



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0114680
(43) 공개일자 2020년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/513 (2006.01) A61K 31/473 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/513 (2013.01)

A61K 31/473 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0036837

(22) 출원일자 2019년03월29일

심사청구일자 2019년03월29일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)

(72) 발명자

박현주

서울특별시 서초구 서초대로74길 30, 502동 902호(서초동, 우성아파트)

오은택

서울특별시 서대문구 연희로39마길 6, 204호(홍은동, 홍은그린파크)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순웅

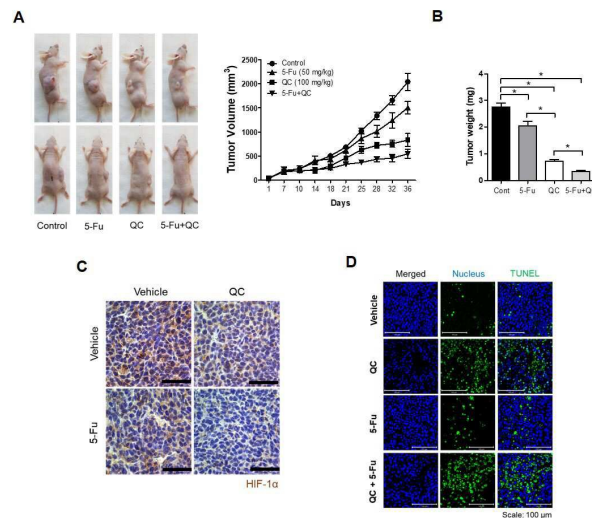
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 암 치료 또는 예방용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 5-FU(5-fluorouracil) 및 퀴나크린(quinacrine)을 유효성분으로 포함하는, 암 치료 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 5-FU(5-fluorouracil) 및 퀴나크린(quinacrine)의 병용처리는 저 산소환경하 암세포의 생존율을 억제시키는 효과가 우수하므로, 암 치료를 위한 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

이재선

서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 22동 106호(서초동, 삼풍아파트)

김하경

경기도 수원시 권선구 당진로31번길 51-20, 104동 1502호(당수동, 서수원1차쌍용스윗닷홈)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2014R1A5A2009392
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	저산소 표적 질환 연구센터
기 여 율	30/100
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2014.05.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2015M2B2B1068623
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원자력연구기반확충사업(R&D)
연구과제명	중양조직환경 세포 표적 방사선 민감도 조절 연구
기 여 율	40/100
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2015.11.01 ~ 2020.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2019R1A2C1008142
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(유형1-1)중견연구(연평균연구비 1억원 이내)
연구과제명	NQ01에 의한 암줄기세포 형성 조절을 통한 암치료 효능 증진 연구
기 여 율	30/100
과제수행기관명	인하대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2024.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

5-FU(5-fluorouracil) 및 퀴나크린(quinacrine)을 유효성분으로 포함하는, 암 치료 또는 예방용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 암은 대장암(colon cancer), 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 혈액암(blood cancer), 뼈암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 피부암(skin cancer), 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종(cutaneous or intraocular melanoma), 자궁육종(uterine sarcoma), 난소암(ovarian cancer), 직장암(rectal cancer), 항문암(anal cancer), 난관암(fallopian tube carcinoma), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 소장암(small intestine cancer), 내분비암(endocrine cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 신장암(adrenal cancer), 연조직종양(soft tissue tumor), 요도암(urethral cancer), 전립선암(prostate cancer), 기관지암(bronchogenic cancer) 및 골수암(bone marrow tumor)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 HIF(hypoxia inducible factor) 유전자; 또는 이의 단백질의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

5-FU(5-fluorouracil) 및 퀴나크린(quinacrine)을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 암 치료 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 5-FU(5-fluorouracil) 및 퀴나크린(quinacrine)을 유효성분으로 포함하는, 암 치료 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암은 인류의 건강을 위협하는 최대의 질병 중의 하나로서, 세포가 일련의 돌연변이 과정을 거쳐, 무제한적이고 비조절적인 방식으로 증식하고 불사화되어 발생하는 질병이다. 암 발생의 원인으로는 화학물질, 바이러스, 세균, 전리방사선 등의 환경적 또는 외적 요인과 선천성 유전자 변이 등의 내적 요인을 들 수 있다.

[0004] 특히, 고형암의 경우, 암조직 내 세포들이 저산소, 산성화 및 영양소 결핍과 같은 미세환경에 쉽게 노출되며, 영양소, 성장인자, 산소 농도 및 pH 등의 증감이 암조직 내 세포와 세포, 세포와 기질간의 상호작용에 주요하게 작용한다. 고형암 내 미세환경 중 가장 중요한 요인인 저산소 환경은 혈관형성(angiogenesis) 과정을 통한 신생 혈관형성(neovasculature)과 연계가 되며, VEGF, angiopoietin 등과 같은 혈관형성 유도 인자의 증가와 angiostatin, endostatin 등과 같은 혈관형성 억제 인자의 감소에 의해 조절을 받는다.

- [0005] 또한, 유전자 수준에서의 다양한 변이는 정상 세포가 악성종양으로 전이되는데 관여하는 다양한 형질들을 획득하도록 원인을 제공하며, 이러한 세포 내 분자 신호 기전들은 암의 진단 및 치료를 위한 중요한 역할을 할 것으로 여겨진다.
- [0006] 이러한 암의 치료법으로는 수술, 방사선 치료법 및 항암 화학 요법으로 크게 나눌 수 있는데, 이중 항암 화학 요법으로 약 60여 종의 다양한 항암제가 사용되고 있으며, 암 발생 및 암 세포의 특성에 관한 지식이 많이 알려짐에 따라, 새로운 항암제 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다.
- [0007] 그러나, 항암제들은 반복적으로 장기간 투여되거나 암이 재발된 경우에는 암 세포가 항암제에 대한 내성을 획득함으로써 치료 효과를 상실하는 단점이 있다. 또한, 대부분의 항암제는 세포 내 핵산의 합성을 억제하거나 핵산에 직접 결합하여 그 기능을 손상시킴으로 효과를 나타내는데, 이들 항암제는 암 세포에만 선택적으로 작용하는 것이 아니라 정상세포, 특히 세포분열이 활발한 조직 세포에도 손상을 입히기 때문에 골수 기능 저하, 위장관 점막 손상, 탈모 등 여러 부작용이 나타나는 단점이 있다. 또한, 방사선 치료도 방사선에 대한 암 세포가 나타나게 되어 완치가 어렵다.
- [0008] 한편, 5-FU (5-fluorouracil)는 기존 항암제 중 다양한 암에서 광범위하게 사용되어 왔다. 그러나 반복적으로 장기간 투여시 암세포가 내성을 획득함으로써 치료효과가 상실되는 단점이 있다.
- [0009] 퀴나크린(Quinacrine)은 (RS)-N'-(6-Chloro-2-methoxy-acridin-9-yl)-N,N-diethylpentane-1,4-diamine로서, 1930년대에 항말라리아제로서 최초 승인되어 2차 세계대전 동안 널리 사용되었으며, 장내 기생충인 편모충증 치료제로서도 승인되었다. 또한, 퀴나크린은 포스포리파아제 A2(phospholipase A2) 억제제로서 연구되어 왔으며, 구충제 즉, 촌충 감염 치료제로서도 사용되어 왔다. 퀴나크린은 프리온 단백질과 결합하여 in vitro 상에서 프리온 응집 형성을 예방할 수 있으며, 크로이츠펬트 야곱병 치료를 위해 영국과 미국 등에서 임상 진행 중에 있다. 또한, 퀴나크린은 여성의 비수술적 불임을 위해 사용되며, 수술적 불임보다 안전하다고 알려져 있다. 또한, 최근 대장암, 유방암, 췌장암, 폐암 등에서 암치료 효능이 있다고 보고되었다.
- [0010] 그러나, 실제 전임상 연구에서는 퀴나크린의 단독 처리는 암치료 효능이 없다고 보고되었다.
- [0011] 따라서, 이와 같은 암세포의 항암제에 대한 내성을 억제하기 위해 단일 제제의 항암제를 사용하기보다는 작용 기전이 서로 다른 약제를 사용하는 병용 요법이 제시되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명자들은 암 치료 방법을 개발하기 위하여 예의 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 퀴나크린 및 5-FU를 병용처리할 경우, 퀴나크린이 5-FU에 대한 암세포 내성의 중요 원인 중 하나인 암조직의 저산소환경에 의해 발현양이 유도되는 HIF(hypoxia inducible factor)의 발현을 억제시키므로, 이에 의해 5-FU에 대한 암세포의 내성이 감소되어 암세포사멸이 증가하는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0014] 따라서, 본 발명의 일 목적은 5-FU(5-fluorouracil) 및 퀴나크린(quinacrine)을 유효성분으로 포함하는, 암 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0015] 또한, 본 발명의 다른 목적은 5-FU(5-fluorouracil) 및 퀴나크린(quinacrine)을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0017] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.
- [0019] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 5-FU(5-fluorouracil) 및 퀴나크린(quinacrine)을 유효성분으로 포함하는, 암 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 암은 저산소 상태이며, 5-FU(5-fluorouracil) 및 퀴나크린

(quinacrine)을 병용투여시, HIF(hypoxia inducible factor) 유전자의 발현 수준; 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정할 경우 HIF 유전자 또는 단백질의 발현 수준이 억제되는 것이다.

- [0021] 본 발명의 조성물의 가장 큰 특징은 퀴나크린 및 5-FU를 병용처리했을 때, 5-FU에 대한 암세포 내성의 중요 원인인 HIF를 억제시킴으로써, 저산소 상태에 있는 암세포의 성장 및 생존을 억제시켜서 현저하게 암 세포의 사멸을 유도하는 시너지 효과를 발휘한다는 것이다.
- [0022] 본 발명의 대상 질환인 "암(cancer)"은 세포가 정상적인 성장 한계를 무시하고 분열 및 성장하는 공격적(aggressive) 특성, 주위 조직에 침투하는 침투적(invasive) 특성, 및 체내의 다른 부위로 퍼지는 전이적(metastatic) 특성을 갖는 세포에 의한 질병을 총칭하는 의미이다. 본 명세서에서 상기 암은 악성 종양(malignant tumor) 또는 악성 복수(malignant ascites)와 동일한 의미로도 사용된다.
- [0023] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 암은, 대장암(colon cancer), 위암(gastric cancer), 유방암(breast cancer), 폐암(lung cancer), 간암(liver cancer), 혈액암(blood cancer), 뼈암(bone cancer), 췌장암(pancreatic cancer), 피부암(skin cancer), 머리 또는 목암(head or neck cancer), 피부 또는 안구 흑색종(cutaneous or intraocular melanoma), 자궁육종(uterine sarcoma), 난소암(ovarian cancer), 직장암(rectal cancer), 항문암(anal cancer), 난관암(fallopian tube carcinoma), 자궁내막암(endometrial carcinoma), 자궁경부암(cervical cancer), 소장암(small intestine cancer), 내분비암(endocrine cancer), 갑상선암(thyroid cancer), 부갑상선암(parathyroid cancer), 신장암(adrenal cancer), 연조직종양(soft tissue tumor), 요도암(urethral cancer), 전립선암(prostate cancer), 기관지암(bronchogenic cancer) 및 골수암(bone marrow tumor)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상의 암세포이며, 이에 한정되는 것은 아니나, 가장 바람직하게는 대장암이다.
- [0024] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 유효 성분인 퀴나크린 및 5-FU는, 5-FU에 대한 암세포 내성의 중요 원인 중 하나인 암조직의 저산소환경에 의해 발현양이 유도되는 HIF (hypoxia inducible factor) 유전자의 발현; 또는 이의 단백질의 발현을 억제하여, 암세포 성장 및 생존율이 감소 또는 억제되면서 항암 효과를 나타낸다.
- [0025] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0026] 본 명세서에서 사용된 용어, "약학적으로 허용되는 담체"는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 약학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-1000 mg/kg이다.
- [0030] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적 유효량을 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0031] 본 명세서에서 사용된 용어, "약학적 유효량(therapeutically effective amount)"은 투여되는 억제제의 양이 치료하고자 하는 질환인 암의 하나 또는 그 이상의 증상을 어느 정도 경감하는 것을 의미한다. 따라서, 약학적 유효량은, (1) 암의 진행 속도를 역전시키거나 (2) 암의 그 이상의 진행을 어느 정도 정지시키게 하는 것을 의미하며, (3) 암과 관련된 하나 또는 그 이상의 증상을 어느 정도 경감(바람직하게는, 제거)하는 효과를 가지는 양을 의미한다.

- [0033] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 5-FU(5-fluorouracil) 및 퀴나크린(quinacrine)을 유효성분으로 포함하는, 암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 조성물은 암의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명에서, "건강기능식품"이란, 암의 예방 및 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복 등 생체조절 기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해해야한다.
- [0035] 본 발명의 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처리)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0036] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강 식품을 모두 포함한다.
- [0037] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1g 이다.
- [0038] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0040] 본 발명의 식품 조성물은 상술한 억제제를 포함하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [0042] 본 발명의 5-FU(5-fluorouracil) 및 퀴나크린(quinacrine)의 병용처리는 저산소환경하 암세포의 생존율을 억제시키는 효과가 우수하므로, 암 치료를 위한 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 정상산소 환경에서 ATP-Glo 어세이를 통한 퀴나크린과 5-FU의 단독 처리 또는 병용 처리를 통한 대장암 세포주에서 암세포 사멸 분석 결과를 보여준다.
- 도 2는 정상산소 환경에서 클론원성 생존 어세이(clonogenic survival assay)를 통한 퀴나크린과 5-FU의 단독 처리 또는 병용 처리를 통한 대장암 세포주에서 암세포 사멸 분석 결과를 보여준다.
- 도 3은 저산소 환경에서 ATP-Glo 어세이를 통한 퀴나크린과 5-FU의 단독 처리 또는 병용 처리를 통한 대장암 세포주에서 암세포 사멸 분석 결과를 보여준다.
- 도 4는 저산소 환경에서 클론원성 생존 어세이(clonogenic survival assay)를 통한 퀴나크린과 5-FU의 단독 처

리 또는 병용 처리를 통한 대장암 세포주에서 암세포 사멸 분석을 보여준다.

도 5는 정상(A) 및 저산소(B) 환경에서 ATP-Glo 어세이를 통한 퀴나크린과 5-FU의 단독 처리 또는 병용 처리를 통한 유방암, 뇌암 및 췌장암 세포주에서 암세포 사멸 분석 결과를 보여준다.

도 6은 정상(A) 및 저산소(B) 환경에서 클론원성 생존 어세이(clonogenic survival assay)를 통한 퀴나크린과 5-FU의 단독 처리 또는 병용 처리를 통한 유방암, 뇌암 및 췌장암 세포주에서 암세포 사멸 분석 결과를 보여준다.

도 7은 퀴나크린이 저산소 환경에서 HIF 단백질 발현에 미치는 영향 분석 결과를 보여준다.

도 8은 퀴나크린과 5-FU 병용 처리에 따른 이종이식모델(xenograft model)의 암의 성장 분석 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0047] 실시예 1. 정상 및 저산소환경하의 대장암 세포주에 대한 약물처리

[0048] 본 발명자들은 대장암에 정상 및 저산소환경을 적용하여 5-FU 및 퀴나크린(quinacrine)의 단독 또는 병용처리를 실시하여 정상 및 저산소 환경에서 약제의 항암 효과를 관찰하였다.

[0049] 먼저, 정상산소 환경에서 실험을 수행하였다. 96-웰 플레이트에 1×10^3 세포의 다양한 대장암 세포주를 분주하여 1일 동안 배양한 후 다양한 농도의 5-FU와 퀴나크린(quinacrine)을 단독 또는 병용처리하였다. 1 일 후 ATP-Glo 어세이를 통해 세포 생존을 관찰하였다.

[0050] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 5-FU 단독처리군과 비교하여 병용처리군에서 암세포 사멸이 증가되는 것을 관찰하였다.

[0051] 추가적으로, 본 연구를 검증하기 위해 약물의 항암효능 및 암세포 증식 억제효과를 관찰할 수 있는 클론원성 생존 어세이(clonogenic survival assay)를 실시하였다.

[0052] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 각 약제의 단독 처리와 비교하여 약제를 병용처리하였을 때 암세포 사멸이 증가되는 것을 관찰하였다.

[0054] 또한, 본 발명자들은 상기 정상산소 환경 하에서의 결과를 기반으로 저산소환경에서 약제의 항암 효과를 관찰하였다. 96-웰 플레이트에 1×10^3 세포의 다양한 대장암 세포주를 분주하여 1일 동안 배양한 후 다양한 농도의 5-FU와 퀴나크린을 단독 또는 병용처리하였다. 저산소환경에서 1일 동안 배양후 ATP-Glo 어세이를 통해 세포 생존을 관찰하였다.

[0055] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 5-FU를 단독으로 처리하였을 때 정상산소 환경과 비교하여 암세포 내성이 관찰되었다. 퀴나크린을 단독으로 처리하였을 때 정상산소 환경과 비교하여 유사한 암세포 사멸이 관찰되었다.

[0056] 또한, 5-FU와 퀴나크린을 병용처리하였을 때 정상산소와 유사한 암세포 사멸이 관찰되었다.

[0057] 추가적으로, 본 연구를 검증하기 위해 약물의 항암효능 및 암세포 증식 억제효과를 관찰할 수 있는 클론원성 생존 어세이(clonogenic survival assay)를 실시하였다.

[0058] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, ATP-Glo 어세이 결과와 유사함을 관찰할 수 있었다.

[0060] 실시예 2. 정상 및 저산소환경하의 다양한 세포주에 대한 약물처리

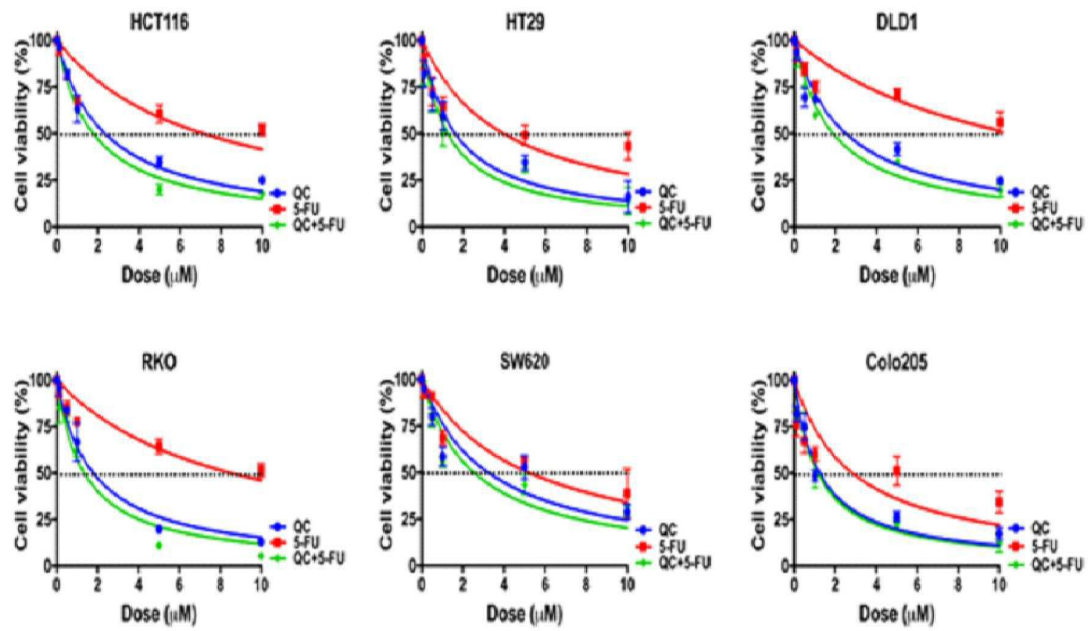
[0061] 본 발명자들은 상기 실시예 1의 대장암 세포주 결과를 기반으로 하여 유방암, 뇌암 및 췌장암에 정상 및 저산소 환경을 적용하여 5-FU 및 퀴나크린(quinacrine)의 단독 또는 병용처리를 실시하여 정상 및 저산소 환경에서 약

제의 항암 효과를 관찰하였다.

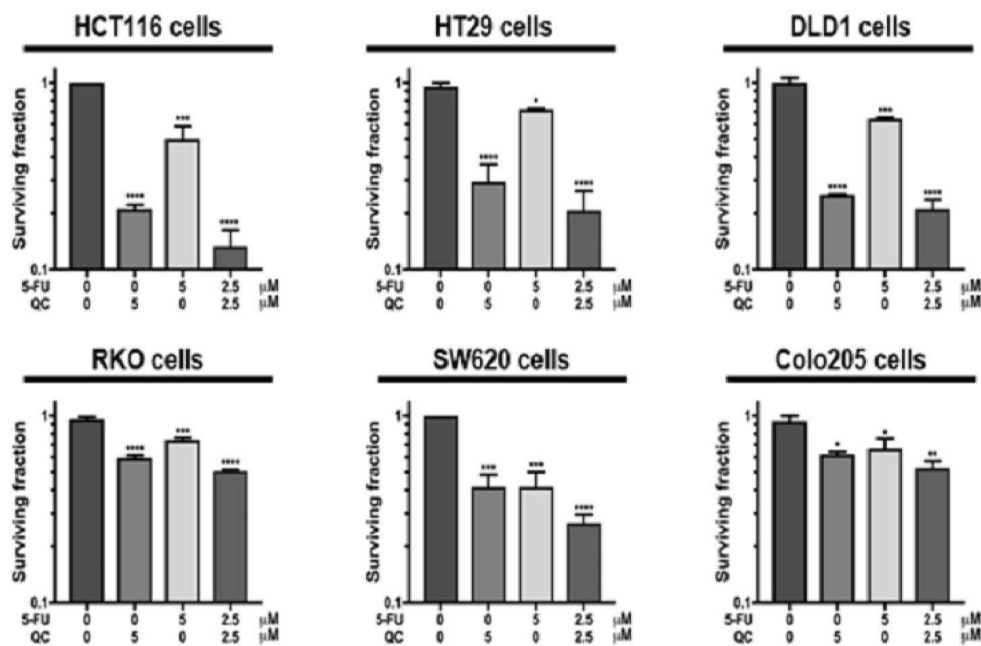
- [0062] 96-웰 플레이트에 1×10^3 세포의 다양한 세포주를 분주하여 1일 동안 배양한 후 다양한 농도의 5-FU와 퀴나크린을 단독 또는 병용처리하였다. 정상 및 저산소환경에서 1일 동안 배양 후 ATP-Glo 어세이를 통해 세포 생존을 관찰하였다.
- [0063] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 다른 암세포주에서도 대장암 세포 연구 결과와 유사한 결과가 나타남을 관찰하였다.
- [0064] 추가적으로 본 연구결과를 검증하기 위해 약물의 항암효능 및 암세포 증식 억제효과를 관찰할 수 있는 클론원성 생존 어세이(clonogenic survival assay)를 실시하였다.
- [0065] 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이, ATP-Glo 어세이 연구결과와 유사한 결과를 관찰하였다.
- [0066] 이는, 퀴나크린이 저산소 환경에서 암세포의 5-FU 내성을 감소시켰음을 제시한다. 상기 결과를 토대로 퀴나크린이 저산소 환경에서 암세포의 HIF 단백질 저해에 작용 가능함을 검증하고자 단독 또는 병용처리 후 HIF 단백질의 발현 수준을 확인하였다.
- [0067] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 퀴나크린(Q)을 단독처리하였을 때 HIF 단백질의 발현양이 감소하였고, 5-FU(F)를 단독처리한 그룹에서는 HIF 단백질의 발현양이 저해되지 않음을 관찰하였다.
- [0068] 반면, 퀴나크린 및 5-FU를 병용처리(QF)하였을 때 HIF 단백질의 발현양이 저해됨을 관찰하였다.
- [0070] **실시예 3. 이종이식모델서의 약물처리**
- [0071] 본 발명자들은 상기 실시예 2의 인 비트로상에서의 결과를 기반으로 하여 인 비보 상에서 5-FU 및 퀴나크린(quinacrine)의 단독 또는 병용처리를 실시하여 약제의 항암 효과를 관찰하였다.
- [0072] 그 결과, 도 8a 및 b에 나타낸 바와 같이, 5-FU 및 퀴나크린의 각 단독 처리군과 비교하여 병용처리시 이종이식 모델(xenograft model)의 암의 성장이 현저히 감소됨을 관찰하였다.
- [0073] 또한, 도 8c에 나타낸 바와 같이, 퀴나크린의 처리에 의해 HIF 단백질의 발현양이 감소됨을 조직염색을 통해 관찰하였다.
- [0074] 또한, 도 8d에 나타낸 바와 같이, 퀴나크린 및 5-FU의 단독 처리 시 조직내의 세포 사멸(cell death)이 일부 유발됨을 TUNEL 어세이를 통해 관찰하였으며 병용처리시 증가됨을 관찰하였다.
- [0075] 즉, 병용처리에 의하여 암세포의 생존율이 현저하게 저하되는 것을 확인하였다.
- [0077] 이상의 실험 결과들을 통하여, 본 발명에 따라 저산소 조건에서 퀴나크린 및 5-FU의 병용처리하는 경우, 퀴나크린이 5-FU에 대한 암세포 내성의 중요 원인 중 하나인 암조직의 저산소환경에 의해 발현이 유도되는 HIF(hypoxia inducible factor)의 발현을 억제하고, 이로 인해 우수한 암세포의 성장 저해 및 사멸 효과가 나타나므로, 이러한 병용처리는 임상에 쉽게 적용할 수 있는 약제로서 암치료 효능을 증진시킬 수 있다.

도면

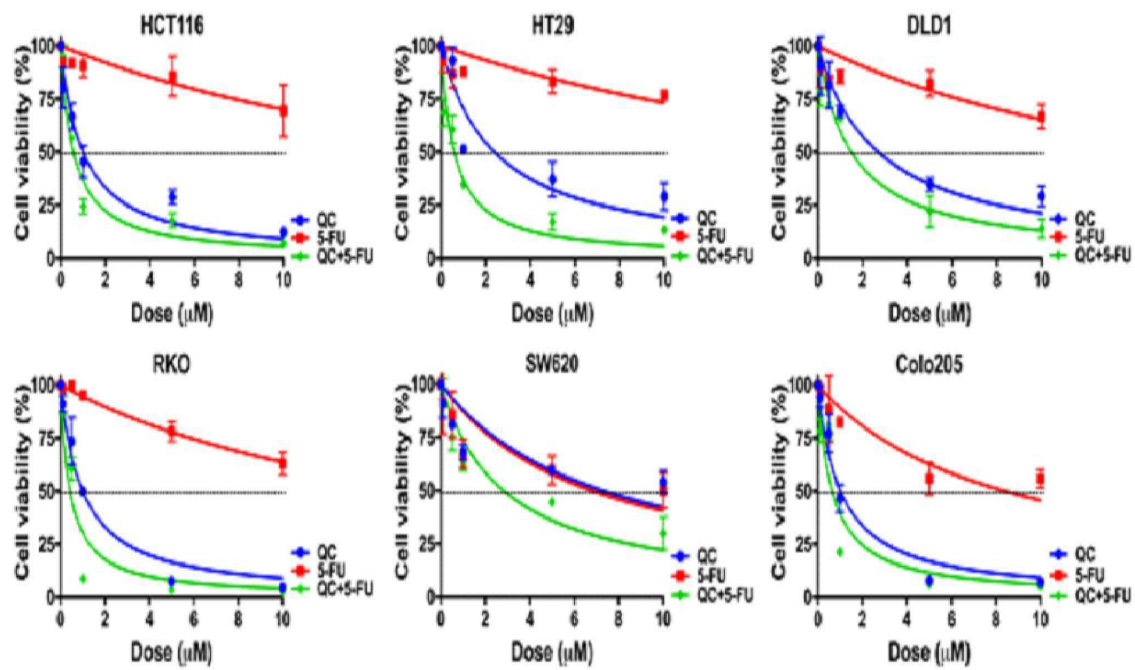
도면1



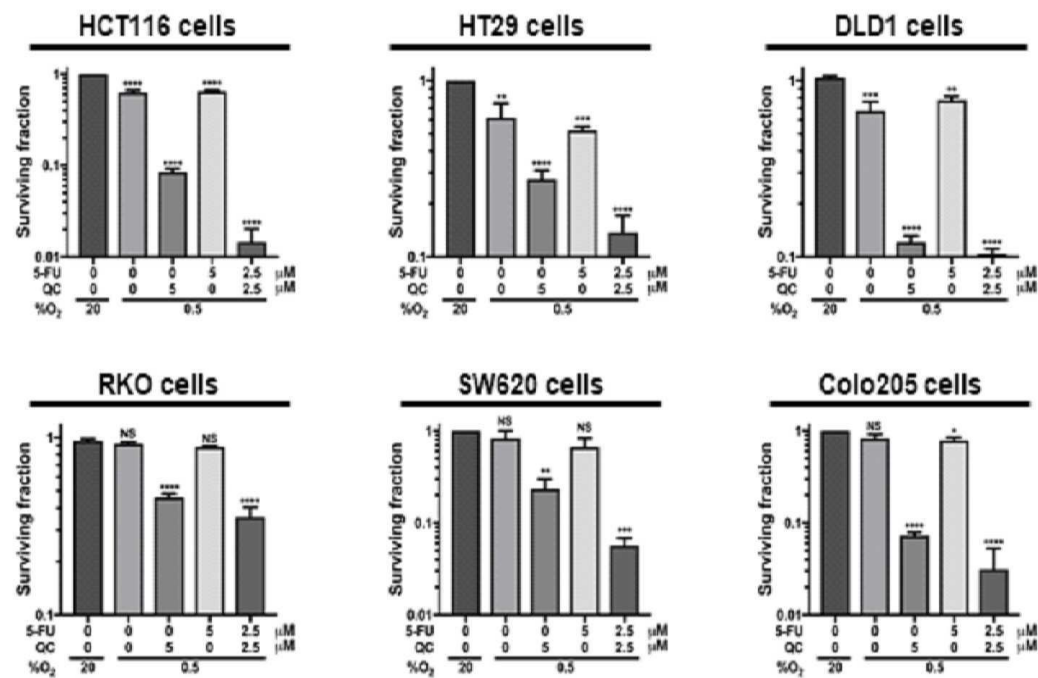
도면2



도면3

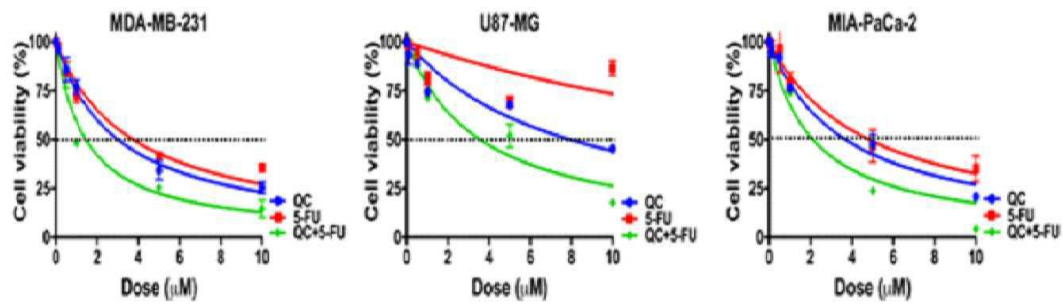


도면4

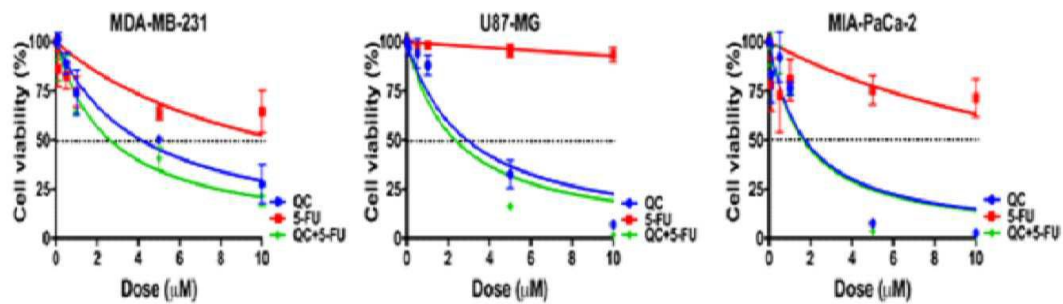


도면5

A

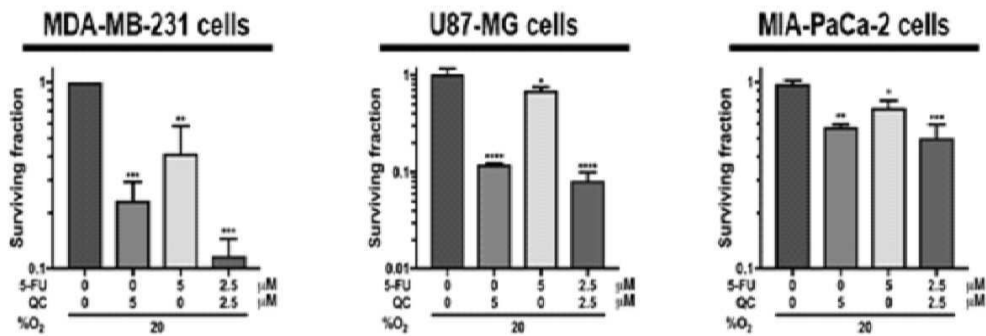


B

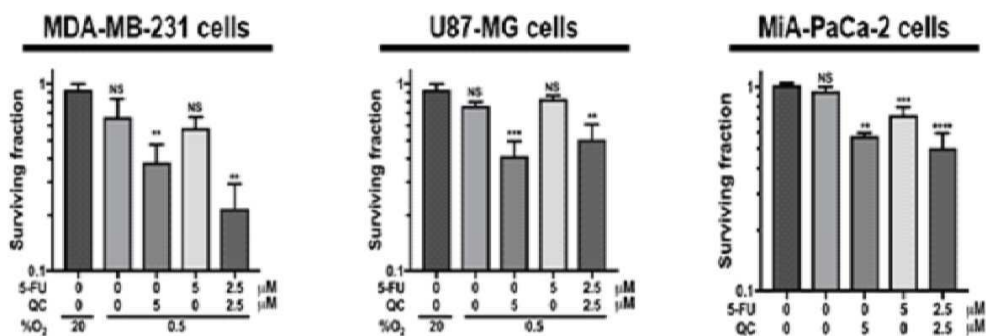


도면6

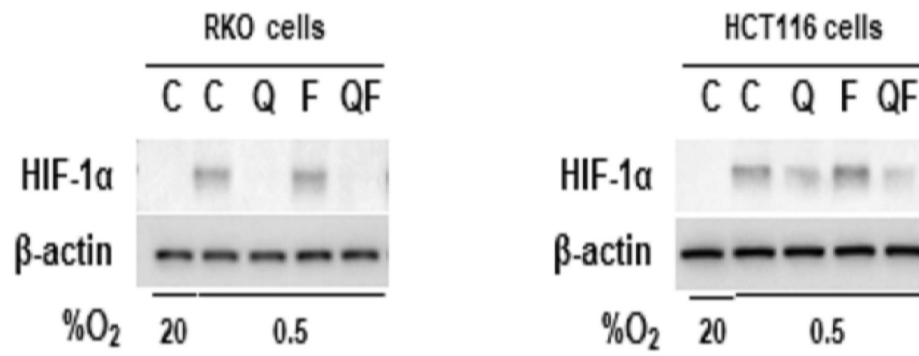
A



B



도면7



도면8

