



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0053560
(43) 공개일자 2009년05월27일

(51) Int. Cl.

A61K 31/4196 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0120447

(22) 출원일자 2007년11월23일

심사청구일자 2007년11월23일

(71) 출원인

재단법인서울대학교산학협력재단

서울특별시 관악구 봉천7동 산4의 2번지

(72) 발명자

한지숙

서울 관악구 봉천7동 서울대학교수아파트 122G동 401호

(74) 대리인

이문섭, 양부현, 윤여강, 오대웅

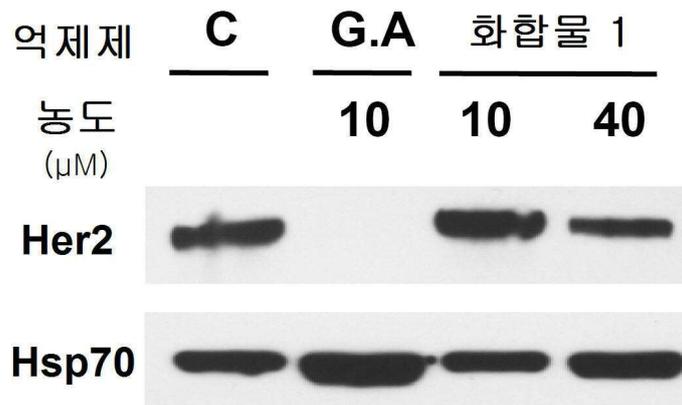
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 1,2,4-트리아졸 유도체를 함유하는 H s p 9 0 억제제 및이를 이용한 항암제

(57) 요약

본 발명은 Hsp90 억제제로 새롭게 분리한 1,2,4-트리아졸 유도체에 관한 것으로, 본 발명의 화합물은 Hsp90을 타겟으로 하는 항암제 조성물에 이용될 수 있다.

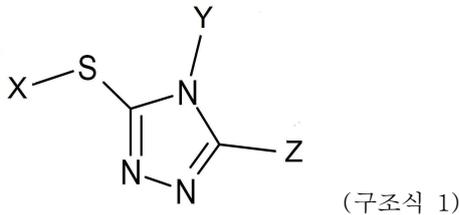
대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

하기 구조식 1의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 Hsp90 억제제 조성물:



상기 구조식 1에서,

X, Y 및 Z는 동일하거나 상이하며, 독립적으로 수소, 할로젠, 나이트릴, C₁-C₂₀ 알킬, 알킬 라디칼, 사이클로알킬, 사이클로알킬 라디칼, C₁-C₂₀ 알콕시, 비치환 또는 치환된 페닐, 알콕시 페닐, 알킬 페닐, 페닐 라디칼, 5 또는 6개의 고리 원자를 갖는 헤테로방향족 또는 헤테로방향족 라디칼, 비치환 또는 치환된 벤질, 비치환 또는 치환된 나프탈레닐, 비치환 또는 치환된 인돌일(indolyl), 하이드록시, C₁-C₂₀ 알킬설포닐, C₁-C₂₀ 알킬티오, 니트로, 트리플루오로메틸, 트리플루오로메틸 C₁-C₂₀ 알콕시, 아미노, 아세트아미도, 카복시, 페나실(phenacyl), 벤즈이미다졸일(Benzimidazolyl), 벤즈이미다졸일메틸(Benzimidazolylmethyl), 비치환 또는 치환된 카바모일, 카바모일메틸(carbamoylmehtyl), 비치환 또는 치환된 피리디닐(pyridinyl), 비치환 또는 치환된 피라졸일(pyrazolyl), 및 1,3-벤조다이옥솔일(1,3-Benzodioxolyl)로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

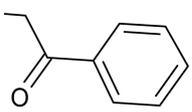
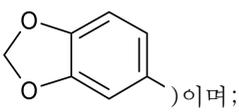
X는 수소, 페나실(phenacyl), 벤즈이미다졸일메틸(Benzimidazolylmethyl), 및 비치환 또는 치환된 카바모일메틸(carbamoylmehtyl)로 이루어진 그룹 중에서 선택되어지고;

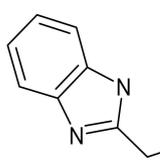
Y는 비치환 또는 치환된 페닐, 및 비치환 또는 치환된 나프탈레닐로 이루어진 그룹 중에서 선택되어지며;

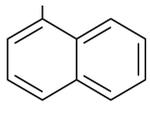
Z는 비치환 또는 치환된 페닐, 비치환 또는 치환된 피리디닐(pyridinyl), 비치환 또는 치환된 피라졸일(pyrazolyl), 및 1,3-벤조다이옥솔일로 이루어진 그룹 중에서 선택되어지는 것을 특징으로 하는 Hsp90 억제제 조성물.

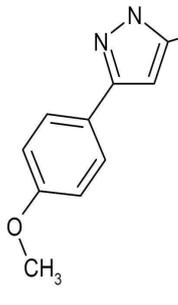
청구항 3

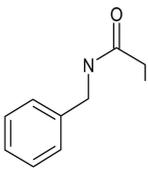
제 2 항에 있어서,

X는 페나실(phenacyl: ) , Y는 페닐, Z는 1,3-벤조다이옥솔-5-일(1,3-Benzodioxol-5-yl: )이며;

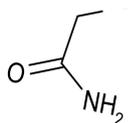
X는 1H-벤즈이미다졸-2-일메틸(1H-Benzimidazol-2-ylmethyl: ) , Y 및 Z는 페닐이며;

X는 수소, Y는 1-나프탈레닐(Naphthalenyl: ) , Z는 3-(4-메톡시페닐)-1H-피라졸-5-

일(3-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrazol-5-yl: )이며;

X는 N-벤질카바모일메틸(N-Benzylcarbamoylmethyl: ) , Y는 페닐, Z는 3-피리디닐(3-pyridinyl:

)이며;

X는 카바모일메틸(carbamoylmethyl: ) , Y는 4-메톡시페닐, Z는 3-메틸페닐인 것을 특징으로 하는 Hsp90 억제제 조성물.

청구항 4

제 1 항에 기재된 Hsp90 억제제를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 암이 유방암인 것을 특징으로 하는 항암제 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 Hsp90 억제제 및 이를 이용한 항암제 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 1,2,4-트리아졸 유도체를 함유하는 Hsp90 억제제 및 이를 이용한 항암제 조성물에 관한 것이다.

배경기술

<2> Hsp90는 진핵세포에서 가장 많이 존재하는 분자 샤페론들 중 하나로서, 클라이언트 단백질이라 불리는 준안정 상태 단백질의 접힘, 안정화, 활성화 및 단백질 복합체의 형성에 중요한 역할을 하고 있다. Hsp90 클라이언트 단백질들에는 Her2/ErbB2, Akt, Raf-1, Hif-1 α , 호르몬 수용체, 서바이빈(survivin), p53 돌연변이 및 hTERT와 같은 종양 유발 단백질들이 포함되어 있다.

<3> Hsp90의 저해는 프로테아좀(proteasome)을 통한 상기 종양 유발 클라이언트 단백질들의 분해를 유도하는데, 이와 같은 특성으로 말미암아 Hsp90는 항암제 개발을 위한 새로운 타겟으로 급부상하고 있다.

<4> Hsp90 억제제에 관한 특허의 일 예로는 대한민국 특허공개번호 제10-2007-0045290호(공개일자 2007년 05월 02일)에 '증식성 질환의 치료 및 상기 질환의 치료용 제약 제제의 제조에 있어서 벤조이미다졸론 화합물 및 그 염의 용도에 관한 것으로, 벤조이미다졸론 화합물을 포함하는 제약 제제, 신규한 벤조이미다졸론 화합물 및 신

규한 벤조이미다졸론 화합물의 제조 방법'이 있다.

- <5> 한편, N-말단 ATPase 도메인에서 ATP 결합과 가수분해에 의한 Hsp90의 형태적 변화는 Hsp90의 샤페론 기능을 위해 필수적이다. 현재까지 알려진 Hsp90 억제제들의 대부분은 N-말단 ATP 결합부위에 결합함으로써 Hsp90 ATPase 활성을 억제한다. 이러한 종류의 Hsp90 억제제들에는 겔다나마이신(geldanamycin, GA)과 라디시콜(radicicol), GA로부터 유래한 17-알릴아미노-17-데메톡시겔다나마이신(17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin; 17-AAG)과 17-다이메틸아미노에틸아미노-17-데메톡시겔다나마이신(17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin;17-DMAG), 퓨린 골격 유도체인 PU3과 PU24FC1, 피아라졸(pyrazol), 그리고 서바이빈-Hsp90 복합체의 펩티도미메틱(peptidomimetic) 억제제인 셰펠딘(shepherdin) 등이 있다.
- <6> 한편, 노보바이오신(novobiocin)과 시스플라인(cisplatin)은 Hsp90 C-말단에 존재하리라 생각되는 두번째 ATP 결합 부위에 결합하여 Hsp90를 억제한다. 종양세포에 존재하는 Hsp90는 보통세포보다 높은 ATPase 활성을 띄며 Hsp90 억제제들과 높은 결합력을 가지게 되어, Hsp90 억제제들이 종양세포에 특이적으로 작용할 수 있게 된다. Hsp90 억제제들의 항암 활성은 다양한 시험관내(in vitro)와 세포내(in vivo) 모델 시스템에서 검증되었으며, 17-AAG는 다양한 암에 대한 임상실험에서 치료제로서 희망적인 결과를 보여주고 있다. 그러나, 17-AAG는 제형, 잠재적 독성, 그리고 낮은 수용해도와 같은 문제가 있다.
- <7> 따라서 상술한 Hsp90 억제제들의 문제점을 개선하고 향상된 제약성질과 효능을 가지는 Hsp90 억제제의 지속적인 개발이 요구되고 있다.

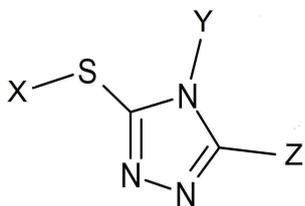
발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <8> 이에 본 발명은 Hsp90에 대한 억제제로서 신규의 화합물을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제 해결수단

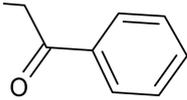
- <9> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 구조식 1의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 Hsp90 억제제 조성물을 제공한다.

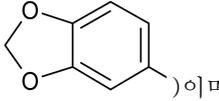


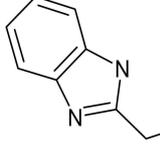
(구조식 1)

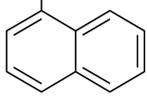
- <10>
- <11> 상기 구조식 1에서,
- <12> X, Y 및 Z는 동일하거나 상이하며, 독립적으로 수소, 할로젠, 나이트릴, C₁-C₂₀ 알킬, 알킬 라디칼, 사이클로알킬, 사이클로알킬 라디칼, C₁-C₂₀ 알콕시, 비치환 또는 치환된 페닐, 알콕시 페닐, 알킬 페닐, 페닐 라디칼, 5 또는 6개의 고리 원자를 갖는 헤테로방향족 또는 헤테로방향족 라디칼, 비치환 또는 치환된 벤질, 비치환 또는 치환된 나프탈레닐, 비치환 또는 치환된 인돌일(indolyl), 하이드록시, C₁-C₂₀ 알킬설포닐, C₁-C₂₀ 알킬티오, 니트로, 트리플루오로메틸, 트리플루오로메틸 C₁-C₂₀ 알콕시, 아미노, 아세트아미도, 카복시, 펜아실(phenacyl), 벤즈이미다졸일(Benzimidazolyl), 벤즈이미다졸일메틸(Benzimidazolylmethyl), 비치환 또는 치환된 카바모일, 카바모일메틸(carbamoylmehtyl), 비치환 또는 치환된 피리디닐(pyridinyl), 비치환 또는 치환된 피라졸일(pyrazolyl), 및 1,3-벤조다이옥솔일(1,3-Benzodioxolyl)로 이루어진 그룹 중에서 선택된다.
- <13> 본 발명은 상기 구조식 1에서, X는 수소, 펜아실(phenacyl), 벤즈이미다졸일메틸 (Benzimidazolylmethyl), 및 비치환 또는 치환된 카바모일메틸 (carbamoylmehtyl)로 이루어진 그룹 중에서 선택되어지고; Y는 비치환 또는 치환된 페닐, 및 비치환 또는 치환된 나프탈레닐로 이루어진 그룹 중에서 선택되어지며; Z는 비치환 또는 치환된 페닐, 비치환 또는 치환된 피리디닐(pyridinyl), 비치환 또는 치환된 피라졸일(pyrazolyl), 및 1,3-벤조다이옥솔일로 이루어진 그룹 중에서 선택되어지는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Hsp90 억제제 조성물을 제공한다.

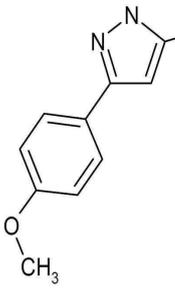
<14>

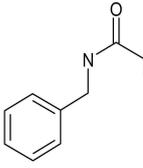
또한, 본 발명은 상기 구조식 1에서, X는 페닐(phenacyl: ) , Y는 페닐, Z는 1,3-벤조다이옥

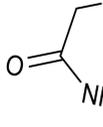
솔-5-일(1,3-Benzodioxol-5-yl: )이며; X는 1H-벤즈이미다졸-2-

일메틸(1H-Benzimidazol-2-ylmethyl: ) , Y 및 Z는 페닐이며; X는 수소, Y는 1-

나프탈레닐(Naphthalenyl: ) , Z는 3-(4-메톡시페닐)-1H-피라졸-5-

일(3-(4-methoxyphenyl)-1H-pyrazol-5-yl: )이며; X는 N-

벤질카바모일메틸(N-Benzylcarbamoylmethyl: ) , Y는 페닐, Z는 3-피리디닐(3-pyridinyl:

)이며; X는 카바모일메틸(carbamoylmehtyl: ) , Y는 4-메톡시페닐, Z는 3-메틸페닐인 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 Hsp90 억제제 조성물을 제공한다.

<15>

또한, 본 발명은 상기에 기재된 Hsp90 억제제 조성물들 중 어느 하나를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항암제 조성물을 제공한다.

<16>

이하, 본 발명에 대해 더욱 상세히 설명하고자 한다.

<17>

본 발명자는 85,000개의 화학물질들을 대상으로 도킹 시뮬레이션을 통한 가상 스크리닝을 수행하여 300개의 화학물질들을 우선 선별하였다. 이 300개 중에서 285개의 화학물질들을 대상으로 효모 Hsp90를 이용한 ATPase 활성 조사를 통해 Hsp90 억제제를 선별하였다.

<18>

Hsp90 ATPase 활성은 말라카이트 그린(malachite green) 시약을 사용하여 방출되는 무기인산을 색의 변화로 검출하는 방법을 통해 96-웰 플레이트에서 측정하였다. 그 결과, 1,2,4-트리아졸 유도체인 본 발명의 화합물에서 50 μM의 첨가 농도에서 Hsp90의 억제활성이 72% 이상으로 나타났다.

<19>

한편, 하기 실시예 1의 표 1의 1번 화합물을 대상으로 하여 세포내(*in vivo*) 억제 효능을 테스트하였다. MCF-7 유방암 세포주에서의 Her2 분해효과를 조사하였는데, Hsp90 클라이언트 단백질 중 하나인 Her2 단백질의 분해와 함께 Hsp70의 유도를 관찰함으로써 Hsp90 억제 활성을 조사하였다. 열충격전사인자(Heat shock transcription factor: Hsf1)는 Hsp90에 의해 음성적으로 조절되므로, 겔다나마이신과 같은 대부분의 Hsp90 억제제들은 Hsp70을 포함한 Hsf1 타겟 유전자의 발현을 활성화시킨다. MCF-7 세포에서 각각의 화학물질을 30 μM의 농도로 24시간 동안 처리하였고, Her2와 Hsp70의 발현수준들을 웨스턴 블랏팅 방법으로 조사하였다. 대조군과 비교했을 때, 1번 화합물 처리군에서 Her2 단백질 수준이 감소하고, Hsp70의 발현이 유도됨을 확인하였다(도 1). 또한, 본 발

명의 Hsp90 억제제 조성물의 세포성장저해 활성을, 상기 화합물을 4일간 노출시킨 뒤 솔포로다민 B(Sulforhodamine B: SRB) 측정법으로 측정하였다(Skehan, P., *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1990, 82, 1107. 참조). 1번 화합물이 44.61 μM 농도의 GI₅₀ 값을 나타내어 효과적으로 MCF-7 세포들의 성장을 저해함을 확인하였다(표 3).

- <20> 한편, 본 발명은 본 발명의 화합물들 중 어느 하나를 포함하는 암 치료용 (더 넓은 의미로는 예방용) 약제, 즉 항암제 조성물을 제공한다. 본 발명의 항암제 조성물은 모든 종류의 암세포의 Hsp90를 타겟으로 할 수 있다.
- <21> 본 발명의 항암제 조성물은 활성 성분으로서 본 발명의 화합물 또는 제약상 허용가능한 이들의 염을 유의한 양 만큼 함유하고, 1종 이상의 무기 또는 유기 고체 또는 액상의 제약상 허용가능한 담체를 포함하거나 혼합하는 혼합물이다.
- <22> 본 발명에 따른 제약 조성물은 포유동물(특히, 인간)에게 경구 또는 비경구(예를 들어, 근육 내 또는 정맥 내 주사)로 투여할 수 있다. 활성 성분의 투여량은 포유동물의 종, 체중, 연령 및 개개의 상태에 따라 달라진다.
- <23> 본 발명의 화합물 또는 제약상 허용가능한 이들의 염을 포유동물, 예를 들어 대략 70kg 체중의 인간에게 투여할 때, 1인당 1일 투여량은 바람직하게는 대략 3 mg 내지 대략 10 g, 더욱 바람직하게는 대략 10 mg 내지 대략 1.5 g, 가장 바람직하게는 약 100 mg 내지 약 1000 mg이다. 투여횟수는 바람직하게 동일량을 2~3회로 나누어 하루에 투여하는 것이 좋다. 일반적으로 어린이에게는 성인 투여량의 절반을 적용한다.
- <24> 본 발명의 항암제 조성물은 활성 성분(본 발명의 화합물)을 대략 1% 내지 대략 95%, 바람직하게는 대략 20% 내지 대략 90% 포함한다. 본 발명에 따른 제약 조성물은 앰플, 바이알, 좌제, 당제, 정제 또는 캡슐제 형태 등과 같은 단위 투여 형태일 수 있다.
- <25> 본 발명의 항암제는 공지된 방식인 통상적인 용해, 동결건조, 혼합, 과립화 또는 당제화 공정 등을 통해 제조될 수 있고, 시판되는 것을 구입해서 사용할 수도 있다.
- <26> 본 발명의 항암제는 부형제(예를 들어, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 가용화제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충액)를 포함할 수 있다. 또한, 점도 증가 물질(예를 들어, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 카르복시메틸셀룰로스, 텍스트란, 폴리비닐피롤리돈 또는 젤라틴)을 포함할 수도 있다.
- <27> 본 발명의 주사 형태 항암제는 멸균 조건하에서 통상적인 방식으로 제조될 수 있으며, 상기 조성물을 앰플 또는 바이알에 도입하고 용기를 밀폐할 때에도 통상적인 방법을 사용할 수 있다.
- <28> 본 발명의 경구 투여용 항암제로서 정제는 활성 성분을 고체 담체와 배합하고, 필요하다면 생성된 혼합물을 과립화하며, 필요에 따라서는 적절한 부형제를 첨가한 후에 상기 혼합물을 가공하여 제조할 수 있다. 적합한 담체로는 옥수수, 밀, 쌀 또는 감자 전분 등을 사용한 전분페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 카르복시메틸 전분, 가교된 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등이 있다. 적합한 부형제로는 유동성 조절제(flow conditioner) 및 윤활제(예를 들어, 규산, 활석, 스테아르산 또는 그의 염-예를 들어 스테아르산마그네슘 또는 스테아르산칼슘 또는 폴리 에틸렌 글리콜-) 등이 있다.
- <29> 본 발명의 경구 투여용 항암제로서 캡슐제는 젤라틴으로 제조된 건조-충진된 캡슐제 및 젤라틴과 가소제(예를 들어, 글리세롤 또는 소르비톨)로 제조된 연질 밀봉된 것을 사용할 수 있다. 건조-충진된 캡슐제에는 과립 형태의 활성 성분에 충전제(예로서, 락토오스), 결합제 (예로서, 전분), 유동화제 (예로서, 활석 또는 스테아르산마그네슘) 또는 안정화제가 함께 첨가될 수 있다. 연질 캡슐제에서 활성 성분은 적합한 오일성 부형제(예로서, 지방 오일, 과립된 오일 또는 액체 폴리 에틸렌 글리콜) 중에 용해되거나 현탁되는 것이 바람직하고, 안정화제 또는 항균제가 첨가될 수도 있다.

효 과

- <30> 상기에서 살펴본 바와 같이 본 발명의 1,2,4-트리아졸 유도체는 Hsp90 단백질에 대한 억제능이 있음이 확인되었는 바, 본 발명의 화합물은 Hsp90 단백질을 타겟으로 하는 새로운 항암제 조성물에 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <31> 이하 본 발명의 내용을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니며, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

<32>
 <33> **실시예 1: 구조식 1로 표시되는 화합물 유도체의 ATPase 활성 측정**

<34> 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) Hsp90 단백질을 코딩하는 HSC82 ORF를 PCR에 의해 증폭하여 pET23b 플라스미드의 *Nde*I과 *Xho*I 위치에 클로닝하였다. 이 플라스미드로 대장균(*E. coli*) BL21 star(DE3)pLysS를 형질전환시킨 후, Ni-NTA 친화성 크로마토그래피와 Mono Q 5/50 GL을 이용하여 C-말단에 6개의 히스-태그(His-tag)를 가지고 있는 효모 Hsp90 단백질을 FPLC로 정제하였다. Hsp90 ATPase 활성은 말라카이트 그린(malachite green) 시약을 사용하여 방출되는 무기인산을 색의 변화로 검출하는 방법을 통해 96-웰 플레이트에서 측정하였다.

<35> 효모 Hsp90(0.6 μM, 최종농도)를 반응버퍼[1mM ATP, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 20 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 0.4 % DMSO]에 첨가하고, 0.4% DMSO에 녹인 본 발명의 화합물(하기 표 1의 시료들)을 40 μM 농도로 첨가하였을 때(1번 화합물은 50 μM 처리), 변화된 활성을 조사하였다. 반응혼합물을 3시간 동안 37°C에서 배양한 후, 말라카이트 그린(bioassay system co.) 시약을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 이 후 37°C에서 10분 동안 배양하고, 마이크로플레이트 리더(thermo labsystem co.)를 사용하여 620nm에서 흡광도를 측정하였다. 이를 무처리군의 흡광도와 비교함으로써, Hsp90의 저해도를 '저해도(%)'로 하기의 표 1에 나타내었다.

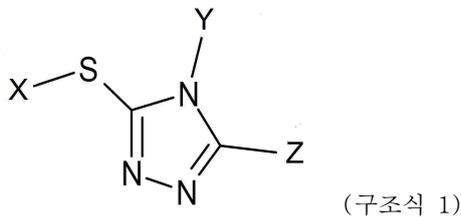


표 1

<37> 본 발명 화합물의 Hsp90의 저해도

화합물	X	Y	Z	저해도(%)
1	펜아실	페닐	1,3-벤조다이옥솔-5-일	78
2	1H-벤즈이미다졸-2-일메틸	페닐	페닐	74
3	수소	1-나프탈레닐	3-(4-메톡시페닐)-1H-피라졸-5-일	86
4	N-벤질카바모일메틸	페닐	3-피리디닐	85
5	카바모일메틸	4-메톡시페닐	3-메틸페닐	72

<38> **실시예 2: 상기 실시예 1에 기재된 화합물 중 1번 화합물의 세포내(in vivo) 효능 검증**

<39> (1) MCF-7 유방암 세포주에서 Her2 분해 및 Hsp70 유도 효과 측정

<40> 1번 화합물을 대상으로 하여 MCF-7 유방암 세포주에서 Hsp90 클라이언트 단백질 중 하나인 Her2 단백질의 분해 효과를 조사하였다. 이와 함께 Hsp70의 유도를 관찰함으로써 Hsp90 억제능을 조사하였다. 열충격전사인자(Hsf 1)는 Hsp90에 의해 그 활성이 억제되므로, Hsp70를 포함하는 Hsf1 타겟 유전자들은 젤다나마이신을 비롯한 Hsp90 억제제들에 의해 발현이 유도되는데 본 실시예에서는 Hsp70의 발현을 조사하였다.

<41> MCF-7 세포에 1번 화합물을 30 μM의 농도로 24시간 동안 처리하였고, Her2와 Hsp70의 발현수준들은 웨스턴 블랏팅 방법으로 조사하였다. 먼저, MCF-7 세포들을 5 x 10⁵ cells/well의 농도로 6-웰 플레이트에 접종하고 하루 동안 세포들을 바닥에 부착시켰다. 그 다음날, 0.4 % DMSO에 녹인 화합물들을 세포에 처리하고, 대조군으로 같은 양의 0.4 % DMSO를 세포에 처리하였다. 24시간 배양 후, 세포들을 TNES 버퍼 [Tris-HCl (50 mM; pH 7.4), NP40 (1 %), EDTA (2 mM), NaCl (100 mM), 페닐메틸설포닐플루오라이드(phenylmethylsulfonyl fluoride) (1 mM), 프로테아제 억제제 콕테일 용액(protease inhibitor cocktail solution) (1 %, sigma)에 용해시킨 후, 세포 추출물들을 Hsp70(Stressgen Bioreagents), Her2(Santa Cruz Biotechnology)에 대한 항체를 사용함으로써 Her2, Hsp70의 발현수준을 분석하였다.

<42> 그 결과 본 발명의 화합물이 Her2 단백질 수준을 대조군과 비교하여 50%이상 감소시키고, Hsp70의 발현을 유도

함을 확인할 수 있었다(도 1). 한편 본 발명 화합물은 15.4 μM의 IC₅₀ 값으로 Hsp90 ATPase 활성을 억제하였다(표 2). 겔다나마이신보다 높은 수치이기는 하지만 향후 더 효능이 향상된 Hsp90 억제제의 골격으로 사용될 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

표 2

<43> 화합물 1의 Hsp90 ATPase 억제 IC₅₀

화합물	겔다나마이신	화합물 1
IC ₅₀ (μM)	2.3	15.4

<44> (2) MCF-7 세포의 성장억제 효과 측정

<45> 한편, 세포의 성장 억제를 측정하기 위하여 술포로다민 B(sulforhodamine B; SRB)를 이용한 방법을 사용하였다. 96-웰 플레이트에서 자란 MCF-7 세포들에 다양한 농도의 겔다나마이신(양성 대조군) 및 1번 화합물을 4일 동안 처리하였다. 세포들을 10% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid)으로 고정한 후, 30분 동안 1 % 아세트산(acetic acid)에 녹아 있는 0.4 % SRB(Sigma-Aldrich)로 염색하였다. 단백질에 결합된 염색약을 트리스 베이스(Tris base; 10 mM; pH 10.5)에 녹인 후, 마이크로플레이트 리더를 통해 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. GI₅₀ 은 무처리 음성 대조군에 비해 50%까지 세포 성장이 저해되는 농도로 계산되었다. 하기 표 3에서 보는 바와 같이, 1번 화합물은 44.61 μM 농도의 GI₅₀ 값을 나타내었으며, 효과적으로 MCF-7 세포들의 성장을 저해하였다. 겔다나마이신보다 다소 높은 수치이기는 하지만 향후 더 효능이 향상된 Hsp90 억제제의 골격으로 사용될 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

표 3

<46> 화합물 1의 MCF-7 성장 억제 GI₅₀

화합물	겔다나마이신	화합물 1
GI ₅₀ (μM) ^a	9.6	44.61
^a n=2 에 의한 수치		

<47> **제형예 1: 정제**

<48> 하기 조성의 정제를 통상적인 방법으로 제조하였다.

<49>

	mg
활성성분으로 상기 화합물 1	100
분말상 락토오스	95
백색 옥수수 전분	35
폴리비닐피롤리돈	8
Na 카복시메틸스타치	10
스테아르산마그네슘	2
정제 총 중량	250

<50> **제형예 2: 캡슐**

<51> 하기 조성의 캡슐을 통상적인 방법으로 제조하였다.

<52>

	mg
활성성분으로 상기 화합물 1	50
겔정질 락토오스	60
미세겔정질 셀룰로오스	34

활석	5
스테아르산마그네슘	1
캡슐 충전 총 중량	150

<53> 제형예 3: 주사액

<54> 하기 조성의 주사액을 일반적인 방법으로 제조하였다.

<55>

활성성분으로 상기 실시예 1번의 화합물	1.0 mg
1N HCl	30.0 μ l
아세트산	0.5 mg
NaCl	8.0 mg
페놀	10.0 mg
1N NaOH	pH 5까지 적당량
H ₂ O	1 mL까지 적당량

도면의 간단한 설명

<56> 도 1은 Hsp90 억제제의 Her2 분해와 Hsp70 유도 효과를 나타낸다. 도 1에서는, 표시된 농도의 겔다나마이신(GA; 양성 대조군), 0.4% DMSO에 녹인 1번 화합물 및 무처리 음성 대조군으로 0.4% DMSO(C)를 MCF-7 세포에 24시간 동안 처리한 후, Her2 와 Hsp70의 발현 정도를 웨스턴 블랏팅을 통해 분석하였다.

도면

도면1

