



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0140268
(43) 공개일자 2022년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 471/04 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61K 31/437 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07D 471/04 (2022.08)
A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2021-0046557

(22) 출원일자 2021년04월09일

심사청구일자 2021년04월09일

(71) 출원인

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

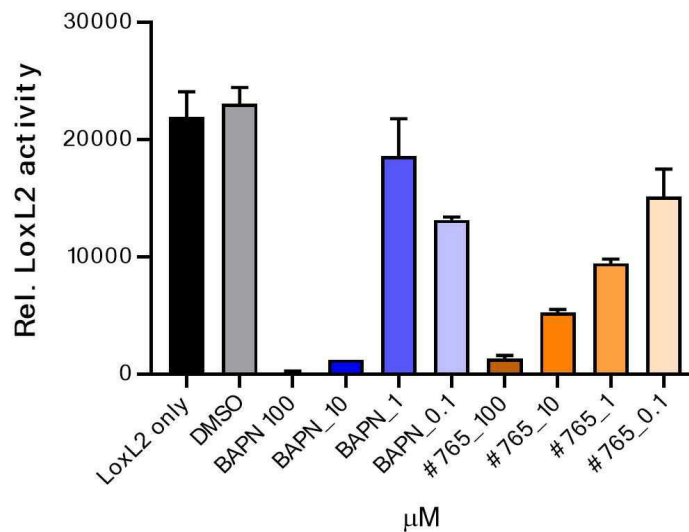
전체 청구항 수 : 총 9 항

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

(57) 요약

본 발명은 신규한 인돌라진 유도체 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 섬유증 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 인돌라진 유도체는 조직의 섬유화에 핵심적인 매개체로 알려진 LoxL2 효소의 활성을 현저히 억제함으로써 콜라겐의 합성 및 수축은 물론 섬유화의 전단계인 염증 반응을 차단함으로써 다양한 섬유증 질환에 대한 효율적인 치료제 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 31/437 (2013.01)

A61P 1/16 (2018.01)

A61P 11/00 (2018.01)

A61P 29/00 (2018.01)

A61P 43/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (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)

이철호

서울특별시 영등포구 선유서로 67, 102동 6층 102-602호(양평동2가)

심두희

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

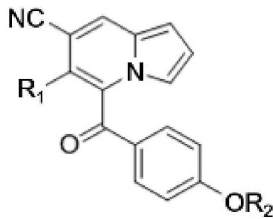
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 섬유증 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 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

제 1 항에 있어서, 상기 섬유증은 폐섬유증, 간섬유증, 신장섬유증, 췌장섬유증, 종격섬유증, 골수섬유증, 후복막섬유증, 진행성 종괴성 섬유증, 신원성 전신섬유증, 피부경화증, 전신 경화증, 신경섬유종증 및 심근섬유증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 섬유증은 폐섬유증 또는 간섬유증인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 염증성 질환은 폐렴, 만성폐쇄성폐질환, 특발성섬유성폐포염, 폐농양, 간염 및 간경변으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 LoxL2(Lysyl oxidase like 2)의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

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

화학식 1

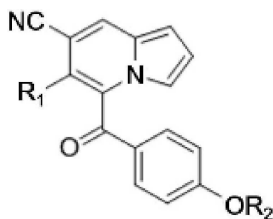


상기 화학식에서 R₁은 NA₁A₂(A₁ 및 A₂는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다)이고 R₂는 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 콜라겐의 합성, 수축 또는 축적 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 섬유증, 구체적으로는 폐섬유증 또는 간섬유증의 예방 또는 치료용 억제학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 폐섬유증(pulmonary fibrosis)은 폐 조직에 섬유질 결합조직이 과다누적됨으로써 폐포가 딱딱한 섬유세포로 변형되어 공기의 순환이 이루어지지 못하고 호흡 곤란으로 이어지는 질환을 의미한다. 폐섬유증은 흡연, 미세먼지, 바이러스 감염, 방사선 노출 등 다양한 원인으로 발생할 수 있으며, 질환의 특성 상 증상이 발생되고 난 뒤 가역적인 회복이 힘들어 질환의 진행을 억제하거나 지연시키는 치료에 초점이 맞추어진다. 특히, 특발성 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)의 경우 그 발생 기전이나 원인이 불분명하고 고령층에서 많이 발생하여 높은 치사율을 보인다. 현재 사용 가능한 약물로는 베링거잉겔하임의 닌테다닙(nintedanib)과 로슈의

피르페니돈(pirfenidone)이 있으나 두 약물 모두 심한 부작용으로 인해 모든 IPF 환자에게 사용가능하지 않고 환자의 상태에 따라 의사의 판단 하에 제한적으로만 사용 가능하다(Carlos et al., 2016; Li et al., 2017).

[0004] 한편, LoxL2(Lysyl oxidase like 2)는 산화효소 활성을 갖는 단백질로서 최근 몇몇의 연구는 폐섬유화의 발생부위에서 LoxL2 단백질의 발현이 증가함을 보고하였다(Aumiller et al., 2017). 이어서 LoxL2의 발현을 조절함으로써 폐섬유증을 치료하거나 진행을 지연시킬 수 있다는 실험결과들이 보고되고 있고 IPF 환자들을 대상으로 LoxL2를 억제하는 항체를 처리하여 질병의 진행 정도를 조사하였으나, 임상 실험에서는 유의한 효과는 나타나지 않고 있다(Espindola et al., 2019). 그러나 마찬가지로 그 발병 및 진행에 LoxL2가 중요한 매개자가 된다고 알려진 종양의 경우 항-LoxL2 항체의 투여를 통해 종양의 크기가 유의하게 줄어들고 LoxL2와 관련된 콜라겐 수준 역시 현저히 감소함을 확인하였다. 간섬유증의 경우 항-LoxL2 항체를 통해 LoxL2의 활성을 억제하자 병변 부위가 줄어들고 증상이 완화된 마우스와 인간에서 확인되었다(Barry-Hamilton et al., 2010). 따라서, LoxL2에 대한 효율적인 억제제는 폐섬유증을 비롯한 다양한 조직에서의 섬유증의 발생 및 진행을 유의하게 저해시킬 수 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. 한국 특허공개공보 제10-2016-0044750호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 콜라겐의 가교 결합과 세포외 기질의 형성을 촉진함으로써 조직의 섬유화에 관여하는 LoxL2(Lysyl oxidase like protein 2) 단백질의 활성을 특이적으로 억제하고 이를 통해 섬유화의 진행을 효율적으로 차단하는 우수한 항섬유화 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 상기 화학식 1로 표시되는 인돌리진(indolizine) 유도체가 LoxL2와의 특이적인 결합을 통해 이의 활성을 저해하고, 조직 내 콜라겐의 생성 및 수축을 감소시키며 염증 반응을 유의하게 억제함으로써 다각적인 항섬유화 효능을 발휘한다는 사실을 발견하여, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 섬유증 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

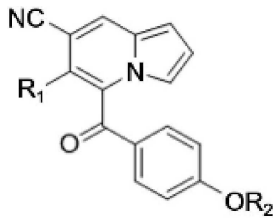
[0011] 본 발명의 다른 목적은 콜라겐의 합성 또는 축적 억제용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 섬유증 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다:

[0016] 화학식 1



[0017]

[0018]

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.

[0019]

본 발명자들은 콜라겐의 가교 결합과 세포외 기질의 형성을 촉진함으로써 조직의 섬유화에 관여하는 LoxL2 (Lysyl oxidase like protein 2) 단백질의 활성을 특이적으로 억제하고 이를 통해 섬유화의 진행을 효율적으로 차단하는 우수한 항섬유화 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 상기 화학식 1로 표시되는 인돌리진(indolizine) 유도체가 LoxL2와의 특이적인 결합을 통해 이의 활성을 저해하고, 조직 내 콜라겐의 생성 및 수축을 감소시키며 염증 반응을 유의하게 억제함으로써 다각적인 항섬유화 효능을 발휘한다는 사실을 발견하였다.

[0020]

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.

[0021]

본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 A_1 및 A_2 는 수소이다.

[0022]

본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 R_2 는 C_1 알킬이다.

[0023]

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-카보닐트릴”로써, 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.

[0024]

본 명세서에서 용어 “섬유증(fibrosis)”은 기관이나 조직 내 과도한 섬유성 연결조직이 형성되어 조직의 정상적인 구조와 기능이 손상되는 병적 상태를 의미한다. 섬유증은 콜라겐 섬유를 주성분으로 하는 세포외 기질(ECM)의 과잉 축적으로 조직이 경화되거나 반흔이 형성되는 만성적 및 진행성 질환인데, 이는 복잡한 세포, 세포외 기질, 사이토카인 및 성장 인자의 상호 작용을 통해 발달하며, 섬유아세포의 증식을 증가 및 사멸을 감소시킬 수 있다. 따라서, 섬유증의 병인(pathogenesis)을 제거하기 위해서는 섬유아세포의 증식, 콜라겐의 합성, 콜라겐의 수축 및 가교 형성이 차단되어야 한다.

[0025]

본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 섬유증은 폐섬유증, 간섬유증, 신장섬유증, 췌장섬유증, 종격섬유증, 골수섬유증, 후복막섬유증, 진행성 종괴성 섬유증, 신원성 전신섬유증, 피부경화증, 전신 경화증, 신경섬유종증 및 심근섬유증으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0026]

보다 구체적으로는, 상기 섬유증은 폐섬유증 또는 간섬유증이다.

[0027]

본 명세서에서 용어 “염증성 질환(inflammatory disease)”은 조직의 손상이나 병원균의 감염에 대한 반응으로서 염증성 사이토카인이나 염증 세포의 침투와 같은 염증 반응이 과도하게 활성화되는 질환을 포괄하는 의미이다. 후술하는 실시예에서 보는 바와 같이, 본 발명의 조성물은 조직의 염증 부위 및 염증 세포의 수를 현저히 감소시켜 염증 반응을 효율적으로 개선시키는 확인되었다. 이에, 본 발명의 조성물은 섬유화의 전단계로서의 염증 반응을 억제하여 섬유화의 진행을 차단함은 물론, 섬유화를 수반하지 않는 다양한 염증성 질환에 대한 치료 조성물로도 유용하게 이용될 수 있다.

[0028]

본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료될 수 있는 염증성 질환은 폐렴, 만성 폐쇄성폐질환, 특발성섬유성폐포염, 폐농양, 간염 및 간경변으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0029]

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.

[0030]

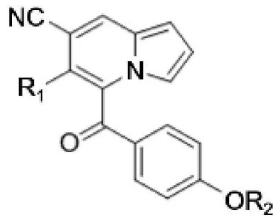
본 명세서에서 용어 “치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하면 종양의 발생,

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.

- [0031] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0032] 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.
- [0033] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한 없이 인간, 마우스, 랫트, 기니피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은 털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.
- [0034] 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.
- [0035] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다.
- [0036] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸셀룰로오스, 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.
- [0037] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 구체적으로는 경구, 정맥, 피하 또는 복강 투여될 수 있다.
- [0038] 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.
- [0039] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 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.
- [0040] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 LoxL2 (Lysyl oxidase like 2)의 활성을 억제한다.
- [0041] 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 콜라겐의 가교 결합과 세포외 기질의 과도한 형성으로 인한 섬유화의 진행 및 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.
- [0043] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능

한 염을 유효성분으로 포함하는 섬유증 또는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 기능성 식품 조성물을 제공한다:

화학식 1

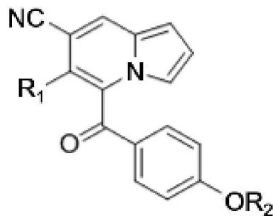


본 발명에서 이용되는 화학식 1 화합물 및 이를 이용하여 예방 또는 개선될 수 있는 섬유증 및 염증성 질환에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

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.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 콜라겐의 합성, 수축 또는 축적 억제용 기능성 식품 조성물을 제공한다:

화학식 1



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

본 발명에서 이용되는 화학식 1 화합물에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

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, 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

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 신규한 인돌리진 유도체 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 섬유증 또는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

(b) 본 발명의 인돌리진 유도체는 조직의 섬유화에 핵심적인 매개체로 알려진 LoxL2 효소의 활성을 현저히 억제함으로써 콜라겐의 합성 및 수축은 물론 섬유화의 전단계인 염증 반응을 차단함으로써 다양한 섬유증 질환에 대

한 효율적인 치료제 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0060]

도 1a는 #765의 농도 의존적으로 LoxL2 단백질의 효소 활성을 억제함을 보여주는 그래프이다. 도 1b는 #765와 LoxL2 단백질의 결합 여부를 DART (Drug affinity responsive target stability) 실험을 통해 확인한 결과를 보여준다.

도 2는 #765를 처리한 섬유세포에서 콜라겐 수축이 저해됨을 보여주는 그림이다.

도 3은 #765를 처리한 섬유세포에서 콜라겐 함량이 감소함을 보여주는 그림이다.

도 4는 마우스에서 #765의 투여를 통해 폐섬유화 증상이 억제되는 정도를 면역조직화학 분석을 통해 확인한 결과를 보여주는 그림이다.

도 5는 섬유화가 진행된 동물의 폐조직에서 LoxL2의 발현 수준이 증가하며, #765를 처리한 군에서는 증가된 LoxL2의 수준이 감소하는 것을 확인한 ELISA(도 5a), PCR(도 5b) 및 면역조직화학(도 5c)을 이용한 분석 결과를 각각 나타낸다.

도 6은 블레오마이신(bleomycin)을 처리한 폐섬유증 동물모델에서 폐섬유화가 유발되는 진행 과정을 CT로 촬영한 사진으로, #765를 처리한 군에서는 폐섬유화 현상이 유의하게 억제됨을 보여주고 있다.

도 7은 폐섬유화 유발 동물모델에서 #765를 처리하였을 때 섬유화 및 LoxL2 관련 유전자인 PDGFR, VEGF 및 α -SMA의 발현 양상을 보여주는 그림이다.

도 8는 TGF- β 의 과발현을 통해 폐섬유화가 유발된 마우스에 #765를 처리함으로써 폐섬유화 현상이 억제됨을 보여주는 그림이다.

도 9는 ConA의 혈관주사를 통해 간섬유화가 유도한 마우스에 #765를 처리할 경우 간에서의 섬유화 진행이 유의하게 억제됨을 보여주는 그림이다.

도 10은 간섬유화가 유도된 마우스에서 섬유화 관련 유전자인 TGF- α , TGF- β , FGF, LoxL2 및 α -SMA의 mRNA 발현 수준을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061]

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.

[0063]

실시예

[0064]

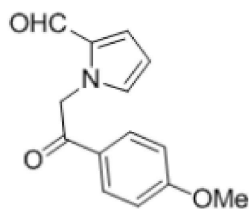
실시예 1: 화합물 #765의 합성

[0065]

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

[0066]

피롤-2-카르보알데하이드(300 mg, 3.155 mmol)를 CH₃CN(10 mL)에 녹이고, K₂CO₃(654 mg, 1.5 당량) 및 2-브로모-4'-메톡시아세토폰(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.

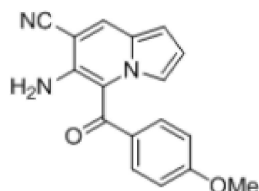


[0067]

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

[0070] 화합물 e (56 mg, 0.23 mmol)를 EtOH 2 ml에 녹이고, 피페리딘류 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 감압 농축 하여 얻은 잔사물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(헥산 : 에틸 아세테이트 : 디클로로메테인 = 10 : 1 : 2)로 정제하여 목적 화합물을 수득하였다.

[0071] 화학식 #765



[0072]

[0073] 오렌지색 고형물, mp: 131.4~132.2℃ (64.3 mg, 96%); $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) 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); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) 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 $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$ 229.1081 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), found 292.1076.

[0075] 실시예 2: #765의 농도에 따른 LoxL2 단백질의 효소활성 억제효과

[0076] LoxL2의 효소활성 측정 진단시약을 이용하여 #765에 의한 LoxL2의 효소 활성 억제 여부를 확인하고자 하였다. LoxL2 단백질(R&D, 2639-A0) 100 ng을 각 웰에 분주한 뒤, #765 화합물을 100, 10, 1 및 0.1 mM의 농도로 각각 첨가하였다. 용매는 DMSO를 사용하였고 #765 0.291 mg을 DMSO 100 μl 에 용해시켜 10 mM 농도의 저장액을 만들어 희석하여 사용하였다. 음성 배경(Negative background) 효과를 억제하기 위해 LoxL2를 용해시킨 용매에 DMSO만을 첨가한 웰도 추가함으로써 DMSO가 효소 활성에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 또한 pan-Lox 억제제로 잘 알려진 유기화합물 BAPN(β -아미노프로피오니트릴)을 양성 대조군으로 사용하였다. 효소억제실험은 lysyl oxidase 활성은 Abcam에서 나오는 Lysyl oxidase activity assay kit (ab112139, Abcam)를 사용하여 LoxL2가 생성하는 H_2O_2 의 억제정도를 측정하였다. 도 1에서 보는 바와 같이, #765는 농도 의존적으로 LoxL2의 효소 활성을 억제함을 확인할 수 있었다(도 1).

[0078] 실시예 3: #765와 LoxL2 단백질의 결합 여부 확인

[0079] 본 발명의 #765가 LoxL2의 효소활성을 억제하는 작용 메커니즘을 확인하기 위하여 LoxL2 단백질과 #765의 결합 여부를 DARTS (Drug affinity responsive target stability) 실험을 통하여 확인하였다. 100 ng의 LoxL2 단백질과 #765 화합물 100 μM , 10 μM 및 1 μM 을 각각 한 튜브에 넣고 저온에서(9℃) 90분 간 반응시킨 뒤, 1 μg 의 단백질 분해효소(protease, 5401119001, liberase TM, Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)를 첨가하여 37℃에서 20분간 추가 반응시켜 #765와 결합하지 않았을 것으로 예상되는 LoxL2 단백질이 상기 효소에 의해서 절단되도록 하였다. 반응 시간이 종료된 뒤, 각 튜브에 SDS 완충액을 첨가하여 추가 반응이 일어나지 않도록 반응을

중지시키고 100℃로 5분 간 끓여주었다. 이렇게 준비된 샘플을 이용하여 웨스턴 블롯팅으로 단백질을 크기별로 분리하여 LoxL2가 잘려진 정도를 확인한 결과를 도 1b에 나타내었으며, 이를 통해 #765와 LoxL2 단백질이 직접적으로 결합하여 단백질의 활성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

[0081] 실시예 4: #765에 의한 섬유아세포에서의 콜라겐 수축 저해

[0082] 섬유세포에서 분비하는 LoxL2에 의해 촉발되는 콜라겐 가교(cross-linking) 작용이 #765의 처리에 의해 억제됨으로써 콜라겐의 수축이 억제될 수 있는지를 확인하기 위하여 콜라겐 수축 실험을 마우스 폐 섬유아세포(도 2a) 및 인간 섬유아세포 유래의 MRC5 세포(도 2b)를 이용하여 각각 진행하였다. #765를 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 4×10^5 세포를 콜라겐과 함께 분주하였다. 콜라겐이 굳은 뒤 #765를 농도별로 1 mM, 0.1 mM 및 0.01 mM을 각각 첨가하고 그 위에 TGF- β 1을 1 ng 첨가하여 이틀간 배양함으로써 콜라겐 수축을 유도하였다. #765 화합물을 1 mM 첨가 시 콜라겐 수축이 95% 이상 억제됨을 확인하였으며, 양성 대조군인 BAPN의 경우 #765보다 억제 효과가 낮거나 거의 없음을 확인하였다(도 2c).

[0084] 실시예 5: #765에 의한 섬유아세포에서의 콜라겐 함량 감소

[0085] #765가 콜라겐 가교 형성을 억제할 뿐 아니라 섬유아세포에서 형성되는 콜라겐의 양에 영향을 끼치는지 확인하기 위해 #765를 세포 배양매지에 농도별로 첨가한 뒤 배지에서 마우스 섬유아세포인 NIH3T3 세포를 배양하였다. 1×10^6 의 NIH3T3 세포를 6-웰에 플레이팅하고 하루 뒤 각 웰에 1 ng의 TGF- β 1과 10 uM, 1 μ M 및 0.1 M의 #765 화합물을 첨가하고 양성 대조군으로 같은 농도의 BAPN을 첨가하였다. 섬유아세포는 6일간 배양 후 각 세포 내에서 TGF- β 1의 반응에 의하여 새로 합성된 콜라겐 양을 sircol 어세이로 측정하였다. 마우스 섬유아세포인 NIH3T3와 인간 섬유아세포인 MRC5 세포를 사용하여 확인한 결과 #765를 처리할 경우 콜라겐 함량이 줄어드는 것을 확인할 수 있었고, BAPN의 경우 높은 농도에서 #765보다 콜라겐 합성을 억제하지만, 낮은 농도에서는 그렇지 못하는 것을 확인하였다.

[0087] 실시예 6. 폐섬유화 유도 동물 모델에서 #765에 의한 폐섬유화 억제 효과

[0088] C57BL/6 수컷 마우스를 이용하여 0.05 U/mouse로 블레오마이신을 기관삽관으로 투여하여 폐섬유화를 유발하였다. 체내 주입용 약물의 경우 피넛 오일에 지정된 용량의 약물을 넣어 실온에서 30분간 초음파 처리하였다. 이때 초음파 처리기 내부의 온도가 실온 혹은 그 이상이어야 약물이 잘 용해되므로 내부의 온도가 내려가지 않도록 주의하였다. 약물을 투여한 그룹의 경우 블레오마이신을 투여하기 하루 전부터 1 mg/kg, 10 mg/kg와 30 mg/kg의 농도의 약물을 투여하는 세 그룹으로 나누어 100 μ l씩 구강으로 주 5회 투여하였다. 폐섬유화를 유발한 뒤 14일째 되는 날 각각의 마우스에서 기관지폐포 세척(bronchoalveolar lavage (BAL) washing)을 하여 염증세포의 수를 측정하고, 폐를 적출하여 폐섬유화 정도를 조직화학염색을 통해 확인하였다. 폐섬유화를 유도한 그룹의 경우 체중 손실이 많이 일어나고 BAL fluid에 모여든 염증 세포의 수가 많고 다양하였으나, #765를 투여한 그룹의 경우 체중 손실의 정도가 덜했으며 염증세포의 침윤도 적게 관찰되었다. 특히, 10 mg/kg 이상의 #765를 투여한 그룹에서는 염증의 정도가 현저히 줄어드는 효과를 보였다(도 4a 및 4b). 또한 폐섬유화가 유발된 그룹은 콜라겐이 증가한 반면 #765를 투여한 그룹은 섬유화 진행이 경미하거나 거의 없는 것으로 나타났고 염증부위도 더 적음을 확인하였다(도 4c). 이들 결과를 통해 #765 화합물이 인 비보에서도 폐섬유화를 유의하게 억제할 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0090] 실시예 7: 폐섬유화 유도 동물모델에서 #765 처리에 의한 LoxL2 수준 변화

[0091] 인간 폐섬유증에서는 증상이 심할수록 분비성 LoxL2의 수준이 증가하므로, 본 발명자들은 폐섬유화가 진행된 동물모델에서 #765의 투여가 폐조직에서 LoxL2의 수준에 영향을 끼치는지 확인하고자 하였다. 마우스 폐에서 LoxL2의 수준을 ELISA(도 5a), PCR(도 5b)을 이용하여 확인한 결과, 폐섬유화가 진행된 마우스의 경우 폐의 LoxL2 수준이 높게 나타나는 반면, #765를 투여한 그룹에서 LoxL2 수준이 증가하지 않음을 확인하였다. 폐조직은 포르말데하이드로 고정 후 파라핀에 담궈 굳힌 후 두께 0.5 μ m로 자른 뒤 슬라이드에 옮겼다. 조직을 올린 슬라이드는 이후 파라핀을 제거하고 항-LoxL2 항체(santa cruz biotechnology, inc. 1:100)를 사용하여 폐조직

에서 LoxL2의 발현 정도를 면역조직화학법으로 확인하였다. 도 5c에서 보는 바와 같이 LoxL2가 갈색으로 염색된 결과를 얻을 수 있었다. 그 결과 블레오마이신을 투여한 마우스(0 mg)에서 LoxL2의 발현이 강하게 나타나고 있었고 #765를 투여한 그룹에서는 투여한 약물의 양이 늘어날수록 LoxL2의 발현이 줄어드는 것을 확인하였다. 위 세 가지 실험을 통해 #765가 마우스에서 LoxL2를 용량 의존적으로 감소시키는 효과를 보이는 것으로 나타났다.

[0093] 실시예 8: 블레오마이신 처리에 의한 폐섬유화 진행 과정

[0094] 섬유화는 염증 단계와 섬유화 단계의 두 단계로 이루어진다. 본 발명의 화합물을 투여한 마우스에서 폐섬유화가 억제되는 현상이 염증 반응의 억제에 따른 것인지 혹은 섬유화 억제와 무관하게 염증 반응은 영향을 받지 않는 지 여부를 확인하기 위하여, 블레오마이신 투여로 폐섬유화가 유도된 마우스는 매주 1회 호흡 마취하여 동물용 micro CT (NFR Polaris-G90, NanoFocusRay, 대한민국)를 이용하여 섬유화진행과정을 관찰하였다. 그 결과, 도 6에서 보는 바와 같이 #765를 처리한 그룹에서는 흰색으로 보이는 섬유화 부위가 처음부터 생성되지 않거나 적게 보이는 수준임을 알 수 있었다. 따라서 블레오마이신을 통해 인위적으로 섬유화를 유도한 동물모델에 #765를 투여할 경우 초기 염증 반응을 억제하여 섬유화를 저해하는 것임을 알 수 있었다. 이에, 본 발명의 #765 화합물은 동물에서 폐섬유화를 유도한 모델에서 항염증 및 항섬유화의 두 가지 효과를 동시에 발휘할 것으로 기대한다.

[0096] 실시예 9: 폐섬유화 유도 동물모델에서 #765 처리에 의한 섬유화 및 LoxL2 관련 유전자의 발현 변화

[0097] 섬유화의 진행과 함께 발현이 증가하는 TGF- β 1이 #765를 처리한 그룹에서 분비가 억제됨을 ELISA (R&D system, Minneapolis, MN, USA) 실험으로 확인하였고, mRNA의 발현이 감소되었음을 PCR로 재확인하였다. 또한, 다른 섬유화 관련 유전자(PDGFR, VEGF, α -SMA) 역시 블레오마이신 처리에 의해 증가하였으나, 하기 표 1의 프라이머를 이용한 PCR 수행 결과 #765를 처리한 그룹에서는 이들 유전자가 증가하지 않음을 확인하였다(도 7). 이에 본 발명의 #765가 조직 내 섬유화를 전반적, 다각적으로 억제하고 있음을 확인하였다.

표 1

PCR에 사용된 프라이머 서열

타겟 유전자	프라이머 서열
TGF- β 1	CAG CTG TAC ATT GAC TTC C
	CAC GTA GTA CAC GTA GGG CA
PDGFR- β	CAT CAT GAG GGA CTC AAA CT-
	GAT GGC ATT GTA GAA CTG GT
α -SMA	GTG ACT ACT GCC GAG CGT G
	ATA GGT GGT TTC GTG GAT GC
FGF2	CGA CCC ACA CGT CAA ACT AC
	CAG CTC TTA GCA GAC ATT GGA A
VEGF	CAC TGG ACC CTG GCT TTA CT
	GGT GAT GTT GCT CTC TGA CG

[0100] 실시예 10: TGF- β 형질전환 마우스에서 #765의 섬유화억제 효능

[0101] Dox(Doxycycline)-유도 TGF- β 형질전환(transgenic, TG) 마우스의 경우, Dox를 처리할 경우 폐에 존재하는 club cell에서 TGF- β 가 과발현하여 폐조직에서 섬유화 현상이 유발하도록 만든 마우스다. Dox 0.5 mg/ml을 식수에 용해시킨 뒤 수크로스를 5%가 되도록 녹여 4주간 마우스가 자유롭게 음용할 수 있도록 하여 폐내에 TGF- β 신호를 증가시켜 폐섬유화를 유도하였다. 동시에 약물 투여하는 형질전환 마우스군에는 #765를 1개월간 구강 투여하면서 Dox가 들어있는 식수를 제공하여 폐섬유화를 유도하였다. 폐세척액을 얻어 원심분리하여 세포들을 분리한 뒤 폐로 이동해 온 염증 세포의 수를 측정하여 구분하였다(도 8a). 폐세척액과 폐조직을 분리하여 각각에 존재하는 콜라겐의 양을 sircol 어세이를 통해 측정하였다(도 8b). 염증 부위의 증가 및 폐조직에 존재하는 콜라겐 부위의 증가 정도는 파라핀에 포매한 폐조직을 잘라만든 슬라이드를 이용하여 메이슨 트리크롬 염색을 통해 콜라겐을 염색하였다. 도 8c에서 보는 바와 같이, 핵은 보라색, 사이토졸은 붉은색, 콜라겐은 파랑색으로

염색된 것을 확인 할 수 있다. 각각의 결과, Dox만 처리한 실험군에서 섬유화가 잘 유도되어 있는 것을 확인하였고, Dox와 #765를 함께 처리한 실험군에서는 섬유화가 현저히 억제됨을 확인하였으며 염증세포의 침습 또한 현저히 감소하고 있고 콜라겐 생성도 줄어들어 있음을 확인하였다. 또한 독시사이클린으로 유도하는 TGF- β 1의 분비가 #765를 처리한 그룹에서 줄어들고 있는 것도 확인하여 #765가 TGF- β 1이 유발하는 섬유화를 억제할 수 있는 것을 확인하였다. 더욱이 블레오마이신으로 유도된 섬유증 모델의 경우 #765약물의 투여 농도가 10 mg/kg에서 섬유화 억제효과가 나타났으나, TGF- β TG 마우스의 경우 투여농도 1 mg/kg 에서도 확인한 섬유화 억제 효과가 나타났다.

[0103] 실시예 11: 간섬유화 모델에서의 #765의 섬유화 억제 효능 검증

[0104] 폐섬유화 뿐만 아니라 간섬유화증 동물모델에서도 #765가 항섬유화 효과를 가지는지를 검증하기 위해 ConA (12.5 mg/kg)를 주 1회씩 6주간 혈관 주사하여 간섬유화증을 유발하고 동시에 분량의 #765를 매일 경구 투여하여 섬유화증의 완화정도를 확인 하였다. 마우스에서 conA로 간 섬유화를 유발한 뒤 1주차(도 9a)와 6주차(도 9b)에 간 손상의 지표인 GOT/GPT/ALP (glutamic oxalacetic transaminase/glutamic pyruvate transaminase/alkaline phosphatase) 분석을 수행하였다.(Cho JJ et al. *GASTROENTEROLOGY* 118:1169-1178(2000); Kiminori K et al. *Inter. Immunol.* 11(9):1419-1500(1999)) 그 결과, 10 mg/kg 및 30 mg/kg의 #765를 투여한 그룹에서 간 염증 수치가 유의하게 감소하였다. 또한 약물을 투여한 그룹이 미투여 그룹에 비해 섬유화 된 영역이 적게 나타나 섬유화의 정도가 훨씬 덜함을 알 수 있었다(도 9c). 나아가 간 섬유화증과 관련된 단백질들의 발현 여부를 하기 표 2의 프라이머를 이용하여 PCR 분석을 통해 확인한 결과 TGF- α , TGF- β , FGF, LoxL2, α -SMA의 발현 수준이 약물을 처리한 그룹에서 증가하지 않는 것을 확인하였다(도 10). 따라서 본 발명의 #765 화합물이 폐조직에서 섬유화 현상을 억제한 것과 같이 간 조직에서도 염증 및 섬유화의 개선에 유익한 효과를 보이는 것으로 나타났다.

표 2

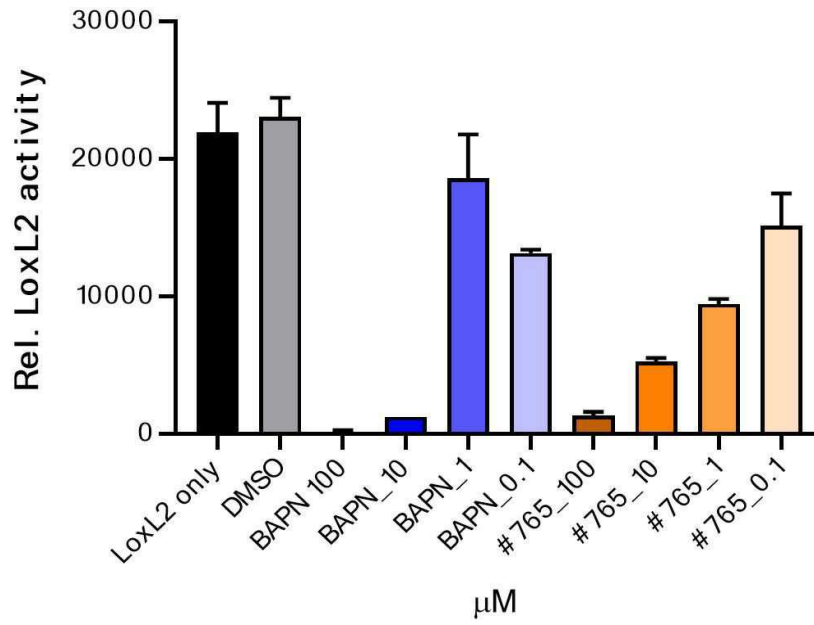
[0105] 간섬유증 관련 인자들의 PCR에 사용된 프라이머 서열

타겟 유전자	프라이머 서열
TGF- α	TGC CCA GAT TCC CAC ACT
	TGG ATC AGC ACA CAG GTG
aFGF	CGG GGG CCA CTT CTT GAG GA
	ACC GGG AGG GGC AGA AAC AA
LoxL2	CGATGTGGTCAAGATCCAGGT
	TGGCCTCTACATAGCCCACTT
TGF- β 1	CAG CTG TAC ATT GAC TTC C
	CAC GTA GTA CAC GTA GGG CA
α -SMA	GTG ACT ACT GCC GAG CGT G
	ATA GGT GGT TTC GTG GAT GC

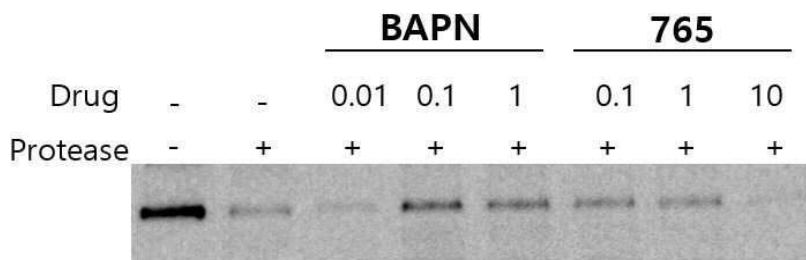
[0107] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

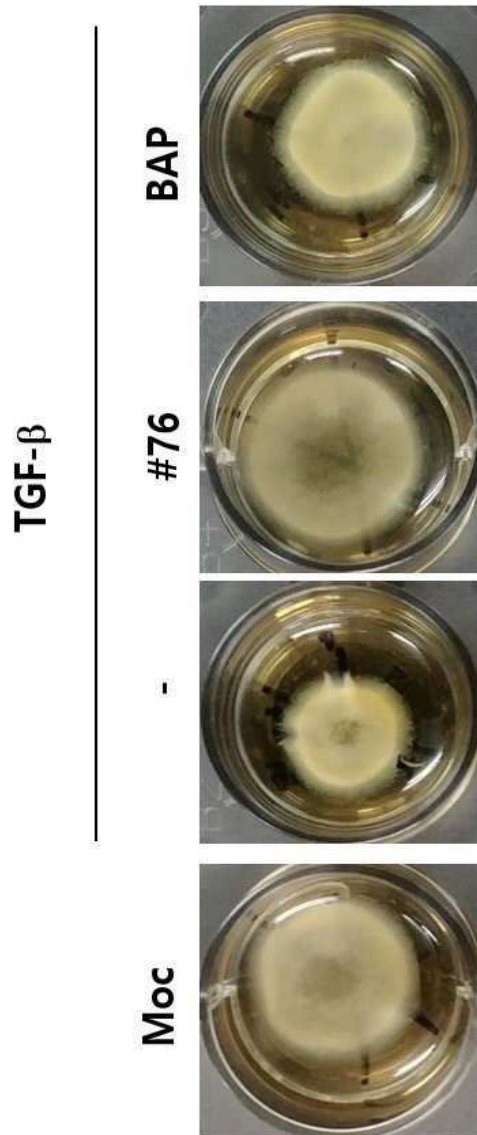
도면1a



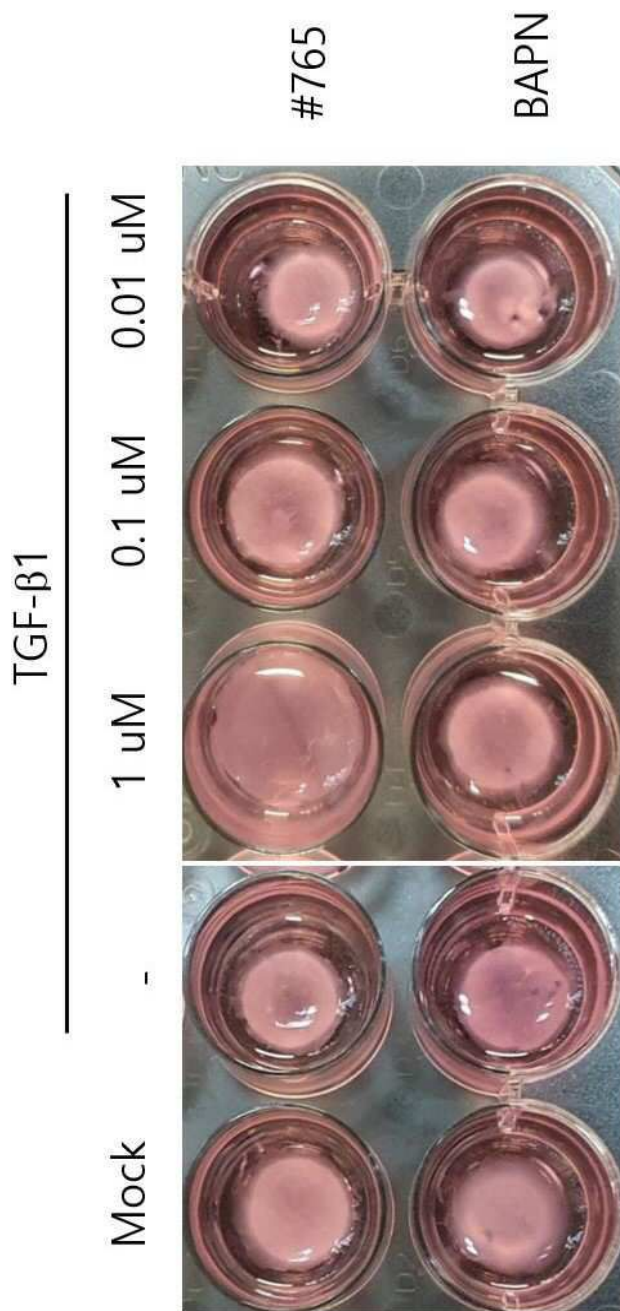
도면1b



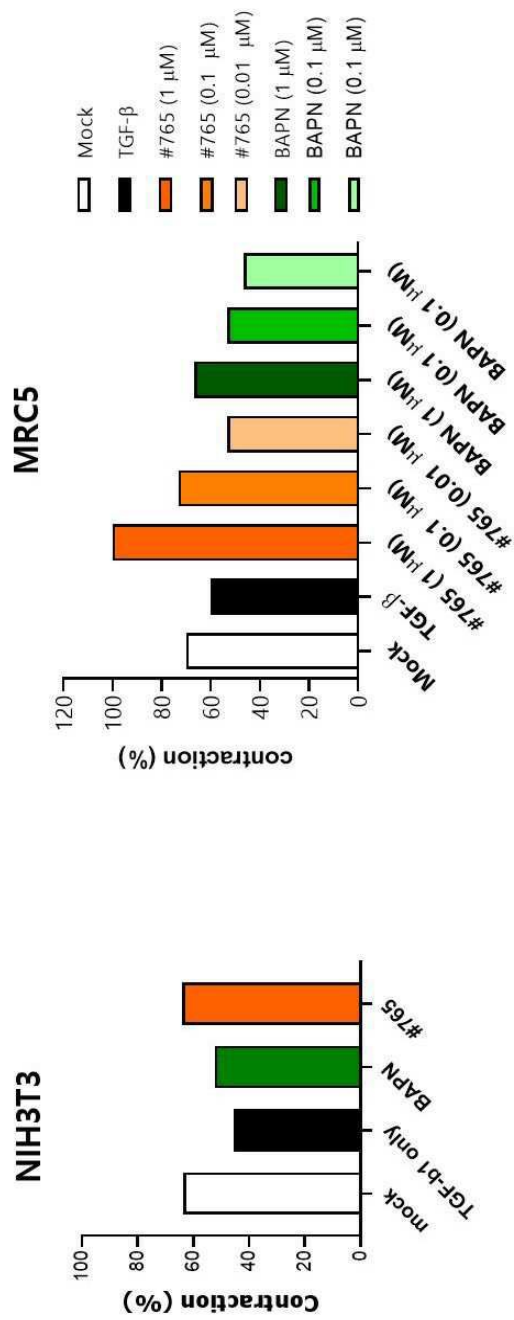
도면2a



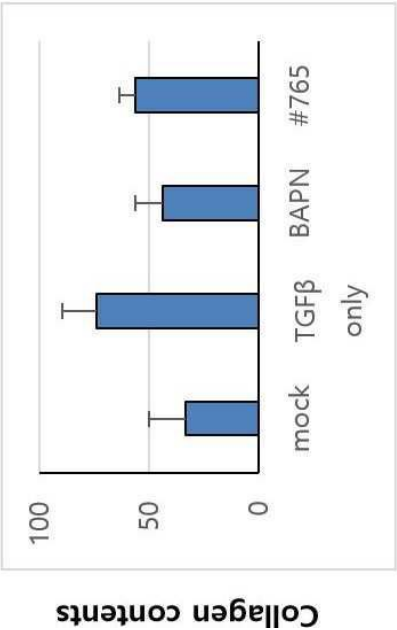
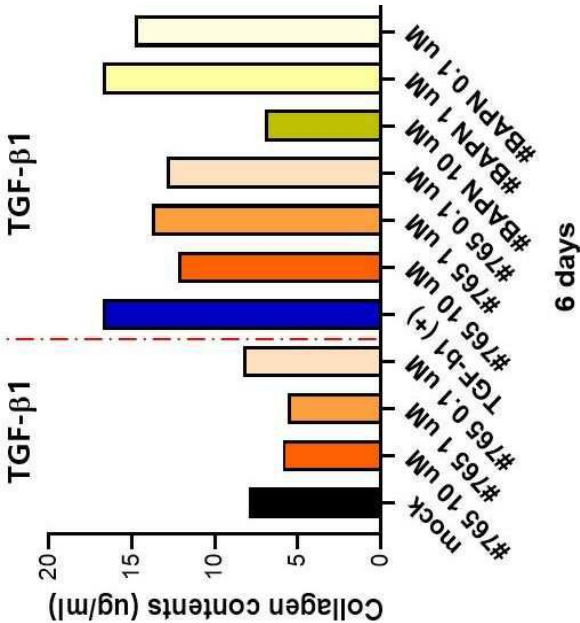
도면2b



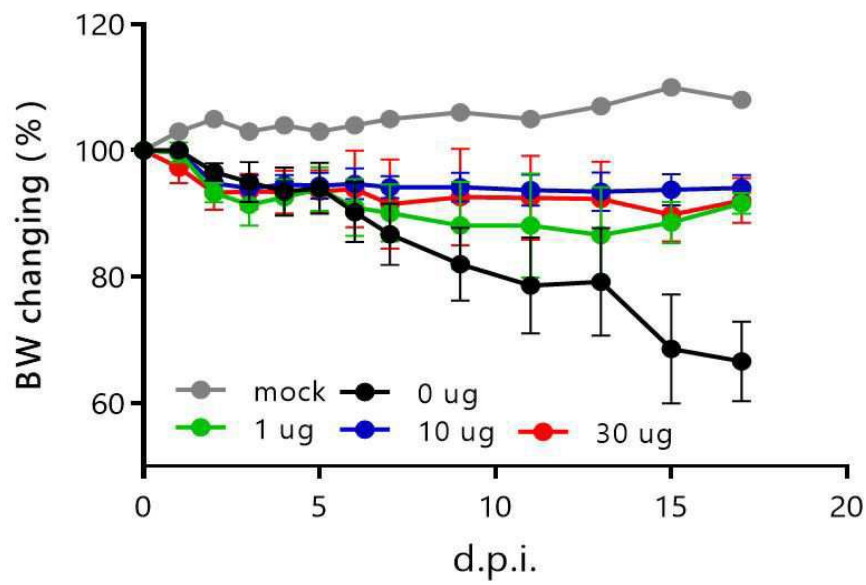
도면2c



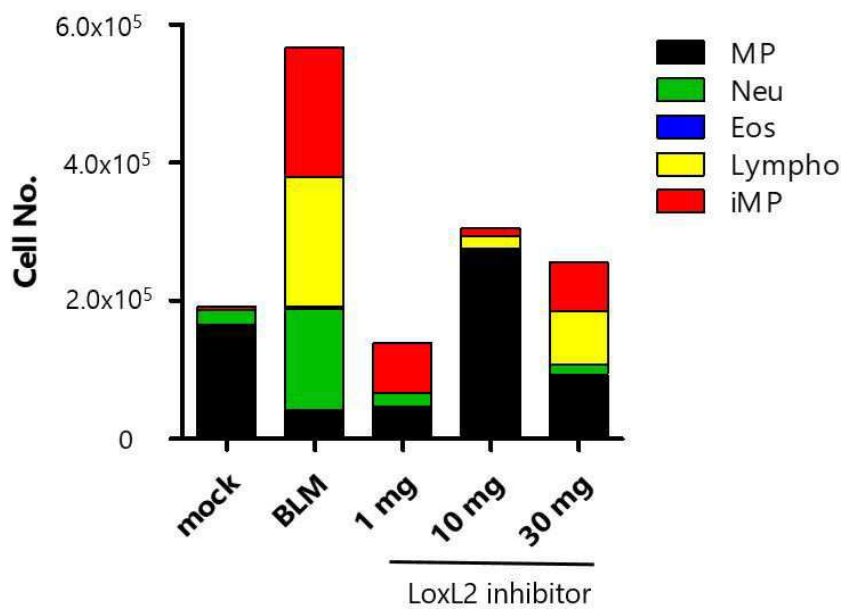
도면3



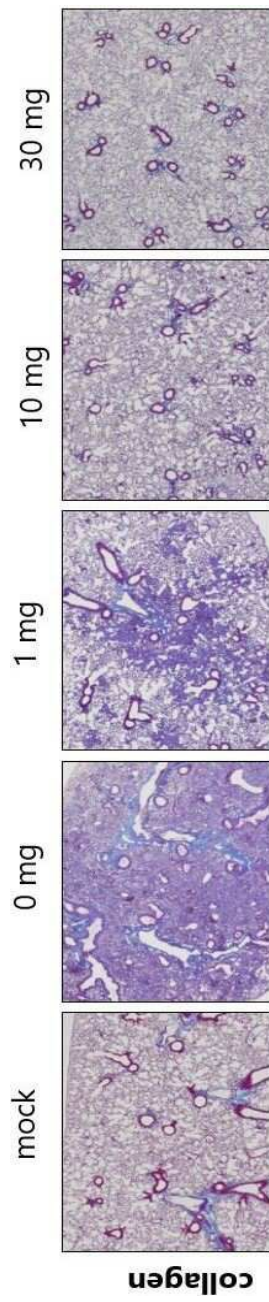
도면4a



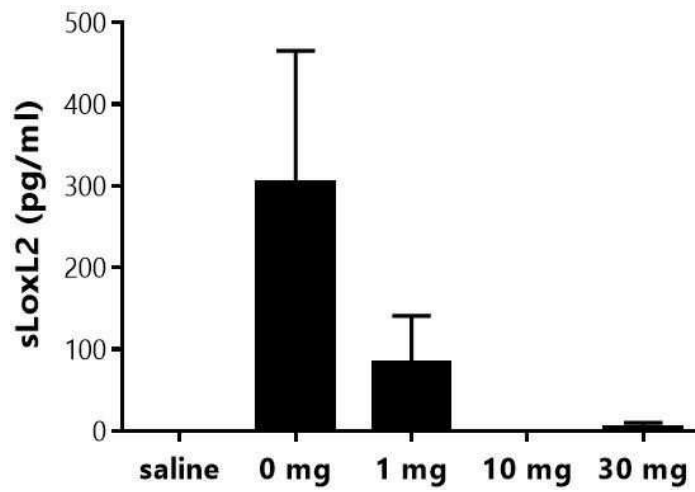
도면4b



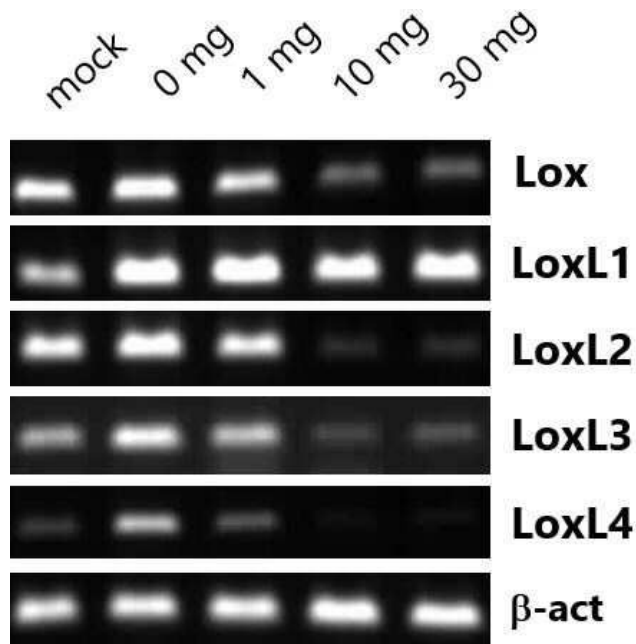
도면4c



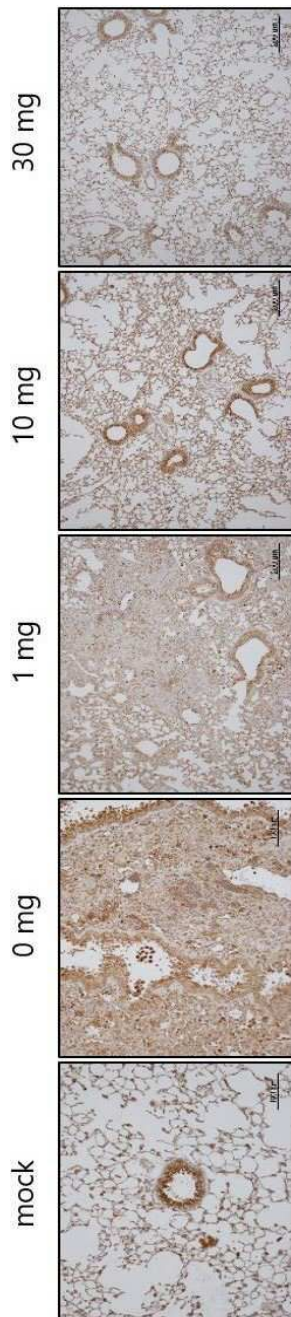
도면5a



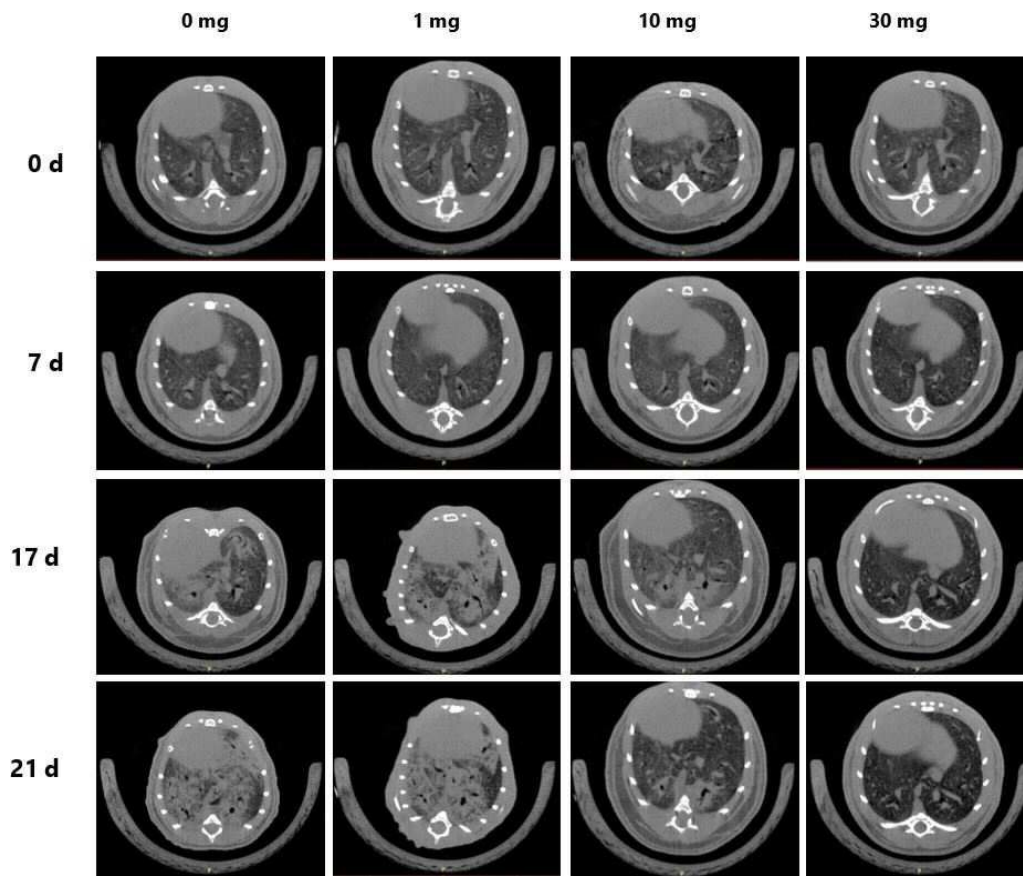
도면5b



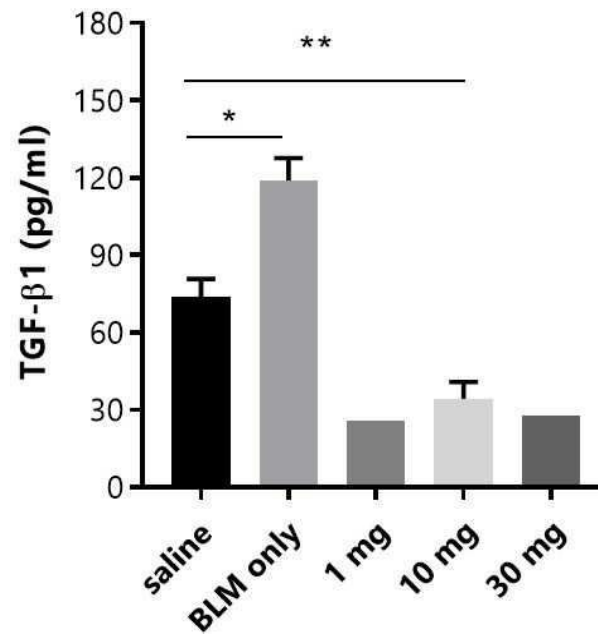
도면5c



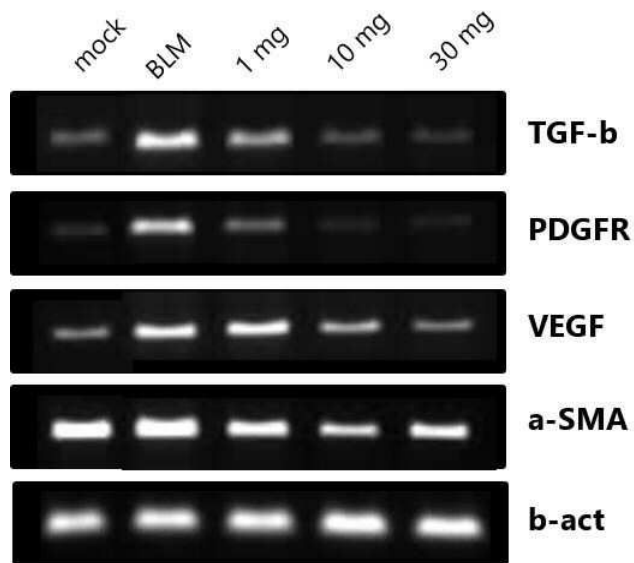
도면6



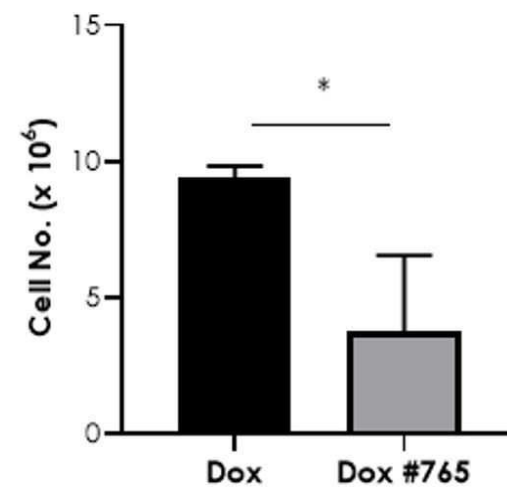
도면7a



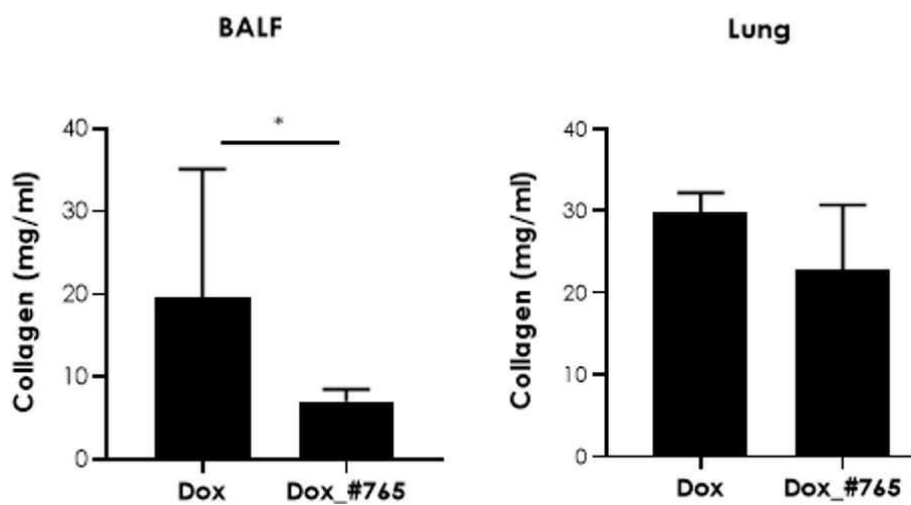
도면7b



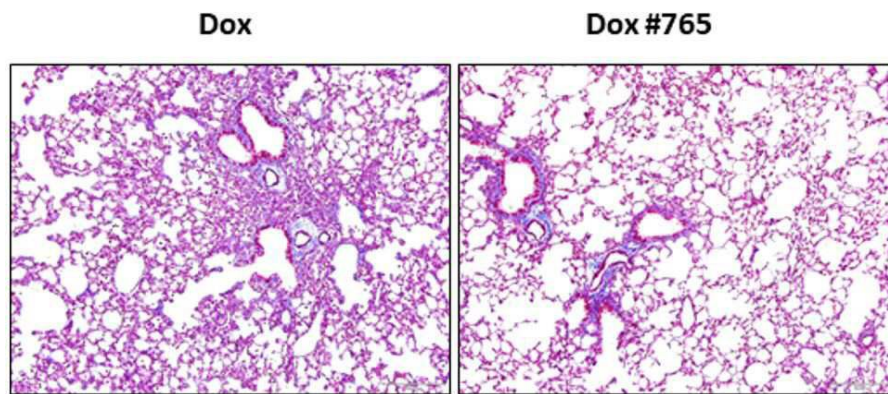
도면8a



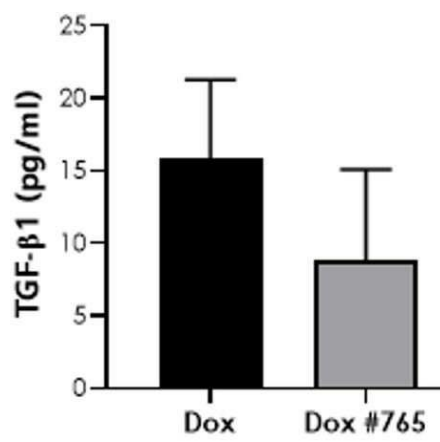
도면8b



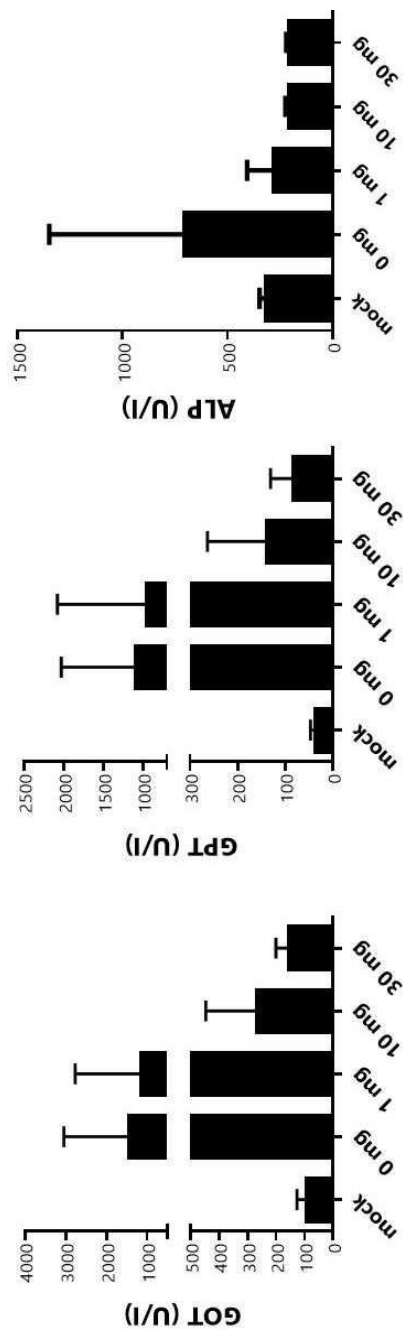
도면8c



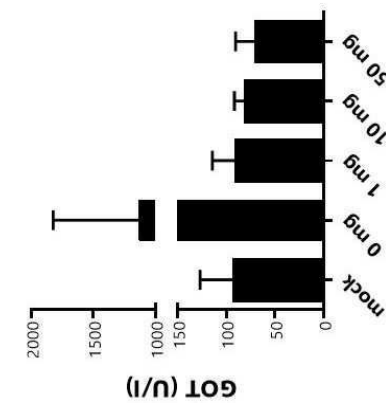
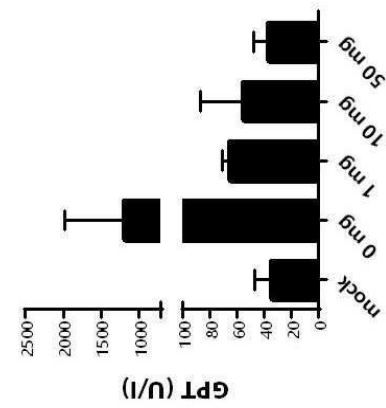
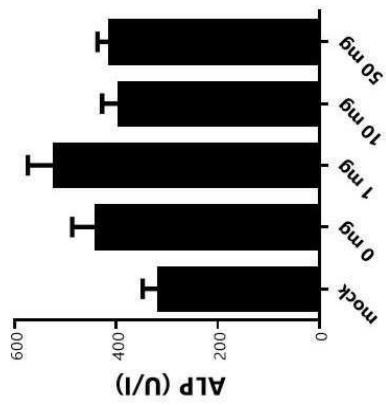
도면8d



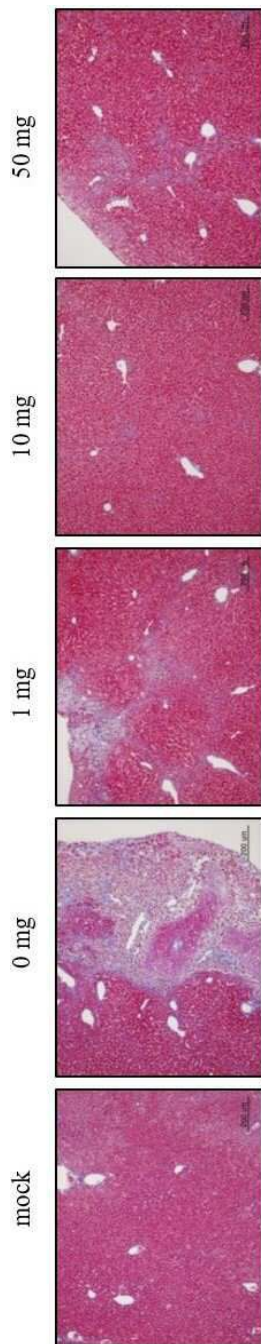
도면9a



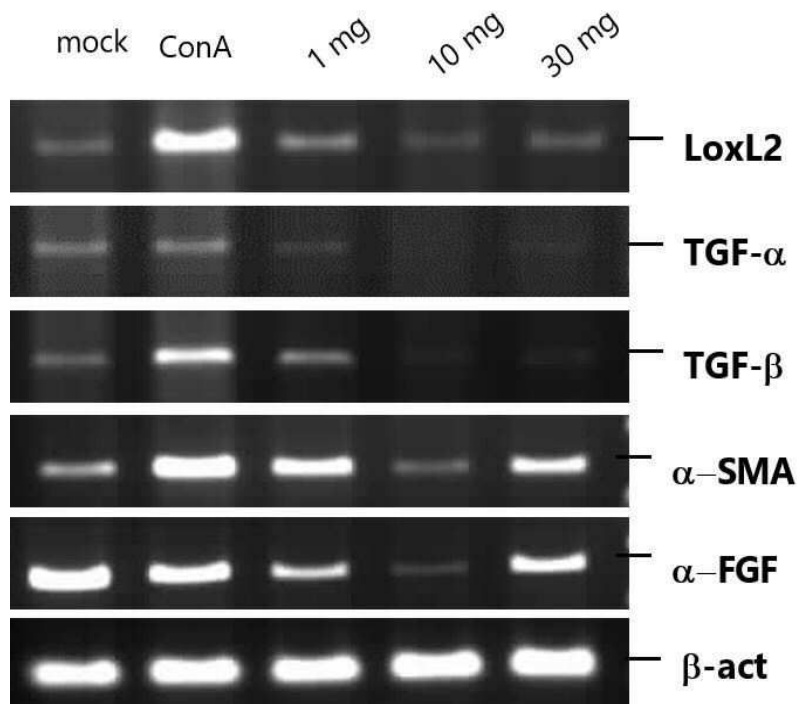
도면9b



도면9c



도면10



서열 목록

- <110> Industry-academic cooperation foundation yonsei university
- <120> Novel Indolizine Derivatives and A Composition for Treating or Preventing Fibrosis Comprising the Same
- <130> HPC-9794
- <160> 16
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> TGF- β 1 F primer
- <400> 1
- cagctgtaca ttgacttcc
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> TGF- β 1 R primer

<400>	2	
cacgtagtac acgtaggga		20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PDGFR-beta F primer	
<400>	3	
catcatgagg gactcaaact		20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	PDGFR-beta R primer	
<400>	4	
gatggcattg tagaactggt		20
<210>	5	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	a-SMA F primer	
<400>	5	
gtgactactg ccgagcgtg		19
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	a-SMA R primer	
<400>	6	
ataggtggtt tcgtggatgc		20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> FGF2 F primer

<400> 7

cgaccacac gtcaactac

20

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF2 R primer

<400> 8

cagctcttag cagacattgg aa

22

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VEGF F primer

<400> 9

cactggaccc tggttttact

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VEGF R primer

<400> 10

ggtgatgttg ctcttgacg

20

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TGF-α F primer

<400> 11

tgcccagatt cccacact

18

<210> 12

<211> 18

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TGF-a R primer	
<400>	12	
	tggatcagca cacaggtg	18
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	aFGF F primer	
<400>	13	
	cgggggccac ttcttgagga	20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	aFGF R primer	
<400>	14	
	accgggaggg gcagaaacaa	20
<210>	15	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	LoxL2 F primer	
<400>	15	
	cgatgtggtc aagatccagg t	21
<210>	16	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	LoxL2 R primer	
<400>	16	
	tggcctctac atagcccact t	21