

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0090482 (43) 공개일자 2011년08월10일
(51) Int. Cl. <i>A61K 31/505</i> (2006.01) <i>A61P 35/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0010290 (22) 출원일자 2010년02월04일 심사청구일자 2010년02월04일	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내 (72) 발명자 정우진 서울 서대문구 연희동 151-20 골든빌 501호 김호진 인천광역시 부평구 갈산2동 362번지 갈산하나아파트 102-402 이서구 서울 종로구 사직동 9번지 광화문 스페이스 본 104-1408 (74) 대리인 강성혜	

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 설피레독신 활성저해작용을 갖는 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 설피레독신의 활성 저해제로서 사용되는 벤조산계 화합물 또는 베타 알라닌계 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 질환의 치료 또는 예방을 위한 약학조성물 및 방사선 치료 보조제를 제공한다. 구체적으로, 본 발명의 벤조산계 화합물 또는 베타 알라닌계 화합물들은 암세포에서 설피레독신의 활성을 저해함으로써, 암 질환의 치료 및 예방을 위한 약학조성물로 이용가능하다.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10527

부처명 서울특별시

연구관리전문기관

연구사업명 서울시 산학연 협력사업(기술기반 구축(핵심)사업, (구)전략산업 혁신 클러스터 육성 지원 사업)

연구과제명 신호전달제어를 통한 항암 및 항염증 신약개발

기여율

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

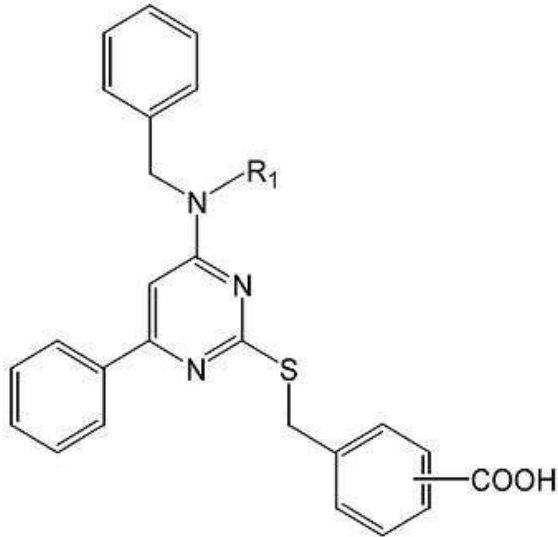
연구기간 2005년 12월 01일 ~ 2010년 11월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

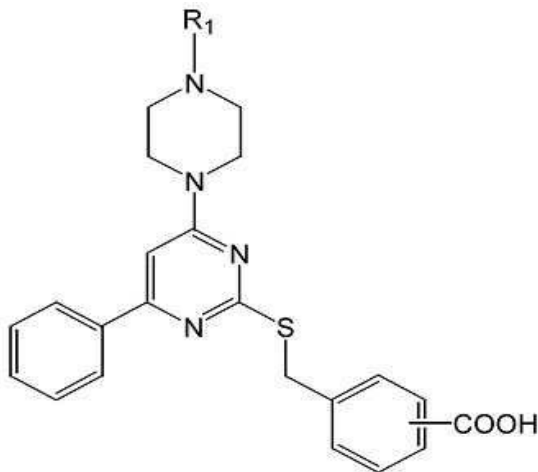
하기 화학식 1 또는 화학식 2의 구조를 갖는 벤조산계 화합물 및 화학식 3의 구조를 갖는 베타 알라닌계 화합물 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염 중 선택된 1종을 유효성분으로 함유하는 암 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물:

<화학식 1>



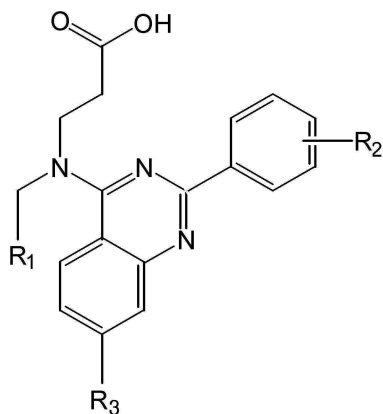
(상기 화학식 1에서, R₁은 수소원자, 메틸기 또는 에틸기이다.)

<화학식 2>



(상기 화학식 2에서 R₁은 벤질기, 메톡시페닐 또는 2-할로페닐기이다.)

<화학식 3>



(상기 화학식 3에서 R₁은 벤질기, 페닐기, 2-푸라닐기 또는 이소프로필기이고, R₂는 할로젠 원소이고, R₃는 수소 원자 또는 염소원자이다.)

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 화학식 1은 (1) 4-[[4-[벤질(메틸)아미노-6-페닐-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 4-[[4-[benzyl(methyl)amino-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **D1**; Catalog No. CGX-01742830, (2) 3-[[4-[벤질(메틸)아미노-6-페닐-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 3-[[4-[benzyl(methyl)amino-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **J15**; Catalog No. CGX-01742851로부터 선택된 화합물임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 화학식 2는 (1) 4-[[[4-[4-(2-플루오로페닐)-1-피페라지닐]-6-페닐-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 4-[[[4-[4-(2-fluorophenyl)-1-piperazinyl]-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **J7**; Catalog No. CGX-01742822, (2) 4-[[[4-페닐-6-[4-(페닐메틸)-1-피페라지닐]-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 4-[[[4-phenyl-6-[4-(phenylmethyl)-1-piperazinyl]-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **J8**; Catalog No. CGX-01742823, (3) 4-[[[4-(4-메톡시페닐)-1-피페라지닐]-6-페닐-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 4-[[[4-(4-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **J11**; Catalog No. CGX-01742828, (4) 4-[[[4-[4-(2-클로로페닐)-1-피페라지닐]-6-페닐-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 4-[[[4-[4-(2-chlorophenyl)-1-piperazinyl]-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **J14**; Catalog No. CGX-01742838, 및 (5) 3-[[[4-페닐-6-[4-(페닐메틸)-1-피페라지닐]-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 3-[[[4-phenyl-6-[4-phenylmethyl)-1-piperazinyl]-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **L25**; Catalog No. CGX-01742844로부터 선택된 화합물임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 화학식 3은 (1) N-[2-(3-(브로모페닐)-4-퀴아졸리닐)-N-(2-페닐에틸)- 베타 알라닌 {β-alanine, N-[2-(3-(bromophenyl)-4-quinazolinyl)-N-(2-phenylethyl)-}; **E7**; Catalog No. CGX-01144778, (2) N-[2-(3-(브로모페닐)-4-퀴아졸리닐)-N-(2-푸라노메틸)-베타 알라닌 {β-alanine, N-[2-(3-(bromophenyl)-4-quinazolinyl)-N-(2-furanylmethyl)-}; **M22**; Catalog No. CGX-01144906, (3) N-[2-(3-(브로모페닐)-4-퀴아졸리닐)-N-(2-페닐메

틸)-베타 알라닌 { β -alanine, N-[2-(3-(bromophenyl)-4-quinazolinyl)-N-(2-phenylmethyl)-}; **M24**; Catalog No. CGX-01144714, 및 (4) N-[7-클로로-2-(4-(플루오로페닐)-4-퀴아졸리닐)-N-(2-메틸프로필)-베타 알라닌 { β -alanine, N-[7-chloro-2-(4-(fluorophenyl)-4-quinazolinyl)-N-(2-methylpropyl)-}; **M25**; Catalog No. CGX-01144599로부터 선택된 화합물임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

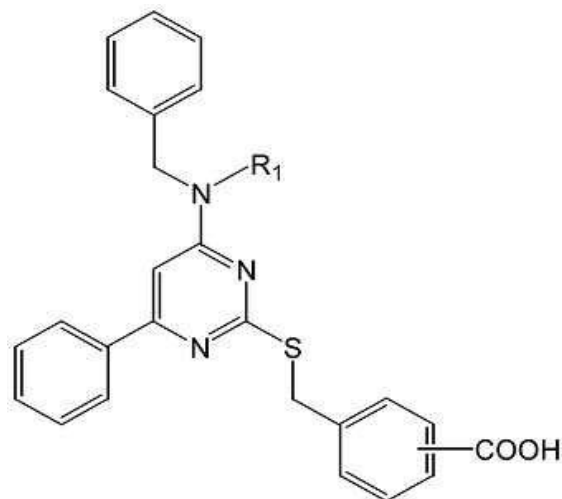
청구항 1에 있어서,

상기 암 질환은 유방암, 구강/갑상선암(oral/thyroid cancer), 전립선암, 결장암, 폐암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문암, 식도암, 췌장암, 위암, 신장암, 자궁암, 유방암, 폐암, 임파선암, 갑상선암, 전립선암, 백혈병, 피부암, 결장암, 뇌종양, 방광암, 난소암 또는 담낭암인 조성물.

청구항 6

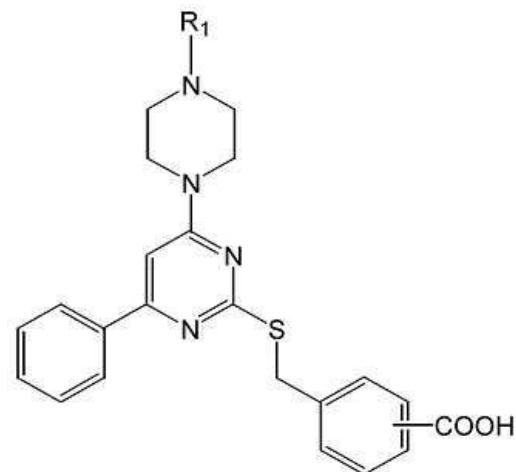
하기 화학식 1 또는 화학식 2의 구조를 갖는 벤조산계 화합물 및 화학식 3의 구조를 갖는 베타 알라닌계 화합물 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염 중 선택된 1종을 유효성분으로 함유하는 방사선 치료 보조용 약학 조성물:

<화학식 1>



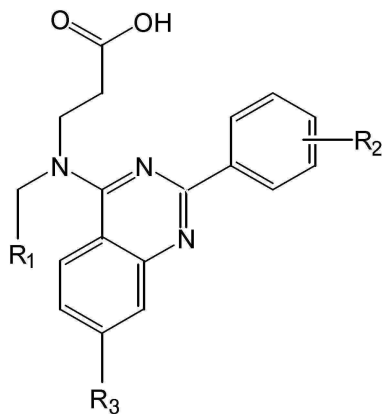
(상기 화학식 1에서, R₁은 수소원자, 메틸기 또는 에틸기이다.)

<화학식 2>



(상기 화학식 2에서 R₁은 벤질기, 메톡시페닐 또는 2-할로페닐기이다.)

<화학식 3>



(상기 화학식 3에서 R₁은 벤질기, 페닐기, 2-푸라닐기 또는 이소프로필기이고, R₂는 할로젠 원소이고, R₃는 수소 원자 또는 염소원자이다.)

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 (1) 4-[[4-[벤질(메틸)아미노-6-페닐-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 4-[[4-[benzyl(methyl)amino-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **D1**; Catalog No. CGX-01742830, (2) 3-[[4-[벤질(메틸)아미노-6-페닐-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 3-[[4-[benzyl(methyl)amino-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **J15**; Catalog No. CGX-01742851로부터 선택된 화합물임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

청구항 6에 있어서,

상기 화학식 II는 (1) 4-[[[4-[4-(2-플루오로페닐)-1-피페라지닐]-6-페닐-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 4-[[[4-[4-(2-fluorophenyl)-1-piperazinyl]-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **J7**; Catalog No. CGX-01742822, (2) 4-[[[4-[4-(페닐메틸)-1-피페라지닐]-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 4-[[[4-phenyl-6-[4-(phenylmethyl)-1-piperazinyl]-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **J8**; Catalog No. CGX-01742823, (3) 4-[[[4-[4-(메톡시페닐)-1-피페라지닐]-6-페닐-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 4-[[[4-(4-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **J11**; Catalog No. CGX-01742828, (4) 4-[[[4-[4-(2-클로로페닐)-1-피페라지닐]-6-페닐-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 4-[[[4-[4-(2-chlorophenyl)-1-piperazinyl]-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **J14**; Catalog No. CGX-01742838, 및 (5) 3-[[[4-[4-(페닐메틸)-1-피페라지닐]-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 3-[[[4-phenyl-6-[4-(phenylmethyl)-1-piperazinyl]-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **L25**; Catalog No. CGX-01742844로부터 선택된 화합물임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

청구항 6에 있어서,

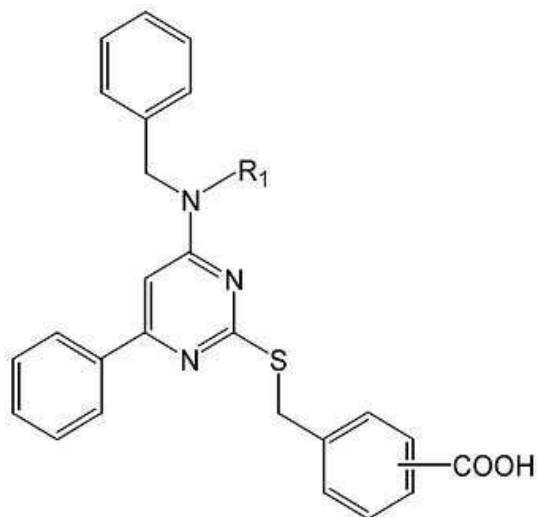
상기 화학식 III은 (1) N-[2-(3-(브로모페닐)-4-퀴아졸리닐)-N-(2-페닐에틸)]-베타 알라닌 {β-alanine, N-[2-(3-(bromophenyl)-4-quinazolinyl)-N-(2-phenylethyl)]-}; **E7**; Catalog No. CGX-01144778, (2) N-[2-(3-(브로모페닐)-4-퀴아졸리닐)-N-(2-푸라노메틸)]-베타 알라닌 {β-alanine, N-[2-(3-(bromophenyl)-4-quinazolinyl)-N-(2-furanylmethyl)]-}; **M22**; Catalog No. CGX-01144906, (3) N-[2-(3-(브로모페닐)-4-퀴아졸리닐)-N-(2-페닐

메틸)-베타 알라닌 { β -alanine, N-[2-(3-(bromophenyl)-4-quinazolinyl)-N-(2-phenylmethyl)-}; **M24**; Catalog No. CGX-01144714, 및 (4) N-[7-클로로-2-(4-(플루오로페닐)-4-퀴아졸리닐)-N-(2-메틸프로필)-베타 알라닌 { β -alanine, N-[7-chloro-2-(4-(fluorophenyl)-4-quinazolinyl)-N-(2-methylpropyl)-}; **M25**; Catalog No. CGX-01144599로부터 선택된 화합물임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

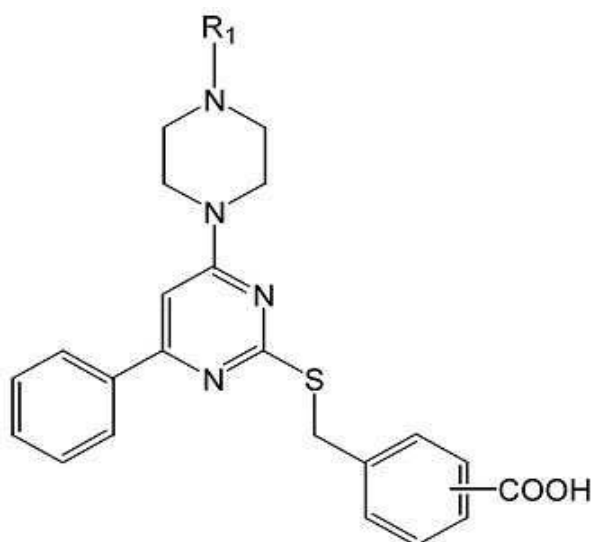
하기 화학식 1 또는 화학식 2의 구조를 갖는 벤조산계 화합물 및 화학식 3의 구조를 갖는 베타 알라닌계 화합물 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염 중 선택된 1종을 유효성분으로 함유하는 설피레독신 활성 저해제:

<화학식 1>



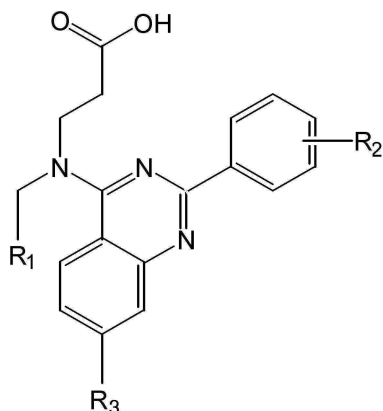
(상기 화학식 1에서, R₁은 수소원자, 메틸기 또는 에틸기이다.)

<화학식 2>



(상기 화학식 2에서 R₁은 벤질기, 메톡시페닐 또는 2-할로페닐기이다.)

<화학식 3>



(상기 화학식 3에서 R₁은 벤질기, 페닐기, 2-푸라닐기 또는 이소프로필기이고, R₂는 할로젠 원소이고, R₃는 수소 원자 또는 염소원자이다.)

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 설피레독신의 활성 저해제로서 사용되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 질환의 치료 또는 예방을 위한 약학조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

효과적인 암 치료를 위해서는 독성이 없고 암 세포에 특이적으로 작용하며 내성을 유발하지 않는 항암제의 개발이 매우 중요하다. 정상세포와 암세포간의 유전적인 차이를 이용하여 개발된 이매티닙(imatinib) (Gleevec®; Novartis)과 트라스투주맙(trastuzumab) (Herceptin®; Genentech/Roche)은 해로운 부작용이 거의 없고 탁월한 치료효과를 보인다(Druker, B. J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.* **355**: 2408, 2006; Comoglio, P. M. *et al.*, *Nature Rev. Drug Discov.* **7**: 504, 2008). 그러나 현재 유전자 표적(gene-targeting) 치료방법은 암세포의 유전체 불안정성과 항암제에 대한 내성획득 때문에 여전히 상당한 도전을 받고 있다(Couzin, J., *Science* **298**: 522, 2002; Frantz, S., *Nature* **437**: 942, 2005; Frantz, S., *Nature Rev. Drug Discov.* **5**: 91, 2006). 대부분의 암세포들은 증가된 호기성 대사와 산화적 스트레스(oxidative stress)를 보인다. 최근 연구들은 이러한 암세포의 특징이 암세포에 대한 선택성이 향상되고 내성유발이 적은 항암제 개발에 활용될 수 있음을 시사하고 있다.

[0003]

많은 종류의 암세포에서 활성산소가 증가되어 있다(Szatrowski, T. P. and Nathan, C. F., *Cancer Res.* **51**: 794, 1991; Kawanishi, S. *et al.*, *Biol. Chem.* **387**: 365, 2006). 암세포에서 증가된 활성산소는 암의 발생과 진행에 매우 중요한 역할을 한다(Behrend, L. *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.* **31**: 1441, 2003; Wu, W. S., *Cancer Metastasis Rev.* **25**: 695, 2006). 그러나 과량의 활성산소는 세포에 해로우므로 증가된 산화적 스트레스를 받고 있는 암세포는 외부물질에 의해 증가되는 활성산소에 의한 산화적 손상에 더 취약하다(Pelicano, H. *et al.*, *Drug Resist. Updat.* **7**: 97, 2004). 많은 연구결과들이 항암제 또는 방사선 조사시 활성산소(ROS, reactive oxygen species) 생성이 증가되며, 이로 인해 암세포 사멸이 유도됨을 보여주고 있다(Schumacker, P. T., *Cancer Cell* **10**: 175, 2006; Cabello, C.M. *et al.*, *Curr. Opin. Investig. Drugs* **8**: 1022, 2007).

[0004]

활성산소는 양날의 칼로 작용한다(Schumacker, P. T., *Cancer Cell* **10**: 175, 2006). 적당한 양의 활성산소는 세포의 증식과 생존을 촉진하지만 세포의 활성산소 제거능력을 초과하는 과량의 활성산소는 세포사멸을 초래한다. 생리적인 조건에서 정상세포는 활성산소의 생성과 제거능력이 균형을 이루어 세포 내 활성산소를 낮은 수준으로 유지하고 있다. 정상세포는 외부 산화적 스트레스에 대하여 활성산소 제거능력(antioxidant capacity)을 증가시킴으로써 활성산소의 양을 세포사멸이 유도되지 않는 수준으로 유지한다. 암세포에서는 비정상적으로 증가된 대사와 암유발 신호전달에 의해 활성산소의 생성이 증가되어 있고, 이에 대한 산화환원 적응반응(redox adaptation response)으로 활성산소 제거능력도 증가되어 있다. 즉 암세포는 활성산소의 양을 세포사멸이 유도되지 않는 수준으로 유지하기 위하여 정상세포보다 훨씬 더 높은 수준으로 활성산소를 생성하고 제거하고 있는

므로 외부 산화적 스트레스에 대하여 더 취약하고 항산화시스템(antioxidant system)에 더 의존적이다. 외부 산화적 스트레스에 대하여 정상세포는 항산화 시스템을 증가시켜 방어 작용을 할 수 있으나, 암세포는 증가된 활성산소에 의한 산화환원 적응반응으로 이미 항산화 시스템이 상당히 높은 수준으로 유지되고 있어 더 이상의 증가가 원활히 이루어지지 않아 정상세포에 비해 훨씬 더 많은 산화적 손상(oxidative damage)을 받아 세포사멸이 유발된다(Pelicano, H. *et al.*, *Drug Resist. Updat.* **7**: 97, 2004; Cabello, C.M. *et al.*, *Curr. Opin. Investig. Drugs* **8**: 1022, 2007). 이것이 활성산소를 매개로 하여 암세포를 선택적으로 죽일 수 있는 치료 방법의 근간이다. 이런 점을 기초로 하여 활성산소의 생성을 유도하거나 항산화 시스템을 저해하는 물질들을 암세포를 선택적으로 죽일 수 있는 항암제로 개발하기 위한 다양한 연구가 수행되고 있다(Wu, X. J. and Hua, X., *Cancer Biol. Ther.* **6**: 646, 2007; Fotsis, T. *et al.*, *Nature* **368**: 237, 1994). 예를 들어, 미토콘드리아 호흡 체인(respiratory chain)의 기능을 손상시켜 슈퍼옥사이드(superoxide) 생성을 증가시키는 알세닉 트리옥사이드(arsenic trioxide, As₂O₃)는 미국 FDA 승인을 받아 세파론사(Cephalon)가 트리세녹스(Trisenox)라는 상품명으로 생산하여 백혈병 환자에 처방되고 있다(Pelicano, H. *et al.* *J. Biol. Chem.* **278**: 37832, 2003). 글루타치온 합성의 속도결정단계를 촉매하는 효소 글루타밀시스테인 합성효소(glutamylcysteine synthetase)를 억제하는 부티오닌 설폭시민(buthionine sulfoximine; BSO), 글루타치온(GSH)과 결합하는 페닐에틸 이소티오시아네이트(β -phenylethyl isothiocyanate)와 아지리딘(aziridine) 유도체(imexon)는 세포내 주요한 항산화 시스템인 글루타치온을 고갈시키는 물질들로 단독 혹은 다른 항암제와 조합으로 임상시험을 진행 중이다(Maeda, H. *et al.* *Cell Death Differ.* **11**: 737, 2004; Trachootham, D. *et al.* *Cancer Cell* **10**: 241, 2006; Dragovich, T. *et al.* *J. Clin. Oncol.* **25**: 1779, 2007). 또 다른 주요한 항산화 시스템인 티오레독신(thioredoxin)을 억제하는 PX-12(1-methylpropyl 2-imidazolyl disulfide)도 강력한 종양억제 활성을 보인다(Welsh, S. J. *et al.* *Mol. Cancer Ther.* **2**: 235, 2003). 슈퍼옥사이드 디스무테아제(superoxide dismutase)를 억제하는 2-메톡시에스트라디올(2-methoxyestradiol, 2-ME)은 전립선, 난소, 뇌, 신장암 등에 대하여 임상 2상 연구 진행 중이다(Huang, P. *et al.* *Nature* **407**: 390, 2000).

[0005]

비록 많은 경우 활성산소를 생성하는 물질이 효과를 보이지만, 낮은 임상적용과 내성이 보고되고 있다(Niu, C. *et al.*, *Blood* **94**: 3315, 1999; Ramanathan, B. *et al.*, *Cancer Res.* **65**: 8455, 2005; Attia, S. *et al.*, *Invest. New Drugs* **26**: 369, 2008). 산화환원 적응반응에 의한 항산화 시스템의 증가가 암세포가 항암제에 대한 내성을 갖게 되는 주요 원인중의 하나로 인식되고 있다(Ramanathan, B. *et al.*, *Cancer Res.* **65**: 8455, 2005; Hour, T. C. *et al.*, *Anticancer Drugs* **15**: 779, 2004). 일례로 알세닉 트리옥사이드에 대한 내성은 슈퍼옥사이드 디스무테아제나 글루타치온의 증가와 연관되어 있다(Hour, T. C. *et al.*, *Anticancer Drugs* **15**: 779, 2004; Zhou, P. *et al.*, *Br. J. Haematol.* **128**: 636, 2005). 그러므로 산화환원 적응기전을 무력화시킬 수 있는 항산화 시스템의 저해제가 좀더 효과적인 항암제로 개발될 가능성이 높다.

[0006]

항산화 효소들 중에서 퍼옥시레독신(peroxiredoxin, Prx)은 활성산소의 일종인 H₂O₂를 제거하는 퍼옥시테이즈(peroxidase)로서, 포유류에서 6종류의 퍼옥시레독신 아이소폼(Prx I-VI)이 발견되었고, 세포내 거의 모든 부분{세포질, 미토콘드리아, 핵, 퍼옥시좀(peroxisome), 소포체(endoplasmic reticulum)}에 존재한다(Rhee, S. G. *et al.*, *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**: 183, 2005). 퍼옥시레독신은 다양한 종류의 암 조직이나 세포에서 발현이 증가되어 있고(Noh, D. Y. *et al.*, *Anticancer Res.* **21**: 2085, 2001; Yanagawa, T. *et al.*, *Cancer Lett.* **145**: 127, 1999; Park, S. Y. *et al.*, *Cancer Res.* **67**: 9294, 2007; Chang, J. W. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **289**: 507, 2001), 항암제 개발을 위한 신규 표적으로 제시되고 있다(Neumann, C. A. *et al.*, *Nature* **424**: 561, 2003; Neumann, C. A. and Fang, Q., *Current Opinion in Pharmacology* **7**: 375, 2007). 실제로 암세포에서 Prx I의 발현을 억제시키면 결장암과 폐암에서 세포의 증식속도가 느려지고 방사선에 대한 민감도가 증가된다(Zhang, B. *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* **75**: 660, 2008; Chen, M. F. *et al.*, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **64**: 581, 2006). 또한 Prx II의 발현이 증가되면 방사선 자극에 대한 세포사멸이 억제된다(Wang, T. *et al.*, *Cancer Res.* **65**: 10338, 2005).

[0007]

퍼옥시레독신은 H₂O₂를 제거하는 촉매과정 중 일정 비율로 과산화되어 활성이 상실되고, 설피레독신(sulfiredoxin, Srx)에 의해 환원되어 활성이 다시 회복된다(Yang, K. S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **277**: 38029, 2002; Woo, H. A. *et al.*, *Science* **300**: 653, 2003; Biteau, B. *et al.*, *Nature* **425**: 980, 2003; Chang, T. S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **279**: 50994, 2004). 설피레독신은 6종류의 퍼옥시레독신 아이소폼 중 4종류의 퍼옥시레독신(Prx I-IV)의 활성을 조절 할 수 있다(Woo, H. A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2005, **280**: 3152). 또한 여러 암 조직에서 발현이 증가되어 있음을 볼 때 설피레독신이 항암제 개발의 신규표적이 될 가능성을 시사하고

있다(Wei, Q. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 19738, 2008).

발명의 내용

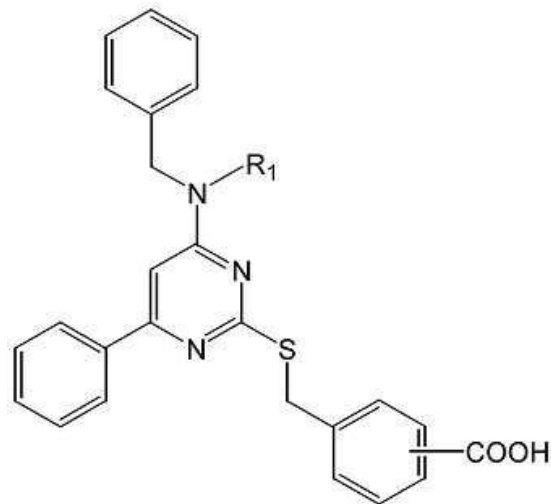
해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 활성산소를 제거하는 퍼옥시레독신의 활성을 유지시키는 설피레독신의 활성 저해제를 발굴하고, 이를 항암제 또는 방사선 요법시 보조제로 개발하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 설피레독신 활성에 대한 강력한 억제 활성을 나타내는, 하기 화학식 1 또는 2의 구조를 갖는 벤조산계 화합물 및 화학식 3의 구조를 갖는 베타 알라닌계 화합물 및 이의 약리학적으로 허용 가능한 염 중 선택된 1종을 유효성분으로 함유하는 암 질환 치료 및 예방을 위한 약학 조성물 또는 방사선 치료 보조용 조성물을 제공한다.

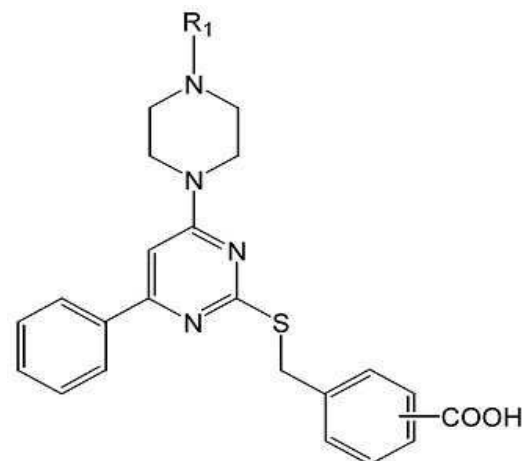
화학식 1



[0010]

[0011] (상기 화학식 1에서, R₁은 수소원자, 메틸기 또는 에틸기이다.)

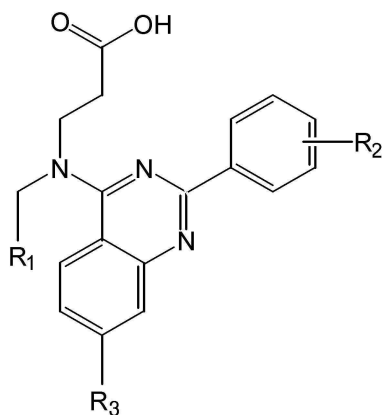
화학식 2



[0012]

[0013] (상기 화학식 2에서 R₁은 벤질기, 메톡시페닐기 또는 2-할로페닐기이다.)

화학식 3



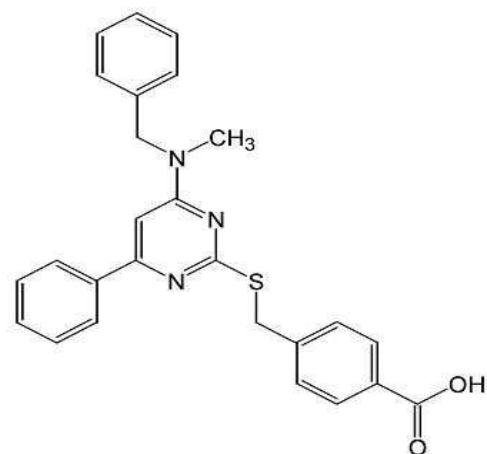
[0014]

[0015] (상기 화학식 3에서 R₁은 벤질기, 페닐기, 2-푸라닐기 또는 이소프로필기이고, R₂는 할로겐 원소이고, R₃는 수소 원자 또는 염소원자이다.)

[0016] 상기 화학식 1에 속하는 화합물군 중에 가장 바람직한 화합물로는 하기와 같은 화합물들이 있다.

[0017] (1) 4-[[4-[벤질(메틸)아미노-6-페닐-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 4-[[4-[benzyl(methyl)amino-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **D1**; Catalog No. CGX-01742830(하기 화학식 4 참조),

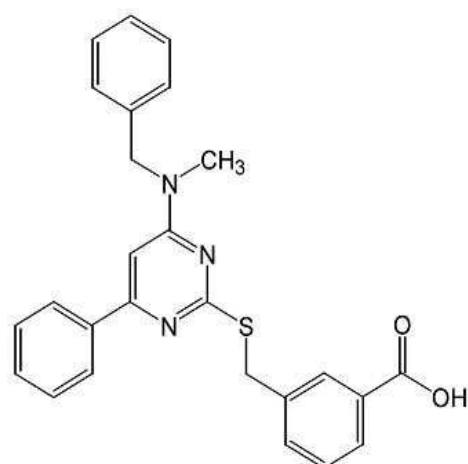
화학식 4



[0018]

[0019] (2) 3-[[4-[벤질(메틸)아미노-6-페닐-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 3-[[4-[benzyl(methyl)amino-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **J15**; Catalog No. CGX-01742851(하기 화학식 5 참조).

화학식 5



[0020]

[0021] 상기 화학식 2에 속하는 화합물군 중에 가장 바람직한 화합물로는 하기와 같은 화합물들이 있다.

[0022] (1) 4-[[[4-(2-플루오로페닐)-1-피페라지닐]-6-페닐-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 4-[[[4-(2-fluorophenyl)-1-piperazinyl]-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **J7**; Catalog No. CGX-01742822,

[0023] (2) 4-[[[4-페닐-6-[4-(페닐메틸)-1-피페라지닐]-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 4-[[[4-phenyl-6-[4-(phenylmethyl)-1-piperazinyl]-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **J8**; Catalog No. CGX-01742823,

[0024] (3) 4-[[[4-(4-메톡시페닐)-1-피페라지닐]-6-페닐-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 4-[[[4-(4-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **J11**; Catalog No. CGX-01742828,

[0025] (4) 4-[[[4-(4-(2-클로로페닐)-1-피페라지닐)-6-페닐-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 4-[[[4-(4-(2-chlorophenyl)-1-piperazinyl)-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **J14**; Catalog No. CGX-01742838,

[0026] (5) 3-[[[4-페닐-6-[4-(페닐메틸)-1-피페라지닐]-2-피리미디닐]티오]메틸]-벤조산 {benzoic acid, 3-[[[4-phenyl-6-[4-(phenylmethyl)-1-piperazinyl]-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-}; **L25**; Catalog No. CGX-01742844.

[0027] 상기 화학식 3에 속하는 화합물군 중에 가장 바람직한 화합물로는 하기와 같은 화합물들이 있다.

[0028] (1) N-[2-(3-(브로모페닐)-4-퀴아졸리닐)-N-(2-페닐에틸)- 베타 알라닌 {β-alanine, N-[2-(3-(bromophenyl)-4-quinazolinyl)-N-(2-phenylethyl)-}; **E7**; Catalog No. CGX-01144778,

[0029] (2) N-[2-(3-(브로모페닐)-4-퀴아졸리닐)-N-(2-퓨라노메틸)-베타 알라닌 {β-alanine, N-[2-(3-(bromophenyl)-4-quinazolinyl)-N-(2-furanylmethyl)-}; **M22**; Catalog No. CGX-01144906,

[0030] (3) N-[2-(3-(브로모페닐)-4-퀴아졸리닐)-N-(2-페닐메틸)-베타 알라닌 {β-alanine, N-[2-(3-(bromophenyl)-4-quinazolinyl)-N-(2-phenylmethyl)-}; **M24**; Catalog No. CGX-01144714, 및

[0031] (4) N-[7-클로로-2-(4-(플루오로페닐)-4-퀴아졸리닐)-N-(2-메틸프로필)-베타 알라닌 {β-alanine, N-[7-chloro-2-(4-(fluorophenyl)-4-quinazolinyl)-N-(2-methylpropyl)-}; **M25**; Catalog No. CGX-01144599.

[0032] 상기 화학식 1, 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 본 발명의 화합물들은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용가능한 염 및 용매화물로 제조될 수 있다.

[0033] 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조한다. 동 몰량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코

을(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.

[0034] 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, *p*-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로 아이오딕산(hydro iodic acid) 등을 사용할 수 있다.

[0035] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로서는 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0036] 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 구조를 갖는 벤조산계 화합물 또는 화학식 3의 구조를 갖는 베타 알라닌계 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 화학식 1 또는 화학식 2의 구조를 갖는 벤조산계 화합물 또는 화학식 3의 구조를 갖는 베타 알라닌계 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용 가능한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이 수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설폰레이트(메실레이트) 및 *p*-톨루엔설폰레이트(토실레이트) 염이 있으며, 당업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.

[0037] 따라서, 본 발명은 화학식 1 또는 화학식 2의 구조를 갖는 벤조산계 화합물 또는 화학식 3의 구조를 갖는 베타 알라닌계 화합물을 유효성분으로 포함하는 설피레독신 활성화에 대한 저해제를 제공한다.

[0038] 본 발명은 설피레독신 활성화에 대한 강력한 억제 활성을 나타내는, 화학식 1 또는 화학식 2의 구조를 갖는 벤조산계 화합물 및 화학식 3의 구조를 갖는 베타 알라닌계 화합물 중 선택된 1종 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 질환 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0039] 본 발명은 설피레독신 활성화에 대한 강력한 억제 활성을 나타내는, 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 구조를 갖는 벤조산계 화합물 및 화학식 3의 구조를 갖는 베타 알라닌계 화합물 중 선택된 1종 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 방사선 치료 보조제 조성물을 제공한다.

[0040] 본 발명자는 상기 화합물들이 설피레독신(sulfiredoxin, Srx) 활성을 강력하게 억제함을 말라카이트 그린을 이용하여 설피레독신의 활성 측정하는 HTS 시험법, 과산화된 퍼옥시레독신에 특이적인 항체를 이용한 설피레독신 활성 측정법, 세포의 생존 능력(cell viability) 측정시험법, 세포내 활성산소 측정시험법, 세포사멸(Cell apoptosis) 측정법 등을 통하여 본 발명의 벤조산계 화합물 또는 베타 알라닌계 화합물이 상기 설피레독신 활성을 억제할 뿐만 아니라 암세포의 증식도 강력하게 억제함을 확인하였다.

[0041] 또 다른 양태로서, 본 발명은 벤조산계 화합물 또는 베타 알라닌계 화합물을 포함하는, 퍼옥시레독신 및 설피레독신 활성 증가로 기인한 암질환을 치료하기 위한 약제학적 조성물과 벤조산계 화합물 및 베타 알라닌계 화합물을 사용하여 상기 질병을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0042] 본 발명에서 용어 "예방"이란 벤조산계 화합물 또는 베타 알라닌계 화합물을 포함하는 조성물의 투여로 퍼옥시레독신 또는 설피레독신 활성 증가로 기인한 암질환을 억제시키거나 발병을 지연하는 모든 행위를 말하며, "치료"란 상기 약제학적 조성물의 투여로 퍼옥시레독신 또는 설피레독신 활성 증가로 기인한 암질환을 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0043] 본 발명에서 퍼옥시레독신 활성 증가와 관련된 암질환의 예로는, 유방암, 구강/갑상선암(oral/thyroid cancer), 전립선암, 결장암, 폐암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문암, 식도암, 췌장암, 위암, 신장암, 자궁암, 유방암, 폐암, 임파선암, 갑상선암, 전립선암, 백혈병, 피부암, 결장암, 뇌종양, 방광암, 난소암, 담낭암 등을 포함하고,

바람직하게는, 유방암, 구강/갑상선암(oral/thyroid cancer), 전립선암, 결장암, 폐암, 좀더 바람직하게는, 전립선암, 결장암 또는 폐암을 들 수 있고, 설피레독신 활성 증가와 관련된 암질환의 예로는 피부암, 직장암, 폐암 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0044] 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은 통상의 약제학적 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0046] 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0047] 상제하게는, 본 발명의 화합물을 포함하는 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0048] 본 발명 화합물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 화합물은 0.0001~100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001~100mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 조성물에서 본 발명의 화합물은 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.0001~10중량%, 바람직하게는 0.001~1중량%의 양으로 존재한다.
- [0049] 또한, 본 발명 화합물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

- [0051] 상기 언급한 바와 같이, 본 발명은 설피레독신(sulfiredoxin, Srx) 활성을 억제하는 벤조산계 화합물 또는 베타 알라닌계 화합물을 제공하고자 하는 것으로 본 발명의 벤조산계 화합물 또는 베타 알라닌계 화합물을 유효성분으로 하는 약학 조성물은 퍼옥시레독신 및 설피레독신 활성 증가로 기인한 암질환의 치료 및 예방을 위한 약제로 이용가능하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 이하, 본 발명의 구성을 아래 실시예, 참고예 및 실험예에 의거하여 좀 더 자세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0053] <시약 및 기기>

[0054] 환원된 글루타치온(GSH), 다이티오프레이트(dithiothreitol; DTT), $MgCl_2$, 암모늄 폴리브레이트 테트라하이드레이트, 폴리비닐알콜 및 말라카이트 그린 카비놀 하이드로클로라이드, 디메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)는 시그마사에서 구입하였다. ATP는 칼바이오켄(Calbiochem)사, Ni-킬레이팅 세포파조 수지는 아머삼(Amersham Biosciences)사에서 각각 구입하였다. 사람의 폐암상피세포인 A549 세포는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)으로부터 구입하였다. 5-(및 6-)크로로메틸-2,7-디클로디하이드로플루레신 디아세테이트(5-(and 6-)chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, CM-H₂DCFDA), 프로피디움아이오다이드(propidiumiodide, PI), 트립신/EDTA(trypsin/EDTA) 혼합용액 등은 인비트로젠사(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로부터 구입하였다. 아넥신-V-플루오스 염색키트(Annexin-V-Fluos staining kit, Cat. No. 11-988-549-001)는 로쉬 어플라이드 사이언스사(Roche Applied Science, Penzberg, Germany)로부터 구입하였다. 과산화된 설피닉 퍼옥시레독신 I(sulfinic PrxI)과 이에 특이적인 항체는 이전에 보고한 방법으로 제조하였다(Chang, T. S. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **279**: 50994, 2004; Woo, H. A. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **278**: 47361, 2003).

[0055] <실시에 1. 시료화합물>

[0056] 본 실험에 사용한 화합물들 즉, (1) ; **D1**; Catalog No. CGX-01742830, (2) β -alanine, N-[2-(3-(bromophenyl)-4-quinazolinyl)]-N-(2-phenylethyl)-; **E7**; Catalog No. CGX-01144778, (3) benzoic acid, 4-[[[4-[4-(2-fluorophenyl)-1-piperazinyl]-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-; **J7**; Catalog No. CGX-01742822, (4) ; **J8**; Catalog No. CGX-01742823, (5) benzoic acid, 4-[[[4-(4-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio] methyl]-; **J11**; Catalog No. CGX-01742828, (6) benzoic acid, 4-[[[4-[4-(2-chlorophenyl)-1-piperazinyl]-6-phenyl-2-pyrimidinyl]thio]methyl]-; **J14**; Catalog No. CGX-01742838, (7) **J15**; Catalog No. CGX-01742851, (8) ; **L25**; Catalog No. CGX-01742844, (9) ; **M22**; Catalog No. CGX-01144906, (10) β -alanine, N-[2-(3-(bromophenyl)-4-quinazolinyl)]-N-(2-phenylmethyl)-; **M24**; Catalog No. CGX-01144714, 및 (11) ; **M25**; Catalog No. CGX-01144599은 AMRI Direct 사 (Albany, NY, USA)로부터 구입하였고, 1 mg/ml 또는 10mM 농도로 각각 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide; DMSO)에 녹인 스톡(stock) 용액으로 96-웰 플레이트에 -80℃의 온도를 유지하며 보관하였다.

[0057] <실험에 1: 설피레독신 활성저해제의 대량탐색(High through-put screening, HTS)>

[0058] 액체 핸들링 워크스테이션(Liquid handling workstation, Beckmann Coulter Co.)을 이용하여 AMRI 다이렉스사로부터 구입한 25,000개의 화합물로 이루어진 라이브러리에 대하여 시험관 내 실험(in vitro)에서 설피레독신 활성을 직접 억제하는 물질을 발굴하기 위한 설피레독신 활성 측정법을 수행하는 HTS를 실시하였다.

[0059] 설피레독신(Srx)에 의한 과산화된 퍼옥시레독신(Prx)의 환원반응 동안 ATP 가수분해가 일어나고, 반응에 넣어준 과산화된 Prx의 양만큼 Pi(inorganic phosphate)가 유리된다. 따라서 유리되는 Pi의 양을 측정하여 설피레독신(Srx)의 활성을 측정할 수 있다(Jeong, W. *et al.*, *J. Biol. Chem.* **281**: 14400, 2006). 이러한 원리를 이용하여 Srx 반응에서 유리되는 무기인산을 말라카이트 그린을 이용하여 측정하는, Srx 활성저해제의 대량탐색(high-throughput screening)이 가능한 설피레독신 발색 어세이(colorimetric Srx assay) 방법을 확립하였다(Kim, H. J. *et al.*, *Anal. Biochem.* **393**: 36, 2009).

[0060] 50 μ l 설피레독신 반응액(50mM Tris-HCl, pH 7.5, 1mM $MgCl_2$, 200 μ M ATP, 10mM GSH, 20 μ M 설피레독신, 1 μ M 설피레독신, 50 μ g/ml chemical)을 상온에서 2시간 반응시키고 증류수 50 μ l를 가하여 100 μ l 시료를 만든 후, 96-웰 마이크로플레이트에서 말라카이트 그린 측정법을 이용하여 설피레독신 활성을 측정하였다. 말라카이트 그린 활성측정법에 필요한 시약 A에는 14.2mM 암모늄 폴리브레이트 테트라하이드레이트와 3.1M H₂SO₄가 들어 있고, 시약 B는 증류수에 폴리비닐알콜(polyvinyl alcohol, MW 30,000 ~ 70,000)을 3.5g/l 농도로 80℃에서 녹이고 상온으로 식힌 후, 말라카이트 그린 카비놀 하이드로클로라이드(malachite green carbinol hydrochloride)를 0.35g/l 농도가 되도록 가하여 만들었다. 상온에서 시료(100 μ l)를 96-웰 마이크로플레이트에

서 시약 A(20 μ l)와 10분 동안 셰이커(orbital titer plate shaker)를 이용하여 혼합하고, 시약 B(20 μ l)를 가하고 20분 동안 좀더 빠르게 섞어준 후, 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 630nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 이 방법을 이용하여 25,000개 화합물로부터 설피레독신 활성을 80% 이상 억제하는 48종의 물질을 선별하였다. 이 중 2종의 물질 (D1 & E7)이 과산화된 퍼옥시레독신(Prx)에 특이적인 항체(a-Prx-SO₂)를 이용한 면역 블랏(immunoblot) 분석에서 설피레독신 활성을 강하게 억제하였다(데이터 기재하지 않음).

[0061] 탐색된 25,000종 화합물 중에서 D1 구조 유사체(L 그룹) 25종과 E7 구조 유사체(M 그룹) 27종, 그리고 대량탐색에서 제외되었던 AMRI사 화합물 중에서 D1 구조 유사체(J 그룹) 16종을 AMRI사의 웹사이트(<http://www.amridirect.com>)에서 검색, 입수하여, 과산화된 퍼옥시레독신에 특이적인 항체(a-Prx-SO₂)를 이용한 면역 블랏 분석방법을 통해 설피레독신 활성억제효과를 조사하였다. 100uM 농도에서 9종 (J7, J8, J11, J14, J15, L25, M22, M24, M25)의 물질이 60% 이상 설피레독신 활성억제효과를 보였고, 이중 J 그룹의 물질 4종은 50uM 농도에서도 D1, E7과 함께 80% 이상 설피레독신 활성을 억제하였다 (표 1). 이들 화합물들의 구조를 분석한 결과, 2종류의 공통적인 화학구조를 지니고 있음을 확인할 수 있었다.

[0062] 50uM 농도에서 80% 이상 설피레독신 활성을 억제한 화합물 6종의 설피레독신 활성에 대한 IC₅₀(half-inhibitory concentration) 값을 구하기 위하여 다양한 농도의 물질 존재 하에서 말라카이트 그린 어세이와 면역 블랏 분석을 이용하여 설피레독신 활성을 측정하고, 시그마플롯 소프트웨어(SigmaPlot software)를 이용하여 얻은 물질의 로그(log) 스케일 농도에 대한 설피레독신 활성억제 곡선으로부터 설피레독신 활성을 50% 억제하는 농도(IC₅₀)를 구하였다. 표 2에 나타난 바와 같이, 2가지 설피레독신 활성측정방법 모두에서 물질 J14가 가장 낮은 IC₅₀ 값을 보였다.

표 1

[0063]

화합물	설피레독신 활성억제(%)	
	50uM	100uM
D1	98.6 $\pm$ 2.4	99.8
E7	98.1 $\pm$ 2.4	92.8
J7	81.6 $\pm$ 13.5	88.6
J8	69.4 $\pm$ 8.8	88.5
J11	93.5 $\pm$ 1.7	98.1
J14	103.5 $\pm$ 7.0	99.7
J15	97.5 $\pm$ 0.6	95.5
L25	47.3 $\pm$ 15.8	84.5
M22	46.6 $\pm$ 15.7	89.9
M24	49.0 $\pm$ 6.3	75.1
M25	33.6 $\pm$ 13.5	61.1

표 2

[0064]

화합물	IC ₅₀ (uM)	
	말라카이트 그린 어세이	면역 블랏 어세이
D1	16.6 $\pm$ 3.7	38.2 $\pm$ 6.6
E7	23.6 $\pm$ 5.9	44.2 $\pm$ 16.6
J7	24.5 $\pm$ 4.4	18.4 $\pm$ 2.3
J11	29.0 $\pm$ 4.9	22.6 $\pm$ 7.5
J14	15.2 $\pm$ 1.6	8.1 $\pm$ 1.6
J15	24.8 $\pm$ 4.1	22.9 $\pm$ 9.3

[0065] <실험예 2: 설피레독신 활성억제 후보물질의 세포성장 억제효과>

[0066] 96-웰 플레이트의 10% 우태혈청(fetal bovine serum; HyClone, Catalog No. SH30397.03)과 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin; Hyclone, Catalog No. SV30010)을 포함한 F-12 영양물질 혼합 HAM(Nutrient Mixture Ham) 액상배지(JBI, Catalog No. LM010-03)에서 자란 A549 세포에 설피레독신 활성억제

후보물질을 각각 10, 20, 40uM 농도로 처리하고 48시간 동안 배양한 후, 생존세포의 양을 WST-1 세포 증식 어레이(cell proliferation assay)를 통해 분석하였다. 각 웰의 100 μ l 세포배양액에 10 μ l의 WST-1 (Roche Co., Catalog No. 11-644-807-001) 용액을 처리하고 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 3시간 동안 반응시켰다. 세포가 없는 배지 100 μ l에 10 μ l의 WST-1를 가한 것을 음성대조군(blank)으로 사용하였다. 450nm와 690nm에서 흡광도(A₄₅₀과 A₆₉₀)를 측정하고 A₄₅₀ 값에서 reference 값인 A₆₉₀을 뺀 A₄₅₀-A₆₉₀ 값을 구하였다. DMSO만을 처리한 대조군에 대한 설피레독신 활성억제 후보물질을 처리한 시료의 상대적인 A₄₅₀-A₆₉₀ 값으로부터 생존세포의 백분율을 계산하여 각 화합물의 세포성장 억제정도를 비교하였다. 데이터는 3개의 실험치를 평균 $\pm$ 평균의 표준오차 값으로 표시하였다.

표 3

[0067]

물질	농도	생존 세포 (대조군에 대한 %)		
		10uM	20uM	40uM
D1		77.8 $\pm$ 1.9 ^a	36.4 $\pm$ 0.6 ^a	3.3 $\pm$ 4.0 ^a
E7		75.2 $\pm$ 0.4 ^a	43.1 $\pm$ 0.3 ^a	1.2 $\pm$ 4.0 ^a
J7		72.9 $\pm$ 3.7 ^a	37.7 $\pm$ 4.2 ^a	5.6 $\pm$ 2.1 ^a
J11		72.6 $\pm$ 3.2 ^a	42.0 $\pm$ 1.7 ^a	4.0 $\pm$ 2.2 ^a
J14		74.7 $\pm$ 3.4 ^a	31.8 $\pm$ 4.2 ^a	2.1 $\pm$ 1.5 ^a
J15		79.5 $\pm$ 4.2 ^a	27.7 $\pm$ 4.1 ^a	11.2 $\pm$ 2.2 ^a
^a p<0.05로 대조군에 비하여 통계적으로 유의적인 차이가 있음을 표시함 (통계처리는 student t-test를 적용하였음)				

[0068]

실험 결과, 표 3에 나타난 바와 같이 6종의 설피레독신 활성억제 후보물질들은 설피레독신 발현이 비교적 높은 인간 폐의 선암 (human lung adenocarcinoma)인 A549 세포의 증식억제 효과가 있었다. 또한 10uM 농도에서도 유의적으로 세포증식을 억제하였고, 20uM 농도에서 50% 이상 세포증식을 억제하였다. 세포성장 억제와 설피레독신 활성억제 효과를 종합하여 볼 때, 6종의 물질 중 J14가 설피레독신 활성억제제로 가장 좋은 물질로 판단되었다.

[0069]

<실험예 3: 설피레독신 활성억제 물질 J14에 의한 세포증식 억제>

[0070]

설피레독신 활성억제 효과가 가장 탁월한 물질 J14에 대하여 농도별, 시간별로 세포증식 억제 효과를 세포 증식 어레이(cell proliferation assay)를 통해 분석하였다(표 4 및 표 5). 다양한 농도의 J14 존재 하에서 A549 세포를 96시간 동안 배양한 후 세포증식을 분석한 결과, 표 4와 같이 J14의 농도가 증가할수록 세포증식 억제 효과가 증가되었고, J14의 로그(log) 스케일 농도에 대한 세포성장 억제 곡선으로부터 세포증식을 50% 억제하는 J14의 농도 (IC₅₀)는 15.8 $\pm$ 0.39uM(평균 $\pm$ 평균의 표준오차)로 계산되었다.

[0071]

또한, 표 5에 나타난 바와 같이 J14는 10uM 농도에서 72시간 이후부터 유의적으로 세포성장 억제효과를 보였고, 20uM 농도에서는 24시간 이후부터 시작된 세포성장 억제효과가 시간이 증가함에 따라 유의적으로 증대되었다.

[0072]

이러한 결과는 J14가 설피레독신 활성을 억제시킴으로써 암세포 내에서 생성되는 H₂O₂를 제거하는 과정에서 생성되는 과산화된 퍼옥시레독신이 환원되지 못하여 세포내 H₂O₂ 축적량이 점점 증가되기 때문에 세포의 생존 능력이 저하되었다고 사료된다.

표 4

[0073]

J14 농도 (uM)	생존세포(대조군에 대한 %)
0	100.00
5	98.44 $\pm$ 0.73
10	81.47 $\pm$ 2.26

15	54.88±2.04
20	24.98±1.18
50	1.84±0.12

표 5

[0074]

경과시간 (시간)	생존세포(대조군에 대한 %)	
	J14(10uM)	J14(20uM)
0	100.00	100.00
24	91.90±1.09	74.38±2.29 ^a
48	99.20±1.98	62.41±1.54 ^a
72	85.95±2.03 ^a	39.64±2.72 ^a
96	81.47±2.26 ^a	30.38±3.01 ^a
^a p<0.05로 대조군에 비하여 통계적으로 유의적인 차이가 있음을 표시함 (통계치리는 student t-test를 적용하였음)		

[0075]

<실험예 4: J14에 의한 세포내 활성산소의 측정>

[0076]

J14에 의한 세포의 생존능력 저하가 설피레독신 활성억제에 따른 세포내 활성산소의 증가에 기인하는 것인지 알아보기 위하여 10uM과 20uM 농도의 J14를 시간별로 처리한 A549 세포의 활성산소 양을 CM-H₂DCFDA 염료와 유세포분류기(flow cytometry)를 이용한 방법으로 측정하였다. 세포를 트립신/EDTA(trypsin 0.25%/EDTA 1 mM)를 사용해 배양접시에서 떼어낸 뒤 인산완충용액(phosphate buffered saline, PBS)로 현탁시킨 후 270xg에서 3분 동안 원심분리 하였다. 세포를 다시 1% FBS 포함하나, 페놀레드는 포함하지 않는 DMEM 배양배지(JBI)에 현탁시킨 후, 270xg으로 3분 동안 원심분리 했다가 현탁과정을 반복했다. 세포 현탁액에 5uM의 CM-H₂DCFDA 염료(Invitrogen, Catalog No.C6827)를 가하고 차광하여, 37℃, 5% CO₂조건의 배양기에서 30분 동안 반응시켰다. 염색반응을 정지하기 위하여 30분 이후로는 4℃에 보관하였다. 활성산소에 의해 산화된 DCF-DA가 나타내는 형광을 유세포 분석기(Becton Dickinson)의 FL-1 채널을 통해 측정하고 형광도의 평균값(MFI, mean fluorescence intensity)을 WinMDI 소프트웨어를 이용하여 계산하였다. 데이터는 3개의 실험치를 평균±표준오차 값으로 표시하였다. 표 6에 나타난 바와 같이 J14 처리에 의해 세포내 활성산소량이 48시간 이후부터 유의적으로 증가하였고, 특히 20uM 농도에서 현저히 증가되었다.

표 6

[0077]

처리시간 (시간)	세포 내 활성산소 수준 (DCF-DA의 평균 형광도)		
	대조군	J14(10uM)	J14(20uM)
0	27.36±4.50	25.02±3.78	25.45±2.14
24	29.41±4.67	38.77±1.57	51.78±2.09
48	21.29±1.30	39.37±1.86 ^a	61.56±1.85 ^a
72	18.30±0.77	45.64±0.13 ^a	85.43±5.68 ^a
96	18.09±0.80	43.38±2.23 ^a	120.46±0.85 ^a
^a p<0.05로 대조군에 비하여 통계적으로 유의적인 차이가 있음을 표시함 (통계치리는 student t-test를 적용하였음)			

[0078]

<실험예 5: J14에 의한 세포사멸>

[0079]

화합물 J14에 의한 세포의 생존능력 저하가 세포사멸에 의한 결과인지를 확인하기 위하여 J14를 처리한 A549 세포를 아넥신 V-FITC 세포사멸 측정 키트(Annexin V-FITC Apoptosis detection kit; BD Co., 556547) 내에 있는 방법에 준하여 PI 염료와 동시에 염색하여 유세포 분석기를 이용하여 세포사멸을 분석하였다.

[0080] 트립신/EDTA(trypsin 0.25%/EDTA 1mM)를 사용하여 세포를 배양접시에서 떼어내어 PBS에 현탁시키고, 270xg에서 3분 동안 원심분리하고, 10⁶ 개의 세포를 1×결합 완충액(binding buffer)에 현탁시켰다. 현탁시킨 용액 100 μ l를 5ml 세포배양 용기에 옮기고 5 μ l 아넥신-V-FITC, 5 μ l PI 염료를 넣고 차광하여 실온에서 15분간 반응시켰다. 반응이 종료되면 1×결합 완충액 400 μ l를 첨가하여 반응을 종료시켰다. 추가적인 염색을 막기 위해서 15분 이후로는 4℃에 보관하였다. 아넥신-V-FITC와 PI에 의해 발생하는 형광을 유세포 분석기의 FL-1과 FL-3 채널을 통해 측정한 후 4사분면 분석법을 이용하여 세포사멸 정도를 측정하고 비교하였다. 즉, 세포 표면에 포스파티딜 세린(phosphatidyl serine)의 노출이 증가되어 여기에 아넥신 V의 결합이 현저히 증가되거나, 세포막의 손상으로 인하여 세포 내로 PI가 유입된 세포들은 사멸이 일어난 것으로 분석하였다. 데이터는 3개의 실험치를 평균±평균의 표준오차 값으로 표시하였다. 표 7에 나타난 바와 같이 20 μ M 농도의 J14는 48시간 이후부터 유의적인 세포사멸 효과를 보였고, 96시간이 경과되었을 때 세포사멸이 현저히 증가되었다.

표 7

[0081]

처리시간 (시간)	세포 사멸 (%)		
	대조군	J14 (10 μ M)	J14 (20 μ M)
0	6.58 $\pm$ 1.28	8.37 $\pm$ 2.30	7.53 $\pm$ 1.25
24	5.97 $\pm$ 0.75	8.79 $\pm$ 0.13	10.60 $\pm$ 1.42
48	4.45 $\pm$ 0.25	7.20 $\pm$ 0.56	16.13 $\pm$ 1.29 ^a
72	4.38 $\pm$ 0.98	7.08 $\pm$ 1.32	21.10 $\pm$ 0.20 ^a
96	3.88 $\pm$ 0.82	8.90 $\pm$ 1.31	40.53 $\pm$ 2.64 ^a
^a p<0.05로 대조군에 비하여 통계적으로 유의적인 차이가 있음을 표시함 (통계처리는 student t-test를 적용하였음)			