



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년01월22일
(11) 등록번호 10-0796637
(24) 등록일자 2008년01월15일

(51) Int. Cl.

C07D 245/06 (2006.01) A61K 31/395 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0095804
(22) 출원일자 2006년09월29일
심사청구일자 2006년09월29일

(56) 선행기술조사문헌
KR1020020072815 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

한국생명공학연구원
대전 유성구 어은동 52번지

(72) 발명자

홍영수
대전광역시 유성구 어은동 한빛아파트 127동 1404호

이경

대전 유성구 반석동 금성백조 502-2003

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 13 항

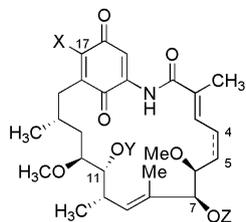
심사관 : 이동욱

(54) 젤다나마이신 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 암 예방 및치료제

(57) 요약

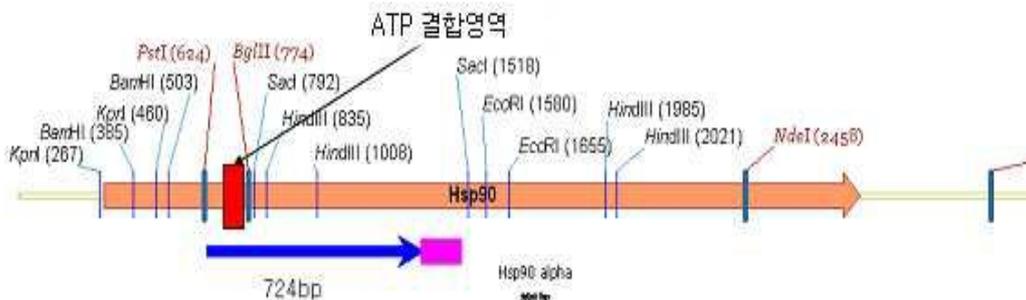
본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 젤다나마이신 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료제에 관한 것으로서, 본 발명의 상기 젤다나마이신 유도체는 암세포의 성장 및 전이에 중요한 역할을 하는 사페론(charperone)인 Hsp90의 활성을 저해함으로써, 암 치료제뿐만 아니라, 항생제, 항진균제, 항바이러스제, 면역억제제, 퇴행성 신경 질환 치료제, 항염증제 등으로 유용하게 사용될 수 있다.

<화학식 1>



(상기 화학식 1에서, X, Y, Z은 명세서 내에 정의된 바와 같다)

대표도 - 도1



(72) 발명자

이정준

대전 유성구 어은동 한빛아파트 101동 1804호

김영란

대전시 유성구 신성동 52 4106호

김원철

대전 유성구 전민동 청구나래아파트 105-101

(56) 선행기술조사문헌

KR1020040023581 A

KR1020040054692 A

KR1020060014532 A

US05932566 A1

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

- 1) 카르밤산 9-카바모일옥시-8, 14, 19-트리메톡시-4, 10, 12, 16-테트라메틸-3, 20, 22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21), 4, 10, 18-테트라엔-13-일 에스테르;
- 2) 카르밤산 9-카바모일옥시-19-에틸아미노-8, 14-디메톡시-4, 10, 12, 16-테트라메틸-3, 20, 22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21), 4, 10, 18-테트라엔-13-일 에스테르;
- 3) 카르밤산 19-알릴아미노-9-카바모일옥시-8, 14-디메톡시-4, 10, 12, 16-테트라메틸-3, 20, 22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21), 4, 10, 18-테트라엔-13-일 에스테르;
- 4) 카르밤산 9-카바모일옥시-19-(2-디메틸아미노-에틸아미노)-8, 14-디메톡시-4, 10, 12, 16-테트라메틸-3, 20, 22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21), 4, 10, 18-테트라엔-13-일 에스테르;
- 5) 카르밤산 9-카바모일옥시-19-(2-디에틸아미노-에틸아미노)-8, 14-디메톡시-4, 10, 12, 16-테트라메틸-3, 20, 22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21), 4, 10, 18-테트라엔-13-일 에스테르;
- 6) 3-옥소-부티르산 8, 14, 19-트리메톡시-4, 10, 12, 16-테트라메틸-3, 20, 22-트리옥소-13-(3-옥소-부티릴옥시)-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21), 4, 10, 18-테트라엔-9-일 에스테르;
- 7) 메틸-카르밤산 8, 14-디메톡시-4, 10, 12, 16-테트라메틸-19-메틸아미노-13-메틸카바모일옥시-3, 20, 22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21), 4, 10, 18-테트라엔-9-일 에스테르;
- 8) 카르밤산 19-알릴아미노-9-카바모일옥시-8, 14-디메톡시-4, 10, 12, 16-테트라메틸-3, 20, 22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21), 4, 6, 10, 18-펜타엔-13-일 에스테르;
- 9) 카르밤산 9-카바모일옥시-19-(2-디메틸아미노-에틸아미노)-8, 14-디메톡시-4, 10, 12, 16-테트라메틸-3, 20, 22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21), 4, 6, 10, 18-펜타엔-13-일 에스테르;
- 10) 카르밤산 9-카바모일옥시-19-(2-디에틸아미노-에틸아미노)-8, 14-디메톡시-4, 10, 12, 16-테트라메틸-3, 20, 22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21), 4, 6, 10, 18-펜타엔-13-일 에스테르;
- 11) 카르밤산 9-카바모일옥시-8, 14-디메톡시-4, 10, 12, 16-테트라메틸-3, 20, 22-트리옥소-19-(2-피롤리딘-1-일-에틸아미노)-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21), 4, 6, 10, 18-펜타엔-13-일 에스테르;
- 12) 카르밤산 19-에틸아미노-13-하이드록시-8, 14-디메톡시-4, 10, 12, 16-테트라메틸-3, 20, 22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21), 4, 10, 18-테트라엔-9-일 에스테르;
- 13) 카르밤산 19-알릴아미노-13-하이드록시-8, 14-디메톡시-4, 10, 12, 16-테트라메틸-3, 20, 22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21), 4, 10, 18-테트라엔-9-일 에스테르;
- 14) 카르밤산 19-(2-디메틸아미노-에틸아미노)-13-하이드록시-8, 14-디메톡시-4, 10, 12, 16-테트라메틸-3, 20, 22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21), 4, 10, 18-테트라엔-9-일 에스테르;
- 15) 카르밤산 19-(2-디에틸아미노-에틸아미노)-13-하이드록시-8, 14-디메톡시-4, 10, 12, 16-테트라메틸-3, 20, 22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21), 4, 10, 18-테트라엔-9-일 에스테르;
- 16) 카르밤산 13-하이드록시-8, 14-디메톡시-4, 10, 12, 16-테트라메틸-3, 20, 22-트리옥소-19-(2-피롤리딘-1-일-에

틸아미노)-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르;

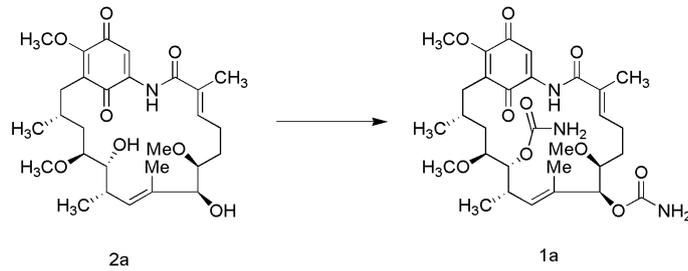
17) 카르바산 13-하이드록시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-19-(2-모르폴린-4-일-에틸아미노)-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르; 및

18) 카르바산 13-하이드록시-19-(3-이미다졸-1-일-프로필아미노)-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 켈다나마이신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 5

하기 반응식 2에 나타난 바와 같이, 출발물질인 화학식 2a의 화합물과 트리클로로아세틸 이소시아네이트를 유기용매하에서 반응시킨 후, 상기 반응생성물을 Al₂O₃ 존재하에서 가수분해하는 단계를 포함하여 이루어지는 하기 화학식 1a로 표시되는 켈다나마이신 유도체의 제조방법.

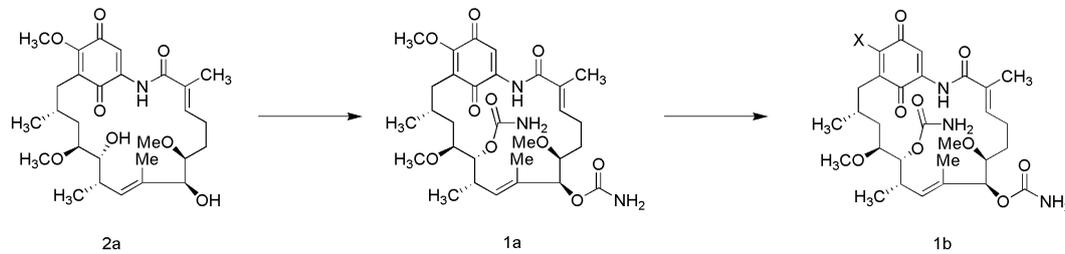
<반응식 2>



청구항 6

제5항에 있어서, 하기 반응식 3에 나타난 바와 같이, 화합물 1a와 아민계 화합물을 유기용매 하에서 반응시키는 단계를 더 포함하여 이루어지는 하기 화학식 1b로 표시되는 켈다나마이신 유도체의 제조방법.

<반응식 3>

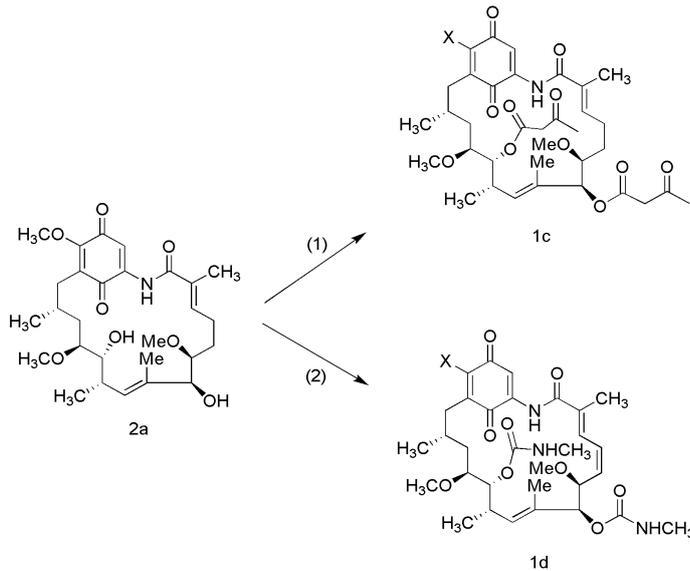


(상기 반응식에서, X는 청구항 4항의 화학물 명칭에서 정의된 바와 같다)

청구항 7

하기 반응식 4의 경로(1)에 나타난 바와 같이, 출발물질인 화학식 2a의 화합물과 디케텐을 4-디메틸아미노피리딘(DMAP) 및 염기의 존재하에 유기용매하에서 반응시키는 단계를 포함하여 이루어지는 하기 화학식 1c로 표시되는 켈다나마이신 유도체의 제조방법.

<반응식 4>



(상기 반응식에서 X는 청구항 4항의 화학물 명칭에서 정의된 바와 같다)

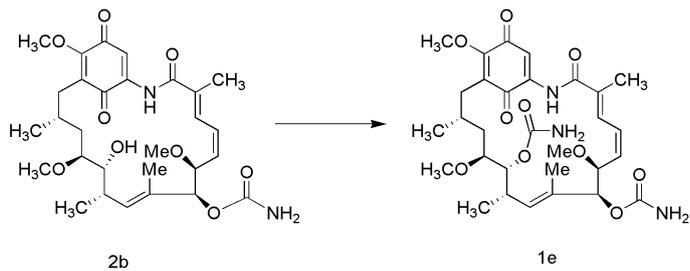
청구항 8

제7항의 반응식 4의 경로(2)에 나타난 바와 같이, 출발물질인 화학식 2a로 표시되는 화합물과 1,1'-카보닐디이미다졸을 유기용매하에서 반응시킨 후, 상기 반응용액에 아민계 화합물을 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하여 이루어지는 상기 화학식 1d로 표시되는 젤다나마이신 유도체의 제조방법.

청구항 9

하기 반응식 5에 나타난 바와 같이, 출발물질인 화학식 2b의 화합물과 트리클로로아세틸 이소시아네이트를 유기용매하에서 반응시킨 후, 상기 반응생성물을 Al₂O₃ 존재하에서 가수분해하는 단계를 포함하여 이루어지는 하기 화학식 1e로 표시되는 젤다나마이신의 제조방법.

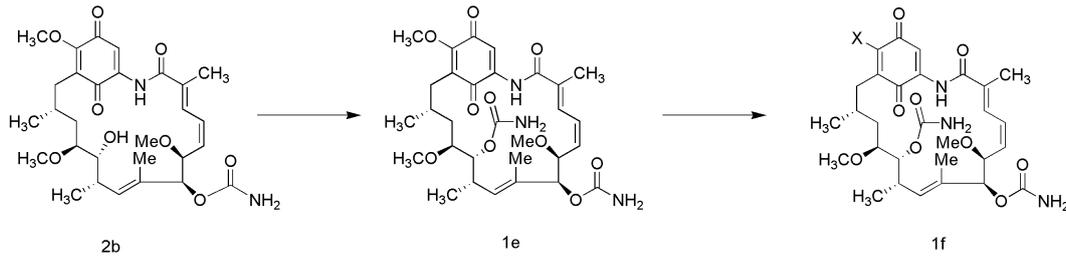
<반응식 5>



청구항 10

제9항에 있어서, 하기 반응식 6에 나타난 바와 같이, 화합물 1e와 아민계 화합물을 유기용매하에서 반응시키는 단계를 더 포함하여 이루어지는 하기 화학식 1f로 표시되는 젤다나마이신 유도체의 제조방법.

<반응식 6>

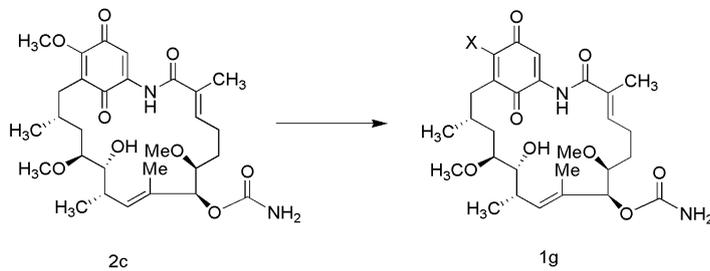


(상기 반응식에서, X는 청구항 4항의 화학물 명칭에서 정의된 바와 같다)

청구항 11

하기 반응식 7에 나타난 바와 같이, 출발물질인 화학식 2c의 화합물과 아민계 화합물을 유기용매하에서 반응시키는 단계를 포함하여 이루어지는 하기 화학식 1g로 표시되는 젤다나마이신 유도체의 제조방법.

<반응식 7>



(상기 반응식에서, X는 청구항 4항의 화학물 명칭에서 정의된 바와 같다)

청구항 12

제5항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유기용매는 디클로로메탄, 디클로로에탄 및 테트라하이드로퓨란으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 1종을 사용하는 것을 특징으로 하는 젤다나마이신 유도체의 제조방법.

청구항 13

제6항, 제8항, 제10항 또는 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아민계 화합물은 에틸아민, 알릴아민, 2-N,N-디메틸아미노-에틸아민, 2-N,N-디에틸아미노-에틸아민, 플루오로에틸아민, 1-(2-아미노에틸)피롤리딘, 4-(2-아미노에틸)모폴린 및 1-(3-아미노프로필)이미다졸로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 1종인 것을 특징으로 하는 젤다나마이신 유도체의 제조방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

제4항의 젤다나마이신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 질환의 예방 및 치료제.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 암질환은 유방암, 간암, 위암, 결장암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부암, 자궁암, 난소암, 직장암, 식도암, 소장암, 항문부근암, 결장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 전립선암, 방광암, 신장암, 수뇨관암, 신장세포암종, 신장골반암종 및 중추신경계 종양으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 질환인 것을 특징으로 하는 암 질환의 예방 및 치료제.

청구항 17

제4항의 젤다나마이신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항생제, 항진균제, 항바이러스제, 면역억제제, 퇴행성 신경 질환 치료제 또는 항염증제.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <4> 본 발명은 젤다나마이신 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이의 제조방법 및 이를 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료제에 관한 것이다.
- <5> 젤다나마이신은 허비마이신(herbimycin), 맥백신(macbecin), 레브라스타틴(reblastatin) 등과 함께, 3-아미노-5-하이드록시벤조산(3-amino-5-hydroxybenzoic acid; AHBA)을 최초 전구체로 이용하여 생합성 되는 폴리케타이드(polyketide) 골격 구조를 갖는 화합물로서, 이들은 1970년에서 2000년 사이에 항생제, 항진균제, 항바이러스제 및 항암제로서 그 기능이 확인된 바 있다.
- <6> 이러한 젤다나마이신은 1994년에 Neckers 등에 의해 샤페론 활성을 가진 열충격 단백질 90(Heat shock protein 90; 이하, Hsp90)의 ATP 결합자리에 결합하는 것이 확인되었다. 이러한 발견으로 인하여 기존의 젤다나마이신이 암 발생단백질(oncogenic protein) 기능을 갖는 타이로신 키나아제(tyrosin kinase)의 효소활성을 억제하여 항암활성을 나타내는 것이 아니라, 타이로신 키나아제를 포함한 다양한 종류의 Hsp90의 결합단백질(client protein)의 구조적 안전성에 중요한 Hsp90의 기능을 저해함으로써, 이러한 결합단백질들의 안정성이 저해되어 나타나는 약리효능인 것으로 확인되었다.
- <7> 이러한 Hsp90의 생리적 중요성 때문에 젤다나마이신의 화학합성 유도체인 17-알릴아미노-데메톡시젤다나마이신(17-allylamino-demethoxygeldanamycin, 17-AAG) 및 17-디메틸아미노에틸아미노-17-디메톡시젤다나마이신(17-(dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin, 17-DMAG)과 같은 Hsp90 활성저해제가 항암제로서 개발되고 있다. 또한, 미국특허출원 제10/212,962호는 세포의 바람직하지 않은 과증식에 의한 암이나 기타 질병의 치료에 유용한 벤조퀴논 안사마이신 유사화합물과 그 제조방법에 관하여 개시하고 있다.
- <8> 나아가, 대한민국특허출원 제2003-7008551호는 신규한 젤다나마이신유도체 및 그 제조방법을 개시하고 있고, 대한민국특허출원 제2004-7004202호는 17-알릴 아미노 젤다나마이신 및 기타 안사마이신에 대한 화학합성을 이용한 제조방법을 개시하고 있다.
- <9> 이에, 본 발명자들은 상기와 같이 젤다나마이신 또는 이의 유도체가 암과 관련된 여러 질병의 치료요법제로 사용될 수 있음에 착안하여 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 아종 두아마이세티쿠스의 생합성유전자기능을 조작하여 젤다나마이신 유도체를 상기 균주로부터 대량 생산하여 이들 생합성 유도체의 화학적 변이를 통해 본 발명의 젤다나마이신 유도체가 우수한 항암 작용을 나타냄을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <10> 본 발명의 목적은 젤다나마이신 유도체를 제공하는 데 있다.
- <11> 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 젤다나마이신 유도체를 제조하는 방법을 제공하는 데 있다.
- <12> 나아가, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 젤다나마이신 유도체를 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료제를 제공하는 데 있다.
- <13> 본 발명의 다른 목적은, 상기 젤다나마이신 유도체를 유효성분으로 함유하는 Hsp90 활성 저해제를 제공하는 데 있다.
- <14> 나아가, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 젤다나마이신 유도체를 유효성분으로 함유하는 항생제, 항진균제, 항바이러스제, 면역억제제, 퇴행성 신경질환 치료제, 항염증제 등을 제공하는 데 있다.

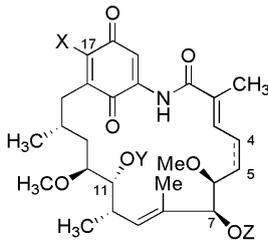
발명의 구성 및 작용

<15> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 1) 젤다나마이신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 2) 이의 제조방법 및 3) 이를 유효성분으로 함유하는 암 예방 및 치료제, Hsp90 활성 저해제, 항생제, 항진균제, 항바이러스제, 면역억제제, 퇴행성 신경질환 치료제 또는 항염증제를 제공한다.

<16> 이하, 본 발명에 대해 상세하게 설명한다.

<17> 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 젤다나마이신 유도체를 제공한다.

화학식 1



<18>

<19> 상기 화학식 1에서,

<20> X는 -OR₁ 또는 -NHR₂이고, 여기서 R₁은 C₁~C₅의 알킬이고, R₂는 C₁~C₅의 알킬, C₁~C₅의 알케닐, C₁~C₅의 알킬로 치환된 모노 또는 디알킬아미노-C₁~C₅의 알킬아미노, 할로젠으로 치환된 C₁~C₅의 할로알킬아미노, 또는 1 또는 2 이상의 동종 또는 이종 헤테로 원자를 포함하는 C₂~C₇ 헤테로사이클로알킬로 치환된 C₁~C₅의 알킬아미노이고;

<21> Y 및 Z는 각각 독립적으로 또는 선택적으로 수소, -COR₃ 또는 -CONHR₄이며, 여기서 R₃는 C₁~C₅의 알킬카보닐-C₁~C₅의 알킬이고, R₄는 수소 또는 C₁~C₅의 알킬이며;

<22> 상기 4번 탄소와 5번 탄소 사이의 결합은 단일결합 또는 이중결합을 형성할 수 있다.

<23> 바람직하게는,

<24> X는 -OR₁ 또는 -NHR₂이고, 여기서 R₁은 C₁~C₃의 알킬이고, R₂는 C₁~C₃의 알킬, C₁~C₃의 알케닐, C₁~C₃의 알킬로 치환된 모노 또는 디알킬아미노-C₁~C₃의 알킬아미노, 할로젠으로 치환된 C₁~C₃의 할로알킬아미노, 또는 1 또는 2 이상의 동종 또는 이종 헤테로 원자를 포함하는 C₂~C₅ 헤테로사이클로알킬로 치환된 C₁~C₃의 알킬아미노이고;

<25> Y 및 Z는 각각 독립적으로 또는 선택적으로 수소, -COR₃ 또는 -CONHR₄이며, 여기서 R₃는 C₁~C₃의 알킬카보닐-C₁~C₃의 알킬이고, R₄는 수소 또는 C₁~C₃의 알킬이며;

<26> 상기 4번 탄소와 5번 탄소 사이의 결합은 단일결합 또는 이중결합을 형성할 수 있다.

<27> 더욱 바람직하게는,

<28> 상기 X는 메톡시, 에틸아미노, 알릴아미노, 2-N,N-디메틸아미노-에틸아미노, 2-N,N-디에틸아미노-에틸아미노, 2-피롤리딘-1-일-에틸아미노, 2-모폴린-4-일-에틸아미노, 3-이미다졸-3-일-프로필아미노 또는 2-플루오로-에틸아미노이고,

<29> Y 내지 Z는 각각 수소, 아세틸메틸카보닐, 카바모일 또는 메틸카바모일이고;

<30> 4, 5번 위치는 이중결합 또는 단일결합을 형성할 수 있다.

<31> 본 발명에 따른 상기 화학식 1의 젤다나마이신 유도체는 하기에 열거되는 화합물을 포함한다.

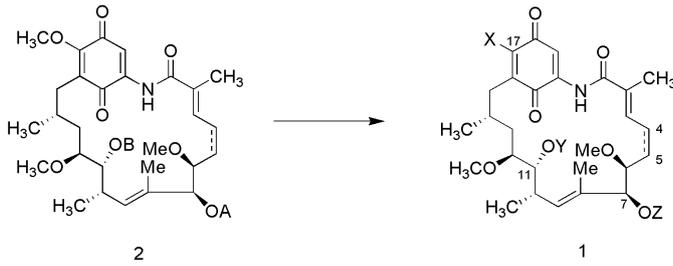
<32> 1) 카르바산 9-카바모일옥시-8,14,19-트리메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로 [16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-13-일 에스테르;

<33> 2) 카르바산 9-카바모일옥시-19-에틸아미노-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바

이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-13-일 에스테르;

- <34> 3) 카르밤산 19-알릴아미노-9-카바모일옥시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-13-일 에스테르;
- <35> 4) 카르밤산 9-카바모일옥시-19-(2-디메틸아미노-에틸아미노)-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-13-일 에스테르;
- <36> 5) 카르밤산 9-카바모일옥시-19-(2-디에틸아미노-에틸아미노)-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-13-일 에스테르;
- <37> 6) 3-옥소-부티르산 8,14,19-트리메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-13-(3-옥소-부티릴옥시)-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르;
- <38> 7) 메틸-카르밤산 8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-19-메틸아미노-13-메틸카바모일옥시-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르;
- <39> 8) 카르밤산 19-알릴아미노-9-카바모일옥시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,6,10,18-펜타엔-13-일 에스테르;
- <40> 9) 카르밤산 9-카바모일옥시-19-(2-디메틸아미노-에틸아미노)-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,6,10,18-펜타엔-13-일 에스테르;
- <41> 10) 카르밤산 9-카바모일옥시-19-(2-디에틸아미노-에틸아미노)-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,6,10,18-펜타엔-13-일 에스테르;
- <42> 11) 카르밤산 9-카바모일옥시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-19-(2-피롤리딘-1-일-에틸아미노)-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,6,10,18-펜타엔-13-일 에스테르;
- <43> 12) 카르밤산 19-에틸아미노-13-하이드록시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르;
- <44> 13) 카르밤산 19-알릴아미노-13-하이드록시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르;
- <45> 14) 카르밤산 19-(2-디메틸아미노-에틸아미노)-13-하이드록시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르;
- <46> 15) 카르밤산 19-(2-디에틸아미노-에틸아미노)-13-하이드록시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르;
- <47> 16) 카르밤산 13-하이드록시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-19-(2-피롤리딘-1-일-에틸아미노)-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르;
- <48> 17) 카르밤산 13-하이드록시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-19-(2-모르폴린-4-일-에틸아미노)-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르; 및
- <49> 18) 카르밤산 13-하이드록시-19-(3-이미다졸-1-일-프로필아미노)-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르.
- <50> 본 발명의 화학식 1로 표시되는 젤다나마이신 유도체는 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 유리형태, 산 또는 염기 부가염 형태로 존재할 수 있다. 바람직한 산 부가염은 하이드로클로라이드, 트리플루오르아세트산, 시트르산, 락트산, 말레산 또는 푸마르산이고, 염기 부가염은 나트륨, 칼륨, 칼슘 또는 아민계의 유기 염기염이다.
- <51> 또한, 본 발명의 상기 화학식 1의 유도체는 그로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물 및 수화물을 모두 포함할 수 있다.
- <52> 본 발명은 하기 반응식 1에서 나타난 바와 같이, 출발물질(2)로부터 화학식 1로 표시되는 젤다나마이신 유도체를 제조하는 방법을 제공한다.

반응식 1



<53>

<54>

(상기 반응식 1에 있어서, 출발물질(2)의 A 및 B는 수소 또는 카바모일기이고; 출발물질(2) 및 생성물(1)의 상기 4번 탄소 및 5번 탄소 사이의 결합은 단일결합 또는 이중결합이고; 생성물(1)의 X, Y 및 Z는 상기 화학식 1에서 정의된 바와 같다)

<55>

또한, 상기 출발물질(2)는 하기 화학식 2a~2d로 표시되는 화합물이다.

<56>

화학식 2a의 화합물은 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 아종 두아마이세티쿠스를 비롯한 젤다나마이신 생산 균주의 디카모일트랜스퍼라제 유전자(ge18) 비활성 균주의 배양액에서 얻거나 젤다나마이신의 화학적 디카바모일 반응을 통해 얻을 수 있다.

<57>

화학식 2b의 화합물은 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 아종 두아마이세티쿠스 균주의 배양액에서 얻거나 젤다나마이신을 이차대사 산물로 생산하는 미생물의 배양액에서 얻을 수 있다.

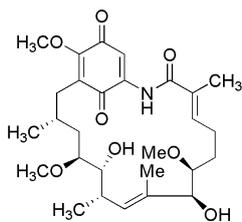
<58>

화학식 2c의 화합물은 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 아종 두아마이세티쿠스를 비롯한 젤다나마이신 생산 균주의 젤다나마이신 4번 탄소 및 5번 탄소 환원 효소 유전자(ge116) 비활성 균주의 배양액에서 얻거나, 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 아종 두아마이세티쿠스와 같은 젤다나마이신 생산 균주를 성장속도가 느린 배양조건에서 배양할 경우 젤다나마이신 생합성 중간체로 얻을 수 있으며, 젤다나마이신과 비교하여 4번 탄소와 5번 탄소 사이의 결합이 단일 결합으로 이루어진 구조를 갖는다.

<59>

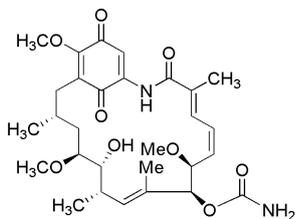
화학식 2d의 화합물은 화학식 2b의 화합물인 젤다나마이신을 출발물질로 하여 화학적 카바모일 반응을 통해 얻을 수 있다.

화학식 2a



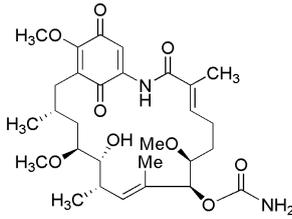
<60>

화학식 2b



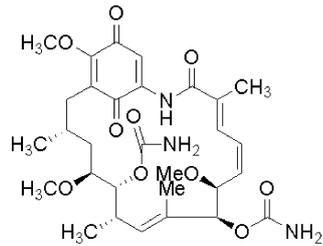
<61>

화학식 2c



<62>

화학식 2d



<63>

<64> 이하, 본 발명의 제조방법을 하기의 제법 1~7에 의해 구체적으로 설명한다.

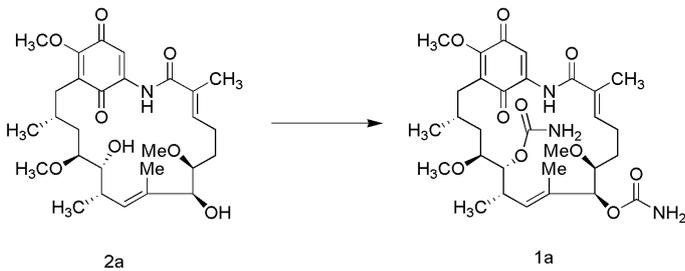
<65> **제법 1**

<66> 제법 1은 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이, 출발물질인 화학식 2a의 화합물과 트리클로로아세틸 이소시아네이트를 유기용매하에서 반응시킨 후, 상기 반응생성물을 과량의 Al₂O₃ 존재하에서 가수분해하는 단계를 포함하여 이루어지는 제조방법으로, 상기 제법에 의해 화학식 1a의 화합물을 제조할 수 있다.

<67> 이 경우, 상기 반응의 용매로는 디클로로메탄, 디클로로에탄 등의 유기용매를 사용하는 것이 바람직하며, 상기 반응은 0~5 °C의 저온에서 트리클로로아세틸 이소시아네이트를 가한 후 상온에서 수행되는 것 °C이 바람직하다. 상기 Al₂O₃는 촉매의 역할을 한다.

<68> 상기 반응이 종료되는 시점은 출발물질인 화학식 2a의 화합물이 전부 소비되는 때이며, 이는 박층크로마토그래피에 의해 확인될 수 있다.

반응식 2



<69>

<70> **제법 2**

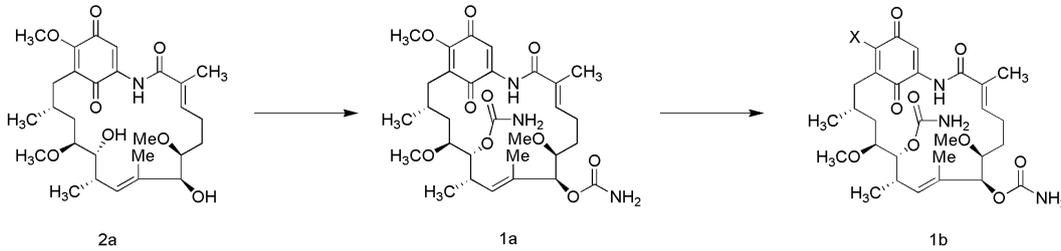
<71> 제법 2는 하기 반응식 3에 나타난 바와 같이, 상기 제법 1의 단계가 종료된 후, 이로부터 제조된 화합물 1a와 다양한 아민계 화합물을 유기용매하에서 반응시키는 단계를 더 포함하여 이루어지는 제조방법으로, 상기 제법에 의해 화학식 1b로 표시되는 화합물을 제조할 수 있다.

<72> 이 경우, 상기 아민계 화합물로는 에틸아민 등과 같은 알킬아민; 알릴아민 등과 같은 알케닐아민; 2-N,N-디메틸아미노-에틸아민, 2-N,N-디에틸아미노-에틸아민 등과 같은 알킬로 치환된 모노 또는 디알킬아미노알킬아민; 2-플루오로에틸아민 등과 같은 할로겐으로 치환된 할로알킬아민; 1-(2-아미노에틸)피롤리딘, 4-(2-아미노에틸)모폴린, 1-(3-아미노프로필)이미다졸 등과 같은 1 또는 2 이상의 동종 또는 이종 헤테로 원자를 포함하는 헤테로 사이클로알킬로 치환된 알킬아민 등을 사용할 수 있다.

<73> 또한, 상기 용매로는 제법 1에서와 같이, 디클로로메탄, 디클로로에탄 등의 유기용매를 사용하는 것이 바람직하다. 화학식 1b의 화합물의 경우 반응온도는 실온에서 수행하는 것이 바람직하다.

<74> 상기 반응이 종료되는 시점은 출발물질인 화학식 1a의 화합물이 전부 소비되는 때이며, 이는 박층크로마토그래피에 의해 확인될 수 있다.

반응식 3



<75> (상기 반응식 3에서, X는 화학식 1에서 정의한 바와 같다)

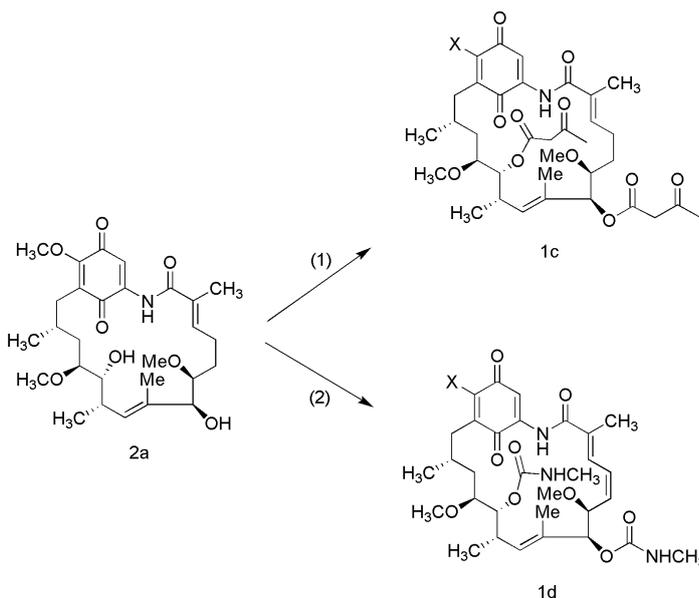
제법 3

<78> 제법 3은 하기 반응식 4의 경로(1)에 나타난 바와 같이, 출발물질인 화학식 2a로 표시되는 화합물과 디케텐을 4-디메틸아미노피리딘(DMAP) 및 염기의 존재하에 유기용매하에서 반응시키는 단계를 포함하여 이루어지는 제조 방법으로써, 상기 제법에 의해 화학식 1c의 화합물을 제조할 수 있다.

<79> 이 경우, 상기 반응의 용매로는 테트라하이드로퓨란(THF) 등의 유기용매를 사용하는 것이 바람직하며, 상기 반응은 상온에서 수행되는 것이 바람직하다. 상기 DMAP는 촉매로서의 역할을 수행한다. 상기 반응에 사용되는 염기로는 후니그 염기(Hunig's base, N,N-diisopropylethylamine), 트리에틸아민 등의 염기 등을 사용할 수 있다.

<80> 상기 반응이 종료되는 시점은 출발물질인 화학식 2a의 화합물이 전부 소비되는 때이며, 이는 박층크로마토그래피에 의해 확인될 수 있다.

반응식 4



<81> (상기 반응식에서 X는 화학식 1에서 정의된 바와 같다)

제법 4

<84> 제법 4는 상기 반응식 4의 경로(2)에 나타난 바와 같이, 출발물질인 화학식 2a로 표시되는 화합물과 1,1'-카보닐디이미다졸을 유기용매하에서 반응시킨 후, 상기 반응용액에 다양한 아민계 화합물을 첨가하여 반응시키는 단

계를 포함하여 이루어지는 제조방법으로써, 상기 제법에 의해 화학식 1d의 화합물을 제조할 수 있다.

<85> 이 경우, 용매로는 디클로로메탄, 디클로로에탄 등이 바람직하며, 상기 다양한 아민계 화합물을 첨가하기 전인 상태의 반응용액을 12 시간 이상 충분히 교반하여 반응시키는 것이 바람직하다. 이후, 아민 화합물을 첨가시킨 후에는 1~2 시간 동안 교반하여 반응시키는 것이 바람직하다.

<86> 상기 아민계 화합물로는 에틸아민 등과 같은 알킬아민; 알릴아민 등과 같은 알케닐아민; 2-N,N-디메틸아미노-에틸아민, 2-N,N-디에틸아미노-에틸아민 등과 같은 알킬로 치환된 모노 또는 디알킬아미노알킬아민; 2-플루오로에틸아민 등과 같은 할로겐으로 치환된 할로알킬아민; 1-(2-아미노에틸)피롤리딘, 4-(2-아미노에틸)모폴린, 1-(3-아미노프로필)이미다졸 등과 같은 아미노알킬로 치환된 1 또는 2 이상의 동종 또는 이종 헤테로 원자를 포함하는 헤테로사이클로 화합물 등을 사용할 수 있다.

<87> 상기 반응이 종료되는 시점은 출발물질인 화학식 2a의 화합물이 전부 소비되는 때이며, 이는 박층크로마토그래피에 의해 확인될 수 있다.

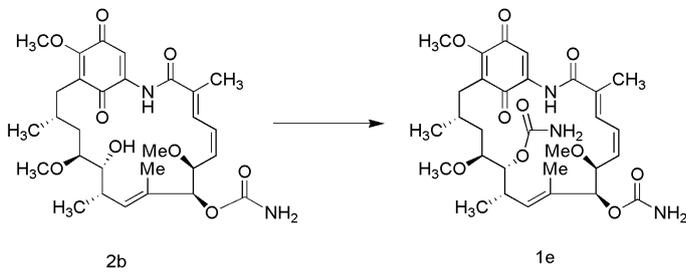
<88> **제법 5**

<89> 제법 5는 하기 반응식 5에 나타난 바와 같이, 출발물질인 화학식 2b의 화합물과 트리클로로아세틸 이소시아네이트를 유기용매하에서 반응시킨 후, 상기 반응생성물을 Al₂O₃ 존재하에서 가수분해하는 단계를 포함하여 이루어지는 제조방법으로, 상기 제법에 의해 화학식 1e의 화합물을 제조할 수 있다.

<90> 이 경우, 상기 반응의 용매로는 디클로로메탄, 디클로로에탄 등의 유기용매를 사용하는 것이 바람직하며, 상기 반응은 0~5 °C의 저온에서 트리클로로아세틸 이소시아네이트를 가한 후 상온에서 수행되는 것이 바람직하다. 상기 Al₂O₃는 촉매의 역할을 한다.

<91> 상기 반응이 종료되는 시점은 출발물질인 화학식 2b의 화합물이 전부 소비되는 때이며, 이는 박층크로마토그래피에 의해 확인될 수 있다.

반응식 5



<92> 2b 1e

<93> **제법 6**

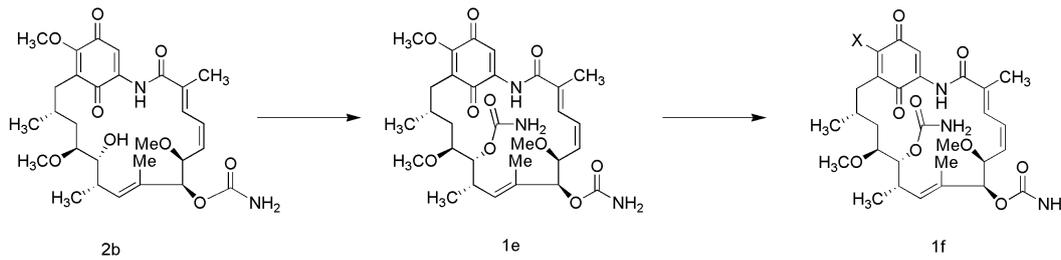
<94> 제법 6은 하기 반응식 6에 나타난 바와 같이, 상기 제법 5의 단계가 종료된 후, 이로부터 제조된 화합물 1e와 다양한 아민계 화합물을 유기용매하에서 반응시키는 단계를 더 포함하여 이루어지는 제조방법으로, 상기 제법에 의해 화학식 1f로 표시되는 화합물을 제조할 수 있다.

<95> 이 경우, 상기 아민계 화합물로는 에틸아민 등과 같은 알킬아민; 알릴아민 등과 같은 알케닐아민; 2-N,N-디메틸아미노-에틸아민, 2-N,N-디에틸아미노-에틸아민 등과 같은 알킬로 치환된 모노 또는 디알킬아미노알킬아민; 2-플루오로에틸아민 등과 같은 할로겐으로 치환된 할로알킬아민; 1-(2-아미노에틸)피롤리딘, 4-(2-아미노에틸)모폴린, 1-(3-아미노프로필)이미다졸 등과 같은 아미노알킬로 치환된 1 또는 2 이상의 동종 또는 이종 헤테로 원자를 포함하는 헤테로사이클로 화합물 등을 사용할 수 있다.

<96> 또한, 상기 용매로는 제법 5에서 사용되는 디클로로메탄, 디클로로에탄 등의 유기용매를 사용하는 것이 바람직하다. 반응온도는 제법 5에서와는 달리, 실온에서 수행하는 것이 바람직하며, 충분히 반응이 진행되도록 하기 위해 반응은 24~48 시간 동안 수행하는 것이 바람직하다.

<97> 상기 반응이 종료되는 시점은 화학식 1e의 화합물이 전부 소비되는 때이며, 이는 박층크로마토그래피에 의해 확인될 수 있다.

반응식 6



<98>

<99> (상기 반응식 6에서, X는 화학식 1에서 정의된 바와 같다)

제법 7

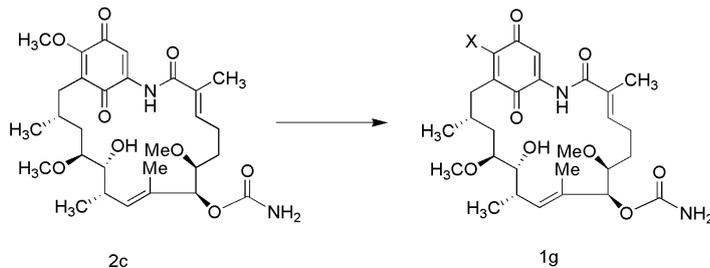
제법 7은 하기 반응식 7에 나타난 바와 같이, 출발물질인 화학식 2c의 화합물과 다양한 아민계 화합물을 유기용매하에서 반응시키는 단계를 포함하여 이루어지는 제조방법으로, 상기 제법에 의해 화학식 1g로 표시되는 화합물을 제조할 수 있다.

이 경우, 상기 아민계 화합물로는 에틸아민 등과 같은 알킬아민; 알릴아민 등과 같은 알케닐아민; 2-N,N-디메틸아미노-에틸아민, 2-N,N-디에틸아미노-에틸아민 등과 같은 알킬로 치환된 모노 또는 디알킬아미노알킬아민; 2-플루오로에틸아민 등과 같은 할로겐으로 치환된 할로알킬아민; 1-(2-아미노에틸)피롤리딘, 4-(2-아미노에틸)모폴린, 1-(3-아미노프로필)이미다졸 등과 같은 아미노알킬로 치환된 1 또는 2 이상의 동종 또는 이종 헤테로 원자를 포함하는 헤테로사이클로 화합물 등을 사용할 수 있다.

또한, 상기 용매로는 디클로로메탄, 디클로로에탄 등의 유기용매를 사용하는 것이 바람직하다. 반응은 실온에서 수행하는 것이 바람직하며, 충분히 반응이 진행되도록 하기 위해 반응은 24-48 시간 동안 수행되는 것이 바람직하다.

상기 반응이 종료되는 시점은 출발물질인 화학식 2c의 화합물이 전부 소비되는 때이며, 이는 박층크로마토그래피에 의해 확인될 수 있다.

반응식 7



<105>

<106> (상기 반응식 7에서, X는 화학식 1에서 정의된 바와 같다)

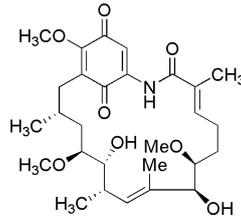
이하, 상술한 화학식 1의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도를 구체적으로 설명한다.

먼저, N 말단 Hsp90의 ATP 결합자리에 대한 결합 역학(binding kinetics) 실험은 젤다나마이신은 Hsp90의 ATP 결합자리에 ATP와 경쟁적으로 결합하여 Hsp90의 사포론 활성을 저해하여 기질 단백질들의 활성화 또는 안정화를 저해하는 것에 근거하여 시행하였다 (Prodromous C. et al. (1997) Cell 90, 65-75). 따라서 본 발명에 따른 젤다나마이신 유도체들의 결합상수(Ka) 값이 해리상수(Kd) 값에 비하여 월등히 큰 것으로부터 Hsp90에 대한 친화도가 우수하고, ATP의 결합상수 값보다 큰 값을 나타내는 것으로부터, ATP의 결합을 배제하고, Hsp90에 결합하여 Hsp90의 활성을 저해하는 것을 알 수 있다(실험예 2 참조). 그 결과, 본 발명의 기본 골격화합물인 젤다나마이신(유도체)는 유방암 SK-Br3 세포내에서 Hsp90 단백질의 발현량의 변화는 없지만 그 기질 단백질중 하나인 ErbB2의 발현만을 저해하는 것으로 나타났다(실험예 3 및 표 3 참조).

따라서, 본 발명에 따른 젤다나마이신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 Hsp90의 활성 저해제로 유용하게 사용될 수 있다.

- <110> 또한, Hsp90은 암세포 성장 및 전이에 중요한 역할을 하므로, Hsp90의 활성을 저해하는 것은 암 질환을 예방 및 치료할 수 있다는 것을 의미한다(Whitesell L. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91, 8324-8328; Neckers L. *et al. (1999) Invest. New Drugs* 17, 361-373; Piper P.W. (2001) *Curr. Opin. Investing Drugs* 2(11) 1606-1610; Whitesell L. & Lindquist S. L. (2005) *Nature Reviews* 5, 761-772; Workman P. (2004) *Trends in Molecular Medicine* 10(2) 47-51).
- <111> 나아가, 유방암 세포주인 SK-Br3를 이용한 암세포에 대한 세포독성을 측정한 실험 결과를 살펴보면, 본 발명의 젤다나마이신 유도체들의 대부분은 50 nM 이하의 IC₅₀ 값을 나타내었으며, 이들 중 일부 젤다나마이신 유도체들은 10 nM 이하의 매우 우수한 IC₆₀ 값을 나타내었다(실험예 1 및 표 2 참조).
- <112> 따라서, 우수한 Hsp90 활성 저해 능력 및 암세포에 대한 세포독성을 갖는 본 발명의 젤다나마이신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 다양한 암 질환을 예방 및 치료하는 데 유용하게 사용될 수 있다.
- <113> 상기 암 질환으로는 상술한 유방암 이외에도 간암, 위암, 결장암, 골암, 췌장암, 두부 또는 경부암, 자궁암, 난소암, 직장암, 식도암, 소장암, 항문부근암, 결장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 전립선암, 방광암, 신장암, 수노관암, 신장세포암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양 등을 들 수 있다.
- <114> 또한, Hsp90 활성을 저해한다는 것은 항생제, 항진균제, 항바이러스제, 면역억제제, 퇴행성 신경질환제 또는 항염증제로서 사용될 수 있음을 의미한다(항생, Takahashi A. *et al. (2003) PNAS* 100(20) 11777-11782; Agbessi S. *et al. (2003) Appl. Microbiol. Biotechnol* 62, 233-238; 항진균제 Cardenas M. E. *et al. (1999) Clinical Microbiology Review* 12(4) 583-611; 항 바이러스 Li Y. *et al. (2004) Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(3) 867-872; 면역억제 Owens-Grillo J. *et al. (1995) J. Biological Chemistry* 270(35) 20479-20484; 퇴행성 신경질환 Sittler A. *et al. (2001) Human Molecular Genetics* 10(12) 1307-1315; Waza M. *et al. (2005) Nature medicine* 11(10) 1088-1095; 항염증 Pittet J. *et al. (2005) The Journal of Immunology* 174, 384-394; Hsu H. *et al. (2006) Molecular Pharmacology*, Web pub. Jul 25. 따라서, 본 발명은 상기 젤다나마이신 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 항생제, 항진균제, 항바이러스제, 면역억제제, 항염증제로 또는 퇴행성 신경질환 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.
- <115> 본 발명에 따른 화학식 1의 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 임상 투여 시에 하기의 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제제화되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- <116> 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- <117> 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 1일 투여량은 본 발명의 화합물의 양을 기준으로 0.1 내지 500 mg/kg이며, 1일 1회 또는 수회 투여될 수 있다.
- <118> 본 발명에 의해 제공되는 젤다나마이신 유도체들은 종래 기술에서 언급한 항암활성뿐만 아니라, 알려진 다른 생리활성 및 그로 인해 유추되는 다른 생리활성을 가짐은 이 분야의 통상인에게 자명하다.
- <119>
- <120> 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

<121> <제조예 1> 출발물질(화학식 2a)의 제조



<122>

<123> 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 아종 두아마이세티쿠스의 디카바모일트랜스퍼라제 유전자(*geI8*) 비활성 균주(*Streptomyces hygroscopicus* AC1)를 28 °C에서 5일 동안 3 l의 액체 효모추출물-맥아추출물(yeast extract - malt extract, YEME) 배지에서 배양하여, 상기 균주 산물이 생산되어 축적되도록 하였다. 배양 후, 각 배지를 에틸아세테이트로 두 번 추출하고, 이들 추출물을 여과하여 불용물을 제거하였다. 상기 추출물을 농축한 후에 에틸아세테이트 및 물로 분획한 후 분획물을 수득하였다. 상기 분획물을 클로로포름-메탄올을 사용하여 실리카 겔 크로마토그래피로 분획하였고, 출발물질(2a)을 포함하는 분획은 세파덱스 LH-20(Sephadex LH-20) 칼럼을 통과시키고 HPLC[YMC J'sphere ODS-H80, 150 20 mm i.d., 메탄올-물(0.05% 아세트산) 구배, 10 ml/분]에 의해 더욱 정제하여 황색 분말의 목적화합물을 수득하였다. 수득된 분획은 표준품과 함께 HPLC로 비교 분석하였다.

<124> mp: 80-83 °C;

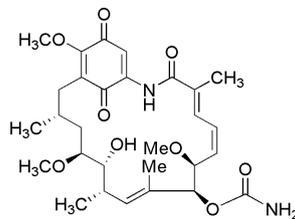
<125> $[\alpha]_D^{25} = -6.7^\circ$ (c 0.15, CHCl₃);

<126> UV(MeOH): $\lambda_{max}(\log \epsilon)$ 304(4.24) nm;

<127> ESIMS m/z 520[M+H]⁺, 518[M-H]⁻;

<128> HRFABMS m/z 542.2732, C₂₈H₄₁O₈NNa 542.2730(계산치).

<129> <제조예 2> 출발물질(화학식 2b)의 제조



<130>

<131> 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 아종 두아마이세티쿠스를 비롯한 젤다나마이신 생산 균주를 28 °C에서 5일 동안 3 l의 액체 효모추출물-맥아추출물 배지에서 배양하여, 상기 균주 산물이 생산되어 축적되도록 하였다. 배양 후, 각 배지를 에틸아세테이트로 두 번 추출하고, 이들 추출물은 여과하여 불용물을 제거하고 농축한 후, 에틸아세테이트 및 물로 분획하여 추출물을 수득하였다. 상기 추출물을 클로로포름-메탄올 혼합용매를 사용하여 실리카 겔 크로마토그래피로 분획화하였다. 상기 분획에서 출발물질(2b)가 포함된 분획은 세파덱스 LH-20 칼럼을 통과시키고, HPLC[YMC J'sphere ODS-H80, 150 20 mm i.d., 메탄올-물(0.05% 아세트산) 구배, 10 ml/분]에 의해 수득된 분획을 표준품과 비교 분석하고, 더욱 정제하여 황색 고형물의 목적 화합물을 얻었다.

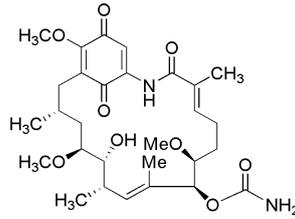
<132> mp: 250-254 °C;

<133> $[\alpha]_D^{25} = +60.4$ (c 0.12, CHCl₃);

<134> UV(MeOH): $\lambda_{max}(\log \epsilon)$ 305(4.10) nm;

<135> ESIMS m/z 561[M+H]⁺, 559[M-H]⁻

<136> <제조예 3> 출발물질(화학식 2c)의 제조

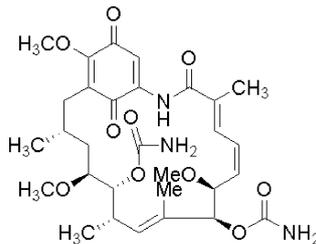


<137>

<138> 스트렙토마이세스 하이그로스코피쿠스 아종 두아마이세티쿠스의 젤다나마이신 생합성 유전자중 시토크롬 단백질 450과 상동성이 높은 유전자(ge116) 비활성 균주를 28 °C에서 5일 동안 3 l의 액체 효모추출물-맥아추출물 배지에서 배양하거나, 균주의 성장 속도가 느린 수크로오스가 360 g/l 첨가된 효모추출물-맥아추출물 배지에서 28 °C 온도 조건하에 5일 동안 배양하여, 균주 산물이 생산되어 축적되도록 하였다. 배양 후, 각 배지를 에틸아세테이트로 두 번 추출하고, 이들 추출물을 여과하여 불용물을 제거하고, 농축한 후에 에틸아세테이트 및 물로 분획하여 추출물을 수득하였다. 상기 추출물을 클로로포름-메탄올 혼합용매를 사용하여 실리카 겔 크로마토그래피로 분획화하였고, 출발물질(2c)를 포함하는 분획은 세파텍스 LH-20 칼럼을 통과시키고 HPLC[YMC J'sphere ODS-H80, 150 20 mm i.d., 메탄올-물(0.05% 아세트산) 구배, 10 ml/분]로 수득된 분획을 표준품과 비교 분석하였다. 상기 분획을 더욱 정제하여 황색 고형물의 목적 화합물을 얻었다.

<139> ESIMS: m/z 563[M+H]⁺, 561[M-H]⁻ (Schnur, R. C. et al. J. Med. Chem. 1995. 38: 3806-3812).

<140> <제조예 4> 출발물질(화학식 2d)의 제조



<141>

<142> 디클로로메탄(9.0 ml)에 제조예 2에서 제조된 출발물질(253.9 mg, 0.45 mmol)을 녹인 용액에 0 °C에서 트리클로아세틸 이소시아네이트(0.067 mg, 0.57 mmol)을 첨가하고, 상기 혼합액을 3 시간동안 교반하였다. 상기 반응용액에 디클로로메탄 및 과량의 Al₂O₃를 첨가하여 2 시간 동안 교반한 후 여과하였다. 상기 여과액을 농축하고, 분취용 박층크로마토그래피(*n*-헥산:에틸아세테이트:메탄올=6:3:1)로 정제하고 노란색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(267.6 mg, 98.5%).

<143> ¹H-NMR (CDCl₃, 300 Hz) 8.61 (1H, s, NH), 7.17 (1H, s, 19), 6.56 (1H, t, J = 11.7 Hz, 3), 5.81 (1H, t, J = 10.5 Hz, 4), 5.19 (1H, d, J = 10.2 Hz, 5), 5.81 (1H, s, 9), 4.62 (1H, d, J = 7.5 Hz, 7), 4.40 (1H, d, J = 9.9 Hz, 6), 4.07 (1H, m, 11), 4.03 (3H, s, 17-OCH₃), 3.37 (3H, s, 6-OCH₃), 3.35 (3H, s, 12-OCH₃), 3.31 (1H, m, 12), 2.95 (1H, m, 10), 2.23-2.47 (2H, m, 15), 2.02 (3H, s, 22-CH₃), 1.90(1H, m, 14), 1.77 (3H, s, 23-CH₃), 1.51-1.65 (2H, m, 13), 1.14 (3H, d, J = 6.9 Hz, 25), 0.88 (3H, d, J = 7.2 Hz, 24); MS(ESI) m/z 628 (M⁺+Na), 604 (M-H).

<144> <실시예 1> 카르바산 9-카바모일옥시-8,14,19-트리메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-13-일 에스테르의 제조(AC23)

<145> 디클로로메탄(2.0 ml)에 제조예 1에서 제조된 출발물질(44.5 mg, 0.086 mmol)을 녹인 용액에 0 °C에서 트리클로아세틸 이소시아네이트(0.01 ml, 0.086 mmol)을 첨가하고, 상기 혼합액을 1.5 시간동안 교반하였다. 상기 반응용액에 디클로로메탄 및 과량의 Al₂O₃를 첨가하여 2 시간 동안 교반한 후 여과하였다. 상기 여과액을 농축하고, 분취용 박층크로마토그래피(*n*-헥산:에틸아세테이트:메탄올=6:3:1)로 정제하고 노란색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(35.1 mg, 68%).

- <146> $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 Hz) 8.64 (1H, s, NH), 7.05 (1H, s, 19), 6.52 (1H, t, $J = 7.2$ Hz, 3), 5.20 (1H, d, $J = 10.5$ Hz, 9), 4.90 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, 7), 4.78 (2H, brs, NH_2), 4.51 (1H, q, $J = 2.4$ Hz, 6), 4.46 (2H, brs, NH_2), 4.03 (3H, s, 17- OCH_3), 3.45 (3H, s, 6- OCH_3), 3.35 (3H, s, 12- OCH_3), 3.29 (2H, m, 11,12), 2.85 (1H, m, 10), 2.26-2.41 (4H, m, 15,4), 1.90 (3H, s, 22- CH_3), 1.80 (2H, m, 5), 1.64 (3H, s, 23- CH_3), 1.25-1.29 (3H, m, 13,14), 1.10 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, 25), 0.93 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, 24); MS(ESI) m/z 628 (M^+Na), 604 (M-H).
- <147>
- <148> <실시예 2> 카르바산 9-카바모일옥시-19-에틸아미노-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-13-일 에스테르의 제조(AC217)
- <149> 디클로로에틸렌(5.0 ml)에 실시예 1의 화합물(68.0 mg, 0.11 mmol)을 녹인 용액에 에틸아민(0.11 ml, 테트라하이드로퓨란에 녹여 제조한 2 M 용액)을 첨가하였다. 상기 혼합액을 철야 교반시킨 후, 에틸아세테이트로 희석하고 중탄산염 수용액 및 염수로 세척하였다. 상기 유기층을 무수황산마그네슘으로 건조시킨 후, 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=20:1)로 정제하여 자주색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(24.3 mg, 36%).
- <150> $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 Hz) 9.28 (1H, s, NH), 7.09 (1H, s, 19), 6.46 (1H, t, $J = 6.6$ Hz, 3), 5.34 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, 9), 4.96 (1H, d, $J = 6.6$ Hz, 7), 4.76 (2H, brs, NH_2), 4.5 - 4.62 (3H, m, NH_2 , 6), 3.45-3.53 (3H, m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$, 11), 3.43 (3H, s, 6- OCH_3), 3.39 (3H, s, 12- OCH_3), 3.20(1H, m, 12), 2.75-2.82 (1H, m, 10), 2.32-2.38 (4H, m, 4, 15), 1.90 (3H, s, 22- CH_3), 1.74-1.35 (5H, m, 5, 13, 14), 1.54 (3H, s, 23- CH_3), 1.30 (3H, m, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$), 1.04 (3H, s, 25), 1.02 (3H, s, 24); MS(ESI) m/z 641 (M^+Na), 617 (M-H).
- <151> <실시예 3> 카르바산 19-알릴아미노-9-카바모일옥시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-13-일 에스테르의 제조(AC180)
- <152> 디클로로에틸렌(4 ml)에 실시예 1의 화합물(97.7 ml, 0.17 mmol)을 녹인 용액에 알릴아민(0.025 ml, 0.34 mmol)을 첨가하였다. 상기 혼합액을 철야 교반한 후, 에틸아세테이트로 희석한 후, 중탄산염 수용액 및 염수로 세척하였다. 상기 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨 후 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=15:1)로 정제하여 자주색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(28.9 mg, 27.0%).
- <153> $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 Hz) 9.24 (1H, s, NH), 7.12 (1H, s, 19), 6.46 (1H, t, $J = 6.6$ Hz, 3), 5.84-5.97 (1H, m, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2^-$), 5.36-5.50 (3H, m, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2^-$, 9), 5.10 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, 7), 4.89 (2H, brs, NH_2), 4.71-4.76 (3H, m, NH_2 , 6), 4.20 (2H, d, $J = 4.8$ Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$), 3.61-3.68 (1H, m, 11), 3.57 (3H, s, 6- OCH_3), 3.54 (3H, s, 12- OCH_3), 3.32 (1H, m, 12), 2.93 (1H, m, 10), 2.40-2.52 (4H, m, 15, 4), 2.04 (3H, s, 22- CH_3), 1.68 (3H, s, 23- CH_3), 1.88-1.42 (5H, m, 5, 13, 14) 1.83 (3H, s, 25), 1.61 (3H, s, 24); MS(ESI) m/z 653 (M^+Na), 629 (M-H).
- <154> <실시예 4> 카르바산 9-카바모일옥시-19-(2-디메틸아미노-에틸아미노)-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-13-일 에스테르의 제조(AC218)
- <155> 디클로로에틸렌(5.0 ml)에 실시예 1의 화합물(82.5 mg, 0.14 mmol)을 녹인 용액에 N,N-디메틸에틸렌디아민(0.06 ml, 0.54 mmol)을 첨가하였다. 상기 혼합액을 철야 교반한 후, 에틸아세테이트로 희석하고 중탄산염 수용액 및 염수로 세척하였다. 상기 유기층을 무수황산마그네슘으로 건조시킨 후 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층 크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=20:1)로 정제하여 자주색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(32.6 mg, 35%).
- <156> $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 Hz) 9.27 (1H, s, NH), 7.07 (1H, s, 19), 6.74 (1H, t, $J = 4.8$ Hz, NH), 6.45 (1H, t, $J = 6.6$ Hz, 3), 5.34 (1H, d, $J = 9.6$ Hz, 9), 4.95 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, 7), 4.83 (2H, brs, NH_2), 4.70

(2H, brs, NH₂), 4.59 (1H, m, 6), 3.46-3.56 (3H, m, 11, (CH₃)₂NCH₂CH₂NH), 3.42 (3H, s, 6-OCH₃), 3.39 (3H, s, 12-OCH₃), 3.18 (1H, m, 12), 2.78 (1H, m, 10), 2.53-2.70 (4H, m, 4, (CH₃)₂NCH₂CH₂NH), 2.31 (8H, m, (CH₃)₂N, 15), 1.89 (3H, s, 22-CH₃), 1.74-1.32 (5H, m, 5, 13, 14), 1.53 (3H, s, 23-CH₃), 1.01-1.04 (6H, m, 24, 25); MS(ESI) *m/z* 684 (M⁺H), 660 (M-H).

<157> <실시예 5> 카르바산 9-카바모일옥시-19-(2-디에틸아미노-에틸아미노)-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-13-일 에스테르의 제조(AC222)

<158> 디클로로에틸렌(3.0 ml)에 실시예 1의 화합물(114.0 mg, 0.19 mmol)을 녹인 용액에 N,N-디메틸에틸렌디아민(0.11 ml, 0.75 mmol)을 첨가하였다. 상기 혼합액을 철야 교반한 후, 에틸아세테이트로 희석하고 중탄산염 수용액 및 염수로 세척하였다. 상기 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨 후 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층 크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=20:1)로 정제하여 자주색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(42 mg, 32%).

<159> ¹H-NMR (CDCl₃, 300 Hz) 9.27 (1H, s, NH), 7.05 (1H, s, 19), 6.93 (1H, t, J = 4.8 Hz, NH), 6.45 (1H, t, J = 6.6 Hz, 3), 5.34 (1H, d, J = 9.0 Hz, 9), 4.94 (1H, d, J = 7.2 Hz, 7), 4.81 (2H, brs, NH₂), 4.67 (2H, brs, NH₂), 4.58 (1H, q, J = 2.4 Hz, 6), 3.49-3.56 (3H, m, 11, NHCH₂-), 3.42 (3H, s, 6-OCH₃), 3.39 (3H, s, 12-OCH₃), 3.17 (1H, m, 12), 2.62-2.84 (7H, m, NHCH₂CH₂N(CH₂CH₃)₂, 10), 2.33 (4H, m, 4, 15), 1.89 (3H, s, 22-CH₃), 1.35-1.76 (5H, m, 5, 13, 14), 1.52 (3H, s, 23-CH₃), 1.01-1.08 (12H, m, N(CH₂CH₃)₂, 24, 25); MS(ESI) *m/z* 712 (M⁺Na), 688 (M-H).

<160> <실시예 6> 3-옥소-부티르산 8,14,19-트리메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-13-(3-옥소-부티릴 옥시)-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르의 제조(AC48)

<161> 촉매량의 4-디메틸아미노-피리딘을 녹인 테트라하이드로퓨란(1 ml), 제조예 1의 화합물(41.2 mg, 0.079 mmol) 및 디케텐(0.0067 ml, 0.087 mmol)의 혼합용액에 트리에틸아민(0.0012 ml, 0.0087 mmol)을 실온에서 천천히 가하였다. 상기 반응 혼합액을 철야 교반한 후 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층 크로마토그래피(n-헥산:에틸아세테이트:메탄올=6:3:1)로 정제하여 노란색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(7.6 mg, 16%).

<162> ¹H-NMR (CDCl₃, 300 Hz) 8.69 (1H, s, NH), 7.03 (1H, s, 19), 6.42 (1H, t, J = 6.6 Hz, 3), 5.28 (1H, d, J = 9.9 Hz, 9), 5.10 (1H, d, J = 7.5 Hz, 7), 4.75 (1H, q, J = 2.7 Hz, 6), 4.12 (3H, s, 17-OCH₃), 3.47 (2H, s, COCH₂CO), 3.41 (3H, s, 6-OCH₃), 3.37 (3H, s, 12-OCH₃), 3.35 (2H, s, COCH₂CO), 3.26 (2H, m, 11,12), 2.87 (1H, m, 10), 2.35-2.41 (4H, m, 15,4), 2.27 (3H, s, COCH₃), 2.20 (3H, s, COCH₃), 1.88 (3H, s, 22-CH₃), 1.59 (3H, s, 23-CH₃), 1.44 (2H, m, 5), 1.23-1.33 (3H, m, 13,14), 1.10 (3H, d, J = 6.9 Hz, 25), 0.97 (3H, d, J = 6.6 Hz, 24); MS(ESI) *m/z* 710 (M⁺Na), 686 (M-H).

<163> <실시예 7> 메틸-카르바산 8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-19-메틸아미노-13-메틸카바모일옥시-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르의 제조(AC130)

<164> 디클로로메탄(1.0 ml)에 제조예 1의 화합물(40.0 mg, 0.077 mmol)을 녹인 용액에 1,1'-카보닐디이미다졸(31.2 mg, 0.19 mmol)을 첨가하였다. 실온에서 상기 혼합액을 철야 교반한 후, 메틸아민(0.014 ml, 테트라하이드로퓨란에 녹여 제조된 2 M 용액)을 첨가하고, 1시간 동안 더 교반한 후 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층 크로마토그래피(n-헥산:에틸아세테이트:메탄올=6:3:1)로 정제하여 자주색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(7.4 mg, 15%).

<165> ¹H-NMR (CDCl₃, 300 Hz) 9.44 (1H, s, NH), 7.11 (1H, s, 19), 6.54 (1H, m, 3), 5.30 (1H, d, J = 9.3 Hz, 9), 4.95 (1H, d, J = 7.5 Hz, 7), 4.62 (1H, m, 6), 3.52 (1H, m, 11), 3.36 (6H, s, 6-OCH₃, NHCH₃), 3.34 (1H, m, 12), 3.16 (3H, s, 12-OCH₃), 2.71-2.74 (7H, m, CONHCH₃, 10), 2.35 - 2.41 (4H, m, 15,4), 2.00 (3H, s, 22-CH₃), 1.86 (3H, s, 23-CH₃), 1.45-1.78 (5H, m, 5,13,14), 1.21 (3H, t, J = 6.9 Hz, 25), 1.00 (3H, t, J = 6.6 Hz, 24); MS(ESI) 655 (M⁺H), 631 (M-H).

- <166> <실시예 8> 카르바산 19-알릴아미노-9-카바모일옥시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,6,10,18-펜타엔-13-일 에스테르의 제조(ACC199)
- <167> 디클로로에틸렌(3.0 ml)에 화학식 2d의 화합물(42.3 mg, 0.07 mmol)을 녹인 용액에 N,N-디메틸에틸렌디아민(0.036 mg, 0.26 mmol)을 첨가하였다. 상기 혼합액을 철야 교반한 후, 에틸아세테이트로 희석하고, 중탄산염 수용액 및 염수로 세척하였다. 상기 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨 후 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층 크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=10:1)로 정제하여 자주색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(43.5 mg, 80%).
- <168> $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 Hz) 9.23 (1H, s, NH), 7.15 (1H, s, 19), 6.54 (1H, ps t, J = 11.7 Hz, 3), 5.90 (2H, m, 4, =CH), 5.24-5.33 (2H, m, 5, 9), 4.80 (3H, m, 7, $\text{CH}_2=\text{CHCH}_2\text{NH}$), 4.48 (1H, d, J = 8.1 Hz, 6), 4.43 (2H, brs, NH_2), 4.09 (2H, d, J = 5.4 Hz, = CHCH_2NH), 3.50 (1H, m, 11), 3.36 (3H, s, 6-O CH_3), 3.24-3.38 (4H, s, 12-O CH_3 , 12), 2.87-2.94 (1H, m, 10), 2.56 - 2.63 (1H, m, 15), 2.27-2.34 (1H, m, 15), 2.01 (3H, s, 22- CH_3), 1.81-1.86 (1H, m, 14), 1.74 (3H, s, 23- CH_3), 1.52-1.61 (2H, m, 13), 1.03 (3H, d, J = 6.6 Hz, 25), 0.97 (3H, d, J = 7.5 Hz, 24); MS(ESI) m/z 651 (M^+Na), 627 (M-H).
- <169> <실시예 9> 카르바산 9-카바모일옥시-19-(2-디메틸아미노-에틸아미노)-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,6,10,18-펜타엔-13-일 에스테르의 제조(AC219)
- <170> 디클로로에틸렌(5.0 ml)에 화학식 2d의 화합물(66.5 mg, 0.11 mmol)을 녹인 용액에 N,N-디메틸에틸렌디아민(0.036 ml, 0.33 mmol)을 첨가하였다. 상기 혼합액을 철야 교반한 후, 에틸아세테이트로 희석하고, 중탄산염 수용액 및 염수로 세척하였다. 상기 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨 후 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층 크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=20:1)로 정제하여 자주색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(21.7 mg, 30%).
- <171> $^1\text{H-NMR}$ ($\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$, 300 Hz) 7.24 (1H, brd, J = 11.4 Hz, 3), 6.98 (1H, s, 19), 6.56 (1H, ps t, J = 11.4 Hz, 4), 5.84 (1H, ps t, J = 10.5 Hz, 5), 5.30 (2H, m, 9, 7), 4.59 (1H, d, J = 7.8 Hz, 6), 3.68 (2H, m, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.60 (2H, m, 11, 12), 3.30 (6H, s, 6-O CH_3 , 12-O CH_3), 2.83-2.94 (3H, m, 10, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 2.50 (6H, s, $(\text{CH}_3)_2\text{N}$), 2.23-2.00 (2H, m, 15), 1.98 (3H, s, 22- CH_3), 1.75-1.88 (1H, m, 14), 1.69 (3H, s, 23- CH_3), 1.31-1.63 (2H, m, 13), 1.02 (3H, d, J = 6.9 Hz, 25), 0.97 (3H, d, J = 6.6 Hz, 24); MS(ESI) m/z 682 (M^+H), 658 (M-H).
- <172> <실시예 10> 카르바산 9-카바모일옥시-19-(2-디에틸아미노-에틸아미노)-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,6,10,18-펜타엔-13-일 에스테르의 제조(AC221)
- <173> 디클로로에틸렌(5.0 ml)에 화학식 2d의 화합물(76.3 mg, 0.14 mmol)을 녹인 용액에 N,N-디메틸에틸렌디아민(0.072 ml, 0.51 mmol)을 첨가하였다. 상기 혼합액을 철야 교반한 후, 에틸아세테이트로 희석하고, 중탄산염 수용액 및 염수로 세척하였다. 상기 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨 후 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층 크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=20:1)로 정제하여 자주색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(10.4 mg, 12%).
- <174> $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 Hz) 9.22 (1H, s, NH), 7.07 (1H, s, 19), 6.53 (1H, ps t, J = 11.4 Hz, 3), 5.82 (1H, t, J = 10.2 Hz, 4), 5.30 (2H, m, 5, 9), 4.80 (3H, brs, 7, NH_2), 4.46 (1H, d, J = 7.8 Hz, 6), 3.59-3.76 (3H, m, 11, NHCH_2-), 3.48 (1H, m, 12), 3.35 (3H, s, 12-O CH_3), 3.34 (3H, s, 6-O CH_3), 2.76-2.89 (7H, m, 10, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2.31- 2.34 (2H, m, 15), 2.00 (3H, s, 22- CH_3), 1.87 (1H, m, 14), 1.74 (3H, s, 23- CH_3), 1.36-1.60 (2H, m, 13), 1.17-1.19 (6H, m, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 1.05 (3H, d, J = 6.0 Hz, 25), 0.95 (3H, d, J = 6.0 Hz, 24); MS(ESI) m/z 710 (M^+H), 686 (M-H).
- <175> <실시예 11> 카르바산 9-카바모일옥시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-19-(2-피롤리딘-1-일-에틸아미노)-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,6,10,18-펜타엔-13-일 에스테르의 제조(AC225)

- <176> 디클로로에틸렌(5.0 ml)에 화학식 2d의 화합물(42.9 mg, 0.071 mmol)을 녹인 용액에 1-(2-아미노에틸)피롤리딘(0.071 ml, 0.57 mmol)을 첨가하였다. 상기 혼합액을 철야 교반한 후, 에틸아세테이트로 희석하고, 중탄산염 수용액 및 염수로 세척하였다. 상기 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨 후 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=20:1)로 정제하여 자주색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(17 mg, 35 %).
- <177> $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 Hz) 9.23 (1H, s, NH), 7.08 (1H, s, 19), 6.69 (1H, brs, 3), 6.53 (1H, ps t, J = 11.4 Hz, 4), 5.82 (1H, t, J = 10.2 Hz, 5), 5.30 (2H, m, 9, 7), 4.82 (2H, brs, NH_2), 4.47 (1H, d, J = 8.4 Hz, 6), 3.67 (2H, m, NHCH_2 -), 3.48 (2H, m, 11, 12), 3.46 (6H, s, 6- OCH_3 , 12- OCH_3), 2.60-2.90 (7H, m, NHCH_2CH_2 -, piperidine-H, 10), 2.02-2.40 (2H, m, 15), 2.00 (3H, s, 22- CH_3), 1.79-1.89 (5H, m, piperidine-H, 14), 1.73 (3H, s, 23- CH_3), 1.42-1.68 (2H, m, 13), 1.08 (3H, d, J = 6.9 Hz, 25), 0.94 (3H, d, J = 6.6 Hz, 24); MS(ESI) m/z 686 (M^+H), 684 (M-H).
- <178> <실시예 12> 카르바산 19-에틸아미노-13-하이드록시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르의 제조(AC216)
- <179> 디클로로에틸렌(5.0 ml)에 제조예 3의 화합물(71.6 mg, 0.13 mmol)을 녹인 용액에 에틸아민(0.125 ml, 테트라하이드로퓨란에 녹여 제조한 2 M 용액)을 첨가하였다. 상기 혼합액을 철야 교반한 후, 에틸아세테이트로 희석하고, 중탄산염 수용액 및 염수로 세척하였다. 상기 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨 후 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=20:1)로 정제하여 자주색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(45.2 mg, 62%).
- <180> $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 Hz) 9.30 (1H, s, NH), 7.14 (1H, s, 19), 6.23-6.25 (2H, m, 3, NH), 5.79 (1H, d, J = 9.6 Hz, 9), 5.20 (1H, d, J = 5.2 Hz, 7), 4.68 (2H, brs, NH_2), 3.41 (3H, s, 6- OCH_3), 3.37 (3H, s, 12- OCH_3), 3.33-3.62 (5H, m, 6, 11, 12, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$), 2.72 (1H, m, 10), 2.41 (4H, m, 4, 15), 1.91 (3H, s, 22- CH_3), 1.64-1.76 (5H, m, 5, 13, 14), 1.68 (3H, s, 23- CH_3), 1.34 (3H, t, J = 6.8 Hz, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}$), 1.02 (1H, d, J = 7.2 Hz, 25), 0.97 (3H, d, J = 6.8 Hz, 24); MS(ESI) m/z 598 (M^+Na), 574 (M-H).
- <181> <실시예 13> 카르바산 19-알릴아미노-13-하이드록시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르의 제조(AC220)
- <182> 디클로로에틸렌(5.0 ml)에 제조예 3의 화합물(80.4 mg, 0.14 mmol)을 녹인 용액에 알릴아민(0.021 ml, 0.29 mmol)을 첨가하였다. 상기 혼합액을 철야 교반한 후, 에틸아세테이트로 희석하고, 중탄산염 수용액 및 염수로 세척하였다. 상기 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨 후 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=20:1)로 정제하여 자주색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(44.9 mg, 55%).
- <183> $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 Hz) 9.23 (1H, s, NH), 7.12 (1H, s, 19), 6.39 (1H, t, J = 6.0 Hz, NH), 6.21 (1H, m, 3), 5.90 (1H, m, =CH), 5.75 (1H, d, J = 9.0 Hz, 9), 5.27 (2H, m, CH_2 =), 5.15 (1H, d, J = 5.7 Hz, 7), 4.91 (2H, brs, NH_2), 4.11 (2H, t, J = 6.3 Hz, = CHCH_2NH), 3.57 (1H, m, 6), 3.28-3.44 (2H, m, 11, 12), 3.38 (3H, s, 6- OCH_3), 3.34 (3H, s, 12- OCH_3), 2.62-2.67 (1H, m, 10), 2.26-2.40 (4H, m, 4, 15), 1.88 (3H, s, 22- CH_3), 1.68 (5H, m, 5, 13, 14), 1.65 (3H, s, 23- CH_3), 0.95-0.99 (6H, m, 24, 25); MS(ESI) m/z 610 (M^+Na), 586 (M-H).
- <184> <실시예 14> 카르바산 19-(2-디메틸아미노-에틸아미노)-13-하이드록시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르의 제조(AC196)
- <185> 디클로로에틸렌(4.0 ml)에 제조예 3의 화합물(85.4 mg, 0.15 mmol)을 녹인 용액에 N,N-디메틸에틸렌디아민(0.033 ml, 0.30 mmol)을 첨가하였다. 상기 혼합액을 철야 교반한 후, 에틸아세테이트로 희석하고, 중탄산염 수용액 및 염수로 세척하였다. 상기 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨 후 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=20:1)로 정제하여 자주색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(18.9 mg, 20%).

- <186> $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 Hz) 9.26 (1H, s, NH), 7.09 (1H, s, 19), 7.00 (1H, brs, NH), 6.23 (1H, t, J = 6.6 Hz, 3), 5.78 (1H, d, J = 9.3 Hz, 9), 5.17 (1H, d, J = 5.4 Hz, 7), 4.80 (2H, brs, NH_2), 3.82 (1H, m, 6), 3.30-3.72 (4H, m, 11,12, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3.39 (3H, s, 6-OCH₃), 3.335 (3H, s, 12-OCH₃), 2.66-2.75 (3H, m, 10, $(\text{CH}_3)_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH-}$), 2.34-2.41 (10H, s, $(\text{CH}_3)_2\text{N}$, 4, 15), 1.89 (3H, s, 22-CH₃), 1.72-1.69 (5H, m, 5, 13, 14), 1.67 (3H, s, 23-CH₃), 0.95-1.00 (6H, m, 24, 25); MS(ESI) m/z 619 (M^+ +H), 617 (M-H).
- <187> <실시예 15> 카르밤산 19-(2-디에틸아미노-에틸아미노)-13-하이드록시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르의 제조(AC223)
- <188> 디클로로에틸렌(4.0 ml)에 중간체 3의 화합물(80.0 mg, 0.14 mmol)을 녹인 용액에 N,N-디메틸에틸렌디아민(0.04 ml, 0.29 mmol)을 첨가하였다. 상기 혼합액을 철야 교반한 후, 에틸아세테이트로 희석하고, 중탄산염 및 염수로 세척하였다. 상기 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨 후 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=20:1)로 정제하여 자주색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(46.8 mg, 52%).
- <189> $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 Hz) 9.24 (1H, s, NH), 7.18 (1H, t, J = 5.1 Hz, NH), 7.05 (1H, s, 19), 6.22 (1H, t, J = 6.6 Hz, 3), 5.75 (1H, d, J = 9.0 Hz, 9), 5.15 (1H, d, J = 5.7 Hz, 7), 4.92 (2H, brs, NH_2), 3.71 (2H, m, NHCH_2-), 3.58-3.28 (3H, m, 6, 11, 12), 3.38 (3H, s, 6-OCH₃), 3.34 (3H, s, 12-OCH₃), 2.62-2.84 (7H, m, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, 10), 2.37 (4H, m, 4, 15), 1.88 (3H, s, 22-CH₃), 1.70 (5H, m, 5, 13, 14), 1.65 (3H, s, 23-CH₃), 1.12 (6H, m, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 0.95-0.99 (6H, m, 24, 25); MS(ESI) m/z 647 (M^+ +H), 645 (M-H).
- <190> <실시예 16> 카르밤산 13-하이드록시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-19-(2-피롤리딘-1-일-에틸아미노)-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르의 제조
- <191> 디클로로에틸렌(3.0 ml)에 제조예 3의 화합물(77.8 mg, 0.14 mmol)을 녹인 용액에 1-(2-아미노에틸)피롤리딘(0.035 ml, 0.28 mmol)을 첨가하였다. 상기 혼합액을 철야 교반한 후, 에틸아세테이트로 희석하고, 중탄산염 수용액 및 염수로 세척하였다. 상기 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨 후 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=10:1)로 정제하여 자주색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(10.9 mg, 12%).
- <192> $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 Hz) 9.21 (1H, s, NH), 7.07 (1H, s, 19), 6.97 (1H, brs, NH), 6.23 (1H, t, J = 6.6 Hz, 3), 5.77 (1H, d, J = 9.3 Hz, 9), 5.17 (1H, d, J = 4.8 Hz, 7), 4.82 (2H, brs, NH_2), 4.743 (1H, brs, OH), 3.56-3.85 (4H, m, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$, 6, 11), 3.45 (1H, m, 12), 3.39 (3H, s, 6-OCH₃), 3.35 (3H, s, 12-OCH₃), 2.91-3.04 (6H, m, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{N}$, piperidine-H), 2.63 - 2.68 (1H, m, 10), 2.37 (4H, m, 4, 15), 2.02-2.06 (4H, m, piperidine-H), 1.89 (3H, s, 22-CH₃), 1.67-1.72 (7H, s, 23-CH₃, 5, 13, 14), 0.98-1.00 (6H, m, 24, 25); MS(ESI) m/z 667 (M^+ +Na), 643 (M-H).
- <193> <실시예 17> 카르밤산 13-하이드록시-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-19-(2-모르폴린-4-일-에틸아미노)-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르의 제조
- <194> 디클로로에틸렌(4.0 ml)에 제조예 3의 화합물(78.6 mg, 0.14 mmol)을 녹인 용액에 4-(2-아미노에틸)모르폴린(0.04 ml, 0.28 mmol)을 첨가하였다. 상기 혼합액을 철야 교반한 후, 에틸아세테이트로 희석하고, 중탄산염 수용액 및 염수로 세척하였다. 상기 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨 후 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=18:1)로 정제하여 자주색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(50.7 mg, 55%).
- <195> $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300 Hz) 9.25 (1H, s, NH), 7.08 (1H, s, 19), 7.06 (1H, brs, NH), 6.23 (1H, t, J = 6.6 Hz, 3), 5.77 (1H, d, J = 9.6 Hz, 9), 5.16 (1H, d, J = 5.4 Hz, 7), 4.88 (2H, brs, NH_2), 3.42-3.76 (9H,

m, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$, morpholine-H, 6, 11, 12), 3.38 (3H, s, 6-OCH₃), 3.34 (3H, s, 12-OCH₃), 2.51-2.74 (7H, m, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$, morpholine-H, 10), 2.36 - 2.39 (4H, m, 4, 15), 1.88 (3H, s, 22-CH₃), 1.71 (5H, m, 5, 13, 14), 1.66 (3H, s, 23-CH₃), 0.94-0.99 (6H, m, 24, 25); MS(ESI) m/z 683 (M⁺Na), 659 (M-H).

<196> <실시예 18> 카르바산 13-하이드록시-19-(3-이미다졸-1-일-프로필아미노)-8,14-디메톡시-4,10,12,16-테트라메틸-3,20,22-트리옥소-2-아자-바이사이클로[16.3.1]도코사-1(21),4,10,18-테트라엔-9-일 에스테르의 제조

<197> 디클로로에틸렌(4.0 ml)에 제조예 3의 화합물(72.8 mg, 0.13 mmol)을 녹인 용액에 1-(3-아미노프로필)이미다졸(0.031 ml, 0.26 mmol)을 첨가하였다. 상기 혼합액을 철야 교반한 후, 에틸아세테이트로 희석하고, 중탄산염 수용액 및 염수로 세척하였다. 상기 유기층을 무수 황산마그네슘으로 건조시킨 후 농축하였다. 상기 농축액을 분취용 박층크로마토그래피(디클로로메탄:메탄올=18:1)로 정제하여 자주색 고형물의 목적 화합물을 얻었다(45.8 mg, 54%).

<198> ¹H-NMR (CDCl₃, 300 Hz) 9.19 (1H, s, NH), 7.09 (1H, s, 19), 6.25 (1H, t, J = 6.3 Hz, N=CH-N), 6.19 (1H, t, J = 6.9 Hz, 3), 5.72 (1H, d, J = 9.3 Hz, 9), 5.12 (1H, d, J = 4.8 Hz, 7), 4.94 (2H, brs, NH₂), 4.11 (2H, m, NCH=CHN), 3.41-3.62 (7H, m, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$, 6, 11, 12), 3.37 (3H, s, 6-OCH₃), 3.33 (3H, s, 12-OCH₃), 2.68 (1H, m, 10), 2.34 (2H, m, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 2.15 (4H, m, 4, 15), 1.87 (3H, s, 22-CH₃), 1.53-1.68 (8H, s, 23-CH₃, 5, 13, 14), 0.96 (3H, d, J = 6.6 Hz, 24), 0.85 (3H, d, J = 5.7 Hz, 25); MS(ESI) m/z 678 (M⁺Na), 654 (M-H).

<199> 상기 실시예 1 ~ 18의 화합물을 하기 표 1에 정리하였다.

표 1

실시예	구조식	실시예	구조식
1		2	
3		4	
5		6	
7		8	
9		10	
11		12	

<200>

13		14	
15		16	
17		18	

<201>

<202>

<203>

<실험예 1> Hsp90 단백질과의 결합력 측정

1-1. Hsp90 단백질의 ATP 결합자리 도메인 정제 및 분리

- <204> Hsp90 단백질을 ATP 결합자리를 분리 및 정제하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다. Hsp90 단백질 중 ATP 결합 자리를 가진 N 말단 부위를 클로닝하기 위해 NdeI 제한효소 부위를 도입한 5'-CCA TAT GCC TGA GGA AAC CCA GAC CC-3'(정방향 프라이머) 및 SalI 제한효소 부위를 도입 5'-GTC GAC CTT TTC TTC AGC CTC ATC ATC GC-3'(역방향 프라이머)으로 중합반응 후 pET-22b(+) 벡터에 클로닝하였다(도 1). 상기 제작된 벡터를 대장균 BL21(DE3)에 형질전환하여 발현시켰다. 단백질의 과생산은 과발현 플라스미드(plasmid)를 가진 대장균을 50 µg/ml 농도의 에피실린(ampicillin)을 포함하는 5 ml LB(Luria-Bertani) 액체 배지에서 약 16시간 동안 배양하였다. 이를 200 ml의 새로운 LB 배지를 사용하여 1/50 희석하였고, 이를 2~3시간 더 배양하면 UV 스펙트럼으로 600 nm에서 OD(optical density)값이 약 0.4~0.8이 되는데, 이때 이소프로필 β-D-티오글루코피라노사이드(isopropyl β-D-thioglucoopyranoside, IPTG)를 최종 농도가 1 mM이 되도록 첨가하여 과발현을 유도하고 37 °C에서 4시간을 더 배양하였다. 이렇게 배양된 대장균을 원심분리(6000 rpm, 10분)하여 수득한 후, 100 mM 용해 완충액(100 mM NaH₂PO₄ pH 7.8, 10 mM 트리스-염산(Tris-HCl), 0.2 mM PMSF, 0.2 mM β-머캅토에탄올) 10 ml에 대장균을 현탁하고 초음파 분쇄기를 이용하여 세포를 분쇄한 후, 원심분리하여 상기 분쇄액을 SDS-PAGE를 수행하고 단백질 생산을 확인하였다.
- <205> 상기 분쇄 상층액은 1 ml의 Ni-NTA 레진과 섞어 상온에서 15-60분간 부드럽게 흔들어 준 후, 분쇄물-레진(lysate-resin) 혼합물을 빈 컬럼에 조심스럽게 채운 다음, 4 ml의 세척 완충액(wash buffer, 100 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM 이미다졸, pH 8.0)을 두 번 처리하고, 마지막으로 용출 완충액(Elution buffer, 100 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 200 mM 이미다졸, pH 8.0)을 0.5 ml씩 네 번 처리한 후, 각각의 분획을 SDS-PAGE로 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.
- <206> 도 2에 나타난 바와 같이, 28 kDa의 Hsp90 단백질의 ATP 결합자리 도메인을 깨끗하게 분리되었음을 알 수 있다.
- <207> 1-2. Hsp90 단백질에 대한 결합력 측정
- <208> Hsp90 단백질과 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물 간의 직접적인 결합력을 측정하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- <209> 1) 실험원리 및 장비
- <210> BIACORE[®]는 SPR(Surface Plasmon Resonance)이라는 광학현상을 이용하여 센서칩 표면에 일어나는 물질 간의 결합 및 분리 과정을 실시간으로 읽어내는 장비이다. 따라서, 상기 BIACORE[®] 3000에 센서칩 CM5와 HBS-P 완충액을 사용하여 실험을 수행하였다. CM5 칩은 가장 범용적으로 사용되는 센서칩으로, 용액과 접촉하는 센서칩 표면에 텍스트란 코팅이 되어 있고, 카복실기가 음전하를 띤다. 텍스트란을 글루코오스의 직선형 중합체로서 생체물질과의 비특이적인 결합이 거의 없다. 상기 카복실기 때문에 음전하를 띤 표면에서 완충액의 pH가 고정화하려는 단백질의 pI보다 낮을 때 양이온을 갖는 단백질이 흡착되는 현상이 일어나게 된다. 리간드의 고정화는 N-하이드록시석신이미드(NHS)와 N-에틸-N'-(디메틸아미노프로필) 카보디이미드(EDC)로 쉽게 활성화되며, 일반적인 조건하에서 약 40%의 카복실기가 반응성이 좋은 N-하이드록시석신이미드 에스테르(NHS-에스테르)로 전환된다. 이러한 N-하이드록시석신이미드-에스테르는 단백질이나 다른 생체물질 내의 1차 아미노기와 결합한다. 고정화할 시료가 센서칩 표면에 쉽게 접근할 수 있도록 낮은 pH의 완충액과 혼합하여 주입을 하게 된다.
- <211> 2) 결합력 측정
- <212> 상기 실험예 1-1에서 정제된 N 말단 Hsp90 단백질을 CM5 칩에 고정화하기 위해 실험용 완충액은 HBS-P 완충액을 비아코어(BIACORE[®])에서 구입하여 사용하였고, 농축 검사(preconcentration test)를 통하여 pH 4.5의 완충액에서 최적의 조건을 확인하였다. 완충액의 유속은 5 µl/분으로 하고 4번 부유 나노 관(flow cell)에 N-에틸-N'-(디메틸아미노프로필)카보디이미드)/N-하이드록시석신이미드를 50 µl 주입하여 칩 표면을 활성화시킨 후, 10 mM 소듐 아세테이트 완충액(pH 4.5) 80 µl에 60 µl의 1 mg/ml의 N 말단 Hsp90 단백질을 희석하여 100 µl을 수동주입으로 고정화한 다음, 5 µl의 50 mM 수산화나트륨을 주입하여 잉여 단백질을 제거하였다. 50 µl의 1 M 에탄올 아민을 주입하여 고정화에 관여하지 못한 NHS-에스테르를 제거하여 불활성화시켜 최종적으로 4230 RU의 N 말단 Hsp90 단백질을 고정하였다. 위와 같은 방법으로 3번 부유 나노 관에 BSA를 고정하여 상기 Hsp90를 참조하는데 사용하였다.
- <213> N말단 Hsp90 단백질의 ATP 결합 자리에 경쟁적으로 결합하는 물질의 결합동역학(binding kinetics)을 확인하기 위하여, 젤다나마이신(제조예 2) 및 상기 화학식 1의 화합물들을 10 mM로 에탄올에 녹인 후, 이를 런닝 완충액

(running buffer)인 2% 에탄올을 포함한 HBS-P 완충액에 5000, 2500, 1250, 625, 312 및 156 nM로 연속적으로 희석하여 주입하였다. 완충액의 유속은 30 μl /분으로 하고, 시료는 30 μl 주입하여 결합시간(association time)을 1분으로 하고 분해시간(dissociation time)을 2분으로 하였다. 상기 과정을 각 샘플당 3회 반복 실험하여 센소그램(sensogram)을 얻었다. 부유 나노 관 4번의 값에서 부유 나노 관 3번의 값을 빼 값으로 나오는 상기 센소그램의 값을 3회 반복한 값의 평균값을 내고, 그 값을 같은 방식으로 런닝 완충액을 주입하여 나오는 센소그램 값의 평균값으로 빼준 센소그램을 그린다. 이 센소그램 도표를 이용하여 결합상수($K_a(1/\text{ms})$ 는 1 molar 화합물과 Hsp90 이 초당 결합하는 수), 해리상수($K_d(1/\text{s})$ 는 두 결합물이 초당 분리되는 수), 평형해리상수 ($KD(K_d/K_a)$ 해리되는 경향성으로 높은 해리상수 값은 낮은 결합력을 의미한다.) 및 카이스퀘어(Chi^2 ; 값이 10이하일 경우 실험의 통계치가 유의 수준임을 확인하는 지표)를 구하고, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

<214>

실시예	$K_a(1/\text{Ms})$	$K_d(1/\text{s})$	KD(M)	Chi^2
1	1.32×10^{-2}	1.00×10^{-5}	7.63×10^{-4}	0.904
2	2.06×10^5	1.36×10^{-3}	6.62×10^{-9}	0.238
3	6.42×10^5	1.74×10^{-3}	2.72×10^{-9}	0.0802
4	5.41×10^5	2.80×10^{-6}	5.18×10^{-12}	1.57
5	4.70×10^3	2.14×10^{-7}	4.54×10^{-11}	0.0591
6	2.31×10^5	0.0695	3.01×10^{-7}	0.0768
7	0.303	1.00×10^{-5}	3.31×10^{-5}	0.0905
8	ND	ND	ND	ND
9	1.41×10^5	1.56×10^{-3}	1.11×10^{-8}	1.06
10	4.60×10^6	2.06×10^{-5}	4.47×10^{-12}	0.123
11	7.90×10^4	0.0163	2.06×10^{-7}	0.102
12	10.7	1.01×10^{-5}	9.43×10^{-7}	6.39
13	2.92×10^4	0.0171	5.87×10^{-7}	0.0345
14	5.14×10^5	1.25×10^{-5}	2.44×10^{-11}	1.13×10^{-1}
15	1.02×10^5	0.0526	5.16×10^{-7}	0.0224
16	5.02×10^3	1.19×10^{-7}	2.37×10^{-11}	0.0279
17	4.41	1.00×10^{-5}	2.28×10^{-6}	1.38
18	4.05×10^{14}	1.76×10^{-3}	4.34×10^{-18}	0.158
19	53.9	1.01×10^{-5}	1.87×10^{-7}	6.2
20	47.1	1.01×10^{-5}	2.14×10^{-7}	0.242
21	2.92×10^5	8.35×10^{-6}	2.86×10^{-11}	0.107
17-AAG	1.36×10^4	6.73×10^{-3}	4.94×10^{-7}	0.192
17-DMAG	4.16×10^4	8.08×10^{-3}	1.94×10^{-7}	0.0721
ATP	10.5	1.00×10^{-5}	9.55×10^{-7}	0.473

<215>

* ND(not detective) 측정되지 않는 것을 말함

<216>

표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 대부분의 젤다나마이신 유도체들의 결합상수(K_a) 값이 해리상수(K_d) 값이나, 또는 ATP의 Hsp90에 대한 결합상수 값에 비하여 월등히 큰 측정값을 갖는 것을 알 수 있다. 이로부터, 본 발명에 따른 젤다나마이신 유도체들이 HsP90에 대한 친화도가 우수하고, 그 결과 ATP의 결합을 배제하고 Hsp90

에 결합하여 Hsp90의 활성을 저해하는 것을 알 수 있다.

<217> <실험예 2> 본 발명에 따른 젤다나마이신 유도체를 이용한 Hsp90 단백질의 기질 단백질인 ErbB2 발현 저해 효과 측정

<218> 젤다나마이신 유도체인 17-알릴 아미노 젤다나마이신을 이용하여 Hsp90 단백질의 기질 단백질인 ErbB2(kinase, 암관련 인산화효소) 발현 저해 효과를 측정하기 위하여 하기와 같은 실험을 진행하였다.

<219> ErbB2를 과발현 세포주에 17-알릴 아미노 젤다나마이신을 처리 후, 시간의 경과에 따라 ErbB2 밴드의 감소치를 관찰하였다. 유방암 암세포주인 SK-Br3를 5% CO₂, 37 °C에서 24시간 배양한 후, DMSO에 녹인 1 μM의 17-알릴 아미노 젤다나마이신을 처리하였다. 이를 다시 동일한 시간으로 배양하고, 배양한 상기 세포주를 수거하여 용해 완충액(50 mM Tris 완충액 pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1%(v/v) 단백질 저해 혼합물(Sigma #P8340)) 처리를 수행한 후, 세포를 초음파 분쇄하여 분쇄물을 얻고, 상기 분쇄물을 BCA법으로 단백질 정량을 실시하였다. 약 50 μg의 단백질을 SDS-PAGE에 로딩하여 ErbB2 및 Hsp90에 대한 면역블로팅(immunoblotting)을 실시하였다. 그 결과를 하기 도 3에 나타내었다.

<220> 도 3에 나타난 바와 같이, 1 μM의 17-알릴 아미노 젤다나마이신을 처리 4시간 이후부터 ErbB2가 감소하기 시작하여 8시간째에는 거의 검출되지 않았으며, Hsp90의 경우에는 17-알릴 아미노 젤다나마이신을 처리 후 8시간까지는 Hsp90 발현 정도가 변화되는 것이 보이지 않았다. 이로부터, 본 발명에 따른 젤다나마이신 유도체들은 Hsp90에 결합하여 Hsp90의 활성을 저해함으로써, Hsp90의 기질 단백질인 ErbB2의 발현을 저해하는 효과가 우수하다는 것을 확인할 수 있었다.

<221> <실험예 3> 시험관 내 항암활성 측정

<222> 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 암세포에 대한 세포독성을 측정하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.

<223> 암 세포주는 유방암 세포인 SK-Br3를 사용하였다. SK-Br3세포주는 Hsp90 단백질의 기질 단백질인 ErbB2(kinase, 암관련 인산화효소)가 과량 발현되는 세포주로 기존의 젤다나마이신 유도체에 대한 항암 활성 평가 세포주로 널리 이용되고 있다. 상기 SK-Br3 세포를 96-웰 플레이트(96-well plate)에 웰 당 10⁴개의 암세포를 분주하고, 5% CO₂, 37 °C에서 24시간 배양한 후, DMSO에 녹인 100, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001, 0 μM 농도 별 시료 처리하였다. 이를 다시 동일 조건하에 72시간 동안 배양하고 나서, MTT 시약을 가하여 37 °C에서 4시간 반응시켜 세포 내에 포마잔(formazan)을 형성하였다. 상기 포마잔을 녹여 흡광도를 측정하기 위하여 용해 완충액(lysis buffer)을 가하여 37 °C에서 하루 동안 방치하고, UV 스펙트럼 분석기를 이용하여 570 nm/650 nm로 흡광도를 측정하고 IC₅₀을 산출하였다. 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

화합물	IC ₅₀ (SK-Br3)	화합물	IC ₅₀ (SK-Br3)
제조예 1	>100	실시예 9	24
제조예 2	49	실시예 10	45
제조예 3	35	실시예 11	4
실시예 1	43	실시예 12	37
실시예 2	101	실시예 13	30
실시예 3	72	실시예 14	41
실시예 4	24	실시예 15	2
실시예 5	1	실시예 16	16
실시예 6	63	실시예 17	37
실시예 7	61	실시예 18	36
실시예 8	28	17-DMAG	10

<225> 표 3에 나타난 바와 같이, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물들의 대부분은 50 nM 이하의 IC₅₀ 값에서 유방암 암세포주인 SK-Br3의 활성을 저해하는 것으로 나타났다. 특히, 실시예 5, 11 및 15는 공지의 젤다나마이신 유도체인 17-DMAG 보다 낮은 IC₅₀ 값을 갖는 것으로 나타났다. 이로부터, 본 발명에 따른 화학식 1의 젤다나마이신 유

도체는 Hsp90 단백질의 ATP 자리에 결합하여 ErbB2와 같은 암화에 관련된 기질 단백질의 발현 저해 및 안정화 저해로 높은 암세포 독성을 보인다는 것을 알 수 있었다.

- <226> 하기 본 발명의 조성물을 이용한 제제예를 예시한다.
- <227> <제제예 1> 산제의 제조
- <228> 화학식 1의 유도체 2 g
- <229> 유당 1 g
- <230> 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- <231> <제제예 2> 정제의 제조
- <232> 화학식 1의 유도체 100 mg
- <233> 옥수수 전분 100 mg
- <234> 유당 100 mg
- <235> 스테아린산 마그네슘 2 mg
- <236> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.
- <237> <제제예 3> 캡슐제의 제조
- <238> 화학식 1의 유도체 100 mg
- <239> 옥수수전분 100 mg
- <240> 유당 100 mg
- <241> 스테아린산 마그네슘 2 mg
- <242> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

발명의 효과

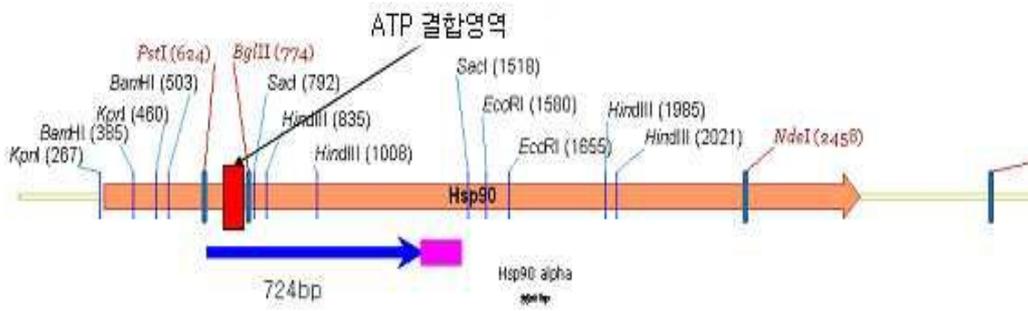
- <243> 본 발명에 의하면, 화학식 1로 표시되는 젤다나마이신 유도체들은 암세포의 성장 및 전이에 중요한 역할을 수행하는 샤페론 단백질인 Hsp90의 활성을 저해하여 항암 활성을 나타낸다. 따라서, 본 발명에 따른 유도체를 유효 성분으로 함유하는 약학적 조성물은 다양한 암 질환의 예방 및 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.
- <244> 또한, 본 발명에 따른 젤다나마이신 유도체들은 젤다나마이신과 유사하게 Hsp90 억제 작용을 나타냄으로써, 항생제, 항진균제, 항바이러스제, 면역억제제, 퇴행성 신경 질환 치료제, 항염증제 등으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

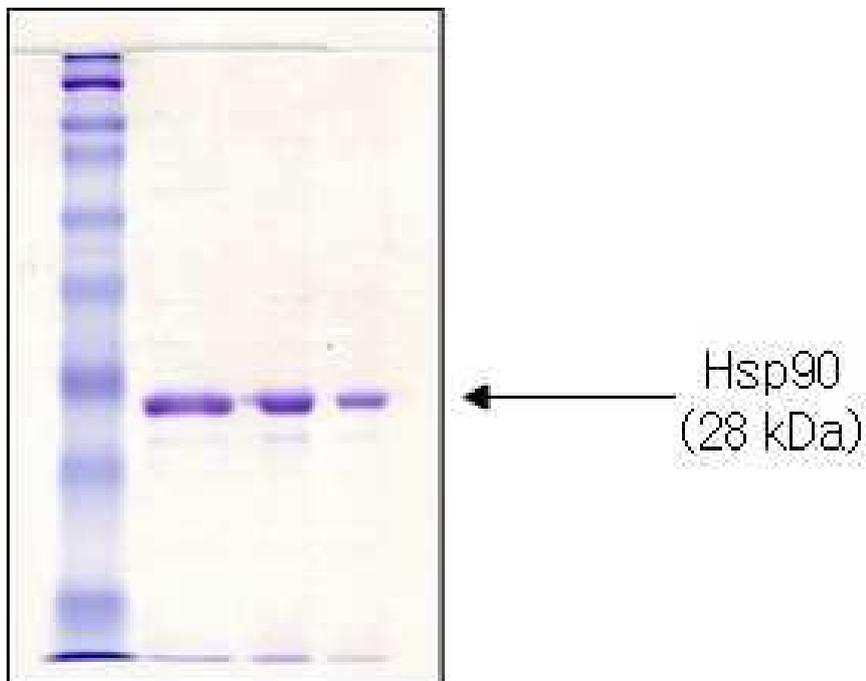
- <1> 도 1은 Hsp90 알파 유전자의 제한효소지도 및 서열 내에서의 ATP 결합부위와 발현에 사용한 부위를 나타내는 모식도이고;
- <2> 도 2는 본 발명의 실험예 1-1에서 분리 정제된 Hsp90의 SDS-PAGE 결과이고;
- <3> 도 3은 본 발명의 실시예 2의 젤다나마이신 유도체를 1 μ M 처리 후 시간에 따른 Hsp90의 억제로 인한 ErbB2의 활성 저해를 나타내는 결과이다.

도면

도면1



도면2



도면3

