(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0118287
(43) 공개일자 2019년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/517 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/517 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0041453
(22) 출원일자 2018년04월10일
심사청구일자 2018년04월10일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이대희
경기도 용인시 처인구 고진로27번길 28-5(고림동)
오상철
서울특별시 강남구 선릉로 120, 7동 602호(대치동, 개포1,2차 우성아파트)
정소연
인천광역시 부평구 길주남로 175, 101동 730호(부개동, 상우신명보람아파트)
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 조성물**

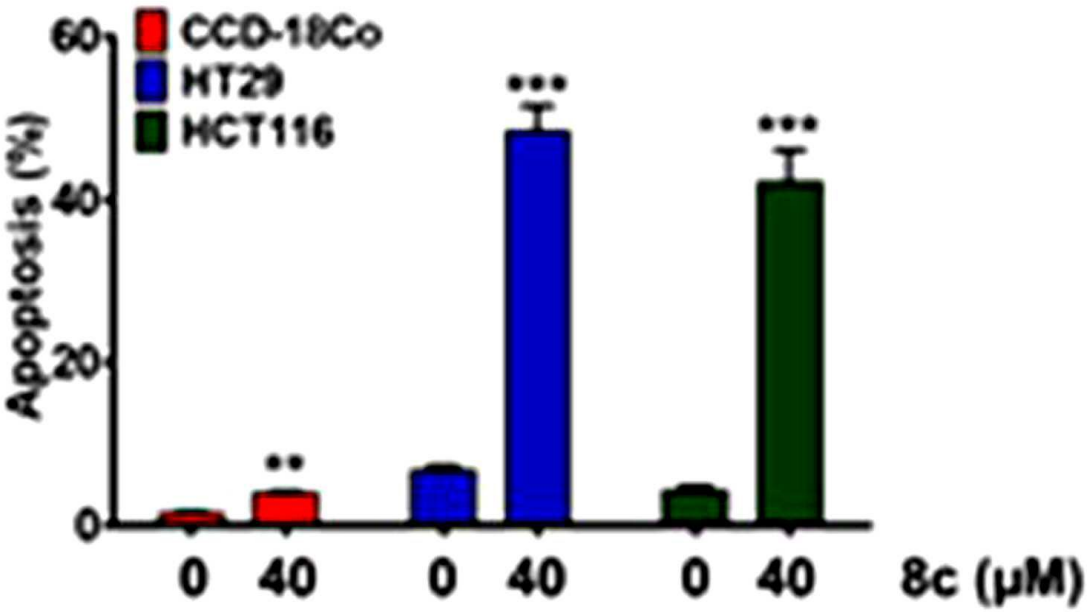
(57) 요 약

본 발명은 화학식 1로 표시되는 1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 대장암 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물, 대장암 세포 사멸 증진 방법, 대장암의 예방 또는 치료

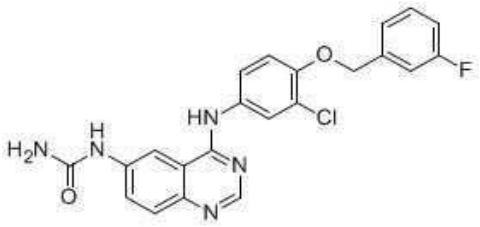
(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도11



방법 및 대장암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함함으로써 대장암의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[화학식 1]



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1A2B2011684

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자사업

연구과제명 헤지호그 억제제 신약 개발 및 내성극복 후보물질 Genipin 병용 연구

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1D1A1A01058303

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학개인기초연구지원사업

연구과제명 TRAIL 저항성 암줄기세포를 위한 타겟 치료의 적용과 개발

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C1665

부처명 한국보건산업진흥원

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구역량 강화지원

연구과제명 바이오메디컬 중개연구 인재 양성 프로그램 개발

기 여 율 1/3

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

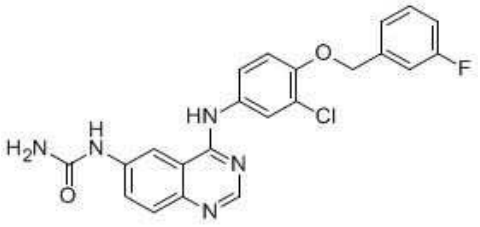
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 카스파제 3(caspase 3), 카스파제 8(caspase 8) 및 카스파제 9(caspase 9)의 활성화와 폴리(ADP-리보오스)중합효소[(Poly(ADP-Ribose)Polymerase, PARP]의 절단(cleavage)을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 DR5(death receptor 5) 및 Nrf2(Nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2)의 활성 유도를 통해 항암 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 약제학적으로 허용가능한 염은 염기성 염 또는 산성 염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 염기성 염은 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 리튬염, 마그네슘염, 세슘염, 아미늄(aminium)염, 암모늄염, 트리에칠아미늄염 및 피리디늄염으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 산성 염은 염산, 브롬산, 황산, 아황산 및 인산으로 이루어진 군에서 선택된 하나의 무기산, 또는 구연산, 초산, 말레산, 퓨마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 캠퍼설폰산, 옥살산, 말론산, 글루타릭산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산 및 아스파르탄산으로 이루어진 군에서 선택된 하나의 유기산에 의해 형성된 산부가염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

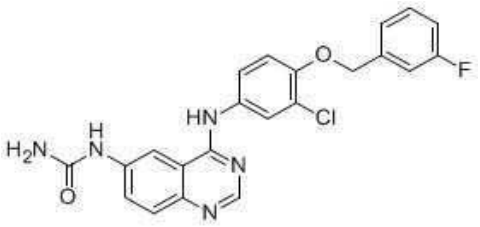
제1항에 있어서,

약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

하기 화학식 1로 표시되는 1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 인간을 제외한 포유동물의 대장암 세포에 투여하는 것을 특징으로 하는 대장암 세포 사멸 증진 방법.

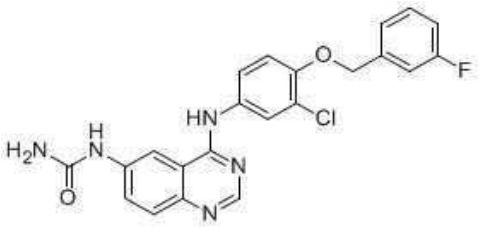
[화학식 1]



청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대장암의 예방 또는 치료 방법.

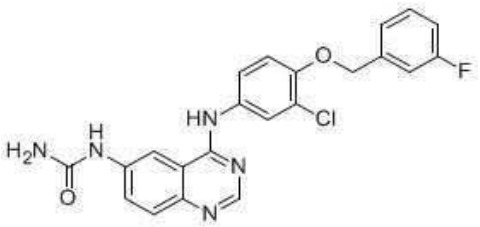
[화학식 1]



청구항 10

하기 화학식 1로 표시되는 1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[화학식 1]



청구항 11

제10항에 있어서,

식품학적으로 허용되는 첨가제, 부형제 또는 향미제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아를 유효성분으로 포함하는 대장암 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있는 실정이며, 우리나라의 경우, 질병 사망원인 중 제 1위의 질병으로서 연간 약 10만 명 이상이 진단되고, 약 6만 명 이상이 사망하고 있다.

[0003] 암은 혈액암과 고형암으로 크게 분류되며, 폐암, 위암, 유방암, 구강암, 간암, 자궁암, 식도암, 피부암 등 신체의 거의 모든 부위에서 발생한다.

[0004] 그 중 대장암(colon cancer)은 전 세계적으로 연간 100만 명의 환자가 발생하고 53만 명이 사망하는 난치성 질환이다.

[0005] 최근에는 서구화된 식습관으로 인해 아시아에서도 그 발병률이 증가하고 있는 추세이며, 관련된 요인으로는 과도한 동물성 지방, 당분, 알코올 섭취와 섬유소, 항산화 비타민, 야채나 과일의 섭취 부족 등이 주요 원인으로 알려져 있다. 특히 동물성 지방과 육류를 많이 섭취하면 채소나 곡물 등의 섬유질 식품 섭취와는 달리 대변 양이 적고 내용물이 대장을 통과하여 배설되는 시간이 많이 걸린다. 또한 담즙산과 스테롤의 배설이 증가하며 대장 내에 존재하는 세균종의 구성에도 변화를 일으켜 이들 물질을 화학적으로 변화시키는 세균의 종류가 증가한다. 따라서 발암물질이 많이 생성되고 발암 물질이 대장 내에 머물고 접촉하는 시간도 길어져서 대장암이 자주 발생하게 된다.

[0006] 특히, 대장암은 식이패턴의 변화와 노령화에 따라 우리나라에서도 전체 암 발생의 12.7 %로 3위를 차지할 정도로 빠른 속도로 증가하고 있다.

[0007] 대장암의 경우 혈관을 중심으로 많은 수의 세포들이 서로 덩어리진 형태로 성장하는 대표적인 고형암 세포로서 치료방법이 극히 제한적으로 완치가 어려운 암 중 하나이다. 즉, 덩어리진 대장암 세포의 중심부까지 약물이 제대로 투과하지 못하기 때문에 대장암 세포를 완전히 제거하기란 쉬운 일이 아니다.

[0008] 현재 약물로써 대장암을 치료할 수 있는 방법은 거의 없는 실정이고, 수술요법이나 방사선요법 등과 같은 외과적인 치료만이 대장암을 치료하는 제한적인 방법이지만 이러한 치료법으로는 대장암의 완치가 어렵다.

[0009] 현재 대장암에 효과적인 항암제로는 5-에프유, 유에프티, 카페시타빈(상품명: 젤로다)과 같은 플루오로피리미딘계 약물, 이리노테칸(상품명: 캄푸토) 및 옥살리플라틴과 같은 약물이 널리 이용되고 있으며, 미국, 유럽 등 세계 7대 제약시장에서 대장암 치료제 시장은 현재 9억 달러 규모에서 2017년 78억 달러로 급성장할 전망이다. 이러한 약물의 지속적인 사용은 내성의 증가 및 부작용을 나타낼 수 있다는 문제점을 항상 지니고 있어, 새로운 치료제의 개발 및 진단에 대한 연구가 필요한 시점이다.

[0010] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 대장암에 대하여 효과적으로 작용하는 항암 조성물을 발명하고자 연구를 수행하였으며, 이에 1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아가 대장암 세포주에서 아폽토시스에 의한 세포사를 증가시키는 효능이 있음을 발견하고, 이를 활용한 암의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 완성하기에 이르렀다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) Ahmed Elkamhawy, et al., Targeting EGFR/HER2 tyrosine kinases with a new potent series of 6-substituted 4-anilinoquinazoline hybrids: Design, synthesis, kinase assay, cell-based assay, and molecular docking., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 25, Issue 22, Pages 5147-5154, 2015.

발명의 내용

해결하려는 과제

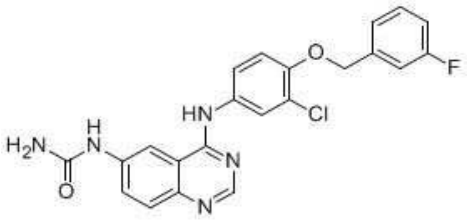
[0012] 본 발명의 목적은 정상세포에는 영향을 주지 않고 선택적으로 대장암 세포의 세포사멸을 유도함으로써 항암 효과를 증진시킬 수 있는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 또한 본 발명의 또 다른 목적은 대장암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] [화학식 1]

[0016] 

[0017] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포유동물의 대장암 세포에 투여하는 것을 특징으로 하는 대장암 세포 사멸 증진 방법을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대장암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0019] 아울러, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물, 대장암 세포 사멸 증진 방법, 대장암의 예방 또는 치료 방법 및 대장암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함함으로써 대장암의 예방, 개선 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 본 발명의 8c가 세포 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 WST-1 assay를 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 2 내지 도 7은 상기 화학식 3 내지 8의 화합물이 세포 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 WST-1 assay를 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8은 도 8은 8c가 대장암의 세포성장에 영향을 미치는 정도를 나타내는 세포성장(cell viability) 그래프이다.

도 9는 대장암 세포에 8c를 투여한 경우 콜로니 형성능이 억제되는 모습을 나타내는 사진이다.

도 10은 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 8c를 처리한 경우 세포사멸 관련 단백질의 발현이 증가되는 것을 나타내는 웨스턴 블랏 결과이다.

도 11은 8c가 투여된 대장암 세포주에서 apoptosis가 현저히 증가하는 것을 나타내는 그래프이다.

도 12는 대장암 세포에 8c 투여시 세포사멸과 관련이 있는 것으로 알려진 DR5(Death receptor5)가 현저히 증가됨을 확인하는 western blotting 결과이다.

도 13은 대장암 세포에 8c 투여시 세포사멸과 관련이 있는 것으로 알려진 DR5(Death receptor5)가 현저히 증가됨을 RNA 수준에서 나타내는 결과이다.

도 14는 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 DR5의 발현을 억제시키는 경우 DR5의 감소가 8c에 의해 유도되는 대장암 세포의 사멸을 억제하는 것을 나타내는 western blot 결과이다.

도 15는 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 DR5를 knockdown시킨 후 8c를 처리한 다음, WST-1 assay를 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 16은 8c의 투여가 대장암 세포의 사멸을 유도한다는 것과, DR5의 감소가 8c에 의해 유도되는 대장암 세포의 사멸을 억제하는 것을 나타내는 그래프이다.

도 17은 대장암 세포에 8c 투여시 세포사멸과 관련이 있는 것으로 알려진 Nrf2가 현저히 증가됨을 나타내는 결과이다.

도 18은 대장암 세포에 8c 투여시 세포사멸과 관련이 있는 것으로 알려진 Nrf2가 현저히 증가됨을 RNA 수준에서 나타내는 결과이다.

도 19는 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 Nrf2의 발현을 억제시키는 경우 Nrf2의 감소가 8c에 의해 유도되는 대장암 세포의 사멸을 억제하는 것을 나타내는 western blot 결과이다.

도 20은 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 Nrf2를 knockdown시킨 후 8c를 처리한 다음, WST-1 assay를 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 21은 8c의 투여가 대장암 세포의 사멸을 유도한다는 것과, Nrf2의 감소가 8c에 의해 유도되는 대장암 세포의 사멸을 억제하는 것을 나타내는 그래프이다.

도 22는 DR5를 knockdown시킨 대장암 세포에서 Nrf2의 발현 정도를 RNA 수준에서 나타내는 그래프이다.

도 23은 DR5를 knockdown시킨 대장암 세포에서 8c의 투여 여부에 따른 Nrf2의 발현 정도를 나타내는 그래프이다.

도 24는 Nrf2를 knockdown시킨 대장암 세포에서 DR5의 발현 정도를 RNA 수준에서 나타내는 그래프이다.

도 25는 DR5를 knockdown시킨 대장암 세포에서 8c의 투여 여부에 따른 Keap1의 발현 정도를 나타내는 그래프이다.

도 26은 DR5를 knockdown시킨 대장암 세포에서 8c의 투여 여부에 따른 HO-1의 발현 정도를 나타내는 그래프이다.

도 27은 8c에 의해 ER Stress 관련 인자가 증가하는지를 확인하는 웨스턴 블랏 실험 결과이다.

도 28은 8c를 투여한 대장암 세포(HT-29, HCT116)에서 CHOP의 감소가 세포성장(cell viability)에 영향을 미치는 정도를 나타내는 그래프이다.

도 29는 8c가 투여된 대장암 세포주에서 CHOP가 감소하는 경우 apoptosis가 줄어드는 것을 나타내는 그래프이다.

도 30은 8c가 ROS를 증가시키는지 확인하기 위해 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에 8c를 투여한 후 발생되는 ROS를 측정한 결과를 나타내는 것이다.

도 31은 대장암 세포에서 ROS가 증가되는 경우 세포사멸 관련 인자(DR5, Nrf2) 및 ER stress 관련 인자(p-IRE1α, p-PERK, p-eIF2α, CHOP, GRP94, Bip)가 증가되는 것을 나타내는 western blot 결과이다.

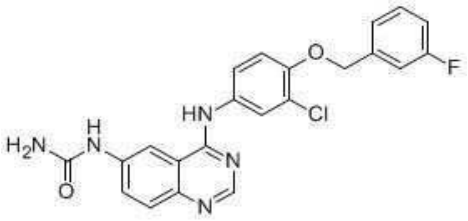
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 도면을 참조하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0023] 본 발명의 발명자들은 대장암 세포에 선택적으로 세포사멸을 유도할 수 있는 방법에 대하여 연구하던 중, 유방암 치료제로 알려진 라파티닙의 유도체 중 하나인 1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아를 대장암 세포에 투여하는 경우, 대장암 세포의 세포사멸이 증대되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0024] 따라서 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0025] [화학식 1]

[0026] 

[0027] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아[1-(4-(3-chloro-4(3-fluorobenzyloxy) phenylamino)quinazolin-6-yl)urea]이며, 이후 '8c'로 기재한다.

[0028] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 8c는 대장암 세포의 증식을 억제하고 세포자멸사를 유도하는 항암 효능을 나타내며, 정상 세포에 심각한 자극을 가한다거나 유해한 작용을 유발함이 없이 안정하게 사용될 수 있는 이점이 있다.

[0029] 이에 따라, 상기 8c는 대장암 예방 또는 치료용 약학 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0030] 특히, 상기 8c는 대장암 세포에 대하여 카스파제 3(caspase 3), 카스파제 8(caspase 8) 및 카스파제 9(caspase 9)의 활성화와 폴리(ADP-리보오스)중합효소[(Poly(ADP-Ribose)Polymerase, PARP]의 절단(cleavage)을 유도함으로써, 대장암 세포의 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 한다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 대장암 세포에 상기 8c를 투여한 경우 세포사멸이 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0032] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 약제학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염은 약제학적으로 허용가능한 염기성 염 또는 산성 염 중 어느 하나의 형태로 사용할 수 있다. 염기성 염은 유기염기염, 무기염기염 중 어느 하나의 형태로 사용할 수 있으며, 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 리튬염, 마그네슘염, 세슘염, 아미늄(aminium)염, 암모늄염, 트리에칠아미늄염 및 피리디늄염으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

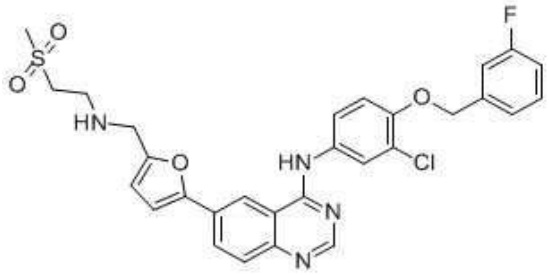
[0033] 또한, 산성 염은 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레산, 퓨마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 캠퍼설폰산, 옥살산, 말론산, 글루타릭산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르탄산 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는 무기산으로는 염산, 유기산으로는 메탄설폰산을 사용할 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.

[0035] 본 발명에 따른 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 화학식 1의 화합물을 수혼화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹이고 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.

[0036] 본 발명의 8c는 하기 화학식 2로 표시되는 N-[3-클로로-4-[(3-플루오로페닐)메톡시]페닐]-6-[5-[(2-메틸술포닐에틸아미노)메틸]-2-푸릴]퀴나졸린-4-아민의 퀴나졸린 코어 부분을 변형하여 만들어진 화합물이다. 상기 화학식 2의 화합물은 유방암 치료제로 알려진 라파티닙이다.

[0037] [화학식 2]



[0038]

[0039] 본 발명에서 "암"은 세포의 사멸 조절과 관련된 질병으로서, 정상적인 아폽토시스(apoptosis)의 균형이 깨지는 경우 세포가 과다증식하게 되어 발병하는 질병을 총칭한다. 이러한 비정상적인 과다증식 세포들은 경우에 따라 주위 조직 및 장기에 침입하여 종괴를 형성할 수 있으며 체내의 정상적인 구조의 파괴나 변형을 유발할 수 있는데, 이러한 상태를 통칭하여 암이라고 한다.

[0040] 일반적으로 종양(tumor)이라 하면 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자란 덩어리를 의미하며, 종양은 양성 종양(benign tumor)과 악성 종양(malignant tumor)으로 구분할 수 있다. 악성 종양은 양성 종양에 비해 성장 속도가 매우 빠르며 주변 조직에 침윤하면서 전이(metastasis)가 일어나 생명을 위협하게 된다. 이러한 악성 종양을 통상적으로 '암(cancer)'이라 한다.

[0041] 본 발명에서 "대장암"은 대장에서 생긴 암세포로 이루어진 악성종양을 말한다. 대부분의 대장암은 대장의 점막에서 발생하는 선암이며, 이 외에도 림프종, 육종, 편평상피암, 다른 암의 전이성 병변 등이 있다.

[0042] 본 발명에서 "예방"은 본 발명의 상기 약학 조성물을 개체에 투여하여 암의 발명을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"는 본 발명의 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하여 암의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.

[0043] 본 발명의 상기 약학 조성물을 대장암 세포에 처리하는 경우, 본 발명의 상기 8c 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 작용에 의하여 암세포에서 카스파제 3(caspase 3), 카스파제 8(caspase 8) 및 카스파제 9(caspase 9)의 활성화와 폴리(ADP-리보오스)중합효소[(Poly(ADP-Ribose)Polymerase, PARP]의 절단(cleavage)이 유도됨에 따라, 대장암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[0044] 또한, 상기 8c 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 작용에 의하여 암세포에서 DR5(death receptor 5) 및 Nrf2(Nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2)의 활성이 유도됨에 따라, 대장암을 효과적으로 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[0045] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기 8c 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염은 상기 약학 조성물의 전체의 부피를 기준으로 바람직하게는 0.1 내지 500 μM로 함유될 수 있고, 보다 바람직하게는 1 내지 100 μM로 함유될 수 있다. 상기 범위 내에서 상기 8c 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 적절한 양으로 사용하면 경제적이면서도 상기 8c에 따른 항암 효과가 충분히 발휘되어 본 발명의 목적을 달성하기에 보다 적합해지는 이점이 있다.

[0046] 또한, 상기 약학 조성물은 상기 8c에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상을 함유할 수 있다.

[0047] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0048] 본 발명에서, 상기 "약학적으로 허용 가능"하다는 것은, 이를 투여시 생물체를 자극하지 않으면서, 투여되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는, 약학 분야에서 통상적으로 사용되는 것을 의미한다.

[0049] 본 발명에서, 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토 덱스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0050] 또한, 본 발명의 상기 약학 조성물은 필요한 경우, 부형제, 희석제, 항산화제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 충진제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 분산제, 계면

활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.

[0051] 본 발명의 상기 약학 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합한 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다.

[0052] 상기 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀젼, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.

[0053] 본 발명의 상기 약학 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴(Amylopectin), 셀룰로오스(Cellulose) 또는 젤라틴(Gelatin) 등과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트(Dicalcium phosphate) 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕괴제; 스테아르산마그네슘(Magnesium stearate), 스테아르산 칼슘(Calcium stearte), 스테아릴 푸마르산 나트륨(Sodium stearyl fumarate) 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스(Polyethylene glycol wax) 등과 같은 윤활유 등을 사용할 수 있으며, 감미제, 방향제, 시럽제 등도 사용할 수 있다. 나아가 캡슐제의 경우에는 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 사용할 수 있다.

[0054] 상기 비경구 제제의 비제한적인 예로는 주사액, 좌제, 호흡기 흡입용 분말, 스프레이용 에어로졸제, 연고, 도포용 파우더, 오일, 크림 등을 들 수 있다.

[0055] 본 발명의 상기 약학 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0056] 또한, 보다 구체적으로 본 발명의 상기 약학 조성물을 주사액으로 제제화하는 경우, 본 발명의 상기 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 또한, 본 발명의 상기 약학 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.

[0057] 또한, 본 발명의 상기 약학 조성물을 연고, 크림 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 오일, 식물성 오일, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.

[0058] 본 발명의 상기 약학 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 상기 약학 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 상기 약학 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.

[0059] 본 발명의 상기 약학 조성물의 보다 바람직한 효과를 위한 투여량은, 바람직하게는 1일 0.001 mg/kg 내지 1,000 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.01 mg/kg 내지 50 mg/kg, 가장 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 5 mg/kg일 수 있다. 이때, 상기 약학 조성물 내 8c의 농도는 0.1 내지 500 μM, 바람직하게는 1 내지 100 μM인 것이 바람직하다. 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수회에 나누어 투여될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0060] 본 발명의 상기 약학 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 않으며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다. 상기 약학 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다.

[0061] 상기 비경구 투여하는 방법으로는, 예를 들어 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내주사, 자궁내 경막주사, 뇌혈관내 주사 또는 흉부내 주사에 의해 투여될 수 있으며, 상기 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무, 흡입하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이들에 제한되지 않는다.

[0062] 본 발명의 상기 약학 조성물은 바람직하게는 경구 투여되거나 주사 투여될 수 있으며, 보다 바람직하게는 경구 투여될 수 있다.

[0063] 또한, 상기 약학 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 사람 또는 동물용으로 투여될 수 있다.

[0065] 또한, 본 발명은 8c 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포유동물의 대장암 세포에 투여하는 것을 특징으로 하는 대장암 세포 사멸 증진 방법을 제공한다.

[0066] 또한, 본 발명은 8c 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대장암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0067] 본 발명에서 "포유동물" 또는 "개체"는 쥐, 토끼, 개, 고양이, 소, 양, 돼지 등의 가축, 인간 등을 포함하는 포유동물을 비롯한 모든 동물을 의미한다.

[0068] 본 발명의 상기 대장암의 예방 또는 치료 방법에서, 상기 8c 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 투여량, 투여 경로, 투여 방식 등은 본 발명의 상기 약학 조성물과 관련하여 상기에서 설명한 바와 같다.

[0069] 또한, 본 발명은 8c 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0070] 본 발명에서 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0071] 본 발명의 상기 건강기능식품 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다.

[0072] 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 비제한적인 예로는, 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 또는 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0073] 본 발명의 상기 건강기능식품 조성물이 음료 조성물인 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비제한적인 예로 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드; 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 들 수 있다. 상기 첨가되는 추가 성분의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[0074] 본 발명의 건강기능식품 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 함유할 수 있다. 그 박에 본 발명의 건강기능식품 조성물은 천연 과일 주스, 과일 음료 또는 야채 음료 등의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 사용되거나 2종 이상을 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가물의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

[0075] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0076] **실시예**

[0077] **제조예**

[0078] Ahmed Elkamhawy 등의 논문(Targeting EGFR/HER2 tyrosine kinases with a new potent series of 6-substituted 4-anilinoquinazoline hybrids: Design, synthesis, kinase assay, cell-based assay, and molecular docking., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 25, Issue 22, Pages 5147-5154, 2015.)을 참고하여 본 발명의 8c(1-(4-(3-클로로-4(3-플루오로벤질옥시)페닐아미노)퀴나졸린-6-일)유레아)를 얻었다. 상기 8c는 화학식 2로 표시되는 라파티닙의 퀴나졸린 코어 부분을 변형하여 얻을 수 있었다.

[0079] **실험예 1. 대장암 세포에서 8c가 세포 성장에 미치는 영향**

[0080] 1-1. 대장암 세포주에서의 암세포 성장 억제효과 확인 - WST-1 assay

[0081] 대장암 세포주와 대장 정상세포에서 상기 화학식 1로 표시되는 8c가 세포 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 WST-1 assay를 수행하였다.

[0082] 먼저, 대장암 세포(HT29, colo205, DLD-1, HCT116)와 대장 정상세포(CCD-18Co)를 96well에 각각 seeding한 후, 다음 날 8c를 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 다양한 농도(0, 5, 10, 25, 50, 100 μM)로 처리하였다.

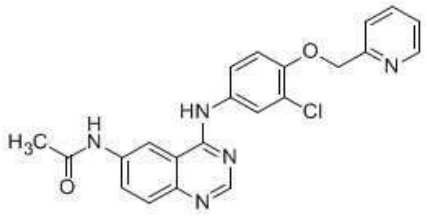
[0083] 그리고, 24시간 후에 WST-1 solution을 넣어 4시간 동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 살아있는 세포 수를 측정하여 도 1에 나타내었다.

[0084] 도 1은 본 발명의 8c가 세포 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 WST-1 assay를 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

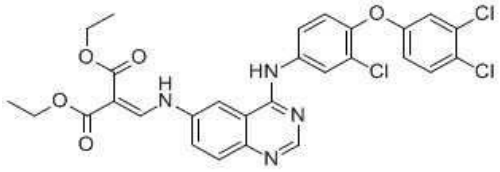
[0085] 도 1을 살펴보면, 8c가 농도 의존적으로 대장암 세포의 성장을 억제하며 사멸을 유도하는 것을 확인할 수 있다.

[0086] 또한, 상기 8c의 실험결과와 비교하기 위하여, 라파티닙의 또 다른 유도체들로서, 하기 화학식 3으로 표시되는 8d 화합물, 하기 화학식 4로 표시되는 10b 화합물, 하기 화학식 5로 표시되는 10c 화합물, 하기 화학식 6으로 표시되는 10d 화합물, 하기 화학식 7로 표시되는 11a 화합물, 하기 화학식 8로 표시되는 11c 화합물이 세포 성장에 미치는 영향을 상기 8c와 동일한 방법으로 조사하였다.

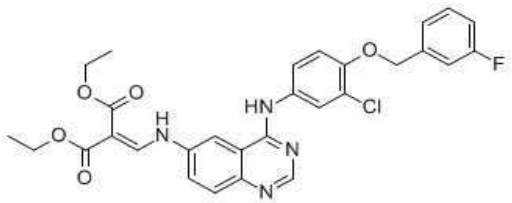
[0087] [화학식 3]

[0088] 

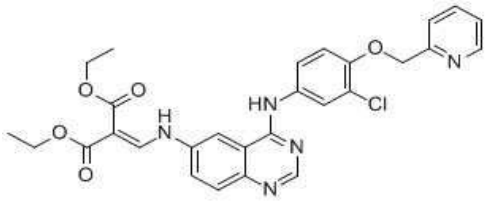
[0089] [화학식 4]

[0090] 

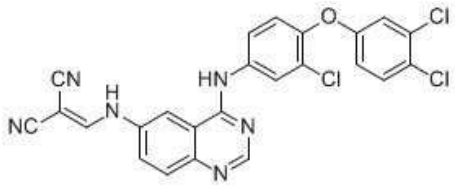
[0091] [화학식 5]

[0092] 

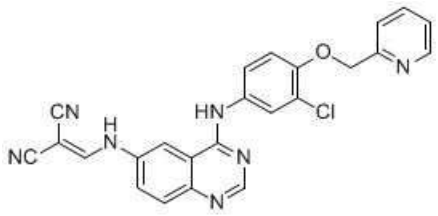
[0093] [화학식 6]

[0094] 

[0095] [화학식 7]

[0096] 

[0097] [화학식 8]



[0098]

[0099] 도 2 내지 도 7은 상기 화학식 3 내지 8의 화합물이 세포 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 WST-1 assay를 수행한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0100]

[0101] 상기 도 1 내지 도 7을 살펴보면, 본 발명의 8c 및 화학식 7의 11a가 대장암 세포주의 세포 성장을 크게 억제하였지만, 상기 11a의 경우에는 대장 정상세포의 사멸도 유도하는 것을 확인하였다.

[0102] 1-1-1. 대장암 세포주에서 8c의 Cell proliferation 억제 효과 확인

[0103] 먼저, K-RAS 야생형 대장암 세포(HT-29), 돌연변이 대장암 세포(HCT116) 및 대장 정상세포(CCD-18Co)를 Dulbecco's Modification of Eagle's Medium(DMEM) 배지에 10% 우태아혈청과 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37℃, 5% 이산화탄소 항온 항습 상태로 배양하였다. $8x10^4$의 대장암 세포를 200 ㎕의 세포배양액에 부유시키고 96-well microplate에 일정하게 seeding한 후 하룻밤 배양시켰다. 이후, 8c를 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 다양한 농도(0, 20, 40, 60, 80, 100 μM)로 각 well에 첨가하고 24 시간 동안 배양하였다.

[0104] 그리고, WST-1 solution을 넣어 3시간 동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 살아있는 세포 수를 측정하여 도 8에 나타내었다.

[0105] 도 8은 8c가 대장암의 세포성장에 영향을 미치는 정도를 나타내는 세포성장(cell viability) 그래프이다. 상기 도 8을 살펴보면, 대장 정상세포에서는 8c의 영향이 거의 없었지만 K-RAS 야생형 및 돌연변이 대장암 세포에서는 8c가 세포 성장을 농도 의존적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

[0106] 1-1-2. 8c의 대장암 세포 콜로니 형성 억제능 확인 - colony formation assay

[0107] 또한, 대장암 세포(HT-29, HCT116)를 소프트 아가 플레이트에 각각 일정하게 seeding한 후 하룻밤 배양하였다. 이후, 40 μM의 8c를 각 plate에 첨가하고, 14일 동안 배양하였다. 그리고, 콜로니가 형성되면 염색하여 콜로니의 수를 확인하였다.

[0108] 도 9는 상기 실험에서 콜로니가 형성된 모습을 나타내는 사진이다. 상기 도 9를 살펴보면, 8c가 첨가된 실험군은 콜로니의 형성 능력이 현저히 감소되는 것을 확인할 수 있다.

[0109] 1-2. 8c를 투여한 대장암 세포주에서 세포사멸이 증가함을 단백질 수준에서 확인 - Western blot

[0110] 상기 8c에 의해 억제된 세포 성장이 세포사멸(apoptosis)로 인한 것인지를 알아보기 위해 세포사멸 관련 분자들의 단백질 발현 정도를 살펴보고자 하였다.

[0111] 구체적으로, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에 8c를 처리한 경우에 세포 사멸 관련 단백질의 발현을 비교하기 위한 실험을 실시하였다. 이를 위해 먼저, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)를 60 dish에 seeding한 후, 다음 날 8c(40 μM)을 처리하였다. 4 시간 후 harvest하여 lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting을 실시하였다. 그리고, 세포 사멸에 관련한 marker(PARP, Caspase)를 사용하여 발현의 변화를 확인하고 도 10에 나타내었다.

[0112] 상기 도 10은 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 8c를 처리한 경우 세포사멸 관련 단백질의 발현이 증가되는 것을 나타내는 웨스턴 블랏 결과이다. 상기 도 10을 살펴보면, c-Caspase 3(Cleaved Caspase-3), c-Caspase 8(Cleaved Caspase-8), c-Caspase 9(Cleaved Caspase-9) 및 c-PARP(Cleaved PARP)와 같은 세포 사멸에 관련된 단백질들의 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

[0113] 이러한 결과들을 통해, 대장암 세포에 8c를 투여하는 경우 세포사멸이 증가하는 것을 세포 수준에서 확인할 수

있었다.

[0114] 1-3. 8c를 투여한 대장암 세포주에서 세포사멸이 증가함을 확인함 - Flow cytometry

[0115] 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 8c가 세포의 사멸에 영향을 끼치는지 알아보고자 하였다.

[0116] 이를 위하여 먼저, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)를 60 dish에 seeding한 후, 다음 날 8c(40 μM)을 처리하였다. 그리고, 4시간 후 cell을 harvest하였다. Annexin V-FITC, PI(propidium iodide)로 염색하고 Flow cytometry 측정 기계를 이용하여 사멸한 세포 수를 측정하여 도 11에 나타내었다.

[0117] 도 11은 8c가 투여된 대장암 세포주에서 apoptosis가 현저히 증가하는 것을 나타내는 그래프이다.

[0119] **실험예 2. 대장암 세포에서 8c에 의해 유도되는 세포사멸 조절 분자(DR5) 확인**

[0120] 2-1. 8c를 투여한 대장암 세포주에서의 Death receptor 발현 확인 - Western blotting 및 PCR

[0121] 2-1-1. western blotting

[0122] 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 8c가 세포사멸과 관련이 있는 것으로 알려진 신호 전달 분자(DR5 단백질)의 발현에 영향을 끼치는지 알아보고자 하였다.

[0123] 이를 위하여, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)를 60 dish에 seeding한 후, 다음 날 8c(40 μM)을 처리하였다. 4시간 후 cell을 harvest하고 lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting을 실시한 후, 이를 도 12에 나타내었다.

[0124] 도 12를 통해, 대장암 세포에 8c 투여시 세포사멸과 관련이 있는 것으로 알려진 DR5(Death receptor5)가 현저히 증가됨을 단백질 수준에서 확인할 수 있었다.

[0125] 2-1-2. PCR

[0126] 또한, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 8c가 세포사멸과 관련이 있는 것으로 알려진 신호 전달 분자(DR5의 mRNA)의 발현에 영향을 끼치는지 알아보고자 하였다.

[0127] 이를 위하여, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)를 60πdish에 seeding한 후, 다음 날 8c(40 μM)을 처리하고, 24시간 후 cell을 harvest하였다. RNA extraction 후 PCR을 통해 cDNA를 합성하고, PCR한 후 도 13에 나타내었다.

[0128] 도 13을 통해, 대장암 세포에 8c 투여시 세포사멸과 관련이 있는 것으로 알려진 DR5(Death receptor5)가 현저히 증가됨을 RNA 수준에서 확인할 수 있었다.

[0129] 2-2. Western blotting

[0130] 상기 대장암 세포에서 DR5가 증가되는 현상이 8c에 의해 유도되는 세포사멸과 연관되어 있는지를 살펴보고자 하였다.

[0131] 이를 위하여, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 DR5 siRNA를 이용하여 DR5를 knockdown시킨 후 8c를 처리한 다음, western blot을 수행하였다.

[0132] 도 14는 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 DR5의 발현을 억제시키는 경우 DR5의 감소가 8c에 의해 유도되는 대장암 세포의 사멸을 억제하는 것을 나타내는 western blot 결과이다. 도 14를 살펴보면, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에 8c를 투여하는 경우 세포사멸과 관련된 Cleaved PARP의 발현이 현저히 증가하지만, DR5의 발현을 억제시킨 후 8c를 투여하는 경우에는 8c에 의해 유도되는 Cleaved PARP의 발현이 감소한 것을 확인할 수 있다.

[0133] 2-3. WST-1 assay

[0134] 또한, 도 15는 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 DR5를 knockdown시킨 후 8c를 처리한 다음, WST-1 assay를 수행한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 15를 살펴보면, DR5의 감소가 8c에 의해 유도되는 대장암 세포의 사멸을 억제하는 것을 확인할 수 있다.

[0135] 2-4. Flow cytometry

[0136] 대장암 세포에서, DR5가 8c에 의해 유도되는 세포사멸에 어떠한 영향을 끼치는지를 살펴보고자 하였다.

[0137] 이를 위해, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)를 60 dish에 seeding한 후, 다음 날 8c(40 μM)을 처리하였다. 24시간 후 cell을 harvest한 후 Annexin V-FITC, PI(propidium iodide)로 double staining하고, Flow cytometry 측정 기계를 이용하여 살아있는 세포 수를 측정하여 도 16에 나타내었다.

[0138] 도 16은 8c의 투여가 대장암 세포의 사멸을 유도한다는 것과, DR5의 감소가 8c에 의해 유도되는 대장암 세포의 사멸을 억제하는 것을 나타내는 그래프이다.

[0140] 이러한 결과들은 8c에 의한 DR5의 증가가 대장암 세포의 세포사멸을 유도한다는 것을 증명한다.

[0142] **실험예 3. 대장암 세포에서 8c에 의해 유도되는 세포사멸 조절 분자(Nrf2) 확인**

[0143] 3-1. 8c를 투여한 대장암 세포주에서의 Nrf2 증가 확인 - Western blotting 및 PCR

[0144] 3-1-1. western blotting

[0145] 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 8c가 세포사멸과 관련이 있는 것으로 알려진 신호 전달 분자(Nrf2)의 발현에 영향을 끼치는지 알아보고자 하였다.

[0146] 이를 위하여, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)를 60 dish에 seeding한 후, 다음 날 8c(40 μM)을 처리하였다. 4시간 후 cell을 harvest하고 lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting을 실시한 후, 이를 도 17에 나타내었다.

[0147] 도 17을 통해, 대장암 세포에 8c 투여시 세포사멸과 관련이 있는 것으로 알려진 Nrf2가 현저히 증가됨을 단백질 수준에서 확인할 수 있었다.

[0148] 3-1-2. PCR

[0149] 또한, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 8c가 세포사멸과 관련이 있는 것으로 알려진 신호 전달 분자(Nrf2의 mRNA)의 발현에 영향을 끼치는지 알아보고자 하였다.

[0150] 이를 위하여, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)를 60πdish에 seeding한 후, 다음 날 8c(40 μM)을 처리하고, 24시간 후 cell을 harvest하였다. TriZol로 cell을 lysis한 후 Chloroform, isopropanol을 이용하여 RNA를 분리하고 PCR 기계로 cDNA를 합성하였다. 그리고, 합성된 cDNA와 Nrf2 TaqMan probe를 이용하여 Realtime PCR을 시행하고, 그 결과를 도 18에 나타내었다.

[0151] 도 18을 통해, 대장암 세포에 8c 투여시 세포사멸과 관련이 있는 것으로 알려진 Nrf2가 현저히 증가됨을 RNA 수준에서 확인할 수 있었다.

[0152] 3-2. Western blotting

[0153] 상기 대장암 세포에서 Nrf2가 증가되는 현상이 8c에 의해 유도되는 세포사멸과 연관되어 있는지를 살펴보고자 하였다.

[0154] 이를 위하여, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 Nrf2 siRNA를 이용하여 Nrf2를 knockdown시킨 후 8c를 처리한 다음, western blot을 수행하였다.

[0155] 도 19는 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 Nrf2의 발현을 억제시키는 경우 Nrf2의 감소가 8c에 의해 유도되는 대장암 세포의 사멸을 억제하는 것을 나타내는 western blot 결과이다. 도 19를 살펴보면, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에 8c를 투여하는 경우 세포사멸과 관련된 Cleaved PARP의 발현이 현저히 증가하지만, Nrf2의 발현을 억제시킨 후 8c를 투여하는 경우에는 8c에 의해 유도되는 Cleaved PARP의 발현이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있다.

[0156] 3-3. WST-1 assay

[0157] 또한, 도 20은 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 Nrf2를 knockdown시킨 후 8c를 처리한 다음, WST-1 assay를 수행한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 20을 살펴보면, Nrf2의 감소가 8c에 의해 유도되는 대장암 세포의 사멸을 억제하는 것을 확인할 수 있다.

[0158] 3-4. Flow cytometry

[0159] 대장암 세포에서, Nrf2가 8c에 의해 유도되는 세포사멸에 어떠한 영향을 끼치는지를 살펴보고자 하였다.

[0160] 이를 위해, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)를 60 dish에 seeding한 후, 다음 날 8c(40 μM)을 처리하였다. 24시간 후 cell을 harvest한 후 Annexin V-FITC, PI(propidium iodide)로 double staining하고, Flow cytometry 측정 기계를 이용하여 살아있는 세포 수를 측정하여 도 21에 나타내었다.

[0161] 도 21은 8c의 투여가 대장암 세포의 사멸을 유도한다는 것과, Nrf2의 감소가 8c에 의해 유도되는 대장암 세포의 사멸을 억제하는 것을 나타내는 그래프이다.

[0163] 이러한 결과들은 8c에 의한 Nrf2의 증가가 대장암 세포의 세포사멸을 유도한다는 것을 증명한다.

[0164] **실험예 4. 대장암 세포에서 8c에 의해 증가되는 DR5 및 Nrf2의 관계 규명**

[0165] 상기 8c에 의해 조절되는 DR5 및 Nrf2 사이의 관계를 확인하고자 하였다.

[0166] 이를 위해, 대장암 세포주(HT-29)에서 DR5 및/또는 Nrf2를 knockdown시켰다. 상기 DR5 및/또는 Nrf2를 knockdown시킨 대장암 세포를 60π dish에 seeding하고, 24 시간 후 cell을 harvest하였다. TriZol로 cell을 lysis한 후 Chloroform, isopropanol을 이용하여 RNA를 분리하고 PCR 기계로 cDNA를 합성하였다. 그리고, 합성된 cDNA와 DR5, Nrf2, Keap1 또는 HO-1 TaqMan probe를 이용하여 Realtime PCR을 시행하고, 그 결과를 도 22 내지 도 26에 나타내었다.

[0167] 도 22는 DR5를 knockdown시킨 대장암 세포에서 Nrf2의 발현 정도를 RNA 수준에서 나타내는 그래프이다. 도 22를 살펴보면, 대장암 세포에서 DR5를 knockdown시킨 경우 Nrf2의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있다.

[0168] 도 23은 DR5를 knockdown시킨 대장암 세포에서 8c의 투여 여부에 따른 Nrf2의 발현 정도를 나타내는 그래프이다. 도 23을 살펴보면, 대장암 세포에서 DR5를 knockdown시킨 경우 8c에 의해 증가되었던 Nrf2의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있다.

[0169] 도 24는 Nrf2를 knockdown시킨 대장암 세포에서 DR5의 발현 정도를 RNA 수준에서 나타내는 그래프이다. 도 24를 살펴보면, 대장암 세포에서 Nrf2를 knockdown시킨 경우 DR5의 mRNA 레벨은 큰 변화가 없는 것을 확인할 수 있다.

[0170] 도 25는 DR5를 knockdown시킨 대장암 세포에서 8c의 투여 여부에 따른 Keap1의 발현 정도를 나타내는 그래프이다. 도 25를 살펴보면, 대장암 세포에서 DR5를 knockdown시킨 경우 Nrf2를 degradation시키는 Keap1의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있다.

[0171] 도 26은 DR5를 knockdown시킨 대장암 세포에서 8c의 투여 여부에 따른 HO-1의 발현 정도를 나타내는 그래프이다. 대장암 세포에서 DR5를 knockdown시킨 경우 Nrf2의 하위에 위치하는 HO-1의 mRNA 발현도 감소되는 것을 확인할 수 있다.

[0172] **실험예 5. 대장암 세포에서 8c에 의한 ROS, ER stress의 증가 확인**

[0173] DR5는 ROS-ER stress에 의해 증가된다고 알려져 있다. 이에, 8c에 의한 DR5의 증가가 ROS-ER Stress에 의한 것인지 확인하고자 하였다.

[0174] 이를 위하여 대장암 세포에서 8c 투여에 의해 ER stress 관련 인자들이 증가하는지를 구체적으로 확인하고자 하였다.

[0175] 5-1. Western blot

[0176] 먼저, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)를 60 dish에 seeding한 후, 다음 날 8c(40 μM)을 처리하였다. 4 시간 후 cell을 harvest하고 lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting을 실시한 후, 이를 도 27에 나타내었다.

[0177] 도 27은 8c에 의해 ER Stress 관련 인자가 증가하는지를 확인하는 웨스턴 블랏 실험 결과이다.

[0178] 상기 도 27을 통해 8c에 의해 ER Stress 관련 인자인 p-IRE1α, p-PERK, p-eIF2α, ATF4, CHOP, GRP94 등이 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[0179] 5-2. WST-1 assay

[0180] 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 ER stress의 최종 transcription factor인 CHOP을 knockdown시킨 후 8c를

처리하는 경우 어떠한 영향이 있는지를 확인하고자 하였다.

[0181] 먼저, CHOP을 knockdown시키거나 시키지 않은 대장암 세포주(HT-29, HCT116)를 60 dish에 seeding한 후, 다음 날 8c(40 μM)을 처리하였다. 24 시간 후 WST-1 solution을 넣어 2시간 동안 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 살아있는 세포 수를 측정하여 도 28에 나타내었다.

[0182] 도 28은 8c를 투여한 대장암 세포(HT-29, HCT116)에서 CHOP의 감소가 세포성장(cell viability)에 영향을 미치는 정도를 나타내는 그래프이다.

[0183] 도 28을 통해 대장암 세포(HT-29, HCT116)에서 CHOP을 knockdown시킨 후 8c를 처리하면 8c에 의해 증가되었던 세포사멸이 감소되는 것을 확인할 수 있다.

[0184] 5-3. Flow cytometry

[0185] 8c를 투여한 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 CHOP의 감소가 세포의 사멸에 영향을 끼치는지 알아보고자 하였다.

[0186] 이를 위하여 먼저, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 siCHOP을 이용하여 CHOP을 knockdown시켰다. 상기 CHOP을 knockdown시킨 대장암 세포 또는 knockdown시키지않은 대장암 세포를 60 dish에 seeding하고, 18시간 후에 8c(40 μM)을 처리하였다. 그리고, 24시간 후 Trypsin-EDTA로 cell을 harvest하였다. Annexin V-FITC, PI(propidium iodide)로 염색하고 Flow cytometry 측정 기계를 이용하여 사멸한 세포 수를 측정하여 도 29에 나타내었다.

[0187] 도 29는 8c가 투여된 대장암 세포주에서 CHOP가 감소하는 경우 apoptosis가 줄어드는 것을 나타내는 그래프이다.

[0188] 5-4. Flow cytometry

[0189] ER stress는 ROS와 연관이 있다고 알려져 있고, ROS는 Nrf2와 연관이 있다고 알려져 있다. 또한, 대장암 세포에 8c를 투여하는 경우 Nrf2가 증가되는 것을 상기 실험을 통해 확인하였다.

[0190] 이에 따라, 대장암 세포에 8c를 투여하는 경우 ROS가 유도되는지를 확인하고자 하였다.

[0191] 대장암 세포(HT-29, HCT116)를 6-well plate에 seeding하고 다음 날 8c를 처리하였다. 24 시간 후 DCF-DA 10μM을 넣고 10분 동안 염색을 한 뒤 trypsin으로 세포를 떼어내고, PBS로 다시 풀어 준 후 flow cytometry로 측정하였다.

[0192] 도 30은 8c가 ROS를 증가시키는지 확인하기 위해 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에 8c를 투여한 후 발생되는 ROS를 측정한 결과를 나타내는 것이다. 상기 도 30을 통해, 대장암 세포에 8c를 투여함으로써 ROS가 현저히 증가되는 것을 확인할 수 있었다.

[0193] 5-5. Western blotting

[0194] 대장암 세포에서 8c의 투여에 의해 증가되는 ROS가 세포사멸과 관련이 있는 신호전달인자(DR5, Nrf2) 및 ER stress 관련 인자들의 발현에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하고자 하였다.

[0195] 이를 위하여, 대장암 세포주(HT-29, HCT116)에서 ROS의 일종인 H_2O_2 및/또는 ROS 저해자인 NAC를 처리한 다음, western blot을 수행하였다.

[0196] 대장암 세포주(HT-29, HCT116)를 96 well plate에 seeding하였다. 그리고, 다음 날 NAC(0 또는 1 μM) 및/또는 H_2O_2(0 또는 300 μM)를 투여한 후 1시간 동안 반응시켰다. 이후, cell을 harvest하고 lysis를 통하여 단백질을 모아 western blotting을 실시한 후, 이를 도 31에 나타내었다.

[0197] 도 31은 대장암 세포에서 ROS가 증가되는 경우 세포사멸 관련 인자(DR5, Nrf2) 및 ER stress 관련 인자(p-IRE1α, p-PERK, p-eIF2α, CHOP, GRP94, Bip)가 증가되는 것을 나타내는 western blot 결과이다.

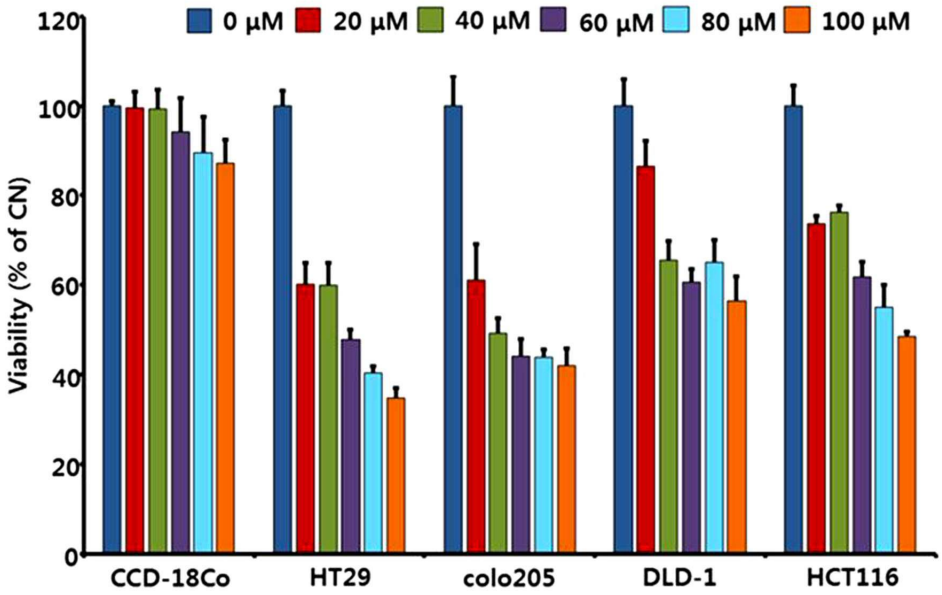
[0198] 상기 결과들을 통해, 대장암 세포에 8c를 투여하는 경우 ROS가 증가되고, 증가된 ROS는 세포사멸 관련 인자(DR5, Nrf2) 및 ER stress 관련 인자(p-IRE1α, p-PERK, p-eIF2α, CHOP, GRP94, Bip)를 증가시킴으로써, 대장암의 세포사멸을 유도한다는 것을 알 수 있다.

[0199] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체

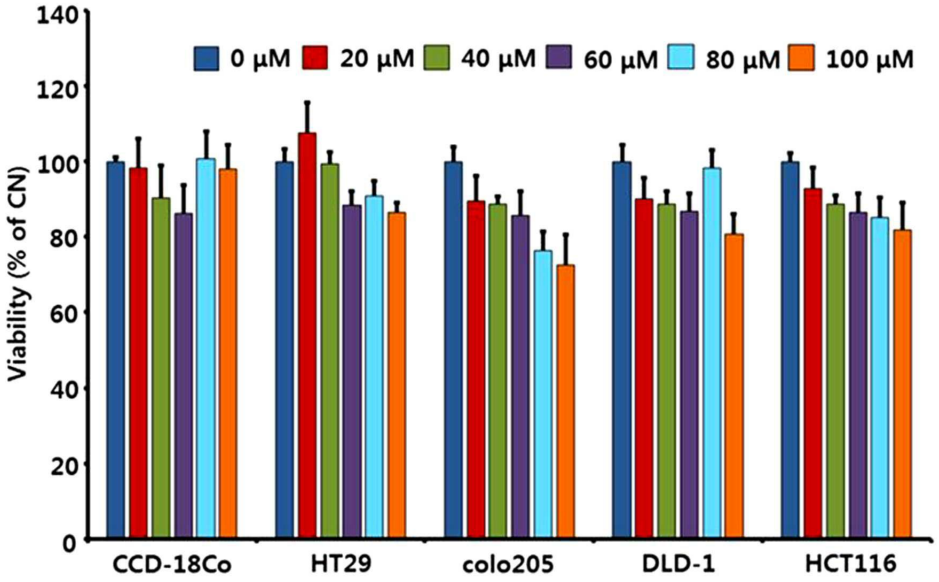
적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

도면

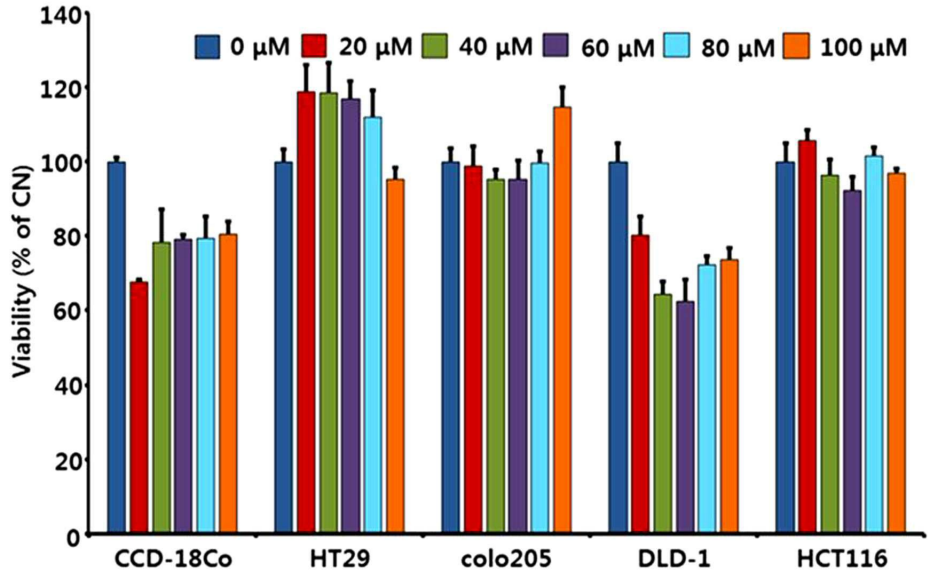
도면1



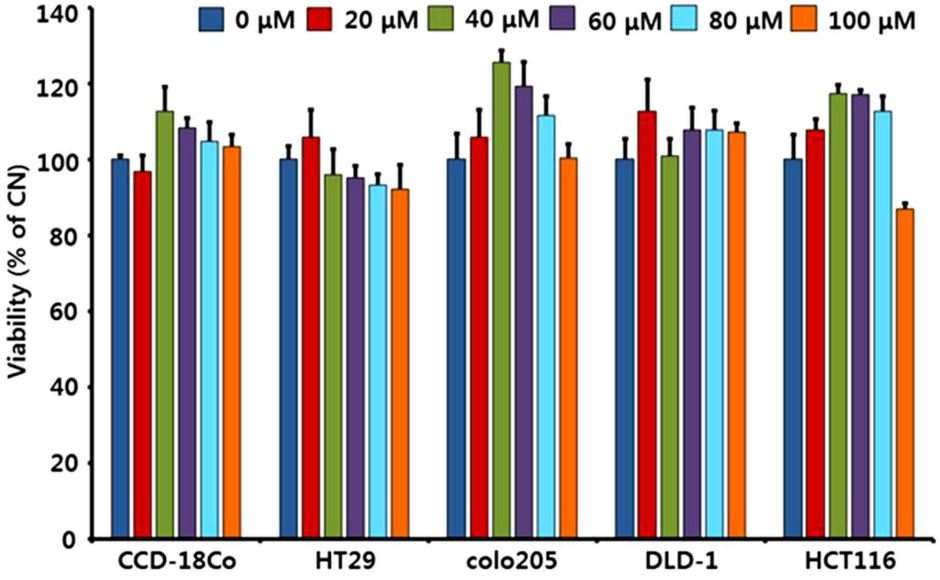
도면2



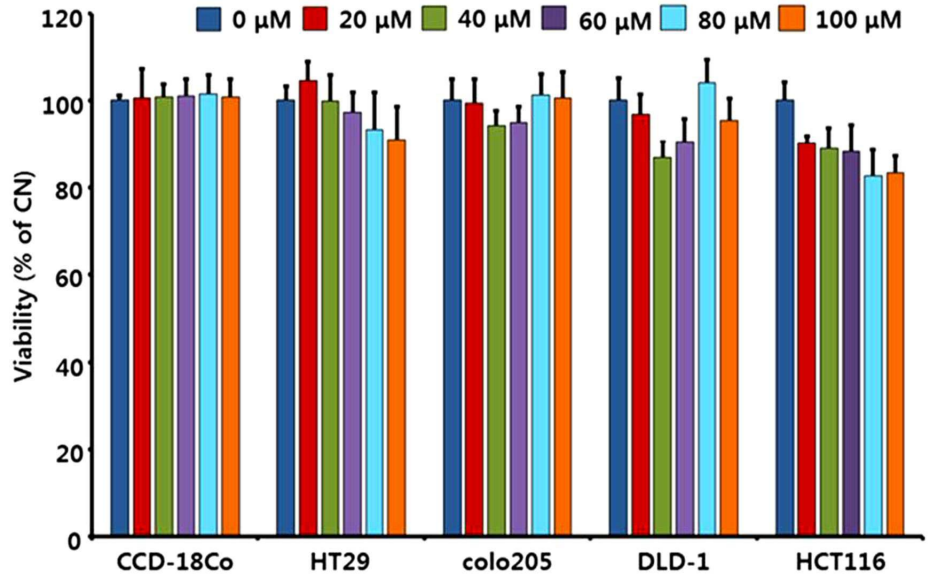
도면3


0 μM
20 μM
40 μM
60 μM
80 μM
100 μM
Viability (% of CN)
140
120
100
80
60
40
20
0
CCD-18Co
HT29
colo205
DLD-1
HCT116

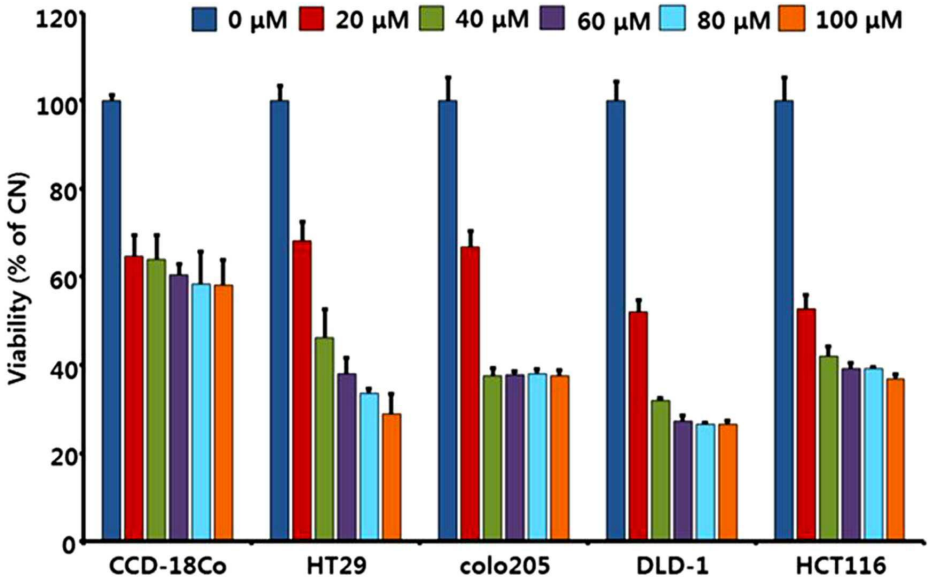
도면4


0 μM
20 μM
40 μM
60 μM
80 μM
100 μM
Viability (% of CN)
140
120
100
80
60
40
20
0
CCD-18Co
HT29
colo205
DLD-1
HCT116

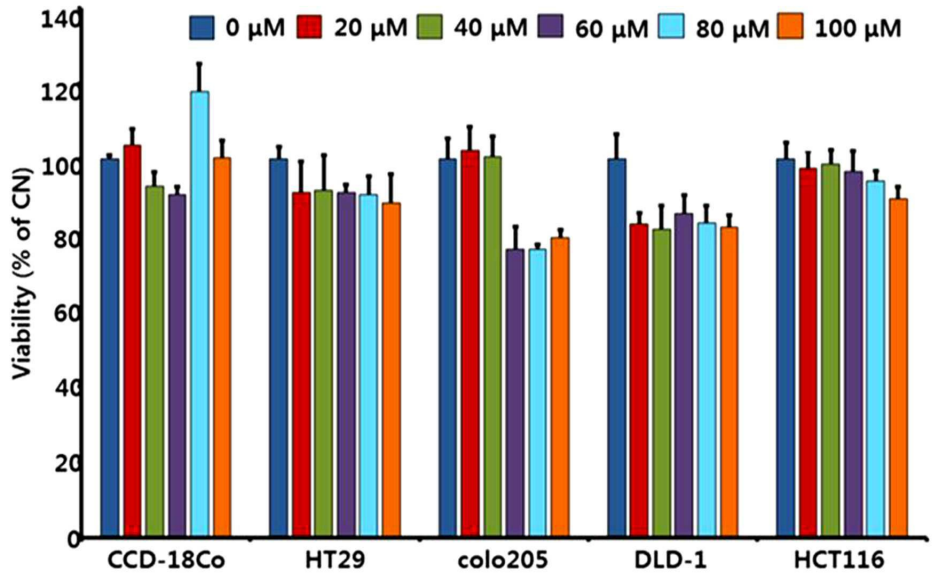
도면5


0 μM
20 μM
40 μM
60 μM
80 μM
100 μM
Viability (% of CN)
120
100
80
60
40
20
0
CCD-18Co
HT29
colo205
DLD-1
HCT116

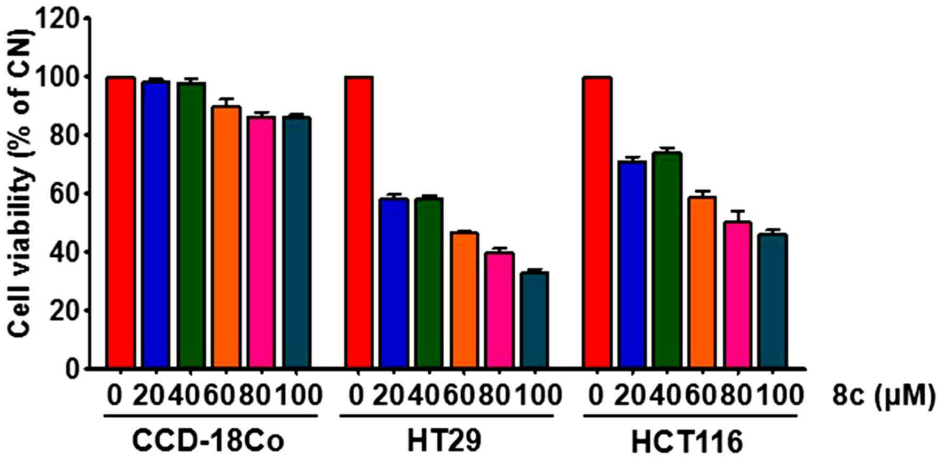
도면6


0 μM
20 μM
40 μM
60 μM
80 μM
100 μM
Viability (% of CN)
120
100
80
60
40
20
0
CCD-18Co
HT29
colo205
DLD-1
HCT116

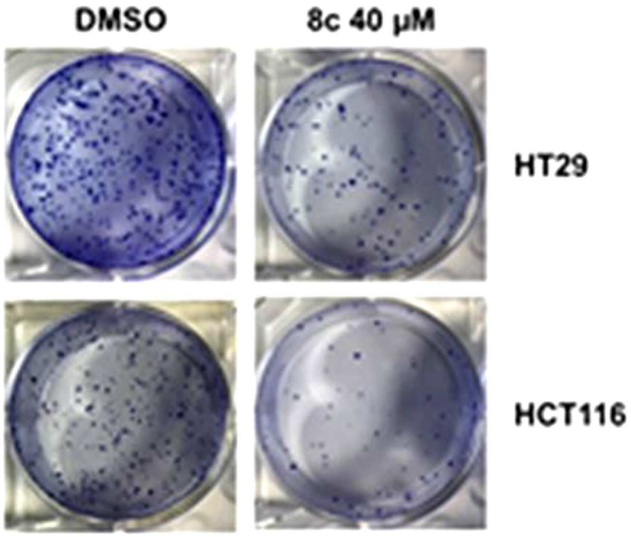
도면7


0 μM
20 μM
40 μM
60 μM
80 μM
100 μM
Viability (% of CN)
140
120
100
80
60
40
20
0
CCD-18Co
HT29
colo205
DLD-1
HCT116

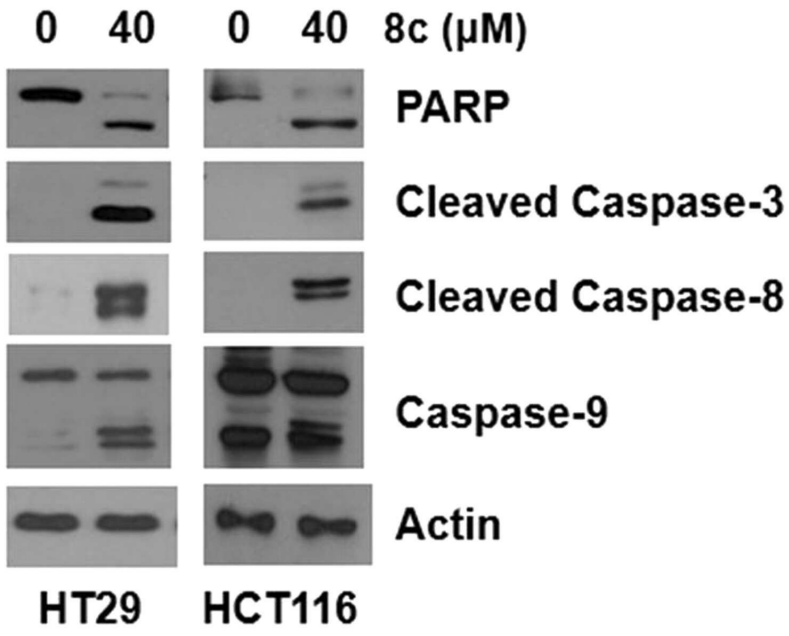
도면8


Cell viability (% of CN)
120
100
80
60
40
20
0
0 20406080100
0 20406080100
0 20406080100
8c (μM)
CCD-18Co
HT29
HCT116

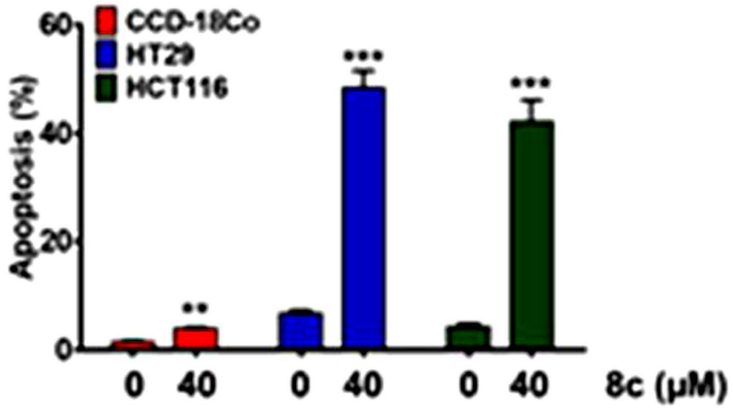
도면9


DMSO
8c 40 μM
HT29
HCT116

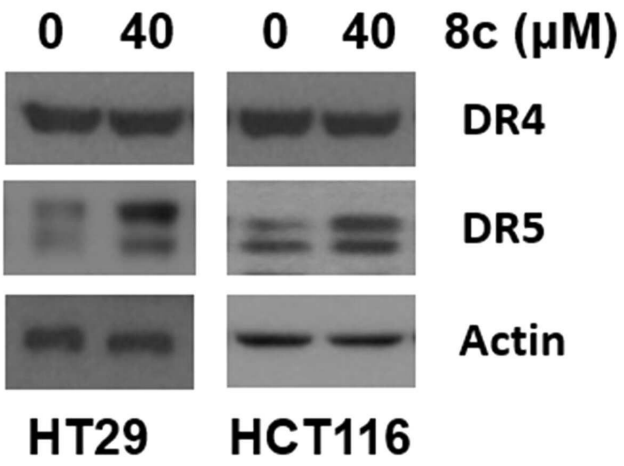
도면10


0
40
0
40
8c (μM)
PARP
Cleaved Caspase-3
Cleaved Caspase-8
Caspase-9
Actin
HT29
HCT116

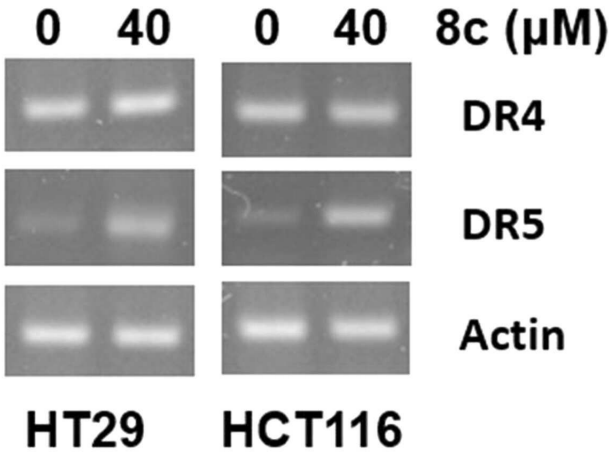
도면11



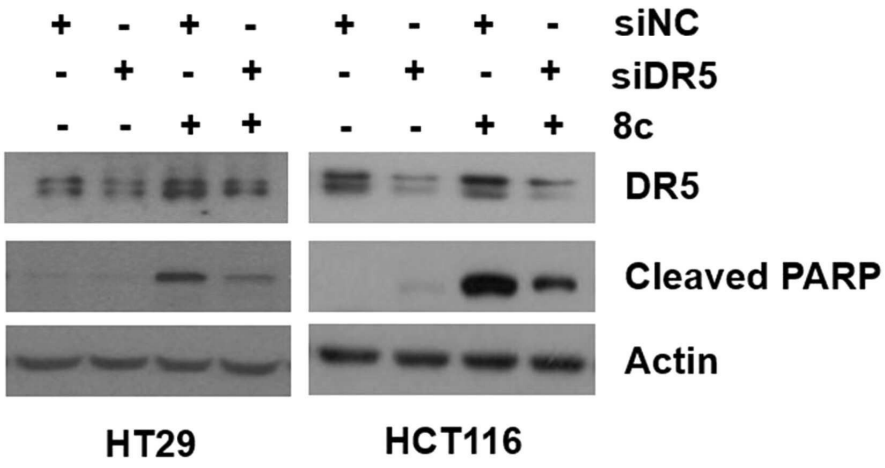
도면12



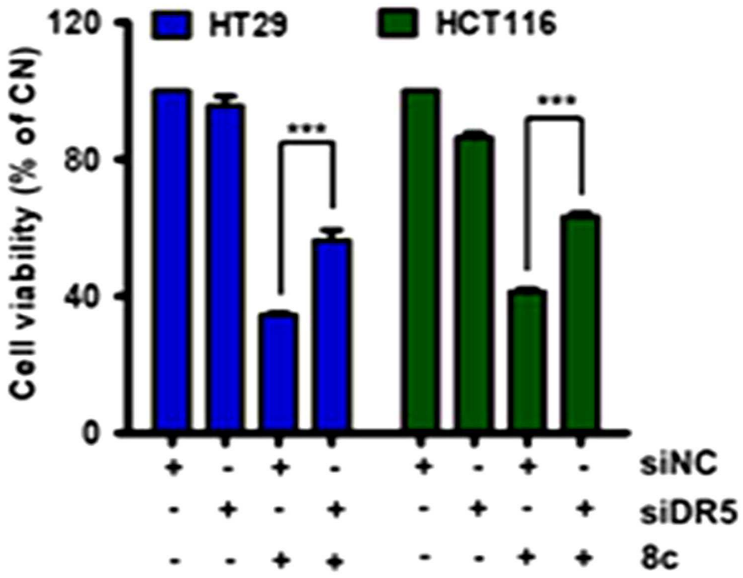
도면13



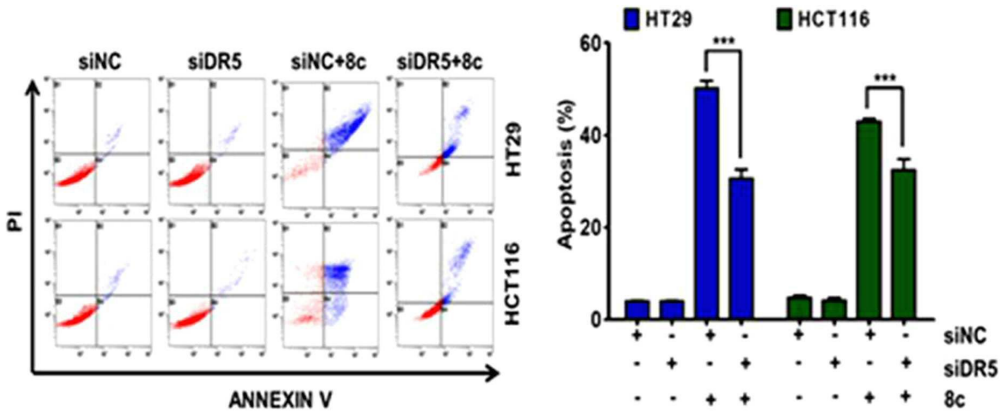
도면14



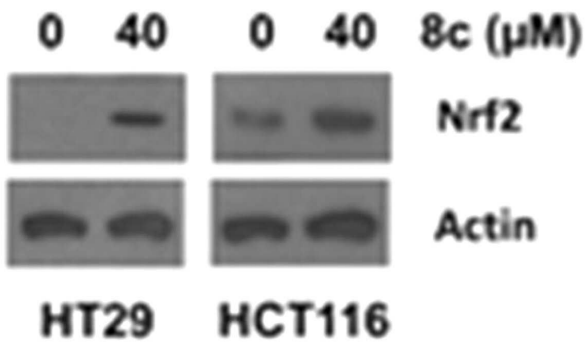
도면15



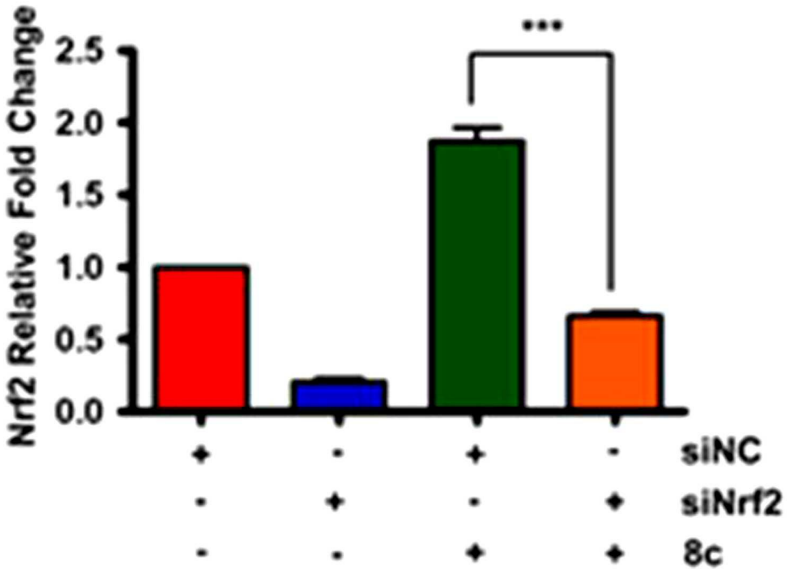
도면16



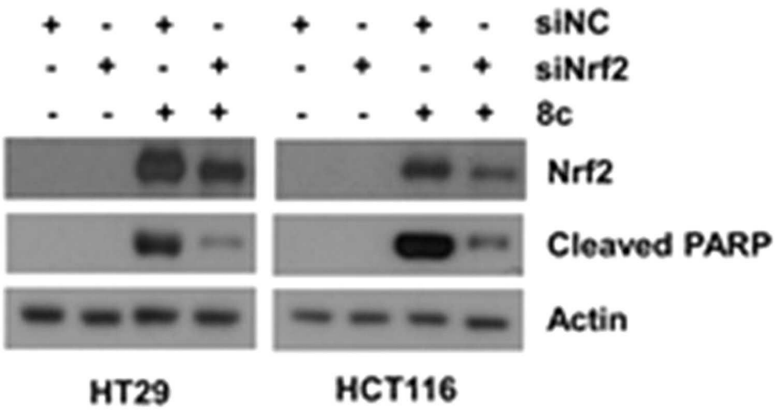
도면17



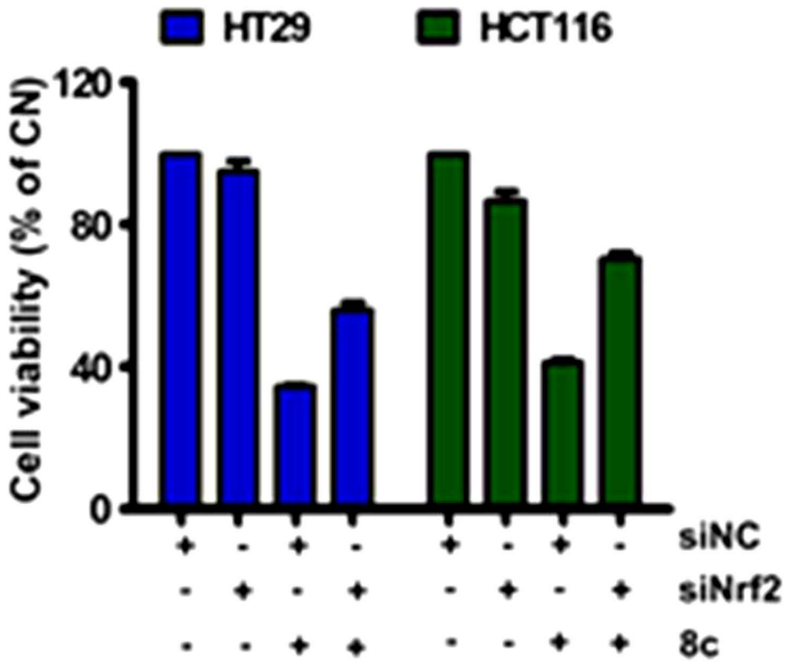
도면18



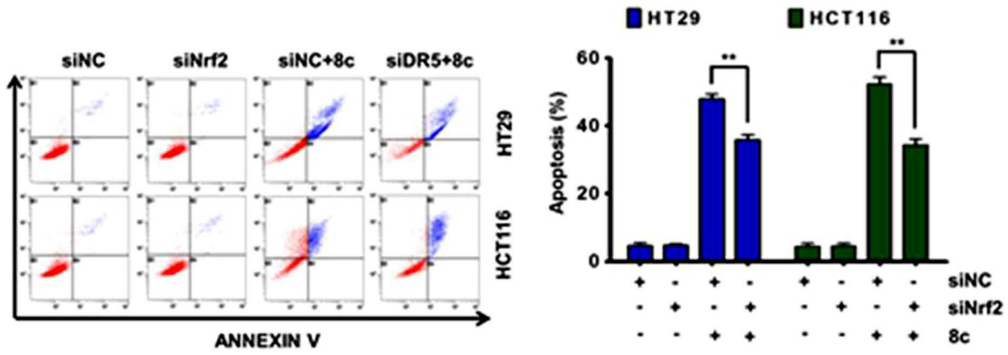
도면19



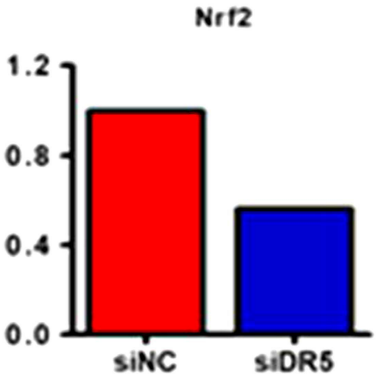
도면20



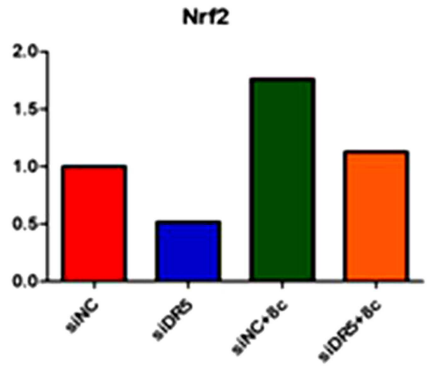
도면21



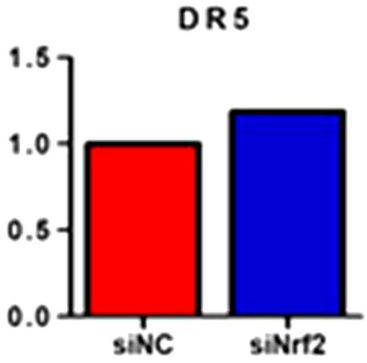
도면22



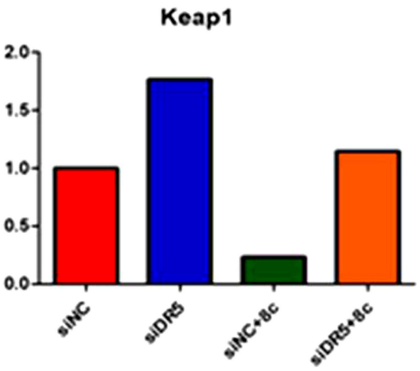
도면23



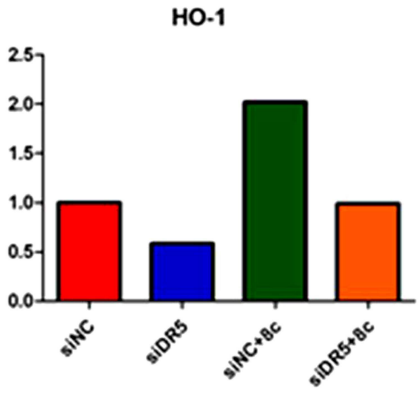
도면24



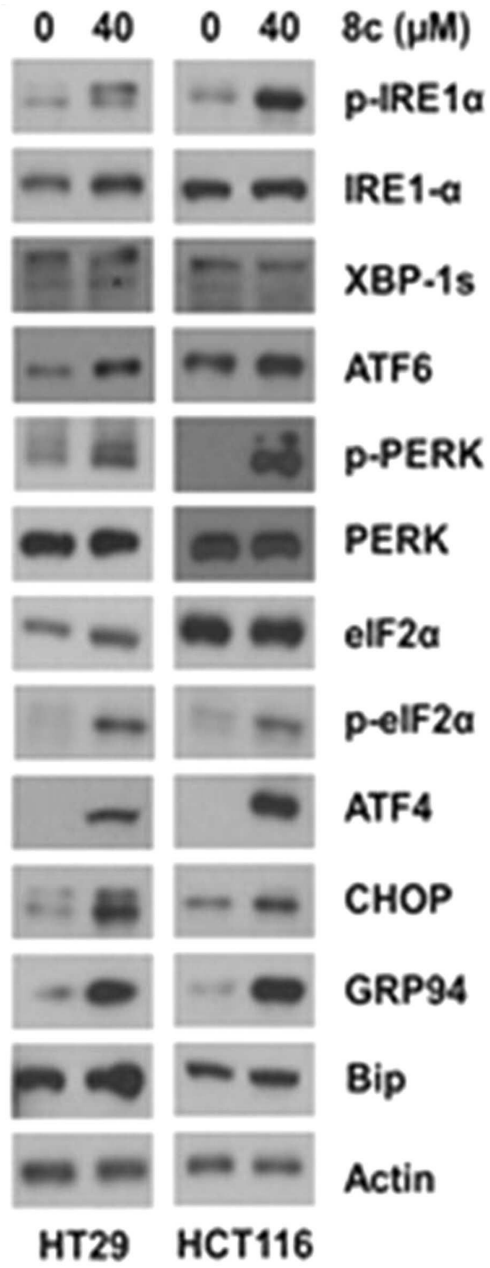
도면25



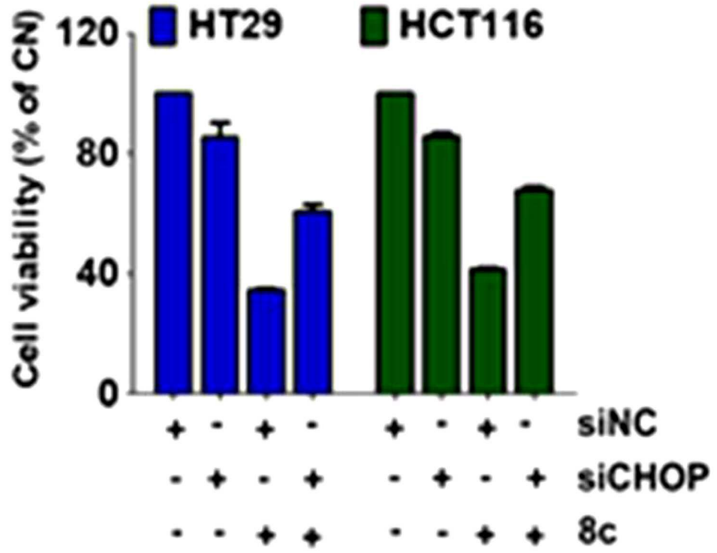
도면26


HO-1
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
siNC
siDR5
siNC+8c
siDR5+8c

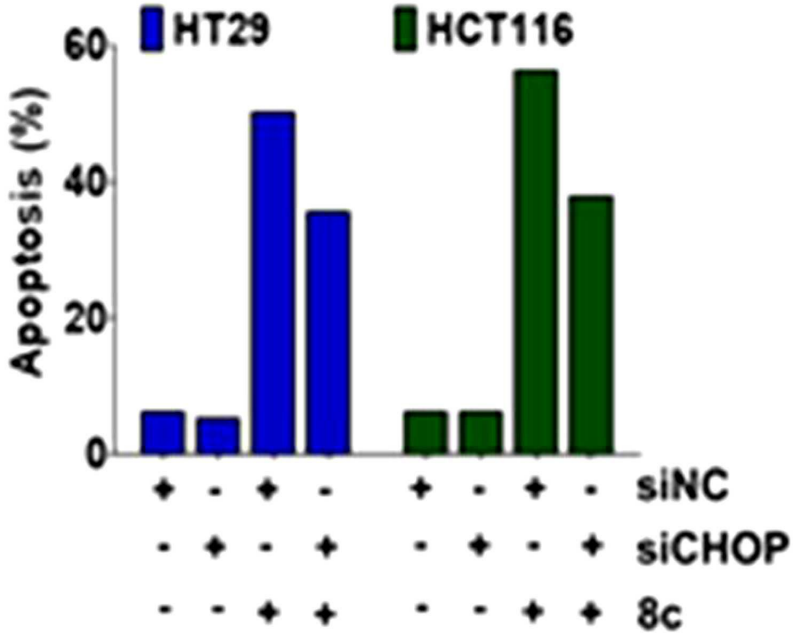
도면27


0 40 0 40 8c (μM)
p-IRE1α
IRE1-α
XBP-1s
ATF6
p-PERK
PERK
eIF2α
p-eIF2α
ATF4
CHOP
GRP94
Bip
Actin
HT29 HCT116

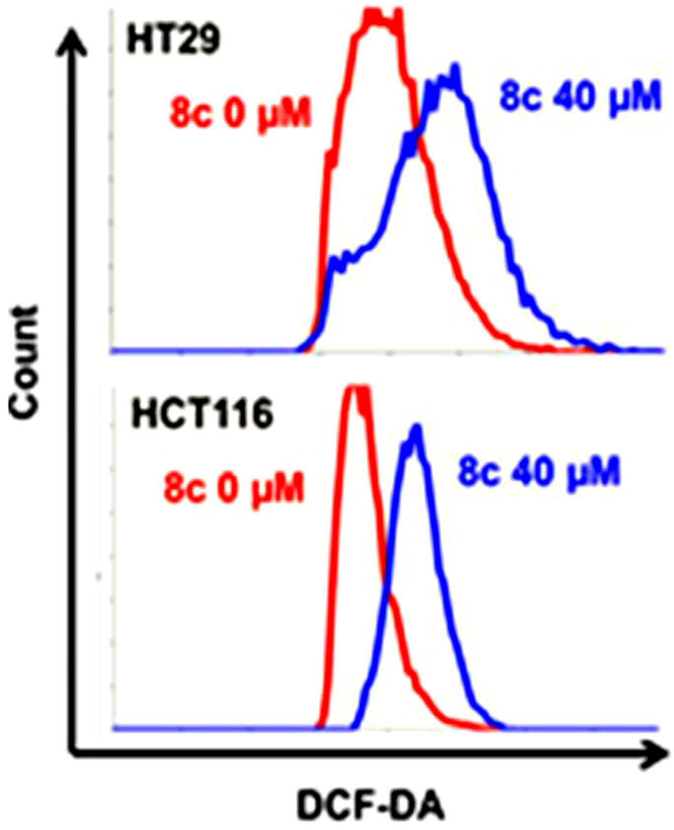
도면28


HT29
HCT116
Cell viability (% of CN)
120
80
40
0
siNC
siCHOP
8c

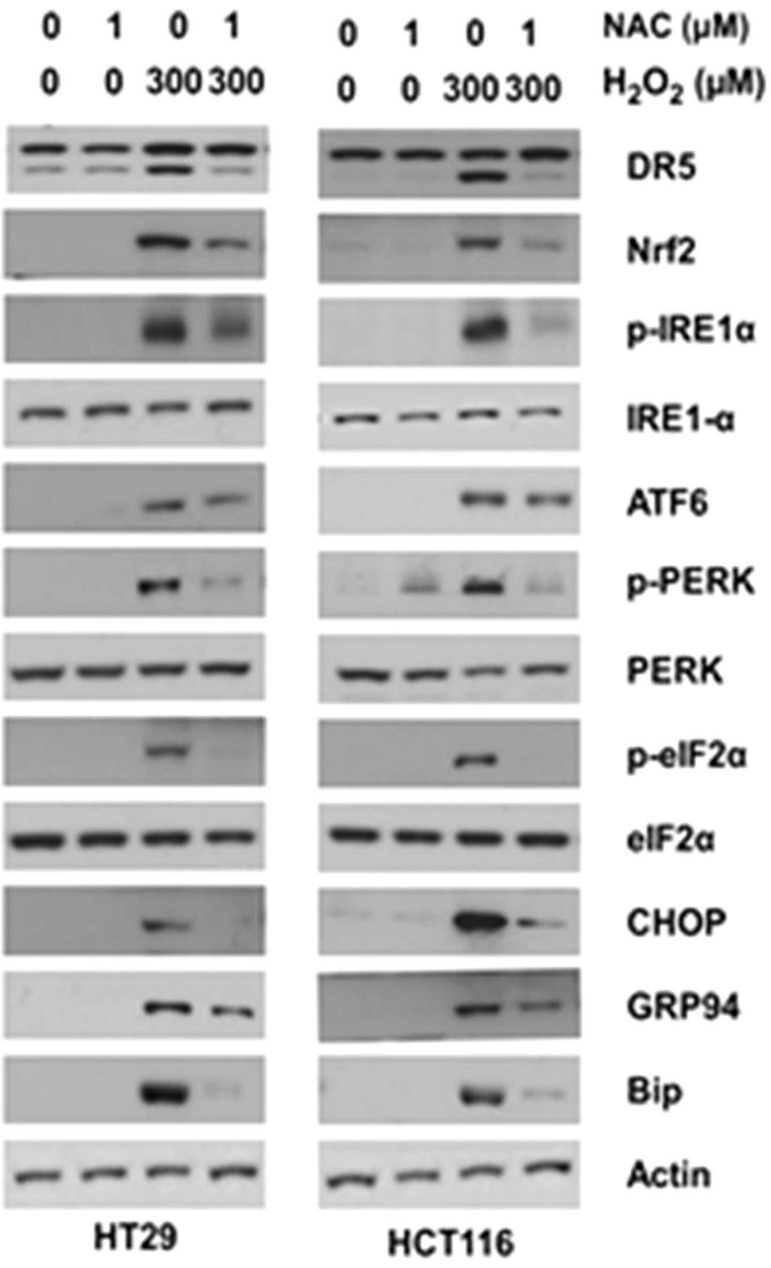
도면29


HT29
HCT116
Apoptosis (%)
60
40
20
0
siNC
siCHOP
8c

도면30



도면31


0 1 0 1
0 0 300 300
NAC (μM)
H2O2 (μM)
DR5
Nrf2
p-IRE1α
IRE1-α
ATF6
p-PERK
PERK
p-eIF2α
eIF2α
CHOP
GRP94
Bip
Actin
HT29
HCT116