



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0094157
(43) 공개일자 2025년06월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/351 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/351 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2023-0184740
(22) 출원일자 2023년12월18일
심사청구일자 2023년12월18일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
오상철
서울특별시 강남구 선릉로 120, 7동 602호 (대치동, 개포1,2차우성아파트)
김보람
서울특별시 구로구 가마산로20길 8, 3층 (구로동, 고려대학교구로병원의생명연구센터)
(74) 대리인
특허법인 무한

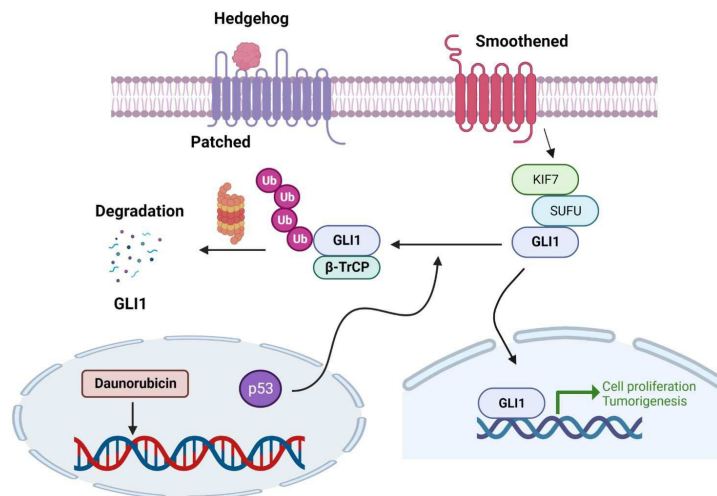
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 다우노루비신 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장암의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 다우노루비신 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장암의 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것으로서, 다우노루비신이 헤지호그 경로를 억제하여 대장암에 대한 항암효과를 나타냄을 확인한 것이다.

대표도 - 도10



명세서

청구범위

청구항 1

다우노루비신 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 대장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 암세포의 증식을 억제하거나 사멸을 유도하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 다우노루비신은 항암제와 병용투여되어 항암제의 활성을 증진시키는 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 파니투무맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미드, 수니티닙, 카보플라틴, 5-플루오로우라실 (5-FU), 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 아플리베르셉트, 레고라페닙, 비스큐알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 켄시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토트렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 류코보린, 카르모피, 말티트렉세드, 인터페론알파-2a, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 테모졸로마이드, 5-플루오로우라실, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레틴, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토락톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인, 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 다우노루비신은 헤지호그 경로를 억제하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 대장암은 GLI1을 과발현하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

다우노루비신 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 대장암에 대한 항암제 치료 반응

성 개선용 조성물.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 파니투무맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 5-플루오로우라실 (5-FU), 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 아플리베르셉트, 레고라페닙, 비스쑼알bum, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라머스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레블린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산홀름 키토산, 쟈시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토크세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 류코보린, 카르모퍼, 팔티트렉세드, 인터페론알파-2a, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 테모졸로마이드, 5-플루오로우라실, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토락톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인, 항암제 치료 반응성 개선용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다우노루비신 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장암의 예방 또는 치료용 조성물 및 대장암에 대한 항암제의 치료반응성 개선용 조성물 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 헤지호그 신호전달 경로는 적절한 세포 분화에 필요한 정보를 배아세포에 전달하는 신호 전달 경로이다. 배아의 부위마다 헤지호그 신호 전달 단백질의 농도가 다르며, 이 경로는 성인에서도 역할을 한다. 이 경로의 기능 장애와 관련된 질병에는 암이 포함되는 것으로 보고되고 있다.

[0004] 헤지호그 경로의 활성화는 뇌, 폐, 유선, 전립선 및 피부를 포함한 다양한 기관의 암 발생과 관련되어 있다. 암성 악성 종양의 가장 흔한 형태인 기저 세포 암종은 헤지호그 신호 전달과 가장 밀접한 관련이 있다. 헤지호그 신호전달 경로와 암 발병 사이의 연관성은 매우 복잡하지만, 헤지호그 신호전달의 비정상적인 활성화가 종양 세포의 성장, 증식 및 침입을 초래한다는 점은 명확해지고 있다.

[0005] 다양한 암 모델을 사용한 여러 연구에서 GLI 전사 인자가 Hh 리간드 또는 PTCH/Smo뿐만 아니라Raf/MEK/ERK 및 PI3K/Akt 신호와 같은 발암 신호 전달 경로에 의해 조절될 수 있음이 밝혀졌다.. 따라서 헤지호그 경로는 중요한 암 치료 표적이다.

[0006] 본 발명자들은 새로운 클래스의 헤지호그 경로 억제제를 찾기 위해 우리는 GLI-루시퍼라제 리포터 분석을 사용하여 스크리닝을 수행하고 새로운 작용 방식으로 GLI1 매개 전사를 억제하는 화합물을 확인하였으며, 이를 발명으로 완성하여 제공하고자 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 다우노루비신 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포

함하는, 대장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명이 이루고자 하는 다른 기술적 과제는 다우노루비신 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 대장암에 대한 항암제 치료 반응성 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명자들은 대장암세포에서 다우노루비신은 GLI 의존성 전사를 억제하고, 항암 활성이 헤지호그 경로의 억제에 의해 부분적으로 매개된다는 사실을 처음으로 확인하여 본 발명을 완성하였으며, 다우노루비신 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 대장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 일 측에 따르면, 상기 약학적 조성물은 암세포의 증식을 억제하거나 사멸을 유도할 수 있다.

[0014] 일 측에 따르면, 상기 다우노루비신은 항암제와 병용투여되어 항암제의 활성을 증진시킬 수 있다.

[0015] 일 측에 따르면, 상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 파니투무맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미브, 수니티닙, 카보플라틴, 5-플루오로우라실 (5-FU), 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 아플리베르셉트, 레고라페닙, 비스큐알분, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산훈류 키토산, 겐시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토크세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토퍼린, 티오구아닌, 클라드리빈, 류코보린, 카르모퍼, 말티트렉세드, 인터페론알파-2a, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 테모졸로마이드, 5-플루오로우라실, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라클, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0016] 일 측에 따르면, 상기 다우노루비신은 헤지호그 경로를 억제할 수 있다.

[0017] 일 측에 따르면, 상기 대장암은 GLI1을 과발현하는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 다우노루비신 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 대장암에 대한 항암제 치료 반응성 개선용 조성물이 제공된다.

[0019] 일 측에 따르면, 상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 파니투무맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미브, 수니티닙, 카보플라틴, 5-플루오로우라실 (5-FU), 베바시주맙, 시스플라틴, 세톡시맙, 아플리베르셉트, 레고라페닙, 비스큐알분, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산훈류 키토산, 겐시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토크세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토퍼린, 티오구아닌, 클라드리빈, 류코보린, 카르모퍼, 말티트렉세드, 인터페론알파-2a, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 테모졸로마이드, 5-플루오로우라실, 부설판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라클, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라

졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토락톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명은 다우노루비신 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 또는 대장암에 대한 항암제 치료 반응성 개선용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따르면 다우노루비신은 헤지호그 경로를 억제하고 GLI1 과발현 대장암에 대한 항암효과가 있으며, 특히 시판 항암제와 병용투여하는 경우 상승효과를 내어 단독으로 또는 병용으로 항암 용도로 유용하게 사용할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 효과는 이상에서 언급된 것들에 한정되지 않으며, 언급되지 아니한 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 다양한 약물에 대한 GLI 루시퍼라제 어세이 결과이다.
- 도 2는 다우노루비신과 프랄라트렉세이트가 HCT116에서 GLI1을 감소시킴을 보여준다.
- 도 3은 다우노루비신이 HCT116세포에서 헤지호그 신호전달을 억제함을 나타낸다.
- 도 4는 다우노루비신이 HT29 및 SNU283 세포를 포함한 다른 CRC 세포에서 GL1 단백질 수준을 하향 조절함을 보여준다.
- 도 5는 HCT116 세포에서 다우노루비신에 의해 유도된 카스파제 의존성 세포사멸효과를 나타낸다.
- 도 6은 다우노루비신이 HCT-116 세포에서 p53 매개 세포사멸과 GLI1 하향조절을 유도함을 보여준다.
- 도 7은 다우노루비신이 GLI1 유비퀴틴화 및 프로테아좀 분해를 촉진함을 나타낸다.
- 도 8은 다우노루비신이 HCT116 이중이식 생체 내 마우스 모델에서 헤지호그 경로를 억제하고 세포사멸을 유도함을 보여준다.
- 도 9는 다우노루비신과 시판항암제의 병용투여시 효과를 나타낸다.
- 도 10은 본 발명의 타겟 경로의 작용 모식도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명자들은 다우노루비신이 P53을 상향 조절함으로써 β -TrCP 매개 GLI1 유비퀴틴화와 후속 프로테아좀 분해를 촉진하여 GLI1을 억제한다는 것을 발견하였으며, 이를 통해 대장암세포에 대해 세포사멸효능과 항암효능을 가짐을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0026] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 다우노루비신 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 대장암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명에서, 용어, “약학적으로 허용 가능한 염”은 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않은 화합물의 제형을 의미한다. 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 본 발명의 화합물을 염산, 브롬산, 황산, 질산, 인산 등의 무기산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산 등의 술폰산, 타타르산, 포름산, 시트르산, 아세트산, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산, 카프릭산, 이소부탄산, 말론산, 석신산, 프탈산, 클루콘산, 벤조산, 락트산, 푸마르산, 말레인산, 살리실산 등과 같은 유기 카본산과 반응시켜 얻어질 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물을 염기와 반응시켜, 암모늄염, 나트륨 또는 칼륨염 등의 알칼리 금속염, 칼슘 또는 마그네슘 염 등의 알칼리 토금속염 등의 염, 디시클로헥실아민, N-메틸-D-글루카민, 트리스 (히드록시메틸) 메틸아민 등의 유기염기들의 염 및 아르기닌, 리신 등의 아미노산 염을 형성함으로써 얻어질 수도 있다.
- [0028] 본 발명에서 용어, "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 암의 발생, 확산 또는 재발을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는

모든 행위를 의미한다.

- [0029] 본 발명에서 용어, "약학적 조성물"은 상기 질환의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 경구형 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0030] 본 발명에서, "유효성분으로 포함"은 원하는 생물학적 효과를 실현하는데 필요하거나 또는 충분한 양으로 해당 성분이 포함되는 것을 의미한다 실제 적용에 있어서 유효 성분으로 포함되는 양의 결정은 대상 질병을 치료하기 위한 양으로서, 다른 독성을 야기하지 않는 사항을 고려해서 결정될 수 있으며, 예를 들어 치료되는 질병 또는 병태, 투여되는 조성물의 형태, 피험체의 크기, 또는 질병 또는 병태의 심각도 등과 같은 다양한 인자에 따라서 변화될 수 있다 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 기술을 지닌 기술자라면 과도한 실험을 동반하지 않고 개별적 조성물의 유효량을 경험적으로 결정할 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은, 각각의 제형에 따라 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함할 수 있다.
- [0032] 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로오스 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 하나 이상의 혼합물일 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수도 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수도 있다. 더 나아가, 당분야의 적절한 방법으로, 또는 Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수도 있다.
- [0033] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 약학적으로 유효한 양으로 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 본 발명의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 다우노루비신 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암 예방 또는 치료 방법을 제공할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 용어, "개체"는 상기 질환의 예방, 치료, 및/또는 진단이 필요한 가축, 인간 등의 포유류라면 제한되지 아니하나, 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 용어 "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물은 개체에 투여를 위한 다양한 형태로 제형화 될 수 있으며, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화 될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는 예를들면 섭취형 정제, 흡착 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽 및 웨이퍼 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제 (예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신)와 활탁제 (예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 포함할 수 있다. 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 포함할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제 및/또는 감미제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 방부제, 수화제, 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제와 같은 보조제와 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 제제화 될 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 목적하는 효과를 상승시킬 수 있는 공지의 화합물과도 병행하여

투여할 수 있다.

- [0039] 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여 경로로는 경구적으로 또는 정맥 내, 피하, 비강 내 또는 복강 내 등과 같은 비경구적으로 사람과 동물에게 투여될 수 있으나, 바람직하게는 정맥 내로 투여될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 본 발명에 따른 다우노루비신 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 통상적으로 성인을 기준으로 1회 투여시 100 µg 내지 3,000 mg 유효용량으로 하루에 수차례 반복 투여될 수 있으나, 해당 함량으로 제한되는 것은 아니며, 상기 다우노루비신 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐 만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정될 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지는 않으며, 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분으로서 상기 다우노루비신 이의 약학적으로 허용가능한 염 이외에 공지된 약제를 추가로 포함할 수 있고, 이들 질환의 치료를 위해 공지된 다른 치료와 병용될 수 있다.
- [0042] 특히, 본 발명자들은 다우노루비신이 항암제와 병용투여되는 경우 대장암세포주에 대해 상당한 상승효과를 보여줌을 확인하였다. 항암제의 비제한적인 예로 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맙, 파니투무맙, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 게피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맙, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 5-플루오로우라실(5-FU), 베바시주맙, 시스플라틴, 세록시맙, 아플리베르셉트, 레고라페닙, 비스쿰알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맙오조가마이신, 이브리투모맙튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노테클린산, 암사크린, 알렘투주맙, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산훈류 키토산, 쟈시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토티렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 류코보린, 카르모피, 알티트렉세드, 인터페론알파-2a, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시롤리무스, 테모졸로마이드, 5-플루오로우라실, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토라톨, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴 등일 수 있으며, 바람직하게는 이리노테칸일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 일 측에 따르면, 상기 약학적 조성물은 암세포의 증식을 억제하거나 사멸을 유도할 수 있다. 상기 대장암은 선암, 림프종, 육종, 편평상피암, 직장결장암, 대장으로 전이된 전이성 병변 중 어느 하나일 수 있다.
- [0044] 일 측에 따르면, 상기 다우노루비신은 헤지호그 경로를 억제할 수 있다.
- [0045] 일 측에 따르면, 상기 대장암은 GLI1을 과발현하는 것일 수 있다.
- [0046] 하기 실시예 2 등에서 개시하는 바와 같이, 본 발명자들은 다우노루비신이 GLI1 을 효과적으로 억제하여 대장암 세포주의 사멸효과를 나타냄을 확인하였으며, 이는 GLI1 과발현 대장암 서브타입에서 더욱 유용하게 이용될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 다우노루비신 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 대장암에 대한 항암제 치료 반응성 개선용 조성물이 제공된다.
- [0048] 본 발명에서 있어서 "치료 반응성"이란, 환자가 치료제, 예컨대 항암제에 대해 선호적으로 또는 비선호적으로 반응할지 여부 또는 항암제에 대한 내성의 위험성, 치료 후 환자의 예후 등을 의미한다. 본 발명에 따른 치료제 반응성 개선을 위한 조성물은 알려진 항암제의 효과보다 다우노루비신을 병용투여하여 상승효과를 얻을 수 있다.
- [0049] 본 발명에서, 용어 "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키거나, 질환이 호전되어 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

- [0050] 본 명세서에서 사용되는 용어 "항암제에 대한 내성"은 암 치료제를 이용하여 암 환자를 치료할 때, 치료 초기부터 치료 효과가 없거나 초기에는 암 치료 효과가 있으나 지속적인 치료 과정에서 암 치료 효과가 상실되는 것을 의미한다. 예를 들어, 항암제 치료에 있어서 일반적인 치료 효과 판정은 고형 종양 그룹의 반응 평가 기준에 기초하여 결정할 수 있다. 상기 기준에 따라 암 치료의 효과는 종양의 크기 변화 등으로부터 완전 반응(Complete Response: CR), 부분 반응(Partial Response: PR), 진행(Progressive Disease: PD) 또는 안정(Stable Disease: SD) 그룹으로 분류할 수 있다.
- [0051] 일 측에 따르면, 상기 항암제는 나이트로젠 머스타드, 이마티닙, 옥살리플라틴, 리톡시맵, 파니투무맵, 엘로티닙, 네라티닙, 라파티닙, 제피티닙, 반데타닙, 니로티닙, 세마사닙, 보수티닙, 악시티닙, 세디라닙, 레스타우르티닙, 트라스투주맵, 게피티니브, 보르테조미, 수니티닙, 카보플라틴, 5-플루오로우라실 (5-FU), 베바시주맵, 시스플라틴, 세톡시맵, 아플리베르셉트, 레고라페닙, 비스큐알BUM, 아스파라기나제, 트레티노인, 하이드록시카바마이드, 다사티닙, 에스트라메스틴, 겐투주맵오조가마이신, 이브리투모맵튜세탄, 헵타플라틴, 메칠아미노레볼린산, 암사크린, 알렘투주맵, 프로카르바진, 알프로스타딜, 질산훈류 키토산, 겐시타빈, 독시플루리딘, 페메트렉세드, 테가푸르, 카페시타빈, 기메라신, 오테라실, 아자시티딘, 메토티렉세이트, 우라실, 시타라빈, 플루오로우라실, 플루다가빈, 에노시타빈, 플루타미드, 데시타빈, 머캅토프린, 티오구아닌, 클라드리빈, 류코보린, 카르모퍼, 칼티트렉세드, 인터페론알파-2a, 도세탁셀, 파클리탁셀, 이리노테칸, 벨로테칸, 토포테칸, 비노렐빈, 에토포시드, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 테니포시드, 독소루비신, 이다루비신, 에피루비신, 미톡산트론, 미토마이신, 블레오마이신, 닥티노마이신, 피라루비신, 아클라루비신, 페프로마이신, 템시플리무스, 테모졸로마이드, 5-플루오로우라실, 부셀판, 이포스파미드, 사이클로포스파미드, 멜파란, 알트레트민, 다카바진, 치오테파, 니무스틴, 클로람부실, 미토락솔, 레우코보린, 트레토닌, 엑스메스탄, 아미노글루테시미드, 아나그렐리드, 나벨빈, 파드라졸, 타목시펜, 토레미펜, 테스토라톤, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 비칼루타미드, 로무스틴 및 카르무스틴으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [0053] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0054] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0055] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0056] **실시예 1. 실험방법**
- [0057] 실시예 1-1. 세포 배양
- [0058] GLI-루시페라제 리포터 구조물을 안정적으로 발현하는 NIH3T3 세포주는 BPS Bioscience Inc.에서 구입하여 DMEM과 10% 태아 송아지 혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신에서 유지하였다. 인간 대장암 세포주인 HCT116, HT29, SNU283, DLD-1 및 HCT8은 한국세포주은행에서 구입하여 RPMI 1640 배지에서 배양하였다. 모든 세포는 5% CO₂ 인큐베이터에서 37° C로 성장시켰다.
- [0060] 실시예 1-2. GLI-루시페라제 리포터 유전자 분석
- [0061] GLI-루시페라제 리포터 구조물을 안정적으로 발현하는 NIH3T3 세포주를 96 웰 플레이트에 웰당 25,000세포/100

μL 의 비율로 시딩하였다. 밤새 인큐베이션한 후, DMSO에 용해된 미리 플레이팅된 화합물 500nL를 Janus 자동 액체 핸들러 워크스테이션(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)을 사용하여 세포에 핀 전달하고 24시간 동안 인큐베이션하였다. Bright-Glo 루시페라제 분석 시약을 세포에 첨가하고 Envision 플레이트 판독기(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 방출 발광을 판독하였다.

[0063] 실시예 1-3. MTT 세포 생존력 분석

[0064] 세포(웰당 5,000개 세포/ $100\mu\text{L}$)를 96웰 조직 배양 처리 플레이트에 시딩하였다. 1일 후, 최고농도 $20\mu\text{M}$ 에서 1/5로 희석을 하여 약물을 처리하였다. 24 시간 후 제조사의 지시에 따라 MTT 시약(Promega Corp., Fitchburg, WI, USA)을 첨가하고 Envision 플레이트 리더기(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 흡수 신호를 판독하였다. GI50은 Prism8 소프트웨어(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 계산하였다.

[0066] 실시예 1-4. 웨스턴블롯

[0067] 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100 및 1% 나트륨 데옥시콜레이트, 프로테아제 및 포스파타제 억제제 각테일을 함유하는 RIPA 완충액으로 세포를 용해시켰다. 동일한 양의 단백질을 SDS-PAGE에 로딩한 다음 멤브레인으로 트랜스퍼하였다. 트랜스퍼후 5% 스킴밀크에서 2시간 동안 블로킹(blocking)하였다. 이후, 1차 항체를 4°C 에서 밤새 배양하고 HRP로 표지된 2차 항체와 함께 2시간 동안 배양하였다. Enhanced Chemiluminescence (ECL)을 이용하여 단백질 발현량을 검출하였다.

[0069] 실시예 1-5. 면역침강 시험법

[0070] 세포를 $300\mu\text{L}$ 의 용해 완충액(1mM PMSF, 프로테아제 억제제, 포스파타제 억제제)으로 용해시키고 비신코닌산(bicinchoninic acid) 함량을 분석하였다. 1차 항체를 밤새 4°C 에서 배양한 후 Protein G PLUS-Agarose 비드를 첨가한 후 1시간 동안 로테이터로 인큐베이션하였다. 면역침전제를 여러 번 세척하고 15,000rpm에서 2X 샘플 완충액을 넣어 100°C 5분간 가열하였으며, 마지막으로 Western blot을 이용하여 단백질 분석하였다.

[0072] 실시예 1-6. 콜로니 형성 분석

[0073] HCT-116 세포를 6 웰 플레이트에 5×10^2 세포/웰로 시딩 후 5% CO₂ 인큐베이터에서 37°C 에서 배양하였다. 배지는 일주일에 2~3회 교체하였다. 2주 후, 세포를 DPBS(Dulbecco 인산염 완충 식염수)로 세척하고, 실온에서 4% 파라포름알데히드로 30분간 고정한 후, 30분간 0.5% 크리스탈 바이올렛으로 염색하였다.

[0075] 실시예 1-7. 셀 아포토시스(Cell apoptosis) 측정

[0076] HCT116 세포주에 다우노루비신 약물을 24 시간 동안 처리하였다. 24시간 후 트립신-EDTA를 이용하여 단일세포로 만들어 주었다. 그런 다음 아넥신 -FITC 및 프로피듐 요오드화물처리 후 4°C 에서 30분간 암실에서 염색하였다. 30분 후 즉시 유세포 분석기를 사용하여 세포의 아포토시스를 측정하였다.

[0078] 실시예 1-8. PCR 시험법

[0079] TRIzol 시약을 사용하여 RNA를 추출하였다. 전사체의 증폭은 역전사효소 PCR 키트를 사용하여 수행하였다. qRT-PCR은 유전자 특이적 Taqman™ 프로브(Applied Biosystems)를 사용하여 Applied Biosystems® QuantStudio™ 6 Flex 실시간 PCR에서 수행하였다. mRNA 발현은 CT값을 이용하여 계산하였다.

[0081] 실시예 1-9. 면역형광염색(Immunofluorescence staining)

[0082] HCT-116 세포를 12 웰 플레이트 내의 유리 커버슬립에서 시딩하고 다우노루비신을 24 시간동안 처리하였다. 24 시간 후 PBS에 3번 세척한 후 상온에서 30분 동안 3.7% 포름알데히드로 고정시켰다. 0.5% Triton X-100을 사용

하여 세포를 실온에서 30분 동안 처리 후 1% BSA(소 혈청 알부민)를 사용하여 2시간 동안 블로킹하였다. 이후, HCT-116 세포를 4° C에서 밤새 1차 항체와 함께 인큐베이션 하였다. 다음날, Alexa Fluor® 594 접합 2차 항체를 15 분 동안 처리하였다. 그런 다음 4',6-다이아미디노-2-페닐인들을 사용하여 핵(DAPI)을 염색하였다. 마운팅 솔루션(Mounting solution)을 이용하여 마운팅 후 형광현미경으로 관찰하였다.

[0084] 실시예 1-10. 카스파제 3/7 활성 측정

[0085] HCT116 세포를 96 웰 플레이트에 웰당 8×10^3 개 세포로 시딩하였다. 다우노루비신을 0, 0.5 및 1 μ M의 농도로 24시간 동안 처리한 후, 각 웰에 카스파제-Glo 3/7 시약 100 μ L를 첨가하였다. 암실에서 2시간 동안 인큐베이션 후 Varioskan Lux reader (Thermo Fisher)를 사용하여 caspase-3/7 활성을 측정하였다.

[0087] 실시예 1-11. 종양 이종 이식

[0088] 4주령 암컷 BALB/c 누드마우스를 구입하여 특정 병원균이 없는 환경에서 사육하였다. 실험 전, 동물들은 적응을 위해 일주일 동안 사육되었으며 음식과 물은 자유롭게 섭취할 수 있었다. HCT116 세포 (2×10^6)를 Matrigel과 혼합하고 5주령 BALB/c 누드 암컷 마우스에 피하 이식하였다. 종양 크기가 100mm³에 도달한 후, 누드 마우스에게 비히클(DMSO) 또는 다우노루비신(2mg/kg)을 15일 동안 이틀마다 복강내 투여하였다.

[0090] 실시예 2. 다우노루비신의 CRC 세포에서 GLI1 활성을 억제 확인

[0091] 헤지호그(Hh) 경로의 새로운 길항제를 확인하기 위해 GLI 의존성 반딧불 루시퍼라제 리포터를 안정적으로 발현하는 상업적으로 이용 가능한 NIH3T3 세포주에 대해 1,018개의 약물로 구성된 FDA 승인 약물 라이브러리를 스크리닝했다. 10가지 약물이 GLI 루시퍼라제 활성을 억제한다는 것을 발견하였다(도 1). 도 2에서 볼 수 있듯이 10가지 약물 중 다우노루비신과 프랄라트렉세이트만이 대장암 세포인 HCT116에서 GLI1을 감소시켰다. 다우노루비신이 GLI 구동 루시퍼라제의 활성을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다(도 3의 A 및 B). 다음으로, HCT116 세포를 다우노루비신(0, 0.5, 1 μ M)으로 24시간 동안 처리하고 표준 Hh 경로에 관여하는 구성 요소의 단백질 수준을 조사했다. GLI1의 단백질 발현 수준은 상당히 하향조절되었다(도 3의 C 및 E). SHH, GLI2, GLI3, Smo 및 Ptch1 단백질 수준은 다우노루비신에 의해 크게 변하지 않았다(도 3의 C). 또한, 다우노루비신은 HT29 및 SNU283 세포를 포함한 다른 CRC 세포에서 GLI 단백질 수준을 하향 조절하는 것으로 나타났다(도 4). 또한 GLI1 표적 유전자가 감소되었음을 확인했다(도 3의 D). HCT116 세포의 세포질 및 핵 추출에 대한 웨스턴 블롯 분석은 다우노루비신 처리가 대조군과 비교했을 때 GLI1의 세포질 및 핵 발현을 하향 조절한다는 것을 보여주었다(도 3의 F). 이러한 결과는 다우노루비신이 GLI1 발현을 억제한다는 것을 보여준다.

[0093] 실시예 3. 다우노루비신의 HCT116 세포에서 카스파제 의존성 세포사멸 유도

[0094] 먼저, CRC 세포에서 다우노루비신의 세포독성을 조사하기 위해(도 5의 A), 다양한 CRC를 다양한 농도(0-20 μ M)의 다우노루비신과 함께 24시간 동안 배양했다. CRC 세포의 생존력은 다우노루비신에 의해 용량 의존적으로 감소되었다. 또한 CRC 세포에서 다우노루비신의 감소된 세포 증식을 확인하기 위해 HCT116 세포에서 콜로니 형성 분석을 수행했다. 도 5의 B에 도시된 바와 같이, HCT116 세포의 콜로니 형성을 강력하게 억제했다. 또한, 처리에 의해 유발된 셀 데스가 아포토시스인지 확인하기 위해 HCT116 세포에 0, 0.5 및 1 μ M의 다우노루비신을 24시간 동안 처리하여 Annexin V-propidium iodide (PI) 염색을 실시하였다. 유동 세포 계측법 분석에서 다우노루비신에 의해 세포사멸이 증가했으며 (도 5의 C), 카스파제-3/7 활성도 용량 의존적으로 증가했다(도 5의 D). 다우노루비신은 절단된 PARP, 카스파제-8, 카스파제-9 및 카스파제-3의 수준을 증가시켰는데, 이는 팬-카스파제 억제제 z-VAD-fmk의 병용 치료에 의해 억제되었으며, 이는 다우노루비신이 HCT116 세포에서 카스파제 의존성 세포사멸(apoptosis)을 유도했음을 나타낸다(도 5의 E). 따라서 이러한 결과는 다우노루비신이 CRC에서 카스파제 의존성 세포사멸을 유도한다는 것을 보여준다.

[0096] 실시예 4. 다우노루비신의 HCT-116 세포에서 p53 매개 세포사멸과 GLI1 하향조절 유도

[0097] 인간 포스포 키나제 항체 어레이를 사용하여 다우노루비신($1\mu\text{M}$)에 의해 어떤 경로가 조절되는지 조사하였다. 흥미롭게도 단백질 배열의 인산화 중 p53 인산화(S15, S46, S392)는 다우노루비신 처리에 의해 증가했다(도 6의 A). 이는 다우노루비신에 의해 유발된 p53 활성화를 나타낸다. 또한, 다우노루비신은 세포 주기 정지에 관여하는 Chk2(T68) 및 p27(T198)의 인산화를 강화했다(도 6의 A).

[0098] 세포사멸 관련 표지 단백질의 수준을 조사했다. 도 6의 A와 일치하게, 다우노루비신은 p53, Bim, Bak, Bax 및 절단된 PARP와 같은 세포사멸 촉진 단백질의 수준을 증가시키는 반면, 항세포사멸 Puma 및 Cyclin D1 수준의 수준은 감소시켰다(도 6의 B). 다우노루비신에 의해 유도된 PARP 절단은 p53 녹다운에 의해 감소되었으며, 이는 다우노루비신이 p53 활성화를 통해 세포사멸을 유도했음을 시사한다(도 6의 C). p300과 PCAF의 활성화는 일반적인 메커니즘에 따라 유전독성 스트레스에 대한 p53 의존적 반응에 필요하다. 이전에 보고된 바와 같이 DNA 손상에 반응하여 GLI1을 억제하려면 p53에 의해 유도된 PCAF의 상향 조절이 필요하다는 것이 입증되었다. 다우노루비신에 의해 PCAF와 P300의 발현이 변화되는지 조사하였다. 다우노루비신은 용량 의존적으로 PCAF의 발현을 증가시켰다(도 6의 D).

[0099] GLI1의 PCAF 의존적 억제가 발생했는지 확인하기 위해 PCAF siRNA를 사용하여 PCAF를 녹다운했다. PCAF의 억제에도 불구하고 GLI1이 다우노루비신에 의해 여전히 감소된다는 것을 입증함으로써 이러한 결과는 다우노루비신에 의한 GLI1의 억제가 PCAF에 의존하지 않는다는 것을 보여준다(도 6의 E).

[0101] 실시예 5. 다우노루비신의 GLI1 유비퀴틴화 및 프로테아좀 분해 촉진

[0102] GLI1의 감소가 프로테아좀 분해인지 리소좀 분해인지 조사하기 위해 보르테조미프과 류페틴을 처리했다. 다우노루비신에 의해 감소된 GLI1 발현은 보르테조미프에 의해 증가되었으며 류페틴에 의해 변경되지 않았다(도 7의 A). 이 데이터는 다우노루비신에 의한 GLI1의 감소가 프로테아좀 분해로 인해 발생했음을 입증한다. 그리고 HCT116 세포에는 단백질 합성 억제제인 사이클로헥사민(CHX)을 처리하였다. HCT116 세포가 CHX 단독보다 다우노루비신과 CHX에 노출되었을 때 GLI1의 발현이 크게 감소했는데, 이는 다우노루비신이 유비퀴틴-프로테아좀 분해를 통해 GLI1 수준을 감소시켰다는 것을 의미한다(도 7의 B). 이러한 결과는 다우노루비신이 GLI1의 유비퀴틴화를 촉진한다는 것을 보여준다(도 7의 C).

[0103] 어떤 E3 리가제가 GLI1 유비퀴틴화를 담당하는지 조사하기 위해 GLI1과 E3 리가제 사이의 상호 작용을 측정하기 위한 면역침전을 수행했다. 도 7의 D에 표시된 것처럼 다우노루비신은 GLI1과 β -TrCP 사이의 상호 작용을 증가시켰다. β -TrCP 의존성 GLI1 유비퀴틴화가 발생했는지 조사하기 위해 β -TrCP siRNA를 사용하여 β -TrCP를 녹다운했다. β -TrCP의 녹다운은 다우노루비신에 의한 GLI1의 감소를 회복시켰고, GLI1의 유비퀴틴화 또한 변하지 않았다(도 7의 E). 이러한 데이터는 다우노루비신이 β -TrCP를 통해 GLI1 유비퀴틴화를 유도한다는 것을 시사한다.

[0105] 실시예 6. 다우노루비신의 HCT116 이종이식 생체 내 마우스 모델에서 헤지호그 경로 억제 및 세포 사멸 유도

[0106] HCT116 세포(2×10^6)를 BALB/c 누드 마우스에 피하 주사하였다. 종양의 크기가 100 mm^3 일 때, 누드 마우스에 다우노루비신(2 mg/kg)을 2일마다 15일 동안 복강내 주사하여 치료하였다. 종양 성장 및 체중은 대조군과 비교하여 다우노루비신 처리군에서 억제되었으며(도 8의 A, B 및 C), 체중은 대조군과 다우노루비신 처리군 간에 크게 다르지 않았다(도 8의 D). 이러한 데이터는 다우노루비신에 의해 유발된 세포사멸을 나타낸다. 시험관 내 결과와 일치하여 면역조직화학은 다우노루비신 처리군에서 GLI1 수준의 강력한 억제를 보인 반면 p53은 증가했다(도 8의 E). TUNNEL 분석은 종양 조직에서 다우노루비신에 의해 유발된 세포사멸을 나타냈다(도 8의 F). 종합하면, 다우노루비신은 부분적으로 GLI1 하향 조절을 통해 CRC 이종 이식 쥐에서 항암 효과를 나타냈다.

[0108] 실시예 7. 다우노루비신 및 시판 항암제와의 병용효과 확인

[0109] 대장암치료를 사용되는 대표적인 항암제인 옥살리플라틴 또는 이리노테칸과 다우노루비신과의 병용 처리 시 병용효과가 있는지를 확인하고자 하였다. 옥살리플라틴의 경우 다우노루비신과 병용 처리 시 시너지적인 효과가 없었고, 이리노테칸의 경우 시너지적인 효과를 확인하였다(도 9의 A). 이리노테칸 $10\mu\text{M}$, 다우노루비신 $0.5\mu\text{M}$ 병용 처리 시 combination index가 0.27381로 가장 시너지적인 효과가 있어 이 농도에서 절단된 PARP의 발현

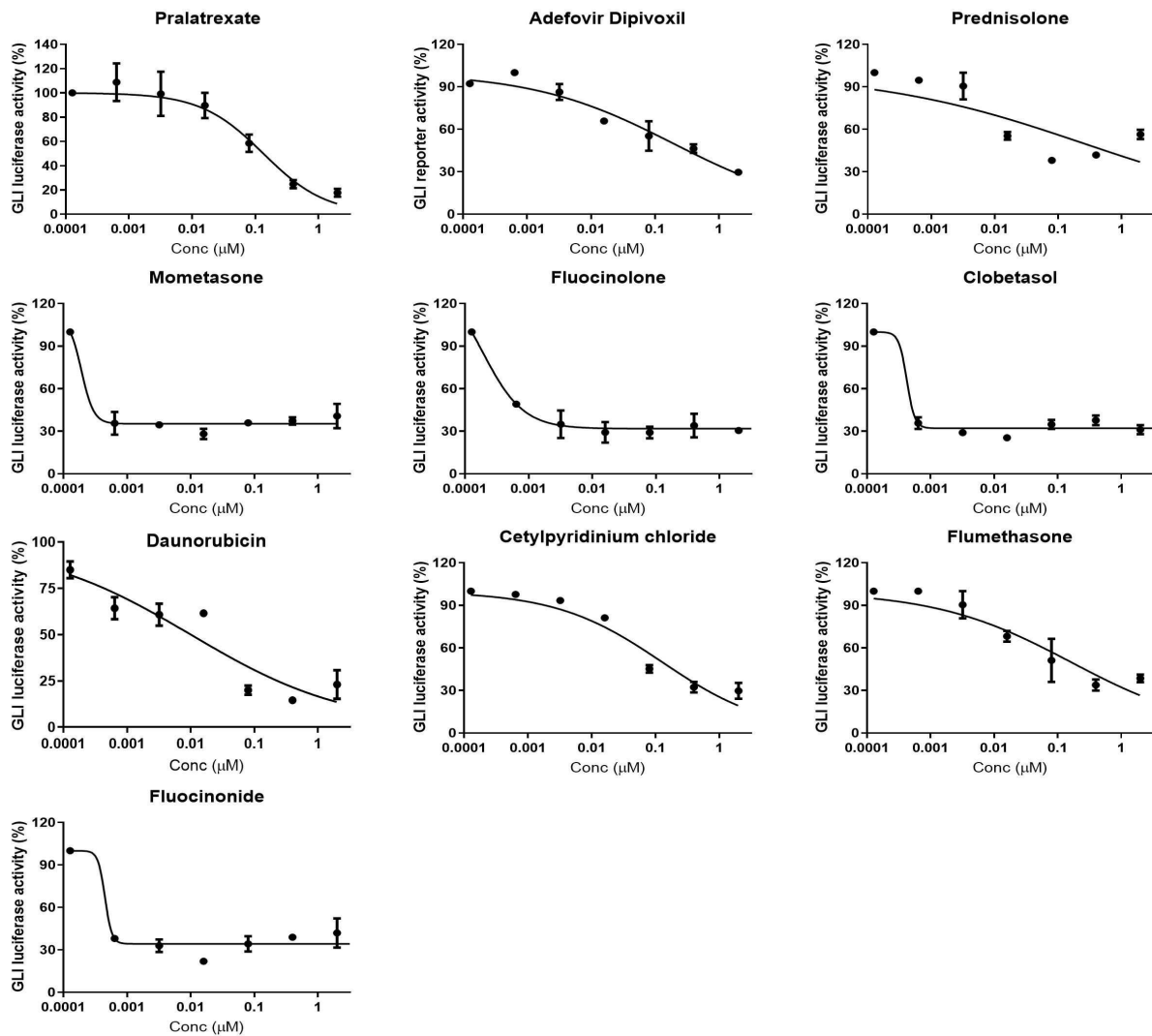
변화를 확인하였다. 확인결과 단독 처리보다 병용 처리 시 절단된 PARP의 발현이 확연히 증가된 것을 확인할 수 있었다(도 9의 B).

[0111] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 시스템, 구조, 장치, 회로 등의 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

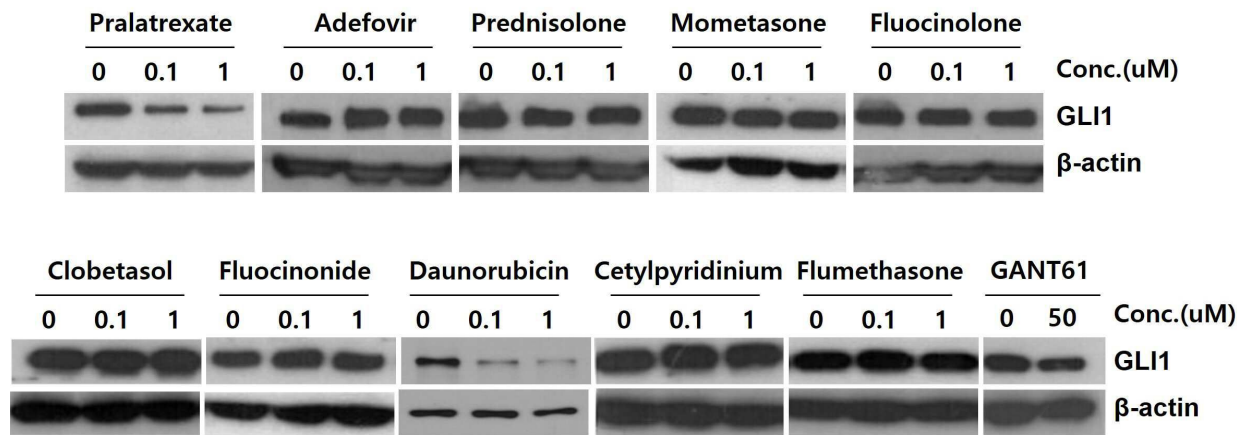
[0112] 그러므로, 다른 구현들, 다른 제조예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

도면1

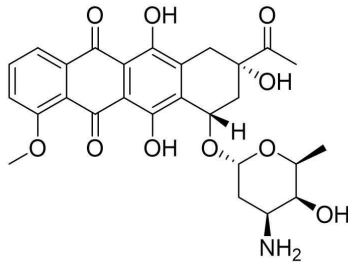


도면2

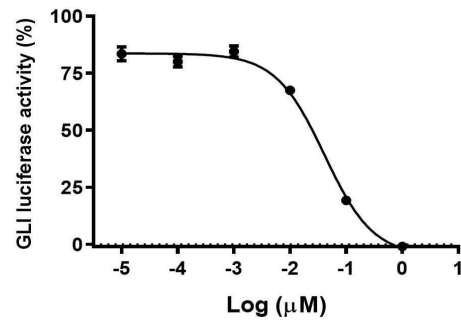


도면3

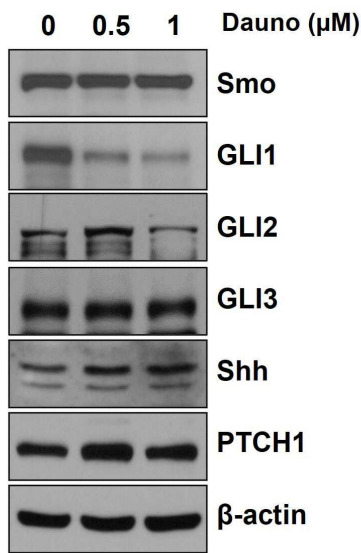
A



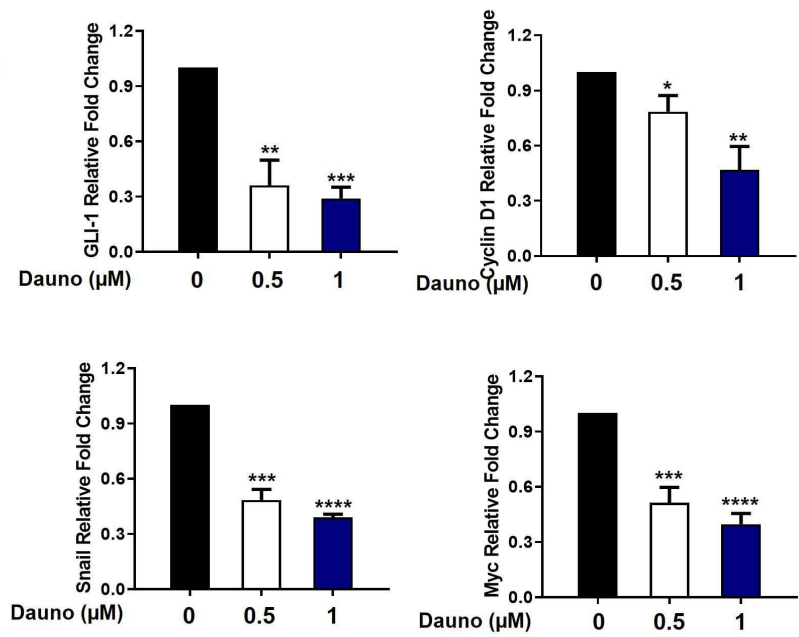
B



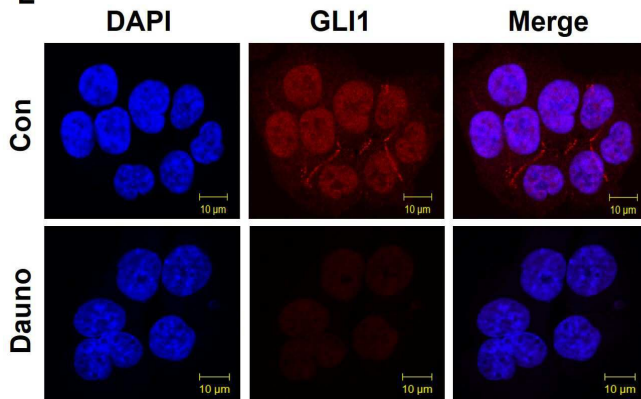
C



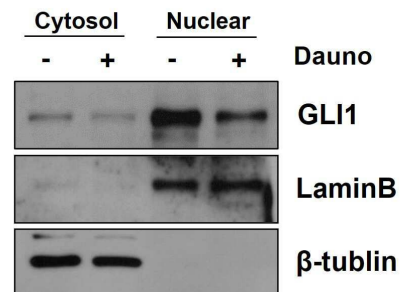
D



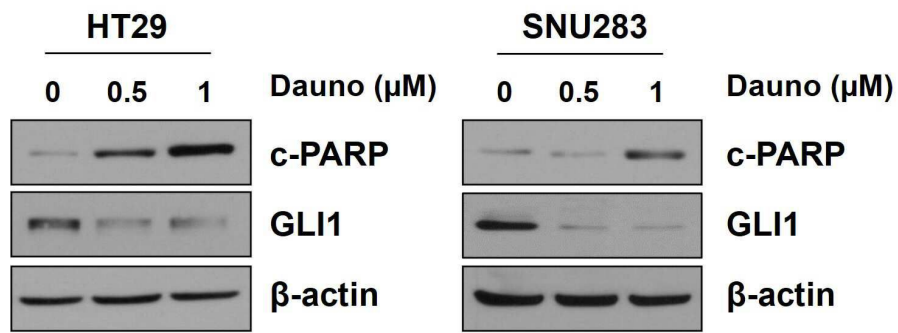
E



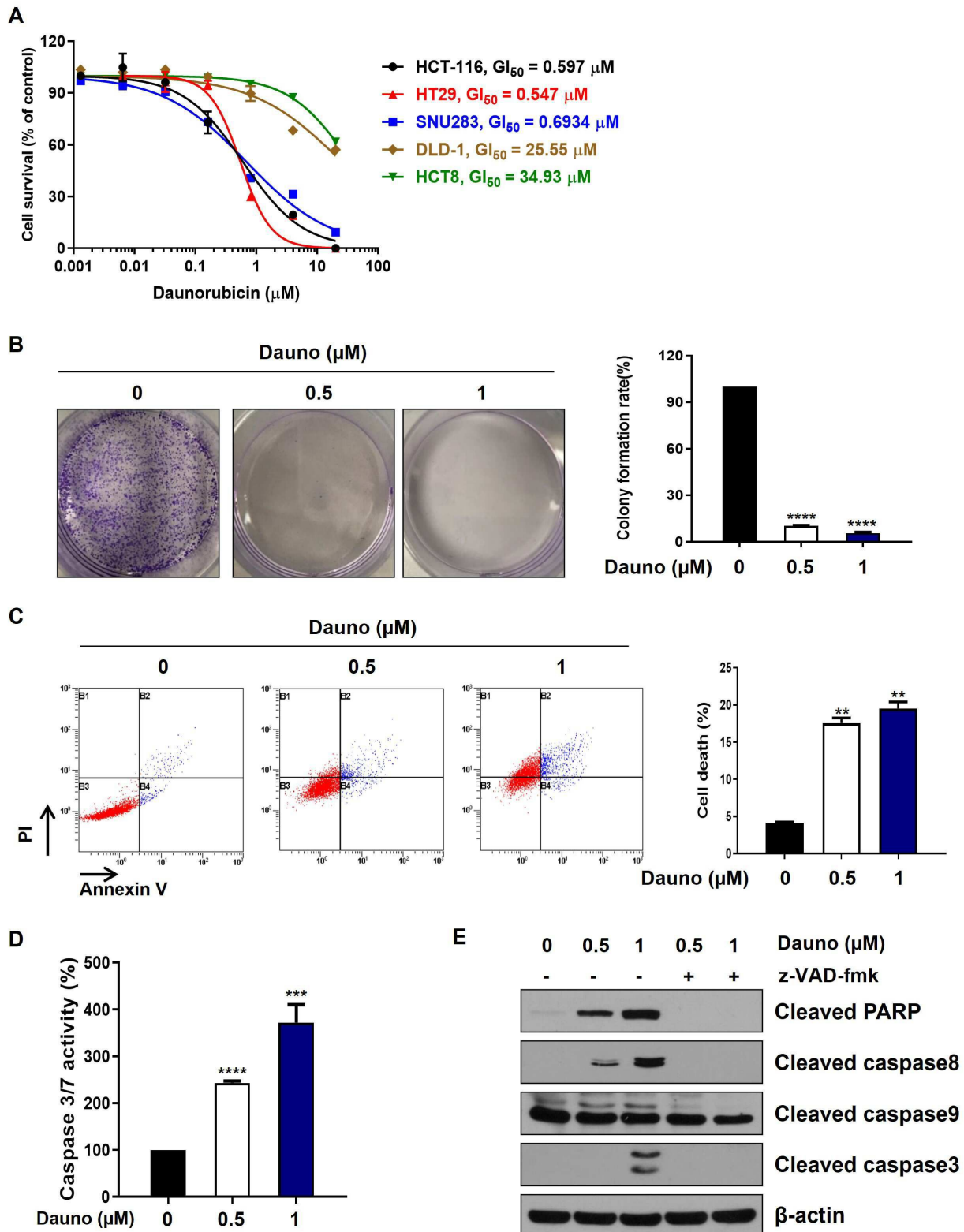
F



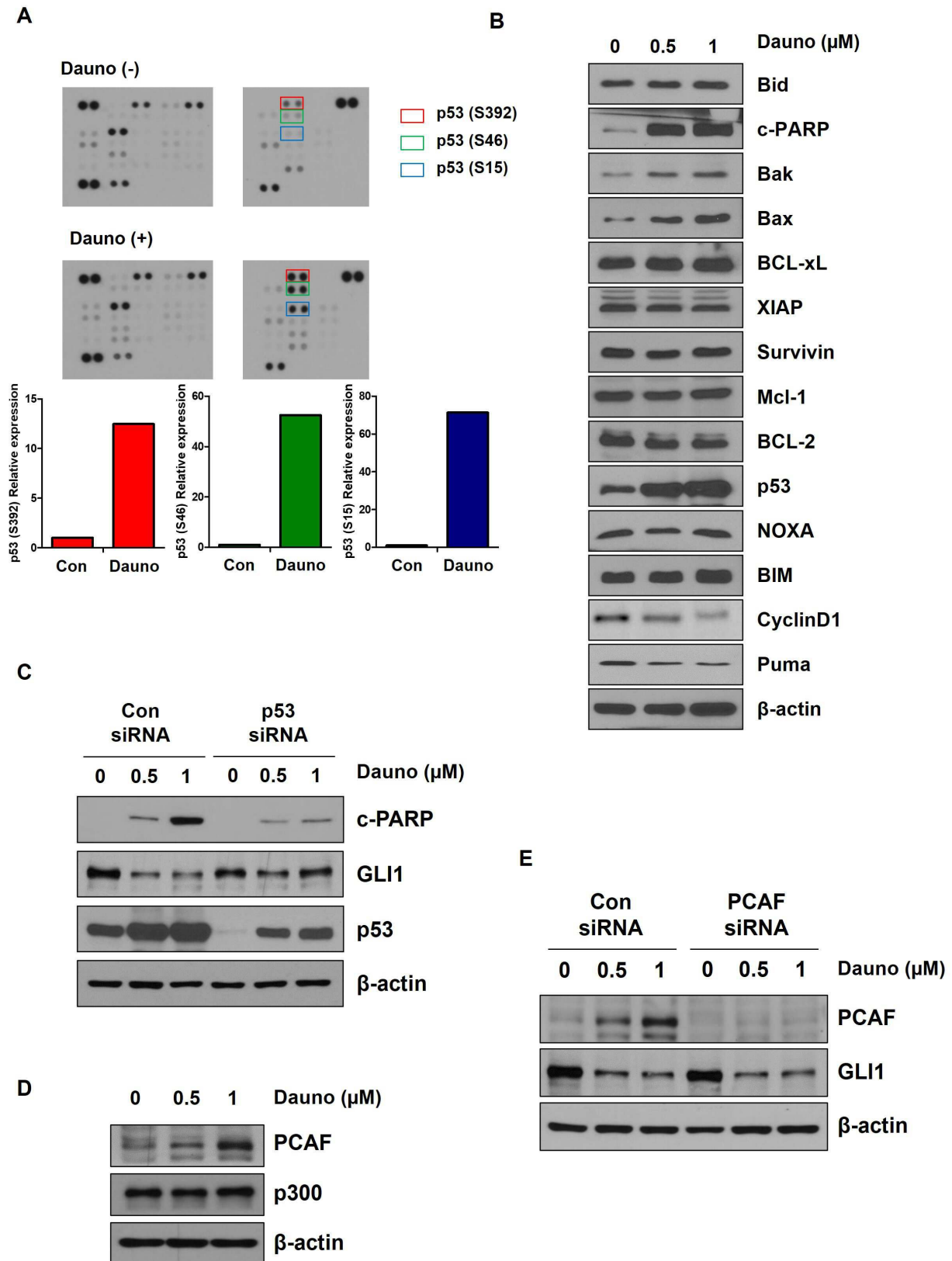
도면4



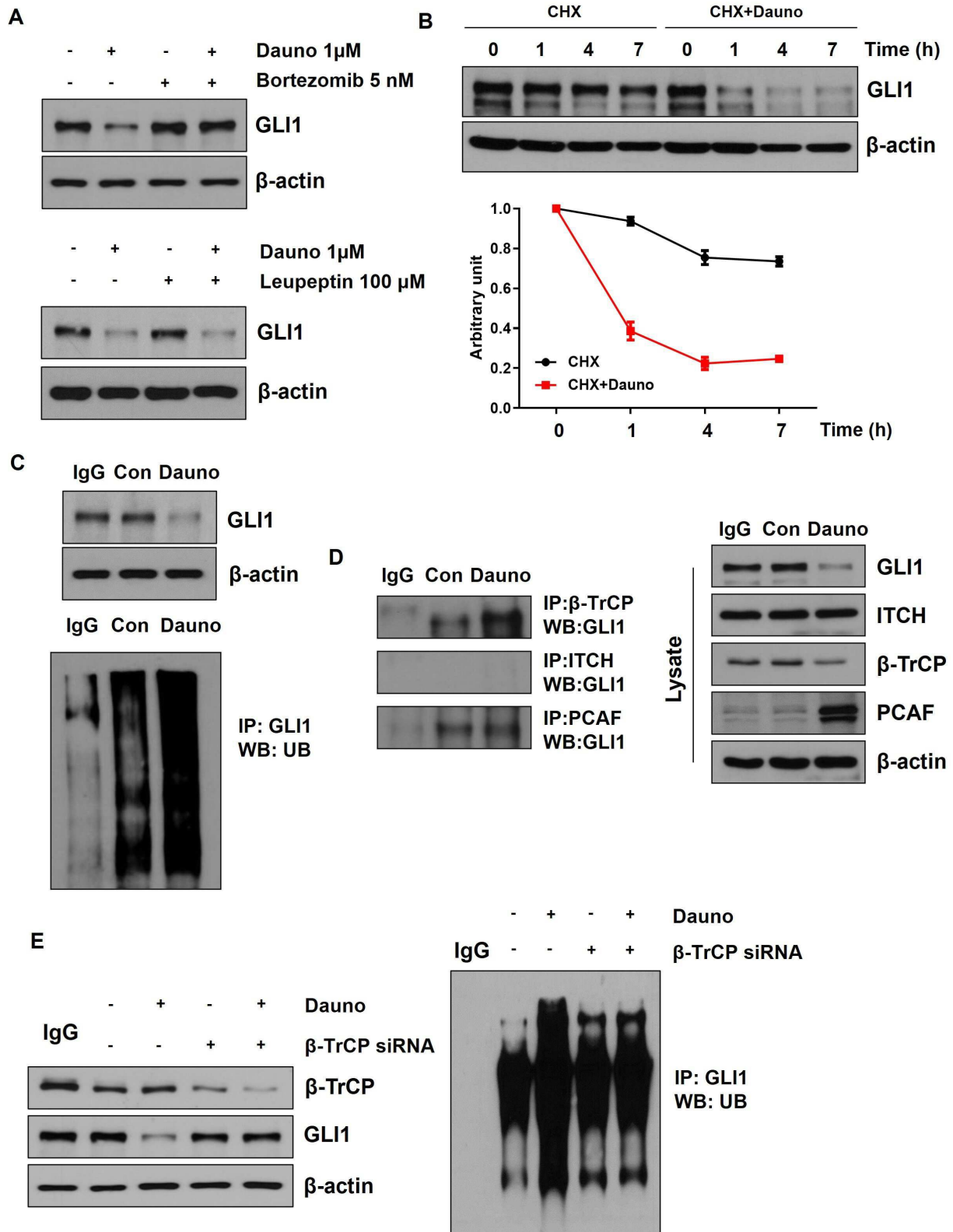
도면5



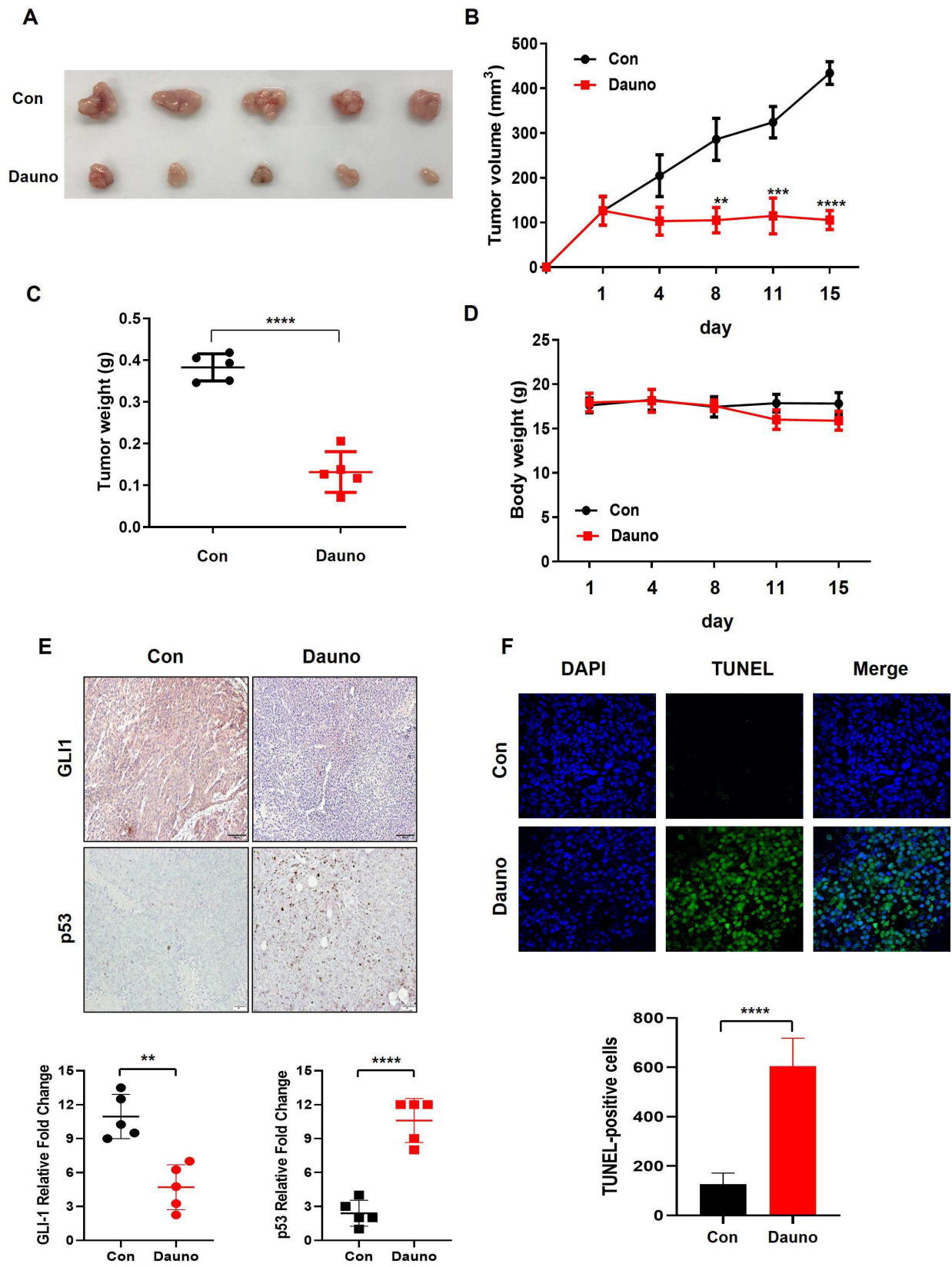
도면6



도면7

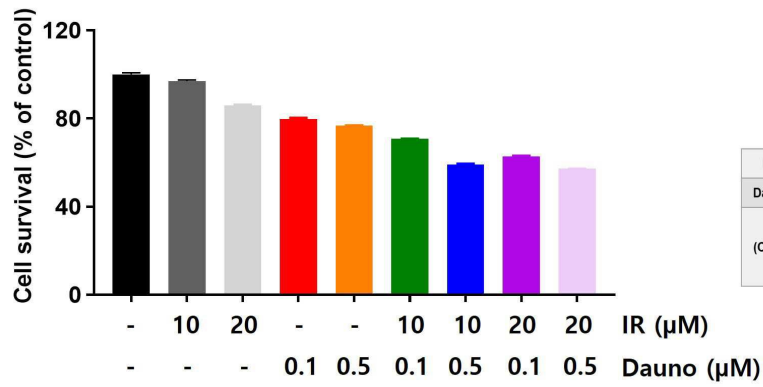
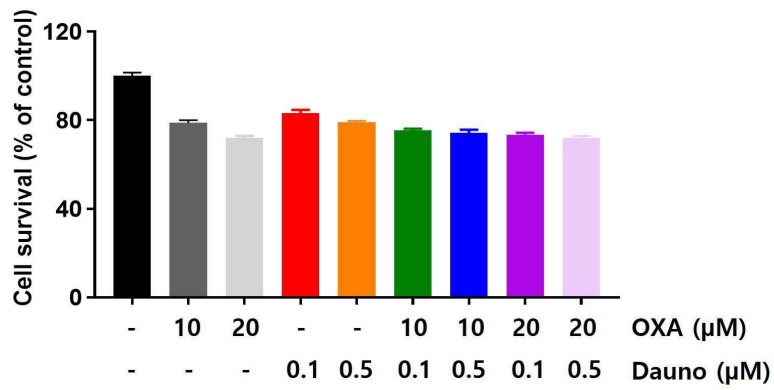


도면8



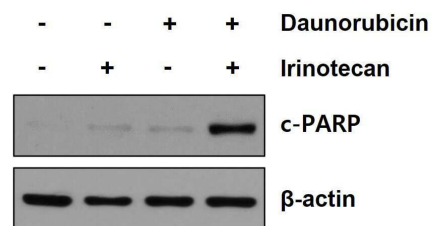
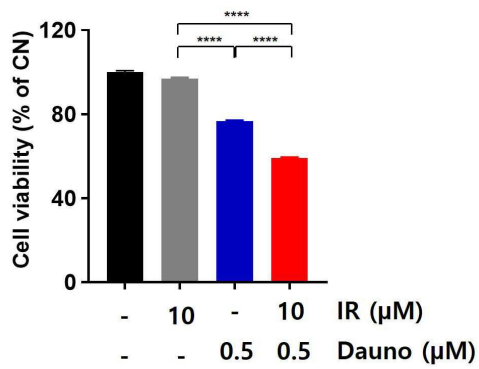
도면9

A



Irinotecan	10	10	20	20
Daunorubicin	0.1	0.5	0.1	0.5
CI (Combination Index)	8.894	0.27381 Strong Synergism	0.58317 Synergism	0.5298 Synergism

B



도면10

