

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0128285
(43) 공개일자 2022년09월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4439 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/4439 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
- (21) 출원번호 10-2022-0027345
 (22) 출원일자 2022년03월03일
 심사청구일자 2022년03월03일
- (30) 우선권주장
 1020210032693 2021년03월12일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
 주식회사 온코크로스
 서울특별시 마포구 새창로 11, 15층, 16층(도화동, 공덕빌딩)
- 경희대학교 산학협력단
 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
- (72) 발명자
 김이랑
 세종특별자치시 도움3로 159, 308동 803호(종촌동, 가재마을3단지)
- 박상윤
 서울특별시 구로구 개봉로20길 6, 115동 1504호(개봉동, 현대아파트1단지)
- (74) 대리인
 위병갑

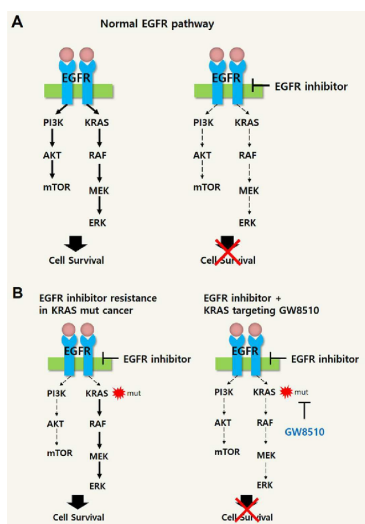
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 항암제 내성 암의 치료를 위한 조성물

(57) 요약

본 발명은 KRAS 돌연변이 암에서 EGFR-TKI 내성을 극복할 수 있는 항암제에 관한 것으로, 본 발명에 따른 GW8510는 항암제인 EGFR 억제제에 대한 내성을 나타내는 암에서 발생하는 암 유발 유전자 돌연변이, 특히, KRAS 돌연변이에 대한 효과적인 억제제이며, KRAS 야생형 및 다양한 돌연변이형 모두의 발현을 현저히 억제함으로써 약물 자체가 항암 효과를 보이고, 항암제 내성도 극복하였으며, 항암제와 병용 처리시 항암제 내성 암세포의 사멸을 현저히 촉진하였으므로, 이를 암, 특히 내성암의 치료 용도로 유용하게 활용할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

최진우

경기도 성남시 분당구 정자일로 120, C동 1804호(
정자동, 삼성아데나루체)

이수민

서울특별시 동대문구 이문로 3, 1205호(회기동)

명세서

청구범위

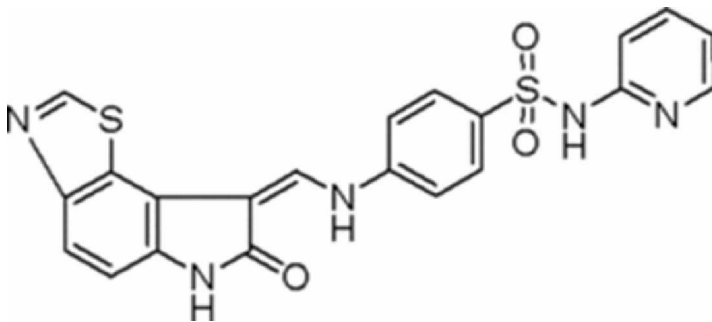
청구항 1

GW8510 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, GW8510은 하기 화학식 1로 표시되는, 암의 예방 또는 치료용 약학조성물:

[화학식 1]



청구항 3

제 1항에 있어서, 암은 고형암인, 암의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 암은 항암제 내성암인, 암의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 암은 EGFR 억제제 내성암인, 암의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, EGFR 억제제는 다코미티닙(dacomitinib), 오시머티닙(osimertinib), 세톡시맙(cetuximab), 파이로티닙(Pyrotinib), 엘코티닙(Lcotinib), 파니투무맙(panitumumab), 잘루투무맙(zalutumumab), 니모투주맙(Nimotuzumab), 마투주맙(matuzumab), 제피티닙(gefitinib), 엘로티닙(erlotinib), 라파티닙(Lapatinib), 네라티닙(neratinib), 반데타닙(vandetanib), 네시투무맙(necitumumab), 아파티닙(afatinib), AP26113, EGFR 저해제 (CAS 번호 879127-07-8), EGFR/ErbB-2/ErbB-4 저해제 (CAS 번호 881001-19-0), EGFR/ErbB-2 저해제 (CAS 번호 179248-61-4), EGFR 저해제 II (BIBX 1382, CAS 번호 196612-93-8), EGFR 저해제 III (CAS 번호 733009-42-2), EGFR/ErbB-2/ErbB-4 저해제 II (CAS 번호 944341-54-2) 또는 PKC β II/EGFR 저해제 (CAS 번호 145915-60-2)인, 암의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 암은 EGFR TKIs(Tyrosine Kinase Inhibitors) 내성암인, 암의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 암은 KRAS 돌연변이를 가진 암인, 암의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, KRAS 돌연변이는 G13D, G12C 또는 G12D인, 암의 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 10

GW8510 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 포함하는 항암 보조제.

청구항 11

제 10항에 있어서, 항암제와 병용하여 투여되는 항암 보조제.

청구항 12

제 11항에 있어서, 항암제와 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여되는 항암 보조제.

청구항 13

제 11항에 있어서, 항암제는 EGFR 억제제인, 항암 보조제.

청구항 14

제 11항에 있어서, 항암제는 EGFR TKIs(Tyrosine Kinase Inhibitors)인, 항암 보조제.

청구항 15

제 11항에 있어서, 항암제는 다코미티닙(dacomitinib), 오시머티닙(osimertinib), 세톡시맙(cetuximab), 파이로티닙(Pyrotinib), 엘코티닙(Lcotinib), 파니투무맙(panitumumab), 잘루투무맙(zalutumumab), 니모투주맙(Nimotuzumab), 마투주맙(matuzumab), 제피티닙(gefitinib), 엘로티닙(erlotinib), 라파티닙(Lapatinib), 네라티닙(neratinib), 반데타닙(vandetanib), 네시투무맙(necitumumab), 아파티닙(afatinib), AP26113, EGFR 저해제 (CAS 번호 879127-07-8), EGFR/ErbB-2/ErbB-4 저해제 (CAS 번호 881001-19-0), EGFR/ErbB-2 저해제 (CAS 번호 179248-61-4), EGFR 저해제 II (BIBX 1382, CAS 번호 196612-93-8), EGFR 저해제 III (CAS 번호 733009-42-2), EGFR/ErbB-2/ErbB-4 저해제 II (CAS 번호 944341-54-2) 또는 PKC β II/EGFR 저해제 (CAS 번호 145915-60-2)인, 항암 보조제.

청구항 16

제 10항에 있어서, 항암제에 대한 내성을 억제하는, 항암 보조제.

청구항 17

GW8510 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 18

제 17항에 있어서, 암은 EGFR 억제제 내성암인, 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 19

제 17항에 있어서, 암은 KRAS 돌연변이를 가진 암인, 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항암제 내성 암의 치료를 위한 조성물에 관한 것으로, KRAS 돌연변이 암에서 EGFR-TKI 내성을 극복할 수 있는 항암제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간의 몸을 구성하고 있는 가장 작은 단위를 세포(cell)이라 부르는데 정상적인 세포는 세포 내 조절기능에 의해 분열하며 성장하고 죽어 없어지기도 하며 세포수의 균형을 유지한다. 어떤 원인으로 세포가 손상을 받은 경우, 치료를 받아 정상 세포로 역할을 하거나 회복이 안 된 경우 스스로 사멸하게 된다. 그러나 여러 가지 이유로 인해 세포의 유전자에 변화가 일어나면 비정상적으로 세포가 변하여 불완전하게 성숙하고, 세포주기가 조절

되지 않아 세포분열을 계속하는데 이를 암(cancer)이라 정의한다. 이러한 암은 다양한 정도의 유병율로 신체의 모든 조직 및 장기에 영향을 미친다. 암에 대한 다수의 치료제가 지난 수십년 동안 여러 종류의 암 치료를 위해 개발되어 왔다. 가장 흔히 사용되는 항암제의 종류는 DNA-알킬화제 (예를 들어, 시클로포스파미드, 이포스파미드), 대사길항물질 (예를 들어, 메토틱렉세이트, 엽산 길항제, 및 5-플루오로우라실, 피리미딘 길항제), 미소관 붕괴제 (예를 들어, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 파클리탁셀), DNA 삽입제 (intercalator) (예를 들어, 독소루비신, 다우노마이신, 시스플라틴), 및 호르몬 요법 (예를 들어, 타목시펜, 플루타미드) 등이 있다.

[0003] 이 중, 표적 치료제인 EGFR 억제제는 크게 단클론 항체와 소분자 EGFR 티로신 키나아제(tyrosine kinase) 억제제로 나뉜다. 티로신 키나아제 수용체의 HER 패밀리에 속한 하나인 EGFR(epidermal growth factor receptor)은 세포증식, 신생혈관형성, 침윤 및 전이를 매개한다 (Harari PM, et al. J Clin Oncol. 2007;25:4057-65; Yarden Y, et al. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001;2:127-37). EGFR의 비정상적인 발현은 다수의 종양에서 빈번히 관찰되고, 강력한 종양 형성 잠재력(oncogenic potential)이 있는 것으로 알려져 있다 (Hirsch FR, et al. J Clin Oncol. 2003;21:3798-807; Rubin Grandis J, et al. J Natl Cancer Inst. 1998;90:824-32). 게피티닙(gefitinib) 및 엘로티닙(erlotinib)과 같은 1세대 EGFR 티로신 키나아제 억제제(Tyrosine Kinase Inhibitors, TKIs)는 가역적으로 EGFR 인산화효소 도메인 내의 ATP 클레프트(ATP cleft)에 결합하여 EGFR의 자기인산화를 억제한다 (Mendelsohn J, et al. J Clin Oncol. 2003;21:2787-99).

[0004] 한편, 포유동물 ras 유전자 패밀리의 Kirsten ras 종양유전자 동족체(homolog)인 KRAS(K-Ras)는 암의 진행과 임상 예후 및 치료 결과와 관련이 있으며, KRAS 돌연변이는 약 20%의 인간 암 발병 이전의 기저를 이루며, 췌장암의 90% 이상, 대장직장암의 40% 이상, 폐 선암의 30% 이상에서 발생한다 (Cox AD, et al. Nature Reviews. Drug Discovery. 13(11): 828-51.). 돌연변이 KRAS 환자는 다른 돌연변이와 비교하여 생존 기간이 더 짧고, KRAS의 돌연변이는 RAF-MEK-ERK 및 PI3K-AKT-mTOR와 같은 신호 경로의 과도한 활성화를 유도하여, 세포 성장, 악성 형질 전환 및 약물 내성에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다. KRAS가 돌연변이가 생기는 경우, KRAS 하위 signal들이 EGFR의 활성화와 상관 없이 활성화되기 때문에 기존의 항 EGFR 억제제에 대해서도 효과가 없다. 이는 환자 데이터에도 같은 결과를 보여주는데, 야생형(wild type) KRAS 대장암의 경우 항 EGFR 억제제 투여시 일반적인 보존적 치료만 시행하는 경우보다 생존율이 나아지지만, KRAS 돌연변이 대장암의 경우 항 EGFR 억제제 투여시에도 효과를 보이지 않는다, 이런 데이터를 바탕으로 현재 KRAS 돌연변이 대장암의 경우 표준치료에도 항 EGFR 억제제의 사용이 배제되어진다. 특히, KRAS 돌연변이는 결장암에서 파니투무맙(panitumumab) (Vectibix) 및 세툽시맙(cetuximab) (Erbix) 치료 요법에 대해 큰 내성을 가지며, 폐암에서 엘로티닙(erlotinib) (Tarceva) 및 게피티닙(gefitinib) (Iressa)를 이용한 치료에도 큰 내성을 나타내는 것으로 보고되었다 (Suda K, et al. Cancer Metastasis Reviews. 29 (1): 49-60.). 이와 같은, RAS 단백질은 암에서 가장 자주 변이된 유전자임에도 불구하고, RAS를 공격하는 다중 표적 치료법은 신호 전달, 피드백 루프, 중복성, 종양 이질성(tumor heterogeneity) 및 RAS 표면의 저분자 물질이 결합 가능한 소수성 포켓의 부재 등의 이유로 인해 실패를 초래할 수 있기 때문에 RAS 단백질은 “undruggable”로 간주되어왔다. 예를 들어, AKT 억제제 개발은 높은 저항력, 심한 고혈당증 및 기타 대사 이상을 포함하여 광범위한 한계를 부딪쳤으며, ERK 억제제의 사용은 심장 및 안과 부작용뿐만 아니라 발진, 설사, 말초 부종, 피로 및 여드름 피부염으로 인해 제한되고 있다. 따라서 이러한 발암 경로를 억제할 수 있는 새로운 표적 약물치료는 과학자로부터 많은 연구 관심을 끌고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 암의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 목적은 항암 보조제를 제공하는 것이다.

[0007] 아울러, 본 발명의 목적은 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적의 달성을 위해, 본 발명은 GW8510 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 GW8510 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는 항암 보조제를

제공한다.

[0010] 아울러, 본 발명은 GW8510 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 GW8510는 항암제인 EGFR 억제제에 대한 내성을 나타내는 암에서 발생하는 암 유발 유전자 돌연변이, 특히, KRAS 돌연변이에 대한 효과적인 억제제이며, KRAS 야생형 및 다양한 돌연변이형 모두의 발현을 현저히 억제함으로써 약물 자체가 항암 효과를 보이고, 항암제 내성도 극복하였으며, 항암제와 병용 처리시 항암제 내성 암세포의 사멸을 현저히 촉진하였으므로, 이를 암, 특히 내성암의 치료 용도로 유용하게 활용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 바이오인포메틱스 분석을 수행하여, KRAS (K-Ras)를 억제할 수 있는 약물을 선별한 도이다:

A: CRC 환자의 DEG Heatmap;

B: KRAS 발현이 높은 20% 그룹 및 KRAS 발현이 낮은 20% 그룹의 약물에 의한 유전자 네트워크 변화 모식도;

C: 약물에 의해 재구성된 유전자 모식도; 및

D: GW8510의 화학 구조.

도 2는 KRAS G13D 돌연변이를 가진 암세포주 HCT116에 대한 GW8510의 KRAS 발현 억제 효과를 확인한 도이다.

도 3은 KRAS G13D 돌연변이를 가진 암세포주 HCT116에 대한 GW8510의 KRAS, XIAP 및 NFYA의 발현 억제 효과를 확인한 도이다.

도 4는 다양한 KRAS 돌연변이를 가진 암세포주들에서의 GW8510의 KRAS, XIAP 및 NFYA 발현 억제 효과를 Endpoint PCR로 확인한 도이다.

도 5는 다양한 KRAS 돌연변이를 가진 암세포에서 GW8510에 의한 KRAS 발현 수준 감소를 Endpoint PCR (A), qRT-PCR (B), 표현형 (C) 및 면역 블롯 (D)으로 확인한 도이다.

도 6은 GW8510의 항암 활성 및 EGFR 억제제 항암제 (항-EGFR 단일클론 항체인 세툽시맙 및 항-EGFR 타이로신 수용체 카이네이즈 억제제인 엘로티닙)와의 병용 처리에 의한 항암 활성을 항암제 내성 암인 HCT116 세포주에서 확인한 도이다.

도 7은 GW8510의 항암 활성 및/또는 EGFR 억제제 항암제 (항-EGFR 단일클론 항체인 세툽시맙)에 의한 항암 활성을 *in vivo*로 확인한 도이다.

도 8은 HCT116 세포주에서 GW8510 및 이외의 다른 Cdk 억제제들의 KRAS 발현 억제 효과 비교 및 세포 주기 분석 결과를 나타낸 도이다:

A: GW8510 및 이외의 다른 Cdk 억제제들의 KRAS 발현 Endpoint PCR 데이터;

B: GW8510 및 이외의 다른 Cdk 억제제들의 KRAS 발현 qRT-PCR 데이터;

C: PI 염색 유세포 분석 데이터; 및

D: 세포 주기 변화 집단 변화 그래프.

도 9는 HCT116 세포주에서 GW8510 및 이외의 다른 Cdk 억제제들의 KRAS 발현 억제 효과를 Endpoint PCR로 비교한 도이다.

도 10은 정상 EGFR 경로 (A), EGFR 억제제에 의한 항암 활성 기전 (B), KRAS 돌연변이에 의한 EGFR 억제제 내성 암의 기전 (C) 및 GW8510의 KRAS 돌연변이 억제를 통한 EGFR 억제제 내성 암의 사멸 기전 (D)을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현으로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현에는 본

발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0014] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

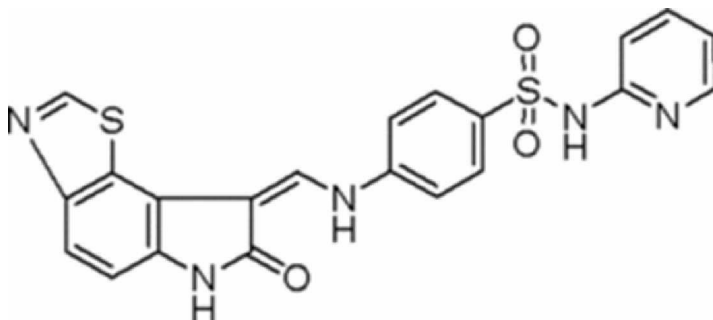
[0015] 본 명세서 전반을 통하여, 천연적으로 존재하는 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용될 뿐만 아니라 Aib(α -아미노이소부티르산), Sar(N-methylglycine) 등과 같은 다른 아미노산에 대해 일반적으로 허용되는 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 발명에서 약어로 언급된 아미노산은 하기와 같이 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재되었다:

[0016] 알라닌: A, 아르기닌: R, 아스파라긴: N, 아스파르트산: D, 시스테인: C, 글루탐산: E, 글루타민: Q, 글리신: G, 히스티딘: H, 이소류신: I, 류신: L, 리신: K, 메티오닌: M, 페닐알라닌: F, 프롤린: P, 세린: S, 트레오닌: T, 트립토판: W, 티로신: Y 및 발린: V.

[0018] 일 측면에서, 본 발명은 GW8510 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것이다.

[0019] 일 구현예에서, GW8510은 하기 화학식 1로 표시될 수 있다:

[0020] [화학식 1]



[0021]

[0022] 일 구현예에서, 암은 고형암일 수 있으며, 항암제 내성암일 수 있고, EGFR 억제제 내성암일 수 있으며, EGFR TKIs(Tyrosine Kinase Inhibitors) 내성암일 수 있다.

[0023] 일 구현예에서, EGFR 억제제는 다코미티닙(dacomitinib), 오시메티닙(osimertinib), 세톡시맙(cetuximab), 파이로티닙(Pyrotinib), 엘코티닙(Lcotinib), 파니투무맙(panitumumab), 잘루투무맙(zalututumab), 니모투주맙(Nimotuzumab), 마투주맙(matuzumab), 제피티닙(gefitinib), 엘로티닙(erlotinib), 라파티닙(Lapatinib), 네라티닙(neratinib), 반데타닙(vandetanib), 네시투무맙(necitumumab), 아파티닙(afatinib), AP26113, EGFR 저해제 (CAS 번호 879127-07-8), EGFR/ErbB-2/ErbB-4 저해제 (CAS 번호 881001-19-0), EGFR/ErbB-2 저해제 (CAS 번호 179248-61-4), EGFR 저해제 II (BIBX 1382, CAS 번호 196612-93-8), EGFR 저해제 III (CAS 번호 733009-42-2), EGFR/ErbB-2/ErbB-4 저해제 II (CAS 번호 944341-54-2) 또는 PKC β II/EGFR 저해제 (CAS 번호 145915-60-2)일 수 있다.

[0024] 일 구현예에서, 암은 KRAS 돌연변이를 가진 암일 수 있으며, KRAS 돌연변이는 G13D, G12C 또는 G12D일 수 있다.

[0025] 일 구현예에서, 상기 암은 뇌종양, 흑색종, 비-흑색종 피부암, 골수종, 구강암, 침샘암, 간암, 간세포 암종, 위암, 결장암, 결장직장 선암종, 유방암, 폐암, 소세포폐암, 비소세포성폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 두경부 편평세포 암종, 대장암, 소장암, 직장암, 교모세포종, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁경부암, 난소암, 자궁내막암, 자궁 편평세포 암종, 자궁 샘암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 식도위 샘암종, 식도위암, 식도 편평세포 암종, 임파선암, 방광암, 방광 요로상피 암종, 상부관 요로상

피 암종, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 배아세포 종양, 크롬친화 세포종, 흉선 종양, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 확산성 고아종, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 팽대 암종, 부신피질 암종, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 결장암, 폐암, 췌장암, 전립선암 또는 유방암인 것이 더욱 바람직하다.

[0026] 일 구현예에서, 상기 조성물은 XIAP 또는 NYFA 발현 억제제를 추가로 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 용어, "항암제 내성(drug-resistance)"은 항암제 치료 요법에 대하여 극히 낮은 감수성을 나타내어 상기 치료 요법에 의하여 암의 증세가 호전, 완화, 경감 또는 치료증상을 나타내지 않는 증상을 말한다. 항암제 내성은 암이 특정 항암제 치료 요법에 대하여 처음부터 내성을 가질 수 있고, 최초에는 내성을 나타내지 않았으나 긴 시간의 치료로 인하여 암세포의 성질이 변하여 동일한 치료제에 대해 더 이상 감수성을 나타내지 않게 되어 나타날 수 있으나, 본 발명에서 항암제 내성은 KRAS의 돌연변이에 의해 나타난 것이다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분으로서 GW8510 이외에 공지된 항암제를 추가로 포함할 수 있고, 이들 질환의 치료를 위해 공지된 다른 치료와 병용될 수 있다. 다른 치료에는 화학요법, 방사선치료, 호르몬 치료, 골수 이식, 줄기-세포 대체치료, 다른 생물학적 치료, 면역치료 등이 포함되지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0029] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명의 조성물의 투여로 암세포의 사멸 또는 암의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0030] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 대상 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적 부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효용성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.

[0031] 본 발명의 약학조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 암의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0033] 일 구현예에서, 상기 약학조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있으며, 경구형 또는 주사 제형이 더욱 바람직하다.

[0034] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 개체 또는 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것

을 의미하며, 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사 제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 상기 암이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학적 조성물을 개체에게 투여함으로써 상기 질환들을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 기존의 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[0036] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 일 측면에서, 본 발명은 GW8510 또는 약제학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 포함하는 항암 보조제에 관한 것이다.

[0038] 일 구현예에서, 본 발명의 항암 보조제는 항암제와 병용하여 투여될 수 있다.

[0039] 일 구현예에서, 본 발명의 항암 보조제는 항암제와 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여될 수 있다.

[0040] 일 구현예에서, 본 발명의 항암 보조제는 항암제에 대한 내성을 억제할 수 있다.

[0041] 일 구현예에서, 상기 항암제는 EGFR 억제제일 수 있으며, EGFR TKIs(Tyrosine Kinase Inhibitors)일 수 있다.

[0042] 일 구현예에서, 항암제는 다코미티닙(dacomitinib), 오시머티닙(osimertinib), 세특시맙(cetuximab), 파이로티닙(Pyrotinib), 엘코티닙(Lcotinib), 파니투무맙(panitumumab), 잘루투무맙(zalututumab), 니모투주맙(Nimotuzumab), 마투주맙(matuzumab), 제피티닙(gefitinib), 엘로티닙(erlotinib), 라파티닙(Lapatinib), 네라티닙(neratinib), 반데타닙(vandetanib), 네시투무맙(necitumumab), 아파티닙(afatinib), AP26113, EGFR 저해제 (CAS 번호 879127-07-8), EGFR/ErbB-2/ErbB-4 저해제 (CAS 번호 881001-19-0), EGFR/ErbB-2 저해제 (CAS 번호 179248-61-4), EGFR 저해제 II (BIBX 1382, CAS 번호 196612-93-8), EGFR 저해제 III (CAS 번호 733009-42-2), EGFR/ErbB-2/ErbB-4 저해제 II (CAS 번호 944341-54-2) 또는 PKC β II/EGFR 저해제 (CAS 번호 145915-60-2)일 수 있다.

[0043] 본 발명의 용어, "항암 보조제"는 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있는 제제로서, 그 자체로는 항암활성을 나타내지 않으나 항암제와 함께 사용될 경우, 상기 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있는 제제일 수 있다. 또한, 농도의존적인 항암활성을 나타내는 제제를 그 자체로는 항암활성을 나타내지 않은 수준으로 항암제와 함께 사용할 경우, 상기 항암제의 항암효과를 개선, 향상 또는 증대시킬 수 있는 제제일 수 있다.

[0044] 항암 보조제의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 항암 보조제는 목적하는 바에 따라 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기 항암 보

조제는 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0045] 일 측면에서, 본 발명은 GW8510 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0046] 일 구현예에서, 암은 EGFR 억제제 내성암일 수 있으며, KRAS 돌연변이를 가진 암일 수 있다.

[0047] 본 발명의 조성물을 식품 조성물로 사용하는 경우, 상기 GW8510을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상의 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 조성물은 유효성분 이외에 식품 학적으로 허용가능한 식품보조첨가제를 포함할 수 있으며, 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0048] 본 발명에서 사용되는 용어 "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 향신제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0049] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 통상의 기술분야에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 항암제의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

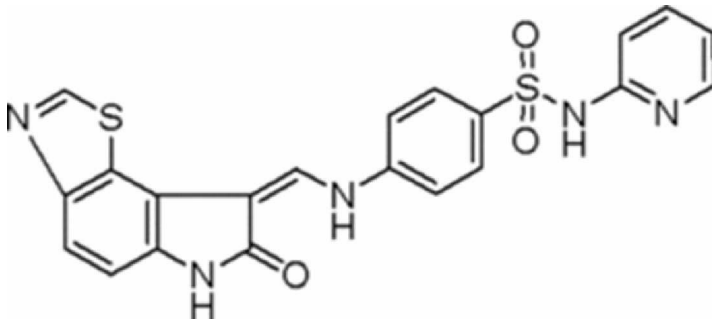
[0050] 또한, 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 건강식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 GW8510을 활성 성분으로 포함하는 조성물은 당업자의 선택에 따라 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 추출물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.

[0052] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0054] 실시예 1. kras 표적 약물 선발

[0055] 바이오인포메틱스 분석을 수행하여, KRAS (K-Ras)를 억제할 수 있는 약물을 선발하였다. 구체적으로, 대장 암(CRC)의 RNA-seq 데이터는 총 331 개의 샘플 (KRAS 높은 그룹 57 환자 및 KRAS 낮은 그룹 56 환자)에서 차등 발현된 유전자 (Differentially Expressed Genes, DEG)의 발현값을 Cancer Genome Atlas Program (TCGA)에서 다운로드하고 AI 플랫폼을 이용하여 통계적으로 처리하여 대조군과 비교군 간에 발현이 유의한 유전자 후보군을 선발하였다. 또한, 모든 약물의 DEG는 CMAP (Connectivity MAP) 데이터베이스에서 추출하였다. CRC 환자는 KRAS 발현에 따라 두 그룹으로 분류되었으며 (KRAS 발현이 높은 20% 그룹 및 KRAS 발현이 낮은 20% 그룹) (도 1A), 이 두 그룹의 유전자 발현 패턴을 비교하여 차별적으로 발현된 유전자 (DEG)를 얻었다 (도 1B). 상기 CRC DEG 및 약물 DEG를 분석하여 KRAS 발현이 높은 20% 그룹에서 KRAS 발현이 낮은 20% 그룹으로 유전자 패턴을 변경할 수 있는 약물 후보를 결정한 결과 (도 1C), 하기 화학식 1의 cyclin-dependent kinase 2 억제제인 GW8510가 KRAS 발현 억제제로 선택되었다 (도 1D).

화학식 1



실시예 2. 다양한 KRAS 돌연변이를 가진 암세포에서 GW8510에 의한 효과 확인

2-1. KRAS 돌연변이를 가진 암세포들에서 KRAS mRNA 발현 억제 효과 확인

GW8510에 의한 KRAS 발현 억제 효과를 확인하기 위해, KRAS에 G13D 돌연변이를 가진 인간 대장암 세포주 HCT116, KRAS에 G13D 돌연변이를 가진 인간 전립선암 세포주 PC-3, KRAS 야생형 세포주인 인간 유방암 세포주 MCF7, KRAS에 G12C 돌연변이를 가진 인간 췌장암 세포주 MIA PaCa-2 및 KRAS에 G12D 돌연변이를 가진 인간 췌장암 세포주 PANC-1를 6-웰 플레이트에 분주하고 GW8510을 0,1,5 또는 10 μ M의 농도로 3, 6, 24 또는 48시간 처리한 후 세포에서 RNA를 TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)을 이용하여 추출한 뒤, M-MLV reverse-transcriptase (ELPIS Biotech, Korea), 2.5 mM dNTP (TransGen Biotech, China) 및 oligo dT15 (bioneer, Korea)를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성한 cDNA, Taq 중합효소 마스터 믹스 및 하기 표 1의 프라이머를 혼합한 Endpoint PCR 용액과 QuantStudio 3 Real-Time PCR Instrument (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)을 이용하여 Endpoint PCR을 수행하였다. 그 후, 아가로스 겔에 로딩하여 KRAS의 mRNA 수준을 확인하였다. 아울러, KRAS와 함께 NYFA(Nuclear transcription factor Y) 및 세포사멸을 억제하는 단백질인 XIAP(X-linked inhibitor of apoptosis protein)의 mRNA 수준도 확인하였다.

표 1

Gene	Classification	Sequence
KRAS	Forward	5'-GAGGCCTGCTGAAAATGACTG-3'
	Reverse	5'-ATTACTACTTGCTTCCTGTAGG -3'
GAPDH	Forward	5'-CAAAAGGGTCATCATCTCTG-3'
	Reverse	5'-CCTGCTTCACCACCTTCTG -3'

그 결과, KRAS G13D 돌연변이를 가진 결장암 세포에서 GW8510 처리 6시간차부터 GW8510의 농도에 의존적으로 KRAS의 mRNA 발현 수준이 감소하는 것으로 나타났으며 (도 2), XIAP 및 NFYA의 mRNA 발현 수준도 감소하는 것으로 나타났다 (도 3). 또한, KRAS에 G13D 돌연변이를 가진 인간 전립선암 세포주 PC-3, KRAS에 G12C 돌연변이를 가진 인간 췌장암 세포주 MIA PaCa-2 및 KRAS에 G12D 돌연변이를 가진 인간 췌장암 세포주 PANC-1 모두에서 GW8510 처리에 의해 KRAS mRNA 수준을 감소되는 것을 확인하였으며, KRAS 야생형 세포주인 인간 유방암 세포주 MCF7에서도 KRAS의 mRNA 수준이 감소되는 것으로 나타나, KRAS 전사 수준이 이들 모든 세포에서 GW8510에 의해 현저하게 저하되는 것을 확인할 수 있었다. 아울러, 상기 세포주 모두에서 XIAP 및 NFYA의 mRNA 수준도 감소하는 것으로 나타났다 (도 4).

2-2. KRAS 돌연변이를 가진 암세포들에서 KRAS 단백질 발현 억제 효과 확인

결장암 세포주 HCT116 (KRAS G13D mut), 췌장암 세포주 PANC-1 (KRAS G12D mut), MIA PaCa-2 (KRAS G12C mut) 및 유방암 세포주 MCF7 (KRAS wt)를 6-웰 플레이트에 분주하고 GW8510을 0,1,5 또는 10 μ M의 농도로 24시간 동안 처리한 후, Endpoint PCR를 수행하였다. 또한, SYBR 그린 마스터 믹스, 상기 실시예 2-1의 cDNA 및 표 1의

프라이머를 혼합하여 qRT-PCR 용액을 제작하고 QuantStudio 3 Real-Time PCR Instrument (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)로 qRT-PCR을 수행하여 유전자 발현 정도를 정량하였다. 아울러, GW8510를 0 또는 10 μ M의 농도로 24시간 동안 처리한 결장암 세포주 HCT116를 이용하여 GW8510 처리에 의한 암세포주의 표현형을 관찰하고, pan ras, K-ras 및 β -actin의 단백질 발현량을 면역 블롯으로 확인하였다. 구체적으로, GW8510를 0 또는 10 μ M의 농도로 24시간 동안 처리한 결장암 세포주 HCT116를 RIPA buffer (Curebio, Korea)로 파쇄한 후, 세포 파쇄물을 원심분리하고 상등액을 취하였다. 세포 파쇄물 상등액에 5x SDS 샘플 버퍼를 첨가한 뒤 10분 동안 끓이고 12 % SDS 폴리 아크릴 아미드 겔을 사용하여 전기 영동을 수행하였다. 전기영동 후 PVDF 멤브레인으로 단백질을 트랜스퍼한 뒤, 5% 스킵밀크 (TBS-T)로 상온에서 1시간 동안 블로킹되었다. 그 후, 1:1000로 블로킹 용액에 희석한 1차 항체 (항-pan ras, 항-K-ras 및 항- β -actin)를 첨가하여 4℃에서 하룻밤 동안 인큐베이션한 뒤, 멤브레인을 0.05% TBS-T로 3회 세척하고 1:10000로 희석한 2차 항체 (horseradish peroxidase-conjugated 2nd Ab)를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 멤브레인을 0.05% TBS-T로 3회 세척하고 ECL(enhanced chemiluminescence) 용액으로 디벨롭하여 X-ray 필름에 감광시켰다.

[0066] 그 결과, 상기 실시예 2-1의 결과와 같이 KRAS 전사 수준은 이들 모든 세포에서 GW8510에 의해 현저하게 저하되었으며 (도 5A 및 5B), KRAS 단백질 수준도 감소된 것을 확인하였다 (도 5D).

[0068] 이를 통해, GW8510가 KRAS의 돌연변이 여부 및 종류와 무관하게 KRAS의 발현을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0070] 실시예 3. GW8510의 암세포 사멸 효과 및 항암제와의 병용 효과 확인

[0071] 전이성 암에서 발생하는 가장 흔한 암 유발 유전자 돌연변이인 KRAS 유전자 돌연변이로 인해, 항암제로 이용되는 EGFR 억제제에 대한 내성 (저항성)을 가지므로, KRAS 및 KRAS 돌연변이의 발현을 전사적으로 억제하는 GW8510의 항암 효과를 확인하고, GW8510 및 항암제의 병용 처리에 의한 항암 효과를 확인하고자, HCT116 세포주에 GW8510 10 μ M, EGFR 억제제인 세툽시맙(cetuximab) 또는 엘로티닙(ertotinib) 25 μ M을 24 또는 48시간 동안 처리한 후, MTT 분석을 통해 암세포주의 생존을 확인하였다. 구체적으로, HCT116 세포를 96웰-플레이트에 분주하고, 하루 뒤에 GW8510 10 μ M, 세툽시맙(cetuximab) 또는 엘로티닙(ertotinib) 25 μ M을 처리하였다. 그 후, 10 μ l MTT 용액 (5mg/ml) 및 RPMI 배지 90 μ l를 첨가하고 3-4시간 동안 5% CO₂ 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 배지를 제거하고 Formazan crystals을 100 μ l DMSO에 용해시켰다. 흡광도는 마이크로플레이트 리더기에서 570nm로 측정하였고, 세포 생존율은 용해된 formazan crystal의 OD 측정값으로 정량화되었다.

[0072] 그 결과, 세툽시맙을 처리한 경우 세포 독성이 거의 나타나지 않았으나, GW8510를 단독 투여한 경우 항암 활성이 나타났으며, 특히, 두 약물을 병용 처리한 경우 암세포 사멸 효과가 현저하게 증가한 것으로 나타났다 (도 6A 및 B). 또한, 엘로티닙과 GW8510를 병용처리한 경우 KRAS 돌연변이를 가진 암세포주의 세포 사멸이 시너지적으로 현저하게 증가한 것으로 나타났다 (도 6C 및 D).

[0074] 실시예 4. GW8510의 생체 내 항암 효과 및 항암제와의 병용 효과 확인

[0075] 시험관 내뿐만 아니라 생체 내에서도 GW8510가 암(종양) 억제 효과를 가지는지 확인하기 위해 누드 마우스에 HCT116 세포를 이용하여 이식 모델을 제작하였다. 실험동물은 6주령 Balb/c nude 마우스 36마리를 사용하였다. 실험식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였으며 모든 실험식이는 사육기간 동안 냉장 보관하였다. 사육환경에 적응시키기 일반 사료로 실험 시작 전 7일 동안 예비사육한 후 총 4군으로 나누었다. 4군은 대조군 (n=9), gw8510 실험군(n=9), cetuximab 실험군(n=9), gw8510과 cetuximab 병용투여 실험군(n=9)으로 나누었다. 모든 mouse는 7주령에 HCT116 cell을 1X10⁶개 S.C로 주사하여 xenograft model을 만들었다. 제작한 종양 이식 모델에서 종양 사이즈가 150 mm³에 도달하였을 때, 각각 GW8510 단독, 세툽시맙 단독, 및 GW8510 및 세툽시맙 병용 투여군으로 나누고, GW8510의 경우 10mg/kg 농도로 1주 3회 복강내 투여하였으며, cetuximab의 경우 1mg/mouse로 1주 1회 총 3회 복강내 투여하였다. 종양 사이즈(Tumor size)는 (장축X단축X단축)/2 공식을 이용하여 측정하였고 주 3회 같은 시간에 측정하였다.

[0076] 그 결과, 세툽시맙 투여에 의해 감소되지 않은 종양 크기가 GW8510 투여시에는 대조군에 비해 감소하는 경향이

나타났으며, 특히, GW8510 및 세특시맵을 병용 투여한 군에서 종양 크기가 시너지적으로 감소하는 것으로 나타났다 (도 7).

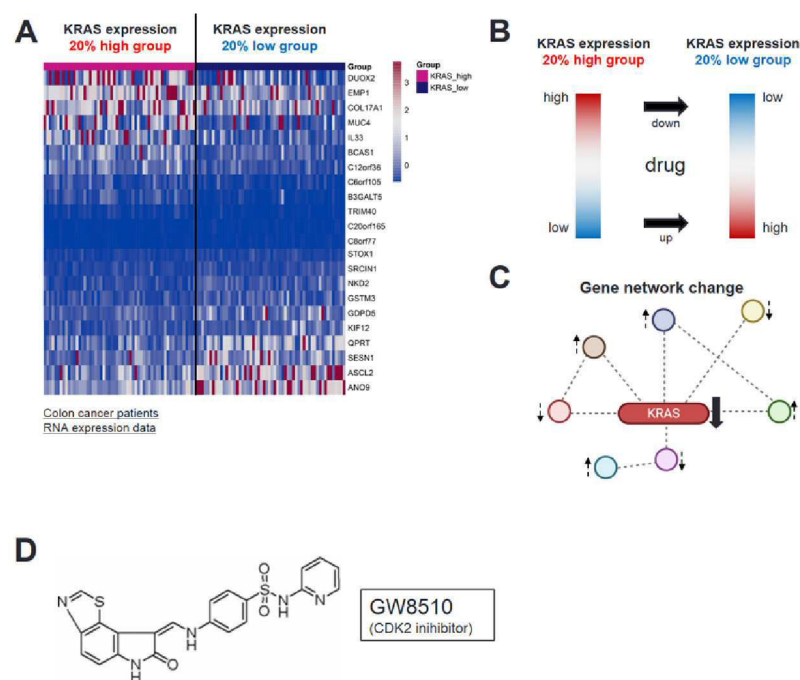
[0078] 이를 통해, KRAS 돌연변이를 가진 암은 항암제로 이용되는 EGFR 억제제, 특히, 세특시맵(Cetuximab)에 대한 내성 (저항성)을 가져 이에 의한 항암 효과가 없으나, KRAS 돌연변이의 발현을 전사적으로 억제하는 GW8510은 단독으로 항암 효과를 가지며, 이를 EGFR 저해제와 병용 처리시 감수성을 증가시켜 시너지적인 항암 효과를 가지는 것을 *in vivo*로도 확인할 수 있었다.

[0080] 실시예 5. 다른 CDK 억제제 처리에 의한 KRAS 변화 확인

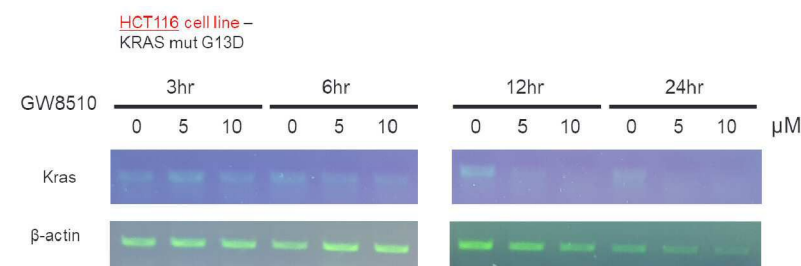
[0081] GW8510가 KRAS를 억제하는 것이 Cdk2 억제를 통해 조절되는 것인지 확인하기 위해, GW8510 (Cdk2 억제제) 외 다른 CDK 억제제들인, PKC 억제제 H7, Cdk2 억제제 CVT-313 및 Cdk4/6 억제제 PD0332991를 각각 HCT116 세포에 24시간 동안 처리한 후, 세포 주기를 분석하기 위해 PI 염색하여 유세포 분석으로 확인하고, KRAS 발현 수준을 Endpoint PCR 및 qRT-PCR로 확인하였다. 그 결과, G0/G1 기에 세포 주기가 정지해 있어, CDK가 잘 억제되는 것을 확인할 수 있었으나 (도 8C 및 D), KRAS 발현에는 변화가 없는 것으로 나타났고 (도 8A 및 B), 본 발명의 GW8510만이 KRAS 발현을 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (도 9).

도면

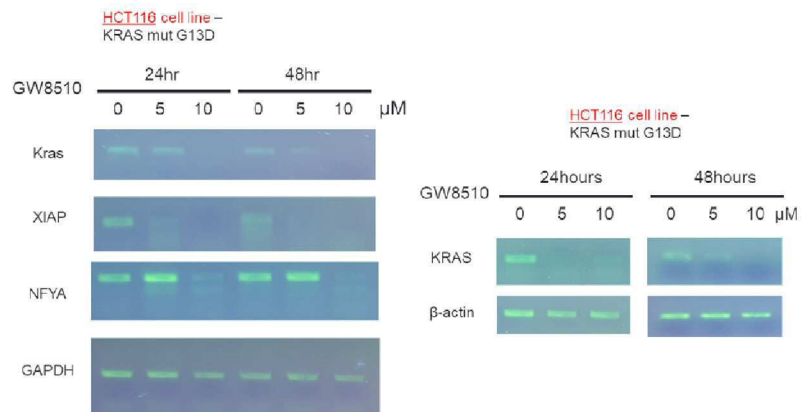
도면1



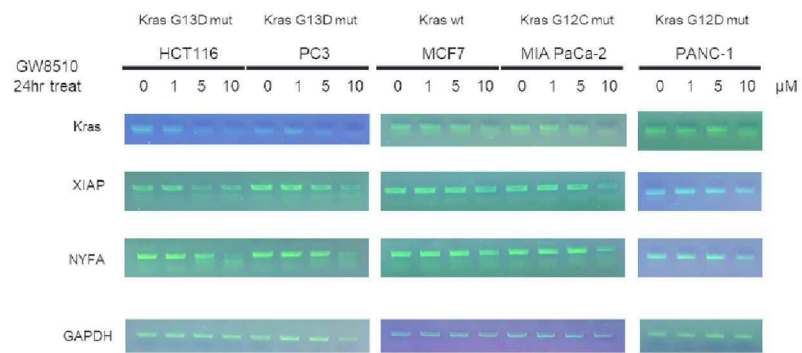
도면2



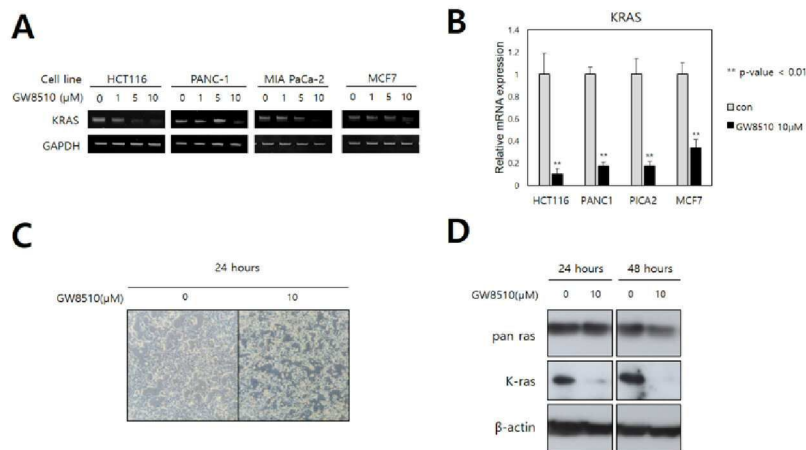
도면3



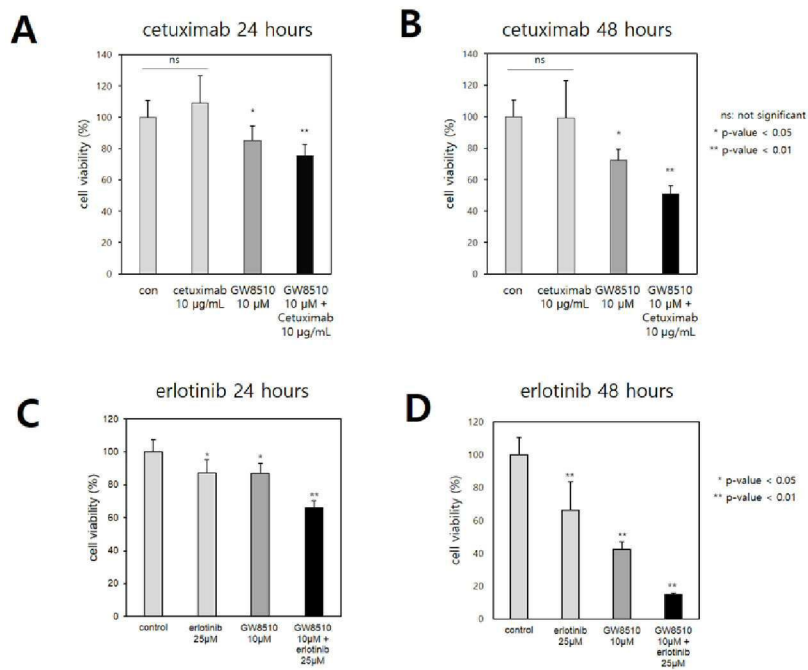
도면4



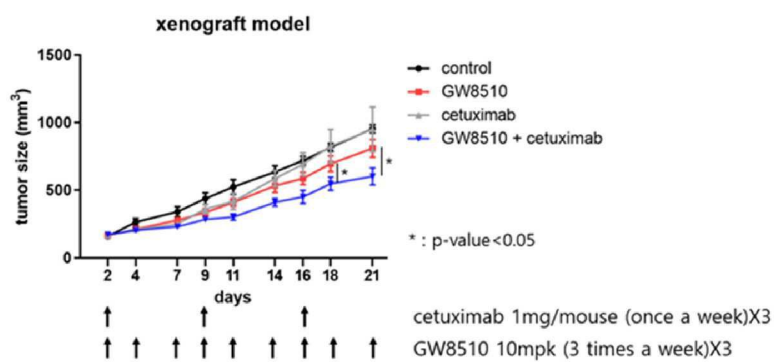
도면5



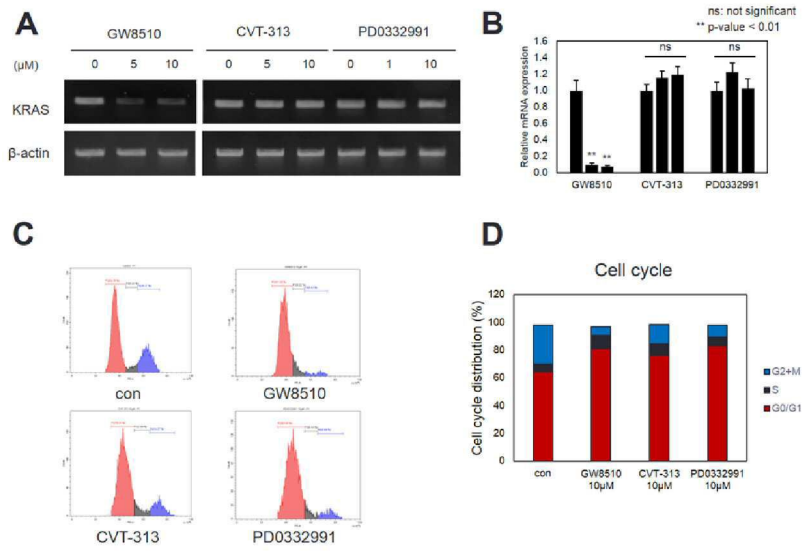
도면6



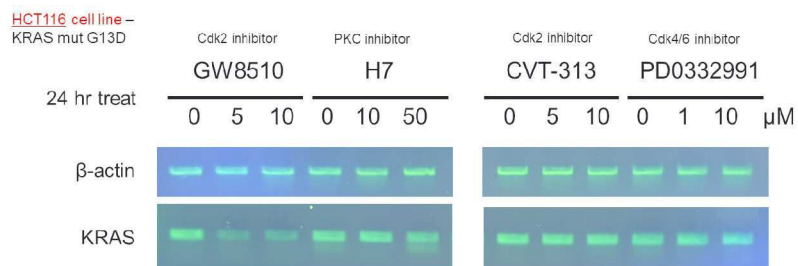
도면7



도면8



도면9



도면10

