(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0044835
(43) 공개일자 2019년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 417/12 (2006.01) *A61K 31/506* (2006.01)
A61K 31/7064 (2006.01) *A61K 45/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 417/12 (2013.01)
A61K 31/506 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0137252
(22) 출원일자 2017년10월23일
심사청구일자 2017년10월23일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박제원
경기도 고양시 일산동구 위시티1로 7, 504동 904호 (식사동, 위시티블루밍5단지아파트)
박재용
서울특별시 성북구 종암로24가길 80, 101동 504호 (종암동, 래미안라센트)
(74) 대리인
이처영, 장제환

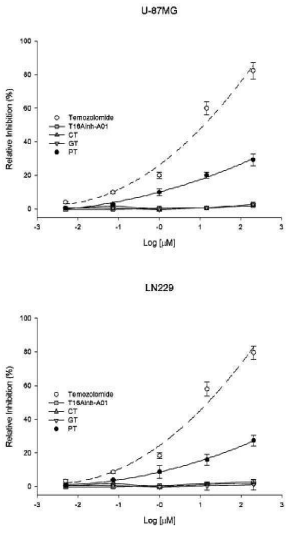
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **클로라이드 채널 차단제를 유효성분으로 함유하는 뇌종양 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 클로라이드 채널 차단제를 유효성분으로 함유하는 뇌종양 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 CaCC 선택적 합성 차단제인 T16Ainh-A01의 유도체를 제조하고, 상기 유도체의 교모세포종 치료 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 칼슘의존성 클로라이드 채널 차단제 T16Ainh-A01의 구조변형 아미노페닐티아졸 유도체는 변형전 T16Ainh-A01에 비해 교모세포종에 대한 항암 활성 및 BBB 투과율이 개선되어 우수하며, 기존의 치료제에 대해 내성을 나타내는 암에서도 항암 활성이 우수하므로, 개선된 뇌종양의 예방 또는 치료제로 활용이 가능하다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 31/7064 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ011066
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청 시스템합성농생명공학사업단
연구사업명 차세대바이오그린21
연구과제명 생합성 경로공학 기반의 토양 방선균 유전자원 활용 신규 당부가 항생물질 생산
기 여 율 1/3
주관기관 고려대학교 보건과학대학 바이오시스템의과학부
연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015R1A2A2A01002524
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자(핵심)지원사업
연구과제명 생합성 경로공학화 기반 아미노사이클리톨 신규 항생제 후보물질 디자이너
기 여 율 1/3
주관기관 고려대학교 보건과학대학 바이오시스템의과학부
연구기간 2017.05.01 ~ 2018.04.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2017M3A9C4092979
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 전통천연물-유전자동의보감사업
연구과제명 질병 막단백질 핵심마커 기반 천연물 작용기전 및 효능 규명
기 여 율 1/3
주관기관 고려대학교 보건과학대학 바이오시스템의과학부
연구기간 2018.07.01 ~ 2019.04.30

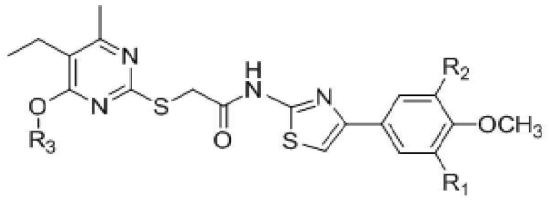
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염:

[화학식 1]

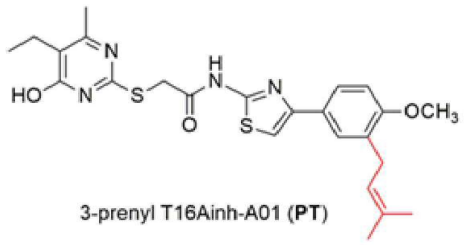


상기 식에서, R_1은 프레닐 (prenyl; $CH_2CHC(CH_3)_2$), 게라닐 (geranyl; $CH_2CHC(CH_3)CH_2CH_2CHC(CH_3)_2$) 또는 수소 (H)이며, R_2는 플루오로 (fluoro; F), 클로로 (chloro; Cl) 또는 수소 (H)이고, R_3는 글루코스 (glucose), 갈락토오스 (galactose), 알로스 (allose), 탈로스 (tallose), 자일로스 (xylose), N-아세틸글루코사민 (N-acetyl-glucosamine), 락토오스 (lactose), 2'-디옥시-글루코스 (2'-deoxy-glucose) 또는 수소 (H)이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 하기 화학식 2 내지 4로 표시되는 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염.

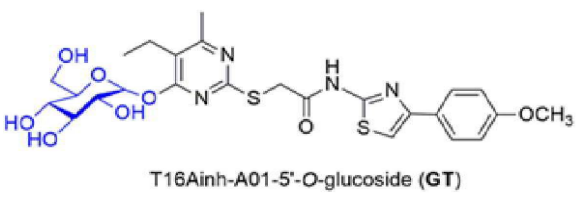
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]



청구항 3

제1항 또는 제2항의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 암은 뇌종양인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 항암제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 항암제와의 병용투여 용도로 사용되는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

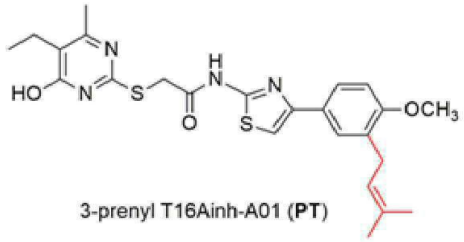
청구항 7

다음 단계를 포함하는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물의 제조방법:

(a) 프레닐트랜스퍼라제 (MrPT) 효소의 존재하에 하기 화학식 5로 표시되는 화합물과 프레닐 공여체를 반응시켜 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 생합성 시키는 단계; 및

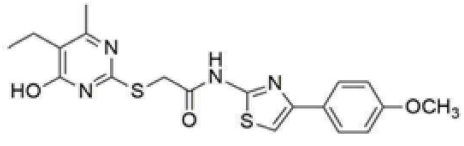
(b) 상기 합성된 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 회수하는 단계.

[화학식 2]



3-prenyl T16Ainh-A01 (PT)

[화학식 5]



청구항 8

제7항에 있어서, 상기 프레닐 공여체는 DMAPP(dimethylallyl diphosphate) 또는 GPP(geranyl diphosphate)인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 프레닐트랜스퍼라제 (MrPT)는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 클로라이드 채널 차단제를 유효성분으로 함유하는 뇌종양 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 칼슘의존성 클로라이드 채널(Calcium-activated chloride ion channel; CaCC) 선택적 합성 차단제인 T16Ainh-A01의 유도체를 제조하고, 상기 유도체의 교모세포종 치료 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 다양한 종류의 세포들로부터 유래된 칼슘의존성 클로라이드 채널(Calcium-activated chloride ion channel, 이하 CaCC)은 세포질 내의 칼슘이온 농도에 의존하여 활성화되는 특징을 가지고 있다. CaCC의 존재는 1980년대에 개구리 난자세포에서 처음 밝혀졌다. 즉, 수정 시 난자세포 내 상승된 칼슘이온 농도에 기인하여 CaCC 통로가 열리게 되면 막의 탈분극화가 발생하여 정자세포의 유입을 막는 생리적 기능이 처음으로 확인되었다. 그 이후로 다양한 신경세포와 세포들에서의 CaCC의 존재가 발견되었으며, CaCC는 유래된 세포에 따라 다양한 생리적 기능을 보여주었다. 즉, 인체 내 상피세포 체액 분비, 심근과 신경세포에서의 막 흥분성, 감각신경 신호전달, 맥박 조절 및 광수용체 반응성 조절 등이 알려지고 있다 (Ferrera L *et al., Compr Physiol.* 1(4):2155-2174, 2011). 따라서 CaCC에 대하여 선택적으로 차단할 수 있는 화합물의 개발은 골다공증, 폐경 후 골다공증과 같은 골 관련 질환, 암과 같은 종양 세포 증식 관련 질환, 노화-관련 황반 변성이나 망막병증 혹은 신생혈관 녹내장, 각막 혈관신생과 같은 안구 혈관형성 관련 질환, 나아가 안구 고혈압이나 개방각 녹내장과 같은 안압감소에 의한 질환들의 예방 또는 치료를 목적으로 다양하게 활용될 수 있을 것이다.

[0004] 한편, CaCC 관련 암호화 유전자는 1980년 이래로 30년 넘도록 확인되지 않고 있던 중, 2008년에 이르러서야 ANO1(혹은 TMEM16A)이 발견되었고, 이후 상기 ANO1이 기관지, 장, 선 상피 혹은 평활근이나 장 박동 조율세포, 감각신경 등에 다수 발현됨을 확인하였다 (Hartzell *et al., J Physiol.* 587(Pt 10):2127-2139, 2009). 또한 ANO1은 유방암, 전립선암 그리고 두경부암과 같은 다양한 암세포에서 과활성됨이 밝혀졌고, 나아가 세포의 성장과, 이동, 암세포화 및 암 전이 발달에 관여함이 확인되었다 (Qu Z *et al., Cancer Med.* 3(3):453-461, 2014; Bill A *et al., Adv Exp Med Biol.* doi: 10.1007/5584_2016_201, 2017). 가령, 전립선암 세포에서 클로라이드 채널인 ANO1의 발현이 억제될 경우 세포의 성장과 전이, 침투 및 종양발달 등이 억제되는 것을 마우스 모델에서 관찰하였으며, ANO1 합성 차단제의 일종인 T16Ainh-A01은 ANO1이 과발현된 췌장암세포(CFPAC1)의 성장을 억제한다고 보고된 바 있다 (Mazzone A *et al., Ano1. Biochem Biophys Res Commun.* 427(2):248-253, 2012; Duvvuri U *et al., Cancer Res.* 72(13):3270-3281, 2012). 그리고, 유방암 세포에서 ANO1의 발현을 억제했을 경우, 그 암세포의 성장이 억제되며 암세포의 사멸이 촉진됨 또한 보고되었다. 또한, ANO1의 발현을 억제할 경우, 두경부암과 식도 편평상피세포암 및 유방암세포에서 표피성장인자 수용체와 CAMK2 (calmodulin-dependent protein kinase2) 신호전달이 억제되는 기전으로 항암효과를 제시함을 알 수 있었다. 이와 같이 ANO1의 발현을 억제하는 경우 항암효과가 나타나는 결과들을 바탕으로 하여, ANO1의 활성을 선택적으로 억제하여 그 항암 활성을 달성할 수 있는 약학적 조성물에 대한 연구가 진행되었다. 특히, 상기 기술된 CaCC 관련 생리 기능과 조절 기전을 밝히고, 나아가 그 관련 질환의 예방 및 치료효과를 제시하고자 근래 여러 종의 ANO1 선택적 차단제가 보고되고 있다.

[0005] ANO1 선택적 차단제 중, 우선 아미노티오펜 (aminothiophene) 구조의 합성 화합물인 CaCCinh-A01은 CaCC 채널에 대하여 반수저해농도 (IC_{50}) 2.1 μM로 저해함을 확인하였고, 칼슘농도의 상승과 CAMK2 활성에 대한 저해 없이 10 μM 반수저해농도로 CaCC의 이온 유입을 차단함을 알 수 있었다 (Namkung *et al., J Biol Chem.* 286(3):2365-2374, 2011). 다음으로, 아미노페닐티아졸 (aminophenylthiazole) 구조의 합성 화합물 T16Ainh-A01은 CaCC 채널에 대하여 반수저해농도 약 1.0 μM로 선택적으로 저해함이 나타났고, 혈관 평활근세포의 CaCC 활성은 저해하는 반면 마우스와 인간 유래 혈관의 경우에는 이완시킴 또한 보고되었다(Duvvuri *et al., Cancer*

Res. 72(13):3270-3281, 2012; US 2014/0378510). 2013년도에는 안트라닐산 (anthranilic acid) 구조의 합성 화합물 MONNA가 합성되었으며, bestrophin-1, CLC2나 CFTR등의 다른 클로라이드 채널에는 10 μM 농도까지 저해하지 않으나, ANO1을 대상으로는 반수저해농도 1.27 μM로 매우 선택적으로 저해함이 보고된 바 있다 (Oh SJ *et al., Mol Pharmacol.* 84(5):726-735, 2013; 대한민국특허 10-2014-0025902). 최근에는 상기 3종의 ANO1 선택적 차단제들과 비교하여, 그 특이성이 강화되어 반수저해농도가 1 μM 미만으로까지 나타나는 아미노아세타미드 (aminoacetamide)계열 합성 화합물인 Ani9이 보고되어 (Seo Y *et al., PLoS One.* 11(5):e0155771, 2016; 대한민국특허 10-2017-0019905), 항암용 약학 조성물로서의 응용 가능성을 제시한 바 있다. 이를 위하여 50,000종이 넘는 저분자 화합물들을 합성하고, 이를 고속 스크리닝기법을 통하여 선발함으로서 최종 후보물질로 Ani9을 도출하였다.

[0006] 이와 같이, 저분자 화합물의 구조적 변형 및 다변화를 통한 신규 유도체의 개발은 신약 및 혁신 의약품 전달 시스템(drug delivery system) 개발의 주요 기술로서 인식되고 있으며, ANO1 선택적 차단제의 개발에도 적용 가능하다. 이 중 하나로, 상기 유기 합성법들과는 상이하게 효소를 이용한 효소적 제조 방법이 가능할 것이다. 특히, 기존 ANO1 차단제의 구조적 유사 화합물들의 유도체화는 원래 물질에 비하여 향상된 생물학적 활성을 제시할 수가 있으며, 또한 의약품의 제형 개량이나 신규 제형 개발 및 프로드럭(prodrug)화 등에 유용한 생전환 기술이라 할 것이다. 무엇보다, 상기 ANO1 선택적 차단제들, 즉 CaCCinh-A01, T16Ainh-A01 그리고 Ani9 화합물들의 경우엔 모두 유기 합성법으로 제조되고 있으며, 효소적 생전환을 통하여 기존 ANO1 차단제에 구조적 변형을 일으킨 유도체의 제조는 현재까지 유래가 없다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 구조적으로 변형되어 약리학적 활성이 개선된 신규한 아미노페닐티아졸 유도체를 생합성하고자 예의 노력한 결과, 기존 ANO1 차단제 중 하나인 아미노페닐티아졸 계열 합성 화합물 T16Ainh-A01을 이전 연구에서 확보한 재조합 효소 (대한민국 특허출원 제10-2017-0030240호, 제10-2017-0030241호 및 PCT-KR2016-002888호)를 이용하여 신규한 아미노페닐티아졸 유도체를 제조하고, 원래 화합물 T16Ainh-A01과 비교하여 교모세포종 세포에 대한 항암 활성 및 BBB에 대한 인비트로 투과도가 우수한 것을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

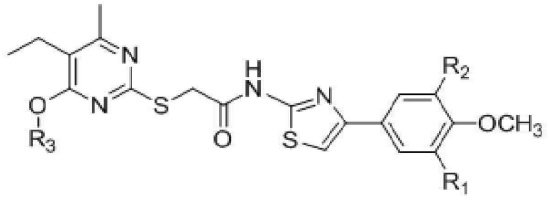
[0009] 본 발명의 목적은 교모세포종을 포함하는 뇌종양의 예방 또는 치료제로 활용될 수 있는 칼슘의존성 클로라이드 채널(CaCC) 선택적 합성 차단제인 T16Ainh-A01의 구조적 유도체를 효소적 방법으로 생전환하여 합성된 신규 아미노페닐티아졸 유도체 및 상기 제조된 유도체의 항암 치료제 용도를 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 칼슘의존성 클로라이드 채널(CaCC) 선택적 합성 차단제인 T16Ainh-A01를 효소를 이용한 생전환 방법을 통해 교모세포종에 대한 항암 활성이 향상된 신규 아미노페닐티아졸 구조적 유도체를 제조하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[0013] [화학식 1]



[0014]

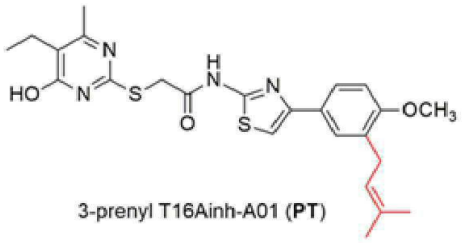
[0015] 상기 식에서, R_1은 프레닐 (prenyl; $CH_2CHC(CH_3)_2$), 게라닐 (geranyl; $CH_2CHC(CH_3)CH_2CH_2CHC(CH_3)_2$) 또는 수소 (H)이며, R_2는 플루오로 (fluoro; F), 클로로 (chloro; Cl) 또는 수소 (H)이고, R_3는 글루코스 (glucose), 갈락

토오스 (galactose), 알로스 (allose), 탈로스 (tallose), 자일로스 (xylose), N-아세틸글루코사민 (N-acetyl-glucosamine), 락토오스 (lactose), 2'-디옥시-글루코스 (2'-deoxy-glucose) 또는 수소 (H)이다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, (a) 프레닐트랜스퍼라제 (MrPT) 효소의 존재하에 하기 화학식 5로 표시되는 화합물과 프레닐 공여체를 반응시켜 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 생합성 시키는 단계; 및 (b) 상기 합성된 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 회수하는 단계를 포함하는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

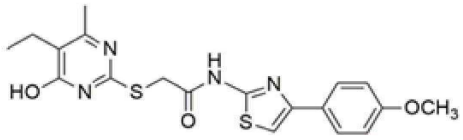
[0018] [화학식 2]



3-prenyl T16Ainh-A01 (PT)

[0019]

[0020] [화학식 5]



[0021]

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따른 칼슘의존성 클로라이드 채널 차단제 T16Ainh-A01의 구조변형 아미노페닐티아졸 유도체는 변형전 T16Ainh-A01에 비해 교모세포종에 대한 항암 활성 및 BBB 투과율이 개선되어 우수하며, 기존의 치료제에 대해 내성을 나타내는 암에서도 항암 활성이 우수하므로, 개선된 뇌종양의 예방 또는 치료제로 활용이 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 효소 반응을 통한 아미노티아졸 유도체 생전환 모식도이다.

도 2는 U251 교모세포주에 PT, CT, 및 GT를 각각 처리한 후, 패치 클램프 방법을 이용하여 CaCC의 이온통로 활성을 측정한 것이다 (대조군: DMSO, 비교군: 테모졸로미드).

도 3은 인간 교모세포종 세포주인 U-87MG 및 LN229에 PT, CT, 및 GT를 각각 처리한 후, 세포증식 억제 농도-반응 곡선을 비교한 것이다 (양성 대조군: 테모졸로미드, 비교군: T16Ainh-A01).

도 4는 테모졸로미드 내성 인간 교모세포종 세포주인 T98G에 PT 및 T-PT (테모졸로미드-PT)를 각각 처리한 후, 세포증식 억제 농도-반응 곡선을 비교한 것이다 (대조군: 테모졸로미드, 비교군: T-T (테모졸로미드-T16Ainh-A01)).

도 5는 원숭이 유래 BBB 투과도 측정용 키트를 사용하여 PT, CT, 및 GT의 BBB 투과율을 비교한 것이다 (대조군: 테모졸로미드, 비교군: T16Ainh-A01).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서

사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

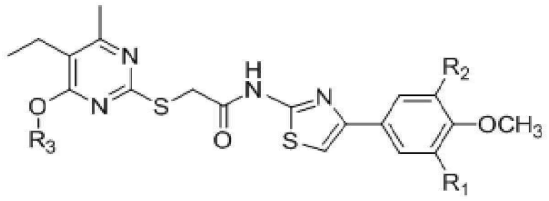
[0028] 본 발명에서는 대장균에서 발현된 마이크로모노스포라 로도랑지아(*Micromonospora rhodorangea*) 방선균 유래의 3종의 재조합 효소인 프레닐트랜스퍼라제 (prenyltransferase), 할로게나아제 (halogenase) 및 당전이효소 (glycosyltransferase) (대한민국 특허출원 제10-2017-0030240호, 제10-2017-0030241호 및 PCT-KR2016-002888호)를 이용하여 칼슘의존성 클로라이드 채널 (Calcium-activated chloride ion channel, CaCC) 선택적 합성 차단제인 T16Ainh-A01를 생전환시켜 T16Ainh-A01의 구조변형 아미노페닐티아졸 유도체를 제조하였다.

[0029] 생합성된 신규 유도체는 인비트로(in vitro) 클로라이드 채널 차단 활성, 여러 교모세포종들에 대한 인비트로 항암 활성 및 퇴행성뇌질환 관련 의약품 개발 및 처치에 주요 한계점이라 할 수 있는 혈액뇌장벽(blood-brain barrier, 이하 BBB)에 대한 인비트로 투과 정도가 현저히 개선된 것을 확인하였다. 특히, 현재 교모세포종 포함 뇌종양 치료에 있어서 표준 치료제로 사용되고 있는 테모졸로미드 (Temozolomide)에 대해 내생을 나타내는 암에서도 효과적인 항암 활성을 나타냈다.

[0030] 그러므로, 본 발명의 유도체는 최근 빈번히 발생하는 테모졸로미드 치료제에 대한 내성 문제를 대체할 수 있는 효과적인 항암제 또는 기존 치료법을 보완할 수 있는 병용 치료제 등의 개발에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0031] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염에 관한 것이다.

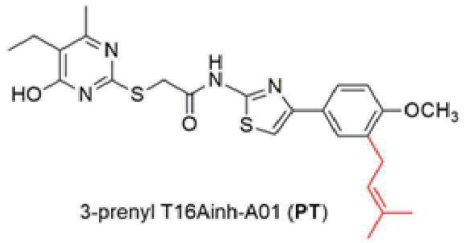
[0032] [화학식 1]

[0033] 

[0034] 상기 식에서, R_1은 프레닐 (prenyl; $CH_2CHC(CH_3)_2$), 게라닐 (geranyl; $CH_2CHC(CH_3)CH_2CH_2CHC(CH_3)_2$) 또는 수소 (H)이며, R_2는 플루오로 (fluoro; F), 클로로 (chloro; Cl) 또는 수소 (H)이고, R_3는 글루코스 (glucose), 갈락토오스 (galactose), 알로스 (allose), 탈로스 (tallose), 자일로스 (xylose), N-아세틸글루코사민 (N-acetyl-glucosamine), 락토오스 (lactose), 2'-디옥시-글루코스 (2'-deoxy-glucose) 또는 수소 (H)인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 2 내지 4로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

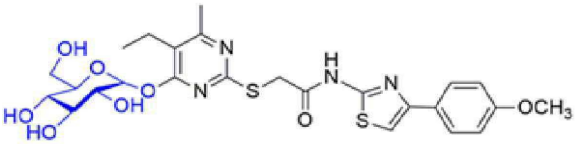
[0036] [화학식 2]

[0037] 

[0038] [화학식 3]

[0039] 

[0040] [화학식 4]



T16Ainh-A01-5'-O-glucoside (GT)

[0041]

[0042] 본 발명에 따른 상기 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 아세트산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 4-톨루엔술폰산, 갈룩투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산 등을 사용할 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 상기 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 포함한다.

[0044] 또한, 본 발명에 따른 상기 화합물은 결정 형태 또는 비결정 형태로 제조될 수 있으며, 화학식 1의 화합물이 결정 형태로 제조될 경우, 임의로 수화되거나 용매화될 수 있다.

[0046] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 화학식 1 내지 4로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0047] 본 발명에 있어서, 상기 암은 뇌종양인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 교모세포종인 것이나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은, 상기 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물의 투여로 교모세포종과 같은 뇌종양 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물의 투여로 교모세포종과 같은 뇌종양 질환 증세가 호전되거나 완치되는 모든 행위를 의미한다.

[0049] 본 발명의 상기 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 패치 클램프 (Patch clamp)방법을 통하여 ANO1 채널 차단제로서의 활성을 나타내고, 생전환 전의 대조군인 T16Ainh-A01에 비하여 교모세포종 암세포들의 증식을 억제됨을 나타내고, 또한 대조군에 비하여 향상된 BBB 투과정도를 나타내며, 기존 항암제에 내성을 가진 암에 대해서도 항암 활성이 우수하므로, 교모세포종을 포함하는 뇌종양의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0050] 따라서, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 화학식 1 내지 4로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 암을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0051] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 화학식 1 내지 4로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 조성물을 암 예방 또는 치료에 사용하는 용도에 관한 것이다.

[0052] 또한, 본 발명은 상기 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 담체를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0053] 본 발명의 약학적 조성물은 표준 약학적 실시에 따라 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 보조제 또는 희석액 등의 첨가물을 함유할 수 있다.

[0054] 본 발명의 조성물을 의약품으로 사용하는 경우, 상기 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 적어도 하나 이상 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 임상 투여 시에 하기의 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제제화되어 투여될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0055] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질 캅셀제, 연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등의 제형일 수 있는데, 이들 제형은 유효성분 외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산의 마그네슘염, 스테아르산의 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제, 및 감미제를 함유할 수 있다.

[0056] 비경구 투여용 제형으로는 피하 주사, 정맥 주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사를 주입하는 방법에 의할 수 있다. 이때, 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여, 상기 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 적어도 하나 이상 포함하고, 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하며, 이를 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 상기 조성물은 멸균되고/되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제, 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

[0057] 또한, 본 발명의 화합물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70 ㎏인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001 ~ 1,000 ㎎/일이고, 바람직하게는 0.01 ~ 500 ㎎/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

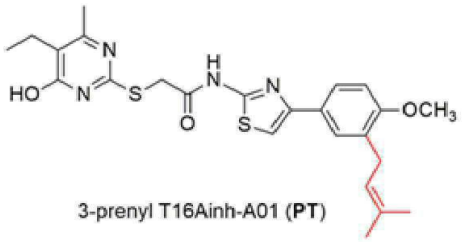
[0058] 본 발명이 있어서, 상기 화합물을 함유하는 조성물은 항암 효과를 직접 나타내거나, 기타 항암제와 병용하여 사용될 수 있다.

[0059] 본 발명이 있어서, 다른 항암제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 다른 항암제와의 병용투여하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0060] "병용"은 상기 화학식 1 내지 4로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나의 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과 항암제 각각이 동시, 순차적, 또는 역순으로 투여될 수 있음을 의미하는 것으로, 당업자의 범위 내 적절한 유효량의 조합으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물과 항암제가 각각 별도의 용기에 보관된 후 동시, 순차적 또는 역순으로 병용 투여될 수 있다.

[0062] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 프레닐트랜스퍼라제 (MrPT) 효소의 존재하에 하기 화학식 5로 표시되는 화합물과 프레닐 공여체를 반응시켜 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 생합성 시키는 단계; 및 (b) 상기 합성된 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 회수하는 단계를 포함하는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물의 제조방법에 관한 것이다.

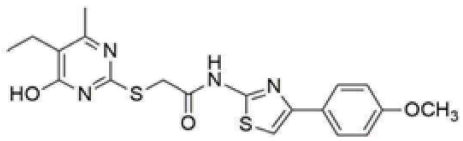
[0063] [화학식 2]



3-prenyl T16Ainh-A01 (PT)

[0064]

[0065] [화학식 5]



[0066]

[0067] 본 발명에 있어서, 상기 프레닐 공여체는 DMAPP(dimethylallyl diphosphate) 또는 GPP(geranyl diphosphate)인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0068] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 제조방법은 효소반응 산물을 중압 액체 크로마토그래피(Medium Pressure Liquid Chromatography; 이하 MPLC) 방법으로 분리, 정제, 또는 분리 및 정제하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 중압 액체 크로마토그래피 방법에 사용되는 고정상은 역상 C18일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기, 중압 액체 크로마토그래피 방법에 사용되는 이동상은 메탄올:물:포름산 60:40:0.2(v/v/v/v) 혼합액일 수 있으며, 중압 액체 크로마토그래피 유지 시간(Retention time)은 14 ~ 21 분일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0069] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 재조합 효소들은 마이크로모노스포라 로도랑지아 (*Micromonospora rhodorangea*)로부터 분리할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0070] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 효소는 프레닐트랜스퍼라제 (MrPT), 플라빈-의존형 할로게나아제 (MrFDH) 또는 당전이효소 (MrSPGT)일 수 있으며, 상기 프레닐트랜스퍼라제 (MrPT)는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0071] 본 발명은 상기 프레닐트랜스퍼라제, 할로게나아제 및 당전이효소 반응을 통하여 프레닐기나 할로겐 기능기 또는 당이 부가된 T16Ainh-A01 유도체를 생합성하고, 이후 질량분석기와 핵자기 공명 스펙트로미트리(nuclear magnetic resornance spectrometry, NMR) 기기분석을 통하여 그 구조의 신규성을 확인하는 한편, 구조 변형 전의 원래 화합물 대비 일부 아미노티아졸 유도체들의 인비트로 클로라이드 채널 차단 활성의 유지, 교모세포종 세포들에 대한 항암 활성 및 인비트로 BBB 투과 정도의 향상들을 일부 확인함으로써, 교모세포종을 포함하는 뇌종양의 예방 및 치료 목적으로 활용될 수 있는 구조로 변형된 아미노티아졸 유도체를 제조하였다.

[0073] **[실시예]**

[0074] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0076] **실시예 1: 아미노티아졸 유도체의 제조**

[0077] 1-1: 재조합 프레닐트랜스퍼라제 MrPT의 생촉매 반응을 통한 프레닐화 아미노티아졸 유도체로의 생전환

[0078] 신규한 프레닐화 유도체로의 생전환을 위하여, 프레닐 수용체로 T16Ainh-A01 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 미국)을 최종 0.3 mM의 농도로 하고, 여기에 탄소골격 5개의 DMAPP (Dimethylallyl diphosphate)를 0.6 mM 수준으로 하는 한편, 재조합 효소 MrPT (서열번호 1, 대한민국 특허출원 제10-2017-0030240호)를 최종 완충용액 (50 mM 인산 완충용액, 2 mM 염화마그네슘) 내 1 mg/ml 수준으로 첨가하여 30℃에서 5시간 동안 효소 반응을 실시하였다 (도 1). 반응 후, 동량의 에틸아세테이트를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층의 유기 용매층만을 모아서 감압건조를 실시하였다. 상기 추출물 내 목적 유도체의 생합성 여부를 확인하기 위하여 HPLC-ESI-MS 분석을 수행하였다. 이동상으로 메탄올:물:포름산 60:40:0.2(v/v/v/v) 혼합액을 분당 120 μl 속도로, 고정상 컬럼으로는 Acquity CSH C18 (Waters, 50x1.0 mm, 1.7 μm; Milford, MA, USA)을 사용하여 분석하였다.

[0079] 다음으로, 상기 조추출물로부터 목적하는 프레닐화 아미노티아졸 유도체의 분리 및 정제를 위해 콤비플래시 Rf 중압 액체 크로마토그래피 시스템을 적용하였다. 역상 (reverse-phased) C18 카트리지에 메탄올:물:포름산 60:40:0.2(v/v/v/v) 혼합액을 이동상으로 분당 12 ml의 속도로 흘러가는 중압 액체 크로마토그래피를 이용하여, 동일한 이동상 4 ml에 용해시킨 상기 조추출물을 주입한 후 크로마토그램 상 검출된 피크를 자동 분취하였다. 개별 분획을 다시 감압하여 농축한 후, 이온트랩 질량 분석기 (LCQ ion-trap mass spectrometer, ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA)로 질량 스펙트럼을 분석함으로써 목적하는 프레닐화 아미노티아졸 유도체 (PT)들을 분리하였다 (도 1).

[0081] 1-2: 재조합 플라빈-의존형 할로게나아제 MrFDH의 생촉매 반응을 통한 할로겐화 아미노티아졸 유도체로의 생전

환

[0082] 신규한 할로겐화 유도체로의 생전환을 위하여, 할로겐화 기질로 T16Ainh-A01(Sigma-Aldrich)을 최종 0.5 mM의 농도로, 조효소 $FADH_2$의 생성을 위하여 상용 가능한 재조합 플라빈 리덕타아제 (flavin reductase; EC1.5.1.29; Novocib, Lyon, France; #E-Nov8; 10 units)와 카탈라아제 (catalase; Sigma-Aldrich; #C9322; 30 units)에 1 mM 농도의 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드 (FAD; Sigma-Aldrich)를 첨가하였다. 반응 완충용액 (25 mM 인산 완충용액; pH 7.4; 20 mM 염화나트륨)에 상기 혼합물들과 정제한 재조합 MrFDH (서열번호 2, 대한민국 특허출원 제 10-2017-0030241호)를 첨가한 후, 할로겐 공여 이온을 위한 염화나트륨 (Sigma-Aldrich) 혹은 브롬화나트륨 (Sigma-Aldrich)용액을 최종 20 mM 수준이 되도록 하여 30℃에서 10시간 동안 효소 반응을 실시하였다 (도 1). 상기 반응물 내 목적 할로겐화 아미노티아졸 유도체의 생합성 여부를 확인하기 위하여 HPLC-ESI-MS 분석을 수행하였다. 이동상으로 메탄올:물:포름산 60:40:0.2(v/v/v/v) 혼합액을 분당 120 μl 속도로, 고정상 컬럼으로는 Acquity CSH C18 (Waters, 50x1.0 mm, 1.7 μm; Milford, MA, USA)을 사용하여 분석하였다.

[0083] 다음으로, 상기 조추출물로부터 목적하는 할로겐화 아미노티아졸 유도체의 분리 및 정제를 위해 콤비플래시 Rf 중압 액체 크로마토그래피 시스템을 적용하였다. 메탄올:물:포름산 60:40:0.2(v/v/v/v) 혼합액을 이동상으로 분당 12 ml의 속도로 흘러가는 중압 액체 크로마토그래피를 이용하여, 동일한 이동상 4 ml에 용해시킨 상기 조추출물을 주입한 후 크로마토그램 상 검출된 피크를 자동 분취하였다. 개별 분획을 다시 감압하여 농축한 후, 이온트랩 질량 분석기 (LCQ ion-trap mass spectrometer, ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA)로 질량 스펙트럼을 분석함으로써 목적하는 할로겐화 아미노티아졸 유도체 (CT)들을 분리하였다 (도 1).

[0085] 1-3: 재조합 당전이효소 MrSPGT의 생촉매 반응을 통한 당부가 아미노티아졸 유도체로의 생전환

[0086] 신규한 당부가 유도체로의 생전환을 위하여, 그 기질로 T16Ainh-A01(Sigma-Aldrich)을 100 mM 수준으로 메탄올에 용해한 후, 반응 완충용액 (50 mM 인산 완충용액, 10 mM 염화마그네슘, 1 mg/ml 소 혈청 알부민)으로 희석하여 최종 2 mM의 농도가 되게 한 후, MrSPGT 당전이 효소 (서열번호 3, PCT/KR2016/002888) 50 μM와 핵산당으로 UDP-글루코스(UDP-glucose)를 4 mM 수준으로 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 당전이 효소 반응을 실시하였다 (도 1). 반응 후, 동량의 에틸아세테이트를 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 상층의 유기용매층만을 모아서 진공건조를 실시하였다. 상기 반응물 내 목적 당부가 아미노티아졸 유도체의 생합성 여부를 확인하기 위하여 HPLC-ESI-MS 분석을 수행하였다. 이동상으로 메탄올:물:포름산 60:40:0.2(v/v/v/v) 혼합액을 분당 120 μl 속도로, 고정상 컬럼으로는 Acquity CSH C18 (Waters, 50x1.0 mm, 1.7 μm; Milford, MA, USA)을 사용하여 분석하였다.

[0087] 다음으로, 상기 조추출물로부터 목적하는 당부가 아미노티아졸 유도체의 분리 및 정제를 위해 콤비플래시 Rf 중압 액체 크로마토그래피 시스템을 적용하였다. 메탄올:물:포름산 60:40:0.2(v/v/v/v) 혼합액을 이동상으로 분당 12 ml의 속도로 흘러가는 중압 액체 크로마토그래피를 이용하여, 동일한 이동상 4 ml에 용해시킨 상기 조추출물을 주입한 후 크로마토그램 상 검출된 피크를 자동 분취하였다. 개별 분획을 다시 감압하여 농축한 후, 이온트랩 질량 분석기 (LCQ ion-trap mass spectrometer, ThermoFinnigan, San Jose, CA, USA)로 질량 스펙트럼을 분석함으로써 목적하는 할로겐화 아미노티아졸 유도체 (GT)들을 분리하였다 (도 1).

[0089] **실시예 2: 아미노티아졸 유도체의 NMR 분석**

[0090] NMR 시료는 200 μl의 DMSO-d6에 실시예 1에서 분리, 정제한 각 유도체들을 용해시킨 후, 5 mm 시게미 어드밴스드 NMR 마이크로튜브 (Shigemi advanced NMR microtube, Sigma, St. Louis, MO)에 상기 용매를 방치시킴으로써 제조하였다. ^{13}C NMR 스펙트럼은 배리언(Varian) INOVA 500 분광광도계를 이용하여 298 K에서 획득하였고, 화학적 이동은 내부 준거로서 TMS를 이용하여 ppm으로 기록되었다. 모든 NMR 데이타 산출은 Mnova Suite 5.3.2 소프트웨어를 이용하여 수행하였고, 프레닐화, 할로겐화 및 당부가된 아미노티아졸 유도체들의 ^{13}C-NMR 스펙트럼을 기질로 사용한 T16Ainh-A01과 비교하였다.

[0091] 3-프레닐 T16Ainh-A01 유도체 (**PT**; 15.1 mg; 생전환율 41%; ^{13}C NMR [125 MHz, DMSO-d6] δ 15.0, 18.2, 18.7, 19.5, 24.4, 28.3, 38.6, 56.0, 104.8, 114.7, 123.0, 125.2, 125.8, 128.2, 131.3, 131.8, 132.3, 150.2, 156.7, 160.6, 161.4, 164.1, 168.2, 171.1)

[0092] 3-클로로 T16Ainh-A01 유도체 (**CT**, 12.6 mg; 생전환율 33%; ^{13}C NMR [125 MHz, DMSO-d6] δ 15.0, 18.2, 19.4, 38.6, 55.3, 104.8, 116.0, 123.1, 126.5, 126.8, 128.2, 132.3, 150.2, 154.4, 160.6, 161.4, 164.1, 168.2, 171.2)

[0093] T16Ainh-A01-5'-*O*-글루코사이드 유도체 (**GT**, 19.6 mg; 생전환율 51%; ^{13}C NMR [125 MHz, DMSO-d6] δ 15.1, 18.2, 19.6, 38.6, 55.8, 62.0, 71.4, 73.2, 76.7, 81.4, 104.8, 109.7, 114.5, 114.9, 125.3, 128.0, 128.5, 128.9, 150.2, 160.5, 164.0, 164.4, 164.8, 166.7, 168.2)

[0095] **실시예 3: 패치 클램프를 통한 클로라이드 채널 차단 활성 검정**

[0096] 실시예 1에서 합성된 아미노페닐티아졸 유도체의 CaCC 이온통로 활성에 대한 효과를 평가하기 위하여, 패치 클램프를 이용한 전기생리학적 측정을 실시하였다.

[0097] 인간 교모세포종에서 유래된 U251 교모종 세포주를 커버슬립 위에 배양하여, 3가지 아미노페닐티아졸 유도체 PT, CT 및 GT를 각각 세포주에 1시간 동안 처리하였다. 대조군으로는 이들 아미노페닐티아졸 유도체들을 용해시키는데 사용된 용매 DMSO를 사용하고, 비교군으로는 T16Ainh-A01를 사용하여 U251 세포주에 동일한 조건으로 처리하였다. 그 다음, CaCC 이온통로 활성을 측정하기 위해 패치 클램프 기법을 이용하여 전세포 상태에서 고농도 칼슘 조건으로 염소이온에 의한 전류밀도를 측정하여 비교하였다. 전기생리학 측정용 유리피펫에 고농도 칼슘(5 mM)을 포함하는 피펫용액을 채우고, 세포에 접근시킨 후 전세포 상태에서 막전위를 -100 ~ +100 mV로 변화시키면서 클로라이드 이온에 의한 전류밀도를 측정하였다.

[0098] 그 결과, 아미노페닐티아졸 유도체인 PT, CT 및 GT은 비교군인 T16Ainh-A01에 비하여, 모두 상대적으로 낮은 클로라이드 채널 차단 활성을 보여주었다 (도 2). GT와 PT 유도체 처리군에서는 각각 대조군과 비교하여 +80 mV의 막전위에서 전류밀도가 50 % 이하로 감소되었고, CT 유도체 처리군에서는 효과가 없음을 확인하였다. 대조군으로는 아미노페닐티아졸들을 용해시키는데 사용된 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용하였다.

[0100] **실시예 4: 교모세포종 암세포주 증식억제 검정**

[0101] 인간 교모세포종 세포주인 U-87MG (American Type Culture Collection[ATCC], Manassas, VA, 미국; HTB-14)와 LN229 (ATCC; CRL2611)을 DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium)에 10% FBS (fetal bovine serum)과 penicillin/streptomycin 항생제를 첨가한 배지로 37℃에서 5% 이산화탄소 조건에서 배양하였다. 세포증식 억제 효과는 WST-1 세포증식 평가법으로 측정하였다. 평편 바닥의 96 well plate 내 1개 well 당 1,000개의 U-87MG 또는 LN229 세포를 분주하여 18시간 동안 배양하였다. 이후, 교모세포종 치료제인 테모졸로미드 (temozolomide, Sigma-Aldrich)를 양성 대조군으로, T16Ainh-A01를 비교군으로 하고, 아미노페닐티아졸 유도체 PT, CT 및 GT를 처리군으로 하여 각각 0.1~32 μM 수준으로 분주하였고, 용매인 DMSO의 농도는 0.2%를 초과하지 않도록 하여 72시간 동안 처리하였다. 그 다음, 5 mg/ml 농도의 WST-1 시약을 5 μl씩 가한 후에 3시간 반응시켜 450 nm에서의 흡광을 측정하여, WST (water-soluble tetrazolium salt) 시험법을 EZ-Cytox (DoGen; Seoul, 대한민국)를 이용해 매뉴얼대로 시행하였다.

[0102] 그 결과, 양성 대조군인 교모세포종 치료제 테모졸로미드는 상기 2종의 암세포주인 U-87MG 및 LN229를 대상으로 뚜렷한 암세포 증식 억제 농도-반응 곡선을 나타냈다 (도 3). 비교군인 T16Ainh-A01의 경우에는 최고 농도인 32 μM에서만 음성 대조군인 DMSO vehicle과 비교하여 미약한 암세포 증식억제 활성이 나타났다. 마찬가지로, 아미노페닐티아졸 유도체인 CT와 GT 또한 2종의 교모세포종 암세포주에 대하여 상기 비교군과 유사한 경향을 보여주었다. 반면, 아미노페닐티아졸 유도체 PT의 경우에는, 비교군 및 유도체 CT 및 GT와는 상이하게 암세포주 증식억제 활성이 3.2 μM에서부터 나타났다. 즉, U-87MG를 대상으로는 농도 구간 내 최대 평균 29%의 저해율을 나타내고 있으며, LN229 암세포주를 대상으로는 최대 평균 27%의 증식 억제 활성을 나타내고 있다 (도 3).

[0103] 비록 실시예 3에서는 유도체 PT가 비교군인 T16Ainh-A01에 비하여 클로라이드 채널 차단 활성이 감소한 것을 보여주었으나, 본 실시예에서는 유도체 PT가 그 생리학적 활성과는 별개로 교모세포종 암세포주를 대상으로 증식억제 활성이 증가한 것을 확인하였다. 이러한 결과는 유도체 PT가 분자 구조상 탄소 골격 5분자가 추가적으로 부가된 소수성 강화에 의한 것으로 볼 수 있다. 따라서, 향후 ANO1 선택적 차단제의 활성을 유지하면서 특정 세포를 표적화 가능한 약리 화합물의 개발이 가능할 것으로 기대할 수 있다.

[0105] **실시예 5: 테모졸로미드 내성 교모세포종 암세포주 대상 증식억제 검정**

[0106] 테모졸로미드 내성 교모세포종 세포주로 알려진 T98G (ATCC; CRL1690)를 실시예 4와 동일한 조건으로 배양했다. 세포증식 억제효과 또한 실시예 4와 동일한 WST-1 세포증식 평가법으로 측정하였다. 평편 바닥의 96 well plate 내 1개 well 당 1,000개의 T98G 세포를 분주하여 18시간 동안 배양하였다. 이후, 테모졸로미드 (Sigma-Aldrich)를 대조군으로, 그리고 실시예 4에서 암세포주 증식 억제활성이 일부 나타난 아미노페닐티아졸 유도체 PT를 처리군으로 하여 각각 1.0~1000 uM 수준으로 분주하였다. 또한, 테모졸로미드와 PT의 병용처리 효과를 확인하기 위하여, 테모졸로미드와 PT를 동일 몰분율로 제조한 T-PT를 병용 처리군으로 하고, 테모졸로미드와 T16Ainh-A01을 동일 몰분률로 제조한 T-T를 비교군으로 하여 1.0~1000 uM 수준으로 분주하였다. 그 다음 각각 72시간 동안 처리한 후, 5 mg/ml 농도의 WST-1 시약을 5 μl씩 가한 후에 3시간 반응시켜 450 nm에서의 흡광을 측정하여, WST (water-soluble tetrazolium salt) 시험법을 EZ-Cytox (DoGen; Seoul, 대한민국)를 이용해 매뉴얼대로 시행하였다.

[0107] 그 결과, 대조군인 테모졸로미드는 그 내성 암세포주 T98G를 대상으로 실시예 4의 2종의 교모세포종 암세포주인 U-87MG 및 LN229들과는 상이하게 상대적으로 낮은 암세포 증식 억제 농도-반응 곡선을 나타냈다 (도 4). 즉, T98G 세포주는 테모졸로미드에 대하여 반수억제농도 약 700 μM로서 높은 내성을 보여주고 있었다. 또한, 테모졸로미드와 T16Ainh-A01을 동일 몰분률로 제조한 T-T 비교군의 경우 상기 테모졸로미드 단독 처리군의 결과와 유사하게 내성을 나타났다.

[0108] 반면, 아미노페닐티아졸 유도체 PT 단독 처리군의 경우는 기존 테모졸로미드 비내성 교모세포종 암세포주 2종 (U-87MG 및 LN229)에서와 같이 큰 차이 없이 농도-증식억제 곡선을 나타냈다. 이는 대조군 테모졸로미드와 처리군 PT의 교모세포종 억제 메커니즘이 차이가 있음을 의미한다. 또한, T-PT 병용 처리군의 경우에도 테모졸로미드와 PT 각각 단독 처리군들에 비하여 내성 암세포주 T98G에 대해 상대적으로 향상된 증식 억제 활성을 나타냈다 (도 4). 즉, 동일 몰분율로 제조한 T-PT 병용 처리군의 경우 테모졸로미드 내성 세포주 T98G를 대상으로 하여 반수억제농도 약 28 μM로 나타났다.

[0109] 이러한 결과는, 아미노페닐티아졸 유도체 PT가 일반적인 교모세포종 암세포주에 대해 증식 억제 활성을 향상시킬 수 있을뿐 아니라, 테모졸로미드 내성 교모세포종 암세포를 대상으로 테모졸로미드와 병용 처리할 경우 내성 암세포주에 대한 증식 억제 활성을 강화시킬 수 있음을 나타낸다. 따라서, 최근에 빈번히 나타나고 있는 테모졸로미드 내성의 악성 교모세포종 치료에 복합제제로서의 활용 가능성을 제시한다.

[0111] **실시예 6: 아미노페닐티아졸 유도체 PT의 BBB 투과도 검정**

[0112] 교모세포종을 포함하는 뇌종양의 치료제로 개발상 가장 큰 난점 중 하나는 아직까지도 BBB (blood-brain barrier) 투과이다. 따라서, CaCC 채널 선택적 차단제로 개발된 아미노페닐티아졸계열 T16Ainh-A01에 소수성인 탄소 5개 골격 프레닐기를 추가적으로 부가한 PT의 경우, 일부 교모세포종을 포함하여 인비트로 뇌종양 치료 활성을 나타내므로, 아미노페닐티아졸 유도체 PT의 BBB 투과정도에 대한 조사는 뇌종양 치료제로서의 임상 활용 가능성을 판단하는 척도가 될 수 있다. 따라서, 본 실시예에서는 아미노페닐티아졸 유도체 중 인간 교모세포종 세포주에 대해 일부 증식 억제활성이 나타난 유도체 PT의 약물전달시스템 상 활용 가능성을 추가적으로 조사하였다.

[0113] 원숭이 (Macaca irus)유래 인비트로 BBB 24-well 키트 (MBT-24, 카탈로그 넘버 PCC-MBT-24H)를 일본 나가사키현 소재 PharmaCo-Cell Ltd.에서 구입하였다. 같이 동봉된 매뉴얼에 맞추어 성상교세포 (astrocyte)를 24 well plate에 배양하여 뇌 측으로, 그리고 바닥이 필터로 구성된 24 well millicell (insert 타입; 폴리에틸렌 테레프탈레이드 재질; 3 μm pore size)에 주피세포 (pericyte)와 내피세포 (endothelial cell)의 2중 층을 순차적으로 배양하여 혈액 측으로 하여 인비트로 BBB를 재건하였다. 이후, 테모졸로미드를 양성 대조군으로, T16Ainh-A01를 비교군으로 그리고 프레닐화 아미노페닐티아졸 유도체 PT, 클로로화 아미노페닐티아졸 유도체 CT 및 당부가 아미노페닐티아졸 GT를 처리군으로 하여 각각 10 μM 수준으로 혈액 측에 점적하였다. 3일간 추가 배양 후, 뇌 측(즉, plate의 well 내부)을 전량 회수하고 동량의 에틸아세테이트를 첨가하고 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층의 유기 용매층만을 모아서 감압건조를 실시하였다. 상기 추출물 내 상기 화합물들의 잔존량을 이온트랩 질량 분석기 (LCQ ion-trap mass spectrometer, ThermoFinnigan)의 질량 스펙트럼을 분석함으로써 초기 농도 10 μM 대비 잔존량으로 BBB 투과 정도를 비교하였다.

[0114] 그 결과, 양성 대조군인 현재 교모세포종 치료제로 임상 이용 중인 테모졸로미드는 초기 혈관 측 점적 농도 대비 약 84%의 BBB 투과도를 보여주었으며, 이는 BBB투과 가능한 기존 임상자료에 부합하는 결과이다 (도 5). 한편 비교군인 T16Ainh-A01의 경우에는 평균 4% 미만의 BBB 투과도를, 친수성 기능기가 추가적으로 부가된 CT와 GT의 경우에도 비교군과 유사한 결과를 나타냈다. 반면, 아미노페닐티아졸 유도체 중 교모세포종 암세포에 일부 증식 억제 활성을 제시한 PT의 경우에는, 다른 유도체들과는 달리 평균 36%의 BBB 투과도를 나타냈다 (도 5). 따라서, 클로라이드 채널 선택적 차단제의 분자 구조 변형을 통한 교모세포종을 포함한 뇌종양 치료제 개발에 주요한 의약품 분자 모델링 기법이 될 수 있다.

[0115] 이상의 결과에서 나타난 바와 같이, 기존 약리 활성 화합물의 구조 변형 유도체로의 생전환을 통하여 기존 화합물의 약리 활성 및 약물전달시스템을 개량할 수 있으며, 이러한 개량화는 의약품 및 의약품 원료로서의 활용 잠재성을 확인할 수 있다.

[0117] 상기 실시예에서 생성된 화합물에 대하여 하기와 같이 제제화하였다.

[0118] **제제예 1: 정제(직접 가압)**

[0119] 화합물 5.0 mg을 체로 친 후, 락토스 14.1 mg, 크로스포비돈(USNF) 0.8 mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.1 mg을 혼합하고 가압하여 정제로 제조하였다.

[0121] **제제예 2: 정제(습식 조립)**

[0122] 화합물 5.0 mg을 체로 친 후, 락토스 16.0 mg과 녹말 4.0 mg을 섞었다. 폴리솔베이트 800.3 mg을 순수한 물에 녹인 후, 이 용액의 적당량을 첨가하여 미립화하였다. 건조 후에 미립을 체질한 후, 콜로이달 실리콘 디옥사이드 2.7 mg 및 마그네슘 스테아레이트 2.0 mg과 혼합하였다. 상기 혼합물을 가압하여 정제로 제조하였다.

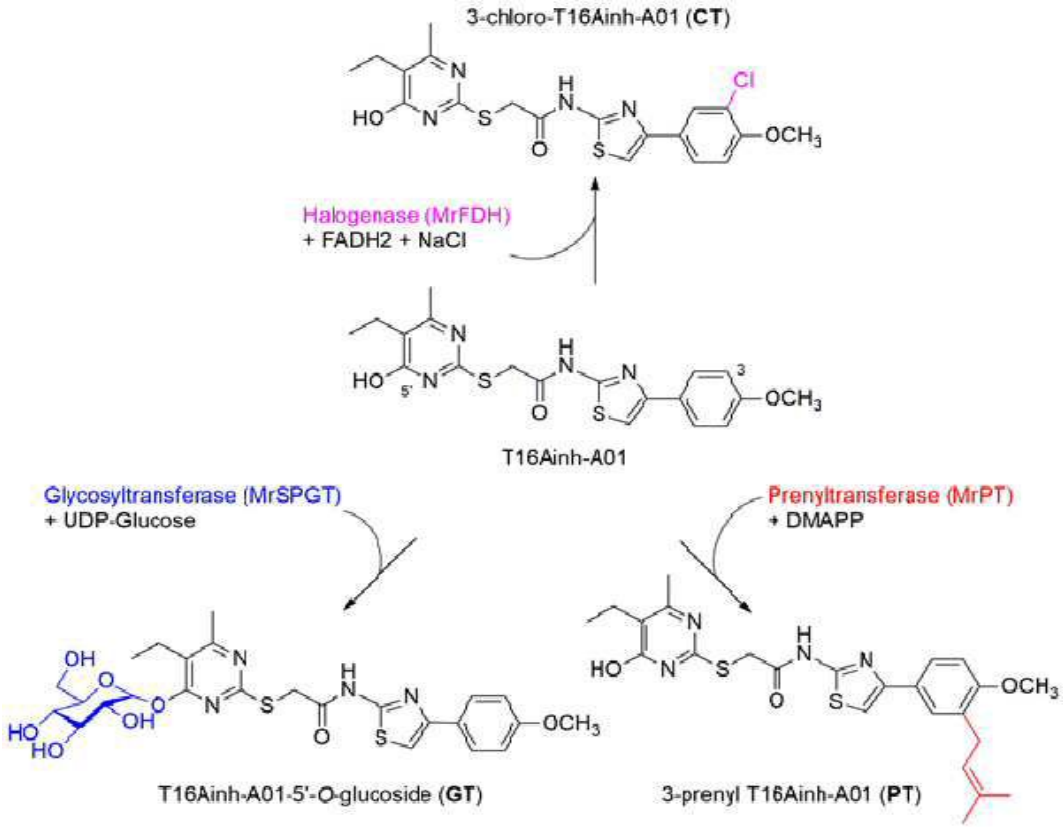
[0124] **제제예 3: 분말과 캡슐제**

[0125] 화합물 5.0 mg을 체로 친 후에, 락토스 14.8 mg, 폴리비닐 피롤리돈 10.0 mg 및 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg과 함께 혼합하였다. 상기 혼합물을 캡슐 제조기를 사용하여 단단한 No. 5 젤라틴 캡슐에 채웠다.

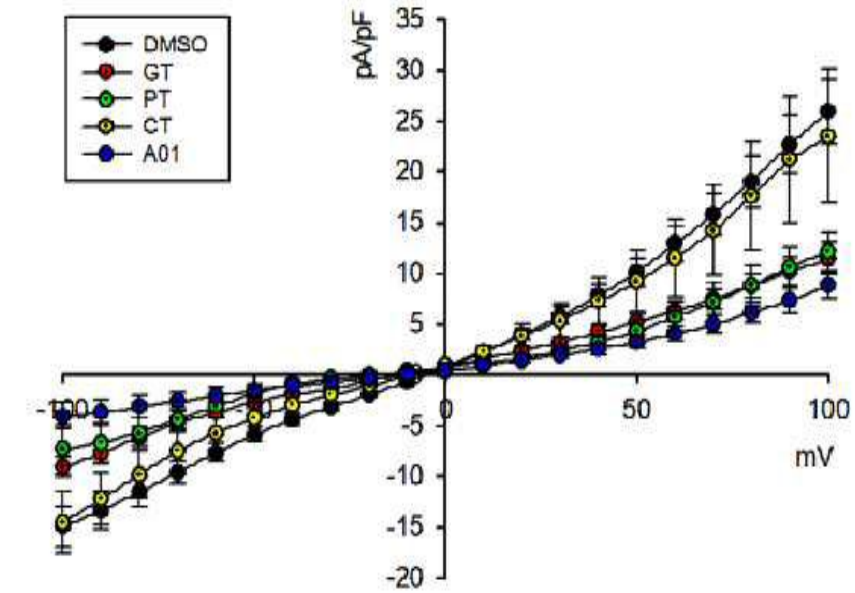
[0127] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

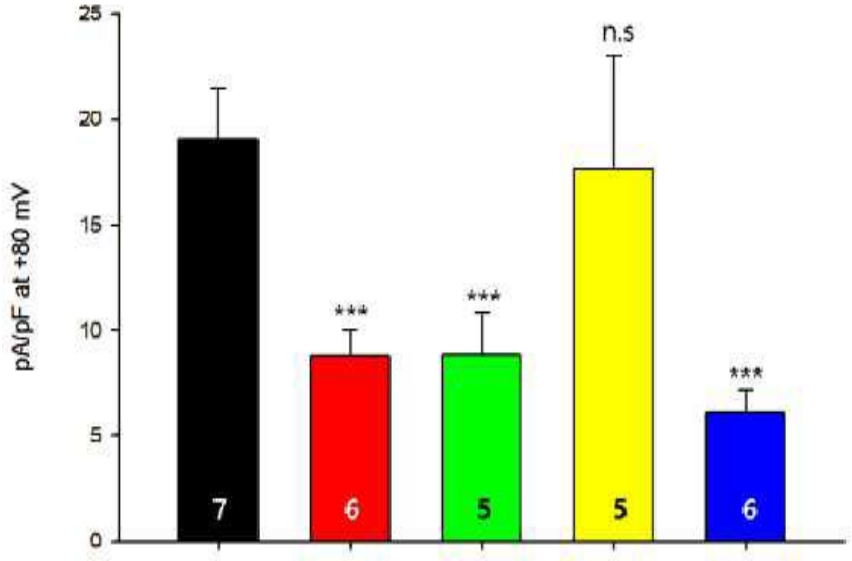
도면

도면1

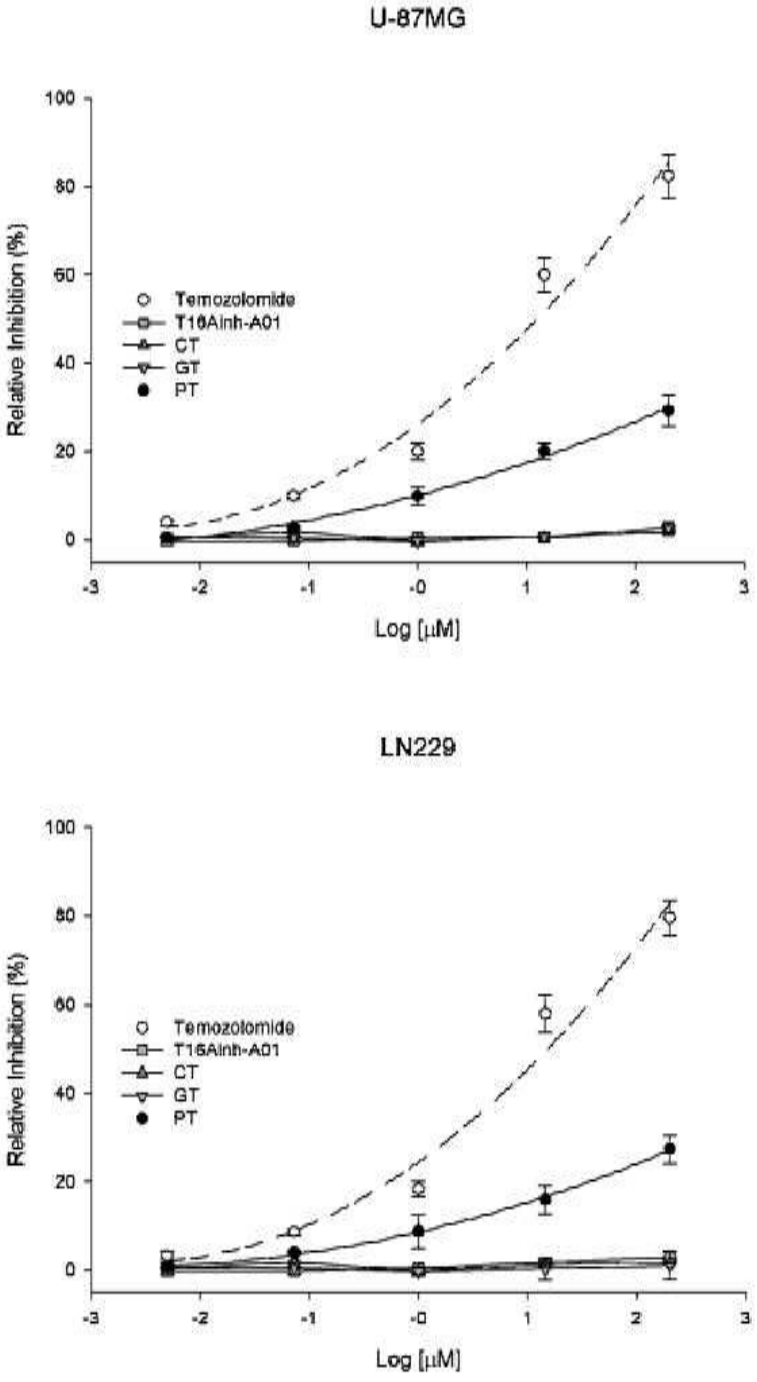

3-chloro-T16Ainh-A01 (CT)
Halogenase (MrFDH)
+ FADH2 + NaCl
T16Ainh-A01
Glycosyltransferase (MrSPGT)
+ UDP-Glucose
Prenyltransferase (MrPT)
+ DMAPP
T16Ainh-A01-5'-O-glucoside (GT)
3-prenyl T16Ainh-A01 (PT)

도면2

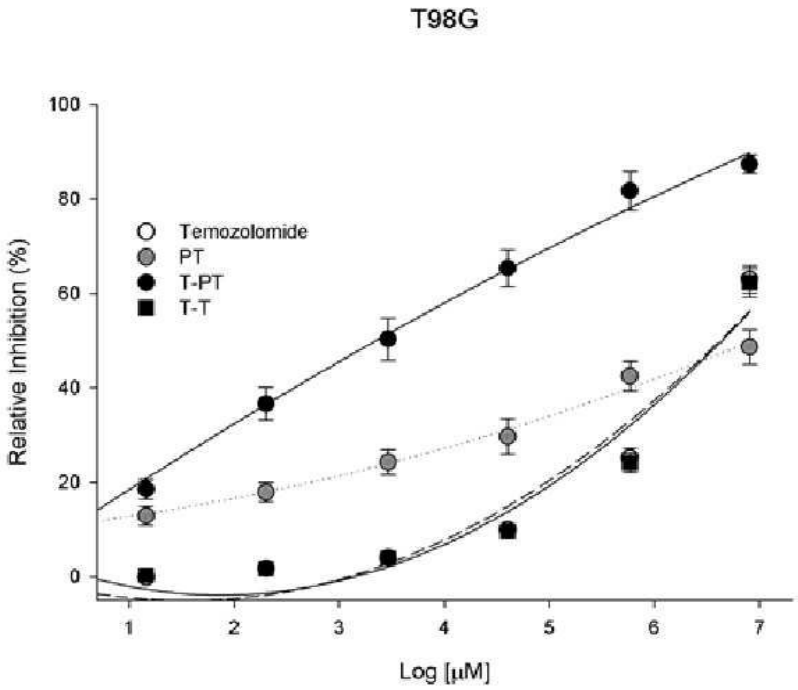

DMSO
GT
PT
CT
A01
pA/pF
35
30
25
20
15
10
5
-5
-10
-15
-20
-100
0
50
100
mV


pA/pF at +80 mV
25
20
15
10
5
0
***
***
n.s
***
7
6
5
5
6

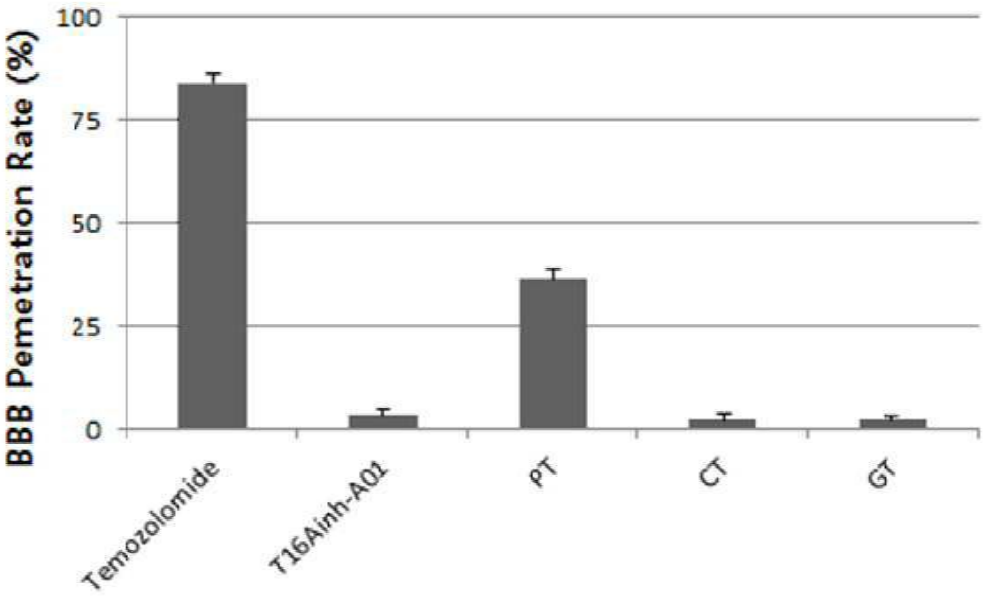
도면3


U-87MG
Relative Inhibition (%)
Log [μM]
Temozolomide
T16Ainh-A01
CT
GT
PT
LN229
Relative Inhibition (%)
Log [μM]
Temozolomide
T16Ainh-A01
CT
GT
PT

도면4



도면5



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Composition for Preventing or Treating Brain Tumor Comprising Calcium-Activated Chloride Channel Inhibitors

<130> P17-B232

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 302

<212> PRT

<213> Micromonospora rhodorangea

<400> 1

Met Ser Glu Pro Ala Gly Ser Arg Gln Leu Tyr Ser Ala Tyr Arg Ala
1 5 10 15

Asp Ala Trp Leu Ile Gly Ala Thr Leu Phe Ala Glu Arg Val Trp Pro
20 25 30

Val Leu Glu Ala Tyr Arg Asp Asn Phe Ala Lys Ala Gly Ala Thr Leu
35 40 45

Arg Val Ala Thr Gly Ser Gln Pro Gly Asp Gln Leu Asp Trp Arg Phe
50 55 60

Thr Val Gly Ser Asp Val Asp Pro Tyr Ala Val Ala Leu Ser Asn Gly
65 70 75 80

Leu Thr Glu Lys Thr Asp His Pro Val Gly Thr Leu Leu Ala Glu Ile
85 90 95

Ser Glu Arg Cys Pro Ile Ala Ser Tyr Gly Ile Asp Phe Gly Val Ala
100 105 110

Gly Gly Phe Lys Lys Ile Tyr Leu Phe Phe Pro Pro Asp Gly Met Gln
115 120 125

Ser Leu Ser Thr Leu Ala Glu Leu Pro Ser Met Pro Arg Ser Leu Ala
130 135 140

Asp Asn Val Asp Leu Phe Ala Arg Arg Gly Leu Gly Asp Lys Val Asn
145 150 155 160

Thr Phe Gly Ile Asp Tyr Arg His Arg Thr Val Asn Val Tyr Phe Gly
165 170 175

Gly Leu Pro Asp Glu Cys Leu Glu Pro Ala Gly Val Leu Ser Met Thr
180 185 190

Arg Glu Leu Gly Leu Pro Asp Pro Gly Glu Gln Met Leu Arg Leu Gly
195 200 205

Arg Gln Ala Phe Gly Ile Tyr Ala Ser Leu Gly Trp Glu Ser Ser Ala
210 215 220
Val Glu Arg Phe Cys Phe Ala Val Met Ala Ser Asp Ser Ser Ala Leu
225 230 235 240

Pro Ile Asp Gln Glu Phe Glu Cys Glu Arg Phe Leu Lys Gly Leu Arg
245 250 255
Ala Thr Ala Ala Asp Ser Arg Phe Val Tyr Tyr Ala Gly Val Ser Ser
260 265 270
Thr Gly Glu Glu Tyr Tyr Lys Leu Gln Ser Tyr Tyr Lys Trp Gln Pro
275 280 285
Leu Asp Arg Met Gly Ser Asp Gln Met Leu Leu Ser Thr Ala
290 295 300

<210> 2
<211> 488
<212> PRT
<213> Micromonospora rhodorangea
<400> 2

Met Val Ser Thr Val Leu Val Ile Gly Gly Gly Pro Ala Gly Ala Thr
1 5 10 15
Ala Ala Ala Leu Leu Ala Arg Ser Gly Leu Ser Val Thr Leu Leu Glu
20 25 30
Lys Glu Thr Phe Pro Arg Tyr His Ile Gly Glu Ser Val Ala Ser Ser
35 40 45
Cys Arg Thr Ile Val Asp Phe Val Gly Ala Leu Asp Glu Val Asp Ser
50 55 60

Arg Gly Tyr Pro Gln Glu Asn Gly Val Leu Leu Arg Trp Gly Asn Lys
65 70 75 80
Asp Trp Ser Ile Asp Trp Ala Lys Ile Phe Gly Pro Gly Ile Arg Ser
85 90 95
Trp Gln Val Asp Arg Asp Asp Phe Asp His Ile Leu Leu Asn Asn Ser
100 105 110
Gly Lys Gln Gly Ala Lys Ile Ile Gln Gly Ala Ala Val Glu Arg Val

115 120 125

Leu Phe Asp Gly Glu Arg Ala Thr Glu Ala Glu Trp Phe Asp Pro Glu

130 135 140

Ser Gly Glu Val Arg Thr Ile Asp Phe Asp Tyr Ile Ile Asp Ser Ser

145 150 155 160

Gly Arg Ala Gly Leu Ile Pro Ser Gln His Phe Lys His Arg Arg Pro

165 170 175

Thr Lys Thr Phe Lys Asn Val Ala Ile Trp Gly Tyr Trp Gln Gly Gly

180 185 190

Ser Leu Leu Pro Asn Ser Pro Ser Gly Gly Ile Asn Val Ile Ala Ala

195 200 205

Pro Asp Gly Trp Tyr Trp Ile Val Pro Leu Arg Gly Asp Arg Tyr Ala

210 215 220

Ile Gly Phe Val Cys His Gln Ser Arg Phe Leu Glu Arg Arg Glu Glu

225 230 235 240

His Ala Ser Leu Glu Asp Met Leu Ala Ser Leu Val Gln Glu Ser Pro

245 250 255

Thr Val Arg Gly Leu Thr Ser Asn Gly Thr Tyr Gln Pro Gly Val Arg

260 265 270

Val Lys Gln Asp Phe Ala Tyr Val Ser Asp Ser Phe Cys Gly Pro Gly

275 280 285

Tyr Phe Ala Ala Gly Asp Ser Ala Cys Phe Leu Asp Pro Leu Leu Ser

290 295 300

Thr Gly Val His Leu Ala Leu Tyr Ser Gly Met Leu Ala Ser Ala Ser

305 310 315 320

Ile Leu Ala Thr Ile His Gly Asp Val Thr Glu Glu Glu Ala Arg Ala

325 330 335

Phe Tyr Glu Ser Leu Tyr Arg Asn Ala Tyr Gln Arg Leu Phe Tyr Leu

340 345 350

Val Ala Gly Val Tyr Gln Gln Gln Ala Gly Arg Arg Ala Tyr Phe Gly

355 360 365

Leu Pro Glu Ala Leu Val Gly Asp Ser Gly Asp Thr Glu Tyr Lys Glu
370 375 380
Val Asp Gly Ala Arg Pro Phe Ala Gln Leu Val Ser His Leu Ala Asp
385 390 395 400
Leu Asp Glu Ala Ala Glu Gly Arg His Asp Ser Pro Ala Ala Ala Ala
405 410 415
Thr Ala Arg Gln Glu Asn Ser Ile Arg Gln Leu Phe Leu Ala Pro Arg

420 425 430
Glu Ala Arg Lys Met Ala Asp Thr Arg Pro Gly Ser Ala Gly Ile Ser
435 440 445
Glu Ala Pro Gly Glu Leu Asp Ser Gly Asp Leu Phe Glu Ser Ala Pro
450 455 460
His Val Tyr Leu Ile Thr Thr Pro Arg Ile Gly Val Arg Arg Pro Glu
465 470 475 480
Thr Ala Asp Thr Gln Ser Ala Ser
485

<210> 3
<211> 391

<212> PRT
<213> Micromonospora rhodorangea
<400> 3
Met Ser Arg Arg Pro Ala His Ile Ala Met Val Ser Ile Pro Phe His
1 5 10 15
Gly His Val Asn Pro Ser Leu Glu Ile Ile Ser Thr Leu Val Arg Arg
20 25 30
Gly His Arg Val Thr Tyr Ala Asn Asp Pro Ala Ala Ala Asp Leu Thr
35 40 45
Lys Ala Thr Gly Ala Glu Leu Val Pro Val Thr Ser Val Pro Pro Val
50 55 60

Ala Asp Asn Ala Gly Ile Asp Asp Pro Ile Ala Gln Leu Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Asp Asp Ala Val Ala Met Leu Pro Gln Val Arg Thr Ala Tyr Ala

85 90 95

Asp Asp Arg Pro Asp Leu Tyr Leu Tyr Asp Ile Ala Gly Ala Pro Ala

100 105 110

Arg Leu Leu Gly Glu Gln Trp Gly Ile Pro Ala Val Gln Arg Ser Pro

115 120 125

Thr Ser Val Ala Trp Glu Gly Tyr Glu Gln Glu Met Ala Ala Met Arg

130 135 140

Ala Asp Pro Pro Gly Ala Asp Tyr Tyr Arg Ala Arg Phe Thr Ala Trp

145 150 155 160

Leu Thr Ala Cys Gly Ala Thr Thr Thr Asp Ser Met Ala Cys Cys Gly

165 170 175

Pro Pro Ser Arg Ser Leu Val Leu Pro Pro Glu Ala Met Gln Pro Tyr

180 185 190

Ala Asp Lys Val Asp Arg Ser Val Tyr Thr Phe Val Gly Pro Val Leu

195 200 205

Gly Arg Arg Ser Asp Glu Gly Thr Trp Val Arg Pro Glu Arg Ala Asp

210 215 220

Lys Val Leu Leu Val Ser Leu Gly Ser Ala Tyr Thr Arg Gln Pro Glu

225 230 235 240

Phe Tyr Arg Asn Cys Leu Ala Ala Leu Gly Glu Leu Pro Gly Trp His

245 250 255

Val Val Leu Gln Ile Gly Arg His Thr Asp Pro Arg Glu Leu Gly Thr

260 265 270

Val Pro Pro Gly Val Asp Val Arg Thr Trp Val Pro Gln Val Ala Val

275 280 285

Leu Ala Glu Ala Asp Ala Cys Val Thr His Ala Gly Ile Gly Ser Ser

290 295 300

Ser Glu Gly Leu Tyr Cys Gly Thr Pro Met Ile Ala Val Pro Gln Gly

305 310 315 320

Ala Glu Gln Phe Met Asn Ala Asp Arg Leu Ala Ser Leu Gly Val Ala

325 330 335

Arg Arg Ile Asp Thr Ala Asp Ala Ser Ala Ala Glu Leu Arg Glu Thr

340 345 350

Leu Leu Ala Leu Thr Ala Asp Pro Ala Val Val Ala Arg Ser Ala Glu
355 360 365
Leu Arg Ala Arg Ala Arg Ala Glu Gly Gly Thr Ala Arg Ala Ala Asp
370 375 380
Pro Val Glu Asp Ala Arg Gly
385 390