



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0033448
(43) 공개일자 2024년03월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/437 (2006.01) A61P 1/04 (2006.01)
C07D 471/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/437 (2013.01)
A61P 1/04 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-0112101

(22) 출원일자 2022년09월05일

심사청구일자 2022년09월05일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

남궁완

인천광역시 연수구 원인제로 124, 103동 1905호

조성우

서울특별시 서초구 현릉로8길 58, 서초더샵포레 102동 502호

박진홍

인천광역시 연수구 랜드마크로 113, 108동 2805호

(74) 대리인

특허법인다나

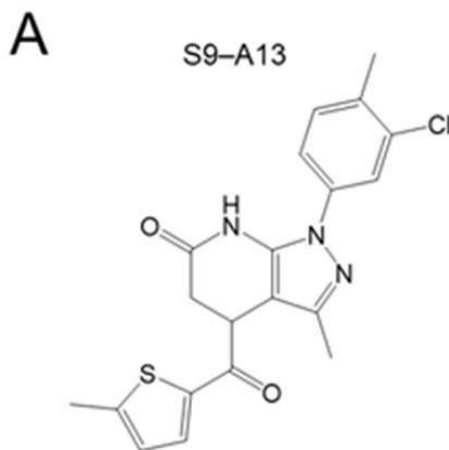
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 SCL26A9 억제제를 유효성분으로 포함하는 위산 분비 억제용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 SCL26A9 억제제를 유효성분으로 포함하는 위산 분비 억제용 약학 조성물에 관한 것으로 상기 억제제는 SLC26A9 활성화에 의해 유발되는 음이온(I^- , SCN^- , Cl^-)의 수송을 저해하여 결과적으로 위 상피세포의 위산 과다 분비를 개선할 수 있다.

대표도 - 도3a



(52) CPC특허분류

C07D 471/04 (2022.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345331278
과제번호	2018R1A6A1A03023718
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	연세대학교 종합약학연구소
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2024.02.29

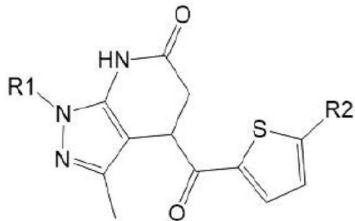
명세서

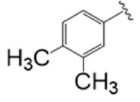
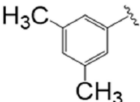
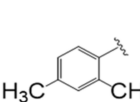
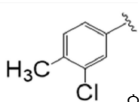
청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 SLC26A9 (solute carrier family 26 member 9) 억제제:

[화학식 1]

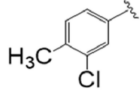


상기 화학식 1에서 R1은 , ,  및  으로 이루어진 군에서 독립적으로 선택되고, R2는 C1 내지 C3의 알킬기 또는 -Cl이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화학식 1에서 R2는 C1 내지 C2의 알킬기 또는 -Cl인 것인, SLC26A9 억제제.

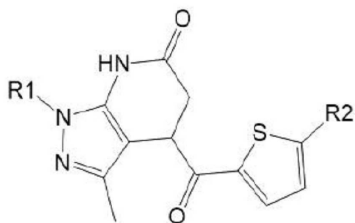
청구항 3

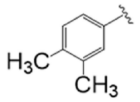
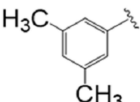
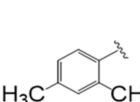
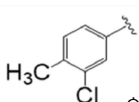
제1항에 있어서, 상기 화학식 1에서 R1은  이고, R2는 -CH₃인 것인, SLC26A9 억제제.

청구항 4

하기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 위산 분비 억제용 약학적 조성물:

[화학식 1]

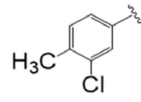


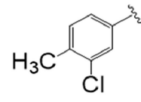
상기 화학식 1에서 R1은 , ,  및  으로 이루어진 군에서 독립적으로 선택되고, R2는 C1 내지 C3의 알킬기 또는 -Cl이다.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 화학식 1에서 R2는 C1 내지 C2의 알킬기 또는 -Cl인 것인, 위산 분비 억제용 약학적 조성물.

청구항 6

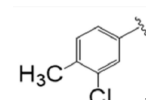
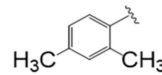
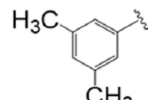
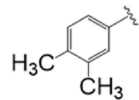
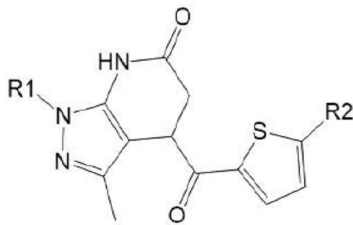


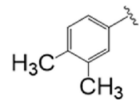
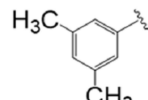
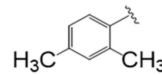
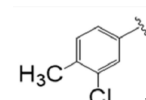
제4항에 있어서, 상기 화학식 1에서 R1은  이고, R2는 -CH₃인 것인, 위산 분비 억제용 약학적 조성물.

청구항 7

하기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 위산 과다 분비 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]

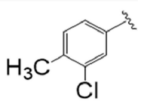


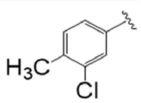
상기 화학식 1에서 R1은 , ,  및  으로 이루어진 군에서 독립적으로 선택되고, R2는 C1 내지 C3의 알킬기 또는 -Cl이다.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 위산 과다 분비 관련 질환은 역류성 식도염, 만성 위염, 위궤양 및 십이지장궤양으로 이루어진 군에서 선택되는 것인, 위산 과다 분비 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9



제7항에 있어서, 상기 화학식 1에서 R1은  이고, R2는 -CH₃인 것인, 위산 과다 분비 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 SCL26A9 억제제를 유효성분으로 포함하는 위산 분비 억제용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 위산 (gastric acid)은 소화, 미네랄 흡수 그리고 섭취한 음식물에 존재하는 해로운 미생물 멸균 등 긍정적 역할을 한다. 하지만 위산은 pH 1~2의 매우 강한 산성이기 때문에 과다하게 위산이 분비되거나 식도로 역류하면

위궤양 (gastric ulcer)이나 위식도 역류질환 (gastroesophageal reflux disease, GERD)이 유발된다.

[0004] 현재 위산 과다에 대한 주된 치료 방법으로는 양성자 펌프 억제제 (proton pump inhibitor, PPI)와 히스타민 H2 수용체 길항제 (histamine H2 receptor antagonist, H2RA)가 사용되고 있다. 하지만 PPI는 전구약물 (prodrug)로 활성화 과정을 거친 후 약효를 발휘하기 때문에 상대적으로 효과 발현시간이 느리고 (비특허문헌 1), 반감기 또한 1.5시간으로 짧은 한계가 있다 (비특허문헌 2 및 3). 또한, H2RA는 쉽게 내성이 생겨 약효가 결국 감소한다는 한계가 존재한다 (비특허문헌 4). 따라서 이러한 한계점을 보완하기 위해 단독 또는 병용 요법이 가능한 새로운 기전의 위산분비 억제제가 필요하다.

[0005] SLC26A9 (solute carrier family 26 member 9)는 음이온 수송체로 사람과 마우스의 위 상피세포에서 풍부하게 발현된다 (비특허문헌 5). SLC26A9 유전자의 발현을 억제하면 동형접합 (homozygous) 돌연변이 (SLC26A9 (-/-)) 마우스는 야생형 마우스와 비교하여 건강하고 정상적인 성장을 나타내지만, 5주령의 돌연변이 마우스에서는 위산 분비가 감소하고 위산 분비에 주로 관여하는 벽세포 (parietal cell)가 감소한다 (비특허문헌 6).

[0006] 따라서 SLC26A9를 선택적으로 억제하면 새로운 작용 기전을 통해 부작용 없이 위산 과다 분비를 예방, 개선할 수 있다. 그러나 아직까지 SLC26A9만을 선택적으로 억제하여 위산 과다 분비 억제에 사용될 수 있는 물질은 개발되지 않은 상황이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) 1. Fock KM 등, Proton pump inhibitors: do differences in pharmacokinetics translate into differences in clinical outcomes? Clin Pharmacokinet. 2008;47(1):1-6.
- (비특허문헌 0002) 2. Hatlebakk JG 등, Pharmacokinetic optimisation in the treatment of gastro-oesophageal reflux disease. Clin Pharmacokinet. 1996 Nov;31(5):386-406,
- (비특허문헌 0003) 3. Sachs G. Improving on PPI-based therapy of GORD. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2001 May;13 Suppl 1:S35-41.
- (비특허문헌 0004) 4. Fackler WK 등, Long-term effect of H2RA therapy on nocturnal gastric acid breakthrough. Gastroenterology. 2002 Mar;122(3):625-32.
- (비특허문헌 0005) 5. Uhlin M 등, Tissue-based map of the human proteome. Science 2015 347(6220):1260419.
- (비특허문헌 0006) 6. Xu J 등, Deletion of the chloride transporter Slc26a9 causes loss of tubulovesicles in parietal cells and impairs acid secretion in the stomach. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Nov 18;105(46):17955-60.

발명의 내용

해결하려는 과제

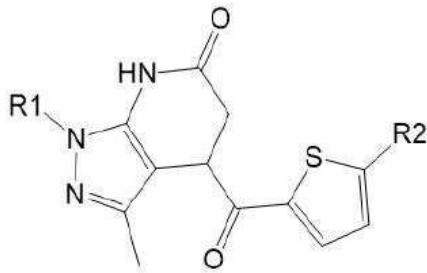
[0009] 상기와 같은 상황에서 본 발명자들은 기존 치료제와 다른 작용 기전을 가져 단독 또는 병용 투여할 수 있는 위산 분비 억제제 개발을 위해 고속 대량 스크리닝 (high throughput screening, HTS)을 수행하였고, 이후 최적화 과정을 통해 현존하는 SLC26A9 억제제 중에서 가장 높은 억제 활성과 선택성을 가지는 물질을 발굴하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 발굴한 SLC26A9 억제제, 상기 억제제 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 위산 분비 억제용 약학 조성물 및 위산 과다 분비 관련 질환 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

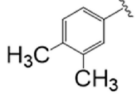
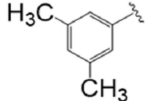
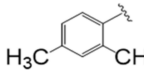
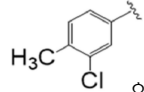
과제의 해결 수단

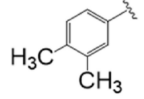
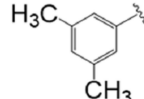
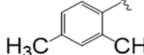
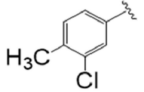
[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 양상은 하기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 SLC26A9 (solute carrier family 26 member 9) 억제제를 제공한다:

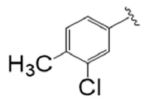
[0013] [화학식 1]



[0014]

[0015] 상기 화학식 1에서 R1은 , ,  및  으로 이루어진 군에서 독립적으로 선택되고, R2는 C1 내지 C3의 알킬기 또는 -Cl이다.

[0016] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 화학식 1에서 R1은 , ,  및  으로 이루어진 군에서 독립적으로 선택되고, R2는 C1 내지 C2의 알킬기 또는 -Cl인 것이 바람직하다.

[0017] 보다 바람직하게는, 상기 화학식 1에서 R1은  이고, R2는 -CH₃일 수 있다.

[0018] 본 발명자들은 5주령의 동형접합 (homozygous) 돌연변이 (SLC26A9 (-/-)) 마우스에서 위산 분비가 감소하고 위산 분비에 주로 관여하는 벽세포 (parietal cell)가 감소하는 점 (비특허문헌 6)에 근거하여 위산 분비를 조절할 수 있는 물질을 찾기 위해 음이온 수송체인 SLC26A9의 억제제 후보물질을 스크리닝 방법으로 발굴하였다 (실시예 2).

[0019] 발굴한 후보물질 중에서 SLC26A9 활성 억제 효과가 우수한 물질이 S9-A01임을 확인하였고, 이의 구조를 기반으로 구조-활성 관계 분석을 진행하였다. 그 결과, SLC26A9 활성 억제 효과가 가장 우수한 물질이 S9-A13임을 확인하였다 (표 1).

[0020] 본 명세서에서 사용된 용어, "약학적으로 허용 가능한 염"은 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 테카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜

레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설폰네이트, 프로판설폰네이트, 나프탈렌-1-설폰네이트, 나프탈렌-2-설폰네이트 또는 만델레이트를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [0021] 상기 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.
- [0022] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수도 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면, 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.
- [0023] 상기 기술하였듯이 SLC26A9의 억제제는 위산 분비를 억제할 수 있다. 따라서, 본 발명의 또 다른 양상은 상기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 위산 분비 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명에서, "유효성분" 또는 "약제학적 유효량"은 질환, 장애 또는 병태, 또는 그의 하나 이상의 증상의 경감, 진행 억제 또는 예방에 충분한 본원에서 제공되는 발명을 실시하는 과정에서 이용되는 조성물의 임의의 양을 의미할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 약학적 조성물은 약제의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아가시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0027] 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 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여법이라면 어느 것이나 사용 가능하고, 전신 투여 또는 국소 투여가 가능하나, 전신 투여가 더 바람직하며, 정맥 내 투여가 가장 바람직하다.
- [0029] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있으며, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 다른 양상은 상기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 위산 과다 분비 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0032] 본 발명에서, 상기 위산 과다 분비 관련 질환은 역류성 식도염, 만성 위염, 위궤양 및 십이지장궤양으로 이루어

진 군에서 선택된다.

[0033] 상기 위산 과다 분비 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 위산 분비 억제용 조성물과 동일한 유효성분을 사용하므로 이 둘 사이에 중복되는 내용은 기재 생략한다.

발명의 효과

[0035] 본 발명의 일 예에 따른 화합물은 위 상피세포에서 풍부하게 발현되는 음이온 수송체인 SLC26A9의 활성을 특이적으로 억제하여 SLC26A9 활성에 의해 유발되는 음이온(I^- , SCN^- , Cl^-)의 수송을 저해하며, 결과적으로 위 상피세포의 위산 과다 분비를 개선할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1A는 SLC26A9 (solute carrier family 26, member 9)를 과발현하는 세포주(SLC26A9-과발현 세포)를 제작한 후 SLC26A9 발현 여부를 확인한 결과이다.

도 1B는 SLC26A9-과발현 세포에 SLC26A9 억제제 후보물질과 음이온을 처리한 후 세포 내로 유입되는 음이온 수준을 측정한 결과이다.

도 1C는 SLC26A9 억제제 후보물질인 S9-A01, S9-B01 및 S9-C01의 구조를 보여준다.

도 2A는 SLC26A9-과발현 세포에 음이온과 S9-A01을 다양한 농도로 처리한 후 세포 내로 유입되는 음이온 수준을 측정한 결과이다.

도 2B는 SLC26A9-과발현 세포에 음이온과 S9-B01을 다양한 농도로 처리한 후 세포 내로 유입되는 음이온 수준을 측정한 결과이다.

도 2C는 SLC26A9-과발현 세포에 음이온과 S9-C01을 다양한 농도로 처리한 후 세포 내로 유입되는 음이온 수준을 측정한 결과이다.

도 2D는 S9-A01, S9-B01 및 S9-C01의 처리 농도에 따른 SLC26A9 저해 수준을 보여주는 결과이다.

도 3A는 SLC26A9 억제제 후보물질인 S9-A13 유도체의 구조를 보여준다.

도 3B는 SLC26A9-과발현 세포에 S9-A13 유도체를 다양한 농도로 처리한 후 Cl^- 와 I^- 의 교환 활성을 측정한 결과이다.

도 3C는 SLC26A9-과발현 세포에 S9-A13 유도체를 다양한 농도로 처리한 후 Cl^- 와 SCN^- 의 교환 활성을 측정한 결과이다.

도 3D는 S9-A13 유도체의 처리 농도에 따른 음이온의 교환 활성을 보여주는 결과이다.

도 3E는 SLC26A9-과발현 세포에 다양한 농도로 S9-A13 유도체를 처리한 후 세포 생존율을 확인한 결과이다.

도 4A 내지 4F는 음이온 수송체인 SLC26A3, SLC26A4 및 SLC26A6, 염소 이온 채널인 CFTR, ANO1 및 VRAC을 발현하는 각각의 세포에 S9-A13 유도체를 처리한 후 세포 내로 유입되는 음이온 수준을 측정한 결과이다.

도 4G는 음이온 수송체인 SLC26A3, SLC26A4 및 SLC26A6, 염소 이온 채널인 CFTR, ANO1 및 VRAC을 발현하는 각각의 세포에 S9-A13 유도체 또는 기준에 알려진 억제제를 처리한 후 음이온 수송체 또는 염소 이온 채널의 활성을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 실시예 1: SLC26A9 과발현 세포주 제조

[0041] 렌티바이러스 시스템 (lentiviral system)으로 LN-215 세포에서 인간 SLC26A9 (solute carrier family 26 member 9) 및 할로젠화물-민감성 형광 단백질 (halide-sensitive fluorescent protein)인 YFP-F46L/H148Q/I152L을 과발현시켰다. 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 푸로마이신 (puromycin)을 처리하여 SLC26A9를 과발현하는 세포를 선별하였다. 이하에서, SLC26A9를 과발현하는 세포는 SLC26A9-과발현 세포로 기재한다. LN-215 세포와 SLC26A9-과발현 세포를 DMEM (Dulbeccos Modified Eagles Media)으로 6-웰 플레이트 (6-well plate)에서 48시간 동안 배양하였다. 이후 배양액을 제거하고, RIPA (radio-immunoprecipitation) 버퍼로 세포에서 단백질을 분리하였다. 분리한 단백질로 웨스턴 블롯을 실시한 결과, SLC26A9-과발현 세포에서 SLC26A9 단백질이 발현하는 것을 확인하였다 (도 1A).

[0042] 같은 방법으로 SLC26A3 또는 SLC26A6과 halide sensor YFP-F46L/H148Q/I152L을 발현하는 세포를 제작하였다.

[0044] 실시예 2: SLC26A9의 억제제 발굴

[0045] SLC26A9-과발현 세포를 DMEM으로 96-웰 마이크로 플레이트에서 48시간 동안 배양한 후 배지를 제거하였다. 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 10 mM D-glucose 및 10 mM HEPES (pH 7.4 with NaOH)로 이루어진 용액 50 μl 과 SLC26A9 억제제 후보물질 (25 μM)을 각 웰에 첨가하고, 37°C 오븐에서 10분 동안 안정화시켰다. 10분 후에 각 웰에 요오드 이온(I^-)이 첨가된 용액 50 μl 를 첨가하고, 플레이트 리더기로 세포 내 음이온 이동 정도를 측정하였다. YFP-F46L/H148Q/I152L 단백질은 세포 내로 유입된 요오드 이온과 반응하면 형광이 증가하므로 세포의 형광 수준을 측정하여 각 후보물질이 SLC26A9를 차단하는지 알 수 있다 (도 1B).

[0046] 상기 실험을 통해 SLC26A9를 통한 음이온 이동을 차단하는 화합물 S9-A01, S9-B01 및 S9-C01을 확보하였다 (도 1C).

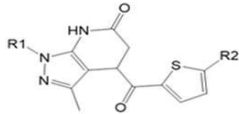
[0048] 실시예 3: SLC26A9 억제제 추가 분석 및 독성평가









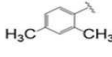
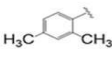








[0049] 3-1. SLC26A9 억제제 추가 분석

[0050] S9-A01, S9-B01 및 S9-A13은 캠티브 (ChemDiv)에서 구매하였다. SLC26A9-과발현 세포를 DMEM으로 96-웰 마이크로 플레이트에서 48시간 동안 배양한 후 배지를 제거하였다. 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 10 mM D-glucose 및 10 mM HEPES (pH 7.4 with NaOH)로 이루어진 용액 50 μl 를 각 웰에 첨가하고, S9-A01을 0, 0.3, 1, 3, 10, 및 30 μM 농도로 각 웰에 첨가하였다. S9-B01과 S9-C01은 0, 3, 10, 30 및 100 μM 농도로 처리하였다. 10분 후, 각 웰에 요오드이온이 첨가된 용액 50 μl 를 처리하여 세포 내 음이온 이동을 측정하였다 (도 2A 내지 2C).

[0051] 그 결과, 도 2D에 나타난 바와 같이 S9-A01, S9-B01 및 S9-C01의 IC_{50} 이 각각 $2.25 \pm 0.52 \mu\text{M}$, $16.63 \pm 3.43 \mu\text{M}$ 및 $38.00 \pm 1.88 \mu\text{M}$ 인 것을 확인하였다. 세 화합물 중에서 SLC26A9의 음이온 이동을 가장 우수하게 억제하는 S9-A01의 구조를 기반으로 구조-활성 관계 (Structure-activity relationship, SAR) 분석을 진행하였다 (표 1).

표 1



Cmpd	R1	R2	IC ₅₀ (μM)
S9-A01		CH ₂ CH ₃	2.25 ± 0.52
S9-A02		H	>30
S9-A03		CH ₃	0.28 ± 0.04
S9-A04		Cl	0.11 ± 0.02
S9-A05		CH ₃	>30
S9-A06		Cl	>30
S9-A07		CH ₃	0.58 ± 0.04
S9-A08		Cl	0.10 ± 0.02
S9-A09		CH ₃	>30
S9-A10		Cl	3.68 ± 0.92
S9-A11		CH ₂ CH ₃	>30
S9-A12		CH ₂ CH ₃	1.08 ± 0.89
S9-A13		CH ₃	0.09 ± 0.01
S9-A14		CH ₂ CH ₃	>30
S9-A15		CH ₂ CH ₃	>30
S9-A16		H	>30
S9-A17		CH ₂ CH ₃	>30
S9-A18		CH ₃	0.26 ± 0.01

[0052]

[0054] 그 결과 S9-A01에 비해 SLC26A9를 약 24.8배 이상 억제하는 S9-A13 유도체를 발굴하였다. S9-A13을 0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 및 10 μM 농도로 처리한 후 Cl⁻와 I⁻ 교환 활성을 측정하였을 때 IC₅₀이 90.9 ± 13.4 nM 인 것을 확인하였다 (도 3B 및 3D).

[0055] 또한, S9-A13을 0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 및 10 μM 농도로 처리한 후 Cl⁻와 SCN⁻ (thiocyanate) 교환 활성을 측정하였을 때 IC₅₀은 171.5 ± 34.7 nM로 나타났다 (도 3C, D).

[0057] 3-2. SLC26A9 억제제의 독성 평가

[0058] SLC26A9를 내인성 (endogenous)으로 발현하는 Calu-3 세포에 S9-A13을 0, 1, 3 및 10 μM 농도로 처리하고, 양성대조군 (positive control)에는 시스플라틴 (cisplatin) 30 μM 을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후 MTT assay로 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, S9-A13은 Calu-3 세포에 대해 독성이 없는 것을 확인하였다 (도 3E).

[0060] 실시예 4: SLC26A9에 대한 S9-A13의 선택성 확인

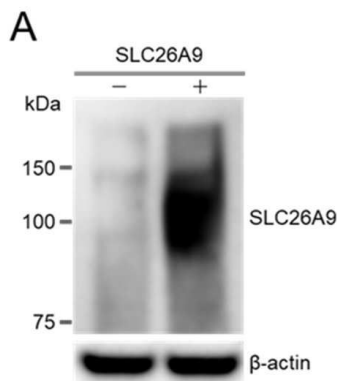
[0061] 다른 음이온 수송체인 SLC26A3, SLC26A4 및 SLC26A6과 염소 이온 채널 단백질인 CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), ANO1 (anoctamin 1) 및 VRAC (volume-regulated anion channels)을 발현하는 세포를 96-웰 마이크로 플레이트에서 48시간 동안 배양하였다. 배지를 제거한 다음, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 10 mM D-glucose 및 10 mM HEPES (pH 7.4 with NaOH)로 이루어진 용액 50 μl 를 각 웰에 첨가하고, 고농도의 S9-A13 (10 μM)을 10분 동안 처리하였다. 이후 각 웰에 요오드이온이 첨가된 용액 50 μl 를 처리하여 세포 내 음이온 이동을 측정하였다.

[0062] 그 결과 도 4에 나타난 바와 같이 S9-A13은 다른 음이온 수송체 및 염소 이온 채널 단백질에 대해서는 억제 효과가 없는 것을 확인하였다. 이 결과는 S9-A13이 SLC26A9만 특이적으로 억제할 수 있음을 의미한다.

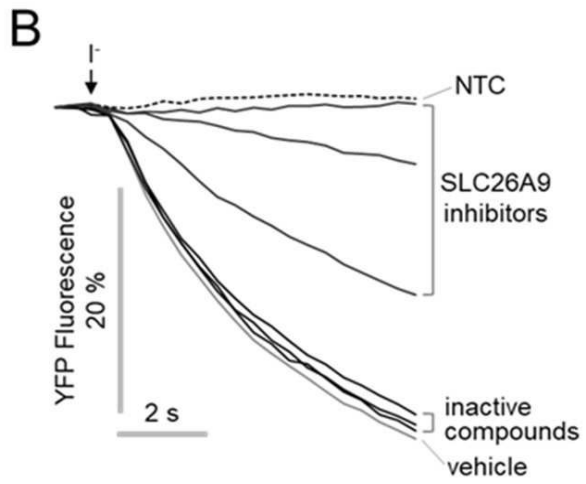
[0063] 또한, 상기와 동일한 방법으로 S9-A13 이외에 다른 화합물들의 SLC26A3, SLC26A4에 대한 선택성을 확인한 결과 고농도 (30 μM)로 처리하여도 SLC26A3, SLC26A4에 대한 억제 효과를 나타내지 않는 것을 알 수 있었다.

도면

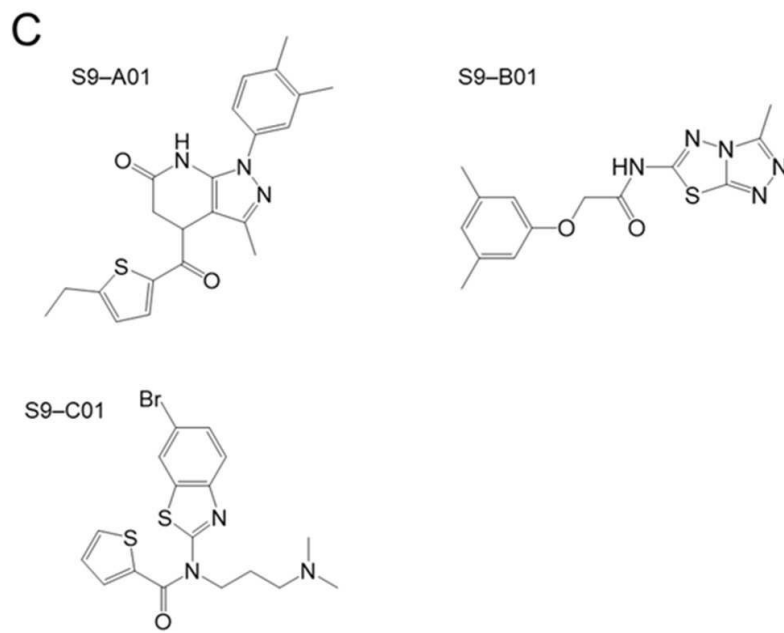
도면1a



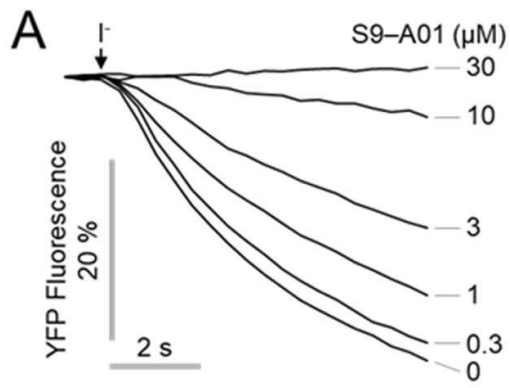
도면1b



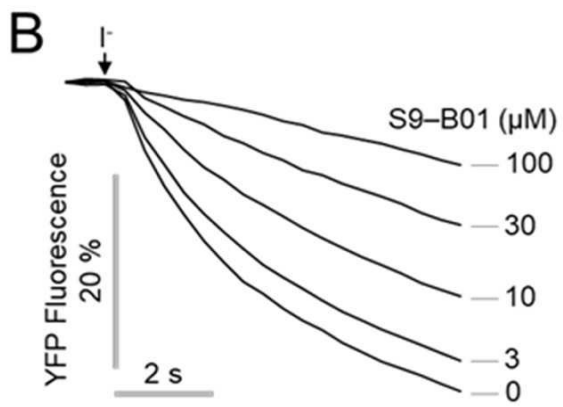
도면1c



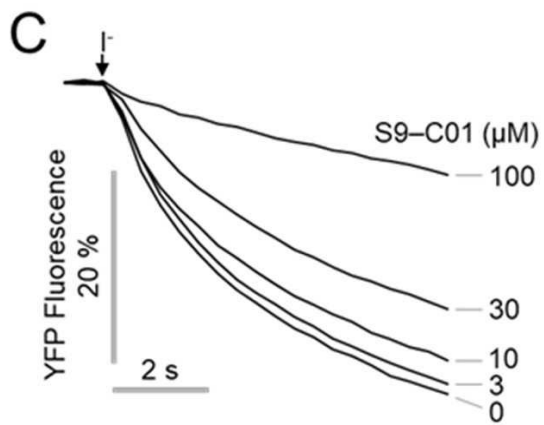
도면2a



도면2b

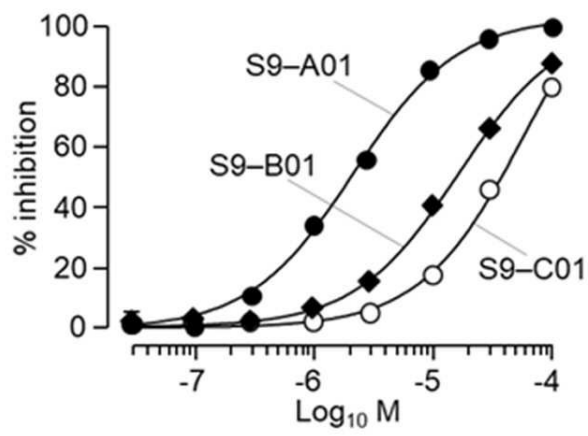


도면2c



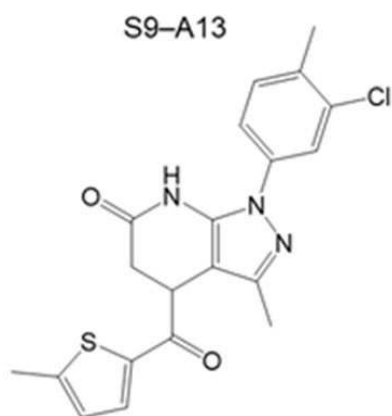
도면2d

D

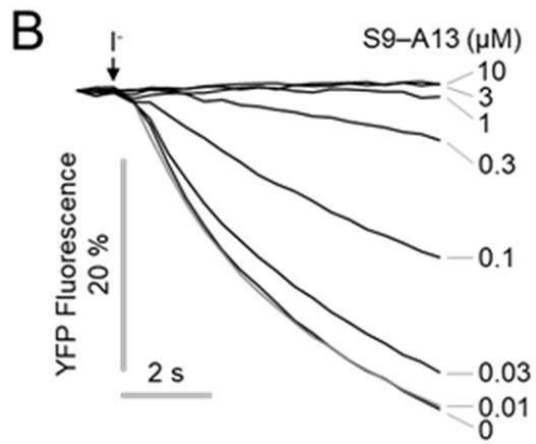


도면3a

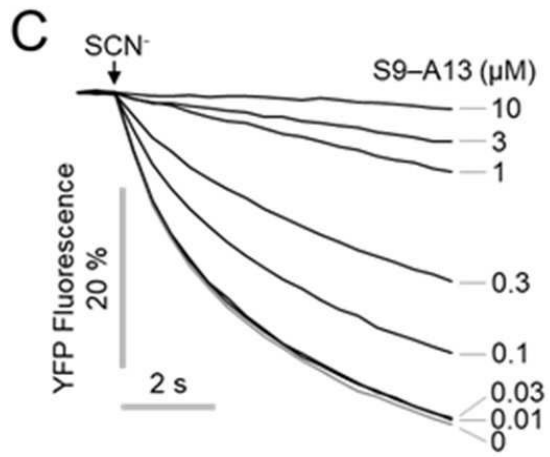
A



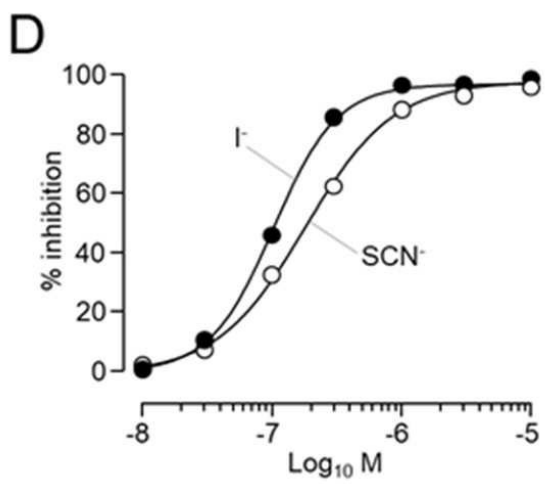
도면3b



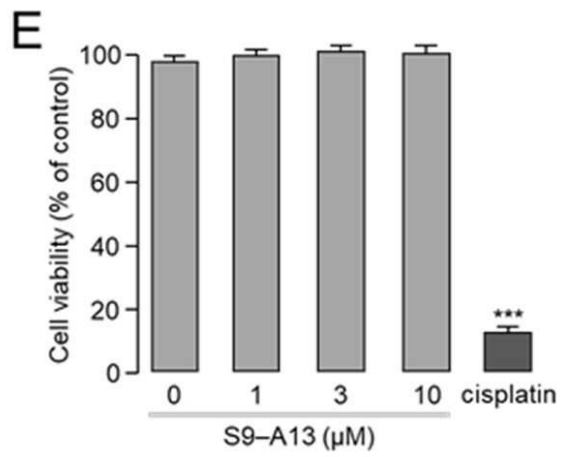
도면3c



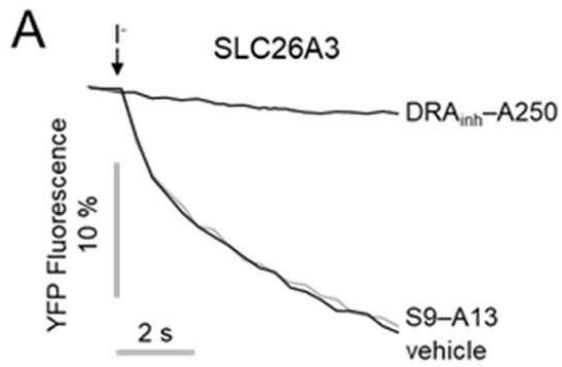
도면3d



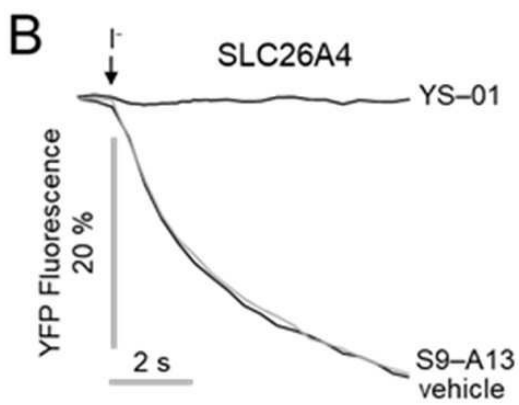
도면3e



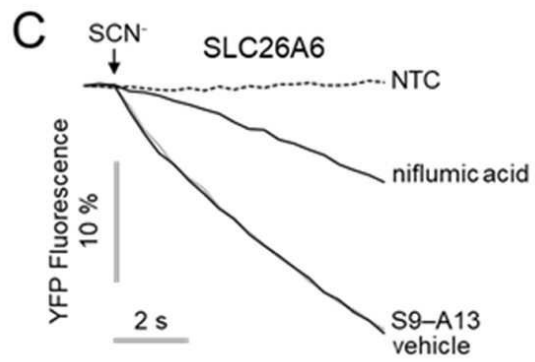
도면4a



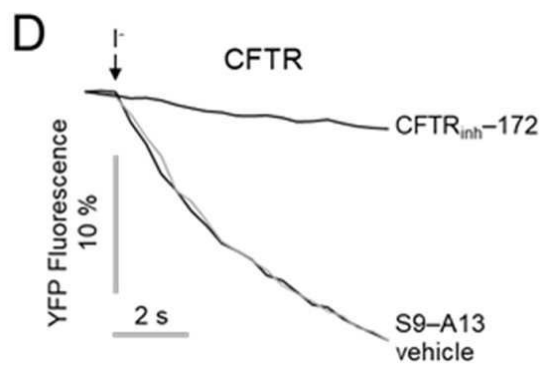
도면4b



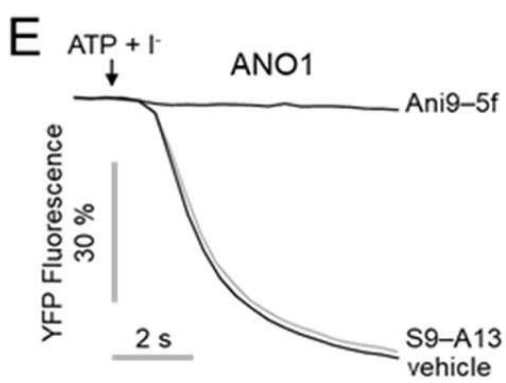
도면4c



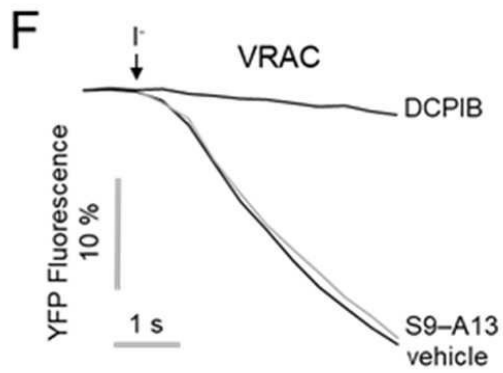
도면4d



도면4e



도면4f



도면4g

