



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0086920
(43) 공개일자 2019년07월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 215/34 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 31/47 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 215/34 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0005046
(22) 출원일자 2018년01월15일
심사청구일자 2018년01월15일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
최강열
서울특별시 종로구 경희궁길 57, 105동 309호(사직동, 광화문풍림스페이스본)
신옥진
서울특별시 서대문구 연희로26다길 51, 403호(연희동)
(74) 대리인
특허법인충현

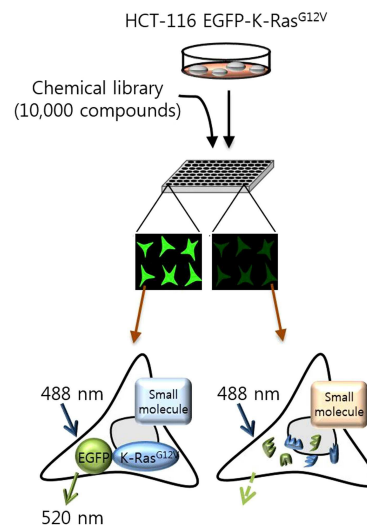
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 Ras 분해 활성을 갖는 퀴놀린 유도체를 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 Ras 분해 활성을 갖는 퀴놀린 유도체 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료하기 위한 약학 조성물에 관한 것으로, 이는 Ras 단백질의 유비퀴틴화를 유도하여, Ras, Ras 돌연변이를 분해함으로써, 일반 암세포부터 내성 암세포까지 성장 및 증식을 억제하기 때문에, 매우 우수한 항암 효과를 나타내는 바, 광범위한 암질환을 대상으로 예방, 개선 또는 치료하는 효능을 갖는다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/47 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017-11-0301

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원

연구과제명 한계극복용 Ras 단백질 안정성 제어 항암제 개발

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교

연구기간 2017.05.01 ~ 2018.04.30

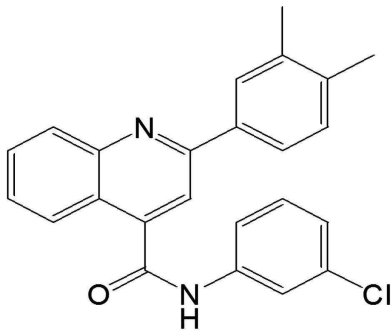
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염:

[화학식 1]



청구항 2

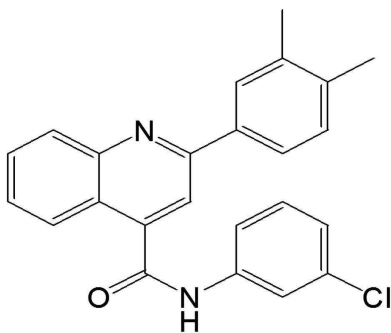
제1항에 있어서,

상기 화합물은 Ras 단백질 분해활성을 가지고 있는 것을 특징으로 하는 염.

청구항 3

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 4

제3항에 있어서,

상기 암은 Ras 단백질, 돌연변이 Ras 단백질에 의해 유도된 암 혹은 종래 항암제에 내성을 갖고 있는 암인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 암은 기저세포 암종, 수모세포종, 횡문근육종, 연골육종, 흑색종, 소세포폐암, 비-소세포 폐암, B-세포림프종, 다발골수종, 뇌암, 식도암, 유방암, 난소암, 위암, 결장직장암, 간암, 신장암, 두경부암, 중피종, 연조직육종, 골육종, 고환암, 전립선암, 췌장암, 골암, 골전이, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 신경아교종, 호지킨스병,

피부 흑색종, 방광암, 내분비계암, 부갑상선암, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 피부암, 신세포암종, 뇌하수체선종, 척추 축 종양, 자궁암, 위암 및 도담암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 화합물은 Ras 단백질에 대한 분해활성을 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

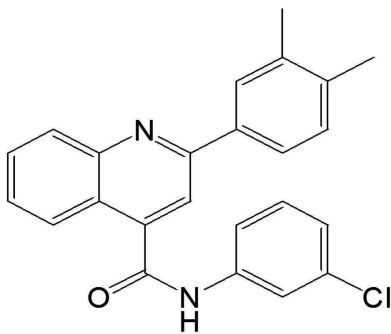
제3항에 있어서,

상기 화합물은 유비퀴틴화를 통한 Ras 단백질 분해과정에 관여하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[화학식 1]



청구항 9

- 후보물질을 GFP, K-Ras 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계;
- 세포의 형광세기를 측정하는 단계; 및
- 세포의 형광세기가 400 내지 1000 a.u인 후보물질을 선택하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 Ras 분해 활성을 갖는 퀴놀린 유도체 화합물 및 이를 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료하기 위한 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암은 인류가 해결해야 할 수많은 난치병들 중 하나로, 질병 사망원인 1위의 질병으로, 약 10만명 이상이 매년 진단되고, 6만명 이상이 사망하고 있는 것으로 알려져있다. 암의 치료제를 개발하기 위하여 전세계적으로 막대한 비용이 투자되고 있다.

[0003] 지금까지 암 발생의 원인은 다양한 환경적 요인과 유전적 요인이 복합적으로 작용하여 발생한다고 알려져 왔다. 악성 종양 발생의 유전적인 원인은 여러가지로 구분될 수 있으나, 현재까지 알려진 암유전자 중에 Ras 유전자는 인체의 악성 종양에서 가장 널리 연구되는 유전자 중에 하나이다.

[0004] Ras 암 유전자는 K-ras, N-ras, H-ras 세개로 구성되어 있고, 종양의 악성 성장에 중요한 요인으로, 인간 종양의 30%에서 Ras 유전자의 돌연변이가 관찰되었다.

[0005] K-Ras의 경우 췌장암, 결장암, 폐암에서 주로 발생하며, K-Ras의 암 관련 돌연변이는 글리신-12(Gly12), 글리신-13(Gly13) 및 글루타민-61(Gln61)에서 발견되는 것으로 알려져 있다. 특히 상기 K-Ras 돌연변이 중에서 Gly12 돌연변이 형이 가장 널리 알려져 있다. 이와 같은 변이는 서로 각각 다른 특성을 가지고 있는데, 구체적으로 G12C의 발현은 종종 시스플라틴에 대한 반응 감소와 관계되고 탁솔 및 페메트렉시드에 대한 증가된 민감성과 관련이 있는 반면, G12D 돌연변이 발현은 탁솔 치료에 저항을 나타내고 소라페닙에 민감하게 된다. G12V 돌연변이는 와이드 타입 변이종과 비교하여 시스플라틴에 대해 강한 민감성을 나타내며 페메트렉시드에 약간 내성을 갖게된다.

[0006] 또한 상기 변이에 의해서 공통적으로 Ras 유전자의 GTPase의 활성이 상실되는 것을 확인하였다. 따라서 이러한 변이의 다양성에 의한 특성들로 인하여 Ras에 특화된 약물로 적절한 치료법을 찾는 데 어려움을 야기하며, Ras의 특정 돌연변이 형태는 K-Ras 활성이 저해용으로 특이적 약물이 요구됨을 강조할 뿐, 다른 돌연변이 형태에 대해서는 치료효과를 나타내지 못한다는 문제가 존재하였다.

[0007] 이러한 사실을 바탕으로 암을 치료하기 위한 타겟으로 Ras 유전자에 대한 약을 발견하기 위하여 많은 연구가 진행되었음에도 불구하고, 이를 개발하는데는 상당한 난제들이 여전히 남아있다.

[0008] 따라서, 암으로 진단된 대상체에서, 더 양호한 효능 및 효력, 신속한 작용 개시, 더 양호한 지속력, 및 더 적은 부작용을 가지는, Ras 유전자 발현 또는 Ras 활성을 선택적으로 억제하거나 저해시키는 신규 조성물 및 방법을 개발할 필요성이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 공개특허공보 제10-2015-0080249호

발명의 내용

해결하려는 과제

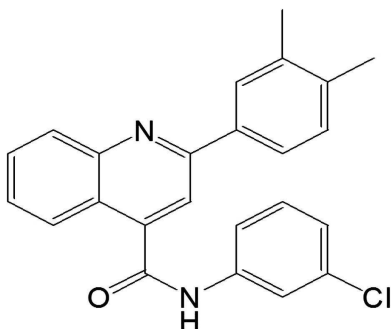
[0010] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 우수한 Ras 저해 활성을 가지고 생체 내 독성이 거의 없는 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공하고자 하는 것이다.

[0011] 또한 본 발명의 다른 목적은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 우수한 암의 예방 또는 치료 효과를 가지면서 생체 내 독성이 거의 없는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 식품 조성물 및 암의 예방, 개선 또는 치료방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 상기 목적을 이루기 위하여, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[0013] [화학식 1]

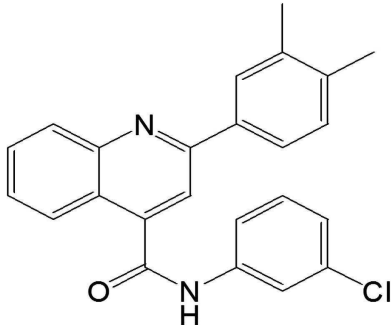


[0014]

[0015] 상기 화합물은 Ras 단백질 분해활성을 가지고 있는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명은 상기 다른 목적을 이루기 위하여, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] [화학식 1]



[0018]

[0019] 상기 암은 Ras 단백질, 돌연변이 Ras 단백질에 의해 유도된 암 혹은 종래 항암제에 내성을 갖고 있는 암인 것일 수 있고, 구체적으로 상기 암은 기존의 Wnt/beta-catenin 억제제, EGFR 항암제에 대해 내성을 갖거나, K-Ras 돌연변이, H-Ras 돌연변이 및 N-Ras 돌연변이 중 어느 하나 이상에 의해 유도된 것일 수 있다.

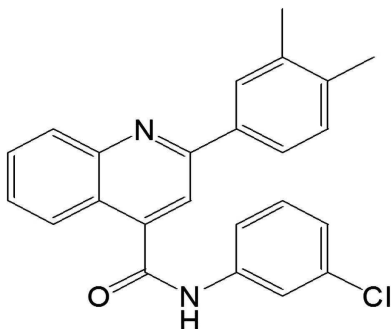
[0020] 상기 암은 기저세포 암종, 수모세포종, 횡문근육종, 연골육종, 흑색종, 소세포폐암, 비-소세포 폐암, B-세포림프종, 다발골수종, 뇌암, 식도암, 유방암, 난소암, 위암, 결장직장암, 간암, 신장암, 두경부암, 중피종, 연조직육종, 골육종, 고환암, 전립선암, 췌장암, 골암, 골전이, 급성 백혈병, 만성 백혈병, 신경아교종, 호지킨스병, 피부 흑색종, 방광암, 내분비계암, 부갑상선암, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 피부암, 신세포암종, 뇌하수체선종, 척추 축 종양, 자궁암, 위암 및 도담암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0021] 상기 화합물은 Ras 단백질에 대한 분해활성을 갖는 것일 수 있다.

[0022] 상기 화합물은 유비퀴틴화를 통한 Ras 단백질 분해과정에 관여하는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명은 상기 또 다른 목적을 이루기 위하여, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0024] [화학식 1]



[0025]

[0026] 본 발명은 상기 또 다른 목적을 이루기 위하여,

[0027] a) 후보물질을 GFP, K-Ras 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계;

[0028] b) 세포의 형광세기를 측정하는 단계; 및

[0029] c) 세포의 형광세기가 400 내지 1000 a.u인 후보물질을 선택하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0030] 본 발명에 따른 Ras 분해 활성을 갖는 신규의 퀴놀린 화합물은 Ras 단백질의 유비퀴틴화를 유도하여, Ras, Ras 돌연변이를 분해함으로써, 일반 암세포부터 내성 암세포까지 성장 및 증식을 억제하기 때문에, 매우 우수한 항

암 효과를 나타내는 바, 광범위한 암질환을 대상으로 예방, 개선 또는 치료하는 효능을 갖는다.

[0031] 게다가 본 발명의 신규 화합물은 다양한 연령층에 대한 폭 넓은 처방이 가능하다는 장점을 가지고 있고, 경구 투여로 인한 예방 또는 치료 효과가 우수하며, 가격 경쟁력이 종래 항암제와는 달리 우수하다.

[0032] 게다가 본 발명의 약학조성물은 종래 치료제와 달리 인체에 대한 독성이 거의 없다고 밝혀진 안전한 화합물이며, 부작용도 확인된 바 없는 물질로, 일반 암뿐만 아니라 내성암 및 돌연변이 암에 대해서도 우수한 치료 효능을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포주를 이용한 본 발명의 HCS 에 대한 원리를 나타낸 개념도이다.

도 2는 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포와 HCT116 모세포를 HCS 형광 이미지로 촬영한 것이다.

도 3은 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포와 HCT116 모세포에 대한 FACS 분석 결과이다.

도 4는 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포에서의 단백질 발현을 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯한 결과이다.

도 5는 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포와 HCT116 모세포의 GFP 신호세기(a.u.)를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 6은 HCS 시스템을 통한 K-Ras 분해활성을 갖는 화합물을 선별하기 위한 스크리닝 과정을 개략적으로 도시한 도면이다.

도 7은 HCS 시스템에 10,000 종류의 화합물을 적용하였을 때, 각 세포에서의 GFP 형광세기를 나타낸 그래프이다.

도 8은 HCS 시스템에 16 종류의 화합물을 적용하였을 때, 각 세포에서의 HCS 형광 이미지이다.

도 9는 HCS 시스템에 16 종류의 화합물을 적용하였을 때 각각의 세포에서, 총 세포 중에서 GFP에 의해 녹색형광을 나타내는 세포의 비율을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 10의 상측 이미지는 실험예 1-2)를 통해 선별된 4개의 화합물(KY2776, KY0971, KY7749, KY1311)을 재조합 대장암세포주인 HCT-116 EGFP-K-Ras^{G12V}에 적용하였을 때, 각 세포별 형광 이미지이고, 도 10의 하측 이미지는 실험예 1-2)를 통해 선별된 4개의 화합물(KY2776, KY0971, KY7749, KY1311)를 각각 쥐 신경줄기세포(rNCS)에 적용하였을 때, 각 세포에서의 세포 증식률과 세포 형태 변화를 측정한 결과이다.

도 11은 실험예 1-2)를 통해 선별된 4개의 화합물(KY2776, KY0971, KY7749, KY1311)을 각각 처리한 HCT-116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포의 FACS 분석 결과로, 각 FACS 결과에서 GFP 형광세기를 띠는 세포의 수(%)를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 12는 도 11의 대조군으로 HCT-116 EGFP 세포에 실험예 1-2)를 통해 선별된 4개의 화합물(KY2776, KY0971, KY7749, KY1311)을 각각 적용한 후, 이들을 FACS 분석한 결과로, 각 FACS 결과에서 GFP 형광세기를 띠는 세포의 수(%)를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 13은 재조합 대장암세포주인 HCT-116 EGFP-K-Ras^{G12V}에 4개의 화합물(KY2776, KY0971, KY7749, KY1311)을 처리하였을 때, 각각의 세포에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 14는 대장암세포주인 HCT-116에 실험예 1-2)를 통해 선별된 4개의 화합물(KY2776, KY0971, KY7749, KY1311) 각각을 0.04, 0.2, 1, 5, 25 μ M의 농도로 처리한 후, 50% 세포 성장 억제 활성 농도(GI₅₀)를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 15는 실험예 1, 2를 통해 최종 선별된 KY7749 화합물의 화학구조를 나타낸 도면이다.

도 16은 대장암세포주인 HCT-116에 KY7749를 처리한 후 0, 3, 6, 9, 12, 24 시간에 따른 웨스턴 블롯 결과이다.

도 17은 KY7749의 특성을 확인한 결과로, cycloheximide(CHX) 처리한 HCT116 세포에, DMSO와 KY7749를 각각 처리하고, 시간(0, 3, 6, 9, 12 h)에 따른 웨스턴 블롯 결과이다.

도 18은 KY7749 화합물의 유비퀴틴화에 따른 Ras 단백질 발현양상을 분석하기 위한 웨스턴블롯 결과이다.

도 19는 HCT116 세포에 KY7749 화합물과 Flag-Ub를 처리하고, RAS 단백질에 대하여 면역침강법 (immunoprecipitation:IP)을 수행한 후, WCL(whole cell lysate)을 사용하여, pan-RAS, β -catenin, α -tubulin에 대한 항체로 면역블롯(IB)을 진행한 결과이다.

도 20은 대장암세포주인 HCT-116 세포에 다양한 농도의 KY7749(1, 5, 10, 25 μ M)을 처리한 후 24 시간에 따른 웨스턴 블롯 결과이다.

도 21은 KY7749에 대한 루시퍼라제 활성도 측정결과를 나타낸 그래프이다.

도 22는 야생형 HEK293 세포에 KY7749를 처리하였을 때, Ras 단백질 분해활성을 myc 항체로 확인한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 23은 HCT116, SW48, LoVo, D-WT, D-MT 세포를 KY7749로 24시간 처리하여 배양한 후, 각 세포에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 24는 HCT116(a), SW48(b), LoVo(c) 세포를 KY7749(5 μ M, 25 μ M)로 24 시간 처리하여 배양하여, 이로부터 K-Ras, H-Ras, N-Ras mRNA 발현양을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 25는 KY7749 또는 KYA1797K에 대한 세포성장 확인(MTT assay)의 실험결과를 나타내는 그래프이다. 구체적으로 HCT116 세포에서 KY7749 또는 KYA1797K의 처리시간(0, 24, 48, 72 시간)에 따른 세포성장정도를 MTT 시험법으로 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 26은 대장암세포주인 HCT-116에 KY7749와 KYA1797K를 각각 처리하였을 때의 웨스턴 블롯 결과이다.

도 27은 GSK3 β +/+ MEF 세포와 GSK3 β -/- MEF 세포에 KY7749와 KYA1797K를 각각 처리하였을 때의 웨스턴 블롯 결과이다.

도 28은 야생형 HEK293 세포와 돌연변이 T144/148A K-Ras를 발현하는 HEK293 세포에 KY7749와 KYA1797K를 처리하였을 때, 각 세포에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

도 29는 야생형(WT) K-Ras와 돌연변이(MT) K-Ras 단백질, 돌연변이(MT) β -카테닌과 야생형(WT) β -카테닌을 발현하는 각 세포에 KY7749를 0, 0.04, 0.2, 1, 5, 25 μ M 처리하였을 때, 50% 세포 성장 억제 활성 농도(GI₅₀)를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 30은 HCT116, SW48, DLD-1, SW480 세포에 KY7749를 0, 0.04, 0.2, 1, 5, 25 μ M 처리하였을 때의 웨스턴 블롯 결과이다.

도 31은 Cetuximab에 내성을 갖고있는 K-Ras 돌연변이 CRC 세포(HCT116, SW48, DLD-1, SW480 세포)에 KY7749, cetuximab, 이의 혼합물을 각각 처리하였을 때, 각 세포의 배양액 흡광도(A₅₉₀)로 세포 성장정도를 나타낸 그래프이다.

도 32는 D-WT, D-MT 세포에 KY7749(25 μ M)과 cetuximab(2.5 μ g/ μ l)로 15 일 처리하고, 배양하여, 이를 크리스탈 바이올렛으로 염색한 뒤 촬영한 사진이다.

도 33은 HCT116, SW480 세포에 KY7749(25 μ M)과 cetuximab(2.5 μ g/ μ l)로 15 일 처리하고, 배양하여, 이를 크리스탈 바이올렛으로 염색한 뒤 촬영한 사진이다.

도 34는 도 32, 33의 결과로부터 염색된 세포의 수를 세어 나타낸 그래프이다.

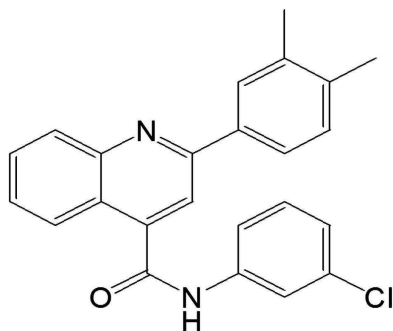
도 35는 LoVo 세포에서 KY7749(25 μ M)과 cetuximab(2.5 μ g/ μ l) 처리에 따른 상처 치유 효과를 나타낸 사진(상)과 세포의 이동율을 정량화한 그래프(하)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이하에서, 본 발명의 여러 측면 및 다양한 구현예에 대해 더욱 구체적으로 살펴보도록 한다.

[0035] 본 발명의 일 측면은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염에 관한 것이다.

[0036] [화학식 1]



[0037]

[0038] 본 발명에서 "약학적으로 허용되는"이라는 용어는 과도한 독성, 자극, 알러지 반응 또는 기타 문제점 또는 합병증없이 이득/위험비가 합리적이어서 대상체의 조직과 접촉하여 사용하기에 적합하며 건전한 의학적 판단의 범위 이내인 화합물 또는 조성물을 의미한다.

[0039] 본 발명에서 사용되는 "염"이라는 용어는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 예를 들어, 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻을 수 있다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 테카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부탄-1-2-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트 락테이트, β -하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0040] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화학식 1로 표시되는 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기용매(메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴)를 사용하여 침전시켜 제조할 수 있다. 또한, 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0041] 또한 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수도 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 예를 들면, 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음영(질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0042] 본 발명에 따르면 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 Ras 단백질 분해활성을 가지고 있는 것으로, Wnt/ β -catenin 신호전달계의 음성조절인자인 GSK3 β 의 존재유무와 관계없이 Ras 단백질을 분해하는 것을 특징으로 한다.

[0043] 이에 Wnt/ β -catenin 신호전달계 억제제와 같은 항암제에 대하여 내성을 갖는 경우에도, Ras 단백질의 유비쿼틴화를 활성화하여 Ras 단백질을 분해하여 인비트로 및 인비보 상에서 암세포의 성장을 저해하므로, 암 세포, Ras 돌연변이형을 보유하고 있는 암세포, 종래의 항암제에 치료효능을 보이지 않는 암세포에 대하여 성장 및 증식을 억제하는 항암효과를 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0044] 종래의 항암제들은 Ras 단백질의 활성을 조절하거나 그 상위에서 Ras 신호전달계를 억제하는 화합물들이 개발되어 왔으나, 돌연변이 Ras를 가진 환자들에서는 내성을 나타내는 문제가 있었다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 β -catenin 파괴 콤플렉스 형성을 촉진하고 GSK3 β 활성을 유도하여 β -catenin의 S33/S37/T41와 K-Ras T144/148 부위의 인산화를 유도함으로써, 인산화된 β -catenin과 K-Ras는 β -TrCP E3 linker가 관련된 폴리우

비퀴틴화 의존적인 프로테아좀 분해 과정을 통해 분해될 수 있도록 하는 저분자 화합물이 개발된 바 있으나, 본 발명은 Ras 단백질의 유비퀴틴화를 유도함으로써 Ras 단백질의 직접적인 분해를 유도하고 있으므로, Axin 혹은 GSK3 β 활성이 저해되거나, Wnt/ β -catenin과 Ras 신호전달계가 발현에 이상이 없는 암을 비롯한 다양한 특성의 암을 치료할 수 있는 광범위 항암제로 활용이 가능하다.

- [0045] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 Ras 단백질의 활성이 아닌 Ras 단백질을 분해하여 그 양을 감소시킨다는 특징을 가지고 있다.
- [0046] 암의 발생은 Wnt/ β -catenin 신호전달계와, Ras/MAPK와 관련된 유전자의 유전적 변이가 함께 유발되어 발생한다. 실제로 많은 항암제가 Ras/MAPK 신호전달계를 구성하는 주요 단백질들을 억제하는 물질로 선별되어 왔다. 그러나 개발된 많은 항암제들은 Wnt/ β -catenin 신호전달계에 의하여 특정 Ras의 분해를 촉진하거나, Ras-MAPK 신호전달계의 업스트림인 EGFR을 억제하는 물질이거나, 중간단계의 인산화 단백질인 MEK를 억제하는 물질로 개발되었을 뿐이므로, Ras 돌연변이가 있는 암에 대해서는 약효가 발휘되지 않는다는 단점이 있다.
- [0047] 이에 본 발명자들은 Ras 단백질 뿐만 아니라, Ras의 돌연변이(K-Ras, H-Ras, N-Ras)를 분해할 수 있는 다중표적 항암효과를 갖는 화합물을 발굴하고, 이들 화합물은 세툽시맙(cetuximab)과 같은 EGFR 항체 항암제에 저항성을 갖는 암환자의 암 치료에 효과를 나타내는 것을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0048] 본 발명에서 "Ras"는 구조적으로 유사성을 가지는 20-25 kDa guanine nucleotide-binding 단백질 그룹인 Ras superfamily에 속하는 것으로, 상기 superfamily 중에서 아미노산 순서와 생물학적인 기능에 따라 나뉜 Ras subfamily(H-Ras, K-RasA, K-RasB, N-Ras)의 4 종류 단백질을 의미한다.
- [0049] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0050] 본 발명에 따른 화합물은 Ras 단백질의 유비퀴틴화를 유도하여 Ras, Ras 돌연변이의 분해를 증가시킴으로써, 암 세포의 이상증식 및 성장을 억제하는 항암 효과를 나타냄을 확인하였다.
- [0051] 즉, 본 발명의 약학 조성물에 포함된 화학식 1로 표시되는 화합물은 Ras 단백질의 분해를 증가시키는 방향으로 활성을 나타내기 때문에, 암 세포의 증식과 성장을 억제할 수 있어, 결과적으로 우수한 항암효과를 나타낼 수 있다.
- [0052] 이때 본 발명의 조성물이 치료효과를 나타낼 수 있는 암으로는 Ras 단백질에 의해 유발되는 암일 수 있다. 상기 Ras 단백질은 야생형 Ras 뿐만 아니라 Ras 돌연변이의 단백질도 분해하는 특징이 있어, Ras 단백질의 돌연변이를 가진 암, 특히 EGFR을 타겟으로 하는 항암제, Axin이나 GSK3 β 를 타겟으로 하는 항암제들에 내성을 보이는 암에서 항암효과를 나타내는 것을 확인하였다.
- [0053] 본 발명에서 사용된 용어, "암(tumor)"이란 대개 조절되지 않은 세포 성장/증식의 특징을 갖는 포유동물의 생리학적인 상태를 나타내며, "종양"으로 대체되어 사용될 수 있다. 상기 암은 Ras 단백질에 의해 유발되는 암일 수 있고, 예로는 암종, 림프종 (예를 들어, 호지킨 및 비-호지킨 림프종), 모세포종, 육종 및 백혈병을 포함하고 이로 제한되지 않는다. 상기 암의 보다 특정한 예는 편평세포암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종, 폐의 편평세포 암종, 복막암, 간세포암, 위장관암, 췌장암, 신경아교종, 자궁경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간암, 유방암, 결장암, 직장결장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 타액선 암종, 신장암, 간암, 전립선암, 외음부암, 갑상선암, 간 암종, 백혈병 및 다른 림프증식성 질환, 및 다양한 종류의 두경부암을 포함한다. 본 명세서에서 암이란 바람직하게는 폐암, 췌장암, 대장암, 담도암, 담낭암, 혈액암일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 폐암, 혈액암일 수 있다. 상기 암은 전이성 암, 내성암, 돌연변이 Ras 단백질에 의해 유도된 암일 수 있다.
- [0054] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0055] 본 명세서에 사용된 아미노산의 일문자(삼문자)는 생화학 분야에서의 표준 약어 규정에 따라 다음의 아미노산을 의미한다:
- [0056] A(Ala): 알라닌; C(Cys): 시스테인; D(Asp):아스파르트산; E(Glu): 글루탐산; F(Phe): 페닐알라닌; G(Gly): 글라이신; H(His): 히스티딘; I(Ile): 이소류신; K(Lys): 라이신; L(Leu): 류신; M(Met): 메티오닌; N(Asn): 아스파라긴; O(Ply)피롤라이신; P(Pro): 프롤린; Q(Gln): 글루타민; R(Arg): 아르기닌; S(Ser): 세린; T(Thr):

트레오닌; U(Sec): 셀레노시스테인, V(Val): 발린; W(Trp): 트립토판; Y(Tyr): 티로신.

- [0057] 본 발명에서 사용된 용어, "암의 예방 또는 치료"는 본 발명에 따른 조성물을 개체에 투여하여 달성되는 상기 암의 예방 및 완전한 또는 부분적인 치료를 포함한다. 이는 또한 암 증상의 감소, 개선, 그 증상의 고통 경감, 암 발생을 감소 또는 치료결과를 증가시키는 환자의 어떠한 다른 변화를 포함한다.
- [0058] 본 발명에서 "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 약학 조성물을 개체에 투여함으로써 상기 암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 기존의 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.
- [0059] 상기 암은 앞서 설명한 바와 같이 전이성 암, 내성암, 돌연변이 Ras 단백질에 의해 유도된 암일 수 있다.
- [0060] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물은 암 세포의 증식과 성장을 효율적으로 억제시키면서, Ras 단백질 혹은 돌연변이 Ras 단백질에 의해 유도된 암 및 T144, T148 번의 아미노산 서열이 치환된 Ras 단백질에 의해 유도된 암 등의 암세포에 대해서도 효능을 갖고 있기 때문에 다양한 연령의 다양한 암 환자에게 적용이 가능하며, 이와 동시에 이러한 효과들이 다른 EGFR 억제제, Wnt/ β -catenin 억제제를 기반으로 하는 항암제 보다도 유의적인 수치범위 이상의 우수한 효과를 가지고 있음을 확인하였다.
- [0061] 본 발명의 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 화학식 1의 화합물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있다.
- [0062] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 조성물이다. 본 발명의 약학조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 0.1 내지 50 중량부로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0063] 본 발명의 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 화학식 1의 화합물을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물리퀴드 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(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 약학조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 1일 0.0001 내지 2000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 1000 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 농도는 1 nM 내지 1 M, 또는 1 μ M 내지 1 mM, 또는 0.1 mM 내지 0.2 mM, 또는 0.05 μ M 내지 5 μ M의 범위로 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니나, 바람직하게 상기 화합물의 농도는 0.04 μ M 이상인 것이 좋고, 50% 이상의 암 세포 성장 억제 효과를 달성하기 위해서는 1 μ M 이상인 것이 바람직하다.
- [0065] 본 발명의 약학조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내

(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

- [0066] 본 발명의 또 다른 측면은 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0067] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0068] 본 발명의 식품 조성물은 암의 예방 또는 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 식품 또는 음료 중의 상기 화합물의 양은 일반적으로 본 발명의 식품 조성물은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.
- [0070] 본 발명의 식품 조성물은 음료로 제조되는 경우에는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 외에 액체성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.
- [0071] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0072] 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0073] 본 발명의 또 다른 측면은 a) 후보물질들 표지물질, ras 유전자가 도입된 세포에 접촉시키는 단계; b) 세포의 형광세기를 측정하는 단계; 및 c) 세포의 형광세기가 400 내지 1000 a.u인 후보물질을 선택하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0074] 상기 표지물질은 GFP(Green Fluorescent Protein), EGFP(Enhanced Green Fluorescent Protein), RFP(Red Fluorescent Protein), mRFP(Monomeric Red Fluorescent Protein), DsRed(Discosoma sp. red fluorescent protein), CFP(Cyan Fluorescent Protein), CGFP(Cyan Green Fluorescent Protein), YFP(Yellow Fluorescent Protein), AzG(Azami Green), HcR(HcRed, Heteractis crispa red fluorescent protein) 및 BFP(Blue Fluorescent Protein)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 GFP일 수 있다.
- [0075] 상기 ras 유전자는 K-ras, H-ras, N-ras 또는 변이된 K-ras, H-ras, N-ras 유전자일 수 있고, 바람직하게는 K-ras 또는 12 번의 G 아미노산 서열이 V로 치환된 G12V 돌연변이 K-Ras 단백질을 발현하는 ras 유전자일 수 있다.
- [0076] 즉 본 발명에 따른 새로운 Ras 단백질 분해활성의 신약을 개발하기 위하여 상술한 세포주를 이용함으로써, 하이컨텐츠 스크리닝(High Content Screening, HCS)을 통해, 살아있는 세포들로부터 고속으로 대량의 후보물질을 검증 및 스크리닝 할 수 있다.
- [0077] 본 발명에서, 상기 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 Ras 유전자로부터 발현된 Ras 단백질에 대하여 분해활성을 가지거나, Ras 단백질 분해를 위한 유비퀴틴화를 활성화하는 특성을 가지는 어떠한 것도 가능하나, 바람직하게는 생체에 적용이 가능한 것일 수 있다. 예를 들어 천연 화합물, 합성 화합물, DNA, RNA, 펩티드, 효소, 리간드, 세포 추출물 또는 포유동물의 분비물일 수 있고, 더욱 바람직하게는 TESK1 또는 인산화된 코릴린에 특이

적인 항체; 압타머; siRNA 또는 shRNA를 포함하는 RNAi 또는 miRNA 일 수 있다.

[0078] 본 발명에서 상기 세포는 암을 발병할 수 있는 세포이면 모두 이용가능하나, 바람직하게는 HCT116, SW48, SW480, D-MT, D-WT, DLD-1, 돌연변이 Ras 단백질을 발현하는 세포주일 수 있다.

[0079] 본 발명에서 상기 표지물질의 형광세기는 후보물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 형광세기가 증가하는 것을 특징으로 할 수 있고, Ras 단백질 분해에 의해 매개되는 GFP의 형광세기 증가는 후보물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 Ras 단백질 분해가 증가하였음을 나타내는 것이라 할 수 있다.

[0080] 다시 말해, 상기 세포 내에서 표지물질과 Ras 단백질이 결합되어 발현되어, 상기 표지물질의 특성이 나타나지 않다가, 후보물질에 의해 분해될 경우 표지물질과 Ras 단백질이 분해됨에 따라 분포가 변화하게 되고, 후보물질이 Ras 단백질 분해활성을 띄지 않는다면 원래의 분포가 변하지 않게된다. 따라서 이러한 개념에 의해 기본적으로 살아있는 세포 내에서 일어나는 단백질들 간의 직접결합 또는 복합체 결합을 영상분석을 통해 고속으로 탐색할 수 있게 하며, 이를 확장한 형광표지 유전자 라이브러리를 이용함으로써, 분석의 정확도, 실시간 결합 측정 및 고효율 스크리닝이 가능하게 된다.

[0081] 이하에서 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하며, 다만 이하에 실시예 등에 의해 본 발명의 범위와 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다. 또한, 이하의 실시예를 포함한 본 발명의 개시 내용에 기초한다면, 구체적으로 실험 결과가 제시되지 않은 본 발명을 통상의 기술자가 용이하게 실시할 수 있음은 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연하다.

[0082] 또한 이하에서 제시되는 실험 결과는 상기 실시예 및 비교예의 대표적인 실험 결과만을 기재한 것이며, 아래에서 명시적으로 제시하지 않은 본 발명의 여러 구현예의 각각의 효과는 해당 부분에서 구체적으로 기재하도록 한다.

[0083] 제조예 1. AK7749의 합성

[0084] KY7749 화합물은 ChemDiv(ChemDiv, San Diego, CA, USA)로부터 구입한 것을 사용하였다.

[0085] <실험방법>

[0086] 1. HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포주 제조

[0087] 1) 세포주 및 이의 배양

[0088] 본 발명에서는 HCT116 세포주를 사용하였으며, 본 발명에 사용된 세포주의 배양조건은 각 세포주의 분양기관인 ATCC(American Type Culture Collection)사의 세포주 배양방법을 이용하였다(당업자의 목적에 의해 세부적인 배양 조건은 달라질 수 있다.) 1% penicillin-streptomycin(Gibco, Grand Island, NY, USA)이 포함된 RPMI 1640(Gibco, Grand Island, NY, USA) 또는 DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium, Gibco) 배양액 속에서 각 세포주를 37℃로 고정된 5% CO₂가 유지되는 배양기에서 배양하였다.

[0089] 2) 세포주의 형질전환

[0090] HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포주를 형질전환을 통해 제작하였다.

[0091] pLVX-IRES-Hygro 렌티바이러스 벡터에 EGFP-K-Ras^{G12V} cDNA를 삽입한 후, HEK293T 세포에 넣어 형질 변환 하였다. 형질 변환 후 생성되는 렌티바이러스를 3 일간 24 시간 마다 모아둔다. 생성된 렌티바이러스를 HCT-116 세포에 6 시간 동안 처리한 후, 새로운 배지에 48 시간 동안 배양한다. 그 후에 50 µg/mL의 하이그로마이신(hygromycin, Sigma-Aldrich) 이 포함된 배지에서 30 일간 EGFP-K-Ras^{G12V}이 발현되는 세포를 선별하였다.

[0092] 2. 세포 배양

[0093] 1) HCT116, SW480, DLD-1, D-WT, D-MT, SW48, HEK293, HEK293T, MEF 세포 배양

[0094] HCT116, SW480, DLD-1, D-WT, D-MT, SW48, HEK293, HEK293T, MEF 세포는 10% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco, Grand Island, NY) 및 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin, P/S, Gibco)이 함유된 RPMI(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) 또는 DMEM(Dulbecco Modified Eagle Medium, Gibco) 배지에서 37°C, 5% CO₂조건 하에 배양하였다.

[0095] 3. 웨스턴 블롯 분석

[0096] HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포를 배양한 후, 배양액을 600 rpm으로 3분 동안 원심분리하고 상층액을 제거한 후, 차가운 PBS(130 mM NaCl, 13 mM Na₂HPO₄, 3.5 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)로 세포 펠렛(pellet)을 2번 세척하였다. 여기에 일정량의 용해 용액(lysis buffer)[50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40 및 0.25% 데옥시콜산 나트륨(sodium deoxycholate)]에 단백질 가수분해효소 억제제 콕테일(protease inhibitor cocktails, GenDepot)을 첨가하여 4°C에서 10 분간 동안 용해시켰다. 상기 용해된 샘플(sample)을 13000 rpm으로 20 분 동안 원심분리하고 상층액을 모아 4x샘플 용액(sample buffer)[200 mM Tris-Cl(pH 6.8), 8% SDS, 0.4% 브로모페놀 블루(bromophenol blue), 40% 글리세롤]을 넣고 10 내지 12% SDS-PAGE 전기영동을 수행하였다. 그리고 나서 Nitrocellulose Membranes ProtranTM 니트로셀룰로오스 막(Whatman)에 이동시킨 후, 5% 탈지 우유(skim milk)로 1시간 동안 전처리하였고, 전처리 후, PBS(130 mM NaCl, 13 mM Na₂HPO₄, 3.5 mM NaH₂PO₄, pH 7.4)로 2번 세척하였으며, pan-Ras(Millipore, MABS195; 1:3000), K-Ras(Santa Cruz Biotechnology, sc-30; 1:1000), H-Ras(Santa Cruz Biotechnology, sc-520; 1:1000), N-Ras(Santa Cruz Biotechnology, sc-31; 1:1000), β -catenin, T-ERK(Santa Cruz Biotechnology, sc-94; 1:3000), Myc(Santa Cruz Biotechnology, sc-40; 1:3000), p-ERK(cell signaling technology, #9101S; 1:1000), PCNA(Santa Cruz Biotechnology, sc-56; 1:2000), α -tubulin(Cell Signaling Technology, #3873S; 1:5000) 및 GFP(Applied Biological Materials INC., G096; 1:3000)의 1차 항체를 이용하여 4°C에서 15 시간 동안 반응시킨 후, 다음날 2차 항체를 반응시키고, ECL(Pierce, 미국)을 이용하여 엑스레이 필름에 현상하였다.

[0097] 실시예 1. HCS를 이용한 고속 분석.

[0098] 후보 물질에 대하여 K-Ras 분해활성을 대량, 고속으로 측정하기 위해, HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포주(실험방법 1 참조)를 이용한 HCS를 통한 스크리닝 방법을 고안하였다.

[0099] ChemDiv (ChemDiv, San Diego, CA, USA)로부터 구입한 10,000 화합물 라이브러리로부터 K-Ras 분해 활성이 있는지 확인하기 위하여, 상기 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포를 10% FBS-RPMI 배지에서 배양하였다. 상기 세포를 384-웰플레이트에 7 x 10³ 세포/웰의 밀도로 분주하고 하루 동안 더 배양한 후, 상기 라이브러리의 후보물질을 각각 10 μ M의 농도로 각 웰에 24시간동안 배양하였다. 각 세포를 고정시키고 GFP의 발현정도를 HCS 형광이미지(PerkinElmer, Operetta High-content Imaging System) 측정하여 비교함으로써, 각 후보물질의 K-Ras 분해활성 여부를 평가하였다.

[0100] 도 1은 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포주를 이용한 본 발명의 HCS에 대한 원리를 나타낸 개념도로, 구체적으로 먼저, HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포주를 배양하면, 녹색형광을 띠는 GFP가 표지된 K-Ras^{G12V} 유전자가 세포 내로 발현되어, 수동 또는 자동 현미경을 이용하여 영상을 분석하면, 세포가 520 nm에서 흡광도가 측정되는, 녹색형광을 띠고 있게 된다.

[0101] 즉, 다량의 후보물질 각각을 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포주에 처리하여 함께 배양한 후, 상기 후보물질이 K-Ras에 대하여 분해활성을 가지는지를 수동 또는 자동 현미경을 이용하여 영상 분석하게 되는데, 이때 녹색형광이 관찰되지 않을 경우에는 K-Ras를 분해하는 활성이 없는 것이고, 녹색형광이 세포 내에 그대로 유지되고 있으면, K-Ras에 대한 분해활성이 존재하고 있음을 평가할 수 있다.

[0102] 본 발명의 HCS 시스템이 제대로 작동하는지 여부를 확인하기 위하여 상술한 과정을 통해 제조된 HCT116 EGFP-K-

Ras^{G12V} 세포에서 녹색형광이 제대로 관찰되는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0103] 도 2는 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포와 HCT116 모세포를 HCS 형광 이미지로 촬영한 것이고, 이에 따르면 본 발명을 통해 제조된 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포에서 GFP에 의하여 녹색형광이 제대로 발현되고 있음을 확인하였다. 이에 반해 HCT116 모세포에서는 녹색형광이 관찰되지 않았다.

[0104] 도 3은 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포와 HCT116 모세포에 대한 FACS 분석 결과로, 이에 따르면 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포는 FITC 신호가 HCT116 모세포의 FICT 신호보다 약 150 배 증가한 것을 확인하였다.

[0105] 도 4는 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포에서의 단백질 발현을 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯한 결과로, 이에 따르면 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포에서는 HCT116 모세포에 비해, GFP의 발현이 크게 증가한 것을 확인하였다. 또한, 세포의 증식과 관련된 핵 단백질인 PCNA 및 p-ERK의 발현도 소폭 증가하고 있음을 확인하였다.

[0106] 도 5는 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포와 HCT116 모세포의 GFP 신호세기(a.u.)를 측정하여 나타낸 그래프로, 이에 따르면 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포에서와 HCT116 모세포(parental)에서의 GFP 신호세기 차이가 현저함을 확인하였다. 즉, HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포를 통한 K-Ras 분해활성을 분명하게 측정할 수 있음을 알 수 있다.

[0107] 실험예 1. HCS 시스템을 통한 K-Ras 분해활성을 갖는 화합물의 선별

[0108] 1) 1차 선정

[0109] ChemDiv(ChemDiv, San Diego, CA, USA)로부터 구입한 10,000 화합물 라이브러리로부터 K-Ras 분해 활성이 있는지 확인하기 위하여, 상기 실시예 1로부터 제조된 HCT116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포를 10% FBS-RPMI 배지에서 배양하였다. 상기 세포를 384-웰플레이트에 7 x 10³ 세포/웰의 밀도로 분주하고 24 시간 동안 더 배양한 후, 상기 라이브러리의 후보물질들 각각 10 μM의 농도로 각 웰에 24시간동안 처리하였다. 각 세포를 고정시키고 GFP의 발현정도를 HCS 형광이미지(PerkinElmer, Operetta High-content Imaging System)로 촬영하고, GFP 형광세기를 측정하여 정량적으로 비교하였다.

[0110] 도 7은 HCS 시스템에 10,000 종류의 화합물을 적용하였을 때, 각 세포에서의 GFP 형광세기를 나타낸 그래프이다. 그 결과, 분석 대상인 10,000 종류의 화합물 중에서, GFP의 형광세기가 800 a.u. 이상이고, GFP에 의한 녹색형광을 띠는 세포의 수가 전체에서 75% 이상 감소하면서, 전체 세포 중에서 생존 세포 수가 80% 이상인 화합물인 총 16 개의 화합물을 선별하였고, 선별된 16개의 화합물을 아래 표 1에 나타내었다.

표 1

[0111]

| 구분 | 화합식 | 분자식 |
|--------|--|--------------------|
| KY1808 | Benzoic acid, 3-nitro-, 2-[(2-hydroxy-5-nitrophenyl)methylene]hydrazide | C14 H10 N4 O6 |
| KY0133 | 2,4,6-(1H,3H,5H)-Pyrimidinetrione,5-[(3-bromo-5-methoxy-4-propoxyphenyl)methylene]- | C15 H15 Br N2 O5 |
| KY0008 | Thieno[2,3-d]pyrimidine-2-aceticacid,5,6-dimethyl-4-[(3,4,5-trimethoxyphenyl)amino]-,methylester | C20 H23 N3 O5 S |
| KY0023 | Ethanone, 1-(2-thienyl)-, 2-[4-(phenylamino)-6-(1-piperidinyl)-1,3,5-triazin-2-yl]hydrazone | C20 H23 N7 S |
| KY1136 | Aceticacid,2-[[1-[(4-chlorophenyl)methyl]-1H-benzimidazol-2-yl]thio]-,2-[1-[4-(acetyloxy)phenyl]ethylidene]hydrazide | C26 H21 Cl N4 O3 S |

| | | |
|--------|--|----------------------|
| KY1406 | Aceticacid,2-[[5-(4-chlorophenyl)-4-(4-methylphenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl]thio]-,2-[(3-methylphenyl)methylene]hydrazide | C25 H20 Cl N5 O S |
| KY0002 | Glycine, N-[4-chloro-6-[(4-iodo-2-methylphenyl)amino]-1,3,5-triazin-2-yl]-,methylester | C13 H13 Cl I N5 O2 |
| KY4521 | 4,6(1H,5H)-Pyrimidinedione,5-[(3,5-dibromo-2-propoxyphenyl)methylene]dihydro-2-thioxo- | C14 H12 Br2 N2 O3 S |
| KY2776 | Benzoic acid, 2-[[3-[(cyclohexylamino)sulfonyl]-4-methylbenzoyl]amino]- | C21 H22 N2 O5 S1 |
| KY0035 | 1H-Benzimidazole,2-[[2-[4-(1,1-dimethylethyl)phenoxy]ethyl]thio]-1-methyl- | C20 H24 N2 O S |
| KY0010 | Benzamide, N-[[5-[[2-[5-(2,3-dimethoxyphenyl)-4,5-dihydro-3-(2-thienyl)-1H-pyrazol-1-yl]-2-oxoethyl]thio]-4-(2-methoxyphenyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl]methyl]-3-methoxy- | C35 H34 N6 O6 S2 |
| KY0971 | Aceticacid,2-[[1-[(2-chlorophenyl)methyl]-1H-benzimidazol-2-yl]thio]-,2-[1-(3-bromophenyl)ethylidene]hydrazide | C24 H20 Br Cl N4 O S |
| KY0047 | L-Ornithine, N5-(aminocarbonyl)- | C6 H13 N3 O3 |
| KY7749 | 4-Quinolincarboxamide, N-(3-chlorophenyl)-2-(3,4-dimethylphenyl)- | C24 H19 Cl N2 O |
| KY1311 | Aceticacid,2-[[5-(4-methoxyphenyl)-4-phenyl-4H-1,2,4-triazol-3-yl]thio]-,2-([1,1'-biphenyl]-4-ylmethylene)hydrazide | C30 H23 N5 O2 S |
| KY0350 | 3-Benzofurancarboxylic acid, 4-bromo-5-[(2-chloro-4-nitrobenzoyl)oxy]-2-formyl-7-methyl-, ethyl ester | C20 H13 Br Cl N O8 |

[0112] 2) 2차 선정

[0113] 실험예 1-1)을 통해 선별된 16개의 화합물을 선별하였고, 이를 HCS 시스템을 통해 다시금 분석하였다.

[0114] 도 8은 HCS 시스템에 16 종류의 화합물을 적용하였을 때, 각 세포에서의 HCS 형광 이미지이고, 도 9는 HCS 시스템에 16 종류의 화합물을 적용하였을 때 각각의 세포에서, 총 세포 중에서 GFP에 의해 녹색형광을 나타내는 세포의 비율을 측정하여 나타낸 그래프이다.

[0115] 그 결과, GFP가 400 a.u. 이상이면서, 전체 세포 중에서 GFP에 의한 녹색형광을 띠는 세포의 수가 85% 이상 감소된 KY2776, KY0971, KY7749, KY1311 4 개의 화합물을 2차로 선정하였다.

[0116] 실험예 2. 최종 선정

[0117] 실험예 1-2)를 통해 4개의 화합물을 선별하였다. 이 중에서 생체 외 실험을 통해, 세포독성이 전혀 없고, Wnt/ β -catenin 신호전달계를 통하지 않으면서 K-Ras 분해활성이 우수한 화합물을 최종 선별하기 위하여 다음과 같은 실험들을 통해 평가하였다.

[0118] 1) K-Ras 분해활성 및 신경세포 보호효과 분석

[0119] 도 10의 상측 이미지는 실험예 1-2)를 통해 선별된 4개의 화합물(KY2776, KY0971, KY7749, KY1311)을 재조합 대장암세포주인 HCT-116 EGFP-K-Ras^{G12V}에 적용하였을 때, 각 세포별 형광 이미지이고, 도 10의 하측 이미지는 실험예 1-2)를 통해 선별된 4개의 화합물(KY2776, KY0971, KY7749, KY1311)을 각각 쥐 신경줄기세포(rNCS)에 적용하였을 때, 각 세포에서의 세포 증식률과 세포 형태 변화를 측정한 결과이다.

[0120] 도 11은 실험예 1-2)를 통해 선별된 4개의 화합물(KY2776, KY0971, KY7749, KY1311)을 각각 처리한 HCT-116 EGFP-K-Ras^{G12V} 세포의 FACS 분석한 결과로, 각 FACS 결과에서 GFP 형광을 띠는 세포의 수(%)를 측정하여 나타낸 그래프이고, 도 12는 이의 대조군으로 HCT-116-EGFP 세포에 실험예 1-2)를 통해 선별된 4개의 화합물(KY2776, KY0971, KY7749, KY1311)을 각각 적용한 후, 이들을 FACS 분석한 결과로, 각 FACS 결과에서 GFP 형광세기를 띠

는 세포의 수(%)를 측정하여 나타낸 그래프이다.

[0121] 도 10 내지 12에 나타난 바와 같이, 10 μ M의 화합물을 첨가하였을 때 GFP에 의한 녹색형광을 띠는 세포의 수가 가장 적고, 신경줄기세포(rNSC)의 sensitive한 특성을 이용하여 독성이 가장 적으면서도 분화를 잘 유도하는 화합물을 선별하였다.

[0122] 2) 웨스턴 블롯팅

[0123] 제조합 대장암세포주인 HCT-116 EGFP-K-Ras^{G12V}에 실험예 1-2)를 통해 선별된 4개의 화합물(KY2776, KY0971, KY7749, KY1311)을 10 μ M의 농도로 각각 처리한 뒤 24시간 뒤에 harvest하여 단백질 샘플을 얻었다. 단백질 sample을 12% polyacrylamide gel에 로딩하여 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 사용된 1차 항체의 농도는 다음과 같다: GFP(1:3000), pan-Ras(1:3000), p-ERK(1:1000), T-ERK(1:3000), β -catenin(1:3000), α -tubulin(1:5000).

[0124] 도 13은 제조합 대장암세포주인 HCT-116 EGFP-K-Ras^{G12V}에 4개의 화합물(KY2776, KY0971, KY7749, KY1311)을 처리하였을 때, 각각의 세포에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.

[0125] 도 13에 나타난 바와 같이 4개의 화합물들 모두 타겟인 pan-Ras 단백질과 EGFP-K-Ras^{G12V}이 감소하였으며, 하위 단백질인 p-ERK의 활성 또한 감소하는 것을 확인하였다. 상기 4개의 화합물 중에서 KY7749 화합물이 가장 효과가 있음을 확인하였다.

[0126] 2) 각 화합물의 GI₅₀ 분석

[0127] 도 14는 대장암세포주인 HCT-116에 실험예 1-2)를 통해 선별된 4개의 화합물(KY2776, KY0971, KY7749, KY1311) 각각을 0.04, 0.2, 1, 5, 25 μ M의 농도로 처리하였을 때, 50% 세포 성장 억제 활성 농도(GI₅₀)를 측정하여 나타낸 그래프이다.

[0128] 도 14에 나타난 바와 같이, 다음의 각 화합물 GI₅₀ 값을 확인하였다(KY2776 > 25 μ M, KY0971 = 7.5 μ M, KY7749 = 1.4 μ M, KY1311 = 11.2 μ M)

[0129] 실험예 3. 최종 선별된 KY7749의 Ras 분해활성 분석: KY7749에 의한 폴리우비퀴틴 매개 Ras 분해활성 분석

[0130] 도 15는 실험예 1, 2를 통해 최종 선별된 KY7749 화합물의 화학구조를 나타낸 도면이고, 도 16은 대장암세포주인 HCT-116에 KY7749를 처리한 후 0, 3, 6, 9, 12, 24 시간에 따른 웨스턴 블롯 결과이다.

[0131] 대장암세포주인 HCT-116에 KY7749를 25 μ M의 농도로 처리한 뒤 24시간 뒤에 harvest하여 단백질 샘플을 얻었다. 단백질 sample을 12% polyacrylamide gel에 로딩하였다. 사용된 1차 항체의 농도는 다음과 같다: pan-Ras(1:3000), β -catenin(1:3000), α -tubulin(1:5000).

[0132] 도 16에 나타난 바와 같이 웨스턴 블롯팅 결과, KY7749 화합물을 처리하고 6시간부터 pan-Ras 단백질이 점차 감소하기 시작하였으며, 24시간째에는 밴드가 희미하게 남아 있는 것으로 확인되었다. 반면 KY7749 화합물에 의하여 β -catenin의 감소는 관찰되지 않았는 바, KY7749 화합물의 Ras 분해활성은 wnt/ β -catenin 신호전달계에 의한 것이 아님을 알 수 있다.

[0133] 도 17은 KY7749의 특성을 확인한 결과로, cycloheximide(CHX) 처리한 HCT116 세포에, DMSO와 KY7749를 각각 처리하고, 시간(0, 3, 6, 9, 12 h)에 따른 웨스턴 블롯 결과이다. 이에 따르면 HCT116 세포에서 KY7749의 β -catenin과 Ras단백질 분해속도가 촉진되었음을 cycloheximide처리를 통해 확인할 수 있었다. 도 16에 비해 약 2배 정도 분해속도가 빨라졌음을 알 수 있다.

[0134] 도 18은 KY7749 화합물의 유비퀴틴화에 따른 Ras 단백질 발현양상을 분석하기 위한 웨스턴블롯 결과이다.

- [0135] 우선 HCT116 세포에 MG132 처리 후 면역침강법을 통하여 Ras의 유비퀴틴화(ubiquitination)을 확인하고자 하였다. 이를 위해 HCT116 세포를 배양하고, 여기에 KY7749 화합물(25 μ M)과 MG132(20 μ M)를 각각 주입하였다. 12 시간이 지난 후, 세포를 수확해 수세하고 lysis buffer를 이용하여 용해하였다. 용해물을 둘로 나눠 하나는 유전자의 주입이 제대로 이뤄졌는지 확인하기 위한 용도로 SDS-PAGE sample buffer를 넣고 5분간 끓인 후, 웨스턴 블롯을 실시하였다.
- [0136] 도 18에 나타난 바와 같이, KY7749 화합물은 MG132와 동시에 사용되었을 때, 유비퀴틴화된 Ras 단백질의 분해가 억제되는 것을 확인한 바, KY7749 화합물은 폴리유비퀴틴 매개에 의해 Ras 분해활성을 가지는 것으로 확인되었다.
- [0137] 도 19는 HCT116 세포에 KY7749 화합물과 Flag-Ub를 처리하고, Ras 단백질에 대하여 면역침강법(immunoprecipitation:IP)을 수행한 후, WCL(whole cell lysate)을 사용하여, pan-Ras, β -catenin, α -tubulin에 대한 항체로 면역블롯(IB)을 진행한 결과이다.
- [0138] 이에 따르면, KY7749를 첨가하였을 때, 폴리유비퀴틴화가 촉진되었으며, Ras 단백질의 폴리유비퀴틴화가 촉진되어 Ras 단백질이 감소되지 않았음을 관찰할 수 있다. 또한 및 β -카테닌도 전혀 변화가 없음을 알 수 있다.
- [0139] 도 20은 대장암세포주인 HCT-116 세포에 다양한 농도의 KY7749(1, 5, 10, 25 μ M)를 처리한 후 24 시간에 따른 웨스턴 블롯 결과이다.
- [0140] 도 20에 나타난 바와 같이, KY7749의 농도가 높아질수록 Ras 단백질의 분해활성이 증가함을 확인하였다. 이와 더불어 p-ERK 발현도 감소함을 확인하였다.
- [0141] 도 21은 KY7749에 대한 루시페라제 활성도 측정결과를 나타낸 그래프이다.
- [0142] 루시페라제 활성도를 측정하기 위하여, HCT-116 세포를 6 웰 플레이트 전체 면적의 60% 정도 차지할 정도로 성장시키고, Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)을 사용하여 세포에 Elk-1 루시페라제 리포터 유전자 구조체(Panomics) 및 pRL-TK를 함께 형질감염시켰다. 형질감염 24시간 후 세포 추출물을 얻은 후, 루시페라아제 활성은 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)을 사용하여 측정하였다.
- [0143] 본 발명을 통해 최종 선별된 KY7749 화합물이 ERK 경로의 활성화에 영향을 나타내는지 확인하기 위하여, 활성화된 ERK에 직접적으로 조절되는 Elk-1 루시페라아제 분석을 수행하였다. 상술한 과정을 통해 형질감염된 세포에 KY7749 화합물을 25 μ M의 농도로 처리 한 후, 24시간 동안 인큐베이션시킨 후 세포(cell)의 용해물(Lysate)로부터 루시페라아제 활성도(Luciferase activity)의 값을 측정하였다. 모든 실험은 3번 반복하여 3회 실시하였다.
- [0144] 도 21에 나타난 바와 같이, KY7749 화합물을 처리할 경우 루시페라아제 활성이 감소됨을 확인하였다. 이는 KY7749 화합물이 Elk-1을 억제하고 있음을 의미한다.
- [0145] **실험예 4. 최종 선별된 KY7749의 Ras 동형상(Ras isotypes)에 대한 분해활성 분석**
- [0146] 우선, 야생형 HEK293 세포를 준비하고, 여기에 Myc이 표지된 K-Ras(pcDNA3.1-K-Ras-Myc), Myc이 표지된 H-Ras(pcDNA3.1-H-Ras-Myc), Myc이 표지된 N-Ras(pcDNA3.1-N-Ras-Myc)를 넣어 형질전환을 시킨 후 24시간 동안 배양하였다. 상기 각각의 세포에 KY7749를 넣어 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 그 후 세포 용해액을 얻어 Myc 항체, α -튜블린 항체(Cell Signaling Technology)를 이용하여 웨스턴블롯을 수행하였다.
- [0147] 도 22는 야생형 HEK293 세포에 KY7749를 처리하였을 때, Ras 단백질 분해활성을 myc 항체로 확인한 웨스턴 블롯 결과로, 이에 따르면 KY7749를 처리할 경우 야생형 HEK293 세포에서 Ras 동형상 단백질(H-Ras, K-Ras, N-Ras)의 분해가 효과적으로 이루어지고 있음을 관찰할 수 있다. 즉 본 발명에 따른 KY7749 화합물은 암세포에서 동형상의 Ras 단백질 모두에 대해 우수한 분해활성을 가지며, 다양한 암에 대한 광범위한 항암 효과를 나타내고 있음을 알 수 있다.

- [0148] 도 23은 HCT116, SW48, LoVo, D-WT, D-MT 세포를 KY7749로 24시간 처리하여 배양한 후, 각 세포에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.
- [0149] 도 23에 나타난 바와 같이 β -catenin과 Ras단백질이 KY7749에 의해 HCT116, SW48, LoVo, D-WT, D-MT 세포와 같은 다양한 암 세포에서 감소함을 확인할 수 있다. 또한 KY7749는 K-Ras 단백질 뿐만 아니라, 이의 isotype인 K-, H-, N- 형 모두에 대하여 모든 세포에서 분해활성을 나타내고 있음을 알 수 있다.
- [0150] 도 24는 HCT116(a), SW48(b), LoVo(c) 세포를 KY7749(5 μ M, 25 μ M)로 24 시간 처리하여 배양하여, 이로부터 K-Ras, H-Ras, N-Ras mRNA 발현양을 측정하여 나타낸 그래프이다.
- [0151] 도 24를 참고로 하면, KY7749는 K-Ras, H-Ras, N-Ras의 mRNA 발현에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인하였다.
- [0152] **실험예 5. KY7749와 종래 wnt/ β -catenin 억제제인 KYA1797K의 효과 비교**
- [0153] 도 25는 KY7749 또는 KYA1797K에 대한 세포독성 확인(MTT assay)의 실험결과를 나타내는 그래프이다. 구체적으로 HCT116 세포에서 KY7749 또는 KYA1797K의 처리시간(0, 24, 48, 72 시간)에 따른 세포성장정도를 MTT 시험법으로 측정하여 나타낸 그래프이다.
- [0154] 세포 성장 확인(MTT assay)을 위해, 우선 HCT116 세포를 96-well plate에 5×10^3 cells/ml의 농도로 접종하고 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양한 후 배지를 모두 제거하고, 새로운 배지를 이용하여 상기 과정을 통해 최종 선별된 KY7749와 이의 비교예인 KYA1797K를 well당 25 μ M씩 처리하여 준 후 0, 24, 48, 72 시간별로 배양하였다. 액상 배지에 첨가하여 각 균주를 일정량 접종하여 배양한 후 세포독성 확인을 위해 각 시간별로 배양된 세포에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; AMRESCO)를 2시간 동안 처리하여 발색된 세포의 흡광도(A_{590 nm})를 측정하여 나타내었다.
- [0155] 도 25에 나타난 바와 같이, Wnt/ β -catenin 신호전달계를 통해 라스를 조절하는 저분자 화합물인 KYA1797K는 암 세포 성장을 저해하지 못하였으나, 본 발명에 따른 KY7749를 처리할 경우 암세포의 성장이 현저히 저해되는 것을 알 수 있다. 이를 통해 본 발명에 따른 KY7749 화합물은 Wnt/ β -catenin 신호전달계를 통해 라스를 조절함으로써, 암 세포 저해활성을 갖고 있음을 알 수 있다.
- [0156] 대장암세포주 HCT116 세포에 KY7749와 KYA1797K를 각각 25 μ M의 농도로 처리한 뒤, 24시간 배양하고 수확하여 단백질 샘플을 얻고, 상기 단백질 샘플을 12% polyacrylamide gel에 로딩하였다. 사용된 1차 항체의 농도는 다음과 같다: pan-Ras(1:3000), p-ERK(1:1000), T-ERK(1:3000), α -tubulin(1:5000).
- [0157] 도 26은 대장암세포주인 HCT-116에 KY7749와 KYA1797K를 각각 처리하였을 때의 웨스턴 블롯 결과로, KY7749는 타겟인 pan-Ras 단백질을 감소시켰으나, KYA1797K는 pan-Ras 단백질을 감소시키지 못하는 것을 확인하였다. 또한, KY7749는 하위 단백질인 p-ERK의 활성 또한 감소하였으나, KYA1797K로 처리하였을 때에는 p-ERK 단백질의 활성에 변화가 관찰되지 않았다.
- [0158] 도 27은 GSK3 β +/+ MEF 세포와 GSK3 β -/- MEF 세포에 KY7749와 KYA1797K를 각각 처리하였을 때의 웨스턴 블롯 결과이다.
- [0159] 이때 사용된 마우스 배아 섬유아세포(MEFs)는 GSK3 β +/+, GSK3 β -/- 쥐의 배아(13.5~14.5일)에서 세포를 추출하여 SV40을 형질전환하여 10번 계대하면서 immortalization한 세포를 사용하였다. MEFs를 DMEM/10% FBS에서 배양하였다. 웨스턴 블롯은 앞선 과정과 동일하게 진행되므로, 이를 참고한다.
- [0160] 이에 따르면, KY7749는 GSK3 β +/+ MEF 세포와 GSK3 β -/- MEF 세포에서 타겟인 pan-Ras 단백질과 이의 하위 단백질인 p-ERK를 모두 감소시키고 있음을 확인하였으나, KYA1797K는 GSK3 β -/- MEF 세포에서는 pan-Ras 단백질과

이의 하위 단백질인 p-ERK의 활성화에 변화가 관찰되지 않았다.

[0161] 다음, 야생형 HEK293 세포와 돌연변이 T144/148A K-Ras를 발현하는 HEK293 세포를 준비하고, 여기에 Myc이 표지된 K-Ras(pcDNA3.1-K-Ras-Myc)를 넣어 형질전환을 시킨 후 24시간 동안 배양하였다. 상기 각각의 세포에 KY7749와 KYA1797K를 넣어 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 그 후 세포 용해액을 얻어 p-ERK 항체, T-ERK 항체, Myc 항체, α -튜불린 항체(oncogene research product)를 이용하여 웨스턴블롯을 수행하였다. 도 28은 이의 결과로, KY7749를 처리할 경우 야생형이든 돌연변이형이든 HEK293 세포에서 K-Ras가 감소하게 됨을 확인하였다. 이에 반해 KYA1797K를 처리할 경우에는 돌연변이 세포에서는 K-Ras의 분해가 이루어지지 않고, 오히려 증가함을 관찰할 수 있었다. 따라서 KY7749가 세포 내에서 Ras 단백질의 양을 효과적으로 억제 및 분해시키고 있음을 관찰할 수 있었다.

[0162] 따라서 본 발명에 따른 KY7749 화합물은 기존에 밝혀진 Wnt/ β -catenin 신호전달계를 통해 라스를 조절하는 저분자 화합물인 KYA1797K와는 달리, Wnt/ β -catenin 신호전달계 비의존적으로 라스를 조절하여 암세포에서 우수한 항종양 효과를 가지고 있음을 알 수 있다.

[0163] 실험예 6. 다양한 암세포에서 KY7749의 항암효과

[0164] 야생형(WT) K-Ras와 돌연변이(MT) K-Ras 단백질, 돌연변이(MT) β -카테닌과 야생형(WT) β -카테닌을 발현하는 세포를 제조하였다. 구체적으로 야생형(WT) K-Ras와 돌연변이(MT) β -카테닌을 발현하는 SW48 세포, 돌연변이(MT) K-Ras 단백질과 돌연변이(MT) β -카테닌을 발현하는 HCT116 세포, 돌연변이(MT) K-Ras 단백질과 야생형(WT) β -카테닌을 발현하는 DLD-1 세포, 돌연변이(MT) K-Ras 단백질과 야생형(WT) β -카테닌을 발현하는 SW480 세포를 준비하였다. 상기 각각의 세포에 KY7749를 0, 0.04, 0.2, 1, 5, 25 μ M 농도별로 처리하고 24시간 배양한 후, 세포 정상율(%)을 측정하여 도 29에 나타내었다.

[0165] 도 29는 야생형(WT) K-Ras와 돌연변이(MT) K-Ras 단백질, 돌연변이(MT) β -카테닌과 야생형(WT) β -카테닌을 발현하는 각 세포에 KY7749를 0, 0.04, 0.2, 1, 5, 25 μ M 처리하였을 때, 각 세포의 50% 세포 성장 억제 활성 농도(GI₅₀)를 측정하여 나타낸 그래프이다.

[0166] 도 29에 나타난 바와 같이 고농도의 KY7749를 처리할수록 암세포의 성장이 현저히 억제되고 있음을 확인하였다. 본 발명에 따른 KY7749는 K-Ras 돌연변이 및 β -카테닌 돌연변이 상태와는 관계없이 우수한 억제활성을 갖고 있음을 알 수 있다.

[0167] SW48 (β -catenin^{S33Y}), HCT-116 (K-Ras^{G13D}, β -catenin ^{Δ S45}), DLD-1(K-Ras^{G13D}), SW480 (K-Ras^{G12D})의 세포주는 각각의 돌연변이가 있는 환자로부터 얻은 세포주를 사용하였다.

[0168] 또한, KY7749 화합물은 0.04 μ M 이상이면 암 성장 억제활성을 나타내나, 효과적인 암 성장 억제활성(50% 성장 억제 활성)을 달성하도록 하기 위해서 1 μ M 이상으로 사용되는 것이 바람직함을 확인할 수 있다.

[0169] 도 30은 HCT116, SW48, DLD-1, SW480 세포에 KY7749를 0, 0.04, 0.2, 1, 5, 25 μ M 처리하였을 때의 웨스턴 블롯 결과로, 이에 따르면 고농도의 KY7749를 처리할수록 Ras 단백질, p-ERK, PCNA의 활성이 강하게 저해되는 것을 알 수 있다.

[0170] 실험예 7. Cetuximab에 내성을 갖고 있는 K-Ras 돌연변이 CRC 세포에서 KY7749의 항암효과

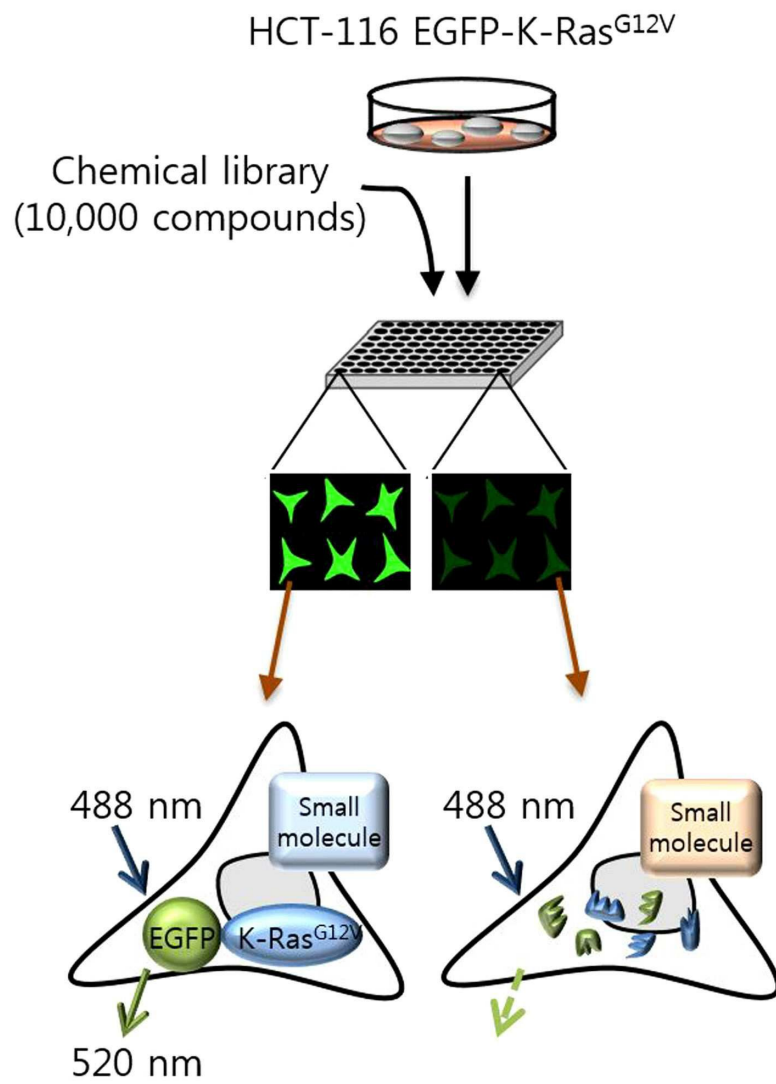
[0171] 도 31은 Cetuximab에 내성을 갖고 있는 K-Ras 돌연변이 CRC 세포(HCT116, SW48, DLD-1, SW480 세포)에 KY7749, cetuximab, 이의 혼합물을 각각 처리하였을 때, 각 세포의 배양액 흡광도로 측정하여 나타낸 그래프이다.

[0172] 도 31에 나타난 바와 같이, cetuximab만 단독으로 처리할 경우, 암 세포 성장이 전혀 억제되지 않았는데 반해, KY7749 화합물을 처리할 경우 암 세포 성장이 억제되는 것을 확인할 수 있다.

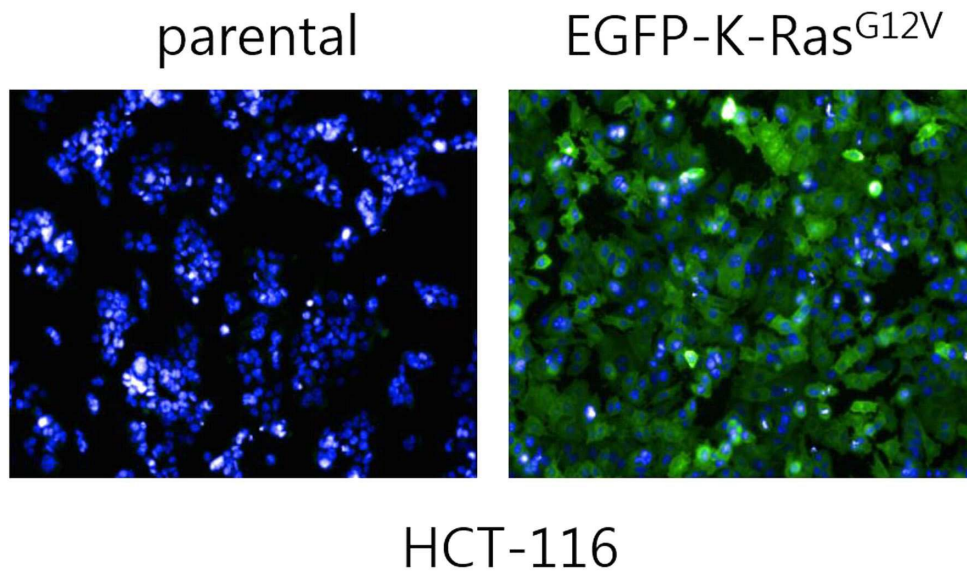
- [0173] 또한 KY7749 화합물은 cetuximab과 혼합사용하여도 우수한 항암효과를 나타냄을 확인하였다.
- [0174] D-WT, D-MT, HCT116, SW480 세포 각각 1×10^3 cell를 6 웰 플레이트에 플레이팅하고, KY7749(25 μ M) 또는 cetuximab(2.5 μ g/ μ l)을 넣어준 RPMI1640 배지에서 18시간, 15 일 동안 배양하면서 셀렉션하였다. 배양액은 3-4일에 한번 간격으로 교체하였다. 0.5% 크리스탈 바이올렛을 20% 에탄올에 녹인 용액을 이용하여 세포를 염색한 후, 사진을 찍고 세포의 수를 센 후 그래프를 그렸다. 콜로니 수는 Image J을 이용하여 세었다.
- [0175] 도 32는 D-WT, D-MT 세포에 KY7749(25 μ M)과 cetuximab(2.5 μ g/ μ l)을 넣어준 배지에서 15 일 동안 배양한 후, 이를 크리스탈 바이올렛으로 염색한 뒤 촬영한 사진이고, 도 33은 HCT116, SW480 세포에 KY7749(25 μ M)과 cetuximab(2.5 μ g/ μ l)로 18 시간 처리하고, 배양하여, 이를 크리스탈 바이올렛으로 염색한 뒤 촬영한 사진이며, 도 34는 도 32, 33의 결과로부터 염색된 세포의 수를 세어 나타낸 그래프이다.
- [0176] 그 결과, 도 32, 33, 34에서 볼 수 있는 바와 같이, 야생형의 암 세포에서는 cetuximab만을 투여하여 세포 성장 및 증식을 억제하는 효과가 관찰되었으나, 돌연변이 암세포, HCT116, SW480 세포에서는 cetuximab 투여로는 세포 성장 및 증식을 억제하는 항암효과가 전혀 관찰되지 않았다.
- [0177] 이에 반해 KY7749는 야생형 암세포, 돌연변이 암세포를 비롯하여 cetuximab에 내성을 갖는 세포 모두에 대해 성장 및 증식을 억제하는 우수한 항암효과를 갖고 있음을 확인하였다.
- [0178] 구체적으로 본 발명에 따른 KY7749는 암세포의 증식을 약 80-99% 억제하고 있음을 확인하였다.
- [0179] 구체적으로 웰(24 well)에 LoVo 세포를 3.5×10^5 개를 시딩하고, 24시간 동안 배양하였다. 이때, 10% FBS가 포함된 DMEM media를 사용하였으며, 24시간 후에는 5% FBS가 포함된 DMEM으로 media change를 해준 후, 200p(yellow) tip끝을 이용해 세포 가운데에 스크래치를 냈다. 그 후, 스크래치를 낸 부분에 상기 KY7749(25 μ M), cetuximab(2.5 μ g/ μ l) 또는 이들 혼합물을 각각 처리하고 18 시간 후 세포의 운동성을 관찰하였다.
- [0180] 도 35는 LoVo 세포에서 KY7749(25 μ M)과 cetuximab(2.5 μ g/ μ l) 처리에 따른 상처 치유 효과를 나타낸 사진(상)과 세포의 이동율을 정량화한 그래프(하)고, 이에 따르면 KY7749 화합물을 단독으로 처리하거나, cetuximab과 혼합하여 처리한 세포가 cetuximab 만을 단독으로 처리한 세포에 비하여 유의적으로 상처 치유 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 세포의 이동율을 정량화한 그래프에서도 마찬가지로 KY7749 화합물을 처리하였을 때 60% 이상 높은 상처 치유 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있다.

도면

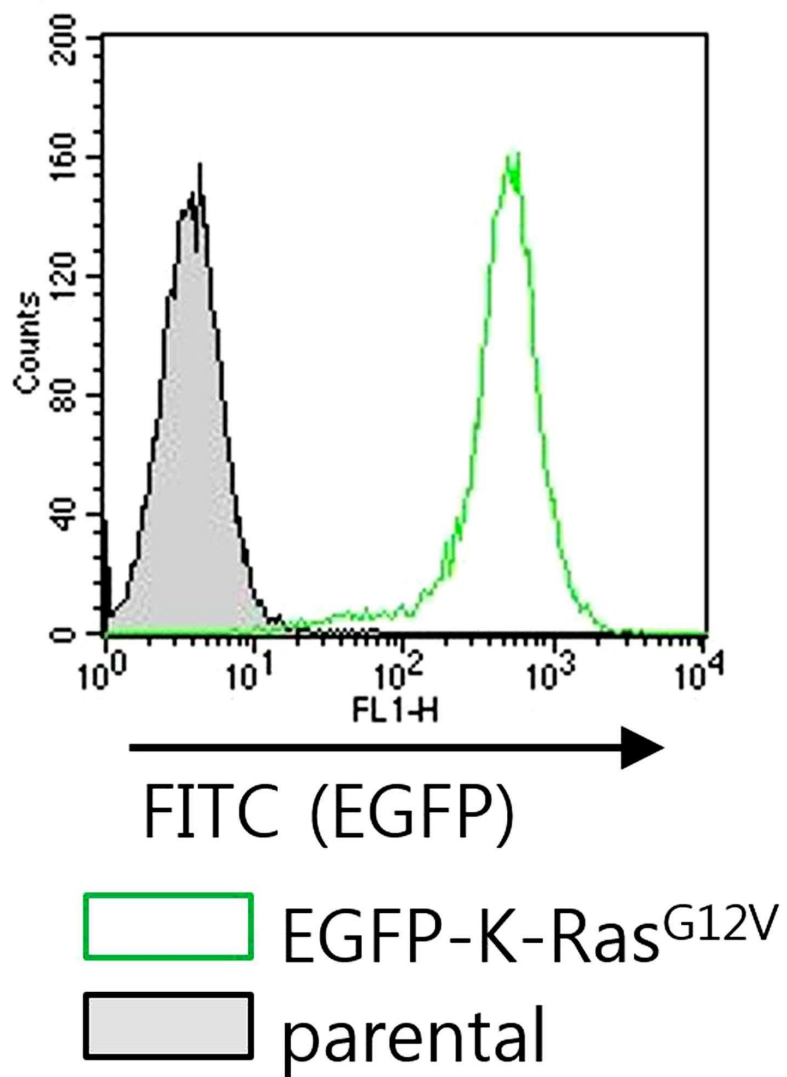
도면1



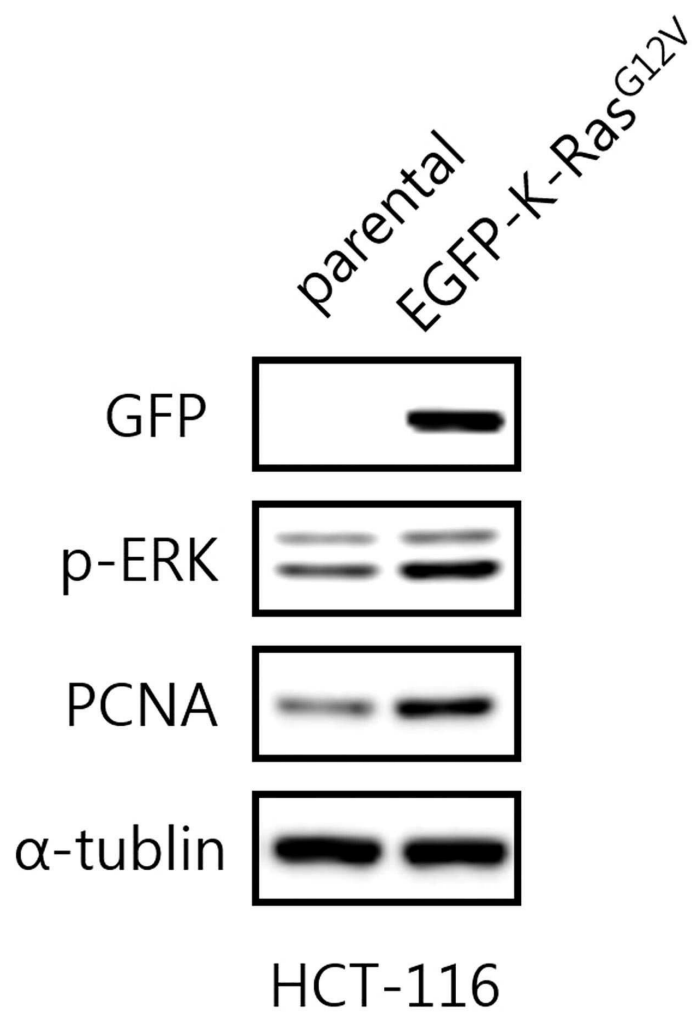
도면2



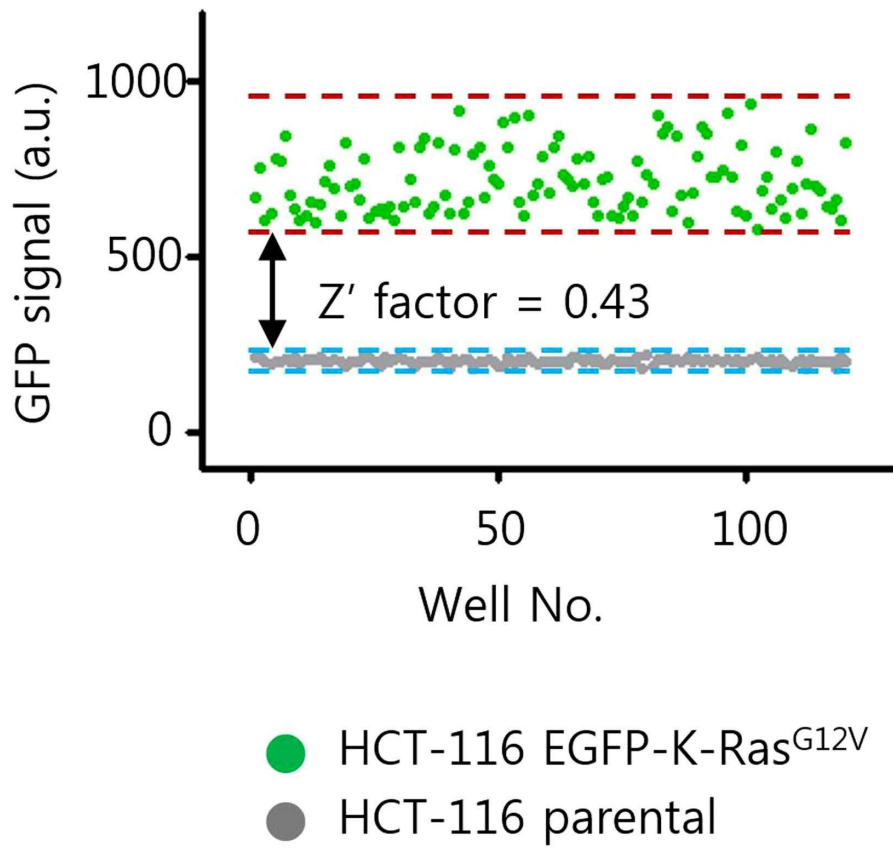
도면3



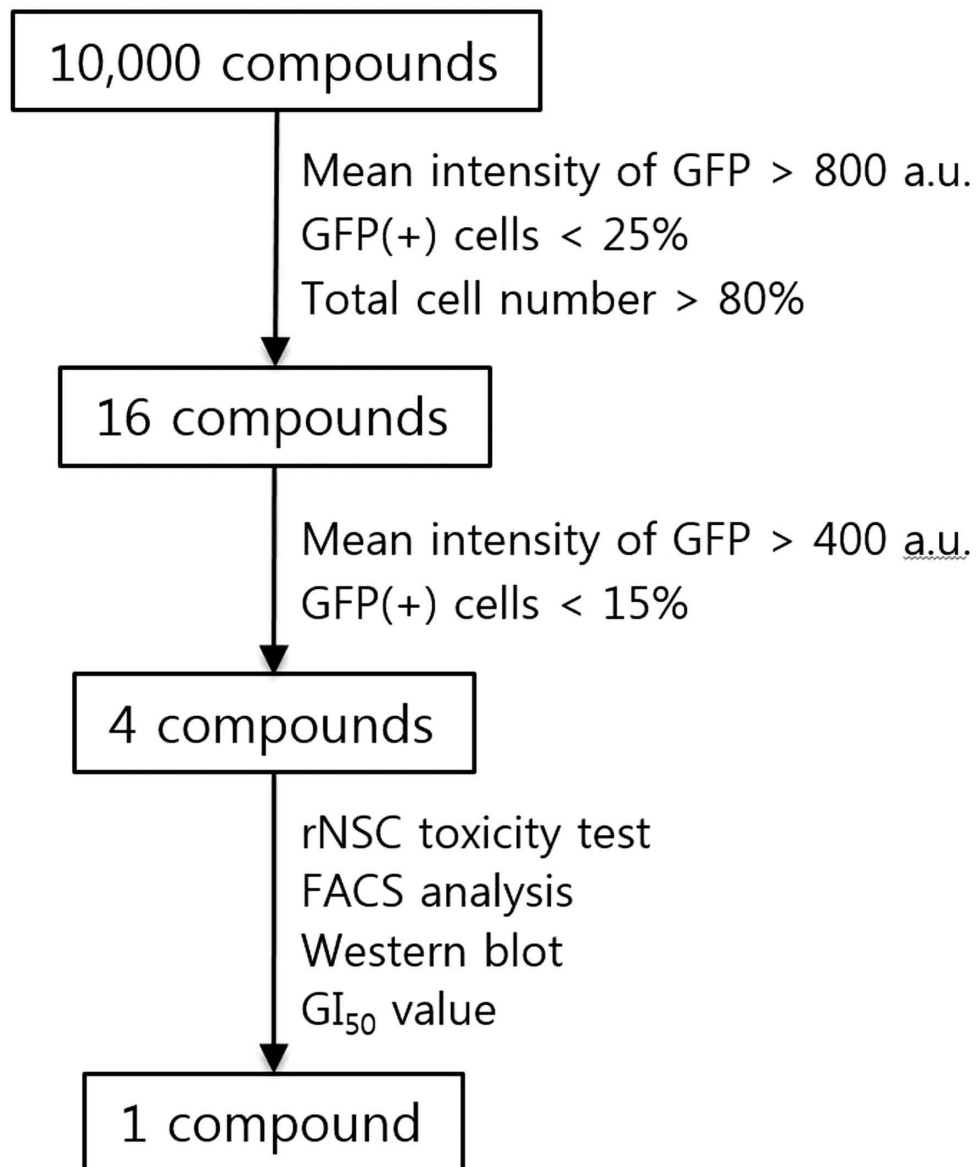
도면4



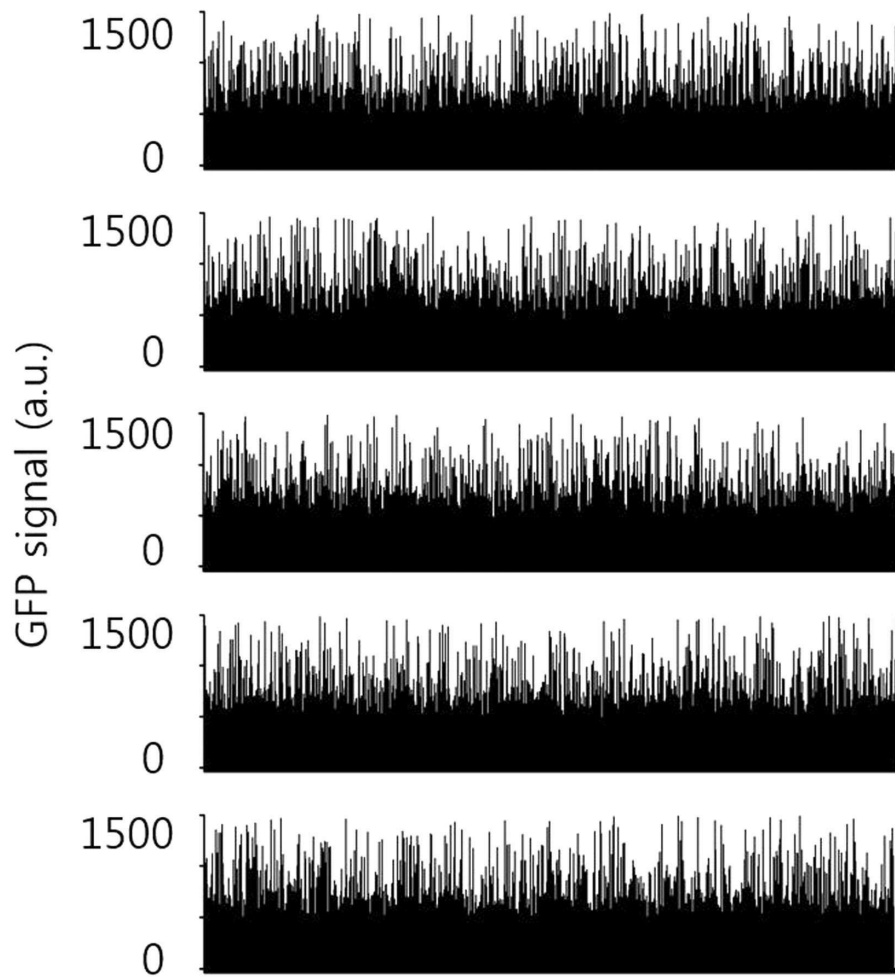
도면5



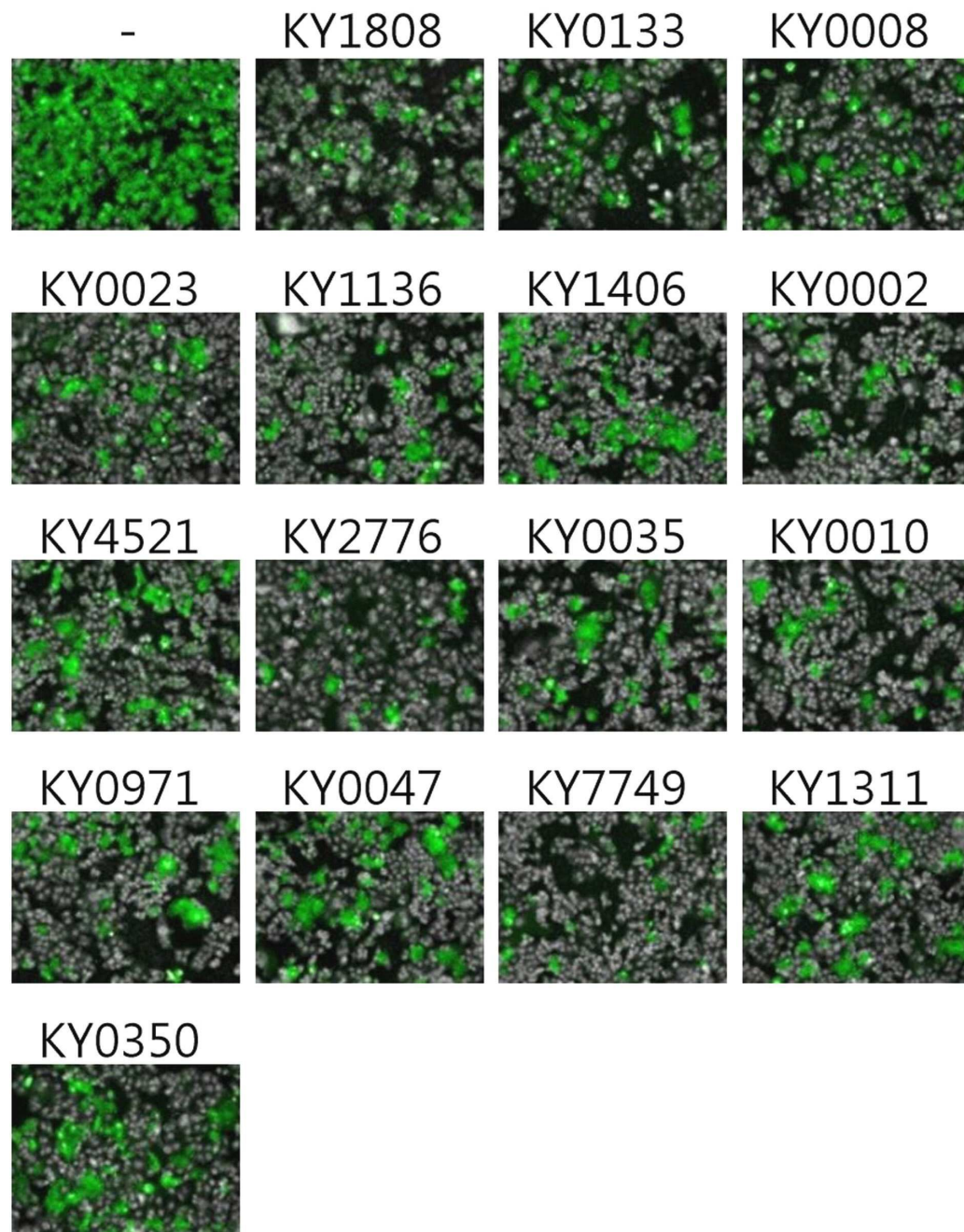
도면6



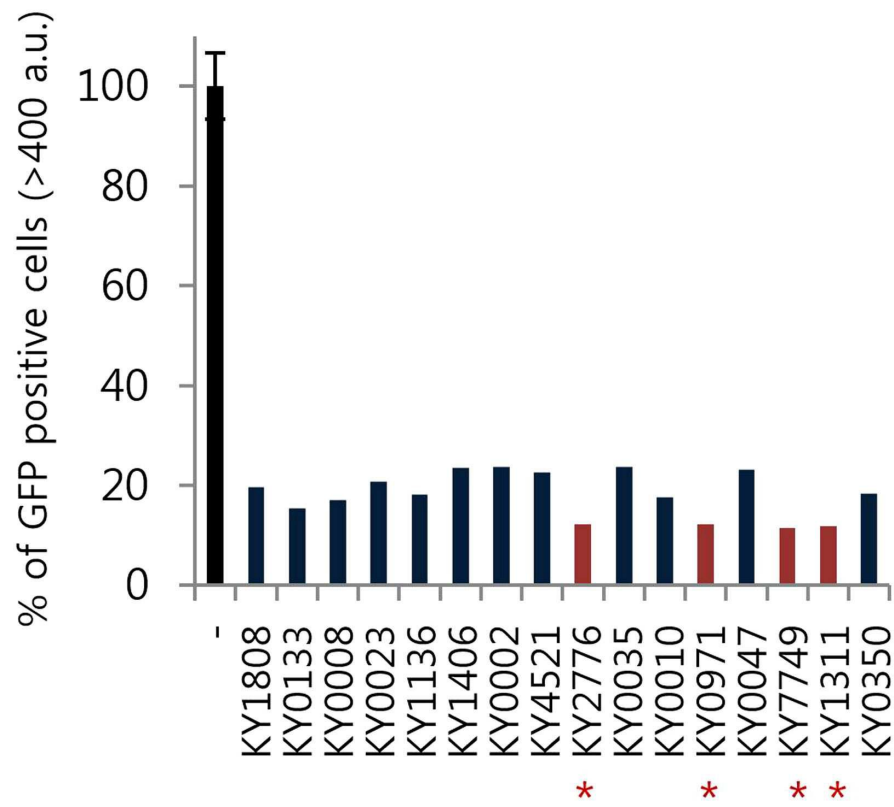
도면7



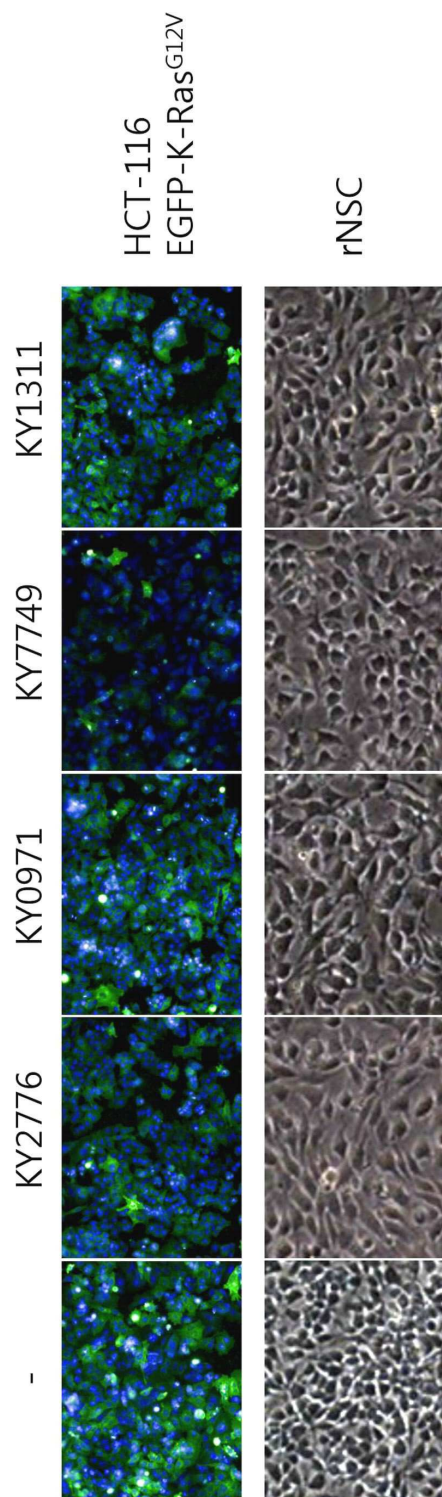
도면8



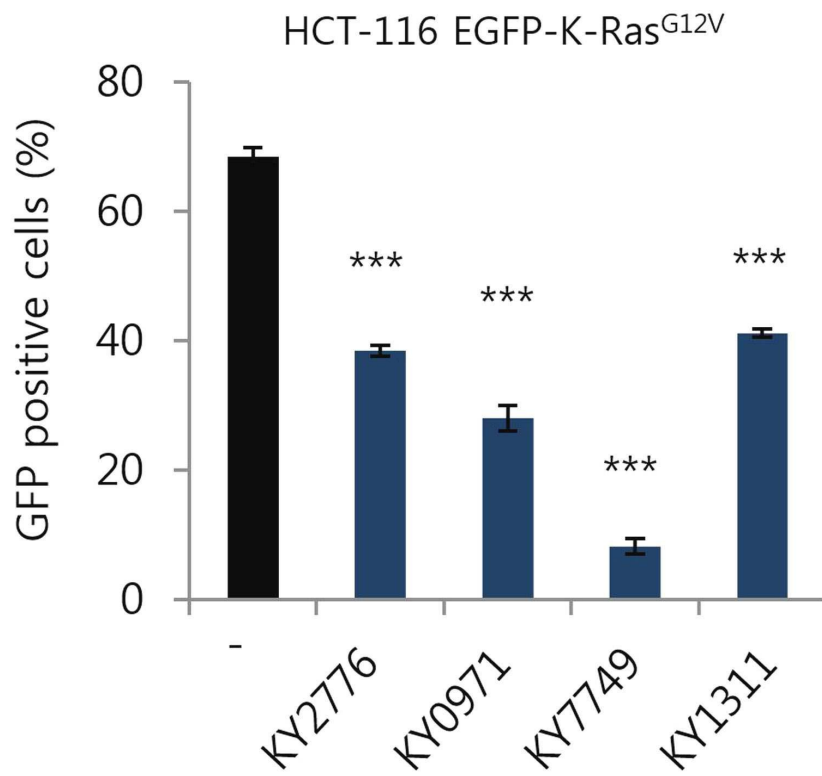
도면9



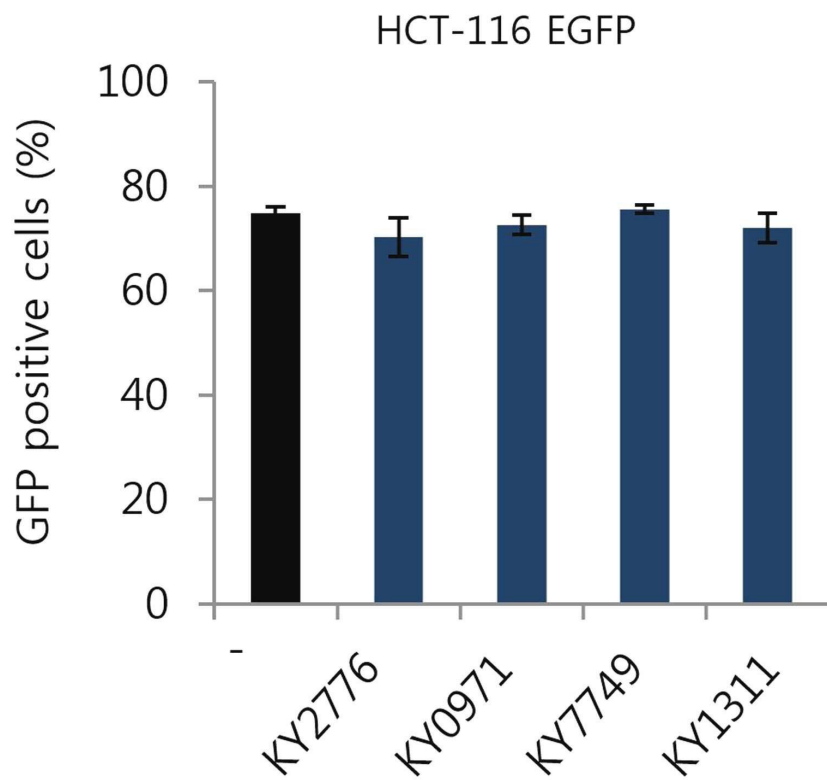
도면10



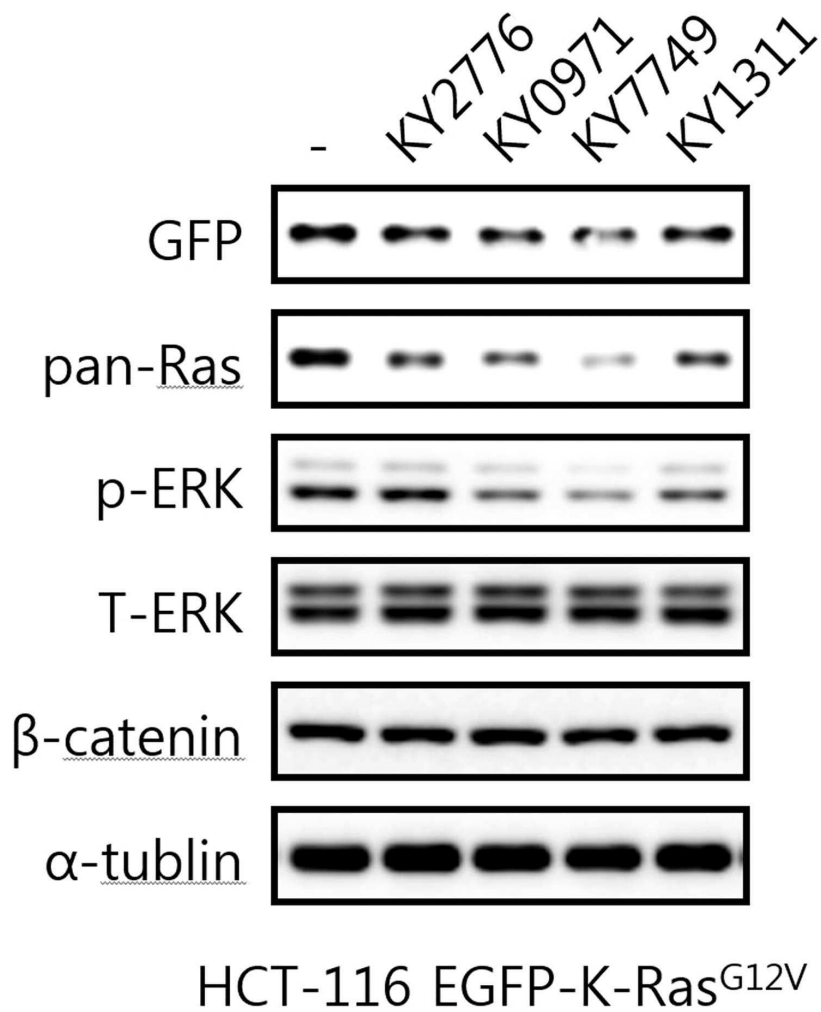
도면11



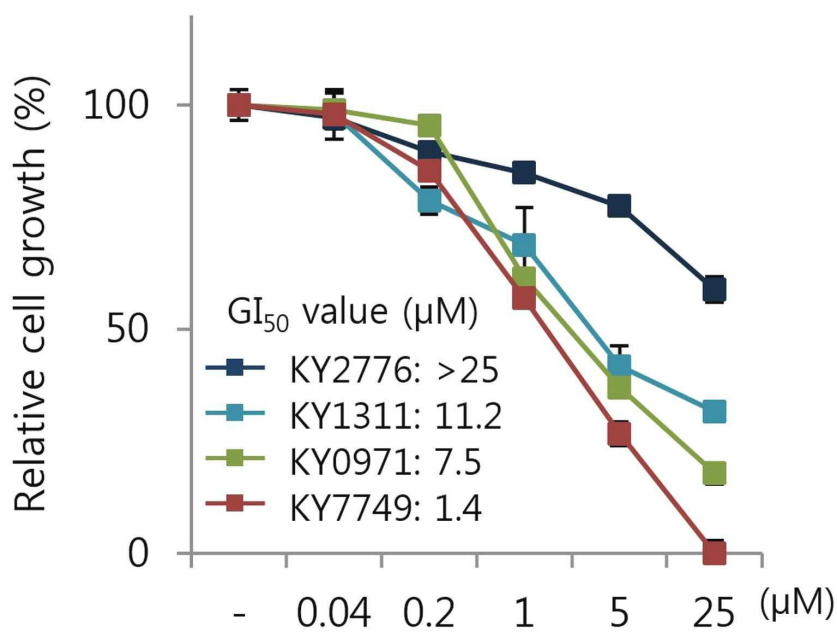
도면12



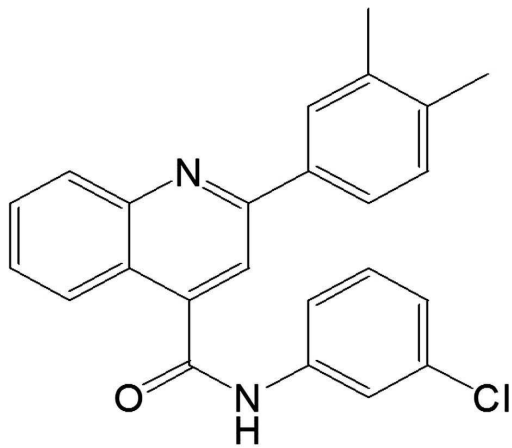
도면13



도면14

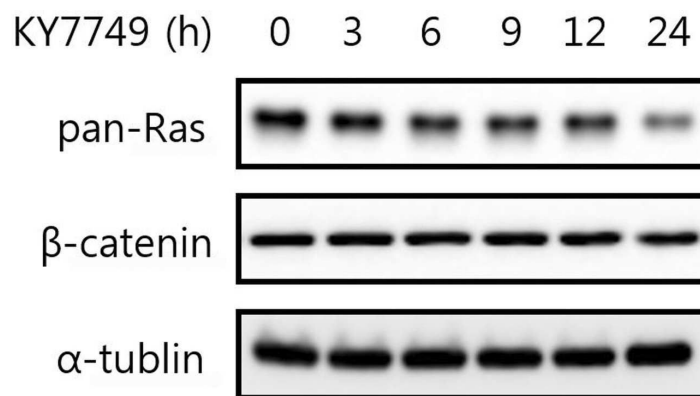


도면15

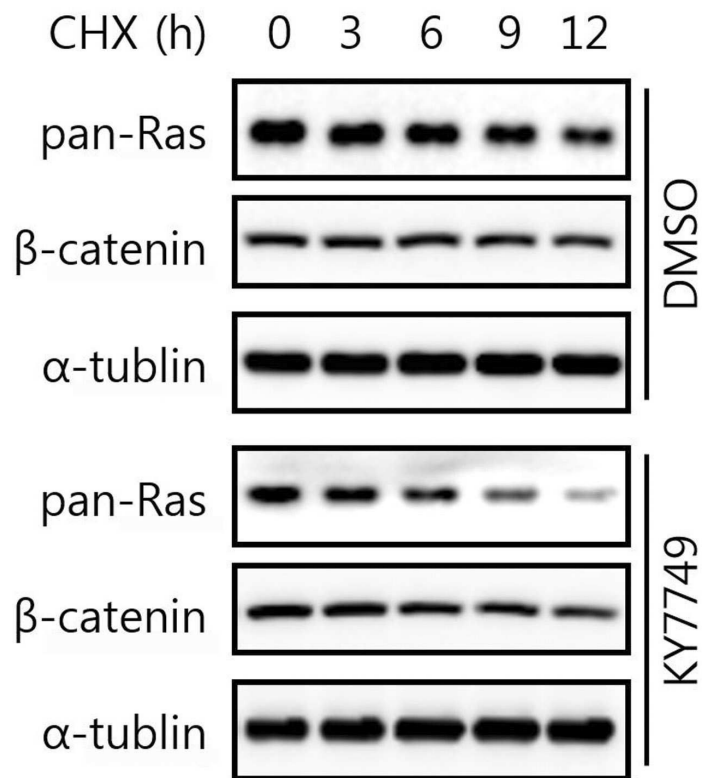


KY7749

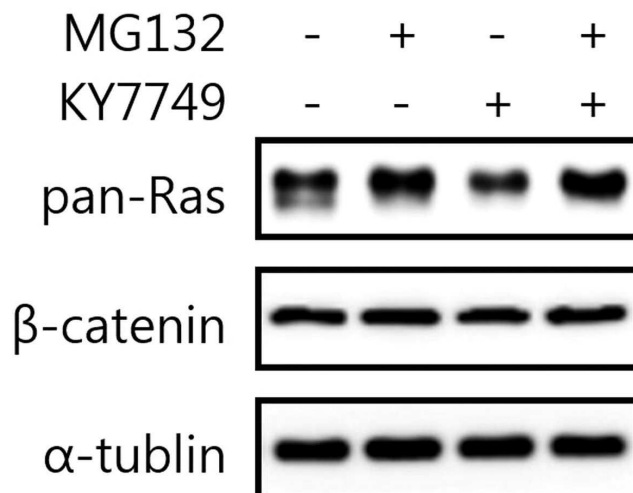
도면16



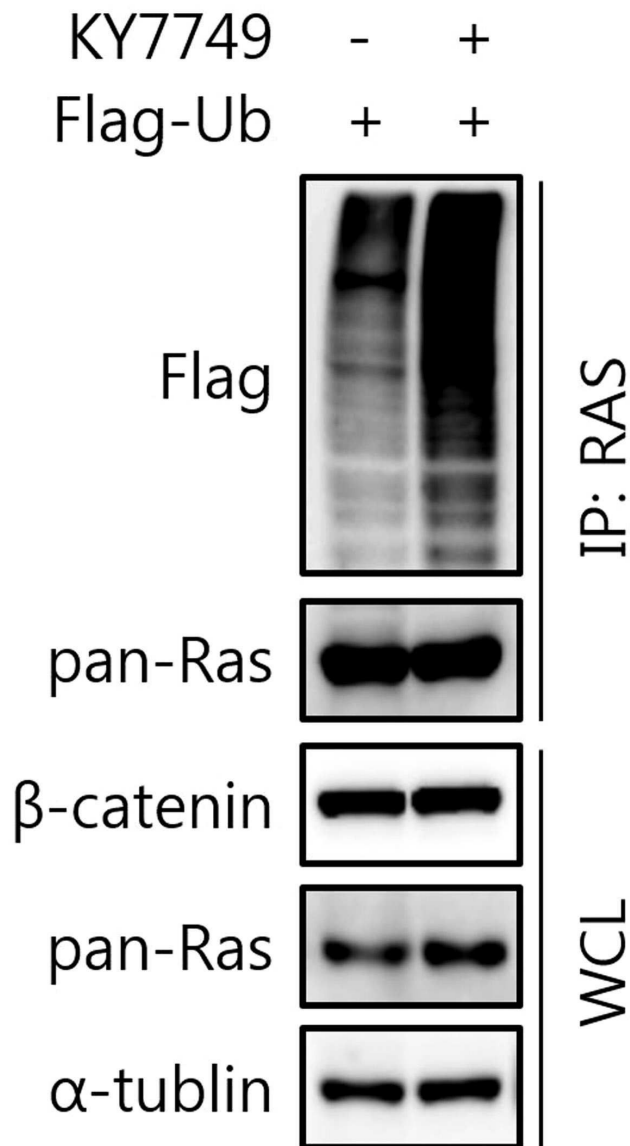
도면17



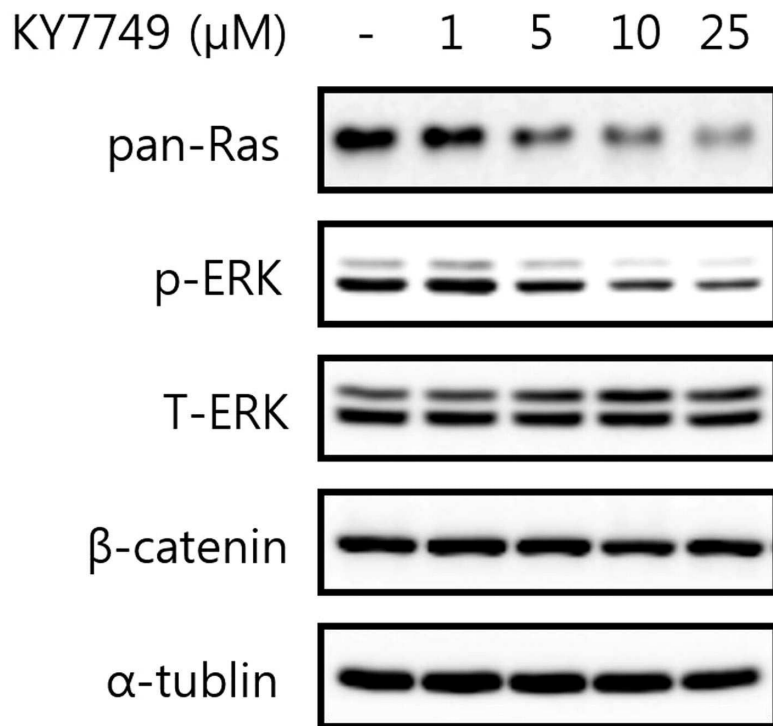
도면18



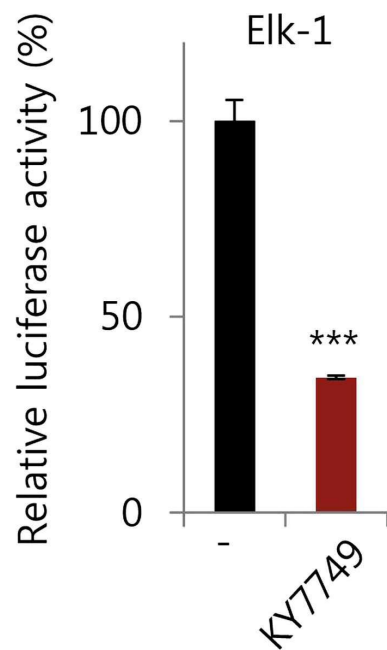
도면19



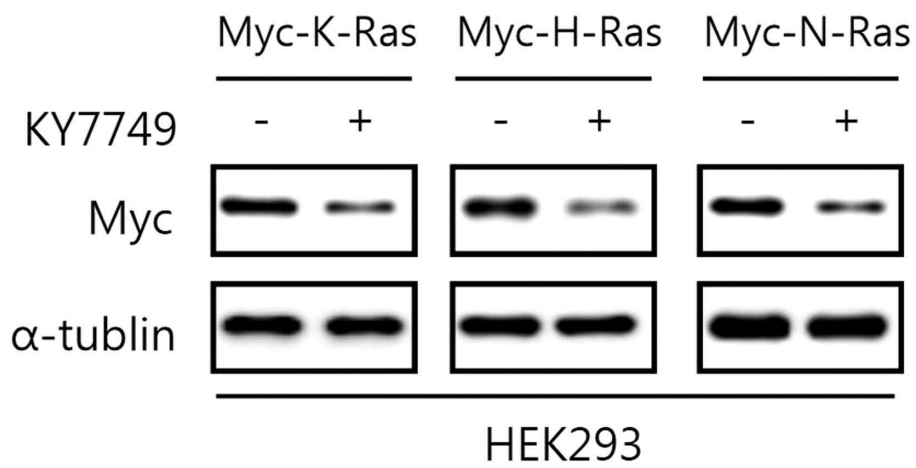
도면20



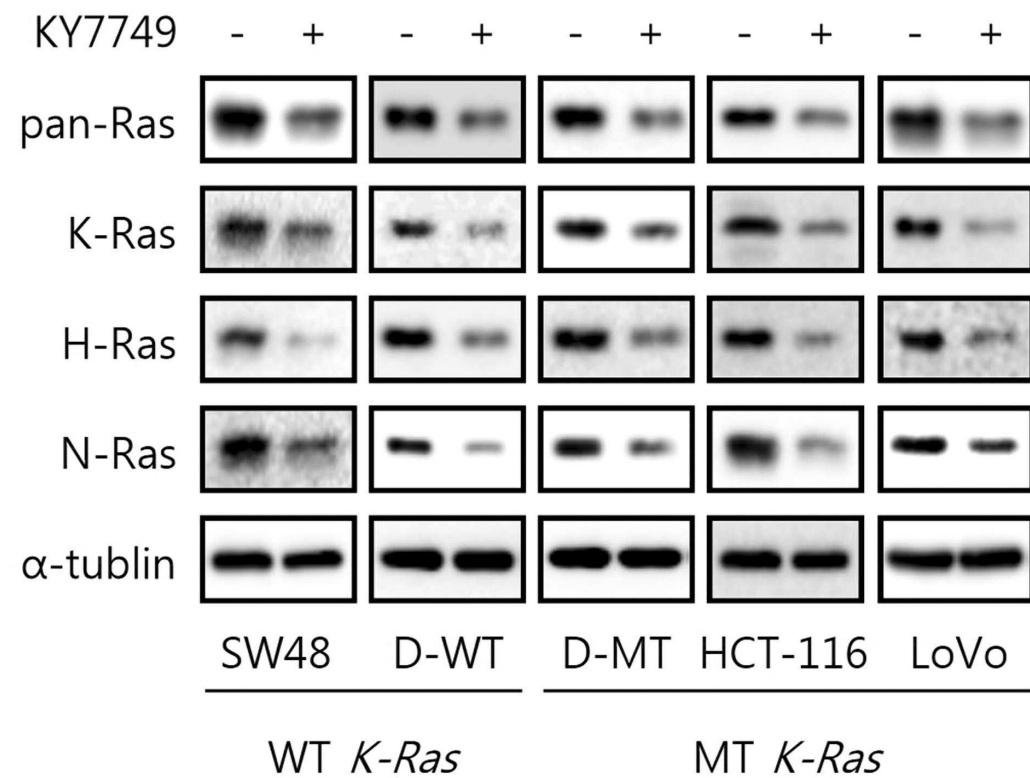
도면21



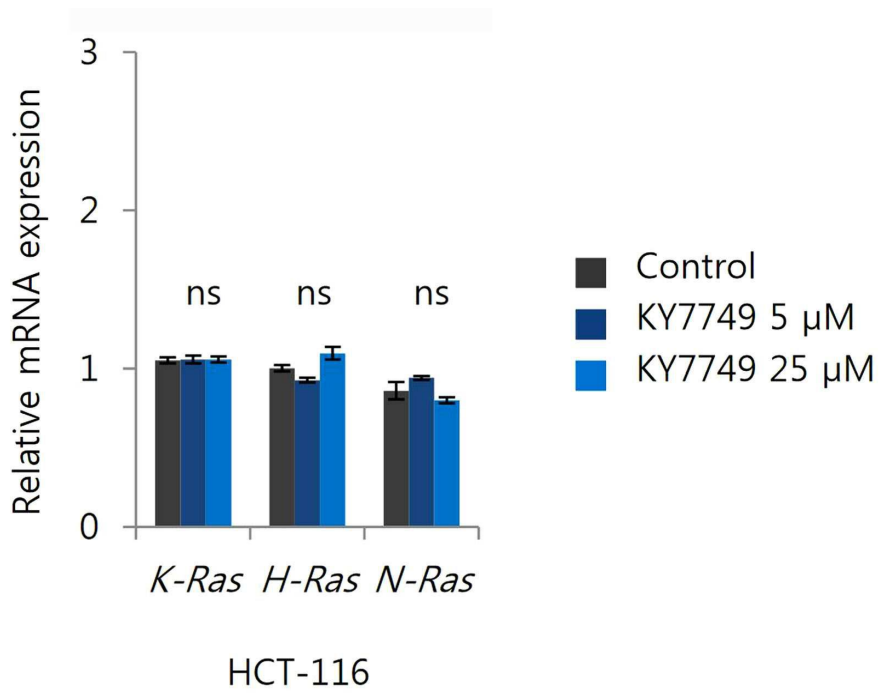
도면22



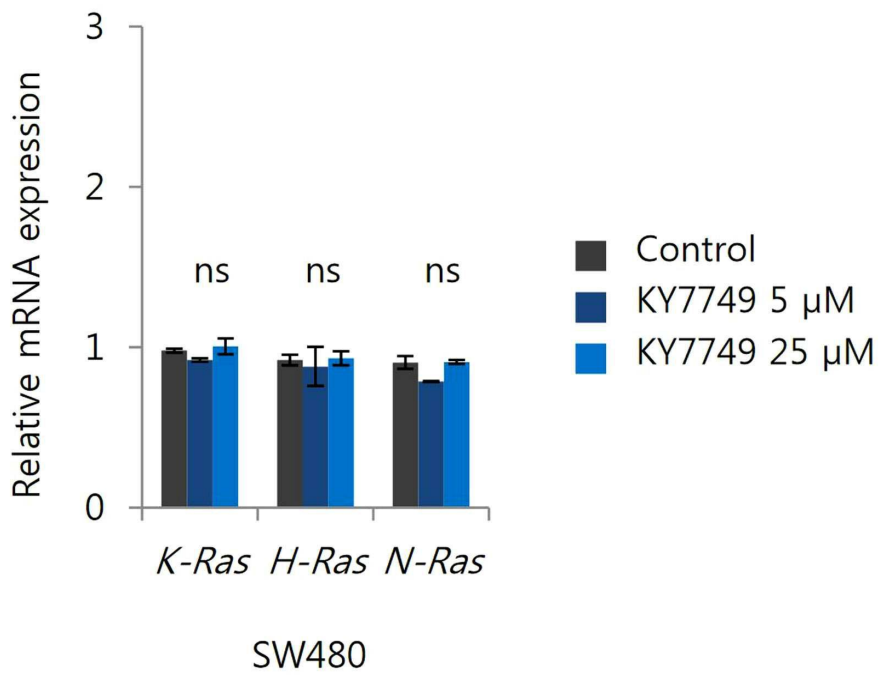
도면23



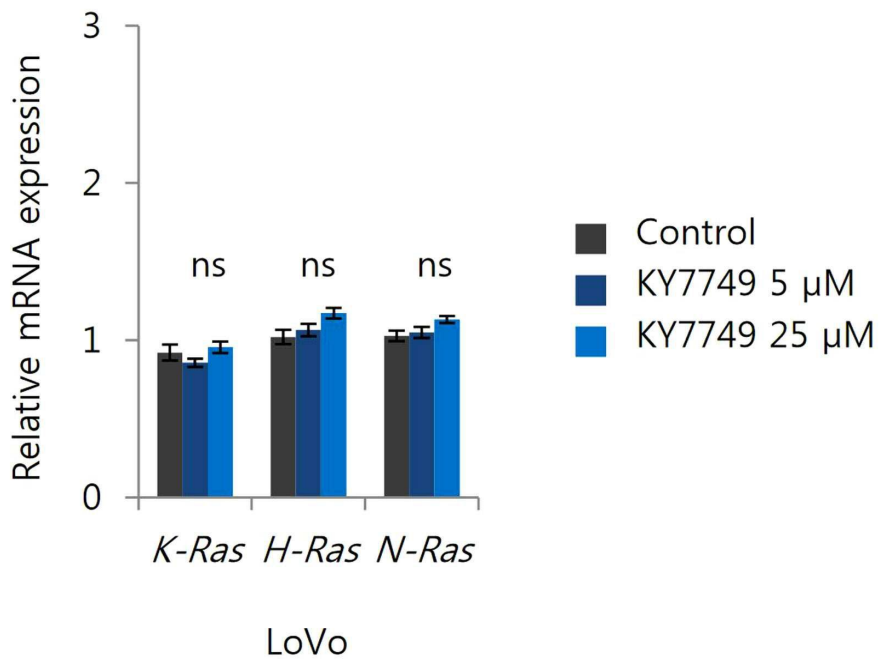
도면24a



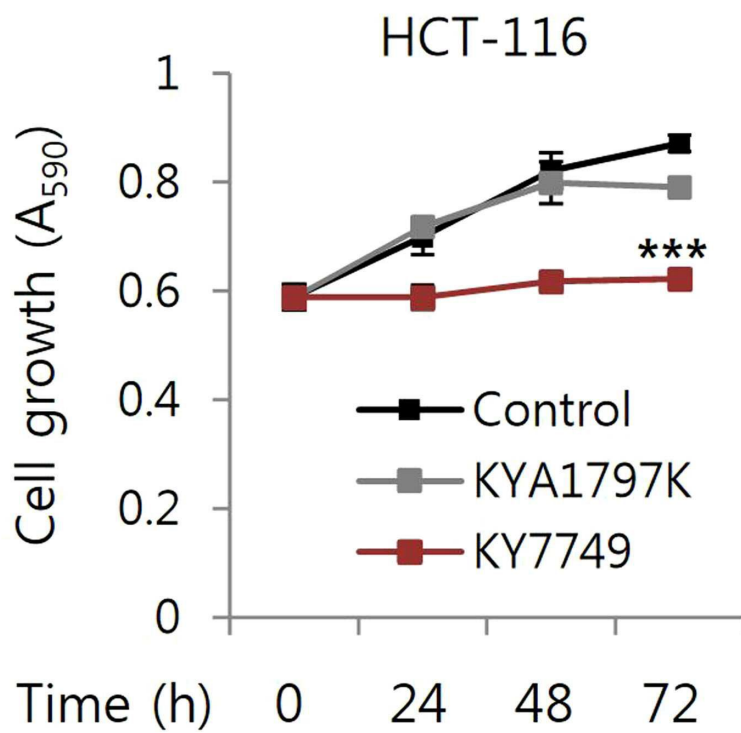
도면24b



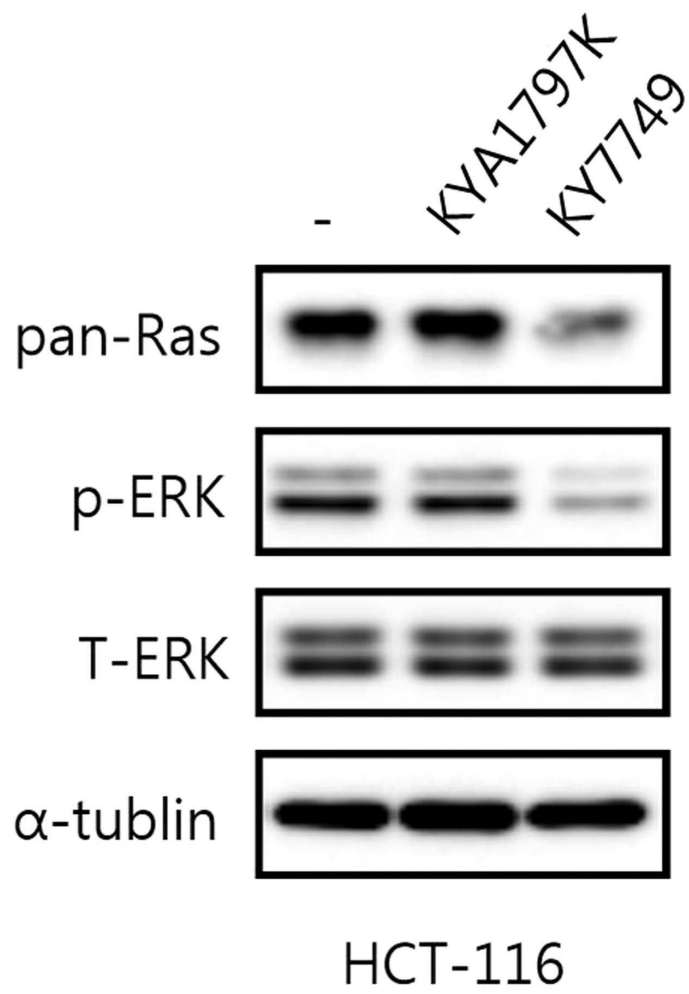
도면24c



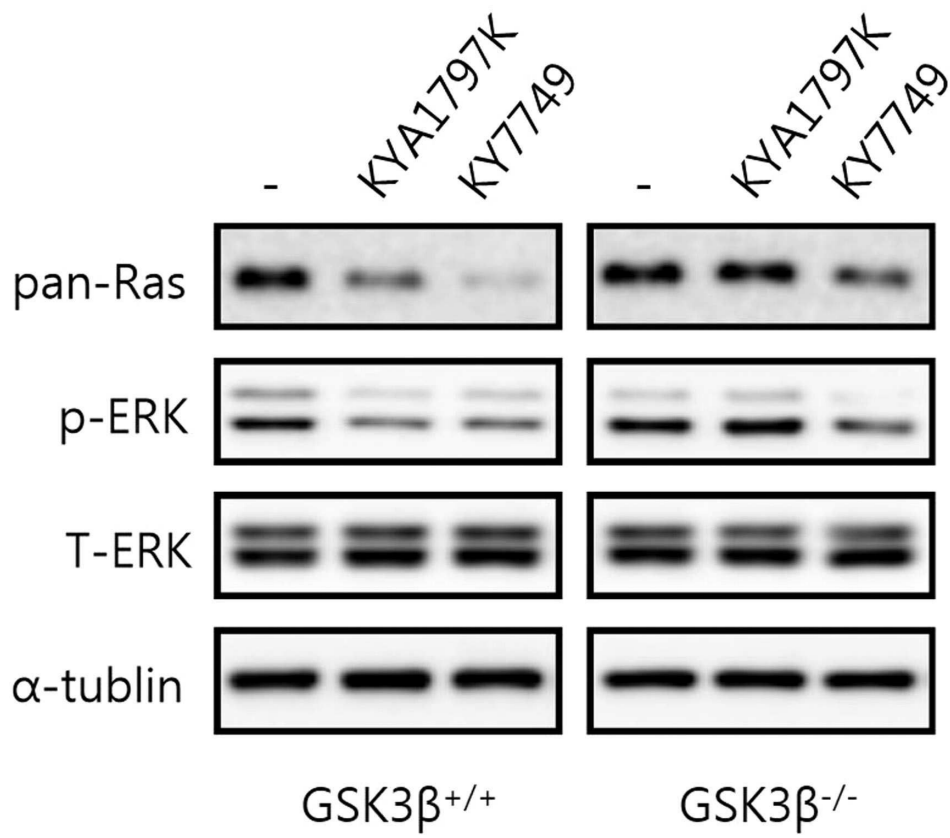
도면25



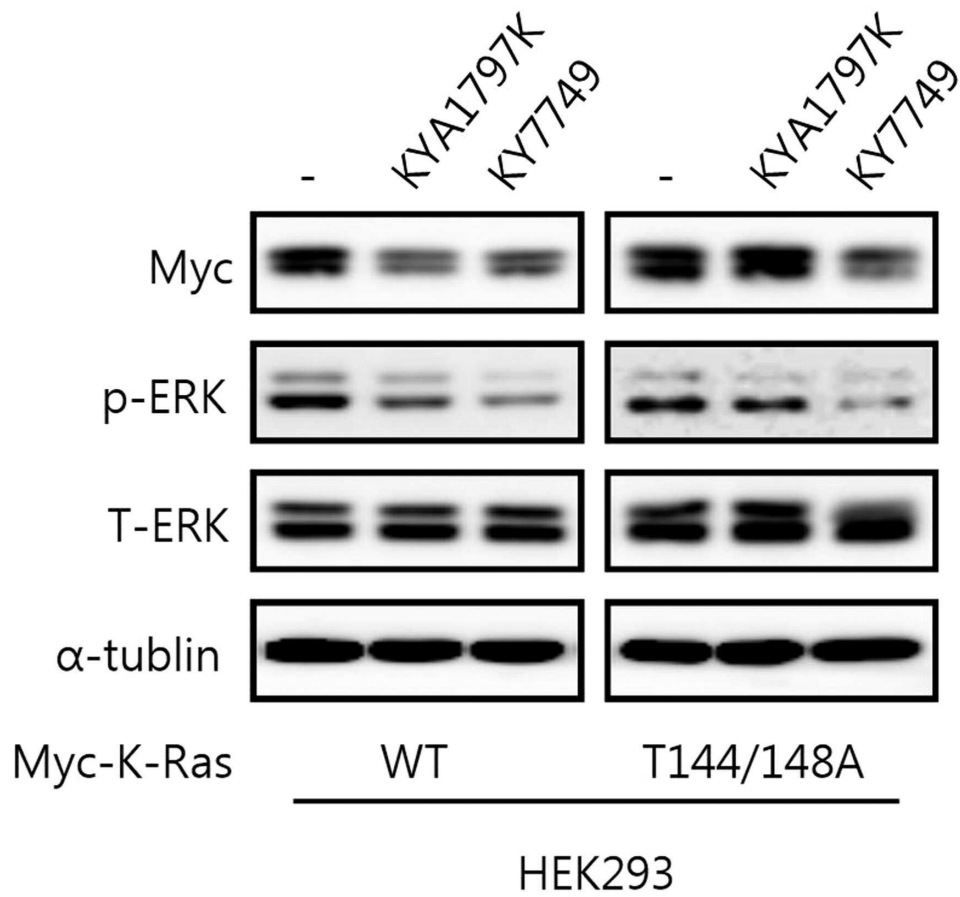
도면26



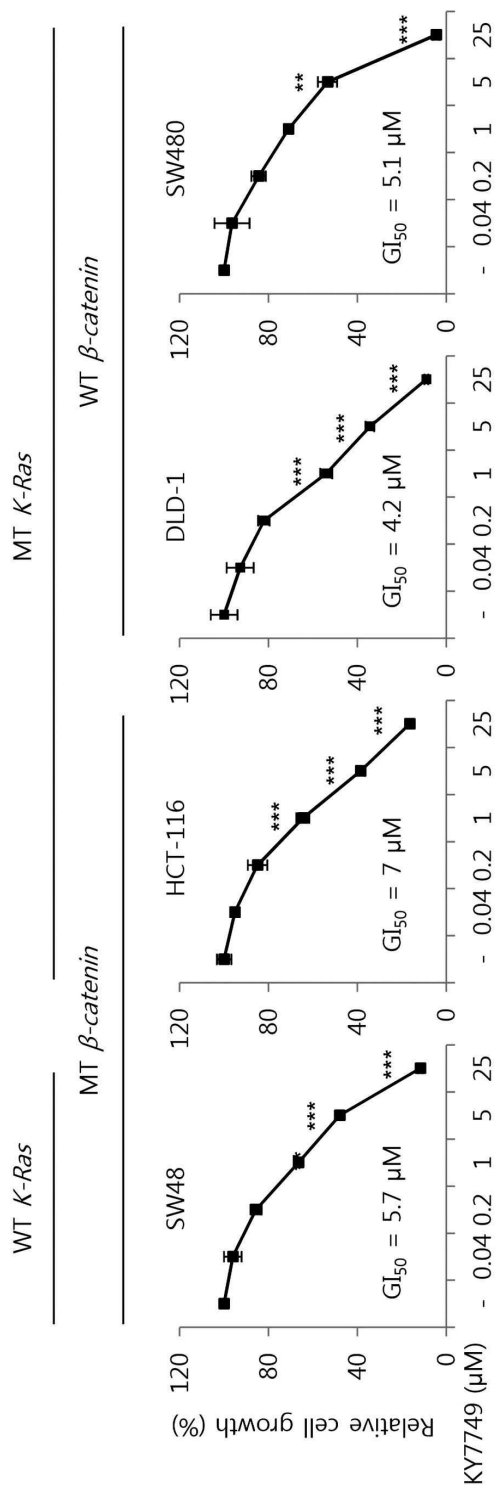
도면27



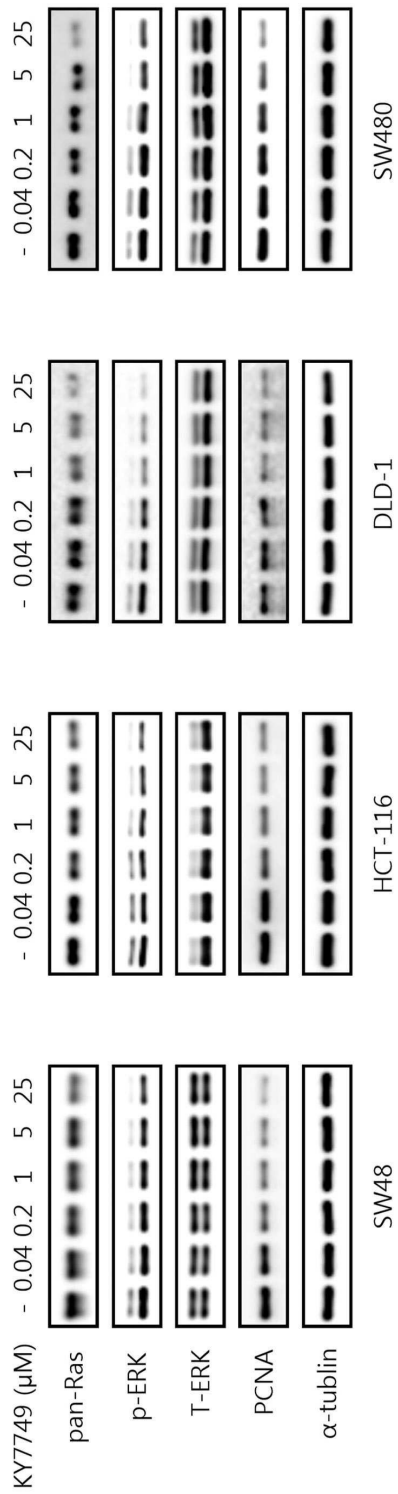
도면28



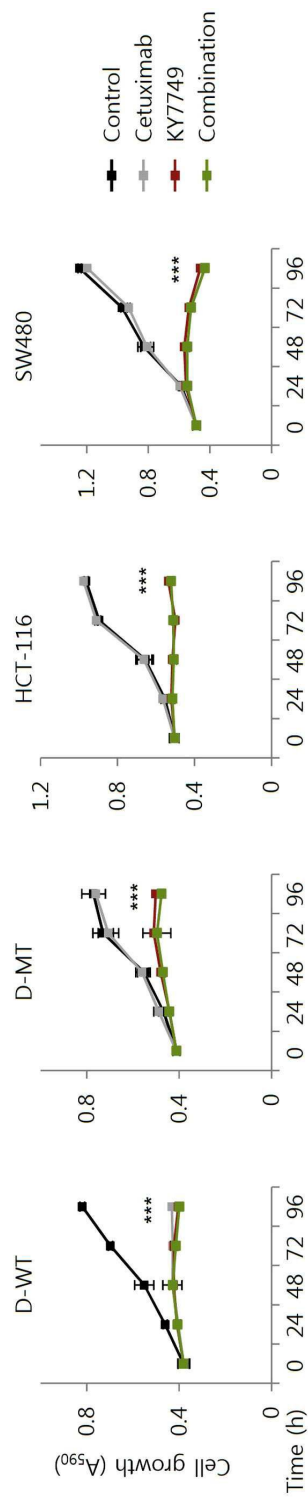
도면29



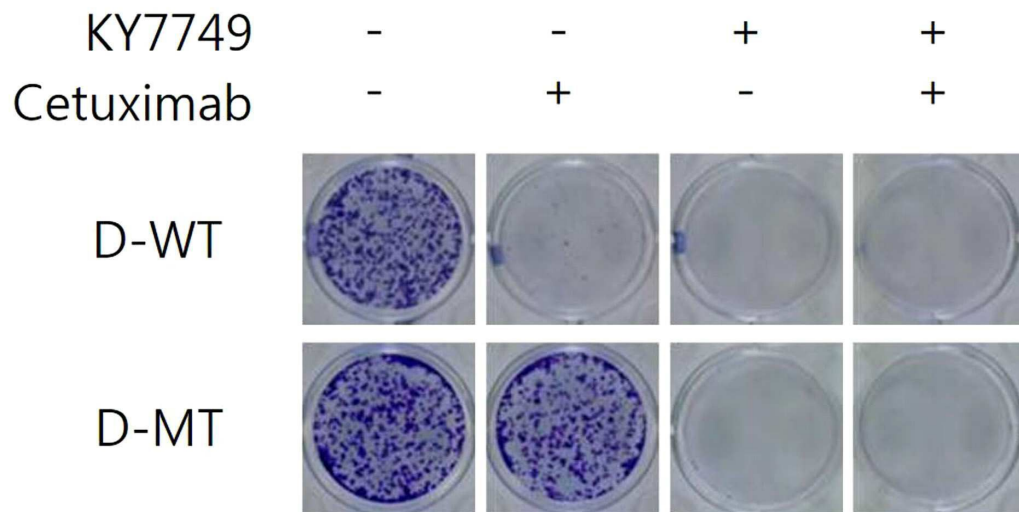
도면30



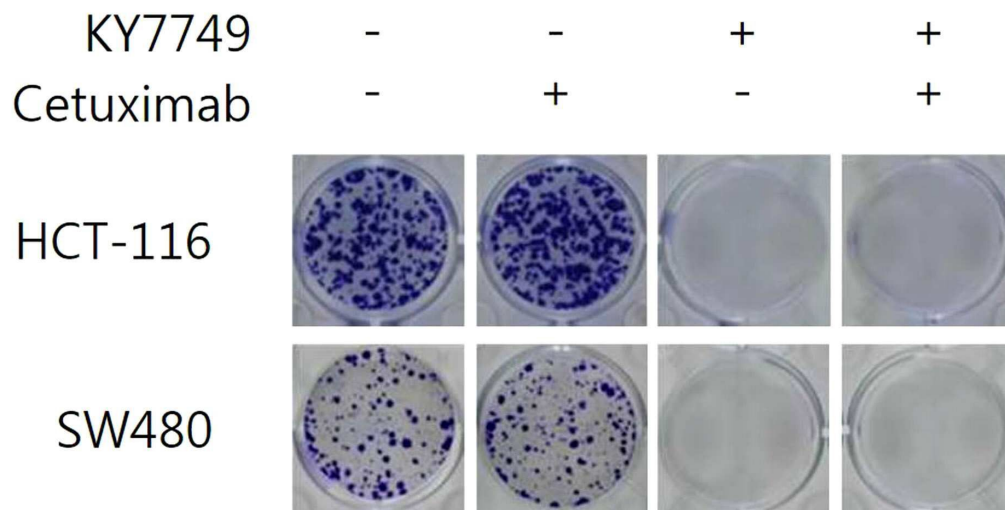
도면31



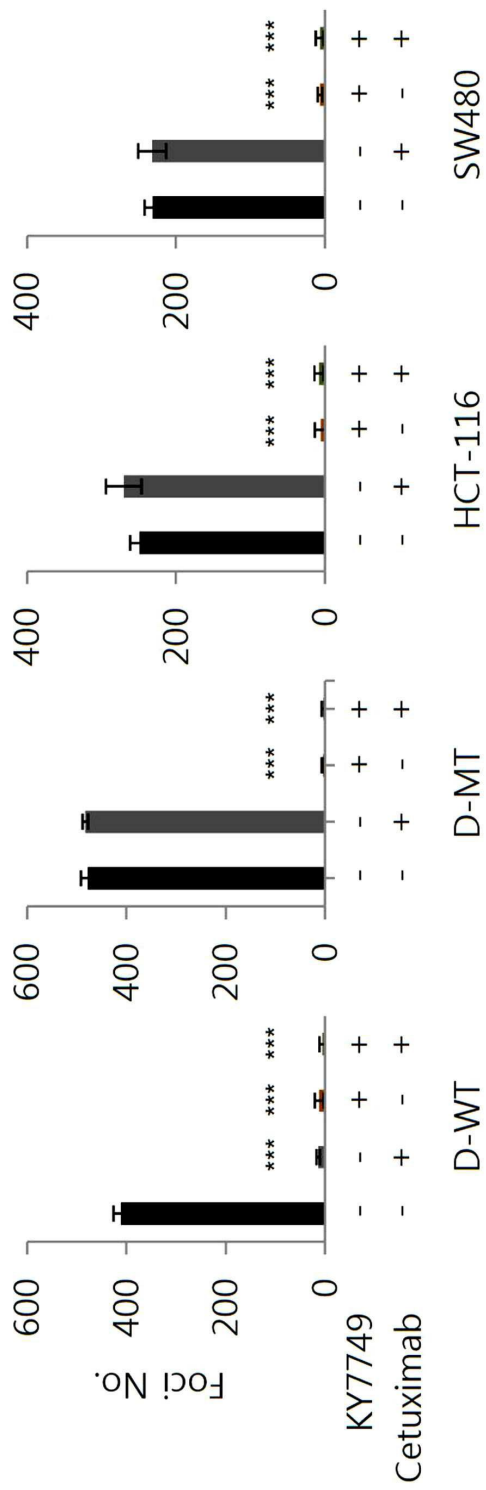
도면32



도면33



도면34



도면35

