



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년06월04일  
(11) 등록번호 10-2119150  
(24) 등록일자 2020년05월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 31/4184 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 31/4184 (2013.01)  
A23L 33/10 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2018-0126869  
(22) 출원일자 2018년10월23일  
심사청구일자 2018년10월23일  
(65) 공개번호 10-2020-0045845  
(43) 공개일자 2020년05월06일  
(56) 선행기술조사문헌  
US20150158878 A1  
KR1020130083921 A  
KR1020150020170 A

(73) 특허권자  
한국원자력의학원  
서울특별시 노원구 노원로 75 (공릉동)  
(72) 발명자  
김재성  
경기도 남양주시 불암로 337, 5101동 2303호(별내동, 남양주별내 유승 한내들)  
김아영  
서울특별시 마포구 고산길 136, 501호(대흥동)  
(74) 대리인  
특허법인태백  
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 10 항

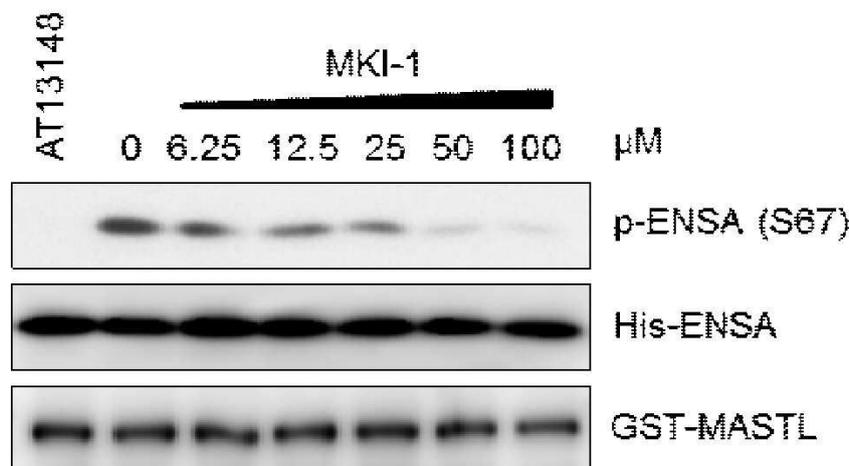
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드, 그의 유도체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 암 치료를 위한 방사선 민감제 조성물 및 암 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다. 본 발명의 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드 또는 그의 유도체를 유효성분으로 약학적 조성물에 포함시키면 암세포의 유사분열을 억류시킴으로써 증식을 억제함과 동시에 정상 세포주에서는 낮은 독성을 나타내 암세포주에 대해서만 세포사멸을 유도할 수 있어, 효과적인 항암제로 활용이 가능하다. 또한, 본 발명의 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드는 처리한 암세포의 방사선에 대한 민감도를 상승시킬 수 있어 암 치료를 위한 방사선 민감제 조성물로 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

**A61P 35/00** (2018.01)  
**A23V 2002/00** (2013.01)  
**A23V 2200/308** (2013.01)

**윤이나**

인천광역시 남동구 방축로 501, 3동 1303호(간석동, 우성아파트)

(72) 발명자

**황상구**

서울특별시 노원구 중계로8길 29, 101동 1203호(중계동, 한화꿈에그린아파트)

**송지영**

서울특별시 영등포구 여의동로3길 10, 101동 3802호(여의도동, 여의도자이)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465025245  
 부처명 보건복지부  
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원  
 연구사업명 암연구소 및 국가암관리사업본부운영  
 연구과제명 MASTL-PP2A표적 구조기반 신규 항암치료제 개발 및 난치성암 치료전략  
 기여율 7/10  
 주관기관 한국원자력의학원  
 연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711072864  
 부처명 과학기술정보통신부  
 연구관리전문기관 한국원자력의학원  
 연구사업명 한국원자력의학원연구운영비지원  
 연구과제명 방사선반응제어실용화기술개발  
 기여율 3/10  
 주관기관 한국원자력의학원  
 연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

---

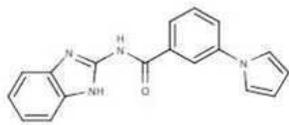
**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

하기 화학식으로 나타나는 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식]



**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 MASTL(microtubule-associated serine/threonine kinase-like) 키나아제(kinase)의 활성을 억제하는 것인, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

**청구항 3**

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 인산화된 엔도설피린 알파(Endosulfine alpha)의 발현양을 감소시키는 것인, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

**청구항 4**

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 암세포의 유사분열(mitosis)을 억류(arrest)시키거나 또는 암세포의 세포사를 유도시키는 것에 특징이 있는 것인, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

**청구항 5**

제1항에 있어서, 상기 암은 뇌종양, 양성성장세포종, 악성성장세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌림프종, 췌장교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 요도암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암, 피부암, 골수종, 백혈병 및 악성림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

**청구항 6**

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 방사선 치료와 병용하여 사용되는 것인, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

**청구항 7**

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 암세포 또는 방사선 저항성(radioresistance)을 가진 암세포의 방사선에 대한 민감도를 증가시키는, 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

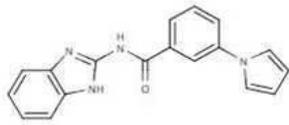
**청구항 8**

제1항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 MASTL 키나아제의 활성을 저해함으로써 방사선 민감성을 회복 또는 증진시키는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

**청구항 9**

하기 화학식으로 나타나는 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 치료를 위한 방사선 민감제(radiosensitizer) 조성물.

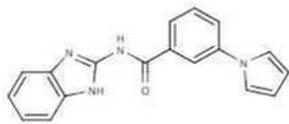
[화학식]



**청구항 10**

하기 화학식으로 나타나는 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품.

[화학식]



**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드, 그의 유도체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 암 치료를 위한 방사선 민감제 조성물 및 암 예방 또는 개선용 건강기능식품에 관한 것이다.

**배경기술**

[0003] 유전자의 정상적인 제어가 이루어지지 않아 발생하는 질병, 대표적으로 암으로 통칭되는 질환에 대한 효과적인 고 전통적인 치료 방법은 외과적으로 종양을 절제하여 제거하는 방법이 활용되고 있었으나, 원발성 암이 타 기관으로 전이가 되는 경우는 외과적 수술이 불가하여 항암 약물 치료 요법이 널리 사용되고 있다. 상기 약물 치료로 사용되는 항암제는 주로 단분자 물질을 유기적 또는 무기적 방법으로 합성하여 사용하고 있다. 이러한 방식의 전통적 약물 치료법은 많은 부작용을 수반하는데, 그 중 한 가지는 약물로 사용되는 물질이 인위적으로 합성된 생체 외부 유래 물질이라는 것과 항암 물질의 작용점이 이미 과다 발현된 단백질을 목적으로 한다는 점이다.

[0004] '암'이란 정상적인 세포사멸 균형이 깨지는 경우 세포가 과다 증식하고, 주변 조직으로 침윤할 수 있는 특징을 갖는 질병군을 말한다. 이 중 특히 유방암은 전세계적으로 여성암 중 발생율은 25.2%로 나타나는 암으로서, 2008년부터 2012년 사이의 유방암 발생율은 지속적으로 상승하는 추세로 약 20% 증가하였다. 우리나라에서는 52.1%의 발생율을 보이고 있어 OECD 국가 중 유방암 발생율이 높은 국가에 속하며, 유방암은 호르몬에 반응하는 리셉터의 발현 유무에 따라 치료방법이 다른 것으로 널리 알려져 있다. 이런 유방암을 치료하기 위하여는 진행 경우에 따라 수술요법, 항암화학요법, 방사선치료요법 및 호르몬치료를 병행하고 있다.

[0005] 현재까지 많은 천연물 및 단백질 또는 펩티드성 항암제와 화학합성 항암제가 개발되어 사용되고 있으나, 대부분 생체 내 정상세포에도 영향을 나타내는 심각한 부작용을 나타낼 뿐만 아니라, 암중에 따라 또는 동일한 암중에

라도 환자에 따라서 동일한 치료효과가 나타나지 않는 경우가 일반적이다.

[0006] 특히, 암을 치료하기 위한 방법으로, 방사선 치료요법은 다양한 암에서 필수적인 치료 방법이나, 암세포의 방사선 내성 획득, 고선량의 방사선 치료 시 정상조직의 손상 등이 방사선치료의 효율을 저하시키는 문제점으로 지속적으로 지적되고 있다. 따라서, 암세포를 치료하기 위한 방법에 있어서 방사선 치료 요법의 효과를 상승시킬 수 있는 물질에 대한 필요성이 높아지고 있다.

[0007] 따라서, 전 세계적으로 상기와 같은 문제점들을 해결한 신개념 항암제로서, 생체 내 정상세포에는 영향을 미치지 않으면서도, 암세포만을 선택적으로 제거할 수 있으면서, 더 나아가 암세포의 방사선에 대한 민감도를 상승시킬 수 있는 항암제를 개발하기 위하여 많은 연구의 필요성이 요구되고 있다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0009] 이에 본 발명자들은 항암활성 및 방사선 민감성을 가지는 물질에 대하여 연구하던 중 유방암 세포주 MCF7에 MASTL 키나아제의 활성을 저해하는 물질 중 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드를 처리하는 경우, 상기 암세포주의 증식이 억제됨과 동시에 방사선 치료 효과가 상승하는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드, 그의 유도체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 암 치료를 위한 방사선 민감제 조성물 및 암 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드, 그의 유도체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드 또는 그의 유도체를 유효성분으로 함유하는 암 치료를 위한 방사선 민감제(radiosensitizer) 조성물을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드 또는 그의 유도체를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

**발명의 효과**

[0016] 본 발명의 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드 또는 그의 유도체를 유효성분으로 약학적 조성물에 포함시키면 암세포의 유사분열을 억류시킴으로써 증식을 억제함과 동시에 정상 세포주에서는 낮은 독성을 나타내 암세포주에 대해서만 세포사멸을 유도할 수 있어, 효과적인 항암제로 활용이 가능하다. 또한, 본 발명의 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드는 처리한 암세포의 방사선에 대한 민감도를 상승시킬 수 있어 암 치료를 위한 방사선 민감제 조성물로 이용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0018] 도 1a는 42종 단일화합물을 유방암 세포주(MCF7) 및 정상 세포주(MCF10A)에 처리한 경우의 세포생존율을 나타낸 도이다.

도 1b는 42종 단일화합물을 처리한 경우의 MASTL 키나아제의 활성 저해의 정도를 나타낸 도이다.

도 1c는 42종 단일화합물을 처리한 경우의 MASTL 키나아제의 활성 저해의 정도와 세포생존율을 하나의 도면에 통합한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 다양한 농도(0~100 μM)의 MKI-1(N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드) 및 GKI-1의 처리로 인한 ADP-Glo 키나아제 활성도와 IC<sub>50</sub> 값을 나타낸 도이다.

도 3은 *in vitro*상에서 다양한 농도(0~100 μM)의 MKI-1 및 GKI-1의 처리로 인한 MASTL 키나아제 활성 억제분석에 대한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 다양한 농도(0~100 μM)의 MKI-1를 유방암 세포주MCF7에 처리한 경우에 유도되는 인산화된 ENSA의 발현

결과를 나타낸 도이다.

도 5는 pan-키나아제 저해제(AT13148), MASTL 키나아제 저해제 MKI-1 및 GKI-1를 유방암 세포주(MCF7)에 처리하여 유도되는 다양한 키나아제 활성 억제 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 MKI-1를 유방암 세포주 MCF7 및 BT549, 정상 세포주(MCF10A)에 처리한 경우의 세포생존율을 나타낸 도이다.

도 7은 pan-키나아제 저해제(AT13148), MASTL 키나아제 저해제 MKI-1 및 GKI-1를 유방암 세포주(MCF7)에 처리한 경우의 암 세포주 집락형성 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 pan-키나아제 저해제(AT13148), MASTL 키나아제 저해제 MKI-1 및 GKI-1를 유방암 세포주(MCF7)에 처리한 경우의 암 세포주 종양구 형성 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 pan-키나아제 저해제(AT13148), MASTL 키나아제 저해제 MKI-1 및 GKI-1를 유방암 세포주(MCF7)에 처리한 경우의 3D 배양환경에서 나타나는 암세포 스페로이드 형성 분석 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 방사선과 함께 pan-키나아제 저해제(AT13148), MASTL 키나아제 저해제 MKI-1 및 GKI-1를 유방암 세포주(MCF7)에 처리한 경우의 암세포 균락 형성 결과(도 10A), 상기 균락 형성을 수치화하여 나타낸 결과(도 10B) 및 웨스턴 블랏을 수행한 결과(도 10C)를 나타낸 도이다.

도 11은 방사선과 함께 pan-키나아제 저해제(AT13148), MASTL 키나아제 저해제 MKI-1 및 GKI-1를 방사선 저항성 표현형을 가지는 유방암 세포주(CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> MCF7)에 처리한 경우의 암세포 균락 형성 결과(도 11A), 상기 균락 형성을 수치화하여 나타낸 결과(도 11B) 및 웨스턴 블랏을 수행한 결과(도 11C)를 나타낸 도이다.

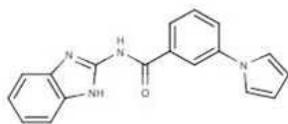
**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0019] 본 발명은 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드, 그의 유도체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명의 유효성분으로 함유되는 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드(MKI-1)는 MASTL 키나아제의 활성을 억제하여, 암세포의 유사분열을 억류시킴으로써 암 세포의 증식을 억제한다. 또한, 정상 세포주에서는 낮은 독성을 나타내고 암세포주에 대해서만 세포사멸을 유도할 수 있어 항암제로 활용하기 용이한 물질로서, 상기 물질의 화학식은 다음과 같다.

[0023] [화학식]



[0024] .....

[0025] 본 발명의 약학적 조성물이 활성을 억제하는 MASTL(microtubule-associated serine/threonine kinase-like) 키나아제는 세포 분열시 중요하게 작용하는 효소로써 ENSA(α-endosulfine)과 ARPP19(cAMP-regulated phosphoprotein 19) 단백질을 인산화하는 것으로 널리 알려져 있다. 또한, 상기 MASTL이 유방암을 포함한 전립선암, 폐암 및 위암에서 높게 발현되는 경우 안 좋은 예후가 나타나는 것으로 알려져있다. 이에 본 발명자들은 상기 MASTL 키나아제를 효과적으로 억제하는 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드(MKI-1)을 암세포에 처리하는 경우 상기 암 세포만을 효과적으로 사멸시킬 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0026] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 인산화된 엔도설린 알파의 발현양을 억제시킬 수 있으며, 암세포의 유사분열을 억류(arrest)시키거나, 암세포의 세포사를 유도시킬 수 있어 암세포의 증식을 효과적으로 억제시킬 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분으로 5 내지 150 μM농도의 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드(MKI-1)가 포함될 수 있으며, 바람직하게는 10 내지 120 μM의 포함될 수 있으며, 보다 바람직하게는 30 내지 100 μM의 유효 농도로 포함될 수 있다.

- [0028] 본 발명의 약학적 조성물은 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드(MKI-1), 그의 유도체 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체 즉 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 1종 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및/또는 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제 또는 흡입제로 제제화하는 것이 바람직하다.
- [0029] 본 발명의 약학적 조성물의 투여방법은 특별히 제한되는 것은 아니나, 목적하는 방법에 따라 정맥내, 피하, 복강 내, 흡입 또는 국소적용과 같이 비경구 투여하거나 경구 투여할 수 있다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 일일 투여량은 치료를 필요로 하는 개체에 투여됨으로서 경감된 질병 상태에 대한 치료에 충분한 본 발명의 치료용 물질의 양을 의미한다. 치료용 물질의 효과적인 양은 특정 화합물, 질병 상태 및 그의 심각도, 치료를 필요로 하는 개체에 따라 달라지며, 이는 당업자에 의해 통상적으로 결정될 수 있다. 비제한적 예로서, 본 발명에 의한 조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여 형태, 건강 상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로는 0.0001 ~ 1000 mg/일, 바람직하게는 1 ~ 500 mg/일이며, 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회에 분할 투여할 수도 있다.
- [0030] 본 발명에서 '개체'란 암의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0031] 본 발명에서의 '암'이란 정상적인 세포사멸 균형이 깨지는 경우 세포가 과다 증식하고, 주변 조직으로 침윤할 수 있는 특징을 갖는 질병군을 말한다. 본 발명의 암은 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌립프종, 핍지교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 요도암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암, 피부암, 골수종, 백혈병 및 악성림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 바람직하게는 유방암을 포함한 전립선암, 폐암 및 위암일 수 있으며, 가장 바람직하게는 유방암일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, MASTL 키나아제의 활성 억제제로 인한 항암 효과가 나타날 수 있는 모든 종류의 암 중에 본 발명이 적용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 약학적 조성물은 방사선 치료와 병용하여 사용될 수 있으며, 특히 본 발명의 약학적 조성물은 암세포 또는 방사선저항성(radioresistance)을 가지는 암세포에 관하여도 방사선에 대한 민감도를 증가시킬 수 있어 방사선 치료와 병용할 때, 암세포의 치료방법에 있어서, 방사선 요법의 효과를 상승시킬 수 있는 것에 그 특징이 존재한다.
- [0034] 또한 본 발명은 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드 또는 그의 유도체를 유효성분으로 함유하는 암 치료를 위한 방사선 민감제(radiosensitizer) 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드 또는 그의 유도체를 암세포에 처리하면 암세포의 방사선에 대한 민감도가 증가하여, 암세포의 사멸을 증진시킬 수 있다.
- [0036] 방사선 민감성 또는 방사선 저항성의 기준은 0 내지 2.5 Gy의 감마 방사선을 조사하였을 때의 세포 생존율을 이용하여 작성한 선형 모델의 기울기 값에 의해 분류할 수 있다. 이러한 분류 방법은 Jerry R. Williams 등이 논문(Acta Oncologica, 46, 628-638, 2007)을 통해 보고한 바 있다. 본 발명에서 사용된 용어 "방사선 민감성"은 상기 기울기 값이 0.00 내지 0.30의 범위에 포함되는 특징을 갖는 세포를 의미하고, "방사선저항성"은 0.31 내지 1.00 범위에 포함되는 특징을 갖는 세포를 의미한다. 방사선 민감성 세포에는 SW1222, HCT116, LoVo, CBS, LS174T, 379.2, 80S4, N6CH3가 알려져 있고, 방사선 저항성 세포에는 DLD-1, HT29, WiDR, SW480, SW116, 19S186, Caco2, Caco2-neoras, U251, U87, T98G가 알려져 있으나, 본 발명에서는 구체적인 일실시예로 방사선 저항성 세포로 CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> MCF7 세포를 사용하였다.
- [0037] 본 발명에 있어서 상기 암은 뇌종양, 양성성상세포종, 악성성상세포종, 뇌하수체 선종, 뇌수막종, 뇌립프종, 핍

지교종, 두개내인종, 상의세포종, 뇌간종양, 두경부 종양, 후두암, 구인두암, 비강/부비동암, 비인두암, 침샘암, 하인두암, 갑상선암, 흉부종양, 소세포성 폐암, 비소세포성 폐암, 흉선암, 종격동 종양, 식도암, 유방암, 남성유방암, 복부종양, 위암, 간암, 담낭암, 담도암, 췌장암, 소장암, 대장암, 항문암, 방광암, 신장암, 남성생식기종양, 음경암, 요도암, 전립선암, 여성생식기종양, 자궁경부암, 자궁내막암, 난소암, 자궁육종, 질암, 여성외부생식기암, 여성요도암, 피부암, 골수종, 백혈병 및 악성림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으나, 바람직하게는 유방암을 포함한 전립선암, 폐암 또는 위암일 수 있으며, 가장 바람직하게는 유방암일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0038] 본 발명에 따른 암세포 방사선 치료용 방사선 민감제 조성물은 방사선 요법과 병용하여 사용될 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 사용하는 방사선 치료요법은 악성 세포의 DNA를 손상시키는 국소 치료 방법이다. 정상 세포는 종양 세포에 비해 이런 손상을 수선하는 능력이 더 큰데, 상기 방사선 치료요법은 이런 차이를 이용하는 것으로 알려져 있다.
- [0040] 상기 방사선 치료요법은 외부 빔 방사선(x-선, γ-선, 양성자 및 중성자), 근접요법 및 방사선 활성화 물질 이식을 포함할 수 있으며, 2-D, 3-D, 공초점, 강도-변조(IMRT) 및 이미지-가이드(IGRT) 접근법에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 암치료에서 사용될 수 있는 표준 방사선 치료요법은 약 60 Gys(50 ~ 70 Gys)의 총 용량으로 2.5 Gy/일로 제공하는 방법일 수 있다. 그러나, 특정 피험자, 장치, 및 종양 타입에 기초하여 당업자가 바람직한 방사선 용량을 선택할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 방사선 민감제 조성물은 방사선에 대한 암세포의 민감도를 증가시킴으로써 기존의 방사선 치료 요법에 대한 개선을 구성한다. 예를 들어, 본 발명의 방사선 민감제 조성물을 사용하면 암세포로 하여금 방사선에 대해 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100% 또는 이 이상의 민감도를 가지게 한다. 본 발명에서 사용된 용어 "민감도" 및 "방사선 민감도"는 방사선 용량에 기초한 생존하는 세포수를 말한다. 따라서, 방사선 민감도의 증가는 어떤 방사선 용량에서 생존하는 세포수의 감소, 치사량에 필요한 방사선 용량의 감소, 또는 이들의 조합을 의미할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 방사선 민감제는 암세포의 방사선 치료뿐만 아니라, 화학요법에서도 민감성을 증가시킬 수 있기 때문에, 화학요법에서 민감도를 증가시키는 민감제의 용도로 본 발명의 방사선 민감제를 사용하는 경우도 본 발명의 범주에 속할 수 있다.
- [0044] 또한 본 발명은 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드 또는 그의 유도체를 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0045] 본 발명에서 용어, "건강기능식품"이란 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어있는 특정성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체 방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 말하는 것으로서, 질병의 예방 또는 건강의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있는 것을 말한다.
- [0046] 본 발명에 따른 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드 또는 그의 유도체를 건강기능식품으로 사용하는 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 이는 필요에 따라 선택하여 적절하게 사용될 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명에 따른 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드 또는 그의 유도체가 사용될 수 있는 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 예컨대, 라면, 기타 면류, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료, 각종 스프, 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 과자류, 피자, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 또는 비타민 복합제 등이 있다. 또한, 본 발명에 따른 건강기능식품은 N-1H-벤지미다졸-2-일-3-(1H-피롤-1-일) 벤자미드 이외 통상의 기술자의 선택에 따라 통상적으로 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조성분과 공지의 첨가제를 혼합할 수 있다.
- [0049] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0051] [실시예]
- [0052] 실시예 1. MASTL 카나아제 저해제 선별을 위한 단일 화합물 준비 및 사용한 세포주와 이의 배양 방법

- [0053] MASTL 키나아제 저해제 선별을 위한 *in silico* 기반 단일 화합물 40종을 캠프리지(Chembridge Corporation), pan-AGC 키나아제 저해제 AT13148을 셀레캠(Selleck Chemicals)에서 구입하고, MASTL 키나아제 저해제 GKI-1을 한국 화학 연구소(Korea Research Institute of Chemical Technology)에서 합성하였다.
- [0054] 또한 본 실험에서 사용된 세포주를 ATCC(American Type Culture Collection; Manassas, VA)에서 분양 받은 것을 사용하였다. 사람 유래 종양 세포주, 유방암세포주인 MCF7 및 T47D는 10% 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS; HyClone, South Logan, UT) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 DMEM 배지(Corning, NY, USA) 에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건으로 배양하였으며, BT549 유방암 세포주는 동일한 조건으로 사용한 배지를 RPMI 1640 (Welgene, Daegu, Korea)로 하여 배양하였다. 사람 유래 정상 세포주 MCF10A는 5% 말 혈청(Invitrogen)과 1% 페니실린/스트렙토마이신, 20 ng/ml EGF (Peprotech, London, UK), 0.5mg/ml 히드로코르티손 (Sigma-Aldrich, MO, USA), 100ng/ml 콜레라 독소(Cholera Toxin, Sigma-Aldrich) 및 10 µg Insulin (Sigma-Aldrich)이 함유된 DMEM/F12 (Invitrogen) 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>조건으로 배양하였다.
- [0055] 또한 방사선저항성을 가지는 CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> MCF7 세포주를 FACS Aria II(BD Biosciences, CA, USA)을 사용하여 상기 표면 마커를 확인하고, MCF7세포주로부터 분리하였고, 분리된 세포주가 방사선저항성 표현형을 가지는지 여부는 방사선에 노출 후, 세포주가 균락(콜로니) 및 구를 형성하는지 여부를 중심으로 판단하여 선별하였다.
- [0057] 이후, 상기 실시예 1의 방법을 통하여 준비한 세포주 및 화합물을 이하 실시예에서 사용하였다.
- [0059] **실시예 2. MASTL (microtubule-associated serine/threonine kinase-like) 키나아제 저해제의 선별**
- [0060] MASTL 키나아제는 ARPP19 및 ENSA 인산화를 억제하여 PP2A의 불활성화를 유도하는 활성을 가지는 유사분열 (mitosis)의 M기 entry조절자이다. 암세포는 정상적인 세포주기를 벗어나 끊임없이 분열하는 불멸화된 세포인데, 상기와 같은 M기 조절자로서 작용하는 MASTL 키나아제를 억제하는 저해제를 활용하면 제한없이 증식 하는 암세포를 사멸시킬 수 있을 것인바, MASTL를 효과적으로 활성을 억제할 수 있는 저해제를 찾기 위한 실험 을 수행하였다.
- [0061] 1차적으로 MASTL 키나아제를 억제할 수 있는 500 화합물 라이브러리 중 가장 효율적으로 활성을 억제하는 화합 물 후보물질 40개를 선별하였다. 이후, 상기 40여종의 후보 물질 중 암세포에만 특이적으로 사멸효과를 나타내 면서, 정상적인 세포에서는 독성을 나타내지 않는 물질을 찾아내기 위하여, 제조자의 프로토콜에 따라 WST-8 분 석 (Cyto XTM cell viability assay kit, LPS solution, 대전, 한국)을 수행하였다. 간단하게, MCF7 및 MCF10A 세포를 96- 웰 플레이트에 접종하고, 24 시간 동안 배양한 다음, 42개의 저해제 후보물질을 처리하였다. 상기 화합물중 멀티-AGC 키나아제 저해제 AT13148을 양성대조군으로 사용하였다. 이후 흡광도를 Versamax 마이크로 플레이트 판독기 (Molecular Devices, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 측정하였으며, 상기 실험의 결과를 도 1a에 나타내었다.
- [0062] 또한, 상기 후보 물질 중 MASTL 활성을 효과적으로 억제하는지 여부를 확인하는 면역 블로팅(immunoblotting) 실험을 함께 수행하였다. In vitro에서 상기 MASTL 키나아제 분석을 위하여 MCF7 세포 유래 재조합 GST-tagged-MASTL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 및 his-tagged-ENSA (Sino Biological Inc., Beijing, China) 단백질 또는 면역 침전된 MASTL를 MASTL 항체 (AP7147d; Abgent, CA, USA) 를 사용하여 100 mM Tris-Hcl (pH 7.5), 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 1 mM EDTA 및 10 µM 초순수 ATP로 이루어진 키나아제 완충액과 함께 반응시켰다. 반응을 시킨 이후, SDS-로딩 완충액을 처리하여 중단시켰다. 본 실험에 있어서, 멀티-AGC 키나아제 저해제 AT13148를 양성대조군으로 사용하였다. 인산화된 ENSA에 대한 면역 블로팅(immunoblotting)을 수행하여 반응을 분석하였으며, 상기 분석의 결과를 도 1b에 나타내었으며, 상기 세포 생존 확인 실험을 통하여 확인한 결과와 키나아제 저해제 활성 실험 결과를 도 1c에 나타내었다.
- [0063] 상기 도 1a에서 확인한 바와 같이, 후보물질 화합물 약 40여종 중 #14 및 #38이 처리한 경우 처리된 암세포주 (MCF7)의 성장이 유의할 정도로 억제되는 것을 확인하여, 암세포의 증식을 억제할 수 있는 항암 효과가 나타나는 것을 확인하라 수 있었다. 정상 세포주(MCF10A)에서는 #38을 처리한 경우 세포 생존률이 50% 이하로 현저하 게 낮아진 것이 확인되었으나, 반면 다른 후보물질인 #14이 세포주에 처리된 경우에 세포의 생존률이 대조군인 DMSO의 값과 유사한 정도로 높게 유지되는 것을 확인하였다.
- [0064] 또한 도 1b에서 확인한 바와 같이, 상기 42종의 후보물질 중 #14 및 #38이 암세포에 처리한 경우에 MASTL 키나 아제 활성이 50% 이하로 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 양성 대조군인 AT13148과 유사한 정도의 키나아제 억 제효과가 나타나는 것이 확인되었다.

- [0065] 종합적으로, 정상 세포에서는 독성이 나타나지 않으나 암세포에서는 특이적인 사멸효과가 나타내면서 특히 MASTL 키나아제 활성까지 가장 높게 억제할 수 있는 후보물질은 도 1c에서 확인한 바와 같이, 후보물질 #14, 즉 N-1H-benzimidazol-2-yl-3-(1H-pyrrol-1-yl) benzamide임을 확인할 수 있었다. 특히 항암제로 활용하기 위해서는 정상세포에는 영향을 미치지 않으면서 암세포에만 특이적으로 작용하는 것이 부작용을 최소화하기 위하여 필요한 것을 고려할 때, N-1H-benzimidazol-2-yl-3-(1H-pyrrol-1-yl) benzamide는 항암제로서 활용될 수 있는 가능성이 있음을 확인하였다.
- [0067] **실시예 3. *in vitro* 상에서 선별된 N-1H-benzimidazol-2-yl-3-(1H-pyrrol-1-yl) benzamide의 MASTL 키나아제 억제활성의 확인**
- [0068] 선별된 N-1H-benzimidazol-2-yl-3-(1H-pyrrol-1-yl) benzamide(MKI-1)가 *in vitro* 상에서 효과적으로 MASTL을 억제할 수 있는지 확인하기 위하여 ADP-Glo™ luminescence-kinase 분석 실험을 수행하였다.
- [0069] 프로메가에서 제공하는 표준 프로토콜에 따라 ADP-Glo™ 키나아제 분석 키트를 이용하여 단백질 키나아제 분석을 수행하였다. ADP-Glo™ luminescence-kinase 분석 실험은 프로메가사의 MASTL 키나아제에 의해 생성되는 ADP를 발광성 신호로 전환하여 측정하였는데, 발광성 신호의 감소는 ADP 생성의 감소를 의미하고, 이는 MASTL 키나아제의 활성이 효과적으로 억제되는 것을 시사한다. MASTL 키나아제 저해제(GKI-1, MKI-1 또는 AT13148)의 연속적인 2배 희석액을 제조하고, 이를 100 mM Tris-HCl (pH7.5), 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 1 mM EDTA 및 10 μM ultra-pure ATP (promega)로 구성된 키나아제 반응 버퍼에서 MASTL 키나아제 25n, ENSA 250ng 및 10 μM ATP를 혼합하였다. 이후 30 °C에서 30분 동안 상기 혼합물을 E-tube에서 반응시키고, 키나아제 검출 시약(Kinase Detection Reagent)을 첨가하여 전환된 ATP를 검출하기 위하여 30분 동안 반응시켰다. 이후 반응시킨 반응물을 384-웰 화이트 플레이트에 옮기고 SpectraMax i3x Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices)를 사용하여 형광을 판독하였으며, GKI-1, N-(4-chlorophenyl)-3-(1H-pyrazol-4-yl)aniline 및 AT13148는 양성대조군으로 사용되었다. 상기 판독결과를 통하여 확인한GKI-1 간 MKI-1 키나아제 활성 억제 효과 및 그 IC<sub>50</sub> 를 도 2에 나타내었다. 또한, 처리한 키나아제 저해제만 달리하고 나머지 조건을 동일하게 하여 수행한 MKI-1 의 농도별 (0, 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 μM) 처리에 의한 효소 활성 분석 실험을 웨스턴 블랏을 통하여 수행하고, 이를 도 3에 나타내었다.
- [0070] 도 2에서 확인한 바와 같이, IC<sub>50</sub> 값을 계산한 결과 MKI-1이 처리된 경우에서 11.62 μM 으로 나타나는 것을 확인하여, 12.02 μM 의 값을 나타내는 양성대조군으로 사용한 GKI-1값과 유사한 정도의 값이 나타나는 것을 확인하였다.
- [0071] 또한, 도 3에서 확인한 바와 같이, MKI-1의 처리 용량이 높아질수록 ENSA의 인산화의 효율적인 저해를 확인하였는바, 용량-의존적인 MASTL키나아제 저해효과가 확인되었다. 특히, MKI-1이 50 μM 이상 처리된 경우에는 p-ENSA가 나타나지 않아 MASTL 키나아제의 활성을 완전히 저해시킬 수 있음을 확인하였다. 따라서, 종합적으로, MKI-1의 처리를 통하면 MASTL 키나아제의 활성을 효과적인 억제가 가능한 것을 확인할 수 있었으며, 상기와 같은 억제는 용량의존적인 것임을 다시 한번 확인할 수 있었다.
- [0073] **실시예 4. 선별된 N-1H-benzimidazol-2-yl-3-(1H-pyrrol-1-yl) benzamide(MKI-1)의 암세포주에서의 MASTL 키나아제 억제활성 효과의 확인**
- [0074] 선별된 MKI-1 이 MASTL키나아제의 활성을 억제하여 유방암 세포주에서도 효과적으로 ENSA의 인산화를 저해시킬 수 있는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. MASTL 키나아제 저해제(MKI-1 및 GKI-1)를 처리하고, 유방암 세포주 MCF7에서 인산화된 ENSA의 발현이 효과적으로 저해되는지 형광으로 확인하기 위해 인산화된 ENSA (Ser67)/ARPP19 (ser62) 대한 항체를 이용하여 면역 형광 염색법을 실시하였다. 2.5x10<sup>4</sup> MCF7세포를 6 웰 플레이트에 24시간 배양 후 MASTL 키나아제 저해제와 세포 주기 조절 약제 콜세마이트 (KaryoMAX™ Colcemid™ Solution in PBS; Gibco) 80ng/mL를 16 내지 18시간 동안 처리하였다. 세포의 고정 및 투과화를 위하여 인산완충식염수로 세척한 후, 4% 파라포름알데히드, 0.2% 트리톤-X를 첨가하여 각각 10분 동안 반응시켰다. 5% 우태아 혈청으로 1시간 전처리하고, 인산화된 ENSA (Ser67)/ARPP19 (ser62)에 대한 1:100희석 항체를 16시간 동안 처리한 후, 0.1% 트리톤X-100/ 인산완충식염수 용액(Tritonx-100/ PBS)으로 3번 세척하였다. Alexa488-접합 이차 항체 (AP132JA4, Invitrogen)로 실온에서 2시간 반응시켜 표지하였으며, IN Cell Analyzer 6000 (GE Healthcare Life Science)로 인산화된 ENSA를 촬영하고 분석하였다. 상기 실험의 결과를 도 4A 및 상기 인산화

된 정도를 도식화하여 도 4B에 나타내었다.

[0075] 도 4A 및 도 4B에서 나타난 바와 같이, MKI-1은 대조군으로 사용한 DMSO 대비 약 절반에 가까운 수준의 ENSA의 인산화 저해 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 양성 대조군으로 사용한 GKI-1과 유사한 정도의 인산화 저해 효과를 나타내는 것이 확인되어, 유방암 세포주에서 효율적인 ENSA 인산화 억제제를 통한 암세포의 MGI를 저해할 수 있음을 확인하였다.

[0077] **실시예 5. 선별된 N-1H-benzimidazol-2-yl-3-(1H-pyrrol-1-yl) benzamide(MKI-1)의 MASTL 키나아제 특이적인 억제활성 효과의 확인**

[0078] 선별된 MKI-1 이 MASTL 키나아제 특이적인 억제활성이 나타나는지 여부를 확인하기 위한 웨스턴블랏팅 실험을 수행하였다. SDS-PAGE 전기영동을 통하여 20 µg의 단백질을 분리하고 PVDF 막으로 옮긴 후 다음의 나열된 특이적인 항체를 사용하였다: 토기 다클론항체 MASTL (Abgent); phospho-ENSA (Ser67)/ARPP19 (Ser62) (#5240), ENSA (#11915S), cleaved PARP (Asp214) (#9541), AKT (#9272), phospho-AKT (ser473) (#9271), phospho-GSK-3α/β (Ser21/9) (#9331), phospho-p70S6K (The 288) (#9205) 및 phospho-Chk2 (Thr68) (#2661; Cell Signaling Technology, MA); p70S6K (sc-230; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), phospho-H3 (S10) (06-570, Merck, NJ); 마우스 단일클론항체 caspase-2 (#2224S). 또한 마우스 다클론항체 β-actin (C4; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)는 로딩 대조군으로 사용하였으며, 1× PBS/0.1% Tween 20으로 세척하고, HRP-결합 2차 항체와 향상된 화학발광 검출 시스템을 이용하여 결합 단백질을 탐지하였으며, 웨스턴 블랏팅의 나머지 조건은 상기 실시예 3과 동일하게 하여 밴드의 이미지를 Amersham Imager 600 시스템 (GE Healthcare Life Science) 또는 X-Ray 필름 (AG, HealthCare, SC, USA)을 사용하여 얻고, 이를 도 5에 나타내었다.

[0079] 상기 도 5에 나타난 바와 같이, 대조군으로 사용한 AT13148은 MCF7 세포에서 AKT의 활성화를 강력하게 억제하였으며, AT13148에 의하여 인산화된 AKT 및 인산화된 GSK-3β의 발현양을 변화시켰다. 반면, MKI-1은 MCF7 세포에서 인산화된 p-ENSA의 발현양만을 처리 용량 의존적으로 감소시켰을 뿐 이외 AKT 및 인산화된 GSK-3β의 활성을 조절하지 않음을 확인하였다. 또한, MKI-1은 인산화된 H3의 발현양을 용량 의존적으로 증가시켰는데, 인산화된 H3의 발현이 증가하면 유사분열이 중지되는바, 상기와 같은 결과를 통하여 MKI-1이 암세포의 유사분열을 중지시킬 수 있음을 확인하였다. 종합적으로, MKI-1이 다른 AGC 키나아제의 활성에는 영향을 미치지 않으면서, 목표하는 MASTL의 키나아제 활성만을 효과적으로 억제시킬 수 있음을 확인하였다.

[0081] **실시예 6. 선별된 N-1H-benzimidazol-2-yl-3-(1H-pyrrol-1-yl) benzamide(MKI-1)의 암세포 특이적인 사멸효과(항암 효과)의 확인**

[0082] **6.1 MKI-1의 암세포 특이적인 사멸효과 확인**

[0083] 선별된 MKI-1 이 암세포만 사멸시킬 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, MKI-1을 처리하고 유방암 세포주 및 정상 세포주의 세포 생존율이 변화하는지 여부를 측정하는 실험을 수행하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 WST-8 분석(Cyto XTM cell viability assay kit, LPS solution, 대전, 한국)을 수행하였다. 암세포인 MCF7 및 BT549와 정상세포주인 MCF10A 세포를 96-웰 플레이트에 접종하고, 24 시간 동안 배양한 다음, 다양한 농도(3.70, 11.11, 33.33 및 100 µM)의 MASTL 키나아제 저해제를 처리하였다. 이후, 흡광도를 Versamax 마이크로 플레이트 판독기 (Molecular Devices, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 측정하였으며, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0084] 상기 도 6에서 확인한 바와 같이, 양성대조군으로 사용한 AT13148은 암세포와 정상세포주를 구분하지 않고 모두 세포 생존율을 급격하게 감소시키는 것을 확인하였다. 특히 MKI-1 및 GKI-1은 정상 세포주에 처리된 경우에는 세포 생존율을 거의 감소시키지 않으나, 암세포주(MCF7 및 BT549)에 대해서는 세포 생존율을 용량 의존적으로 감소시키는 항암 활성을 나타낼 수 있음을 확인하였다. 특히, 암세포주에 있어서, MKI-1은 33.33 µM 이상에서 암세포의 생존율을 현저하게 감소시켰으며, 특히 동일 용량을 처리한 경우 GKI-1 보다 MKI-1이 처리된 군에서 현저하게 세포 생존율을 감소시킨 것을 확인하였다. 따라서, MKI-1은 다른 키나아제 저해제 보다 암세포 특이적인 사멸효과가 용량 및 특이도를 비교한 경우에도 현저하게 우수함을 확인하였다.

[0086] **실시예 6.2 MKI-1의 균락형성 분석법(Clonogenic assay)을 통한 암세포 사멸효과(항암 효과)의 확인**

[0087] 선별된 MKI-1 이 암세포를 효율적으로 사멸시킬 수 있는지 여부를 확인하기 위하여 균락형성 분석을 수행하였다. 먼저, 60 mm 배양 플레이트에 유방암 세포 MCF7 (500-1000 cells)개의 세포를 배양하고, 24시간 후 MASTL 키나아제 저해제(AT13148, MKI-1 및 GKI-1)를 각각 처리하고 15일간 배양하였다. 메탄올이 첨가된 트립토판 블루로 고정 및 염색시켜 균락수를 수치화하고, 이를 도 7에 나타내었다.

- [0088] 도 7에서 확인한 바와 같이, 대조군인 DMSO 대비 GKI-1을 처리한 군에서는 암세포주의 세포 균락수는 거의 감소하지 않아, GKI-1 은 암세포의 균락을 거의 감소시키지 않는 것을 확인하였다. 반면, MKI-1 처리 군에서는 양성 대조군으로 사용한 AT13148을 처리한 군과 유사한 정도로 암세포 균락이 현저하게 감소한 것을 확인하였다. 따라서, MKI-1은 암세포의 균락을 효과적으로 사멸시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [0090] **실시예 6.3 MKI-1의 종양구 형성 분석법(Tumorsphere forming assay)을 통한 암세포 사멸효과(항암 효과)의 확인**
- [0091] 선별된 MKI-1 이 암세포의 종양구의 형성을 효과적으로 감소시킬 수 있는지 여부를 확인하기 위하여 종양구 형성 분석법을 수행하였다. 부착률이 낮은 플레이트에 유방암 세포 MCF7 (2500-10000 cells)를 1% 페니실린, B-27 (1:50; invitrogen), 20ng/mL 표피 세포 성장인자 (R&D Systems) 및 20ng/mL 섬유모 세포 성장인자 (R&D Systems)가 함유된 무혈청 DMEM/ F12 (weIGENE)에 현탁하여 배양시켰다. 24시간이 경과한 후 MASTL 키나아제 저해제(AT13148, MKI-1 및 GKI-1)를 각각 처리하고, 15일간 배양한 후 종양구의 직경을 측정하여 수치화하였고, 이를 도 8에 나타내었다.
- [0092] 도 8에 나타난 바와 같이, 대조군인 DMSO 대비 GKI-1을 처리한 군에서는 암세포주의 세포 종양구의 직경은 거의 감소되지 않아, GKI-1 은 암세포의 크기를 거의 감소시키지 않는 것을 확인하였다. 반면, MKI-1 처리 군에서는 양성대조군으로 사용한 AT13148을 처리한 군과 유사한 정도로 암세포 종양구 직경이 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있었다. 따라서, MKI-1은 암세포 종양구의 크기를 효과적으로 감소시킴과 동시에 종양구의 형성 역시 효과적으로 감소시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0094] **실시예 6.4 MKI-1의 3-D 배양법(Three-dimensional culture)을 통한 암세포 사멸효과(항암 효과)의 확인**
- [0095] 선별된 MKI-1 이 세포의 기질(ECM)의 환경과 유사한 3-D 배양에서도 암세포의 증식이 효과적으로 억제시킬 수 있는지 확인하기 위하여 암세포 사멸효과를 확인하는 실험을 수행하였다. 제조 회사인 TheWell Bioscience의 프로토콜에 따라 3D 배양을 수행하였다. 10,000개의 MCF7 세포를 MCF7 세포:하이드로겔 용액을 1:3의 비율(v/v)로 함유하는 혼합물DMEM 과 하이드로 겔: diH2O을 1 : 3 의 비율(v/v)로 0.1 % PBS로 희석한 VitroGel™ 3D-RGD을 포함하는 24-웰에 접종하였다. 이후 상기 VitroGel 3D-RGD 하이드로 겔을 안정화시키기 위해 37 °C에서 15 분간 배양시켰다. 하이드로 겔을 떼기 위해 하이드로 겔과 같은 부피의 DMEM을 첨가하였고, 다음날 하이드로 겔을 DMSO, AT13148 (2 μM), GKI-1 (10 μM) 및 MKI-1 (10 μM)을 포함하는 DMSO 염기 약물로 처리하였다. 14 내지 20일 동안 2 일을 주기로 하여 배지를 교환하였다. 이후 스페로이드의 영역을 DIXI 이미지 솔루션으로 측정하고, 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [0096] 도 9에 나타난 바와 같이, 대조군인 DMSO 대비 GKI-1을 처리한 군에서는 암세포주의 스페로이드의 크기는 거의 감소되지 않아, GKI-1 은 암세포 스페로이드를 거의 감소시키지 않는 것을 확인하였다. 반면, MKI-1 처리 군에서는 양성대조군으로 사용한 AT13148을 처리한 군과 유사한 정도로 암세포 스페로이드의 크기를 현저하게 감소시켰다. 따라서, MKI-1은 자연적인 세포의 기질에서의 환경과 유사한 3-D 배양환경에서도 암세포 스페로이드의 형성을 효과적으로 억제시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0098] 종합적으로, MKI-1은 정상 세포에 대해서는 생존율에 영향을 주지 않으면서, 암세포에 대해서만 사멸효과를 나타내며, 또한 암세포의 균락 형성, 종양구 형성 및 스페로이드 형성을 효과적으로 억제시킬 수 있어 항암제의 유효성분으로 효과적으로 활용될 수 있음을 확인하였다.
- [0100] **실시예 7. 선별된 N-1H-benzimidazol-2-yl-3-(1H-pyrrol-1-yl) benzamide(MKI-1)의 처리를 통한 암세포주의 방사선 민감도 상승효과의 확인**
- [0101] **7.1 MKI-1의 처리를 통한 MCF7 암세포주의 방사선 민감도 상승효과의 확인**
- [0102] MCF7 암세포주에 있어서 MKI-1을 처리하는 경우 방사선 치료효과에 대한 민감도가 상승시킬 수 있는지를 확인하기 위하여 균락형성 분석 실험을 수행하였다. 먼저, 60 mm 배양 플레이트에 유방암 세포 MCF7 (500-1000 cells)개의 세포를 60-mm 조직 배양배지에 두고, MASTL 키나아제 저해제(AT13148, MKI-1 및 GKI-1)를 각각 처리한 후, Biobeam GM8000 (감마 - Gamma-Service Medical GmbH, Leipzig, Germany)을 사용하여 2.5Gy 방사선을 처리하였고, 대조군에는 방사선을 처리하지 않았다. 10 내지 14 일 후, 상기 세포 콜로니를 메탄올로 고정시키고 0.5 % 크리스탈 바이올렛으로 염색시킨 후, 그 결과를 도 10A에 나타내었고, 상기 결과를 통해 나타난 균락수를 Image J 소프트웨어를 사용하여 수치화하고 이를 도 10 B에 나타내었으며, 이후 웨스턴블랏을 수행하고 이에 대한 결과를 도 10C에 나타내었다.

[0103] 도 10 A 및 도 10B에서 나타난 바와 같이, GKI-1을 처리한 군에서는 DMSO를 처리한 군과 유사하게 화학물 처리로 인한 암세포의 방사선 치료에 대한 민감도 상승효과가 나타나지 않았다. 반면, MKI-1을 처리한 군에서는 DMSO를 처리한 군 대비 유의할 정도의 MCF-7 암세포주의 방사선 치료효과가 나타나, 암세포 군락의 수가 감소한 것을 확인할 수 있었다. 특히 도 10C에서 확인한 바와 같이, 방사선을 처리한 이후 MKI-1을 처리한 군에서는 cleaved-PARP 및 인산화된 Chk2의 발현양이 증가되었고, procaspase-2의 발현양이 감소되는 것이 확인되었는바, 상기와 같은 결과를 통해 암세포의 사멸이 효과적으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 종합하면, 암세포에 있어서, MKI-1은 방사선 민감제(radiosensitizer)로 효과적으로 활용될 수 있는 물질임을 확인하였다.

[0105] **7.2 MKI-1의 처리를 통한 방사선 저항성 표현형(radioresistant phenotype)을 가진 MCF7 암세포주의 방사선 민감도 상승효과의 확인**

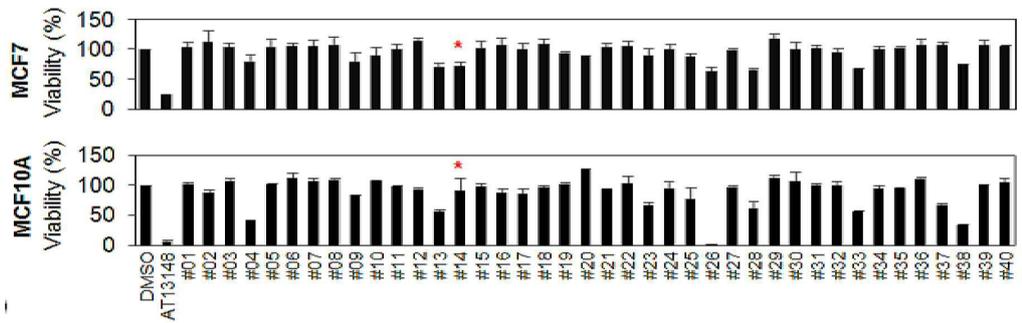
[0106] 방사선 저항성의 표현형을 가지는 CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> MCF7 암세포주에 있어서도 MKI-1을 처리하는 경우 방사선 치료효과에 대한 민감도가 상승되는지를 확인하기 위하여 균락형성 분석 실험을 수행하였다. 먼저, 60 mm 배양 플레이트에 유방암 세포 CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup> MCF7 (500-1000 cells)개의 세포를 60-mm 조직 배양배지에 두고, MASTL 키나아제 저해제(AT13148, MKI-1 및 GKI-1)를 각각 처리한 후, Biobeam GM8000 (감마 - Gamma-Service Medical GmbH, Leipzig, Germany)을 사용하여 2.5Gy 방사선을 처리하였고, 대조군에는 방사선을 처리하지 않았다. 10 내지 14 일 후, 상기 세포 콜로니를 메탄올로 고정시키고 0.5 % 크리스탈 바이올렛으로 염색시킨 후, 그 결과로도 11A에 나타내었고, 상기 결과를 통해 나타난 균락수를 Image J 소프트웨어를 사용하여 수치화하고 이를 도 11 B에 나타내었으며, 이후 웨스턴블랏을 수행하고 이에 대한 결과를 도 11C에 나타내었다.

[0107] 도 11 A 및 도 11B에서 나타난 바와 같이, GKI-1을 처리한 군에서는 DMSO를 처리한 군과 유사하게 화학물 처리로 인한 암세포의 방사선 치료에 대한 민감도 상승효과가 나타나지 않았다. 반면, MKI-1을 처리한 군에서는 DMSO를 처리한 군 대비 유의할 정도의 MCF-7 암세포주의 방사선 치료에 대한 민감도 상승 효과가 나타나, 암세포 군락의 수가 현저하게 감소한 것을 확인할 수 있었다. 특히 상기와 같은 결과는 실시예 7.1에서 확인한 민감도 상승효과보다 더 유의한 정도의 감소였는바, 방사선 저항성의 표현형인 암세포주는 MKI-1의 처리로 인하여 현저한 민감도 상승효과가 나타남을 확인하였다. 또한 도 11C에서 확인한 바와 같이, 방사선을 처리한 이후 MKI-1을 처리한 군에서는 c MKI-1을 처리한 군에서는 cleaved-PARP 및 인산화된 Chk2의 발현양이 증가되었고, procaspase-2의 발현양이 감소되는 것이 확인되었는바, 상기와 같은 결과를 통해 암세포의 사멸이 효과적으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

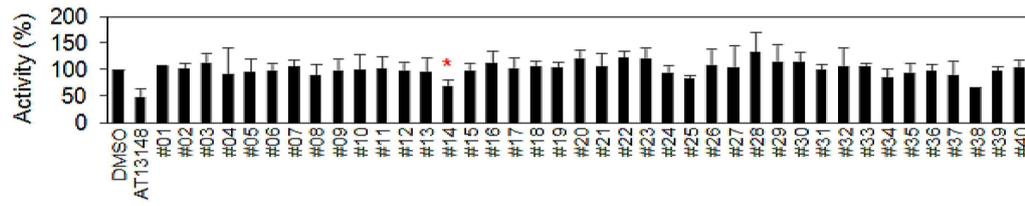
[0108] 종합하면, 방사선 저항성이 나타나는 암세포에 있어서 MKI-1은 보다 더 효과적으로 방사선에 대한 민감도를 상승시킬 수 있는 바, 방사선 민감제(radiosensitizer)로 더욱 더 효과적으로 활용될 수 있는 물질임을 확인하였다.

**도면**

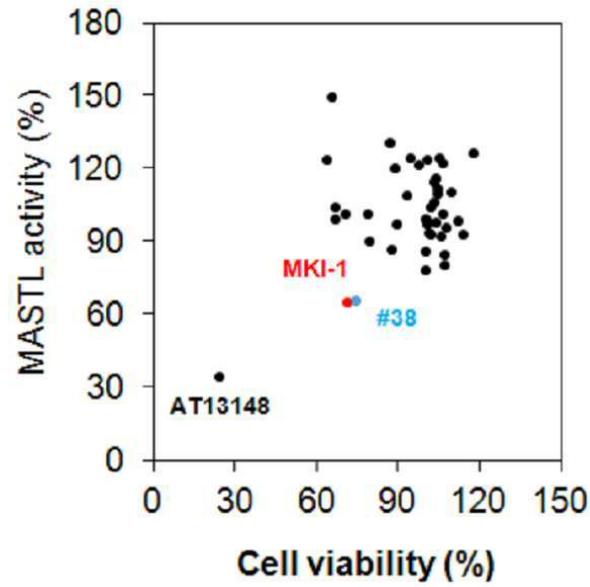
**도면 1a**



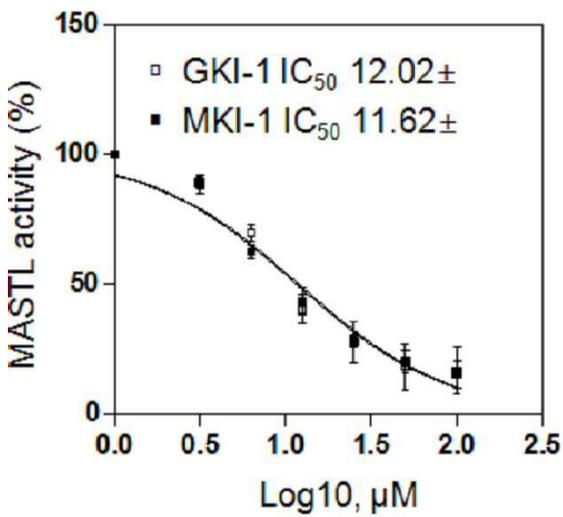
도면1b



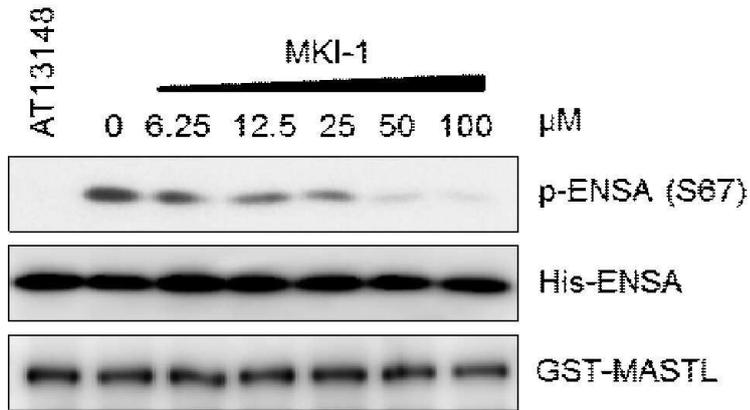
도면1c



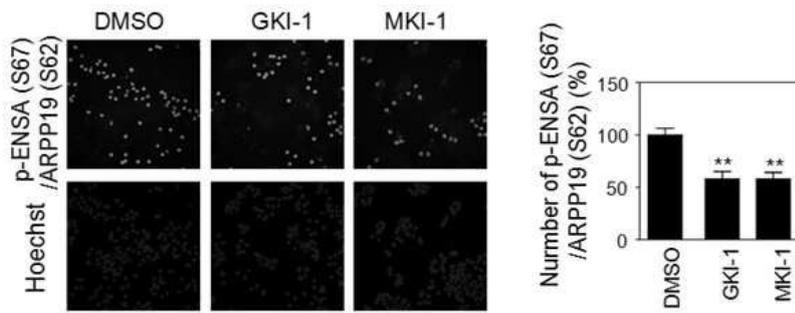
도면2



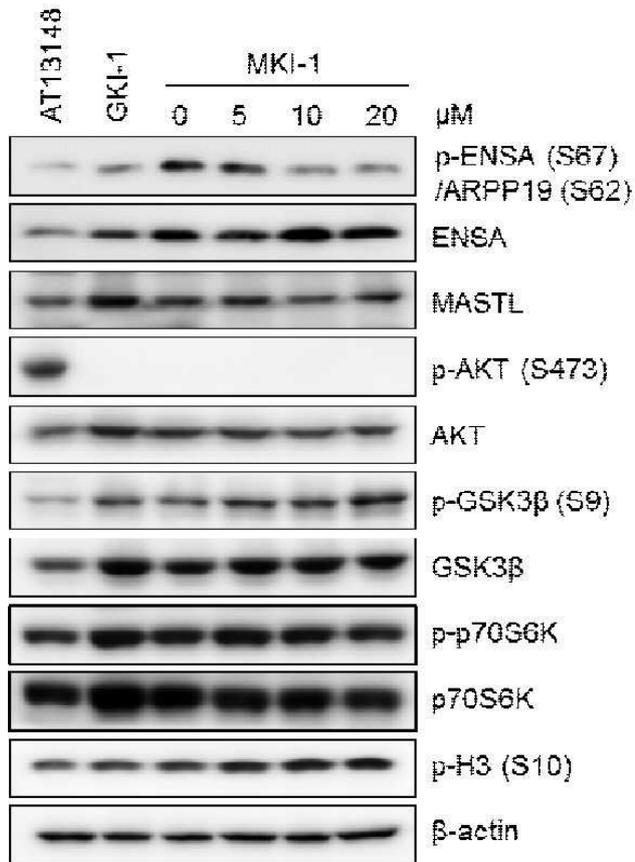
도면3



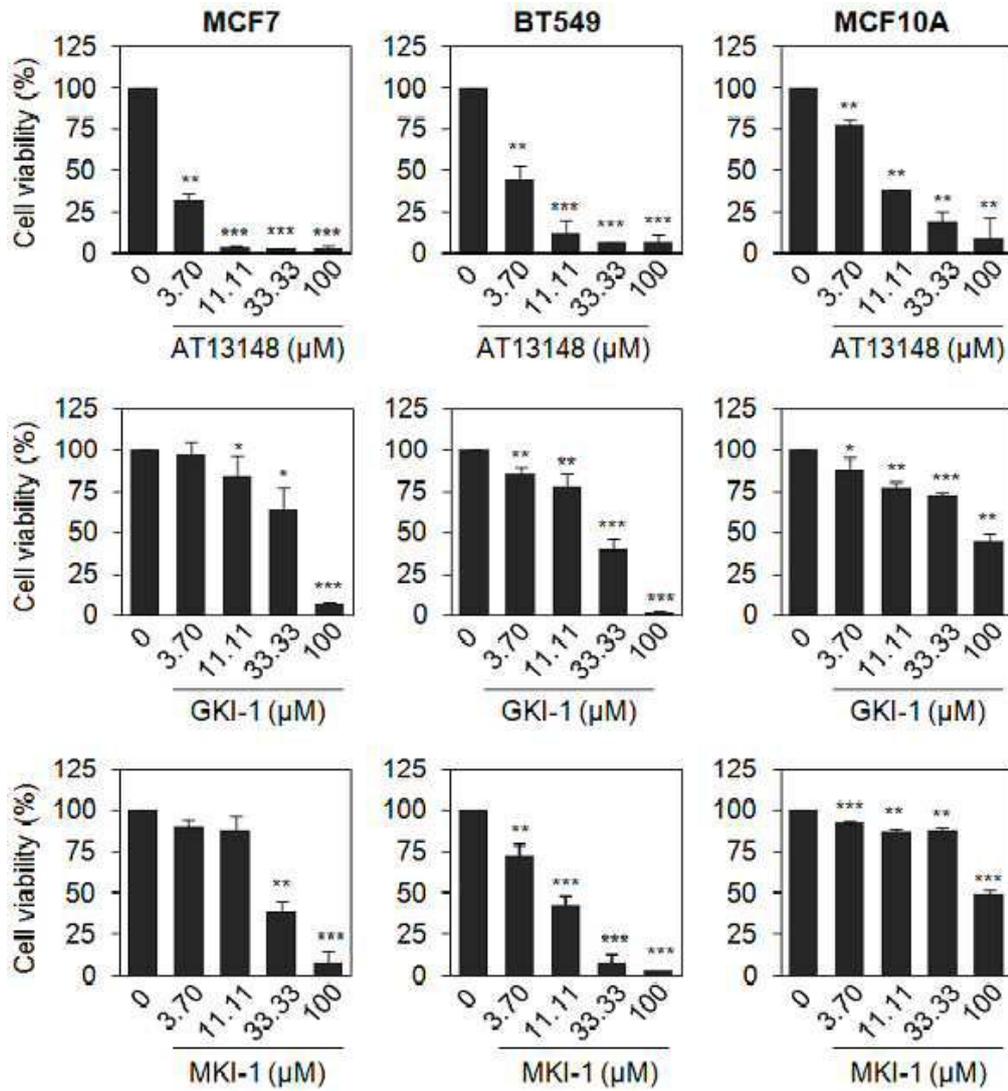
도면4



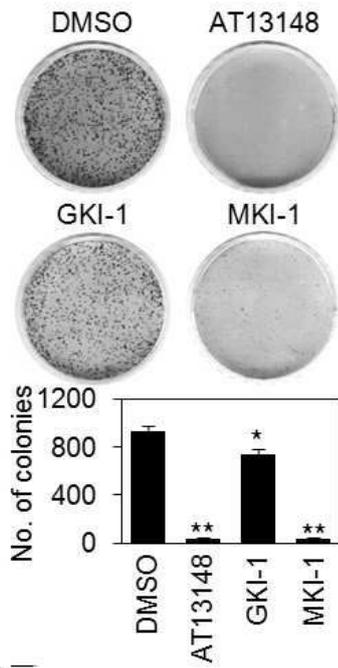
도면5



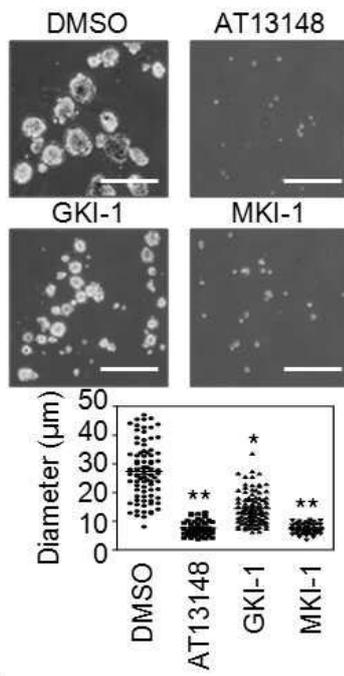
도면6



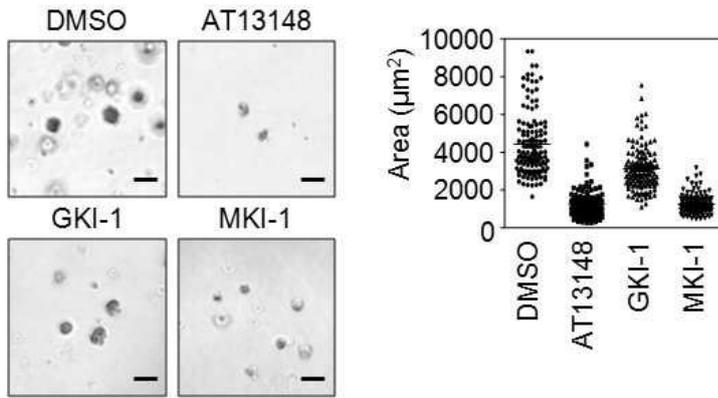
도면7



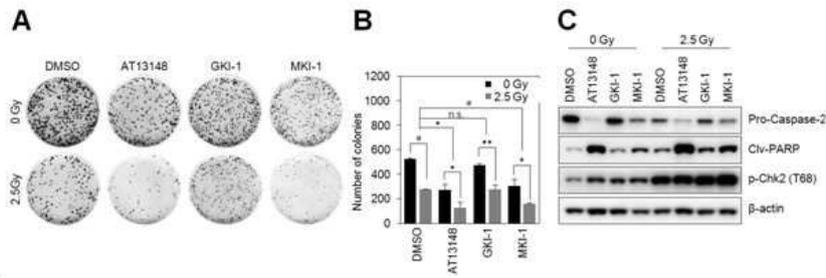
도면8



도면9



도면10



도면11

