(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0130261
(43) 공개일자 2023년09월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/519 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61K 31/167 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/519 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2022-0027188
(22) 출원일자 2022년03월03일
심사청구일자 2022년03월03일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
홍순선
서울특별시 서대문구 문화촌길 6-24, 102동 1601호(홍제동, 문화촌현대아파트)
한범석
인천광역시 미추홀구 용정공원로83번길 49, 1333호(용현동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

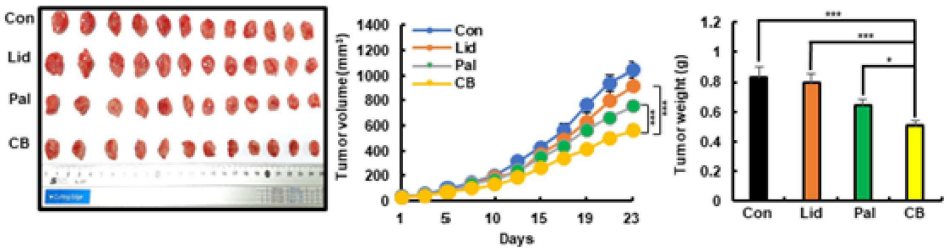
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **암의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 유방암의 치료 효과가 우수한 신규 항암 치료제에 관해 연구하던 중, 팔보시클립 및 리도카인의 병용 투여를 개발하였고, 약물을 투여하여 유방암 치료 효과를 극대화하고자 하였다. 팔보시클립 및 리도카인의 병용 투여는 PI3K/AKT 신호 전달 단백질과의 상호작용을 억제함으로서 암 세포의 생존, 증식 및 전이를 억제하였고 세포 사멸 효과 또한 유의적으로 증가시킴을 확인하였으며, 유방암을 비롯한 암 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61K 31/167 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/308 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자
정경희
경기도 부천시 경인로484번길 68-7, 102동 1105호
(괴안동, 신일해피트리아파트)

김현주
인천광역시 중구 인항로 27(신흥동3가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711140029
과제번호 2021R1A2B5B03086410
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 췌장암 암화 과정에서 림프 전이 유발 신경주위 침윤 타겟 인자 발굴 및 치료제 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 인하대학교
연구기간 2021.09.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711137725
과제번호 2021R1A5A2031612
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 세포교신 제어 연구센터
기 여 율 20/100
과제수행기관명 인하대학교
연구기간 2021.06.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711126551
과제번호 2019M3E5D1A02069621
부처명 다부처
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 혁신형의사과학자공동연구(R&D)(과기정통부,복지부)
연구과제명 혈관기능 제어기반 질환 치료기술 개발
기 여 율 20/100
과제수행기관명 인하대학교의과대학부속병원
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711146879
과제번호 2020R1C1C1006816
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 Lidocaine을 포함한 마취약제 동시 투여의 영향에 대한 세포, 동물 및 임상연구
기 여 율 30/100
과제수행기관명 인하대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

팔보시클립 (palbociclib) 및 리도카인 (lidocaine)을 유효성분으로 포함하는 유방암 (breast cancer)의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 유방암은 삼중 음성 유방암 (TNBC)인 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 약학 조성물은 유방암세포의 증식 및 전이에 관여하는 PI3K/AKT 신호 전달 단백질의 신호전달 경로를 저해시켜 암세포의 증식 및 전이를 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 약학 조성물은 미트콘드리아 연관 세포의 사멸 (apoptosis)을 유발시켜 암세포의 증식 및 전이를 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학 조성물.

청구항 5

팔보시클립 (palbociclib) 및 리도카인 (lidocaine)을 유효성분으로 포함하는 유방암 (breast cancer)의 예방 또는 개선용 건강보조식품 조성물.

청구항 6

팔보시클립 (palbociclib) 및 리도카인 (lidocaine)을 유효성분으로 포함하는 유방암세포의 증식 및 전이에 관여하는 PI3K/AKT 신호 전달 단백질의 신호전달 경로 저해용 시약 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 암의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 자세히는 CDK4/6 억제제인 팔보시클립 및 국소마취제인 리도카인을 포함하는 유방암 치료 및 예방용 조성물을 제공한다.

배 경 기 술

[0002] 현재 전 세계적으로 매년 230만 건의 새로운 유방암 사례가 발생하고 있으며, 오늘날 여성들 사이에서 가장 흔하게 진단되는 암으로 유방암 발병률이 계속 증가하고 있다. 유방암은 초기 단계 질환 환자의 70 내지 80 %에서 완치가 가능하지만, 심각한 장기 전이가 있는 진행성 유방암은 최근 치료법으로 치료가 불가능한 것으로 간주된다. 특히, 유방암 중 삼중 음성 유방암 (TNBC) 은 에스트로겐 수용체 (ER), 프로게스테론 수용체 (PR), 인간 표피 성장 인자 수용체-2 (HER2)의 발현이 없는 공격적인 유형이다. 비 삼중 음성 유방암 (TNBC) 사례에 비해 유방암 사례의 10 내지 15 %를 차지하는 이질성 질환으로 치료 후 5년 이내에 낮은 예후와 높은 재발률을 보인다.

[0003] 최근에 유방암에 대한 치료 패러다임에는 종양의 외과적 절제술이 포함되며, 종종 방사선과 화학 요법을 사용한다. 많은 삼중 음성 유방암 (TNBC) 환자들이 수술 전에 화학 요법으로 치료를 받고 있다. 삼중 음성 유방암 (TNBC)과 같은 진행성 전이가 있는 유방암은 수술할 수 없는 경우가 많기 때문에 보조 화학 요법을 통해 수술 가능한 종양으로 전환할 수 있으며 치료에 대한 반응을 직접적이고 조기에 관찰할 수 있어 치료 계획을 효과적으로 수립할 수 있다. 현재 신 보조화학 요법으로써 삼중 음성 유방암 (TNBC)에 대한 임상 표적 약물에는 폴리 (ADP)-리보스 중합 효소 억제제 (PARPi), 포스파티딜 이노시톨 -3 키나제 억제제 (PI3Ki), 사이클린 D-의존성 키나제 4/6 억제제 (CDK 4 / 6i) 등이 있는데 최근 들어 CDK 4/6 억제제인 팔보시클립이 TNBC 의 환자들에게 신

보조화학요법으로써 널리 사용되고 있다.

[0004] 신보조화학요법으로 치료하는 암 환자의 경우, 수술 중 사용하는 마취제의 선택이 환자의 재발 및 결과의 예후에 미치는 영향이 매우 크다. 일반적으로 다양한 마취제가 혼합되어 수술 중에 사용되는데 대표적인 전신 마취제로써 세보플루란및 프로포폴을 사용하고, 추가로 오피오이드를 혼합하여 환자의 통증을 완화하고 마취 효과를 높힌다. 그러나 프로포폴과 오피오이드는 2011년 항정신병 약물로 지정되어 수술 중 암 환자에게 지속적으로 사용할 경우 정신 질환 및 중독 증상을 유발할 수 있으며, 심한 경우 유전 변이에 문제가 발생할 수 있다. 게다가, 다양한 선행 연구에서 마취제는 암 전이 및 재발을 유발하는 요인으로 작용 하기 때문에 마취제의 사용량을 줄이고 암환자에 맞는 마취제를 선택을 하는 것이 새로운 치료 전략이 될 수 있다고 보여진다.

[0005] 국소 마취제인 리도카인은 수술 중 가장 널리 사용되는 마취제 중 하나로, 수술 후 통증을 효과적으로 약화시키고 마약성 진통제 부작용을 줄일 수 있다. 많은 연구에서 리도카인은 다양한 암에서 증식을 억제하고 세포 사멸을 유도한다고 보고되어 있다. 특히, 리도카인은 항암제인 미토마이신 (mitomycin) C, 5-플루오로우라실 (5-fluorouracil), 시스플라틴 (cisplatin)과 같은 화학 항암제의 효능을 증가시킨다고 알려져 있다.

[0006] 따라서, 기존의 약물만을 투여하는 것보다 삼중 음성 유방암 (TNBC) 치료 효과를 극대화하고자 하였고, CDK4/6 억제제 및 국소마취제 간의 병용투여를 통한 시너지 효과에 대해서 계속 연구가 되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2020-0031622호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 팔보시클립 (palbociclib) 및 리도카인 (lidocaine)을 유효성분으로 포함하는 유방암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 팔보시클립 (palbociclib) 및 리도카인 (lidocaine)을 유효성분으로 포함하는 유방암의 예방 또는 개선용 건강보조식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 팔보시클립 (palbociclib) 및 리도카인 (lidocaine)을 유효성분으로 포함하는 유방암 세포의 증식 및 전이에 관여하는 PI3K/AKT 신호 전달 단백질의 신호전달 경로 저해용 시약 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 팔보시클립 (palbociclib) 및 리도카인 (lidocaine)을 유효성분으로 포함하는 유방암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 팔보시클립 (palbociclib) 및 리도카인 (lidocaine)을 유효성분으로 포함하는 유방암의 예방 또는 개선용 건강보조식품 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 팔보시클립 (palbociclib) 및 리도카인 (lidocaine)을 유효성분으로 포함하는 유방암세포의 증식 및 전이에 관여하는 PI3K/AKT 신호 전달 단백질의 신호전달 경로 저해용 시약 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 팔보시클립 및 리도카인을 포함하는 유방암 치료 또는 예방용 약학조성물에 관한 것으로, 이러한 병용투여는 PI3K/AKT 신호전달 경로를 차단함으로써, 암세포의 증식 및 전이를 억제하는 효과가 우수하므로, 유방암을 비롯한 암 질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 팔보시클립 및 리도카인을 병용처리한 유방암 세포의 세포독성을 측정한 결과를 나타낸다.

도 2는 팔보시클립 및 리도카인을 병용처리한 유방암 세포에서 세포사멸과 미트콘드리아 연관 세포사멸 유발 여부를 확인한 결과를 나타낸다.

도 3은 팔보시클립 및 리도카인을 병용처리한 유방암 세포에서 신호전달경로 단백질의 발현 저해 효과 확인한 결과를 나타낸다.

도 4는 팔보시클립 및 리도카인을 병용처리한 유방암 세포에서 세포 이동 및 침습 능력의 저해 효과 확인한 결과를 나타낸다.

도 5는 팔보시클립 및 리도카인을 병용처리한 유방암 세포를 이용한 동물실험을 통해 얻어진 종양의 사진과 무게를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

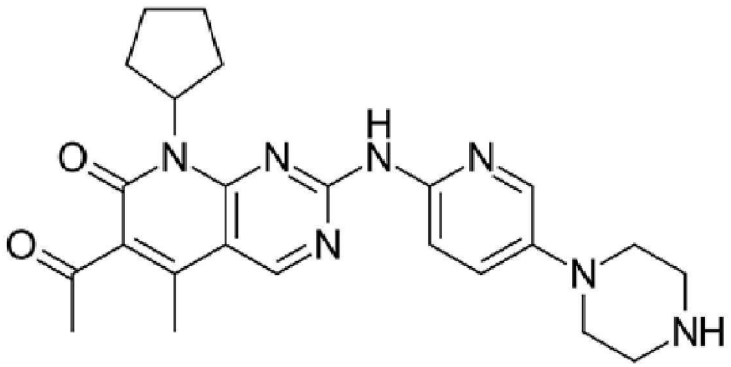
[0016] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0017] 신보조화학요법으로 치료하는 암 환자의 경우, 수술 중 사용하는 마취제의 선택이 환자의 재발 및 결과의 예후에 미치는 영향이 매우 큰 바, 기존 유방암 치료제인 PI3K/AKT 신호전달 단백질과의 상호작용을 억제함으로서 암세포의 생존, 증식 및 전이를 억제하고, 세포사멸 효과 또한 유의적으로 증가시킨 본 발명을 완성하였다.

[0019] 본 발명은 팔보시클립 (palbociclib) 및 리도카인 (lidocaine)을 유효성분으로 포함하는 유방암 (breast cancer)의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하며, 상기 유방암은 삼중 음성 유방암 (TNBC)일 수 있다.

[0020] 본 발명의 유효성분인 팔보시클립 (palbociclib)은 입랜스 (Ibrance)로 불리는 CDK4/6의 인산화효소 억제제로서 하기 화학식 1로 표시되며, 6-아세틸-8-시클로펜틸-5-메틸-2-[5-(피페라진-1-일)피리딘-2-일]아미노피리도[2,3-d]피리미딘7(8H)-온 ($C_{24}H_{29}N_7O_2$)은 시클린-의존성 키나제 (CDK) 4 및 6의 FDA-승인된 억제제이다.

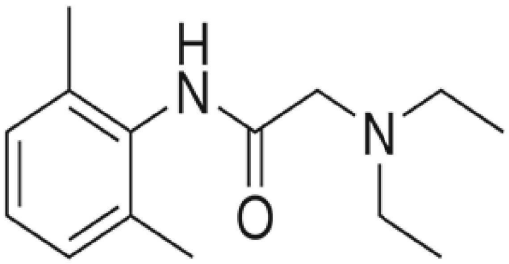
[0021] [화학식 1]



[0022]

[0023] 본 발명의 또 다른 유효성분인 리도카인 (lidocaine)은 국소마취제로서 하기 화학식 2로 표시되며, 2-(다이에틸아미노)-*N*-(2,6-다이메틸페닐)아세트아마이드 ($C_{14}H_{22}N_2O$)이다.

[0024] [화학식 2]



[0025]

[0026] 본 발명에서 용어, “예방”은 본 발명의 팔보시클립 및 리도카인을 포함하는 조성물을 이용하여 유방암 증상을 차단하거나, 유방암 증상의 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[0027] 본 발명에서는 용어, “치료”는 본 발명의 팔보시클립 및 리도카인을 포함하는 조성물을 이용하여 유방암 증상이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 말한다.

[0028] 상기 약학 조성물은 유방암세포의 증식 및 전이에 관여하는 PI3K/AKT 신호 전달 단백질의 신호전달 경로를 저해시켜 암세포의 증식 및 전이를 억제할 수 있다.

[0029] 상기 약학 조성물은 미트콘드리아 연관 세포의 사멸 (apoptosis)을 유발시켜 암세포의 증식 및 전이를 억제할 수 있다.

[0030] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0031] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0032] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0033] 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 투여량이 0.01 mg/kg 내지 200 mg/kg, 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0035] 또한, 본 발명은 팔보시클립 (palbociclib) 및 리도카인 (lidocaine)을 유효성분으로 포함하는 유방암 (breast cancer)의 예방 또는 개선용 건강보조식품 조성물을 제공한다.

[0036] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0037] 그밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0038] 또한, 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0039] 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[0040] 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 유효성분은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량부에 1 중량부 내지 90 중량부 포함되도록 첨가될 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 팔보시클립 (palbociclib) 및 리도카인 (lidocaine)을 유효성분으로 포함하는 유방암세포의 증식 및 전이에 관여하는 PI3K/AKT 신호 전달 단백질의 신호전달 경로 저해용 시약 조성물을 제공한다.

[0044] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 등은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 등에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예 등은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0046] **[준비예] 유방암 세포주의 준비**

[0047] 유방암 세포주인 MDA-MB 231 및 MDA-MB 453를 American Type Culture Collection (ATCC Manassas, VA)에서 구매하여 10 % Fetal Bovine Ser μM (FBS)와 1 % 항생물질 (Antibiotics)이 포함된 DMEM와 RPMI배지에서 5 % 이산화탄소와 37 ℃에서 습도가 유지되는 인큐베이터에서 배양했다.

[0049] **[실험예 1] 팔보시클립 및 리도카인을 병용처리한 유방암 세포의 MTT 실험을 통해 세포 성장 저해 활성 측정**

[0050] 팔보시클립 및 리도카인 병용처리에 의한 유방암 세포 생존율을 알아보기 위하여, 두 가지 유방암 세포주인 MDA-MB 231 및 MDA-MB 453에 대한 세포 생존율 평가를 수행하였다. 유방암 세포 생존율을 알아보기 위하여, 팔보시클립 및 리도카인을 처리한 유방암 세포들에 대한 세포 생존율을 종래 공지된 MTT 실험법으로 측정하였다.

[0051] 구체적으로는, 상기 준비예에서 준비된 두 가지 유방암 세포주인 MDA-MB 231 및 MDA-MB 453에 팔보시클립을 먼저 0.05, 0.1 및 0.5 μM 농도로 48시간 처리한 후, 48시간 뒤에 리도카인을 1 내지 3 mM 으로 48시간 처리하였다. 이후, 각 반응 배양물에 대한 MTT 실험법을 수행하였다. 팔보시클립 및 리도카인의 병용처리에 따른 유방암 세포 생존율 평가 결과를 비교하기 위하여, MTT 실험법을 통해 산출된 측정값의 수치를 분석하였다.

[0052] 그 결과, 도 1에 따를 때, 팔보시클립 및 리도카인을 병용처리한 실험군은 두 가지 유방암 세포주인 MDA-MB 231 및 MDA-MB 453의 세포 생존율을 모두 유의적으로 저해시키는 것을 확인했다.

[0054] **[실험예 2] 팔보시클립 및 리도카인을 병용처리한 유방암 세포에서 세포사멸과 미트콘드리아 연관 세포사멸 유발 여부를 확인한 결과**

[0055] 팔보시클립 및 리도카인의 병용처리가 미트콘드리아의 막전위에 영향을 확인하기 위해 유방암 세포주인 MDA-MB 231 및 MDA-MB 453에 팔보시클립 및 리도카인을 각각 48 시간 동안 병용처리한 후, JC-1 형광염색을 수행하였다. 단독 처리군 및 처리하지 않은 대조군을 동일한 방법으로 실험하였다. JC-1은 미트콘드리아 내에서 살아있는 세포에서는 빨간색 파장을 내고 세포질 안에 신호전달을 통해서 세포사멸으로 진행하는 세포에서는 초록색 파장을 내며 축적된다.

[0056] 추가적으로, 팔보시클립 및 리도카인의 병용처리가 아폽토시스 유발 여부를 확인하기 위해서 TUNEL을 수행하여 확인하였다. 먼저 팔보시클립 및 리도카인의 병용처리가 MDA-MB 231 및 MDA-MB 453에 96 시간 동안 병용처리한 후, TUNEL을 확인 하였다.

[0057] 그 결과, 도 2에 따를 때, 팔보시클립 및 리도카인을 병용처리한 실험군에서 빨간색 파장이 줄어들고 초록색 파장이 증가된 것을 두가지 유방암 세포주에서 관찰하였고, 단독 처리한 실험군에 비해 팔보시클립 및 리도카인을 병용처리 한 실험군에서 높은 수준의 TUNEL 양성 세포가 증가하는 것을 확인하여, 팔보시클립 및 리도카인의 병용처리가 미트콘드리아 신호전달 경로를 조절함으로써 세포사멸을 유도함을 알 수 있었다.

[0059] **[실험예 3] 팔보시클립 및 리도카인을 병용처리한 유방암 세포에서 신호전달경로 단백질의 발현 저해 효과**

[0060] 팔보시클립 및 리도카인의 병용처리에 의한 PI3K/AKT 신호전달경로 차단 효과를 알아보기 위하여, 신호전달경로의 단백질, 즉 phospho-AKT 및 GSK3β에 대한 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0061] 그 결과, 도 3에 따를 때, 팔보시클립 및 리도카인의 병용처리는 단독 그룹에 비교하여 phospho-AKT 및 GSK3β 단백질 수치를 현저히 감소시켰음을 확인하여, 유방암세포의 증식 및 전이에 관여하는 PI3K/AKT 신호전달경로를 차단함으로, 암을 예방 또는 치료하는 효과를 확인할 수 있었다.

[0063] **[실험예 4] 팔보시클립 및 리도카인을 병용처리한 유방암 세포에서 세포 이동, 침투 능력의 저해 효과**

[0064] 팔보시클립 및 리도카인의 병용처리에 의한 세포이동, 침투 능력을 알아보기 위하여, 마이그레이션 분석(Migration assay) 및 인베이젼 분석 (Invasion assay)을 수행하였다.

[0065] 구체적으로는, 상기 준비예의 유방암 세포주인 MDA-MB 231에 팔보시클립 및 리도카인을 96 시간 동안 병용처리한 후, 마이그레이션 및 인베이젼 분석법을 수행하였다.

[0066] 그 결과, 도 4에 따를 때, 팔보시클립 및 리도카인의 병용처리한 실험군은 세포 이동 및 침투 능력이 현저히 저해되는 것을 확인하여, 이러한 병용처리가 유방암 세포의 전이를 억제함을 알 수 있었다.

[0068] **[실험예 5] 팔보시클립과 리도카인을 병용처리에 의한 유방암 성장 억제 효과**

[0069] 팔보시클립 및 리도카인을 병용처리에 의한 종양 억제 효과가 생체 내에서도 유효한지 확인하기 위하여, 동물실험을 하기와 같이 수행하였다.

[0070] 구체적으로는, 팔보시클립 및 리도카인을 병용처리 하였을 때, 종양 성장 억제 효과를 *in vivo* 에서 종양 크기를 확인하였다. 유방암 세포주 4T1를 5주령 암컷 BALB/c 마우스에 1×10^4 세포수로 50 μL의 PBS에 섞어 접종하였다. 종양의 크기가 30 내지 50 mm^3 이상 되었을 때 4개의 실험군에 10 마리씩 분류하여 팔보시클립 (100 mg/kg), 리도카인 (50 mg/kg)을 매일 23일 동안 팔보시클립을 경구투여로 진행하였고, 리도카인은 복강 내 주사하였다. 그리고 마지막 날에 희생시켜 종양의 크기 및 무게를 측정하였다.

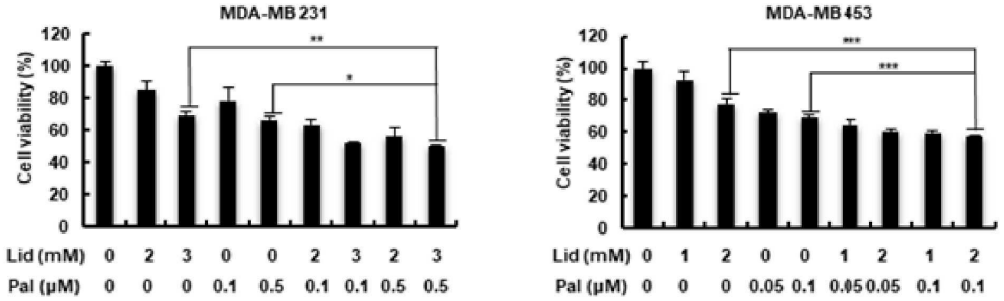
[0071] 그 결과, 도 5에 따를 때, 동물 실험을 통해 팔보시클립 및 리도카인의 병용 처리가 종양의 성장 및 무게 단독 그룹에 비해 효과적으로 감소하는 것을 확인하여, 동물모델에서도 효과적으로 종양의 성장을 억제시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0073] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

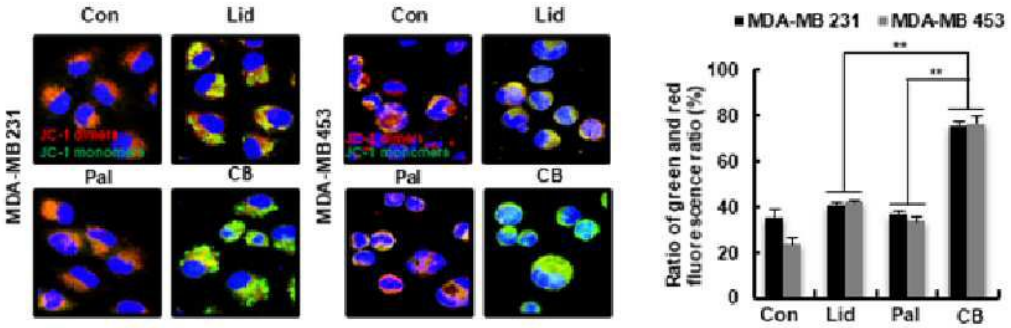
[0074] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

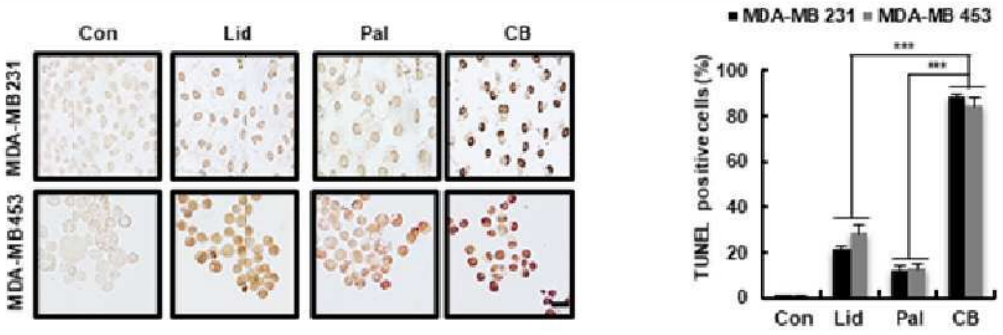
도면

도면1

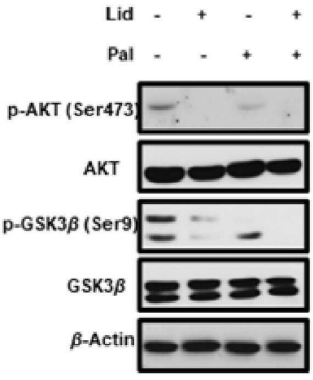


도면2

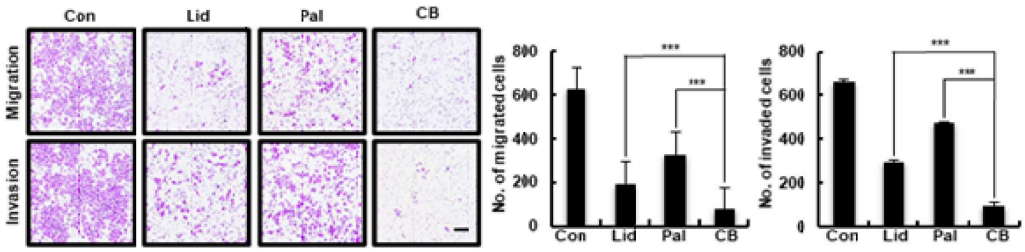




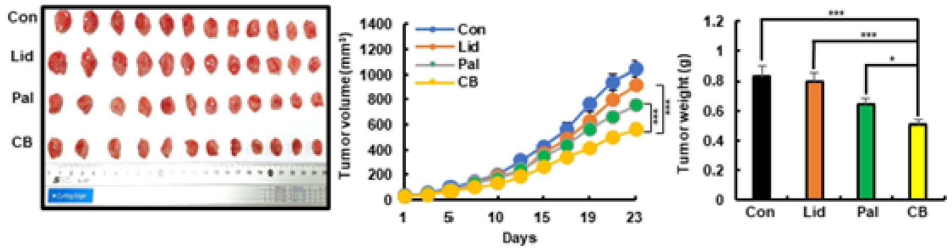
도면3



도면4


Con
Lid
Pal
CB
Migration
Invasion
No. of migrated cells
No. of invaded cells
800
600
400
200
0
***
***
Con
Lid
Pal
CB

도면5


Con
Lid
Pal
CB
Tumor volume(mm³)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
1
5
10
15
19
23
Days
Tumor weight (g)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
***
*