(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0094959
(43) 공개일자 2023년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/496 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/496 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-0144475
(22) 출원일자 2022년11월02일
심사청구일자 2022년11월02일
(30) 우선권주장
1020210184299 2021년12월21일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한국과학기술연구원
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
김은경
서울특별시 성북구 화랑로 14길 5
송은주
서울특별시 용산구 이촌로87길 21, 105동 902호(이촌동, 이촌아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

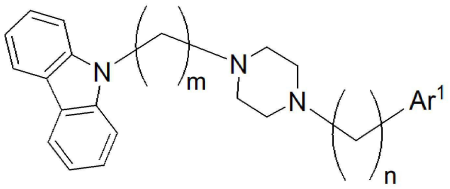
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **카바졸 유도체 화합물을 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물**

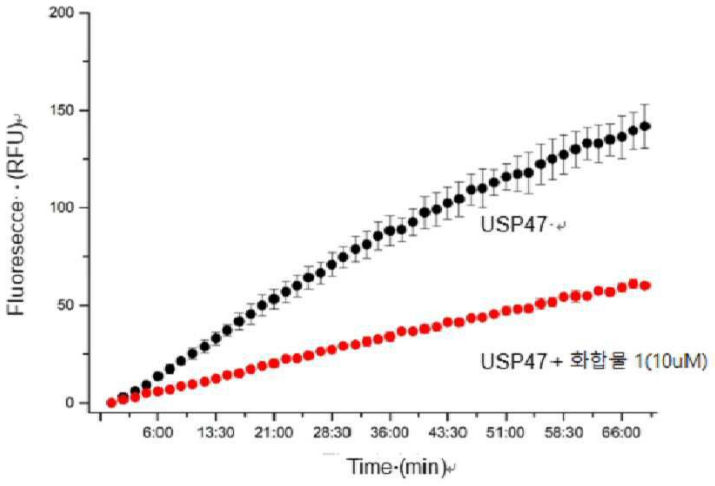
(57) 요 약

본 발명은 하기 구조식 1로 표시되는 카바졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[구조식 1]



대 표 도 - 도1



(72) 발명자

추현아

서울특별시 성북구 화랑로 14길 5

신상철

서울특별시 성북구 화랑로 14길 5

정정현

서울특별시 성북구 화랑로 14길 5

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711137211
과제번호	2020R1A4A4079494
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	일반연구자지원사업
연구과제명	혁신 항암제 개발을 위한 탈유비퀴틴화 효소 제어 네트워크 연구실
기 여 율	1/2
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711144483
과제번호	2017R1A2B3007224
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	탈유비퀴틴화 효소 USP의 활성 조절 기전 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	한국과학기술연구원
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

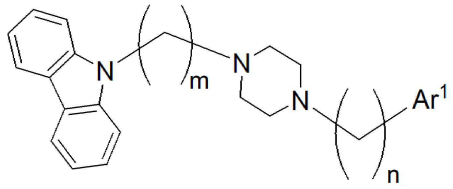
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 구조식 1로 표시되는 카바졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물;

[구조식 1]



구조식 1에서,

m은 1 내지 10의 정수이고,

n은 0 내지 3의 정수이고,

Ar^1은 수소원자, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C7 알킬기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C7 알킬카보닐기, 치환 또는 비치환된 C3 내지 C10 시클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C6 내지 C10 아릴기이다.

청구항 2

제1항에서,

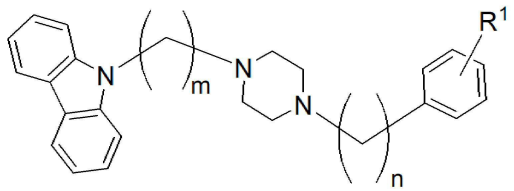
Ar^1은 수소원자, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C4 알킬기, 치환 또는 비치환된 또는 치환 또는 비치환된 페닐기인 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 구조식 1로 표시되는 카바졸 유도체는 하기 구조식 2로 표시되는 카바졸 유도체인 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물;

[구조식 2]



구조식 2에서,

m은 1 내지 6의 정수이고,

n은 0 또는 1이고,

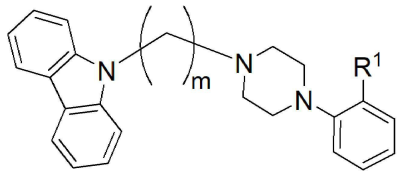
R^1은 수소원자, 하이드록시기, C1 내지 C7 알킬기, 또는 C1 내지 C7 알콕시기이다.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 구조식 2로 표시되는 카바졸 유도체는 하기 구조식 3으로 표시되는 카바졸 유도체인 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물;

[구조식 3]



구조식 2에서,

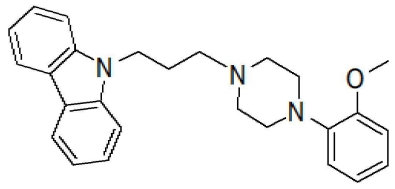
m은 2 내지 4의 정수이고,

R^1은 하이드록시기, 또는 C1 내지 C3 알콕시기이다.

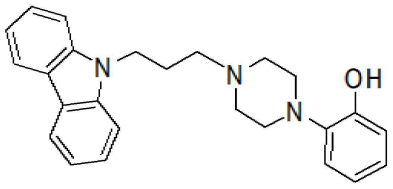
청구항 5

제1항에 있어서,

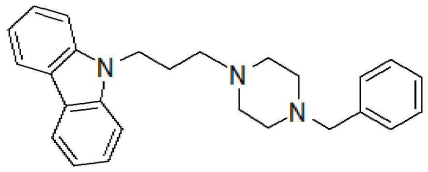
상기 구조식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 1 내지 13 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물.



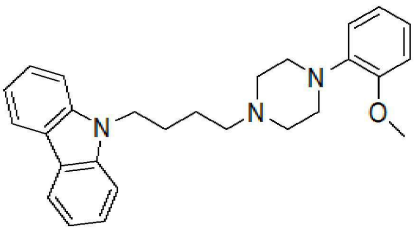
1



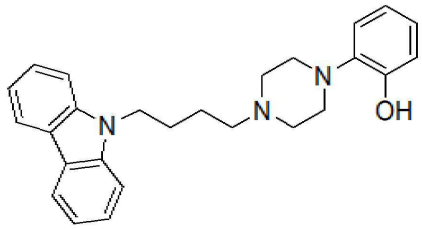
2



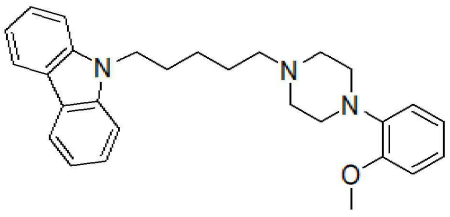
3



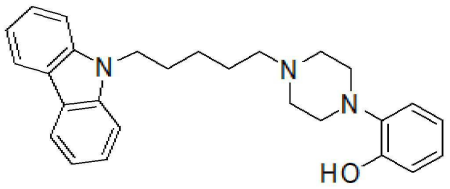
4



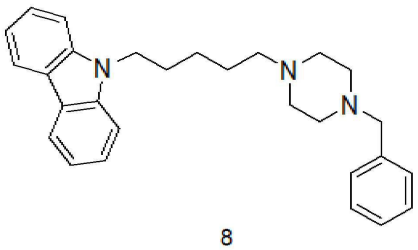
5



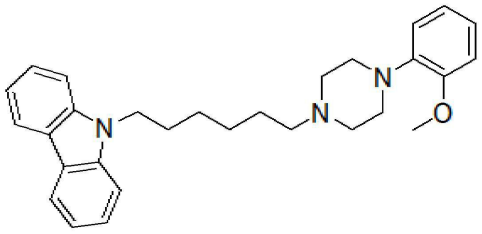
6



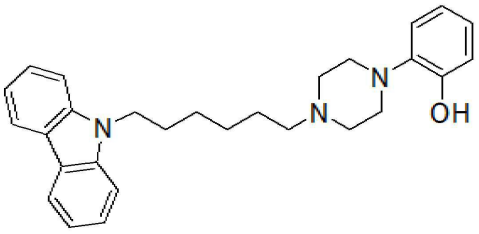
7



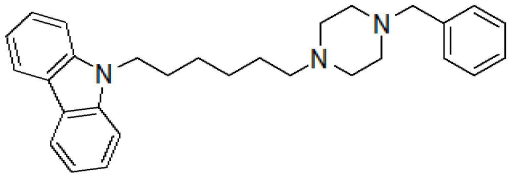
8



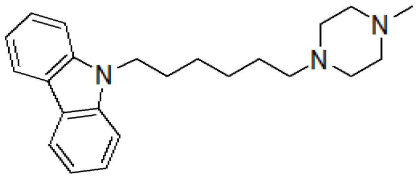
9



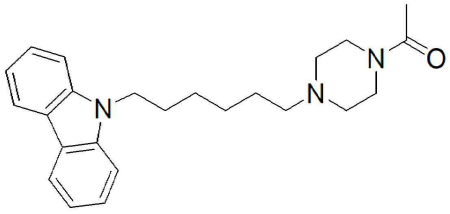
10



11



12

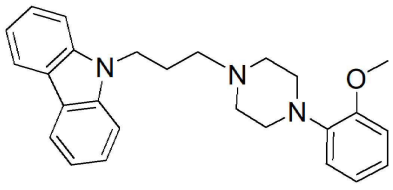


13

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 구조식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 1인 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물.



1

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 USP47 단백질 활성 저해용도인 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 약학적으로 허용 가능한 염은 염산, 브롬산, 술폰산, 아미도황산, 인산, 질산, 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 젖산, 타르타르산, 시트르산, 파라톨루엔설폰산 및 메탄설폰산 중에서 선택되는

어느 하나의 무기산 또는 유기산을 이용하여 형성된 염인 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 및 캅셀제 중에서 선택된 어느 하나의 제제인 것을 특징으로 하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 카바졸 유도체 화합물을 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 USP47 저해제로 작용하는 카바졸 유도체 화합물을 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 유비퀴틴화 (ubiquitination)과 탈유비퀴틴화 (deubiquitination)는 세포내에서 단백질 분해, 신호전달, 세포주기, DNA 손상 반응, 자가포식등 다양한 역할을 담당한다. E1 (ubiquitin-activating enzyme), E2 (ubiquitin-conjugating enzyme), E3 (ubiquitin ligase)와 DUB (deubiquitinatinase)가 긴밀하게 작용하여 유비퀴틴화/탈유비퀴틴화를 조절하게 된다. 이러한 유비퀴틴화/탈유비퀴틴화 조절이 실패하게 되면 암, 신경계 질환, 발달 장애 등 다양한 질병이 발생하게 된다.

[0003] 백 개가 넘는 DUB 중에 USP7는 항바이러스, 항암뿐만 아니라 다양한 질병의 표적 단백질로써 제넨텍(Genentech), 노바티스(Novatis), 슈뢰딩거(Schrφdinger)와 같은 글로벌 제약사가 USP7을 겨냥한 저해제를 개발 중이며 일부 화합물은 전임상을 통과하고 임상 실험에 진행중에 있다.

[0004] USP47은 USP7과 가장 유사한 아미노산 서열을 가지고 있으며, 생물학적 및 생화학적 기능 측면에서도 그 유사성을 보이고 있다. 최근 USP47의 기능 및 생장을 저해한 경우 급성 골수성 백혈병, 대장암, 시스플라틴(cisplatin)의 내성을 보이는 암세포 성장에 대한 저해력이 확인된 바 있다. 이뿐만 아니라 폐암을 비롯한 폐 관련 질환들에 대한 표적 단백질로 동정이 되었다. 이와 같이 다양한 암 및 질병에 연관이 있는 USP47의 저해제 개발은 매우 미비하며, 특히 USP47만을 겨냥한 저해 화합물의 경우 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1672943호

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Cancers, 2020, 12, 1137

(비특허문헌 0002) Nat Commun. 2021 Jan 4;12(1):51.

발명의 내용

해결하려는 과제

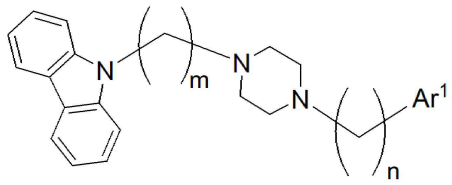
[0007] 본 발명의 목적은 USP47 단백질의 활성을 저해함으로써 폐암 세포 생장을 억제할 수 있는 카바졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 하나의 측면에 따르면,

[0009] 하기 구조식 1로 표시되는 카바졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물이 제공된다;

[0010] [구조식 1]

[0011] 

[0012] 구조식 1에서,

[0013] m은 1 내지 10의 정수이고,

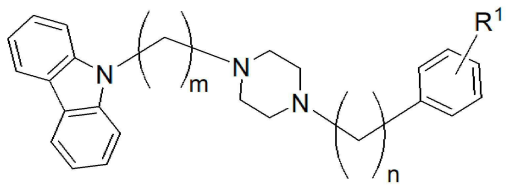
[0014] n은 0 내지 3의 정수이고,

[0015] Ar^1은 수소원자, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C7 알킬기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C7 알킬카보닐기, 치환 또는 비치환된 C3 내지 C10 시클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C6 내지 C10 아릴기이다.

[0016] 바람직하게는, Ar^1은 수소원자, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C4 알킬기, 치환 또는 비치환된 또는 치환 또는 비치환된 페닐기일 수 있다.

[0017] 상기 구조식 1로 표시되는 카바졸 유도체는 하기 구조식 2로 표시될 수 있다.

[0018] [구조식 2]

[0019] 

[0020] 구조식 2에서,

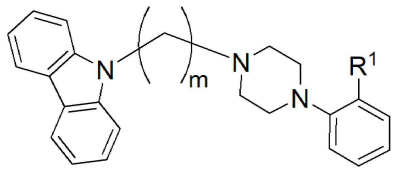
[0021] m은 1 내지 6의 정수이고,

[0022] n은 0 또는 1이고,

[0023] R^1은 수소원자, 하이드록시기, C1 내지 C7 알킬기, 또는 C1 내지 C7 알콕시기이다.

[0024] 상기 구조식 2로 표시되는 카바졸 유도체는 하기 구조식 3으로 표시될 수 있다.

[0025] [구조식 3]

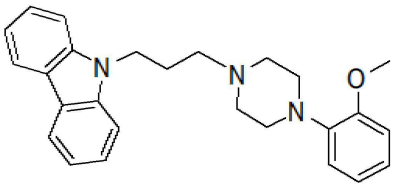
[0026] 

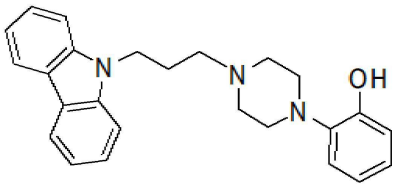
[0027] 구조식 2에서,

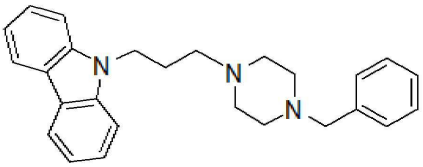
[0028] m은 2 내지 4의 정수이고,

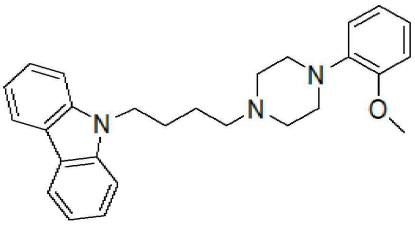
[0029] R^1은 하이드록시기, 또는 C1 내지 C3 알콕시기이다.

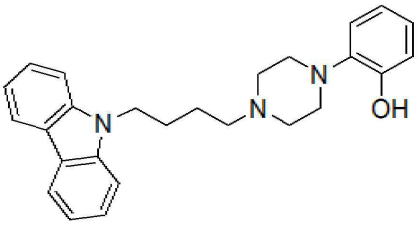
[0030] 상기 구조식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 1 내지 13 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

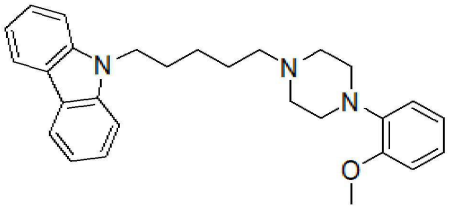
[0031] 
1

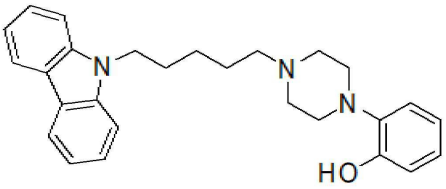

2

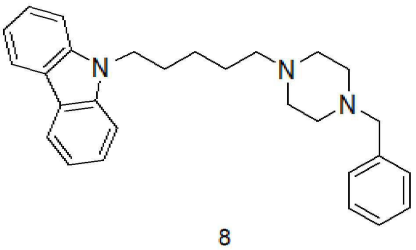
[0032] 
3

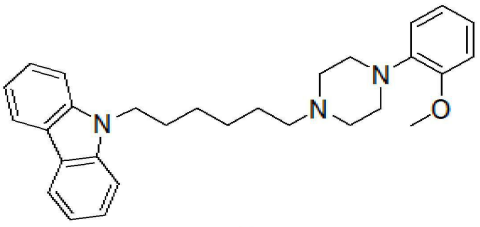

4

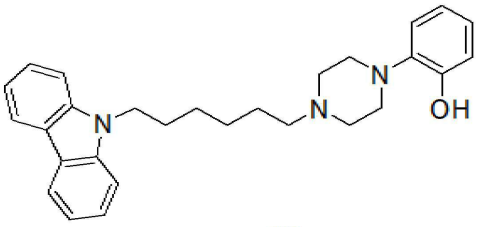
[0033] 
5

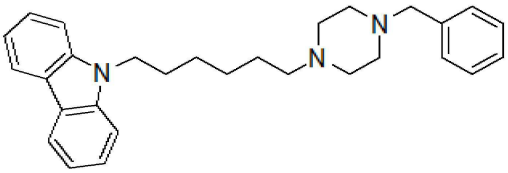

6

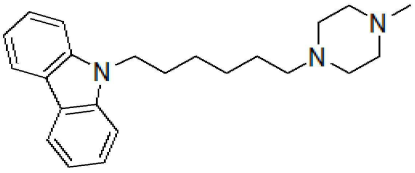
[0034] 
7

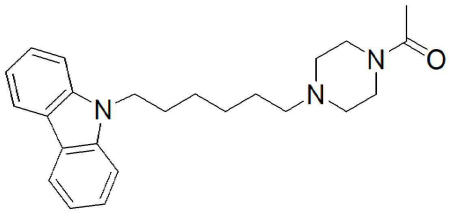

8

[0035] 
9


10

[0036] 
11

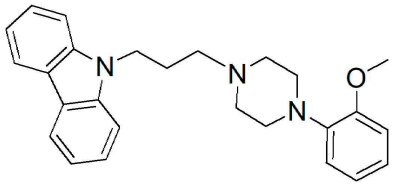

12



13

[0037]

[0038] 가장 바람직하게는, 상기 구조식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 1일 수 있다.



1

[0039]

[0040] 상기 약학 조성물은 USP47 단백질 활성 저해용도일 수 있다.

[0041] 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 염산, 브롬산, 술폰산, 아미도황산, 인산, 질산, 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 젖산, 타르타르산, 시트르산, 파라톨루엔설폰산 및 메탄설폰산 중에서 선택되는 어느 하나의 무기산 또는 유기산을 이용하여 형성된 염일 수 있다.

[0042] 상기 약학 조성물은 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 및 캅셀제 중에서 선택된 어느 하나의 제제일 수 있다.

발명의 효과

[0043] 본 발명의 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 USP47 단백질의 활성을 저해함으로써 폐암 세포 생장을 억제할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 실험예 1의 단계 1에 따른 USP47 효소 활성도 평가 결과이다.

도 2는 실험예 1의 단계 2에 따른 화합물 1의 농도별 USP47 효소 활성도 평가 결과이다.

도 3은 실험예 2의 세포 기반 USP47과 USP7에 대한 활성 분석을 위한 웨스턴 블로팅 분석 결과이다.

도 4는 실험예 3에 따른 화합물 1 처리 농도에 따른 폐암세포 성장 억제 효과를 분석하기 위한 MMT 분석 결과이다.

도 5는 실험예 3에 따른 화합물 1 처리 농도에 따른 폐암세포 콜로니 형성 사진이다.

도 6은 실험예 3에 따른 화합물 1 처리 농도에 따른 폐암세포 콜로니 수 측정 결과이다.

도 7은 실험예 3에 따른 화합물 1의 처리시 p53과 MDM2의 발현 양상에 미치는 영향을 웨스턴 블롯팅에 따라 분석한 결과이다.

도 8은 H358 세포주에 대한 화합물 1의 암 성장 속도 지연 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 실험동물의 몸무게 변화에 따른 독성 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 Calu-1 세포주에 대한 화합물 1의 암 성장 속도 지연 분석 결과이다.

도 11은 실험동물의 몸무게 변화에 따른 독성 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0046] 상기 "치환된"이란 적어도 하나의 수소원자가 중수소, C1 내지 C30 알킬기, C3 내지 C30 시클로알킬기, C2 내지 C30 헤테로시클로알킬기, C1 내지 C30 할로겐화알킬기, C6 내지 C30 아릴기, C1 내지 C30 헤테로아릴기, C1 내지 C30 알콕시기, C3 내지 C30 시클로알콕시기, C1 내지 C30 헤테로시클로알콕시기, C2 내지 C30 알케닐기, C2 내지 C30 알키닐기, C6 내지 C30 아릴옥시기, C1 내지 C30 헤테로아릴옥시기, 실릴옥시기($-OSiH_3$), $-OSiR^1H_2$(R^1은 C1 내지 C30 알킬기 또는 C6 내지 C30 아릴기), $-OSiR^1R^2H$(R^1 및 R^2는 각각 독립적으로 C1 내지 C30 알킬기 또는 C6 내지 C30 아릴기), $-OSiR^1R^2R^3$, (R^1, R^2, 및 R^3는 각각 독립적으로 C1 내지 C30 알킬기 또는 C6 내지 C30 아릴기), C1 내지 C30 아실기, C2 내지 C30 아실옥시기, C2 내지 C30 헤테로아릴옥시기, C1 내지 C30 술포닐기, C1 내지 C30 알킬티올기, C3 내지 C30 시클로알킬티올기, C1 내지 C30 헤테로시클로알킬티올기, C6 내지 C30 아릴티올기, C1 내지 C30 헤테로아릴티올기, C1 내지 C30 인산아마이드기, 실릴기($SiR^1R^2R^3$)(R^1, R^2, 및 R^3는 각각 독립적으로 수소 원자, C1 내지 C30 알킬기 또는 C6 내지 C30 아릴기), 아민기(-NRR')(여기에서, R 및 R'은 각각 독립적으로, 수소 원자, C1 내지 C30 알킬기, 및 C6 내지 C30 아릴기로 이루어진 군에서 선택되는 치환기임), 카르복실기, 할로겐기, 시아노기, 니트로기, 아조기, 및 하이드록시기로 이루어진 군에서 선택되는 치환기로 치환된 것을 의미한다.

[0047] 또한 상기 치환기 중 인접한 두 개의 치환기가 융합되어 포화 또는 불포화 고리를 형성할 수도 있다.

[0048] 또한, 상기 "치환 또는 비치환된 알킬기" 또는 "치환 또는 비치환된 아릴기" 등에서의 상기 알킬기 또는 아릴기의 탄소수 범위는 상기 치환기가 치환된 부분을 고려하지 않고 비치환된 것으로 보았을 때의 알킬 부분 또는 아릴 부분을 구성하는 전체 탄소수를 의미하는 것이다. 예컨대, 파라 위치에 부틸기가 치환된 페닐기는 탄소수 4의 부틸기로 치환된 탄소수 6의 아릴기에 해당하는 것을 의미한다.

[0049] 본 명세서에서 "수소원자"란 별도의 정의가 없는 한, 일중수소, 이중수소, 또는 삼중수소를 의미한다.

[0050] 본 명세서에서 "알킬(alkyl)기"란 별도의 정의가 없는 한, 지방족 탄화수소기를 의미한다.

[0051] 알킬기는 어떠한 이중결합이나 삼중결합을 포함하고 있지 않은 "포화 알킬(saturated alkyl)기" 일 수 있다.

[0052] 알킬기는 적어도 하나의 이중결합 또는 삼중결합을 포함하고 있는 "불포화 알킬(unsaturated alkyl)기"일 수도 있다.

[0053] 포화이든 불포화이든 간에 알킬기는 분쇄형, 직쇄형 또는 환형일 수 있다.

[0054] C1 내지 C4 알킬기는 알킬쇄에 1 내지 4 개의 탄소원자, 즉, 알킬쇄는 메틸, 에틸, 프로필, 이소-프로필, n-부틸, iso-부틸, sec-부틸 및 t-부틸로 이루어진 군에서 선택됨을 나타낸다.

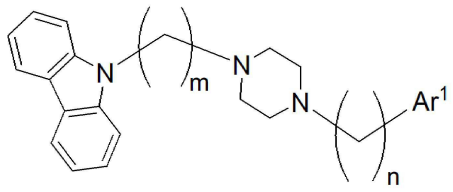
[0055] 구체적인 예를 들어 상기 알킬기는 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소프로필기, 부틸기, 이소부틸기, t-부틸기, 펜틸기, 헥실기, 에테닐기, 프로페닐기, 부테닐기, 시클로프로필기, 시클로부틸기, 시클로펜틸기, 시클로헥실기 등을 의미한다.

[0056] 한편, 본 명세서에서 용어 '유효성분으로 포함하는'이란 카바졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 일예로, 상기 카바졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염은 10 내지 1500 ㎍/㎖, 바람직하게는 100 내지 1000 ㎍/㎖의 농도로 사용될 수 있으나, 본 발명의 범위가 여기에 한저오디지 않으며 본 발명의 약학 조성물 내에 포함되는 카바졸 유도체의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

[0058] 이하, 본 발명의 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 대해 설명하도록 한다.

[0059] 본 발명의 폐암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 하기 구조식 1로 표시되는 카바졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염이다.

[0060] [구조식 1]



[0061]

[0062] 구조식 1에서,

[0063] m은 1 내지 10의 정수이고,

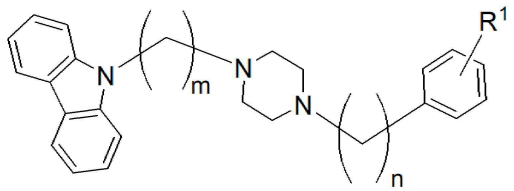
[0064] n은 0 내지 3의 정수이고,

[0065] Ar^1은 수소원자, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C7 알킬기, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C7 알킬카보닐기, 치환 또는 비치환된 C3 내지 C10 시클로알킬기, 또는 치환 또는 비치환된 C6 내지 C10 아릴기이다.

[0066] 바람직하게는, Ar^1은 수소원자, 치환 또는 비치환된 C1 내지 C4 알킬기, 치환 또는 비치환된 또는 치환 또는 비치환된 페닐기일 수 있다.

[0067] 더욱 바람직하게는, 상기 구조식 1로 표시되는 카바졸 유도체는 하기 구조식 2로 표시되는 카바졸 유도체일 수 있다.

[0068] [구조식 2]



[0069]

[0070] 구조식 2에서,

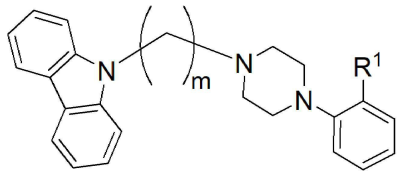
[0071] m은 1 내지 6의 정수이고,

[0072] n은 0 또는 1이고,

[0073] R^1은 수소원자, 하이드록시기, C1 내지 C7 알킬기, 또는 C1 내지 C7 알콕시기이다.

[0074] 더욱 바람직하게는, 상기 구조식 2로 표시되는 카바졸 유도체는 하기 구조식 3으로 표시되는 카바졸 유도체일 수 있다.

[0075] [구조식 3]



[0076]

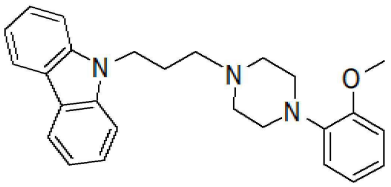
[0077] 구조식 2에서,

[0078] m은 2 내지 4의 정수이고,

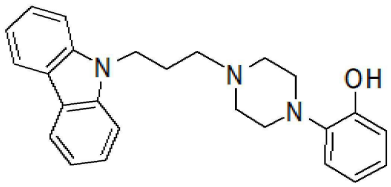
[0079] R^1은 하이드록시기, 또는 C1 내지 C3 알콕시기이다.

[0080] 더욱 더 바람직하게는, 상기 구조식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 1 내지 13 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0081]

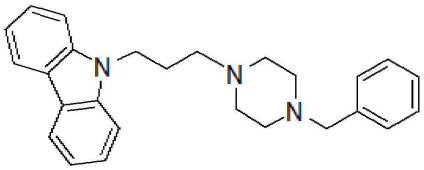


1

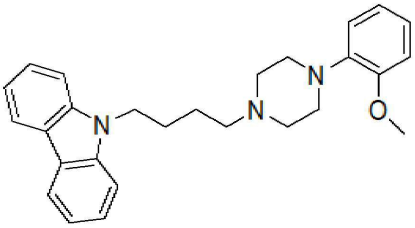


2

[0082]

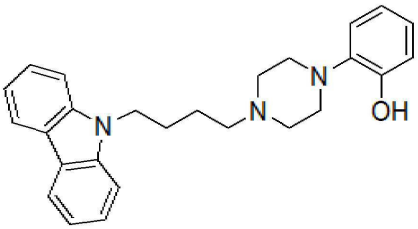


3

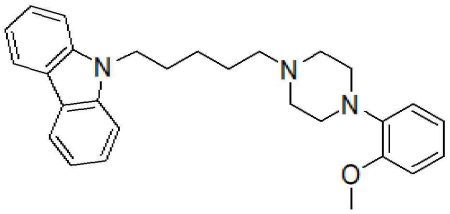


4

[0083]

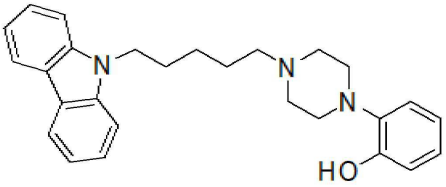


5

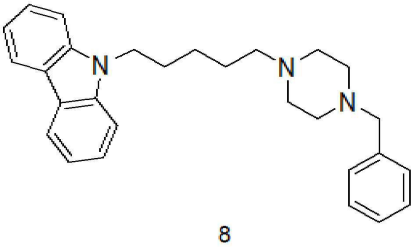


6

[0084]

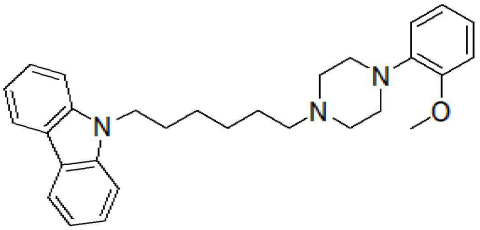


7

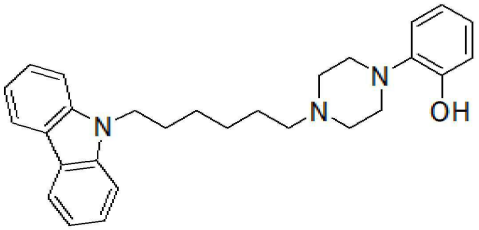


8

[0085]

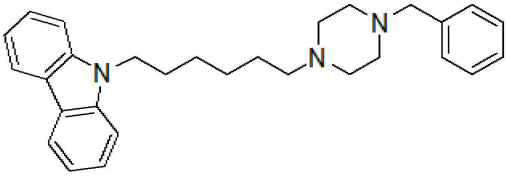


9

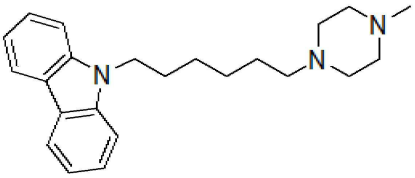


10

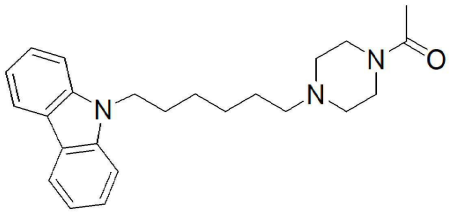
[0086]



11



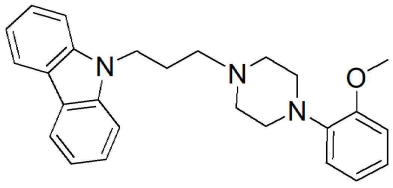
12



13

[0087]

[0088] 가장 바람직하게는, 상기 구조식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 1일 수 있다.



1

[0089]

[0090] 상기 약학 조성물은 USP47 단백질 활성 저해용도일 수 있다.

[0091] 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 염산, 브롬산, 술폰산, 아미도황산, 인산, 질산, 아세트산, 프로피온산, 숙신산, 글리콜산, 스테아르산, 젖산, 타르타르산, 시트르산, 파라톨루엔설폰산 및 메탄설폰산 중에서 선택되는 어느 하나의 무기산 또는 유기산을 이용하여 형성된 염일 수 있다.

[0093] 본 발명의 약학 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0094] 상기 약학 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0095] 상기 약학 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다.

[0096] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0097] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여이다.

[0098] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 약학 조성물의 1일 투여량은 0.001-10 g/kg이다.

[0099] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액,

현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0101] 또한, 본 발명은 상기 구조식 1로 표시되는 카바졸 유도체 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 폐암의 예방 또는 치료를 목적으로 사용하는 의약적 용도를 제공한다.

[0103] 이하, 본 발명의 실시예를 들어 설명하도록 한다.

[0104] **[실시예]**

[0105] **제조예 1: 9-(3-브로모헥실)-9H-카바졸 합성**

[0106] 반응용기에 카바졸(2 g, 11.96 mmol)과 1,3-다이브로모프로판(2.8 ml, 17.94 mmol), t-BuOK(1.3 g, 11.96 mmol)를 THF(15 ml)에 녹인 후, 40 ℃에서 10 시간 동안 가열 교반하였다. 반응 종결 후, 용액을 감압 농축시키고 다시 CH_2Cl_2로 희석시켰다. 이 용액을 H_2O로 씻어주고 무수 Na_2SO_4로 건조시킨 후, 여과하였다. 여과액을 감압 농축시켜 농축액을 실리카 겔 관 크로마토그래피(hexane:MC =8:1)로 분리 정제하여 목적 화합물인 9-(3-브로모헥실)-9H-카바졸 2.1 g(6.36 mmol, 53% 수율)을 얻었다.

[0108] **제조예 2: 9-(4-브로모부틸)-9H-카바졸 합성**

[0109] 1,3-다이브로모프로판 대신에 1,4-다이브로모부탄을 사용한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 목적 화합물을 제조하였다.

[0111] **제조예 3: 9-(5-브로모펜틸)-9H-카바졸 합성**

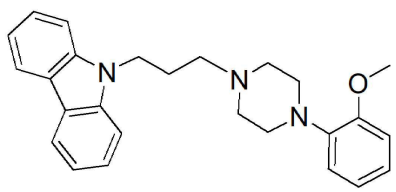
[0112] 1,3-다이브로모프로판 대신에 1,5-다이브로모펜탄을 사용한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 목적 화합물을 제조하였다.

[0114] **제조예 4: 9-(6-브로모헥실)-9H-카바졸 합성**

[0115] 1,3-다이브로모프로판 대신에 1,6-다이브로모헥산을 사용한 것을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 목적 화합물을 제조하였다.

[0117] **실시예 1: 화합물 1 합성**

[0118] 제조예 1에 따라 제조된 9-(3-브로모헥실)-9H-카바졸(176 mg, 0.61 mmol), 1-(2-메톡시페닐)피페라진(0.13 ml, 0.73 mmol)을 아세토나이트릴(10 ml)에 녹이고 40 ℃에서 다음날까지 가열환류하였다. 반응 완결 후 반응 혼합물을 CH_2Cl_2로 묽힌 후, H_2O를 넣고 수층을 CH_2Cl_2로 추출하여 얻은 유기층을 무수 Na_2SO_4로 건조시킨 후, 여과하였다. 여과액을 감압 농축시켜 농축액을 실리카겔 관 크로마토그래피(MC:MeOH =20:1)로 분리 정제하여 목적 화합물인 9-(3-(4-(2-메톡시페닐)피페라진-1-일)프로필)-9H-카바졸 145.8 mg(0.36 mmol, 60 % yield)을 얻었다.

[0119] 

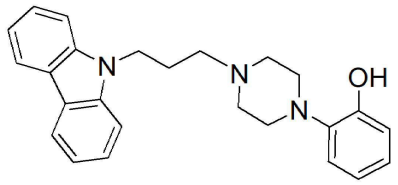
1

[0120] ^1H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.04(d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.43-7.37(m, 4H), 7.19-7.15(m, 2H), 6.96-6.86(m,

3H), 6.78-6.76(m, 1H), 4.29(t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.75(s, 3H), 3.06(brs, 4H), 2.50(brs, 4H), 2.26(t, J = 6.7 Hz, 2H), 1.94(quint, J = 6.6 Hz, 2H)

[0122] **실시예 2: 화합물 2 합성**

[0123] 실시예 1의 합성 방법에 따라 9-(3-브로모헥실)-9H-카바졸(176 mg, 0.61 mmol), 1-(2-하이드록시페닐)피페라진(153 mg, 0.86 mmol)을 사용하여 목적 화합물 131.6 mg(0.34 mmol, 60 % yield)을 얻었다.

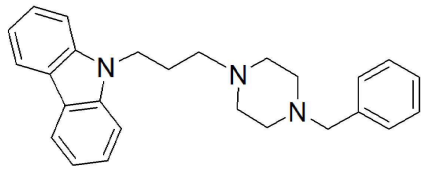


[0124] 2

[0125] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.07(d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.46-7.41(m, 4H), 7.24-7.15(m, 3H), 7.08-7.03(m, 1H), 6.94(dd, J = 6.0 Hz, J =1.4 Hz, 1H), 6.85(td, J = 7.6 Hz, J = 1.5 Hz, 1H), 4.36(t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.85(t, J = 4.7 Hz, 4H), 2.47(brs, 4H), 2.30(t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.01(quint, J = 6.6 Hz, 2H)

[0127] **실시예 3: 화합물 3 합성**

[0128] 실시예 1의 합성 방법에 따라 9-(3-브로모프로필)-9H-카바졸(200 mg, 0.69 mmol), 벤질피페라진(0.14 ml, 0.83 mmol)을 사용하여 목적 화합물 9-(3-(4-벤질피페라진-1-일)프로필)-9H-카바졸 204.6 mg(0.53 mmol, 77 % yield)을 얻었다.

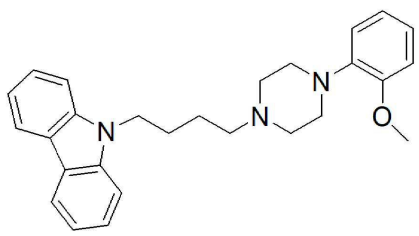


[0129] 3

[0130] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.04-8.02(m, 2H), 7.41-7.36(m, 4H), 7.30-7.24(m, 4H), 7.23-7.14(m, 3H), 4.26(t, J = 6.7 Hz, 2H), 3.46(s, 2H), 2.39(brd, J = 41.2 Hz, 8H), 2.21(t, J = 6.8 Hz, 2H), 1.92(quint, J = 6.7 Hz, 2H)

[0132] **실시예 4: 화합물 4 합성**

[0133] 실시예 1의 합성 방법에 따라 제조예 2의 9-(4-브로모부틸)-9H-카바졸(200 mg, 0.66 mmol), 1-(2-메톡시페닐)피페라진(0.14 ml, 0.79 mmol)을 사용하여 목적 화합물 9-(4-(4-(2-메톡시페닐)피페라진-1-일)부틸)-9H-카바졸 256.4 mg(0.62 mmol, 94 % yield)을 얻었다.

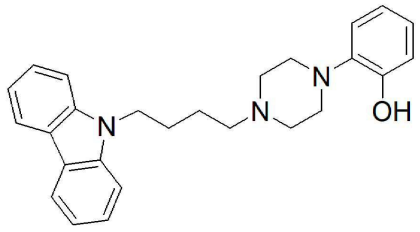


[0134] 4

[0135] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.04(d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.42-7.38(m, 2H), 7.33(d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.19-7.15(m, 2H), 6.95-6.88(m, 1H), 6.85(d, J = 4.0 Hz, 2H), 6.75(d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.18(t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.74(s, 3H), 3.00(brs, 4H), 2.50(brs, 4H), 2.31(t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.81(quint, J = 7.4 Hz, 2H), 1.50(quint, J = 7.5 Hz, 2H)

[0137] **실시예 5: 화합물 5 합성**

[0138] 실시예 1의 합성 방법에 따라 제조예 2의 9-(4-브로모부틸)-9H-카바졸(200 mg, 0.66 mmol), 1-(2-하이드록시페닐)피페라진(177 mg, 0.99 mmol)을 사용하여 목적 화합물 2-(4-(4-(9H-카바졸-9-일)부틸)피페라진-1-일)페놀 104.5 mg(0.26 mmol, 40 % yield)을 얻었다.



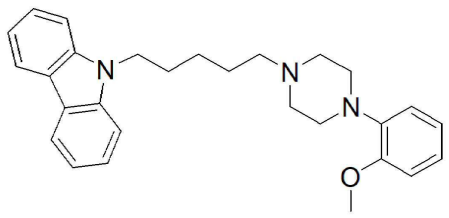
5

[0139]

[0140] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.06(d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.45-7.41(m, 2H), 7.37(d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.22-7.18(m, 2H), 7.09(dd, J = 5.9 Hz, J = 1.5 Hz, 1H), 7.05-7.01(m, 1H), 6.92(dd, J = 6.0 Hz, J = 1.4 Hz, 1H), 6.81(td, J = 7.6 Hz, J = 1.5 Hz, 1H) 4.25(t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.80(t, J = 4.7 Hz, 4H), 2.45(brs, 4H), 2.31(t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.86(quint, J = 7.4 Hz, 2H), 1.52(quint, J = 7.5 Hz, 2H)

[0142] **실시예 6: 화합물 6 합성**

[0143] 실시예 1의 합성 방법에 따라 제조예 3의 9-(5-브로모펜틸)-9H-카바졸(200 mg, 0.63 mmol), 1-(2-메톡시페닐)피페라진(0.13 ml, 0.76 mmol)을 사용하여 목적 화합물 9-(5-(4-(2-메톡시페닐)피페라진-1-일)펜틸)-9H-카바졸 247.7 mg(0.58 mmol, 92 % yield)을 얻었다.



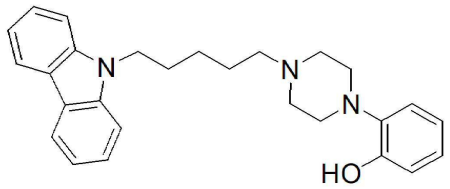
6

[0144]

[0145] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.05(d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.43-7.39(m, 2H), 7.32(d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.20-7.16(m, 2H), 6.95-6.84(m, 3H), 6.77(d, J = 7.6 Hz, 1H), 4.18(t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.76(s, 3H), 3.04(brs, 4H), 2.55(brs, 4H), 2.27(t, J = 7.7 Hz, 2H), 1.81(quint, J = 7.4 Hz, 2H), 1.48(quint, J = 7.6 Hz, 2H), 1.31(quint, J = 7.6 Hz, 2H)

[0147] **실시예 7: 화합물 7 합성**

[0148] 실시예 1의 합성 방법에 따라 제조예 3의 9-(5-브로모펜틸)-9H-카바졸(200 mg, 0.63 mmol), 1-(2-하이드록시페닐)피페라진(169 mg, 0.95 mmol)을 사용하여 목적 화합물 2-(4-(5-(9H-카바졸-9-일)펜틸)피페라진-1-일)페놀 172.3 mg(0.42 mmol, 66 % yield)을 얻었다.



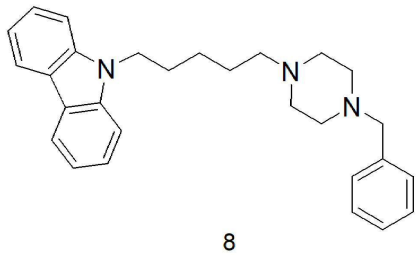
7

[0149]

[0150] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.04(d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.42-7.38(m, 2H), 7.31(d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.19-7.15(m, 2H), 7.09-7.06(m, 1H), 7.03-6.99(m, 1H), 6.92(dd, J = 6.0 Hz, J = 1.5 Hz, 1H), 6.80(td, J = 7.6 Hz, J = 1.5 Hz, 1H), 4.16(t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.79(t, J = 4.7 Hz, 4H), 2.41(brs, 4H), 2.20(t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.79(quint, J = 7.4 Hz, 2H), 1.41(quint, J = 7.5 Hz, 2H), 1.32-1.24(m, 2H)

[0152] **실시예 8: 화합물 8 합성**

[0153] 실시예 1의 합성 방법에 따라 제조예 3의 9-(5-브로모펜틸)-9H-카바졸(200 mg, 0.63 mmol), 벤질피페라진(0.13 ml, 0.76 mmol)을 사용하여 목적 화합물 9-(5-(4-벤질피페라진-1-일)펜틸)-9H-카바졸 248.0 mg(0.60 mmol, 95 % yield)을 얻었다.



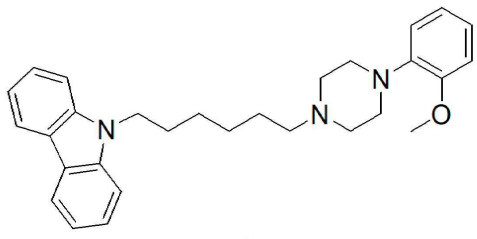
8

[0154]

[0155] H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.04(d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.41-7.37(m, 2H), 7.30(d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.26-7.15(m, 7H), 4.17(t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.44(s, 2H), 2.39(brs, 8H), 2.19(t, J = 7.7 Hz, 2H), 1.79(quint, J = 7.4 Hz, 2H), 1.43(quint, J = 7.6 Hz, 2H), 1.28(quint, J = 7.6 Hz, 2H)

[0157] **실시예 9: 화합물 9 합성**

[0158] 실시예 1의 합성 방법에 따라 1-(2-메톡시페닐)피페라진(699 mg, 3.64 mmol), 제조예 4의 9-(6-브로모헥실)-9H-카바졸(1 g, 3.03 mmol)와 K_2CO_3(418 mg, 3.03 mmol)을 사용하여 목적 화합물 9-(6-(4-(2-메톡시페닐)피페라진-1-일)헥실)-9H-카바졸 650 mg(1.47 mmol, 49%)을 얻었다.



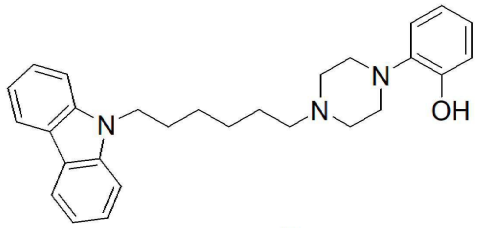
9

[0159]

[0160] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.23(d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.58(t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.50(d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.36(t, J = 7.4 Hz, 2H), 7.13-7.04(m, 3H), 6.95(d, J = 7.7 Hz, 1H), 4.35(t, J = 7.0 Hz, 2H), 3.94(s, 3H), 3.21(brs, 4H), 2.73(brs, 4H), 2.46(t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.99-1.94(m, 2H), 1.60-1.47(m, 4H)

[0162] **실시예 10: 화합물 10 합성**

[0163] 실시예 1의 합성 방법에 따라 제조예 4의 9-(6-브로모헥실)-9H-카바졸(100 mg, 0.30 mmol), 1-(2-하이드록시페닐)피페라진(81 mg, 0.45 mmol)을 사용하여 목적 화합물 2-(4-(6-(9H-카바졸-9-일)헥실)피페라진-1-일)페놀 111.2 mg(0.26 mmol, 86 % yield)을 얻었다.



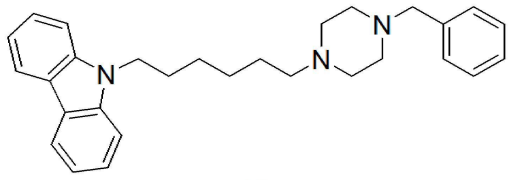
10

[0164]

[0165] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.06(d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.43-7.39(m, 2H), 7.34(d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.20-7.16(m, 2H), 7.10(dd, J = 5.9 Hz, J = 1.5 Hz, 1H), 7.02(td, J = 7.7 Hz, J = 1.3 Hz, 1H), 6.92(dd, J = 6.0 Hz, J = 1.4 Hz, 1H), 6.81(td, J = 7.6 Hz, J = 1.5 Hz, 1H), 4.21(t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.83(t, J = 4.7 Hz, 4H), 2.48(brs, 3H), 2.26(t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.82(quint, J = 7.3 Hz, 2H), 1.44-1.25(m, 7H)

[0167] **실시예 11: 화합물 11 합성**

[0168] 실시예 1의 합성 방법에 따라 제조예 4의 9-(6-브로모헥실)-9H-카바졸(100 mg, 0.30 mmol), 벤질피페라진(0.06 ml, 0.36 mmol)을 사용하여 목적 화합물 9-(6-(4-벤질피페라진-1-일)헥실)-9H-카바졸 111.2 mg(0.24 mmol, 79 % yield)을 얻었다.



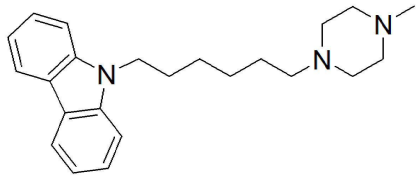
11

[0169]

[0170] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.07-8.05(m, 2H), 7.44-7.40(m, 2H), 7.34(d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.30-7.19(m, 7H), 4.23(t, J = 7.2 Hz, 2H), 3.47(s, 2H), 2.42(brs, 8H), 2.23(t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.82(quint, J = 7.3 Hz, 2H), 1.44-1.23(m, 6H)

[0172] **실시예 12: 화합물 12 합성**

[0173] 실시예 1의 합성 방법에 따라 제조예 4의 9-(6-브로모헥실)-9H-카바졸(100 mg, 0.30 mmol), 메틸피페라진(0.04 ml, 0.36 mmol)을 사용하여 목적 화합물 9-(6-(4-메틸피페라진-1-일)헥실)-9H-카바졸 62.0 mg(0.18 mmol, 59 % yield)을 얻었다.



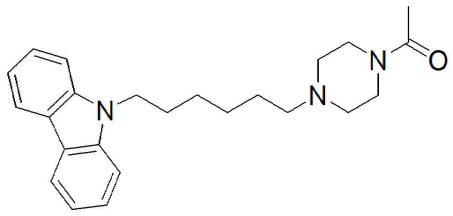
12

[0174]

[0175] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.08(d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.44(t, J = 7.6 Hz, 2H), 7.37(d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.23-7.19(m, 2H), 4.26(t, J = 7.1 Hz, 2H), 2.43(brs, 10H), 2.28-2.24(m, 3H), 1.85(quint, J = 7.3 Hz, 2H), 1.47-1.25(m, 6H)

[0177] **실시예 13: 화합물 13 합성**

[0178] 실시예 1의 합성 방법에 따라 제조예 4의 9-(6-브로모헥실)-9H-카바졸(100 mg, 0.30 mmol), 아세틸피페라진(47 mg, 0.36 mmol)을 사용하여 목적 화합물 1-(4-(6-(9H-카바졸-9-일)헥실)피페라진-1-일)에타논 103.6 mg(0.27 mmol, 91 % yield)을 얻었다.



13

[0179]

[0180] ^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ 8.07(d, J = 7.6 Hz, 2H), 7.44-7.40(m, 2H), 7.35(d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.22-7.18(m, 2H), 4.24(t, J = 7.1 Hz, 2H), 3.55(t, J = 5.1 Hz, 2H), 3.34(t, J = 5.1 Hz, 2H), 2.27(t, J = 4.6 Hz, 4H), 2.20(t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.02(s, 3H), 1.83(quint, J = 7.3 Hz, 2H), 1.41-1.21(m, 6H)

[0182] **[제제예]**

[0183] 본 발명에 따른 상기 구조식 1로 표시되는 카바졸 유도체는 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 이하, 본 발명에 따른 상기 [화학식 1]로 표시되는 카바졸 유도체 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 활성성분으로 함유시킨 제제화 방법을 예시하기로 한다. 그러나 이들 제제예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0185] **제제예 1: 가압 방식의 정제**

[0186] 실시예에서 합성한 활성성분 5.0 mg을 체로 친 후, 락토스 14.1 mg, 크로스포비돈 USNF 0.8 mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.1 mg을 혼합하고 가압하여 정제로 만들었다.

[0188] **제제예 2: 습식 조립 방식의 정제**

[0189] 실시예에서 합성한 활성성분 5.0 mg을 체로 친 후, 락토스 16.0 mg과 녹말 4.0 mg을 섞었다. 폴리솔베이트 80 0.3 mg을 순수한 물에 녹인 후 이 용액의 적당량을 첨가한 다음, 미립화하였다. 건조 후에 미립을 체질한 후 콜로이달 실리콘 디옥사이드 2.7 mg 및 마그네슘 스테아레이트 2.0 mg과 섞었다. 미립을 가압하여 정제로 만들었다.

[0191] **제제예 3: 분말과 캡슐제**

[0192] 실시예에서 합성한 활성성분 5.0 mg을 체로 친 후에, 락토스 14.8 mg, 폴리비닐 피롤리돈 10.0 mg, 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg와 함께 섞은 후, 단단한 No. 5 젤라틴 캡슐에 채웠다.

[0194] **제제예 4: 주사제**

[0195] 활성성분으로써 실시예의 화합물 100 mg을 함유시키고, 부가재료로써 만니톨 180 mg, $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 26 mg 및 증류수 2974 mg를 함유시켜 주사제를 제조하였다.

[0197] **[실험예: 세포 내 실험]**

[0198] **실험예 1: USP47 효소 활성 저해력 평가**

[0199] **단계 1: USP47 효소 활성도 평가**

[0200] 인공 기질인 UB-AMC를 이용하여 탈유비퀴틴화 효소의 활성도를 측정하였다. 탈유비퀴틴화 효소의 활성이 있을 시 인공 기질인 UB와 형광 물질인 AMC (7-amido-4-methylcoumarin)가 분리가 된다. 이때 분리된 AMC(7-amido-4-methylcoumarin)에 대한 형광 파장의 크기를 측정하였다. 측정되는 형광의 방사 파장(Emission)은 460 nm 이고 자극 파장(Excitation)의 경우 380 nm를 기준으로 측정하였다. 이 두 파장의 측정이 가능한 장비인 SpectraMax M3 plate reader를 이용하여 형광의 변화량을 측정하였다. 정제된 수용액 상태의 USP47 단백질 50nM을 완충용액 (150 mM 염화나트륨, 20 mM HEPES-염산완충액, pH 7.5, 150 mM 디티오트레이톨)에 보존하여 단백질을 안정화시켰다. 안정화된 상태의 USP47 단백질 50nM(대조군)과 동일한 양(50nM)의 USP47 단백질과 실시예 1에 따라 제조된 화합물 1 500nM 몰비율 1:10(실험군)으로 넣은 후 각각의 시료를 상온 25℃에서 30분 반응시킨 후 여기에 500nM UB-AMC를 넣어 USP47 활성에 따른 AMC(7-amido-4-methylcoumarin)의 변화량을 90초 간격으로 1시간 동안 측정하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0202] **단계 2: K-552 화합물 농도 변화에 따른 USP47의 효소 활성도 저해력 측정**

[0203] 상기 단계 1에서 얻은 초기 실험 결과를 바탕으로 화합물 1의 농도 변화에 따른 USP47 단백질의 활성도 차이를 확인하였다. 화합물 1의 다양한 농도(100, 50, 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.01 μM)에서 USP47 단백질의 효소 활성도를 측단계 1와 동일한 방법으로 측정하여 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0204] 이에 따르면, 본 발명의 화합물 1은 농도 의존적으로 USP47 단백질의 효소 활성도에 대한 저해능이 높은 것을 확인할 수 있다.

[0206] **시험예 2. 세포 기반 USP47과 USP7에 대한 활성 분석**

[0207] 본 발명의 화합물 1에 의한 USP47과 USP7의 억제 효과를 확인하기 위하여 activity probe assay를 사용하였다. A549 폐암 세포주에 화합물 1을 25μM에서 100μM 사이의 농도로 6시간동안 처리하였다. 또한 종래 USP47과 USP7의 억제제로 알려져 있는 P50429를 25μM 농도로 세포에 6시간 동안 처리하고 그 효과를 비교하였다. 약물을 처리한 각 세포를 수득하여 단백질 용해 버퍼 (20mM Tris-Cl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 50 mM NaF, 5 mM beta-glycero phosphate, 1mM Na3VO4, 1X protease inhibitor (cOmplete, EDTA-free; Roche, Basel, Switzerland)를 이용하여 단백질을 준비하였다. 60 ㎍의 세포단백질을 HA-Ub-PA (UBIQ, ubiq-078), 1mM DTT와 1시간 동안 37℃에서 반응시킨 후 2X SDS 샘플 버퍼와 함께 95℃에서 5분간 가열하고 6-15% SDS-PAGE 겔로 분리하고 웨스턴 블로팅으로 분석하였다. 본 실험에 사용한 일차 항체는 다음과 같다: USP47 Antibody (bethyl, A301-904); USP7 antibody (bethyl, A303-033); beta actin antibody (Ab Frontier, LF-PA0207).

[0208] 이에 따른 웨스턴 블로팅으로 분석 결과를 도 3에 나타내었다. 이에 따르면, 약물을 처리하지 않은 대조군(DMSO)에서는 USP47과 USP7 항체를 이용한 웨스턴 블로팅에서 HA-Ub 프로브가 결합된 밴드가 잘 나타나는 것을 볼 수 있으나 P50429를 처리한 경우에는 프로브가 결합되지 않은 것을 확인할 수 있었다. 또한, 화합물 1을 처리하였을 때 USP47의 블롯에서는 HA-Ub 프로브가 결합된 밴드가 대조군에 비해 현저히 감소한 것으로 보아 USP47의 활성이 억제되었음을 확인할 수 있었다. 그러나, USP7의 경우에는 HA-Ub 프로브와 결합이 유지되는 것으로 보아 USP7의 활성에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

[0210] **실험예 3. 폐암세포(NSCLC) 성장 억제 효과 분석**

[0211] 본 발명의 화합물 1이 폐암 세포의 성장에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 폐암 세포주인 A549 폐암 세포주에 화합물 1을 12.5 내지 100 μM 농도로 처리한 후, 콜로니 형성 분석 및 MTT 분석을 수행하였다.

[0212] 세포의 성장을 알아보기 위하여 A549 폐암세포는 96 웰 플레이트에 3000개의 세포를 깔아준 후 화합물 1을 1 내지 3일 동안 처리하였다. 이후, EZ-Cytox reagent (DoGEN, EZ-3000, Korea)을 배지에 첨가하고 30분 동안 기다린 후 microplate absorbance reader (Bio-Rad, Hercules,CA,USA)를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정하였고, 이에 따른 MTT 분석 결과를 도 4에 나타내었다. 이에 따르면, 그 결과 화합물 1 처리시 농도 의존적으로 폐

암 세포의 성장이 저해되는 것으로 나타났다.

[0213] 또한, 콜로 형성 분석을 위하여 화합물 1을 A549 폐암 세포에 48시간 동안 처리한 후 2일 마다 배지를 교환하면서 8일 동안 세포를 배양하였다. 세포를 PBS로 씻어낸 후 4% 파라모름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정하고 ice-cold 메탄올을 20분간 처리한 후 30분 동안 크리스탈 바이올렛(crystal violet)으로 염색한 사진을 도 5에 나타내었고, 콜로니의 수를 카운팅한 그래프를 도 6에 나타내었다. 이에 따르면 화합물 1을 처리하였을 때 농도 의존적으로 폐암 세포의 콜로니 형성이 감소하는 것으로 나타났다.

[0214] 한편, 화합물 1의 처리시 USP47이 관여하는 것으로 알려진 p53과 MDM2의 발현 양상에 미치는 영향을 웨스턴 블롯팅에 따라 분석하고 그 결과를 도 6에 나타내었다. 이에 따르면, p53 단백질 발현량은 화합물 1을 처리하였을 때 50 μM 까지 농도 의존적으로 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 9-(3-(4-(2-메톡시페닐)피페라진-1-일)프로필)-9H-카바졸이 USP47의 활성을 저해하여 p53의 단백질 발현양이 증가하게 되고 이에 따라 폐암 세포의 성장 및 colony formation이 감소됨을 확인할 수 있었다.

[0216] **[실험예: 세포 외 실험]**

[0217] **실험예 4: 항암 효과 평가**

[0218] 실험예 3에서 확인한 바와 같이 USP47 억제제 역할을 하는 화합물 1의 항암효과를 규명하기 위해 동물 실험을 진행하였고, 폐암 세포주 2종(H358, Calu-1)을 동물 실험에 선택하여 사용하였다. 각각의 세포주에 대한 화합물 1의 항암효과를 규명하기 위해 각 세포주를 마우스에 이식하는 동물 모델 (xenograft model)을 만들어 연구를 진행하였다. 각각의 세포주의 세포들을 마우스에 5,000,000개로 피하주사를 통해 이식하였고 세포가 생착된 후 암의 부피를 측정하여 50-100mm^3에 도달하면 대조군과 실험군으로 군 분리를 진행하여 화합물 투여를 시작하였다. 화합물 1은 하루에 한 번씩 21일 동안 30mg/kg의 농도로 복강 내 투여하였다. 약물을 투여하는 기간 동안 약물 투여로 인한 암 성장 속도 지연을 확인하기 위해 하루에 한 번씩 암 부피를 측정했고, 약물 투여로 인한 독성을 간접적으로 확인하기 위해 실험동물의 몸무게 측정을 진행하였다.

[0219] 암 부피 측정은 다음 식 1에 따라 계산하였다.

[0220] [식 1]

[0221] 암 부피(mm^3) = 너비(mm) x 너비(mm) x 길이(mm)

[0223] H358 세포주에 대한 화합물 1의 암 성장 속도 지연 분석 결과를 도 8에 나타내었고, 실험동물의 몸무게 변화에 따른 독성 분석 결과를 도 9에 나타내었다.

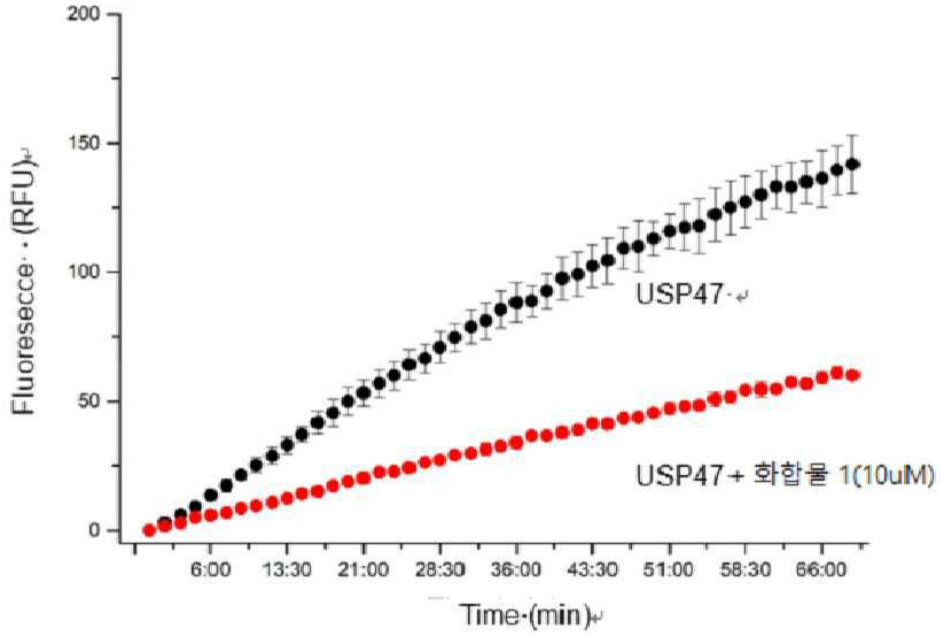
[0224] 이에 따르면, 마우스에 H358 암세포를 이식하여 화합물 1을 투여하였을 때 대조군과 비교한 결과, 화합물 1을 투여한 군에서 암세포 성장이 지연되었으며, 투여하는 기간 동안 두 그룹 간의 몸무게 변화가 차이가 없어 화합물 1을 투여하는 것이 실험동물에 스트레스를 주지 않고 독성이 없다는 것을 간접적으로 확인하였다.

[0225] 또한, Calu-1 세포주에 대한 화합물 1의 암 성장 속도 지연 분석 결과를 도 10에 나타내었고, 실험동물의 몸무게 변화에 따른 독성 분석 결과를 도 11에 나타내었다. 이에 따르면, 마우스에 Calu-1 암세포를 이식하여 화합물 1을 투여하였을 때 대조군과 비교해 화합물 1을 투여한 군에서 암세포 성장이 지연되었으며, 투여하는 기간 동안 두 그룹 간의 몸무게 변화가 차이가 없어 화합물 1을 투여하는 것이 실험동물에 스트레스를 주지 않고 독성이 없다는 것을 간접적으로 확인하였다.

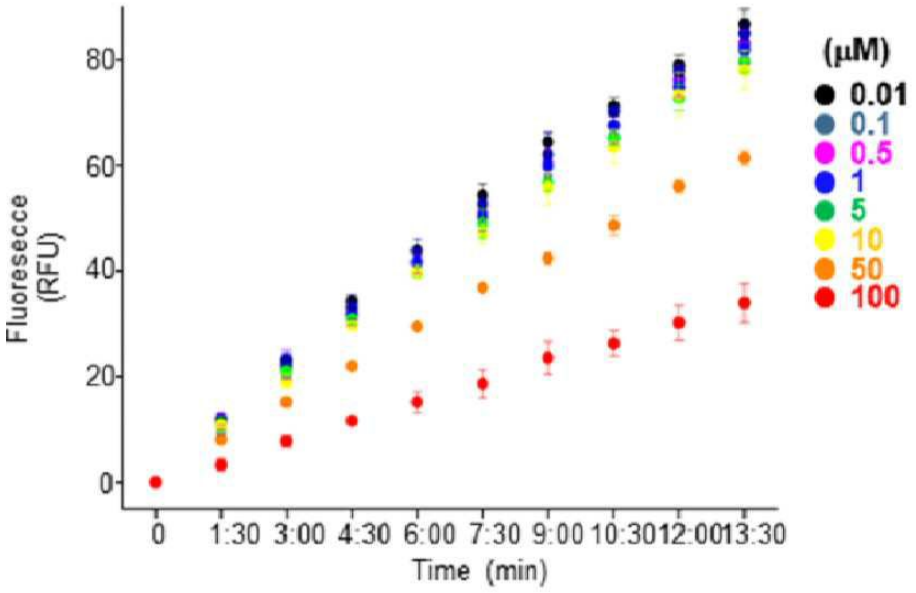
[0227] 이상, 본 발명의 실시예들에 대하여 설명하였으나, 해당 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서, 구성 요소의 부가, 변경, 삭제 또는 추가 등에 의해 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있을 것이며, 이 또한 본 발명의 권리범위 내에 포함된다고 할 것이다.

도면

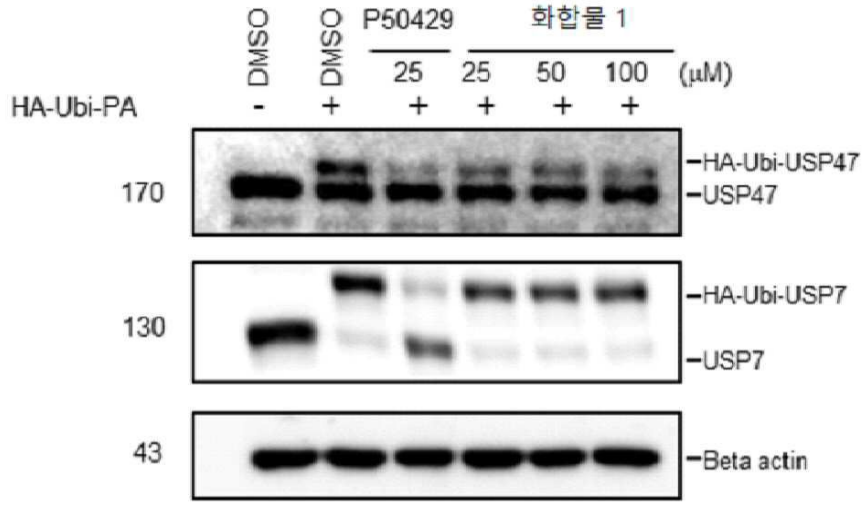
도면1


200
150
100
50
0
Fluoresecce (RFU)
USP47
USP47+ 화합물 1(10uM)
6:00
13:30
21:00
28:30
36:00
43:30
51:00
58:30
66:00
Time (min)

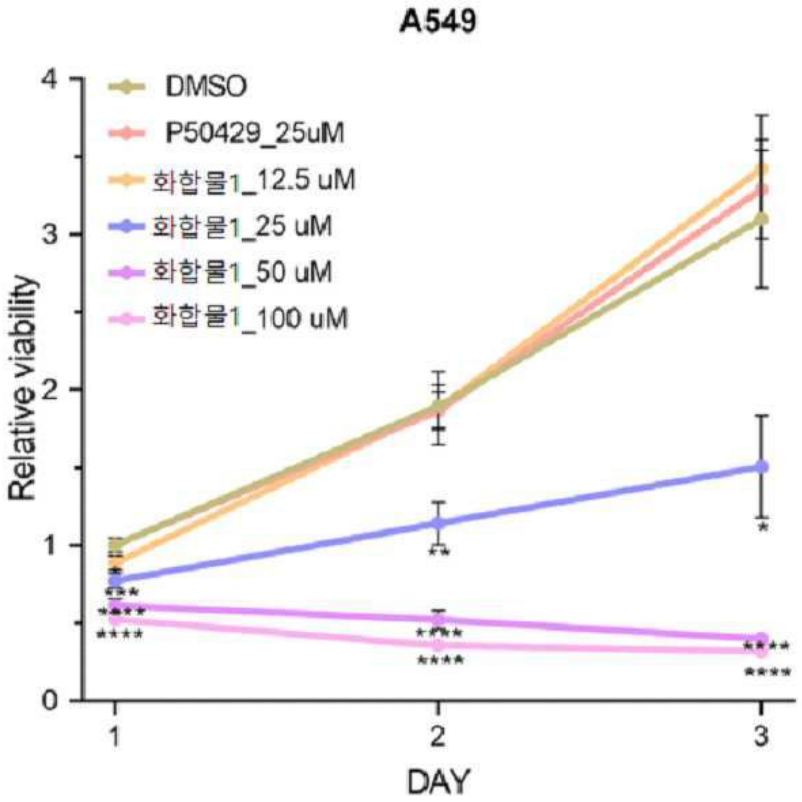
도면2


80
60
40
20
0
Fluoresecce (RFU)
0
1:30
3:00
4:30
6:00
7:30
9:00
10:30
12:00
13:30
Time (min)
(μM)
0.01
0.1
0.5
1
5
10
50
100

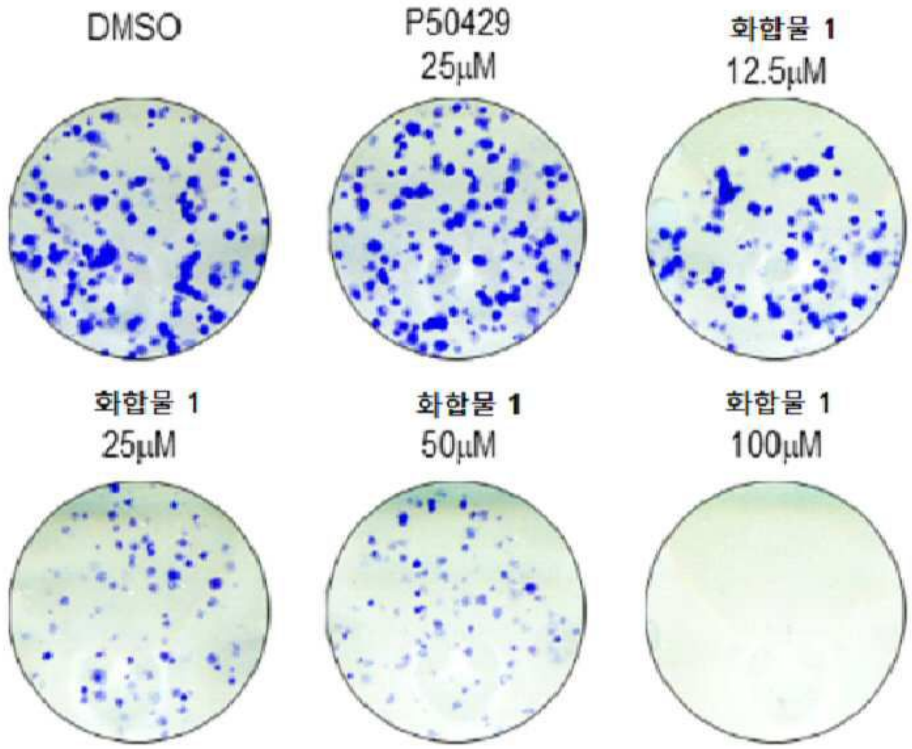
도면3


DMSO
DMSO
P50429
화합물 1
25
25
50
100
(μM)
HA-Ubi-PA
-
+
+
+
+
+
170
130
43
HA-Ubi-USP47
USP47
HA-Ubi-USP7
USP7
Beta actin

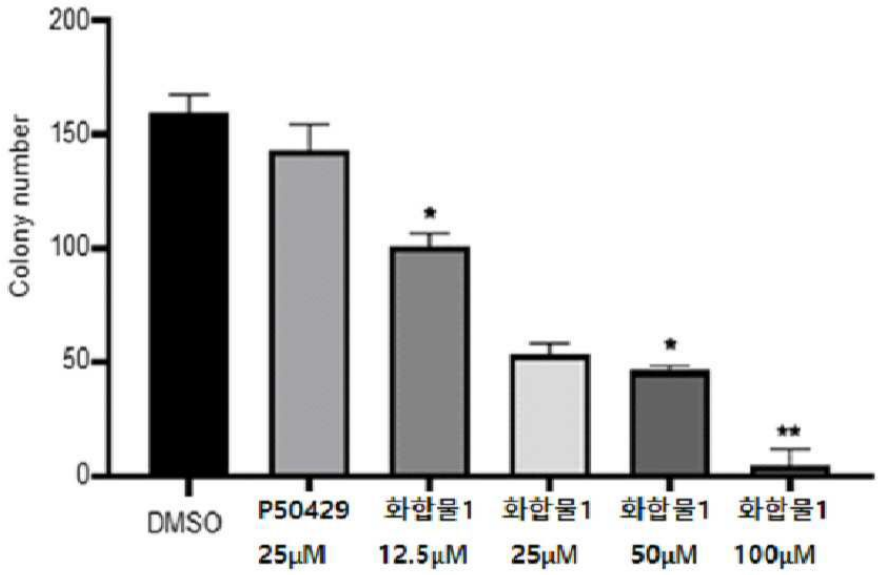
도면4


A549
DMSO
P50429_25uM
화합물1_12.5 uM
화합물1_25 uM
화합물1_50 uM
화합물1_100 uM
Relative viability
DAY
0
1
2
3
4

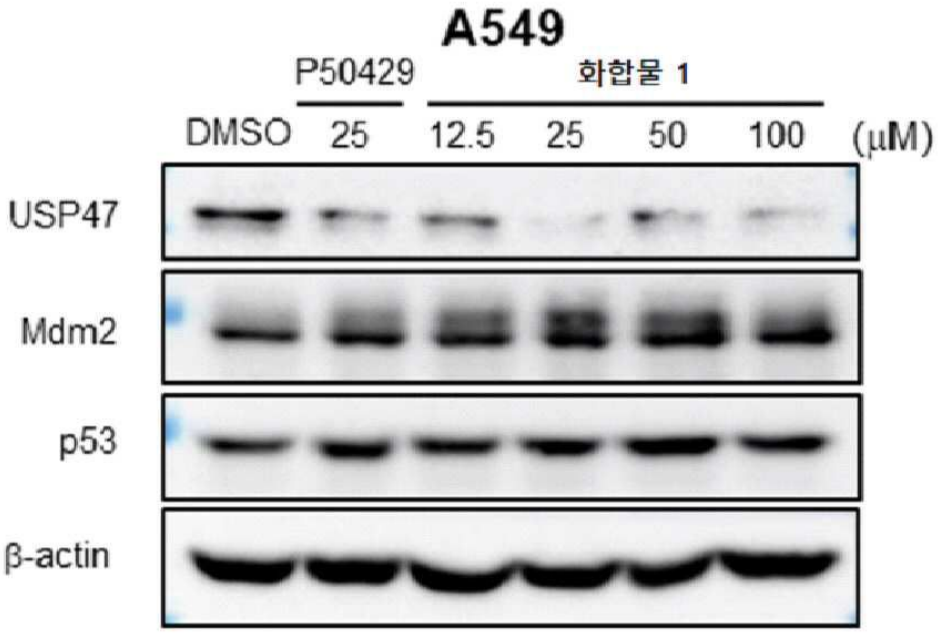
도면5


DMSO
P50429
25μM
화합물 1
12.5μM
화합물 1
25μM
화합물 1
50μM
화합물 1
100μM

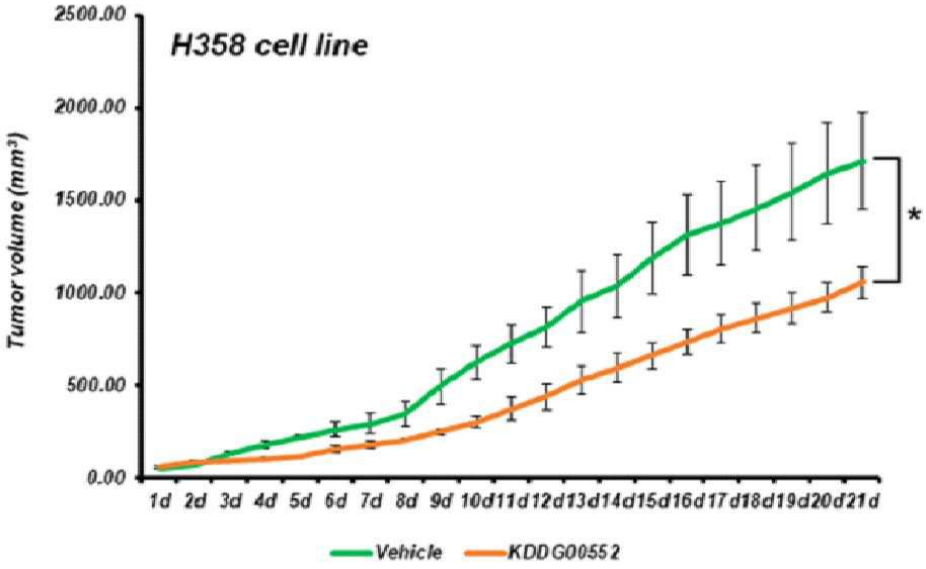
도면6


Colony number
200
150
100
50
0
*
*
**
DMSO
P50429
25μM
화합물1
12.5μM
화합물1
25μM
화합물1
50μM
화합물1
100μM

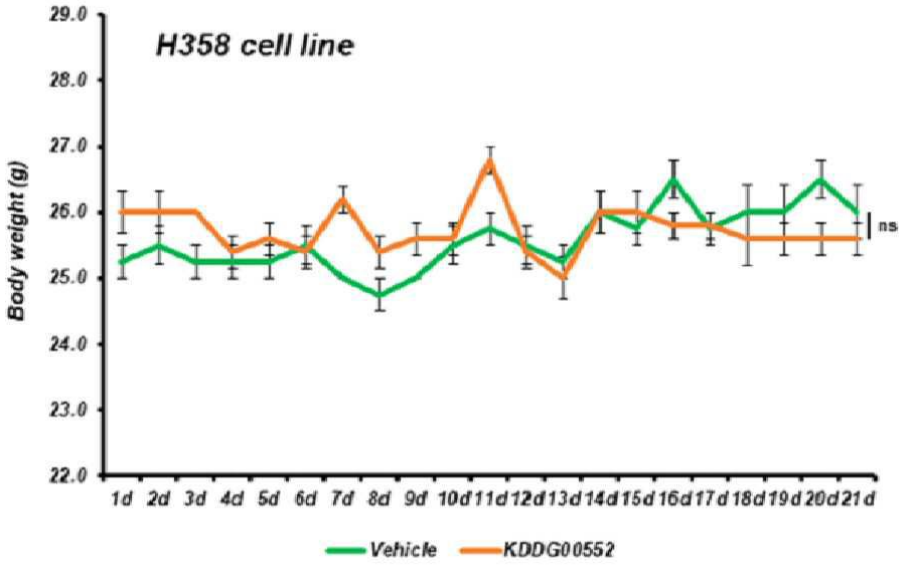
도면7


A549
P50429
화합물 1
DMSO
25
12.5
25
50
100
(μM)
USP47
Mdm2
p53
β-actin

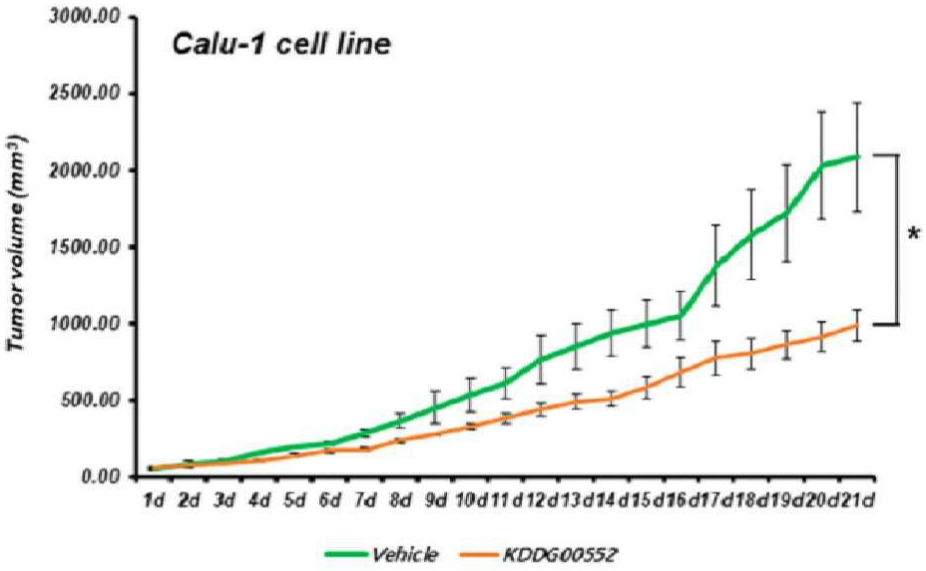
도면8


H358 cell line
Tumor volume (mm³)
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
1d 2d 3d 4d 5d 6d 7d 8d 9d 10d 11d 12d 13d 14d 15d 16d 17d 18d 19d 20d 21d
*
Vehicle
KDDG00552

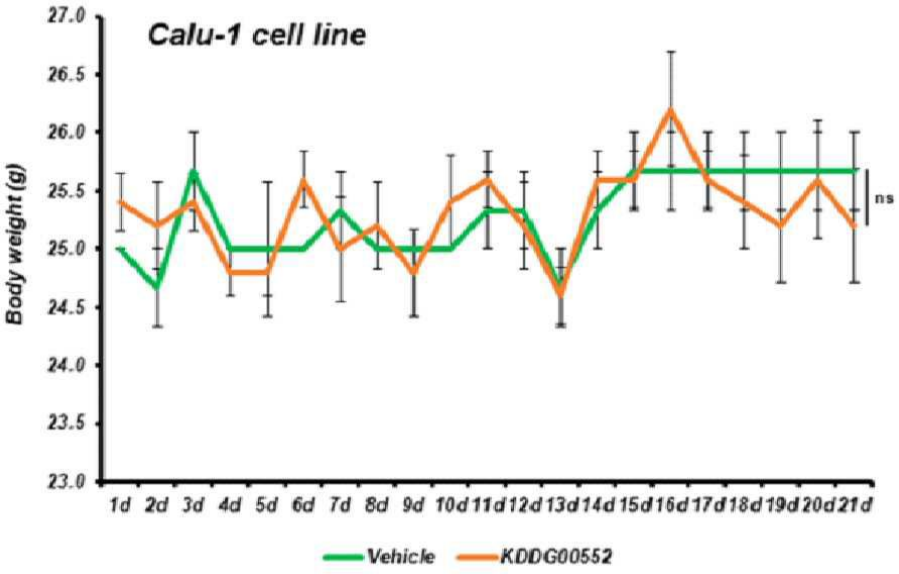
도면9


H358 cell line
Body weight (g)
29.0
28.0
27.0
26.0
25.0
24.0
23.0
22.0
ns
1d 2d 3d 4d 5d 6d 7d 8d 9d 10d 11d 12d 13d 14d 15d 16d 17d 18d 19d 20d 21d
Vehicle
KDDG00552

도면10


Calu-1 cell line
Tumor volume (mm³)
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
*
1d 2d 3d 4d 5d 6d 7d 8d 9d 10d 11d 12d 13d 14d 15d 16d 17d 18d 19d 20d 21d
Vehicle
KDDG00552

도면11


Calu-1 cell line
Body weight (g)
27.0
26.5
26.0
25.5
25.0
24.5
24.0
23.5
23.0
ns
1d 2d 3d 4d 5d 6d 7d 8d 9d 10d 11d 12d 13d 14d 15d 16d 17d 18d 19d 20d 21d
Vehicle
KDDG00552