

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0045126
(43) 공개일자 2020년05월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/192 (2006.01) A61K 36/18 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/192 (2013.01)

A61K 36/18 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0125754

(22) 출원일자 2018년10월22일

심사청구일자 2018년10월22일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

허강민

대전광역시 유성구 상대남로 26, 903동 502호

나민균

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 208동 602호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

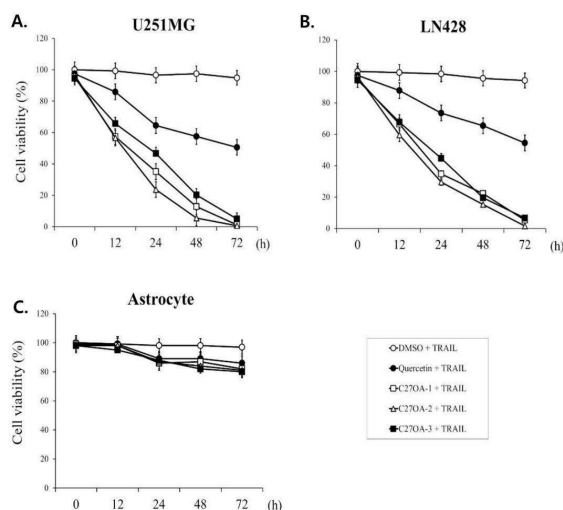
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **올레아놀산 유도체 및 TRAIL을 유효성분으로 함유하는 교모세포종 예방 및 치료용 약학 조성물**

(57) 요약

본 발명은 올레아놀산(oleanolic acid) 유도체 및 TRAIL을 유효성분으로 함유하는 교모세포종 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명의 올레아놀산(oleanolic acid) 유도체인 C270A-1~3은 TRAIL(TNF-related apoptosis inducing ligand)과 병행 처리하였을 때, TRAIL 항암제 또는 C270A-1~3에 의한 항암효과가 나타나지 않던 교모세포종의 세포 사멸을 촉진시키는 효과가 우수하였으므로, 올레아놀산(oleanolic acid) 유도체 및 TRAIL을 유효성분으로 함유하는 본 발명의 조성물은 교모세포종의 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/191 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자

변희선

대전광역시 대덕구 계족산로 136, 517동 1903호

박인화

대전광역시 서구 둔산로 15, 108동 601호

송규용

대전광역시 서구 둔산중로 20, A동 1201호 (탄방동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2A1A05001225

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 도약연구

연구과제명 단백질 전사후변형을 표적하는 신규 NF-kB 조절인자 발굴 및 기능 연구

기 여 율 4/10

주관기관 충남대학교

연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A5A2015385

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터

연구과제명 감염제어 컨버전스 연구센터

기 여 율 3/10

주관기관 충남대학교

연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A2A2A05001340

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견핵심(개인)

연구과제명 천연물 유래 약물-표적 단백질 조절물질 연구

기 여 율 3/10

주관기관 충남대학교

연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.28

명세서

청구범위

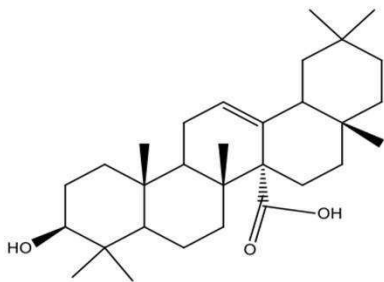
청구항 1

올레아놀산(oleanolic acid) 유도체 및 TRAIL(TNF-related apoptosis inducing ligand)을 유효성분으로 함유하는 교모세포종 예방 또는 치료용 약학 조성물.

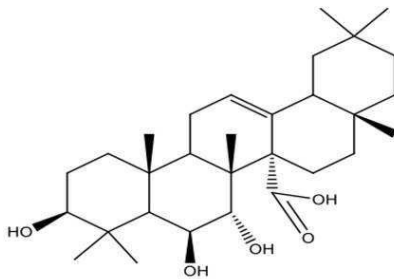
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 올레아놀산 유도체는 하기 화학식 1, 2 또는 3의 화합물인 것을 특징으로 하는 교모세포종 예방 또는 치료용 약학 조성물.

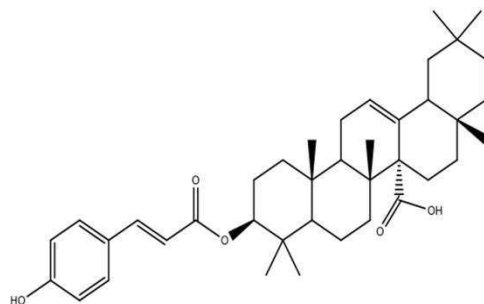
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 3

제1항에 있어서, 상기 올레아놀산 유도체는 아스틸베 리볼라리스(*Astilbe rivularis*)로부터 분리되는 것을 특징으로 하는 교모세포종 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 올레아놀산 유도체는 p38의 활성화를 통해 CHOP 매개 DR5의 발현을 조절하는 것을 특징으로

로 하는 교모세포종 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 올레아놀산 유도체는 TRAIL-내성 교모세포종을 TRAIL에 대해 감작시키는 것을 특징으로 하는 교모세포종 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 교모세포종 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 기술은 올레아놀산(oleanolic acid) 유도체 및 TRAIL을 유효성분으로 함유하는 교모세포종 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 교모세포종(glioblastoma)은 미국에서 신경교종(glioma)의 대부분을 차지하며, 조직학적으로 두 번째로 빈번하게 발생하고, 5년 생존률이 5%에 불과한 뇌 및 중추신경계에서 가장 빈번한 악성 종양이다. 한국에서, 교모세포종은 전체 뇌 및 CNS 원암종의 15.1%를 차지하며, 전체 신경교종의 34.4%를 차지하는 가장 흔한 뇌상피종이다. 그러나 신경교종에 대한 치료는 치료제에 대한 내성, 비정상적으로 활성화된 신호 전달 경로의 반복적 발생, 치료제의 효율적 전달의 어려움, 그리고 개개인의 종양 간의 현저한 공간적, 시간적 비균일성으로 인해 어려운 실정이다.

[0003] 세포자살(apoptosis)에 의한 세포 사멸 유도는 암 치료에서 훌륭한 전략으로 생각되고 있다. 카스파제(caspase)-의존적 세포자살은 내인성 또는 외인성 세포자살 경로를 통해 전형적으로 활성화된다. 내인성 세포자살 경로는 DNA 손상, 저산소증, 또는 기타 세포적 스트레스와 같은 내인성 스트레스에 의해 유도되고, 외인성 세포자살 경로는 종양 괴사 인자 수용체 슈퍼 패밀리(TNFR superfamily)와 같은 세포 사멸 수용체에 의해 매개된다.

[0004] 인간에서, TNF 슈퍼 패밀리의 일원인 종양 괴사 인자 관련 세포자살 유도 리간드(tumor-necrosis-factor related apoptosis-inducing ligand, 이하 TRAIL)는 말단절단된 원형질막 사멸 도메인(truncated cytoplasmic death domain)으로 2개의 사멸 수용체(DR4/TRAIL receptor-1 및 DR5/TRAIL receptor-2) 및 2개의 디코이(decoy) 수용체(DcR1/TRAIL receptor-3 및 DcR2/TRAIL receptor-4)와 상호작용할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 디코이 수용체는 TRAIL과 결합하는 사멸 수용체 (DR4 및 DR5)와 경쟁적 길항효과가 있다. 암세포와 달리 정상세포는 디코이 수용체의 발현이 증가되어 있으며, 이로 인해 TRAIL에 의한 세포자살이 일어나지 않는 것으로 알려져 있다.

[0005] 따라서 TRAIL은 정상세포에 손상을 주지 않으면서 암세포에만 선택적인 세포자살을 유도할 수 있어 항암 후보 물질로서 주목받고 있다. 그러나 교모세포종을 비롯한 다양한 암세포가 TRAIL에 대해 내성을 나타내어, 실제 임상에서 적용하는 데에는 한계가 있다.

[0006] 한편, 한국등록특허 제1826398호에는 모루신 및 TRAIL을 유효성분으로 포함하는 TRAIL-내성 교모세포종 치료용 조성물이 개시되어 있지만, 본 발명의 올레아놀산(oleanolic acid) 유도체 및 TRAIL을 유효성분으로 함유하는 교모세포종 예방 및 치료용 약학 조성물에 관해 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로, 올레아놀산(oleanolic acid) 유도체 및 TRAIL을 유효성분으로 함유하는 교모세포종 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공하고, 상기 조성물이 TRAIL 항암제 또는 C270A-1~3에 의한 항암효과가 나타나지 않던 교모세포종의 세포 사멸을 촉진시키는 효과가 있다는 것을 확인함으로써,

본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 올레아놀산(oleanolic acid) 유도체 및 TRAIL(TNF-related apoptosis inducing ligand)을 유효성분으로 함유하는 교모세포종 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명은 올레아놀산(oleanolic acid) 유도체 및 TRAIL을 유효성분으로 함유하는 교모세포종 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 화학식 1~3으로 표시되는 본 발명의 올레아놀산(oleanolic acid) 유도체인 C270A-1~3은 TRAIL(tumor-necrosis-factor related apoptosis-inducing ligand)과 병행 처리하였을 때, TRAIL 항암제 또는 C270A-1~3 단독에 의한 항암효과가 나타나지 않던 교모세포종의 세포 사멸을 촉진시키는 효과가 우수하였으므로, 올레아놀산(oleanolic acid) 유도체 및 TRAIL을 유효성분으로 함유하는 본 발명의 조성물은 교모세포종의 예방 또는 치료용 약학 조성물로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 본 발명의 올레아놀산 유도체인 C270A-1~3에 의한 TRAIL에 저항성을 가지는 신경교종 세포의 TRAIL 감작 향상을 확인한 결과이다. A 및 B는 C270A-1~3 및 TRAIL 병행처리에 의한 세포 사멸 효과를 인간 교모세포종 세포인 U251MG 및 LN428 세포에서 확인한 결과이고, C는 정상 성상세포(astrocyte)에서 C270A-1~3 및 TRAIL 병행처리에 의한 세포 사멸 효과를 확인한 결과이다.

도 2는 본 발명의 올레아놀산 유도체인 C270A-1~3에 의한 TRAIL에 저항성을 가지는 신경교종 세포의 TRAIL 감작 향상을 현미경으로 확인한 결과이다. A는 U251MG 세포에서 C270A-1~3 및 TRAIL 병행처리에 의한 세포 사멸 효과를 확인한 결과이고, B는 정상 성상세포(astrocyte)에서 C270A-1~3 및 TRAIL 병행처리에 의한 세포 사멸 효과를 확인한 결과이다.

도 3은 본 발명의 올레아놀산 유도체인 C270A-1~3에 의한 TRAIL 감작시 일어나는 세포 사멸의 형태를 확인한 결과이다. Z-VAD 및 IETD는 카스파제-8 억제제이다. A는 C270A-1~3 및 TRAIL 병행처리, C270A-1, Z-VAD 및 TRAIL 병행처리 또는 C270A-1, IETD 및 TRAIL 병행처리에 의한 세포 사멸 효과를 확인한 결과이고, *은 TRAIL을 처리하지 않은 군에 비해 C270A-1~3 및 TRAIL 병행 처리군의 세포 사멸 효과가 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p < 0.05$ 이다. B는 C270A-1 및 TRAIL 병행처리에 의한 미토콘드리아 막 전위의 변화를 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명의 올레아놀산 유도체인 C270A-1~3에 의한 TRAIL 감작과 세포 사멸 인자의 발현변화를 확인한 결과이다. A는 C270A-1~3 및 TRAIL 병행처리에 의한 세포 사멸 인자의 발현변화를 확인한 결과이고, B는 C270A-1 처리 후 TRAIL 처리 시간에 따른 세포 사멸 인자의 발현변화를 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명의 올레아놀산 유도체인 C270A-1~3에 의한 TRAIL 감작과 DISC(death-inducing signaling complex)-매개 세포 사멸 캐스케이드(cascade)와의 연관성을 확인한 결과이다. TRAIL, CHX+TNF 또는 FasL는 외인성 세포 사멸 결함인자이다.

도 6은 TRAIL 매개 세포 사멸에서 본 발명의 올레아놀산 유도체인 C270A-1~3에 의한 DR5의 발현변화를 확인한 결과이다. A는 시간에 따른 C270A-1 또는 C270A-1 및 TRAIL 병행처리에 의한 세포 사멸 인자 및 DR(death receptor)의 발현변화를 확인한 결과이고, B 내지 D는 C270A에 의한 DR5 특이적 발현증가를 확인한 결과이고, E는 C270A-1에 의한 DR5 발현을 세포분획을 통해 확인한 결과이다.

도 7은 본 발명의 올레아놀산 유도체인 C270A-1 및 TRAIL에 의한 세포 사멸에 DR5가 미치는 영향을 확인한 결과이다. A는 DR5 발현억제를 통한 세포 사멸을 확인한 결과이고, *은 DR5 발현 억제에 의해 세포 사멸 효과가 유의미하게 감소하는 것을 의미하며, $p < 0.05$ 이다. B는 DR5 발현억제를 통한 세포 사멸 인자의 발현변화를 확인한 결과이다.

도 8은 본 발명의 C270A-1 처리 시간에 따른 DR5 유전자 발현변화를 확인한 결과이다. *은 C270A-1 처리 전에 비해 처리 후 DR5의 발현이 유의미하게 증가하였음을 의미하며, $p < 0.05$ 이다.

도 9는 본 발명의 올레아놀산 유도체인 C270A-1에 의해 유도된 CHOP와 DR5의 조절 기작을 분석한 결과이다. A는 C270A-1 처리에 의한 DR5 및 CHOP의 발현변화를 세포 타입별로 확인한 결과이고, B는 DR5 프로모터에 CHOP 단백질이 결합하는지 분석한 결과이며, C는 CHOP 발현 억제를 통한 DR5 발현변화를 확인한 결과이다.

도 10은 본 발명의 올레아놀산 유도체인 C270A-1에 의해 유도된 CHOP와 DR5의 상향 조절 기작을 분석한 결과이다. A 및 B는 C270A-1에 의한 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 신호전달 경로 및 이에 의한 CHOP 및 DR5의 발현을 확인한 결과이다. C는 C270A-1 및 MAPK 억제제를 TRAIL과 병행처리 하였을 때, 세포 사멸 효과를 확인한 결과이고, *은 C270A-1 단독 처리군 대비 p38 활성 억제제 병행처리군의 세포 사멸 억제효과가 유의미하다는 것을 의미하며, $p < 0.05$ 이다. D는 p38 억제제인 SB203580 처리에 의한 CHOP의 발현억제효과를 C270A-1 처리 시간에 따라 확인한 결과이고, E는 C270A-1 및 SB203580 처리에 의한 CHOP 프로모터 활성화 분석 결과이다.

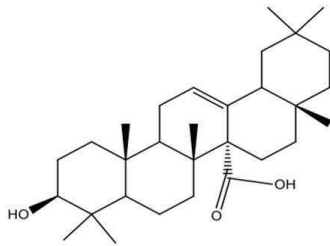
도 11은 p38 발현 억제에 따른 C270A-1 처리 시간별 CHOP 및 DR5 상향 조절 기작을 분석한 결과(A) 및 p38 발현 억제에 따른 C270A-1 및 TRAIL 처리 시간별 세포 사멸 효과를 확인한 결과(B)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

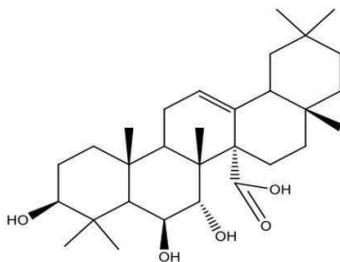
본 발명은 올레아놀산(oleanolic acid) 유도체 및 TRAIL(TNF-related apoptosis inducing ligand)을 유효성분으로 함유하는 교모세포종 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

상기 올레아놀산 유도체는 하기 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되며, 상기 화학식 1의 올레아놀산 유도체는 3 β -하이드록시올레안-12-엔-27-오익산(3 β -hydroxyolean-12-en-27-oic acid, C270A-1)이고, 화학식 2의 올레아놀산 유도체는 3 β , 6 β , 7 α -트리하이드록시올레안-12-엔-27-오익산(3 β , 6 β , 7 α -trihydroxyolean-12-en-27-oic acid, C270A-2)이며, 화학식 3의 올레아놀산 유도체는 3 β -트랜스-p-쿠마로일옥시-올레안-12-엔-27-오익산(3 β -trans-p-coumaroyloxyolean-12-en-27-oic acid, C270A-3)이다.

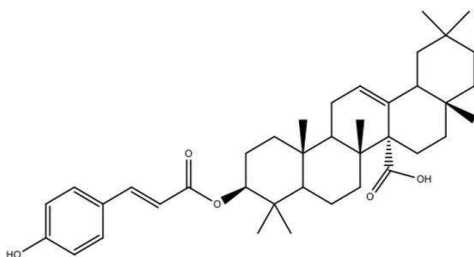
화학식 1



화학식 2



화학식 3

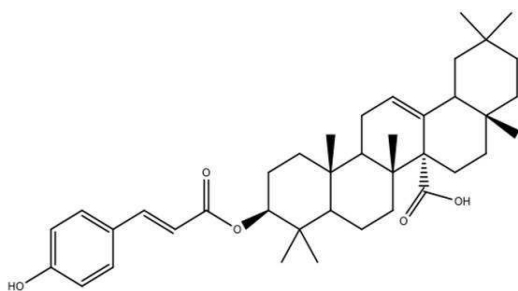


- [0016] 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 올레아놀산 유도체는 아스틸베 리볼라리스(*Astilbe rivularis*)로부터 분리된 것을 특징으로 하지만, 이에 제한되는 것은 아니며, 다른 천연물로부터 추출하거나 합성하는 것이 얼마든지 가능하다.
- [0017] 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 화학식 1, 2 또는 3으로 표시되는 올레아놀산 유도체는 p38의 활성화를 통해 CHOP 매개 DR5의 발현을 조절하고, 이를 통해 TRAIL-내성 교모세포종을 TRAIL에 대해 감작시키는 작용을 하여 신경교종 세포(glioma cell)의 세포 사멸을 유도한다.
- [0018] 본 발명에 따른 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0019] 본 발명에 따른 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다.
- [0021] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 약학 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당하는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 약학 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 다양하게 처방될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여의 경우, 피부에 국소적으로 도포, 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0024] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.
- [0025] **재료 및 방법**
- [0026] 1. 식물재료
- [0027] 아스틸베 리볼라리스(*Astilbe rivularis*, *A. rivularis*)는 2011년 베트남 사파(Sapa)에서 채취되었으며, 푸옹 티엔투옹(Phuong ThienThuong) 박사(베트남 약용 재료 연구소)와 나민균(충남대학교 약학 대학) 교수의 인증을 받았다. 바우처 표본은 베트남 하노이, 베트남 약용 재료 연구소(VDL-01/2011-01) 및 충남 대학교 약학 대학 실험실(CNU 00196)에 보관되었다.
- [0028] 2. C270A-1~3의 추출 및 분리
- [0029] C270A-1~3은 *A. rivularis*의 건조 뿌리로부터 분리되었다.

[0030] *A. rivularis*의 건조 뿌리 3kg을 메탄올(10ℓ×2)로 실온에서 1주일 동안 2회 추출하였다. 상기 메탄올 추출물 200g을 2ℓ의 물에 현탁시키고, n-헥산(2ℓ×3), EtOAc(2ℓ×3) 및 n-부탄올(2ℓ×3)로 분획하여 각각의 분획물을 획득하였다.

[0031] 상기 획득한 n-헥산 가용성 분획(55g)을 n-헥산-EtOAc(95:5→50:50)의 구배를 갖는 실리카겔 MPLC(SNAP Cartridge KP-Sil, 340g)에 적용하여 10개의 컬럼 분획물(H1-H10)을 획득하였다. 메탄올-물(78:22→96:4)로 용출시키는 MPLC(C₁₈ SNAP Cartridge KP-C₁₈-HS, 120g)를 이용하여 H4 분획(3g)을 9개의 하위 분획물(Fr.H41-H49)로 분획하였으며, 그 중 Fr.H49(312mg)로부터 n-헥산-EtOAc-아세톤(7:1:0.1) 용매를 사용하는 실리카겔 컬럼(2×80cm) 크로마토그래피를 통해 하기 화학식 3의 3β-트랜스-p-쿠마로일옥시-올레안-12-엔-27-오익산(C270A-3, 50mg)을 분리하였다.

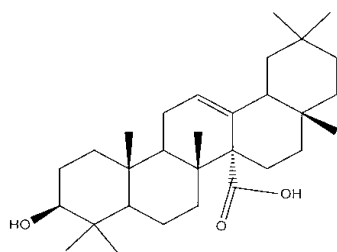
[0032] [화학식 3]



[0033]

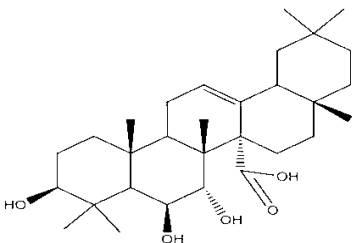
[0034] H5 분획(3.3g)은 메탄올-물(75:25→95:5)로 용출시키는 MPLC(C₁₈ SNAP Cartridge KP-C₁₈-HS, 120g)를 이용하여 7개의 하위 분획물(Fr.H51-H57)을 수득하였으며, 그 중 Fr.H56(450mg)으로부터 n-헥산-EtOAc-아세톤(각 단계에 대해 6.5:1:0.1, 5.2:1:0.1, 800ml)으로 실리카겔 컬럼(2.5×80cm) 크로마토그래피를 통해 하기 화학식 1 및 2의 3β-하이드록시올레안-12-엔-27-오익산(C270A-1, 200mg) 및 3β,6β,7α-트리하이드록시올레안-12-엔-27-오익산(C270A-2, 8.5mg)을 분리하였다.

[0035] [화학식 1]



[0036]

[0037] [화학식 2]



[0038]

[0039] 3. 항체 및 시약

[0040] 항-카스파제-8, 항-카스파제-3, 항-phospho-p38, 항-phospho-ERK, 항-phospho-JNK, 항-Bid, 항-Bcl-xL, 항-Bcl2, 항-Bax, 항-서바이빈, 항-CHOP 및 항-GRP78/BiP 항체는 Cell Signaling Technology로부터 구입하였고, 항-카스파제-8(sc6163), 항-JNK, 항-ERK, 항-p38, 항-FADD, 항-Mcl-1 및 항-p53 항체는 Santa Cruz Biotechnology로부터 구입하였고, 항-액틴 항체, N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine, NAC) 및 1,2-Bis-(2-아

미노페녹시)에탄-N,N,N,N-테트라아세트 산 테트라-(아세톡시메틸)-에스터(BAPTA-AM)는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다. 항-PARP, 항-RIP1, 항-xIAP 및 항-토끼 FITC-결합 항체는 BD Biosciences로부터 구입하였고, 항-DR4 및 항-DR5 항체는 Abcam으로부터 구입하였고, 재조합 TNF- α 및 항-TNFR1 항체는 R&D system으로부터 구입하였고, 재조합 인간 sTRAIL/Apo2 리간드(비 태그 19kDa 단백질, 168 아미노산 폴리펩티드)는 PeproTech로부터 구입하였고, 재조합 FasL는 Enzo life sciences로부터 구입하였다. 항-cIAP1 및 항-cIAP2 항체는 EMD Millipore로부터 구입하였고, 항-카스파제-10 항체는 MBL International Corporation으로부터 구입하였고, SB203580, SP600125, PD98059, 독소루비신, 에토포시드, 벤질옥시-카보닐-Asp-(OMe)-Glu-(OMe)-Val-Asp-(OMe)-플루오메틸 케톤(z-DEVD-fmk) 및 벤질옥시-카보닐-Ile-Glu-(OMe)-Tyr-Asp-(OMe)-플루오메틸 케톤(z-IETD-fmk)은 Calbiochem으로부터 구입하였다.

- [0041] 4. 세포 배양, 플라스미드 및 siRNA(small-interfering RNA) 형질주입
- [0042] 인간 교모세포종 세포인 LN428 및 U251MG 세포는 10%(v/v) FBS(fetal bovine serum), 2mmol/l의 글루타민, 100unit/ml의 페니실린, 100g/ml의 스트렙토마이신이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 이용하여 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.
- [0043] 랫트 신생아로부터 분리된 정상 성상세포(astrocyte)는 10%(v/v) FBS(fetal bovine serum), 2mmol/l의 글루타민, 100unit/ml의 페니실린, 100g/ml의 스트렙토마이신이 포함된 MEM(Minimum Essential Media) 배지를 이용하여 5% CO₂가 공급되는 37°C 배양기에서 배양하였다.
- [0044] 한편, 리포터 플라스미드 pDR5-wt CHOP, pDR5-mt CHOP[DR5 프로모터 서열의 CHOP 결합 부위(276/-263)의 점 돌연변이를 가지는 플라스미드] 및 pCHOP[CHOP 프로모터 서열(-945)를 포함하는 플라스미드]를 제작하였고, DR5, CHOP 및 p38의 발현을 억제하기 위해, 인간 DR5(1154243), 인간 CHOP(1039869) 및 인간 p38(1092108)을 위한 siRNA는 (주)바이오니아로부터 구입하였으며, 일시적인 형질주입은 리포펙타민 2000(Invitrogen Life Technologies)을 구입하여, 제조사의 프로토콜에 따라 형질주입하였다.
- [0045] 5. 세포 생존율 분석
- [0046] 세포 생존율 분석은 살아있는 세포에 존재하는 아데노신 트리포스페이트(adenosine triphosphate, ATP)의 수준에 기초한 세포 생존력을 측정하는 Cell Titer-glo Luminescent 세포 생존율 분석 키트(프로메가)를 이용하여 수행하였다.
- [0047] 발광의 측정은 Tecan Infinite 플레이트 리더기로 측정하였고, 모든 실험은 독립적으로 3번 반복 수행하였다.
- [0048] 6. 세포 사멸 및 미토콘드리아 막 전위($\Delta\psi_m$)의 정량분석
- [0049] 생존 및 사멸하는 세포의 정량 분석은 형광 염료 키트(Muse Annexin V 및 Dead Cell Assay Kit, Merck)를 이용하여 수행하였다.
- [0050] 세포를 TRAIL 및 C-27 PT(pentacyclic triterpenoids)로 처리한 후 MUSE™ Analyzer(EMD Millipore Bioscience)를 이용하여 세포 사멸 세포의 백분율을 계산하였다.
- [0051] 또는 Mitopotential 염료를 사용하여 $\Delta\psi_m$ 및 7-AAD의 변화를 세포 사멸의 지표로 감지하는 Muse® Mitopotential Assay Kit(EMD Millipore Bioscience)를 사용하여 미토콘드리아 막 전위($\Delta\psi_m$)의 변화를 측정하였다.
- [0052] 7. 면역 블랏(immunoblot) 분석 및 면역침강(immunoprecipitation)
- [0053] 각 조건으로 처리된 세포는 M2 완충액(20mM Tris(pH 7.6), 0.5%(v/v) NP-40, 250mM NaCl, 3mM EDTA, 3mM EGTA, 2mM DTT, 0.5mM PMSF, 20mM β -글리세롤 인산염, 1mM 바나듐산나트륨, 1g/mL 류페틴)을 이용하여 회수하고 용해하였다.

- [0054] 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 분석 시약을 사용하여 측정하였고, 50 μ g의 단백질을 10%(v/v) SDS-폴리 아크릴 아미드 겔에서 분획하고 PVDF 멤브레인 상에 블랏팅하였다.
- [0055] 5%(w/v) 탈지분유가 포함된 PBS/T를 이용하여 상기 멤브레인을 블로킹한 후, 관련 항체와 반응시킨 후 화학발광 (Thermo Fisher Scientific)을 이용하여 시각화 하였다.
- [0056] 면역침강 분석을 위해 용해물은 1 μ g의 카스파제-8 항체 및 단백질-G 세파로즈 비드와 함께 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켜 표적 단백질을 침강시켰다. 침강시킨 비드는 M2 완충액을 이용하여 3회 세척하고, 카스파제-8 항체와 상호작용하는 단백질을 면역 블랏 분석을 통해 확인하였다.
- [0057] 8. 세포 내 분획화(Sub-cellular fractionation)
- [0058] 세포질 및 막 분획은 ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 분리하였다. 각 분획의 순도는 β 액틴 및 TNFR1에 대한 항체를 사용하여 확인하였다.
- [0059] 9. 세포 표면 DR4/DR5 분석
- [0060] 세포는 세척하고, 1차 항체(2 μ g/ml의 항-DR4 또는 항-DR5 항체)를 함유하는 PBS에 재현탁시켰다. 재현탁된 세포 는 얼음 위에서 30분 동안 염색한 다음 PBS로 세척하고, 그 후 얼음에서 30분 동안 암 조건에서 FITC가 결합된 항-토끼 IgG(FITC-conjugated 항-토끼 IgG)와 반응시켰다. 음성 대조군으로서 동일 조건하에 토끼 동형 항체 (rabbit isotype antibody)를 반응시켰다. 반응 후 PBS로 세척하고, DR4 또는 DR5의 발현량을 FACS 칼리버 유 동 세포 계측기(BD Bioscience)로 분석하였다.
- [0061] 10. RT-PCR(Reverse transcription polymerase chain reaction) 및 정량 실시간 PCR(quantitative real-time PCR) 분석
- [0062] ReliaPrep RNA 미니프렙 시스템(Promega)을 이용하여 전체 RNA를 추출한 이후에, RT-PCR 키트(Agilent Technologies)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. RT-PCR은 각 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 사용하여 수행되 었다.
- [0063] 정량 실시간 PCR은 SYBR Green(Applied Biosystems) 검출을 사용하여 DR4, DR5, DcR1 및 DcR2의 발현량을 분석 하였다.
- [0064] 11. 세포 내 ROS 생산의 확인
- [0065] 세포 내 ROS는 형광 염료인 DCF-DA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 사용하여 측정하였다. 각 조건으 로 처리된 세포는 세척 후 HBSS(Hank's balanced salt solution)에서 30분 동안 5 μ M의 CM-H₂DCFDA를 이용하여 염색하고, 그 후 회수하였다. 염색된 세포는 FACS 칼리버 유동 세포 계측기로 분석하였고, 결과는 CellQuest 소 프트웨어(BD Bioscience)로 가공하였다.
- [0066] 12. 루시페라아제 리포터 분석
- [0067] pDR5-wt CHOP, pDR5-mt CHOP 및 pCHOP 플라스미드를 U251MG 세포에 형질 감염시켰다. 24시간 후 형질 감염된 세포에 C270A-1~3 또는 SB203580을 처리하였고, 루시페라아제 분석 키트(Promega)를 사용하여 루시페라아제 활 성을 측정하였다. 루시페라아제 활성은 각 샘플의 β -갈락토시다아제 활성에 대해 표준화하였다.
- [0068] 13. 통계 분석
- [0069] 실험 결과는 최소한 3번의 개별적 실험 결과를 평균 $\pm$ 표준편차(standard deviation)로 표기하였고, 실험군 사이 의 통계학적 비교는 Student's t-test를 통해 분석하였으며, $p < 0.05$ 이하를 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

통계적인 분석은 SPSS 소프트웨어(버전 24; SPSS Inc.)를 이용하여 수행되었다.

[0070] 실시예 1. C270A-1~3 및 TRAIL 병행 처리에 의한 세포 사멸 효과

[0071] 아스틸베 리블라리스(*Astilbe rivularis*)에서 분리된 올레아놀산 유도체인 C270A-1~3, 퀘르세틴(quercetin), TRAIL 및 이들의 병행 처리에 의한 교모세포종 세포 사멸 효과를 확인하였다.

[0072] 그 결과, TRAIL 저항성을 갖는 U251MG 및 LN428에서 C270A-1~3 및 퀘르세틴을 병행 처리한 경우 세포 사멸 효과가 나타나는 것을 확인하였고, 특히 C270A-1~3을 TRAIL과 병행 처리한 경우 퀘르세틴 및 TRAIL 병행 처리군에 비해 세포 사멸 효과가 더욱 현저하였다(도 1A 및 B).

[0073] 한편, 정상 성상세포(astrocyte)에서는 C270A-1~3 및 TRAIL 병행 처리에 의한 세포 사멸 효과가 나타나지 않았다(도 1C).

[0074] 또한, U251MG에 C270A-1~3을 단독 처리한 군과 TRAIL과 병행 처리한 군의 세포 사멸 효과를 관찰한 결과, C270A-1~3을 단독 처리한 군에서는 세포 사멸 효과가 나타나지 않았으나 TRAIL과 병행 처리한 경우 도1A와 동일하게 세포 사멸 효과가 나타났고, 정상 성상세포에서는 세포 사멸 효과가 나타나지 않았다(도 2).

[0075] 실시예 2. DISC(death-inducing signaling complex)-중재된 세포 사멸에 의한 C270A-1~3에 의한 TRAIL 민감도 향상

[0076] 일반적으로 TRAIL에 의해 유발되는 암세포 사멸은 주로 세포자살(apoptosis)이지만, 세포 성질에 따라 비-세포자살(non-apoptosis)에 의한 세포 사멸을 유도하기도 한다. 따라서 C270A-1~3에 의한 TRAIL 매개 세포 사멸의 형태를 확인하기 위해 U251MG 세포를 TRAIL, C270A-1~3 또는 이들을 병행하여 24시간 동안 처리한 후 annexin V와 7-AAD 염색법을 사용하여 유세포 분석기로 세포 사멸을 분석하였다.

[0077] 그 결과, TRAIL은 실시예 1에서 확인한 바와 같이 단독으로는 U251MG 세포의 사멸을 거의 일으키지 않았으나, C270A-1~3을 처리한 후 TRAIL을 병행하여 처리한 경우 세포 사멸이 현저히 증가하였으며, 카스파제-8 억제제인 Z-VAD 또는 IETD를 함께 처리한 경우 세포 사멸이 억제되는 것을 확인하였다(도 3A).

[0078] 또한, C270A에 의해 유발된 TRAIL-매개 세포 사멸의 형태를 추가로 확인하기 위해, 초기 단계의 세포 사멸과 관련이 있는 미토콘드리아 막 전위($\Delta \psi_m$ 의 손실)의 탈분극을 분석했다. 그 결과, TRAIL 및 C270A-1을 병행 처리하였을 경우 탈분극이 격렬하게 일어났고, 이를 통해 C270A 및 TRAIL의 병용처리가 세포 사멸 경로를 유발한다는 것을 확인하였다(도 3B).

[0079] 또한, C270A-1~3 병행 처리에 의한 TRAIL 민감도 상승에 따른 세포 사멸의 신호전달 경로를 확인하기 위해 카스파제 캐스케이드(caspase cascade)의 활성 과정 및 PARP의 절단 정도를 확인하였다. 그 결과, C270A-1~3 병행 처리에 의해 카스파제-8 및 카스파제-3의 활성화, PARP의 절단을 확인하였으며(도 4A 및 B), 이를 통해 카스파제-8의 활성화가 TRAIL 저항성을 가지는 교모세포종에서 C270A에 의해 유도된 세포 사멸을 일으키는데 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

[0080] 한편, 외인성 세포 사멸을 유도하는 수용체 결합 인자(TNF α , TRAIL, FasL)가 수용체(TNFR, DR4, Fas 등)에 결합하면 수용체 연결 단백질인 FADD(Fas-associated protein with death domain)와 카스파제-8(procaspase-8)이 함께 결합해 세포 사멸 유도 신호 복합체(death-inducing signaling complex, DISC)가 형성되고, 카스파제-8의 활성화를 통해 세포 사멸이 일어난다.

[0081] 상기 외인성 세포 사멸 수용체 결합인자(TRAIL, CHX(cycloheximide) 및 TNF α , FasL)에 의한 DISC 형성에 미치는 C270A-1의 효과를 분석하기 위해, 면역 침강 분석을 실시한 결과, TRAIL 단독 처리에 의해서는 나타나지 않던 FADD, RIP1 및 절단형태의 RIP1, 카스파제-10 및 카스파제-8(p43,41 및 p18)의 카스파제-8과의 결합이 C270A-1 및 TRAIL을 병행처리하였을 때에만 현저하게 증가되는 것을 확인하였고, 다른 외인성 세포 사멸 자극들(CHX(cycloheximide) 및 TNF α , FasL)은 C270A-1과 병행처리하였을 경우 유의한 증가현상이 관찰되지 않았다(도 5).

[0082] 이상의 결과로부터 본 발명의 C270A는 TRAIL에 의한 암세포 자살만 선택적으로 작동시켜 항암효과를 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

[0083] **실시예 3. TRAIL 매개 세포 사멸에서 C270A-1~3에 의한 DR5의 발현변화**

[0084] U251MG 세포에서 TRAIL과 연관된 경로의 세포 사멸과 관련된 단백질의 발현을 확인해본 결과, C270A-1의 처리에 의해 시간 또는 농도 의존적으로 DR5의 발현이 증가한 반면, 다른 항-세포 사멸 단백질(anti-apoptotic protein)들의 발현에는 거의 변화가 없었고, C270A-1~3에 의한 DR5의 발현증가의 정도는 기존에 DR5의 발현을 증가시킨다고 보고된 퀘르세틴에 비해 현저하다는 것을 확인하였다(도 6A, B 및 C).

[0085] 또한, C270A-1은 세포 표면의 DR5의 발현은 증가시키지만, DR4의 발현에는 영향이 없었으며(도 6D 및 E), TRAIL 및 C270A-1의 병행 처리에 의해 세포 사멸이 유도될때 DR5의 역할을 확인하기 위해 siDR5를 이용하여 DR5의 발현을 억제시킨 결과, C270A-1 및 TRAIL 병행처리에 의해 증가되었던 세포 사멸이 DR5 발현 억제에 의해 감소하였고, 세포 사멸시 쪼개진 형태의 양이 증가함에 따라 감소하는 카스파제-3 및 PRAP의 발현이 DR5 발현 억제시 감소하지 않는 것을 확인하였다(도 7).

[0086] **실시예 4. C270A-1에 의한 DR5 유전자 발현 조절**

[0087] C270A에 의한 DR5 단백질 발현 증가의 원인을 규명하기 위해, 암세포에 존재하는 모든 TRAIL 수용체 아형의 유전자 발현을 분석한 결과, C270A-1이 DR5의 유전자 발현을 조절하였으며, DR4, DcR1(Decoy receptor 1) 및 DcR2의 발현에는 영향이 없는 것을 확인하였다(도 8).

[0088] 이를 통해 C270A에 의해 유도되는 DR5의 발현 증가는 유전자 전사단계에서부터 조절된다는 것을 알 수 있었다.

[0089] 한편, ER(endoplasmic reticulum) 스트레스-매개 전사인자인 CHOP의 활성이 DR5의 전사를 증가시키므로, C270A-1~3이 CHOP의 발현을 조절하는지 확인한 결과, U251MG 및 LN428 세포에서는 C270A-1의 처리시간에 따라 CHOP의 발현 및 DR5의 발현이 증가하였고, 정상 성상세포(astrocyte)에서는 상기 발현의 증가가 나타나지 않았다(도 9A).

[0090] CHOP이 C270A에 의해 유도되는 DR5의 전사 활성화와 연관이 있는지 확인하기 위해 야생형 DR5 프로모터(pDR5-wt) 또는 CHOP와 상호작용할 수 없는 DR5 돌연변이 프로모터(-276~-263; pDR5-mt)를 과발현시킨 세포에 C270A-1을 처리하여 프로모터 활성화 여부를 루시페라아제 분석을 통해 확인한 결과, C270A-1에 의해 증가되었던 루시페라아제 활성이 CHOP와 상호작용할 수 없는 pDR5-mt를 발현하는 세포에서는 나타나지 않았다(도 9B). 또한, siCHOP을 이용하여 CHOP의 발현을 억제한 세포에서도 C270A-1의 처리에 의한 DR5의 발현증가가 대조군(siCon)에 비해 감소한 것을 확인하였다(도 9C).

[0091] 상기의 결과를 통해 C270A에 의해 유도되는 DR5의 전사활성화에는 CHOP의 발현이 중요하다는 것을 확인하였다.

[0092] **실시예 5. C27A 1~3에 의해 유도된 CHOP와 DR5의 상향 조절 기작 분석**

[0093] MAPK(mitogen-activated protein kinase)아과(subfamily)의 활성화는 ER 스트레스에 대한 반응으로 TRAIL 수용체 유도에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 C270A-1이 U251MG 세포에서 MAPK를 활성화 시키는 지 확인하였다.

[0094] 그 결과, C270A-1 처리 후 p38 ERK의 활성이 유도되었으며(도 10A), SB203580(p38 억제제), PD98059(MEK1 억제제) 및 SP600125(JNK 억제제)를 C270A-1과 함께 처리한 경우, SB203580을 처리한 군에서 C270A-1에 의해 유도된 CHOP의 발현 및 DR5의 발현이 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 10B). 또한, 세포 사멸을 확인한 결과, C270A-1 및 TRAIL을 병행처리하였을 때 유도된 세포 사멸은 SB203580을 함께 처리하였을 때 억제되었으며, PD98059 및 SP600125를 처리하였을 경우에는 세포 사멸을 억제하는 효과가 나타나지 않았다(도 10C).

[0095] 또한, 상기 SB203580의 처리에 의한 세포 사멸 억제효과는 CHOP의 발현 억제 및 p38의 활성 억제효과를 동반한다는 것을 확인하였다(도 10D 및 E).

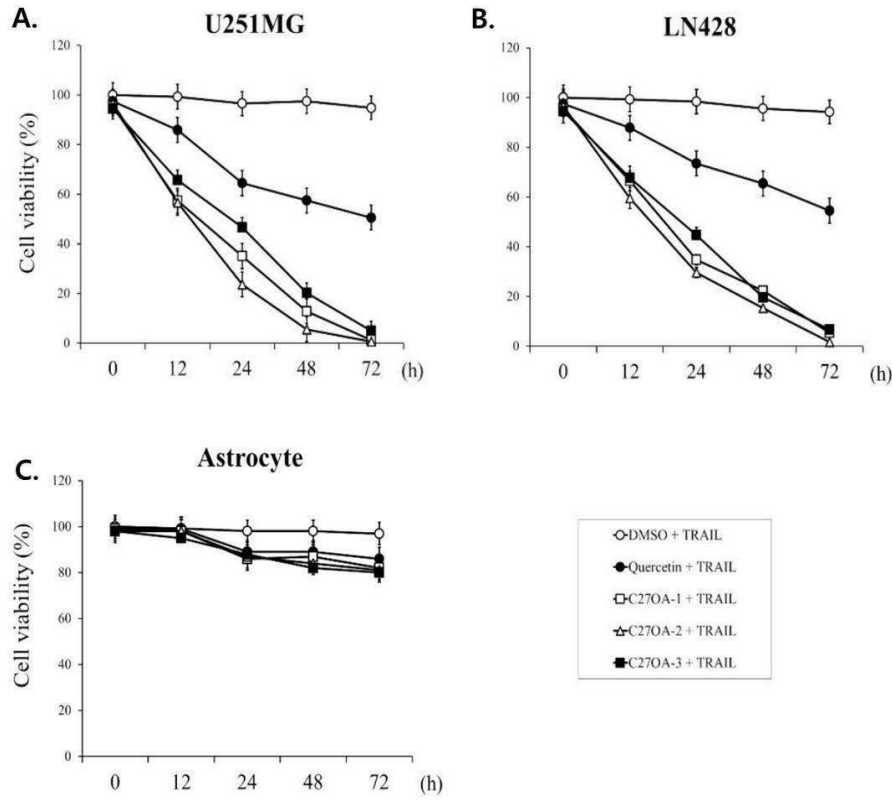
[0096] 한편, p38이 CHOP/DR5 상향 조절을 통한 TRAIL 민감성 증가에 직접 관여하는지 추가로 검증하기 위해, p38 특이적 siRNA를 사용하여 p38의 발현을 억제하였다. 그 결과, p38의 억제는 C270A-1에 의해 유도된 CHOP 및 DR5의 증가된 발현을 억제하였고(도 11A), C270A-1 및 TRAIL 병행처리에 의한 세포 사멸을 감소시켰다(도 11B).

[0097]

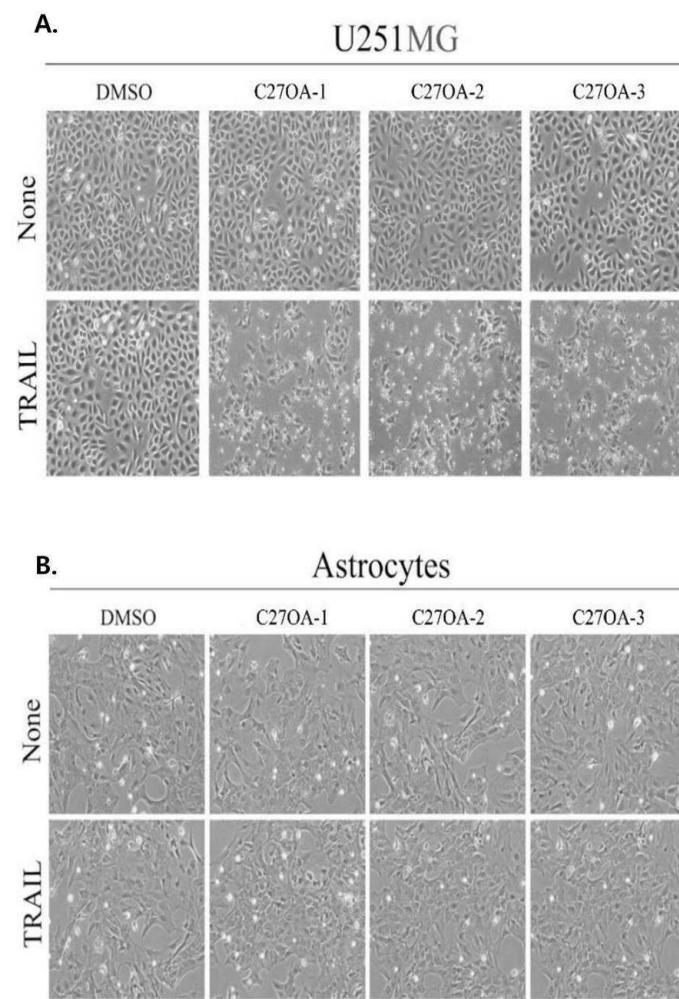
상기 실시예를 통해 p38의 활성화가 CHOP 매개 DR5 발현에 중요한 역할을 하며, 이는 C270A에 의해 유도된 신경 교종 세포(glioma cell)의 TRAIL 매개 세포 사멸에 대한 민감성을 유도한다는 것을 확인하였다.

도면

도면1

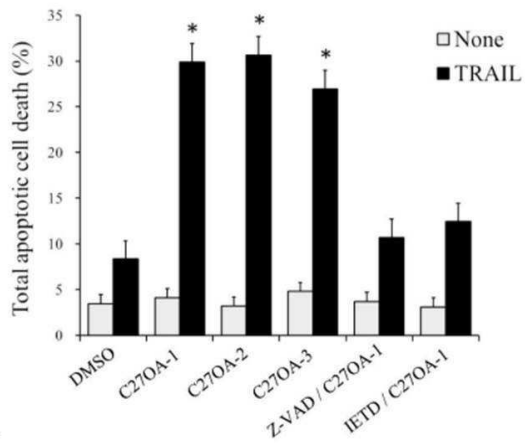


도면2

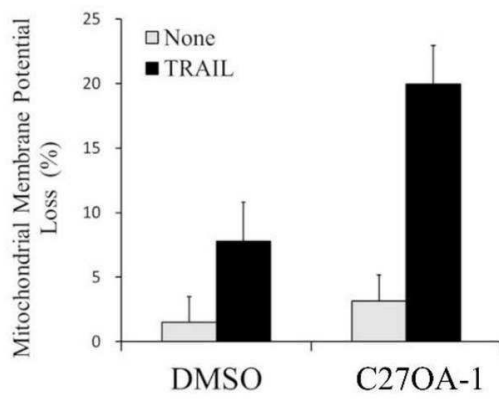


도면3

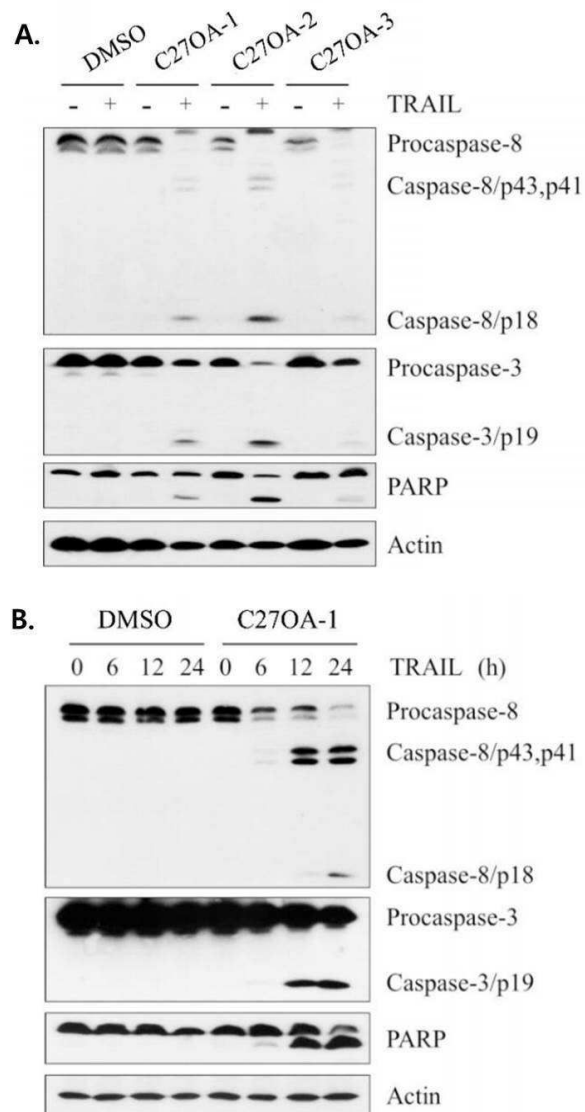
A.



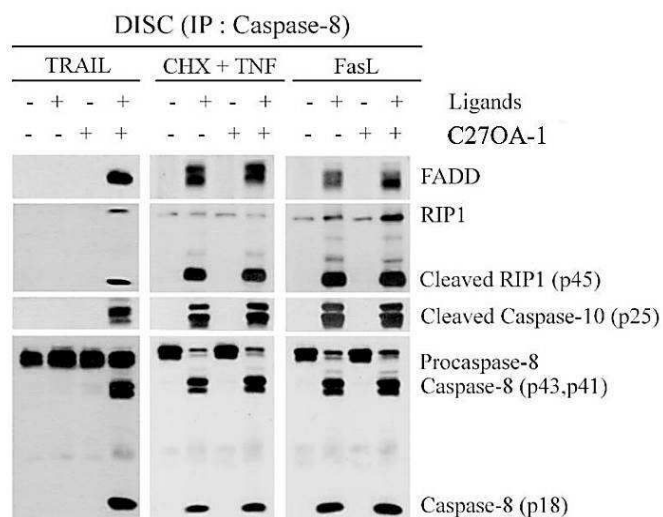
B.



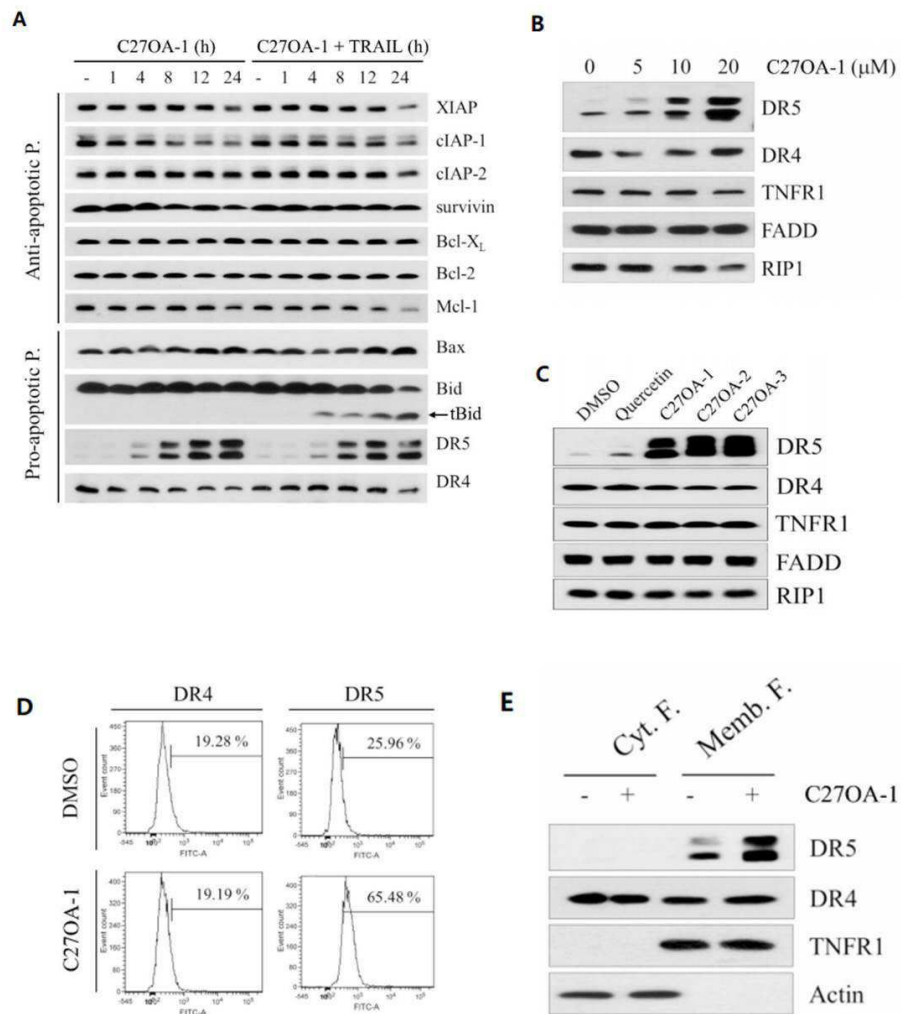
도면4



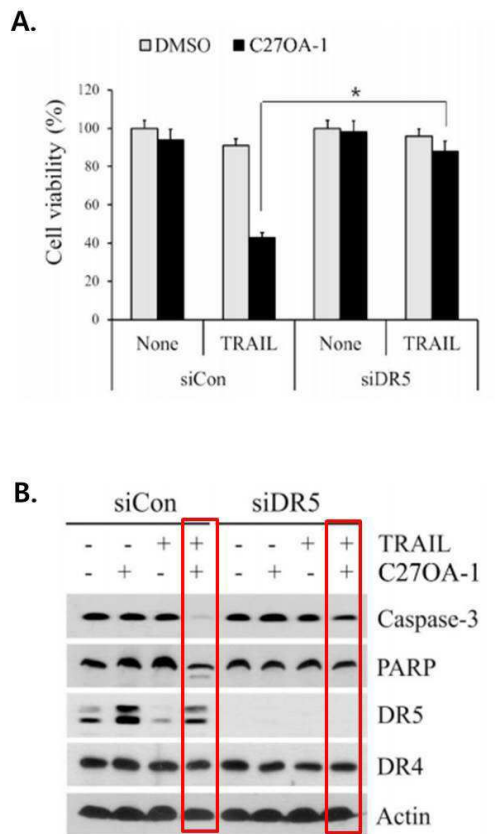
도면5



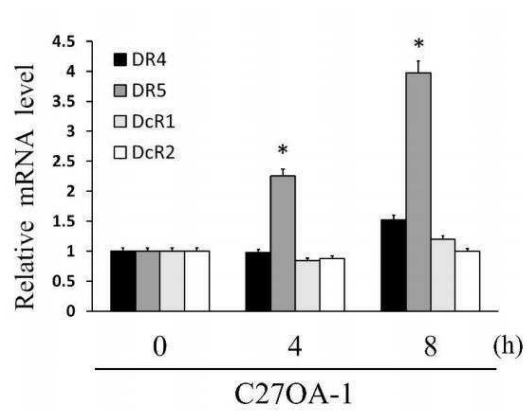
도면6



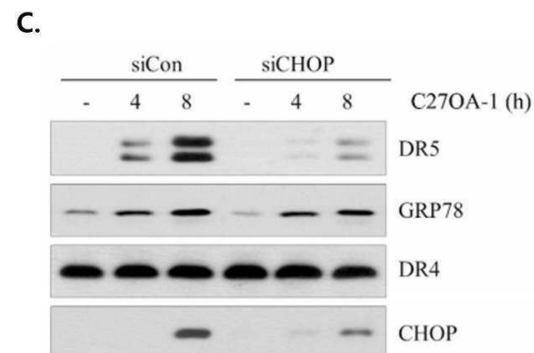
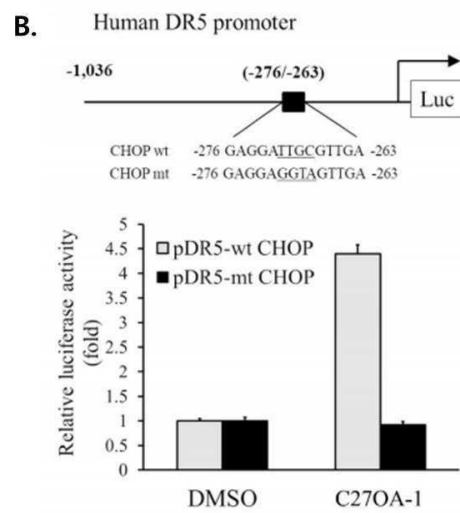
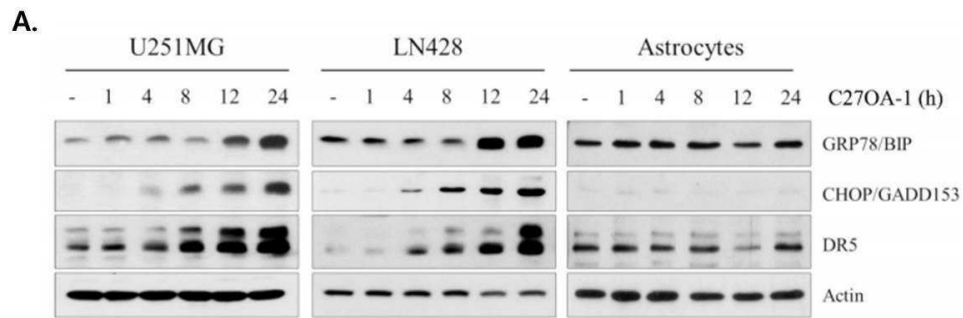
도면7



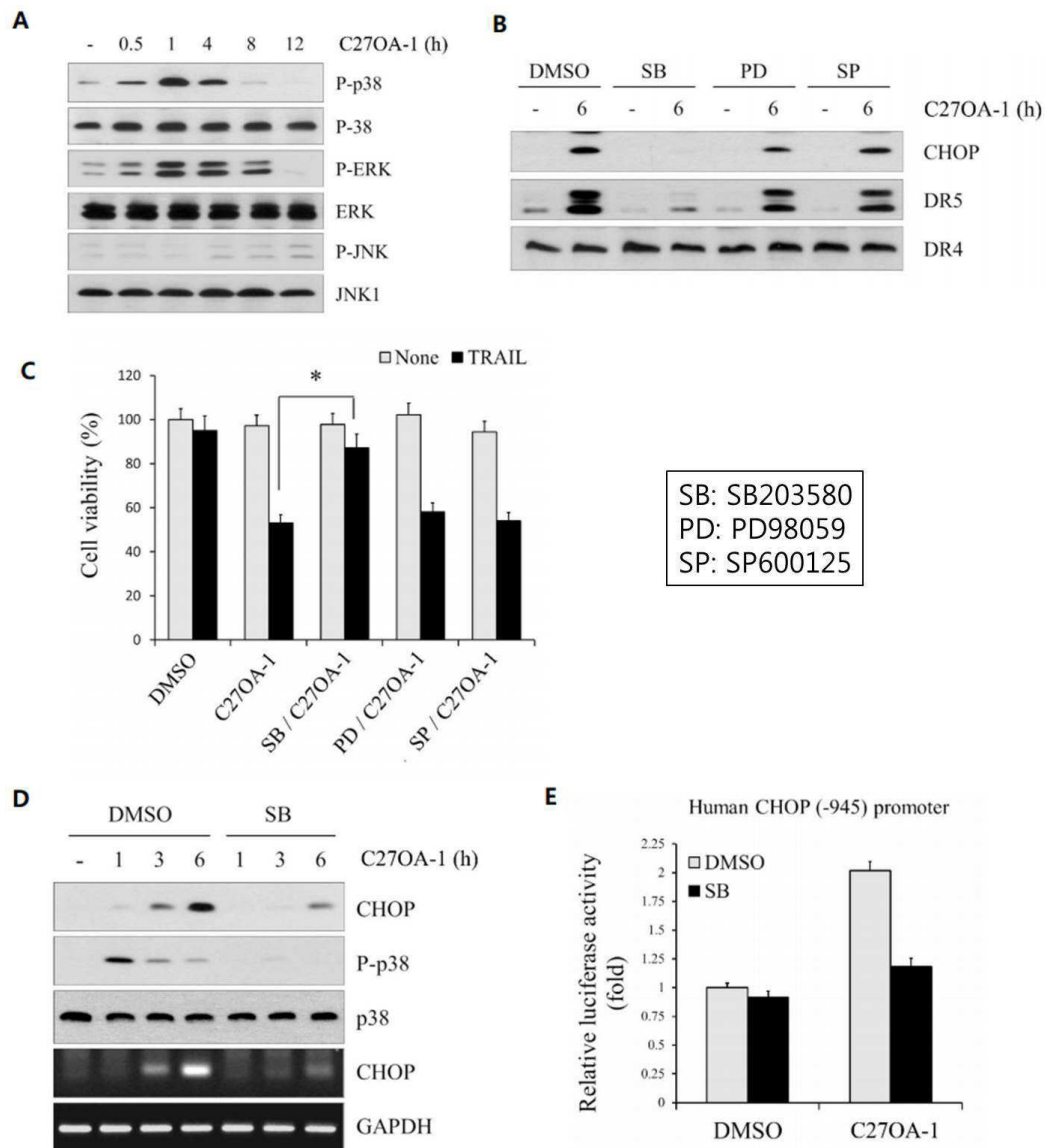
도면8



도면9



도면10



도면11

