

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 7월 9일 (09.07.2015)



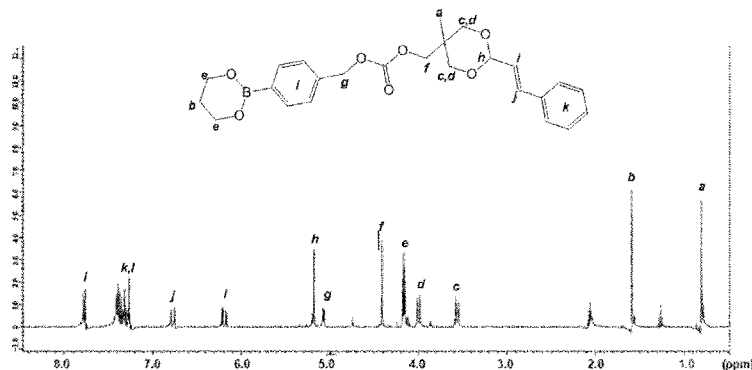
(10) 국제공개번호
WO 2015/102448 A1

- (51) 국제특허분류: C07D 319/06 (2006.01) A61K 31/357 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/000067
- (22) 국제출원일: 2015년 1월 5일 (05.01.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2014-0000653 2014년 1월 3일 (03.01.2014) KR
10-2015-0000660 2015년 1월 5일 (05.01.2015) KR
- (71) 출원인: 전북대학교 산학협력단 (INDUSTRIAL CO-OPERATION FOUNDATION CHONBUK NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 561-756 전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567, Jeollabuk-do (KR). 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-806 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 권병목 (KWON, Byoung Mog); 305-806 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이동원 (LEE, Dong Won); 561-817 전라북도 전주시 덕진구 솔내 4길 15, 307호, Jeollabuk-do (KR). 노경연 (NOH, Joung Youn); 561-301 전라북도 전주시 덕진구 송천로 109, 1206호, Jeollabuk-do (KR). 권병수 (KWON, Byeng Su); 560-855 전라북도 전주시 완산구 신봉 1길 14-3, Jeollabuk-do (KR). 한동초 (HAN, Dong Cho); 305-806 대전광역시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 152-766 서울시 구로구 디지털로 31길 20 (구로동) 601호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: HYBRID ANTICANCER PRODRUG SIMULTANEOUSLY PRODUCING CINNAMALDEHYDE AND QUINONE METHIDE AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) 발명의 명칭 : 신남알데히드 및 퀴논 메티드를 동시에 생성하는 혼성 항암 전구약물 및 이의 제조방법



(57) Abstract: The present invention relates to a hybrid anticancer prodrug simultaneously producing cinnamaldehyde and quinone methide. The hybrid anticancer prodrug according to the present invention sequentially releases quinone methide and cinnamaldehyde by H₂O₂ and acidic pH, and thus alkylates antioxidant GSH through the release of quinone methide, thereby inhibiting an anti-oxidative system and increasing oxidation stress, and generates and accumulates reactive oxygen species (ROS) through the release of cinnamaldehyde, thereby promoting apoptosis, and thus the hybrid anticancer prodrug according to the present invention can be favorably used as an anticancer drug by creating a synergetic anticancer effect through double stimulus-response and sequential treatment action in a cancer cell-specific manner.

(57) 요약서: 본 발명은 신남알데히드 및 퀴논 메티드를

[다음 쪽 계속]

WO 2015/102448 A1



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

동시에 생성하는 혼성 항암 전구약물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 혼성 항암 전구약물은 H₂O₂와 산성 pH에 의해 퀴논 메티드와 신남알데히드를 순차적으로 방출되게 하여 퀴논 메티드의 방출에 의해 항산화제 GSH를 알킬화하여 항산화 시스템을 저해시키고 산화 스트레스를 증가시킬 수 있으며, 신남알데히드의 방출에 의해 활성산소(ROS)가 생성 및 축적되어 아포토시스를 촉진시킴으로써 암세포-특이적 방식으로 이중 자극 반응 및 순차 치료 작용을 통해 시너지 항암효과를 일으켜 항암제로 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 신남알데히드 및 퀴논 메티드를 동시에 생성하는 혼성 항암 전구약물 및 이의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 신남알데히드 및 퀴논 메티드를 동시에 생성하는 혼성 항암 전구약물로서, 상호보완적 시너지 작용으로 산화스트레스를 증가시키면서 암세포의 사멸을 유도하는 혼성 항암 전구약물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 암은 “개체의 필요에 따라 규칙적으로 증식과 억제를 할 수 있는 정상세포와 달리 조직 내에서 필요한 상태를 무시하고 무제한 증식하는 미분화 세포로 구성되어 종양을 형성하는 것”으로 정의되며, 체내의 정상세포가 특정한 이유로 하여금 세포내의 유전자에 변화가 일어나 암세포로 변형된 것이다. 세계적으로 암은 전체 사망원인 중 약 13%를 차지하고 있으며 성별, 나이에 구분 없이 발병이 가능하며 세계 질병 중 2위의 사망원인, 국내 사망원인 1위를 차지하는 무서운 질병으로, 암 정복을 목표로 활발한 연구가 진행되고 있다. 이러한 연구 속에서 암의 다양성 및 발병 기전의 다양화로 인해 부작용이 적고 내성을 이겨낼 수 있는 효율적인 항암제의 개발이 요구되고 있으며, 새로운 항암제들이 계속해서 출시되고 있는 실정이다.
- [3] 자극감응시스템은 pH, 온도, 이온 강도(ionic strength), 전장 (electric field), 자장 (magnetic field), 빛, 초음파 등과 같은 외부환경에 감응해서 전달체가 상전이, 팽윤, 분해 등의 변화가 일어나는 것을 말한다. 이러한 자극 감응 시스템은 약물을 보호할 뿐만 아니라 약물의 방출 속도를 조절하거나, 특정 부위에 약물이 머물 수 있도록 유도한 방출조절 시스템에 주로 이용되고 있다. 특히, 암 부위의 pH는 일반적인 체내의 pH (7.4 ± 0.04)와 다르고 pH에 민감한 다양한 작용기가 존재하여 매우 널리 이용되고 있다.
- [4] 한편, 신남알데히드(cinnam aldehyde)는 동서양 모두에서 소화불량, 위염, 혈액순환 장애, 염증을 치료하는데 사용되어 온 녹나무과(Lauraceae) 식물인 수피(cinnamomum cassia)의 주약효 성분 물질로서 계피 껍질(cinnamon bark)의 주요 구성 성분이다. 신남알데히드는 Micheal 수용체 약물특이분자단(michael receptor pharmacophore)으로 알려진 α, β -카보닐을 함유하고 있으며, 활성산소종(Reactive Oxygen Speacises, ROS)을 생성하여 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential)를 저하시켜 세포에서 시토졸(cytosol)로 시토크롬 C(cytochrome C)의 방출을 통해 아포토시스를 유도하는 물질로서 카스파제(caspase)에 의존하는 기전을 통한 항암 능력이 입증되어 있다. 하지만 신남알데히드와 그 유도체의 뛰어난 항암능력에도 불구하고, 생체 내에서 간 대식세포에 의해 빨리 포획(phagocytosis)되어 1.5시간 미만(수 분, 약 5분)의 짧은

반감기를 가져 암을 표적할 수 있는 능력이 없다는 단점이 있다. 그러므로, 임상에서 신남알데히드를 항암치료에 적용하기 위해서는 항암효과를 증진시키기 위한 물리, 화학적 개질 또는 새로운 약물 전달체의 개발이 요구되고 있다.

- [5] 또한, 퀴논 메티드(quinone methide)는 암세포 내의 필수적인 항산화 효소인 GSH(글루타치온, glutathione)와 반응하여 항산화 수준을 저하시켜 상대적으로 산화 스트레스를 증가시키면서 항암효과를 일으키는 것으로 알려져 있다.
- [6] 이에 본 발명자들은 아포토시스를 유도하는 신남알데히드의 단점인 짧은 체내 머무름 시간과 약효를 증진시키고, 이의 효과를 증진시킬 수 있도록 시너지 작용을 하는 혼성 항암 전구약물을 제조하기 위하여 연구한 결과, 신남알데히드 및 퀴논 메티드를 동시에 생성하는 전구약물인 QCA(4-(1,3,2-dioxaborinan-2-yl)benzyl ((5-methyl-2-styryl-1,3-dioxan-5-yl)methyl)carbonate) 및 4-(1,3,2-dioxaborinan-2-yl)benzyl ((5-methyl-2-(2-benzoyloxyphenyl)vinyl-1,3-dioxan-5-yl)methyl)carbonate(QBCA)를 합성하였으며, 상기 제조된 QCA 및 QBCA가 신남알데히드의 체내 머무름 시간을 증진시키고, 더 나아가 암세포에 선택적으로 작용하여 부작용을 최소화하면서 항암효과를 최대로 나타내어 새로운 항암치료제로서의 가능성을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명은 신남알데히드 및 퀴논 메티드를 동시에 생성하는 혼성 항암 전구약물로서, 상호보완적 시너지 작용으로 산화스트레스를 증가시키면서 암세포의 사멸을 유도하는 혼성 항암 전구약물 및 이의 제조방법을 제공함을 목적으로 한다.
- [8] 또한, 본 발명은 상기 혼성 항암 전구약물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공함을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [9] 본 발명은 신남알데히드 및 퀴논 메티드를 동시에 생성하는 혼성 항암 전구약물로서, 상호보완적 시너지 작용으로 산화스트레스를 증가시키면서 암세포의 사멸을 유도하는 혼성 항암 전구약물 및 이의 제조방법을 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 혼성 항암 전구약물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [11] 또한, 본 발명은 상기 혼성 항암 전구약물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [12] 본 발명의 혼성 항암 전구약물은 H_2O_2 와 산성 pH에 의해 퀴논 메티드와

신남알데히드를 순차적으로 방출되게 하여 퀴논 메티드의 방출에 의해 항산화제 GSH를 알킬화하여 항산화 시스템을 저해시키고 산화 스트레스를 증가시킬 수 있으며, 신남알데히드의 방출에 의해 활성산소(ROS)가 생성 및 축적되어 아포토시스를 촉진시킴으로써 암세포-특이적 방식으로 이중 자극 반응 및 순차 치료 작용을 통해 시너지 항암효과를 일으켜 항암제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [13] 도 1은 본 발명의 실시예 1-1에서 제조된 (4-(1,3,2-디옥사보리난-2-일)페닐)메탄올(1)의 ¹H-NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- [14] 도 2는 본 발명의 실시예 1-2에서 제조된 신남알데히드 유도체(2)의 ¹H-NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- [15] 도 3은 본 발명의 실시예 1-4에서 제조된 QCA의 ¹H-NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- [16] 도 4는 본 발명의 실시예 3-4에서 제조된 [4-(1,3,2-dioxaborinan-2-yl)phenyl]methyl N-(5-methyl-2-styryl-1,3-dioxan-5-yl)carbamate의 ¹H-NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- [17] 도 5는 본 발명의 실시예 1-4에서 제조된 QCA의 암세포에서 가수분해 반응 후 ¹H-NMR 스펙트럼을 나타낸 도이다.
- [18] 도 6은 화학 발광에 의해 H₂O₂에 대한 QCA의 민감성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [19] 도 7은 본 발명의 QCA를 세포 내에 처리시 GSH의 수치 변화를 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [20] 도 8은 본 발명의 QCA를 세포 내에 처리시 활성산소의 생성 여부를 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [21] 도 9는 본 발명의 QCA를 세포 내에 처리시 세포 독성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [22] 도 10은 본 발명의 QBCA를 세포 내에 처리시 세포 독성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [23] 도 11은 본 발명의 QCA를 DU145 세포 내에 처리시 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [24] 도 12는 본 발명의 QCA를 SW620 세포 내에 처리시 웨스턴 블롯 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [25] 도 13은 본 발명의 QCA로 처리된 SW620 세포의 DNA의 분절을 전기영동으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [26] 도 14는 본 발명의 QCA로 처리된 SW620 세포의 DNA 분절을 시간의 흐름에

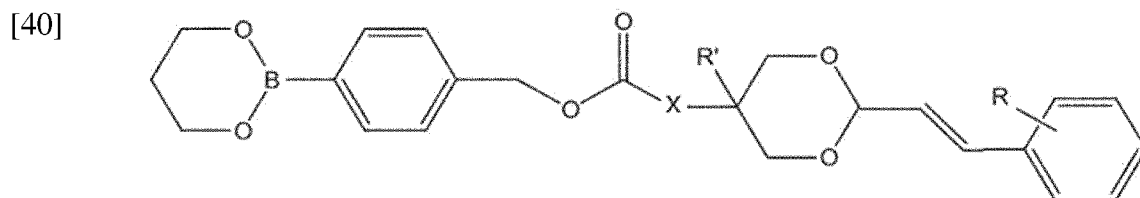
따라 분석한 결과를 나타낸 도이다.

- [27] 도 15는 본 발명의 QCA로 처리된 DU145 세포의 유세포 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [28] 도 16은 본 발명의 QCA로 처리된 SW620 세포의 유세포 분석 결과를 나타낸 도이다.
- [29] 도 17은 본 발명의 QCA를 투여에 따른 이중 이식 모델의 종양의 크기를 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [30] 도 18은 본 발명의 QCA를 투여량에 따른 이중 이식 모델의 종양의 크기를 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [31] 도 19는 본 발명의 QCA를 투여한 마우스의 종양 용해물을 LC-MS/MS로 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- [32] 도 20은 본 발명의 QCA로 처리된 SW620 세포의 H&E 염색을 통해 세포 사멸 여부를 확인한 도이다.
- [33] 도 21은 본 발명의 QCA로 처리된 SW620 세포의 TUNEL 염색을 통해 세포 사멸 여부를 확인한 도이다.
- [34] 도 22는 본 발명의 QCA를 투여한 마우스의 간과 심장 조직의 H&E 염색을 통해 장기 손상 여부를 확인한 도이다.
- [35] 도 23은 본 발명의 QCA를 투여한 마우스의 간과 심장 조직의 TUNEL 염색을 통해 장기 손상 여부를 확인한 도이다.
- [36] 도 24는 본 발명의 QCA를 투여한 마우스의 ALT 평가를 통해 QCA의 독성 여부를 확인한 도이다.
- [37] 도 25는 본 발명의 QCA를 투여한 마우스의 간 및 심장 조직의 H&E 염색을 통해 QCA의 독성 여부를 확인한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [38] 본 발명은 신남알데히드(cinnam aldehyde) 및 퀴논 메티드(quinone methide)를 동시에 생성하는 혼성 향암 전구약물로서, 하기 화학식 1로 표시되는 혼성 향암 전구약물을 제공한다.

[39] [화학식 1]



- [41] 상기 화학식 1에서, R은 H-, HO-, CH₃O- 또는 C₆H₅COO-, R'는 H- 또는 CH₃-이며, X는 O 또는 NH이다.
- [42] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하면 다음과 같다.
- [43] 일반적으로 신남알데히드(Cinnam aldehyde)는 활성산소(Reactive Oxygen Species, ROS) 생성을 통해 아포토시스를 유도하는 것으로 알려져 있으나, 정상

세포에는 미약한 세포 독성을 가진다. 그러나, 신남알데히드의 혈액 내에서의 짧은 반감기 및 일반적인 항암 약물에 비해 낮은 활성에 의해 활용이 제한되어 왔다. 따라서 이러한 단점을 극복하기 위해, 본 발명에서는 신남알데히드에 항산화 물질을 소거하는 퀴논 메티드 부분을 결합하여 새로운 혼성 항암

전구약물인 4-(1,3,2-dioxaborinan-2-yl)benzyl

((5-methyl-2-styryl-1,3-dioxan-5-yl)methyl)carbonate(QCA),

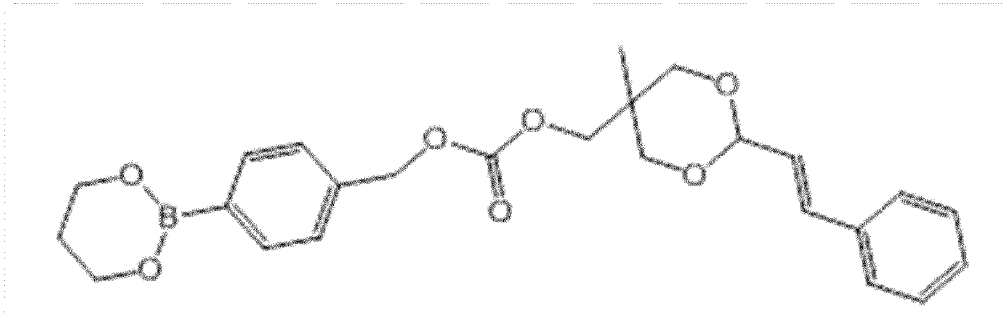
4-(1,3,2-dioxaborinan-2-yl)benzyl

((5-methyl-2-(2-benzoyloxyphenyl)vinyl-1,3-dioxan-5-yl)methyl)carbonate(QBCA) 및

[4-(1,3,2-dioxaborinan-2-yl)phenyl]methyl N-(5-methyl-2-styryl-1,3-dioxan-5-yl)carbamate를 제조하였으며, 이는 하기 화학식 2 내지 4로 표시된다.

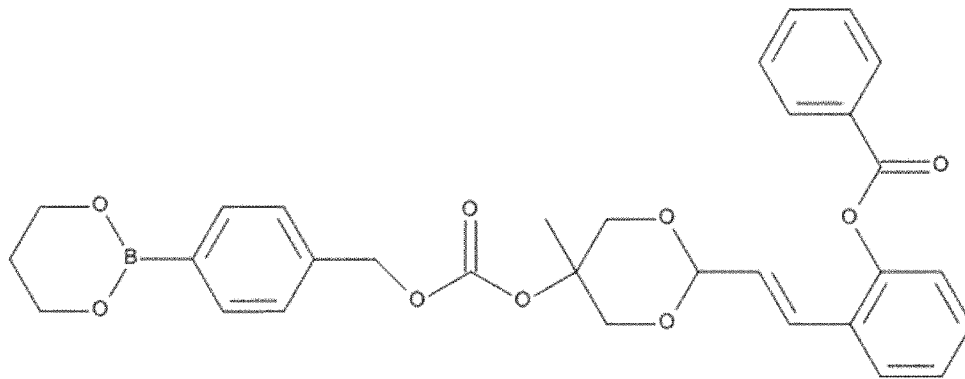
[44] [화학식 2]

[45]



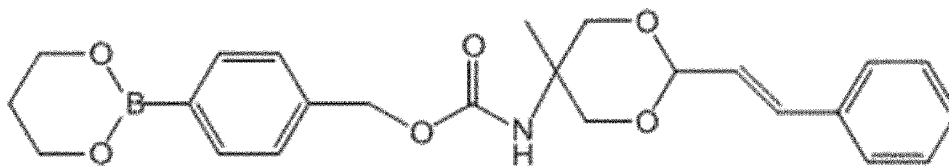
[46] [화학식 3]

[47]



[48] [화학식 4]

[49]

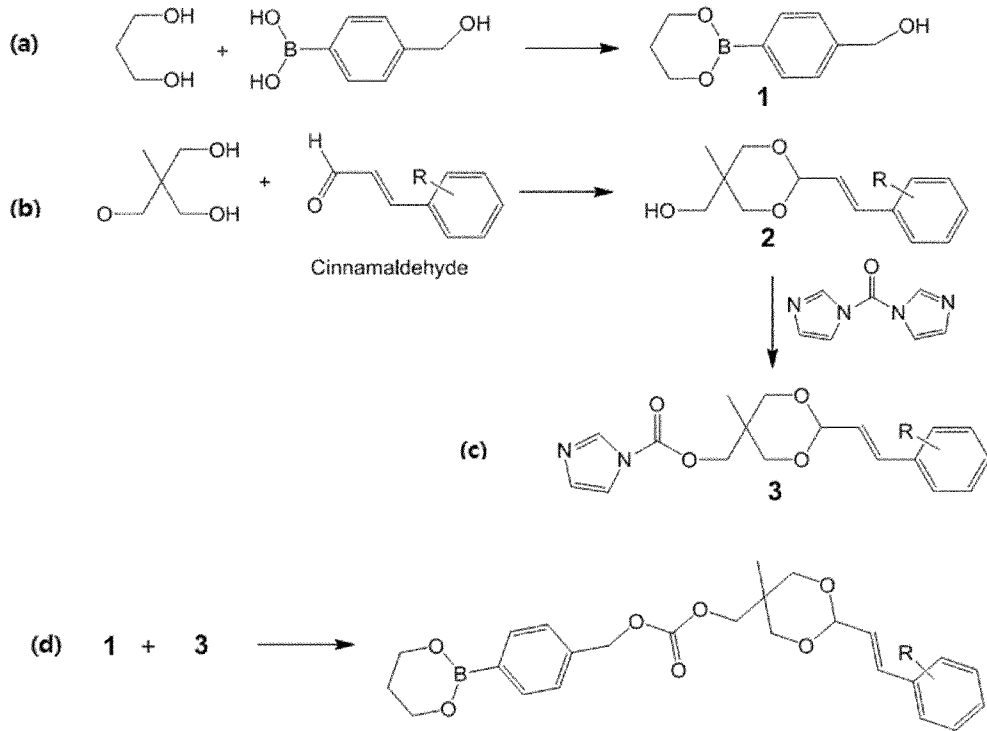


[50] 상기 혼성 항암 전구약물은 퀴논 메티드를 생성하는 보로네이트 화합물 부분 및 신남알데히드 유도체 부분으로 구성되어 있으며, 상기 보로네이트 화합물 부분과 신남알데히드 유도체 부분은 카보네이트(carbonate, -OCOO-) 또는

카바메이트(carbamate, -NHCOO-)로 연결 될 수 있다. 여기서, 반드시 보로네이트 화합물 부분이 -COO-와 연결되어야 한다.

- [51] 상기 퀴논 메티드 및 신남알데히드는 과산화수소(H_2O_2) 및 산성 pH에 의해 생성될 수 있으며, 특히 이들은 암세포에서 특이적으로 생성될 수 있다.
- [52] 이때, 과산화수소에 의한 보로네이트 산화를 통해 퀴논 메티드를 생성하며 이때 생성된 퀴논 메티드는 항산화제 글루타치온(glutathione, GSH)를 알킬화하여 항산화 시스템을 저해시키고 산화 스트레스를 증가시킬 수 있다. 또한, 산성 pH는 본 발명의 아세탈 결합을 절단하여 신남알데히드를 방출하고, 이때 방출된 신남알데히드는 ROS를 생성하여 아포토시스(apoptosis)를 촉진시킬 수 있다. 항산화 수준이 저하된 상태에서 신남알데히드의 방출에 의해 생성되는 ROS는 대량 축적되어 아포토시스를 더욱 촉진시킨다. 따라서, 본 발명의 혼성 항암 약물은 암세포-특이적 방식으로 이중 자극 반응 및 순차 치료 작용을 통해 시너지 항암효과를 나타낸다.
- [53] 또한, 본 발명은
- [54] (a) 디올 화합물 및 보론산(boronic acid) 화합물을 반응시켜 퀴논 메티드를 생성하는 보로네이트 화합물을 제조하는 단계;
- [55] (b) 신남알데히드를 산성 용액과 반응시켜 아세탈 결합을 가진 신남알데히드 유도체를 제조하는 단계;
- [56] (c) 상기 (b) 단계에서 제조된 신남알데히드 유도체를 카보닐디이미다졸(carbonyldiimidazole)과 반응시켜 신남알데히드 방출 화합물을 제조하는 단계; 및
- [57] (d) 상기 (a) 단계에서 제조된 보로네이트 화합물과 상기 (c) 단계에서 제조된 신남알데히드 방출 화합물을 반응시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 혼성 항암 전구약물의 제조방법을 제공한다.
- [58] 본 발명의 혼성 항암 전구약물의 제조방법의 대표적인 예는 하기 반응식 1로 나타낼 수 있다.
- [59] [반응식 1]

[60]



[61] 상기 반응식 1에서, 상기 R은 화학식 1에서 정의한 바와 같다.

[62] 본 발명의 혼성 향암 전구약물의 제조방법을 단계별로 상세히 설명하면 다음과 같다.

[63] 상기 (a) 단계는 퀴논 메티드를 생성하는 보로네이트 화합물을 제조하는 단계로, 유기용매 하에 디올 화합물과 보론산 화합물을 반응시켜 보로네이트 화합물을 제조한다.

[64] 상기 디올 화합물은 프로판디올, 부탄디올, 펜탄디올이 바람직하나 이에 한정하지 않으며, 보론산 화합물은

(4-히드록시메틸페닐)보론산((4-Hydroxymethylphenyl)boronic acid),

(4-(히드록시메틸)-2-메틸페닐)보론산((4-(hydroxymethyl)-2-methylphenyl)boronic acid) 및

(2-플루오로-4-(히드록시메틸)페닐)보론산((2-fluoro-4-(hydroxymethyl)phenyl)boronic acid)이 바람직하다.

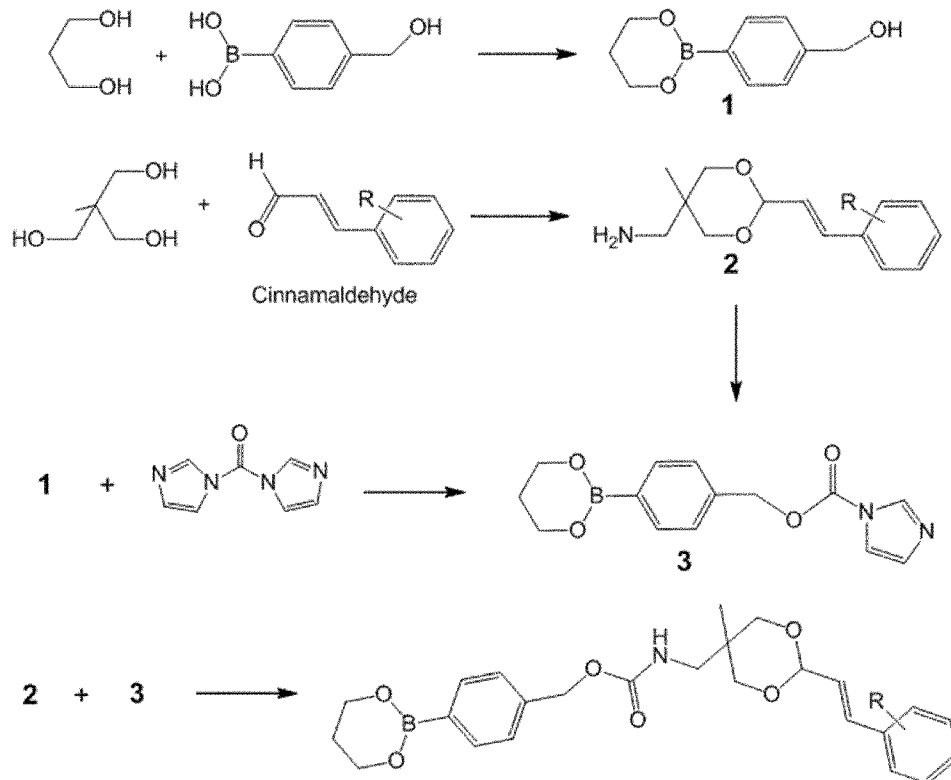
[65] 상기 (b) 단계는 아세탈 결합을 가진 신남알데히드 유도체를 제조하는 단계로, 신남알데히드를 산성 용액에 첨가하고 70~100°C의 고온에서 반응을 진행시킨 후 용매를 증발시켜 얻는다. 상기 산성 용액은 p-톨루엔 설펡산 또는 황산이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.

[66] 상기 제조된 신남알데히드 유도체는 아세탈 결합을 포함하여 산에서 분해 가능하므로 암세포에서 신남알데히드 방출을 가능하게 한다.

[67] 상기 (c) 단계는 신남알데히드 방출 화합물을 제조하는 단계로, 상기 (b)

단계에서 제조된 신남알데히드 유도체를 카보닐디이미다졸과 함께 유기용매에 녹인 후 20~40°C에서 반응시키고 용매를 증발하여 얻는다.

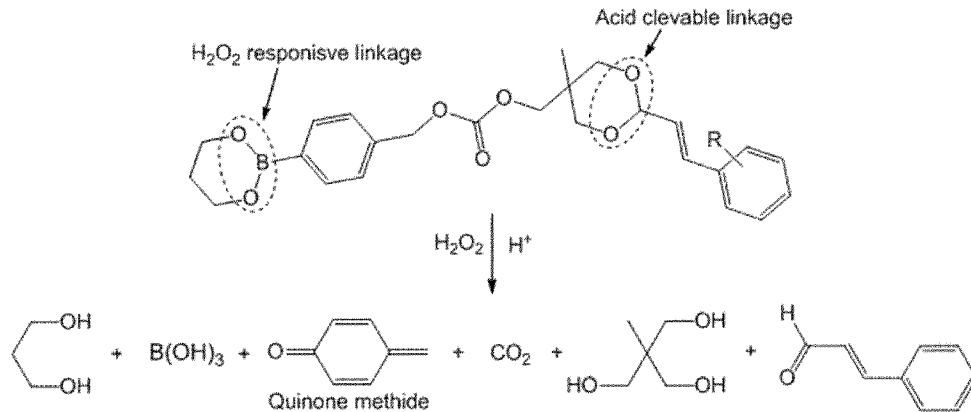
- [68] 상기 (d) 단계는 신남알데히드 및 퀴논 메티드를 동시에 생성하는 혼성 항암 전구약물을 제조하는 단계로, 상기 (a) 단계에서 제조된 보로네이트 화합물과 상기 (c) 단계에서 제조된 신남알데히드 방출 화합물을 유기용매하에서 반응시킨 후 용매를 증발시켜 얻는다.
- [69] 상기 각 단계에서 사용된 유기용매는 테트라하이드로퓨란, 디클로로메탄, 헥산, 디옥산, 벤젠, 디메틸설폭시드, 디메틸포름아미드 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.
- [70] 또한, 본 발명의 혼성 항암 전구약물의 제조방법은
- [71] (a) 디올 화합물 및 보론산(boronic acid) 화합물을 반응시켜 퀴논 메티드를 생성하는 보로네이트 화합물을 제조하는 단계;
- [72] (b) 신남알데히드를 산성 용액과 반응시켜 아세탈 결합을 가진 신남알데히드 유도체를 제조하는 단계;
- [73] (c) 상기 (a) 단계에서 제조된 보로네이트 화합물을 카보닐디이미다졸과 반응시켜 퀴논 메티드 방출 화합물을 제조하는 단계; 및
- [74] (d) 상기 (b) 단계에서 제조된 신남알데히드 화합물과 상기 (c) 단계에서 제조된 퀴논 메티드 방출 화합물을 반응시키는 단계;를 포함할 수 있다.
- [75] 본 발명의 상기 제조방법의 대표적인 예는 하기 반응식 2로 나타낼 수 있다.
- [76] [반응식 2]
- [77]



- [78] 상기 반응식 2에서, 상기 R은 화학식 1에서 정의한 바와 같다.
 [79] 본 발명의 혼성 항암 전구 약물의 분해 과정의 대표적인 예는 하기 반응식 3으로 표시될 수 있다.

[80] [반응식 3]

[81]



- [82] 상기 반응식 3에서, 상기 R은 화학식 1에서 정의한 바와 같다.
 [83] 또한, 본 발명은 상기 혼성 항암 전구 약물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
 [84] 상기 조성물은 약학적 조성물 및 식품 조성물을 포함한다.
 [85] 본 발명의 혼성 항암 전구약물은 H₂O₂와 산성 pH에 의해 퀴논 메티드와 신남알데히드를 순차적으로 방출되게 하여 퀴논 메티드의 방출에 의해 항산화제 GSH를 알킬화하여 알킬화하여 항산화 시스템을 저해시키고 산화 스트레스를 증가시킬 수 있다. 또한, 항산화 수준이 저하된 상태에서 신남알데히드의 방출에 의해 생성되는 활성산소(ROS)가 대량 축적되어 아포토시스를 촉진시킴으로써 암세포-특이적 방식으로 이중 자극 반응 및 순차 치료 작용을 통해 시너지 항암효과를 일으켜 항암제로 유용하게 사용될 수 있다.
 [86] 상기 암은 폐암, 췌장암, 대장암, 결장직장암, 골수성 백혈병, 갑상선암, 골수형 성이상증후군(MDS), 방광 암종, 표피 암종, 흑색종, 유방암, 전립선암, 두경부암, 자궁암, 난소암, 뇌암, 위암, 후두암, 식도암, 방광암, 구강암, 간염 기원의 암, 육종, 기형암종, 신경모세포종, 신장 암종, 간암, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 및 갑상선 미분화암으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
 [87] 본 발명의 조성물은 상기 혼성 항암 전구 약물과 함께 암에 대하여 예방 또는 치료의 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
 [88] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이

바람직하다. 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

- [89] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [90] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 혼성 항암 전구 약물은 1일 1 mg/kg 내지 10000 mg/kg의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 또는 수 회 나누어 투여할 수 있다.
- [91] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [92] 본 발명의 조성물은 암의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [93] 본 발명의 식품 조성물은 상기 혼성 항암 전구 약물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15중량 % 이하, 바람직하게는 10 중량 % 이하의

양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

- [94] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [95] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.
- [96] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [97] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 적용되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

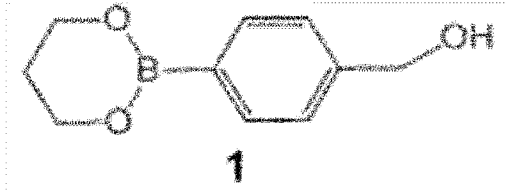
[98]

[99] **실시예 1. OCA(4-(1,3,2-dioxaborinan-2-yl)benzyl ((5-methyl-2-styryl-1,3-dioxan-5-yl)methyl)carbonate)의 제조**

[100] **1-1.**

(4-(1,3,2-디옥사보리난-2-일)페닐)메탄올((4-(1,3,2-dioxaborinan-2-yl)phenyl)methanol) (1)의 제조

[101]



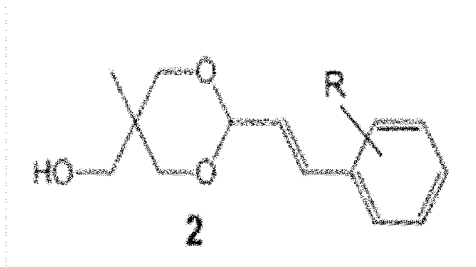
[102] (4-히드록시메틸페닐)보론산((4-Hydroxymethylphenyl)boronic acid) (2.0g) 및 1,3-프로판디올(1,3-propanediol) (1.0g)을 상온에서 40mL의 건조 테트라퓨란(tetrahydrofuran)에 용해시켰다. 반응 혼합물을 교반하면서 72시간 동안 반응시켰다. 반응 혼합물을 감압 하에 증발시켜 용매를 제거하고, 실리카 겔 크로마토그래피(헥산/에틸 아세테이트 = 6/4)로 정제하여 점성의 무색 액체인 표제 화합물 (1)을 얻었다.

[103] 상기 표제 화합물 (1)의 ¹H NMR 스펙트럼은 도 1에 나타내었다.

[104]

[105] 1-2. 신남알데히드 유도체((5-methyl-2-styryl-1,3-dioxan-5-yl)methanol) (2)의 제조

[106]



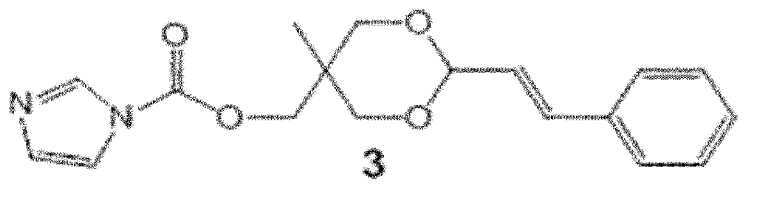
[107] 트리스(히드록시메틸)에탄(Tris(hydroxymethyl)ethane) (4.88g)을 70ml의 건조 벤젠(benzene)에 용해시켰다. 그 다음, 반응 용액에 신남알데히드 (5.714mL) 및 p-톨루엔설폰산(p-toluenesulfonic acid)(40 mg)을 첨가하고 90°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 그 후 반응 용액을 상온에서 냉각시키고, 1mL의 트리에틸렌아민(triethyleneamine)을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 반응 혼합물 내의 벤젠을 회전증발기(rotary evaporator)를 이용하여 증발시키고 컬럼 크로마토그래피(hexane/ethyl acetate = 7/3)로 정제하여 표제 화합물을 얻었다.

[108] 상기 표제 화합물의 ¹H NMR 스펙트럼은 도 2에 나타내었다.

[109]

[110] 1-3. 신남알데히드 방출 화합물 (3)의 제조

[111]



[112] 1,1'-카보닐디이미다졸(1,1'-Carbonyldiimidazole)(4.1g) 및 상기 1-2에서 제조한 신남알데히드 유도체 (2)(3.0g)를 50mL의 건조 디클로로메탄(dichloromethane)에

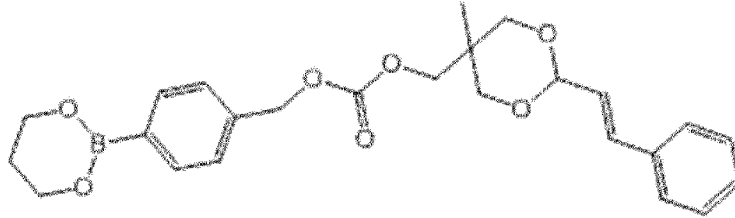
용해시킨 후 상온에서 30분동안 반응시켰다. 반응 혼합물을 감압 하에 증발시켜 디클로로메탄을 제거하고 에틸아세테이트를 용출 용매로 이용하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물 (3)을 얻었다.

[113]

[114] 1-4. 4-(1,3,2-dioxaborinan-2-yl)benzyl

((5-methyl-2-styryl-1,3-dioxan-5-yl)methyl)carbonate(QCA)의 제조

[115]



[116] 상기 1-1에서 제조된 (4-(1,3,2-디옥사보리난-2-일)페닐)메탄올 (1)(1.0g) 및 상기 1-3에서 제조된 신남알데히드 방출 화합물 (3)(1.7g)을

4-(디메틸아미노)피리딘(4-(dimethylamino)pyridine)(0.64g)을 포함하는 50mL의 건조 디클로로메탄에 용해시키고 40°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응 혼합물을 감압 하에 증발시켜 용매를 제거하고, 컬럼 크로마토그래피(헥산/에틸아세테이트 = 5/5)로 정제하여 흰색 고체 물질인 표제 화합물(QCA)를 얻었다.

[117] 상기 제조된 표제 화합물(QCA)의 ¹H NMR 스펙트럼은 도 3에 나타내었다.

[118] 도 3에 나타낸 바와 같이, 5.1ppm의 피크로 아세탈 양이온의 존재를 확인하였으며, 4.1ppm의 피크로 보로네이트와 신남알데히드의 성공적인 결합을 확인하였다.

[119]

[120] 실시예 2. QBCA(4-(1,3,2-dioxaborinan-2-yl)benzyl

((5-methyl-2-(2-benzoyloxyphenyl)vinyl)-1,3-dioxan-5-yl)methyl)carbonate)의 제조

[121] 2-1.(4-(1,3,2-디옥사보리난-2-일)페닐)메탄올((4-(1,3,2-dioxaborinan-2-yl)phenyl) methanol) (1)의 제조

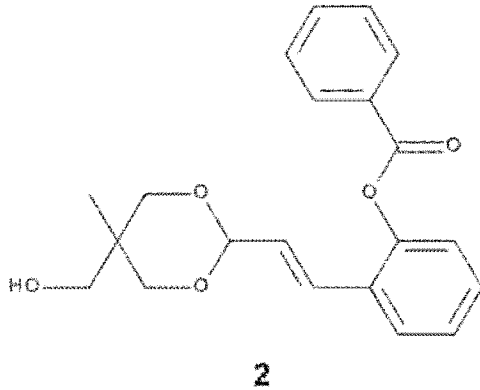
[122] 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 표제 화합물을 제조하였다.

[123]

[124] 2-2. 신남알데히드

유도체((2-(2-(5-hydroxymethyl-5-methyl-1,3-dioxan-2-yl)vinyl)phenyl) benzoate) (2)의 제조

[125]

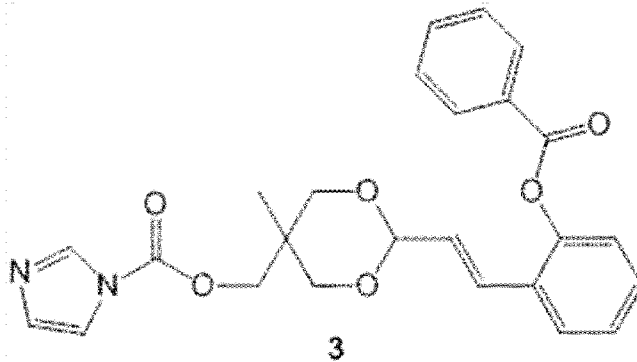


[126] 상기 실시예 1-2에서 신남알데히드 대신 벤조일옥시신남알데히드를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1-2와 동일한 방법으로 표제 화합물 (2)를 제조하였다.

[127]

[128] 2-3. 신남알데히드 방출 화합물 (3)의 제조

[129]



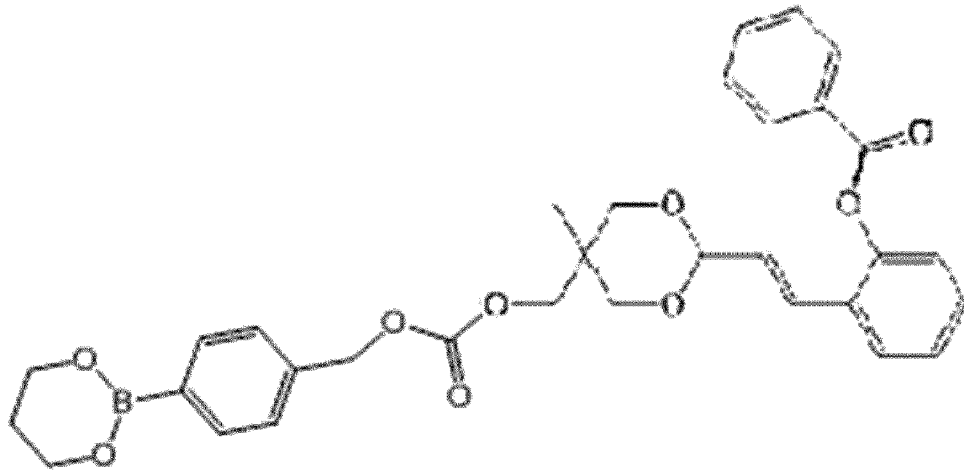
[130] 상기 실시예 1-3에서 상기 실시예 1-2에서 제조한 신남알데히드 유도체 (2) 대신 상기 실시예 2-2에서 제조한 신남알데히드 유도체 (2)를 사용하는 것을 제외하고는 실시예 1-3과 동일한 방법으로 표제 화합물 (3)를 제조하였다.

[131]

[132] 2-4. 4-(1,3,2-dioxaborinan-2-yl)benzyl

((5-methyl-2-(2-benzoyloxyphenyl)vinyl-1,3-dioxan-5-yl)methyl)carbonate(OBCA)의 제조

[133]



[134] 상기 실시예 1-4에서, 실시예 1-3에서 제조된 신남알데히드 방출 화합물 (3) 대신 실시예 2-3에서 제조된 신남알데히드 방출 화합물 (3)을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 1-4와 동일한 방법으로 표제 화합물(QBCA)를 제조하였다.

[135]

[136] **실시예 3. [4-(1,3,2-dioxaborinan-2-yl)phenylmethyl**

N-(5-methyl-2-styryl-1,3-dioxan-5-yl)carbamate의 제조

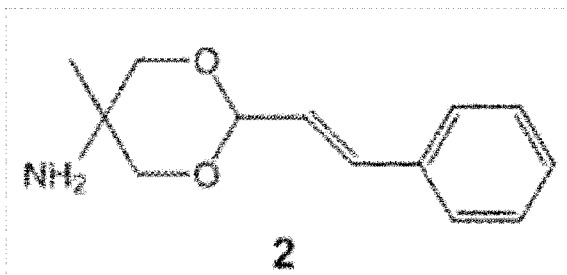
[137] 3-1.(4-(1,3,2-디옥사보리난-2-일)페닐)메탄올((4-(1,3,2-dioxaborinan-2-yl)phenyl) methanol) (1)의 제조

[138] 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 표제 화합물을 제조하였다.

[139]

[140] 3-2. 신남알데히드 유도체(5-methyl-2-styryl-1,3-dioxan-5-amine) (2)의 제조

[141]



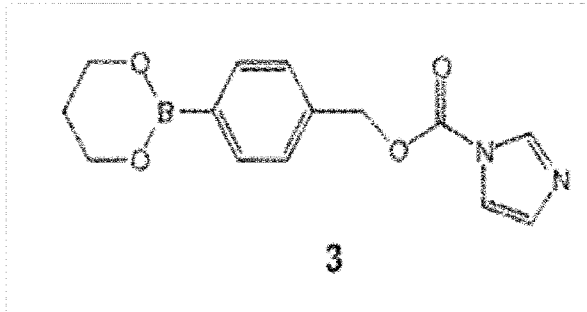
[142] 2-아미노-2-메틸프로판-1,3-디올(2-amino-2-methylpropane-1,3-diol) (4g)과 에틸 2,2,2-용하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다. 여기에 신남알데히드(2.63 g)를 침트리플루오로아세테이트(ethyl 2,2,2-trifluoroacetate) (5.4g)를 MeOH에 용해시키고 상온에서 12시간 반응하여 N-(1,3-디히드록시-2-메틸프로판-2-일)-2,2,2-트리플루오로아세트아미드(N-(1,3-dihydroxy-2-methylpropan-2-yl)-2,2,2-trifluoroacetamide)를 얻었다. 얻은 N-(1,3-디히드록시-2-메틸프로판-2-일)-2,2,2-트리플루오로아세트아미드 (4 g)를 에틸아세테이트를 이가하여 THF에서 70°C로 6시간 반응시켜 2,2,2-트리플루오로-N-(5-메틸-2-스티릴-1,3-디옥산-5-일)아세트아미드(2,2,2-trifl

uro-N-(5-methyl-2-styryl-1,3-dioxan-5-yl)acetamide))를 얻은 후 이를 컬럼 크로마토그래피(hexane/ethyl acetate = 8/2)로 정제하였다. 정제된 2,2,2-트리플루오로-N-(5-메틸-2-스티릴-1,3-디옥산-5-일)아세트아미드 (2 g)를 MeOH에 용해 시키고 물에 용해시킨 탄산칼륨(potassium carbonate) (1.2g)을 첨가하여 60°C에서 5시간 반응시켜 표제 화합물을 얻었다.

[143]

[144] 3-3. 퀴논 메티드 방출 화합물 (3)의 제조

[145]

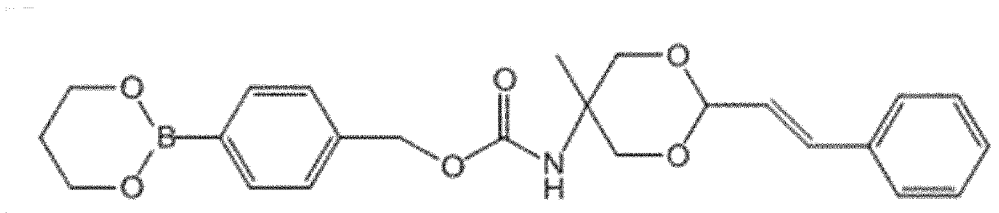


[146] 1,1'-카보닐다이미다졸(1,1'-Carbonyldiimidazole)(4.1g) 및 상기 3-1에서 제조한 보로네이트 화합물(1)(3.0g)를 50mL의 건조 디클로로메탄(dichloromethane)에 용해시킨 후 상온에서 30분동안 반응시켰다. 반응 혼합물을 감압 하에 증발시켜 디클로로메탄을 제거하고 에틸아세테이트를 용출 용매로 이용하여 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물 (3)을 얻었다.

[147]

[148] 3-4. 4-(1,3,2-dioxaborinan-2-yl)phenyl]methyl N-(5-methyl-2-styryl-1,3-dioxan-5-yl)carbamate의 제조

[149]



[150] 상기 3-2에서 제조된 5-메틸-2-스티릴-1,3-디옥산-5-아민(2)(1.0g) 및 상기 3-3에서 제조된 퀴논 메티드 방출 화합물 (3)(1.7g)을 4-(디메틸아미노)피리딘(4-(dimethylamino)pyridine)(0.64g)을 포함하는 50mL의 건조 디클로로메탄에 용해시키고 40°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응 혼합물을 감압 하에 증발시켜 용매를 제거하고, 컬럼 크로마토그래피(헥산/에틸 아세테이트 = 5/5)로 정제하여 표제 화합물을 얻었다.

[151] 상기 제조된 표제 화합물의 ¹H NMR 스펙트럼은 도 4에 나타내었다.

[152] 도 4에 나타낸 바와 같이, 4.1ppm의 피크로 보로네이트와 신남알데히드의 성공적인 결합을 확인하였다.

[153]

[154] 실험예 1. 종양 환경에서 가수분해 후 QCA 구조의 확인

[155] 종양 환경에서 이중 자극에 의해 촉발된 QCA의 구조를 확인하기 위해 pH 5.5에서 24시간 동안 배양 후, $^1\text{H NMR}$ 을 통해 확인하였으며, 이를 도 5에 나타내었다.

[156] 도 5에 나타낸 바와 같이, 9.4 ppm의 아세트알 양이온 및 알데히드 양이온의 피크에 의해 아세트알 결합이 끊어지면서 생성된 신남알데히드를 확인하였으며, 6.9 및 6.4 ppm의 방향족 양이온 피크에 의해 히드록시벤질 알코올의 형성 및 H_2O_2 -매개 보로네이트 산화를 확인하였다.

[157] 그러나, H_2O_2 없이 중성 pH에서 72시간 동안 배양한 후에는 아무런 변화도 관측되지 않았으며, 이는 QCA가 각각 QM(quinone methide) 및 생체 활성 신남알데히드를 생성하기 위하여 H_2O_2 및 산성 pH에 의해 활성화되었음을 나타낸다.

[158]

[159] **실험예 2. Hydrogen peroxide에 대한 QCA의 민감성 확인**

[160] H_2O_2 에 대한 QCA의 민감성을 확인하기 위하여, QCA를 루브렌(rubrene)을 포함하는 디페닐 옥살레이트(diphenyl oxalate) 용액에서 반응시킨 후 화학발광(chemiluminescence) 강도를 측정하여 평가하였다. 구체적으로는, QCA를 H_2O_2 용액($1\mu\text{M}$)에 첨가하였고 1분동안 반응시켰다. 그 다음 디페닐 옥살레이트 용액을 H_2O_2 용액에 첨가하고, 화학 발광 강도는 조도계(luminometer)(Femtomaster FB 12, Zylux Corporation, TN, US)를 이용하여 측정하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[161] 도 6에 나타낸 바와 같이, 미처리된 H_2O_2 용액은 현저히 높은 발광 강도를 나타내었으나(1.1×10^5 RLU), QCA를 첨가한 경우 농도 의존적으로 화학 발광 강도가 상당히 감소함을 확인하였다. 이는 QCA에서 보로네이트 에스터가 특히 빠르게 H_2O_2 와 반응하여 QM을 방출하도록 QCA가 활성화된다는 것을 나타낸다.

[162]

[163] **실험예 3. 세포 GSH 수치 측정**

[164] 전립선암 세포주(DU145), 대장암 세포주(SW620) 및 섬유아세포주(NIH3T3) 각각을 80%의 컨플루언시(confluency)에 도달하도록 6 웰 플레이트(5×10^5 /well)에 접종하였다. 37°C 에서 1.5시간 동안 다양한 화합물로 처리한 후, 세포를 수확하고, 이를 PBS로 세척하였다. 그 후 $40\mu\text{L}$ 의 트리톤 Triton X-100(X-100) 용해 완충액(lysis buffer)에서 얼음에 용해하였다. 20분 후, 용해물을 $9,000\text{g}$ 로 원심분리하고 $10\mu\text{L}$ 의 상청액을 $50\mu\text{L}$ 의 Ellman's 시약(0.5 mM DTNB)과 혼합하였다. GSH의 양을 마이크로 플레이트 리더(microplate reader)(Biotek Instruments, Winooski, VT)를 사용하여 405nm 에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 처리된 세포에서 GSH 함량의 백분율을 미처리 세포에서 측정된 기저 GSH 함량과 비교하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[165] 도 7에 나타낸 바와 같이, QCA를 처리한 경우 전립선암 세포주(DU145) 및

대장암 세포주(SW620) 모두에서 용량 의존적으로 GSH의 수치가 상당히 감소함을 확인하였다. GSH의 대부분은 50 μ M 투여시 고갈되었으며, 100 μ M 투여시 GSH의 감소는 더 관측되지 않았다. QCA는 대장암 세포주(SW620) 세포에 비해 전립선암 세포주(DU145) 세포에서 GSH 수치를 더욱 감소시켰으나, 비악성의 섬유아세포주(NIH3T3)에서는 GSH 수치에 아무 영향을 미치지 않았음을 확인하였다. 이는 QCA로부터 방출된 QM이 암세포 내에서 GSH 수치를 감소시킴을 나타낸다.

[166]

[167] **실험예 4. 유세포 분석기(Flow cytometry)를 이용한 활성산소 생성능력 평가**

[168] 전립선암 세포주(DU145)(4 \times 10⁵)를 24 웰 배양 플레이트에 접종한 후, 24시간 동안 배양하고 신남알데히드 또는 QCA를 12시간 동안 처리하였다. 세포를 두 번 새로운 배지로 세척하고 1 \times 10⁵ 세포s/mL의 농도의 1 \times 결합 완충액(binding buffer)에서 재현탁하였다. 세포 현탁액(100 μ L)를 5 mL 배양 튜브로 옮기고 5 μ M의 DCFH-DA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 첨가하여 부드럽게 혼합하였다. 세포를 15분동안 상온에서 암배양한 후 400 μ L의 1 \times 결합 완충액을 첨가하였다. 염색된 세포를 유세포 분석기(flow cytometry)(FACS Caliber, Becton Dickinson, San Jose, CA)를 이용하여 측정하였으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다. 각 시료 당 총 1.5 \times 10⁴개의 세포를 분석하였다.

[169] 도 8에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 혼성 함암 전구약물 QCA 투여시 아포토시스를 보이며 신남알데히드 보다 상당히 높은 세포 독성을 나타냄을 확인하였다. 이는 QM에 의한 GSH의 감소가 세포를 산화 스트레스에 더욱 민감하게 만들며 ROS를 생성하여 암세포 자멸을 유도한다는 것을 나타낸다.

[170]

[171] **실험예 5. QCA 및 QBCA의 세포독성 측정**

[172] 상기 실시예 1에서 제조한 QCA 및 상기 실시예 2에서 제조한 QBCA의 세포독성을 MTT assay로 측정하였다. 구체적으로는, 전립선암 세포주(DU145), 대장암 세포주(SW620) 및 섬유아세포주(NIH3T3)를 각각 24 웰 플레이트에 1 \times 10⁵ 세포/웰의 밀도로 접종하고 ~90% 컨플루언시에 도달하도록 24시간 동안 배양하였다. 세포를 다양한 양의 QCA, QBCA, Q1 또는 신남알데히드로 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 각 웰에 100 μ L의 MTT 용액을 넣고 4시간 동안 배양하였다. 생성된 포르마잔 결정(formazan crystals)을 디메틸 설펝시드 200 μ L에 용해시켰다. 배양 10분 후, 570nm에서의 흡광도를 마이크로 플레이트 리더(Biotek Instruments, Winooski, VT)를 사용하여 측정하였다. 세포 생존율은 대조군 세포와 QCA 또는 QBCA 처리된 세포의 흡광도를 비교하여 결정하였으며, 그 결과를 도 9 및 도 10에 나타내었다.

[173] 도 9에 나타낸 바와 같이, QCA 처리시 농도에 따라서 세포 독성이 증가함을 확인하였다. 이는 활성산소의 생성에 의한 세포 자멸을 유도한다는 것을 나타낸다.

[174] 도 10에 나타낸 바와 같이, QBCA 처리시 농도에 따라서 세포 독성이 증가함을 확인하였다. 이는 활성산소의 생성에 의한 세포 자멸을 유도한다는 것을 나타낸다.

[175]

[176] **실험예 6. 면역 블롯 분석(Immunoblot analysis)**

[177] 전립선암 세포주(DU145) 및 대장암 세포주(SW620)(1×10^6 /well)를 다양한 농도의 신남알데히드 또는 QCA로 8시간 동안 처리하고 새로운 PBS로 2번 세척하였다. 단백질을 용해 완충액을 이용하여 세포로부터 추출하였다. 1%의 폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gel)에서 20g의 세포 용해물을 이용하여 전기 영동을 수행하고 단백질을 PVDF 막(Millipore, Billerica, MA)으로 옮겼다. 블롯을 PARP 단일클론 항체(monoclonal antibody)(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) 또는 카스파제-3 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)와 함께 배양하고, 이차항체로서 HRP-결합된 항 염소 항체(anti-goat)(Millipore, Billerica, MA)를 사용하였다. 면역 블롯 신호는 SuperSignal Ultra의 화학 발광 시약(Pierce, Rockford, IL)을 사용하여 확인하였으며, 그 결과를 각각 도 11 및 12에 나타내었다.

[178] 도 11 및 도 12에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 혼성 항암 전구약물인 QCA는 농도 의존적으로 프로카스파제-3 및 PARP-1의 발현을 감소시킴을 확인하였다.

[179]

[180] **실험예 7. 활성 산소(ROS)에 의한 DNA 분절 확인**

[181] DNA 분절에 QCA가 미치는 영향을 확인하기 위하여, SW620의 DNA 분절 분석(DNA fragmentation assay)을 실시하였다. 먼저 DU145 및 SW620 세포를 24시간 배양한 후 100 μ m의 신남알데히드, 100 μ m의 Q1(4-(1,3,2-dioxaborinan-2-yl)benzyl benzyl carbonate, 퀴논 메티드만을 생성) 및 25 μ m, 50 μ m, 100 μ m의 QCA로 처리하여 DNA를 분리하고, nucleosomal DNA의 분절을 전기영동으로 관찰하였으며, 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[182] 도 13에 나타낸 바와 같이, QCA 처리 한 세포에서 아포토시스의 전형적인 ladder pattern이 나타났으며, 이는 QCA가 신남알데히드 및 Q1에 비해 더 많은 DNA 분절을 유도함을 나타낸다.

[183] 또한, 상기에서 100 μ m의 QCA로 처리된 SW620의 DNA 분절을 시간의 흐름에 따라 분석하였으며, 그 결과를 도 14에 나타내었다.

[184] 도 14에 나타낸 바와 같이, DNA 절편의 양은 농도 및 시간 의존적으로 점차 증가함을 확인하였으며, 이는 QCA가 아포토시스를 유도할 수 있음을 나타낸다.

[185] 또한, 상기 DNA 절편 분석의 결과를 뒷받침하기 위하여 24시간 동안 DU145 및 SW620 세포를 배양하고 신남알데히드, Q1 또는 QCA를 24시간 동안 처리한 후, 아포토시스의 마커로서 Annexin V-FITC 및 세포 생존에 대한 마커로서 PI(propidium idoide)를 이용하여 유세포 분석을 수행하였으며, 그 결과를 도 15 및 도 16에 나타내었다.

[186] 도 15 및 도 16에 나타낸 바와 같이, QCA-처리된 세포는 신남알데히드 및 Q1을 처리한 세포에 비해 더 빠른 아포토시스를 나타냄을 확인하였으며, QCA의 투여량이 증가할수록 Annexin V 및 PI 세포는 증가하였다.

[187]

[188] **실험예 8. 이종 이식 모델(xenograft model)에서의 종양의 성장과 크기 측정**

[189] QCA의 in vivo 항암 활성을 확인하기 위하여, 이종 이식 모델의 종양을 관찰하였다. 먼저, DU145 및 SW620의 이종이식 마우스 모델을 사용하여 암세포를 마우스의 옆구리 피하 조직으로 주입하였으며, 세포 이식 후 종양이 작게 만져지기 시작할 때 신남알데히드, Q1, 신남알데히드와 Q1, 또는 QCA의 투여를 시작하여 3일마다 꼬리 정맥을 통해 2 mg/kg씩 투여한 후, 상기 마우스의 종양의 크기를 측정하였으며, 그 결과를 도 17에 나타내었다.

[190] 도 17에 나타낸 바와 같이, 신남알데히드 단독 또는 Q1 단독 처리된 경우는 종양의 성장 저해 효과가 미비하였으며, 신남알데히드 및 Q1을 병용투여 한 경우에도 항암 효과가 크지 않았다. 그러나, QCA로 처리한 마우스의 경우 신남알데히드, Q1 또는 신남알데히드 및 Q1의 병용투여한 경우와 비교하여 현저히 작은 종양의 크기를 확인하였다. 이 때, QCA로 처리한 마우스의 경우 효과가 가장 좋은 것은 QCA가 QM 및 신남알데히드를 연속하여 방출할 수 있음을 나타낸다.

[191] 또한, 종양을 가진 마우스에 각각 다른 양의 QCA를 투여하고, 이의 효과를 비교하기 위하여 다른마우스에 시판되고 있는 항암제인 CPT(camptothecin)를 2mg/kg을 투여한 후, 상기 마우스의 종양의 크기를 측정하였으며, 그 결과를 도 18에 나타내었다.

[192] 도 18에 나타낸 바와 같이, QCA를 1 mg/kg 이하로 투여한 경우 별다른 항암 활성을 나타내지 않았으나 2 mg/kg를 투여한 경우 CPT와 비교하여 눈에 띄는 항암 활성을 나타내었다.

[193]

[194] **실험예 9. QM 및 신남알데히드의 생성여부 확인**

[195] 종양에서 QM 및 신남알데히드의 생성여부를 확인하기 위하여 22일 후에 종양 용해물을 LC-MS로 분석하였으며, 그 결과를 도 19에 나타내었다.

[196] 도 19에 나타낸 바와 같이, QCA 처리된 마우스의 종양은 미처리된 마우스의 종양에 비해 ~38% 낮은 GSH 수치를 나타냄을 확인하였으며, 신남알데히드를 처리한 경우와 동일한 새로운 피크의 존재로 인해 신남알데히드의 생성을 확인하였다. 다만, QM 및 신남알데히드는 간에서 검출되지 않았다. 이는 QCA가 종양 내에서 QM 및 신남알데히드를 생성하며, 암세포의 사멸을 유도하는 산화 스트레스를 증가시킨다는 것을 나타낸다.

[197]

[198] **실험예 10. 종양의 조직학적 검사**

[199] QCA의 QCA에 의해 유도된 아포토시스 세포 사멸을 확인하기 위해 SW620

종양 마우스 모델에 3일에 1번 21일간 신남알데히드, Q1, 신남알데히드와 Q1, 또는 QCA의 투여 후 종양의 H&E 염색을 수행하였으며, 그 결과를 도 20에 나타내었다.

[200] 또한, 동일한 방법으로 종양의 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) 염색을 수행하였으며, 그 결과를 도 21에 나타내었다.

[201] 도 20 및 21에 나타낸 바와 같이, 뚜렷한 손상이 발견되지 않은 대조군 마우스의 종양 조직과는 달리, QCA-처리된 마우스의 종양은 핵이 없는 세포 사멸 부분이 넓게 나타남을 확인하였다.

[202] 또한, QCA 처리가 장기 손상을 유발하는지 확인하기 위하여 상기와 동일한 방법으로 처리한 마우스의 간과 심장 조직의 H&E 염색 및 TUNEL 염색을 수행하였으며, 그 결과를 도 22 및 도 23에 나타내었다.

[203] 도 22 및 도 23에 나타낸 바와 같이, QCA 처리는 특별한 장기 손상을 유도하지 않음을 확인하였다.

[204]

[205] **실험예 11. QCA의 안정성 확인**

[206] QCA의 안정성을 확인하기 위하여, 마우스에 QCA (2 mg/kg)를 2일에 1회씩 10일간 주사한 후 ALT(alanine transaminase) 평가 및 간 및 심장조직의 H&E 염색을 수행하였으며, 그 결과를 도 24 및 25에 나타내었다.

[207] 도 24 및 25에 나타낸 바와 같이, QCA 처리한 마우스는 미처리한 마우스와 비교하여 혈청 ALT 수치의 차이가 거의 없었으며, 간 및 심장에 축적된 독성의 증거가 관찰되지 않았다. 이는 QCA의 독성이 없거나 또는 매우 적음을 나타낸다.

[208]

[209] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제제예를 예시한다.

[210]

[211] **제제예 1. 약학적 제제의 제조**

[212] **1. 산제의 제조**

[213] 화학식 1의 화합물 20 mg

[214] 유당 100 mg

[215] 탈크 10 mg

[216] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[217]

[218] **2. 정제의 제조**

[219] 화학식 1의 화합물 10 mg

[220] 옥수수전분 100 mg

[221] 유당 100 mg

[222] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[223] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를

제조한다.

[224]

[225] 3. 캡슐제의 제조

[226] 화학식 1의 화합물 10 mg

[227] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[228] 락토오스 14.8 mg

[229] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[230] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[231]

[232] 4. 주사제의 제조

[233] 화학식 1의 화합물 10 mg

[234] 만니톨 180 mg

[235] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[236] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

[237] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[238]

[239] 5. 액제의 제조

[240] 화학식 1의 화합물 20 mg

[241] 이성화당 10 g

[242] 만니톨 5 g

[243] 정제수 적량

[244] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[245]

[246] **제제예 2. 식품 조성물의 제조**

[247] 2-1. 건강식품의 제조

[248] 화학식 1의 화합물 100 mg

[249] 비타민 혼합물 적량

[250] 비타민 A 아세테이트 70 g

[251] 비타민 E 1.0 mg

[252] 비타민 B1 0.13 mg

[253] 비타민 B2 0.15 mg

[254] 비타민 B6 0.5 mg

[255] 비타민 B12 0.2 g

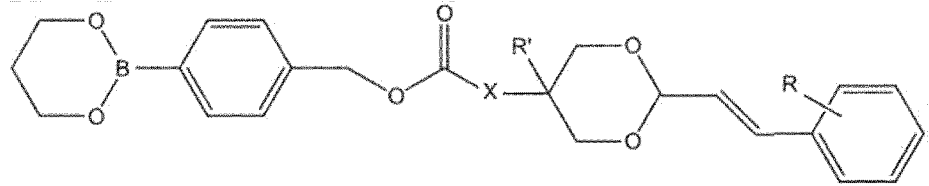
- [256] 비타민 C 10 mg
- [257] 비오틴 10 g
- [258] 니코틴산아미드 1.7 mg
- [259] 엽산 50 g
- [260] 판토텐산 칼슘 0.5 mg
- [261] 무기질 혼합물 적량
- [262] 황산제1철 1.75 mg
- [263] 산화아연 0.82 mg
- [264] 탄산마그네슘 25.3 mg
- [265] 제1인산칼륨 15 mg
- [266] 제2인산칼슘 55 mg
- [267] 구연산칼륨 90 mg
- [268] 탄산칼슘 100 mg
- [269] 염화마그네슘 24.8 mg
- [270] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을
바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도
무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을
제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

청구범위

[청구항 1]

신남알데히드(cinnam aldehyde) 및 퀴논 메티드(quinone methide)를 동시에 생성하는, 하기 화학식 1로 표시되는 혼성 항암 전구약물.

[화학식 1]

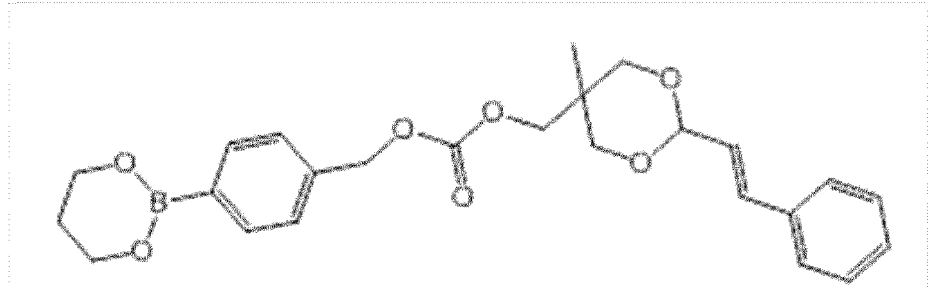


상기 화학식 1에서, R은 H-, HO-, CH₃O- 또는 C₆H₅COO-, R'는 H- 또는 CH₃-이며, X는 O 또는 NH이다.

[청구항 2]

제1항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 혼성 항암 전구약물.

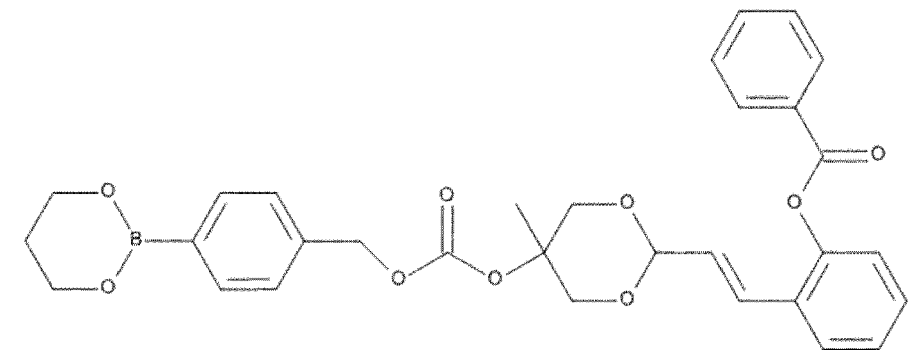
[화학식 2]



[청구항 3]

제1항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 3으로 표시되는 혼성 항암 전구약물.

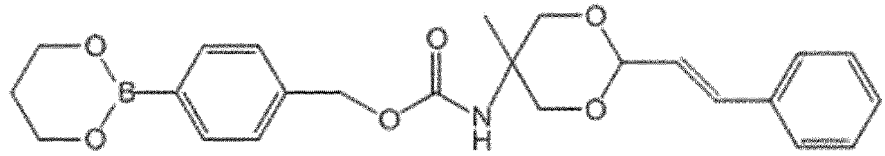
[화학식 3]



[청구항 4]

제1항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 4로 표시되는 혼성 항암 전구약물.

[화학식 4]



- [청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 신남알데히드 및 퀴논 메티드는 과산화수소(H_2O_2)와 산성 pH에 의해 생성되는 것을 특징으로 하는, 혼성 항암 전구약물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 혼성 항암 전구약물은 아포토시스(apoptosis)를 촉진시키는 것을 특징으로 하는, 혼성 항암 전구약물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서, 상기 혼성 항암 전구약물은 글루타티온(glutathione)의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 혼성 항암 전구약물.
- [청구항 8] (a) 디올 화합물 및 보론산(boronic acid) 화합물을 반응시켜 퀴논 메티드를 생성하는 보로네이트 화합물을 제조하는 단계;
 (b) 신남알데히드를 산성 용액과 반응시켜 아세탈 결합을 가진 신남알데히드 유도체를 제조하는 단계;
 (c) 상기 (b) 단계에서 제조된 신남알데히드 유도체를 카보닐디이미다졸(carbonyldiimidazole)과 반응시켜 신남알데히드 방출 화합물을 제조하는 단계; 및
 (d) 상기 (a) 단계에서 제조된 보로네이트 화합물과 상기 (c) 단계에서 제조된 신남알데히드 방출 화합물을 반응시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 혼성 항암 전구약물의 제조방법.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 디올 화합물은 프로판디올, 부탄디올 및 펜탄디올로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는, 혼성 항암 전구약물의 제조방법.
- [청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 보론산 화합물은 (4-히드록시메틸페닐)보론산((4-Hydroxymethylphenyl)boronic acid), (4-(히드록시메틸)-2-메틸페닐)보론산((4-(hydroxymethyl)-2-methylphenyl)boronic acid) 및 (2-플루오로-4-(히드록시메틸)페닐)보론산((2-fluoro-4-(hydroxymethyl)phenyl)boronic acid)로 구성되는 군으로부터 선택된 것을 특징으로 하는, 혼성 항암 전구약물의 제조방법.
- [청구항 11] (a) 디올 화합물 및 보론산(boronic acid) 화합물을 반응시켜 퀴논 메티드를 생성하는 보로네이트 화합물을 제조하는 단계;
 (b) 신남알데히드를 산성 용액과 반응시켜 아세탈 결합을 가진

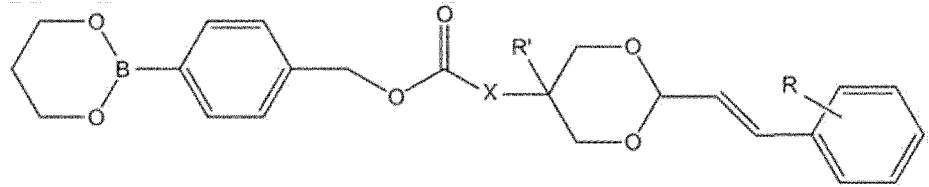
신남알데히드 유도체를 제조하는 단계;

(c) 상기 (a) 단계에서 제조된 보로네이트 화합물을 카보닐디이미다졸과 반응시켜 퀴논 메티드 방출 화합물을 제조하는 단계; 및

(d) 상기 (b) 단계에서 제조된 신남알데히드 화합물과 상기 (c) 단계에서 제조된 퀴논 메티드 방출 화합물을 반응시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 혼성 항암 전구약물의 제조방법. 하기 화학식 1로 표시되는 혼성 항암 전구 약물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 12]

[화학식 1]

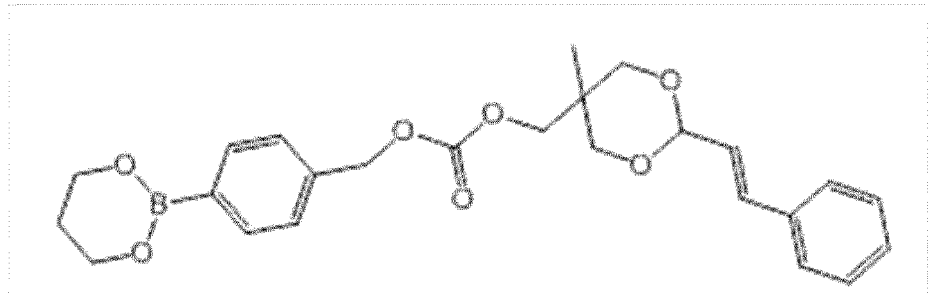


상기 화학식 1에서, R은 H-, HO-, CH₃O- 또는 C₆H₅COO-, R'는 H- 또는 CH₃-이며, X는 O 또는 NH이다.

[청구항 13]

제12항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 2로 표시되는 혼성 항암 전구약물인 것을 특징으로 하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

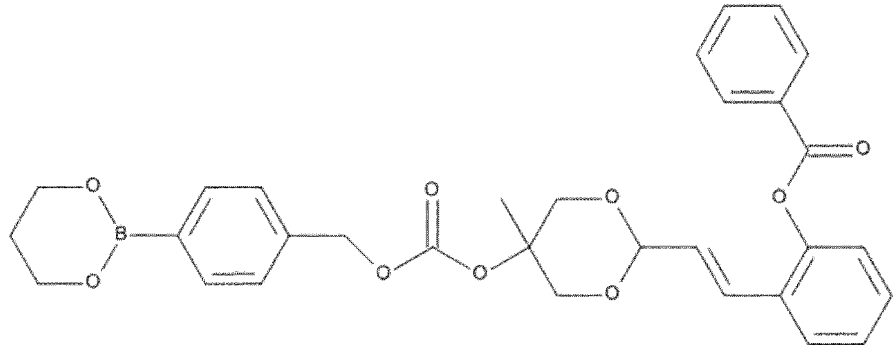
[화학식 2]



[청구항 14]

제12항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 3으로 표시되는 혼성 항암 전구약물인 것을 특징으로 하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

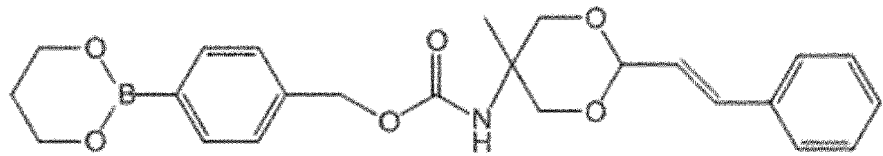
[화학식 3]



[청구항 15]

제12항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 4로 표시되는 혼성 항암 전구약물인 것을 특징으로 하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[화학식 4]



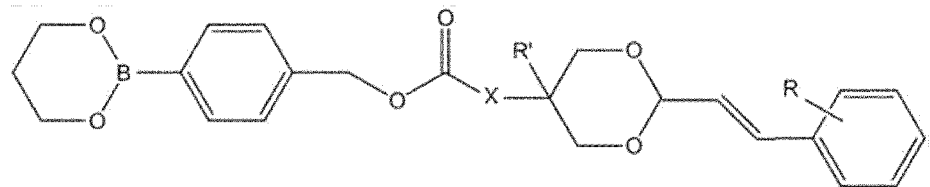
[청구항 16]

제12항에 있어서, 상기 암은 폐암, 췌장암, 대장암, 결장직장암, 골수성 백혈병, 갑상선암, 골수형 성이상증후군(MDS), 방광 암종, 표피 암종, 흑색종, 유방암, 전립선암, 두경부암, 자궁암, 난소암, 뇌암, 위암, 후두암, 식도암, 방광암, 구강암, 간엽 기원의 암, 육종, 기형암종, 신경모세포종, 신장 암종, 간암, 비-호지킨 림프종, 다발성 골수종, 및 갑상선 미분화암으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 17]

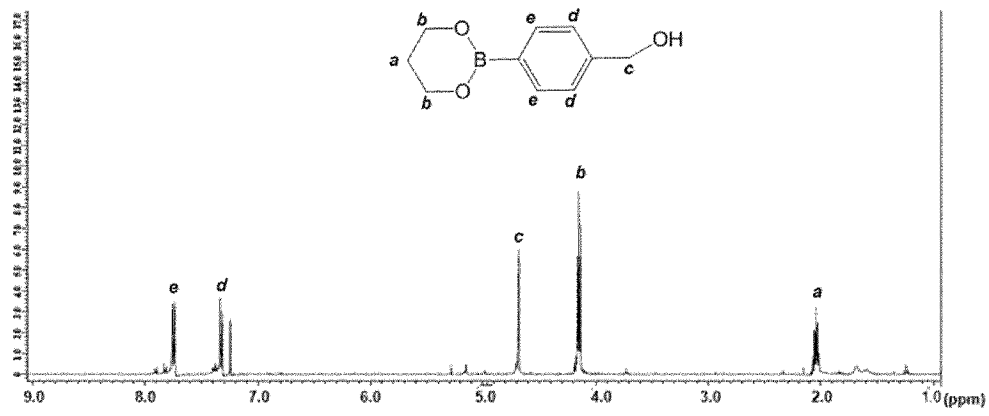
하기 화학식 1로 표시되는 혼성 항암 전구 약물을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

[화학식 1]

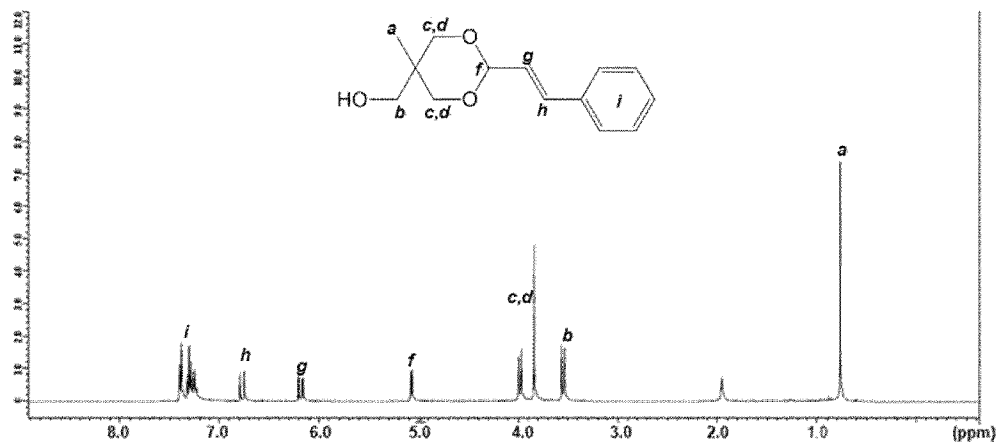


상기 화학식 1에서, R은 H-, HO-, CH₃O- 또는 C₆H₅COO-, R'는 H- 또는 CH₃-이며, X는 O 또는 NH이다.

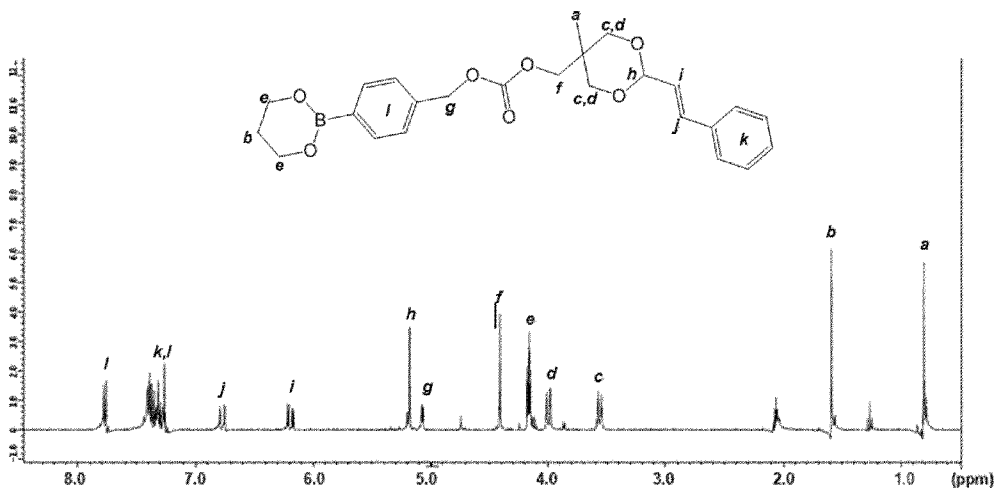
[Fig. 1]



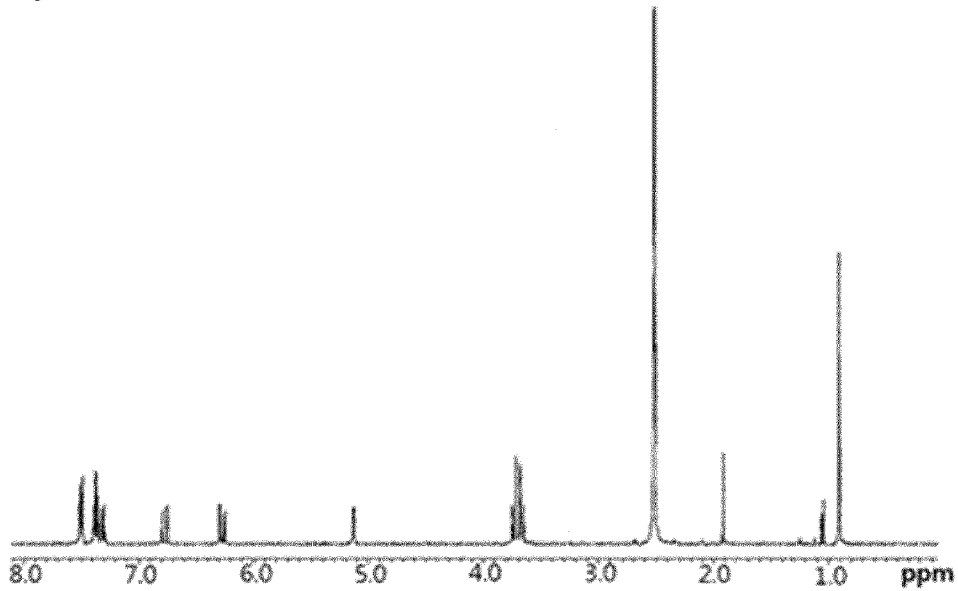
[Fig. 2]



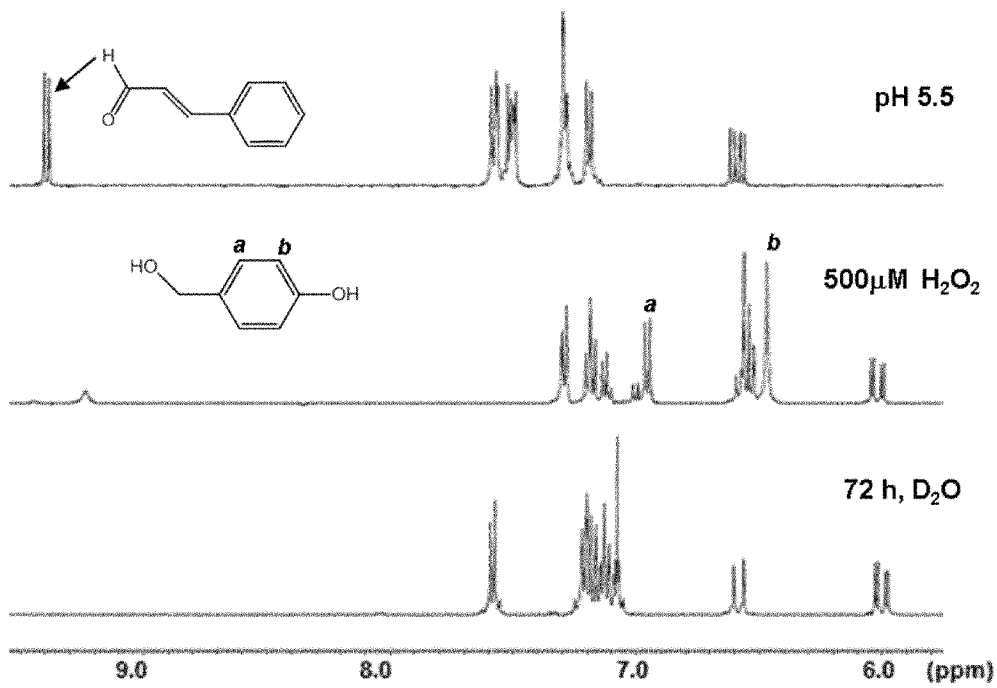
[Fig. 3]



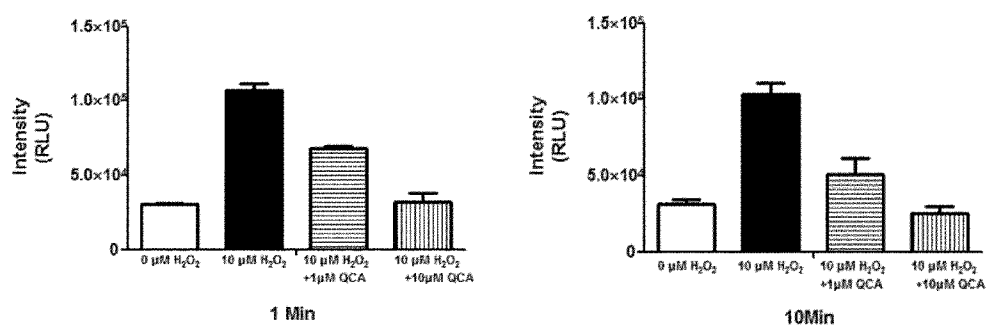
[Fig. 4]



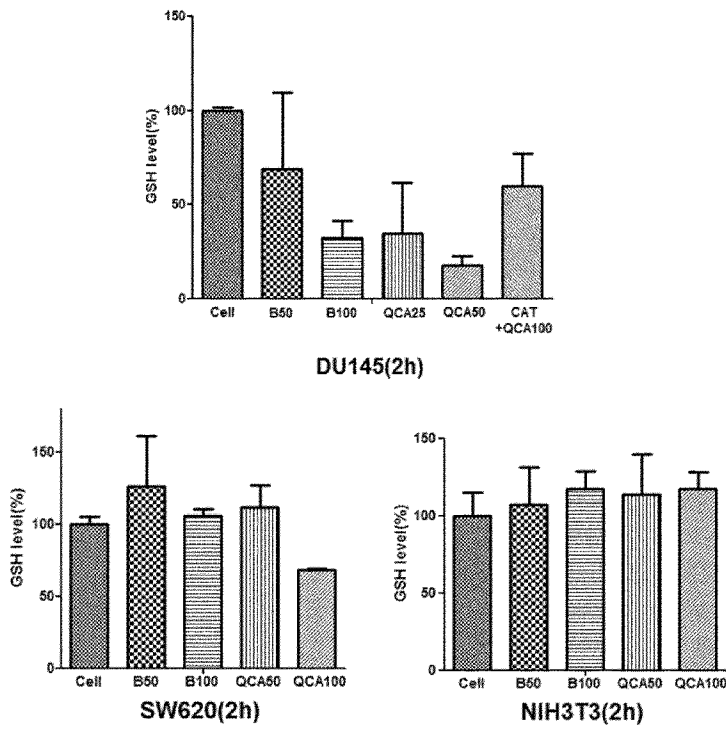
[Fig. 5]



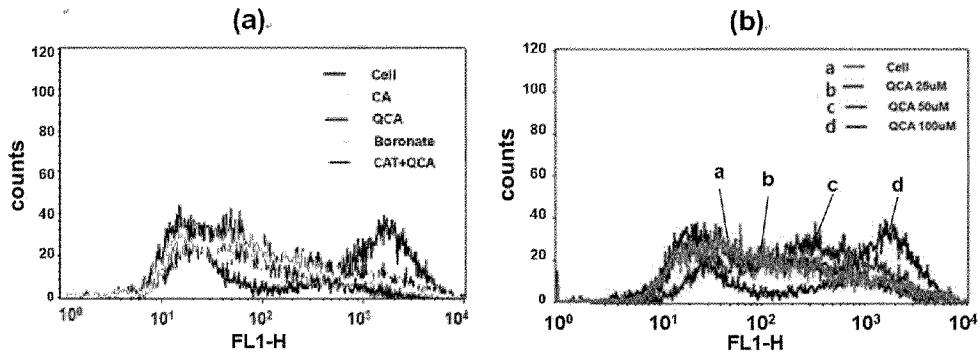
[Fig. 6]



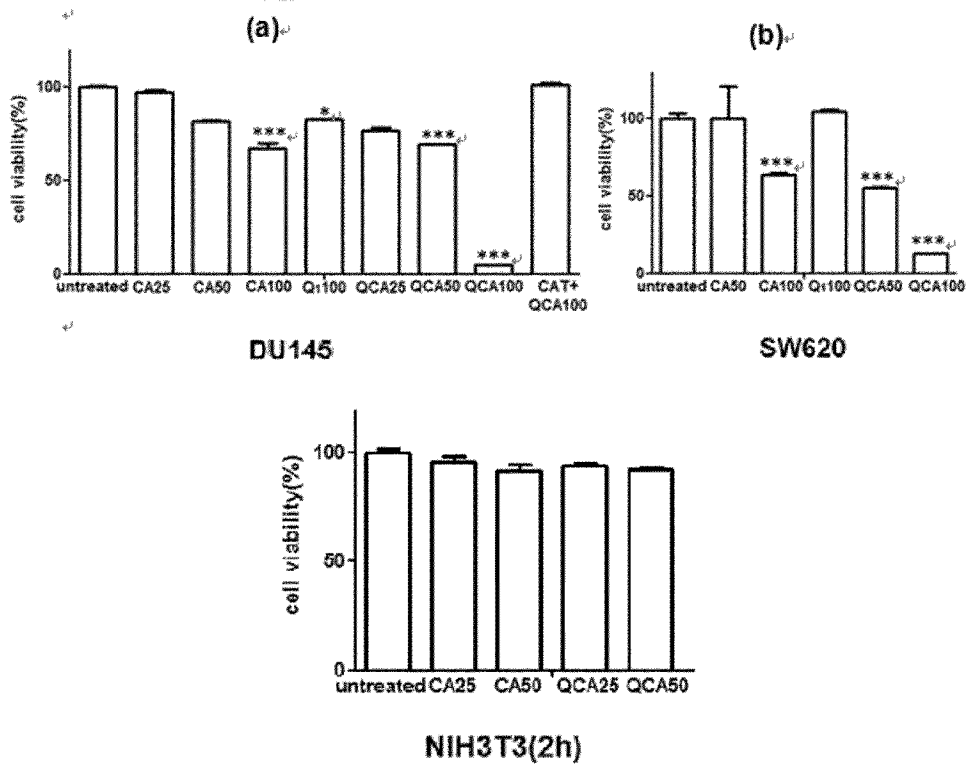
[Fig. 7]



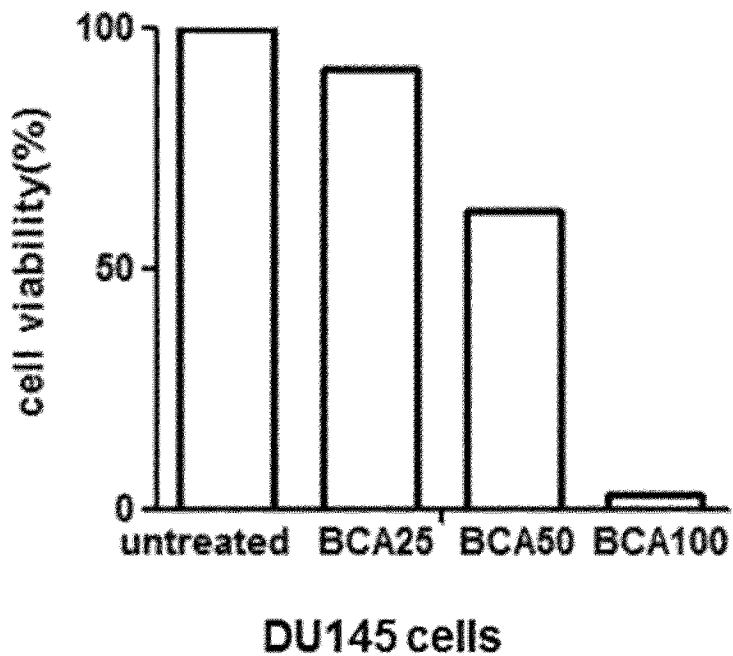
[Fig. 8]



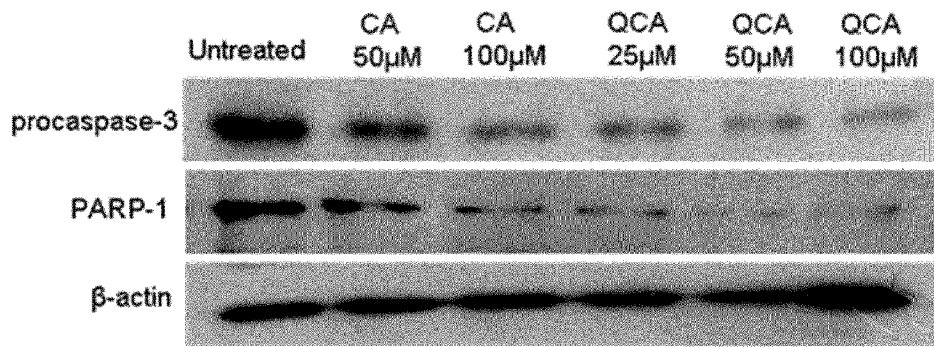
[Fig. 9]



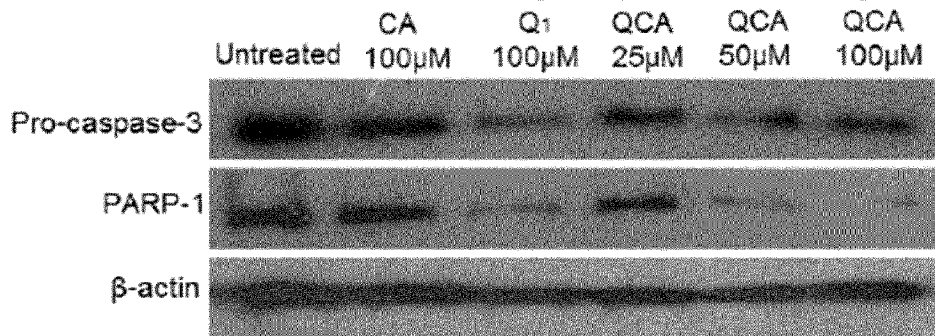
[Fig. 10]



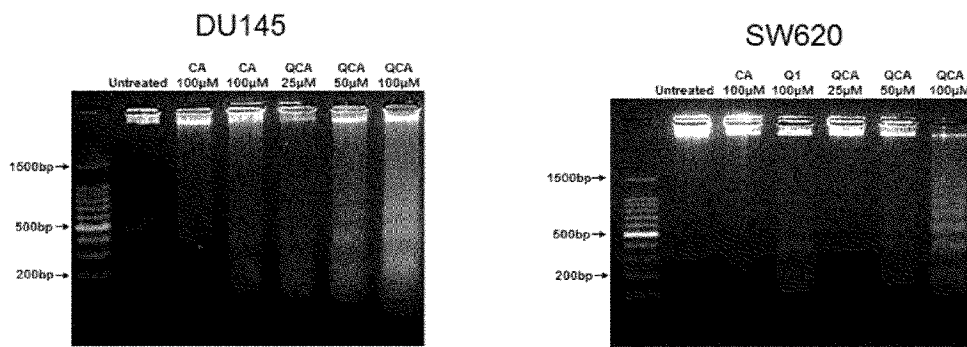
[Fig. 11]



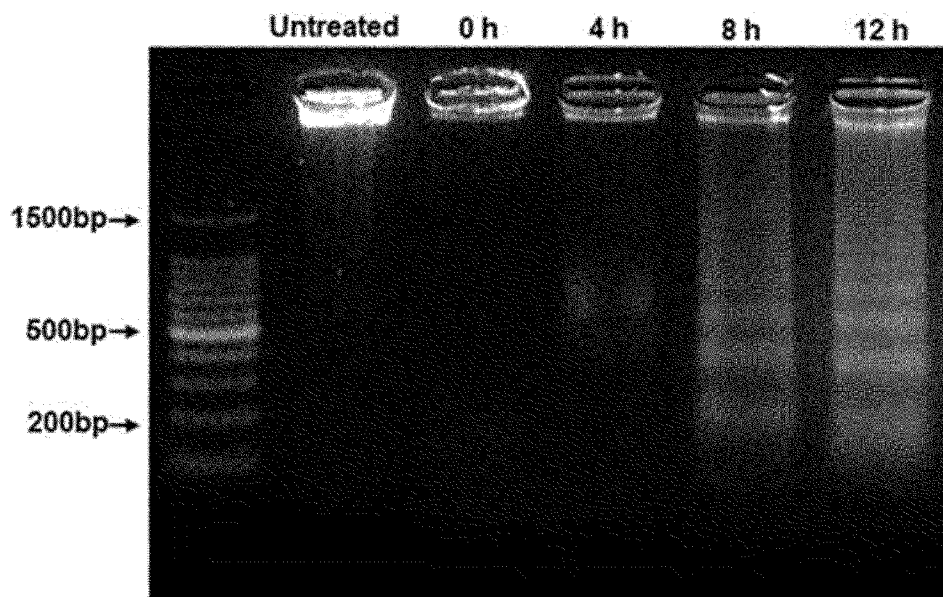
[Fig. 12]



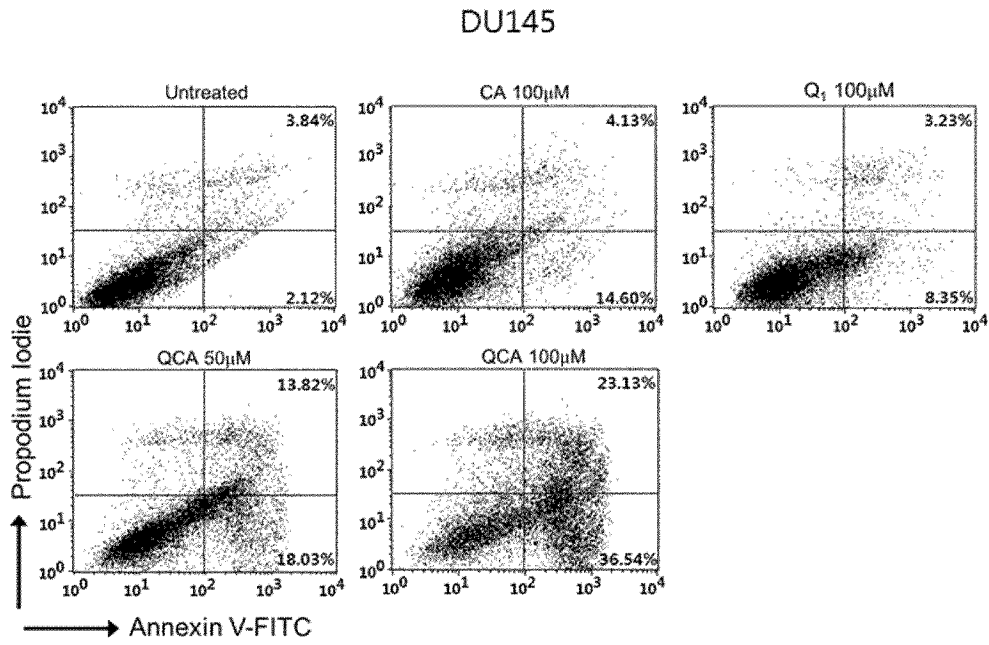
[Fig. 13]



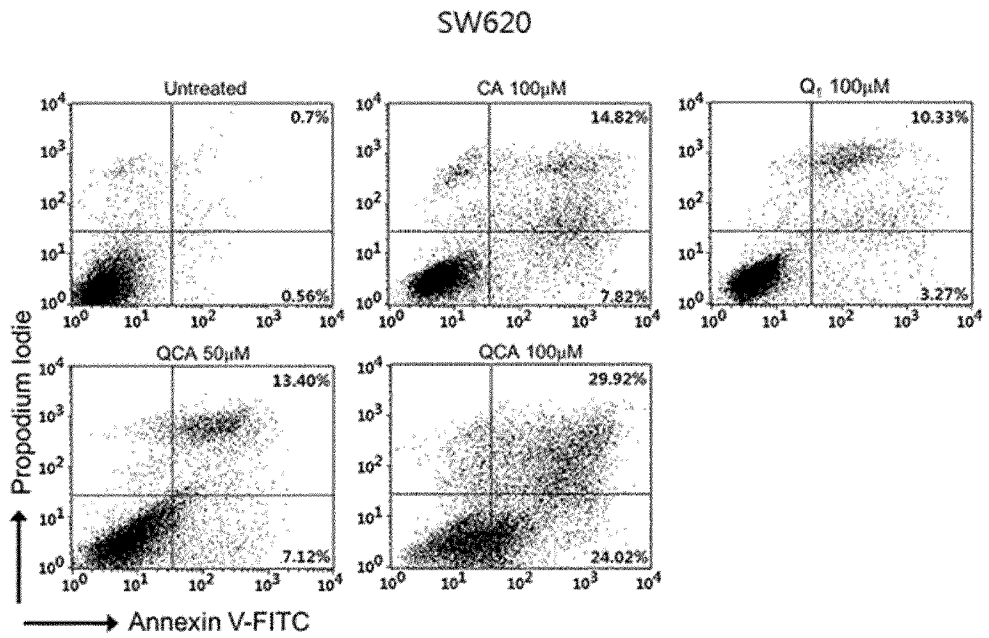
[Fig. 14]



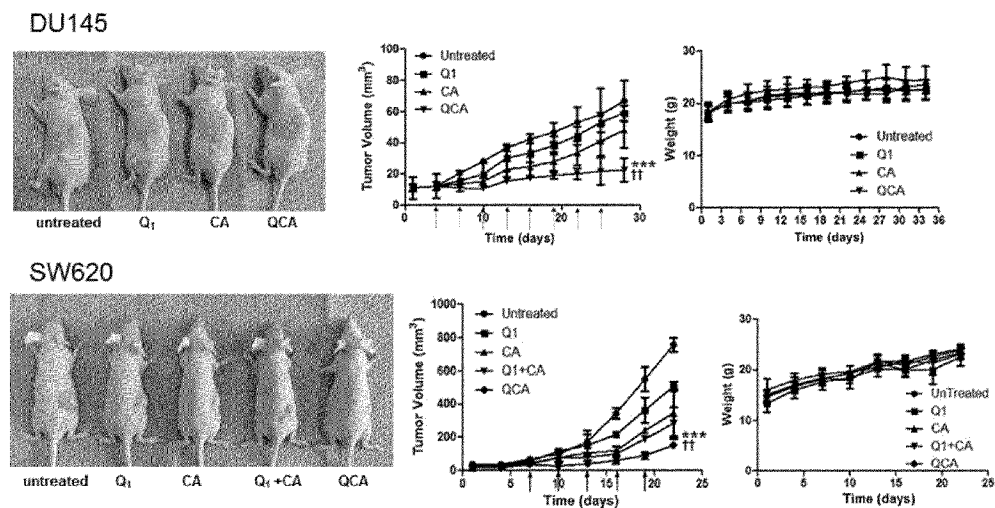
[Fig. 15]



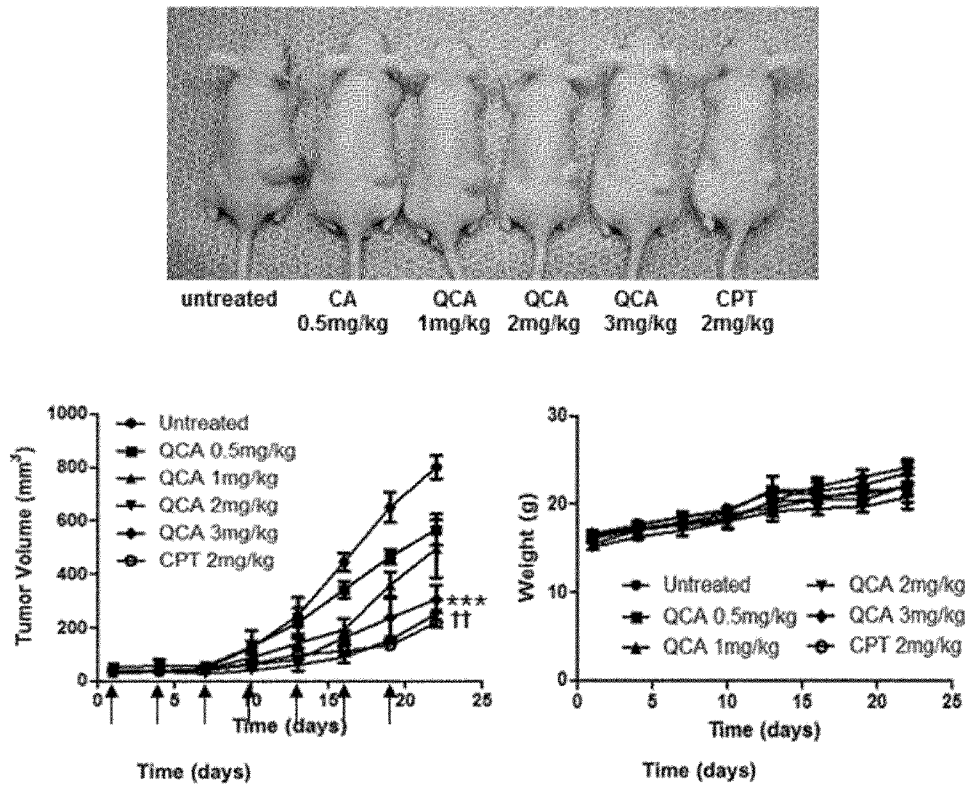
[Fig. 16]



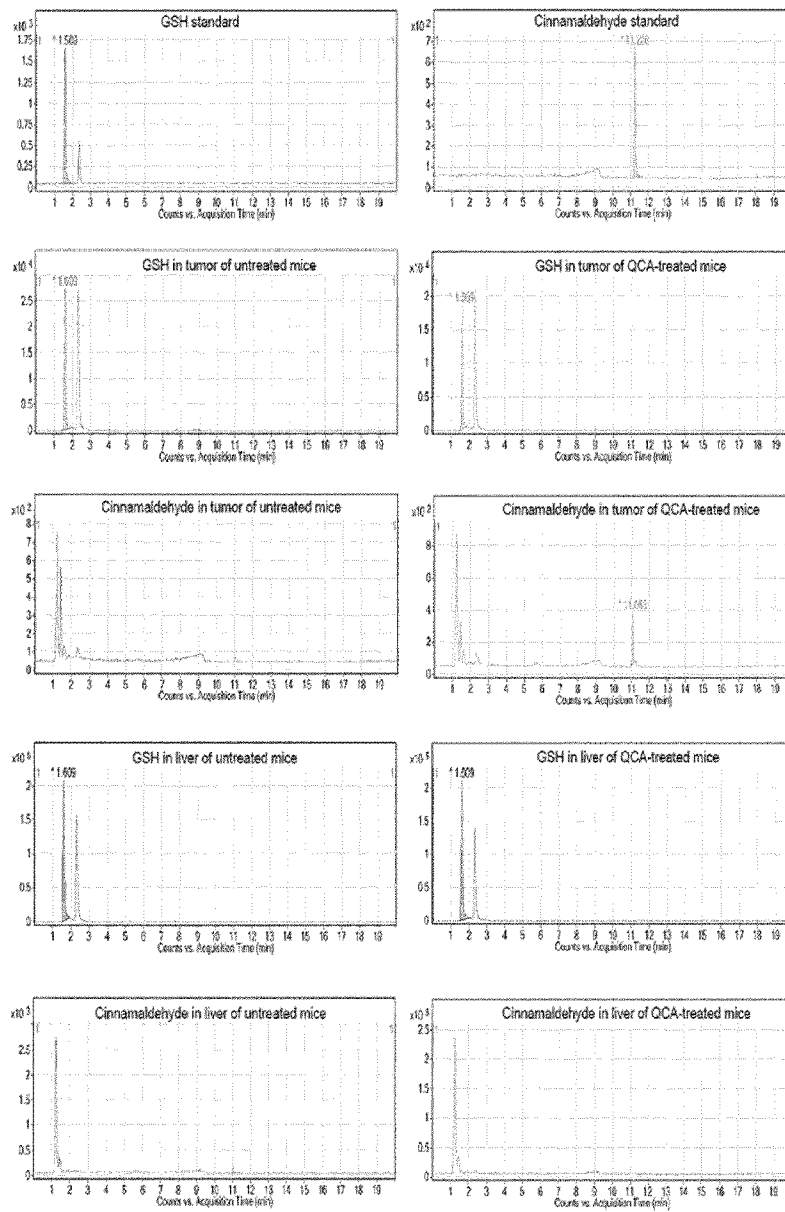
[Fig. 17]



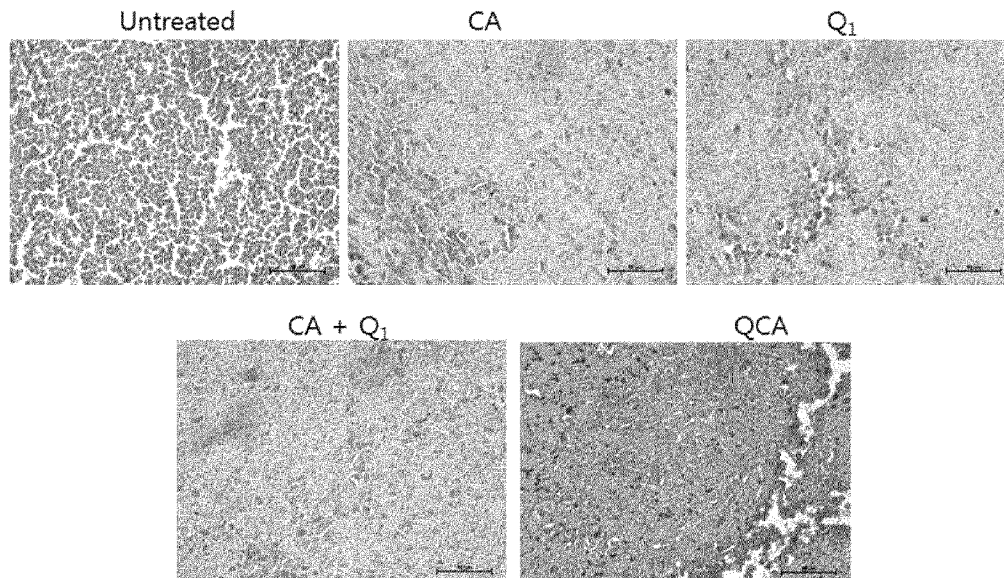
[Fig. 18]



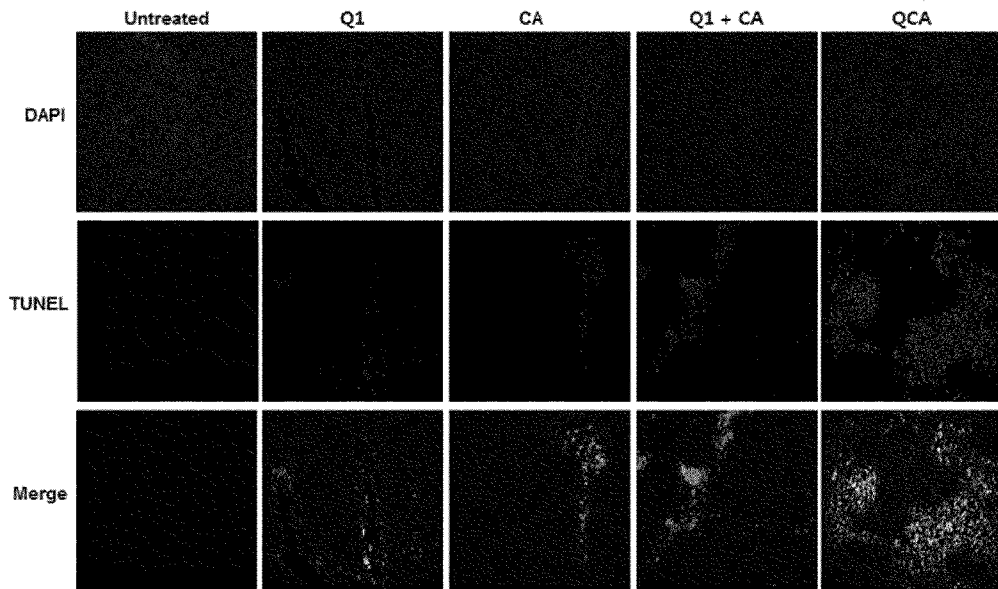
[Fig. 19]



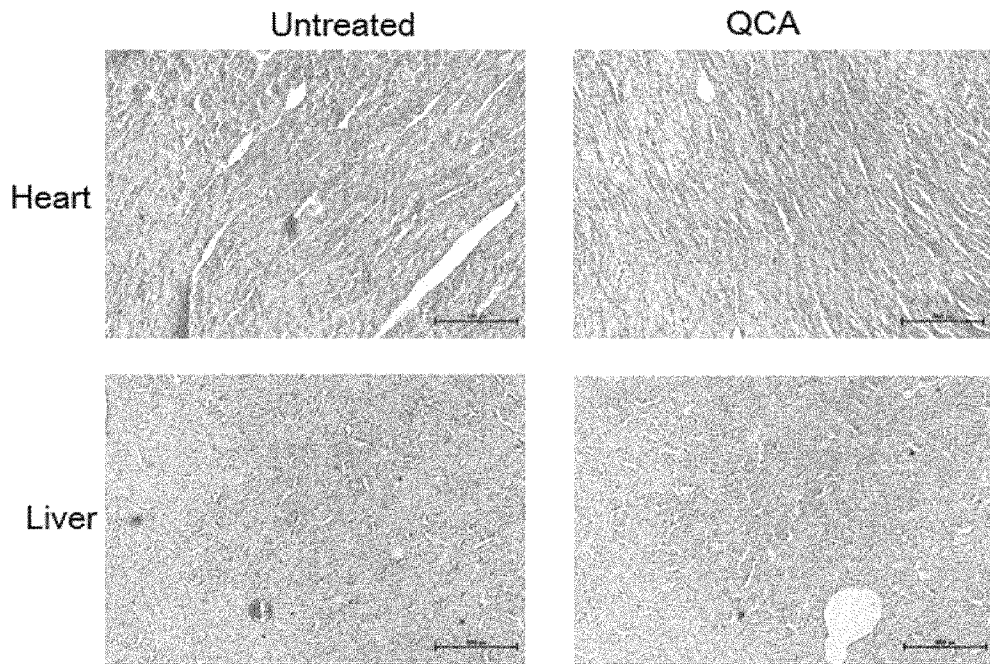
[Fig. 20]



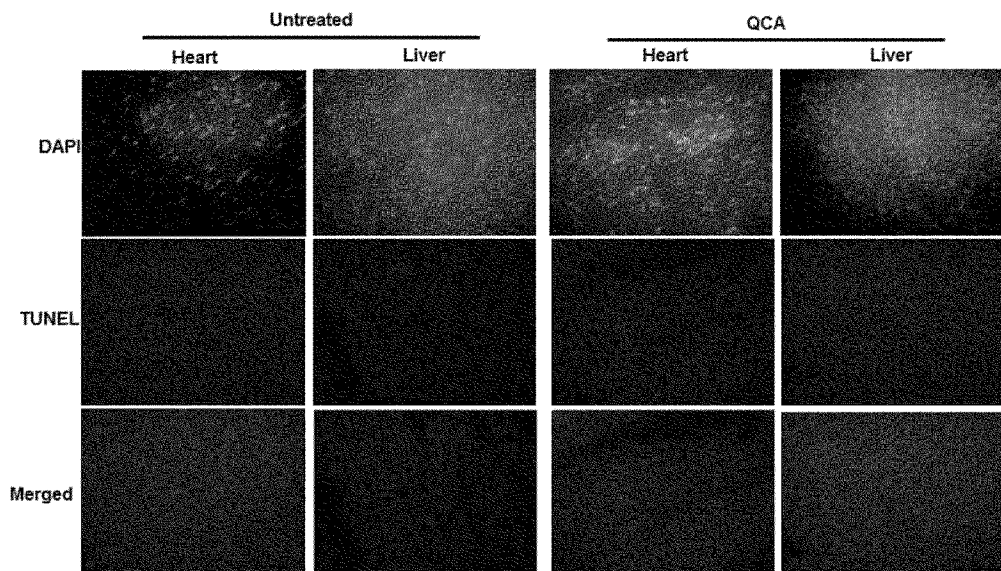
[Fig. 21]



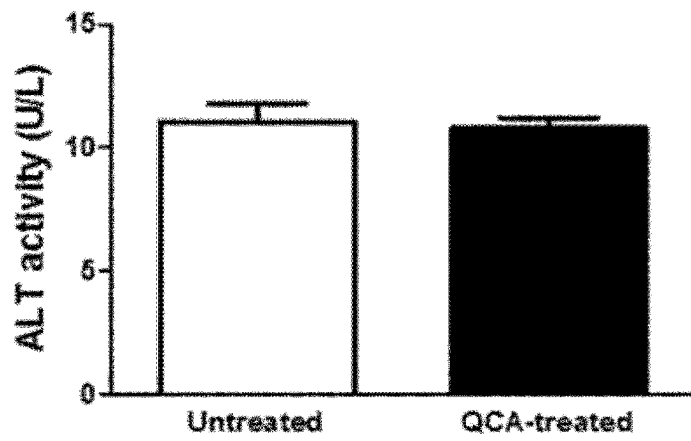
[Fig. 22]



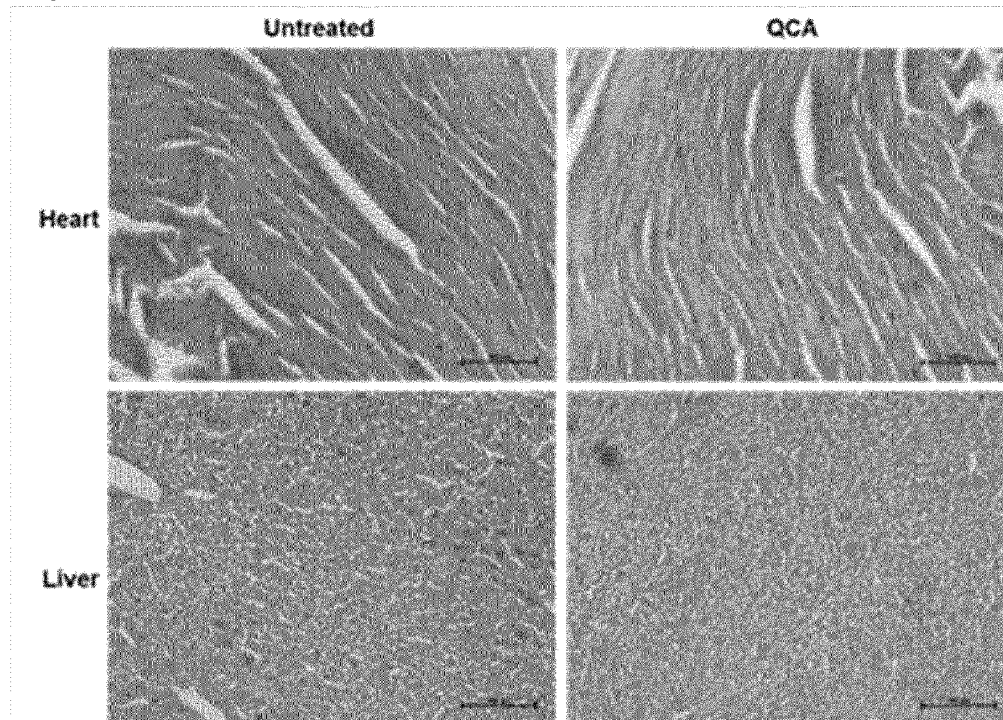
[Fig. 23]



[Fig. 24]



[Fig. 25]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/000067

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07D 319/06(2006.01)i, A61K 31/357(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 319/06; NotA vai/lable; A61P 35/00; A61K 35/78; A61K 31/357

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as aboveElectronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
eKOMPASS (KIPO internal), STN Registry, STN CAplus & Keywords: cinnamaldehyde, quinone methide, prodrug, cancer

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00-33858 A1 (ECOSMART TECHNOLOGIES, INC. et al.) 15 June 2000 See claim 2.	1-17
A	WO 2005-065361 A2 (KASHFI, Khosrow) 21 July 2005 See claims 14, 15.	1-17

 Further documents are listed in the continuation of Box C.
 See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search

24 APRIL 2015 (24.04.2015)

Date of mailing of the international search report

24 APRIL 2015 (24.04.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/000067

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 00-33858 A1	15/06/2000	AR 020019 A1	27/03/2002
		AR 020020 A1	27/03/2002
		AR 020021 A1	27/03/2002
		AT 307601 T	15/11/2005
		AU 1841900 A	26/06/2000
		AU 2000-18419 A1	26/06/2000
		AU 2000-21670 A1	26/06/2000
		AU 2000-21671 A1	26/06/2000
		AU 2167000 A	26/06/2000
		AU 2167100 A	26/06/2000
		BR 9916879 A	06/11/2001
		CA 2353475 A1	15/06/2000
		CA 2353476 A1	15/06/2000
		CA 2353516 A1	15/06/2000
		CN 100448454 C	07/01/2009
		CN 1329498 A	02/01/2002
		CZ 20011979 A3	17/10/2001
		DE 69928000 D1	01/12/2005
		DE 69928000 T2	08/06/2006
		EP 1137425 A1	04/10/2001
		EP 1137426 A1	04/10/2001
		EP 1137426 B1	26/10/2005
		EP 1137427 A1	04/10/2001
		ES 2247858 T3	01/03/2006
		HU 0104674 A2	29/06/2002
		HU 0104674 A3	28/01/2003
		ID 29393 A	30/08/2001
		IL 143488 D0	21/04/2002
		JP 2002-531511 A	24/09/2002
		JP 2002-531512 A	24/09/2002
		JP 2002-531513 A	24/09/2002
		KR 10-2001-0080692 A	22/08/2001
		MX PA01005545 A	14/07/2003
		MX PA01005598 A	14/07/2003
		MX PA01005641 A	14/07/2003
		NO 20012774 A	06/06/2001
		NO 20012774 D0	06/06/2001
		NZ 527850 A	30/07/2004
		PL 349028 A1	01/07/2002
		RU 2252772 C2	27/05/2005
TR 200101481 T2	21/09/2001		
US 2002-182268 A1	05/12/2002		
US 2003-017215 A1	23/01/2003		
US 2003-017218 A1	23/01/2003		
US 2003-108622 A1	12/06/2003		
US 2003-108623 A1	12/06/2003		
US 2004-146595 A1	29/07/2004		
US 2004-156922 A1	12/08/2004		
US 2008-015249 A1	17/01/2008		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/000067

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
		US 6812258 B2	02/11/2004
		US 7008649 B2	07/03/2006
		US 7291650 B2	06/11/2007
		WO 00-33856 A1	15/06/2000
		WO 00-33857 A1	15/06/2000
		WO 00-33857 A9	13/12/2001
		ZA 200104611 A	13/12/2001
WO 2005-065361 A2	21/07/2005	EP 1709155 A2	11/10/2006
		EP 1709155 A4	31/10/2007
		EP 1709155 B1	02/10/2013
		US 2005-0182134 A1	18/08/2005
		US 7585997 B2	08/09/2009
		WO 2005-065361 A3	05/10/2006

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
C07D 319/06(2006.01)i, A61K 31/357(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C07D 319/06; NotA vai/lable; A61P 35/00; A61K 35/78; A61K 31/357

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN Registry, STN CPlus & 키워드: cinnamaldehyde, quinone methide, prodrug, cancer

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 00-33858 A1 (ECOSMART TECHNOLOGIES, INC. 외 2명) 2000.06.15 청구항 2 참조.	1-17
A	WO 2005-065361 A2 (KASHFI, KHOSROW) 2005.07.21 청구항 14, 15 참조.	1-17

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2015년 04월 24일 (24.04.2015)	국제조사보고서 발송일 2015년 04월 24일 (24.04.2015)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 ++82 42 472 7140	심사관 김용원 전화번호 +82-42-481-5049
--	------------------------------------



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 00-33858 A1	2000/06/15	AR 020019 A1	2002/03/27
		AR 020020 A1	2002/03/27
		AR 020021 A1	2002/03/27
		AT 307601 T	2005/11/15
		AU 1841900 A	2000/06/26
		AU 2000-18419 A1	2000/06/26
		AU 2000-21670 A1	2000/06/26
		AU 2000-21671 A1	2000/06/26
		AU 2167000 A	2000/06/26
		AU 2167100 A	2000/06/26
		BR 9916879 A	2001/11/06
		CA 2353475 A1	2000/06/15
		CA 2353476 A1	2000/06/15
		CA 2353516 A1	2000/06/15
		CN 100448454 C	2009/01/07
		CN 1329498 A	2002/01/02
		CZ 20011979 A3	2001/10/17
		DE 69928000 D1	2005/12/01
		DE 69928000 T2	2006/06/08
		EP 1137425 A1	2001/10/04
		EP 1137426 A1	2001/10/04
		EP 1137426 B1	2005/10/26
		EP 1137427 A1	2001/10/04
		ES 2247858 T3	2006/03/01
		HU 0104674 A2	2002/06/29
		HU 0104674 A3	2003/01/28
		ID 29393 A	2001/08/30
		IL 143488 D0	2002/04/21
		JP 2002-531511 A	2002/09/24
		JP 2002-531512 A	2002/09/24
		JP 2002-531513 A	2002/09/24
		KR 10-2001-0080692 A	2001/08/22
		MX PA01005545 A	2003/07/14
		MX PA01005598 A	2003/07/14
		MX PA01005641 A	2003/07/14
		NO 20012774 A	2001/06/06
		NO 20012774 D0	2001/06/06
		NZ 527850 A	2004/07/30
		PL 349028 A1	2002/07/01
		RU 2252772 C2	2005/05/27
		TR 200101481 T2	2001/09/21
		US 2002-182268 A1	2002/12/05
		US 2003-017215 A1	2003/01/23
		US 2003-017218 A1	2003/01/23
		US 2003-108622 A1	2003/06/12
		US 2003-108623 A1	2003/06/12
		US 2004-146595 A1	2004/07/29
		US 2004-156922 A1	2004/08/12
		US 2008-015249 A1	2008/01/17

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
		US 6812258 B2	2004/11/02
		US 7008649 B2	2006/03/07
		US 7291650 B2	2007/11/06
		WO 00-33856 A1	2000/06/15
		WO 00-33857 A1	2000/06/15
		WO 00-33857 A9	2001/12/13
		ZA 200104611 A	2001/12/13
WO 2005-065361 A2	2005/07/21	EP 1709155 A2	2006/10/11
		EP 1709155 A4	2007/10/31
		EP 1709155 B1	2013/10/02
		US 2005-0182134 A1	2005/08/18
		US 7585997 B2	2009/09/08
		WO 2005-065361 A3	2006/10/05