



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0033689
(43) 공개일자 2022년03월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 235/46 (2006.01) A61K 31/167 (2006.01)
C07C 235/50 (2006.01) C12N 9/80 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07C 235/46 (2013.01)
A61K 31/167 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0115858
(22) 출원일자 2020년09월10일
심사청구일자 2020년09월10일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
서영호
대구광역시 수성구 청수로 261, 1410동 1301호(황
금동, 캐슬골드파크 4단지)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 9 항

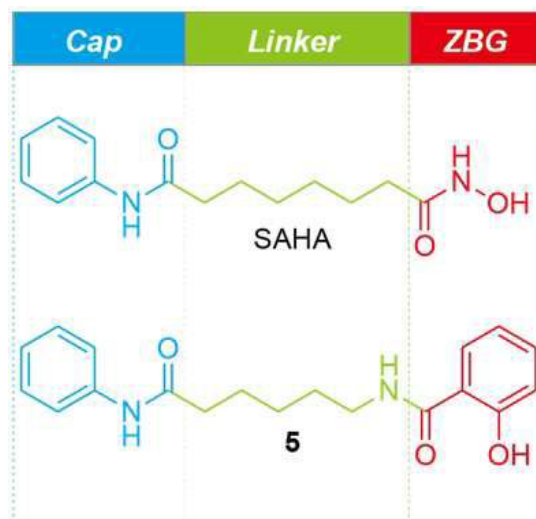
(54) 발명의 명칭 히스톤 탈아세틸화효소 억제 활성을 갖는 신규 화합물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 히스톤 탈아세틸화효소 억제 활성을 갖는 신규 화합물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 신규의 아연 결합기를 가진 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염, 이를 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물, 및 히스톤 탈아세틸화효소(HDAC) 억제제 등을 제공한다.

본 발명에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 신규의 아연 결합기를 가짐으로써, 히스톤 탈아세틸화효소를 억제함과 동시에 기존 약물에 비해 약물동력학적(PK) 성질이 개선되어 약물의 흡수, 분포, 대사 등이 개선될 수 있으며, 이를 이용하여 암 질환과 같이 HDAC와 관련된 질환들을 보다 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07C 235/50 (2013.01)

C12N 9/80 (2013.01)

C12Y 305/01098 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345311903
과제번호	2016R1A6A1A03011325
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명	약학연구소 - 약물의존장애 핵심 진단기술 개발 및 치료전략 연구
기 여 율	50/100
과제수행기관명	계명대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345315105
과제번호	2016R1D1A1B01009559
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	여성생식기 암 치료를 위한 저분자 화합물 설계 및 합성 연구
기 여 율	50/100
과제수행기관명	계명대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

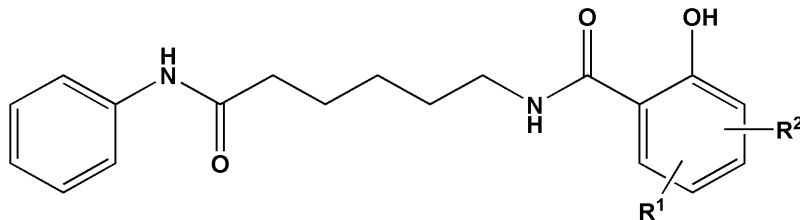
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

<화학식 1>



상기 식에서,

R^1 및 R^2 는 각각 동일하거나 다를 수 있고, 수소, 할로젠, 니트로, (C1~C4)알킬, 또는 (C1~C4)알콕시에서 선택됨.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 염은,

2-하이드록시-N-(6-옥소-6-(페닐아미노)헥실)벤즈아미드 [2-Hydroxy-N-(6-oxo-6-(phenylamino)hexyl)benzamide]인 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 염은,

히스톤 탈아세틸화효소(histone deacetylases, HDACs)의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 암 질환은,

유방암, 삼중음성유방암, 위암, 결장암, 폐암, 비소세포성 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 히스톤 탈아세틸화효소(HDAC) 억제제.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 히스톤 탈아세틸화효소는,

HDAC1, HDAC2, HDAC3, 및 HDAC8로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 클래스(class) I HDAC 인 것을 특징으로 하는 히스톤 탈아세틸화효소 억제제.

청구항 8

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 히스톤 탈아세틸화효소(HDAC) 활성 억제용 시약 조성물.

청구항 9

개체로부터 분리된 세포에 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하는 단계를 포함하는 히스톤 탈아세틸화효소(HDAC) 활성 억제 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 히스톤 탈아세틸화효소 억제 활성을 갖는 신규 화합물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 신규의 아연 결합기를 가진 HDAC 억제제 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 리신 아세틸화(lysine acetylation)는 히스톤 탈아세틸화효소(histone deacetylases, HDACs) 및 이에 대응하는 히스톤 아세틸전달효소(histone acetyltransferases, HATs)에 의해 조절되는 가역적인 번역 후 변형(post-translational modification)이다. 이 번역 후 변형은 유전자 전사 및 단백질 기능을 조절하는 데 중요한 역할을 한다.

[0003] 히스톤 탈아세틸화효소(HDACs)는 히스톤 및 비히스톤 단백질의 ϵ -N-아세틸-리신(ϵ -N-acetyl-lysine)의 측쇄로부터 아세틸 그룹의 절단을 촉매하기 위해 아연 이온(Zn^{2+})을 필요로 한다. 아연 의존성 HDACs는 클래스 I (HDAC 1, 2, 3, 및 8), 클래스 IIa (HDAC 4, 5, 7, 및 9), 클래스 IIb (HDAC6 및 10), 및 클래스 IV (HDAC11)의 4가지 클래스로 나뉜다.

[0004] 지난 10년 동안, HDACs는 암 및 중추신경계(CNS) 질환 등 광범위한 적응증을 가진 중요한 약물 타겟으로 부상하였다. 현재까지 5개의 HDAC 억제제가 전 세계적으로 승인되었다(도 1). 보리노스탯(Vorinostat, SAHA), 로미덱신(Romidepsin, FK228), 벨리노스탯(Belinostat, PXD101) 및 파노비노스탯(Panobinostat, LBH589)을 포함한 4개의 HDAC 억제제는 피부 T 세포 림프종 및 다발성 골수종의 치료를 위해 미국 FDA 승인을 받았으며, 다른 한 HDAC 억제제인 치다마이드(Chidamide, HBI-8000)는 피부 T 세포 림프종의 치료를 위해 중국 FDA의 승인을 받았다.

[0005] HDAC 억제제 대부분은 캡핑(capping)기, 링커(linker)기 및 아연 결합기(zinc binding group, ZBG)의 세 가지 구별기로 구성된 공통의 약물작용발생단(pharmacophore)을 공유한다. 캡핑기는 활성 부위 포켓의 외부 표면 영역에 결합하고, 링커기는 아연 결합기(ZBG) 및 캡을 연결하며, 아연 결합기는 활성 부위에서 촉매 아연 이온을 킬레이트화하는데, 이는 HDAC 효소의 촉매 기능에 중요하다.

[0006] 아연 결합기가 효능 및 동형 선택성에 대한 중요성에도 불구하고, 아직까지 아연 결합기에 대해서는 상대적으로 관련 연구가 적다. 더욱이, 가장 일반적으로 사용되는 아연 결합기인 하이드록삼산(hydroxamic acid)은 부족한

약동학 및 비특이적 금속 결합 성질로 인해, 생체 이용률이 낮은 등 임상 사용의 한계가 두드러졌다. 따라서 HDAC 억제제의 약물 개발에서 새로운 아연 결합기를 찾는 데에 관심이 높아지고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2015-0132345호 (2015.11.25. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 신규의 아연 결합기를 가진 화합물을 제공하는 데에 있다.

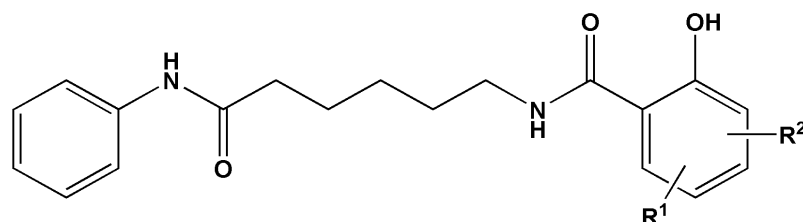
[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물을 유효성분으로 포함하는 히스톤 탈아세틸화효소 억제제를 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0012] <화학식 1>



[0013]

[0014] 상기 식에서, R^1 및 R^2 는 각각 동일하거나 다를 수 있고, 수소, 할로젠, 니트로, (C1~C4)알킬, 또는 (C1~C4)알콕시에서 선택됨.

[0015] 본 발명은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 히스톤 탈아세틸화효소 (HDAC) 억제제를 제공한다.

[0017] 본 발명은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 히스톤 탈아세틸화효소 (HDAC) 활성 억제용 시약 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 개체로부터 분리된 세포에 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하는 단계를 포함하는 히스톤 탈아세틸화효소(HDAC) 활성 억제 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 신규의 아연 결합기를 가짐으로써, 히스톤 탈아세틸화효소(HDAC)의 활성을 억제할 수 있고, 특히 클래스 I HDAC의 선택적 억제제로 사용될 수 있다.

[0020] 이와 더불어, 상기 신규의 아연 결합기를 가진 화합물 또는 이의 염은 기존 약물에 비해 약물동력학적(PK) 성질이 개선되어 약물의 흡수, 분포, 대사 등이 개선될 수 있고, PK가 개선된 상기의 신규 화합물 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 이용함으로써, 암 질환과 같이 HDAC와 관련된 질환들을 보다 효과적으로

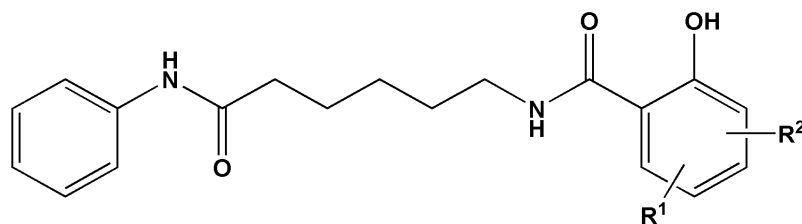
예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 FDA 승인된 히스톤 탈아세틸화효소(histone deacetylase, HDAC) 억제제의 화학구조식이다.
- 도 2는 HDAC 억제제의 약물작용발생단(pharmacophore) 구조 및 이를 바탕으로 설계한 새로운 아연 결합기를 포함한 화합물이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실험예에 따른 화합물 5의 처리에 따른 유방암 세포(MDA-MB-231)의 세포 생존율을 확인한 그래프이다. 데이터는 평균 $\pm$ SD (n=4)로 나타내었다.
- 도 4는 본 발명의 일 실험예에 따른 화합물 5의 처리에 따른 히스톤 H3(Histone H3) 및 α -튜불린(α -tubulin)의 아세틸화 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 것이며, DMSO(dimethyl sulfoxide, D)는 음성 대조군으로 사용되었다.
- 도 5는 본 발명의 일 실험예에 따른 화합물 5의 농도에 따른 유방암 세포(MDA-MB-231)의 형태학적 변화를 관찰한 이미지이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 합성된 화합물 5의 분자 도킹 포즈를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.
- [0024] 본 발명자는 새로운 아연 결합기의 필요성을 해결하기 위하여, 잠재적인 새로운 아연 결합기로서 살리실산(salicylic acid)을 연구하였고, 이에 살리실레이트(salicylate) 구조의 아연 킬레이트 특성을 기반으로 SAHA의 하이드록삼산 아연 결합기를 살리실아미드(salicylamide)기로 대체하여 새로운 HDAC 억제제를 설계함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0026] 본 발명은 신규의 아연 결합기를 가진 화합물인, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.
- [0027] <화학식 1>



- [0028]
- [0029] 상기 식에서, R^1 및 R^2 는 각각 동일하거나 다를 수 있고, 수소, 할로젠, 니트로, (C1~C4)알킬, 또는 (C1~C4)알콕시에서 선택될 수 있다.
- [0030] 바람직하게는, 상기 화합물 또는 이의 염은 2-하이드록시-N-(6-옥소-6-(페닐아미노)헥실)벤즈아미드 [2-Hydroxy-N-(6-oxo-6-(phenylamino)hexyl)benzamide]일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 화합물은 이와 동일한 효능을 갖는 범위 내에서 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용할 수 있다.
- [0033] 본 명세서에서, "약학적으로 허용가능한"이란, 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없어, 인간에게 투여하기에 적합한 안전성 및 효능 프로파일을 갖는 염을 의미한다.
- [0034] 상기 염은 약학적으로 허용가능한 염기성 염 또는 산성염 중 어느 하나의 형태로 사용할 수 있다. 염기성염은 유기 염기염, 무기 염기염 중 어느 하나의 형태로 사용할 수 있으며, 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 리튬염, 마그

네슘염, 세슘염, 아미늄염, 암모늄염, 트리에칠아미늄염 및 피리디늄염으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

- [0035] 산성염은 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산, 이중 인산, 질산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레산, 말산, 푸마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 캄페설폰산, 옥살산, 말론산, 글루타릭산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르탄산, 스테아르산 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에서 통상적으로 사용되는 다양한 무기산 및 유기산을 이용하여 형성되는 염이 모두 포함될 수 있다.
- [0036] 또한, 상기 화합물은 상기 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물, 용매화물, 유도체 등을 모두 포함할 수 있다. 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있고, 수산화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹여 과량의 유기염기를 가하거나 무기염기의 염기 수용액을 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 또는 이 혼합물에서 용매나 과량의 염기를 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 히스톤 탈아세틸화효소(histone deacetylases, HDACs)의 활성을 억제할 수 있다.
- [0039] 본 명세서에서, "히스톤 탈아세틸화효소(histone deacetylases, HDACs)"는 히스톤 단백질을 구성하는 리신(lysine) 아미노산에서 아세틸기를 제거하고 염색질의 구성물질의 구조변화를 유도하여 유전자의 전사 조절을 유도하는 효소로, 암, 치매 등의 다양한 질환의 표적 단백질로 알려져 있다. HDAC는 기능과 DNA 서열의 유사성을 근거로 하여 4개의 클래스(I, II, III, IV)로 분류되며, 이들은 아형에 따라 다른 생물학적 기능을 수행하기 때문에 세포 내에서 분포하는 영역도 다르다.
- [0040] 바람직하게는, 상기 화합물 또는 이의 염은 HDAC1, HDAC2, HDAC3, 및 HDAC8로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 클래스 I HDAC의 활성을 억제할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0043] 상기 화합물 또는 이의 염은 HDAC 활성 억제를 통해 히스톤의 아세틸화를 촉진하고, 암 세포의 성장, 증식, 분화 등을 억제함으로써 다양한 암 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0044] 상기 암 질환은 유방암, 삼중음성유방암, 위암, 결장암, 폐암, 비소세포성 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 피부 또는 안구 내 흑색종, 자궁암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 항문부근암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 소장암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 방광암, 신장 또는 수뇨관 암, 신장세포 암종, 신장골반 암종, 중추신경계(CNS; central nervous system) 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌간신경교종 및 뇌하수체 선종으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 상기 화합물 또는 이의 염은 50 내지 1000 μM 농도로 포함될 수 있고, 바람직하게는 100 내지 1000 μM 농도로, 보다 바람직하게는 300 내지 1000 μM 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 일 실험예에 따르면, 화합물 5의 처리에 의해 농도 및 시간 의존적으로 유방암 세포의 증식이 억제됨을 확인할 수 있었다.
- [0048] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 약학 조성물은 제형에 따라 약학적으로 허용가능한 적절한 담체와 배합될 수 있고, 필요에 따라, 부형제, 희석제, 분산제, 유화제, 완충제, 안정제, 결합제, 붕해제, 용해제 등을 더 포함하여 제조될 수 있다. 상기 적절한 담체 등은 본 발명에 따른 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 활성 및 특성을 저해하지 않는 것으로, 투여 형태 및 제형에 따라 달리 선택될 수 있다.

- [0049] 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제, 희석제 등으로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0051] 본 발명에 따른 약학 조성물은 어떠한 제형으로도 적용될 수 있고, 상세하게는 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여에 적합한 단위투여형의 제제로 제형화시켜 사용될 수 있다.
- [0052] 보다 상세하게는, 상기 경구형 제형 중 고형 제형은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등의 형태로, 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스, 락토오스, 솔비톨, 만니톨, 셀룰로오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있고, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 포함될 수 있다. 또한, 캡슐제형의 경우 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0053] 상기 경구형 제형 중 액상 제형은 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0054] 상기 비경구 제형은 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 주사제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 이에 제한되지 않고, 당업계에 널리 공지된 적합한 제제를 모두 사용 가능하다.
- [0056] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 치료 효능의 증진을 위해 칼슘이나 비타민 등을 더 첨가할 수 있다. 예를 들어, 티아민(thiamin, 비타민 B1), 리보플라빈(riboflavin, 비타민 B2), 나이아신(niacin, 비타민 B3), 판토텐산(pantothenic acid, 비타민 B5), 피리독신(pyridoxine, 비타민 B6) 및 코발라민(cobalamin, 비타민 B12) 등의 비타민 B군의 화합물과 비타민 C, 비타민 D, 비타민 E 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 당업계에 널리 공지된 적합한 제제를 모두 사용 가능하다.
- [0058] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.
- [0059] 본 명세서에서, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미한다.
- [0060] 상기 약학 조성물의 유효 용량 수준은 사용 목적, 환자의 연령, 성별, 체중 및 건강 상태, 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 달리 결정될 수 있다. 예를 들어, 일정하지는 않지만 일반적으로 0.001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여될 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명에 따른 약학 조성물은 암 질환이 발생할 수 있는 임의의 동물에 투여될 수 있고, 상기 동물은 예를 들어, 인간 및 영장류뿐만 아니라 소, 돼지, 말, 개 등의 가축 등을 포함할 수 있다.
- [0063] 상기 약학 조성물은 제제 형태에 따른 적당한 투여 경로로 투여될 수 있고, 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다. 투여 방법은 특히 한정할 필요 없이, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피부 도포, 호흡기내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracere-

broventricular) 주사 등의 통상적인 방법으로 투여될 수 있다.

- [0064] 본 발명에 따른 약학 조성물은 암 질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로 사용될 수 있고, 수술 또는 다른 약물 치료 등과 병용하여 사용될 수 있다.
- [0066] 본 발명은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 히스톤 탈아세틸화효소 (HDAC) 억제제를 제공한다.
- [0067] 바람직하게는, 상기 HDAC는 HDAC1, HDAC2, HDAC3, 및 HDAC8로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 클래스 I HDAC 일 수 있고, 보다 바람직하게는 HDAC1, HDAC2 및 HDAC3일 수 있기에 상기 화합물 또는 이의 염은 클래스 I HDAC의 선택적 억제제로 사용될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 일 실험예에 따르면, 상기 화합물은 α -튜불린(α -tubulin)보다 히스톤 H3(Histone H3)의 아세틸화를 보다 효과적으로 유도하였으며, 분자 도킹에서는 상기 화합물의 살리실아미드 아연 결합기가 클래스 I HDAC2의 활성 아연 이온을 조정하는 것으로 확인되었다. 보다 상세한 것은 하기 실험예에 의해 후술될 것이다.
- [0070] 본 발명은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 히스톤 탈아세틸화효소 (HDAC) 활성 억제용 시약 조성물을 제공한다.
- [0071] 바람직하게는, 상기 HDAC는 HDAC1, HDAC2, HDAC3, 및 HDAC8로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 클래스 I HDAC 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0073] 또한, 본 발명은 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 세포 증식 억제 용 시약 조성물을 제공한다.
- [0074] 이에 상응하는 특징들은 상술된 부분에서 대신할 수 있다.
- [0076] 본 발명은 개체로부터 분리된 세포에 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하는 단계를 포함 하는 히스톤 탈아세틸화효소(HDAC) 활성 억제 방법을 제공한다.
- [0077] 상기 세포는 HDAC 과발현이 예상되는 개체에서 분리된 세포일 수 있고, 암 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것 은 아니다.
- [0079] 또한, 본 발명은 개체로부터 분리된 암 세포에 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 처리하는 단 계를 포함하는 암 세포 증식 억제 방법을 제공한다.
- [0080] 이에 상응하는 특징들은 상술된 부분에서 대신할 수 있다.
- [0082] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명 의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업 계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0084] <실시예 1> 화합물 합성

- [0085] 모든 시약과 용매는 상업적 공급처로부터 구매하였고 추가 정제없이 사용하였다. 수분에 민감한 화합물을 다루 는 모든 실험은 아르곤 분위기에서 수행되었다. 감압 농축 또는 용매 제거는 회전 증발기를 사용하여 수행되었 다.
- [0086] 분석적 박층 크로마토그래피는 UV 광 하에서 시각화하거나 또는 요오드를 사용한 염색으로 프리코팅된 실리카 겔 F254 TLC 플레이트 (E, Merck)에서 수행되었다. 컬럼 크로마토그래피는 중압 하 실리카 (Merck Silica Gel

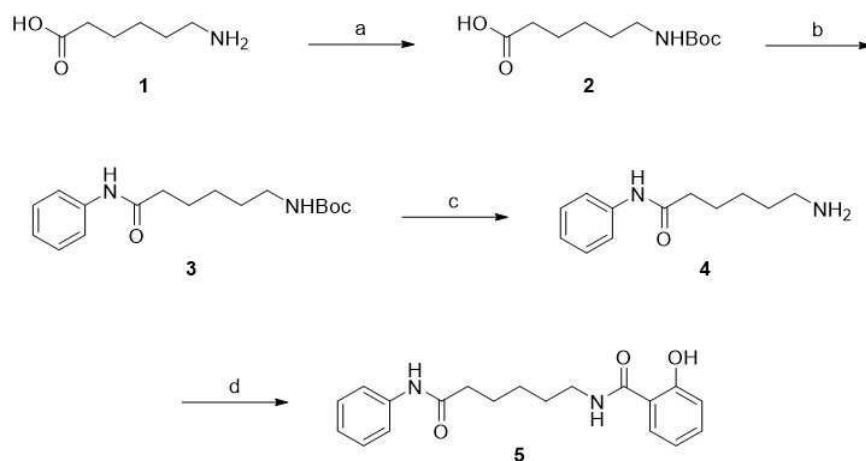
40-63 m)에서 수행되거나 또는 실리카 겔 카트리지가 프리패킹된 중압 액체 크로마토그래피 (MPLC, Biotage Isolera One instrument)로 수행되었다.

[0087] NMR 분석은 Jeol resonance에 의해 제조된 JNM-ECZ500R (500 MHz)를 사용하여 수행되었다. 화학적 이동은 백만 분율 (δ)로 보고되었다. 시료 용매의 중수소 잠금 신호는 기준으로 사용되었고, 커플링 상수(J)는 헤르츠 (hertz, Hz) 단위로 제공되었다. 분할 패턴 약자는 하기와 같다: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; dd, doublet of doublet; td, triplet of doublet; m, multiplet.

[0088] 모든 최종 화합물의 순도는 VP-ODS C18 column (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m, Shimadzu)이 장착된 이중 펌프 Shimadzu LC-6AD 시스템으로 수행된 분석적 HPLC에 의해 95% 이상으로 확인되었다. MS 분석은 Agilent 1290 Infinity LC (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA)와 함께 an Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF LC/MS system을 사용하여 수행되었다.

[0090] 하기 반응식 1은 타겟 화합물 5의 합성 과정을 나타낸 것이다. 약간 변형된 기존 절차에 따라 화합물 2의 합성 부터 시작하였다.

[0091] <반응식 1>



^a Reagents and conditions: (a) Boc_2O , dioxane, 1M NaOH, rt, 12 h, 100% (b) aniline, EDC, DIPEA, HOBT, DMF, rt, 12 h, 23% (c) HCl, diethyl ether, rt, 12 h, 100% (d) salicylic acid, EDC, DIPEA, HOBT, DMF, rt, 12 h, 48%

[0094] 요약하면, NaOH 존재 하에 6-아미노헥사노익산(6-aminohexanoic acid) 및 디-tert-부틸 디카보네이트(Di-tert-butyl dicarbonate, Boc_2O)의 보호 반응으로 화합물 2를 정량적으로 수득한 다음, 디이소프로필에틸아민(diisopropylethylamine, DIPEA) 및 하이드록시벤조트리아졸(hydroxybenzotriazole, HOBT) 존재 하에 아닐린(aniline)과 화합물 2의 EDC-약물 첨가된 아마이드 커플링 반응을 수행하여, 23% 수율의 화합물 3을 성공적으로 수득하였다. 이어서, N-Boc 보호기의 산성 절단은 정량적 수율로 화합물 4를 제공하였고, 최종적으로 살리실산(salicylic acid)과 화합물 4의 아마이드 커플링 반응으로 48% 수율의 타겟 화합물 5를 수득하였다.

[0096] **1. 화합물 2의 합성 : 6-((tert-부톡시카르보닐)아미노)헥사노익산 [6-((tert-Butoxycarbonyl)amino)hexanoic acid]**

[0097] 다이옥세인 (dioxane, 110 mL) 및 물 (55 mL)에 용해된 6-아미노헥사노익산 (1.01 g, 7.62 mmol)에 1 M NaOH 수용액 (10 mL, 7.62 mmol)을 첨가한 후, 0°C에서 Boc_2O (Di-tert-butyl dicarbonate, 1.83 g, 8.39 mmol)를 추가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 3시간 동안 교반한 후, 회전 증발기를 사용하여 감압 농축시켰다. 수용액은 에틸 아세테이트 (ethyl acetate, 50 mL)로 세척하고 1N HCl(aq)에 의해 pH가 1로 될 때까지 산성화하였다. 이 후 수성 층을 에틸 아세테이트 (3 $\times$ 50 mL)로 추출하였다. 화합한 유기 용액을 MgSO_4 에서 건조시키고, 여과

및 감압 농축하여 100% 수율로 화합물 2를 수득하였다.

[0098] - 화합물 2 : ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 4.70 (s, 1H), 3.07-3.01 (m, 2H), 2.29 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.62-1.56 (m, 2H), 1.47-1.38 (m, 11H), 1.34-1.28 (m, 2H)

[0100] **2. 화합물 3의 합성 :** tert-부틸 (6-옥소-6-(페닐아미노)헥실)카르바메이트 [tert-Butyl (6-oxo-6-(phenylamino)hexyl)carbamate]

[0101] 디메틸포름아미드 (dimethylformamide, DMF, 40 mL)에 화합물 2 (0.70 g, 3.06 mmol), 아닐린 (aniline, 0.28 g, 3.06 mmol), 에틸렌 디클로라이드(ethylene dichloride, EDC, 0.52 g, 3.37 mmol), DIPEA (0.64 mL, 3.67 mmol), 및 HOBt (0.41 g, 3.06 mmol)의 혼합물을 넣어 실온, 아르곤 하에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압 농축한 후, 에틸 아세테이트 (80 mL)로 희석시킨 다음, 1N HCl (80 mL)로 세척하고 브라인 (brine, 80 mL) 처리하였다. 유기층은 MgSO_4 로 건조시키고 감압 농축한 후, MPLC (Biotage SNAP HP-Sil column)로 정제하여 23% 수율로 화합물 3을 수득하였다 [R_f = 0.26 (4:6 ethyl acetate: hexane)].

[0102] - 화합물 3 : ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.46 (s, 1H), 7.56 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.27 (t, J = 8.0 Hz, 2H), 7.07 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 4.84 (s, 1H), 3.07 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 2.33 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.72-1.66 (m, 2H), 1.49-1.44 (m, 11H), 1.35-1.26 (m, 2H)

[0104] **3. 화합물 4의 합성 :** 6-아미노-N-페닐헥산아미드 [6-Amino-N-phenylhexanamide]

[0105] 다이에틸 에터 (diethyl ether, 5 mL)에 화합물 3 (0.071 g, 0.23 mmol) 및 2N HCl 혼합물을 넣어 실온에서 24 시간 동안 교반시켰다. 반응 혼합물을 감압 농축하여 100% 수율로 화합물 4를 수득하였다.

[0106] - 화합물 4 : ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10.03 (s, 1H), 7.94 (s, 2H), 7.61 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.27 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.01 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 2.76 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 2.32 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.60-1.54 (m, 4H), 1.34 (q, J = 7.8 Hz, 2H)

[0108] **4. 화합물 5의 합성 :** 2-하이드록시-N-(6-옥소-6-(페닐아미노)헥실)벤즈아미드 [2-Hydroxy-N-(6-oxo-6-(phenylamino)hexyl)benzamide]

[0109] DMF (20 mL)에 화합물 4 (0.064 g, 0.31 mmol), 살리실산(salicylic acid, 0.028 g, 0.20 mmol), EDC (0.062 g, 0.40 mmol), HOBt (0.027 g, 0.20 mmol), 및 DIPEA (0.040 mL, 0.22 mmol) 혼합물을 넣어 아르곤 하, 실온에서 12시간 동안 교반시켰다. 반응 혼합물은 에틸 아세테이트 (100 mL)로 희석하고 물 (100 mL)로 세척하였다. 유기층은 1 N HCl (100 mL)로 두번 세척하고 브라인 (100 mL)으로 처리한 후, Na_2SO_4 로 건조시켰으며, 감압 농축하고 MPLC (Biotage SNAP HP-Sil column)로 정제하여 48% 수율로 화합물 5를 수득하였다 [R_f = 0.42 (5:5 ethyl acetate:hexane)].

[0110] - 화합물 5 : ^1H NMR (500 MHz, CH_3OD) δ 7.69 (d, J = 7.7 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.32 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.24 (t, J = 7.7 Hz, 2H), 7.03 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.85-6.81 (m, 2H), 3.37 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 2.35 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.75-1.69 (m, 2H), 1.67-1.61 (m, 2H), 1.46-1.40 (m, 2H). ^{13}C NMR (126 MHz, CH_3OD) δ 174.5, 171.0, 161.3, 139.8, 134.6, 129.8, 128.7, 125.1, 121.3, 120.0, 118.4, 117.0, 40.3, 37.8, 30.2, 27.6, 26.5. ESI MS (m/z) = 327.16 [$M+H$]+

[0112] <실험예 1> 화합물 5의 생물학적 분석

[0113] <실험방법>

[0114] 1. 도킹 연구 (Docking study)

- [0115] HDAC2 (PDB code: 4LXZ)의 X-ray 결정 구조의 3D 좌표를 사용하는 화합물 5의 인실리코(*in silico*) 도킹은 스크립스 연구소(Scripps Research Institute)의 Molecular Graphics Laboratory로부터 다운로드한 AutoDock 프로그램을 사용하여 수행되었다. AutoDock 프로그램은 현장 최적화 후 분자에 의해 채택된 형태의 변화가 후속 포즈(pose)로 사용되는 유전(genetic) 알고리즘의 Lamarckian 버전을 활용하여 알려지거나 예측된 결합 부위에 내부에 있는 리간드의 포즈를 생성하기 위해 유전 알고리즘을 사용하기에 선택되었다.
- [0116] 수행된 도킹 실험에서, Gasteiger 전하는 AutoDock suite로부터 도구를 사용하여 화합물 5와 함께 HDAC2의 X-ray 구조에 배치되었다. $50 \times 50 \times 50$ points 및 $0.375 \text{ \AA}$ 간격의 정의를 갖는 HDAC2 효소의 기질 결합 포켓에 중심을 둔 격자 상자는 리간드 도킹 실험을 위해 선택되었다. 도킹 파라미터는 인구 크기를 150, 세대 수를 27,000 및 평가 수를 2,500,000로 설정하는 것으로 구성되었으며, 도킹 수행 수는 각 도킹 실험의 그룹에 대한 평균 제곱근 허용 오차에 대한 $1 \text{ \AA}$ 의 컷오프로 100 까지 설정되었다. 화합물 5와 HDAC2의 도킹 포즈는 후술될 도 6에 표시되어 있으며, 상기 도면의 렌더링은 PyMol (DeLanoScientific)을 사용하여 생성되었다.
- [0118] 2. 생물 제제
- [0119] L-글루타민(L-glutamine)이 포함된 돌베코 수정 이글배지(Dulbecco's Modified Eagle's medium, DMEM)는 GenDEPOT (Barker, TX, USA)에서 구입하였고, 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 HyClone에서 구입하였으며, 페니실린(penicillin) 및 스트렙토마이신(streptomycin)은 Gaithersburg (MD, USA)에서 구입하였다.
- [0120] α -튜불린(α -tubulin), 아세틸화된 α -튜불린(Ac- α -tubulin, Lys40), 히스톤 H3(Histone H3), 아세틸화된 히스톤 H3(Ac-Histone H3, Lys9), HDAC1, HDAC6, 및 GAPDH에 대한 항체는 Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA)로부터 구입하였다. Goat anti-rabbit IgG horseradish peroxidase 접합체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다.
- [0121] Cell Titer 96 Aqueous One Solution 세포 증식 분석 키트는 Promega (Madison, WI, USA)로부터 구입하였고, Amersham ECL select Western blotting 검출 시약은 GE Healthcare로부터 구입하였다. HDAC fluorogenic assay kits (HDAC1, #50061; HDAC2, #50062; HDAC3, #50073; HDAC4, #50064; HDAC6, #50076; HDAC11, #50687)는 BPS Bioscience (San Diego, CA, USA)로부터 구입하였다.
- [0123] 3. 세포 배양
- [0124] MDA-MB-231 유방암 세포는 10% 소태아혈청, 100 units/mL의 페니실린 및 500 mg/mL의 스트렙토마이신이 포함된, L-글루타민이 포함된 DMEM에서 배양되었다. 세포는 습한 분위기(37°C , 5% CO_2)에서 배양되었다.
- [0126] 4. HDAC 분석
- [0127] 효소적 HDAC 분석은 제조사의 프로토콜 (BPS Bioscience)에 따라 수행되었다. 요약하면, 96-웰(well) 블랙 플레이트에서 HDAC 분석 완충액 (buffer, $35 \mu\text{L}$)은 $5 \mu\text{L}$ 의 BSA (1 mg/mL) 및 $5 \mu\text{L}$ 의 HDAC 기질 (200 mM)과 혼합되었다. $5 \mu\text{L}$ 의 HDAC 효소 ($7 \text{ ng}/\mu\text{L}$)가 웰에 추가되고, 이어서 다양한 농도의 화합물 5 ($5 \mu\text{L}$) 또는 양성대조군으로 수베로일아닐라이드 하이드록삼산(suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA, $5 \mu\text{L}$)을 처리하여 37°C 에서 30분간 배양하였다. 그 후, $50 \mu\text{L}$ 의 희석되지 않은 HDAC developer를 각 웰에 첨가하고 실온에서 15분 동안 배양하였다. 형광 강도는 360 nm 여기(excitation) 및 460 nm 방출 파장에서 Tecan Infinite F200 Pro plate reader를 사용하여 측정하였다. IC_{50} 값 및 커브 피트 (curve fit)은 Prism (GraphPad Software)을 사용하여 획득하였다.
- [0129] 5. 세포 증식 분석
- [0130] 세포 (2×10^3 cells/well)를 투명 96-웰 플레이트에 접종하고, 배지 용량을 $100 \mu\text{L}$ 로 하여 밤새 세포를 부착하게 하였다. 다음, 다양한 농도의 화합물 5를 각 웰에 첨가하고 37°C 에서 1, 2 및 3일 동안 배양하였다.
- [0131] 세포 생존율(cell viability)은 Promega Cell Titer 96 Aqueous One Solution cell proliferation assay를 사

용하여 측정하였다. 흡광도는 96 웰 플레이트 리더로 490 nm에서 기록되었으며, 값은 DMSO 단독에서만 배양된 세포의 흡광도 백분율로 표시되었다.

6. 웨스턴 블롯

MDA-MB-231 세포는 100 mm 배양 접시에 접종되어 밤새 배양된 후, 표시된 농도별의 화합물 5로 24시간 동안 처리하였다. 그 후 세포를 수확하고 프로테아제(protease) 및 포스파타아제(phosphatase) 억제제 각테일이 보충된 RIPA buffer (23 mM Tris-HCl pH 7.6, 130 mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS)로 얼음에서 용해시킨 후, 30 µg의 용해물 per lane을 SDS-PAGE로 분리하여 PVDF 막 (Bio-Rad, Hercules, USA)으로 옮겼다. 상기 막은 TBST에서 5% skim milk로 블로킹한 다음, 해당 1차 항체 (α -tubulin, Ac- α -tubulin, Histone H3, Ac-Histone H3, HDAC1, HDAC6, or GAPDH)와 함께 배양하였다. horseradish peroxidase와 결합된 적절한 2차 항체 (Santa Cruz, CA, USA)의 결합 후, 제조사 (GE healthcare, USA)의 지침에 따라 ECL 화학발광에 의한 단백질을 시각화하였다.

7. 세포 형태의 평가

MDA-MB-231 세포 (1×10^4 cells/well)가 6-웰 플레이트에 접종되고, 24시간 후, 배양 배지를 화합물 5가 포함된 신선한 배지로 변경한 다음 24시간 더 배양하였다. 세포 형태는 $20 \times$ 배율에서 광학 현미경으로 관찰되었다.

<실험 결과>

1. 화합물 5의 HDAC 억제 활성 분석 (*in vitro*)

실시에 1에 따른 합성을 완료한 후, FDA- 승인된 HDAC 억제제인 SAHA를 비교 약물로 하여 HDAC 동형 단백질 (isoform)에 대한 화합물 5의 억제 활성을 평가하였다.

표 1은 HDAC 동형 단백질에 대한 화합물 5의 억제 활성(*in vitro*)을 나타낸 것이다.

표 1

HDAC subtype		Compound 5 (IC ₅₀ ; µM)	SAHA (IC ₅₀ ; µM)
Class I	HDAC1	22.2	0.14
	HDAC2	27.3	0.44
	HDAC3	7.9	0.73
Class IIa	HDAC4	>100	5.40
Class IIb	HDAC6	>100	0.03
Class IV	HDAC11	>100	>100

상기 표 1을 참조하면, 화합물 5는 HDAC1, 2, 및 3 (HDAC1 IC₅₀ = 22.2 µM, HDAC2 IC₅₀ = 27.3 µM, 및 HDAC3 IC₅₀ = 7.9 µM)를 포함하는 class I HDAC 동형 단백질 억제제가 가능하였으나, 그 외 class IIa, IIb, 및 IV를 포함하는 다른 HDAC class 억제는 어려운 것으로 나타났다.

대조적으로, pan-HDAC 억제제인 SAHA는 마이크로몰 미만의 농도에서 HDAC 1, 2, 3, 및 6 (HDAC1 IC₅₀ = 0.14 µM, HDAC2 IC₅₀ = 0.44 µM, HDAC3 IC₅₀ = 0.73 µM, HDAC6 IC₅₀ = 0.03 µM, 및 HDAC11 IC₅₀ = >100 µM)을 포함하는 class I, IIa, IIb, 및 IV를 억제하였다.

M, HDAC2 $IC_{50} = 0.44 \mu M$, HDAC3 $IC_{50} = 0.73 \mu M$, 및 HDAC6 $IC_{50} = 0.03 \mu M$)을 효과적으로 억제하였다. 또한, SAHA는 class IIa HDAC4 ($IC_{50} = 5.40 \mu M$)에 대해 보통의 억제 활성을 보였으나, class IV HDAC11에 대해서는 $100 \mu M$ 농도까지 억제활성을 보이지 않아, 이전에 보고된 데이터와 일치함을 확인할 수 있었다 (Yang et al., 2019, Song et al., 2019).

[0147] 상대적으로 평범한 억제 활성에도 불구하고, 화합물 5의 살리실아미드 모이어티는 HDAC 억제제 개발에서 class I HDAC에 대한 우수한 선택성을 가진 아연 결합기로 작용할 수 있음을 입증하였다.

[0149] 2. 화합물 5의 처리에 따른 유방암 세포 MDA-MB-231의 세포 생존율 확인

[0150] 인간 유방암 중 MDA-MB-231 세포의 세포 생존율에 대한 화합물 5의 용량 및 시간 의존적 영향을 확인하기 위해, MDA-MB-231 세포에 다양한 농도의 화합물 5를 1, 2 및 3일 동안 처리하고 MTS colorimetric assay로 세포 생존율을 측정하였다.

[0151] 그 결과, 도 3과 같이, 화합물 5를 처리한 경우, $100 \mu M$ 농도까지는 MDA-MB-231 세포에 대한 유의한 항-증식 활성이 나타나지 않았으나, 용량 및 시간 의존적으로 300 에서 $1000 \mu M$ 범위의 농도에서 항-증식 활성을 나타내었다. 또한, 화합물 5를 3일 동안 세포에 처리 ($500 \mu M$ 및 $1000 \mu M$) 한 경우, 각각 MDA-MB-231 세포 성장의 64% 및 81%가 손상됨을 확인하였다. 이렇게 상대적으로 적은 세포의 항 증식 활성은 상기 표 1에 나타난 HDAC 효소 분석에서 화합물 5의 높은 IC_{50} 값 때문일 것으로 판단된다.

[0153] 3. 화합물 5의 처리에 따른 메커니즘 확인

[0154] 화합물 5의 기본 세포 메커니즘 및 용량 반응을 추가로 실험하였다. MDA-MB-231 세포에 화합물 5를 50 에서 $500 \mu M$ 범위의 농도를 24시간 처리하여 웨스턴 블롯으로 Histone H3, 아세틸화된 Histone H3, α -tubulin, 아세틸화된 α -tubulin, HDAC1, 및 HDAC6의 수준을 분석하였다. Histone H3 및 α -tubulin은 HDAC1 및 HDAC6 효소의 잘 알려진 기질로, HDAC1 및 HDAC6의 억제는 각각 Histone H3 및 α -tubulin의 아세틸화를 후성적으로 유도한다.

[0155] 그 결과, 도 4와 같이, 화합물 5는 용량 의존적으로 $300 \mu M$ 농도까지 HDAC1 효소의 억제를 통해 Histone H3의 아세틸화를 증가시켰고, 300 에서 $500 \mu M$ 의 농도 범위까지 α -tubulin의 아세틸화를 촉진시키는 것으로 나타났다. 흥미롭게도, 화합물 5는 용량 의존적으로 HDAC6의 발현을 감소시켰고, $500 \mu M$ 농도의 화합물 5의 투여는 HDAC6의 발현 수준을 완전히 억제하였으나, 내부 기준인 GAPDH의 발현 수준은 변하지 않았다.

[0156] 이는 화합물 5가 HDAC6 효소 활성의 억제를 통해서가 아니라, HDAC6의 하향 조절을 통해 α -tubulin의 아세틸화를 촉진시켰음을 시사한다. 종합하면, 웨스턴 블롯 실험은 화합물 5가 HDAC6 보다 HDAC1를 선택적으로 억제함을 나타내며, 이는 상기 표 1에 나타난 HDAC 효소 분석 결과와 연관된다.

[0158] 4. 화합물 5의 처리에 따른 세포 형태학적 변화 확인

[0159] 미세소관(microtubule)은 튜불린(tubulin) 서브 유닛으로 구성된 매우 역동적인 생물학적 고분자로, 세포 분열, 세포 이동 및 세포질 구조에 필수적인 역할을 한다. 최근 연구는 동적 미세소관 조립에서 튜불린 아세틸화의 중요성을 강조하며, α -tubulin의 아세틸화가 미세소관의 안정화를 유도함을 증명하였다 (Eshun-Wilson et al., 2019). 이에, 다음 실험을 통해 MDA-MB-231 세포의 형태에 대한 화합물 5의 효과를 확인하였다.

[0160] 그 결과, 도 5와 같이, MDA-MB-231에 화합물 5의 처리는 용량 의존적 방식으로 세포의 형태학적 변화를 유도하였다. 상기 화합물 5의 농도가 증가함에 따라, MDA-MB-231 세포는 더 길어지고 스핀들(spindle) 형태로 변하였다. 이러한 형태학적 변화는 300 에서 $500 \mu M$ 의 농도 범위에서 더 중요하다. 이러한 관찰은 300 에서 $500 \mu M$ 의 농도 범위에서 α -tubulin의 아세틸화가 미세소관을 더 안정화하여 더 길고 스핀들 형태로의 형태학적 변화를 초래함을 나타낸다.

[0162] 5. 분자 도킹 연구를 통한 화합물 5의 결합 모드 확인

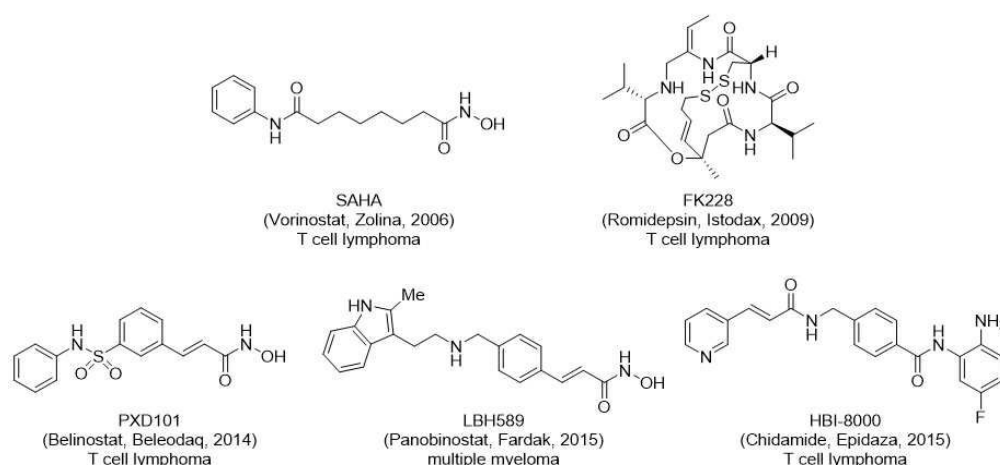
[0163] 단백질-리간드 결합 방식에 대한 이해는 약물 개발 분야에서 매우 중요하다. 따라서, HDAC2의 결합 포켓 (PDB code: 4LXZ)에서 화합물 5의 결합 방식을 평가하기 위해 분자 도킹 연구를 수행하였다.

[0164] 그 결과, 도 6과 같이, *in silico* 도킹 연구는 새로운 아연 결합기, 화합물 5의 살리실아미드가 결합 포켓의 바닥에 잘 위치하고, 살리실아미드의 카르보닐 산소(carbonyl oxygen, C=O) 및 페놀 산소(phenolic oxygen, OH)가 두 자리 방식에서 활성 아연 이온(Zn^{2+})을 조정함을 보여주었다. 살리실아미드의 페닐 고리는 기질 결합 포켓의 가장 바닥을 차지하고, Leu144 및 Cys156의 측쇄와 인접하는 반데르발스(Van der Waals) 상호작용을 형성하였다. 화합물 5의 중간 알킬 사슬은 소수성 채널에 끼워져 Phe155, Phe210, 및 Leu276 잔기의 측쇄와 소수성 상호작용을 형성하였다. 화합물 5의 말단 아닐리드(Cap group)는 기질 결합 포켓의 외부 표면을 차지하고, His183 잔기와 수소 결합을 형성하였다. 종합적으로, 상기 도킹 연구는 화합물 5가 다양한 분자간 상호작용으로 HDAC2의 기질 결합 포켓에 결합할 수 있음을 보여준다.

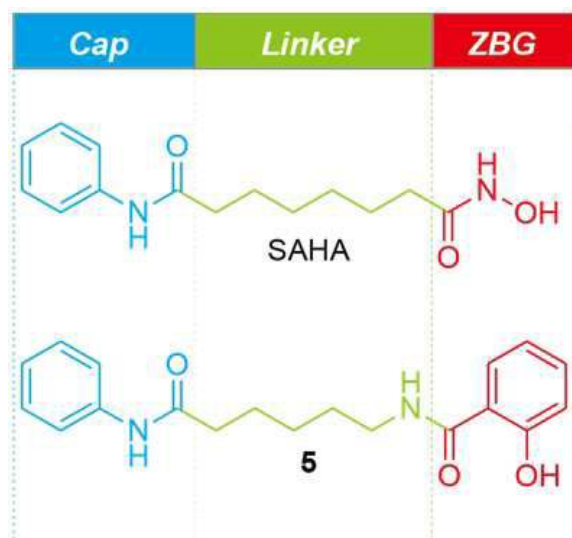
[0166] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

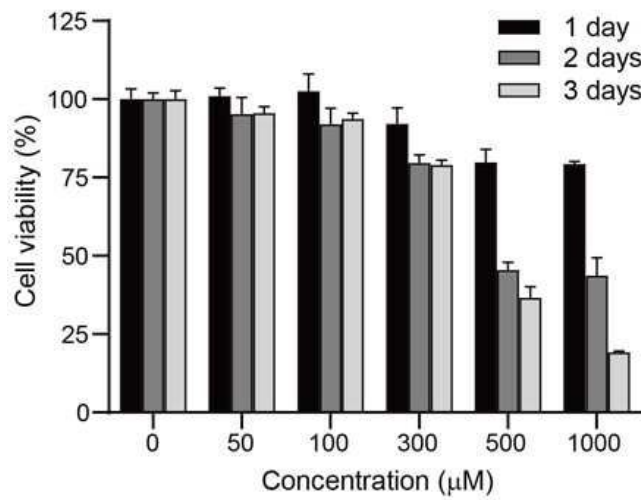
도면1



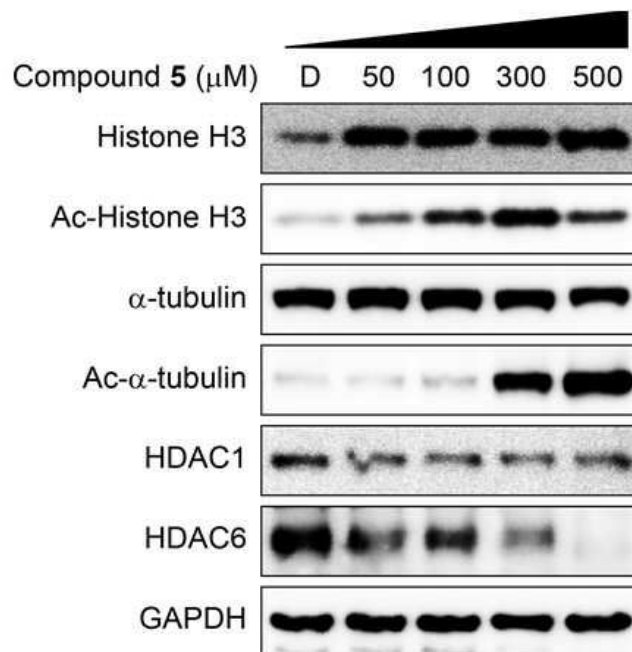
도면2



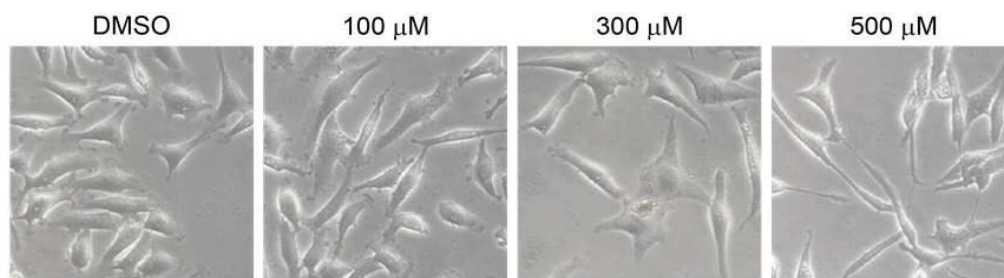
도면3



도면4



도면5



도면6

