

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0016812

(43) 공개일자 2024년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/517 (2006.01) A61P 39/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/517 (2013.01)

A61P 39/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2022-0095033

(22) 출원일자 2022년07월29일

심사청구일자 2022년07월29일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)

고려대학교 세종산학협력단

세종특별자치시 조치원읍 세종로 2511 (고려대학교세종캠퍼스내)

(72) 발명자

이윤행

서울특별시 동작구 여의대방로44길 10, 111동 801호

국명옥

인천광역시 계양구 임학서로42번길 3, 401호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

차준용

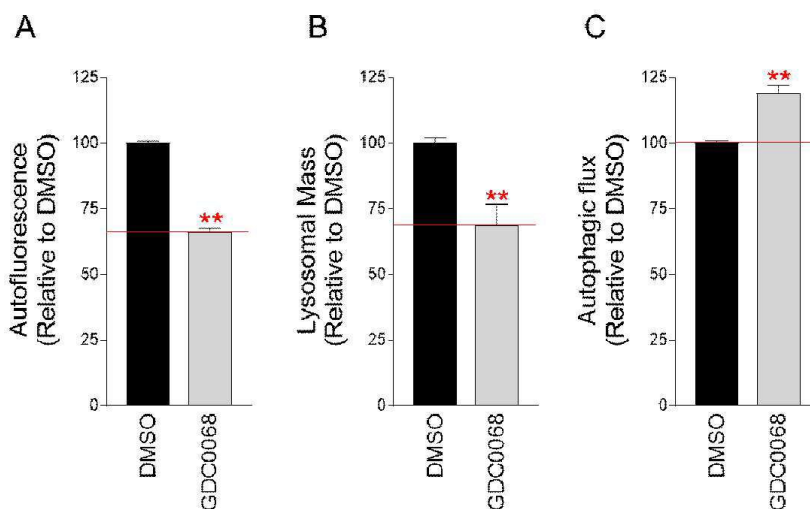
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 AKT 저해제를 포함하는 미토파지 활성화 방법

(57) 요약

본 발명의 일실시예는 AKT 저해제를 포함하는 미토파지 활성화 방법을 제공한다. 구체적으로 AKT 저해제로서 이파타선티브(Ipatasertib)이 리포푸신이 축적된 리소좀 기능을 회복시킬 수 있고, 이는 노화된 세포에서 기능이 저하된 미토콘드리아를 제거하는 미토파지(mitophagy) 기능을 활성화시킬 수 있다. 또한, 상기 이파타선티브는 노화된 세포에서 미토콘드리아의 막 전위(MMP)를 증가시킬 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 43/00 (2018.01)

(72) 발명자

박준태

인천광역시 연수구 해송로 143, 101동 703호

권형욱

서울특별시 서초구 효령로4길 56-16, 201호

변영주

대전광역시 유성구 엑스포로 448, 206동 408호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345335798
과제번호	2018R1D1A1B07040293
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	2018년도 이공학개인지초연구(기본 지역)
연구과제명	자가포식작용 매개 대사과정 조절을 통한 노화 제어
기 여 율	0.35/1
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415180937
과제번호	20019181
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	산업기술알키미스트프로젝트
연구과제명	세포 에너지 대사 조절을 통한 노화 제어
기 여 율	0.35/1
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2029.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345351426
과제번호	2020R1A6A1A03041954
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	대학중점연구소지원사업
연구과제명	융복합기반기술을 이용한 감염병 매개곤충 제어 플랫폼 구축
기 여 율	0.3/1
과제수행기관명	인천대학교 산학협력단
연구기간	2020.05.01 ~ 2023.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

시험관(in vitro)에서 기능이 저하된 미토콘드리아를 함유하는 세포에 이파타선티브(Ipatasertib)을 처리하는 단계를 포함하는 미토파지 활성화 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 이파타선티브는 기능이 저하된 리소좀을 감소시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 리소좀은 리포푸신(lipofuscin)이 축적되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 이파타선티브는 미토콘드리아에서 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)동안 최대 호흡(maximal respiration)을 활성화시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 이파타선티브는 미토콘드리아 막 전위를 증가시키는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 AKT 저해제를 포함하는 미토파지 활성화 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 AKT 저해제인 이파타선티브(Ipatasertib)을 포함하는 미토파지 활성화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

노화에 관한 연구는 과거로부터 현재에 이르기까지 지속되고 있다. 이는 노화가 질병을 일으킬 수 있는 질병 유발인자 중 하나이기 때문이다. 세포분열이 정지된 상태가 영구적으로 지속되는 단계를 세포의 노화로 규정하며, 이는 근본적인 노화의 기작으로서 암, 동맥경화 및 퇴행성관절염과 같은 노화에 따른 질병들을 유발하는 원인으로 조명되고 있다. 노화에 대한 연구 초기 생물학자들은 생체조직의 노화는 더 이상 분화하지 않는 세포들에 의한 주변세포들의 복구 기작의 억제에 의한 것이라 추측하였다. 더 이상 분화하지 않는 세포란 현재는 노화세포(senescent cells; SNC)라 불리며, 노화세포는 손상된 세포조직의 복구에 참여하지 않을 뿐만 아니라, 노화세포

에서 분비되는 물질들에 의한 염증세포의 이동, 세포외부환경(extracellular matrix)의 재구성, 원치 않는 세포 사멸 및 섬유증(fibrosis) 등을 유발한다고 알려져 있다. 이러한 노화세포는 노화에 따라 자연스럽게 축적되며, 이는 세포조직의 손상을 누적시키게 된다.

[0004] 현재 연구되는 기술들은 노화세포를 선택적으로 제거할 수 있으며, 이는 수많은 노화 관련 질환을 예방하고 치료하는 방법을 개발하는 데 있어 많은 가능성을 제공하게 되었다. 치료법을 크게 나누어 보면 senolysis, 면역력을 통한 노화세포의 제거 그리고 SASP의 무력화 등이 있다. 이 중에서 노화세포의 영구적인 제거는 SASP의 지속적인 감소를 유도할 뿐만 아니라 만일 노화세포가 살아남아 야기할 수 있는 암 생성의 위험성 또한 감소시킬 수 있다. 하지만, 이러한 기술들을 적용하기에 앞서 고려해야 될 사항들이 있다. 우선, 어떤 세포로부터 어떤 방법으로 노화세포를 유도하여 어떤 질병모델에 적용해야 할지 고려해야 한다. 그리고 실제 마우스 실험에 적용 시에 스트레스를 주거나, 수술을 통해 노화세포를 유도하거나 또는 나이 든 마우스를 이용하기도 하는데, 이중 어떤 방법으로 유도해야 할지도 중요할 것이다. 무엇보다도 특정 질병에 적절한 치료법을 잘 찾아야 한다. 이를 찾기 위해서는 여러 조건이 맞아야 하는데, 그 질병과 노화세포의 관계가 명확히 밝혀져야 하며, 기작도 잘 알려져 있어야 한다. 따라서, 노화 기작에 대한 연구를 통해 노화를 억제시킬 수 있는 기술이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 노화 억제를 위해 AKT 저해제를 이용하여 미토파지를 활성화하는 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여, 본 발명의 일실시예는 시험관(in vitro)에서 기능이 저하된 미토콘드리아를 함유하는 세포에 이파타선티브(Ipatasertib)을 처리하는 단계를 포함하는 미토파지 활성화 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 이파타선티브는 기능이 저하된 리소솜을 감소시킬 수 있다.

[0011] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 리소솜은 리포푸신(lipofuscin)이 축적되어 있을 수 있다.

[0012] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 이파타선티브는 미토콘드리아에서 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)동안 최대 호흡(maximal respiration)을 활성화시킬 수 있다.

[0013] 본 발명의 실시예에 있어서, 상기 이파타선티브는 미토콘드리아 막 전위를 증가시킬 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 실시예에 따르면, 노화된 세포에 있는 기능 이상 미토콘드리아를 제거함으로써 노화된 세포를 회복시킬 수 있다.

[0016] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 특허청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 AKT 억제에 의한 노화 제어를 할 수 있는 후보 약물들을 찾기 위한 화학적 스크리닝 그림이다. 세포 수를 측정하기 위한 DNA 양 기반 방법이다. 1.4배 이상의 세포 증식을 증가시킨 억제제로서 정의된 잠재적 후보는

붉은 화살표 머리로 표시되었다(Means $\pm$ S.D., N = 3).

도 2는 ATK 억제제가 리소좀 기능 회복을 보여주는 그림이다. (A)는 자가형광에 대한 유세포 분석을 보여준다(**P < 0.01, Student's t-test; Mean $\pm$ S.D., N = 3). (B)는 LysoTracker Green을 사용해서 리소좀 질량에 대한 유세포 분석을 보여준다(**P < 0.01, Student's t-test; Mean $\pm$ S.D., N = 3). (C)는 Cyto-ID를 사용해서 자가포식 흐름(autophagic flux)에 대한 유세포 분석을 보여준다(**P < 0.01, Student's t-test; Mean $\pm$ S.D., N = 3).

도 3은 AKT 억제제로 매개된 미토파지 활성화에 의한 기능 저하 미토콘드리아의 제거를 보여주는 그림이다. (A)는 LC3B(녹색) 및 미토콘드리아(붉은색)의 형광염색을 보여준다(Scale bar 10 μ m). 미토파지는 흰색 화살표로 표시되었다. (B)는 MitoTracker Green를 사용해서 미토콘드리아 질량에 대한 유세포 분석을 보여준다(**P < 0.01, Student's t-test; Mean $\pm$ S.D., N = 3). (C)는 CQ 처리후 LC3B(녹색) 및 미토콘드리아(붉은색)의 형광염색을 보여준다(Scale bar 10 μ m). 미토파지는 흰색 화살표로 표시되었다.

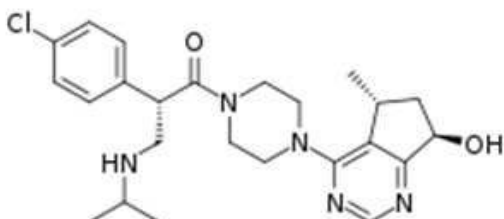
도 4는 AKT 억제제는 미토콘드리아 기능 회복을 유도하는 걸 보여주는 그림이다. (A)는 JC-10을 사용해서 MMP에 대한 유세포 분석을 보여준다(**P < 0.01, Student's t-test; Mean $\pm$ S.D., N = 3). (B) 및 (C)는 DHR123 (B) 및 MitoSOX (C)를 사용해서 미토콘드리아 ROS에 대한 유세포 분석을 보여준다(**P < 0.01, Student's t-test; Mean $\pm$ S.D., N = 3).

도 5는 AKT 억제제가 OXPHOS 효율을 증가시킴으로써 미토콘드리아 기능을 제어하는 것을 보여주는 그림이다. OCR (검은선: DMSO 처리된 노화 섬유아세포, 붉은선: GDC0068 처리된 노화 섬유아세포)에 대한 측정이다(**P < 0.01, two-way ANOVA followed by Bonferroni's post test). Means $\pm$ S.D., N = 3.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 그리고 도면에서 본 발명을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0020] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결(접속, 접촉, 결합)"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우 뿐만 아니라, 그 중간에 다른 부재를 사이에 두고 "간접적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다. 또한 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0021] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0022] 본 발명의 일측면에 따르면, 본 발명은 시험관(in vitro)에서 기능이 저하된 미토콘드리아를 함유하는 세포에 이파타셀티브(Ipatasertib)을 처리하는 단계를 포함하는 미토파지 활성화 방법을 제공한다.
- [0023] 상기 이파타셀티브(Ipatasertib 또는 GDC0068; Cas No.: 1001264-89-6)은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 말한다.

화학식 1



[0024]

- [0025] 상기 이파타선틱은 구강을 통해 작용할 수 있는 잠재적 항신생물제(antineoplastic) 활성 가지고 있는 세린/트레오닌 단백질 키나제 AKT(protein kinase B)의 억제제이다.
- [0026] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 이파타선틱은 노화된 세포에서 기능이 저해되어 리포푸신(lipofuscin)이 축적된 리소좀의 기능을 회복시킬 수 있다. 상기 리포푸신은 간, 뇌 등에 축적되는 불용해성의 황갈색 과립성 세포내 물질을 의미하고, 본 발명에서 리소좀 내에서 점차적으로 축적되는 자가형광 물질이다. 리포푸신이 축적된 리소솜은 새롭게 생산되는 가수분해효소의 싱크(sink)로서 작용할 수 있고, 결과적으로 리소좀의 질량을 증가시킬 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 이파타선틱은 리소좀 기능을 회복시킴으로써 기능이 저하된 미토콘드리아 제거를 촉진시킬 수 있고, 이는 미토파지(mitophagy)를 촉진시킬 수 있다는 의미가 될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 이파타선틱으로 인한 리소좀 기능의 회복은 오토파지 활성을 촉진할 수 있고, 노화된 세포내 기능이 저하된 미토콘드리아에서 산화적 인산화(oxidative phosphorylation)동안 최대 호흡(maximal respiration)을 활성화시킬 수 있다. 게다가, 상기 이파타선틱은 노화된 세포내 기능이 저하된 미토콘드리아의 막 전위를 증가시킬 수 있다.
- [0030] 이하 첨부된 도면을 참고하여 본 발명의 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

[0032] 실시예1. 약물 스크리닝

- [0033] 웰(well)당 2000개 세포의 밀도로, 노화된 섬유아세포들이 96 웰 플레이트들에 시딩(seeding)되었다. 4일마다, AKT 억제제 라이브러리(Selleck Chem, Houston, TX, USA)로부터 얻은 조성물들이 최종 0.5 μ M 농도로 희석된 후에 각 웰들에 추가되었다. AKT 억제제 라이브러리는 GDC0068 (S2808, Selleck Chem), AZD5363 (S8019, Selleck Chem), GSK690693 (S1113, Selleck Chem), PF-04691502 (S2743, Selleck Chem), TIC10 (S7963, Selleck Chem), Triciribine (S1117, Selleck Chem), Honokiol (S2310, Selleck Chem), PHT-427 (S1556, Selleck Chem), AT7867 (S1558, Selleck Chem), A-674563 (S2670, Selleck Chem) and MK-2206 2HCl (S1078, Selleck Chem), and CCT128930 (S2635, Selleck Chem)를 포함했다.

[0035] 실시예2. 세포 배양

- [0036] 본 발명에서 인간 이배체 섬유아세포(PCS-201-010; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)가 사용되었다. 세포들은 종래 기술과 같이 배양되었다. 배양 배지에서 GDC0068 및 DMSO (D8148; Sigma, St. Louis, MO, USA)의 최종 농도는 각각 0.5 μ M 및 1.4 mM였다. 기능 검사(functional assay)를 수행하기 위해서, 세포들은 21일동안 GDC0068 또는 DMSO로 처리되었다.

[0038] 실시예3. 세포 리포푸신 수준에 대한 유세포 분석

- [0039] 비포화 지방산들은 대부분 단백질에 결합되고 과산화(oxidized)되어 리포푸신(lipofuscin)을 형성한다. 카보닐기와 아미노 분자간의 상호작용으로 인해 생성된 Schiff base때문에 리포푸신은 자가형광을 보여준다. 자가형광 측정은 리포푸신 정량화를 위해 널리 사용되는 방법들의 기본이 된다((Cho and Hwang, 2011; Jensen et al., 2016; Jung et al., 2010; Moore et al., 1995)). 자가형광을 정량화하기 위해서, 유세포 분석에서 FITC setup (488 nm에서의 excitation으로 530/30 nm bandpass filter)가 사용되었다. 결과는 Cell Quest 3.2 (Becton Dickinson) 소프트웨어를 사용해서 분석되었다.

[0041] 실시예4. 리소좀 질량 및 자가포식 흐름(autophagic flux)의 측정

- [0042] 리소좀 질량은 종래기술처럼 측정되었다. 자가포식 흐름은 종래기술처럼 Cyto-ID를 사용해서 측정되었다. 자가포식 흐름을 계산하기 위해 다음과 같은 수식이 사용되었다. Mean Fluorescence Intensity (MFI) Cyto-ID =

MFI Cyto-ID (+CQ) - MFI Cyto-ID (-CQ).

[0044] **실시예5. 면역형광측정**

[0045] 면역형광 측정을 위해서 세포들은 챔버 슬라이드(30104; SPL, Pocheon, Korea)에 플레이트되었다. PBS에서 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 15분동안 고정시킨 뒤에, 세포들은 PBS에서 0.1% Triton X-100으로 15분동안 처리되었다. PBS에서 상온 상태로 10% FBS를 사용해서 1시간동안 블로킹을 수행했다. 토끼 항-LC3B 항체(2775; 1:200 dilution, Cell Signaling Technology) 및 마우스 항-total OXPHOS 항체(AB110411; 1:1,000 dilution; abcam, Cambridge, UK)가 4 ° C 하룻밤동안 세포들을 인큐베이팅하기 위해서 사용되었다. 면역형광 측정에 있어서 이후 과정들은 종래기술대로 수행되었다.

[0047] **실시예6. 미토콘드리아 질량, 미토콘드리아 막 전위(MMP) 및 활성 산소(ROS)의 측정**

[0048] 미토콘드리아 질량은 50 nM MitoTracker Deep Red (M22426; Life Technologies)를 함유하는 배지에서 37 ° C로 30분동안 세포들을 인큐베이팅함으로써 정량화되었다. MMP는 0.6 µg/ml JC-1 (T3168; Life Technologies)을 함유하는 배지에서 37 ° C로 30분동안 세포들을 인큐베이팅함으로써 정량화되었다. 미토콘드리아 ROS는 30 µM DHR123 (D632; Life Technologies) 및 5 µM MitoSOX (M36008; Life Technologies)를 함유하는 배지에서 37 ° C로 30분동안 세포들을 처리함으로써 정량화되었다. 그리고 나서, 세포들은 종래기술처럼 FACS 분석을 위해 준비되었다.

[0050] **실시예7. 산소 소비율(oxygen consumption rate, OCR) 분석**

[0051] XFe24 flux analyzer (Seahorse Bioscience XFe24 Instrument; Seahorse Bioscience, Billerica, MA, USA)가 사용되었다. 간단히 말하면, XFe24 세포 배양 플레이트(100850-001; Seahorse Bioscience)의 각 웰에, 5×10^4 세포들이 넣어졌고 종래기술처럼 측정되었다.

[0053] **시험예1. AKT 억제에 의한 노화를 제어할 수 있는 약물 선택을 위한 화학적 스크리닝**

[0054] 본 발명에서, 노화 세포에서 세포 주기를 멈추게 해주는 세포 증식을 촉진시키는 후보 물질의 효능이 평가되었다. 세포 증식을 측정하는데 기반을 둔 스크리닝 방법이 사용되었다. 노화 섬유아세포들은 12개의 AKT 저해제 라이브러리로 처리되었고, 각 저해제의 효과를 평가하기 위해 21일 후에 세포 증식이 측정되었다(도 1). 잠재적 후보는 세포 증식이 1.4배이상 증가된 저해제로 정의되었다. 1개의 화합물(GDC0068)이 잠재적 후보로 선택되었다(도 1, 붉은 화살표 머리부분).

[0056] **시험예2. 리소좀 기능 회복을 유도한 AKT 억제**

[0057] 관찰된 세포 증식 유도 효과는 발명자들로 하여금 상기 화합물이 어떻게 노화 표현형에 영향을 미치는지 연구하도록 했다. 노화의 지표 중 하나인, 리포푸신의 축적이 분석되었다. 리포푸신 수준은 세포내 자가형광 수준을 측정함으로써 평가되었다. 자가형광 수준이 GDC0068 처리 후 현저히 감소하였고, 이는 GDC0068이 리포푸신 축적을 감소시켰다는 것을 보여준다(도 2A).

[0058] 리포푸신은 리소좀에서 점차적으로 쌓이는 자가형광 물질이다. 리포푸신으로 채워진 리소좀은 새로 생성된 가수분해효소를 위한 싱크(sink)로서 작용하고, 차례로 리소좀의 질량을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명자들은 GDC0068이 리소좀 증가에 효과가 있는지 여부를 연구하였다. 리소좀 질량은 GDC0068에 의해서 현저히 감소하였고, 이는 GDC0068에 의해서 기능이 저하된 리소좀의 감소를 의미한다(도 2B).

[0059] 리소좀 기능의 회복은 자가포식(autophagy) 기능을 촉진하고, 자가포식에 사용되는 기질 제거를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 발명자들은 GDC0068에 의한 기능 저하 리소좀의 감소를 확인하였기 때문에, GDC0068이 어떻게 자가포식 기능에 영향을 미치는지 연구하였고, 이는 자가포식 흐름(autophagic flux)을 측정함으로써 평가되었다. GDC0068 처리후, 자가포식 흐름은 상당히 강화되었고, 이는 GDC0068이 자가포식 시스템의 기능을 회복

시켰다는 것을 의미한다(도 2C).

[0061] **시험예3. AKT 매개 미토파지(mitophagy) 활성화에 의한 기능 저하 미토콘드리아의 제거**

[0062] 리소좀/자가포식 시스템은 기능이 저하되거나 손상을 입은 미토콘드리아를 제거하는 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서, 발명자들은 리소좀/자가포식 시스템에 의한 GDC0068 매개 회복이 기능 저하 미토콘드리아의 제거를 촉진하는지 여부를 연구하였다. 미토콘드리아 형태(morphology)를 시각화하기 위해 OXPHOS 단백질들에 대한 항체가 사용되었고, 자가포식 마커 경쇄 3B(LC3B)에 대한 항체가 자가포식을 시각화하기 위해 사용되었다. 노화된 섬유아세포는 젊은 섬유아세포보다 더 많은 가지를 가진 미토콘드리아 형태를 가지고 있다(도 3A). 미토콘드리아 및 LC3B간의 공동 지역화(co-localization)이 젊은 세포들에서 관찰되었지만 DMSO 처리된 노화 세포들에서는 거의 관찰되지 않았다(도 3A). LC3B 및 미토콘드리아의 공동 지역화는 GDC0068로 처리된 후 다시 나타났다(도 3A, 흰색 화살표). 동시에, 미토콘드리아 질량이 감소했고, 이는 자가포식에 의한 기능 저하 미토콘드리아의 선택적 분해과정인 미토파지가 활성화되었음을 의미한다(도 3B). 회복된 리소좀/자가포식 시스템이 미토파지를 증가시키는지 확인하기 위해, 세포들은 자가포식 흐름을 억제하는 약물인 클로로퀸(chloroquine)을 공동 처리했다. 공동 지역화가 젊은 세포 및 GDC0068 처리된 노화 세포들에서 증가하였지만, DMSO 처리된 노화세포에서는 그렇지 않았다(도 3C, 흰색 화살표). 이는 리소좀/자가포식 시스템의 GDC0068가 매개된 회복이 미토파지를 사실상 활성화시켰음을 의미한다.

[0064] **시험예4. AKT 억제에 의한 미토콘드리아 기능 회복**

[0065] 미토콘드리아 기능 유지는 미토파지(mitophagy)에 의해서 손상받은 미토콘드리아의 효율적인 제거를 요구한다고 알려져 있다. 미토콘드리아 기능이 GDC0068에 의해서 회복되는지 여부를 확인하기 위해서, 미토콘드리아 막 전위(mitochondrial membrane potential, MMP)가 측정되었다. GDC0068 처리하자마자, MMP는 현저히 증가하였고, 이는 미토콘드리아 기능 회복을 의미한다(도 4A). 기능 저하 미토콘드리아는 과도한 ROS를 발생시키고, 이는 세포 소기관들에 심각한 손상을 야기시킨다고 알려져 있다. 발명자들은 GDC0068가 매개된 미토콘드리아 기능의 회복을 확인하였기 때문에, 추가로 GDC0068이 ROS 수준에 영향을 미치는지 확인하였다. 2개의 다른 염료, DHR123 및 MitoSox가 ROS 수준을 측정하기 위해 사용되었다. 수산화(hydroxyl radicals) 및 과산화수소의 수준은 DHR123으로 측정될 수 있고, 초과산화물 음이온(superoxide anions)의 수준은 MitoSox로 측정될 수 있다. GDC0068 처리된 군에서, ROS 수준이 훨씬 더 낮았다(도 4B 및 C).

[0067] **시험예5. OXPHOS 효율 증가로 인한 AKT 억제의 미토콘드리아 기능 조절**

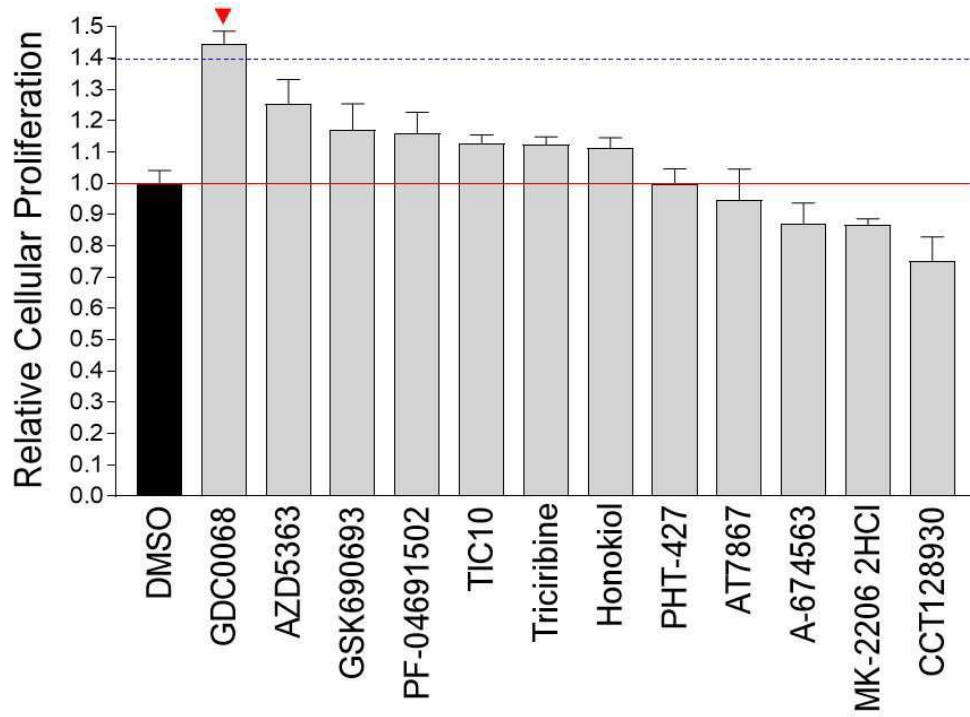
[0068] MMP는 OXPHOS 동안 ATP 생성을 가능하게 하는 힘으로 알려져 있다. 발명자들은 GDC0068이 매개된 MMP 증가를 확인하였기 때문에, GDC0068이 어떻게 OXPHOS 효율에 영향을 미치는지 연구하였다. OXPHOS 효율의 지표로서, 산소 소비율(the oxygen consumption rate, OCR; pmoles/min)이 측정되었다. 화합물 (올리고마이신, carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine (FCCP), 로테논(rotenone) 및 안티마이신 A(antimycin A)의 혼합물)이 차례로 주입되었다. 차례대로 측정된 OCR 값들은 ATP 생성(올리고마이신 주입 이후), 최대 호흡(maximal respiration)(FCCP 주입 이후), 및 비-미토콘드리아 호흡(로테논(rotenone) 및 안티마이신 A의 혼합물 주입 이후) 측정을 위해 사용되었다. FCCP 주입 이후, GDC0068 처리된 노화 세포들은 DMSO 대조군보다 더 높은 OCR값을 보여줬고, 이는 GDC0068이 OXPHOS동안 최대 호흡을 활성화시켰다는 것을 보여준다(도 5, 검은색 vs 붉은색).

[0070] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 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. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

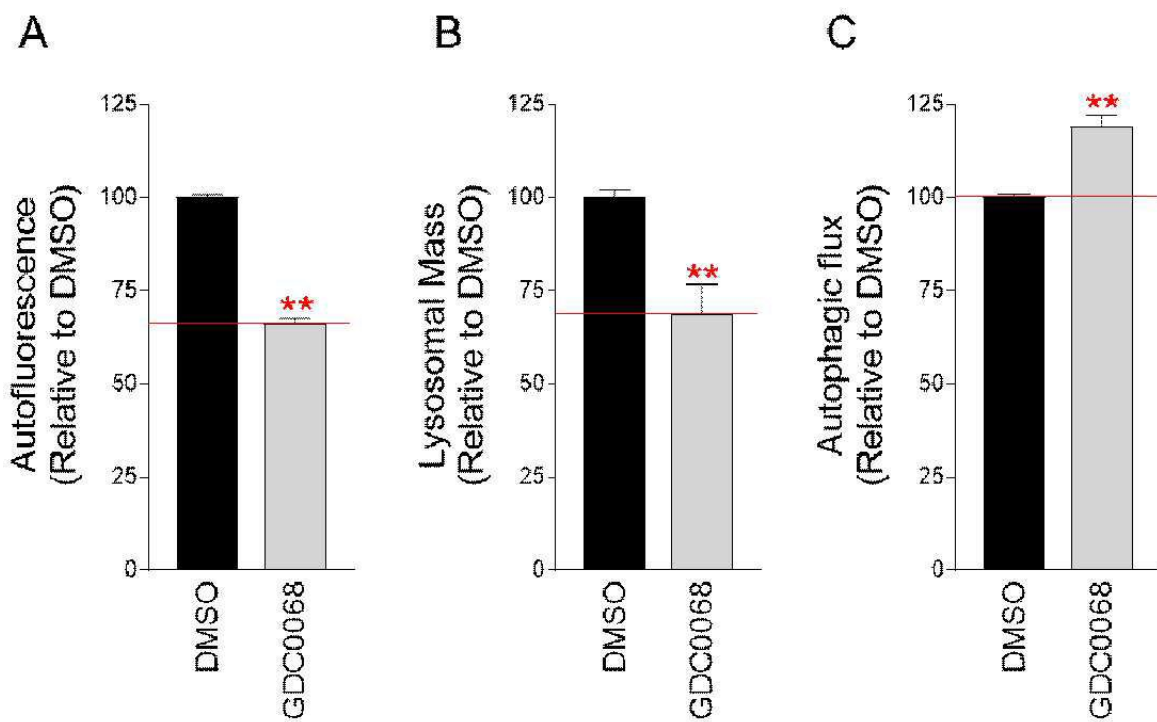
[0071] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

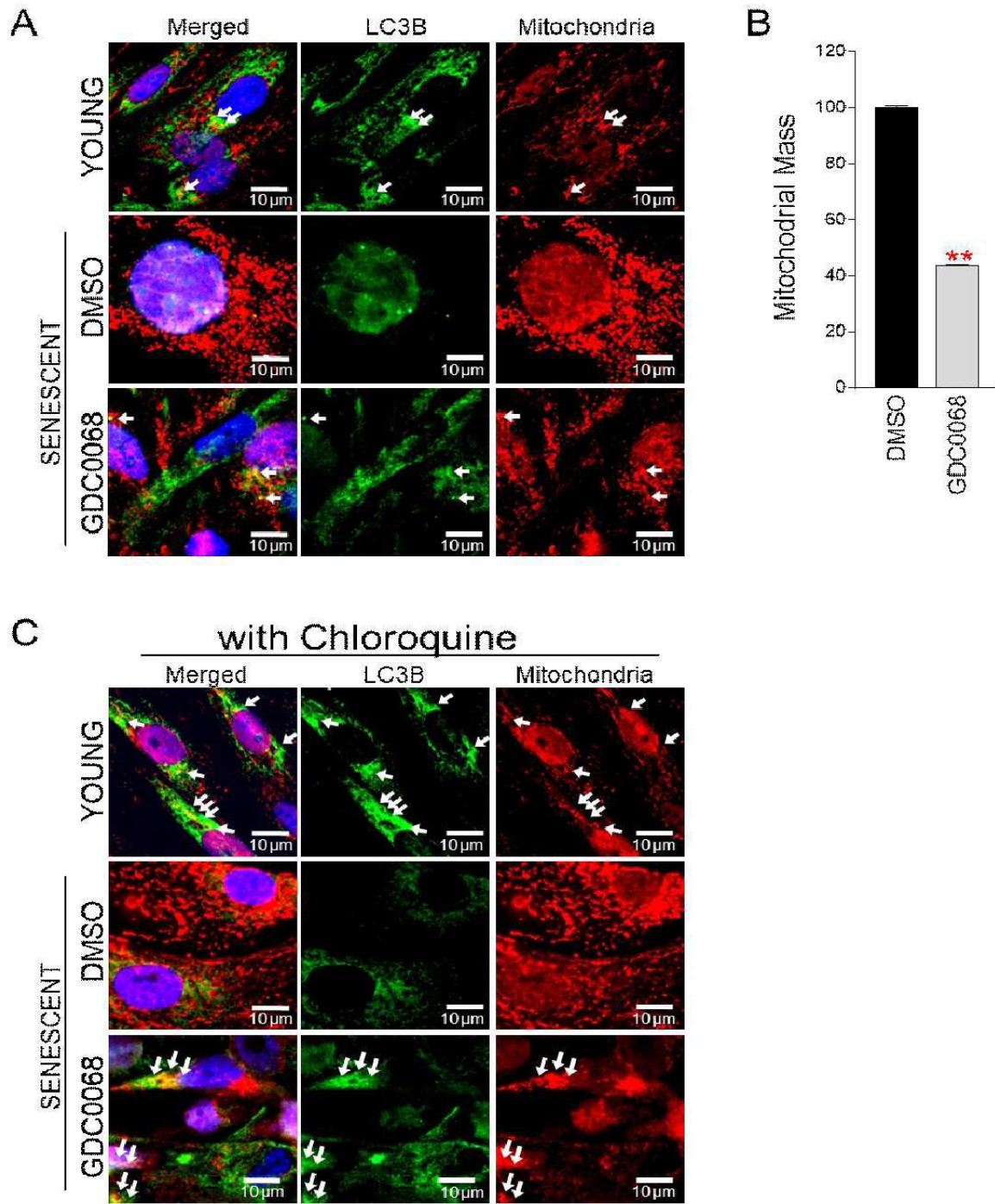
도면1



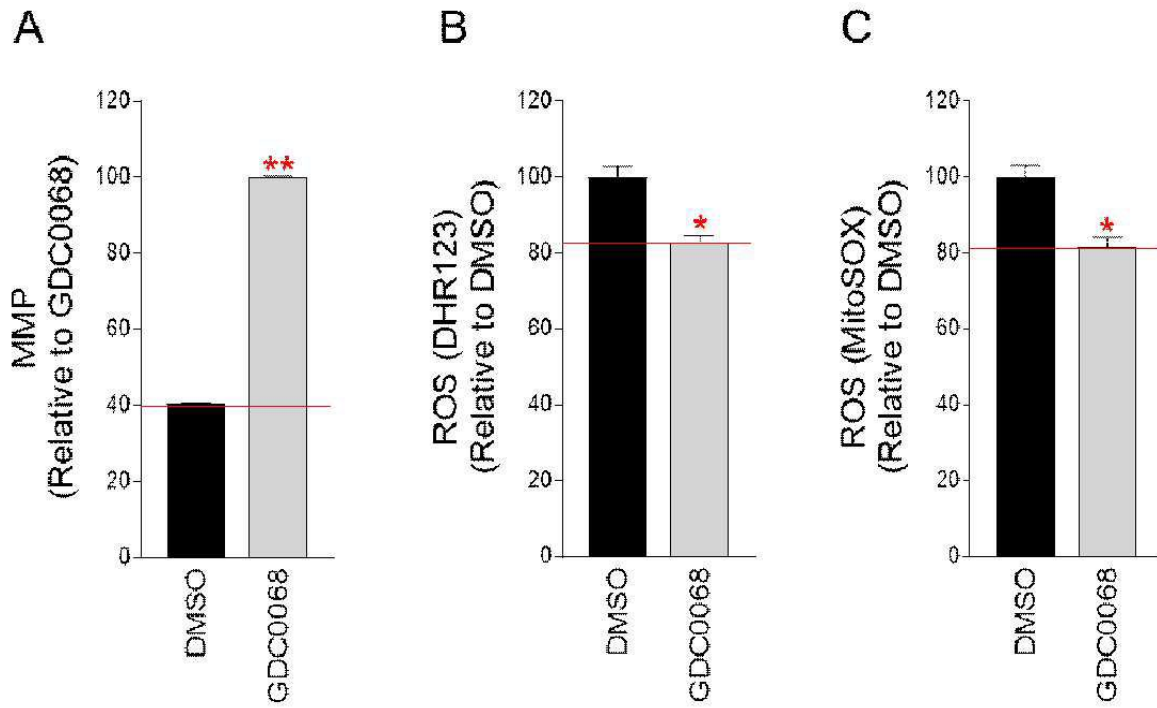
도면2



도면3



도면4



도면5

