



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월30일
(11) 등록번호 10-2608183
(24) 등록일자 2023년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 471/04 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61K 31/437 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 471/04 (2022.08)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0032023
(22) 출원일자 2021년03월11일
심사청구일자 2021년03월11일
(65) 공개번호 10-2022-0127570
(43) 공개일자 2022년09월20일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020150028130 A*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
이재면
서울특별시 서초구 반포대로 275, 116동 2701호(반포동, 래미안퍼스티지아파트)
김익연
서울특별시 마포구 마포대로24길 16, 109동 202(아현동, 공덕자이 아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
파도특허법인유한회사, 특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 7 항

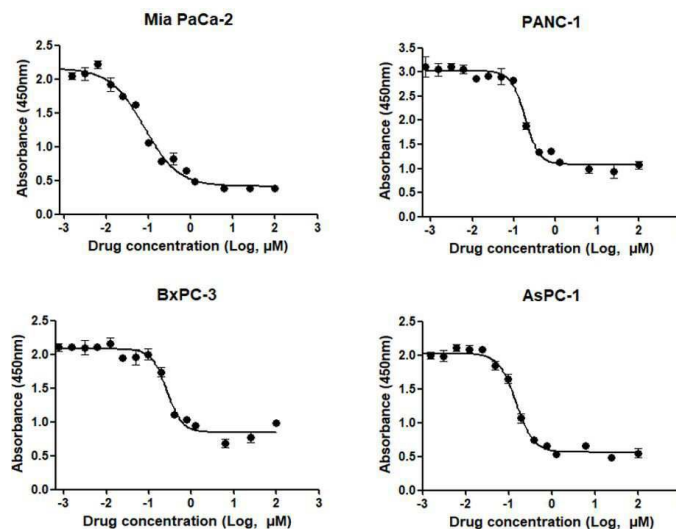
심사관 : 강신진

(54) 발명의 명칭 신규한 인돌라진 유도체 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 신규한 인돌라진 유도체 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 인돌라진 유도체는 종양의 발생과 전이 과정에 핵심적인 매개체로 알려진 LoxL2 효소의 활성을 현저히 억제할 뿐 아니라 종양세포의 증식 과정에서 미세관(microtubule)의 중합화를 저해하여 세포주기를 유사분열(mitosis)에서 정지시킴으로써 체장암을 비롯한 다양한 종양에 대한 효율적인 항암제 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 31/437 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

(72) 발명자

동승명

경기도 고양시 일산서구 강선로 92, 507동 504호(주엽동, 강선마을5단지아파트)

한균희

경기도 화성시 영통로27번길 53, 209동 1702호(반월동, 신영통 현대타운)

김청비

경기도 안산시 상록구 감골2로 58(사동, 선경아파트)

심두희

서울특별시 서대문구 연세로 50-1, 연세대학교 의과대학 신관 249호(신촌동)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170125897 A

Bioorg. Med. Chem. Lett., Vol. 26, No. 1, pp. 110-113

J. Org. Chem., Vol. 78, No. 20, pp. 10395-10404

Oncotarget, Vol. 7, No. 27, pp. 42539-42552

Mol. Cell Biol., Vol. 31, No. 16, pp. 3286-3297

Cell Res., Vol. 30, No. 10, pp. 885-901

Cell Res., Vol. 30, No. 10, pp. 885-901

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

화학식 1



상기 화학식에서 R_1 은 NA_1A_2 (A_1 및 A_2 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_1-C_3 알킬이다)이고 R_2 는 수소 또는 C_1-C_3 알킬이다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 A_1 및 A_2 는 수소인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 R_2 는 C_1 알킬인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 췌장암은 전이 또는 재발된 암인 것으로 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 JNK(c-Jun N-terminal kinase)를 활성화시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물:

화학식 1

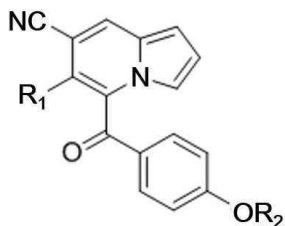


상기 화학식에서 R₁은 NA₁A₂(A₁ 및 A₂는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다)이고 R₂는 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

청구항 10

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 LoxL2(Lysyl oxidase like 2)의 활성 억제용 기능성 식품 조성물:

화학식 1



상기 화학식에서 R₁은 NA₁A₂(A₁ 및 A₂는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다)이고 R₂는 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 LoxL2 억제제인 인돌리진 유도체 화합물 및 이를 포함하는 암, 구체적으로는 췌장암의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암은 생체로부터 영양을 공급받으면서도, 생체와는 독립적으로 과잉 증식하며, 생체를 파괴하는 생체조직에서 발생한 비정상적인 조직 덩어리이다. 신체의 모든 장기는 수많은 세포로 구성되어 있는데 정상적인 세포가 과증식성의 이상 세포로 변질되면서 무질서하게 분열 증식하여 암 조직이 발생하게 된다. 암의 발병에는 유전적 소인 뿐 아니라, 환경적 요인을 비롯한 후천적 원인 또한 큰 영향을 미치며 선진국일수록 암의 발병이 증가하는 경향을 보인다.

[0004] 췌장암은 발병률과 사망률의 거의 비슷해 5년 생존율이 8% 내외에 불과한 매우 불량한 예후를 보이는 암으로 위험성 또한 높은 것으로 나타났다. 췌장암의 병인은 유전적인 요인과 환경적 요인으로 부분적으로 설명하고 있으나 아직 그 발병 기전이 명확하지 않고, 암이 상당부분 진행되기 전까지 특별한 자각 증상이 없으며, 질병에 취약한 환자들을 선별해 낼 수 있는 구체적인 표지자가 개발되지 못하여 조기 진단이 매우 어렵다. 더욱이 췌장암 세포는 전이가 잘 되는 특성으로 인해 수술 후 높은 재발율을 보여 완치를 더욱 어렵게 하고 있다. 췌장암의 효과적인 치료를 위해 다양한 치료제 개발이 진행되어 왔지만 현재 FDA의 승인을 받은 약물은 DNA의 합성을 억제하여 암세포의 성장을 억제하는 겐시타빈(Gemcitabine)과 5-FU(5-fluorouracil)를 비롯한 보조 치료제 몇 종에 지나지 않으며 그 효과 또한 환자의 생존률을 유의미하게 개선시킬 정도의 수준이 아니다. 겐시타빈은

현재 췌장암 치료의 표준 1차 치료로서 1996년에 미국 FDA 승인이 되었으나, 국부 진행성 췌장암을 가진 126명의 환자를 대상으로 한 임상 연구에서 젬시타빈은 5-FU보다 중앙 전체생존기간, 질환 진행까지의 중앙 기간 및 임상 이익 반응면에서 우월한 것으로 나타났으나, 승인된 이후 췌장암의 표준 완화적 요법이 되었지만, 췌장암 치료에서의 개선은 거의 없었다. 때문에 췌장암은 여전히 예후가 매우 불량한 대표적인 암으로 남아있어 보다 효율적인 신규 치료제의 개발이 시급하다.

[0005] 한편, LoxL2(Lysyl oxidase like protein 2)는 산화효소 활성을 갖는 단백질로서 최근 각종 암의 발생 및 전이 과정에서 중요한 역할을 한다는 것이 보고되고 있다. LoxL2는 암 전이 과정 중 EMT(epithelial to mesenchymal transition)의 진행에 관여하는 효소로서 다양한 연구에서 LoxL2의 억제가 EMT 저하 및 암 전이 차단으로 이어진다고 보고하고 있다. 따라서, LoxL2에 대한 효율적인 억제제는 암 발생 및 전이의 진행을 유의하게 저해시킬 수 있다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 미국 특허공개공보 제2019-0119269호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 종양의 발생과 전이 과정에 중요한 역할을 하는 산화 효소인 LoxL2(Lysyl oxidase like protein 2)의 활성을 특이적으로 억제함으로써 암세포의 증식, 이동 및 침윤을 저해하고 암세포의 사멸을 효율적으로 유도하는 우수한 항암 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 하기 화학식 1로 표시되는 인돌리진(indolizine) 유도체가 악성 종양에서의 LoxL2 발현량 및 활성을 현저히 억제하면서 암세포의 증식과 세포분열을 억제하고, 암세포 사멸과 관련된 유전자의 발현을 크게 증가시킴으로써 다각적인 항암 활성을 발휘한다는 사실을 발견하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 신규한 인돌리진 유도체 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

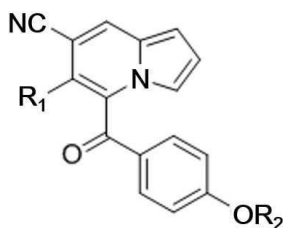
[0012] 본 발명의 다른 목적은 LoxL2의 활성 또는 발현 억제용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 제공한다:

[0017] 화학식 1



[0018]

[0019] 상기 화학식에서 R₁은 NA₁A₂(A₁ 및 A₂는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다)이고 R₂는 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

- [0020] 본 발명자들은 종양의 발생과 전이 과정에 중요한 역할을 하는 산화 효소인 LoxL2(Lysyl oxidase like protein 2)의 활성을 특이적으로 억제함으로써 암세포의 증식, 이동 및 침윤을 저해하고 암세포의 사멸을 효율적으로 유도하는 우수한 항암 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 상기 화학식 1로 표시되는 인돌리진(indolizine) 유도체가 악성 종양에서의 LoxL2 발현량 및 활성을 현저히 억제하면서 암세포의 증식과 세포분열을 억제하고, 암세포 사멸과 관련된 유전자의 발현을 크게 증가시킴으로써 다각적인 항암 활성을 발휘한다는 사실을 발견하였다.
- [0021] 본 명세서에서 용어 “알킬”은 직쇄 또는 분쇄의 포화 탄화수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필 등을 포함한다. C_1 - C_3 알킬은 탄소수 1 내지 3의 알킬 유니트를 가지는 알킬기를 의미하며, C_1 - C_3 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.
- [0022] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 A_1 및 A_2 는 수소이다.
- [0023] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 R_2 는 C_1 알킬이다.
- [0024] A_1 및 A_2 가 수소이고 R_2 가 C_1 알킬(메틸)인 화학식 1 화합물은 “6-아미노-5-(4-메톡시벤조일)인돌리진-7-카보니트릴”로서, 본 발명자들은 방대한 후보 화합물 라이브러리를 이용하여 LoxL2에 대한 억제제를 탐색한 결과, 현저히 우수한 LoxL2 억제 활성을 보이는 상기 화합물(실시예에서는 “#765”로 명명함)을 발굴하였다.
- [0026] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 전술한 본 발명의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 명세서에서 용어 “예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [0028] 본 명세서에서 용어 “치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하면 종양의 발생, 증식 및 전이에 핵심적인 매개체인 LoxL2의 활성을 억제함으로써, 악성 종양의 발생 및 진행을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 종양의 치료 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 종양에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [0029] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0030] 본 발명에서 용어 “치료적 유효량”은 본 발명의 약제학적 조성물을 투여하고자 하는 개체에게 조성물 내의 약리성분이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 “예방적 유효량”을 포함하는 의미이다.
- [0031] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [0032] 본 명세서에서 용어 “약제학적으로 허용되는 염”은 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 트리플루로초산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 암은 췌장암, 유방암, 대장암 및 위암으로 구성된 군으로부터 선택된다. 보다 구체적으로는, 상기 암은 췌장암이다.
- [0034] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 JNK(c-Jun N-terminal kinase)를 활성화시키고, 미세관의 중합을 저해함으로써 암세포의 증식을 억제한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 LoxL2의 억제 및 미세관 탈중합화(microtubule depolymerization)라는 이중의 항암 메커니즘을 통해 다각적으로 암세포를 사멸시키며, 이에 LoxL2 양성 암 뿐 아니라 LoxL2 음성 암에 대해서도 유의한 치료 효과를 발휘한다.
- [0035] 본 명세서에서 용어 “LoxL2 양성 암”은 세포 또는 조직에서 LoxL2 효소의 발현이 검출되는 고형암 또는 혈액암

을 의미한다.

[0036] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

[0037] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0038] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 구체적으로는 경구, 정맥, 피하 또는 복강 투여될 수 있다.

[0039] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-1000 mg/kg 범위 내이다.

[0040] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물을 제공한다:

[0043] **화학식 1**



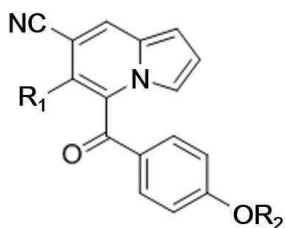
[0044]

[0045] 본 발명에서 이용되는 화학식 1 화합물 및 이를 이용하여 예방 또는 개선될 수 있는 암에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0046] 본 명세서에서 용어 "식품학적으로 허용되는 염"은, 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하는 염 중에서도 식품 조성물에 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하며, 그 구체적인 예는 상술한 "약제학적으로 허용되는 염"의 예를 포함한다.

[0048] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 LoxL2(Lysyl oxidase like 2)의 활성 억제용 기능성 식품 조성물을 제공한다:

[0049] **화학식 1**



[0050]

[0051] 본 발명에서 이용되는 화학식 1 화합물에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를

생략한다.

[0052] 본 명세서에서 용어 “활성의 억제”는 목적 단백질, 즉 LoxL2 효소의 활성 또는 발현의 저하를 야기하는 것을 의미하며, 이에 의해 LoxL2의 활성 또는 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 경우 뿐 아니라, LoxL2의 산화 효소로서의 생물학적 기능이 유의하게 저해되어 종양의 발생, 증식 및 전이와 이로 인한 증상의 악화가 측정 가능한 수준으로 개선될 정도로 LoxL2 효소의 발현량 또는 LoxL2 효소의 생체 내 고유한 기능이 감소하는 것을 의미한다. 구체적으로는 대조군에 비하여 활성 또는 발현량이 20% 이상 감소한 상태, 보다 구체적으로는 40% 이상 감소한 상태, 더욱 구체적으로는 60% 이상 감소한 상태를 의미할 수 있다.

[0054] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 본 발명의 화합물 뿐 만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 탄수화물, 조미제 및 향미제를 포함할 수 있다. 탄수화물의 예는 포도당, 과당 등의 단당류; 말토스, 수크로스 등의 이당류 및 텍스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 다당류 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 향미제로서 천연 향미제[타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 유효성분인 #765 화합물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

발명의 효과

[0056] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0057] (a) 본 발명은 신규한 인돌리진 유도체 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0058] (b) 본 발명의 인돌리진 유도체는 종양의 발생과 전이 과정에 핵심적인 매개체로 알려진 LoxL2 효소의 활성을 현저히 억제함으로써 췌장암을 비롯한 다양한 암에 대한 효율적인 항암제 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

[0059] (c) 본 발명의 인돌리진 유도체는 또한 종양세포의 증식 과정에서 미세관(microtubule)의 중합화를 저해하여 세포주기를 유사분열(mitosis)에서 정지시킴으로써 췌장암을 비롯한 증식이 빠른 종양에 대해 현저한 암세포 사멸 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 췌장암 세포의 증식에 대한 #765의 효과를 나타낸 것이다.

도 2는 췌장암 세포의 콜로니(colony) 형성에 대한 #765의 효과를 나타낸 것이다.

도 3은 유세포분석법(flow cytometry)을 이용하여 #765를 처리한 췌장암 세포의 세포 주기를 분석한 것이다.

도 4는 웨스턴 블롯(western blot)과 면역형광염색법(immunofluorescence assay)을 이용하여 #765를 처리한 췌장암 세포에서 세포 주기와 관련된 단백질의 발현을 분석한 것이다.

도 5는 미세관 역동학(microtubule dynamics)에 대한 #765의 효과를 나타낸 것이다.

도 6은 유세포분석법(flow cytometry)을 이용하여 췌장암 세포와 정상 췌장 표피 세포에서의 아포토시스에 대한 #765의 효과를 나타낸 것이다.

도 7은 웨스턴 블롯을 이용하여 #765를 처리한 췌장암 세포에서 세포사멸 관련 단백질의 발현 변화를 분석한 결과를 나타낸다.

도 8은 Mia PaCa-2 세포에서 #765에 의해 유도되는 세포사멸에 있어서의 JNK의 영향을 보여주는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

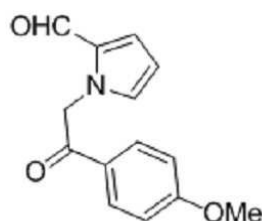
[0064] 실시예

[0065] 실험방법

[0066] 화합물 #765의 합성

[0067] 1-(2-(4-메톡시페닐)-2-옥소에틸)-1H-피롤-2-카르보알데하이드(전구체)의 합성

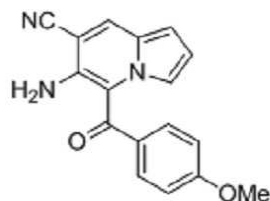
[0068] 피롤-2-카복스알데하이드(300 mg, 3.155 mmol)를 CH₃CN(10 ml)에 녹이고, K₂CO₃(654 mg, 1.5 당량) 및 2-브로모-4'-메톡시아세트페논(867.1 mg, 1.2 당량)을 넣은 뒤 상온에서 저어주었다. 24시간 동안 저어준 후, 반응 혼합액을 감압 농축하고, 에틸아세테이트(18 ml)로 희석한 다음 H₂O(18 ml)로 세척하였다. 에틸아세테이트(18 ml)를 사용하여 수층을 다시 한 번 추출하였다. MgSO₄로 유기물 층을 건조시키고, 감압 농축하였다. 얻은 잔사물을 혼합 용매(헥산 : 에틸아세테이트 : 디클로로메탄 = 30 : 1 : 2 또는 10 : 1 : 2)로 마쇄(trituration)하여 정제함으로써 목적 화합물(629.3 mg, 82%)을 수득하였다.



[0069] 6-아미노-5-(4-메톡시벤조일)인돌리진-7-카보니트릴(#765)의 합성

[0071] 화합물 e(56 mg, 0.23 mmol)를 EtOH 2 ml에 녹이고, 피페리딘 아세테이트(17 mg, 0.5 당량)와 말로노나이트릴(화합물 C; 22.8 mg, 1.5 당량)을 넣은 뒤, 120℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응 종결 후 반응물을 감압농축 하여 얻은 잔사물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(헥산 : 에틸 아세테이트 : 디클로로메테인 = 10 : 1 : 2)로 정제하여 목적 화합물을 수득하였다.

[0072] 화학식 #765



[0073]

[0074] 오렌지색 고형물, mp: 131.4~132.2℃ (64.3 mg, 96%); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.83 (s, 1H), 7.54 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.01 (s, 1H), 6.89 (d, J = 8.8 Hz, 2H), 6.72 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 6.53 (dd, J = 2.4, 3.8 Hz, 1H), 5.83 (s, 2H), 3.87 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 188.5, 163.5, 139.3, 131.0, 130.8, 130.1, 128.4, 122.6, 116.7, 114.5, 114.4, 113.5, 108.2, 93.8, 55.6; HRMS (ESI-QTOF) calcd for C₁₇H₁₃N₃O 229.1081 ([M+H]⁺), found 292.1076.

[0076] 세포배양

[0077] 인간 췌장암 세포주(Mia PaCa-2, PANC-1, BxPC-3, AsPC-1)는 ATCC(American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 정상 인간 췌장 상피세포(HPDE)는 방승민 교수(연세대학교 의과대학)로부터 제공받았다. Mia PaCa-2는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium; Hyclone, Logan, UT, USA)에 2.5% 말혈청(Gibco, New York, NY, USA), 불활성화시킨 10% 우태아혈청(FBS; Hyclone), 1% 페니실린/스트렙토마이신(p/s; Hyclone)을 첨가하여 배양하였다. PANC-1은 DMEM에 10% FBS, 1% p/s를 첨가하여 배양하였다. BxPC-3와 AsPC-1은 RPMI (Hyclone)에 10% FBS, 1% p/s를 첨가하여 배양하였다. HPDE는 각질형성세포 없는 배지에 인간 재조합 표피성장인자(Gibco), 소 뇌하수체 추출물(Gibco), 1% p/s를 첨가하여 배양하였다. 모든 세

포는 37℃ 및 5% CO₂ 가습 조건에서 유지되었다.

[0078]

[0079]

세포증식 어세이

[0080]

약제가 세포 증식에 미치는 영향을 세포계수 킷-8(CCK-8; Dojindo Molecular Technologies Inc., Kumamoto, Japan)을 사용하여 평가하였다. 96-웰 플레이트에 웰당 2.5×10^3 개의 세포를 넣고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 본 발명의 화합물을 농도 별로 3중(triplicate)으로 처리하였으며, 양성 대조군으로 체장암 1차 항암제인 겐시타빈(gemcitabine)을 함께 사용하였다. 약제의 용매로 사용되는 DMSO의 최종 농도는 1% 이하이다. 약물 처리 72 시간 후, CCK-8 용액(2-[2-메톡시-4-니트로페닐]-3-[4-니트로페닐]-5-[2,4-디설포닐]-2H-테트라졸륨)을 웰에 있는 배지의 1/10의 양을 처리하여 색이 나타날 때까지 배양하였다. 흡광도는 450nm에서 Epoch 마이크로플레이트 분광광도계(BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA)을 이용하여 측정하였다.

[0081]

[0082]

콜로니 형성 분석

[0083]

암세포의 콜로니 형성에 대한 약제의 영향을 확인하기 위해 콜로니 형성 분석이 실행되었다. 6-웰 플레이트에 웰당 500 개의 세포를 도말하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 약물을 48시간 동안 처리하고, 새로운 배지로 교체한 뒤 9일 동안 배양하여 콜로니가 형성될 수 있도록 하였다. 그 후 100% 에탄올로 고정하고 0.5% 크리스탈 바이올렛을 이용하여 염색하였다.

[0084]

[0085]

유세포 분석법을 이용한 세포주기 분석

[0086]

암세포를 6-웰 플레이트에 웰당 $2.0 - 3.0 \times 10^5$ 개 세포를 도말하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 약물을 24시간 동안 처리한 후, 세포를 수확하여 차가운 FACS 용액(1% FBS를 첨가한 PBS)으로 2번 씻고 70% 에탄올로 -20℃에서 하루 동안 고정시켰다. 이후 차가운 FACS 용액으로 2회 세척하고 실온에서 어둡게 하여 RNase와 함께 7-AAD로 30분 동안 염색하였다. 이후 유세포 분석기(FACS Celesta, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 통해 세포당 DNA 양을 측정하여 세포주기를 분석하였다.

[0087]

[0088]

면역형광염색법

[0089]

4-웰 챔버 슬라이드에 웰당 6.25×10^4 개의 세포를 도말하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 약물을 24시간(p-HH3 염색) 혹은 18시간(tubulin 염색) 동안 처리하였고, 양성대조군으로 mitotic arrest를 유발하는 항암제인 파클리탁셀과 노코다졸을 사용하였다. 이후 세포를 PBS로 세척하고, 메탄올을 사용하여 4℃에서 20분간 고정하였다. 그 후 0.1% PBS-T (PBS에 Triton X-100 첨가)로 세척하고, 실온에서 1시간 동안 0.1% PBS-T로 만든 20% 정상 고트 혈청으로 블로킹을 진행하였다. 블로킹이 끝난 후, 항-phospho-Histone H3 항체(Ser10; #JBC1377950; Upstate, Billerica, MA, USA) 또는 항- α -튜불린 항체(#sc-32293; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)를 20% 정상 고트 혈청에 희석하여 4℃에서 하루 동안 세포를 염색하였다. 그런 다음, 0.1% PBS-T로 세포를 3회 세척하고, Rhodamine Red-X-접합 항-래빗 IgG 또는 Alexa Flour 488-접합 항-마우스 IgG를 사용하여 실온에서 1시간 동안 세포를 염색하였다. 이후, 0.1% PBS-T로 세포를 3회 세척하고, VECTASHIELD Antifade mounting Medium with DAPI(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)를 사용하여 DAPI 염색과 마운팅을 진행하였다. 이와 같은 과정을 거친 슬라이드를 공초점 현미경(Olympus FlouView FV1000; Olympus, Waltham, MA, USA)으로 촬영하였다.

[0090]

[0091]

튜불린 중합 분석법 (*In vitro tubulin polymerization assay*)

[0092]

튜불린 중합화 어세이 킷(BK006P; Cytoskeleton Inc., Denver, CO, USA)를 이용하여 미세관 결합을 평가하였다. 각 조건에서 정제된 돼지의 튜불린을 4℃ 상태를 유지하며 튜불린 중합화 완충액(80 mM PIPES pH6.9, 2mM MgCl₂, 0.5mM EGTA, 1mM GTP, 및 10.2% 글리세롤)에 넣고, 즉시 미리 데워진 96-웰 플레이트로 옮긴 후, 1분 마다 340nm에서의 흡광도를 60분 동안 37℃ 플레이트 리더(Flexstation3; Molecular Devices Inc.,

Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

[0093]

[0094]

유세포분석법을 이용한 세포사멸 분석

[0095]

6-웰 플레이트에 웰당 $1.0 - 2.0 \times 10^5$ 개의 세포를 도말하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 약물을 48시간 동안 처리한 후 세포를 수확하여 차가운 1 x AnnexinV 결합 완충액으로 2회 세척하였다. 그 후 같은 용액을 사용하여 APC-conjugated AnnexinV (BD Pharmingen, Sparks, MD, USA)와 7-AAD (BD Pharmingen)으로 실온에서 빛을 차단하고 20분 간 세포를 염색하였다. 이후 유세포 분석기(FACSCelesta)를 통해 세포사멸을 분석하였다

[0096]

[0097]

웨스턴 블롯

[0098]

세포를 37℃에서 24시간 동안 배양한 후, 약물을 24시간 혹은 48시간 동안 처리하였다. 이후 세포를 수확하여 차가운 PBS로 2회 세척한 뒤, 1 x 프로테아제 억제제 콕테일과 0.5% 오소바나데이트 나트륨을 첨가한 RIPA 완충액(50 mM Tris-Cl [pH 7.5], 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% 디옥시콜산 나트륨, 0.1% 황산도데실나트륨[SDS])을 이용하여 얼음에서 30분간 용해하였다. 용해된 세포를 4℃에서 12,000 rpm에 20분간 원심분리한 후, 상층액을 수득하였다. 단백질의 농도는 BCA 어세이 키트(Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)을 사용하여 측정하였다. 추출된 단백질은 2-머캅토에탄올을 첨가한 4 x SDS 샘플 완충액(2% SDS, 50 mM Tris-HCl [pH 6.8], 0.4 mM EDTA(pH 8.5), 10% 글리세롤, 0.002% 피로닌 Y)를 이용하여 농도를 맞춰주었다. 이후 동일한 양의 단백질을 SDS 폴리아크릴아마이드 겔을 사용하여 전기영동을 하였고, 반건조 트랜스퍼를 이용하여 0.45μm 니트로셀룰로오스 막(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 옮겼다. 폰소 S 염색 용액(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 이용하여 트랜스퍼된 단백질을 확인하였다. 이후 TBS-T[0.1% Tween-20를 함유한 TBS(Tris-buffered saline)]를 이용하여 만든 5% 탈지유로 1시간 동안 블로킹하였다. 1차 항체는 3% BSA에 희석하여 4℃에서 하루 동안 교반하였다. 다음날 TBS-T로 3번 씻어준 후, HRP(horseradish peroxidase)가 접합된 2차 항체를 5% 탈지유에 희석하여 실온에서 1시간 30분 동안 교반하였다. 이후 TBS-T를 이용하여 6번 씻어준 다음, X-Ray 필름(AGFA, Mortsel, Belgium)과 WesternBright ECL Chemiluminescent HRP Substrate (Advansta, Menlo Park, CA, USA)를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 확인하였다.

[0099]

사용한 1차 항체는 다음과 같다: 항-β-actin (AC-15; Sigma Aldrich), 항-phospho-Cdc2 (Tyr15; #4539S; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), 항-Cdc2 (#28439S; Cell Signaling Technology), 항-cyclin B1 (#4135S; Cell Signaling Technology), 항-phospho-Histone H3 (Ser10; #JBC1377950 ; Upstate), 항-PARP (#9542S; Cell Signaling Technology), 항-caspase3 (#9662S; Cell Signaling Technology), 항-Bcl-2 (#556354; BD Pharmingen), 항-Bim (#2933S; Cell Signaling Technology), 항-phospho-JNK (Thr183/Tyr185; #9251S; Cell Signaling Technology), 항-JNK (#9252; Cell Signaling Technology).

[0101]

실험결과

[0102]

인간 췌장암 세포주의 증식 억제 효과

[0103]

인간 췌장암 세포주 Mia PaCa-2, PANC-1, BxPC-3, AsPC-1의 세포 증식에 대한 #765의 영향을 CCK-8 평가법을 통해 확인하였으며, 그 결과를 도 1 및 표 1에 나타내었다. 도 1에 나타난 바와 같이, #765는 농도 의존적으로 4가지 인간 췌장암 세포의 증식을 억제하였다. 췌장암의 1차 약제(first line drug)로 사용되는 겐시타빈(gemcitabine)과 비교하였을 때, #765는 췌장암 세포에 대해서 nM 수준에서 세포증식 억제 효능이 매우 강하게 나타났다. #765의 50% 저해 농도를 표 1에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, #765는 Mia PaCa-2와 PANC-1의 콜로니 형성을 효과적으로 억제하였다.

표 1

[0104]

췌장암 세포에 대한 #765와 겐시타빈의 IC₅₀ 값

세포주	#765 (nM)	겐시타빈 (μM)
Mia PaCa-2	78.6	2.2
PANC-1	184.2	8.1
BxPC-3	226.4	N.D.

AsPC-1	151.1	N.D.
--------	-------	------

[0106] 인간 췌장암 세포의 세포 주기 관련 단백질 조절 및 유사분열을 중단 효과

[0107] #765에 의한 세포증식 억제효과가 세포 주기 진행의 억제로 인해 발생하는 것인지를 조사하기 위해, #765의 처리 후 췌장암 세포주의 세포 주기 진행을 유세포 분석을 통해 확인하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 #765를 세포에 처리하자 Mia PaCa-2와 PANC-1 모두에서 G2/M 단계에 있는 세포가 축적되고 G1 및 S 단계의 세포는 감소함을 관찰하였다. 또한, #765를 고농도로 처리하자 subG1 단계에 있는 세포가 증가하는 것으로 보아, #765가 세포의 죽음을 유도한다는 것을 알 수 있다. 세포 주기를 조절하는 단백질의 발현을 웨스턴 블롯을 이용하여 확인한 결과, 도 4A에 나타난 바와 같이 #765를 처리하자 Mia PaCa-2 와 PANC-1에서 G2 단계에서 M 단계로 진행되는 데에 관여하는 것으로 알려진 Tyr15번 잔기-인산화된 Cdc2(phospho-Cdc2 (Tyr15)) 단백질의 발현이 증가함을 확인하였다. #765를 처리하면 cyclinB1의 발현이 PANC-1에서는 증가하지만, Mia PaCa-2에서는 증가하지 않았다. 또한, 도 4b에 나타난 바와 같이, 유사분열 중단의 표지자로 알려진 Ser10번 잔기-인산화된 Histone H3(phospho-Histone H3 (Ser10)) 단백질이 #765를 처리하자 Mia PaCa-2와 PANC-1에서 발현이 증가함을 확인하였다. PANC-1에 #765를 처리하였을 때 phospho-Histone H3(Ser10)의 발현이 증가함을 면역형광염색을 이용하여 확인하였다(도 4c). 도 3과 도 4를 종합하면, #765가 Cdk1/cyclinB1 복합체의 활성화와 phospho-Histone H3 (Ser10)의 발현 증가를 유도함으로써 유사분열 중단을 야기한다는 것을 알 수 있다.

[0109] 튜불린의 탈중합화 촉진

[0110] #765가 유사분열 중단을 일으키는 기전을 밝히기 위해, 시험관 내 튜불린 중합 평가법(*in vitro* cell-free tubulin polymerization assay)을 이용하여 #765가 미세관 동역학(microtubule dynamics)에 미치는 영향을 알아보았다. 도 5a에서 나타난 바와 같이, 미세관 탈중합화 시약인 nocodazole과 마찬가지로 #765가 튜불린의 탈중합화를 일으켰다. 아울러, 면역형광염색법을 이용하여 PANC-1 세포에서 #765가 nocodazole과 마찬가지로 미세관을 붕괴시킴을 확인하였다(도 5b). 이를 종합하면, #765가 튜불린의 탈중합화를 유도하고, 이것이 인간 췌장암 세포의 유사분열 중단까지 일으킨다는 것을 알 수 있다.

[0112] #765의 인간 췌장암 세포의 세포사멸 유도

[0113] Annexin-V/7-AAD를 이용한 유세포 분석을 통해 #765가 세포사멸을 일으키는지 조사한 결과, 도 6에서 나타난 바와 같이, Mia PaCa-2와 PANC-1 세포에 #765를 처리하였을 때 농도 의존적으로 세포사멸이 일어남에 반하여 HPDE 세포에서는 세포사멸을 거의 일으키지 않았다. 이를 통해 #765가 정상세포가 아닌 췌장암 세포에 선택적인 세포독성을 보인다는 것을 알 수 있다. 세포사멸 관련 단백질의 발현을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과, #765를 처리한 Mia PaCa-2와 PANC-1 세포에서 잘린 카스파아제-3(caspase-3)와 잘린 다중(에이디피-리보스) 당 중합효소(PARP)의 발현이 증가함을 확인하였다(도 7a 및 7b). 아울러 #765의 처리는 항 세포사멸(항-apoptotic) 단백질인 Bcl-2의 발현을 감소시키고, 세포사멸을 일으키는(pro-apoptotic) 단백질인 Bim의 발현은 증가시켰다(도 7c). 종합하면, #765가 Mia PaCa-2와 PANC-1 세포에서 카스파아제-3와 다중(에이디피-리보스)당 중합효소를 잘리게 함으로써 세포사멸을 유도한다는 것을 알 수 있다.

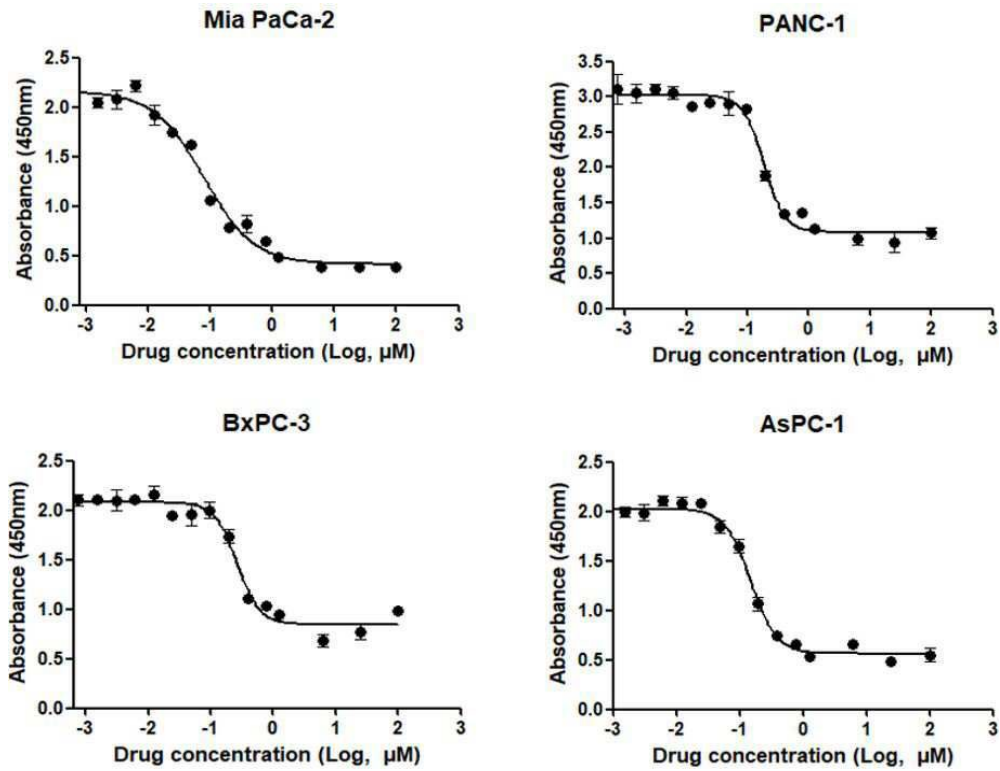
[0115] #765에 의해 유도된 세포사멸에서의 JNK의 활성화

[0116] JNK 신호가 #765에 의해 유도된 세포사멸에 어떠한 역할을 하는지를 웨스턴블롯으로 분석하였다(도 8). 그 결과, #765를 처리한 Mia PaCa-2 세포에서 Thr183 잔기와 Tyr185 잔기(Thr183/Tyr185)에 인산화된 JNK의 발현이 시간과 농도 의존적으로 증가하였다(도 8a 및 8b). 이러한 JNK의 활성화가 #765에 의해서 일어나는 세포사멸에 필요한지를 조사하기 위해, JNK 특이적 억제제인 SP600125를 사용하였다. 도 8c에 나타난 바와 같이, SP600125를 #765 처리하기 2시간 전에 미리 처리한 경우, #765에 의해서 유도된 잘린 PARP의 발현이 다시 감소하였다. 이를 통해, JNK 신호가 #765에 의해 유도된 세포사멸과 관련되어있음을 확인하였다.

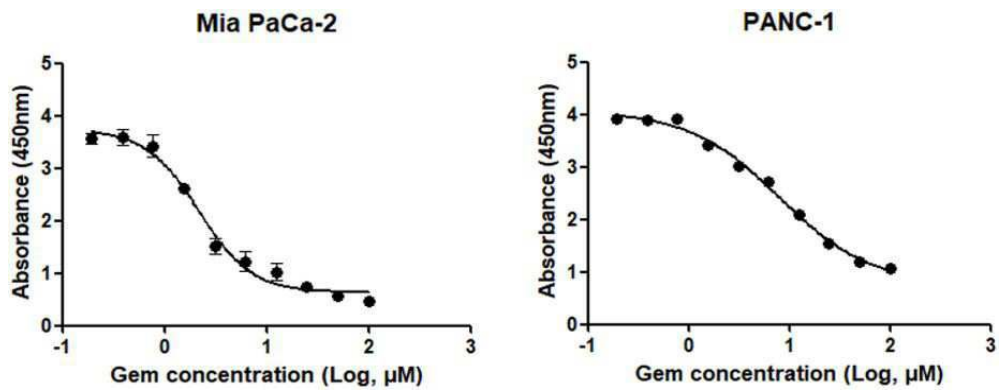
[0118] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

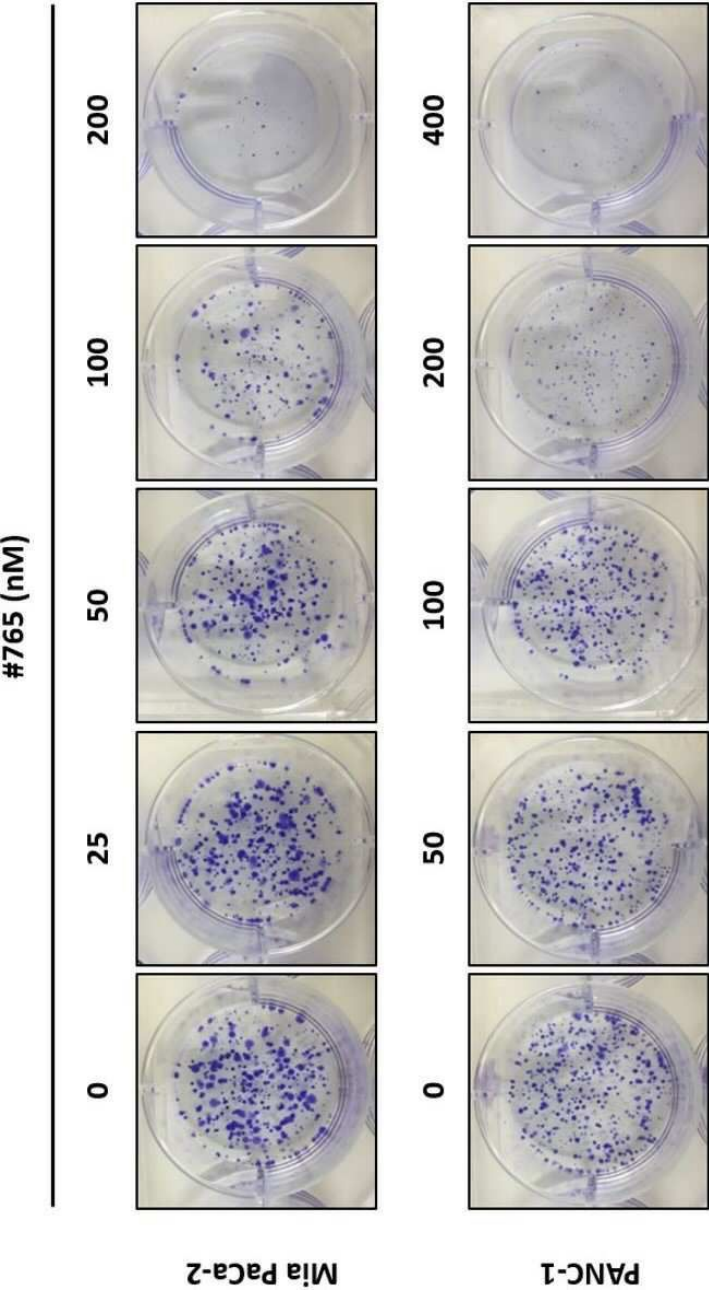
도면1a



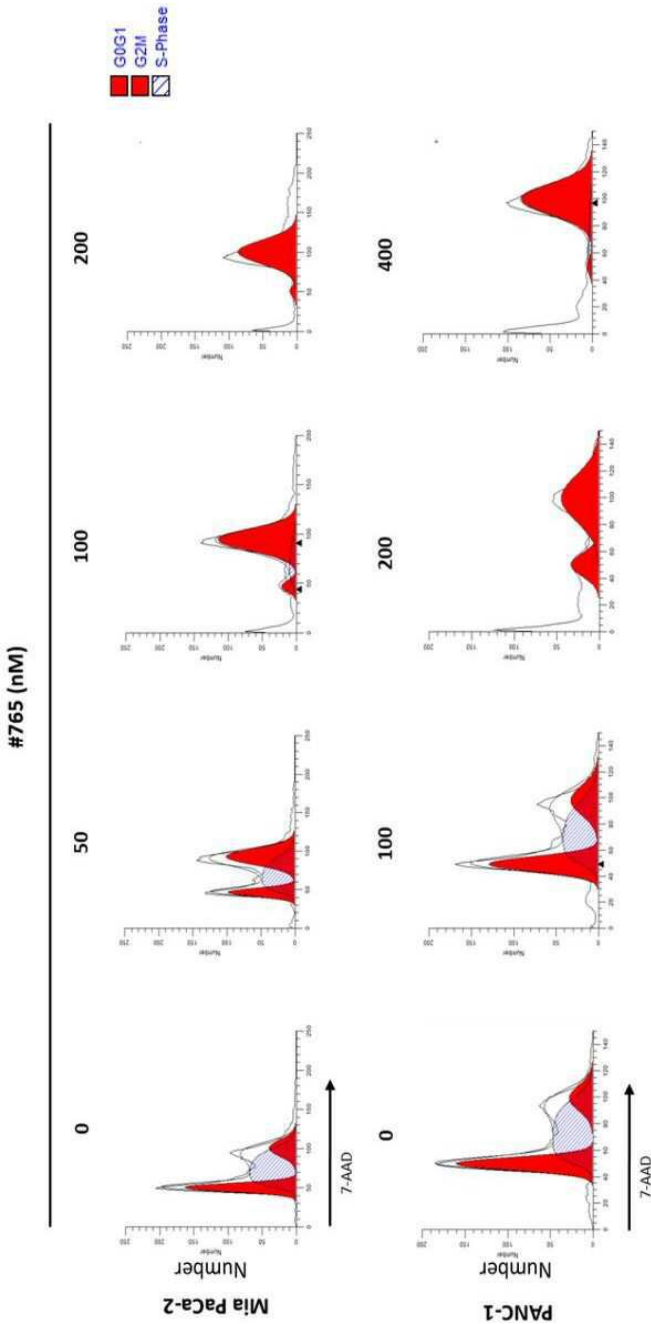
도면1b



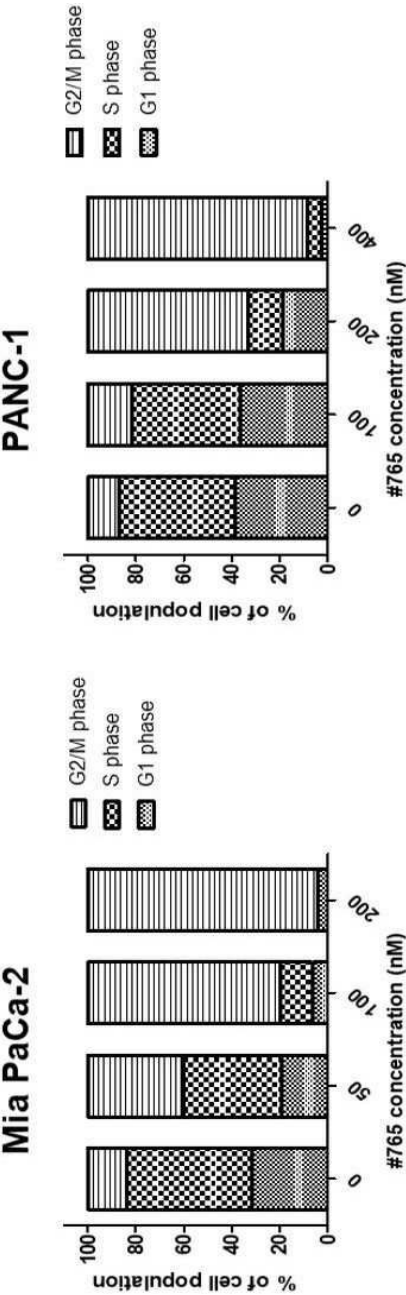
도면2



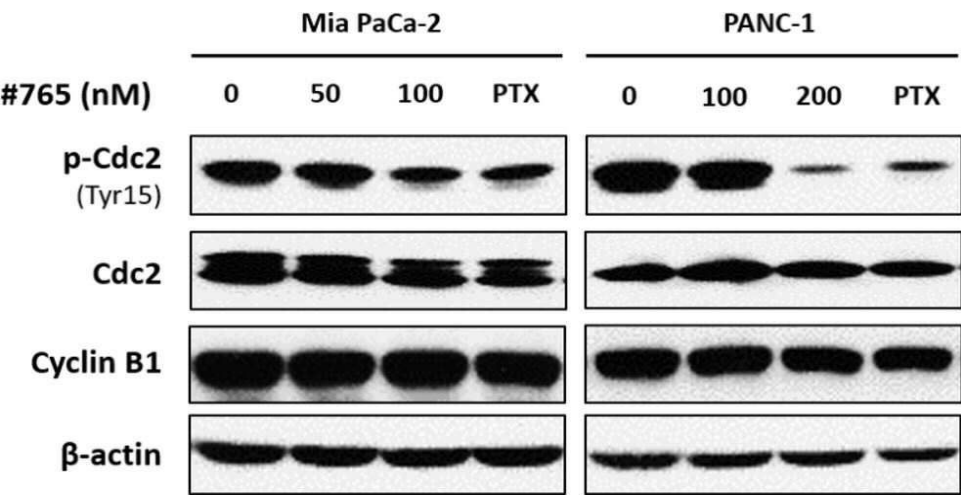
도면3a



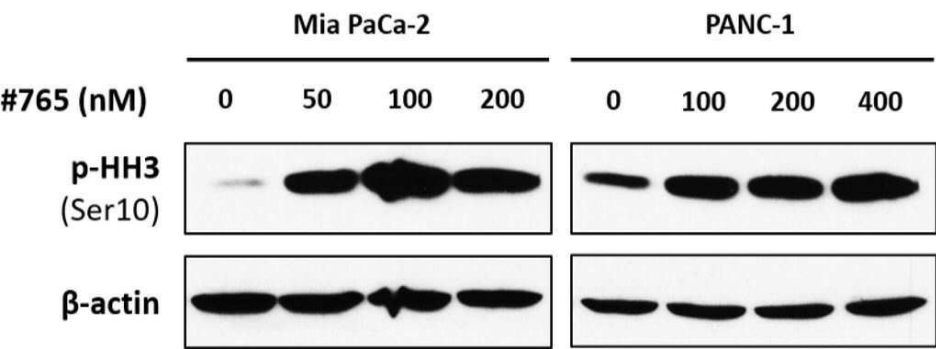
도면3b



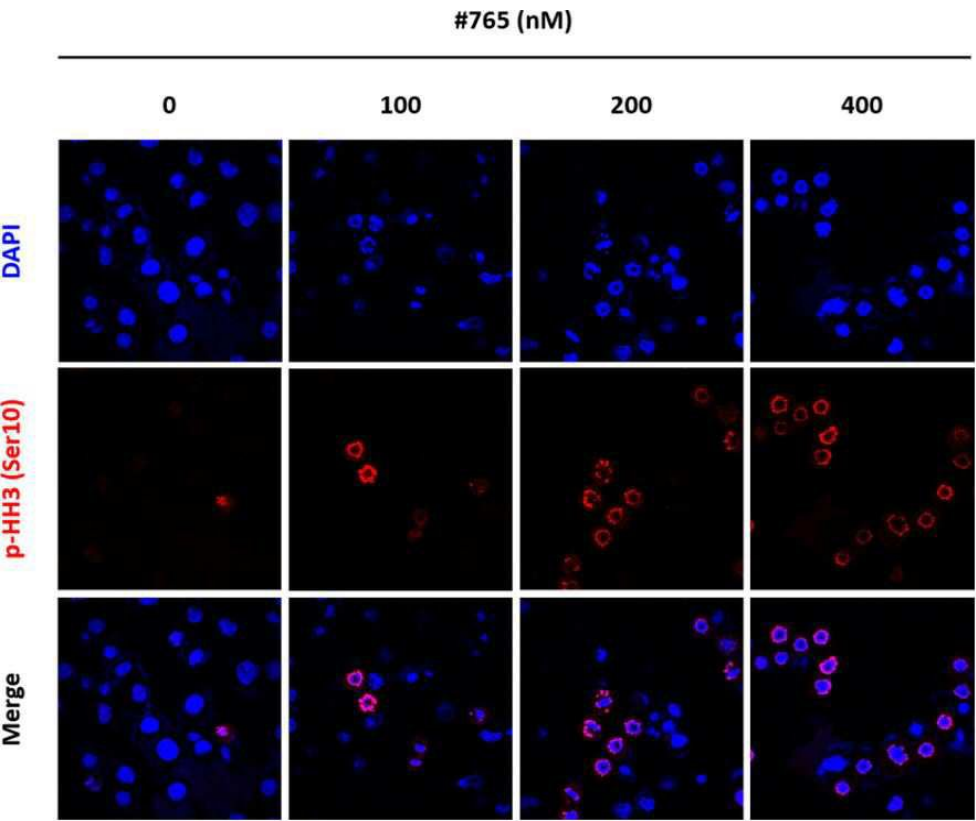
도면4a



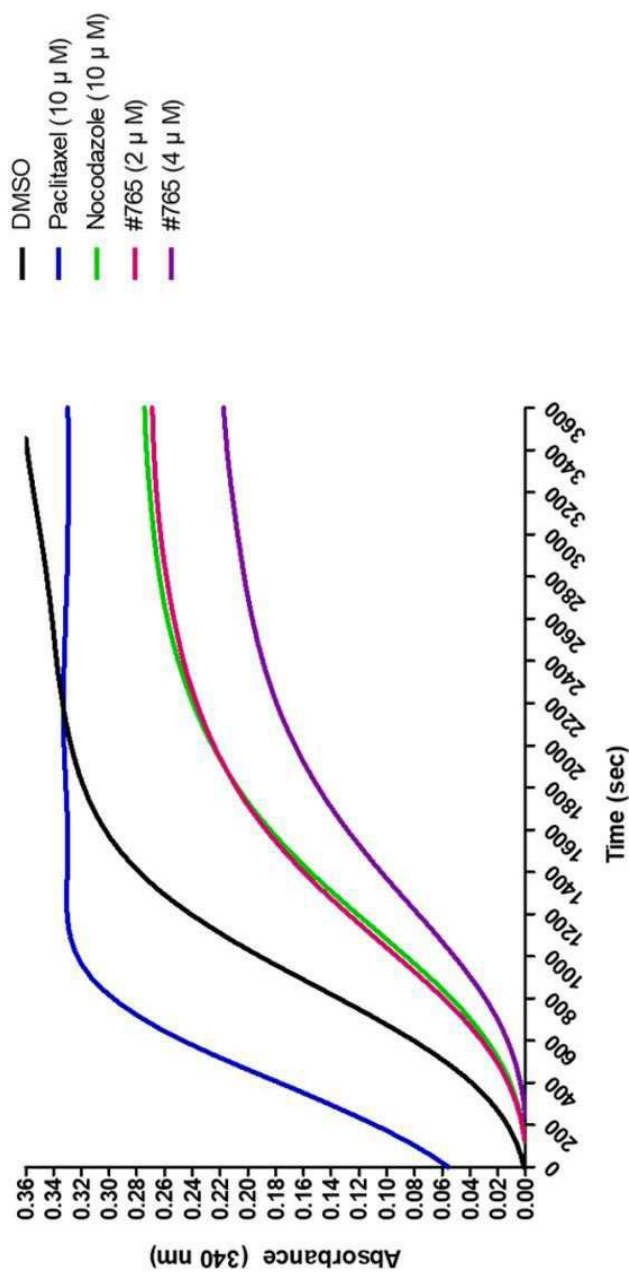
도면4b



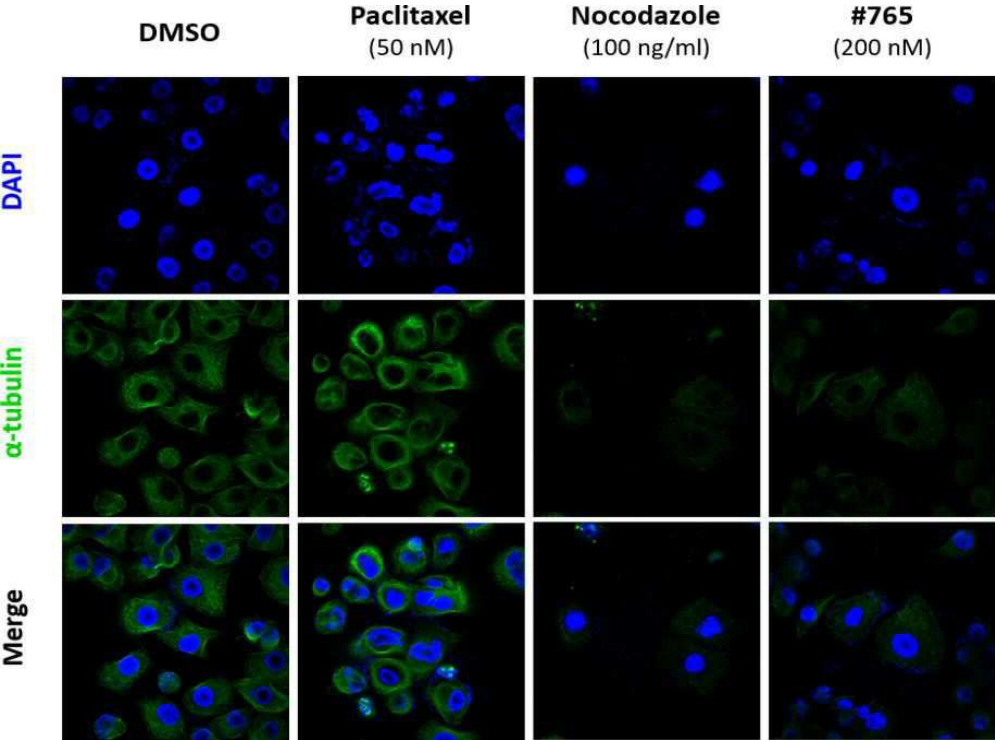
도면4c



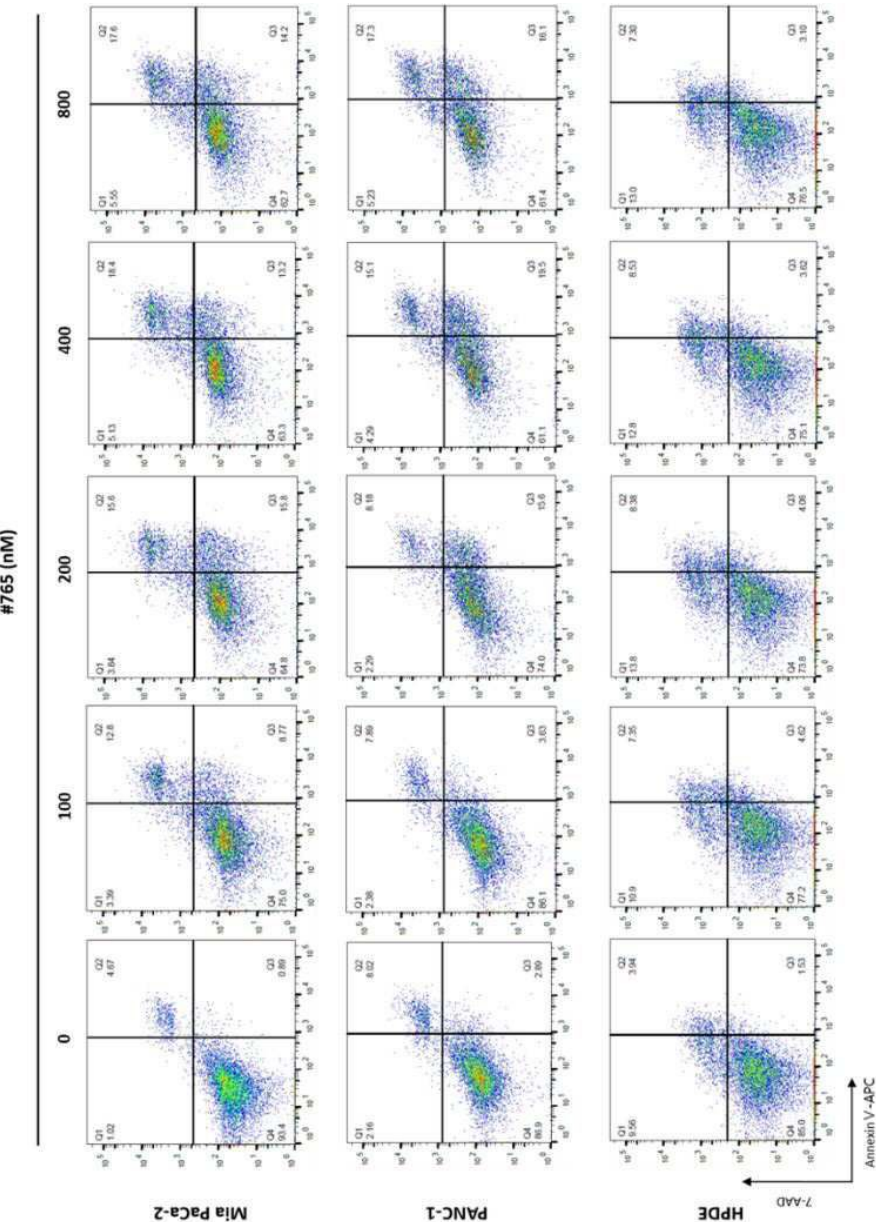
도면5a



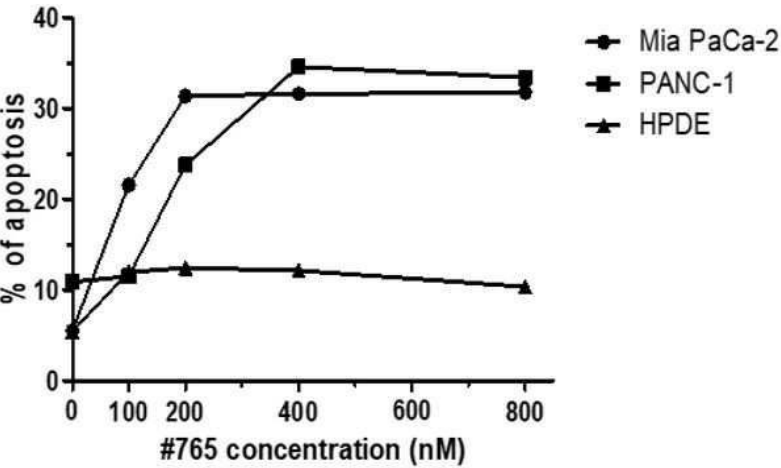
도면5b



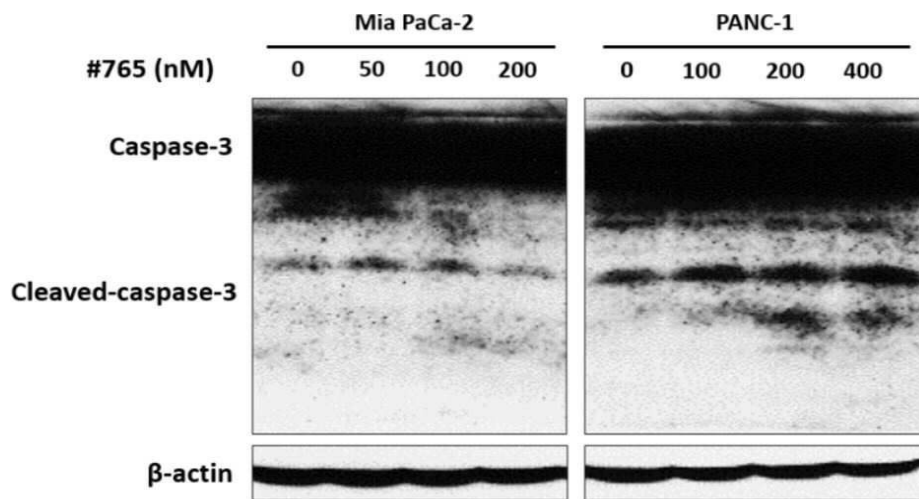
도면6a



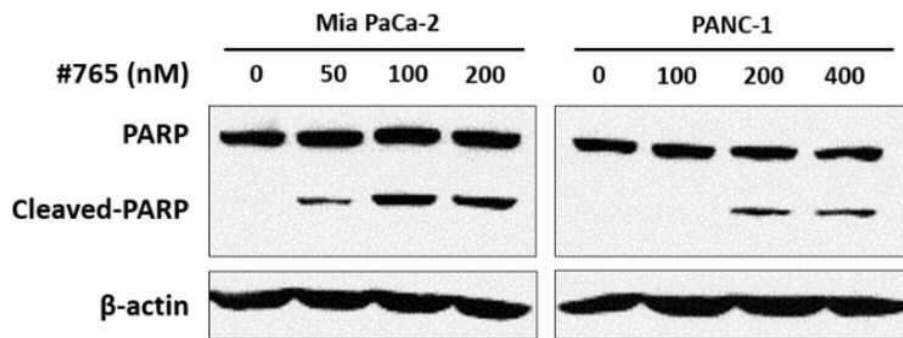
도면6b



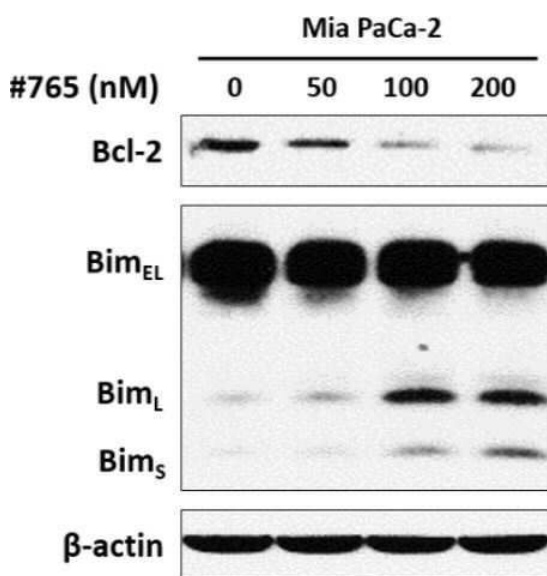
도면7a



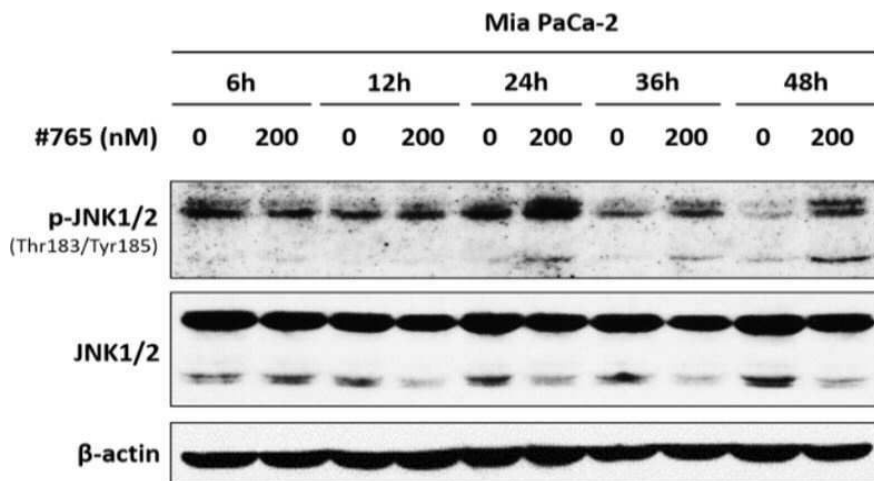
도면7b



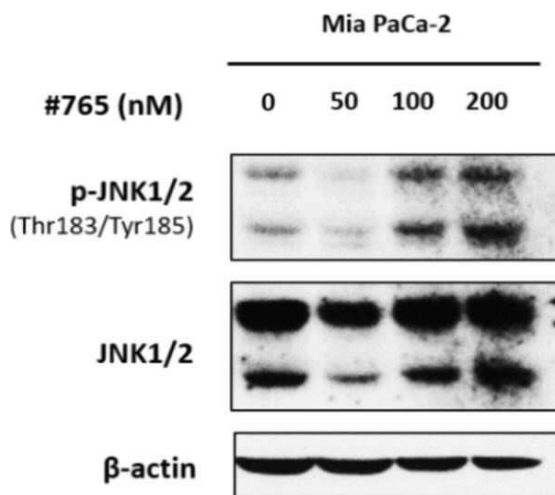
도면7c



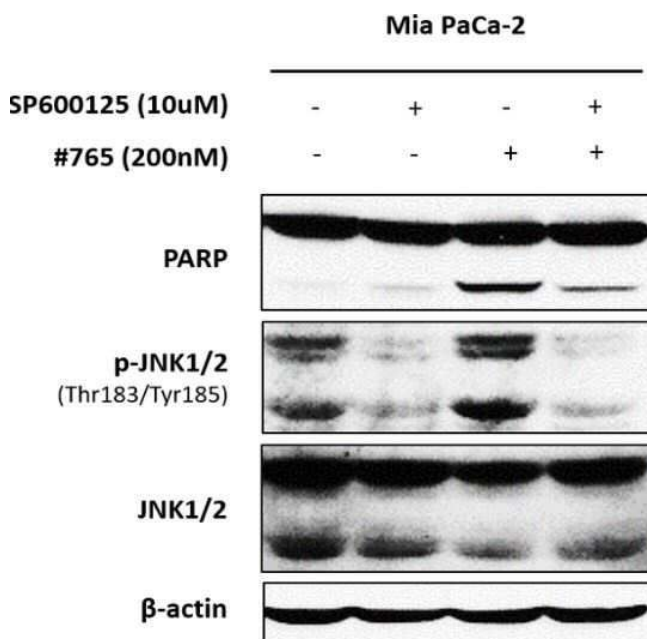
도면8a



도면8b



도면8c



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 7

【변경전】

제 1 항에 있어서, 상기 암은 전이 또는 재발된 암인 것으로 특징으로 하는 조성물.

【변경후】

제 1 항에 있어서, 상기 췌장암은 전이 또는 재발된 암인 것으로 특징으로 하는 조성물.