



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0065215
(43) 공개일자 2014년05월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 211/74 (2006.01) A61K 31/4418 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-0132468
(22) 출원일자 2012년11월21일
심사청구일자 2012년11월21일
기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도
- (71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
- (72) 발명자
아난담 카신 야두난담
부산광역시 남구 용소로 45(대연동, 부경대학교 미생물학과)
김군도
부산광역시 남구 분포로 113, 225동 704호(용호동, LG메트로시티)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
위병갑

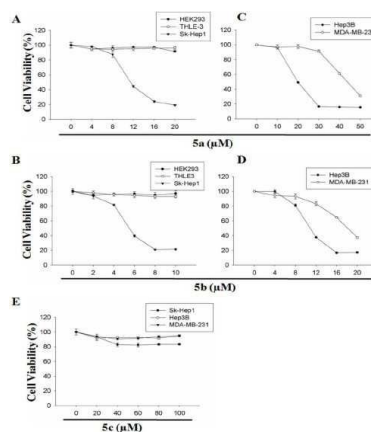
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 신규 테트라하이드로피리디놀 유도체 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 신규한(새로운) 테트라하이드로피리디놀 유도체 화합물 및 이들의 암 치료의 신규 용도에 관한 것으로, 자세하게는 신규 테트라하이드로피리디놀 유도체 화합물, 이를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 건강기능식품에 관한 것이다. 본 발명의 신규 테트라하이드로피리디놀(tetrahydropyridinol) 유도체 화합물은 베타-카테닌(β -catenin) 발현의 하향 조절, GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3- β) 발현의 상향 조절 또는 이캐드헤린(E-cadherin) 발현의 상향 조절을 통한 wnt/ β -catenin 신호 방해 기작으로 암세포의 증식 및 침투를 억제할 수 있을 뿐만 아니라, CDK2의 발현 억제 및 p21과 p27의 발현 증대를 통한 암세포의 세포주기중지(cell cycle arrest)를 유도할 수 있다. 따라서 본 발명의 신규 테트라하이드로피리디놀 유도체는 암을 예방 또는 치료할 수 있는 물질로서 약리학적 조성물과 같은 의약품은 물론이고, 건강기능식품 등으로 활용할 수 있어 식품산업 및 의약산업에 응용될 경우 그 가치가 매우 높을 것으로 기대된다. 또한 본 발명의 신규 테트라하이드로피리디놀 유도체는 암세포가 아닌 비-종양성 세포에는 세포독성을 보이지 않기 때문에, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 장기적 사용에도 안전한 이점을 가진다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

정연태

부산광역시 해운대구 대천로103번길 61, 108동
2102호(좌동, 엘지해운대아파트)

윤진수

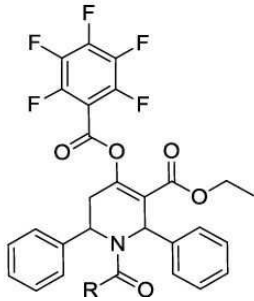
부산광역시 부산진구 진사로61번길 29, 12동 45호
(개금동, 시영아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 신규 화합물;

<화학식 1>



상기 식에서,

R은 CH_2Br 또는 CH_2Cl 이다.

청구항 2

제1항의 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 암은 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌림프종, 췌장교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부종양, 후두암, 구인두암, 비강암(부비동)암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 구강암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장(직장)암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경(요도)암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성생식기외부암 및 여성요도암으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 화합물은 베타-카테닌(β -catenin) 발현의 하향 조절, GSK-3 β (glyco-gensynthase kinsase 3- β) 발현의 상향 조절 또는 이케드헤린(E-cadherin) 발현의 상향 조절을 통한 wnt/ β -catenin 신호 방해 기작으로 암세포의 증식 및 침투를 억제하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 화합물은 CDK2의 발현 억제 및 p21와 p27의 발현 증대를 통한 암세포의 세포주기중지(cell cycle arrest) 기작으로 암세포의 증식을 억제하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 6

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 화합물은 조성물에 1 내지 1000 μM 의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항의 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규한(새로운) 테트라하이드로피리디놀 유도체 화합물 및 이들의 암 치료의 신규 용도에 관한 것으로, 자세하게는 신규 테트라하이드로피리디놀 유도체 화합물, 이를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 건강기능식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 1982년 Roel Nusse와 Harold Varmus가 마우스의 유방암 바이러스로 활성화되는 암유전자인 Integrase-1(Int1)을 보고하였으며, 몇 년 후 Int1은 1973년에 발견된 초파리의 발생과정에서 날개 형성에 관여하는 segment polarity gene인 Wingless(Wg)와 동족체(homologue)라는 것을 확인하였다. Wnt는 Wingless와 Integrase-1의 이름을 합쳐서 붙여진 이름으로서, 발생과정 및 암과 관련해서 현재까지 많은 연구들이 이루어지고 있다.

[0003] Wnt 단백질은 매우 보존된 신호 분자로서 많은 종과 기관에서 세포운명의 결정이나 전구세포(progenitor cell)의 세포증식 및 배(embryo) 발달과정에서 분비되는 중요한 단백질이다. 따라서 Wnt 유전자 또는 Wnt 신호경로의 구성성분들의 변이는 발생적 결함이나 암과 같은 질환에 관여한다고 알려져 있다.

[0004] Wnt 신호경로에서 핵심적인 역할을 하는 전사인자는 베타-카테닌(β -catenin)이며, 베타-카테닌은 세포막에 카드헤린(cadherin)과 결합한 형태로 존재하기도 하면서, 세포-세포간 부착(adhesion)을 조절하기도 한다. 이러한 베타-카테닌을 포함하는 신호경로를 canonical pathway라 하며, 이 전사인자는 canonical pathway에서 TCF/LEF(T cell factor)(lymphocyte-enhancer-binding factor)와 결합하여 사이클린 D1(cyclin D1) 및 c-myc 등과 같은 유전자를 발현시킴으로서 암 발생에 관여한다.

[0005] 스캐폴딩 단백질(Scaffolding protein)인 APC(adenomatous polyposis coli)와 axin(axis inhibition protein), 그리고 세린/트레오닌 키네이스인 글리코젠 신타제 키나제 3-베타(이하 간략하게 'Gsk 3- β '라 함)와 CK1(casein kinase1)로 구성된 destruction complex는 Wnt 신호가 없을 때, 베타-카테닌을 분해시켜 세포 내에서의 베타-카테닌 수준을 낮게 유지한다.

[0006] 구체적인 기작은 GSK3- β 가 베타-카테닌을 인산화시키면, 이를 인지한 E3 유비퀴틴 리가아제(ubiquitin ligase)인 베타 TrCP(beta transducin repeat containing protein)가 베타 카테닌을 폴리유비퀴티네이션(polyubiquitination) 시키게 되고, 폴리유비퀴티네이션된 베타-카테닌은 프레테아좀(proteasome)에 의해 분해되게 된다. 그 결과 베타 카테닌이 핵으로 들어가지 못하여 사이클린 D1 및 c-myc과 같은 발암 유전자를 발현하지 못하게 된다.

[0007] 따라서 상기와 같은 Wnt 신호를 조절할 수 있는 다양한 단백질 또는 이들을 암호화하는 유전자들은 Wnt 신호와 관련된 질환의 치료에 있어서 중요 타겟이 될 수 있다.

[0008] 이에 본 발명자들은 암 예방 또는 치료(개선)에 효과적인 신규 치료제를 개발하기 위해 연구하던 중, 신규한 테트라하이드로피리디놀 유도체 화합물을 합성하였으며, 이들이 베타-카테닌(β -catenin) 발현의 하향 조절, GSK-3 β (glyco-gensynthase kinsase 3- β) 발현의 상향 조절 또는 이케드헤린(E-cadherin) 발현의 상향 조절을 통한 wnt/ β -catenin 신호 방해 기작으로 암세포의 증식 및 침투를 억제할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2011-0014229호

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2011-0122870호

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) Keana, J. F. W.; Cai, S. X. New reagents for photoaffinity labeling: synthesis and photolysis of functionalized perfluorophenyl azides. J. Org. Chem. 1990, 55, 3640-3647.

(비특허문헌 0002) Kato, S.; Morie, T.; Hino, K.; Kon, T.; Naruto, S.; Yoshida, N.; Karasawa, T.; Matsumoto, J. Novel benzamides as selective and potent gastric prokinetic agents. 1. Synthesis and structure-activity relationships of N-[(2-morpholinyl)alkyl]benzamides. J. Med. Chem., 1990, 33 (5), 1406-1413.

(비특허문헌 0003) Aridoss, G.; Amirthaganesan, S.; Ashok Kumar, N.; Kim, J. T.; Lim, K. T.; Kabilan, S.; Jeong, Y. T. A facile synthesis, antibacterial, and antitubercular studies of some piperidin-4-one and tetrahydropyridine derivatives. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008, 18, 6542-6548.

(비특허문헌 0004) Aridoss, G.; Amirthaganesan, S.; Jeong, Y. T. Synthesis, crystal and antibacterial studies of diversely functionalized tetrahydropyridin-4-ol. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010, 20, 2242-2249.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 신규 테트라하이드로피리디놀(tetrahydropyridinol) 유도체 화합물을 제공하는 것이다.

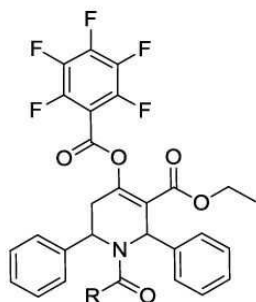
[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료에 효과적인 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선에 효과적인 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 신규 화합물을 제공한다.

[0015] <화학식 1>



[0016]

[0017] 상기 식에서,

[0018] R은 CH₂Br 또는 CH₂Cl이다.

- [0019] 본 발명은 또한, 상기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 암은 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌렴프종, 핍지교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부종양, 후두암, 구인두암, 비강암(부비동)암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 구강암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장(직장)암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경(요도)암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성생식기외부암 및 여성요도암으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화합물은 베타-카테닌(β -catenin) 발현의 하향 조절, GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3- β) 발현의 상향 조절, 이케드헤린(E-cadherin) 발현의 상향 조절을 통한 wnt/ β -catenin 신호 방해 기작으로 암세포의 증식 및 침투를 억제할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화합물은 CDK2의 발현 억제 및 p21과 p27의 발현 증대를 통한 암세포의 세포주기중지(cell cycle arrest) 기작으로 암세포의 증식을 억제할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화합물은 조성물에 1 내지 1000 μ M의 농도로 포함될 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 견류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

발명의 효과

- [0026] 본 발명의 신규 테트라하이드로피리디놀(tetrahydropyridinol) 유도체 화합물은 베타-카테닌(β -catenin) 발현의 하향 조절, GSK-3 β (glycogen synthase kinase 3- β) 발현의 상향 조절 또는 이케드헤린(E-cadherin) 발현의 상향 조절을 통한 wnt/ β -catenin 신호 방해 기작으로 암세포의 증식 및 침투를 억제할 수 있을 뿐만 아니라, CDK2의 발현 억제 및 p21과 p27의 발현 증대를 통한 암세포의 세포주기중지(cell cycle arrest)를 유도할 수 있다. 따라서 본 발명의 신규 테트라하이드로피리디놀 유도체는 암을 예방 또는 치료할 수 있는 물질로서 약리학적 조성물과 같은 의약품은 물론이고, 건강기능식품 등으로 활용할 수 있어 식품산업 및 의약산업에 응용될 경우 그 가치가 매우 높을 것으로 기대된다. 또한 본 발명의 신규 테트라하이드로피리디놀 유도체는 암세포가 아닌 비-종양성 세포에는 세포독성을 보이지 않기 때문에, 이를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 장기적 사용에도 안전한 이점을 가진다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 HEK293, THLE-3, Sk-Hep1, Hep3B 및 MDA-MB-231 세포 각각에 실시예 1을 통해 제조된 신규 화합물(5a, 5b, 5c)을 농도별로 처리한 후 각각의 세포 생존율을 측정하여 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 2A는 Sk-Hep1 세포주에 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 처리한 후 시간 경과에 따른 종양 억제 단백질(p53, p16) 및 암유전자(베타-카테닌: β -catenin)의 발현 변화를 웨스턴 블랏을 통해 측정한 것이다.
- 도 2B는 Hep3B 세포주에 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 처리한 후 시간 경과에 따른 베타-카테닌의 발현 변화를 웨스턴 블랏을 통해 측정한 것이다.
- 도 3은 간암세포주(Sk-Hep1 또는 Hep3B)에 DCA(5 μ M)와 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 병용 처리한 후 phospho- β -catenin(Tyr 142) 및 phospho- β -catenin(Ser 33/37)의 발현 변화를 웨스턴 블랏을 통해 측정한 것이다.
- 도 4는 간암세포주(Sk-Hep1 또는 Hep3B)에 DCA(5 μ M)와 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 병용 처리한 후 베타-카테닌 신호 경로에 관여하는 다른 단백질들(E-cadherin: 전이 억제 단백질, Axin1: 종양 억제 단백질, GSK-3 β : 베타-카테닌 인산화 효소)의 발현 변화를 웨스턴 블랏을 통해 측정한 것이다.
- 도 5는 유방암세포주(MDA-MB-231)에 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 처리한 후 시간 경과에 따른 p53, 베타-

타-카테닌(β -catenin), 이카드헤린(E-cadherin), GSK-3 β 의 발현 변화를 웨스턴 블랏을 통해 측정하는 것이다.

도 6A 및 도 6B는 간암세포주(Sk-Hep1 또는 Hep3B)에 DCA(5 μ M)와 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 병용 처리한 후 베타-카테닌의 목적 유전자인 사이클린 D1 및 c-myc의 발현 변화를 웨스턴 블랏을 통해 측정하는 것이다.

도 6C는 유방암세포주(MDA-MB-231)에 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 처리한 후 시간 경과에 따른 베타-카테닌의 목적 유전자인 사이클린 D1 및 c-myc의 발현 변화를 웨스턴 블랏을 통해 측정하는 것이다.

도 7은 Sk-Hep1, Hep3B 및 MDA-MB-231 각각의 세포주에 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 처리하여 12시간 반응시킨 후 유세포분석기를 이용하여 세포주기를 분석한 것이다.

도 8은 Hep3B 세포에 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 처리한 후 시간 경과에 따른 세포주기와 관련된 단백질(p21, p27, cdk2)들의 발현 변화를 웨스턴 블랏을 통해 측정하는 것이다.

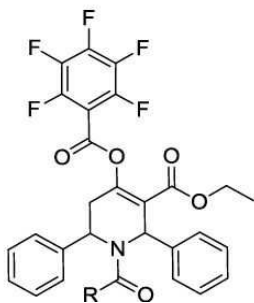
도 9는 Sk-Hep1 및 MDA-MB-231 세포에 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 농도별로 처리한 후 세포 침습 에세이(cell invasive assay)를 통해 암세포의 침습 억제 정도를 측정하는 것이다.

도 10은 Sk-Hep1 및 MDA-MB-231 세포에 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 처리한 후 시간 경과에 따른 MMP-2 단백질(암 침습에서 기저막 분해에서 중요한 역할) 발현 변화를 웨스턴 블랏을 통해 측정하는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 신규 테트라하이드로피리딘올(tetrahydropyridinol) 유도체를 제공함에 그 특징이 있다.

[0029] <화학식 1>



[0030]

상기 식에서,

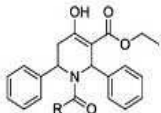
[0031]

R은 CH₂Br 또는 CH₂Cl이다.

[0032]

[0033] 본 발명의 상기 화학식 1의 신규 화합물은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자의 화학적인 지식에 기반으로 제조될 수 있으며, 특별히 그 합성방법을 제한하는 것은 아니다.

[0034] 본 발명의 일구체예에서, 상기 화학식 1의 신규 화합물은 (a) 메틸펜타플루오로벤조에이트에 수산화나트륨, 메탄올 및 물을 첨가하여 가수분해함으로써 산의 형태의 화합물로 제조한 후, 여기에 티오닐클로라이드(SOCl₂), 드라이 톨루엔을 첨가하여 환류시킨 다음 용매를 증발하여 펜타플루오로벤조일 클로라이드(pentafluorobenzoyl chloride: ) 화합물을 제조하는 단계; (b) 테트라하이드로피리딘 유도체 화합물인 (R=CH₂Br 또는 CH₂Cl)을 제조하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 화합물에 DMAP 또는 NEt₃를 첨가하여 교반하여 반응 혼합물을 제조한 후, 여기에 상기 (a) 단계에서 제조한 펜타플루오로벤조일 클로라이드(pentafluorobenzoyl chloride)를 디클로로메탄에 녹인 용액을 첨가하여 혼합시키는 단계; (d) 상기 (c) 단계의 반응이 완료된 용액에서 용매를 제거하고 잔여물을 에틸아세테이트로 녹인 후 세척하는 단계; 및 (e) 상기 (d) 단계를 통해 수득한 유기층을 Na₂SO₄로 건조하고, 증발을 통해 얻어진 잔사는 순수한 물질을 얻기 위해 컬럼(0.5:10 to 1:10, ethyl acetate: hexane)을 이용하여 정제하는 단계를 거쳐 제조할 수 있다(하기 실시예1 참조).

chloride:  (R=CH₂Br 또는 CH₂Cl)을 제조하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 화합물에 DMAP 또는 NEt₃를 첨가하여 교반하여 반응 혼합물을 제조한 후, 여기에 상기 (a) 단계에서 제조한 펜타플루오로벤조일 클로라이드(pentafluorobenzoyl chloride)를 디클로로메탄에 녹인 용액을 첨가하여 혼합시키는 단계; (d) 상기 (c) 단계의 반응이 완료된 용액에서 용매를 제거하고 잔여물을 에틸아세테이트로 녹인 후 세척하는 단계; 및 (e) 상기 (d) 단계를 통해 수득한 유기층을 Na₂SO₄로 건조하고, 증발을 통해 얻어진 잔사는 순수한 물질을 얻기 위해 컬럼(0.5:10 to 1:10, ethyl acetate: hexane)을 이용하여 정제하는 단계를 거쳐 제조할 수 있다(하기 실시예1 참조).

- [0035] 본 발명의 상기 화학식 1의 신규 화합물은 당해 기술분야에서 통상의 방법에 따라 약학적으로 허용 가능한 염 및 용매화물로 제조될 수 있다.
- [0036] 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. 동물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올(예, 글리콜 모노메틸에테르)을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시킬 수 있다.
- [0037] 이때, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산, 주석산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만테르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycolic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 히드로 아이오딕산 등을 사용할 수 있다.
- [0038] 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.
- [0039] 상기의 화학식 1의 신규 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 상기 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함한다. 예를 들면, 약학적으로 허용가능한 한 염으로는 히드록시기의 나트륨, 칼슘 및 칼륨 염이 포함되며, 아미노기의 기타 약학적으로 허용가능한 한 염으로는 히드로브로마이드, 황산염, 수소 황산염, 인산염, 수소 인산염, 이수소 인산염, 아세테이트, 숙시네이트, 시트레이트, 타르트레이트, 락테이트, 만델레이트, 메탄설폰레이트(메실레이트) 및 p-톨루엔설폰레이트(토실레이트) 염이 있으며, 당 업계에서 알려진 염의 제조방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.
- [0040] 본 발명자들은 상기 화학식 1의 신규한 테트라하이드로피리딘 유도체(tetrahydropyridinol derivative) 화합물을 합성(제조)하였으며, 이렇게 합성된 화합물이 베타-카테닌(β -catenin) 발현의 하향 조절, GSK-3 β (glycogensynthase kinsase 3- β) 발현의 상향 조절 또는 이케드헤린(E-cadherin) 발현의 상향 조절을 통한 wnt/ β -catenin 신호 방해 기작으로 암세포의 증식 및 침투를 억제할 수 있을 뿐만 아니라, CDK2의 발현 억제 및 p21과 p27의 발현 증대를 통한 암세포의 세포주기중지(cell cycle arrest)를 유도할 수 있다는 사실을 최초로 규명하였다.
- [0041] 본 발명의 하기 실험예 1에서는, 상기 화학식 1의 신규 화합물의 암세포주에 대한 세포 독성을 확인하기 위해 HEK293(인간 배아 신장 세포), THLE-3(정상 인간 간세포), Sk-Hep1(인간 HCC 세포), Hep3B(인간 HCC 세포) 및 MDA-MB-231(인간 유방암 세포) 각각에 화학식 1의 신규 화합물을 처리한 후 세포 생존율을 측정된 결과, 비-종양성 세포주인 HEK293 및 THLE-3 세포에서는 세포독성이 나타나지 않는 반면에, 암세포주에서는 본 발명의 상기 화학식 1의 화합물 처리 농도에 의존적으로 세포 생존율이 두드러지게 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 상기 화학식 1의 신규 화합물은 간암 및 유방암에 특이적인 세포독성을 가지는 것을 확인할 수 있었다(도 1 참조).
- [0042] 또한 본 발명의 하기 실험예 2에서는, 상기 화학식 1의 신규 화합물의 간암세포에서의 종양 억제 단백질(p53, p16) 또는 암유전자(베타-카테닌: β -catenin) 발현에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 웨스턴 블랏을 실시한 결과, Sk-Hep1 세포주에 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 처리한 실험군에서 p53 및 p16 발현에는 변화가 없는 반면, 베타-카테닌의 단백질 발현은 시간 의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다(도 2A 참조). 그러나 Hep3B 세포주에서는 베타-카테닌의 단백질 발현이 하향 조절되지 않았으며, 시간 경과에 따라 발현 수준이 변화되지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 2B 참조).
- [0043] 또한 본 발명의 하기 실험예 3에서는, 베타-카테닌 단백질 하향 조절이 단백질 활성의 억제로서 나타나는지를 더욱 자세히 규명하고자 인산화된 형태의 베타-카테닌의 단백질을 측정된 결과, Sk-Hep1 세포주에 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 처리한 실험군에서 phospho- β -catenin(Tyr 142) 발현은 감소되며 phospho- β -catenin(Ser 33/37) 발현은 증대되는 것으로 나타났다(도 3A 참조). 그러나 Hep3B 세포주에서는 상기과 같은 발

현 패턴이 관찰되지 않았다(도 3B 참조). 이러한 실험결과를 통해, 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물은 간암세포에서도 Sk-Hep1 세포에서만 특이적으로 베타-카테닌 발현을 억제할 수 있다고 판단되었다.

[0044] 또한 본 발명의 하기 실험에 4에서는, 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물이 베타-카테닌 신호 경로에 관여하는 다른 단백질들(E-cadherin[전이 억제 단백질], Axin1[종양 억제 단백질] 및 GSK-3 β [베타-카테닌 인산화 효소])에게도 영향을 미치는지를 살펴본 결과, Sk-Hep1 세포주에 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 처리한 실험군에서 베타-카테닌의 인산화 효소인 GSK-3 β 의 발현이 두드러지게 상향 조절되는 것을 확인할 수 있었다(도 4A 참조). 이와 같은 실험결과를 통해, 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물은 Sk-Hep1 세포에서 GSK-3 β 발현을 증대시키며, 증대된 GSK-3 β 효소가 베타-카테닌의 Ser 33/37 잔기를 인산화시키면 이를 인지한 여러 단백질에 의해 베타-카테닌이 polyubiquitination되고, 이렇게 polyubiquitination된 베타-카테닌이 프로테아좀에 의해 분해됨으로서, 종국에는 베타-카테닌 단백질이 하향 조절되는 것으로 판단되었다.

[0045] 또한 본 발명의 하기 실험에 5에서는, 본 발명 화학식 1의 신규 화합물의 유방암세포(MDA-MB-231)에서의 베타-카테닌 신호 경로에 미치는 영향을 살펴본 결과, 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 처리한 경우 베타-카테닌 및 p53 발현에는 변화가 없는 반면, 베타-카테닌의 결합 파트너인 이카드헤린(E-cadherin) 단백질의 발현이 상향 조절되는 것을 확인할 수 있었다(도 5 참조). 이와 같은 실험결과를 통해, 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물은 Sk-Hep1(간암) 세포에서는 GSK-3 β 발현의 상향 조절 및 베타-카테닌의 발현 차단으로 본 신호 경로에 영향을 미치며, MDA-MB-231(유방암) 세포에서는 E-cadherin의 발현을 상향 조절함으로써 본 신호 경로에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

[0046] 또한 본 발명의 하기 실험에 6에서는, 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물이 암세포에서 세포주기 증진을 유도할 수 있는지를 살펴본 결과, 대조군과 비교하여 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 처리한 실험군에서 G1기의 cell population이 높게 나타났으며, 특히 Hep3B 세포에서는 subG1기 및 G1기의 cell population이 본 발명의 화합물 처리에 따라 두드러지게 높아지는 것을 확인할 수 있었다(도 7 참조). 또한 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물 처리에 따라 Hep3B 세포에서의 p21 및 p27의 발현 수준이 두드러지게 상향 조절되는 반면, CDK2가 두드러지게 하향 조절되는 것을 확인할 수 있었다(도 8 참조). 이러한 실험 결과를 통해, Hep3B 세포에서의 성장 억제는 세포주기증진을 통해 이루어지는 것을 알 수 있었다.

[0047] 또한 본 발명의 하기 실험에 7에서는, 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물이 암세포의 침습을 억제할 수 있는지 살펴본 결과, 높은 침습성을 보이는 Sk-Hep1 및 MDA-MB-231 세포주에 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 농도별로 처리한 실험군에서 화합물 처리 농도에 의존적으로 암세포들의 침습성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다(도 9 참조). 또한 암 침습에서 기저막 분해에서 중요한 역할로 작용하는 MMP-2의 단백질 발현 수준을 웨스턴 블랏을 통해 살펴본 결과, Sk-Hep1 또는 MDA-MB-231 세포주에 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 처리하고 12시간이 경과하였을 때 MMP-2 발현이 두드러지게 감소된 것을 확인할 수 있었다(도 10 참조).

[0048] 상기와 같은 실험결과를 통해, 본 발명자들은 화학식 1의 신규 화합물이 암세포에만 특이적으로 세포독성을 보이며, 특히 높은 침습성을 갖는 암세포에서 wnt/ β -catenin 신호 방해 기작을 통해 암세포의 증식 및 침투를 억제할 수 있다는 사실을 실험적으로 입증하였다.

[0049] 그러므로 화학식 1의 신규 화합물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있으며, 특히 침습성이 강한 암의 치료에 효과적일 수 있다.

[0050] 본 발명의 조성물은 상기 화학식 1의 신규 화합물을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물로서 이러한 유효성분 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.

[0051] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0052] 상기 약제학적 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. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 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. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0053] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물은 조성물에 1 내지 1000 μ M의 농도로 포함될 수 있으며, 또한 본 발명의 화합물은 조성물 총 중량에 대하여 0.1 ~ 95중량%로 포함될 수 있다.

[0054] 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물은 하나 이상의 치료제와 조합하여 치료 유효량으로 투여될 수 있다(제약 조합물). 예를 들어, 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 화학요법제와 조합하여 사용하는 경우 상승작용 효과가 발생할 수 있다. 본 발명의 화합물을 다른 요법과 함께 투여하는 경우, 공동-투여된 화합물의 투여량은 물론 사용된 공동-약물의 유형, 사용된 구체적인 약물, 치료할 병태 등에 따라 달라질 것이다.

[0055] 또한, 본 발명은 암 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 상기 화학식 1의 신규 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기한 화학식 1의 신규 화합물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 암의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.

[0056] 또한, 본 발명은 포유동물에게 상기 화학식 1의 신규 화합물을 투여하는 것을 포함하는 암의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0057] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

[0058] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약제학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 화합물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.01mg/kg~250mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0059] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 화학식 1의 신규 화합물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명은 화학식 1의 신규 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0061] 본 발명의 건강기능식품은 암의 예방 및 개선을 목적으로, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0062] 본 발명에서 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0063] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0064] 상기 "식품 첨가물 공전"에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트

름제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.

[0065] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 화학식 1의 신규 화합물을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

[0066] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 상기 화학식 1의 신규 화합물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 상기 화학식 1의 신규 화합물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0067] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 상기 화학식 1의 신규 화합물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0068] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 상기 화학식 1의 신규 화합물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0069] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0070] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0071] <실시예>

[0072] 시약

[0073] 모든 용매 및 시약들은 상업적인 소스로부터 시약 등급을 사용하였으며, 별도의 정제과정을 거치지 않고 그대로 사용하였다. TLCon Silica Gel 60 F254 precoated plates를 수행하여 반응 과정 및 제조된 생산물들의 정제를 평가하였다. 녹는점은 Electrothermal-9100 (Shimadzu, Japan) 장치를 이용하여 측정 및 기록하였다. 핵자기 공명 스펙트럼 (^1H NMR, ^{13}C NMR)을 위하여 ^1H 는 400 MHz, 완전히 프로톤 분리된 ^{13}C 는 100.6 MHz에서 작동하는 JNM ECP-400 (JEOL, Japan) 장치를 이용하여 수행하였다. 이때, CDCl_3 을 용매로 사용하고 CDCl_3 의 경우에는 TMS를 내부표준물질로 기준하여 ppm 값을 표기하였다($\text{CDCl}_3, \delta = 7.26 \text{ ppm}$ for proton and 77.00 ppm for ^{13}C carbon NMR). 질량 스펙트럼은 JMS-700 (JEOL) instrument를 이용하여 측정하였으며, 실리카겔 (200-400 mesh-60)을 이용하여 최종 화합물들의 정제를 수행하였다.

[0074] 세포주 구입 및 세포배양

[0075] 모든 세포주들은 American Type Culture Collection(ATCC)로부터 구입하였다. 인간 HCC Sk-Hep1 및 Hep3B 세포들은 10% FBS가 포함된 MEM/EBSS에서 37°C , 5% CO_2 공기 하에서 배양하였다. 인간 유방암 MDA-MB-231 세포주 및 비종양성(non-cancerous) 인간 배아 신장 HEK293 세포주들은 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 37°C , 5% CO_2 공기 하에서 배양하였다. THLE-3 인간 정상 간 세포들은 10% FBS를 포함하는 BEBM 배지에서 37°C , CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 3가지 다른 화합물들의 stock solution(10ml)은 이들을 DMSO에 녹여서 준비하였다. 1×10^4 세포들을 포함하는 완전 배지 100 μl 를 96 웰(well) 세포 배양 마이크로타이타터판(microtiter plate)의 각각의 웰에 분주하였다. 상기 플레이트는 시험 전에 37°C 5% CO_2 인큐베이터에서 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 배지를 제거한 후, 다른 농도의 화합물을 포함하는 100 μl 의 새로운 배지를 각각의 웰에 첨가하고 37°C 에서 24시간 동안 인큐베이션시켰다. 인큐베이션 후, 10 μl 의 EZ-Cytox Cell Viability Assay Solution WST-1reagents (Daeil Lab Service, Korea)를 각각의 웰에 첨가한 다음 4시간 동안 추가로 인큐베이션시켰다. 460nm에서 흡광도는 마

이크로플레이트 리더(Molecular Devices)를 이용하여 측정하였다. IC₅₀은 DMSO로 처리된 세포에서 100% 생존율을 기준으로 세포 증식을 50% 억제시키는데 필요로 하는 농도로서 정의되었다.

통계

화합물 처리된 값과 비-처리된 그룹간의 통계적인 유효성은 GraphPad Prism 5.0로 결정되었다. 결과들은 3번의 독립적인 실험의 평균±표준편차로서 나타내었다. 데이터는 one-way analysis of variance를 이용하여 분석하였으며, 다양한 비교를 위해 turkey analysis를 수행하였다.

<실시예 1>

테트라하이드로피리디놀(tetrahydropyridinol) 유도체 화합물 제조

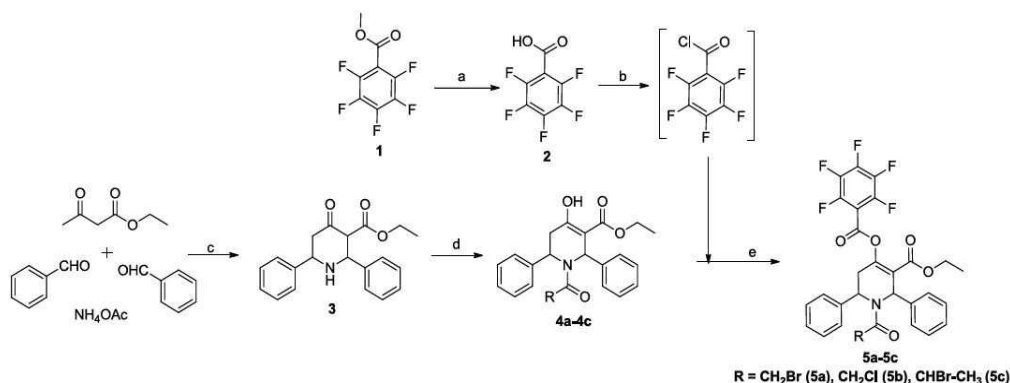
<1-1> 펜타플루오로벤조일 클로라이드(pentafluorobenzoyl chloride) 제조

산업적으로 이용 가능한 메틸펜타플루오로벤조에이트 (1)를 수산화나트륨(NaOH), 메탄올 및 물을 첨가하여 25℃에서 가수분해하여 산의 형태(2)의 화합물로 제조하였다. 상기 화합물(2) 0.005mol에 20ml의 티오닐 클로라이드(SOCl₂), 15ml의 드라이 톨루엔(dry toluene)을 첨가하고 6시간 동안 환류하였다. 그런 다음, 반응 혼합물을 식히고 진공에서 용매를 증발시켰으며, 톨루엔 10ml를 상기 반응 용액에 다시 첨가한 후 용매를 완전히 증발시켰다. 이렇게 수득한 잔여물은 드라이 디클로로메탄(Dichloromethane, DCM)에 녹여 본 발명의 목적 화합물 제조를 위해 사용하였다.

<1-2> 본 발명의 테트라하이드로피리디놀 유도체 화합물 제조

테트라하이드로피리디놀 유도체 화합물은 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 펜타플루오로벤조일 클로라이드(pentafluorobenzoyl chloride) 용액에 하기 반응식(4a, 4b, 4c 화합물(R기는 4a=CH₂Br, 4b=CH₂Cl, 4c=CHBrCH₃임)을 첨가하고 반응시켜 제조하였는데, 이때 상기 4a, 4b, 4c 화합물은 공지된 문헌에 기술된 방법으로 합성하여 사용하였다(G. Aridoss, S. Amirthaganesan, N. Ashok Kumar, J. T. Kim, K. T. Lim, S. Kabilan, Y. T. Jeong, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008, 18, 6542-6548; G. Aridoss, S. Amirthaganesan, Y. T. Jeong, Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010, 20, 2242-2249 참고). 보다 상세하게, 드라이 디클로로메탄 20ml에 상기 화합물 4a, 4b, 4c 각각을 0.005 mol로 녹인 후 0.015mol의 DMAP 또는 NEt₃를 첨가하여 교반하였다. 이러한 반응 혼합물에 상기 실시예 <1-1>을 통해 준비된 펜타플루오로벤조일 클로라이드(pentafluorobenzoyl chloride) 용액을 첨가하고 5시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응이 완료된 후 용매를 제거하고, 잔여물은 에틸아세테이트로 녹인 후 바이카보네이트, 물 및 브라인(brine)을 이용하여 순차적으로 세척하였다. 마지막으로 유기층은 Na₂SO₄로 건조하고, 증발을 통해 얻어진 잔사는 순수한 물질을 얻기 위해 컬럼(0.5:10 to 1:10, ethyl acetate:hexane)을 이용하여 본 발명의 테트라하이드로피리디놀 유도체 화합물을 정제하였다.

하기에서는 본 발명의 테트라하이드로피리디놀 유도체 화합물을 제조하기 위한 공정을 나타내었다.



상기 반응식에서, 각 단계의 반응은,

[0087] a: NaOH, MeOH, H₂O, 25℃에서 수행; b: SOCl₂, Dry toluene, reflux 수행; c: EtOH, heat, HCl, NH₃ 반응; d: RCOX(X = Br and Cl), NEt₃ or DMAP, Dry DCM, rt 반응; e: DMAP, dry DCM, rt 반응시켰다.

[0088] <1-3> 본 발명의 테트라하이드로피리디놀 유도체 화합물 동정

[0089] 상기 실시예 <1-2>를 통해 제조된 본 발명의 테트라하이드로피리디놀 유도체 화합물 5a, 5b 및 5c의 확인을 위해 핵자기 공명 스펙트럼을 수행하였다.

[0090] N-(Bromoacetyl)-3-carboxyethyl-2,6-diphenyl-4-O-(pentafluorobenzoyl)- Δ^3 -tetrahydropyridine (5a)

[0091] Yield: 65%, a semi solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.19-7.03 (m, 10H); 6.88 (bs, 1H), 5.51 (bs, 1H), 4.31 (d, J = 12.86 Hz, 1H), 4.16 (d [not resolved well], 1H), 4.05 (q, J = 7.05 Hz, 2H), 3.14 (dd, J = 17.84 Hz, J = 4.98 Hz, 1H), 2.98 (dd, J = 17.84 Hz, J = 6.22 Hz, 1H), 0.99 (t, J = 7.05 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 166.57, 162.42, 157.23, 152.79, 148.09 (m), 145.47 (m), 139.04 (m), 138.15, 138.02, 128.51-126.76 (phenyl carbons), 120.17, 103.13 (t, JC-F = 11.14), 61.18, 55.34, 53.82, 42.33, 33.20, 13.64; MS (ESI, positive) m/z calcd. for C₂₉H₂₁BrF₅NO₅ (M+H): 637.05; found 637.3.

[0092] N-(Chloroacetyl)-3-carboxyethyl-2,6-diphenyl-4-O-(pentafluorobenzoyl)- Δ^3 -tetrahydropyridine (5b)

[0093] Yield: 81%. White solid, mp 142-144℃. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.20-7.02 (m, 10H, phenyl protons); 6.95 (bs, 1H), 5.51 (bs, 1H), 4.31 (d, J = 12.86 Hz, 1H), 4.14 (d [not resolved well], 1H), 4.06 (q, J = 7.05 Hz, 2H), 3.14 (dd, J = 17.84 Hz, J = 5.39 Hz, 1H), 2.98 (dd, J = 17.43 Hz, J = 6.22 Hz, 1H), 0.99 (t, J = 7.05 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 166.62, 162.44, 157.24, 152.78, 148.13 (m), 145.40 (m), 139.06 (m), 138.19, 138.03, 128.53-126.72 (phenyl carbons), 120.20, 103.17 (t, JC-F = 11.19), 61.19, 55.27, 53.83, 42.32, 33.23, 13.65; MS (ESI, positive) m/z calcd. for C₂₉H₂₁ClF₅NO₅ (M+H): 593.1; found 593.3.

[0094] N-(2-Bromopropanoyl)-3-carboxyethyl-2,6-diphenyl-4-O-(pentafluorobenzoyl)- Δ^3 -tetrahydropyridine (5c)

[0095] Yield: 61%, a white solid, mp 140-141℃. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm: 7.19-7.03 (m, 10H), 6.98 (s, 1H), 5.51 (s, 1H), 4.65 (q [not resolved well], 1H), 4.02 (q [not resolved well], 2H), 3.15 (s, 2H), 1.87 (d, J = 6.22 Hz, 3H), 0.96 (t, J = 7.05 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ ppm: 169.13, 162.40, 157.29, 152.24, 148.06 (m), 145.60 (m), 139.08 (m), 138.54, 138.43, 128.64-126.26 (phenyl carbons), 119.97, 103.31 (t, JC-F = 11.15), 61.07, 55.07, 53.11, 39.10, 32.50, 22.01, 13.62; MS (ESI, positive) m/z calcd. for C₃₀H₂₃BrF₅NO₅ (M+H): 651.07; found 651.1.

[0096] <실시예 1>

[0097] 본 발명 화합물의 암세포주에 대한 항증식 활성(in vitro) 분석

[0098] 상기 실시예를 통해 제조된 본 발명의 화합물 5a, 5b, 5c의 암세포주에 대한 세포독성을 평가하기 위하여 인간 배아 신장 HEK293 세포, 정상 인간 간세포 THLE-3, 인간 HCC(Sk-Hep1 및 Hep3B) 및 인간 유방암 MDA-MB-231 세포주를 이용하여 Cell viability assay를 실시하였다.

[0099] 먼저 HEK293, THLE-3, Sk-Hep1, Hep3B 및 MDA-MB-231 세포 각각을 1×10⁴ cells 밀도로 100 μ l 배지에 재현탁

시켜 96-웰 플레이트 분주한 후 24시간 인큐베이션시켰다. 그런 다음 다양한 농도의 본 발명의 화합물 5a, 5b, 5c를 개별적으로 상기 세포에 처리하여 24시간 동안 배양한 후 새 배지로 교환 한 뒤, 10 μ l의 WST-1 용액을 첨가하여 5시간 동안 반응시켰다. 반응 흡광도는 ELISA reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 460nm에서 측정하였다. 결과는 3번의 독립적인 실험을 통해 평균±표준편차로 나타내었다.

[0100] 그 결과는 도 1에서 나타내었다. 도1A 및 1B는 본 발명의 화합물 5a 및 5b에서 HEK293, THLE-3 및 Sk-Hep1 세포들의 생존율을 비교한 것이다. 비록 두 개의 화합물 모두 농도 의존적으로 세포독성을 나타냈지만, 5b는 Sk-Hep1 세포에서 5a 보다 더욱 두드러지게 높은 세포독성을 보여주었다. 반면에, 두 개의 화합물 모두 비-종양성 세포주인 HEK293 및 THLE-3 세포에서는 매우 낮은 세포독성을 나타내었다. 5a 및 5b 화합물의 IC₅₀ 농도는 각각 Sk-Hep1 세포에서 12 μ M 및 6 μ M이었다. 또한 5a 화합물의 Hep3B 및 MDA-MB-231 세포에서의 세포독성을 측정한 결과, 도 1C에서 나타난 바와 같이 5a 화합물 처리 농도에 의존적으로 두 세포주 모두 증식이 억제되는 것으로 나타났다. 5a 화합물의 Hep3B 및 DA-MB-231 세포주에서 IC₅₀ 농도는 각각 24 μ M 및 48 μ M이었다. 유사하게 본 발명의 화합물 5b 또한 농도 의존적으로 Hep3B 및 MDA-MB-231 세포의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 5b 화합물의 Hep3B 및 DA-MB-231 세포주에서 IC₅₀ 농도는 각각 11 μ M 및 20 μ M이었다.

[0101] 반면에, 도 1E에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 5c 화합물은 상기 3가지 세포주(Sk-Hep1, Hep3B, MDA-MB-231) 모두에서 세포독성을 거의 나타내지는 못하였다.

[0102] 이러한 결과를 통해 본 발명의 화합물 중 5a 및 5b가 간암 및 유방암 세포들의 증식을 억제할 수 있으며, 5c의 경우에는 암세포에 대한 세포독성이 미약함을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명의 화합물 중 5a 및 5b가 항암 활성이 있다고 판단하였는바, 하기 실험에서는 본 발명의 화합물 5a 및 5b를 이용하여 추가적인 실험을 수행하였다.

표 1

[0103] 각각의 암세포주에 대한 본 발명의 화합물 5a, 5b의 IC₅₀ 농도

암세포주	IC50 (5a)	IC50 (5b)
Sk-Hep1	12 μ M	6 μ M
Hep3B	24 μ M	11 μ M
MDA-MB-231	48 μ M	20 μ M

[0104] <실험예 2>

[0105] 본 발명 화합물(5a, 5b)의 간암세포에서의 종양 억제 단백질 또는 암유전자 발현에 미치는 영향

[0106] 상기 실험예 1을 통해 본 발명의 화합물 중 5a 및 5b가 간암 및 유방암 세포주에 대해 세포증식 억제 활성이 있다고 확인하였는바, 본 실험에서는 이러한 암세포 증식 억제 활성이 종양 억제 단백질(p53, p16)의 상향 조절 또는 암유전자(베타-카테닌: β -catenin)의 하향조절에 기인하는지 웨스턴 블랏을 통해 살펴보았다.

[0107] 본 실험을 위해서 먼저 간암세포주인 Sk-Hep1 및 Hep3B 세포에 본 발명의 화합물 5a 및 5b 각각을 IC₅₀ 농도(표 1 참조)로 3, 6, 12시간 처리한 다음 수집하여 원심분리하고 차가운 PBS 버퍼로 2번 세척하였다. 상기 과정을 통해 수득한 펠렛은 용해버퍼[50 mMTris-Cl (pH 7.5), 150 mMNaCl, 1 mM DTT, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100, 1% Deoxycholate, 0.1% SDS 및 단백질 억제제 콕테일(Intron biotechnology, Korea)] 로 재현탁하였다. 세포들을 1시간 동안 차가운 용해버퍼로 용해시킨 후 14,000rpm에서 20분 동안 원심분리하여 불용성 물질을 제거하고 단백질 용해물을 수집하였다. 12% SDS-PAGE에 동량의 단백질을 녹여 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 이동시켰다 (PALL life science). 멤브레인은 5% 스킵 밀크를 함유하는 PBST 버퍼로 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 상기 멤브레인을 p53, p16, β -catenin, GAPDH(Cell Signaling Technology)에 대한 1차 항체로 4℃에서 밤새도록 반응시킨 후 HRP-컨쥬게이트 2차 항체(cell Signal Technology)로 1시간 동안 반응시켰다. 모든 멤브레인들은 WESTSAVETM Gold ECL (Ab Frontier)로 가시화되었으며 Hyperfilm (GE Healthcare)에 노출되었다. 대조군으로서 GAPDH를 이용하였다.

[0108] 그 결과 도 2A에서 나타난 바와 같이, Sk-Hep1 세포주에 본 발명의 화합물(5a 또는 5b)을 처리한 실험군에서

p53 및 p16의 발현에는 변화가 없는 반면, 베타-카테닌의 단백질 발현은 시간 의존적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 본 발명의 화합물(5a 또는 5b) 처리 후 12시간이 경과한 시점에서 베타-카테닌의 단백질 발현은 완전히 억제되는 것으로 나타났다.

[0109] 한편, 도 2B에서 나타난 바와 같이, Hep3B 세포주에 본 발명의 화합물(5a 또는 5b)을 처리한 실험군에서는 베타-카테닌의 단백질 발현이 하향 조절되지 않았으며, 시간 경과에 따라 발현 수준이 변화되지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0110] <실험예 3>

[0111] 본 발명 화합물(5a, 5b)의 간암세포에서의 베타-카테닌 발현 조절

[0112] 상기 실험예 2를 통해 본 발명의 화합물(5a 또는 5b)이 암유전자로 알려진 베타-카테닌의 단백질 하향 조절을 통해 Sk-Hep1 세포증식 억제 활성이 있다고 확인하였는바, 본 실험에서는 베타-카테닌 단백질 하향 조절이 단백질 활성의 억제로서 나타나는지를 더욱 자세히 규명하고자 인산화된 형태의 베타-카테닌의 단백질 측정을 통해 알아보았다.

[0113] 인산화된 형태의 베타-카테닌의 단백질 측정은 웨스턴 블랏을 이용하였다. 본 실험을 위해 세포들을 (1) 대조군(DMSO), (2) DCA(5 μ M) 단독 처리군, (3) DCA(5 μ M) 및 본 발명의 화합물 5a 처리군, (4) DCA(5 μ M) 및 본 발명의 화합물 5b 처리군으로 나누었다. 이때 DCA와 본 발명의 화합물 병용 처리군은 DCA를 30분 동안 처리한 후 본 발명의 화합물에 12시간 노출시켰다. 이렇게 준비된 세포들은 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 웨스턴 블랏을 수행하였으며, 다만 1차 항체로 항-phospho-베타-카테닌(Ser 33/37) 및 항-phospho-베타-카테닌(Tyr 142)을 사용하였다. 참고로 DCA(deoxycholic acid)는 베타-카테닌의 인산화를 활성화시킬 수 있는 물질이다.

[0114] 그 결과 3A에서 나타난 바와 같이, Sk-Hep1 세포에 DCA(5 μ M)를 단독으로 처리한 실험군에서는 phospho- β -catenin(Tyr 142)의 발현이 증대되었으며, DCA와 본 발명의 화합물(5a 또는 5b)을 병용 처리한 실험군에서는 phospho- β -catenin(Tyr 142) 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 반면에, phospho- β -catenin(Ser 33/37) 발현은 상기 결과와는 대조적으로, DCA 단독 처리군과 비교하여 DCA와 본 발명의 화합물(5a 또는 5b)을 병용 처리한 실험군에서 발현이 증대되는 것을 확인할 수 있었다.

[0115] 한편 Hep3B 세포주에서는 상기와 같은 발현 패턴이 관찰되지 않았다(도 3B 참조).

[0116] 베타-카테닌의 Ser 33/37 잔기에서의 인산화는 유비퀴틴-프로테오솜 복합체에 의한 베타-카테닌 분해의 타겟으로 작용하는 반면, 베타-카테닌의 Tyr142 잔기에서의 인산화는 베타-카테닌과 함께 axin-APC 복합체의 병합을 억제하는 기능을 한다. 따라서 베타-카테닌의 Ser 33/37 잔기 인산화가 증대되는 경우 베타-카테닌 분해를 촉진할 수 있으며, 베타-카테닌의 Tyr142 잔기 인산화가 증대되는 경우 베타-카테닌의 세포질에서의 축적 및 핵 내로의 유입으로 사이클린 D1 및 c-myc과 같은 발암 유전자의 전사 개시를 촉진시키게 된다.

[0117] 상기와 같은 실험결과를 통해, 본 발명의 화합물 5a 및 5b가 간암세포에서도 Sk-Hep1 세포에서만 특이적으로 베타-카테닌 발현을 억제할 수 있다고 판단되었다.

[0118] <실험예 4>

[0119] 본 발명 화합물(5a, 5b)의 간암세포에서의 베타-카테닌 신호에 미치는 영향

[0120] 상기 실험예 2에서는 본 발명의 화합물(5a 또는 5b)이 단지 베타-카테닌의 단백질 발현 억제 활성이 있음을 확인하였는바, 본 실험에서는 본 발명의 상기 화합물들이 베타-카테닌 신호 경로에 관여하는 다른 단백질들(E-cadherin[전이 억제 단백질], Axin1[종양 억제 단백질] 및 GSK-3 β [베타-카테닌 인산화 효소])에게도 영향을 미치는지를 살펴보았다.

[0121] E-cadherin, Axin1 및 GSK-3 β 단백질 측정은 웨스턴 블랏을 이용하였다. 본 실험을 위해 세포들을 상기 실험예 3과 동일하게 (1) 대조군(DMSO), (2) DCA(5 μ M) 단독 처리군, (3) DCA(5 μ M) 및 본 발명의 화합물 5a 처리군, (4) DCA(5 μ M) 및 본 발명의 화합물 5b 처리군으로 나누었다. 이때 DCA와 본 발명의 화합물 병용 처리군은 DCA를 30분 동안 처리한 후 본 발명의 화합물에 12시간 노출시켰다. 이렇게 준비된 세포들은 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 웨스턴 블랏을 수행하였으며, 다만 1차 항체로 항-E-cadherin, 항-Axin, 항-GSK-3 β 를 사용하였다.

- [0122] 그 결과 도 4A에서 나타낸 바와 같이, Sk-Hep1 세포에서 DMSO를 처리한 대조군은 E-cadherin 및 Axin1의 매우 낮은 단백질 발현을 보였으며, 본 발명의 화합물 처리에 따라 발현의 변화가 나타나지 않았다. 반면에, DCA(5 μ M)와 함께 본 발명의 화합물들을 병용 처리한 실험군에서 GSK-3 β 의 발현이 두드러지게 상향 조절되는 것을 확인할 수 있었다. 한편 Hep3B 세포주에서는 상기와 같은 발현 패턴이 관찰되지 않았다(도 4B 참조).
- [0123] 상기와 같은 결과를 통해, 본 발명의 화합물 5a 및 5b는 Sk-Hep1 세포에서 GSK-3 β 발현을 증대시키며, 증대된 GSK-3 β 효소가 베타-카테닌의 Ser 33/37 잔기를 인산화시키면서 이를 인지한 여러 단백질에 의해 베타-카테닌이 다중유비퀴틴화(polyubiquitination)되고, 이렇게 다중 유비퀴틴화된 베타-카테닌이 프로테아좀에 의해 인지되어 분해됨으로서, 종국에는 베타-카테닌 단백질이 하향 조절되는 것으로 판단되었다.
- [0124] <실험예 5>
- [0125] 본 발명 화합물(5a, 5b)의 유방암세포에서의 베타-카테닌 단백질 발현 및 베타-카테닌 신호 경로에 미치는 영향
- [0126] 상기 실험예 2 내지 4에서는 본 발명 화합물(5a 또는 5b)이 간암세포에서 베타-카테닌 단백질을 하향 조절하며, 베타-카테닌 신호 경로에 관련된 단백질들의 발현에 영향을 주는 것을 확인하였는바, 본 실험에서는 상기와 같은 결과를 더욱 확실히 증명하기 위하여, 높은 침습성을 가진 유방암 세포주 MDA-MB-231을 이용하여 동일한 실험을 진행하였다.
- [0127] 먼저, MDA-MB-231 세포들을 본 발명의 화합물 5a 또는 5b에 노출시킨 후 베타-카테닌 및 p53에 대한 웨스턴 블랏을 수행하였다. 그 결과 도 5A에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 화합물(5a 또는 5b) 처리에 따라 베타-카테닌 및 p53 발현에 있어서 변화가 나타나지 않았다.
- [0128] 또한 MDA-MB-231 세포에 본 발명의 화합물 처리에 따른 베타-카테닌의 결합 파트너인 E-cadherin 및 GSK-3 β 의 발현을 확인하였으며, 그 결과는 도 5B에서 나타내었다. 본 발명의 화합물 5a 및 5b 모두 E-cadherin의 발현을 상향 조절하는 것을 확인할 수 있었으나, GSK-3 β 에는 영향을 주지 못하는 것을 알 수 있었다.
- [0129] 결론적으로, 본 발명의 화합물 5a 및 5b는 wnt/ β -cartenin 신호 경로에서 다른 기작으로 작용하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, Sk-Hep1 세포에서는 GSK-3 β 발현의 상향 조절 및 베타-카테닌의 발현 차단으로 본 신호 경로에 영향을 미치며, MDA-MB-231 세포에서는 E-cadherin의 발현을 상향 조절함으로써 본 신호 경로에 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.
- [0130] <실험예 6>
- [0131] 본 발명 화합물(5a, 5b)의 암세포에서 세포주기 중지 유도
- [0132] <6-1> 베타-카테닌의 목적 유전자 발현 조절
- [0133] 본 실험에서는 화합물 5a 및 5b가 베타-카테닌의 목적 유전자인 사이클린 D1과 c-myc의 발현을 조절하는지를 알아보기 위하여, Sk-Hep1, Hep3B 및 MDA-MB-231 세포들로부터 발현되는 단백질들의 웨스턴 블랏팅을 수행하였다.
- [0134] 본 실험을 위해 세포들을 상기 실험예 3과 동일하게 (1) 대조군(DMSO), (2) DCA(5 μ M) 단독 처리군, (3) DCA(5 μ M) 및 본 발명의 화합물 5a 처리군, (4) DCA(5 μ M) 및 본 발명의 화합물 5b 처리군으로 나누었다. 이때 DCA 및 본 발명의 화합물 병용 처리군은 DCA를 30분 동안 처리한 후 본 발명의 화합물에 12시간 노출시켰다. 이렇게 준비된 세포들은 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 웨스턴 블랏을 수행하였으며, 다만 1차 항체로 항-cyclin D1, 항-c-myc, 항-GSK-3 β 를 사용하였다.
- [0135] 그 결과 도 6에서 나타낸 바와 같이, Sk-Hep1 및 MDA-MB-231 세포주를 대상으로 DCA(5 μ M)과 함께 본 발명의 화합물(5a, 5b)을 병용 처리한 실험군에서 사이클린 D1 및 c-myc의 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 Hep3B 세포에서는 이러한 베타-카테닌 목적 단백질들의 발현이 변화되지 않는 것으로 나타났다.

- [0136] <6-2> 세포주기중지 유도
- [0137] 본 실험에서는 화합물 5a 및 5b가 세포주기중지를 유도할 수 있는지 여부를 살펴보았으며, 이는 유세포분석기를 이용한 세포주기 집단(cell cycle population) 변화의 측정을 통해 평가되었다.
- [0138] Sk-Hep1, Hep3B 및 MDA-MB-231 각각의 세포주에 본 발명의 화합물 5a 및 5b를 처리(Sk-Hep1: 5a-12 μ M, 5b-6 μ M; Hep3B: 5a-24 μ M, 5b-11 μ M; MDA-MB-231: 5a-48 μ M, 5b-20 μ M)하여 12시간 반응시켰다. 상기 세포에 트립신을 처리한 다음, 원심분리를 통해 세포 수집 후 4℃에서 70% 에탄올을 이용하여 밤새 고정하였다. 그 후, 상기 세포들은 0.2mg/ml RNase A 및 0 μ g/ml의 프로피디움 요오드화물(Propidium iodide, PI)을 포함하는 PBS 버퍼로 재현탁하였다. 상기 과정을 거친 세포들은 암실에서 30분 동안 유지하였다. 세포주기분포는 FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson)를 이용하여 분석하였다.
- [0139] 그 결과 도 7에서 나타낸 바와 같이, G1기의 세포 집단(cell population)의 퍼센트는 무처리된 대조군과 비교했을 때 본 발명의 화합물을 처리한 모든 실험군에서 높게 나타났다. 특히, Hep3B 세포에서는 subG1기 및 G1기의 세포 집단의 퍼센트가 본 발명의 화합물 처리에 따라 두드러지게 높아지는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 통해, Sk-Hep1 또는 MDA-MB-231 세포주에서의 세포 성장 억제는 wnt/ β -catenin 신호 경로에 의해 매개되는 반면, Hep3B 세포에서의 성장 억제는 세포주기중지를 통해 이루어지는 것이라 확신하였다.
- [0140] <6-3> 세포주기조절 단백질의 발현 조절
- [0141] 상기 실험에 <6-2>에서는 본 발명의 화합물 5a 및 5b가 Hep3B 세포에서 세포주기중지를 유도할 수 있음을 확인하였는바, 본 실험에서는 Hep3B 세포에 본 발명의 화합물(5a, 5b) 처리에 따른 세포주기조절 단백질들인 p21, p27, cdk2 단백질 발현 변화를 좀 더 살펴보았다.
- [0142] 이를 위해, Hep3B 세포에 본 발명의 화합물 5a 또는 5b 각각을 IC₅₀ 농도(표 1 참조)로 3, 6, 12시간 처리한 후 준비된 세포들은 상기 실험에 2와 동일한 방법으로 웨스턴 블랏을 수행하였으며, 다만 1차 항체로 항-CDK2, 항-p21, 항-p27을 사용하였다.
- [0143] 그 결과 도 8에서 나타낸 바와 같이, 본 발명의 화합물 처리에 따라 Hep3B 세포에서의 p21 및 p27의 발현 수준이 두드러지게 상향 조절되는 반면, CDK2가 두드러지게 하향 조절되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0144] 참고로, 포유동물세포에서 사이클린 D, E 및 A는 세포주기의 G1기 동안 연속적으로 합성된다. 이러한 사이클린들의 주요 촉매 파트너는 CDK2 및 CDK4이다. 이러한 CDKs는 p21, p27 및 p53과 같은 CDK-억제자들에 의해 음성적으로 조절되는 것으로 알려져 있다.
- [0145] 결론적으로, 본 발명의 화합물(5a, 5b)은 CDK2 발현의 하향 조절 및 p21 및 p27의 발현 유도를 통해 Hep3B 세포의 성장을 억제할 수 있다고 판단되었다.
- [0146] <실험예 7>
- [0147] **본 발명 화합물(5a, 5b)의 암세포의 침습 억제 효과**
- [0148] <7-1> 세포 침습 에세이(cell invasive assay)
- [0149] 상기 실험예 1 내지 6을 통해 화합물 5a, 5b는 간암 및 유방암 세포의 증식을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였으며, 특히 이러한 특성은 침습성이 높은 세포주(Sk-Hep1 및 MDA-MB-231)에서 더욱 두드러지게 나타났다. 따라서 본 실험에서는, 화합물 5a, 5b가 침습성이 높은 Sk-Hep1 및 MDA-MB-231 세포주에서 암세포의 침습을 억제할 수 있는지를 matrigel invasive assay를 통해 평가하였다.
- [0150] 세포 침습 에세이(cell invasive assay)는 8 μ m 홀 사이즈의 6.5mm 폴리비닐/피롤리돈-프리 폴리카보네이트 필터를 가진 matrigel 코팅된 트랜스웰 챔버(Corning life sciences)를 이용하여 이전에 묘사된 방법으로 수행되었다(W.-C. Hung, H.-C. Chang, J. Agr. Food Chem. 2008, 57, 76-82.). 간략하게, 100 μ l의 시림 프리 배지가 함유된 상층 트랜스웰 챔버에 5×10^4 세포(Sk-Hep1, Hep3B 또는 MDA-MB-231)를 본 발명의 화합물(5a 또는 5b)과 함께 현탁시킨 후 37℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 그 다음, 상기 필터의 상층 표면에 놓인 세포들은 cotton

swab으로 완전히 닦고, 필터의 아래층은 크리스탈 바이올렛으로 염색된 4% 포르말데하이드로 고정하였다. 염색 후 아래 표면 세포들은 2% SDS 로 1시간 동안 용해시킨 후 그 용해물을 570nm에서 마이크로플레이트 리더를 이용하여 측정하였다.

[0151] 그 결과 도 9에서 나타난 바와 같이, Sk-Hep1 및 MDA-MB-231 세포에 본 발명의 화합물 5a 또는 5b를 농도별로 처리한 실험군에서 화합물 처리 농도에 의존적으로 Sk-Hep1 및 MDA-MB-231 세포들의 침습성이 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, 반면에 Hep3B 세포주에는 본 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

[0152] <7-2> MMP-2 발현 억제 효과

[0153] 본 실험에서는 암세포의 침습 과정에 수반되는 것으로 알려진 MMP-2 단백질의 발현 변화를 웨스턴 블랏으로 살펴보았다. MMP-2를 포함하는 MMPs의 발현은 암 침습에서 기저막 분해에서 중요한 역할로 작용하는 것으로 알려져 있으며, 암 전이와 관련되어있다.

[0154] 이를 위해, Sk-Hep1 또는 MDA-MB-231 세포에 본 발명의 화합물 5a 또는 5b 각각을 IC₅₀ 농도로 3, 6, 12시간 처리한 후 준비된 세포들은 상기 실험에 2와 동일한 방법으로 웨스턴 블랏을 수행하였으며, 다만 1차 항체로 항-MMP-2을 사용하였다.

[0155] 그 결과 도 10에서 나타난 바와 같이, Sk-Hep1 또는 MDA-MB-231 세포주에 본 발명의 화합물 각각의 처리하고 12시간이 경과하였을 때 MMP-2 발현이 두드러지게 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0156] 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명의 화합물 5a 및 5b는 침습성이 높은 세포주(Sk-Hep1, MDA-MB-231)에 세포 증식(성장) 억제활성과 더불어 침습 억제 활성도 가지므로, 침습성이 강한 암세포에 대하여 항암 소재로서 유용하게 사용될 수 있다고 판단되었다.

[0157] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

부호의 설명

[0158] HCC: hepatocellular carcinoma

EMEM: Eagle's minimal essential medium

BEBM: bronchial epithelial cell basal medium

PBS: phosphate-buffered saline

DCA: deoxycholic acid

DMSO: Dimethyl sulfoxide

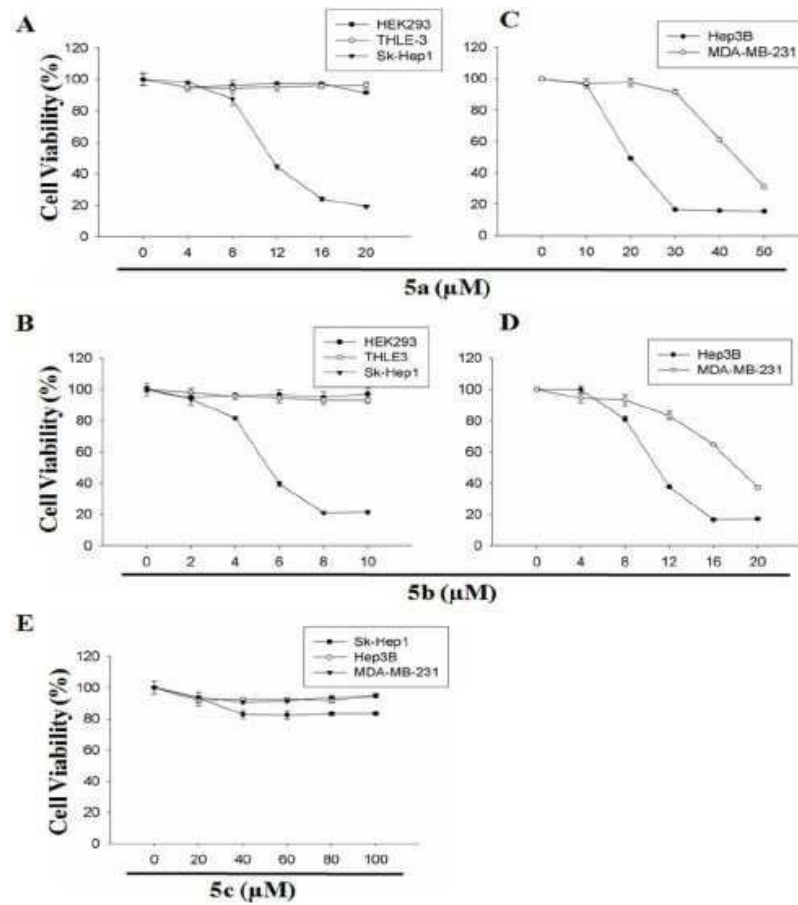
BSA: bovine serum albumin

CDK2: cyclin-dependent kinase 2

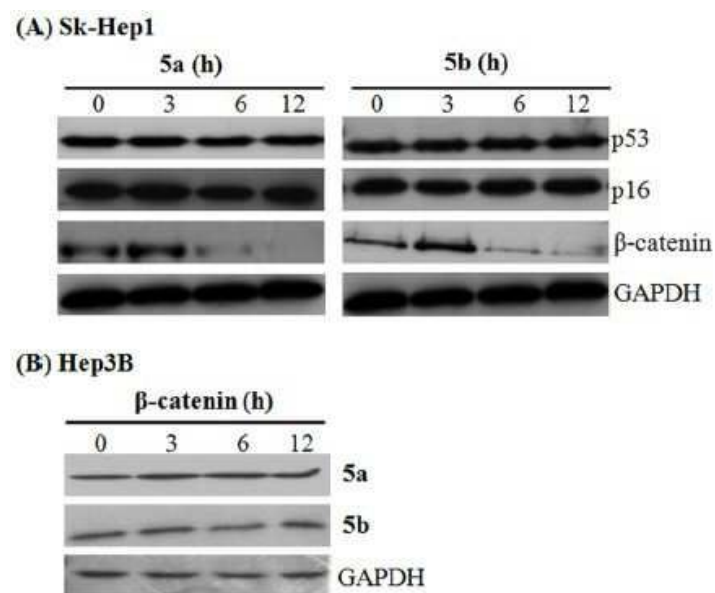
WST-1: 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt

도면

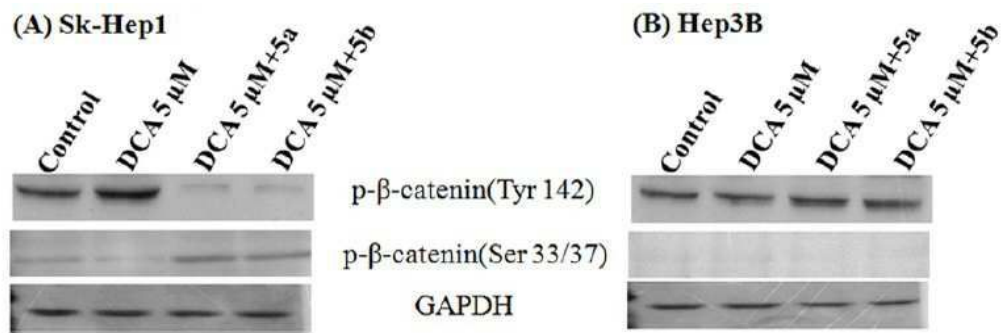
도면1



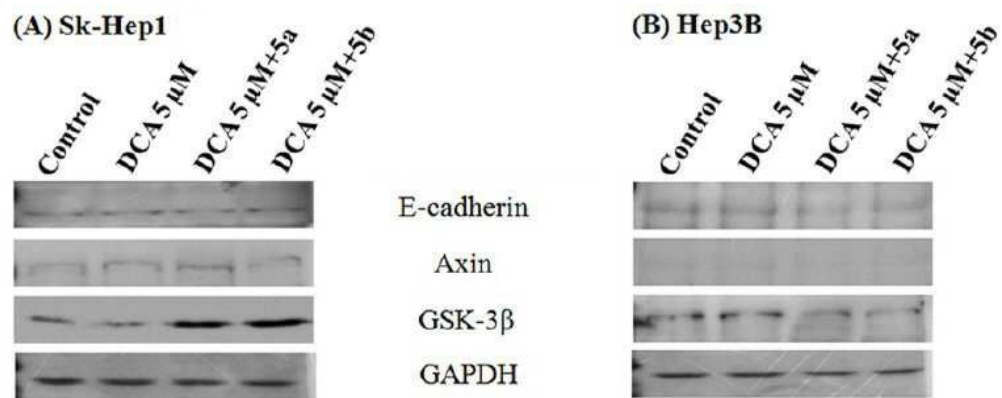
도면2



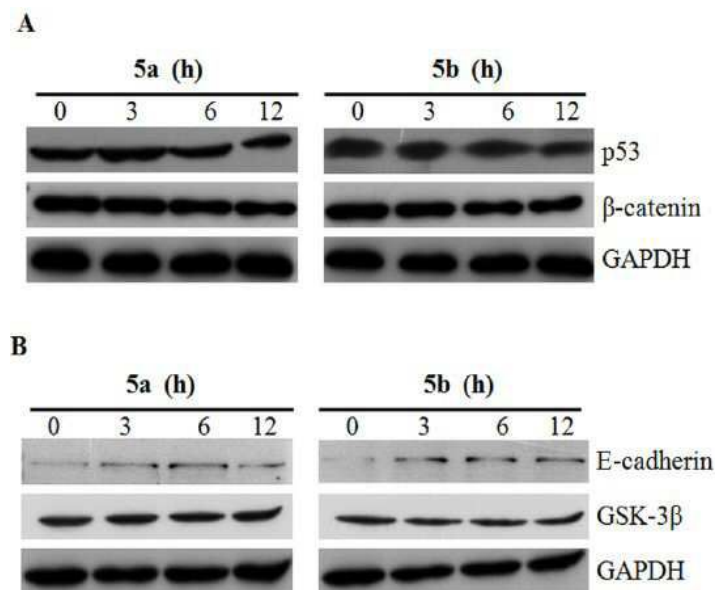
도면3



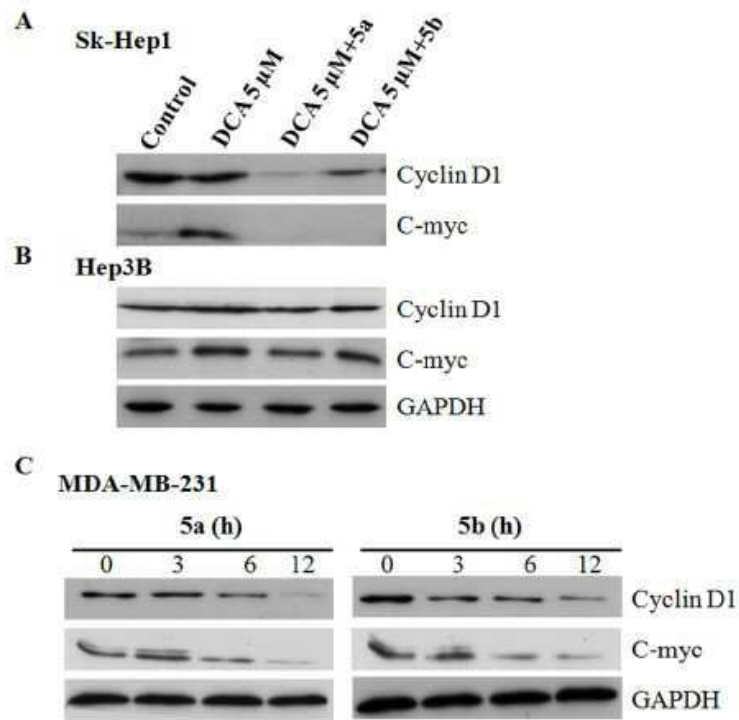
도면4



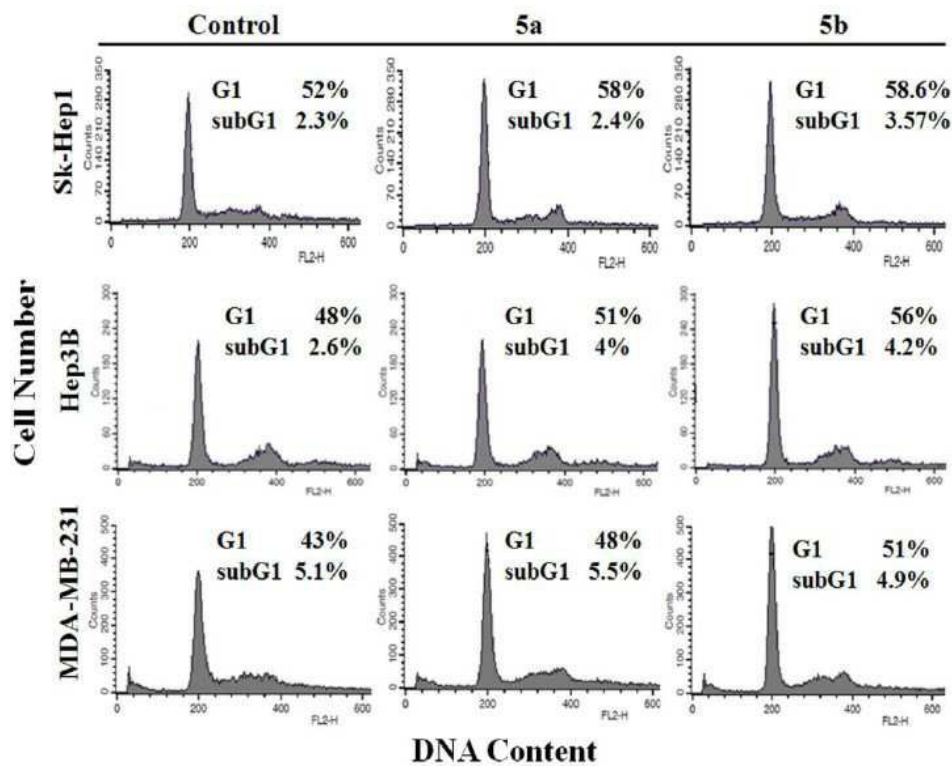
도면5



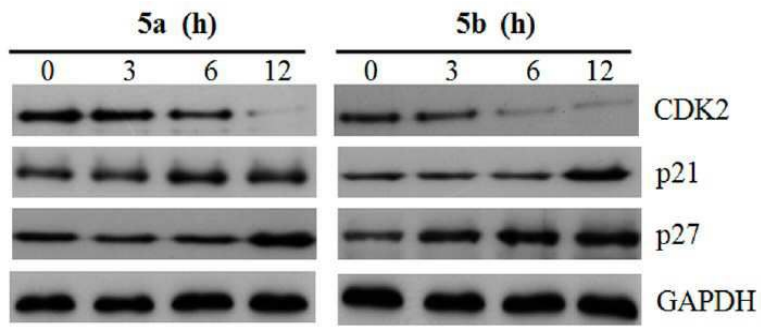
도면6



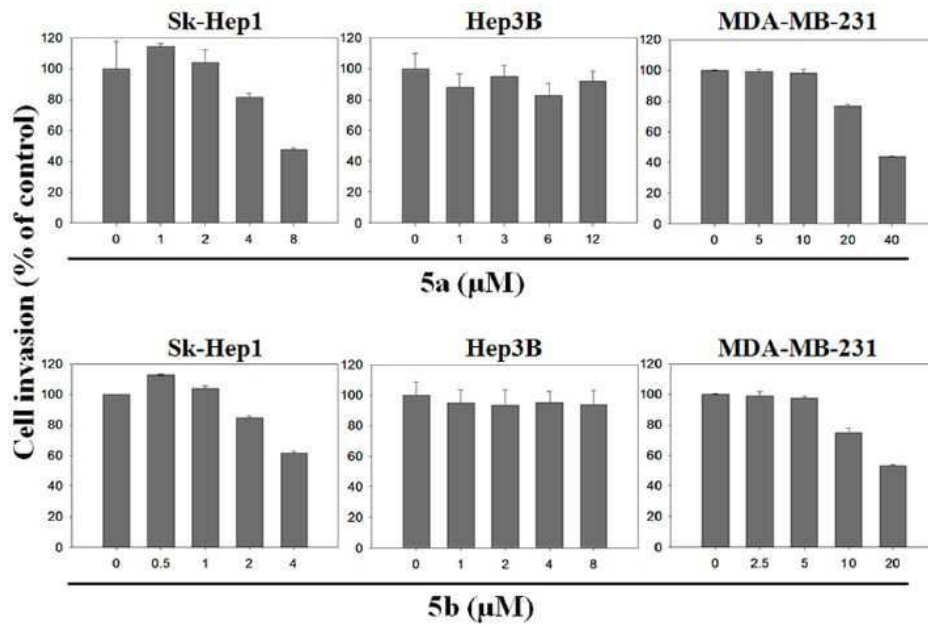
도면7



도면8



도면9



도면10

