



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0033634  
(43) 공개일자 2009년04월06일

(51) Int. Cl.

*C07D 239/88* (2006.01) *A61K 31/517* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0098765  
(22) 출원일자 2007년10월01일  
심사청구일자 2007년10월01일

(71) 출원인

재단법인서울대학교산학협력재단  
서울특별시 관악구 봉천7동 산4의 2번지

(72) 발명자

한지숙  
서울 관악구 봉천7동 산 4-2 교수아파트  
122G-401호

박황서

서울 성동구 행당동 한신아파트 105동 302호

김윤정

제주 제주시 이호2동 세원주택 502호

(74) 대리인

오용주

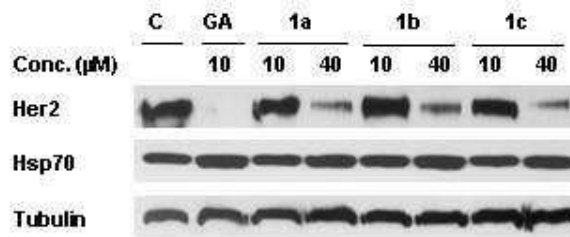
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 3H-퀴나졸린-4-온 유도체를 함유하는 Hsp90 억제제 및 이를 이용한 항암제

(57) 요약

본 발명은 Hsp90 억제제로 새롭게 분리한 3H-퀴나졸린-4-온 유도체에 관한 것으로, 항암제로 제공될 수 있다.

대표도 - 도1

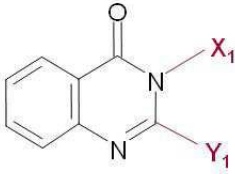


**특허청구의 범위**

**청구항 1**

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

**화학식 1**



상기 화학식 1에서,

X<sub>1</sub>은 H이고, Y<sub>1</sub>은 2-(4-클로로페닐)에티닐, 2-아미노-1-(3-클로로-4-메틸페닐)-4,5-다이하이드로-4-옥소-1H-파이롤-3-일, [2-[(2-푸라닐메틸)아미노]-2-옥소에틸]티오, [2-[(4-아세틸페닐)아미노]-2-옥소에틸]티오 및 [[4-(메톡시카르보닐)페닐]메틸]티오 중 하나이며;

X<sub>1</sub>은 메틸이고, Y<sub>1</sub>은 2-(5-메톡시-1H-인돌-3-일)에티닐이며;

X<sub>1</sub>은 2-하이드록시에틸이고, Y<sub>1</sub>은 2-[4-(다이메틸아미노)페닐]에티닐이며;

X<sub>1</sub>은 4-메톡시사이클로헥사-2,6-다이옥시 에틸이고, Y<sub>1</sub>은 4-메톡시페닐이며;

X<sub>1</sub>은 1-나프타레닐이고, Y<sub>1</sub>은 2-(2-하이드록시페닐)에티닐이며;

X<sub>1</sub>은 페닐이고, Y<sub>1</sub>은 2-(2-하이드록시페닐)에티닐, 2-(2-하이드록시-3-메톡시페닐)에티닐, 2-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)에티닐, [2-(4-모르포리닐)-2-옥소에틸]티오 및 [(4-니트로페닐)메틸]티오 중 하나이며;

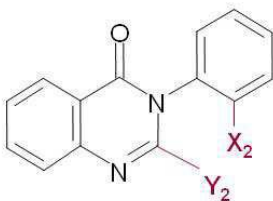
X<sub>1</sub>은 4-파이리디닐메틸이고, Y<sub>1</sub>은 2-(4-니트로페닐)에티닐이며;

X<sub>1</sub>은 2-파이리다이닐메틸이고, Y<sub>1</sub>은 2-(4-플루오로페닐)에티닐 및 (이소인돌-1,3-다이오닐)에틸 중 하나이다.

**청구항 2**

하기 화학식 2의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 Hsp90 억제제:

**화학식 2**



상기 화학식 2에서,

X<sub>2</sub>는 메톡시이고, Y<sub>2</sub>는 2-(2-메틸-1H-인돌-3-일)에티닐 및 (2-파이리다이닐티오)메틸 중 하나이며;

X<sub>2</sub>는 하이드록시이고, Y<sub>2</sub>는 2-(2-푸라닐)에틸닐 및 2-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)에틸닐 중 하나이며;

X<sub>2</sub>는 클로로이고, Y<sub>2</sub>는 2-(3-피리다일)에틸닐 및 (2-피리다일티오)메틸 중 하나이다.

### 청구항 3

하기 화학식 3의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 Hsp90 억제제:

#### 화학식 3



상기 화학식 3에서,

X<sub>3</sub>는 메톡시이고, Y<sub>3</sub>는 2-[2-(다이메틸아미노)페닐]에틸닐, 2-(4-하이드록시페닐)에틸닐, 2-(4-니트로페닐)에틸닐 및 2-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)에틸닐 중 하나이며;

X<sub>3</sub>는 하이드록시이고, Y<sub>3</sub>는 2-[4-(다이메틸아미노)페닐]에틸닐 및 2-페닐에틸닐 중 하나이며;

X<sub>3</sub>는 메틸이고, Y<sub>3</sub>는 [(1,2-다이하이드로-2-옥소-3H-인돌-3-일아이딘)메틸]이다.

### 청구항 4

하기 화학식 4의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 Hsp90 억제제:

#### 화학식 4



상기 화학식 4에서,

X<sub>4</sub>는 메톡시이고, Y<sub>4</sub>는 2-(2-하이드록시-3-메톡시페닐)에틸닐, 2-(4-하이드록시페닐)에틸닐, (1H-벤지미다졸-2-일메틸)티오, [2-(4-모르포리닐)-2-옥소에틸]티오, [2-[[4-(다이메틸아미노)페닐]아미노]-2-옥소에틸]티오 및 [(1,2-다이하이드로-2-옥소-3H-인돌-3-일아이딘)메틸] 중 하나이며;

X<sub>4</sub>는 에톡시이고, Y<sub>4</sub>는 [(3-플루오로페닐)메틸]티오 및 (2-아미노-2-옥소에틸)티오 중 하나이며;

X<sub>4</sub>는 니트로이고, Y<sub>4</sub>는 2-(4-플루오로페닐)에틸닐이며;

X<sub>4</sub>는 메틸이고, Y<sub>4</sub>는 [2-(1,3-벤조다이옥솔-5-일아미노)-2-옥소에틸]티오, (2-아미노-2-옥소에틸)티오 및 [2-옥소-2-(1-피피리다일)에틸]티오 중 하나이며;

X<sub>4</sub>는 클로로이고, Y<sub>4</sub>는 [2-[(4-메틸페닐)아미노]-2-옥소에틸]티오, [2-(2,3-다이하이드로-1H-인돌-1-일)-2-옥소에틸]티오, [1-[(6-인다조리닐)카르바모일]메틸]티오 및 [2-(1,3-벤조다이옥솔-5-일-2-옥소에틸]티오

오 중 하나이며;

X<sub>4</sub>는 플루오로이고, Y<sub>4</sub>는 (이소인돌-1,3-다이오닐)에틸이며;

X<sub>4</sub>는 카르복실이고, Y<sub>4</sub>는 2-(2-하이드록시페닐)에틸이다.

**청구항 5**

제1항 내지 제4항 중 어느 하나의 항에 기재된 Hsp90 억제제를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항암제

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술분야**

<1> 본 발명은 Hsp90 억제제 및 이를 이용한 항암제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 3H-퀴나졸린-4-온의 유도체를 함유하는 Hsp90 억제제 및 이를 이용한 항암제에 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 $\alpha$ , 호르몬 수용체, 서바이빈(survivin), p53 돌연변이 및 hTERT 와 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 신규한 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, 피라졸스(pyrazoles), 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.

<7> 그러나, 17-AAG는 제형, 잠재적 독성, 그리고 낮은 수용체도와 같은 문제가 있기 때문에, 향상된 제형 성질과 효능을 가지는 Hsp90 억제제의 지속적인 개발이 요구되고 있다.

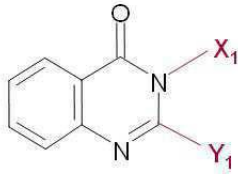
**발명의 내용**

**해결하고자하는 과제**

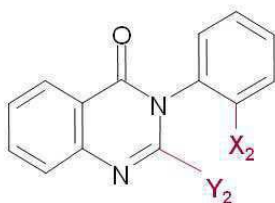
<8> 이에 본 발명은 Hsp90에 대한 억제제로서 신규의 화합물을 제공하는데 그 목적이 있다.

**과제 해결수단**

<9> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은,  
 <10> [화학식 1]



- <11>
- <12> 상기 화학식 1에서,
- <13> X<sub>1</sub>은 H이고, Y<sub>1</sub>은 2-(4-클로로페닐)에티닐(2-(4-chlorophenyl)ethenyl), 2-아미노-1-(3-클로로-4-메틸페닐)-4,5-다이하이드로-4-옥소-1H-파이롤-3-일(2-amino-1-(3-chloro-4-methylphenyl)-4,5-dihydro-4-oxo-1H-pyrrol-3-yl), [2-[(2-푸라닐메틸)아미노]-2-옥소에틸]티오([2-[(2-furanyl)methylamino]-2-oxoethyl]thio), [2-[(4-아세틸페닐)아미노]-2-옥소에틸]티오([2-[(4-acetylphenyl)amino]-2-oxoethyl]thio) 및 [[4-(메톡시카르보닐)페닐]메틸]티오([[4-(methoxycarbonyl)phenyl]methyl]thio) 중 하나이며;
- <14> X<sub>1</sub>은 메틸(methyl)이고, Y<sub>1</sub>은 2-(5-메톡시-1H-인돌-3-일)에티닐(2-(5-methoxy-1H-indol-3-yl)ethenyl)이며;
- <15> X<sub>1</sub>은 2-하이드록시에틸(2-hydroxyethyl)이고, Y<sub>1</sub>은 2-[4-(다이메틸아미노)페닐]에티닐(2-[4-(dimethylamino)phenyl]ethenyl)이며;
- <16> X<sub>1</sub>은 4-메톡시사이클로헥사-2,6-다이이녹시 에틸(4-methoxycyclohexa-2,6-dienoxy ethyl)이고, Y<sub>1</sub>은 4-메톡시페닐(4-methoxyphenyl)이며;
- <17> X<sub>1</sub>은 1-나프탈레닐(1-naphthalenyl)이고, Y<sub>1</sub>은 2-(2-하이드록시페닐)에티닐(2-(2-hydroxyphenyl)ethenyl)이며;
- <18> X<sub>1</sub>은 페닐(phenyl)이고, Y<sub>1</sub>은 2-(2-하이드록시페닐)에티닐(2-(2-hydroxyphenyl)ethenyl), 2-(2-하이드록시-3-메톡시페닐)에티닐(2-(2-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethenyl), 2-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)에티닐(2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethenyl), [2-(4-모르포리닐)-2-옥소에틸]티오([2-(4-morpholinyl)-2-oxoethyl]thio) 및 [(4-니트로페닐)메틸]티오([(4-nitrophenyl)methyl]thio) 중 하나이며;
- <19> X<sub>1</sub>은 4-파이리디닐메틸(4-pyridinylmethyl)이고, Y<sub>1</sub>은 2-(4-니트로페닐)에티닐(2-(4-nitrophenyl)ethenyl)이며;
- <20> X<sub>1</sub>은 2-파이리다닐메틸(2-pyridinylmethyl)이고, Y<sub>1</sub>은 2-(4-플루오로페닐)에티닐(2-(4-fluorophenyl)ethenyl) 및 (이소인돌-1,3-다이오닐)에틸((isoindol-1,3-dionyl)ethyl) 중 하나인,
- <21> 상기 화학식 1의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 Hsp90 억제제를 제공하고,
- <22> [화학식 2]



<23>

<24> 상기 화학식 2에서,

<25> X<sub>2</sub>는 메톡시(methoxy)이고, Y<sub>2</sub>는 2-(2-메틸-1H-인돌-3-일)에티닐(2-(2-methyl-1H-indol-3-yl)ethenyl) 및 (2-파이리다일닐티오)메틸((2-pyridinylthio)methyl) 중 하나이며;

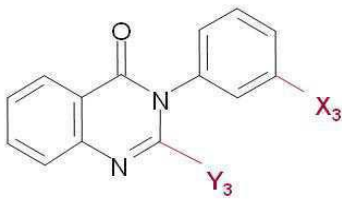
<26> X<sub>2</sub>는 하이드록시(hydroxy)이고, Y<sub>2</sub>는 2-(2-푸라닐)에티닐(2-(2-furanyl)ethenyl) 및 2-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)에티닐(2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethenyl) 중 하나이며;

<27> X<sub>2</sub>는 클로로(chloro)이고, Y<sub>2</sub>는 2-(3-파이리다일)에티닐(2-(3-pyridinyl)ethenyl) 및 (2-파이리다일닐티오)메틸((2-pyridinylthio)methyl) 중 하나인,

<28> 상기 화학식 2의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 Hsp90 억제제를 제공하고,

<29>

<30> [화학식 3]



<31>

<32> 상기 화학식 3에서,

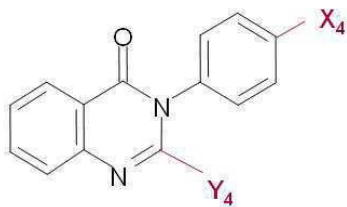
<33> X<sub>3</sub>는 메톡시(methoxy)이고, Y<sub>3</sub>는 2-[2-(다이메틸아미노)페닐]에티닐(2-[2-(dimethylamino)phenyl]ethenyl), 2-(4-하이드록시페닐)에티닐(2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl), 2-(4-니트로페닐)에티닐(2-(4-nitrophenyl)ethenyl), 및 2-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)에티닐(2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethenyl) 중 하나이며;

<34> X<sub>3</sub>는 하이드록시(hydroxy)이고, Y<sub>3</sub>는 2-[4-(다이메틸아미노)페닐]에티닐(2-[4-(dimethylamino)phenyl]ethenyl) 및 2-페닐에티닐(2-phenylethenyl) 중 하나이며;

<35> X<sub>3</sub>는 메틸(methyl)이고, Y<sub>3</sub>는 [(1,2-다이하이드로-2-옥소-3H-인돌-3-일아이딘)메틸]((1,2-dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidene)methyl)인,

<36> 상기 화학식 3의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 Hsp90 억제제를 제공하고,

<37> [화학식 4]



<38>

<39> 상기 화학식 4에서,

<40> X<sub>4</sub>는 메톡시(methoxy)이고, Y<sub>4</sub>는 2-(2-하이드록시-3-메톡시페닐)에티닐(2-(2-hydroxy-3-methoxyphenyl)ethenyl), 2-(4-하이드록시페닐)에티닐(2-(4-hydroxyphenyl)ethenyl), (1H-벤지미다졸-2-일메틸)티오((1H-benzimidazol-2-ylmethyl)thio), [2-(4-모르포리닐)-2-옥소에틸]티오([2-(4-morpholinyl)-2-oxoethyl]thio), [2-[4-(다이메틸아미노)페닐]아미노]-2-옥소에틸]티오([2-[4-(dimethylamino)phenyl]amino]-2-oxoethyl]thio) 및 [(1,2-다이하이드로-2-옥소-3H-인돌-3-일아이딘)메틸]((1,2-dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidene)methyl) 중 하나이며;

- <41> X<sub>4</sub>는 에톡시(ethoxy)이고, Y<sub>4</sub>는 [(3-플루오로페닐)메틸]티오([(3-fluorophenyl)methyl]thio) 및 (2-아미노-2-옥소에틸)티오((2-amino-2-oxoethyl)thio) 중 하나이며;
- <42> X<sub>4</sub>는 니트로(nitro)이고, Y<sub>4</sub>는 2-(4-플루오로페닐)에틸(2-(4-fluorophenyl)ethenyl)이며;
- <43> X<sub>4</sub>는 메틸(methyl)이고, Y<sub>4</sub>는 [2-(1,3-벤조다이옥솔-5-일아미노)-2-옥소에틸]티오([2-(1,3-benzodioxol-5-ylamino)-2-oxoethyl]thio), (2-아미노-2-옥소에틸)티오((2-amino-2-oxoethyl)thio) 및 [2-옥소-2-(1-피페리다닐)에틸]티오([2-oxo-2-(1-piperidinyl)ethyl]thio) 중 하나이며;
- <44> X<sub>4</sub>는 클로로(chloro)이고, Y<sub>4</sub>는 [2-[(4-메틸페닐)아미노]-2-옥소에틸]티오([2-[(4-methylphenyl)amino]-2-oxoethyl]thio), [2-(2,3-다이하이드로-1H-인돌-1-일)-2-옥소에틸]티오([2-(2,3-dihydro-1H-indol-1-yl)-2-oxoethyl]thio), [1-[(6-인다조리닐)카르바모일]메틸]티오([1-[(6-indazoliny]l)carbamoyl]methyl]thio) 및 [2-(1,3-벤조다이옥솔-5-일-2-옥소에틸]티오([2-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2-oxoethyl]thio) 중 하나이며;
- <45> X<sub>4</sub>는 플루오로(fluoro)이고, Y<sub>4</sub>는 (이소인돌-1,3-다이오닐)에틸((isoindol-1,3-dionyl)ethyl)이며;
- <46> X<sub>4</sub>는 카르복실(carboxyl)이고, Y<sub>4</sub>는 2-(2-하이드록시페닐)에틸(2-(2-hydroxyphenyl)ethenyl)인,
- <47> 상기 화학식 4의 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 Hsp90 억제제를 제공한다.
- <48> 또한, 본 발명은 상기에 기재된 화합물들을 중 어느 하나의 Hsp90 억제제를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항암제를 제공한다.
- <49> 이하, 본 발명에 대해 더욱 상세히 설명하고자 한다.
- <50> 본 발명에서는 85,000개의 화합물질을 대상으로 도킹 시뮬레이션을 통한 가상 스크리닝을 수행하여 300개의 화합물질을 우선 선별하였다. 이 300개 중에서 285개의 화합물질을 대상으로 효모 Hsp90를 이용한 ATPase 활성 조사를 통해 Hsp90 억제제를 선별하고자 하였다.
- <51> Hsp90 ATPase 활성은 말라카이트 그린(malachite green) 시약을 사용하여 방출되는 무기인산을 색의 변화로 검출하는 방법을 통해 96-웰 플레이트에서 측정하였다. 그 결과, 3H-퀴나졸린4-온 유도체인 본 발명의 48개의 화합물에서 50 μM의 첨가 농도(일부 화합물은 40 μM)에서 Hsp90의 활성이 65% 이하(35% 이상의 억제 효능을 의미함)로 나타났다.
- <52> 한편, 실시예 중 21번 화합물, 31번 화합물, 48번 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 조사한 것이다. MCF-7 세포에서 각각의 화합물질을 30 μM의 농도로 24시간 동안 처리하였고, Her2와 Hsp70의 발현수준들을 웨스턴 블랏팅 방법으로 조사하였다. 대조군(겔다나마이신)과 비교했을 때, 21번 화합물, 31번 화합물, 48번 화합물 처리군에서 Her2 단백질 수준이 50% 이상 감소하고, Hsp70의 발현이 유도됨을 확인하였다.
- <53> 또한, 세포의 성장 저해를 측정하였는데, 21번 화합물, 31번 화합물, 48번 화합물들이 25.4~35.6 μM 농도 사이의 GI<sub>50</sub> 값을 나타내어 효과적으로 MCF-7 세포들의 성장을 저해함이 확인되었고, 이는 겔다나마이신의 GI<sub>50</sub> (9.6 μM) 보다 2.6~3.7배 정도밖에 높지 않은 수치이다.
- <54> 한편, 본 발명은 본 발명의 48개 화합물 중 하나를 포함하는 암 치료용 (더 넓은 의미로는 예방용) 약제, 즉 항암제를 제공한다.
- <55> 본 발명의 항암제는 활성 성분으로서 본 발명의 화합물 또는 제약상 허용가능한 이들의 염을 유의한 양만큼 함유하고, 1종 이상의 무기 또는 유기 고체 또는 액상의 제약상 허용가능한 담체를 포함하거나 혼합하는 혼합물이다.
- <56> 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.



- <57> 본 발명의 화합물 또는 제약상 허용가능한 이들의 염을 포유동물, 예를 들어 대략 70 kg 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.
- <58> 본 발명의 항암제는 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.
- <59> 본 발명의 항암제는 공지된 방식인 통상적인 용해, 동결건조, 혼합, 과립화 또는 당제화 공정 등을 통해 제조될 수 있고, 시판되는 것을 구입해서 사용할 수도 있다.
- <60> 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.
- <61> 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.
- <62> 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.
- <63> 본 발명의 경구 투여용 항암제로서 캡슐제는 젤라틴으로 제조된 건조-충전된 캡슐제 및 젤라틴과 가소제(예를 들어, 글리세롤 또는 소르비톨)로 제조된 연질 밀봉된 것을 사용할 수 있다. 건조-충전된 캡슐제에는 과립 형태의 활성 성분에 충전제(예로서, 락토오스), 결합제 (예로서, 전분), 유동화제 (예로서, 활석 또는 스테아르산 마그네슘) 또는 안정화제가 함께 첨가될 수 있다. 연질 캡슐제에서 활성 성분은 적합한 오일성 부형제(예로서, 지방 오일, 파라핀 오일 또는 액체 폴리 에틸렌 글리콜) 중에 용해되거나 현탁되는 것이 바람직하고, 안정화제 또는 항균제가 첨가될 수도 있다.

**효 과**

- <64> 이상 상기에서 살펴본 바와 같이 본 발명의 3H-퀴나졸린-4-온 유도체는 Hsp90 단백질에 대한 억제능이 있음이 확인되었는 바, 본 발명은 항암제로서 사용될 수 있으므로 의약산업에서 매우 유용한 것이다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

- <65> 상기 본 발명의 내용을 하기 실시예를 들어 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예만 한정되는 것은 아니고 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.
- <66> 한편, 하기의 실시예 1~4에서는 본 발명에서 선별한 화합물의 ATPase 활성억제능을 측정하였는데, 그 방법은 하기와 같았다.
- <67> 사카로마이세스 세레비시애(*Saccharomyces cerevisiae*) Hsp90 단백질을 코딩하는 HSC82 ORF를 PCR에 의해 증폭하여 pET23b 플라스미드의 *NdeI*과 *XhoI* 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.
- <68> 효모 Hsp90(0.6 μM, 최종농도)를 반응버퍼[1mM ATP, 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 20 mM KCl, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.4 % DMSO]에 첨가하고, 0.4% DMSO에 녹인 본 발명의 화합물(하기 실시예1~4에서 샘플번호 1~48로 표시)을 40 μM 농도로 첨가하였을 때(21번 화합물, 31번 화합물, 48번 화합물은 50 μM 처리), 변화된 활성을 조

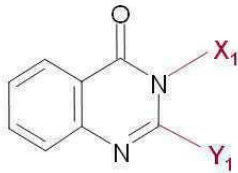


사하였다. 반응혼합물을 3시간 동안 37℃에서 배양한 후, 말라카이트 그린(bioassay system co.) 시약을 첨가하여 반응을 중단시켰다. 이 후 37℃에서 10분 동안 배양하고, 마이크로플레이트 리더(thermo labssystem co.)를 사용하여 620nm에서 흡광도를 측정하였다. 이를 무처리군의 흡광도와 비교함으로써, Hsp90의 저해도를 '활성 (%)'으로 하기의 실시예 1~4에서 표시하였다(하기의 실시예 1~5에 표시된 수치들은 모두 유의성이 인정되는 데이터 값들이다)

<69> 한편, ATPase 억제 화합물로 알려진 양성 대조군, 겐다나마이신은 2.3 μM 처리시 50%의 활성을 나타냈다.

<70> 실시예 1: 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 유도체의 ATPase 활성 측정

<71> [화학식 1]



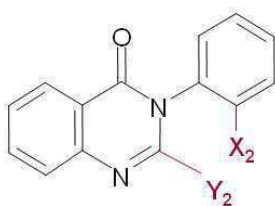
<72>

표 1

샘플	X <sub>1</sub>	Y <sub>1</sub>	활성(%)
1	H	2-(4-클로로페닐)에티닐	50.16
2		2-아미노-1-(3-클로로-4-메틸페닐)-4,5-다이하이드로-4-옥소-1H-파이롤-3-일	58.31
3		[2-[(2-푸라닐메틸)아미노]-2-옥소에틸]티오	55.80
4		[2-[(4-아세틸페닐)아미노]-2-옥소에틸]티오	59.56
5		[[4-(메톡시카르보닐)페닐]메틸]티오	57.68
6	메틸	2-(5-메톡시-1H-인돌-3-일)에티닐	52.04
7	2-하이드록시에틸	2-[4-(다이메틸아미노)페닐]에티닐	58.93
8	4-메톡시사이클로헥사-2,6-다이옥시 에틸	4-메톡시페닐	49.22
9	1-나프타레닐	2-(2-하이드록시페닐)에티닐	37.00
10	페닐	2-(2-하이드록시페닐)에티닐	56.11
11		2-(2-하이드록시-3-메톡시페닐)에티닐	55.80
12		2-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)에티닐	56.74
13		[2-(4-모르포리닐)-2-옥소에틸]티오	54.86
14		[(4-니트로페닐)메틸]티오	59.87
15	4-파이리디닐메틸	2-(4-니트로페닐)에티닐	50.16
16	2-파이리다닐메틸	2-(4-플루오로페닐)에티닐	54.86
17		(이소인돌-1,3-다이오닐)에틸	15.6

<74> 실시예 2: 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 유도체의 ATPase 활성 측정

<75> [화학식 2]



<76>

표 2

<77>

샘플	X <sub>2</sub>	Y <sub>2</sub>	활성(%)
18	메톡시	2-(2-메틸-1H-인돌-3-일)에티닐	53.29
19		(2-파이리다이닐티오)메틸	47.65
20	하이드록시	2-(2-푸라닐)에티닐	60.50
21		2-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)에티닐	25.10
22	클로로	2-(3-파이리다이닐)에티닐	59.25
23		(2-파이리다이닐티오)메틸	55.49

<78>

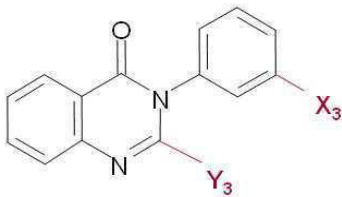
주) 21번 샘플은 50 μM 처리군

<79>

실시예 3: 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물 유도체의 ATPase 활성 측정

<80>

[화학식 3]



<81>

표 3

<82>

샘플	X <sub>3</sub>	Y <sub>3</sub>	활성(%)
24	메톡시	2-[2-(다이메틸아미노)페닐]에티닐	55.17
25		2-(4-하이드록시페닐)에티닐	55.49
26		2-(4-니트로페닐)에티닐	55.49
27		2-(4-하이드록시-3-메톡시페닐)에티닐	59.87
28	하이드록시	2-[4-(다이메틸아미노)페닐]에티닐	58.31
29		2-페닐에티닐	60.50
30	메틸	[(1,2-다이하이드로-2-옥소-3H-인돌-3-일아이딘)메틸]	59.87

<83>

실시예 4: 하기 화학식 4로 표시되는 화합물 유도체의 ATPase 활성 측정

<84>

[화학식 4]



<85>

표 4

<86>

샘플	X <sub>4</sub>	Y <sub>4</sub>	활성(%)
----	----------------	----------------	-------

31	메톡시	2-(2-하이드록시-3-메톡시페닐)에티닐	21.30
32		2-(4-하이드록시페닐)에티닐	53.92
33		(1H-벤지미다졸-2-일메틸)티오	50.78
34		[2-(4-모르포리닐)-2-옥소에틸]티오	53.61
35		[2-[[4-(다이메틸아미노)페닐]아미노]-2-옥소에틸]티오	51.10
36		[(1,2-다이하이드로-2-옥소-3H-인돌-3-일아이딘)메틸	60.50
37	에톡시	[(3-플루오로페닐)메틸]티오	22.30
38		(2-아미노-2-옥소에틸)티오	47.02
39	니트로	2-(4-플루오로페닐)에티닐	46.71
40	메틸	[2-(1,3-벤조다이옥솔-5-일아미노)-2-옥소에틸]티오	53.92
41		(2-아미노-2-옥소에틸)티오	58.31
42		[2-옥소-2-(1-피페리다이닐)에틸]티오	55.17
43	클로로	[2-[(4-메틸페닐)아미노]-2-옥소에틸]티오	55.80
44		[2-(2,3-다이하이드로-1H-인돌-1-일)-2-옥소에틸]티오	57.05
45		[1-[(6-인다조리닐)카르바모일]메틸]티오	59.87
46		[2-(1,3-벤조다이옥솔-5-일-2-옥소에틸]티오	52.66
47	플루오로	(이소인돌-1,3-다이오닐)에틸	52.66
48	카르복실	2-(2-하이드록시페닐)에티닐	30.30

<87> 주) 31번, 48번 샘플은 50 μM 처리군

<88> 실시예 5: 상기 실시예 1~4에 기재된 화합물 중 21번 화합물, 31번 화합물, 48번 화합물의 세포내(*in vivo*) 효능 검증

<89> 21번 화합물, 31번 화합물, 48번 화합물을 대상으로 하여 MCF-7 유방암 세포주에서 Her2 분해효과를 조사하였다. Hsp90 클라이언트 단백질 중 하나인 Her2 단백질의 분해와 함께 Hsp70의 유도를 관찰함으로써 Hsp90 억제능을 조사한 것이다. 열 충격전사인자(Hsf1)는 Hsp90에 의해 그 활성이 억제되므로, Hsp70를 포함하는 Hsf1 타겟 유전자들은 켈다나마이신을 비롯한 Hsp90 억제제들에 의해 발현이 유도되는데 본 실시예에서는 Hsp70의 발현 정도도 조사하였다.

<90> MCF-7 세포에 각각의 화합물(21번, 31번, 48번)을 30 μM의 농도로 24시간 동안 처리하였고, Her2와 Hsp70의 발현수준들은 웨스턴 블랏팅 방법으로 조사하였다. 먼저, MCF-7 세포들을 5x10<sup>5</sup> 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), phenylmethylsulfonyl fluoride (1 mM), protease inhibitor cocktail solution (1 %, sigma)]에 용해시킨 후, 세포 추출물들을 Hsp70 (Stressgen Bioreagents), Her2(Santa Cruz Biotechnology) 및 튜불린(tubulin; Santa Cruz Biotechnology)에 대한 항체를 사용함으로써 Her2, Hsp70, 튜불린의 발현수준을 분석하였다.

<91> 양성 대조군(켈다나마이신)과 비교했을 때, Her2 단백질 수준이 50% 이상 감소하고, Hsp70의 발현이 유도되었다(도 1: 도 1에서 1a는 21번 화합물, 1b는 31번 화합물, 1c는 48번 화합물). 이들 3 개 화합물들은 Her2가 분해되어 감소되는 효과가 모두 유사하게 나타났다.

<92> 한편, 세포의 성장 저해를 측정하기 위하여 설향로다민 B(sulforhodamine B; SRB)를 이용한 방법을 사용하였다. 96-웰 플레이트에서 자란 MCF-7 세포들에 다양한 농도의 켈다나마이신(양성 대조군), 21번 화합물, 31번 화합물 및 48번 화합물을 4일 동안 처리하였다. 세포들을 10% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid)으로 고정된 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. GI<sub>50</sub>은 무처리 음성 대조군에 비해 50%까지 세포 성장이 저해되는 농도로 계산되었다(표 5).

**표 5**

<93>

화합물	겔다나마이신	21번 화합물	31번 화합물	48번 화합물
GI <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	9.6	25.4	27.5	35.6
<sup>a</sup> n=2 에 의한 수치				

<94>

상기 표 5에서 보는 바와 같이, 21번 화합물, 31번 화합물, 48번 화합물들은 25.4~35.6 μM 농도 사이의 GI<sub>50</sub> 값을 나타내었으며, 효과적으로 MCF-7 세포들의 성장을 저해했다. 이는 겔다나마이신의 GI<sub>50</sub> (9.6 μM) 보다 2.6~3.7배 정도밖에 높지않은 수치이다.

<95>

**제형예 1: 정제**

<96>

하기 조성의 정제를 통상적인 방법으로 제조하였다.

<97>

	mg
활성성분으로 상기 48번의 화합물	100
분말상 락토오스	95
백색 옥수수 전분	35
폴리바이닐피롤리돈	8
Na 카복시메틸스타치	10
스테아르산마그네슘	2
정제 총 중량	250

<98>

**제형예 2: 캡슐**

<99>

하기 조성의 캡슐을 통상적인 방법으로 제조하였다.

<100>

	mg
활성성분으로 상기 48번의 화합물	50
결정질 락토오스	60
미세결정질 셀룰로오스	34
활석	5
스테아르산마그네슘	1
캡슐 충전 총 중량	150

<101>

**제형예 3: 주사액**

<102>

하기 조성의 주사액을 일반적인 방법으로 제조하였다.

<103>

활성성분으로 상기 실시예 48번의 화합물	1.0 mg
1N HCl	30.0 μl
아세트산	0.5 mg
NaCl	8.0 mg
페놀	10.0 mg
1N NaOH	pH 5까지 적당량
H <sub>2</sub> O	1 mL까지 적당량

**도면의 간단한 설명**

<104>

도 1은 Hsp90 억제제의 Her2 분해와 Hsp70 유도 효과를 나타낸다. 도 1에서는, 표시된 농도의 겔다나마이신(GA; 양성 대조군), 0.4% DMSO에 녹인 21번 화합물(1a), 31번 화합물(1b), 48번 화합물(1c) 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. 튜블린(Tubulin)은 정량적 분석을 위한 대조군으로 사용한 것이다.

**도면**

**도면1**

