creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

약학석사 학위논문

Lenvatinib 및 Sorafenib 구조 기반

신규 Hsp90 저해제 개발 연구

2019 년 2 월

서울대학교 대학원

약학과 약품화학전공

조 다 솔

국 문 초 록

Heat Shock Proteins (이하 HSPs)는 단백질의 접힘(folding)에 관여하여 단백질의 항상성을 유지하는데 핵심적인 역할을 하는 분자 샤페론(molecular chaperone) 단백질로, 세포가 다양한 스트레스에 노출되었을 때 세포내 방어기전으로 유도된다. 특히 분자량이 약 90kDa 인 Hsp90 는 진핵세포 내부에 가장 많이 존재하는 분자 샤페론 중 하나로 세포의 성장, 분화, 생존에 관련된 다양한 단백질을 안정화 및 활성화한다.

암세포 분화와 관련하여, Hsp90 는 형질 전환 중에 생겨나는 v-Src, Bcr-Abl, p50 등의 불안정한 돌연변이 단백질을 안정화하여 암세포로의 분화를 촉진하고, 정상세포에 비해 암세포에서 그 활성과 발현이 높은 것으로 알려져 있다. 따라서 암세포 내 높은 활성의 Hsp90 를 강력하게 결합하여 억제한다면, 정상세포에는 비교적 작은 영향을 미치면서 암세포에 선택적으로 항암 효과가 나타날 것으로 기대할 수 있다. 또한 특정 표적에 한정하여 작용하는 기존의 항암제에 비해 Hsp90 저해제는 다양한 암 유발 단백질을 동시에 억제할 수 있어 다양한 암 종류에 적용할 수 있다.

Hsp90 단백질의 구조는 N-terminal ATPase domain (NTD), middle domain (MD), C-terminal dimerizing domain (CTD)의 3 가지 영역으로 나누어지며, CTD 를 통해 homodimer 를 이루어 다양한 co-chaperone 및 client protein 과 복합체를 형성하여 기능한다.

N-terminal 을 억제하는 기존의 Hsp90 저해제는 억제에 대한 보상작용으로 다른 HSPs 의 발현이 증가하는 현상인 HSR (heat shock response)을 유도한다고 보고된 바 있다. 반면, Hsp90 C-terminal 을 저해하는 화합물은 다른 HSPs 의 발현을 증가시키지 않는다는 것이 확인되어 C-terminal 을 저해하는 화합물 개발의 필요성이 제기되어 왔다. 하지만 현재까지 보고된 C-terminal 저해제는 만족스러운 효능을 보이지 않아 신규 유도체 연구가 필요하다.

본 연구에서는 Hsp90 의 C-terminal 을 저해하는 기전의 항암제 개발을 목표로 신규 화합물을 설계하고 합성하였다. 선행연구에서 도출된 천연물 Deguelin 유도체와 protein kinase inhibitors (sorafenib 과 lenvatinib)의 약리작용단을 이용한 pharmacophore-mix and match approach 를 통해 신규 화합물 10 종을 디자인, 합성하였으며 이들 화합물의 암세포 증식 억제 작용을 평가하여 일부 화합물에서 항암 활성이 있음을 in vitro 에서 확인하였다.

주요어: Heat shock protein 90 (Hsp90), C-terminal, 저해제, sorafenib, lenvatinib, 항암제, heat shock response

학번: 2011-20227

목 차

Ⅰ. 서론 1

1. Hsp90 와 암 1

2. Hsp90 저해제와 새로운 유도체 개발의 필요성 4

3. 선행 연구 및 연구 목표 5

Ⅱ. 본론 6

1. 새로운 화합물의 설계 (Design) 6

2. 합성 (Chemistry) 8

3. 화합물의 생물학적 활성 평가 11

Ⅲ. 결론 13

Ⅳ. 실험 14

1. 실험 정보 14

2. 실험 과정 14

3. 실험 데이터 18

Ⅴ. 참고문헌 22

그림 목차

Figure 1. Structure of Heat Shock Protein 90 2

Figure 2. Hsp90 inhibitors and Heat Shock Response 4

Figure 3. Deguelin and its ring-truncated derivative, L-80 5

Figure 4. Design of Hsp90 C-terminal inhibitors 6

Figure 5. Structures of designed compounds 7

표 목차

Table 1. Hsp90 clients and the malignant phenotype 3

Table 2. Antiproliferative Activity of Sorafenib-type compounds 11

I. 서론

1. Hsp90과 암

세포의 단백질이 정상적으로 기능하려면 적절한 구조로의 변형이 선행되거나 불안정한 상태로부터 안정화되는 것이 필요하다. Heat shock protein (이하 Hsp)은 단백질의 구조적 변화를 유도함으로써 단백질이 기능할 수 있도록 돕는 분자 샤페론 (molecular chaperone)으로, 단백질의 항상성을 유지하는데 핵심적인 역할을 한다. 세포가 고열, 자유 라디칼, 중금속 등과 같은 스트레스에 노출되면 세포 내 방어 기전으로 Hsp가 유도되어 스트레스 대응 등의 과정에서 중요한 역할을 수행한다. Hsp는 분자량에 따라 Hsp100, 90, 70, 60, 40, small Hsp 등으로 분류할 수 있는데, 이 중 분자량이 약 90kDa인 Hsp90는 진핵 세포 내부에 가장 많이 존재하는 샤페론 중 하나로, 세포의 성장, 분화, 생존에 관련된 다양한 단백질의 안정화와 활성화를 돕는다.

Hsp90은 동일한 단량체 두 개가 모여 형성된 이합체 (homo-dimer)가 다양한 co-chaperone과 복합체를 이루어 기능하는데, 하나의 단량체는 N-terminal domain(NTD), middle domain(MD), C-terminal domain(CTD)의 3가지 도메인으로 구성되어 있다.

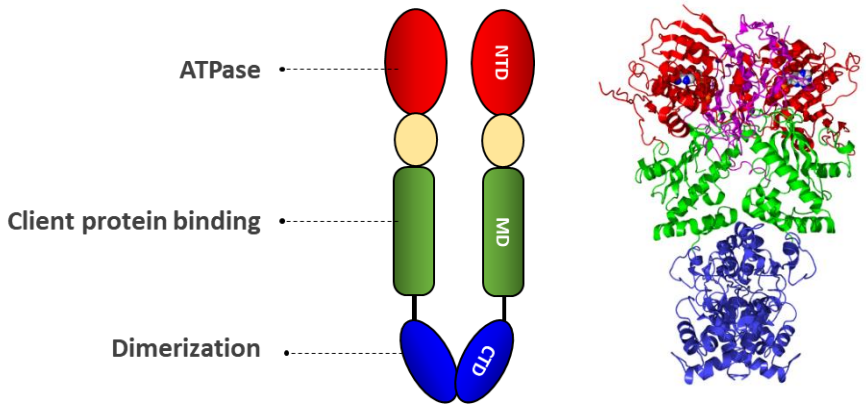


Figure 1. Structure of Heat Shock Protein 90

Hsp90의 기질 단백질을 총칭하여 'client 단백질'이라 하는데, Hsp90 client 단백질은 세포의 성장, 분화, 생존에 기여하는 여러가지 세포 내 신호전달(cell signaling)과 스트레스 반응 (stress response)에서 필수적인 역할을 하며, Hsp90의 활성이 억제되면 client 단백질은 프로테아좀 (proteasome)에 의해 분해되어 그 기능을 상실한다.

50여 종의 암 유발 단백질 또한 client 단백질에 포함되어 있는데, Hsp90의 샤페로닝 기전은 이용하여 형질 전환 중에 생기는 Akt, Her2, HIF-2, Src 등의 불안정한 돌연변이 단백질을 안정화 하고 분해로부터 보호한다. 그 결과 여러 종류의 암 유발 단백질이 관여하는 여러 경로를 통해 증식, 침윤, 전이, 혈관 신생 등이 일어나고 암세포로의 분화가 촉진된다.

Client proteins	Malignant phenotypes
Her2, EGFR, Raf, MEK	세포 증식
Akt, IGF-1R	세포 생존
JAK/STAT3, MMP2	암 전이
Cdk4, Cdk6	세포 주기
VEGFR, HIF-1α, Src	혈관 생성
Telomerase	무한 증식

Table 1. Hsp90 clients and the malignant phenotypes

한편 암세포에서는 암세포 주변의 스트레스 환경 (저산소, 병리적인 pH, 영양분 고갈 등)에 의해 Hsp90의 활성 및 발현 증가가 유도되어, 정상세포에서보다 Hsp90 level이 높다.

이와 같은 사실들은 Hsp90을 저해하는 것이 효과적인 항암 기전이 될 수 있음을 시사하며, 암세포에서 높은 활성 상태의 Hsp90에 강하게 결합하여 그 기능을 억제하는 화합물이 정상세포에는 비교적 작은 영향을 미치면서 암세포에 선택적으로 작용하는 항암제로서 작용할 것으로 기대할 수 있다. 또한 암세포의 Hsp90을 저해하면 다양한 암 유발 단백질을 동시에 감소시킬 수 있으므로 Hsp90 저해제는 여러 종류의 암에 광범위하게 적용할 수 있는 항암제로 주목받고 있다.

2. Hsp90 저해제와 새로운 유도체 개발의 필요성

현재까지 임상시험 단계에 진입한 Hsp90 저해제는 N-terminal을 표적으로 하고 있는데, 이들은 공통적으로 억제에 대한 보상작용으로서 Hsp70, Hsp27과 같은 antiapoptotic protein의 발현이 증가하는 heat shock response(이하 HSR)를 유도한다는 문제점을 가지고 있다.

반면, Hsp90의 C-terminal을 표적으로 하여 Hsp90의 작용을 억제하는 화합물은 HSR을 유발하지 않는 것이 확인되어, C-terminal 저해를 통한 항암 작용이 Hsp90 저해 기전 항암제 개발에서 중요한 전략으로 주목받고 있다. 하지만 C-terminal 저해제의 경우 활성 개선 등을 위한 추가적인 구조 기반 신규 유도체 연구가 필요한 상태이다.

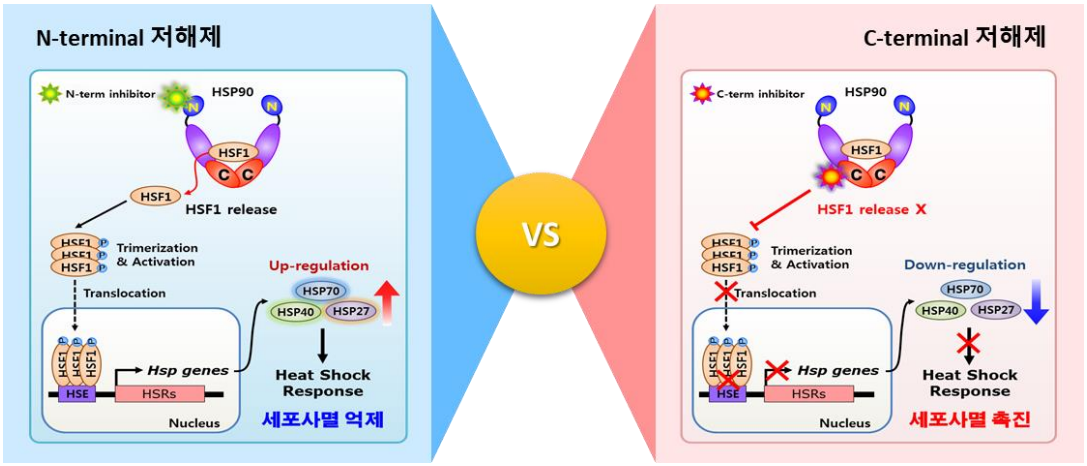


Figure 2. Hsp90 inhibitors and Heat Shock Response

3. 선행 연구 및 연구 목표

선행연구에서 Hsp90를 저해하는 것으로 알려진 천연물 Deguelin이 높은 항암 활성을 나타내는 것에 근거하여 선도물질 도출 연구를 수행하였고, 약리작용단 분석 및 고리 절단 (ring truncation) 전략을 통해 Deguelin 유도체 L-80을 도출하였다.

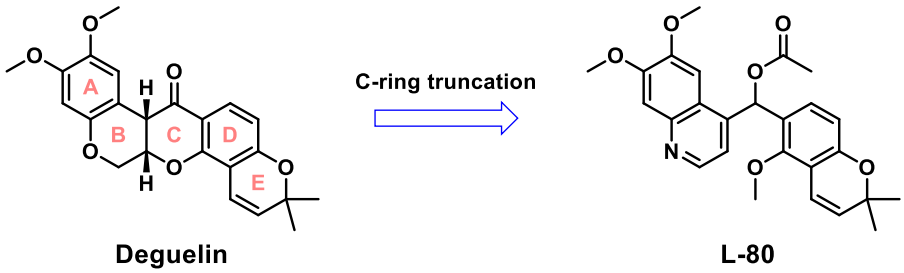


Figure 3. Deguelin and its ring-truncated derivative, L-80

L-80은 우수한 암세포 성장 억제 효과를 나타냈고, Deguelin과 달리 정상 세포의 성장에 대해서는 유의한 억제 작용을 보이지 않아 독성이 비교적 작았다. 또한 L-80의 항암 작용은 Hsp90 C-terminal 저해 기전을 통해 발현되는 것이 확인되었다.

이에 따라 본 연구에서는 기존 Hsp90 저해제에서 나타난 HSR 유발 문제점을 해결한 Hsp90 C-terminal 저해 기전의 항암제 개발을 목표로, C-terminal 저해 활성이 확인된 선도물질 L-80과 기존에 보고된 항암 활성 화합물에 기반하여 신규 화합물을 설계 및 합성하고, 암세포 증식 억제 효과를 확인하고자 하였다.

II. 본론

1. 새로운 화합물의 설계

선행연구를 통해 Hsp90 C-terminal 저해 활성을 확인한 화합물에 보고된 항암 활성 화합물의 약리작용단을 조합하는 Pharmacophore mix and match 전략을 통해 Hsp90 C-terminal을 강하게 저해할 것으로 기대되는 신규 화합물 10종을 디자인 하였다.

선행연구에서 도출한 L-80의 dimethoxy quinoline 구조에, kinase의 ATP-binding site에 결합하는 protein kinase inhibitor 화합물 두 종류 (sorafenib, lenvatinib)의 약리작용단 일부를 각각 도입하였다. 도입된 kinase inhibitor의 약리작용단은 L-80의 dimethoxy quinoline과 유사한 구조 (sorafenib에서는 pyridine, lenvatinib에서는 quinolone) 를 제외한 나머지 작용단이었으며, kinase inhibitors에서 유래한 두 가지 약리작용단을 L-80에서 유래한 dimethoxy quinoline과 다섯 가지 구조를 통해 각각 연결하여 총 10종의 화합물을 설계하였다.

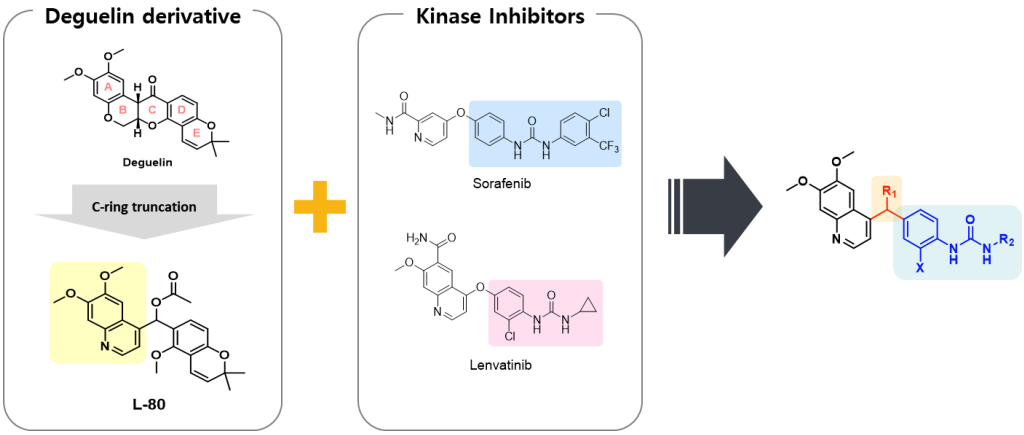
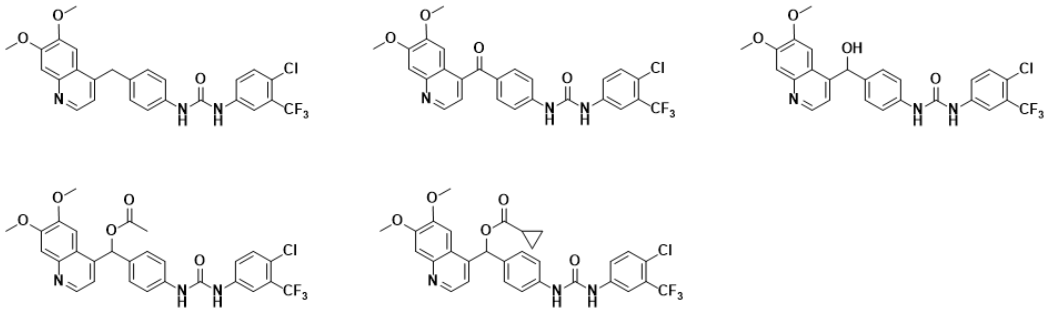


Figure 4. Design of Hsp90 C-terminal inhibitors

Group A. Sorafenib-type



Group B. Lenvatinib-type

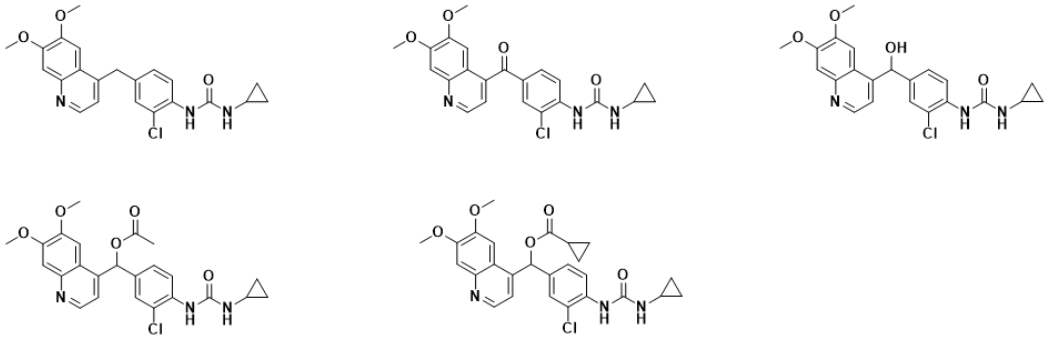


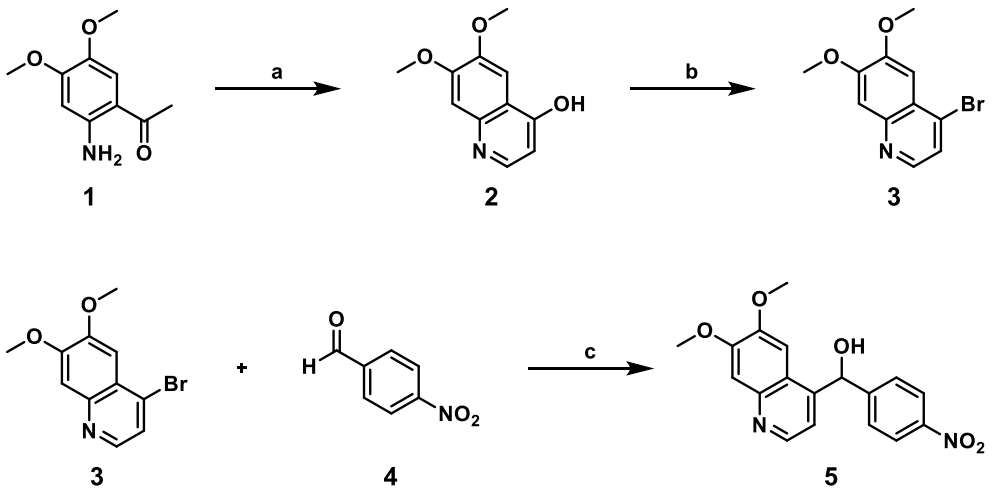
Figure 5. Structures of designed compounds

2. 합성

Sorafenib-type 화합물의 합성

Sodium tert-butoxide (NaO*t*-Bu)를 염기로 하여 2'-amino-4',5'-dimethoxyacetophenone (1)과 ethyl foramte를 반응시켜 quinolinol 화합물 (2)을 합성한 후, phosphorus tribromide (PBr_3)을 이용해 OH를 Br로 치환하여 bromo-quinoline 화합물 (3)을 얻었다.

n-Butyllithium (*n*-BuLi, 2.5M in hexane)을 이용해 bromo-quinoline 화합물 (3) 과 4-nitrobenzaldehyde (4)를 반응시켜 2차 alcohol 화합물 (5)을 합성할 수 있었다.

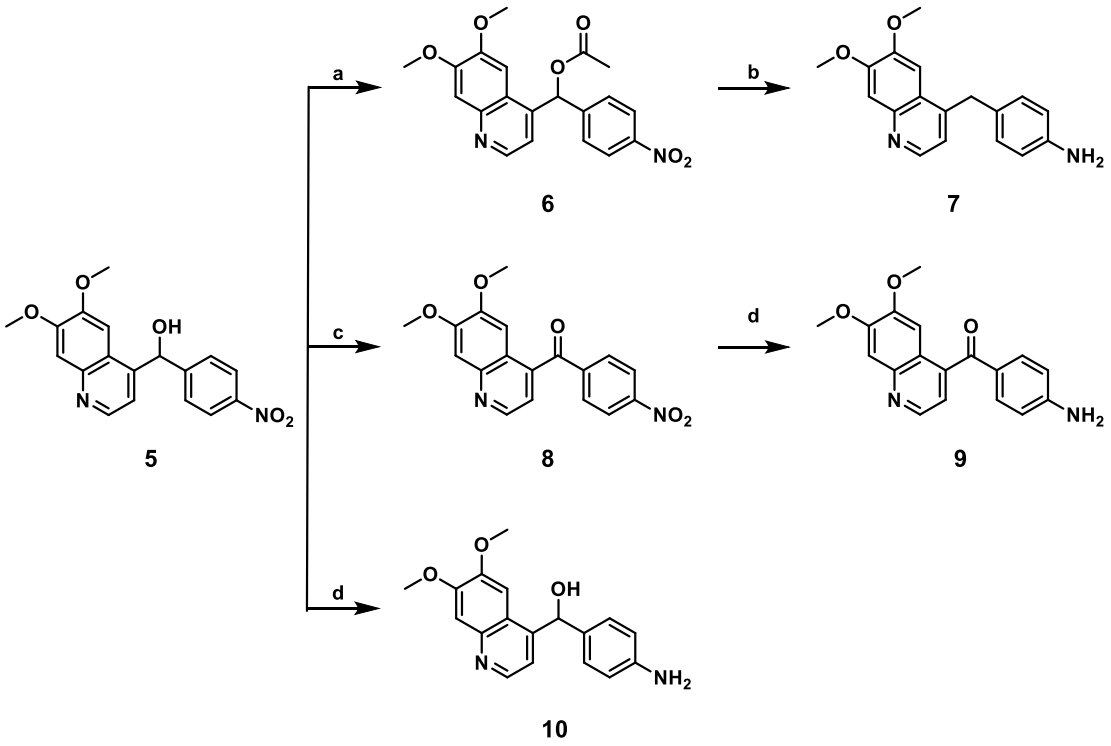


Scheme 1. Reagents and Conditions: (a) Ethyl formate, NaO*t*-Bu, 0℃ to r.t.; (b) PBr_3, DMF, 0℃ to r.t.; (c) *n*-BuLi, THF, −78℃ to r.t.

염기 pyridine 존재 하에서 acetyl chloride (AcCl)으로 alcohol 화합물 (5)를 O-acetylation 한 뒤(6), zinc와 calcium chloride ($CaCl_2$) 조건에서 decarbonylation과 nitro reduction을 수행하여 quinolinyl methyl aniline 화합물 (7)을 합성하였다.

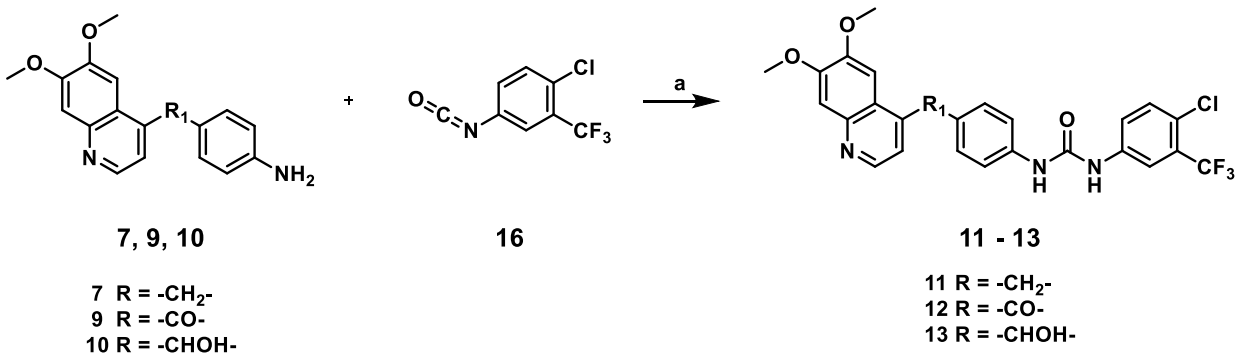
2차 alcohol 화합물 (5)을 Dess-Martin periodinane (DMP)로 oxidation 하여 상응하는 ketone 화합물 (8)을 합성하였다.

앞에서 얻은 nitro phenyl 화합물 (5, 8)을 수소 기체 하에서 10% palladium on activated charcoal (10% Pd/C)으로 reduction하여 amino phenyl 화합물 (9, 10)을 얻을 수 있었다.



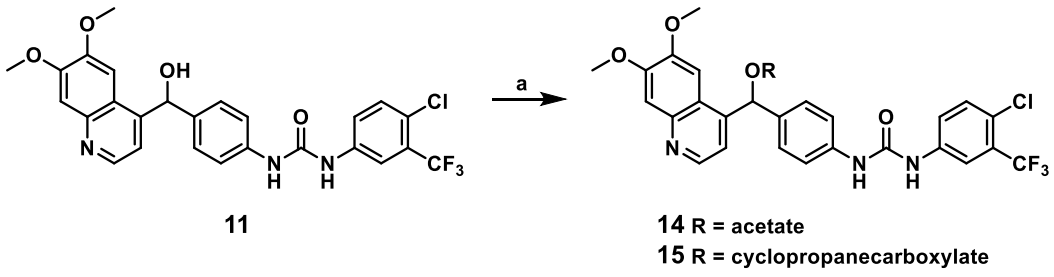
Scheme 2. Reagents and Conditions: (a) AcCl, pyridine, DCM, 0℃ to r.t.; (b) Zn, $CaCl_2$, EtOH/H_2O, 80℃; (c) DMP, DCM, 0℃ to r.t.; (d) H_2, Pd/C, MeOH, r.t.

Nitro reduction을 통해 얻은 amino phenyl 화합물 (7, 9, 10)을 N,N-diisopropylethylamine (DIPEA)을 염기로 하여 phenyl isocyanate 화합물 (16)과 coupling을 수행하여 urea 화합물 (11, 12, 13)을 최종적으로 합성할 수 있었다.



Scheme 3. Reagents and Conditions: (a) DIPEA, toluene, r.t.

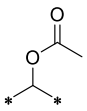
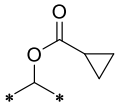
2차 alcohol 구조의 최종화합물 (11)을 pyridine을 염기로 하여 두 가지 O-acylation을 수행하였고 ester 화합물 (14, 15)을 최종적으로 얻을 수 있었다.



Scheme 4. Reagents and Conditions: (a) RCOOCl, pyridine, DCM, 0℃ to r.t.

3. 화합물의 생물학적 활성 평가

화합물의 암세포 증식 억제 효과를 평가하기 위해 합성한 5종의 Sorafenib-type 최종 화합물에 대해 SRB(sulforhodamine B) Assay를 수행하였다. 다섯 종류의 암세포주 (lung cancer, breast cancer, liver cancer, stomach cancer, colon cancer) 및 정상세포주 (lung fibroblast)의 증식을 억제하는 정도를 IC_{50}값으로 나타내어 평가하였다. 항암제인 etoposide를 양성 대조군 (positive control)로 사용하였다.

Compounds		Cell lines					
Code	R	A549	HCT116	MDA-MB-231	SK-Hep-1	SNU638	MRC-5
11		3.41	2.20	3.11	2.98	4.50	>20
12		6.25	5.05	5.23	4.76	6.31	6.54
13		>20	19.96	>20	16.52	>20	>20
14		8.22	6.97	7.21	5.39	11.07	>20
15		11.56	7.75	8.48	6.11	13.69	18.17
Ref.	Etoposide (+)	0.68	1.16	3.34	0.40	0.32	13.64

A549: Lung cancer cells, MDA-MB-213: Breast cancer cells, SK-Hep-1: Liver cancer cells, SNU638: Stomach cancer cells, HCT116: Colon cancer cells, MRC5: Lung fibroblast

Table 2. Antiproliferative Activity of Sorafenib-type compounds (IC_{50}, μM)

생물학적 활성 평가를 진행한 Sorafenib-type 화합물 5종 가운데 alcohol linker을 가진 화합물 13번을 제외한 4종의 화합물에서 유의한 항암 활성을 나타났다. 활성을 가진 나머지 4종 중에서 methylene bridge 구조의 11번 화합물의 활성이 가장 우수하였으며 정상세포에 대한 독성도 작음(MRC5 IC_{50} >20 μM)을 확인하였다. Ketone linker 구조의 12번의 경우 암세포 증식 억제 효과는 우수했지만 정상세포에 대한 독성(MRC5 IC_{50} =6.54 μM)도 관찰되었다.

III. 결론

본 연구에서는 선행 연구를 통해 Hsp90 C-terminal 저해활성을 확인한 Deguelin 유도체 L-80 화합물과 두 종의 protein kinase inhibitor (sorafenib, lenvatinib)의 약리작용단을 조합하여 설계, 합성한 화합물에 대한 활성 평가 연구를 진행하였다.

Sorafenib-type 화합물 5종에 대하여 암세포 증식 억제 정도에 관한 생물학적 활성 평가를 수행하였다. 그 결과, 13번을 제외한 4종의 화합물(11, 12, 14, 15)에서 항암활성이 유의하게 나타남을 확인하였다. 특히 methylene bridge구조를 가지는 11번 화합물이 가장 우수한 항암활성과 작은 독성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

활성 평가 결과를 바탕으로 현재 추가적인 유도체 합성과 활성 평가를 진행하고 있으며, C-terminal 억제 기전을 통해 우수한 항암 활성을 보이는 Hsp90 저해 선도물질을 도출하기 위한 기전 연구 및 구조-활성 연구를 진행할 예정이다.

이를 통해 궁극적으로는 기존의 N-terminal 저해제에서 나타나는 HSR 유도 부작용이 없으면서 높은 선택성과 강한 활성을 가지는 Hsp90 C-terminal 저해제 임상 후보 물질을 도출할 수 있을 것으로 예상하며, 본 연구의 결과가 차기 기초연구 및 응용연구에 중요한 기반 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대한다.

IV. 실험

1. 실험 정보 (Experimental Information)

박층 크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC)는 precoated silica gel plates (Kiesel gel $60F_{254}$, Merck)를 사용하였고, 컬럼 크로마토그래피 silica gel (Kiesel gel 60, 230−400 mesh, Merck)를 사용하였고, 모든 크로마토그래피 용매는 시약용 일급 용매를 사용하였다. Low resolution mass spectra는 VG Trio−2 GC−MS, JEOL JMS−AX 505wA, JEOL JMS−HX/HX 110A spetrometer를 사용하여 ESI로 측정하여 m/z로 나타냈다. ^{1}H NMR (nuclear magnetic resonance) spectra는 JEOL JNM−LA 300MHz 와 JEOL JMCT 400MHz를 이용하여 측정하였다. 이때 TMS(tetramethylsilane)를 내부 표준물질(internal standard)로 사용하였으며, chemical shift는 ppm(δ) 단위로, coupling constant는 Hz(hertz)로 나타냈다.

2. 실험 과정 (Experimental Procedures)

2.1. *n*−BuLi coupling

Bromo quinoline 화합물 (1.0 equiv.)을 tetrahydrofuran (THF) 용매에 녹인 후 −78℃에서 2.5M *n*−butyllithium (*n*−BuLi) solution in *n*−hexane (1.5 equiv.)을 천천히 적가한 뒤, aldehyde (1.0 equiv.) 화합물을 적가하였다. 반응물을 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응이 끝나면 ammonium chloride (NH_4Cl) 포화 수용액을 넣어 반응을 중지하고, ethyl acetate (EA)로 추출하였다. 유기층을

brine으로 씻고 magnesium sulfate ($MgSO_4$)로 건조한 뒤, 감압 농축하였다. 잔사를 column chromatography로 정제하여 생성물을 얻었다

2.2. Synthesis of quinolinol

상온에서 amino acetophenone 화합물 (1.0 equiv.)을 과량의 ethyl formate에 녹인 후, sodium tert-butoxide (NaO*t*-Bu, 10.0 equiv.)를 0℃에서 천천히 넣어주고 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 0℃에서 HCl 수용액으로 중화한 다음, 생성된 고체를 여과하고 ethyl ester으로 씻어주었다. 이렇게 얻어진 고체를 건조하여 quinolinol 화합물을 얻었다.

2.3. Conversion of OH to Br

Quinolinol 화합물 (1.0 equiv.)을 상온에서 dimethylformamide (DMF) 용매에 녹이고, 0℃에서 phosphorus tribromide (PBr_3, 1.2 equiv.)를 천천히 적가하였다. 상온에서 2시간 동안 교반한 뒤, 반응이 끝나면 0℃에서 sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) 포화 수용액으로 중화하였다. EA으로 추출하고 유기층을 $MgSO_4$로 건조한 뒤, 감압 농축하였다. 잔사를 column chromatography로 정제하여 생성물을 얻었다.

2.4. DMP oxidation

Alcohol 화합물 (1.0 equiv.)을 dichloromethane (DCM) 용매에 녹이고, 0℃에서 Dess-Martin periodinane (DMP, 1.0 equiv.)을 넣었다. 상온에서 1시간 동안

교반한 뒤, sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) 포화 수용액으로 중화하였다. EA으로 추출하고 유기층을 $MgSO_4$로 건조한 뒤, 감압 농축하였다. 잔사를 column chromatography로 정제하여 생성물을 얻었다.

2.5. Palladium (10% Pd/C) reduction

상온에서 nitro 화합물 (1.0 equiv.)을 methanol 용매에 녹인 후, 10% palladium on activated charcoal (10% Pd/C, 10% w/w)을 넣어주었다. 반응물을 수소 기체 하에 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 시작 물질이 사라지면 반응물을 celite pad로 여과한 뒤 여액을 감압 농축하였다. 잔사는 column chromatography로 정제하여 생성물을 얻었다.

2.6. Acylation

Alcohol 화합물 (1.0 equiv.)을 DCM 용매에 녹인 후, 0℃에서 pyridine (3.0 equiv.)과 acyl chloride (3.0 equiv.)을 적가한 후, 상온에서 2시간 동안 교반하였다. 반응물을 DCM으로 희석하고 0℃에서 $NaHCO_3$ 포화 수용액으로 중화하였다. DCM으로 추출하고 유기층을 $MgSO_4$로 건조한 뒤, 감압 농축하였다. 잔사를 column chromatography로 정제하여 생성물을 얻었다.

2.7. Urea Coupling

Aniline 화합물 (1.0 equiv.)을 toluene 용매에 녹인 후, 상온에서 phenyl isocyanate (1.5 equiv.)와 N,N−diisopropylethylamine (DIPEA, 2.0 equiv.)을 차

례로 적가하였다. 반응물을 상온에서 for overnight 교반하였다. 생성된 고체 화합물을 여과하고 toluene으로 씻어주었다. 이렇게 얻어진 고체 화합물을 건조하여 urea 화합물을 얻었다.

2.8. Biological Assay

SRB (sulforhodamine B) assay Cell lines: A549 (lung cancer cells), MDA-MB-231 (breast cancer cells), SK-Hep-1 (liver cancer cells), SNU638 (stomach cancer cells), HCT116 (colon cancer cells), MRC-5 (lung fibroblast)

96-well plate에 seeding한 세포($3.5 - 3.7 \times 10^4 cells/mL$, 190μL)를 24시간 동안 배양한 후, 시험 화합물 용액을 처리(10 μL per well)하고 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 10% trichloroacetic acid (TCA)로 고정한 다음, 배양액을 제거하고 0.4% sulforhodamine B (SRB) in 1% acetic acid solution으로 stain하였다. 결합하지 않은 dye를 씻어내고 stained cell을 10mM Tris (pH 10.0)에 녹이고 515nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 증식 정도는 다음과 같은 방식으로 계산되었다.

Cell proliferation (%)

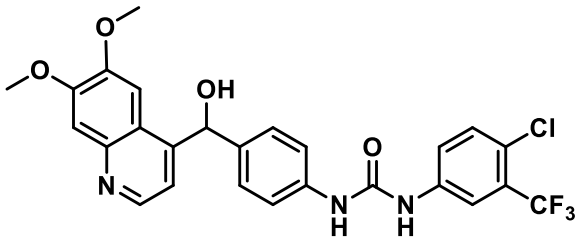
$$= \frac{average\ absorbance_{compound} - average\ absorbanve_{zero\ day}}{average\ absorbance_{control} - average\ absorbance_{zero\ day}} \times 100$$

IC_{50} 값은 TableCurve 2D v5.01 software (Systant Software Inc., Richmond, CA)를 이용해 비선형 회귀 분석으로 계산되었다.

3. 실험 데이터 (Experimental Data)

1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((6,7-dimethoxyquinolin-4-yl)(hydroxy)methyl)phenyl)urea

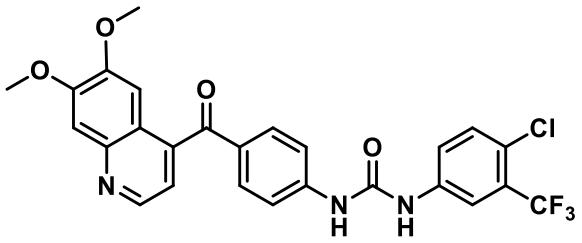
(compound 11)



35% yield, white Solid; ^{1}H-NMR (CD_3OD, 400MHz) δ 8.65 (d, 1H, J=5.2), 7.95 (d, 1H, J=2.8), 7.66 (d, 1H, J=4.4), 7.57 (dd, 1H, J_1=8.8, J_2=2.8), 7.46 (d, 1H, J=8.8), 7.43 (m, 2H, J=8.8), 7.33 (m, 3H, J=9.6), 7.25 (s, 1H), 6.33 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.79 (s, 3H); MS (ESI) calcd. for $C_{26}H_{22}ClF_3N_3O_4^+$ $[M+H]^+$: 532.1245. Found: 532.1268

1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-(6,7-dimethoxyquinoline-4-carbonyl)phenyl)urea

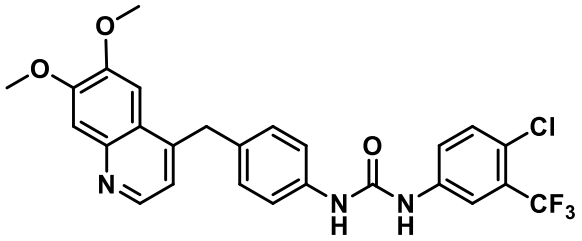
(compound 12)



11% yield, light Yellow Solid; ^{1}H-NMR (CD_3OD, 600MHz) δ 8.75 (d, 1H, J=4.6), 8.00 (d, 1H, J=2.3), 7.82 (d, 2H, J=8.7), 7.64 (d, 2H, J=8.7), 7.64 (d, 1H, J=8.7), 7.51 (d, 1H, J=8.7), 7.46 (s, 1H), 7.37 (d, 1H, J=4.6), 7.13 (s, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.80 (s, 3H); MS (ESI) calcd. for $C_{26}H_{20}ClF_3N_3O_4^+$ $[M+H]^+$: 530.1089. Found: 530.1107

1-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-3-(4-((6,7-dimethoxyquinolin-4-yl)methyl)phenyl)urea

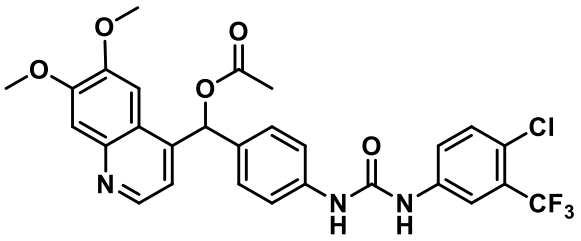
(compound 13)



21% yield, white solid; ^{1}H-NMR (DMSO, 400MHz) δ 9.08 (s, 1H), 8.75 (s, 1H), 8.55 (d, 1H, J=4.6), 8.05 (s, 1H), 7.56 (m, 2H), 7.35 (d, 2H, J=8.8), 7.34 (s, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.19 (d, 2H, J=8.4), 7.10 (d, 1H, J=4.6), 4.31 (s, 2H), 3.87 (s, 3H), 3.84 (s, 3H); MS (ESI) calcd. for $C_{26}H_{22}ClF_3N_3O_3^+$ $[M+H]^+$: 516.1296. Found: 516.1301

(4-(3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)phenyl)(6,7-dimethoxyquinolin-4-yl)methyl acetate

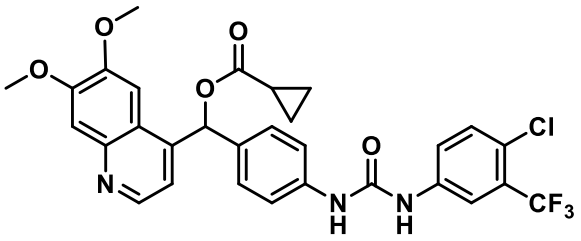
(compound 14)



47% yield, light Yellow Solid; ^{1}H-NMR (DMSO, 400MHz) δ 9.25 (s, 1H), 9.00 (s, 1H), 8.68 (d, 1H, J=4.4), 8.04 (d, 1H, J=1.6), 7.56 (s, 2H), 7.39 (m, 7H), 7.21 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 2.16 (s, 3H); MS (ESI) calcd. for $C_{28}H_{24}ClF_3N_3O_5^+$ $[M+H]^+$: 574.1351. Found: 574.2000

(4-(3-(4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)ureido)phenyl)(6,7-dimethoxyquinolin-4-yl)methyl cyclopropanecarboxylate

(compound 15)



66% yield, light Yellow Solid; ^{1}H-NMR (DMSO, 400MHz) δ 9.16 (s, 1H), 8.93 (s, 1H), 8.69 (d, 1H, J=4.8), 8.04 (d, 1H, J=2.0), 7.56 (s, 2H), 7.38 (m, 7H), 7.22 (s, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 1.81 (m, 1H), 0.93 (m, 2H), 0.87 (m,

2H); MS (ESI) calcd. for $C_{30}H_{26}ClF_3N_3O_5^+$ $[M+H]^+$: 600.1508. Found: 600.2000

V. 참고 문헌

(1) Whitesell, L.; Lindquist, S. L. (2005) *Nat. Rev. Cancer.*, 5, 761-772

(2) Neckers, L.; Workman P. (2012) *Clin. Cancer. Res.*, 18, 64-76

(3) Meli, M.; Pennati, M.; Curto, M.; Daidone, M. G.; Plescia, J.; Toba, S.; Altieri, D. C.; Zaffaroni, N.; Colombo, G. (2006) *J. Med. Chem.*, 49, 7721-7730

(4) Zhao, H.; Moroni, E.; Colombo, G.; Blagg, B. S. J. (2014) *Med. Chem. Lett.*, 5, 84-88

(5) Koay. Y. C.; McConnell, J.R.; Wang, Y.; Kim S. J.; Buckton, L. K.; Mansour, F.; McAlpine. S. R. (2014) *Med. Chem. Lett.*, 5, 771-776

(6) Conde, R.; Belak, Z. R.; Nair, M.; O'Carroll R. F.; Ovsenek, N. (2009) *Biochem. Cell Biol.*, 87, 845-851

(7) Sgobba, M.; Degliesposti, G.; Ferrari, A. M.; Rastelli, G. (2008) *Chem. Biol. Drug Des.*, 71, 420-433

(8) Lee, S.-C., Min, H.-Y., Choi, H., Kim H. S., Kim, K.-C., Park, S.-J., Seong, M. A., Seo, J. H., Park, H.-J., Suh, Y.-G., Kim, K.-W., Hong, H.-S., Kim, H., Lee, M.-Y., Lee, J., Lee, H.-Y. (2015) *Mol. Pharmacol.*, 88, 245-255

(9) Den, R. B.; Lu, B. (2012) *Ther. Adv. Med. Oncol.*, 4, 211-218

(10) Okamoto, K.; Ikemori-Kawada, M.; Jestel, A.; Konig, K. v.; Funajashi, Y.; Matsushima, T.; Tsuruoka, A.; Inoue, A.; Matsui, J. (2015) *Med. Chem. Lett.*, 6, 89-94

Abstract

Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Hsp90 inhibitors based on Lenvatinib and Sorafenib

Dasol Cho

College of Pharmacy, Pharmaceutical Chemistry Major

The Graduate School

Seoul National University

Heat Shock Proteins (HSPs) are molecular chaperone proteins that play a key role in maintaining cellular protein homeostasis by participating in protein folding. They are induced as adaptive responses to various cellular stresses. Hsp90, which has a molecular weight of about 90 kDa, is one of the most abundant molecular chaperons in eukaryotes. It stabilizes and activates various proteins involved in the pathways of cell growth, differentiation and survival.

Hsp90 is highly activated and expressed in cancer cells. It promotes differentiation by stabilizing unstable mutated proteins (including v-Src, Bcr-Abl, and p50) generated during transformation. Therefore, inhibition of Hsp90 by strong binding might have a selective anticancer effect while having a

relatively little toxicity on normal cells. In addition, an Hsp90 inhibitor might inhibit various oncoproteins and thus be effective against several kinds of cancer.

Hsp90 functions in the form of homodimer. Each dimer is made up of monomers that consist of three structural domains: N-terminal ATPase domain (NTD), middle domain (MD), and C-terminal dimerizing domain (CTD).

Hsp90 inhibitors that target the N-terminal domain of Hsp90 have been reported to induce heat shock response (HSR), a phenomenon that increases the expression of other HSPs to compensate for inhibition. On the other hand, compounds that inhibit the Hsp90 C-terminal do not increase the expression of other HSPs, so C-terminal inhibitors are worth exploring for anticancer activity. However, C-terminal inhibitors reported so far do not show satisfactory efficacy, and further research on new derivatives is needed.

In this study, new compounds were designed and synthesized with the aim of developing anticancer drugs that inhibit Hsp90 C-terminal domain. Ten new compounds were designed and synthesized through the pharmacophore mix and match approach by combining the pharmacophores of the Deguelin derivative derived from previous studies and protein kinase inhibitors (sorafenib and lenvatinib). The inhibitory effect of these compounds on cancer cell proliferation was evaluated. Some compounds showed in vitro anticancer activity.

Keywords: Heat shock protein 90 (Hsp90), C-terminal, inhibitor, sorafenib, lenvatinib, anticancer, heat shock response

Student number: 2011-20227