

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
A61K 31/65

(11) 공개번호 특2000-0070212
(43) 공개일자 2000년11월25일

(21) 출원번호	10-1999-7006438	(87) 국제공개번호	WO 1998/31224
(22) 출원일자	1999년07월 15일	(87) 국제공개일자	1998년07월23일
번역문제출일자	1999년07월 15일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1998/00332		
(86) 국제출원출원일자	1998년01월 15일		
(81) 지정국	AP ARIPO특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 우간다 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 타지키스탄 투르크메니스탄 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 프랑스 영국 그리스 아일랜드 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베냉 중앙아프리카 콩고 코트디부아르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고 국내특허 : 알바니아 아르메니아 오스트리아 오스트레일리아 아제르바이잔 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 벨라루스 캐나다 스위스 중국 쿠바 체코 독일 덴마크 에스토니아 스페인 핀란드 영국 그루지아 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본 케냐 키르기즈 북한 대한민국 카자흐스탄 세인트루시아 스리랑카 라이베리아 레소토 리투아니아 룩셈부르크 라트비아 몰도바 마다가스카르 마케도니아 몽고 말라위 멕시코 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 포르투갈 루마니아 러시아 수단 스웨덴 싱가포르 슬로베니아 슬로바키아 타지키스탄 투르크메니스탄 터키 트리니다드토바고 우크라이나 우간다 미국 우즈베크스탄 베트남		
(30) 우선권주장	8/783,655 1997년01월 15일 미국(US)		
(71) 출원인	더 리서치 파운데이션 오브 스테이트 유니버시티 오브 뉴욕 제임스 알. 데니히 미국 뉴욕 12201-0009 알바니 피.오.박스 9유니버시티 오브 마이애미 알랜 제이. 피쉬 미국 플로리다 33136 마이애미 노오쓰웨스트 10 애브뉴 1600 고롭로르네엠. 미국뉴욕11781스미스타운취트니게이트29 맥나마라토마스에프. 미국뉴욕11777포트제퍼슨박스44 라마무르티눈가바람에스. 미국뉴욕11787스미스타운리남코트10 리시-밍 미국뉴욕11733시타우켓알리슨플레이스20 시몬샌포드 미국뉴욕11790스토니브룩크시더스트리트71 로케시와바라크리시나엘. 미국플로리다33176마이애미코트12615112 셀저마리에지. 미국플로리다33308포트라우더델리베이뷰드라이브6035 블록노르말엘. 미국플로리다33156마이애미사우스웨스트에잇티세컨드애브뉴19000		
(72) 발명자	황의만		
(74) 대리인			

심사청구 : 없음

(54) 암성장을 억제하는 방법

요약

본 발명은, 포유동물에서 암 세포 증식, 침입, 또는 전이를 억제하거나, 또는 암에 대한 세포독성을 일으킴으로써, 암 성장을 억제하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 암 성장을 억제하기 위해, 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3) 및 기타 작용적으로 관련이 있는 화학적으로 변형된 비항균성 테트라시클린 화합물을 이용한다. 특히, 상기 방법은 대장암 세포, 유방암 세포, 흑색종 세포, 전립선 암종 세포, 또는 폐암 세포로부터 유도되는 종양과 같은 총실성 종양의 정착, 성장 및 전이를 억제하는데 효과적이다.

대표도

도 1a

명세서

기술분야

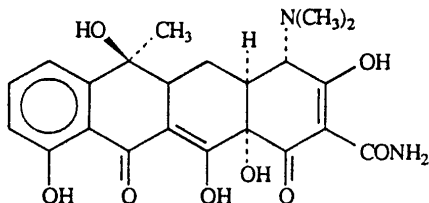
본 발명은 생체계에서 암성장을 감소시키는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 포유동물에서 총실성 종양의 침입 및 전이의 억제에 관한 것이다.

배경기술

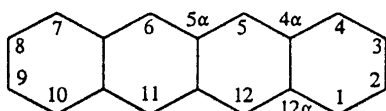
암은 그 모든 무수한 표식으로, 인류에 파괴적인 재앙으로 남아있다. 호지킨 림프종 및 다른 어떤 형태에 대한 특정한 성공을 포함하여, 암을 예방 및 치료하는데 있어서의 발달이 이루어져 왔지만, 많은 유형의 암은 일반적인 치료 계획(protocol)에 여전히 실제로 무감각하다. 대표적으로, 암은 환자에게 고독성의 화학제를 투여하는 화학요법 또는 환자에게 독성량의 방사선을 쏘이는 방사선요법에 의해 치료된다. 막대한 수의 암세포를 죽이는 것이 일반적으로 효과적이지만, 이러한 세포독성 치료는 엄청난 수의 건강한 세포들도 죽임으로써, 환자가 오심, 설사, 빛에 대한 과민증, 모발 손실 등과 같은 심각한 허약 증세를 격게된다. 이러한 세포독성 화합물의 부작용때문에 이러한 화합물을 투여하는 횟수 및 투여량이 제한된다. 이러한 무력화하는 부작용은 순환 세포를 선택하여 목표로 정하는 화합물, 다시말하면 활성적으로 재생되는 세포에서 DNA 복제 또는 기타 성장 과정을 방해하는 화합물을 사용함으로써 어느정도까지 완화될 수 있다. 암세포는 엄청나게 증식될 수 있다는데 특징이 있으므로, 상기의 치료 계획은 건강한 세포보다 더 큰 비율로 암세포를 우선적으로 죽이지만, 세포독성 및 부수적인 질병이 문제로 남아있다.

더욱 최근에는, 암세포를 아주 정밀하게 확인하기 위하여 종양 유전자에 대하여 특이적이거나 또는 HLA 특이성이 있는 단클론 항체를 개발하려는 노력이 있었다. 그러나, 이러한 과정은 아주 값비싸고 절차가 아주 정교함에도 불구하고, 원하는 효능을 여전히 나타내지 못한다. 실제로, 이러한 과정은 치료되는 환자의 작은 부분모집단에서만 효과가 있는 것으로 보고되었다.

종양 세포 매커니즘에 관한 암 연구 분야는 Liotta와 그의 동료들이 제안한 개념상의 뼈대로부터 크게 득을 보았다(예를들어, Yamamoto 등(1996) 및 Emmert-Buck등(1994)의 문헌 참조). 이러한 방법은 다음과 같은 세 가지의 분별되는 단계를 포함하는 논리적인 진행으로 침입 과정을 설명하고 있다: 세포외 기질(ECM)에 종양 세포의 부착, 상기 기질의 단백질 분해성 소화, 및 상기 단백질 분해된 장벽을 통한 세포의 이동. 이러한 과정에서 중요한 인자는 침입동안 ECM의 분해에 주된 역할을 하는 금속단백질 분해효소(각각 MMP-2 및 MMP-9인 젤라티나제 A 및 B, 및 MMP-3를 포함한 MMPs(Lokeshwar 등(1993a)문헌 참조)의 조절이다. 테트라시클린 및 이것의 다수의 동족체들은 특히 성공적인 부류의 항생물질을 형성한다. 테트라시클린 그 자체뿐 아니라 스포로시클린등을 포함하는 어떠한 테트라시클린 화합물은 넓은 종류의 세균에 대하여 이용성을 갖는 광범위한 항생물질이다. 상기 모화합물, 즉 테트라시클린은 하기의 일반적 구조를 갖는다:



상기 다중 고리 핵에 대한 번호매기기 체계는 하기와 같다:



테트라시클린뿐 아니라 5-OH(테라마이신) 및 7-Cl(오레오마이신)은 천연에 존재하는 것들로서 모두 잘 알려져있는 항생물질들이다. 또한, 7-디메틸아미노-테트라시클린(미노시클린) 및 6 α -데옥시-5-히드록시-테트라시클린(독시시클린)도 잘 알려져있는 항생물질들이다. 천연 테트라시클린은 그 항생 특성이 손실됨이 없이 변형될 수 있지만, 이렇게하기 위해서는 그 구조의 어떤 원소들은 그대로 유지되어야 한다. 기본 테트라시클린 구조에 대하여 이루어지고 또 이루어지지 않을 수 있는 상기의 변형이 Mitscher(1978)에 의해 개검토되었다. Mitscher에 따르면, 항생 특성의 완전한 손실이 발생되지않고 상기 테트라시클린 고리계의 위치 5-9에서 변형이 이루어질 수 있다.

상기 고리계의 기본 구조를 변화시키거나 또는 위치 1-4 또는 10-12에서 치환체들을 교체하면 항균 활성이 실제로 감소되거나 또는 거의 없는 합성 테트라시클린이 얻어진다. 예를들어, 일반적으로 4-데(디메틸아미노)테트라시클린은 비항균성 테트라시클린인 것으로 판단된다.

더욱 최근에, 신속하게 흡수되고 연장된 반감기를 갖는 테트라시클린은 그 항균성에 무관하게 생물학적 작용을 나타내는 것으로 입증되었다(Golub 1991, Golub 1992, Uitto 1994 참조). 이러한 작용으로는 콜라게나아제(MMP-1; MMP-8; MMP-13) 및 젤라티나아제(MMP-2; MMP-9)를 포함한 기질 금속단백질분해효소(matrix metalloproteinase)의 억제, 및 병리학적 조직 파괴가 있다(Golub 1991 참조). 일부의 계에 있어서 어떤 테트라시클린 및 금속단백질분해효소 억제제가 종양 진행(DeClerk 등 1994 참조) 또는 맥관형성(WIPO 공보 WO 92/12717; Maragoudakis 등 1994 참조)을 억제할 수 있다는 최근의 연구가 발표되었다. Zucker 등(1985)은 미노시클린이 생체외에서 흑색종 세포 활성을 억제할 수 있음을 설명하였다. 어떤 테트라시클린은 어떤 종양에 대하여 세포종식억제 효과를 나타낼 수 있다(Kroon 등 1984, van den Bogert 등 1986 참조).

그러나, 테트라시클린 항생물질을 사용하는 것은 감염을 치료하는데에 일반적으로 효과가 있지만 원치않는 부작용의 원인이 될 수 있다. 예를들어, 항생 테트라시클린을 장기간 투여하면 장내 미생물과 같은 건강한 미생물군이 감소 또는 제거될 수 있고, 항생물질 내성 유기체가 생성되거나 또는 이스트 및 균류가 과도하게 성장된다. 따라서, 항균 활성이 감소 또는 제거되어있는 화학적으로 변형된 테트라시클린이, 항콜라겐용해 활성을 나타내는 용도로 사용하기에 바람직할 수 있다.

상기의 상황에 비추어, 암세포의 침입 및 전이를 억제하는 현존하는 방법을 보충할 필요가 있음이 명백해 진다. 오늘날의 방법은 환자에 있어서 부수적인 허약 증상을 일으키는 고독성 화합물에 의존하거나, 또는 값비싸고 진행이 어렵고 예측할 수 없는 방법을 사용하고있다.

발명의 상세한 설명

따라서, 본 발명의 목적은, 암세포의 침입 및 전이를 억제하고 1차 종양의 회귀를 유도하는 것을 포함하는 것으로 암세포의 성장 진행 특성을 억제하기위한 화합물 및 방법을 제공함으로써, 암 치료에서 상기의 한계를 극복하는데 있다. 특히, 암성장을 특이적으로 억제하고 비교적 높은 활성을 갖는, 즉 해로운 부작용이 실제로 없는 투여량일 때 활성이 있는, 신규한 항암 화합물 및 방법을 확인하는 것이 바람직하다.

상기의 목적 및 다른 목적들은, 상기 제시된 결과를 달성하는데 유효한 양의 화학적으로 변형된 테트라시클린을 포유 동물에게 제공함으로써 포유 동물에서 암의 성장 및 전이를 억제하는 방법을 제공하는 본 발명에 따라 달성될 수 있음이 발견되었다.

일 실시예에서, 본 발명은 포유 동물에서 암 성장을 억제하는 방법으로서, 4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 테트라시클린 피라졸(CMT-5), 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시엔하이드로테트라시클린(CMT-9), 및 4-데(디메틸아미노)미노시클린(CMT-10)으로 이루어지는 그룹에서 선택되는 테트라시클린을 포유 동물에게 암억제량으로 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다:

특히 바람직한 테트라시클린 화합물은 6-데메틸-6-데옥시-4-데디메틸아미노테트라시클린(CMT-3)이다.

상기 방법은 폐암, 전립선암, 유방암, 난소암, 정소암, 대장암, 및 흑색종과 같은 암의 성장을 억제하는데 유용하다.

상기 방법은 암의 세포 증식을 억제하고, 암의 침입을 억제하고, 및/또는 암의 전이를 억제하는 것을 포함할 수 있다.

상기 테트라시클린 화합물은 암세포에 의한 기질 금속단백질분해효소의 발현, 또는 세포외 기질에서 그 활성을 특이적으로 억제하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다.

하나의 바람직한 측면에 있어서, 상기 방법은 젤라티나아제 A 또는 젤라티나아제 B와 같은 젤라티나아제인 기질 금속단백질분해효소를 억제하는데 유용하다.

상기 방법은 포유 동물을 보조 항종양 방식으로 치료하는 것을 더 포함할 수 있다. 상기 보조 항종양 방식은 화학요법, 수술, 및/또는 방사선요법을 포함할 수 있다.

또다른 실시예에 있어서, 본 발명은 포유 동물에서 암 성장을 억제하는 방법으로, 4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 테트라시클리노이트릴(CMT-2), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7), 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시엔하이드로테트라시클린(CMT-9), 및 4-데(디메틸아미노)미노시클린(CMT-10)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 테트라시클린 화합물을 암 억제량으로 포유 동물에게 투여하는 것을 포함한다.

또다른 실시예에 있어서, 본 발명은 암 세포의 증식을 억제하는 방법으로서, 4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7), 및 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 증식 억제량의 테트라시클린 화합물을 암 세포와 접촉시키는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다. 상기 테트라시클린 화합물은 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3) 또는 6- α -5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8)인 것이 바람직하다.

또다른 실시예에 있어서, 본 발명은 암세포의 침입 가능성을 억제하는 방법으로서, 4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 테트라시클리노니트릴(CMT-2), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7), 및 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8)으로 이루어지는 그룹에서 선택되는 침입 억제량의 테트라시클린 화합물을 암세포와 접촉시키는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

상기 테트라시클린 화합물은 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3)인 것이 바람직하다.

또한 또다른 실시예에 있어서, 본 발명은 암세포의 전이 가능성을 억제하는 방법으로서, 4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1) 및 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3)로 이루어지는 그룹에서 선택되는 전이억제량의 테트라시클린 화합물을 암세포와 접촉시키는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

여전히 또다른 실시예에 있어서, 본 발명은 과도한 젤라틴분해 활성에 특징이 있는 암질환을 치료하는 방법으로서, 과도한 젤라틴분해 활성을 억제하기에 유효한 양의 테트라시클린 화합물을 포유류에게 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

이러한 실시예에 있어서, 상기 암은 젤라티나아제 A의 과도한 활성이 있다는데 특징이 있고 상기 테트라시클린 화합물은 4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 테트라시클리노니트릴(CMT-2), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7), 및 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8)으로 이루어지는 그룹에서 선택된다. 상기 테트라시클린 화합물은 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7) 또는 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3)인 것이 더욱 바람직하다.

또는 그렇지 않으면, 이러한 실시예에 있어서, 상기 암 질환은 젤라티나아제 B의 과도한 활성이 있다는데 특징이 있을 수 있고, 상기 테트라시클린 화합물은 4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 및 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6)으로 이루어진 그룹에서 선택된다. 이러한 경우에 있어서, 상기 테트라시클린 화합물은 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3) 또는 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4)인 것이 바람직하다.

여전히 또다른 실시예에 있어서, 본 발명은 포유 동물에서 종양 발생률을 억제하는 방법으로서,

(a) 어떤 특정한 암성 장애를 관찰하기전에, 암에 대한 예비소인(predeposition)과 관련된 유전자 생성물 또는 대사산물을 포유 동물의 생물학적 시료로부터 검출하고,

(b) 4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 테트라시클리노니트릴(CMT-2), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7), 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시엔하이드로테트라시클린(CMT-9), 및 4-데(디메틸아미노)미노시클린(CMT-10)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 종양 발생률 억제량의 테트라시클린 화합물을 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

여전히 또다른 실시예에 있어서, 본 발명은 포유 동물에서 암성 종양과 관련된 젤라틴분해 활성을 억제하는 방법으로서, 젤라틴분해 활성을 억제하기에 효과적인 양의 테트라시클린 화합물을 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

상기 젤라틴 분해 활성은 암성 종양, 정상 조직, 또는 상기 둘 모두로부터 비롯될 수 있다. 정상 조직이 관련되는 경우, 상기 정상 조직은 상피 조직 또는 간질 조직(stromal tissue)일 수 있다.

여전히 또다른 실시예에 있어서, 본 발명은 포유 동물에서 암성장을 억제하는 방법으로서, 테트라시클리노니트릴(CMT-2) 및 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 암억제량의 테트라시클린 화합물을 포유 동물에게 국소적으로 투여하는 방법을 제공한다.

또다른 실시예에 있어서, 본 발명은 암세포를 죽이는 방법으로서,

4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 테트라시클리노니트릴(CMT-2), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7), 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시엔하이드로테트라시클린(CMT-9), 및 4-데(디메틸아미노)미노시클린(CMT-10)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 세포독성량의 테트라시클린 화합물을 암세포와 접촉시키는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 이러한 실시예에 있어서, 상기 암세포는 육종 세포 또는 선암종과 같은 암종일 수 있다. 예를들어, 상기 방법은 전립선암, 유방암, 난소암, 정소암, 또는 대장암 세포를 죽이기 위해 사용될 수 있다. 상기 암세포들은 전립선암 세포이고, 상기 테트라시클린 화합물은 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3)인 것이

바람직하다.

그리고 또다른 실시예에 있어서, 본 발명은 암세포의 성장을 억제하는 방법으로서, 암 세포에서 차별적인 세포독성을 일으키기에 충분한 양의 테트라시클린 화합물을 암에 걸린 포유 동물에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공하는데, 상기 테트라시클린 화합물은 4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 테트라시클리노니트릴(CMT-2), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7), 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시엔하이드로테트라시클린(CMT-9), 및 4-데(디메틸아미노)미노시클린(CMT-10)으로 이루어진 그룹에서 선택된다.

본 발명에 따라, 항종양 화학요법과 일반적으로 관련되는 부작용을 더욱더 회피하거나 또는 완화시키는 방법으로서, 암세포를 죽이거나 또는 암 성장 또는 전이를 억제하는 방법이 제공된다. 본 발명의 상기 및 다른 이점들은 하기의 상세한 설명 및 실시예로부터 명백해질 것이다. 하기의 상세한 설명 및 실시예는 본 발명의 이점을 더하기 위한 것이지만, 본 발명의 범위를 제한하려고 의도되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

본 발명의 바람직한 실시예들은 예시 및 설명의 목적으로 선택된 것이지만, 어떤 방식으로 본 발명의 범위를 제한하려고 의도되는 것은 아니다. 본 발명의 어떤 측면의 바람직한 실시예들이 첨부 도면에서 보여진다.

도 1a 내지 1d는 MMP 활성에 관한 CMT-3 및 독시시클린의 효과를 예시하는 것으로, 시험관내에서 전립선 암세포로부터 얻은 조절된 배지의 효소 분석(zymographic analysis)을 나타내는 네 개의 전자 사진(electrophoretogram)으로서, 도 1a는 CMT-3로 처리한 TSU PRI 전립선 종양 세포에 대한 것이고, 도 1b는 독시시클린으로 처리한 TSU PRI 전립선 종양 세포에 대한 것이고, 도 1c는 CMT-3로 처리한 AMT LyLu 전립선 종양 세포에 대한 것이고, 도 1d는 독시시클린으로 처리한 AMT LyLu 전립선 종양 세포에 대한 것이다.

도 2a 및 2b는 LNCaP 종양 세포(도 2a), TSU PRI 종양 세포(도 2b), 및 MAT LyLu(도 2c)에서 테트라시클린 유도체에 의한 세포 증식의 시험관내 투여량-의존 억제를 예시하는 그래프이다.

도 3a 내지 3d는 DU-145 종양 세포(도 3a), PC-3 종양 세포(도 3b), BPH-1 발암성 전립선 상피 세포(도 3c), 및 FHS733 사람의 섬유 아세포(도 3d)에서 테트라시클린 유도체에 의한 세포 증식의 시험관내 투여량-의존 억제를 예시하는 그래프이다.

도 4a 및 4b는 24시간 노출(도 4a) 및 48시간 노출(도 4b)시에 Dunning MAT LyLu 종양 세포(쥐의 전립선 암 모델)에서 테트라시클린 유도체에 의한 세포독성의 시험관내 투여량-의존 발생을 예시하는 그래프이다.

도 5a는 시험관내에서 TSU PRI 종양 세포(사람의 전립선 암 세포계)의 침입을 억제하기 위한 CMT 화합물들의 능력의 비교예를 보여주는 막대그래프이고, 도 5b는 시험관내에서 MAT LyLu 종양 세포의 침입을 억제하기 위한 CMT 화합물들의 능력의 비교예를 보여주는 막대그래프이다.

도 6은 테트라시클린 화합물에 의한 MAT LyLu 종양 전이의 억제를 예시하는 막대 그래프이다.

도 7a는 테스트 동물에게 MAT LyLu 종양 세포를 주입한 후 종양 발생률을 감소시키기 위한 CMT-3의 능력을 예시하는 막대그래프이고, 도 7b는 테트라시클린 화합물에 의한 MAT LyLu 종양 전이의 억제를 예시하는 막대 그래프이다.

도 8은 흑색종 암세포 침입성의 억제와 화학적으로 변형된 테트라시클린 투여량사이의 상관관계를 예시하는 막대그래프이다.

도 9a 내지 9d는 정상 전립선 간질 세포(도 9a), LNCaP 종양 세포(도 9b), PC-3 종양 세포(도 9c), 및 DU-145 종양 세포(도 9d)의 투여량 의존 세포독성을 예시하는 그래프이다.

도 10a는 MAT LyLu 세포에 의한 뉴클레오솜의 투여량-의존 테트라시클린-유도된 발생을 보여주는 막대그래프이고, 도 10b는 MAT LyLu 세포에 의한 뉴클레오솜의 시간-의존 CMT-3 유도 발생을 보여주는 막대그래프이다.

실시예

일실시예에 있어서, 본 발명은 생물학적 계에서 세포 성장, 침입, 및 전이 과정을 포함한 암 성장을 억제하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 테트라시클린 화합물을 암성장 억제제로서 사용하는 것을 포함한다. 상기 방법은 포유 동물과 같은 살아있는 동물에서 암세포 증식, 침입, 전이, 또는 종양 발생률을 억제 또는 감소시키는 데 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 방법은 암세포 성장 및 그 성질을 평가분석하는 것과 같은 평가분석 시스템에서 사용하기에 특히 적합하다.

본 발명에 따라 유용한 화합물은 활성, 생물학적 이용효능, 용해도, 및 부작용의 감소를 포함한 물리화학적 성질들의 바람직하면서도 예외적인 결합을 가진다. 이러한 성질들때문에 상기 화합물은 암치료에 특히 바람직하게 된다.

이러한 화합물로는 테트라시클린 고리 구조의 위치 4에서 디메틸아미노기가 없는 것들이 있는데, 예를 들어 4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7), 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시엔하이드로테트라시클린(CMT-9), 및 4-데(디

메틸아미노)미노시클린(CMT-10), 4-데(디메틸아미노)-5-옥시테트라시클린, 5 α ,6-언히드로-4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린, 4-데(디메틸아미노)-11-히드록시-12 α -데옥시테트라시클린, 12 α -데옥시-4-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린, 및 12 α ,4 α -언히드로-4-데(디메틸아미노)테트라시클린을 들 수 있다. 또한, 항균 활성의 감소를 위해 변형되는 테트라시클린의 예로는 6- α -벤질티오메틸렌테트라시클린, 테트라시클린의 모노-N-알킬화 아미드, 6-플루오로-6-데메틸테트라시클린, 11 α -클로로테트라시클린, 테트라시클리노니트릴(CMT-2), 및 테트라시클린피라졸(CMT-5)가 있다.

바람직한 테트라시클린 화합물로는 4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 및 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8)이 있다. 가장 바람직한 테트라시클린 화합물은 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3)이다. 상기 화합물들의 결합물이 이용될 수 있다. 독시시클린은 본 발명에 포함되지 않는다.

상기 화합물들은, 알려져있는 화학요법제들보다 부작용이 더 작아지는 농도에서, 그리고 어떤 경우에 있어서는 부작용이 실제로 없는 농도에서 암억제성을 나타낸다. 예를들어, 상기 화합물들의 이러한 유용한 농도는 어떤 중대한 항균 활성을 나타내지 않는다. 이러한 테트라시클린 화합물은 다른 화합물들이 원치않는 부작용을 나타낼 수 있는 장기간의 치료 계획에 유용하다. 또한, 이러한 화합물에 있어서 친수성 및 소수성이 적당하게 균형을 이룸으로써, 시험관내 및 특히 생체내 둘 모두에서 상기 화합물의 이용성이 강화되는 한편, 상기 화합물은 신체에서 흡수 및 생체이용이 가능하도록 수성 배지에서 적절한 용해도를 가지며, 또 추정 작용 부위에 대한 세포막의 통과가 가능하도록 하는 정도로 지질에서의 용해도를 가지는 것으로 판단된다. 상기 화합물은 종양 부위에 전해지고 또 종양 세포내에 들어가는 경우에 최대 효과가 있다.

어떤 국소화된 종양의 치료에 있어서, 비항균 테트라시클린 화합물의 친수성 정도는 중요성이 덜할 수 있다. 수성계에서 낮은 용해도를 가지는 테트라시클리노니트릴(CMT-2) 및 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6)과 같은 화합물은 흑색종 또는 기초 세포 암종과 같은 피부암의 직접 또는 국소적 치료, 또는 뇌내로 주입함에 의한 뇌양의 국소적 치료에 사용될 수 있다. 이러한 두 가지의 CMT들을 성숙한 쥐들에게 경구투여하는 동물 실험 결과, 상기 화합물들의 검출가능한 혈액 수준은 확인되지 않았는데, 이는 전신 흡수 및/또는 대단히 빠른 배출이 없음을 나타내는 것이다.

본 발명의 이러한 실시예는, 모든 항균 활성이 실제로 제거되도록 화학적으로 변형되는 특정한 테트라시클린 화합물이 시험관내뿐 아니라 생체내에서 암세포의 증식, 침입 및 전이를 억제하는데 효과적이라는 예상치 못한 관찰에 근거하여 전개된 것이다. 이들 중에서, 한 가지 특히 바람직한 CMT, 즉 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클리노('CMT-3'라고도함)는, 암세포의 증식, 침입, 및 전이를 포함한 암성장을 억제하는데 있어서 예외적으로 강한 활성을 가지는 것으로 확인된다는 점에서 성질들의 좋은 균형을 가지는 것으로 판단된다. CMT-3의 또다른 이점은 예상치못하게 긴 혈청 반감기(약 28시간)를 가진다는 것이다. 따라서, CMT-3는 일주에 한 번 또는 두 번과 같이 주기적인 투여만을 필요로 한다.

또다른 실시예에 있어서, 본 발명의 방법은 포유 동물에서 암성 종양과 관련되는 콜라게나아제 및 젤라티나아제와 같은 기질 금속단백질 분해효소의 효소적 활성을 억제하는데 효과적이다. 억제될 수 있는 젤라틴 분해 활성은 암성 종양에 의한 젤라티나아제 발현으로부터 발생될 수 있거나 또는 정상 조직, 즉 비암성 조직으로부터 발생될 수 있다. 특히, 상기 젤라티나아제 활성은 상피 조직 또는 간질 조직과 같은 정상 조직으로부터 발생될 수 있다. 상기 방법은 이러한 종양들과 관련되는 과도한 젤라틴 분해 활성을 억제하기 위해 사용하는 것이 더욱 바람직하다. 억제될 수 있는 젤라티나아제로는 젤라티나아제 A(72kDa 타입 젤라티나아제; MMP-2; 타입 IV 콜라게나아제로도 알려져있음); 및 젤라티나아제 B(92kDa 타입 젤라티나아제; MMP-9; 타입 V 콜라게나아제로도 알려져있음)이 있다. 이러한 관측되는 젤라틴분해활성의 억제는 MMP 활성의 억제, MMP 발현의 하향 조절, 또는 전구물질 형태의 효소인 프로-젤라티나아제(또는 pro-MMP)의 활성화의 억제와 같은 상기 젤라티나아제와 관련되는 생리현상의 방해때문일 수 있다.

본 발명의 발명자들은 본 발명이 어떤 특정한 매커니즘에 구속되는 것을 바라는 바는 아니지만, CMT들이 특히, 암의 상황에서 본질적으로 알려지지않은 매커니즘에 따라 작용할 수 있음을 발견한 것은 전혀 예상치 못한 것이었다. 본 발명의 발명자들은 화학적으로 변형된 테트라시클린 화합물은 암과 일반적으로 관련되는 금속단백질 분해효소의 발현 수준을 감소(하향조정)시킴을 발견하였다. 예를들어, CMT-3는 사람의 대장암 세포에 의한 젤라티나아제 A의 발현을 감소시키고 사람의 유방암 세포에 의한 젤라티나아제 B의 발현을 억제함을 발견하였다. 본 발명의 발명자들은 이러한 관찰은 암치료에 있어서 상당한 치료적 의미를 가지는 것으로 판단한다. 또한 본 발명의 발명자들은 상기 CMT 및 기타 화학적 및 작용적으로 관련있는 화합물들은 과도한 젤라티나아제 발현 또는 활성에 특징이 있는 기타 질병의 영향을 억제하는데 유용한 것으로 판단한다.

본 발명은 암세포에서 세포독성을 유도하는(세포를 죽이는) 방법 또는 암세포의 생존 능력을 감소시키는 방법을 포함한다. 테트라시클린 화합물의 세포독성은 바람직하게 선암종과 같은 암종 또는 육종에 대하여 이용될 수 있다. 예를들어, 본 발명은 전립선암, 유방암, 난소암, 정소암, 폐암, 또는 대장암 세포에서 세포독성을 일으키는데 사용될 수 있다. 이러한 세포독성을 일으키는 매커니즘이 충분히 이해되지는 않지만, 세포자멸사, 회사, 또다른 매커니즘, 또는 상기 매커니즘들의 결합을 통해 암세포들을 선택적으로 죽이는 것이 발생할 수 있다.

암세포를 죽이는 것은 통상적인 세포독성 치료요법에서 발견되는 것보다 더욱 적은, 정상 세포 또는 조직에 대한 세포 독성을 가지고서 발생될 수 있고, 바람직하게는 정상 세포 또는 조직에 대한 실제적인 세포독성이 없이 발생될 수 있다. 예를들어, 테트라시클린, 즉 CMT-3는 정상 세포 또는 조직에서 세포독성을 거의 생성함이 없이 암세포에서 세포독성을 일으킬 수 있음이 예상치못하게 관측되었다. 따라서, 대표적으로 모든 성장 세포들을 죽이는 통상적인 세포독성 항암치료 요법과는 다르게, CMT-3는 차별적인 세포독성을 생성하는데, 암세포들은 선택적으로 죽이는 반면에 정상 세포들은 살려둔다. 따라서, 또다른 실시예에 있어서, 본 발명은 정상 세포 또는 조직과 차별하여 암 세포에서 세포독성을 일으키기 위한 방법에 관한 것이다. 상기 테트라시클린 화합물과 관련되는 이러한 예상치 못한 차별적인 세

포도성은 세포자멸사, 회사, 또다른 매커니즘, 또는 상기 매커니즘들의 결합의 결과로서 발생하는 것이다.

하기의 실시예들에서 제시되는 데이터로부터, 상기의 화합물로 처리되는 암세포는 세포외 젤라틴 분해활성의 감소, 세포의 시험관내 침입 가능성의 투여량-의존 감소, 및 생체내에서 세포의 전이성의 감소를 일으킨다는 것을 알 수 있다. 또한, 상기 화합물은 종양 세포를 죽일 수 있고, 또 정상 세포에 대하여는 실제로 비독성이면서 종양 세포를 죽일 수 있다. 따라서, 상기 화학적으로 변형된 테트라시클린은 특정한 암과 관련되는 전이의 형성 및 정도를 억제하기 위해 사용될 수 있고, 또 기타 치료요법에 대한 보조물로서 사용될 수 있고, 또 전이성 암의 치료 효능을 더 증가시킨다.

본 발명에 의해 치료될 수 있는 암은 포유 동물에서 생긴다. 포유 동물의 예로는 사람뿐 아니라, 개 및 고양이와 같은 애완동물, 쥐 및 마우스와 같은 실험 동물, 말 및 소와 같은 농장 동물이 있다.

종양 또는 신생물은 세포들의 증식이 제어되지 않고 진행되는, 조직의 새로운 성장을 포함한다. 일부의 이러한 성장은 양성이지만, 다른 것들은 유기체의 죽음을 초래하는 '악성'이다. 악성 신생물 또는 '암'은, 공격적인 세포 증식을 나타내는 것 외에도, 조직 및 전이 주위에 침입한다는 점에서 양성 성장과 구별된다. 또한, 악성 신생물은 분화의 큰 손실, 조직화의 큰 손실 및 주위 조직의 큰 손실을 나타낸다는 점에서 특징이 있다. 이러한 성질은 '퇴생'이라고도 부른다.

본 발명에 따라 치료될 수 있는 신생물은 모든 종실성 종양, 즉 암종 및 육종을 포함한다. 암종으로는 주위의 조직을 침투(침입)하여 전이를 일으킬 수 있는 상피 세포로부터 발생하는 악성 신생물이 있다. 선암종은 선조직으로부터 발생되거나, 또는 종양 세포가 인식가능한 선구조를 형성하는 암종이다. 광범위하게 육종은 그 세포들이 미발달 연결 조직과 같은 소섬유성 또는 균일 물질에 끼워지는 종양을 포함한다.

특히, 본 발명은 특정한 유형의 실험적으로 정의되는 암의 치료에 관하여 본원에 예시된다. 이러한 예시적인 치료에 있어서, 종래기술의 표준 상태인 시험관내 및 생체내 모델이 사용되었다. 이러한 모델은 생체내 치료 요법에서 효능이 있는 것으로 예상될 수 있는 약물을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 그러나, 본 발명의 방법이 이러한 종양 유형의 치료로 제한되지 않고, 어떤 기관 계로부터 발생하는 어떤 종실성 종양까지 확장됨은 물론이다. 그 침입 및 전이가 MMP 발현, 특히 젤라티나아제 발현과 관련이 있는 암은 본 발명에 따라 억제될 수 있거나 또는 회귀될 수 있다.

따라서, 치료될 수 있는 암의 예로는 대장암, 방광암, 유방암, 흑색종, 난소암, 전립선암, 또는 폐암뿐 아니라 여러가지의 다른 암들을 들 수 있다. 본 발명은 전립선, 유방, 신장, 난소, 정소, 및 대장의 선암종을 포함한 선암종에서 암 성장을 억제하는데 특히 유용하다. 또한 본 발명은 피부 및 기타 기관의 흑색종 세포 계로부터 발생하는 흑색종에 대하여 유용하다.

상기 방법은 포유동물에서 암세포 성장, 즉 세포 증식, 침입, 전이, 또는 종양 발생률을 감소시키기에 효과적인 양의 테트라시클린 화합물을 제공 또는 투여하는 것을 포함한다. 상기 암세포 성장 억제는 MMP 활성의 억제, MMP 발현의 하향 조절, 어떤 기타 매커니즘, 또는 상기 매커니즘들의 결합으로부터 얻어질 수 있다. 예를들어, 본 발명의 발명자들은 CMT-3는 생체내 암세포에서 MMP-2 및 MMP-9의 발현을 억제함을 발견하였다. MMP를 발현하거나 또는 침입성 또는 전이성을 나타내는 모든 종실성 종양들이 본 발명의 방법에 따라 치료될 수 있는 것으로 판단된다. 일부의 경우에 있어서, 종양 병소의 발생률 또는 발달이 억제될 수 있거나 또는 상기 종양 병소가 생기는 것이 실제로 방지될 수 있다. 따라서, 상기 방법은, 예를들어 어떤 특정한 암 장애를 검출하기 전에 암에 대한 예비소인과 관련이 있는 유전자 생성물 또는 대사산물을 검출한후 포유동물에게 테트라시클린 화합물을 투여함에 의해 예방 치료를 위해 사용될 수 있다. 또는 그렇지 않으면, 상기 테트라시클린 화합물은 수술 절제 또는 방사선 치료후에 남아있는 암을 치료하기 위한 것과 같이 암 재발을 방지하는데 유용하다. 본 발명에 따라 유용한 상기 테트라시클린 화합물은 실제로 비독성이기 때문에 다른 암 치료제와 비교하여 특히 이점이 있다.

예외적으로 낮은 농도를 포함한 넓은 범위의 농도에 걸쳐서 효과가 발생한다. 본 발명에 따라 사용되는 테트라시클린 화합물의 양은 암 성장을 효과적으로 억제하는 양이다. 다량의 테트라시클린 화합물은 세포 증식 또는 침입 또는 전이 가능성을 상당히 감소시킴으로써 경우에 암 성장을 효과적으로 억제한다. 증식은 종양이 세포 분화를 통해 그 체적을 증가시키려는 능력을 말하는 것으로서, 대표적으로 '배가울'(doubling rate)로 측정된다. 본 발명에 따른 세포 증식의 억제는 성장 속도가 감소함을 의미하는 것이다. 일부의 경우에 있어서, 세포 분화를 통한 종양 세포의 분출 속도를 세포 사망률이 초과하는 경우에, 상기 방법은 실제로 종양 물질의 회귀 또는 감소를 실제로 일으킬 수 있다. 침입은, 종양 또는 종양 세포가 대표적으로 다른 조직의 세포와 기질을 파괴함으로써 다른 조직에 침입하려는 가능성을 말한다. 전이는 종양이 시작되는 1차 부위로부터 떨어져있는 부위에서 새로운 종양 병소가 자리잡게 하려는 종양 또는 종양 세포의 가능성을 나타내는 것이다. 대표적으로, 전이는, 1차 종양으로부터 분리되고 예를들어 혈액 또는 림프를 통해 이동하여 또다른 조직 또는 기관에 새로운 병소가 자리잡게 하는 개개의 세포 또는 세포 그룹에 의해 진행된다. 종양 전이에서 일반적인 하나의 자리는 폐인데, 상기 폐 조직의 매우 미세한 맥관조직이 종종 종양 세포를 포획함으로써 상기 폐 조직에서 종양 병소의 정착이 가능해진다. 어떤 유형의 종양은 특정한 유형의 조직으로 전이한다. 예를들어, 전립선 선암종이 큰 특이성을 가지고서 빠르게 전이할 수 있다. 본원에서 제시되는 데이터는, 본 발명의 방법이 상기 매개변수들의 일부 또는 모두에 의해 정의되는 바와같은 암 성장 및 재발을 억제할 수 있다는 증거를 나타내는 것이다.

상기 테트라시클린 화합물은 항균 활성이 거의 없는 양으로 제공되는 것이 바람직하다. 테트라시클린 화합물은 세균의 성장을 중대하게 방해하지 않기 때문에 효과적인 항균성을 가지지 않는다. 따라서, 상기 방법은 항균 활성이 감소 또는 제거되도록 화학적으로 변형된 테트라시클린 화합물을 이용하는 것이 이로울 수 있다. 이러한 화학적으로 변형된 테트라시클린 화합물을 사용하는 것이 바람직한데, 이는 항균량의 상기 화합물을 연장된 시간동안 사용하는 것을 흔히 수반하는 내성 세균의 출현 또는 이로인한 세균의 무차별한 살상과 같은 특정한 단점들을 회피하면서 상기 화합물이 항균성 테트라시클린보다 더 높은 수준으로 사용될 수 있기 때문이다.

본 발명의 방법에 따라 유용한 테트라시클린 화합물은 투여량-의존 방식일 때 이로인한 효과를 나

타내는 것으로 보인다. 따라서, 넓은 한계내에서, 다량의 테트라시클린 화합물을 투여하면, 소량을 투여할 때와 비교하여 암 세포 성장 또는 침입이 더 높은 정도로 억제되는 것으로 관측되었다. 정상 세포에서 독성이 관찰되는 수준이하의 투여량일 때 유효성이 관측되었다. 따라서, 본 발명의 이점들중 한 가지는 통상적인 세포독성 암치료시에 보통 수반되는 부작용이 감소되고 바람직하게는 회피된다는 것이다.

대상물에 대한 최대 투여량은 원치않거나 또는 허용불가능한 부작용을 일으키지않는 최고 투여량이다. 예를들어, 상기 테트라시클린 화합물(들)은 약 0.1mg/kg/일 내지 약 30mg/kg/일의 양, 바람직하게는 약 1mg/kg/일 내지 약 18mg/kg/일의 양으로 투여될 수 있다. 본 발명의 목적을 위하여, 부작용은 독성작용뿐 아니라, 임상학적으로 중대한 항균 활성을 포함할 수 있다. 예를들어, 약 50mg/kg/일을 초과하는 투여량은 사람을 포함한 대부분의 포유동물에서 부작용을 일으킬 수 있다. 어떤 경우에 있어서, 당업자는 이 분야의 기술 및 이론에 의해 안내를 받고, 본 발명은 상술한 효과를 달성하기에 유효한 투여량을 제한 없이 포함한다.

또한, 본 발명은 어떤 통상적인 화학요법제와 같은 하나 이상의 기타 항암 화학요법제에 상기 테트라시클린 화합물을 포함시켜서 실시할 수도 있다. 상기의 기타 약제와 상기 테트라시클린 화합물의 결합물은 상기 화학요법 계획의 효력을 증가시킨다. 다수의 화학요법 계획이 본 발명의 방법에 포함될 수 있는 것으로서 당업자에게 명백해질 것이다. 천연 생성물뿐 아니라 알킬화제, 항대사물질, 호르몬 및 길항제를 포함한 어떤 화학요법제가 사용될 수 있다. 예를들어, 비항균성 테트라시클린 화합물은 독소루비신 및 기타 안트라시클린 유사체와 같은 항생 물질, 시클로포스파미드와 같은 질소 머스타드, 5-플루오로우라실, 시스플라틴, 히드록시우레아, 텍솔 및 이것의 천연 및 합성 유도체와 같은 피리미딘 유사체등과 함께 투여될 수 있다. 또다른 예로서, 종양이 고나도트로핀-의존 및 고나도트로핀-무의존 세포를 포함할 수 있는 유방 및 전립선의 선암종과 같은 혼합된 종양의 경우에 있어서, 상기 테트라시클린은 루프로리드 또는 고세렐린(LH-RH의 합성 유사체)와 함께 투여될 수 있다. 기타 항신생물 계획은 수술, 방사선, 기타 화학요법제 등과 같은 또다른 치료 방법(본원에서는 '보조 항신생물 방법'이라함)과 함께 테트라시클린 화합물을 사용하는 것을 포함한다. 따라서, 본 발명의 방법은 부작용을 감소시키고 유효성을 강화하는 이점을 가지고서 상기의 통상적인 치료 요법과 함께 이용될 수 있다.

본 발명의 방법에서 사용하기에 바람직한 제약 조성물은 당업자가 이해하고 있는 바와같은 적당한 제약학적 담체 또는 부형제에서 테트라시클린 화합물의 결합물을 포함한다.

소화관내 투여가 테트라시클린의 운반을 위한 바람직한 경로이고, 테트라시클린 화합물과 함께 적절한 희석제, 담체등을 포함하는 조성물이 쉽게 제형화된다. 액체 또는 고체(예를들어, 정제, 젤라틴 캡슐) 제제가 이용될 수 있다. 많은 경우에 있어서, 통상적인 화학요법제에서 대표적으로 요구되는 비경구적 운반(예를들어, 주사, 주입)과는 다르게, 상기 테트라시클린 화합물이 경구적으로 운반될 수 있다는 것은 본 발명의 이점들중 하나이다.

또한 비경구적 사용(예를들어, 정맥내, 근육내, 피하 주사)이 기대되고, 당업계에 잘 알려져있는 바와같은 통상적인 희석제, 담체등을 사용하는 제제가 상기 화합물을 운반하기 위해 이용될 수 있다.

또는 그렇지않으면, 상기 테트라시클린 화합물의 운반에는 국소적 사용이 포함될 수 있다. 이러한 국소적 사용에 적합한 것으로 보이는 조성물로는 젤, 연고, 로션등과 같은 형태의 조성물이 있다. 신체내에서 병소를 가지는 종양, 예를들어 뇌종양의 경우에 있어서, 상기 테트라시클린 화합물은 완속-방출 운반 매개체, 예를들어 장애 장소에 주입되거나 또는 그 근처에 위치하는 중합체성 물질을 통해 운반될 수 있다.

본 발명을 전개하는데 있어서, 몇몇의 화학적으로 변형된 테트라시클린(CMT)이 암성장을 억제하는데 있어서의 그 효과(상업적으로 이용가능한 항균성 테트라시클린, 독시시클린과 비교하여)에 대하여 테스트되었다. 이러한 테스트에 의하여, 상기 화합물이 시험관내에서 전립선 암세포 증식 및 침입 가능성에 미치는 효과, 및 생체내 종양 모델, 즉 쥐의 Dunning MAT LyLu의 종양 성장 및 폐의 전이증식에 미치는 효과를 조사했다. 시험관내 실험동안에, 항균 독시시클린 및 특정한 비항균성 CMT는 사람의 전립선 암세포계(PC-3, DU-145, TSU PR1, 및 LNCaP) 및 Dunning 전립선 종양 세포의 세포 증식을 억제했다(IC₅₀=3-120 μ g/mL). 또한 독시시클린 및 CMT는 침입 가능성을 화합물에 따라 10 내지 90%만큼 억제했다. CMT-3(6-데옥시-6-데메틸-4-데(디메틸아미노)테트라시클린)가 상기 테트라시클린 유사체들중에서 가장 효능있는 것인데, 이는 경구 투여에 의해 생체내에서 쉽게 달성되는 약물의 수준인 5 μ g/mL일 때 침입 가능성을 90%만큼 억제한다. 1차 부위에서 Dunning 종양의 성장은, 종양 주입후 21일동안 독시시클린 또는 CMT-3를 매일 위장내에 경구투여하여 처리한 쥐에 있어서는 별로 변화되지 않았다. 그러나, 폐 전이의 수는 상당히 감소되었는데(p < 0.01), CMT-3로 처리한 그룹에 있어서 전이의 수는 28.9 \pm 15.4부위/동물인 반면에 무처리 그룹에 있어서는 59.5 \pm 13.9부위/동물이며, 이러한 감소는 동일 경구 투여량일 때 독시시클린에서 보여지는 효과의 두 배이다. 종양 주입하기 7일전에 쥐에게 예비투여하면 종양 성장이 상당히 지연(46 \pm 9.3%, p<0.05)되고 전이가 감소된다. 그밖에, CMT-3(40mg/kg)으로 처리한 그룹에 있어서는 종양 경감(종양 발생률의 억제)이 발생하였다. 그러나, 독시시클린으로 처리하면 종양 경감이 일어나지 않는다. 또한, CMT-3로 처리한 그룹에서 폐 전이의 수가 58 \pm 8%감소되는 반면에 독시시클린으로 처리한 그룹에 있어서는 33 \pm 7.0% 감소된 것으로 관측되었다. 본원에 설명된 실험 그 어디에서도 중대한 약물-유도 사망률이 관측되지 않았다. 이러한 결과들은 종양 공격을 억제하고 전이를 방해하기위한 화학요법 치료에 있어서 CMT-3의 유용성을 더욱더 입증하는 것이다.

후술하는 다른 실험에 있어서, 본 발명의 발명자들은 높은 침입성 및 전이성을 가지는 사람의 흑색종 세포계 C8161으로부터 얻은 젤라티나아제 A 및 B 활성의 세포외 수준에 미치는 독시시클린 및 CMT의 효과(들)을 연구하고, 이러한 관찰을, 시험관내 침입 평가분석 및 생체내 SCID 마우스 모델에서의 세포의 생물학적 거동의 변화와 상관시켰다. 그 결과로부터, 젤라티나아제 활성의 세포외 수준을 차별적으로 억제하기 위한 상기 화합물들의 능력과 일치하여, 독시시클린 및 CMT-1, CMT-3, 및 CMT-6를 이용하여 처리한 C8161 세포는 투여량 의존 방식(3-50 μ g/mL)일때 생체내에서 침입성이 덜하다는 것을 알 수 있다. 또한, 상기 생체내 모델로부터 유도한 데이터로부터, CMT-1 및 CMT-3가 경구 투여된 SCID 마우스는 꼬리 정맥 접종을 통해 C8161 세포가 정맥내 주사된 후 폐 전이의 수가 감소하였음을 알 수 있다.

하기의 실시예들은 본 발명의 이해를 더욱더 돕기 위해 제시되는 것이다. 이용되는 특정한 물질 및 조건들은 본 발명을 더 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 정당한 범위를 제한하는 것이 아니다.

실시예 1A

암세포에서 효소 발현의 억제

미합중국 매릴랜드주 로크빌에 소재한 미국 종균 협회(ATCC)로부터 두 개의 사람의 암-유도 세포계들을 얻었다. 상기 세포계들은 MMP-2 또는 젤라티나아제 A를 발현하는 사람의 대장암-유도 세포계인 COLO 205 및 MMP-9 또는 젤라티나아제 B를 발현하는 사람의 유방암-유도 세포계인 X-10을 포함했다.

각각의 세포계의 세포들을, 100유닛/ml 페니실린 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신을 함유하는 10% 열불활성화 태아소 혈청(FBS)과 함께 RPMI-1640(Gibco)의 75cm² T-플라스크에서 배양했다. 상기 세포들을 2일마다 공급하고 일주일마다 통과시켰다. 상기 세포들을 80-90% 합류점까지 성장시킨 다음, 상기 FBS-함유 배지를 혈청이 없는 배지(SFM)으로 교체했다. 상기 SFM내의 세포에 CMT-3(CollaGenex Pharmaceuticals, Inc., 펜실베이니아 뉴우튼 소재)를 몇 가지 농도로 부가했다. 24시간 후 조절된 배지를 수거하고, 원심분리하여 세포 부수러기를 제거한 다음, 통상적인 방법을 사용하고 레이저 농도계에 의해 얼룩(blots)을 스캐닝하여 Western blot에 의해 MMP 단백질 발현을 평가분석하였다. 얻어지는 데이터는 하기의 표 1에서 요약된다.

[표 1]

CMT-3에 의한 암세포계에서 MMP 단백질 발현의 억제%

암세포계	CMT-3 농도		
	0 μ M	10 μ M	20 μ M
COLO 205(MMP-2 발현)	---	13.3%	66.9%
E-10(MMP-9 발현)	---	45.3%	60.8%

상기 데이터는 두 개의 상이한 유형의 암세포에서 두 개의 상이한 MMP의 발현을 억제하는데 있어서 CMT-3의 투여량-의존 활성을 명백히 보여준다. MMP 발현의 억제는 건강한 조직의 세포의 기질을 분해하려는 상기 암세포의 능력을 억제함으로써 상기의 건강한 조직에 침입하려는 암의 능력을 제한하는 것으로 판단된다. 시험관내에서 암세포 증식의 억제 및 생체내에서 암 전이의 억제가 하기의 몇몇의 실시예에서 입증된다.

실시예 1B

암세포에서 기질 금속단백질분해효소 활성의 억제

전립선 암세포에 의한 젤라티나아제 활성 또는 발현에 미치는 CMT-3 및 독시시클린의 효과를 테스트했다. 우선, 배지내로 MMP 분비를 억제하려는 CMT-3 및 독시시클린의 능력을 테스트했다. Dean 및 Woessner (1985)의 방법에서 변안한 방법을 사용하여 젤라티나아제 활성을 측정했다. 2일동안 CMT-3 또는 독시시클린을 이용하여 처리한 MAT LyLu 및 TSU PR1 세포로부터 조절된 배지를 수거했다. 상기 혈청이 없는 배지는 인슐린(5 μ g/mL), 트랜스페린(5 μ g/mL), 셀렌산(5ng/mL) 및 겐타미신(2 μ g/mL)을 함유하는 RPMI 1640 기초 배지를 포함했다. 이러한 조절된 배지의 초기 평가분석 결과, MMP 평가분석을 방해하는 TIMP의 존재가 확인되었다. 따라서, 상기 조절된 배지를 37°C에서 30분동안 화학적으로 환원(1mM 디티오프라이톨) 및 알킬화(1mM 요오드아세트아미드)한 다음, 투석하여 내인성 TIMPs를 파괴하였다(Dean 등 1987; Woessner 1991 참조). 상기 투석된 배지를, 37°C에서 30분동안 1mM p-아미노페닐 머큐리 아세테이트(APMA)를 이용하여 숨어있는 MMP를 활성화한 후, 젤라티나아제 활성에 대하여 평가분석했다. 상기 평가분석 믹스는 0.5mL의 전체 체적의 평가분석 완충액(20mM Tris-HCl, pH 7.4, 30mM NaCl, 0.005% Brij35, 10mM CaCl₂, 2 μ M ZnSO₄, 및 0.02% NaN₃)에 용해된 0.1mL의 처리 조절된 배지, 1mM 페닐메틸 술포닐 플루오라이드(PMSF), 및 25 μ g ³H-젤라틴(열-변경된 ³H-아세틸화된 산 가용성 콜라겐으로부터 제조됨)이다. 일부의 경우에 있어서, 10mM 대신에 1mM CaCl₂가 사용되었다. 1 mM 1, 10-페난트롤린을 부가하여 블랭크(blank)를 얻었다. 숨어있는 MMP를 활성화한 후 그리고 상기 기질 ³H-젤라틴을 부가하기 전에, 독시시클린 또는 CMT-3를 상기 평가분석 혼합물에 부가했다.

그 밖에, MMP의 APMA 활성화를 억제하려는 독시시클린 또는 CMT-3의 능력을 테스트했다. 1 mM APMA를 부가하기 전에 처리된 조절 배지를 1시간 동안 상기 억제와 함께 배양한 다음 2시간 동안 배양을 계속했다. 이어서, ³H-젤라틴을 부가하고 평가분석을 4시간 동안 계속했다. 모든 평가분석은 복제관에서 수행되었고, 최소한 2회 반복되었다.

평가분석 완충액에서 $[Zn^{2+}]$ 의 변화 없이 1 mM 및 10 mM $CaCl_2$ 일 때, 배지에서 MMP 활성을 연구했다. 1 mM $CaCl_2$ 의 농도는 생리학적 농도에 더 근접하기 때문에 이용되었고, 10 mM $CaCl_2$ 의 농도는 생체내 평가분석에서 최적의 농도로 보고되었기 때문에 이용되었다(Woessner 1991 참조), 표 2에서 나타난 바와 같이, CMT-3 및 독시시클린 둘 모두는 시험관내에서 활성화된 젤라티나아제를 억제했다. 1 mM $CaCl_2$ 일 때, CMT-3의 50% 억제 투여량(IC_{50})은 0.5 μM 인 반면에, 10mM $CaCl_2$ 일 때 CMT-3에 대한 IC_{50} 은 $\sim 1.5 \mu M$ 이었다. 비교로서, 10 mM $CaCl_2$ 일 때, 독시시클린에 대한 IC_{50} 은 5.0 μM 이다. 또한, 상기 억제 둘 모두는 p-아미노페닐 머큐리 아세테이트에 의한 MMP의 활성화를 억제했고 CMT-3에 대한 IC_{50} 은 $10 \mu g/mL$ (2.2 μM)이었고, 독시시클린에 대한 IC_{50} 은 10 mM $CaCl_2$ 일 때, $2.5 \mu g/mL$ (5 μM)이었다.

[표 2]

전립선 암 세포에서 CMT-3 및 독시시클린에 의한 효소 억제

약제농도 (μM)	억제%				
	CMT-3		독시시클린		
	1 mM $CaCl_2$	10 mM $CaCl_2$	1 mM $CaCl_2$	10 mM $CaCl_2$	
ND	0.25	ND	31.5 \pm 1.2	ND	
ND	0.50		84.8 \pm 10.1	37.8 \pm 7.5	54.8 \pm 0.6 ^a
ND	1.0	96.7 \pm 4.6 ^a	45.1 \pm 2.9	77.4	0.0
ND	2.0	ND	51.2 \pm 2.6	ND	ND
ND	5.0	97.2 \pm 2.9	52.4 \pm 3.5	ND	64.3
± 19.5	10	100	69.9 \pm 10.5	91.2 \pm 3.3	75.5
± 3.3	20	ND	78.9 \pm 11.4	ND	85.1
± 3.5	50	ND	94.2 \pm 3.3	100	93.2
± 2.7	100	ND	ND	ND	91.2 \pm
2.6					

^a. 억제제 없이(무처리) 1mM $CaCl_2$ 의 존재하의 전체 젤라티나아제 활성은 $18.95 \pm 3.18 \text{ ng [H]}^3$ 젤라틴 소화/분/투석된 매질의 mL이다.

^b. 억제제 없이 10 mM $CaCl_2$ 의 존재하의 전체 젤라티나아제 활성은 $48.92 \pm 2.7 \text{ ng/min/mL}$ 이다.

다음에, CMT-3 및 독시시클린이 두 가지 주된 유형의 젤라티나아제인 젤라티나아제 A(MMP-2) 및 젤라티나아제 B(MMP-9)의 생성에 차별적으로 영향을 미치는지에 대하여 연구했다. TSU PR1 및 MAT LyLu 세포의 합류 배지를 혈청이 없는 배지에서 48시간 동안 여러 가지 농도의 독시시클린 및 CMT-3와 함께 배양했다. 이어서, 상기 조절된 배지를 후술하는 바와 같이 효소분석법으로 MMP에 대하여 분석했다.

독시시클린 또는 CMT-3에 의해 2일 간 처리되었던 배지로부터 조절된 배지를 수거하였다. 이어서, 배지를 실온에서 30분간 겔 전기이동 시료 완충액과 함께 배양한 다음 젤라틴(1 mg/mL)을 함유하는 SDS-폴리아크릴아미드 겔(8%)상에서 겔 전기 이동에 의해 분석했다. 전기이동 후, 상기 겔들을 30분 간 0.25% TRITON^R x 100을 이용하여 각각 씻고, 30 mM NaCl, 1 mM PMSF, 10 mM $CaCl_2$, 2 μM $ZnSO_4$, 0.005% Brij 35, 및 0.02 NaN_2 를 함유하는, 20 mM Tris-HCl를 포함하는 MMP 소화 완충액에서 37 $^{\circ}C$ 로 18시간 동안 배양했다(Lokeshwar 1993a 참조). 배양 후, 상기 겔들을 증류수에서 간단히 씻고, 40% 이소프로판올 용액에서 제조한 0.25% Coomassie 브릴리언트 블루 R250으로 1시간 동안 채색했다. 겔들을 7% 아세트산을

이용하여 탈색시키면, 겔에서 MMP의 장소는 소화된 젤라틴을 나타내는, 푸른색 바탕에 투명한 영역으로 보였다.

그 결과들이 도 1a 내지 1d에서 보여진다. 두 개의 세포계로부터 유도한 조절된 배지는 주로 MMP-2 및 MMP-9를 함유했다. 상기 TSU PRI 배지는 숨어있는 형태의 상기 두 개의 효소를 주로 함유한 반면에(도 1a 및 1b), MAT LyLu 배지는 활성화된 MMP-2를 함유하지만 MMP-9는 약간 함유했다(도 1c 및 1d).

둘 모두의 약제들은 MMP-2 수준의 투여량-의존 감소를 나타냈다. 그러나, CMT-3은 독시시클린보다 더 낮은 농도에서 MMP-2 및 MMP-9 수준을 감소시켰다. 또한 MMP-9 수준은 독시시클린 농도가 증가하여도 별로 감소되지 않았다. 두 개의 테트라시클린 화합물의 농도의 증가에 따른 MMP수준의 감소는 모든 레인(lane)에 동일한 전체 량의 단백질이 채워지기 때문에, MMP에 대하여 특이성이 있다.

실시에 2-6

하기의 실시에 2-6에 있어서, 하기의 물질 및 방법에 이용되었다:

약제: 화학적으로 변형된 테트라시클린 화합물을 공지의 방법에 따라 제조하였다. 여러 가지의 CMT들의 합성이 광범위하게 보고되었다. 예를 들어, Mitscher(1978) 참조. 하기의 CMT들을 평가했다:

4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 테트라시클리노니트릴(CMT-2), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7), 및 6- α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8). 동물 연구에 사용되는 고정제된 CMT-3(93-98%)을 펜실베이니아주 뉴우타운 소재의 CollaGenex, Inc.로부터 입수하였다. 독시시클린을 미저리주 세인트루이스 소재의 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였다. 중앙 기초막의 용해된 제제인 매트릭겔(Matrigel)을 매릴랜드주 베드포드소재의 Collaborative Research로부터 입수했다. Boyden Chemotaxis 평가분석 챔버(Transwells)를 메사추세츠주 보스턴 소재의 Costar/Corning Corp.로부터 입수하였다. 모든 다른 시약들은 Sigma Chemical Co.로부터 입수하였다.

세포 및 중앙계: 사람의 전립선 암세포인 PC-3, DU-145, 및 LNCaP를 미합중국 메릴랜드 록크빌 소재의 미국종균협회(ATCC)로부터 입수했다. 또한, 사람의 전이 전립선 암세포계인 TSU PRI 및 ALYA101, 및 비중앙형성 전립선 세포계인 BPH-1을 사용했다(Lokeshwar 1995b; Hayward(1995) 참조). 상기 배지들을 10% 태아소 혈청 및 10 μ g/mL 젠타마이신과 함께 RPMI-164 매질로 이루어진 충분한 매질에서 유지했다. Dunning MAT LyLu 쥐 중앙계는 Copenhagen 쥐에서 림프 결절 및 폐로 전이하는 안드로겐-비감수성 전립선 중앙 모델이다. MAT LyLu 세포를, 부가된 250mM 맥사메타손과 함께 충분한 매질에서 유지했다.

중앙 발생 및 처리:배양 플라스크로부터 MAT LyLu 세포를 수득하고, 2x10⁵ 내지 2x10⁶ 세포/mL를 함유하는 0.5mL 현탁액을 성숙한 Copenhagen 쥐(인디애나주 인디애나폴리스에 소재한 Harlan Sprague Dawley)의 등측면에 접종했다. 상기 쥐의 중앙은 250-300 g이었고, 나이는 90-100일 이었다. 상기 중앙 세포의 주입 후 3일부터 주사부위 주위의 피부를 손으로 만져서 중앙을 탐지했다(Lokeshwar 등, 1995a 참조).

생체내 약물치료 : 독시시클린 및 CMT-3을 가용성 형태의 카르복시메틸 셀룰로오스(Sigma Cat. No. C-5678)의 2% 수용액에 용해시키고, 새로운 용액을 매일 만들었다. 쥐들에게 1mL의 상기 약물 용액(하기에 제시된 농도), 또는 매개체(2% 카르복시메틸 셀룰로오스)를 매일 먹였다. 중앙 성장을 일주일에 3회 기록하고, 쥐들의 중앙을 1주일마다 측정했다. 중앙 성장에 관한 여러 가지 치료 효과를 캘리퍼스를 사용하여 모니터 하였고, 그 체적은 타원면(즉, 체적=길이x폭x높이x0.5236)에 가까웠다(Lokeshwar 등 1993b 참조). 중앙을 갖는 쥐에 있어서, 중앙 성장을 각각의 시간에 대한 중앙 체적의 회귀 분석에 의하여 측정했다. 이어서, 각각의 처리 그룹에 대한 평균 중앙 성장 속도(고정된 체적에 도달하는 시간)를, INSTAT 통계학적 프로그램(캘리포니아주 샌디에고에 소재한 Ravitz Software)를 사용하여 치료 효능의 통계학적 중요성을 평가하기 위해 사용했다. 중앙 체적이 $\geq 10\text{cm}^3$ 에 도달하면 쥐들을 안락사 시켰다. 동시에 쥐들을 부검하고, 중앙 및 폐를 제거하여 Bouin's 염착제에 고정시켰다. 폐의 육안으로 보이는 중앙 병소를 분석용 현미경으로 계산했다.

실시에 2

생체 내에서 전립선 암세포 증식에 관한 CMT의 효과

전립선 중앙 세포계에 대한 CMT의 세포특성을 측정하기 위하여 TSU-PRI 세포(및 다른 중앙 세포계의 세포)을 충분한 매질에서 24시간 또는 48시간 동안 여러 가지의 CMT 또는 독시시클린에 노출시켰다. 트립판 블루색(trypan blue staining) 후 세포의 수를 세어서 세포 생존능력(살아있는 세포의 %)을 평가했다. 또한, 테트라졸륨 염료 감소 평가분석(MTT 평가분석)을 이용하여 세포 생존 능력을 평가했다(Lokeshwar 등, 1995b 참조). 암세포들의 공격적인 증식 능력 때문에, 생존 가능한 세포들은 활성적으로 증식되는 것으로 판단된다. 따라서, 생존능력의 측정을 증식의 평가로 사용했다. 결과들은 세 개의 분리된 실험으로부터 얻은 평균 \pm SEM으로 표시된다.

독시시클린 및 몇몇의 CMT들이 세포 생존능력을 감소시켜서 시험관내에서 세포증식을 억제하는 것으로 발견되었다. 세포증식의 억제는 약물농도 및 노출 기간에 비례하지만, 화합물마다 상당히 변화하였다. 특히, CMT-2 및 CMT-3는 독시시클린보다 아주 더 독성이 있었다. 두 개의 사람의 전립선암 세포계인 DU-145 및 TSU-PRI 에 있어서, 여러 가지의 CMT에 대한 50% 억제 투여량(IC₅₀)은 2.7 μ g/mL(CMT-3, 48시간 노출) 내지 120 μ g/mL(CMT-6)였다. CMT-2에 대한 IC₅₀은 5.7 μ g/mL였다. CMT-5는 억제력이 없었

다. 세포계 LNCaP, TSU PR1 및 MAT LyLu에 대한 대표적인 결과들이 제시되는데, CMT들이 독시시클린과 함께 테스트되고(도 2a-2c), 세포계 DU-145, PC-3, BPH-1 및 FHS733(사람의 정상적인 섬유아세포계)에 대하여 테스트되었다(도 3a-3d).

실시예 3A

시험관내에서 MATLyLu 세포에 관한 CMT의 효과

독시시클린 및 몇몇의 CMT들(CMT-2, CMT-3, 및 CMT-6)를 시험관내에서 Dunning MATLyLu 세포에 대하여 테스트하는 때 유사한 결과들이 얻어졌다. 세포 생존능력을 평가하기 전에 Dunning MAT LyLu 세포를 상기 약물에 24시간 또는 48시간 동안 노출시켰다. 약물에 노출시킨 후, 트립판 블루 채색하여 세포 생존능력을 평가했다. 이러한 연구결과가 도 4a(24시간) 및 도 4b(48시간)에서 요약된다. 데이터는 세 개의 분리된 실험으로부터 얻은 평균 \pm SEM으로 제시된다. CMT-3 및 CMT-2는 이러한 평가분석에 있어서 가장 효과적인 세포증식 억제제였다.

실시예 3B

시험관내에서 전립선암 세포 증식에 관한 CMT-3의 효과

상술한 데이터에 근거하면 시험관내에서 테스트된 모든 CMT들 중에서 CMT-3가 가장 효능 있는(가장 세포독성인) 것으로 보인다. 이러한 관찰을 확인하기 위하여, 사람의 일반적인 전립선 암세포계에 대한 CMT-3와 독시시클린의 세포독성들을 비교했다. 상술한 MTT 평가분석 및 Lokeshwar 등(1995a)가 설명한 세포 티미딘 혼입 평가분석을 사용하여 세포독성을 측정했다. 상기 두 평가분석을 사용하여 얻은 50% 성장억제(GI_{50})값들은 동일했다. 하기의 표 3에서 요약되는 데이터에서 보여지는 바와 같이, CMT3는 독시시클린에 비해 세포독성이 2배 내지 8배 더 낮았다.

[표 3]

전립선 암세포계에 대한 CMT-3 및 독시시클린의 세포독성

암세포계 (복제 실험의 수)	세포독성 GI_{50} (μ M)	
	독시시클린	CMT-3
ALVA 101(4)	36.6 \pm 2.42	6.82 \pm 0.75
BPH-1(3)	21.3 \pm 5.4	10.53 \pm 3.7
DU 145(8)	43.6 \pm 9.36	5.06 \pm 1.18
LNCaP(5)	13.86 \pm 2.97	5.0 \pm 2.1
MAT LyLu(7)	20.0 \pm 6.4	5.2 \pm 1.9
PC-3(5)	36.4 \pm 2.5	10.56 \pm 2.1
TSU PR-1(5)	41.0 \pm 1.1	14.74 \pm 2.64

세포증식(무처리의 %)에 대한 \log (투여량)를 사용하여 각각의 실험에서 발생하는 투여량-응답 커브의 선형 회귀로부터 성장억제를 계산했다. 상관계수(γ)는 항상 ≥ 0.95 였다. 결과들은 각각의 실험으로부터 계산된 최소한 3개의 GI_{50} 의 평균 \pm 으로 제시된다.

실시예 4

전립선 암세포의 침입/전이 가능성에 대한 CMT의 효과

특정한 CMT를 이용하여 전립선 암세포를 처리한 결과, 상기 세포가 중앙 기초막의 인공 구조물에 침입하려는 능력이 상당히 억제되었다(Lokeshwar 등 1996 참조), 이러한 방법에 있어서, Boyden 주화성 평가분석 챔버(Costar Transwell plates)의 상부 챔버에 4×10^5 종양세포들을 플레이트했다. 상기 챔버의 바닥면은 0.5mm 두께의 매트릭셀 층이 덮여있는 12μ m -공극 폴리카보네이트 필터였다. 상기 바닥부의 웰(well)은 화학흡인물질, 사람의 폐 섬유아세포계(ATCC No. HTB-157)인 FHS 733 세포로부터의 무혈청 배지-조절된 매질을 함유했다. 암세포(4×10^5)를 상기 플레이트의 상부 웰에 플레이팅했다. 독시시클린 또는 CMT를 5μ g/mL로 무혈청 매질에 희석하여, 상기 상부 및 바닥부 챔버 둘 모두에 부가했다. 무처리 웰은 0.1% 디메틸 술폰(DMSO, 희석제)만을 함유했다. 48시간 배양한 후, 상기 상부 및 하부 웰 둘 모두에 MTT(0.5μ g/mL)를 부가하고, 4시간 동안 계속 배양했다. 다음에 웰들을 비우고, 상기 필터의 하부 면으로부터의 세포들을 필터팁을 이용하여 바닥부 웰에서의 세포들과 합쳤다. 상기 및 바닥부 웰로부터의 상기 환원된 MTT(포름아잔)를, DMSO를 이용하여 방해 용해시키고, 515nm에서 흡수도(O.D)를 측정했다. 전체의 O.D.(즉, 상부+바닥부 웰의 O.D.)에 대한 바닥부 웰로부터의 O.D.의 비를 침입 가능성으로 취한다. 이러한 과정은, 몇몇의 무작위 적으로 선택되는 광학계(optical field)로부터 필터의 바닥면의 세포

들을 집계하는 예전의 보고서(Albini 등, 1987)에서 사용된 것 보다 일관되게 우수했다. 또한, 상기 MTT 평가분석 과정은 평가동안에 약물의 세포독성 효과로 인한 동시적 억제를 정상화한다. 세 개의 독립된 실험으로부터 얻어진 결과들이 제시된다.

TSU-PRI 및 Dunning MAT LyLu 세포의 침입 가능성에 대한 CMT-3 및 기타 테트라시클린 화합물의 효과를 매트릭셀 평가분석(Matrigel assay)을 이용하여 평가했다. 도 5a에서 도시한 바와 같이, 상기 화합물이 침입 활성을 억제하려는 능력은 상당히 변화했다. TSU-PRI 세포의 침입/전이 가능성에 있어서 CMT-3가 가장 효능 있는 억제제였고, CMT-7은 최소한의 효능이 있는 억제제였다. CMT들은, TSU-PRI 세포의 매트릭셀 침입의 단지 적당한 ($8 \pm 1.8\%$) 억제만을 일으키는 일반적인 테트라시클린, 즉 독시시클린과 비교하여 놀라운 정도의 효과가 있었다. 특히, 여러 가지의 CMT들에 대하여 계산된 50% 억제 투여량 (IC_{50})은 CMT-3의 경우의 $1.7 \pm 0.31 \mu\text{g/mL}$ 에서 CMT-7의 경우의 $>100 \mu\text{g/mL}$ 까지 변화하였다. 독시시클린은 TSU PRI 세포에 대하여 별로 억제력이 없었다($IC_{50}=27 \pm 4.3 \mu\text{g/mL}$). 다른 세 가지의 사람의 전립선 암세포 계(DU 145, PC-3, 및 ALVA 101)의 침입에 대한 CMT-3 및 독시시클린의 IC_{50} 값은 TSU PRI 과 동일한 범위였다.

상기 Dunning 세포에 있어서, CMT-2 및 CMT-3 둘 모두는 매트릭셀 침입을 동등하게 억제했다. 도 5b 참조, 또한, 독시시클린은 48시간에 걸쳐서 상기 Dunning MAT LyLu 세포의 침입/전이 가능성을 상당히 억제했다($68 \pm 4.2\%$). 침입 가능성의 중대한 억제를 달성하기 위해서는 상기 억제제들이 연속적으로 존재할 필요가 있었다. CMT-3를 이용하여 48시간 동안 예비처리한 후 침입 챔버의 약물을 제거한 결과, 침입 가능성에 보통의 영향만이 미쳐졌다.

무처리 웰(0.1% DMSO)에서 48시간 침입 평가분석 결과, 하기의 침입 지수가 얻어졌다: TSU-PRI 세포에 대하여는 22 ± 8.3 및 MAT LyLu 세포에 대하여는 $17 \pm 4.2\%$.

실시에 5

MAT LyLu 종양 성장 및 폐 전이에 관한 CMT-3의 효과

생체 내에서 CMT-3 및 독시시클린의 항 종양 활성을 테스트했다. 이러한 일련의 실험에 있어서, 테스트 동물에서 종양 세포를 주입한 날에 약물의 투여를 개시했다. 1×10^6 종양 세포의 피하조직 주사에 의해 종양 성장을 개시했다.

종양은 6일까지는 주사된 동물의 50% 이상에서, 그리고 12일 까지는 100%의 동물에서 손으로 만져질 수 있었다($\geq 0.1 \text{ cm}^3$). 종양은 체적이 신속하게 증가하여, 주입 후 15일에는 $>10 \text{ cm}^3$ 까지 도달하였다. 3 cm^3 의 체적에 도달하는 시간으로 측정되는 종양 성장 속도는, 20 mg/kg 또는 40 mg/kg 의 농도로 독시시클린 또는 CMT-3으로 처리한 쥐와 매개체(카르복시 셀룰로오스의 2% 용액)만을 제공한 쥐의 사이에서 상당히 변화하였다. 종양 체적의 회귀 분석 결과, 무처리 그룹과 독시시클린 및 CMT-3 처리 그룹사이의 1차 종양 성장에는 중대한 차이가 없었다. 구체적으로, 세포의 주사와 3 cm^3 종양의 성장사이의 기간은 무처리 그룹에 있어서는 13.57 ± 2.12 일이고 CMT-3 처리 그룹에 있어서는 14.0 ± 1.9 일이었다. 무처리 그룹뿐 아니라 약물-처리 그룹으로부터의 모든 종양은 종양이 10 cm^3 이상까지 성장함에 따라 높은 괴사성의 중심을 발생했다.

Bouin's 염착제에 고정된 폐에서 전이성 종양 병소(MTF)가 확인되었다. 대부분의 상기 MTF는 모든 처리 그룹에 있어서는 직경 1 mm 미만이었다. 도 6은 폐에서 전이 병소의 수(평균 \pm SEM)를 보여준다. 도 6에서 예시된 바와 같이, 무처리 그룹은 59.5 ± 13.9 MTF/쥐(평균 \pm SD)를 나타냈고, 낮은 투여량(20 mg/kg) 및 높은 투여량(40 mg/kg) 독시시클린 처리 그룹에 있어서는 단지 39.7 ± 17.2 또는 43.6 ± 18.8 MTF/쥐를 나타냈다. 고투여량 CMT-3-처리 그룹(10 mg/kg , 즉 40 mg/kg)은 28.9 ± 15.4 MTF/쥐로서 MTF를 상당히 감소시켰는데, 이는 무처리 그룹과 비교하여 MTF를 51% 감소시킨 것이다($p < 0.01$, Tukey Kramer Multiple 비교 테스트). 폐 부위의 이력적 연구결과, 여러 가지의 처리 그룹은 종양 병소에 있어서 어떠한 뚜렷한 차이도 나타내지 않았다.

실시에 6

종양 성장 및 전이에 관한 예비처리 효과

또다른 일련의 실험에 있어서, 숙주 동물에게 약물을 예비 투여하는 것이 종양 성장 및 전이에 영향을 줄 수 있는지에 대하여 연구했다. MAT LyLu 종양세포(2×10^5 세포/동물)를 주사하기 7일 전에 무처리 또는 약물(독시시클린 또는 CMT-3; 30 mg/kg)을 매일 투여하고 이러한 투여를 전체 21일 동안 계속했다.

이러한 스케줄을 사용하여, 종양 발생률 및 암 성장 속도가 감소됨을 확인하였다. 10 g-변형 체적 측정의 선형 회귀분석에 의해, 종양 체적을 일주에 3회 측정하여 종양 성장 속도를 계산했다(Dudak 등, 1996참조), 다음에, 이러한 방법에 따라 측정된 종양 성장 속도를 Tukey-Kramer 다중 비교 테스트에 따라 테스트하여 처리 그룹이 무처리 그룹과 상당히 차이가 있음을 확인하였다.

도 7a에 도시한 바와 같이, 세 개의 독립된 실험에 있어서 종양 발생률은 무처리 그룹 및 독시시클린-처리 그룹에 있어서는 $>90\%$ 였다. 그러나 놀랍게도, 네 개의 분리된 실험에 있어서 CMT-3-처리 그룹의 종양 발생률은 $28\%(2/7)$ 에서 $85\%(6/7)$ 까지 변화하였다. 따라서, 종양 발생률이 무처리 또는 독시시클린-처리 그룹에 비해 $55\% \pm 18$ 정도로 상당히 저하되었다. 1차 종양 발생률이 없는 쥐들은 종양이 없는 상태로 6개월 동안 유지된 다음, 안락사 되었다. 주사 부위 또는 폐에서, 이력적으로 확인 가능한 종양 병소가 관측되지 않았다. 또한, 더 높은 순도의 CMT-3의 제제는 종양 발생률을 43% 까지 감소시켰다. 따라서, 상업적으로 입수 가능한 테트라시클린, 즉 독시시클린이 아니라 오직 CMT-3만이 1차 종양 발생률의

상당한 억제를 나타냈다.

그 밖에, 측정 가능한 종양을 전개한 CMT-3-처리그룹의 쥐들 가운데서($\leq 50\%$), 종양 성장속도(3 cm^3 의 종양 체적에 도달하는 시간)는 무처리 그룹(15.9 ± 2.0) 또는 독시시클린-처리 그룹(16.7 ± 1.9 일)에 비해 상당히 더 느렸다(20.2 ± 3.5 일) 상기 종양 성장 속도가 종양을 측정할 수 있는 동물들로부터 계산되었음은 물론이다. 따라서, 종양 성장에 관한 CMT-3의 전체 효과는 상기 데이터에 의해 제시되는 것 보다 더 컸다.

본 발명의 발명자들은, 두 개의 분리된 실험에 있어서 CMT-3(30%) 또는 독시시클린(20%)으로 처리한 쥐들에서 손으로 만져질 수 있는 종양의 뚜렷한 경감(즉, 종양 흡수; 종양 크기의 감소)이 있다는 사실에 특히 놀랐다. 상기 동물에 있어서, 종양은 1차 부위에서의 주사 후 8-10일까지는 손으로 만져질 수 있었지만, 체적이 증가하지 않고 4-7일 후에는 없어졌다. 1차 종양 발생물이 없는 쥐들은 8개월까지 종양이 없는 상태로 건강하게 보낸 다음에 안락사 하였다.

또한, CMT-3는 동물에게 예비 투여되는 경우 종양 전이를 억제했다. 도 7b 참조, 이러한 효과는 예비투여하지 않고 관찰한 것들과 비교될 수 있다. 처리된 동물의 MTF는 CMT-3-처리그룹은 46.3 ± 6.7 인 반면에 무처리 그룹은 74.2 ± 6.4 였다. 따라서, MTF는 37.5% 감소했다. 제시되는 데이터는 종양이 $>10\text{ cm}^3$ 의 크기까지 성장하는 모든 동물로부터 얻은 평균 \pm SD로 표시된다. 종양이 없는 동물로부터 제거한 폐에는 이력적으로 인식 가능한 전이가 없었다. 자극과민성, 광민감성, 모발손실, 또는 설사와 같은 통상적인 화학요법 약물치료의 대표적인 부작용은 상술한 테트라시클린 처리에 있어서는 전혀 관측되지 않았다. 정상조직에 대한 전체의 손상이 독시시클린 또는 CMT-3에 의해 발생되므로, 동물들의 체중을 치료 전, 치료 후 및 치료동안에 측정하고 모든 변화를 검사했다. 모든 실험에 있어서, 동물들은 상당한 체중 저하를 전혀 나타내지 않았다. 대신에, 실험이 종료되었을 때(처리 후 6개월 관찰기간), 체중이 3%(무처리 그룹) 내지 12%(CMT-3-처리그룹)증가하였다. 따라서, 본 발명의 방법은 암억제성 테트라시클린 투여량일 때 정상조직에 대하여 독성이 작고, 바람직하게는 독성이 실제적으로 없으므로 통상적인 항암 치료와 비교할 때 실제적인 이점을 갖는다.

실시에 7-10

실시에 7-10에 있어서, 하기의 물질 및 방법이 이용되었다:

세포 배지 및 유지: 사람의 흑색종 세포계인 C8161 세포를 10% 열불활성화 태아소 혈청(FBS; GIBCO) 및 0.1% 젠타마이신 설페이트가 보충된 Dulbecco's 변형된 Eagle's 매질(DMEM; GIBCO, 뉴욕주 그랜드 아이슬랜드에 소재함)에서 유지했다. GenProbe Rapid Detection System(일리노이즈주 시카고에 소재한 Fisher Scientific)를 사용하여 상기 세포들을 마이코프라스마 오염에 대하여 스크리닝했다.

화학적으로 변형된 테트라시클린: 2% 디메틸설폭사이드(DMSO)/물 pH10에서 수화시킨 다음, 1.0 M HCl을 이용하여 pH 7.4로 조절하여, 화학적으로 변형된 테트라시클린 화합물의 새로운 원료 용액(mg/mL)을 각각의 실험용으로 제조했다.

실시에 7

세포 증식에 관한 화학적으로 변형된 테트라시클린의 효과

DMSO(0.05%; Sigma Chem. Co.; 무처리) 또는 $5\mu\text{g}$ 의 독시시클린 또는 기타 CMT의 존재 하에 세 개의 24-웰 배지 디쉬(dish)의 각각의 디쉬의 웰당 1×10^5 의 C8161세포를 공급했다. 인산염 완충 염수(PBS, 마이너스 2가 양이온)에 용해된 2mM EDTA를 이용하여 24시간 후에 제 1플레이트로부터 세포를 수득하고, 48시간 후에는 제 2플레이트로부터, 그리고 72시간 후에는 제 3플레이트로부터 세포를 수득했다. 다음에, 각각의 화합물의 존재 하에 C8161에 대한 배가 시간(doubling time)을 측정하여 DMSO 처리세포(무처리)와 비교하였다.

플라스틱에서 C8161세포의 증식에 관한 CMT의 효과가 하기의 표 4에서 보고된다:

[표 4]

C8161 세포증식에 관한 테트라시클린 화합물의 효과

화합물	배가시간
DMSO	22시간
CMT-1	24시간
CMT-3	28시간
CMT-4	22시간
CMT-6	24시간
CMT-7	24시간
CMT-8	26시간
독시시클린	22시간

나타낸 바와 같이, CMT-4 및 독시시클린은 플라스틱에서 C8161의 배가시간에 영향을 미치지 않았

는데 CMT-1, CMT-6 및 CMT-7은 배가시간을 약간 증가시켰고, CMT-8 및 CMT-3은 배가시간을 크게 증가시켰다.

실시예8

젤라틴-혼입 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기이동(효소분석)

DMEM플러스 Mito+ 및 0.1% 젠타마이신 선펜이트에 용해된 라미닌/콜라겐 IV/젤라틴 기질이 코팅된 12-웰 디쉬의 웰 당 6×10^5 의 C8161세포를 공급했다. 약 1시간 점종하여 세포들을 부착시킨 후, 웰당 50mg/mL의 독시시클린 또는 기타 CMT들 중 하나의 CMT를 부가한 다음에, 상기 디쉬를 37°C의 촉촉한 5% CO₂ 배양기에 두었다. 24시간 후, 상정액을 제거하고 원심분리하여 어떠한 세포 또는 부스러기를 제거하였다. 환원제를 뺀 1배 체적의 Laemmli 시료 완충액을 두배 체적의 상기 매질에 부가하고, 상기 시료를, 예비가열 또는 비등시키지 않고 0.1% 젤라틴을 함유하는 10% SDS-PAGE(동일한 수의 세포/매질체적/배양시간에 근거하여 표준화한 시료)에 전기 이동시켰다. 전기이동 후, 상기 겔을 50mL Tris-HCl (pH 7.5)+2.5% TRITON^{??} x100+최초 처리에 사용되는 상응하는 CMT 50mg/mL에서 30분간 실온으로 완만하게 교반하면서 씻었다. 다음에, 상기 겔을 50mg/mL의 상응하는 CMT를 또한 함유하는 배양 완충액(50mM Tris-HCl /10mM CaCl₂/150mM NaCl /0.05% NaN₃)에 두고 37°C로 20-24시간 동안 배양했다. 상기 겔을 Coomassie BBR-250으로 채색한 다음, 세척액이 맑아질 때까지, 물에 용해된 10% 메탄올/10% 아세트산을 이용하여 탈색했다. 비디오 카메라 및 Snappy Video Snapshot 시스템(캘리포니아 란코 코르도바에 소재한 Play Inc.)을 이용하여 상기 겔의 네가티브를 디지털화 했다. 소프트웨어 Image PC8α(the National Institutes of Health로부터 입수 가능함)를 사용하여 각각의 투명한 단백질 분해영역에 대한 통합 밀도를 측정하고, 기록되는 젤라틴 분해활성의 상응하는 변화를 1.0의 값으로 표준화한 무처리 시료와 비교하였다.

상기 화합물로 처리한 C8161 세포로부터 얻은 조절된 배지에서 젤라틴분해 활성의 상대량을 효소분석법(zymography)으로 측정하고, 아래의 표 5에서 나타난 바와 같이 농도 분석에 의해 상기 무처리 시료의 활성량에 대하여 정량화 했다.

[표 5]

자이모그램의 농도 분석

화합물	젤라티나아제 A	젤라티나아제 B
무처리	1.00*	1.00*
독시시클린	0.26	0.40
CMT-1	0.24	0.22
CMT-2	0.89	1.51
CMT-3	0.22	0.03
CMT-4	0.75	0.12
CMT-6	0.07	0.51
CMT-7	0.17	1.22
CMT-8	0.70	1.05

* 이미지 분석 소프트웨어 이미지 PCα(NIH)를 사용하여 무처리 시료의 1.00의 값으로 표준화한 디지털화 네가티브의 통합밀도.

각각의 상기 화합물을 이용하여 C8161세포를 처리한 결과, 11 내지 93%(CMT-2<CMT-4<CMT-8<독시시클린<CMT-1<CMT-3CMT-7<CMT-6)의 범위에 걸쳐서 젤라티나아제 A의 세포외 활성 수준이 감소하였다(표 5). 또한, 상기 5개의 화합물을 이용하여 세포를 처리한 결과, 47% 내지 97%(CMT-6<독시시클린<CMT-1<CMT-4<CMT-3)의 범위에 걸쳐서 젤라티나아제 B의 세포외 수준이 감소하였다. 상기 3개의 CMT로 처리한 결과, 젤라티나아제 B의 세포외 수준이 감소하였다(5 내지 51%; CMT-8<CMT-7<CMT-2).

실시예 9

생체내 침입 평가분석

상술한 바와 같은 변형된 Boyden 챔버(Membrane Invasion Culture System, MICS)를 사용하여 무처리(DMSO) 및 화학적으로 변형된 테트라시클린 처리 세포의 생체내 침입 가능성을 측정했다. 이러한 연구를 위하여, 사람의 라미닌/콜라겐 IV/젤라틴의 한정된 기질(미저리주 세인트루이스에 소재한 Sigma)이 코팅된 10μm 공극을 함유하는 폴리카보네이트 필터(캘리포니아주 리버모어에 소재한 Osmonics)로 이루어진 개재 장벽을 이용했다. Mito+를 함유하는 DMEM(메사추세츠주 베드포드에 소재한 Collaborative Biomedical; 즉 무혈청 매질)에 용해시켜서 챔버의 상부 웰내에 C8161 사람 흑색종 세포를 공급하고 37°C에서 촉촉한 5% CO₂ 배양기에 부착했다. 다음에, 독시시클린 및 개개의 CMT들을 공급 후 2시간째에 그리고 평가분석 동안 매일 3, 20 또는 50μg/mL로 챔버의 상이한 웰들에 부가했다. 48시간 후, 하부 웰로부터 세포들을 제거하여 침입 세포의 수를 측정하고 상기 상부 웰에 공급된 세포들의 최초 수와

비교하였다. 적절하다면, 시험관내 평가분석 동안 증식 데이터를 보정했다.

세 개의 상이한 농도(범위: $3\mu\text{g/mL}$; $20\mu\text{g/mL}$; $50\mu\text{g/mL}$)의 독시시클린 및 CMT가 C8161세포의 시험관내 침입 가능성에 미치는 효과가 도 8도에서 보여진다. 이러한 데이터는 아래의 표 6에서 요약된다.

[표 6]

라미닌/콜라겐 IV/젤라틴 기질-코팅된 필터를 통한 C8161세포의 침입 가능성의 억제

화합물	억제 %	억제유형
독시시클린	12-79%	투여량 의존
CMT-1	26-58%	투여량 의존
CMT-2	-10%	투여량 비의존
CMT-3	35-74%	투여량 의존
CMT-4	-20%	투여량 비의존
CMT-6	8-50%	투여량 의존
CMT-7	15-55%	투여량 비의존
CMT-8	-12%	투여량 비의존

실시에 10

시험관내 전이 평가분석

면역억제 마우스(Harlan Sprague Dawley로부터 입수한 무흉선 결절/결절 SCID 암컷)를, 마이크로 아이솔레이터 톱(microisolator top)을 갖는 오토클레이브 케이지(autoclaved cage)에 가두고, ABQ살균제를 이용하여 후드, 글러브 및 케이지를 구석구석까지 닦은 후 층류 후드(laminar flow hood)에서 상기 동물의 모든 조작을 수행했다. 상기 마우스에게 살균 Pico Lab Chow(Purina) 및 고압처리 세인트루이스 수돗물을 먹였다. 일주일 내내 오전 7:00시에서 8:00시 사이에, 살균된 1회용 동물용 사료 공급 바늘을 이용하여 독시시클린 또는 CMT를 2% 카르복시메틸 셀룰로오스를 함유하는 살균수에 타서 상기 마우스에게 매일 위내 투여했다. 상기 화합물 및 무처리물(살균수+2% 카르복시메틸 셀룰로오스)를 알루미늄 포일로 싸서 -80°C 로 저장하여 어떤 빛 유도변화를 방지하고, 사용하기 바로 전에 해동시켰다.

네 개의 화합물, 즉 40 및 100mg/kg 의 CMT-1, CMT-3 및 CMT-7 및 40mg/kg 의 CMT-8을, 꼬리 정맥을 통해 정맥내 주사된 C8161 세포의 전이 가능성에 대한 효과에 대하여 테스트하고, 무처리물과 비교하였다. 100mg/kg 투여량을 얻기 위해 사용되는 병에 들어 있는 화합물의 농도는, 40mg/kg 투여량의 경우의 농도의 2.5배이므로 두 경우에 있어서 대략 동일한 체적, 즉 약 0.5mL /동물의 체적이 사용되었다. -4 일째 되는 날 그룹당 9마리의 동물을 이용하여 실험을 출발했다. 0일째 되는 날, 차가운 Hank's Balanced Salt Solution(HBSS)중의 2×10^5 C8161세포들을 꼬리 정맥 접종을 통해 정맥내 주사했다. 24시간 더 실험을 계속한 다음, 동물들을 죽이고 그 폐를 제거하고 Bouins/포름알데히드(5부; 1부)의 용액에 고정시켰다. 폐를 회전시키고 6x 배율유리를 이용하여 각각의 폐엽상의 종양의 수를 세어서 폐의 전체 표면상의 종양을 정량화했다. Microsoft's Excel 스프레드시트 소프트웨어를 사용하여 통계학적 분석을 수행했다.

두 가지 상이한 농도의 CMT-1, CMT-3, CMT-7 및 CMT-8이 SCID 마우스에서 C8161의 전이 가능성에 미치는 효과가 아래의 표 7에서 제시된다.

[표 7]

화합물	투여량	폐전이의 수/마우스*	범위	마우스의 수(n)	$p_{\text{값}}^{\dagger}$
무처리	0.5 mL 매개체**	231 ± 49	120 내지 >250	7	
CMT-1	40mg/kg	129 ± 102	3 내지 >250	9	0.023
	100mg/kg	240 ± 28	165 내지 >250	5	0.647
CMT-3	40mg/kg	111 ± 105	4 내지 >250	9	0.033
	100mg/kg	176 ± 82	9 내지 >250	5	0.141
CMT-7	40mg/kg	136 ± 107	63 내지 >250	6	0.169
	100mg/kg	166 ± 101	11 내지 >250	5	0.157
CMT-8	40mg/kg	186 ± 60	124 내지 >250	7	0.184
	100mg/kg	(하기의 주 참조)			

SCID 마우스에서 C8161 세포의 전이 가능성에 대한 CMT의 효과

* 평균 \pm SEM

+ 무처리와 비교한 $p < 0.05$ 는 상당한 차이가 있는 것으로 간주됨.

** 2% 카르복시메틸 셀룰로오스를 함유하는 살균수.

주: 이러한 그룹의 마우스들은 섭식 처리된 것이 처음이었고,

기술적인 어려움 때문에 생존하지 않았음.

CMT-1 또는 CMT-3를 동물에게 경구 투여한 결과, 40mg/kg($p < 0.05$)로 매일 투여되는 경우에는 SCID 마우스 모집단에서 폐전이의 수가 상당히 감소되었지만, 100mg/kg투여량일 때는 폐 전이의 수가 별로 감소되지 않았다. 화합물 CMT-7 및 CMT-8은 상기 두 경우의 투여량($p > 0.05$)일 때 폐 전이의 수를 중대하게 감소시키지 않았다.

실시예 11

암세포에 대한 테트라시클린 화합물의 차별적인 세포독성

몇몇의 암세포계 및 정상세포를 시험관내에서 연구하여 테트라시클린 화합물이 독성(세포죽임) 효과를 나타내는 지에 대하여 측정했다. 세포에서의 레독스 활성화에 근거한 배양세포의 생존능력에 대한 통상적인 평가분석을 이용했다(Page 등 1993 참조). 상기 평가분석은 세포가 전자 운반 활성을 가질때에만 형광 레드 생성물로 전환되는 발형광 지시 염료인 레독스 염료 Alamar Blue를 사용한다.

표준적인 37세 남성의 생검으로부터 얻은 보통의 전립선 간질세포 및 세 개의 전립선 종양 세포계 즉 LNCAP, DU-145 및 PC-3로부터 얻은 배양 세포를, 테스트 화합물에 대한 노출시에 상기 세포 유형들 사이의 증식 활성의 차이가 최소화되도록 다중 웰 마이크로플레이트에서 합류점까지 성장시켰다. 상기 웰에 10 μ M 및 20 μ M(DU-145의 경우에는 50 μ M)의 농도로 CMT-3를 부가했다. 실험의 출발시 및 다시 1, 2 및 3일째에, 선택된 웰들을 상기 지시 염료와 함께 3시간 동안 배양하고 Cytofluor 2300 형광 마이크로플레이트 판독기에서 형광을 측정했다. 그 결과가 도 9a-9d에서 요약된다.

정상 전립선 간질 세포는 CMT-3의 투여량에 상관없이 3일 동안에는 형광변화를 실제적으로 나타내지 않았다(도 9a). 1일째에, CMT-3에 노출되지 않은 간질세포에서 약간 증가가 있는 것은 연구되는 상이한 세포들 사이의 증식 활성의 현저한 차이의 복잡성이 포함되는 것을 회피하려는 본 발명자들의 의도를 지지하는 것이다. LNCAP는 제한된 증식조건하에서도 CMT-3에 아주 민감한 것으로 입증되었다. 세포 독성은 20 μ M일 때에는 24시간 이내에 충분해지고 10 μ M CMT-3에서는 24시간이 되었을 때 거의 충분해진다(도 9b). PC-3 종양세포는 CMT-3에 대하여 어느 정도 덜 민감한데, 24시간에서 약 25%의 세포독성, 48시간에서 50%의 세포독성 및 72시간 후에 75%의 세포독성이 발생되었다(도 9c). DU-145 종양 세포는 덜 민감한데, 20 μ M에서 72시간 후에 어느 정도의 세포독성이 나타났다(도 9d). DU-145 세포들은 50 μ M에서 상당한 세포독성을 나타내며, 이러한 세포독성은 72시간의 테스트 기간동안에 점차적으로 전개된다. 50 μ M CMT-3에 노출된 정상 세포는 비교 가능한 세포독성을 나타내지 않는다.

CMT-3에 노출된 후 정상 간질 세포와 종양 세포의 사이에 세포 형태의 현저한 차이가 관측되었는데, 간질 세포에서의 변화는 관찰되지 않은 반면에 모든 종양 세포는 점차적으로 공포를 가지게 되었다.

실시예 12

암세포에 대한 테트라시클린 화합물의 세포독성

화학적으로 변형된 테트라시클린 화합물 및 독시시클린을 두 개의 암종, 즉 COLO 205(사람의 대장암-유도세포계) 및 MDA-MB-231와 E-10클론(사람의 유방암-유도 세포계)에 대한 세포독성에 대하여 테스트했다. 테트라졸륨 염(MTS)을 이용하는 통상적인 생존능력 평가분석법을 이용하여 세포독성을 측정했다. 5 μ M 내지 100 μ M의 농도로 CMT를 함유하는 매질에서 세포를 2일 간 성장시켰다. 다음에, 상기 세포들을 MTS와 함께 7시간 동안 배양한 후, 상기 상부 매질을 제거하여, 살아있는 세포에 의해서만 발생하는 포름아잔 농도를 측정했다. 그 결과가 아래의 표 8A 및 8B에서 제시된다. 결과들은 상기 매질내의 측정된 포름아잔 농도의 감소%인 세포독성으로 나타내어진다. 'A' 및 'B'로 지정되는 두 개의 상이한 부분의 CMT-3가 테스트되었다.

[표 8A]

시험관내에서 COLO 205세포에 관한 CMT의 세포독성 효과

화합물	5 μ M	10 μ M	20 μ M	50 μ M	100 μ M
CMT-1	0	4	32.5	63.8	82.8
CMT-2	2.7	4.5	0	7	16.3
CMT-3	17	28.8	52	79	85.6
CMT-3	25.9	38.9	37	86.7	86.7
CMT-4	1.8	6.8	25.3	73.3	81.9
CMT-5	0	0	0	0	0
CMT-6	1.7	0	0	0	22.2
CMT-7	0	0	0	0	29.4
CMT-8	0	20.5	35.5	44.4	50
독시시클린	0	0	45.7	58.8	66.5

[표 8B]

생체내에서 E-10세포에 관한 CMT의 세포독성 효과

화합물	5 μ M	10 μ M	20 μ M	50 μ M	100 μ M
CMT-1	7.6	0	0	2.2	7.6
CMT-2	1.5	3.8	0.8	0	2.3
CMT-3	0	0	4.15	3	13.9
CMT-3	0	1.8	8.5	17.7	47
CMT-4	9	16.7	0.8	0	0
CMT-5	0	0	0	0	0
CMT-6	0	6	3	7.6	16.7
CMT-7	0	0	0	0	8.3
CMT-8	0	0	0	0	0
독시시클린	0	0	4.5	24.2	29.5

상기의 데이터로부터 테스트된 화합물 중에서 CMT-3가 가장 효능이 있고 또 CMT-1, CMT-4 및 CMT-8도 상당한 세포독성을 나타낸다는 것을 알 수 있다. 또한, 독시시클린도 어느 정도의 세포독성을 나타냈다.

실시에 13

암세포에 대한 테트라시클린 화합물의 세포독성

프로그래밍된 세포죽음(세포자멸사)의 관련을 측정하기 위하여, 화학적으로 변형된 테트라시클린 화합물의, 암세포에 대한 세포독성의 평가를 수행했다(Duke 등 1996 참조). MAT LyLu 세포를 여러 가지 농도의 CMT-3 및 독시시클린과 함께 배양했다. 제조자의 지시에 따라 Boehringer Mannheim GmbH로부터의 Cell Death Detection ELISA 플러스 키트(카다로그 번호 1774425)를 사용하여, 누클레오솜간 DNA 중단으로부터 얻어지는 가용성 누클레오솜에 대하여 조절 배지를 평가분석 했다. 투여량-의존시험에 있어서, 세포들을 테트라시클린 화합물과 함께 48시간 동안 배양한 다음, 매질을 수거했다. 다음에, 세포들을 0 내지 48시간의 특정한 시간 동안 테트라시클린 화합물에 노출시키고, 적절하다면, 매질을 수거하는 시점인 실험개시로부터 48시간이 될 때까지 새로운 매질에서 유지했다. 이러한 실험을 3회 수행했다. 대표적인 데이터가 도 10a 및 10b에서 보여진다.

도 10a에서 도시한 바와같이, CMT-3로 처리한 MAT LyLu 세포에서는 가용성 누클레오솜의 투여량-의존 증가가 관측되었지만, 독시시클린으로 처리한 세포에서는 상기 투여량-의존 증가가 관측되지 않았다. 실제로, 상술한 바와 같은 증식 평가분석법으로 측정하였을 때 50% 성장 억제 투여량(GI₅₀)을 초과하는 독시시클린 농도에서도 프로그래밍된 세포 죽음 발생은 별로 대단하지 않았다. 상기 매질내에 방출된 가용성 누클레오솜의 양은, 선택 영역에서 현미경으로 측정하였을 때 세포자멸사 세포의 부분에 직접 비례했다. 또한 도 10b에서 도시되는 바와 같이, MAT LyLu세포에서 추정되는 프로그래밍된 세포 죽음 응답을 유도하기 위해서는 CMT-3에 대한 단기간 노출(5 μ g/mL 또는 10 μ g/mL)만으로도 충분했지만, 이러한 응답은 독시시클린-처리세포의 경우에는 관측되지 않았다.

따라서, 지금은 본 발명의 바람직한 실시예라고 판단되는 것들이 기술되었지만, 본 발명의 정신을 일탈하지 않고 다른 실시예들이 만들어질 수 있고 청구의 범위에 속하는 것과 같은 모든 다른 변경 및 변화가 포함된다는 것이 당업자에게 명백해진다.

참조문헌목록

본원에 언급되어진 하기의 참조문헌들의 모든 개시내용을 참조한다:

Albini A, Iwamoto Y, Kleinman HK, Martin GR, Aaronson SA, Kozlowski JM, and McEwan RM, "A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells," *Cancer Res* 47:3239-3245 (1987).

Dean DD and Woessner JF Jr, "A sensitive, specific assay for tissue collagenases using telopeptide-free ³H-acetylated collagen," *Anal Biochem* 148:174-181 (1985).

Dean DD, Curry TE, LeMaire WJ, and Woessner JF Jr, "Determination of metalloproteinase activity after selective destruction of tissue inhibitor of metalloproteinases," *Trans 33rd Mtg Orthopedic Res Soc*, 12:248 (1987).

DeClerck YA, Shimada H, Taylor SM, and Langley KE, "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor progression," *Annals NY Acad Sci* 732:222-232 (1994).

Dudak SD, Lopez A, Block NL, and Lokeshwar BL, "Enhancement of radiation response of prostatic carcinoma by lonidamine," *Anticancer Res* 16:3665-3672 (1996).

Duke RC and Cohen JJ, "IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells," *Lymphokine Res* 5:289-299 (1986).

Emmert-Buck MR, Roth MJ, Zhuang Z, Campo E, Rozhin J, Sloane BF, Liotta LA, and Stetler-Stevenson W, "Increased gelatinase A (MMP-2) and cathepsin B activity in invasive tumor regions of human colon cancer samples," *Am J Pathol* 145(6):1285-1290 (1994).

Golub LM, Ramamurthy NS, and McNamara TF, *Crit Rev Oral Biol Med* 2:297-322 (1991).

Golub LM, Sorsa T, and Suomalainen K, *Curr Opin Dent* 2:80-90 (1992).

Greenwald RA, Moak SA, Ramamurthy NS, and Golub LM, "Tetracyclines suppress matrix metalloproteinase activity in adjuvant arthritis and in combination with flurbiprofen, ameliorate bone damage," *J Rheumatol* 19:927-938 (1992).

Hayward SW, Dahiya R, Cunha GR, Bartek J, Deshpande N, and Narayan P, "Establishment and characterization of an immortalized but non-transformed human prostate epithelial cell line: BPH-1," *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 31(1):14-24 (1995).

Kroon AM, Dontje BHJ, Holtrop M, and van den Bogert C, "The mitochondrial genetic system as a target for chemotherapy: tetracyclines as cytostatics," *Cancer Letts* 25(1):33-40 (1984).

Lokeshwar BL, Selzer MG, Block NL, and Gunja-Smith Z, "Secretion of matrix metalloproteinases and the inhibitors (TIMPs) by human prostate in explant cultures: Reduced tissue inhibitor of metalloproteinase secretion by malignant tissues," *Cancer Res* 53:4493-4498 (1993a).

Lokeshwar BL, Hurkadli KS, Sheth AR, and Block NL, "Human prostatic inhibin suppresses tumor growth and inhibits clonogenic cell survival of a model prostatic adenocarcinoma, the Dunning R3327G rat tumor," *Cancer Res* 53:4855-4859 (1993b).

Lokeshwar BL, Ferrell SM, and Block NL, "Radiation sensitization of prostatic adenocarcinoma by taxol: Potential for therapeutic application in advanced malignancy," *Anticancer Res* 15:93-98 (1995a).

Lokeshwar BL, Lokeshwar VB, and Block NL, "Expression of CD44 in prostate cancer cells: Association with cell proliferation and invasive potential," *Anticancer Res* 15:1191-1198 (1995b).

Lokeshwar B, Dudak S, Selzer M, Block N, and Golub L, "Novel therapies for metastatic prostate cancer: Chemically modified tetracycline," in *Therapeutic Strategies in Molecular Medicine, Miami Biotechnology Short Report, Vol. 7: Advances in Gene Technology*, Oxford University Press, London (1996).

Maragoudakis ME, Peristeris P, Missirlis E, Aletras A, Andriopoulou P, and Haralabopoulos G, *Annals NY Acad Sci* 732:280-293 (1994).

Mitscher LA, *The Chemistry of the Tetracycline Antibiotics*, Ch. 6, Marcel Dekker, New York (1978).

Nip LH, Uitto V-J, and Golub LM, "Inhibition of epithelial cell matrix metalloproteinases by tetracyclines," *J Periodont Res* 28:379-385 (1993).

Pagé B, Pagé M, and Noël C, "A new fluorometric assay for cytotoxicity measurements *in vitro*," *International J Oncol* 3:473-476 (1993).

Rifkin BR, Vernillo AT, and Golub LM, "Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue-destructive enzymes: a potential therapeutic role for tetracyclines and their chemically-modified analogs," *Amer Acad Periodontol* 64:819-827 (1993).

Seftor REB, Seftor EA, Gehlsen KR, Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Ruoslahti E, and Hendrix MJC, "Role of the $\alpha_v\beta_3$ integrin in human melanoma cell invasion," *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1557-1561 (1992).

Seftor REB, Seftor EA, Stetler-Stevenson WG, and Hendrix MJC, "The 72 kDa type IV collagenase is modulated via differential expression of $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins during human melanoma cell invasion," *Cancer Res* 53:3411-3415 (1993).

Sorsa T, Konttinen YT, Lindy O, Suomalainen K, Ingman T, Saari H, Halinen S, Lee H-M, Golub LM, Hall J, and Simon S, "Doxycycline protects serum alpha-1-antitrypsin from human neutrophil collagenase," *Agents Actions Suppl* 39:225-229 (1993).

Uitto VJ, Firth JD, Nip L, and Golub LM, "Doxycycline and chemically modified tetracyclines inhibit gelatinase A (MMP-2) gene expression in human skin keratinocytes," *Annals NY Acad Sci* 732:140-151 (1994).

van den Bogert C, Dontje BHJ, Holtrop M, Melis TE, Romijn JC, van Dongen JW, and Kroon AM, "Arrest of the proliferation of renal and prostate carcinomas of human origin by inhibition of mitochondrial protein synthesis," *Cancer Res* 46(7):3283-3289 (1986).

Woessner JF Jr., "Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling," *FASEB J* 5:2145-2154 (1991).

Yamamoto M, Mohanam S, Sawaya R, Fuller GN, Seiki M, Sato H, Gokaslan ZL, Liotta LA, Nicolson GL, and Rao JS, "Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors in vivo and in vitro," *Cancer Res* 56(2):384-392 (1996).

Yu Z, Leung MK, Ramamurthy NS, McNamara TF, and Golub LM, "HPLC determination of a chemically modified nonantimicrobial tetracycline: Biological implications," *Biochem Medicine Metab Biol* 47:10-20 (1992).

Zucker S, Lysick RM, Ramamurthy NS, Golub LM, Wieman JM, and Wilkie DP, "Diversity of plasma membrane proteinases in mouse melanoma cells: Inhibition of collagenolytic activity and cytolytic activity by minocycline," *J Natl Cancer Inst* 75:517-525 (1985).

(57) 청구의 범위

청구항 1

4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 테트라시클린 피라졸(CMT-5), 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시엔하이드로테트라시클린(CMT-9), 및 4-데(디메틸아미노)미노시클린(CMT-10)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 양역제량의 테트라시클린 화합물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 암성장을 억제하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 테트라시클린 화합물은 6-데메틸-6-데옥시-4-디메틸아미노테트라시클린(CMT-3)인 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 암은 암종인 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 암은 선암종인 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 암은 폐, 전립선, 유방, 난소, 정소, 또는 대장의 선암종인 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 암은 흑색종인 방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 암의 세포 증식을 억제하는 것을 포함하는 방법.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 암의 침입을 억제하는 것을 포함하는 방법.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 암의 전이를 억제하는 것을 포함하는 방법.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 테트라시클린 화합물은 암세포에 기질 금속단백질분해효소의 발현을 특이하게 억제하기에 충분한 양으로 투여되는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 기질 금속단백질분해효소는 젤라티나아제인 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 기질 금속단백질분해효소는 젤라티나아제 A 또는 젤라티나아제 B인 방법.

청구항 13

제 1 항에 있어서, 보조적인 항신생물 방법을 이용하여 상기 포유동물을 처리하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 보조적인 항신생물 방법은 화학요법, 방사선요법, 및 수술을 포함하는 방법.

청구항 15

4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 테트라시클리노니트릴(CMT-2), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7), 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시언하이드로테트라시클린(CMT-9), 및 4-데(디메틸아미노)미노시클린(CMT-10)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 암억제량의 테트라시클린 화합물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 암성장을 억제하는 방법.

청구항 16

4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7), 및 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 증식-억제량의 테트라시클린 화합물을 암세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 암세포의 증식을 억제하는 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 테트라시클린 화합물은 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3) 또는 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8)인 방법.

청구항 18

4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 테트라시클리노니트릴(CMT-2), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7), 및 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8)로 이루어진 그룹에서 선택되는 침입 억제량의 테트라시클린 화합물을 암세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 암세포의 침입 가능성을 억제하는 방법.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 상기 테트라시클린 화합물은 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3)인 방법.

청구항 20

4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1) 및 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 전이 억제량의 테트라시클린 화합물을 암세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 암세포의 전이 가능성을 억제하는 방법.

청구항 21

과도한 젤라틴 분해 활성에 특징이 있는 암 질환을 치료하는 방법으로서, 과도한 젤라틴 분해 활성을 억제하기에 유효한 양의 테트라시클린 화합물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 상기 암은 젤라티나아제 A의 과도한 활성에 특징이 있고, 상기 테트라시클린 화합물은 4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 테트라시클리노이트릴(CMT-2), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7), 및 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 방법.

청구항 23

제 22 항에 있어서, 상기 테트라시클린 화합물은 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 또는 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7)인 방법.

청구항 24

제 21 항에 있어서, 상기 암 질환은 젤라티나아제 B의 과도한 활성에 특징이 있고, 상기 테트라시클린 화합물은 4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 및 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 방법.

청구항 25

제 24 항에 있어서, 상기 테트라시클린 화합물은 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 또는 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4)인 방법.

청구항 26

(a)어떤 특정한 암 장애를 관측하기 전에 암에 대한 예비소인과 관련되는 유전자 생성물 또는 대사산물을 포유동물의 생물학적 시료로부터 검출하고;

(b)4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 테트라시클리노이트릴(CMT-2), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7), 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시엔하이드로테트라시클린(CMT-9), 및 4-데(디메틸아미노)미노시클린(CMT-10)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 종양 발생률-억제량의 테트라시클린 화합물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 포유동물에서 종양 발생률을 억제하는 방법.

청구항 27

포유동물에서 암성 종양과 관련되는 젤라틴분해 활성을 억제하는 방법으로서, 젤라틴분해 활성을 억제하기에 유효한 양의 테트라시클린 화합물을 포유동물에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 상기 젤라틴분해 활성은 상기 암성 종양에서 발생하는 방법.

청구항 29

제 27 항에 있어서, 상기 젤라틴분해 활성은 정상 조직에서 발생하는 방법.

청구항 30

제 29 항에 있어서, 상기 정상 조직은 상피 조직인 방법.

청구항 31

제 27 항에 있어서, 상기 정상 조직은 간질 조직인 방법.

청구항 32

테트라시클리노이트릴(CMT-2) 및 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 암억제량의 테트라시클린 화합물을 포유동물에게 국소적으로 투여하는 것을 포함하는, 포유동물에서 암성장을 억제하는 방법.

청구항 33

4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 테트라시클리노이트릴(CMT-2), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7), 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시엔하이드로테트라시클린(CMT-9), 및 4-데(디메틸아미노)미노시클린(CMT-10)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 세포독성 억제량의 테트라시클린 화합물을 암세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 암 세포를 차별적으로 죽이는 방법.

청구항 34

제 33 항에 있어서, 상기 암 세포는 육종, 암종, 또는 선암종의 세포인 방법.

청구항 35

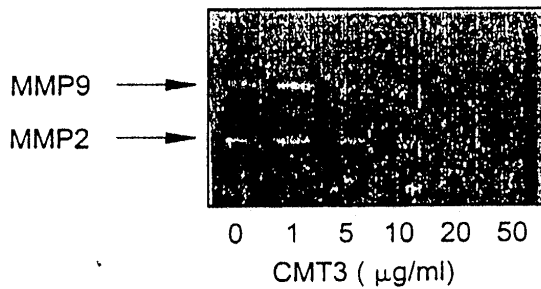
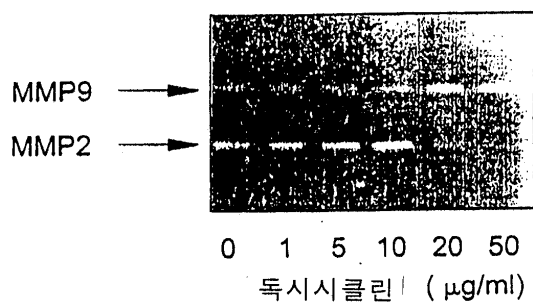
제 34 항에 있어서, 상기 암 세포는 전립선, 유방, 난소, 정소, 폐, 또는 대장의 암종 세포인 방법.

청구항 36

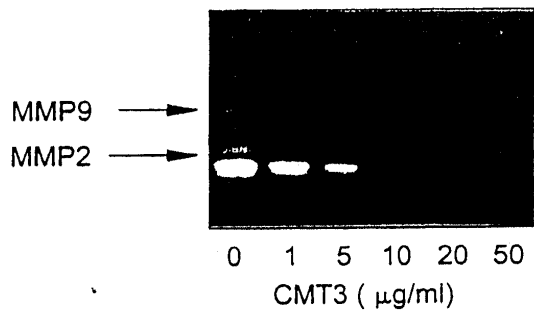
제 33 항에 있어서, 상기 암 세포는 전립선의 암종 세포이고, 상기 테트라시클린 화합물은 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3)인 방법.

청구항 37

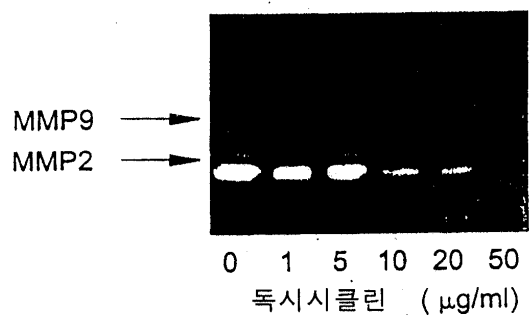
포유동물에서 암 성장을 억제하는 방법으로서, 암세포에서 세포독성을 일으키기에 충분한 양의 테트라시클린 화합물을 암에 걸린 포유동물에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 테트라시클린 화합물은 4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-1), 테트라시클리노이트릴(CMT-2), 6-데메틸-6-데옥시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-3), 4-데(디메틸아미노)-7-클로로테트라시클린(CMT-4), 4-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-6), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시테트라시클린(CMT-7), 6 α -데옥시-5-히드록시-4-데(디메틸아미노)테트라시클린(CMT-8), 4-데(디메틸아미노)-12 α -데옥시엔하이드로테트라시클린(CMT-9), 및 4-데(디메틸아미노)미노시클린(CMT-10)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 방법.

도면**도면 1a****도면 1b**

도면 1c

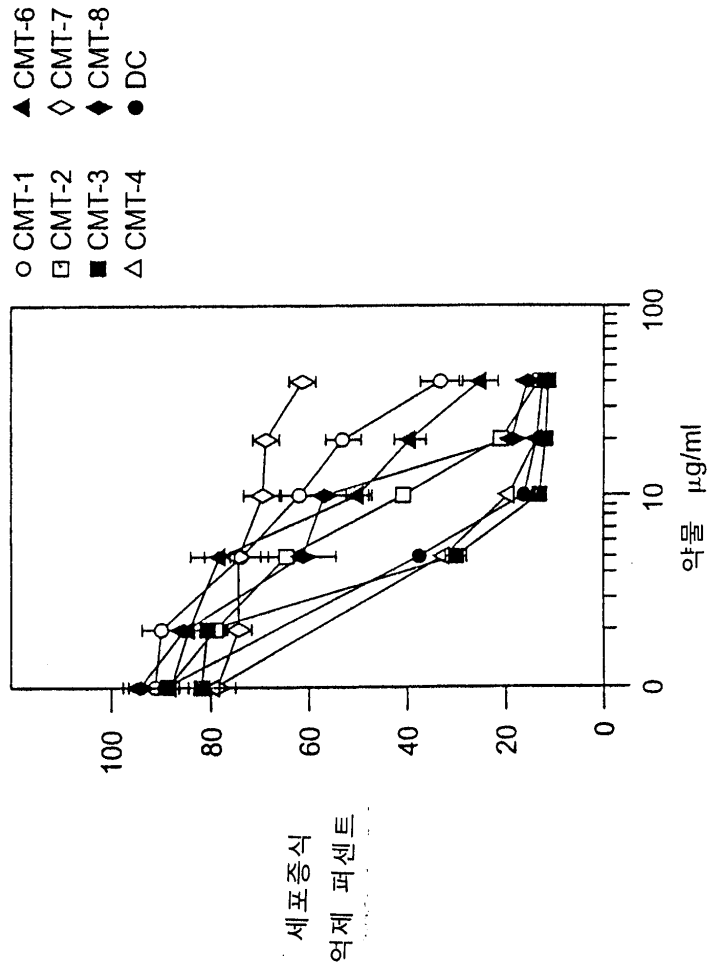


도면 1d



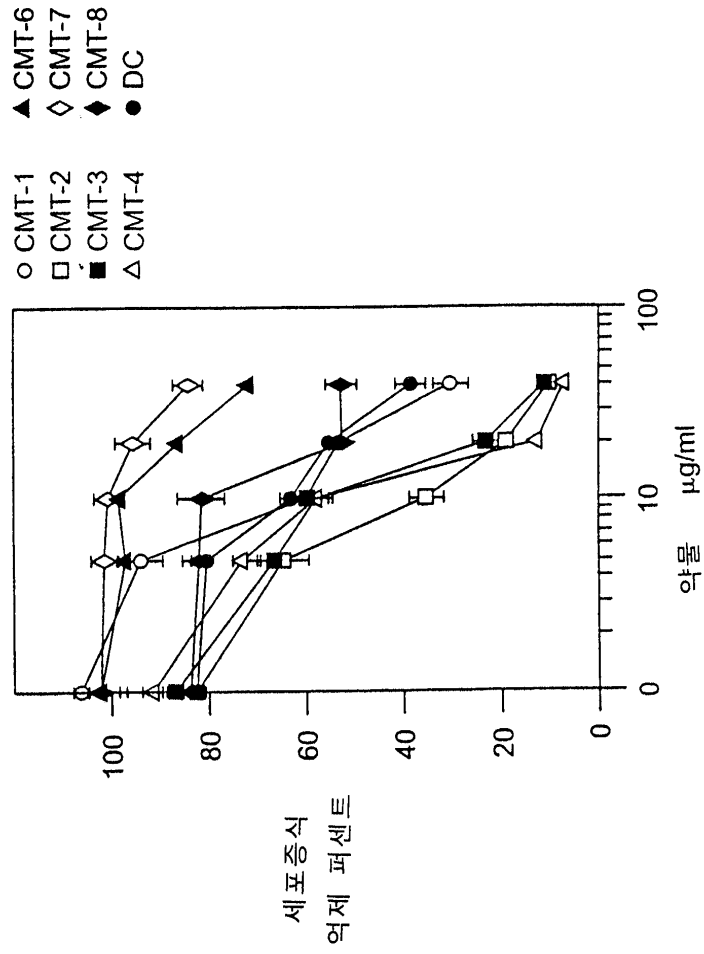
도면2a

LNCaP

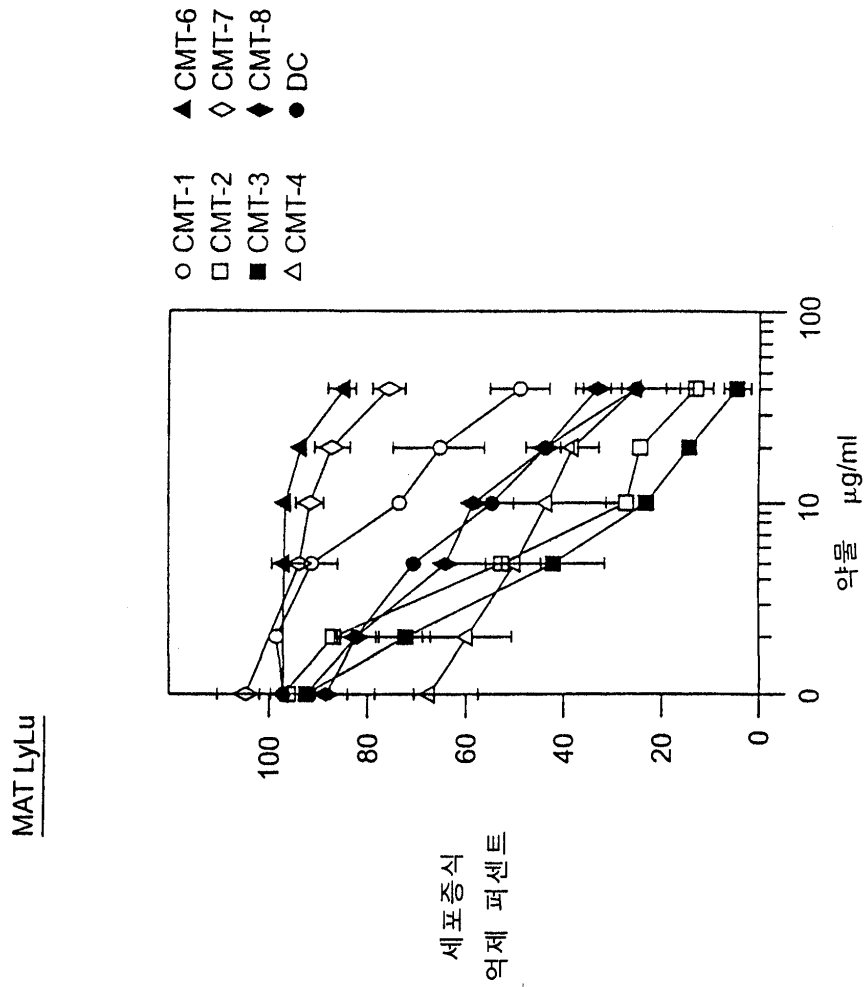


도면2b

TSU PR1

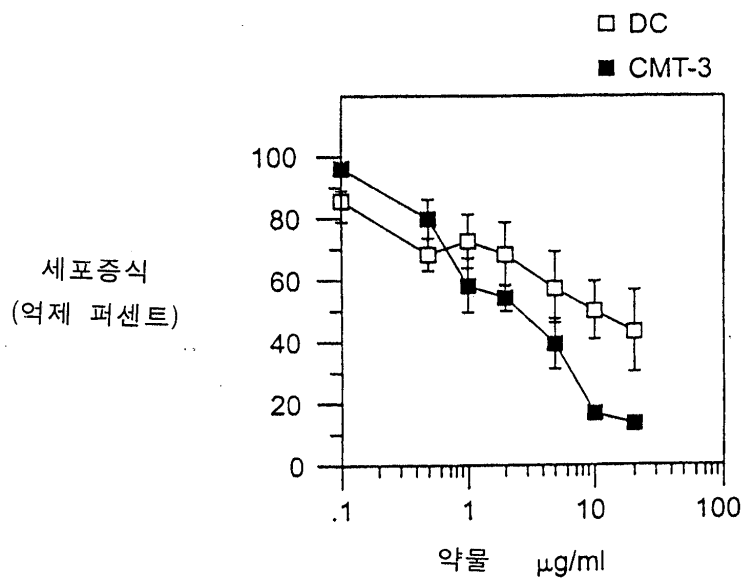


도면2c



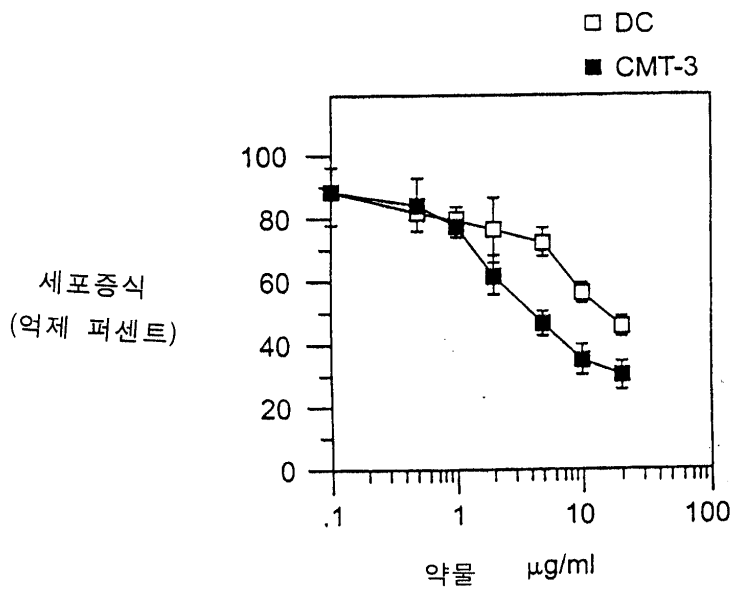
도면3a

DU145



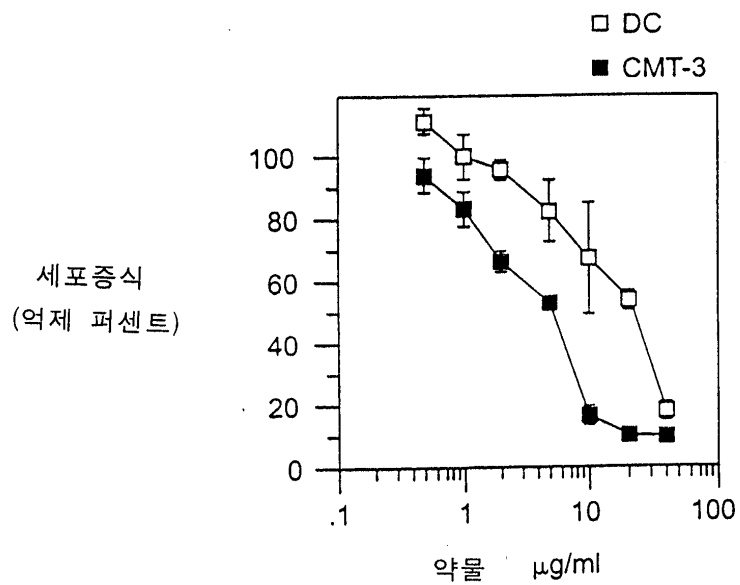
도면3b

PC-3



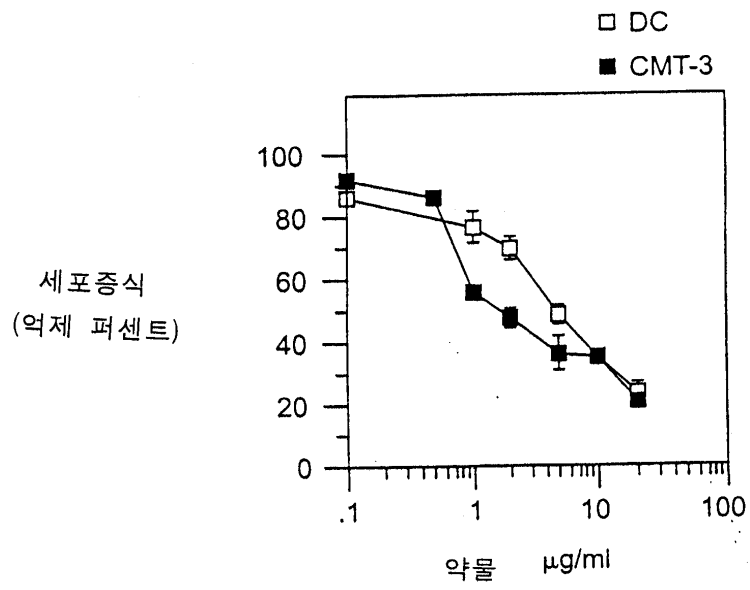
도면3c

BPH-1

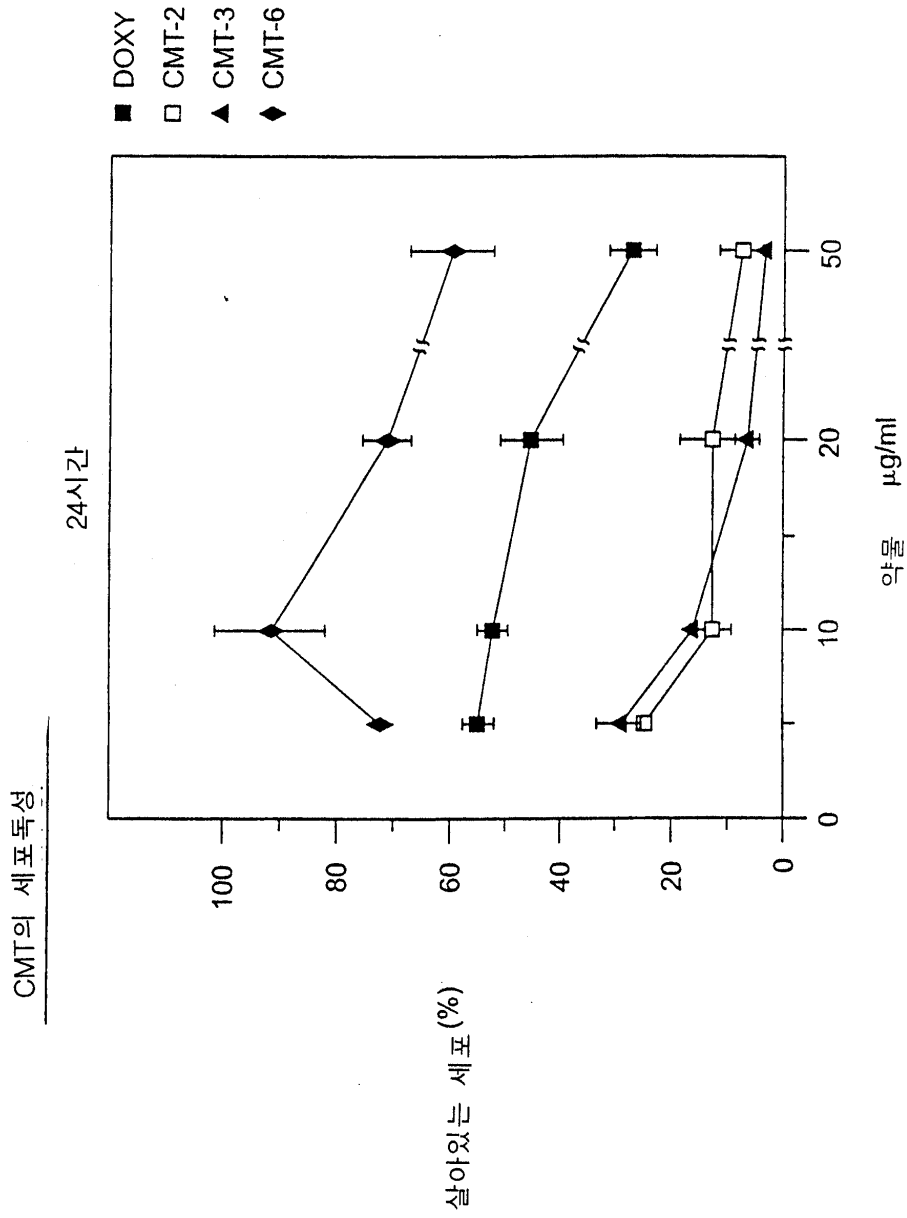


도면3d

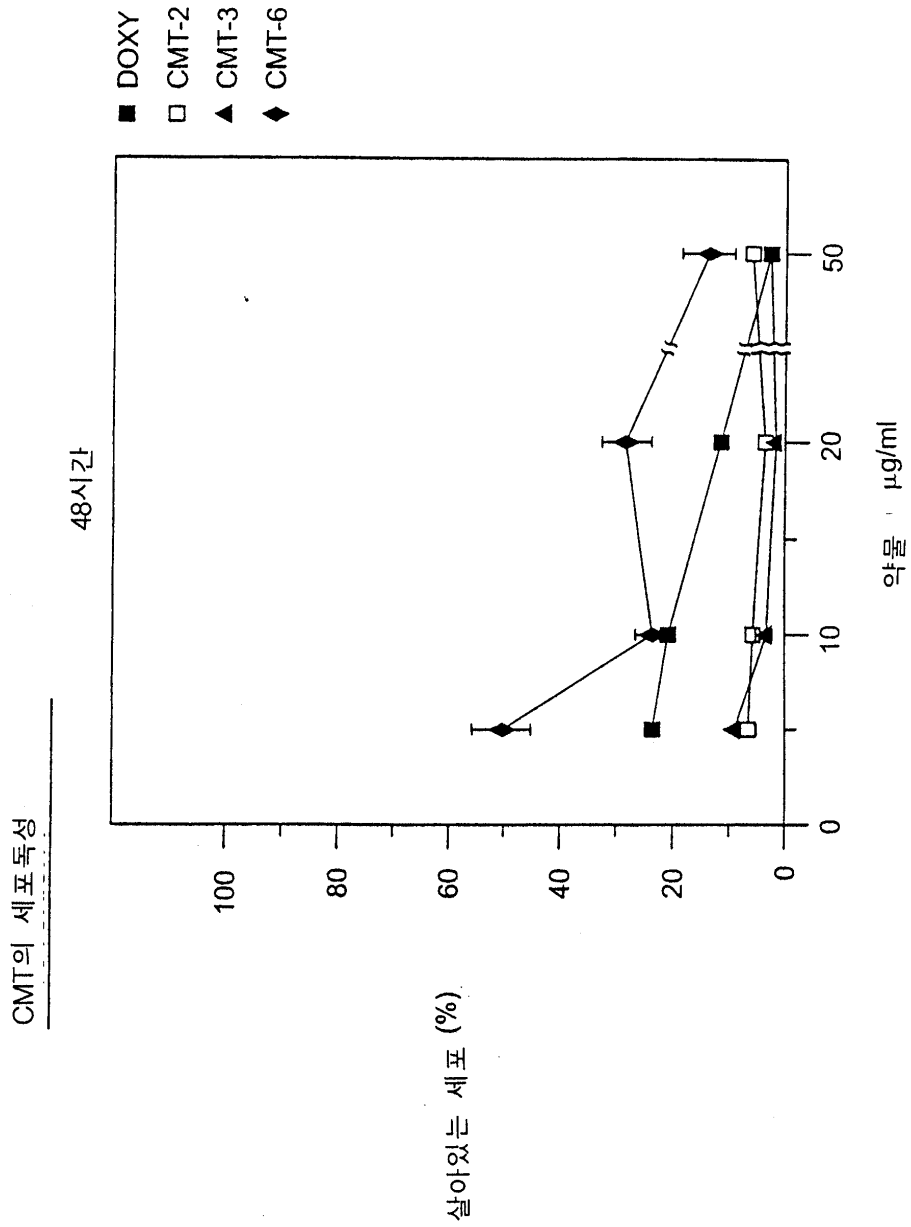
FHS733



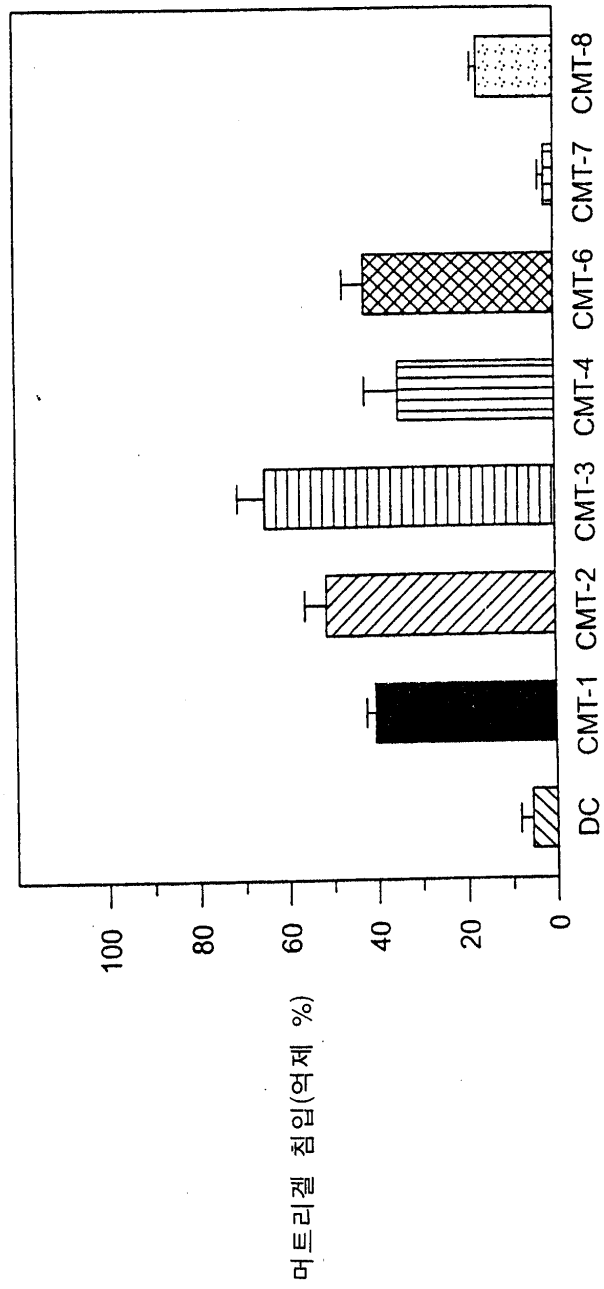
도면4a



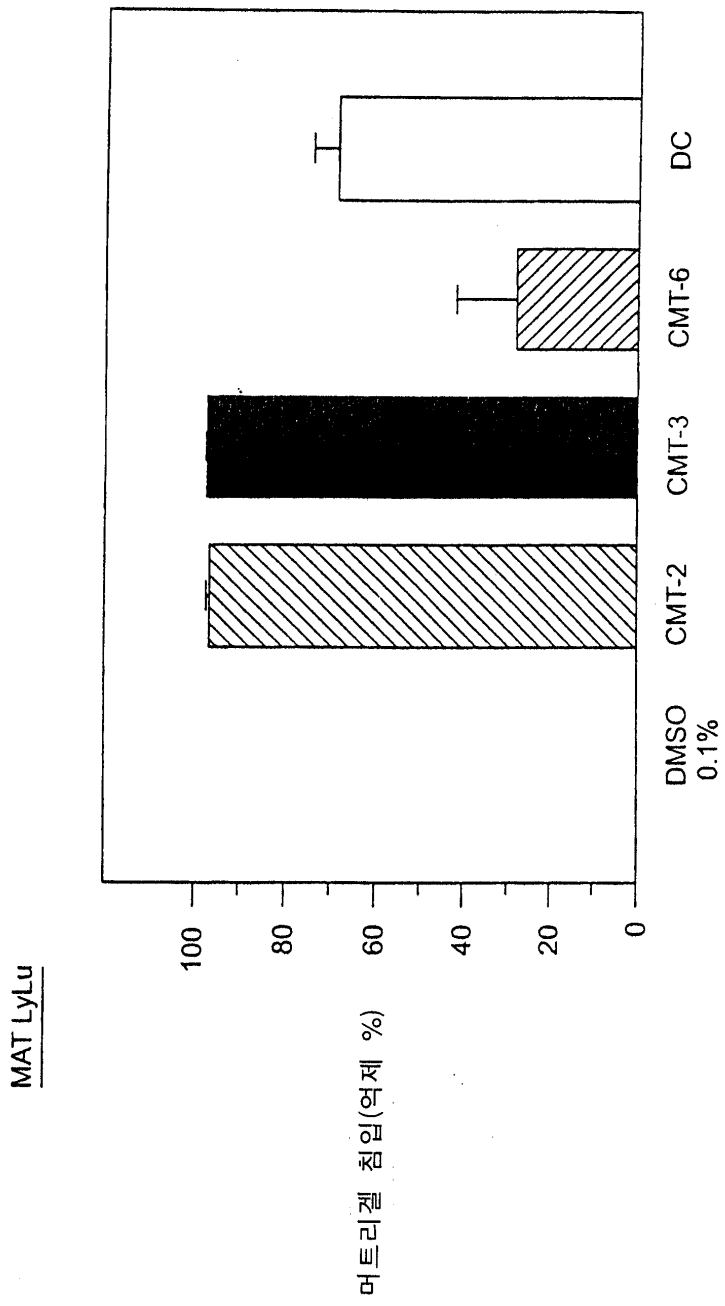
도면4b



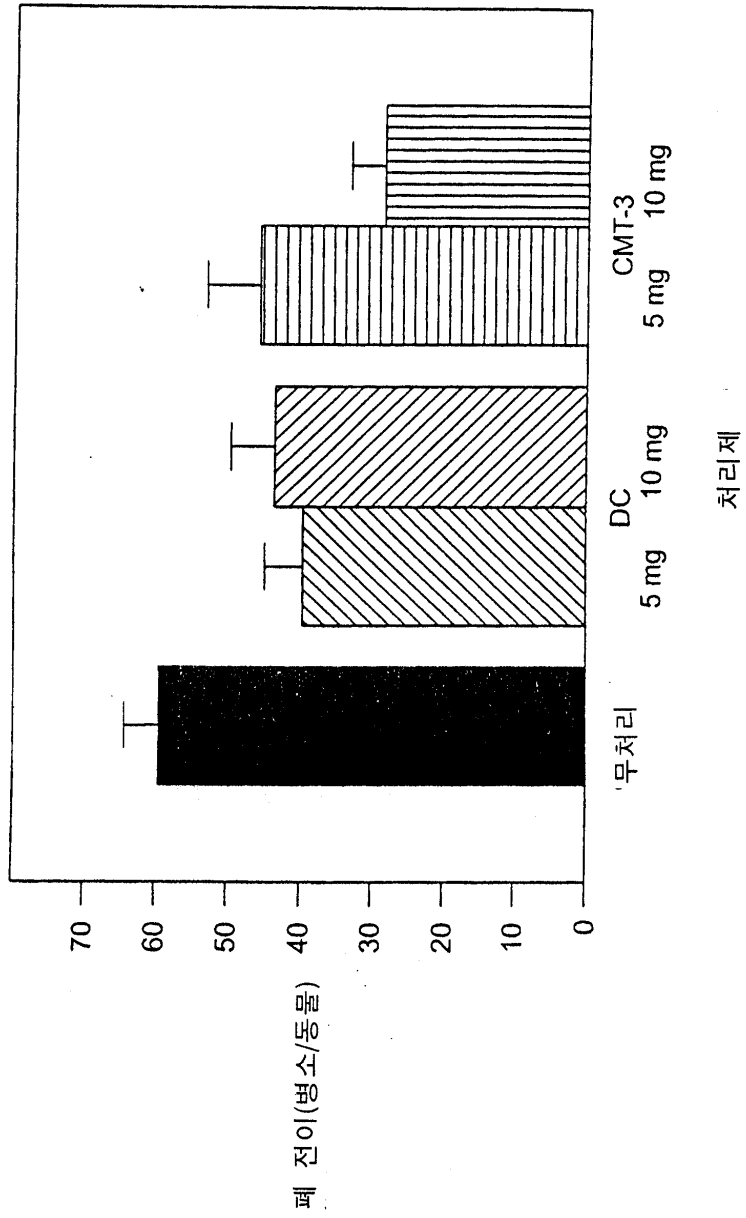
도면5a

TSU-PR1

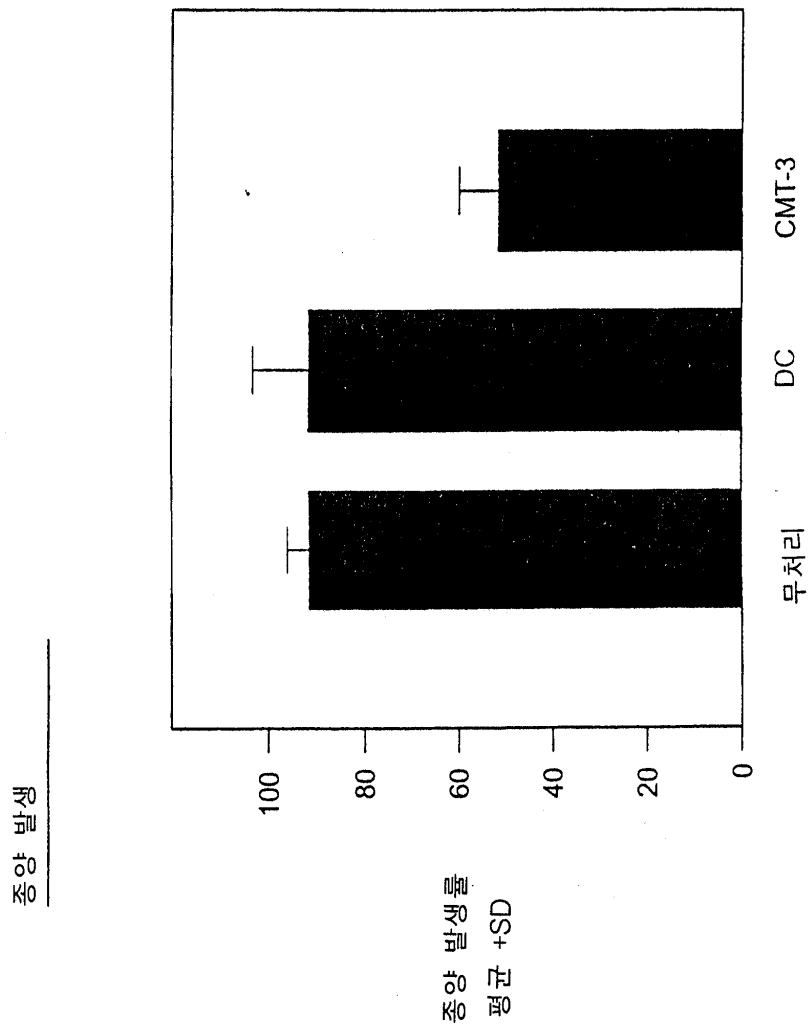
도면5b



도면6

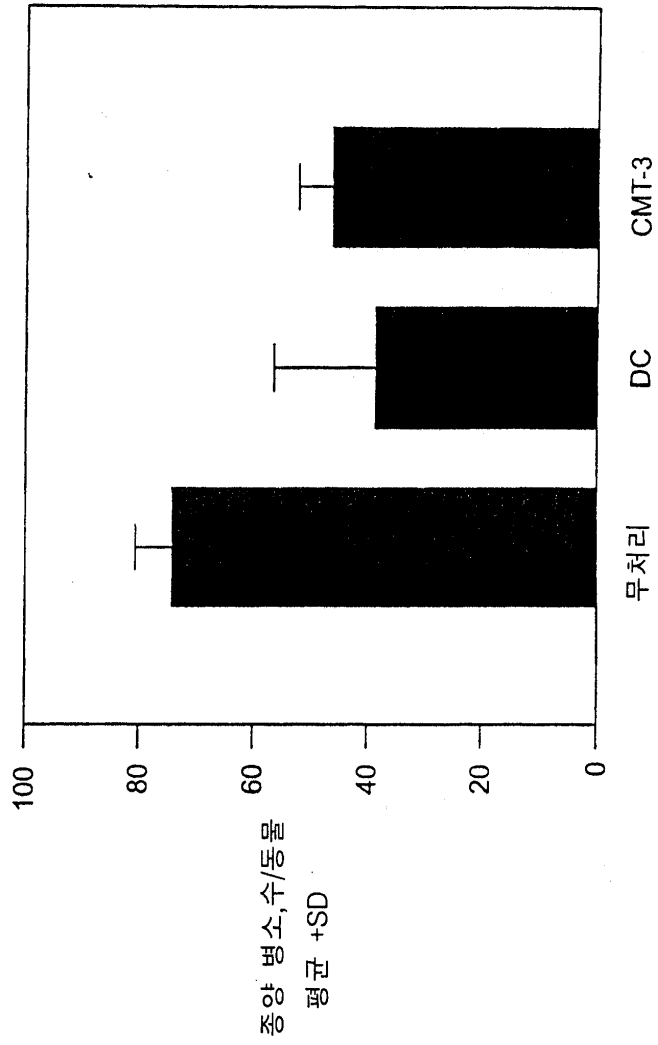


도면7a

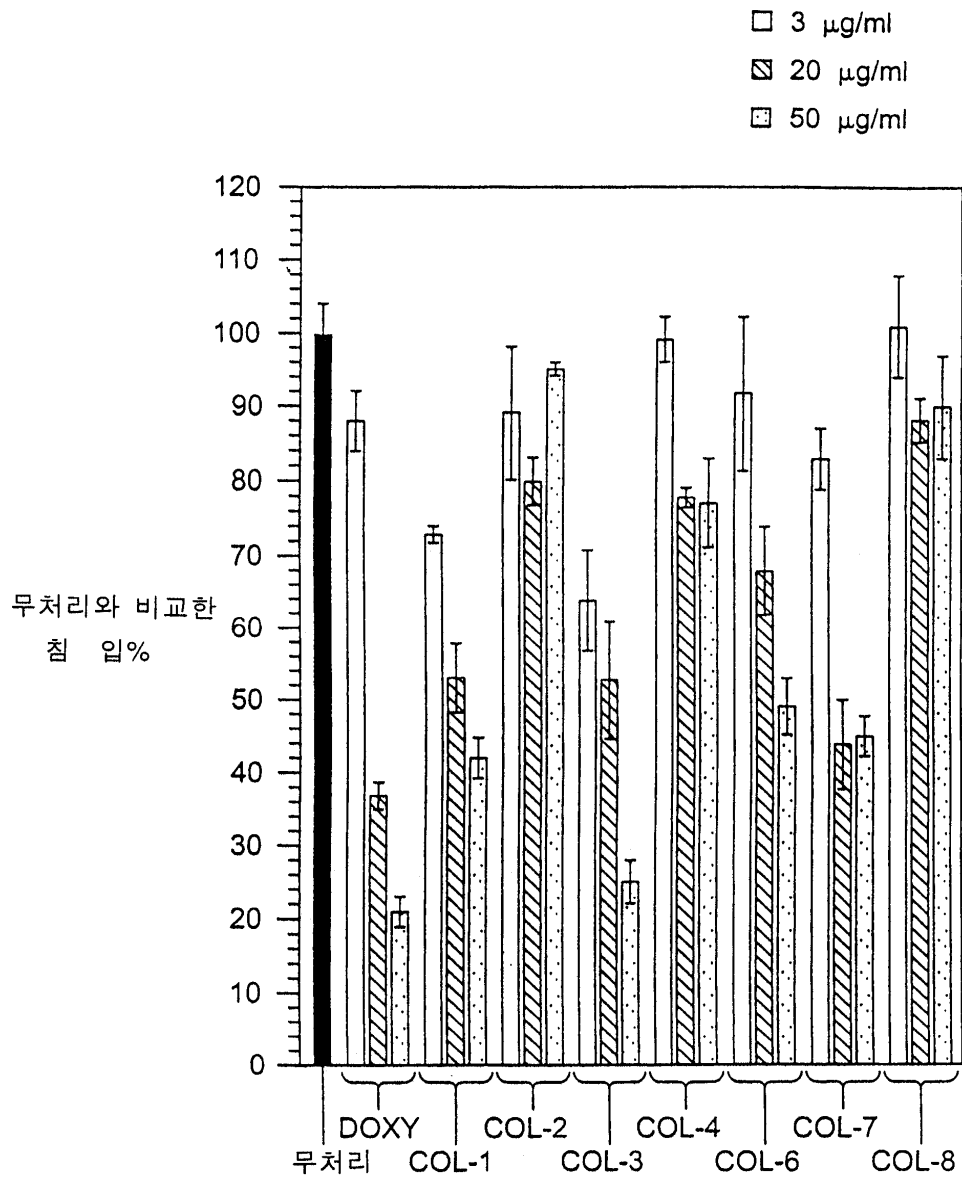


도면 7b

전 이

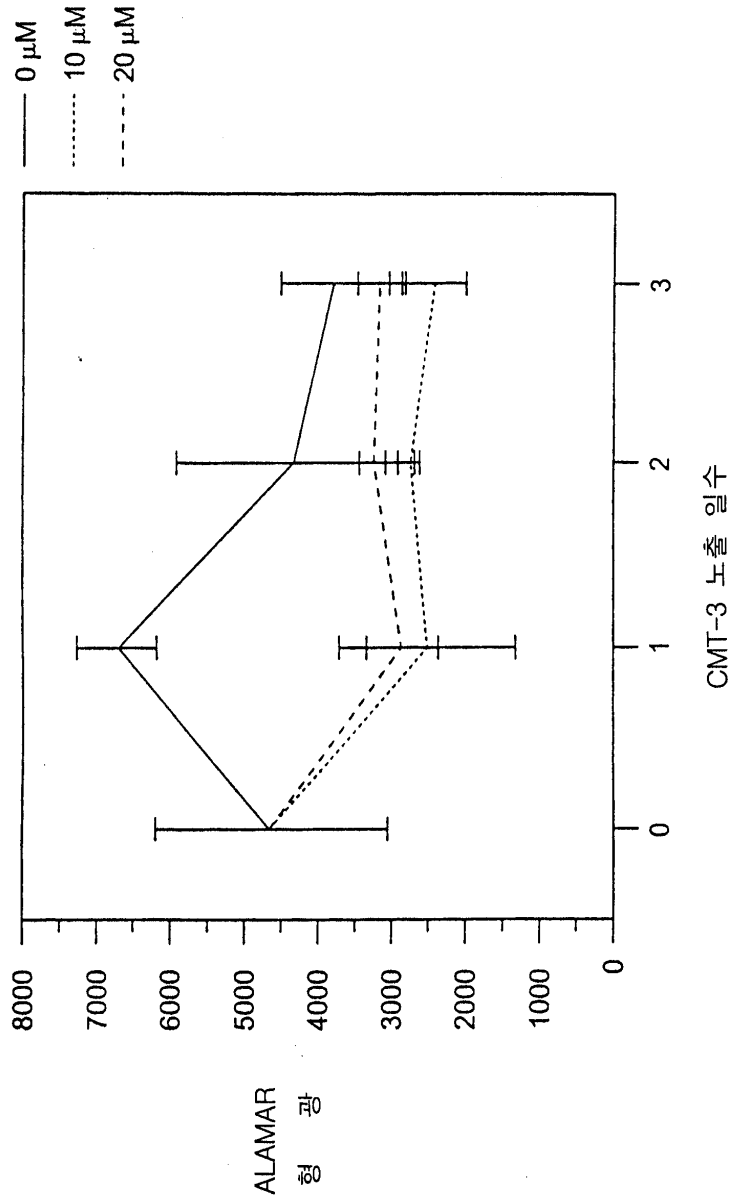


도면8



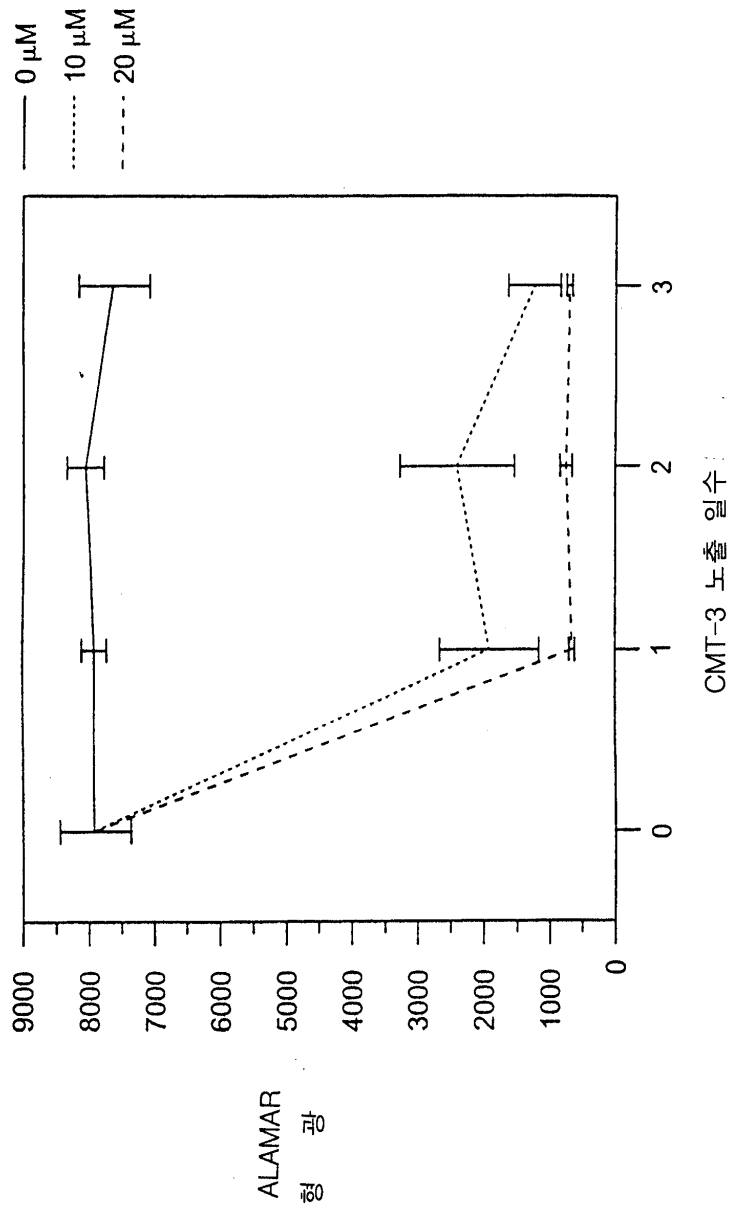
도면9a

3일간의 CMT-3의 효과
전립선 간질 세포 : 37세, CMT-3: 0, 10 및 20 μ A



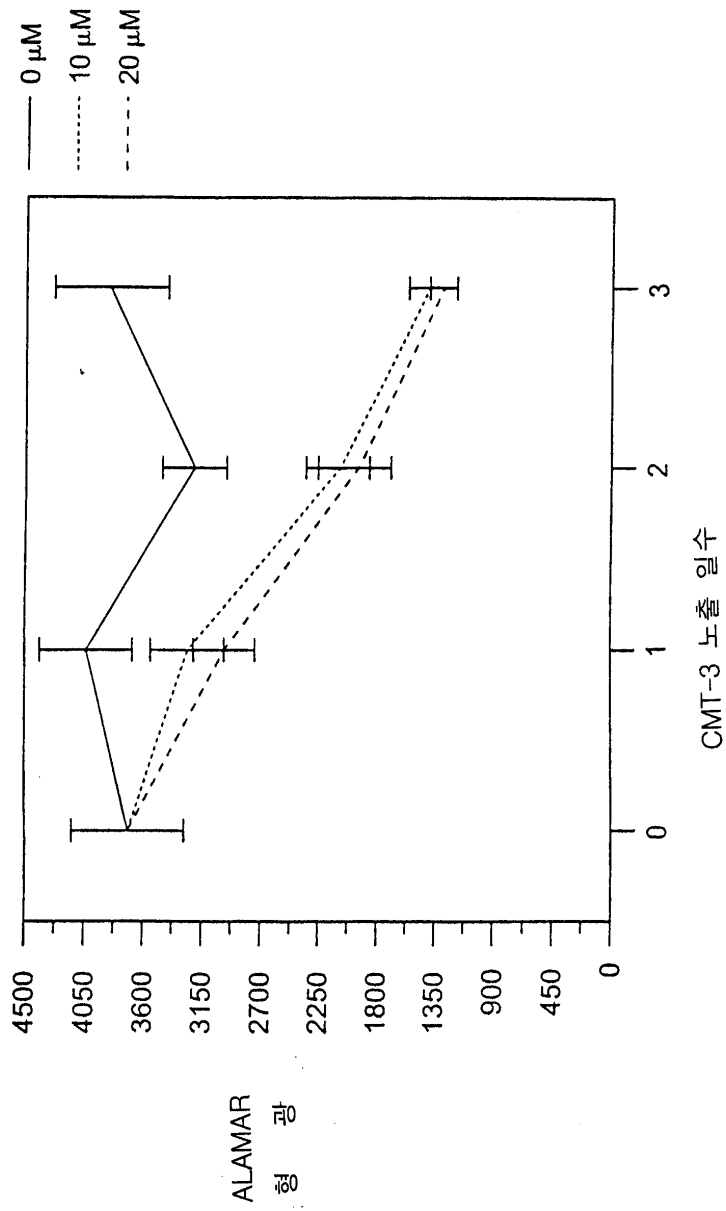
도면9b

3일간의 CMT-3의 효과

전립선 종양 : LnCaP, CMT-3 : 0, 10 및 20 μ M

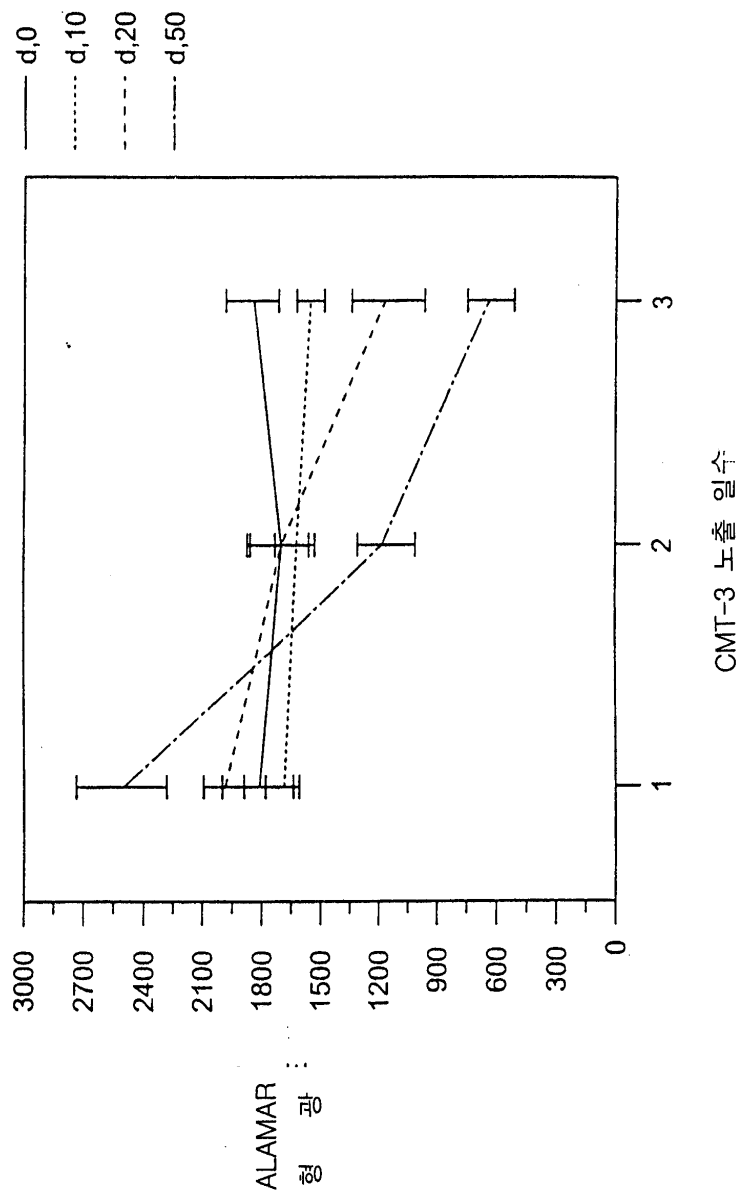
도면9c

3일간의 CMT-3의 효과

전립선 종양 : PC-3, CMT-3 : 0, 10 및 20 μ M

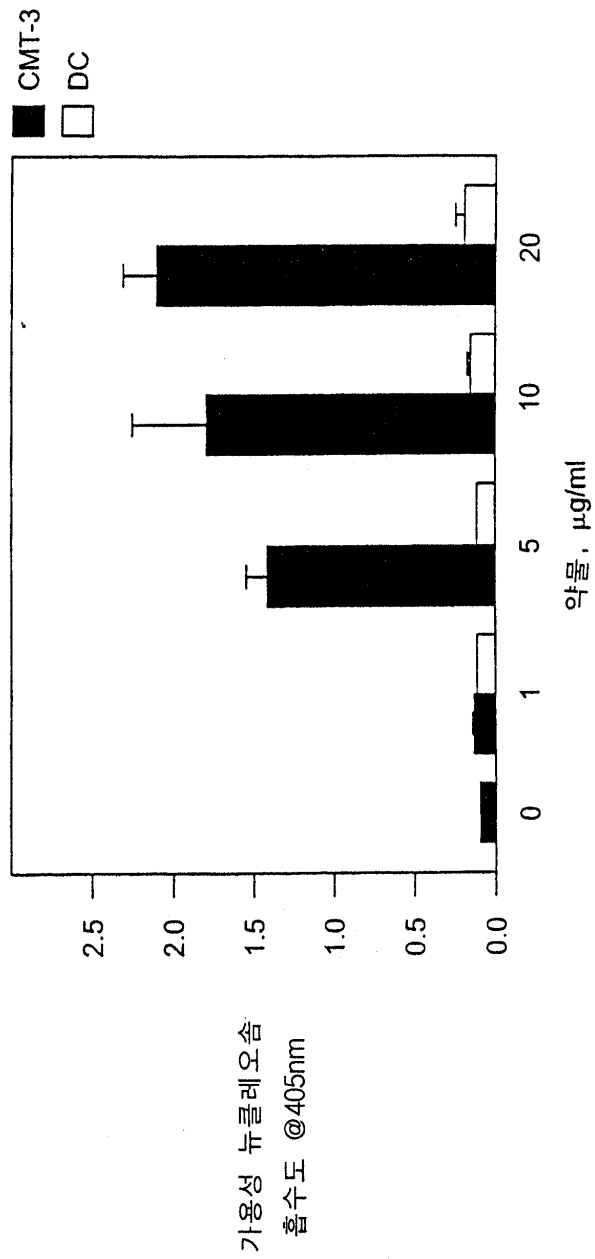
도면9d

3일간의 CMT-3의 효과
전립선 종양 : 여-145, CMT-3 : 0, 10, 20 및 50 μ M



도면 10a

CMT-3 유도 세포자멸사



도면 10b

CMT-3 유도 세포자멸사

