

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

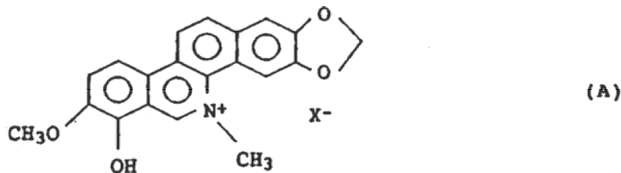
(51) Int. Cl. ⁶ A61K 31/47 C07D 491/056	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	1998년 12월 01일 특0159934 1998년 08월 14일	
(21) 출원번호 (22) 출원일자	특 1990-019899 1990년 12월 05일	(65) 공개번호 (43) 공개일자	특 1992-011486 1992년 07월 24일
(30) 우선권주장 (73) 특허권자	1-321503 1989년 12월 13일 일본(JP) 닛뽕 가야꾸 가부시기가이샤 다께다 가즈히코 일본국 도오교오도 지요다구 후지미 1 쯔오메 11-2		
(72) 발명자	하나오까 미요지 일본국 이시가와켄 가나자와시 구보 1쯔오메 149-2 에끼모도 히사오 일본국 도오교오도 기다구시모 2쯔오메 11-1-803 고바야시 후미코 일본국 도오교오도 고오또오구 후루이시바 3 쯔오메 13-9-602 이리에 유키오 일본국 군마켄 마에바시시 시모가와와마찌 2-3 다까하시 가쓰도시 일본국 도오교오도 기다구 가미야 3쯔오메 10-8-512		
(74) 대리인	최재철, 김기중, 권동용		

심사관 : 이병현

(54) 항종양제

요약

본 발명은 강력한 항종양 활성과 혈소판 응집 억제활성을 나타내며 종양치료에 유용한 것으로 기대되는 하기 구조식 (A) 의 화합물에 관한 것이다.



(위의 식에서 X⁻는 산성의 잔기이다.)

명세서

[발명의 명칭]

항종양제

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 온혈동물에 있어서 악성 종양 예방 및 치료에 사용되는 의약품 화합물 및 억제학적 조성물에 관한 것이다.

오늘날 알킬화제, 핵산 대사 길항물질, 항생제, 식물 알칼로이드등을 종양이 있는 환자의 화학요법용 약물로 사용하고 있으나 이들은 그 효능이 아직까지 만족스럽지 못하다.

위암, 폐암등과 같은 악성 종양 또는 조혈(造血) 기관과 관련된 질환, 예컨대 백혈병은 암 또는 저산소혈증으로 인한 전파된 맥관내 응고증후군을 유발하므로 결국은 내인성 및 외인성 혈액응고계를 자극하게 된다 [SOGO RINSHO (general clinic), 34, 2360~2364, 1985].

따라서 종래의 화학요법제들은 암세포내로 효과적으로 흡수되지 못하여 그 활성을 제대로 발휘하지 못하고 있다.

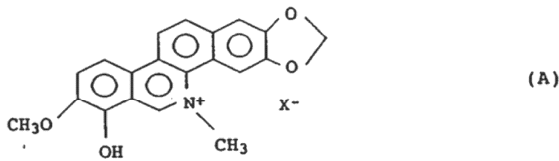
이런 관점에서 혈액응고계에서 작용하여 혈액응고의 방지효과를 나타냄과 동시에 항종양 활성을 나타내는 항종양제의 개발이 요구되었다.

본 발명의 의약품 화합물과 억제학적 조성물을 제공하고 있다.

본 발명의 의약품 화합물 또는 억제학적 조성물은 인간을 비롯한 온혈동물의 악성 종양치료에 유용하므로 혈액 종양뿐만 아니라 악성 종양에 대하여 우수한 항종양 활성을 나타낸다.

본 발명인들이 철저하게 연구한 결과 확인하 바로는 하기 구조식 (A)의 7-히드록시-8-메톡시-5-메틸-2,3-메틸렌디옥시벤조 [c] 페난트리디늄 산성 4 차염은 혈소판 응집의 방지효과와 항종양활성을 나타낸다는 것이었고 따라서 본 발명을 완성하게 된 것이다. 즉, 본 발명은 하기 구조식 (A)의 7-히드록시-8-메톡시-5-메틸-2,3-메틸렌디옥시벤조 [c] 페난트리디늄 산성 4 차염을 신규 의약으로 제공하는 것이다.

화학식 1



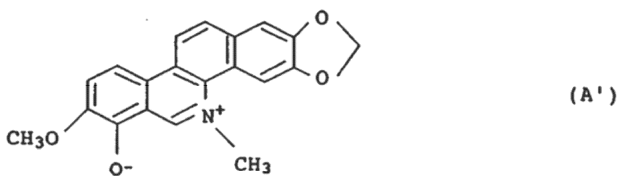
(위의 식에서 X^- 는 산성의 잔기이다)

구조식 (A)의 화합물을 의약으로 사용할 경우에는 구조식 (A)의 화합물과 약제학적 첨가제를 함유하는 약제학적 조성물로 만들어 사용한다.

구조식 (A)의 화합물의 유효투여량을 종양이 있는 온혈동물에게 투여하여 종양성장을 억제하여 종양을 치료할 수 있다.

여기서 고려할 수 있는 것은 투여시 본 발명의 화합물은 생체내에서 다음 구조식(A')의 화합물을 해리된다는 것이다.

화학식 2



본 발명에서 사용되는 구조식 (A)의 화합물에 있어서 X^- 나타낸 산성의 잔기의 예로서는 무기산 잔기 [예 : 할로겐 (예 : 염소이온, 브롬이온, 요오드 이온, 플루오르 이온등), 질산이이노, 인산이온, 황산이온 등] 와, 유기산 잔기 (예 : 디메틸 술페이트, 디에틸 술페이트등) 가 있다.

본 발명의 7-히드록시-8-메톡시-5-메틸-2,3-메틸렌디옥시벤조 [c] 페난트리디늄을 공지방법 [예 : Chem, Pharm, Bull, 33, 1763~1765 (1985)] 으로 제조하여 얻을 수 있다.

본 발명에 의한 구조식 (A)의 화합물은 다음에 나오게 되는 약리학적 시험에서 알수 있는 바와 같이 우수한 항종양 활성을 가지고 있다. 이들 화합물은 배양된 각종 종양세포에 대하여 그 성장 억제 활성이 현저하다. 더욱이, 본 발명의 화합물은 종양이 있는 각종 동물에 있어서 종양 성장을 억제하여 동물의 수명을 연장하는 효과를 나타낸다. 더욱이 이들 화합물은 혈소판 활성화 인자로 혈소판 응집을 억제하여 종양의 전이를 억제한다. 따라서, 본 발명의 항종양 조성물은 인간의 악성종양, 예컨대 위암, 간암, 직장암, 폐암등에 효과적이며 백혈병, 호지킨병 (Hodgkin's disease) 등과 같은 혈액질환에도 효과가 있다.

본 발명에 의한 구조식 (A)의 화합물을 의약으로 사용할 경우 이들 화합물을 약제학적으로 제제로 만들어 종래의 여러가지 방식에 따라 사용한다. 즉, 제제를 비경구, 경구, 직장내등의 경로로 투여한다. 이들 제제를 주사, 분말, 과립, 정제, 좌제등의 형태로 해도 된다. 약제학적 조성물을 제조할때 약물에 사용되는 여러가지 보조제, 즉 담체와 기타 조제, 예를 들자면 안정제, 방부제, 진통제, 유화제등을 필요에 따라 사용할 수도 있다.

조성물에 있어서 구조식 (A)의 화합물의 함량을 제제 형태에 따라 폭넓게 변화시킬 수 있으나 구조식 (A)의 화합물의 일반적인 함량범위는 0.01~100 wt%, 바람직하게는 0.1~50 wt% 이다. 나머지는 종래에 의 약조성물에 사용되고 있는 담체와 기타 보조제이다.

구조식 (A)의 화합물의 투여량은 조건등에 따라 다르겠으나 일반적으로 성인의 경우 약 50~500 mg/일이다.

다음에는 약리학적 시험과 실시예에 대하여 설명하기로 하는 데 본 발명은 여기에 한정되는 것은 아니다.

[약리학적 시험]

시험 약물로서 7-히드록시-8-메톡시-5-메틸-2,3-메틸렌디옥시벤조 [c] 페난트리디늄 클로라이드를 사용하였다.

[종양세포에 대한 생체의 성장억제 시험]

각 세포에 대한 실험조건은 표 1 에 나와 있다. 이들 실험조건하에 5% CO₂ 중에서 37℃ 에서 24 시간 배양한 각 세포에 대해 시험약물을 2 - 4 일간 작용시킨 다음 각 세포를 0.05% 메틸렌 블루 (Methylene Blue) 로 염색하였다. 색소를 염색된 세포로부터 추출하고 추출된 색소의 흡광도를 기준으로 하여 660 nm 에서 세포의 성장억제율을 측정하여 50% 성장억제 농도 (IC₅₀)를 구하였다.

[표 1]

각종 종양세포의 배양조건

세포	접종된 세포수	배양 시간
HeLa S ₃	$7.5 \times 10^3/\text{ml}$	72 시간
Colon 26	$7.5 \times 10^3/\text{ml}$	65 시간
SW1116	$1.5 \times 10^4/\text{ml}$	96 시간
Li-7	$1.5 \times 10^4/\text{ml}$	48 시간
HepG2	$1.0 \times 10^4/\text{ml}$	96 시간
LL	$4.0 \times 10^3/\text{ml}$	72 시간
PC-3	$1.0 \times 10^4/\text{ml}$	72 시간
B16	$7.5 \times 10^3/\text{ml}$	72 시간

그 결과는 표 2 에 나와 있는데, 여기서 명백히 알수 있는 것은 시험약물이 각종 종양세포의 성장을 억제하였다는 점이다.

[표 2]

각종 종양세포에 대한 세포성장 억제 활성

세포 종류	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)
HeLa S ₃	0.32
Colon 26	0.038
SW1116	0.25
Li-7	0.12
HepG2	0.059
LL	0.044
PC-3	0.21
B16	0.057

[종양세포에 대한 생체내 항종양 활성]

[생체내 항종양 활성 (1)]

마우스 (mouse) 백혈병 P388, 섬유육종 M5076 및 대장암 C26 의 세가지를 사용하였다. P388 (10/mouse) 과 C26 (10/mouse) 를 6 주된 암컷쥐 (CDF mice : 1 군당 5 마리)에게 복강내와 피하에 이식하였고, M5076 (10/mouse)을 6 주된 암컷쥐 (C57 BL/6 mice : 1 군당 5 마리) 에게 피하에 이식하였다. 시험약물

을 20% 디메틸설폭시드에 용해시켜 사용하였다. 즉, 이 용액을 종양을 이식한 다음날 부터 P388 군과 M5076 군에게 1일 1 회씩 5 일간 계속해서 투여하였고, 또한 C26 군에게는 종양을 이식한지 5 일째 되는 날로부터 시작하여 1일 1 회씩, 5일간 계속해서 투여하였다. 각 군에 있어서 평균 생존일수 (T) 와 대조 군에 있어서의 평균 생존일수 (C)의 비율 (T/C %) 로 항종양 활성을 판정하였다.

그 결과는 표 3,4 및 5에 나와 있는데 이들 표로부터 명백히 알수 있는 것은 화합물이 세가지 종류의 종양에 대하여 강력한 항종양 활성을 나타내었다는 점이다.

[표 3]

백혈병 P388 에 미치는 영향

	투여량 (mg/kg/ 일)	평균생존시간 (일)	영향 (T/C %)
시험약물	25	22.5	223
	12.5	16.5	163
	6.25	14.8	147
	3.13	13.5	134
생리식염수 투여군	-	10.1	100

[표 4]

섬유육종 M5076 에 미치는 영향

	투여량 (mg/kg/ 일)	평균생존시간 (일)	영향 (T/C %)
시험약물	25	28.5	154
	12.5	20.5	111
	6.25	20.5	111
생리식염수 투여군	-	18.5	100

[표 5]

대장암 C26 에 미치는 영향

	투여량 (mg/kg/ 일)	평균생존시간 (일)	영향 (T/C %)
시험약물	50	42.5	139
	25	31.3	103
	12.5	33.5	110
생리식염수 투여군	-	30.5	100

[생체내 항종양 활성 (2)]

[(가) 마우스 (mouse) 대장 종양]

6 주 되는 암컷 CDF 쥐 (1 군당 3 마리)에게 마우스 대장 종양 C26 (10/mo use) 을 피하에 이식하고 시험약을 투여량을 50 mg/kg 으로 하여 종양을 이식한지 7일되는 날로부터 시작하여 하루 1회씩, 계속하여 5일간 정맥투여 하거나, 시험약물 투여량을 75 mg/kg 으로 하여 4 일 간격으로 하루 1 회씩, 3 회 정맥투여하였다.

[(나) 마우스 폐종양]

6 주 되는 수컷 BDF 쥐 (1 군당 3마리) 에게 마우스 폐종양 LL (10/mouse)을 피하에 이식하고 시험약물 투여량 60 mg/kg 으로 하여 폐종양을 이식한지 8 일되는 날에 4 일 간격으로 하루 1 회씩, 3 회 정맥투여 하였다.

[(다) 인체 간 종양]

6 주 되는 암컷 누우드 (nude) BALB-c/nu-A 쥐 (1 군당 3 마리) 에게 인체 간종양 Li-7 (단편) 을 피하 이식하고 시험약물 투여량을 60 mg/kg 으로 하여 이식한지 8 일되는 날에 4 일 간격으로 하루 1 회씩, 3 회 정맥투여 하였다.

위의 (가), (나) 및 (다) 에 있어서 투여를 시작했을 때 보다 종양크기가 10배 될때까지의 소요되는 일수를 주의 연장된 수명으로 하여 투여군과 대조군의 비(T/C %) 로 항종양활성을 측정하였다. 그 결과는 표 6 에 나와 있는데 이들 결과로부터 알수 있는 것은 화합물은 C26, LL 및 Li-7 등의 종양의 성장을 억제하고 있고 어떠한 종양을 가진 쥐에 있어서도 수명연장이 130% 이상 높게 나타나고 있다는 점이다.

[표 6]

종양 세포	시험 화합물 투여량 (mg/kg)	투여일정	종양성장지연율 (%)	수명연장 (T/C %)
C26	50	g1d × 5	219	135
C26	75	g4d × 3	203	135
LL	75	g4d × 3	118	152
Li-7	50	g4d × 3	253	137

[혈소판응집에 대한 억제 활성]

혈소판이 풍부한 혈장 (PRP : Platelet - rich plasma) 을 일본산 흰토끼 (체중 3~4 kg) 로 부터 채취하였고, 혈소판 응집 유발제로서 혈소판 활성화인자 (PAF : platelet activation factor)를 최종농도 10M 에서 사용하였다. 시험 약물을 PRP에 가하고 일정시간동안 항온처리한 후 PAF 를 가하여 혈소판 응집 반응을 유발시켰다. EDTA 를 사용하여 반응을 종결시키고 원심분리하여 상청액을 제거함으로써 혈소판 펠릿을 얻었다. 혈소판 침전물에 증류수를 가하여 주고 혈소판에 잔존한 세로토닌을 오르토프탈알데히드시약과 반응시켜 세로토닌-오르토프탈알데히드 축합물을 얻었다. 이 축합물을 360 nm 의 들뜬 파장

(excited wavelength) 및 475 nm 의 측정파장을 측정하였다.

시험약물의 항 PAF 활성을 다음식으로 구하였다.

$$\frac{(\text{시험약물} + \text{PAF}) \text{ 값} - \text{PAF 값}}{\text{공시험 값 (Blank Value)} - \text{PAF 값}} \times 100$$

그 결과는 표 7 에 나와 있는데 이 표로부터 명백히 알 수 있는 것은 시험 약물이 혈소판 응집에 대하여 강력한 억제활성을 보였다는 점이다.

[표 7]

혈소판응집에 대한 억제활성

	농도 ($\mu\text{g/ml}$)	억제율 (%)
시험약물	100	107
	50	107
	25	85.5
	12.5	48.6
생리식염수		0.0

[생체내 종양 전이 억제 활성]

5 주 되는 수컷 C57 BL/6 쥐에게 시험약물을 25 mg/kg 또는 50 mg/kg 투여량으로 하여 복강내 투여하고 15 분 경과후 전이성이 큰 마우스 흑색종 (mouse melanoma) B61BL6 (10/mouse) 을 꼬리 혈관을 통해 쥐에게 이식하였다. 이식후, 사육하다가 14 일 되는날 쥐를 죽여 BL6 의 폐속로의 전이수를 육안으로 관찰하였다.

표 8 로부터 분명히 알수 있는 바와 같이 시험약물은 흑색종의 폐속으로의 전이를 억제하였다.

[표 8]

생체내 종양전이 억제 활성

	투여량 (mg/kg)	전이 마디 (metastatic node) 의 수 (평균 $\pm$ S.E.)
시험약물	50	76.9 $\pm$ 13.6
	25	55.8 $\pm$ 15.7
생리식염수	-	111.9 $\pm$ 19.8

[급성독성]

6 주 되는 암컷 CDF쥐에게 시험약물을 정맥투여하였는데 쥐는 100 mg/kg 의 투여량에서도 치명적인 독성을 나타냄이 없이 생존하였다. 위에 나온 결과들로부터 알수 있는 것은 본 발명의 7-히드록시-8-메틸-2,3-메틸렌디옥시벤조[c] 페난트리딘류 클로라이드는 항종양 활성과 혈소판 응집 억제 활성을 나타내기 때문에 종양치료에 유용하다는 것을 기대할 수 있다는 점이다.

[실시예 1]

[약제학적 조성물]

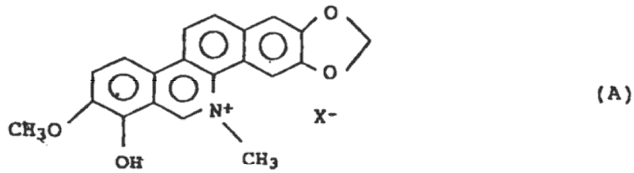
위에 나온 여러가지 실험에 사용된 시험약물 1g 폴리소르베이트 1g 및 마크로골 400(Macrogol 400) 1g

을 주사용 증류수 100g 에 분산, 용해시킨 다음 멤브레인 필터 (membrane filter) 로 여과하여 얻은 용액을 별도로 앰플에 충전한 후 종래방법으로 동결건조시켜 앰플 하나당 구조식 (A) 의 화합물 50 mg 을 함유하는 주사용 제제를 얻었다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

하기 구조식 (A) 의 7-히드록시-8-메톡시-5-메틸-2,3-메틸렌디옥시벤조 [c] 페난트리딘늄 산성 4 차염을 유효성분으로 함유하고 약제학적으로 허용되는 첨가제를 함유한 악성종양의 치료, 성장억제 및 전이억제를 위한 약제학적 조성물.



(위에 식에서 X^- 는 산성의 잔기이다.)

청구항 2

제1항에 있어서, 산성 4 차염이 할로게노산염인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 산성 4 차염이 염산염인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 온혈동물의 악성종양의 성장억제, 전이억제 및 치료용 조성물.