



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0117298
(43) 공개일자 2018년10월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/352 (2006.01) A61K 31/353 (2006.01)

A61K 31/37 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/352 (2013.01)

A61K 31/353 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0050222

(22) 출원일자 2017년04월19일

심사청구일자 2017년04월19일

(71) 출원인

경북대학교 산학협력단

대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)

충남대학교 산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

류광현

대구광역시 북구 대학로 80 경북대학교 약학대학
(제4합동강의동) 401-3호

송규용

대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 약학대학

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 피씨알

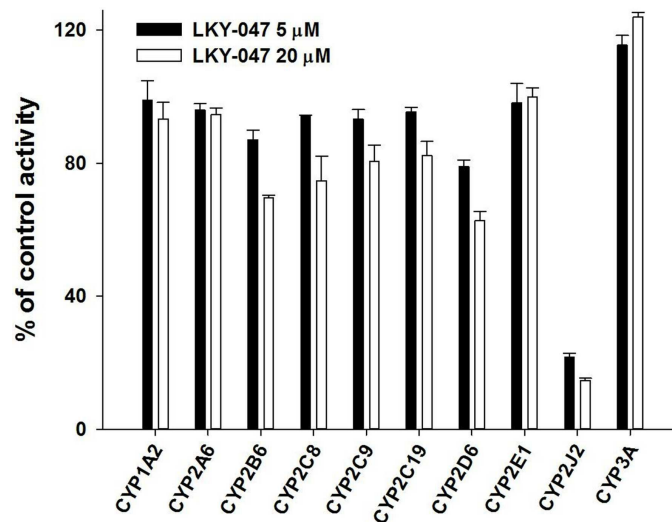
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 시토크롬 P450 동효소 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 시토크롬 P450 동효소 억제용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 일 실시예에 개시된 화합물을 이용하면 시토크롬 450 2B6, 시토크롬 450 2C8, 시토크롬 450 2C9, 시토크롬 450 2D6 및 시토크롬 450 2J2의 활성을 효과적으로 저해할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/37 (2013.01)

(72) 발명자

오유석

대전광역시 유성구 대학로 99 충남대학교 약학대학

오철학

대한민국 41566 대구광역시 북구 대학로 80 경북대학교 약학대학

푸누엔민

대한민국 41566 대구광역시 북구 대학로 80 경북대학교 약학대학 407호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201616070000

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기본연구(후속연구지원)

연구과제명 탠덤질량분석기 기반 신약후보물질의 약물성 평가 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 경북대학교

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093815

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소사업

연구과제명 심혈관계 질환 치료제 개발 기반연구

기 여 율 1/2

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.31

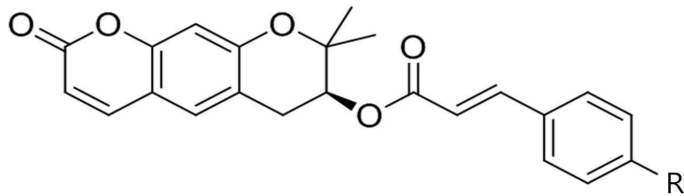
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염 또는 용매화물을 포함하는 시토크롬 P450 동효소 억제용 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식에서 R은 수소 원자, C₁ 내지 C₅의 알콕시 또는 질소 산화물이다.

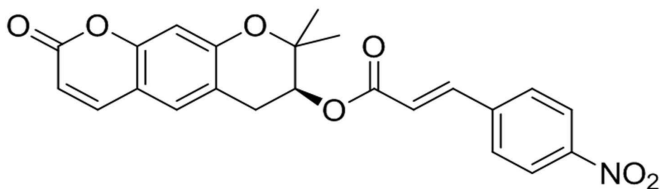
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 시토크롬 P450 동효소는 시토크롬 450 2B6, 시토크롬 450 2C8, 시토크롬 450 2C9, 시토크롬 450 2D6 및 시토크롬 450 2J2로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물인 것인 조성물:

[화학식 2]



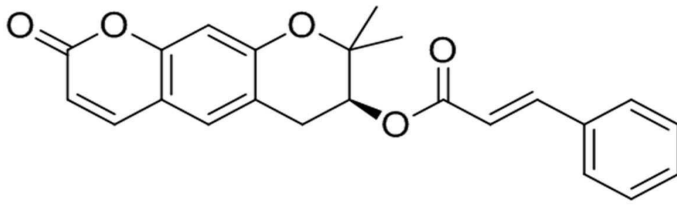
청구항 4

제3항에 있어서, 상기 조성물은 시토크롬 P450 2J2를 억제하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물인 것인 조성물:

[화학식 3]



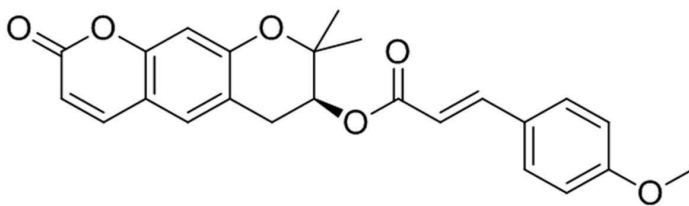
청구항 6

제5항에 있어서, 상기 조성물은 시토크롬 P450 2B6, 시토크롬 P450 2C8 및 시토크롬 P450 2D6으로 이루어진 군 으로부터 선택되는 하나 이상의 시토크롬 P450 동효소를 억제하는 것인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 4로 표시되는 화합물인 것인 조성물:

[화학식 4]



청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조성물은 시토크롬 P450 2B6, 시토크롬 P450 2C9 및 시토크롬 P450 2J2로 이루어진 군 으로부터 선택되는 하나 이상의 시토크롬 P450 동효소를 억제하는 것인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 시토크롬 P450 동효소 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

시토크롬 P450(cytochrome P450, P450)은 헴(heme)을 보조인자(prosthetic group)로 가지는 슈퍼 패밀리 (superfamily) 효소군으로 약물 및 생체이물질(xenobiotics)의 대사에 관여하는 1상(phase I) 반응을 매개하는 효소의 하나이다. 시토크롬 P450의 활성이 변화하면 약물동력학적 약물-약물 상호작용(pharmacokinetic drug-drug interactions, DDIs)이 일어나는 것으로 알려져 있으며, 일반적으로 시토크롬 P450이 관여하는 약물 대사가 저해되면 DDIs가 발생한다. 따라서, 시토크롬 P450의 활성을 저해하는 약물들의 상호작용 가능성을 예측하기 위하여 약물 대사에 관여하는 시토크롬 P450의 동효소(isoform)를 확인하는 것이 중요하다. 약물 개발의 초기 과정에서 이 목적으로 시토크롬 P450에 대한 약물대사 평가시험이 일반적으로 이루어지며, 이 과정에서 DDIs가 일어날 가능성이 낮은 후보 약물을 발굴하기도 한다.

시토크롬 P450에 대한 약물대사 평가시험을 수행하는 방법의 하나는 시토크롬 P450 동효소의 선택적 저해제를 인체 간 마이크로솜(human liver microsomes, HLMs)과 반응시키는 것이다. 시토크롬 P450 동효소 선택적 저해

제에는 CYP1A2에 대하여 퓨라필린(furafylline), CYP2A6에 대하여 3-((pyridine-3-yl)-1H-pyrazol-5-yl)methanamine, CYP2B6에 대하여 티오테파(thiotepa), CYP2C8에 대하여 몬테루카스트(montelukast), CYP2C9에 대하여 설파페나졸(sulfaphenazole), CYP2C19에 대하여 S-벤질니르바놀(S-benzyl nirvanol), CYP2D6에 대하여 퀴니딘(quinidine), CYP2E1에 대하여 4-메틸피라졸(4-methylpyrazole) 및 CYP3A에 대하여 케토코나졸(ketoconazole)이 있다(Khojasteh et al., 2011) (<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm093664.htm#cypEnzymes>).

[0005] CYP2J2는 알벤다졸(albendazole; Wu et al., 2013b), 아미오다론(amiodarone; Karkhanis et al., 2016), 아스테미졸(astemizole; Matsumoto and Yamazoe, 2001), 에바스틴(ebastine; Liu et al., 2006) 및 테르페나딘(terfenadine; Lafite et al., 2006)과 몇몇 약물의 대사에 중요한 역할을 한다. CYP2J2의 선택적 저해제에 대하여 지금까지 알려진 것은 거의 없으며, 다나졸(Danazol; Lee et al., 2012; Lee et al., 2015), 히드록시 에바스틴(hydroxyebastine; Yoon and Liu, 2011; Lee et al., 2015) 및 텔미사르탄(telmisartan; Ren et al., 2013; Lee et al., 2015)이 저해 효과를 가지는 것으로 알려져 있으나 HLMs 대신 재조합 CYP2J2를 이용하여 저해 활성을 실험한 것이다. 또한, 상기 화합물들은 다른 P450 동효소에도 저해 효과를 나타낸다. 예를 들어 다나졸은 IC₅₀ 기준으로 CYP2C8, CYP2C9 및 CYP2D6의 활성을 각각 1.95, 1.44 및 2.74 μ M로 저해하였다(Lee et al., 2012). 히드록시에바스틴은 CYP2C9, CYP2C19 및 CYP2D6의 활성을 Ki 기준으로 각각 2.74, 10.2 및 3.83 μ M로 저해하였으며(Yoon and Liu, 2011), 텔미사르탄은 CYP2C9-매개 톨부타미드 히드록실라제(tolbutamide hydroxylase)의 활성을 IC₅₀(half maximal inhibitory concentration) 기준으로 4.78 μ M로 저해하였다(Ren et al., 2013). CYP2A6, CYP2B6 및 CYP2E1에 대한 다나졸 및 텔미사르탄의 저해 효과는 아직 알려지지 않았다.

[0006] 이전 연구에서 본 발명자들은 약용 식물(medicinal plants)에서 CYP2J2에 대하여 저해 효능을 가지는 50개의 천연 물질을 확인하였다(Lee et al., 2014b). 예를 들어, 데커신(decursin)은 CYP2J2에 의해 매개되는 아스테미졸 O-디메틸라제(astemizole O-demethylase activity)의 활성을 K_i 기준으로 8.34 μ M로 저해하여 보통(moderate) 수준의 저해 활성을 보였다. 본 발명자들은 데커신 유도체를 합성하여 시토크롬 P450 동효소에 대한 저해 효능을 실험하였으며, 시토크롬 P450 2J2에 대하여 선택적 저해 효능을 보이는 데커신 유도체를 확인하였다.

[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

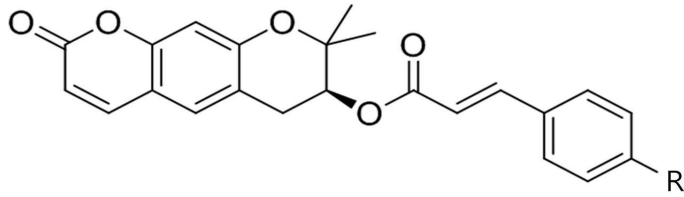
[0009] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 10-1496435
(특허문헌 0002) 1. 대한민국 등록특허 10-1513189

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 일 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염 또는 용매화물을 포함하는 시토크롬 P450 동효소 억제용 조성물을 제공하는 것이다:

화학식 1



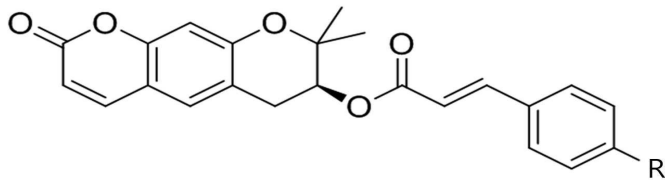
[0011]

[0012] 상기 화학식에서 R은 수소 원자, C₁ 내지 C₅의 알콕시 또는 질소 산화물이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 염 또는 용매화물을 포함하는 시토크롬 P450 동효소 억제용 조성물을 제공한다:

[0015] [화학식 1]



[0016]

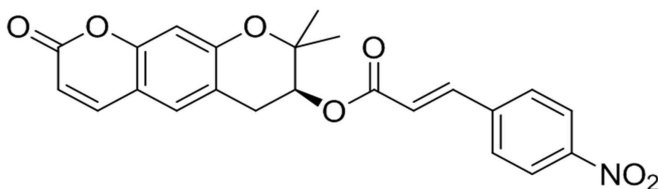
[0017] 상기 화학식에서 R은 수소 원자, C₁ 내지 C₅의 알콕시 또는 질소 산화물이다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 시토크롬 P450 동효소는 시토크롬 450 2B6(CYP2B6), 시토크롬 450 2C8(CYP2C8), 시토크롬 450 2C9(CYP2C9), 시토크롬 450 2D6(CYP2D6) 및 시토크롬 450 2J2(CYP2J2)로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 화학식에서 R은 수소 원자, 메톡시(-OCH₃) 또는 이산화질소(-NO₂)일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물일 수 있다:

화학식 2



[0021]

[0022] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 화학식 2의 화합물을 포함하는 시토크롬 P450 동효소 억제용 조성물은 시토크롬 P450 2J2를 억제할 수 있다. 시토크롬 P450 2J2(CYP2J2)는 인체에 존재하는 유일한 CYP2J 서브패밀리 동효소로 아라키돈산의 에폭시에이코사트리엔산 (epoxyeicosatrienoic acid, EET)으로의 대사 등과 같은 내인성 물질의 대사에 관여하여 인체의 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한, 사이클로스포린(cyclosporin), 아미오다론(amiodarone), 아스테미졸(astemizole), 아픽사반(apixaban), 알벤다졸(albendazole), 에바스틴(ebastine), 타목시펜(tamoxifen), 테르페나딘(terfenadine), 티오리다진

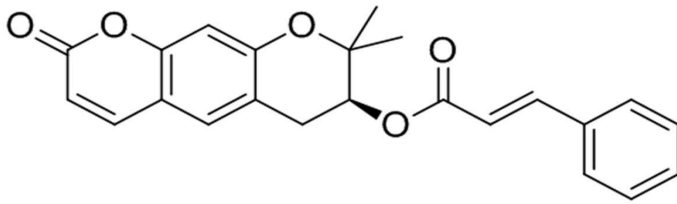
(thioridazine) 및 펜벤다졸(fenbendazole)과 같은 약물의 대사에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0023] 상기 화학식 2의 화합물은 천연물에서 분리한 것 또는 통상적인 유기합성 방법을 이용하여 제조한 것을 포함할 수 있다. 합성하는 경우 4-니트로신남산(4-nitrocinnamic acid), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride 및 4-(dimethylamino)pyridine의 혼합물을 무수 디클로로메탄(dichloromethane anhydrous)에 용해시킨 후 상기 용액에 (+)-데커시놀(decursinol)을 첨가하여 교반하고, 결과물을 진공건조한 후 정제하여 제조할 수 있다.

[0024] 상기 화학식 2의 화합물은 다른 시토크롬 P450 동효소의 활성을 억제하지 않으면서 시토크롬 P450 2J2의 활성을 경쟁적으로 억제하므로 시토크롬 P450 동효소 억제용 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 화합물은 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물일 수 있다:

화학식 3



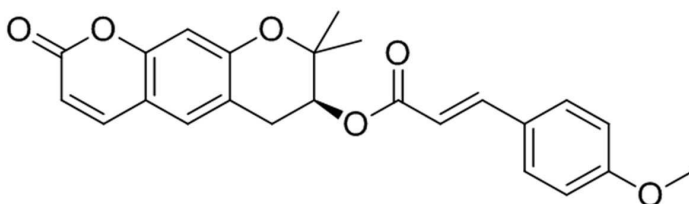
[0026]

[0027] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 화학식 3의 화합물을 포함하는 시토크롬 P450 동효소 억제용 조성물은 시토크롬 P450 2B6, 시토크롬 P450 2C8 및 시토크롬 P450 2D6의 활성을 억제할 수 있다.

[0028] 상기 화학식 3의 화합물은 천연물에서 분리한 것 또는 통상적인 유기합성 방법을 이용하여 제조한 것을 포함한다. 합성하는 경우 신남산(cinnamic acid), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride 및 4-(dimethylamino)pyridine의 혼합물을 무수 디클로로메탄에 용해시킨 후 상기 용액에 (+)-데커시놀을 첨가하여 교반하고, 결과물을 진공건조한 후 정제하여 제조할 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 화합물은 하기 화학식 4로 표시되는 화합물일 수 있다:

화학식 4



[0030]

[0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 화학식 4의 화합물을 포함하는 조성물은 시토크롬 P450 2B6, 시토크롬 P450 2C9 및 시토크롬 P450 2J2의 활성을 억제할 수 있다.

[0032] 상기 화학식 4의 화합물은 천연물에서 분리한 것 또는 통상적인 유기합성 방법을 이용하여 제조한 것을 포함한다. 합성하는 경우 4-메톡시신남산(4-methoxycinnamic acid), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride 및 4-(dimethylamino)pyridine의 혼합물을 무수 디클로로메탄에 용해시킨 후 상기 용액에 (+)-데커시놀을 첨가하여 교반하고, 결과물을 진공건조한 후 정제하여 제조할 수 있다.

[0033] 상기 시토크롬 P450 동효소 억제용 조성물은 상기 화학식 1의 화합물과 함께 약물대사 효소의 억제 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.

[0034] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨,

만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다.

발명의 효과

[0036] 본 발명의 시토크롬 P450 동효소 억제용 조성물을 이용하면 시토크롬 P450 2B6, 시토크롬 P450 2C8, 시토크롬 P450 2C9, 시토크롬 P450 2D6 및 시토크롬 P450 2J2의 활성을 효과적으로 저해할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 시토크롬 P450 동효소에 대한 LKY-047의 저해 효과를 확인한 결과를 보여주는 도이다.

도 2는 다른 농도의 LKY-047 존재 하에서 아스테미졸(A) 및 테르페나딘(B) 각각의 농도와 효소 반응 속도 사이의 관계를 보여주는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실험방법

[0042] 1. 화합물 및 시약

[0043] 아스테미졸 (Astemizole, AST), *O*-데스메틸아스테미졸 (*O*-desmethylastemizole, DAST), 히드록시에바스틴 (hydroxyebastine, HEB), 텍스트로판 (dextrophan), 미다졸람 (midazolam), 1'-히드록시미다졸람(1'-hydroxymidazolam), 오메프라졸 (omeprazole), 히드록시오메프라졸 (hydroxyomeprazole), 톨부타미드 (tolbutamide), 및 히드록시톨부타미드 (hydroxytolbutamide)는 Toronto Research Chemicals(North York, Canada)에서 구입하였다.

[0044] 글루코오스-6-인산 (Glucose-6-phosphate, G6P), 글루코오스-6-인산 탈수소효소 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH), 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드 인산 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP+), 신남산 (cinnamic acid, 계피산), 4-브로모신남산 (4-bromocinnamic acid), 4-니트로신남산 (4-nitrocinnamic acid), 4-메톡시신남산 (4-methoxycinnamic acid), 4-디메틸아미노피리딘 (4-dimethylaminopyridine), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide, 아세트아미노펜 (acetaminophen), 텍스트로메토르판 (dextromethorphan), 페나세틴 (phenacetin), 부프로피온 (bupropion), 히드록시부프로피온 (hydroxybupropion), 쿠마린 (coumarin), 히드록시쿠마린 (hydroxycoumarin), 클로르족사존 (chlorzoxazone), 히드록시클로르족사존 (hydroxychlorzoxazone), 아모디아퀸 (amodiaquine), N-데스메틸아모디아퀸 (N-desethylamodiaquine), 우리딘-5'-디포스포글루쿠론산 (uridine 5'-diphosphoglucuronic acid, UDPGA), 메벤다졸 (mebendazole, MBZ), 테르페나딘 (terfenadine, TFD) 및 내부 표준물질(internal standard, IS)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0045] 인체 간 마이크로솜(pooled human liver microsomes, 이하 HLMs로 표기함)은 XenoTech(H0630, Lenexa, KS, USA)에서 구입하였고, 용매는 HPLC (high performance liquid chromatography) 등급을 이용하였다. 용매 이외의 다른 시약과 화합물들은 분석 등급(analytical grade; $\geq 98\%$; Fisher Scientific Co., Pittsburgh, 미국)을 사용하였다.

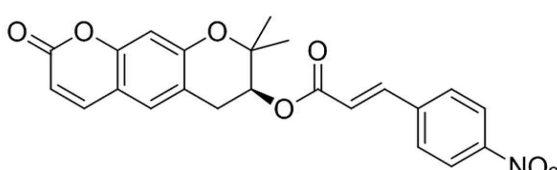
[0047] 2. Cinnamoyl-decursin Derivatives [LKY-047(-NO₂), LKY-021(-H), LKY-024(-OCH₃) 및 LKY-046(-Br)] 합성

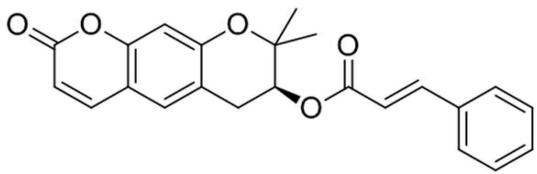
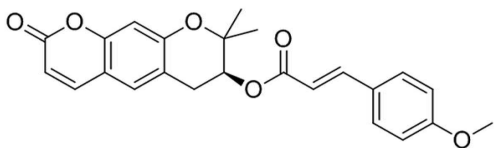
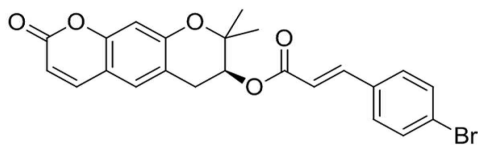
[0048] 2-1: (7S)-(+)-3-(4-Nitro-phenyl)-acrylic acid, 8,8-dimethyl-2-oxo-6,7-dihydro-2H,8H-pyrano[3,2-gl]chromen-7-yl-ester (LKY-047, 화학식 2) 제조

- [0049] 4-nitrocinnamic acid(1.2 당량, 1.2 equivalent), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride (2 당량) 및 4-(dimethylamino)pyridine(0.4 당량)의 혼합물을 무수 디클로로메탄(dichloromethane anhydrous)에 용해시켰다. 상기 용액에 (+)-데커시놀(1 당량)을 첨가하여 상온에서 8 내지 12시간 동안 교반하였다. 진공 상태에서 용액 성분을 제거하고, 남은 잔사(residue)를 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography; 25% ethyl acetate in n-hexane)로 정제하여 LKY-047(수율 65.7%, 밝은 황색 고체)을 수득하였다. 수득한 LKY-047(화학식 2)에 대한 분석 결과는 하기와 같다.
- [0050] MP: 193℃
- [0051] $R_f = 0.42$ (1:1 *n*-hexane:ethyl acetate)
- [0052] $[\alpha]_D^{25} +21.1$ (c=3, CHCl₃)
- [0053] ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ_H 8.23 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.72-7.62 (m, 3H), 7.59 (d, *J*=9.2 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.56 (d, *J*=11.2 Hz, 1H), 6.24 (d, *J*=9.6 Hz, 1H), 5.22 (t, *J*=4.8 Hz, 1H), 3.27 (dd, *J*=4.8, 17.2 Hz, 1H), 2.95 (dd, *J*=4.8, 17.2 Hz, 1H), 1.44 (s, 3H, CH₃), 1.40 (s, 3H, CH₃)
- [0054] ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ_C 165.4, 160.4, 155.9, 153.7, 148.2, 144.2, 142.9, 140.3, 129.7, 129.7, 123.9, 122.0, 115.8, 112.9, 112.7, 103.6, 76.7, 70.1, 27.1, 24.2, 23.5
- [0055] IT-TOF/MS: *m/z*=444.1035 [M+Na]⁺
- [0057] **2-2: (7S)-(+)-3-Phenyl-acrylic acid, 8,8-dimethyl-2-oxo-6,7-dihydro-2H,8H-pyrano[3,2-g]chromen-7-yl-ester (LKY-021, 화학식 3) 제조**
- [0058] 출발물질로 4-nitrocinnamic acid 대신 cinnamic acid을 이용하여 상기 2-1과 동일한 방법으로 LKY-021을 합성하였다(수율 49.3%, 흰색 고체). 합성한 LKY-021(화학식 3)에 대한 분석 결과는 하기와 같다.
- [0059] MP: 137℃
- [0060] $R_f = 0.40$ (1:1 *n*-hexane-ethyl acetate)
- [0061] $[\alpha]_D^{25} +42.0$ (c=3, CHCl₃)
- [0062] ¹H NMR (400 MHz, acetone-d₆): δ_H 7.88 (d, *J*=9.6 Hz, 1H), 7.72-7.68 (m, 3H), 7.43-7.42 (m, 4H), 6.75(s, 1H), o 6.56 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 6.21 (d, *J*=9.2 Hz, 1H), 5.24 (t, *J*=4.6 Hz, 1H), 3.34 (dd, *J*=4.6, 17.6 Hz, 1H), 2.99 (dd, *J*=4.4, 17.6 Hz, 1H), 1.43 (s, 3H, CH₃), 1.42 (s, 3H, CH₃)
- [0063] ¹³C NMR (100 MHz, acetone-d₆): δ_C 166.4, 160.8, 157.1, 155.0, 146.1, 144.2, 135.0, 131.3, 130.2, 130.2, 129.7, 129.7, 129.1, 118.4, 116.7, 113.8, 113.7, 104.5, 77.5, 70.8, 28.2, 25.0, 23.6
- [0064] IT-TOF/MS: *m/z*=399.1186 [M+Na]⁺
- [0066] **2-3: (7S)-(+)-3-(4-Methoxy-phenyl)-acrylic acid, 8,8-dimethyl-2-oxo-6,7-dihydro-2H,8H-pyrano[3,2-g]chromen-7-yl-ester (LKY-024, 화학식 4) 제조**
- [0067] 4-nitrocinnamic acid 대신 4-methoxycinnamic acid을 이용하여 상기 2-1과 동일한 방법으로 LKY-024를 합성하였다(수율 91.2%, 흰색 고체). 합성한 LKY-024(화학식 4)에 대한 분석 결과는 하기와 같다.
- [0068] MP: 68℃

- [0069] $R_f = 0.20$ (2:1 *n*-hexane-ethyl acetate)
- [0070] $[\alpha]_D^{25} +21.9$ (c=3, CHCl₃)
- [0071] ¹H NMR (400 MHz, CHCl₃): δ_H 7.63 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 7.58 (d, *J*=9.6 Hz, 1H), 7.45 (d, *J*=8.8 Hz, 2H), 7.17 (s, 1H), 6.85 (d, *J*=8.0 Hz, 2H), 6.78 (s, 1H), 6.28 (d, *J*=16.0 Hz, 1H), 6.23 (d, *J*=9.6 Hz, 1H), 5.18 (t, *J*=4.8 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H, OCH₃), 3.23 (dd, *J*=4.4, 17.6 Hz, 1H), 2.93 (dd, *J*=4.4, 17.6 Hz, 1H), 1.43 (s, 3H, CH₃), 1.39 (s, 3H, CH₃);
- [0072] ¹³C NMR (100 MHz, acetone-d₆): δ_C 166.7, 162.6, 160.8, 157.2, 155.0, 145.9, 144.2, 130.8, 130.8, 130.2, 127.6, 116.8, 115.6, 115.1, 115.1, 113.8, 113.7, 104.5, 77.5, 70.6, 55.7, 28.3, 25.0, 23.5
- [0073] IT-TOF/MS: *m/z*=429.1287 [M+Na]⁺
- [0075] 2-4: (7S)-(+)-3-(4-Bromo-phenyl)-acrylic acid, 8,8-dimethyl-2-oxo-6,7-dihydro-2H,8H-pyrano[3,2-*g*]chromen-7-yl-ester (LKY-046, 화학식 5) 제조
- [0076] 출발물질로 4-nitrocinnamic acid 대신 4-bromocinnamic acid을 이용하여 상기 2-1과 동일한 방법으로 LKY-046을 합성하였다(수율 62.2%, 흰색 고체). 합성한 LKY-046(화학식 5)에 대한 분석 결과는 하기와 같다.
- [0077] MP: 120℃
- [0078] $R_f = 0.48$ (1:1 *n*-hexane-ethyl acetate)
- [0079] $[\alpha]_D^{25} +22.9$ (c=3, CHCl₃)
- [0080] ¹H NMR (400 MHz, CHCl₃): δ_H 7.60 (d, *J*=16.4 Hz, 1H), 7.58 (d, *J*=9.2 Hz, 2H), 7.50 (d, *J*=8.4 Hz, 2H), 7.35 (d, *J*=8.4 Hz, 1H), 7.17 (d, 1H), 6.82 (s, 1H), 6.40 (d, *J*=16.4 Hz, 1H), 6.23 (d, *J*=9.2 Hz, 1H), 5.19 (t, *J*=4.4 Hz, 1H), 3.24 (dd, *J*=4.4, 17.2 Hz, 1H), 2.93 (dd, *J*=4.4, 17.2 Hz, 1H), 1.43 (s, 3H, CH₃), 1.39 (s, 3H, CH₃)
- [0081] ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ_C 165.8, 160.4, 156.0, 153.7, 144.2, 144.2, 133.2, 131.9, 130.6, 129.7, 124.1, 118.5, 115.8, 112.8, 112.7, 103.6, 76.7, 69.8, 27.1, 24.3, 23.4
- [0082] IT-TOF/MS: *m/z*=477.0288 [M+Na]⁺
- [0084] 상기 2-1 내지 2-4에서 합성한 화합물의 구조를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

화학식	구 조
화학식 2 (LKY-047)	

화학식 3 (LKY-021)	
화학식 4 (LKY-024)	
화학식 5 (LKY-043)	

3. 데커신 유도체의 시토크롬 P450 동효소 저해 효능 측정

모든 실험은 3번 반복하여 평균값을 결과로 표시하였다.

3-1: 데커신 유도체의 시토크롬 P450 동효소에 대한 저해 효능 확인

당업계에 알려진 기질 각테일 방법(Kim et al., 2005; Joo and Liu, 2013)을 이용하여 시토크롬 P450 동효소 (CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A 및 2J2)에 대한 데커신 유도체의 IC₅₀을 측정하였다.

시토크롬 P450 동효소의 선택적 기질은 기질의 Km(Michaelis-Menten constant)에 해당하는 농도를 이용하였다: 페나세틴 50 μ M(CYP1A2), 쿠마린 5 μ M(CYP2A6), 부프로피온 50 μ M(CYP2B6), 아모디아퀸 1 μ M (CYP2C8), 톨부타미드 100 μ M(CYP2C9), 오메프라졸 20 μ M(CYP2C19), 텍스트로메토르판 5 μ M(CYP2D6), 클로르족사존 50 μ M(CYP2E1) 및 미다졸람 5 μ M(CYP3A). 데커신 유도체의 존재 또는 부존재 상태에서 상기 시토크롬 P450 동효소 선택적 기질과 HLMs(0.25 mg/ml)를 15분 동안 접촉시키고, 원심분리하여 반응을 종결시켰다. 원심분리 후 당업계에 알려진 방법(Kim et al., 2005; Joo and Liu, 2013)을 이용하여 LC-MS/MS로 상등액을 분석하였다.

3-2: 아스테미졸 O-메틸라제(Astemizole O-Demethylase) 실험

상기 2-1 내지 2-4에서 합성한 데커신 유도체의 시토크롬 P450 동효소 저해 효과를 확인하기 위하여 하기와 같이 실험하였다.

먼저, HLMs(0.25 mg/ml), AST(1 μ M) 및 데커신 유도체(0.2 내지 10 μ M)를 혼합하여 최종 부피를 100 μ l로 조정한 후, 37°C에 5분 동안 방치하였다. 5분 후 NADPH-생성 시스템(NADPH-generating system; 1.3 mM NADP⁺, 3.3 mM G6P, 3.3 mM MgCl₂, 및 500 unit/ml G6PDH 포함)을 첨가하여 반응을 개시시켰다. 이때 LKY-047의 저해 상수(inhibition constant, K_i)를 확인하기 위하여 각각 다른 농도의 LKY-047(0, 0.2, 0.5, 2, 5 및 10 μ M)을 서로 다른 농도의 AST(0.2, 1 및 5 μ M)를 포함하고 있는 반응용액에 첨가하였다. 20분 후 차갑게 한 아세토니트릴 100 μ l(MBZ 100 nM 포함)를 첨가하여 반응을 종료시키고, 4°C 및 14,000 g 조건에서 5분 동안 원심분리하였다. 메벤다졸(MBZ)은 내부 표준물질로 이용하였다. 이후 상등액 1 μ l를 당업계에 공지된 방법(Yoon and Liu, 2011)을 이용하여 LC-MS/MS(liquid chromatography-tandem mass spectrometry)로 분석하였다.

3-3: 테르페나딘 히드록실라제(Terfenadine Hydroxylase) 실험

0.2 μ M 테르페나딘을 포함하는 HLMs(0.25 mg/ml)을 LKY-047(0.2 내지 10 μ M) 각각과 37°C에서 5분 동안 접촉시키고, NADPH-생성 시스템을 첨가하여 반응을 개시시켰다. 이때 HLMs에 대한 LKY-047의 K_i를 확인하기 위하여

다른 농도의 LKY-047(0, 0.2, 0.5, 2, 5, 및 10 μ M)을 서로 다른 농도의 테르페나딘(0.2, 1 및 5 μ M)이 포함되어 있는 반응용액에 첨가하였다. 20분 후 차갑게 한 아세트니트릴 100 μ l(MBZ 100 nM 포함)를 첨가하여 반응을 종료시키고, 4°C 및 14,000 g 조건에서 5분 동안 원심분리하였다. 이후 상등액 1 μ l를 당업계에 공지된 방법(Yoon and Liu, 2011)을 이용하여 LC-MS/MS로 분석하였다.

3-4: LKY-047의 시간 의존적(Time-Dependent) CYP2J2 저해 효능 확인

LKY-047의 시간-의존적 CYP2J2 저해 효능을 확인하기 위하여 IC₅₀ 쉬프트(IC₅₀ shift) 값을 확인하였다.

NADPH-생성 시스템의 존재 하에 서로 다른 농도의 LKY-047(0.2 내지 20 μ M)을 HLMs(0.25 mg/ml)과 30분 동안 미리 반응시켰다. 이후, AST 1 μ M을 첨가하여 반응을 개시시키고, 20분 뒤에 상기 2와 동일한 방법으로 반응을 종료시킨 후 4°C 및 14,000 g 조건에서 5분 동안 원심분리하였다. 이후 상등액을 당업계에 공지된 방법을 이용하여 LC-MS/MS로 분석하였다.

4. 결과 분석

IC₅₀은 WinNonlin software(Pharsight, Mountain View, 미국)를 이용하여 계산하였다. Ki는 라인위버-버크 플롯(Lineweaver-Burk plot), 디슨 플롯(Dixon plot) 및 2차 역수 플롯(secondary reciprocal plots)을 이용하여 1차로 계산하였고, 최적 효소 저해 모델(best enzyme inhibition model; Harold, 1976)에 기초한 비선형 최소 제곱 회귀 분석(non-linear least squares regression analysis) 방법으로 WinNonlin software를 이용하여 추가로 확인하였다.

실험 결과

1. 테커신 유도체의 시토크롬 P450 동효소 저해 효능 확인 결과

테커신 유도체(LKY-021, -024, -046 및 -047) 각각의 시토크롬 P450 동효소 저해 효능을 확인한 결과, 표 2에 나타난 것과 같이 유도체에 따라 상이한 결과가 나오는 것을 확인할 수 있었다.

LKY-021, LKY-024 및 LKY-046은 CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 또는 CYP2D6의 활성을 저해하였으며, LKY-047은 CYP2J2를 제외한 다른 P450 동효소에 대하여 저해 능력이 없는 것을 확인할 수 있었다(IC₅₀>50).

또한, 다른 유도체와 비교하여 *p*-니트로벤질 유도체(*p*-nitrobenzyl derivative)인 LKY-047이 현저히 우수한 CYP2J2 저해 효능(IC₅₀=1.7 μ M)을 보였다. LKY-047은 테커신(IC₅₀=6.95 μ M; Lee et al., 2014b)보다 우수한 CYP2J2 저해 효능을 나타냈으며, *p*-메톡시벤질 유도체(*p*-methoxybenzyl derivative)인 LKY-024와 *p*-브로모벤질 유도체(*p*-bromobenzyl derivative)인 LKY-046은 IC₅₀이 각각 27.2 및 47.1 μ M로 나타나 약한 CYP2J2 저해 효능을 보였다. 반면, 벤질 유도체(benzyl derivative)인 LKY-021은 CYP2J2 저해 효능이 거의 없었다(IC₅₀>50 μ M).

표 2

P450 동효소	Marker activity	IC ₅₀ (μ M) ^a			
		LKY-021	LKY-024	LKY-046	LKY-047
		-H	-OCH ₃	-Br	-NO ₂
1A2	Phenacetin <i>O</i> -deethylase	42.1	> 50	> 50	> 50
2A6	Coumarin 7-hydroxylase	> 50	> 50	> 50	> 50
2B6	Bupropion 4-hydroxylase	18.5	28.8	41.7	> 50
2C8	Amodiaquine <i>N</i> -deethylase	37.8	> 50	47.1	> 50
2C9	Tolbutamide 4-hydroxylase	> 50	16.4	> 50	> 50
2C19	Omeprazole 5-hydroxylase	> 50	> 50	> 50	> 50
2D6	Dextromethorphan <i>O</i> -demethylase	37.3	> 50	> 50	> 50
2E1	Chlorzoxazone 6-hydroxylase	> 50	> 50	> 50	> 50
3A	Midazolam 1' -hydroxylase	> 50	> 50	> 50	> 50

2J2	Astemizole <i>O</i> -demethylase	> 50	27.2	47.1	1.7
-----	----------------------------------	------	------	------	-----

[0115] 또한, LKY-047의 시토크롬 P450 동효소에 대한 선택성을 확인한 결과 LKY-047이 CYP2J2를 선택적으로 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

[0116] 도 1은 시토크롬 P450 동효소에 대한 LKY-047의 저해 능력을 측정한 결과를 보여주는 그래프이다. CYP2J2에 대하여 LKY-047은 20 μ M 농도일 때 다른 유도체보다 약 20배 높은 K_i 값을 보였으며 다른 P450 동효소의 활성에는 영향을 미치지 않으면서 CYP2J2 활성을 85.3%까지 저해하는 것을 알 수 있다.

[0118] 2. LKY-047의 CYP2J2 저해 효능 확인 결과

[0119] LKY-047은 CYP2J2-매개 아스테미졸 *O*-디메틸라제 및 테르페나딘 히드록실라제(terfenadine hydroxylase)의 활성을 K_i 기준으로 각각 0.96 및 2.61 μ M 수준에서 저해하였다(도 2).

[0120] 도 2는 LKY-047 및 기질의 농도 변화에 따른 아스테미졸 *O*-디메틸라제 및 테르페나딘 히드록실라제의 활성을 측정한 결과를 보여주는 그래프로 도 2A는 아스테미졸, 도 2B는 테르페나딘을 기질로 사용한 결과이다. 라인위버-버크 플랏이 Y-축에서 교차하기 때문에 기질 농도 0.2 내지 5.0 μ M 범위에서 LKY-047이 효소의 활성을 경쟁적으로 저해한다는 것을 확인할 수 있다.

[0121] 상기 결과를 통해 확인한 LKY-047의 CYP2J2 활성 저해 효능은 기존에 알려진 CYP2J2 저해제보다 우수하다: 예를 들어, 테커신($K_i=8.3 \mu$ M; Lee et al., 2014b), 할로페리돌(haloperidol, $IC_{50}=14.5 \mu$ M; Liu, 2011), 탄쉬논 IIA(tanshinone IIA, $IC_{50}=2.5 \mu$ M; Jeon et al., 2015), 텔레포르산(thelephoric acid, $IC_{50}=3.23 \mu$ M; Wu et al., 2013a) 및 TSAHC[4'-(p-toluenesulfonylamido)-4-hydroxychalcone] ($K_i=2.03 \mu$ M; Lee et al., 2014a)보다 우수하다.

[0123] 3. LKY-047의 시간 의존적 CYP2J2 저해 효능 확인

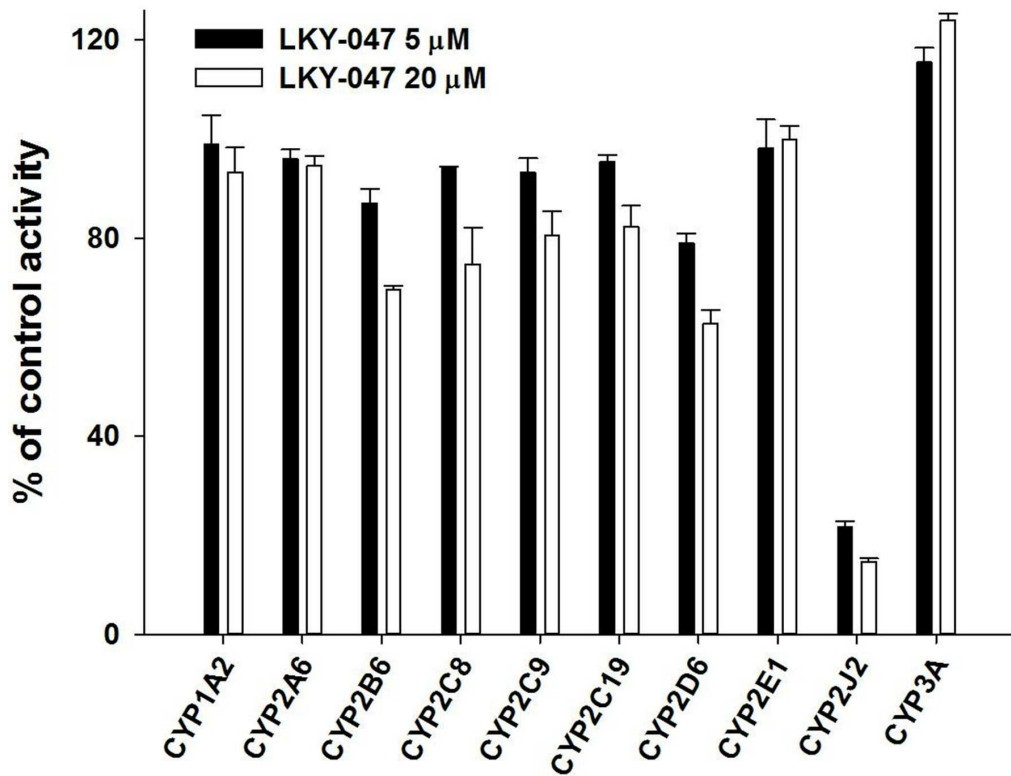
[0124] LKY-047의 시간 의존적 CYP2J2 저해 효능을 확인한 결과, HLMs과 LKY-047을 미리 반응시킨 경우 그렇지 않은 경우와 비교하여 저해 효능이 약간 낮은 것을 확인할 수 있었다. NADPH-생성 시스템의 존재 또는 부존재 하에서 IC_{50} 은 각각 4.2 및 1.7 μ M이었으며, 이러한 결과는 LKY-047이 시간 의존적 저해제가 아님을 의미한다.

[0126] 상기 실험 결과들을 통하여 LKY-047 [(7S)-(+)-3-(4-nitro-phenyl)-acrylic acid, 8,8-dimethyl-2-oxo-6,7-dihydro-2H,8H-pyran[3,2-g]chromen-7-yl-ester]이 CYP2J2에 대하여 강력하고 선택적이며, 가역적인 경쟁적 저해제로 사용될 수 있음을 확인하였다. 또한, LKY-021 [(7S)-(+)-3-Phenyl-acrylic acid, 8,8-dimethyl-2-oxo-6,7-dihydro-2H,8H-pyran[3,2-g]chromen-7-yl ester]은 CYP2B6, CYP2C8 및 CYP2D6를 저해하며, LKY-024 [(7S)-(+)-3-(4-Methoxy-phenyl)-acrylic acid, 8,8-dimethyl-2-oxo-6,7-dihydro-2H,8H-pyran[3,2-g]chromen-7-yl-ester]는 CYP2B6, CYP2C9 및 CYP2J2를 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0128] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



도면2

