



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년08월27일

(11) 등록번호 10-1547885

(24) 등록일자 2015년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/421 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0023182

(22) 출원일자 2014년02월27일

심사청구일자 2014년02월27일

(56) 선행기술조사문헌

W02007076161 A2

(73) 특허권자

한국화학연구원

대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)

(72) 발명자

김광록

대전광역시 유성구 구즉로 16, 109동 906호 (송강동, 한마을아파트)

김채원

울산광역시 남구 변영로107번길 22 (달동, 주공아파트) 304-409

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 4 항

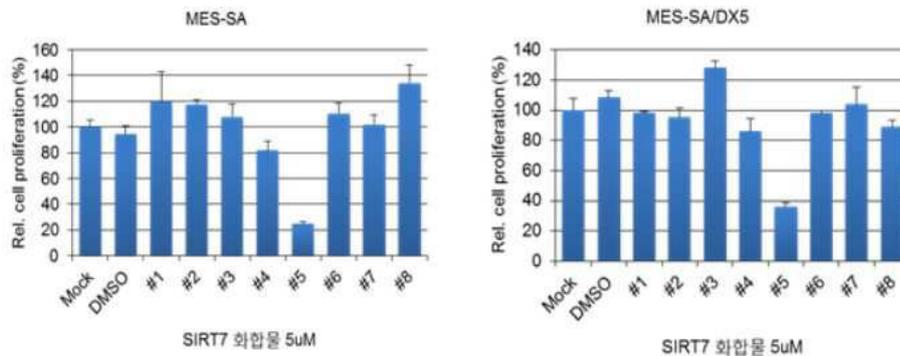
심사관 : 이형준

(54) 발명의 명칭 SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성을 저해하는 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

발명은 SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성을 억제하는 활성을 갖는 하기 화학식 I로 표시되는 ID: 97491 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 암을 예방 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

**서지희**

대전광역시 유성구 어은로 57 (어은동, 한빛아파트) 107-603

**이규양**

대전광역시 유성구 어은로 57 (어은동, 한빛아파트) 132-605

**최상운**

대전광역시 유성구 어은로 57, 132-104 (어은동, 한빛아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 10038744

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 산업융합원천기술개발사업

연구과제명 (RCMS)Drug Repositioning 기술을 이용한 신약개발 활용시스템 구축

기 여 율 1/1

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2013.04.01 ~ 2014.03.31

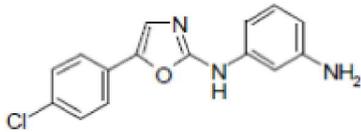
---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

하기 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

<화학식 I>



**청구항 2**

제 1항에 있어서,

상기 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 3**

제 1항에 있어서,

상기 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염이 1 내지 10 μM의 양으로 포함되는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**청구항 4**

제 1항에 있어서,

상기 염이 위암, 유방암, 자궁암, 대장암, 췌장암 및 간암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성을 저해하는 억제제를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이를 이용한 암 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] SIRT(sirtuin)은 효모를 포함한 다양한 생물종에서 노화와 관련된 기능이 밝혀져 있으며, 니코틴산아미드(NAD) 의존성의 탈아세틸화 활성을 가지고 있다고 알려져 있다. 현재까지 SIRT1에서 SIRT7까지 총 7종의 단백질이 밝혀져 있으며, 대부분 노화, 대사질환, 유전자의 안정성 등에 관여한다. 1992년 효모에서 DNA의 말단부분을 연장함으로써 효모의 수명을 늘려 주는 역할을 하는 것으로 밝혀졌고, 그 대상이 척추동물로 확대되어 대사질환과도

관련되는 것으로 알려졌다.

- [0003] SIRT1의 활성이 억제되었을 때 식욕이 억제되는 것으로 나타났고, 비만 모델 쥐의 지방세포에서 SIRT1의 발현이 감소 되었다는 보고가 있다. 실제 SIRT1을 과발현시킨 모델 쥐에서는 지방세포의 생성이 억제되었으며 지방의 분해가 증가하였다. 실제 비만 여성보다 마른 여성의 피하지방에서 SIRT1이 두 배 많이 발현된다. SIRT2와 SIRT3도 지방세포와 지방분해에 관여한다. SIRT4의 경우 베타세포에 많이 발현되는데 인슐린 분비에 관여하는 것으로 보고되었다. SIRT6는 글루코스 분해에 관여하며 미토콘드리아의 기능과 관련이 있다고 알려져 있으며, 실제 SIRT6를 유전적으로 제거한 쥐는 저혈당으로 태어나 초기에 사망한다고 보고되었다.
- [0004] SIRT7은 2012년에 그 기능이 처음 밝혀졌으며, class III의 히스톤 탈아세틸화효소(Histone deacetylase)에 해당하고 NAD+에 의존적으로 히스톤과 타겟 단백질을 탈아세틸화하여 세포사멸, 스트레스 반응, DNA 복구, 세포 주기, 대사를 조절하며, 암, 당뇨병, 심장질환과 관련성이 있다. SIRT7은 주로 핵 내에 존재하며 rRNA gene (rDNA)에 결합하고 RNA 중합효소 I 을 활성화하여 ribosomal RNA (rRNA)를 조절하고 감상선암, 유방암 및 간암과 관련이 있다. (Houtkooper RH et al., Sirtuins as regulators of metabolism and healthspan. Nat Rev Mol Cell Biol 2012 Vol. 13, pp. 225-238; Bosch-Presegue L et al., The dual role of sirtuins in cancer. Genes Cancer 2011 Vol. 2, pp. 648-662; Ford E et al., Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I ranscription. Genes Dev 2006 Vol. 20, pp. 1075-1080; Grob A et al., Involvement of SIRT7 in resumption of rDNA transcription at the exit from mitosis. J Cell Sci 2009 Vol. 122, pp. 489-498)
- [0005] SIRT7은 히스톤 H3의 18번 lysine(H3K18) 잔기를 탈아세틸화하고, COPS2, NME1과 같은 종양억제 유전자의 발현을 억제시켜 종양형성에 기여한다. H3K18은 바이러스에 의한 인간 세포의 암화 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이러한 이유로 SIRT7은 암관련 유전자인 NME1, COPS2, RPS20의 발현을 조절하며 나아가 SIRT7 특이 siRNA를 암세포에 처리했을 때 암세포의 성장이 억제되는 것을 발견하였다. 이에 SIRT7의 활성을 억제함으로써 암의 성장 및 생성을 억제할 수 있다. (Barber, M.F. et al., SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. Nature 2012 Vol. 487, pp. 114-120)
- [0006] 또한, SIRT7은 심장세포에서 p53 단백질의 라이신 382번 잔기에 특이적으로 탈아세틸화하여 Akt, Ras와 같은 다양한 신호전달을 억제하여 세포 사멸을 막는 역할을 한다고 알려져 있다. (Vakhrusheva, O. et al., Sirt7 Increases Stress Resistance of Cardiomyocytes and Prevents Apoptosis and Inflammatory Cardiomyopathy in Mice, Circ Res. 2008 Vol. 102, pp. 703-710)
- [0007] 본 발명에서는 본 연구팀의 종래 발명인 SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성을 정량분석하는 방법과 이의 활성을 저해하는 억제제를 스크리닝하는 방법을 활용하여 다양한 후보물질로부터 SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성을 저해하는 효과가 우수한 화합물을 스크리닝하고, 이의 암 예방 또는 치료 효과를 밝힘으로써 이 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이를 이용한 암 예방 또는 치료방법을 개발하였다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0008] (특허문헌 0001) WO 2012/106509 A1 (2012. 8. 9. 공개)

**비특허문헌**

- [0009] (비특허문헌 0001) Kelly, G. S. "A review of the Sirtuin system, its clinical implications and the potential role of dietary activators line resveratrol: Part 2." Aternative Medicine Review 2010 Vol. 15(4), pp 313-328.

(비특허문헌 0002) Barber, M. F. et al. "SIRT7 links H3K18 deacethlation to maintenance of oncogenic transfromation." Nature 2012, vol 487.

**발명의 내용**

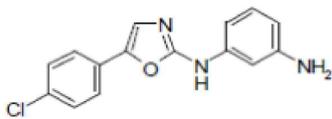
**해결하려는 과제**

[0010] 본 발명에서는 다양한 후보물질로부터 SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성을 저해하는 효과가 우수한 화합물을 스크리닝하고, 이의 암 예방 또는 치료 효과를 밝힘으로써 이 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이를 이용한 암 예방 또는 치료방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**과제의 해결 수단**

[0011] 위와 같은 발명의 목적을 달성하기 위하여 본 발명에서는 본 연구팀의 종래 발명인 SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성을 정량분석하는 방법과 이의 활성을 저해하는 억제제를 스크리닝하는 방법을 활용하여 다양한 후보물질로부터 SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성을 저해하는 효과가 우수한 화합물을 스크리닝하고, 하기의 화학식 I로 표시되는 ID: 97491 화합물의 암 예방 또는 치료 효과를 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

[0012] <화학식 I>



[0013]

**발명의 효과**

[0014] 본 발명에서는 SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성을 저해하는 효과가 우수한 상기 화학식 I로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하고자 한다. 상기 약학 조성물은 SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성에 의해 발생하는 위암, 유방암, 자궁암, 대장암, 췌장암, 간암 등의 다양한 암을 효율적으로 예방 또는 치료하는데 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0015] 도 1은 SIRT7 억제제를 스크리닝하기 위해 사용되는 SIRT Glo assay과정을 나타내는 모식도이다.  
 도 2는 사람의 자궁암 세포인 MES-SA 및 MES-SA/DX5 세포에 스크리닝된 표 1의 8종 화합물을 처리한 후 세포증식을 확인한 결과를 보여주고 있다. No. 5 화합물인 ID: 97491 화합물이 가장 높은 세포증식 억제 효과를 보이고 있다.  
 도 3은 사람의 유방암 세포인 MCF-7 세포에 스크리닝된 표 1의 8종 화합물을 처리한 후 세포증식을 확인한 결과를 보여주고 있다. No. 5 화합물인 ID: 97491 화합물이 가장 높은 세포증식 억제 효과를 보이고 있다.  
 도 4는 사람의 자궁암 세포인 MES-SA 및 MES-SA/DX5 세포에 대한 화학식 I로 표시되는 ID: 97491 화합물의 EC50 값을 나타내고 있다.  
 도 5는 사람의 자궁암 세포인 MES-SA 및 MES-SA/DX5 세포에 화학식 I로 표시되는 ID: 97491 화합물을 처리한 후 표적 단백질의 탈아세틸화를 확인하기 위한 western blot 결과를 보여주고 있다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0016] 이하, 본 발명을 구체적인 실시예에 의해 보다 상세히 설명하고자 한다. 하지만, 본 발명은 하기 실시예에 의해

한정되는 것은 아니며, 본 발명의 아이디어와 범위 내에서 여러 가지 변형 또는 수정할 수 있음은 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 것이다.

[0017] 본 명세서에서 사용되는 용어 “암세포”는 유방암세포, 간암세포, 췌장암세포, 위암세포, 대장암세포, 자궁암세포 등을 포함한다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어 “예방 또는 치료”는 암세포를 보유하고 있는 동물, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간에서 질병 또는 장애가 발생하는 것을 예방하는 것, 암세포의 생성을 억제하는 것 및 암세포를 경감시키는 것을 의미한다.

[0018] 본 발명에 따른 상기 화학식 I의 화합물은 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있으며, 이러한 염은 본 기술분야에서 알려진 통상의 방법을 통하여 화학식 I의 화합물로부터 제조할 수 있다.

[0019] 본 발명에 따른 암 예방 또는 치료용 약학 조성물은 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 염을 0.1 내지 50  $\mu\text{M}$ , 바람직하게는 1 내지 10  $\mu\text{M}$ 의 양으로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0020] 본 발명에 따른 약학 조성물은 암세포의 성장을 억제하며, SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성을 억제함으로써 포유동물, 바람직하게는 인간에 대한 암 예방 또는 치료 용도를 갖는다.

[0021] 상기 암은 바람직하게는 위암, 유방암, 자궁암, 대장암, 췌장암 및 간암으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0022] 본 발명에 따른 약학 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 첨가제를 추가로 포함할 수 있으며, 약학 분야에서의 통상적인 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제로 제형화될 수 있다. 이러한 목적에 적합한 제형으로는 비경구투여 제제로서 주사용 용액 또는 현탁액, 또는 주사시에 주사용 증류수로 제조하여 사용할 수 있는 즉시 사용형 주사용 건조분말 등의 주사용 제제, 또는 연고제 등의 국소 투여용 제제 등이 바람직하다. 이때 일반적으로 사용되는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 함께 사용할 수 있다.

[0023] 상기 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 염의 1일 투여량은 1 내지 1,000 mg/kg 체중, 바람직하게는 100 mg/kg 체중이며, 바람직하게는 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 유효성분의 실제 투여량은 암세포의 양, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등 여러 관련 인자를 고려하여 결정할 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 형태로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0024] 이하 실시예에서는 다양한 후보 화합물 중에서 스크리닝된 SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성을 억제하는 우수한 억제제인 화학식 I로 표시되는 ID: 97491 화합물의 암 예방 또는 치료 효과를 사람의 자궁암 세포인 MES-SA와 MES-SA/DX5 세포와 유방암 세포인 MCF-7 세포를 대상으로 하고 있지만, 이 화합물의 약학적으로 허용되는 염과 다른 다양한 암세포에 대해서도 같은 방식으로 적용될 수 있음은 이 기술분야에 있어서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 사항이다.

[0025] [실시예 1]

[0026] **SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성 억제제의 스크리닝**

[0027] 1. 대상 후보물질

[0028] SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성을 억제하는 화합물의 후보군으로는 한국화학물은행에서 대표화합물 6000종을 받아 이를 대상으로 하였다.

[0029] 2. SIRT7 억제제의 스크리닝 SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성 억제제를 스크리닝하기 위하여 SIRT Glo assay (Promega, G6452) kit를 사용하였고, 대상 SIRT7 단백질로는 SignalChem의 Cat. No. S41-30H 단백질을 사용하였다. 스크리닝은 384 well plate (Greiner Bioone, white, small volume, Cat. No. 874075)에서 진행하였으며, well 당 SIRT7 단백질 20 ng과 각 후보 화합물 5  $\mu\text{M}$ 을 섞고 전체 부피는 SIRT Glo buffer로 10

μl로 맞춘 후 30분간 실온에서 흔들며 반응시켰다. SIRT Glo assay에서 제공된 기질을 만들어 앞서 반응한 well에 동일한 양으로 10 μl 넣고 상온에서 흔들며 1시간 동안 반응한 뒤 루시페라제(luciferase) 활성을 마이크로플레이트 리더(microplate reader, Molecular Device, spectramax i3)로 측정하였다 (도 1 참조).

상기 SIRT Glo assay는 각 후보 화합물에 대하여 두 차례 반복하여 수행하였으며, 효과를 보인 화합물에 대하여는 다시 반복하여 assay를 수행하여 가장 효과가 좋은 화합물을 선별하였다. 이러한 방법을 이용하여 효과를 보인 8종의 화합물을 표 1에 나타내었다.

[표 1] SIRT Glo assay를 통해서 얻어진 탈아세틸화 억제제 화합물

No	ID	position	농도 (mM)	Volume(μl)	실험농도(μM)	%inhibition	IC50(μM)
1	98546	H-000001-A03	4.9	10	4.9	99.0	
2	111286	H-000001-B03	5	10	5	88.4	
3	192989	H-000001-C03	5.9	10	5.9	86.2	
4	136676	H-000001-D03	5.3	10	5.3	82.4	3.211
5	97491	H-000001-E03	5.2	10	5.2	65.7	5.731
6	19129	H-000001-F03	5.4	10	5.4	89.6	
7	91291	H-000001-G03	5	10	5	85.2	
8	808	H-000001-H03	5.1	10	5.1	87.8	

[실시예 2]

**후보 화합물의 암세포 증식 억제 효과**

1. 대상 암세포

사람의 자궁암 세포인 MES-SA와 MES-SA/DX5 세포와 사람의 유방암 세포인 MCF-7 세포를 대상으로 하여 상기 실시예 1에서 선별된 화합물들의 암세포 증식 억제 활성을 확인하였다. MES-SA/DX5 세포는 MES-SA 세포를 독소루비신(doxorubicin)에 내성이 있도록 변형한 세포이다.

2. 암세포 증식 억제 효과

MES-SA 세포, MES-SA/DX5 세포 및 MCF-7 세포를 96 well plate (BD Falcon, Cat. No. 353072)에 well 당 2,000개로 seeding하고 24시간 뒤 상기 실시예 1에서 선별된 각 억제제 화합물을 5 μM씩 처리하였으며, 2일 간격으로 배지를 교환해주며 억제제 화합물을 함께 처리하는 방법으로 총 4일간 수행하였다. 세포 증식은 EZ-Cytox Enhanced cell viability assay kit (DoGEN, Cat. No. EZ-3000)을 well 당 10 μl씩 처리하고 30분간 37 °C에서 반응시킨 후 450nm 파장에서 microplate reader (Molecular Device, spectramax i3)로 측정하였다.

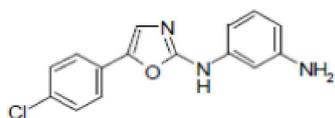
도 2는 자궁암 세포인 MES-SA 및 MES-SA/DX5 세포에 스크리닝된 표 1의 8종 화합물을 처리한 후 세포증식을 확인한 결과를 보여주고 있다. No. 5 화합물인 ID: 97491 화합물이 가장 높은 자궁암세포의 증식 억제 효과를 보이는 것을 알 수 있다.

도 3은 사람의 유방암 세포인 MCF-7 세포에 스크리닝된 표 1의 8종 화합물을 처리한 후 세포증식을 확인한 결과를 보여주고 있다. No. 5 화합물인 ID: 97491 화합물이 가장 높은 세포증식 억제 효과를 보이고 있다.

3. 억제제 ID: 97491 화합물

자궁암 세포 및 유방암 세포에 대해 가장 높은 증식 억제 효과를 보인 ID: 97491 화합물의 구조는 아래 화학식 I과 같다.

<화학식 I>



[0044]

[0045] 상기 화학식 I의 억제제 화합물을 최고 20  $\mu\text{M}$ 에서 1/2씩 단계 희석(serial dilution)하여 IC<sub>50</sub> (half maximal inhibitory concentration) 값을 구하였다. 그 결과 IC<sub>50</sub> 값은 5.731  $\mu\text{M}$ 이었다.

[0046] 또한, 자궁암 세포인 MES-SA 및 MES-SA/DX5 세포 각각에 대하여 EC<sub>50</sub> 값을 측정된 결과 상기 화학식 I의 억제제 화합물의 EC<sub>50</sub> 값은 도 4로부터 알 수 있는 바와 같이 각각 4.07  $\mu\text{M}$ 과 13.93  $\mu\text{M}$ 이었다. 상기 결과로부터 본 발명의 화합물이 암세포를 사멸시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0047] [실시예 3]

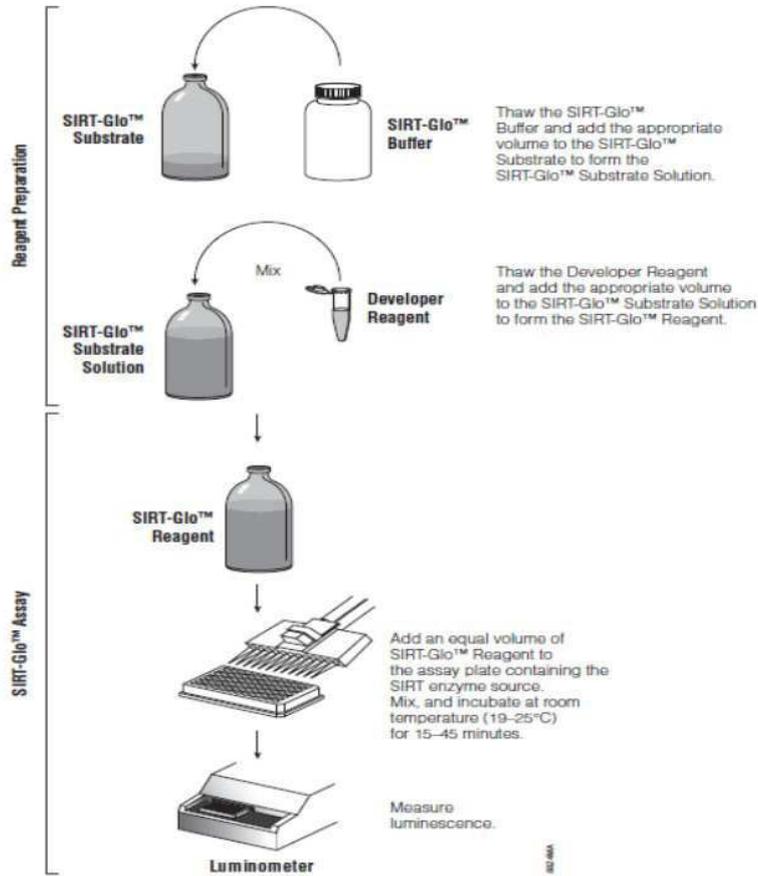
[0048] **ID: 97491 화합물의 표적 단백질의 탈아세틸화 억제 효과**

[0049] 사람의 자궁암 세포인 MES-SA와 MES-SA/DX5 세포에 화학식 I로 표시되는 ID: 97491 화합물을 1, 5, 10  $\mu\text{M}$ 씩 24시간 처리한 후 단백질을 추출하였다. SIRT7 단백질의 표적 유전자로 p53 단백질의 탈아세틸화를 western blot으로 확인하였다. p53의 주요 아세틸화 잔기 중에서 라이신 373, 379, 382번 잔기를 선택하였다.

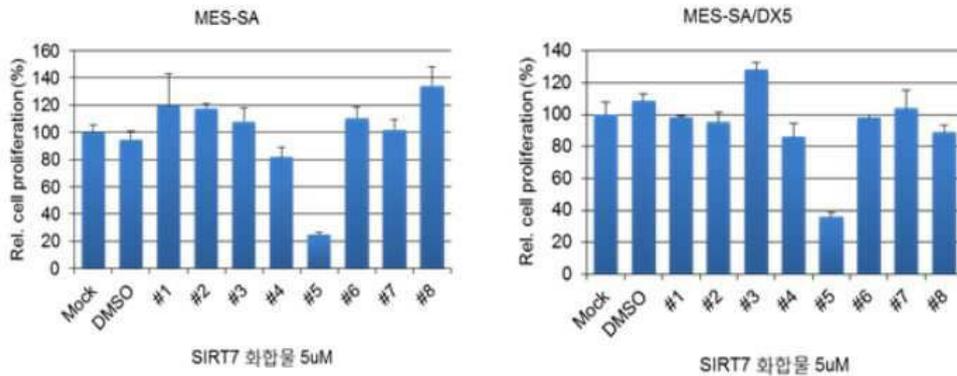
[0050] 그 결과 도 5에서 보는 바와 같이 화학식 I의 ID: 97491 화합물을 처리하여 SIRT7 단백질의 탈아세틸화 활성을 억제시켰을 때, p53 단백질의 아세틸화가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 상기 결과는 본 발명에 따른 화학식 I의 ID: 97491 화합물이 암을 예방 또는 치료하는데 효과적이라는 것을 입증한다.

도면

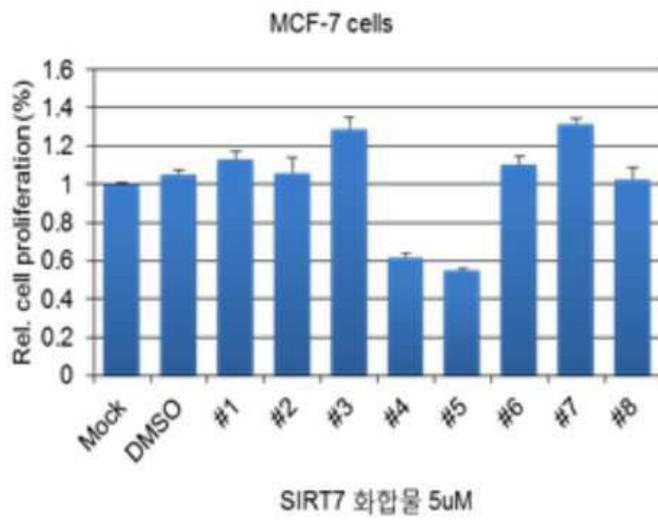
도면1



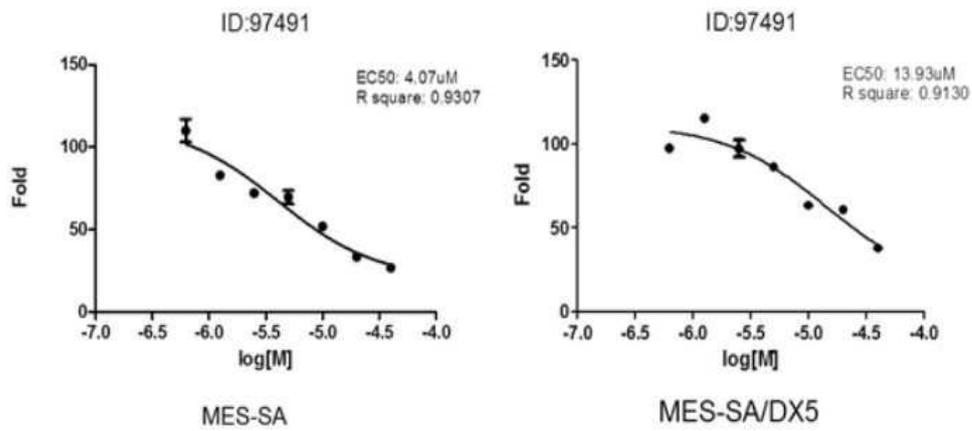
도면2



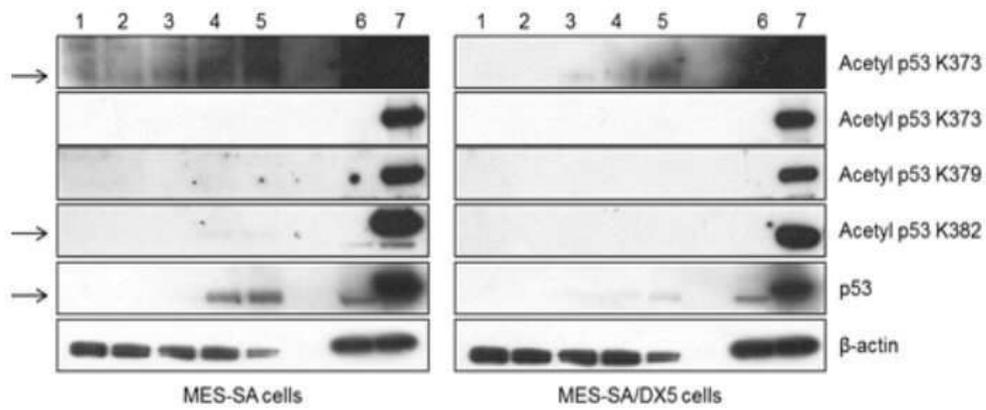
도면3



도면4



도면5



- 1: Mock
- 2: DMSO
- 3: 97491 1uM
- 4: 97491 5uM
- 5: 97491 10uM
- 6: MCF7 DMSO
- 7: MCF7 DOX+TSA 0.5uM each