(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019 년 1 월 3 일 (03.01.2019)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2019/004732 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 31/498 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2018/007316

(22) 국제출원일: 2018 년 6 월 27 일 (27.06.2018)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2017-0081491 2017 년 6 월 27 일 (27.06.2017) KR
10-2018-0074375 2018 년 6 월 27 일 (27.06.2018) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 **(EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION)** [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52, Seoul (KR).

(72) 발명자: 강상원 **(KANG, Sang Won)**; 06517 서울시 서초구 잠원로 166-17, 2동 1003호, Seoul (KR).

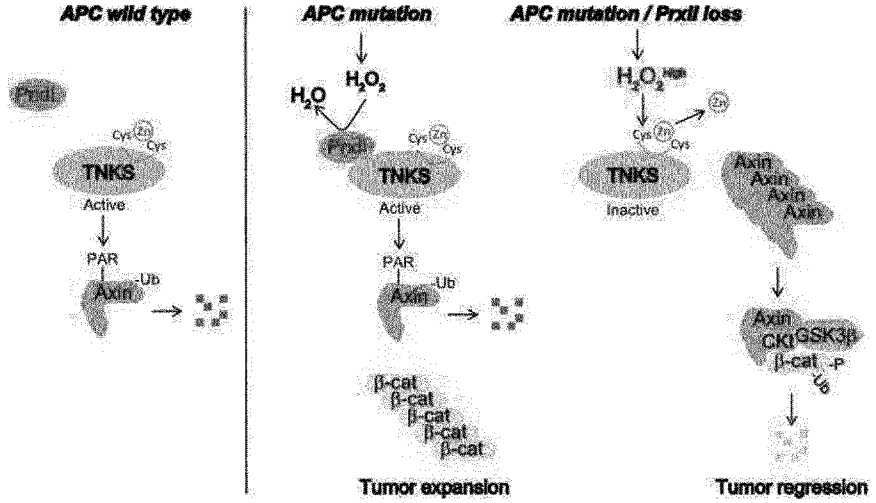
(74) 대리인: 김태선 **(KIM, Tae Sun)**; 06748 서울시 서초구 강남대로 148 4층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING SUBSTANCE INHIBITING ENZYMATIC ACTIVITY OF PEROXIREDOXIN 2 AS EFFECTIVE INGREDIENT FOR TREATMENT OF COLORECTAL CANCER

(54) 발명의 명칭: 퍼록시레독신 2 의 효소 활성을 억제하는 물질을 유효 성분으로 포함하는 대장암 치료용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising a substance inhibitory of the enzymatic activity of peroxiredoxin 2 as an effective ingredient for treatment of colorectal cancer and, more particularly, to a pharmaceutical composition for treatment of colorectal cancer wherein, on the basis of the mechanism in which peroxiredoxin 2 (Prx II) interacts with tankyrase (TNKS) in APC mutant cells to play a tumor-promoting role in colorectal cancer, the composition exhibits the effect of reducing colorectal tumors by inhibiting the activity of peroxiredoxin 2 to increase the active β-catenin destruction.

(57) 요약서: 본 발명은 퍼록시레독신 2 의 효소 활성을 억제하는 물질을 유효 성분으로 함유하는 대장암 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 APC 돌연변이 세포에서 퍼록시레독신 2(Prx II) 가 탄키라제(Tankyrase, TNKS)와 상호작용하여 대장암 종양을 촉진하는 메커니즘에 기초하여, 퍼록시레독신 2 의 활성을 억제함으로서 활성 베타카테닌 분해를 증가시켜 대장 용종을 감소시키는 효과를 나타내는 대장암 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

WO 2019/004732 A1

[다음 쪽 계속]

MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

명세서

발명의 명칭: 퍼록시레독신 2 의 효소 활성을 억제하는 물질을 유효 성분으로 포함하는 대장암 치료용 약학적 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 퍼록시레독신 2 의 효소 활성을 억제하는 물질을 유효 성분으로 포함하는 대장암 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 암은 가장 다루기 힘든 질병들 중의 하나이며, 환자들의 완치를 위해 끊임없이 연구되고 있다. 또한, 병원에서는 암을 치료하기 위해 약물 치료, 방사선치료, 유전자치료 등등의 기술들이 이용되고 있다.

[4] 대장암(Colorectal cancer, CRC)은 전세계적으로 흔한 암이다. 우리나라에서는 남자의 경우 위암, 폐암, 간암에 이어, 여자의 경우는 유방암, 위암에 이어 흔히 발생하는 암이다. 근래에 식생활이 서구화되면서 그 발생 빈도가 더욱 가파르게 증가하였다. 최근 10년 사이 대장암에 의한 사망률은 약 80%정도 증가하였고, 계속 증가하는 추세이다.

[5] 대장암(Colorectal cancer, CRC) 환자의 약 40-50%는 재발 및 전이가 발생한다. 대장암을 비롯한 악성 종양 환자의 주된 사망 원인은 악성 종양 자체가 아니라 악성 종양의 전이 때문이다. 대부분의 전이는 다발성, 전신성으로 발생한다.

[6] 대량 염기 서열 분석 자료에 따르면 대장암 환자(CRC)의 80 % 이상이 선종성 용종증 종양 억제 유전자(Adenomatous polyposis coli, APC)의 돌연변이를 가지고 있다. APC(Adenomatous polyposis coli) 단백질은 베타카테닌 (β- catenin) 파괴 복합체의 중요한 골격 단백질이다. 이 때문에, APC 유전자 돌연변이 세포 내에서는 활성 베타카테닌(β- catenin)이 Wnt-독립적으로(Wnt-independent) 축적됨으로써 장의 종양 형성을 개시한다고 알려져 있다.

[7] 최근 연구에 의하면, APC 유전자 돌연변이에 의해 시작된 장 종양 형성은 핵산의 염기가 산화적 DNA 손상 되었을 때 수선에 중요한 역할을 하는 DNA 글리코실화효소(DNA Glycosylase)의 돌연변이의 획득 또는 유전에 의해 촉진된다고 알려져 있다. 이는 활성 산소종 (reactive oxygen species, ROS) 수준의 상승이 APC 돌연변이 유발성 장내 종양 형성에 관여한다는 것을 보여준다.

[8] 퍼록시레독신(Peroxiredoxin, Prx)은 생체 내에서 과산화수소 및 알킬 하이드로퍼록사이드의 제거 효소 (peroxidase)로 알려져 있다. (Chae, H. Z. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 91: 7017-7021, 1994). 퍼록시레독신(Peroxiredoxin, Prx)은 포유류에서는 타입 I~VI Prx 동종효소(isozymes)로 구분되며 조직의 다양한 부분에서 관찰된다(Rhee, SG et al., IUBMB Life 52:35~41, 2001).

[9] 퍼록시레독신(Peroxiredoxin, Prx)은 세포 내에서 강한 항산화 활성을

나타낸다고 알려져 있다. Prx 타입 VI를 제외한 대부분의 퍼록시레독신 동종효소들은 전자 공여자(electron donor)로서 티오레독신(thioredoxin)을 이용한다. 그래서 티오레독신(thioredoxin) 퍼록시다제(Peroxidase)로서 알려져 있다.

[10] Prx family는 2-Cys와 1-Cys(Cysteine) 소그룹(subfamily)로 나누어진 6개의 동종효소(isozymes)로 구성된다. 2-Cys 소그룹(subfamily) 효소는 박테리아부터 사람까지 광범위하게 보존되는 티오레독신(thioredoxin)-의존성 과산화효소이다. 2-Cys Prx 중에서, 세포질 PrxI 및 PrxII 동종효소(isozymes)는 다양한 암 유형에서 과발현되고 막 수용체 - 매개 신호 전달에서 중요한 조절 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[11] 포유류의 2-Cys Prx 효소는 티오레독신(thioredoxin)-티오레독신 리덕테이즈(thioredoxin reductase)로 구성된 전자-수송 시스템(electron-conveying system)으로부터 전자를 제공받아, NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) 존재 하에서 H_2O_2(과산화수소)를 물로의 환원시킨다.

[12] H_2O_2는 단백질 키나아제 또는 단백질 티로신 포스파타아제(Protein Tyrosine Phosphatases)를 포함한 신호 전달 단백질의 가역적 산화를 조절한다. 때문에, H_2O_2는 증식하는 암세포에서 잠재적인 2차 메신저로 기능한다. PrxII는 국소적으로 H_2O_2를 조절한다고 알려져 있다. 따라서 2-Cys Prx 효소인 PrxII는 세포내 ROS 해독 및 신호 전달에서 다각적인 역할을 한다고 생각되고 있다.

[13] 탄키라제(Tankyrase, TNKS)는 폴리(ADP-라이보스)폴리머레이즈 (Poly(ADP-ribose) polymerase)의 한 종류이다. 대장암 세포에서 탄키라제(Tankyrase, TNKS)의 활성은 베타카테닌(β-catenin) 분해를 억제하여 비정상적인 세포 증식을 유발한다. 그래서 탄키라제 억제는 대장암(Colorectal cancer, CRC) 치료를 위한 표적으로 각광받고 있으나, 탄키라제(TNKS)의 직접적인 억제는 광범위한 기질로 인해 다면발현(pleiotropic) 효과 또는 부작용을 유발할 수 있다는 우려가 있다. 또한 대장암 종양 형성에서 탄키라제(Tankyrase, TNKS) 활성을 조절하는 메커니즘은 자세히 알려져 있지 않다.

[14] Axis 억제 단백질 1 (Axis Inhibitor Protein, Axin1) 종양 억제 인자는 베타카테닌(β-catenin) 파괴 복합체를 구성하는 또 다른 골격 단백질이다. APC 돌연변이 세포에서 탄키라제에 의한 Axin1 단백질의 조절 기작은 정확히 밝혀져 있지 않다. 또한 생체 내 산화 환원 시스템의 조절을 통해 탄키라제의 활성을 조절하는 대장암(Colorectal cancer, CRC)의 치료는 지금까지 시도되지 않았다.

[15]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[16] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 APC 돌연변이 세포에서 산화 환원 시스템 및 신호 전달에서 다각적 역할을 하는 퍼록시레독신 2(Peroxiredoxin 2, Prx II)가 탄키라제(Tankyrase, TNKS) 활성을 조절하는 메커니즘을 밝히고, 이로부터 이와 같은 메커니즘에 의해 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제에 의해 대장암을 억제할 수 있는 새로운 대장암 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[17]

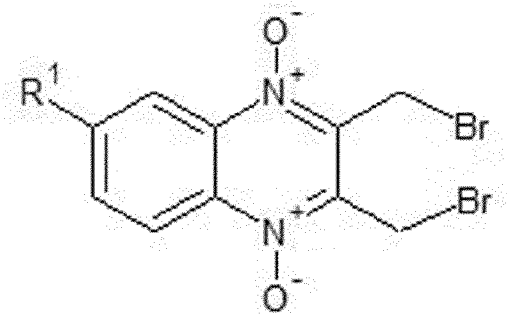
과제 해결 수단

[18] 상기 과제를 해결하기 위해서, 본 발명의 일 실시예는 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하는 물질을 유효 성분으로 포함하는 대장암 치료용 약학적 조성물을 포함한다.

[19] 본 발명에 의한 대장암 치료용 약학적 조성물에 있어서, 상기 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하는 물질은 하기 화학식 1로 표시된다.

[20] [화학식 1]

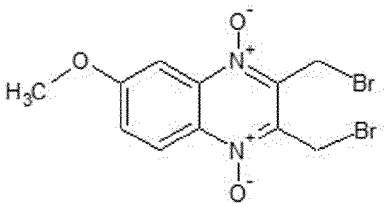
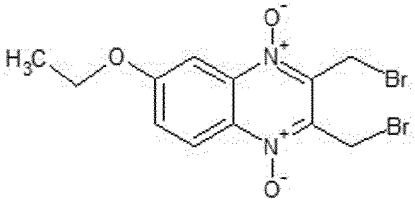
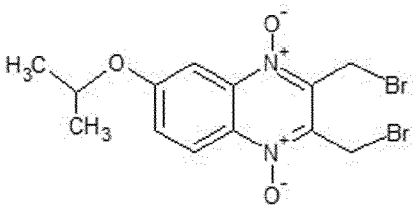
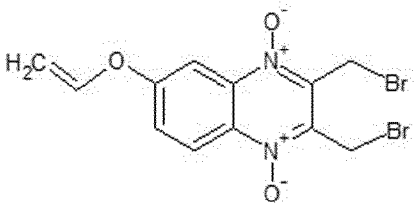
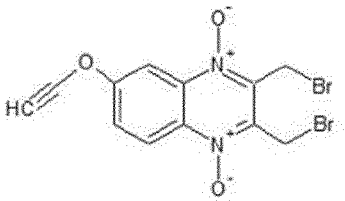
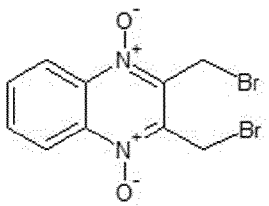
[21]



[22] (상기 화학식 1에서 R1은 -O-R2 또는 사이클릭화합물 또는 -H로 이루어진 화합물이고, R2는 C1 내지 C8 의 분지 또는 분지가 아닌 알킬기(Alkyl), 또는 치환 또는 비치환 벤질기(benzyl), -CH=CH2 또는 알릴기(Allyl)로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것임)

[23] 본 발명에 의한 대장암 치료용 약학적 조성물에 있어서, 상기 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하는 물질은 아래 화합물-1 내지 화합물-6으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 화합물을 포함할 수 있다.

[24]

화합물-1	
화합물-2	
화합물-3	
화합물-4	
화합물-5	
화합물-6	

[25] 본 발명에 의한 대장암 치료용 약학적 조성물에 있어서, 상기 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하는 물질은 베타카테닌(β-catenin) 분해를 증가시키는 것을 특징으로 한다.

[26] 본 발명에 의한 대장암 치료용 약학적 조성물에 있어서, 상기 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하는 물질은 탄키라제(Tankyrase, TNKS)에 의한 Axin1의 분해를 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[27] 본 발명에 의한 대장암 치료용 약학적 조성물에 있어서, 상기 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하는 물질은 탄키라제(Tankyrase, TNKS)의 산화적 불활성화를 증가시키는 것을 특징으로 한다.

[28] 본 발명에 의한 대장암 치료용 약학적 조성물에 있어서, 상기 탄키라제의 산화적 불활성화는 APC 돌연변이 세포의 세포질에서 일어나는 것을 특징으로 한다.

[29] 본 발명에 의한 대장암 치료용 약학적 조성물에 있어서, 상기 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하는 물질은 퍼록시레독신 2와 탄키라제와의 상호작용을 저해시키는 것을 특징으로 한다.

[30] 본 발명에 의한 대장암 치료용 약학적 조성물은 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하는 물질을 약학적 유효량 함유하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 용어 "약학적 유효량"은 상기 퍼록시레독신 2 단백질 활성 억제하는 물질의 효능 또는 활성을 달성하는데 충분한 양을 의미한다.

[31] 상기 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀루로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[32] 상기 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[33] 상기 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[34] 본 발명의 일 실시형태의 특성, 형태 및 이점은 이하의 설명에 기재되고, 일부는 그 설명으로부터 명확하게 되거나 이러한 예시의 실시형태의 실시에 의해 습득될 수 있다.

[35] 그 외의 특성, 형태 및 이점은 이하의 설명 및 청구범위로부터 통상기술자에게 충분히 명백하게 되거나 이하 기재된 실시형태를 실시함으로서 습득될 수 있다.

[36]

발명의 효과

[37] 본 발명의 일 실시형태에 따르면 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하여 대장암 세포의 산화 환원 시스템을 조절하여 대장 용종을 감소시키고 대장암 치료 또는 예방이 가능한 조성물이 제공될 수 있다. 본 발명의 일 실시형태에 따르면 APC 돌연변이 세포의 세포질에서 PrxII와 탄키라제의 상호작용을 감소시킴으로서 대장 용종을 감소시키고 대장암의 치료 또는 예방이 가능한 약학적 조성물이 제공될 수 있다. 본 발명의 일 실시형태에 따르면 세포 내 산화 환원 시스템 조절에 의한 탄키라제 활성 억제하는 대장암 치료방법이 제공될 수 있다.

[38]

도면의 간단한 설명

[39] 도 1 및 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 이중 돌연변이 마우스의 유전자형을 확인한 결과이다.

[40] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 소장의 비용종(non-polyp) 분절 및 용종에서 면역 형광 염색으로 퍼록시레독신 2 단백질 발현을 측정한 결과이다.

[41] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 이중 돌연변이 마우스의 장 조직의 현미경 사진이다.

[42] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 이중 돌연변이 마우스의 장 조직에서의 용종의 숫자를 측정한 결과이다.

[43] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 이중 돌연변이 마우스의 소장 및 결장 단면을 헤마톡실린(hematoxylin) 및 에오신(eosin)으로 염색한 결과이다.

[44] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 이중 돌연변이 마우스의 장 조직의 현미경 사진이다.

[45] 도 8는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 이중 돌연변이 마우스의 장 조직에서의 용종의 숫자를 측정한 결과이다.

[46] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 이중 돌연변이 마우스의 장 조직 추출액을 사용한 면역블로팅 수행 결과이다.

[47] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 이중 돌연변이 마우스의 용종 조직에서의 Axin1, 베타카테닌(β-catenin) 및 베타카테닌(β-catenin) 표적 유전자의 발현을 측정한 결과이다.

[48] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 이중 돌연변이 마우스의 용종 조직에서의 Ki-67 대한 면역조직 화학적(Immunohistochemistry)이미지 측정한 결과이다.

[49] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 이중 돌연변이 마우스의 용종 조직에서의 안티 브로모유리딘 (anti-BrdU) 항체로 형광 염색한 뒤 증식하는 세포 수를 측정한 결과이다.

[50] 도 13은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 이중 돌연변이 마우스의 용종 조직에서의 안티 브로모유리딘(anti-BrdU) 항체로 면역 염색 측정한 결과이다.

[51] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 제조된 이중 돌연변이 마우스의 용종 조직에서의 세포사멸을 터널(TUNEL) 염색으로 측정한 결과이다.

[52] 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따라 세포를 PrxI 및 PrxII에 대해 특이적인 siRNA 세트로 48 시간 동안 감염시키고 베타카테닌(β-catenin)에 대해 면역블로팅(IB) 측정한 결과이다.

[53] 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따라 세포를 다른 농도의 PrxII-1 siRNA로 48 시간 동안 감염시키고 베타카테닌(β-catenin)에 대해 면역블로팅(IB) 측정한 결과이다.

[54] 도 17은 본 발명의 일 실시예에 따라 다양한 APC 돌연변이 대장암 세포주들에서 PrxII-1 siRNA로 48 시간 동안 감염시키고 베타카테닌(β-catenin) 및 활성 베타카테인 (active β-catenin)에 대해 면역블로팅(IB) 측정한 결과이다.

[55] 도 18 및 도 19는 본 발명의 일 실시예에 따라 APC 돌연변이 대장암 세포주에서 PrxII-1 siRNA로 48 시간 동안 감염시킨 후 다시 PrxII의 활성형태 (WT)와 불활성형태 (CS 또는 C172S)를 발현하는 레트로바이러스로 감염시킨 세포에서 베타카테닌(β-catenin) 및 활성 베타카테인 (active β-catenin)에 대해 면역블로팅(IB) 측정한 결과이다.

[56] 도 20은 본 발명의 일 실시예에 따른 APC 돌연변이 대장암 세포에서의 PrxII 의존성 세포 H_2O_2 수준을 측정한 결과이다.

[57] 도 21 내지 도 23은 본 발명의 일 실시예에 따른 대조군과 PrxII-결핍된 SW480 와 HT29 대장암 세포주들에서 프로테아좀(proteasome)과 GSK3β(glycogen synthase kinase-3β) 억제제 (25μM MG132 및 lactacystin 와 2.5μM BIO 및 SB216763)로 1시간 동안 처리하고 베타카테닌(β-catenin) 및 활성 베타카테인 (active β-catenin) 발현 정도를 측정하여 베타카테인 파괴 복합체 (Destruction complex)가 관여함을 보여 주는 결과이다.

[58] 도 24 은 본 발명의 일 실시예에 따른 APC 돌연변이 대장암세포에서 PrxII 결핍이 GSK3β 의 활성화에 영향이 없음을 보여 주는 결과이다.

[59] 도 25은 본 발명의 일 실시예에 따른 HEK293 세포주에서 PrxII 결핍은 정상적인 Wnt3A 신호자극에는 영향이 없음을 보여주는 결과이다.

[60] 도 26은 본 발명의 일 실시예에 따른 베타카테닌(β-catenin) / TCF 전사 활성을 측정한 결과이다.

[61] 도 27 내지 도 32은 본 발명의 일 실시예에 따른 PrxII 결핍에 의해 HT29 및 SW480 세포에서 다르게 발현된 유전자의 분석 결과이다

[62] 도 33은 본 발명의 일 실시예에 따른 HT29 및 SW480 세포를 대조군 또는 PrxII-1 siRNA로 형질 감염시키고 활성 베타카테닌(β- catenin) 및 Axin1에 대해 면역블로팅 수행한 결과이다.

[63] 도 34은 본 발명의 일 실시예에 따른 SW480 세포를 대조군 또는 PrxII-1 siRNA로 형질 감염시키고 Axin-1을 면역 침전 (IP)으로 분리한 복합체 결합 단백질들 전부에 대하여 면역블로팅 수행한 결과로 PrxII 결핍이 복합체를 크게

증대함을 보여 주는 결과이다.

[64] 도 35은 본 발명의 일 실시예에 따른 HT29 세포를 대조군 또는 Axin-1/Axin-2 siRNA들로 형질 감염시키고 활성 베타카테닌(β- catenin) 및 Axin1에 대해 면역블로팅 수행한 결과이다.

[65] 도 36은 본 발명의 일 실시예에 따른 HT29 및 SW480 세포를 대조군 또는 PrxII-1 siRNA로 형질 감염시키고 Axin-1을 면역 침전 한 뒤 유비퀴틴화 및 poly-ADP-risose 화에 대하여 면역블로팅 수행한 결과이다.

[66] 도 37 은 본 발명의 일 실시예에 따른 APC 야생형 대장암세포주인 RKO 와 APC 돌연변이 세포주인 HT29 및 SW480 세포를 대조군 또는 PrxII-1 siRNA로 형질 감염시키고 콜로니 형선 에세이를 수행한 결과이다.

[67] 도 38 은 본 발명의 일 실시예에 따른 APC 돌연변이 세포주인 HT29 및 SW480 세포를 대조군 또는 PrxII-1 siRNA로 형질 감염시키고 이어 활성화된 베타카테인 (S37A)를 발현 시킨 뒤 콜로니 형선 에세이를 수행한 결과이다.

[68] 도 39 및 도 40은 본 발명의 일 실시예에 따른 HT29 및 RKO 세포를 대조군 또는 PrxII-1 siRNA로 형질 감염시키거나 또는 H_2O_2 로 처리한 후 TNKS1을 면역 침전 (IP)한 뒤 ADP-risose 중합효소 (PARP) 활성을 측정한 결과이다.

[69] 도 41 은 본 발명의 일 실시예에 따른 다양한 APC 야생형 및 돌연변이 대장암 세포주에서 대조군 또는 PrxII-1 siRNA로 형질 감염시키고 TNKS1와 이 효소의 기질인 Axin1 및 TRF1의 발현을 면역블로팅으로 측정한 결과이다.

[70] 도 42 은 본 발명의 일 실시예에 따른 다양한 APC 야생형 및 돌연변이 대장암세포주에서 TNKS1 억제제 (XAV939)를 1시간동안 전처리한 후 TNKS1와 이 효소의 기질인 Axin1 및 TRF1의 발현을 면역블로팅으로 측정한 결과이다.

[71] 도 43 은 본 발명의 일 실시예에 따른 다양한 APC 돌연변이 대장암 세포주에서 TNKS1 억제제 (XAV939)를 1시간동안 전처리한 후 세포 증식 정도를 측정한 결과이다.

[72] 도 44는 본 발명의 일 실시예에 따른 RKO 대장암세포주에서 APC 유전자 발현을 siRNA를 사용하여 결핍한 후 세포 내 H_2O_2수준을 측정한 결과이다.

[73] 도 45는 본 발명의 일 실시예에 따른 베타카테인, Axin1, 및 TNKS1 의 수준을 면역블로팅으로 측정한 결과이다.

[74] 도 46는 본 발명의 일 실시예에 따른 TNKS1의 ADP-ribose 중합효소 활성을 측정한 결과이다.

[75] 도 47은 본 발명의 일 실시예에 따른 세포에 다양한 TNKS1 시스테인 단독 돌연변이 효소를 발현하고 anti-TNKS 항체로 면역 침전 후 TNKS1의 ADP-ribose 중합효소 활성을 측정한 결과이다.

[76] 도 48는 본 발명의 일 실시예에 따른 TNKS1의 PARP 도메인에 대하여 재조합 단백질을 대장균 세포에서 발현 및 정제한 결과이다.

[77] 도 49는 본 발명의 일 실시예에 따른 정제된 재조합 TNKS1-PARD 단백질에서 H_2O_2 처리에 의한 Zinc 이온의 발출을 측정한 결과이다.

[78] 도 50는 본 발명의 일 실시예에 따른 세포를 anti-TNKS 항체로 면역 침전 반응 후 표시된 단백질에 대해 면역 블로팅한 결과이다.

[79] 도 51은 본 발명의 일 실시예에 따른 TNKS와 PrxII 단백질 사이의 결합을 검출하기 위한 동시 면역 침전 (co-IP) 결과이다.

[80] 도 52 및 도 53은 본 발명의 일 실시예에 따른 인시츄 근접 결합분석(in situ proximity ligation assays) 결과이다.

[81] 도 54 및 도 55는 본 발명의 일 실시예에 따라 각각 TNKS 및 Myc-PrxII의 절단 돌연변이 또는 단일 잔기 돌연변이를 사용하여 서로의 상호결합을 분석한 결과이다.

[82] 도 56 및 도 57은 본 발명의 일 실시예에 따른 PrxII의 야생형과 G116V 돌연변이의 세포 내 발현 및 퍼옥시다제의 활성을 측정한 결과이다.

[83] 도 58은 본 발명의 일 실시예에 따른 PrxII의 야생형과 G116V 돌연변이를 발현하는 세포에서 TNKS1의 PARP 활성 분석을 수행한 결과이다.

[84] 도 59은 본 발명의 일 실시예에 따른 PrxII의 야생형과 G116V 돌연변이를 발현하는 세포에서 콜로니 형성 에세이를 수행한 결과이다.

[85] 도 60 및 도 61은 본 발명의 일 실시예에 따른 건강한 개인 및 TCGA(암 유전체 지도, The Cancer Genome Atlas) 코드 데이터베이스에서 가져온 대장 암 환자(CRC, n = 155)의 PrxI 및 PrxII 유전자의 발현 수준을 비교한 결과이다.

[86] 도 62은 본 발명의 일 실시예에 따른 건강한 사람과 대장암 환자의 대장 조직 배열에서 PrxII 면역 염색(immunostaining) 결과이다.

[87] 도 63 은 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물-6(코노이딘 A)의 PRXI 과 PrxII에 대한 활성 억제반응 결과이다.

[88] 도 64 은 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물-6(코노이딘 A)를 전처리한 대장암 세포주에서 콜로니 형성 에세이를 수행한 결과이다.

[89] 도 65 내지 도 66은 본 발명의 일 실시예에 따른 화합물-6(코노이딘 A)을 처리한 대장암 세포주 HT29를 쥐에 이식 (xenograft)한 뒤 종양의 성장을 In vivo luminescence imaging 과 무게를 측정한 결과이다.

[90] 도 67은 본 발명의 일 실시예에 따른 PrxII 효소 활성 저해에 의한 대장암 억제 효과를 나타내는 모식도이다.

[91] 도 68은 본 발명의 일 실시예에 따른 APC WT와 APC 돌연변이를 가진 대장암 환자에서 PrxII 유전자의 발현 수준을 측정한 결과이다.

[92] 도 69는 본 발명의 일 실시예에 따른 PrxII를 화합물-1과 In vitro 상에서 반응시키고 측정한 퍼록시다아제 활성 결과이다.

[93] 도 70은 본 발명의 일 실시예에 따른 PrxII를 화합물-2와 In vitro 상에서 반응시키고 측정한 퍼록시다아제 활성 결과이다.

[94] 도 71은 본 발명의 일 실시예에 따른 PrxII를 화합물-3과 In vitro 상에서 반응시키고 측정한 퍼록시다아제 활성 결과이다.

[95] 도 72는 본 발명의 일 실시예에 따른 PrxII를 화합물-4와 In vitro 상에서

반응시키고 측정한 퍼록시다아제 활성 결과이다.

[96] 도 73은 본 발명의 일 실시예에 따른 PrxII를 화합물-5와 In vitro 상에서 반응시키고 측정한 퍼록시다아제 활성 결과이다.

[97] 도 74와 도 75는 본 발명의 일 실시예에 따른 코노이딘 A와 화합물-1 내지 화합물-5의 RKO 세포 콜로니 배양 실험 결과에 대한 것이다.

[98] 도 76와 도 77는 본 발명의 일 실시예에 따른 코노이딘 A와 화합물-1 내지 화합물-5의 HT29 세포 콜로니 배양 실험 결과에 대한 것이다.

[99]

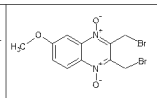
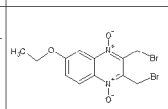
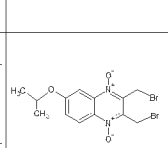
발명의 실시를 위한 형태

[100] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 후술하는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이하의 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

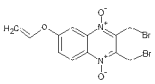
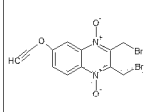
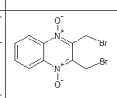
[101] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 포함한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[102] 본 출원 명세서 사용되는 용어 화합물-1 내지 화합물-6은 하기 표1의 물질을 말한다.

[103]

화합물-1	2,3-비스(브로모메틸)-6-메톡시퀴녹살린 1,4-다이옥사이드 (2,3-b.s(bromomethyl)-6-methoxy-quinoxaline 1,4 dioxide)	
화합물-2	2,3-비스(브로모메틸)-6-에톡시퀴녹살린 1,4-다이옥사이드(2,3-bis(bromomethyl)-6-ethoxy-quinoxaline 1,4-dioxide)	
화합물-3	2,3-비스(브로모메틸)-6-이소프로폭시퀴녹살린 1,4-다이옥사이드(2,3-bis(bromomethyl)-6-isopropoxy-quinoxaline 1,4-dioxide)	

[104]

화합물-4	6-(알릴옥시)-2,3-비스(브로모메틸) 퀴녹살린 1,4-다이옥사이드 (6-(allyloxy)-2,3-bis(bromomethyl)quinoxaline 1,4-dioxide)	
화합물 5	2,3 비스(브로모메틸) 6 (프로프 2-인일옥시)퀴녹살린 1,4-다이옥사이드(2,3-bis(Bromomethyl)-6-(prop-2-ynyloxy)quinoxaline 1,4-dioxide)	
화합물-6	코노이딘 A 또는 (2,3-비스(브로모메틸)퀴녹살린 1,4-다이옥사이드(2,3-bis(bromomethyl)Quinoxaline 1,4-dioxide)	

[105] *<실시예 1> 세포 배양*

[106] 모든 CRC 및 HEK293 세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA,

USA)로부터 제공되었다. SW480, DLD1, CoLo205, Colo741 및 SW620 세포는 10 % 소 태아 혈청(fetal bovine serum)이 보충 된 RPMI 1840 배지에서 계대배양 하였다.

[107] HEK293 및 RKO 세포를 10 % FBS 을 첨가한 Dulbecco 's Modified Eagle 's Medium에서 배양하였다. HT29 세포는 10 % FBS 를 첨가한 McCoy 's 5A 배지에서 배양 하였다. Mycoplasma 오염은 mycoplasma detection kit (Biotool, USA)를 사용하여 세포 배양 상등액(supernatants)에서 주기적으로 시험하였다.

[108]

[109] ***<실시예 2> 이중 돌연변이 마우스(double-mutant mice) 제조***

[110] 생체 내에서 PrxII 의 CRC-특이적 기능을 검사하기 위해, PrxI+/-와 PrxII+/- 마우스를 APCMin / + 마우스와 교배시킴으로써 이중 돌연변이 마우스(double-mutant mice)를 만들었다.

[111] C57BL/6 background (Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA)에 따라 PrxI+/- 및 PrxII+/- C57BL / 6 마우스를 APC Min/+ 마우스와 교배하여 무균 시설에서 사육하고 유지하여 APCMin/+;PrxI+/+, APCMin/+;PrxI+/-, APCMin/+;PrxI-/-, APCMin/+;PrxII+/+, APCMin/+; PrxII+/- 및 APCMin/+;PrxII -/- 의 유전자형을 나타내는 복합 돌연변이체를 만들었다.

[112] 리터메이트(littermates)들은 특정 프라이머(primer)들과 쥐의 꼬리 DNA의 게놈 PCR에 의해 유전자형이 확인 되었다(genotyped). 리터메이트는 한 배에서 태어난 새끼들을 말한다. :

[113] 모든 마우스 실험은 이화 여자 대학교의 Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)의 승인을 받아 ARRIVE 가이드 라인을 준수하였다. 동물 실험은 동물 육종과 조직 분석을 분리하여 이중 맹검법(double-blinded)으로 실시되었다.

[114] 종양 이종 이식 모델의 경우, 쥐를 이소플루란 가스(isoflurane gas) (N2O : O2 / 70 % : 30 %)를 흡입하여 마취시킨 후 PBS 200μl에 현탁된 HT29-luc2 세포(2.5x10 5 cells)를 피하 주사하였다. 화합물 1 내지 6 (DMSO 중 286μM)의 복강 내 투여는 세포 주입 6일 후에 시작되었고 매 3일마다 반복되었다.

[115] 생물 발광 이미징(bioluminescent imaging)은 IVIS Lumina Series III (Perkin Elmer)로 수행되었다. 각 영상 촬영 세션에 대해 제조사의 프로토콜에 따라 PBS (체중 kg 당 Luciferin 150mg)에 있는 루시페린(luciferin)을 복강 내로 투여 하였다. 통합 마취 매니 폴드(integral anesthetic manifold) 장비에 최대 4마리의 동물을 유지시키고, 루시페린(Luciferin)주입 10분 후에 영상화 하였다. IVIS 이미징 시스템은 쥐의 사진 이미지와 양적 생물 발광 신호(quantitative bioluminescent signal)를 수집 한 다음 서로 겹치게 한다.

[116]

[117] ***<실시예 3> 이중 돌연변이 마우스(double-mutant mice) 유전자형 결정***

[118] 게놈 PCR에 의해 4주에 상기 실시예에서 제조된 이중 돌연변이가 유도된

마우스의 유전자형을 결정하고, 도 1 및 도 2에서 상기 실시예에 의해 제조된 이중 돌연변이 마우스에 대한 유전자형을 결정한 결과를 나타내었다.

[119] 도 1 내지 도 3에서 상기 실시예에 의해 제조된 이중 돌연변이 마우스는 APC(adenomatous polyposis coli) 절단 돌연변이에 의해 다발성 장종양(multiple intestinal neoplasia, Min)을 발생시키는 것을 확인할 수 있다. 도 1 및 도 2에서 절단된 APC 유전자에 대한 산물은 별표로 표시하였다.

[120] APC 돌연변이가 이형접합체(heterozygous) 임에도 불구하고, 장 선종성 용종증은 잔류(residual) APC 야생형(wild type, WT) 의 소실에 의해 유발되는 것으로 알려져 있으며, 그 결과로 생긴 선종성 용종증은 인간 대장 암 종양과 유사한 절단된 APC 단백질(truncated APC wild type(WT) copy)을 포함하고 있다고 알려져 있다.

[121] 유전자형을 결정하기 위해 사용된 프라이머는 아래와 같다.

[122] APC ^{Min}

[123] (wild type) 5'-GCCATCCCTTCACGTTAG-3',

[124] (mutant) 5'-TTCTGAGAAAGACAGAAGTTA-3'

[125] (common) 5'-TTCCACTTTGGCATAAGGC - 3'

[126] PrxI

[127] forward 5'-CTGGAAACCTGGCAGTGATA-3 ',

[128] reverse, 5'-CTGTGACTGATAGAAGATTGGT-3'),

[129] PrxII

[130] forward ,5'-GATGATCTCCGTGGGGCAAACAAA-3',

[131] reverse, 5'-ATGGCCTCCGGCAACGCGCAAATC-3',

[132] Neo cassette

[133] forward, 5'-GCTTGGGTGGAGAGGCTATTCG-3',

[134] reverse, 5'-GTAAAGCACGAGGAAGCGGTCAGC-3'.

[135]

[136] ***<실시예 4> 이중 돌연변이 마우스(double-mutant mice) 선종성 용종 관찰***

[137] 주된 마우스에서 작은 창자와 결장을 절제하고, 장의 선종성 용종을 분리하여 입체 현미경을 사용하여 관찰하고 도 4에 나타내었다

[138] 마우스의 소장 및 결장에서 직경이 0.3 mm를 초과하는 용종의 수를 측정하고 도 5에 나타내었다. 도 5에서 보는 바와 같이 APC $^{Min/+}$;PrxII $^{-/-}$ 마우스의 소장 및 결장에서 평균적으로 보이는 직경 0.3 mm 초과 용종의 수는 APC $^{Min/+}$;PrxII $^{+/+}$ 및 APC $^{Min/+}$;PrxII $^{+/-}$ 마우스의 용종의 수와 비교하여 약 50 % 감소하였다.

[139] APC $^{Min/+}$;PrxII $^{-/-}$ 생쥐(평균 생존 = 241 일)는 APC $^{Min/+}$;PrxII $^{+/+}$ (평균 생존 = 146 일) 및 APC $^{Min/+}$;PrxII $^{+/-}$(평균 생존 = 152 일) 보다 훨씬 더 오래 생존했다.

[140] 마우스의 소장과 대장의 조직 검사를 수행하고 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6 에서 보는 바와 같이 PrxII 결손은 융모 구조를 변화시키지 않았으나 선종성 폴립의 빈도와 크기를 감소시켰다.

[141] PrxI 결손 마우스에 대한 장의 선종성 용종을 입체 현미경을 사용하여 관찰하고 그 갯수를 세어 도 7 및 도 8에 나타내었다. APC $^{Min/+}$;PrxI $^{-/-}$의 평균 장내 용종의 수는 APC $^{Min/+}$;PrxI $^{+/+}$ 및 APC $^{Min/+}$;PrxI $^{+/-}$ 의 용종의 숫자와 같았다.

[142] 이와 같은 결과로부터 PrxII가 생체 내에서 APC 돌연변이에 의해 유도되는 장의 종양 형성을 촉진하는데 비해, PrxI은 APC 돌연변이에 의해 유도되는 장의 종양과 무관하다는 것을 알 수 있었다.

[143] **<실시예 5> 베타카테닌(β-catenin) 발현 측정**

[144] APC $^{Min/+}$;PrxII $^{+/+}$ 및 APC $^{Min/+}$;PrxII $^{-/-}$ 에서 분리된 용종에서 베타카테닌(β-catenin)과 그 유전자 발현양을 immunoblotting 으로 측정하고 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[145] 도 9 에서 보는 바와 같이 APC $^{Min/+}$;PrxII $^{-/-}$ 종양에서의 베타카테닌(β-catenin)과 그 전사 target 인 c-Myc와 Cyclin D1의 발현 수준은 APC $^{Min/+}$;PrxII $^{+/+}$의 종양에서의 발현 수준에 비해 현저히 감소했다. 그러나, 베타카테닌(β-catenin) 파괴 복합체(destruction complex)에서 중요한 스캐폴드 단백질인 Axin1의 발현 수준은 종양과 반비례로 APC $^{Min/+}$;PrxII $^{-/-}$ 마우스에서 발현이 증가하는 양상을 나타내었다.

[146] 도 10 에서 보는 바와 같이 APC $^{Min/+}$;PrxII $^{+/+}$ 및 APC $^{Min/+}$;PrxII $^{-/-}$ 의 사이에서 베타카테닌(β-catenin)과 Axin1의 mRNA 발현양은 변하지 않았기 때문에, PrxII가 생체 내에서 Axin1과 베타카테닌(β-catenin) 의 발현을 단백질 수준에서 조절하고 있다는 것을 알 수 있다.

[147]

[148] **<실시예 6> 베타카테닌(β-catenin) 표적 유전자가 CRC 세포의 증식과 생존에 관여하는지 여부 측정**

[149] 베타카테닌(β-catenin) 표적 유전자가 CRC 세포의 증식과 생존에 관여하는지 여부를 측정하기 위해 증식하는 세포와 죽은 세포를 세었다.

[150] 도 11 및 도 12의 Ki-67 발현 및 BrdU 혼합 검정(BrdU incorporation assays)에서 보는 바와 같이 APC $^{Min/+}$;PrxII $^{+/+}$ 및 APC $^{Min/+}$;PrxII $^{-/-}$ 의 용종에서는 증식하는 세포의 비율이 유사했다.

[151] 또한, 도 13에서 BrdU 혼합 검정(BrdU incorporation assays)은 PrxII 결손이 음낭의 장상피 세포의 증식과 이동에 전혀 영향을 미치지 않음을 보여 주었다.

[152] 이와는 반대로 도 14에서 APC $^{Min/+}$;PrxII $^{-/-}$ 의 용종에서 TUNEL 염색으로 측정한 죽은 세포의 수는 APC $^{Min/+}$;PrxII $^{+/+}$ 의 용종에서 TUNEL 염색으로 측정한 죽은 세포의 수보다 현저하게 높았다. 이와 같은 결과로부터 PrxII가 APC 돌연변이에 의해 유도된 장 선종성 용종에서 종양 세포의 생존을 촉진한다는 것을 알수 있다.

[153]

[154] **<실시예 7> PrxII에 의한 베타카테닌(β- catenin) 발현 조절 메커니즘 분석**

[155] PrxII를 과다 발현하는 인간 CRC 세포에서 PrxII에 의한 베타카테닌(β-catenin)

발현 조절 메커니즘을 분석했다.

[156] 도 15에서 보는 바와 같이 APC-돌연변이 CRC 세포인 SW480과 HT29 세포 모두에서 siRNA 분석시 PrxII 발현 감소는 내인성 베타카테닌(β-catenin)의 발현양을 현저하게 감소시켰으며, 절단된 돌연변이 형태의 APC 단백질이 발현되었다. 그러나, SW480과 HT29 세포 모두에서 PrxI 결핍은 베타카테닌(β-catenin) 발현을 변화시키지 않았다.

[157] 또한, 도 16에서 보는 바와 같이 베타카테닌(β-catenin) 발현 감소는 PrxII 결핍의 정도에 비례하며, 이로부터 PrxII 를 엄격하게 knockdown 시키는 것이 베타카테닌(β-catenin) 수준을 감소시키는 데 중요하다는 것을 알 수 있다.

[158] 도 17에서 보는 바와 같이 PrxII 결핍은 또한 다른 APC-돌연변이 CRC 세포인 SW620, DLD-1 및 CoLo205 에서 총 베타카테닌(β-catenin) 및 활성 베타카테닌(active β-catenin) (비인산화된 형태)의 발현양을 감소시켰다.

[159] PrxII siRNA의 부정확한 영향(off-target effects)을 배제하기 위해, PrxII의 siRNA 내성 형태로 HT29 세포를 형질 감염시킴으로써 PrxII를 발현하였다.

[160] 도 18 및 도 19에서 보는 바와 같이 PrxII 야생형(wild type, WT)은 siRNA가 형질 감염된 대조 세포와 비교해 총 베타카테닌(β-catenin) 및 활성 베타카테닌(active β-catenin) 수준을 완벽하게 회복하여 이로부터 베타카테닌(β-catenin) 발현을 조절하는 PrxII의 특정 역할을 확인할 수 있다.

[161] 반대로, 퍼옥시다제-불활성화 돌연변이(peroxidase-inactive mutants) C172S 및 C51/172S 에서의 PrxII의 발현은 베타카테닌(β-catenin) 발현 수준을 회복시키지 못하여, PrxII의 퍼옥시다아제 활성이 CRC 세포에서 활성 베타카테닌(active β-catenin) 수준을 유지하는데 필요하다는 것을 알 수 있다. 도 20에서 PrxII 결손은 HT29 및 SW480 세포에서 세포 내 H_2O_2양을 증가시켰다.

[162] PrxII 결핍이 베타카테닌(β-catenin) mRNA 수준을 변화시키지 않았음을 확인했기 때문에 카제인 키나아제-1(casein kinase-1)과 GSK -3β(glycogen synthase kinase -3β)에 의한 베타카테닌(β-catenin)의 순차적인 인산화를 나타내는 파괴 복합체(canonical destruction complex)에 의한 베타카테닌(β-catenin) 단백질의 분해를 측정하였다.

[163] 인산화된 베타카테닌(β-catenin)은 β-TrCP(Beta-transducin repeats-containing proteins) 또는 E3 유비퀴틴 리가아제(ubiquitin E3 ligase)라고도 불리우는 효소에 의해 유비퀴톤화 되어 포로테아좀(proteasome)에 의해 분해된다고 알려져 있으므로, 베타카테닌(β-catenin) 파괴 복합체(canonical destruction complex)가 베타카테닌(β-catenin) 발현의 PrxII-의존성 조절에 관여하는 것인지를 실험하였다.

[164] 도 21 내지 도 23에서 GSK3β(glycogen synthase kinase -3β) 억제제는 활성 베타카테닌(active β-catenin) 발현을 증가 시켰으며, 이것은 구성적 활성화된(constitutively-active) GSK3β(glycogen synthase kinase -3β)가 관여함을 의미한다.

[165] 그러나, 도 24에서 보는 바와 같이 kinase 활성화의 지표가 되는, GSK3β(glycogen synthase kinase -3β)의 티로신 인산화 수준으로부터 PrxII 결손이 GSK3β(glycogen synthase kinase -3β) 활성화를 자극할 가능성이 없다는 것을 알 수 있다.

[166] 또한, 도 25에서 PrxII 결핍이 Wnt 유발(Wnt-induced) 베타카테닌(β-catenin) 안정화에 영향을 미치지 않음을 관찰하였으며, 탈조절된 베타카테닌 시그널링(deregulated β-catenin signaling)에 PrxII가 선택적으로 참여한다는 것을 확인했다.

[167] 도 26에서 감소된 베타카테닌(β-catenin) 발현의 결과로서, PrxII 결손은 TCF-의존성 리포터 발현(TCF-dependent reporter expression)의 현저한 감소를 유도하였다.

[168] ***<실시예 8> PrxII 결핍에 의한 베타카테닌(β-catenin) / TCF 의존성 전사 조절***

[169] mRNA 서열 분석에 의해 HT29 세포에서 베타카테닌(β-catenin) / TCF 의존성 전사를 mRNA 시퀀싱으로 조사하고 그 결과를 도 27, 도 28, 도 29 및 도 30에 나타내었다.

[170] 도 31에서 보는 바와 같이 특히, PrxII 결손에 의해 CCND1, AXIN2 및 BIRC5와 같은 주요 베타카테닌(β-catenin) 표적 유전자가 포함된 CRC 세포에서 발현되는 베타카테닌(β-catenin) 표적 유전자 중 12 개의 유전자가 하향조절(down regulated)되었다 (FDR <0.05).

[171] S100A4, MMP7, ID2 및 PTTG1과 같은 다른 전이 및 세포주기 촉진 유전자도 PrxII 결손에 의해 하향 조절되었다.

[172] HT29 세포 외에도, PrxII 결핍은 SW480 세포에서 13 개의 베타카테닌(β-catenin) 표적 유전자를 하향 조절하였으며(FDR <0.05), 도 32에서 그 중 4 개의 유전자 (CCND1, S100A4, ID2, EDN1)가 겹쳐 있음을 알 수 있다.

[173] SW480 세포에서 몇 가지 다른 유전자의 하향 조절은 베타카테닌(β-catenin) 관련 전사 복합체 또는 베타카테닌(β-catenin) 감소의 2차 효과에 의해 매개 될 수 있다는 것을 의미한다.

[174] 이와 같은 결과로부터 PrxII 결손이 CRC 세포의 파괴 복합체를 통해 전사 활성 베타 카테닌(active β-catenin) 의 분해를 촉진한다는 것을 알수 있다.

[175]

[176] ***<실시예 9> CRC 세포에서 PrxII 결핍에 의한 베타카테닌(β- catenin) 의 Wnt-독립적(Wnt-independent) 및 Axin1 의존적(Axin1-dependent) 파괴 분석***

[177] APC 돌연변이에서 다른 스캐폴드 단백질인 Axin1은 베타카테닌(β-catenin) 파괴에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. APC-돌연변이 CRC 세포에서의 Axin1 과발현은 베타카테닌(β-catenin) 분해를 충분히 유도한다고 알려져 있다.

[178] 앞서 도 9에서 PrxII 유전자가 제거된 쥐의 장 용종에서 Axin1 발현이 증가된다는 것을 확인한 바 있다.

[179] CRC 세포에서 Axin1 및 Axin1과 관련된 파괴 복합체의 양을 측정하였다. 도

33에서 면역 블롯 분석 결과, PrxII 결핍은 HT29 및 SW480 CRC 세포 모두에서 내인성 Axin1 단백질 발현을 증가시켰으며, 이는 활성 베타카테닌 (active β-catenin)발현과 역 상관 관계가 있음을 나타낸다.

[180] 도 34의 공동 면역 침전 실험(co-immunoprecipitation experiment)에서 PrxII 결손이 Axin1 관련 파괴 복합체의 발현을 증가 시켰음을 확인할 수 있다. GSK3β(glycogen synthase kinase -3β) 억제제인 BIO가 처리되었을 때, 인산화 베타카테닌(phospho-β-catenin)은 복합체에서 사라졌다.

[181] 또한, 도 35에서 Axin1/2의 녹다운(knockdown)은 PrxII 결손 세포의 활성 베타카테닌(active β-catenin) 수치를 대조군 세포 수준으로 회복시켰다.

[182] 이러한 결과는 PrxII가 결손된 CRC 세포에서 Axin이 기능적 파괴 복합체를 형성하여 베타카테닌(β-catenin) 분해를 조절한다는 것을 의미한다.

[183]

[184] Axin은 폴리(ADP-라이보스)폴리머레이즈 (poly(ADP-ribose)polymerization, PARsylation) 및 후속 유비퀴틴(ubiquitination)에 의해 분해되기 때문에, HT29 및 SW480 세포에서 Axin1의 상태를 분석 하였다.

[185] 실제로, 프로테아솜 억제제인 MG132의 처리는 대조군 세포에서 폴리 ADP 라이보실화(PARsylated) 및 유비퀴틴화된 Axin1의 축적을 유도하고, 이로부터 Axin1이 계속 분해된다는 것을 알 수 있다.

[186] 반대로, 도 36에서 보는 바와 같이 PrxII 결손은 세포 내 총 유비퀴틴화(ubiquitination)에 영향을 주지 않으면서 Axin1의 폴리ADP-라이보실화/유비퀴틴화(PARsylation / ubiquitination)을 억제하였다.

[187] **<실시예 10> PrxII 결핍 CRC 세포의 콜로니 형성 능력 측정**

[188] Axin1 / 베타카테닌(β-catenin) 경로의 PrxII 의존성 조절 기작의 생물학적 중요성을 평가하기 위하여 CRC 세포에서 콜로니 형성 능력을 조사하였다.

[189] 시험관 내 콜로니 형성 능력 분석 결과 도 37에서 APC WT를 발현하는 RKO 세포가 아닌, HT29 및 SW480 세포에서 PrxII 결손이 콜로니 형성을 충분히 억제함을 알 수 있다.

[190] 도 38에서 활성 베타카테닌(active β-catenin) S37A 돌연변이체의 발현은 PrxII 결손에 의해 손상된 APC 돌연변이체 CRC 세포의 콜로니 형성 능력을 거의 완전히 복구함을 확인할 수 있다.

[191] 이로부터 PrxII 결손은 Axin1에 의한 베타카테닌(β-catenin) 분해를 유도함으로써 APC 돌연변이의 발암적 표현형을 충분히 역전시킬 수 있음을 알 수 있다.

[192]

[193] **<실시예 11> PrxII 결핍에 의한 TNKS-Axin1 신호체계조절 분석**

[194] TNKS는 Axin 단백질을 위한 유일한 폴리 ADP 라이보실화 효소이다. PrxII가 TNKS 활성에 필수적인지 여부를 in vitro PARP 분석을 수행하여 확인하였다.

[195] 도 39에서 보는 바와 같이 PrxII 결손은 APC- 돌연변이 HT29 및 SW480

세포에서 TNKS 활성의 심각한 손상을 유도하였지만, APC- 기능이 살아 있는 RKO 세포에서는 그렇지 않았다. 도 40에서 보는 바와 같이 이와는 대조적으로, H_2O_2 처리는 SW480 및 RKO 세포 모두에서 TNKS 활성을 억제하였다.

[196] 이상의 결과로부터 APC 돌연변이에 상관없이 외인성 H_2O_2가 TNKS 활성을 직접 불활성화함을 알 수 있다.

[197] TNKS는 자가 폴리ADP라이보실화(auto PARsylation) 및 분해되는 것으로 알려져 있으므로, CRC 세포 패널에서 기질 단백질과 함께 TNKS 발현양을 측정했다.

[198] 도 41에서 보는 바와 같이, 실험을 실시한 모든 APC- 돌연변이 CRC 세포에서 PrxII 결손은 TNKS 및 Axin1 발현양을 증가시켰지만, RKO 및 Colo741 세포를 포함한 APC- 기능을 유지하는 세포에서는 발현양이 증가하지 않았다.

[199] 더 중요한 것은, PrxII 결손은 핵에서 텔로머라제 조절에 필수적인 다른 TNKS 기질인 TRF1(텔로머릭 반복결합인자 1, telomeric repeat-binding factor 1) 발현 수준에 영향을 미치지 않았다는 것이다.

[200] 도 42 및 도 43에서, 대조적으로, 특정 억제제인 XAV939를 사용하는 TNKS의 직접 저해는 모든 CRC 세포에서 TNKS와 기질인 Axin1 및 TRF1의 발현 양을 증가시켰고, 결과적으로 HT29 및 SW480 세포의 증식을 억제 하였다.

[201] CRC 세포에서 APC와 PrxII 기능 간의 직접적인 상관 관계를 확인하기 위해 RKO 세포에서 APC 녹다운(knockdown)을 수행했다.

[202] 도 44, 도 45, 및 도 46에서 보는 바와 같이 APC knockdown은 확실히 세포내의 H_2O_2와 베타카테닌(β-catenin)의 발현의 현저한 증가를 유도하고, 결과적으로 TNKS1의 H_2O_2 의존성 불활성화를 가속화시켰다. 또한, APC와 PrxII의 동시 결핍은 베타카테닌(β-catenin) 발현의 감소와 함께 TNKS 및 Axin1 단백질 발현을 증가시켰다.

[203] PrxII가 세포질 내 퍼록시데이즈(peroxidase) 이므로, PrxII는 APC 돌연변이 또는 손실에 의해 유도된 산화 스트레스로부터 세포질 내 TNKS를 선택적으로 보호 할 수 있음을 시사한다.

[204]

[205] **<실시예 12> H2O2 매개된 TNKS의 PARP 활성의 불활성화의 메커니즘 확인**

[206] H_2O_2 매개된 TNKS의 PARP 활성의 불활성화의 메커니즘을 확인하기 위하여 TNKS의 PARP 촉매 도메인 내에서 산화 - 민감성 Cys 잔기를 검색하였다.

[207] 다양한 PARP 도메인의 펩타이드 서열을 정렬하여 아연 결합 모티프 3 개를 포함하는 5 개의 Cys 잔기를 발견했고, PARP 계통사이에서 TNKS 이성체에 유일하게 존재한다는 것을 알아냈다.

[208] TNKS1에서 각각의 Cys 잔기를 Ser로 변이시키고 그의 PARP 활성을 조사한 결과, 도 47에서 보는 바와 같이 발견된 5 개의 Cys 잔기중 3 개의 아연 - 배위 Cys 잔기 (C1234, C1242 및 C1245)의 돌연변이는 PARP 활성의 완전한 손실을 초래하였다.

[209] 아연 결합 모티프가 산화 조건에서 불안정한지를 시험하기 위해 재조합 TNKS1 PARP 도메인 (1023-1327의 아미노산)을 준비했다. TNKS1 PARP 도메인은 손상되지 않은 폴리ADP라이보실화(PARsylating) 활성을 나타내었으며, 도 48에서 보는 바와 같이 H_2O_2와 함께 배양함으로써 완전히 불활성화 되었다.

[210] 아연 결합 단백질은 시스테인 산화에 의해 아연 이온이 튀어 나오고, 방출된 유리 아연 이온은 4-(2-피리딜라조)레조르시놀(4-(2-pyridylazo)resorcinol)을 사용하여 분광 광도계로 측정할 수 있다.

[211] 상기 방법에 의하여 분광 광도계로 측정한 결과를 도 49에 나타내었다. 도 44B에서 H_2O_2처리가 아연 이온의 거의 완전한 방출을 유도하여 TNKS1 PARP 단백질의 90 % 이상이 궁극적으로 아연 이온을 잃었음을 알 수 있다.

[212] 이와 같은 결과로부터 TNKS의 아연 결합 모티프가 PARP 활성에 필수적이며 Cys 잔기의 H_2O_2 유도 산화가 PARP 도메인으로부터 아연 이온의 방출을 유도한다는 것을 알 수 있다.

[213] 이러한 결과로부터 PrxII에 의해 조절되는 과산화수소(PrxII-regulated H_2O_2)에 의해 TANKS 의 산화 환원이 조절되는 것을 알 수 있다.

[214]

[215] **<실시예 13> PrxII와 TNKS 사이의 선택적 결합 조사**

[216] PrxII가 어떻게 TNKS를 H_2O_2매개 불활성화로부터 보호하는지를 입증하기 위해 PrxII와 TNKS 사이의 상호 작용을 조사했다.

[217] 공동 면역 침전 (Co-immunoprecipitation, IP) 실험 결과를 나타내는 도 50에서 내인성 TNKS가 APC-기능이 있는 RKO 세포가 아닌, APC-돌연변이 HT29 및 SW480 세포에서만 PrxII와 상호 작용한다는 것을 확인할 수 있다.

[218] 이와는 대조적으로 TNKS는 APC-돌연변이 HT29 및 SW480 세포에서 PrxI와 상호 작용하지 않았으며, 이로부터 TNKS/Axin1/베타카테닌(β-catenin) 경로에서 PrxII의 특정 역할을 확인할 수 있다.

[219] TNKS1과 PrxII 사이의 직접적인 상호 작용을 특성화하기 위해, 비 CRC 세포로서 인간 배아 신장 세포 HEK293에서 두 개의 단백질을 과발현시켰다. 그 결과, 도 51에서 보는 바와 같이 co-IP 실험에서 TNKS와 PrxII가 직접 상호 작용함을 확인할 수 있다.

[220] 보다 명확하게, 도 52 및 도 53에서 in situ 근접 연결 분석(in situ proximity ligation assay, in situ PLA)은 TNKS와 PrxII 사이의 직접적인 상호 작용이 RKO 세포가 아닌 HT29 및 SW480 세포의 세포질에서 일어난다는 것을 시각화했다. 도 52 및 도 53에서 두 단백질의 상호 작용을 나타내는 적색 형광 신호는 PrxII 결핍에 의해 거의 완전히 사라졌다.

[221] 따라서, PrxII에 의한 산화 환원 차폐 TNKS가 단백질 - 단백질 상호 작용에 의해 매우 특이적이며 APC 돌연변이에 의존함을 알 수 있다.

[222] TNKS 및 PrxII 돌연변이 유발을 수행하여 분자 상호 작용 지도를 분석하였다.

도 54에서 IP 실험은 절단된 TNKS 돌연변이체가 PrxII와 함께 발현될 때, PrxII가 TNKS의 안키린 반복 클러스터(ankyrin repeat cluster(ARC) 4/5 도메인과 상호 작용 함을 보여 주었다. 이는 PrxII 결합이 ARC 2/3 도메인에 결합하는 Axin1과 중첩되지 않는 다는 것을 입증하였다.

[223]

[224] TNKS ARC 도메인은 클라이언트 단백질에서 공통 서열(consensus sequence) RXXPXG를 인식하며 특히 6번 위치의 Gly 잔기가 직접 결합에 결정적인 역할을 한다.

[225] PrxII에서 유사한 헥사펩티드(hexapeptide) 서열을 검색하고 3군데 잠재적 공통 영역을 찾은 뒤 Gly-to-Val 돌연변이를 도입했다. Co-IP 실험 결과를 나타내는 도 55에서 3군데의 돌연변이 사이트 중 G116V 돌연변이만이 PrxII와 TNKS1의 결합을 완전히 소멸시킴을 확인할 수 있다.

[226] 도 56 및 도 57에서 PrxII WT와 G116V 돌연변이체가 동일한 수준의 발현과 퍼옥시다제 활성을 나타냈지만, 도 53에서 보는 바와 같이 PrxII G116V 돌연변이체는 H_2O_2에 의한 TNKS 활성 저해를 막지 못했으며, PrxII WT는 완전히 막았다.

[227] 또한, 도 58의 레인 2 및 레인 3에서 Prx-$SO_{2/3}$ 블롯은 H_2O_2 처리시 내인성 2-Cys Prx가 완전히 과산화되는 반면, C-말단 Myc 태그 (PrxII-Myc)가 있는 외인성 PrxII는 과산화에 내성이 있음을 알 수 있다.

[228] 실제로, 재조합 효소를 사용하여 생체 외 2-Cys Prx의 활성을 분석한 결과 도 58에서 보는 바와 같이 야생형 PrxII 효소와는 달리, PrxII-Myc 효소는 과산화의 징후 없이 강력한 과산화 효소 활성을 보였다.

[229] PrxII 단백질의 C 말단 변형이 과산화에 대한 저항성을 부여한다는 것이 알려져 있으므로, Myc 태그를 C- 말단에 첨가하면 PrxII에 유사한 구조 변화가 일어날 수 있으며, 이는 과산화 저항성 형태로 전환된다는 것을 예측했다.

[230] 또한 PrxII-TANKS 상호 작용의 생물학적 중요성을 결정하기 위해 콜로니 형성 분석(colony formation assay) 를 수행하였다.

[231] 도 59에서 PrxII 결핍에 의해 억제된 APC-돌연변이 SW480 세포의 콜로니 형성은 PrxII WT의 이소성 발현에 의해 완전히 회복 되었지만 G116V 돌연변이체는 완전히 회복되지 않았다

[232] 이러한 결과로부터 결합 PrxII가 탄키라제의 H_2O_2를 제거함으로써 탄키라제의 산화적 불활성화를 예방할 수 있으며, 이는 APC-변이 CRC 세포의 생장에 중요하다는 것을 알 수 있다.

[233]

[234] **<실시예 14> 사람 대장암 조직에서 PrxII 발현 분석**

[235] 도 60 에서 보는 바와 같이 TCGA(The Cancer Genome Atlas) 데이터베이스1의 유전자 발현 분석 결과, PrxII 발현이 대장 선암 환자의 종양 표본에서 정상 대장 조직보다 상당히 높았으며, 가장 가까운 동형단백질인 PrxI의 발현은 그러한

차이가 없음이 확인되었다. 도 61에서 모든 종양 단계에서 증가된 PrxII 발현이 관찰되었다.

[236] 도 62에서 보는 바와 같이 CRC 조직배열(CRC tissue array)를 이용한 면역 조직화학 검사(immunohistochemistry)에서 정상 조직과 비교했을 때 PrxII 수치가 CRC 조직에서 약 2배 더 높았다. 이러한 결과로부터 특정 PrxII 유도가 CRC 확장을 위한 전제 조건이 될 수 있음을 알 수 있다.

[237]

[238] **<실시예 15> 화합물 6(코노이딘 A) 에 의한 PrxII 활성 조절**

[239] 상기 분석을 바탕으로, PrxII 를 저해함에 의한 인간 CRC 치료 가능성을 평가하기 위해 PrxII에 공유 결합하는 것으로 알려져 있는 코노이딘 A(Conoidin A)라고 불리는 화합물 6의 세포 투과성 화합물을 시험하였다.

[240] 도 63의 in vitro Prx 분석에서 화합물 6 코노이딘 A가 인간 PrxII 활성을 약 85 % (대조군의 경우 214.9 ± 24.3 nmol min^{-1}, 코노이딘 A 처리의 경우 38.8 ± 17.1 nmol min^{-1})까지 억제함을 발견했으며, PrxI 활성은 약 50 %까지 억제하였다.

[241] 이에 비해, PrxI 활성의 초기 속도는 화합물 6 코노이딘 A 에 의해 영향을 받지 않았다(대조군의 경우 263.7 ± 45.4 nmol min -1, 코노이딘 A의 경우 241.7 ± 21 nmol min -1)

[242]

[243] **<실시예 16> 화합물 6(코노이딘 A) 처리에 의한 콜로니 형성 분석**

[244] 도 64에서 콜로니 형성 분석은 화합물 6(코노이딘 A) 처리가 RKO 세포가 아닌 HT29 및 SW480 세포의 증식을 충분히 억제한다는 것을 보여 주었다. 인간 APC 돌연변이 CRC 세포를 선택적으로 표적하기 위한 PrxII 억제의 치료 가능성을 암시하는 것이다.

[245] 화합물 6(코노이딘 A) 를 HT29 유래 종양 이종 이식(tumor xenografts)편을 보유한 쥐에게 복강 내 주사했을 때, 도 65 및 도 66에서 보는 바와 같이 화합물 6(코노이딘 A) 처리는 대조군에 비해 종양 성장을 상당히 지연시켰다.

[246] 이로부터 도 67 의 모식도에서 보는 바와 같이 PrxII 가 인간 CRC에 대한 새로운 표적 치료가 될 수 있으며, 화합물 6(코노이딘 A) 와 같이 PrxII를 억제하는 화합물이 인간 CRC에 대한 새로운 치료약이 될 수 있음을 알 수 있다.

[247]

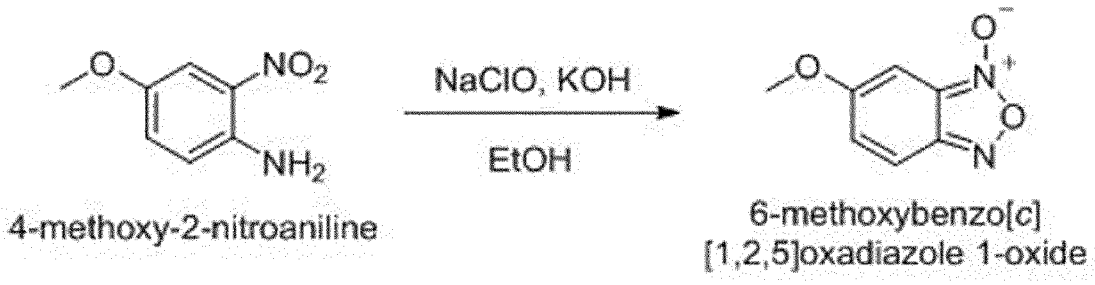
[248] 이하 합성예에서 화합물-1 내지 화합물-5의 합성방법을 설명한다. 화합물-6은 코노이딘 A이며 Candia Thamtech Company Limited, Shanghai YuLue Chemical Co., Ltd.등 널리 판매되고 있는 제품이다.

[249]

[250] **<합성예 1 - 2,3-비스(브로모메틸)-6-메톡시퀴녹살린 1,4-다이옥사이드 (2,3-bis(bromomethyl)-6-methoxyquinoxaline 1,4-dioxide)) 합성(화합물-1)>**

[251] **단계 1**

[252]



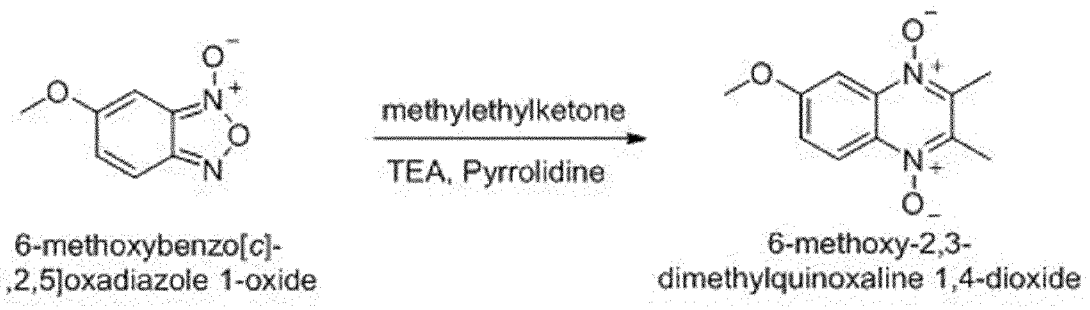
[253] 4-메톡시-2-나이트로아닐린(4-Methoxy-2-nitroaniline) (1.01g, 5.89 mmol) 을 미리 제조한 20% KOH/ethanol 용액(35ml)에 투입 후 교반한다. 얼음 수조하에서 NaOCl 12% 용액을 약 30ml 적가한 뒤 실온으로 승온하여 출발물질이 사라질 때까지 교반하여 준다.

[254] 발생 고체를 필터 한 뒤 차가운 에탄올로 세척한다. 이렇게 얻은 노란 고체는 물:에탄올 = 1:3 용액을 이용하여 재결정 과정을 거친다 (0.65g, 66%).

[255] ^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3) δ 7.47 - 6.40 (m, 3H), and 3.90 (s, 3H).

[256] **단계 2**

[257]



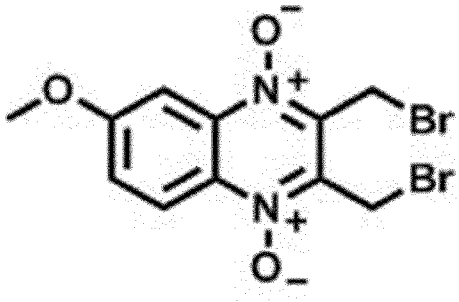
[258] 6-메톡시벤조[c][1,2,5]옥사디아졸 1-옥사이드(6-Methoxybenzo[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxide) (1.00 g, 6.02 mmol)를 트리에틸아민(trimethylamine) (18.06 mmol)과 함께 교반한다. 얼음수조 하에서 피롤리딘(Pyrrolidine) (0.78g, 10.83 mmol), 메틸에틸케톤(methylethylketone) (0.65g, 9.03 mmol)를 적가하여 준다.

[259] 실온 승온 후 약 1시간 후 반응 종결을 확인하였다 (TLC 분석 조건, n-Hexane:EtOAc = 2:1). 반응액을 필터 후 차가운 에탄올로 위시하여 갈색 고체 (1.06 g, 80%)를 얻었다. 이 단계에서는 별도의 정제 없이 다음 단계를 진행하였다.

[260] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.36 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.78 (d, J= 2.0Hz, 1H), 7.49 (dd, J = 9.0, Hz, 3.0Hz, 1H) 3.97 (s, 3H), 2.59 (s, 3H), and 2.56 (s, 3H).

[261] **단계 3**

[262]



[263] 6-메톡시-2,3-디메틸퀴녹살린 1,4-다이옥사이드(6-methoxy-2,3-dimethylquinoxaline 1,4-dioxide) (1.00 g, 4.54 mmol)를 1,4-다이옥사이드(1,4-dioxide)에 용해 한 뒤, 브롬(12.71 mmol)를 적가하였다.

[264] 반응액을 90 °C 까지 승온한 뒤 시작물질의 스팟이 사라질 때 까지 약 2시간 반응하였다. 이때 반응 진행 여부는 TLC 분석을 이용하여 판단하였다 (n-Hexane:EtOAc = 1:2).

[265] 반응 종결 후 $NaHCO_3$ 수용액을 투입 후 에틸 아세테이트(ethyl acetate)로 추출하였다. 이후 유기층을 브린(Brine)을 이용하여 세척 후 $MgSO_4$를 이용하여 건조 후 여과, 농축하여 혼합 상태의 생성물을 얻었다. 이 생성물은 MPLC (n-Hexane:EtOAc = 3:1) 를 이용하여 컬럼을 하였고, 화합물-1(1.15 g, 65%)을 얻었다.

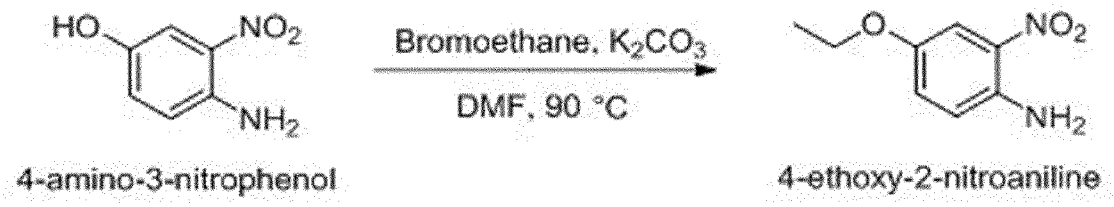
[266] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.39 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.81 (d, J = 2.4 Hz), 7.59 (dd, J = 7.4 Hz, 2.2 Hz), 5.06 (s, 4H), and 4.01 (s, 3H); ^{13}C-NMR (100MHz, DMSO-d_6) δ 162.9, 124.4, 122.2, 99.5, 57.0, 23.5, and 23.4; HRMS (ESI) : m/z 377.9038 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{11}H_{10}Br_2N_2O_3^+$ 378.9170)

[267]

[268] **<합성예 2 : 2,3-비스(브로모메틸)-6-에톡시퀴녹살린 1,4-다이옥사이드(2,3-bis(bromomethyl)-6-ethoxyquinoxaline 1,4-dioxide)) 합성(화합물-2)>**

[269] **단계 1**

[270]



[271] 4-아미노-3-니트로페놀(4-Amino-3-nitrophenol)(5.00 g, 32.44 mmol)과 브로모에텐(bromoethane)(5.30g, 48.66 mmol)을 DMF 용매 하에서 교반하며 탄산칼슘(potassium carbonate)(6.73g, 48.66 mmol)를 소분하여 투입한다.

[272] 이후 반응 용기의 온도를 90°C 로 승온하여 출발물질이 사라질 때 까지 약

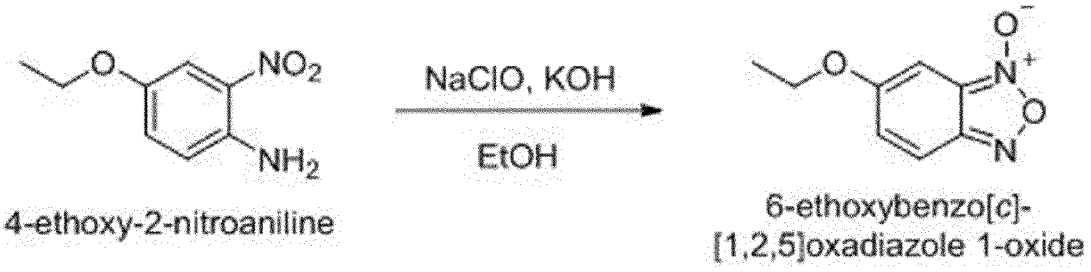
3시간 반응 관찰하였다(TLC분석 조건, n-Hexane:EtOAc = 3:1).

[273] 반응이 종결되면 실온 냉각 후 얼음물에 반응 용액을 투입한다. 발생되는 고체를 필터하여 혼합물 상태의 붉은 고체를 얻었다. 이는 컬럼 (n-Hexane:EtOAc = 10:1)을 통하여 정제하여 4-에톡시-2-니트로아닐린(4-ethoxy-2-nitroaniline) (4.25g, 72%)를 최종적으로 확인하였다.

[274] ^{1}H-NMR (400MHz, CDCl3) δ 7.55(bs, 1H), 7.07(d, J=8Hz, 1H), 6.77(d, J=8Hz, 1H), 5.89(bs, 2H), 4.01(m, 2H), and 1.41(t ,J=6.0Hz, 3H).

[275] **단계 2**

[276]



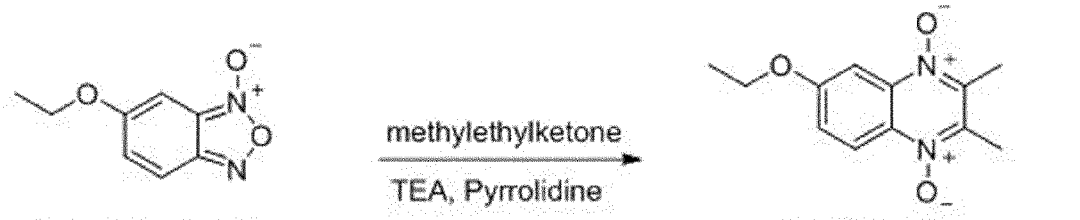
[277] 4-에톡시-2-니트로아닐린(4-Ethoxy-2-nitroaniline) (2.00 g, 10.98 mmol) 을 미리 제조한 20% KOH/ethanol 용액(60ml)에 투입 후 교반한다.

[278] 얼음 수조하에서 NaOCl 12% 용액을 약 50ml 적가 한 뒤 실온으로 승온하여 출발물질이 사라질 때 까지 교반한다. 발생 고체를 필터 한 뒤 차가운 에탄올로 세척한다. 이렇게 얻은 노란 고체는 물:에탄올 = 1:3 용액을 이용하여 재결정 과정을 거친다 (1.85g, 94%).

[279] ^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3) δ 7.49 - 6.34 (m, 3H), 4.08 (m, 2H), and 1.48 (t, J = 8.0 Hz, 3H)

[280] **단계 3**

[281]



[282] 6-에톡시벤조[c][1,2,5]옥사디아졸 1-옥사이드(6-Ethoxybenzo[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxide) (1.50 g, 8.33 mmol)를 트리에틸아민(trimethylamine)(2.52g, 24.98 mmol)과 함께 교반한다.

[283] 얼음수조 하에서 피롤리딘(Pyrrolidine)(1.08g, 14.99 mmol), 메틸에틸케톤(methylethylketone)(0.90g, 12.49 mmol) 를 적가하여 준다.

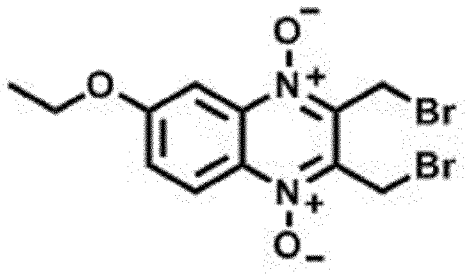
[284] 실온 승온 후 약 1시간 후 반응 종결을 확인하였다 (TLC 분석 조건, n-Hexane:EtOAc = 2:1). 반응액을 필터 후 차가운 에탄올로 워시하여 갈색 고체 (1.11 g, 57%)를 얻었다. 이 단계에서는 별도의 정제 없이 다음 단계를

진행하였다.

[285] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO- d6) δ 8.51 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.38 (dd, J = 9.4, 2.6 Hz, 1H), 4.24 (m, 2H), 2.74 (s, 3H), 2.71 (s, 3H), and 1.51 (t, J = 6.8 Hz, 3H).

[286] **단계 4**

[287]



[288] 6-에톡시-2,3-디메틸퀴녹살린 1,4-다이옥사이드(6-ethoxy-2,3-dimethylquinoxaline 1,4-dioxide) (1.00 g, 4.27 mmol)를 1,4-다이옥사이드(1,4-dioxide)에 용해 한 뒤, 브롬(12.71 mmol)를 적가하였다.

[289] 반응액을 90 °C 까지 승온한 뒤 시작물질의 스팟이 사라질 때 까지 약 2시간 반응하였다. 이 때 반응 진행 여부는 TLC 분석을 이용하여 판단하였다(n-Hexane:EtOAc = 1:2). 반응 종결 후 NaHCO3 수용액을 투입 후 에틸 아세테이트(ethyl acetate) 로 추출하였다.

[290] 이후 유기층을 브린(Brine)을 이용하여 세척 후 MgSO4 를 이용하여 건조 후 여과, 농축하여 혼합 상태의 생성물을 얻었다. 이 생성물은 MPLC (n-Hexane:EtOAc = 3:1) 를 이용하여 컬럼을 하였고, 화합물-2(0.98 g, 61%)를 얻었다.

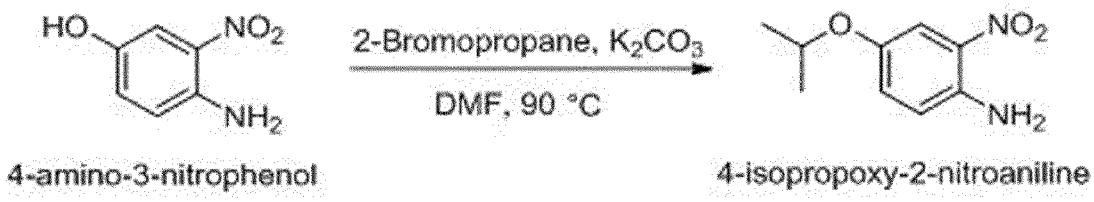
[291] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ 8.52 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.42 (dd, J = 9.6, 2.8 Hz), 4.90 (s, 4H), 4.24 (m, 2H), and 1.52 (t, J = 7.2 Hz, 3H); ^{13}C-NMR (100MHz, DMSO-d $_6$) δ 163.2, 122.5, 122.1, 101.2, 58.0, 23.9 and 13.9; HRMS (ESI) : m/z 391.9194 [M+H] $^+$ (calcd for C $_{12}$H $_{12}$Br $_2$N $_2$O3 $^+$ 392.9155)

[292]

[293] **<합성예 3 : 2,3-비스(브로모메틸)-6-이소프로폭시퀴녹살린 1,4-다이옥사이드(2,3-bis(bromomethyl)-6-isopropoxyquinoxaline 1,4-dioxide) 합성(화합물-3)>**

[294] **단계 1**

[295]



[296] 4-아미노-3-니트로페놀(4-Amino-3-nitrophenol)(5.00 g, 32.44 mmol)과 2-브로모프로펜(2-bromopropane)(5.98g, 48.66 mmol)을 DMF 용매 에서 교반하며 탄산칼슘(potassium carbonate)(6.73g, 48.66 mmol)를 소분하여 투입한다.

[297] 이후 반응 용기의 온도를 90°C 로 승온하여 출발물질이 사라질 때 까지 약 5시간 반응 관찰하였다 (TLC분석 조건, n-Hexane:EtOAc = 3:1).

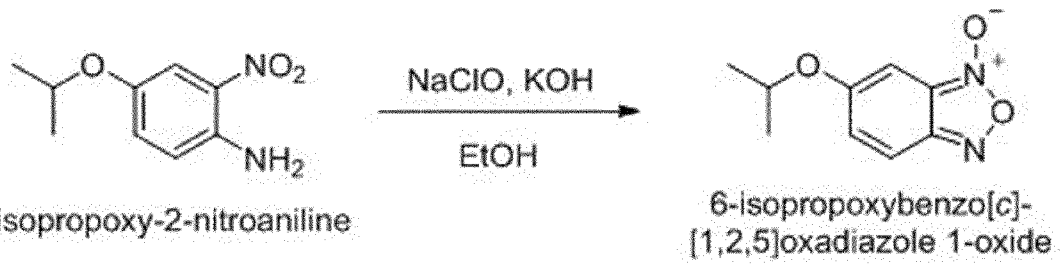
[298] 반응이 종결되면 실온 냉각 후 얼음물에 반응 용액을 투입한다. 이후 디에틸에테르(diethyl ether)를 이용하여 수층에 스팟이 사라질 때 까지 추출하였다. 유기층은 브린(brine)으로 세척 후 MgSO4를 이용하여 건조 후 농축하여 붉은색 고체를 얻었다.

[299] 이는 컬럼(n-Hexane:EtOAc = 10:1)을 통하여 정제하여 4-이소프로폭시-2-니트로아닐린(4-isopropoxy-2-nitroaniline)(5.90g, 93%)를 최종적으로 확인하였다.

[300] ^{1}H-NMR (400MHz, CDCl3) δ7.51(bs, 1H), 7.04(d ,J=8.0Hz, 1H), 6.75(d ,J=8.0Hz, 1H), 5.88(bs, 2H) ,4.46(m, 1H), and 1.33(d, J=6.0Hz ,6H).

[301] **단계 2**

[302]



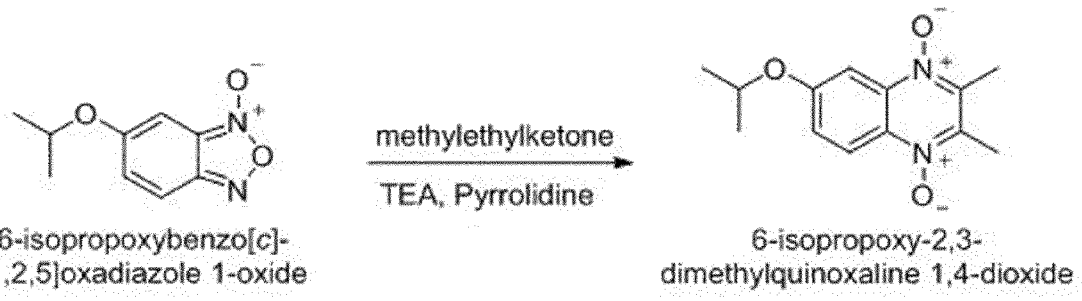
[303] 4-이소프로폭시-2-니트로아닐린(4-Isopropoxy-2-nitroaniline)(2.00 g, 10.19 mmol) 을 미리 제조한 20% KOH/ethanol 용액(60ml)에 투입 후 교반한다.

[304] 얼음 수조 하에서 NaOCl 12% 용액을 약 50ml 적가한 뒤 실온으로 승온하여 출발물질이 사라질 때 까지 교반하여 준다. 발생 고체를 필터 한 뒤 차가운 에탄올로 세척한다. 이렇게 얻은 노란 고체는 물:에탄올 = 1:3 용액을 이용하여 재결정 과정을 거친다 (1.93g, 97%).

[305] ^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3) δ 7.48 - 6.34 (m, 3H), 4.60 (m, 1H), and 1.41 (d, J = 6.0 Hz, 6H).

[306] **단계 3**

[307]



[308] 6-이소프로폭시벤조[c][1,2,5]옥사디아졸

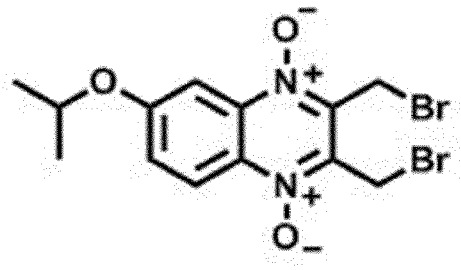
1-옥사이드(6-Isopropoxybenzo[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxide)(1.50 g, 7.72 mmol)를 트리에틸아민(trimethylamine)(2.34g, 23.17 mmol)과 함께 교반한다.

[309] 얼음수조 하에서 피롤리딘(Pyrrolidine)(1.00g, 13.90 mmol), 메틸에틸케톤(methylethylketone)(0.84g, 11.59 mmol)를 적가하여 준다. 실온 승온 후 약 1시간 후 반응 종결을 확인하였다 (TLC 분석 조건, n-Hexane:EtOAc = 2:1). 반응액을 필터 후 차가운 에탄올로 워시하여 갈색 고체 (1.49 g, 78%) 를 얻었다. 이 단계에서는 별도의 정제 없이 다음 단계를 진행하였다.

[310] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO- d6) δ 8.50 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.91 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.34 (dd, J = 9.4 Hz, 2.6 Hz, 1H) 4.81 (s, 1H), 2.73 (s, 3H), 2.71 (s, 3H), and 1.44 (d, J = 6.0 Hz, 3H).

[311] **단계 4**

[312]



[313] 6-이소프록시-2,3-디메틸퀴녹살린 1,4-다이옥사이드(6-isoproxy-2,3-dimethylquinoxaline 1,4-dioxide) (1.00 g, 4.03 mmol)를 1,4-다이옥사이드(1,4-dioxide)에 용해 한 뒤, 브롬(12.71 mmol)를 적가하였다.

[314] 반응액을 90 °C 까지 승온한 뒤 시작물질의 스팟이 사라질 때 까지 약 2시간 반응하였다. 이 때 반응 진행 여부는 TLC 분석을 이용하여 판단하였다 (n-Hexane:EtOAc = 1:2).

[315] 반응 종결 후 $NaHCO_3$ 수용액을 투입 후 에틸 아세테이트로 추출하였다. 이후 유기층을 브린(Brine)을 이용하여 세척 후 $MgSO_4$ 를 이용하여 건조후 여과, 농축하여 혼합 상태의 생성물을 얻었다. 이 생성물은 MPLC (n-Hexane:EtOAc = 3:1) 를 이용하여 컬럼을 하였고, 화합물-3(0.69 g, 42%)을 얻었다.

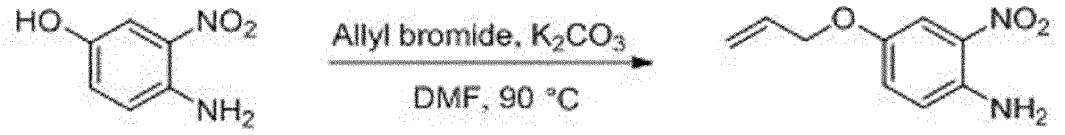
[316] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.52 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.90 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.42 (dd, J = 9.6, 2.8 Hz), 4.90 (s, 4H), 4.24 (m, 2H), and 1.52 (t, J = 7.2 Hz, 3H); ^{13}C-NMR (100MHz, DMSO-d_6) δ 162.9, 122.70, 105.7, 73.0, 23.9 and 21.8; HRMS (ESI) : m/z 405.9351 $[M+H]^+$ (calcd for $C_{13}H_{14}Br_2N_2O3$+ 406.9458)

[317]

[318] **<합성예 4 : 6-(알릴옥시)-2,3-비스(브로모메틸) 퀴녹살린 1,4-다이옥사이드 (6-(allyloxy)-2,3-bis(bromomethyl)quinoxaline 1,4-dioxide) 합성(화합물-4)>**

[319] **단계 1**

[320]



4-amino-3-nitrophenol 4-(allyloxy)-2-nitroaniline

[321] 4-아미노-3-니트로페놀(4-Amino-3-nitrophenol)(5.00 g, 32.44 mmol)과 알릴브로마이드(allyl bromide)(5.89g, 48.66 mmol)을 DMF 용매에서 교반하며 탄산칼슘(potassium carbonate)(6.73g, 48.66 mmol)를 소분하여 투입한다.

[322] 이후 반응 용기의 온도를 90°C 로 승온하여 출발물질이 사라질 때 까지 약 3시간 반응 관찰하였다 (TLC분석 조건, n-Hexane:EtOAc = 3:1).

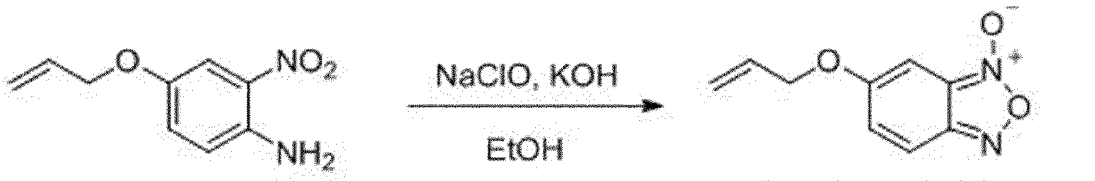
[323] 반응이 종결되면 실온 냉각 후 얼음물에 반응 용액을 투입한다. 이후 diethyl ether를 이용하여 수층에 스팟이 사라질 때 까지 추출하였다. 유기층은 브린(brine)으로 세척 후 MgSO4를 이용하여 건조 후 농축하여 붉은색 고체를 얻었다.

[324] 이는 컬럼 (n-Hexane:EtOAc = 10:1)을 통하여 정제하여 4-(알릴옥시)-2-니트로아닐린(4-(allyloxy)-2-nitroaniline)(4,44g, 71%) 를 최종적으로 확인하였다.

[325] ^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3) δ7.52(bs, 1H), 7.00(d, J=7.6Hz, 1H) ,6.73(d, J=8.0Hz, 1H), 6.06(m, 1H), 5.60(bs, 2H), 5.47(d, J=16.0Hz, 1H), 5.34(d, J=10.4Hz, 1H), and 4.70(d, J=5.2Hz, 2H).

[326] **단계 2:**

[327]



4-(allyloxy)-2-nitroaniline 6-(allyloxy)benzo-[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxide

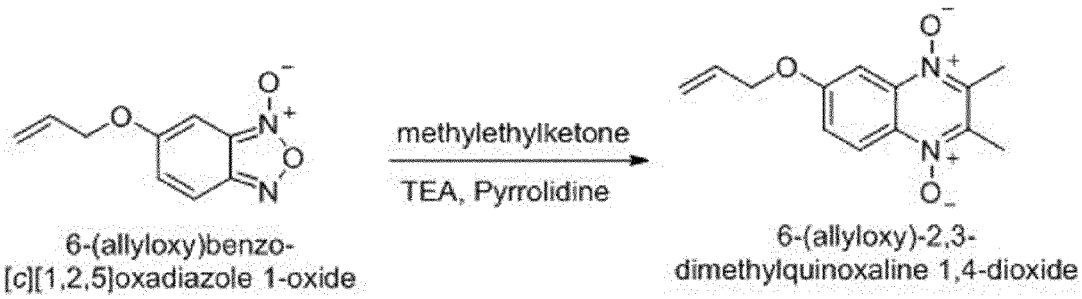
[328] 4-알릴옥시-2-니트로아닐린(4-Allyloxy-2-nitroaniline)(2.00 g, 10.30 mmol)을 미리 제조한 20% KOH/ethanol 용액(60ml)에 투입 후 교반한다.

[329] 얼음 수조 하에서 NaOCl 12% 용액을 약 50ml 적가한 뒤 실온으로 승온하여 출발물질이 사라질 때 까지 교반하여 준다. 발생 고체를 필터 한 뒤 차가운 에탄올로 세척한다. 이렇게 얻은 노란 고체는 물:에탄올 = 1:3 용액을 이용하여 재결정 과정을 거친다 (1.96g, 99%).

[330] ^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3) δ 7.76 - 6.69 (m, 3H), 6.06 (m, 1H).

[331] **단계 3:**

[332]



6-(allyloxy)benzo-[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxide

6-(allyloxy)-2,3-dimethylquinoxaline 1,4-dioxide

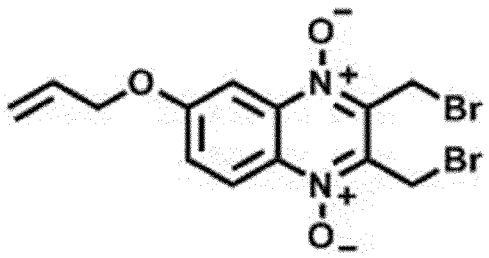
[333] 6-(알릴옥시)벤조[c][1,2,5]옥사디아졸 1-옥사이드(6-(Allyloxy)benzo[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxide)(1.50 g, 7.81 mmol)를 트리에틸아민(trimethylamine)(2.36g, 23.42 mmol)과 함께 교반한다.

[334] 얼음수조 하에서 Pyrrolidine (1.01g, 14.05 mmol), methylethylketone (0.84g, 11.71 mmol) 를 적가하여 준다. 실온 승온 후 약 1시간 후 반응 종결을 확인하였다 (TLC 분석 조건, n-Hexane:EtOAc = 2:1). 반응액을 필터 후 차가운 에탄올로 워시하여 갈색 고체 (0.96 g, 50%) 를 얻었다. 이 단계에서는 별도의 정제 없이 다음 단계를 진행하였다.

[335] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO- d6) δ 8.38 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.52 (dd, J = 9.4, 2.4 Hz, 1H), 6.10 (m , 1H), 5.57 (dd, J = 17.2, 1.6 Hz, 1H), 5.34 (dd, J = 10.6, 1.6 Hz, 1H), 2.59 (s, 3H), 2.57 (s, 3H).

[336] **단계 4:**

[337]



[338] 6-(알릴옥시)-2,3-디메틸퀴녹살린 1,4-다이옥사이드(6-(allyloxy)-2,3-dimethylquinoxaline 1,4-dioxide) (1.00 g, 4.06 mmol)를 1,4-다이옥사이드(1,4-dioxide)에 용해 한 뒤, 브롬(12.71 mmol)를 적가하였다.

[339] 반응액을 90 °C 까지 승온 한 뒤 시작물질의 스팟이 사라질 때 까지 약 2시간 반응하였다. 이때 반응 진행 여부는 TLC 분석을 이용하여 판단하였다(n-Hexane:EtOAc = 1:2). 반응 종결 후 $NaHCO_3$ 수용액을 투입 후 에틸아세테이트로 추출하였다. 이후 유기층을 브린(Brine)을 이용하여 세척 후 $MgSO_4$ 를 이용하여 건조후 여과, 농축하여 혼합 상태의 생성물을 얻었다.

[340] 이 생성물은 MPLC (n-Hexane:EtOAc = 3:1) 를 이용하여 컬럼을 하였고, 화합물-4(0.72 g, 44%)을 얻었다.

[341] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.25 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.90 (m, 2H), 5.87 (m, 1H) 5.23~5.17 (m, 2H), 4.92 (s, 4H), and 4.61 (d, J = 4.8 Hz, 2H) ; ^{13}C-NMR

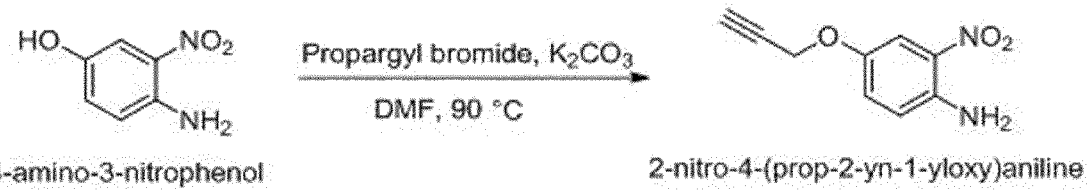
(100MHz, DMSO-d $_6$) δ 167.0, 134.5, 122.3, 122,1, 117.5, 105.0, 70.1, and 23.9
HRMS (ESI) : m/z 403.9194 [M+H] $^+$ (calcd for C $_{13}$H $_{12}$Br $_2$N $_2$O3+ 404.9279)

[342]

[343] **<합성예 5: 2,3-비스(브로모메틸)-6-(프로프-2-인일옥시)퀴녹살린 1,4-다이옥사이드(2,3-bis(bromomethyl)-6-(prop-2-ynyloxy)quinoxaline 1,4-dioxide(화합물-5)) 합성 >**

[344] **단계 1:**

[345]



4-amino-3-nitrophenol 2-nitro-4-(prop-2-yn-1-yloxy)aniline

[346] 4-아미노-3-니트로페놀(4-Amino-3-nitrophenol)(5.00 g, 32.44 mmol)과 프로파길 브로마이드(propargyl bromide)(5.79g, 48.66 mmol)을 DMF 용매 에서 교반하며 탄산 칼슘(potassium carbonate)(6.73g, 48.66 mmol)를 소분하여 투입한다. 이후 반응 용기의 온도를 90°C 로 승온하여 출발물질이 사라질 때 까지 약 3시간 반응 관찰하였다(TLC분석 조건, n-Hexane:EtOAc = 3:1).

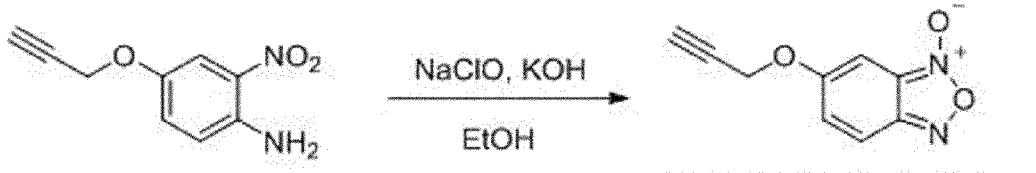
[347] 반응이 종결되면 실온 냉각 후 얼음물에 반응 용액을 투입한다. 이후 디에틸에테르(diethyl ether)를 이용하여 수층에 스팟이 사라질 때 까지 추출하였다. 유기층은 브린(brine)으로 세척 후 MgSO4를 이용하여 건조 후 농축하여 붉은색 고체를 얻었다.

[348] 이는 컬럼 (n-Hexane:EtOAc = 10:1)을 통하여 2-니트로-4-(프롭-2-인-1-일옥시)아닐린(2-nitro-4-(prop-2-yn-1-yloxy)aniline)(3.95g ,63%)를 최종적으로 확인하였다.

[349] ^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3) δ7.69(bs, 1H), 7.13(d, J=8.0Hz, 1H), 6.78(d, J=8.0Hz, 1H), 5.91(bs, 2H), 4.67(d, J=4.0Hz, 2H), and 2.55(t, J=2.0Hz, 1H).

[350] **단계 2:**

[351]



2-nitro-4-(prop-2-yn-1-yloxy)aniline 6-(prop-2-yn-1-yloxy)benzo-[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxide

[352] 2-니트로-4-(프롭-2-인-1-일옥시)아닐린(2-Nitro-4-(prop-2-yn-1-yloxy) aniline)(2.00 g, 10.41 mmol) 을 미리 제조한 20% KOH/ethanol 용액(60ml)에 투입 후 교반한다. 얼음 수조하에서 NaOCl 12% 용액을 약 50ml 적가 한 뒤 실온으로 승온하여 출발물질이 사라질 때 까지 교반하여 준다.

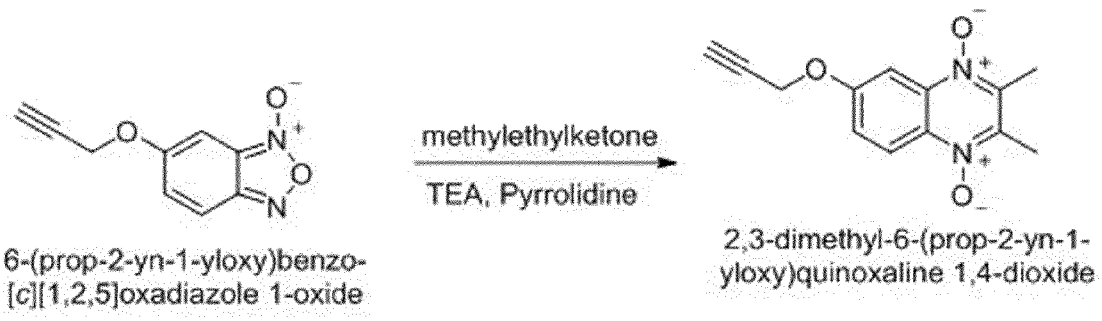
[353] 발생 고체를 필터 한 뒤 차가운 에탄올로 세척한다. 이렇게 얻은 노란 고체는

물:에탄올 = 1:3 용액을 이용하여 재결정 과정을 거친다 (1.96g, 99%).

[354] ^{1}H-NMR (400 MHz, CDCl3) δ 7.81 - 6.81 (m, 3H), 4.98 (d, J = 2.0 Hz, 2H), and 3.34 (s, 1H).

[355] **단계 3:**

[356]



6-(prop-2-yn-1-yloxy)benzo-[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxide

2,3-dimethyl-6-(prop-2-yn-1-yloxy)quinoxaline 1,4-dioxide

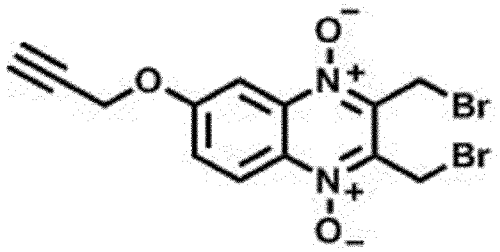
[357] 6-(프롭-2-인-1-일옥시)벤조[c][1,2,5]옥사디아졸 1-옥사이드(6-(Prop-2-yn-1-yloxy)benzo[c][1,2,5]oxadiazole 1-oxide) (1.50 g, 7.89 mmol)를 트리에틸아민(trimethylamine)(2.39g, 23.66 mmol)과 함께 교반한다.

[358] 얼음수조 하에서 피롤리딘(Pyrrolidine)(1.02g, 14.20 mmol), 메틸에틸케톤(methylethylketone)(0.85g, 11.83 mmol) 를 적가하여 준다. 실온 승온 후 약 1시간 후 반응 종결을 확인하였다(TLC 분석 조건, n-Hexane:EtOAc = 2:1). 반응액을 필터 후 차가운 에탄올로 워시하여 갈색 고체 (0.96 g, 51%) 를 얻었다. 이 단계에서는 별도의 정제 없이 다음 단계를 진행하였다.

[359] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO- d6) δ 8.38 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 7.92 (d, J = 2.4, 1H), 7.51 (dd, J = 9.4, 2.6 Hz, 1H), 5.06 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 3.71 (t, J = 2.4 Hz, 1H), 2.59 (s, 1H), 2.57 (s, 1H).

[360] **단계 4:**

[361]



[362] 2,3-디메틸-6-(프롭-2-이닐옥시)퀴녹살린 1,4-다이옥사이드(2,3-dimethyl-6-(prop-2-ynyloxy)quinoxaline 1,4-dioxide) (1.00 g, 4.09 mmol) 화합물을 1,4-(다이옥사이드)1,4-dioxide에 용해 한 뒤, 브롬 (12.71 mmol)를 적가하였다.

[363] 반응액을 90 °C 까지 승온 한 뒤 시작물질의 스팟이 사라질 때 까지 약 2시간 반응하였다. 이때 반응 진행 여부는 TLC 분석을 이용하여 판단하였다 (n-Hexane:EtOAc = 1:2). 반응 종결 후 $NaHCO_3$ 수용액을 투입 후 에틸 아세테이트로 추출하였다.

[364] 이후 유기층을 브린(Brine)을 이용하여 세척 후 $MgSO_4$ 를 이용하여 건조후

여과, 농축하여 혼합 상태의 생성물을 얻었다. 이 생성물은 MPLC (n-Hexane:EtOAc = 3:1) 를 이용하여 컬럼을 하였고, 화합물-5(0.68 g, 41%)를 얻었다.

[365] ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO-d $_{6}$) δ 8.34 (d, J = 9.6 Hz, 1H), 8.06 (m, 2H); 5.00 (s, 4H), 4.86 (d, J = 2.4 Hz, 2H) and 3.51 (t, J = 2.4 Hz, 1H); ^{13}C-NMR (100MHz, DMSO-d $_{6}$) δ 164.8, 122.2, 120.6, 106.3, 80.0, 78.8, 58.8 and 23.1; HRMS (ESI) : m/z 401.9038 [M+H] $^{+}$ (calcd for C $_{13}$H $_{10}$Br $_{2}$N $_{2}$O3+ 402.9465)

[366]

[367] **<실시예 17> 화합물-1 내지 화합물-5에 의한 PrxII 활성 조절 분석**

[368] PrxII 를 저해함에 의한 인간 CRC 치료 가능성을 평가하기 위해 화합물-1 내지 화합물-5의 세포 투과성 화합물을 시험하였다.

[369] 도 72 내지 도 73의 그래프에서 본 발명의 일 실시예에 의하여 합성된 화합물-1 내지 화합물-5는 PrxII 활성을 크게 억제하는 것을 확인할 수 있다.

[370]

[371] **<실시예 18> 화합물-1 내지 화합물-5에 의한 콜로니 형성 분석**

[372] 도 74는 RKO 세포에 화합물-1 내지 화합물-5를 처리하고 콜로니 개수를 측정한 것이다. 도 75는 RKO 세포에 화합물-1 내지 화합물-5와 코노이딘 A(Conoidin A, 화합물-6)을 처리하여 배양한 콜로니 형성 분석 결과이다.

[373] 도 76는 HT29 세포에 화합물-1 내지 화합물-5의 처리 후 콜로니 개수를 측정한 것이다. 도 77는 HT29세포에 화합물-1 내지 화합물-5와 코노이딘 A(Conoidin A,화합물-6)을 처리하여 배양한 콜로니 형성 분석 결과이다.

[374] 화합물-1 내지 화합물-5의 처리 후 RKO 세포가 아닌 HT29 세포의 증식을 충분히 억제한다는 것을 보여 주었다. 이로부터 PrxII 가 인간 CRC에 대한 새로운 표적 치료가 될 수 있으며, 코노이딘 A(화합물-6) 및 화합물-1 내지 화합물-5와 같이 PrxII를 억제하는 화합물이 인간 CRC에 대한 새로운 치료약이 될 수 있음을 알 수 있다.

[375]

[376] **<참고예 1> 암유전체지도 분석 (The Cancer Genome Atlas, TCGA analysis)**

[377] 대장 암 및 정상 대장 조직 샘플에서 PrxI 및 PrxII의 발현은 암유전체지도 (Cancer Genome Atlas, TCGA) 프로젝트 (https://tcga-data.nci.nih.gov)의 마이크로어레이(microarray) 데이터를 사용하여 측정되었다.

[378] 설명하자면, Agilent G4502A 마이크로어레이 플랫폼을 사용하여 mRNA 발현 데이터를 생성 한 후 이전에 설명한대로 처리 및 표준화하였다. 유전자 발현 데이터를 분석을 위해 155 개의 대장암 조직 샘플 및 26 개의 정상 대장 조직 샘플이 포함되었다.

[379]

[380] **<참고예 2> 면역블로팅과 면역침강법 (Immunoblotting and immunoprecipitation)**

[381] 장 내강(lumen)을 평평한 바늘이 달린 주사기를 사용하여 얼음으로 찬 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하고 세로방향으로 절개하였다. 용종이 없는 장의 절편을 용종과 함께 면역블로팅(immunoblotting) 분석을 하기 위해 절제하였다.

[382] 조직을 10 % 글리세롤, 1mM EDTA, 2mM EGTA, 1mM DTT, 5mM Na3VO4, 5mM NaF, 1mM AEBSF, 아프로티닌(aprotinin, 5μg / ml), 류 펩틴 (5 μg / ml)을 함유하는 HEPES- 완충 식염수에서 Dounce 균질화기를 사용하여 균질화시켰다.

[383] 배양 된 세포를 얼음으로 차가운 PBS로 1 회 헹구고, 20 mM HEPES (pH 7.0), 1 % Triton X-100, 150 mM NaCl, 10 % 글리세롤, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 5 mM Na3 VO4, 5 mM NaF, 1 mM AEBSF, 아프로티닌 (5 μg / ml) 및 류 펩틴 (5 μg / ml)를 포함하는 용해 완충액에서 용해한다.

[384] 조직 균질균(homogenates)및 세포 용해물을 15,000 x g에서 15분 동안 원심 분리하고, 단백질 농도를 브래드포드(Bradford) 분석법(Pierce)에 의해 조사하였다. 단백질 시료를 SDS 시료 완충액과 혼합하고 5 분간 끓였다.

[385] 그 단백질을 SDS-PAGE로 분리한 다음 1 시간 동안 일렉트로블로팅 (electroblotting)하여 나이트로셀룰로오스 막(nitrocellulose Membranes)으로 이동시켰다. 막을 0.05 % (v / v) Tween-20 (TBST)을 함유하는 트리스(Tris) 완충 식염수에서 2시간 동안 5 % 소 혈청 알부민(BSA) 또는 5 % 건조 탈지유로 블로킹 한 후, 실온에서 2시간 동안 블로킹 완충액에서 적절한 일차 항체와 항온 배양하였다.

[386] 다음, TBST로 3회 세척 한 후, 막을 블로킹 완충액 중에서 겨자무과산화효소 접합(horseradish peroxidase-conjugated) 2차 항체(Amersham Biosciences)와 배양했다. 면역 반응성 밴드(The immune-reactive bands)는 화학 발광 키트 (AbFrontier, Korea)로 검출하고 LAS-3000 이미징 시스템(imaging system, Fuji Film, Japan)으로 정량화 하였다.

[387] 필요한 경우 67 mM Tris (pH 6.7), 2%SDS 및 100mM 베타 머캡토에탄올(β-mercaptoethanol)에서 37°C로 60분간 흔들어 막을 벗겨낸 다음 적절한 일반항체(pan-antibody)로 재조사한다.

[388] 면역침강(immunoprecipitation)을 위해, 정제된 세포 용해물 (0.5 ~ 1 mg 단백질)을 30μl의 단백질-A/G Sepharose 4 Fast Flow beads (Amersham Biosciences)로 1시간 동안 미리 제거 하였다.

[389] 상청액(supernatant, 표면에 뜬 배양액)을 3 ug의 적절한 항체와 함께 밤새 배양 한 다음, 다시 3시간동안 4 ℃에서 30 ㎕의 protein-A / G beads와 혼합하여 침전시켰다.

[390] 그 후 그 beads를 1ml의 용해 완충액으로 3회 세척 한 후, 시험 관내 PARP분석 또는 면역블롯팅(immunoblotting)을 수행 하였다.

[391]

[392] ***<참고예 3> 베타 카테닌/TCF 전사 리포터 분석(β-catenin/TCF transcription reporter assay)***

[393] SW480세포를 12-well plates에 넣고, pTOPflash 또는 pFOPflash 플라스미드로 형질감염시켰다. 형질감염 효율을 정상화하기 위해, 세포를 pRL-TK 레닐라 루시퍼레이즈 컨트롤 플라스미드(Renilla Luciferase control plasmid)와 같이 형질 감염시켰다.

[394] 형질 감염 후, 세포를 완전배지에서 24시간 동안 배양한 다음, 리포터 용해 완충액(reporter lysis buffer)으로 용해시켰다. 루시퍼레이즈(Luciferase)활성은 듀얼 루시퍼레이즈 리포터 분석(Dual-Luciferase reporter assay, Promega)로 3회 측정 하였다.

[395] 형질감염 효율의 정상화 후에 대조 siRNA군과 비교하여 접지유도(fold induction)로서 데이터가 보고되었다. 접지유도(fold induction)는 실험 활동과 제어 활동의 비율을 말한다.

[396]

[397] **<참고예 4> RNA 서열 분석(RNA Sequence analysis, RNA-Seq analysis)**

[398] siRNA-형질감염 된 HT29세포의 4개 시료를 고처리량 mRNA 서열 분석(high-throughput mRNA sequencing)을 위해 준비하였다. 각 샘플에서 1μg의 RNA를 추출하고 TruSeq RNA Library Preparation kit v2 (Illumina)를 사용하여 mRNA 라이브러리(library)(~300 bp의 삽입 크기)를 만들었다.

[399] 쌍극자 전사체 시퀀싱(Paired-end transcriptome sequencing, 101 bp read length)은 Illumina HiSeq 2500에서 수행되었다. 각 샘플에 대한 판독수(The number of reads)는 6,940만에서 7,480만에 이른다. 시퀀싱 데이터는 GEO 데이터베이스에 기탁되었다 (수탁 번호는 GSE81429).

[400] FastQC와 Fastx-toolkit으로 표준 품질 검사와 트리밍(trimming)을 한 후 MapSplice v2.1.7을 사용하여 RNA 서열 데이터를 인간 게놈 (UCSC의 hg19)에 정렬했다. 판독의 매핑 속도(The mapping rate of reads)는 96.5 - 96.8 % 사이 였고, RSG v1.2.12는 refGene mRNA의 전사체(transcriptome)의 존재량을 추정하는 데 사용되었다.

[401] 다르게 발현된 유전자(Differentially expressed genes, DEG)는 0.05의 FDR 컷오프를 갖는 DESeq2를 사용하여 확인되었다

[402]

[403] **<참고예 5> 시험관 내 PARP 분석 (In vitro PARP assay)**

[404] 면역 복합체 결합 구슬(Immunocomplex-bound beads)를 4μCi의 γ-32 [P] -NAD +를 포함하는 40μl의 분석 완충액(50mM Tris-HCl pH 8.0, 4 mM MgCl 2)에서 25°C, 30분 동안 배양했다. 그 반응은 2 × SDS 샘플 완충액을 첨가함으로서 중단된다. 샘플을 끓인 후 SDS 변성 젤(SDS denaturing gel)을 이용하여 분리한다.

[405] 그 겔은 진공 건조되고 영상판(imaging plate)에서 방사선 촬영되었다. 플레이트에 기록 된 방사능을 판독하고 Fujifilm Bio-imaging Analyzer System (BAS) -3000에 의해 정량화 하였다.

[406]

[407] **<참고예 6> 플라스미드 구축 및 부위-지정 돌연변이(Plasmid construction and site-directed mutagenesis)**

[408] 인간 탄키라제 1(tankyrase-1, TNKS1)의 전체 상보 DNA(full-length complementary DNA)를 포함하는 플라스미드를 Open Biosystems(mRNA accession number, BC098394)로부터 구입하였다. 탄키라제-1(tankyrase-1)의 전체 서열(sequence)를 전방향 및 역방향 프라이머(NotI and BglII 부위에 각각 밑줄이 그어진,

[409] 5'- ATAAGAATGCGGCCGCGGCGGCGTCGCGTCGCTC-3' 및

[410] 5'-GAAGATCTCTAGGTCTTCTGCTCTG-3');를 이용하여 PCR-증폭 하였고, p3×FLAG CMV9 벡터에 삽입하여 플래그-표지 탄키라제 1(FLAG-tagged TNKS1)을 생성 하였다.

[411] 도메인 맵핑 실험을 위해, 다양한 탄키라제 1(tankyrase-1) 단편을 PCR 증폭하고 p3x FLAG CMV9 벡터에 다음의 순방향 및 역방향 프라이머를 사용하여 서브 클로닝 하였다 :

[412] 아미노산 잔기 1-158,
5'-ATAAGAATGCGGCCGCGGCGGCGTCGCGTCGCTC-3 ' 및

[413] 5'-GAAGATCTCTAGGCCGCCTCGGGGCTCTC-3';

[414] 아미노산 잔기 158-595,
5'-ATAAGAATGCGGCCGCCGGAGTTAGCAGCACAGCAC-3 '및

[415] 5'-GAAGATCTCTACAAAGCAGTCTGACCAAGGG-3';

[416] 아미노산 잔기 596-1022,
5'-ATAAGAATGCGGCCGCGCATAGAGCCGCCCTAGCAGG-3 '및

[417] 5'-GAAGATCTCTATCCTTCCTTCCTTTCTGTTCC-3';

[418] 아미노산 잔기 1023-1327,
5'-ATAAGAATGCGGCCGCAGAAGTTGCTGGTCTTGAC-3 '및

[419] 5'-GAAGATCTCTAGGTCTTCTGCTCTG-3 '

[420] (밑줄 친 부분은 NotI 및 BglII 부위)GST-TNKS1 (1023-1327)에 대한 대장균 발현 플라스미드는 Chang-Woo Lee (성균관대 학교 의과 대학)로부터 기증받았다.

[421] Myc-태그 된 siRNA-내성 PrxII WT, C172S 단일 돌연변이체 및 C51/172S 이중 돌연변이체를 발현하는 레트로 바이러스 벡터 (pQ-CXIX)는 전술 한 바와 같이 제조하였다. 아미노산 치환을 위한 부위별 돌연변이(Site-directed mutagenesis)는 QuikChange kit (Stratagene)을 이용하여 수행하였다.

[422] 탄키라제 1(tankyrase-1)에서의 Cys-Ser 치환을 위한 이중 가닥의 프라이머는 다음과 같다 :

[423] C1163S 돌연변이체의 경우,

[424] (sense) 5'-GTTGAGGGAGCGGTTCTCCCACCGACAGAAGGAAG-3';

[425] C1234S 돌연변이체의 경우,

[426] (sense) 5'-GGAGGAGGAACAGGCTCCCCTACACACAAGGAC-3';

[427] C1242S 돌연변이체의 경우,

[428] (sense) 5'-CACAAGGACAGGTCATCCTATATATGTCACAGAC-3';

[429] C1245S 돌연변이체의 경우,

[430] (sense) 5'-CAGGTCATGCTATATATCTCACAGACAAATGCTCTTC-3';

[431] C1252S 돌연변이체의 경우,

[432] (sense) 5'-GACAAATGCTCTTCTCTAGAGTGACCCTTGGG-3'

[433] 인간 PrxII에 대한 Gly-Val 치환을 위한 이중 가닥의 프라이머는 다음과 같다 :

[434] G9V 돌연변이체의 경우, (sense) 5'-GCGCGCATCGTAAAGCCAGCCCCTG-3';

[435] G23V 돌연변이체의 경우, (sense) 5'-GCGGTGGTTGATGTCGCCTTCAAAG-3';

[436] G116V 돌연변이체의 경우, (sense) 5'-CTGAGGATTACGTCGTGCTGAAAAC-3'.

[437] 베타 카테닌 S37A 변이체를 발현하는 레트로 바이러스 pQ 벡터는 이전에 기재된 pBI-EGFP-베타카테닌(S37A) 구조로부터 PCR 서브 클로닝에 의해 제작되었다. 모든 구조 및 돌연변이는 뉴클레오타이드 시퀀싱에 의해 확인되었다.

[438]

[439] **<참고예 7> 아연 측정(Zinc determination)**

[440] 아연 이온은 수용액에서 4-(2-피리디라조)레조르시놀 (4-(2-pyridylazo) resorcinol) (PAR)을 사용하여 관찰된다.

[441] The glutathione S-transferase (GST)-fused TNKS1 PARP(1023-1327) 단백질을 100μM ZnCl2가 보충 된 LB 배지에서 성장시킨 대장균에서 발현시키고, 제조자 프로토콜(GE Healthcare Life Sciences)에 따라 글루타티온 세파로스 4B 고속 흐름 비즈(Glutathione Sepharose 4B Fast Flow beads)를 사용하는 친화성 크로마토그래피(affinity chromatography)에 의해 정제한다.

[442] GST-TNKS1 PARP 단백질의 순도 (> 99.5 %)를 농도 측정법으로 확인한 후, 결합되지 않은 아연 이온을 제거하기 위해 25mM HEPES (pH 7.0) 및 2mM DTT가 함유 된 Chelex100 처리 완충액에서 광범위하게 투석한다.

[443] GST-TANK1 PARP 단백질을 0.1mM PAR을 함유하는 40mM HEPES (pH 7.0) 반응 완충액 200μl에서 30분 동안 500μM H_2O_2와 함께 배양 하였다. PAR2-Zn2+ 복합체의 형성을 UV/VIS 분광 광도계(spectrophotometer, Agilent)로 500nm에서 모니터링 하였다.

[444] 분석에 사용 된 정제된 GST-TNKS1 PARP 단백질의 총 아연 함량은 반응 혼합물에 0.5mM p-클로로머큐리벤조산(p-chloromercuribenzoic acid)를 첨가하여 결정 하였다.

[445]

[446] **<참고예 8> 퍼록시레독신 분석 (Peroxiredoxin assay)**

[447] 퍼록시레독신 분석(peroxidase assay)은 250μm의 NADPH, 1.5μm의 효모 TR,

3μm의 효모 Trx, 재조합 인간 Prx (PrxI, 4.6μM, PrxII, 16.4μm)를 포함하는 200μl 반응 혼합물 및 1mM EDTA를 함유하는 50mM HEPES (pH 7.0), 200μM H_2O_2에서 수행하였다.

[448] 혼합물(마이너스 H_2O_2)을 화합물 1 내지 6 (100μM)의 존재 또는 부재하에 5분간 예비 배양 한 후, H_2O_2를 첨가하여 반응을 개시 하였다. Agilent UV8453 분광 광도계 (Hewlett Packard, USA)에서 340 nm부근의 흡광도 감소에 따라 NADPH산화가 30°C에서 5분간 모니터링 되었다. 초기 반응 속도는 곡선의 선형 부분을 사용하여 계산되었고 분당 산화 된 NADPH의 양으로 표현되었다.

[449]

[450] **<참고예 9> 조직학, 면역 조직 화학 염색 및 면역 형광 염색 (Histology, immunohistochemistry, and immunofluorescence staining)**

[451] 생후 12 주된 수컷 쥐를 이소플루란 가스(isoflurane gas) (N2O : O2 / 70 % : 30 %)의 흡입에 의해 마취시키고, 3.7 % 포름알데히드를 함유하는 헤파린 처리된 식염수로 심장을 관류해 고정(transcardiac perfusion-fixation)시켰다.

[452] 그런 다음 장을 절제하고 소장과 결장의 두 부분으로 잘랐으며 양쪽 모두 세로로 열고 바깥쪽으로 접었다. 접혀진 장은 회전식 마이크로톰(rotary microtome, Leica RM2255)에 의해 파라핀 삽입 및 절편화되었다.

[453] 3개의 연속 조직 절편(Three serial tissue sections, 두께 10μm)을 헤마톡실린과 에오신(hematoxylin and eosin, HE)으로 염색 하였다. 접혀진 장은 즉시 OCT 배지에 묻고, 드라이 아이스로 동결시켰다. 10μm 단면으로 조직을 자르기 위해 냉동조직박절기 cryotome이 사용되었다.

[454] Cryotome은 냉동 조직을 다루는 마이크로톰(microtome)이다. 마이크로톰은 현미경 관찰을 위한 표본을 만들기 위해 시료(試料)를 일정한 두께의 조각으로 자르는 기계를 말한다. Superfrost Plus 슬라이드 (Surgipath Medical Inc. UK)에 놓여져, 상온에서 건조되었으며, 면역 염색(immunostaining)을 위해 해동될 때까지 -80°C에서 유지되었다.

[455] 면역 조직 화학 염색(immunohistochemistry)을 위해 파라핀 절편을 자일렌(xylene)으로 왁스 제거하고 에탄올에서 재수화(rehydrated)하였다. 이어서 항원 검색(Antigen retrieval)은 절편을 시트르산 나트륨 완충액 (pH 6.0)에서 끓여서 수행하였다.

[456] 조직 절편을 4°C에서 48시간 동안 anti-Ki-67 항체 (1:200 희석) 및 친화성-정제(affinity-purified)된 anti-PrxII 항체 (1 : 500 희석)로 배양 하였다. PBS로 3회 세척 한 후, 절편을 퍼옥시다아제 - 결합 2 차 항체(peroxidase-conjugated secondary antibody)와 함께 배양하고, 3,3'-디아미노벤지딘(3,3'- diaminobenzidine, DAB) 기질 용액으로 염색 하였다.

[457] 핵은 헤마톡실린(hematoxylin)으로 더 염색되었다. HistoFAXS 조직 분석 시스템 (HistoFAXS Tissue Analysis System, TissueGnostics, USA)을 사용하여 DAB 염색 이미지를 얻고 정량화 하였다. 면역 형광 염색을 위해, 파라핀 또는

동결 절편을 실온에서 1시간 동안 PBST (0.3 % Triton X-100 in PBS)에서 5 % 정상 토끼 혈청 (Vector Laboratories)으로 차단시켰다.

[458] 절편들은 1 차 항체 (anti- PrxII 항체의 경우 1 : 500 희석, anti- BrdU 항체의 경우 1 : 100 희석)와 함께 4 ℃에서 밤새 배양 하였다. 여러 번 PBST를 세척한 후, 샘플을 실온에서 2시간 동안 Alexa Fluor 568- conjugated donkey anti-rabbit IgG 항체와 배양하였다.

[459] 절편들을 (4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (4',6- diamidino -2 phenylindole, DAPI, Sigma-Aldrich)로 30분 동안 대조 염색하고, Vectashield 장착 배지(Vectashield mounting medium)를 사용하여 장착하였다.

[460] 형광 이미지는 아르곤 및 헬륨-네온 레이저 (Carl Zeiss, Germany)가 장착 된 LSM 51 Meta 공초점(confocal) 현미경을 사용하여 100x 배율에서 조직 단면 당 3개의 무작위 장(fields)에서 얻어졌다.

[461]

[462] **<참고예 10> 통계 분석(Statistical analysis)**

[463] 달리 명시되지 않는 한, 통계적 유의성(statistical significance, P값)을 결정하기 위해, 데이터는 두 그룹 간의 비교를 위한 the Student's t-test 또는 여러 그룹 (Windows의 경우 SPSS 12.0K, 미국 일리노이, SPSS)은 투키 사후검증(Tukey's honestly significant difference, 또는 Tukey-HSD, 또는 Tukey test)을 사용하여 분산분석(Analysis of Variance, ANOVA)으로 분석되었다. $P < 0.05$경우 통계적으로 의미가 있다고 간주되었다.

[464]

[465] **<참고예 11> 데이터 가용성(Data availability)**

[466] 이 연구 결과를 뒷받침하는 RNA 서열(sequencing) 데이터는 GEO(유전자 발현 옴니버스, Gene Expression Omnibus DB, GEO DB) 데이터베이스 (수탁 번호 : GSE81429)에 기탁되어 있다.

[467]

[468] **<시약>**

[469] 항균제 (mouse monoclonal, B-5-1-2, 1 : 8000, T5168) 및 anti-FLAG 항체 (mouse monoclonal, M2, 1 : 1000, F3165)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

[470] β-catenin (rabbit monoclonal, 6B3, 1 : 1000, 9582), Axin1 (rabbit monoclonal, C76H11, 1 : 1000, 2087), pS33 / 37pT41-β-catenin (rabbit polyclonal, 1 : 1000,9561), Axin2 (rabbit monoclonal, 76G6, 1 : 1000, 2151), GSK3β (rabbit monoclonal, 27C10, 1 : 1000, 9315), β-actin (rabbit monoclonal, 13E5, 1 : 1000, 4970) 및 cyclin D1 (rabbit polyclonal , 1 : 1000, 2922)에 대한 항체는 Cell Signaling Technology에서 구입하였다.

[471] c-Myc (rabbit polyclonal, 1:1000, sc-788), 유비퀴틴 (mouse monoclonal, P4D1, 1 : 1000, sc-8017), pY279 / 216-GSK3β (rabbit polyclonal, 1 : 1000, sc-135653) 및 tankyrase-1 / 2 (rabbit polyclonal, 1 : 1000, H-350)는 Santa Cruz Biotechnology에서

구입하였다.

[472] anti-active β-catenin (mouse monoclonal, 8E7, 1 : 1000, 05-665) 및 anti-Myc (agmouse monoclonal, 9E10, 1 : 1000, 05-419) 및 anti-APC (mouse monoclonal, FE9, : 1000, ABC202) 항체는 Millipore에서 구입하였다.

[473] Alexa Fluor 568 접합 당나귀(Alexa Fluor 568-conjugated donkey) anti-rabbit IgG (1 : 200, A-21206) 및 anti-β-TrCP (mouse monoclonal, 1B1D2, 1 : 1000, 37-3400) 항체는 Invitrogen에서 구입하였다.

[474] Poly (ADP-ribose) 사슬을 검출하는 anti-PAR 항체 (rabbit polyclonal, 1 : 2000, 551813)는 BD Bioscience에서 구입하였다.

[475] anti-Ki-67 항체 (rabbit monoclonal, SP6, 1 : 200, MA5-14520)는 Thermo Fisher Scientific으로부터 구입하였다.

[476] 이전에 기술 된 바와 같이 PrxI (1 : 3000), PrxII (1 : 3000) 및 Prx-SO 2/3 (1 : 1000)에 대한 토끼 polyclonal 항체를 생산하였다.

[477] rabbit anti-PrxII 항혈청을 재조합 PrxII 단백질과 agarose gel beads로 affinity-purification 하고 면역 형광(immunofluorescence)및 근접 연결 분석(proximity ligation assays, PLA)에 사용 하였다.

[478] Wnt3a는 R & D Biosystems에서 구입하였다.

[479] DuoLink in situ fluorescence시약은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

[480] TissueFocus 결장암 조직 Microarray는 OriGene Technologies (Rockville, USA)에서 구입하였다

[481]

[482] 전술한 본 발명의 실시예는 이해를 돕기 위하여 도면에 도시된 실시예를 참고로 설명되었으나, 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 분야에서 통상적 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 타 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서, 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구범위에 의해 정해져야 할 것이다.

[483]

[484]

산업상 이용가능성

[485] 본 발명의 일 실시형태에 따르면 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하여 대장암 세포의 산화 환원 시스템을 조절하여 대장 용종을 감소시키고 대장암 치료 또는 예방이 가능한 조성물이 제공될 수 있다.

[486] 본 발명의 일 실시형태에 따르면 APC 돌연변이 세포의 세포질에서 PrxII와 탄키라제의 상호작용을 감소시킴으로서 대장 용종을 감소시키고 대장암의 치료 또는 예방이 가능한 약학적 조성물이 제공될 수 있다.

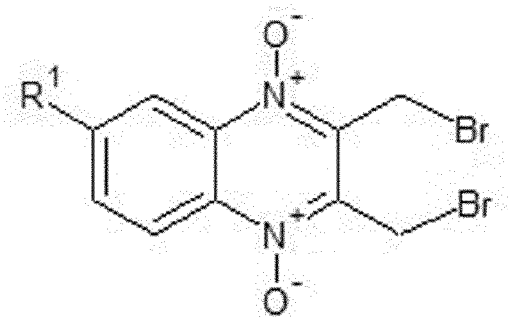
[487]

[488]

청구범위

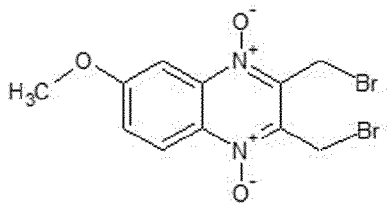
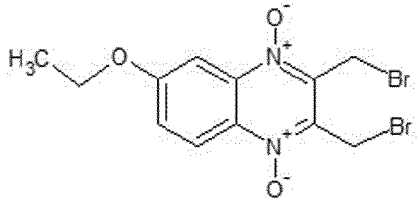
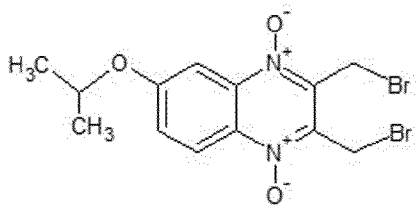
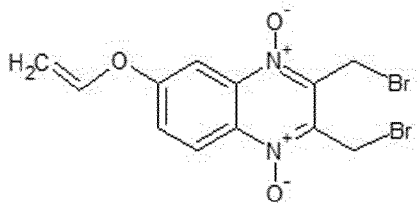
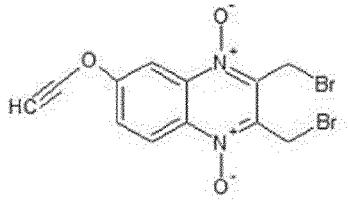
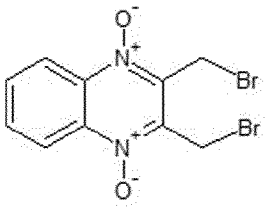
[청구항 1] 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하는 물질을 유효 성분으로 포함하는 대장암 치료용 약학적 조성물

[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하는 물질은 하기 화학식 1로 표시되는 물질로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인 대장암 치료용 약학적 조성물
[화학식 1]



상기 화학식 1에서
R1은 -O-R2 또는 사이클릭화합물 또는 -H로 이루어진 화합물이고,
R2는 C1 내지 C8 이고 분지 또는 분지가 아닌 알킬기(Alkyl), 또는 치환 또는 비치환이면서 방향족 또는 비방향족인 사이클릭화합물, -CH=CH2 또는 알릴기(Allyl)로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것임.

[청구항 3] 제 1 항에 있어서, 상기 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하는 물질은 아래 화합물-1 내지 화합물-6으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것인 대장암 치료용 약학적 조성물

화합물-1	
화합물-2	
화합물-3	
화합물-4	
화합물-5	
화합물-6	

[청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하는 물질은 베타 카테닌(β-catenin) 분해를 증가시키는 것인 대장암 치료용 약학적 조성물

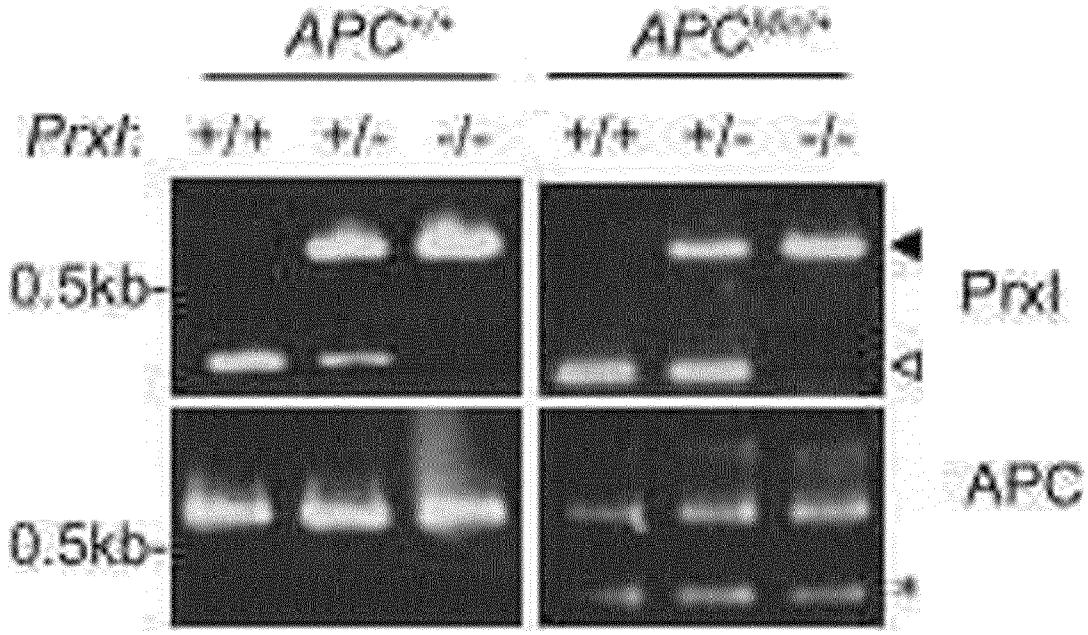
[청구항 5] 제 1 항에 있어서,
상기 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하는 물질은 탄키라제에 의한 Axin1의 분해를 감소시키는 것인 조성물

[청구항 6] 제 1 항에 있어서,
상기 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하는 물질은
탄키라제(Tankyrase, TNKS)의 산화적 불활성화를 증가시키는 것인
조성물

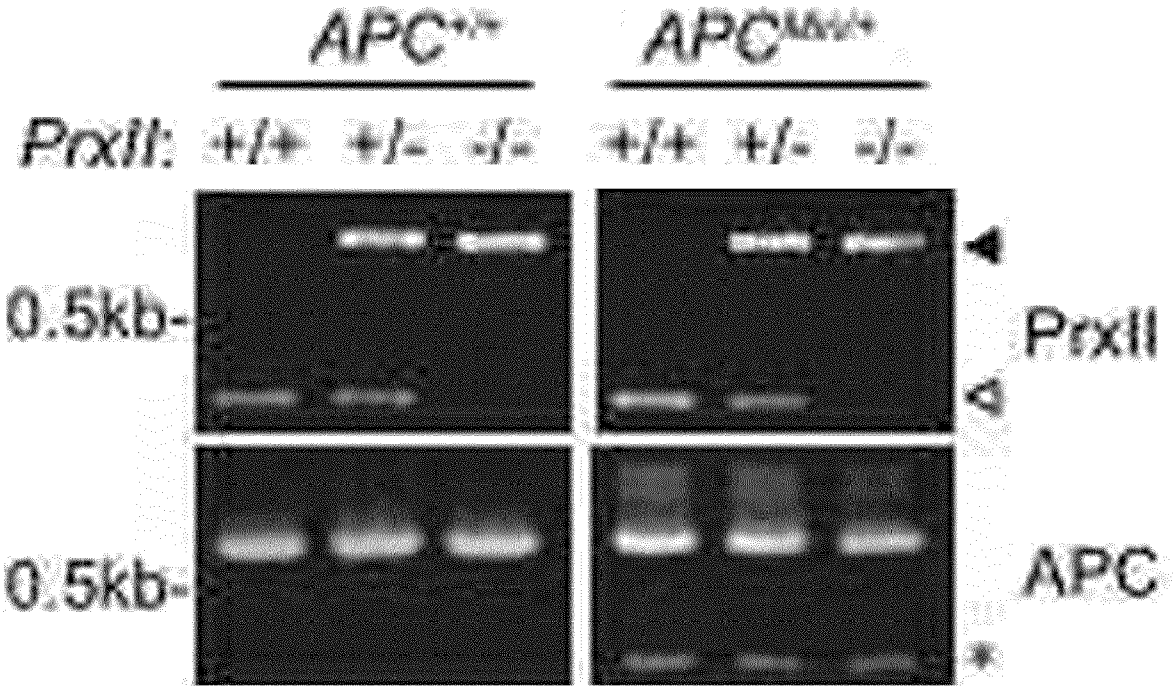
[청구항 7] 제 5 항에 있어서,
상기 탄키라제(Tankyrase, TNKS)의 산화적 불활성화는 APC 돌연변이
세포의 세포질 내에서 일어나는 것인 조성물

[청구항 8] 제 1 항에 있어서,
상기 퍼록시레독신 2의 효소 활성을 억제하는 물질은 APC 돌연변이
세포의 세포질에서 퍼록시레독신 2와 탄키라제(Tankyrase, TNKS)의
상호작용을 감소시키는 조성물

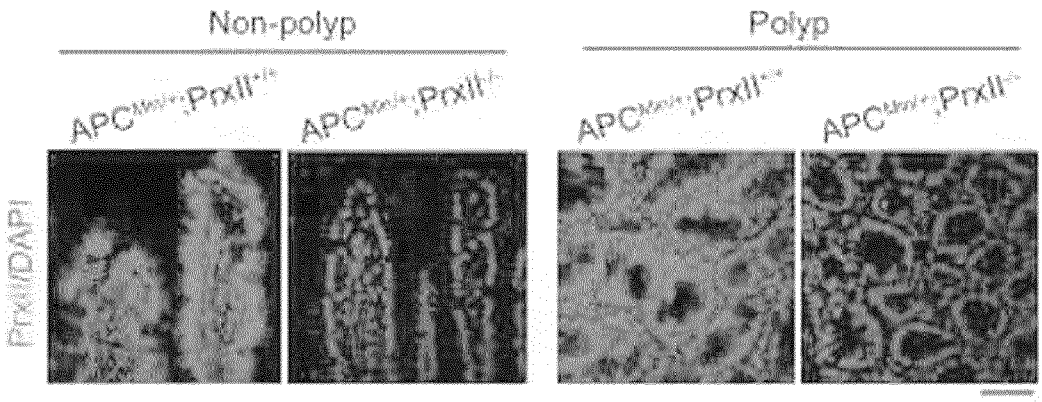
[도1]


APC+/+
APCMin/+
Prxl: +/+ +/- -/- +/+ +/- -/-
0.5kb-
Prxl
0.5kb-
APC

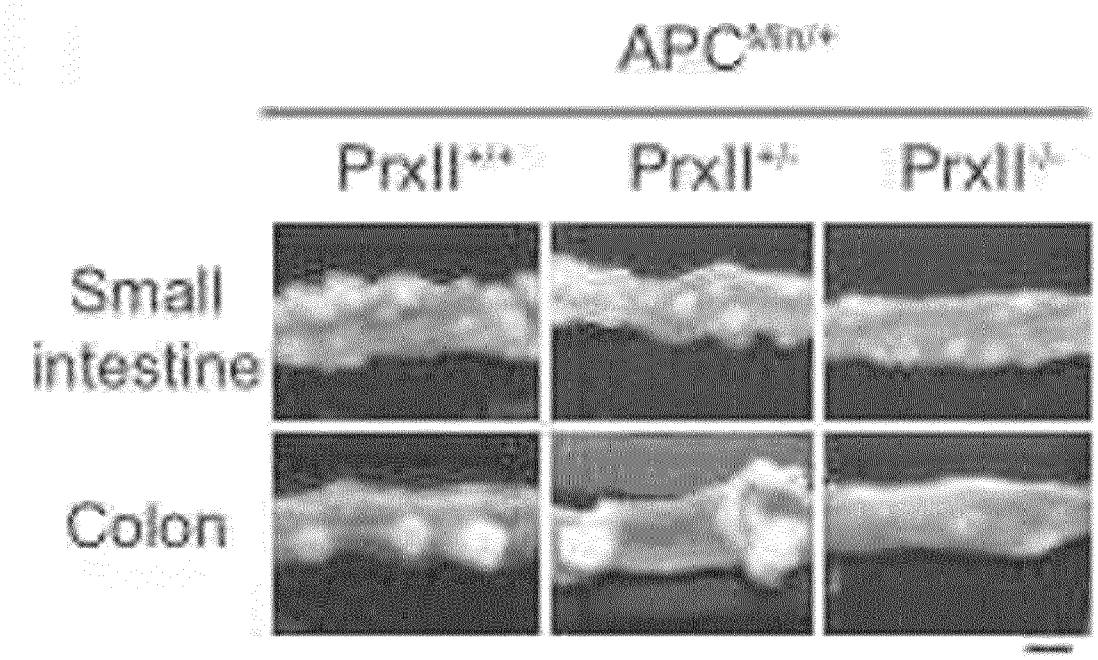
[도2]


APC+/+
APCMin/+
Prxll: +/+ +/- -/- +/+ +/- -/-
0.5kb-
Prxll
0.5kb-
APC

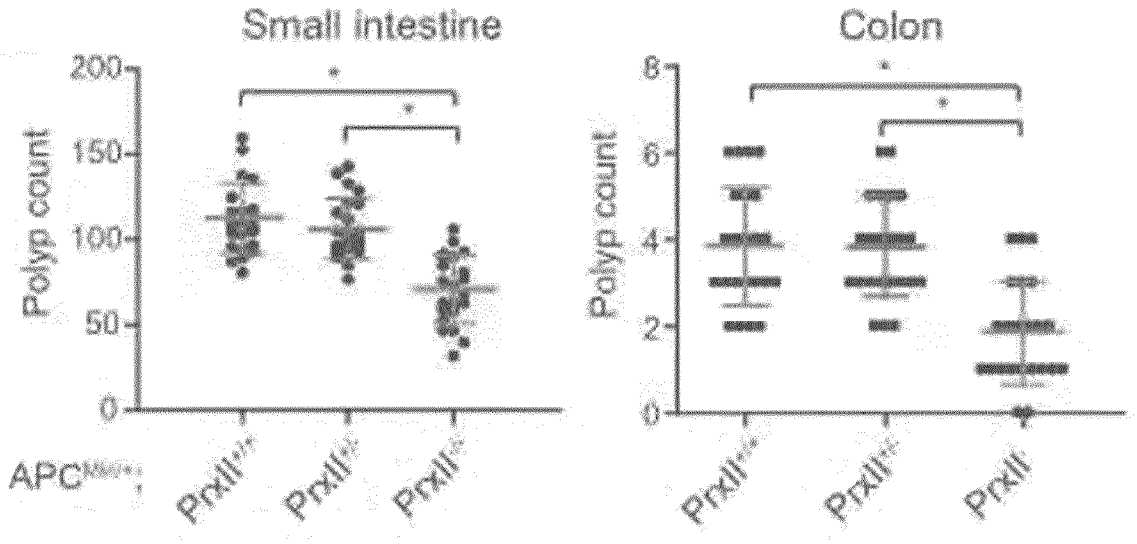
[도3]



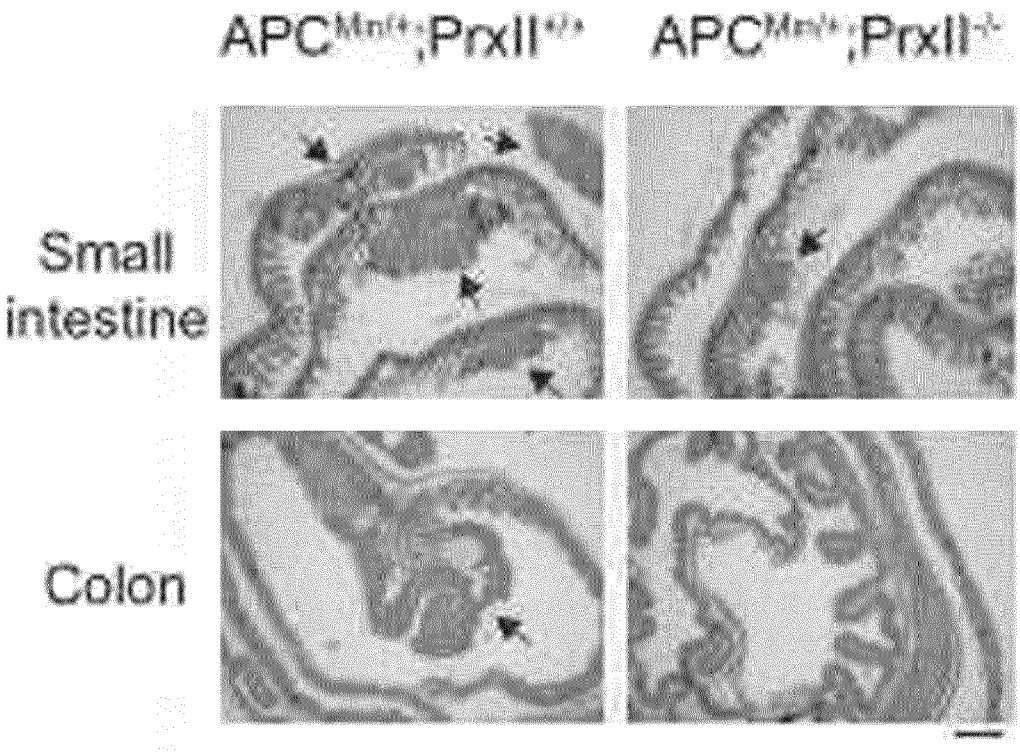
[도4]



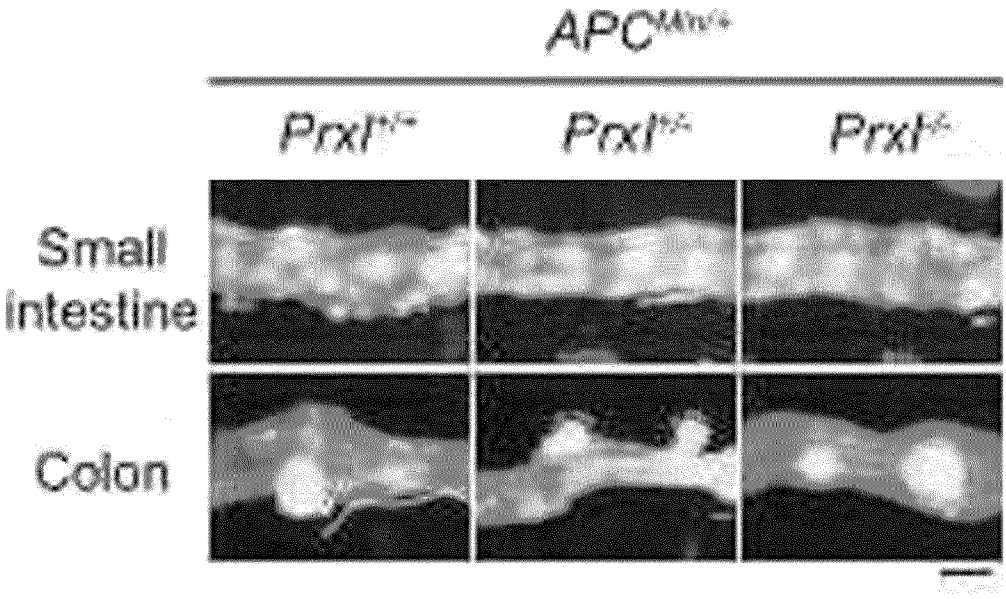
[도5]


Small intestine
Colon
Polyp count
200
150
100
50
0
8
6
4
2
0
*
*
APC
Prxll
Prxll
Prxll

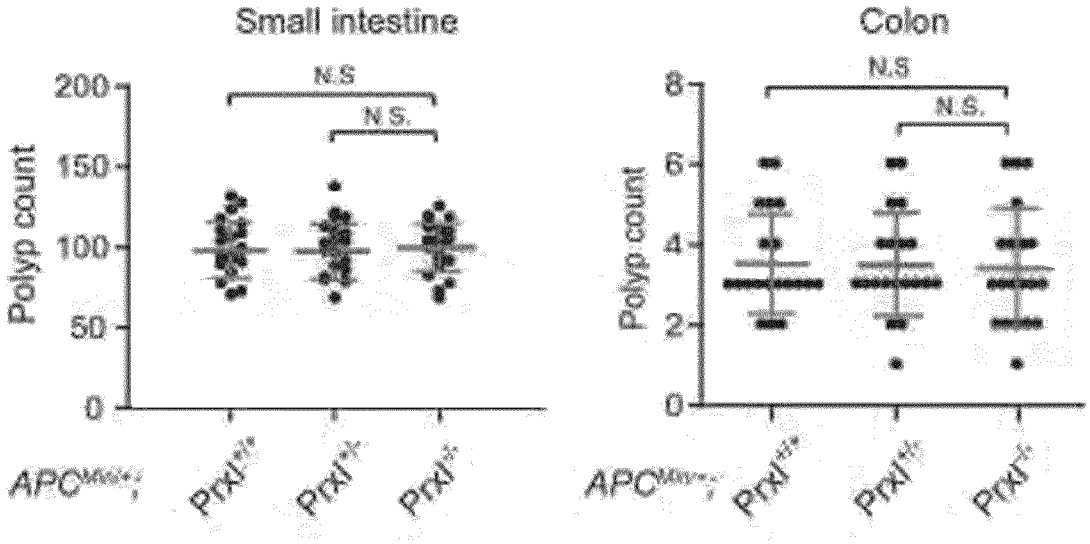
[도6]


APC;Prxll
APC;Prxll
Small intestine
Colon

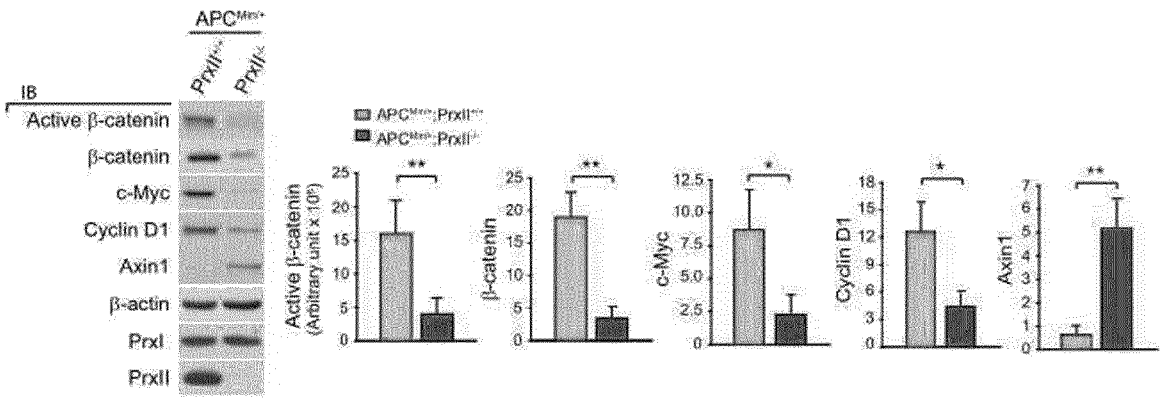
[도7]


APC
Prxl
Prxl
Prxl
Small Intestine
Colon

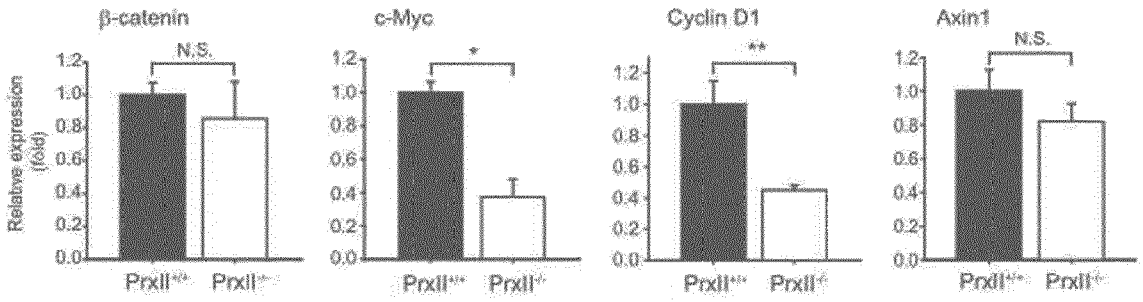
[도8]


Small intestine
Colon
Polyp count
N.S
N.S.
200
150
100
50
0
8
6
4
2
0

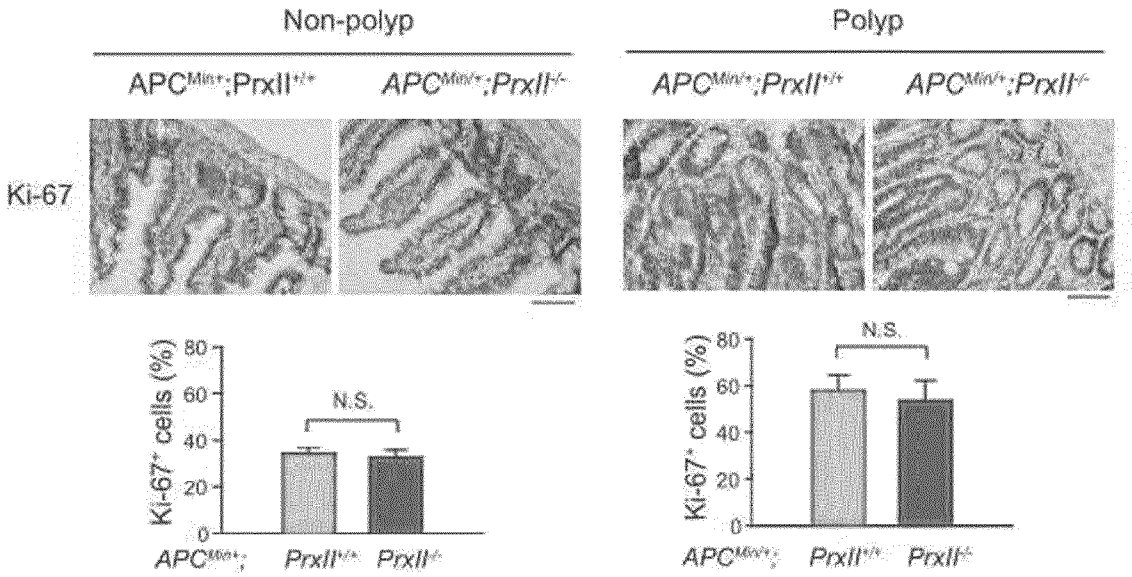
[도9]


IB
Active β-catenin
β-catenin
c-Myc
Cyclin D1
Axin1
β-actin
Prxl
PrxII
Active β-catenin (Arbitrary unit x 10⁶)
β-catenin
c-Myc
Cyclin D1
Axin1

[도10]


β-catenin
c-Myc
Cyclin D1
Axin1
Relative expression (fold)
N.S.
*
**
N.S.
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
PrxII+/+
PrxII-/-

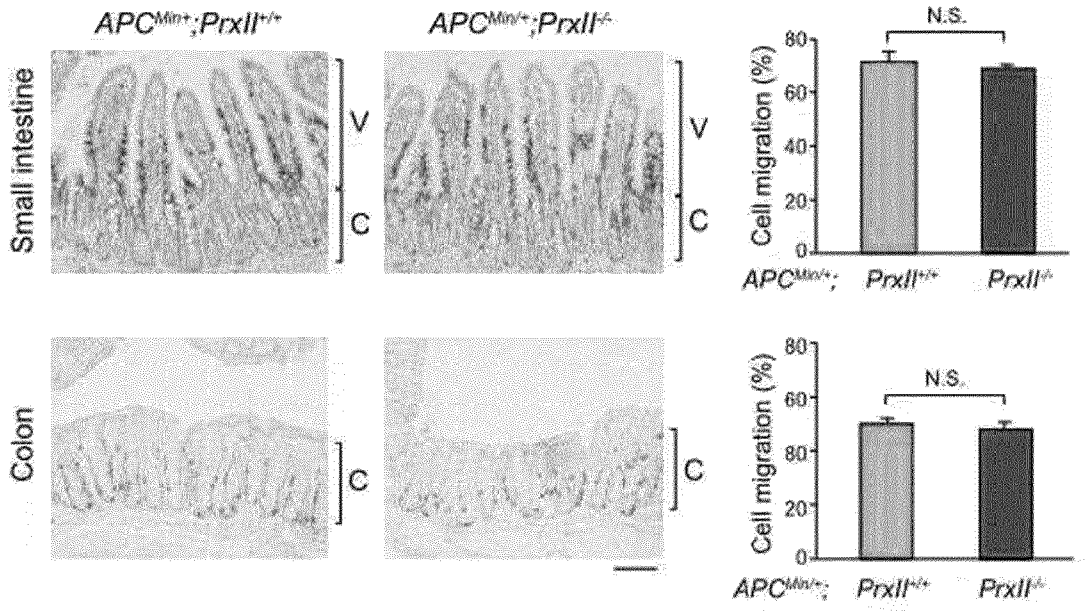
[도11]


Non-polyp
Polyp
APCMin/+;PrxII+/+
APCMin/+;PrxII-/-
Ki-67
Ki-67+ cells (%)
N.S.
80
60
40
20
0
APCMin/+;
PrxII+/+
PrxII-/-

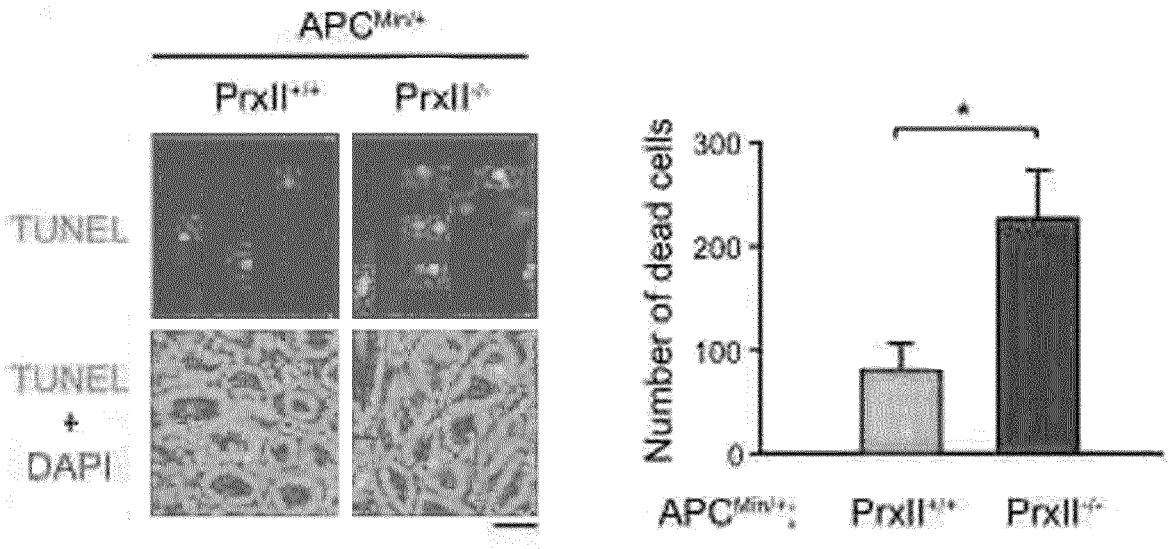
[도12]


APCMin/+;PrxII+/+
APCMin/+;PrxII-/-
BrdU/DAPI
BrdU+ cells (%)
N.S.
30
20
10
0
APCMin/+;
PrxII+/+
PrxII-/-

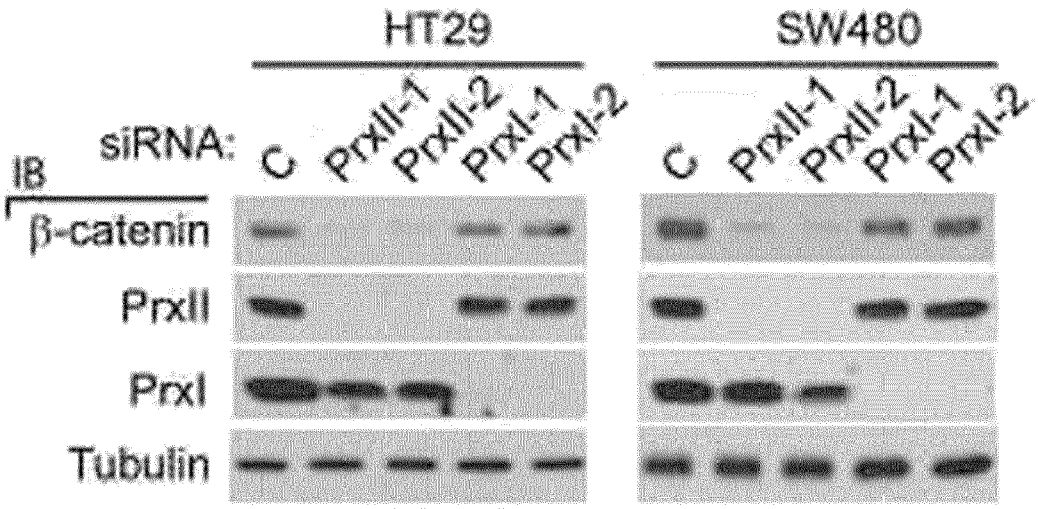
[도13]


APCMin/+;Prxll+/+
APCMin/+;Prxll-/-
Small intestine
V
C
Colon
N.S.
Cell migration (%)
0
20
40
60
80
APCMin/+; Prxll+/+ Prxll-/-

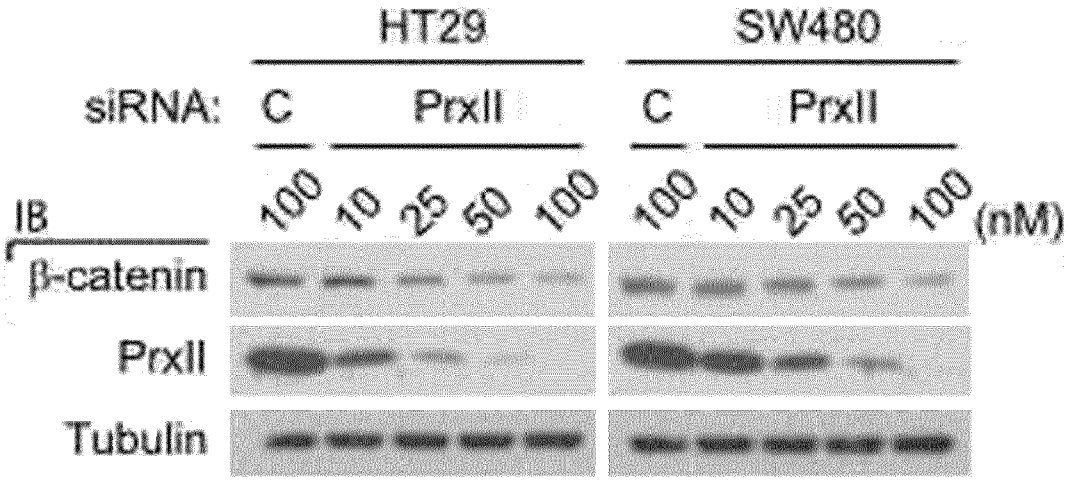
[도14]


APCMin/+
Prxll+/+
Prxll-/-
TUNEL
TUNEL + DAPI
*
Number of dead cells
0
100
200
300
APCMin/+; Prxll+/+ Prxll-/-

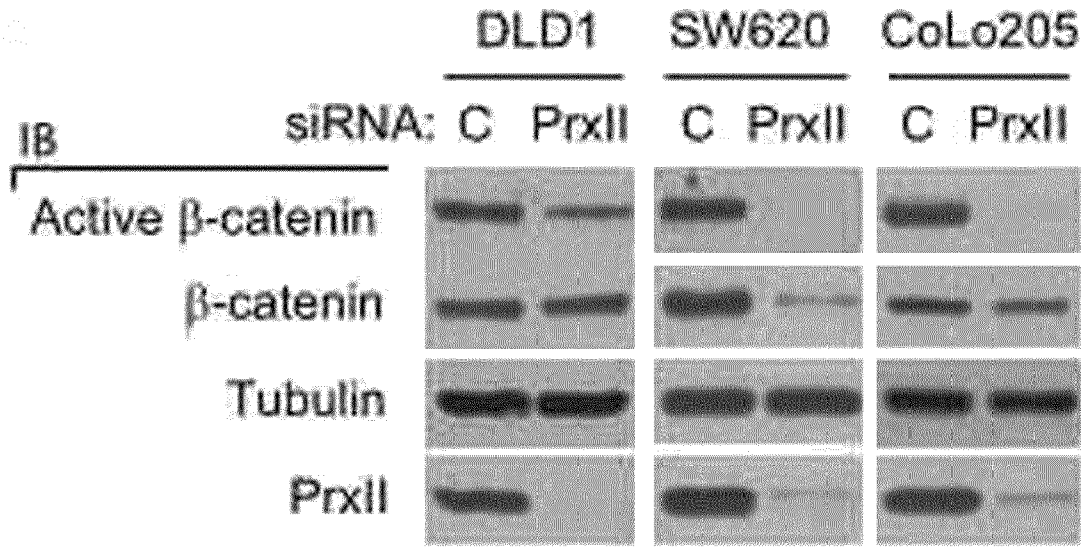
[도15]


HT29
SW480
siRNA:
C
PrxII-1
PrxII-2
PrxI-1
PrxI-2
IB
β-catenin
PrxII
PrxI
Tubulin

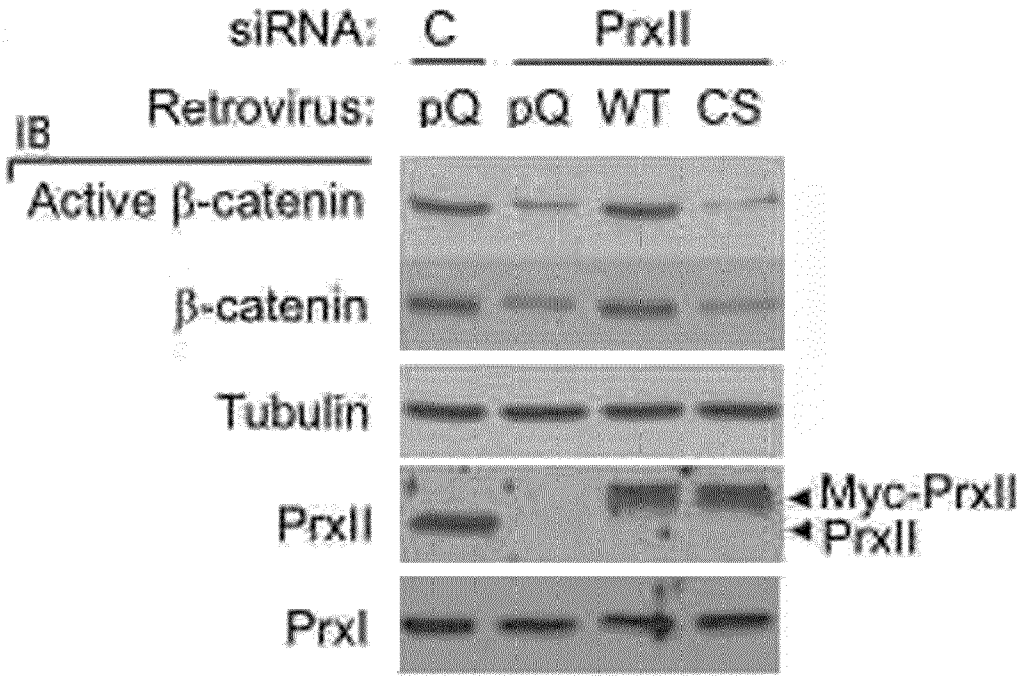
[도16]


HT29
SW480
siRNA:
C
PrxII
100
10
25
50
100
(nM)
IB
β-catenin
PrxII
Tubulin

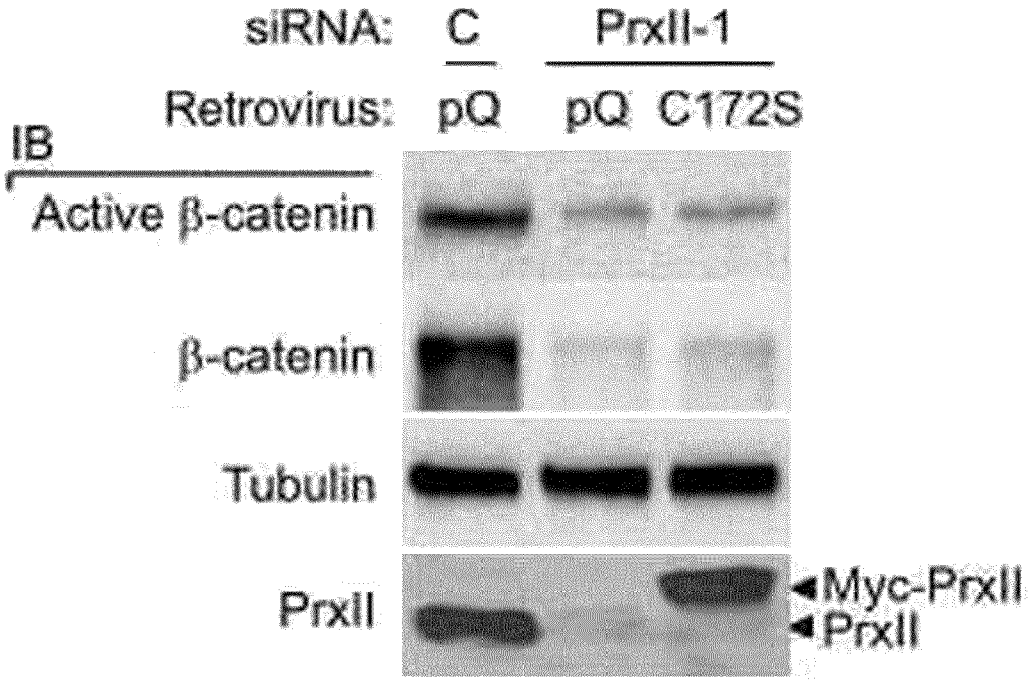
[도17]


DLD1
SW620
CoLo205
siRNA: C PrxII C PrxII C PrxII
IB
Active β-catenin
β-catenin
Tubulin
PrxII

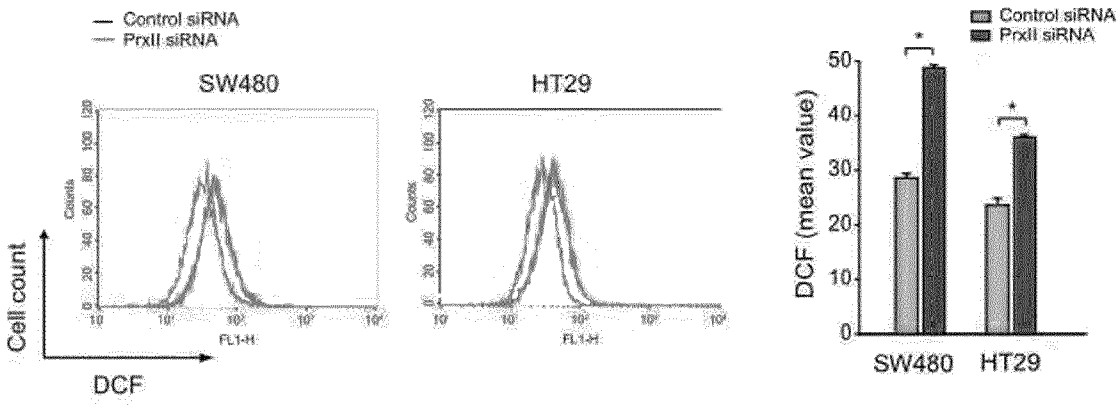
[도18]


siRNA: C PrxII
Retrovirus: pQ pQ WT CS
IB
Active β-catenin
β-catenin
Tubulin
PrxII
PrxI
Myc-PrxII
PrxII

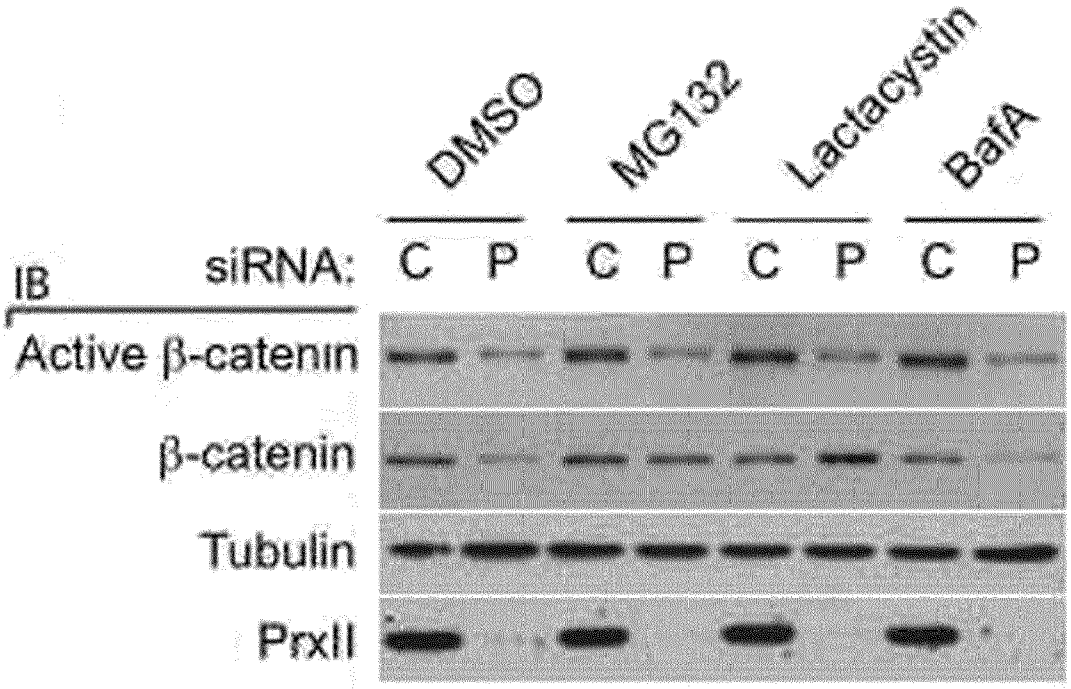
[도19]


siRNA: C PrxII-1
Retrovirus: pQ pQ C172S
IB
Active β-catenin
β-catenin
Tubulin
PrxII
Myc-PrxII
PrxII

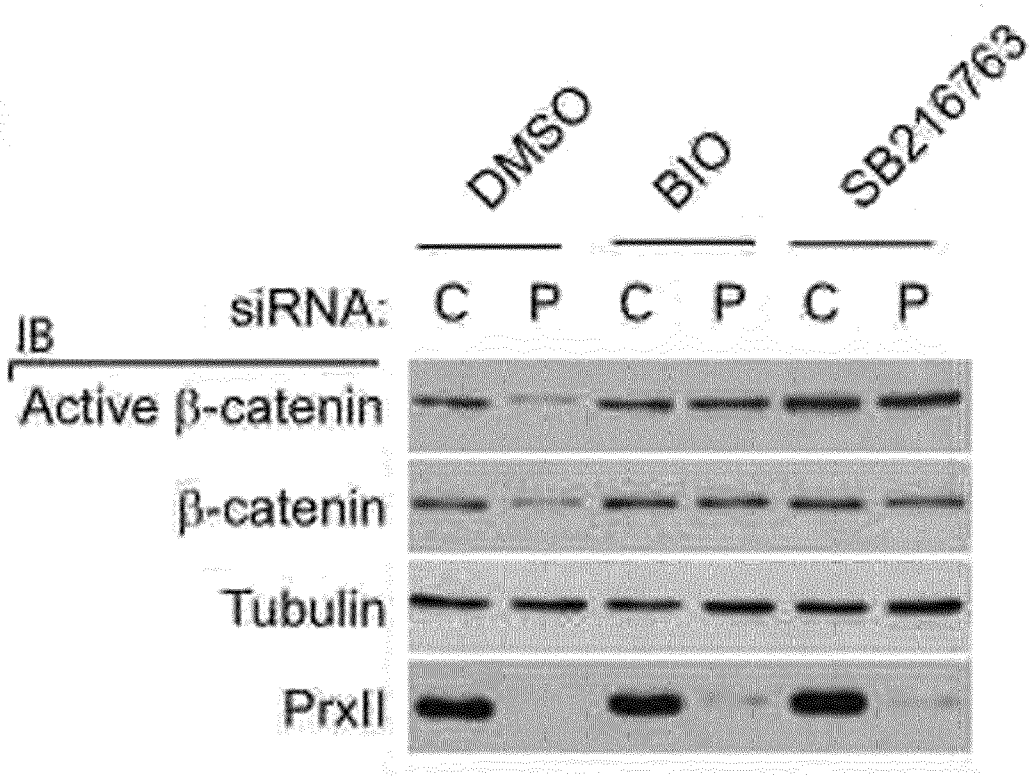
[도20]


Control siRNA
PrxII siRNA
SW480
HT29
Cell count
DCF
FL1-H
Counts
Control siRNA
PrxII siRNA
DCF (mean value)
SW480
HT29

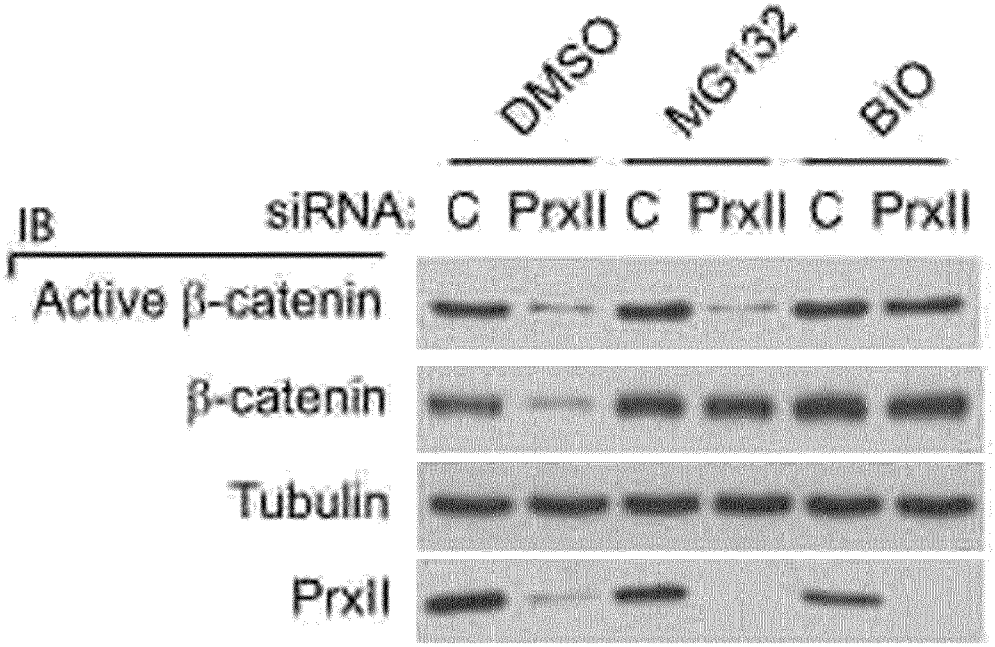
[도21]


DMSO
MG132
Lactacystin
BafA
siRNA:
C P C P C P C P
IB
Active β-catenin
β-catenin
Tubulin
PrxII

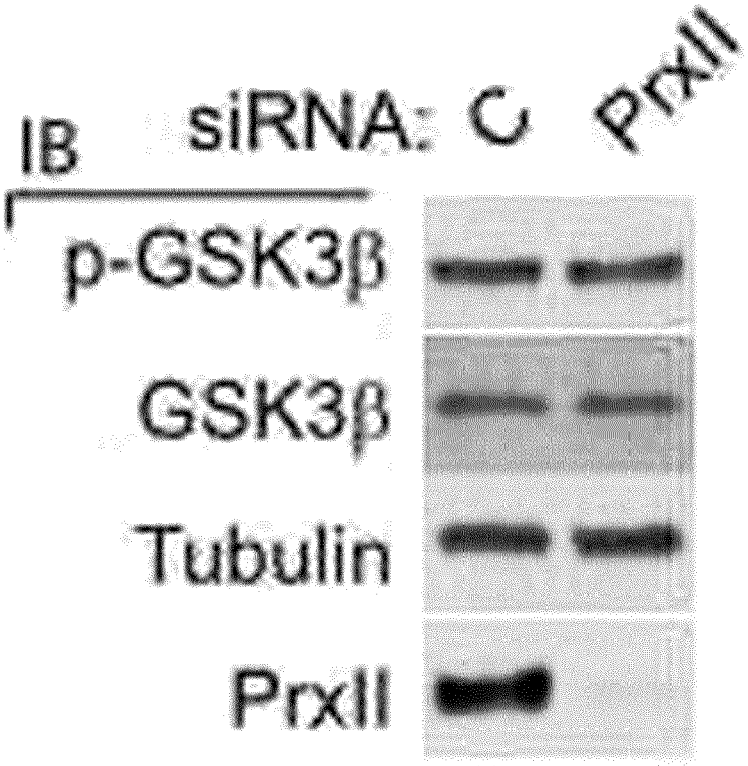
[도22]


DMSO
BIO
SB216763
siRNA:
C P C P C P
IB
Active β-catenin
β-catenin
Tubulin
PrxII

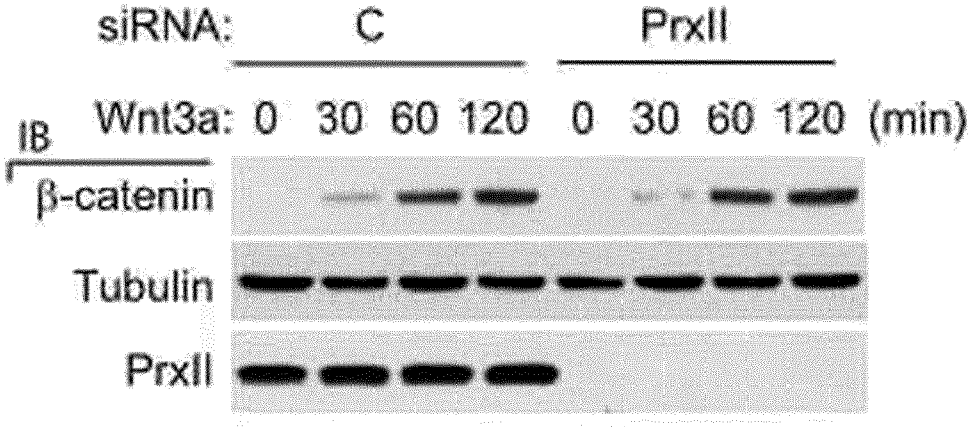
[도23]


DMSO
MG132
BIO
siRNA: C PrxII C PrxII C PrxII
IB
Active β-catenin
β-catenin
Tubulin
PrxII

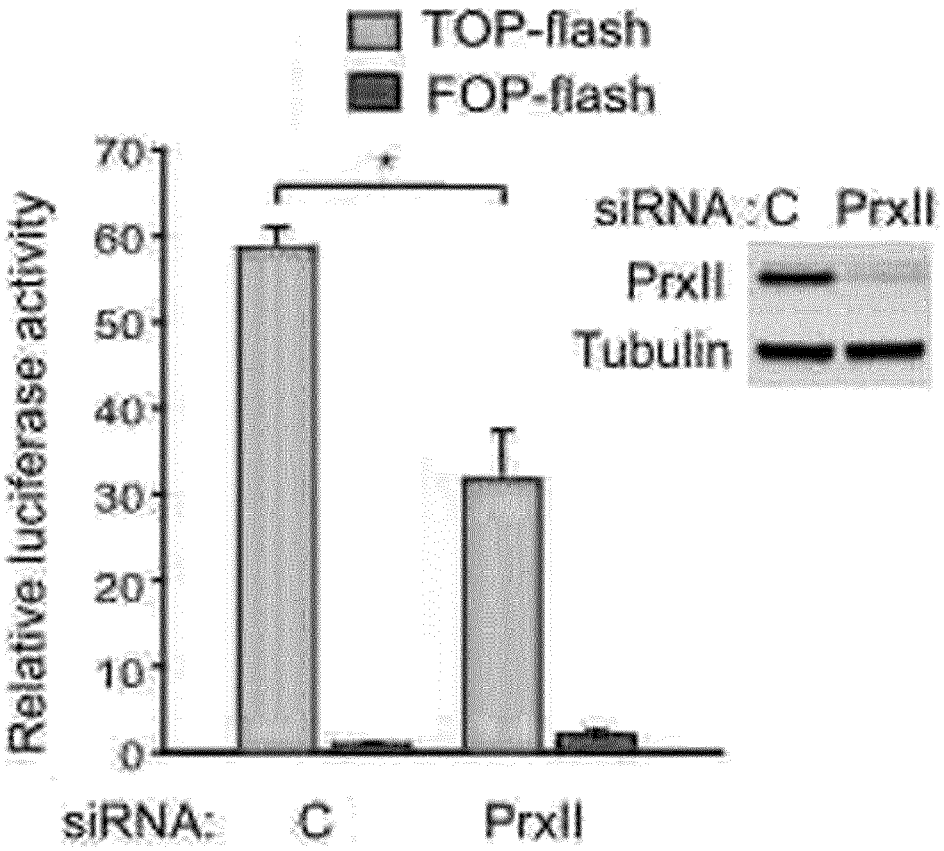
[도24]


siRNA: C PrxII
IB
p-GSK3β
GSK3β
Tubulin
PrxII

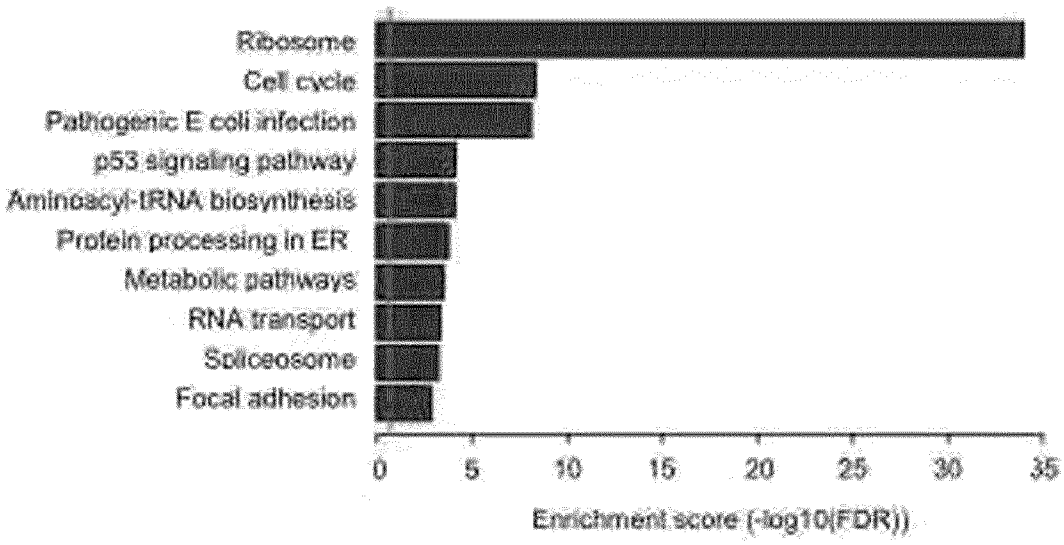
[도25]


siRNA: C PrxII
Wnt3a: 0 30 60 120 0 30 60 120 (min)
IB
β-catenin
Tubulin
PrxII

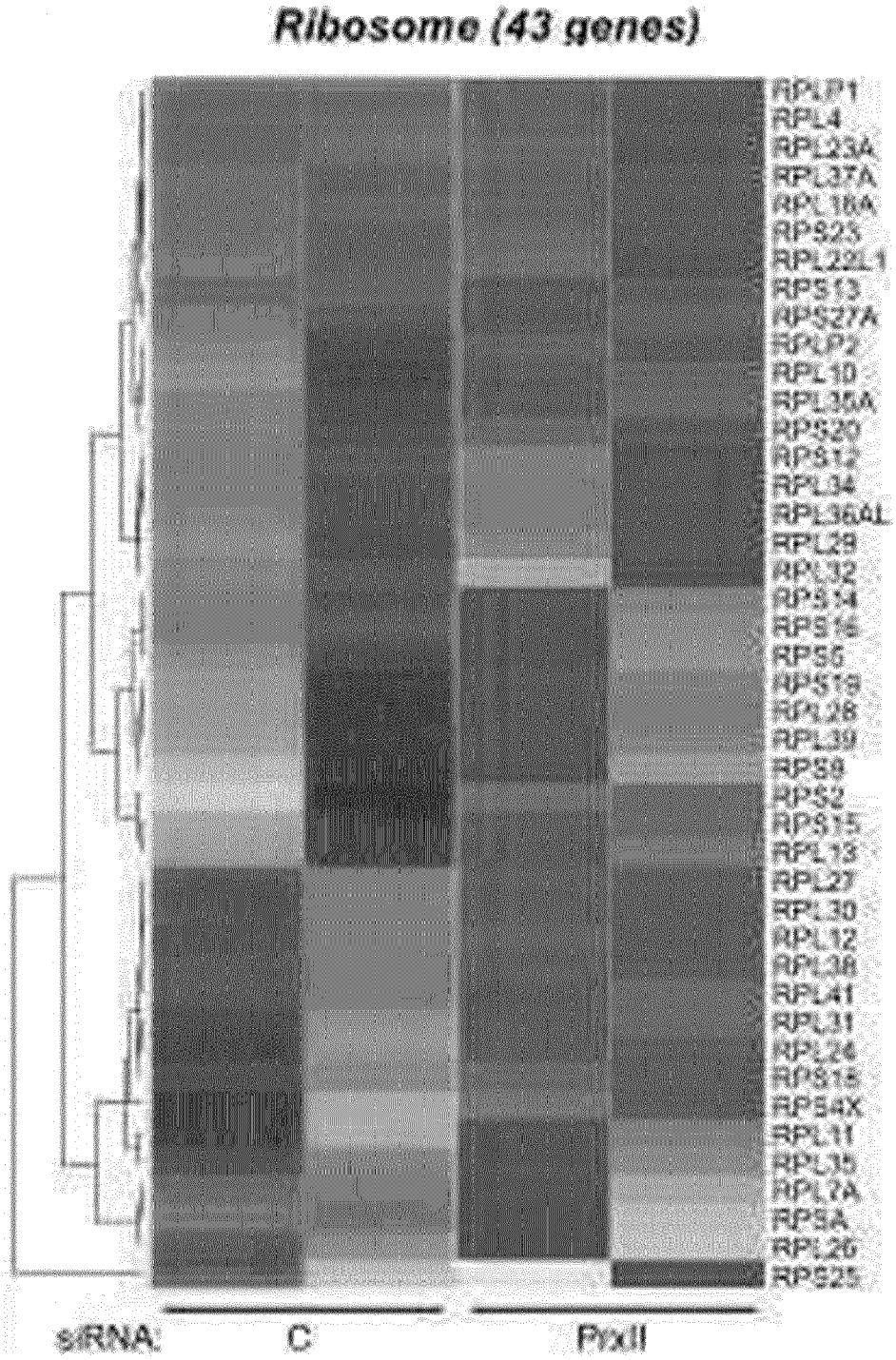
[도26]


TOP-flash
FOP-flash
Relative luciferase activity
70
60
50
40
30
20
10
0
siRNA: C PrxII
PrxII
Tubulin
siRNA: C PrxII

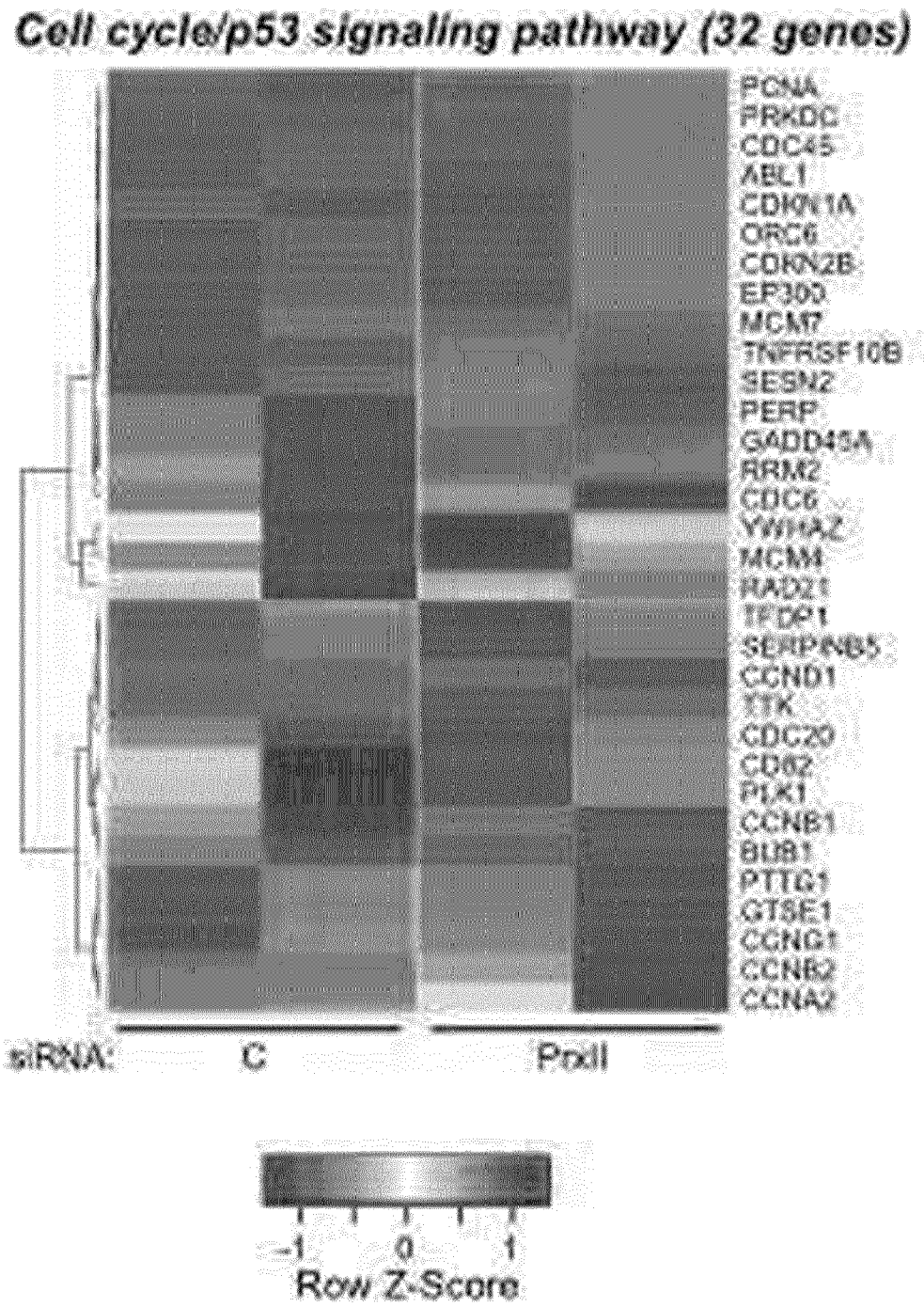
[도27]


Ribosome
Cell cycle
Pathogenic E coli infection
p53 signaling pathway
Aminoacyl-tRNA biosynthesis
Protein processing in ER
Metabolic pathways
RNA transport
Spliceosome
Focal adhesion
0
5
10
15
20
25
30
35
Enrichment score (-log10(FDR))

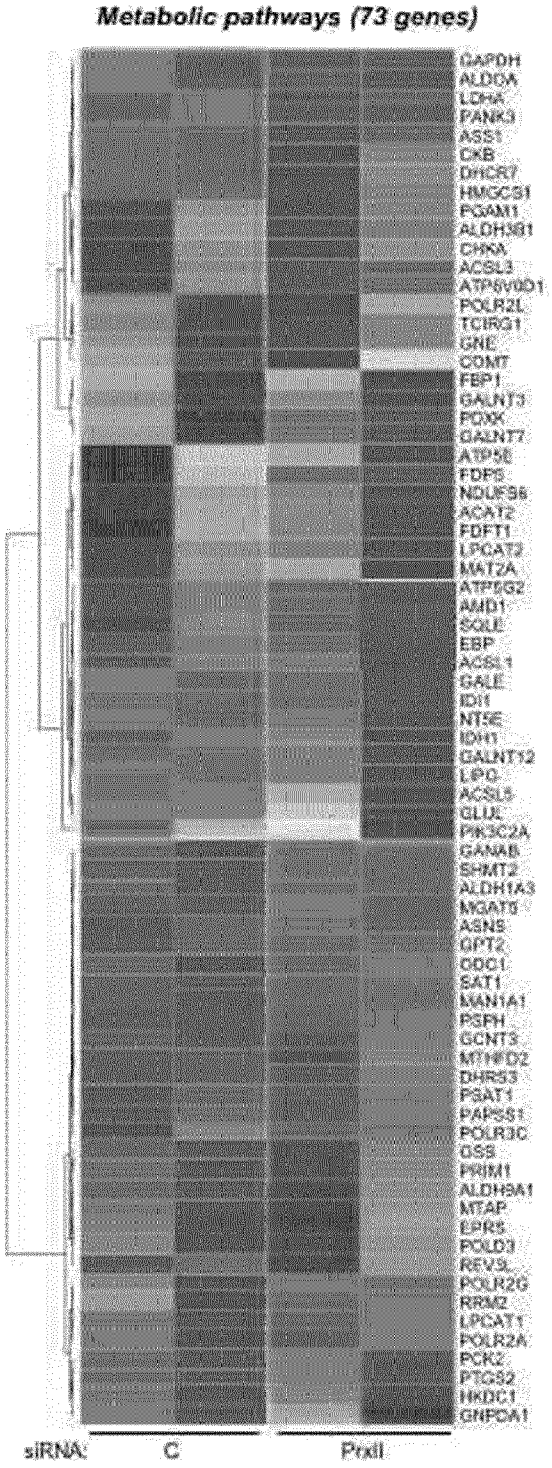
[도28]


Ribosome (43 genes)
RPLP1
RPL4
RPL23A
RPL37A
RPL18A
RPS23
RPL22L1
RPS13
RPS27A
RPLP2
RPL10
RPL35A
RPS20
RPS12
RPL34
RPL36AL
RPL29
RPL32
RPS14
RPS16
RPS6
RPS19
RPL28
RPL39
RPS9
RPS2
RPS15
RPL13
RPL27
RPL30
RPL12
RPL36
RPL41
RPL31
RPL24
RPS18
RPS4X
RPL11
RPL35
RPL7A
RPSA
RPL26
RPS25
siRNA:
C
PyxII

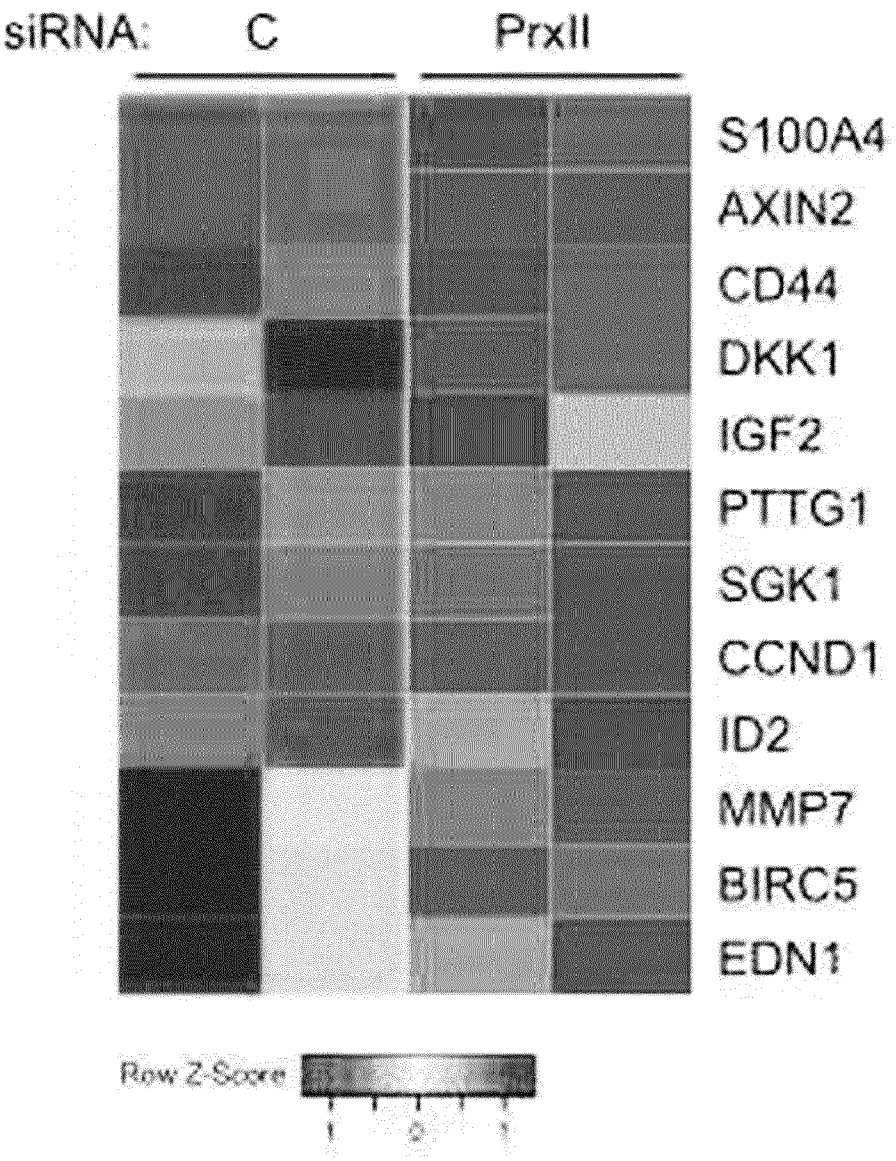
[도29]


Cell cycle/p53 signaling pathway (32 genes)
PCNA
PRKDC
CDC45
ABL1
CDKN1A
ORC6
CDKN2B
EP300
MCM7
TNFRSF10B
SESN2
PERP
GADD45A
RRM2
CDC6
YWHAZ
MCM4
RAD21
TFDP1
SERPINB5
CCND1
TTK
CDC20
CD82
PLK1
CCNB1
BUB1
PTTG1
GTSE1
CCNG1
CCNB2
CCNA2
siRNA:
C
PolII
−1
0
1
Row Z-Score

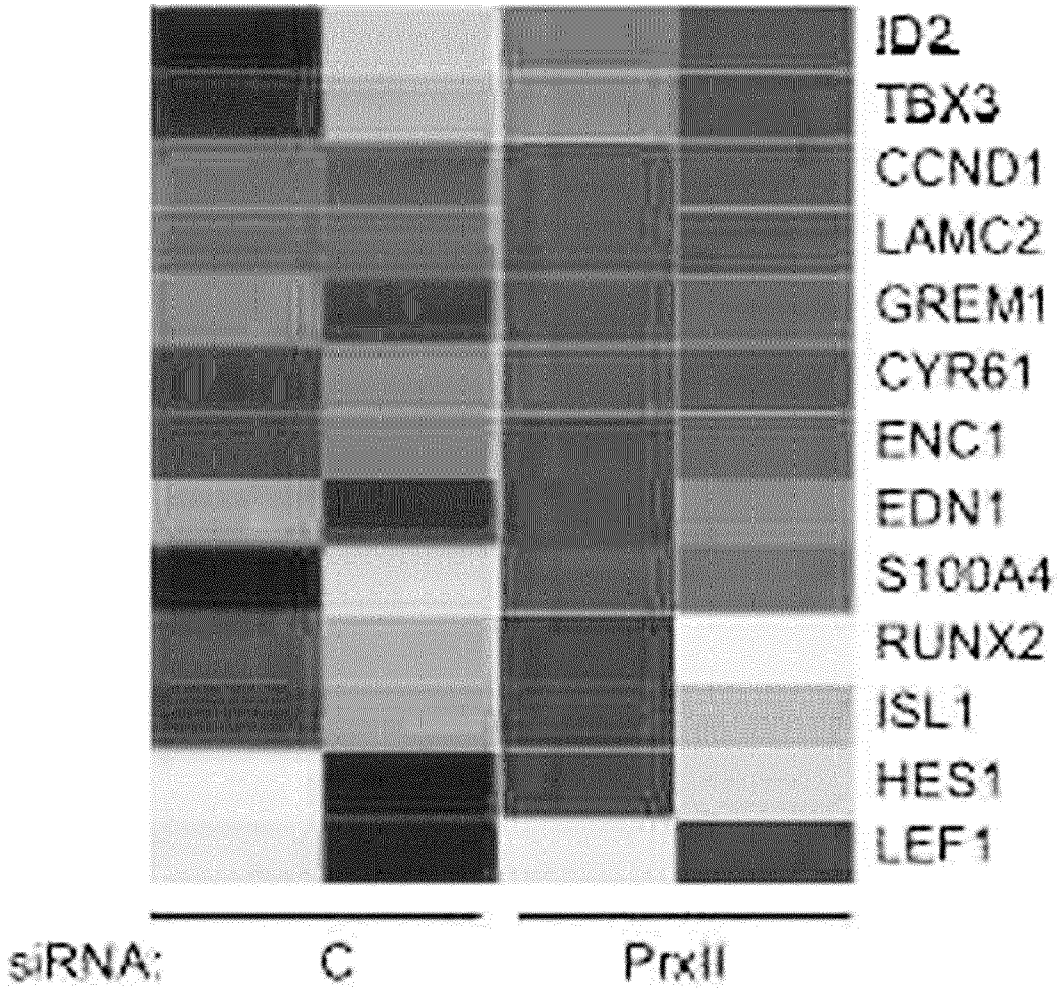
[도30]


Metabolic pathways (73 genes)
GAPDH
ALDOA
LDHA
PANK3
ASS1
CKB
DHCR7
HMGCS1
PGAM1
ALDH3B1
CHKA
ACSL3
ATP6V0D1
POLR2L
TCIRG1
GNE
COMT
FBP1
GALNT3
POXK
GALNT7
ATP5E
FDPS
NDUFS6
ACAT2
FDFT1
LPCAT2
MAT2A
ATP5G2
AMD1
SQLE
EBP
ACSL1
GALE
IDI1
NT5E
IDH1
GALNT12
LIPG
ACSL5
GLUL
PIK3C2A
GANAB
SHMT2
ALDH1A3
MGAT5
ASNS
GPT2
ODC1
SAT1
MAN1A1
PSPH
GCNT3
MTHFD2
DHRS3
PSAT1
PAPSS1
POLR3C
GSS
PRIM1
ALDH9A1
MTAP
EPRS
POLD3
REV3L
POLR2G
RRM2
LPCAT1
POLR2A
PCK2
PTGS2
HKDC1
GNPDA1
siRNA:
C
PrxII

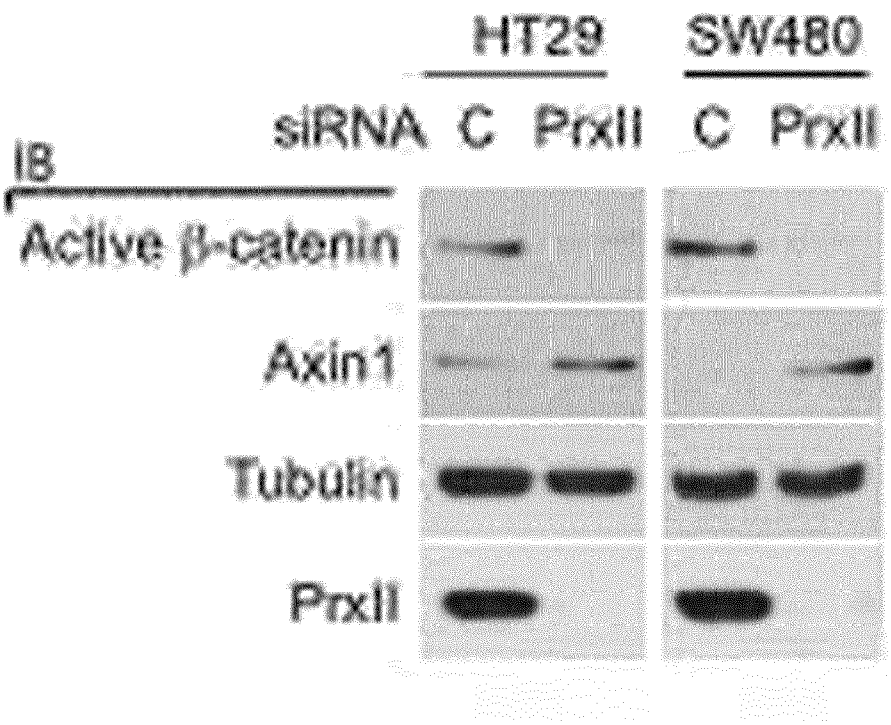
[도31]


siRNA:
C
PrxII
S100A4
AXIN2
CD44
DKK1
IGF2
PTTG1
SGK1
CCND1
ID2
MMP7
BIRC5
EDN1
Row Z-Score
1
0
1

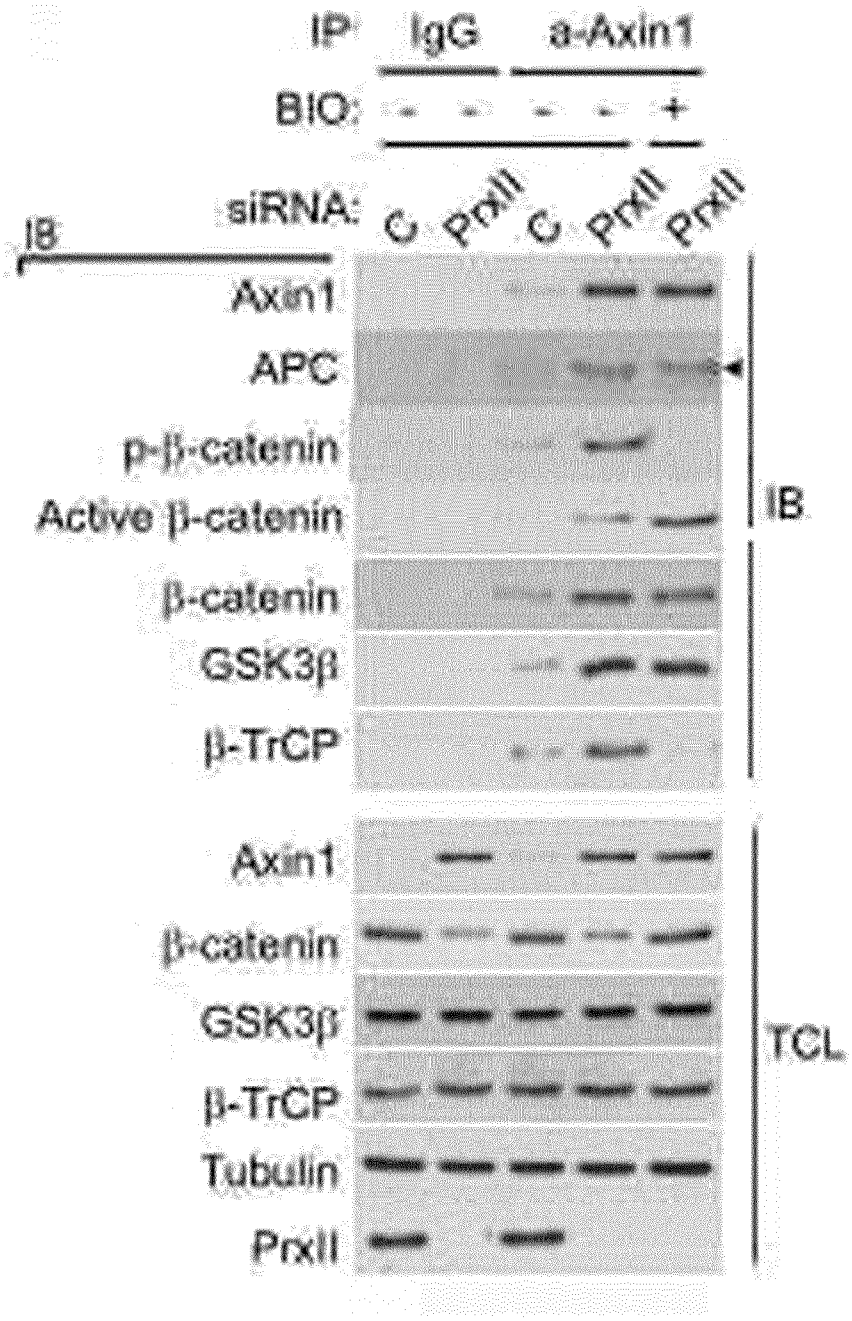
[도32]


ID2
TBX3
CCND1
LAMC2
GREM1
CYR61
ENC1
EDN1
S100A4
RUNX2
ISL1
HES1
LEF1
siRNA:
C
PrxII

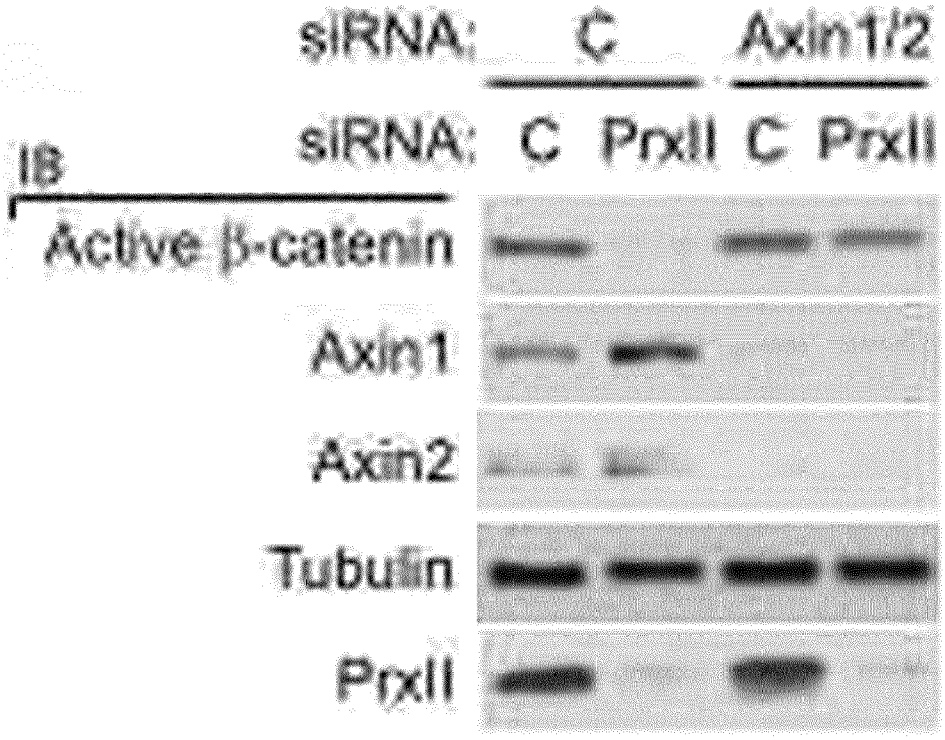
[도33]


HT29
SW480
siRNA C PrxII C PrxII
IB
Active β-catenin
Axin1
Tubulin
PrxII

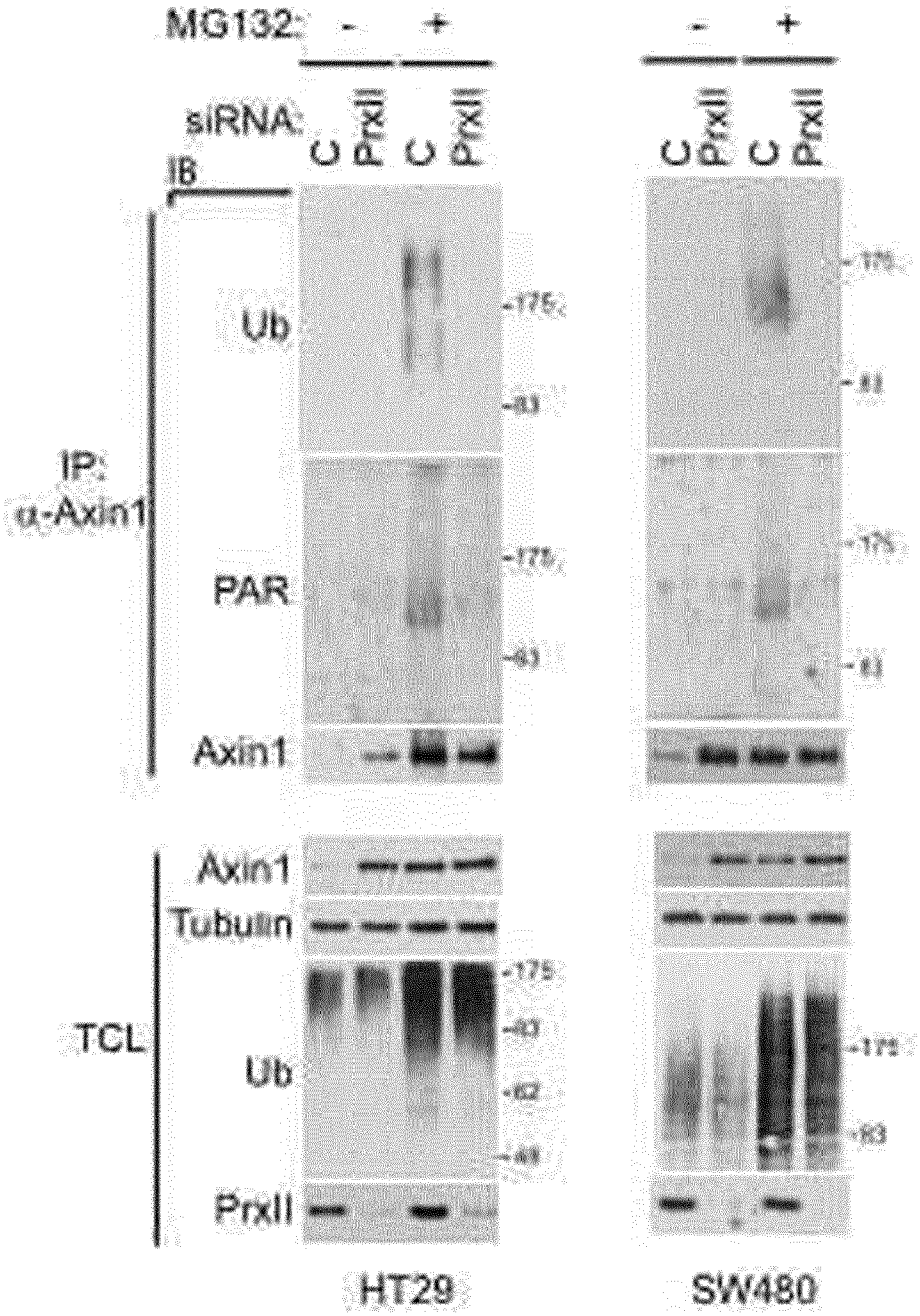
[도34]


IP
IgG
a-Axin1
BIO:
siRNA:
C
PrxII
C
PrxII
PrxII
IB
Axin1
APC
p-β-catenin
Active β-catenin
β-catenin
GSK3β
β-TrCP
IB
Axin1
β-catenin
GSK3β
β-TrCP
Tubulin
PrxII
TCL

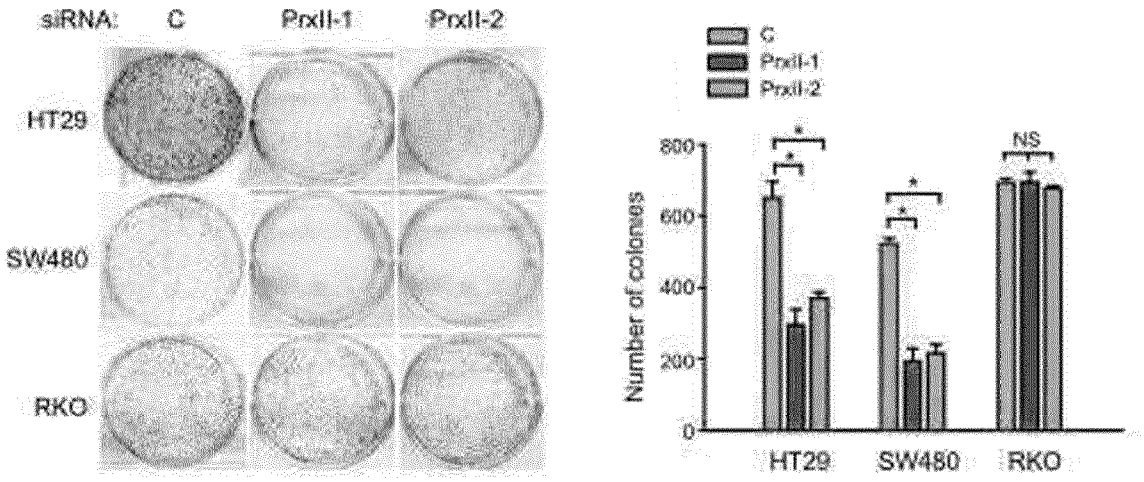
[도35]


siRNA: C Axin1/2
siRNA: C PrxII C PrxII
IB
Active β-catenin
Axin1
Axin2
Tubulin
PrxII

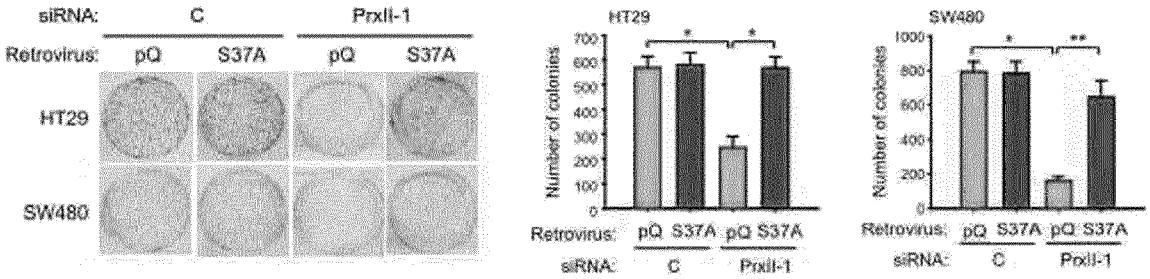
[도36]


MG132:
siRNA:
IB
IP:
α-Axin1
Ub
PAR
Axin1
TCL
Axin1
Tubulin
Ub
PrxII
HT29
SW480

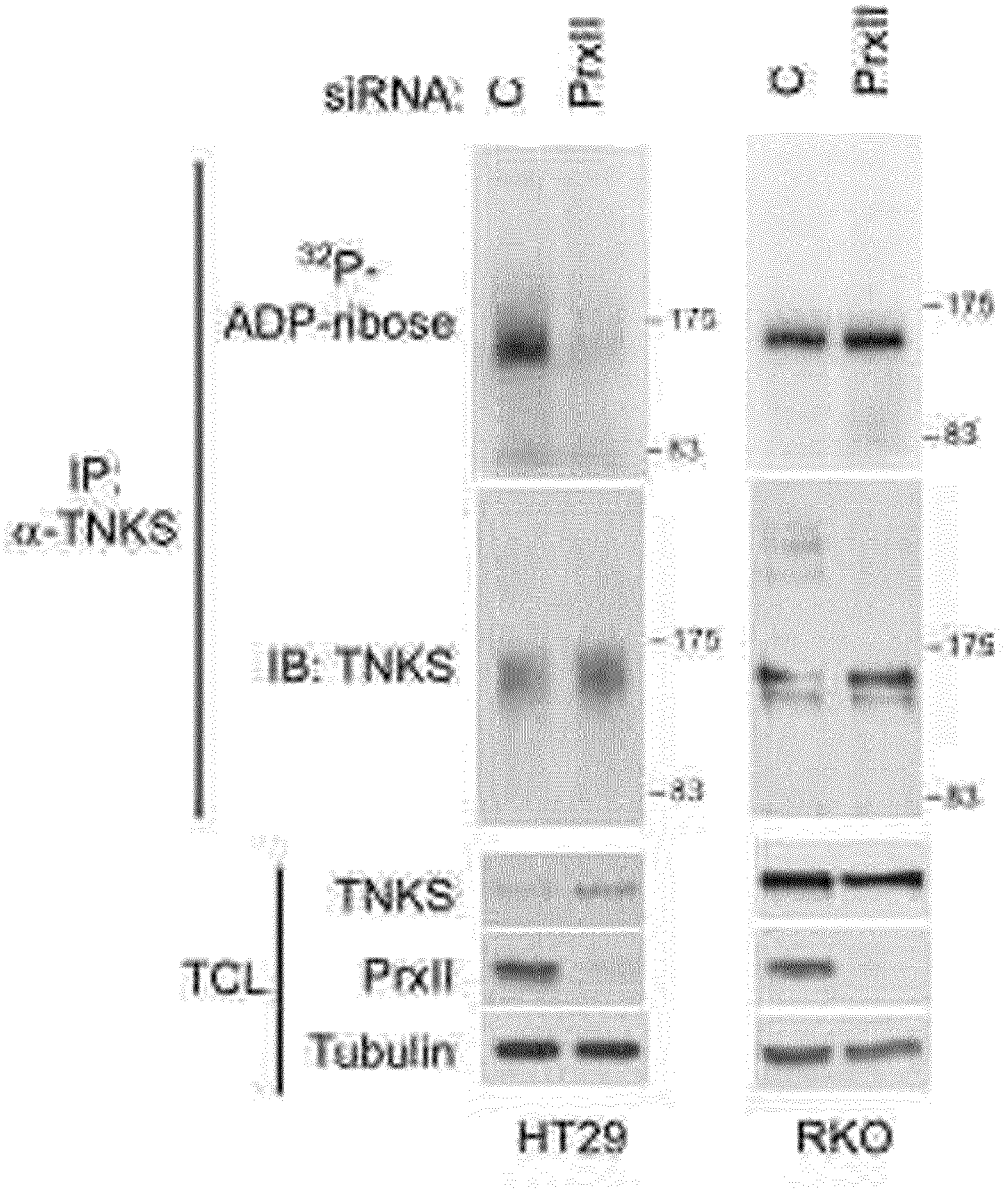
[도37]


siRNA: C PrxII-1 PrxII-2
HT29
SW480
RKO
C
PrxII-1
PrxII-2
Number of colonies
800
600
400
200
0
NS
HT29
SW480
RKO

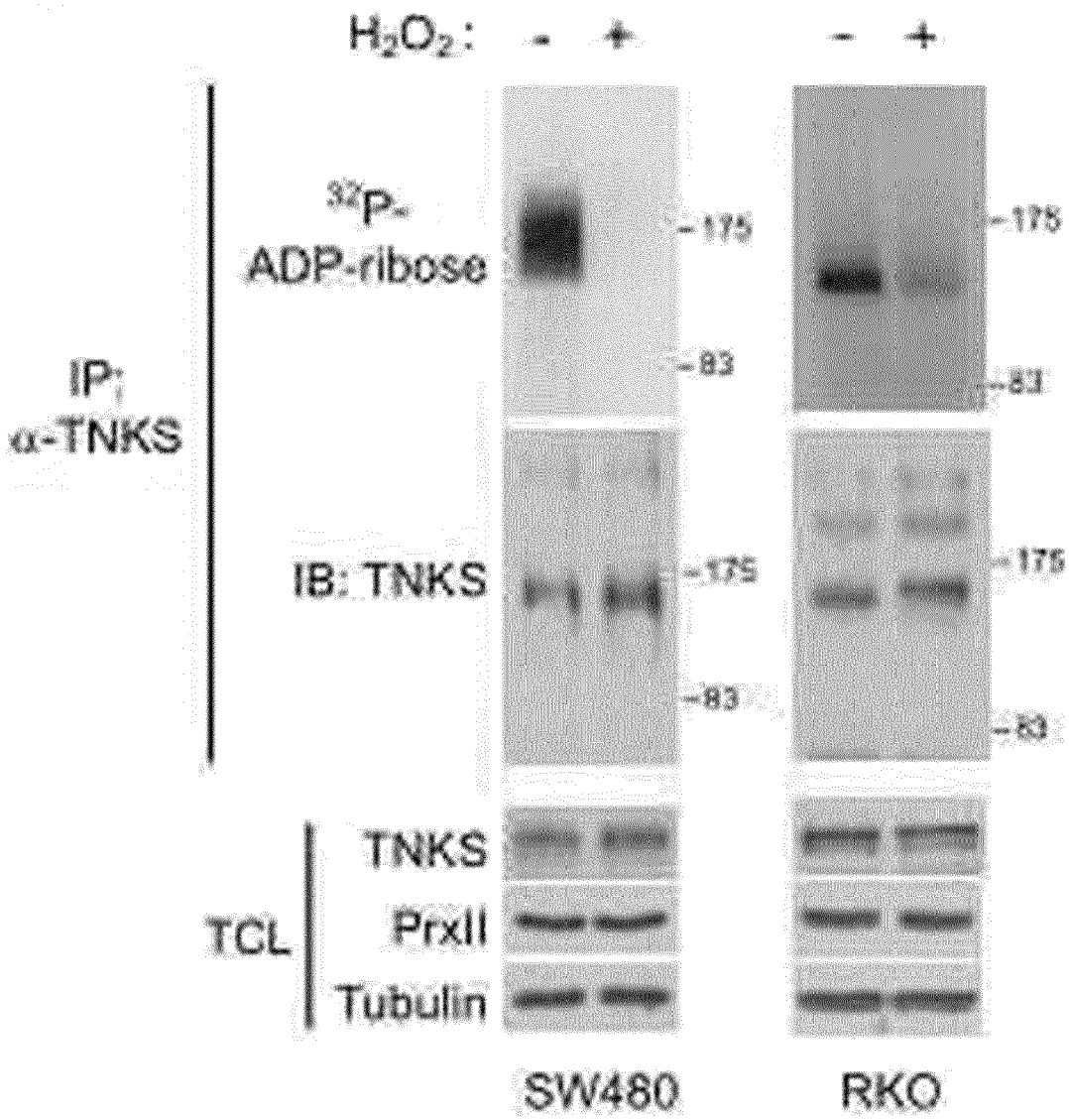
[도38]


siRNA: C PrxII-1
Retrovirus: pQ S37A pQ S37A
HT29
SW480
HT29
Number of colonies
Retrovirus: pQ S37A pQ S37A
siRNA: C PrxII-1
SW480
Number of colonies
Retrovirus: pQ S37A pQ S37A
siRNA: C PrxII-1

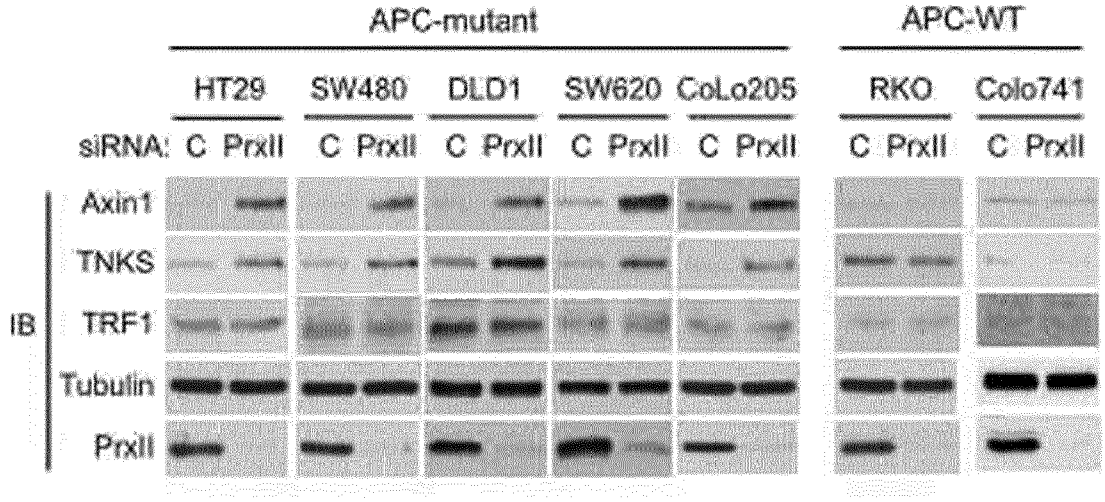
[도39]


siRNA: C
PrxII
C
PrxII
IP:
α-TNKS
32P-
ADP-ribose
IB: TNKS
TCL
TNKS
PrxII
Tubulin
175
83
HT29
RKO

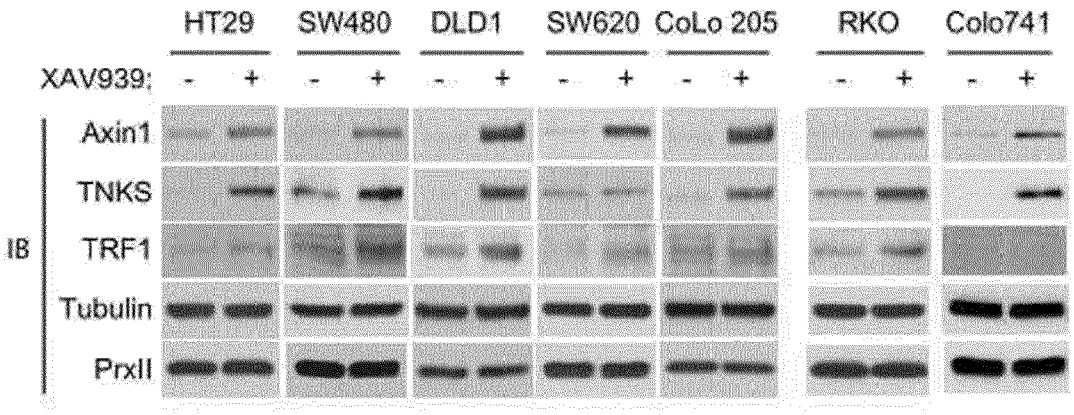
[도40]


H2O2 : - + - +
IP: α-TNKS
32P-ADP-ribose
IB: TNKS
TCL
TNKS
PrxII
Tubulin
175
83
SW480
RKO

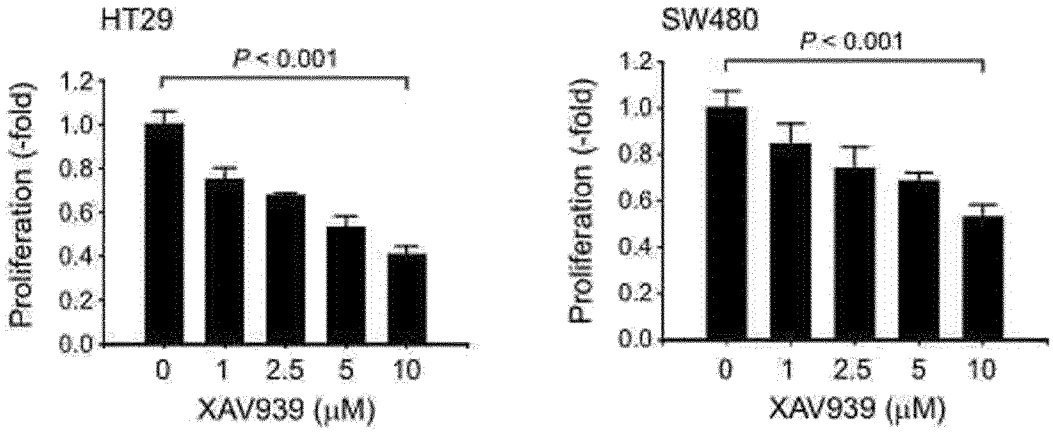
[도41]


APC-mutant
APC-WT
HT29
SW480
DLD1
SW620
CoLo205
RKO
Colo741
siRNA: C PrxII C PrxII C PrxII C PrxII C PrxII C PrxII C PrxII
IB
Axin1
TNKS
TRF1
Tubulin
PrxII

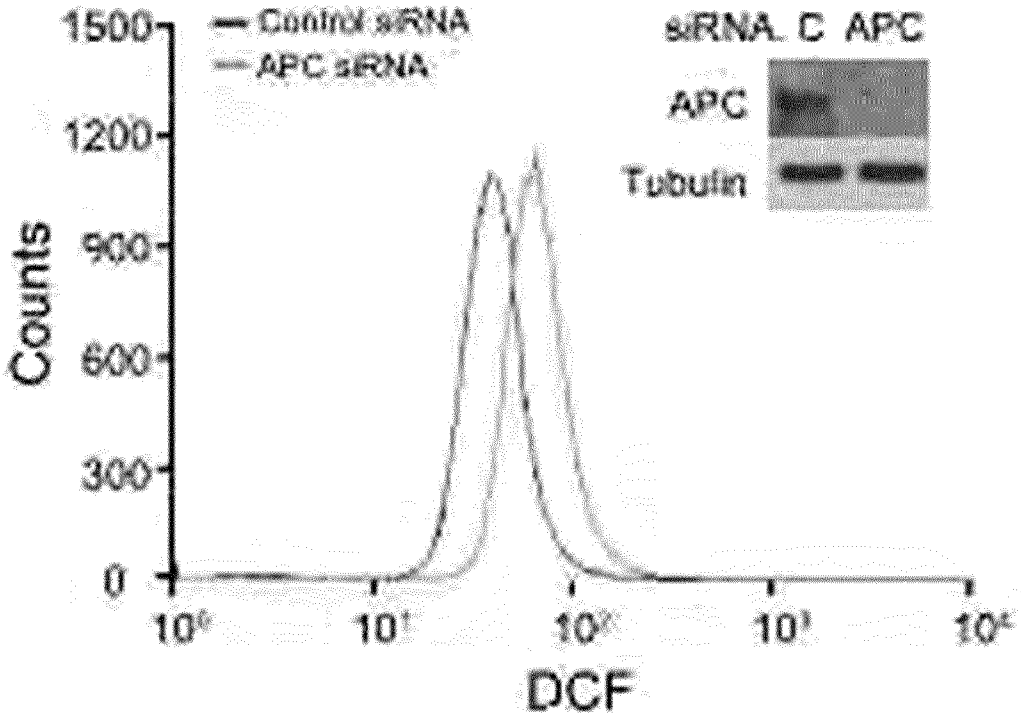
[도42]


HT29
SW480
DLD1
SW620
CoLo 205
RKO
Colo741
XAV939
-
+
IB
Axin1
TNKS
TRF1
Tubulin
PrxII

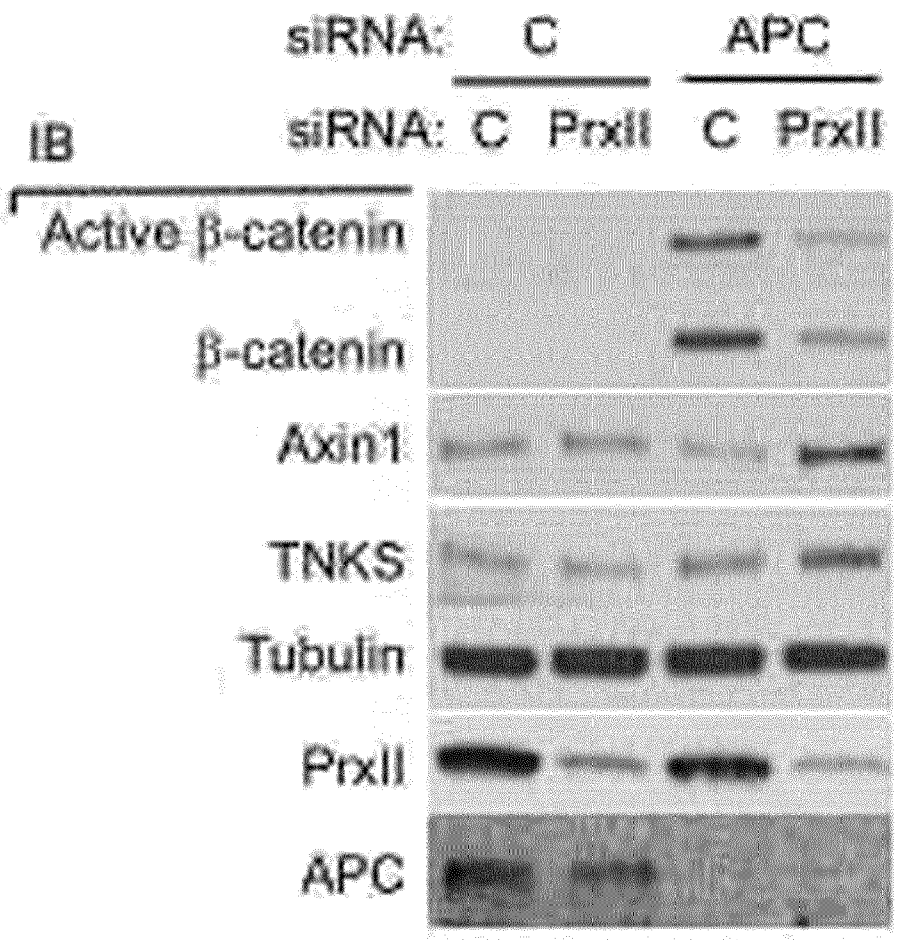
[도43]


HT29
P < 0.001
Proliferation (-fold)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
1
2.5
5
10
XAV939 (μM)
SW480
P < 0.001
Proliferation (-fold)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
1
2.5
5
10
XAV939 (μM)

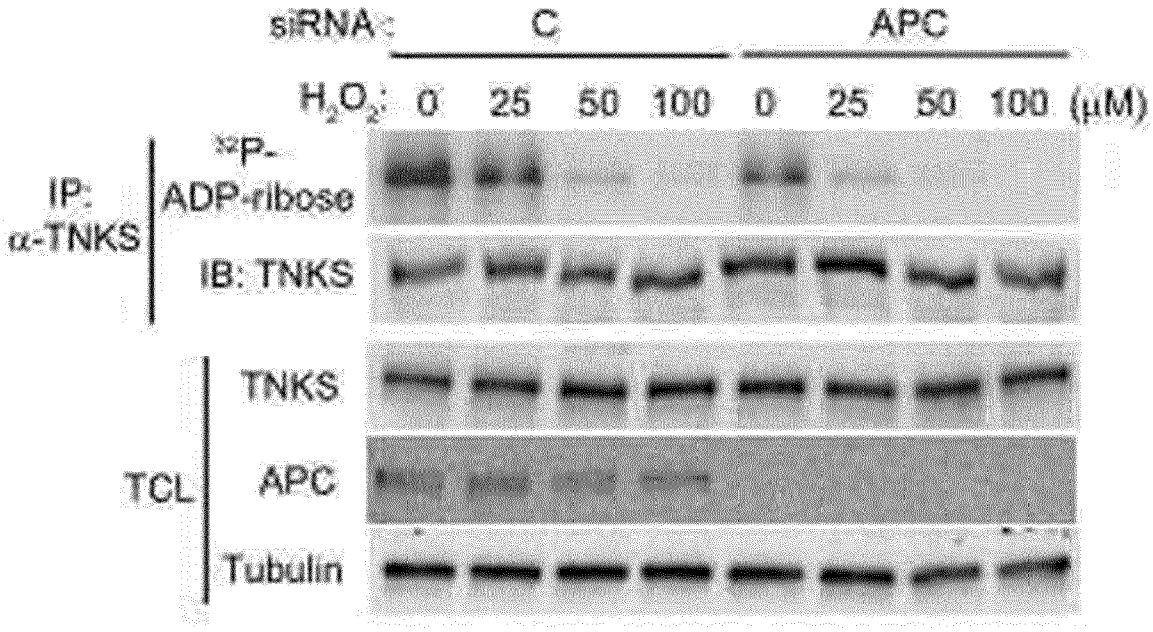
[도44]


Control siRNA
APC siRNA
siRNA C APC
APC
Tubulin
Counts
1500
1200
900
600
300
0
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
DCF

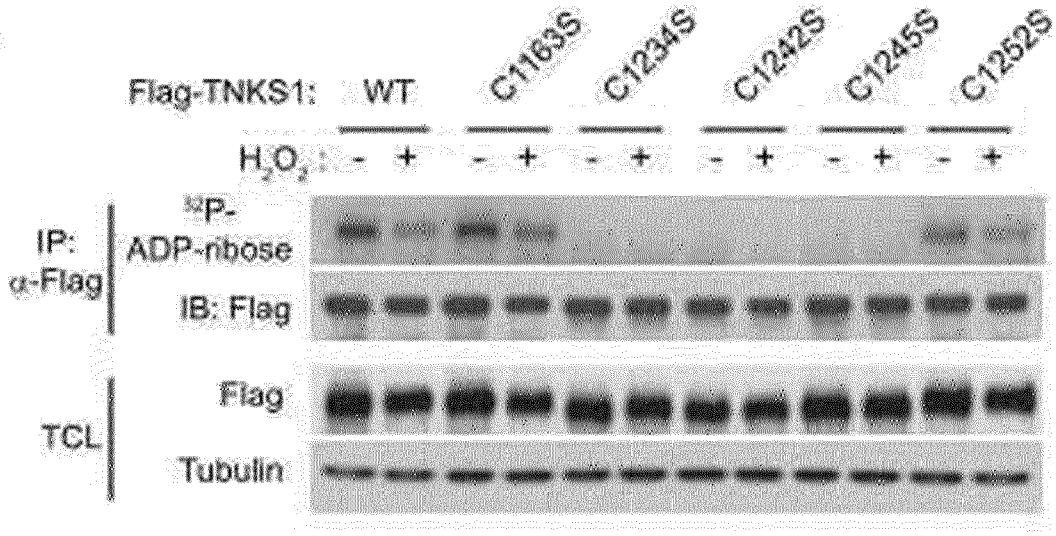
[도45]


siRNA: C APC
siRNA: C PrxII C PrxII
IB
Active β-catenin
β-catenin
Axin1
TNKS
Tubulin
PrxII
APC

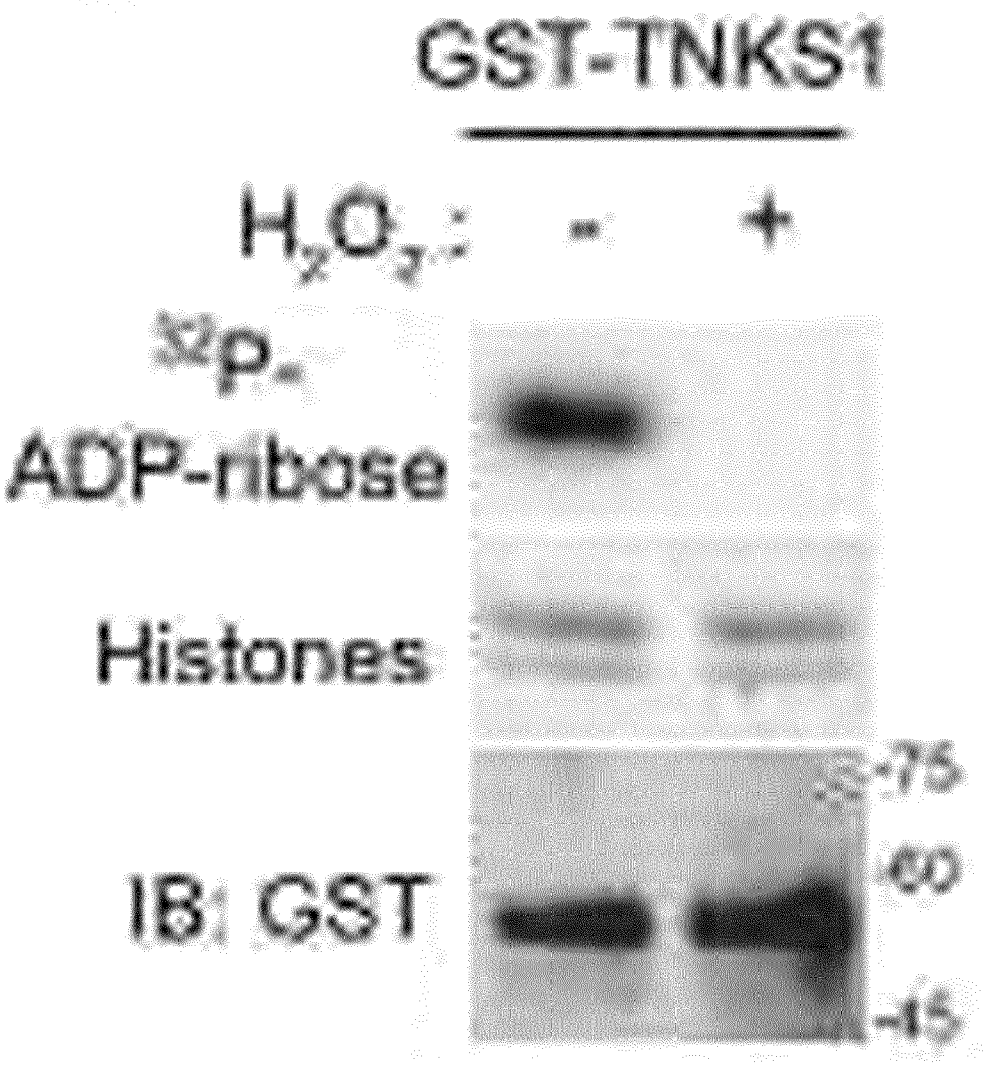
[도46]


siRNA: C APC
H2O2: 0 25 50 100 0 25 50 100 (μM)
IP: α-TNKS
32P-ADP-ribose
IB: TNKS
TCL
TNKS
APC
Tubulin

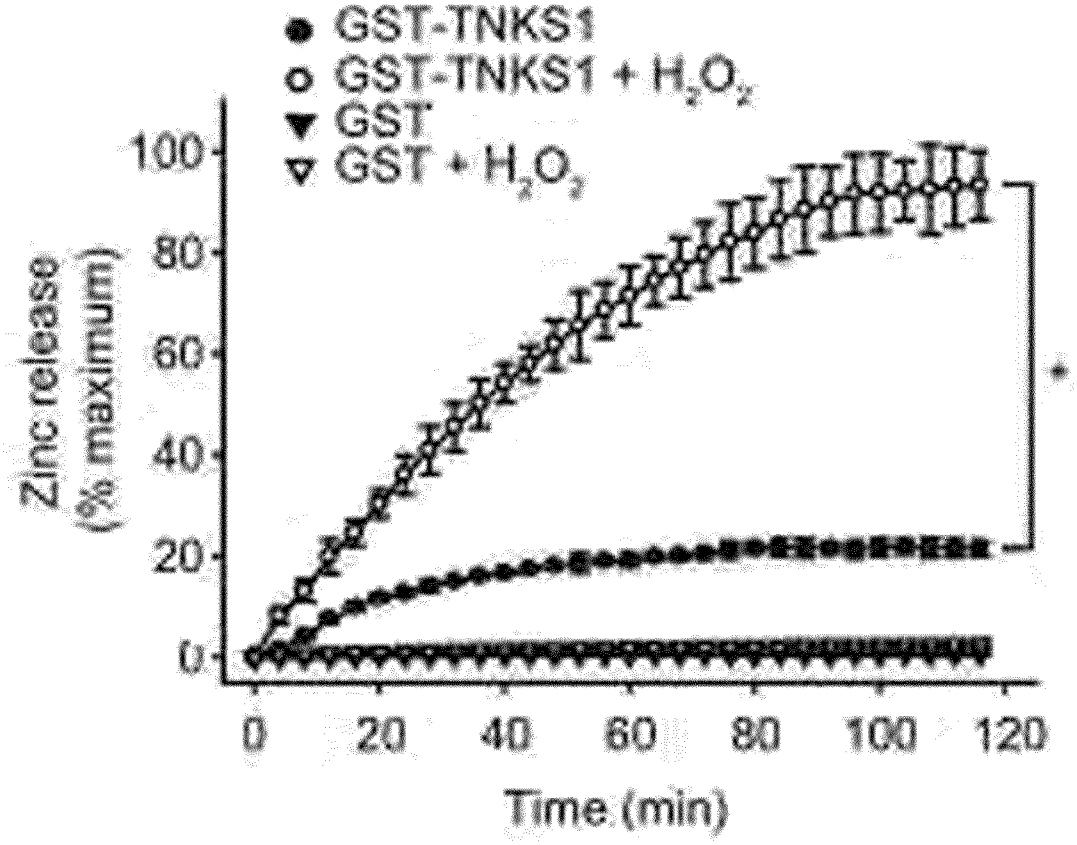
[도47]


Flag-TNKS1:
WT
C1163S
C1234S
C1242S
C1245S
C1252S
H2O2:
- + - + - + - + - + - +
IP: α-Flag
32P-ADP-ribose
IB: Flag
TCL
Flag
Tubulin

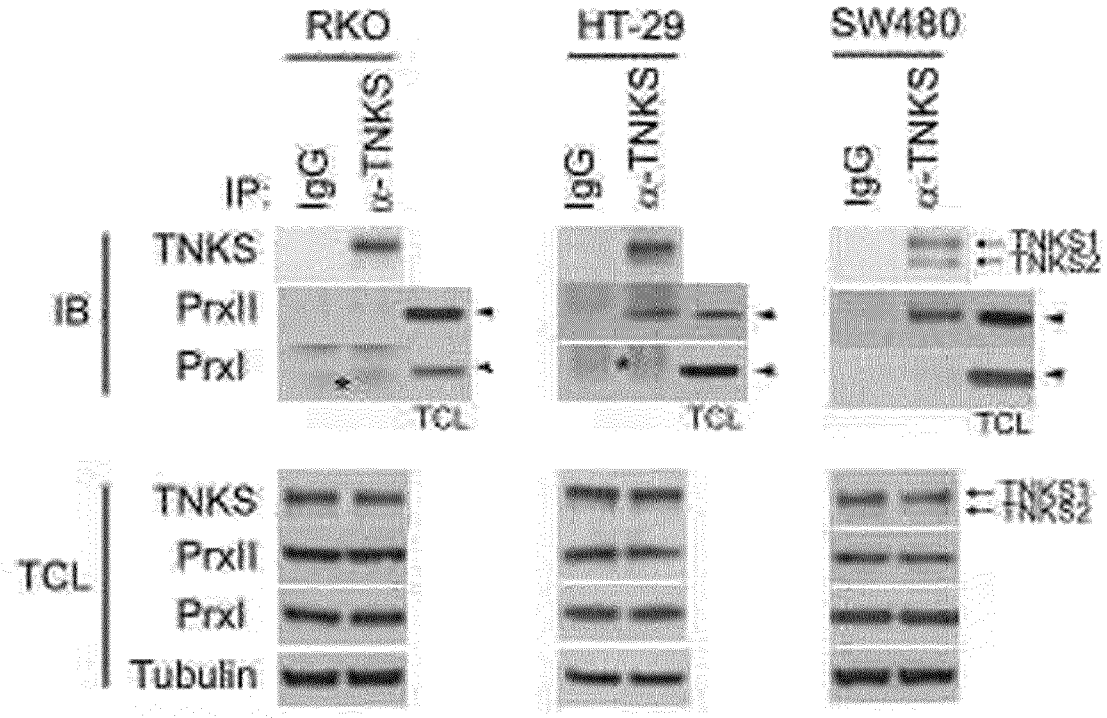
[도48]



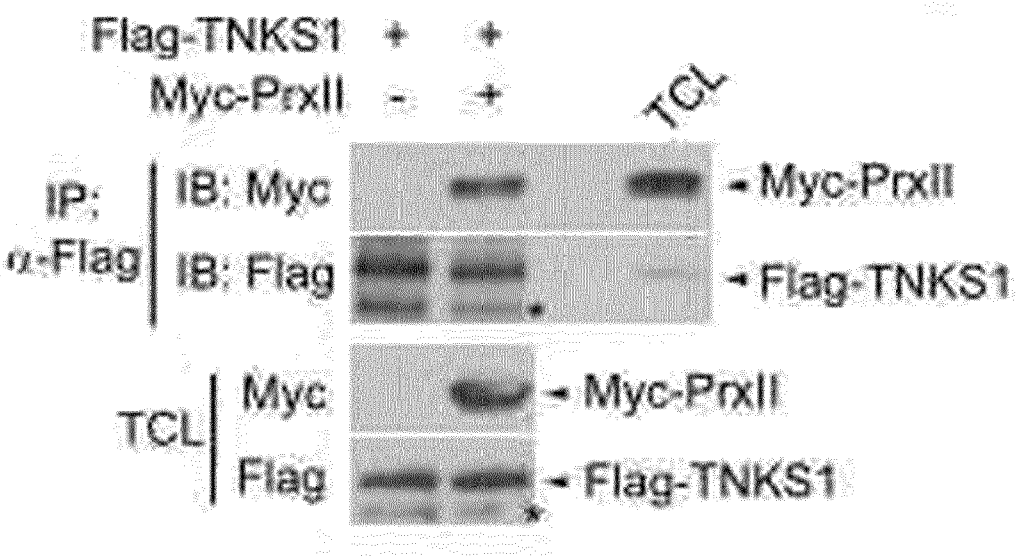
[도49]


GST-TNKS1
GST-TNKS1 + H_2O_2
GST
GST + H_2O_2
Zinc release (% maximum)
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
Time (min)
*

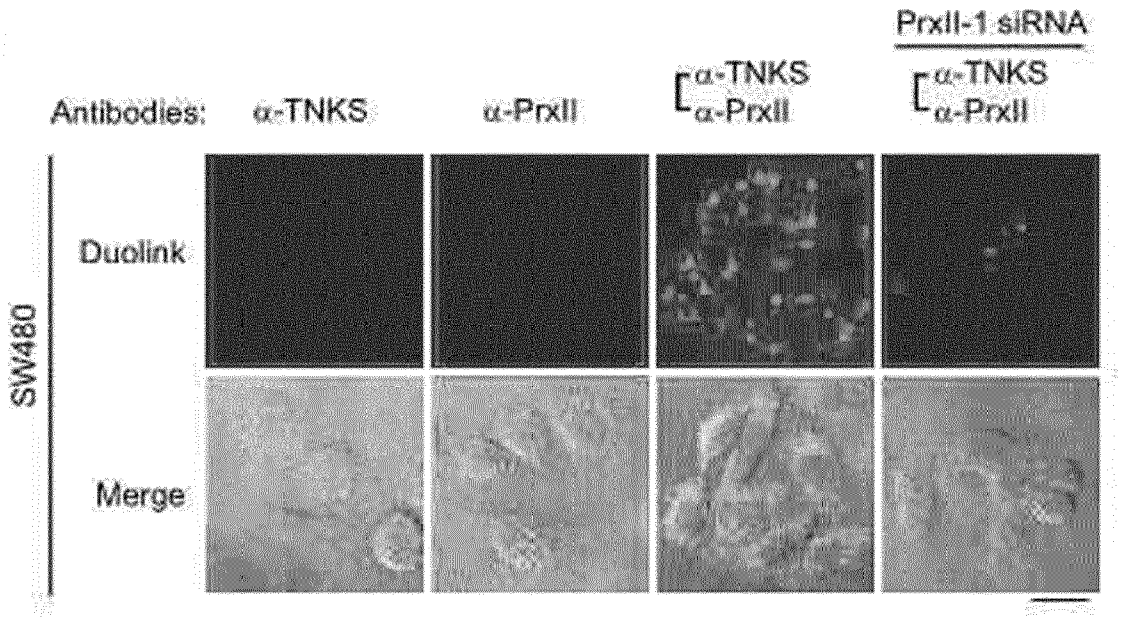
[도50]


RKO
HT-29
SW480
IP:
IgG
α-TNKS
IB
TNKS
PrxII
PrxI
TCL
TNKS1
TNKS2
Tubulin

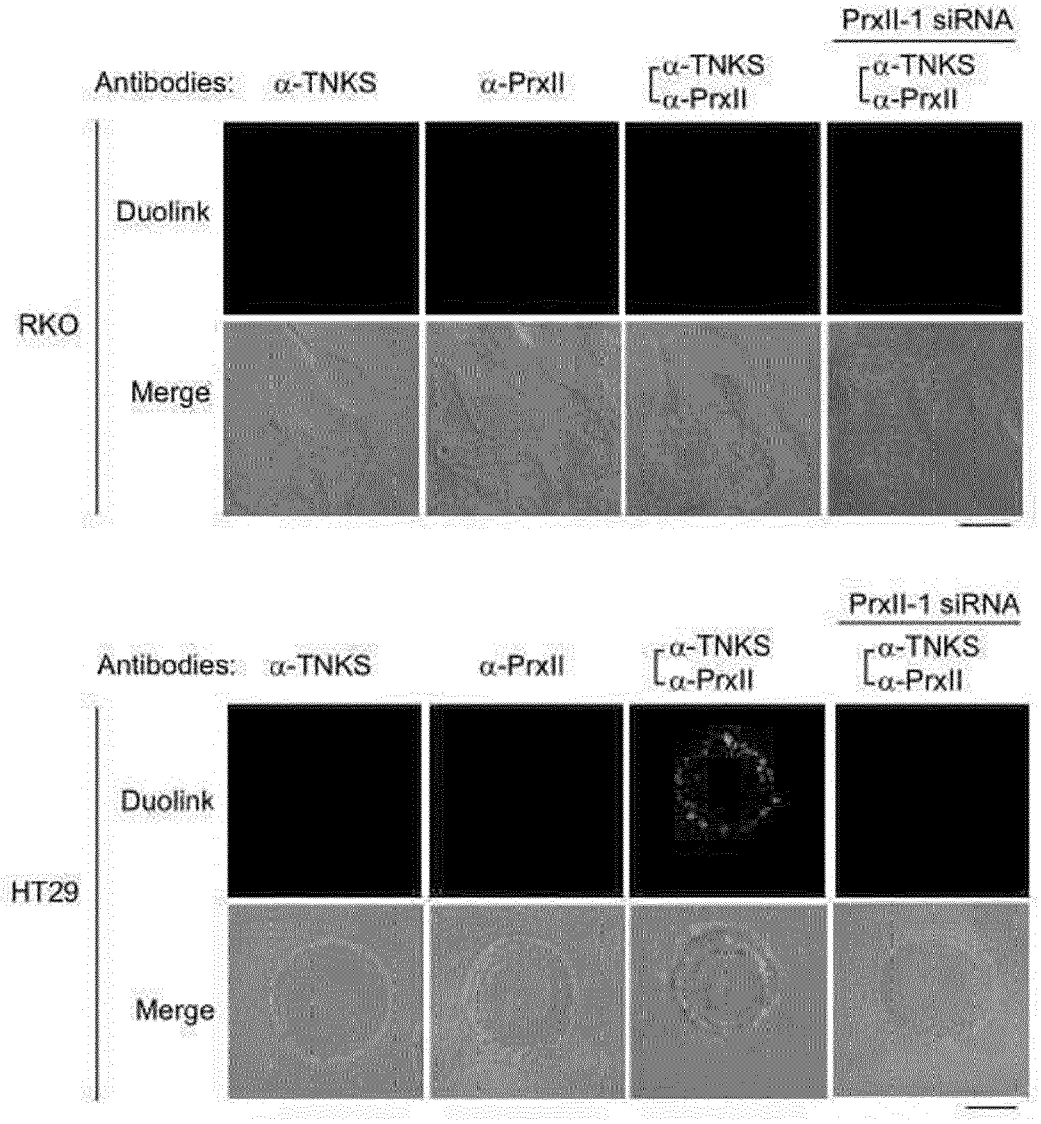
[도51]


Flag-TNKS1 + +
Myc-PrxII - +
TCL
IP: α-Flag
IB: Myc
IB: Flag
Myc-PrxII
Flag-TNKS1
TCL
Myc
Flag
Myc-PrxII
Flag-TNKS1

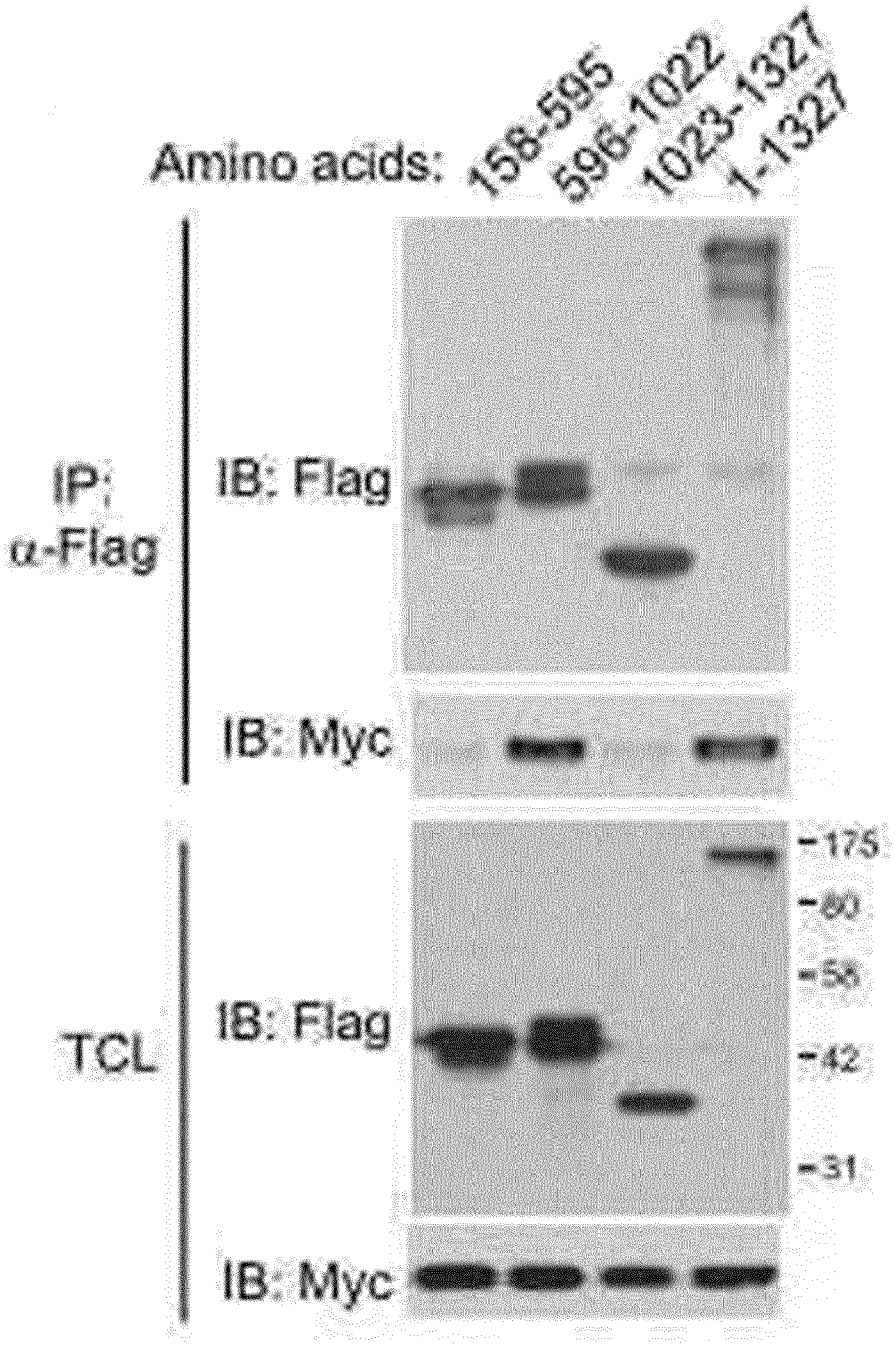
[도52]


PrxII-1 siRNA
Antibodies:
α-TNKS
α-PrxII
α-TNKS α-PrxII
α-TNKS α-PrxII
SW480
Duolink
Merge

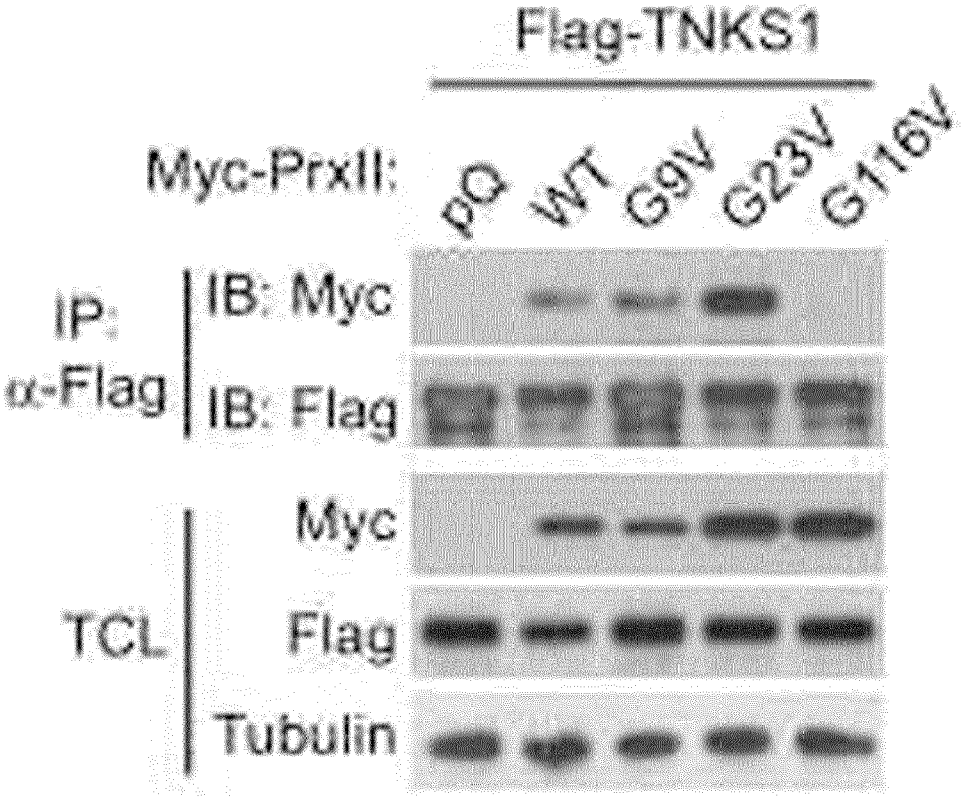
[도53]


PrxII-1 siRNA
Antibodies:
α-TNKS
α-PrxII
α-TNKS
α-PrxII
α-TNKS
α-PrxII
RKO
Duolink
Merge
PrxII-1 siRNA
Antibodies:
α-TNKS
α-PrxII
α-TNKS
α-PrxII
α-TNKS
α-PrxII
HT29
Duolink
Merge

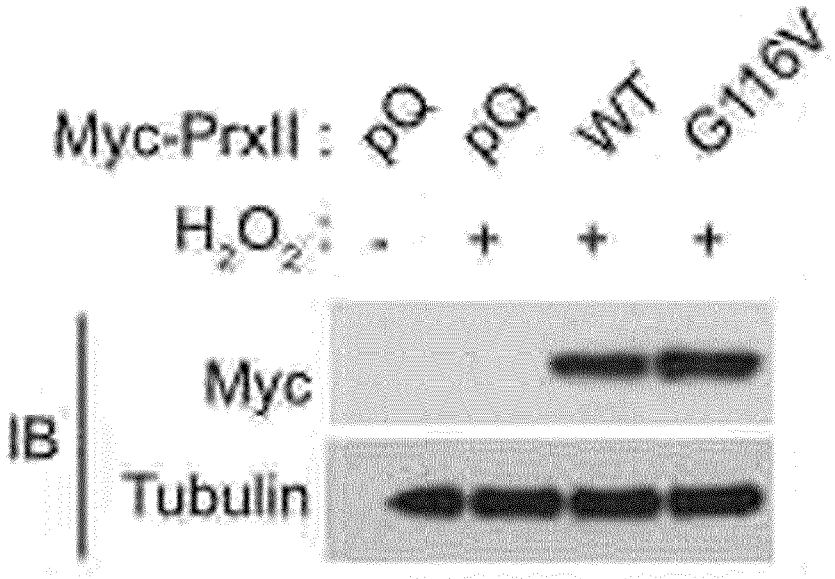
[도54]


Amino acids:
158-595
596-1022
1023-1327
1-1327
IP:
α-Flag
IB: Flag
IB: Myc
TCL
IB: Flag
IB: Myc
175
80
58
42
31

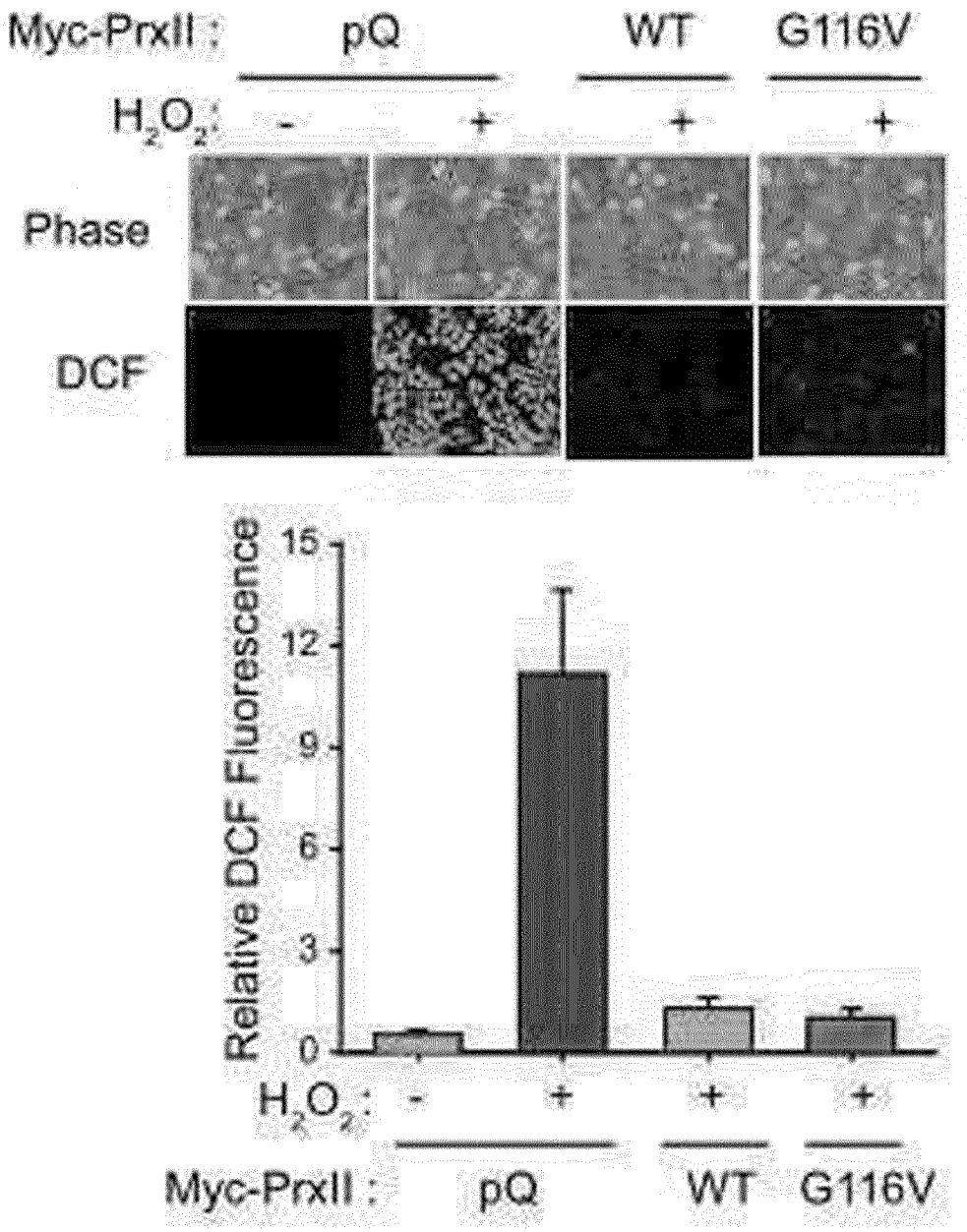
[도55]


Flag-TNKS1
Myc-PrxII:
pQ
WT
G9V
G23V
G116V
IP:
α-Flag
IB: Myc
IB: Flag
TCL
Myc
Flag
Tubulin

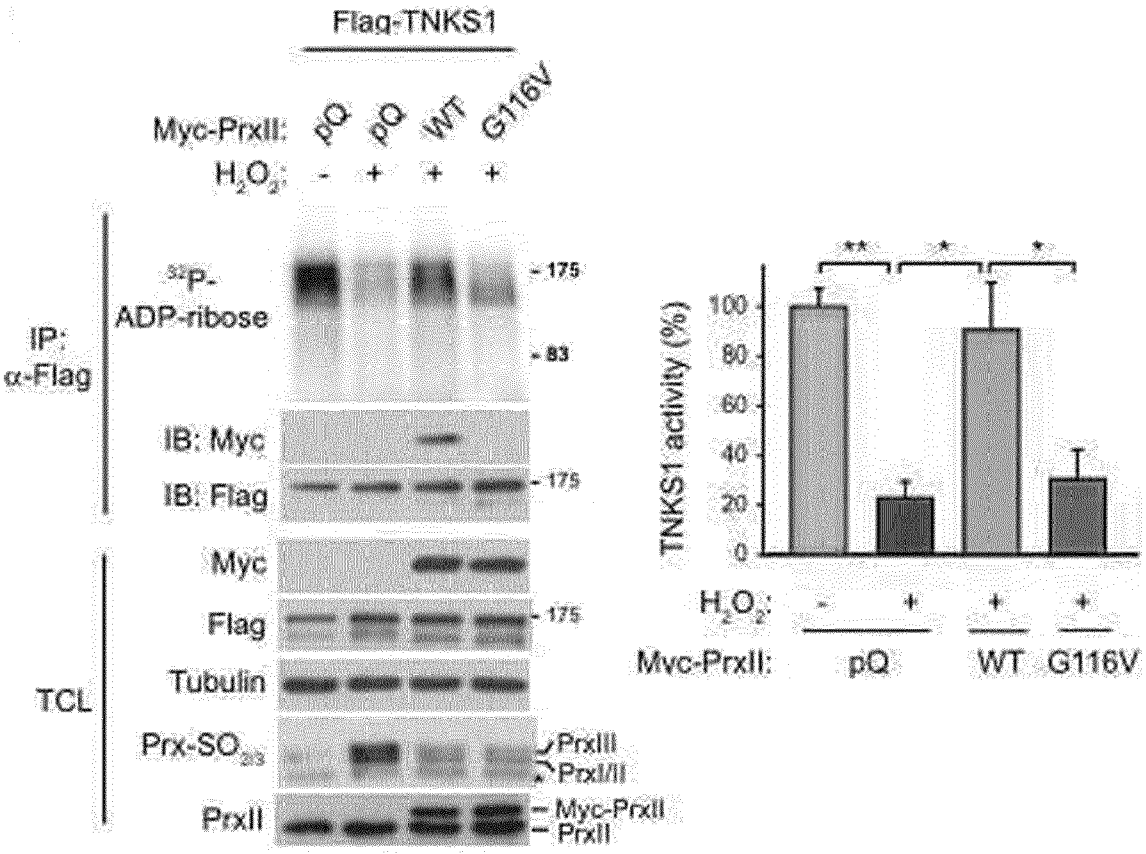
[도56]


Myc-PrxII :
pQ
pQ
WT
G116V
H2O2 :
-
+
+
+
IB
Myc
Tubulin

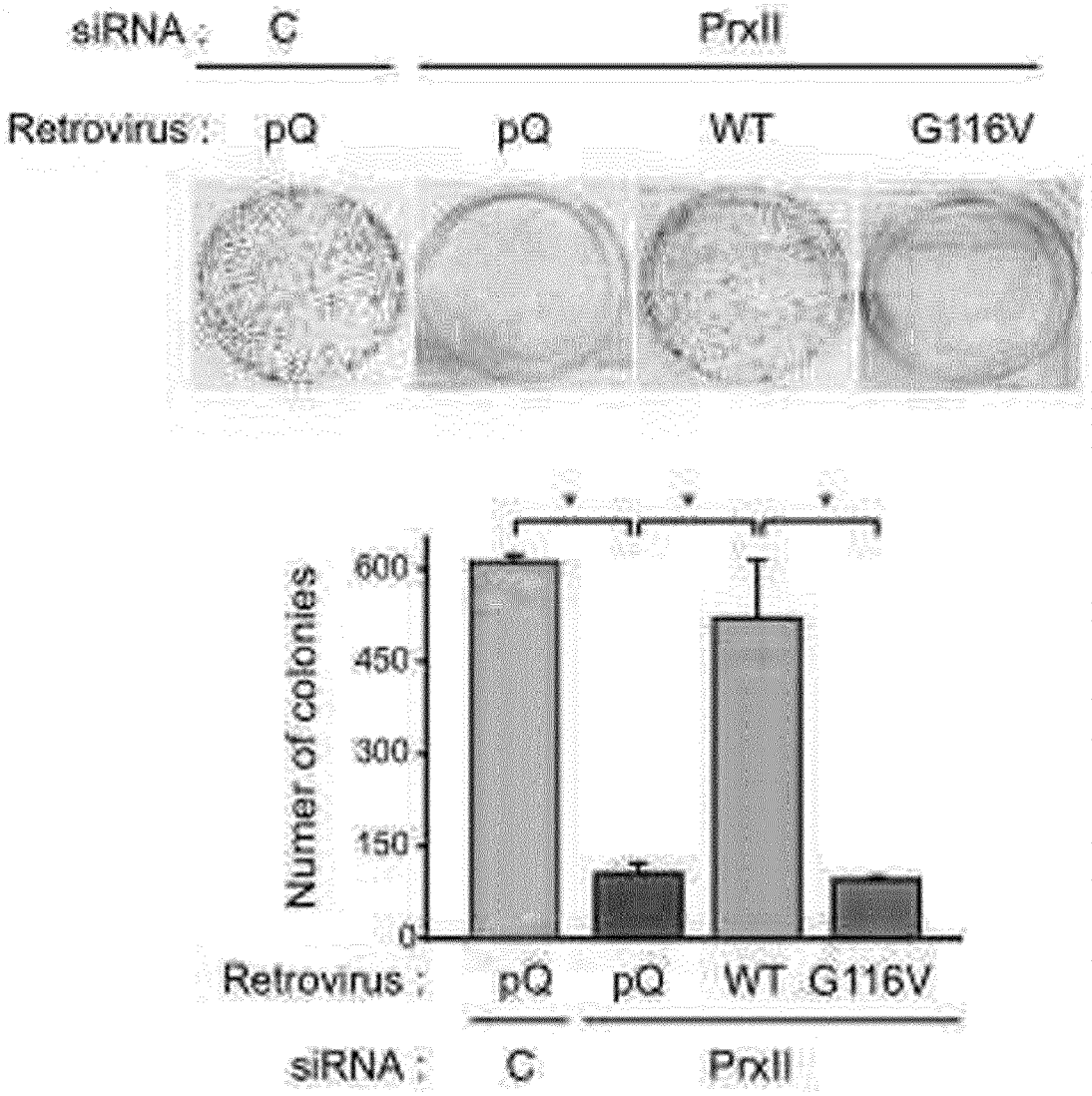
[도57]


Myc-PrxII :
pQ
WT
G116V
H2O2 :
-
+
+
+
Phase
DCF
Relative DCF Fluorescence
15
12
9
6
3
0
H2O2 :
-
+
+
+
Myc-PrxII :
pQ
WT
G116V

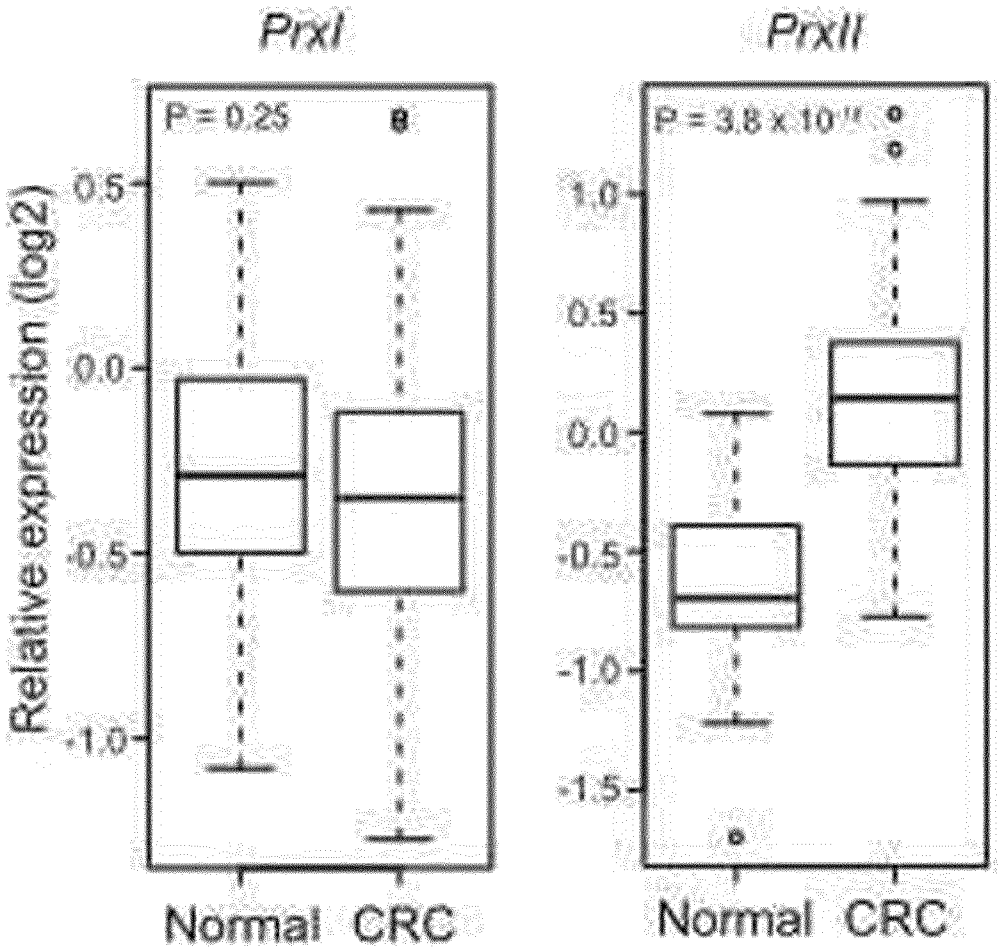
[도58]


Flag-TNKS1
Myc-PrxII:
pQ
pQ
WT
G116V
H2O2:
- + + +
IP: α-Flag
32P-ADP-ribose
IB: Myc
IB: Flag
TCL
Myc
Flag
Tubulin
Prx-SO2/3
PrxIII
PrxI/II
PrxII
Myc-PrxII
PrxII
175
83
TNKS1 activity (%)
100
80
60
40
20
0
**
*
*
H2O2:
- + + +
Myc-PrxII:
pQ
WT
G116V

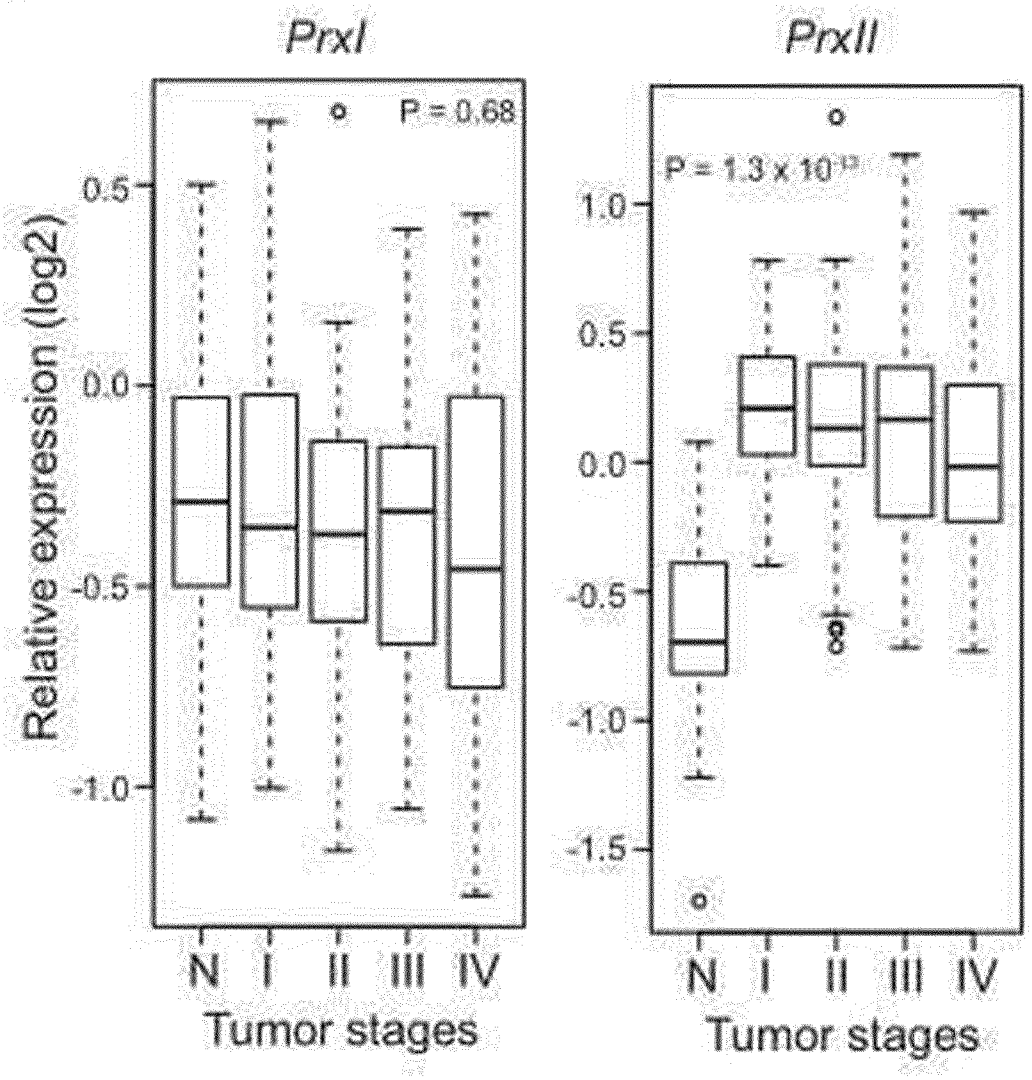
[도59]


siRNA : C PrxII
Retrovirus : pQ pQ WT G116V
Numer of colonies
600
450
300
150
0
Retrovirus : pQ pQ WT G116V
siRNA : C PrxII

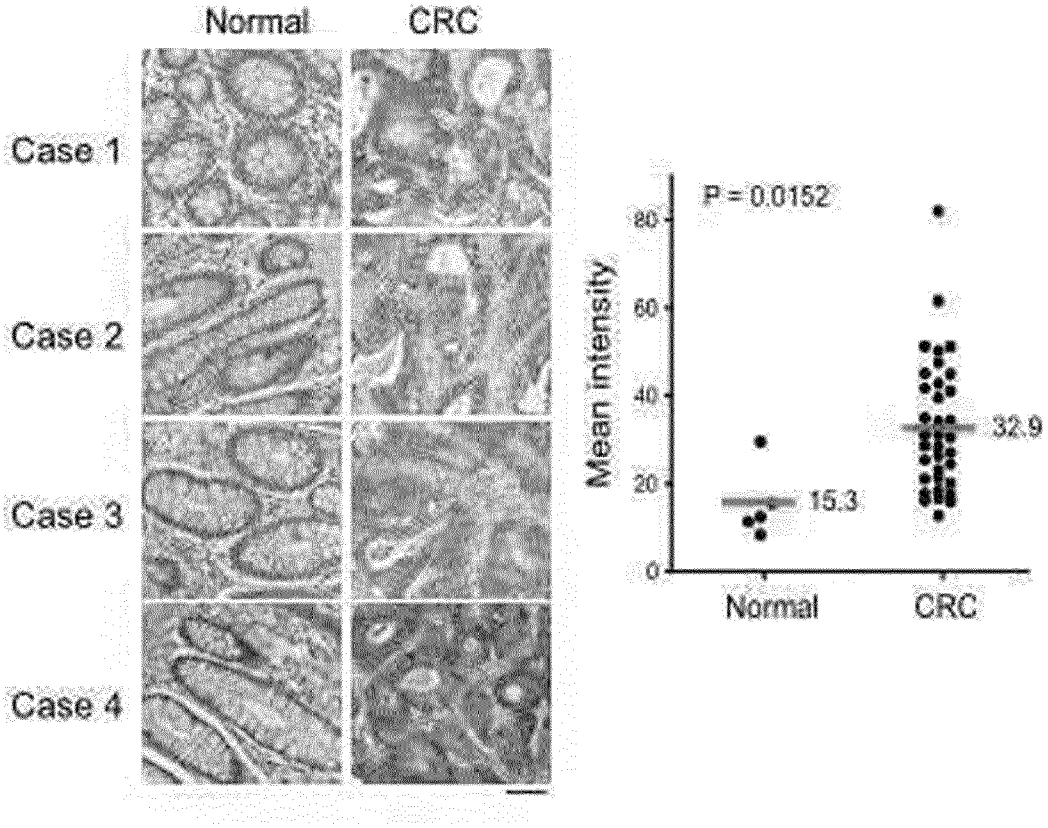
[도60]


PrxI
PrxII
P = 0.25
P = 3.8 x 10⁻¹¹
Relative expression (log2)
0.5
0.0
-0.5
-1.0
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
Normal
CRC
Normal
CRC

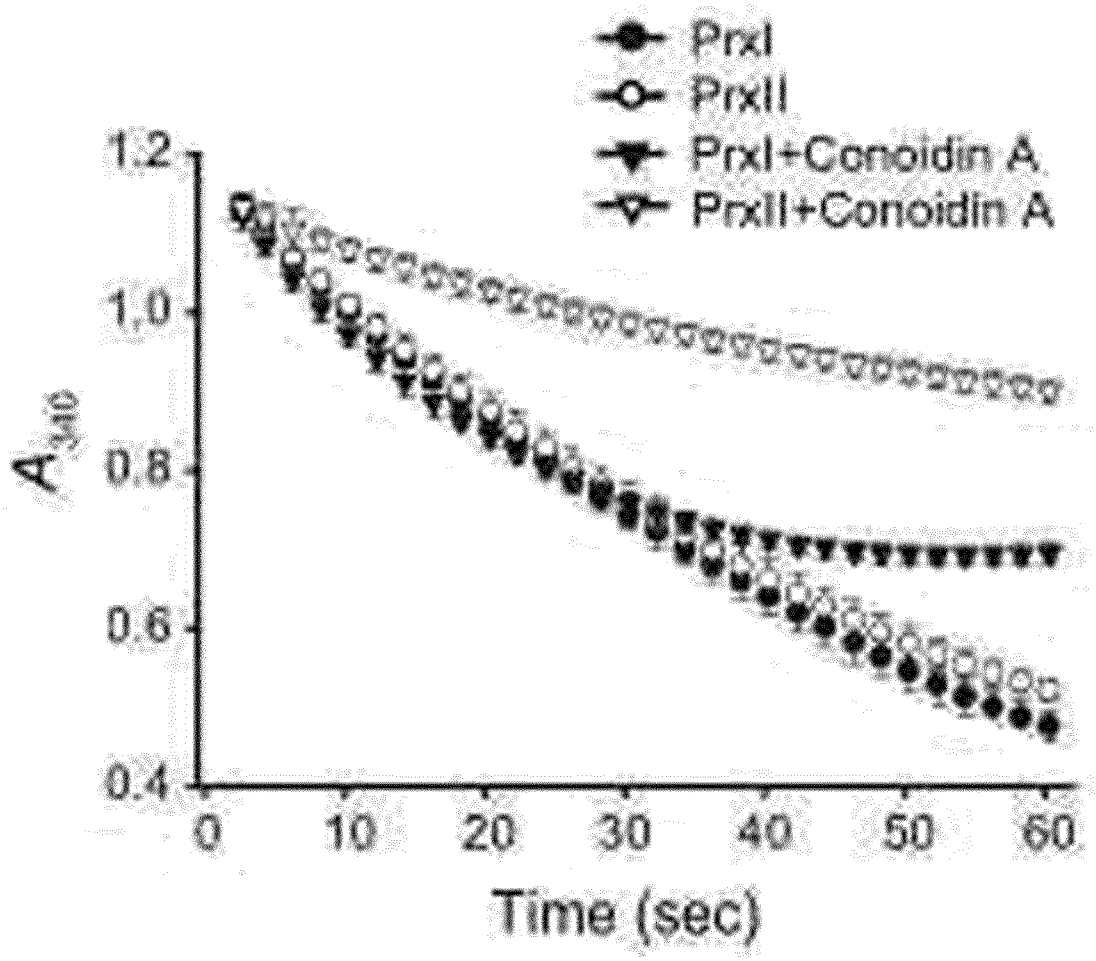
[도61]


PrxI
P = 0.68
Relative expression (log2)
0.5
0.0
-0.5
-1.0
N I II III IV
Tumor stages
PrxII
P = 1.3 x 10-13
1.0
0.5
0.0
-0.5
-1.0
-1.5
N I II III IV
Tumor stages

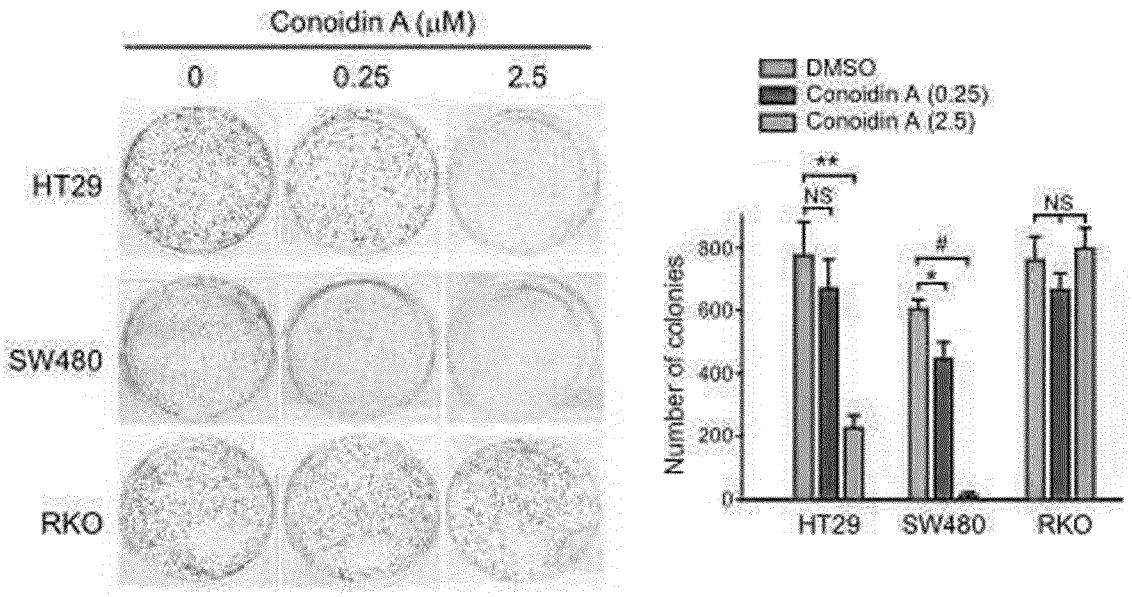
[도62]


Normal
CRC
Case 1
Case 2
Case 3
Case 4
P = 0.0152
Mean intensity
80
60
40
20
0
15.3
32.9
Normal
CRC

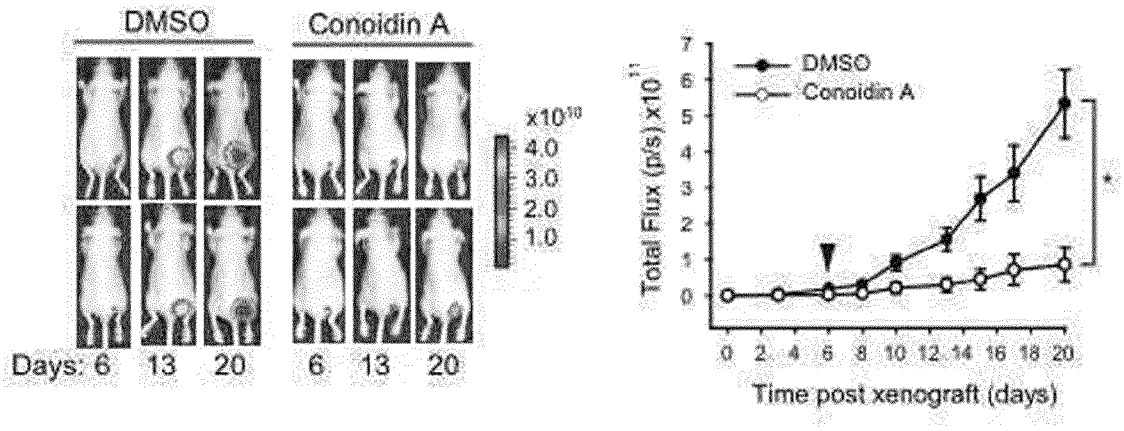
[도63]


PrxI
PrxII
PrxI+Conoidin A
PrxII+Conoidin A
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
A340
0
10
20
30
40
50
60
Time (sec)

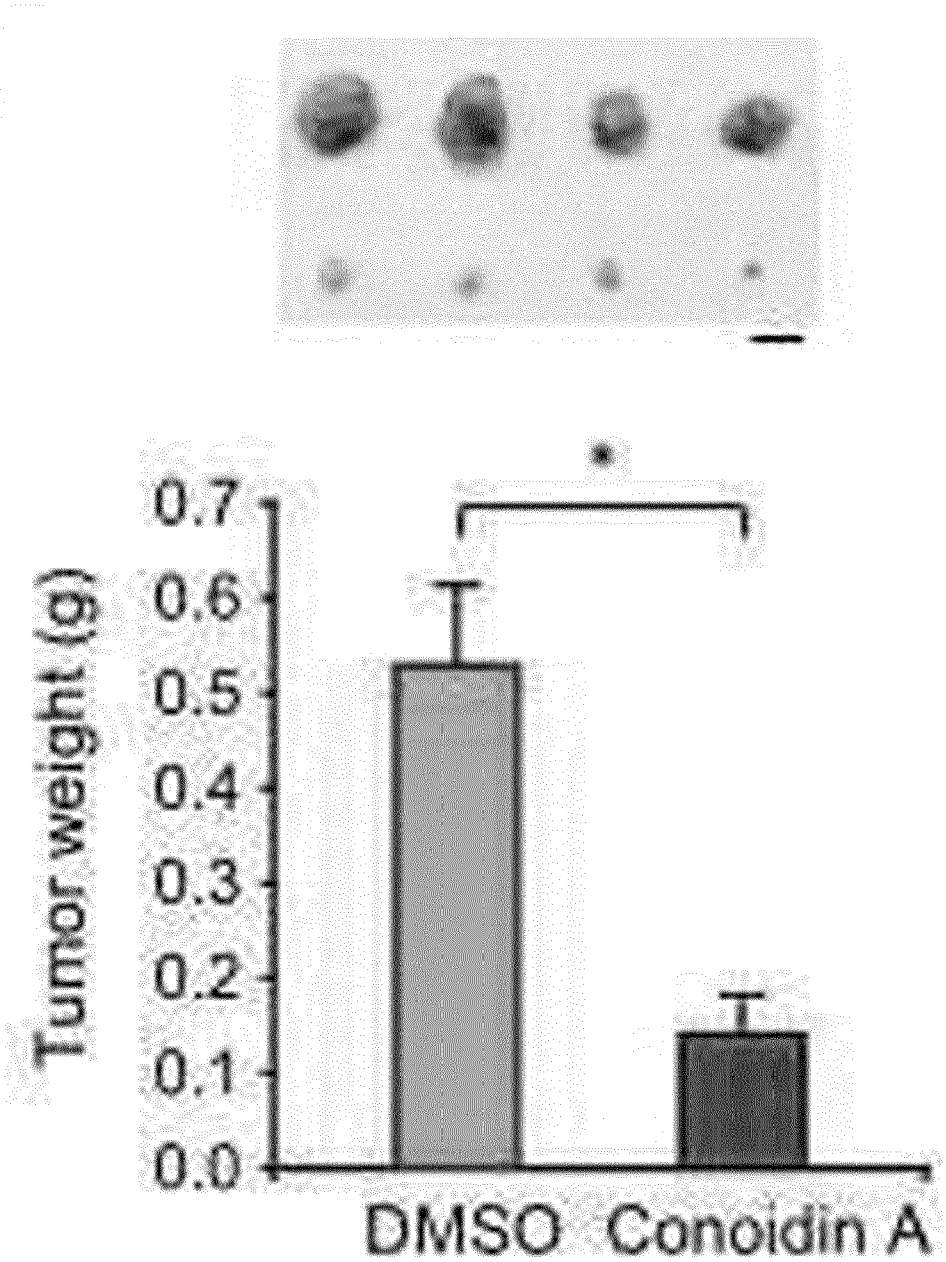
[도64]


Conoidin A (μM)
0
0.25
2.5
HT29
SW480
RKO
DMSO
Conoidin A (0.25)
Conoidin A (2.5)
**
NS
#
*
NS
Number of colonies
800
600
400
200
0
HT29
SW480
RKO

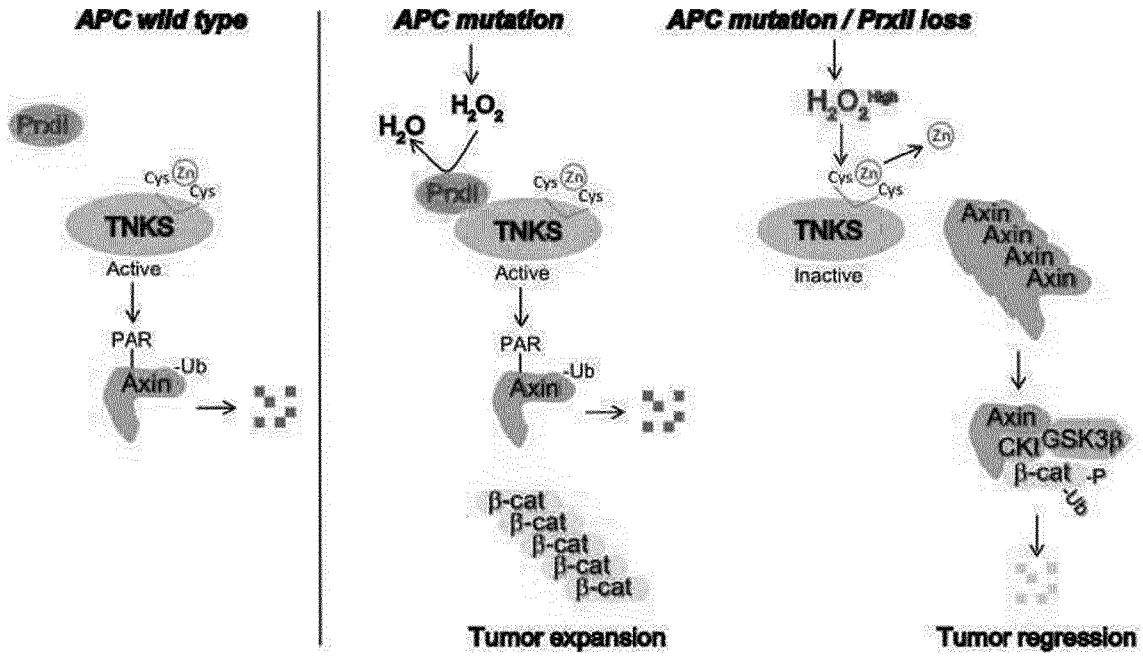
[도65]


DMSO
Conoidin A
x10^10
4.0
3.0
2.0
1.0
Days: 6 13 20 6 13 20
DMSO
Conoidin A
Total Flux (p/s) x10^11
0 1 2 3 4 5 6 7
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
Time post xenograft (days)
*

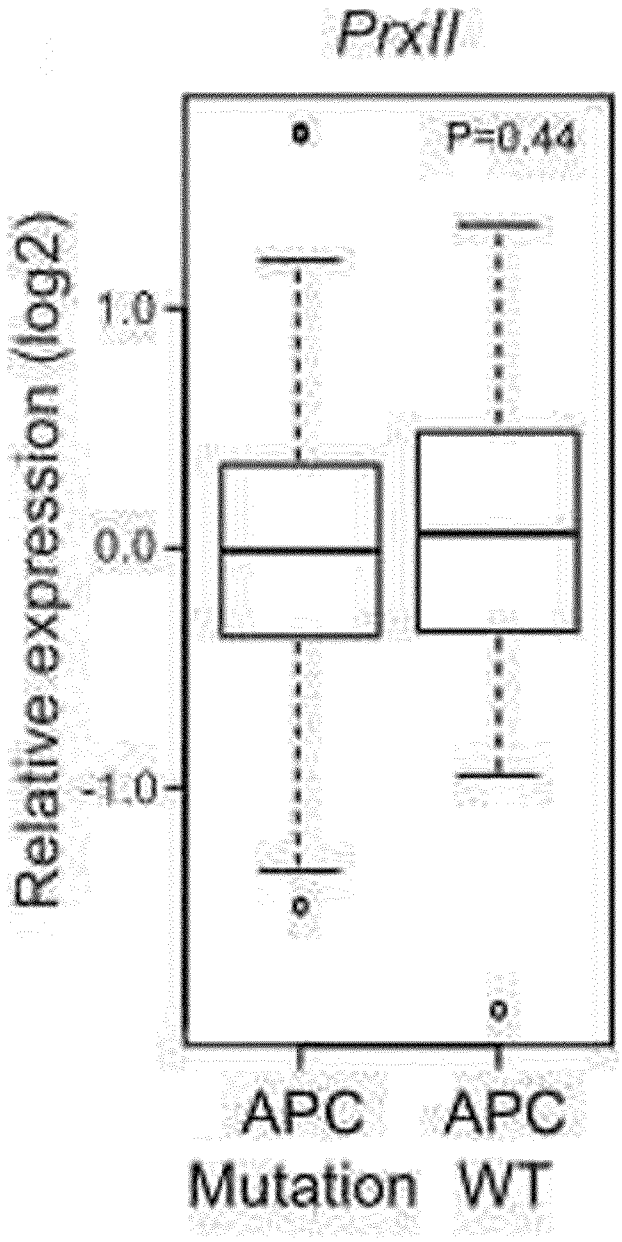
[도66]



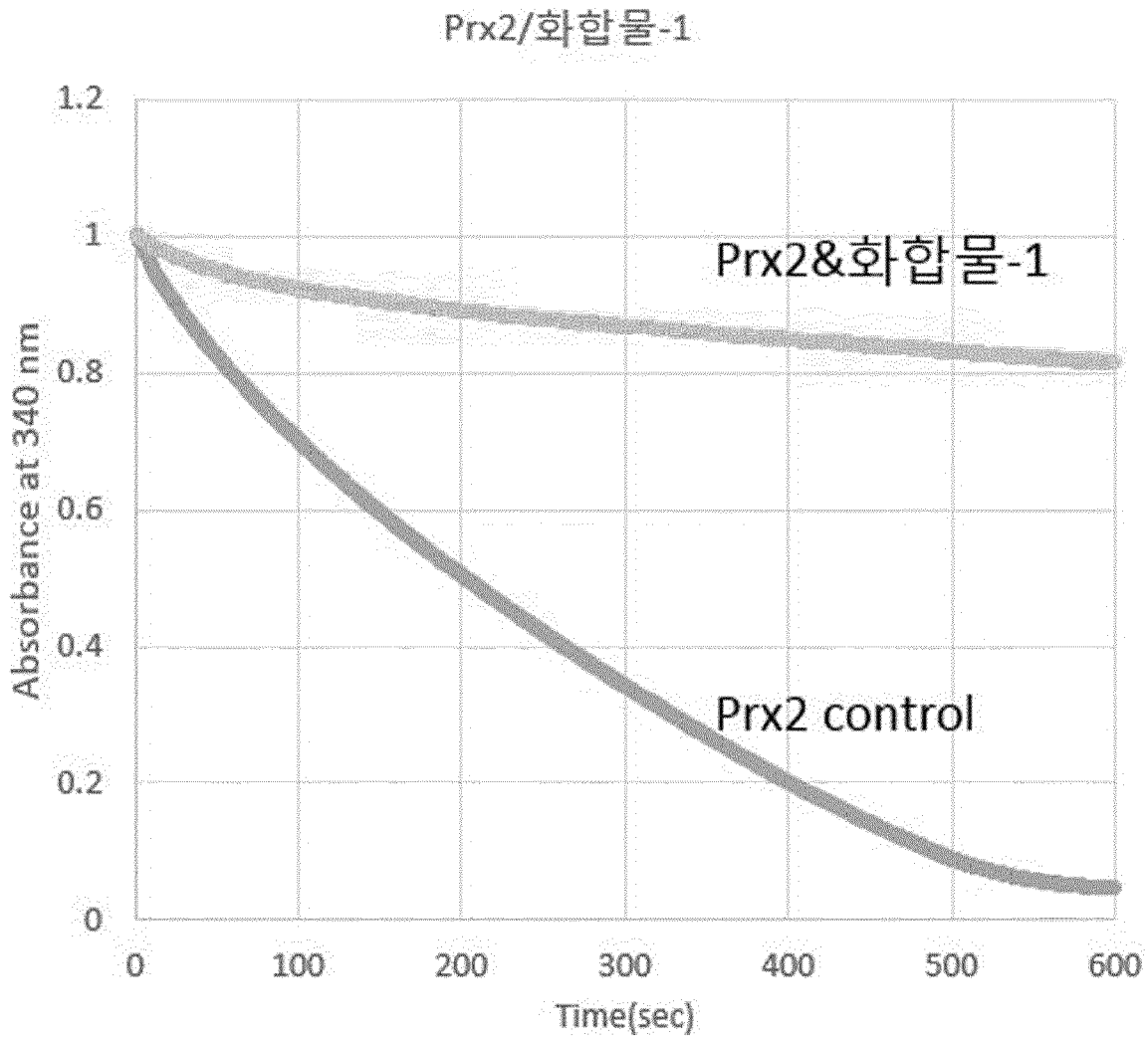
[도67]


APC wild type
Prxll
Cys Zn Cys
TNKS
Active
PAR
Axin
-Ub
APC mutation
H2O2
H2O
Prxll
Cys Zn Cys
TNKS
Active
PAR
Axin
-Ub
β-cat
β-cat
β-cat
β-cat
β-cat
Tumor expansion
APC mutation / Prxll loss
H2O2 High
Zn
Cys Zn Cys
TNKS
Inactive
Axin
Axin
Axin
Axin
Axin
CKI
GSK3β
β-cat
-P
Ub
Tumor regression

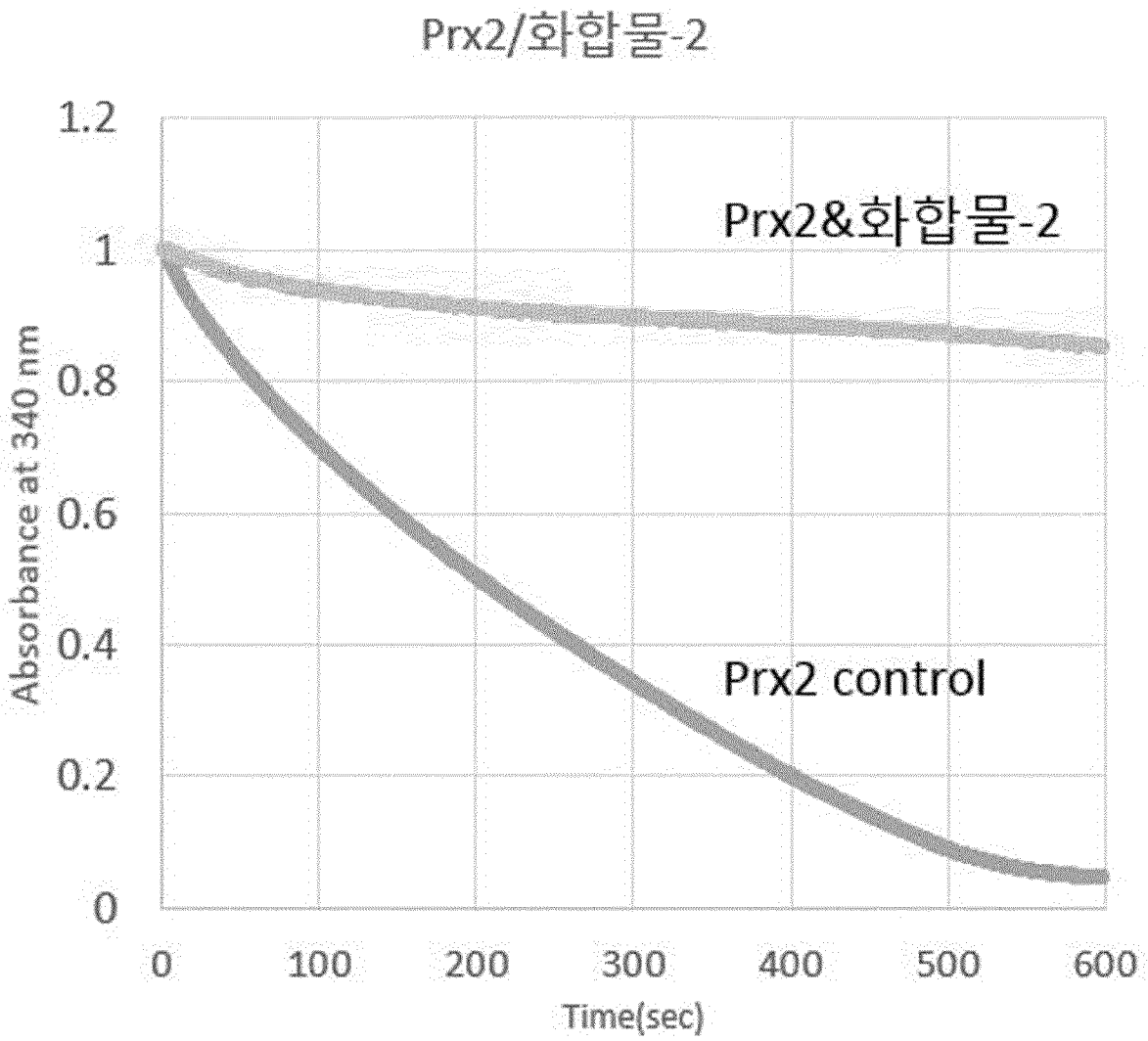
[도68]


Prxll
P=0.44
Relative expression (log2)
1.0
0.0
-1.0
APC Mutation
APC WT

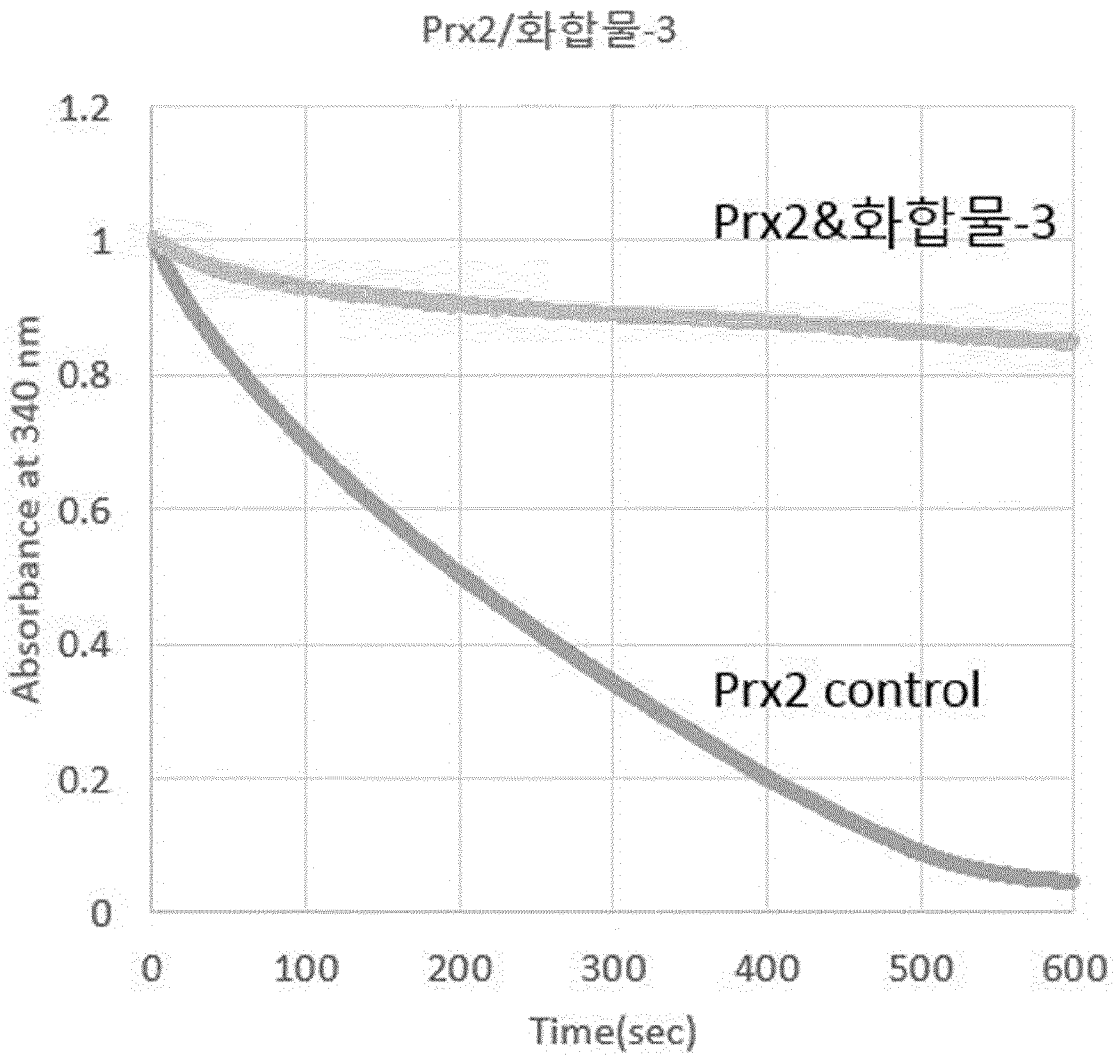
[도69]


Prx2/화합물-1
Absorbance at 340 nm
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
100
200
300
400
500
600
Time(sec)
Prx2&화합물-1
Prx2 control

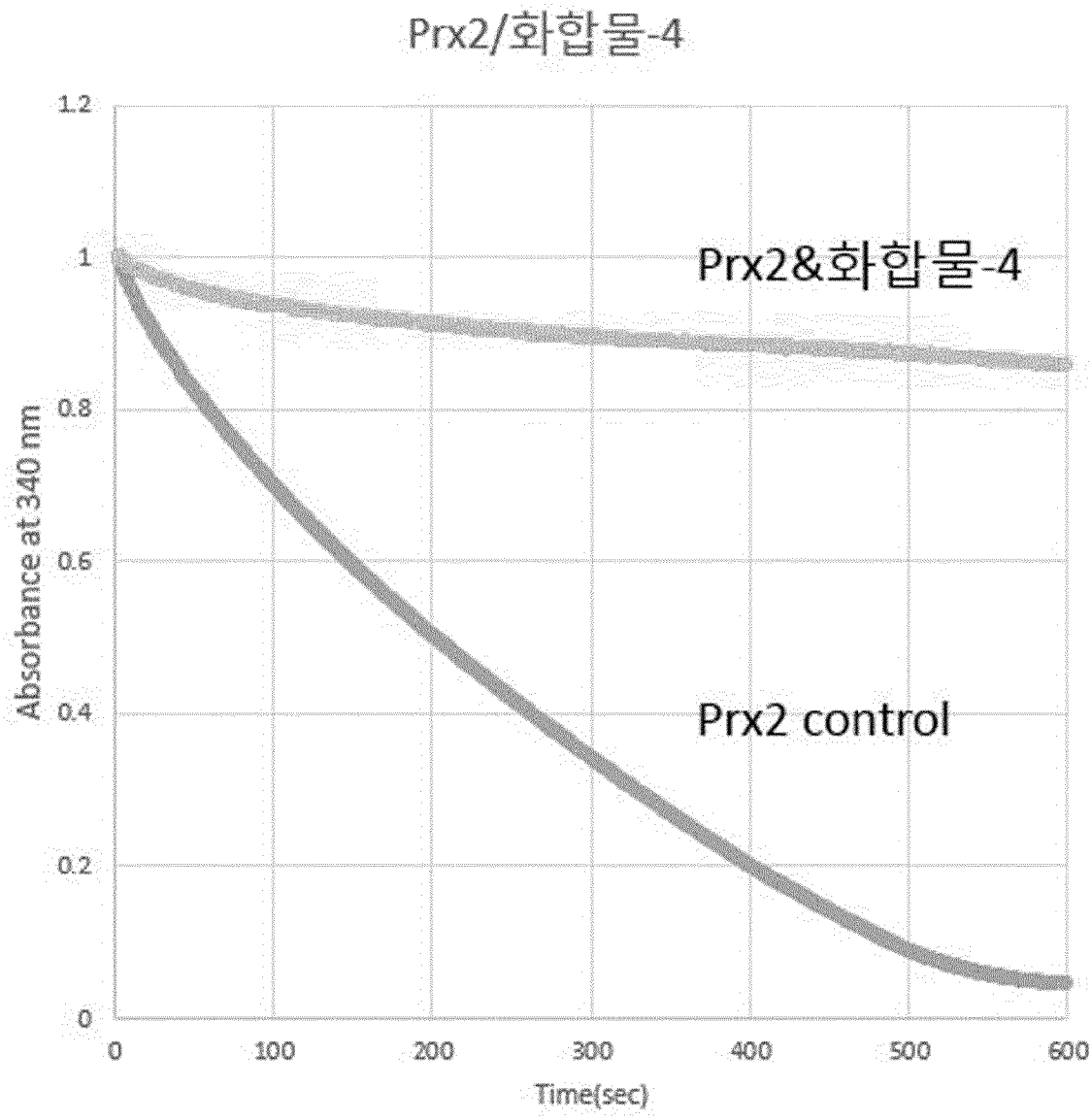
[도70]


Prx2/화합물-2
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Absorbance at 340 nm
Prx2&화합물-2
Prx2 control
0
100
200
300
400
500
600
Time(sec)

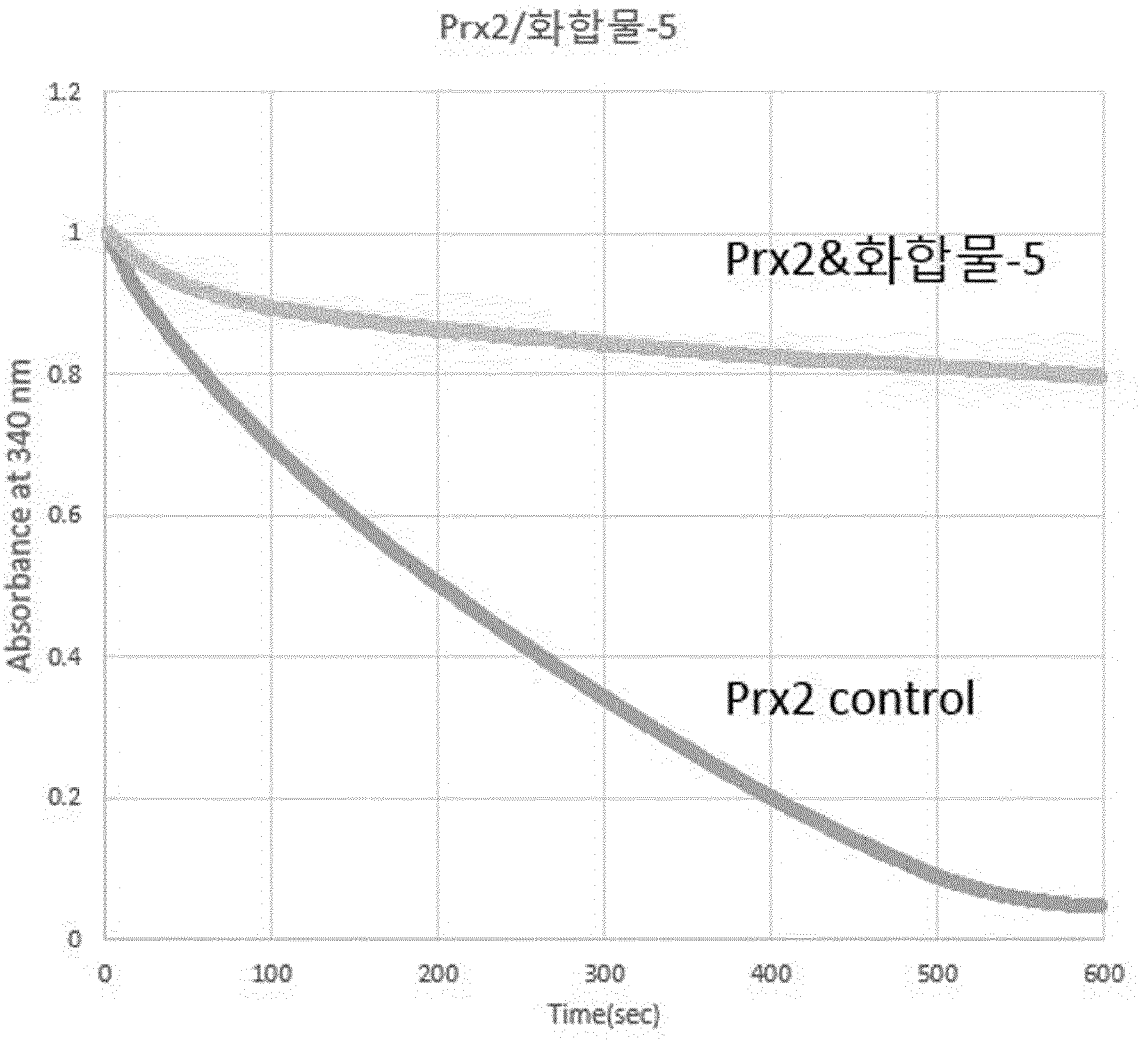
[도71]


Prx2/화합물-3
Prx2&화합물-3
Prx2 control
Absorbance at 340 nm
Time(sec)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
100
200
300
400
500
600

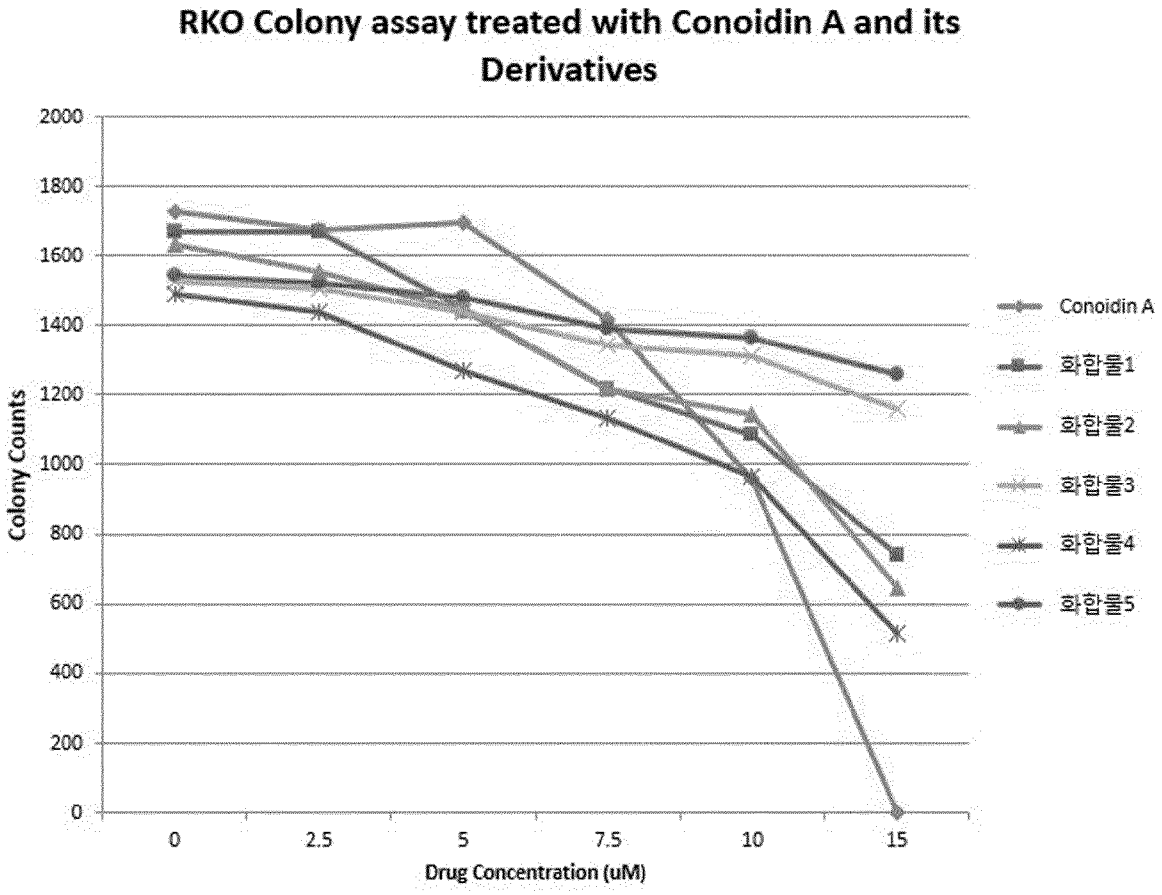
[도72]


Prx2/화합물-4
Prx2&화합물-4
Prx2 control
Absorbance at 340 nm
Time(sec)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
100
200
300
400
500
600

[도73]


Prx2/화합물-5
Absorbance at 340 nm
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
100
200
300
400
500
600
Time(sec)
Prx2&화합물-5
Prx2 control

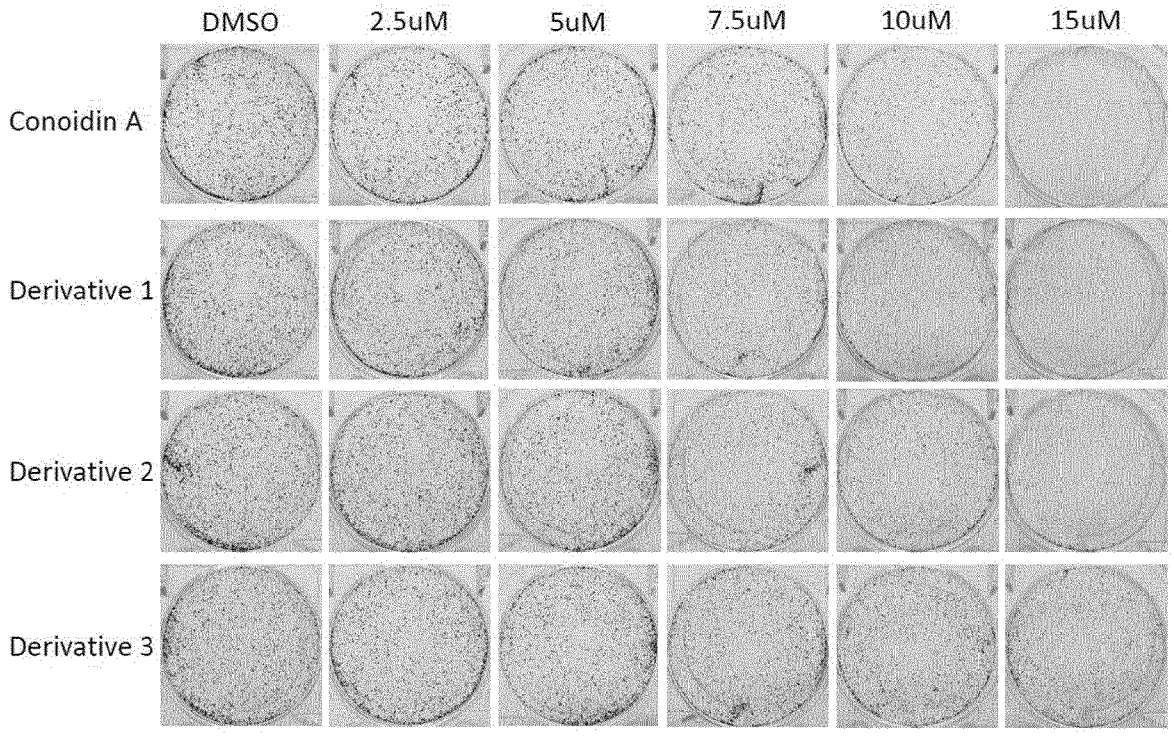
[도74]


RKO Colony assay treated with Conoidin A and its Derivatives
Colony Counts
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
2.5
5
7.5
10
15
Drug Concentration (uM)
Conoidin A
화합물1
화합물2
화합물3
화합물4
화합물5

[도75]

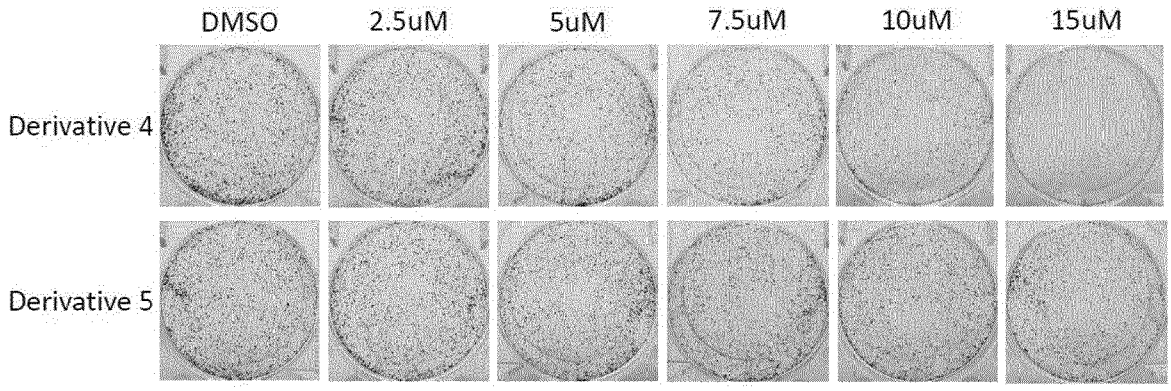
a)

3000 **RKO** cells/6-well; 1 day of seeding + 6 days incubation (20180521 Lab Presentation)

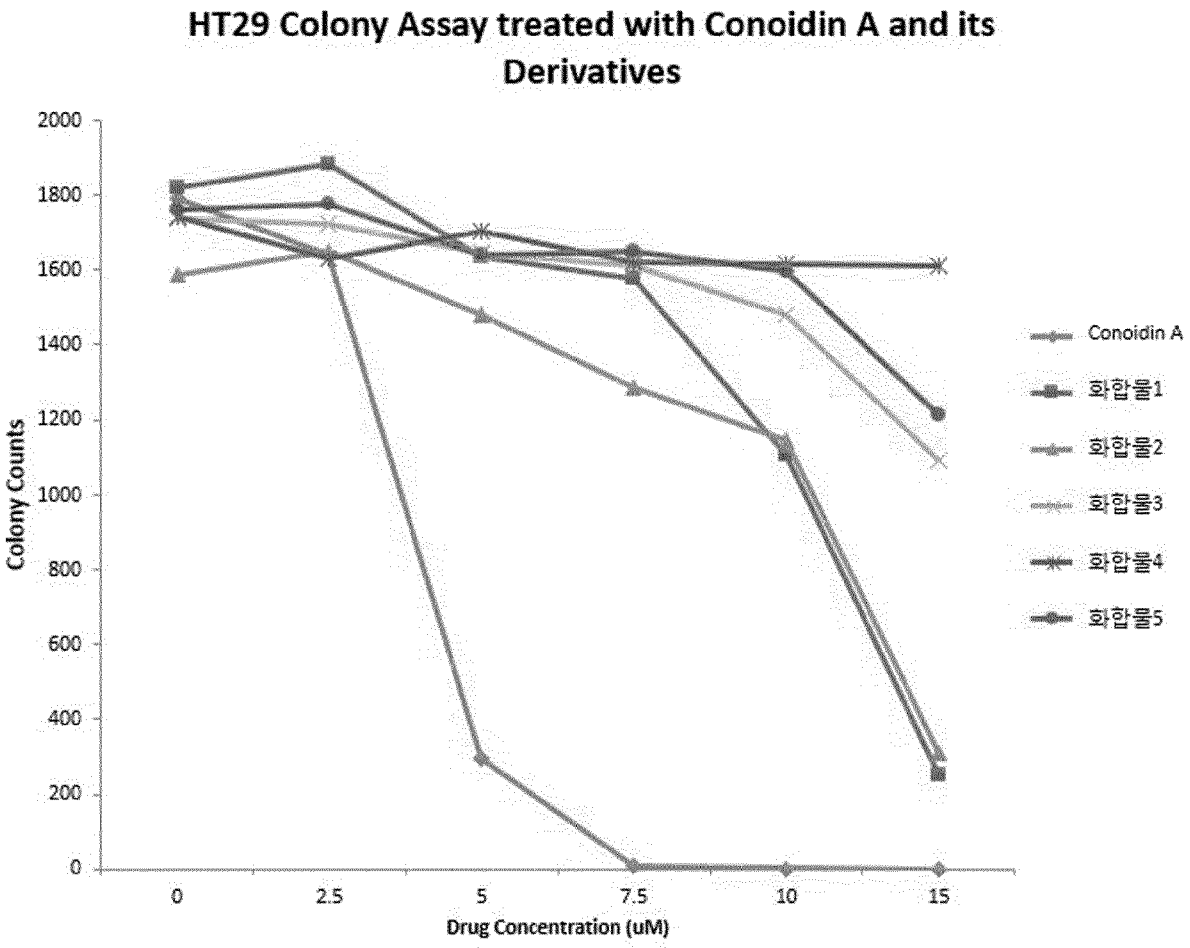


b)

3000 **RKO** cells/6-well; 1 day of seeding + 6 days incubation



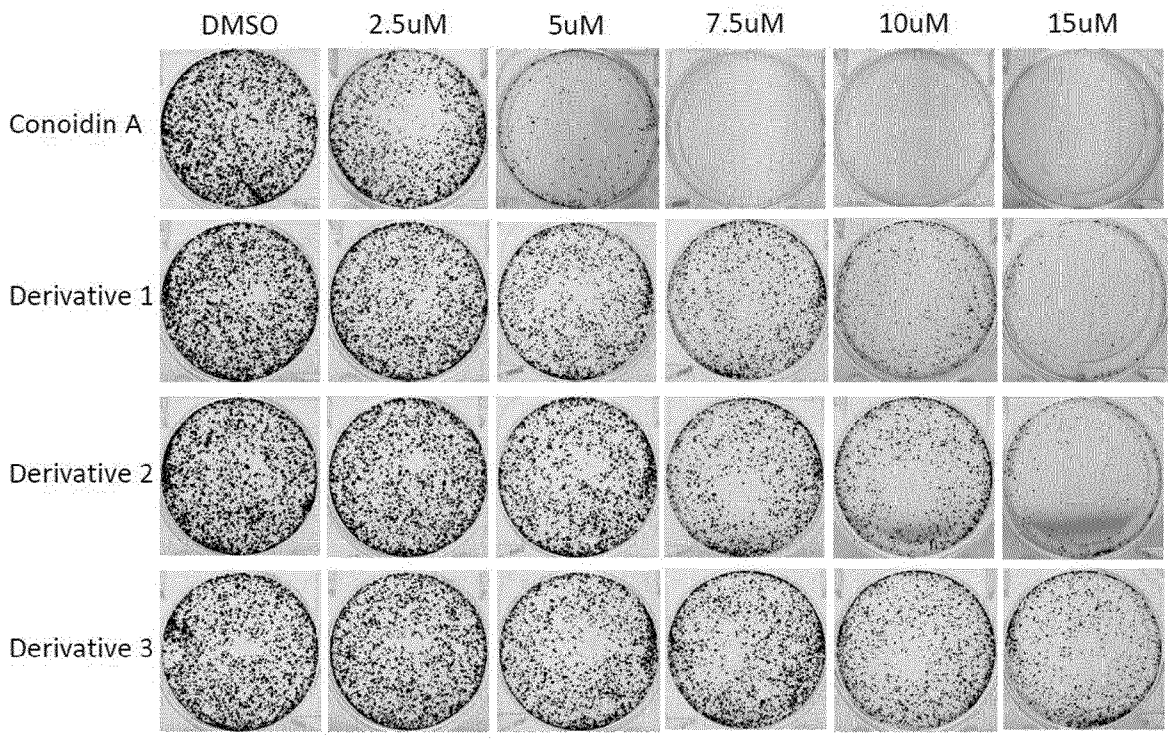
[도76]


HT29 Colony Assay treated with Conoidin A and its Derivatives
Colony Counts
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
2.5
5
7.5
10
15
Drug Concentration (uM)
Conoidin A
화합물1
화합물2
화합물3
화합물4
화합물5

[도77]

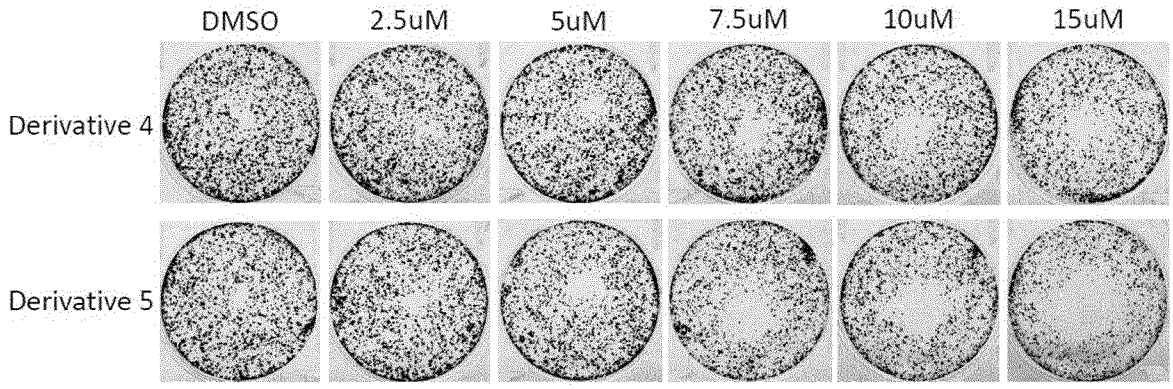
a)

3000 **HT29** cells/6-well; 1 days seeding + 9 days incubation (20180521 Lab Presentation)



b)

3000 **HT29** cells/6-well; 1 days seeding + 9 days incubation



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/007316

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/498(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K 31/498

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, Caplus), Google & Keywords: peroxidoredoxin II, Prx II, inhibitor, colorectal cancer, pharmaceutical composition

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HARALDSEN, J. D. et al., "Identification of Conoidin A as a Covalent Inhibitor of Peroxiredoxin II", Organic & Biomolecular Chemistry, 2009, vol. 7, no. 15, pages 3040-3048 See abstract; page 3041, left column; figure 1.	1-8
X	LIU, G. et al., "Optimisation of Conoidin A, a Peroxiredoxin Inhibitor", ChemMedChem, 2010, vol. 5, pages 41-45 See page 41, left column; formula 1; table 2.	1-8
X	NGUYEN, J. B. et al., "Peroxiredoxin-1 from the Human Hookworm Ancylostoma Ceylanicum Forms a Stable Oxidized Decamer and Is Covalently Inhibited by Conoidin A", Chemistry & Biology, 2013, vol. 20, no. 8, pages 991-1001 See abstract; page 991, right column; figures 2, 4.	1-8
A	PENG, L. L. et al., "Peroxiredoxin 2 Is Associated with Colorectal Cancer Progression and Poor Survival of Patients", Oncotarget, 24 January 2017, vol. 8, no. 9, pages 15057-15070 See the entire document.	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
29 OCTOBER 2018 (29.10.2018)	**29 OCTOBER 2018 (29.10.2018)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2018/007316

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LU, W. et al., "Peroxiredoxin 2 Is Upregulated in Colorectal Cancer and Contributes to Colorectal Cancer Cells' Survival by Protecting Cells from Oxidative Stress", Molecular and Cellular Biochemistry, 2014, vol. 387, pages 261-270 See the entire document.	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2018/007316

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
None			

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2018/007316

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/498(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A61K 31/498

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN(Registry, Caplus), 구글 & 키워드: 퍼록시레독신 II, Prx II, 억제제, 대장암, 약학적 조성물

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	HARALDSEN, J. D. 등, "Identification of conoidin A as a covalent inhibitor of peroxiredoxin II", Organic & Biomolecular Chemistry, 2009, 제7권, 제15호, 페이지 3040-3048 초록; 페이지 3041, 좌측 컬럼; 도면 1 참조.	1-8
X	LIU, G. 등, "Optimisation of conoidin A, a peroxiredoxin inhibitor", ChemMedChem, 2010, 제5권, 페이지 41-45 페이지 41, 좌측 컬럼; 도식 1; 표 2 참조.	1-8
X	NGUYEN, J. B. 등, "Peroxiredoxin-1 from the human hookworm Ancylostoma ceylanicum forms a stable oxidized decamer and is covalently inhibited by conoidin A", Chemistry & biology, 2013, 제20권, 제8호, 페이지 991-1001 초록; 페이지 991, 우측 컬럼; 도면 2, 4 참조.	1-8
A	PENG, L. L. 등, " Peroxiredoxin 2 is associated with colorectal cancer progression and poor survival of patients", Oncotarget, 2017.01.24, 제8권, 제9호, 페이지 15057-15070 전체 문헌 참조.	1-8

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2018년 10월 29일 (29.10.2018)	2018년 10월 29일 (29.10.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
이기철
전화번호 +82-42-481-3353

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2018/007316

C(계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	LU, W. 등, "Peroxiredoxin 2 is upregulated in colorectal cancer and contributes to colorectal cancer cells' survival by protecting cells from oxidative stress", Molecular and Cellular Biochemistry, 2014, 제387권, 페이지 261-270 전체 문헌 참조.	1-8

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2018/007316

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일

없음