



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0022759
(43) 공개일자 2020년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 311/58 (2006.01) A61K 31/352 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 311/58 (2013.01)
A61K 31/352 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0098788
(22) 출원일자 2018년08월23일
심사청구일자 2019년09월18일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
(72) 발명자
서재홍
경기도 과천시 관문로 166, 1018동 303호(중앙동, 주공아파트)
김지영
서울특별시 구로구 구로동로28길 49-2, 202호(구로동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 다해

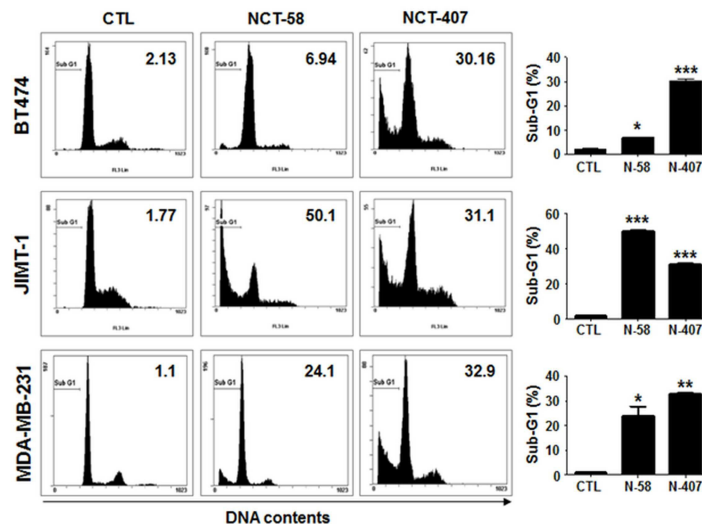
전체 청구항 수 : 총 10 항

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

(57) 요약

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

대표도 - 도4



- (52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
- (72) 발명자
김윤재
 경기도 광명시 목감로 88, 104동 807호(광명동, 현
 진에버빌아파트)
오은혜
 서울특별시 노원구 노원로 331, 311동 1003호(중계
 동, 시영3단지복련아파트)
이지우
 서울특별시 강남구 압구정로 113, 27동 901호(압구
 정동, 미성아파트)

안지혜

서울특별시 서초구 신반포로33길 30, 314동 602호
 (잠원동, 신반포9차아파트)

응웬콩트럼

서울시 관악구 관악로 1 서울대학교 약학대학 143
 동 502호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1720340 (HA17C0053)
 부처명 국립암센터 (보건복지부)
 연구관리전문기관 보건복지부
 연구사업명 암정복추진연구개발사업 암 중개융합연구(협동)
 연구과제명 HER2 양성 유방암의 내성 및 암전이 극복 HSP90 억제 혁신 신약 개발
 기 여 율 1/2
 주관기관 고려대학교 산학협력단
 연구기간 2017.12.01 ~ 2022.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HA17C0053020019
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 암정복추진연구개발사업
 연구과제명 HSP90 신 저해기전의 혁신신약 후보물질 도출
 기 여 율 1/2
 주관기관 서울대학교 약학대학
 연구기간 2017.12.01 ~ 2018.05.31

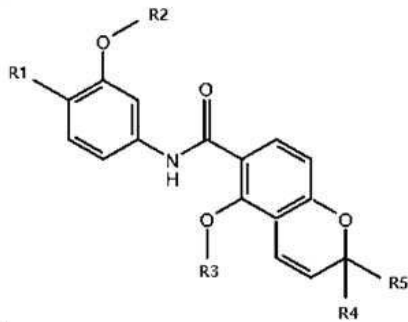
명세서

청구범위

청구항 1

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

[화학식 1]



상기 식에서,

R¹은 치환 또는 비치환 알콕시기이고;

R², R³, R⁴ 및 R⁵는 각각 독립적으로 수소 원자; 또는 C₁-C₂ 알킬기(alkyl)이고;

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

청구항 2

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

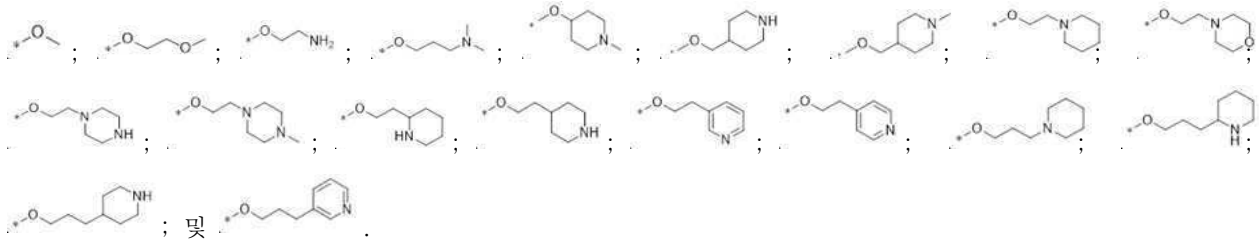
청구항 3

제1항에 있어서, 상기 R¹은, 메톡시기(methoxy), 2-메톡시-에톡시기(2-methoxy-ethoxy), 2-아미닐에톡시기(2-aminylethoxy), 2-메틸아미닐에톡시기(2-methylaminylethoxy), 2-디메틸아미닐에톡시기(2-dimethylaminylethoxy), 3-아미닐프로폭시기(3-aminylpropoxy), 3-메틸아미닐프로폭시기(3-methylaminylpropoxy), 3-디메틸아미닐프로폭시기(3-dimethylaminylpropoxy), (1-메틸피페리딘-4-일)옥시기((1-Methylpiperidin-4-yl)oxy), (피페리딘-4-일)메톡시기((1-Methylpiperidin-4-yl)methoxy), (1-메틸피페리딘-4-일)메톡시기((1-Methylpiperidin-4-yl)methoxy), (2-피페리딘-1-일)에톡시기(2-(piperidin-1-yl)ethoxy), (2-모르폴린-4-일)에톡시기((2-morpholin-4-yl)ethoxy), (2-피페라진-1-일)에톡시기((2-piperazine-1-yl)ethoxy), 2-(4-메틸피페라진-1-일)에톡시기(2-(4-methylpiperazine-1-yl)ethoxy), 2-(피페리딘-2-일)에톡시기((2-piperazine-2-yl)ethoxy), 2-(피페리딘-4-일)에톡시기((2-piperazine-4-yl)ethoxy), 2-(피리딘-3-일)에톡시기((2-pyridine-3-yl)ethoxy), 2-(피리딘-4-일)에톡시기((2-pyridine-4-yl)ethoxy), (3-피페리딘-1-일)프로폭시기(3-(piperidine-1-yl)propoxy), (3-피페리딘-2-일)프로폭시기(3-(piperidine-2-yl)propoxy), (3-피페리딘-4-일)프로폭시기(3-(piperidine-4-yl)propoxy), (3-피리딘-3-일)프로폭시기(3-(pyridine-3-yl)propoxy) 및 (3-피리딘-4-일)프로폭시기(3-(pyridine-4-yl)propoxy)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로

로 하는

청구항 4

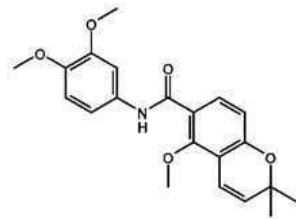
제1항에 있어서, 상기 R¹은 하기 그룹에서 선택되는 하나인 것인 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물:



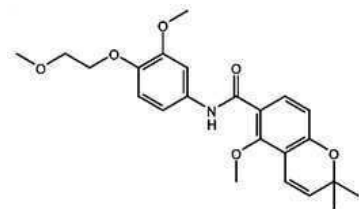
청구항 5

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

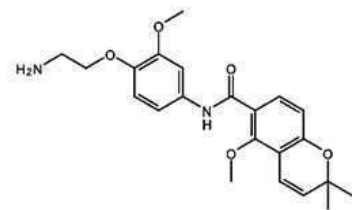
[화학식 2]



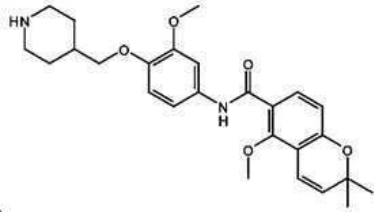
[화학식 3]



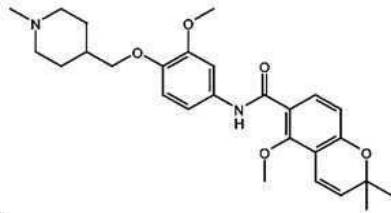
[화학식 4]



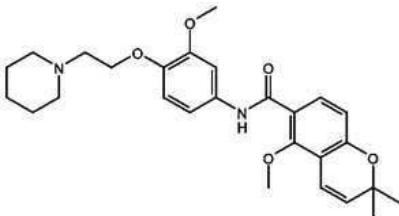
[화학식 11]



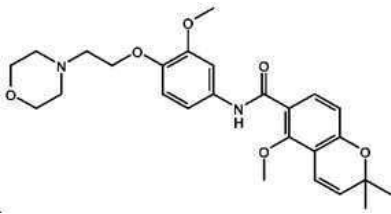
[화학식 12]



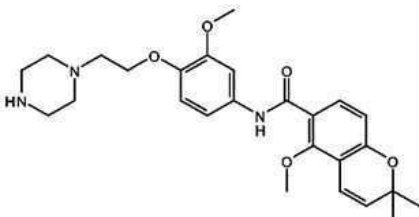
[화학식 13]



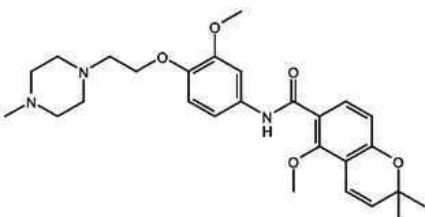
[화학식 14]



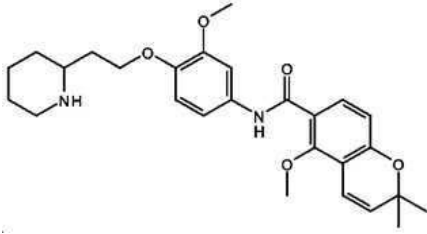
[화학식 15]



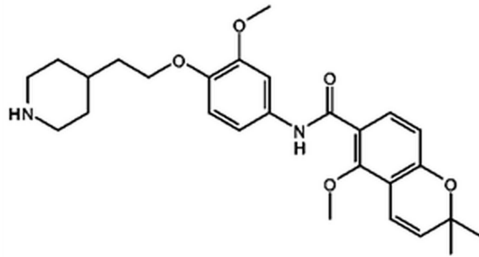
[화학식 16]



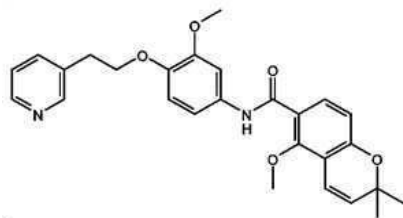
[화학식 17]



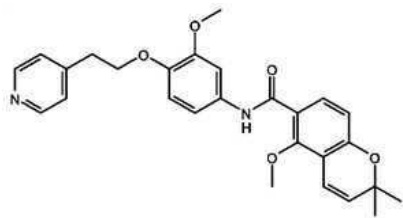
[화학식 18]



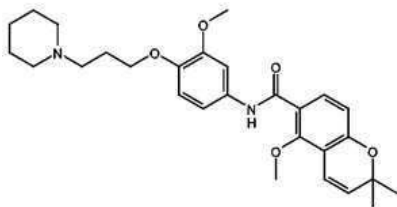
[화학식 19]



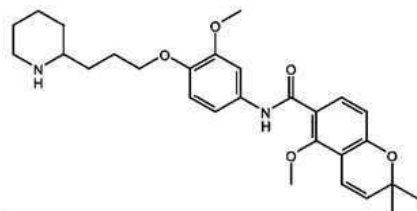
[화학식 20]



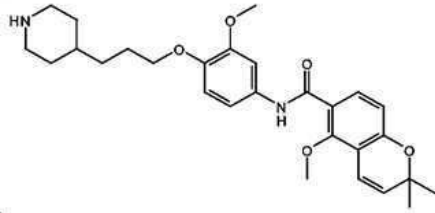
[화학식 21]



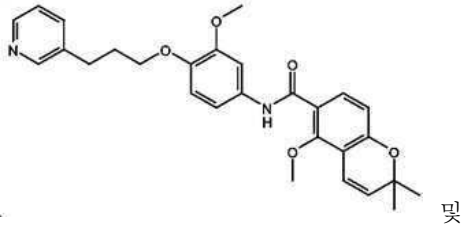
[화학식 22]



[화학식 23]

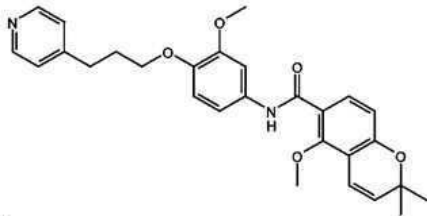


[화학식 24]



및

[화학식 25]



청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조성물은 Hsp90을 억제하여 항암 활성을 나타내는 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 암은 전립선암, 난소암, 폐암, 간암, 위암, 대장암, 췌장암, 담낭 및 담도암, 유방암, 백혈병, 식도암, 비호치킨 림프종, 갑상선암, 자궁경부암, 피부암의 원발성 암과 이로부터 기타 장기로 전이되어 유발되는 전이암 및 비정상적인 과다 세포 분열을 촉진하여 생성되는 종양성 세포 질환으로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상의 암인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 암은 유방암인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 유방암은 삼중음성 유방암 또는 HER2 양성 유방암인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 벤조파이란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 Hsp90(Heat shock protein 90)의 활성을 저해하여 항암 활성을 나타내는 신규한 벤조파이란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 국내외에서 유방암은 1990년대 이후로 계속 증가되어 2000년대에서는 모든 여성의 암중 1, 2위로 높은 발병률과 사망률을 나타내고 있다. HER2 양성 유방암은 암세포 막에 존재하는 막 단백질 수용체인 HER2 (human epidermal growth factor receptor 2)가 과발현된 암으로 전체 유방암 환자의 20~30%에서 나타나고, HER2 음성인 환자보다 예후가 좋지 않아 생존율이 현저히 떨어지며, 일반적으로 상용되는 세포독성 항암제에 대한 반응성이 매우 낮다.

[0004] Hsp90의 억제제는 신생혈관형성 관련 질병의 새롭고 효과적인 치료법으로 고려될 수 있으며, Hsp90 억제제는 신생혈관형성 관련 질병의 잠재적 화학치료제이다(Eccles, S.; Massey, A.; Raynaud, F.; Sharp, S.; Box, G.; Valenti, M.; Patterson, L.; de Haven Brandon, A.; Gowan, S.; Boxall, F. NVP-AUY922: a novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res.* 2008, 68, 2850).

[0005] HER2 양성 유방암 표적치료제인 단일클론항체 트라스투주맵(trastuzumab, 상품명: ®Herceptin)과 퍼투주맵(상품명: ®Perjeta) 및 T-DM1 (상품명: ®Kadcyla) 등이 개발되었으나 고가의 가격으로 환자에게 상당한 경제적 부담을 안겨준다. Trastuzumab이 HER2 양성 유방암 환자에 1차 치료제(First-line treatment)로 사용되고 있으나, 초기치료에서 약 40~50%의 환자에서 1차 내성을 나타내며, 초기반응이 좋은 환자에서도 90% 정도는 1년 내에 2차 내성을 나타냄. 이러한 내성은 재발 및 전이의 주요한 원인이 되며 환자의 생존율 감소에 결정적 역할을 하게 된다.

[0006] HER2는 Hsp의 주요 client protein중 하나로 Hsp에 의해 kinase activity의 활성이 직접적으로 조절된다. 따라서 Hsp 억제제는 궁극적으로 내성의 주요 원인이 되는 p95HER2의 활성화 및 HER2/HER3 dimerization을 직접적으로 억제 할 수 있으므로 Hsp 저해제는 HER2의 상위 표적치료제가 될 것이며 약물 내성 극복약물로서 가치가 높다. Hsp 저해제인 ansamycin에 의해 HER2의 발현 및 활성이 억제되는 것으로 처음 보고된 이후, HER2 양성 유방암에서 HER2의 활성화를 제어하기 위한 약물로 주목받아 현재까지 많은 Hsp 저해제의 유도체들이 개발되고 있는 실정이다.

[0007] 하지만 현재까지 임상시험 중인 Hsp90 저해제는 대부분 N-terminal Hsp90을 저해하는 것으로, 약리활성부족, 독성 및 Heat shock response가 유도되는 등 심각한 부작용으로 대부분 임상에 실패하거나 중단되었다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 본 발명의 신규한 벤조파이란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물이 C-terminal homology model 구조를 기반으로 Hsp90 C-terminal에 강력한 결합력을 부여하여 Hsp90의 활성을 억제하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 Hsp90(Heat shock protein 90)의 활성을 저해하여 항암 활성을 나타내는 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화

물을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물은 HSP90과 HSF-1의 complex 구조에 영향을 미치지 않아 HSF-1의 활성화나 HSP gene들의 발현을 유도하지 않으므로 효과적으로 암세포의 사멸을 촉진할 수 있어, 항암제의 유효성분으로 사용될 수 있다.

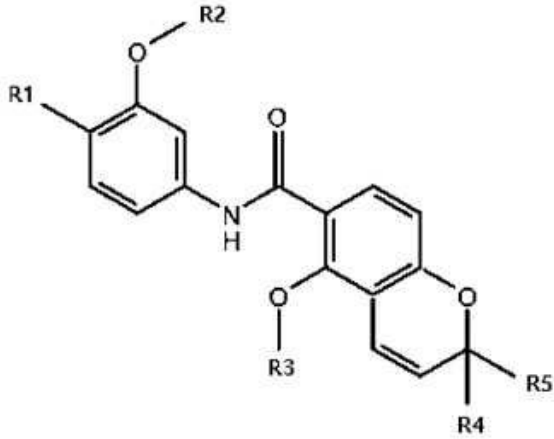
도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 본 발명의 화합물을 처리한 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231의 생존율 측정된 결과이다.
- 도 2는 유방암 세포주에, 본 발명의 화합물을 농도별로 처리한 후, 세포생존율을 측정된 결과이다.
- 도 3은 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에, 본 발명의 화합물을 처리한 후, 세포형태 변화를 조사한 것이다.
- 도 4는 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에, 본 발명의 화합물을 처리한 후, 세포사멸율을 측정된 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 화합물을 처리한 유방암 세포에서, 세포사멸 관련 인자들의 발현을 측정된 결과이다.
- 도 6은 본 발명의 화합물을 처리한 후, HSP90 clients의 발현을 측정된 결과이다.
- 도 7은 인간 전립선암 세포주 DU145, 대장암 세포주 HCT116, 간암 세포주 HepG2 및 난소암 세포주 SKOV-3에, 본 발명의 화합물을 처리한 후, 세포생존율을 측정된 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명에서는 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물이 casapse-3 활성을 증가시키고, EGFR, STAT3의 발현뿐만 아니라, 활성화형인 phospho-EGFR, phospho-STAT3의 발현을 현저히 감소시켰으며, AKT, ERK, Cyclin D1 및 Survivin의 발현을 현저히 억제하여 효과적으로 암세포의 사멸을 촉진하는 것을 확인하였다.
- [0020] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물에 관한 것이다.

[0021] [화학식 1]



[0022]

[0023] 상기 식에서, R¹은 치환 또는 비치환 알콕시기이고; R², R³, R⁴ 및 R⁵는 각각 독립적으로 수소 원자; 또는 C₁-C₂ 알킬기(alkyl)이고; 상기 R¹에서 치환 알콕시의 경우, 상기 치환기는 질소 원자; 산소 원자; 알킬기; 또는 C₁-C₆ 알킬기(alkyl)로 치환된 헤테로 고리형 알킬기(alkyl)(헤테로 원자는 질소, 산소, 황 중 하나 이상을 포함하며, 헤테로 고리는 5각형, 6각형고리이다.)이다.

[0024] 본 발명에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 벤조파이란의 유도체이다.

[0025] 본 발명에서 용어 “치환(substitution)”은 화합물의 분자 중에 포함되는 원자 또는 원자단을 다른 원자 또는 원자단으로 바꾸어 놓는 반응이다.

[0026] 본 발명에서 용어 “알콕시기(alkoxy group)”는 산소와 결합된 알킬기(O-alkyl group)를 의미하는 것으로, 본 발명에서 메톡시기(C₁), 에톡시기(C₂), 프로폭시기(C₃), 부톡시기(C₄), 펜틸옥시기(C₅), 헥실옥시기(C₆), 헵틸옥시기(C₇) 및 옥틸옥시(C₈)를 포함하는 C₁-C₈ 알콕시기로 구성된 군에서 선택되는 것일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명에서, 용어 "C₁-C₂ 알킬"은 1 내지 2개의 탄소 원자를 갖는, 오직 탄소와 수소 원자로만 이루어진 1가 선형 탄화수소 잔기를 의미한다. 용어 "C₁-C₆ 알킬"은 1 내지 6개의 탄소 원자를 갖는, 오직 탄소와 수소 원자로만 이루어진 1가 선형 또는 분지형 또는 고리형 포화된 탄화수소 잔기를 의미한다. 이러한 알킬기의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 아이소프로필, 부틸, 아이소부틸, 2급-부틸, 3급-부틸, 펜틸, n-헥실 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. "분지형 알킬"의 예는 아이소프로필, 아이소부틸, 3급-부틸 등이 있다. "고리형 알킬"은 탄소수 3 - 6 개의 고리형 알킬기이고, 그 예로는, 시클로프로필기, 시클로부틸기, 시클로펜틸기 또는 시클로헥실기 등이 있다.

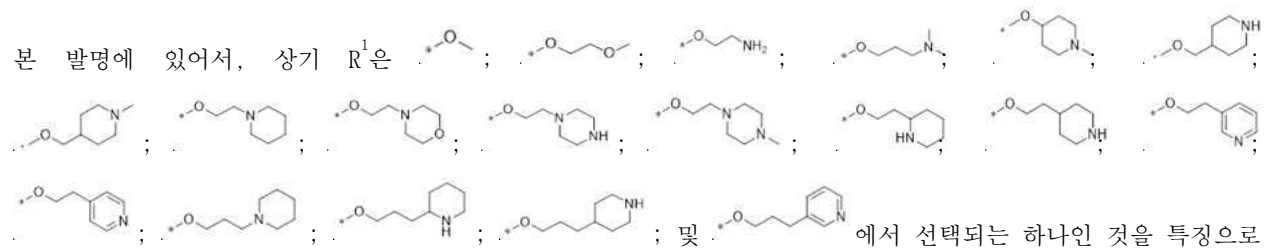
[0028] 본 발명에서, 용어 "헤테로 고리"는 헤테로 사이클릴이라고 일컫으며, 탄소 원자 이외에 N, O 및 S로부터 선택되는 1, 2 또는 3개의 고리 헤테로원자를 포함하는, 4 내지 9개의 고리 원자의 포화되거나 부분적으로 불포화된 카보사이클릭 고리를 나타낸다. 두 고리는 2개의 공통의 고리 원자를 갖는 2개의 고리로 구성됨을 의미하는데, 즉, 두 고리를 분리하는 다리는 단일 결합이거나 1 또는 2개의 고리 원자의 쇠이다. 상기 헤테로사이클릴 고리는 본원에서 정의된 바와 같이 치환되거나 비치환될 수 있다. 예를 들어, 헤테로사이클릴은 아제티디닐, 피롤리디닐, 테트라하이드로푸라닐, 테트라하이드로-티에닐, 피라졸리디닐, 이미다졸리디닐, 옥사졸리디닐, 아이소옥사졸리디닐, 티아졸리디닐, 피페리디닐, 테트라하이드로피라닐, 테트라하이드로티오피라닐, 피페라지닐, 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 1,1-다이옥소-티오모르폴린-4-일, 아제파닐, 다이아제파닐, 호모피페라지닐, 옥사제파닐, 다이하이드로인돌릴, 다이하이드로푸릴, 다이하이드로이미다졸리닐, 다이하이드로옥사졸릴, 테트라하이드로피리디닐, 다이하이드로피라닐 또는 벤조다이옥솔릴이다. 한 구현예에서 헤테로사이클릴은 피페라지닐, 모르폴리닐, 벤조다이옥솔릴 또는 다이하이드로인돌릴이고, 이들은 본원에 기재된 바와 같이 각각 치환되거나 비치환될 수 있다.

[0029] 본 발명에서 용어 “고리형”이란, 유기 화합물의 골격에서 연쇄된 양단이 이어져 고리모양이 된 구조를

말한다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 R¹의 헤테로 고리형 알킬기는 피리딘, 피페리딘, 모르폴린 또는 피페라진인 것으로 할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 R¹은, 메톡시기(methoxy), 2-메톡시-에톡시기(2-methoxy-ethoxy), 2-아미닐에톡시기(2-aminylethoxy), 2-메틸아미닐에톡시기(2-methylaminylethoxy), 2-디메틸아미닐에톡시기(2-dimethylaminylethoxy), 3-아미닐프로폭시기(3-aminylpropoxy), 3-메틸아미닐프로폭시기(3-methylaminylpropoxy), 3-디메틸아미닐프로폭시기(3-dimethylaminylpropoxy), (1-메틸피페리딘-4-일)옥시기((1-Methylpiperidin-4-yl)oxy), (피페리딘-4-일)메톡시기((1-Methylpiperidin-4-yl)methoxy), (1-메틸피페리딘-4-일)메톡시기((1-Methylpiperidin-4-yl)methoxy), (2-피페리딘-1-일)에톡시기(2-(piperidin-1-yl)ethoxy), (2-모르폴린-4-일)에톡시기((2-morpholin-4-yl)ethoxy), (2-피페라진-1-일)에톡시기((2-piperazine-1-yl)ethoxy), 2-(4-메틸피페라진-1-일)에톡시기(2-(4-methylpiperazine-1-yl)ethoxy), 2-(피페리딘-2-일)에톡시기((2-piperazine-2-yl)ethoxy), 2-(피페리딘-4-일)에톡시기((2-piperazine-4-yl)ethoxy), 2-(피리딘-3-일)에톡시기((2-pyridine-3-yl)ethoxy), 2-(피리딘-4-일)에톡시기((2-pyridine-4-yl)ethoxy), (3-피페리딘-1-일)프로폭시기(3-(piperidine-1-yl)propoxy), (3-피페리딘-2-일)프로폭시기(3-(piperidine-2-yl)propoxy), (3-피페리딘-4-일)프로폭시기(3-(piperidine-4-yl)propoxy), (3-피리딘-3-일)프로폭시기(3-(pyridine-3-yl)propoxy) 및 (3-피리딘-4-일)프로폭시기(3-(pyridine-4-yl)propoxy)로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 R¹은 에서 선택되는 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0033] 본 발명에 있어서, 하기 화학식 중 어느 하나로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

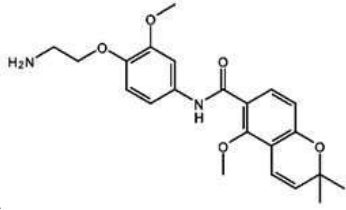
[0034] [화학식 2]

[0035]

[0036] [화학식 3]

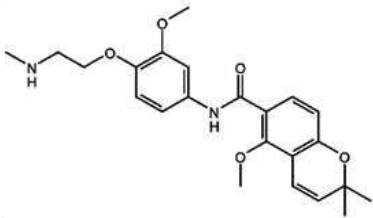
[0037]

[0038] [화학식 4]



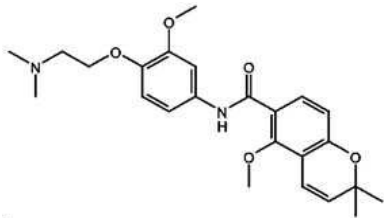
[0039]

[0040] [화학식 5]



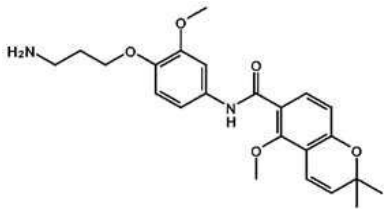
[0041]

[0042] [화학식 6]



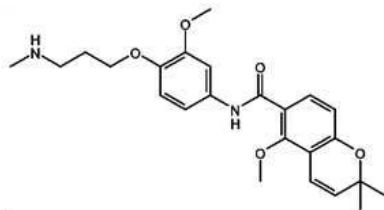
[0043]

[0044] [화학식 7]



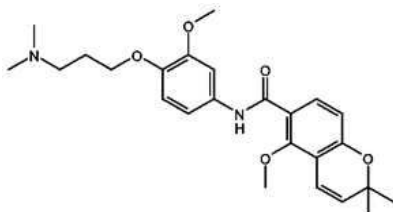
[0045]

[0046] [화학식 8]



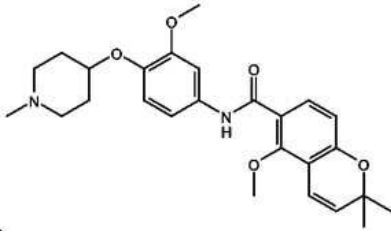
[0047]

[0048] [화학식 9]



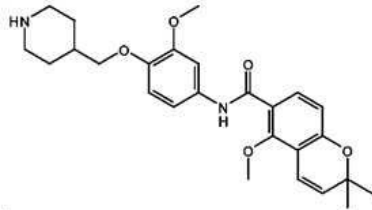
[0049]

[0050] [화학식 10]



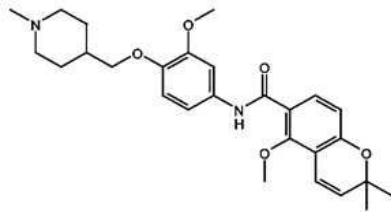
[0051]

[0052] [화학식 11]



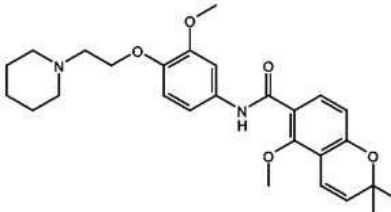
[0053]

[0054] [화학식 12]



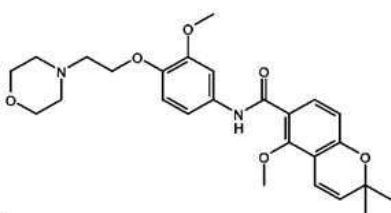
[0055]

[0056] [화학식 13]



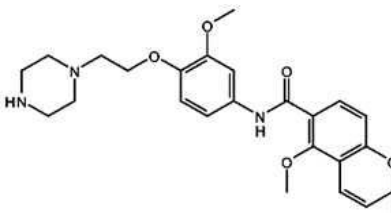
[0057]

[0058] [화학식 14]



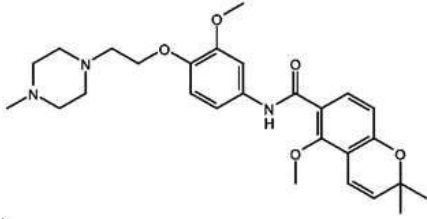
[0059]

[0060] [화학식 15]



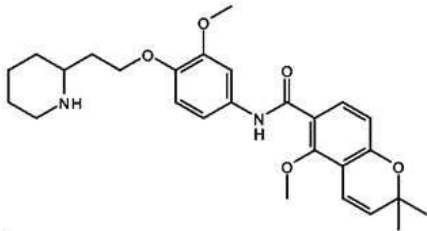
[0061]

[0062] [화학식 16]



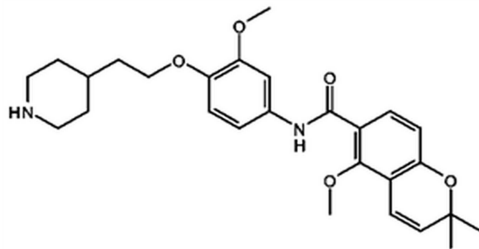
[0063]

[0064] [화학식 17]



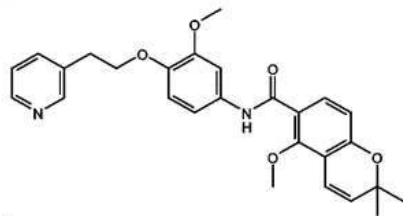
[0065]

[0066] [화학식 18]



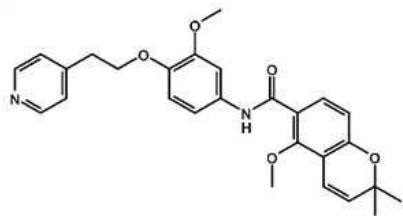
[0067]

[0068] [화학식 19]



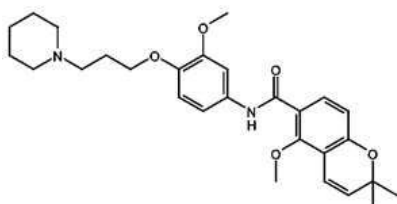
[0069]

[0070] [화학식 20]



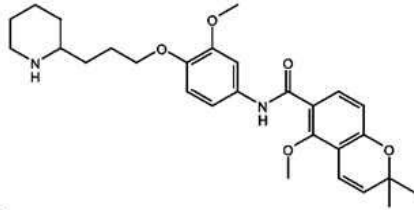
[0071]

[0072] [화학식 21]



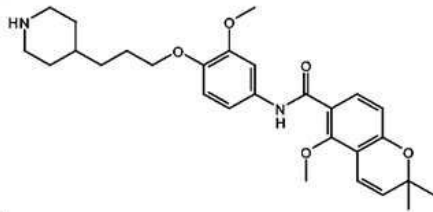
[0073]

[0074] [화학식 22]



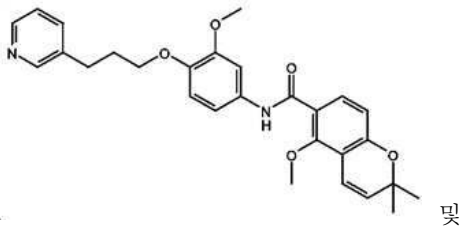
[0075]

[0076] [화학식 23]



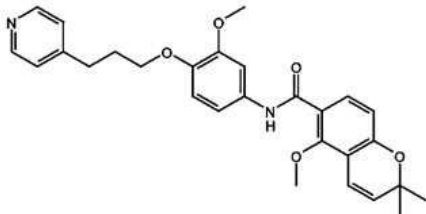
[0077]

[0078] [화학식 24]



[0079]

[0080] [화학식 25]



[0081]

[0082] 본 발명에서, 신규한 벤조파이란 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물이 C-terminal homology model 구조를 기반으로 Hsp90 C-terminal에 강력한 결합력을 부여하여 Hsp90의 활성을 억제하였다.

[0083] 본 발명의 화합물은 염, 특히 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 존재할 수 있다. 염으로는 약학적으로 허용가능한 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 임의의 모든 유기 또는 무기부가염을 의미한다.

[0084] 본 발명에서, 화학식 1로 표시되는 신규한 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트

로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

- [0085] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 화학식 1로 표시되는 신규한 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 동량의 화학식 1로 표시되는 신규한 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.
- [0086] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.
- [0087] 발명에서, 제조된 신규한 벤조파이란 유도체는 제조 후, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 분리 정제한 후 핵자기 공명에 의해 분자구조를 확인할 수 있다.
- [0088] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그 용매화물을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0089] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 Hsp90을 억제하여 항암 활성을 나타내는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0090] 본 발명에 있어서, “조성물”은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0091] 본 발명에서, 열충격 단백질군(heat-shock protein families; HSPs)과 같은 분자샤페론은 ATP 의존적인 구조 변화를 통해 클라이언트 단백질의 접힘을 조절하여 초기 단백질(nascent proteins)의 활성화, 손상된 단백질의 재접힘이나 분해를 도와주는 단백질이다. 또한, 클라이언트 단백질은 분자샤페론과의 결합을 통해 집합 현상(aggregation)을 회피하며 이들의 결합은 클라이언트 단백질의 막 이동(membrane translocation)을 통해 세포 내 퇴적(intracellular deposition)을 도와준다.
- [0092] 열충격 단백질군의 하나인 Hsp90의 분자 샤페론 기능은 세포의 신호 전달 경로에 관계 있는 다양한 클라이언트 단백질의 안정성과 활성화에 필요하다고 알려져 있다. 외부의 자극을 받지 않는 정상 조건에서 Hsp90의 양은 세포내 단백질의 1~2%를 차지하지만, 외부의 자극을 받는 조건에서는 Hsp90의 양이 두 배 정도 증가한다. 클라이언트 단백질의 암유발 돌연변이는 더 높은 수준의 Hsp90 기능을 요구하고 Hsp90의 과발현으로 이어지며, 정상 조직에 비해 과발현된 Hsp90은 암세포의 공통된 특징이다(Bagatell, R.; Whitesell, L. Altered Hsp90 function in cancer: A unique therapeutic opportunity. *Mol. Cancer Ther.* 2004, 3, 1021-1030).
- [0093] ErbB2, Src, Met 티로신 키나아제, MEK 1/2(mitogen-activated protein kinase kinase), Akt, Raf-1, 사이클린 의존성 키나아제(Cyclin-dependent serine kinases), 스테로이드 호르몬 수용체, 말단소체복원효소(telomerase), 금속단백질-2(MMP-2), HIF-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α)를 포함하는 Hsp90 클라이언트 단백질은 세포의 생존, 증식, 침범, 전이, 신생혈관형성 등을 포함하는 다양한 신호 전달 경로 상에 존재하고 악성 표현형에 기여한다고 알려져 있다(Eustace, B. K.; Sakurai, T.; Stewart, J. K.; Yimlamai, D.; Unger, C.; Zehetmeier, C.; Lain, B.; Torella, C.; Henning, S. W.; Beste, G.; Scroggins, B. T.; Neckers, L.; Ilag, L. L.; Jay, D. G. Functional proteomic screens reveal an essential extracellular role for hsp90 alpha in cancer cell invasiveness. *Nat. Cell Biol.* 2004, 6, 507-514).
- [0094] 본 발명에 있어서, 상기 암은 전립선암, 난소암, 폐암, 간암, 위암, 대장암, 췌장암, 담낭 및 담도암, 유방암, 백혈병, 식도암, 비호치킨 림프종, 갑상선암, 자궁경부암, 피부암의 원발성 암과 이로부터 기타 장기로 전이되어 유발되는 전이암 및 비정상적인 과다 세포 분열을 촉진하여 생성되는 종양성 세포 질환으로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상의 암인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0095] 본 발명에 있어서, 상기 암은 유방암인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 유방암은 삼중음성 유방암 또는 HER2 양성 유방암인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0096] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명의 벤조파이란 유도체 NCT-58, NCT-407 약물을 유방암 세포주에 처리하였을

때, casapse 활성이 증가하고, 삼중음성유방암의 세포 침투, 이동 및 암전이와 관련된 HSP90의 대표적 client인 EGFR, STAT3의 발현뿐만 아니라, 활성화 형인 phospho-EGFR, phospho-STAT3의 발현을 현저히 감소시켰으며, AKT, ERK, Cyclin D1 및 Survivin의 발현을 현저히 억제하여, 암세포의 사멸을 유도함을 확인하였다(도 4, 도 5 및 도 6).

[0097] 또한, NCT 44, NCT 50 및 NCT 58이 테구엘린에 비해 용해도가 우수한 것을 확인하였다.

[0098] 본 발명의 약학적 조성물은 다양한 경구 또는 비경구투여 형태로 제형화할 수 있다. 경구투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/ 또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유하고 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.

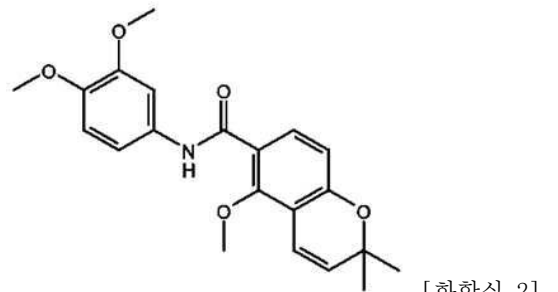
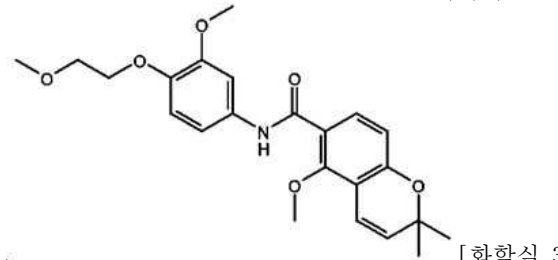
[0099] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 하는 약학 조성물은 비경구투여할 수 있으며, 비경구투여는 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부내 주사를 주입하는 방법에 의한다. 이때, 비경구투여용 제형으로 제제화하기 위하여 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다. 유효성분으로서 화학식 1의 화합물은 사람을 포함하는 포유동물에 대해서 하루 0.1 내지 500mg/kg(체중), 바람직하게는 0.5 내지 100mg/kg(체중)의 양으로 1일 1회 또는 분할하여 경구 또는 비경구 경로를 통해 투여할 수 있다.

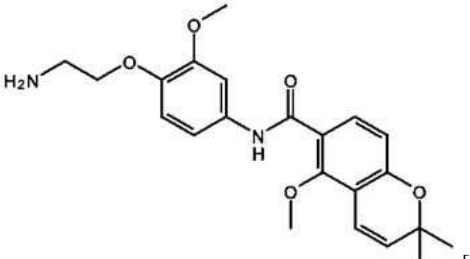
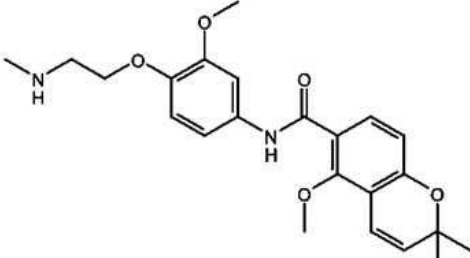
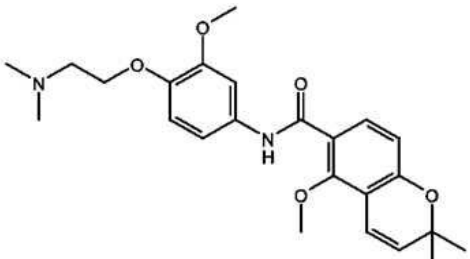
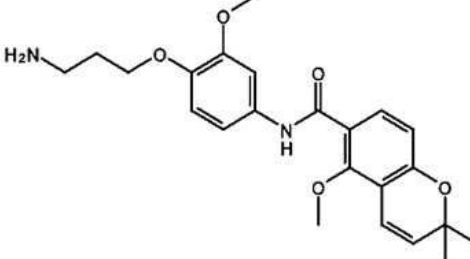
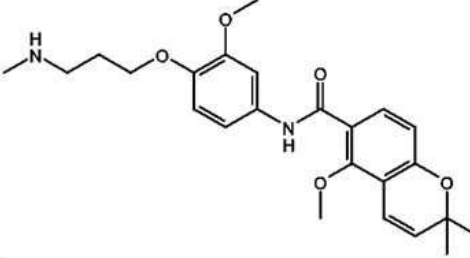
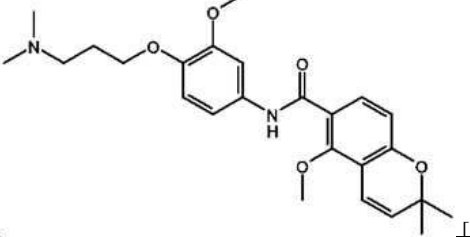
[0100] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

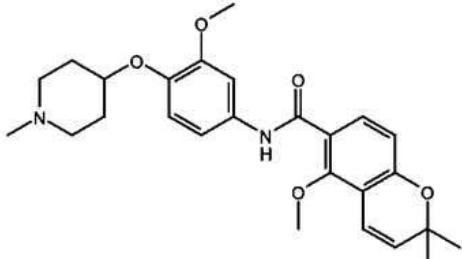
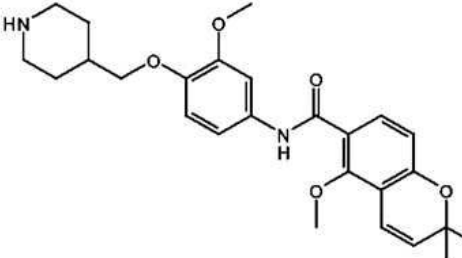
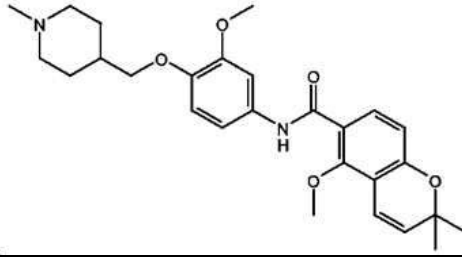
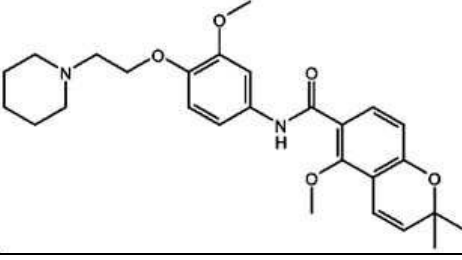
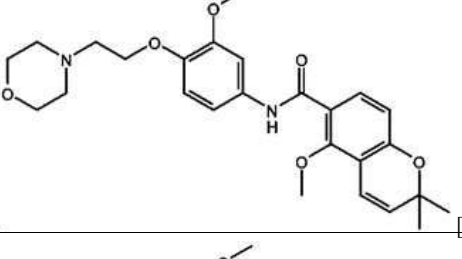
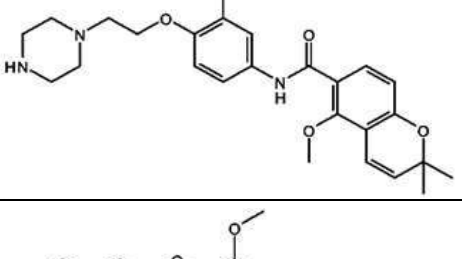
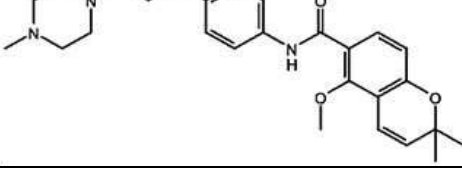
[0101] 본 발명에 따른 화학식 1의 신규한 벤조피리란 유도체의 화합물명 및 구조를 하기 표 1에 정리하였다.

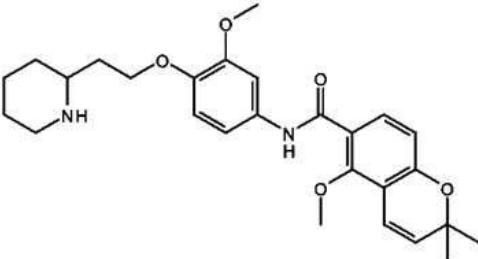
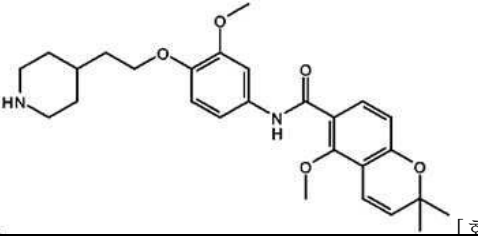
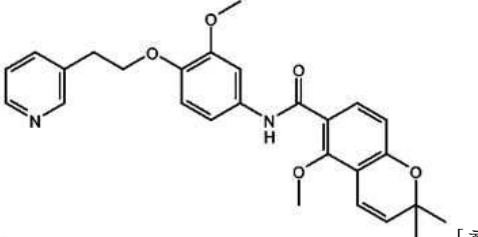
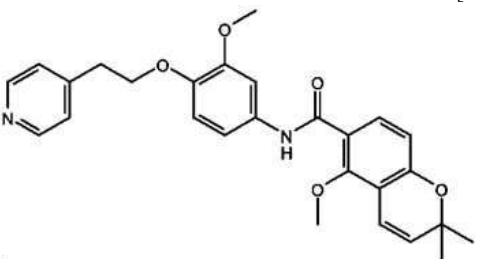
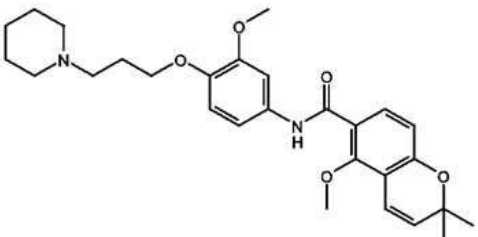
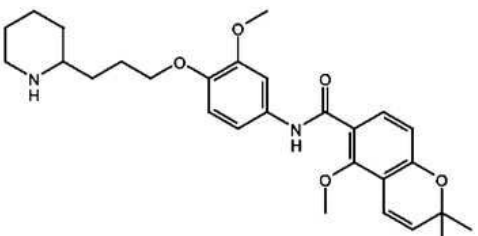
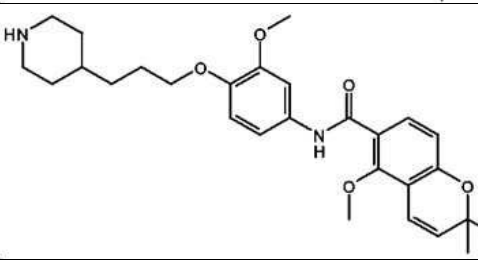
표 1

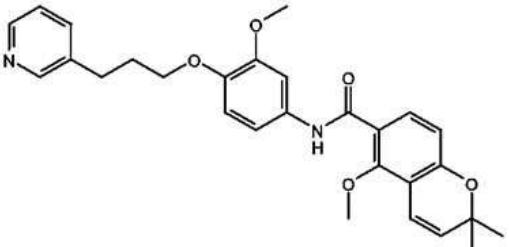
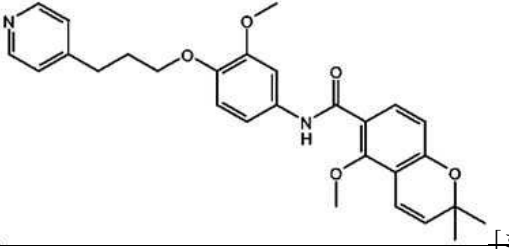
[0102]

화합물명	구조
1 NCT-88	 <p style="text-align: right;">[화학식 2]</p>
2 NCT-368	 <p style="text-align: right;">[화학식 3]</p>

3	NCT-66	 <p>[화학식 4]</p>
4	NCT-82	 <p>[화학식 5]</p>
5	NCT-69	 <p>[화학식 6]</p>
6	NCT-96	 <p>[화학식 7]</p>
7	NCT-101	 <p>[화학식 8]</p>
8	NCT-55	 <p>[화학식 9]</p>

9	NCT-29	 <p>[화합식 10]</p>
10	NCT-375	 <p>[화합식 11]</p>
11	NCT-385	 <p>[화합식 12]</p>
12	NCT-20	 <p>[화합식 13]</p>
13	NCT-21	 <p>[화합식 14]</p>
14	NCT-43	 <p>[화합식 15]</p>
15	NCT-25	 <p>[화합식 16]</p>

16	NCT-58	 <p>[화학식 17]</p>
17	NCT-44	 <p>[화학식 18]</p>
18	NCT-80	 <p>[화학식 19]</p>
19	NCT-50	 <p>[화학식 20]</p>
20	NCT-364	 <p>[화학식 21]</p>
21	NCT-407	 <p>[화학식 22]</p>
22	NCT-394	 <p>[화학식 23]</p>

23	NCT-377	 <p style="text-align: right;">[화학식 24]</p>
24	NCT-383	 <p style="text-align: right;">[화학식 25]</p>

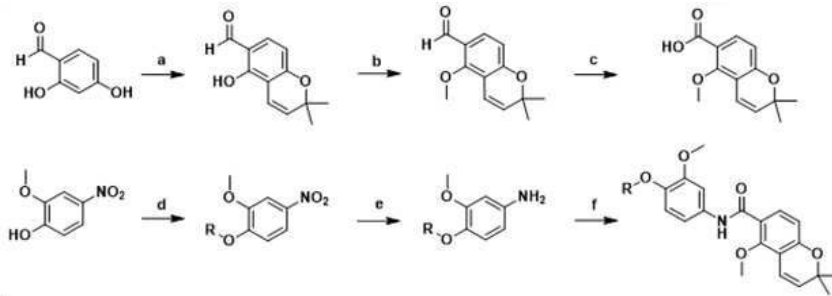
[0104] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0106] **실시예 1: 화합물 제조**

[0107] 모든 화학 시약은 상업적으로 이용 가능한 것을 사용하였다. 실리카겔 컬럼 크로마토 그래피는 실리카겔 230-400 메쉬, Merck에서 수행하였다.

[0108] ¹H NMR 스펙트럼은 JEOL JNM-LA 300(300 MHz), 400(400 MHz), 500(500 MHz)에서 기록되었다.

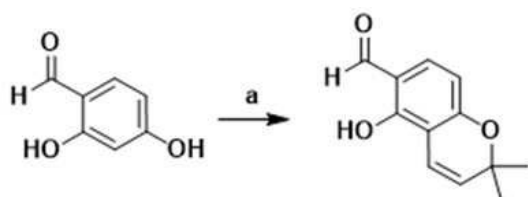
[0109] 하기 구조식은 화합물의 제조 방법을 정리한 것이다.



[0110] .

[0111] 시약 및 조건은 (a) 3-methyl-but-2-enal, pyridine, 140 °C ,o.n.; (b)MeI, K₂CO₃, DMF, 70 °C, 2h; (c)H₂O₂, NaH₂PO₄, NaClO₂, AC, ,r.t., 2h; (d)K₂CO₃, DMF, 70 °C, 3h; (e)10% Pd/C, H₂; (g)DCM, r.t, 2h; (f)EDC-HCl, TEA, HOBt, DCM이다.

[0113] 1.1. 5-Hydroxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carbaldehyde의 제조

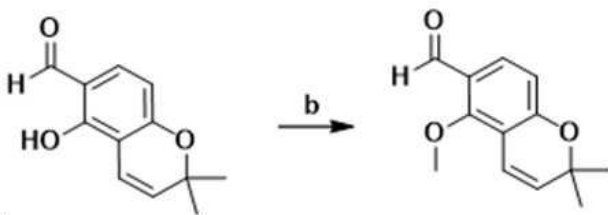


[0114] .

[0115] 질소가 공급되는 조건에서 피리딘 (50 ml)에 2, 4-dihydroxybenzaldehyde (5.53 g, 40 mmol)를 용해시킨 혼합 용액에 2, 3-methylbutenal (2 ml, 20 mmol)를 첨가 후 전열사반 (sand bath)를 이용하여 반응 온도를 140 °C로 유지시키고 24시간 교반하였다. 이후, 전열사반 제거 후 반응기를 실온으로 식히고 1N HCl로 중화시킨 뒤, EtOAc (100 ml)와 물 (100 ml)로 추출하였다. 추출된 유기층을 MgSO₄로 건조시키고 감압 후 농축하였다. EtOAc/Hex (1:4)를 용출 용매로 실리카겔 (230-400 mesh) 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 5-Hydroxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carbaldehyde 를 수득하였다.

[0116] yellow solid (1.35g, 32%). ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 11.62 (s, 1H,OH), 9.63 (s, 1H,-CHO), 7.26 (d, 1H, J = 8.43 Hz, H7-chromene), 6.66 (d, 1H, J = 10.05 Hz, H4-chromene), 6.40 (dd, 1H, J = 8.61 Hz, 0.72 Hz, H8-chromene), 5.58 (d, 1H, 10.08 Hz, H3-chromene), 1.49 (s, 6H, CH₃⁻).

[0118] 1.2. 5-Methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carbaldehyde 의 제조

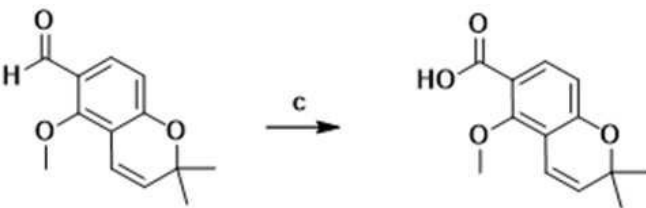


[0119] .

[0120] DMF에 5-hydroxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carbaldehyde (1.35g, 6.6 mmol) 를 용해한 혼합용액에 포타슘카보네이트 (3.69 g, 26.7 mmol)와 iodomethane (1.24 ml, 19.9 mmol)을 첨가한 후 질소가 주입되는 조건으로 70°C에서 3시간 교반하였다. 이후 전열사반을 제거하여 반응 온도를 실온으로 낮춘 뒤 물 (20 ml)을 첨가하여 반응을 종료하였다. 혼합물질을 EtOAc (20 ml x 2) 와 brine (25 ml) 로 추출 하고 MgSO₄로 건조 후 감압-농축 하였다. EtOAc/Hex (7:3) 의 용출용매로 실리카겔 (230-400 mesh) 칼럼 크로마토그래피로 정제하여 5-Methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carbaldehyde를 수득하였다.

[0121] brown oil (1.05 g, 72%). ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 10.15 (s, 1H,-CHO), 7.63 (d, 1H, J = 8.58 Hz, H7-chromene), 6.62 (d, 1H, J = 8.61 Hz, H4-chromene), 6.57 (d, 1H, J = 10.08 Hz, H8-chromene), 5.67 (d, 1H J = 10.08, H3-chromene), 3.88 (s, 3H, CH₃O⁻), 1.44 (s, 6H, CH₃⁻).

[0123] 1.3. 5-Methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carboxylic acid 의 제조



[0124] .

[0125] 아세트나이트릴 (20 ml)에 5-Methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carbaldehyde (1.05 g, 4.81 mmol), NaH₂PO₄ (114mg, 0.95mmol), H₂O₂ (1.82ml, 3%, 4.81mmol), NaClO₂ (652.8mg, 7.22mmol)를 첨가하고 실온에서 2시간 교반하였다. 혼합물질은 EtOAc/H₂O로 추출 후 MgSO₄로 건조 후 감압 농축하였다. MC/MeOH (30:1)을 용출용매로 실리카겔 (230-400 mesh) 칼럼 크로마토그래피로 혼합물질을 정제하여 5-Methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromene-6-carboxylic acid 를 수득하였다.

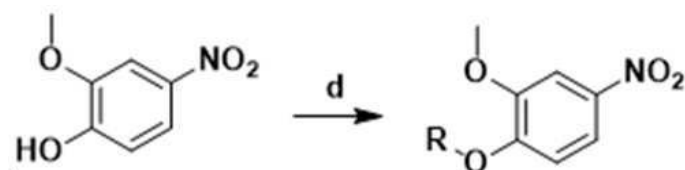
[0126] yellow solid (710.8 mg, 63%). ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 7.89 (d,1H,J = 8.79 Hz, H7-chromene), 6.68 (dd, 1H, J = 8.79 Hz, 0.72 Hz, H4-chromene), 6.52 (dd, 1H, J = 10.05 Hz, 0.54 Hz, H8-chromene), 5.72 (d,

1H, J = 9.87 Hz, H3-chromene), 3.93 (s, 3H, CH₃O⁻), 1.45 (s, 6H, CH₃⁻).

[0128] 1.4. 2-methoxy-4-nitrophenol의 치환 (1. Mitsunobu reaction), (2. Williamson Reaction)

[0129]

[0130]



(1) 2-메톡시-4-니트로페놀의 하이드록시그룹의 치환은 Mitsunobu reaction 조건을 이용하였다. DCM에 4-nitroguaiacol (1eq)을 용해한 후, 0℃에서 알코올 형태의 적합한 알킬체인 (1.1eq)과 Triphenylphosphine (1.5eq) in DMC을 첨가한 후, DEAD (40%/toluene) (1.5eq)를 적가하였다. 혼합용액을 질소가 공급되는 조건의 실온에서 15시간 교반 후 물을 첨가하여 반응으로 종료하고 EtOAc로 추출 후 MgSO₄로 건조 후 감압-농축하였다. EtOAc/Hex (4:1)을 용출용매로 용출용매로 실리카겔 (230-400 mesh) 칼럼크로마토그래피로 혼합물질을 정제하여 원하는 화합물을 수득하였다.

[0131]

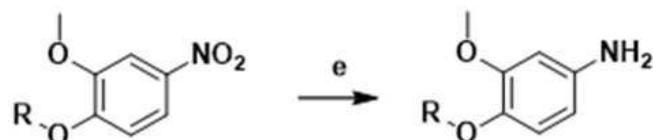
(2) DMF에 4-nitroguaiacol (1eq)과 K₂CO₃ (3 eq)을 용해하여 30분 교반 후, 적합한 할로-알킬화합물을 첨가하였다. 전열사반을 이용하여 반응온도 70℃에서 3시간 교반하고 전열사반을 제거하여 실온으로 맞춘 후 물을 첨가하여 반응을 종료하였다. 혼합유기화합물은 EtOAc로 추출하고 brine으로 여러번 씻어준 뒤 MgSO₄로 건조 후 감압-농축하였다. EtOAc/Hex (4:1)을 용출용매로 용출용매로 실리카겔 (230-400 mesh) 칼럼 크로마토그래피로 혼합물질을 정제하여 원하는 화합물을 수득하였다.

[0133]

1.5. 아닐린의 제조

[0134]

[0135]



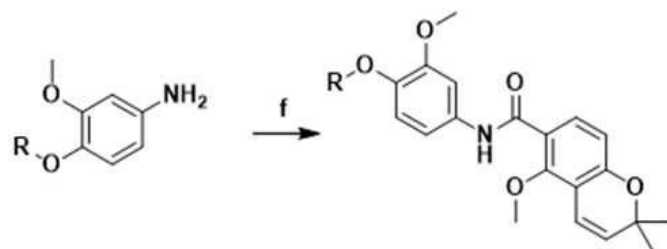
합성된 니트로 화합물 (1 eq)를 메탄올에 용해한 후 10% Pd/C (0.1 eq)를 첨가하고 수소가스를 공급하는 조건으로 실온에서 1시간 교반하였다. TLC를 이용하여 반응이 완결된 것을 확인 후 셀라이트 필터 후 감압-농축하여 아닐린을 수득하였다.

[0137]

1.6. 아마이드결합

[0138]

[0139]



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

- [0141] 1.7. 신규 유도체의 분석 결과
- [0142] 제조한 신규한 벤조파이란 유도체를 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 분리 정제한 후 핵자기 공명에 의해 분자 구조를 확인하였다.
- [0143] NCT-88
- [0144] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.61 (s, 1H), 7.96 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 2.37 Hz, 1H), 6.94 (dd, J = 8.43 Hz, 2.55 Hz, 1H), 6.84 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.60 (d, J = 10.62 Hz, 1H), 5.73 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.88 (s, 6H), 1.47 (s, 6H).
- [0146] NCT-368
- [0147] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.60(s,1H), 7.93(d,J = 8.79 Hz, 1H), 7.62 (s, 1H), 6.88 (s, 2H), 6.69 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 9.90 Hz, 1H), 5.71 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 4.14 (t, J = 5.31 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.75 (t, J = 5.31 Hz, 2H), 3.43 (s, 3H), 1.44 (s, 6H).
- [0149] NCT-66
- [0150] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.63 (s, 1H), 7.96 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 6.91-6.89 (m, 2H), 6.72 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.60 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 5.73 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 4.04 (t, J = 5.31 Hz, 2H), 3.92 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.09 (t, J = 5.13 Hz, 2H), 1.47 (s, 6H).
- [0152] NCT-82
- [0153] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.63 (s, 1H), 7.95 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.89 (s, 2H), 6.72 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.59 (d, J = 9.87 Hz, 1H), 5.73 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 4.16 (t, J = 5.13 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.06 (t, J = 5.13 Hz, 2H), 2.57 (s, 3H), 1.46 (s, 6H).
- [0155] NCT-69
- [0156] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.62 (s, 1H), 7.96 (d, J = 8.58 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 1.83 Hz, 1H), 6.90-6.89 (m, 2H), 6.72 (d, J = 8.58 Hz, 1H), 6.60 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 5.72 (d, J = 9.90 Hz, 1H), 4.13 (t, J = 6.03 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 2.83 (t, J = 6.03 Hz, 2H), 2.40 (s, 6H), 1.46 (s, 6H).
- [0158] NCT-96
- [0159] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.62 (s, 1H), 7.95(d, J = 8.61 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 2.19 Hz, 1H), 6.93 (dd, J = 8.61 Hz, 2.37 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.59 (d, J = 9.87 Hz, 1H), 5.73 (d, J = 9.87 Hz, 1H), 4.11 (t, J = 6.03 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 2.99 (t, J = 6.39 Hz, 2H), 2.00 (quin, J = 6.24 Hz, 2H), 1.46 (s, 6H).
- [0161] NCT-101
- [0162] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.68 (s, 1H), 7.95(d, J = 8.79 Hz, 1H), 7.69 (d, J = 2.40 Hz, 1H), 6.94 (dd, J = 8.61 Hz, 2.19 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.58 Hz, 1H), 6.72 (d, J = 8.58 Hz, 1H), 6.59 (d, J = 9.90 Hz,

1H), 5.74 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 4.19 (t, J = 5.49 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.31 (t, J = 5.52 Hz, 2H), 2.80 (s, 3H), 2.25 (quin, J = 5.49 Hz, 2H), 1.47 (s, 6H).

[0164] NCT-055

[0165] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 9.61 (s, 1H), 7.93(d, J = 8.58 Hz, 1H), 7.65 (s, 1H), 6.85 (br, 2H), 6.69 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 9.90 Hz, 1H), 5.71 (d, J = 10.05 Hz, 1H), 4.06 (t, J = 6.24 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 2.81 (t-like, 2H), 2.49 (s, 6H), 2.18-2.15 (m, 2H), 1.44 (s, 6H).

[0167] NCT-029

[0168] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 9.57 (s, 1H), 7.89 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 7.57 (s, 1H), 6.83 (s, 2H), 6.65 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.53 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 5.66 (d, J = 10.05 Hz, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.68 (m, 2H), 2.22 (s, 3H), 2.13 (br, 2H), 1.90 (br, 2H), 1.80 (br, 2H), 1.40 (s, 6H).

[0170] NCT-375

[0171] ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ 9.58 (s, 1H), 7.94 (d, J = 8.70Hz, 1H), 7.59 (d, J = 2.15Hz, 1H), 6.91 (dd, J = 8.50Hz, 2.20Hz, 1H), 6.82 (d, J = 8.60Hz, 1H), 6.70 (d, J = 8.70Hz, 1H), 6.57 (d, J = 9.95Hz, 1H), 5.70 (d, J = 10.00Hz, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.82 (d, J = 6.65Hz, 2H), 3.16 (d, J = 12.10Hz, 2H), 2.67 (td, J = 12.15Hz, 1.95Hz, 2H), 2.01-1.97 (m, 1H), 1.89 (d, J = 12.85Hz, 2H), 1.44 (s, 6H), 1.34-1.26 (m, 2H).

[0173] NCT-385

[0174] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 9.53 (s, 1H), 7.88 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 2.19 Hz, 1H), 6.85 (dd, J = 8.61 Hz, 2.22 Hz, 1H), 6.77 (d, J = 8.58 Hz, 1H), 6.64 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.53 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 5.66 (d, J = 9.90 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.79 (t, J = 6.24 Hz, 1H), 2.88 (d, J = 11.34 Hz, 2H), 2.25 (s, 3H), 1.96 (t, J = 10.62 Hz, 2H), 1.85-1.82 (m, 3H), 1.51-1.39 (m, 8H).

[0176] NCT-20

[0177] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 9.57 (s, 1H), 7.89 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 7.59 (s, 1H), 6.82 (s, 2H), 6.65 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.53 (d, J = 9.90 Hz, 1H), 5.66 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 4.14 (t, J = 6.06 Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.86(t-like, 2H), 2.59 (br, 4H), 1.62 (br, 4H), 1.39 (s, 6H).

[0179] NCT-21

[0180] ¹H NMR (300MHz, CDCl₃) δ 9.61 (s, 1H), 7.93 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 2.22 Hz, 1H), 6.92 (dd, J = 8.61 Hz, J = 2.19 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.43 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 9.90 Hz, 1H), 5.71 (d, J = 10.05 Hz, 1H), 4.13 (t, J = 6.21 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.72 (t, J = 4.56 Hz, 4H), 2.81 (t, J = 6.03, 2H), 2.57 (t, J = 4.59 Hz, 6H), 1.44 (s, 6H).

[0182] NCT-43

[0183] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.60(s, 1H), 7.93 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 2.19 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 8.79 Hz, 2.19 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 9.87 Hz, 1H), 5.70 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 4.12 (t, J = 6.21 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 2.90 (t, J = 4.77 Hz, 4H), 2.80 (t, J = 6.21 Hz, 2H), 2.53 (t, J = 4.77 Hz, 4H), 1.44 (s, 6H).

[0185] NCT-025

[0186] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.56 (s, 1H), 7.89 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 7.56 (d, J = 2.01, 1H), 6.85 (dd, J = 8.43 Hz, J = 2.01 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.65 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.53 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 5.66 (d, J = 9.87 Hz, 1H), 4.07 (t, J = 6.03 Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 2.79 (t, J = 6.21 Hz, 2H), 2.59 (br, 4H), 2.46 (br, 4H), 2.33 (s, 3H), 1.40 (s, 6H).

[0188] NCT-58

[0189] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 9.60 (s, 1H), 7.93 (d, J = 8.80 Hz, 1H), 7.62 (d, J = 2.40 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 8.40 Hz, 2.00 Hz, 1H), 6.85 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 6.58 (d, J = 9.60 Hz, 1H), 5.71 (d, J = 10.00 Hz, 1H), 4.14-4.04 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.08 (bd, J = 12.00 Hz, 1H), 2.80-2.72 (m, 1H), 2.66 (dt, J = 11.60 Hz, 2.80 Hz, 1H), 1.89 (dd, J = 6.80 Hz, 2.8 Hz, 1H), 1.86 (d, J = 6.40 Hz, 1H), 1.78 (bd, J = 13.60 Hz, 1H), 1.69 (bd, J = 12.40 Hz, 1H), 1.60 (bd, J = 12.40 Hz, 1H), 1.45 (s, 6H), 1.42-1.37 (m, 1H), 1.27-1.14 (m, 2H).

[0191] NCT-44

[0192] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.59 (s, 1H), 7.93 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 7.59 (d, J = 2.58 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 8.61 Hz, 2.40 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 8.61 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 9.87 Hz, 1H), 5.70 (d, J = 9.90 Hz, 1H), 4.02 (t, J = 6.39 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.12 (bd, J = 11.86, 2H), 2.68-2.60 (m, 2H), 1.76-1.69 (m, 5H), 1.44 (s, 6H), 1.22-1.14 (m, 2H).

[0194] NCT-80

[0195] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 9.60 (s, 1H), 8.59 (s, 1H), 8.49 (d, J = 4.05 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 8.70 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 7.80 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 2.25 Hz, 1H), 7.31 (dd, J = 7.70 Hz, 5.00 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 8.55 Hz, 2.30 Hz, 1H), 6.80 (d, J = 8.60 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 8.65 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 10.05 Hz, 1H), 5.70 (d, J = 10.05 Hz, 1H), 4.20 (t, J = 6.80 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.13 (t, J = 6.75 Hz, 2H), 1.44 (s, 6H).

[0197] NCT-50

[0198] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.61 (s, 1H, amide), 8.51 (dd, 2H, J = 4.38 Hz, J = 1.65 Hz, pyridine), 7.93 (d, 1H, J = 8.79, chromene), 7.62 (d, 1H, J = 2.37 Hz, benzene), 7.23 (dd, 2H, J = 4.38 Hz, J = 1.65 Hz, pyridine), 6.89 (dd, 1H, J = 8.61 Hz, J = 2.37 Hz, benzene), 6.80 (d, 1H, J = 8.43 Hz, chromene), 6.70 (d, 1H, J = 8.61 Hz, benzene), 6.57 (d, 1H, J = 9.90 Hz, chromene), 5.71 (d, 1H, J = 10.08 Hz, chromene), 4.22 (t, 2H, J = 6.78 Hz, $-\text{OCH}_2-$), 3.88 (s, 3H, $\text{CH}_3-\text{O}-\text{chromene}$), 3.58 (s, 3H, $\text{CH}_3-\text{O}-\text{benzene}$), 3.11 (t, 2H, J = 6.78 Hz, pyridine- CH_2), 1.44 (s, 6H, $-\text{CH}_3$).

- [0200] NCT-364
- [0201] ^1H NMR (500MHz, CD_3OD) δ 7.62 (d, J = 8.60Hz, 1H), 7.48 (d, J = 2.30Hz, 1H), 7.10 (dd, J = 8.65Hz, 2.35Hz), 6.94 (d, J = 8.65Hz, 1H), 6.67 (d, J = 9.90 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 8.36Hz, 1H), 5.82 (d, J = 10.05Hz, 1H), 4.06 (t, 5.85Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 2.84 (br, 2H), 2.78 (br, 2H), 2.07 (quin, J = 7.75Hz, 2H), 1.72 (quin, J = 5.40Hz, 4H), 1.56 (br, 2H), 1.43 (s, 6H).
- [0203] NCT-407
- [0204] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 9.59 (s, 1H), 7.93 (d, J = 8.65 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 2.25 Hz, 1H), 6.90 (dd, J = 8.60 Hz, 2.30 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 8.60 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 8.70 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 10.00 Hz, 1H), 5.70 (d, 10.00 Hz, 1H), 4.02-3.99 (m, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.15 (bd, J = 11.55 Hz, 1H), 2.66 (td, J = 12.10 Hz, 2.70 Hz, 2H), 1.94-1.86 (m, 2H), 1.80 (bd, J = 12.60 Hz, 2H), 1.73 (bd, J = 13.45 Hz, 2H), 1.63 (bd, J = 13.60 Hz, 2H), 1.44 (s, 6H).
- [0206] NCT-394
- [0207] ^1H NMR (500MHz, CDCl_3) δ 9.58 (s, 1H), 7.93 (d, J = 8.70 Hz, 1H), 7.58 (d, J = 2.10 Hz, 1H), 6.91 (dd, J = 8.55 Hz, 2.25 Hz, 1H), 6.82 (d, J = 8.55 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 8.70 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 10.00 Hz, 1H), 5.70 (d, J = 10.05 Hz, 1H), 3.97 (t, J = 6.75 Hz, 2H), 3.89 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.14 (bd, J = 12.10 Hz, 2H), 2.62 (bd, J = 11.70 Hz, 2H), 1.82 (quin, J = 6.80 Hz, 2H), 1.74 (bd, J = 12.85 Hz, 2H), 1.44 (s, 6H), 1.43-1.37 (m, 3H), 1.25-1.19 (m, 2H).
- [0209] NCT-377
- [0210] ^1H NMR (400MHz, CD_3OD) 8.44 (s, 1H), 8.37 (d, J = 4.00 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 8.00 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 2.40 Hz, 1H), 7.36 (dd, J = 8.00 Hz, 5.20 Hz), 7.10 (dd, J = 8.40 Hz, 2.00Hz, 1H), 6.91 (d, J = 8.40 Hz, 1H), 6.68 (d, J = 10.00 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 8.00 Hz, 1H), 5.82 (d, J = 9.60 Hz, 1H), 4.00 (t, J = 6.40 Hz, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 2.89 (t, J = 7.20 Hz, 2H), 2.10 (quin, J = 6.40 Hz, 2H), 1.44 (s, 6H).
- [0212] NCT-383
- [0213] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) δ 9.60 (s, 1H), 8.50 (br, 2H), 7.93 (d, J= 8.61 Hz, 1H), 7.63 (d, J = 2.19 Hz, 1H), 7.20 (br, 2H), 6.88 (dd, J = 8.43, 2.37 Hz, 1H), 6.79 (d, J = 8.67 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 8.79 Hz, 1H), 6.57 (d, J = 9.87 Hz, 1H), 5.70 (d, J = 10.08 Hz, 1H), 3.99 (t, J = 6.24 Hz, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 2.84 (t, J= 6.96 Hz, 2H), 2.14 (quint, J = 6.57 Hz, 2H), 1.44 (s, 6H).
- [0215] **실시예 2: 벤조파이란 유도체 HSP90 저해제 NCT1 13개의 합성 물질의 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에서 생존율 조사**
- [0216] 인간 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231 각각은 10% fetal bovine serum (FBS), streptomycin-penicillin (100 U/ml) 및 Fungizone (0.625 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$ 환경으로 배양하였다.
- [0217] 인간 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에서 신규한 벤조파이란 유도체 HSP90 저해제 NCT1 13개의 합

성 물질 (NCT-20, NCT-29, NCT-44, NCT-50, NCT-58, NCT-80, NCT-364, NCT-375, NCT-377, NCT-383, NCT-385, NCT-394, NCT-407)을 10 μ M 농도로 72시간 처리한 후, MTS assay기법으로 세포생존율을 측정하였다. MTS assay는 96 well plate에 24시간 동안 세포를 부착시킨 후, 벤조파이란 유도체 72시간 처리하여, MTS(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)로 4시간 동안 발색한 뒤, Spectramax Plus384 microplate analyzer를 이용하여 490 nm에서 흡광도로 측정하였다.

[0218] 상기 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에서 13종의 벤조파이란 신규유도체 (NCT-20, NCT-29, NCT-44, NCT-50, NCT-58, NCT-80, NCT-364, NCT-375, NCT-377, NCT-383, NCT-385, NCT-394, NCT-407) 모두 세포 생존율을 유의하게 억제하였다. 대조군과 약물처리군 간의 유의성을 unpaired Students t-test로 검증 (* $p < 0.01$; DMSO control vs NCT1 series)하여 도표화하였다(도 1).

[0220] **실시예 3: 유방암 세포주에서 벤조파이란 유도체 NCT-58 및 NCT-407의 농도별 세포생존율 측정**

[0221] 세가지의 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에서 HSP90 저해제 NCT-58, NCT-407을 각각 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 및 20 μ M의 다양한 농도로 72 시간 동안 처리한 후, 상기 MTS assay 기법으로 세포생존율을 측정하였다(Cell seeding numbers: 2(B), 1(J), 0.7(M) $\times 10^4$ cells / wells (confluency $\geq 25\%$)). 세가지의 유방암 세포주에서 NCT-58, NCT-407 약물 모두 농도 의존적으로 세포생존율을 유의하게 저해함을 확인하였다. 세포생존율 실험은 독립적으로 3번 수행하였으며, 유의성은 One-Way Anova, Bonferroni post-hoc test (* $p < 0.01$; DMSO control vs NCT-58 or NCT-407)로 검증하여 도 2에 각 세포주 및 약물처리군별로 그래프화하여 나타내었다.

[0223] **실시예 4: 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에서 벤조파이란 유도체 NCT-58 및 NCT-407의 세포형태 변화 조사**

[0224] 상기 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에서 NCT-58, NCT-407을 10 μ M 농도로 72시간 처리한 후, 약물의 의한 세포 독성 여부를 위상차 현미경을 이용하여 세포 형태 변화를 관찰하였다. 본 결과를 phase contrast microscopy로 x200 배율에서 촬영하여 도 3에 나타내었다. NCT-58, NCT-407 약물을 처리 하였을 때, BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231 세포주 모두에서 세포질이 수축하는 형태 변화가 관찰 되었으며, 세포독성으로 인하여 대부분의 세포가 부유한 상태로 관찰되었다.

[0226] **실시예 5: 유방암 세포주 BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에서 벤조파이란 유도체 NCT-58 및 NCT-407 약물의 세포 사멸율 측정**

[0227] NCT-58, NCT-407 약물이 유도하는 암세포의 사멸정도를 유세포 측정기 (Flow cytometry)를 이용한 DNA 함량분석을 통하여 측정하였다. BT474, JIMT-1 및 MDA-MB-231에 대하여, control (DMSO), NCT-58 및 NCT-407을 각각 10 μ M의 농도로 72시간 처리한 후, 상기 세포들을 수확한 후, 24시간 동안 0.5% Tween-20을 포함하는 95% 에탄올로 고정하여, 30분 동안 propidium iodide (PI, 50 μ g/ml)과 RNase (50 μ g/ml)를 가지고 염색하였다. 이후, 유세포 측정기로 암세포의 사멸정도를 분석하였다.

[0228] 일반적으로 세포주기 (cell cycle)는 세포내 DNA의 함량에 따라 G1 (세포성장기)-S (세포복제기)-G2/M (세포분열기)로 나뉘어지며, 세포사멸이 유도되면 DNA의 절편현상 (DNA fragmentation)을 동반하여, 각 세포내의 DNA의 함량이 G1기 보다 현저히 적어진다. 이러한 세포사멸의 결과는 Sub G1 부위로써 세포주기상에 나타나게 되며 Sub G1의 비율을 수치로 표기하여 도 4에 각각 나타내었다.

[0229] 상기 NCT-58 및 NCT-407 두 약물 모두 BT474, JIMT-1, MDA-MB-231 유방암 세포주들에서 세포사멸 (Sub-G1 population)을 유의하게 유도함을 확인하였다. 세포사멸 실험은 독립적으로 3번 수행하였으며, 유의성은 unpaired Students t-test로 검증(* $p < 0.01$; DMSO control vs NCT-58 or NCT-407)하여, 도 4에 각각의 세포주별로 그래프화하여 나타내었다.

[0231] **실시예 6: 벤조파이란 유도체 NCT-58 및 NCT-407에 의한 세포사멸 관련 인자들의 발현 조사**

[0232] 실시예 5의 결과에서, NCT-58 및 NCT-407에 의한 세포사멸기작을 조사하기 위해, 세포사멸 관련 인자 caspase

family member의 활성화를 Western Blotting 기법을 통하여 조사하였다.

[0233] Western blotting 수행을 위하여, control (DMSO), NCT-58 및 NCT-407을 각각 10 μ M의 농도로 72시간 처리한 후, 각 유방암 세포들을 phosphatase과 protease inhibitor를 포함하는 lysis buffer (30 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl; pH 7.4)에서 용해시켜 상층액에 존재하는 단백질을 수확하였다. 단백질 농도 측정은 Bradford protein assay kit를 가지고 수행하였으며, 각 약물 처리군에서 단백질 30 μ g을 균등하게 취하여 SDS-Polyacrylamide gel (8~15%)에서 전기 영동하여 nitrocellulose membrane에 전기적으로 전위시켰다. 상기 멤브레인은 5% bovine serum albumin (BSA)에 희석된 일차 항체 [pro PARP (1:1000), cleaved PARP (1:2000), cleaved caspase-3 (1:1000), cleaved caspase-7 (1:1000), β -actin (1:5000)]를 가지고 4°C에서 24시간 동안 반응한 후, 2차 항체인 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit IgG (1:3000)에 2시간 상온에서 반응시켰다. 상기 단백질의 신호강도(Signal intensity)는 Enhanced Chemiluminescence Kit와 x-ray film으로 발색하였다.

[0234] BT474 및 JIMT-1 유방암 세포주에서 caspase-3의 활성화 형태인 cleaved caspase-3의 양을 Western blotting 기법으로 확인한 결과, 대조군과 비교 하여 NCT-58 및 NCT-407 처리군에서 현저히 단백질량이 증가함을 확인하였다. DNA 회복 인자인 PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase)는 caspase-3의 substrate로써, NCT-58 및 NCT-407 약물 처리에 의해 유도된 caspase-3의 활성화에 의해 분절화 됨을 pro-PARP (116 kDa)의 감소 및 cleaved-PARP (86 kDa)의 증가로 확인하였다. 상기 MDA-MB-231 세포주에서는 NCT-58 및 NCT-407 처리군에서 cleaved caspase-3 및 cleaved caspase-7이 증가함을 확인하였다. 이는 벤조파이란 유도체들이 유도하는 세포사멸이 caspase 활성이 동반됨을 증명하는 것으로 상기 결과는 도 5에 나타내었다.

[0236] **실시예 7: 벤조파이란 유도체 NCT-58 및 NCT-407에 의한 HSP90 clients의 발현 조사**

[0237] BT474 및 JIMT-1 세포주는 HER2 양성 유방암 세포주로 HSP90의 대표적 client인 HER2, HER1 (EGFR)의 발현 및 활성화 (phosphorylation)을 HSP90 억제제인 NCT-58 및 NCT-407이 하향조절 할 수 있는지 상기 Western blotting 기법으로 조사하였다. 또한 HSP90 clients로 세포 생존에 주요한 인자들인 ERK, Cyclin D1 및 Survivin의 발현을 조사하였다. NCT-58 및 NCT-407을 각각 10 μ M의 농도로 72시간 처리하였을 때, BT474, JIMT-1 세포주들의 HER2, EGFR의 발현을 감소됨을 확인하였으며, 활성화 형인 phospho-HER2, phospho-EGFR의 발현 또한 현저히 감소되었다. 또한 두 약물 모두 세포증식 인자인 ERK, Cyclin D1 및 Survivin의 발현을 억제시킴을 확인하였다.

[0238] 상기 MDA-MB-231 세포주는 삼중음성유방암(triple-negative breast cancer, TNBC) 세포주로서 유방암의 재발 및 전이율이 높은 암종이다. 삼중음성유방암의 세포 침투, 이동 및 암전이와 관련된 HSP90의 대표적 client인 EGFR, STAT3의 발현과 인산화를 측정하였으며, 생존인자인 AKT, ERK, Cyclin D1 및 Survivin의 발현을 조사하였다. NCT-58 및 NCT-407 약물 모두 삼중음성유방암 MDA-MB-231 세포주에서 EGFR, STAT3의 발현뿐만 아니라, 활성화 형인 phospho-EGFR, phospho-STAT3의 발현을 현저히 감소시켰으며, AKT, ERK, Cyclin D1 및 Survivin의 발현을 현저히 억제하였다. 상기 약물에 의한 client들의 발현 결과는 도 6에 나타내었다.

[0239] 상기 Western blotting에 사용된 일차 항체는 [HER2 (1:5000), phospho-HER2 (Tyr1221/1222, 1:1000), EGFR (1:2000), phospho-EGFR (Tyr1068, 1:2000), Akt (1:2000), ERK (1:2000), phospho-ERK (Thr202/Tyr204, 1:2000), STAT3, phospho-STAT3 (Tyr705, 1:1000), Cyclin D1 (1:3000), Survivin (1:1000), β -actin (1:5000)]로 5% bovine serum albumin (BSA)에 희석하여 사용하였다.

[0241] **실시예 8: 인간 전립선암 세포주 DU145, 대장암 세포주 HCT116, 간암 세포주 HepG2 및 난소암 세포주 SKOV-3에서 벤조파이란 유도체가 세포생존율에 미치는 영향 조사**

[0242] 전립선암 세포주 DU145, 대장암 세포주 HCT116, 간암 세포주 HepG2 및 난소암 세포주 SKOV-3에서 벤조파이란 유도체 NCT-375, NCT-394, NCT-407 약물들의 효과를 조사하였다. 각각의 약물을 10 μ M 농도로 72시간 처리한 후, 상기 MTS assay기법으로 세포생존율을 측정된 결과, 3개의 약물 모두 DU145, HCT116, HepG2 SKOV-3 세포주들에서 세포생존율을 유의하게 억제하였다. 대조군과 약물처리군 간의 유의성을 unpaired Students t-test로 검증 (*p<0.01; DMSO control vs NCT-375, NCT-394 or NCT-407)하여 도 7에 나타내었다.

[0244] 실시예 9: NCT 44, NCT 50 및 NCT 58의 용해도 측정

[0245] NCT 44, NCT 50 및 NCT 58의 용해도를 측정하기 위하여, 표준곡선(Standard curve)은 1 mg/ml product solution을 serial dilution하여 최종 농도 100ng/ml, 200ng/ml, 500ng/ml 농도의 용액을 만든다. 이 용액을 standard로 하여 sample의 농도를 산출하였고, Serial dilution에서 이동상은 MeOH를 사용하였다.

[0246] 농도 분석 샘플은 Product 3 mg을 100ul EtOH에 녹여 solution을 제조하였다(농도 = 30mg/ml). 육안으로 다 녹은 것처럼 보여도 실제로 미량의 석출이 생길 수 있으므로 원심분리하여 석출된 것을 침전시켰다. 30mg/ml의 용액을 원심분리(13,200rpm, 5 min)하고 그 상층액 50ul 만 수득하여 분석에 사용하였다(침전물은 분석이 포함하지 않음). 30mg/ml을 serial dilution 하여 최종 농도 300ng/ml이 되게 하였다(standard curve 농도 범위 안에 들어가게 희석 하여 분석). 300ng/ml의 용액을 측정하고 상기에서 standard curve를 토대로 최초 농도를 계산하였다.

[0247] 그 결과, NCT 44, NCT 50 및 NCT 58이 테구엘린에 비해 용해도가 우수한 것을 확인하였다.

표 2

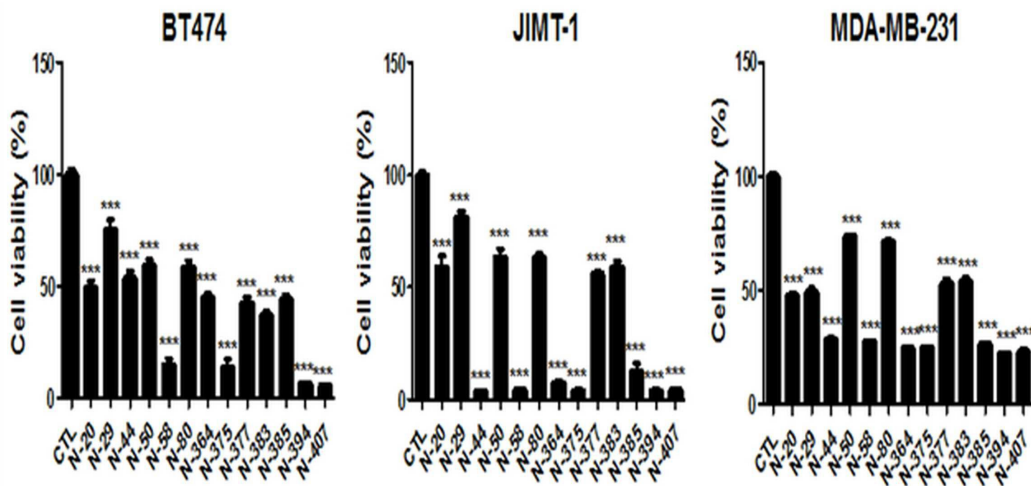
[0249]

	MW	Solubility (in Ethanol)
Deguelin	394.42	50 mM
NCT 44	466.58	66 mM
NCT 50	460.53	72 mM
NCT 58	466.58	69 mM

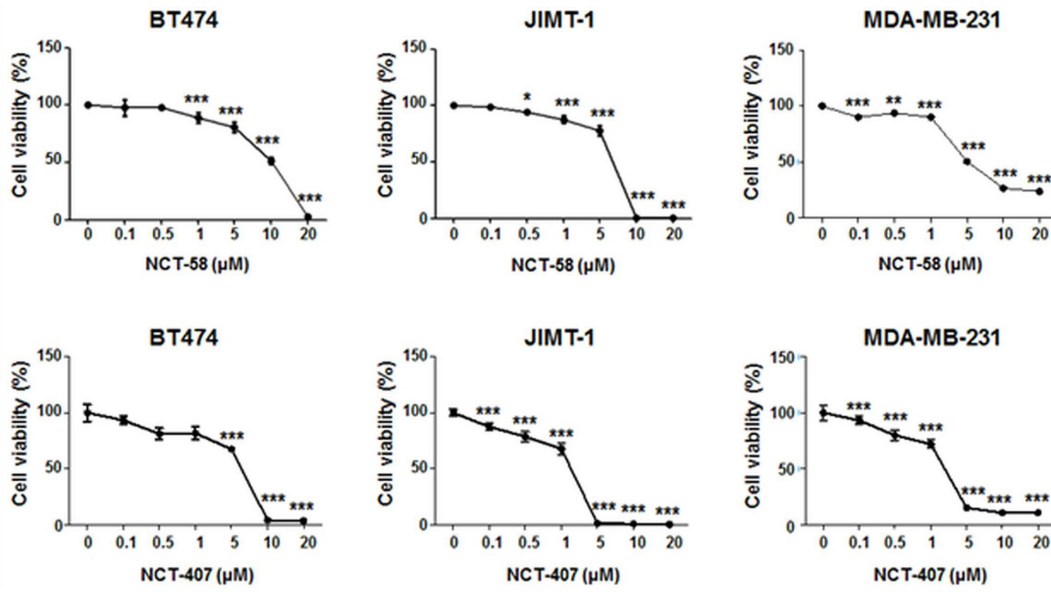
[0251] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

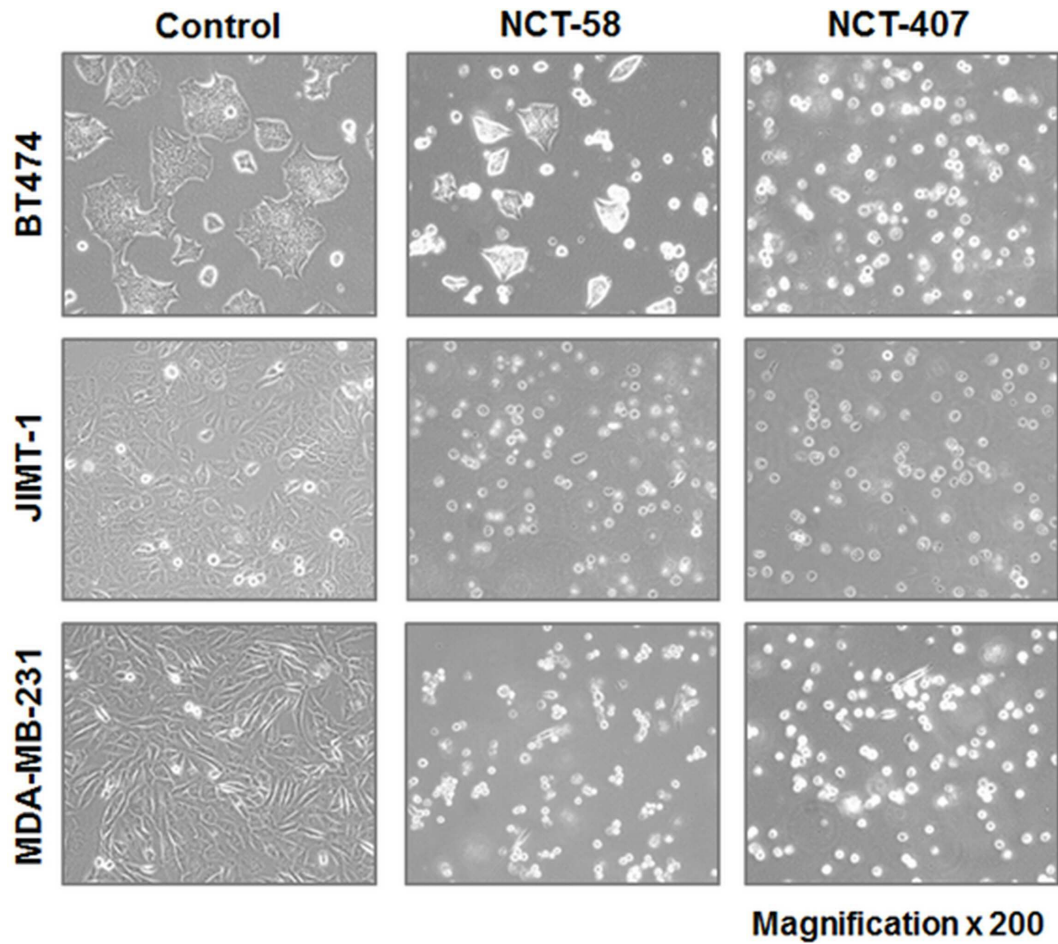
도면1



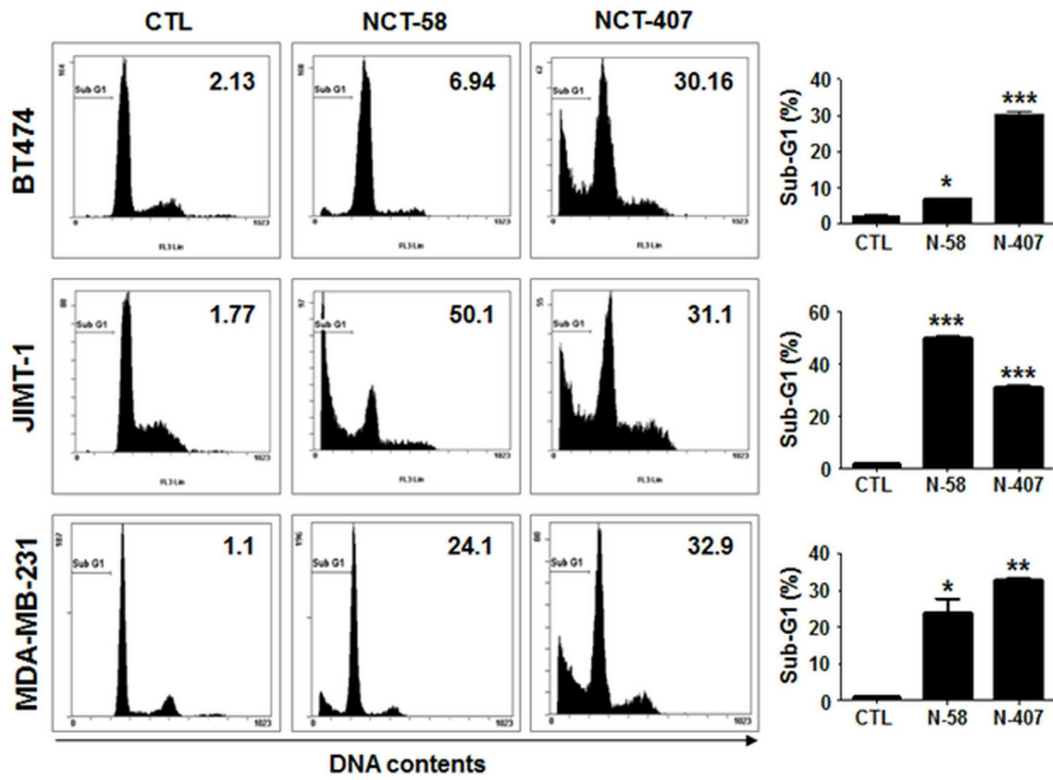
도면2



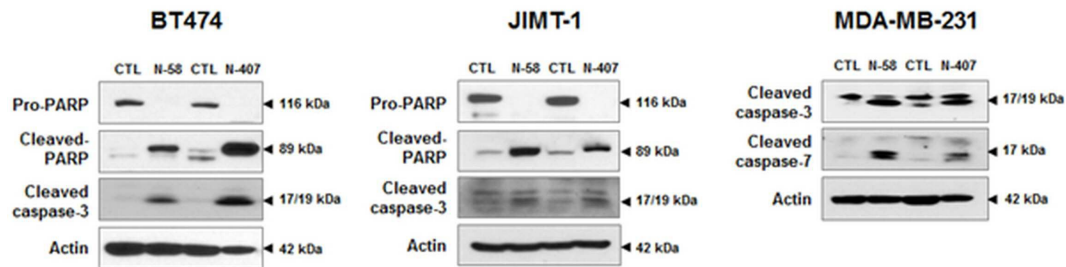
도면3



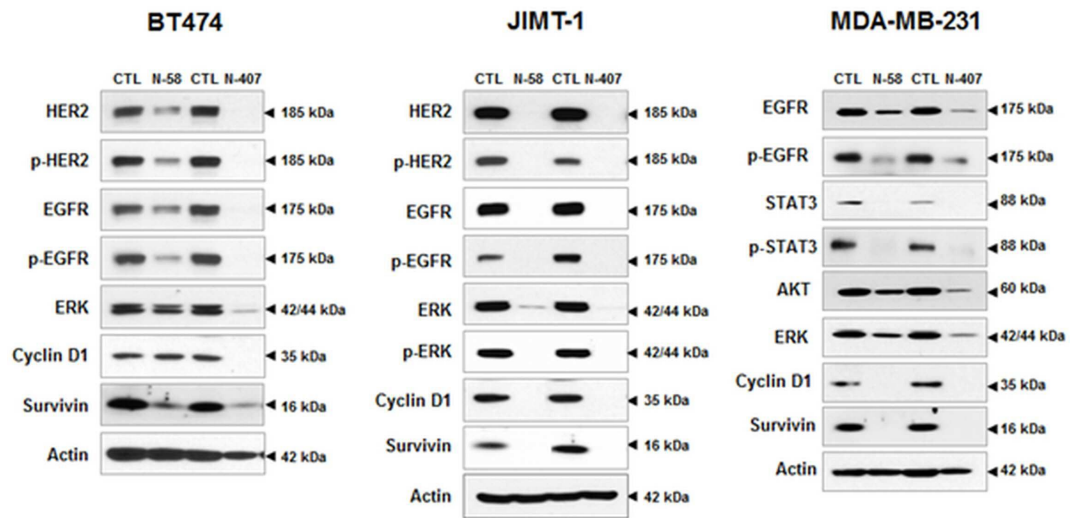
도면4



도면5



도면6



도면7

