(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0136289
(43) 공개일자 2017년12월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/437 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 31/18 (2006.01) *A61K 31/4188* (2006.01)
A61K 31/444 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/437 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0068176
(22) 출원일자 2016년06월01일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
홍순선
서울특별시 은평구 은평터널로 121-6, 101동 1104호 (신사동, 이랜드타운아파트)
정경희
경기도 부천시 소사구 경인로484번길 68-7, 102동 1105호 (괴안동, 신일해피트리아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

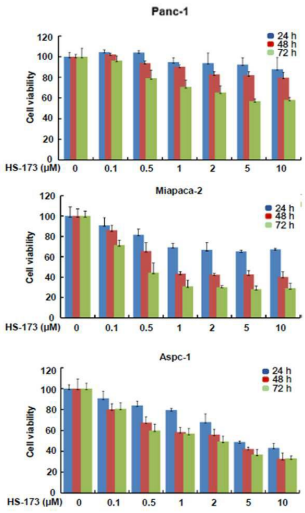
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **이미다조피리딘 유도체를 유효성분으로 포함하는 암 전이 억제용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 PI3K(phosphotidylinostiol-3-kinase; PI-3-kinase; PI3K) 저해활성을 갖는 이미다조피리딘 유도체(imidazopyridine derivative)를 유효성분으로 함유하는 췌장암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 이미다조피리딘 유도체는 TGFβ/smad 신호경로 및 PI3K/Akt/mTOR 신호경로를 동시에 차단함으로써 상피간엽이행(EMT)을 억제하여 암세포의 증식 및 전이를 억제하는 효과가 우수하므로, 췌장암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 31/18 (2013.01)
A61K 31/4188 (2013.01)
A61K 31/444 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)
(72) 발명자
방정환
인천광역시 남구 아암대로45번길 65 (용현동), 104호

마루파
인천광역시 중구 서해대로 366, A동 202호 (신흥동3가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI15C0554
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 질환극복기술개발사업
연구과제명 폐암의 Necroptosis를 제어하는 새로운 패러다임의 항암제 개발
기 여 율 1/1
주관기관 인하대학교 산학협력단
연구기간 2015.09.07 ~ 2016.09.06

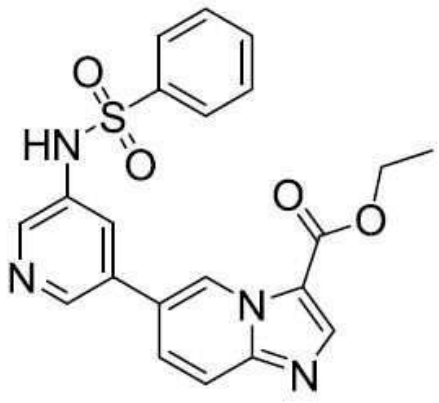
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 이미다조피리딘 유도체를 유효성분으로 함유하는, 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 이미다조피리딘 유도체는 PI3K(phosphotidylinostiol-3-kinase) 저해활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 상피간엽이행(EMT)을 억제하는 것을 특징으로 하는, 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 췌장암의 증식 및 전이를 억제하는 것을 특징으로 하는, 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

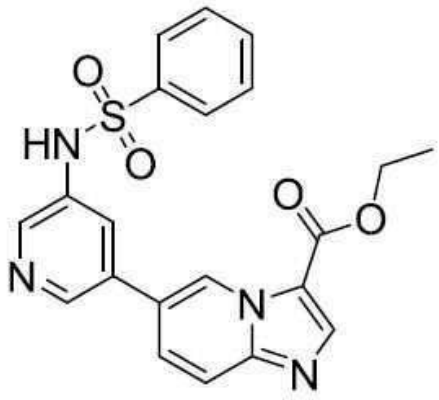
청구항 5

제1항에 있어서, 상기 췌장암은 췌관선암, 낭종선암 또는 내분비종양인 것을 특징으로 하는, 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 이미다조피리딘 유도체를 유효성분으로 함유하는, 췌장암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[화학식 1]



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 이미다조피리딘 유도체(imidazopyridine derivative)를 유효성분으로 포함하는 암 전이 억제용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 일반적으로 '종양(tumor)'은 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자라난 덩어리를 의미하며, 양성종양(benign tumor)과 악성종양(malignant tumor)으로 구분할 수 있다. 양성종양이 비교적 성장 속도가 느리고 전이(metastasis; 종양이 원래 발생한 곳에서 멀리 떨어진 곳으로 이동함)되지 않는 것에 반해 악성종양은 주위 조직에 침윤하면서 빠르게 성장하고 신체 각 부위에 확산되거나 전이되어 생명을 위협하게 된다. 악성종양을 암과 동일한 의미로 생각할 수 있다.

[0003] 신체를 구성하는 가장 작은 단위인 세포(cell)는 정상적으로는 세포 자체의 조절 기능에 의해 분열 및 성장하고, 수명이 다하거나 손상되면 스스로 사멸(죽어 없어짐)하여 전반적인 수의 균형을 유지한다. 그러나 여러 가지 원인에 의해 이러한 세포 자체의 조절 기능에 문제가 생기면 정상적으로는 사멸해야 할 비정상 세포들이 과다 증식하게 되며, 경우에 따라 주위 조직 및 장기에 침입하여 종괴(덩어리)를 형성하고 기존의 구조를 파괴하거나 변형시키는데, 이러한 상태를 암(cancer)으로 정의할 수 있다.

[0004] 췌장암(pancreatic cancer)은 다른 암에 비해 발생 빈도는 낮으나, 기간별 암환자 사망률이 가장 높은 것으로 알려져 있다. 보건복지부 암등록 본부에서 공개한 자료에 따르면, 췌장암 발병 후 1년 이내의 사망률은 췌장암 발병 환자의 약 80%를 차지하는 것으로 조사되어, 췌장암 환자의 생존율이 매우 낮은 것으로 확인 되었으며, 치료를 위한 여러 노력에도 불구하고, 발병 후 5년간의 생존율은 지난 30년 동안 개선되지 않았다. 또한 조기 진단이 어려운 암으로, 주변 장기나 림프절로 쉽게 전이되는 특징 때문에 예후가 다른 암들에 비해 좋지 않은 것으로 집계되었다.

[0005] 상피간엽이행(EMT; epithelial-to-mesenchymal transition)은 상피세포가 전이 능력과 침윤능력을 가지는 세포로 변환하는 과정이며 이는 척추동물과 무척추동물 모두에서의 태생기에 조직과 기관의 발생을 포함하는 형태학적 발생의 기본적인 현상으로 간주되었지만 과학의 발전과 더불어 성인의 상처 치유 및 암의 생성, 진행과정에 있어서도 EMT가 중요하게 작용함이 입증되었다. EMT에서 가장 초기에 일어나고 가장 중요한 과정은 E-카데린(E-cadherin)에서 N-카데린(N-cadherin)으로 전환하는 카데린 변환이다. E-카데린은 막성 당단백질로 세포외 영역은 인접 세포 의 E-카데린 분자와 결합하여 세포 간의 부착을 유지하고, 세포 내 영역은 α-, β- 및 p120 카데린과 결합하여 상피 세포의 극성과 세포골격을 형성한다. E-카데린은 TGF-β, Integrin, Wnt, RTK(receptor tyrosine kinase), Notch 등 세포증식과 세포소멸에 관여하는 다양한 신호체계에 의해 조절된다. 이중 TGF-β는 SMAD나 PI3K/AKT(phosphatidylinositol 3-kinase/serine-threonine kinase)에 작용하는데 이중 PI3K/AKT는 EMT를 활성화시키는데 중요한 역할을 담당한다고 보고되고 있다. 핵 내에서 EMT 관련 전사인자로는 Snail계인 Snail1, Snail2(Slug) 및 Snail3가 있으며 Zinc finger E-box Binding(ZEB)계로 ZEB1, ZEB2, SIP1(Smad-Interacting Protein 1)과 basic Helix-loop-helix (bHLH)계의 Twist가 있다. 췌장암에 있어서도 EMT가 관여하

는데 정상 췌장에서는 Snail과 Slug가 발현되지 않았으나 췌장암에서는 각각 78%와 50%에서 발현되었으며 췌장암 세포주를 저산소 조건에 노출시켰을 때 Twist가 발현되었다. 또한 췌장암에서 가장 많이 사용하는 피리미딘 항대사물질인 젬시타빈(gemcitabine) 저항성을 보이는 췌장암 세포주에서는 EMT 표지자와 암줄기 세포(Cancer stem cell) 표현형이 동시에 발현됨이 보고되었다. EMT가 췌장암의 증식 및 전이에 영향을 미친다는 연구를 바탕으로 EMT 인자들을 조절하는 약물을 개발한다면 암의 진행, 전이 및 항암제 내성을 극복할 수 있는 새로운 치료법이 제시될 것으로 사료된다.

[0006] PI3K(포스파티딜 이노시톨 3-키나아제)는 분자 구조와 기능, 기질 특이성에 따라 class I, II, III의 세 그룹으로 나뉘는데 그 중 종양 성장에 관여하는 것은 class I PI3K이며, 이들은 암세포의 성장, 증식, 분화, 자가사멸, 부착과 이동 등에 관여한다. PI3K/Akt/mTOR 신호(signaling)는 다양한 종류의 암에서 공통적으로 발현되는 대표적 신호전달 인자로써 세포의 성장 및 생존에 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있다. 그러나 PI3K/Akt/mTOR 신호와 췌장암의 상피 간엽이행을 통한 암의 전이 연구는 미비한 실정이다.

[0007] 본 발명자들은 이미다조피리딘 유도체 중 췌장암 치료 효과를 갖는 물질에 대해 연구하던 중, 이미다조피리딘 유도체가 TGF/smad 신호경로 및 PI3K/Akt/mTOR 신호경로를 동시에 차단함으로써, 상피간엽이행을 억제하여 암세포의 증식 및 전이를 억제하는 효과가 우수함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

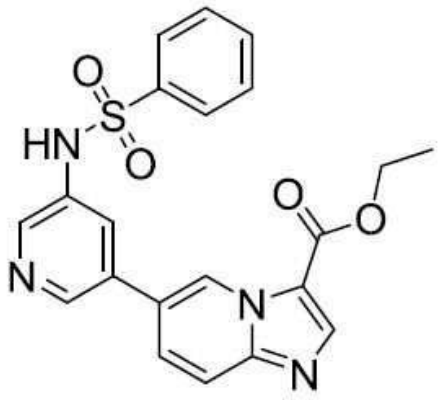
해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 이미다조피리딘 유도체(imidazopyridine derivative)를 유효성분으로 포함하는 암 전이 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 이미다조피리딘 유도체를 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] [화학식 1]



[0011]

[0012] 또한, 본 발명은 상기 이미다조피리딘 유도체를 유효성분으로 포함하는 췌장암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 이미다조피리딘 유도체는 TGFβ/smad 신호경로 및 PI3K/Akt/mTOR 신호경로를 동시에 차단함으로써 상피간엽이행(EMT)을 억제하여 암세포의 증식 및 전이를 억제하는 효과가 우수하므로, 췌장암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1a는 췌장암 세포에 본 발명에 따른 에틸6-(5-(페닐술폰아미드)피리딘-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-3-카복시레이트(이하, "HS-173")을 처리한 후 MTT 분석을 통해 시간 및 처리 농도에 따른 생존률을 확인한 결과를 나타

낸 도이다.

도 1b는 췌장암 세포에 HS-173을 처리한 후 집락형성 분석법(clonogenic assay)을 통해 시간의 흐름에 따른 생존률을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 1c는 췌장암 세포에 HS-173을 처리한 후 생존분율(survival fraction) 측정을 통해 생존률을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 췌장암 세포에서 HS-173의 침투능력을 확인하기 위하여 TGF-β에 의해 증가된 췌장암 세포의 침투가 HS-173에 의해 억제되는지 여부를 침윤 분석(invasion assay)을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다[a: Panc-1, b: Miapaca-2, c: Aspc-1].

도 3a는 췌장암 세포에 HS-173을 처리한 후 상피간엽이행 연관 단백질의 발현을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3b는 췌장암 세포에 HS-173을 처리한 후 상피간엽이행 연관 단백질의 발현을 형광염색법을 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 췌장암 세포에 HS-173을 처리한 후 TGF-β에 의해 증가된 PI3K/AKT 신호경로 및 TGF-β/smad 신호경로 억제를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

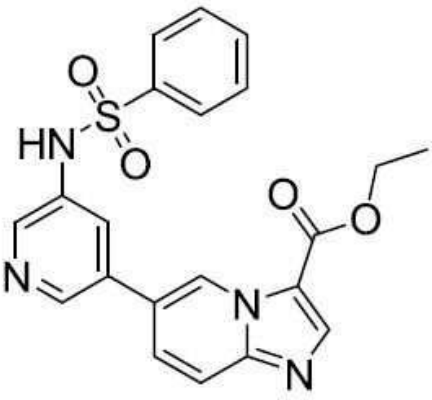
도 5은 췌장암 동물모델에서 HS-173을 처리한 후 종양 증식 억제 및 암세포 사멸 증가를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 췌장암 전이 동물모델에서 HS-173을 처리한 후 간과 폐로의 암전이 억제를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 이미다조피리딘 유도체(imidazopyridine derivative)를 유효성분으로 함유하는, 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] [화학식 1]



[0017]

[0018] 본 발명의 유효성분인 화학식 1로 표시되는 이미다조피리딘 유도체는 에틸 6-(5-(페닐술폰아미도)피리딘-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-3-카르복실레이트(이하 "HS-173"으로 명명)이며, PI3K(phosphotidylinostiol-3-kinase; PI-3-kinase;PI3K) 저해활성을 갖는 PI3K 저해제이다.

[0019] 본 발명의 이미다조피리딘 유도체는 TGFβ/smad 신호경로 및 PI3K/Akt/mTOR 신호경로를 동시에 차단함으로써, 상피간엽이행을 억제하여 암세포의 증식 및 전이를 억제하는 효과가 우수하므로, 췌장암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0020] 본 발명의 조성물은 상기 화학식 1의 이미다조피리딘 유도체와 함께 췌장암 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.

[0021] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형

제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸 히드록시 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 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

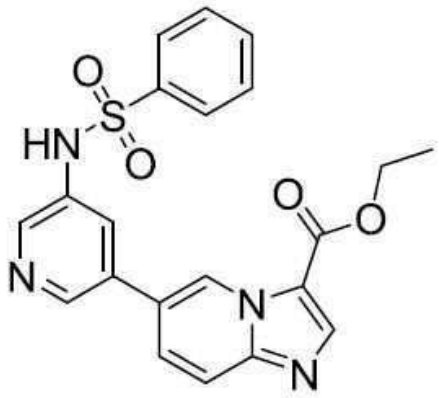
[0023] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 이미다조피리딘 유도체의 일일 투여량은 1일 1 mg/kg 내지 30 mg/kg의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

[0024] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0025] 본 발명의 조성물은 췌장암 치료 효과를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 이미다조피리딘 유도체(imidazopyridine derivative)를 유효성분으로 함유하는, 췌장암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0027] [화학식 1]



[0028]

[0029] 본 발명에서, "식품"이란, 질병의 예방 및 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체조절 기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해해야 한다.

[0030] 본 발명의 조성물은 췌장암의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 N-치환된 L-글루타민 유도체를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 N-치환된 L-글루타민 유도체를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합

양은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 N-치환된 L-글루타민 유도체는 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0031] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0032] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.

[0033] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0034] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 제제예를 제시한다. 그러나 하기 실시예 및 제제예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 제제예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0035] **실시예 1. 이미다조피리딘 유도체의 준비**

[0036] 이미다조피리딘 유도체로서 에틸 6-(5-(페닐술폰아미드)피리딘-3-일)이미다조[1,2-a]피리딘-3-카복실레이트(HS-173)를 사용하였으며, 실험시 DMSO에 녹여 사용하였다.

[0037] **실험예 1. 이미다조피리딘 유도체의 췌장암 세포증식 억제 효과**

[0038] **1-1. MTT 분석**

[0039] 본 발명의 이미다조피리딘 유도체의 췌장암 세포증식 억제 효과를 알아보기 위하여, 췌장암 세포에 대한 세포독성 평가를 수행하였다. 먼저, 췌장암 세포주인 Panc-1, Miapaca-2 및 Aspc-1에 0.1% (v/v) HS-173를 각각 0, 0.1, 0.5, 1, 2, 5 및 10 μM의 농도로 처리하였다. 처리한 각 세포를 24 시간 동안 배양한 후, 20 ㎕의 MTT 용액(2mg/mℓ)을 각 웰에 첨가하고, 플레이트를 37℃의 온도에서 4시간 동안 다시 배양하였다. 배양 후, 포르마잔 결정을 DMSO(100 혹은 300 ㎕/well)에 넣고 5분간 일정하게 흔들면서 녹였다. 각 플레이트의 흡광도를 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 사용하여 540nm에서 측정하였으며, 그 결과를 도 1a에 나타내었다.

[0040] 도 1a에 나타난 바와 같이, 본 발명의 HS-173은 Panc-1, Miapaca-2 및 Aspc-1에서 모두 용량 의존적으로 췌장암 세포의 성장을 억제하는 것을 확인하였다.

[0041] **1-2. 집락형성 분석(clonogenic assay)**

[0042] 본 발명의 이미다조피리딘 유도체의 췌장암 세포증식 억제 효과를 알아보기 위하여, 췌장암 세포에 대한 집락형성 분석을 수행하였다. 먼저, Panc-1, Miapaca-2 세포를 방사선 조사 양에 따라 0G 200개, 2G 500개, 4G 2000개, 6G 5000개로 시딩(seeding)하고 안정화시킨 후 다음날 HS-173을 각각 0, 1, 5 및 10 μM의 농도로 6시간 동안 처리하였다. 그 후 방사선을 (0-6G)로 조사하고 2시간 후 배지를 갈아주었으며, 14일 후 집락 형성 분석을 수행하였다. 집락이 형성되면 4% PFA를 500μl/0.5% 크리스탈 바이올렛(crystal violet)을 500 μl 0-20분간 처리하였다. 크리스탈 바이올렛 염색이 완료된 플레이트를 흐르는 물에 세척하고, 그 결과를 도 1b에 나타내었다.

[0043] 도 1b에 나타난 바와 같이, 본 발명의 HS-173은 시간 의존적으로 췌장암 세포의 성장을 억제하는 것을 확인하였

다.

[0044] **1-3. 생존분율(Survival Fraction) 측정**

[0045] 상기 실험예 1-2에서 Panc-1, Miapaca-2 세포에 대하여 형성된 집락을 카운팅하여 생존분율을 하기 식을 통해 계산하였으며, 그 결과를 도 1c에 나타내었다.

[0046] $$PE(PlatingEfficiency)=\frac{\text{카운팅된집락의수}}{\text{시딩된세포의수}}$$

[0047] $$\text{생존분율}(survivalfraction)=\frac{\text{처리된군내집락의수}}{\text{시딩된세포의수}SPE}$$

[0048] 도 1c에 나타난 바와 같이, 본 발명의 HS-173은 시간 의존적으로 췌장암 세포의 성장을 억제하는 것을 확인하였다.

[0049] **실험예 2. 이미다조피리딘 유도체의 췌장암 세포에 대한 침투능력 확인**

[0050] 본 발명의 이미다조피리딘 유도체의 췌장암 세포에 대한 침투 능력을 확인하기 위하여, 침윤 분석(invasion assay)을 수행하였다.

[0051] 12웰 플레이트에 FALCON cell culture insert(8㎛ 기공크기)를 끼우고 30~40 ㎕의 매트리젤(matrigel)을 첨가하였다. 그 후, 37 ℃ 배양기에서 30분 동안 굳히고 세포를 분주(5×10^4 /웰)하고, 하부 챔버에도 약 300 ㎕의 배양액을 채워주었다. 24시간 후 12웰 플레이트 중 한 웰에 PBS를 넣고 세척하여 매트리젤을 제거하고 75%의 EtOH로 고정하고 트리판 블루(trypan blue)로 염색한 후 침윤된 세포를 카운팅하였으며, 그 결과를 도 2a 내지 2c에 나타내었다.

[0052] 도 2a 내지 2c에 나타난 바와 같이, 본 발명의 HS-173은 Panc-1, Miapaca-2 및 Aspc-1 모두에서TGF-β에 의한 증가된 침투를 억제하는 것을 확인하였다.

[0053] **실험예 3. 이미다조피리딘 유도체가 췌장암 세포의 상피간엽이행 관련 단백질의 발현에 미치는 영향 확인**

[0054] **3-1. 웨스턴 블롯**

[0055] 본 발명의 이미다조피리딘 유도체가 췌장암 세포의 상피간엽이행에 미치는 영향을 확인하기 위하여, EMT 관련 단백질의 발현을 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다. 먼저, 웰 플레이트에 췌장암 세포주인 panc-1, Miapaca-2 를 1×10^6 세포수로 분주하고 24시간 동안 배양한 후, HS-173을 처리하여 48시간 동안 두었다. 상기 처리된 세포를 차가운 PBS로 3회 세척한 후, 1% 트리톤 X-100, 1% 노니뎃(Nonidet) P-40과 아프로티닌(aprotinin)(10 mg/ml), 류펩틴(leupeptin)(10 mg/ml)(ICN Biomedicals, Asse-Relegem, Belgium), PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride)(1.72 mM), 불화나트륨(NaF)(100 mM), NaVO3(500mM)및 Na4P207(500mg/ml;Sigma-Aldrich)로 구성된 단백질 분해효소 및 인산화 효소 저해제를 포함하는 완충용액에 넣고 용해시켰다. 각 세포로부터 수득된 동량의 단백질을 8 또는 12%의 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 전기영동하여 분리하고, 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membranes)으로 이동시켰다. 단백질의 이동은 폰소 S(Ponceau S) 염색 용액을 사용하여 확인하였다. 그 후 EMT 관련 인자에 특이적으로 결합하는 1차 항체에 HRP(horseradish peroxidase)와 결합된 2차 항체를 반응시켜 발광 시스템(chemiluminescence plus system, Amersham Biosciences)으로 해당 단백질의 발현량을 시각화하였으며, 그 결과를 도 3a에 나타내었다.

[0056] 도 3a에 나타난 바와 같이, 본 발명의 HS-173은 Panc-1, Miapaca-2 및 Aspc-1 모두에서 TGF-β에 의해 감소된 상피마커 Ecadherin과 CK-18의 발현을 증가시키고, 증가된 간엽마커인 비멘틴(vimentin)의 발현을 감소시킴을 확인하였다.

[0057] **3-2. 형광염색법**

[0058] 본 발명의 이미다조피리딘 유도체가 췌장암 세포의 상피간엽이행에 미치는 영향을 확인하기 위하여, EMT 관련 단백질의 발현을 면역형광 분석을 수행하였다. 구체적으로는 췌장암 세포주 PANC-1을 DMEM 배지에서 18-mm 커버글라스에 분주한 후, 24시간 동안 배양하였다. 5 ㎛M의 HS-173을 6시간 처리 및 PBS로 세척한 후, 아세트산:에탄올(2:1)의 혼합 용액을 사용하여 -20 ℃의 온도에서 5분간 고정시켰다. 비-특이적 결합을 실온에서 5% 염소 및 말 혈청/PBS로 실온에서 1시간 동안 차단한 후, 세포를 가습 챔버에서 ZEB1, CK-18에 대항하는 1차 항체로 배양하였다. 배양 종료 후 세포를 PBS로 2회 반복하여 세척하고, 어두운(dark), 37 ℃의 실온 조건에서 1.5% 말

혈청/PBS에서 형광-표지된 2차 항체로 1시간 동안 배양하였다. 핵은 4,6-디아미디노(diamidino)-2-페닐 인돌(DAPI)로 어두운 실온에서 30분 동안 염색하였다. 슬라이드를 PBS로 2회 반복하여 세척한 후, Dabco(Sigma-Aldrich)로 덮고, 공초점 레이저 현미경(confocal laser scanning microscope; CLSM) (Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 308 nm 및 568 nm 에서 관찰하였으며, 그 결과를 도 3b에 나타내었다.

[0059] 도 3b에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 HS-173은 CK-18의 발현을 증가시키고, 증가된 전사인자 Zeb1을 억제함을 확인하였다.

[0060] **실험예 4. 이미다조피리딘 유도체의 췌장암 억제 메커니즘 확인**

[0061] 본 발명의 이미다조피리딘 유도체의 췌장암 억제 메커니즘을 확인하기 위하여 PI3K/AKT신호경로와 TGF-β/smad 신호경로 활성을 웨스턴 블롯을 통해 확인하였다. 먼저 PI3K/AKT signaling을 저해하는 HS-173이 TGF-β/smad singaling에서의 각각의 단백질 활성의 변화를 확인하기 위하여 췌장암 세포주인 Panc-1, Miapaca-2에 HS-173을 48시간 동안 처리한 후 phospho-AKT, p-mTOR, p-smad2, p-smad3의 발현을 웨스턴 블롯을 통해 확인하였으며, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0062] 도 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 HS-173은 p-AKT와 p-mTOR, p-smad2, p-smad3의 발현을 저해함을 확인하였다. 이는 HS-173이 TGFβ/smad 신호경로 및 PI3K/Akt/mTOR 신호경로를 동시에 차단함을 나타낸다.

[0063] **실험예 5. 췌장암 동물모델에서 이미다조피리딘 유도체의 췌장암 세포증식 억제 및 세포 사멸 증가 효과**

[0064] 이종이식(Xenograft) 암 모델을 만들기 위하여 누드 마우스의 등에 췌장암 세포주(PANC-1)를 접종하고, 4주 후 종양이 생성되면 종양 부피를 측정하였다. 먼저, HS-173을 마우스에 10mg/kg으로 하루에 한번씩 투여하고 3일 간격으로 종양의 부피(공식: 장축×단축×단축÷2)를 측정하여 HS-173의 암증식 억제효과를 확인하고, 몸무게를 측정하여 HS-173의 약물 독성을 측정하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0065] 도 5에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 HS-173은 종양 증식을 억제하고 암세포 사멸을 증가시킴을 확인하였다.

[0066] **실험예 6. 췌장암 동물모델에서 이미다조피리딘 유도체의 췌장암 전이 억제 효과**

[0067] 전이 암 모델을 만들기 위하여 누드 마우스의 비장에 췌장암 세포주(PANC-1)를 접종한 후, HS-173을 마우스에 10, 30mg/kg으로 하루에 한번씩 투여하였다. 8주 후에 폐와 간으로의 암세포 전이를 확인 측정하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0068] 도 6에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 HS-173은 췌장암이 간과 폐로 전이되는_것을 억제함을 확인하였다.

[0069] 상기와 같이, 본 발명의 이미다조피리딘 유도체는 TGFβ/smad 신호경로 및 PI3K/Akt/mTOR 신호경로를 동시에 차단함으로써 상피간엽이행을 억제하여 암세포의 증식 및 전이를 억제하는 효과가 우수함을 실험을 통해 확인하였다.

[0070] 이하 본 발명의 이미다조피리딘 유도체를 함유하는 췌장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0071] **제제예 1. 약학적 제제의 제조**

[0072] 1. 산제의 제조

[0073]	화학식 1의 이미다조피리딘 유도체	20 mg
[0074]	유당	100 mg
[0075]	탈크	10 mg

[0076] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0077] 2. 정제의 제조

[0078]	화학식 1의 이미다조피리딘 유도체	10 mg
[0079]	옥수수전분	100 mg
[0080]	유당	100 mg
[0081]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0082] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0083] 3. 캡슐제의 제조

[0084] 화학식 1의 이미다조피리딘 유도체	10 mg
[0085] 결정성 셀룰로오스	3 mg
[0086] 락토오스	14.8 mg
[0087] 마그네슘 스테아레이트	0.2 mg

[0088] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0089] 4. 주사제의 제조

[0090] 화학식 1의 이미다조피리딘 유도체	10 mg
[0091] 만니톨	180 mg
[0092] 주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0093] $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$	26 mg

[0094] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0095] 5. 액제의 제조

[0096] 화학식 1의 이미다조피리딘 유도체	20 mg
[0097] 이성화당	10 g
[0098] 만니톨	5 g
[0099] 정제수	적량

[0100] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0101] **제제예 2. 식품 제제의 제조**

[0102] 1. 건강식품의 제조

[0103] 화학식 1의 이미다조피리딘 유도체	100 mg
[0104] 비타민 혼합물	적량
[0105] 비타민 A 아세테이트	70 g
[0106] 비타민 E	1.0 mg
[0107] 비타민 B1	0.13 mg
[0108] 비타민 B2	0.15 mg
[0109] 비타민 B6	0.5 mg
[0110] 비타민 B12	0.2 g
[0111] 비타민 C	10 mg
[0112] 비오틴	10 g
[0113] 니코틴산아미드	1.7 mg
[0114] 엽산	50 g
[0115] 판토텐산 칼슘	0.5 mg

[0116] 무기질 혼합물 적량

[0117] 황산제1철 1.75 mg

[0118] 산화아연 0.82 mg

[0119] 탄산마그네슘 25.3 mg

[0120] 제1인산칼륨 15 mg

[0121] 제2인산칼슘 55 mg

[0122] 구연산칼륨 90 mg

[0123] 탄산칼슘 100 mg

[0124] 염화마그네슘 24.8 mg

[0125] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0126] 2. 건강음료의 제조

[0127] 화학식 1의 이미다조피리딘 유도체 100 mg

[0128] 비타민 C 15 g

[0129] 비타민 E(분말) 100 g

[0130] 젖산철 19.75 g

[0131] 산화아연 3.5 g

[0132] 니코틴산아미드 3.5 g

[0133] 비타민 A 0.2 g

[0134] 비타민 B1 0.25 g

[0135] 비타민 B2 0.3g

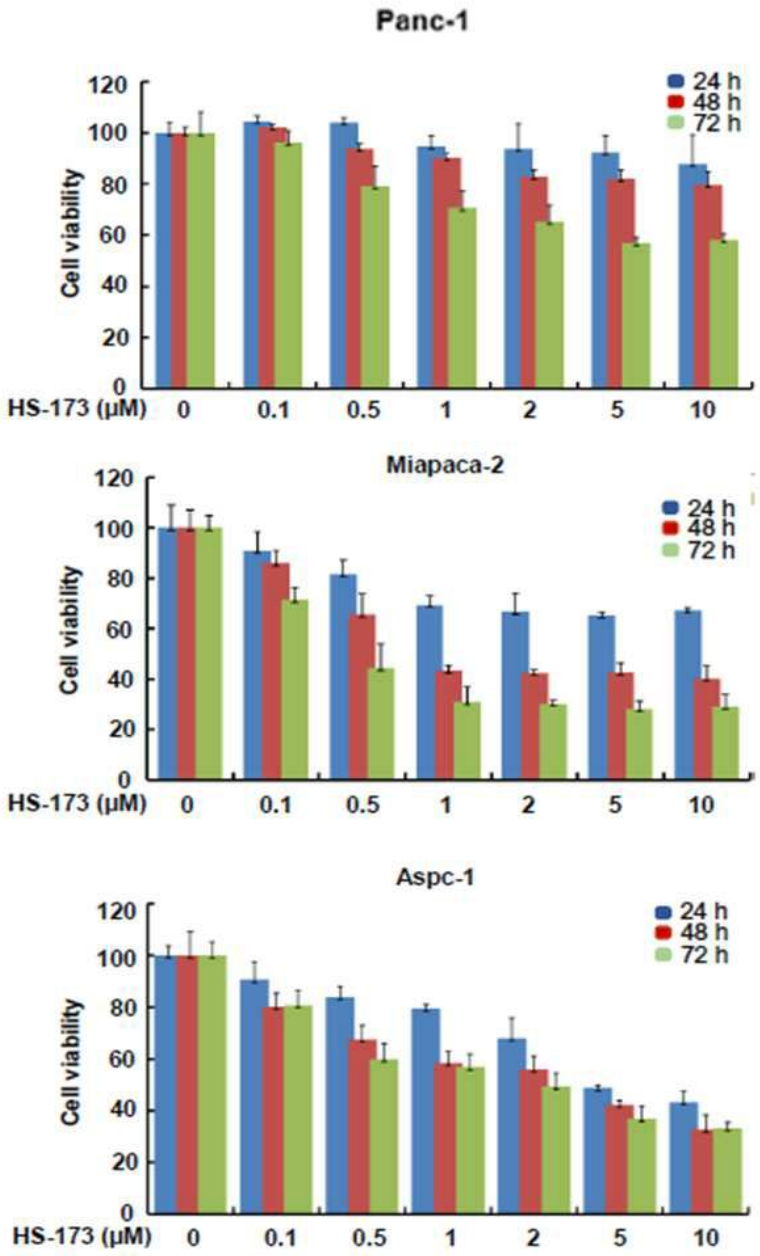
[0136] 물 정량

[0137] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

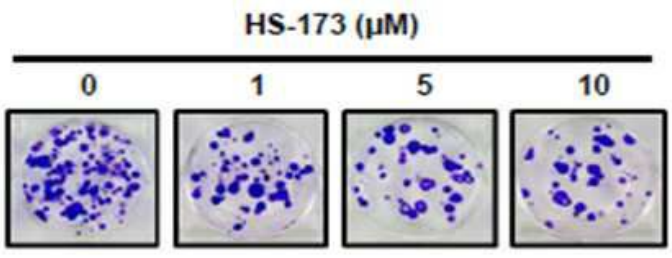
[0138] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

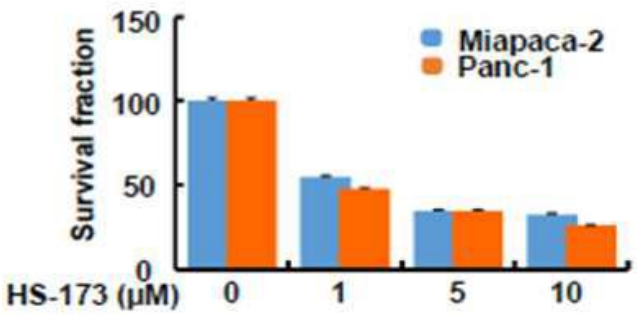
도면1a


Panc-1
Cell viability
120
100
80
60
40
20
0
24 h
48 h
72 h
HS-173 (μM) 0 0.1 0.5 1 2 5 10
Miapaca-2
Cell viability
120
100
80
60
40
20
0
24 h
48 h
72 h
HS-173 (μM) 0 0.1 0.5 1 2 5 10
Aspc-1
Cell viability
120
100
80
60
40
20
0
24 h
48 h
72 h
HS-173 (μM) 0 0.1 0.5 1 2 5 10

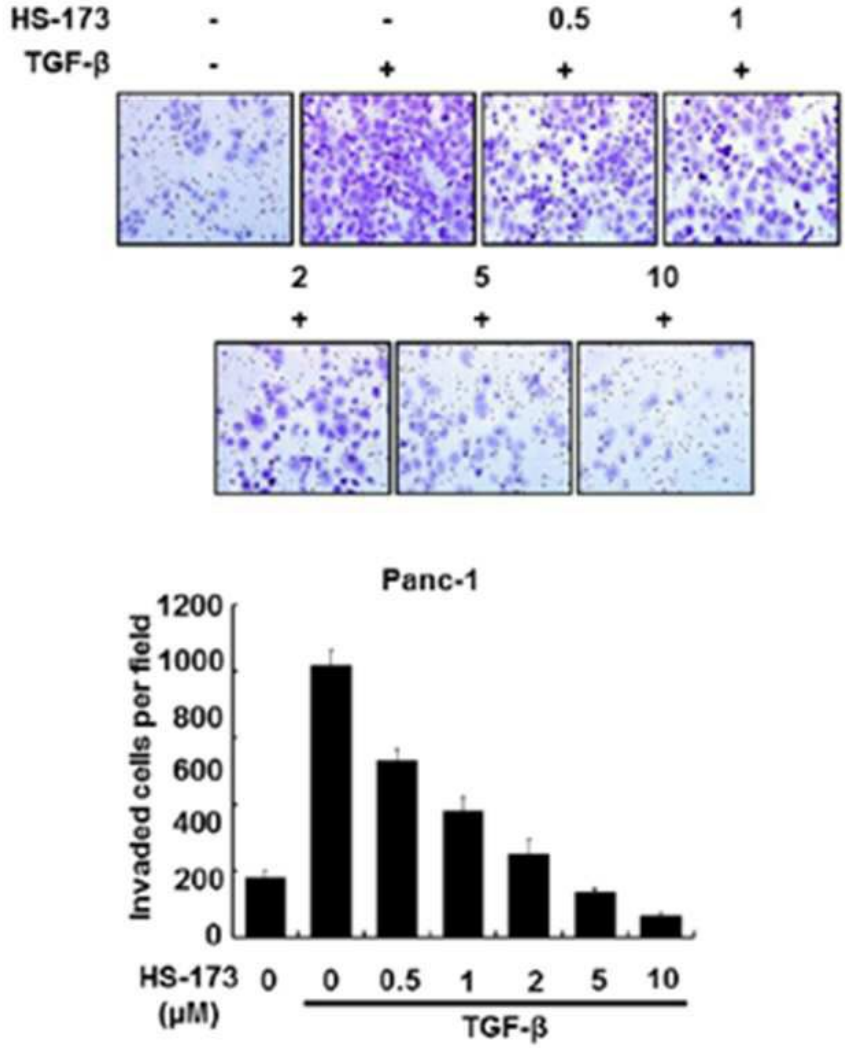
도면1b


HS-173 (μM)
0
1
5
10

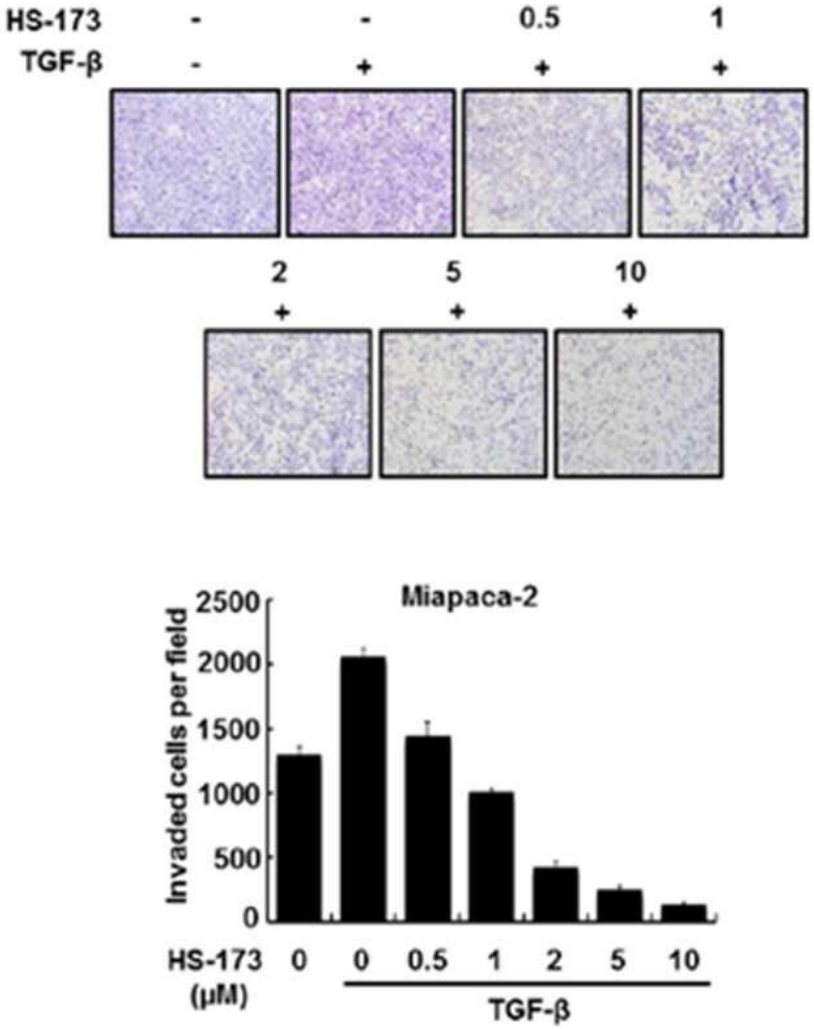
도면1c


Survival fraction
150
100
50
0
Miapaca-2
Panc-1
HS-173 (μM)
0
1
5
10

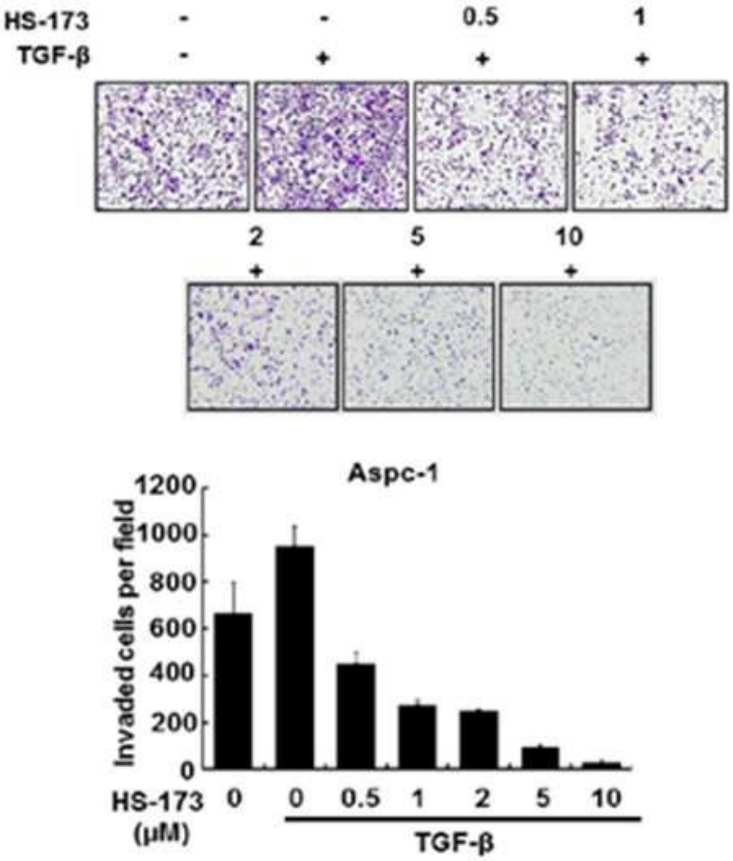
도면2a


HS-173
TGF-β
-
-
0.5
1
-
+
+
+
2
5
10
+
+
+
Panc-1
Invaded cells per field
1200
1000
800
600
400
200
0
HS-173 (μM)
0
0
0.5
1
2
5
10
TGF-β

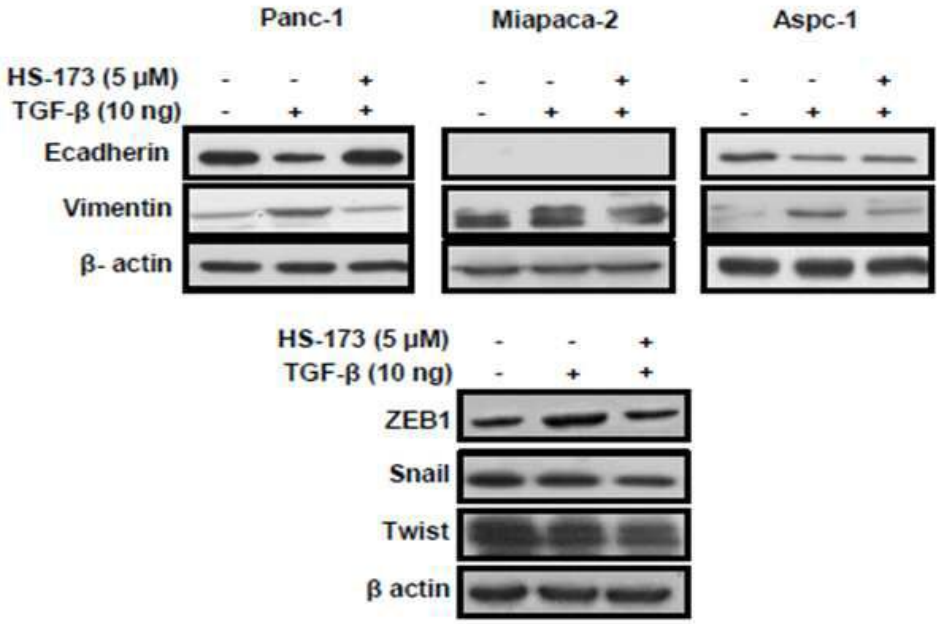
도면2b


HS-173 - - 0.5 1
TGF-β - + + +
2 5 10
+ + +
Miapaca-2
Invaded cells per field
2500
2000
1500
1000
500
0
HS-173 (μM) 0 0 0.5 1 2 5 10
TGF-β

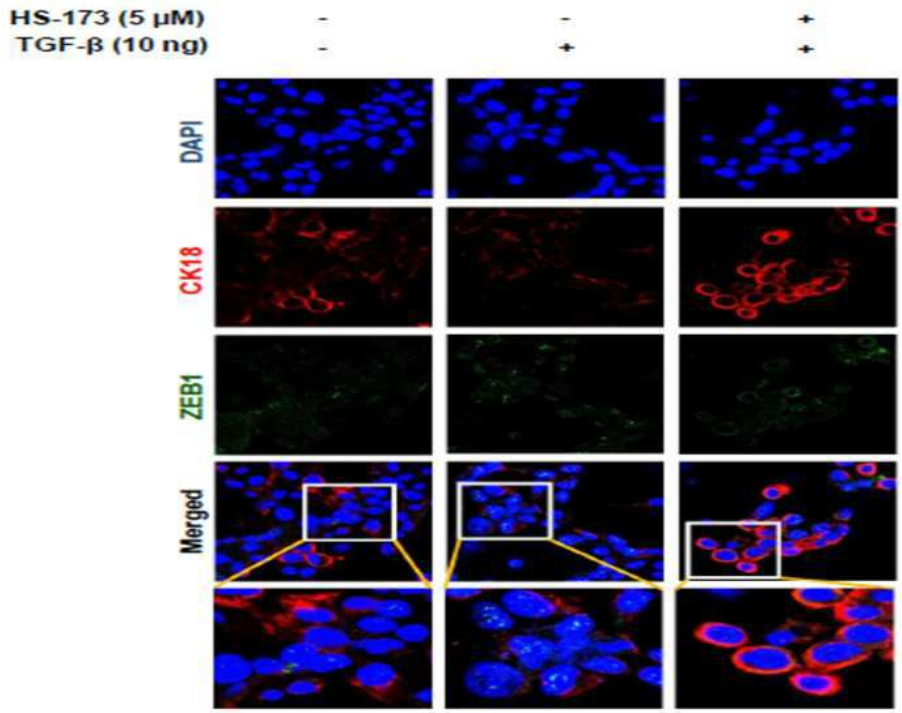
도면2c


HS-173 - - 0.5 1
TGF-β - + + +
2 5 10
+ + +
Aspc-1
Invaded cells per field
1200
1000
800
600
400
200
0
HS-173 (μM) 0 0 0.5 1 2 5 10
TGF-β

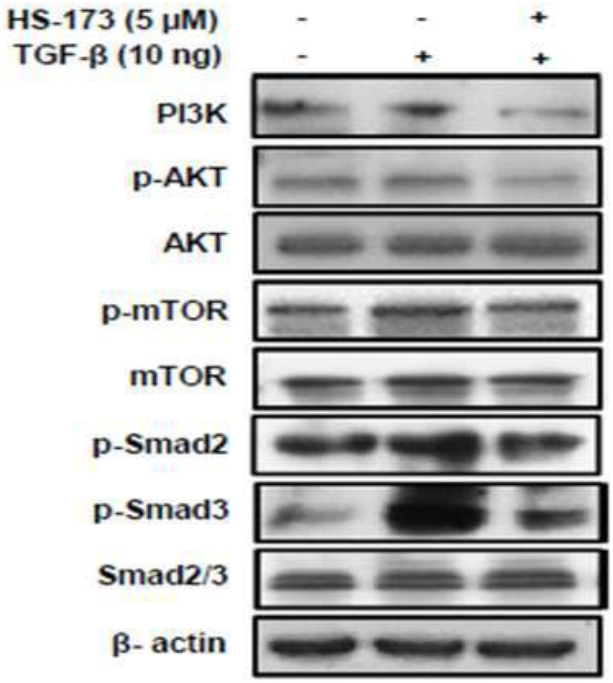
도면3a


Panc-1
Miapaca-2
Aspc-1
HS-173 (5 μM)
TGF-β (10 ng)
Ecadherin
Vimentin
β- actin
HS-173 (5 μM)
TGF-β (10 ng)
ZEB1
Snail
Twist
β actin

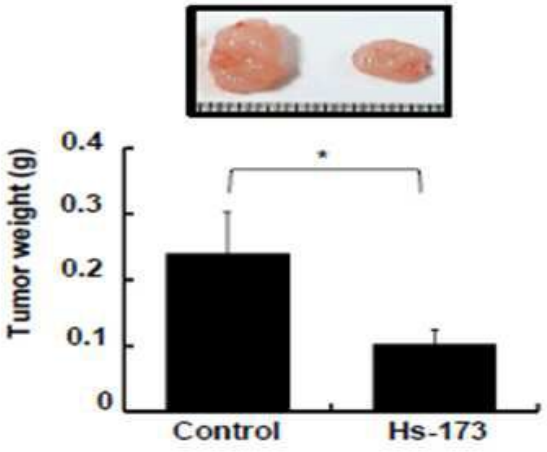
도면3b


HS-173 (5 μM) - - +
TGF-β (10 ng) - + +
DAPI
CK18
ZEB1
Merged

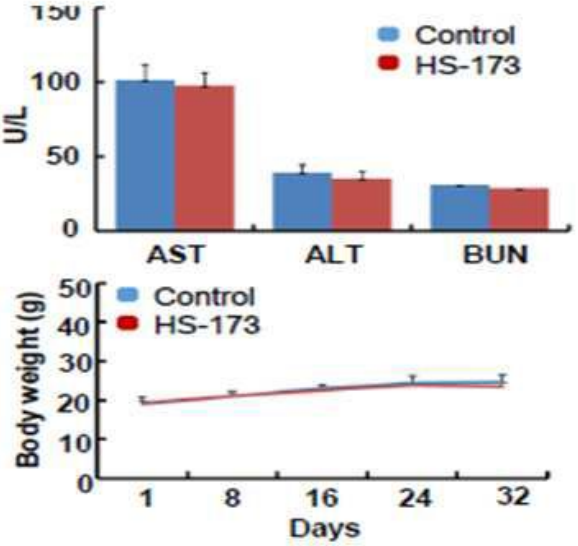
도면4


HS-173 (5 μM) - - +
TGF-β (10 ng) - + +
PI3K
p-AKT
AKT
p-mTOR
mTOR
p-Smad2
p-Smad3
Smad2/3
β- actin

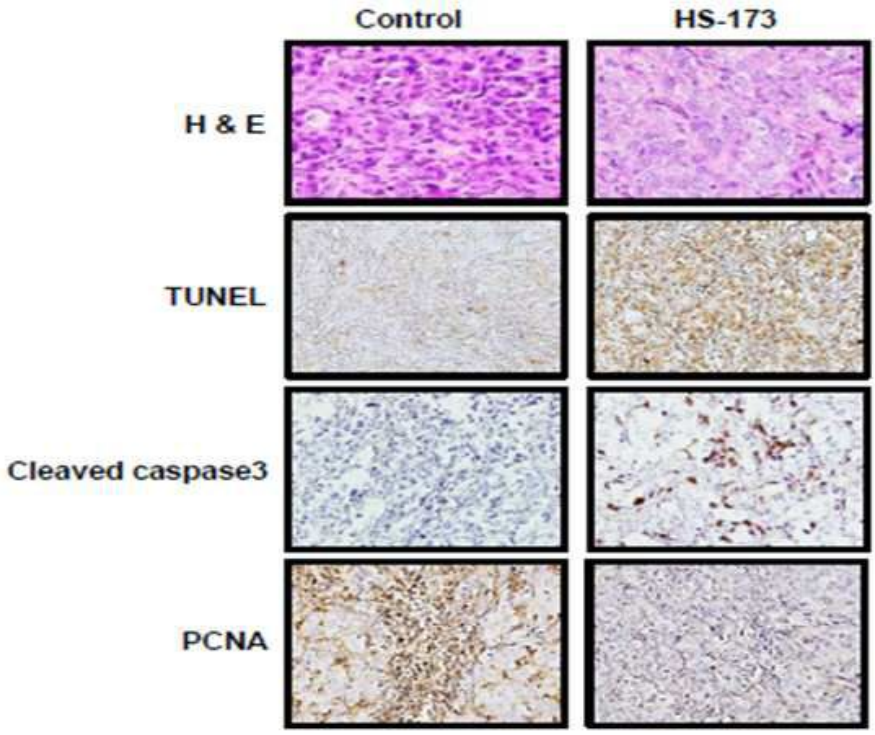
도면5a


Tumor weight (g)
0.4
0.3
0.2
0.1
0
*
Control
Hs-173

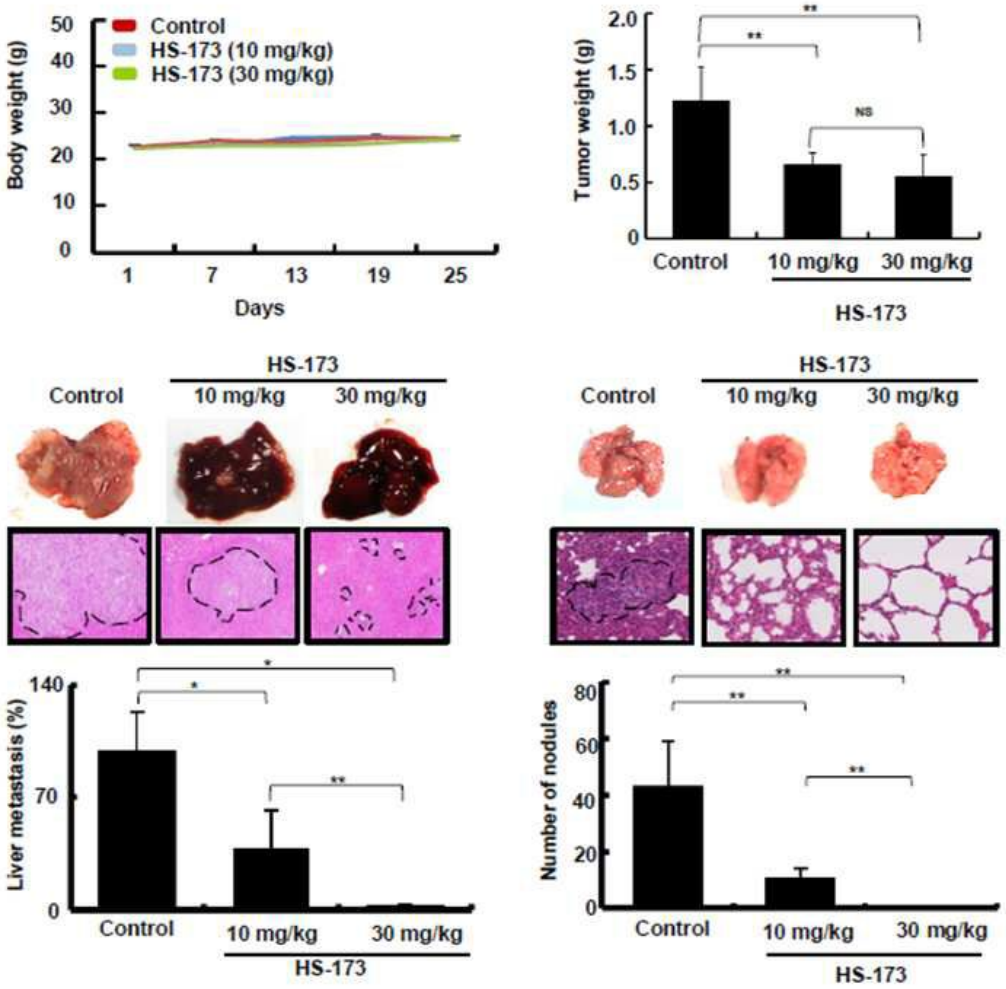
도면5b


150
100
50
0
U/L
Control
HS-173
AST
ALT
BUN
Body weight (g)
50
40
30
20
10
0
Control
HS-173
1
8
16
24
32
Days

도면5c



도면6


Body weight (g)
Control
HS-173 (10 mg/kg)
HS-173 (30 mg/kg)
Days
Tumor weight (g)
NS
Control
10 mg/kg
30 mg/kg
HS-173
Liver metastasis (%)
Number of nodules