



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0102814  
(43) 공개일자 2013년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/4375 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2012-0023945  
(22) 출원일자 2012년03월08일  
심사청구일자 없음

(71) 출원인  
인하대학교 산학협력단  
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)  
(72) 발명자  
홍순선  
서울특별시 은평구 신사동 369번지 굿모닝기륭아파트 402호  
정경희  
경기도 부천시 소사구 괴안동 신일해피트리 아파트 102동 1105호  
(74) 대리인  
김순용

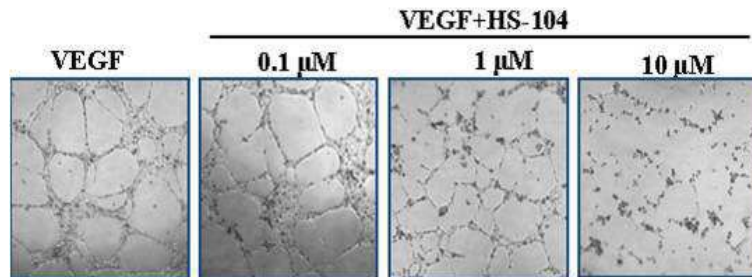
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 P I 3 - 키나제 저해 활성을 갖는 이미다조피리딘 유도체를 유효성분으로 포함하는 혈관신생 억제용 약학적 조성물

**(57) 요약**

본 발명은 PI3-키나제 저해 활성을 갖는 N-(5-(3-(5-메틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-6-일)피리딘-3-일)벤젠술폰아미드를 유효성분으로 포함하는 혈관신생억제용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 N-(5-(3-(5-메틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-6-일)피리딘-3-일)벤젠술폰아미드는 CD34, VEGF 및 혈관내피세포의 생성을 억제함으로써, 혈관 신생을 억제하는 효과가 우수하다.

**대표도** - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 43714

부처명 보건복지부

연구사업명 보건의료기술진흥사업

연구과제명 신규 PI3kinase 저해제 (HSW-104)에 의한 체장압 증식 및 내성 억제 효과 검증

주관기관 인하대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.01 ~ 2013.03.31

---



- [0003] 그러나 혈관신생이 자율적으로 조절되지 못하고 병적으로 성장함으로써 야기되는 질환들이 있다. 병리학적 상태에서 나타나는 혈관신생에 관련된 질환으로는 암, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증, 건선, 혈우병성 관절, 켈로이드, 상처 과립화, 혈관 접착, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 재발협착증, 아테롬성 동맥경화, 장관 접착, 캣 스크래치 질환, 궤양, 간경변증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증성 질환 또는 신경퇴행성 질환이 있는 것으로 보고되고 있으며, 특히 암의 성장과 전이는 반드시 혈관신생에 의존한다(D'Amato RJ et al., Ophthalmology, 102(9), pp1261-1262, 1995; Arbiser JL, J. Am. Acad. Dermatol., 34(3), pp486-497, 1996; O'Brien KD et al. Circulation, 93(4), pp672-682, 1996; Hanahan D et al., Cell, 86, pp353-364, 1996).
- [0004] 염증성 질환의 대표적인 질환인 관절염은 자가면역 이상이 원인이지만, 병이 진행되면서 관절 사이의 활액강에 생긴 만성 염증이 혈관신생을 유도하여 연골이 파괴된다. 즉, 염증을 유도하는 사이토카인의 도움으로 활액세포와 혈관내피세포가 활액강에서 증식을 하여 혈관신생이 진행되면서 연골부에 발생하는 결합조직층인 관절 판누스를 형성하여 쿠션 역할을 하는 연골이 파괴된다(Koch AE et al., Arthritis. Rheum., 29, pp471-479, 1986; Stupack DG et al., Braz J. Med. Biol. Rcs., 32(5), pp578-581, 1999; Koch AE, Arthritis. Rheum., 41(6), pp951-962, 1998).
- [0005] 또한, 해마다 전 세계적으로 수백만 명이 실명하게 되는 많은 안과질환도 혈관신생이 원인이 되고 있다(Jeffrey MI et al., J. Clin. Invest., 103, pp1231-1236, 1999). 그 대표적인 예로 노인에게 일어나는 퇴화반(macular degeneration), 당뇨병성 망막증(diabetic retinopathy), 조숙아의 망막증, 신생혈관성 녹내장과 신생혈관에 의한 각막 질환과 같은 질병은 혈관신생이 원인이 되는 질병들이다(Adamis AP et al., Angiogenesis, 3, pp9-14, 1999). 그 중 당뇨병성 망막증은 당뇨병의 합병증으로 망막에 있는 모세혈관이 초자체를 침습하여 결국 눈이 멀게 되는 질병이다.
- [0006] 특히 암의 경우, 혈관신생은 암세포의 성장과 전이에 중요한 역할을 한다. 종양은 신생혈관을 통하여 성장과 증식에 필요한 영양과 산소를 공급받으며, 또한 종양까지 침투한 신생 혈관들은 전이하는 암세포가 혈액순환계로 들어가는 기회를 줌으로써 암세포가 전이(metastasis) 되도록 한다(Folkman and Tyler, Cancer Invasion and metastasis, Biologic mechanisms and Therapy(S.B. Day ed.) Raven press, New York, pp94-103, 1977; Polverini PJ, Crit. Rev. Oral. Biol. Med., 6(3), pp230-247, 1995). 또한 임상적으로 1차 종양에서 혈관신생이 많이 일어날수록 예후가 나쁘고 재발률이 높은 것으로 보고되고 있다. 최근 성장, 분화, 생존, 이동, 전이의 원인이 되어 종양형성에 매우 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있는 PI3-키나제(PI3K)가 암 진행에서 혈관신생과정에 관여한다는 점이 보고되었다. 따라서, PI3-키나제를 표적하여 신혈관 생성을 억제하고, 이를 통해 암의 전이를 막고자 하는 연구가 진행되고 있다.
- [0007] 이처럼 혈관 신생의 병적인 성장은 다양한 질환의 원인으로 지적되고 있으므로, 혈관신생 억제제는 각종 혈관신생 관련 질환의 치료제로 적용할 수 있다. 따라서, 효과적으로 혈관신생을 억제할 수 있는 새로운 물질 및 이를 이용한 혈관신생 관련 질환을 치료할 수 있는 약학적 조성물에 대한 연구가 절실하게 필요하다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 대한민국 특허 출원 제 제10-2009-0038964호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 이미다조피리딘 유도체 중 혈관신생 억제 효과를 갖는 물질에 대해 연구하던 중, PI3-키나제 저해 활성을 갖는 N-(5-(3-(5-메틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-6-일)피리딘-3-일)벤젠술폰아미

도가 혈관 신생을 효과적으로 억제함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 본 발명의 목적은 PI3-키나제 저해 활성을 갖는 N-(5-(3-(5-메틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-6-일)피리딘-3-일)벤젠술폰아미드를 유효성분으로 포함하는 혈관신생억제용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 PI3-키나제 저해 활성을 갖는 N-(5-(3-(5-메틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-6-일)피리딘-3-일)벤젠술폰아미드를 유효성분으로 포함하는 혈관신생억제용 약학적 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 PI3-키나제 저해 활성을 갖는 N-(5-(3-(5-메틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-6-일)피리딘-3-일)벤젠술폰아미드는, CD34, VEGF 및 혈관내피세포의 생성을 억제함으로써 혈관 신생을 억제하는 효과가 우수하다.

### 도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 in vitro에서 혈관신생을 관찰하기 위하여, N-(5-(3-(5-메틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-6-일)피리딘-3-일)벤젠술폰아미드(이하, HS-104)를 처리한 후 튜브 형성 에세이를 통해 튜브의 형성을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 쥐의 동맥혈관에 VEGF와 각각 1 μM, 10 μM의 HS-104를 혼합한 매트릭셀을 덮은 후, Aortic ring sprouting assay 를 이용하여 혈관내피세포를 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 쥐의 표피에 10 μM 의 HS-104와 VEGF를 넣은 매트릭셀을 주입한 후, H&E 염색을 이용하여 혈관 신생을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 종양 유발 마우스에 10mg/kg 및 30mg/kg의 HS-104를 투여한 후, 종양의 크기를 나타낸 도이다.

도 5는 종양 유발 마우스에 10mg/kg 및 30mg/kg의 HS-104를 투여한 후, 혈관신생마커인 VEGF와 CD34의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 간암 세포에 저산소증을 유도한 후, HS-104와 HS-116를 각각 1 μM, 5 μM, 15 μM 처리하고 VEGF 억제 효과를 비교한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 1 μM 및 10 μM의 HS-104 또는 HS-116를 각각 혈관내피세포에 처리한 후 튜브형성 에세이를 이용하여 혈관 생성 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 1 μM 및 10 μM의 HS-104 또는 HS-116를 각각 혈관내피세포에 처리한 후 세포 이동 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 PI3-키나제 저해 활성을 갖는 N-(5-(3-(5-메틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-6-일)피리딘-3-일)벤젠술폰아미드(N-(5-(3-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)imidazo[1,2-a]pyridin-6-yl)pyridin-3-yl)benzenesulfonamide)를 유효성분으로 포함하는 혈관신생억제용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명의 PI3-키나제 저해 활성을 갖는 N-(5-(3-(5-메틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-6-일)피리딘-3-일)벤젠술폰아미드는 혈관내피세포의 생성을 억제하고 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF) 및 CD34를 억제한다.

[0017] 따라서, 본 발명에 따른 PI3-키나제 저해 활성을 갖는 N-(5-(3-(5-메틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-6-일)피리딘-3-일)벤젠술폰아미드는 혈관신생에 의해 유발되는 질환에 유용하게 사용될 수 있다.

- [0018] 상기 혈관신생에 의해 유발되는 질환은 암, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 각막 이식 거부, 신생혈관 녹내장, 홍색증, 증식성 망막증, 건선, 혈우병성 관절, 켈로이드, 상처 과립화, 혈관 접착, 류마티스 관절염, 골관절염, 자가면역 질환, 크론씨병, 재발협착증, 아테롬성 동맥경화, 장관 접착, 캣 스크래치 질환, 궤양, 간경병증, 사구체신염, 당뇨병성 신장병증, 악성 신경화증, 혈전성 미소혈관증, 기관 이식 거부, 신사구체병증, 당뇨병, 염증성 질환 또는 신경퇴행성 질환으로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 질환을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0019] 상기 암은 폐암, 비소세포성폐암, 글암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부 암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁암, 난소암, 직장암, 위암, 항문부근암, 결장암, 유방암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수노관암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종, 간암으로 이루어진 군에서 선택된 1종이상의 암일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 혈관신생억제용 약학적 조성물은 N-(5-(3-(5-메틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-6-일)피리딘-3-일)벤젠술폰아미드와 함께 혈관신생억제 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0022] 예를 들어 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0023] 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에도 마그네슘 스테아레이트, 탈크와 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.
- [0024] 경구투여를 위한 액상제에는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0025] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 경구투여 외에도 목적하는 방법에 따라 다양한 경로로 투여될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 N-(5-(3-(5-메틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-6-일)피리딘-3-일)벤젠술폰아미드의 유효 투여량은 환자의 나이, 성별 체중에 따라 달라질 수 있으나 10 내지 50mg/kg으로 투여되는 것을 특징으로 할 수 있으며, 바람직하게는 20 내지 30mg/kg으로 투여될 수 있다.
- [0028] 이하, 본 발명을 실시예 및 제제예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예 및 제제예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제제예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 실시예 1. 혈관내피세포(HUVECs)에서 N-(5-(3-(5-메틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-6-일)피

**리딘-3-일)벤젠술폰아미드의 혈관신생 억제 효과**

[0030] in vitro 혈관신생억제 효과를 확인하기 위해서 in vitro 에서 튜브형성에세이(Tube formation assay)를 수행하였다. 구체적으로는, 매트릭젤(BD Bioscience)을 4 °C에서 천천히 녹인 후, 48 웰 플레이트에 코팅하고, 혈관 내피세포를 37 °C 온도에서 30분 내지 1시간 가량 배양하여, 겔 상태로 만들었다. 배양한 혈관내피세포(HUVECs)를 0.1 μM, 1 μM, 10 μM의 N-(5-(3-(5-메틸-1,2,4-옥사디아졸-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-6-일)피리딘-3-일)벤젠술폰아미드(N-(5-(3-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)imidazo[1,2-a]pyridin-6-yl)pyridin-3-yl)benzenesulfonamide; 이하, HS-104)와 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor; 이하, VEGF)가 포함된 배지와 함께 재분산하여 5×10<sup>4</sup> 세포 수로 분주한 후 16시간 동안 배양하였다. 배양 후, 광학현미경을 이용하여 혈관 내피세포(HUVECs)에서 혈관이 형성되는 것을 관찰하였다.

[0031] 결과를 도 1에 나타내었다.

[0032] 도 1에 나타난 바와 같이, HS-104의 농도가 증가할수록 혈관내피세포(HUVECs)의 혈관 형성이 더욱 효과적으로 억제되었다. 따라서, 본 발명의 HS-104는 in vitro에서 혈관신생억제 효과가 있는 물질임을 확인하였다.

**[0033] 실시예 2. HS-104의 혈관신생 억제효과 확인을 위한 Aortic ring sprouting assay**

[0034] 쥐의 동맥혈관(Aortic blood vessel)을 찾아 분리하고 오염을 방지하기 위해 HBSS(Hank's Buffered Salt Solution)로 세척하였다. 세척 후, HBSS가 담긴 튜브에 분리한 쥐의 동맥혈관을 넣고 얼음에 박아 클린벤치톱으로 이동시켰다. 동맥혈관 주위에 붙은 지방조직과 기타 불필요한 부분들을 면봉으로 깨끗이 제거하고 1.5mm의 크기로 잘랐다. 48 웰 플레이트에 매트릭젤 200ul를 깔고, 1.5mm로 자른 동맥혈관을 매트릭젤 위에 위치시켰으며, 1 μM 또는 10 μM HS-104와 VEGF를 넣은 매트릭젤을 다시 위에 덮고 37° C에서 15~30분 동안 굳혔다. 배지를 넣고 7일 후 혈관내피세포(HUVECs)가 얼마나 관찰되는지 확인하였다.

[0035] 결과를 도 2에 나타내었다.

[0036] 도 2에 나타난 바와 같이, 1 μM 또는 10 μM의 HS-104를 VEGF와 혼합한 매트릭젤을 덮은 후 굳힌 동맥혈관에서는, 혈관내피세포(HUVECs)가 VEGF 단독 처리군에 비하여 현저히 감소한 것을 확인하였다. 따라서, HS-104는 동맥혈관에서 혈관내피세포(HUVECs)의 생성을 효과적으로 억제함을 알 수 있다.

**[0037] 실시예 3. HS-104의 혈관신생 억제효과 확인을 위한 매트릭젤 플러그 에세이**

[0038] 매트릭젤을 24시간 이상 4°C에서 서서히 녹인 후, 양성 대조군으로써 매트릭젤에 VEGF (50ng/ml)를 혼합하고, 실험군으로써 10 μM의 HS-104와 VEGF를 매트릭젤에 혼합하였다. 각각의 매트릭젤을 6-7주령의 수컷 마우스의 등쪽 표피에 얇게 주입하였고 5 ~ 7일 후 매트릭젤 플러그만을 취하여 블록을 만들어 절단하고 H&E 염색법으로 염색하여 혈관생성을 확인하였다.

[0039] 결과를 도 3에 나타내었다.

[0040] 도 3에 나타난 바와 같이, VEGF만을 혼합한 매트릭젤을 주입한 마우스의 표피는 혈관신생이 활발하게 일어났으며, 이와 비교하여 VEGF와 HS-104를 혼합한 매트릭젤을 주입한 마우스의 표피에서는 혈관신생이 뚜렷하게 억제되었다. 따라서, In vivo 에서도 HS-104가 혈관 신생을 효과적으로 억제함을 알 수 있다.

**[0041] 실시예 4. 암 유발 마우스에서 HS-104의 암증식 억제 및 혈관신생 억제 효과**

**[0042] 4.1 암 유발 마우스에서 HS-104의 암증식 억제효과**

[0043] 이종이식(Xenograft) 암 모델을 만들기 위하여 누드 마우스의 등에 간암 세포주 (Huh-7)를 접종한 다음, 3주 후에 종양이 생성되면 종양 부피를 측정하였다. 이 후, HS-104를 마우스에 하루에 한번씩 투여하고 2일 간격으로 종양의 부피를 측정하면서 HS-104의 암증식 억제효과를 확인하였다.

[0044] 결과를 도 4에 나타내었다.

[0045] 도 4에 나타낸 바와 같이, 종양 부피 증가율은 HS-104 처리에 의하여 감소하였으며, 10mg/kg의 HS-104를 처리한 마우스보다 30mg/kg의 HS-104를 처리한 마우스에서 부피 증가율이 뚜렷하게 감소함을 확인하였다. 따라서, HS-104는 암 증식을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다.

[0046] **4.2 암 유발 마우스에서 HS-104의 혈관신생억제 효과**

[0047] 암 유발 마우스에서 HS-104 처리에 의한 혈관신생억제 효과를 확인하기 위하여, 항신혈관생성 마커인 VEGF와 CD34의 발현을 분석하였다. 준비된 슬라이드 상의 조직을 3.7% 파라포름 알데하이드에서 약 5분 동안 고정시켰다. 고정된 혈관 내피세포(HUVEC)의 조직은 세척 완충액(2% FBS + 0.1% Sodium Azid in PBS)으로 세 번에 걸쳐서 세척한 후, 일차항체(항- VEGF와 CD34)와 1:200 비율로 4℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 그 후, 반응에 이루어지지 않고 남아 있는 항체를 제거하기 위해서 조직을 다시 세척 완충액으로 세 번에 걸쳐서 세척하고, VEGF와 CD34에 특이적으로 반응한 항체를 DAB(diamino-benzidine) 발색으로 확인할 수 있도록 제작된 이차항체[항- 래빗(또는 마우스) 항체]와 1:500 비율로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 남아있는 항체를 제거하기 위해 상기 세척 완충액으로 다시 세 번에 걸쳐서 세척한 후에 갈색으로 염색한 후 현미경으로 발현 정도를 관찰 분석하였다.

[0048] 결과를 도 5에 나타내었다.

[0049] 도 5에 나타낸 바와 같이, 10mg/kg 또는 30mg/kg의 HS-104 처리에 의하여 VEGF와 CD34의 발현은 뚜렷하게 감소하였으며, 이를 통해 HS-104가 암 유발 마우스에서 암 혈관신생을 뚜렷하게 감소시켰음을 확인하였다.

[0050] **실시예 5. HS-104와 HS-116의 VEGF 억제 효과 비교**

[0051] HS-104의 혈관신생 억제 효과를 다른 PI3-키나제 억제제인 N-(5-(3-(3-시아노페닐)-1H-피로로[2,3-b]피리딘-5-일)피리딘-3-일)벤젠술폰아미드[(N-(5-(3-(3-cyanophenyl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-5-yl) pyridin-3-yl)benzenesulfonamide); 이하 HS-116]의 혈관신생 억제 효과와 비교하였다.

[0052] 간암세포에 CoCl<sub>2</sub>를 처리하여 저산소증을 유도한 후, 신혈관 생성의 대표적 물질인 VEGF의 생성 억제에 HS-104와 HS-116가 미치는 효과를 비교하기 위하여, HS-104와 HS-116을 1 μM, 5 μM, 10 μM로 각각 처리하고 VEGF 억제 효과를 확인하였다.

[0053] 결과를 도 6에 나타내었다.

[0054] 도 6에 나타낸 바와 같이, HS-104와 HS-116 모두 저산소증이 유도된 간암세포에서 VEGF의 생성을 억제하였으나, HS-104는 HS-116과 비교하여 더 낮은 농도에서도 VEGF의 생성을 유의적으로 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0055] **실시예 6. HS-104와 HS-116의 혈관내피세포(HUVECs)의 혈관신생 억제효과 비교**

[0056] VEGF로 혈관내피세포(HUVECs)에서 혈관 생성을 유도한 후, HS-104와 HS-116를 처리하고 상기 실시예 1의 튜브형성에세이(Tube formation assay)를 이용하여 혈관신생 억제 효과를 비교하였다. HS-104와 HS-116을 각각 저농도(1 μM) 또는 고농도(10 μM)로 처리한 후 광학현미경을 이용하여 혈관 내피세포(HUVECs)에서 혈관의 생성을 관찰하였다.

[0057] 결과를 도 7에 나타내었다.

[0058] 도 7에 나타낸 바와 같이, VEGF만을 처리한 대조군에서는 혈관 신생이 활발하게 일어남을 확인하였으며, HS-104 및 HS-116를 처리하면 모두 효과적으로 혈관의 신생을 억제하는 것을 확인하였다. 특히, HS-104는 저농도(1 μM) 및 고농도(10 μM) 모두에서 효과적으로 혈관의 신생을 억제하였으며 이를 통해 저농도에서 혈관신생 억제 효과가 미미한 HS-116에 비하여 더욱 강력한 혈관신생억제 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0059] **실시예 7. HS-104와 HS-116의 혈관내피세포(HUVECs) 이동 저해 효과 비교**

[0060] 혈관신생이 일어나면 세포의 이동이 일어나게 되므로 HS-104와 HS-116을 각각 저농도(1 μM) 또는 고농도(10 μM)로 처리하여

M)로 처리한 후, 혈관내피세포(HUVECs) 이동 저해 효과를 비교하였다.

[0061] 결과를 도 8에 나타내었다.

[0062] 도 8에 나타낸 바와 같이, VEGF 만을 처리한 혈관내피세포(HUVECs)(대조군)에서는 세포의 이동을 확인하였으나, HS-104 및 HS-116을 처리한 혈관내피세포(HUVECs)에서는 세포의 이동이 억제되었다. 특히, HS-104는 저농도(1 μM) 및 고농도(10 μM) 모두에서 효과적으로 혈관내피세포의 이동을 억제하였으며, 이를 통해 HS-104는 저농도에 서 혈관신생 억제 효과가 미미한 HS-116에 비하여 더욱 강력한 혈관신생억제 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0063] **제제예. 약학적 제제**

[0064] 1. 산제의 제조

[0065] HS-104 2g

[0066] 유당 1g

[0067] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[0068] 2. 정제의 제조

[0069] HS-104 100mg

[0070] 옥수수전분 100mg

[0071] 유 당 100mg

[0072] 스테아르산 마그네슘 2mg

[0073] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0074] 3. 캡슐제의 제조

[0075] HS-104 100mg

[0076] 옥수수전분 100mg

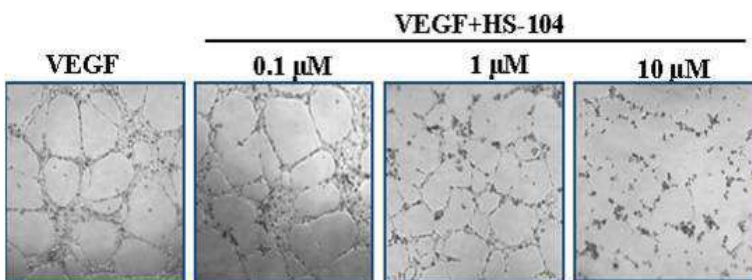
[0077] 유 당 100mg

[0078] 스테아르산 마그네슘 2mg

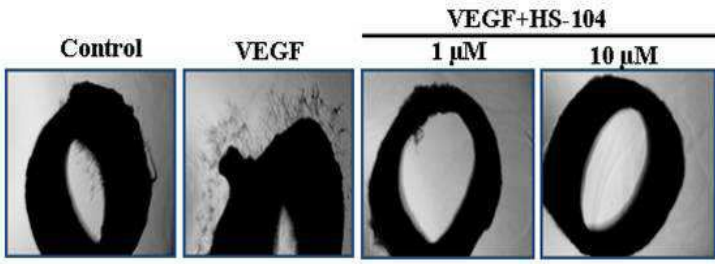
[0079] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

**도면**

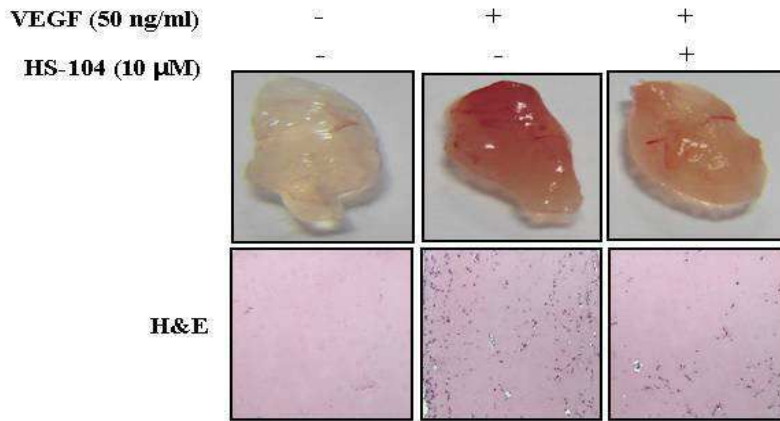
**도면1**



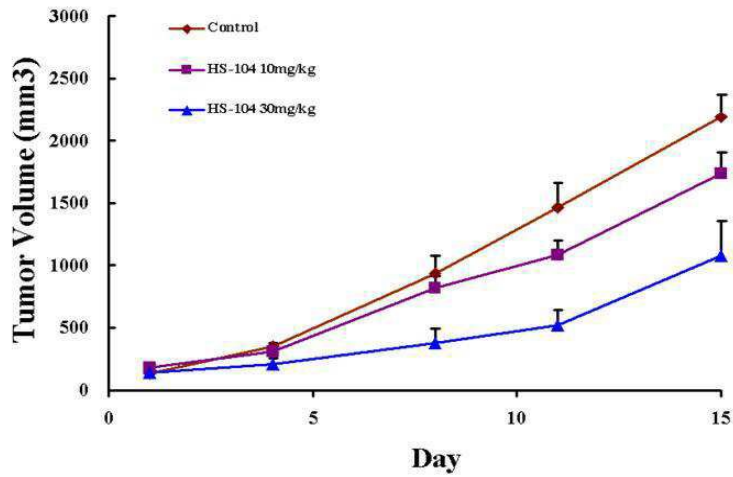
도면2



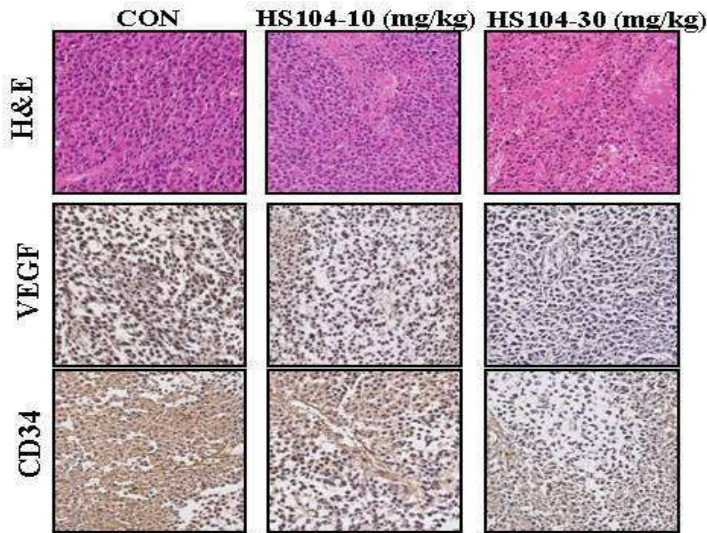
도면3



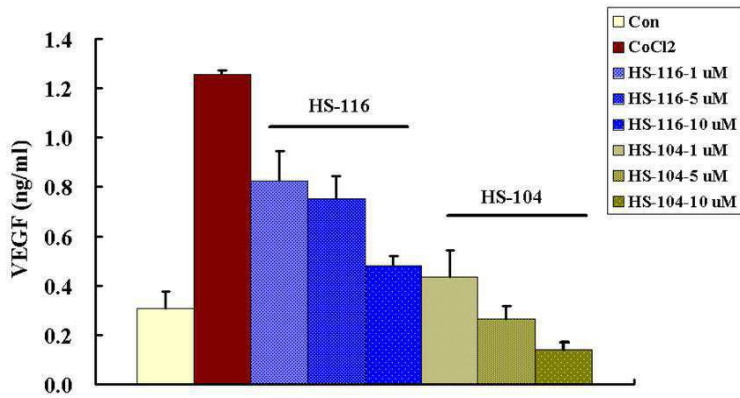
도면4



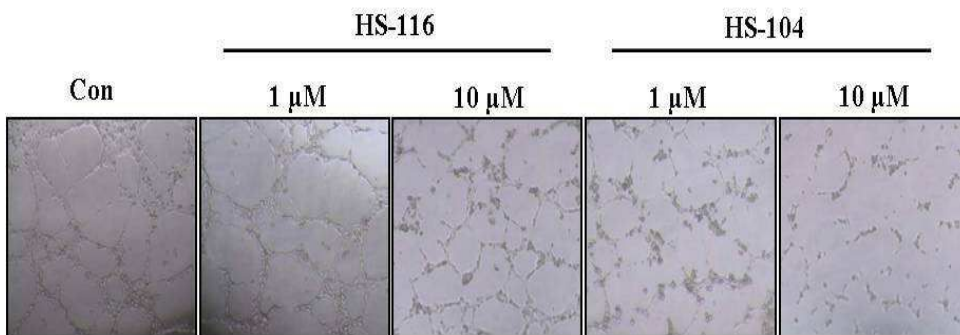
도면5



도면6



도면7



도면8

