



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 31/01 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2006-0121177

(43) 공개일자 2006년11월28일

(21) 출원번호 10-2006-7011566

(22) 출원일자 2006년06월12일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년06월12일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2004/004769

(87) 국제공개번호 WO 2005/049001

국제출원일자 2004년11월12일

국제공개일자 2005년06월02일

(30) 우선권주장 0326518.8 2003년11월13일 영국(GB)

(71) 출원인 컴프롬 디벨로프먼츠 엘티디
영국 에스에이6 8와이에이치 스완씨 피오 박스 425

(72) 발명자 보웬 아이포 텔메
영국 카디프 씨에프10 3유에스 피오박스 911 뮤지엄 에비뉴바이오메이
컬 싸이언스 빌딩 카디프 유니버시티
에이엘아이 아쉽 야신
영국 카디프 씨에프10 3유에스 피오박스 911 뮤지엄 에비뉴바이오메이
컬 싸이언스 빌딩 카디프 유니버시티

(74) 대리인 이상용
구현서
제갈혁

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 항종양 테르펜 화합물

(57) 요약

본 발명은 암의 치료 및 예방에서의 테르펜 화합물의 용도와 관련된다. 본 발명은 역시 상기 테르펜 화합물과 약제적으로 수용되어지는 첨가제(excipient), 캐리어(carrier), 보조약(adjuvant) 또는 부형약(vehicle)을 포함하는 약제의 합성에 관련된다. 상기 테르펜은 I) 하기 시스- β -오시멘(cis- β -Ocimene) 그리고 하기 트랜스- β -오시멘(trans- β -Ocimene), 그리고 II) 비사볼렌 타입(bisabolene type)의 모노사이클릭 세스퀴테르펜(monocyclic sesquiterpene)으로부터 선택된다.

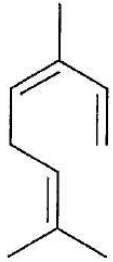
특허청구의 범위

청구항 1.

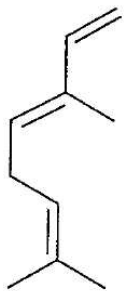
암의 치료 및 예방을 위한 약제의 제조에서의 화합물의 용도에 있어서,

상기 화합물은 테르펜 또는 그것의 산소화된 유도체이고,

상기 테르펜은 I) 하기 시스- β -오시멘(cis- β -Ocimene) 그리고 하기 트랜스- β -오시멘(trans- β -Ocimene), 그리고 II) 비사볼렌 타입(bisabolene type)의 모노싸이클릭 세스퀴테르펜(monocyclic sesquiterpene)으로부터 선택되는 것인 화합물의 용도.



cis- β -Ocimene



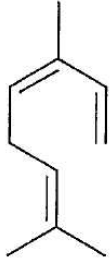
trans- β -Ocimene

청구항 2.

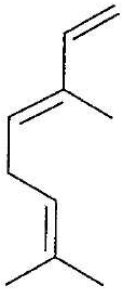
치료가 필요한 환자들에게 화합물의 효과적인 양을 투여하는 것을 포함하는 암 치료 또는 예방의 방법에 있어서,

상기 화합물은 테르펜 또는 상기 테르펜의 산소화된 유도체이고,

상기 테르펜은 I)하기 시스- β -오시멘(cis- β -Ocimene) 그리고 하기 트랜스- β -오시멘(trans- β -Ocimene), 그리고 II) 비사볼렌 타입(bisabolene type)의 모노싸이클릭 세스퀴테르펜(monocyclic sesquiterpene)으로부터 선택되는 것인 암 치료 또는 예방 방법.



cis-β-Ocimene



trans-β-Ocimene

청구항 3.

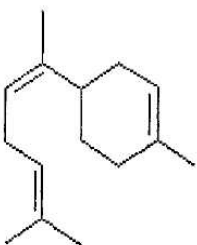
제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 화합물은 트랜스-β-오시멘인 것인 화합물의 용도 또는 암의 치료 또는 예방 방법.

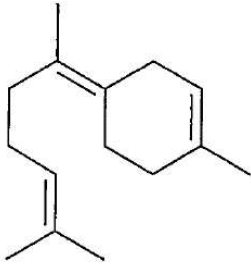
청구항 4.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 화합물은 하기 α-비사볼렌 또는 하기 γ-비사볼렌인 것인 화합물의 용도 또는 암의 치료 또는 예방 방법.



α-bisabolene



γ -bisabolene

청구항 5.

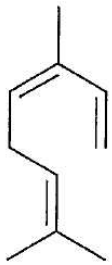
제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 화합물은 0. 2 μ M 내지 100mM의 농도에서 사용되는 것인 화합물의 용도 또는 암의 치료 또는 예방 방법.

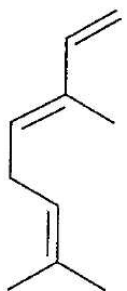
청구항 6.

I) 하기 시스- β -오시멘(cis- β -Ocimene) 그리고 하기 트랜스- β -오시멘(trans- β -Ocimene); 및

II) 비사볼렌 타입(bisabolene type)의 모노싸이클릭 세스퀴테르펜(monocyclic sesquiterpene)으로부터 선택되는 테르펜 화합물 또는 상기 테르펜 화합물의 산소화된 유도체와 함께 약제적으로 수용되어 질 수 있는 첨가제(excipient), 캐리어(carrier), 보조제(adjuvant) 또는 부형약(vehicle)을 포함하는 약학적 조성물.



cis- β -Ocimene



trans- β -Ocimene

청구항 7.

제6항에 있어서,

상기 조성물의 단위 복용량이 단위 복용량 당 0. 2 μ M 내지 100mM의 농도에서 테르펜 화합물을 제공하는 것인 약학적 조성물.

청구항 8.

제1항 내지 제2항에 있어서,

상기 암은 유방암, 난소암, 전립선암, 췌장암(colon cancer), 폐암, 췌장암, 장암(bowel cancer), 흑색종, 고환암, 자궁경부암, 피브로사르코마(fibrosarcoma), 스쿠아모스 세포 카르시노마(squamous cell carcinoma), 류카미아(leukaemia), 아스트로시토마(astrocytoma) 및 글리오마(glioma)로 이루어진 군에서 선택되는 것인 화합물의 용도 또는 암의 치료 또는 예방 방법.

청구항 9.

암의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에서의 코미포라 구이도티 추출물의 용도.

청구항 10.

치료가 필요한 환자들에게 코미포라 구이도티 추출물의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 암 치료 또는 예방 방법.

명세서**기술분야**

본 발명은 암의 치료 및 예방에서의 테르펜 화합물의 용도와 관련된다. 본 발명은 역시 상기 테르펜 화합물과 약제적으로 수용되어지는 첨가제(excipient), 캐리어(carrier), 보조약(adjuvant) 또는 부형약(vehicle)을 포함하는 약제의 합성에 관련된다.

배경기술

아프리카 관목의 수지로 만든 산물인 몰약(Myrrh) 즉 코미포라 몰물(Commiphora molmol)은 치료에 대한 오래된 민간의 역사를 갖는다. 몰약 그리고 센티드 몰약(scented Myrrh)(Commiphora guidotti)의 약용의 배경은 주로 고대의 민간 전승에 근거하고, 아랍, 인도, 중국의 약초 치료에서의 일반적 사용을 발견해 왔다. 이러한 정황을 통해, 그것은 비독성이고, 항염증성이고, 항균적이며, 치료적인 특성을 갖는 것이 알려진다. 그것은 역시 향수 산업에서도 널리 사용된다. 쥐의 엘룰리히 솔리드 종양(Elulich solid tumour)에 대항한 코미포라 몰물의 천연 추출물의 활성에 대한 이전의 보고서가 있음에도 불구하고, 그것의 명백한 항종양 특성은 체계적으로 또는 과학적으로 테스트되지 않았다.(Al Harbi et al., Experimental Chemotherapy, 40,337-347, 1994 참조). 그 천연 추출물은 역시 면역 장애에서의 그리고 주혈흡충병(Schistosomiasis)에 대한 사용을 위한 수많은 약초 치료에서 인용된다. 코미포라 몰물과 코미포라 구이도티(Commiphora guidotti)의 개개의 화학성분들의 활성에 대해서는 분석되지 않았다. 우리의 추출물들에 대한 최초의 화학적 분석은 그들이 매우 풍부한 소스(source), 약 300 종류의 화합물을 포함하는 것을 보여준다.

많은 배경적인 정보의 관점에서, 많은 약초 치료에서의 몰약의 사용이 알려진다. 그러나, 아무런 이전의 기술적인 자료도 몰약으로부터의 명백한 항암의 화학적인 화합물에 대한 체계적인 확인을 명시하지 않는다. 몇몇의 참고문헌들은 쥐의 종양에 대한 몰약(코미포라 몰물)의 천연 추출물의 효능을 지적한다. (Qureshi & Al Harbi et al., Cancer Chemotherapy and Pharmacology, JJ, 130-138, 1993 ; and Al-Harbi et al., 1994 (supra) 참조).

국제특허출원 WO 00/50053은 암의 고전적인 약초 치료로서 다른 식물과 함께 몰약(코미포라 몰물)의 사용을 묘사한다. 더 많은 공개(Rao et al., J. Etlmophannacology, 76, 151-154, 2001 참조)취에서의 코미포라 몰물의 독성 충격이 없음을 묘사한다.

Tatman et al.(Cancer Letters, 175, 129-139, 2002 참조)은 휘발성의 이소프레노이드(volatile isoprenoid)가 쥐의 멜라노마(murine melanoma)와 인간의 류카미아(leukaemia) 세포 라인에 대해 효과적이라는 것을 개시한다.

Leal et al.(J. Agric. Food. Chem., 51, 2520-2525, 2003 참조)은 생강과 심황 추출물이 항암 활성을 보였다는 것을 개시한다.

Saleh et al.(Pharm. Pharmacol. Lett. , 8, 97-99, 1998 참조)은 셀러리의 휘발물이 인간 암 세포 라인에 대해 세포 독성이 있다는 것을 개시한다.

미국 특허 US-A-6,486, 706은 바이러스 기원 종양의 치료에서의 α -산타롤과 β -산타롤의 사용을 개시한다.

미국특허 US patent US-A-5,602, 184은 인간 암 세포 라인에 대한 선택적인 테르펜의 사용을 개시한다.

미국 특허출원 US 2002/0155522은 종양 세포에 대한 β -엘레멘의 사용을 개시한다.

국제특허출원 WO 01/80868은 암을 치료하고 예방하는 것을 위한 세스퀴테르펜(sesquiterpene) 혼합물의 사용을 개시한다.

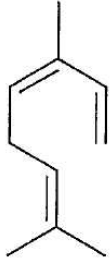
Itokawa et al.(Chem. Pharm. Bull. , 3, 3488-3492, 1985 참조)은 비사볼렌 세스퀴테르페노이드(bisabolene sesquiterpenoids)의 항암 활성에 대한 연구에 대해 묘사한다.

코미포라 몰물과 코미포라 구디오티로부터 얻어지는 화합물의 범위는 GC/MS 및 HPLC/MS으로부터 얻어지는 화합물의 스펙트라 또는 피크로부터 측정된다. 이들 피크는 테스트된 새로운 분자들의 넓은 범위를 주면서 표본화될 수 있다. 그러한 작업의 혁신적인 국면의 몇몇은 1)몰약(코미포라 몰물) 및 하디(Haddi) 또는 센티드 몰약(코미포라 구이도티)에서 테스트되지 않은 분자들의 생물학적으로 풍부한 소스를 선택하는 것, 2) 이들 몰약 추출물로부터의 새로운 화합물들의 폭 넓은 소스의 확인 및 특징 부여, 3)인간 종양 세포 라인을 제어하는 것을 위해 적절한 비독성 화합물을 선택하는 것을 위한 명백한 생물학적 정량(bioassay)의 사용을 포함한다.

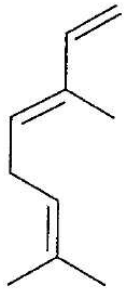
어떤 이전의 기술적 문헌들도 인간 종양에 대한 항암 활성을 갖는 몰약 및 센티드 몰약으로부터의 명백한 화합물을 개시하지 않는다. 예상되는 것과 같이, 효과적인 항암 약 그리고 특별히 아무런 또는 제한적인 비항암 세포에 대한 독성을 갖는 약에 대한 요구가 있다. 발명자들은 인간 종양 세포에 명백하게 에팍토시스를 야기하는 그러나 정상 조직에는 그렇지 않은 수많은 특정한 화합물을 확인해왔다. 탁솔(Taxol), 파클리탁셀(Paclitaxel) 및 빈블라스틴(Vinblastin)과 같은 약물을 사용하는 최근의 치료는 염증 세포 죽음의 해를 주는 형태 또는 네크로시스를 야기시킨다. 계획된 세포 죽음의 자연적 진행인 에팍토시스를 위한 약물들은 거의 또는 아무런 부작용을 야기시키지 않는다. 이러한 접근은 그것이 제약산업 그리고 궁극적으로 의학적 직업에 매력적인 행동의 양성의 메카니즘(benign mechanism)을 선택한다는 점에서 혁신적이다. 이러한 선택적 접근은 비독성 항암제를 드러내왔다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 첫번째 국면에 따르면, 암의 치료 및 예방을 위한 약의 제조에서의 화합물의 용도가 제공된다. 그 화합물은 테르펜 또는 그것의 산소로 처리된 유도체이고, 테르펜은 I)시스- β -오시멘(cis- β -Ocimene) 그리고 트랜스- β -오시멘(trans- β -Ocimene) 그리고 II) 비사볼렌 타입(bisabolene type)의 모노싸이클릭 세스퀴테르펜(monocyclic sesquiterpene)으로부터 선택된다. 시스- β -오시멘(cis- β -Ocimene) 및 트랜스- β -오시멘(trans- β -Ocimene)은 아래와 같다.

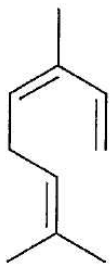


cis-β-Ocimene

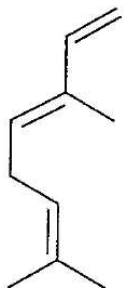


trans-β-Ocimene

본 발명의 두번째 국면에 따르면, 그런 치료의 필요에 있는 환자들에게 어떤 화합물의 효과적인 양을 투여하는 것을 포함하는 암 치료 또는 예방의 방법을 제공한다. 상기 화합물은 테르펜 또는 그것의 산소로 처리된 유도체이고, 테르펜은 I)시스-β-오시멘(cis-β-Ocimene) 그리고 트랜스-β-오시멘(trans-β-Ocimene) 그리고 II) 비사볼렌 타입(bisabolene type)의 모노싸이클릭 세스퀴테르펜(monocyclic sesquiterpene)으로부터 선택된다. 시스-β-오시멘(cis-β-Ocimene) 및 트랜스-β-오시멘(trans-β-Ocimene)은 아래와 같다.



cis-β-Ocimene

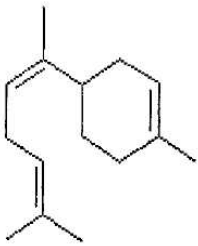


trans-β-Ocimene

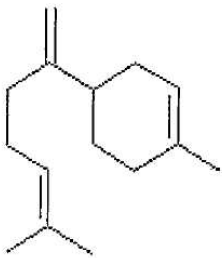
위에서 언급된 특정한 테르펜 화합물들은 인간 암세포의 에팍토시스를 야기하면서 항암제로서 행동한다는 것이 발견되어져 왔다.

바람직하게는 상기 화합물은 트랜스- β -오시멘이다.

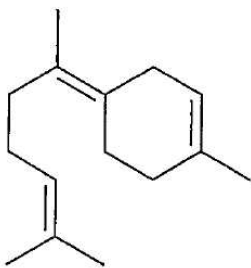
대표적인 비사볼렌 타입의 테르펜은 α -비사볼렌, β -비사볼렌, γ -비사볼렌을 포함한다. α -비사볼렌, β -비사볼렌, γ -비사볼렌은 아래와 같다.



α -bisabolene



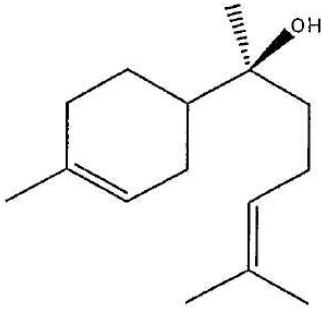
β -bisabolene



γ -bisabolene

바람직하게는 비사볼렌 타입의 테르펜은 α -비사볼렌 또는 γ -비사볼렌이다.

본 발명의 하나의 바람직한 실시예에서 테르펜은 α -비사볼렌이 아니다. α -비사볼렌은 아래와 같다.

 α -bisabolol

위에서 지적된 대표적인 화합물들 중에서 본 발명의 첫번째 또는 두번째 국면에서 사용된 화합물이 선택되는 것이 특별히 바람직하다. 만일 수정된 화합물이 항암 활성을 갖는다면, 본 발명의 테르펜의 일반식 안에서 작은 수정(Minor modification)이 만들어질 수 있다. 작은 수정은 상기 화합물의 활성을 파괴하지 않는 것으로 여겨지는 사이드 그룹을 그와 밀접하게 관련된 사이드 그룹으로 치환하는 것을 포함한다. 예를 들어, $-\text{CH}_3$ 를 $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ 로 치환하는 것을 말한다. 당업계에서 기술을 가진 사람들은 상기 화합물들의 활성을 파괴하지 않으면서 위에 주어진 일반식에 의해 포섭되는 테르펜 화합물로 만들어질 수 있는 적절한 수정에 대해 잘 알고 있다.

특별히 테르펜 화합물은 트랜스- β -오시멘, α -비사볼렌 또는 γ -비사볼렌이 선호된다.

본 발명의 첫번째 또는 두번째 국면에서 사용된 화합물은 이타리움(etarium), 지메나(Ximenia), 폴리고넘(Polygonum), 코미포라(Commiphora) 또는 보스웰라(boswellia) 속에 있는 식물들로부터 얻어질 수 있다. 특별히, 그것은 식물 디타리움 마이크로카퓼(Detarium microcarpum), 지메나 아메리카나(Ximenia americana), 폴리고넘 림카툼(Polygonum limbatum), 코미포라 몰몰, 코미포라 구구이도티 또는 보스멜리아 sp(Bosmellia sp)로부터 얻어지는 것이 선호된다.

본 발명의 첫번째 또는 두번째 국면에서 사용된 화합물은 상기 지적된 적절한 식물들로부터 그것을 분리함에 의해 얻어질 수 있다. 특별히, 그 화합물들의 대다수는 코미포라 몰몰 또는 코미포라 구구이도티로부터 분리될 수 있다. 상기 화합물은 어떠한 적절한 준비 방법을 사용하면서 분리될 수 있다. 그런 화합물들을 분리하는 방법은 당업계에서 통상의 기술을 가진 자들에게 잘 알려져 있고, 플래쉬 컬럼 크로마토그래피(flash column chromatography)와 고체 상 추출 컬럼(solid phase extraction column)와 같은 크로마토그래피 방법(chromatographic method)을 포함한다. NMR(Nuclear Magnetic Resonance)과 MS(Mass Spectrometry)가 개개의 화합물들을 확인하기 위해 사용될 수 있다.

본 발명의 조성물(composition)에서 사용되는 화합물이 식물로부터 분리될 때, 실질적으로 아무런 오염 식물 물질이 존재하지 않는다. 실질적으로 아무런 오염 식물 물질이 존재하지 않는다는 것은 오염 식물 물질이 0.1% (w/w)보다 적게 존재한다는 것을 의미한다.

본 발명의 조성물에서 사용된 화합물은 RC Treat Ltd(trans- β -Ocimene과 γ -bisabolene)와 KIC Inc.,(α -bisabolol)과 같은 상업적인 소스로부터 얻어질 수 있다. 본 발명의 화합물은 역시 표준의 화학적인 합성 과정을 사용하면서 합성될 수 있다.

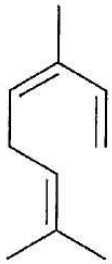
테르펜 화합물의 둘 또는 그 이상은 항암제로서 함께 사용될 수 있다. 게다가, 부가적인 항암제, 테라퓨틱스(therapeutics), 마커(marker) 등이 역시 본 발명의 첫번째 또는 두번째 국면에 따라 사용되는 테르펜 화합물과 함께 사용될 수 있다.

항암이란 단어의 의미는 암의 발전을 막거나 감소시키기 위해 사용될 수 있는 또는 암의 크기를 감소시킬 수 있는 것을 의미한다.

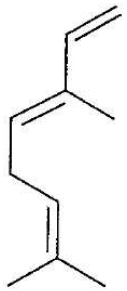
본 발명의 첫번째 또는 두번째 국면에 따라 치료된 또는 예방될 수 있는 암은 어떠한 암일 수도 있다. 그러나 바람직하게는 인간 암이다. 선호되는 암들은 유방암, 난소암, 전립선암, 콜론암(colon cancer), 폐암, 췌장암, 장암(bowel cancer), 흑색종, 고환암, 자궁경부암, 피브로사르코마(fibrosarcoma), 스쿠아모스 세포 카르시노마(squamous cell carcinoma), 류카미아(leukaemia), 아스트로시토마(astrocytoma) 및 글리오마(glioma)를 포함한다.

본 발명의 첫번째 또는 두번째 국면에서 사용되는 화합물들은 상응하는 정상 세포보다 암세포에서 에팍토시스의 더 높은 레벨을 생산한다. 이것은 상기 화합물들이 적절한 복용량에서 암세포에 대해 활성이 있다는 것을 의미한다.

본 발명의 세번째 국면에 따르면, 테르펜 또는 그것의 산소로 처리된 유도체와 약제적으로 수용되어질 수 있는 첨가제(excipient), 캐리어(carrier), 보조제(adjuvant) 또는 부형약(vehicle)을 포함하는 약제의 조성물이 제공된다. 상기 테르펜은 I)시스- β -오시멘(cis- β -Ocimene) 그리고 트랜스- β -오시멘(trans- β -Ocimene) 그리고 II) 비사볼렌 타입(bisabolene type)의 모노싸이클릭 세스퀴테르펜(monocyclic sesquiterpene)으로부터 선택된다. 시스- β -오시멘(cis- β -Ocimene) 그리고 트랜스- β -오시멘(trans- β -Ocimene)은 아래와 같다.



cis- β -Ocimene



trans- β -Ocimene

바람직하게 테르펜 화합물은 본 발명의 첫번째 및 두번째 국면과 관련하여 위에서 정의된 것과 같다.

상기 테르펜 화합물은 어떠한 약제적으로 수용될 수 있는 캐리어, 보조제 또는 부형약과도 함께 개체에 전달될 수 있다. 약제적으로 수용될 수 있는 캐리어, 보조제 또는 부형약들은 알투니나(alutina), 알루미늄 스테아레이트(aluminum stearate), 레시틴(lecithin), 인간 세럼 알부민과 같은(human serum albumin) 세럼 단백질(serum protein), 포스페이트(phosphate)같은 완충물질(buffer substance), 글리신(glycine), 소르빅산(sorbic acid), 포타시움 소베이트(potassium sorbate), 포화된 식물 지방산의 부분 글리세라이드 혼합물(partial glyceride mixtures of saturated vegetable fatty acid), 물, 소금 또는 프로토민 설페이트(protomine sulphate)같은 전해질(electrolyte) 디소듐 하이드로젠포스페이트(disodium hydrogen phosphate), 포타시움 하이드로젠 포스페이트(potassium hydrogen phosphate), 소듐 클로라이드(sodium chloride), 아연 염(zinc salt), 콜로이달 실리카(colloidal silica), 마그네시움 트리실리케이트(magnesium trisilicate), 폴리비닐 피롤리돈(polyvinyl pyrrolidone), 셀룰로오계물질(cellulose-based substance), 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol), 소듐카복시메틸셀룰로스(sodium carboxymethylcellulose), 폴리아크릴레이트(polyacrylate), 왁스(wax), 폴리에틸렌-폴리옥시프로필렌-블록 중합체polyethylene-polyoxypropylene-block polymer 및 양모 지방(wool fat)을 포함하며, 이들에 한정되는 것은 아니다.

상기 약제 조성물은 구강으로, 비경구적으로(parentally), 흡입 스프레이에 의해서, 국부적으로(topically), 직장으로(rectally), 코로(nasally), 볼로(buccally), 질로(vaginally) 또는 이식된 숙주(implanted reservoir)에 의해서 투여될 수 있다. 바람직하게는 상기 약제 조성물은 주사에 의해 투여된다. 여기서 사용된 비경구적으로(parentally)란 단어는 피하의

(subcutaneous), 피내의(intracutaneous), 정맥내의(intravenous), 근육내의(intramuscular), 관절내의(intra-articular), 활액내의(intrasynovial), 흉골내의(intrasternal), 인트라테칼(intrathecal), 인트라레저널(intralesional) 및 인트라레니얼(intracranial) 주사 또는 주입 기술을 포함한다.

상기 약제 조성물은 무균의 주사 가능한 조제약(sterile injectable preparation)의 형태로, 예를 들어 무균의 수성 또는 유성의 서스펜션의 형태로 전달될 수 있다. 이 서스펜션은 적절한 분산제 또는 습윤제(예를 들어 Tween 80) 그리고 서스펜딩 에이전트를 사용하면서 당업계에서 알려진 기술에 따라서 형성될 수 있다.

본 발명의 상기 약제 조성물은 역시 직장 투여(rectal administration)를 위한 유체 또는 좌약의 형태로 투여될 수 있다. 좌약은 테르펜 화합물과 상온에서는 고체이고 직장의 온도에서는 액체이어서 직장에서 녹아 테르펜 화합물을 놓아줄 수 있는 적절한 염증을 일으키지 않는 첨가제와 함께 준비될 수 있다. 그런 물질은 코코나 버터(cocoa butter), 비스왁스(beeswax) 및 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol)을 포함하나, 이들에 한정되는 것은 아니다. .

상기 화합물의 국부 투여는 요구되는 치료가 국부투여에 대해 쉽게 접근할 수 있는 지점 또는 조직을 포함할 때 바람직할 수 있다. 피부로의 국부적인 적용을 위해, 테르펜 화합물은 미네랄 오일(mineral oil), 액체 페트롤레움(liquid petroleum), 백색 페트롤레움(white petroleum), 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리옥시에틸렌(polyoxyethylene), 폴리옥시프로필렌 화합물(polyoxypropylene compound), 유화용 왁스(emulsifying wax) 그리고 물과 같은 국부투여를 위한 케리어들과 함께 형성된다. 다만, 케리어가 상기 물질들로 한정되는 것은 아니다. 대신으로, 테르펜 화합물은 적절한 로션 또는 크림과 함께 형성되거나 케리어에서 용해될 수 있다. 적절한 케리어는 미네랄 오일(mineral oil), 소비탄 모노스테레이트(sorbitan monostearate), 폴리소베이트 60(polysorbate 60), 세틸 에스테르(cetyl ester), 왁스(wax), 세테아릴 알콜(cetearyl alcohol), 2-옥틸도데카놀(2-octyldodecanol), 벤질 알콜(benzyl alcohol) 및 물을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 테르펜 화합물은 직장의 좌약 형성에 의해 또는 적절한 관장제 형성으로서 너 낮은 장의 트렉트(intestinal tract)로 국부적으로 적용될 수 있다.

본 발명의 상기 약제 조성물은 코의 에어로졸(nasal aerosol) 또는 흡입(inhalation)에 의해 투여될 수 있다. 그런 투여를 위한 적절한 조성물은 약제 형성의 분야에서 기술을 가진 자들에게 잘 알려진 기술에 따라서 준비될 수 있고, 벤질 알콜 또는 다른 방부제, 흡수 방부제를 포함하는 염분을 포함한 용액으로서 준비된다.

환자에게 전달되는 테르펜 화합물의 정확한 양은 환자의 암의 상태, 일반적 건강, 나이, 체중 그리고 성과 음식물, 투여 시간 및 빈도, 반응 민감성 및 치료법으로의 내성 및 반응에 의존할 것이다. 적절한 양은 일상적인 실험에 의해 결정되고 임상 의학자의 판단 안에 있다. 일반적으로 효과적인 복용량은 0.2pM 내지 100mM이 바람직하고, 0.2pM 내지 100mM이 더 바람직하다.

상기 본 발명의 약제 조성물은 다른 약물, 에이전트 또는 마커(marker)와의 결합을 통해 투여될 수 있다.

본 발명은 역시 치료에서의 사용을 위한 본 발명의 첫번째 국면에서 사용된 테르펜 화합물을 제공한다.

본 발명은 체외에서의 항암제로서 본 발명의 첫번째 국면에서 사용된 테르펜 화합물의 사용을 제공한다.

본 발명은 역시 암의 치료 또는 예방을 위한 약물의 제조에서 코미포라 구이도티의 사용을 제공한다.

본 발명은 역시 그런 치료의 필요에 있는 환자에게 코리포라 구이도티 추출물의 효과적인 복용량을 투여하는 것을 포함하는 암 치료 또는 예방의 방법을 제공한다.

코미포라 구이도티 추출물은 어떤 추출물일 수 있다, 그리고 바람직하게는 그것은 본 발명의 첫번째 국면에서 사용된 화합물의 적어도 하나를 포함한다. 바람직하게는, 상기 추출물은 적어도 하나의 트랜스- β -오시텐, α -비사볼렌, γ -비사볼렌을 포함한다.

상기 추출물은 바람직하게는 알코올성의 추출물(alcoholic extract)이고, 식물의 알코올성 추출물을 얻는 것을 위한 표준의 과정을 사용하면서 얻어질 수 있다. 특별히, 그런 알코올성의 추출물을 얻는 것을 위한 방법은 당업계에서 통상의 기술의 가진 자들에게 잘 알려져 있다. 대신으로, 식물 물질(plant material)은 식물의 필수적인 오일의 알코올성의 추출물인 것이 바람직하다. 필수적인 오일은 단편 식물 물질(fragment plant matter)의 휘발성의 유기 구성 성분(volatilic, organic constituent)이다. 필수적인 오일은 일반적으로 두개의 주된 방법, 즉 증류(스팀, 물 또는 건조 증류)와 콜드 프레스(cold pressing)에 의해 식물로부터 추출될 수 있다. 주로 오일을 포함하는 식물 추출물은 역시 용매, 이산화탄소 엑스트랙션

(carbon dioxide extraction) 또는 하이드로프로로알칸을 사용하면서 준비될 수 있다. 텅크 식물 추출물(Tincture plant extract)은 식물 물질들을 분해하고 수용성의 에탄올 용매(70%-90% ethanol in water)를 사용하면서 추출하고 일정 시간동안 방치하고 그 후에 고체 부스러기들을 필터링함에 의해서 만들어질 수 있다.

도면을 참조하면서 다음의 예들이 설명을 위해 제공된다. 그러나, 어떤 방식으로든 본 발명을 제한하는 것은 아니다.

도 1은 성장 배지(growth medium)로 667ug/ml의 코미포라 몰몰과 하디 추출물(Haddi extract)을 첨가한 그리고 첨가하지 않은 인간 피브로사코마 세포의 성장 커브를 보여준다.

도 2는 성장 배지(growth medium)로 667ug/ml의 코미포라 몰몰과 하디 추출물(Haddi extract)을 첨가한 그리고 첨가하지 않은 S180 피브로사코마 세포의 성장 커브를 보여준다.

도 3은 S180 피브로사코마 세포 라인에서 에탄올 추출된 코미포라 몰몰의 세포 독성의 효과를 보여 준다.

도 4는 HT1080 피브로사코마 세포 라인에서 에탄올 추출된 코미포라 몰몰의 세포 독성의 효과를 보여 준다.

도 5는 S180 피브로사코마 세포 라인에서 헥산 추출된 하디의 세포 독성의 효과를 보여 준다.

도 6은 HT1080 피브로사코마 세포 라인에서 헥산 추출된 하디의 세포 독성의 효과를 보여 준다.

도 7은 S180 종양 세포 라인에서의 트랜스- β -오시멘의 세포 독성 효과를 보여준다.

도 8은 HT1080 종양 세포 라인에서의 트랜스- β -오시멘의 세포 독성 효과를 보여준다.

도 9는 S180 종양 세포 라인에서의 γ -비사볼렌의 세포 독성 효과를 보여준다.

도 10는 HT1080 종양 세포 라인에서의 γ -비사볼렌의 세포 독성 효과를 보여준다.

도 11은 12시간 동안 5uM 비사볼렌으로 처리된 HT1080 인간 피브로사코마 세포에서의 에팍토틱한 세포 죽음의 유도를 보여 준다.

도 12는 정상 피브로블레스트 세포(fibroblast cell)에서의 에탄올 추출된 코미포라 몰몰의 효과를 보여준다.

도 13은 정상 피브로블레스트 세포(fibroblast cell)에서의 헥산 추출된 하디의 효과를 보여준다.

도 14는 5uM 비사볼렌 으로 12시간 동안 처리된 혼합된 조직 배양(tissue culture)를 보여 준다.

도 15는 100uM 트랜스- β -오시멘으로 12시간 동안 처리된 혼합된 조직 배양(tissue culture)를 보여 준다.

실시예

실험예(EXAMPLES)

1. 성장 곡선 분석은 체외에서의 일정시간 동안의 세포주 성장패턴에 대한 정보를 제공한다.

S180 뮤린(murine) 사코마 세포 라인과 인간 피브로사코마 HT1080 세포 라인에서의 에탄올 추출된 코미포라 몰몰과 헥산 추출된 하디의 세포 죽음 유도 특성이 테스트된다. 종래의 실험들로부터의 결과는 두 추출물의 667ug/ml 용액은 모두 세포 죽음을 야기시키는 에이전트로서 효과가 있다는 것을 지적한다. 5×10^4 cells/ml의 세포 밀도를 갖는 스톡 세포 서스펜션(stock cell suspension)은 존재하는 세포 배양로부터 신선하게 생산되었다. 48개의 플라스크가 라벨되고 이 세포 서스펜션의 5ml가 48개의 플라스크로 주입된다.(8일의 실험 동안 매일 2개의 에탄올 추출 코미포라 몰몰과 2개의 헥산 추출된 하디 플라스크, 1개의 비처리 플라스크 당 2개의 조절 플라스크). 모든 플라스크는 37 °C와 5%의 이산화탄소에서 인큐베이트되었다. 4일째 되는 날에 배지들이 모든 남아 있는 플라스크에서 변화되었다. 비처리된 배지들은 조절 플라스크를 보충하기 위해 사용되었다. 반면 667ug/ml의 추출물 농도를 갖는 배지는 상응하는 치료 플라스크를 보충하기 위해 사용되

었다. 4일(4일째 되는 날, 이하 동일하게 기재함.)이 성장 커브의 급격한 성장의 첫번째 날이기 때문에 그 날이 처리 날로서 선택되었다. 성장 커브에서 이 점에서의 처리는 이 변형된 세포 라인에서 세포 죽음을 야기시키기 위한 에탄올 코미포라 물질과 핵산 하디의 능력을 전적으로 증명하기 위해 기여하였다. 유사한 프로토콜이 HT1080, 인간 피브로사코마 세포 라인을 성장시키기 위해 사용되었다. 이 예에서, 성장은 더 늦어지고 세포는 7일(7일째 되는 날)에 융합될 때 추출물과 함께 처리된다(도 1 참조).

매일의 카운트는 표준의 프로토콜을 따르면서 매일 같은 시간에 수행되었다. 간략하게, 모든 배지들은 피펫팅에 의해 제거되었다. 플라스크들은 플라스크들로부터 가능한 많은 세포 찌꺼기를 제거하기 위해 2ml PBS로 두번 세척되었다. 마지막 세척은 1ml Tris-EDTA를 사용하면서 수행되었고, 이것은 어떤 남아있는 배지를 중화하기 위한 매우 빠른 세척이다. 모든 액체는 1ml의 Tris-EDTA가 추가적으로 플라스크에 더해지기 전에 피펫팅에 의해 조심스럽게 깊게 제거되었다. 이 플라스크들은 모든 세포가 플라스크로부터 분리되는 것을 확실히 하기 위해 2-5분 동안 37°C에서 5%의 이산화탄소 분위기에서 인큐베이트되었다. 4일로부터 Tris-EDTA의 2ml는 세포 수가 현저하게 증가할 때에 세포 카운팅을 쉽게 하기 위해 사용되었다. 이 세포 서스펜션은 균질성을 확실히 하기 위해 부드러운 피펫팅(gentle pipetting)에 의해 혼합되었고, 샘플은 아헤모시토메터(ahemocytometer)에 위치하게 되고, 세포들은 라이트 현미경 아래에서 카운트되었다. 모든 것에서, 4 카운트가 각각의 플라스크로부터 얻어졌다. 평균적인 값은 성장 커브를 플롯하기 위해 계산되고 사용되었다(도 1, 2 참조).

도 2는 명백하게 S180 세포가 S자 모양의 성장 커브를 나타낸다는 것을 보여준다. 세포 밀도는 0일과 3일 사이에 5×10^4 cells/ml에서 21.1×10^4 cells/ml 매우 천천히 증가한다. 3일부터 6일까지는 급격한 성장 페이스(exponential growth phase)이다. 이 때, 세포 밀도는 10배 정도(240×10^4 cells/ml 정도로) 증가한다. 평탄한 페이스는 6일과 7일 사이에 관찰되었다. 이 때, 세포 수는 상대적으로 일정하게 유지되고 8일에 떨어지기 시작한다. 세포수에 있어서의 이러한 감소는 세포 배양에서의 공간과 영양분 고갈(nutrient depletion)에 기인한다.

핵산 하디 추출물로 처리된 세포들은 보통 4일까지 활동한다. 5일은 세포 숫자의 급격한 감소를 본다(4일의 68.6×10^4 cells/ml에서 1.8×10^4 cells/ml으로). 세포수는 8일에서 0에 도달할 때까지 꾸준히 감소한다. 이것은 세포들이 보통 6일까지 성장을 계속하는 것으로 기대되기 때문에 빠르게 성장하는 변형된 세포 라인에서의 세포 죽음을 야기시키는 핵산 추출 하디의 능력을 증명한다(조절 커브 참조).

에탄올 추출 코미포라 물질도 역시 S180 세포들에서 세포 죽음을 효과적으로 야기시키는 것으로 보여진다. 다시, 4일까지 S180 세포들은 전형적인 성장 패턴을 따른다. 4일에서의 치료를 따르면서 세포 수는 47.9×10^4 cells/ml(4일)로부터 12.8×10^4 cells/ml(5일)로 떨어진다. 세포수에서의 이러한 감소는 핵산 하디 치료에서보다 더 늦은 속도로 일어난다.

도 1은 7일에 성장 배지로 에탄올 추출 코미포라 물질과 핵산 추출 하디의 $667 \mu\text{g/ml}$ 의 첨가를 따르면서 인간 HT1080 피브로사코마 세포로부터의 유사한 반응을 보여준다. 비처리 세포는 13일까지 잘 성장하는 것을 계속한다. 반면에 코미포라 물질과 하디 처리된 세포 라인은 7일로부터 수적으로 빠르게 감소한다.

2. 에탄올 추출 코미포라 물질과 핵산 추출 하디 추출물로 처리된 S180 사르코마와 HT1080 인간 피브로사코마 세포 라인에 대한 MTT 에세이

MTT 에세이는 세포 개체군의 생존 능력을 측정하는 강력하고 정량적이고, 고도로 신뢰할 수 있는 칼라리메트릭 에세이(colourimetric assay)이다. 생존 가능한 세포의 미토콘드리아 효소는 노란 수용성 화합물로부터 비수용성 자주색의 포르마잔(formazan) 프로덕트로 3-(4, 5-디메틸티아졸-2-yl)-2, 5-디페닐테트라졸리움브로마이드(3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) (MTT)를 신진대사시킬 수 있다.-이것은 상기 에세이의 화학적 근거이다. 생산된 포르마잔의 양은 직접적으로 테스트 개체군에서의 생존 능력이 있는 세포의 수에 비례한다.

형성된 포르마잔 프로덕트는 디메틸 설펍사이드(DMSO)에서 용해될 수 있다. 디메틸 설펍사이드(DMSO)는 스펙트로포토메트리(spectrophotometry)를 통해 얻어지는 프로덕트의 양 정함(quantification)을 할 수 있다. 대부분 생존 가능한 세포를 포함하는 개체군은 포르마잔 프로덕트의 하이 레벨을 생산할 것이고, 그리하여 DMSO와의 용해에서 진한 자주빛의 용액을 제공할 것이다. 반면에, 대부분 죽은 세포를 가지는 세포 개체군은 색깔 없는 용액을 생산할 것이다.

흡수된 빛(575nm의 파장)의 양은 아래 계산을 사용하여 % 세포독성(% cytotoxicity)으로 변경될 수 있다.

[컨트롤 흡수(control absorption)-테스트 흡수(test absorption)]X 100/컨트롤 흡수(control absorption) = % 세포 독성(% cytotoxicity)

실험적인 프로토콜(Experimental Protocol)

두 개의 변형된 세포 라인이 MTT 분석을 위하여 선택되었다(S180 뮤린 사르코마 세포와 HT1080 인간 피브로사코마 세포). 세포들은 2×10^5 cells/ml의 밀도에서 96-웰 마이크로타이트레 플레이트(96-well microtitre plate)에서 씨드(seed)되었고, 치료에 앞서 24시간 동안 37°C, 5% 이산화탄소 분위기에서 인큐베이트되었다. 200ul PBS는 세포를 포함하는 웰로부터 증발 손실을 감소하기 위해 플레이트의 외부의 끝에서 웰로 더해졌다.

이 연구에서 우리는 변형된 세포에 대한 세포 독성에 대하여 에탄올 추출 코미포라 물질과 헥산 추출된 하디 추출물을 테스트했다. 추출물들은 1333ug/ml의 치료를 주기위해 각각의 세포 라인을 위한 배지로 더해졌다. 추출물의 점진적으로 더 희석된 농도의 범위가 테스트되도록하기 위해 연속적인 희석은 수행되었다. 같은 진행이 같은 농도의 스토로스포린(Staurosporine) 및 에탄올의 용액을 만들기 위해 뒷따라졌다. 추출물의 세포 독성을 비교하기 위한 기준(benchmark)을 제공하기위해, 잘 확립된 세포독성을 갖는 에이전트인 스토로스포린은 그 연구로 구체화(incorporated)된다. 추출물들은 주로 배지에서 홀로 용해되지 않는 유기 분자를 포함하므로, 추출물이 배지로의 도입에 앞서 에탄올에서 용해될 필요가 있기 때문에 에탄올 조절은 수행되었다-이러한 조절은 그것이 어떠한 얻어진 세포 죽음을 야기시키는 에탄올이 아니라는 것을 확실히 한다.

각각의 추출물의 각각의 농도의 100ul는 라벨된 마이크로타이트레 플레이트(labeled microtitre plate)에서 세 개의 분리된 웰로 더해진다. 비처리된 대조군 웰에서 배지의 100ul가 더해졌다-모든 웰은 200ul의 총 최종적인 부피를 가진다. 이것의 3개의 동일한 복제(replicate)들이 24, 48, 72시간 후의 테스트를 위하여 수행되었다. 모든 식물들은 리딩(reading)까지 37°C 그리고 5% 이산화탄소 분위기에서 인큐베이트되었다.

요구되는 길이의 시간 후에(예를 들어, 24, 48 또는 72 시간), 20ul MTT 용액(Smg/ml)은 각각의 웰로 더해진다(단지 PBS를 포함하는 웰들은 제외한다). 플레이트는 추가적인 4 시간 동안 인큐베이터로 되돌아갔다(같은 환경에서). MTT는 감광성이다. 그래서 모든 플레이트들은 빛으로의 노출을 최소화하기 위해 포일에서 덮여졌다. 4 시간 후에 웰로부터의 모든 배지들은 피펫으로 옮겨졌다. 그리고, 200ul DMSO는 각각의 웰로 더해졌다. 피펫을 이용한 조심스런 혼합은 용해를 통하여 확인되어졌다. 모든 플레이트는 575nm에서의 빛의 흡수에 대해 스펙트로포토미터에서 읽혀졌다. 이것은 DMSO의 추가 후에 즉시 행해졌다. 결과는 도 3 내지 도 6에서 보여진다.

같은 방법이 역시 하디 추출물의 확인된 구성 성분의 영향을 테스트하기 위해 채용되어졌다. 앞서 말한 바와 같이, 하디 추출물의 주된 구성성분인 트랜스-β-오시멘과 γ-비사볼렌은 종양 세포 세포독성 및 생존능력에 대한 그들의 영향을 평가하기 위해 MTT 분석을 사용하면서 테스트되어졌다(도 7 내지 10 참조).

S180 피브로사코마와 HT1080 인간 피브로사코마 세포 라인에 대한 에탄올 추출된 코미포라 물질과 헥산 추출된 하디의 세포 독성 효과가 도 3 내지 6에서 보여진다. 코미포라 물질과 하디 추출물은 시간과 함께 세포독성에서의 복용량 의존적인 증가를 생산한다. 일반적으로 코리포라 물질 추출물의 효과는 하디 추출물의 그것보다 더 점진적인 것으로 발견되었다. 코미포라 물질 추출물은 24시간 후에 세포 죽음에서의 점진적인 증가를 보여준다. 반면에 하디 추출물은 더 낮은 복용량에서 더 즉각적인 세포 죽음 시작을 일으킨다.

S180과 HT1080 종양 세포 라인에 대한 트랜스-β-오시멘과 γ-비사볼렌의 세포 독성 효과는 도 7 내지 10에서 보여진다.

트랜스-β-오시멘과 γ-비사볼렌 및 α-비사볼렌의 세포 독성 효과는 역시 MM6 세포(모노사이트 류카미아 세포 라인(monocyte leukaemia cell line)) 및 A375 세포에서 테스트되었다. 결과는 아래의 표 5 내지 10에서 보여진다.

표 1은 S180 세포에 대한 24, 48 및 72 시간 후의 트랜스-β-오시멘의 세포 독성의 측정 결과이다.

[표 1]

Concentration (mM)	% Cytotoxicity		
	24 hours	48 hours	72 hours
250	92± 0	95 ± 0	95 ± 0
200	87± 3	95 ± 1	95 ± 0
150	82± 7	87 ± 5	87 ± 5
100	69± 11	82 ± 7	88 ± 4
50	19± 3	28 ± 4	22 ± 5

*n=3 3번의 레플리케이트

표 2는 HT1080 세포에 대한 24, 48 및 72 시간 후의 트랜스-β-오시텐의 세포 독성의 측정 결과이다.

[표 2]

Concentration (mM)	% Cytotoxicity		
	24 hours	48 hours	72 hours
250	67± 2	90 ± 0	90 ± 1
200	62± 2	90 ± 0	90 ± 1
150	43± 8	71 ± 10	64 ± 12
100	16± 6	33 ± 5	15 ± 3
50	1± 5	0 ± 2	-5 ± 3

*n=3 3번의 레플리케이트

표 3은 S180 세포에 대한 24, 48 및 72 시간 후의 γ-비사볼렌의 세포 독성의 측정 결과이다.

[표 3]

Concentration (mM)	% Cytotoxicity		
	24 hours	48 hours	72 hours
250	89±0	89±1	86±1
200	90±0	93±1	89±1
150	92±0	93±1	91±1
100	93±0	95±0	94±0
50	93± 1	95±0	94±0

*n=3 3번의 레플리케이트

표 4는 HT1080 세포에 대한 24, 48 및 72 시간 후의 γ -비사볼렌의 세포 독성의 측정 결과이다.

[표 4]

Concentration (mM)	% Cytotoxicity		
	24 hours	48 hours	72 hours
250	78 $\pm$ 2	89 $\pm$ 1	81 $\pm$ 2
200	87 $\pm$ 1	92 $\pm$ 1	88 $\pm$ 1
150	87 $\pm$ 1	93 $\pm$ 0	90 $\pm$ 0
100	90 $\pm$ 0	94 $\pm$ 1	91 $\pm$ 0
50	90 $\pm$ 0	94 $\pm$ 0	92 $\pm$ 0

*n=3 3번의 레플리케이트

트랜스- β -오시멘과 γ -비사볼렌은 양쪽 다 S180 피브로사코마와 배양에서 성장된 인간 종양에서 세포 독성이 있고, 항암 약을 제공한다는 사실은 데이터로부터 명백하다. 오시멘은 200mM 이상의 농도에서 거의 100%의 종양 세포 죽음 (tumour cell death)을 야기하고, 비사볼렌은 약 50 mM 정도의 농도에서 효능이 있다. 두 약물 모두 에팍토시스를 야기한다(다음 섹션 참조). 오시멘은 조미료로 리스트되고 US Food and Drug Administration에 의해서 음식 첨가제로서 허가되었으며, 포유동물에 독성을 갖지 않는다.

표 5는 MM6 세포(모노사이트 류카믹 세포 라인)의 24, 48 및 72 시간 후의 트랜스- β -오시멘의 세포 독성 측정 결과이다.

[표 5]

Concentration (μ M)	%Cytotoxicity		
	24 hours	48 hours	72 hours
368	57	67	67
184	46	57	60
92	32	24	12
42	15	-30	-18

표 6은 A375 세포(인간 피부 멜라노마 세포 라인)에서의 24, 48 및 72 시간 후의 트랜스- β -오시멘의 세포 독성 측정 결과이다.

[표 6]

Concentration (μ M)	%Cytotoxicity		
	24 hours	48 hours	72 hours
368	29	35	31
184	7	8	-10
92	-11	-25	-31
46	7	-2	-33

표 7은 MM6 세포에서의 24, 48 및 72 시간 후의 γ -비사볼렌의 세포 독성 측정 결과이다.

[표 7]

Concentration (μ M)	%Cytotoxicity		
	24 hours	48 hours	72 hours
10	45	67	78
2.5	51	70	78
0.25	49	68	80
0.13	3	-37	13

표 8은 A375 세포에서의 24, 48 및 72 시간 후의 γ -비사볼렌의 세포 독성 측정 결과이다.

[표 8]

Concentration (μ M)	%Cytotoxicity		
	24 hours	48 hours	72 hours
10	23	64	77
2.5	15	55	71
0.25	10	7	50
0.13	15	5	13

γ -비사볼렌은 양 쪽의 종양 세포 타입에 대해 0.25×10^{-6} M 정도의 낮은 농도에서 높은 세포 죽음을 야기시키는 효능이 좋은 항종양제이다.

표 9는 MM6 세포에서의 24, 72 시간 후의 α -비사볼의 세포 독성 측정 결과이다.

[표 9]

Concentration (μ M)	%Cytotoxicity	
	24 hours	72 hours
10	33	49
2.5	46	51
0.25	48	54
0.13	48	53

표 10은 A375 세포에서의 24, 48 및 72 시간 후의 α -비사볼의 세포 독성 측정 결과이다.

[표 10]

Concentration (μ M)	%Cytotoxicity	
	24 hours	72 hours
225	31	41
112	10	26
56	-27	10
28	-2	1

α -비사볼은 MM6 종양 세포에 대해 $0.13 \times 10^{-6} \text{M}$ 정도의 낮은 농도에서 높은 세포 죽음을 야기시키는 효능이 좋은 항종양제이다. 더 높은 농도($225 \times 10^{-6} \text{M}$)는 A375 종양 세포를 위한 세포 죽음을 개시하기 위해 요구된다.

에탄올 추출 코미포라 몰몰과 헥산 추출 하디로 처리된 HT1080 피브로사코마 세포에서의 에팍토시스의 아네신 V 바이오에세이(Annexin V Bioassay)

아네신 V 바이오에세이는 에팍토시스를 통해 죽는 세포와 네크로시스를 통해 죽은 세포 사이를 구별하기 위해 사용된다. 오시멘과 비사볼렌이 어떻게 세포 죽음을 야기하는지를 아는 것은 중요하다. 만일 그 화합물들이 네크로시스 죽음을 야기했다면 그들은 치료제로서 거의 효능을 갖지 못하는 것이다. 이것은 네크로틱(necrotic) 세포는 이웃한 타겟되지 않은 세포로 잠재적으로 해를 주는 염증 반응을 야기시키면서 주위로 그들 자신을 분산시키기 때문이다. 한편, 에팍토시스는 염증을 야기시키지 않는 세포 자살(cell suicide)의 자연적인 분리된 형태(natural discrete form) 생산한다.

아네신 V 바이오에세이는 에팍토틱(apoptotic) 세포의 플라즈마 멤브레인에서 초기 변화를 이용한다. 그 동안에 포스페이트딜세린(phosphatidylserine (PS)), 즉 멤브레인 바운드 포스포리피드는 멤브레인 2층(bi-layer)의 내부 표면으로부터 외부 표면으로 이동된다-그리하여 PS는 외부환경과 접촉하게 된다. 이러한 변화는 초기 에팍토틱 세포를 위해 그것을 이상적인 마커(marker)로 만들면서 멤브레인 블레빙(membrane blebbing) 전에 그리고 DNA 분열(DNA fragmentation)보다 훨씬 일찍 일어난다. 아네신 V PS에 대한 높은 친화성(affinity)을 가진 Ca^{2+} -의존 포스포리피드 바인딩 단백질(phospholipid binding protein)이다. 이 연구에서 아네신 V는 아네신 V-FITC 컨주게이트를 생성하기 위해 FITC라고 불리는 형광성 마커로 커플(couple)된다. FITC는 형광성 마이크로스코피를 통해 보여질 때 강렬한 녹색/노란색을 가지고 발광한다. 그래서, 초기 에팍토틱 세포는 Annexin V-FITC를 그들의 플라즈마 멤브레인 위에서 결합하고, 녹색/노란색을 발광한다. 반면, 늦은 에팍토틱 세포는 멤브레인에서 뿐만 아니라 세포질(cytoplasm)에서 녹색/노란색을 발광할 것이다.

네크로틱 세포를 확인하기 위해 또 다른 다잉 에이전트(dying agent)인 프로피디움 요오드(propidium iodide (PI))가 사용된다. PI는 세포의 크로마틴(chromatin)을 얼룩지게 하고 적색/오렌지색을 발광하는 DNA 인터칼레이팅 에이전트(DNA intercalating agent)이다. PI는 온전한 플라즈마 멤브레인을 크로스(cross)할 수 없기 때문에, 그것은 단지 상처 입은 멤브레인(damaged membrane) 즉, 구멍이 있는(leaky) 네크로틱 또는 늦은 에팍토틱 세포를 갖는 세포의 크로마틴을 오염시킨다.

HT1080 세포는 37°C , 5%의 이산화탄소 분위기, 1×10^6 cells/ml의 세포 밀도에서 12-웰 플레이트 안에 있는 커버-슬립 위에서 성장했다. 일단 확립되었을 때, 이들 배양들은 24시간 동안 추출물의 0.2% 용액으로 처리되었다. 처리되지 않은 조절은 역시 같은 조건에서 수행되었다.

아네신 V-FITC와 PI 스테이닝(staining)은 메뉴팩처 프로토콜(manufacturers protocol)(Oncogene Research Products, Boston USA)에 따라서 수행되었다. 모든 성장 배지는 제거되었고 세포들은 세포로 더해진 500 μl 의 바인딩 버퍼와 1ml의 PBS와 함께 세척되었다. 10 μl 의 미디어 바인딩 에이전트와 1.25 μl 아네신 V-FITC는 웰로 더해진다. 이것은 어둠 속에서 상온(room temperature)($\sim 22^{\circ}\text{C}$)에서 15분 동안 인큐베이트되었다. 모든 미디어는 피펫팅에 의해 제거되었고, 차가운 바인딩 버퍼의 500 μl 가 세포로 더해졌다. 프로피디움 요오드 용액의 10 μl 가 더해졌다.

커버 슬립은 웰로부터 제거되었다. 세포는 즉시 FITC 및 로다민 필터를 사용하면서 발광 현미경(fluorescent microscope) 위에서 25배의 배율로 관찰되었다.

실험예(Examples)

아래의 아네신 V 테스트는 12시간 동안 5 μM 의 비사볼렌으로 처리된 HT1080 인간 피브로사코마 세포에서의 에팍토틱 세포 죽음의 야기를 보여준다. 녹색을 발광하는 세포(도면에서는 하얀색으로 보여짐)는 세포 사멸의 계획된 형태인 에팍토시스로 들어가는 것을 나타낸다(도 11 참조).

유사한 결과는 12시간 동안 100 μM 의 오시멘으로 처리된 S180 피브로사코마 세포 및 HT1080 인간 피브로사코마 세포로부터도 얻어졌다.

테스트된 개개의 화합물질들은 센티드 몰약 또는 하디의 주된 구성 성분을 나타낸다. 많은 작업은 몰약 또는 몰물의 주된 구성성분을 테스트하고 분리하는 것에서 행해져야 한다. 이 관점에서 특별한 주목은 퓨라노세스퀴터페노이드(Furanosesquiterpenoid)의 항 종양 특성을 테스트하는 것으로 주어질 것이다. 그들의 몇몇은 확인된 그리고 특성이 부여된 상태로 남아 있다.

정상 피브로블라스트 세포(Normal Fibroblast Cells)

대조군 배양에서 성장한 정상 피브로플라스트 세포는 에팍토틱 세포의 매우 낮은 발생을 보여 주었다(총 400개의 세포가 평가되었을 때, 약 3%가 에팍토틱 세포이고, 97%가 정상 세포이었다). 정상 피브로블라스트 세포가 666 μ g/ml의 에탄올 추출 코미포라 물질을 포함하는 배지에서 성장되었을 때, 에팍토틱 세포의 생산은 S180 및 HT1080 종양 세포 라인보다 훨씬 더 적다(인큐베이션의 6시간 후에 4.5% 에팍토틱 세포로부터 24시간 후에 32%로 증가함). 세포가 234 μ g/ml의 에탄올 추출 코미포라 물질을 포함하는 미디어에서 성장되었을 때, 에팍토틱 세포의 더 낮은 퍼센테이지가 관찰되었음에도 불구하고, 유사한 결과가 나왔다(인큐베이션의 6시간 후에 6.25%로부터 24시간 후에 19.25%로 증가함).(도 12 참조)

분리된 실험에서 정상 조절 배양에서 성장된 피브로블라스트 세포는 역시 에팍토틱 세포의 약간의 발생을 보여주었다(400개의 세포가 평가되었을 때 2.25%, 상대적으로 정상 생존 세포는 97.75%). 정상 피브로블라스트 세포가 666 μ g/ml 헥산 하디 추출물을 포함하는 배지에서 성장하였을 때, 에팍토틱 세포의 생산은 S180 및 HT1080 종양 세포 라인에서 얻어진 것보다 더 적었다(인큐베이션의 6시간 후에 16%의 에팍토틱 세포로부터 24시간 후에 37%로 증가함). 201 μ g/ml의 헥산 하디 추출물을 포함하는 배지에서 성장된 세포에서 에팍토틱 세포의 더 낮은 퍼센테이지가 관찰되었음에도 불구하고 유사한 결과가 관찰되었다(인큐베이션의 6시간 후에 11%로부터 24시간 후에 단지 25.5%로 증가함).(도 13 참조)

헥산 추출 하디가 에탄올 추출 코미포라 물질보다 S180 종양 세포에서 에팍토틱시스를 생산하는데 약간 더 잘 수행했다는 것이 주목되어진다. 에탄올 코미포라 물질 추출물과 헥산 하디 추출물 처리는 HT1080 인간 키브로사코마 세포에서 에팍토틱 세포의 퍼센테이지의 견지에서 매우 유사한 결과를 낳았다. 그 차이는 별로 크지 않았다.

두 개의 추출물 모두 정상 피브로사이트(fibrocyte)에서보다 형질전환된 피브로사코마 세포에서 더 높은 레벨의 에팍토틱시스를 생산한다는 것은 명백하다. 이것은 적절한 복용량에서 이들 추출물들이 종양 세포에 대항하여 우수한 활성을 갖는다는 것을 의미한다.

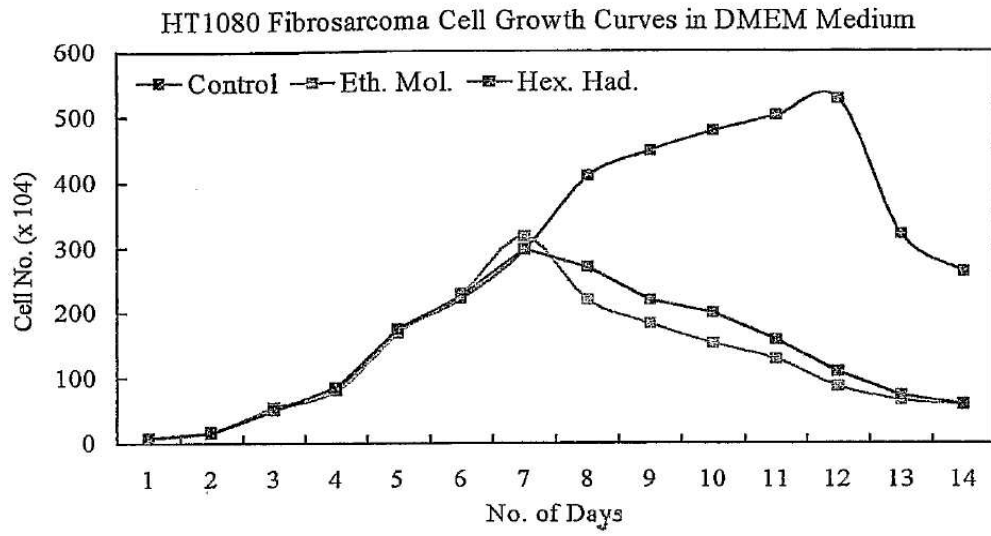
유사한 결과는 오시멘과 비스볼렌에 대한 우수한 반응의 견지에서 얻어질 수 있다. 게다가 피브로블라스트 세포와 종양 세포를 포함하는 혼합된 배양이 처리되었을 때, 정상 피브로블라스트는 생존하는 것으로 보인다. 반면 종양 세포는 에팍토틱시스로 간다.

그런 실험의 결과는 도 14에서 보여진다. 여기에서 혼합된 조직 배양은 5 μ M 비사볼렌으로 12시간 동안 처리되었다. 평평해진 피브로사이트(flattened fibrocyte)가 생존한 반면, 종양 세포는 에팍토틱 바디로서 죽는 것으로 관찰되었다. 도 15에서 혼합된 조직 배양은 100 μ M 오시멘으로 12시간 동안 처리되었다. 피브로사이트는 생존한 반면 종양 세포는 에팍토틱 바디를 형성하여 죽는 것으로 관찰되었다.

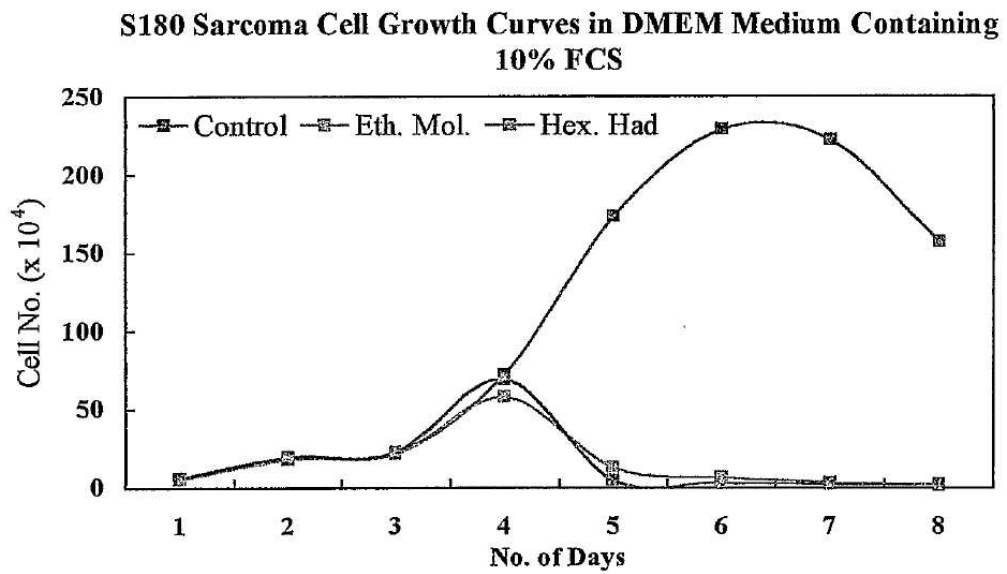
위에서 인용된 모든 문헌은 참고문헌에 의하여 여기에서 통합된다.

도면

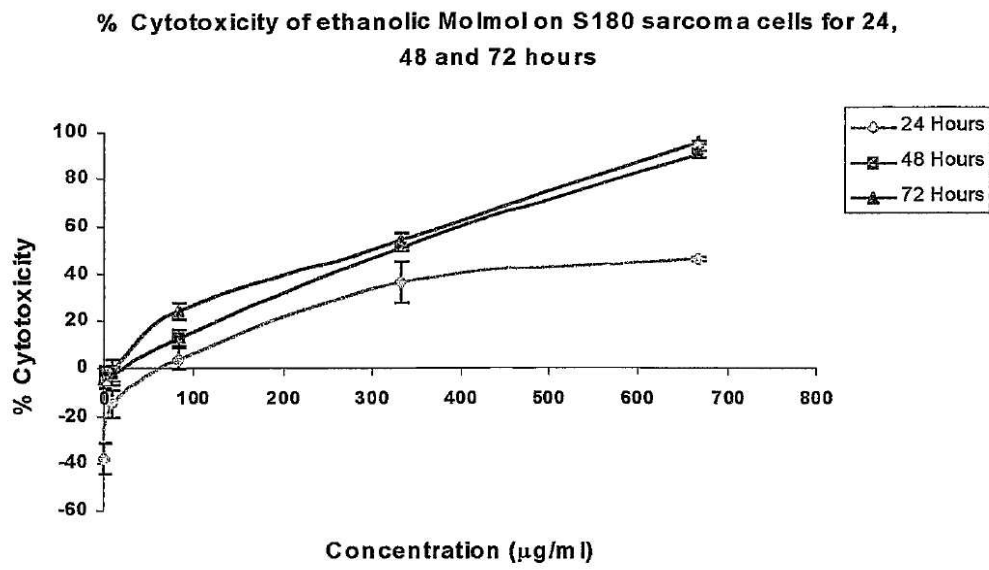
도면1



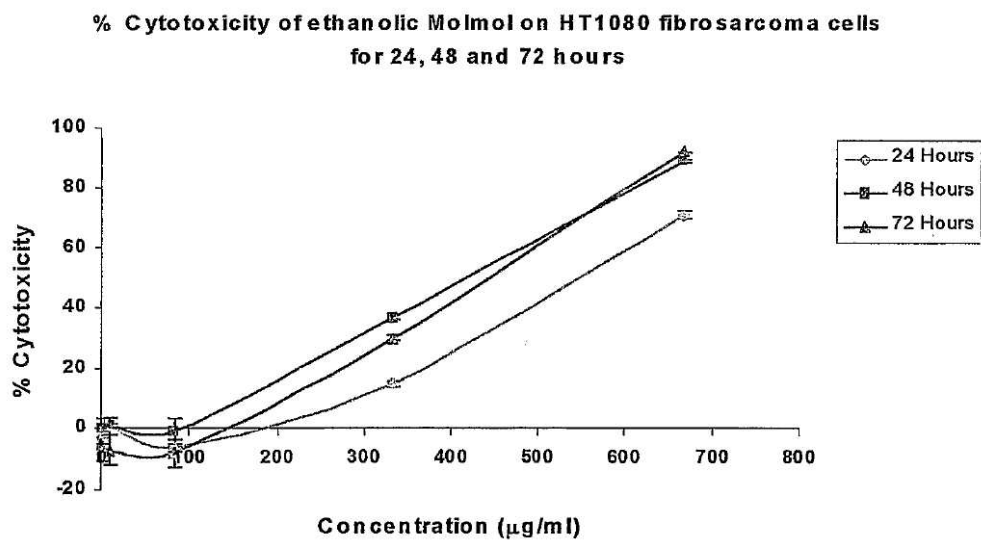
도면2



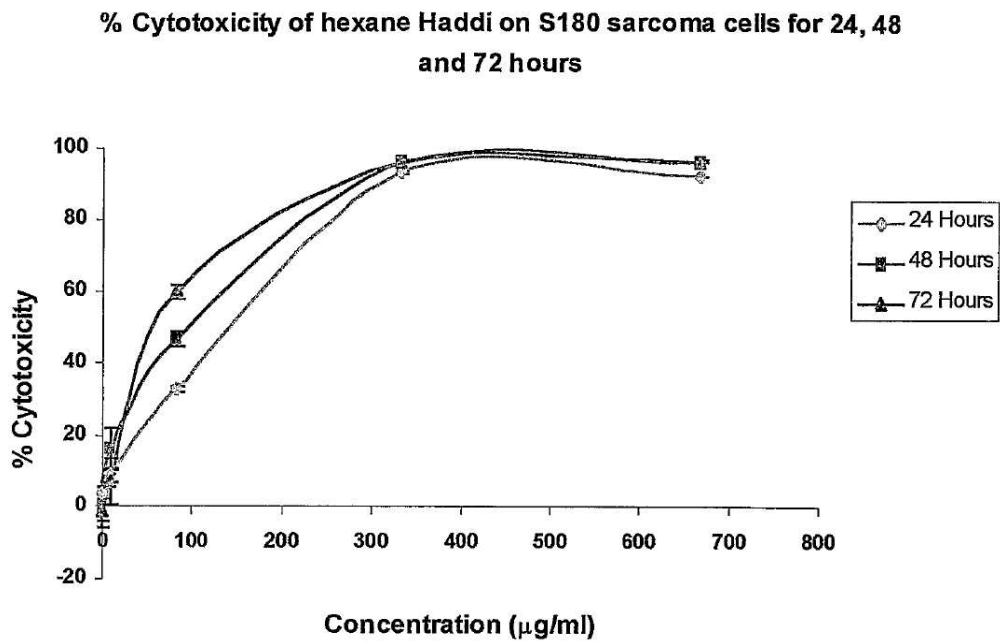
도면3



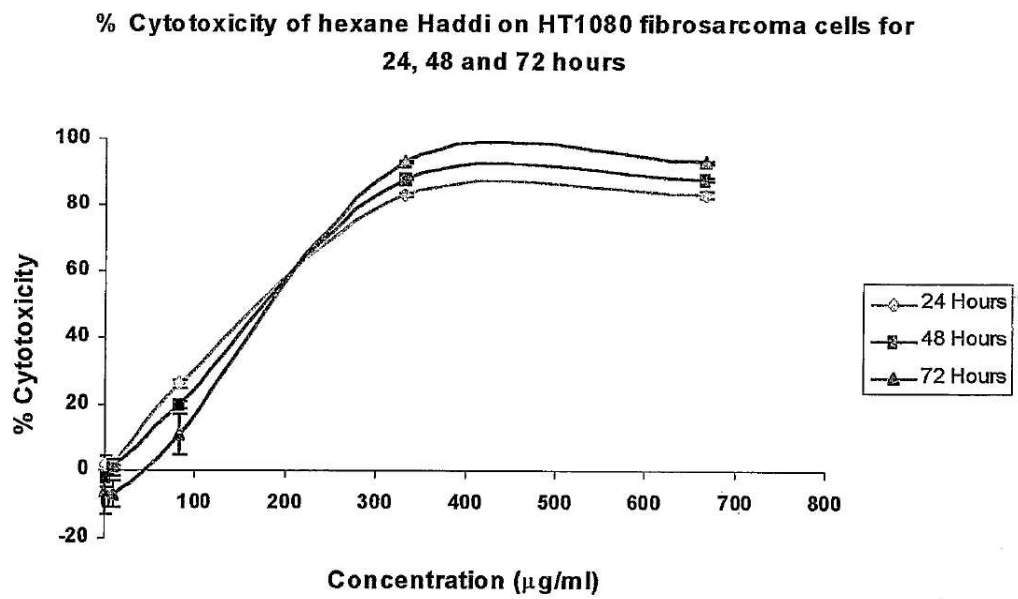
도면4



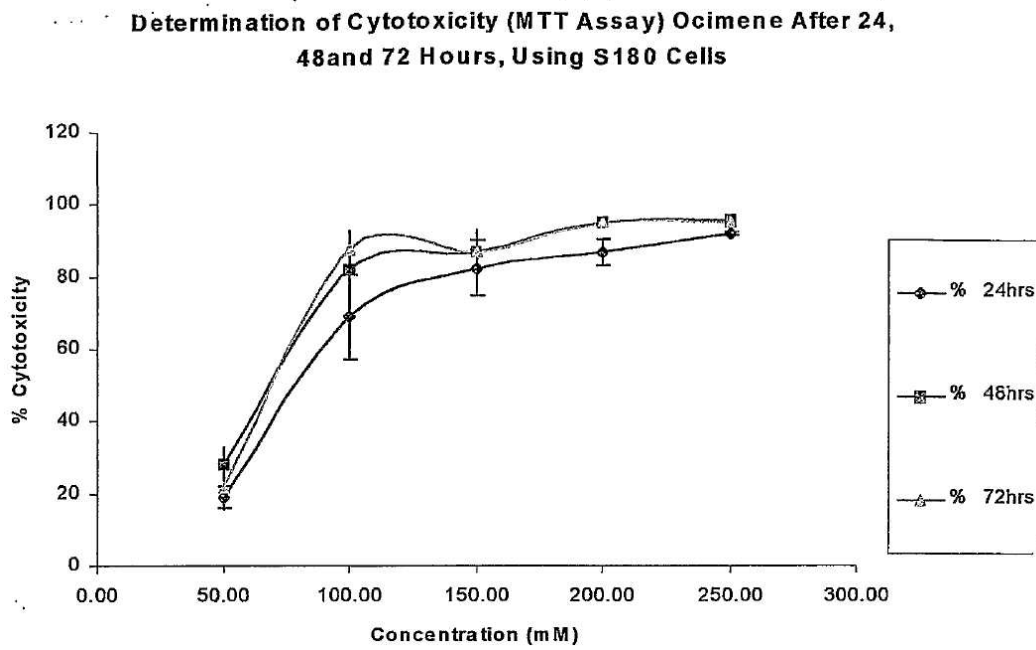
도면5



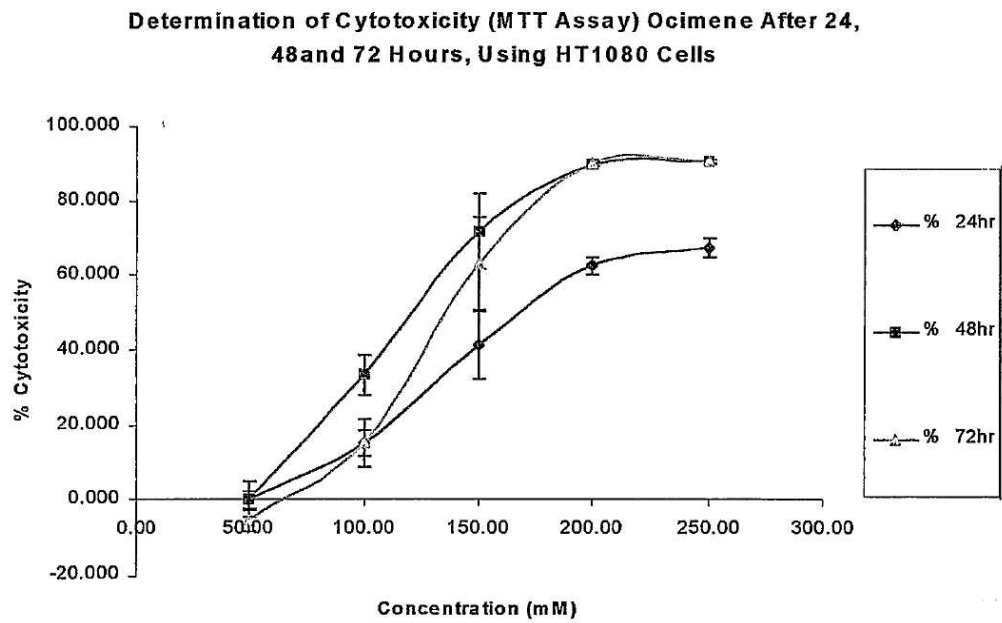
도면6



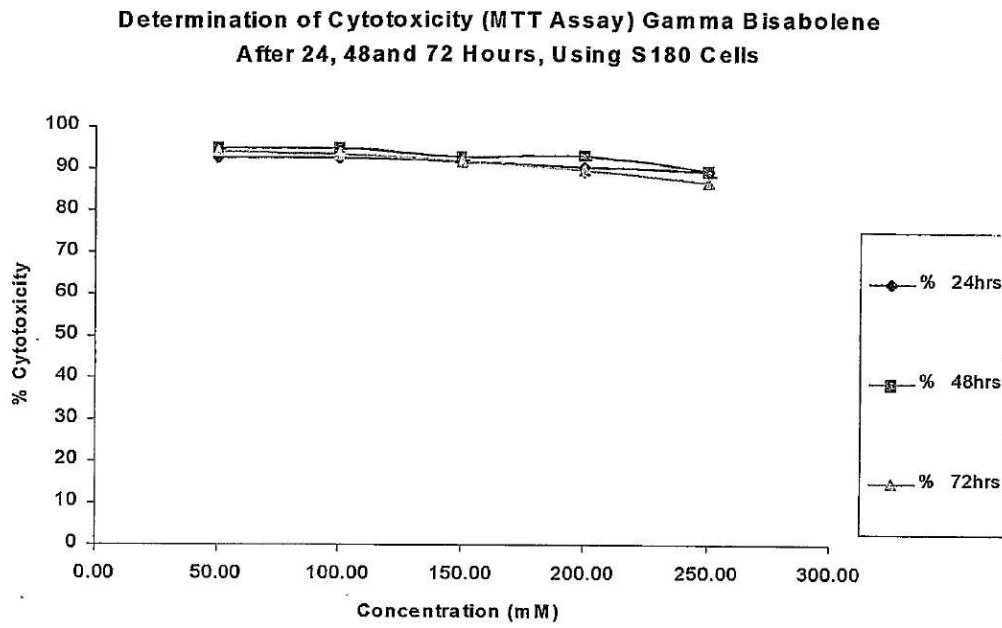
도면7



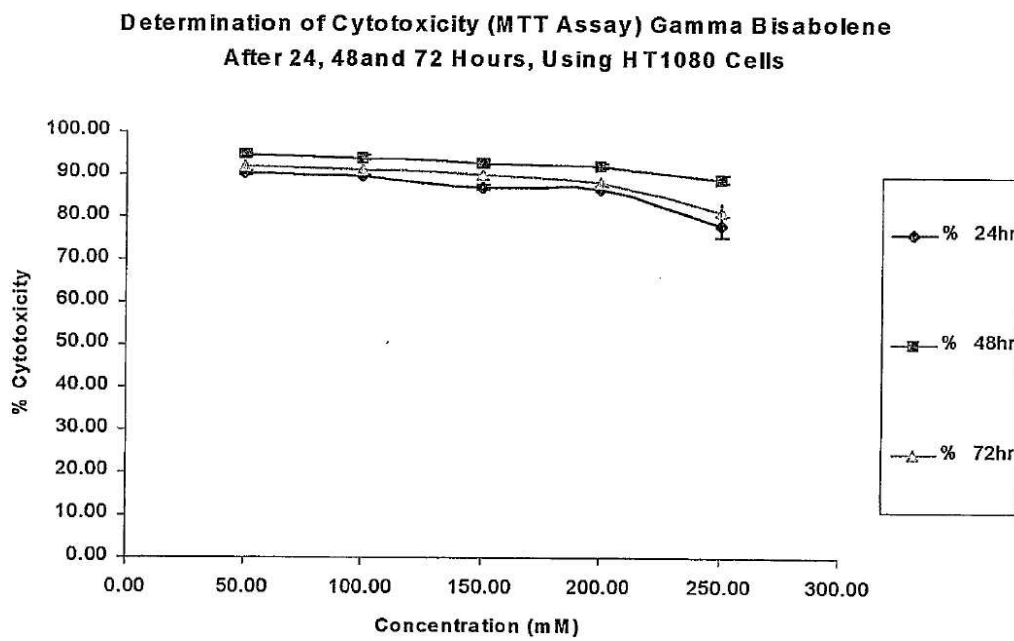
도면8



도면9



도면10

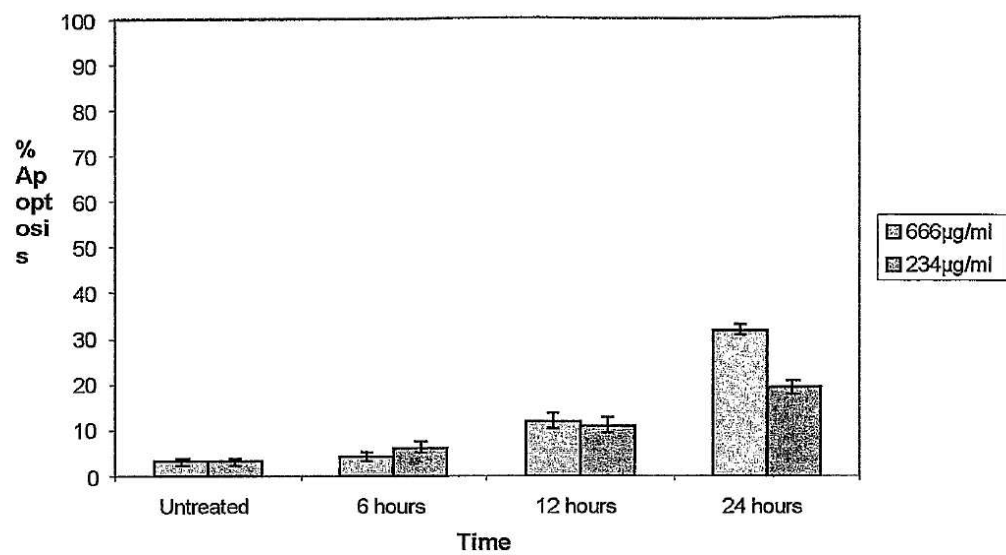


도면11

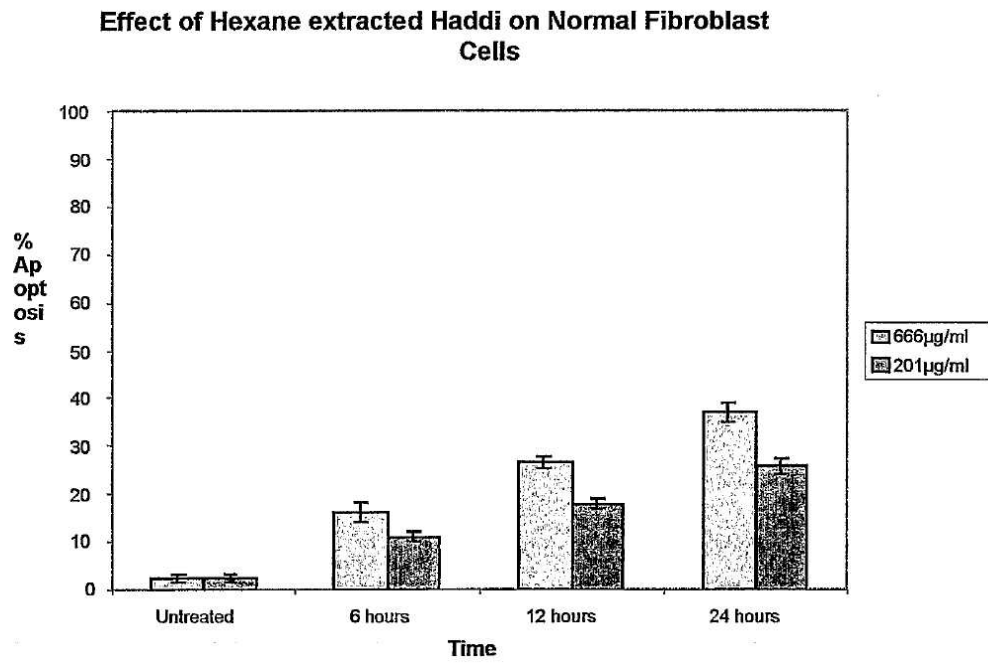


도면12

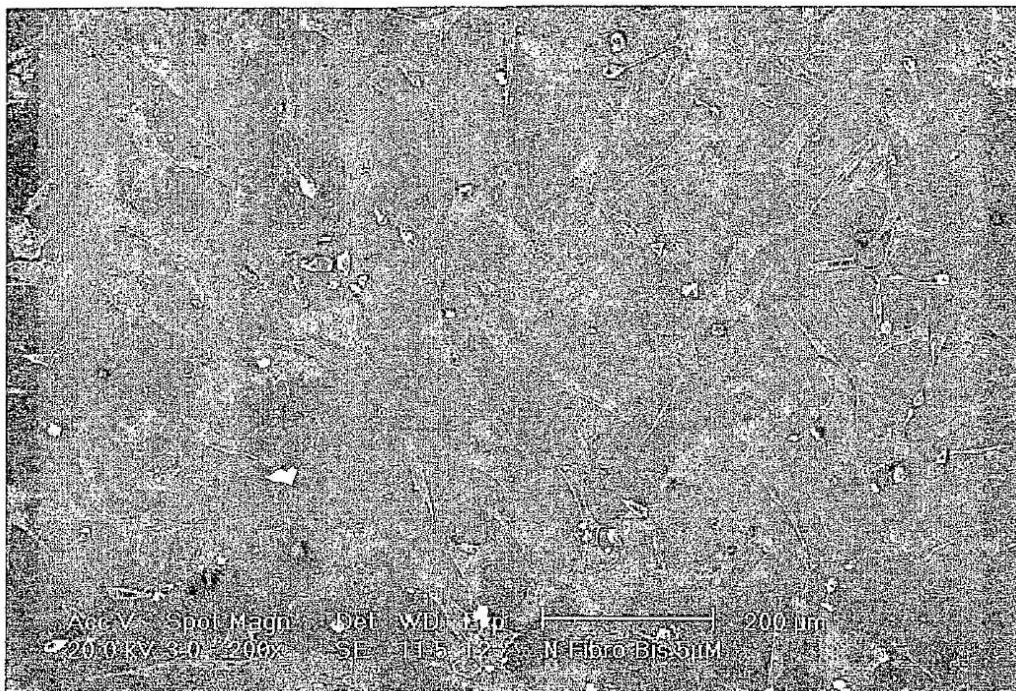
Effect of Ethanolic extracted Molmol on Normal Fibroblast Cells



도면13



도면14



도면15

