



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0069449
(43) 공개일자 2011년06월23일

(51) Int. Cl.

A61K 31/52 (2006.01) A61K 31/4178 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) A61P 13/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0126190

(22) 출원일자 2009년12월17일

심사청구일자 2009년12월17일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내

(72) 발명자

이상국

서울특별시 강남구 대치동 974 대치현대아파트
107동 1104호

정낙신

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

정화진

서울특별시 서대문구 대현동 럭키아파트 109동
1401호

(74) 대리인

강철중, 조영신, 김윤배

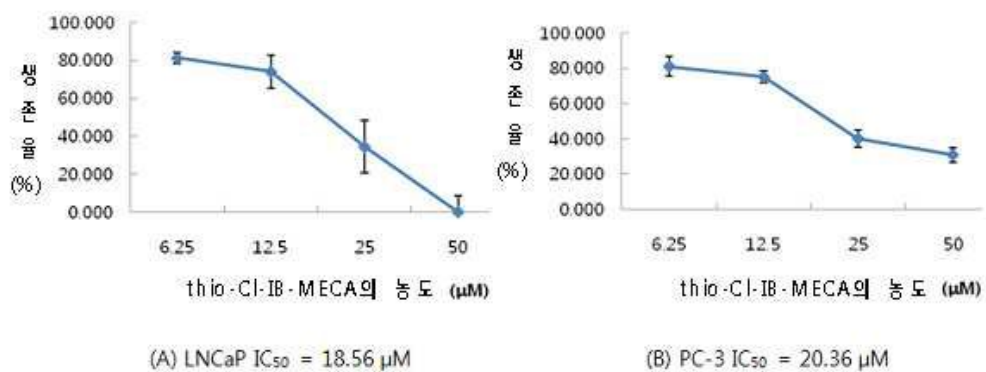
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) A3 아데노신 수용체 효능제를 포함하는 전립선암 치료용 약제학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 선택적 A₃ 아데노신 수용체 효능제 (agonist), 2-클로로-N⁶-(3-아이오도벤질)-4' -싸이오아데노신-5' -N-메칠유로나마이드 (thio-Cl-IB-MECA), N⁶-(3-아이오도벤질)-4' -싸이오아데노신-5' -N-메칠유로나마이드 (thio-IB-MECA), 또는 약제학적으로 허용가능한 이들의 염을 포함하는 전립선암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 A₃ 아데노신 수용체 효능제, thio-Cl-IB-MECA 또는 thio-IB-MECA는 낮은 독성을 가질 뿐만 아니라, 다른 A₃ 아데노신 수용체 효능제에 비하여 보다 더 선택적으로 안드로젠 수용체 의존성 또는 비의존성 전립선 암 세포의 성장을 억제하므로 전립선암의 예방 또는 치료에 유용하다.

대표도 - 도1

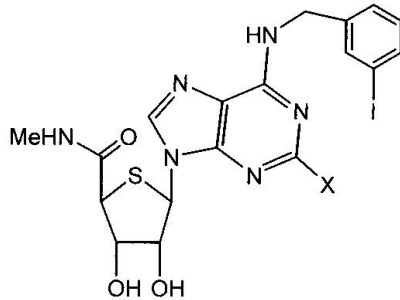


특허청구의 범위

청구항 1

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

[화학식 I]



상기 식에서, X는 Cl 또는 H이며, Me는 메틸기임.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 전립선암은 안드로젠 수용체 의존형 전립선암 또는 안드로젠 수용체 비의존형 전립선암인 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 또는 이들의 혼합물을 추가로 포함하는 약제학적 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

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

배경기술

[0002] 암은 인류가 해결해야 할 난치병 중의 하나로, 전 세계적으로 이를 치유하기 위한 개발에 막대한 자본이 투자되고 있는 실정이다. 우리나라의 경우도, 질병 사망 원인 중 제 1위의 질병으로서 연간 약 10만 명 이상이 진단되고, 약 6만 명 이상이 사망하고 있다. 이러한 암의 유발 인자인 발암물질로는 흡연, 자외선, 화학 물질, 음식물, 기타 환경인자들이 있으나, 그 유발 원인이 다양하여 치료제의 개발이 어려울 뿐만 아니라, 발생하는 부위에 따라 치료제의 효과 또한 각기 다르다. 또한, 현재 치료제로 사용되는 물질들은 상당한 독성을 지니고 있으며, 암 세포만을 선택적으로 제거하지 못하므로, 암의 발생 후 이의 치료 뿐 아니라, 암의 발생을 예방하기 위한 독성이 적고 효과적인 항암제의 개발이 절실히 필요하다. 암이란 신생물 (neoplasia)이라고도 불리며, 일반적으로 “제어되지 않은 세포성장”으로 특징지어진다. 암 세포의 비정상적인 세포성장에 의해 종양 (tumor)이라고 불리는 세포 덩어리가 형성되어 주위의 조직으로 침투하고 심한 경우에는 신체의 다른 기관으로 전이되기도 한다. 암은 수술, 방사선 및 화학요법으로 치료를 하더라도 많은 경우에 근본적인 치유가 되지 못하고 환자

에게 고통을 주며 궁극적으로는 죽음에 이르게 하는 난치성 만성질환이다. 암의 발생요인으로서는 여러 가지가 있으나, 내적 요인과 외적 요인으로 구분하기도 한다. 정상세포가 어떠한 기전을 거쳐 암세포로 형질전환이 되는 지에 대해서는 정확하게 규명되지 않았으나, 적어도 80 내지 90%가 환경요인 등 외적인자에 의해 영향을 받아 발생하는 것으로 알려져 있다. 내적 요인으로서는 유전 인자, 면역학적 요인 등이 있으며, 외적 요인으로서는 화학 물질, 방사선, 바이러스 등이 있다. 암의 발생에 관련되는 유전자에는 종양형성유전자 (oncogenes)와 종양억제 유전자 (tumor suppressor genes)가 있는데, 이들 사이의 균형이 위에서 설명한 내적 혹은 외적 요인들에 의해 무너질 때 암이 발생하게 된다.

[0003] 암세포는 정상세포와 많은 면에서 그 성질이 유사하므로 정상세포에는 피해를 주지 않고 암세포만을 제거하는 것은 쉬운 일이 아니다. 그러나 암세포에는 몇 가지 일반 세포와 구분되는 특징이 있는데, 첫째는 암세포는 세포 증식이 조절되지 않는다는 것이고, 둘째는 분화의 특징이 비교적 결여되어 있다는 것이며, 셋째는 주위의 조직에 침투하여 전이를 한다는 것이다. 정상세포는 필요에 따라 성장인자에 의해 신호를 전달받아 증식을 하는 반면 암세포는 성장인자에 대한 의존도가 낮고 주변의 세포와 접촉에 의해 성장이 저해되는 접촉성 저해 (contact inhibition)가 없으며, 안지오제닉 인자 (angiogenic factor)를 분비하여 전이를 활발히 한다. 또한 암세포는 분화가 되지 않고, 세포사멸 (apoptosis or programmed cell death)이 일어나지 않으며, 유전적으로 불안정한 특징이 있다. 암세포의 유전적인 불안정은 암의 진행에 있어서 매우 중요하며 화학요법에 대한 내성을 유도하기도 하는 것으로 알려져 있다 (Folksman *et al.*, Science, **235**, 442-447, 1987; Liotta *et al.*, Cell, **64**, 327-336, 1991).

[0004] 암은 혈액암과 고형암으로 크게 분류되며, 폐암, 위암, 유방암, 구강암, 간암, 자궁암, 식도암, 피부암 등 신체의 거의 모든 부위에서 발생한다. 특히 전립선 암은 현재 남성 암의 6번째로 흔한 암이며 남성에 국한된 질병이지만 증가세가 뚜렷하여 우리나라에서도 최근 관심이 고조되고 있는 질병이다. 통계청 자료에 따르면 1990년 이후 지난 10년 동안 전립선 암 환자는 무려 20.6배나 급증하였다. 또한 2000년에 비해 2006년에는 전립선 암 환자수가 두 배 가량 급증했다는 통계도 있었다. 전립선암에 의한 사망자 수는 1996년 남성 10만 명 중 304명이었던 것에 비해 꾸준히 증가하여 2006년에는 1,010명으로 사망률이 1.3%에서 4.1%로 10년 새 급격히 증가하였다. 현재 다른 질환의 경우는 치료기술이 발달하고 사람들이 꾸준한 관리를 해옴에 따라 사망률이 둔화되고 있다. 하지만 전립선암의 경우 그 발생 빈도가 가파르게 증가하고 있으므로 이를 치료하기 위한 의약품 개발 연구 역시 활발히 증가하고 있다.

[0005] 전립선 세포는 성장 자극, 기능 및 증식에 안드로젠 (androgen)을 필요로 하며 안드로젠 자극이 결핍되면 세포 사멸 (apoptosis)이 일어나므로, 전립선 세포의 안드로젠 활동을 억제하는 모든 치료를 일컬어 안드로젠 박탈 요법 (androgen deprivation therapy: ADT)라고 한다. 특히 전립선 암 치료에는 외과적 또는 내과적 거세를 통한 고환에서의 안드로젠 분비 억제와 안드로젠 경쟁물질 (anti-androgen)을 이용하여 전립선 세포내의 안드로젠의 활동을 억제하는 방법을 병용하는 완전 안드로젠 박탈 요법(Complete androgen blockade)이 주요한 치료법으로 사용되고 있다. 이런 안드로젠 박탈 요법은 안드로젠 비의존적인 세포만이 성장하게 하여 거세 후에도 암이 진행되는 안드로젠 비의존적인 전립선 암 (hormone-refractory prostate cancer cell: 호르몬 불응성 전립선 암)의 형태로 변하게 된다.

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

[0007] 이에 A₃AR 효능제의 항암 효과에 대하여 다년간 실험한 결과, 선택적인 A₃ 아데노신 수용체 효능제인 thio-Cl-IB-MECA 및 thio-IB-MECA가 기존의 아데노신 A₃ 수용체 효능제에 비해 비교적 낮은 농도에서도 호르몬 의존적 사람 전립선 암 세포인 안드로젠 수용체 의존적 (androgen receptor dependent: AR+) LNCaP 세포뿐만 아니라, 안드로젠 수용체 비의존적 (androgen receptor independent: AR-) PC-3 세포 모두의 성장을 선택적으로 억제하고, 독성 또한 낮다는 사실을 발견하고, 기존의 전립선암 치료제를 대체할 수 있는 항암제 성분으로 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

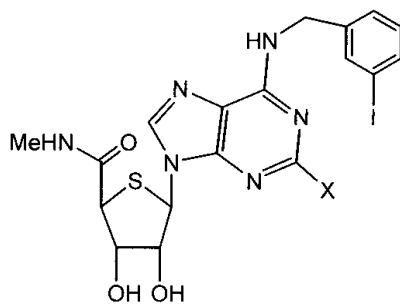
[0008] 본 발명은 전립선암을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 선택적인 A₃ 아데노신 수용체 효능제를 제공하기 위한 것이다.

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

과제 해결수단

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

[0011] [화학식 I]



[0012] 상기 식에서, X는 Cl 또는 H이며, Me는 메틸기임.

[0014] 본 발명에 따른 A₃ 아데노신 수용체 효능제는 상기 화학식 (I)에서 X가 Cl인 thio-Cl-IB-MECA, X가 H인 thio-IB-MECA, 또는 이들의 혼합물로부터 선택된다.

[0015] 본 발명에 따른 약제학적 조성물로 치료될 수 있는 전립선암은 안드로젠 수용체 의존형 또는 안드로젠 수용체 비의존형 전립선암을 모두 포함한다.

[0016] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제, 예를 들면 당업계에서 통상적으로 사용되는 희석제, 활택제, 결합제, 붕해제, 감미제, 안정제, 및 방부제로부터 선택되는 1종 이상을 포함할 수 있으며, 정제, 과립제, 캡슐제, 산제 등으로 제제화될 수 있다.

[0017] 바람직하기는 정맥내 투여, 복강내 투여 또는 경구투여의 형태로 사용된다.

[0018] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 치료효과를 증강시키기 위하여 본 발명에 따른 유효성분 이외에 다른 공지의 항-종양 약제와 함께 투여될 수 있다.

[0019] 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여량 및 투여 횟수는 환자의 연령, 상태, 체중, 질환의 중증도, 약물 형태, 투여 경로, 및 기간에 따라 당업자에 의하여 적절하게 조절될 수 있다. 바람직하기는, 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 유효성분이 환자의 체중 당 1 내지 10 mg/kg이 되도록, 1회 내지 수회/1일 투여되는 것이다.

효과

[0020] 본 발명에 따른 선택적 A₃ 아데노신 수용체 효능제, 2-클로로-N⁶-(3-아이오도벤질)-4' -싸이오아데노신-5' -N-메칠유로나마이드 (thio-C1-IB-MECA)와 N⁶-(3-아이오도벤질)-4' -싸이오아데노신-5' -N-메칠유로나마이드 (thio-IB-MECA)는 안드로젠 수용체 의존적(AR+) LNCaP 세포뿐만 아니라, 비의존적 사람 전립선 암 세포인 안드로젠 수용체 비의존적 (AR-) PC-3 세포에 대해 탁월한 세포성장 억제 효과를 나타내므로, 전립선암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 A₃ 아데노신 수용체 효능제는 기존의 A₃ 아데노신 수용체 효능제인 IB-MECA 또는 C1-IB-MECA와 비교하여 더 낮은 농도에서 보다 더 선택적으로 전립선암 세포의 증식을 억제하며 낮은 독성을 나타낸다는 장점을 가진다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0021] 다음의 실시예들은 본 발명을 예시하기 위한 것이다. 따라서 본 발명의 범위가 하기 실시예에 의하여 제한되어서는 안된다.

[0022] 실시예

[0023] 실시예 1: 시험관 내에서 사람암세포 성장 억제 효능 측정 (SRB assay)

[0024] 사람 전립선 암 세포인 LNCaP (androgen receptor dependent) 및 PC-3 (androgen receptor independent)의 성장 저해 효과를 확인하기 위하여, 술포호다민 B (Sulforhodamine B: SRB) 검사를 진행하였다.

[0025] 10% 디메틸설폭사이드 (DMSO)에 용해된 thio-C1-IB-MECA를 50, 25, 12.5, 6.25 μ M의 농도로 96-웰 플레이트의 각 웰에 10 μ L씩 3중 로딩하여 시험 플레이트를 만든 후 10% FBS, 항생-항진균제 (antibiotics-antimycotics)가 첨가된 RPMI 1640 배지로 6×10^4 cells/ml가 되게 희석한 세포를 190 μ L씩 가해 총 양이 200 μ L가 되게 하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3일 동안 배양하였다. 그와 동시에 시료(thio-C1-IB-MECA)를 넣지 않은 새로운 96-웰 플레이트에 동일한 세포 현탁액 190 μ L씩 16웰 이상에 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양하여 기준일을 잡아주었다. 배양 후 50% 트리클로로아세트산(TCA)을 50 μ L씩 가한 후 4°C에서 한 시간 동안 배양시켜 세포를 고정하였다. 이후 수돗물로 5회 세척하고 건조시켰다. 각 웰에 4% 술포호다민 B (SRB)를 포함하는 1% 아세트산 용액을 100 μ L씩 넣어서 세포를 염색시키고 상온에서 한 시간 방치하였다. 1% 아세트산으로 5회 세척하여 충분히 건조시킨 후 각 웰에 100 mM Tris-base 200 μ L씩을 가하여 결합된 염색액을 용해시켜 웨이커로 충분히 흔들어 섞어준 후 ELISA 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 515 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정한 흡광도를 바탕으로 하기 수학적 식 1에 의해 대조군에 대한 실험군의 각 실험 물질 처리에 따른 생존율을 환산하였고, 각 농도에 대한 생존율을 바탕으로 TableCurve 프로그램을 이용하여 IC₅₀ 값을 계산하였다.

[0026] <수학적 식 1>

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

[0027]

[0028] 안드로젠 의존적 사람 전립선 암 세포 LNCaP(A) 및 안드로젠 비의존적 사람 전립선 암 세포 PC-3(B)에 대한 생존율 결과를 도 1에 나타내었다.

[0029] 널리 알려진 아데노신 유도체 IB-MECA에 대해서도 위와 같은 실험을 실시하여 암 세포에 대한 생존율을 확인하였고, 각 전립선암 세포에 대한 IC₅₀ 값을 표 1에 나타내었다.

표 1

[0030]

	IB-MECA	thio-C1-IB-MECA
LNCaP	54.18	18.56
PC-3	97.09	20.36

[0031] (IC₅₀ μ M)

[0032] IB-MECA의 경우 최고 농도 50 μ M에서도 세포 생존율이 LNCaP의 경우 54%, PC-3의 경우 63%로 IC₅₀값이 50 μ M

이상이었으나, thio-Cl-IB-MECA 경우 IB-MECA에 비하여 현저하게 낮은 농도에서, 농도 의존적으로 세포의 성장을 저해함을 알 수 있었다 ($IC_{50}=18.56 \mu M$; LNCaP cells, $IC_{50}=20.36 \mu M$; PC-3 cells) (표 1 및 도 1). 세포 저해 활성 결과를 토대로 추가적인 기전 연구를 수행하였다.

[0033] 실시예 2: 시험관내에서 세포의 형태학적 변화 관찰

[0034] 본 실시예에서는 LNCaP 및 PC-3 전립선 암 세포 각각에 thio-Cl-IB-MECA를 40, 20, 10 μM 의 농도로 처리하여 48 시간 배양한 다음, 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다.

[0035] 각 전립선 암 세포를 10% FBS(Fetal Bovine Serum)가 포함된 배지로 100 mm 배양 접시 당 1.0×10^6 가 되도록 희석하여 37°C, 5% CO_2 조건에서 24시간을 배양한 후 PBS(Phosphate Buffered Saline)로 2회 세척하였다. 10% FBS가 포함된 배지에 thio-Cl-IB-MECA를 필요한 농도로 희석한 후, 100 mm 배양 접시에 준비된 배지를 10 ml 첨가하여 일정 시간 배양하였다. 처리 시간과 농도에 맞추어 현미경으로 세포의 형태를 관찰하였다(도 2a 및 2b).

[0036] 실험 결과, 도 2a 및 2b에 나타난 바와 같이 LNCaP (도 2a) 및 PC-3 (도 2b) 전립선 암 세포 모두에서 시료(thio-Cl-IB-MECA)를 처리하지 않고 DMSO만을 처리한 대조군(Control)의 경우 세포 수의 증가를 보였으나 thio-Cl-IB-MECA를 처리한 군은 농도 의존적으로 세포 수가 감소하였다.

[0037] 실시예 3: 시험관 내에서 세포 주기 분석 (FACS)

[0038] thio-Cl-IB-MECA를 40, 20, 10 μM 의 농도로 처리하여 48 시간 배양하여 유세포 분석기(flow cytometer analysis: FACS)로 세포 주기를 분석하였다. 세포를 10% FBS가 포함된 배지로 100 mm 배양 접시 당 1.0×10^6 가 되도록 희석하여 37°C, 5% CO_2 조건에서 24시간을 배양한 후 PBS로 2회 세척하였다. 10% FBS가 포함된 배지에 thio-Cl-IB-MECA를 필요한 농도로 희석한 후, 100 mm 배양 접시에 준비된 배지를 10 ml 첨가하여 일정 시간 배양하였다. 세포 배지 내에 부착되지 않은 세포와 부착된 세포를 모아 PBS로 2회 세척한 후 100% 냉 메탄올을 500 μL 씩 첨가하여 4°C에서 세포를 고정하였다. PBS로 2회 세척하고 RNase A가 들어있는 용액에서 30분간 방치한 후 PI(Propidium Iodide) 완충액으로 5분간 차광 염색하였다. PI 완충액을 제거한 후 폴리스티렌 둥근 바닥 튜브로 옮겨서 FACScalibur® 유세포 분석기로 세포의 주기를 분석하였다.

[0039] 도 3에 나타난 바와 같이, LNCaP 세포(A)와 PC-3 세포(B)에 thio-Cl-IB-MECA를 처리한 경우 모두 G_1 기 증가가 나타났으며 특히 LNCaP 세포에서의 G_1 기 정지(arrest)가 PC-3 세포에 비하여 뚜렷하게 나타났다.

[0040] 실시예 4: 시험관 내에서 웨스턴 블랏팅 분석을 통한 세포 주기 조절 관련 단백질 발현 및 신호전달체계 활성화 조절 작용 확인

[0041] 실시예 4는 thio-Cl-IB-MECA에 의한 LNCaP 세포와 PC-3 세포 증식 억제 효과가 Wnt 신호 전달 경로를 조절하여 나타나는 것인지를 확인하기 위한 것이다. LNCaP 세포와 PC-3 세포를 10% FBS가 포함된 배지로 100mm 배양 접시 당 1.0×10^6 가 되도록 희석하여 37°C, 5% CO_2 조건에서 24시간을 배양한 후 PBS로 2회 세척하였다. 10% FBS가 포함된 배지에 thio-Cl-IB-MECA를 필요한 농도로 희석한 후, 100 mm 배양 접시에 준비된 배지를 10 ml 첨가하여 일정 시간 배양하였다. 세포 배지 내에 부착되지 않은 세포와 부착된 세포를 모아 PBS로 2회 세척한 후 끓고 있는 세포 용해 완충액을 넣어 세포를 현탁시키고 이를 100°C 하에서 5분간 가열하였다. 이를 식힌 후 20°C에서 보관하였고 사용 직전에 37°C에서 녹여 단백질 정량 및 전기영동에 이용하였다. 단백질 정량은 BCA 법을 이용하였고 30~50mg의 단백질을 8~12% SDS-폴리아크릴아미드 겔을 이용하여 150V에서 110분 동안 전기영동하였다. 원하는 부위의 겔을 잘라 1시간 동안 PVDF(polyvinylidene fluoride) 막으로 이동시킨 후 PBST로 2회 세척하고 블로킹 완충액에 넣어 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 그 다음 PBST로 5분간 3회 세척한 후 다음의 1차 항체를 3% 탈지유/PBST로 1:1,000~1:2,000의 비율로 희석하여 막과 함께 밀봉하여 4°C에서 교반을 하면서 12시간 이상 배양하였다. 막을 PBST로 5분간 2-3회씩 세척한 후 HRP-결합된 2차 항체를 1:1,500~1:2,000으로 희석하여 막과 함께 상온에서 2-3시간 배양하였다. 이를 PBST로 5분간 3회 세척한 후 웨스턴 블랏팅 기질 (WESTSAVE UpTM)을 처리하여 생성된 발광(luminescence)을 LAS-3000을 이용하여 확인하였다.

[0042] 실험 결과, LNCaP 세포 (도 4a) 및 PC-3 세포 (도 4b)에서 thio-Cl-IB-MECA는 G_1 기 억제를 유발시키는 종양 억제 인자인 p53 및 사이클린(cyclin)/CDK 복합체를 억제하는 p27의 발현을 증가시킨 반면, 사이클린 D, 사이클린 A, CDK4, c-myc, PCNA의 발현 및 RB 인산화를 억제하였다. 또한, thio-Cl-IB-MECA는 LNCaP 세포 (도 5a) 및

PC-3 세포 (도 5b)에서 세포 증식 관련 신호전달체계인 Wnt 신호 전달 경로를 억제하는 작용을 나타내었다.

실시예 5: 동물실험을 통한 항암활성 측정

실시예 5는 thio-C1-IB-MECA의 전립선 암 세포에 대한 시험관 내 실험을 통한 항암 활성 효능을 바탕으로 동물 실험을 통한 항암활성을 측정하였다. 전립선 암 세포주 PC-3를 누드마우스에 피하 이식하여 8일 이후 종양크기가 150 내지 200 mm³에 달하였을 때, 약물로서 thio-C1-IB-MECA (0.02, 0.2, 2 mg/kg), thio-IB-MECA (2 mg/kg), 또는 IB-MECA (2 mg/kg)을 매일 35일 동안 경구 투여하였다. 종양크기는 3-5일 간격으로 측정하였다. 종양의 부피는 수학적 식 2에 의해 측정하였다.

<수학적 식 2>

$$\text{종양의 부피} = abc \times \pi / 6$$

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

그 결과, PC-3 세포를 이용한 암세포 이식 누드마우스 실험 동물 모델에서 3종의 화합물은 2 mg/kg의 농도에서 thio-C1-IB-MECA(○), thio-IB-MECA(■), IB-MECA(▲) 순으로 종양의 생성을 억제하였으며, 종양 생성 저해 활성 수치는 활성물질을 투여하지 않은 대조군을 기준으로 thio-C1-IB-MECA가 82.6 %, thio-IB-MECA가 약 53.6 %, IB-MECA가 약 45.9 %였다 (도 6). 또한, thio-C1-IB-MECA는 농도 의존적으로 종양의 생성을 억제하는 것으로 나타났다 (도 7). 도 8은 약물 투여 35일 후 촬영된 각 동물의 종양 사진이다.

실시예 6: 동물 독성 실험

thio-C1-IB-MECA 및 thio-IB-MECA의 독성을 알아보기 위하여 ICR 흰쥐 (n=10, 25g)에 1500 mg/kg/몸무게의 농도로 각 화합물을 경구 투여하여 행동 변화 및 상태를 관찰해 보았다.

모든 시험 동물이 화합물(thio-C1-IB-MECA 및 thio-IB-MECA) 투여 7일 후까지 체중 변화 등의 특별한 이상없이 건강하게 생존하였다. 따라서, 화합물 thio-C1-IB-MECA와 thio-IB-MECA의 최대내성용량 (Maximum Tolerance Dose: MTD)은 1500 mg/kg 이상 (MTD > 1500 mg/kg/mouse)이며, 안전한 약물로 확인되었다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 유효성분인 thio-C1-IB-MECA의 사람 전립선 암세포 (A) LNCaP 및 (B) PC-3에 대한 성장 억제 효과를 나타낸 그래프이다.

도 2a 및 2b는 본 발명에 따른 유효성분인 thio-C1-IB-MECA의 사람 전립선 암세포 LNCaP (도 2a) 및 PC-3 (도 2b)의 성장억제 효과를 나타낸 현미경 사진이다.

도 3은 본 발명에 따른 유효성분인 thio-C1-IB-MECA의 사람 전립선 암세포 (A) LNCaP 및 (B) PC-3에 대한 세포 주기 진행 억제 작용을 나타낸 세포 주기 분석 실험결과이다.

도 4a 및 4b는 본 발명에 따른 유효성분인 thio-C1-IB-MECA의 사람 전립선 암세포 LNCaP (도 4a) 및 PC-3 (도 4b)에 대한 G1기 진행 억제 관련 인자들에 대한 발현 조절 작용을 나타낸 웨스턴 블롯팅 결과이다.

도 5a 및 5b는 본 발명에 따른 유효성분인 thio-C1-IB-MECA의 사람 전립선 암세포 LNCaP (도 5a) 및 PC-3 (도 5b)에 대한 세포 증식 관련 신호전달체계의 활성화 억제 작용을 나타낸 웨스턴 블롯팅 결과이다.

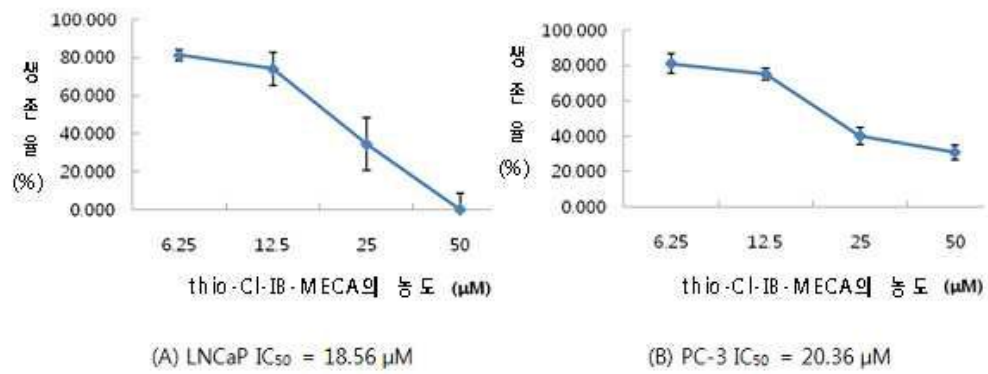
도 6은 IB-MECA, C1-IB-MECA 및 thio-C1-IB-MECA의 PC-3 종양 이식 동물 모델에서의 종양 부피 및 종양 생성 저해 활성 결과 그래프이다.

도 7은 농도에 따른 thio-C1-IB-MECA의 PC-3 종양 이식 동물 모델에서의 종양 부피 및 종양 생성 저해 활성 결과 그래프이다.

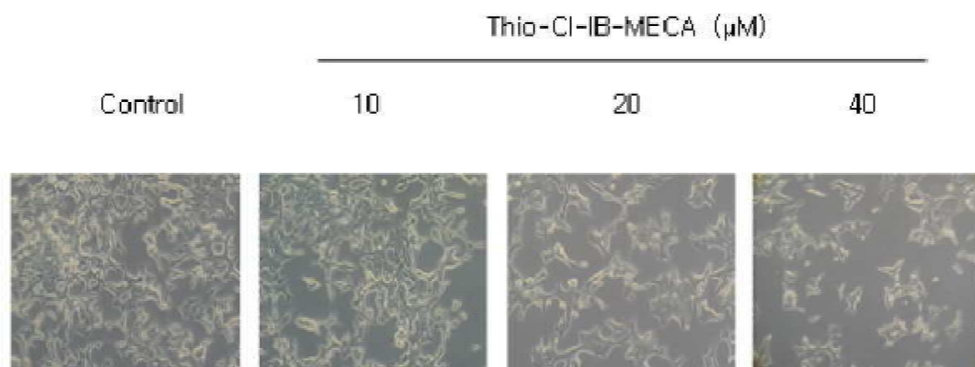
도 8은 대조군 동물, 및 IB-MECA, C1-IB-MECA, 또는 thio-C1-IB-MECA가 투여된 동물의 종양 부피 및 종양 생성 저해 활성 정도를 확인할 수 있는 사진으로서, 약물 투여 35일 후 촬영된 사진이다.

도면

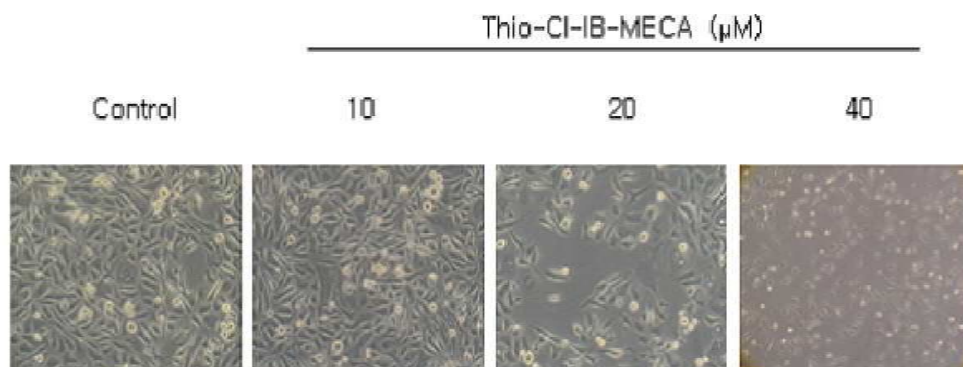
도면1



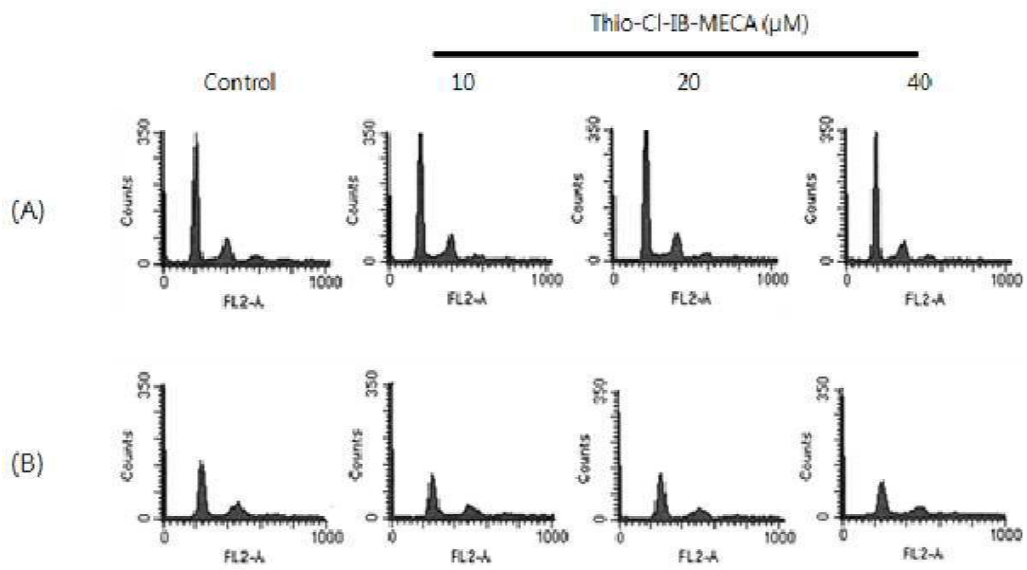
도면2a



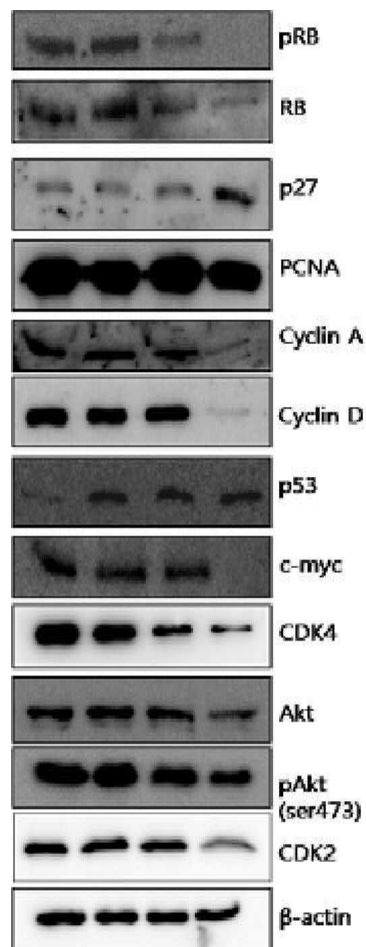
도면2b



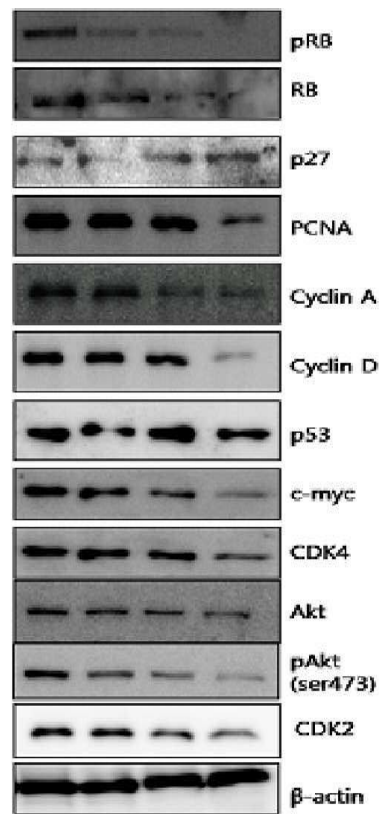
도면3



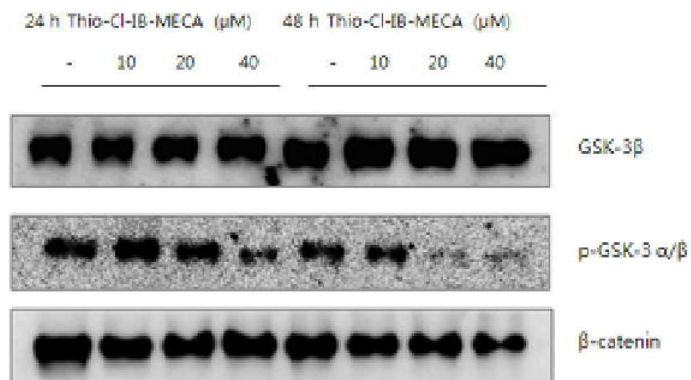
도면4a



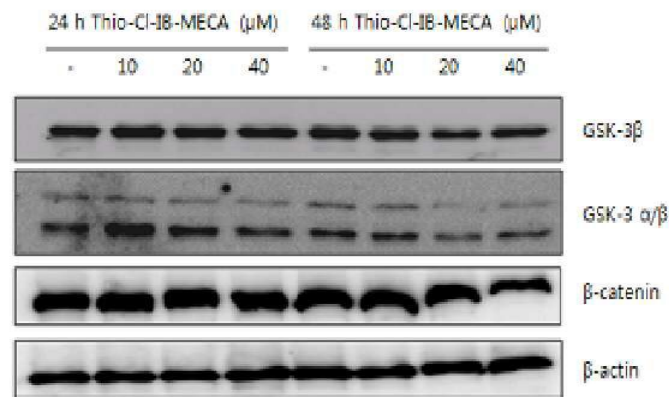
도면4b



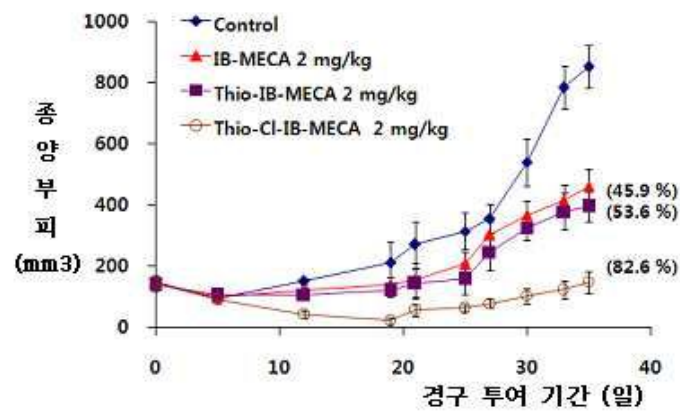
도면5a



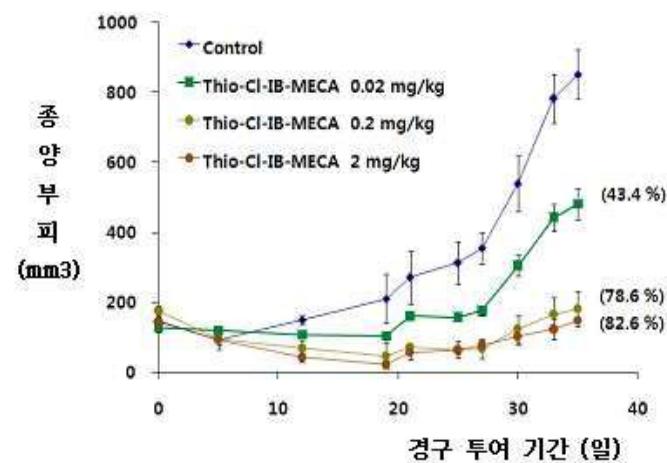
도면5b



도면6



도면7



도면8

