



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0053015
(43) 공개일자 2010년05월20일

(51) Int. Cl.

A61K 31/15 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0111959

(22) 출원일자 2008년11월12일

심사청구일자 2008년11월12일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

김성훈

서울특별시 강남구 도곡동 타워팰리스 e-2405

박민중

경상남도 양산시 중부동 690-7 뉴양산프라자 601호 제일한의원

(74) 대리인

김동완

전체 청구항 수 : 총 5 항

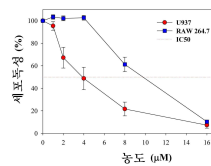
(54) 인간 골수성 백혈병 세포주에 세포사멸을 유도하는 나프타자린 유도체

(57) 요약

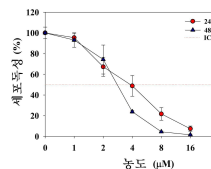
본 발명은 나프타자린 유도체의 인간 골수성 백혈병 세포주 내의 카스파제-3 단백질의 활성화를 통한 아포토시스의 유도 및 핵 전사 인자 NF- κ B의 활성화를 저해하여 인간 골수성 백혈병 세포주 U937의 세포사멸을 유도하는 나프타자린 유도체를 제공한다.

대표도 - 도1

(A)



(B)



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R13-2007-019-00000-0

부처명 교육과학부

연구사업명 MRC

연구과제명 항암 및 전이억제 효능 한방소재 개발

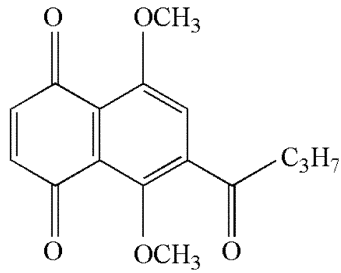
주관기관 경희대학교

연구기간 2007년 5월 1일 ~ 2008년 6월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

인간 골수성 백혈병 세포주에 세포사멸을 유도하는 하기 식 I 로 표시되는 나프타자린 유도체(DMNQ-S17)



식 I

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 인간 골수성 백혈병 세포주의 세포사멸은 카스파제-3의 활성화를 통해 이루어짐을 특징으로 하는 나프타자린 유도체

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 인간 골수성 백혈병 세포주의 세포사멸은 NF- κ B의 전사 활성 저해를 통해 이루어짐을 특징으로 하는 나프타자린 유도체

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 인간 골수성 백혈병 세포주의 세포사멸은 시험관 내에서 나프타자린 유도체(DMNQ-S17)의 8~16 μ M 농도에서 용량 의존적으로 야기됨을 특징으로 하는 나프타자린 유도체

청구항 5

제 1항의 나프타자린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 인간 골수성 백혈병 치료용 항암 활성화제

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 인간 골수성 백혈병 세포주 U937의 세포사멸을 유도하는 나프타자린 유도체에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 나프타자린 유도체의 인간 골수성 백혈병 세포주 내의 카스파제-3 단백질의 활성화를 통한 아포토시스의 유도 및 핵 전사 인자 NF- κ B의 활성화를 저해하여 인간 골수성 백혈병 세포주 U937의 세포사멸을 유도하는 나프타자린 유도체에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 백혈병은 백혈구의 비정상적인 증식이 특징인 혈액암 또는 골수암이다. 백혈병은 림프모세포성 백혈병 및 골수성 백혈병으로 분류된다. 아폴토시스 조절제의 기능장애는 급성 골수성 백혈병 환자의 화학요법제 저항성 및 불충분한 효과를 유발한다. 이들 결함을 극복하기 위해 미토콘드리아, 세포사멸 수용체 및 카스파제 활성화의 수렴 경로에서 중요한 단백질을 목표로 하는 신규한 분자가 개발되고 있다. 급성 골수성 백혈병(AML)의 초기 치료는 일반적으로 다우노루비신(daunorubicin), 시타라빈(cytarabine), 이다루비신(idarubicin), 티오구아닌(thioguanine), 에토포사이드(etoposide) 및 단백동화 스테로이드로 이루어진 반면 만성 골수성 백혈병(CML)의 화학요법은 수산화요소(Hydrea®), 부설판(busulfan)(Myleran®) 또는 이마티닙 메실레이트(imatinib mesylate)(Gleevec)로 시작된다. 지난 25년 간 급성 골수성 백혈병(AML) 치료법 개선에도 불구하고 대부분의 환자는 여전히 이러한 질환에 굴복하고 있다.
- [0003] 미토잔트론(mitoxantrone), 안트라퀴논(anthraquinone)을 이용한 임상적 연구는 1979년 이후 미국에서 시작되었다. 후속 임상시기 II 및 III 시험은 미토잔트론이 급성 백혈병, 림프종 및 유방암 환자에서 유의적인 임상적 활성을 지님을 나타내었다. 안트라사이클린(anthracycline), 다우노루비신, 독소루비신, 미토잔트론 및 사인토펜(saintopin)과 같은 다양한 퀴논 항암 약물은 DNA 국소이성화효소-II 저해, 세미퀴논 라디칼의 형성 및 항종양 활성으로 인한 세포독성 효과를 나타내었다.
- [0004] 2- 또는 6-옥소-DMNQ, 2-하임(hyim)-DMNQ-S33, DMNQS64 및 DMNQ-S52와 같은 나프타자린(naphthazarin) 구조 포함 화합물이 유효한 항종양 활성을 지닌다는 사실이 입증되고 있다.
- [0005] 대한민국 특허등록 제10-634232호 '항암활성을 갖는 신규한 화합물과 그 제조방법 및 상기 화합물을 함유하는 항암활성 의약 조성물'은 본 발명자들이 출원 등록한 선행 특허로서 기존의 항암제에 DMNQ를 약제학적으로 결합하여 합성한 항암활성을 갖는 하기 화학식(I)의 트윈 화합물, 그 제조방법 및 상기 트윈 화합물 및 그 제약학적으로 허용가능한 염을 유효량 함유하는 항암활성을 갖는 의약조성물에 관한 것이다. 선행특허의 트윈 화합물은 사람의 암세포주인 A549, HT-1080, SK-OV-3, U937등에서 특이적으로 작용하며, 사람 폐암주인 A549의 P53을 변이한 2가지 종류의 A549에서 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였으며, 동물실험에서도 종양성장을 억제함을 확인하였다.
- [0006] 또한 대한민국 공개특허 제10-2004-46874호 '나프타자린 유도체 S64를 함유하는 고형암 치료 및 예방용 약제학적 조성물'은 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 활성 성분으로 나프타자린 유도체인 S64를 약제학적으로 유효한 양으로 포함하는 것을 특징으로 하는 고형암 치료 및 예방용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 선행 특허의 조성물은 고형암세포에 특이적으로 작용하여 HSP70 유전자의 발현억제, HSP70 및/또는 HSF 단백질의 활성억제 및 글루타치온의 양을 감소시킴으로써 고형암 치료 및 예방에 효과를 나타낸다.
- [0007] 그러나 나프타자린 유도체중 신규한 합성 화합물인 6-(1-옥소알킬)-5,8-디메톡시-1,4-나프토클리논-S17(DMNQ-S17)에 관해서는 그 항암 활성이 상세히 개시된 바 없다.
- [0008] 따라서 본 발명에서는 DMNQ-S17이 인간 백혈병 치료에 응용 가능한지 여부를 조사하기 위해 인간 골수성 백혈병 세포주에 그 항암 활성을 시험하였으며, 그 결과 인간 골수성 백혈병 U937 세포주 내 카스파제 의존적 아폴토시스를 유발하는 구성적 NF- κ B 활성화의 억제를 통한 DMNQ-S17의 항종양 메커니즘을 규명함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

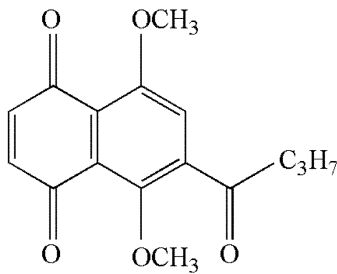
발명의 내용

해결 하고자 하는 과제

- [0009] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 6-(1-옥소알킬)-5,8-디메톡시-1,4-나프토크논-S17(DMNQ-S17)이 인간 백혈병 치료에 응용 가능한지 여부를 조사하기 위해 인간 골수성 백혈병 세포주에 그 항암 활성을 측정코자 한 것이다. 또한 인간 골수성 백혈병 U937 세포주 내 카스파제 의존적 아포토시스를 유발하는 구성적 NF- κ B 활성화의 억제제를 통한 DMNQ-S17의 항종양 메커니즘을 규명코자 한 것이다.

과제 해결수단

- [0010] 본 발명의 목적은 인간 골수성 백혈병 세포주에 세포사멸을 유도하는 하기 식 I 로 표시되는 나프타자린 유도체(DMNQ-S17)를 제공하는 것이다:



[0011]

[0012] 식 I

- [0013] 또한 상기 인간 골수성 백혈병 세포주의 세포사멸은 카스파제-3의 활성화를 통해 이루어짐을 특징으로 한다.

- [0014] 또한 상기 인간 골수성 백혈병 세포주의 세포사멸은 NF- κ B의 전사 활성 저해를 통해 이루어짐을 특징으로 한다.

- [0015] 또한 상기 인간 골수성 백혈병 세포주의 세포사멸은 시험관 내에서 나프타자린 유도체(DMNQ-S17)의 8~16 μ M 농도에서 용량 의존적으로 야기됨을 특징으로 한다.

- [0016] 또한 본 발명의 또다른 목적은 상기 나프타자린 유도체 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 인간 골수성 백혈병 치료용 항암 활성제를 제공하는 것이다.

효 과

- [0017] 본 발명의 효과는 6-(1-옥소알킬)-5,8-디메톡시-1,4-나프토크논-S17(DMNQ-S17)이 인간 백혈병 치료에 응용 가능한지 여부를 측정하여 인간 골수성 백혈병 세포주에 유효한 항암제로 제공하는 것이다. 또한 인간 골수성 백혈병 U937 세포주 내 카스파제 의존적 아포토시스를 유발하는 구성적 NF- κ B 활성화의 억제제를 통한 DMNQ-S17의 항종양 메커니즘을 규명한 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0018] 나프토크논(naphthoquinone) 유도체의 세포독성 선별을 통해 신규한 화합물 6-(1-옥소알킬)-5,8-디메톡시-1,4-나프토크논-S17(DMNQ-S17)의 인간 골수 백혈병 U937 세포에 대한 효능을 측정하였다. 또한 DMNQ-S17의 아포토시스 메커니즘을 규명하기 위해 본 발명은 골수 백혈병 U937 세포 내에서 2,3-비스 [2-메톡시-4-니트로-5-설포페닐]-2H-테트라졸륨-5-카르복사닐리드(XTT) 에세이, 전기영동 이동 변화 에세이(EMSA), 말단 데옥시뉴클레오타이드 전이효소 매개 dUTP 틸(nick) 및 표지(TUNEL) 에세이, 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI) 염색 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.
- [0019] 본 발명의 시험에서 DMNQ-S17은 U937 세포에서 구성적 NF- κ B 활성화 및 그의 전사 활성을 저해하였다. 더욱이 DMNQ-S17은 U937 세포에서 아포토시스성 소체, 세포 수축 및 염색질 응축과 같은 아포토시스 특징을 유도하였다. 이와 마찬가지로 유세포 분석은 DMNQ-S17이 농도 의존적 방식으로 서브 G1 부분 및 TUNEL 양성 세포를 증가시킴을 나타내었다.
- [0020] 또한 DMNQ-S17은 미토콘드리아 막전위를 약화시키고, 사이토크롬 C를 방출시키고, 카스파제-3 및 -9를 활성화시키고, 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP)를 분열시켰다. 이에 반하여 카스파제-3 및 -9 저해제는 U937 세포 내에서 DMNQ-S17 유도된 카스파제-3 활성화 및 PARP 분열을 차단하였다.
- [0021] 따라서 DMNQ-S17은 인간 골수 백혈병 U937 세포 내에서 카스파제 3의 활성화를 유발하는 NF- κ B 활성화의 억제에 의해 골수 백혈병에 대한 유효한 항암 후보물질이 될 수 있음을 나타낸다.
- [0022] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0023] U937 세포에 대해 세포독성을 나타내는 DMNQ-S17
- [0024] 골수 백혈병 U937 세포 및 RAW 264.7 대식세포에 대한 DMNQ-S17의 세포독성 효과는 XTT 에세이에 의해 조사되었다. 도 2A 및 B에 나타난 바와 같이 DMNQ-S17는 각각 24시간에 4 μ M 및 48시간에 3 μ M의 IC₅₀으로 시간- 및 용량-의존적 방식으로 U937 세포의 생존력을 유의적으로 저해하였다. 이와 대조적으로 DMNQ-S17은 ~9.8 μ M의 IC₅₀으로 RAW 264.7 대식세포 및 16 μ M 이상의 IC₅₀으로 MCF10A 정상 유방 내피 세포에 대해 적은 세포독성을 나타내었다.
- [0025] 구성적 NF- κ B DNA 결합 및 그의 전사 활성을 저해하는 DMNQ-S17
- [0026] U937 세포 내 구성적 NF- κ B 활성의 조절시 DMNQ-S17의 역할을 평가하기 위해 루시페라제 에세이 및 EMSA가 수행되었다. 세포는 pNF- κ B-luc 수용체로 일시적으로 동시 트랜스펙트되었고 다양한 농도의 DMNQ-S17로 처리되었다. 이후 세포는 채취되고 수용체 활성이 Promega 루시페라제 에세이 시스템을 이용하여 측정되었다. DMNQ-S17은 용량-의존적 방식으로 전사적 NF- κ B 활성을 저해하였다(도 3A). 이와 마찬가지로 DMNQ-S17은 U937 세포 내 구성적 NF- κ B DNA 결합 활성을 강하게 억제하였다(도 3B).

[0027] U937 세포 내 미토콘드리아 의존적 경로를 통해 아포토시스를 유도하는 DMNQ-S17

[0028] DMNQ-S17에 의해 유도되는 아포토시스의 분자 메커니즘을 조사하기 위해 미토콘드리아가 그의 외부 및 내부 막 투과성을 변화시킴으로서 세포 사멸에 중요한 역할을 하기 때문에 미토콘드리아 막전위가 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine, TMRE) 염색 후 유세포 측정에 의해 DMNQ-S17 처리된 U937 세포 내에서 분석되었다. 도 4A에 나타난 바와 같이 DMNQ-S17은 비처리 대조군의 97.86%와 비교시 각각 1, 2 및 4 μ M의 농도에서 미토콘드리아 막전위를 반영하는 형광 강도를 95.57%, 91.33% 및 79.32%로 감소시켰다. 신호전달 연쇄반응을 규명하기 위해 Bcl-2 패밀리의 단백질의 연루 및 미토콘드리아로부터의 사이토크롬 C 방출이 웨스턴 블롯팅에 의해 DMNQ-S17 처리된 U937 세포에서 조사되었다. 미토콘드리아 외부막 투과성은 Bcl-2 패밀리의 단백질에 의해 조절되고, 이는 미토콘드리아로부터의 사이토크롬 C 방출 및 카스파제 활성화의 중추적 조절제이다. 본 발명에서 사이토크롬 C는 도 4B에 나타난 바와 같이 DMNQ-S17에 의해 농도-의존적 방식으로 미토콘드리아로부터 세포질 내로 효과적으로 방출되었다.

[0029] U937 세포에서 카스파제-3 활성화 및 PARP 분해를 유도하는 DMNQ-S17

[0030] 아포토시스 관련 단백질 상의 DMNQ-S17의 효과를 조사하기 위해 카스파제-3의 활성화 및 PARP 분열이 웨스턴 블롯팅에 의해 DMNQ-S17-처리 U937 세포에서 조사되었다. 카스파제-3 활성화는 아포토시스 유도에 중추적 역할을 한다. 본 발명에서는 DMNQ-S17이 도 5A에 나타난 바와 같이 카스파제-3 활성화 및 DMNQ-S17에 의한 116 kDa 고유 형태에서 85 kDa 단편으로의 PARP 분열을 효과적으로 유도하였다. DMNQ-S17이 미토콘드리아성 의존적 경로를 통해 아포토시스를 유도하는지 여부를 확인하기 위해 DMNQ-S17 상의 카스파제-3 및 -9의 저해제 효과는 U937 세포에서 카스파제-3 활성화 및 PARP 분열과 같은 아포토시스를 유도하였다. 도 5B에 나타난 바와 같이 카스파제-3 및 -9 저해제는 이들 세포에서 DMNQ-S17 유도된 카스파제-3 활성화 및 PARP 분열을 차단시켰다.

[0031] DMNQ-S17 처리된 U937 세포 내에서 관찰되는 아포토시스성 형태 특징

[0032] DMNQ-S17의 세포독성 효과가 아포토시스 유도에 기인하는지 여부를 측정하기 위해 세포막 기포형성과 같은 형태 특징이 도 6A에 나타난 바와 같이 현미경 및 형광 현미경에 의해 4 μ M DMNQ-S17로 처리된 U937 세포에서 관찰되었다. 더욱이 도 6B 및 C에 나타난 바와 같이 DAPI 및 TUNEL 염색 에세이는 고유 대조군 세포와 비교시 DMNQ-S17 처리된 U937 세포에서 아포토시스성 소체, 세포 수축 및 염색질 응축(화살표)과 같은 아포토시스성 형태 특징이 관찰되었음을 나타내었다.

[0033] U937 세포 내 서브-G₁ DNA 함량을 증가시키는 DMNQ-S17

[0034] DMNQ-S17의 아포토시스 활성을 확인하기 위해 세포 주기 분석이 DMNQ-S17 처리 U937 세포에서 수행되었다. PI 염색 후 DNA 함량은 유세포 측정으로 분석되었다. 도 7A에 나타난 바와 같이 아포토시스 부분을 나타내는 서브-G₁ DNA 함량은 비처리 대조군의 $2.49 \pm 0.49\%$ 와 비교시 1, 2 및 4 μ M의 DMNQ-S17에서 각각 $5.56 \pm 1.36\%$, $8.03 \pm 0.21\%$ 및 $23.33 \pm 3.47\%$ 로 증가되었다. 이와 마찬가지로 도 7C 및 D에 나타난 바와 같이 유세포 측정을 이용한 TUNEL 에세이는 TUNEL 양성 세포가 비처리 대조군의 1.3%와 비교시 1, 2 및 4 μ M의 DMNQ-S17에서 각각 1.6%, 3.9% 및 24.7%로 증가됨을 나타내었다.

[0035] 아포토시스는 특정한 내부 또는 외부 신호에 의해 유발되는 세포 사멸의 엄격하게 제어되는 메커니즘이다. 많은 화학요법 약물이 악성 세포 내 아포토시스를 유도하기 때문에 아포토시스는 현재 항종양 약물 개발을 위한 표적이 되고 있다.

- [0036] 본 발명에서는 DMNQ-S17이 4 μ M의 IC₅₀으로 U937 세포에 대한 세포독성을 나타낸 반면 정상 RAW 264.7 대식세포 및 MCF10A 유방 내피 세포에 대해서는 각각 ~9.8 μ M 및 16 μ M 이상의 IC₅₀으로 세포독성을 나타내었고, 이는 DMNQ-S17이 정상 세포보다는 백혈병 암세포에 대해 더욱 세포독성적임을 나타낸다. DMNQ-S17의 세포독성이 아포토시스에 의해 매개되는지 여부를 조사하기 위해 TUNEL 및 DAPI 염색 관찰이 수행되었다. 아포토시스 소체, 세포 수축 및 염색질 응축과 같은 아포토시스 특징이 DMNQ-S17 처리 U937 세포에서 나타났고, 이는 DMNQ-S17의 세포독성 활성이 괴사가 아닌 아포토시스에 기인함을 나타낸다. 또한 본 발명은 유세포 측정 분석에 의해 DMNQ-S17이 U937 세포에서 농도 의존적 방식으로 서브 G1 부분 및 TUNEL 양성 세포를 증가시킴을 확인하였다.
- [0037] 일반적으로 아포토시스 신호전달은 2가지 원리 경로로 구성된다. 하나는 카스파제-8의 전구체 형태의 동원을 유발하는 사멸 수용체 라이게이션으로부터 사멸-유도 복합체까지의 직접 경로이다. 또다른 경로는 미토콘드리아 내에서 개시된다. 사이토크롬 C가 미토콘드리아로부터 세포질 내로 방출된 후 Apaf1 및 ATP에 결합하고, 이는 카스파제-9를 활성화시킨 후 카스파제-3을 활성화시키고 DNA 복구 관련 세포핵 효소 폴리(ADP-리보스) 중합효소(PARP)의 분열을 유도하여 89 kDa 단편을 형성시킨다. 본 발명의 실험에서 웨스턴 블롯팅은 4 μ M에서 DMNQ-S17이 U937 세포에서 미토콘드리아 막전위를 약화시키고, 사이토크롬 C를 방출시키고 카스파제-3을 활성화시키고 PARP를 분열시킴을 나타내었다. 또한 카스파제-3 및 -9 저해제는 U937 세포에서 DMNQ-S17 유도된 카스파제-3 활성화 및 PARP 분열을 차단시켰다. 이들 데이터는 DMNQ-S17이 U937 세포에서 미토콘드리아 의존적 경로를 통해 아포토시스를 유도함을 강하게 제시한다.
- [0038] 대부분의 종양유전자는 jun, fos, myc, NF- κ B 및 STAT 유전자 패밀리의 멤버와 같은 전사 인자 활성화를 암호화한다. 증식 및 아포토시스 내 다양한 단계가 NF- κ B에 의해 조절되기 때문에 최근 NF- κ B의 특이적 표적화는 다발 골수종의 치료법 및 만성 골수 백혈병의 저항성으로 제안되었다. 본 발명에서는 DMNQ-S17이 EMSA에 의해 구성적 NF- κ B DNA 결합 활성 및 루시페라제 에세이에 의해 그의 전사 활성이 저해되었고 이는 DMNQ-S17에 의해 NF- κ B 경로가 U937 골수 백혈병 세포 내 아포토시스 유도에 관련됨을 나타낸다. 유사하게는 최근 연구는 NF- κ B 활성화를 억제함으로써 아포토시스를 유도함을 나타내었고, 이는 DMNQ-S17을 포함한 퀴논 함유 작용제가 NF- κ B 활성화의 조절을 통해 프로-아포토시스 역할을 할 수 있음을 나타낸다. 더욱이 NF- κ B 및 서비빈(survivin), Bcl-2, Bcl-x1 및 IAP1/2를 포함한 그의 관련 유전자 생성물의 억제가 아포토시스를 매개할 수 있다는 종전 연구는 본 발명의 결과를 강하게 지지한다.
- [0039] 간략하게 DMNQ-S17은 U937 세포에서 구성적 NF- κ B 활성화를 억제하고 아포토시스를 유도하고, DAPI 및 TUNEL 에세이에 의해 아포토시스 소체와 같은 형태적 아포토시스 특징을 나타내고, 유세포 측정 분석에 의해 서브 G1 DNA 부분 및 TUNEL 양성 세포를 증가시킴을 나타내고, 카스파제-3 활성화를 유도하고, PARP를 분열시키고, 미토콘드리아 막전위를 약화시키고 웨스턴 블롯팅에 의해 사이토크롬 C를 방출시킴을 나타내었다. 더욱이 카스파제-3 및 -9의 저해제는 DMNQ-S17 유도된 아포토시스를 차단하였다. 따라서 이들 발견은 DMNQ-S17이 인간 골수 백혈병에서 미토콘드리아 의존적 아포토시스를 유발하는 구성적 NF- κ B 활성화의 억제에 의해 인간 골수 백혈병에 대한 유효한 항암 후보물질이 될 수 있음을 나타낸다.
- [0040] 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0041] 화학물질 및 시약
- [0042] DMNQ-S17는 한국 대전 충남대학교 약학과에서 합성되었다(식 I). DMNQ-S17은 디메틸설폭시화물(DMSO)에 용해되었다. RPMI 1640 배지 및 항생제-항진균제는 GIBCO(Grand island, NY)에서 구입하였다. 우태아혈청(FB

S)는 JRH(Lenexa, KS)에서 구입하였다. XTT(2,3-비스 [2-메톡시-4-니트로-5-설포페닐]-2H-테트라졸륨-5-카복사닐리드), 프로피디움 요오드화물(PI), N-메틸디벤조-피라진 메틸 설페이트(PMS), RNase A, 프로테아제 K, 우혈청 알부민(BSA) 및 폴리-L-리신은 Sigma chemical Co.(St. Louis, MO)에서 구입하였다. Dead EndTM 형광 측정 TUNEL(TdT-매개-dUTP 틸-말단 표지) 에세이 키트 및 루시페라제 에세이 시스템은 Promega(Madison, WI)에서 구입하고, 4',6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI)은 Vector(Vector Lab., CA)에서 구입하고, 프로테아제 저해제 콕테일은 Boehringer Mannheim(Indianapolis, IN)에서 구입하였으며 DC 단백질 에세이 키트 II는 Bio-Rad(Hercules, CA)에서 구입하였다. 마우스 항-인간 사이토크롬 C 및 마우스 항-인간 PARP는 PharMingen(San Diego, CA)에서 구입하였다. 염소 항-인간 카스파제 3은 Santa Cruz(La Jolla, CA)에서 구입하였다. 토끼 항-인간 분열 카스파제-3은 Cell Signaling Technology(Beverly, MA)에서 구입하였다. 마우스 항-인간 β -액틴은 Sigma chemical Co.에서 구입하였다. 염소 항-마우스 IgG HRP 컨쥬게이트된 2차 항체는 Zymed(San Francisco, CA)에서 구입하였고, 염소 항-토끼 IgG HRP 컨쥬게이트된 2차 항체는 Pierce (Rockford, IL)에서 구입하였다. 4x NuPAGE LDS 표본 완충액, 4-12 % NuPAGE Bis-Tris 겔 및 NuPAGE MES SDS 이동 완충액은 Invitrogen(Carlsbad, CA)에서 구입하였다. Hybond 강화 화학발광(ECL) 이동 멤브레인 및 ECL 웨스턴 블롯팅 검출 키트는 Amercham Pharmacia(Arlington Heights, IL)에서 구입하였다. X 선 필름은 Agfa-Gevaert(CP-BU, N. V., Belgium)에서 구입하였다. 테트라메틸로다민(tetramethylrhodamine, TMRE)은 Molecular Probe에서 구입하였다.

[0043] 세포 배양

[0044] 인간 골수 단핵구 백혈병 U937 세포(ATCC, CRL-1593.2) 및 인간 전립선암 PC3 세포는 미국 유전자 은행에서 획득되었다. 세포는 5% CO₂를 함유한 가습 대기 내 37℃에서 10% 열-불활성화 FBS, 25 mM HEPES 완충액, 100 유닛/ml 항생제-항진균제 및 2 g/L 중탄산나트륨으로 보충된 RPMI 1640 내에서 배양되었다.

[0045] (실시예 1) 세포독성 분석

[0046] DMNQ-S17의 세포독성은 XTT 비색 분석에 의해 측정되었다. 세포는 다양한 농도의 DMNQ-S17(0, 1, 2, 4, 8 및 16 μ M)를 지닌 무혈청 RPMI 1640 배지 100 μ l 내에 웰 당 2×10^4 세포의 밀도로 96-웰 미량 역가판 상에 분주되었다. XTT 작용 용액은 1 ml의 XTT 원액(PBS 내 1 mg/ml)과 10 μ l의 PMS(PBS 내 1.53 mg/ml)를 혼합함으로써 배양 적용 직전에 제조되었다. 37℃의 가습 인큐베이트 내에서 24시간 및 48시간 동안 인큐베이션 후 50 μ l의 XTT 작용 용액이 각 웰에 첨가되었다. 세포는 37℃에서 2시간 동안 인큐베이트되었고 459 nm에서 미량 역가판 판독기(Sunrise, TECAN)를 이용하여 흡광도가 측정되었다. 세포 생존력은 하기 방정식에 의해 PBS-처리 대조군 대비 DMNQ-S17-처리군 내 생존 세포의 백분율로 계산되었다. 세포 생존력(%) = [OD(DMNQ-S17)-OD(블랭크) / OD(대조군)-OD(블랭크)] $\times$ 100

[0047] (실시예 2) 일시적 트랜스펙션 및 루시페라제 분석

[0048] 트랜스펙션 및 루시페라제 분석은 Yamaki, A. et al., Biochem Biophys Res Commun 313(3):482-488, 2004에서 기술된 바와 같이 수행되었다. U937 세포는 제조사의 지침에 따라 Eugene 6 트랜스펙션 시약(Roche, 스위스) 및 NF- κ B-Luc 수용체 플라스미드(BD Biosciences, San Jose, CA)를 이용하여 트랜스펙트되었다. 트랜스펙션 후 세포는 12-웰 플레이트(4×10^5 세포/ml) 내에 분주되고 DMNQ-S17(2 및 4 μ M)로 처리되었다. 24시간 동안 인큐베이션 후 세포는 용해되고 루시페라제 활성이 Promega 루시페라제 에세이 시스템을 이용하여 측정되었다.

[0049] (실시예 3) 전기영동 이동 변화 분석

[0050] U937 세포는 100-mm 디쉬(4×10^5 세포/ml) 내에 도말되었다. 세포는 24시간 동안 DMNQ-S17(2, 4 μ M)으로 처리되었고 원심분리에 의해 펠렛화되었다. 세포핵 추출물은 Won, J.H. et al., Br J Pharmacol 148(2):216-225, 2006에 기술된 바와 같이 준비되었다. 세포 펠렛은 저장성 완충액(10 mM HEPES, pH 7.9, 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM KCl, 0.2 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 10 μ g/ml 아프로티닌) 내에 재현탁되고 15분간 얼음 위에서 인큐베이트되었다. 세포는 0.1% Nonidet P-40의 첨가에 의해 용해되었고 10초간 강하게 진탕되었다. 세포핵은 4°C에서 1분간 $12,000 \times g$ 에서 원심분리에 의해 펠렛화되었고 고염도 완충액(20 mM HEPES, pH 7.9, 25% 글리세롤, 400 mM KCl, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 1 mM NaF, 1 mM 소듐 오르토바나테이트) 내에 재현탁되었다.

세포핵 추출물 10 μ g은 이중-나선 NF- κ B 올리고뉴클레오타이드인 [γ - 32 P] dATP에 의해 말단 표지된 5'-AGTTGAGGGGACTTTCAGGC-3'(서열번호: 1)(밑줄은 κ B 공통 서열 또는 NF- κ B/cRel 동종이합체 및 이형이합체 복합체에 대한 결합 사이트를 나타냄)과 혼합되었다. 결합 반응은 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 4% 글리세롤, 1 μ g의 폴리(dI-dC) 및 1 mM DTT를 포함한 반응 완충액 30 μ l 내에서 37°C로 30분간 수행되었다. DNA-단백질 복합체는 0.5 $\times$ TBE 완충액 내에서 100 V로 고유 5% 폴리아크릴아미드 겔 상에서 비결합 DNA 프로브로부터 분리되었다. 겔은 80°C에서 1시간 동안 진공으로 건조되었고 24시간 동안 -70°C에서 X-선 필름에 노출되었다.

[0051] (실시예 4) 미토콘드리아 막전위의 측정

[0052] 미토콘드리아 막전위는 Mancini, M. et al., Ann Surg Oncol 5(3):287-295, 1998에서 기술된 바와 같이 측정되었다. DMNQ-S17로 처리된 U937 세포는 37°C에서 24시간 동안 인큐베이트되고 채취되었다. 차가운 PBS로 2회 세척 후 펠렛은 1 ml의 150 μ M TMRE 내에 재현탁되고 유세포 측정(FACSCalibur, BD)에 의해 분석되었다.

[0053] (실시예 5) 사이토크롬 C 면역블롯

[0054] 세포질 분획은 Lim, E.S. et al., Ann N Y Acad Sci 1095:7-18, 2007에 기술된 바와 같이 준비되었다. DMNQ-S17로 처리된 U937 세포(6×10^6)가 채취되고 차가운 PBS로 세척되었다. 세포 펠렛은 얼음 위에서 20분간 40 μ l의 용해 완충액(20 mM HEPES/NaOH, pH 7.5, 250 mM 슈크로스, 10 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 프로테아제 저해제 콕테일) 내에서 용해되었다. 이는 22-게이지 바늘을 통한 10회 통과에 의해 균질화되었다. 균질액은 4°C에서 30분간 $25,000 \times g$ 에서 원심분리되었고 상청액 내 단백질 함량은 Bio-Rad DC 단백질 에세이 키트 II를 이용하여 측정되었다. 25 μ g의 단백질을 포함한 용해질은 사이토크롬 C에 대해 웨스턴 블롯팅에 의해 분석되었다(1:1000 희석).

[0055] (실시예 6) 웨스턴 블롯팅

[0056] DMNQ-S17으로 처리된 U937 세포(2×10^6)가 채취되고 차가운 PBS로 세척되었다. 세포 펠렛은 얼음 위에서 30분간 30 μ l의 용해 완충액(50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.1 % SDS, 1 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF, 프로테아제 저해제 콕테일) 내에서 용해되었다. 용해질은 4°C에서 20분간 $13,000 \times g$ 에서 원심분리되었고 상청액 내 단백질 함량은 Bio-Rad DC 단백질 에세이 키트 II를 이용하여 측정되었다. 20 μ g의 전체 단백질을 포함한 용해질은 1x NuPAGE MES SDS 이동 완충액으로 4-12% NuPAGE Bis-Tris 겔 상에서 분리된 후 2시간 동안 300 mA에서 이동 완충액(25 mM Tris, 250 mM 글리신, 20% 메탄올)으로 Hybond ECL 이동 멤브레인 상에 전기이동(electrotransfer)되었다. 멤브레인은 실온에서 2시간 동안 0.1% Tween 20을 함유한

TBS 완충액(TBST) 내의 5% 탈지분유로 차단되었다. 멤브레인은 4℃에서 밤새 1차 항체로 면역블롯되었고 실온에서 2시간 동안 2차 항체와 인큐베이트되었다. 단백질은 ECL 웨스턴 블롯팅 검출 키트를 이용하여 전개되었고 X 선 필름에 노출되었다. 단백질 함량은 β-액틴으로 동일한 멤브레인을 프로브함으로서 표준화되었다.

[0057] (실시예 7) 세포 주기 분석

[0058] 아포토시스를 측정하기 위해 세포 주기 분석이 Herrmann, M. Nucleic Acids Res 22(24):5506-5507, 1994에 기술된 바와 같이 수행되었다. DMNQ-S17로 처리된 U937 세포(1×10^6)가 채취되었고 차가운 PBS로 2회 세척되고 -20℃에서 75% 에탄올로 고정되었다. 고정된 세포는 10 μl의 RNase A(10 mg/ml)를 함유한 100 μl PBS 내에 재현탁되고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이트되었다. 세포는 암조건으로 실온에서 30분간 400 μl 요오드화프로피디움(50 μl/ml)을 첨가함으로서 염색되었다. 염색된 세포의 DNA 함량은 FACSCalibur(Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) 유세포 측정으로 CellQuest 소프트웨어를 이용하여 분석되었다.

[0059] (실시예 8) DAPI 염색

[0060] DMNQ-S17에 의한 형태 변화는 DAPI 염색에 의해 측정되었다. 4 μM DMNQ-S17로 처리 후 세포는 폴리-L-리신 코팅된 슬라이드 상에 분주되고 4℃에서 25분간 4% 무-메탄올 포르말데하이드 용액을 이용하여 고정되었다. 슬라이드는 PBS로 2회 세척되었다. DAPI를 지닌 봉입체는 슬라이드의 전체 절편 위에 분산되었다. 봉입된 슬라이드는 광 없이 4℃에서 보관되었다. 각각의 슬라이드는 Axio 비전 4.0 형광 현미경(Carl Zeiss Inc., USA) 하에서 관찰되었다.

[0061] (실시예 9) 형광 현미경 및 유세포 측정에 의한 TUNEL 에세이

[0062] 개별적 아포토시스성 세포 사멸의 형태는 제조사에 의해 기술된 바와 같이 DeadEnd™ 형광측정 TUNEL 에세이 키트를 이용하여 관찰되었다. 24시간 동안 4 μM DMNQ-S17로 처리된 U937 세포가 채취되고 차가운 PBS로 세척되었다. 세포는 실온에서 10분간 100 μl의 평형 완충액으로 평형되었다. 평형 완충액의 제거 후 세포는 플루오레세인-12-dUTP를 함유한 50 μl TdT 효소 완충액에 의해 첨가되고, 플라스틱 커버슬립으로 커버되고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이트되었다. PBS로 세척된 세포는 암조건으로 15분간 PBS 내에서 1 μg/ml로 희석된 PI 용액으로 염색되었다. 탈이온수로 세척 후 슬라이드는 PBS 내 30% 글리세롤 내에 봉입되고 620 nm에서 적색 형광 PI 염색을 지닌 표준 플루오레세인 필터를 이용하여 Axio 비전 4.0 형광 현미경(Carl Zeiss, Inc., USA) 하에서 관찰되었다.

[0063] 유세포 측정 분석은 제조사에 의해 기술된 바와 같이 원위치 세포 사멸 검출 시약(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany)을 이용하여 수행되었다. 간단하게는 U937 세포(1×10^6)는 37℃에서 24시간 동안 DMNQ-S17(1, 2 및 4 μM)로 처리되고 37℃에서 60분간 반응 혼합물과 함께 인큐베이트되었다. 염색된 세포는 유세포 측정(FACSCalibur, BD Biosciences)에 의해 분석되었다.

도면의 간단한 설명

[0064] 도 1은 DMNQ-S17이 U937 세포에 대해 세포독성을 나타냄을 나타낸다. 도 1(A)는 농도 의존적 방식으로 U937 및 RAW 264.7 세포 상에 DMNQ-S17의 세포독성 효과를 나타낸다. 도 1(B)는 시간- 및 용량-의존적 방식으로 U937 세포 상에 DMNQ-S17의 세포독성 효과를 나타낸다. U937 세포는 다양한 농도의 DMNQ-S17로 24시간 또는 48시간 동안 처리되었고 세포 생존력은 XTT 에세이에 의해 측정되었다. 모든 데이터는 평균±S.D로 표기되었다.

[0065] 도 2는 DMNQ-S17이 구성적 NF-κB 활성화 및 그의 전사 활성을 저해함을 나타낸다. U937 세포는 표시된 농도

의 DMNQ-S17로 24시간 동안 처리되었다. 도 2(A)는 세포가 채취되고 용해질 내 수용체 활성이 루시페라제 에세이에 의해 측정되었음을 나타낸다. 도 2(B)는 EMSA가 세포핵 단백질 추출물로 수행되었음을 나타낸다. 모든 데이터는 평균±S.D로 표기되었다. 대조군과 DMNQ-S17 처리군 간의 통계적으로 유의적인 차이는 Student t 테스트에 의해 계산되었다. #, 대조군과 비교시 $p<0.05$, **, 대조군과 비교시 $p<0.01$

[0066]

도 3은 DMNQ-S17이 U937 세포에서 미토콘드리아 막전위를 약화시키고 사이토크롬 C를 방출시킴을 나타낸다. 도 3(A)는 DMNQ-S17이 미토콘드리아 막전위를 약화시킴을 나타낸다. 세포는 다양한 농도의 DMNQ-S17로 24시간 동안 처리되었다. PBS로 세척 후 세포는 37℃에서 30분간 TMRE 용액(150 nM)을 첨가함으로써 염색되었고 유세포 측정에 의해 분석되었다. 도 3(B)는 미토콘드리아로부터 사이토크롬 C 방출을 유도함을 나타낸다. 20 μ g의 전체 단백질을 포함한 세포 용해질은 4-12 % NuPAGE Bis-Tris 겔 상에서 분리되고 Hybond ECL 이동 멤브레인 으로 옮겨지고 사이토크롬 C로 프로브되었다. 단백질은 ECL 웨스턴 블롯팅 검출 키트를 이용하여 전개되었고 X-선 필름에 노출되었다. 단백질 함량은 β -액틴에 의해 표준화되었다.

[0067]

도 4는 카스파제-3 및 -9의 저해제가 U937 세포에서 DMNQ-S17 유도된 카스파제-3 활성화 및 PARP 분열을 차단함을 나타낸다. 도 4(A)는 DMNQ-S17이 U937 세포에서 카스파제-3 활성화 및 PARP 분열을 유도함을 나타낸다. U937 세포는 다양한 농도의 DMNQ-S17로 24시간 동안 처리되었다. 20 μ g의 전체 단백질을 포함한 세포 용해질은 4-12 % NuPAGE Bis-Tris 겔 상에서 분리되고 Hybond ECL 이동 멤브레인 으로 옮겨지고 카스파제-3 및 PARP로 프로브되었다. 단백질은 ECL 웨스턴 블롯팅 검출 키트를 이용하여 전개되었고 X-선 필름에 노출되었다. 단백질 함량은 β -액틴으로 동일한 멤브레인을 프로브함으로써 표준화되었다. 도 4(B)는 카스파제-3 및 -9의 저해제는 U937 세포에서 DMNQ-S17 유도된 카스파제-3 활성화 및 PARP 분열을 차단함을 나타낸다. 카스파제-3, 분열된 카스파제-3, PARP 및 β -액틴의 발현은 웨스턴 블롯팅에 의해 평가되었다. U937 세포는 50 μ M의 카스파제-9 및/또는 카스파제-3 저해제로 2시간 동안 예비-인큐베이트되었고 4 μ M의 DMNQ-S17로 24시간 동안 처리되었다. 30 μ g의 전체 단백질을 포함한 세포 용해질은 4-12 % NuPAGE Bis-Tris 겔 상에서 분리되고 Hybond ECL 이동 멤브레인 으로 옮겨지고 카스파제-3, 분열된 카스파제-3, PARP 및 β -액틴으로 프로브되었다. 단백질은 ECL 웨스턴 블롯팅 검출 키트를 이용하여 전개되었고 X-선 필름에 노출되었다. 단백질 함량은 β -액틴 항체로 동일한 멤브레인을 프로브함으로써 표준화되었다.

[0068]

도 5는 DMNQ-S17 처리된 U937 세포에서 관찰되는 아포토시스 형태 특징을 나타낸다. U937 세포는 4 μ M DMNQ-S17로 24시간 동안 처리되었다. 도 5(A)는 저배율($\times 200$)에서 DMNQ-S17 처리된 U937 세포의 형태를 나타낸다. 도 5(B)는 DAPI 염색($\times 630$)을 나타낸다. 도 5(C)는 TUNEL 에세이($\times 630$)를 나타낸다. 화살표는 아포토시스 소체를 나타낸다.

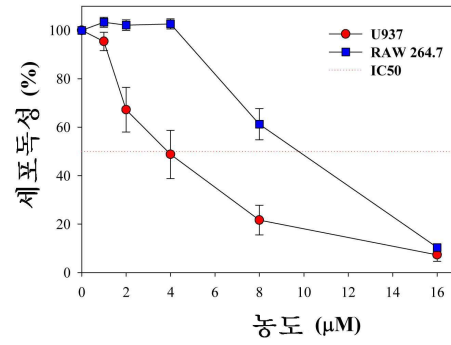
[0069]

도 6은 DMNQ-S17이 U937 세포에서 서브-G₁ DNA 함량 및 TUNEL 양성 세포를 증가시킴을 나타낸다. 도 6(A)는 U937 세포가 다양한 농도의 DMNQ-S17(1, 2 및 4 μ M)로 24시간 동안 처리됨을 나타낸다. 75% 에탄올 내에서 고정 후 세포는 PI로 염색되고 서브-G₁ DNA 함량은 유세포 측정에 의해 분석되었다. 도 6(B)는 DMNQ-S17 처리된 U937 세포 내 서브-G₁ DNA 함량에 대한 막대그래프이다. *, 미처리군과 비교시 $p<0.05$. 도 6(C)는 유세포 측정에 의한 TUNEL 양성 막대그래프를 나타낸다. 세포는 TdT-매개 dUTP 틸 말단 표지(TUNEL)로 표지되고 유세포 측정에 의해 분석되었다. 도 6(D)는 DMNQ-S17 처리된 U937 세포 내 TUNEL 양성 세포군의 막대그래프이다. 모든 데이터는 평균±S.D로 표기되었다. 대조군과 DMNQ-S17 처리군 간의 통계적으로 유의적인 차이는 Student t 테스트에 의해 계산되었다. **, 대조군과 비교시 $p<0.01$

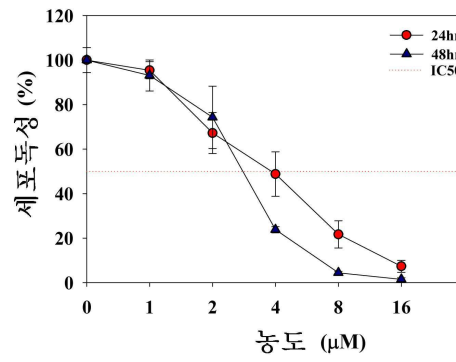
도면

도면1

(A)

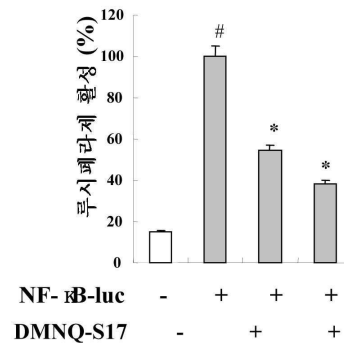


(B)

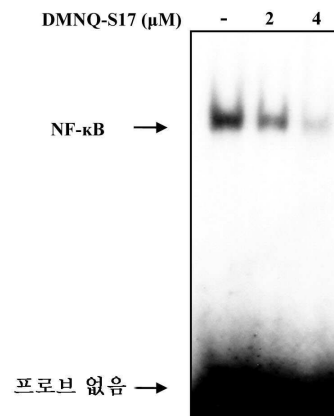


도면2

(A)

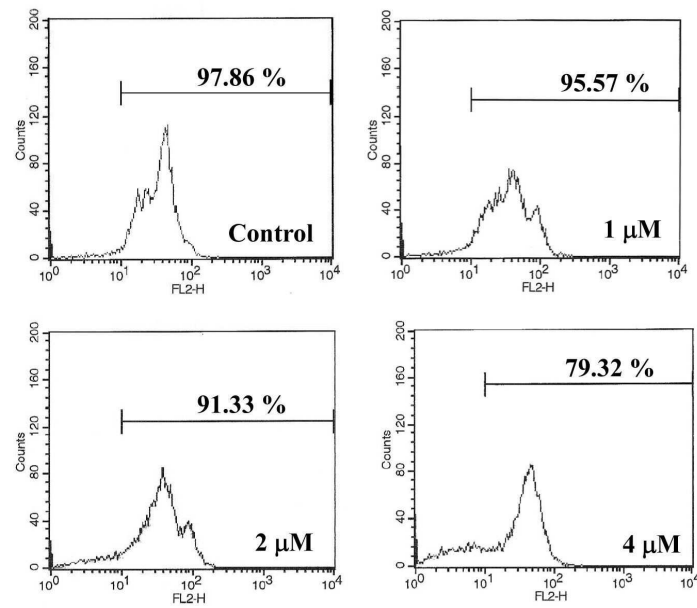


(B)

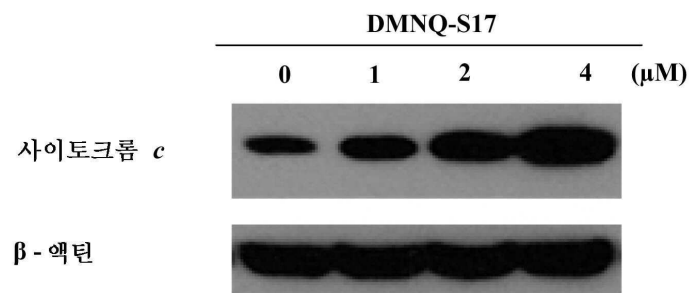


도면3

(A)

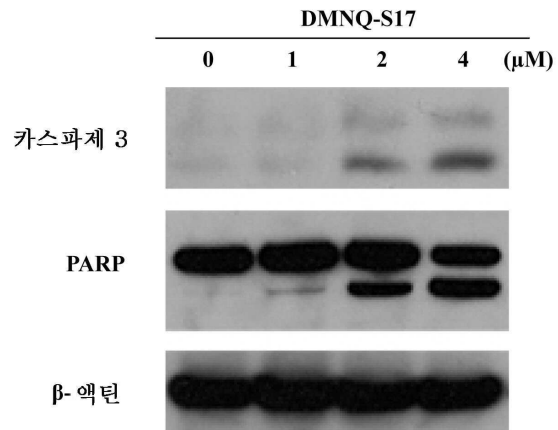


(B)

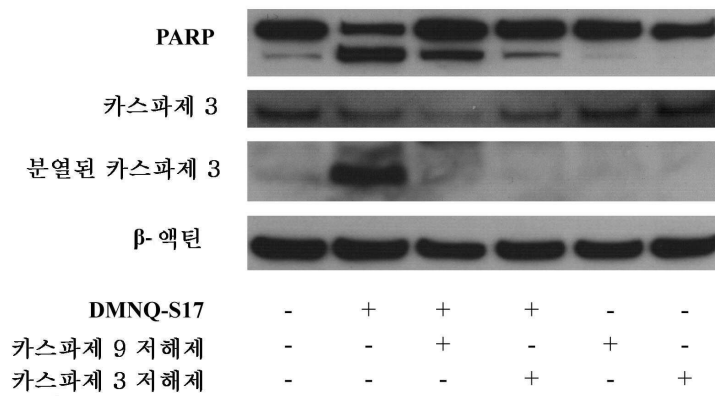


도면4

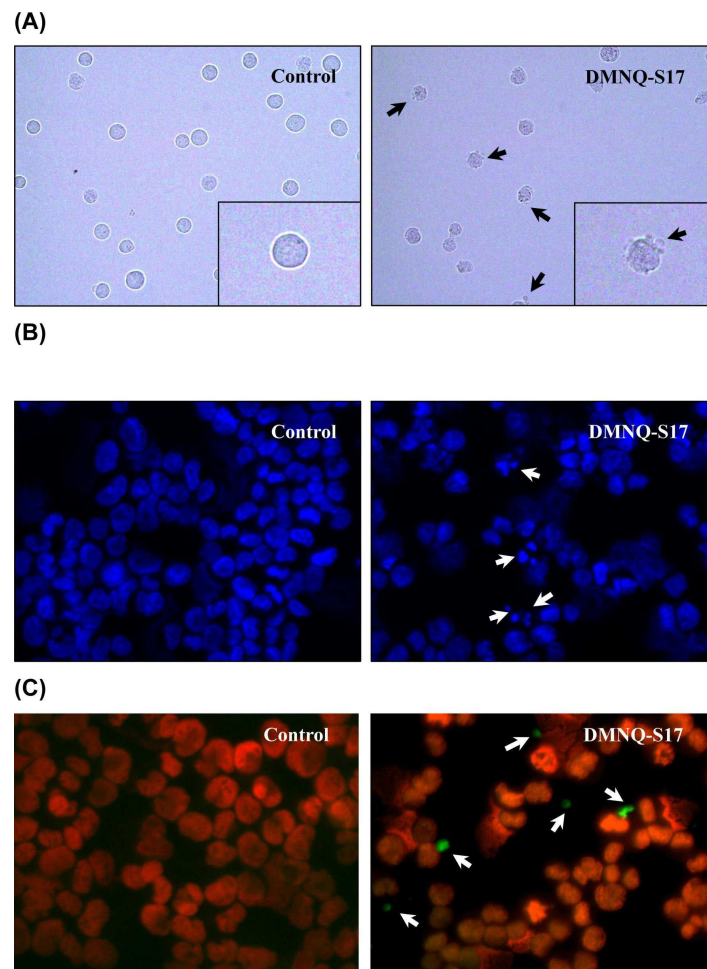
(A)



(B)

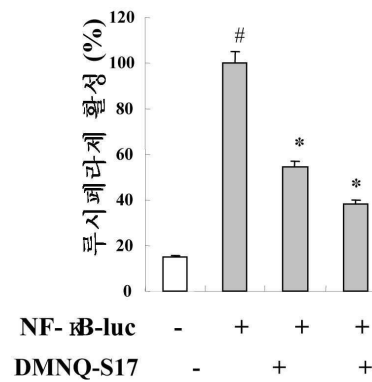


도면5

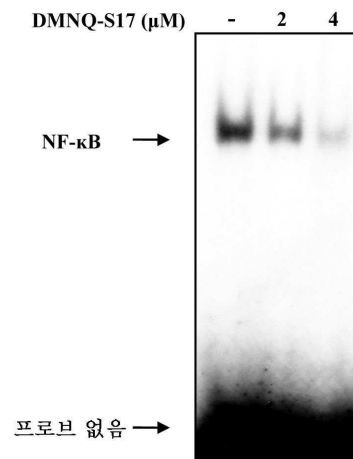


도면6

(A)



(B)



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Naphthazarin derivative inducing apoptosis in human myeloid leukemia cell line
- <160> 1
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>

<223> oligonucleotide

<400> 1
agttgagggg actttccag gc

22