



등록특허 10-2549327



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년06월29일

(11) 등록번호 10-2549327

(24) 등록일자 2023년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/454 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)

A61K 31/215 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

C12N 5/0793 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/454 (2013.01)

A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2021-0007779

(22) 출원일자 2021년01월20일

심사청구일자 2021년01월20일

(65) 공개번호 10-2022-0105279

(43) 공개일자 2022년07월27일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020070098925 A*

WO2019241620 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

하윤

서울특별시 영등포구 영신로 191, 102동 102호(당산동3가, 동부센트레빌)

오진수

인천광역시 미추홀구 소성로 120, 120동 403호(학익동, 동아, 푸림아파트)

(74) 대리인

파도특허법인유한회사, 특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 8 항

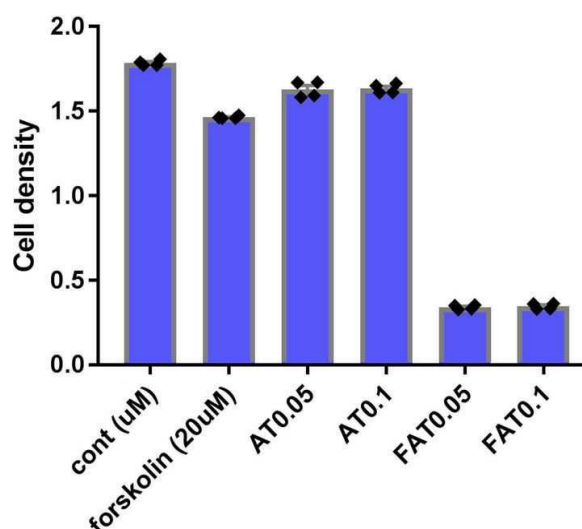
심사관 : 여경숙

(54) 발명의 명칭 저분화 화합물의 조합을 유효성분으로 포함하는 뇌종양의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 암, 구체적으로는 뇌종양, 보다 구체적으로는 신경교모세포종에 대한 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 피라졸일 벤즈아마이드 유도체 화합물과 cAMP의 활성화제의 병용 투여를 통해, 단독 투여시에는 유의한 항암 활성이 측정되지 않을 정도의 저용량으로도 현저한 암세포 증식 억제 효과를 보인다. 이에, 본 발명의 조성물은 내성이나 부작용 없이 저용량의 장기 투여가 가능한 효율적 항암 조성물로 이용될 수 있다. 본 발명은 또한 악성의 신경교모세포종을 양성 신경세포로 직접 전환시켜 종양의 제거 및 소실된 세포의 양적 복구를 동시에 달성함으로써, 종래의 대중적 치료에서 벗어나 종양으로 손상된 신경 조직을 가역적으로 회복시키는 근원적 치료제 조성물로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 31/215 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 5/0619 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

C12N 2501/01 (2013.01)

C12N 2506/08 (2013.01)

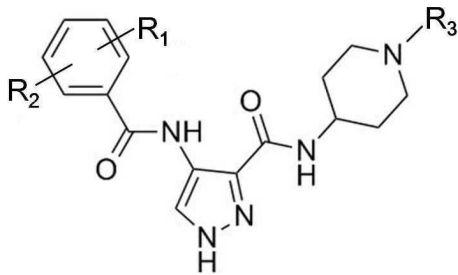
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염; 및 고리형 아데노신 일인산(cAMP)의 활성화제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물로서,

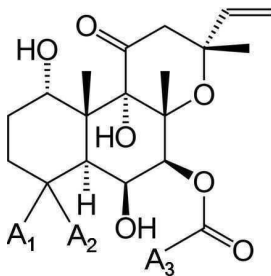
화학식 1



상기 화학식 1에서, R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 수소 또는 할로겐이며, R₃는 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이고;

상기 고리형 아데노신 일인산(cAMP)의 활성화제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염인 것을 특징으로 하는 조성물:

화학식 2



상기 화학식 2에서, A₁ 내지 A₃는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 R₁ 및 R₂는 Cl(클로로)인 것을 특징으로 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 R₃는 수소인 것을 특징으로 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 A₁ 내지 A₃는 C₁ 알킬인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 아은 뇌종양인 것을 특징으로 하는 조성물.

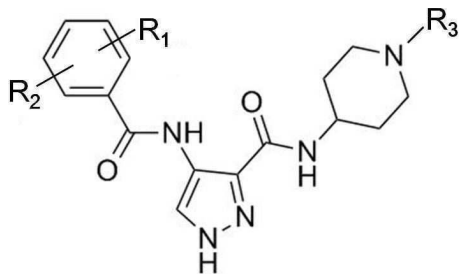
청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 뇌종양은 신경교모세포종인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용되는 염; 및 고리형 아데노신 일인산(cAMP)의 활성화제를 유효성분으로 포함하는 암의 증상 개선용 기능성 식품 조성물로서,

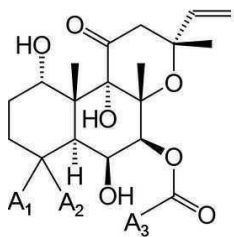
화학식 1



상기 화학식 1에서, R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 수소 또는 할로겐이며, R₃는 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이고;

상기 고리형 아데노신 일인산(cAMP)의 활성화제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염인 것을 특징으로 하는 조성물:

화학식 2



상기 화학식 2에서, A₁ 내지 A₃는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

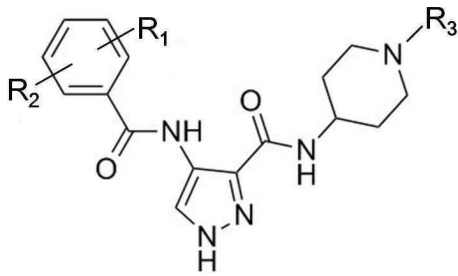
청구항 9

삭제

청구항 10

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염; 및 고리형 아데노신 일인산(cAMP)의 활성화제를 유효성분으로 포함하는 신경교모세포종의 신경세포로의 전환 유도용 식품 조성물로서,

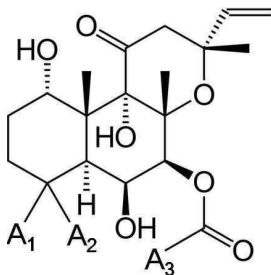
화학식 1



상기 화학식 1에서, R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 수소 또는 할로젠이며, R₃는 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이고;

상기 고리형 아데노신 일인산(cAMP)의 활성화제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염인 것을 특징으로 하는 조성물:

화학식 2



상기 화학식 2에서, A₁ 내지 A₃는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 저분화 화합물, 구체적으로는 포스콜린 및 AT7519의 조합을 유효성분으로 포함하는 뇌종양, 구체적으로는 신경교모세포종의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 신경교종이란 뇌 또는 척수를 구성하는 세포 중 신경세포에 영양을 공급하는 신경교세포에 발생한 종양을 통칭한다. 대부분의 신경교종은 뇌에서 발생하며, WHO(World Health Organization)에서는 이를 기원이 되는 세포, 종양의 병리학적 단계, 발생 위치, 핵의 비정형성, 세포괴사, 혈관내피세포 증식도, 유사분열성 등에 따라 4개의 등급으로 분류한다. 이중, 가장 악성인 4등급으로 분류되면 이를 교모세포종(glioblastoma)으로 진단하게 된다. 다형성 신경교모세포종(GM: glioblastoma multiforme)은 인간에서 발생하는 가장 공격적인 원발성 종양으로 여러 종류의 뇌종양 중 가장 악성이며, 신경교세포와 관련되며 모든 두개 내 종양 중 가장 많은 부분을 차지한다. 유럽과 북미에서 GM의 유병률은 십만명 당 2-3명이며 3년 이상 생존환자가 3% 미만으로 대부분의 환자가 매우 불량한 예후를 가진다. 최근에 교모세포종에 대한 방대한 유전자 발현 연구를 통하여 전신경 아형(proneural subtype), 간엽성 아형(mesenchymal subtype), 고전적 아형(classical subtype) 및 신경형 아형(neural subtype)의 4가지 종류의 교모세포종 아형이 존재함이 규명되었다.

[0004] 현재까지 교모세포종에 대한 치료 전략은 일반적인 뇌종양 치료 전략과 같이 외과적 수술, 방사선 요법 및 항암제 요법이 적용되고 있으나, GM의 특유의 복잡한 발병 기전과 복합적인 약물 내성으로 인해 환자의 생존성을 거의 개선하지 못하고 있다. 이에, 교모세포종을 제거하거나 정상 세포로 전환함으로써 악성 세포를 근원적으로

제거, 환자의 생존성을 현실적으로 개선시킬 수 있는 유효한 뇌종양 치료 전략의 수립이 요구되고 있다.

[0006] 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

[0008] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 미국 등록특허공보 제7,385,059호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 암세포, 특히 신경교모세포종을 비롯한 뇌종양 조직 내 암세포의 증식을 낮은 용량에서도 유의하게 억제하는 효율적인 항암 조성물을 개발하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과, 상기 화학식 1의 피라졸일 벤즈아마이드 유도체 화합물과 cAMP의 활성화제를 병용 투여할 경우 현저한 상승 효과가 발생하여 저용량에서도 암세포의 성장을 선택적으로 억제할 뿐 아니라, 악성의 신경교모세포종을 양성의 신경세포로 직접 전환시킴으로써 종양의 제거 및 소실된 세포의 양적 복구를 동시에 달성하여 손상된 신경 조직을 가역적으로 회복시킬 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

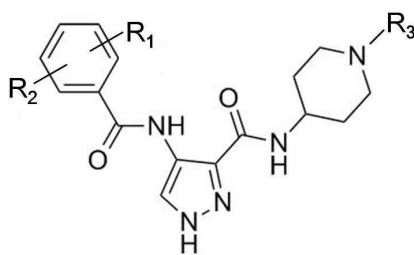
[0011] 본 발명의 다른 목적은 신경교모세포종의 신경세포로의 전환 유도용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염; 및 고리형 아데노신 일인산(cAMP)의 활성화제를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다:

[0015] 화학식 1



[0016]

[0017] 상기 화학식 1에서, R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 수소 또는 할로젠이며, R₃는 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

[0018] 본 발명자들은 암세포, 특히 신경교모세포종을 비롯한 뇌종양 조직 내 암세포의 증식을 낮은 용량에서도 유의하게 억제하는 효율적인 항암 조성물을 개발하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과, 상기 화학식 1의 피라졸일 벤즈아마이드 유도체 화합물과 cAMP의 활성화제를 병용 투여할 경우 현저한 상승 효과가 발생하여 저용량에서도 암세포의 성장을 선택적으로 억제할 뿐 아니라, 악성의 신경교모세포종을 양성의 신경세포로 직접 전환시킴으로써 종양의 제거 및 소실된 세포의 양적 복구를 동시에 달성하여 손상된 신경 조직을 가역적으로 회복시킬 수 있음을 발견하였다.

[0019] 본 명세서에서 용어 “알킬”은 직쇄 또는 분쇄의 포화 탄화수소기를 의미하며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필 등을 포함한다. C₁-C₃ 알킬은 탄소수 1 내지 3의 알킬 유닛을 가지는 알킬기를 의미하며, C₁-C₃ 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

[0020] 본 명세서에서 용어 “할로겐”은 할로젠족 원소를 나타내며, 예컨대, 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오도를 포함한다.

[0021] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 R_1 및 R_2 는 Cl이다. 보다 구체적으로는, 상기 R_3 는 수소이다.

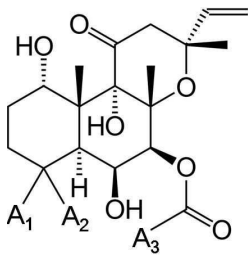
[0022] R_1 및 R_2 가 Cl이고 R_3 가 수소인 화학식 1 화합물은 CDK1, CDK2, CDK4, CDK6 및 GSK-3 β 의 저분자 억제제인 AT7519 [4-(2,6-디클로로벤즈아미도)-N-(피페리딘-4-일)-1H-피라졸-3-카복사마이드)]이다.

[0023] 본 명세서에서 용어 “cAMP의 활성화제”는 cAMP의 농도 또는 이의 신호전달 활성을 증진시키는 유효성분을 의미하며, 예를 들어 당업계에 이미 그 서열 및 구조가 공지된 cAMP 합성효소인 아데닐산고리화효소(Adenylate cyclase)의 발현을 유전자 또는 단백질 수준에서 촉진시켜 cAMP의 합성을 증진시키거나, 또는 cAMP의 세포간 2차 신호전달자로서의 고유의 생물학적 활성을 증진시키는 핵산분자, 펩타이드, 단백질, 화합물 및 천연물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이에, 본 발명에서 이용될 수 있는 cAMP의 활성화제에는 아데닐산고리화효소의 단백질 자체 또는 이를 인코딩하는 유전자가 탑재된 유전자 전달체와 같이 대상체 내에서 cAMP의 합성을 직접적으로 증가시킬 수 있는 수단은 물론 이의 cAMP의 활성화에 영향을 주는 유효성분이 모두 포함된다. 따라서, 용어 “cAMP의 활성화제(activator)”는 “cAMP 작용제(agonist)”와 동일한 의미로 사용된다.

[0024] cAMP의 활성화제로서 이용될 수 있는 저분자 화합물의 예는 NKH477, PACAP 1-27, PACAP 1-38, 6-Bzn-cAMP 나트륨염, 8-브로모-cAMP 및 디부틸릴-cAMP를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 cAMP의 활성화제는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염이다:

[0026] **화학식 2**



[0027] 상기 화학식 1에서, A_1 내지 A_3 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_1 - C_3 알킬이다.

[0029] 보다 구체적으로는, 상기 A_1 내지 A_3 는 C_1 알킬이다.

[0030] A_1 내지 A_3 가 C_1 알킬(메틸)인 화학식 2 화합물은 포스콜린(Forskolin, 3R,4aR,5S,6S,6aS,10S,10aR,10bS)-6,10,10b-트리하이드록시-3,4a,7,7,10a-펜타메틸-1-옥소-3-비닐도데카하이드로-1H-벤조[f]크로멘-5-일 아세테이트)이다.

[0032] 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.

[0033] 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 암세포의 증식을 억제하고 악성의 신경교모세포종을 양성 신경세포로 전환시킴으로써 종양, 특히 신경교모세포종의 진행으로 인한 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 암 치료용 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 암에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 “치료” 또는 “치료제”는 “치료 보조” 또는 “치료 보조제”의 의미를 포함한다.

[0034] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.

[0035] 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 “예방

적 유효량”을 포함하는 의미이다.

[0036] 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.

[0037] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 암은 뇌종양이다. 보다 구체적으로는 상기 뇌종양은 신경교모세포종이다. 본 명세서에서 용어 “신경교모세포종(glioblastoma)”은 뇌에서 1차적으로 발생하는 신경교세포 기원의 악성 종양을 의미한다. 신경교모세포종은 전체 뇌종양의 약 12-15%를 차지하고, 뇌 교종의 50 - 60%를 차지하여, 뇌에 발생하는 단일 종양 중 가장 흔하면서 중증인 종양이다.

[0038] 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.

[0039] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.

[0040] 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, 프록틸히드록시벤조에이트, 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.

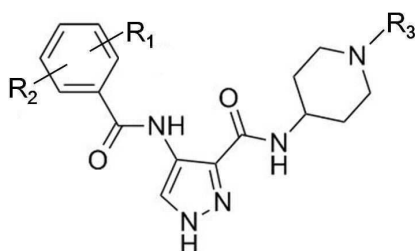
[0041] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 구체적으로는 경구, 정맥, 피하 또는 복강 투여될 수 있다.

[0042] 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 0.001-100 mg/kg 범위 내이다.

[0043] 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 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용되는 염; 및 고리형 아데노신 일인산(cAMP)의 활성화제를 유효성분으로 포함하는 암의 증상 개선용 기능성 식품 조성물을 제공한다:

[0045] **화학식 1**



[0046]

[0047] 본 발명에서 이용되는 화학식 1 화합물, cAMP 활성화제 및 이를 이용하여 개선될 수 있는 암종에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

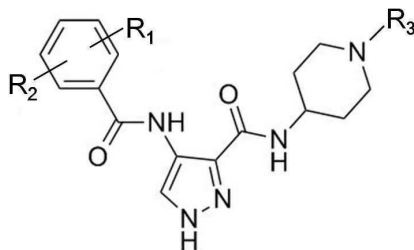
[0048] 본 명세서에서 용어 “식품학적으로 허용되는 염”은, 양이온과 음이온이 정전기적 인력에 의해 결합하는 염 중

에서도 식품 조성물에 사용될 수 있는 형태의 염을 의미하며, 그 구체적인 예는 상술한 “약제학적으로 허용되는 염”의 예를 포함한다.

[0049] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 본 발명의 화합물 뿐 만 아니라, 식품 제조시에 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 당알코올을 포함하나 이에 제한되는 것은 아니다. 향미제로서 천연 향미제[타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 유효성분인 소나무 수피 추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0050] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염; 및 고리형 아데노신 일인산(cAMP)의 활성화제를 유효성분으로 포함하는 신경교모세포종의 신경세포로의 전환 유도용 조성물을 제공한다:

[0051] **화학식 1**



[0052]

[0053] 본 발명에서 이용되는 화학식 1 화합물 및 cAMP 활성화제에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0054] 본 발명에 따르면, 암세포를 포함하는 생물학적 시료에 본 발명의 조성물을 처리할 경우 신경세포의 형태적 특징이 관찰되면서 신경세포 특이적 마커인 TUJ1과 MAP2의 발현이 증가함을 관찰함으로써 악성의 신경교모세포종이 양성의 신경세포로 직접 전환됨을 확인하였다. 이를 통해 종양의 제거 및 소실된 세포의 양적 복구를 동시에 달성하여 보다 효율적인 암 치료 및 조직의 정상화를 달성할 수 있다.

[0055] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 생체 외에서 신경교모세포종을 신경세포로 전환시키기 위한 조성물이다.

발명의 효과

[0057] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0058] (a) 본 발명은 암, 구체적으로는 뇌종양, 보다 구체적으로는 신경교모세포종에 대한 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0059] (b) 본 발명은 피라졸일 벤즈아마이드 유도체 화합물과 cAMP의 활성화제의 병용 투여를 통해, 단독 투여시에는 유의한 항암 활성이 측정되지 않을 정도의 저용량으로도 현저한 암세포 증식 억제 효과를 보인다. 이에, 본 발명의 조성물은 내성이나 부작용 없이 저용량의 장기 투여가 가능한 효율적 항암 조성물로 이용될 수 있다.

[0060] (c) 본 발명은 악성의 신경교모세포종을 양성의 신경세포로 직접 전환시켜 종양의 제거 및 소실된 세포의 양적 복구를 동시에 달성함으로써, 종래의 대중적 치료에서 벗어나 종양으로 손상된 신경 조직을 가역적으로 회복시키는 근원적 치료제 조성물로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 0.05 μ M 및 0.1 μ M의 AT7519와 20 μ M(도 1a) 및 10 μ M(도 1b)의 포스콜린을 각각 단독 또는 병용 처리할 경우 암세포 성장 억제율을 관찰한 결과를 보여주는 그림이다.

도 2는 포스콜린과 AT7519를 병용 처리한 경우와 포스콜린과 다른 약물(CHIR99021 및 탄산리튬)을 각각 조합하

여 병용 처리한 경우의 암세포 성장 억제 활성을 비교한 결과를 보여준다.

도 3은 CHIR99021 및 탄산리튬을 저용량에서 단독 및 포스콜린과 병용 투여한 경우의 암세포 성장 억제 활성을 비교한 결과를 보여준다.

도 4는 포스콜린과 AT7519의 병용 처리가 정상 세포의 성장 속도에 영향을 미치는지를 여부를 마우스 피부세포(도 4a) 및 인간 피부세포(도 4b)를 이용하여 각각 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 포스콜린과 AT7519의 병용 처리에 의해 신경교모세포종이 신경세포로 전환됨을 광학현미경을 통한 세포 형태 관찰(도 5a) 및 신경세포 마커인 TUJ1 및 MAP2의 발현 여부(도 5b)를 통해 확인한 결과를 나타내는 그림이다.

도 6는 본 발명의 조성물에 의한 Balb/c 누드 마우스에서의 신경교종세포 성장 억제 효과를 보여주는 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 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.

[0065] **실시예**

[0066] **실험방법**

[0067] 신경교모세포 및 피부세포 배양

[0068] 설치류 신경교모세포 C6를 1% 항생제(Gibco, 15140-122)와 10% FBS(Fetal bovine serum, gibco)이 포함된 DMEM (Thermo, cat# 11965-092) 배지에서 배양하였다. 신경교모세포는 2-3일에 한번씩 계대배양을 실시하였다.

[0069] 마우스 및 인간피부세포를 1% 항생제 (Gibco, 15140-122)와 10% FBS(Fetal bovine serum, gibco)이 포함된 DMEM (Thermo, cat# 11965-092) 배지에서 배양하였다. 2-3일에 한번씩 계대배양을 실시하였다.

[0071] 신경교모세포의 분화 유도

[0072] 신경 세포로의 전환 유도

[0073] 실험 시작 전에, DMEM/F12 (Gibco, 12634-010) 와 Neurobasal (Gibco, 21103-049)이 1:1로 혼합된 배지에 1% Glutamax (Gibco, 35050), 1% N2 supplement (Gibco, 17502-048), 2% B27 (Gibco, 17504-044), 0.05% 소 혈청 알부민(Bovine serum albumin, Gibco, 11020-021), beta-머캅토에탄올(Gibco, 21985), 1% 항생제 (Gibco, 15140-122)가 포함되도록 신경 유도 배지를 준비하였다. 설치류 C6 신경교모세포 2 x 10³ 개를 24 well plate에 분주하여 하루 동안 배양하였다. 상기 제조된 신경 유도 배지에 AT7519(selletchem, Cat# S1524, 최종 농도 0.1 μM, mulit-CDK 억제제), 고리형 AMP(cyclic AMP)증강제로서 Forskolin (tocris, Cat# 1099, 최종 농도 10 μM, AMP 증가제)를 혼합하여 신경교모세포종에 처리한 후 약 35일간 배양하여 신경교모세포가 신경세포 형태로 전환될 수 있는지의 여부를 확인하였다. 배지는 2-3일에 한 번씩 교환하였다.

[0075] 면역화학 염색법

[0076] 신경 유도 배지에서 35일간 배양한 후, 신경세포 특이적 마커인 tujl 항체 (abcam, ab18207)와 map2(abcam, ab5392) 항체를 사용하여 면역형광염색을 실시하였다. 1 x PBS로 간단히 세척한 후 4% 파라포름알데히드 (Merck, cat# 104005)를 처리하여 상온에서 10분간 반응시켜 세포 고정을 실시하였다. 0.3% 트리톤 X 100 (Sigma, cat# X100) 및 10% 일반 당나귀 혈청(normal donkey serum, Jackson ImmunoResearch, cat# 017-000-121)을 포함하는 1 x PBS를 이용하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 0.3% 트리톤 X 100 및 10% 일반 당나귀 혈청을 포함하는 1 x PBS에 신경세포 특이적 항체인 Tuj1 및 Map2를 약 1~2000배 희석하여 세포에 처리한 후 상온에서 한 시간 동안 반응시켰다. 이후, 형광물질이 함유된 2차 항체 (Jackson ImmunoResearch, cat# 711-165-152, 1:500배 희석)를 30분 간 암실에서 반응시켰다. 이후, 1 x PBS를 사용하여 세포를 3회 세척한 후 형광 현미경을 통해 신경세포 전환 여부를 분석하였다. 신경세포 특이적 마커인 Tuj1 및 Map2에 양성반응을 보이는 몇몇 세포를 확인하였고, 신경세포와 유사한 형태를 확인하였다.

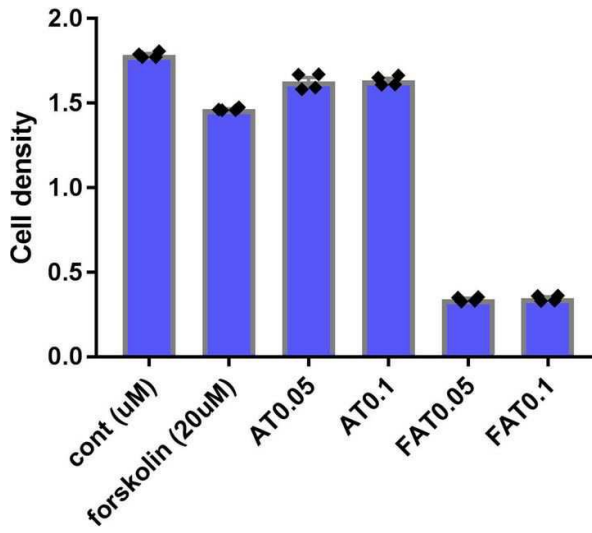
[0078] 세포 증식 억제 효과

- [0079] 신경교모세포에 대하여 다양한 저분자 화합물의 조합에 의한 세포 증식 억제 효과를 확인하였다. C6 신경교모세포 1×10^3 개를 각각 48-웰 플레이트에 분주하여 하루 동안 배양하였다. 다음날 저분자화합물이 포함된 배지로 교체하여 7일 간 추가 배양하고 세포 증식능을 조사하였다. 저분자 화합물 농도는 하단에 표기하였다. 7일 경과후, 48 well plate에 배양 중인 세포에 MTT 용액(Sigma, cat# M5655, 최종농도 5mg/ml) 50 μ l를 직접 처리하고 3시간 동안 배양하였다. 3시간 후 배양 배지를 제거하여 보라색 결정체가 형성됨을 확인하였다. 500 μ l의 DMSO (Sigma, cat# D8418)를 사용하여 37° C에서 10분간 반응시켜 보라색 결정체를 용해시켰다. 용해된 결정체를 포함하는 DMSO 용액 100 μ l를 96 well plate로 옮겼고, 분광광도계를 사용하여 490 nm에서 세포 증식을 측정하였다. 피부세포를 이용한 실험도 위의 방법과 동일한 조건에서 진행하였다.
- [0080] 저분자화합물 농도는 다음과 같이 사용하였다. AT7519(selletchem, Cat# S1524, 최종 농도 0.05 μ M, 0.1 μ M, mulit-CDK 억제제), 고리형 AMP(cyclic AMP)증강제로서 Forskolin (tocris, Cat# 1099, 최종 농도 10 μ M, 20 μ M AMP 증가제), CHIR99021 (Tocris, Cat# 4423, 20 μ M 혹은 2 μ M, GSK3억제제), Lithium carbonate (8mM, 1.6mM, GSK3 억제제)
- [0082] 척수종양 모델 제작 및 약물 투여
- [0083] 척수종양 동물모델은 성체 누드마우스 (6주, 중앙실험동물)를 사용하였다. 흉추10번을 후궁절제술로 제거하여 척수가 노출되도록 하였다. C6 신경교모세포 (2×10^3 개/ 1μ l)를 미세바늘에 주입하여 누드마우스 척수에 직접 주입하였다. 미세펌프를 사용하였고 주입 속도는 1μ l/분이다. 신경교모세포 이식 2일 후부터 저분자화합물을 음수에 희석하여 경구 투여하였다. 사용된 화합물 농도는 다음과 같다: AT7519(selletchem, Cat# S1524, 최종 농도 3.75mg/kg, 7.5mg/kg, mulit-CDK 억제제), 고리형 AMP(cyclic AMP) 활성화제로서 포스콜린(tocris, Cat# 1099, 최종 농도 10 mg/kg, AMP 증가제).
- [0085] 행동검사
- [0086] 마우스 척수종양 모델의 경우 주입된 신경교모세포가 서서히 증식하여 신경을 압박하게 되므로 동물의 하반신의 움직임이 점차 둔화되며 최종적으로 하지 마비가 된다. 따라서 척수종양모델 제작 후 하지의 움직임을 관찰해야 한다. 보행 테스트를 위해서 동물을 평평한 판지위에 올려두고 자유롭게 보행하는 동물의 하지 보행을 관찰하였다. BMS 스코어를 사용하여 하지의 움직임에 따라 점수를 부과하였다 (정상:9점, 하지마비:0점). BMS 스코어는 종래에 보고된 방법에 따라 계산하였다(D. Michele Basso et al., *Journal of Neurotrauma* 23(5):635-659(2006)).
- [0088] 실험결과
- [0089] 포스콜린과 AT7519의 병용처리에 따른 암세포 성장 억제효과
- [0090] AT7519 화합물의 경우 가장 재현성이 좋고 병행 처리 조건에서 암세포 성장 억제 효과도 뚜렷하게 관찰되는 것을 확인하였다. AT 0.05 μ M 및 AT 0.1 μ M과 같이 저농도의 AT7519를 단일 처리한 경우 대조군과 비교하여 암세포 성장 억제효과가 높지 않았으나, 동일 농도 조건에서 각각 20 μ M(도 1a) 및 10 μ M(도 1b)의 포스콜린과 병용 처리할 경우 암세포 성장을 현저히 억제함을 확인하였다.
- [0092] 포스콜린과 다른 약물과의 조합에 따른 항암 효과의 비교
- [0093] GSK3 억제제인 CHIR99021(CHIR) 및 탄산리튬(Lithium carbonate, Li)과 포스콜린을 병용 처리할 경우와 AT7519와 포스콜린을 병용 처리할 경우의 암세포 성장 억제 효과를 확인하기 위하여 AT7519(0.05 μ M, 0.1 μ M), CHIR99021(20 μ M), 탄산리튬(8mM)을 포스콜린(10 μ M)와 병용 처리한 결과, 모든 조합에서 암세포 성장이 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 2).
- [0095] 포스콜린과 저농도 약물과의 조합에 따른 항암 효과의 비교
- [0096] 각 조합 약물에서 단독 투여시에는 암세포 성장 억제 효과가 전혀 없는 낮은 농도 조건에서도 포스콜린과의 병용 처리에 의해 상승 효과가 관찰되는지를 확인하기 위해 CHIR과 Li를 단독 투여로는 유의미한 암세포 성장 억제 효과가 관찰되지 않는 저농도로 추가적인 실험을 진행하였다. 이를 위해 2 μ M의 CHIR99021과 6mM의 탄산리튬을 단일 혹은 포스콜린과 병행 처리한 결과, 모든 처리군에서 대조군과 유사한 속도로 성장하여 암세포 성장 억제효과가 전혀 관찰되지 않았다(도 3). 이를 통해 본 발명의 AT7519과 포스콜린의 두 저분자 화합물 조합이 암세포의 성장을 효과적으로 억제할 수 있는 의미있는 조합임을 확인하였다.

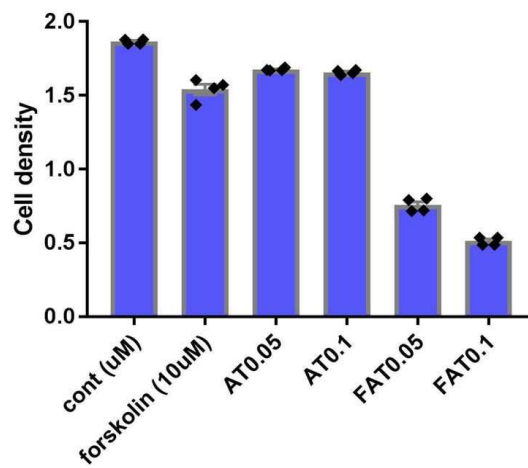
- [0098] 정상세포에 대한 독성의 조사
- [0099] AT7519 및 포스콜린의 병용 처리가 정상 세포의 성장 속도에도 영향을 미치는지 조사하기 위하여 마우스 피부세포를 대상으로 전술한 실험 조건과 동일한 조건에서 실험을 진행하였다. 그 결과, AT7519 단일 혹은 포스콜린 병용 처리 조건 모두 마우스 피부세포의 성장에 큰 영향을 미치지 못하는 것을 확인하였다(도 4a).
- [0100] 아울러, 인간 정상 세포에 대한 독성을 추가적으로 확인하기 위해 인간 피부세포를 대상으로 동일한 조건에서 실험을 수행한 결과, 역시 AT7519 단일 혹은 포스콜린 병행 처리 조건 모두 인간 피부세포의 성장에 큰 영향을 미치지 못함을 재확인하였다(도 4b).
- [0102] 신경세포 전환 효과의 조사
- [0103] AT7519와 포스콜린의 병용 처리가 암세포의 성장을 억제하고 신경세포 전환을 유도할 수 있는지 조사하기 위해 포스콜린과 AT7519 화합물이 모두 처리된 조건에서 약 5주간 장기 배양 후 세포의 형태를 관찰한 결과, 광학현미경 하에서 살펴볼 때 신경세포의 형태적 특징을 보이는 세포가 관찰되기 시작하였다(도 5a).
- [0104] 아울러, 신경세포 특이 마커인 TUJ1 혹은 MAP2 항체를 사용하여 항체의 양성 반응 여부를 조사한 결과, TUJ1 및 MAP2에 양성 반응을 보이는 세포가 다수 관찰되었으며, 이들 세포에서 신경세포 특이적인 형태가 관찰되는 것을 확인하였다(도 5b).
- [0106] 인 비보에서의 항암 효과 확인
- [0107] 신경교종세포 20,000개를 Balb/c 누드 마우스 척수에 이식한 후, 포스콜린과 AT7519 화합물을 각각의 농도에서 병용 처리하여 암세포 성장 억제 효과를 인 비보에서 조사하고자 하였다. 이를 위해 3.75 mg/kg 및 7.5mg/kg의 AT7519와 10mg/kg의 포스콜린을 각각 음수와 혼합하여 마우스에 경구투여하였다. AT7519 화합물의 경우, 종래 보고된 동물실험에서의 유효 용량보다 약 2~4배 희석된 낮은 농도 조건을 사용하였으며(KANG et al., *International Journal of Oncology* 53: 703-712 (2018); L Santo et al., *Oncogene* 29: 2325-2336(2010)), 포스콜린의 경우 10mg/kg로 고정하였다.
- [0108] 척수내로 주입된 신경교종세포가 계속하여 성장할 경우 척수 내 종양 덩어리를 형성하고 시간이 경과 할수록 하반신 운동 기능이 소실되면서 최종적으로 완전 마비를 보인다. 따라서, 14일 간의 약물 투여 기간 동안 하반신 운동 기능 소실 및 완전 마비 시점을 조사하였다. 그 결과, 측정된 BMS(Basso Mouse Scale) 점수로부터 약물을 투여하지 않은 대조군의 경우 이식 후 약 11일째부터 급격하게 하반신 운동 기능이 소실되었으며, 14일째부터 체중을 신지 못하는 완전한 운동 신경 마비가 나타남을 관찰되었다(도 6).
- [0109] 포스콜린 10mg/kg, AT7519 3.75mg/kg 혹은 AT7519 7.5mg/kg 단독 투여군은 대조군과 유사한 패턴을 보였으나, 포스콜린과 병용 투여한 경우 하반신 운동 기능이 완전히 소실되는 기간이 유의하게 지연되는 것을 확인하였다(3점 이상일 경우 체중을 신고 일어서는 것을 의미하여, BMS score에서 매우 의미있는 수치이다).
- [0111] 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

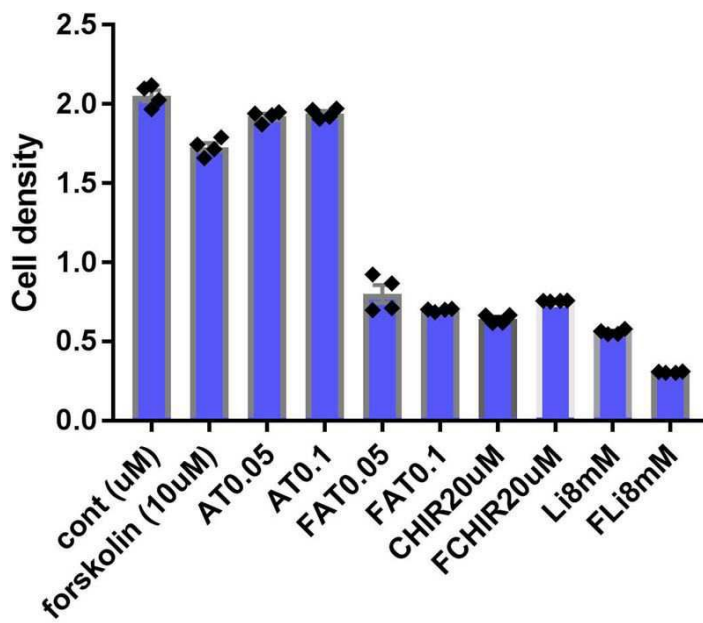
도면1a



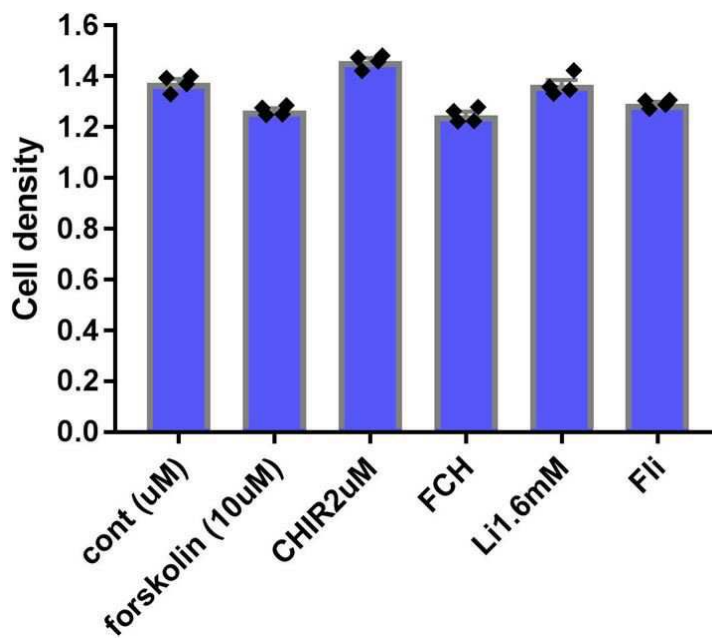
도면1b



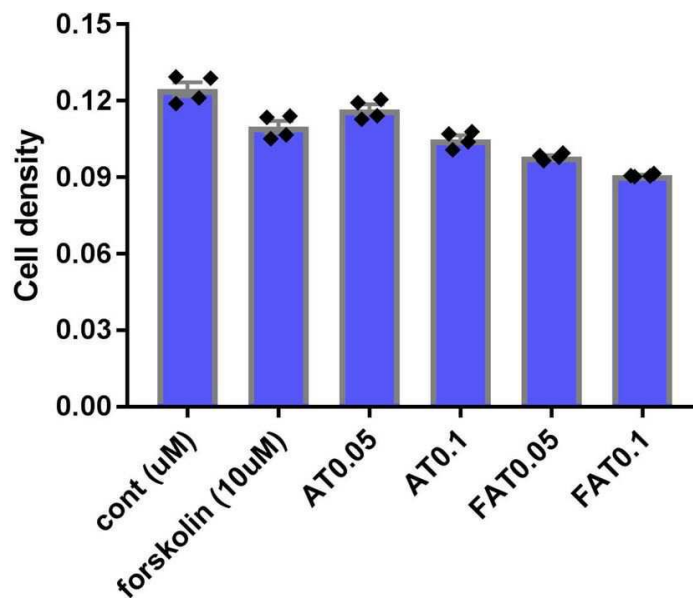
도면2



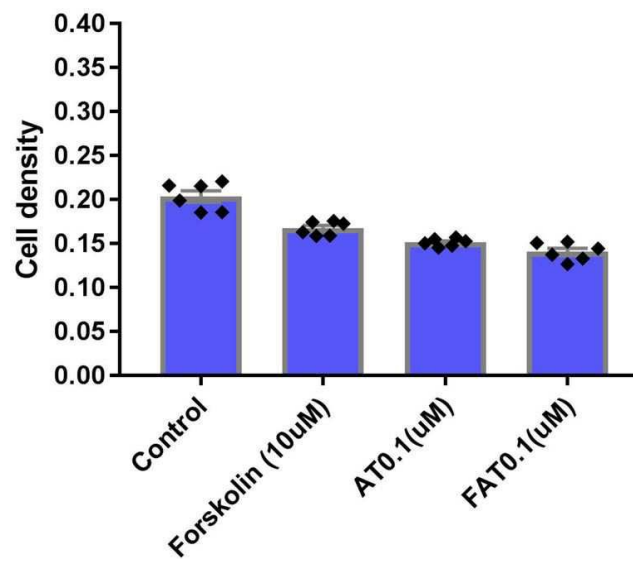
도면3



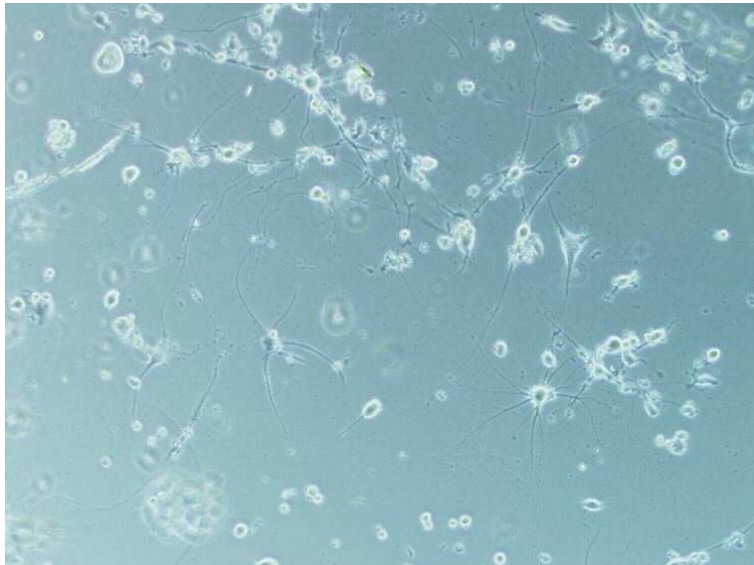
도면4a



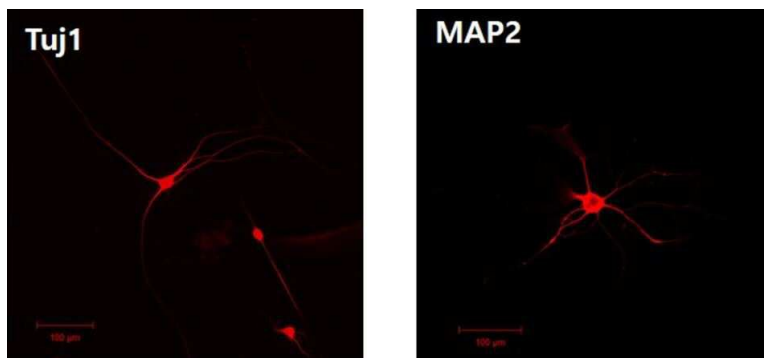
도면4b



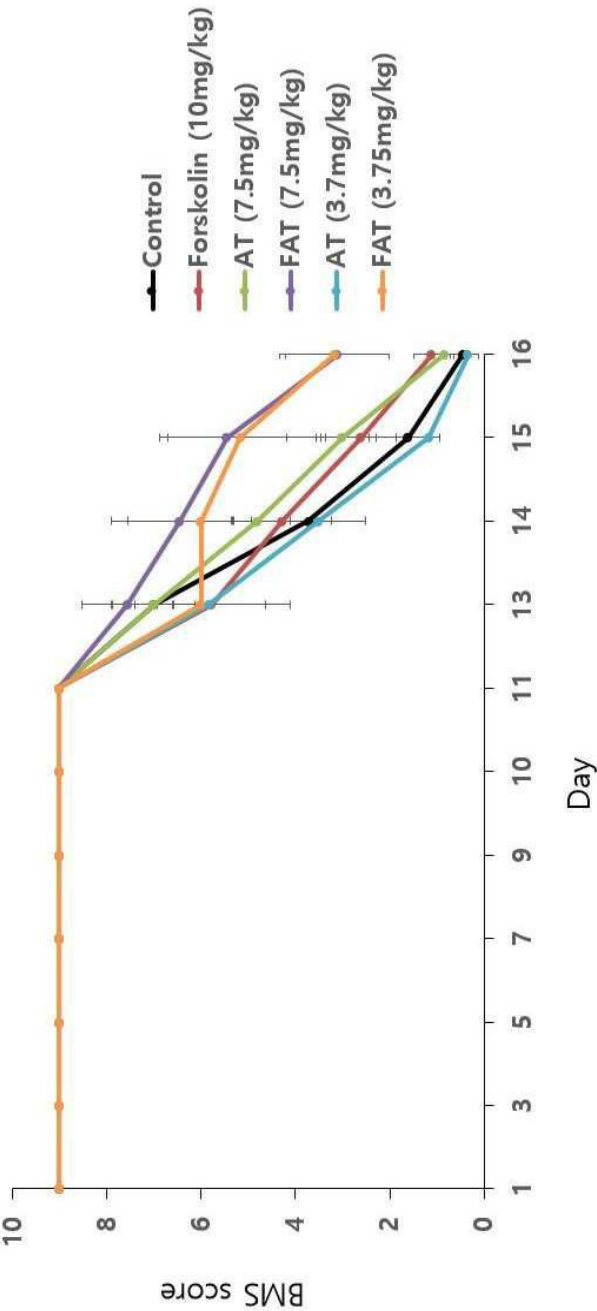
도면5a



도면5b



도면6



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 2

【변경전】

제 1 항에 있어서, 상기 R₁ 및 R₂는 Cl인 것을 특징으로 조성물.

【변경후】

제 1 항에 있어서, 상기 R₁ 및 R₂는 Cl(클로로)인 것을 특징으로 조성물.