



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0043483
(43) 공개일자 2019년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/235 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/235 (2013.01)
A61K 9/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0124248
(22) 출원일자 2018년10월18일
심사청구일자 2018년10월18일
(30) 우선권주장
1020170135325 2017년10월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김기광
충청남도 청양군 장평면 묵은논길 67
천성혜
세종특별자치시 만남로 92, 807동 403호(고운동, 가락마을8단지)
(74) 대리인
특허법인충정

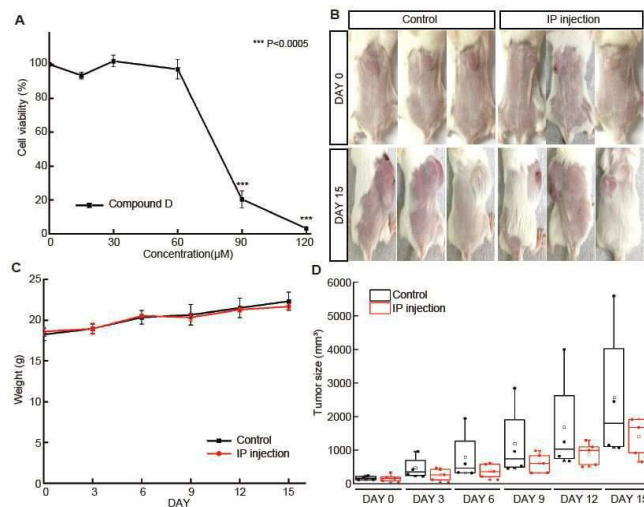
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 항암치료용 약학 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 세포의 죽음을 유도함에 따라 암세포의 성장억제 및 사멸작용을 갖는 알킬 4-히드록시-3,5-디알콕시벤조이트(Alkyl 4-hydroxy-3,5-dialkoxybenzoate) 유도체 및 이를 포함하는 항암용 조성물을 제공함에 있다. 본 발명에 따른 화합물 및 조성물은 정상세포의 세포생존능에 영향을 미치지 않으면서, 특이적으로 암세포의 세포 주기 파괴 및 세포사를 유발하여 세포생존능을 감소시키는 효과가 있다.

대표도 - 도5



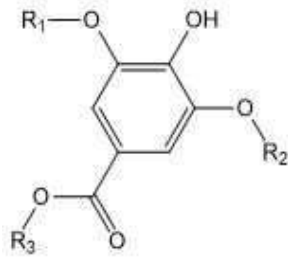
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는, 항암 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



(단, 상기 화학식 1 중,

R_1 은 $-CH_3$, $-CH_2CH_3$ 또는 $-(CH_2)_2CH_3$ 이고,

R_2 는 $-CH_3$, $-CH_2CH_3$ 또는 $-(CH_2)_2CH_3$ 이며,

R_3 는 $-(CH_2)_nCH_3$ 이며 상기 n 은 6 내지 10임.)

청구항 2

청구항 제1항에 있어서,

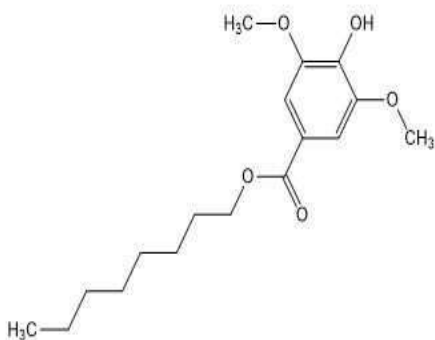
상기 화학식 1 중 R_1 은 $-CH_3$, R_2 는 $-CH_3$ 인 것을 특징으로 하는, 항암 치료용 약학 조성물.

청구항 3

청구항 제1항에 있어서,

상기 화학식 1은 하기 화학식 2인 것을 특징으로 하는, 항암 치료용 약학 조성물.

[화학식 2]



청구항 4

청구항 제1항에 있어서,

상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 60 μM 이상 120 μM 이하 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는, 항암 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 복강내 투여하는 것을 특징으로 하는, 항암 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 항암 치료는, 유방암, 위암, 자궁경부암, 간암, 대장암을 치료하는 것을 목적으로 하는, 항암 치료용 약학 조성물.

청구항 7

청구항 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 항암 치료용 약제.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 항암 치료는, 유방암, 위암, 자궁경부암, 간암, 대장암을 치료하는 것을 목적으로 하는, 항암 치료용 약제.

청구항 9

청구항 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 개체에 투여하는 것을 특징으로 하며,

상기 개체는 암이 발병한 개체로서 인간을 제외한 동물인, 항암 치료 방법.

청구항 10

청구항 제9항에 있어서,

상기 항암 치료는, 유방암, 위암, 자궁경부암, 간암, 대장암을 치료하는 것을 목적으로 하는, 항암 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 포유동물에서 암을 치료하는 방법, 이러한 치료에 유용한 조성물 및 이를 포함하는 약제에 관한 것이다. 특히, 상기 방법은 알킬 4-히드록시-3,5-디알콕시벤조에이트(Alkyl 4-hydroxy-3,5-dialkoxybenzoate) 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 항암 치료용 조성물, 및 이러한 조성물을 포함하는 약제에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 세포의 죽음은, 세포 손상 등으로 발생하는 세포 사고사인 네크로시스(necrosis, 괴사)와 자기 사멸의 형태인 아포토시스(apoptosis, 예정된 세포 사멸) 메커니즘으로 일어날 수 있다. 이 중 아포토시스는 세포수의 적절한 조절에 관여하며 배아 발생 및 다양한 질병, 예컨대, 퇴행성 신경 질환, 심혈관 질환 및 암의 발병기전에서 필수적인 역할을 수행한다. 일반적으로, 암은 세포 분열, 분화, 및 아포토시스성 세포 사멸을 제어하는 정상적인 과정의 조절이상에 의해 초래된다. 암세포는 정상세포와 달리 자기사멸 기능이 적절하게 조절되지 못하는 세포이기 때문에 자기사멸 기능 유도를 통해 암세포의 증식을 억제하는 것이 가능하다. 또한, 암세포에서의 세포사멸사 유도는 암세포의 직접적인 감소 효과뿐만 아니라 암세포와 환자간의 상호반응, 특히 면역반응에도 긍정적인 영향을 미칠 수 있다.
- [0004] 암을 비롯한 과증식성 장애의 효과적 치료는 종양학 분야에서 지속적인 목표이며, 암은 공중 보건에 있어서 주된 관심사를 차지하고 있다. 현재까지 화학요법 항암제 개발을 위한 다양한 시도가 있었고, 대장암, 결장암, 직장암, 췌장암, 유방암, 위암, 폐암, 간암, 방광암, 자궁경부암, 두경부암(head and neck cancer), 폐암, 난소암, 갑상선암 및 전립선암 등을 치료하는데 효과가 있는 새로운 약물계 치료 요법이 절실하게 요구되고 있는 실정이다. 그러나 기존의 화학요법 항암제는 암세포 뿐 아니라 정상세포의 생존에도 영향을 주는 문제가 있었다. 그러므로, 암세포의 생존율을 감소시키는데 효과적이며 독성이 감소된 항암치료용 조성물을 개발할 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 목적은, 세포의 죽음을 유도함에 따라 암세포의 성장억제 및 사멸작용을 갖는 알킬 4-히드록시-3,5-디알콕시벤조에이트(Alkyl 4-hydroxy-3,5-dialkoxybenzoate) 유도체, 특히 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트(Octyl 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate) 화합물 및 이를 포함하는 항암 치료용 약학 조성물을 제 공함에 있다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명은 알킬 4-히드록시-3,5-디알콕시벤조에이트(Alkyl 4-hydroxy-3,5-dialkoxybenzoate) 유도체 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는, 항암 치료용 조성물을 제공하며, 바람직하게는 알킬 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트, 더 바람직하게는 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트(Octyl 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는, 항암 치료용 조성물을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 화합물을 60 μ M 이상 120 μ M 이하 농도로 포함하는 것을 특징으로 하는, 항암 치료용 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명의 조성물은 복강내 투여하는 것을 특징으로 한다.
- [0011] 또한 상기 항암 치료용 조성물을 포함하는, 항암 치료용 약제를 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한 상기 항암 치료용 조성물을 이용하는 항암 치료 방법을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 상기 항암 치료는 특히, 유방암, 위암, 자궁경부암, 간암, 대장암을 대상으로 한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명은 정상세포의 세포생존능에 영향을 미치지 않으면서, 특이적으로 암세포의 세포 주기 파괴 및 세포사를 유발하여 세포생존능을 감소시키는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0018]

도 1은 4종류의 옥틸 벤조에이트(Octyl benzoate) 유도체 화합물(Compound A, B, C, D)의 구조를 나타낸 것으로, 이 중 Compound D로 지칭되는 화합물이 본 발명의 일부 구성요소인 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트(Octyl 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate)에 해당한다.

도 2는 유방암세포(MCF7 cell, MDA-MB-231 cell, SK-BR-3 cell) 및 정상유방세포(MCF 10A cell)에 화합물 A, B, C 및 D를 각각 다양한 농도(0, 15, 30, 60, 90, 120 μ M)로 24시간 동안 처리한 후 세포생존능을 MTS assay로 측정한 것이다.

도 3은 MCF7 세포(도 3의 A) 및 MCF 10A 세포(도 3의 B)에 Compound D(옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트)를 다양한 농도(0, 60, 120 μ M)로 12시간 동안 처리한 후 세포 주기에 미치는 영향을 알아보기 위해 유세포분석기(flow cytometry)로 측정한 것이다.

도 4는 MCF7 cell 및 MCF 10A의 annexin V-5-fluorescein isothiocyanate(FITC) / propidium iodine(PI) 염색을 보여주는 대표적인 플롯이다. 구체적으로, 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트가 60 μ M(도 4의 B, 도 4의 C) 및 120 μ M(도 4의 D, 도 4의 E) 농도로 처리된 MCF7 cell을 annexin V-FITC/PI 염색을 이용하여 세포사멸(apoptosis)/괴사(necrosis)를 측정한 유세포분석(flow cytometric analysis)이다. 여기서 Q1 : annexin V-FITC-/PI+, Q2 : annexin V-FITC+/PI+, Q3 : annexin V-FITC-/PI-, Q4 : annexin V-FITC+/PI- 를 나타낸다.

도 5의 A는 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트를 다양한 농도(0, 15, 30, 60, 90, 120 μ M)로 처리한 CT26 cell의 세포생존능을 나타낸다. 도 5의 B, C, D는 BALB/c 쥐에 CT26 cell을 피하 주입 하여 종양 크기가 100mm³이 되었을 때, 3일 간격으로 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트를 처리한 경우를 나타낸 것으로, 도 5의 B는 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트를 처리하지 않은 경우(Control)와 처리한 경우(IP injection)의 종양 크기 변화를 육안으로 비교한 사진이고, 도 5의 C는 3일 간격의 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트 주입 여부에 따른 쥐의 무게 변화를, 도 5의 D는 3일 간격의 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트 주입 여부에 따른 종양 크기 변화를 나타낸 것이다.

도 6은 위암세포(AGS), 자궁경부암세포(HeLa), 간암세포(HepG2), 대장암세포(HT29)에 대하여 옥틸-4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트를 다양한 농도(0, 30, 60, 90, 120 μ M)로 24시간 동안 처리한 후 세포생존능을 MTS assay로 측정한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019]

본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정하여 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해서 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여, 본 발명의 기술적 사상에 부합되는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서 본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 하나의 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

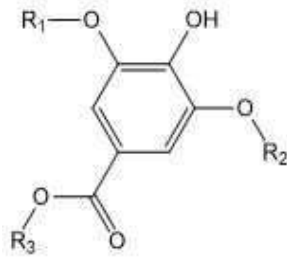
[0020]

본 발명의 발명자들은 벤젠고리에 치환되는 작용기를 달리한 네 종류의 옥틸 벤조에이트(Octyl benzoate) 유도체 화합물(도면 1 참조 : Compound A, B, C, D)에 대해 항암 효과를 실험하여, 이 중 화합물 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트(Octyl 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate)의 경우 항암 효과가 우수함을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0021]

본 발명은 암세포의 세포사(cell death)를 유도하는 항암 치료용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로는, 하기 화학식 1로 표시되는 4-히드록시-3,5-디알콕시벤조에이트(Alkyl 4-hydroxy-3,5-dialkoxybenzoate) 유도체 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는, 항암 치료용 조성물을 제공한다.

화학식 1



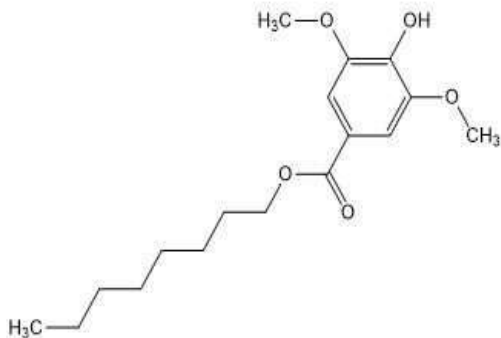
[0023]

[0024] 여기서, R₁은 -CH₃, -CH₂CH₃ 또는 -(CH₂)₂CH₃ 이고, R₂는 -CH₃, -CH₂CH₃ 또는 -(CH₂)₂CH₃ 이며, R₃는 -(CH₂)_nCH₃이며 상기 n은 6 내지 10이다.

[0025] 바람직하게는 상기 화학식 1에서 R₁이 CH₃이고, R₂가 CH₃이다.

[0026] 더 바람직하게는 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트(Octyl 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는, 항암 치료용 조성물을 제공한다.

화학식 2



[0027]

[0028] 본 발명의 화합물의 제약상 허용되는 염은 당업자에 의해 용이하게 제조된다.

[0029] 본 발명의 약제학적 조성물은 암의 치료 또는 예방에 이용될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물에 의해 치료 또는 예방될 수 있는 암은, 유방암, 대장암, 결장암, 직장암, 췌장암, 위암, 폐암, 간암, 방광암, 자궁경부암, 두경부암, 난소암, 갑상선암 및 전립선암을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 구체적으로, 도 2의 D를 참조하면 본 발명 조성물은 유방암 치료·예방에 효과가 있음을 알 수 있으며, 또한 도 6을 참조하면 위암, 자궁경부암, 간암, 대장암에 또한 치료·예방 효과가 있음을 알 수 있다.

[0030] 본원에서 사용된 용어 "조성물" 및 그의 파생어는, 치료 유효량의 알킬 4-히드록시-3,5-디알콕시벤조에이트(Alkyl 4-hydroxy-3,5-dialkoxybenzoate) 유도체, 바람직하게는 알킬 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트(Alkyl 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate) 유도체, 더 바람직하게는 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트(Octyl 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate) 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염을 의미한다.

[0031] 본 발명의 약학 조성물은 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 보조제를 추가로 포함할 수 있다.

[0032] 예를 들면, 약학 조성물 중 활성을 나타내는 화합물은 일반적으로 담체와 혼합되거나, 또는 담체에 의하여 희석되거나, 앰플, 캡슐, 사체(sachet), 종이 또는 다른 용기의 형태로 될 수 있는 담체 내에 동봉될 수 있다. 상기

화합물이 담체와 혼합되거나, 담체가 희석제로서 사용되면, 그것은 고체, 세미-고체, 또는 액체 물질일 수 있으며, 이는 본 화합물을 위한 비히클, 부형제 또는 매질로서 작용할 수 있다. 본 화합물은 미립자 고체 담체 (granular solid carrier), 예를 들어 사체에 함유되는 곳에 흡착될 수 있다. 적합한 담체의 몇몇 예는 물, 염 용액, 알코올, 폴리에틸렌 글라이콜, 폴리하이드록시에톡실레이트드 캐스터 오일, 피넛 오일, 올리브 오일, 젤라틴, 락토오스, 백토(terra alba), 수크로오스, 텍스트린, 마그네슘 카보네이트, 슈가, 사이클로텍스트린, 아밀로오스, 마그네슘 스테아레이트, 탈크, 젤라틴, 아가, 펙틴, 아카시아, 스테아르산 또는 셀룰로오스의 저급 알킬 에터(lower alkyl ethers of cellulose), 규산(silicic acid), 지방산, 지방산 아민, 지방산 모노글리세라이드 및 다이글리세라이드, 펜타에리트리톨 지방산 에스테르(pentaerythritol fatty acid ester), 폴리옥시에틸렌, 하이드록시메틸셀룰로오스 및 폴리비닐피롤리돈이다. 유사하게, 담체 또는 희석제는 글리세릴 모노스테아레이트 또는 글리세릴 디스테아레이트, 단독 또는 왁스와 혼합된 것과 같은, 당 분야에서 공지된 어떠한 지효성(sustained release) 물질을 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 제형(formulation)은 활성을 나타내는 화합물과 유해하게 반응하지 아니하는 보조제와 함께 혼합될 수 있다. 이러한 첨가제는 습윤제, 유화제 및 현탁제, 삼투압에 영향을 주기 위한 염, 완충제 및/또는 착색 물질 보존제, 감미제 또는 향미제를 포함할 수 있다.

[0034] 당 업계에서 잘 알려진 바와 같이 "염(salt)"은 반대이온(counter ion)과 결합된, 이온성 형태로, 카르복시산, 설폰산 또는 아민과 같은 유기 화합물을 포함한다. 예를 들어, 음이온 형태의 산은 금속 양이온과 같은, 예를 들어 소듐, 포타슘, 및 이와 같은, 금속성 양이온과 같은 양이온; NH_4^+ 와 또는 다양한 아민의 양이온과 같은 양모늄 염과 염을 형성할 수 있고, 테트라메틸암모늄과 같은 테트라알킬암모늄, 또는 트리메틸설포늄과 같은 양이온, 및 이와 같은 것을 포함한다. "약학적으로 허용되는, 약학적으로 허용 가능한(pharmaceutically acceptable)" 또는 "약리학적으로 허용되는, 약리학적으로 허용 가능한(pharmacologically acceptable)" 염은 식용으로 승인된 이온으로부터 형성된 염이며, 일반적으로 클로라이드염 또는 소듐염과 같이, 비독성이다. "양성 이온(zwitterion)"은 각각의 균형을 제공하는, 음이온 및 다른 양이온을 형성하는 적어도 두 개의 이온 가능한 기를 가지는 분자의 형태가 될 수 있는 분자내 염이다. 예를 들어, 글리신과 같은 아미노산은 양성이온의 형태로 존재할 수 있다 "양성이온"은 본 명세서 의미 내에서 염이다. 본 발명의 화합물은 염의 형태를 취할 수 있다. 용어 "염"의 의미는 본 발명의 화합물의 유리 염기 또는 유리 산의 부가 염을 포함한다. 염은 "약학적으로 허용 가능한 염"일 수 있다. "약학적으로 허용 가능한 염"은 약제학 분야에서 유용성을 얻을 수 있는 범위 내의 독성 프로파일을 가진 염을 일컫는다. 적합한 약학적으로 허용 가능한 산 부가 염은 유기산 또는 무기산으로부터 준비될 수 있다.

[0035] 본원에서 사용된 용어 "예방", "치료" 및 그의 파생어는 치료학적 요법을 의미한다. 특정 상태와 관련하여, 치료는 다음을 의미한다: (1) 상태의 생물학적 징후중 하나 이상의 상태를 완화함, (2) (a) 상태를 야기하거나 그의 원인이 되는 생물학적 캐스케이드에서의 하나 이상의 지점 또는 (b) 상태의 하나 이상의 생물학적 징후를 방해함, (3) 상태 또는 그의 치료와 관련된 하나 이상의 증상, 효과 또는 부작용을 완화함, 또는 (4) 상태 또는 상태의 하나 이상의 생물학적 징후의 진행을 지연시킴.

[0036] "치료 유효량"이란, 개체의 질환, 장애, 또는 질환 또는 상태의 증상 개선 또는 치료를 일으키는 양을 가리키며, "투여"는, 경구, 피내, 피하, 혈관, 근육, 복강 내 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0037] 본 발명의 약학 조성물은 암세포의 성장을 효과적으로 억제함으로써, 유방암, 대장암, 결장암, 직장암, 췌장암, 위암, 간암, 방광암, 자궁 경부암, 두경부암, 폐암, 난소암 및 전립선암 등의 암환자(개체)에게 투여될 수 있으며, 그 적합한 투여량은 체제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학 조성물은 총 조성물 중 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트를 $60\text{ }\mu\text{M}$ 내지 $150\text{ }\mu\text{M}$ 의 농도로 포함하는 것을 특징으로 하며, 이는 정상세포에 영향을 미치지 않으면서, 암세포의 세포생존능을 감소시키는 농도로, 바람직하게는 $60\text{ }\mu\text{M}$ 내지 $120\text{ }\mu\text{M}$ 또는 $90\text{ }\mu\text{M}$ 내지 $150\text{ }\mu\text{M}$, 더 바람직하게는 $90\text{ }\mu\text{M}$ 내지 $120\text{ }\mu\text{M}$ 에 해당함을 알 수 있다.

[0039] 본원에서 사용된 용어 "개체"란, 암이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[0040] 이하에서는, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예에 따른 항암치료용 약학 조성물 및 이의 제조방법을 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는다.

[0042] 실시예

[0043] 제조예 1. 세포계(Cell line) 형성 - 배양 조건

[0044] (1) 암세포(MCF7 cell, MDA-MB-231 cell, SK-BR-3 cell, CT-26 cell) 배양

[0045] CT-26 cell 및 유방암 세포(예 : MCF7 cell, MDA-MB-231 cell, SK-BR-3 cell)의 배양은, 배지 보충물로서 10% 열-비활성화된 fetal bovine serum(FBS, Gibco), 100 U/ml 페니실린(penicillin) 및 100 µg/ml 스트렙토마이신(streptomycin)(Hyclone)이 사용된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, WELGENE)에서 배양되었다.

[0046] (2) 정상세포(MCF 10A cell) 배양

[0047] MCF 10A cell은 Dulbecco's Modified Eagle Medium에서 유지된다. Dulbecco's Modified Eagle Medium은 배지 보충물로서 10% 열-비활성화된 horse serum(Gibco), 100 U/ml 페니실린 및 100 µg/ml 스트렙토마이신(Hyclone), 10 µg/ml 인슐린(insulin), 100 ng/ml 콜레라독소(cholera toxin), 0.5 µg/ml 하이드로코르티손(hydrocortisone) 및 20 ng/ml 재조합 인간 상피세포성장인자(recombinant human epidermal growth factor)가 사용된 Nutrient Mixture F-12 medium(DMEM/F12, WELGENE)이다.

[0048] 이러한 모든 세포는 humidified incubator에서 37℃, 5% CO₂ 조건 하에 유지된다.

[0050] 제조예 2. 동물 모델 제조

[0051] 대한바이오링크(Eumseong, Korea)에서 구매한 생후 5주의 암컷 BALB/c 쥐(22 ± 2℃, 상대습도 50 ± 5%, 및 12 시간의 명/암주기의 통제된 조건에서 사육됨)에 일반적인 사료 및 물을 무제한 공급하였다. 모든 쥐를 실험 개시 전에 7일 동안 순응시킨다(모든 동물 실험은 충남대학교(Daejeon, Korea)의 동물실험윤리위원회에 승인 받았고, 위원회의 가이드라인에 따라 수행됨).

[0052] 이후 종양 유발 마우스 모델을 만들기 위해, 0일째에 BALB/c 쥐의 등에 0.4×10^6 CT-26 cell을 피하 접종한다(그룹 당 4마리의 쥐, 총 2그룹).

[0053] 종양 크기가 100 mm³이 되면, 1.5 mg/kg의 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트를 3일마다 복강 내 주입한다. 대조군 쥐는 PBS로 처리한다. 종양 성장은 촉진(palpation)으로 3일마다 관측하고, 종양 크기는 microcalipers로 직각의 두 직경을 측정한다. 종양의 부피는 다음의 공식에 의해 계산한다: tumor volume [mm³] = (length [mm]) × (width [mm])² × 0.5.

[0055] 실험예 1. 세포생존능(Cell viability) 측정

[0056] 세포생존능은 MTS assay를 이용하여 측정한다. 96-well plate에 well당 10,000개의 세포를 seed한 후, 다음날, 다양한 양의 화합물을 처리하거나 처리하지 않은 세포를 24시간동안 배양한다.

[0057] 살아있는 세포의 상대적인 활성을 측정하기 위해, 20 µl의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium과 inner salt (MTS) solution (Promega #G3580)이 각각의 well에 첨가되었다. microplate reader (Molecular Devices EMax Plus, #6611048)를 이용하여 490 nm에서 상대적인 흡광도를 측정하여 상대적인 세포의 생존능을 확인한다.

[0058] 유방암세포(MCF7, MDA-MB-231, SK-BR-3) 및 정상유방세포(MCF 10A cell)에 도 1의 화합물 A(Octyl 3,4-dihydroxybenzoate), 화합물 B(Octyl 3,4-dimethoxybenzoate), 화합물 C(Octyl 3,4,5-trimethoxybenzoate) 및 화합물 D(Octyl 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate)를 각각 다양한 농도(0, 15, 30, 60, 90, 120 µM)로 24시간 동안 처리한 후 세포생존능을 측정한 결과, 화합물 A, B 및 C와 달리 화합물 D는 특이적으로 유방암세포(MCF7,

MDA-MB-231, SK-BR-3)의 세포생존능을 감소시키고, 정상유방세포(MCF 10A)의 세포생존능에 영향을 미치지 않음을 알 수 있다(도 2 참조). 정상세포에 영향을 미치지 않으면서, 암세포의 세포생존능을 감소시키는 농도는 60 μ M 내지 150 μ M에 해당하며, 바람직하게는 60 μ M 내지 120 μ M 또는 90 μ M 내지 150 μ M, 더 바람직하게는 90 μ M 내지 120 μ M에 해당함을 알 수 있다(도 2 참조).

[0059] 상기 결과에 의하여, 화합물 D인 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트(Octyl 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate)를 AGS(위암세포, human caucasian gastric adenocarcinoma), HeLa(자궁경부암세포, human cervix adenocarcinoma), HepG2(간암세포, human hepatocellular carcinoma), HT29(대장암세포, human colorectal adenocarcinoma)에 24시간 동안 처리하여, 상기과 같은 방법으로 세포생존능을 측정하였다. 이를 통해 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트는 60 μ M 내지 120 μ M, 바람직하게는 90 μ M 내지 120 μ M의 농도에서 위암, 자궁경부암, 간암, 대장암세포의 세포생존능을 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있다(도 6 참조).

[0061] 실험예 2. 유세포분석기(flow cytometry)를 이용한 세포 주기 측정

[0062] 세포가 60 - 80%의 confluence에 도달한 후, 다양한 농도의 화합물을 처리한다. 24시간 후, 세포를 수확하고 차가운 PBS로 2회 세척한 다음, 1시간동안 4°C에서 70% ethanol로 고정한다. 고정된 세포를 PBS로 세척하고 RNase를 포함하는 propidium iodide(PI) solution(Sigma, P4170)으로 재부유시킨 후, 30분동안 상온의 어두운 공간에서 배양한다. DNA량이 flow cytometry(유세포분석기)를 통해 분석된다.

[0063] 이에 따라, 도 3은 MCF7 cell(도 3의 A) 및 MCF 10A cell(도 3의 B)에 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트를 다양한 농도(0(Control), 60, 120 μ M)로 12시간 동안 처리한 후, 세포 주기에 미치는 영향을 알아보기 위해 유세포분석기(flow cytometry)로 측정한 것이다. 이를 통해 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트는 MCF7 cell의 세포 주기에 기능장애를 일으켜 세포 사멸을 유도한다. 하지만, MCF 10A cell에서는 G1 arrest를 유발하지만, 세포사멸에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

[0065] 실험예 3. 유세포분석기(flow cytometry)를 이용한 세포사멸 감지

[0066] 밀도 0.2×10^6 cells/well의 6-well plate에서 24시간 배양한 후, 세포가 60, 120 μ M의 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트로 처리되어 4, 12 시간 동안 배양되었다. FITC Annexin V Apoptosis Detection kit(BD Biosciences)을 이용하여 세포사멸이 관측되었다. 제조업체의 프로토콜에 따라, 트립신(trypsin)으로 세포를 부유시키고 차가운 PBS로 2회 세척한 뒤, 100 μ l 완충용액으로 세포 농도가 1×10^6 cells/ml이 되도록 재부유시킨다. 세포를 15분동안 상온의 어두운 공간 조건의 5 μ l의 FITC Annexin V 및 5 μ l PI에서 배양하고, 염색 후 400 μ l 완충액을 첨가한다. flow cytometer에 의해 형광강도가 감지된다.

[0067] 이에 따라, 도 4는 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트가 처리된 MCF7 cell을 annexin V-FITC/PI 염색을 이용하여 세포사멸(apoptosis)/괴사(necrosis)를 측정된 유동혈구계산분석(flow cytometric analysis)이다. 여기서 Q1(annexin V-FITC-/PI+)은 괴사 세포, Q2(annexin V-FITC+/PI+)는 후기 세포자살/괴사 세포, Q3(annexin V-FITC-/PI-)는 정상 세포, Q4(annexin V-FITC+/PI-)는 초기 세포자살 세포를 나타낸다. 따라서 Q1, Q2, Q3 및 Q4의 비율은 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트가 괴사와 연관된 MCF7 cell의 세포사를 유발한다는 것을 보여준다.

[0069] 실험예 4. 종양 크기 측정 및 대조군과 비교

[0070] 제조한 동물 모델에 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트를 처리하여, 처리하지 않은 대조군(Control)과 종양 크기를 비교하였다.

[0071] 도 5의 A는 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트를 다양한 농도(0, 15, 30, 60, 90, 120 μ M)로 처리한 CT26 cell의 세포생존능을 나타낸다. 이에 따라 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트는 CT26의 세포생존능을 감소시킴을 알 수 있다(도 5의 A 참조). 도 5의 B, 도 5의 C, 도 5의 D는 BALB/c 쥐에 CT26 cell을 피하 주입 하여 종양 크기가 100mm³이 되었을 때, 3일 간격으로 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트를 처리한 경우를 나타낸 것으로, 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트를 처리하지 않은 경우(Control)와 처리한 경우(IP injection)를 비교할 수 있는데, 종양 크기를 측정하여 수치적으로 비교한 경우(도 5의 D 참조)는 물론, 육

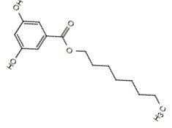
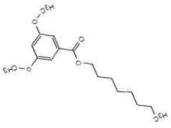
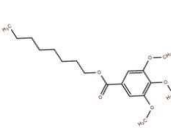
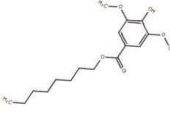
안(도 5의 B 참조)으로도 종양의 성장 속도가 대폭 감소함을 확인할 수 있다.

[0072]

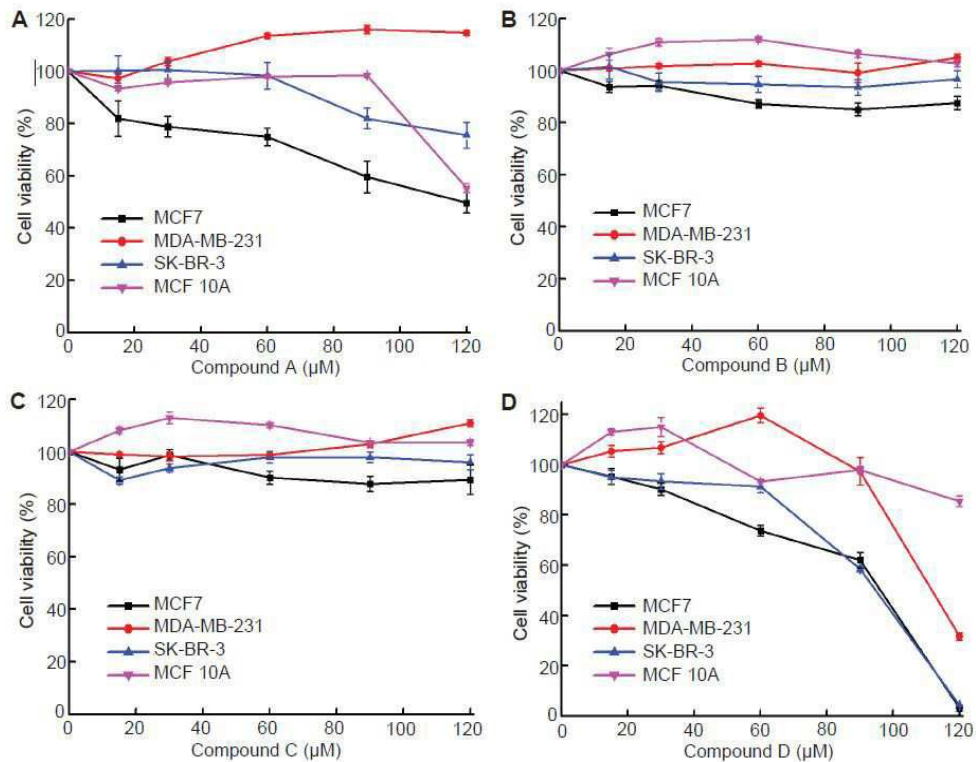
결론적으로, 옥틸 4-히드록시-3,5-디메톡시벤조에이트는 종양 성장 속도는 감소시키면서 생존율은 증가시키는 한편, 종래 다른 화학 약물 치료법보다도 독성이 감소된 것을 보여준다.

도면

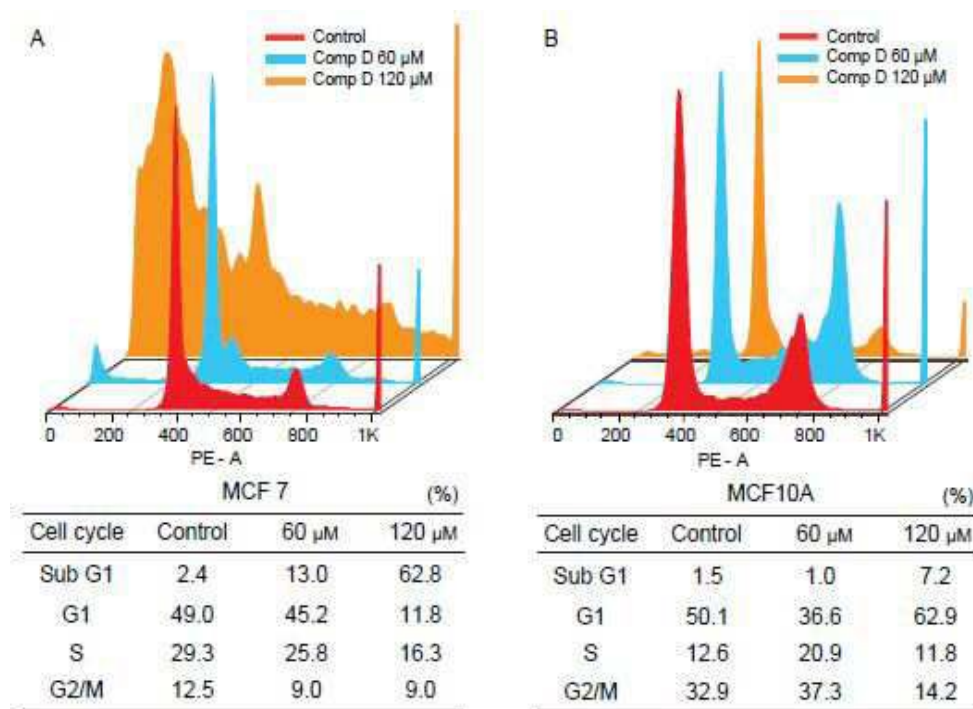
도면1

Compound A	Compound B	Compound C	Compound D
			
Octyl 3,5-dihydroxybenzoate	Octyl 3,5-dimethoxybenzoate	Octyl 3,4,5-trimethoxybenzoate	Octyl 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoate

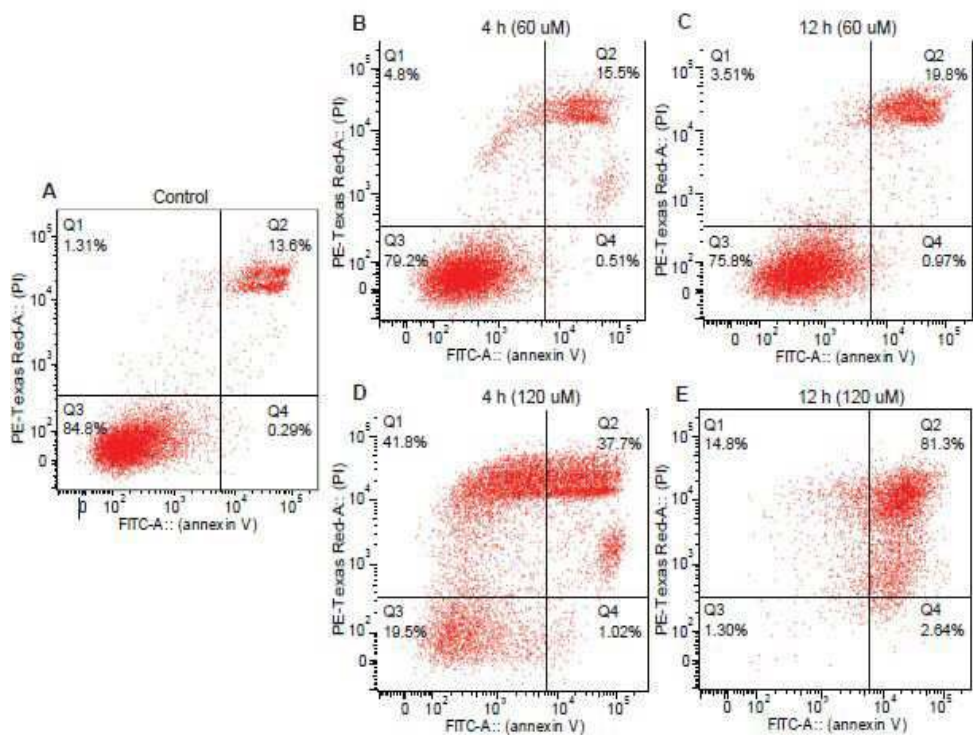
도면2



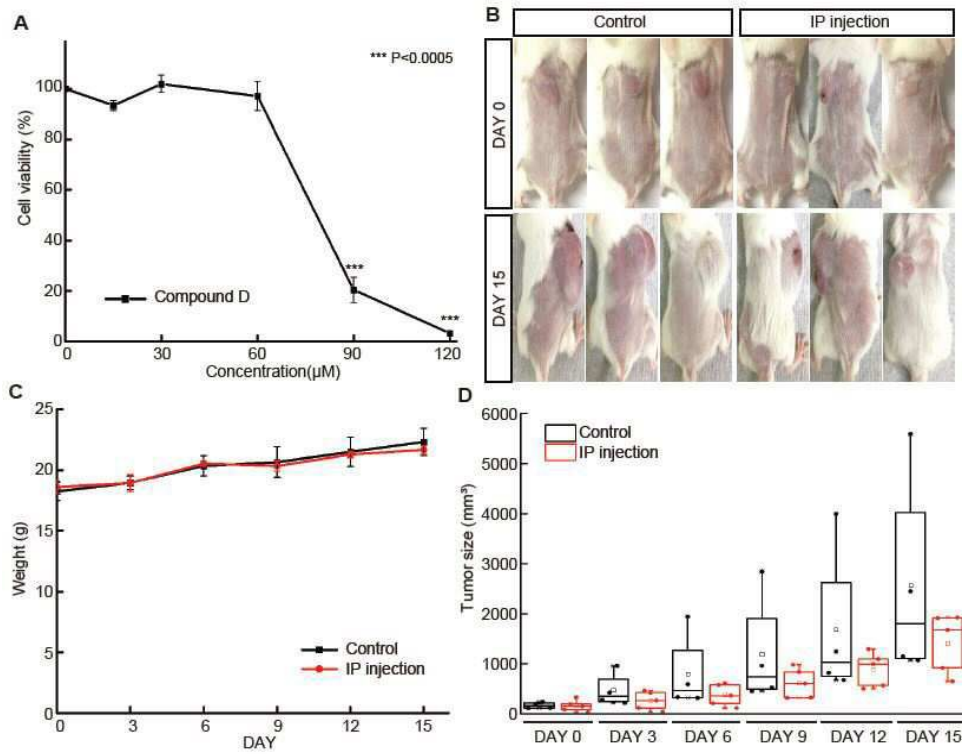
도면3



도면4



도면5



도면6

