



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0045870
(43) 공개일자 2018년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/16 (2006.01) A61K 31/167 (2006.01)
A61K 31/343 (2006.01) A61K 31/4184 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01) A61K 9/20 (2006.01)
A61K 9/48 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/16 (2013.01)
A61K 31/167 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0012090(분할)

(22) 출원일자 2018년01월31일

심사청구일자 없음

(62) 원출원 특허 10-2016-0140268

원출원일자 2016년10월26일

심사청구일자 2016년10월26일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

송시영

서울특별시 마포구 백범로 205, 104동 1106호 (신공덕동, 마포펜트하우스)

정다운

서울특별시 마포구 월드컵북로 501, 916동 601호 (상암동, 상암월드컵파크9단지)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이재영

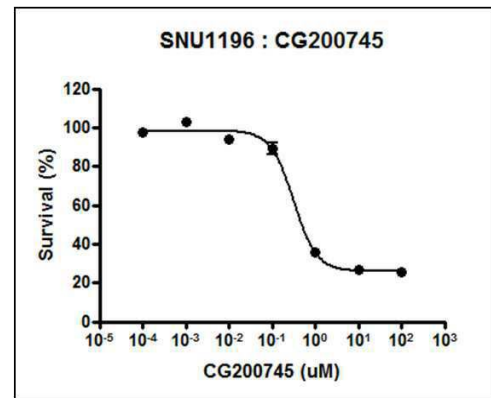
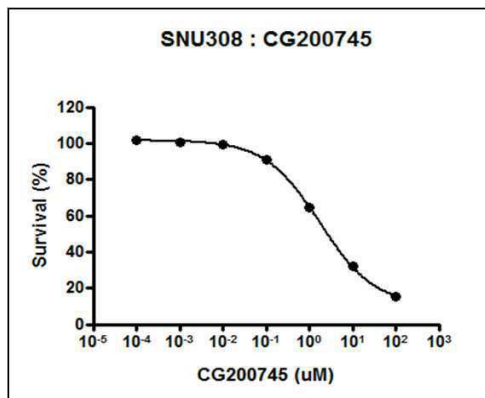
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 담도암 및 담낭암의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 히스톤 탈아세틸화 저해제(Histone deacetylation inhibitor)를 이용한 담도암 및/또는 담낭암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 암 세포의 증식을 효과적으로 억제하여 상기 암을 예방 및/또는 치료하는데 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/343 (2013.01)

A61K 31/4184 (2013.01)

A61K 31/505 (2013.01)

A61K 9/20 (2013.01)

A61K 9/48 (2013.01)

(72) 발명자

박수빈

서울특별시 마포구 월드컵로34길 13, 1동 1316호
(성산동)

김선아

서울특별시 구로구 고척로10길 7-5, 402호 (오류동, LG아트빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI14C1324

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 연구중심병원 육성 R&D

연구과제명 글로벌 의료수요 해결을 위한 전략적 기술통합의 개방형 연구 비즈니스 플랫폼 구축

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2014.10.01 ~ 2023.03.31

명세서

청구범위

청구항 1

히스톤 탈아세틸화 저해제(Histone deacetylation inhibitor)를 유효성분으로 포함하는, 담도암 및 담낭암 중 어느 하나 이상의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 히스톤 탈아세틸화 저해제는 (E)-N1-(3-(다이메틸아미노)프로필)-N8-하이드록시-2-((나프탈렌-1-일옥시)메틸)옥트-2-에네디아마이드((E)-N1-(3-(dimethylamino)propyl)-N8-hydroxy-2-((naphthalen-1-yloxy)methyl)oct-2-enediamide)인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물:

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 담도암 및 담낭암 중 어느 하나 이상의 성장을 억제하는 것인, 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 담도암의 성장을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 히스톤 탈아세틸화 저해제는 HDAC(Histone Deacetylases) 동질효소(isozyme)인 HDAC 3, HDAC4 및 HDAC7으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 발현을 저해하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 히스톤 탈아세틸화 저해제는 다중 약물 저항성 단백질 3(multi-drug resistance protein 3; MRP3) 및 다중 약물 저항성 단백질 4(multi-drug resistance protein 4; MRP4) 중 어느 하나 이상의 발현을 저해하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는, 약학 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 담도암 및 담낭암 중 어느 하나 이상의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게

는 히스톤 탈아세틸화 저해제(Histone Deacetylation Inhibitor)를 유효성분으로 포함하는 담도암 및 담낭암 중 어느 하나 이상의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 담도암은 간의 담관에 생기는 암으로 간암과 같은 줄기세포에서 발생하는 것으로 알려져 있다(Sell and Dunsford Am J. Pathol. 134:1347-1363, 1989). 세계적으로 담도암의 발생빈도는 간암에 비해 훨씬 낮으나, 동남아시아에서의 발생빈도는 유럽이나 북아메리카 보다 높은 비율로 나타난다. 담도암은 높은 재발률 때문에 외과적 절제술이 효과적이지 않고, 일반적인 화학요법이나 방사선요법도 효과가 좋지 않다는 특징이 있다(Pederson et al Cancer Res. 4325-4332, 1997).
- [0004] 또한, 담낭암은 담낭에서 생기는 암세포로 이루어진 종괴로, 담낭 세포에서 발생하는 선암종이 거의 대부분을 차지하고 있어 일반적으로 담낭암이라고 하면 담낭 선암종을 의미한다. 발생 기전은 아직 명확하게 규명되어 있지 않지만, 위험 인자로는 담석과 만성 담낭염, 췌담관 합류 이상, 석회화 담낭(porcelain gallbladder), 장티푸스 보균자 등이 제시되고 있다.
- [0005] 암 치료 분야에서의 발전에도 불구하고, 현재 담도암 및/또는 담낭암의 치료제에 대한 보고는 미흡한 편이다. 따라서, 외과적 치료 이외의 담도암 치료의 효과적인 화학적 치료제의 개발이 시급한 실정이지만, 아직 효과적인 치료법이 개발되지 않아서, 이에 대한 연구와 개발이 요구되는 실정이다.
- [0006] 한편, 히스톤 단백질은 5가지 유형(H1, H2A, H2B, H3 및 H4)으로 알려져 있다. 히스톤 H2A, H2B, H3 및 H4는 뉴클레오솜에서 발견되고, H1은 뉴클레오솜들 사이에 위치한 링커이다. 각 뉴클레오솜은 그 핵심 내의 각 히스톤형들 중, 뉴클레오솜 구조의 외부 부분에만 존재하는 H1를 제외한 2가지를 함유한다. 히스톤 단백질이 과아세틸화(Hypoacetylation)될 때, DNA 포스페이트(phosphate) 골격에 대한 히스톤의 더 큰 친화성이 있는 것으로 보고되어 있다. 상기 친화성은 DNA가 단단히 결합되도록 할 뿐만 아니라, DNA가 전사적 조절 요소 및 기구로써 이용이 불가능 하도록 하는 역할을 한다고 알려져 있다. 히스톤 단백질의 아세틸화(acetylation)의 조절은, 히스톤 아세틸 트랜스퍼라제(Histone acetyl transferase: HAT) 및 히스톤 디아세틸라제(Histone deacetylase: HDAC) 간의 활성의 균형을 통해 일어난다. HDAC은 크로마틴 핵심 히스톤의 아세틸기 제거를 촉매 하도록 하여, 과아세틸화된 상태를 형성하고, 이를 통해 DNA 전사를 억제하는 것으로 보고되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명의 일 목적은 담도암 및/또는 담낭암 세포의 증식을 효과적으로 억제하여 상기 암을 예방 및/또는 치료할 수 있는 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명자들은 연구 결과, 히스톤 탈아세틸화 저해제(Histone deacetylation inhibitor) 계열 화합물인 (E)-N1-(3-(다이메틸아미노)프로필)-N8-하이드록시-2-((나프탈렌-1-일옥시)메틸)옥트-2-에네디아마이드 ((E)-N1-(3-(dimethylamino)propyl)-N8-hydroxy-2-((naphthalen-1-yloxy)methyl)oct-2-enediamide)를 사용하는 경우, 담도암 및/또는 담낭암 세포의 증식을 효과적으로 억제하고, 상기 암 세포의 세포사멸을 유도함으로써 상기 암을 예방 및/또는 치료할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0012] 단, 본 발명에서 상기 “히스톤 탈아세틸화 저해제(Histone Deacetylation Inhibitor)”란 유전자 발현 조절 기작에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 히스톤 탈아세틸화효소(Histone deacetylase; HDAC)의 활성을 저해하는 것으로, 히스톤의 과아세틸화(Hypoacetylation)와 이에 따른 유전자 발현의 변화를 유도한다. 상기 HDAC 저해제는 a)금속(특히, 아연)과 결합 가능한 영역(domain), b) 상기 HDAC의 채널을 채울 수 있는 링커(linker),

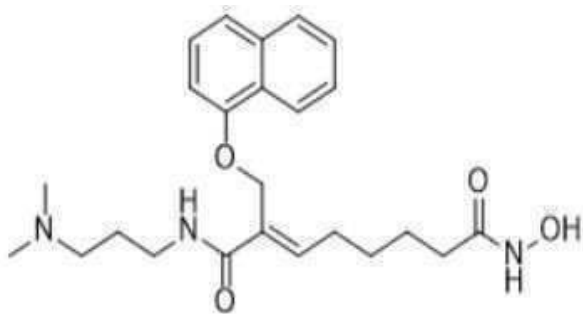
및 c) HDAC 활성 영역의 가장자리에서 구조체들과 상호 작용할 수 있는 표면 인지 영역의 구조적인 특징을 갖고 있다(J. Med. Chem., 2003, 46(24), 5097-5116).

[0013]

구체적으로, 본 발명은 히스톤 탈아세틸화 저해제 화합물을 유효성분으로 포함하는 담도암 및/또는 담낭암의 예방 및/또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 바람직하게는 상기 히스톤 탈아세틸화 저해제는 하기 화학식 1로 표시되는 (E)-N1-(3-(다이메틸아미노)프로필)-N8-하이드록시-2-((나프탈렌-1-일옥시)메틸)옥트-2-에네디아마이드 ((E)-N1-(3-(dimethylamino)propyl)-N8-hydroxy-2-((naphthalen-1-yloxy)methyl)oct-2-enediamide); 하기 화학식 2로 표시되는 3-[(다이메틸아미노)메틸]-N-{2-[4-(하이드록시카르바모일)페녹시]-1-벤조퓨란-2-카르복사마이드(3-[(Dimethylamino)methyl]-N-{2-[4-(hydroxycarbamoyl)phenoxy]ethyl}-1-benzofuran-2-carboxamide); 하기 화학식 3으로 표시되는 {6-[(다이메틸아미노)메틸]나프탈렌-2-일}메틸 [4-(하이드록시카르바모일)페닐]카르바메이트((6-((diethylamino)methyl)naphthalen-2-yl)methyl (4-(hydroxycarbamoyl)phenyl)carbamate); 하기 화학식 4로 표시되는 (S)-N-하이드록시-4-(3-메틸-2-페닐부타나미도)벤즈아마이드((S)-N-hydroxy-4-(3-methyl-2-phenylbutanamido)benzamide); 하기 화학식 5로 표시되는 싸이클로헥틸(S)-2-싸이클로헥실-2-((4-(8-(하이드록시아미노)-8-옥소옥탄아미도)벤질)아미노)아세테이트(cyclopentyl (S)-2-cyclohexyl-2-((4-(8-(hydroxyamino)-8-oxooctanamido)benzyl)amino)acetate); 및 하기 화학식 6으로 표시되는 2-(다이페닐아미노)-N-(7-(하이드록시아미노)-7-옥소헵틸)피리미딘-5-카르복사미드(2-(diphenylamino)-N-(7-(hydroxyamino)-7-oxoheptyl)pyrimidine-5-carboxamide) 중 어느 하나로 표시되는 화합물 또는 이의 유도체일 수 있고, 보다 바람직하게는 하기 화학식 1로 표시되는 (E)-N1-(3-(다이메틸아미노)프로필)-N8-하이드록시-2-((나프탈렌-1-일옥시)메틸)옥트-2-에네디아마이드 일 수 있다:

[0014]

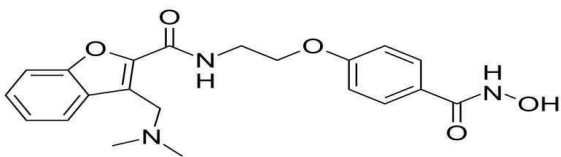
[화학식 1]



[0015]

[0016]

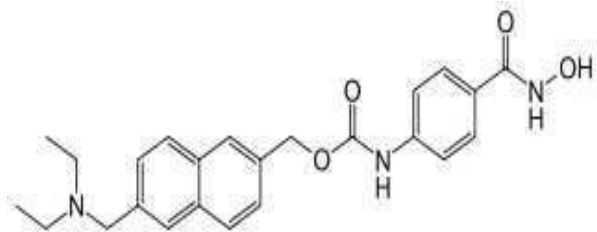
[화학식 2]



[0017]

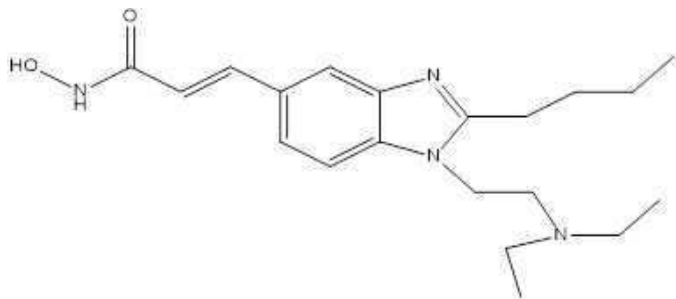
[0018]

[화학식 3]



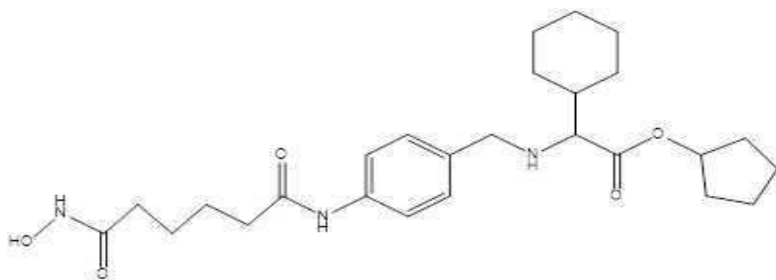
[0019]

[0020] [화학식 4]



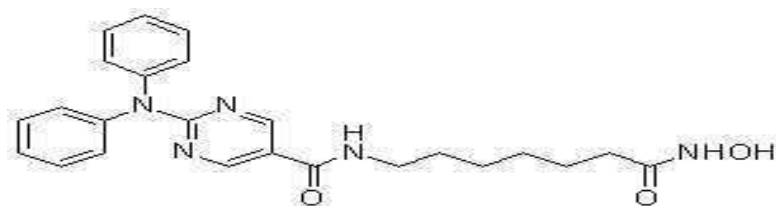
[0021]

[0022] [화학식 5]



[0023]

[0024] [화학식 6]



[0025]

[0027] 상기한 바와 같이, 본 발명에서 상기 화학식 1 내지 화학식 6으로 표시되는 화합물은 암 세포의 성장억제 및 세포사멸을 유도하여 담도암 및 담낭암 중 어느 하나 이상의 암을 예방 및/또는 치료할 수 있고, 바람직하게는 담도암을 효과적으로 예방 및/또는 치료할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0028] 본 발명에서 상기 화학식 1 내지 화학식 6으로 표시되는 화합물, 보다 바람직하게 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 HDAC 동질효소(isozyme)인 HDAC 3, HDAC4 및 HDAC7로부터 선택되는 어느 하나 이상을 저해하여 담도암 및/또는 담낭암 세포의 증식을 효과적으로 억제할 수 있다.

[0029] 여기서, 상기 “HDAC 동질효소(isozyme)”란, HDAC과 동일한 기질특이성을 지니면서 다른 분자구조를 지닌 효소 단백질을 의미한다. 보다 자세히는, 주로 핵안에 위치하는 트리코스타틴 A(TSA)에 의한 저해에 감응성이 있는 I 군인 HDAC 1,2,3,8, TSA 감응성을 나타내는 II군인 HDAC 4,5,6,7,9 및 NAB+ 의존성과 TSA 무감응성에 의해 구별되는 III군인 Sir2로 구별되며, 전사 억제인자 복합체와 회합하여 크로마틴을 전사 불활성인 침묵구조로 바꾸는 역할을 한다(marks et al, Nature cance Rev. 1, 189-202, 2001).

[0030] 또한, 본 발명에서 상기 화학식 1 내지 화학식 6으로 표시되는 화합물, 보다 바람직하게 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 ABC 운송 유전자(ABC transporter gene)의 발현을 억제하고, 보다 상세하게는 상기 ABC 운송 유전자의 전령 RNA(mRNA)인 다중약물 저항성 단백질 3(Multidrug resistance protein; MRP3) 및 다중 약물 저항성 단백질 4(Multidrug resistance protein; MRP4) 중 어느 하나 이상을 저해하여 담도암 및 담낭암 중 어느 하나 이상의 세포 증식을 효과적으로 억제할 수 있다.

[0031] 여기서, 상기 “ABC 운송 유전자(transporter gene)”란, 세포막에 존재하며 폭 넓은 약물 특이성을 갖는 ATP(adenosine triphosphate) 의존적인 배출펌프를 말하며, 특정 항암제에 노출된 암세포가 전에 사용한 적이 없는 구조나 기능이 다른 다양한 항암제에 내성을 보이는 다중 약물 저항성(multi-drug resistance; MDR)을 유발한다. 현재 49개의 ABC 운송 유전자 중 17개의 유전자가 항암제 내성과 관련되어 있다고 알려져 있다(Wei LY,

et. al., Biophys J. 69(3):883-95, 1995; Nakayama K, et. al., Int J Cancer. 97(6):751-60, 2002; Spiegl-Kreinecker S, et. al., J Neurooncol. 57(1):27-36, 2002; Stein U, et. al., Int J Cancer. 97(6):751-60, 2002; Wu X, et. al., Gynecol Obstet Invest. 2003;55(4):225-30; Yasui K, et. al., Cancer Res. 64(4):1403-10; Guo Y, et. al., J Biol Chem. 278(32):29509-14, 2003; Belinsky MG, et. al., Cancer Res. 62(21):6172-7, 2002; Moustafa MA, et. al., Cancer Sci. 95(6):530-6, 2004; Duan Z, et. al., Mol Cancer Ther. 3(7):833-8, 2004; Tian Q, et. al., Pharm Res. 2005 Nov;22(11):1837-53; Yoshida M, et. al., Int J Cancer. 94(3):432-7, 2001; Hopper-Borge E, et. al., Cancer Res. 64(14):4927-30, 2004; Huang Y, et. al., Cancer Res. 64(12):4294-301, 2004; Kool M, et. al., Proc Natl Acad Sci USA. 96(12):6914-9, 1999; Boonstra R, et. al., Br J Cancer. 14;90(12):2411-7, 2004; Marie JP, et. al., Blood. 78(3):586-92, 1991; Hirschmann-Jax C, et. al., Proc Natl Acad Sci USA. 101(39):14228-33, 2004)). 내성과 관련되어 있다고 보고된 상기 ABC 운송 유전자에 의하여 세포 내 약물 배출이 증가되면, 세포 내부에 있는 약물의 농도가 낮아지기 때문에 내성이 유도 된다고 보고되어 있다.

[0032] 다만, 본 발명의 약학 조성물은 추가로 다른 항암제와 병용 투여할 수 있으며, 이를 통해서 일반적인 암세포뿐만 아니라, 더 나아가 담도암 및 담낭암 중 어느 하나 이상의 재발이나 전이를 억제하는 약학 조성물로도 사용될 수 있다.

[0033] 여기서 상기 항암제로는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 소라페닙, 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 비스쿰알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙류세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름키토산, 쟈시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토크세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 카페시타빈, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르포퍼, 알티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 테모졸로마이드, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레틴, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴, 5FU, 보리노스텍, 엔티노스텍 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0035] 본 발명의 약학 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서(elixir), 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

[0036] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0037] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골

수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장이 포함된다. 경구 또는 비경구 투하가 바람직하다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 피하, 피내, 정맥내, 근육내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 병소내 및 두개골내 주사 또는 주입기술을 포함한다. 본 발명의 약학 조성물은 또한 직장 투여를 위한 좌제의 형태로 투여될 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증도를 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50mg/kg 또는 0.001 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 의약 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 젤, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.

발명의 효과

[0040] 본 발명에 따른 약학 조성물은 암 중에서도 특히 담도암 및 담낭암 중 어느 하나 이상의 세포 증식 억제 및 세포사멸을 유도하여 상기 암을 예방 및/또는 치료하는데 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 담도암 세포주의 성장 저해에 의한 IC₅₀의 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 보리노스탤(vorinostat) 및 엔티노스탤(Entinostat)의 성장 저해에 의한 IC₅₀의 결과를 나타낸 것이다.

도 3의 (a) 내지 (d)는 본 발명의 일 실시예에 따른 담도암 세포주의 이중이식 쥐에서 CG200745 약물의 효능을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 웨스턴 블롯 분석(Western blot assay) 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 PCR에 의해 증폭된 약물 방출 유전자의 알엔에이 발현 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[실시예]

[실시예 1] 담도암 세포주(SNU308 및 SNU1196)의 배양

[0048] 본 발명에 따른 (E)-N1-(3-(다이메틸아미노)프로필)-N8-하이드록시-2-((나프탈렌-1-일옥시)메틸)옥트-2-에네디아마이드((E)-N1-(3-(dimethylamino)propyl)-N8-hydroxy-2-((naphthalen-1-yloxy)methyl)oct-2-enediamide, CG200745)에 의한 담도암 세포의 생존 저해 및 약물 방출 유전자 발현 확인 등을 위하여 담도암 세포주 SNU308 및 SNU1196을 계대배양 하였다. SNU308 및 SNU1196 세포주는 한국 세포주 은행(KCLB, Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)에서 구입하였다. 상기 세포주는 한국 세포주 은행에 의해 제시된 프로토콜에 의하여 RPMI1640 배지 볼륨의 10%에 해당하는 우태아혈청(FBS; hyclone, logan, UT)을 포함하는 영양배지로 37℃, 5 % CO₂ 배양기 내에서 배양을 실시하였다.

[0050] **[실시예 2] 담도암 세포주에서 CG200745에 의한 성장저해 확인**

[0051] 상기 담도암 세포주(SNU308 및 SNU1196)에서 CG200745에 의한 성장 저해 효능을 알아보기 위해, MTT 분석을 진행하였다. MTT 분석은 상기 담도암 세포주를 96 웰 플레이트에 3×10^3 cells/well씩 분주한 후, 다음 날 CG200745를 1/10으로 희석한 후 농도 별로 투여하여 72시간 동안 배양하였다. 배양 후 MTT(3-[4,5-다이메틸싸아졸-2-일]-2,5 다이페닐테트라졸리움브로마이드 (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide, Sigma-Aldrich)용액))을 $100\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 넣고 차광 조건에서 3시간 동안 반응시켰다. 3시간 후 상기 반응 용액을 제거한 뒤 DMSO(다이메틸 설펡사이드(dimethyl sulfoxide))를 $100\mu\text{l}/\text{well}$ 씩 넣고, 570nm에서 측정된 흡광도를 Graphpad Prism 4 소프트웨어를 이용하여 IC_{50} 값을 산정하였고, 그 결과를 도 1 및 표 1에 나타내었다.

표 1

세포주	CG200745	
	SNU308	SNU1196
IC_{50} (μM)	1.8	0.5

[0055] 도 1 및 표 1에서 보는 바와 같이, SNU308 세포주는 $1.8\mu\text{M}$ 및 SNU1196 세포주는 $0.5\mu\text{M}$ 의 농도에서 IC_{50} 이 측정되었다. 상기 IC_{50} 결과를 통하여 담도암 세포주 각각에서 히스톤 탈아세틸화 저해제인 CG200745는 $1\mu\text{M}$ 내외의 낮은 농도에서 세포 성장저해 효능이 있는 것을 확인 할 수 있다.

[0057] **[실시예 3] 담도암 세포주에서 기존 치료제와의 성장저해 효능 비교**

[0058] 기존의 담도암 치료제로 사용되는 약물인 보리노스텍(vorinostat) 및 엔티노스텍(Entinostat)과의 성장저해 효능을 비교하기 위하여 실시예 2와 동일한 조건으로 약물을 투여한 뒤, MTT 실험을 통하여 성장 저해 정도를 확인하였다. MTT 실험의 결과로 측정된 흡광도는 Graphpad Prism 4 소프트웨어를 이용하여 IC_{50} 값을 산정하여, 그 결과를 도 2 및 표 2에 나타내었다.

표 2

세포주	보리노스텍		엔티노스텍	
	SNU308	SNU1196	SNU308	SNU1196
IC_{50} (μM)	3.9	1.2	6.7	16.4

[0062] 도 2 및 표 2에서 보는 바와 같이, 보리노스텍을 처리하였을 경우 SNU308에서는 $3.9\mu\text{M}$ 및 SNU1196에서는 $1.2\mu\text{M}$ 에서 IC_{50} 이 산정되었다. 또한, 엔티노스텍을 처리하였을 경우 SNU308에서는 $6.7\mu\text{M}$ 및 SNU1196에서는 $16.4\mu\text{M}$ 의 농도에서 IC_{50} 이 산정되었다.

[0063] 반면, 본 발명에 따른 CG200745를 담도암 세포주에 처리한 경우, 상기 실시예 2에서 보는 바와 같이 SNU308에서는 $1.8\mu\text{M}$ 및 SNU1196에서는 $0.5\mu\text{M}$ 로, 기존의 보리노스텍 및 엔티노스텍에 비하여 담도암 세포에 대한 성장 저해 효능이 현저히 뛰어난 것을 알 수 있다.

[0065] **[실시예 4] 담도암 이중이식 쥐에서의 CG200745의 효능 확인**

[0066] 6~8 주된 수컷 누드 쥐(오리엔트 바이오)를 하기 실험에 사용하였다. 수컷 쥐를 무균의 조건하에서 기르며, 빛 온도 및 습도는 중앙에서 조절하였다. 주사기를 이용하여 수컷 누드 쥐의 옆구리에 상기 담도암 세포주 SNU1196를 삽입하여 담도암을 유도하였다. 주입된 종양의 평균 부피가 100mm^3 이상 된 후, $30\text{mg/kg}(100 \mu\text{l}/\text{mouse})$ 의 CG200745를 상기한 수컷 쥐에 5일 동안 투약 및 2일 휴약의 스케줄로 3주간 복강 투여하였다. 음성 대조군으로는 상기 CG200745를 대신하여 식염수(Saline)를 동일한 스케줄로 복강 투여하였다. 3주가 지난 뒤 종양의 부피, 쥐의 몸무게 및 종양의 무게 측정을 실시하였으며, 그 결과는 도 3의 (a) 내지 (d)에 나타내었다.

[0067] 도 3의 (a) 내지 (c)에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 CG200745를 복강 투여한 경우 식염수를 투여한 음성 대조군에 비하여 종양의 크기, 부피 및 무게가 현저히 감소한 것을 볼 수 있다.

[0068] 또한, 도 3의 (d)에서 보는 바와 같이, 본 발명에 따른 CG200745를 복강 투여한 경우, 상기한 수컷 쥐의 몸무게는 약물의 투여에 의한 변화가 없다.

[0069] 상기 결과를 통하여, 본 발명에 따른 CG200745는 담도암의 세포 내 실험뿐만 아니라 생체 내(in vivo)에서도 담도암 치료 효능이 있는 것을 확인할 수 있었고, 쥐의 몸무게의 변화가 없는 것으로 보아 약물에 의한 부작용도 적을 것으로 예상할 수 있다.

[0071] **[실시예 5] CG200745의 HDAC 저해 여부 확인**

[0072] CG200745 약물의 HDAC 저해여부를 단백질 수준에서 확인하기 위하여, 실시예 2에서 얻은 담도암 세포주 각각의 CG200745 IC_{50} 농도를 처리하고, 0시간 내지 72시간대에서 수득한 단백질을 이용하여 웨스턴 블롯(Western blot)을 수행하였다.

[0073] 웨스턴 블롯에 사용된 단백질의 준비 방법은 하기와 같다. 상기 담도암 세포주에 아큐타아제(Accutase; Sigma-Aldrich)를 처리하여 수득(harvest)하고, PBS로 세척 후 단백질 분해 억제제가 포함되어 있는 세포 용해 버퍼(cell lysis buffer)를 이용하여 용해시켰다. 상기 용해된 용액을 원심분리기를 이용하여 전체 용액을 분획한 뒤, 단백질이 포함된 용액만을 추출하였다. 상기 추출된 단백질은 브래드포드(Bradford) 방법에 의해 정량화하였다. 정량화를 통해 동일 농도의 단백질을 SDS-폴리아크릴아미드(polyacrylamide) 겔 전기영동을 수행하여 분리한 뒤, PVDF 막에 옮겼다. 단백질이 옮겨진 막은 비 특이적 결합을 줄이기 위하여 5% 탈지유(non-fat milk)가 포함된 TBS-T(Tris-buffered saline/0.05% Tween-20)용액으로 상온에서 1시간 동안 차단(blocking)한 후, 1차 항체(1: 1000 희석)를 4°C 조건에서 하룻밤(overnight) 동안 반응시킨 뒤, 2차 항체(1: 5000 희석)를 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 시각화를 위해서는 PIERCE 제품의 강화된 화학발광 시스템(Enhanced chemiluminescence system)을 이용하였다.

[0074] 웨스턴 블롯 분석은 HDAC의 동질효소(isozyme)에 해당하는 HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC4, HDAC7 및 HDAC6 마커를 이용하여 수행하였고, 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0075] 도 4에서 보는 바와 같이, 담도암 세포주 각각에 대하여 CG200745의 IC_{50} 농도를 투여한 후, 24, 48 및 72시간에서 HDAC 3, HDAC4 및 HDAC7의 단백질 발현양이 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있다.

[0076] 이를 통하여 본 발명에 따른 CG200745는 담도암 세포주에 있어서, HDAC의 동질효소(isozyme)인 HDAC 3, HDAC4 및 HDAC7 효소의 발현을 저해하는 것을 통하여 담도암 세포주의 성장을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.

[0078] **[실시예 6] CG200745의 전이 및 재발 억제 여부 확인**

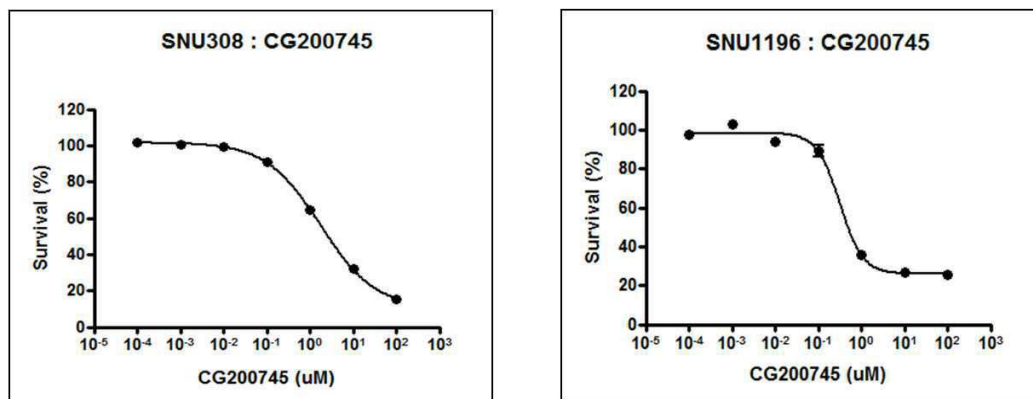
[0079] CG200745 약물의 전이 및 재발 억제 여부를 단백질 수준에서 확인하기 위하여, 실시예 2에서 얻은 담도암 세포주 SNU1196에 CG200745 IC_{50} 농도를 처리하고, 0시간 내지 72시간대에서 수득한 단백질을 이용하여 상기 실시예 5의 방법으로 웨스턴 블롯(Western blot)을 수행하였다.

[0080] 웨스턴 블롯 분석은 전이 및 재발에 관련되어 있는 단백질로 알려져 있는 YAP, AXL 및 Notch3 마커를 이용하여 수행하였고, 그 결과는 도 5에 나타내었다.

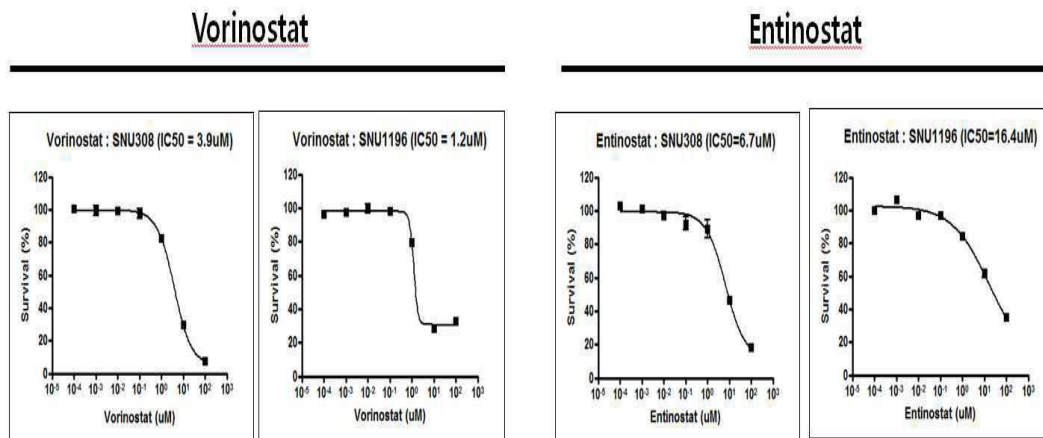
- [0081] 도 5에서 보는 바와 같이, 담도암 세포주 SNU1196에서 시간에 따라 YAP, AXL 및 Notch3가 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0082] 이를 통하여 본 발명에 따른 CG200745는 담도암 세포주에 있어서, 전이 및 재발을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있다.
- [0084] **[실시예 7] 담도암 세포주에서 다중 약물 저항성 유전자 발현 확인**
- [0085] 세포로부터 해당 약물을 제거하는 작용을 통하여 암의 화학적 치료 효능의 감도를 결핍시키는 ABC 운송 유전자(transporter gene)의 전령 RNA(mRNA) 발현을 확인하기 위하여 아래의 과정을 수행하였다.
- [0086] RNAeasy Mini (QIAGEN)키트를 이용하여 일반적인 방법에 따라 CG200745를 실시예 2의 IC₅₀ 농도에서 24 및 48시간 처리한 담도암 세포주 각각의 RNA 전체(total RNA)를 추출하였다. 상기 추출된 RNA 2 µg과 Superscript II (GibcoBRL)를 42℃에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA를 얻은 후 서열번호 1로 표시되는 ABCG2, 서열번호 2로 표시되는 hENT1, 서열번호 3으로 표시되는 MRP1, 서열번호 4로 표시되는 MRP3, 서열번호 5로 표시되는 MRP4, 서열번호 6으로 표시되는 MRP5 및 항존유전자인 β-actin 유전자 프라이머를 이용하여 Taq 폴리머라아제(polymerase)에 의한 유전자 증폭(PCR)을 수행한 뒤, 아가로스 겔 전기영동을 수행하였고, 그 결과는 도 6에 나타내었다.
- [0087] 도 6에서 보는 바와 같이, 담도암 세포주 각각에 IC₅₀ 농도를 24시간 및 48시간 동안 투약하였을 때, ABC 운송 유전자인 MRP3 및 MRP4의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있다.
- [0088] 이를 통하여 본 발명에 따른 CG200745는 ABC 운송 유전자인 MRP3 및 MRP4의 발현을 저해하여 담도암 세포주의 성장을 효과적으로 억제하는 수 있음을 알 수 있다.
- [0089] 상기 결과를 이상에서 본 발명에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고, 청구범위에 기재된 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능하다는 것은 당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게는 자명할 것이다.

도면

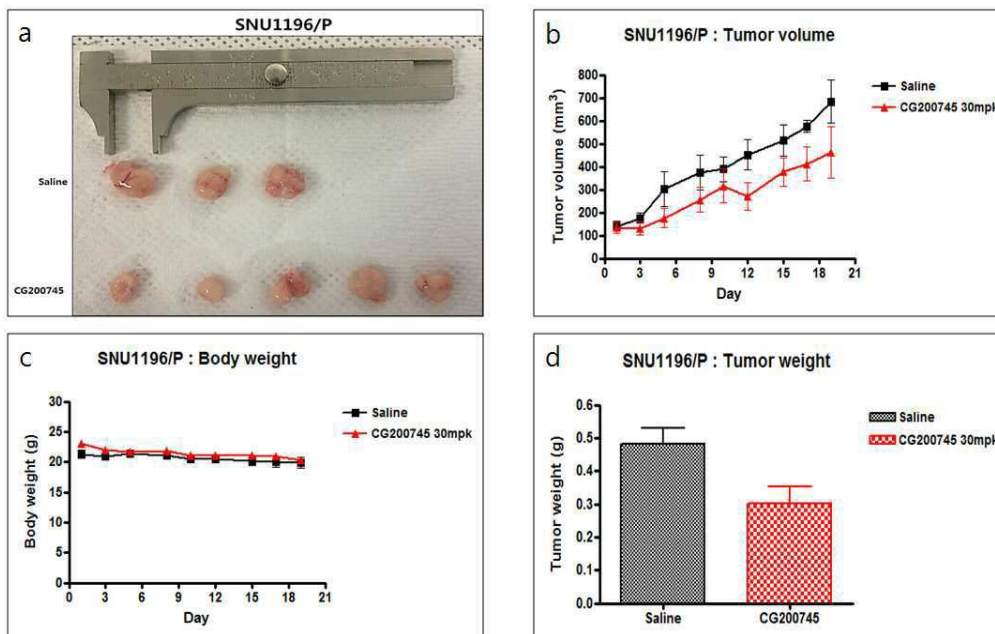
도면1



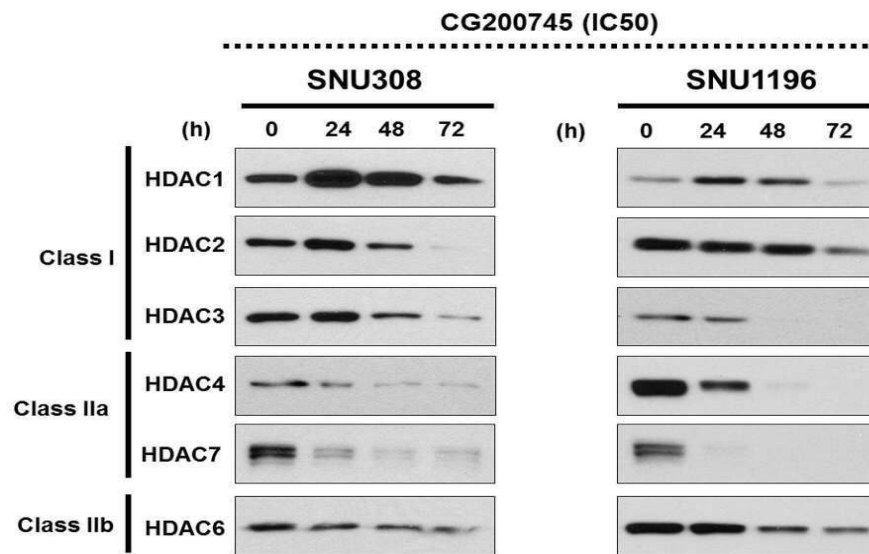
도면2



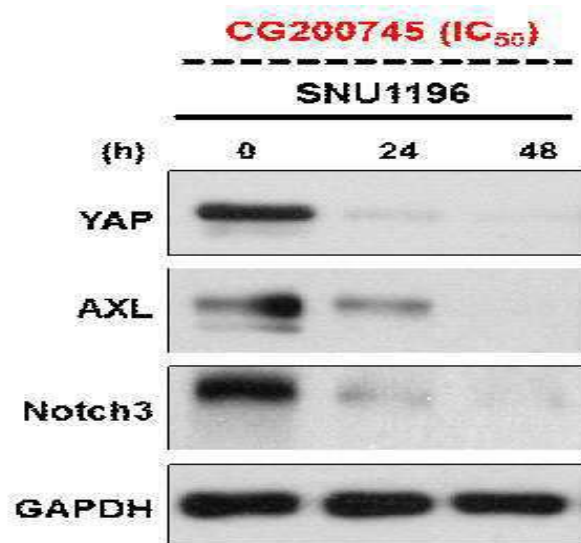
도면3



도면4



도면5



도면6

