



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0069452
(43) 공개일자 2011년06월23일

(51) Int. Cl.

A61K 31/52 (2006.01) A61K 31/4178 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0126195

(22) 출원일자 2009년12월17일

심사청구일자 2009년12월17일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

이상국

서울특별시 강남구 대치동 974 대치현대아파트
107동 1104호

정낙신

서울특별시 강남구 역삼2동 755-1 개나리푸르지오
아파트 305동 1003호

정화진

서울특별시 서대문구 대현동 럭키아파트 109동
1401호

(74) 대리인

강철중, 조영신, 김윤배

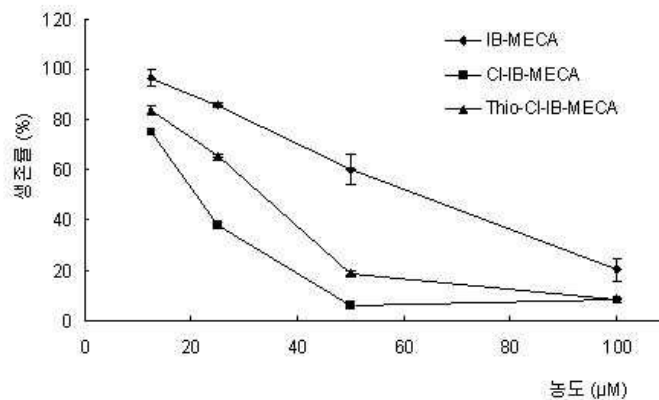
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) A₃ 아데노신 수용체 효능제를 포함하는 대장암 치료용 억제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 선택적 A₃ 아데노신 수용체 효능제 (agonist), 2-클로로-N⁶-(3-아이오도벤질)-4' -싸이오아데노신-5' -N-메칠유로나마이드 (thio-Cl-IB-MECA) 또는 억제학적으로 허용가능한 이의 염을 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 억제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 A₃ 아데노신 수용체 효능제, thio-Cl-IB-MECA는 독성이 낮고, 다른 A₃ 아데노신 수용체 효능제에 비하여 선택적으로 대장암 세포의 성장을 억제하므로 대장암의 예방 또는 치료에 유용하다.

대표도 - 도1

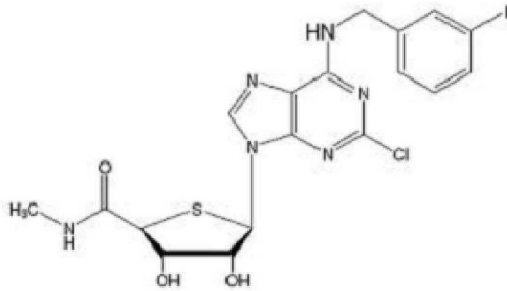


특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 (I)로 나타나는 A₃ 아데노신 수용체 효능제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

[화학식 I]



청구항 2

제1항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 이들의 혼합물을 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 A₃ 아데노신 수용체 효능제를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 대장암 세포 성장을 효율적으로 억제하여 대장암 예방 또는 치료에 효과적인 선택적 A₃ 아데노신 수용체 효능제, 2-클로로-N⁶-(3-아이오도벤질)-4'-싸이오아데노신-5'-N-메칠유로나마이드 (이하 'thio-Cl-IB-MECA' 라 함) 또는 약제학적으로 허용가능한 이의 염을 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있는 실정이며, 우리나라의 경우, 질병 사망 원인 중 제 1위의 질병으로서 연간 약 10만 명 이상이 진단되고, 약 6만 명 이상이 사망하고 있다. 이러한 암의 유발 인자인 발암물질로는 흡연, 자외선, 화학 물질, 음식물, 기타 환경인자들이 있으나, 그 유발 원인이 다양하여 치료제의 개발이 어려울 뿐만 아니라 발생하는 부위에 따라 치료제의 효과 또한 각기 다르다. 현재 치료제로 사용되는 물질들은 상당한 독성을 지니고 있으며, 암세포만을 선택적으로 제거하지 못하므로, 암의 발생 후 이의 치료 뿐 아니라, 암의 발생을 예방하기 위한 독성이 적고 효과적인 항암제의 개발이 절실히 필요하다.

[0003] 암이란 신생물 (neoplasia)이라고도 불리며, 일반적으로 “제어되지 않은 세포성장”으로 특징지어진다. 이러한 비정상적인 세포 성장에 의해 종양 (tumor)이라고 불리는 세포 덩어리가 형성되어 주위의 조직으로 침투하고 심한 경우에는 신체의 다른 기관으로 전이되기도 한다. 암은 수술, 방사선 및 화학요법으로 치료를 하더라도 많은 경우에 근본적인 치유가 되지 못하고 환자에게 고통을 주며 궁극적으로는 죽음에 이르게 하는 난치성 만성질환이다. 암의 발생요인으로는 여러 가지가 있으나, 내적 요인과 외적 요인으로 구분하기도 한다. 정상세포가 어떠한 기전을 거쳐 암세포로 형질전환이 되는지에 대해서는 정확하게 규명되지 않았으나, 적어도 80 내지 90%가 환경요인 등 외적인자에 의해 영향을 받아 발생하는 것으로 알려져 있다. 내적 요인으로는 유전 인자, 면역학적 요인 등이 있으며, 외적 요인으로는 화학물질, 방사선, 바이러스 등이 있다. 암의 발생에 관련되는 유전자에는

종양형성유전자 (oncogenes)와 종양억제유전자 (tumor suppressor genes)가 있는데, 이들 사이의 균형이 위에서 설명한 내적 혹은 외적 요인들에 의해 무너질 때 암이 발생하게 된다. 암세포는 정상세포와 많은 면에서 그 성질이 유사하므로 정상세포에는 피해를 주지 않고 암세포만을 제거하는 것은 쉬운 일이 아니다. 그러나 암세포에는 몇 가지 일반 세포와 구분되는 특징이 있는데, 첫째는 암세포는 세포 증식이 조절되지 않는다는 것이고, 둘째는 분화의 특징이 비교적 결여되어 있다는 것이며, 셋째는 주위의 조직에 침투하여 전이를 한다는 것이다. 정상세포는 필요에 따라 성장인자에 의해 신호를 전달받아 증식을 하는 반면 암세포는 성장인자에 대한 의존도가 낮고 주변의 세포와 접촉에 의해 성장이 저해되는 접촉성 저해 (contact inhibition)가 없으며, анги오제닉 인자 (angiogenic factor)를 분비하여 전이를 활발히 한다. 또한 암세포는 분화가 되지 않고, 세포사멸 (apoptosis or programmed cell death)이 일어나지 않으며, 유전적으로 불안정한 특징이 있다. 암세포의 유전적인 불안정은 암의 진행에 있어서 매우 중요하며 화학요법에 대한 내성을 유도하기도 하는 것으로 알려져 있다 (Folksman *et al.*, Science, **235**, 442-447, 1987; Liotta *et al.*, Cell, **64**, 327-336, 1991).

[0004] 암은 혈액암과 고형암으로 크게 분류되며, 폐암, 위암, 유방암, 대장암, 구강암, 간암, 자궁암, 식도암, 피부암 등 신체의 거의 모든 부위에서 발생한다. 국가 암 발생 통계 산출 결과, 1996년 대비 사망률이 가장 많이 증가한 암은 폐암이며, 그 다음이 대장암, 전립선암, 췌장암이다. 특히 대장암은 전 세계적으로 가장 흔한 암 중의 하나로, 우리나라에서의 대장암의 발생도 전체 암 발생의 12.0%로 장기별 암 발생률과 사망률에서 각각 3, 4위를 차지하였고 점차 증가 추세에 있다. 남자의 주요 암 중 발생이 가장 많이 증가한 암은 전립선암과 대장암으로, 1999년 대비 2005년 연령표준화발생률이 각각 74.1%, 50.4% 증가하였다. 선진 외국의 경우, 대표적으로 많이 발생하는 3대 암 종이 남자는 전립선암, 대장암, 폐암, 여자는 유방암, 대장암, 폐암으로 보고하고 있음을 감안할 때, 생활양식이 점차 서구화되어 가고 있는 우리나라의 경우에도 대장암, 전립선암, 유방암의 증가가 가속화될 것으로 예상된다. 현재 다른 질환의 경우는 치료기술이 발달하고 사람들이 꾸준한 관리를 해옴에 따라 사망률이 둔화되고 있다. 하지만 대장암의 경우 그 발생 빈도가 가파르게 증가하고 있으므로 이를 치료하기 위한 의약품 개발 연구 역시 활발히 증가하고 있다.

[0005] 대장암에 대한 일차적 치료 원칙은 수술 절제이지만, 수술 절제 후에도 재발률이 40~60%에 이르기 때문에 (Reynolds *et al.*, Drugs, **64**, 109-118, 2004), 생존 기간을 연장시키며 증상을 완화시키고 삶의 질의 유지와 향상을 위해서 방사선 치료 혹은 항암화학요법 등의 보조 치료가 필요하다. 그러나 항암화학요법의 약물의 종류와 투여 경로에 대해 절대적인 원칙은 없는 상태이며, 그 효과 또한 만족할 정도는 아니다 (Simmonds *et al.*, BMJ, **321**, 531-535, 2000). 또한 같은 대장암 환자들 중에도 항암화학요법에 대한 반응률과 생존율의 차이가 크게 나타나기도 한다 (McLeod *et al.*, Br J cancer, **79**, 191-203, 1999). 현재까지 대장암을 포함한 고형암 환자의 치료제 개발을 위해 종양의 유전적 성향, 특히 성장 신호의 전달 (growth signaling transduction)과 종양 세포의 미세 환경을 목표로 하는 약제의 연구가 활발히 진행되고 있으나 (Rowinsky, Drugs, **605**, 1-14, 2000), 만족할 만한 치료제가 개발되지 못하고 있는 실정이다.

[0006] 본 발명자들은 다양한 암의 예방 또는 치료에 대한 아데노신 수용체 및 그 효능제의 역할에 대하여 오랜 기간 연구를 계속해 왔다. 아데노신 수용체는 G-단백질-결합 수용체로 A₁, A_{2A}, A_{2B} 그리고 A₃의 총 4가지 서브타입이 존재하는데 A_{2A}, A_{2B}는 환형 아데노신 모노인산(cyclic adenosine monophosphate: cAMP)을 증가시키는 반면, A₁와 A₃는 cAMP를 감소시키기 때문에 어떤 수용체가 발현하느냐에 따라 세포 내 신호전달이 영향을 받게 된다 (Fredholm BB *et al.*, Pharmacol Rev, **53**, 527-552, 2001; Jacobson KA *et al.*, Trends pharmacol Sci, **19**, 184-191, 1998). 아데노신 수용체는 다양한 세포에서 많이 발현하고 있는 수용체이고 여러 아데노신 유도체 중 A₃ 아데노신 수용체 (A₃AR)에 선택적인 A₃AR 효능제가 다른 서브타입 수용체 관련 효능제 보다 A₃ 아데노신 수용체를 활성화시키는 내인적 활성이 좀 더 우수하므로 (Gao ZG *et al.*, Biochem Pharmacol, **65**, 1675-84, 2003) 약물로서의 개발 가능성이 높다고 여겨진다. 또한, A₃AR의 활성화는 염증 반응이나 면역 반응에 관여하기 때문에 A₃AR에 대한 효능제는 심혈관계 질환, 면역 질환, 류마티스 관절염, 대장염과 같은 염증관련 질환과 암세포 억제 등에 효능이 있다고 알려져 있다 (Merighi S *et al.*, Pharmacol Ther. **100**, 31-48, 2003; Baraldi PG *et al.*, Med Res Rev, **20**, 103-128, 2000; Liang BT *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, **95**, 6995-6999, 1998; Fishman P *et al.*, Anti-cancer Drugs, **13**, 437-443, 2000).

[0007] 이에 A₃AR 효능제의 항암 효과에 대하여 다년간 실험한 결과, 선택적인 A₃아데노신 수용체의 효능제인 thio-Cl-IB-MECA가 특별한 독성이나 부작용없이 사람 대장암 세포인 HCT 116의 증식을 선택적으로 억제한다는 사실을 확인하고, 기존의 대장암 치료제를 대체할 수 있는 항암제 성분으로 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

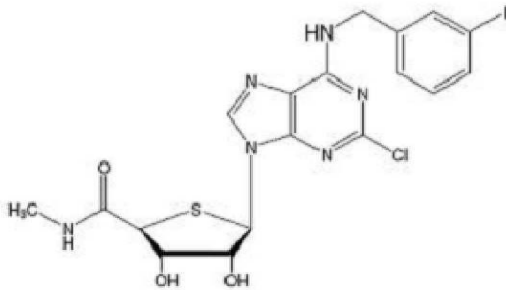
[0008] 본 발명은 대장암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 선택적인 A₃ 아데노신 수용체 효능제를 제공하기 위한 것이다.

[0009] 또한, 본 발명은 선택적인 A₃ 아데노신 수용체 효능제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염를 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제 해결수단

[0010] 본 발명은 하기 화학식 (I)로 나타나는 A₃ 아데노신 수용체 효능제 (thio-Cl-IB-MECA) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 대장암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] [화학식 I]



[0012]

[0013] 본 발명에 따른 약제학적 조성물로 치료될 수 있는 대장암은 발병 원인에 무관하며, 결장암, 직장암을 포함하여 대장 부위에 형성된 종양을 포괄적으로 포함하는 것으로 해석된다.

[0014] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제, 예를 들면 당업계에서 통상적으로 사용되는 희석제, 활택제, 결합제, 붕해제, 감미제, 안정제, 및 방부제로부터 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있으며, 정제, 과립제, 캡슐제, 산제 등으로 제제화될 수 있다.

[0015] 바람직하기는 정맥내 투여, 복강내 투여 또는 경구투여의 형태로 사용된다.

[0016] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 치료효과를 증강시키기 위하여 본 발명에 따른 유효성분 이외에 다른 공지의 항-종양 약제와 함께 투여될 수 있다.

[0017] 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여량 및 투여 횟수는 환자의 연령, 상태, 체중, 질환의 중증도, 약물 형태, 투여 경로, 및 기간에 따라 당업자에 의하여 적절하게 조절될 수 있다. 바람직하기는, 약제학적 조성물의 유효성분은 환자의 체중 당 1 내지 10 mg/kg으로 1회 내지 수회/1일 투여되는 것이다.

효 과

[0018] 본 발명에 따른 선택적 A₃ 아데노신 수용체 효능제인 thio-Cl-IB-MECA는 선택적으로 대장암 세포의 증식을 억제하며 낮은 독성을 나타낸다는 장점을 가진다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0019] 다음의 실시예들은 본 발명을 예시하기 위한 것이다. 따라서 본 발명의 범위가 하기 실시예에 의하여 제한되어서는 안된다.

[0020] 실시예

[0021] 실시예 1: 시험관 내 사람암세포 성장 억제 효능 측정 (SRB assay)

[0022] 본 발명에 따른 thio-Cl-IB-MECA의 사람 대장암 세포인 HCT 116 세포에서의 성장 저해 효과를 다른 A₃ 아데노신

수용체 효능제, IB-MECA, Cl-IB-MECA의 효과와 비교하기 위하여, 술포호다민 B (Sulforhodamine B: SRB) 검사를 진행하였다.

[0023] 10% 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해된 thio-Cl-IB-MECA를 100, 50, 25, 12.5 μM 의 농도로 96-웰 플레이트의 각 웰에 10 μL 씩 3중 로딩하여 시험 플레이트를 만든 후 10% FBS, 항생-항진균제(antibiotics-antimycotics)가 첨가된 RPMI 1640 배지로 5×10^4 cells/ml 가 되게 희석한 세포를 190 μL 씩 가해 총 양이 200 μL 가 되게 하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3일 동안 배양하였다. 그와 동시에 시료(thio-Cl-IB-MECA)를 넣지 않은 새로운 96-웰 플레이트에 동일한 세포 현탁액 190 μL 씩 16웰 이상에 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양하여 기준일을 잡아주었다. 배양 후 50% 트리클로로아세트산 (TCA)을 50 μL 씩 가한 후 4°C에서 한 시간 동안 배양시켜 세포를 고정하였다. 이후 수돗물로 5회 세척하고 건조시켰다. 각 웰에 4% 술포호다민 B (SRB)를 포함하는 1% 아세트산 용액을 100 μL 씩 넣어서 세포를 염색시키고 상온에서 한 시간 방치한다. 1% 아세트산으로 5회 세척하여 충분히 건조시킨 후 각 웰에 100 mM Tris-base 200 μL 씩을 가하여 결합된 염색액을 용해시켜 웨이커로 충분히 흔들어 섞어준 후 ELISA 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정한 흡광도를 바탕으로 수학적 1에 의해 대조군에 대한 실험 군의 각 실험 물질 처리에 따른 생존율을 환산하였고 각 농도에 대한 생존율을 바탕으로 TableCurve 프로그램을 이용하여 IC₅₀ 값을 계산하였다.

[0024] <수학적 1>

$$\text{세포 생존율 (\%)} = \frac{\text{시료처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

[0025]

[0026] IB-MECA 또는 Cl-IB-MECA에 대해서도 thio-Cl-IB-MECA와 동일한 방법으로 암세포 생존율을 확인하였다. 암세포 생존율 결과는 도 1에 나타내었다.

[0027] 도 1에 나타난 바와 같이, IB-MECA, Cl-IB-MECA 및 thio-Cl-IB-MECA는 사람 대장암 세포 HCT 116에 대해 72시간 배양 조건에서 농도 의존적으로 세포의 성장을 저해하며, 본 발명에 따른 thio-Cl-IB-MECA의 경우 기존의 IB-MECA에 비하여 현저히 낮은 농도에서 세포 성장을 저해함을 알 수 있었다 (IB-MECA의 IC₅₀=62.37 μM ; Cl-IB-MECA의 IC₅₀=19.26 μM ; thio-Cl-IB-MECA의 IC₅₀=37.45 μM) (도 1). 세포 저해 활성 결과를 토대로 사람 대장암 세포 HCT 116에서 추가적인 기전 연구를 수행하였다.

[0028] 실시예 2: 시험관 내 세포의 형태학적 변화 관찰

[0029] 본 실시예에서는 사람 대장암 세포 HCT 116에 thio-Cl-IB-MECA를 40 μM 의 농도로 처리하여 48 시간 배양한 다음, 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다.

[0030] HCT 116 세포를 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 포함된 배지로 100 mm 배양 접시 당 1×10^6 가 되도록 희석하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간을 배양한 후 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 2회 세척하였다. 10% FBS가 포함된 배지에 thio-Cl-IB-MECA를 40 μM 로 희석한 후, 100 mm 배양 접시에 준비된 배지를 10 ml 첨가하여 일정 시간 배양하였다. 처리 시간과 농도에 맞추어 현미경으로 세포의 형태를 관찰하였다(도 2).

[0031] 실험 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 시료(thio-Cl-IB-MECA)를 처리하지 않고 DMSO 만을 처리한 대조군(Control)의 경우 세포 수의 증가를 보였으나 thio-Cl-IB-MECA 40 μM 를 처리한 군은 세포 수가 감소하였다.

[0032] 실시예 3: 시험관 내 세포 주기 분석 (FACS)

[0033] thio-Cl-IB-MECA를 40 μM 의 농도로 처리하여 24, 36 시간 배양하여 플로우 사이토미터 분석 (flow cytometer analysis: FACS)로 세포 주기를 분석하였다. 세포를 10% FBS 가 포함된 배지로 100 mm 배양 접시 당 1×10^6 가 되도록 희석하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간을 배양한 후 PBS로 2회 세척하였다. 10% FBS가 포함된 배지에 thio-Cl-IB-MECA를 40 μM 로 희석한 후, 100 mm 배양 접시에 준비된 배지를 10 ml 첨가하여 일정 시간 배양하였다. 세포 배지 내에 부착되지 않은 세포와 부착된 세포를 모아 PBS로 2회 세척한 후 100% 냉 메탄올을 500 μL 씩 첨가하여 4°C에서 세포를 고정하였다. PBS로 2회 세척하고 RNase A가 들어있는 용액에서 30분간 방치한 후 PI(Propidium Iodide) 완충액으로 5분간 차광 염색하였다. PI 완충액을 제거한 후 폴리스티렌 둥근 바닥 튜

브로 옮겨서 FACScalibur[®] 유세포 분석기로 세포의 주기를 분석하였다.

[0034] 도 3에 나타난 바와 같이, 사람 대장암 세포 HCT 116에서 thio-Cl-IB-MECA를 24, 36시간 처리하였을 때 대조군에 비하여 G₁기 증가가 나타났다.

[0035] 실시예 4: 시험관 내 RT-PCR를 통한 세포 주기 조절 관련 유전자 발현 확인

[0036] 실시예 4는 G₁기에 관여하는 세포 주기 조절 유전자의 발현 여부를 확인하기 위한 것이다.

[0037] HCT 116 세포를 10% FBS가 포함된 배지로 100mm 배양 접시 당 1×10^6 가 되도록 희석하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 24시간을 배양한 후 PBS로 2회 세척하였다. 10% FBS가 포함된 배지에 thio-Cl-IB-MECA를 40 μM로 희석한 후, 100 mm 배양 접시에 준비된 배지를 10 ml 첨가하여 일정 시간 배양하였다. 세포 배지 내에 부착되지 않은 세포와 부착된 세포를 모아 PBS로 2회 세척한 후, TRI 시약(TRIZol)을 이용하여 세포를 깨서 모은 후 CHCl₃를 첨가하여 RNA를 추출하고, 이소프로필알코올을 이용하여 침전시켰다. RNA 침전물을 70% 에탄올로 세척한 후 공기 중에서 건조시킨 후 뉴클레아제로 오염되지 않은 물(nuclease-free water)에 현탁시켰다. 55℃에서 10분간 가열하고, 70℃에서 5분간 가열하여 RNA가 단일 사슬 상태로 존재하게끔 하였다. 총 RNA를 나노 드롭으로 정량한 후, 1 μg/μl 농도로 희석하여 조류 골수아세포종 바이러스 (avian myeloblastosis virus: AMV) 역전사효소와 올리고(dT)₁₅ 프라이머를 이용하여 cDNA를 만들었다. 0.2 mM dNTP 혼합물, 10pmol 표적 유전자-특이적 프라이머 (표 1), 및 0.25 유닛 Taq DNA 폴리머라제를 GeneAmp PCR 시스템 2400에서 증폭시킨 후 생성된 PCR 생성물을 2% 아가로스 겔에서 100V, 40분간 전기영동하고 SYBR Safe로 염색시킨 후 Alpha Imager를 이용하여 염색된 DNA를 확인하였다.

표 1

[0038]

유전자		서열
p21	센스	5'-GCT GGG GAT GTC CGT CAG AA-3'
	안티센스	5'-GAG CGA GGC ACA AGG GTA CAA-3'
p53	센스	5'-GGA GGT TGT GAG GCG C-3'
	안티센스	5'-CAC GCA CCT CAA AGC TGT TC-3'
cMyc	센스	5'-GTT TGC TGT GGC CTC CAG CAG AAG-3'
	안티센스	5'-CTT CCC CTA CCC TCT CAA CGA CAG-3'
Cyclin D1	센스	5'-GAA CAA ACA GAT CAT CCG CAA-3'
	안티센스	5'-TGC TCC TGG CAG GCA CGG A-3'
β-actin	센스	5'-AGC ACA ATG AAG ATC AAG AT-3'
	안티센스	5'-TGT AAC GCA ACT AAG TCA TA-3'

[0039] 실험 결과, 사람 대장암 세포 HCT 116에서 thio-Cl-IB-MECA는 G₁기 억제를 유발시키는 CDK(사이클린 의존성 키나아제) 저해제 p21과 종양 억제 인자인 p53의 발현을 증가시킨 반면, 사이클린 D1, c-Myc의 발현을 억제하였다 (도 4).

[0040] 실시예 5: 시험관 내 웨스턴 블랏팅 분석을 통한 세포 주기 조절 관련 단백질 발현 및 신호전달체계 활성화 조절 작용 확인

[0041] 실시예 5는 thio-Cl-IB-MECA에 의한 사람 대장암 세포 HCT 116의 G₁기 정지가 확인됨에 따라 G₁기에 관여하는 세포 주기 조절 단백질의 발현 여부를 확인하고, 암세포 증식 억제 효과가 신호 전달 경로를 조절하여 나타나는 것인지 Wnt 관련 단백질의 발현을 확인하기 위한 것이다. HCT 116 세포를 10% FBS가 포함된 배지로 100mm 배양 접시 당 1×10^6 가 되도록 희석하여 37℃, 5% CO₂ 조건에서 24시간을 배양한 후 PBS로 2회 세척하였다. 10% FBS가 포함된 배지에 thio-Cl-IB-MECA를 40 μM로 희석한 후, 100 mm 배양 접시에 준비된 배지를 10 ml 첨가하여 일정 시간 배양하였다. 세포 배지 내에 부착되지 않은 세포와 부착된 세포를 모아 PBS로 2회 세척한 후 끓고 있는 세포 용해 완충액을 넣어 세포를 현탁시키고 이를 100 °C 중에 5분간 가열하였다. 이를 식힌 후 20℃에서 보관하였고 사용 직전에 37℃에서 녹여 단백질 정량 및 전기영동에 이용하였다. 단백질 정량은 BCA 법을 이용하였고 30~50mg의 단백질을 8~12% SDS-폴리아크릴아미드 겔을 이용하여 150V에서 110분 동안 전기영동하였다. 원하는 부위의 겔을 잘라 1시간 동안 PVDF(polyvinylidene fluoride) 막으로 이동시킨 후 PBST로 2회 세척하고

블로킹 완충액에 넣어 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 그 다음 PBST로 5분간 3회씩 세척한 후 다음의 1차 항체를 3% 탈지유/PBST로 1:1,000 ~1:2,000의 비율로 희석하여 막과 함께 밀봉하여 4℃에서 교반하면서 12시간 이상 배양하였다. 막을 PBST로 5분간 2-3회씩 세척한 후 HRP-결합된 2차 항체를 1:1,500~1:2,000으로 희석하여 막과 함께 상온에서 2-3시간 배양하였다. 이를 PBST로 5분간 3회 세척한 후 웨스턴 블랏팅 기질 (WESTSAVE UpTM)을 처리하여 생성된 발광(luminescence)을 LAS-3000을 이용하여 확인하였다.

[0042] 실험 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 사람 대장암 세포 HCT 116에서 G₁기에서 S기로의 진행을 조절하는 단백질인 사이클린 D1, 사이클린 A, 사이클린 E의 발현이 thio-C1-IB-MECA에 의해 억제되었고, 종양억제인자인 Rb, p-Rb의 발현 또한 억제되었다. 한편, 사람 대장암 세포 HCT 116에서 thio-C1-IB-MECA는 종양 억제 인자인 p53의 발현을 증가시켰고, 세포 증식 관련 신호전달체계인 Wnt 신호 전달 경로를 억제하는 작용을 나타내었다 (도 6).

[0043] 실시예 6-8은 동물 실험을 통하여 IB-MECA, C1-IB-MECA, 및 thio-C1-IB-MECA의 사람 대장암 세포 HCT 116에 대한 항암 효능을 비교하기 위한 것이다.

[0044] 실시예 6: 동물실험을 통한 IB-MECA의 항암활성 측정

[0045] HCT 116 세포를 준비하고, 준비된 세포 2 X 10⁶ cells/200 μ l (RPMI)를 6주령의 누드마우스 (Balb/c-nu/nu mouse) 암컷의 우측 옆구리 (right flank)에 피하로 투여하였다. 칼리퍼 (caliper)로 암 크기를 측정된 뒤, 암 크기가 약 100 mm³ 되었을 때, 암 크기가 거의 동일한 마우스 20마리를 분리하여 대조군 (Control)과 3군의 시료 처리군으로 나누었다. 3군의 시료처리군에는 IB-MECA를 각각 0.02, 0.2, 또는 2 mg/kg씩 21일간 경구 투여하였다. 대조군과 시료 처리군에서, 매 주 1회 체중과 3-4 일마다 암 크기를 측정하여 모니터링하였다. 종양의 부피는 수학적 2에 의해 측정하였다.

[0046] <수학적 2>

[0047] 종양의 부피 = $abc \times \pi/6$

[0048] 상기 식에서, a는 종양의 긴 쪽 직경을, b는 종양의 짧은 쪽 직경을, c는 종양의 높이를 의미한다.

[0049] 그 결과, 사람 대장암 세포 HCT 116을 이용한 암세포 이식 누드마우스 실험 동물 모델에서 IB-MECA 0.02 mg/kg을 투여하였을 때 20.7%, 0.2 mg/kg에서는 48.7%, 2 mg/kg에서는 58.6%의 농도 의존적인 종양 성장 억제 효능을 보여주었다 (도 7). 도 8은 종양 부피 및 종양 생성 저해 정도를 확인할 수 있는 종양 사진이다. 시험 기간 동안 IB-MECA 투여에 의한 부작용은 관찰되지 않았다.

[0050] 실시예 7: 동물실험을 통한 C1-IB-MECA의 항암활성 측정

[0051] 6주령의 누드마우스 암컷에 시료로서 IB-MECA 대신 C1-IB-MECA를 투여한 것을 제외하고는 실시예 6과 동일한 방법으로 동물 실험을 진행하여 항암 활성을 측정하였다.

[0052] 그 결과, 사람 대장암 세포 HCT 116을 이용한 암세포 이식 누드마우스 실험 동물 모델에서 C1-IB-MECA 0.02 mg/kg을 투여하였을 때 18.2%, 0.2 mg/kg에서는 43.8%, 2 mg/kg에서는 67.3%의 농도 의존적인 종양 성장 억제 효능을 보여주었다 (도 9). 도 10은 종양 부피 및 종양 생성 저해 정도를 확인할 수 있는 종양 사진이다. 시험 기간 동안 C1-IB-MECA 투여에 의한 부작용은 관찰되지 않았다.

[0053] 실시예 8: 동물실험을 통한 thio-C1-IB-MECA의 항암활성 측정

[0054] 6주령의 누드마우스 암컷에 시료로서 IB-MECA 대신 thio-C1-IB-MECA를 투여한 것을 제외하고는 실시예 6과 동일한 방법으로 동물 실험을 진행하여 항암 활성을 측정하였다.

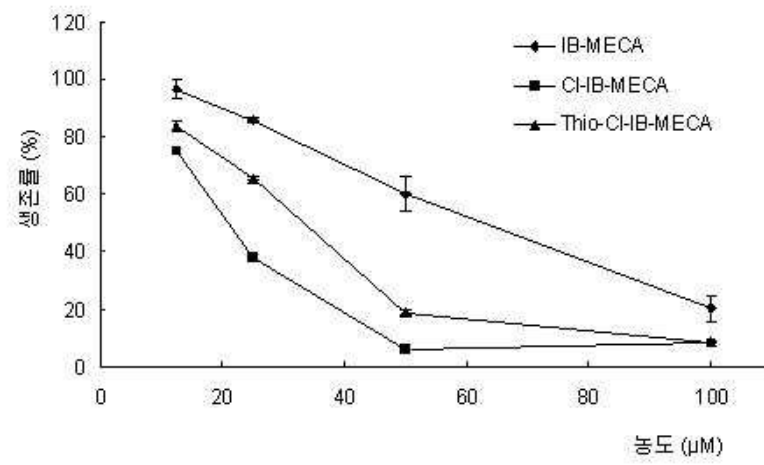
[0055] 그 결과, 사람 대장암 세포 HCT 116을 이용한 암세포 이식 누드마우스 실험 동물 모델에서 thio-C1-IB-MECA 0.02 mg/kg을 투여하였을 때 16.1%, 0.2 mg/kg에서는 54.4%, 2 mg/kg에서는 62.1%의 농도 의존적인 종양 성장 억제 효능을 보여주었다 (도 11). 도 12는 종양 부피 및 종양 생성 저해 정도를 확인할 수 있는 종양 사진이다. 시험 기간 동안 thio-C1-IB-MECA 투여에 의한 부작용은 관찰되지 않았다.

[0056] 실시예 6 내지 8의 결과를 종합하여 보면, IB-MECA, C1-IB-MECA 및 thio-C1-IB-MECA는 모두 농도 의존적으로 종양 성장 억제 효능을 나타내었고, thio-C1-IB-MECA의 경우 기존의 IB-MECA 또는 C1-IB-MECA와 비슷하거나 보다 우수한 항암활성을 나타내었다.

- [0057] 시험 기간 동안 IB-MECA, Cl-IB-MECA 및 thio-Cl-IB-MECA 투여에 의한 동물의 체중 변화(도 13)등 특별한 이상 없이 건강하게 생존하였다.
- [0058] 실시예 9: 동물 독성 실험
- [0059] thio-Cl-IB-MECA의 독성을 알아보기 위하여 ICR 흰쥐(n=10, 25g)에 1500 mg/kg/몸무게의 농도로 경구 투여하여 행동 변화 및 상태를 관찰해 보았다.
- [0060] 모든 시험 동물이 thio-Cl-IB-MECA 투여 7일 후까지 체중 변화 등 특별한 이상없이 건강하게 생존하였다. 따라서 thio-Cl-IB-MECA의 최대 내성용량 (Maximum Tolerance Dose: MTD)은 1500 mg/kg 이상 (MTD > 1500 mg/kg/mouse)으로 안전한 약물로 확인되었다.
- 도면의 간단한 설명**
- [0061] 도 1은 본 발명에 따른 유효성분인 thio-Cl-IB-MECA의 사람 대장암 세포 HCT 116에 대한 성장 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- [0062] 도 2는 본 발명에 따른 유효성분인 thio-Cl-IB-MECA의 사람 대장암 세포 HCT 116의 성장억제 효과를 나타낸 현미경 사진이다.
- [0063] 도 3은 본 발명에 따른 유효성분인 thio-Cl-IB-MECA의 사람 대장암 세포 HCT 116에 대한 세포 주기 진행 억제 작용을 나타낸 세포 주기 분석 실험결과이다.
- [0064] 도 4는 본 발명에 따른 유효성분인 thio-Cl-IB-MECA의 G1기 진행 억제 관련 인자들에 대한 유전자 발현 조절 작용을 사람 대장암 세포 HCT 116에서 본 RT-PCR 결과이다.
- [0065] 도 5는 본 발명에 따른 유효성분인 thio-Cl-IB-MECA의 G1기 진행 억제 관련 인자들에 대한 단백질 발현 조절 작용을 사람 대장암 세포 HCT 116에서 본 웨스턴 블롯팅 결과이다.
- [0066] 도 6은 본 발명에 따른 유효성분인 thio-Cl-IB-MECA의 세포 증식 관련 신호전달체계의 활성화 억제 작용을 사람 대장암 세포 HCT 116에서 본 웨스턴 블롯팅 결과이다.
- [0067] 도 7 및 8은 IB-MECA의 대장암 세포 HCT 116 종양 이식 동물 모델에서의 종양 파괴 및 종양 생성 저해 활성 그래프 (도 7) 및 종양사진 (도 8)이다.
- [0068] 도 9 및 10은 Cl-IB-MECA의 대장암 세포 HCT 116 종양 이식 동물 모델에서의 종양 파괴 및 종양 생성 저해 활성 그래프 (도 9) 및 종양사진 (도 10)이다.
- [0069] 도 11 및 12는 thio-Cl-IB-MECA의 대장암 세포 HCT 116 종양 이식 동물 모델에서의 종양 파괴 및 종양 생성 저해 활성 그래프 (도 11) 및 종양사진 (도 12)이다.
- [0070] 도 13은 IB-MECA, Cl-IB-MECA 및 thio-Cl-IB-MECA의 대장암 세포 HCT 116 종양 이식 동물 모델에서의 각 약물 투여에 대한 몸무게 변화를 보여주는 결과이다.

도면

도면1



도면2

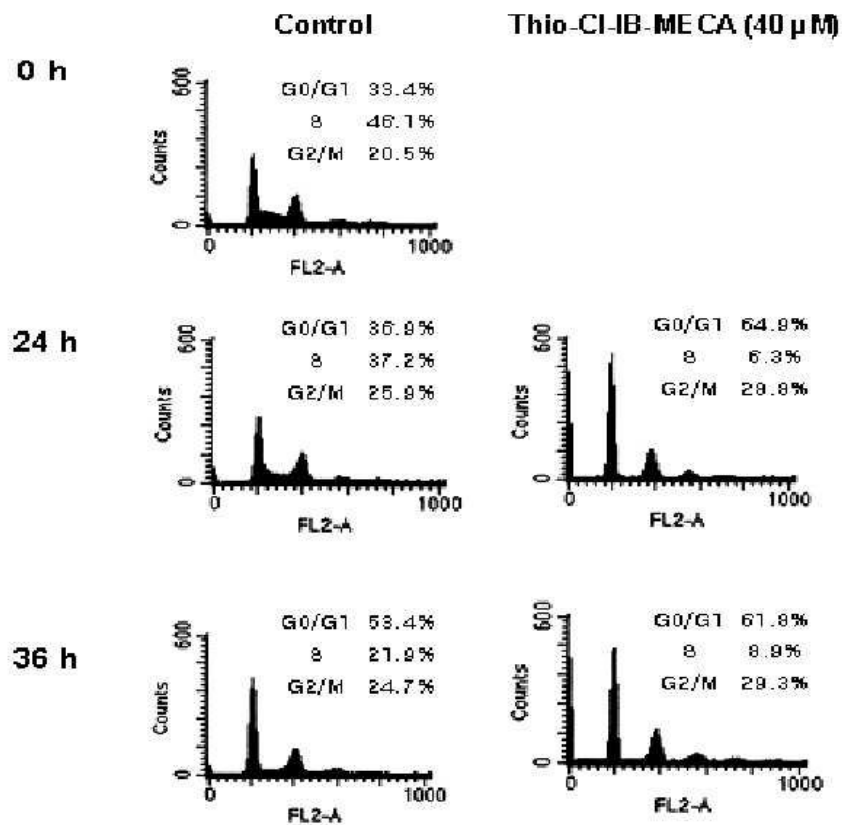


Control

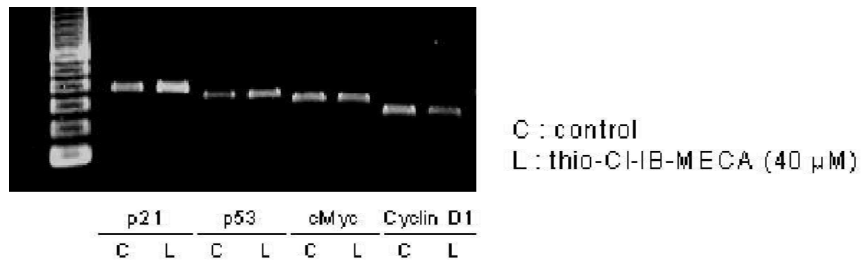


Thio-Cl-IB-MECA (40 μM)

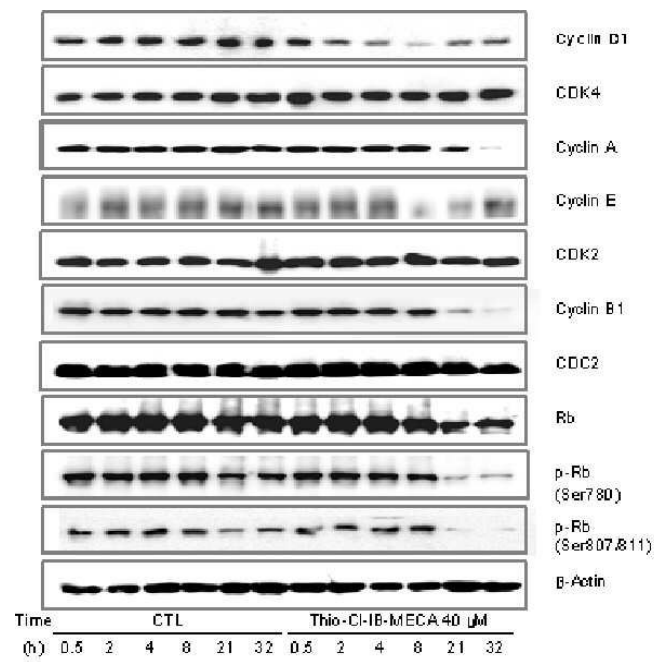
도면3



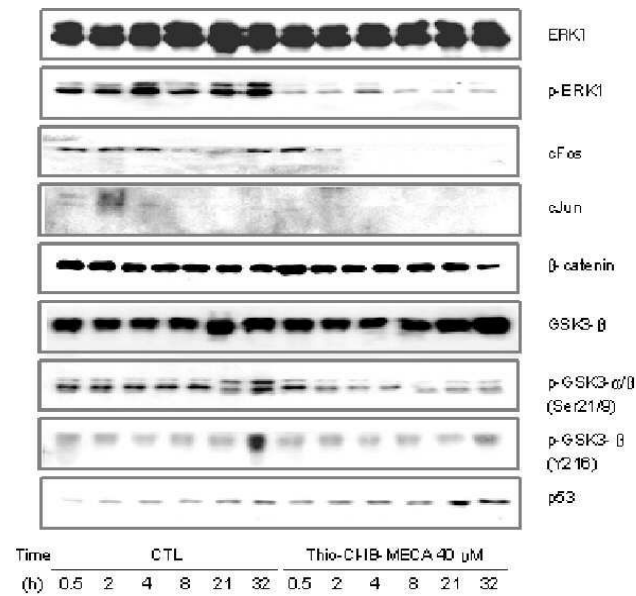
도면4



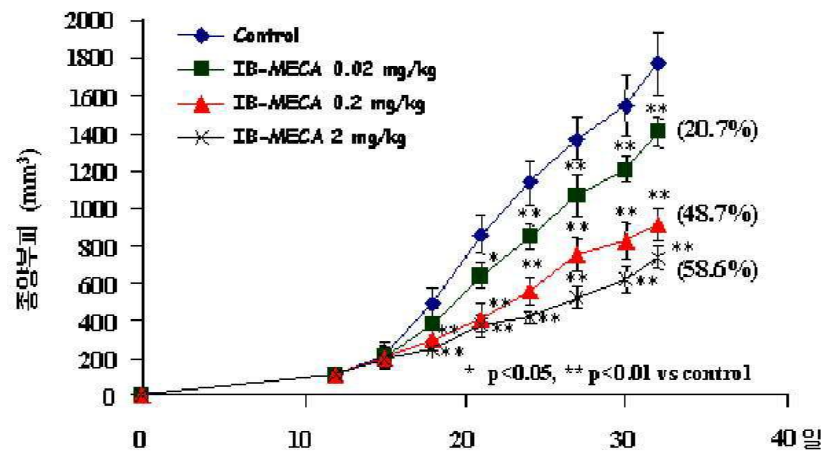
도면5



도면6



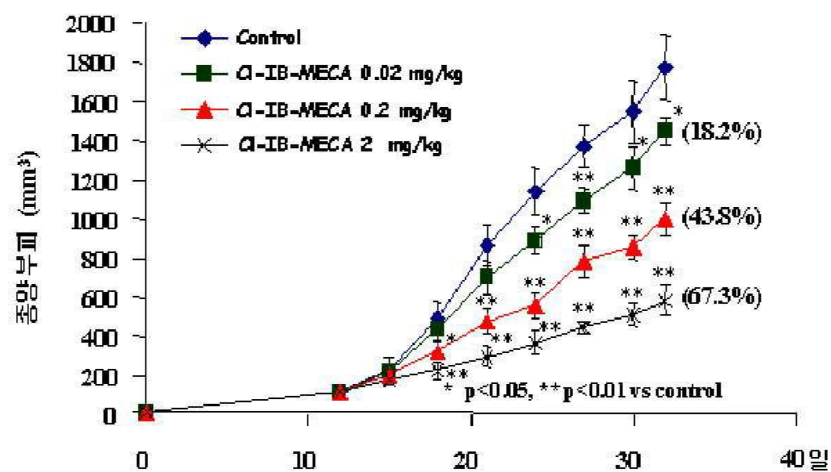
도면7



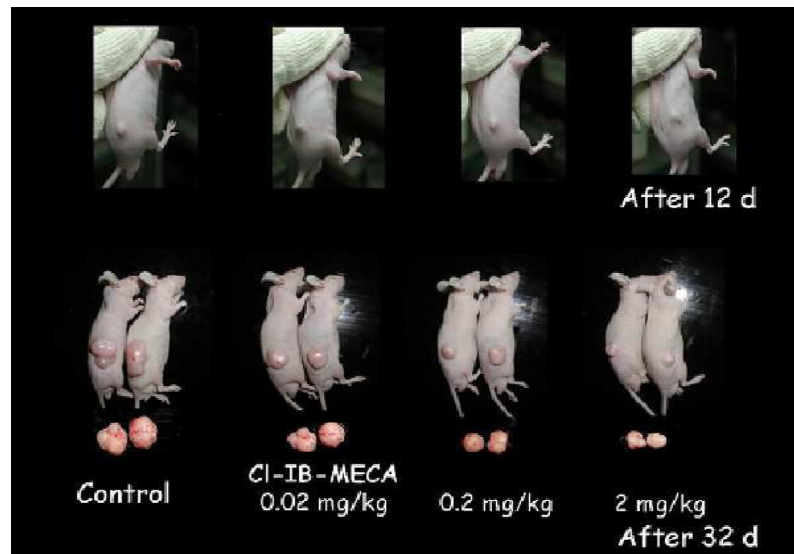
도면8



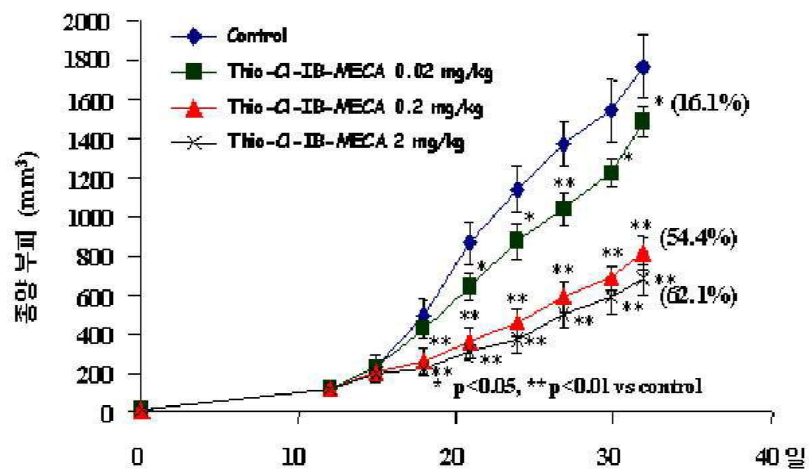
도면9



도면10



도면11



도면12



도면13

