



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0057502  
(43) 공개일자 2010년05월31일

(51) Int. Cl.

C07C 317/32 (2006.01) C07C 317/24 (2006.01)  
A61K 31/10 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0111710

(22) 출원일자 2009년11월18일

심사청구일자 2009년11월18일

(30) 우선권주장

1020080116343 2008년11월21일 대한민국(KR)

(뒷면에 계속)

(71) 출원인

부산대학교 산학협력단

부산 금정구 장전동 산30 부산대학교 내

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 궁동 220번지 충남대학교

(72) 발명자

박범준

부산광역시 금정구 부곡동 대우아파트 113동 1103호

하남출

부산광역시 금정구 부곡3동 SK아파트 108동 2201호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

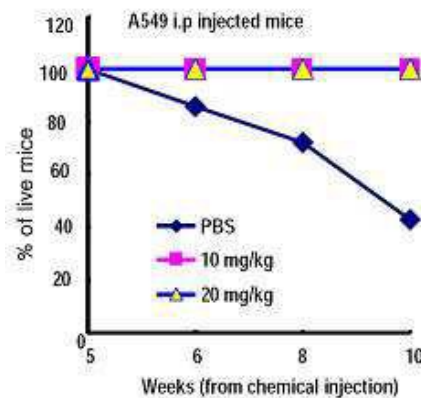
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 스네일-p53 간의 결합을 저해하는 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암질환 치료제

(57) 요약

본 발명은 스네일-p53 간의 결합을 저해하는 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암질환 치료제에 관한 것으로, 상기 스네일-p53 간의 결합 저해제는 K-Ras 돌연변이 세포주에서 p53의 발현을 유도함으로써 췌장암, 폐암, 담관암 및 대장암과 같이 진단이나 치료가 용이하지 않은 K-Ras 돌연변이성 암질환을 효과적으로 치료하거나 예방할 수 있다.

대표도 - 도24



(72) 발명자

**이선혜**

부산광역시 동래구 온천2동 화신아파트 2동 809호

**송규용**

대전광역시 중구 태평2동 삼부아파트4단지 412동  
101호

**이지현**

대전광역시 서구 만년동 초원아파트 108동 308호

(30) 우선권주장

1020090018956 2009년03월05일 대한민국(KR)

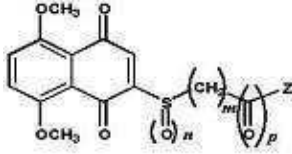
1020090075529 2009년08월17일 대한민국(KR)

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

m은 0 내지 10의 정수, n 및 p는 각각 0 또는 1의 정수이고,

Z는  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_q\text{CH}_3$ ,  $-\text{OH}$ , 4-페닐피페리딘기, 4-페닐피페라진기, 이소부틸아미노기 및 이소부틸옥시기로 이루어진 군에서 선택되며, q는 0 내지 9의 정수임.

**청구항 2**

청구항 1에 있어서, 상기 화합물은 2-노닐아미노-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논; 2-데실아미노-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논; 3-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소나프탈렌-2-일티오)프로판오익 엑시드; 11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드로나프탈렌-2-일티오)운데카노익 엑시드; 이소부틸-11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드록시나프탈렌-2-일티오)-운데카노에트; 11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드로나프탈렌-2-일티오)-N-이소부틸 운데칸아마이드; 및 이소부틸 11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드로나프탈렌-2-일설피닐) 운데카노에이트로 이루어진 군에서 선택된 화합물 또는 그의 염.

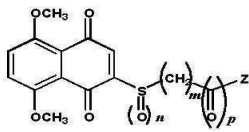
**청구항 3**

스네일-p53 간의 결합을 저해하는 화합물을 유효성분으로 함유하는 암질환 치료제.

**청구항 4**

청구항 3에 있어서, 상기 화합물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염인 암질환 치료제:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서,

m은 0 내지 10의 정수, n 및 p는 각각 0 또는 1의 정수이고,

Z는  $-\text{NH}(\text{CH}_2)_q\text{CH}_3$ ,  $-\text{OH}$ , 4-페닐피페리딘기, 4-페닐피페라진기, 이소부틸아미노기 및 이소부틸옥시기로 이루어진 군에서 선택되며, q는 0 내지 9의 정수임.

**청구항 5**

청구항 3 또는 청구항 4에 있어서, 상기 암질환은 K-Ras 돌연변이성 암질환인 암질환 치료제.

**청구항 6**

청구항 5에 있어서, 상기 K-Ras 돌연변이성 암질환은 췌장암, 폐암, 담관암 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 암질환 치료제.

**청구항 7**

p53을 고정시킨 플레이트에 스네일 및 후보약물을 배양하는 단계; 및  
 ELISA 리더로 스네일-p53의 결합을 저해하는 후보약물을 선별하는 단계  
 를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 K-Ras 돌연변이성 암질환의 치료제 스크리닝 방법.

**청구항 8**

p53의 DNA 결합 도메인의 엔도사이토시스(endocytosis)를 이용하여 전달하고자 하는 약물을 K-Ras 돌연변이 세포에 특이적으로 전달하는 것을 특징으로 하는, K-Ras 돌연변이 세포 특이적 약물전달방법.

**청구항 9**

청구항 8에 있어서, 상기 DNA 결합 도메인은 인간 p53의 90번째부터 280번째까지의 아미노산 서열을 포함하는, K-Ras 돌연변이 세포 특이적 약물전달방법.

**청구항 10**

청구항 8 또는 청구항 9에 있어서, 상기 약물전달방법은 p53의 DNA 결합 도메인 및 전달하고자 하는 약물을 함께 세포에 처리하는 단계; 및 상기 p53의 DNA 결합 도메인에 의한 엔도사이토시스(endocytosis)에 의해 이웃한 K-Ras 돌연변이 세포에 약물이 전달되는 단계를 포함하여 이루어지는, K-Ras 돌연변이 세포 특이적 약물전달방법.

**청구항 11**

스네일 항체의 발현 유무를 측정하는 것을 특징으로 하는, K-Ras 돌연변이성 암질환의 초기진단방법.

**청구항 12**

청구항 11에 있어서, 상기 스네일 항체의 발현은 K-Ras 돌연변이성 암질환을 지닌 환자의 혈청에서 측정하는, K-Ras 돌연변이성 암질환의 초기진단방법.

**청구항 13**

청구항 11 또는 청구항 12에 있어서, 상기 K-Ras 돌연변이성 암질환은 췌장암, 폐암, 담관암 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인, K-Ras 돌연변이성 암질환의 초기진단방법.

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 스네일-p53 간의 결합을 저해하여 p53의 발현을 유도함으로써 췌장암, 폐암, 담관암 및 대장암과 같은 K-Ras 돌연변이성 암질환 치료에 유용하게 사용될 수 있는 스네일-p53 간의 결합을 저해하는 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암질환 치료제에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 항암제 및 진단기술의 개선에 의해 전체 암환자의 5년 생존율이 50% 증가되었다. 그러나, 어떤 종류의 암질환, 예를들어 폐암과 췌장암은 여전히 10% 이하의 낮은 생존율을 나타내고 있다. 따라서, 이러한 환자들의 생존율을 증가시키기 위하여 이러한 질환의 초기진단방법의 개발이 시급한 실정이다. 흥미로운 것은 이러한 유형의 암들은 K-Ras에서 흔히 변화를 보였다. 특히, 발암성 K-Ras는 5% 이하의 생존율을 나타내는 췌장암에서 압도적으로 우세한 경향을 나타내고 있다.

[0003] 발암성 Ras는 p53 활성화를 통한 노화 및 연이은 세포사를 유도한다고 알려져 있고, 발암성 Ras 매개 종양 형성은 p53 결핍 조건 하에서 일어날 것으로 추정되고 있으며, 특히 H-Ras 유도 간암세포종은 재빨리 활성화된 p53에 의해 억제되었다.

[0004] 현재 사용되고 있는 폐암, 췌장암 등의 치료제는 약물 효과의 지속시간이 짧은 반면, 다양한 부작용이 유발되므

로, 이러한 질환들을 효과적으로 치료하거나 초기 진단할 수 있는 약물의 개발이 시급한 실정이다.

**발명의 내용**

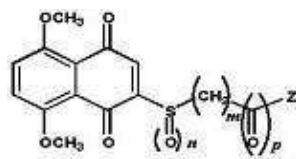
**해결 하고자하는 과제**

- [0005] 본 발명자는 발암성 K-Ras가 스네일의 유도를 통해 p53을 억제함을 밝혔으며, p53 및 스네일 간의 상호작용을 차단할 수 있는 화합물을 동정하였고, 이러한 화합물이 K-Ras 돌연변이 세포주에서 p53 발현을 유도하는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [0006] 이에, 본 발명의 목적은 스네일-p53의 결합을 저해하는 후보약물을 선별하는 단계를 포함하는 K-Ras 돌연변이성 암질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0007] 또한, 본 발명의 다른 목적은 스네일-p53 간의 결합을 저해하는 화합물 및 이를 유효성분으로 함유하는 암질환 치료제를 제공하는 데에 있다.
- [0008] 또한, 본 발명자는 p53의 특정영역 예를들어 DNA 결합 도메인은 K-Ras 돌연변이 세포에서의 투과성이 증가되므로, 이를 담체로 이용하여 K-Ras 돌연변이 세포에 특이적으로 약물을 전달할 수 있다는 점을 밝혔으며, 또한 스네일의 자동항체 발현 유무를 측정하여 K-Ras 돌연변이성 암질환 예를들어, 췌장암, 폐암, 담관암, 대장암 등을 초기에 진단할 수 있다는 점을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 이에, 본 발명의 또다른 목적은 p53의 DNA 결합 도메인의 엔도사이토시스를 이용하여 K-Ras 돌연변이 세포에 특이적으로 약물을 전달할 수 있는 약물전달방법을 제공하는 데에 있다.
- [0010] 또한, 본 발명의 또다른 목적은 스네일 자동항체의 발현 유무를 측정하여 K-Ras 돌연변이성 암질환을 진단할 수 있는 초기진단방법을 제공하는 데에 있다.

**과제 해결수단**

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 p53을 고정시킨 플레이트에 스네일 및 후보약물을 배양하는 단계; 및 ELISA 리더로 스네일-p53의 결합을 저해하는 후보약물을 선별하는 단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 K-Ras 돌연변이성 암질환의 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염을 제공한다:

**화학식 1**



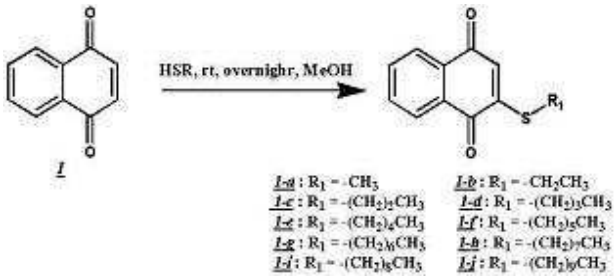
- [0013] 상기 화학식 1에서,
- [0014] m은 0 내지 10의 정수, n 및 p는 각각 0 또는 1의 정수이고,
- [0015] Z는 -NH(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>CH<sub>3</sub>, -OH, 4-페닐피페리딘기, 4-페닐피페라진기, 이소부틸아미노기 및 이소부틸옥시기로 이루어진 군에서 선택되며, q는 0 내지 9의 정수이다.
- [0017] 보다 바람직하게는, 상기 화합물은 2-노닐아미노-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논; 2-데실아미노-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논; 3-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소나프탈렌-2-일티오)프로판오익 엑시드; 11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드로나프탈렌-2-일티오)운데카노익 엑시드; 이소부틸-11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드록시나프탈렌-2-일티오)-운데카노에트; 11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드로나프탈렌-2-일티오)-N-이소부틸 운데칸아마이드; 및 이소부틸 11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드로나프탈렌-2-일설피닐) 운데카노에이트로 이루어진 군에서 선택된 화합물 또는 그의 염일 수 있다.
- [0018] 상기 화학식 1 화합물은 상기 K-Ras 돌연변이성 암질환의 치료제 스크리닝 방법을 이용하면 스네일-p53의 결합을 저해하는 약물을 특이적으로 선별할 수 있어 췌장암, 폐암 및 대장암과 같이 진단이나 치료가 용이하지 않은

K-Ras 돌연변이성 암 질환을 효과적으로 치료하거나 예방할 수 있다.

[0019] 하나의 구체적 양태로서, 상기 화학식 1 화합물은 염의 형태로 존재할 수 있다. 상기 염은 염산 또는 황산 등과 같은 무기산, 또는 p-톨루엔술폰산 등과 같은 유기산의 약제학적으로 허용가능한 염일 수 있다.

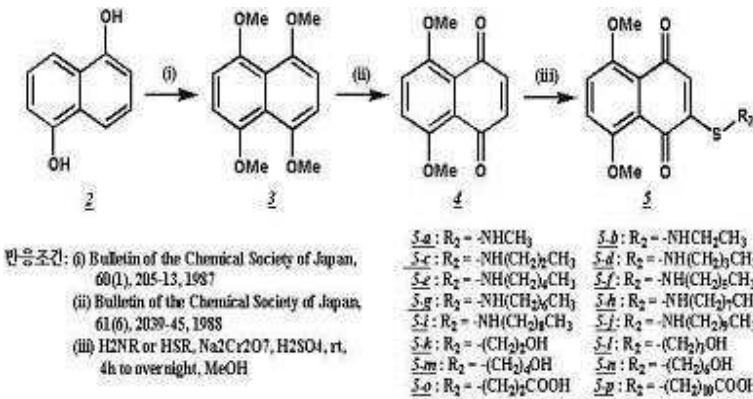
[0020] 상기 화학식 1 화합물은 하기 반응식 1 내지 5와 같은 방법으로 제조될 수 있다.

**반응식 1**



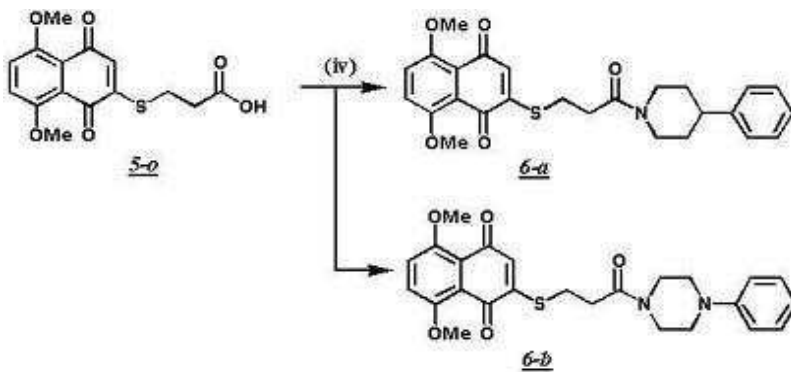
[0021]

**반응식 2**



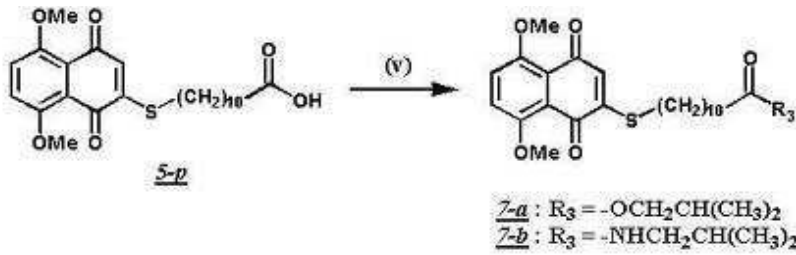
[0022]

**반응식 3**



[0023]

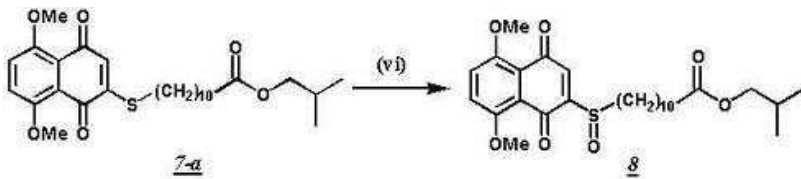
반응식 4



반응조건: (v) EDC, *i*-butylalcohol or *i*-butylamine, rt, overnight,  $\text{CHCl}_3$

[0024]

반응식 5



반응조건: (vi) M-CPBA, rt, 2h,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

[0025]

반응식 2의 공정을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

[0026]

1,5-디하이드록시나프탈렌(2)을 출발물질로 이용하여 이미 알려진 3단계의 반응을 거쳐 1,4,5,8-테트라메톡시나프탈렌(3)을 합성하였고 다시 탈메틸화하여 합성중간체인 5,8-디메톡시-1,4-나프토크논(4)을 합성하였다. 자세한 합성방법은 합성 스킴에 있는 참고문헌에서 볼 수 있는데 이때 사용된 용매는 반응에 악영향을 미치지 않는 용매인 소듐하이드록사이드, 아세트니트릴, 무수메탄올, *N,N*-디메틸포름아미드, 클로로포름 등을 사용하였다. 처음의 메틸화 반응은 질소가스 존재하에서 수산화나트륨에 녹인 1,5-디하이드록시나프탈렌에 디메틸 설페이트를 1시간 동안 적가하여 2시간 반응시켜 얻었다. 나중에 벤젠으로 재결정해서 1,5-디메톡시나프탈렌을 얻었다.

[0027]

1,4,5,8-테트라메톡시나프탈렌(3)을 합성할 때는 무수조건에서 소디움메톡시드와 요오드화 구리를 디메틸포름아미드와 메탄올을 넣고 30시간 가열환류하여 얻었다. 반응에 대한 온도는 80°C 이상으로 하여 계속 환류시켰다. 중간체 5,8-디메톡시-1,4-나프토크논을 합성할 때는 질산세리움디암모늄을 사용하였는데 실온에서 30분간 적가하고 30분간 더 반응시켜 얻었다. 화합물 5a 내지 5p는 중간체 5,8-디메톡시-1,4-나프토크논(4)을 메탄올에 녹이고 얻고자 하는 아민이나 메르캡탄 또는 말단에 카복실기나 하이드록실기가 붙은 메르캡탄을 넣고 실온에서 4시간에서 하룻밤을 교반하여 TLC로 반응진행상황을 확인하고 황산과 증크롬산염나트륨수용액으로 워크업시키고 실리카겔 컬럼크로마토그래피로 분리하여 얻었다.

[0028]

다음 단계에서 화합물 5o의 2번 위치 카복실기에 4-페닐피페리딘 또는 4-페닐피페라진 유도체를 붙일 때는 1,3-디사이클로헥실카보디이미드(DCC)와 *N,N*-디메틸아미노피리딘(DMAP)보다는 *N*-(3-디메틸아미노프로필)-*N'*-에틸카보디이미드 하이드로 클로라이드(EDC)를 넣고 반응시킴으로써 화합물 6a와 6b를 합성할 수 있으며, 상기 반응은 수율도 높았고 분리과정에 우레아가 없이 깨끗하게 분리할 수 있다. 다음 단계로 화합물 5p를 이용하여 아이소부틸알콜과 아이소부틸아민을 붙일 때에도 역시 *N*-(3-디메틸아미노프로필)-*N'*-에틸카보디이미드하이드로클로라이드(EDC)를 써서 얻고자 했던 화합물 7a, 7b를 쉽게 얻을 수 있다. 설폭사이드 화합물 8을 합성할 때에는 화합물 7a를 이용하여 MCPBA를 쓰고 TLC로 반응 상황을 확인하면서 합성할 수 있다. 마지막에 중탄산나트륨으로 반응을 중지시키고 실리카겔 컬럼을 걸어서 정제된 화합물 7a를 얻을 수 있다.

[0029]

그러나 상기 반응식 2 내지 5에 따른 방법은 화학식 1 화합물 제조방법의 일례에 해당하며, 예를 들어 반응용매, 염기, 반응물질의 사용량과 같은 반응 조건들이 상기에서 설명된 것으로만 한정되는 것은 아니며, 상기 반응식 2 내지 5의 방법 외에도 당업계에서 통상의 지식을 가진 기술자에게 알려진 공지된 다양한 합성방법을 이용하여 상기 화학식 1의 화합물을 제조할 수 있다.

[0030]

또한, 본 발명은 스네일-p53 간의 결합을 저해하는 화합물을 유효성분으로 함유하는 암질환 치료제를 제공한다.

[0031]

상기 화합물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 염일 수 있고, 보다 바람직하게는, 2-노닐아미노-

[0032]



5,8-디메톡시-1,4-나프토크논; 2-테실아미노-5,8-디메톡시-1,4-나프토크논; 3-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소나프탈렌-2-일티오)프로판오익 엑시드; 11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드로나프탈렌-2-일티오)운데카노익 엑시드; 이소부틸-11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드록시나프탈렌-2-일티오)-운데카노에트; 11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드로나프탈렌-2-일티오)-N-이소부틸 운데칸아마이드; 및 이소부틸 11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드로나프탈렌-2-일설피닐) 운데카노에이트로 이루어진 군에서 선택된 화합물 또는 그의 염일 수 있다.

- [0033] 상기 암질환은 K-Ras 돌연변이성 암질환이며, 바람직하게는 췌장암, 폐암, 담관암 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택된 암질환일 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따른 암질환 치료제는 약학조성물 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 사용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [0036] 상기 암질환 치료제는, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0037] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다.
- [0038] 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0039] 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 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0040] 상기 암질환 치료제의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.
- [0041] 또한, 이러한 암질환 치료제의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0042] 상기 암질환 치료제는 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.
- [0043] 또한, 본 발명은 p53의 DNA 결합 도메인의 엔도사이토시스(endocytosis)를 이용하여 전달하고자 하는 약물을 K-Ras 돌연변이 세포에 특이적으로 전달하는 것을 특징으로 하는, K-Ras 돌연변이 세포 특이적 약물전달방법을 제공한다.
- [0044] 상기 DNA 결합 도메인은 인간 p53(Genbank Accession No. P04637)의 90번째부터 280번째까지의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0045] 바람직하게는, 상기 약물전달방법은 p53의 DNA 결합 도메인 및 전달하고자 하는 약물을 함께 세포에 처리하는 단계; 및 상기 p53의 DNA 결합 도메인에 의한 엔도사이토시스(endocytosis)에 의해 이웃한 K-Ras 돌연변이 세포에 약물이 전달되는 단계를 포함하여 이루어질 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명은 스네일 항체의 발현 유무를 측정하는 것을 특징으로 하는, K-Ras 돌연변이성 암질환의 초기진단방법을 제공한다.



[0047] 상기 스네일 항체의 발현은 K-Ras 돌연변이성 암질환을 지닌 환자의 혈청에서 측정할 수 있으며, K-Ras 돌연변이성 암질환은 췌장암, 폐암, 담관암 및 대장암으로 이루어진 군에서 선택된 암질환일 수 있다.

**효과**

[0048] 본 발명에 따른 K-Ras 돌연변이성 암질환의 치료제 스크리닝 방법을 이용하면 스네일-p53 간의 결합을 저해하는 약물을 특이적으로 선별할 수 있어 췌장암, 폐암, 담관암 및 대장암 등과 같이 진단이나 치료가 용이하지 않은 K-Ras 돌연변이성 암질환을 효과적으로 치료하거나 예방할 수 있다.

[0049] 또한, p53의 DNA 결합 도메인을 담체로 이용하여 K-Ras 돌연변이 세포에 특이적으로 약물을 전달할 수 있어 K-Ras 돌연변이성 암질환의 치료에 매우 유용하며, 스네일의 자동항체 발현 유무를 측정하여 K-Ras 돌연변이에 의해 유발되는 암질환을 초기에 진단할 수 있어 진단이 곤란한 췌장암 등의 조기진단이 가능하여 암환자의 생존율을 연장시키거나 치료에 효율적으로 대처할 수 있다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

[0050] 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 하기에 제시한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[스네일 매개 p53 억제에 관한 분자적 기전 고찰]

<실시예 1>

1. 마우스 섬유아세포 분리 및 무한분열

[0054] 6개월령 수컷 마우스를 희생시켜 폐 섬유아세포(fibroblast)를 모았다. 폐를 분리한 후, 조직 매스를 이용하여 조직을 자르고 용출하였다. 20% FBS를 함유한 DMEM 배지에서 3일 동안 배양한 후, 부착된 세포를 배양접시에 분주하고 jetpei를 이용하여 제조자의 지침에 따라 돌연변이 H-Ras, N-Ras 및 K-Ras로 형질감염 시켰다. 72시간 후, DMEM 함유 G418 400µg/ml를 이용하여 형질감염된 세포를 선별하였다.

2. 세포 배양 및 시약 준비

[0056] 본 발명에서 사용한 세포주는 ATCC로부터 구입하였고 10% FBS를 함유한 RPMI-1640 또는 DMEM에서 유지되었다. 또, 사용된 항체는 Santa Cruz 또는 Cell Signaling (p53-R, P-Erk)으로부터 구매하였다. Ras 발현벡터 및 Snail 벡터는 각각 Dr. Chi SG 및 Hung M-C로부터 제공받았다. p53 S46D 및 46A는 Mayo LD로부터 제공받았다. 또, 본 발명에서 사용된 화학물질은 Calbiochem으로부터 구매하였고, 제조합 p53은 Assay designs으로부터 구매하였다.

[0057] 또, 세포분획 분석은 Subcell fraction Kit(Merck)를 이용하여 제조자의 지침에 따라 수행하였다. 배지 분석을 위해, 세포 배양된 배지를 모아 Centricon(Millipore) 또는 EtOH 침강을 이용하여 농축하였다.

3. 면역염색 및 웨스턴블롯

[0059] 세포 염색을 위해, 앞서 배양된 세포를 세정하고 100% 메탄올로 고정하며, 항체(제1차 항체; 1:200, 4°C에서 밤새도록, 제2차 항체; 1:1000, 실온에서 2시간)로 배양하였다. 분비된 p53 및 Snail를 측정하기 위하여, HCT116 p53<sup>-/-</sup> 세포를 1mL RPMI 1640 배지에서 24시간 동안 벡터로 형질감염시키고, 세정없이 2% PFA 1mL를 가하여 고정시켰다. 고정 후, 세포를 PBS로 2회 세정하고 블로킹 완충액 [PBS + 항인간 Ab(1:500)]으로 배양하여 비특이적 결합을 제거하였다. PBS 세정 후, 세포를 항-p53 Ab 및 항-Snail Ab와 배양하여 제2차 Ab와 매칭하였다. 단백질 분석을 위해, RIPA 완충액으로 단백질을 추출하고 SDS-PAGE에 시료를 적용하고 일반적인 웨스턴블롯(WB) 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0060] 면역침강 분석은 일반적인 프로토콜에 따라 수행되었다. 즉, 세포 용출물을 4시간 동안 Ab와 먼저 배양하고, 단백질-A/G-아가로스 2시간 동안 배양하였다. 원심분리 후 3회 세정하였다. 침강된 복합체를 이용하여 SDS-PAGE/WB 분석을 수행하였다.

4. 형질감염 및 si-RNA 효과 검토

[0062] 세포 형질감염을 위해, 제조자의 프로토콜에 따라 Jetpei를 이용하였다. 세포를 완전 배지에서 24시간 동안 DNA/jetpei 혼합물로 배양하였다. 생체의 유전자 녹아웃을 위해, Snail 및 MDM2에 대한 si-RNA를 만들었다.

jetpei를 이용하여 si-RNA를 형질감염시키고 24시간 후 그 효과를 검토하였다.

[0063] 5. 실험결과

[0064] 도 1A에 도시된 바와 같이, N-Ras 또는 H-Ras의 형질감염이 아팍토시스 또는 노화를 유도하였으나, K-Ras로 형질감염된 세포는 6개월이 경과되어도 계속 성장하고 유지되었다.

[0065] 또, 발암성 K-Ras의 강제 발현이 야생형 p53-함유 세포주에서 p53 발현을 억제하였고(도 2A 참조), K-Ras는 N-Ras 또는 H-Ras와 달리 p53 억제를 야기하고 이는 si-MDM2에 의해 차단되지 않았다(도 2B 참조). 그러나, 야생형 K-Ras는 p53 발현을 억제하지 않았다(도 2C 및 도 2D 참조).

[0066] 도 1B에 도시된 바와 같이, 이러한 p53은 K-Ras 농도의존적으로 억제되었다. DN-Rase에 의한 Ras 활성의 차단이 K-Ras 돌연변이 A549에서 p53 발현을 증가시켰지만 HepG2에서는 증가시키지 않았다(도 2E).

[0067] 상기 결과를 종합하면, 내인성 발암성 K-Ras가 p53 발현을 억제함을 시사한다. 그러나, 도 1C와 같이 DN-Rase가 DNA 손상-매개 p53 억제에 관해 명확하고 상가적인 효과를 관찰할 수 없었고, 이는 강한 유전독성 스트레스가 발암성 K-Ras 매개 p53 억제를 극복할 수 있음을 시사한다.

[0068] 도 2F 및 도 2G에 도시된 바와 같이, K-Ras 매개 p53 억제가 점돌연변이 p53에서 확인되었지만, p53 활성형인 p53 S46D는 K-Ras 매개 p53 억제에 저항성을 나타내었다. 이러한 결과는 유전독성 유도성 p53 활성화가 K-Ras 매개 억제를 극복할 수 있다는 도 1C의 결과와도 일치한다.

[0069] 22/23 돌연변이가 MDM2와 관련되지 않기 때문에 K-Ras 매개 p53 억제는 MDM2와 독립적인 경로로 수행됨을 확인할 수 있었고, 프로테아좀-저해제가 K-Ras 매개 p53을 차단하지 못하였기 때문에 MDM2 또는 p53 유비퀀틴 시스템과 무관함을 알 수 있었다(도 1A 및 도 2H 참조).

[0070] 또, K-Ras 매개 p53 억제에 대한 MAPK 신호 저해제의 효과를 검토한 결과, MAPK 경로 차단이 K-Ras 매개 p53 억제에 관한 효과를 없애지 못하였다. 이러한 결과로부터 K-Ras 매개 p53 억제는 다른 신규 경로로 수행될 것으로 판단된다.

[0071] 또한, 불용성 분획에서 스네일에 의한 p53의 분포를 검토한 결과, 도 12A와 같이 p53은 스네일 또는 발암성 K-Ras에 의해 감소되었고, 세포를 4개의 분획 즉, 핵, 세포질, 막/기관 및 불용성 분획으로 나누어 검토한 결과, 도 12B와 같이 스네일에 의해 감소된 p53은 어떤 세포분획에서도 회복되지 않았다.

[0072] 또한, K-Ras 돌연변이 세포에서 스네일의 제거가 si-MDM2보다 압도적으로 p53을 유도하였다(도 12C). 그리고, 도 12D 및 도 12E와 같이 스네일에 의한 p53의 감소는 MDM2-매개 억제와 달리 프로테아좀 저해제에 의해 회복되지 않았다.

[0073] <실시에 2>

[0074] 1. 웨스턴 블롯 및 생체의 카이네이즈 또는 바인딩 분석

[0075] Snail 및 p53 간의 직접 결합을 검토하기 위하여, 전형적인 SDS-PAGE 및 겔이동 방식을 통해 재조합 p53 또는 Snail 또는 p53 형질감염된 세포 용출물로 로딩된 멤브레인을 준비하였다. 5% 비지방 건조유로 블로킹한 후, 멤브레인을 p53 또는 Snail 형질감염된 p53<sup>-/-</sup> HCT116 세포 용출물로 4°C에서 4시간 동안 배양하였다. 세정 후, 멤브레인을 p53 Ab 또는 Snail Ab를 이용하여 전형적인 WB 절차를 진행하였다.

[0076] 인비트로 결합을 위하여, 재결합 p53 및 GST-Snail을 교대로 4°C에서 1시간 동안 배양하고, p53 Ab 또는 GST Ab를 지닌 IP 및 GST 또는 p53 Ab를 지닌 WB를 수행하였다. Snail의 변형을 조사하기 위하여, 293 세포를 형질감염을 위해 사용하였다. 프랙션 또는 라이시스 후, 용출물을 GST 또는 GST-Snail로 25°C에서 1시간 동안 배양하고, SDS-PAGE 및 WB 분석을 수행하였다. p-MAPK 및 p-ATM/ATR 기질에 대한 항체를 cell signaling으로부터 구입하였다.

[0077] 2. 실험결과

[0078] 도 3A에 도시된 바와 같이, 스네일 발현에 대한 K-Ras의 효과를 검토한 결과, 스네일이 K-Ras에 의해 유도될 수 있음을 관찰하였다. 또한, 세포주에서 p53 발현에 대한 스네일의 효과를 검토한 결과, 도 3B와 같이 스네일의 과발현이 A549 및 HepG2 세포주에서 p53을 억제할 수 있는 반면, 스네일 녹다운이 A549(발암성 K-Ras 함유 세포주)에서만 p53을 유도할 뿐 HepG2에서는 유도하지 못하였다.

- [0079] 또, si-스네일이 DNA 손상 약제에 대해 민감성을 증가시켰고(도 4F), 따라서 스네일의 과발현이 세포 증식을 증진시키고 DNA 손상 유도성 세포사에 저항성을 나타내었다(도 4G).
- [0080] 도 3C와 같이 스네일은 K-Ras와 유사하게 endo-p53 뿐 아니라 exo-p53을 억제하였고, 도 3D 내지 도 3F와 같이 스네일과 p53을 함께 형질감염시켰을 때 돌연변이 p53과 상관없이 스네일 및 p53 모두 감소되었다. 그러나, 스네일 및 p53의 mRNA는 감소되지 않았다(도 3C 및 도 3D). 또한, p53 전사물에 대한 스네일의 효과를 검토한 결과, 스네일은 p53 mRNA를 감소시키지 않았다(도 4H).
- [0081] 따라서, p53 및 스네일은 비록 잘 알려진 전사 조절제일지라도 이들의 감소는 전사 조절과 무관하다는 것을 시사한다. 또한, 도 3G 및 도 3H와 같이 스네일의 제거가 K-Ras 매개 p53 억제를 차단할 수 있다. 또한, 도 5A 및 도 5B와 같이 exo-p53에서도 유사한 결과를 얻었다. 이러한 결과로부터 K-Ras 매개 p53 억제는 스네일 유도를 통해 얻어짐을 알 수 있다.
- [0082] 또한, 도 5C와 같이 발암성 K-Ras는 4시간 이내에 p53을 유도하는 반면, p53은 6시간 후 감소되었고, 이는 p53 억제가 형질감염의 인위적 결과가 아니라 형질감염된 단백질의 효과임을 나타낸다.
- [0083] 또한, 도 5E와 같이 K-Ras/스네일 형질감염된 세포에서 아팜토시스 및 세포주기를 검토하였고, 아팜토시스 및 세포주기 저해는 K-Ras/스네일에 의해 뚜렷하게 유도되지 않았다.
- [0084] 또한, Aphidicolin 처리 세포에서 K-Ras/스네일에 의해 p53의 감소가 관찰되어 p53의 감소는 세포주기와는 관련되지 않은 것으로 판단된다.
- [0085] 또한, CHX-pulse chase를 통해 p53의 반감기에 대한 스네일의 효과를 검토하였고, 도 5F와 같이 스네일은 p53 반감기를 단축시키지 않았다. 그리고, p53 S46D의 발현에 대한 스네일의 효과를 검토하였고, 도 6A와 같이 스네일이 K-Ras와 달리 p53 S46D 발현을 억제하였다.
- [0086] 또한, 스네일 발현에 대한 p53 S46D의 효과를 검토한 결과, 도 6B와 같이 S46D가 전사 및 번역 수준에서 스네일 발현을 억제하였다. 따라서, si-스네일이 p53 억제를 회복시킬 수 있는 야생형 p53과 달리, 도 6C와 같이 S46D로 형질감염될 경우에는 si-스네일이 p53 발현을 유도하지 못하였다.
- [0087] 이러한 결과로부터 어떤 스트레스 조건 하에서 세린 46 잔기에서 변형에 의해 활성화된 p53은 스네일 전사물의 억제를 통해 K-Ras 매개 억제 기전을 극복할 수 있다.
- [0088] 또한, 스네일 유도가 ATR을 통해 이루어졌다.
- [0089] K-Ras가 스네일을 어떻게 유도하는지를 검증하기 위하여, AKT의 관련성을 검토하였다. Ras는 AKT를 활성화하여 GSK-3 $\beta$  매개 스네일 불안정성을 억제할 수 있다고 알려져 있다.
- [0090] 그러나, 도 7A와 같이 AKT-KD는 스네일 또는 K-Ras 유도 p53 억제를 차단하지 못하였다. 한편, 도 7B와 같이 si-RNA를 통한 ATR의 억제가 p53 억제를 차단하였다. 또한, 도 7C 및 도 7D와 같이 스네일은 ATR 처리에 의해 증가되지만 ATM 및 노코다졸 처리에 의해서는 증가되지 않았다. 도 6D와 같이 인비트로 카이네이즈 분석에서 스네일은 ATR에 의해 인산화되었다. ATR을 활성화시키는 것으로 알려진 K-Ras는 도 7E와 같이 p-스네일을 ATR-의존성 방식과 동일하게 증가시켰고, 도 7F와 같이 스네일의 반감기를 연장시켰다.
- [0091] <실시예 3>
- [0092] 1. 재조합 단백질 및 GST-pull down 분석
- [0093] 3개의 인간 snail 단편(잔기 1-90, 91-112 및 113-264) 및 p53 단편(1-93 및 93-292)을 GST-융합 단백질로서 대장균에서 발현하였다. 각 단편을 GSH-아가로오스에 로딩하고, 세정한 후, 20mM 환원 글루타치온을 함유한 완충액을 이용하여 용출하였다. 용출 분획을 음이온-교환크로마토그래피(Hi trapQ)를 이용하여 정제하였다. 재조합 인간 p53 단백질(잔기 94-292)을 벡터 pET28A를 이용하여 대장균에서 발현시켰다. 상기 벡터 pET28A는 C말단에 헥사-히스티딘 태그를 함유하였다.
- [0094] Ni-NTA 친화력 및 크기 배제 크로마토그래피(Superdex 200)를 이용하여 p53 단백질을 정제하였다. p53 및 Snail 간의 직접 결합을 검토하기 위하여, 아가로오스-비드 접합 GST 또는 GST-Snail을 4°C에서 45분 동안 RIPA에서 세포 용출물 또는 His-p53과 배양하였다. PBS 및 RIPA로 세정한 후, 침전된 단백질을 SDS-PAGE 및 WB를 수행하였다.
- [0095] 2. 실험결과

- [0096] 스네일은 핵 단백질이기 때문에, 스네일 및 p53을 함께 형질감염시켰을 때 스네일 및 p53이 모두 없어졌다(도 3D 내지 도 3F 참조). 도 8A와 같이, endo-IP로부터 이들 단백질이 서로 관련됨을 알 수 있었다. 도 8B 및 도 8C와 같이 Far-western blot 분석 및 GST-pull down 분석을 통해 스네일 및 p53이 서로 직접적으로 상호작용을 함을 알 수 있었다. 또, p53의 DNA 결합 도메인 및 스네일의 중간 영역이 결합 도메인으로서 역할을 수행하였다(도 8D 내지 8F, 도 6E, 도 6F 참조).
- [0097] <실시예 4>
- [0098] 1. 화학적 스크리닝을 위한 ELISA 시스템 제조
- [0099] Snail-p53 결합 저해제를 분리하기 위하여, ELISA 시스템을 제조하였다. 0.5% PFA를 이용하여 96웰 플레이트에 His-p53(93-292)을 고정시켰다. 건조하고 세정한 후, 0.1 μM 화학물질을 지닌 GST-Snail로 배양하였다. 1시간 배양 후, 96웰 플레이트를 TBST로 세정하고 항-GST-Ab(1:10000, 45분) 및 항-마우스-IgG-HRP(1:50000, 30분)로 배양하였다. 2회 세정 후, 플레이트를 TMB 용액 및 정지 용액으로 배양하였다. ELISA 리더를 이용하여 측정하였다.
- [0100] 2. 실험결과
- [0101] 도 9A 및 도 9B와 같이, p53 및 스네일 간의 결합 억제를 ELISA 시스템으로 검토하였다. 도 9C와 같이, 150 여 개의 화학물질로부터 스네일 및 p53의 결합 저해제로 3개의 화학물질을 동정하였다. 도 10A 및 도 11A와 같이 이러한 화학물질은 농도의존적으로 스네일 및 p53 간의 결합을 억제하였다.
- [0102] GST-pull down 분석을 통해, 이러한 화합물 처리 후 p53 및 이의 표적의 발현을 검토하였고, 3개 화학물질이 모두 p53 및 스네일의 상호작용 발현을 억제하고, p53 발현을 유도하였다(도 8B 및 도 11B).
- [0103] 또한, 도 10C와 같이 이러한 화학물질 처리에 의해 PUMA 및 p21의 유도를 관찰할 수 있었다. 특히, p53의 유도가 K-Ras 돌연변이 세포에서만 검출되고 야생형 K-Ras 세포에서는 검출되지 않았다(도 10D). 퀴세틴 및 모린의 유사한 구조가 본 발명의 스크리닝 시스템의 신뢰성을 높여주었다(도 10E).
- [0104] 또한, 스네일 매개 p53 억제에 대한 화학물질의 효과를 검토하였고, 도 10E 및 도 10F와 같이 스네일의 공형질 감염에 의한 p53의 감소가 #3 및 #9에 의한 화학물질 처리에 의해 차단되었다. 이러한 결과로부터 p53-스네일의 상호작용의 차단이 p53 발현을 회복할 수 있다.
- [0105] 또한, 트립판 블루 염색을 이용하여 세포 증식에 대한 이들 화학물질의 효과를 검토하였다. A549에서 이들 화학물질들이 세포증식을 뚜렷히 억제한 반면, MKN45(K-Ras 야생형 세포)에 대한 항증식 효과를 나타내지 않았다(도 11C).
- [0106] 게다가, 페롤린산은 K-Ras 돌연변이 세포에서 세포사를 유발하였다(도 11D). 또한, 퀴세틴(#2)은 스네일-p53 상호작용 억제제로서 확인되었다.
- [0107] [p53의 DNA 결합도메인의 엔도사이토시스를 이용한 K-Ras 돌연변이 세포 특이적으로 약물전달방법 고찰]
- [0108] <실시예 5>
- [0109] 1. p53의 핵에서 세포질로의 이동 기전 검토
- [0110] GST-pull down 분석을 위하여, 먼저 인간 스네일 및 p53 재조합 단백질을 알려진 방법에 따라 제조하였다(Neoplasia 11: 1-10, 2009). 배지 및 전세포 라이세이트에서 p53 및 스네일 간의 직접적인 결합을 검토하기 위하여, 아가로오즈-비드 접합 GST 또는 GST-스네일을 세포 라이세이트 또는 배양배지와 4℃에서 2시간 동안 배양하였다. PBS 및 RIPA로 세정 후, 침강된 단백질을 앞선 방법과 동일하게 SDS-PAGE 및 WB에 적용하였다.
- [0111] 2. 실험결과
- [0112] p53의 핵에서 세포질로의 이동 서열에서 변이를 일으키는 p53 NES에 대한 스네일의 효과를 검토한 결과, 스네일은 p53 NES 발현을 감소시켰고(도 13A), 랩토마이신B(LMB; 핵에서 세포질로의 이동 차단제)는 스네일 매개-p53 감소를 차단하지 못하였다(도 13B 및 도 13C). 스네일에 의한 p53 감소가 리얼타임을 통해 확인되었다(도 13D). 배양배지에서 p53의 발현을 검토한 결과, 2시간 이내에 배지에서 p53의 발현을 검출할 수 있었다(도 13E). 게다가, p53은 스네일 또는 K-Ras 형질감염세포에서 소낭과 같은 구조로 사이토졸에서 검출되었고, 최종적으로 세포의 영역에서 검출되었다(도 13F). 한편, 스네일은 p53과 함께 사이토졸의 소낭에 존재하였다(도 17A).



- [0113] K-Ras 돌연변이 세포에서 p53의 분비를 검토하기 위해, 배양배지 및 세포 라이세이트에서 스네일-GST를 이용한 GST-Pull down 분석을 수행하였다. 스네일 관련 p53이 모든 세포 라이세이트에서 검출될지라도, K-Ras 돌연변이 채장암 세포주에서만 배지 p53을 관찰할 수 있었다(도 13G). 또, K-Ras 돌연변이 세포의 배양배지에서 스네일-pull down 없이 배지 p53을 관찰할 수 있었다(도 13H).
- [0114] p53은 소낭과 같은 수송을 통해 감소되기 때문에, 노코다졸(nocodazole; Noc)에 의한 세포골격 네트워크를 방해하여 p53의 발현을 검토한 결과, Noc 처리는 스네일 또는 K-Ras 매개 p53 감소를 차단할 수 있었다(도 14A). Noc-처리 세포에서 p53의 사이토졸 소낭성 염색에도 불구하고, 세포 형상은 대조군과 구별되게 변화되었다(도 14B). Noc는 p53 감소를 차단할 수 있었다(도 14C). Noc-처리에 의해 배지 p53이 없어진 반면, p53은 소낭으로써 세포질에서 축적되었다(도 14D 및 도 14E). Aph/Noc는 p53의 감소를 차단할 수 있고, 이는 LMB에 의해 얻어질 수 없었다(도 14F 및 도 14G).
- [0115] <실시예 6>
- [0116] 1. 세포의 p53 및 스네일의 양상 검토
- [0117] 1) 조직 분석
- [0118] 정상 및 종양이 한쌍을 이루는 담관암 및 간 조직을 순천향 의약센터로부터 얻었다. 조직을 deep freezer에서 재빨리 동결하였고, 동결된 조직을 잘라 0.5mg의 조직을 0.25mL 혈청 프리 배지에서 37℃에서 30분 동안 배양하여 조직액을 유리하였다. 배양 후, 배양 배지를 모아 0.5mL 100% EtOH에서 침강시켰다. 침강된 물질을 RIPA를 이용하여 용해시키고 앞선 방법과 동일하게 SDS-PAGE 및 WB 분석을 수행하였다. 또, 동일한 방법으로 동일 배양배지를 얻어 p53 Ab를 검출하였다.
- [0119] 2) p53 ELISA 분석
- [0120] p53 조사를 위해, 제조자의 지침(Assay Design)에 따라 ELISA를 수행하였다. 즉, 0.2mL 조직 배양 배지를 각 웰에 가하고 검출 Ab와 배양하였다. 세정 완충액으로 세정한 후, 0.2mL 기질 줄 및 0.05mL 정지 용액을 가하였다.
- [0121] 3) 혈액시료에서 스네일 Ab 검출
- [0122] 인간 혈액 시료를 순천향 대학(채장암 및 담석 환자)으로부터 얻었고, 부산대학의 의약 센터(폐암)로부터 얻었다. 정상 혈액 시료를 지원자 또는 암이 아닌 환자로 부터 모았다. 혈청은 원심분리하여 모으며, 사용 전까지 -70℃에서 보관되었다. 3µl의 혈청을 GST-단백질과 사전 승인 후, 아가로오즈-접합 GST-스네일-N과 배양하였다. 침강된 GST-스네일-Ab 복합체는 RIPA 및 SDS 시료 완충액으로 용해하고, 앞선 방법과 동일하게 SDS-PAGE에 적용하였다. PVDF 막에 옮긴 후, 단백질을 항-인간 Ab 및 항-GST Ab와 배양하였다.
- [0123] 2. 실험결과
- [0124] 먼저, A549 및 MKN 45 세포에 재조합 p53을 처리하고, 이들의 위치를 조사하였다. 배지로부터 회수된 대조군 단백질(His-lamin A)과 비교하여, His-p53은 A549의 전세포 라이세이트에서 발현되었다(도 15A). 게다가, His-p53은 MKN45 세포 및 이의 배양배지에서 완전히 제거되었다(도 15A).
- [0125] 보다 구체적인 검토를 위해, 본 발명에서는 신선한 배지, A549-배양배지, PC3 및 HCT116를 이용하여 재조합 p53을 배양하였다. 배지에서 회수된 His-laminA와 비교하여, p53-His는 HCT116의 전세포 라이세이트에서 검출되었다. 게다가, p53은 PC3 뿐 아니라 A549 배양 배지에서 회수되지 않았다. 이러한 결과로부터 p53은 배양된 세포로부터 분비되는 프로테아제에 의해 소화되며 K-Ras 돌연변이 세포에 의해 재흡수됨을 알 수 있다.
- [0126] 또, 프로테아제 저해제(PMSF) 및 엔도사이토시스 저해제(Brefeldin A; BFA)를 A549 및 Capan-1에 처리하였다. 세포내 p53 발현에 대한 미반응에도 불구하고 이들 화합물은 배지 p53의 발현을 증가시켰다(도 15B). BFA는 A549 전세포 라이세이트에서 재조합 p53의 국채를 차단하였다(도 15C).
- [0127] 분비된 스네일의 양상을 확인하기 위하여, 재조합 스네일로 처리하여 p53의 목적지를 비교하였다. p53 중간영역은 A549의 WCL로부터 회수되었고, 이는 BFA에 의해 억제되었다. 그러나, MKN45에 처리된 재조합 p53은 배지 및 WCL에서 없어졌다. 이러한 결과로부터 분비된 p53은 세린 프로테아제 뿐 아니라 MMP와 같은 다른 종류의 프로테아제에 의해 소화된다고 판단되었다. 한편, 스네일은 배지로부터 회수되었고, 프로테아제 저해제 없이 재조합 스네일을 회수하였다. 이러한 결과로부터 스네일은 프로테아제 매개 소화 뿐 아니라 엔도사이토시스에 저

항성이 있다고 판단되었다.

[0128] p53-엔도사이토시스에 대한 K-Ras의 효과를 검토한 결과, 재조합 p53은 K-Ras 형질감염 세포에 의해 선택적으로 제거되었다. p53 중간영역이 K-Ras 돌연변이 세포에 의해 선택적으로 다시 들어갈 수 있다면, 이러한 특징은 K-Ras 돌연변이 세포에 대한 화합물의 전달을 위해 매우 유용할 것이다.

[0129] 이를 확인하기 위하여, PI(propidium iodine; Red dye, 50µg/mL) 및 His-p53(2µg/mL)를 A549 및 MKN 45에 처리한 결과, PI만 처리한 경우에는 두 세포주에서 세포로 축적되지 않았지만, PI 및 p53을 함께 처리하면 A549의 세포내로 PI의 축적을 관찰할 수 있었다(도 15E, 도 16A 내지 도 16B). 그러나, MKN 45에서는 이러한 관찰을 할 수 없었다. 이러한 결과로부터 p53은 K-Ras 특이적 약물전달시스템으로서 유용할 것으로 판단되었다.

[0130] 스네일 매개 분비된 p53에 의해 p53의 자동Ab가 생성되는지 여부를 검토하기 위하여, 조직액에서의 p53 및 스네일의 발현 양상을 조사한 결과, 담관암에서는 p53 및 스네일이 검출되었지만, 간암세포종 및 비암 조직액에서는 검출되지 않았다(도 17A 및 도 17B). 도 17C와 같이 ELISA를 이용하여 조직액에서의 p53의 존재를 확인한 결과, 항-p53 Ab 및 항-스네일 Ab는 담관암에서는 검출되었으나, 간암세포종에서는 검출되지 않았다(도 17D 및 도 17E). 또, 췌장암 또는 담관암 환자의 혈청에서 p53 및 스네일에 대한 자동Ab를 조사한 결과, 항-p53 Ab는 암과 관련성을 나타내지 않았다. 이러한 결과로부터 p53 자동Ab는 암의 상태와 관련되지 않는 것으로 판단되며, 분비된 p53은 신속하게 프로테아제 및 엔도사이토시스에 의해 제거되었다(도 15A).

표 1

| sample NO | Age | Sex | Stage | Diagnosis  | serum p53 | serum Snail | anti-p53 Ab | anti-Snail Ab |
|-----------|-----|-----|-------|--|-----------|-------------|-------------|---------------|
| 1         | 45  | F   | IV    | CBD cancer/adenocarcinoma                        | Y         | Y           | Y           | Y             |
| 2         | 78  | F   | III   | CBD cancer/adenocarcinoma                        | Y         | Y           | Y           | Y             |
| 3         | 58  | M   | IIB   | adenocarcinoma (intrahepatic cholangiocarcinoma) | Y         | Y           | Y           | Y             |
| 4         | 74  | M   | IIA   | CBD cancer/adenocarcinoma                        | Y         | Y           | Y           | Y             |
| 5         | 62  | M   | IIB   | Gall Bladder adenocarcinoma                      | Y         | Y           | Y           | Y             |
| 6         | 38  | M   | IIA   | CBD cancer/adenocarcinoma                        | Y         | Y           | Y           | Y             |
| 7         | 56  | F   | IIB   | adenocarcinoma (intrahepatic cholangiocarcinoma) | Y         | Y           | Y           | Y             |
| 8         | 59  | M   | IIA   | CBD cancer/adenocarcinoma                        | Y         | Y           | Y           | Y             |
| 9         | 68  | M   | IB    | Amulla of Vater adenocarcinoma                   | Y (weak)  | N           | N           | Y             |
| 10        | 54  | F   | IIB   | CBD cancer/adenocarcinoma                        | Y         | Y           | N           | N             |
| HCC       |     |     |       |  |           |             |             |               |
| 1         | 58  | M   | II    | HCC  | N         | N           | N           | N             |
| 2         | 43  | M   | I     | HCC  | N         | N           | N           | Y(weak)       |
| 3         | 66  | M   | III   | HCC  | N         | N           | N           | Y(weak)       |
| 4         | 63  | F   | I     | HCC  | N         | N           | N           | N             |

[0131]

[0132] 반면, 스네일은 프로테아제 및 엔도사이토시스에 대한 저항성을 나타내었다(도 15D). 따라서, 혈청에서 스네일 자동Ab를 측정하였다. 스네일 Ab의 발현은 췌장암 환자의 혈청 및 담석 환자의 혈청에서 검출되었다(도 15F). 반면, 스네일 Ab는 정상 건강인에서는 검출되지 않았다(도 15G). 또, 폐암 환자의 혈청에서도 스네일 Ab가 관찰되었다(도 18). 따라서, 스네일 Ab의 존재가 암 진단 마커로서 매우 유용할 것으로 판단되었다.

표 2

| No | sex/age | cell type  | TNM    | Stage     | Meta       |             | Snail Ab |
|----|---------|------------|--------|-----------|------------|-------------|----------|
| 1  | M/64    | ADC        | T2N0M0 | IB        | x          |             |          |
| 2  | M/65    | ADC        | T4N3M1 | IV        | brain      | lost to f/u | positive |
| 3  | M/73    | SQC        | T4N3M1 | IV        | Lung       |             |          |
| 4  | M/68    | SQC        | T4N2Mx | IIIB      | ?          |             | positive |
| 5  | M/63    | SQC        | T4N2Mx | IIIB      | ?          |             |          |
| 6  | M/50    | ADC        | T4N3M1 | IV        | brain,bone |             |          |
| 7  | M/72    | SQC        | T4N2M1 | IV        | brain      |             | positive |
| 8  | M/66    | SQC        | T4N3Mx | IIIB      | ?          |             |          |
| 9  | M/65    | SQC        | T2N2Mx | IIIA      | ?          | NA          | positive |
| 10 | M/56    | SQC        | T2N1Mx | IIB       | ?          | NA          | positive |
| 11 | M/72    | SQC        | T4N2M1 | IV        | bone       | lost to f/u |          |
| 12 | M/58    | SQC        | T2N3M0 | IIIB      | x          | expired     |          |
| 13 | M/72    | ADC        | T1N2M0 | IIIA      | x          |             |          |
| 14 | M/80    | ADC        | T4N3M1 | IV        | bone       |             |          |
| 15 | M/71    | SQC        | T3N2M1 | IV        | lung       | expired     | positive |
| 16 | F/74    | SCLC       | -      | extensive | lung       | expired     |          |
| 17 | M/62    | SQC        | T4N3M1 | IV        | lung       |             |          |
| 18 | M/48    | non-cancer |        |           |            |             |          |
| 19 | M/73    | SQC        | T2N1Mx | IIB       | ?          | NA          | positive |
| 20 | M/63    | SQC        | T4N3M0 | IIIB      | x          | expired     | positive |
| 21 | F/64    | ADC        | T4N3M1 | IV        | lung       | NA          | positive |
| 22 | M/69    | SQC        | T4N3Mx | IIIB      | ?          |             | positive |
| 23 | M/80    | SQC        | T4N1Mx | IIIB      | ?          |             |          |
| 24 | F/47    | ADC        | T4N2M1 | IV        | lung       | lost to f/u |          |
| 25 | M/61    | SQC        | T2N3M0 | IIIB      | x          | expired     | positive |
| 26 | M/63    | SQC        | T2N3Mx | IIIB      | ?          |             | positive |
| 27 | F/65    | SCLC       | -      | limited   | x          |             | positive |
| 28 | M/62    | SQC        | T3N3Mx | IIIB      | ?          | NA          | positive |
| 29 | M/67    | ADC        | T4N3Mx | IIIB      | ?          |             | positive |
| 30 | F/53    | ADC        | T1N0M0 | IA        | -          |             | positive |

[0133]

[0134] [스네일-p53 간 결합저해제 동정]

[0134]

[0135]

<실시예 1>

[0136]

1-1. 2-메틸티오-1,4-나프토크논(2-Methylthio-1,4-naphthoquinone, 1a)의 합성

[0137]

1구 100ml의 라운드 플라스크에 1,4-나프토크논(1,4-naphthoquinone) 0.617mM을 메탄올 30ml에 용해시킨 후 소듐 티오메톡시드(sodium thiomethoxide) 1.54mM을 넣고 하룻밤 동안 교반시켰다. 반응혼액에 포화 염화나트륨용액 50ml을 넣고 클로로포름 50ml로 3회 추출한 뒤 유기층을 무수망초로 탈수시킨 후 여과하였다. 여과한 여액을 감압농축하여 얻은 잔사를 메탄올로 재결정하여 황색결정의 표제 화합물을 얻었다.

[0138]

수율: 14.0%, 녹는 점: 185-186°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 8.12-8.07(m, 2H), 7.78-7.70(m, 2H), 6.58(s, 1H), 2.40(s, 3H), m/z 205.1 (M+H)<sup>+</sup>.

[0139]

1-2. 2-에틸티오-1,4-나프토크논(2-Ethylthio-1,4-naphthoquinone, 1b)의 합성

[0140]

상기 실시예 1-1의 합성방법과 동일한 방법으로 제조하되, 단지 소듐 티오메톡시드(sodium thiomethoxide) 대신에 에틸메르캡탄(Ethylmercaptan)을 사용하여 황색 결정의 표제 화합물을 얻었다. 이의 수율 및 물성은 하기



와 같았다.

[0141] 수율: 40.7%, 녹는 점: 135-136°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 8.12-8.08(m, 2H), 7.78-7.69(m, 2H), 6.62(s, 1H), 2.87(q, J=7.2Hz, 2H), 1.44(t, J=7.2Hz, 3H), m/z 219.1 (M+H)<sup>+</sup>.

[0142] 1-3. 2-프로필티오-1,4-나프토퀴논(2-Propylthio-1,4-naphthoquinone, 1c)의 합성

[0143] 상기 실시예 1-1의 합성방법과 동일한 방법으로 제조하되, 단지 소디움 티오메톡시드(sodium thiomethoxide) 대신에 프로필메르캡탄(Propylmercaptan)을 사용하여 황색 결정의 표제 화합물을 얻었다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.

[0144] 수율: 33.9%, 녹는 점: 118-119°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 8.12-8.07(m, 2H), 7.77-7.68(m, 2H), 6.61(s, 1H), 2.82(t, J=7.6Hz, 2H), 1.86-1.77(m, 2H), 1.11(t, J=7.2Hz, 3H), m/z 233.0 (M+H)<sup>+</sup>.

[0145] 1-4. 2-부틸티오-1,4-나프토퀴논(2-Butylthio-1,4-naphthoquinone, 1d)의 합성

[0146] 상기 실시예 1-1의 합성방법과 동일한 방법으로 제조하되, 단지 티오메톡시드(sodium thiomethoxide) 대신에 부틸메르캡탄(Butylmercaptan)을 사용하여 황색 결정 2-부틸티오-1,4-나프토퀴논(1d)을 얻었다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.

[0147] 수율: 33.9%, 녹는 점: 97-98°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 8.12-8.07(m, 2H), 7.77-7.68(m, 2H), 6.61(s, 1H), 2.84(t, J=7.2Hz, 2H), 1.80-1.72(m, 2H), 1.57-1.48(m, 2H), 0.98(t, J=7.6Hz, 3H), m/z 247.1 (M+H)<sup>+</sup>.

[0148] 1-5. 2-펜틸티오-1,4-나프토퀴논(2-Pentylthio-1,4-naphthoquinone, 1e)의 합성

[0149] 상기 합성방법과 동일한 방법으로 제조하되, 단지 티오메톡시드(sodium thiomethoxide) 대신에 펜틸메르캡탄(pentylmercaptan)을 사용하여 황색 결정의 표제 화합물을 얻었다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.

[0150] 수율: 15.3%, 녹는 점: 111-112°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 8.11-8.06(m, 2H), 7.77-7.68(m, 2H), 6.60(s, 1H), 2.83(t, J=7.6Hz, 2H), 2.17-1.74(m, 2H), 1.51-1.33(m, 4H), 0.93(t, J=7.2Hz, 3H), m/z 261.2 (M+H)<sup>+</sup>.

[0151] 1-6. 2-헥실티오-1,4-나프토퀴논(2-Hexylthio-1,4-naphthoquinone, 1e)의 합성

[0152] 상기 실시예 1-1의 합성방법과 동일한 방법으로 제조하되, 단지 소디움 티오메톡시드(sodium thiomethoxide) 대신에 헥실메르캡탄(hexylmercaptan)을 사용하여 황색 결정의 표제 화합물을 얻었다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.

[0153] 수율: 15.0%, 녹는 점: 101-102°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 8.13-8.08(m, 2H), 7.77-7.69(m, 2H), 6.61(s, 1H), 2.83(t, J=7.6Hz, 2H), 1.81-1.73(m, 2H), 1.56-1.46(m, 2H), 1.35-1.31(m, 4H), 0.91(t, J=6.8Hz, 3H), m/z 275.3 (M+H)<sup>+</sup>.

[0154] 1-7. 2-헵틸티오-1,4-나프토퀴논(2-Heptylthio-1,4-naphthoquinone, 1g)의 합성

[0155] 상기 실시예 1-1의 합성방법과 동일한 방법으로 제조하되, 단지 소디움 티오메톡시드(sodium thiomethoxide) 대신에 헵틸메르캡탄(heptylmercaptan)을 사용하여 황색 결정의 표제 화합물을 얻었다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.

[0156] 수율: 46.4%, 녹는 점: 114-115°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 8.12-8.07(m, 2H), 7.77-7.68(m, 2H), 6.61(s, 1H), 2.83(t, J=14.8Hz, 2H), 1.77(quint, J=7.6Hz, 2H), 1.52-1.45(m, 2H), 1.35-1.29(m, 6H), 0.90(t, J=6.8Hz, 3H), m/z 289.2 (M+H)<sup>+</sup>.

[0157] 1-8. 2-옥틸티오-1,4-나프토퀴논(2-Octylthio-1,4-naphthoquinone, 1h)의 합성

[0158] 상기 실시예 1-1의 합성방법과 동일한 방법으로 제조하되, 단지 소디움 티오메톡시드(sodium thiomethoxide) 대신에 옥틸메르캡탄(octylmercaptan)을 사용하여 황색 결정의 표제 화합물을 얻었다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.

와 같았다.

- [0159] 수율: 76.8%, 녹는 점: 114-115°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 8.12-8.10(m, 2H), 7.78-7.70(m, 2H), 6.61(s, 1H), 2.84(t, J=7.6Hz, 2H), 1.77(quint, J=7.6Hz, 2H), 1.49-1.47(m, 2H), 1.35-1.29(m, 8H), 0.89(t, J=6.8Hz, 3H), m/z 304.5 (M+H)<sup>+</sup>.
- [0160] 1-9. 2-노닐티오-1,4-나프토퀴논(2-Nonylthio-1,4-naphthoquinone, 1i)의 합성
- [0161] 상기 실시예 1-1의 합성방법과 동일한 방법으로 제조하되, 단지 소듐 티오메톡시드(sodium thiomethoxide) 대신에 노닐메르캡탄(nonylmercaptan)을 사용하여 황색 결정의 표제 화합물을 얻었다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.
- [0162] 수율: 87.4%, 녹는 점: 105-106°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 8.12-8.07(m, 2H), 7.77-7.68(m, 2H), 6.61(s, 1H), 2.83(t, J=7.6Hz, 2H), 1.77(quint, J=7.6Hz, 2H), 1.51-1.45(m, 2H), 1.33-1.29(m, 10H), 0.89(t, J=6.4Hz, 3H), m/z 317.5 (M+H)<sup>+</sup>.
- [0163] 1-10. 2-데실티오-1,4-나프토퀴논(2-Decylthio-1,4-naphthoquinone, 1-j)의 합성
- [0164] 상기 실시예 1-1의 합성방법과 동일한 방법으로 제조하되, 단지 소듐 티오메톡시드(sodium thiomethoxide) 대신에 데실메르캡탄(Decylmercaptan)을 사용하여 황색 결정의 표제 화합물을 얻었다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.
- [0165] 수율: 87.4%, 녹는 점: 101-102°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 8.12-8.08(m, 2H), 7.77-7.68(m, 2H), 6.61(s, 1H), 2.83(t, J=7.2Hz, 2H), 1.77(quint, J=7.6Hz, 2H), 1.50-1.42(m, 2H), 1.33-1.29(m, 12H), 0.88(t, J=6.4Hz, 3H), m/z 331.1 (M+H)<sup>+</sup>.
- [0166] <실시예 2>
- [0167] 2-1. 2-메틸아미노-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논(2-Methylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 5a)의 합성
- [0168] 1구 100ml의 라운드 플라스크에 앞에서 제조된 5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논(5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 4)을 0.45mmol을 메탄올 30ml에 용해시킨 후 메틸아민(Methylamine) 0.687mmol을 넣고 실온에서 3시간 교반시켰다. 반응혼액에 중크롬산염나트륨(Sodium dichromate) 0.64mmol과 황산(sulfuric acid) 0.18mmol을 물에 용해시켜 천천히 적가한 후 실온에서 3분간 교반하였다. 반응혼액에 포화 염화나트륨용액 50ml을 넣고 클로로포름 50ml로 3회 추출한 뒤 유기층을 합쳐서 무수망초로 탈수시킨 후 여과하였다. 여과한 여액을 감압농축하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼 분리를 통하여 적갈색의 표제 화합물을 얻었다. 표제 화합물의 수율 및 물성은 하기와 같았다.
- [0169] 수율: 56.7%, 녹는점: 203-204°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.34(d, J=9.6MHz, 1H), 7.19(d, J=9.2MHz, 1H), 5.75(BR, 1H), 5.60(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.94(s, 3H), 2.87(d, J=5.2MHz, 3H), m/z 248(M+H)<sup>+</sup>.
- [0170] 2-2. 2-에틸아미노-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논(2-Ethylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 5b)의 합성
- [0171] 상기 실시예 2-1의 라운드 플라스크에 메틸아민 대신 에틸아민(ethylamine)으로 바꾸는 점만 제외하고는 실시예 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 표제 화합물(5b)을 제조하였다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.
- [0172] 수율: 23.6%, 녹는점: 172-173°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.34(d, J=9.2Hz, 1H), 7.19(d, J=9.6Hz, 1H), 5.63(BR, 1H), 5.61(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.94(s, 3H), 3.09(q, 2H), 1.29(t, J=7.2Hz, 3H), m/z 262.1(M+H)<sup>+</sup>.
- [0173] 2-3. 2-프로필아미노-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논(2-Propylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 5c)의 합성
- [0174] 상기 실시예 2-1의 라운드 플라스크에 메틸아민 대신 프로필아민(propylamine)으로 바꾸는 점만 제외하고는 실

시에 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 표제 화합물(5c)을 제조하였다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.

[0175] 수율: 46.5%, 녹는점: 175-176°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.34(d, J=9.2Hz, 1H), 7.19(d, J=9.2Hz, 1H), 5.72(BR, 1H), 5.61(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.94(s, 3H), 3.09(q, 2H), 1.68(J=6.8Hz, 2H), 0.99(t, J=7.6Hz, 3H), m/z 276(M+H)<sup>+</sup>.

[0176] 2-4. 2-부틸아미노-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논(2-Butylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 5d)의 합성

[0177] 상기 실시예 2-1의 라운드 플라스크에 메틸아민 대신 부틸아민(butylamine)으로 바꾸는 점만 제외하고는 실시예 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 표제 화합물(5d)을 제조하였다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.

[0178] 수율: 46.2%, 녹는점: 104-105°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.34(d, J=9.6Hz, 1H), 7.19(d, J=9.6Hz, 1H), 5.70(BR, 1H), 5.61(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.94(s, 3H), 3.11(q, 2H), 1.64(p, 2H), 1.46-1.38(m, 2H), 0.95(t, J=7.2Hz, 3H), m/z 290(M+H)<sup>+</sup>.

[0179] 2-5. 2-펜틸아미노-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논(2-Pentylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 5e)의 합성

[0180] 상기 실시예 2-1의 라운드 플라스크에 메틸아민 대신 펜틸아민(pentylamine)으로 바꾸는 점만 제외하고는 실시예 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 표제 화합물(5e)을 제조하였다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.

[0181] 수율: 55.9%, 녹는점: 102-103°C <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400): δ 7.34(d, j=9.2MHz, 1H), 7.19(d, J=9.2Hz, 1H), 5.70(BR, 1H), 5.61(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.94(s, 3H), 3.11(q, 2H), 1.29(t, J=7.2Hz, 3H), m/z 303.6(M+H)<sup>+</sup>.

[0182] 2-6. 2-헥실아미노-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논(2-Hexylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 5f)의 합성

[0183] 상기 실시예 2-1의 라운드 플라스크에 메틸아민 대신 헥실아민(Hexylamine)으로 바꾸는 점만 제외하고는 실시예 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 표제 화합물(5f)을 제조하였다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.

[0184] 수율: 47.3%, 녹는점: 83-84°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.34(d, J=9.6Hz, 1H), 7.18(d, J=9.6Hz, 1H), 5.69(BR, 1H), 5.61(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.94(s, 3H), 3.11(q, 2H), 1.66-1.58(m, 4H), 1.32-1.30(m, 4H), 0.89(t, J=6.8Hz, 3H), m/z 318(M+H)<sup>+</sup>.

[0185] 2.7 2-헵틸아미노-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논(2-Heptylamino-5,8- dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 5g)의 합성

[0186] 상기 실시예 2-1의 라운드 플라스크에 메틸아민 대신 헵틸아민(Heptylamine)으로 바꾸는 점만 제외하고는 실시예 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 표제 화합물(5g)을 제조하였다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.

[0187] 수율: 41.8%, 녹는점: 74-75°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.34(d, J=9.6Hz, 1H), 7.33(d, j=9.6Hz, 1H), 7.18(d, J=9.6Hz, 1H), 5.69(BR, 1H), 5.60(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.94(s, 3H), 3.11(q, 2H), 1.66-1.61(m, 2H), 1.35-1.29(m, 8H), 0.89(t, J=6.4Hz, 3H), m/z 332(M+H)<sup>+</sup>.

[0188] 2-8. 2-옥틸아미노-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논(2-Octylamino-5,8- dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 5h)의 합성

[0189] 상기 실시예 2-1의 라운드 플라스크에 메틸아민 대신 옥틸아민(octylamine)으로 바꾸는 점만 제외하고는 실시예 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 표제 화합물(5h)을 제조하였다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.

[0190] 수율: 45.1%, 녹는점: 81-82°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.34(d, j=9.6Hz, 1H), 7.18(d, J=9.6Hz, 1H), 5.69(br, 1H), 5.61(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.94(s, 3H), 3.11(q, 2H), 1.68-1.61(m, 2H), 1.41-1.20(m, 10H), 0.88(t, J=6.4Hz, 3H), m/z 346(M+H)<sup>+</sup>.

[0191] 2-9. 2-노닐아미노-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논(2-Nonylamino-5,8- dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 5i)의 합성

성

- [0192] 상기 실시예 2-1의 라운드 플라스크에 메틸아민 대신 노닐아민(nonylamine)으로 바꾸는 점만 제외하고는 실시예 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 표제 화합물(5i)을 제조하였다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.
- [0193] 수율: 44.0%, 녹는점: 85-86°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.34(d, *J*=9.6Hz, 1H), 7.18(d, *J*=9.6Hz, 1H), 5.69(br, 1H), 5.61(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.94(s, 3H), 3.11(m, 2H), 1.66-1.61(m, 2H), 1.41-1.20(m, 12H), 0.88(t, *J*=6.4Hz, 3H), *m/z* 360(M+H)<sup>+</sup>.
- [0194] 2-10. 2-데실아미노-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논(2-Decylamino-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 5j)의 합성
- [0195] 상기 실시예 2-1의 라운드 플라스크에 메틸아민 대신 데실아민(decylamine)으로 바꾸는 점만 제외하고는 실시예 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 표제 화합물(5j)을 제조하였다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.
- [0196] 수율: 17.6%, 녹는점: 86-87°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.33(d, *J*=9.2Hz, 1H), 7.18(d, *J*=9.2Hz, 1H), 5.69(br, 1H), 5.60(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.94(s, 3H), 3.11(q, 2H), 1.66-1.61(m, 2H), 1.40-1.20(m, 14H), 0.88(t, *J*=6.4Hz, 3H), *m/z* 374(M+H)<sup>+</sup>.
- [0197] 2-11. 2-(2-하이드록시에틸티오)-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논[2-(2-Hydroxyethylthio)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 5k]의 합성
- [0198] 상기 실시예 2-1의 라운드 플라스크에 메틸아민 대신 2-메르캅토에탄올(2-mercaptoethanol)로 바꾸는 점만 제외하고는 실시예 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 표제 화합물(5k)을 제조하였다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.
- [0199] 수율: 59.5% 녹는점: 117-118°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.34(d, *J*=9.6Hz, 1H), 7.28(d, *J*=9.6Hz, 1H), 6.61(s, 1H), 3.96(s, 6H), 3.93(t, *J*=6.4Hz, 2H), 3.05(t, *J*=6.4Hz, 2H), *m/z* 316.9(M+Na)<sup>+</sup>.
- [0200] 2-12. 2-(3-하이드록시프로필티오)-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논[2-(3-Hydroxypropylthio)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 5l]의 합성
- [0201] 상기 실시예 2-1의 라운드 플라스크에 메틸아민 대신 3-메르캅토프로판올(3-mercaptoopropanol)로 바꾸는 점만 제외하고는 실시예 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 표제 화합물(5l)을 제조하였다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.
- [0202] 수율: 69.9%, 녹는점: 125-126°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.33(d, *J*=9.6Hz, 1H), 7.27(d, *J*=9.6Hz, 1H), 6.51(s, 1H), 3.96(s, 6H), 3.81(t, *J*=6.4Hz, 2H), 2.91(t, *J*=7.2Hz, 2H), 1.99(m, 2H), *m/z* 331.1 (M+Na)<sup>+</sup>.
- [0203] 2-13. 2-(4-하이드록시부틸티오)-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논[2-(4-Hydroxybutylthio)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 5m]의 합성
- [0204] 상기 실시예 2-1의 라운드 플라스크에 메틸아민 대신 4-메르캅토프부탄올(4-mercaptobutanol)로 바꾸는 점만 제외하고는 실시예 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 표제 화합물(5m)을 제조하였다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.
- [0205] 수율: 64.0%, 녹는점: 122-123°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.33(d, *J*=9.6Hz, 1H), 7.29(d, *J*=10.0Hz, 1H), 6.46(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.95(s, 3H), 3.71(t, *J*=6.4Hz, 2H), 1.87-1.81(m, 2H), 1.78-1.50 (m, 2H), *m/z* 345.1 (M+Na)<sup>+</sup>.
- [0206] 2-14. 2-(6-하이드록시헥실티오)-5,8-디메톡시-1,4-나프토퀴논[2-(6-Hydroxyhexylthio)-5,8-dimethoxy-1,4-naphthoquinone, 5n]의 합성
- [0207] 상기 실시예 2-1의 라운드 플라스크에 메틸아민 대신 6-메르캅토헥산올(6-mercaptohexanol)로 바꾸는 점만 제외하고는 실시예 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 표제 화합물(5n)을 제조하였다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.

와 같았다.

- [0208] 수율: 38.2% Melting point: 87~88°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.33(d, J=9.6Hz, 1H), 7.27(d, J=9.6Hz, 1H), 6.45(s, 1H), 3.96(s, 6H), 3.66(t, J=6.4Hz, 2H), 2.76(t, J=7.6Hz, 2H), 1.78-1.12(m, 2H), 1.61-1.25(m, 6H), m/z 372.9 (M+Na)<sup>+</sup>.
- [0209] 2-15. 3-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소나프탈렌-2-일티오)프로판오익 엑시드[3-(5,8-dimethoxy-1,4-dioxo-naphthalen-2-ylthio)propanoic acid, 5o]의 합성
- [0210] 상기 실시예 2-1의 라운드 플라스크에 메틸아민 대신 3-메르캅토프로피오닉 애시드(3-mercaptopropionic acid)로 바꾸는 점만 제외하고는 실시예 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 표제 화합물(5o)을 제조하였다. 이의 수율 및 물성은 하기와 같았다.
- [0211] 수율: 80.6%, 녹는점: 208~209°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.35(d, J=9.2Hz, 1H), 7.28(d, J=13.6Hz, 1H), 6.51(s, 1H), 3.97(s, 3H), 3.96(s, 3H), 3.07(t, J=7.2Hz, 2H), 2.81(t, J=7.2Hz, 2H), m/z 348.4 (M+Na)<sup>+</sup>.
- [0212] 2-16. 11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드로나프탈렌-2-일티오)운데카노익 엑시드[11-(5,8-dimethoxy-1,4-dioxo-naphthalen-2-ylthio)undecanoic acid, 5p]의 합성
- [0213] 상기 실시예 2-1의 라운드 플라스크에 메틸아민 대신 11-메르캅토운데카노익 애시드(11-mercaptoundecanoic acid)로 바꾸는 점만 제외하고는 실시예 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 표제 화합물(5p)을 제조하였다.
- [0214] 수율: 77.9%, 녹는점: 146~147°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.33(d, J=9.6Hz, 1H), 7.27(d, J=9.6Hz, 1H), 6.46(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.95(s, 3H), 3.34(t, J=7.2Hz, 2H), 2.75(t, J=2.7Hz, 2H), 2.41~2.32(m, 5H), 2.06~2.00(m, 2H), 1.76~1.56(m, 5H), 1.48~1.39(m, 2H), 0.97~0.88(m, 2H), m/z 435 (M+H)<sup>+</sup>
- [0215] <실시예 3>
- [0216] 3-1. 5,8-디메톡시-2-[3-옥소-3-(4-페닐피페리딘-4-일) 프로필티오]-1,4-나프토퀴논[5,8-dimethoxy-2-(3-oxo-3-(4-phenylpiperazin-1-yl)propylthio)naphthalene-1,4-dione, 6a]의 합성
- [0217] 1구 100ml의 라운드 플라스크에 앞에서 제조된 3-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드로나프탈렌-2-일티오)프로판오익 애시드, 0.163mmol을 클로로포름 40ml에 용해시킨 후, N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카보디이미드 하이드로 클로라이드(EDC) 0.26mmol과 4-페닐피페리딘(4-phenylpiperidine) 0.26mmol을 넣고 하룻밤 교반시켰다. 반응혼액에 1N 염산용액을 넣고 후 실온에서 3분간 교반하였다. 다시 포화 염화나트륨용액 50ml을 넣고 클로로포름 50ml로 3회 추출한 뒤 유기층을 합쳐서 무수망초로 탈수시킨 후 여과하였다. 여과한 여액을 감압농축하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼 분리를 통하여 적갈색의 표제 화합물(6a)을 얻었다. 표제 화합물의 수율 및 물성은 하기와 같았다.
- [0218] 수율: 73.5%, 녹는점: 94~95°C, H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.34~7.28(m, 5H), 7.19(d, J=7.6Hz), 6.26(s, 1H), 3.95(s, 3H), 3.94(s, 3H), 3.14(t, 4H), 2.79~2.74(q, 4H), 2.67(t, J=12Hz, 1H), 1.89(t, J=12.4Hz, 2H), 1.65(t, J=12.4Hz, 2H), m/z 466.3(M+H)<sup>+</sup>.
- [0219] <실시예 4>
- [0220] 4-1. 이소부틸-11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드록시나프탈렌-2-일티오)-운데카노에트[Isobutyl-11-(5,8-dimethoxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalene-2-ylthio)undecanoate, 7a]의 합성
- [0221] 1구 100ml의 라운드 플라스크에 앞에서 제조된 11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드로나프탈렌-2-일티오)운데카노익 엑시드(5p) 1.15mmol을 클로로포름 60ml에 용해시킨 후 N-(3-디메틸아미노프로필)-N'-에틸카보디이미드 하이드로 클로라이드(EDC) 1.38mmol과 이소부틸알콜(isobutylalcohol) 1.38mmol을 넣고 하룻밤 교반시켰다. 반응혼액에 1N 염산용액을 넣고 후 실온에서 3분간 교반하였다. 다시 포화 염화나트륨용액 50ml을 넣고 클로로포름 50ml로 3회 추출한 뒤 유기층을 합쳐서 무수망초로 탈수시킨 후 여과하였다. 여과한 여액을 감압농축하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼 분리를 통하여 적갈색의 표제 화합물(7a)을 얻었다. 표제 화합물의 수율 및 물성은 하기와 같았다.



[0222] 수율: 52.4%, 녹는점: 58-59°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.32(d, J=9.6Hz, 1H), 7.26(d, J=9.6Hz, 1H), 6.44(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.95(s, 3H), 3.85(d, J=6.8Hz, 2H), 2.75(t, J=7.6Hz, 2H), 2.31(t, 7.6Hz, 2H), 1.96-1.89(m, 1H), 1.72-1.68(m, 4H), 1.29-1.25(m, 12H), 0.94(s, 3H), 0.92(s, 3H), m/z 491 (M+H)<sup>+</sup>

[0223] 4-2. 11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드로나프탈렌-2-일티오)-N-이소부틸 운테칸아마이드[11-(5,8-dimethoxy-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalene-2-ylthio)-N-isobutyl undecanamide, 7b)의 합성

[0224] 상기 실시예 4-1의 라운드 플라스크에 아이소부틸알콜 대신 아이소부틸아민을 바꾸는 점만 제외하고는 실시예 1의 반응과 동일한 공정을 수행하여 하기 물성치를 갖는 표제 화합물(7b)를 얻었다. 수율 및 물성은 하기와 같았다.

[0225] 수율: 77.9%, 녹는점: 74-75°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.33(d, J=9.6Hz, 1H), 7.27(d, J=9.2Hz), 6.44(s, 1H), 5.55(s, 1H), 3.96(s, 3H), 3.95(s, 3H), 3.10(t, J=6.6Hz, 2H), 2.75(t, J=7.6Hz, 2H), 2.17(t, J=7.4Hz, 2H), 1.78-1.7(m, 2H), 1.63(m, 2H), 1.45(m, 1H), 0.92(s, 3H), 0.90(s, 3H), m/z 490.0 (M+H)<sup>+</sup>.

[0226] <실시예 5>

[0227] 5-1. 이소부틸 11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드로나프탈렌-2-일설피닐)운테카노에이트[isobutyl 11-(5,8-dimethoxyl-1,4-dioxo-1,4-dihydronaphthalene-2-yl sulfinyl) undecanoate, 8]의 합성

[0228] 1구 100ml의 라운드 플라스크에 앞에서 제조된 이소부틸 11-(5,8-디메톡시-1,4-디옥소-1,4-디하이드록시나프탈렌-2-일티오)-운테카노에트 0.163mM(7a)를 디클로로메탄 30ml에 용해시킨 후 3-클로로페록시벤조익 엑시드(3-chloroperoxybenzoic acid) 0.196mM을 넣고 2시간 교반시켰다. 반응혼액에 중탄산나트륨용액을 넣고 후 실온에서 3분간 교반하였다. 다시 포화 염화나트륨용액 50ml을 넣고 클로로포름 50ml로 3회 추출한 뒤 유기층을 합쳐서 무수망초로 탈수시킨 후 여과하였다. 여과한 여액을 감압농축하여 얻은 잔사를 실리카겔 컬럼 분리를 통하여 적색의 표제 화합물(8)을 얻었다. 표제 화합물의 수율 및 물성은 하기와 같았다.

[0229] 수율: 45.8%, 녹는점: 92~93°C, <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz): δ 7.41(d, J=9.6Hz, 1H), 7.36(d, J=9.6Hz, 1H), 7.31(s, 1H), 3.99(s, 3H), 3.98(s, 3H), 3.85(d, J=6.8Hz, 1H), 3.28~3.21(m, 1H), 2.96~1.89(m, 2H), 1.69~1.59(m, 4H), 1.41~1.23(m, 12H), 0.93(d, J=6.8MHz, 6H), m/z 507(M+H)<sup>+</sup>

[0230] 상기 방법들로 합성한 화합물군을 이용해 스네일-p53의 결합억제 효과를 다음 실험들을 통해 확인하였다.

[0231] <실험예 1> p53 활성 회복 및 타겟 유전자 유도 확인

[0232] 상기 실시예 1~5에서 합성된 화합물이 스네일-p53 결합 저해효과가 있는지 세포 수준에서 효과적인지 입증하기 위하여, 상기 화합물을 K-Ras 돌연변이형 암세포주 HCT116에 처리하였고 웨스턴 블롯을 이용하여 이 결과를 확인하였다.

[0233] K-Ras는 스네일의 활성을 억제하여 p53을 유도하는 작용을 하는 유전자로써 상기 세포주 HCT116은 K-Ras의 돌연변이로 인해 스네일이 항상 발현하여 p53과 결합한 후 p53이 정상적으로 작동하지 못하게 하는 역할을 한다. 상기 K-Ras 돌연변이형 암세포주 HCT116에 스네일-p53 결합을 억제하는 화합물을 처리하게 되면 p53이 정상 작용함으로써 발현양이 증가하고 p53의 타겟 유전자들이 유도된다.

[0234] 우선적으로 p53과 타겟유전자인 p21의 발현을 확인하기 위해 웨스턴 블롯을 수행하였다. 본 발명에서 사용한 모든 세포주는 ATCC로부터 구입하였고 10% FBS를 함유한 RPMI-1640 또는 DMEM에서 유지되었다. RIPA 완충액으로 단백질을 추출하고 전형적인 SDS-PAGE 및 겔이동 방식을 통해 세포 용출물로 로딩된 멤브레인을 준비하였다. 5% 비지방 건조유로 블로킹한 후, 각 유전자에 해당하는 항체를 이용하여 전형적인 웨스턴 블롯 절차를 진행하였다. 본 발명에서 사용된 항체는 Cell signaling, SantaCruz에서 구매하였다. p53의 활성은 p53의 타겟유전자인 p21의 발현양을 통해서 확인할 수 있었다. 도 1은 실시예 1~5에서 합성한 화합물의 일부를 이용하여 K-Ras 돌연변이형 암세포주인 HCT116 세포에서 웨스턴 블롯을 수행한 결과를 나타내는 그림 및 이를 수치화해서 나타낸 그래프이고, 표 3은 이 수치값을 나타낸 도표이다.

표 3

[0235]

| 유전자 | 대조군          | 대조군 대비 화합물의 단백질 발현비 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|--------------|---------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     | DMSO control | 5i                  | 5j  | 5k  | 5l  | 5n  | 5m  | 5o  | 5p  | 8   | 7b  | 7a  | 6a  | 6b  |
| p53 | 1.0          | 1.6                 | 1.3 | 0.3 | 0.6 | 1.1 | 0.8 | 2.6 | 1.6 | 2.3 | 4.6 | 4.2 | 1.9 | 4.0 |
| p21 | 1.0          | 4.6                 | 5.0 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 2.5 | 0.3 | 1.7 | 7.0 | 7.2 | 2.8 | 8.7 |

[0236]

상기 화합물을 K-Ras 돌연변이형 HCT116 암세포주에 처리했을 때 대조군(DMSO control)과 비교해서 상기 화합물을 10 μM 농도로 처리한 곳에서 p53을 2~5배 정도로, p21을 2~8배 정도로 발현양이 크게 증가되는 화합물이 있음을 확인할 수 있었다(도 20 및 표 3 참고). 상기 화합물이 p53과 p53의 타겟 유전자인 p21의 발현양을 증폭시켰다는 것은 스네일이 항상 활성화되어 있는 상태의 K-Ras 돌연변이 세포주인 HCT116 세포에서 스네일의 역할이 상기 화합물을 통해 억제되어 스네일-p53의 결합 저해 상태가 유지된다는 것을 나타낸다.

[0237]

**<실험예 2> 스네일-p53 결합 저해 효과 확인**

[0238]

다음으로는 p53과 p21을 동시에 유도하면서 발현양이 많았던 상기 화합물 중에서 두 가지 화합물 5o 또는 7a를 선택하여 K-Ras, 스네일 및 p53의 관계를 확인하기 위해 사용하기로 하였다. 스네일-p53의 결합이 저해된다는 것을 입증하기 위해 상기 두 가지 화합물 5o 및 7a을 이용하여 GST 풀다운 분석(GST pull down assay)을 수행하여 확인하였다.

[0239]

GST 풀다운 분석은 두 가지 단백질의 결합 정도를 확인할 수 있는 방법으로 GST가 융합된 스네일 단백질과 p53 재조합 단백질을 제조하여 상기 화합물 5o 혹은 7a를 함께 처리하여 GST-스네일 단백질과 p53 단백질의 결합 정도를 확인하였다. 상기 화합물의 비교군으로는 Nutlin-3를 사용하였다. Nutlin-3는 p53의 음성조절인자인 MDM2와 p53의 결합을 차단하는 물질로 많은 종양세포에서 과발현되는 단백질로 알려져 있다. MDM2가 과발현되면 p53의 단백질분해가 유도되어 p53의 타겟 유전자들을 통해 일어나는 아포토시스(apoptosis) 등의 반응을 억제하고 세포의 항증식효과 등을 유도한다. 대표적인 p53의 조절인자이지만 K-Ras 돌연변이성 질환이나 돌연변이 p53을 가진 질환에는 작용하지 않는다.

[0240]

GST 풀다운 분석을 위해 3개의 인간 스네일 단편(잔기 1-90, 91-112 및 113-264) 및 p53 단편(1-93 및 93-292)을 GST-융합 단백질로서 대장균에서 발현하였고 각 단편을 GSH-아가로오스에 로딩하고, 세정한 후, 20mM 환원 글루타치온을 함유한 완충액을 이용하여 용출하였다. 용출 분획을 음이온-교환크로마토그래피(HitrapQ)를 이용하여 정제하였다. 재조합 인간 p53 단백질(잔기 94-292)을 벡터 pET28A를 이용하여 대장균에서 발현시켰다. 상기 벡터 pET28A는 C말단에 헥사-히스티딘 태그를 함유하였다. Ni-NTA 친화력 및 크기 배제 크로마토그래피(Superdex 200)를 이용하여 히스티딘이 달린 p53 단백질을 정제하였다. p53 및 스네일 간의 직접 결합을 검토하기 위하여, 아가로오스-비드 접합 GST 또는 GST-스네일을 4℃에서 45분 동안 PBS에서 His-p53(히스티딘-p53)과 배양하였다. PBS로 세정한 후, 침전된 단백질을 SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0241]

도 21에 도시된 바와 같이 GST 풀다운 분석 결과를 확인해보면 대조군(c)의 경우 GST-스네일과 p53이 다량으로 결합되어 있는 것을 확인할 수 있다. Nutlin-3도 MDM2를 조절하여 p53 활성을 유도하는 물질이기 때문에 스네일-p53의 결합을 저해하지 못하고 대조군과 비슷한 결합 정도를 나타내고 있다. 반면 상기 두 개의 화합물 5o 와 7a를 사용한 분획에서는 GST-스네일 단백질에 p53이 결합되는 정도가 확연히 줄어드는 것을 확인할 수 있었고 상기 화합물이 스네일-p53의 결합을 억제하였다는 것을 입증할 수 있었다.

[0242]

**<실험예 3> K-Ras 의존적인 p53 유도 능력 확인**

[0243]

다음으로는 상기 화합물이 정상 세포에는 작용하지 않고 K-Ras 돌연변이 암세포에만 선택적으로 작용하여 사멸시킬 수 있는 능력이 있는지를 확인하기 위해 세포 생존율을 통해 상기 두 개의 화합물 5o와 7a에 대한 세포 독



성 및 사멸 효과를 트립판 블루 용액을 이용하여 세포수를 측정하여 확인하였다. 상기 화합물의 p53 유도 능력이 K-Ras와 관계가 있는지 검토하기 위해 K-Ras 돌연변이 암세포주인 A549과 HCT116, K-Ras 야생형 암세포주인 MKN45를 이용하였다.

[0244] 표 4는 각각의 세포주에 대한 사멸율을 수치화하여 나타낸 도표이고 도 22는 사멸율에 대한 수치값을 나타낸 그래프이다.

표 4

[0245]

| 암세포 종류               | 대조군 (%)        | 대조군 대비 화합물에 대한 암세포의 사멸율 (%) |        |        |        |        |        |          |        |        |
|----------------------|----------------|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|--------|--------|
|                      | control (DMSO) | 5o                          |        |        | 7a     |        |        | Nutlin-3 |        |        |
|                      | 0 μM           | 5 μM                        | 10 μM  | 20 μM  | 5 μM   | 10 μM  | 20 μM  | 5 μM     | 10 μM  | 20 μM  |
| A546 (k-Ras 돌연변이형)   | 1±1.3          | 30±4.5                      | 51±1.1 | 62±1.7 | 23±3.4 | 34±2.3 | 45±2.3 | 11±4.0   | 19±4.5 | 25±4.7 |
| HCT116 (k-Ras 돌연변이형) | 1±1.2          | 35±3.2                      | 57±1.6 | 67±2.5 | 32±2.1 | 44±2.5 | 57±2.8 | 21±2.4   | 32±2.9 | 40±3.1 |
| MKN45 (k-Ras 야생형)    | 1±1.1          | 10±2.9                      | 15±2.4 | 18±1.9 | 1±1.0  | 1±1.0  | 3±2.4  | 28±2.2   | 38±2.9 | 47±2.2 |

[0246] 세포 사멸율을 통해 나타난 결과는 상기 화합물 5o가 K-Ras 돌연변이 암세포주인 A549과 HCT116에서 10 μM 정도에서 각각 51%와 57% 정도의 사멸율을 보였고 7a도 동일 농도 10 μM에서 대략 34%와 44% 정도의 사멸율을 보였다(표 4 및 도 22 참조). 반면 K-Ras 야생형 암세포주인 MKN45에서는 동일 농도 10 μM에서 상기 화합물 5o는 15% 정도의 사멸율을, 상기 화합물 7a는 거의 1%의 사멸율을 보여 K-Ras 돌연변이형 암세포주와 확실히 다른 결과를 나타내었다. 이로써 상기 화합물이 K-Ras가 정상적으로 작용하지 않는 암세포주에서만 선택적으로 작용하여 높은 사멸율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 상기 화합물이 K-Ras가 손상되어 있는 암세포에만 선택적으로 작용할 수 있고 K-Ras가 손상되어 암에 걸린 환자들에게 유용할 수 있다는 것을 암시한다. 반면 Nutlin-3는 K-Ras 돌연변이 암세포주인 A549과 HCT116 세포주에서 동일 농도 10 μM에서 각각 19%와 32% 사멸율을 나타내었으며 K-Ras 야생형 세포주인 MKN45에서는 동일 농도 10 μM에서 세포 사멸율이 38% 정도로 더 높아지는 등의 일관적이지 못한 유형을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이처럼 Nutlin-3는 K-Ras가 정상적으로 작용을 하거나 돌연변이 상태로 있는 것에 상관없이 어떤 유의한 반응을 나타내지 않으며 K-Ras에 선택적인 반응을 나타내지 않는다는 것을 확인할 수 있었다. 이것으로 상기 화합물 5o와 7a가 Nutlin-3와 달리 K-Ras에 선택적 작용 효과가 뛰어나다는 것을 입증하였다.

[0247] <실험예 4> p53의 타겟유전자의 활성 유도

[0248] 다음으로는 돌연변이 p53이 있을 때의 상기 화합물 5o의 효과를 확인하였다.

[0249] 상기 화합물 5o를 돌연변이 p53 유형인 MT/WT-p53 유전자를 갖는 MDA-MB 468이라는 인간 유방암 세포주에 처리하여 웨스턴 블롯을 실시하였다. 도 23은 MDA-MB에 5o를 처리하여 실시한 웨스턴 블롯의 결과를 나타내는 그래프이고 표 5는 이 그래프 값을 수치로 나타낸 도표이다.

표 5

[0250]

| 유전자 | 대조군 (DMSO control) | 대조군 대비 5o에 대한 유전자의 발현비 |       |       |      | 대조군 (DMSO control) | 대조군 대비 Nutlin-3에 대한 유전자의 발현비 |       |  |
|-----|--------------------|------------------------|-------|-------|------|--------------------|------------------------------|-------|--|
|     | 0 μM               | 5 μM                   | 10 μM | 20 μM | 0 μM | 5 μM               | 10 μM                        | 20 μM |  |
| p21 | 1.0                | 13.5                   | 25.9  | 31.3  | 1.0  | 1.4                | 0.9                          | 1.2   |  |

[0251] 상기 화합물 5o와 Nutlin-3를 p53 돌연변이형 암세포주 MDA-MB 468에 처리했을 때 5o가 처리된 곳에서만 다량의 p21이 발현되는 것을 확인할 수 있었다.(도 23 및 표 5 참조). 이 결과로 Nutlin-3는 돌연변이 p53이 있을 때 타겟 유전자인 p21에 아무런 영향을 끼치지 못하는 반면 상기 화합물 5o는 p21의 활성을 유도하여 Nutlin-3와 차별적인 영향력이 있음을 나타낸다.

[0252] <실험예 5> 생체내 이종이식(xenograft) 고찰

[0253] 1. 실험방법

[0254] 비흉선 마우스를 Daehan Biolink Co. Ltd로부터 구입하였고, 온도 및 빛 조절 조건(20-23℃, 12시간 빛/ 12시간 암 주기) 하에서 생육시켰고, 멸균 식이와 물을 자유롭게 공급하였다. 2주 후, 비흉선 마우스(n=21)에 복강 주사를 통해 A549 세포를  $1 \times 10^7$  세포로 접종하였다. 2주 후, 각 그룹을 3개의 서브그룹으로 나누어 PBS, 10mg/kg 또는 20mg/kg의 5o를 일주일에 한번씩 10주 동안 복강 내로 투여하고, 생존률을 관찰하였다. 동물시험은 부산대학교 동물보호위원회의 승인 및 지침에 따라 수행되었다.

[0255] 2. 실험결과

[0256] 도 24와 같이, 10mg/kg와 20mg/kg의 5o의 처리에 의해 종양에 의한 사망률이 차단된 반면, PBS 처리군에서는 10주 후 생존률이 50% 이하가 되었고, 도 25에 나타난 바와 같이 5o 처리군에서의 종양은 거의 사멸하는 모습이 관찰되었다. 또한, 도 26과 같이, 체중 감소나 화합물 주사에 따른 총체적인 해부학적 이상 소견을 관찰하지 못하였다. 하기 표 6은 종양의 발생위치 및 형태학적 특징을 요약한 것이다.

표 6

| 종양 부위 | 대조군           | 10 mg/kg       | 20 mg/kg       |
|-------|---------------|----------------|----------------|
| 간     | 1 (death)     | 0              | 0              |
| 폐     | 1 (death)     | 0              | 0              |
| 췌장    | 2 (1/2 death) | 0              | 0              |
| A.C   | 2             | 3 (regression) | 2 (regression) |

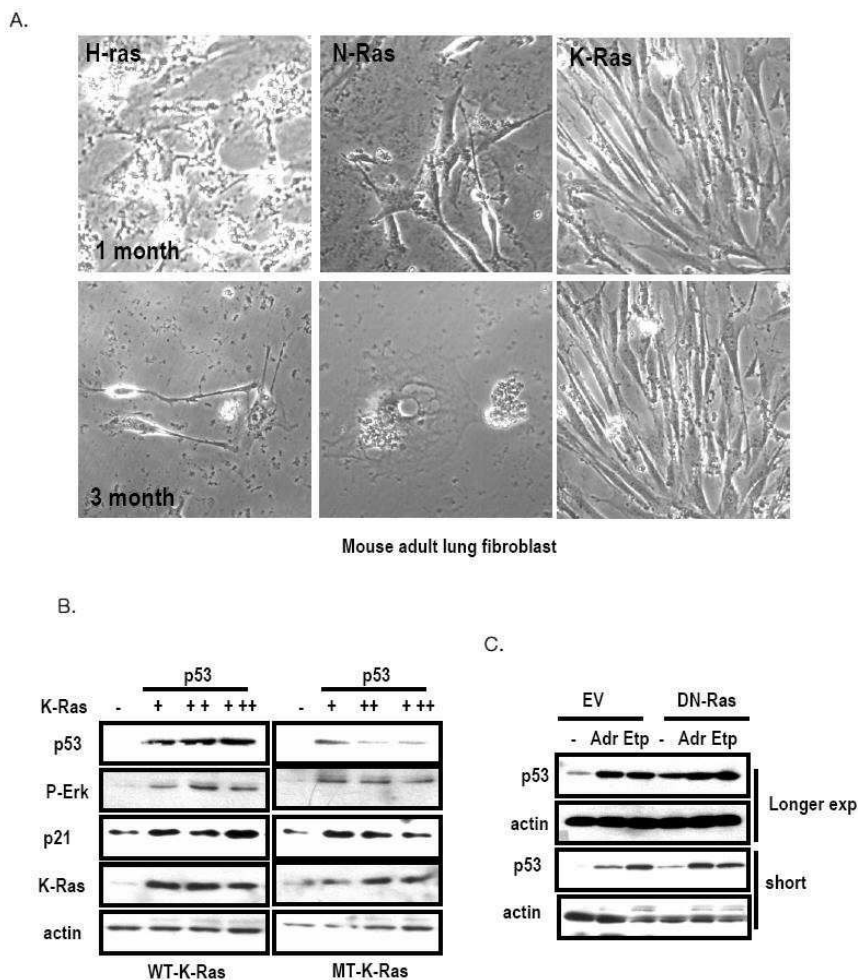
도면의 간단한 설명

- [0258] 도 1 내지 도 3 및 도 12는 스네일 매개 p53 발현 억제에 관한 분자적 기전 고찰을 나타낸 것이고,
- [0259] 도 4는 발암성 K-Ras 매개 p53 억제가 화학적 저해제에 의해 차단되지 않는 것을 나타낸 것이고,
- [0260] 도 5는 스네일이 발암성 K-Ras 매개 p53 억제를 위해 중요한 매개체인 것을 나타낸 것이고,
- [0261] 도 6은 스네일과 p53 간의 직접적인 상호작용을 나타낸 것이고,
- [0262] 도 7은 K-Ras 유도성 스네일 안정화에 있어서 ATR 활성의 필요조건을 나타낸 것이고,
- [0263] 도 8은 스네일 및 p53 간의 직접적인 결합을 나타낸 것이고,
- [0264] 도 9는 스네일 및 p53 간의 결합저해제의 동정에 관한 것이고,
- [0265] 도 10 및 도 11은 스네일 및 p53 간의 결합 차단이 K-Ras 돌연변이 세포에서 p53 기능을 유도하는 것을 나타낸 것이고,
- [0266] 도 13은 p53의 핵에서 세포질로의 이동 기전에 관한 결과이고,
- [0267] 도 14는 p53이 소낭 수송을 통해 분비되는 것을 나타낸 것이고,
- [0268] 도 15는 p53이 프로테아제 및 엔토사이토시스에 의해 제거되는 반면, 스네일은 이들에 저항성을 나타낸 결과이고,
- [0269] 도 16은 K-Ras 돌연변이 세포에서의 His-p53의 재흡수를 나타낸 것이고,
- [0270] 도 17은 암조직에서의 p53 및 스네일 분비를 나타낸 것이고,

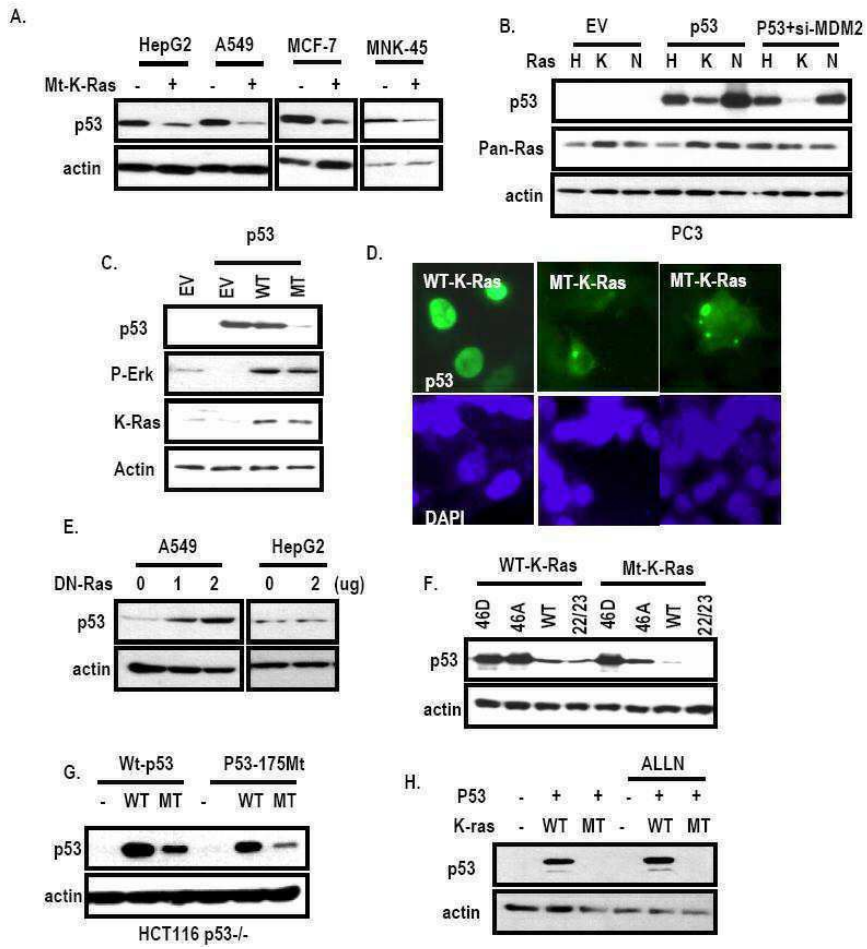
- [0271] 도 18은 폐암 혈청에서 항-스네일 Ab를 분석한 것이고,
- [0272] 도 19는 발암성 K-Ras에서 p53 및 스네일의 분비 양상을 모식화한 것이고,
- [0273] 도 20은 실시예 1~5에서 합성된 화합물의 p53 및 p21의 유도능력을 확인하는 웨스턴 블롯 결과를 나타낸 것이고,
- [0274] 도 21은 Nutlin-3와 상기 화합물 중에서 5o와 7a를 선택하여 스네일-p53 결합 저해 효과를 확인하는 GST 풀다운 분석 결과를 나타낸 것이고,
- [0275] 도 22는 K-Ras 돌연변이 암세포주와 K-Ras 야생형 암세포주에 화합물 5o, 7a 및 Nutlin-3를 처리해 나타난 세포 사멸율을 나타낸 것이고,
- [0276] 도 23은 p53 돌연변이 세포주에 화합물 5o와 Nutlin-3를 처리해 p21의 활성이 유도되는 것을 나타내는 웨스턴 블롯 결과를 수치화하여 나타낸 것이고,
- [0277] 도 24는 복강 주사로 A549 세포를 비흉선 마우스에 주입 후 화합물 5o 처리에 따른 마우스의 생존률을 나타낸 것이고,
- [0278] 도 25는 복강주사후 발생한 종양의 조직사진을 나타낸 것이고,
- [0279] 도 26은 A549 세포에서 화합물 5o 처리에 따른 총체적인 해부학적 이상 소견을 관찰한 것이다.

**도면**

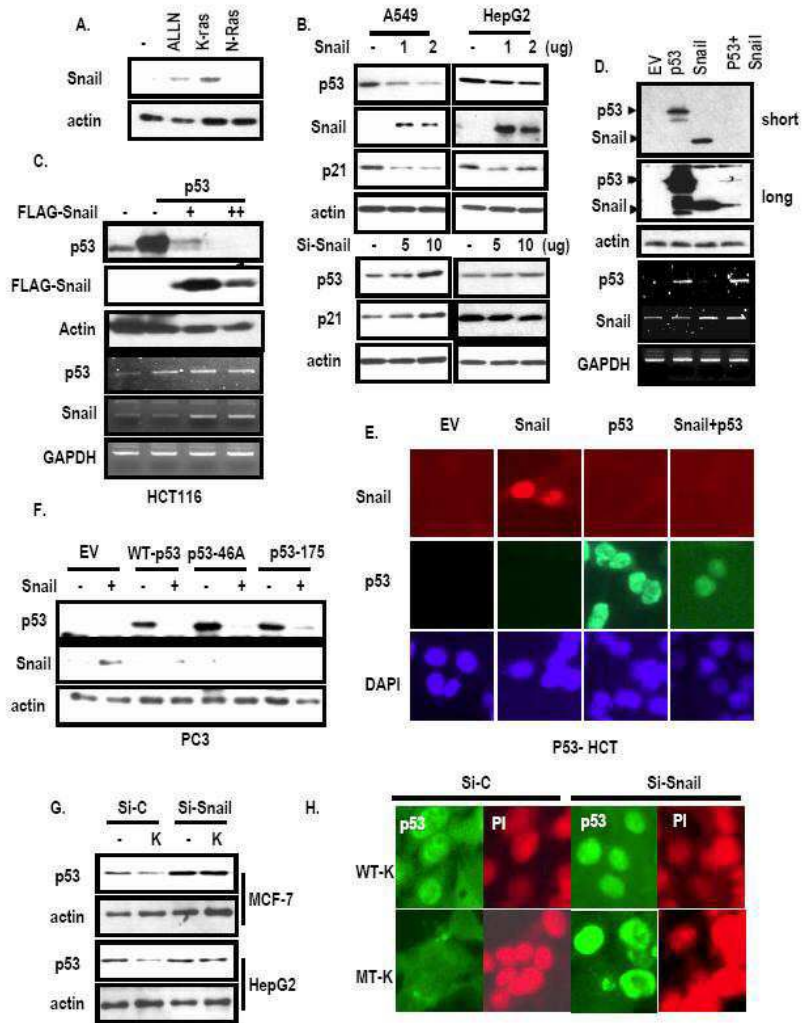
**도면1**



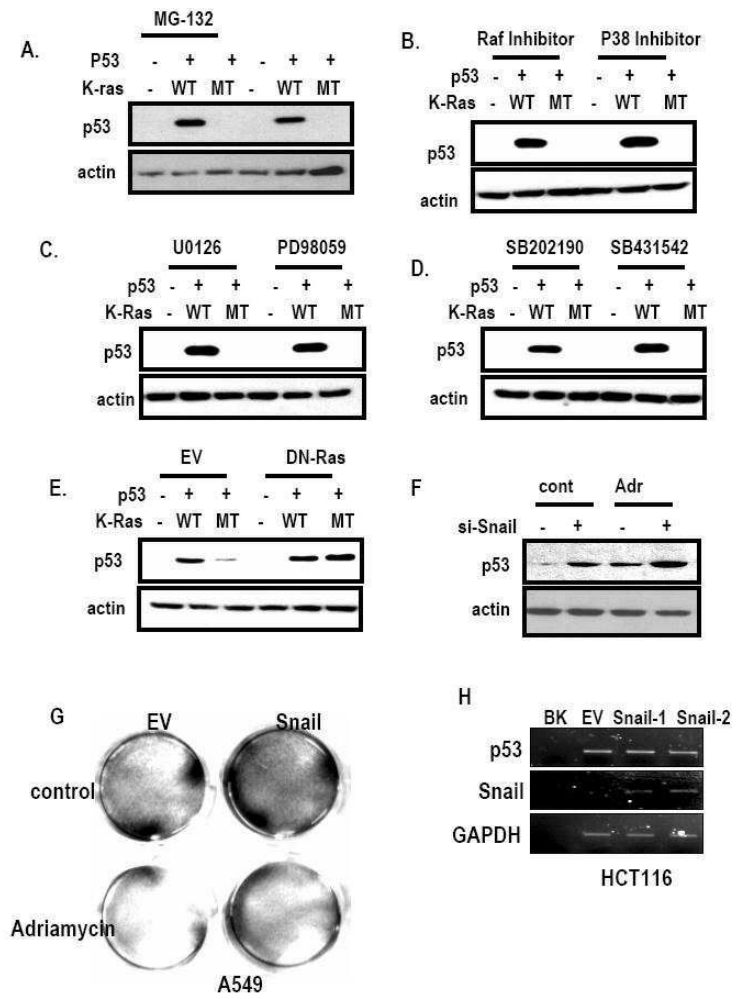
도면2



도면3

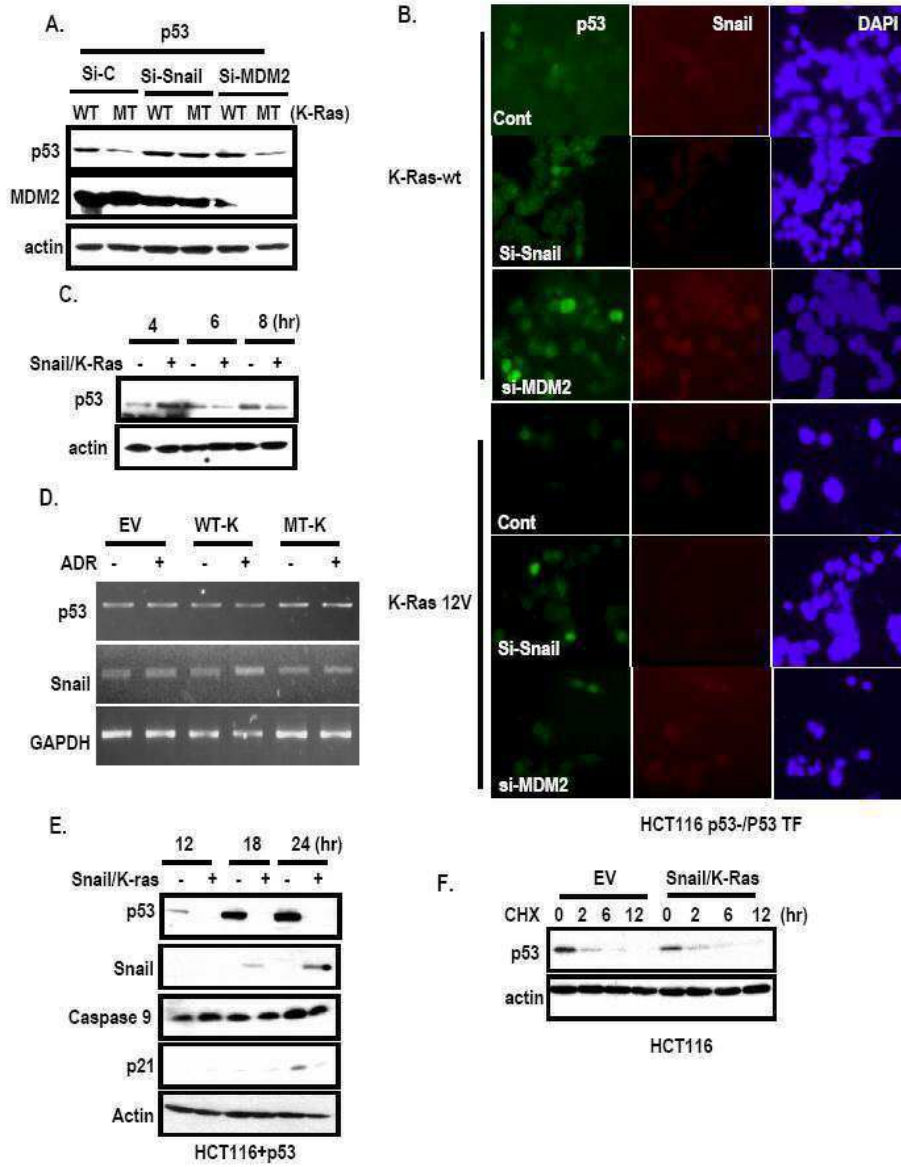


도면4



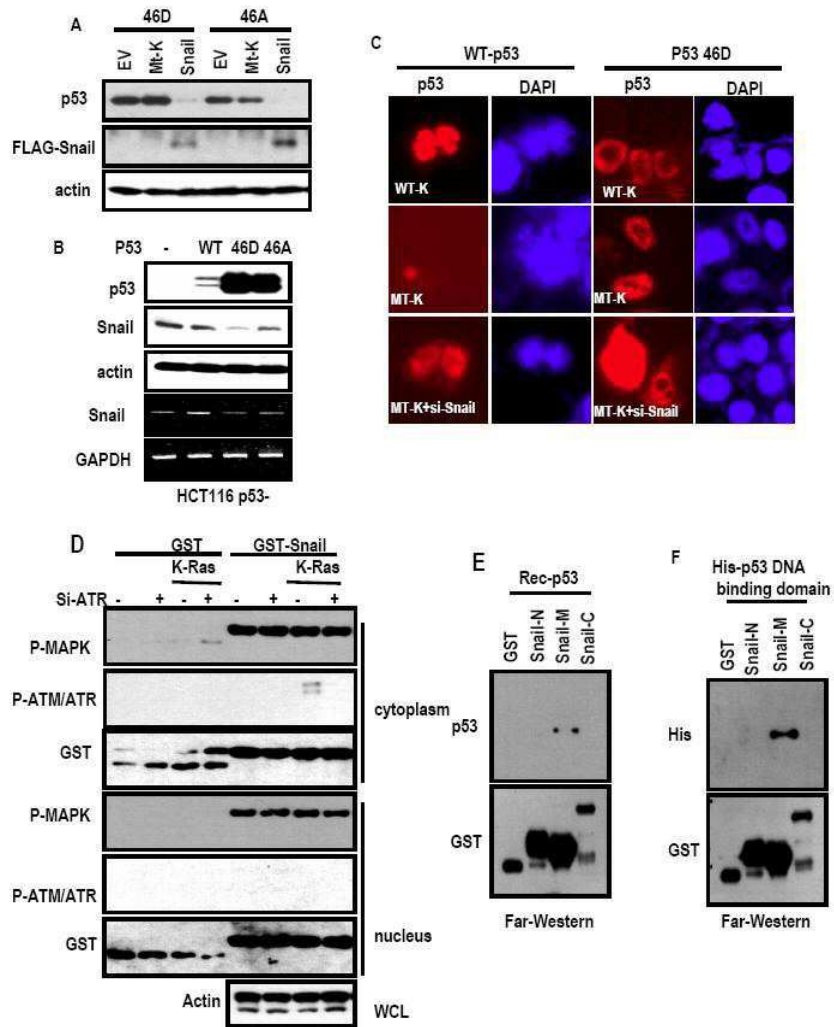


도면5

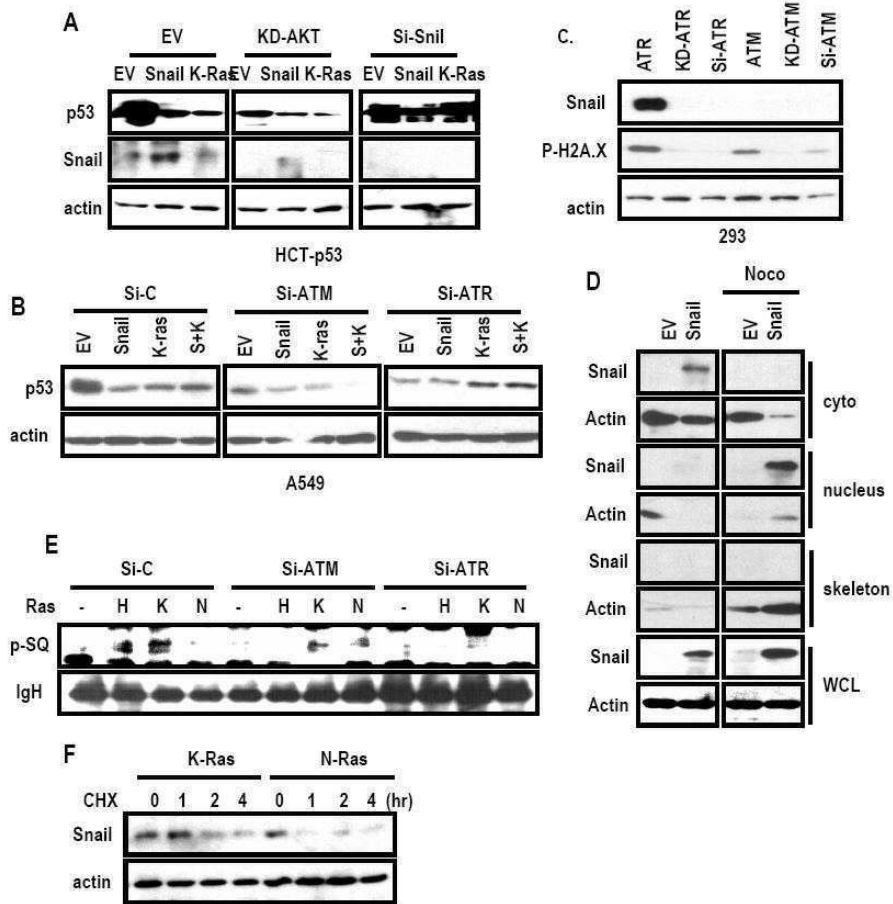




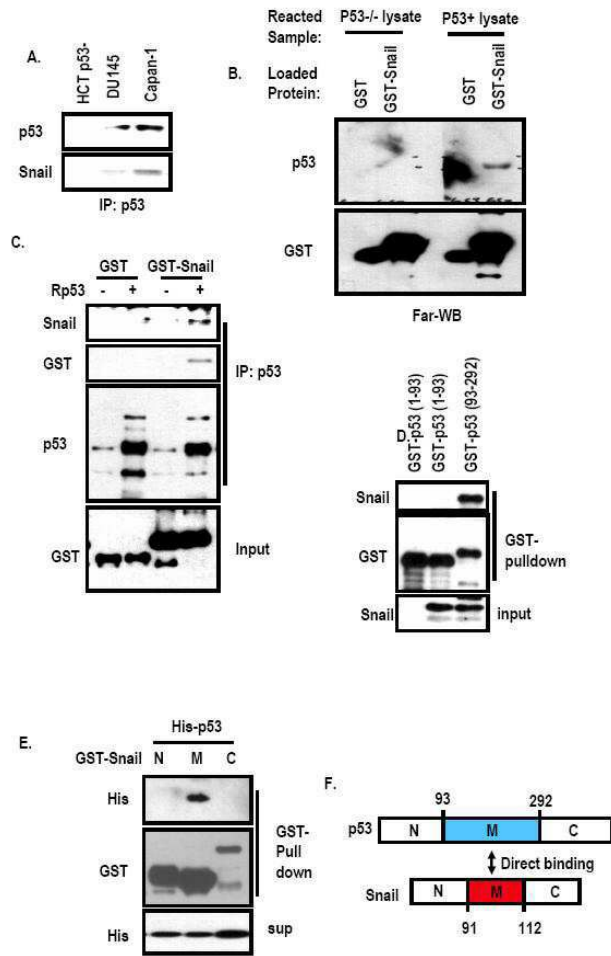
도면6



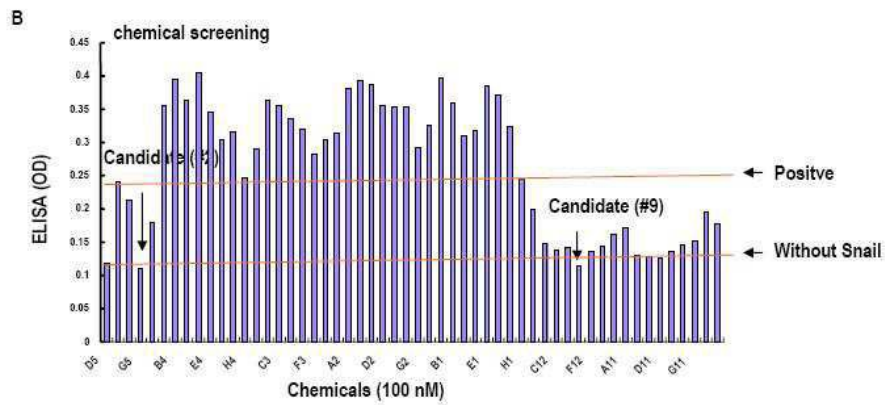
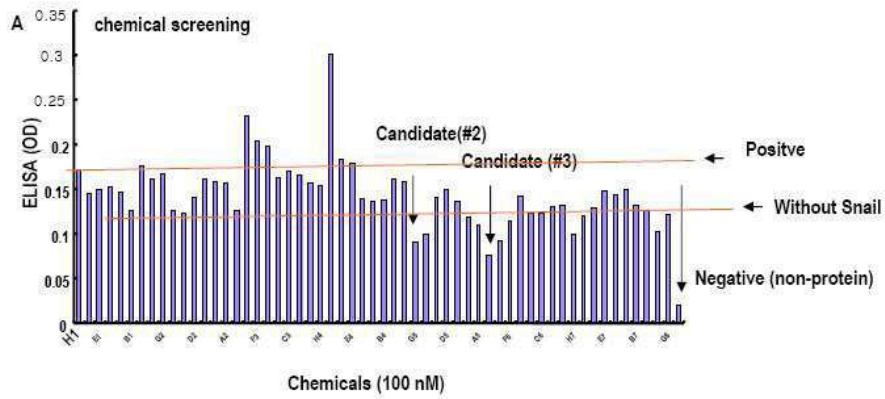
도면7



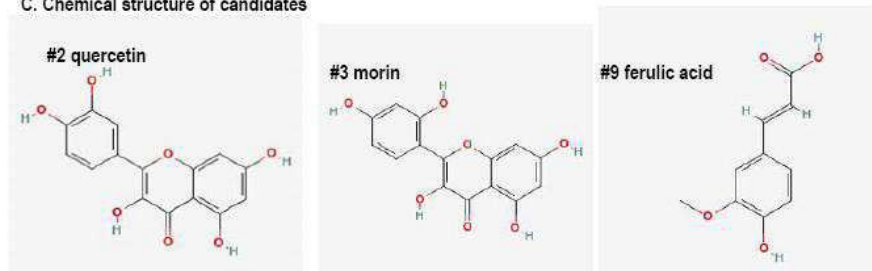
도면8



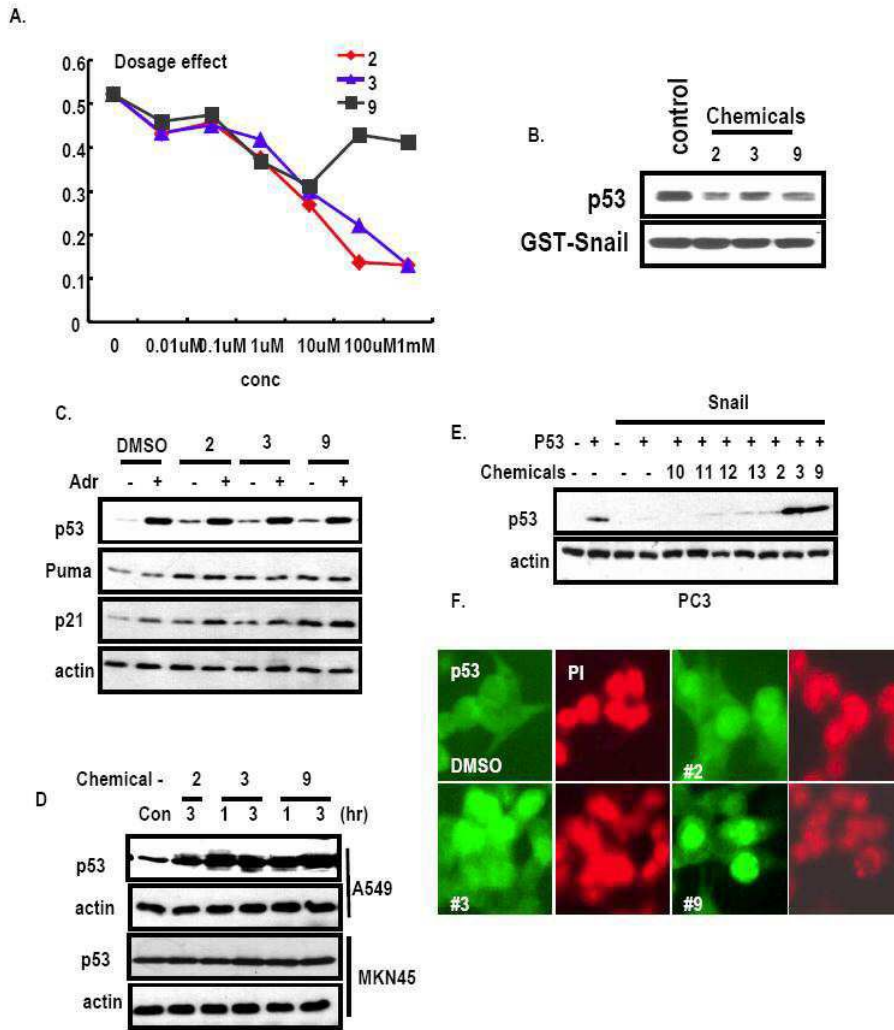
도면9



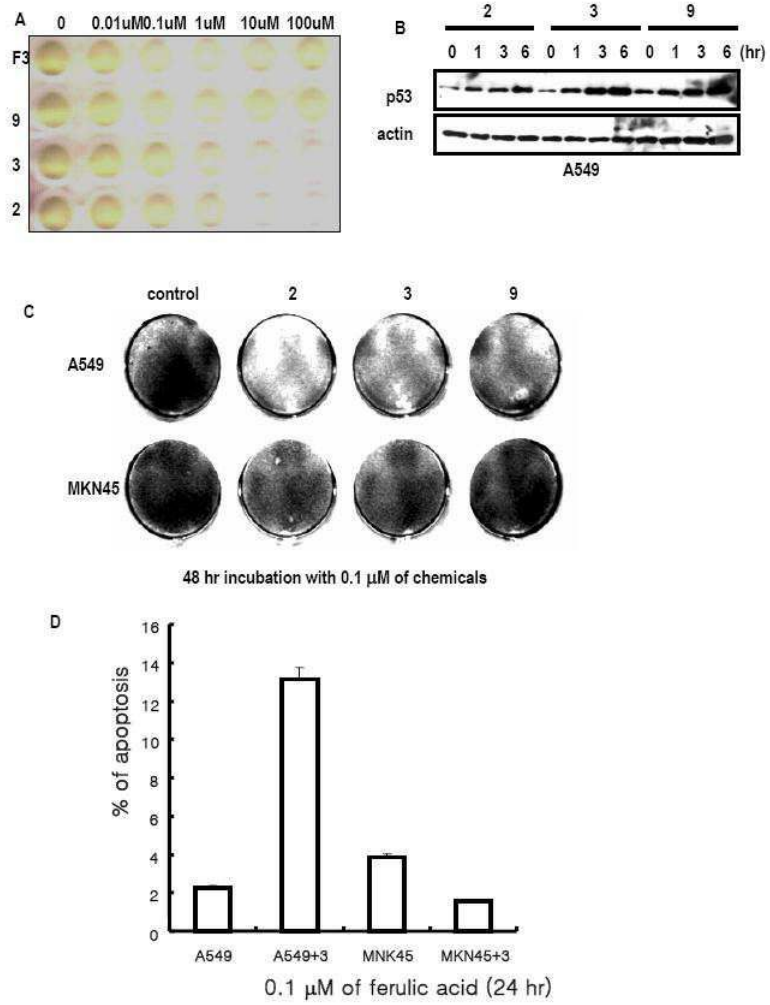
C. Chemical structure of candidates



도면10

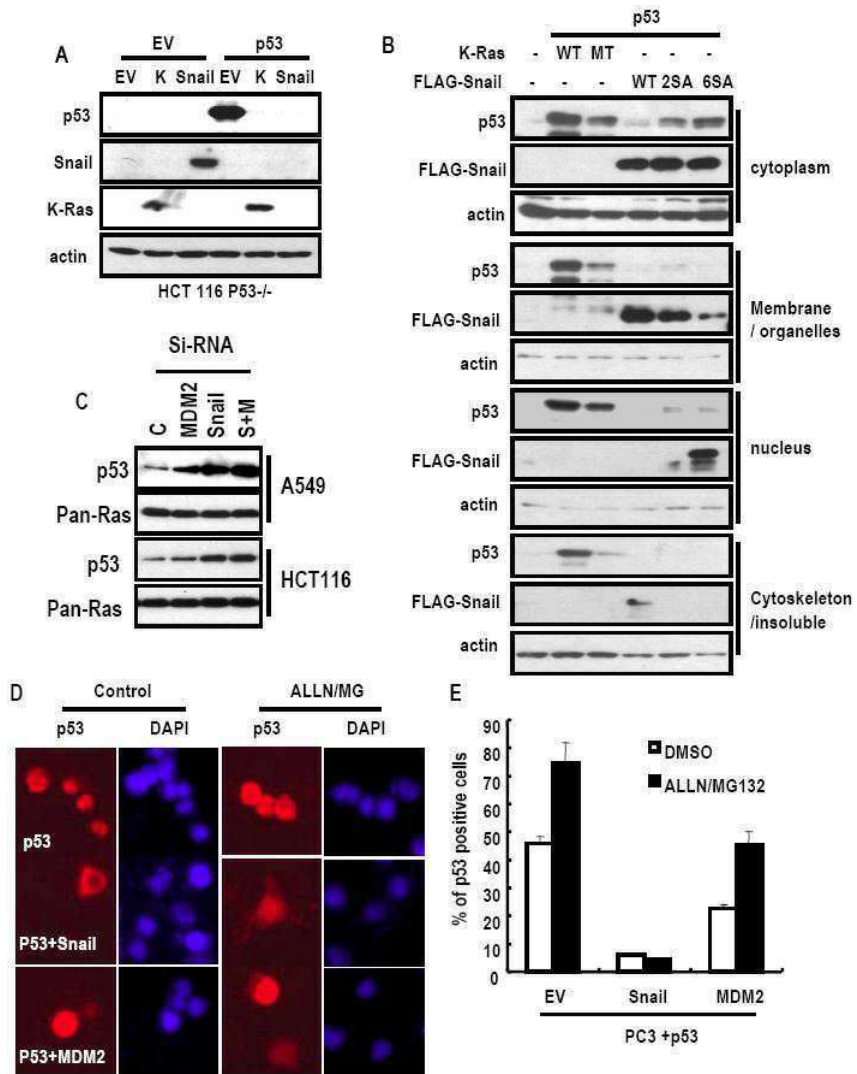


도면11

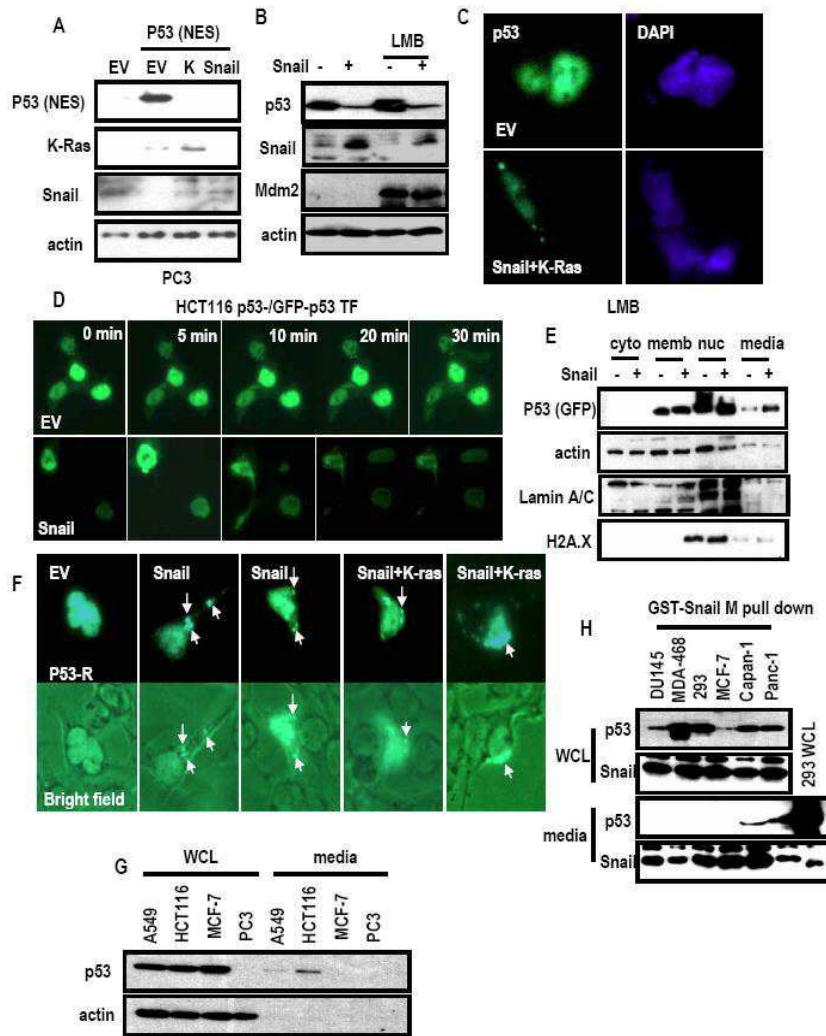




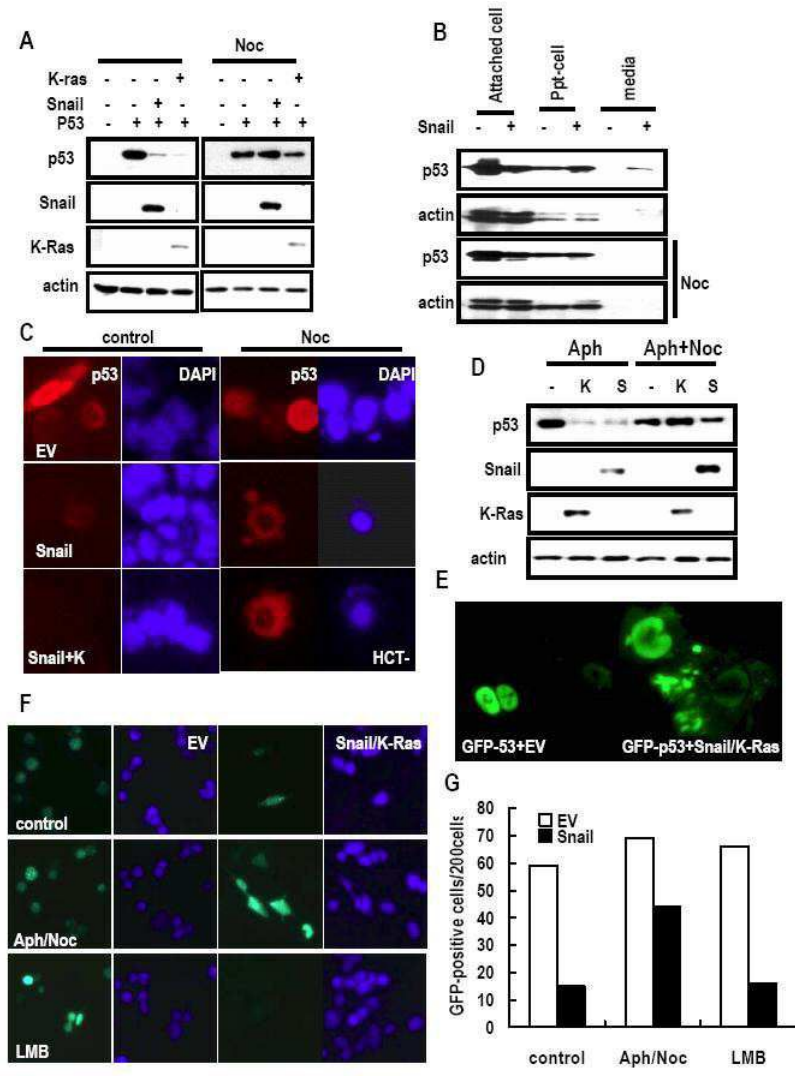
도면12



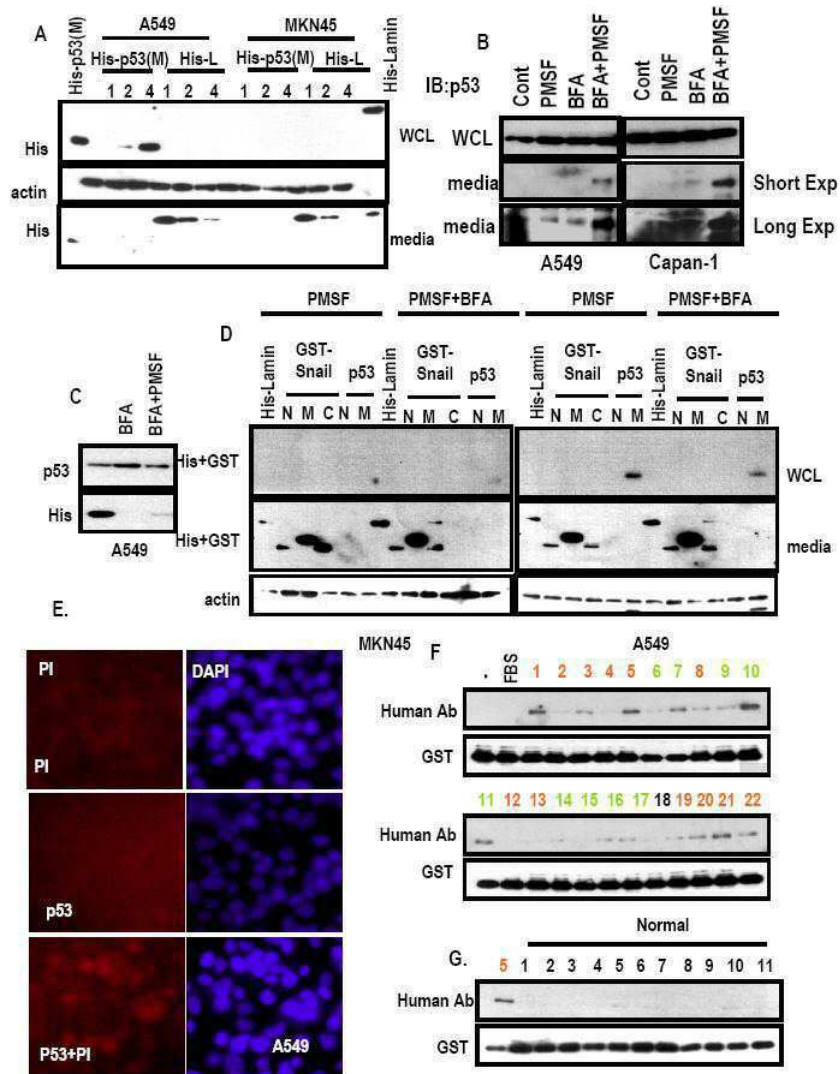
도면13



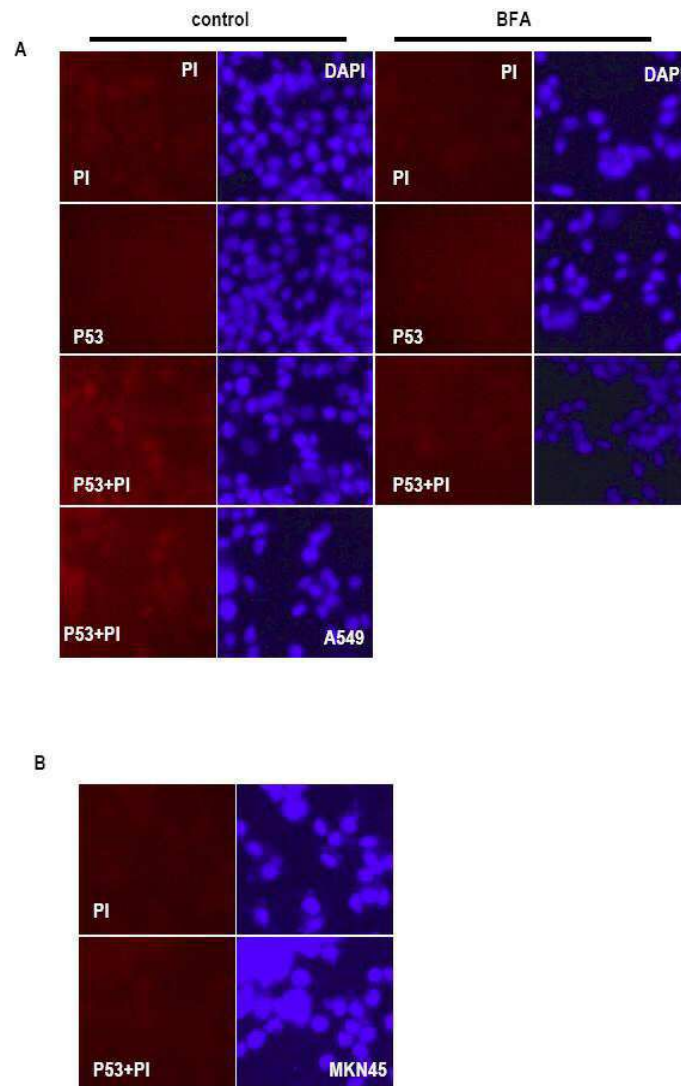
도면14



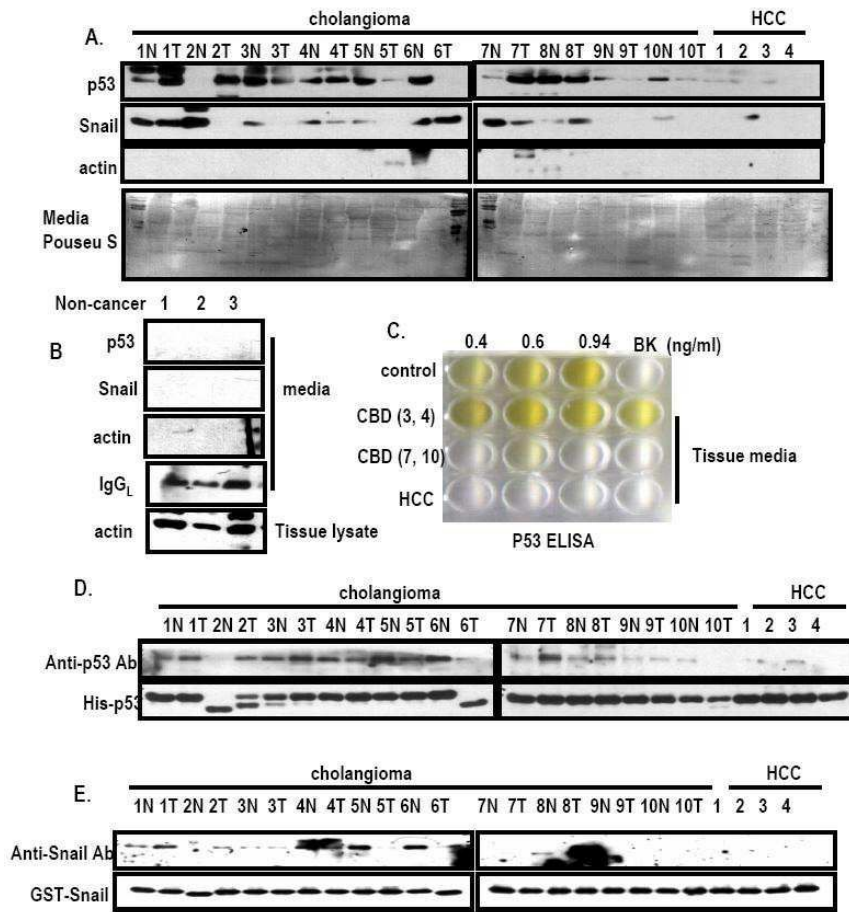
도면15



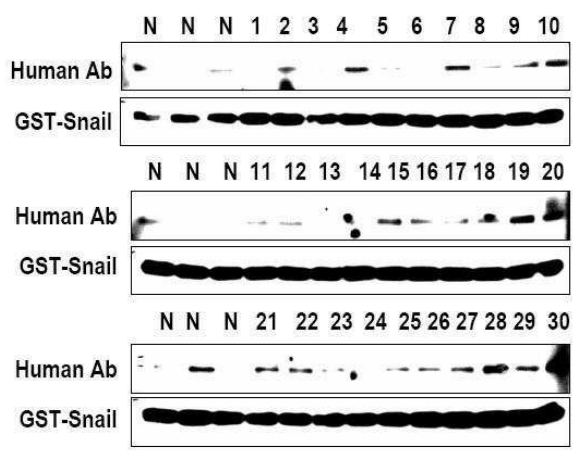
도면16



도면17

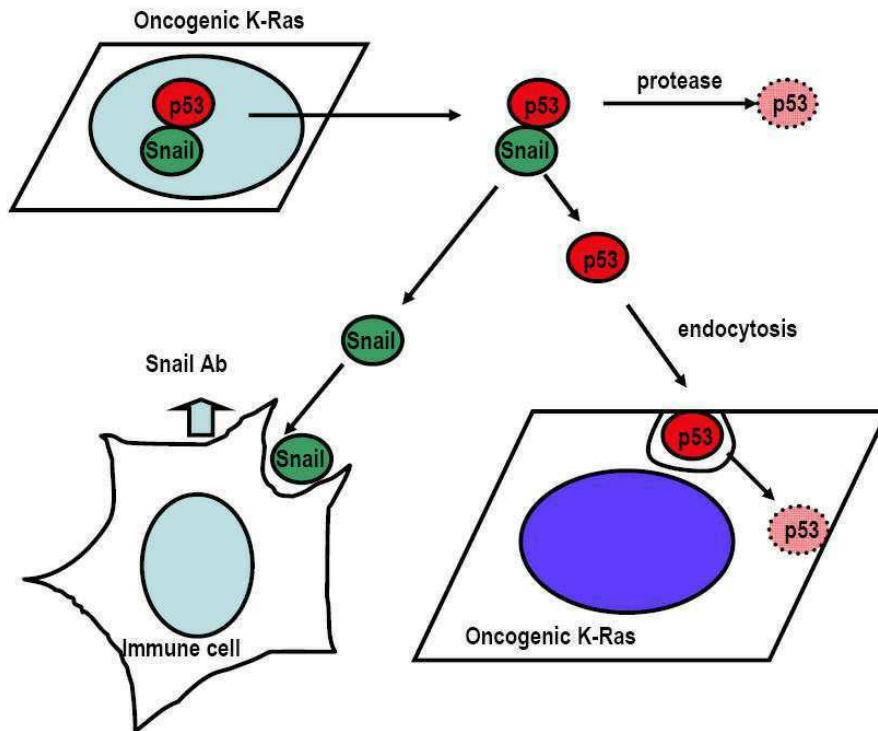


도면18

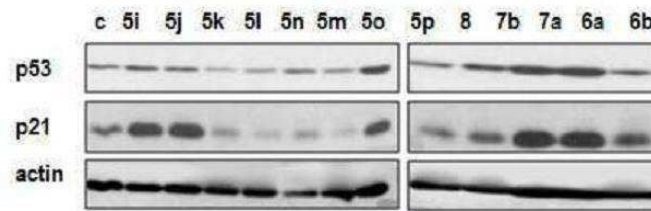




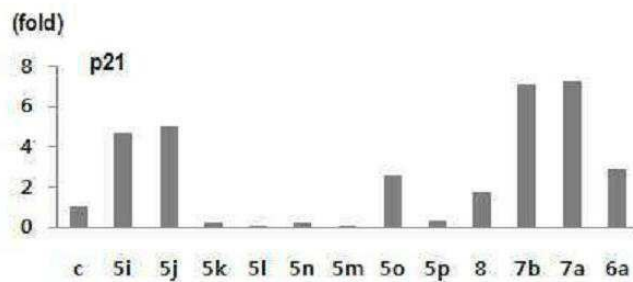
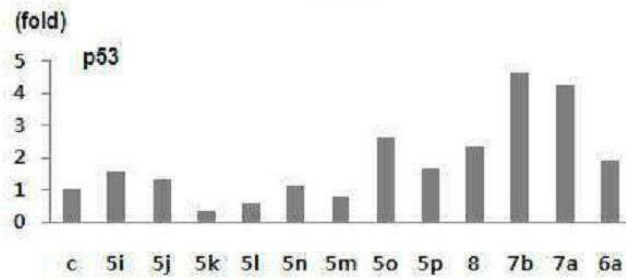
도면19



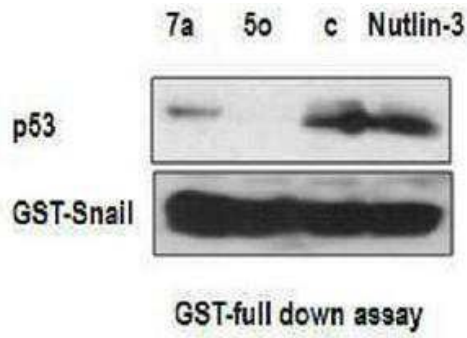
도면20



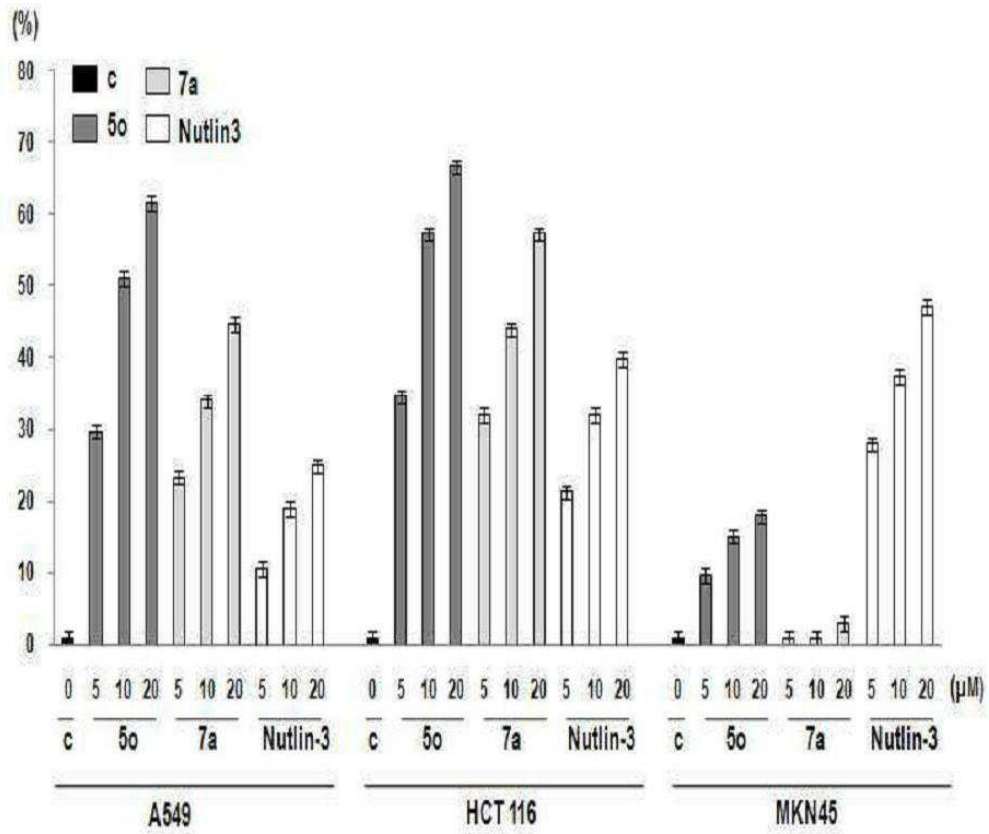
HCT116



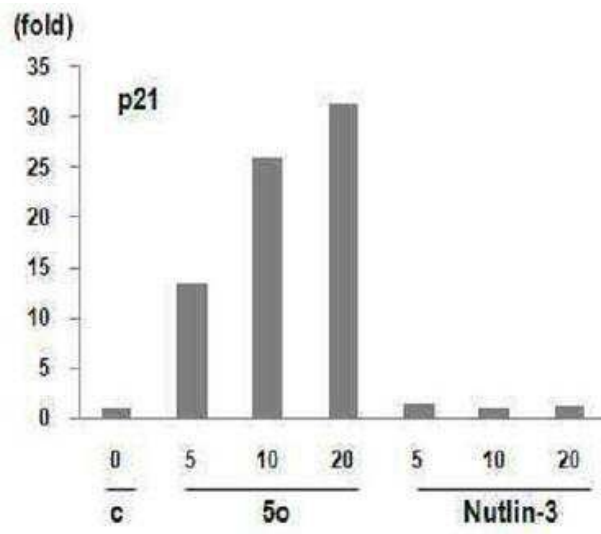
도면21



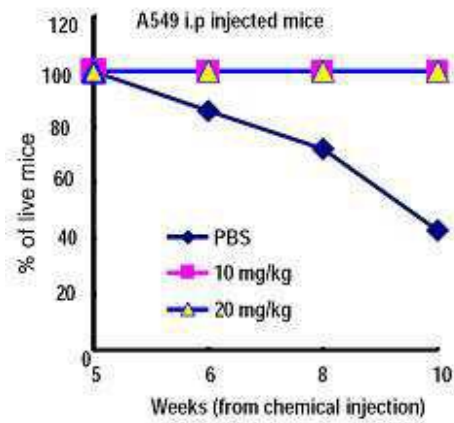
도면22



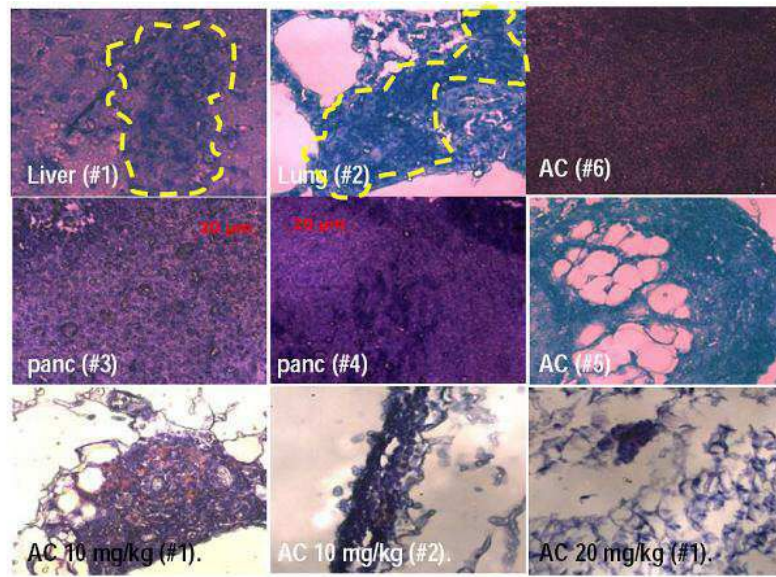
도면23



도면24

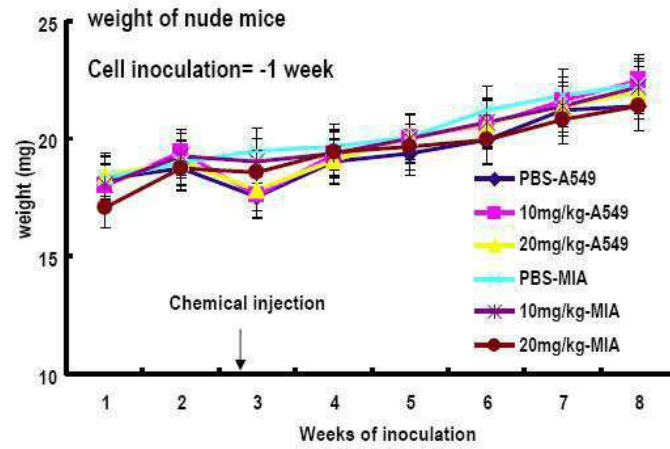


도면25

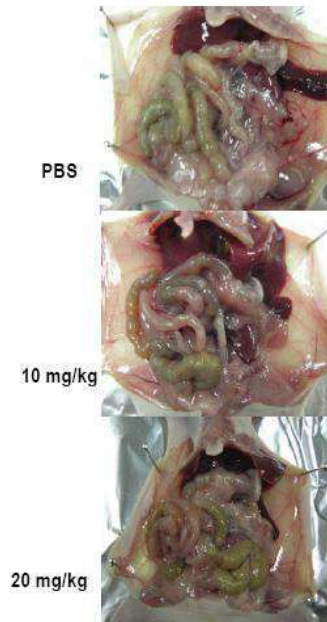


도면26

A



B. 8 weeks injection



서열목록

- <110> Pusan National University Industry-University Cooperation Foundation  
THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Chemical inhibitor of snail-p53 binding and pharmaceutical  
composition for treating cancer disease comprising the same
- <130> DP-2009-0556
- <160> 1
- <170> Kopatent In 1.71

<210> 1  
 <211> 393  
 <212> PRT  
 <213> human p53 cellular tumor antigen

<400> 1  
 Met Glu Glu Pro Gln Ser Asp Pro Ser Val Glu Pro Pro Leu Ser Gln  
 1 5 10 15

Glu Thr Phe Ser Asp Leu Trp Lys Leu Leu Pro Glu Asn Asn Val Leu  
 20 25 30

Ser Pro Leu Pro Ser Gln Ala Met Asp Asp Leu Met Leu Ser Pro Asp  
 35 40 45

Asp Ile Glu Gln Trp Phe Thr Glu Asp Pro Gly Pro Asp Glu Ala Pro  
 50 55 60

Arg Met Pro Glu Ala Ala Pro Arg Val Ala Pro Ala Pro Ala Ala Pro  
 65 70 75 80

Thr Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Pro Ser Trp Pro Leu Ser Ser Ser  
 85 90 95

Val Pro Ser Gln Lys Thr Tyr Gln Gly Ser Tyr Gly Phe Arg Leu Gly  
 100 105 110

Phe Leu His Ser Gly Thr Ala Lys Ser Val Thr Cys Thr Tyr Ser Pro  
 115 120 125

Ala Leu Asn Lys Met Phe Cys Gln Leu Ala Lys Thr Cys Pro Val Gln  
 130 135 140

Leu Trp Val Asp Ser Thr Pro Pro Pro Gly Thr Arg Val Arg Ala Met  
 145 150 155 160

Ala Ile Tyr Lys Gln Ser Gln His Met Thr Glu Val Val Arg Arg Cys  
 165 170 175

Pro His His Glu Arg Cys Ser Asp Ser Asp Gly Leu Ala Pro Pro Gln  
 180 185 190

His Leu Ile Arg Val Glu Gly Asn Leu Arg Val Glu Tyr Leu Asp Asp



