

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0111495
(43) 공개일자 2021년09월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/47 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/47 (2013.01)
A61K 9/0014 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0026504
 (22) 출원일자 2020년03월03일
 심사청구일자 2020년03월03일
- (71) 출원인
 경상국립대학교산학협력단
 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
- (72) 발명자
 윤태진
 서울특별시 강남구 압구정로 201, 83동 1204호 (압구정동, 현대아파트)
- (74) 대리인
 특허법인태백

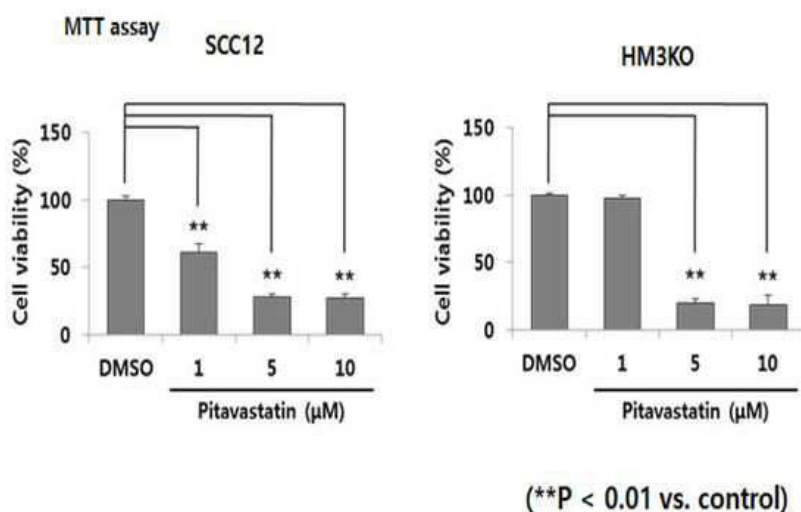
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 피타바스타틴을 유효성분으로 함유하는 피부암 예방 또는 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 피타바스타틴을 유효성분으로 함유하는 피부암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 피타바스타틴이 처리된 편평세포암과 흑색종 세포에서 세포사멸과 관련된 단백질의 발현 수준이 증가하고, 암세포 증식이 억제되는 것이 확인된 반면, 정상 각질세포에서는 세포사멸 효과가 나타나지 않는 것을 확인함에 따라, 상기 피타바스타틴을 유효성분으로 함유하는 조성물은 피부암 치료용 조성물 또는 피부 외용제로 제공될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	NRF-2017R1A2B2005612
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구
연구과제명	새로운 색소조절약물을 신약재창출로 개발함
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

피타바스타틴을 유효성분으로 함유하는 피부암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 피타바스타틴은 피부암세포의 세포증식을 억제하고 세포사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 피부암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 피부암은 편평세포암, 기저세포암, 흑색종 및 상피내 전구암으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 피부암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 상피내 전구암은 광선각화증, 보웬병, 쾨라 홍색형성증, 파젯병으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 피부암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 약학조성물은 피부 외용제인 것을 특징으로 하는 피부암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 피타바스타틴은 피부암세포의 세포사멸을 유도하는 caspase-3, caspase-8 및 PARP-1 단백질 발현을 증가시켜 피부암 세포의 사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 피부암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 피타바스타틴은 ER 스트레스에 의해 유도된 세포사멸(ER stress-induced cell death)과 관련된 CHOP, ATF4, caspase-4 및 caspase-12의 단백질 발현을 증가시켜 피부암 세포의 사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 피부암 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 피타바스타틴은 파이프토티스(Pyroptosis), 자가포식(Autophagy) 및 세포괴사(Necroptosis)와 관련된 유전자인 caspase-1, LC3II 및 MLKL 단백질 발현을 증가시켜 피부암 세포의 사멸을 유도하는 것을 특징으로 하는 피부암 예방 또는 치료용 약학조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피타바스타틴을 유효성분으로 함유하는 피부암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부암은 피부에서 발생하는 모든 암을 말하며, 다른 부위의 암에 비해 복잡한 검사나 고가의 의료장비 등이 필요치 않고, 쉽게 육안으로 발견할 수 있으며, 간단한 조직검사를 통해 진단할 수 있다. 많은 피부암 환자들이 처음 피부에 암이 발생했을 때 단순히 피부염 또는 점이나 종기로 간과하기 때문에 병원에 늦게 방문하여 조기 발견이 어려우므로 병의 완치가 어렵게 되는 경우가 있다.

- [0003] 주종을 이루는 피부암으로는 기저세포암종 (Basal cell carcinoma, BCC)으로 약 80%에 달하며 그밖에도, 약 16%에 달하는 편평상피세포 암종 (squamous cell carcinoma, SCC) 및 약 4% 해당하는 흑색종 (melanoma)이 있다. 기저세포 암종과 편평상피세포 암종을 합쳐서 비흑색종성 암종 (nonmelanoma skin cancer, NMSC)이라 일컫는다.
- [0004] 흑색종은 표피내에 있는 멜라노사이트로부터 발생하는데 대부분의 전이암이나 사망에 이르게하는 암을 일컫는다. 자외선에 의해 발생하는 흑색종은 자외선의 만성적인 노출에 의해서라기보다 극심한 선텐 등의 간헐적인 노출에 의해 발생하는 것으로 추측되고 있다.
- [0005] 기저세포 암종의 경우 표피의 각질세포(keratinocyte)에서 발생하며 기저세포암은 천천히 종양으로 발생하며 전이 가능성이 낮고 주로 만성적인 자외선 노출에 의해서 발생할 수 있다. 또한, 편평상피세포 암종은 표피의 윗부분에서 주로 생기는데 5년 안에 다른 피부 부위로의 전이 비율이 매우 높으며 기저세포 암과 마찬가지로 만성적인 자외선 노출에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다.
- [0006] 이러한 피부암의 80%는 얼굴, 머리, 손목 등 태양광에 노출된 부위에서 나타난다. 피부암 발병자 중 대부분은 기저세포암이나 편평상피세포암이며, 상기 암들은 비교적 치료가 잘 되는 편이다. 흑색종은 피부암 환자의 3%를 차지하지만, 흑색종 환자 가운데 사망률은 14%로 위험한 암에 속한다.
- [0007] 이와 같은 피부암 치료를 위해 세포사멸을 유도하여 예방하거나 치료하기 위한 기술들이 개발되고 있다. 그 예로, 피부 과증식증 및 종양세포를 억제하기 위한 약학적 조성물인 1,25-디하이드록시-16,22,23-트리스테하이드로-콜레칼시페롤 유도체(대한민국 등록특허 제10-0240541호), 피부질환, 종양 및 암의 치료를 위해 세포사멸을 유도하는 피토스핑고신 유도체를 함유하는 아포토시스 유도용 조성물(대한민국 특허공개 제10-2004-0016353호)과 같은 다양한 신규 피부암 치료제가 개발되고 있으나, 아직까지는 많은 한계점이 있으며, 현재까지 피부암을 치료하기 위한 최적의 치료법은 없는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2007-0107252호 (2007.11.07. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 정상세포에 대한 부작용을 감소시키면서 피부암 치료 효과를 향상시키기 위해 피타바스타틴을 유효성분으로 함유하는 조성물을 피부암 치료제로 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명은 피타바스타틴을 유효성분으로 함유하는 피부암 예방 또는 치료용 피부외용제를 제공하고자 한다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명에 따르면, 피타바스타틴이 처리된 편평세포암과 흑색종 세포에서 세포사멸과 관련된 단백질의 발현 수준이 증가하고, 암세포 증식이 억제되는 것이 확인된 반면, 정상 각질세포에서는 세포사멸 효과가 나타나지 않는 것을 확인함에 따라, 상기 피타바스타틴을 유효성분으로 함유하는 조성물은 피부암 치료용 약학조성물 또는 피부 외용제로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 편평세포암(SCC12) 및 흑색종 (HM3KO)에 피타바스타틴 (0, 1, 5 및 10 μ M) 처리 후 피부암 세포생존을 확인한 MTT 분석 결과이다.

도 2는 편평세포암(SCC12) 세포에 피타바스타틴 (0, 1, 5 및 10 μ M) 처리 후 세포내 세포사멸 관련 단백질의 발현 수준을 확인한 웨스턴블롯 분석 결과이다.

도 3은 편평세포암(SCC12) 세포에 피타바스타틴 (0, 1, 5 및 10 μ M) 처리 후 세포내 ER 스트레스에 의해 유도

되는 세포사멸 관련 단백질의 발현 수준을 확인한 웨스턴블롯 분석 결과이다.

도 4는 평편세포암(SCC12) 세포에 피타바스타틴 (0, 1, 5 및 10 μ M) 처리에 의한 세포내 파이롭토시스(Pyroptosis), 자가포식(Autophagy) 및 세포괴사(Necroptosis) 관련 단백질의 발현 수준을 확인한 웨스턴블롯 분석 결과이다.

도 5는 흑색종(HM3K0) 세포에 피타바스타틴 (0, 5, 10 및 20 μ M) 처리에 의한 세포내 파이롭토시스(Pyroptosis), 자가포식(Autophagy) 및 세포괴사(Necroptosis) 관련 단백질의 발현 수준을 확인한 웨스턴블롯 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0014] 본 발명은 피타바스타틴을 유효성분으로 함유하는 피부암 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.
- [0015] 상기 피타바스타틴은 피부암세포의 세포증식을 억제하고 세포사멸을 유도하는 것일 수 있다.
- [0016] 상기 피부암은 편평세포암, 기저세포암, 흑색종 및 상피내 전구암으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0017] 상기 상피내 전구암은 광선각화증, 보웬병, 귀라 홍색형성증, 파젯병으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 상기 약학조성물은 피부 외용제로 제공될 수 있다.
- [0019] 상기 피타바스타틴은 피부암세포의 세포사멸을 유도하는 caspase-3, caspase-8 및 PARP-1 단백질 발현을 증가시켜 피부암 세포의 사멸을 유도하는 것일 수 있다.
- [0020] 상기 피타바스타틴은 ER 스트레스에 의해 유도된 세포사멸(ER stress-induced cell death)과 관련된 CHOP, ATF4, caspase-4 및 caspase-12의 단백질 발현을 증가시켜 피부암 세포의 사멸을 유도하는 것일 수 있다.
- [0021] 또한, 상기 피타바스타틴은 파이롭토시스(Pyroptosis), 자가포식(Autophagy) 및 세포괴사(Necroptosis)와 관련된 유전자인 caspase-1, LC3II 및 MLKL 단백질 발현을 증가시켜 피부암 세포의 사멸을 유도하는 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일실시예에 따르면, 인체 암세포인 평편세포암(SCC12, 구입처) 및 흑색종(HM3K0, 구입처)에 피타바스타틴을 1, 5 및 10 μ M 농도로 투여하고 24시간 동안 배양한 후 MTT 분석을 수행하여 피타바스타틴(pitavastatin)에 의한 피부암 세포의 생존율을 확인한 결과, 도 1과 같이 피타바스타틴의 농도 1 μ M (SCC 12) 또는 5 μ M (HM3K0) 이상에서 암세포의 생존이 매우 강력하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 정상 인체 세포인 각질형성세포 및 멜라닌 세포에서 피타바스타틴에 의한 생존율 억제 효과가 나타나지 않았다.
- [0025] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 피타바스타틴을 유효성분으로 함유하는 피부암 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 구체예에서, 피타바스타틴을 유효성분으로 함유하는 피부암 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0027] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 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 스테아레이트, 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, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0028] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0029] 상기 피타바스타틴의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0033] <실시예 1> 피타바스타틴(pitavastatin)에 의한 피부암 세포 생존율 확인

[0034] 인체 암세포인 평편세포암(SCC12, donated by Dr James Rheinwald, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA) 및 흑색종(HM3KO; provided by Dr. Yoko Funasaka, Kobe University School of Medicine, Kobe, Japan.)에서 피타바스타틴에 의한 세포생존율을 확인하기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)를 사용하여 MTT assay 수행하였다.

[0035] SCC12 세포주는 5% FBS가 첨된 DMEM으로 배양하였으며 HM3KO 세포주는 10% FBS가 첨된 MEM을 이용하여 배양하였다. 각각의 세포주를 12 웰 플레이트에 1×10^5 cells/ml의 양으로 분주하고 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 24시간 후, 피타바스타틴을 농도별 (0, 1, 5 및 10 μ M)로 각각의 세포주에 첨가하고 24시간 배양시켰다. 이후 배지를 제거하고 MTT 용액을 0.5 mg/ml의 농도로 각각의 웰에 처리한 뒤 37℃에서 1 시간동안 반응시켰다. 미 반응된 MTT 용액을 제거하고 DMSO를 가해 형성된 반응물을 용해시킨 후 540 nm에서의 흡광도를 측정해 세포 내 독성을 확인하였다.

[0036] 그 결과, 도 1과 같이 피타바스타틴의 농도 1 μ M (SCC 12) 또는 5 μ M (HM3KO) 이상에서 암세포의 생존이 매우 강력하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 정상 인체세포인 각질형성세포 및 멜라닌 세포에서 피타바스타틴에 의한 생존율 억제 효과가 나타나지 않았다.

[0038] <실시예 2> 평편세포암에서 피타바스타틴이 세포사를 유도하는 단백질 발현에 미치는 영향 확인

[0039] 2-1. 세포사멸 (Apoptosis)에 대한 피타바스타틴의 효과 확인

[0040] 피타바스타틴에 의해서 일어나는 세포의 죽음이 세포사멸 (apoptosis)에 의해서 일어나는 것인지 알아보기 위하여 세포 사멸 (apoptosis) 마커들의 발현변화를 웨스턴 블로팅 (western blotting)을 통하여 확인하였다.

[0041] SCC12 와 SCC13 세포주는 5% FBS가 첨된 DMEM으로 배양하였다. 우선 SCC12와 SCC13 세포주를 100mm 플레이트에 분주하고 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이후 피타바스타틴을 농도별 (0, 1, 5 및 10 μ M)로 처리한 후 24시간 뒤에 세포와 배지를 같이 수거하였다. 수거한 세포는 원심분리 (1500 rpm)를 한 후 BCA (bicinchoninic acid assay)분석을 통하여 단백질 양을 정량하였다.

[0042] 다음으로 Polyacrylamide, SDS, Ammonium persulfate, TEMED 등을 이용하여 SDS-page gel을 만들고, 이 gel에 정량한 단백질을 같은 양으로 넣어준 뒤 단백질 전기영동을 수행하였다. 전기영동을 통하여 단백질을 크기별로 분리한 뒤 니트로셀룰로오스 막에 단백질 transfer를 수행하였다. 이후 탈지우유로 블로킹을 상온에서 30분간 진행하고, 1차 항체 (Cleaved caspase-3, Cleaved caspase-8, PARP-1, Actin)를 넣고 4℃에서 하룻밤동안 반응

시켰다. 다음날, TBST를 이용하여 상온에서 세척 (1회 10분, 총 3회 이상) 한 후 2차 항체 (rabbit, mouse)를 넣고 1 시간동안 상온에서 반응 시킨 뒤 같은 방법으로 TBST를 이용하여 세척하였다. 이후 암실에서 X-ray film을 이용하여 결과를 확인하였다.

[0043] 그 결과, 도 2와 같이 평편세포암 SCC12 및 SCC13에서는 caspase-3, caspase-8 및 PARP-1 단백질의 발현이 매우 증가가 확인된 반면, 정상 인체세포인 각질형성세포 및 멜라닌 세포에서는 caspase-3, caspase-8 및 PARP-1 단백질의 발현 증가 효과가 나타나지 않았다.

[0045] 2-2. ER 관련 세포사 (ER stress-induced cell death)에 대한 피타바스타틴의 효과 확인

[0046] 피타바스타틴에 의해서 일어나는 세포사멸 (apoptosis)이 상위에서 어떤 signal을 통하여 일어나는지 알아보기 위하여 대표적인 상위 signal중 하나인 endoplasmic reticulum stress (ER stress)의 마커들의 발현변화를 웨스턴 블로팅 (western blotting)을 통하여 확인하였다.

[0047] SCC12 와 SCC13 세포주는 5% FBS가 첨된 DMEM으로 배양하였다. 우선 SCC12와 SCC13 세포주를 100mm 플레이트에 분주하고 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이후 피타바스타틴을 농도별 (0, 1, 5 및 10 μ M)로 처리한 후 24시간 뒤에 세포와 배지를 같이 수거하였다. 수거한 세포는 원심분리 (1500 rpm)를 한 후 BCA 분석을 통하여 단백질 양을 정량하였다.

[0048] 다음으로 Polyacrylamide, SDS, Ammonium persulfate, TEMED 등을 이용하여 SDS-page 겔을 만들고, 상기 겔에 정량한 단백질을 같은 양으로 넣어준 뒤 단백질 전기영동을 수행하였다. 전기영동을 통하여 단백질을 크기별로 분리한 뒤 니트로셀룰로오스 막에 단백질 옮겼다. 이후 탈지우유로 블로킹을 상온에서 30분간 진행하고, 1차 항체 (CHOP, ATF4, Caspase-4, Caspase-12, Actin)를 넣고 4℃에서 하룻밤동안 반응시켰다. 다음날, TBST를 이용하여 상온에서 세척(1회 10분, 총 3회 이상) 한 후 2차 항체 (rabbit, rat, mouse)를 넣고 1 시간동안 상온에서 반응 시킨 뒤 같은 방법으로 TBST를 이용하여 세척하였다. 이후 암실에서 X-ray film을 이용하여 결과를 확인하였다.

[0049] 그 결과, 도 3과 같이 ER 스트레스에 의해 유도된 세포사멸과 관련된 CHOP, ATF4, caspase-4 및 caspase-12의 단백질 발현이 매우 증가된 것을 확인할 수 있었다. 반면, 정상 인체세포인 각질형성세포 및 멜라닌 세포에서는 유의한 증가 효과가 확인되지 않았다.

[0051] 2-3. 파이로토시스(Pyroptosis), 자가포식(Autophagy) 및 세포괴사(Necroptosis)에 대한 피타바스타틴의 효과 확인

[0052] 피타바스타틴이 세포 사멸 (apoptosis) 이외에 다른 방법으로도 세포 죽음에 관여하는지 알아보기 위하여 대표적으로 잘 알려져 있는 세포괴사 (necroptosis, MLKL), 자가포식 (autophagy, LC3), 파이로토시스 (pyroptosis, Caspase-1) 마커들의 발현변화를 웨스턴 블로팅 (western blotting)을 통하여 확인하였다.

[0053] SCC12 와 SCC13 세포주는 5% FBS가 첨된 DMEM으로 배양하였다. 우선 SCC12와 SCC13 세포주를 100mm 플레이트에 분주하고 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이후 피타바스타틴을 농도별 (0, 1, 5 및 10 μ M)로 처리한 후 24시간 뒤에 세포와 배지를 같이 수거하였다. 수거한 세포는 원심분리 (1500 rpm)를 한 후 BCA 분석 (bicinchoninic acid assay)을 수행하여 단백질 양을 정량하였다. 다음으로 Polyacrylamide, SDS, Ammonium persulfate, TEMED 등을 이용하여 SDS-page gel을 만들고, 이 gel에 정량한 단백질을 같은 양으로 넣어준 뒤 단백질 전기영동을 수행하였다. 전기영동을 통하여 단백질을 크기별로 분리한 뒤 니트로셀룰로오스 막에 단백질 transfer를 수행하였다. 이후 탈지우유로 블로킹을 상온에서 30분간 진행하고, 1차 항체 (MLKL, LC3, Caspase-1, Actin)를 넣고 4℃에서 하룻밤동안 반응시켰다. 다음날, TBST를 이용하여 상온에서 세척 (1회 10분, 총 3회 이상) 한 후 2차 항체 (rabbit, mouse)를 넣고 1 시간동안 상온에서 반응 시킨 뒤 같은 방법으로 TBST를 이용하여 세척하였다. 이후 암실에서 X-ray film을 이용하여 결과를 확인하였다.

[0054] 그 결과, 도 4와 같이 파이로토시스(Pyroptosis), 자가포식(Autophagy) 및 세포괴사(Necroptosis)와 관련된 유전자인 caspase-1, LC3II 및 MLKL 단백질의 발현 수준이 매우 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 반면, 정상 인체세포인 각질형성세포 및 멜라닌 세포에서는 유의한 증가 효과가 나타나지 않았다.

[0056] 상기 결과들로부터 피타바스타틴은 피부암세포 증식을 억제하고, 세포사에 관련된 유전자를 활성화시켜 피부암 종에 대한 항암효과를 나타내는 것이 확인되었다.

[0058] <실시예 3> 흑색종세포에서 피타바스타틴이 세포죽음을 유도하는 단백질 발현에 미치는 영향 확인

[0059] 흑색종 세포의 세포죽음을 유도하는 피타바스타틴이 흑색종 세포 내 세포괴사(necroptosis, MLKL), 자가포식 (autophagy, LC3) 및 파이로토시스 (pyroptosis, Caspase-1) 마커들의 발현 수준 변화에 미치는 영향을 확인하기 위해 웨스턴 블로팅 (western blotting)을 수행하였다.

[0060] HM3KO 세포주를 10% FBS가 첨가된 MEM으로 배양하였다. 먼저, HM3KO 세포주를 100 mm 플레이트에 분주하고 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 이후 피타바스타틴을 농도별 (0, 1, 10 및 20 μ M)로 처리한 후 24시간 뒤에 세포와 배지를 같이 수거하였다. 수거한 세포는 원심분리 (1500 rpm)하고, BCA (bicinchoninic acid assay)를 수행하여 단백질 양을 정량하였다.

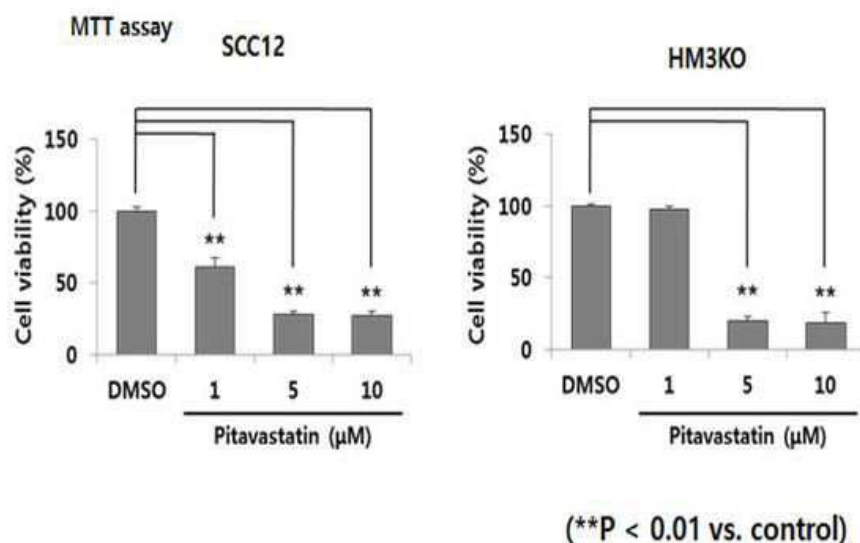
[0061] 다음으로 Polyacrylamide, SDS, Ammonium persulfate, TEMED 등을 이용하여 SDS-page gel을 만들고, 이 gel에 정량한 단백질을 같은 양으로 넣어준 뒤 단백질 전기영동을 수행하였다. 전기영동을 통하여 단백질을 크기별로 분리한 후 니트로셀룰로오스 막에 단백질 transfer를 수행하였다. 이후 탈지우유로 블로킹을 상온에서 30분간 진행하고, 1차 항체 (MLKL, LC3, Caspase-1 및 Actin)를 넣고 4℃에서 하룻밤동안 반응시켰다. 다음날, TBST를 이용하여 상온에서 세척(1회 10분, 총 3회 이상) 한 후 2차 항체 (rabbit, rat, mouse)를 넣고 1 시간동안 상온에서 반응시킨 뒤 같은 방법으로 TBST를 이용하여 세척하고, 이후 암실에서 X-ray film을 이용하여 결과를 확인하였다.

[0062] 그 결과, 도 5와 같이 흑색종 세포주에서 피타바스타틴은 자가포식 및 파이로토시스를 통하여 세포 죽음이 유도되는 것을 확인할 수 있었다.

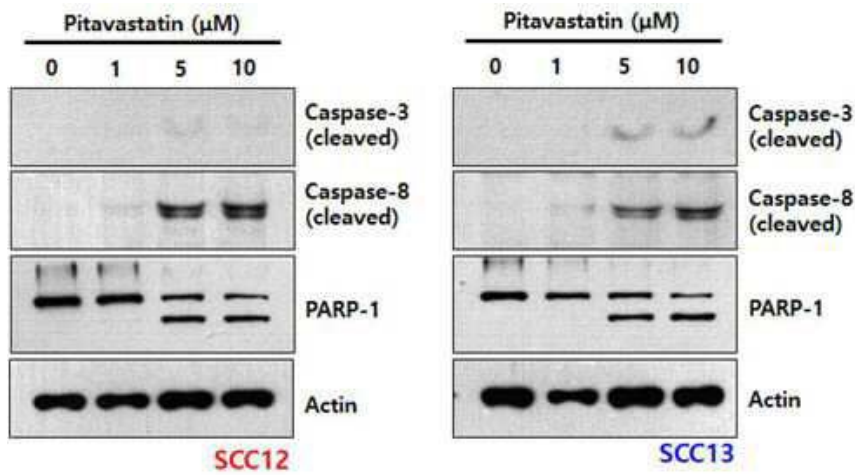
[0064] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

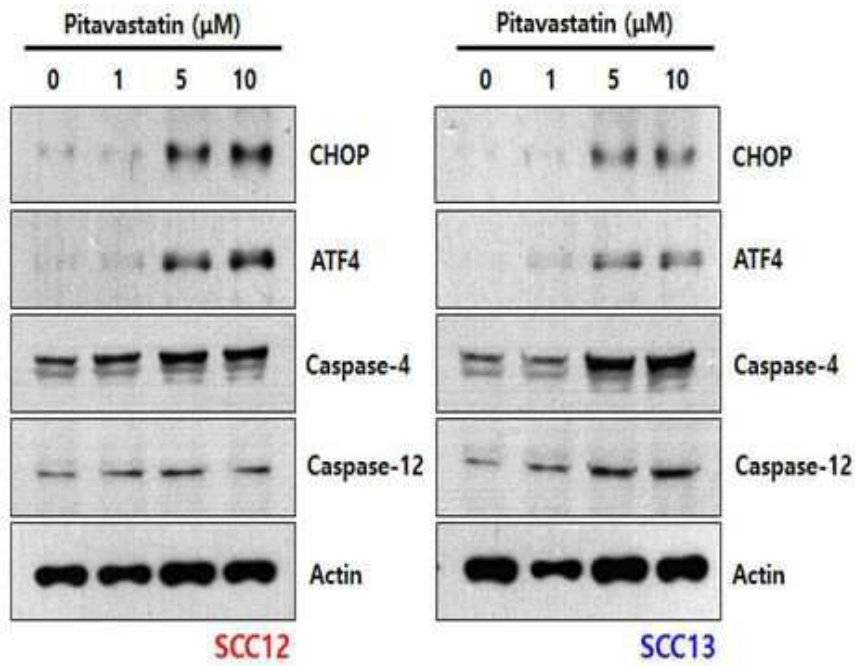
도면1



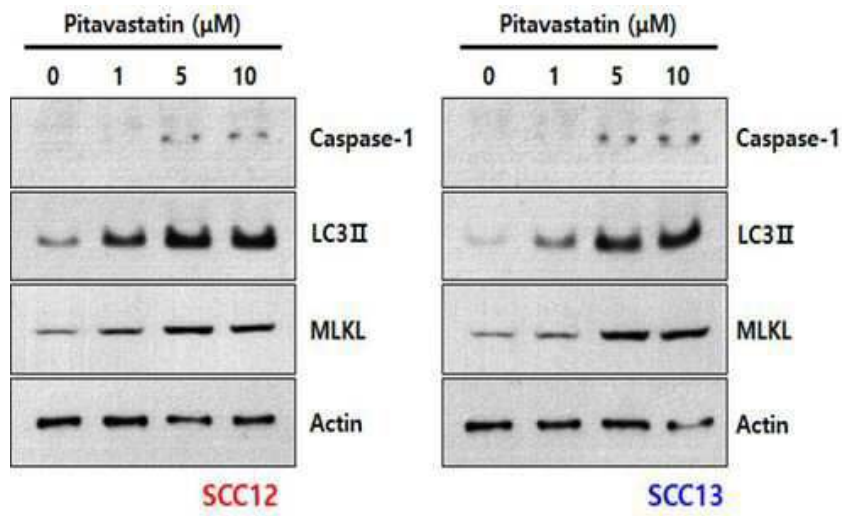
도면2



도면3



도면4



도면5

