화합물 5d(BTCP)의 처리후에 HCT15 세포에서 보이듯 Cleaved caspase-3 및 cleaved PARP의 증가외에도, 괴사 단백질(예를들어 Bax 및 p53)의 도입이, 안티-괴사 마커 Bcl-2, XIAP(X-linked inhibitor of apoptosis protein), 및 survivin의 감소와 함께 관찰되었다. 증식의 마커인 PNCA, Ki-67, 및 COX-2는 화합물 5d(BTCP)를 처리한 종양 샘플에서 더욱 확실히 감소되었다(도 11f 및 11g). 화합물 5d의 항암제 활성은 명백히 G1 정지의 도입 및 HER2 과발현된 CRC 세포의 이중 이식 마우스 모델의 괴사에 의해 확인되었다. 화합물 5d(BTCP)에 의해 유도된 ERK 및 GSK-3 β 인산화의 억제는 c-Jun 전사의 감소를 야기하였고 결과적으로 c-Jun 및 c-Jun의 하류 타겟인 cyclin D의 불활성화를 야기하였다. 세포 주기에서 G1 단계의 진행은 p53 및 p21의 증가된 발현을 야기시키는 약화인 c-Jun에 의하여 영향을 받는다. c-FOS의 활성화는 c-Jun 및 c-Fos 간에 헤테로다имер 형성하여,

cyclin D1 프로모터에 직접적으로 결합하고 cyclin D1 단백질 수준을 완화하는 AP-1 콤플렉스의 생성을 통해, cyclin D1의 과발현을 유도한다. MAPK 신호는 AP-1의 활성화 또한 높인다. 그러므로 본 발명의 실험 결과를 통해 본 발명의 화합물 5d(BTCP)가 MAPK/ERK/GSK-3 β 패스웨이를 포함하는 HER1/HER2의 신호 캐스케이드를 억제하고, 결과적으로 전신적인 cyclin D1, CDK4, c-Jun, c-Fos, PCNA, Ki-67, COX-2, Bcl-2, XIAP, 및 survivin의 억제를 통하여 종양의 성장을 감소시킴을 확인하였다.

[346]

[347] 또한, 화합물 5d(BTCP)는 HCT15의 이종이식 마우스 모델에서 종양 혈관형성 마커를 감소시켰다. 종양 성장 및 전이는 혈관형성에 의존하고, 직장암은 특히 혈관형성 의존적인 악성종양이다. 혈관내피성장인자(Vascular endothelial growth factor) 및 대장암에서 종양 내 미세혈관 밀도에 대한 문헌의 메타 분석은 CD31(PECAM-1라고도 불림), 저산소증 유도 성장인자(HIF), COX-2, VEGF, 및 VEGFR2는 CRC에서 가장 중요한 혈관형성 조절인자임을 확인하여 주었다. 화합물 5d(BTCP)가 처리된 종양 부위의 면역화학적 염색 분석에서 CD31 발현의 감소가 나타났다(도 11c). 또한, 웨스턴 블롯 분석으로 혈관형성의 마커의 변화를 분석한 결과 VEGF, HIF-1, COX-2, 및 VEGFR2 Tyr1175의 인산화에서 뚜렷한 감소를 보임을 확인하였다.

[348]

[349] HER3은 직장암 진행에 상당히 관련되어 있는 것으로 알려져 있으며, HER3 단백질 과발현 및 HER3 인산화 증가가 직장암 세포에서 관찰되었다. HER3의 하향조절은 heregulin- β 1-기반의 이동(migration) 및 침윤(invasion)을 감소시켰으며, 또한 직장암 세포에서 세포사멸을 유도하였다. 테스트를 실시한 16명의 직장암 환자 중의 56%에서 HER3 과발현이 나타난 것으로 보고되었다(Beji A et al., *Clin Cancer Res.*, 2012, 18, 956-968). HER3는 호모이합체(homodimer) 또는 HER2와의 헤테로이합체(heterodimer)를 형성하기 위해 리간드 결합이 필요하다. HER3의 호모이합체화(homo-dimerization)는 키나아제 도메인의 결합으로 인해 하류 시그널 캐스케이드(cascade)를 불활성화한다. 반면, HER3 및 HER2의 헤테로이합체화는 티로신 인산화를 통해 MAPK 및 Akt의 시그널 캐스케이드를 모두 활성화하며, HER2-HER3 이합체화는 발암성 유닛으로 여겨진다.

[350]

상기 실시예 8 및 실시예 11의 결과에서, 화합물 5d(BTCP)에 의해 유도된 MAPK 및 Akt 시그널 저해는 ESX-Sur2 상호작용의 교란(perturbation)을 일으키고 HER1, HER2 및 HER4 키나아제 활성을 저해하였다(도 7D, 도 9 및 표 5). 이에 본 발명자들은 뉴레굴린 1(NRG1)-기반의 HER3 활성화에 있어서의 화합물 5d(BTCP)의 영향을 조사하였다.

[351]

그 결과, HER2-HER3 이합체 형성을 유도하는 HER3 결합 리간드로 알려진 NRG1의 처리는 HER3 활성을 향상시킨 반면, 화합물 5d(BTCP)를 동시에 처리한

경우에는 HER3 인산화가 감소하였다(도 12).

[352]

[353] 트라스트주맵 내성 발생(trastuzumab resistance occurrence)의 여러 가지 메커니즘 중에서, HER3가 Akt 및 MAPK 하류 시그널 경로의 주요 활성제로 작용하는 것으로 보고되었다. 또한, HER3가 HER2 저발현 및 과발현 암세포 모두에서 다른 HER 패밀리의 멤버와의 이합체화를 통해 트라스트주맵의 내성을 유도하고 HER3 c-말단 티로신 잔기의 인산화를 유도하는 것으로 보고되었다(Choi BK et al., *Cancer Med.*, 2012, 1, 28-38).

[354] NRG1-촉진 HER3 인산화의 차단(blockage)은 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 트라스트주맵보다는 25 μM 의 화합물 5d(BTCP)의 처리에 의해 더욱 강하게 나타났다(도 12). 상기 본 발명에서 사용된 트라스트주맵의 농도는 환자에게 사용하는 치료상 복용량 범위이다. 미국 종합 암네트워크(National Comprehensive Cancer Network; NCCN)의 가이드라인에 따르면, 2 내지 8 mg/kg의 트라스트주맵 투여는 파클리탁셀, 독소루비신 및/또는 5-플루오로우라실과 같은 화학치료제를 함께 사용하거나 사용하지 않는 HER2-양성 암환자에게 적합한 투약방법이다. 상기 결과는, 화합물 5d(BTCP)가 트라스트주맵에 내성을 나타내는 HER2-양성 직장암 환자 치료에 적용가능함을 시사한다.

[355]

[356] 트라스트주맵-내성 세포에서의 화합물 5d(BTCP)의 영향을 분석하기 위해, 트라스트주맵-내성 세포를 제조하였다. 트라스트주맵-내성 HCT15 세포는 IC_{50} 농도보다 낮은 0.687 μM 의 농도로 4개월 동안 트라스트주맵을 처리하여 제조하였다. HCT15 세포에 생성된 트라스트주맵 내성은 Y1248에서의 phospho-HER2의 레벨 증가로 확인하였고(도 13a), 트라스트주맵에 대한 IC_{50} 값은 HCT15 모세포에서 $1.04 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 로, 2달간 처리한 세포에서 $13.79 \pm 0.14 \mu\text{M}$ 로, 4달간 처리한 세포에서 $14.66 \pm 0.65 \mu\text{M}$ 로 나타났다. IC_{50} 값 및 증가된 인산화-HER2(Y1248)에 근거하여, HCT15 세포에서 완전한 트라스트주맵 저항성은 4개월 처리후에 얻어지는 것으로 추정되었다.

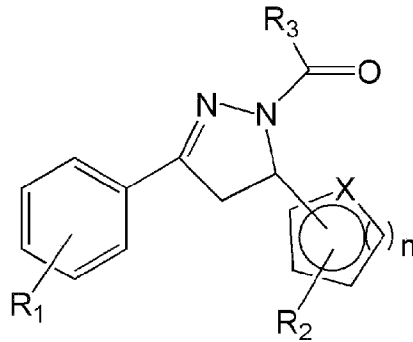
[357] 한편, 다양한 농도(0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 25 μM)의 화합물 5d(BTCP), 제피티닙 또는 트라스트주맵을 72시간 동안 처리한 트라스트주맵-내성 HCT15세포(HCT15/R)의 생존율을 조사하였다. 그 결과, 화합물 5d(BTCP)는 제피티닙과 유사한 농도에서 HER2의 Y877 및 Y1248 잔기의 인산화를 감소시켰으며, 트라스트주맵-내성 HCT15 세포에서의 p-MAPK 및 p-Akt를 하향조절하였다(도 13c). 또한, 화합물 5d(BTCP)는 내성이 없는 HCT15 모(parent)세포에서 보다는 트라스트주맵-내성 HCT15 세포에서 보다 강한 활성을 나타내었다(도 13b).

[358]

청구범위

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

[화학식 1]



상기 식에서,

n 은 1 또는 2이고;

X 는 탄소, 산소, 질소 및 황으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R_1 및 R_2 는 동일하거나 상이하며, 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_1 - C_6 알킬, C_3 - C_8 사이클로알킬, C_1 - C_6 할로알킬, C_1 - C_6 알콕시, 아미노, 시아노 및 니트로로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R_3 은 C_3 - C_{12} 헤테로아릴이고, 상기 R_3 은 니트로로 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 R_1 및 R_2 는 동일하거나 상이하며, 각각 독립적으로 수소, 할로젠, C_1 - C_6 알콕시 및 니트로로 이루어진 군으로부터 선택된 피라졸린 유도체 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 R_1 및 R_2 는 동일하거나 상이하며, 각각 독립적으로 수소, 클로로, 메톡시 및 니트로로 이루어진 군으로부터 선택된 피라졸린 유도체 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 R_3 은 퓨릴, 피리디닐 또는 벤조티아졸릴이고, 상기 R_3 은 니트로로 치환되거나 치환되지 않은 피라졸린 유도체 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 R_1 은 수소, 클로로 및 메톡시로 이루어진 군으로부터 선택되고;
상기 R_2 는 수소, 클로로, 메톡시 및 니트로로 이루어진 군으로부터 선택되고;
상기 R_3 은 퓨릴, 피리디닐 또는 벤조티아졸릴이고, 상기 R_3 은 니트로로 치환되거나 치환되지 않은 피라졸린 유도체 화합물, 또는 이의

약학적으로 허용가능한 염.

[청구항 6]

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물들로 이루어진 군에서 선택되는 것인 피라졸린 유도체 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

1)

퓨란-2-일(5-(4-메톡시페닐)-3-페닐-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)메타논[Furan-2-yl(5-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)methanone]

2)

(3-(2-메톡시페닐)-5-(4-니트로페닐)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)(5-니트로퓨란-2-일)메타논[(3-(2-Methoxyphenyl)-5-(4-nitrophenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)(5-nitrofur-2-yl)methanone]

3)

벤조[d]티아졸-2-일(5-(4-메톡시페닐)-3-페닐-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)메타논[Benzo[d]thiazol-2-yl(5-(4-methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)methanone]

4)

벤조[d]티아졸-2-일(3-(4-클로로페닐)-5-(4-메톡시페닐)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)메타논[Benzo[d]thiazol-2-yl(3-(4-chlorophenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)methanone]

5)

(5-(4-메톡시페닐)-3-페닐-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)(피리딘-4-일)메타논[(5-(4-Methoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)(pyridin-4-yl)methanone]

6)

(3-(2-메톡시페닐)-5-(4-니트로페닐)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)(피리딘-4-일)메타논[(3-(2-Methoxyphenyl)-5-(4-nitrophenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)(pyridin-4-yl)methanone]

7)

퓨란-2-일(5-(퓨란-2-일)-3-(4-메톡시페닐)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)메타논[Furan-2-yl(5-(furan-2-yl)-3-(4-methoxyphenyl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)methanone]

8)

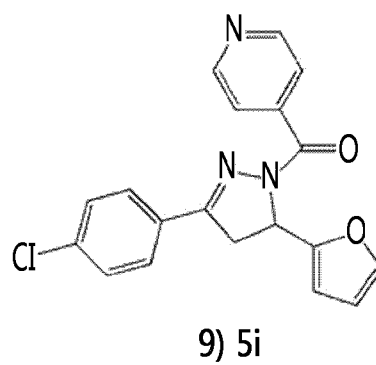
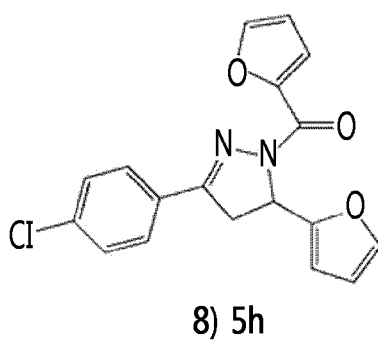
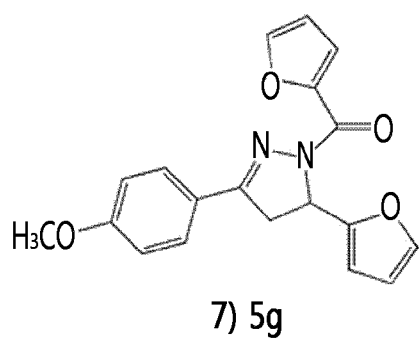
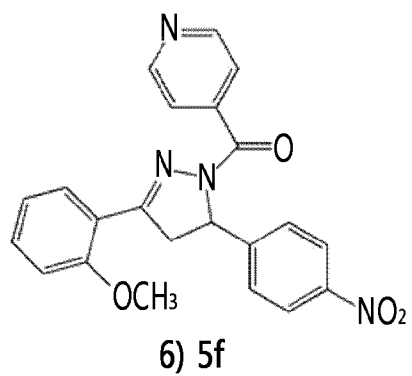
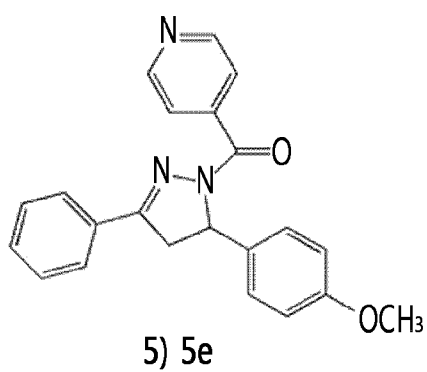
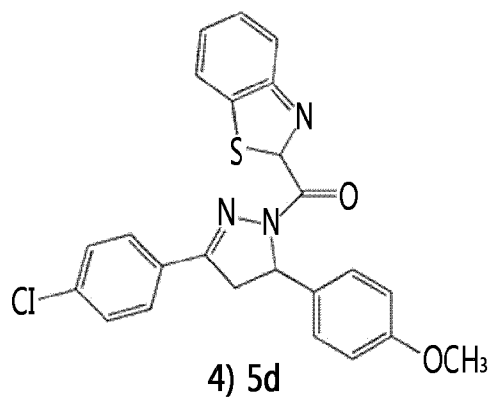
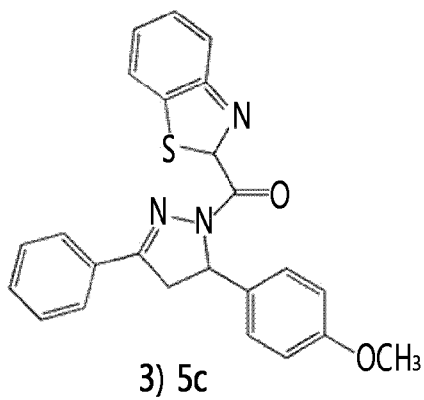
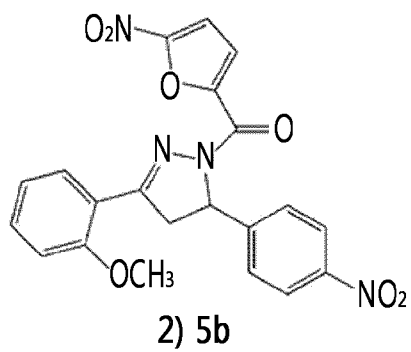
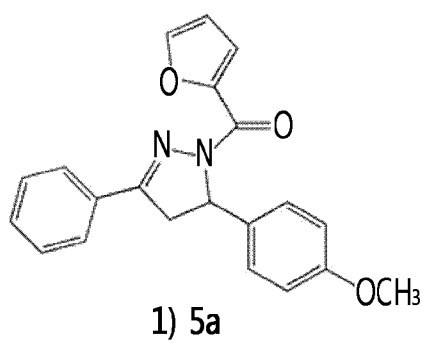
(3-(4-클로로페닐)-5-(퓨란-2-일)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)(퓨란-2-일)메타논[(3-(4-Chlorophenyl)-5-(furan-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)(furan-2-yl)methanone]

9)

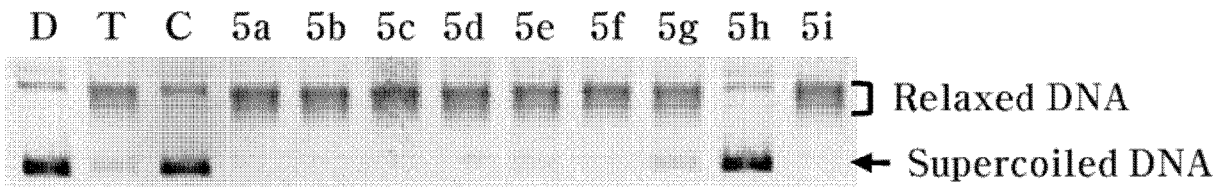
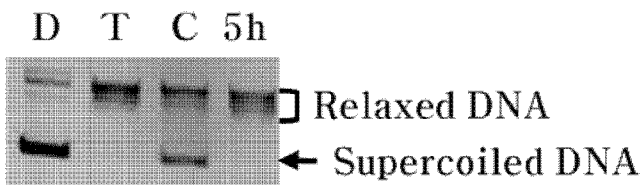
(3-(4-클로로페닐)-5-(퓨란-2-일)-4,5-디하이드로-1H-피라졸-1-일)(피리딘-4-일)메타논[(3-(4-Chlorophenyl)-5-(furan-2-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrazol-1-yl)(pyridin-4-yl)methanone]

- [청구항 7] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 피라졸린 유도체 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 조성물은 토포이소머라제 II, HER2(human epidermal growth factor receptor 2) 또는 둘 다의 활성을 저해하는 것이 특징인 약학적 조성물.
- [청구항 9] 제7항에 있어서, 상기 암은 유방암, 난소암, 폐암, 위암, 자궁암, 직장암, 췌장암 및 방광암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 특징인 약학적 조성물.
- [청구항 10] 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 피라졸린 유도체 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료방법.
- [청구항 11] 암의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물의 제조를 위한, 제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 피라졸린 유도체 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도.

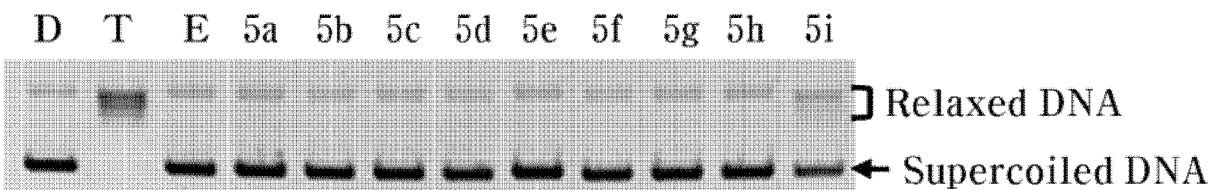
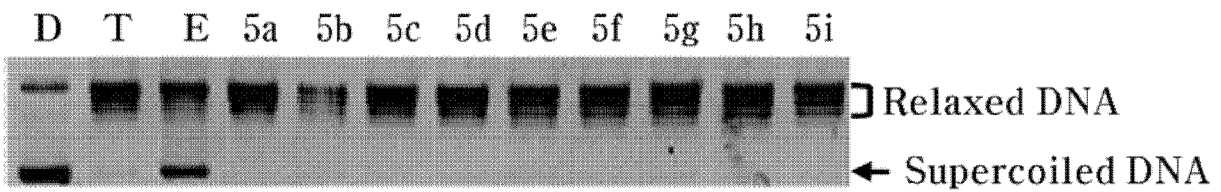
[도 1]



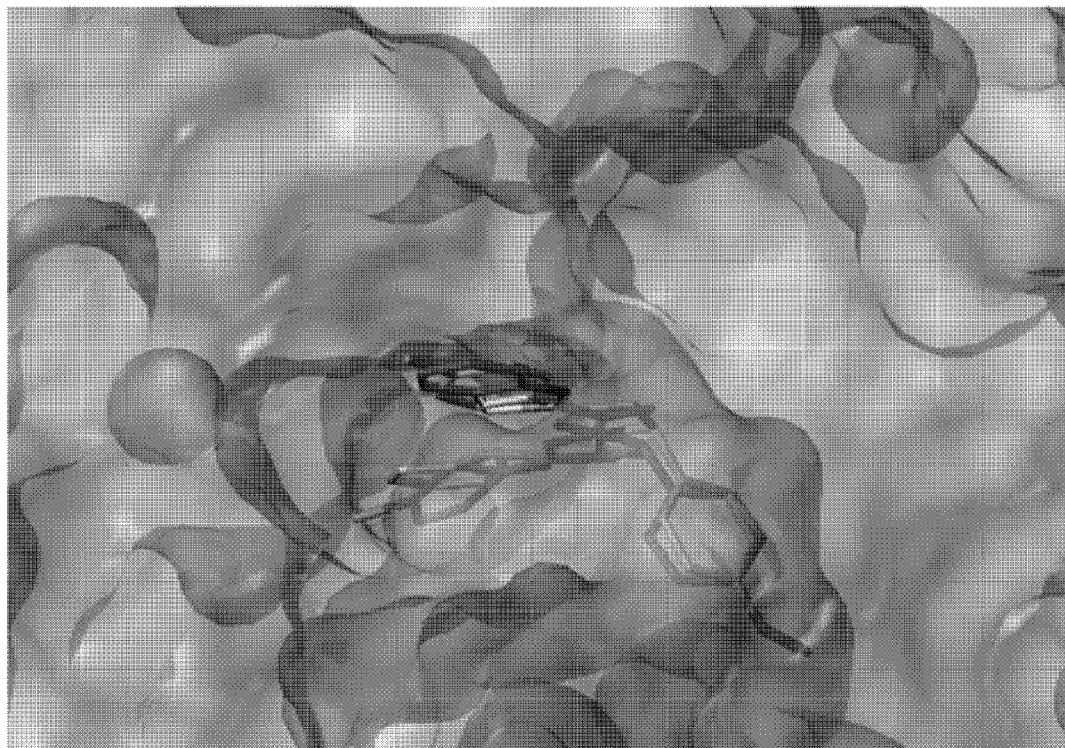
[도2]

(A) 100 μ M(B) 20 μ M

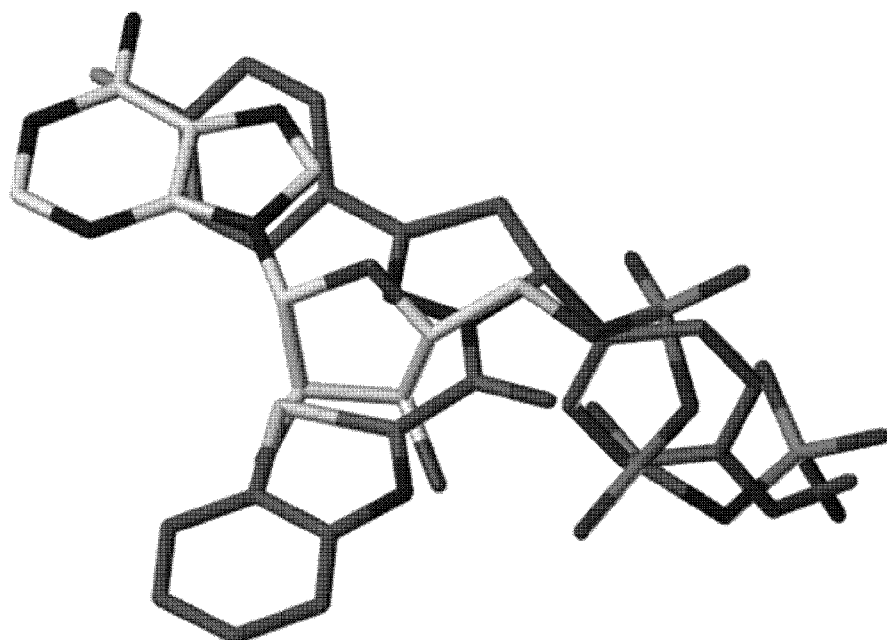
[도3]

(A) 100 μ M(B) 20 μ M

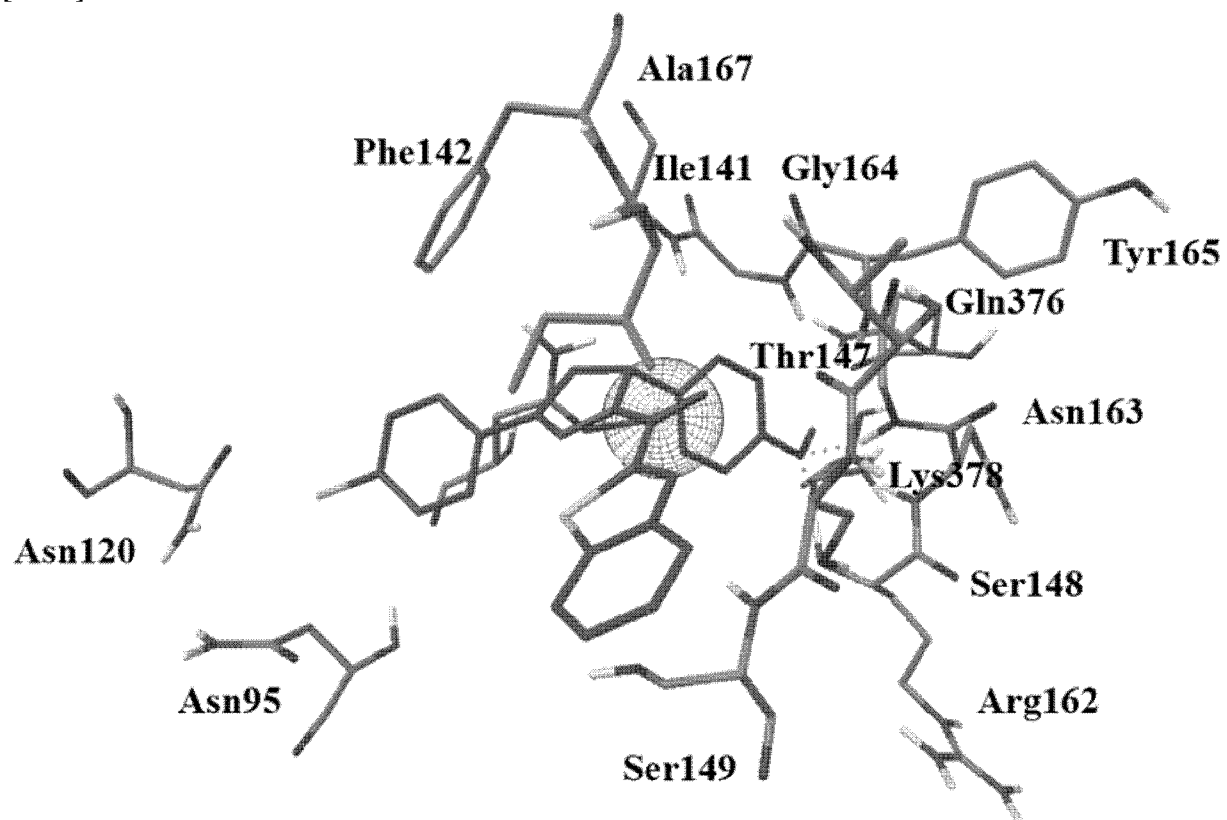
[도4a]



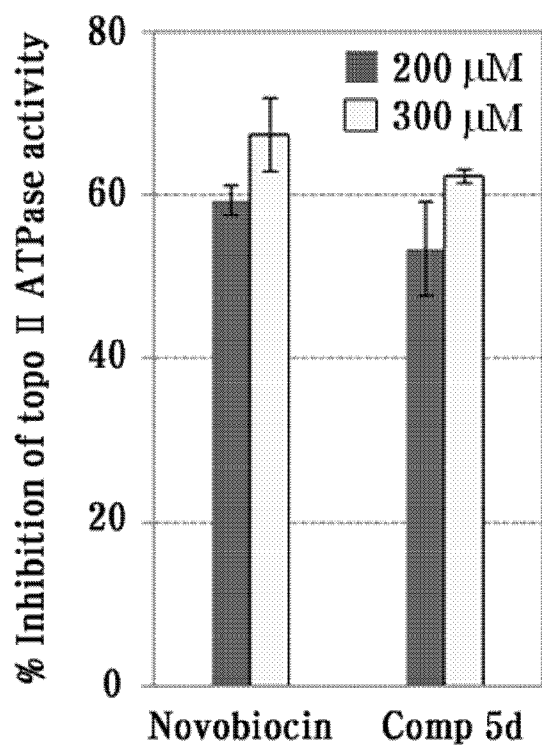
[도4b]



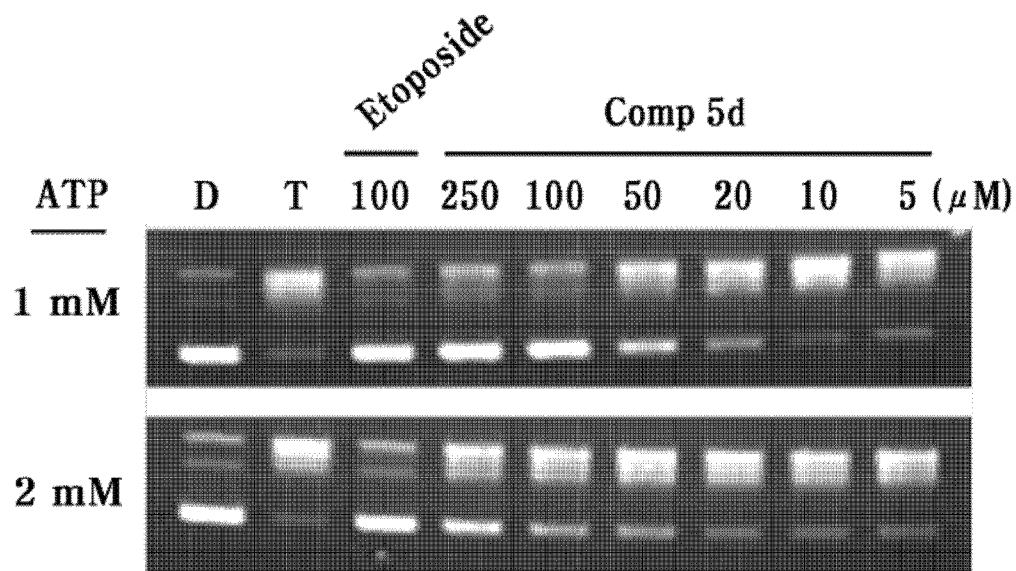
[도4c]



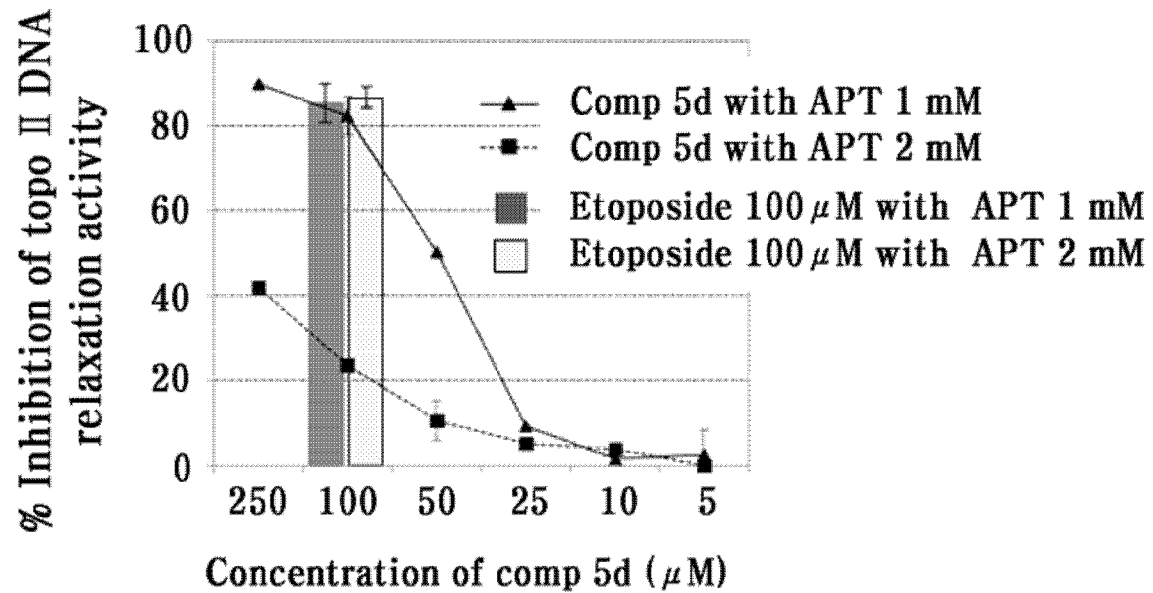
[도5a]



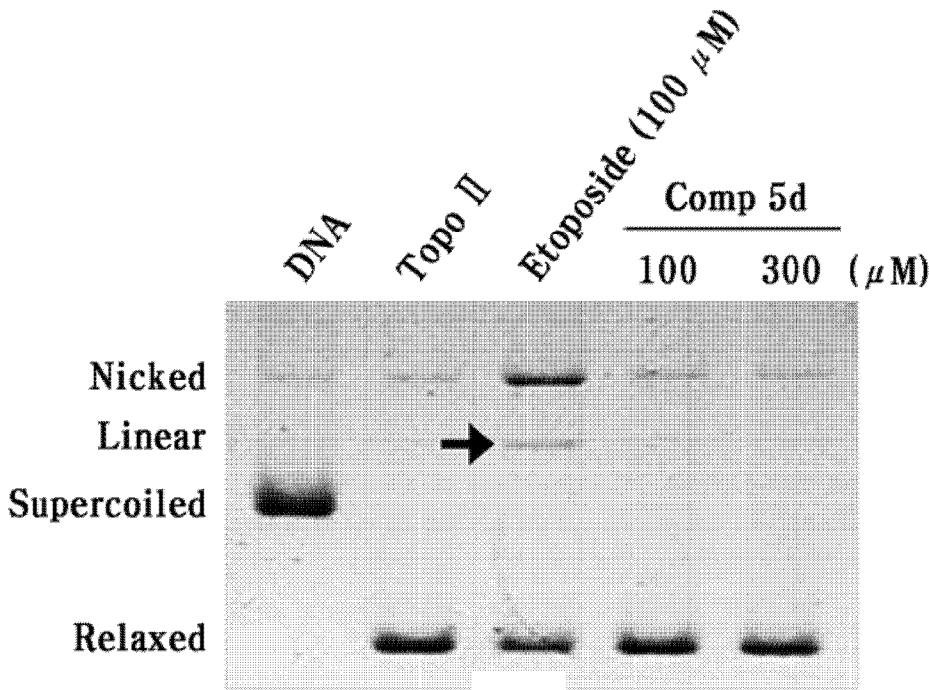
[도5b]



[도5c]



[도5d]

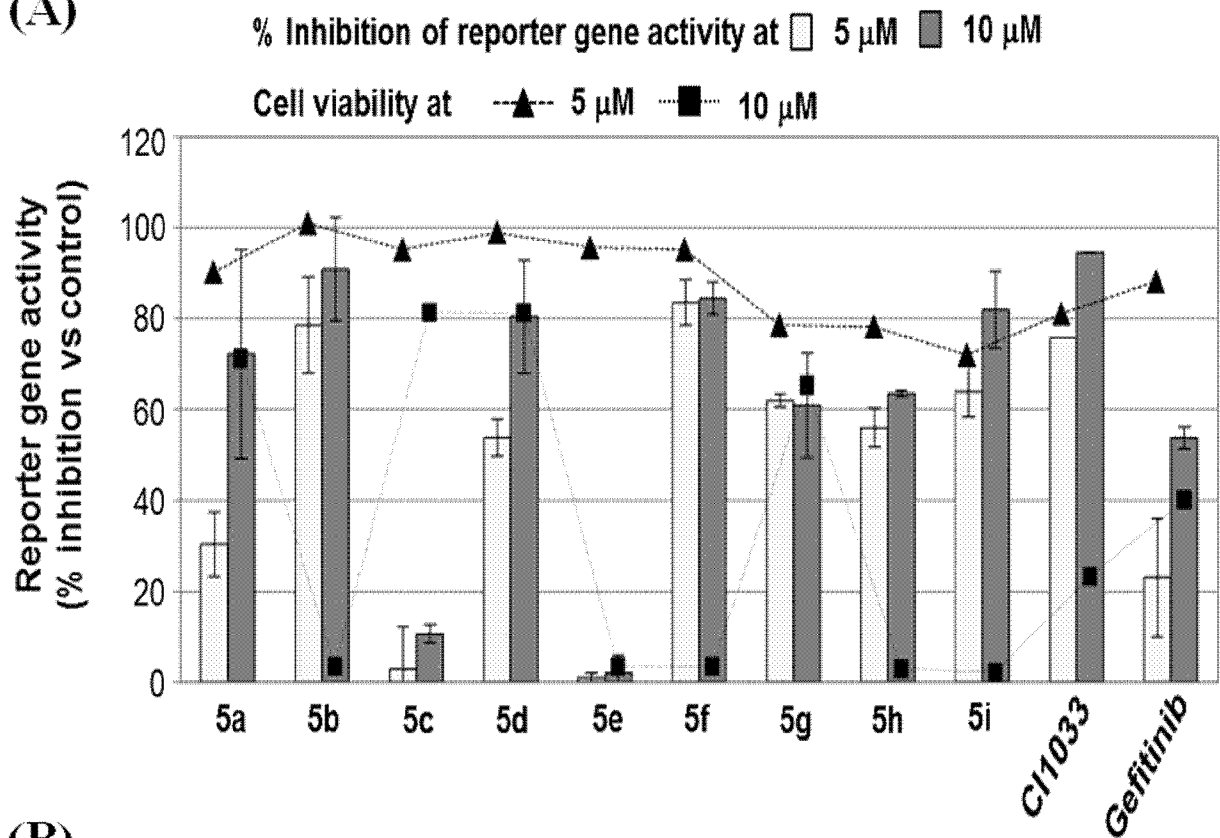


[도6]

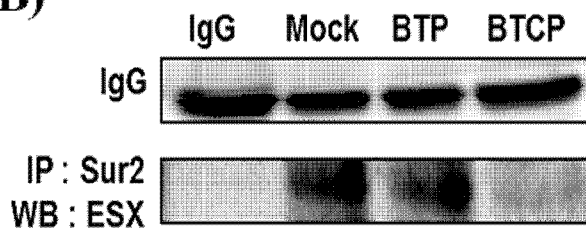
pBR322 (100 ng)	+	+	+	+	+	
Untreated nuclear lysate	-	+	-	-	-	
Nuclear lysate- treated with	etoposide (μ M)	-	-	50	-	-
	Comp 5d (μ M)	-	-	-	50	100
Relaxed						
Supercoiled						
% Inhibition	36.0 $\pm$ 1.7 78.0 $\pm$ 4.7 85.4 $\pm$ 2.2					

[도7]

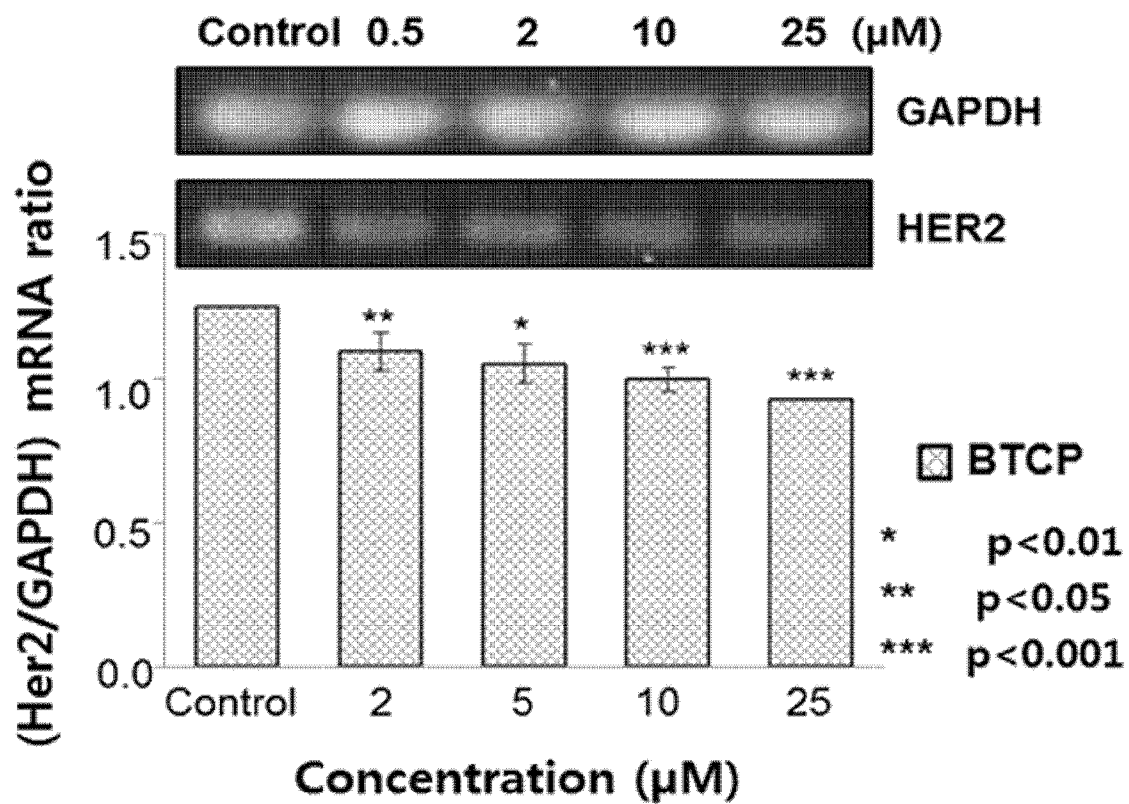
(A)



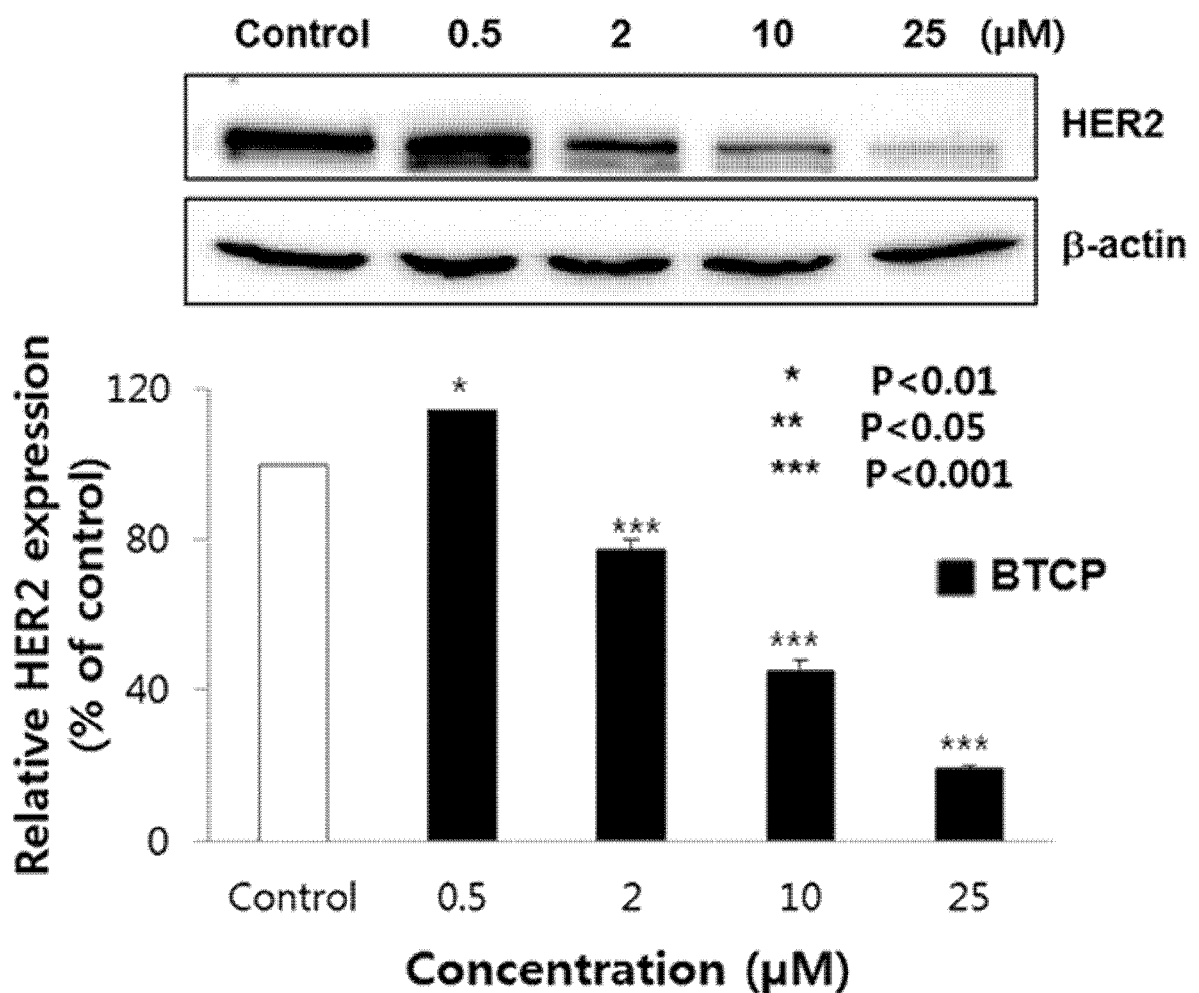
(B)



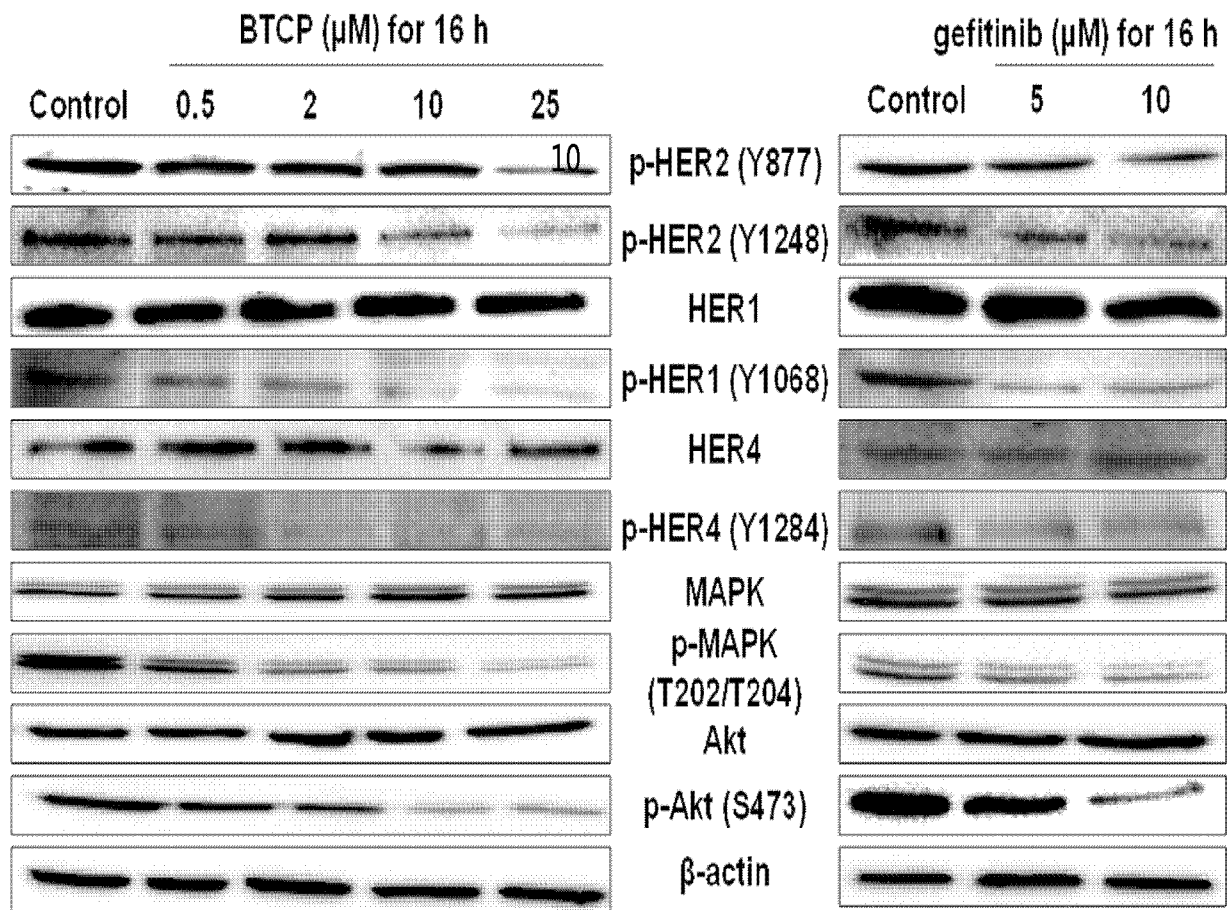
[도8a]



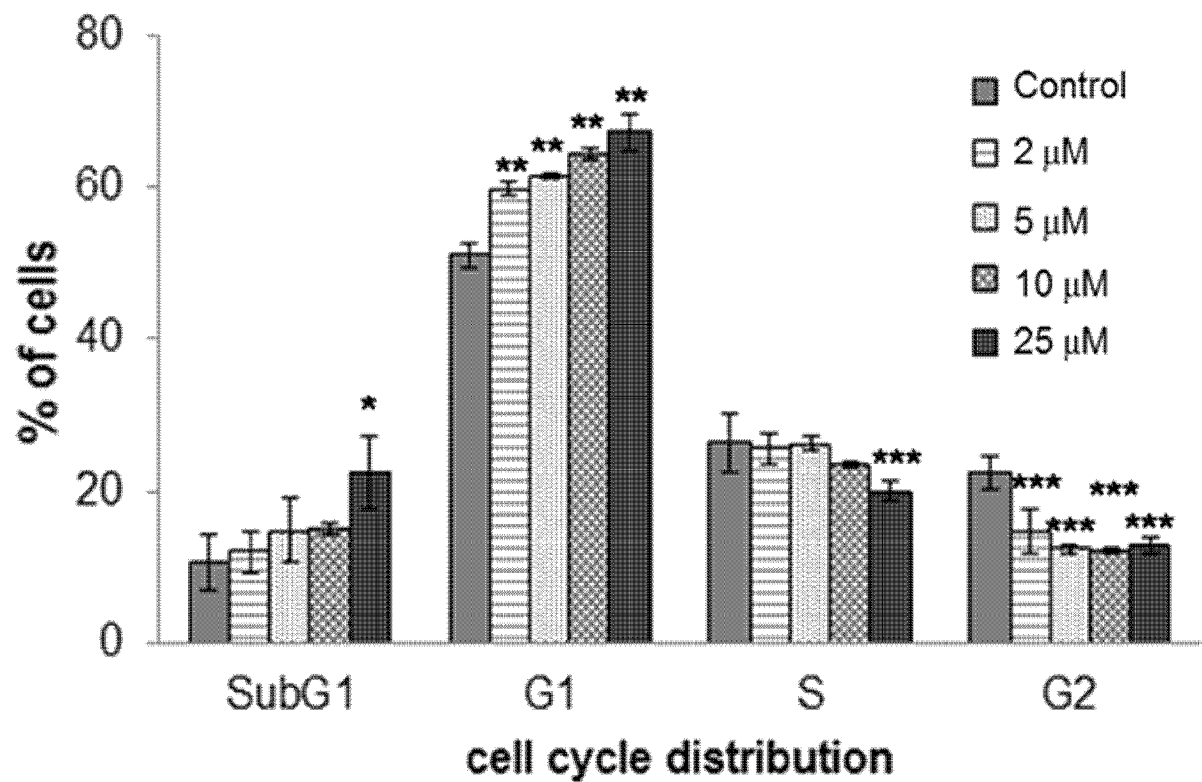
[도8b]



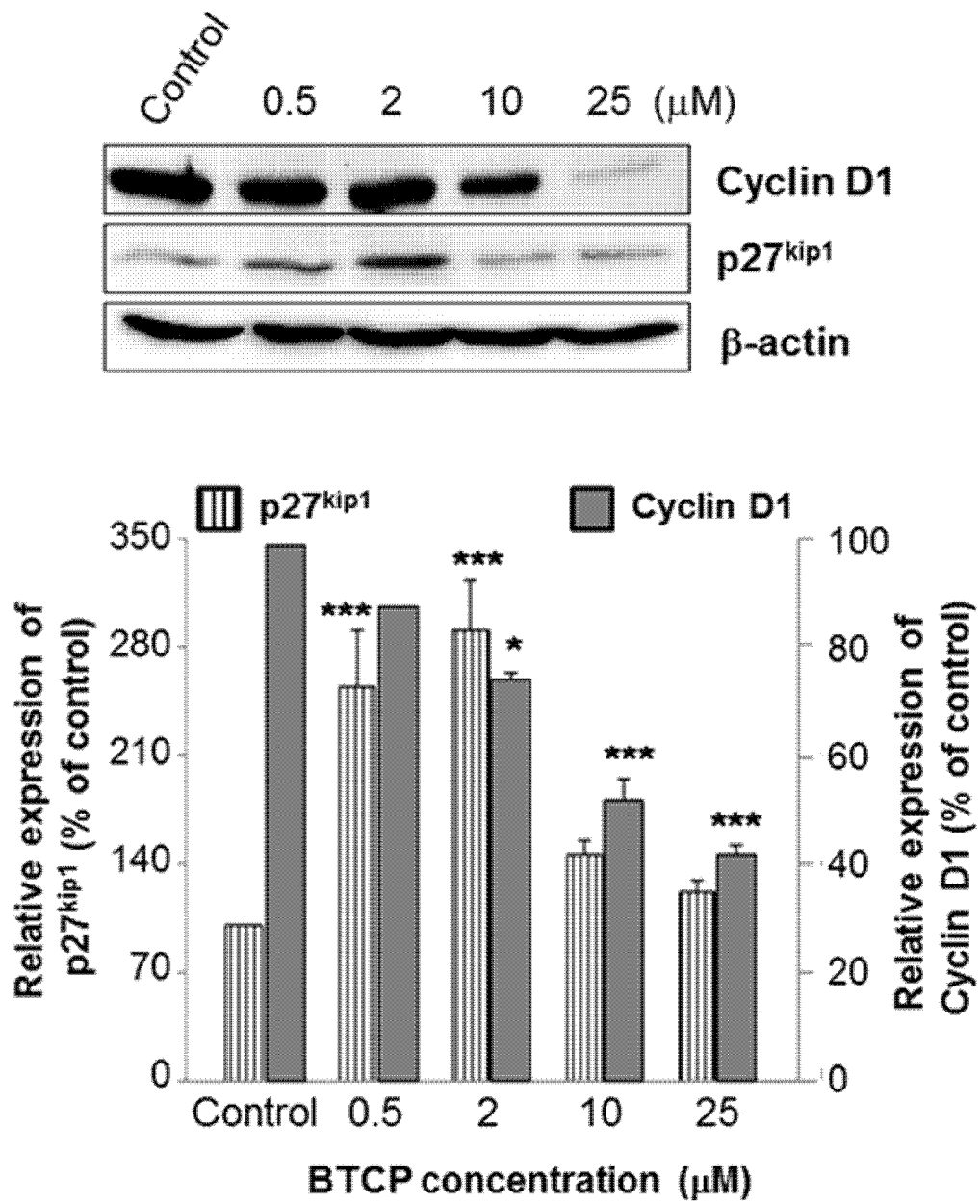
[도9]



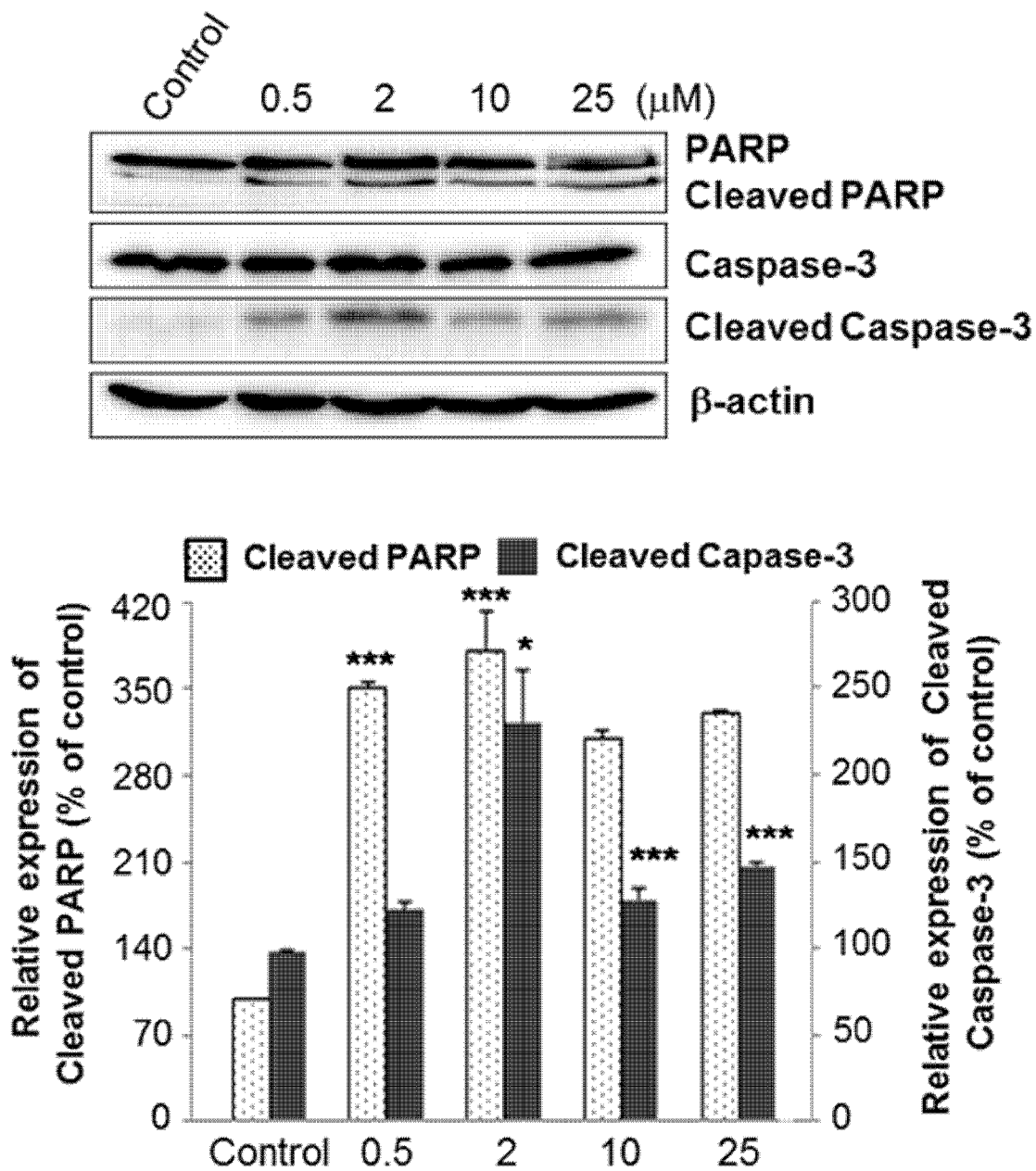
[도10a]



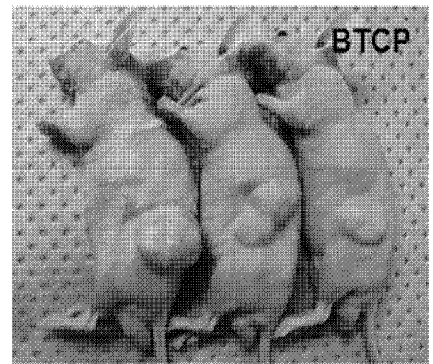
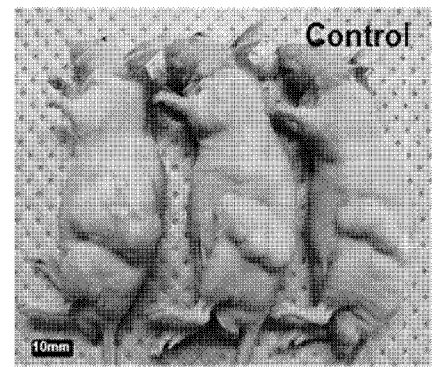
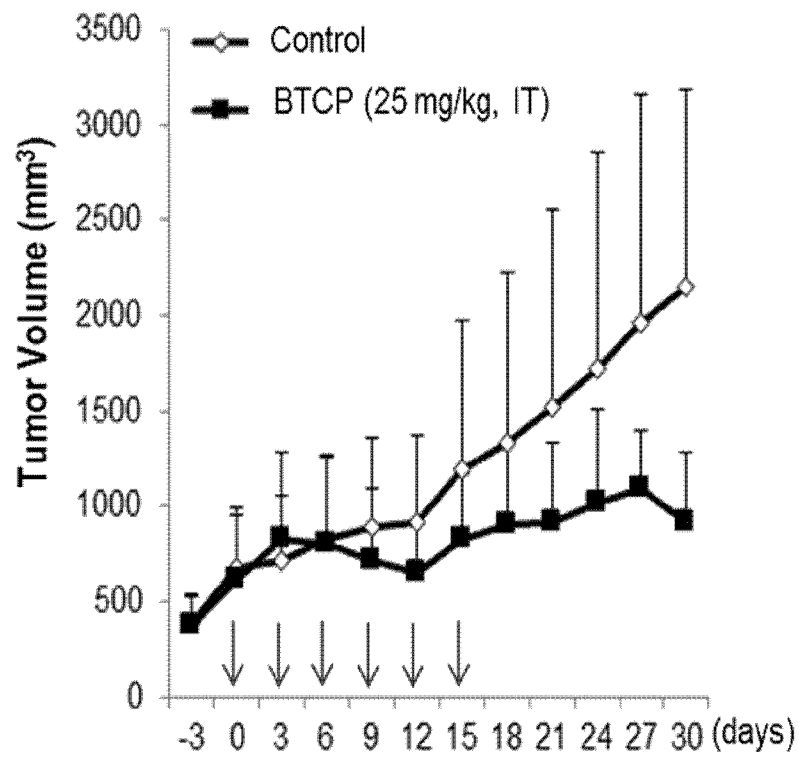
[도10b]



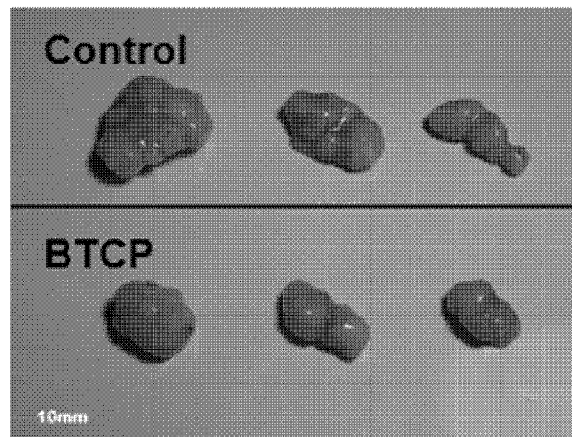
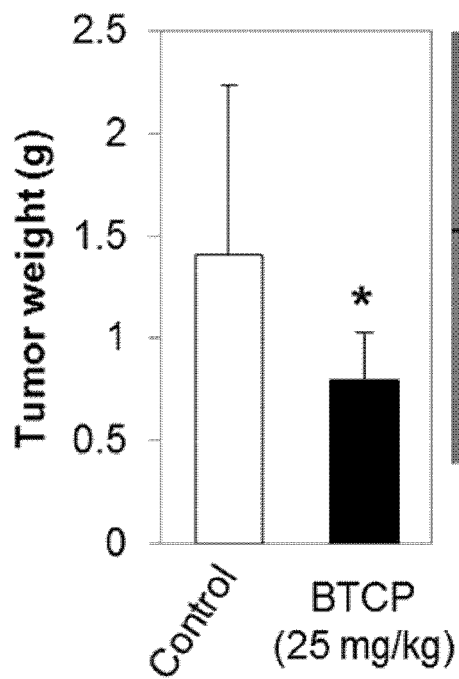
[도10c]



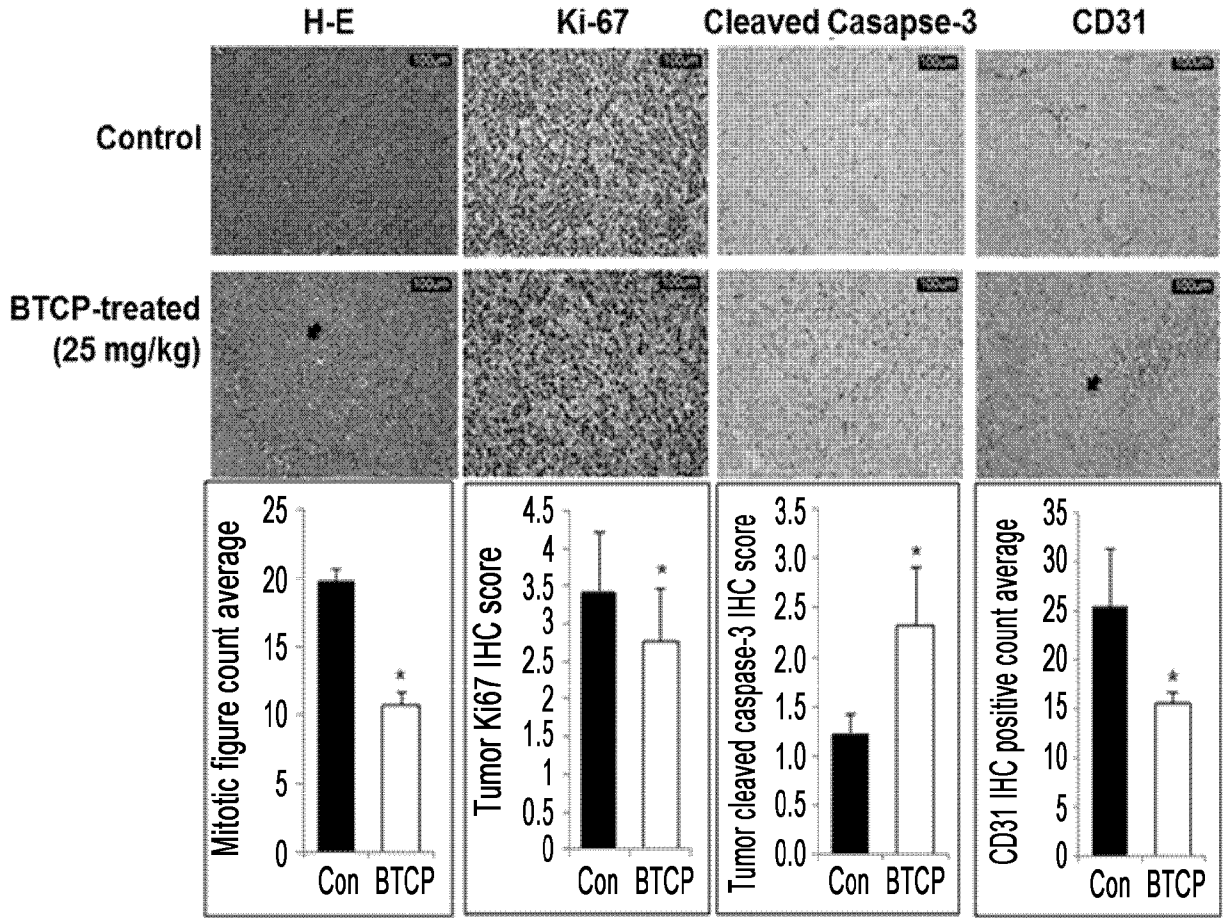
[도11a]



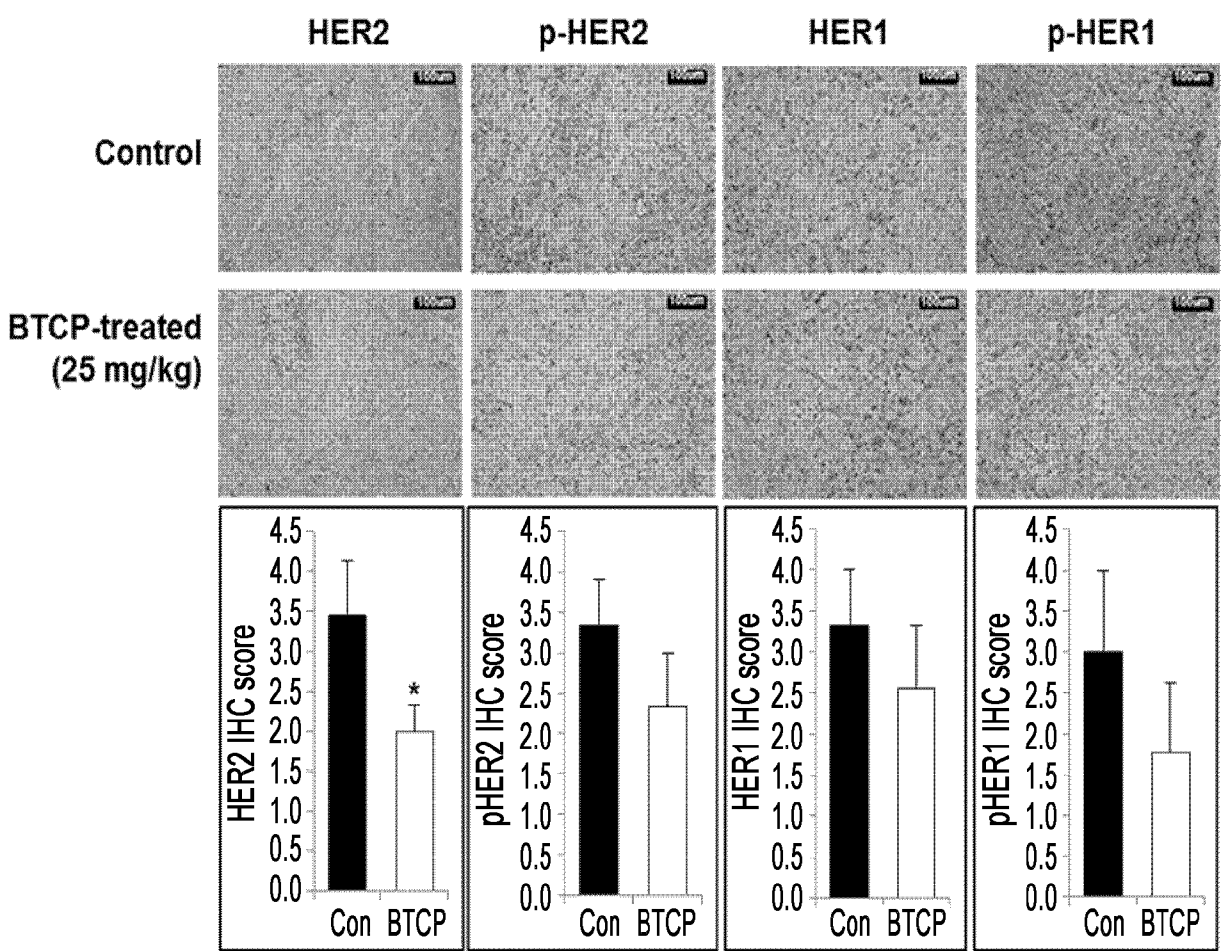
[도11b]



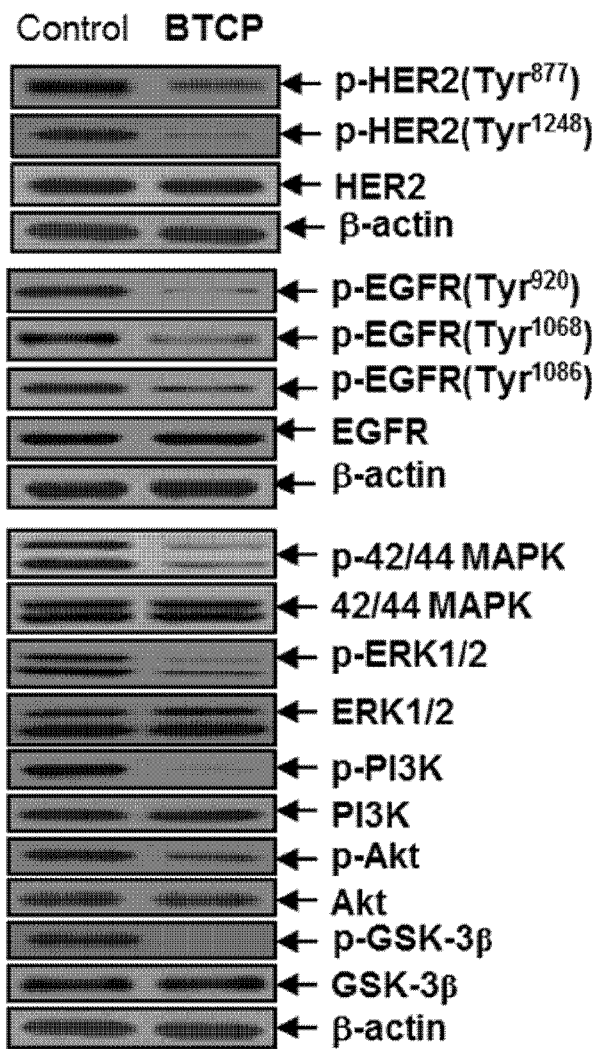
[도11c]



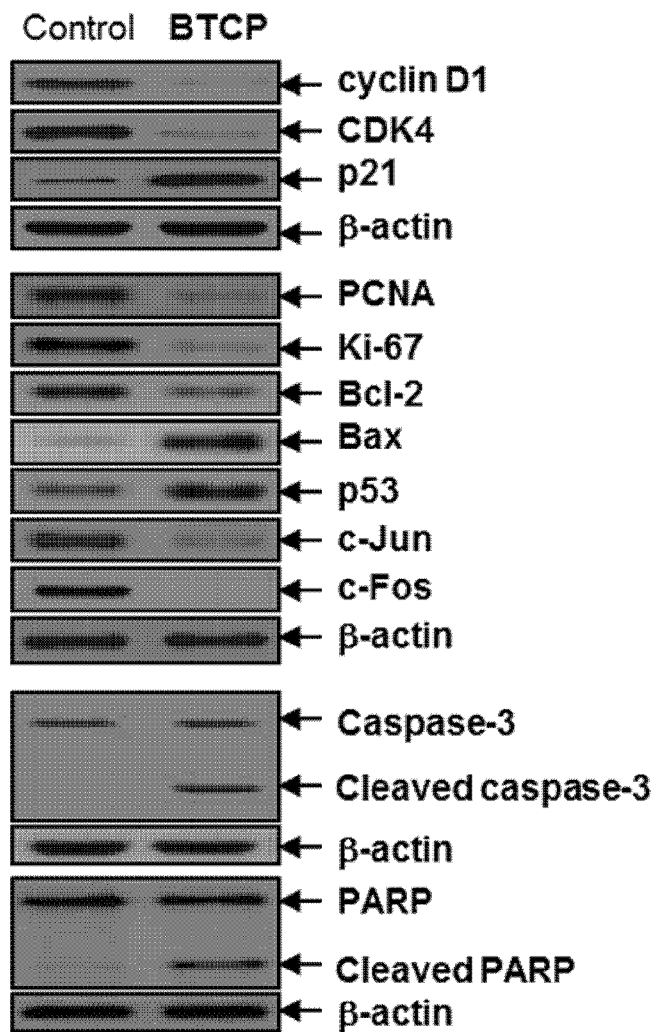
[도11d]



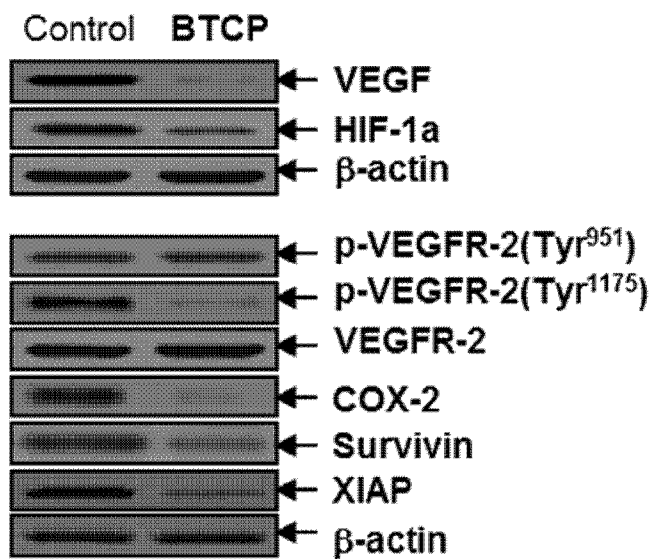
[도11e]



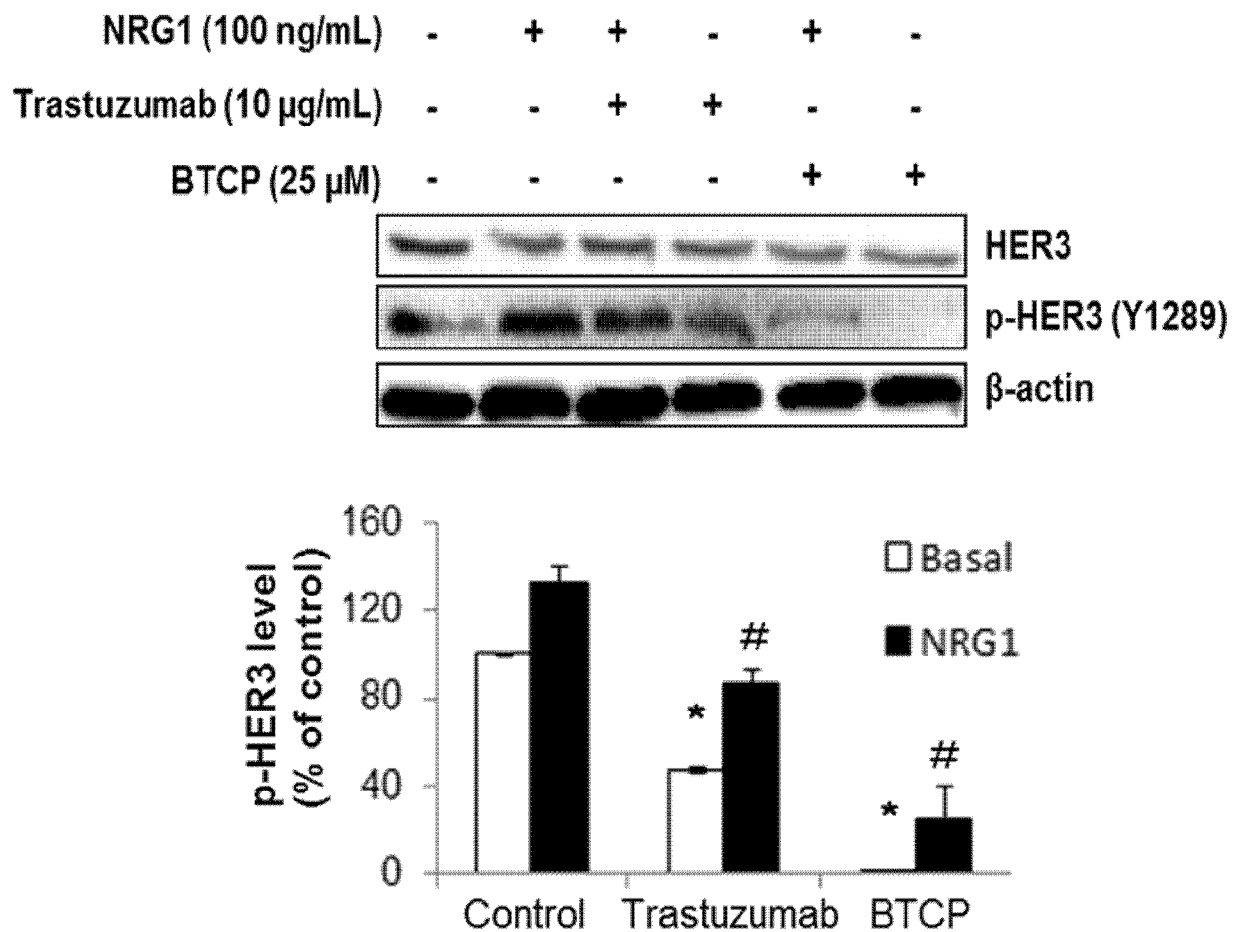
[도11f]



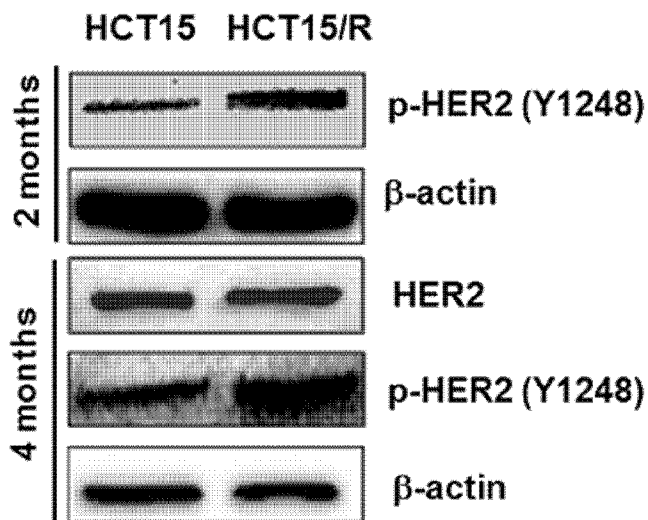
[도11g]



[도12]



[도13a]

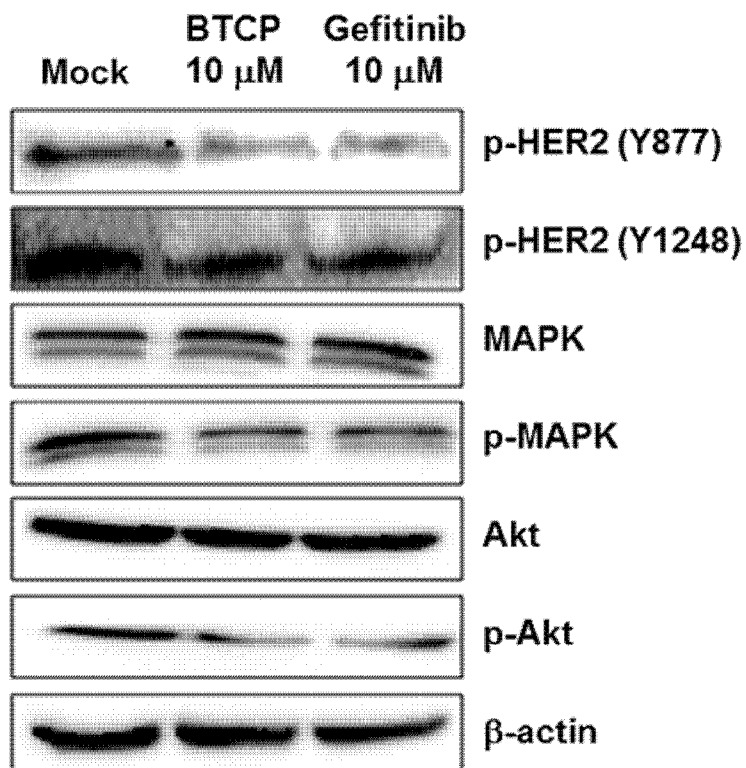


	Trastuzumab treatment of HCT15		
Duration (month)	0	2	4
IC ₅₀ (µM)	1.04 ± 0.01	13.79 ± 0.14	14.66 ± 0.65

[도13b]

Compound	Gefitinib	BTCP	Trastuzumab
IC ₅₀ (μM) in HCT15/R	0.88 ± 0.14	9.33 ± 0.17	14.66 ± 0.65
IC ₅₀ (μM) in HCT15	9.29 ± 0.53	12.78 ± 0.25	1.04 ± 0.01

[도13c]

Trastuzumab-resistant cells

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/010363**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****C07D 405/04(2006.01)i, C07D 403/04(2006.01)i, C07D 409/04(2006.01)i, A61K 31/4155(2006.01)i, A61K 31/415(2006.01)i**

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 405/04; C07D 403/04; C07D 409/04; A61K 31/4155

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

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

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

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

eKOMPASS (KIPO internal), STN(Registry, CAplus), Google & Keywords: pyrazoline derivative, topoisomerase, HER2, cancer, herceptin

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI, Qing-Shan et al., "Discovery and Pharmacophore Studies of Novel Pyrazole-Based Anti-Melanoma Agents", Chemistry & Biodiversity, January 2015, vol. 12, pages 116-132 See abstract; pages 116-117, 122; and table 4.	1-9,11
X	CASTORENO, Adam B. et al., "Small Molecules Discovered in a Pathway Screen Target the Rho Pathway in Cytokinesis", Nature Chemical Biology, e-pub. 02 May 2010, vol. 6, pages 457-463 See abstract; pages 457,460; and figure 3.	1-9,11
X	PAREKH, Shrey et al., "Synthesis of Some Novel Benzofuran-2-yl(4,5-dihydro-3,5-substituted Diphenylpyrazol-1-yl) Methanones and Studies on the Antiproliferative Effects and Reversal of Multidrug Resistance of Human MDRI-gene Transfected Mouse Lymphoma Cells in Vitro", European Journal of Medicinal Chemistry, 2011, vol. 46, pages 1942-1948 See pages 1942-1943; table 1 and diagram 1.	1-9,11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 JANUARY 2017 (12.01.2017)

Date of mailing of the international search report

12 JANUARY 2017 (12.01.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/010363

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **10**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 10 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/010363

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HADDA, Taibi Ben et al., "Tautomeric Origin of Dual Effects of N1-Nicotinoyl-3-(4'-Hydroxy-3'-Methyl Phenyl)-5-[(Sub)Phenyl]-2-Pyrazolines on Bacterial and Viral Strains: POM Analyses as New Efficient Bioinformatics' platform to Predict and Optimize Bioactivity of Drugs", Medicinal Chemistry Research, 2013, vol. 22, pages 1438-1449 See the entire document.	1-9,11
A	HIRAYAMA, Kazunori et al., "Identification of Novel Chemical Inhibitors for Ubiquitin C-terminal Hydrolase-L3 by Virtual Screening", Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007, vol. 15, pages 6810-6818 See the entire document.	1-9,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/010363

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07D 405/04(2006.01)i, C07D 403/04(2006.01)i, C07D 409/04(2006.01)i, A61K 31/4155(2006.01)i, A61K 31/415(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07D 405/04; C07D 403/04; C07D 409/04; A61K 31/4155

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN(Registry, CAplus), Google & 키워드: 피라졸린 유도체, 토포이소머라제, HER2, 암, 허셉틴

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	LI, QING-SHAN 등, `Discovery and Pharmacophore Studies of Novel Pyrazole-Based Anti-Melanoma Agents`, CHEMISTRY & BIODIVERSITY, 2015.01, 12권, 페이지 116-132 초록; 페이지 116-117, 122; 및 표 4 참조.	1-9, 11
X	CASTORENO, ADAM B. 등, `Small molecules discovered in a pathway screen target the Rho pathway in cytokinesis`, NATURE CHEMICAL BIOLOGY, 전자공개일 2010.05.02, 6권, 페이지 457-463 초록; 페이지 457, 460; 및 도면 3 참조.	1-9, 11
X	PAREKH, SHREY 등, `Synthesis of some novel benzofuran-2-yl(4,5-dihydro-3,5-substituted diphenylpyrazol-1-yl) methanones and studies on the antiproliferative effects and reversal of multidrug resistance of human MDR1-gene transfected mouse lymphoma cells in vitro`, EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, 2011, 46권, 페이지 1942-1948 페이지 1942-1943; 표 1 및 도식 1 참조.	1-9, 11

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

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

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

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 01월 12일 (12.01.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 01월 12일 (12.01.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

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

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박정민

전화번호 +82-42-481-3516



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	HADDA, TAIBI BEN 등, `Tautomeric origin of dual effects of N1-nicotinoyl-3-(4'-hydroxy-3'-methyl phenyl)-5-[(sub)phenyl]-2-pyrazolines on bacterial and viral strains: POM analyses as new efficient bioinformatics' platform to predict and optimize bioactivity of drugs`, MEDICINAL CHEMISTRY RESEARCH, 2013, 22권, 페이지 1438-1449 전체 문헌 참조.	1-9, 11
A	HIRAYAMA, KAZUNORI 등, `Identification of novel chemical inhibitors for ubiquitin C-terminal hydrolase-L3 by virtual screening`, BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, 2007, 15권, 페이지 6810-6818 전체 문헌 참조.	1-9, 11

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 10
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 제10항은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음