(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0026760
(43) 공개일자 2013년03월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/47 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0090125
(22) 출원일자 2011년09월06일
심사청구일자 2011년09월06일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
장기철
경상남도 사천시 정동면 대곡리 255번지
(74) 대리인
김순웅

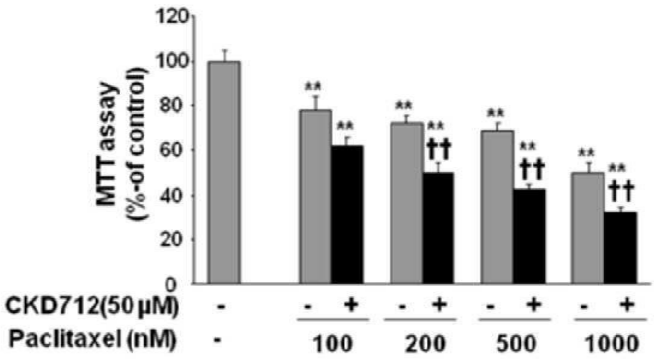
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **ＣＫＤ７１２, (Ｓ-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 CKD712 (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물 및 항암 활성 증강제에 관한 것이다. 상기 화합물은 PTEN 및 Akt 관련 신호전달체계를 조절함으로써 암세포의 성장 및 전이를 억제한다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

CKD712, (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 암은 폐암, 췌장암, 비소세포성폐암, 간암, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁경부암, 자궁암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 나팔관암종, 난소암, 직장암, 항문부근암, 위암, 유방암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장암, 수뇨관암, 신장세포 암종 및 신장골반 암종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

CKD712, (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 항암제의 활성 증진제.

청구항 4

제 3항에 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 5

제 4항에 있어서, 상기 탁산계 항암제는 파클리탁셀인 것을 특징으로 하는 항암제의 활성 증진제.

청구항 6

제 3항에 있어서, 상기 항암제의 활성 증진제는 암세포의 성장 및 전이를 억제하는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 항암제의 활성 증진제.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CKD712, (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물 및 항암 활성 증강제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 암 (종양)은 비정상적이고 비제어성이며 무질서한 세포증식의 산물이다. 이러한 종양의 파괴적인 성장성, 침습성 및 전이성이 있다면 악성으로 분류된다. 침습성이란 주위 조직을 침윤 또는 파괴하는 성질로서, 일반적으로

조직의 경계를 이루는 기저층을 파괴시켜 종양이 국부적으로 전파되는 것을 의미하며, 종종 체내의 순환계로도 유입된다. 전이란 일반적으로 림프관(lymphotic) 또는 혈관에 의해 원발 위치와는 다른 곳으로 종양 세포가 퍼지는 것을 의미한다. 또한 장액성 체강 또는 다른 공간을 통해 직접 신장하여 종양 세포를 이동시키는 것을 의미하기도 한다.

[0003] 현재, 암은 주로 3가지 치료법, 즉 외과적인 수술, 방사선조사 및 화학요법 중 1가지 또는 이들의 조합을 통해 치료되고 있다. 수술은 질병 조직을 대부분 제거하는 것을 포함한다. 이러한 외과적 수술은 특정 부위, 예컨대 유방, 결장 및 피부에 위치한 종양을 제거하는 데에는 효과적이지만, 척추와 같이 일부 구역에 있는 종양을 치료하거나 백혈병과 같은 분산성 종양 질환을 치료하는 데는 사용할 수 없다. 화학요법은 세포 복제 또는 세포 대사를 붕괴시키며, 흔히 유방, 폐 및 정소의 암을 치료하는데 많이 사용되는데, 종양 질병을 치료하는데 사용되는 전신성 화학요법의 부작용은 암 치료를 받는 환자들에게 가장 문제가 된다. 이러한 부작용 중에서 멀미와 구토는 가장 일반적이며 심각한 부작용이다. 화학요법에 의한 부작용은 환자의 생명에 큰 영향을 미치며 치료에 대한 환자의 순응성을 급격하게 변화시킬 수 있다. 또한, 화학치료제와 관련된 부작용으로는 일반적으로 이러한 약물의 투여 시 주의해야 하는 주 용량 제한 독성(DLT)이 있다. 예를 들어, 점막염은 여러 항암제, 예컨대 항대사물질 세포 독소제인 5-플루오로우라실(5-Fluorouracil), 메토트렉세이트(metotrexate) 및 항종양 항생제(예, 독소루비신) 등에 대한 주 용량 제한 독성이다. 이러한 화학요법 유래의 부작용 중 대부분은 심한 경우 입원을 요하거나 통증을 치료하기 위해 진통제를 필요로 하기도 한다. 이와 같이 화학치료제 및 방사선 치료에 의한 부작용들은 암 환자의 임상적 처치 시 주요 문제가 되고 있다. 또한, 종래의 항암제들은 정상세포까지 죽이는 경우가 많았기 때문에, 최근에는 정상세포에는 작용하지 않고 암세포에만 작용할 수 있는 새로운 기전의 항암제에 대한 연구가 진행되고 있다.

[0004] 유방암은 미국에서는 여성암 중 1위, 우리나라에서는 3위를 차지하는 가장 보편적인 암으로 매년 약 2만 명의 여성들이 유방암에 걸리며, 환자 발생도 매년 증가 추세이다. 유방암의 치료는 조기 진단시 외과적 절제술로 치료가 가능하나 많은 환자에서 폐, 뼈, 간 등 원격적인 전이 형태로 재발된다. 보다 구체적으로 살펴보면, 국내의 경우 유방암의 발병 빈도는 1984년 여성 암 중 8.7%에 불과하였으나, 2000년 조사에서는 여성암의 15.1%로 나타나 15.6%의 위암 다음으로 많은 암이 되고 있다. 단지 숫자상으로 증가했다는 정도뿐만 아니라 그 증가 속도가 빠르기에 더욱 우려가 되는 실정이다. 불과 15년 사이에 그 발생률이 50%이상 증가하였으며, 멀지 않은 시기에 유방암이 여성 암 중 제일 많은 비중을 차지하는 암이 될 전망이다. 또한, 동양인은 서구인에 비해 대체적으로 유방암 발생빈도가 낮은 편이다. 2000년 통계를 보면, 한국인의 유방암 발생률이 23명/100,000명, 일본인이 20~30명/100,000인 것에 비해, 미국(백인) 111.8명/100,000명, 미국(흑인) 95.4명/100,000명의 수준이다. 서구인들은 나이가 많아짐에 따라 유방암 발생빈도가 증가하는 것에 반해 국내의 유방암은 40대에서 가장 많은 빈도이고 그 다음이 50대, 60대 그리고 30 대의 순이다.

[0005] 유방암의 발생 원인에는 여러 가지가 있겠지만 가장 중요하게 작용하는 것은 여성 호르몬이며, 이 외에도 유전적인 영향이 크다. 가족 중에 유방암이 있는 경우 유전자 검사를 통하여 일부 유전자의 변형이 있는 경우 그 발생률이 높은 것을 확인할 수 있다. 그 외에도 지방식이 많은 음식 등이 또 하나의 원인으로 인식되고 있다.

[0006] 한편, 파클리탁셀 (paclitaxel 또는 taxol)은 미국 서해안에 자생하는 주목나무 (Taxus brevifolia)의 껍질에서 추출해낸 물질로, 암의 화학치료에서 가장 중요한 약물중의 하나로 생각되는 물질이다. 파클리탁셀은 암세포의 DNA와 RNA의 합성에는 영향을 주지 않고 DNA 분자 자체에도 손상을 주지 않으면서 선택적으로 튜뷸린(tubulin)에 작용한다. 이로써 중합되었던 튜뷸린이 탈중합되었던 것을 막음으로써 암세포의 성장을 세포분열 중기에 멈추게 하여, 암세포를 죽이는 역할을 한다. 파크리탁셀은 최근 유방암의 화학치료제로 이용되었음에도 불구하고, 진행암 (advanced cancer)의 치료에는 약 저항성 (resistance) 때문에 이용되지 못하였다.

[0007] CKD712, (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린)은 가능성 있는 항-면역제로 연구되었다. 과거 연구를 통해, CKD712는 패혈증 (sepsis)와 같은 면역 장애의 치료에 이용될 수 있다고 밝혀졌으며, 염증성 사이토킨 (cytokine)에 의한 adhesion molecules을 억제하므로 동맥경화를 억제하는 작용이 있음이 밝혀졌다. 그러나 지금까지 CKD712가 항암활성을 갖는다는 사실은 밝혀진 바가 없다.

[0008] 이에 본 발명자들은 신규한 항암제를 개발하고자 노력한 결과, CKD712, (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린)가 파크리탁셀의 항암활성을 증진시키고, 이는 PTEN/PI3K/Akt 신호전달계를 통해 이루어진다는 것을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 국내출원번호 : 10-2009-0074870

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 ＣＫＤ７１２, (Ｓ-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 CKD712, (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 항암 활성 증강제을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 CKD712, (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 CKD712, (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 항암 활성 증강제을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 화합물은 PTEN 및 Akt 관련 신호전달체계를 조절함으로써 암세포의 성장 및 전이를 억제하며, 항암제의 활성을 증진시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물을 사용하면 적은 량의 항암제를 사용하여 항암제 독성을 줄이면서도 치료효과는 상승시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1 은 CKD712 및 파클리탁셀이 세포 생존에 미치는 효과를 확인한 그래프이다.

도 2는 CKD712의 농도 증가에 따른 MTT assay 결과이다.

도 3 및 도 4는 파클리탁셀 및 CKD712가 세포 전이에 미치는 영향을 확인한 그림이다.

도 5 및 도 6는 CKD712가 Akt 및 PTEN 단백질 활성에 미치는 영향을 확인한 그림이다.

도7은 파클리탁셀의 세포의 생존 및 전이에 억제 효과와 PTEN의 관계를 확인한 그림이다.

도8은 파클리탁셀 및 PTEN이 세포 생존에 미치는 효과를 확인한 그래프이다.

도 9 및 도 10은 파클리탁셀 및 PTEN이 세포 전이에 미치는 효과를 확인한 그래프이다.

도 11은 LY294002 (PI3K 저해제)가 MMP9의 발현에 미치는 영향을 확인한 그림이다.

도 12는 LY294002 (PI3K 저해제)가 파클리탁셀의 세포 생존 억제 효과에 미치는 영향을 확인한 그래프이다.

도 13및 도 14는 LY294002 (PI3K 저해제)가 파클리탁셀의 세포 전이 억제 효과에 미치는 영향을 확인한 그래프이다.

도 15는 CKD712가 파클리탁셀의 민감도에 미치는 영향이 PTEN 활성을 통한 것인지, 단백질 (MMP9, Akt, PTEN) 발현 정도를 비교하여 확인한 그림이다.

도 16는 siRNA를 이용하여 CKD712가 파클리탁셀의 민감도에 미치는 영향이 PTEN 활성을 통한 것인지, MTT assay를 통해 확인한 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명은 CKD712, (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 항암용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 유효성분은 CKD712, (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 이며, 상기 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물의 약학적으로 허용된 염 또는 이들의 프로드러그(prodrug)가 포함될 수 있다.

[0019] 상기 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물의 염은 약학적으로 사용되는 통상의 염을 의미하며, 염의 제조에 사용되는 각종 산으로는 염산, 브롬산, 황산, 메탄술폰산, 프로피온산, 숙신산, 글루타르산, 시트르산, 푸마르산, 말레산, 타르타르산, 글루탐산, 글루콘산, 글루쿠론산, 갈락투론산, 아스코르브산, 카본산, 인산, 질산, 아세트산, L-아스파르트산, 락트산, 바닐릭산 및 하이드로 아이오딕산 등이 있다.

[0020] 본 발명의 프로드러그란 화합물의 작용성 유도체들로서, 생체에 들어가서 약효를 나타내기 위하여 쉽게 변화될 수 있다. 적당한 프로드러그 유도체들의 선택 및 제법에 대한 통상적 과정은 기존의 문헌에 기술되어 있다.

[0021] 본 발명의 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등 경구 투여용 제형, 멸균 주사용액, 좌제 및 경피 투여용 제제로 제형화하여 사용될 수 있다. 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 필요에 따라 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용 하여 제형화한다.

[0022] 한 양태로서, 본 발명의 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물은 경구 투여용 고상 제제로 제형화할 수 있다. 경구 투여를 위한 고상 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되는데, 이러한 고상 제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.

[0023] 다른 양태로서, 본 발명의 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물을 함유한 약학적 조성물을 경구 투여용 액상 제제로 제형화할 수도 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 이러한 액상 제제에는 통상적으로 사용되는 불활성 희석제 (예를 들면, 정제수, 에탄올, 리퀴드 파라핀) 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0024] 또 다른 양태로서, 본 발명의 테트라하이드로이소퀴놀린 화합물을 함유한 약학적 조성물은 비경구, 바람직하게는 복강 내 투여를 위한 제제로 제형화 될 수도 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 멸균된 수용액으로는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 적절한 완충용액을 이용할 수 있으며, 비수성용제로, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸 올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 이용될 수 있다. 필요에 따라 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제를 이용할 수도 있다. 한편, 좌제의 경우에는 이의 통상적인 기제인 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0025] 상기와 같은 방법으로 제형화된 조성물은 유효량으로 경구 또는 비경구(경피, 피하, 정맥, 근육, 복강등)를 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 상기에서 "유효량"이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 연령, 성별, 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 바람직하게는 1㎍~100mg/체중kg/day, 보다 바람직하게는 10㎍~10mg/체중kg/day의 유효량으로 투여될 수 있다.

[0026] 본 발명의 조성물은 암의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0027] 또한 본 발명은 CKD712, (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 또는 이의 약학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 항암제의 활성 증진제를 제공한다.

[0028] 본 발명의 조성물이 적용될 수 있는 대상 암은 폐암, 췌장암, 비소세포성폐암, 간암, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 경부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 자궁경부암, 자궁암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 나팔관암종, 난소암, 직장암, 항문부근암, 위암, 유방암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 방광암, 신장암, 수뇨관암, 신장세포 암종 및 신장골반 암종 등을 포함하며, 바람직하게는 유방암이다.

[0029] 본 발명의 조성물과 함께 사용할 수 있는 항암제는 암의 증식 또는 전이를 억제하는 약제라면 특별히 제한되는 것은 아니며, 안쓰라사이크린계 항암 항생제 (독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신, 다루비신빈카 알칼로이드 등), 탁산계 항암제 (파클리탁셀, 도스탁셀 등), 콜히친, 에피포도필로톡신계 항암제 (에토포사이드, 테니포사이드인 등), 미토산트론, 액티노마이신 D 및 마이토마이신 C등이 포함될 수 있으며, 바람직하게는 파클리탁셀이다.

[0030] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0031] **실시예 1: 항-증식(anti-proliferative) 효과 증진 실험**

[0032] CKD712가 인간 유방암 세포 (MDA-MB-231)의 생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여 MTT assay를 수행하였다.

[0033] 실험 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, paclitaxel은 CKD712와 함께 처리하였을 때 농도 의존적으로 현저한 세포 생장을 억제하는 시너지 효과를 나타냈다. 또한, 도 2에 나타낸 바와 같이 CKD712를 단독으로 처리하였을 때 또는 Paclitaxel과 함께 처리한 후 세포 성장을 확인하였다. 그 결과 CKD712는 현저한 세포 생장 억제 효과를 보였으며, paclitaxel의 억제 효과를 증가시키는 작용을 보여주었다. 그러나 CKD712를 저농도로 처리하였을 때에는 이러한 증진 효과는 크지 않았다.

[0034] **실시예 2: 항-전이(anti-metastatic) 효과 증진 실험**

[0035] MDA-MB-231 세포를 이용하여 invasion assay를 수행하였다.

[0036] 실험 결과, 도 3 및 도4에 나타낸 바와 같이, Paclitaxel을 처리한 세포의 이동이 약화된 데 반해, 아무것도 처리하지 않은 세포 (con)는 metrigel을 통과한 것을 확인하였다. 또한 CKD712와 Paclitaxel을 함께 처리한 경우, Paclitaxel의 항-이동(migration) 효과가 증가되는 것을 확인하였다. CKD712를 단독으로 사용한 경우에도 대조군에 비해 세포의 이동이 저해되었다.

[0037] 또한, 지난 연구를 통해 세포의 성장 및 침투(invasion)에 PI3K/Akt 신호전달이 중요한 역할을 한다고 알려져 있어, CKD712가 이에 관여하는지를 확인하였다.

[0038] 도 5및 도6에 나타낸 바와 같이, CKD712는 Akt 를 dephosphorylation 시킴으로서 이의 활성을 억제하고, PTEN의 인산화를 조절하여 PTEN의 활성에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 또한, CKD712는 Pro-metastatic 단백질로 잘 알려져있는 MMP9 (matrix metalloproteinase-9)를 조절하였다. 특히 Paclitaxel을 단독으로 처리한 경우에는 p-Akt, p-PTEN, MMP9dml 활성에는 영향을 미치지 않았으며, CKD712와 병용처리하였을 경우에만 유의한 결과가 나타났다.

[0039] **실시예 3: PTEN/PI3K/Akt 신호전달에 미치는 영향 분석**

[0040] 실시예 2에서 CKD712가 MDA-MB231 유방암 세포에서 PTEN을 활성화시키는 것을 확인하였다. 따라서 이번에는 유방암세포에서 Paclitaxel의 항암 효과에 PTEN의 중요성을 설명하기 위하여 PTEN 과발현 벡터를 이용하여 실험을 수행하였다.

[0041] 도 7 및 도 8에 나타낸 바와 같이, 지난 연구 결과와 일치하게, PTEN의 과발현은 현저하게 MMP9 단백질의 발현을 감소시켰으며, 이의 활성인 세포 이동의 저해를 가져왔다. 또한, 도 9 및 도 10에 나타낸 바와 같이 PTEN과발현 벡터로 형질전환된 세포에서 현저하게 Paclitaxel의 효과 (PTEN, p-Akt, MMP9의 활성 및 세포 이동)가 증가하였다.

[0042] **실시예 4: PI3K/Akt 신호전달에 미치는 영향 분석**

[0043] 유방암세포에서 CKD712가 Paclitaxel의 약효를 증진시키는 효과가 PTEN/PI3K/Akt 의 활성에서 나온다는 것을 입증하기 위하여, LY294002를 처리하여 PI3K/Akt 신호전달의 저해를 수행하였다.

[0044] 도 9 내지 도 13에 나타낸 바와 같이 LY294002는 유방암세포에서 세포 성장 및 matrigel invasion 및 MMP9 단백질 발현을 억제하여 Paclitexel의 작용을 강화시킨다는 것을 확인하였다.

[0045] **실시예 5: PTEN 의 활성 분석**

[0046] CKD712가 PTEN의 활성을 조절하는 것을 재확인하기 위하여 SiRNA를 이용하여 실험을 수행하였다.

[0047] 도 14 내지 도16에 나타낸 바와 같이, Paclitaxel을 단독으로 처리하였을 때에는 PTEN, p-Akt, MMP9의 발현에 영향을 미치지 않았다. 그러나 세포를 siRNA와 함께 형질전환 시킨 경우, CKD712는 Paclitaxel의 존재에 상관없이 p-Akt 및 MMP9의 발현을 현저하게 감소시켰다. 그러나 siPTEN을 형질전환시킨 세포에서는 CKD712의 처리에 민감성을 나타내지 않았으며, 이를 통해 CKD712는 암세포의 성장, 침투, 및 MMP9의 발현조절 억제효과는 PTEN을 통해 매개 된다는 것을 알 수 있었다.

[0048] 이하 본 발명의 상기 조성물을 함유하는 약학적 조성물 및 건강기능식품의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0049] **제제예 1. 산제의 제조**

[0050] CKD712, (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 20 mg

[0051] 유당 100 mg

[0052] 탈크 10 mg

[0053] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0054] **제제예 2. 정제의 제조**

[0055] CKD712, (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 10 mg

[0056] 옥수수전분 100 mg

[0057] 유당 100 mg

[0058] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0059] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0060] **제제예 3. 캅셀제의 제조**

[0061] CKD712, (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 10 mg

[0062] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0063] 락토오스 14.8 mg

[0064] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0065] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0066] **제제예 4. 주사제의 제조**

[0067] CKD712, (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 10 mg

[0068] 만니톨 180 mg

[0069] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0070] $Na_2HPO_4 2H_2O$ 26 mg

[0071] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0072] **제제예 5. 액제의 제조**

[0073] CKD712, (S-1-(α-나프틸메틸)-6,7-디하이드록시-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린) 20 mg

[0074] 이성화당 10 g

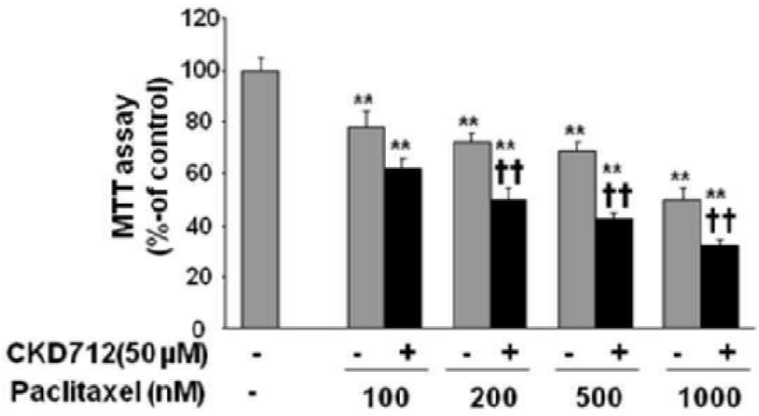
[0075] 만니톨 5 g

[0076] 정제수 적량

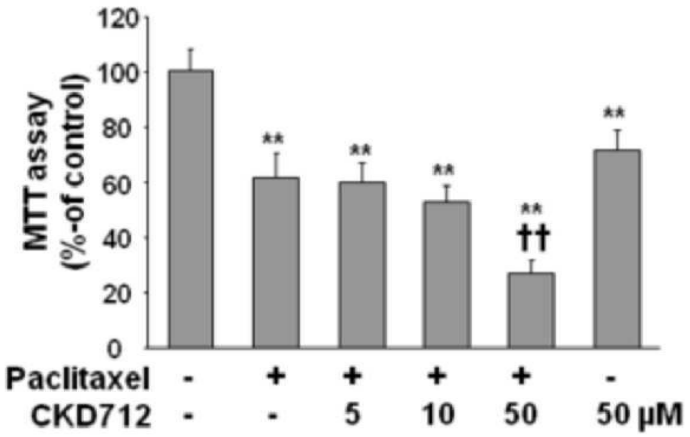
[0077] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

도면

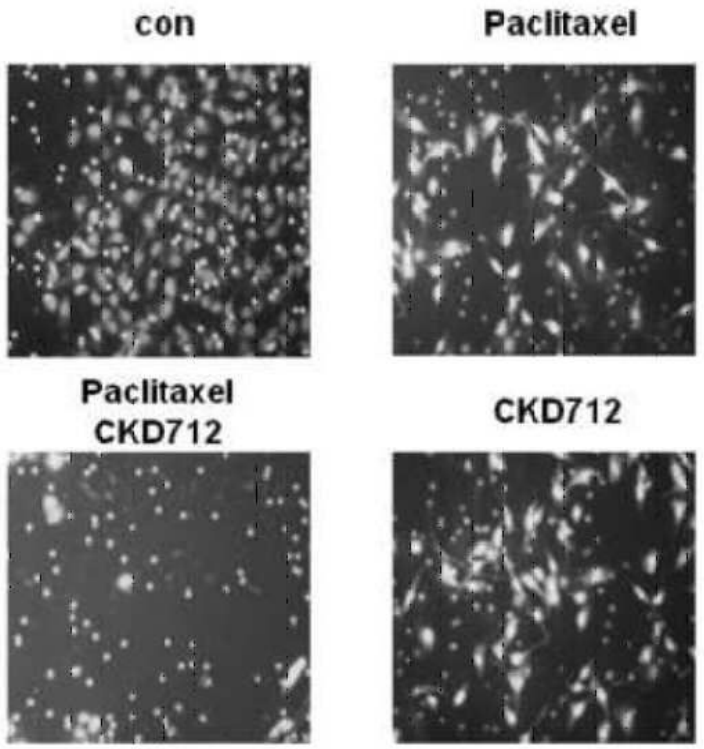
도면1



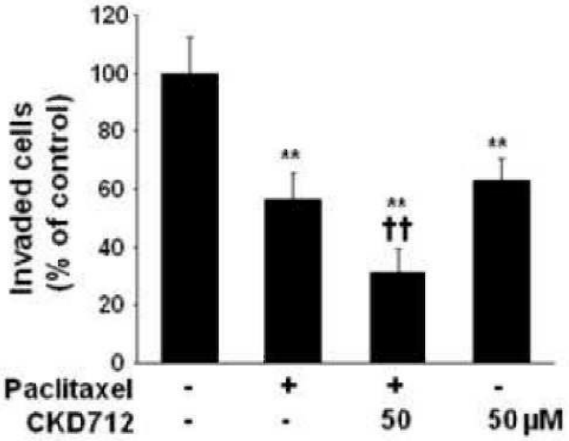
도면2


MTT assay
(%-of control)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
**
**
††
**
Paclitaxel - + + + + -
CKD712 - - 5 10 50 50 μM

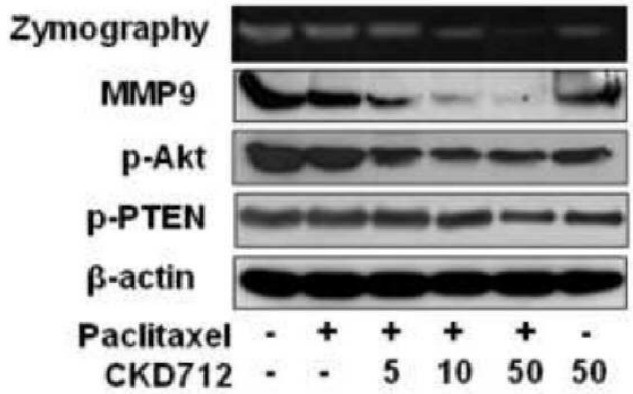
도면3


con
Paclitaxel
Paclitaxel
CKD712
CKD712

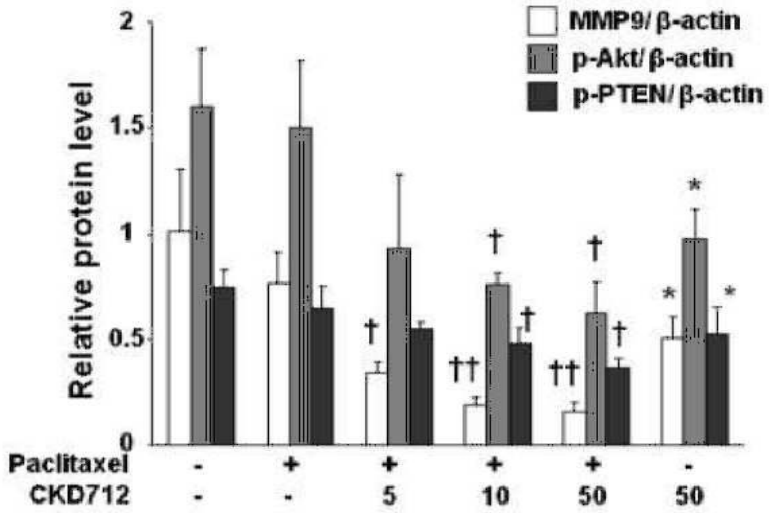
도면4


Invaded cells
(% of control)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
††
**
Paclitaxel - + + -
CKD712 - - 50 50 μM

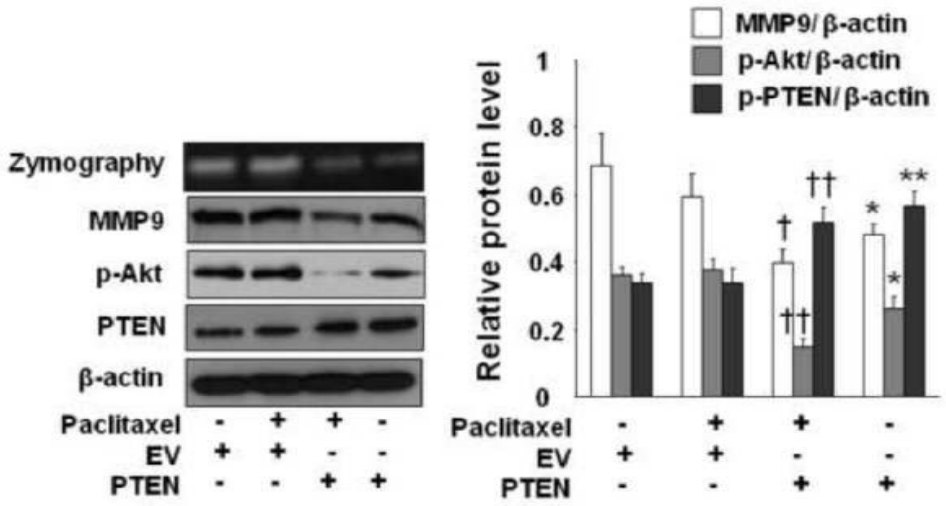
도면5


Zymography
MMP9
p-Akt
p-PTEN
β-actin
Paclitaxel - + + + + -
CKD712 - - 5 10 50 50

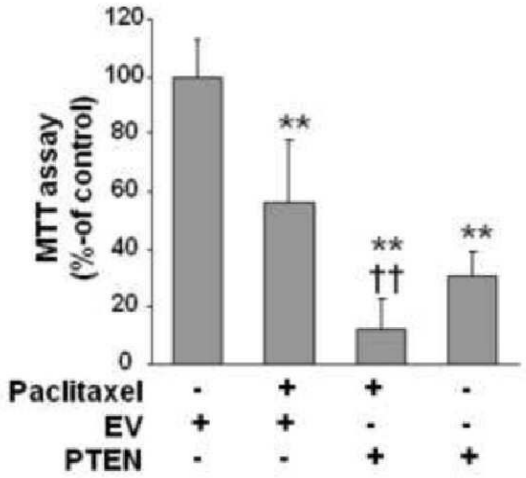
도면6


MMP9/β-actin
p-Akt/β-actin
p-PTEN/β-actin
Relative protein level
2
1.5
1
0.5
0
Paclitaxel - + + + + -
CKD712 - - 5 10 50 50

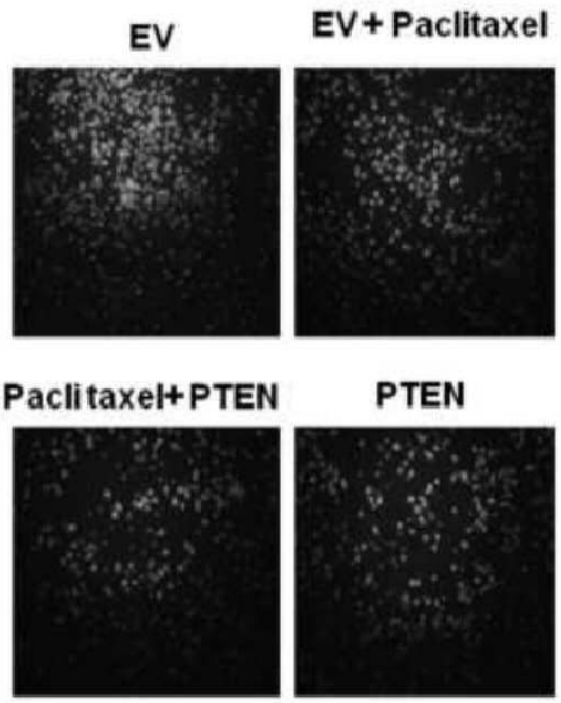
도면7


Zymography
MMP9
p-Akt
PTEN
β-actin
Paclitaxel - + + -
EV + + - -
PTEN - - + +
MMP9/β-actin
p-Akt/β-actin
p-PTEN/β-actin
Relative protein level
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Paclitaxel - + + -
EV + + - -
PTEN - - + +

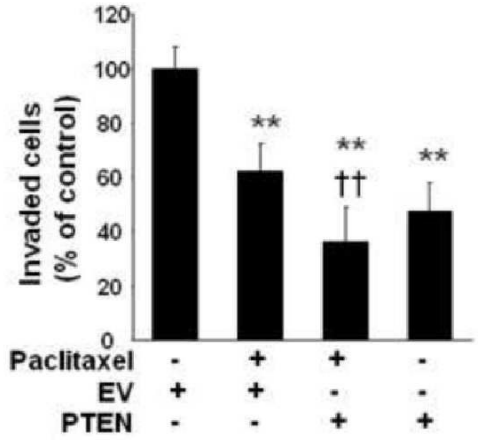
도면8


MTT assay (%-of control)
120
100
80
60
40
20
0
Paclitaxel - + + -
EV + + - -
PTEN - - + +

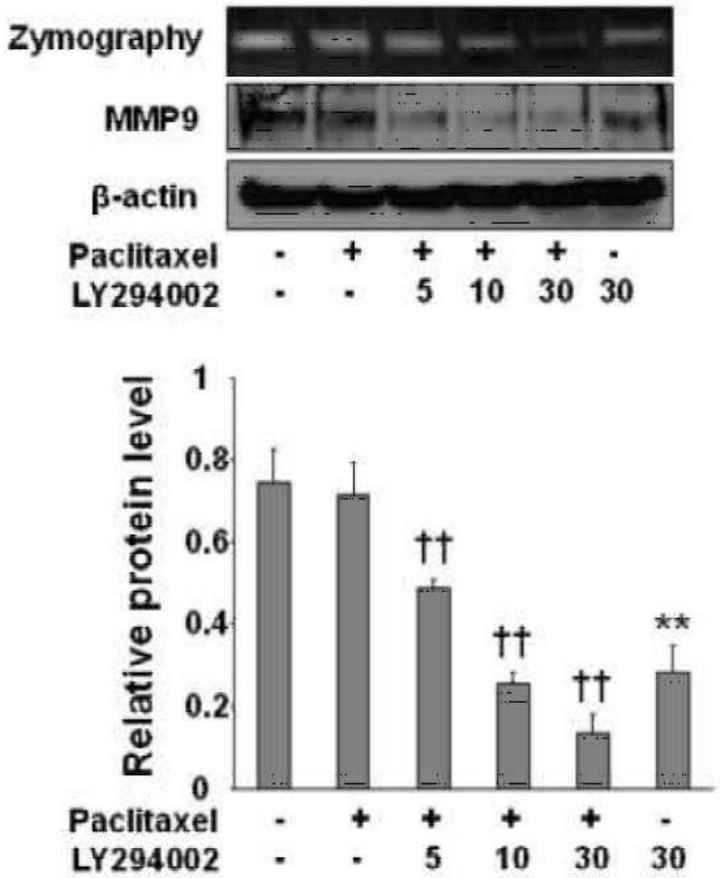
도면9


EV
EV+Paclitaxel
Paclitaxel+PTEN
PTEN

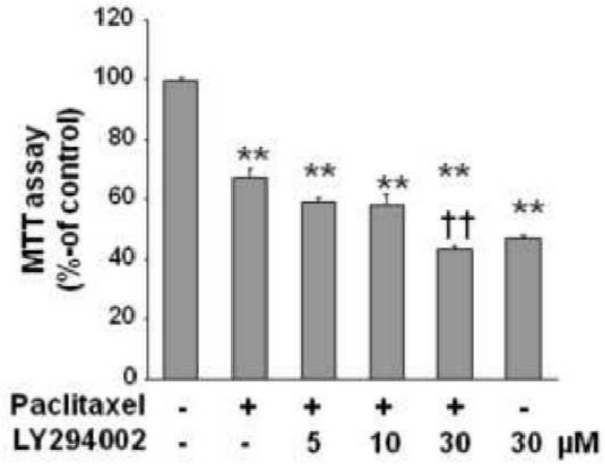
도면10


Invaded cells (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
††
**
Paclitaxel - + + -
EV + + - -
PTEN - - + +

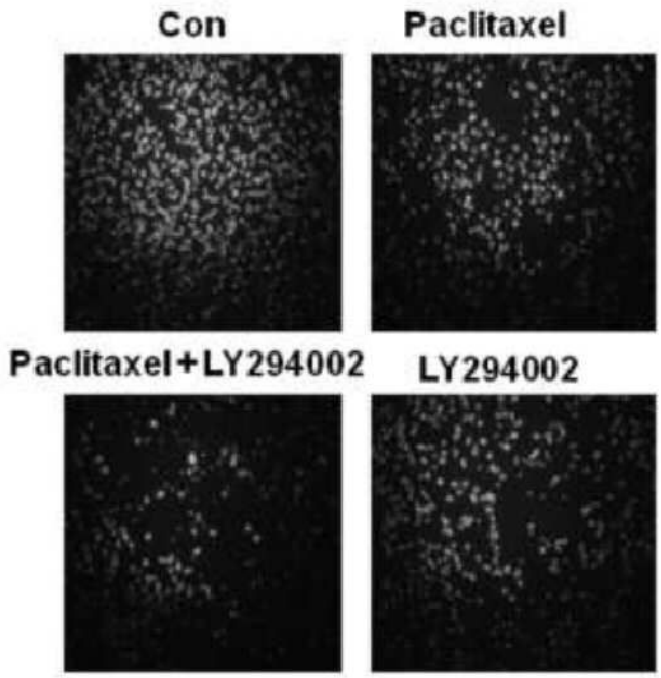
도면11


Zymography
MMP9
β-actin
Paclitaxel - + + + + -
LY294002 - - 5 10 30 30
Relative protein level
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
††
††
††
**
Paclitaxel - + + + + -
LY294002 - - 5 10 30 30

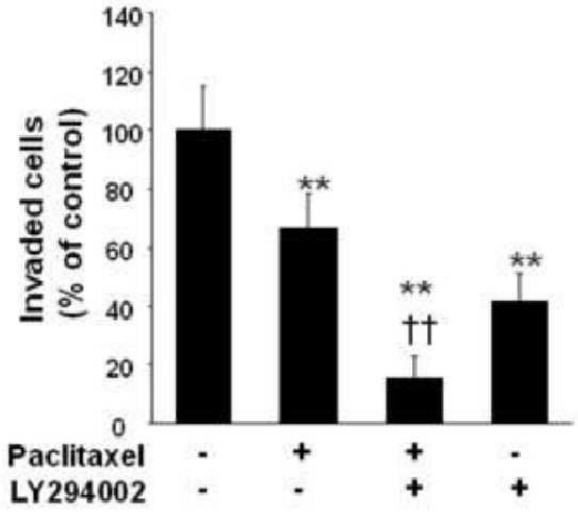
도면12


MTT assay (%-of control)
120
100
80
60
40
20
0
**
**
**
**
††
**
Paclitaxel - + + + + -
LY294002 - - 5 10 30 30 μM

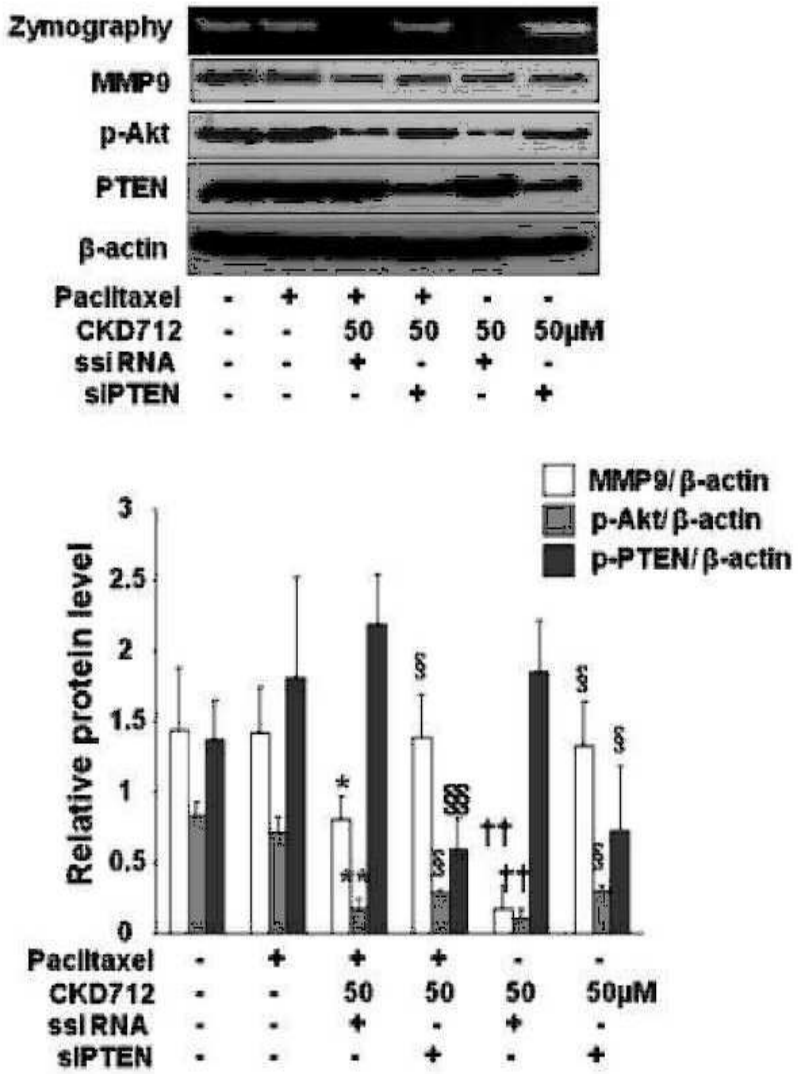
도면13


Con
Paclitaxel
Paclitaxel+LY294002
LY294002

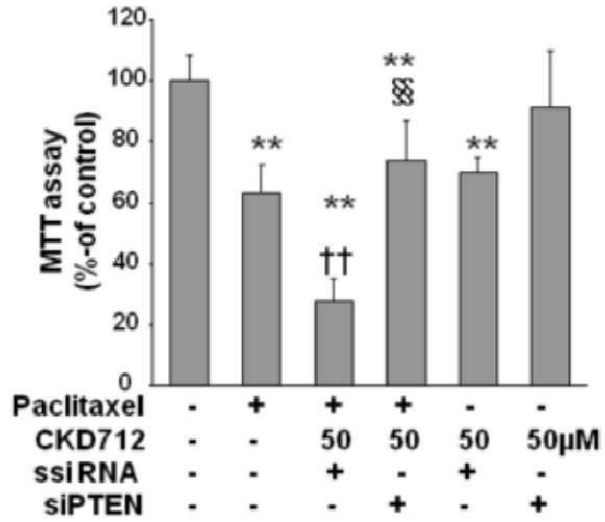
도면14


Invaded cells
(% of control)
140
120
100
80
60
40
20
0
**
**
††
**
Paclitaxel - + + -
LY294002 - - + +

도면15


Zymography
MMP9
p-Akt
PTEN
β-actin
Paclitaxel - + + + - -
CKD712 - - 50 50 50 50μM
ssiRNA - - + - + -
siPTEN - - - + - +
MMP9/β-actin
p-Akt/β-actin
p-PTEN/β-actin
Relative protein level
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Paclitaxel - + + + - -
CKD712 - - 50 50 50 50μM
ssiRNA - - + - + -
siPTEN - - - + - +

도면16


MTT assay (%-of control)
120
100
80
60
40
20
0
Paclitaxel - + + + - -
CKD712 - - 50 50 50 50μM
ssiRNA - - + - + -
siPTEN - - - + - +