(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년11월18일
(11) 등록번호 10-0869330
(24) 등록일자 2008년11월12일

(51) Int. Cl.
A61K 31/352 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0058028
(22) 출원일자 2007년06월13일
심사청구일자 2007년06월13일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020050027374 A
논문:Biochemical and biophysical research communications
KR1020040014007 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기획팀
(72) 발명자
최철희
광주 남구 봉선동 70 한국아델리움 101-1404호
정주미
경기 안산시 상록구 수암동 491-17 신성빌라 A-302
(74) 대리인
이원희

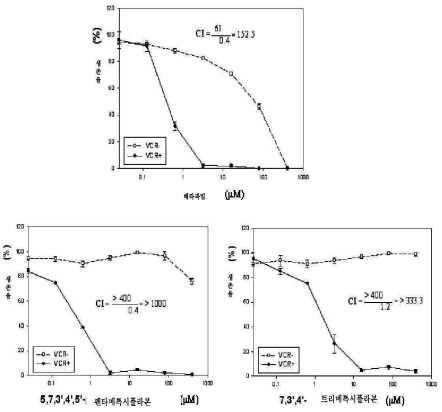
전체 청구항 수 : 총 10 항 심사관 : 김성길

(54) 트리메톡시플라본을 유효성분으로 함유하는 항암제의활성 증진제

(57) 요 약

본 발명은 트리메톡시플라본(trimethoxyflavone, TMF)을 유효성분으로 함유하는 항암제의 활성 증진제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 7,3',4'-트리메톡시플라본 또는 약학적으로 허용되는 그의 염은 Caco-2 시스템(인체소장상피세포주) 내에서 P-당단백질(P-glycoprotein, Pgp)의 활성을 억제하고 파클리탁셀의 이동을 조절함으로써 파클리탁셀의 경구 생체이용률 및 감수성의 효과를 증진시킬 수 있고, 낮은 독성이 확인되었으므로 파클리탁셀의 화학요법과 병용하여 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

7,3',4'-트리메톡시플라본 또는 약학적으로 허용되는 그의 염을 유효성분으로 함유하는 항암제의 활성 증진제.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 7,3',4'-트리메톡시플라본은 P-당단백질을 억제하는 것을 특징으로 하는 항암제의 활성 증진제.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 7,3',4'-트리메톡시플라본은 항암제의 암세포에 대한 흡수(AP→BL) 방향의 수송을 증가시키고 분비(BL→AP) 방향의 수송을 감소시키는 것을 특징으로 하는 항암제의 활성 증진제.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 증진제는 P-당단백질에 의해서 매개되는 항암제의 내성 암세포에 대한 감수성을 증진시키는 것을 특징으로 하는 항암제의 활성 증진제.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 증진제는 항암제의 경구 생체이용률을 증진시키는 것을 특징으로 하는 항암제의 활성 증진제.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 항암제는 안쓰라사이크린계 항암 항생제, 빈카 알칼로이드, 탁산계 항암제, 콜히친, 에피포도필로톡신계 항암제, 미토산트론, 액티노마이신 D 및 마이토마이신 C로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 항암제의 활성 증진제.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 안쓰라사이크린계 항암 항생제는 독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신 및 이다루비신로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 항암제의 활성 증진제.

청구항 9

제 7항에 있어서, 상기 빈카 알칼로이드는 빈크리스틴 또는 빈블라스틴인 것을 특징으로 하는 항암제의 활성 증진제.

청구항 10

제 7항에 있어서, 상기 탁산계 항암제는 파클리탁셀 또는 도스탁셀인 것을 특징으로 하는 항암제의 활성 증진제.

청구항 11

제 7항에 있어서, 상기 에피포도필로톡신계 항암제는 에토포사이드 또는 테니포사이드인 것을 특징으로 하는 항암제의 활성 증진제.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<16> 본 발명은 트리메톡시플라본을 유효성분으로 함유하는 항암제의 활성 증진제에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 7,3',4'-트리메톡시플라본 또는 약학적으로 허용되는 그의 염은 P-당단백질의 활성을 억제하고 파클리탁셀의 이동을 조절함으로써 파클리탁셀의 경구 생체이용률 및 감수성의 효과를 증진시킬 수 있고, 낮은 독성이 확인되었으므로 파클리탁셀의 화학요법과 병용하여 유용하게 사용할 수 있다.

<17> 암은 전 세계적으로 성인의 중요한 사망원인 중 하나가 되는 치명적인 질병으로, 우리나라에서도 그 발생빈도가 점차 증가하고 있다. 현재 암의 치료를 위하여 다양한 약물들이 항암제로 사용되고 있으나, 이들 대부분의 약물 사용에는 약물 투여에 따른 부작용과 더불어 항암제에 대한 내성을 갖는 암세포 출현이라는 두 가지 큰 문제점이 있다.

<18> 항암제 내성의 가장 중요한 원인은 다약제내성 유전자의 발현에 의한 세포막 단백질인 Pgp의 과다 발현에 의한 것으로 가장 잘 알려져 있다. P-당단백질은 1,280개의 아미노산으로 구성되고 분자량이 170 kDa 정도인 전이막 당단백질로, ATP를 사용하여 빈카알칼로이드, 안트라사이클린 및 에피포도필로톡신과 같은 다양한 종류의 약물들을 세포 외로 방출시킴으로써 암세포가 이들 약물에 대하여 내성을 가지도록 한다(D. W. Shen, et al., Science 232:643-645, 1986).

<19> 이러한 암의 약제내성은 일반적으로 항암제의 사용에 따라 증가하며 임상적으로 P-당단백질을 발현하는 암환자는 그렇지 않은 암환자에 비해 암 치료율이 현저히 떨어지는 결과를 보이고 있다. P-당단백질의 영향을 받는 것으로 알려진 항암제는 빈블라스틴, 파클리탁셀 또는 독소루비신 등과 같은 수많은 항암제들이 있다. 따라서, P-당단백질에 의한 다약제내성의 저해제는 이들 항암제와 함께 투여되는 경우 항암제의 항암작용을 증가시킴으로써 악성종양의 치료를 더욱 용이하게 할 수 있다.

<20> P-당단백질은 세포로부터 생체 이물을 밀어냄으로써 약물이 세포 내에 축적되는 것을 감소시킬 뿐만 아니라, 장의 내피세포 등에 존재하면서 약물의 경구 생체이용률을 방해하는 것으로도 알려져 있다(Schinkel, et al., Cell 77: 491-502, 1994).

<21> 항암제의 중요한 약물인 탁산계(taxanes : 파클리탁셀, 도세탁셀 등) 화합물은 경구 생체이용률이 극히 미미하여 경구로 투여되는 경우에는 전혀 약효를 나타내지 못한다. 따라서, 이들 약물은 정맥 혹은 근육 주사에 의하여 투여되며, 난용성 물질인 파클리탁셀은 계면활성제인 크레모포어 EL(Cremophor EL)을 사용하여 액상형태의 주사제로 제조되어 사용된다. 그러나, 이때 사용되는 크레모포어 EL은 알레르기 반응에 의한 과민반응을 일으켜 장시간에 걸친 점적주사만이 가능하며, 또한 이러한 과민반응을 억제하기 위한 사전 약물요법 등으로 인해 환자의 입원이 요구되는 등 불편과 위험이 뒤따른다.

<22> 탁산계 약물의 경구 생체이용률을 높이는 방법은 환자의 자가치료를 가능하게 할 뿐만 아니라 약물투여의 편리성과 안전성을 높이고 의료비용을 줄일 수 있다. 따라서, 경구로 투여되어 경구 생체이용률을 높일 수 있는 약물 혹은 제제의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다. 이러한 연구의 일환으로, 탁산계 항암제의 경구 생체이용률을 증가시키기 위한 많은 시도들이 있었으며, 몇몇 화합물들은 병용 투여시킬 때 위장관의 P-당단백질에 의한 흡수약물의 배출시스템을 저해시켜 경구 생체이용률이 향상되는 결과를 보여주었다. 그러나, 기존에 알려진 P-당단백질 저해제인 베라파밀(verapamil), 사이클로스포린 A(cyclospolin A)와 같은 물질들은 화합물 자체가 강력한 약리작용을 지니고 있어 혈압강하 또는 면역억제와 같은 심각한 부작용을 나타내는 문제점이 있다.

<23> 파클리탁셀은 항미세소관 활성을 가지는 항암제이다. 현재 임상에 사용되는 파클리탁셀은 유방암, 난소암 및 비세포 폐암에 효과가 뛰어난 항암제이다(Rowinsky EK, et. al., *Semin Oncol*. 19: 646-62, 1992). 파클리탁셀의 화학요법은 투여 경로와 항암제 내성과 관련된 두 가지 문제를 가지고 있다. 현재 임상에서 사용되고 있는 파클리탁셀의 제형은 정맥제형으로 낮은 수성가용성 때문에 보조-용매(co-solvent)로 사용한 크레모퍼(Cremophor) EL/에탄올(ethanol)이 알레르기성 쇼크의 부작용을 일으킨다(Dorr RT, *Ann Pharmacother*. 28:S11-4, 1994). 이와 같은 문제를 해결하기 위하여 수용성 파클리탁셀로 제조하여 유방암 이종이식 검증법에서 연구되었다(Deutsch HM, et al., *J Med Chem*. 32:788-92, 1989). 파클리탁셀-리포좀(liposome) 제형은 건강한 또는 암을 가진 생쥐의 정맥이나 복강에 리포좀 투여 후 파클리탁셀을 투여하는 것보다 효과가 더 좋았다(Sharma A, et al., *Cancer Lett*. 107:265-72, 1996). 최근에 새로운 폴리머(polymer)가 포함된 수용성 파클리탁셀의

임상 제1상 및 약물동력학 실험이 시행되었다(Meerum JM, et al., *Anticancer Drugs*. 12:315-23, 2001).

<24> 파클리탁셀을 경구로 투여할 경우 투여방법이 환자에게 편리하고, 비용을 줄일 수 있으며, 오랫동안 사용할 수 있는 이유로 사용하기 편리하기 때문에 선호될 수 있다(Malingre 등, 2001). 그럼에도 불구하고 파클리탁셀의 경구 투여제는 낮은 경구 생체이용률 때문에 이용되지 않고 있다. 파클리탁셀은 위장내부에서 유래하는 다약물 수송자인 P-당단백질에 높은 친화력를 가지고 있어서 경구 생체이용률이 낮다(Wacher VJ, et al., *J Pharm Sci*. 87:1322-30, 1998; van Asperen J, et al., *Br J Cancer*. 76:1181-3, 1997; Sparreboom A, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. ;94:2031-5, 1997). *Mdr1a* 유전자를 녹아웃(knock-out)시킨 생쥐에서 P-당단백질 기능이 소실됨으로 인하여 경구로 투여한 파클리탁셀의 생체이용률이 증가되었다(Malingre MM, et al., *Invest New Drugs*. 19:155-62, 2001). P-당단백질 억제제인 사사이클로스포린(cyclosporin) A나 PSC 833은 쥐와 사람에서 파클리탁셀의 생체이용률을 증진시켰다(van Asperen J, et al., *Br J Cancer*. 76:1181-3, 1997; Sparreboom A, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:2031-5, 1997; Schellens JH, et al., *Eur J Pharm Sci*. 12:103-10, 2000). 파클리탁셀은 P-당단백질 기질로서 P-당단백질가 과발현되는 경우 파클리탁셀 내성의 원인이 된다(Oza AM., *Novartis Found Symp*. 243:103-15; discussion 115-8, 180-5, 2002). 그러므로, P-당단백질을 과발현하는 암세포에서 P-당단백질 억제를 통해서 파클리탁셀에 대한 내성을 억제시킬 수 있을 뿐 아니라 파클리탁셀의 경구 생체이용률을 증진시킬 수 있다.

<25> 이에 본 발명자들은 부작용을 나타내지 않으면서 효과적으로 P-당단백질을 억제하여 파클리탁셀이 가지는 문제점을 해결할 수 있는 화합물을 찾고자 연구한 결과, 7,3',4'-트리메톡시플라본은 P-당단백질 억제 효능이 뛰어나고, 파클리탁셀의 생체이용률의 증진시키는 효과를 가지며, 독성이 낮음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<26> 본 발명의 목적은 부작용이 적으며, P-당단백질의 활성을 억제하여 항암제의 생체이용률을 증진시키는 항암제의 활성 증진제를 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<27> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 트리메톡시플라본 또는 약학적으로 허용되는 그의 염을 유효성분으로 함유하는 항암제의 활성 증진제를 제공한다.

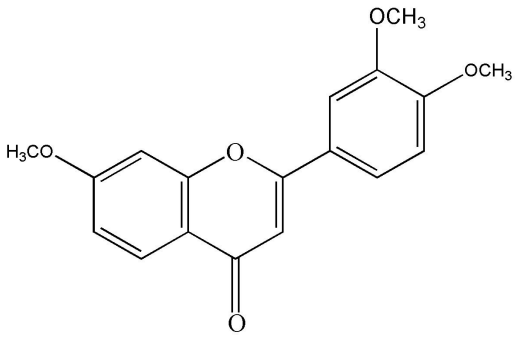
<28> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<29> 본 발명의 트리메톡시플라본 또는 약학적으로 허용되는 그의 염을 유효성분으로 함유하는 항암제 증진제를 제공한다.

<30> 본 발명의 상기 트리메톡시플라본는 하기 화학식 1로 기재되는 7,3',4'-트리메톡시플라본인 것을 특징으로 한다.

화학식 1

<31>



<32> 본 발명의 상기 증진제는 P-당단백질에 의해서 항암제에 대해 내성을 갖는 암세포에 대한 감수성를 증진시키는 것을 특징으로 한다.

<33> 본 발명의 실시예에서는, P-당단백질를 억제하는 플라보노이드를 선별하였다. 열 한개의 플라보노이드를 대상으로 세포독성과 화학감작은 MTT 방법으로 측정한 결과, 플라보노이드 중 5, 7, 3', 4', 5' -펜타메톡시플라본

(pentamethoxyflavone)(PMF)과 트리메톡시플라본이 각각 1000 이상과 333 이상의 높은 화학감작지수를 보인 반면, P-당단백질 억제제로 잘 알려져 있는 베라파밀의 화학감작지수는 152였다. 그러나 세포독성은 오히려 베라파밀 보다 낮았다. 이와 같이, 펜타메톡시플라본 및 트리메톡시플라본은 베라파밀에 비해서 높은 화학감작지수을 가지는 반면 세포독성은 낮음을 확인하였다.

<34> 인체소장암 상피 세포주를 이용한 Caco-2 시스템을 이용하여 파클리탁셀의 양방향 수송에서 트리메톡시플라본의 효능을 조사하여 보았다. 파클리탁셀 농도는 내부 표준 방식을 이용하여 HPLC분석에 의해 양을 측정하였다. 파클리탁셀의 BL 챔버에서 AP 챔버로의 이동은 AP 챔버에서 BL 챔버로의 이동보다 10배 더 높았다. 이 결과는 BL 챔버에서 AP 챔버로의 파클리탁셀의 이동이 AP 챔버에서 BL 챔버로의 이동보다 4-10배 더 높았다는 이전의 연구와 일치하였다(Walle and Walle, *Drug Metab Dispos*, 26:343-6, 1998). 트리메톡시플라본와 베라파밀은 AP 챔버에서 BL 챔버로의 파클리탁셀의 이동을 증가시켰지만 BL 챔버에서 AP 챔버로의 이동은 감소시켰다. 결과적으로 트리메톡시플라본과 베라파밀의 파클리탁셀의 이동에 미치는 순수효과는 감소되었다. P-당단백질이 억제되면 BL 챔버에서 AP 챔버로의 파클리탁셀의 이동이 감소되고, AP 챔버에서 BL 챔버로의 이동이 증가된다(JJ Xiao, et. al., *Pharmacol Exp Ther,* 313: 268-76, 2005). 선행실험에서 트리메톡시플라본는 MRP1(Multidrug Resistance-Associated Protein 1)을 억제하지 않았기 때문에 P-당단백질을 억제함으로써 적어도 세포막의 브러쉬 보더(brush border)를 통과하는 BL 챔버의 파클리탁셀을 증가시키는 것으로 보인다. 그러나 P-당단백질 이외의 다른 수송자(transporters)와 사이토크롬(cytochrome) P-450이 트리메톡시플라본에 의한 파클리탁셀의 이동에 관여하는지를 배제하지 않았다. 50 μM 트리메톡시플라본가 파클리탁셀의 이동에 미치는 순수효과는 50 μM 베라파밀의 효과와 비슷하였으나, 400 μM 트리메톡시플라본의 파클리탁셀의 이동에 미치는 순수효과는 100 μM 베라파밀 효과의 약 1/4배이었다. 그러나 트리메톡시플라본의 낮은 독성을 고려하면 파클리탁셀의 용량을 증가시킬 수 있으므로 생체이용률의 증진 측면에서 베라파밀 보다 우수할 수 있을 것으로 생각된다. 기대했던 것과 달리 펜타메톡시플라본은 화학감작효과가 가장 높았으나 BL 챔버에서 AP 챔버로의 파클리탁셀의 이동이 억제되지 않았다. 이와 같은 결과는 플라보노이드의 P-당단백질 억제 효능이 파클리탁셀의 이동 효과와 항상 비례하지는 않는 것을 의미한다. 따라서, 본 발명의 트리메톡시플라본은 파클리탁셀의 경구투여에 의한 낮은 생체이용률을 향상시킬 수 있다.

<35> 본 발명의 실시예에서는 상기 트리메톡시플라본이 Caco-2 시스템에서 파클리탁셀 내성 세포의 감수성을 증가시키는지를 확인하는 실험을 시행하였다. 50 uM 파클리탁셀을 트리메톡시플라본와 함께 3 시간 동안 AP 챔버에 배양 후 BL 챔버로부터 얻은 배양액을 96-웰 플레이트의 SK-MES-1/WT세포와 SK-MES-1/PT4000세포에 투여하여 3일간 배양한 후 파클리탁셀의 감수성을 MTT 방법으로 측정하였다. 도 9에서 보는 것과 같이, 트리메톡시플라본와 베라파밀은 대조군과 비교하였을 때 SK-MES-1/PT4000세포에 파클리탁셀의 감수성을 통계적으로 유의하게 증가시켰다.

<36> 본 발명의 트리메톡시플라본은 다양한 항암제와 병용으로 투여되어 항암제의 작용을 증가시킨다. 항암제는 P-당단백질의 영향을 받는 것으로 알려진 항암제는 모두 가능하며, 안쓰라사이크린계 항암 항생제(독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신, 이다루비신), 빈카 알칼로이드(빈크리스틴, 빈블라스틴), 탁산계 항암제(파클리탁셀, 도스탁셀), 콜히친, 에피포도필로톡신계 항암제(에토포사이드, 테니포사이드), 미토산트론, 액티노마이신 D 및 마이토마이신 C등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

<37> 본 발명은 트리메톡시플라본 및 약학적으로 허용되는 그의 염뿐만 아니라 그로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물 및 수화물을 모두 포함한다.

<38> 본 발명의 트리메톡시플라본은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 인산, 황산, 질산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 메탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산(maleic acid), 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르빈산, 카르본산, 바닐린산, 요오드산 등을 사용할 수 있다.

<39> 본 발명의 트리메톡시플라본은 임상투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화학식 1의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘(Calcium

carbonate), 자당(Sucrose) 또는 유당(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜 (Propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

<40> 이하, 본 발명을 실시예 및 제제예에 의해 상세히 설명한다.

<41> 단, 하기 실시예 및 제제예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제제예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<42> **<실시예 1> 세포의 배양**

<43> 인간 백혈병 세포주인 OCI-AML-2(AML-2; Ontario Cancer Institute Toronto, ONT, Canada)세포와 AML-2/WT세포로부터 선별한 다우노루비신(daunorubicin)(Sigma Chemical Co., ST.Louis, MO, USA)에 내성을 보이는 AML-2/D100세포를 10% FBS(Cambrexm, San Diego, CA, USA)와 100 u/㎖ 항생항균제(antibiotic-antimycotics)(Cambrexm, San Diego, CA, USA)를 함유한 α-MEM 배지(Gibco BRL, Gland Island, NY, USA)를 이용하여 5% CO_2를 함유한 습윤화된 37℃ 배양기에서 배양하였다(CH Choi, et.al., *Mol C ells* 1997, 7:170-7). 인간 결장 아데노카르시노마(adenocarcinoma) 세포주인 Caco-2세포와 폐암세포주인 SK-MES-1세포와 파클리탁셀 내성세포인 SK-MES-1/PT4000세포는 DMEM 배지(Gibco BRL, Gland Island, NY, USA)에서 배양하였고, Caco-2 세포는 24 ~ 32회 사이에 계대 배양한 세포를 사용하였다. AML-2/D100세포와 SK-MES-1/PT4000세포는 각각의 약물 감수성 모세포에 다우노루비신 혹은 파클리탁셀의 IC_{50} 농도(세포의 수가 50%로 감소하는 약물의 농도)를 처치하여 점차 약물의 농도를 증가시키는 방법으로 선별하였다. AML-2/D100세포는 최종 100 nM 다우노루비신에서, SK-MES-1/PT4000세포는 최종 4000 ng/ml 파클리탁셀에서 선별하였다.

<44> **<실시예 2> 세포독성 및 화학감작 효과 분석**

<45> 파클리탁셀 또는 빈크리스틴(vincristine)(Sigma Chemical Co., ST.Louis, MO, USA) 항암제의 세포독성 실험과 화학감작제의 스크리닝 방법은 AML-2/D100세포에서 MTT 시약(Sigma Chemical Co., ST.Louis, MO, USA)이 미토콘드리아 효소를 환원시켜 포르마잔(formazan)을 형성하므로 그 농도를 측정하여 생존한 세포수를 측정한다. 세포독성 실험은 96 웰 마이클로플레이트(microplate)(Nunc, Franklin Lakes, NJ, USA)에 세포를 배양 후 해당 항암제를 농도별로 넣고, 대조군으로 약물 대신 PBS를 넣고, 블랭크(blank)는 세포 대신 배양액만 넣어 실험하였다. 화학감작 효과는 AML-2/D100세포에 P-당단백질의 기질로 알려져 있는 120 ng/ml의 빈크리스틴(vincristine)(Sigma Chemical Co., ST.Louis, MO, USA)을 함유하거나 함유하지 않은 상태에서 세포독성 방법과 동일한 방법으로 실험하였다(R Pieters, et.al., *Cancer Lett* 1988, 41:323-32). 96 웰 마이클로플레이트를 3일간 배양 후 MTT용액 500 ㎍/㎖를 넣고 다시 4시간 배양하여 포르마잔을 형성하면 배양액을 버리고 150 ㎕ DMSO 용액(Sigma Chemical Co., ST.Louis, MO, USA)으로 잘 녹여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

<46> 세포독성(%) = 항암제를 처치한 웰의 흡광도/항암제를 처치하지 않은 웰의 흡광도×100

<47> 화학감작 효과 = 빈크리스틴(vincristine)을 처리하지 않은 군의 IC_{50}/빈크리스틴을 처리한 군의 IC_{50}

<48> 열 한개의 플라보노이드를 대상으로 세포독성과 화학감작은 MTT방법으로 측정한 결과, 플라보노이드 중 5, 7, 3', 4', 5´-펜타메톡시플라본(pentamethoxyflavone)(PMF)과 트리메톡시플라본이 각각 1000 이상과 333 이상의 높은 화학감작지수를 보였고, 3', 4' -디메톡시플라본은 321. 7를, 3, 6, 3', 4'-테트라메톡시플라본은 210. 5를, 6, 7, 3', 4'-펜타메톡시플라본은 125. 5를, 6, 7, 3', 4', 5'-헥사메톡시플라본은 71.9를, 5, 7, 4' -트리메톡시플라본은 51.9를, 5, 7, 3', 4' -테트라메톡시플라본은 40.42를, 5, 7, 3', 4' -테트라하이드록시플라본은 1.7을, 3, 5, 7, 3', 4' -펜타하이드록시플라본은 1.16를, 3, 7-디하이드록시-3', 4'-디메톡시플라본은 1.17을 나타내었다. P-당단백질 억제제로 잘 알려져 있는 베라파밀의 화학감작지수는 152였다. 그러나 세포독성은 오히려 베라파밀 보다 낮았다. 이와 같이, 펜타메톡시플라본 및 트리메톡시플라본은 베라파밀에 비해서 높은 화학감작지수을 가지는 반면 세포독성은 낮음을 확인하였다(도 4참조).

<49> **<실시예 3> RNA 적출과 역전사 폴리머라아제 연쇄반응**

<50> SK-MES-1/WT과 SK-MES-1/PT4000세포에서 P-당단백질의 유전자인 *MDR1*의 mRNA의 농도를 측정하기 위하여 RNA 적출후 역전사 폴리머라아제 연쇄반응 분석을 시행하였다.

<51> **<3-1> 총 RNA의 추출**

<52> TRIzol® 시약(GibcoBRL, Long Island, NY, USA)을 이용하여 총 RNA를 분리 추출하였다. 폴리프로필렌 튜브(Polypropylene tube)에 5 × 10^6개의 세포를 침전시킨 후 1 ㎖ TRIzol®을 넣고 5분 동안 15 ~ 30℃에서 반응시켰다. 200 ㎕ 클로로포름(chloroform)을 넣고 15초 동안 손으로 가볍게 섞어주고 2 ~ 3분 동안 15 ~ 30℃에서 반응시킨 후 4℃에서 13,200 rpm으로 15분간 원심분리 하여 상층 액을 튜브에 옮겼다. 500 ㎕ 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol)을 넣고 잘 섞어준 다음 10분 동안 15 ~ 30℃에서 반응시켜 4℃에서 13,200 rpm으로 15분 동안 원심분리 하고 상층액을 버린 후 75% EtOH를 RNA 펠릿(pellet)에 넣고 회전(vortexing)한 후 4℃에서 13,200 rpm으로 5분간 원심분리 하였다. 실온에서 펠릿를 건조시킨 후 0.1% DEPC 워터(water)에 다시 녹였다. RNA 농도(단일 가닥의 RNA의 1 A_{260} 유닛 = 40 ㎍/㎖)는 260 nm에서 측정하였다(DUR 650 spectrophotometer, Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).

<53> **<3-2> 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)**

<54> 첫 번째 가닥 cDNA를 1 U/㎕ RNasin(Promega, Madison, WI, USA), 450 ng 올리고$(dT)_{20}$, 40 mM tris-HCl(pH 8.4), 100 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM 각 dNTP, 10 mM DTT (GibcoBRL, Long Island, NY, USA)와 200 U M-MLV(Moloney murine leukimia virus) 역전사 효소(Garlsbad, CA, USA)가 함유된 20 ㎕의 용액에서 총 1 ㎍ RNA으로부터 합성하였다. PCR은 1 X PCR 완충액(10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 100 ㎍/㎖ 젤라틴, 0.05% 트리톤 X-100)에 25 ng의 RNA로부터 합성된 cDNA, 각각 10 pM *MDR1* 프라이머(*MDR1* sense; CTg gTT TgA TgT gCA CgA TgT Tgg(서열번호 1), *MDR1* anti-sense; TgC CAA gAC CTC TTC AgC TAC Tg(서열번호 2)), 50 μM dNTP와 taq DNA 폴리머라아제(Perkin-Elmer Life Sciences, Billerica, MA, USA) 2.5 유닛을 넣은 후 5 μCi[α-^{32}P] dCTP(AgenBio Ltd., Seoul, South Korea)를 섞어 총 25 ㎕의 반응 용액에 PCR을 시행하였다. PCR 기계는 GeneAmp PCR system 2400(Perkin-Elmer Life Sciences)을 사용하였으며 각 샘플당 변성(denaturation)(95℃에서 30초), 풀림(annealing)(53℃에서 30초) 및 연장(extension)(72℃에서 30초)으로 25 사이클(β-액틴(actin)은 18 사이클)로 실험하였으며 모든 PCR 산물을 72℃에서 5분간 마지막 연장을 하였다. 이 샘플에 10X DNA 다이(5 ㎎/㎖ 브로모페놀 블루(bromophenol blue), 50% 글리세롤(glycerol), 100 mM 트리스(Tris), 20 mM NaCl, 1 mM EDTA)를 섞고 7% 비변성 폴리아크릴아마이드(polyacrylamide) 젤에 전기영동 한 후 코닥 이미지 스테이션(Kodak Image Station) 4000MM(Eastman Kodak, Rochester, NY, USA)를 사용하여 스캔하였다.

<55> 그 결과, SK-MES-1/PT4000세포에서 P-당단백질의 유전자의 발현이 증가됨을 확인하였다(도 5참조).

<56> **<실시예 4> HPLC에 의한 파클리탁셀의 결정**

<57> 배양액의 파클리탁셀의 양은 도스탁셀을 내부표준물질로 이용하여 HPLC방법으로 측정하였다(TA Willey, et.al., *J Chromatogr* 1993, 621:231-8). 0.4 ㎖의 배양액과 0.4 ㎖ 0.2 M 암모늄 아세테이트 버퍼용액(ammonium acetate buffer solution)(pH 5.0)을 혼합한다. 혼합한 배양액은 고체상 추출법(solid-phase extraction, SPE) 방법을 이용하여 정제하였다. 먼저, 시아노 결합 엘루트 컬럼(cyano bond elut column)(1 ㎖, Analytichem International, Harbor, CA, USA)을 2.0 ㎖ 메탄올, 1.0 ㎖ 0.01 M 암모늄 아세테이트(monium acetate) 완충용액(pH 5.0)으로 세척 후 혼합된 배양액을 컬럼에 통과시켰다. 2 ㎖ 0.01 M 암모늄 아세테이트 완충용액, 1 ㎖의 에탄올및 0.01 M 암모늄 아세테이트 완충용액(2 : 8, v/v)의 혼합액과 1 ㎖ 헥산(Merk Co., Darmatadt, Germany) 순으로 컬럼에 통과시켜 세척하여 15분 동안 컬럼을 건조시켰다. 1 ㎖의 아세토니트릴(acetonitrile) 및 트리에틸아민(triethylamine)(Sigma Chemical Co., ST.Louis, MO, USA)(1000 : 1, v/v)의 혼합액을 컬럼에 통과시켜 혼합액을 1.5 ㎖ 튜브에 회수하였다. 회수된 용액은 농축기(Ecospin 314, South Korea)를 이용하여 상온에서 건조시켰다. 건조된 시험물질과 10 ㎍/㎖ 도스탁셀(docetaxol)을 100 ㎕ 이동상에 녹여 HPLC의 ODS C18 컬럼(4.6×250 mm, 5 ㎛ Simazu, Japan)에 주입시켰다. 이동상은 아세토니트릴(acetonitrile)(Merk Co., Darmatadt, Germany), 메탄올(methanol)(Merk Co., Darmatadt, Germany) 및 20 mM 암모늄 아세테이트(ammonium acetate)(Sigma Chemical Co., ST.Louis, MO, USA) 완충용액(pH 5.0)을 20 : 55 : 25의 비율로 하여 0.22 ㎛ 막필터(membrane filter)로 여과하였다. 이동상의 유속은 1 ㎖/min이고, UV의 흡광도는 230 nm으로 파클리탁셀을 측정하였다.

<58> 상기 조건으로 HPLC를 수행하여 내부표준 물질(도스탁셀)의 피크면적에 대한 파클리탁셀의 피크면적 비를 가지고 검량선을 적정하였다. 검량선은 일직선이었고(R = 0.9985), 크로마토그램의 파클리탁셀(Korea United Pharm Co., Seoul, South Korea)과 도스탁셀(Korea United Pharm Co., Seoul, South Korea) 각각의 체류시간(retention time)은 9.867분과 10.867분으로 잘 분리되었다(도 2 및 3). 250 pmole 파클리탁셀 샘플 세 개의 평균 변이지수(CV)는 15%이었다. 파클리탁셀의 측정한계는 50 ng이었다. 이들 파라미터는 본 분석방법이 파클리탁셀을 정량분석 하는데 적절하다는 것을 증명하고 있다.

<59> **<실시예 5> Caco-2 시스템에서 파클리탁셀의 양 방향수송에서 TMF의 효능**

<60> Caco-2 세포는 Transwell® 폴리탄산염 필터(구멍 크기: 0.4 ㎛; 직경, 24.5 mm; 성장범위, 4.71cm^2)(Corning Costar Corp., Cambridge, MA, USA)의 상위 챔버에 $4\times10^4/cm^2$의 CaCo-2세포를 배양하고, 3 ~ 5일마다 배양액을 교체해 준다. 16 ~ 20일 후 Transwell®에 세포가 단층막으로 성장한 후 실험을 하였다(Bromberg and Alakhov, 2003). 단층막으로 형성된 Caco-2세포는 Millicell-ERS 장치(Millipore, Bedford, MA, USA)을 이용하여 트랜스-상피 전기 저항(trans-epithelial electrical resistance, TEER)를 측정하였다. 챔버의 AP와 BL의 배양액에 두개의 탐침봉을 각각 넣어 TEER값을 측정하였다. 실험조건의 최적 TEER 값은 800-850 Ω cm^2이다. 파클리탁셀은 단층막 AP 챔버(상부) 혹은 BL 챔버(하부)에 단독 처리하거나 베라파밀이나 플라보노이드(Indofine Chemical Co., Hillsborough, NJ, USA)와 함께 처리하여 3시간 동안 배양 후 각각의 챔버 안에 배양액을 분석하였다.

<61> Caco-2 단층막을 통과하는 파클리탁셀의 이동을 펜타메톡시플라본, 트리메톡시플라본 및 베라파밀의 존재 유무에 따라 3 시간 동안 배양한 후 AP 챔버(chamber)에서 BL챔버 방향 또는 BL 챔버에서 AP 챔버 방향으로 이동을 상부챔버와 하부챔버 내 배양액 내의 파클리탁셀의 양을 측정하여 계산하였다. 결과는 평균값 ± 평균값의 표준편차로 나타내었고, 통계학적 분석은 Student t' test(Sigma Plot 2001)를 이용하였으며, 통계학적 유의 수준은 $p<0.05$로 하였다. 기대했던 것과 달리 가장 높은 화학감작지수를 보였던 펜타메톡시프라본은 AP 챔버에서 BL 챔버로의 파클리탁셀의 이동을 감소시켰기 때문에, 본 연구에서는 트리메톡시플라본과 베라파밀의 파클리탁셀 이동효과만을 비교하였다. 도 6에서 보는 것과 같이, 파클리탁셀의 BL 챔버에서 AP 챔버로의 이동은 AP 챔버에서 BL 챔버로의 이동보다 10배 더 컸다. 트리메톡시플라본와 베라파밀은 AP 챔버에서 BL 챔버로의 파클리탁셀 이동을 농도 의존적으로 증가시켰고, BL 챔버에서 AP 챔버로의 파클리탁셀 이동을 감소시켰다. 50 μM 트리메톡시플라본이 파클리탁셀 이동에 미치는 순수효과(BL 챔버에서 AP 챔버로의 이동 - AP 챔버에서 BL 챔버로의 이동)는 50 μM 베라파밀의 효과와 비슷하였으나, 400 μM TMF의 파클리탁셀 이동에 미치는 순수효과는 100 μM 베라파밀 효과의 약 1/4배이었다.

<62> **<실시예 6> Caco-2 시스템에서 파클리탁셀에 대한 SK-MES-1/PT4000 세포의 감수성에서의 TMF의 효력**

<63> 트리메톡시플라본이 내성 암세포에서 항암제에 대한 감수성을 증가시키는지를 증명하기 위하여 파클리탁셀 내성 암세포주를 선별하였다. 도 7에서 보는 것과 같이, SK-MES-1/WT세포와 P-당단백질이 과발현된 SK-MES-1/PT4000 세포에서 파클리탁셀에 대한 IC_{50} 값은 각각 71 nM과 6200 nM로 87배의 차이가 있었다. 또한, 트리메톡시플라본이 Caco-2시스템에서 파클리탁셀 내성 세포의 감수성을 증가시키는지를 확인하기 위해 실험을 시행하였다. 50 uM 파클리탁셀을 트리메톡시플라본과 함께 3 시간 동안 AP 챔버에 배양 후 BL 챔버로부터 얻은 배양액을 96-웰 플레이트의 SK-MES-1/WT세포와 SK-MES-1/PT4000세포에 투여하여 3일간 배양한 후 파클리탁셀의 감수성을 MTT 방법으로 측정하였다. 도 9에서 보는 것과 같이, 트리메톡시플라본과 베라파밀은 대조군과 비교하였을 때 SK-MES-1/PT4000세포에 파클리탁셀의 감수성을 통계적으로 유의하게 증가시켰다.

<64> 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 물활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증 정도에 따라 적절히 양을 사용할 수 있다.

<65> **<제제예 1> 시럽제의 제조방법**

<66> 본 발명의 트리메톡시플라본 및 약학적으로 허용되는 그의 염을 유효성분 2% (중량/부피)로 함유하는 시럽은 다음과 같은 방법으로 제조한다.

<67> 7,3',4'-트리메톡시플라본의 산부가염, 사카린, 당을 온수 80 g에 용해시켰다. 이 용액을 냉각시킨 후, 여기에 글리세린, 사카린, 향미료, 에탄올, 소르브산 및 증류수로 이루어진 용액을 제조하여 혼합하였다. 이 혼합물에 물을 첨가하여 100 ㎖가 되게 하였다. 상기 부가염은 실시예에 의한 다른 염으로 대치시킬 수 있다.

<68> 상기 시럽제의 구성성분은 다음과 같다.

<69> 7,3',4'-트리메톡시플라본·염산염 ····· 2 g

<70> 사카린 ····· 0.8 g

<71> 당 ····· 25.4 g

<72> 글리세린 ····· 8.0 g

<73> 향미료 ····· 0.04 g

<74> 에탄올 ····· 4.0 g

<75> 소르브산 ····· 0.4 g

<76> 증류수 ····· 정량

<77> **<제제예 2> 정제의 제조방법**

<78> 유효성분 15 ㎎이 함유된 정제는 다음과 같은 방법으로 제조한다.

<79> 7,3',4'-트리메톡시플라본·염산염 250 g을 락토오스 175.9 g, 감자전분 180 g 및 콜로이드성 규산 32 g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160 g, 활석 50 g 및 스테아린산 마그네슘 5 g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

<80> 상기 정제의 구성성분은 다음과 같다.

<81> 7,3',4'-트리메톡시플라본·염산염 ····· 250 g

<82> 락토오스 ····· 175.9 g

<83> 감자전분 ····· 180 g

<84> 콜로이드성 규산 ····· 32 g

<85> 10% 젤라틴 용액

<86> 감자전분 ····· 160 g

<87> 활석 ····· 50 g

<88> 스테아르산 마그네슘 ····· 5 g

<89> **<제제예 3> 주사액제의 제조방법**

<90> 유효성분 10 ㎎을 함유하는 주사액제는 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

<91> 7,3',4'-트리메톡시플라본·염산염 1 g, 염화나트륨 0.6 g 및 아스코르브산 0.1 g을 증류수에 용해시켜서 100 ㎖을 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20 ℃에서 30 분간 가열하여 멸균시켰다.

<92> 상기 주사액제의 구성성분은 다음과 같다.

<93> 7,3',4'-트리메톡시플라본·염산염 ····· 1 g

<94> 염화나트륨 ····· 0.6 g

<95> 아스코르브산 ····· 0.1 g

<96> 증류수 ····· 정량

발명의 효과

<97> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 7,3',4'-트리메톡시플라본은 P-당단백질의 활성을 억제하고 파클리탁셀의 이동을 조절함으로써 파클리탁셀의 경구 생체이용률 및 감수성 증진 효과를 가지며, 낮은 독성을 가진다는 점에서 암환자, 특히 P-당단백질을 과도발현하는 암 세포를 가지는 사람들을 치료하기 위해 P-당단백질 기질인 파클리탁셀의 경구투약과 조화하여 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 탁센(Taxenes)의 추출 과정을 나타내는 모식도이고,

<2> 도 2는 HPLC 방법을 이용한 측정한 파클리탁셀의 검량선을 나타내는 그래프이고,

<3> 도 3은 파클리탁셀(PT, 체류시간 9.867분) 및 도스탁셀(DT, 체류시간 10.867 분)의 혼합물질의 크로마토그램을 나타내는 것이고,

<4> 도 4는 AML-2/D100 세포에서 플라보노이드와 베라파밀의 세포 독성과 화학감작 효과를 나타내는 그래프이고;

<5> CI(화학감작 지수) = IC_{50} (VCR-) / IC_{50} (VCR+);

<6> IC_{50}: 세포 성장을 50% 억제하는 약물 농도;

<7> VCR: 빈크리스틴(100 ng/ml),

<8> 도 5는 SK-MES-1/WT과 SK-MES-1/PT4000세포에서 P-당단백질의 유전자의 발현 정도를 확인하기 위하여 RNA 적출 후 역전사 폴리머라아제 연쇄반응하여 분석한 전기영동을 나타낸 그림이고,

<9> 도 6는 Caco-2 단층막에서 파클리탁셀 이동에 대한 트리메톡시플라본의 효과를 나타내는 그래프이고;

<10> AP: 상부(Apical); BL: 하부(Basolateral);

<11> $P < 0.05$,

<12> 도 7은 Caco-2 시스템에서 SK-MES-1/WT 및 SK-MES-1/WT/PT4000 세포의 파클리탁셀에 대한 감수성을 나타내는 그래프이고,

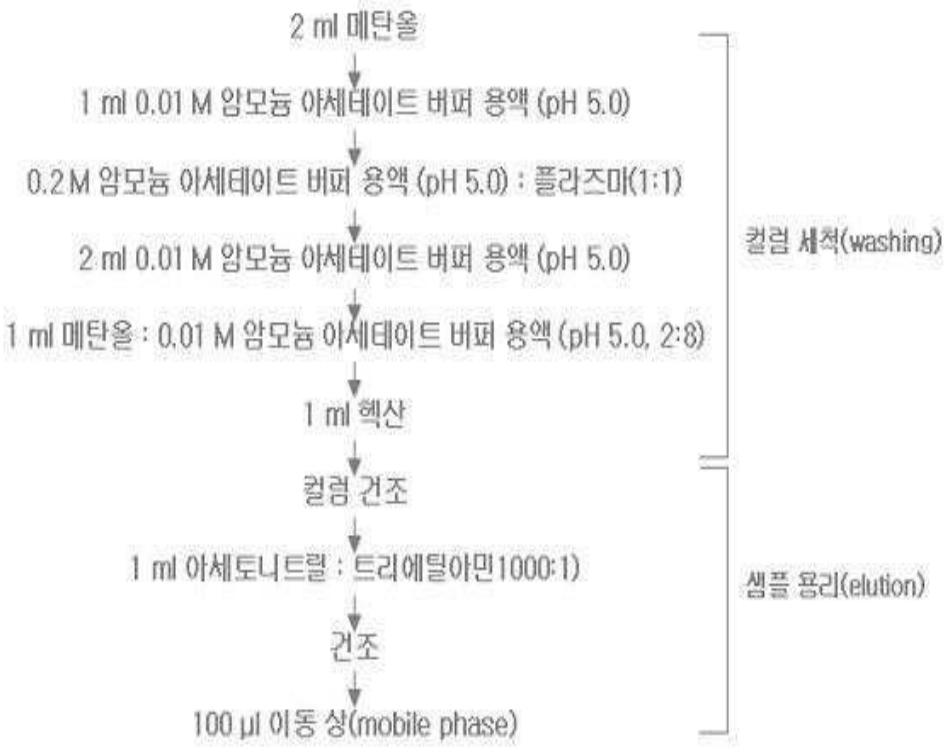
<13> 도 8은 파클리탁셀 및 트리메톡시플라본을 첨가하여 배양한 후 BL 챔버(chamber)로부터 배양액을 얻은 후 MTT을 시행하는 실험 순서를 나타내는 그림이고,

<14> 도 9은 도 8의 과정으로부터 얻은 배양액을 SK-MES-1/WT세포 또는 SK-MES-1/PT4000세포에 투여하여 배양한 후 파클리탁셀의 감수성을 MTT 방법으로 측정한 결과를 나타내는 그래프이다;

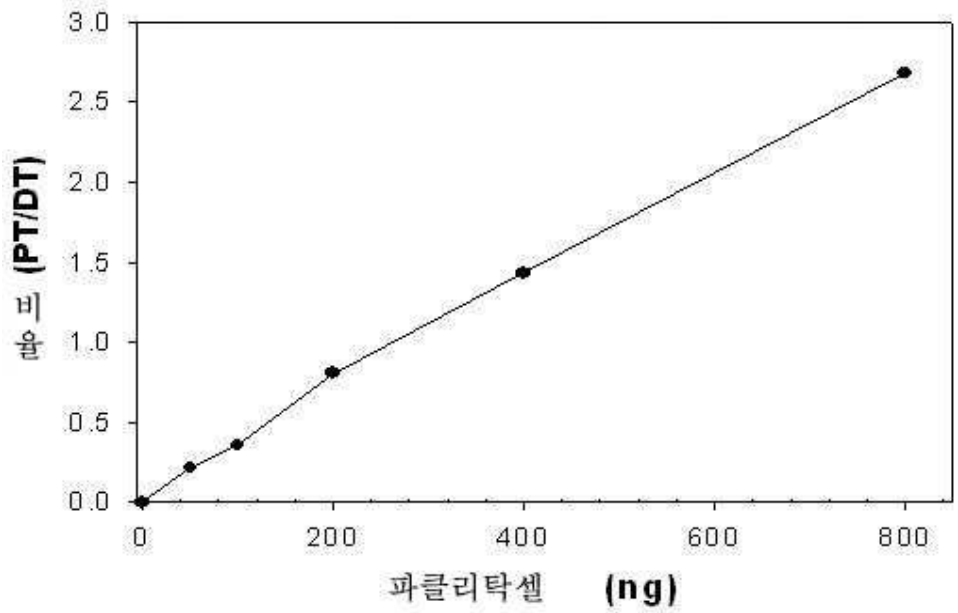
<15> $P < 0.05$.

도면

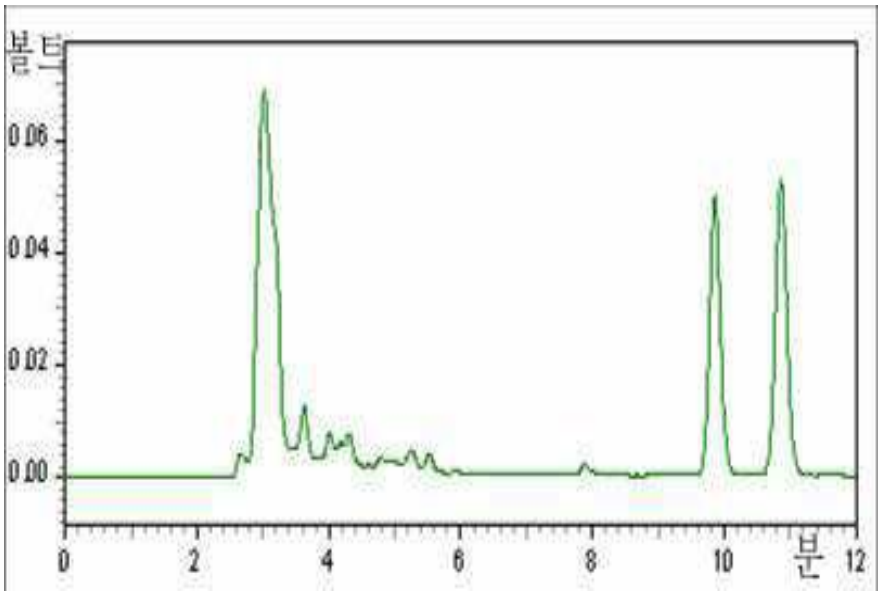
도면1


2 ml 메탄올
1 ml 0.01 M 암모늄 아세테이트 버퍼 용액 (pH 5.0)
0.2 M 암모늄 아세테이트 버퍼 용액 (pH 5.0) : 플라즈마(1:1)
2 ml 0.01 M 암모늄 아세테이트 버퍼 용액 (pH 5.0)
1 ml 메탄올 : 0.01 M 암모늄 아세테이트 버퍼 용액 (pH 5.0, 2:8)
1 ml 헥산
컬럼 세척(washing)
컬럼 건조
1 ml 아세토니트릴 : 트리에틸아민1000:1)
건조
100 μl 이동 상(mobile phase)
샘플 용리(elution)

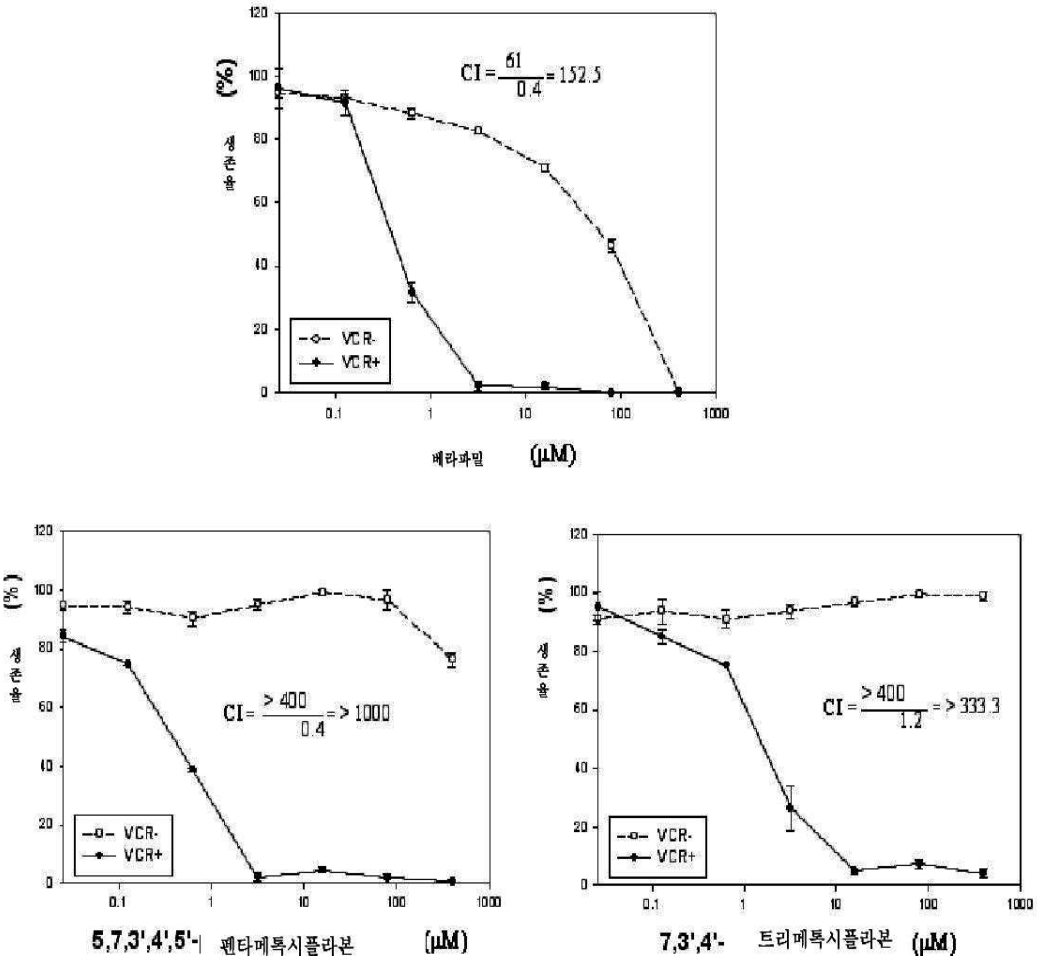
도면2


3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
비율 (PT/DT)
0
200
400
600
800
파클리탁셀 (ng)

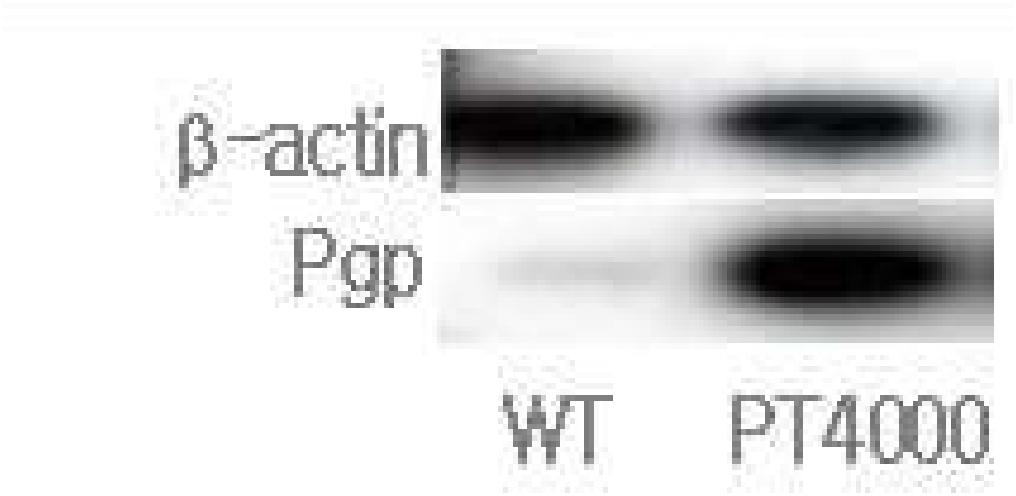
도면3


볼트
0.06
0.04
0.02
0.00
0
2
4
6
8
10
분
12

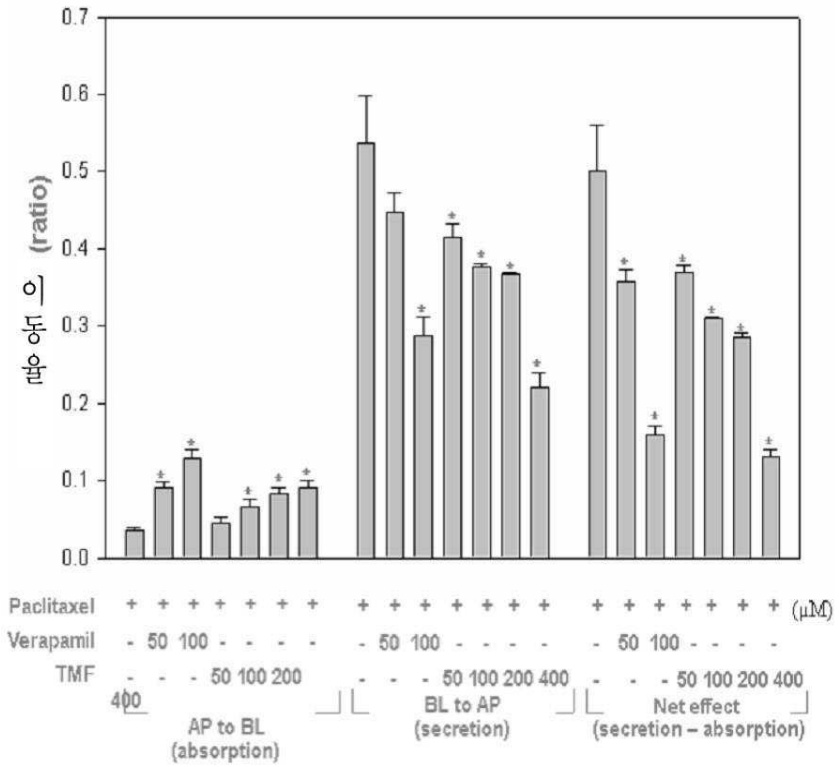
도면4


CI = 61 / 0.4 = 152.5
VCR-
VCR+
(%)
베라파밀 (μM)
CI = > 400 / 0.4 = > 1000
5,7,3',4',5'-펜타메톡시플라본 (μM)
CI = > 400 / 1.2 = > 333.3
7,3',4'-트리메톡시플라본 (μM)

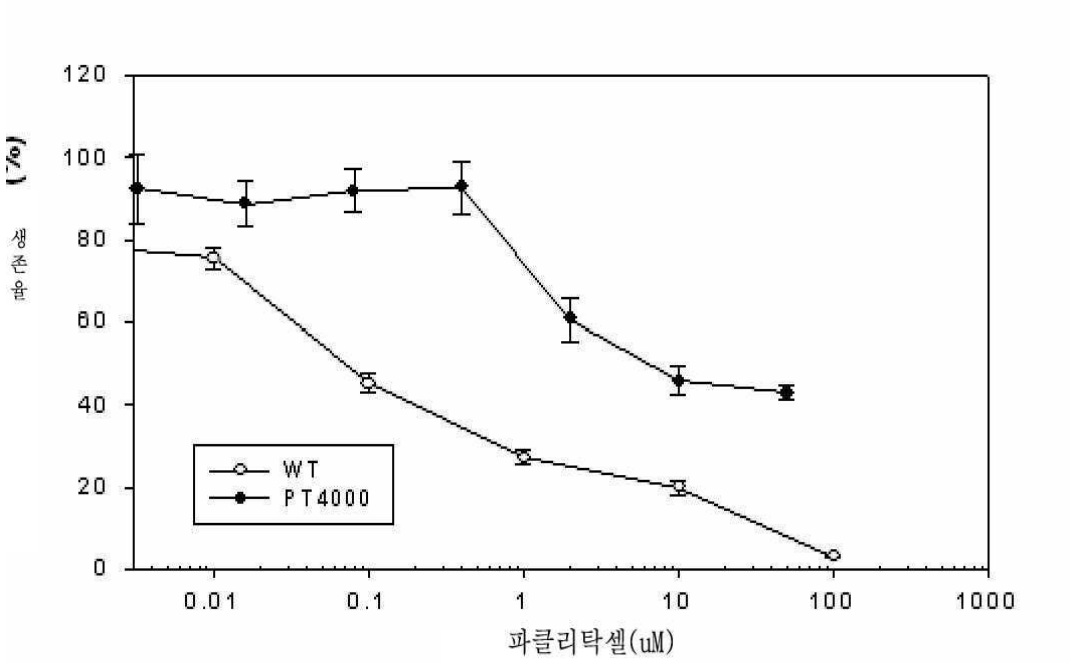
도면5


β-actin
Pgp
WT
PT4000

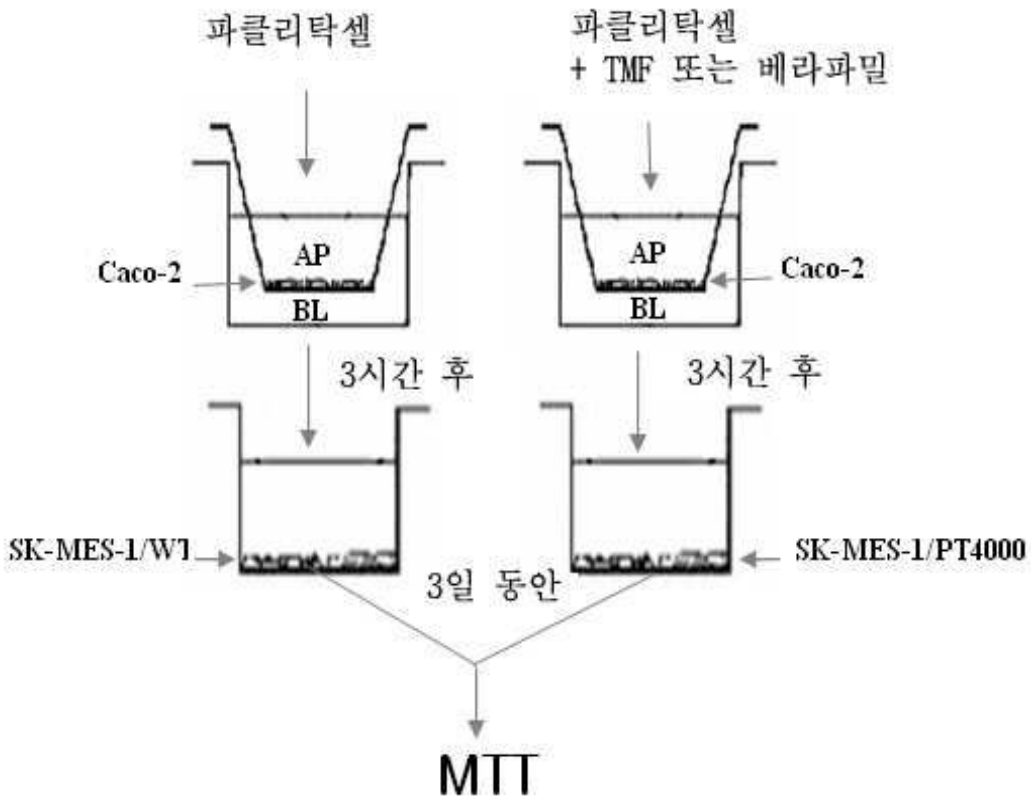
도면6


이동율 (ratio)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
Paclitaxel
Verapamil
TMF
(μM)
AP to BL (absorption)
BL to AP (secretion)
Net effect (secretion – absorption)

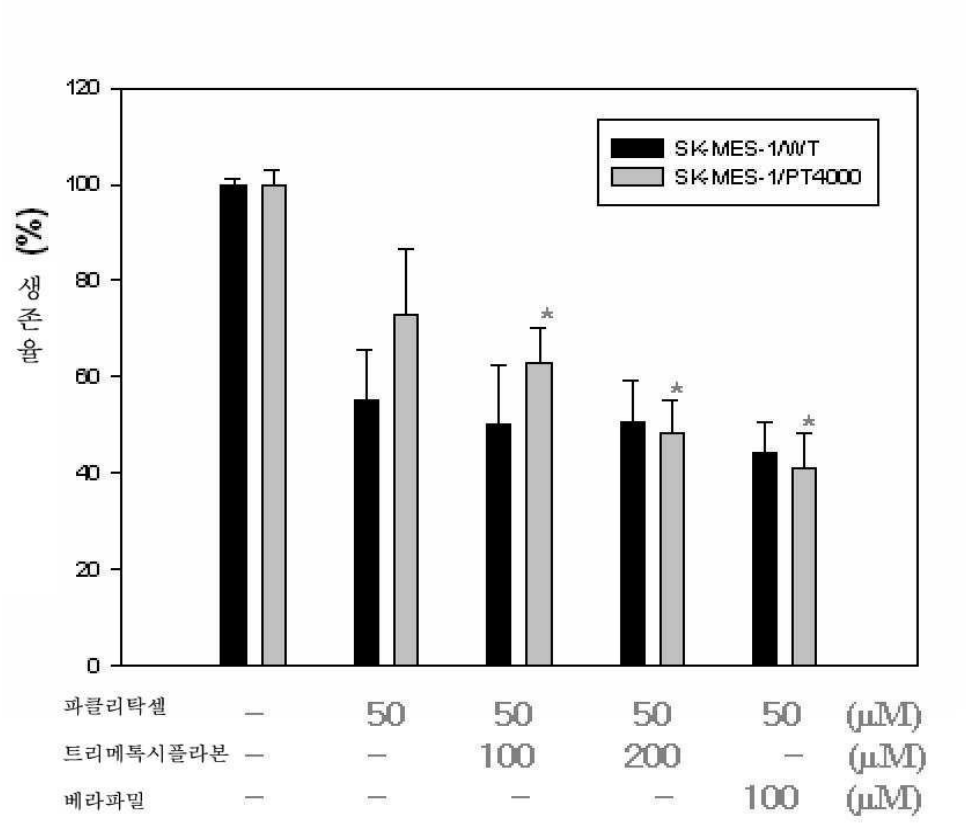
도면7


120
100
80
60
40
20
0
(%)
생존율
WT
PT4000
0.01
0.1
1
10
100
1000
파클리탁셀(uM)

도면8


파클리탁셀
파클리탁셀
+ TMF 또는 베라파밀
Caco-2
AP
BL
AP
Caco-2
BL
3시간 후
3시간 후
SK-MES-1/WT
SK-MES-1/PT4000
3일 동안
MTT

도면9



서 열 목 록

<110> chosun univ.

<120> Anticancer activity enhancer cotaining trimethoxyflavone as an effective ingredient

<130> 7p-03-51

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 24
<212> DNA
<213> MDR1 sense primer

<400> 1

ctggtttgat gtgcacgatg ttgg 24

<210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> MDR1 anti-sense primer

<400> 2
tgccaagacc tcttcagcta ctg 23