



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0166719
(43) 공개일자 2024년11월26일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 31/522</i> (2006.01) <i>A23L 33/10</i> (2022.01)
 <i>A61K 31/7068</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 31/522</i> (2013.01)
 <i>A23L 33/10</i> (2022.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-0064293
 (22) 출원일자 2023년05월18일
 심사청구일자 2023년05월18일</p> | <p>(71) 출원인
 인하대학교 산학협력단
 인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)</p> <p>(72) 발명자
 홍순선
 인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동)
 고소연
 인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동)
 정경희
 인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인태백</p> |
|--|---|

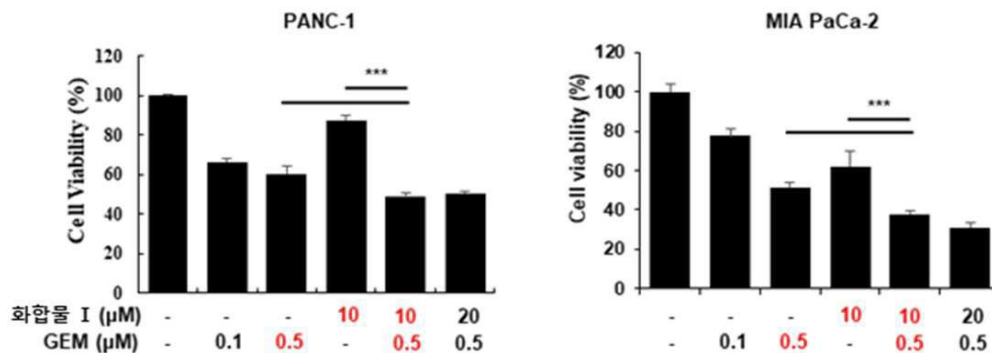
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **DDR1 저해제 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요약

본 발명은 DDR1(Discoidin domain receptor 1) 저해제 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 화학식 1로 표시되는 화합물이 DDR1 활성을 억제하면서 췌장암에 대한 항암 효과를 나타내고, 항암제인 겐시타빈(gemcitabine)과 병용처리 시, 췌장암에 대한 항암 시너지 효과가 나타나는 것을 확인함으로써, 췌장암 예방, 치료 또는 개선용 조성물; 또는 DDR1 활성 억제용 시약 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 31/7068 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711181049
과제번호	2021R1A2B5B03086410
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	췌장암 암화 과정에서 림프 전이 유발 신경주위 침윤 타겟 인자 발굴 및 치료제 개

발

기 여 율	70/100
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711183279
과제번호	2021R1A5A2031612
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	세포교신 제어 연구센터
기 여 율	30/100
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

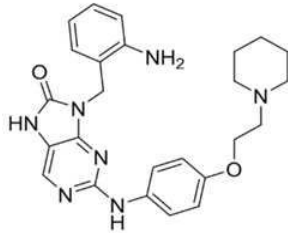
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 겐시타빈(gemcitabine)을 유효성분으로 포함하는 제장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 9-(2-아미노벤질)-2-((4-(2-(피페리딘-1-일)에톡시)페닐)아미노)-7,9-디하이드로-8H-푸린-8-온[9-(2-aminobenzyl)-2-((4-(2-(piperidine-1-yl)ethoxy)phenyl)amino)-7,9-dihydro-8H-purine-8-on]인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 DDR1(Discoidin domain receptor 1) 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 비멘틴(Vimentin), 피브로넥톤(fibronectin), α -SMA, 콜라겐 I(collagen I), MMP2(Matrix Metalloproteinase 2), MMP9(Matrix Metalloproteinase 9), p-FAK, p-PYK2 및 p-DDR1로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 Cleaved casepase-3의 발현을 촉진하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 암세포의 이동(migration) 및 침투(invasion) 능력을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 암세포의 세포자멸사(apoptosis)를 촉진하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

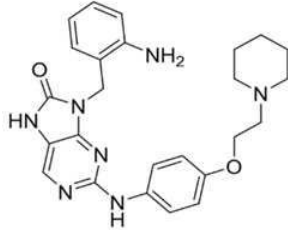
청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 겐시타빈(gemcitabine)은 1 : 0.005 내지 0.05의 중량 비율로 포함되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염; 및 겐시타빈(gemcitabine)을 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

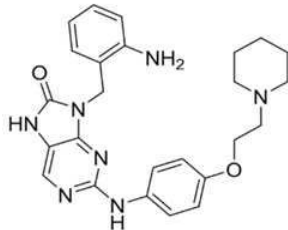
[화학식 1]



청구항 10

인간을 제외한 개체에 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 겐시타빈(gemcitabine)을 병용투여하는 단계(제1단계)를 포함하는, 췌장암 예방 또는 치료방법.

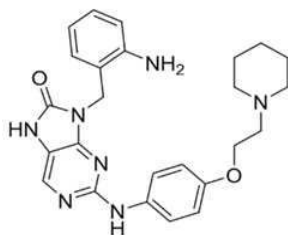
[화학식 1]



청구항 11

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 DDR1(Discoidin domain receptor 1) 활성 억제용 시약 조성물.

[화학식 1]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 DDR1(Discoidin domain receptor 1) 저해제 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 췌장암은 조기 진단이 어렵고, 쉽게 전이되어 1년 이내 사망률이 약 80%에 이를 정도로 예후가 좋지 않은 암 중 하나이다. 췌장암의 치료는 외과적 절제, 항암화학요법, 방사선 요법 등이 있으며 이 중 수술로 절제하는 것이 가장 효과적이라고 알려져 있다. 다만, 췌장암은 초기에 증상이 없는 경우가 대부분이라 진단 시에 이미 병

이 많이 진행되어 수술할 수 없는 경우가 70~90%에 달한다. 또한, 일반적인 방사선 치료와 항암화학요법은 뚜렷한 효과를 보이지 못한다.

[0003] 젬시타빈(Gemcitabine)은 췌장암 치료를 위한 대표적인 항암화학요법 치료제로 알려져 있다. 그러나 10% 내외의 낮은 반응율로 항암 효과가 미미하고 대부분 1년을 넘기지 못하는 생존기간을 보인다. 또한, 췌장암은 젬시타빈에 대한 내성을 쉽게 획득하는 것으로 보고되어 있기 때문에 젬시타빈을 다른 약물과 혼합하여 화학 요법의 효능을 높이기 위한 연구가 다방면으로 시도되고 있다.

[0004] 젬시타빈은 암 주변의 세포외기질(extracellular matrix; ECM)로 인해 약물 전달능력이 떨어져 내성이 발생한다고 알려져 있다. DDR1(Discoidin domain receptor1)은 세포외기질의 주요 구성성분인 콜라겐을 인식하여 결합하는 단백질로써, 세포 특정 티로신 잔기의 인산화를 증가시키고, 주변 콜라겐 매트릭스와 반응하여 세포 거동을 변화시키는 신호전달 경로를 활성화시킨다. 또한, 암세포에서 발현이 증가하는 것으로 알려져 있기 때문에 이를 타겟하는 것은 암세포의 증식을 억제할 뿐만 아니라 젬시타빈과 같은 약물의 내성을 일으키게 하는 세포외기질 생성을 억제함으로써 약물의 효능을 증진시킬 수 있을 것으로 기대되고 있다. 현재까지 개발된 DDR1 저해제 중 FDA 승인을 받은 약물은 없으며, 췌장암을 치료할 수 있는 새로운 약물 및 병용 투여요법의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 KR 10-2022-0001284(2022.01.05. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 DDR1(Discoidin domain receptor 1) 저해제 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 DDR1(Discoidin domain receptor 1) 저해제 및 항암제를 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 인간을 제외한 개체에 DDR1(Discoidin domain receptor 1) 저해제 및 항암제를 병용 투여하는 단계를 포함하는, 췌장암 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 DDR1(Discoidin domain receptor 1) 저해제를 유효성분으로 포함하는 DDR1 활성 억제용 시약 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

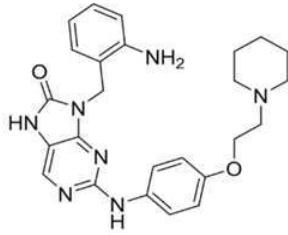
[0010] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 젬시타빈(gemcitabine)을 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염; 및 젬시타빈(gemcitabine)을 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 인간을 제외한 개체에 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 젬시타빈(gemcitabine)을 병용투여하는 단계를 포함하는, 췌장암 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 DDR1(Discoidin domain receptor 1) 활성 억제용 시약 조성물을 제공한다.

[0014] [화학식 1]



[0015]

발명의 효과

[0016]

본 발명에 따르면, 화학식 1로 표시되는 화합물이 DDR1(Discoidin domain receptor 1) 활성을 억제하면서 췌장암에 대한 항암 효과를 나타내고, 항암제인 겐시타빈(gemcitabine)과 병용처리 시, 췌장암에 대한 항암 시너지 효과가 나타나는 것을 확인함으로써, 췌장암 예방, 치료 또는 개선용 조성물; 또는 DDR1 활성 억제용 시약 조성물로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017]

도 1은 9-(2-아미노벤질)-2-(4-((2-(피페리딘-1-일)에톡시)페닐)아미노)-7,9-디하이드로-8H-푸린-8-온[9-(2-aminobenzyl)-2-(4-((2-(piperidine-1-yl)ethoxy)phenyl)amino)-7,9-dihydro-8H-purine-8-on; 이하 화합물 I 이라 함] 제조방법을 나타내는 모식도이다.

도 2는 화합물 I 및 겐시타빈(gemcitabine; GEM) 병용처리가 췌장암 세포의 세포생존율에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 3은 화합물 I 및 겐시타빈(GEM) 병용처리가 췌장암 세포의 미토콘드리아 막전위; 및 세포사멸에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 4는 화합물 I 및 겐시타빈(GEM) 병용처리가 췌장암 세포외기질(extracellular matrix) 활성화에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 5는 화합물 I 및 겐시타빈(GEM) 병용처리가 DDR1 신호전달 경로 활성화에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 6은 화합물 I 및 겐시타빈(GEM) 병용처리가 췌장암 세포의 이동 및 침투에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

도 7은 화합물 I 및 겐시타빈(GEM) 병용투여가 생체 내(췌장암 세포 이종이식 동물모델)에서 종양 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해, 종양 크기 및 무게를 측정한 결과이다.

도 8은 화합물 I 및 겐시타빈(GEM) 병용투여가 생체 내(췌장암 세포 이종이식 동물모델)에서 종양 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해, 암 전이 관련 인자 및 콜라겐 관련 인자 발현량을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

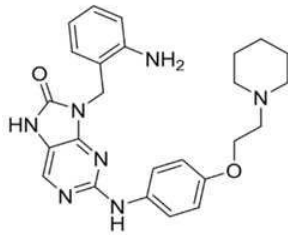
[0018]

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0020]

본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 겐시타빈(gemcitabine)을 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0021] [화학식 1]



[0022]

[0023] 상기 화합물은 9-(2-아미노벤질)-2-((4-(2-(피페리딘-1-일)에톡시)페닐)아미노)-7,9-디하이드로-8H-푸린-8-온 [9-(2-aminobenzyl)-2-(4-(2-(piperidine-1-yl)ethoxy)phenyl)amino]-7,9-dihydro-8H-purine-8-on]일 수 있다.

[0024] 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 DDR1(Discoidin domain receptor 1) 활성을 억제할 수 있다.

[0025] 또한, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 비멘틴(Vimentin), 피브로넥톤(fibronecton), α -SMA, 콜라겐 I(collagen I), MMP2(Matrix Metalloproteinase 2), MMP9(Matrix Metalloproteinase 9), p-FAK, p-PYK2 및 p-DDR1로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 발현을 억제할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 또한, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 Cleaved casepase-3의 발현을 촉진할 수 있다.

[0027] 또한, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 암세포의 이동(migration) 및 침투(invasion) 능력을 억제할 수 있고, 암세포의 세포자멸사(apoptosis)를 촉진할 수 있다.

[0028] 또한, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 겐시타빈(gemcitabine)은 1 : 0.005 내지 0.05의 중량 비율로 포함될 수 있다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 약학 조성물에 포함되는 첨가제의 함량은 특별히 한정되는 것은 아니며 통상의 제제화에 사용되는 함량 범위 내에서 적절하게 조절될 수 있다.

[0030] 상기 약학 조성물은 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 피부 외용제 형태로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 약학 조성물은 제형화를 위해 추가로 있는 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 전분, 당 및 만니톨과 같은 부형제, 칼슘 포스페이트 등과 같은 충전제 및 증량제, 카르복시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 등과 같은 셀룰로오스 유도체, 젤라틴, 알긴산염, 폴리비닐 피롤리돈 등과 같은 결합제, 활석, 스테아린산 칼슘, 수소화 피마자유 및 폴리에틸렌글리콜과 같은 윤활제, 포비돈 및 크로스포비돈과 같은 붕해제, 폴리소르베이트, 세틸알코올, 글리세롤 등과 같은 계면활성제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체 및 희석제는 대상체에 게 생물학적 및 생리학적으로 친화적인 것일 수 있다. 희석제의 예로는 염수, 수용성 완충액, 용매 및/또는 분산제(dispersion media)를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있다. 경구 투여일 경우, 정제, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽, 엘릭시르제 등으로 제형화될 수 있다. 비경구 투여일 경우, 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등으로 제형화 될 수 있다.

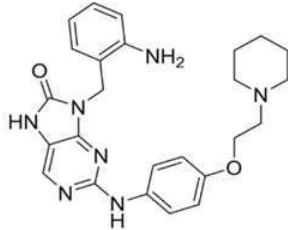
[0033] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이 체질 특이성, 제제의 성질, 질병의 정도, 조성물의 투여시간, 투여방법, 투여기간 또는 간격, 배설율 및 약물 형태에 따라 그 범위가 다양할 수 있으며, 이 분야 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예컨대, 약 0.1 내지 10,000mg/kg의 범위일 수 있으나 이제 제한되지 않으며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여될 수 있다.

[0034] 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여되거나 비경구 투여(예를 들면, 정맥 내, 피하 내, 복강 내 또는 국소에 적용)될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 약학적 유효량 및 유효 투여량은 약학 조성물의 제제화

방법, 투여 방식, 투여 시간, 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수도 있다.

[0036] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염; 및 겐시타빈(gemcitabine)을 유효성분으로 포함하는 췌장암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0037] [화학식 1]



[0038]

[0039] 본 발명은 통상적으로 이용되는 식품으로써 일반적으로 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명의 식품 조성물은 건강기능식품으로서 사용될 수 있다. 상기 “건강기능식품”이라 함은 건강기능 식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, “기능성”이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0041] 상기 건강기능식품 조성물은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 상기 “식품 첨가물”로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0042] 상기 “식품 첨가물 공전”에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류들을 들 수 있다.

[0043] 본 발명의 식품 조성물은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다. 예를 들어, 캡슐 형태의 건강기능 식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질 캡슐에 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합 및 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 본 발명에 따른 조성물을 부형제 등의 첨가제와 혼합하고 젤라틴 등 캡슐기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡슐제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0044] 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향제 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 통상적인 의미에서의 건강 기능식품을 모두 포함한다.

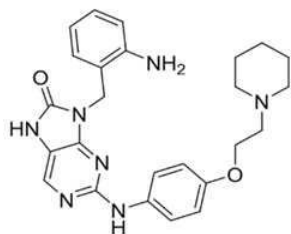
[0045] 본 발명에서 용어 “예방”은 본 발명에 따른 조성물의 투여로 췌장암을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[0046] 본 발명에서 용어 “치료”는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 췌장암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.

[0047] 본 발명에서 용어 “개선”은 본 발명의 조성물을 개체에 투여하거나 섭취시켜 췌장암의 나쁜 상태를 좋게 하는 모든 행위를 의미한다.

[0049] 또한, 본 발명은 인간을 제외한 개체에 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염; 및 겐시타빈(gemcitabine)을 병용투여하는 단계를 포함하는, 췌장암 예방 또는 치료방법을 제공한다.

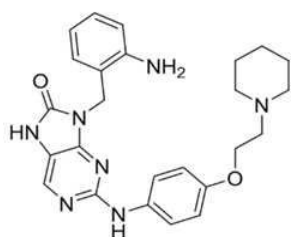
[0050] [화학식 1]



[0051]

[0053] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 DDR1(Discoidin domain receptor 1) 활성 억제용 시약 조성물을 제공한다.

[0054] [화학식 1]



[0055]

[0057] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0059] [실험예 1] 화합물 I 제조

[0060] 도 1에 나타난 바와 같이, 하기 실험예 1-1 내지 1-3 과정을 거쳐 화합물 I를 제조하였다.

[0062] 1-1. 2-클로로-4-(2-니트로벤질)메틸아미노-5-니트로피리미딘 제조

[0063] 둥근바닥플라스크에 2,4-디클로로-5-니트로피리미딘(2,4-dichloro-5-nitropyrimidine, 3g, 15.5mmol)을 넣고, 테트라하이드로퓨란 (Tetrahydrofuran, 30ml)에 녹인 후, (2-니트로페닐)메탄아민((2-nitrophenyl)methanamine, 0.38g, 2.15mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(N,N-diisopropyl ethylamine, 5.4ml, 30mmol)을 넣고, 4시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응이 종결되면 감압증류로 용매를 제거하고, 반응 혼합물에 물을 가한 후, 디클로로메테인(Dichloromethane)으로 추출하고 무수 황산마그네슘으로 건조시켰다. 그 후, 감압증류로 용매를 제거하고, 관 크로마토그래피(에틸아세테이트:헥세인 = 1:3)로 분리하여 2-클로로-4-(2-니트로벤질)메틸아미노-5-니트로피리미딘(2-chloro-4-(2-nitrobenzyl)methylamino-5-nitropyrimidine; 이하 화합물 1이라 함)(3g, 63%)을 얻었다. 상기 화합물 1의 NMR 분석 결과는 하기와 같다.

[0064] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.06 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 7.48 (t, J = 7.72 Hz, 1H), 7.61 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.68(d, J = 7.44 Hz, 1H), 8.09 (d, J = 8.12 Hz, 1H), 8.98 (s, 1H), 9.13 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 42.73, 125.65, 129.66, 131.50, 132.71, 134.30, 148.51, 155.50, 157.30, 164.16.

[0066] 1-2. 4-(2-아미노페닐)메틸아미노-5-아미노-2-[4-(2-(피페리딘-1-일)에톡시)페닐아미노]피리미딘 제조

[0067] 둥근바닥플라스크에 화합물 1(0.5g, 1.61mmol) 및 4-(2-(피페리딘-1-일)에톡시)아닐린(4-(2-(piperidine-1-

yl)ethoxy)aniline, 0.355g, 1.61mmol)을 2-메톡시에탄올(2-methoxyethanol, 20ml)에 녹이고, 염산(4M 다이옥세인(dioxane) 용액의 0.2ml)을 넣은 후, 24시간 동안 110℃에서 교반하였다. 반응이 종결되면 감압증류로 용매를 제거하고, 반응 혼합물에 탄산수소나트륨 포화수용액을 가한 후, 디클로로메테인으로 추출하고 무수 황산 마그네슘으로 건조시켰다. 그 후, 감압증류로 용매를 제거하고, 관 크로마토그래피(메탄올:디클로로메테인 = 1:10)로 분리하여 4-(2-아미노페닐)메틸아미노-5-아미노-2-[4-{2-(피페리딘-1-일)에톡시}페닐아미노]피리미딘(4-(2-aminophenyl)methylamino-5-amino-2-[4-{2-(piperidine-1-yl)ethoxy}phenylamino] pyrimidine; 이하 화합물 2라 함)(0.6g, 75%)을 얻었다. 상기 화합물 2(0.6g, 1.21mmol)에 10% 팔라듐/차콜(palladium/charcoal)을 넣고, 디클로로메테인(20 ml)에 녹인 후, 수소가스를 주입하여 실온에서 2시간동안 교반하였다. 반응이 종결되면 셀라이트 필터를 한 후 감압증류하여 화합물 2(0.5g, 95%)를 얻었다. 상기 화합물 2의 NMR 분석 결과는 하기 와 같다.

[0068] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.42 (s, 2H), 1.58 (s, 4H), 2.65 (s, 4H), 2.85 (s, 2H), 4.08 (s, 2H), 4.48 (s, 2H), 5.06 (s, 2H), 6.50 (s, 1H), 6.66(d, J = 7.20 Hz, 1H), 6.78 (d, J = 7.80 Hz, 2H), 6.95 (s, 2H), 7.08 (d, J = 6.48 Hz, 1H), 7.40 (s, 1H), 7.57 (d, J = 7.80 Hz, 2H), 8.34 (s, 1H); ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6) δ 23.60, 25.06, 40.99, 54.36, 57.20, 65.27, 114.87, 114.95, 116.17, 119.28, 120.50, 123.04, 127.98, 129.22, 136.27, 137.86, 146.77, 152.10, 153.56, 154.36.

[0070] 1-3. 화합물 I 제조

[0071] 둥근바닥플라스크에 화합물 2(0.115g, 0.265mmol)를 무수 아세트나이트릴(anhydrous acetonitrile, 25ml)에 녹이고, 트리에틸아민(triethylamine, 0.074ml, 0.53mmol)을 넣은 후, 카보닐이미다졸(carbonyl imidazole, 0.052g, 0.318mmol)을 무수 아세트나이트릴에 녹여 용액으로 천천히 적가하고 24시간 동안 환류하여 교반하였다. 반응이 종결되면 감압증류로 용매를 제거하고, 반응 혼합물을 디클로로메테인 및 메탄올로 추출하고 무수 황산나트륨으로 건조시킨 후, 감압증류로 용매를 제거하고 관 크로마토그래피(메탄올:디클로로메테인 = 1:3)로 분리하여 화합물 I[9-(2-아미노벤질)-2-((4-(2-(피페리딘-1-일)에톡시)페닐)아미노)-7,9-디하이드로-8H-푸린-8-온; 9-(2-aminobenzyl)-2-(4-((2-(piperidine-1-yl)ethoxy)phenyl)amino)-7,9-dihydro-8H-purine-8-on](0.069g, 57%)을 얻었다. 상기 화합물 I의 NMR 분석 결과는 하기와 같다.

[0072] ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.39-1.42 (m, 2H), 1.48-1.54 (m, 4H), 2.44 (s, 4H), 2.64 (t, J = 5.97 Hz, 2H), 4.03 (t, J = 5.98 Hz, 2H), 4.80 (s, 2H), 5.32 (s, 2H), 6.52 (t, J = 7.39 Hz, 1H), 6.68 (d, J = 7.90 Hz, 1H), 6.87 (d, J = 9.06 Hz, 2H), 7.00 (t, J = 7.60 Hz, 1H), 7.06 (d, J = 6.74 Hz, 1H), 7.61 (d, J = 9.04 Hz, 2H), 7.97 (s, 1H), 9.12 (s, 1H), 11.09 (s, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 24.43, 26.06, 29.49, 54.93, 58.01, 66.23, 114.78, 115.17, 115.46, 116.31, 119.55, 120.41, 128.94, 129.84, 134.62, 134.71, 146.77, 151.38, 153.44, 154.10, 155.72.

[0074] [실시예 1] 화합물 I의 키아나제(kinase) 활성 분석

[0075] 상기 제조한 화합물 I의 키아나제(kinase) 활성을 확인하기 위해, Eurofins Pharma Discovery Services UK(www.eurofins.com)에서 1 μM 에서 40개의 발암성 키아나제 패널로 키아나제 선택성을 분석한 결과, 표 1에 나타난 바와 같이, 테스트한 키아나제 중에서 상기 화합물 I는 DDR1(Discoidin domain receptor 1)의 POC(Particulate organic carbon)=9로 나타나, DDR1과 가장 강력한 결합을 나타내는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터, 화합물 I는 DDR1 저해 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

표 1

키아나제(kinase)	POC	키아나제(kinase)	POC
DDR1	9	JAK1	100
DDR2	103	JAK2	73
ALK	95	LKB1	112
AMPK α 1	103	MAPK1	112
Aurora-A	109	MEK1	96
Aurora-B	99	Met	104

Aurora-C	101	p70S6K	103
Axl	108	PAK1	101
Blk	59	PDGFR α	89
Bmx	79	PDGFR β	91
B-Raf	102	Pim-1	101
c-RAF	97	PKB α	106
DAPK1	100	PKC α	99
DYRK2	103	Plk1	147
EGFR	97	Ret	97
ErbB2	106	ROCK-I	109
FAK	95	TAK1	106
Fer	117	Tie2	94
Fes	63	Wee1	101
FGFR1	97	DNA-PK	105
FGFR2	104	PI3 Kinase(p110b/p85a)	96
Flt1	97	PI3 Kinase(p120g)	97
GSK3 β	104	PI3 Kinase(p110d/p85a)	96
IGF-1R	101	PI3 Kinase(p110a/p85a)	97
IKK β	112		
화합물 농도= 1000nm			

[실시예 2] 화합물 I 및 젠시타빈 병용처리를 통한 췌장암에 대한 항암 시너지 효과 분석

화합물 I 및 젠시타빈 병용처리를 통한 췌장암에 대한 항암 시너지 효과가 나타나는지 분석하였다. 세포실험 시 화합물 I를 DMSO에 녹여 사용하였고, 동물 실험 시 DMSO:PEG400:DW = 1:4:5 비율의 용액에 녹여 사용하였다.

2-1. 세포독성 분석

화합물 I 및 젠시타빈(gemcitabine)의 병용처리가 세포독성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 2종의 췌장암 세포주(MIA PaCa-2 및 PANC-1)(ATCC, Manassas, VA, USA)에 화합물 I 및 젠시타빈을 단독 혹은 병용으로 72시간 처리하고, 각 반응 배양물에 대한 MTT 실험법을 수행하여 산출된 측정값의 수치를 분석하였다.

그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 2종의 췌장암 세포주 모두 단독처리군 및 병용처리군에서 세포 생존율이 모두 유의하게 감소했고, 단독처리군보다 병용처리군의 생존 생존율이 더 낮게 나타났다. 상기 결과로부터, 화합물 I가 젠시타빈의 암세포 사멸 효과를 향상시켜 항암 시너지 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

2-2. 세포자멸사 분석

화합물 I 및 젠시타빈의 병용처리가 미토콘드리아 막전위에 미치는 영향을 확인하기 위해, JC-1 형광염색 및 Mitotracker/Cytochrome C 염색을 수행하였다. 췌장암 세포(PANC-1)에 화합물 I(10 μ M) 및 젠시타빈(0.5 μ M)을 단독 또는 병용으로 6시간 처리하고, JC-1 형광염색 및 Mitotracker/Cytochrome C 염색을 수행하였다.

또한, 화합물 I 및 젠시타빈의 병용처리가 세포사멸에 미치는 영향을 확인하기 위해, cleaved caspase-3 염색을 수행하였다. 췌장암 세포(PANC-1)를 커버 슬립(cover slip) 위에서 배양하고, 화합물 I(10 μ M) 및 젠시타빈(0.5 μ M)을 단독 또는 병용으로 72시간 처리하고, 세포를 고정시킨 후, 면역 형광법(immunofluorescence)으로 cleaved caspase-3 염색을 수행하였다.

그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 병용처리군(COMBI)에서 단독처리군(GEM 및 화합물 I)보다 초록색 파장이 증가하였고, cleaved caspase-3 양성 세포 또한 증가한 것을 확인하였다. 상기 결과로부터, 화합물 I 및 젠시타빈 병용처리가 미토콘드리아 신호전달 경로를 조절함으로써 세포사멸을 유도하고, 췌장암 세포에서 단독투여보다 병용투여가 더 많은 세포 자멸사를 유도해 항암 시너지 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0090] 2-3. 세포외기질 관련 분자 발현 분석

[0091] DDR1은 세포외기질(extracellular matrix; 이하 ECM이라 함) 형성 및 신호전달을 활성화하는 것으로 알려져 있으므로, 화합물 I 및 쥬시타빈 병용처리가 ECM 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해, ECM 관련 인자인 비멘틴(Vimentin) 및 피브로넥틴(fibronectin) 및 α -SMA의 발현량을 측정하였다. 쥬장암 세포(PANC-1)에서 화합물 I(10 μ M) 및 쥬시타빈(0.5 μ M)을 단독 또는 병용으로 72시간 처리하고, 세포를 고정한 후, 면역 형광염색을 수행하였다.

[0092] 그 결과, 도 4에서 나타난 바와 같이, 대조군(CON) 및 쥬시타빈 단독처리군(GEM)보다 화합물 I 단독처리군(화합물 I)이 상기 3종의 ECM 관련 인자의 발현을 유의하게 감소시켰고, 단독처리군보다 병용처리군(COMBI)이 상기 3종의 ECM 관련 인자 및 콜라겐 I(collagen I) 발현을 더 유의하게 감소시켰다. 상기 결과로부터, 화합물 I는 단독으로도 ECM 관련 인자 발현 억제를 통해 ECM으로 인해 유도된 내성을 개선할 수 있고, 화합물 I 및 쥬시타빈 병용처리가 상기 ECM 관련 인자 발현 억제 및 이를 통한 항암에 대한 시너지 효과가 나타나는 것을 확인하였다.

[0094] 2-4. PYK2/FAK 신호전달 경로 활성화 분석

[0095] 화합물 I 및 쥬시타빈의 병용처리에 의한 세포사멸 효과의 메커니즘을 확인하기 위해, DDR1 신호전달 경로 활성화에 미치는 영향을 분석하였다. 쥬장암 세포(PANC-1)에 화합물 I(10 μ M) 및 쥬시타빈(0.5 μ M)을 단독 또는 병용으로 48시간 처리하고, 웨스턴 블랏(western blot) 및 면역 형광염색을 수행하였다.

[0096] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 병용처리군(COMBI)에서 콜라겐 I 발현이 유의하게 감소하였고, DDR1의 하위 신호인 p-FAK 및 p-PYK2의 발현도 유의하게 감소하는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터, 화합물 I 및 쥬시타빈의 병용처리에 의한 세포사멸 효과는 PYK2/FAK 신호경로 활성화와 관련 있음을 확인하였다.

[0098] 2-5. 세포 이동 및 침투 분석

[0099] 화합물 I 및 쥬시타빈 병용처리가 세포의 이동 및 침투에 미치는 영향을 확인하기 위해, 트랜스웰(transwell)을 이용한 이동(migration) 분석을 통해 세포 이동능력을 확인하였고, 트랜스웰에 매트릭젤(matrigel)을 깔아 침투(invasion) 분석을 통해 세포의 침투능력을 확인하였다. 트랜스웰 위에 화합물 I(10 μ M)를 72시간 처리한 쥬장암 세포(MIA PaCa-2 및 PANC-1)를 깔고, 트랜스웰 아래에 쥬시타빈(0.5 μ M)을 처리하여 세포의 이동(migration) 및 침투(invasion) 분석을 수행하였다.

[0100] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 2종의 쥬장암 세포주 모두 단독처리군(GEM 및 화합물 I)보다 병용처리군(COMBI)에서 세포 이동능력 및 침투능력이 더 유의하게 감소하였다. 상기 결과로부터, 화합물 I 및 쥬시타빈 병용처리가 쥬장암 세포의 침입 및 전이 능력 억제에 대한 시너지 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0102] 2-6. 종양 성장 분석(*in vivo*)

[0103] 화합물 I 및 쥬시타빈 병용처리가 생체 내(에서 종양 성장에 미치는 영향을 확인하기 위해, Balb/c 마우스를 오리엔트바이오(주)에서 구입하여 MIA Paca-2 세포를 5×10^6 세포로 피하주사하여 쥬장암 세포 이종이식 모델을 만들고, 병용투여의 효과를 분석하였다. 종양 크기가 50mm³에 도달했을 때 치료를 시작하고, 치료 시작일을 실험 1일 차로 설정하였으며, 실험 45일 차까지 치료를 진행하였다. 화합물 I는 30mg/kg로 매일 투여하였고, 쥬시타빈은 3mg/kg로 일주일에 3번 투여하였다.

[0104] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 단독투여군(GEM 및 화합물 I)은 종양 성장을 억제했으나, 이 차이가 통계적 유의성에 도달하진 않았다. 반면, 병용투여군(COMBI)에서 대조군 대비 종양 크기가 약 64% 감소하는 등 단독투여군보다 종양 성장이 더 유의하게 억제되었고, 부작용 및 체중 변화는 나타나지 않았다.

[0105] 또한, 도 8에 나타난 바와 같이, 단독투여군(GEM 및 화합물 I)보다 병용투여군(COMBI)에서 암세포 증식 마커인 Ki-67의 발현이 더 유의하게 감소하고, 세포 자멸사 마커인 Cleaved caspase-3의 발현이 더 유의하게 증가하며, 전이 관련 인자[MMP2(Matrix Metalloproteinase 2) 및 MMP9(Matrix Metalloproteinase 9)] 및 DDR1에 의한 세포신호 관련 인자(p-FAK, p-PYK2 및 p-DDR1) 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터, 화합

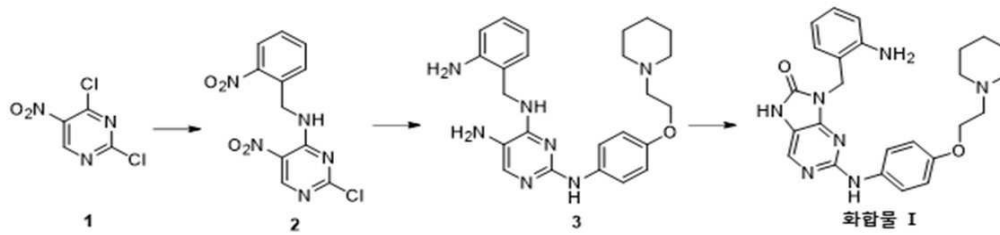
물 I 및 젬시타빈 병용투여가 생체 내에서 항암 시너지 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0107]

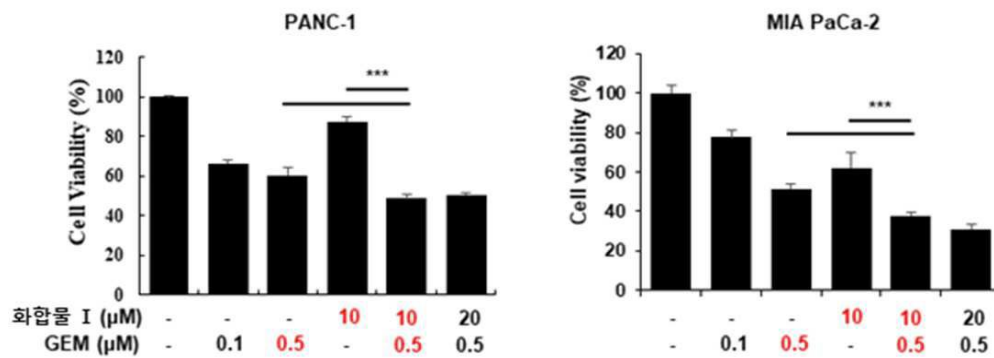
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

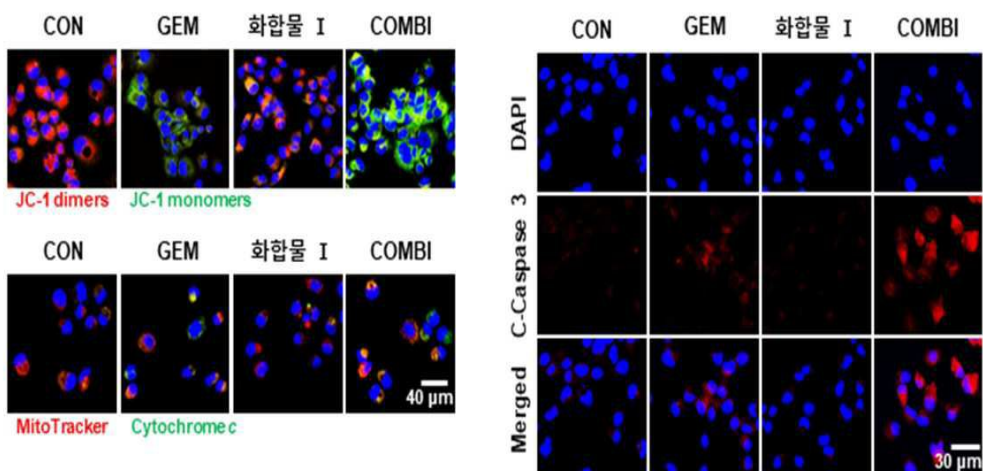
도면1



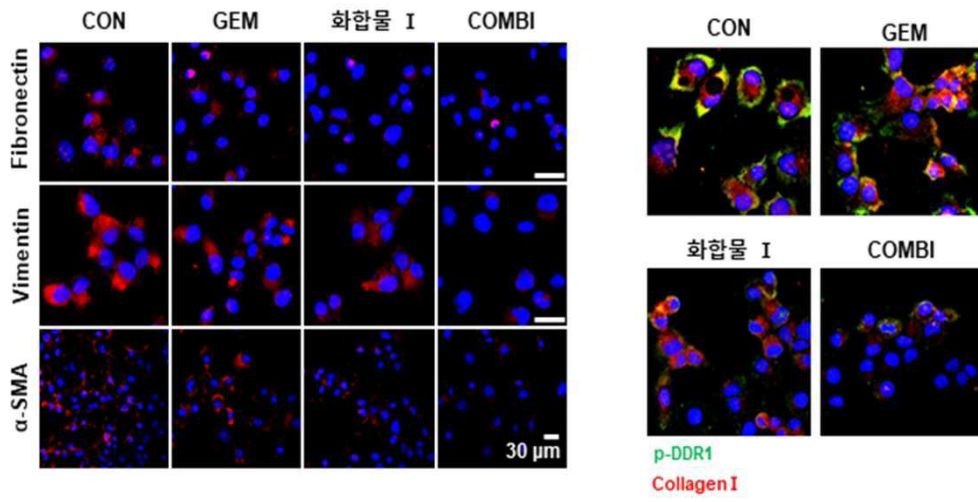
도면2



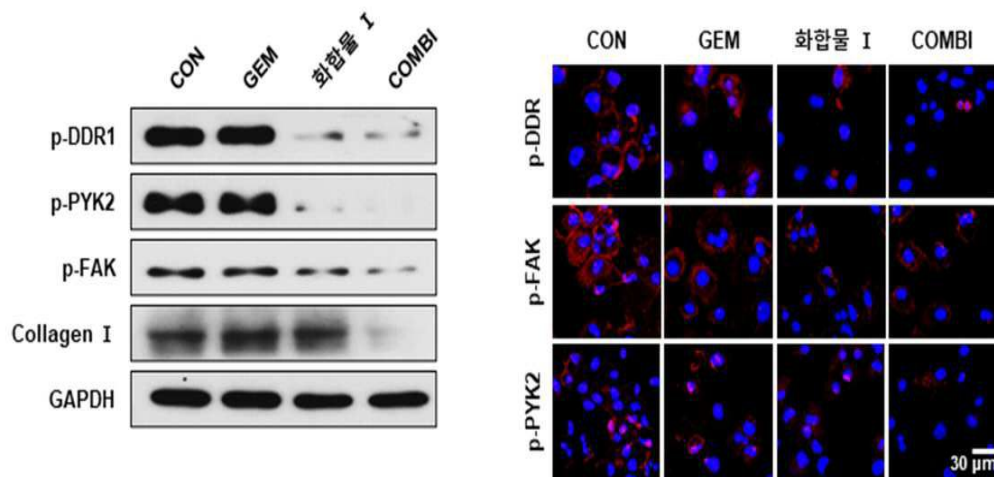
도면3



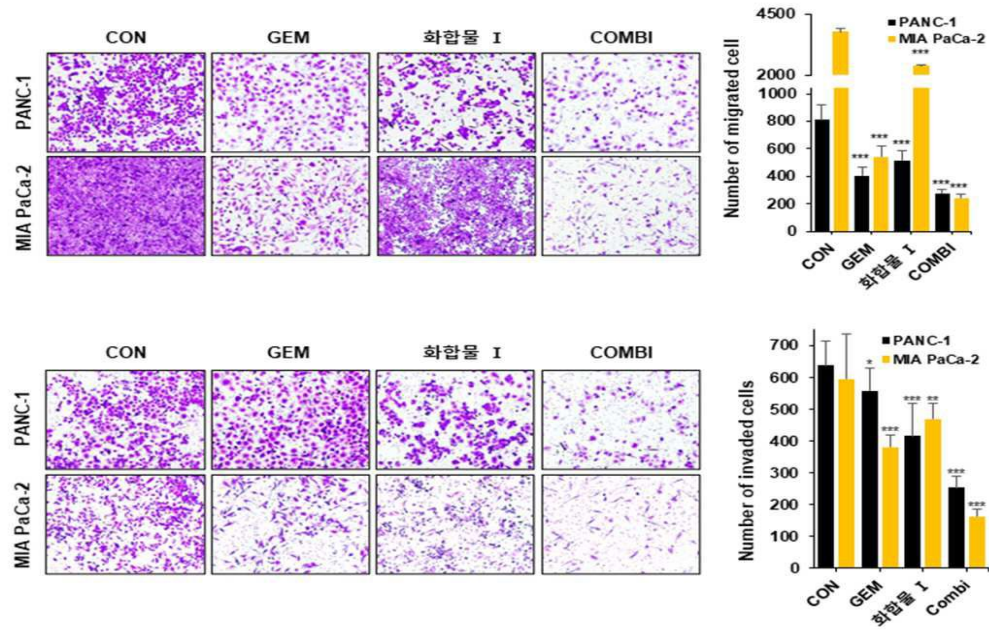
도면4



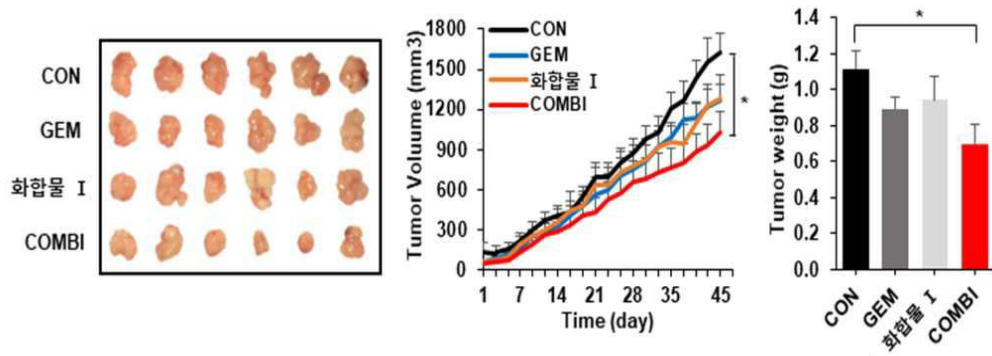
도면5



도면6



도면7



도면8

