



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0143038
(43) 공개일자 2021년11월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/047 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/047 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0059948
(22) 출원일자 2020년05월19일
심사청구일자 2020년05월19일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
송권화
충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동
803호
김재진
서울특별시 성동구 뚝섬로 51, 104동 902호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 5 항

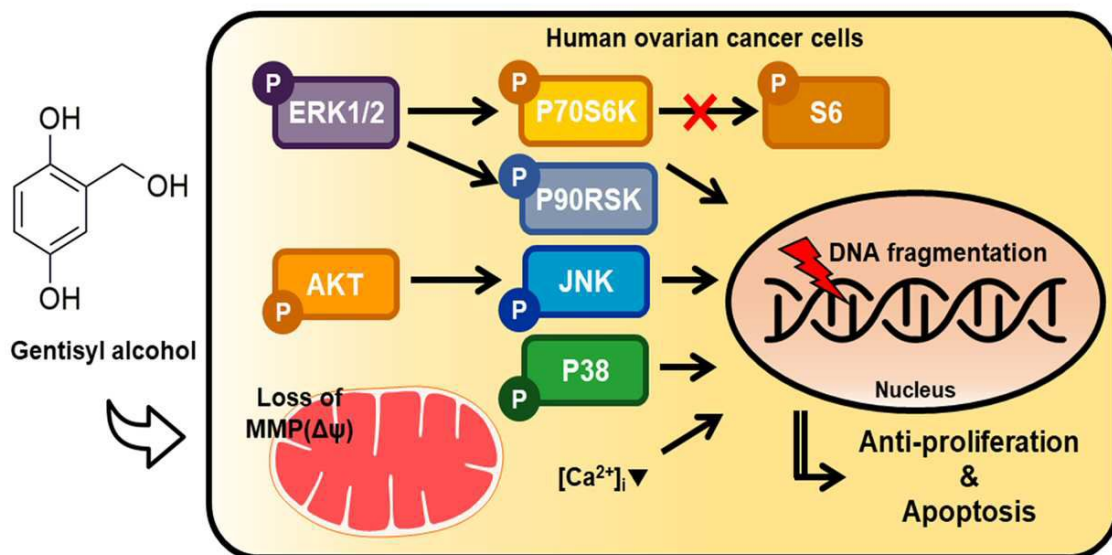
(54) 발명의 명칭 젠티실 알코올을 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 젠티실 알코올(gentisyl alcohol)을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 젠티실 알코올을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 젠티실 알코올을 유효성분으로 포함하는 조성물은 상피성 난소암 세포 내 증식 및 이주성을 억제하고 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 상피성 난소암을 예방 및 치료할 수 있는 의약학 관련 분야에 서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자

이동호

서울특별시 강남구 삼성로 212, 23동 1402호

함지연

서울특별시 성북구 고려대로 38-1, 402호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711049757
과제번호	2017R1A2B4002071
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(미래부)
연구과제명	해양 진균류 <i>Arthrinium</i> 속 유래 신규 기능성 물질 개발을 위한 Multi-OMICs 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2017.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

젠티실 알코올을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 젠티실 알코올이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

젠티실 알코올을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 상피성 난소암 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법.

청구항 5

젠티실 알코올을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 상피성 난소암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 젠티실 알코올(gentisyl alcohol)을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 젠티실 알코올을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 난소암은 초기 증상 및 조기 진단을 위한 효과적인 바이오마커의 부재로 대다수의 난소암 환자들이 병기(stage) III 또는 IV에 진단되며 낮은 5년 생존율을 나타내며, 2016년 통계학적 분석을 통해 미국 내 사망률 5위에 이르는 치명적인 암으로 분류되었다(Siegel RL *et al.*, CA Cancer J Clin, 65:5-29 2016; and Jayson GC *et al.*, Lancet, 384:1376-88, 2014).

[0003] 대다수의 난소암은 난소 상피세포로부터 유전적 변이 발생에 따라 악성 종양으로 발생되어 상피성 난소암으로 명명된다. 상피성 난소암은 조직병리학적 분석을 통해 장액성 난소암(serous carcinoma), 점액성 난소암(mucinous carcinoma), 자궁내막양 난소암(endometrioid carcinoma), 투명세포암(clear cell carcinoma)으로 분류된다 (Kaku T *et al.*, Med Electron Microsc, 36:9-17, 2003).

[0004] 일반적인 상피성 난소암의 치료 방법은 종양감축술(cytoreductive surgery) 이후 항암화학요법 또는 방사선치료를 실시하는 것이다. 하지만, 고등급 장액성 난소암과 투명세포암은 백금계, 타산계 항암제를 동시에 사용하는 표준 항암화학요법에 저항성을 나타내며 나쁜 예후를 나타낸다 (Tan DS and Kaye S, J Clin Pathol, 60:355-60, 2007; Vaughan S *et al.*, Nat Rev Cancer, 11(10):719-25, 2011). 그러므로 상피성 난소암 신호전달과정 내 세포사멸기전을 방해함에 따라 나타나는 항암제 내성을 극복하기 위해 상피성 난소암 예방법 및 새로운 치료제 개발이 요구된다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 천연물 유래 물질을 이용한 새로운 상피성 난소암 치료제를 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 상피성 난소암 세포주 ES2 및 OV90 세포를 이용하여 젠티실 알코올에 의한 세포 증식 억제 및 세포 사멸 유도 효과를 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 젠티실 알코올을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명은 또한, 젠티실 알코올을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 상피성 난소암 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 또한, 젠티실 알코올을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 상피성 난소암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 젠티실 알코올을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, 젠티실 알코올을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 상피성 난소암 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명은 또한, 젠티실 알코올을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 상피성 난소암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 젠티실 알코올을 유효성분으로 포함하는 조성물은 상피성 난소암 세포 내 증식 및 이주성을 억제하고 세포 사멸 효과를 향상시키는 효과가 있는바, 상피성 난소암을 예방 및 치료할 수 있는 의약학 관련 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 젠티실 알코올의 난소암 세포주 (ES2, OV90) 증식 억제 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 젠티실 알코올의 난소암 세포주 내 세포사멸 유도 및 세포주기 정지 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 젠티실 알코올의 상피성 난소암 세포주에 대한 미토콘드리아 기능 저해 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 상피성 난소암 세포주 내 젠티실 알코올의 용량의존적 처리에 따른 MAPK 신호전달 물질의 인산화 양상 변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 상피성 난소암 세포주 내 젠티실 알코올의 용량의존적 처리에 따른 PI3K/AKT 신호전달 물질의 인산화 양상 변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 젠티실 알코올과 신호전달기전 억제제의 병용처리시 상피성 난소암 세포의 단백질 키나아제 활성변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 상피성 난소암 세포주 내 젠티실 알코올에 의한 항암기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

- [0016] 본 발명에서는 젠티실 알코올의 상피성 난소암 세포주 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 7).
- [0017] 본 발명은 일 관점에서 젠티실 알코올을 유효성분으로 포함하는 상피성 난소암 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0020] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 담체는 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 완충 물질, 물, 염, 전해질, 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 구강, 심장내, 골수내, 경막내, 경피, 장관, 피하, 설하 또는 국부 투여용으로 제형화하는 것을 특징으로 할 수 있고, 완충제, 항균성 보존제, 계면활성제, 산화방지제, 긴장성 조정제, 방부제, 증점제 및 점도 개질제로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 보조제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 용액, 현탁액, 에멀전, 겔 및 분말로 구성된 군에서 선택되는 제형을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 증상의 경중도, 환자의 체중, 연령, 성, 투여 방식 및 투여시간 등과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 따르면, 상기 젠티실 알코올이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다. 구체적으로 상기 젠티실 알코올은 난소암 ES2, OV90 세포 내 ERK1/2, P38 MAPK 및 P90RSK의 인산화를 증가시키고, JNK의 인산화는 감소시키며, OV90 세포 내 AKT의 인산화는 감소시키고, ES2 세포 내 P70S6K의 인산화는 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 본 발명에 따르면, PI3K/AKT 또는 MAPK 신호전달경로를 억제하는 타겟 억제제를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따르면, 상기 젠티실 알코올은 미토콘드리아 탈분극을 유도하고, 세포 내 칼슘항상성을 와해하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 시스플라틴 또는 파클리탁셀을 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니고 상피성 난소암 치료제로 사용되는 화학치료제를 더 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명은 또 다른 관점에서, 젠티실 알코올을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 상피성 난소암 세포주의 증식 능력을 억제시키는 방법에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명은 또 다른 관점에서, 젠티실 알코올을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 상피성 난소암 세포주의 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.
- [0032] [실시예]
- [0033] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다

- [0035] **실험 방법**
- [0036] 실험 재료
- [0037] 젠티실 알코올(Gentisyl alcohol)은 종래 문헌(Diversity and Ecology of Marine Algicolous Arthrinium Species as a Source of Bioactive Natural Products. Mar Drugs 2018, 16, 508)에 따라 Arthrinium spp. (KUC21332)의 2차 대사산물에서 분리 및 정제하여 수득하였다. Phospho-ERK1/2, JNK, P38, P90RSK, AKT, P70S6K, S6, GSK3 β 단백질 및 total-ERK1/2, JNK, P38, P90RSK, AKT, P70S6K, S6, GSK3 β 단백질에 대한 항체는 Cell Signaling Technology사로부터 구매하였다. 또한, U0126 (ERK1/2 억제제), LY294002 (PI3K/AKT 억제제), SP600125 (JNK 억제제)를 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다.
- [0039] 세포배양
- [0040] ES2, OV90 세포는 American Type Culture Collection에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 McCoy's 5A (Modified) 배지를 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)과 함께 혼합하여 사용하였다.
- [0042] 세포 증식 능력 분석
- [0043] ES2, OV90 세포를 96 well plate에 100 μ l/well씩 분주하여 배양하고, FBS 기아조건으로 24시간 동안 추가 배양 후, 젠티실 알코올을 용량의존적으로 (0, 2, 5, 10, 20, 40 μ M) 48시간 처리하였다. BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 후, 10 μ M BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37 $^{\circ}$ C/5% CO $_2$ 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. 난소암 세포에 BrdU를 labeling 하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 후 3차례 씻어주고, 마지막으로 100 μ l의 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate으로 세포를 반응시키고 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm, 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.
- [0045] 면역형광법을 통한 PCNA발현 분석
- [0046] 3×10^4 개의 난소암 세포를 10% FBS가 포함된 배지 300 μ l와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 젠티실 알코올 20 μ M을 48시간 동안 처리하였다. 이후, 처리시간이 끝나면 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, Santa Cruz Biotechnology사에서 구입하여 2 μ g/ml로 희석된 PCNA 항체를 처리하였으며 대조군에는 mouse IgG를 처리하여 4 $^{\circ}$ C에서 16시간 인큐베이션 하였다. 이후, 0.1% BSA (bovine serum albumin)이 포함된 PBS로 2번의 워싱과정을 거쳐 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG Alexa 488 (catalog number: A-11001, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 antibody dilution buffer에 1:200으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 난소암 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 세포 내 타겟 단백질뿐만 아니라 핵을 동시에 관찰할 수 있도록 하였다. 실험 종료 후 LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.
- [0048] Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 세포사멸 분석
- [0049] 젠티실 알코올의 용량의존적 (0, 2, 5, 10, 20 μ M) 처리에 따라 사멸된 세포를 검출하기 위해 FITC Annexin V 세포 사멸 진단 키트 I (BD Biosciences)를 사용하였다. 6 well에 배양된 ES2, OV90세포에 젠티실 알코올의 48시간 처리 끝난 후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고 1 mL의 1 $\times$ binding buffer를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 pellet을 얻은 다음, 200 μ L의 1 $\times$ binding buffer으로 세포 현탁 배양하여 브라운 1.5 mL 튜브에 100 μ L 넣고 Annexin V 5 μ L, PI 5 μ L를 함께 혼합하여 세포를 15분 동안 실온에 두어 염색하였다. 이후, 1 $\times$ binding buffer를 400 μ L 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도 분석을 통해 사멸된 세포의 수를 측정하였다.

[0051] Propidium iodide (PI)를 이용한 세포주기 분석

[0052] 난소암 세포 주기의 정지 효과를 확인하기 위하여 BD Biosciences사의 Propidium iodide (PI) 시약을 사용하여 실험을 진행하였다. 6 well에 ES2, OV90세포가 70 ~ 80% 정도 찻을 때, 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양 및 젠티실 알코올을 용량의존적으로 (0, 2, 5, 10, 20 μ M) 48시간 처리하여 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 2번 워싱을 진행하고 70%의 에탄올로 고정시켜 4°C에 하루 동안 보관하였다. 다음으로 PBS로 2번 워싱을 진행하고 10 mg/ml의 RNase A 5 μ L, 50 mg/ml PI 5 μ L을 PBS에 함께 혼합하여 실온에 30분 동안 빛을 차단한 채 염색하였다. 이후, PBS를 400 μ L 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도 분석을 통해 세포주기의 변화를 측정하였다.

[0054] TUNEL 반응을 통한 세포사멸 분석

[0055] 3×10^4 개의 난소암 세포를 10% FBS가 포함된 배지 300 μ L와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 젠티실 알코올 20 μ M을 48시간 동안 처리하였다. 이후, 세포를 에어드라이 시키고 4% paraformaldehyde로 상온에서 1시간 인큐베이션하여 세포를 고정시켰다. 고정된 세포는 PBS로 한번 헹구내고 0.1% sodium citrate에 0.1% Triton X-100가 함유된 용액을 사용하여 아이스 위에서 2분간 인큐베이션 시킨 다음, In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche)에 포함된 TUNEL staining mixture를 사용하여 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 1시간 동안 배양하였다. 마지막으로 PBS로 헹구고 DAPI를 염색한 후, LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0057] JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정

[0058] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. 6 well에 ES2, OV90 세포가 70 ~ 80% 정도 찻을 때, 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양 및 젠티실 알코올을 용량의존적으로 (0, 2, 5, 10, 20 μ M) 48시간 처리하여 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포는 JC-1 staining solution에 풀어준 후 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 20분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포는 다시 원심분리하여 1x JC-1 staining buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0060] Rhod-2 AM 염색을 통한 미토콘드리아 기질 내 칼슘 농도 측정

[0061] 세포질 내 칼슘농도를 측정하기 위해 Rhod2-AM을 사용하여 측정하였다. 6 well에 ES2, OV90세포가 70 ~ 80% 정도 찻을 때, 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양 및 젠티실 알코올을 용량의존적으로 (0, 2, 5, 10, 20 μ M) 48시간 처리하여 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포는 Rhod2 staining solution에 풀어준 후 빛을 차단시켜 4°C 냉장상태 내에서 30분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포는 다시 원심분리하여 HBSS (w/o Ca²⁺, Mg²⁺) 500 μ L로 세포 pellet을 풀어준 후 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 10분 배양하였다. 이후, 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0063] Fluo-4 AM 염색을 통한 세포질 내 칼슘농도 변화 측정

[0064] 세포질 내 칼슘농도를 측정하기 위해 Fluo-4 AM을 사용하여 측정하였다. 6 well에 ES2, OV90세포가 70 ~ 80% 정도 찻을 때, 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양 및 젠티실 알코올을 용량의존적으로 (0, 2, 5, 10, 20 μ M) 48시간 처리하여 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포는 Fluo-4 staining solution에 풀어준 후 37°C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 20분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포는 다시 원심분리하여 PBS로 워싱한 후, 다시 원심분리하여 세포

pellet을 얻었다. 이후, 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0066] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0067] 난소암 세포에 젠티실 알코올을 용량의존적으로 처리 (0, 5, 10, 20 μ M) 또는 세포신호전달 억제제 (20 μ M)와의 혼합물을 처리한 다음 난소암 세포로부터 전체 단백질을 추출하여 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 이후, 추출한 단백질을 95°C에서 5분간 변성하였으며 10% SDS/PAGE 젤을 이용하여 전기영동 수행한 뒤, nitrocellulose membrane으로 옮겨주고, 1차 항체와 2차 항체를 차례로 인큐베이션 시킨 다음, chemiluminescence detection (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL, USA) 시약 및 ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0069] 통계분석

[0070] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0072] 결과 및 고찰

[0073] 젠티실 알코올에 의한 상피성 난소암 세포주의 증식 억제 효과

[0074] 젠티실 알코올에 의한 상피성 난소암 세포주 (ES2, OV90)의 세포증식 억제 효과를 확인하기 위해, 젠티실 알코올을 용량의존적으로 (0, 2, 5, 10, 20, 40 μ M) 처리하여 48시간 배양하였다. BrdU incorporation 방법으로 세포 증식을 측정된 결과, 20 μ M의 젠티실 알코올은 ES2 세포의 증식 활성을 39%가량 감소시켰고, OV90은 57% 가량 감소시켰다 (도 1A-B). 추가적으로, 증식 마커로 쓰이는 PCNA의 발현을 면역형광기법을 이용하여 확인하였으며, 젠티실 알코올 처리시 초록 형광의 강도가 ES2와 OV90 둘 다 대조군에 비해 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (도 1C-D). 이러한 결과를 통해, 젠티실 알코올이 상피성 난소암 세포의 증식을 효과적으로 억제시키는 것을 확인하였다.

[0076] 젠티실 알코올에 의한 상피성 난소암 세포의 사멸 유도 효과

[0077] 젠티실 알코올에 의해 난소암 세포주에서 세포사멸이 유도되는지 알아보기 위하여, Annexin V와 PI 염색을 진행하였다. 도 2A-B에 개시된 바와 같이, ES2와 OV90 세포주에서 후기 세포자멸사에 해당하는 부분(오른쪽 위 사분면)이 20 μ M의 젠티실 알코올을 처리하였을 때, 대조군에 비해 각각 234%, 303% 증가함을 확인할 수 있었다. 또한, TUNEL assay를 통해, 20 μ M의 젠티실 알코올을 처리한 ES2와 OV90 세포에서 세포자멸사의 특징인 DNA 분절화를 확인하였다 (도 2C). 또한, 젠티실 알코올의 용량의존적 처리에 따라, ES2와 OV90에서 sub-G1에 해당하는 세포의 수는 각각 5배, 3배까지 늘었으며, 이와는 반대로 G0/G1과 G2 주기의 세포의 수는 상대적으로 감소하는 것을 확인하였다 (도 2D-E). 이러한 결과를 통해, 젠티실 알코올은 상피성 난소암 세포에서 세포자멸사를 유도하며 세포주기 정지를 일으킨다는 것을 확인하였다.

[0079] 젠티실 알코올에 의한 상피성 난소암 세포의 미토콘드리아 기능 저해 및 칼슘 항상성 와해 효과

[0080] 상피성 난소암 세포주에 젠티실 알코올이 미토콘드리아에 미치는 효과를 알아보기 위해, 미토콘드리아 막전위를 JC-1 dye를 통해 측정하였으며, 초록 형광의 단량체가 젠티실 알코올(20 μ M) 처리에 따라 ES2와 OV90 세포에서 대조군에 비해 각각 428%, 620.6%가 증가함을 확인하였다 (도 3A-B). 또한, Rhod2를 이용하여 상대적으로 미토콘드리아 기질 내 칼슘 농도를 측정한 결과, ES2 세포에서는 젠티실 알코올 처리에 따라 약 30% 수준이 감소하는 경향을 보였지만, OV90에서는 오히려 2배 이상 증가하는 양상을 보임을 확인하였다 (도 3C-D). 이와는 반대로, Fluo4로 측정한 세포질 내 상대적인 칼슘 농도는 ES2와 OV90 세포에서 모두 젠티실 알코올의 용량의존적 처리에 따라 대조군에 비해 55%, 61% 수준으로 감소하였다 (도 3E-F). 이러한 결과를 통해, 젠티실 알코올이 사람의 난소암 세포주에서 미토콘드리아의 기능을 와해시켜 미토콘드리아 막전위 감소와 칼슘 항상성의 저해를 유도

함을 확인하였다.

[0082] 젠티실 알코올에 의한 상피성 난소암 내 MAPK 및 PI3K/AKT 신호전달 경로의 조절 양상 분석

[0083] 젠티실 알코올 처리에 의한 상피성 난소암 세포 내 신호전달 기작을 확인하기 위해 웨스턴블롯으로 MAPK와 PI3K/AKT 신호전달물질의 인산화를 확인하였다. ERK1/2와 P38 MAPK의 인산화는 젠티실 알코올 처리에 따라 ES2 세포에서 모두 용량의존적으로 (0, 5, 10, 20 μ M) 각각 1.4배, 2.7배까지 증가하였지만 JNK의 인산화는 대조군에 비해 절반으로 감소하였다 (도 4A-C). OV90 세포에서는 큰 유의적 변화가 없던 ERK1/2에 비해 P38의 인산화는 젠티실 알코올 처리에 따라 2.5배까지 증가하는 경향을 보였으며, JNK의 인산화는 대조군에 비해 약간 감소하는 경향을 보였다 (도 4A-C). 또한, ERK1/2의 하위인자인 P90RSK의 인산화는 젠티실 알코올 처리에 따라 두 세포주 모두에서 각각 3.7배, 1.3배까지 증가하는 양상을 보였다 (도 4D). PI3K/AKT 신호전달 경로에서는, ES2와 OV90에서 젠티실 알코올 처리시 P70S6K의 인산화가 활성화 되었으며, AKT의 인산화는 약하게 감소하였다 (도 5A-B). S6와 GSK3 β 의 인산화는 젠티실 알코올에 의해 유의미하게 변하지 않았다 (도 5C-D). 이러한 결과를 통해, 젠티실 알코올이 상피성 난소암 세포주에서 ERK1/2와 P38 MAPK를 활성화시키는 효과가 있음을 확인하였다.

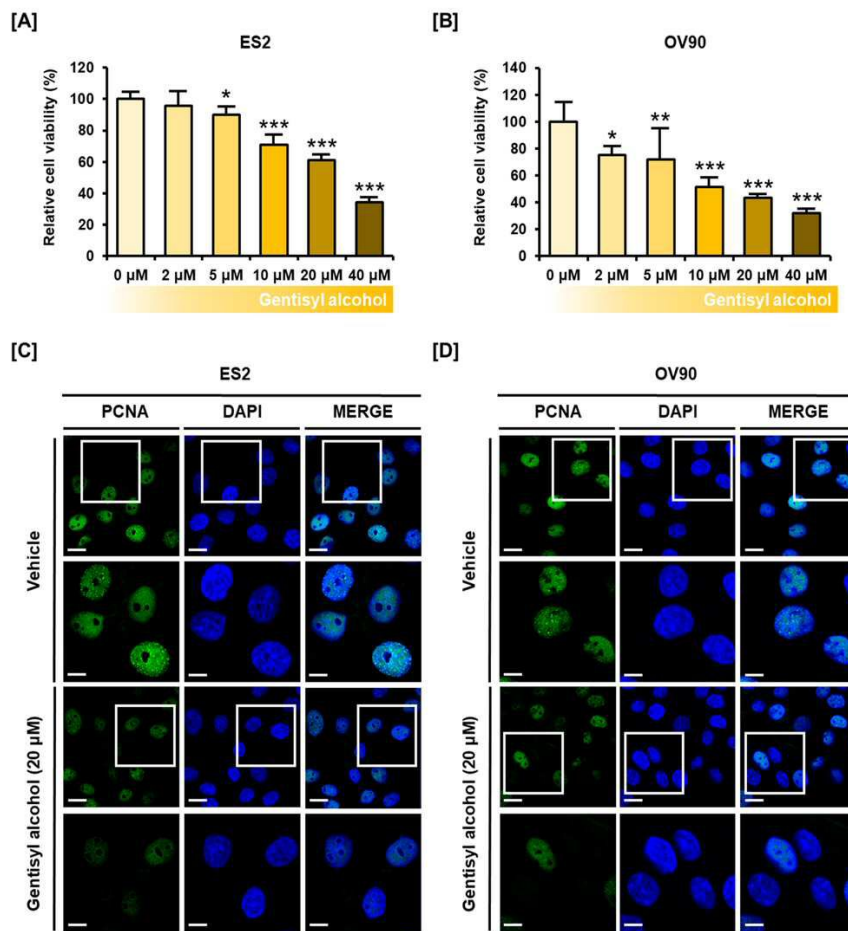
[0085] 젠티실 알코올과 신호전달기전 억제제의 병용처리를 통한 상피성 난소암 세포 내 신호전달기전 양상 분석

[0086] 젠티실 알코올이 상피성 난소암 세포 내에서 어떠한 기작으로 작동하는지 알아내기 위해, U0126 (ERK1/2 억제제), LY294002 (PI3K/AKT 억제제), SP600125 (JNK 억제제)를 각 20 μ M 농도로 젠티실 알코올(20 μ M)과 병용처리 하여 웨스턴블롯으로 단백질 발현 변화를 분석하였다. ES2와 OV90 세포에서 젠티실 알코올 처리에 의해 증가된 ERK1/2의 인산화 수준은 LY294002와 젠티실 알코올의 병용처리에 의해 원래의 수준으로 회복하였고, U0126와의 병용처리에서는 완전히 감소하였지만, SP600125는 외려 더욱 인산화 수준을 더욱 증가시키는 양상을 보였다 (도 6A). 또한, 두 세포주에서 모두 JNK의 인산화는 젠티실 알코올을 단독처리 했을 때보다 U0126과 SP600125과 병용 처리하였을 때 더욱 감소하는 경향을 보였으며, LY294002와 병용 처리하였을 때에는 오히려 대조군보다 더 증가하는 양상을 띄었다 (도 6B). PI3K/AKT 신호전달 경로에서는, ES2와 OV90 세포 모두에서, 젠티실 알코올과 U0126 또는 LY294002를 병용처리 시에, AKT, P70S6K, S6 단백질의 인산화가 모두 대조군에 비해 30% 수준으로 유의미하게 감소하였다 (도 6C-E). P70S6K의 인산화의 경우, SP600125와 젠티실 알코올이 병용처리 되었을 때, ES2와 OV90세포에서 대조군에 비해 각 2.4배, 1.7배 더 높게 인산화 되는 경향을 보였다 (도 6D). 이러한 결과를 통해, 젠티실 알코올이 사람의 난소암 세포주의 MAPK와 PI3K/AKT 신호전달 경로를 조절하는 것을 확인하였다.

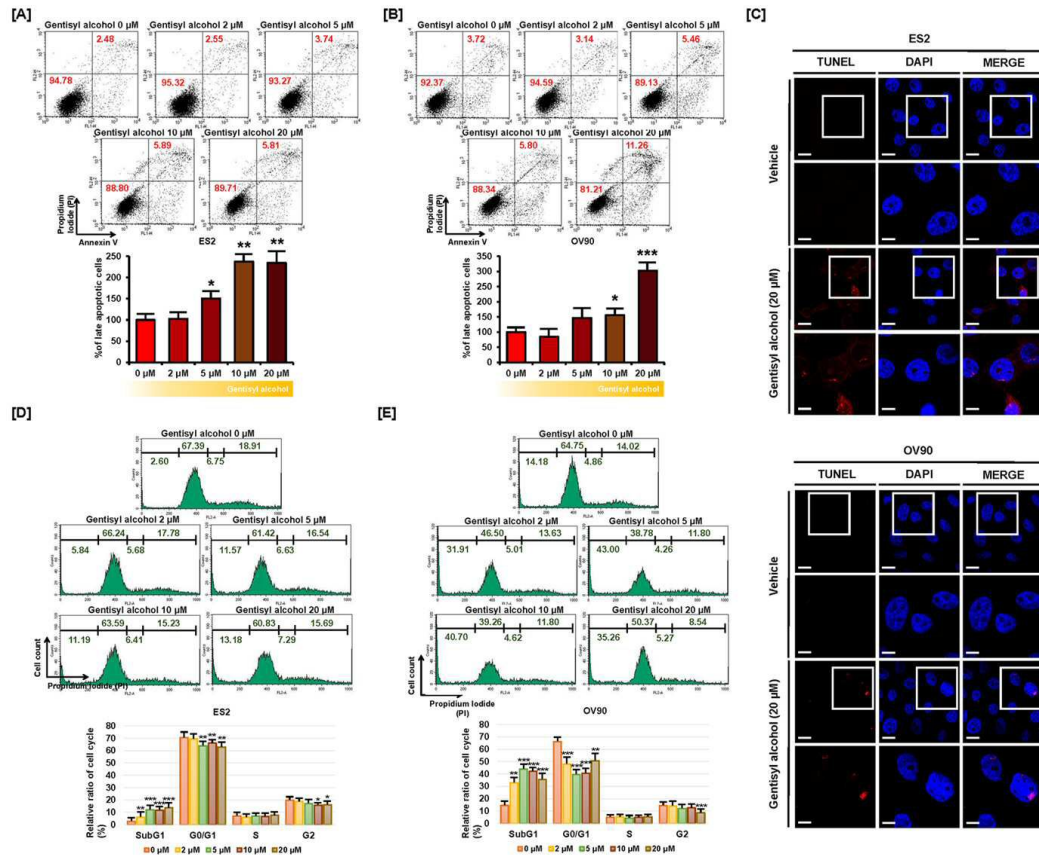
[0088] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

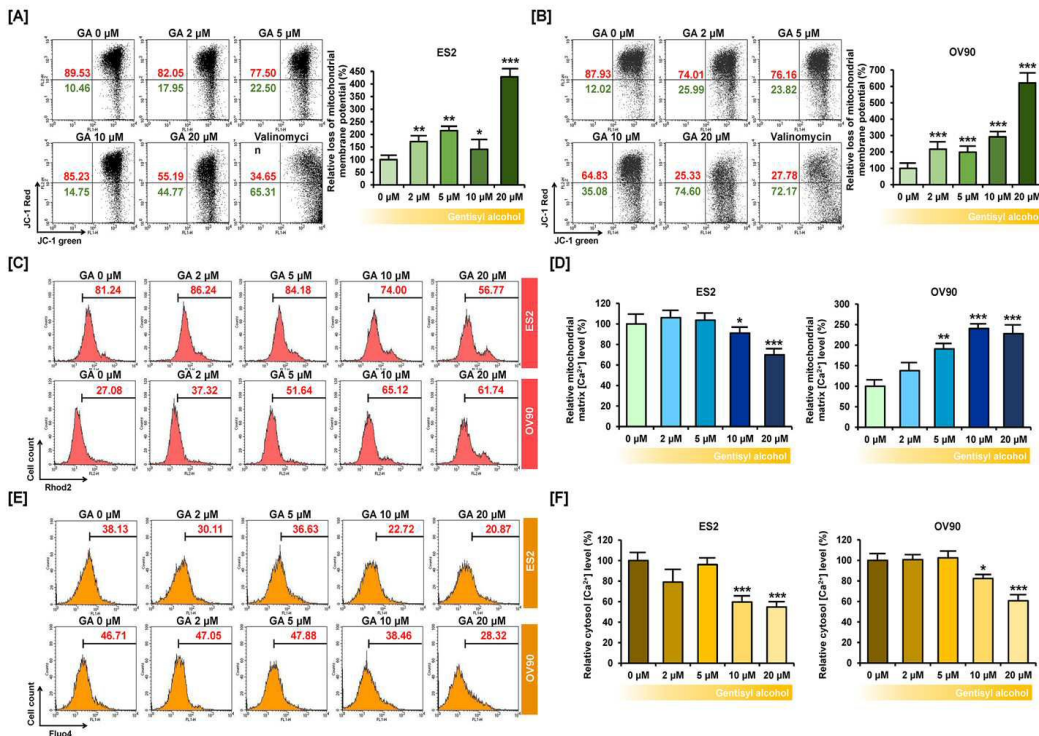
도면1



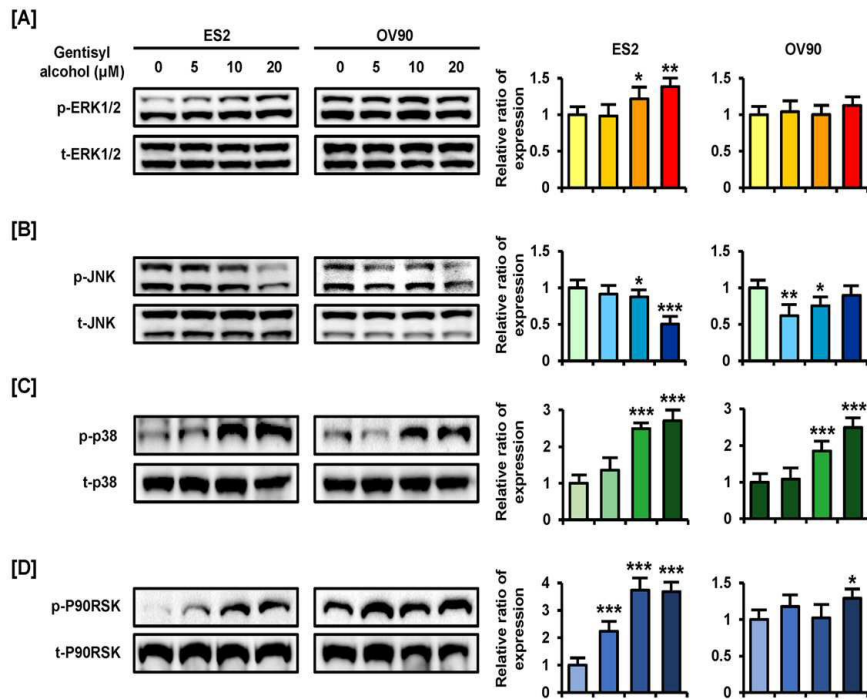
도면2



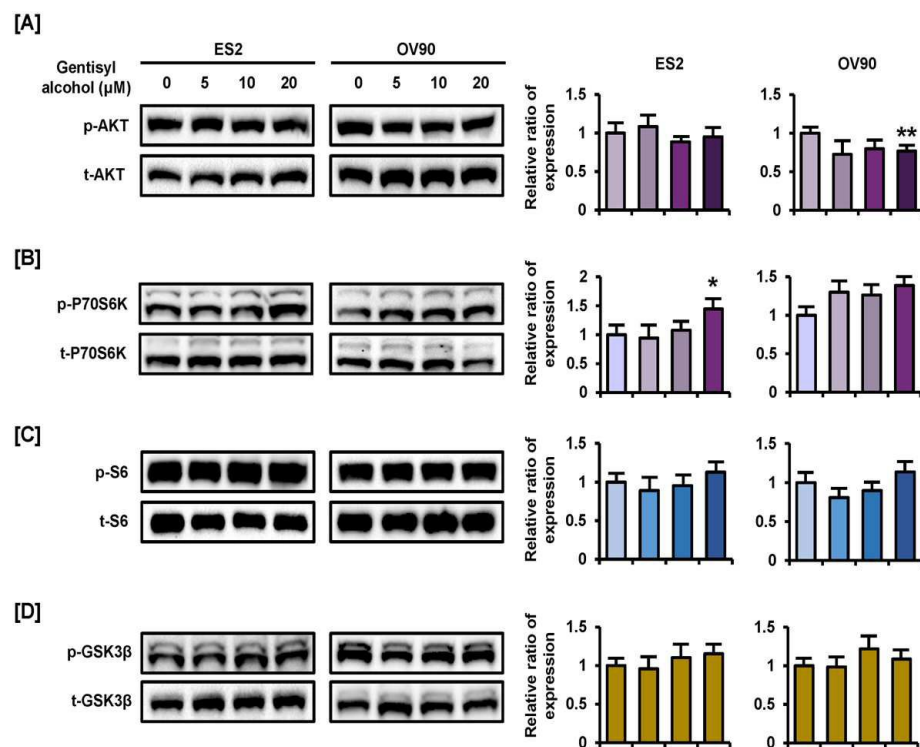
도면3



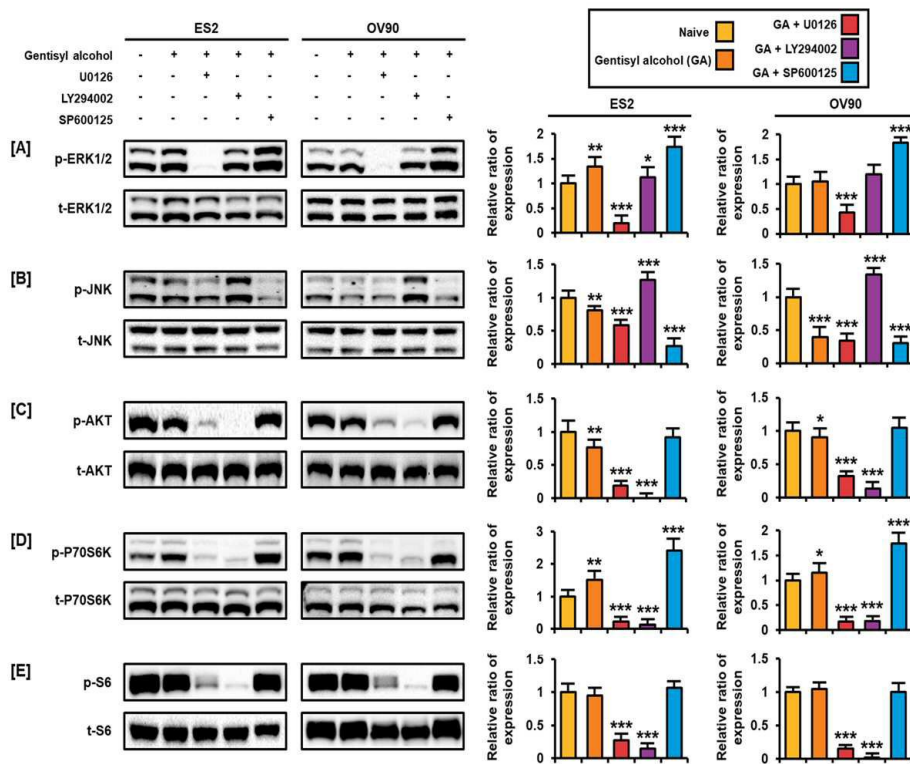
도면4



도면5



도면6



도면7

