



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년01월26일
(11) 등록번호 10-2356238
(24) 등록일자 2022년01월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07J 9/00 (2006.01) A61K 31/575 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07J 9/00 (2013.01)
A61K 31/575 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0033707
(22) 출원일자 2019년03월25일
심사청구일자 2020년03월02일
(65) 공개번호 10-2020-0113476
(43) 공개일자 2020년10월07일
(56) 선행기술조사문헌
US20070049538 A1*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
이상협
서울특별시 강남구 삼성로 151, 11동 1001호(대치동, 선경아파트)
김영천
서울특별시 광진구 천호대로102길 49(군자동)
최다운
서울특별시 노원구 성발로 265, 14동 1003호(중계동, 경남,롯데,상아아파트)
(74) 대리인
특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 2 항

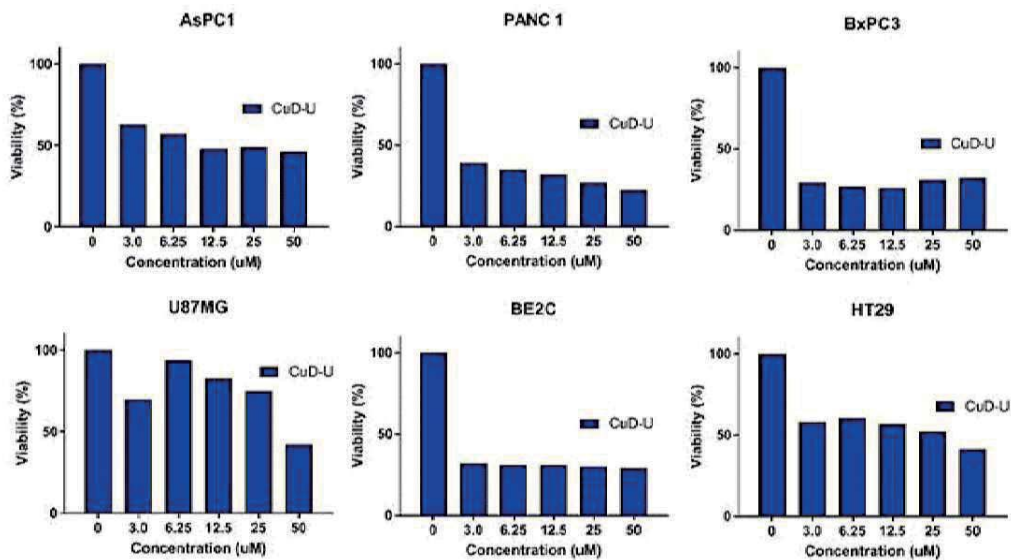
심사관 : 김지은

(54) 발명의 명칭 신규 화합물 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물

(57) 요약

본 발명은 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물에 관한 것으로, 상기 화합물은 다양한 암세포주에 대하여 세포 사멸 효과를 나타내어, 우수한 항암 활성을 가지고, 정상 세포에 대해서는 적은 독성을 가져, 부작용이 적은 항암제로서 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)

(56) 선행기술조사문헌
 US20120004169 A1
 US20130039883 A1
 US20080207578 A1
 CN101485665 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015K2A2A2001928
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	교육부 - 한국연구재단
연구사업명	한중협력연구사업
연구과제명	Citrullus 속 에서의 쿠쿠비테신생합성 경로 규명
기 여 율	7/10
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2015.07.01 ~ 2017.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

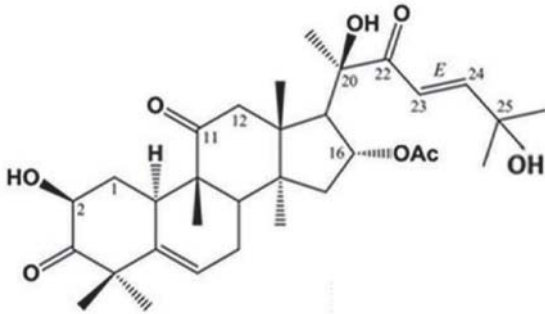
과제고유번호	1345280688
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	“Effectoromics” 기반의 노균병 저항성 유전자 발굴
기 여 율	3/10
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2019.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물로서, 상기 암은 신경아세포종, 전립선암, 신장암 및 갑상선암으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 의약 조성물:
[화학식 1]



청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 조성물은 인간 투여용인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규 화합물 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암은 세계적으로 높은 사망률을 보이고 있으며, 서구 사회에서는 심혈관 질환 다음으로 가장 일반적인 사망 원인이다. 특히, 인구의 고령화와 더불어 흡연 인구의 증가 및 대기 오염으로 인해 폐암이 증가하고 있으며, 식생활이 서구화되어 고지방식의 섭취가 일반화되고, 환경 오염 물질의 급격한 증가, 음주량의 증가 등으로 대장암, 유방암, 전립선암 등이 지속적으로 증가하는 추세에 있다. 이러한 실정에서 암의 조기 예방 및 치료를 가능하게 하여 인간 건강의 증진, 건강한 삶의 질 향상 및 인류 보건 증진에 기여할 수 있는 항암 물질의 창출이 절실히 요구되고 있다.

[0004] 한편, 암의 치료 방법은 암조직을 세포레벨에서 체내로부터 제거하는 데 있다. 현재의 암 치료방법은 외과요법, 방사선요법, 화학요법 등으로 나뉜다. 외과요법은 암을 조직레벨에서 체내로부터 제거하는 것으로서, 가장 합리적이지만 세포레벨에서 보면 주위의 조직 속에 침윤하거나 림프선에 전이해 있는 현미경적 병소를 완전히 제거하는 것은 힘든 문제점이 있다. 그러므로 조기암 또는 병소가 일부에 국한되어 있는 암(병기가 1기 또는 2기인

암)에 대해서는 외과요법이 매우 효과적이지만, 어느 정도 진행된 3기의 암인 경우에는 외과요법뿐 아니라 방사선요법이나 화학요법을 병용할 필요가 있다.

[0005] 방사선요법, 화학요법은 3기 이후의 진행암 또는 말기암에 주로 쓰이나, 후두암, 자궁경부암에서는 1기의 암이라도 방사선요법만으로 완치되므로 방사선요법이 제일 우선시 되고 있다. 특히, 후두암에서는 성대의 기능을 보존하기 위하여 1기에는 방사선요법만을 하고, 2기에는 방사선요법에 부분수술 또는 화학요법을 병용하는 수가 있다. 또, 폐암 중 소세포암은 종래부터 외과요법으로 시술하여도 예후가 좋지 않았는데, 지금은 화학요법을 우선으로 하며 방사선요법을 병용하는 경우가 많다. 이 요법에 의해 최근에는 근소하나마 5년 생존율을 상승시킬 수 있게 되었다. 이상과 같이 암 치료법은 조기암을 제외하고는 어느 것이나 안전하다고 말하기 어려우며, 상기의 외과요법, 방사선요법 및 화학요법들은 모두 정상세포들에게도 영향을 주어 심각한 부작용을 초래하는 문제가 있다.

[0006] 따라서 보다 안전하고, 치료 효과가 높은 대체적인 암치료 방법이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1538264호

발명의 내용

해결하려는 과제

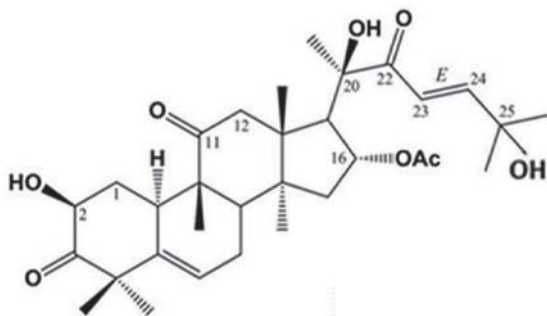
[0009] 본 발명은 신규 화합물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 암세포 특이적 사멸을 유도할 수 있는 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 1. 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염:

[0013] [화학식 1]



[0014]

[0015] 2. 위 1의 화합물 또는 그 염을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물.

[0016] 3. 위 2에 있어서, 상기 암은 신경교종, 신경아세포종, 췌장암, 전립선암, 유방암, 갑상선암, 신장암, 대장암, 간암 및 난소암으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 조성물.

[0017] 4. 위 2에 있어서, 상기 조성물은 인간 투여용인 조성물.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 조성물은 다양한 암세포주에 대하여 항암 활성을 나타낸다.

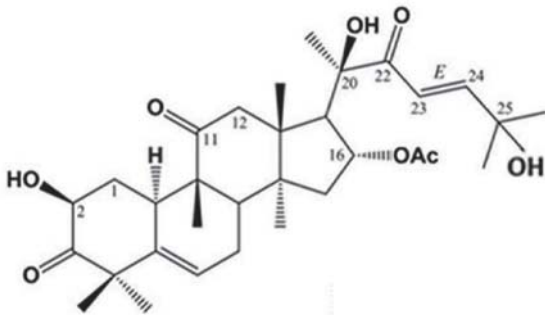
[0020] 본 발명의 조성물은 정상 세포에 대한 독성이 매우 적다.

도면의 간단한 설명

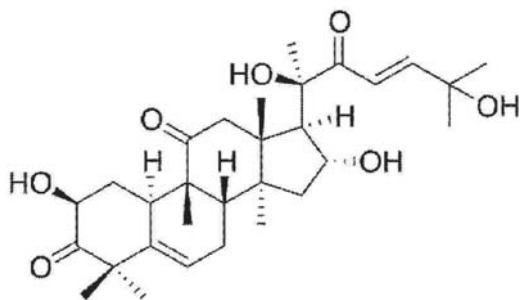
- [0022] 도 1 내지 3은 화학식 1의 화합물의 다양한 암세포주에 대한 항암 활성을 나타낸 것이다.
- 도 4는 화학식 1의 화합물의 정상 세포에 대한 독성을 나타낸 것이다.
- 도 5는 화학식 1의 화합물의 HPLC peak이다.
- 도 6은 화학식 1의 화합물의 LC-MS 분석 결과이다.
- 도 7은 화학식 1의 화합물의 ¹H NMR 분석 결과이다.
- 도 8은 화학식 1의 화합물의 ¹³C NMR 분석 결과이다.
- 도 9는 화학식 1의 화합물의 NMR 분석 결과 요약이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명은 신규 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명의 신규 화합물은 하기 화학식 1로 표시될 수 있다.
- [0026] [화학식 1]



- [0027]
- [0028] 상기 화학식 1의 화합물은 다양한 암 세포주에 대하여 우수한 항암 활성을 나타낼 수 있으며, 특히 정상 세포에 대한 독성이 적어, 암세포 특이적인 항암제로서 바람직하게 활용될 수 있다.
- [0029] 화학식 1의 화합물은 예를 들면 하기 화학식 2의 화합물을 아세틸화시켜 제조될 수 있다.
- [0030] [화학식 2]



- [0031]
- [0032] 아세틸화는 촉매로는 아세틸 트랜스퍼레이즈를 사용하여 수행될 수 있고, 구체적인 예를 들자면 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질질을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 코딩하는 유전자는 예를 들어 서열번호 2의 염기 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0034] 아세틸 트랜스퍼레이즈 사용시에 예를 들면 C16의 히드록시기를 아세틸기로 치환시켜 화학식 1의 화합물을 제조할 수 있다.
- [0035] 상기 화학식 2의 화합물은 예를 들면 수박(*Citrullus lanatus*)으로부터 얻어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은

아니다.

- [0036] 본 발명에 있어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 여기서 언급한 화합물들에서 발견되는 특정 치환체에 의존하는 비교적 비독성 산 및 염기로 제조된 활성 화합물의 염들을 포함한다. 본 발명의 화합물들은 상대적으로 산성 기능성을 포함할 때, 염기(base) 부가 염들은 충분한 양의 원하는 염기, 순수한 또는 적당한 비활성(inert) 용매로 그러한 화합물들의 중성 형태를 접촉하여 얻을 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염기 부가 염의 예들은 나트륨, 칼륨, 칼슘, 암모늄, 유기 아미노 또는 마그네슘 염 또는 유사한 염을 포함한다. 본 발명의 화합물들은 상대적으로 염기성 기능성을 포함할 때, 산성 부가 염들은 충분한 양의 원하는 산, 순수한 또는 적당한 비활성(inert) 용매로 그러한 화합물들의 중성 형태를 접촉하여 얻을 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 산성 부가 염의 예들은 초산, 프로피온산, 이소부틸산, 옥살릭산(oxalic), 마레익(maleic), 말로닉(malonic), 안식향산, 숙신산, 수버릭(suberic), 푸마릭(fumaric), 만데릭(mandelic), 프탈릭(phthalic), 벤젠설포닉(benzenesulfonic), p-톨릴설포닉(tolylsulfonic), 구연산, 주석산, 메탄설포닉(methanesulfonic), 및 그 유사체를 포함하는 상대적으로 비독성 유기산에서 유래한 염들 뿐만 아니라, 염화수소, 브롬화 수소, 질산, 탄산, 일수소탄산(monohydrogencarbonic), 인산(phosphoric), 일수소인산, 이수소인산, 황산, 일수소황산, 요오드화 수소 또는 아인산(phosphorous acid) 및 그 유사체를 포함한다. 또한 알긴네이트(arginate)와 그 유사체와 같은 아미노산의 염 및 글루쿠로닉(glucuronic) 또는 갈락투노릭(galactunoric) 산들과 그 유사체와 같은 유기산의 유사체를 포함한다(예를 들어, Berge 등 (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19). 본 발명의 일부 특정한 화합물들은 화합물들을 염기성 또는 산성 부가(addition) 염들로 전환하게 하는 염기성 및 산성 기능성 모두를 갖는다. 염들의 다른 예들은 본 발명이 속한 분야에서 공지된 문헌들, 예를 들면, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18theds. Mack Publishing, Easton PA (1990) 또는 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th eds., Mack Publishing, Easton PA (1995)에 개시되어 있다.
- [0038] 본 발명은 암의 예방 또는 치료용 의약 조성물에 관한 것이다.
- [0039] 본 발명의 의약 조성물은 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함한다.
- [0040] 본 발명의 조성물의 예방 또는 치료 대상인 암은 당 분야에 공지된 모든 암일 수 있으며, 예를 들면, 폐암(소세포 폐암 및 비소세포 폐암 포함), 대장암, 결장암, 직장암, 유방암, 전립선암, 방광암, 혈액암, 백혈병, 골수성 백혈병, 림프종, 자궁경부암(cervical carcinoma), 골육종(osteosarcoma), 교아종(glioblastoma), 흑색종(melanoma), 췌장암, 위암, 간암, 신장암, 담낭암, 담도암, 식도암, 난소암, 신경아세포종(neuroblastoma), 신경교종, 갑상선암 등을 포함하는, 암(cancer), 종양형성증(neoplasia), 또는 종양(tumor)이고, 구체적으로는 신경교종, 신경아세포종, 췌장암, 전립선암, 유방암, 갑상선암, 신장암, 대장암, 간암, 난소암 등일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 조성물에 따라 치료될 적합한 개체는 포유동물 개체를 포함한다. 본 발명에 따른 포유동물은, 이에 한정되는 것은 아니지만, 인간, 개(canine), 고양이과동물(feline), 소(bovine), 염소(caprine), 말(equine), 양(ovine), 돼지(porcine), 설치류(rodents), 토끼목(lagomorphs), 영장류(primates) 등을 포함하고, 자궁 내의(in utero) 포유동물을 포함하고, 구체적으로는 인간일 수 있다. 개체는 양쪽 성(性) 모두 일 수 있고 발생(development)의 임의의 단계일 수 있다.
- [0042] 본 발명에 따른 화합물은 임의의 적합한 경로에 의하여 이러한 경로에 적당한 약학 조성물의 형태, 그리고 의도된 치료를 위하여 효과적인 투여량으로 투여될 수 있다. 효과적인 투여량은 단일 또는 분할 투여로 일반적으로 약 0.001 내지 약 100 mg/체중kg/일이고, 바람직하게는 약 0.01 내지 약 30 mg/kg/일이다. 나이, 중, 및 치료될 질병 또는 상태(condition)에 따라 이 범위의 하한 미만의 투여량 수준이 적합할 수 있다. 다른 경우에는, 여전히 더 큰 투여량이 해로운 부작용없이 사용될 수 있다. 더 큰 투여량은 하루 동안 투여를 위하여, 여러 작은 투여량으로 분할될 수 있다. 적절한 투여량을 결정하기 위한 방법들이 본 발명이 속한 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 문헌 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Mack Publishing Co., 20th ed., 2000이 이용될 수 있다.
- [0043] 본 발명에 따른 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 다음과 같이 투여될 수 있다.
- [0044] 본 발명에 따른 화합물은 구강으로 투여될 수 있으며, 구강은 연하(swallowing)를 포함하는 개념이다. 구강 투여에 의하여 본 발명의 화합물이 위장관(gastrointestinal tract)에 들어가거나, 예를 들어, 구강(buccal) 또는 설하(sublingual) 투여와 같이, 입으로부터 혈류로 직접적으로 흡수될 수 있다.
- [0045] 구강 투여를 위한 적합한 조성물은 고형상, 액상, 겔(gel), 또는 파우더 형상일 수 있으며, 정제(tablet), 로젠지(lozenge), 캡슐(capsule), 과립제, 산제 등의 제형을 가질 수 있다.

- [0046] 구강 투여를 위한 조성물은 선택적으로 장용 코팅(enteric coating)될 수 있으며, 장용 코팅을 통하여 지연된(delayed) 또는 지속된(sustained) 방출을 나타낼 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 구강 투여를 위한 조성물은 즉시 또는 변형된(modified) 방출 패턴을 가진 제형일 수 있다.
- [0047] 액체 제형은 용액, 시럽 및 현탁액을 포함할 수 있으며, 이러한 액상 조성물은 연질 또는 경질 캡슐 내에 함유된 형태일 수 있다. 이러한 제형은 약학적으로 허용 가능한 담체, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리에틸렌글리콜, 셀룰로오스, 또는 오일(oil)을 포함할 수 있다. 상기 제형은 또한 하나 이상의 유화제 및/또는 현탁제를 포함할 수 있다.
- [0048] 정제(tablet) 제형에서, 활성 성분인 약물의 양은 정제 총 중량 대비 약 0.05 중량% 내지 약 95 중량%, 더욱 일반적으로 제형의 약 2 중량% 내지 약 50 중량%로 존재할 수 있다. 또한, 정제는 약 0.5 중량% 내지 약 35 중량%, 더욱 일반적으로 제형의 약 2 중량% 내지 약 25 중량%를 포함하는 붕해제를 함유할 수 있다. 붕해제의 예로는 유당, 전분, 소디움스타치글리콜레이트, 크로스포비돈, 크로스카멜로스소디움(croscarmellose sodium), 말토덱스트린 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 정제로 제조하기 위해 포함되는 적합한 활택제는 약 0.1 중량% 내지 약 5 중량% 양으로 존재할 수 있고, 탈크(talc), 이산화규소, 스테아린산, 칼슘, 아연 또는 마그네슘 스테아레이트, 소듐 스테아릴 푸마레이트 등이 활택제로 사용될 수 있으나, 본 발명은 이러한 첨가제들의 종류에 한정되는 것은 아니다.
- [0050] 정제로 제조하기 위한 결합제(binder)로는 젤라틴, 폴리에틸렌글리콜, 당(sugar), 검(gum), 녹말(starch), 폴리비닐피롤리돈, 하이드록시프로필셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등이 사용될 수 있으며, 정제로 제조하기 위한 적합한 희석제로는 만니톨, 자일리톨, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 녹말(starch), 미결정셀룰로오스 등이 사용될 수 있으나, 본 발명은 이러한 첨가제들의 종류에 한정되는 것은 아니다.
- [0051] 선택적으로 정제에 포함될 수 있는 가용화제는 정제 총 중량 대비 약 0.1 중량% 내지 약 3 중량% 양이 사용될 수 있고, 예를 들어, 폴리소르베이트, 소듐 라우릴설페이트, 소듐 도데실설페이트, 프로필렌 카보네이트, 디에틸렌글리콜모노에틸에테르, 디메틸이소소르비드, 폴리옥시에틸렌글리콜화된 천연 또는 수소화 피마자유, HCORTM(Nikkol), 올레일에스테르, 젤루시어(Gelucire™), 카프릴릭/카프릴산 모노/디글리세리드, 소르비탄지방산에스테르, 솔루톨HSTM 등이 본 발명에 따른 약학 조성물에 사용될 수 있으나, 본 발명은 이러한 가용화제의 구체적 종류에 한정되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명에 따른 화합물은 혈류, 근육, 또는 내장 내로 직접 투여될 수 있다. 비경구 투여를 위한 적합한 방법은 정맥내(intravenous), 근육내(intra-muscular), 피하 동맥내(subcutaneous intraarterial), 복강내(intraperitoneal), 척추강내(intrathecal), 두개내(intracranial) 주사 등을 포함한다. 비경구 투여를 위한 적합한 장치는 (바늘 및 바늘 없는 주사기를 포함하는) 주사기(injector) 및 주입 방법(infusion method)을 포함한다.
- [0053] 비경구 투여를 위한 조성물은 즉시 또는 변형된 방출 패턴을 가진 제형일 수 있으며, 변형된 방출 패턴은 지연된(delayed) 또는 지속된(sustained) 방출 패턴일 수 있다.
- [0054] 대부분의 비경구 제형은 액상 조성물이며, 이러한 액상 조성물은 본 발명에 따른 약효 성분, 염, 완충제, 등장화제 등을 포함하는 수용액이다.
- [0055] 비경구 제형은 또한 건조된 형태(예를 들어, 동결 건조) 또는 멸균 비-수용액으로서 제조될 수 있다. 이들 제형은 멸균수(sterile water)와 같은 적합한 비히클(vehicle)과 함께 사용될 수 있다. 용해도 증강제(solubility-enhancing agents) 또한 비경구 용액의 제조에 사용될 수 있다.
- [0056] 본 발명에 따른 화합물은 피부 또는 경피로 국소적으로 투여될 수 있다. 이 국소 투여를 위한 제형은 로션, 용액, 크림, 젤, 하이드로젤, 연고, 폼(foam), 임플란트(implant), 패치 등을 포함한다. 국소 투여 제형을 위한 약학적으로 허용 가능한 담체는 물, 알코올, 미네랄 오일, 글리세린, 폴리에틸렌글리콜 등을 포함할 수 있다. 국소 투여는 또한 전기천공법(electroporation), 이온도입법(iontophoresis), 음파영동(phonophoresis) 등에 의하여 수행될 수 있다.
- [0057] 국소 투여를 위한 조성물은 즉시 또는 변형된 방출 패턴을 가진 제형일 수 있으며, 변형된 방출 패턴은 지연된(delayed) 또는 지속된(sustained) 방출 패턴일 수 있다.
- [0058] 질병 또는 상태의 적절한 치료 또는 예방을 위한 의약 조성물의 제조 방법은 본 발명이 속한 분야에서 통상의

지식을 가진 자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, Handbook of Pharmaceutical Excipients (7th ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy (20th ed.), Encyclopedia of Pharmaceutical Technology (3rd ed.), Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems (1978) 등에 기재된 바에 따라, 약학적으로 허용 가능한 담체, 운반체, 첨가제들 등을 본 발명에 따른 화합물과 적절히 혼합하여 본 발명의 목적을 위한 의약 조성물을 제조할 수 있다.

[0059] 본 발명에 따른 화합물은 단독 또는 다른 약학적 활성 화합물(pharmaceutically active compound)과 조합하여 암의 예방 또는 치료를 위하여 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 화합물 및 다른 약학적 활성 화합물(pharmaceutically active compound)(들)은 동시에(동일한 제형 또는 분리된 제형으로) 또는 연속적으로 투여될 수 있다.

[0060] 본 발명의 의약 조성물은 본 발명에 따른 화합물 이외의 하나 이상의 추가적인 약학적 활성 화합물(pharmaceutically active compound)을 더 포함할 수 있다.

[0061] 상기 하나 이상의 추가적인 약학적 활성 화합물(pharmaceutically active compound)은 항암제이다. 예를 들어, 항암제는 EGFR 키나아제 억제제, MEK 억제제, VEGFR 억제제, 항-VEGFR2 항체, KDR 항체, AKT 억제제, PDK-1 억제제, PI3K 억제제, c-kit/Kdr 타이로신 키나아제 억제제, Bcr-Abl 타이로신 키나아제 억제제, VEGFR2 억제제, PDGFR-베타 억제제, KIT 억제제, Flt3 타이로신 키나아제 억제제, PDGF 수용체 집단 억제제(PDGF receptor family inhibitor), Flt3 타이로신 키나아제 억제제, RET 타이로신 키나아제 수용체 집단 억제제(RET tyrosine kinase receptor family inhibitor), VEGF-3 수용체 길항제, Raf 단백질 키나아제 집단 억제제(Raf protein kinase family inhibitor), 혈관 신생 억제제(angiogenesis inhibitor), Erb2 억제제, mTOR 억제제, IGF-1R 항체, NFkB 억제제, 프로테아좀 억제제, 화학요법제(chemotherapy agent), 또는 포도당 환원제(glucose reduction agent)이다.

[0062] 보다 구체적인 예를 들면 질소 머스타드, 클로말부실(chlorambucil), 사이클로포스포미드(사이톡산(cytoxan)), 이소프라마이드(ifosfamide), 멜팔란(melphalan), 티프테파(thiotepe) 및 부설판(busulfan)을 포함하는 알킬화제; 메토트렉세이트(methotrexate), 5-플루오로우라실, 사이톡신 아라비노사이드(ara-C), 5-아자시딘, 6-메트캅토프린, 6-티오구아닌, 및 블루다라빈 포스페이트(fludarabine phosphate)를 포함하는 항대사제; 토독소루비신(todoxorubicin)(아드리아마이신(adriamycin)), 다우노루비신(daunorubicin), 닥티노마이신(dactinomycin), 블레오마이신(bleomycin), 미토마이신(mitomycin) C, 플리카마이신(plicamycin), 이다루비신(idarubicin), 및 미톡산트론(mitoxantrone)을 포함하는 항암성 항생제; 빈크리스틴(vincristine), 빈블라스틴(vinblastine), 빈데신(vindesine), 에톱사이드(etoposide), 및 테니포사이드(teniposide)를 포함하는 빈카알카로이드 및 에피도필록독신제; 카르머스틴(carmustine), 로머스틴(lomustine), 세머스틴(semustine) 및 스트렙토조신(streptozocin)을 포함하는 니트로소우레아; 다크라바진(Dacrabazine), 헥사메틸멜라민, 하이드록시우레아, 미토탄 프로카바진(mitotane procabazine), 시스플라틴(cisplatin), 시스플라티늄(cisplatinum) 및 카르보플라틴(carboplatin)을 포함하는 합성 약제; 코르티코스테로이드류(코르티손 아세테이트, 하이드로코르티손, 프레드니손(prednisone), 프레드니솔론(prednisolone), 메틸 프레드니솔론 및 덱사메타손(dexamethasone)), 에스트로겐류(디에틸스티베스테롤(diethylstibesterol), 에스트라디올(estradiol), 에스테르화 에스트로겐류, 접합 에스트로겐, 클로로티아스넨(chlorotiasnene)), 프로게스테론류(메드록시프로게스테론 아세테이트(medroxyprogesterone acetate), 하이드록시 프로게스테론 카프로에이트, 메게스테롤(megestrol) 아세테이트), 항에스트로겐류(타목시펜(tamoxifen)), 아로마스타제(aromastase) 억제제(아미노글루테티미드(aminoglutethimide)), 안드로겐류(테스토스테론 프로피오네이트(testosterone propionate), 메틸테스토스테론, 플루옥시메스테론(flouxymesterone), 데스톨락톤(testolactone)), 항안드로겐류(플루타미드(flutamide)), LHRH 유사체(루프롤이드(leuprolide) 아세테이트), 및 전립선 암용 내분비물(케토코나졸(ketoconazole))을 포함하는 액성 치료제를 예시할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다.

[0066] **실시예**

[0067] **화합물의 제조**

[0068] 쿠쿠르비타신 D(화학식 2)는 수박(*Citrullus lanatus*)으로부터 수득하였다.

[0069] 구체적으로, 수박 잎, 줄기, 뿌리 조직을 마쇄한 후 100% 메탄올 추출용매로 1시간동안 초음파추출 및 증탕추출하였다. 추출액은 원심분리와 감압농축기를 이용 용액 층을 회수 및 농축하였다. 농축된 용액은 C18 역상 칼럼

과 LC 기기를 이용 쿠쿠르비타신 D 용출부분을 분획하였다. 분획된 용출액은 seed vacuum concentrator를 이용 건조하여 본 발명에 사용되었다.

[0070] 수박(citrullus spp.) 식물체로부터 total RNA를 추출하여 oligo-dT prime 및 reverse transcription enzyme을 이용 complementary DNA(cDNA)를 제작하였다. Infusion법으로 재조합 단백질 발현 벡터에 클로닝하기 위해 ACT3 단백질 유전자(서열번호 2)의 start codon과 BamH1 제한효소 염기서열 (GGATCC, 서열번호 3)이 포함된 forward primer(염기서열: CAAATGGGTCGCGGATCCATGGGACGATGAATTAC, 서열번호 4)와 stop codon이 제외되고 XhoI 제한효소 염기서열(CTCGAG, 서열번호 5)이 포함된 reverse primer(염기서열: GTGGTGGTGGTCTCGAGATTGGCACTGGGTTCAA, 서열번호 6) 그리로 pfu DNA polymerase를 이용 polymerase chain reaction(PCR)법으로 상기 제작된 cDNA를 template로 하여 ACT3 단백질 유전자를 증폭하여 gel 전기영동법으로 분리 및 정제하였다. 정제된 ACT3 단백질 유전자 단편은 infusion cloning법으로 pET28a(+) 재조합 단백질 발현 벡터에 클로닝하였다.

[0071] ACT3 재조합 단백질을 발현시키기 위해 클로닝된 ACT3 재조합단백질 발현 벡터는 단백질 발현 E. coli인 BL21a1에 transformation 시킨 후 LB(lysogeny broth) 배양액에서 1mM IPTG(isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside)로 16℃에서 180rpm으로 mixing 시켜 ACT3 단백질 발현을 유도하였다.

[0072] ACT3 단백질이 유도된 배양액을(2 리터) 원심분리기를 이용 BL21a1 cell을 침전시킨 후 binding buffer(20mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, pH7.4)에 현탁 및 sonicator를 이용하여 cell을 파쇄하였다. 파쇄된 cell를 원심분리하여 상층액을 회수 후 Ni sepharoes를 이용하여 His-tag된 ACT3 단백질을 결합시켜 binding buffer로 washing 후 Elution buffer(350~500mM imidazole, 20mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, pH7.4)로 회수 하였다. 회수된 ACT3 단백질 용액은 30KDa cut off centricon을 이용 농축 및 storage buffer(10% glycerol, 50mM sodium phosphate, 0.1M sodium citrate, pH 7.4)로 교환 후 -80℃에 보관하여 사용하였다.

[0073] cucurbitacin D(CuD) 표준품을 이용하여 ACT3 효소활성을 확인하였다. 200 μM의 CuD, 400 μM의 acetyl-CoA(aceryl coenzyme A) 그리고 40μg의 ACT 효소를 효소반응 buffer(50mM sodium phosphate buffer, pH7.4)에 넣고 30℃에서 1시간 동안 효소반응 후, 반응액을 100% etyl acetate로 분획하였다. 분획된 ethylacetate 분획 용액은 centrifugal vacuum concentrator로 건조 후 120 μl의 100% mehtanol에 녹인 후 분석용 시료로 사용하였다.

[0074] ACT3 효소반응 결과는 HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용하여 반응물질을 분석하였다. 쿠쿠르비사틴 D 표준품의 retention time을 확인하였다. 반응물질을 분석하여 표준품과 같은 retention time의 물질을 표준물질(CuD)로 정하였고, 다른 retention time의 peak 물질을 효소반응생성물로 정하였다(도 5 참조). 효소반응물 분석에 사용한 HPLC의 조건은 하기 표 1과 같다.

표 1

	조 건
장비	Pump, autosampler, UV detector(Shimadzu, Japan)
column	Synchronis C18, 250×4.6mn(Thermo Scientific, USA)
용매조건	A용매: 100% acetonitrile, 0.1% formic acid B용매: water, 0.1% formic acid Linear gradient: 30% A용매, 70% B용매(5min) 70% A용매, 30% B용매(20~30min) 30% A용매, 70% B용매(40~45min) Flow rate: 1ml/min
검출 파장	230nm

[0077] 분석결과, 표준품 CuD과 같은 retention time의 peak 이외의 다른 retention time의 peak가 검출됨을 알 수 있었다. 새롭게 검출된 물질을 분자량을 알아내기 위해 LC-MS(liquid chromatography-mass spectrometry) 분석을 실시하였다(도 6 참조). 효소반응물의 분자량 분석에 사용한 LC-MS의 조건은 하기 표 2와 같다.

표 2

[0079]

조 건	
장 비	ACQUITY UPLC system, SYNAPT G2-Si HDMS (Waters)
Column	Waters Acquity BEH C18 1.7 μm (2.1 x 100mm) column temp.:40℃
용매조건	A용매: water, 0.1% formic acid B용매: 100% acetonitrile, 0.1% formic acid Linear gradient: 95% A용매, 5% B용매(initial) 95% A용매, 5% B용매(2.5min) 30% A용매, 70% B용매(5.0min) 30% A용매, 70% B용매(9.0min) 0% A용매, 100% B용매(9.5min) 0% A용매, 100% B용매(10.5min) 95% A용매, 5% B용매(11min) 95% A용매, 5% B용매(12min) Flow rate: 0.3ml/min
검출과장	230nm
질량분석 조건	Mode : ESI(-) Capillary voltage : 2 kV Source temp : 400 °C Sampling cone : 10 Desolvation Gas Flow (L/hr): 900.0

[0080]

LC-MS 분석결과, 표준품 CuD를 기질로 ACT3 단백질과의 반응물에서 기질인 CuD의 mass [M-H+FA]값 557.3110이 검출됨과 동시에 acetylation된 라나투신 mass 값 603.3157가 검출되었다. 추가로 라나투신의 구조를 알아내기 위해, 1H-NMR (600 MHz, CD3OD, δ H)과 13C-NMR (150 MHz, CD3OD, δ C) 구조분석을 통해, 본 발명에서 ACT3 효소가 triterpenoids계인 CuD의 C16번 탄소 위치를 acetylation시켜 화학식 1의 라나투신을 합성함을 확인하였다 (도 7 내지 9).

[0082]

항암 활성 평가

[0083]

암세포주는 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 수득하였다. 암세포주의 종류는 하기 표 3과 같다.

표 3

[0085]

Cell line	Origin	Cell line	Origin
AsPC1	Pancreatic cancer	BHT101	Thyroid cancer
PANC-1	Pancreatic cancer	CAK1	Kidney cancer
BxPC3	Pancreatic cancer	HT29	Colon cancer
BE2C	Neuroblastoma	Huh-7	Liver cancer
PC3	Prostate cancer	MDA-MB231	Breast cancer
T47D	Breast cancer	SKOV3	Ovary cancer
BCPAP	Thyroid cancer	U87MG	Glioma
CAL62	Thyroid cancer	BJ6	Human fibroblast cell

[0086]

각 항암 세포주를 96 well plate 에 5000 cells/well 농도로 분주한 후 24 시간 동안 배양기에서 pre-culture 한 후 라나투신을 농도별로 처리하여 48 시간 동안 배양기에서 배양하였다. 이후 배양액을 대상으로 CCK-8 assay 방법을 적용한 후 microplate reader 를 이용하여 450 nm 에서의 흡광도를 측정하여 항암 활성을 평가하였다.

[0087]

도 1 내지 3을 참조하면, 화학식 1의 화합물은 다양한 암종의 다양한 세포주에 대하여 항암 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있다.

[0089] 정상 세포 독성 평가

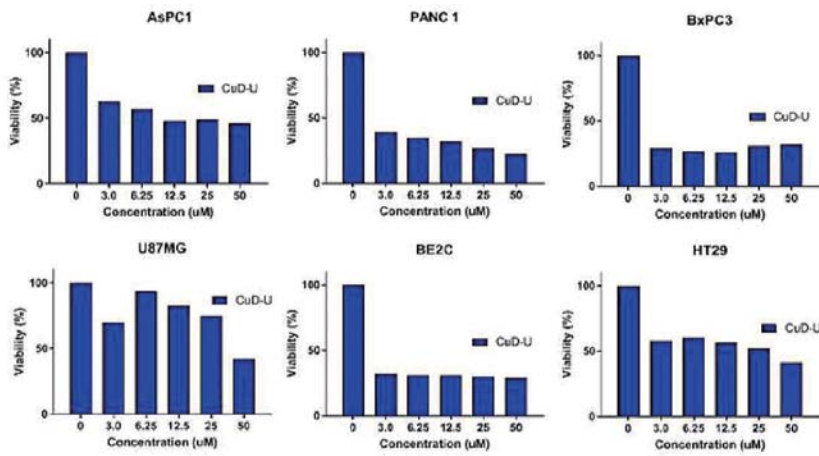
[0090] 정상세포로는 BJ6(human fibroblasts) 세포를 사용하였으며 이는 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 수득하였다.

[0091] 정상 세포주를 96 well plate 에 5000 cells/well 농도로 분주한 후 24 시간 동안 배양기에서 pre-culture 한 후 라나투신과 CuD (16번 탄소가 deacetylation 되어서 구조적으로 가장 유사하여 대조구로 사용)를 처리하여 48 시간 동안 배양기에서 배양하였다. 이후 배양액을 대상으로 CCK-8 assay 방법을 적용한 후 microplate reader 를 이용하여 450 nm 에서의 흡광도를 측정하여 항암 활성을 평가하였다.

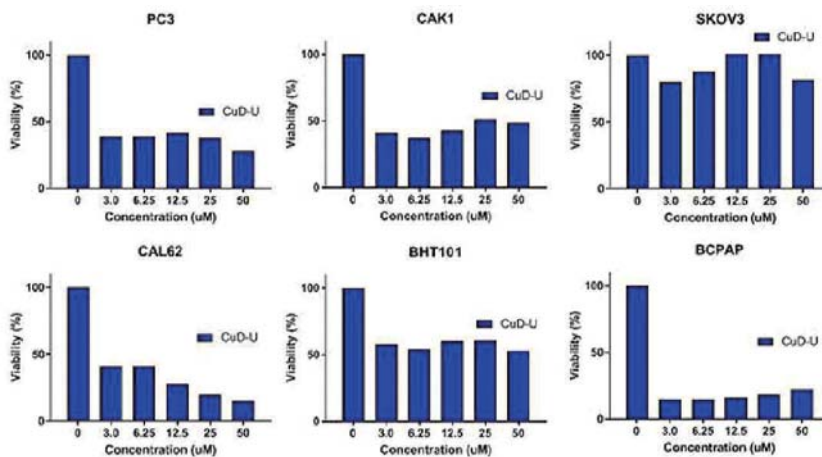
[0092] 도 4를 참조하면, 화학식 1의 화합물은 BJ6 세포에 대하여 매우 낮은 독성을 나타내는 것을 확인할 수 있다.

도면

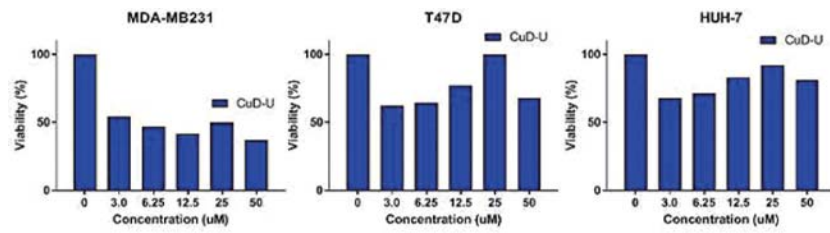
도면1



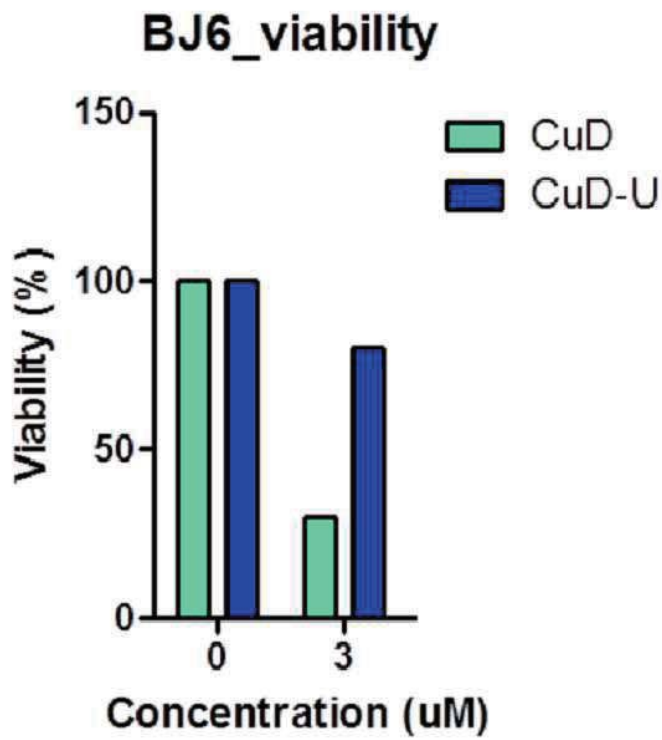
도면2



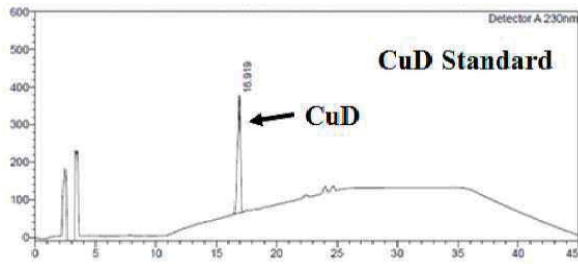
도면3



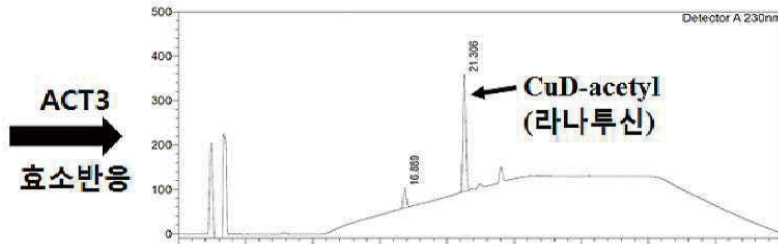
도면4



도면5

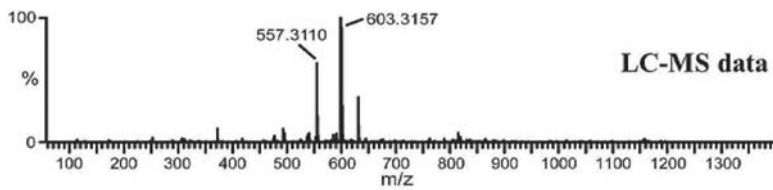


CuD 표준물질에 대한 HPLC peak



효소 반응 후 검출된 HPLC peak

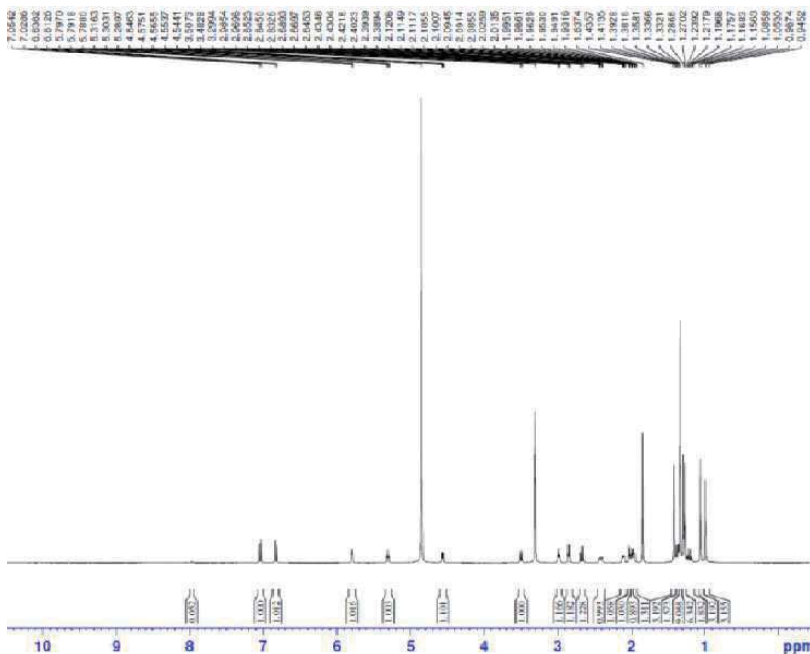
도면6



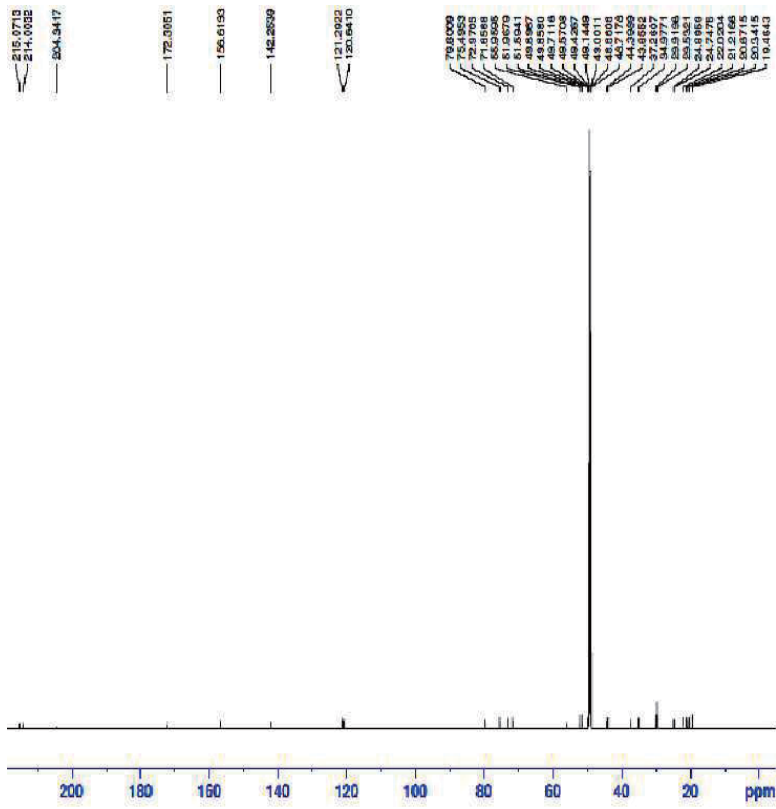
LC-MS result of acetylated cucurbitacin D(m/z 603.3157) in fractioned sample

557.3110 : CuD
603.3157 : CuD-Acetyl (lanatusin)

도면7



도면8



도면9

Table

No.	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
1	2.97, m, 1.19, m	37.3
2	4.55, m	75.5
3		214.0
4		51.6
5		142.3
6	5.79, br. d, J=5.4 Hz	121.3
7	2.41, br. dd, J=18.0, 5.4 Hz; 1.99, overlapped	24.7
8	2.01, overlapped	44.4
9		49.9
10	2.97, br. d, J=12.6 Hz	35.0
11		215.1
12	5.47, d, J=14.4 Hz; 2.65, d, J=14.4 Hz	49.7
13		52.0
14		49.9
15	1.94, dd, J=14.4, 6.6 Hz; 1.33, br. d, J=14.4 Hz	45.9
16	5.57, br. dd, J=14.4, 6.6 Hz	73.0
17	2.63, d, J=14.4 Hz	56.0
18	0.96, s	20.7
19	1.05, s	20.3
20		79.6
21	1.59, s	24.9
22		204.3
23	6.76, d, J=15.6 Hz	120.6
24	7.06, d, J=15.6 Hz	156.6
25		71.7
26	1.54, s	29.9
27	1.56, s	29.5
28	1.28, s	29.5
29	1.27, s	22.0
30	1.33, s	19.5
1'		
2'		
3'		
4'		
5'		
6'		
Ac		172.3
Ac-Me	1.83, s	21.2
Ac-Me	2.01, s	

서열 목록

- <110> SEJONG UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMY COOPERATION FOUNDATION
- <120> NEW COMPOUND AND MEDICINAL COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING
CANCER INCLUDING THE SAME
- <130> 015
- <160> 6
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 437
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> acetyl transferase
- <400> 1

Met Gly Thr Met Asn Tyr Met Gln His Leu Gln Ile Val Ser Thr Glu
 1 5 10 15
 Thr Ile Lys Pro Ser Ser Pro Thr Pro Pro Asn Leu Asn Thr His Thr
 20 25 30
 Leu Ser Leu Phe Asp Gln Leu Ala Pro His Ile Phe Val Pro Leu Val
 35 40 45
 Phe Phe Phe Ser His His Gly His Gly Ser Gly Thr Cys Val Gln Leu
 50 55 60
 Leu Arg Arg Ser Leu Ser Met Thr Leu Ser Arg Tyr Tyr Pro Phe Ala
 65 70 75 80
 Gly Arg Ile Lys Asp Asn Val Ser Val Asp Cys Asn Asp Glu Gly Val
 85 90 95
 Thr Phe Val Glu Ala Arg Leu Glu Gly Val Thr Val Ser Glu Ile Leu
 100 105 110
 Glu Asn Pro Arg Ser Glu Ile Val Glu Val Leu Phe Val Asp Gly Leu
 115 120 125
 Gln Trp Lys Asp Ser Lys Ile Gly Ala Leu Leu Lys Val Gln Ile Thr
 130 135 140
 Phe Phe Glu Cys Gly Gly Leu Ser Ile Gly Val Met Leu Ser His Arg
 145 150 155 160
 Leu Gly Asp Leu Ala Thr Leu Val Lys Phe Val Lys Asp Trp Ala Val
 165 170 175
 Val Thr Arg Asn Ser Gly Phe Gly Glu Glu Ile Val Asn Pro Leu Phe
 180 185 190
 Asn Ser Ala Asp Leu Phe Pro His Gly Asp Leu Pro Ala Met Ser Gly
 195 200 205
 Ala Val Val Glu Glu Gly Asn Phe Thr Cys Lys Arg Phe Val Phe Glu
 210 215 220
 Gly Ser Lys Ile Val Ser Leu Lys Asn Arg Ile Ser Glu Lys Val Glu
 225 230 235 240
 Asn Pro Ser Arg Val Glu Val Val Ser Ala Leu Ile Tyr Lys Ala Ile

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

305 310 315 320
 Gly Glu Phe Cys Asn Lys Tyr Ala Lys Lys Tyr Arg Thr Lys Glu Trp
 325 330 335
 Pro Glu Leu Ile Lys Arg Arg Leu Asn Glu Ser Arg Glu Ile Leu Ser
 340 345 350
 Lys Asn Gly Asn Asn Gln Leu Val Tyr Arg Phe Ser Ser Gly Cys Asn
 355 360 365
 Phe Pro Ile Tyr Glu Val Asp Phe Gly Trp Gly Ala Ala Asp Trp Val
 370 375 380

Thr Val Ala Ala Phe Lys Met Lys Asn Thr Val Met Met Leu Asp Ala
 385 390 395 400
 Lys Asn Gly Gly Gly Ile Glu Ala Leu Val Ser Leu Gln Asp His Glu
 405 410 415
 Met Ala Ala Phe Gln His Asn Gln Glu Leu Leu Ala Phe Ala Ser Leu
 420 425 430

Asn Pro Ser Ala Asn
 435

<210> 2

<211> 1314

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

acetyl transferase

<400> 2

atggggacga tgaattacat gcaacacctt caaattgttt caacagaaac cattaacct

60

tcttctccaa ctctccaaa tctcaact cataacctt cctcttcga tcagctagcc	120
ccccacattt tctgctctt cgtgttctt tctcccacc acggtcacgg ttcgggtact	180
tgcgtccaat tcttctgacg atctctttt atgactctat ctcggtacta cccatttgcg	240
ggtaggatta aagacaactg ctcggttgac tgaacgatg agggggtgac ttttgggag	300
gctcggctcg agggcgtgac ggtgtcggag attttgaaa accctagaag tgagattgtg	360
gaagtgttat ttgtgatgg gttgcaatgg aaagattcaa aaattggagc tttgttgaag	420
gttcaataa cgtttttga atgtggagga ttgagcattg gagtgatgct gtctcacagg	480
cttggggatt tggcaactg agtgaagttc gtaaaagatt gggcagtcgt gactcgaac	540
agcggttttg gggaagaaat tgtaaacccg ctttttaact ctgaggattt gttccccac	600
ggcgacttac ccgcatgtc cggcgcctg gttgaagaag gaaatttcac gtgcaagagg	660
ttcgtattcg aaggttcaa gattgtatcc ctaaaaata ggatttcaga gaaggtggag	720
aatccatctc gagtggaagt tgtgcagca ttaatttaca aagccatcat ttcagcttcg	780
cgaaattccc aaaaccacc cactgttg ttacaacac taaatttacg taaaagggtg	840
gcgccccgc tgcggaaag tttagtggga agtttagtgt cattcttccc gttgggtgtg	900
ggcggagaaa gagaagtaat agagctgcat gatttgggtg gtacaatgag aaaagaaatg	960
ggagagtttt gtaacaaata cgccaaaag tacagaacaa aagagtggcc tgaattgata	1020
aaaagacgat taaatgaatc gagagaaatt ttgagcaaaa atgggaataa tcaattggtt	1080
tatagattta gcagtggatg caattttcca atttatgaag tggattttgg gtggggagcg	1140
gcggattggg ttactgtggc ggcgtttaag atgaaaaaca ccgtaatgat gttggacgcc	1200
aaaaatggcg gcggaattga agctttggtc agtttacaag accacgaaat ggctgccttc	1260
caacacaatc aggagcttct tgcttttgc tctttgaacc caagtccaa ttaa	1314
<210> 3	
<211> 6	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> BamHI restriction site	
<400> 3	
ggatcc	6
<210> 4	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> forward primer
 <400> 4
 caaatgggtc gcggatccat ggggacgatg aattac 36
 <210> 5
 <211> 6
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Xho1 restriction site
 <400> 5
 ctcgag 6
 <210> 6
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> reverse primer
 <400> 6
 gtggtggtgg tgctcgagat tggcacttgg gttcaa 36