(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년07월22일
(11) 등록번호 10-1641829
(24) 등록일자 2016년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 495/04 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 31/4365 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 495/04 (2013.01)
A23L 1/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0057156
(22) 출원일자 2015년04월23일
심사청구일자 2015년04월23일
(56) 선행기술조사문헌
European journal of medicinal chemistry, 2014, 76, 53-60
Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2014, 24(11), 2525-2529
Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2015, 25(3), 462-465
WO2010060854 A1

(73) 특허권자
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
서영호
대구광역시 수성구 청수로 257 1304동 1002호 (황금동,캐슬골드파크3단지)
(74) 대리인
특허법인태백

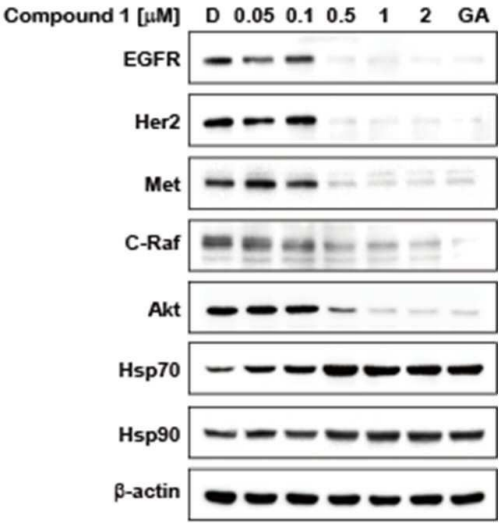
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 민경난

(54) 발명의 명칭 **Hsp90 억제 활성을 갖는 신규한 티에노피리딘 화합물 및 이의 의학적 용도**

(57) 요 약

본 발명은 Hsp90 억제 활성을 갖는 신규한 티에노피리딘 화합물 및 이의 의학적 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따른 티에노피리딘 화합물은 Hsp90의 억제효과가 우수하여, Hsp90의 억제를 통한 암질환 또는 퇴행성 신경질환을 일으키는 Hsp90 클라이언트 단백질의 분해를 유도하여 암질환 또는 퇴행성 신경질환과 같은 Hsp90 매개 질환의 치료 또는 예방용 의약품 또는 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 31/4365 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016-011325
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중점연구소지원 (이공계분야)
연구과제명 약물의존장애 핵심 진단기술 개발 및 치료전략 연구(약학연구소)
기 여 율 1/1
주관기관 계명대학교
연구기간 2016.05.01 ~ 2024.12.31

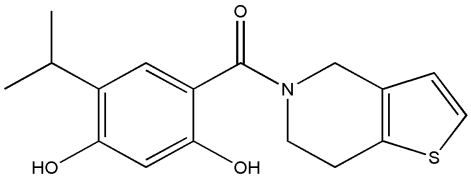
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 티에노피리딘(thienopyridine) 화합물.

[화학식 1]



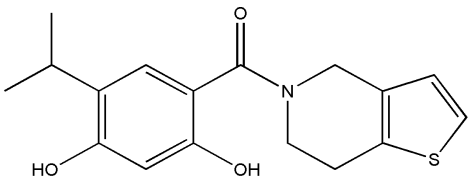
청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 티에노피리딘 화합물은 Hsp90의 활성을 억제시키는 것을 특징으로 하는 티에노피리딘 화합물.

청구항 3

하기 화학식 1로 표시되는 티에노피리딘(thienopyridine) 화합물을 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

[화학식 1]



청구항 4

삭제

청구항 5

청구항 3에 있어서, 상기 암질환은 비소세포성 폐암, 폐암, 유방암, 자궁암, 췌장암, 전립선암, 위암, 대장암, 백혈병, 뇌종양 및 두경부암으로 이루어진 군에서 선택된 질환인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

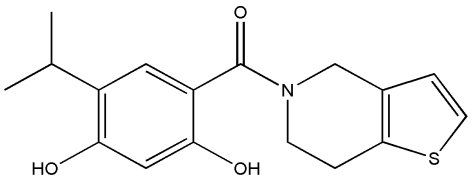
청구항 6

삭제

청구항 7

하기 화학식 1로 표시되는 티에노피리딘(thienopyridine) 화합물을 유효성분으로 함유하는 암질환 예방 또는 개선용 건강식품.

[화학식 1]



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 Hsp90 억제 활성을 갖는 신규한 티에노피리딘(thienopyridine) 화합물 및 이의 의학적 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 열 충격 단백질 90(Heat shock protein 90; Hsp90)은 ATP 의존성 분자적 샤페론으로 Hsp90의 기질 단백질인 클라이언트(client) 단백질의 변형, 활성 및 안정화를 조절한다. 많은 종류의 Hsp90 클라이언트 단백질들은 암을 유발시키는 것으로 알려져 있으며, 막을 통과하는 티로신 키나아제(EGFR, Her2, Met), 준안정성 신호전달 단백질(Akt, Raf-1, IKK) 및 변이된 신호전달 단백질(p53, v-Src) 등이 이에 포함된다.

[0003] 암세포들은 그들의 유전적 불안정성 및 스트레스 환경 때문에 정상세포보다 Hsp90 샤페론 기능에 더욱 의존적임에 따라, 정상세포보다 암세포에서 Hsp90의 발현이 2 내지 10배 높게 나타난다.

[0004] 이에 따라, Hsp90는 효과적인 암 치료를 위한 타겟이 될 수 있는데, Hsp90 단백질의 활성 억제제는 다양한 암유발 단백질을 동시에 감소시키는 효과를 나타낼 수 있으며, 저항성을 가지는 암치료에 효과를 나타낼 수 있다.

[0005] 특히, Hsp90 클라이언트 단백질인 EGFR 및 Met 유전자의 돌연변이 및 발현 증가는 비소세포성 폐암 약물 저항성의 원인이되며, Hsp90의 활성 억제제는 이러한 비소세포성 폐암의 가장 효과적인 치료 방법이 될 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2007-0038565호(2007.04.10)

발명의 내용

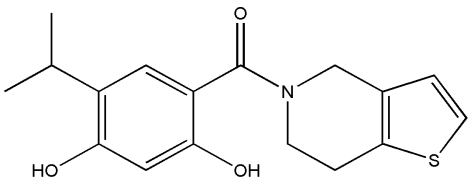
해결하려는 과제

[0007] 본 발명에서는 새로운 구조의 Hsp90 억제제를 개발하여, 이를 비소세포성 폐암을 포함한 암질환 치료제 또는 알츠하이머병을 포함한 퇴행성 신경질환 치료제로 사용하는 의학적 용도를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 티에노피리딘(thienopyridine) 화합물을 제공한다.

[0009] [화학식 1]

[0010] 

[0011] 또한, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 티에노피리딘(thienopyridine) 화합물을 유효성분으로 함유하는 Hsp90

(Heat Shock Protein 90: 열충격단백질 90) 매개 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 티에노피리딘(thienopyridine) 화합물을 유효성분으로 함유하는 Hsp90 (Heat Shock Protein 90: 열충격단백질 90) 매개 질환 예방 또는 개선용 약학조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 티에노피리딘 화합물은 Hsp90의 억제효과가 우수하여, Hsp90의 억제를 통한 암질환 또는 퇴행성 신경질환을 일으키는 Hsp90 클라이언트 단백질의 분해를 유도하여 암질환 또는 퇴행성 신경질환과 같은 Hsp90 매개 질환의 치료 또는 예방용 의약품 또는 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명에 따른 티에노피리딘 화합물의 Hsp90 결합부위를 보여주는 사진이다.

도 2는 본 발명에 따른 티에노피리딘 화합물의 농도별 H1975 세포 증식 억제 효과를 확인한 결과이다.

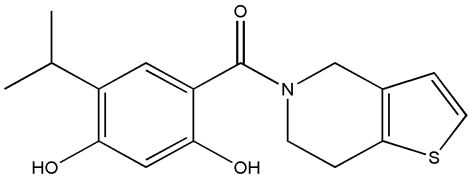
도 3은 본 발명에 따른 티에노피리딘 화합물의 Hsp90 클라이언트 단백질 저해 효과를 확인한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 4는 본 발명에 따른 티에노피리딘 화합물의 Hsp90와 관련된 세포사멸 유도 단백질의 저해 효과를 확인한 웨스턴 블롯 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 티에노피리딘(thienopyridine) 화합물을 제공한다.

[0016] [화학식 1]

[0017] 

[0018] 상기 티에노피리딘 화합물은 6,7-디하이드로티에노[3,2-c]피리딘-5(4H)-일)(2,4-디하드록시-5-이소프로필페닐)메탄온일 수 있다.

[0019] 상기 티에노피리딘 화합물은 Hsp90 (Heat Shock Protein 90: 열충격단백질 90) 단백질의 N-말단에 결합하여 Hsp90의 활성을 억제시킬 수 있다.

[0020] 본 발명에 따른 티에노피리딘 화합물은 Hsp90 활성을 억제하고, Her2, Met, Akt 등의 암유발 단백질을 감소시키고, Hsp70을 증가시키고, 더불어, 분자모델링을 통해 이러한 화합물이 Hsp90 단백질의 N-말단 ATP 포켓에 결합하는 것을 확인하였다.

[0021] 본 발명은 화학식 1로 표시되는 티에노피리딘(thienopyridine) 화합물을 유효성분으로 함유하는 Hsp90 (Heat Shock Protein 90: 열충격단백질 90) 매개 질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0022] 상기 Hsp90 매개 질환은 암질환, 퇴행성 신경질환 및 바이러스 감염증으로 이루어진 군에서 선택된 질환일 수 있다.

[0023] 상기 암질환은 비소세포성 폐암, 폐암, 유방암, 자궁암, 췌장암, 전립선암, 위암, 대장암, 백혈병, 뇌종양 및 두경부암으로 이루어진 군에서 선택된 질환일 수 있으며, 상기 퇴행성 신경질환은 뇌졸중, 중풍, 기억력 상실, 기억력 손상, 치매, 건망증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 피크병, 크로이츠펠트-야콥병, 헌팅턴병 및 루게릭병으로 이루어진 군에서 선택되는 질환일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0025] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 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 위한고형제제에는 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 스티레이트, 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, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름,에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로 는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0026] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 과립제, 산제, 피복정, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 제형화하여 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 약학조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내,근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0028] 상기 티에노피리딘 화합물의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중,질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 또한, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 티에노피리딘(thienopyridine) 화합물을 유효성분으로 함유하는 Hsp90 (Heat Shock Protein 90: 열충격단백질 90) 매개 질환 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

[0031] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 건강식품은, 전체 건강식품 100 중량부에 대하여 티에노피리딘 화합물을 0.01 내지 90 중량부, 0.1 내지 90 중량부, 1 내지 90 중량부, 또는 10 내지 90 중량부로 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 건강식품은 유기산, 인산염, 항산화제, 유당 카제인, 덱스트린, 포도당, 설탕 및 솔비톨로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 유기산은 이에 제한되는 것은 아니지만 구연산, 후말산, 아디픽산, 젖산 또는 사과산일 수 있으며, 인산염은 이에 제한되는 것은 아니지만 인산나트륨, 인산칼륨, 산성피로인산염 또는 폴리인산염(중합인산염)일 수 있으며, 항산화제는 이에 제한되는 것은 아니지만 폴리페놀, 카테킨, 알파-토코페롤, 로즈마리 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산 또는 피틴산 등의 천연 항산화제일 수 있다.

[0033] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 건강식품은 상기 유효성분 이외에도 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 또한 본 발명의 일실시예에 따른 식품 조성물은 천연 과일 주스, 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0034] 본 발명의 일실시예에 따르면, 건강식품의 제형은 이에 제한되는 것은 아니지만 고형, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 액상 또는 음료 형태일 수 있다.

[0035] 또한 상기 건강식품은 이에 제한되는 것은 아니지만 과자류, 당류, 아이스크림 제품류, 유가공품, 식육제품, 어육제품, 두부류 또는 묵류, 식용유지류, 면류,다류, 음료류, 특수영양식품, 건강보조식품, 조미식품, 얼음, 인삼제품류, 김치절임식품, 건포류, 과일, 야채, 과일 또는 야채의 건조제품, 절단제품, 과일쥬스, 야채쥬스, 이들의 혼합쥬스, 칩류, 면류, 축산가공식품, 수산가공식품, 유가공식품, 발효유식품, 두류식품, 곡류식품, 미생물발효식품, 제과제빵, 양념류, 육가공류, 산성음료수, 감초류, 허브류 등의 식품의 제조에 사용될 수 있다.

[0036] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0037] **<실시예 1> 티에노피리딘(thienopyridine) 화합물 합성**

[0038] 달리 언급되지 않은 경우를 제외하고, 모든 반응은 아르곤 대기하에서 수행되었으며, 구매한 모든 제품을 추가 정제 없이 사용하였다. 얇은층 크로마토그래피(TLC)는 Merck 실리카겔 60 F_{254} 플레이트를 이용하여 수행하였다. TLC 플레이트 시각화는 UV, *p*-아니스알데하이드(anisaldehyde), 세릭 암모니움 몰리브덴산염(ceric ammonium molybdate), 닌하이드린(ninhydrin), 및 과망간산 칼륨(potassium permanganate) 염색 조합을 이용하였다.

[0039] NMR 스펙트라는 Bruker 400 (400 MHz for ^{1}H; 100 MHz for ^{13}C) spectrometer를 사용하여 측정하고, ^{1}H 및 ^{13}C NMR 화학적 변화는 TMS를 비교하여 백만(ppm)부분당 나타내었으며 잔류 용매 피크는 내부 참조로 사용되었다.

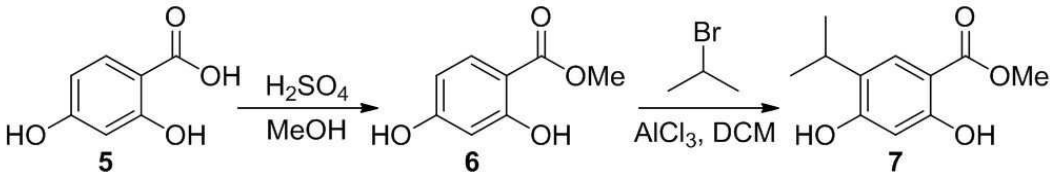
[0040] 신호는 m (multiplet), s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), bs (broad singlet), bd (broad doublet), dd (doublet of doublets), dt (doublet of triplets) 및 dq (doublet of quartets)로 보고되었으며; 연결된 정수는 헤르츠(Hz)로 보고되었다.

[0041] 합성된 최종 화합물은 실리카겔 컬럼(Biotage SNAP HP-Sil)을 이용한 MPLC (Biotage Isolera One instrument)로 정제하였다.

[0042] 상기 MNR 및 HPLC (Shimadzu prominence, VP-ODS C18 column) 분석 결과, 합성된 모든 화합물의 순도는 > 95%로 확인되었다.

[0043] 1. 화합물 6 합성

[0044] [반응식 1]

[0045] 

[0046] 반응식 1과 같은 방법으로 화합물 6을 합성하였다.

[0047] 2,4-디하이드록시아세토페논(10.2 g, 66.0 mmol) 및 황산(sulfuric acid) 5 mL을 메탄올 40 mL에 넣고 아르곤 하 환류 응축기에서 100 ℃조건으로 12시간 동안 교반하였다.

[0048] 상기 혼합물을 실온에서 냉각시키고 감압하여 농축시킨 후 얼음 수조에서 H_2O 40 mL을 붓고 여과하여 흰색 고체를 얻었다.

[0049] 상기 고체를 에틸 아세테이트로 용해시키고 포화된 $NaHCO_3$ 용액으로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4로 건조시키고 감압 농축하여 화합물 6을 86% 수율로 얻었다.

[0050] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.97 (s, 1H), 7.74 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.40 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.37 (dd, J = 8.8 Hz, 2.4 Hz, 1H), 5.36 (s, 1H), 3.91 (s, 1H).

[0051] 2. 화합물 7 합성

[0052] 상기 반응식 1과 같은 방법으로 화합물 7을 합성하였다.

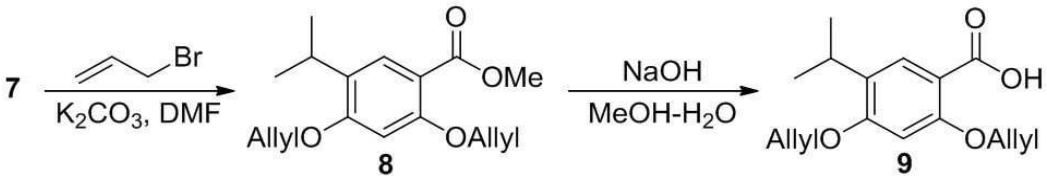
[0053] 화합물 6(3.9 g, 23.0 mmol), 2-브로모프로판(4.3 mL, 46.0 mmol) 및 알루미늄 클로라이드(6.1 g, 46.0 mmol)를 CH_2Cl_2 넣고 아르곤 하 환류 응축기에서 50 ℃조건으로 24시간 동안 교반하였다.

[0054] 상기 반응 혼합물에 2-브로모프로판(4.3 mL, 46.0 mmol)을 6 시간마다 3번 첨가하였다. 그 다음 혼합물에 10% NaOH(pH 5)를 첨가하여 중화시키고 감압 농축한 후 에틸 아세테이트로 추출하였다.

[0055] 유기층을 포화된 $NaHCO_3$ 용액으로 3번 세척하고, Na_2SO_4로 건조시킨 후 감압 농축하였다. 그 후 농축물을 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 화합물 7을 45% 수율로 얻었다. R_f = 0.21 (1:4 ethyl acetate: hexane). ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 10.8 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 6.34 (s, 1H), 5.53 (s, 1H), 3.92 (s, 3H), 3.15-3.08 (m, 1H), 1.25 (d, J = 10.8 Hz, 6H). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 170.7, 161.6, 159.6, 128.1, 127.1, 105.7, 103.2, 52.2, 26.7, 22.8.

[0056] 3. 화합물 8 합성

[0057] [반응식 2]

[0058] 

[0059] 반응식 2와 같은 방법으로 화합물 8을 합성하였다.

[0060] 화합물 7(2.1 g, 10.3 mmol), 알릴 브로마이드(2.3 mL, 26.8 mmol) 및 탄산칼륨(3.7 g, 26.8 mmol)을 DMF에 넣은 혼합물을 18시간 동안 교반하고, 상기 혼합물을 에틸아세테이트에 용해시켰다.

[0061] 유기층을 H_2O로 세척하고 Na_2SO_4로 건조시킨 후 감압 농축하여 화합물 8을 84% 수율로 얻었다.

[0062] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.71 (s, 1H), 6.41 (s, 1H), 6.10-5.97 (m, 2H), 5.50 (dd, J = 17.2 Hz, 1.6 Hz, 1H), 5.41 (dd, J = 17.2 Hz, 1.2 Hz, 1H), 5.27 (d, J = 10.8 Hz, 2H), 4.56 (dd, J = 9.6 Hz, 4.8 Hz, 4H), 3.84 (s, 1H), 3.26-3.19 (m, 1H), 1.19 (d, J = 6.8 Hz, 6H).

[0063] 4. 화합물 9 합성

[0064] 상기 반응식 2와 같은 방법으로 화합물 9를 합성하였다.

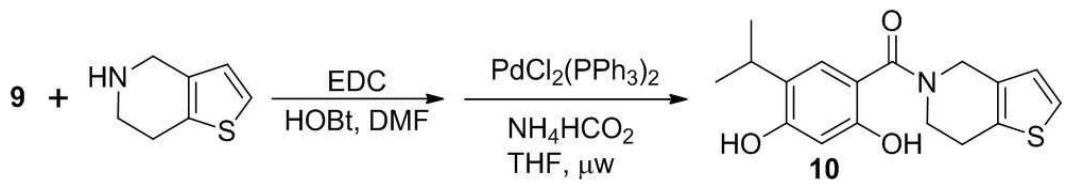
[0065] 화합물 8(2.5 g, 8.6 mmol) 및 수산화나트륨(1.7 g, 43.1 mmol)을 MeOH-H_2O (30 mL : 30 mL)에 녹인 혼합물을 24시간 동안 실온에서 교반하고 상기 혼합물을 에틸 아세테이트에 용해시켰다.

[0066] 유기층을 3N HCl 용액으로 세척하고 Na_2SO_4로 건조시킨 후 감압 농축한 후, 실리카 겔 크로마토그래피로 정제하여 화합물 9를 58% 수율로 얻었다. R_f = 0.18 (1:4 ethyl acetate: hexane).

[0067] ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.97 (s, 1H), 6.43 (s, 1H), 6.10-5.97 (m, 2H), 5.47-5.39 (m, 2H), 5.30 (d, J = 10.8 Hz, 2H), 4.73 (d, J = 5.6 Hz, 2H), 4.57 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 3.26-3.19 (m, 1H), 1.18 (d, J = 6.8 Hz, 6H).

[0068] 5. 화합물 10[6,7-디하이드로티에노[3,2-c]피리딘-5(4H)-일)(2,4-디하드록시-5-이소프로필페닐)메탄온] 합성

[0069] [반응식 3]

[0070] 

[0071] 반응식 3과 같은 방법으로 화합물 10을 합성하였다.

[0072] DMF(4mL)에 화합물 9(0.23 g, 0.82 mmol), 4,5,6,7-테트라하이드로티에노-[3,2-c]피리딘 하이드로클로라이드(0.20 g, 1.24 mmol), EDC(0.32 g, 1.65 mmol), HOBt(0.11 g, 0.82 mmol) 및 DIPEA(0.15 mL, 0.82 mmol)를 넣은 혼합물에 마이크로파를 조사(Biotage Initiator)하면서 3시간 동안 120℃ 조건으로 교반시킨 후 상기 혼합물

을 에틸 아세테이트로 용해시켰다.

[0073] 유기층을 1N HCl 용액으로 세척하고 Na_2SO_4로 건조시킨 후 감압 농축하였다.

[0074] MPLC (Biotage SNAP HP-Sil column)를 이용하여 상기 농축물을 정제하여 중간 화합물을 얻었다 R_f = 0.21 (1:4 ethyl acetate: hexane).

[0075] 상기 중간 화합물과 Pd $Cl_2(PPh_3)_2$ (40 mg) 및 포름산암모늄(ammonium formate; 400 mg)이 녹아있는 THF 4 mL을 혼합하고 마이크로파를 조사하면서 120℃ 조건을 30분간 교반한 후, 상기 반응 혼합물을 에틸 아세테이트로 희석하였다.

[0076] 유기층을 물로 세척하고 Na_2SO_4로 건조시킨 후 감압 농축하였다.

[0077] 그 후 MPLC (Biotage SNAP HP-Sil column)를 이용하여 상기 농축물을 정제하여 화합물 10을 32% 수율로 얻었다 R_f = 0.27 (3:7 ethyl acetate: hexane).

[0078] ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.15-7.14 (m, 2H), 6.76 (d, *J* = 5.2 Hz, 1H), 6.41 (s, 1H), 4.74 (s, 2H), 3.95 (t, *J* = 5.6 Hz, 5.6 Hz, 2H), 3.22-3.16 (m, 1H), 3.04 (t, *J* = 4.8 Hz, 5.6 Hz, 2H), 1.21 (d, *J* = 7.2 Hz, 6H)

[0079] **<실시예 2> 티에노피리딘(thienopyridine) 화합물의 Hsp 90 결합부위 확인**

[0080] Molecular Graphics Laboratory of the Scripps Research Institute로 부터제공받은 AutoDock 프로그램을 이용하여 화합물 10의 결합부위를 확인하였다.

[0081] *In silico* 에서 60_60_60 배율로 확대된 사람 Hsp90 (PDB code: 2XJX)의 N-말단 도메인의 중심 사각부위 및 0.375 Å 간격이 리간드 도킹 실험을 위해 선택되었다.

[0082] 그 결과, 도 1과 같이 화합물 10이 사람 Hsp90 단백질의 N-말단 ATP 포켓에 결합하는 것을 확인할 수 있다.

[0083] **<실시예 3> 티에노피리딘(thienopyridine) 유도체의 효과 확인**

[0084] 1. 물질

[0085] EGFR, Her2, Met, Akt, c-Raf, Hsp90, Hsp70, PARP, cleaved caspase8, cleaved caspase3, caspase3, Bax 및 β-actin 특이적 항체를 Cell Signaling Technology(Beverly, MA)에서 구입하여 사용하였다.

[0086] Bcl-2, Goat-anti-rabbit IgG 홀스래디쉬 페록시다아제 및 Goat-anti-mouse IgG 홀스래디쉬 페록시다아제를 Santa Cruz Biotechnology(Paso Robles, CA)에서 구입하여 사용하였다.

[0087] Radio-immunoprecipitat-ion Assay(RIPA) 버퍼, 태아소혈청(FBS), 스트렙토마이신/페니실린, Halt™ 프로테아제 및 포스파타아제 억제제 칵테일(100X)을 Thermo Scientific (Waltham, MA)에서 구입하여 사용하였다.

[0088] Cell Titer 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay kit를 Promega(Fithburg, WI)에서 구입하여 사용하였다.

[0089] 2. 세포 배양

[0090] 제피티닙-저항성 비소세포성 폐암 세포주인 H1975 세포(구입처)를 L-글루타민, 스트렙토마이신(500 mg/mL), 페니실린(100 units/mL), 및 10% 태아소혈청(FBS)이 포함된 RPMI 1640 배지를 이용하여 37℃, 5% CO_2 배양 조건에서 세포를 성장시켰다.

[0091] 3. 티에노피리딘(thienopyridine) 유도체에 의한 세포 증식 효과 확인

[0092] 96-웰 플레이트 한 웰당 H1975 세포를 3000개씩 접종하고 최종 부피가 100 mL이 되도록 배지를 분주하고 세포가 부착되도록 하룻밤 동안 배양하였다.

[0093] 그 다음날, 0, 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 20 및 30 μM 농도의 화합물 10과 대조군으로 1% DMSO를 각 웰에 첨가하고, 37℃에서 3일간 배양하였다.

[0094] Promega Cell Titer 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay를 이용하여 세포 생존도를 분석하였다.

[0095] 화합물 인큐베이션 후, 분석 기질 용액 20 mL를 각 웰에 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 추가로 배양한 후, Tecan Infinite F200 Pro plate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하고 그 값을 DMSO 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

[0096] 그 결과, 도 2와 같이 화합물 10에 의해 비소세포성 폐암 세포의 사멸이 유도된 것을 확인할 수 있었다.

[0097] 4. 웨스턴 블롯 확인

[0098] 100 mm 배양 디쉬에 H1975 세포를 1×10^{6} 씩 접종하고 하룻밤 동안 부착시켰다. 그 후, 화합물 10을 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1 및 2 μM 농도로 처리하고 24 시간 동안 추가 배양하였으며, 비교를 위해, 세포에 음성 대조군으로 1% DMSO와 양성대조군으로 1 mM 겔다나마이신을 처리하여 24 시간 동안 인큐베이트하였다.

[0099] 그 후, 각 세포를 얼음같이 차가운 용해버퍼(23mM Tris-HCl pH 7.6, 130mM NaCl, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)를 이용하여 수집하고 SDS-PAGE 레인당 용해물 30 mg을 분리시키고 PVDF 막(Bio-Rad)으로 옮겼다.

[0100] 5% 탈지유를 녹인 TBST로 상기 막을 블로킹한 후, EGFR, Her2, Met, Akt, c-Raf, Hsp90, Hsp70, PARP, 카스파제 3(caspase 3), 절단된 카스파제 3, 절단된 카스파제 8, Bcl-2, Bax 또는 β-Actin 항체로 인큐베이트하였다.

[0101] 그 후, 적절한 홀스래디쉬 페록시다아제가 연결된 2차 항체를 결합시키고 ECL 화학 발광(GE healthcare, USA)을 이용하여 제조사의 설명서에 따라 단백질을 시각화하였다.

[0102] 그 결과, 도 4와 같이 Hsp90 클라이언트 단백질인 EGFR, Her2, Met, c-Raf, Akt의 발현이 감소한 반면, Hsp70의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

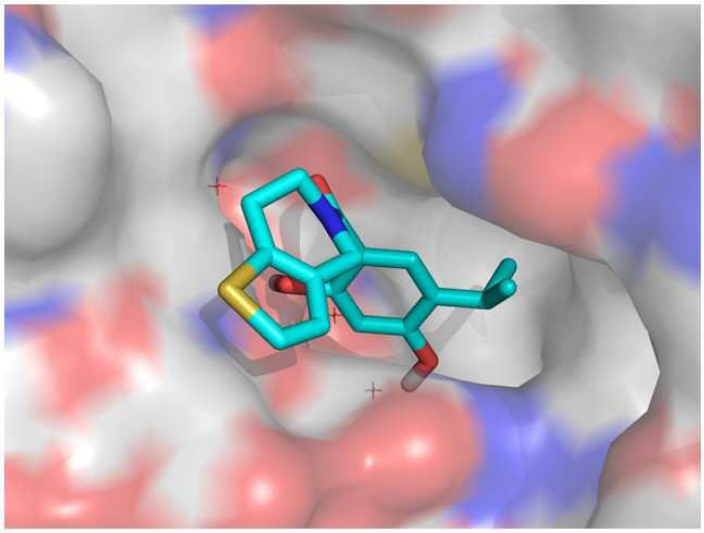
[0103] 또한 도 5와 같이 세포사멸 단백질인 PARP, 절단된 카스파제 8, 절단된 카스파제 3, Bcl-2 및 Bax의 발현이 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0104] 상기 결과로부터 본 발명의 티에노피리딘(thienopyridine) 유도체(화합물 10)는 암을 유발시키는 Hsp90 클라이언트 단백질의 발현을 억제하고 세포사멸을 유도하는 단백질을 발현시켜 효과적으로 비소세포성 폐암 세포를 사멸시키는 것을 확인할 수 있었다.

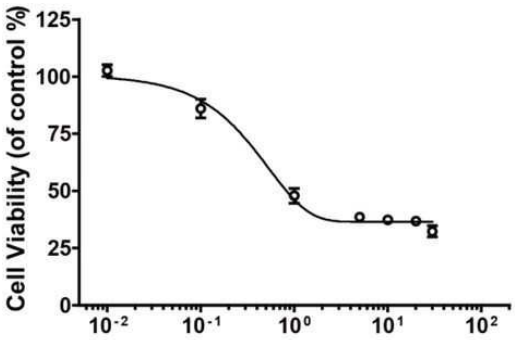
[0105] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

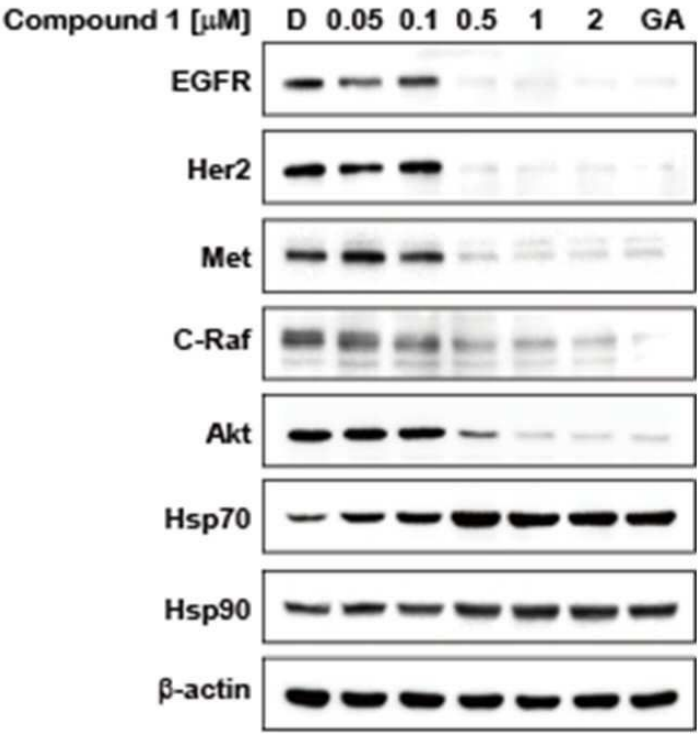
도면1



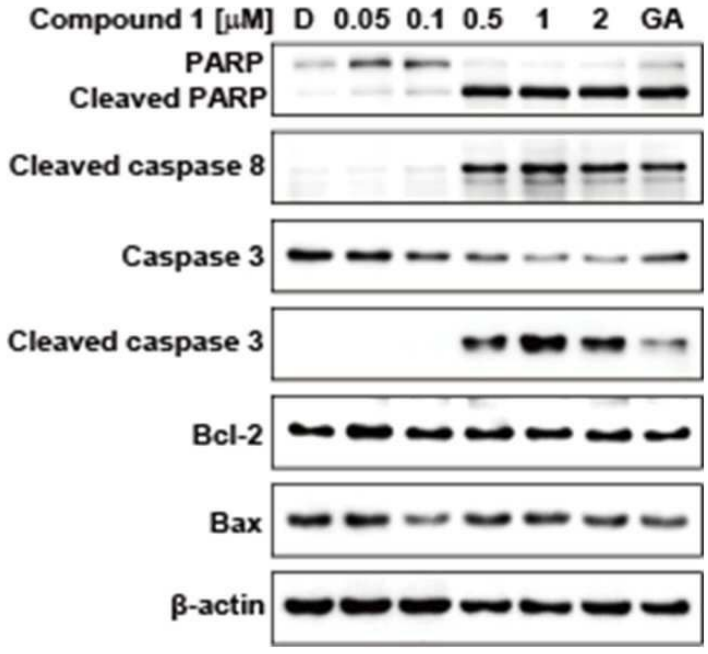
도면2


Cell Viability (of control %)
125
100
75
50
25
0
10-2
10-1
100
101
102

도면3


Compound 1 [μM] D 0.05 0.1 0.5 1 2 GA
EGFR
Her2
Met
C-Raf
Akt
Hsp70
Hsp90
β-actin

도면4


Compound 1 [μM] D 0.05 0.1 0.5 1 2 GA
PARP
Cleaved PARP
Cleaved caspase 8
Caspase 3
Cleaved caspase 3
Bcl-2
Bax
β-actin