	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0135018 (43) 공개일자 2011년12월16일
(51) Int. Cl. <i>A61K 31/37</i> (2006.01) <i>A61K 31/35</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0054716 (22) 출원일자 2010년06월10일 심사청구일자 없음	(71) 출원인 연세대학교 산학협력단 서울 서대문구 신촌동 134 연세대학교 (72) 발명자 최강열 서울특별시 양천구 목동 2단지 216-902 문병산 서울특별시 서대문구 신촌동 연세대학교 생명공학과 제2공학관 501호 차부현 서울특별시 서대문구 신촌동 연세대학교 생명공학과 제2공학관 501호 (74) 대리인 특허법인다나	

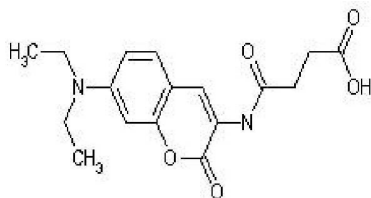
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 암의 치료 또는 예방을 위한 약제학적 조성물

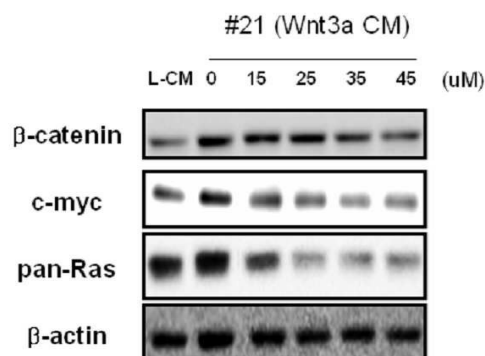
(57) 요약

본 발명은 약제학적으로 허용되는 담체 및 하기 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 치료 또는 예방을 위한 약제학적 조성물, 암의 치료 또는 예방용 의약의 제조를 위한 화학식 1의 화합물의 용도, 및 치료상 유효량의 화학식 1의 화합물을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염 및 제2의 약물을 포함하는 복합제제를 제공한다. 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 Wnt/ β -카테닌 신호전달계를 저해함과 동시에 Ras 단백질 안정성을 조절하는 물질로서, *ras* 유전자 돌연변이로 인해 EGFR, VEGF 등에 대한 항체 항암제를 포함한 각종 항암제에 저항성을 보이는 환자를 효과적으로 치료할 수 있다.

[화학식 1]



대표도 - 도1

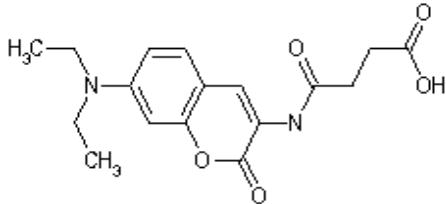


특허청구의 범위

청구항 1

약제학적으로 허용되는 담체 및 하기 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 치료 또는 예방을 위한 약제학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 암은 Ras 돌연변이 또는 Wnt 신호전달계의 이상으로 인해 유발된 것인 암의 치료 또는 예방을 위한 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 암은 대장암, 위암, 췌장암, 뇌종양, 폐암, 방광암, 신장암, 갑상선 암, 직장암, 조혈기 종양, 악성 흑종, 신경 아세포종, 악성 흑종 및 횡문 근육종으로 구성되는 군으로부터 선택되는 암인 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 정제, 캡슐제, 환제, 과립제, 산제, 주사제 또는 액제의 형태로 제제화되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 서방성 정제의 형태로 제제화되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 약제학적 조성물은 제2의 약물과의 병용 사용을 위한 것인 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 제2의 약물은 항암제인 약제학적 조성물.

청구항 8

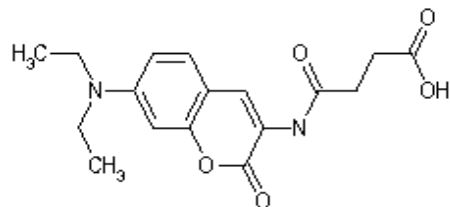
제7항에 있어서,

상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미드, 수니티닙, 카보플라틴, 소라페닙, 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 비스콤알분, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙티세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 젬시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모페, 알티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 테모졸로마이드, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레틴, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 로무스틴 및 카르무스틴으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 약물인 약제학적 조성물.

청구항 9

하기 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 및 제2의 약물을 포함하는 복합제제:

[화학식 1]



청구항 10

제9항에 있어서,

상기 제2의 약물은 항암제인 복합제제.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 엘로티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미드, 수니티닙, 카보플라틴, 소라페닙, 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 비스콤알분, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙티세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 젬시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모페, 알티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토

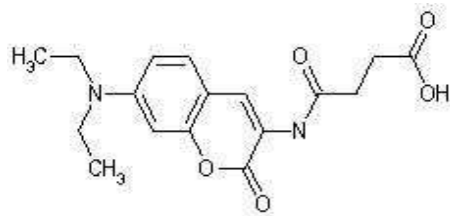
포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 테모졸로마이드, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레틴, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토락톨, 로무스틴 및 카르무스틴으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 약물인 복합 제제.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 본 발명은 약제학적으로 허용되는 담체 및 하기 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 치료 또는 예방을 위한 약제학적 조성물, 암의 치료 또는 예방용 의약의 제조를 위한 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염의 용도, 및 치료상 유효량의 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 또는 예방 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 및 제2의 약물을 포함하는 복합제제에 관한 것이다.

[0002] [화학식 1]



[0003]

배경 기술

[0004] 세포신호전달은 외부에서 오는 자극 (호르몬, 성장인자, 신경전달물질 등)이 세포내로 전달되어, 유전자 발현, 세포분화 및 분열, 성장 및 사멸 등 다양한 세포 반응을 일으키는 여러 단계 과정으로 이중 한 가지 이상의 손상 및 비정상 반응은 종종 질병을 유발하는 원인이 된다. 현대인의 4대 질병 (암, 심혈관, 면역, 뇌질환)들이 거의 모두 세포신호전달계의 이상에 의한 것이므로 신호전달 단백질들을 타겟으로 한 약물 발굴이나 세포신호전달계의 활성을 조절하는 약물 스크리닝이 신약개발의 주 표적이 되고 있으며, 이러한 약물은 제약 산업의 50%이상을 차지하고 있다.

[0005] 이러한 세포신호전달계 가운데 Wnt/ β -카테닌 신호전달계는 척추동물의 발생, 성장, 항상성 유지에 있어 필수적인 역할을 하는 신호전달계이다. Wnt/ β -카테닌 신호전달계의 이상은 암, 골다공증, 혈관질환, 탈모 그리고 당뇨 등을 포함한 여러 질병의 원인이 된다.

[0006] 이러한 질병들 가운데 특히 암의 발생기전은 세포 성장 및 분화 조절과 관계된 유전자의 발현 이상, 즉 돌연변이에 의한 비정상적인 발현과 관계되는 것으로 알려져 있고 이러한 변화는 다른 관련된 유전자 및 단백질 발현과 연관되어지는 것으로 알려져 있다. 발암과 관련한 대표적인 유전자 군으로 알려져 있는 *ras* 유전자 군에는 *H-ras*, *N-ras*, *K-ras* 등이 속해 있다. 이들 유전자는 세포 성장, 분화에 중요한 유전자들이며 이들의 돌연변이는 암 유발과 밀접한 관련 있다. 특히 이들 *Ras* 군에 속하는 각각의 *Ras* 돌연변이는 특정 세포계열의 암과 관련 있다고 보고되어 있다. 예를 들어, *K-ras*의 돌연변이는 대장암의 약 50% 이상에서 돌연변이가 관찰되고 있다.

[0007] 그러나, 현재 시판되고 있는 주요 항암제들은 이러한 환자의 유전적인 소인에 의해서 약효를 나타내지 못하는 경우가 많다. 따라서 환자 맞춤형 항암제의 개발과 이에 따른 치료 전략의 확보가 필요하다.

[0008] 최근, 비특이적 기존 항암제와 달리 차세대 항암제로서 타이로신-키나제 수용체(RTK)에 대한 특이적 항체 항암제[예: Herceptin (Trastuzumab), Erbitux (Cetuzimab)]와 VEGF 등의 세포성장인자 기능을 저해하는 항체 항암제[예: Avastin (Bevacizumab)]들이 다국적 제약사에 의해 개발되어 전세계 항암제 시장을 주도하고 있으나, 이들 항암제조차도 50-80% 이상의 암환자에 항암 효과가 거의 없는 것으로 확인되고 있다. 이는 타이로신-키나제 수용체(RTK)의 하부 유전자인 *ras* 암 유전자에 돌연변이가 있는 경우 세포 외부에서 항체 항암제를 투여해도 세포 내부의 암 유전자 활성을 억제하지 못하여 치료 효과를 나타내지 못하기 때문이다.

[0009] 이로 인해 2009년 7월 미국 FDA에서는 항체 항암제의 처방을 위한 전제조건으로 *ras*의 돌연변이 검사를 필수적

으로 수행할 것을 권고하기에 이르렀다(Pharmacogenomics Reporter, Oct 02, 2009). 따라서 환자 개개의 암 유전자 변이의 차이를 고려한 환자 맞춤형 항암제를 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 Ras 유전자의 돌연변이로 인해 항암 효과를 나타내지 못하는 기존의 항암제를 대체할 수 있는 항암제의 개발을 목적으로 한다. 구체적으로, 본 발명은 Wnt 신호전달계를 억제하여, Ras의 단백질 레벨을 감소시킴으로써 Ras 돌연변이 또는 Wnt 신호전달계의 이상으로 인해 기존 항암제에 저항성을 보이는 환자에 적용할 수 있는 항암제를 개발하고자 한다.

과제의 해결 수단

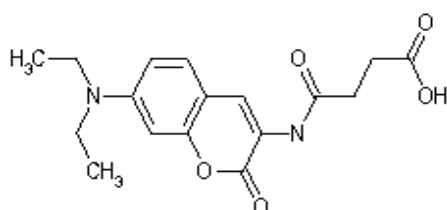
[0011] Wnt/ β -카테닌 신호전달계에 관여하는 유전자들의 돌연변이에 의해 Wnt/ β -카테닌 신호전달계가 비정상적으로 활성화된 것이 종종 암의 원인이 되기 때문에 이 신호전달계에 대한 저해제를 발굴하는 것이 관건이었다. 그러나, 일차적으로 Wnt/ β -카테닌 신호전달계를 저해하는 물질을 선별하였다 하더라도 암 발생이 Wnt/ β -카테닌 신호전달계를 활성화시키는 리간드의 과 발현 때문이기 보다는 Apc 혹은 β -카테닌과 같은 주요 분자(key molecule)들의 유전자 돌연변이에 의한 경우가 대부분이기 때문에 이 신호전달계의 세포질 혹은 핵 내에서 작용하는 신호전달물질들을 타겟으로 하는 저분자 화합물을 발굴하는 것이 중요하다.

[0012] 한편, 이러한 암의 발생이 Wnt/ β -카테닌 신호전달계 단독에 의한 것이 아니라 암화와 밀접한 관련이 되어있는 Ras/MAPK 신호전달계 관련 유전자의 유전적 변이가 함께 유발됨으로써 유도된다는 많은 보고가 있다. 실제로 많은 항암제가 Ras/MAPK 신호전달계를 구성하는 주요 단백질들을 억제하는 물질로써 선별되어 왔다. 개발된 많은 항암제들은 Ras-MAPK 신호전달계의 가장 업스트림(upstream)인 EGFR을 억제하는 물질이거나 중간단계의 인산화 단백질인 MEK를 억제하는 물질로써 개발되었다. 그러나 최근에 이들 항암제가 Ras 돌연변이가 있는 암의 경우 약효가 거의 없는 것으로 보고되었으므로, 본 발명자들은 Wnt/ β -카테닌 신호전달계 신호전달계를 저해하면서 Ras/MAPK 신호전달계를 동시에 저해하는 물질을 스크리닝했다.

[0013] 본 발명자들은 Wnt/ β -카테닌 신호전달 리포터 세포주를 이용하여, 3840개의 선별된 화합물들로 구성된 라이브러리로부터, 세포에 심각한 독성이 없으면서 Wnt/ β -카테닌 신호전달계의 활성화를 저해하는 후보 약물들을 스크리닝하였다. 이 같은 방법을 통해 골라진 38개의 후보 화합물들 가운데 암세포의 성장을 억제하는 물질로서 하기 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 최종 선별하였다. 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 하기 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염은 Wnt/ β -카테닌 신호전달계가 일반적으로 활성화 되어있는 대장암 세포주에서 Wnt/ β -카테닌 신호전달계를 억제시키고 동시에 Ras의 단백질 수준을 감소시키는 것으로 확인되었으며, 이에 따라 대장암 세포주의 성장 및 증식을 매우 효과적으로 억제한다.

[0014] 따라서, 본 발명은 약제학적으로 허용되는 담체 및 하기 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 치료 또는 예방을 위한 약제학적 조성물, 암의 치료 또는 예방용 의약의 제조를 위한 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염의 용도, 및 치료상 유효량의 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 대상체에 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 또는 예방 방법을 제공한다.

[0015] [화학식 1]



[0016]

- [0017] 상기 화학식 1의 화합물은 공지의 화합물로서 당업계에 공지된 방법을 통해 합성하거나 시판되고 있는 물질을 구입하여 사용할 수 있다. 또한, 화학식 1의 화합물의 약제학적으로 허용되는 염 또한 공지의 방법을 통해 합성할 수 있다. 화학식 1의 화합물의 약제학적으로 허용되는 염으로는 예를 들어 다음과 같은 산 부가염을 사용할 수 있다: 염산, 설페이트, 나이트레이트, 포스페이트, 설파이트, 디티오네이트, 아세테이트, 벤조에이트, 시트레이트, 글리코레이트염, 글리옥시레이트, 머캅토아세테이트, 감마하이드록시부티레이트, 파모에이트, 아스파르테이트, 글루타메이트, 피롤리돈 카르복시레이트, 메탄설포네이트, 나프탈렌 설포네이트, 글루코스-1-포스페이트, 클로로페녹시 아세테이트, 엠보네이트, 말리에이트, 파라클로로페녹시이소부티레이트, 포르메이트, 락테이트, 석신네이트, 타트레이트, 시클로헥산카르복시레이트, 헥사노에이트, 옥타노에이트, 데카노에이트, 헥사데카노에이트, 옥토데카노에이트, 벤젠설포네이트, 트리메톡시 벤조에이트, 파라톨루엔 설포네이트, 아다만탄카르복시레이트, 글루타메이트, 피롤리돈카르복시레이트, 말로네이트, 말레이트, 옥살레이트, 2-[4-(2-히드록시에틸)피페라진-1-일]에탄설포네이트 등.
- [0018] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물로 치료가능한 암의 종류는 특별히 제한되지 않으나, 앞서 설명한 바와 같이 화학식 1의 화합물은 Wnt/ β -카테닌 신호전달계를 억제시키는 동시에 Ras의 단백질 수준을 감소시키므로, 화학식 1의 화합물은 특히 Ras 돌연변이 또는 Wnt 신호전달계의 이상으로 인해 EGFR, VEGF 항체 항암제 등을 포함한 기존 항암제에 저항성을 보이는 암 환자의 치료를 위해 매우 유용하게 사용될 수 있다. Ras 돌연변이 또는 Wnt 신호전달계의 이상으로 인해 유발된 암으로는 대장암, 위암, 췌장암, 뇌종양, 폐암, 방광암, 신장암, 갑상선암, 직장암, 조혈기 종양, 악성 흑종, 신경 아세포종, 악성 흑종, 횡문 근육종 등이 포함된다.
- [0019] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효 성분 이외에 약제학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, '약제학적으로 허용가능한 담체'는 투여용 약제학적 활성 화합물을 제형화할 경우에 유용하고 사용 조건하에 사실상 비독성 및 비민감성인 공지된 약제학적 부형제를 의미한다. 이러한 부형제의 정확한 비율은 활성 화합물의 용해도와 화학적 특성, 선택된 투여경로뿐만 아니라, 표준 약제학적 관행에 의해 결정된다.
- [0020] 본 발명의 약제학적 조성물은 적합하고 생리학적으로 허용되는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제 등과 같은 보조제를 사용하여 원하는 투여 방법에 적합한 형태로 제제화될 수 있다.
- [0021] 상기 약제학적 조성물은 이에 제한되는 것은 아니나, 정제, 캡슐제, 환제, 과립제, 산제, 주사제 또는 액제의 형태로 제제화될 수 있다.
- [0022] 경구 투여에 적합한 제제는 고체 제제, 예를 들어 정제, 미립자, 액체 또는 분말을 함유한 캡슐제, 환제, 과립제, 산제, 로젠지제(lozenge)(액체-충전된 것 포함), 츄제(chew), 멀티- 및 나노-미립제, 젤제, 고용제(solid solution), 리포솜, 필름제(점막-점착성 포함), 난형제(ovule), 분무제(spray) 및 액제를 포함한다. 액제는 예를 들어 현탁액제, 용액제, 시럽제 및 엘릭시르(elixir)제를 포함한다.
- [0023] 정제는 약물 이외에도 일반적으로 붕해제를 함유한다. 붕해제로서 나트륨 전분 글리콜레이트, 옥수수 전분, 감자 전분 또는 예비 젤라틴화 전분 등의 전분 또는 변성전분과, 벤토나이트, 몬모틸로나이트, 비검(veegum) 등의 클레이와, 미세결정성 셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 또는 카르복시메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류와, 알긴산 나트륨 또는 알긴산 등의 알긴류와, 크로스카멜로스(croscarmellose) 나트륨 등의 가교 셀룰로오스류와, 구아검, 잔탄검 등의 검류와, 크로스포비돈(crospovidone) 등의 가교 중합체와, 중탄산 나트륨, 시트르산 등의 비등성 제제 등을 혼합 사용할 수 있다. 일반적으로, 붕해제는 투여 형태의 약 1 중량% 내지 약 25 중량%, 바람직하게는 투여 형태의 약 2 중량% 내지 약 10 중량%를 포함할 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 결합제는 일반적으로 정제 제제에 점착성을 부여하기 위해 사용된다. 적합한 결합제는 미세결정성 셀룰로오스, 젤라틴, 당(sugar), 폴리에틸렌 글리콜, 천연 및 합성 검(gum), 폴리비닐피롤리돈, 예비젤라틴화된 전분, 전분, 코포비돈, 고분산성 실리카, 만니톨, 락토스, 하이드록시프로필 셀룰로스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로스를 포함한다. 일반적으로, 결합제는 투여 형태의 약 1 중량% 내지 약 40 중량%, 바람직하게는 투여 형태의 약 2 중량% 내지 약 25 중량%를 포함할 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 정제는 희석제로서, 예를 들어 전분, 미세결정성 셀룰로오스, 유당, 포도당, 만니톨, 알기네이트, 알칼리토류금속염, 클레이, 폴리에틸렌글리콜 및 디칼슘 포스페이트 등을 사용할 수 있다. 일반적으로, 희석제는 투여 형태의 약 1 중량% 내지 약 70 중량%, 바람직하게는 투여 형태의 약 2 중량% 내지 약 50 중량%를 포함할 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0025] 정제는 또한 계면활성제, 예컨대 나트륨 라우릴 설페이트 및 폴리솔베이트 80, 및 활택제(glidant), 예컨대 이산화규소 및 활석을 선택적으로 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 계면활성제는 정제의 약 0.2 중량% 내지 약 5 중량%를 포함할 수 있고, 활택제는 정제의 약 0.2 중량% 내지 약 1 중량%를 포함할 수 있다.
- [0026] 또한 윤활제로서, 예컨대 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 칼슘 스테아레이트, 아연 스테아레이트, 나트륨 스테아릴 푸마레이트, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 라우릴 설페이트, 라우릴 설페이트, 수소화 식물성 오일, 나트륨 벤조에이트, 글리세릴 모노스테아레이트, 폴리에틸렌글리콜 4000 등을 사용할 수 있다. 윤활제는 일반적으로 정제의 약 0.25 중량% 내지 약 5 중량%, 바람직하게는 약 0.5 중량% 내지 약 3 중량%를 포함한다.
- [0027] 그 밖의 다른 가능한 성분은 산화방지제, 착색제, 향미제, 보존제 및 맛-차단제를 포함한다.
- [0028] 정제 배합물은 직접적으로 압착되거나 롤러로 압착되어 정제를 형성할 수 있다. 다른 방법으로 정제 배합물 또는 그 배합물의 일부는 정제화되기 전에 습식-, 건식-, 용융-과립화(granulated)되거나, 용융 응고(melt congealed)되거나, 또는 압출될 수 있다. 최종 제제는 하나 이상의 층을 포함할 수 있고, 코팅되거나 코팅되지 않을 수 있으며, 캡슐화될 수 있다.
- [0029] 경구 투여용 고체 제제는 즉시(immediate) 방출형 및/또는 변형(modified) 방출형으로 제제화될 수 있다. 변형 방출형 제제는 지연(delayed)-, 지속(sustained)-, 펄스(pulsed)-, 제어(controlled)-, 표적(targeted) 및 프로그래밍(programmed) 방출형을 포함한다.
- [0030] 약제학적 조성물의 제형 및 약제학적으로 허용되는 담체는 당업계에 공지된 기술에 따라 적절히 선택할 수 있으며, 예를 들어, 하기 문헌을 참조할 수 있다: [Urquhart et al., Lancet, 16:367, 1980]; [Lieberman et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS-DISPERSE SYSTEMS, 2nd ed., vol. 3, 1998]; [Ansel et al., PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS & DRUG DELIVERY SYSTEMS, 7th ed., 2000]; [Martindale, THE EXTRA PHARMACOPEIA, 31st ed.]; [Remington's PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16th-20th editions]; [THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Goodman and Gilman, eds., 9th ed., 1996]; [Wilson and Gisvolds' TEXTBOOK OF ORGANIC MEDICINAL AND PHARMACEUTICAL CHEMISTRY, Delgado and Remers, eds., 10th ed., 1998]. 또한 약제학적 조성물을 제제화하는 원리는 또한 예를 들어, 하기 문헌[Platt, Clin Lab Med, 7:289-99, 1987]; [Aulton, PHARMACEUTICS: THE SCIENCE OF DOSAGE FORM DESIGN, Churchill Livingstone, NY, 1988]; [EXTEMPORANEOUS ORAL LIQUID DOSAGE PREPARATIONS, CSHP, 1998], ["Drug Dosage," J Kans Med Soc, 70(1):30-32, 1969] 등을 참조할 수 있다.
- [0031] 한 구체예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 정제일 수 있다. 정제는 임의적으로 필름 코팅될 수 있다. 복용 단위당 약의 총량은 환자에게 편리한 크기의 복용 형태를 제공하는 양일 수 있다.
- [0032] 한 구체예에서, 본 발명의 약제학적 조성물은 서방성 정제의 형태로 제제화될 수 있다.
- [0033] 서방성 정제의 제조를 위해서는, 매트릭스 기재로서 장용 중합체, 소수성 물질, 친수성 고분자 등 중에서 선택된 성분을 사용할 수 있다.
- [0034] 상기 장용 중합체로서는 폴리비닐아세테이트프탈레이트, 메타크릴산 공중합체, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스프탈레이트, 셀락, 셀룰로오스아세테이트프탈레이트, 셀룰로오스프로피오네이트프탈레이트, 유드라짓L 및 유드라짓S 등 중에서 선택된 1 종 이상의 혼합물을 사용할 수 있다.
- [0035] 상기 소수성 물질은 약학적으로 허용 가능한 것으로 폴리비닐 아세테이트, 폴리메타크릴레이트 공중합체로서 폴리(에틸아크릴레이트, 메틸 메타크릴레이트) 공중합체, 폴리(에틸아크릴레이트, 메틸 메타크릴레이트, 트리메틸아미노에틸메타크릴레이트)공중합체, 에틸셀룰로오스 및 셀룰로오스아세테이트, 지방산 및 지방산 에스테르류, 지방산 알코올류, 왁스류 및 무기물질 등을 선택 사용할 수 있으며, 구체적으로, 지방산 및 지방산 에스테르류로서 글리세릴 팔미토스테아레이트, 글리세릴 스테아레이트, 글리세릴 비헤네이트, 세틸 팔미테이트, 글리세릴 모노 올레이트 및 스테아린산 등 지방산 알코올류로서 세토스테아릴 알코올, 세틸알코올 및 스테아릴알코올 등 왁스류로서 카르나우바왁스, 밀납 및 미결정왁스 등 무기물질로서 탈크, 침강탄산칼슘, 인산일수소칼슘, 산화아연, 산화티탄, 카올린, 벤토나이트, 몬모릴로나이트 및 비검 등 중에서 선택된 1 종 또는 2 종을 선택하여 사용할 수 있다.
- [0036] 상기 친수성 고분자는 당류, 셀룰로오스 유도체, 검류, 단백질류, 폴리비닐 유도체, 폴리메타크릴레이트 공중합체, 폴리에틸렌 유도체 및 카르복시비닐중합체 등을 선택 사용할 수 있으며, 구체적으로 당류로서 텍스트린, 폴리텍스트린, 텍스트란, 펙틴 및 펙틴 유도체, 알긴산염, 폴리갈락투론산, 자일란, 아라비노자일란, 아라비노갈락탄, 전분, 히드록시프로필스타치, 아밀로오스, 아밀로펙틴 등을 선택 사용할 수 있고, 셀룰로오스 유도체로서

히드록시프로필메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스 나트륨, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 아세테이트 숙시네이트, 히드록시에틸메틸셀룰로오스 등을 선택하여 사용할 수 있으며, 검류로서 구아검, 로커스트 콩 검, 트라가칸타, 카라기난, 아카시아검, 아라비아검, 젤란검, 잔탄검 등을 선택 사용할 수 있으며, 단백질을로서 젤라틴, 카제인, 및 제인 등을 선택 사용할 수 있고, 폴리비닐 유도체로서 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈 및 폴리비닐아세탈 디에틸아미노아세테이트 등을 선택 사용할 수 있으며, 폴리메타크릴레이트 공중합체로서 폴리(부틸 메타크릴레이트), (2-디메틸아미노에틸)메타크릴레이트, 메틸메타크릴레이트) 공중합체, 폴리(메타크릴산, 메틸메타크릴레이트) 공중합체, 폴리(메타크릴산, 에틸아크릴레이트) 공중합체 등을 선택하여 사용할 수 있으며, 폴리에틸렌 유도체로서 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 옥사이드 등을 선택 사용할 수 있으며, 카르복시비닐폴리머로서 카보머를 사용할 수 있다.

[0037] 한 구체예에서, 상기 약제학적 조성물은 제2의 약물과의 병용 사용을 위한 것일 수 있다.

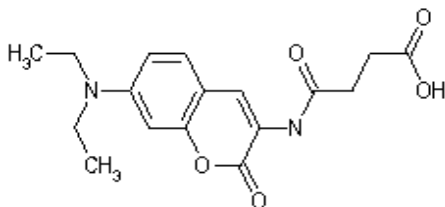
[0038] 본 발명에 있어서, "제2의 약물"이라 함은 본 발명의 화학식 1의 화합물의 산 부가염 이외의 또다른 약제학적 유효성분을 의미한다. 본 발명의 화학식 1의 화합물의 산 부가염은 상기한 바와 같이 다양한 질환의 치료를 위해 사용될 수 있는 것으로 공지되어 있다. 따라서, 본 발명의 화학식 1의 화합물의 산 부가염은 각각의 질환의 효율적인 치료를 위한 제2의 약물과 함께 병용 사용될 수 있다.

[0039] 한 구체예에서, 상기 제2의 약물은 항암제일 수 있다. 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물의 산 부가염과 병용 사용하기 위한 항암제는 공지의 항암제라면 어떠한 것이든 가능하다. 예를 들어, 알킬화제, 대사길항제, 천연제제, 호르몬 및 길항제 등의 공지의 화학요법제 및 면역요법제, 유전자치료제 등의 생물학적 제제 등이 포함된다. 한 구체예에서, 상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 엘로티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조미드, 수니티닙, 카보플라틴, 소라페닙, 베바시주맵, 시스플라틴, 세록시맵, 비스쿰알부미, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵티세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 겐시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 카르모피, 말티트렉세드, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 다우노루비신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 테모줄로마이드, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 로무스틴 및 카르무스틴으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 약물일 수 있다.

[0040] 또 다른 구체예에서, 본 발명은

[0041] 하기 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 및 제2의 약물을 포함하는 복합제제를 제공한다

[0042] [화학식 1]



[0043]

[0044] 복약의 편의를 위해, 상기 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염은 제2의 약물과 함께 제제화되어 있는 복합 제제의 형태로 제공될 수 있다. 한 구체예에서, 상기 제2의 약물은 항암제일 수 있으며, 사용가능한 항암제의 종류는 앞서 예시한 바와 같다.

[0045] 한편, 본 발명에 있어서, '대상체'는 특정 질병, 장애 또는 질환에 걸린 포유동물과 같은 온혈 동물을 의미하며, 예를 들어, 인간, 오랑우탄, 침팬지, 마우스, 랫트, 개, 소, 닭, 돼지, 염소, 양 등을 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 또한 '치료'는 증상을 경감시키거나, 증상의 원인을 일시적 또는 영구적으로 제거하거나 증상의 출현 및 상기한

질병, 장애 또는 질환의 진행을 예방 또는 둔화시키는 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0047] 본 발명의 약제학적 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 치료를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 예컨대, 성인의 경우, 화학식 1의 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염은 1일 1회 내지 수회 투여 시, 총 1 내지 4000 mg의 용량으로 투여할 수 있다.

발명의 효과

[0048] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 Wnt/ β -카테닌 신호전달계를 저해함과 동시에 Ras 단백질 안정성을 조절하는 물질로서, *ras* 유전자 돌연변이로 인해 EGFR, VEGF 등에 대한 항체 항암제를 포함한 각종 항암제에 저항성을 보이는 환자를 효과적으로 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 L-Wnt3a세포에 약물을 처리한 후 웨스턴 블롯을 이용하여 β -카테닌의 양을 측정한 결과를 보여준다.
 도 2는 Wnt/ β -카테닌 신호전달계 활성도를 확인할 수 있는 리포터 세포주인 TOPFlash HEK293 세포주에 화합물을 농도별로 처리하여 화합물의 최대 활성 농도를 구하기 위한 결과를 보여준다.
 도 3은 암세포의 콜로니 형성 (foci formation) 억제를 통한 화합물의 항암 활성을 보여주는 결과이다.
 도 4는 암세포의 성장 억제를 통한 화합물의 항암 활성을 보여주는 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0051]

[실시예]

[0053] 실시예 1. Ras 단백질 안정성을 억제하는 Wnt 신호전달계 저해 물질 선별

[0054] Wnt/ β -카테닌 신호전달계의 활성화 및 저해를 확인할 수 있는 Topflash 리포터 세포주인 TOPFlash HEK293 세포주를 이용하여 (Gwak et al., 2006. JCS 119, 4702) Wnt/ β -카테닌 신호전달계를 조절할 수 있는 물질들을 일차적으로 선별하였다.

[0055] 먼저, 96웰 플레이트(greiner 사)에 10% FBS (fetal calf serum)를 함유한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)을 웰 당 100 μ l씩 가한 후, 상기 TOPFlash HEK293 세포주를 웰 당 2.5x10³개 분주하였다. 그런 다음, 4300여개의 화합물들을 상기 세포주에 15-18시간동안 처리했다. 스크리닝을 위해 적용된 개별 화합물은 1mg/ml 농도의 저장품을 이용하여 개별 웰에 처리되는 양은 500분의 1로 희석하여 2 μ g/ml의 농도로 처리했다.

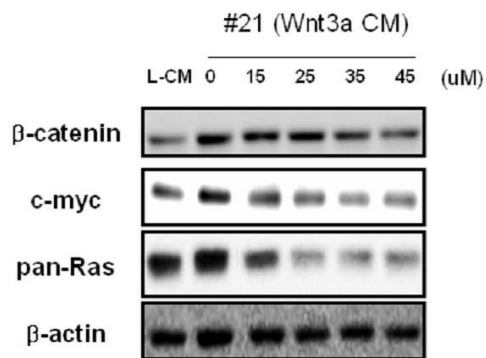
[0056] 리포터 분석을 위해 화합물을 처리한 배지를 모두 제거한 후, 각 웰에 1x lysis 완충용액을 25 μ l씩 분주하였다. shaker incubator에 5분 동안 인큐베이션시켜 충분히 lysis시킨 후 루시퍼라제를 각 웰 당 25 μ l씩 분주한 후 곧바로 루미노미터 (luminometer)를 이용하여 520 nm 파장에서 값을 측정하였다.

[0057] 이와 같이, 4300여개의 화합물들을 TOPFlash HEK293 세포주에 처리하여 스크리닝해 낸 결과, 38개의 Wnt/ β -카테닌 신호전달계를 저해하는 화합물을 선별하였으며, 최종적으로 #21화합물(본 발명의 화학식 1의 화합물)이 항암효능을 가질 것으로 예상되었다. 스크리닝 단계를 통해 선별된 후보물질이라고 할 지라도 암 치료제로서의 가능성을 확인할 수는 없으므로, 이들 화합물들이 상기 후보물질이 항암 효능을 갖는지 확인하고자, 단백질 발현 분석을 수행하였다.

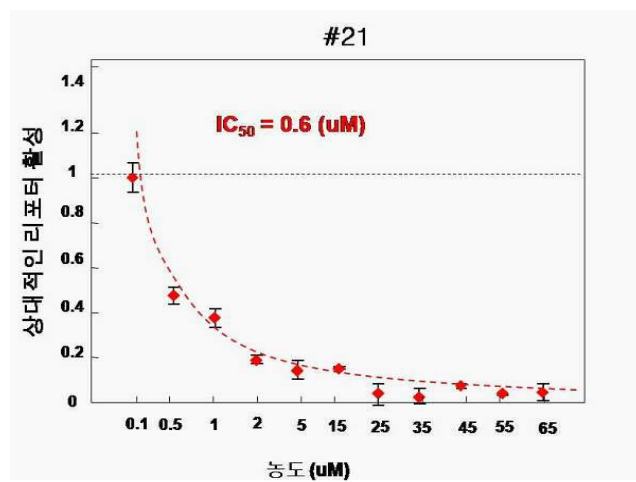
- [0058] 우선 선별된 후보 물질들이 실제로 Wnt/ β -카테닌 신호전달계에서 핵심적인 역할을 수행하는 β -카테닌 단백질 레벨을 감소시키는지 확인하기 위해 L-Wnt3a세포에 각각 약물을 처리한 후 웨스턴 블롯을 이용하여 β -카테닌의 양을 측정하였다. L-Wnt3a 세포는 자체적으로 Wnt3a를 발현할 수 있도록 고안된 세포이기 때문에 세포가 성장하면서 자체적으로 분비되는 Wnt3a 신호에 의해서 항상 Wnt/ β -카테닌 신호전달계가 활성화되어 있다. 단백질의 탐지를 위해, RIPA 버퍼 중에서 용해시킨 후, 이뮤노블롯 분석을 위한 용해물을 제조하였고 항- β -catenin, 항-c-myc, 항-pan-Ras, 또는 항- β -액틴 항체로 수행하였으며 호오스래디쉬 퍼옥시다제가 컨쥬게이트된 2차 항체(Santa Cruz)로 인큐베이션 하였다.
- [0059] 위와 같은 방법을 이용하면 β -카테닌의 양적 변화가 있는 경우 약물작용점이 β -카테닌 혹은 윗 단계인지를 추정할 수 있으며, 또한 Ras 단백질의 양적 변화의 유무를 웨스턴블롯으로 확인하여 양이 함께 변화될 경우 Wnt/ β -카테닌과 Ras-ERK 신호전달계의 cross-talk을 통해 신경줄기세포의 신경줄기세포로의 분화나 세포성장 억제와 같은 생리 현상을 조절하는지를 알 수 있다.
- [0060] L-Wnt3a 세포에 21번 화합물을 처리한 결과, 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 21번 화합물을 처리한 군에서 β -카테닌 단백질 레벨뿐만 아니라 Ras 단백질 레벨까지도 동시에 감소하고 있는 것을 확인했다. 이것은 특히, 대장암의 경우 β -카테닌 단백질 레벨이나 Ras/Erk 신호전달계의 활성화 단백질인 인산화된 ERK 단백질 레벨이 굉장히 과발현 되어 있는데 대장암에 특이적인 후보 약물로써의 가능성을 기대할 수 있을 것으로 기대된다.
- [0061] 21번 화합물의 최대 활성 농도를 구하기 위해서 Wnt/ β -카테닌 신호전달계 활성도를 확인할 수 있는 리포터 세포주인 TOPFlash HEK293 세포주를 96웰에 분주한 후 21번 화합물을 농도별로 처리하였다. 그 결과, 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 21번 화합물의 IC₅₀ 값은 약 0.6 μ M으로 나타났다.
- [0062] **실시예 2. 21번 화합물의 항암 효능 확인**
- [0063] 암세포의 콜로니 형성 (foci formation) 억제를 통한 #21 화합물의 항암 활성을 분석하였다. 6 웰 플레이트에 HCT15 대장암 세포를 웰 당 1x10⁵개로 분주한 후 12시간 뒤에 pcDNA3.1 empty vector 1mg씩을 대장암 세포주에 트랜스펙션하였다. 4시간 뒤 배지(OptiMEM)를 RIPM배지로 바꾼 후 CO₂ 인큐베이터속에서 12시간 동안 안정화시켰고 #21 화합물을 2주 동안 3일마다 1회씩 배지 선별을 위해서 G418과 함께 처리하였다. 그 결과, 도3에서 볼 수 있는 바와 같이, 2주 후 #21 화합물을 처리한 항암 세포주는 콜로니 크기 및 개수가 아무것도 처리하지 않은 군과 비교해 현저히 감소되어 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 #21 화합물의 콜로니 생성 억제 효과와 함께 HCT15 대장암 세포주뿐만 아니라 HCT116과 SW480 대장암 세포주에서도 세포 성장 활성을 분석하였다. 6 웰 플레이트에 HCT15 및 SW480 대장암 세포를 웰 당 1x10⁵개로 분주한 후 12시간 뒤에 약물을 매일 처리하였고 24 및 48 시간 후 MTT 분석을 실시하였다. 각 웰 당 5 mg/ml 농도의 MTT 용액을 200 μ l씩 첨가하였고 37도씨 CO₂ 인큐베이터 속에서 3시간 30분 동안 인큐베이션시켰다. 조심스럽게 MTT 용액이 포함된 배지를 제거하고 MTT solvent인 DMSO를 웰 당 1 ml씩 첨가한 후 Orbital shaker에서 15분간 흔들어 주었다. 96 웰 플레이트의 각 웰에 100 μ l씩 현탁액을 넣고 590 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이 HCT15 및 SW480 대장암 세포주에서도 21번 약물 처리에 의해서 세포 성장이 저해되고 있음이 확인 되었다.

도면

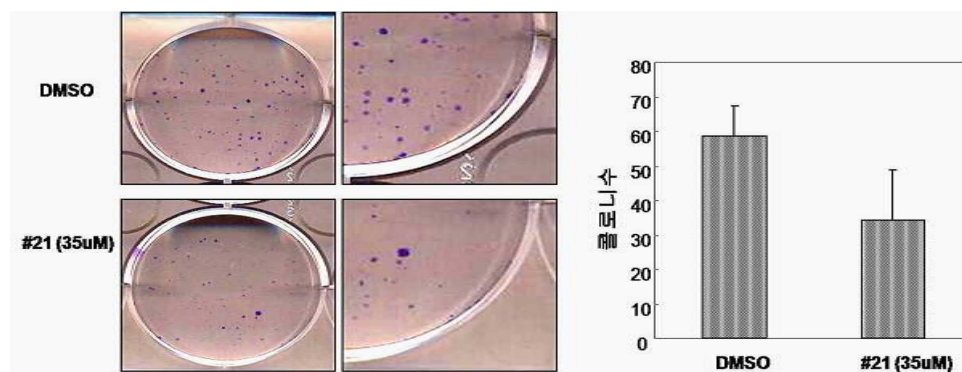
도면1



도면2



도면3



도면4

