(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0032847
(43) 공개일자 2021년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 5/087 (2006.01) *A61K 47/64* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 5/0812 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0114372
(22) 출원일자 2019년09월17일
심사청구일자 2019년09월17일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
유자형
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
지나 마나야스 데케일
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
진성언
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
리앤목특허법인

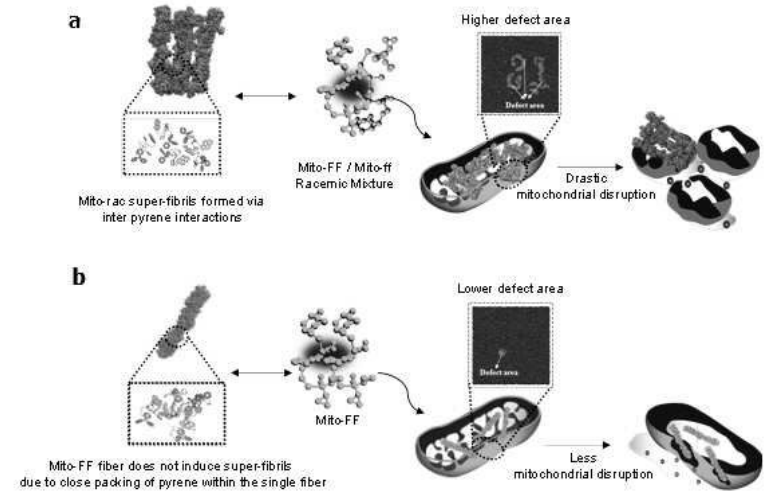
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **세포소기관에서 자기조립 가능한 펩타이드 분자를 포함하는 접합체의 D-거울상이성질체 및 L-거울상이성질체가 공동으로 조립되어 형성된 자기조립체 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

세포소기관에서 자가조립 가능한 펩타이드 분자를 포함하는 접합체의 D-거울상이성질체 및 L-거울상이성질체가 공동으로 조립되어 형성된 자기조립체 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 일 양상에 따른 자기조립체 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 의하면, 암 세포의 미토콘드리아를 표적하여 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/64 (2017.08)
A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711085340
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 세포 소기관 표적 자기조립을 통한 새로운 항암치료 연구
기 여 율 1/3
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711075964
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 미토콘드리아 안에서의 펩타이드 자기조립에 의한 선택적 노화세포 제거를 통한 생체조직의 재생능력 회복
기 여 율 1/3
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2018.07.01 ~ 2019.06.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711081966
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 다공성 플랫폼 기반 생체모방 촉매
기 여 율 1/3
과제수행기관명 울산과학기술원
연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

미토콘드리아 표적화 모이어티 및 (Xaa)n-Lys로 표시되는 펩타이드를 포함하고, 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티는 상기 펩타이드의 리신 아미노산에 연결되어 있는 것이고,

상기 n은 펩타이드 결합을 통하여 연결된 아미노산 Xaa의 개수로서, 2 내지 200의 정수이고,

상기 Xaa는 각각 독립적으로 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파라긴, 글루탐산, 아스파르트산, 글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 프롤린, 글루타민, 히스티딘, 리신, 아르기닌, 티로신, 트립토판 및 이들의 C3-C10 사이클로알킬 결합 변이체로 이루어진 군에서 선택되며,

상기 아미노산은 2개 이상의 아미노산 사이에 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 형성하는 것이고,

상기 펩타이드는 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 포함하는 것인 접합체 (conjugate)의 D-거울상이성질체 및 L-거울상이성질체가 공동으로 조립(co-assembly)되어 형성된 자기조립체(self-assembly).

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 n은 2이고, 상기 아미노산은 페닐알라닌, 알라닌, 사이클로헥실 알라닌, 및 발린으로 이루어진 군에서 선택된 것으로서, 서로 동일한 것인, 자기조립체.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 리신의 C-말단 카르복실기의 하이드록시기는 아민, 알킬기, 알코올기, 케톤기, 아실기, 에스터기, 에테르기, 아세틸기, 아실 할라이드기, 및 알데하이드기로 이루어진 군에서 선택된 것과 치환된 것인, 자기조립체.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드에 연결된 미토콘드리아 표적화 모이어티의 개수는 1 내지 상기 (Xaa)n-Lys로 표시되는 펩타이드에 존재하는 아민기 개수 범위에서 선택된 정수인, 자기조립체.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티는 TPP (triphenylphosphonium)인, 자기조립체.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드와 미토콘드리아 표적화 모이어티는 직접 또는 링커를 통하여 연결된 것인, 자기조립체.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 형광단 (fluorophore)을 추가로 포함하고, 상기 형광단은 상기 펩타이드에 연결된 것인, 자기조립체.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 형광단은 상기 펩타이드의 N-말단에 아마이드 결합으로 연결된 것인, 자기조립체.

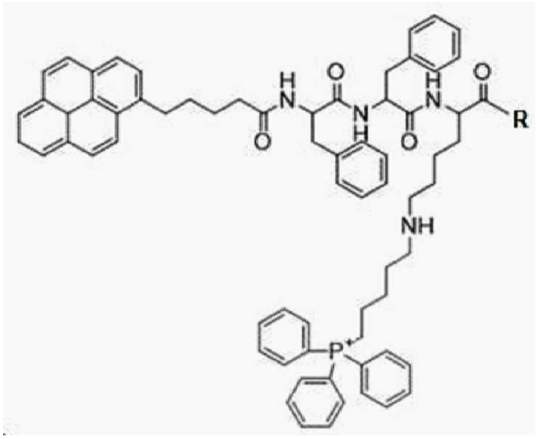
청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 형광단은 pyrene, NBD (4-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole), perylene, naphtalene, 및 coronene으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상인, 자기조립체.

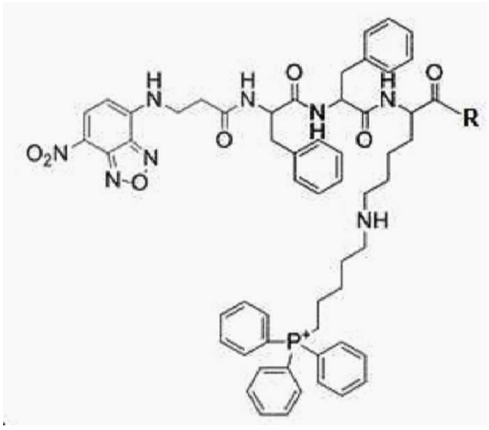
청구항 10

청구항 7에 있어서, 화학식 2 또는 화학식 3의 구조를 갖는, 자기조립체.

[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 11

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항의 자기조립체를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 11항에 있어서, 상기 약학적 조성물의 상기 자기조립체는 암 세포 내 미토콘드리아에서 세포 자멸(Apoptosis)을 유도하는 것인, 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 세포소기관에서 자가조립 가능한 펩타이드 분자를 포함하는 접합체의 D-거울상이성질체 및 L-거울상이성질체가 공동으로 조립되어 형성된 자기조립체 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 분자 자가조립 (Self-assembly)은 약물 전달, 조직공학, 유전자 치료 등의 다양한 생의학 분야에 적용될 수 있는 기능성 나노재료를 생성하는데 있어서 주목 받는 분야이다. 대부분 분자의 나노 구조로의 자가조립은 용매에서 연구되어 왔지만, 합성 양친매성 펩타이드의 세포 내부에서의 조립은 많은 연구가 되어 있지 않아서 세포 기능을 조절하기 위한 생체 모방의 조립 분야에 촉망 받는 연구 주제가 되고 있다.

[0003] 미토콘드리아는 산화적 인산화를 통해 에너지를 생산하는 상당히 역동적인 세포소기관으로써, 지방산 산화, TCA 회로, 아미노산 대사작용, 뿐 아니라 세포 자멸 (apoptosis), necrosis 및 necroptosis를 포함하는 세포 사멸 (cell death) 과정에 관련이 있다는 것이 알려져 있다. 미토콘드리아 기능의 이상은 뇌에 단백질 섬유의 축적과 연관이 있는 몇몇의 퇴행성 질병, 알츠하이머 (Alzheimer) 병, 파킨슨 (Parkinson) 병, 헌팅턴 (Huntington) 병, 및 루게릭 병 (Amyotrophic lateral sclerosis)에서 보고된 바 있다. 알츠하이머 질병인 환자의 미토콘드리아에서 Aβ와 같은 베타-쉬트 (beta-sheet) conformation이 풍부한 비정상적으로 folding된 단백질이 관찰되고, 이와 같은 비정상적으로 folding된 단백질은 세포 독성 효과를 나타낸다는 것이 알려져 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 일 양상은 미토콘드리아 표적화 모이어티 및 (Xaa)n-Lys로 표시되는 펩타이드를 포함하고, 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티는 상기 펩타이드의 리신 아미노산에 연결되어 있는 것이고, 상기 n은 펩타이드 결합을 통하여 연결된 아미노산 Xaa의 개수로서, 2 내지 200의 정수이고, 상기 Xaa는 각각 독립적으로 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파라긴, 글루탐산, 아스파르트산, 글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 프롤린, 글루타민, 히스티딘, 리신, 아르기닌, 티로신, 트립토판 및 이들의 C3-C10 사이클로알킬 결합 변이체로 이루어진 군에서 선택되며, 상기 아미노산은 2개 이상의 아미노산 사이에 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 형성하는 것이고, 상기 펩타이드는 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 포함하는 것인 접합체 (conjugate)의 D-거울상이성질체 및 L-거울상이성질체가 공동으로 조립(co-assembly)되어 형성된 자기조립체(self-assembly)를 제공하는 것이다.

[0005] 다른 양상은 상기 자기조립체를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 일 양상은 미토콘드리아 표적화 모이어티 및 (Xaa)n-Lys로 표시되는 펩타이드를 포함하고, 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티는 상기 펩타이드의 리신 아미노산에 연결되어 있는 것이고, 상기 n은 펩타이드 결합을 통하여 연결된 아미노산 Xaa의 개수로서, 2 내지 200의 정수이고, 상기 Xaa는 각각 독립적으로 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파라긴, 글루탐산, 아스파르트산, 글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 프롤린, 글루타민, 히스티딘, 리신, 아르기닌, 티로신, 트립토판 및 이들의 C3-C10 사이클로알킬 결합 변이체로 이루어진 군에서 선택되며, 상기 아미노산은 2개 이상의 아미노산 사이에 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 형성하는 것이고, 상기 펩타이드는 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 포함하는 것인 접합체 (conjugate)의 D-거울상이성질체 및 L-거울상이성질체가 공동으로 조립(co-assembly)되어 형성된 자기조립체(self-assembly)를 제공한다.

[0007] 상기 펩타이드 (Peptide)는 3 내지 201개의 아미노산이 펩타이드 결합을 통해 연결된 것을 의미하고, 상기 펩타이드는 (Xaa)n-Lys로 표시될 수 있다. 상기 n은 펩타이드 결합을 통하여 연결된 아미노산 개수로서, 2 내지 200, 2 내지 150, 2 내지 100, 2 내지 50, 2 내지 40, 2 내지 30, 2 내지 20, 2 내지 15, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6, 2 내지 4, 또는 2 내지 3의 정수일 수 있고, 상기 Xaa는 각각 독립적으로 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파라긴, 글루탐산, 아스파르트산, 글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 프롤린, 글루타민, 히스티딘, 리신, 아르기닌, 티로신, 트립토판 및 이들의 C3-C10 사이클로알킬 결합 변이체로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으며, 예컨대 상기 n은 2이고 상기 Xaa는 동일한 페닐알라닌, 알라닌, 사이클로헥실 알라닌, 또는 발린이 펩타이드 결합을 이루는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0008] 상기 펩타이드 (Xaa)n-Lys는 아미노산의 N-말단에서 C-말단 순으로 각각의 아미노산 또는 아미노산의 R 그룹에 C3-C10 사이클로알킬기가 결합한 변이체 (C3-C10 사이클로알킬 결합 변이체)가 펩타이드 결합으로 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0009] 상기 펩타이드 (Xaa)n-Lys의 Lys의 C-말단의 카르복실기의 하이드록시기는 아민기, 알코올기, 에테르기, 및 아세틸기로 이루어진 군에서 선택된 것과 치환된 것일 수 있으며, 특정한 화학적 그룹이 결합되지 않을 수도 있으며, 이외에 다른 화학적 그룹이 화학적 결합을 이룬 것 일 수도 있으며, 예컨대 아민기가 결합한 것일 수 있다.

[0010] 상기 C3-C10 사이클로알킬 결합 변이체는 탄소의 숫자가 3 내지 10인 사이클로알킬이 상기 아미노산의 R 그룹에

결합한 것일 수 있으며, 예컨대 알라닌의 R 그룹인 메틸기의 탄소에 사이클로헥실이 결합한 사이클로헥실 알라닌 (Cyclohexyl alanine; CHA)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0011] 상기 펩타이드는 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 펩타이드는 펩타이드에 내부에 존재하거나 다른 펩타이드에 존재하는 2개 이상의 아미노산 사이에 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 형성하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0012] 상기 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조는 단백질을 구성하는 아미노산 서열간의 상호작용으로 형성되는 2차 구조의 하나로서 수평적으로 연결되는 인정 분자간의 수소결합을 통해 형성된다. 상기 베타 쉬트 2차 구조는 많은 인간의 질병에서 단백질 엉김 (aggregates) 또는 섬유 형성과 관계 있는 것으로 알려져 있다.

[0013] 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티 (moiety)는 세포 내부의 미토콘드리아로 해당 물질을 표적화 시키는 기능을 하는 것을 의미하며, 예컨대 TPP (triphenylphosphonium)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0014] 또한, 본 발명에서 접합체를 구성하는 미토콘드리아 표적화 모이어티로 인하여 본 접합체가 세포 내부의 미토콘드리아로 표적화 될 수 있으며, 미토콘드리아의 이중막을 통과하여 상기 접합체가 미토콘드리아 내부로 들어갈 수 있다.

[0015] 본 발명에서 상기 접합체는 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티로 인하여 미토콘드리아로 들어갈 수 있으며, 상기 미토콘드리아 내부로 들어간 접합체는 암세포 특이적이게 암세포의 미토콘드리아 내부에서 합성된 펩타이드의 자기조립 (Self-assembly)체를 형성하여 세포 자멸을 유도할 수 있다.

[0016] 상기 암 세포 내 미토콘드리아에서 자기조립체의 형성에 관하여, 암 세포의경우 암 세포 미토콘드리아의 큰 음성 내부 막 전위에 의해서 상기 약학적 조성물에 포함되어 있는 펩타이드가 축적되고 이를 통해 자기조립 과정이 가속되어 일어나지만, 정상세포의 경우는 음성 막 전위가 암세포에 비해 작기 때문에 펩타이드가 충분히 축적되지 못하여 미토콘드리아 내부에서 자기조립에 의한 섬유 형성이 이뤄지지 않아 상기 자기조립체가 형성되지 않는다.

[0017] 상기 펩타이드에 연결된 미토콘드리아 표적화 모이어티의 개수는 1 내지 상기 (Xaa)n-Lys로 표시되는 펩타이드에 존재하는 아민기 개수 범위에서 선택된 정수일 수 있다. 상기 펩타이드의 C 말단에 아민기가 존재하는 경우, 상기 펩타이드에 연결된 미토콘드리아 표적화 모이어티의 개수는 1 내지 상기 리신 아미노산의 개수 (m)에 1을 더한 숫자인 m+1개 이내의 정수일 수 있다. 일 예에서, 상기 펩타이드에 연결된 미토콘드리아 표적화 모이어티의 개수는 1 개 또는 2개일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

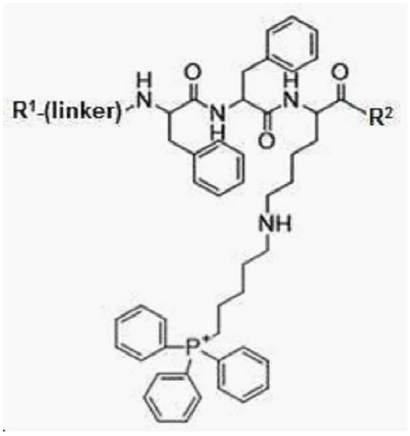
[0018] 본 발명에서 상기 접합체의 펩타이드 N-말단은 형광단과 아마이드 결합으로 연결된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0019] 상기 형광단 (fluorophore)은 유기 화합물이 형광을 발하기 위해 필요한 원자단을 말한다. 본 발명에서 상기 형광단은 상기 펩타이드의 N-말단에 아마이드 결합으로 연결된 것으로, pyrene, NBD (4-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole), perylene, naphtalene, coronene, 및 방향족으로 이루어진 화합물로 평평한 구조를 가지고 있어 파이결합으로 서로 쌓이기 쉬운 형광단으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상이 될 수 있으며, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 상기 펩타이드와 미토콘드리아 표적화 모이어티, 펩타이드와 형광단, 또는 이들 모두는 직접연결 된 것이거나, 링커를 통하여 연결된 것 일 수 있다. 상기 링커는 탄소수 1 내지 10개, 1 내지 5개, 1 내지 4, 또는 2 내지 3인 알킬기 (alkyl), 알켄기 (alkene), 알카인기 (alkyne)가 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 상기 링커는 한 말단에 펩타이드와 아마이드 결합 등의 적절한 결합을 형성할 수 있는 관능기 (functional group)를 포함하는 것일 수 있다.

[0021] 상기 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 하기 화학식 1로 표현될 수 있다:

[0022] [화학식 1]

[0023] 

[0024] 상기 화학식 1에서,

[0025] R^1은 수소 또는 형광단을 의미하는 것으로, 수소, pyrene, NBD (4-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole), perylene, naphtalene, coronene, 및 방향족으로 이루어진 화합물로 평평한 구조를 가지고 있어 파이결합으로 서로 쌓이기 쉬운 형광단으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있고,

[0026] 상기 링커 (linker)는 펩타이드의 N-말단과 형광단을 연결해주는 것으로, 존재하지 않거나, 탄소수 1 내지 10개, 1 내지 5개, 1 내지 4, 또는 2 내지 3인 알킬기 (alkyl), 알켄기 (alkene), 알카인기 (alkyne)가 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

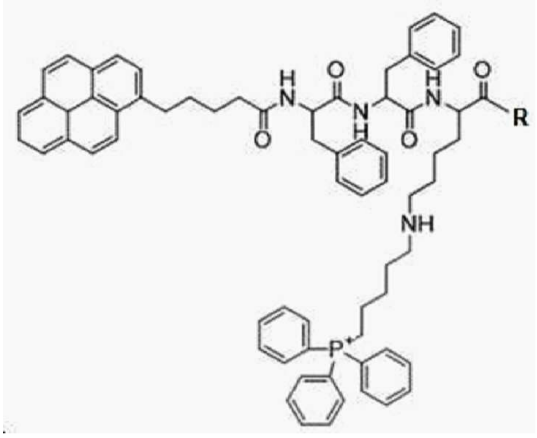
[0027] 또한 상기 링커는 한 말단에 펩타이드와 아마이드 결합 등의 적절한 결합을 형성할 수 있는 관능기 (functional group)를 포함하는 것일 수 있으며, pyrene, NBD (4-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole), perylene, naphtalene, coronene, 및 방향족으로 이루어진 화합물로 평평한 구조를 가지고 있어 파이결합으로 서로 쌓이기 쉬운 형광단으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상과 상기 펩타이드를 아마이드 결합을 통해 연결해 주는 것을 수 있다.

[0028] 다마, 상기 R^1은 수소인 경우, 링커는 존재하지 않을 수 있으며,

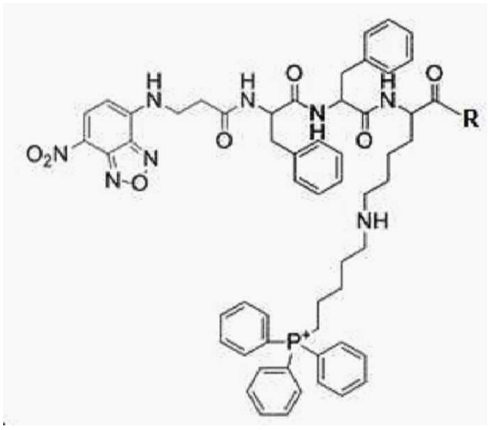
[0029] R^2는 펩타이드의 C-말단 (즉, 리신의 C 말단) 부위로서, 하이드록시기 (OH), 아민기, 알킬기, 알코올기, 에테르기, 및 아세틸기, (상기, 알킬기, 알코올기, 에테르기 및 아세틸기는 탄소수 1 내지 20, 탄소수 1 내지 10, 또는 탄소수 1 내지 5임)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0030] 일 예에서, 상기 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 화학식 2 또는 화학식 3의 구조를 갖는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] [화학식 2]

[0032] 

[0033] [화학식 3]



[0034]

[0035] 상기 화학식 2에서 상기 R이 아민기인 것은 하기 실시예에서 Mito-FF라고 불리는 것으로서, 암 세포내의 미토콘드리아에서 서로 같거나 다른 접합체와 자기조립하여 섬유를 형성할 수 있고, 상기 화학식 3에서 상기 R이 아민기인 것은 하기 실시예에서 Mito-FF-NBD라고 불리는 것으로서, 암세포내의 미토콘드리아에서 서로 같거나 다른 접합체와 자기조립하여 섬유를 형성할 수 있다.

[0036] 본 발명에서 상기 접합체는 양친매성을 나타낼 수 있으며, 상기 양친매성은 극성 및 비극성 물질 모두에 대해 모두 친화성을 갖는 상태를 의미하며, 본 발명의 접합체에서는 펩타이드에 포함된 비극성 아미노산과 형광단이 소수성을, 극성 아미노산이 친수성을 띄어서 접합체 전체적으로 양친매성을 나타낼 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 상기 접합체는 이성질체 형태로 존재할 수 있으며, 이성질체는 분자식은 같으나 공간배열이 동일하지 않은 화합물을 의미하며, 바람직하게는 입체 이성질체 (Stereoisomer)를 의미한다. 입체 이성질체에는 거울상 이성질체 (Enantiomer)와 부분입체 이성질체 (Diastereomer)가 존재한다. 거울상 이성질체는 오른손과 왼손의 관계처럼 그 거울상과 서로 겹쳐지지 않는 이성질체를 말하며, 이를 광학 이성질체 (Optical isomer)라고도 한다. 또한 구조에 따라 D-거울상 이성질체 또는 L-거울상 이성질체로 구분될 수 있다. 부분입체 이성질체는 거울상 관계가 아닌 입체 이성질체를 말하며, 구성 원자들의 공간적 배열이 다른 부분이성질체와 사이클로알케인과 알켄 화합물에서 탄소-탄소 결합의 자유롭지 못한 회전 때문에 원자의 공간 배열이 달라 생긴 cis-trans 이성질체로 나눌 수 있다.

[0038] 다른 양상은 상기 자기조립체를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0039] 상기 자기조립체는 약학적으로 허용되는 염의 형태로 존재할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 산 또는 염기의 부가염 및 그의 입체화학적 이성체 형태를 모두 포함하며, 예컨대, 유기산 또는 무기산의 부가염일 수 있다. 상기 염에는 투여 대상에서 모화합물 (parent compound)의 활성을 유지하며 바람직하지 못한 효과를 유발하지 않는 염이라면 어느 것이든 포함되는 것으로, 특별히 제한되는 것이 아니다.

[0040] 이러한 염에는 무기염과 유기염이 포함되며, 예를 들어, 아세트산, 질산, 아스파트산, 술폰산, 설퓨릭산, 말레산, 글루탐산, 포름산, 숙신산, 인산, 프탈산, 탄닌산, 타르타르산, 히드로브롬산, 프로피온산, 벤젠술폰산, 벤조산, 스테아르산, 락트산(lactic acid), 비카르본산, 비설퓨릭산, 비타르타르산, 옥살산, 부틸산, 칼슘 이데트, 카르보닉산, 클로로벤조산, 시트르산, 이데트산, 톨루엔술폰산, 푸마르산, 글루셉트산, 에실린산, 파모익산, 글루코닉산, 메틸니트릭산, 말론산, 히드로클로린산, 히드로요도익산, 히드록시나프톨산, 이세티온산, 락토비오닉산, 만델산, 점액산, 나프실릭산, 뮤코닉산, p-니트로메탄설포닉산, 헥사믹산, 판토테닉산, 모노히드로겐인산, 디히드로겐인산, 살리실산, 술파민산, 술파닐린산, 메탄술폰산일 수 있다.

[0041] 또한, 상기 염의 형태로는, 암모늄염, 리튬염, 소듐염, 포타슘염, 마그네슘염 및 칼슘염과 같은 알칼리 및 알칼리 토금속의 염, 예를 들어, 벤자틴, N-메틸-D-글루카민, 하이드라바민 염과 같은 유기 염기를 갖는 염, 및 아르기닌, 리신과 같은 아미노산을 갖는 염을 포함한다. 또한, 상기 염 형태는 적당한 염기 또는 산으로 처리함으로써 유리 형태로 전환될 수도 있다.

[0042] 상기 자기조립체, 또는 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 표함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 암 세포 내 미토콘드리아에서 자기조립체를 형성하여 세포 자멸을 유도하는 것 일수 있다.

[0043] 상기 세포 자멸 (apoptosis)은 세포가 유전자에 의해 제어되어 죽는 방식의 한 형태로, 세포의 괴사나 병적인 죽음으로서 화상과 타박, 독극물 등의 자극에 의해 일어나는 세포의 죽음인 네크로시스와는 구별되는 것으로서, 세포가 축소되면서 시작되어, 이후 인접하는 세포 사이에 틈새가 생기고, 세포 내에서는 DNA가 규칙적으로 절단되어 단편화되는 방법으로 세포가 사망하는 것을 말한다.

[0044] 상기 암 세포 내 미토콘드리아에서 자기조립체의 형성에 관하여, 암 세포의경우 암 세포 미토콘드리아의 큰 음성 내부 막 전위에 의해서 상기 약학적 조성물에 포함되어 있는 펩타이드가 축적되고 이를 통해 자기조립 과정이 가속되어 일어나지만, 정상세포의 경우는 음성 막 전위가 암세포에 비해 작기 때문에 펩타이드가 충분히 축적되지 못하여 미토콘드리아 내부에서 자기조립에 의한 섬유 형성이 이뤄지지 않아 상기 자기조립체가 형성되지 않는다.

[0045] 상기 약학적 조성물의 예방 또는 치료의 대상이 되는 암은 고형암 또는 혈액암일 수 있고, 원발성암 또는 전이암일 수 있다. 상기 암은 자궁경부암, 간암, 피부암, 전립선암, 유선암, 유방암, 비인두 선암, 폐암, 또는 뇌종양으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 약학적 조성물은 의도한 투여 방법에 적합한 임의의 형태일 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 있어서 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 약학적 조성물의 투여경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여 등을 거론할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0047] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 바람직하게는 경구로 투여된다. 비경구로 투여되는 경우, 본 발명의 약학 조성물은 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입 및 복강 주입 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여 경로가 결정되는 것이 바람직하다.

[0048] 일 구현예는 경구 투여용 제형 또는 비경구 투여 제형으로 제형화된 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0049] 본 명세서에서 제공되는 약학 조성물은, 통상의 방법에 따라 제형화 된, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 또는 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 외용제, 좌제, 멸균 주사 용액, 이식용 제제 등의 비경구용 제형 등으로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0050] 상기 약학 조성물은 유효성분 (즉, 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염) 이외에 제형화에 사용 가능한 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있다.

[0051] 본 발명의 약학적 조성물의 제형화에 사용될 수 있는 부형제는 담체, 비히클, 희석제, 용매, 예를 들어 1가 알코올, 예를 들어 에탄올, 이소프로판올 및 다가 알코올, 예를 들어 글리세롤 및 식용 오일, 예를 들어 대두유, 코코넛유, 올리브유, 잇꽃유, 면실유, 유성 에스테르, 예를 들어 에틸 올레에이트, 이소프로필 미리스테이트; 결합제, 애주번트, 가용화제, 증점제, 안정화제, 붕해제, 활택제, 윤활제, 완충제, 유화제, 습윤제, 현탁제, 감미제, 착색제, 풍미제, 코팅제, 방부제, 항산화제, 가공제, 약물 전달 개질제 및 향상제(enhancer), 예를 들어 인산칼슘, 마그네슘 스테이트, 활석, 단당류, 이당류, 전분, 젤라틴, 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 덱스트로스, 하이드록시프로필-β-사이클로덱스트린, 폴리비닐피롤리돈, 저융점 왁스, 이온 교환 수지 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0053] 상기 약학적 조성물은 다양한 경구 투여 제형의 형태로 제형화 될 수 있다. 예를 들어, 정제, 환제, 경·연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭서제(elixirs) 등의 임의의 경구 투여용 제형으로 될 수 있다. 이러한 경구 투여용 제형은 각 제형의 통상적인 구성에 따라 상기 유효 성분 외에, 예를 들어, 락토즈,

덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신 등의 희석제나, 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜 등의 활택제 등의 제약상 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다.

[0054] 또한, 상기 경구 투여용 제형이 정제인 경우, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘 등의 결합제를 포함할 수 있고, 경우에 따라, 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염과 같은 붕해제나, 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 또는 감미제 등을 포함할 수도 있다.

[0055] 그리고, 상기 약학적 조성물은 비경구투여 제형의 형태로 제형화 될 수도 있는데, 이러한 경우 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 등의 비경구투여 방법에 의해 투여된다. 이때, 상기 비경구투여 제형으로 제제화하기 위하여, 상기 약학적 조성물은 유효 성분이 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합되어 용액 또는 현탁액으로 제조되고, 이러한 용액 또는 현탁액이 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제조될 수 있다.

[0056] 또한, 상기 약학적 조성물은 멸균되거나, 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제를 더 포함할 수도 있고, 기타 치료적으로 유용한 물질을 더 포함할 수도 있으며, 혼합, 과립화 또는 코팅의 통상적인 방법에 따라 제제화될 수 있다.

[0057] 상기 약학적 조성물 내의 자기조립체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 함량은 약학 조성물의 사용 목적, 제형의 형태 등에 따라서 적절하게 조절 가능하며, 예컨대, 약학 조성물의 전체 중량 기준으로 0.001 내지 99중량%, 0.001 내지 90중량%, 0.001 내지 50중량%, 0.01 내지 50중량%, 0.1 내지 50중량%, 또는 1 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 또한, 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 자기조립체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 치료상 유효량은 질환 치료 효과를 기대하기 위하여 투여에 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 환자의 질환 종류, 질환의 경중, 투여되는 유효성분의 종류, 제형의 종류, 환자의 연령, 성별, 체중, 건강 상태, 식이, 약물의 투여 시간 및 투여 방법에 따라 조절될 수 있다. 예를 들어, 사람을 포함하는 포유류에 대하여, 하루에 0.01 내지 500 ㎎/㎏(체중)의 약학적 유효량으로 투여될 수 있다. 상기 약학적 유효량은 원하는 효과, 예를 들어 암의 치료 및/또는 예방 효과를 얻을 수 있는 양에 따를 수 있다. 상기 약학적 유효량은 1 일 1 회 또는 2 회 이상 분할되어 경구 또는 비경구적 경로(예를 들어, 정맥 주사, 근육 주사 등)를 통해 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0059] 일 양상에 따른 자기조립체 및 이를 포함하는 약학적 조성물에 의하면, 암 세포의 미토콘드리아를 표적하여 암의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 세포의 미토콘드리아 내에서 펩타이드가 공동으로 조립되는 것을 도식화한 것이다:

도 1a는 Mito-rac이 미토콘드리아 내에서 공동 조립된 그림이고; 도 1b는 Mito-FF가 미토콘드리아 내에서 공동 조립된 그림이다.

도 2는 Mito-FF 및 Mito-ff의 구조를 나타낸 그림이다.

도 3은 CD 스펙스럼을 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 푸리에-변환 적외선(Fourier-transform infrared, FR-IR) 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5a는 CAC (Critical aggregation concentration) 값을 분석한 결과를 나타낸 그래프이고; 도 5b는 혼탁도 분석과 광산란 실험 결과를 나타낸 사진 및 그래프이며; 도 5c는 방출 스펙트럼을 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6a는 Mito-FF의 투과 전자 현미경(TEM) 이미지이고; 도 6b는 Mito-ff의 TEM 이미지이며; 도 6c는 Mito-rac의 TEM 이미지이고; 도 6d는 Mito-FF의 Cryo-TEM 이미지이며; 도 6e는 Mito-ff의 Cryo-TEM 이미지이고; 도 6f는 Mito-rac의 Cryo-TEM 이미지이며; 도 6g는 Mito-FF의 공 초점 현미경 이미지이고; 도 6h는 Mito-ff의 공 초점 현미경 이미지이며; 도 6i는 Mito-rac의 공 초점 현미경 이미지이다.

도 7은 코스-그레인드 (Coarse-grained, CG) 모델을 나타낸 그림이다.

도 8a는 Mito-FF 섬유에서 피렌 스태킹 구조와 결합에너지를 나타낸 그림이고; 도 8b는 한 쌍의 Mito-FF 백본이 밀접하게 마주하고 있는 구조를 나타낸 그림이며; 도 8c는 Mito-rac에서 Mito-FF와 Mito-ff의 백본이 이루는 이면각의 확률분포를 나타낸 그래프이고; 도 8d 및 도 8e는 Mito-FF와 Mito-ff의 피렌 스태킹 구조와 결합에너지를 나타낸 그림이다.

도 9는 방사형 분포 함수 (radial distribution functions, RDFs)를 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 10a는 Mito-rac 의 섬유 다발을 형성한 것을 나타낸 그림이고; 도 10b는 RDF를 분석한 결과를 나타낸 그래프이며; 도 10c는 Mito-FF 가 이루는 섬유를 나타낸 그림이다.

도 11a는 L-Mito-FF-NBD의 구조를 나타낸 그림이고; 도 11b는 시간에 따라 L-Mito-FF-NBD가 Mito-FF 또는 Mito-ff와 공동조립을 이루는 것을 나타낸 그림이며; 도 11c는 시간 의존 공 초점 현미경 분석한 결과를 나타낸 이미지이고; 도 11d는 유세포 분석기로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 12는 공 초점 현미경 분석 결과를 나타낸 이미지이다:

도 12a는 미토콘드리아의 단편화를 관찰한 이미지이고; 도 12b는 미토콘드리아 막의 탈분극을 관찰한 이미지이다.

도 13은 세포 독성 분석 결과를 나타낸 그래프이다:

도 13a는 HT-29 암세포에서 세포 독성 결과를 나타낸 그래프이고; 도 13b는 IMR-90 정상 세포에서 세포 독성 결과를 나타낸 그래프이다.

도 14a는 마우스에서 종양 치료 효능을 보기 위해 찍은 옵티컬 이미지이고; 도 14b는 시간에 따라 종양의 부피를 나타낸 그래프이며; 도 14c는 시간에 따른 마우스의 체중을 나타낸 그래프이고; 도 14d 및 도 14e는 Mito-rac이 처리된 종양 절편의 미토콘드리아를 찍은 TEM 이미지이다.

도 15는 CGMD 시뮬레이션 결과를 나타낸 그림이다:

도 15a는 Mito-rac에 의한 암 세포막 결함 영역을 나타낸 그림이고; 도 15b는 Mito-FF에 의한 암 세포막 결함 영역을 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0062] **실험재료 및 기구**

[0063] 모든 펩타이드는 0.25 μM 규모로 수동으로 합성되었다. 생성물을 ACN/물 혼합물 중의 C18 역 칼럼을 갖는 고성능 액체 크로마토그래피(High-performance liquid chromatography, HPLC, Agilent Technologies, USA)로 정제하였다. 아미노산은 비드 테크(Bead Tech, Korea) 및 APEX 바이오(APEX Bio, Houston, USA)에서 구입하였다. 테트라 메틸 로다민 메틸 에스테르(The tetra methyl rhodamine methyl ester, TMRM)는 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnologies, Korea)로부터 구입하였다. 살아있는 세포의 미토콘드리아를 형광염색할 수 있는 제품인 MitoSox와 Mito Tracker Red FM은 라이프 테크놀로지(Life Technologies)에서 구입하였다. 펩타이드의 합성은 매트릭스 보조 레이저 탈착 / 이온화 (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI-TOF / TOF, Bruker, Ultraflex III)로 확인하였다. 공 초점 레이저 스캐닝 현미경 이미지(confocal laser scanning microscopy(CLSM) images)는 LSM 780(Zeiss)로 찍었다. 투과 전자 현미경 이미지(transmission electron microscopy(TEM) images)는 BioTEM 시스템 (JEOL, JEM 1400)을 사용하여 얻었다. 분광 형광 분석은 형광 분석기인 Cary Eclipse(Agilent)를 사용하여 수행하였다. CD 스펙트럼은 CD 분광기 (JASCO)를 사용하여 확인하였다. 계수율(count rate) 분석은 zetasizer(Malvern)를 사용하여 수행하였다. 유세포 분석은 BD LSRFortessa(BD Biosciences) 를 사용하여 수행하였다. 세포 독성 분석은 플레이트 판독기 SpectraMax M5(Molecular Devices)를 사용하여 수행하였다.

[0064] **실시예 1. Mito-FF 및 Mito-ff의 합성**

[0065] Mito-FF는 L-form 형태의 Phe-Phe-Lys (FFK)의 3개의 펩타이드를 기본 단위로 구성되어 있고, 9-fluorenylmethoxycarbonyl chemistry (Fmoc)를 기초로 표준 고체 상 합성 (standard solid phase synthesis

(SSPS))방법을 이용하여 하기와 같이 합성하였다.

[0066] Mito-FF는 0.25 nmol 규모로 표준 9-fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase peptide synthesis를 사용하여 합성했다. 합성된 펩타이드에 대하여 diisopropyl ethyl amine (DIPEA, 500 umol)의 존재하에서 1-pyrene carboxylic acid (500 umol) 및 O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N′ '-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) (500 umol)을 처리하고 DMF (dimethylformamide)상에서 상온에서 24시간 동안 저어 가며 섞어주었다. Resin은 filtration을 통해 모으고 반응하지 않은 화합물을 제거하기 위해서 DMF로 세척했다. cleavage cock tail TFA/Water/Tri isopropyl amine mixture (9.5:0.5:0.5)를 사용하여 resin에서 절단한 생산물을 차가운 Ether 내에서 침전시켰다. 생산물은 HPLC에 의해서 정제하고, MALDI-TOF/TOF를 사용하여 질량분석을 수행하였다. triphenyl phosphonium (TPP)의 conjugation을 위해서, 합성된 펩타이드 (0.02 mmol)는 DMF 상에서 1-hexyl triphenylphosphonium bromide salt (0.04 mmol)과 tri ethyl amine (0.02 mmol)을 처하고 상온에서 12시간 동안 저어 가며 섞어주었다. 순수한 생산물은 HPLC를 이용하여 정제하고, 말린 후 얼려서 보관한다. Mito-ff 합성은 D-form 형태의 Phe-Phe-Lys (FFK)의 3개의 펩타이드를 이용하여, 위와 동일한 방법으로 합성을 진행하였다.

[0067] 상기의 방법으로 합성된 Mito-FF와 Mito-ff의 펩타이드 N 말단은 형광 검출이 가능하게 하기 위해서 pyrene (butyric acid)과 연결되어 있고, 리신의 곁사슬의 아민 그룹은 미토콘드리아 타겟팅을 위해 TPP와 연결되어 있다. Mito-FF에서 피렌(pyrene)부분은 형광원으로 작용할 뿐만 아니라 소수성 결합력 및 파이-파이 상호결합을 향상시켜 자기조립을 향상시킨다.

[0068] 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 Mito-FF와 Mito-ff의 분자 구조를 나타낸 그림이다.

[0069] **실험예 1. Mito-rac의 특성 분석**

[0070] Mito-rac의 특성을 분석하기 위한 실험을 수행하였다. Mito-rac은 상기 실시예 1에서 제조된 Mito-FF와 이의 D-거울상 이성질체인 Mito-ff가 등몰로 공동으로 조립(co-assembly)된 것을 의미한다.

[0071] 먼저, 원평광 이색성(Circular dichroism, CD) 스펙트럼을 분석하였다. 펩타이드를 saline phosphate buffer (250 μM, PBS)에 녹여 CD 스펙트럼을 분석하였다. 그 결과 Mito-FF는 음의 코튼 효과(Cotton effect)를 나타내었고, Mito-ff는 양의 코튼 효과를 나타내었으며, Mito-rac은 아무 신호도 나타내지 않았다(도 3). 이는 Mito-rac이 Mito-FF와 Mito-ff의 등몰의 혼합물로써, 상쇄 간섭에 의해 아무 신호도 나타내지 않은 것을 의미한다.

[0072] Mito-rac의 형성으로 구조가 변형되지 않는지를 확인하기 위하여 푸리에-변환 적외선(Fourier-transform infrared, FR-IR) 분석을 수행하였다. 구체적으로, Mito-FF, Mito-ff 및 Mito-rac을 각각 물에 녹여 100 μM 용액을 제조하여, 하루 동안 동결 건조시켰다. 수집된 분말을 ATR 모드에서 FT-IR 분광기 (VARIAN)를 사용하여 분석하였다. 그 결과 1630 및 1670 cm^{-1}에서 피크를 갖는 거울상 이성질체의 변화가 없으므로 Mito-rac에서 베타 쉬트(beta-sheet) 구조가 보존되었음을 확인하였다(도 4). 이러한 결과는 Mito-rac이 거울상 이성질체와 동일한 2차 구조를 가지고 있음을 의미한다.

[0073] 도 3은 CD 스펙스럼을 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0074] 도 4는 푸리에-변환 적외선(Fourier-transform infrared, FR-IR) 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0075] **실험예 2. Mito-rac의 응집현상 분석**

[0076] Mito-rac의 응집현상을 Mito-FF 및 Mito-ff와 비교하기 위한 실험들을 수행하였다.

[0077] 먼저, 세포 내부에서 분자가 자기조립이 되기 위해서는 세포내의 분자의 농도가 CAC (Critical aggregation concentration) 값보다 훨씬 높아야 하는데, 본 발명의 Mito-rac이 세포 내부에서 자기조립이 될 수 있는지 확인하기 위해서 Mito-rac의 CAC값을 분석하였다. 구체적으로, 피렌은 응집하지 않은 분자 개체로 존재할때와, 응집하여 존재할때 excitation spectrum에서의 344 nm와 339 nm 의 빛의 강도가 달라지게 되는데, 상기 344 nm와 339 nm에서의 excitation spectrum을 측정하고 344 nm와 339 nm excitation spectrum의 비율을 구하여 도 5의 표준곡선을 통해 Mito-rac의 CAC값을 결정하였다. 그 결과, Mito-rac의 CAC값은 30 μM 임을 확인하였다(도 5a). 이는 Mito-FF나 Mito-ff의 CAC값인 60 μM보다 절반인 값으로, Mito-rac이 Mito-FF 또는 Mito-ff 보다 자기조립이 더 쉽게 가능한 것을 의미한다.

[0078] 또한, Mito-FF, Mito-ff, 및 Mito-rac의 농도를 100 μM 로 하여 PBS 상에서 혼탁도를 분석하였을 때, Mito-

rac은 낮은 농도에서 큰 응집체를 이뤄 혼탁함을 보였다. 육안으로 볼 때, Mito-rac의 자기 조립 용액은 같은 농도의 Mito-FF, Mito-ff 용액보다 더 혼탁함을 확인하였다(도 5b). 이러한 결과는 Mito-FF, Mito-ff, Mito-rac을 200 μM 농도로 하여 PBS 상에서 광산란 실험을 수행한 결과, 동일한 농도에서 Mito-rac이 251.96 ± 22.3 kcps의 계수율을 보여, Mito-FF 및 Mito-ff가 각각 70.2 ± 14 kcps, 63.8 ± 9.1 kcps의 계수율을 보이는 것에 비해 높은 계수율을 나타낸 것과 일치하는 결과이다(도 5b).

[0079] 피렌 분자는 응집할 때 다른 방출 특성을 나타내므로, Mito-FF, Mito-ff, Mito-rac의 농도를 200 μM 으로 하여 PBS에서 방출 스펙트럼을 분석하였다. 그 결과, Mito-rac은 피렌 분자 간의 덜 안정하거나 불안정한 파이-파이(π-π) 상호 작용을 나타내는 엑시머 영역(excimeric region)에서의 피크의 확대와 함께, Mito-rac의 방출 강도가 현저하게 감소하였다(도 5c).

[0080] 상기와 같은 실험 결과들은 Mito-rac의 자기조립체가 Mito-FF 또는 Mito-ff의 자기조립체와 상당히 다르다는 것을 보여 주는 결과이고, Mito-rac은 더 큰 응집체로 자기조립되며, Mito-rac의 자기조립체가 Mito-FF 또는 Mito-ff의 자기조립체보다 자기조립하는 경향이 높음을 의미한다.

[0081] 도 5a는 CAC (Critical aggregation concentration) 값을 분석한 결과를 나타낸 그래프이고; 도 5b는 혼탁도 분석과 광산란 실험 결과를 나타낸 사진 및 그래프이며; 도 5c는 방출 스펙트럼을 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0082] **실험예 3. Mito-rac의 섬유 구조 분석**

[0083] Mito-FF, Mito-ff, 및 Mito-rac의 형태를 투과 전자 현미경(TEM)으로 관찰하였다.

[0084] 구체적으로, Mito-FF, Mito-ff 및 Mito-rac의 농도를 PBS 용액에서 100 μM로 하여, 한 방울을 포름바/카본 코팅 구리 격자판 (formvar / carbon-coated copper grid)에 놓고 대기조건에서 증발시켰다. 샘플을 2 중량% 우라닐 아세테이트(uranyl acetate) 용액으로 염색하고, 1 분 동안 증발시키고, 초과된 용액을 여과지로 제거하였다. 그 다음, 120 kV에서 작동하는 JEM-1400 TEM으로 관찰하였다. Image J 프로그램을 사용하여 100개 이상의 나노 섬유로 자기조립 된 Mito-FF, Mito-ff 및 Mito-rac 섬유 구조 정보를 10개 이상의 현미경 사진으로 얻었다. 그 결과, Mito-FF 및 Mito-ff는 직경이 약 10 nm 인 좁은 섬유로 자기 조립된 반면(도 6a, 도 6b), Mito-rac은 두꺼운 섬유 번들을 형성하고 있고 개별 섬유는 거의 보이지 않았다(도 6c). Mito-rac 번들의 직경은 30 ~ 100 nm 범위로, 다분산적이었다. 이는 많은 섬유가 응집되어 수퍼-섬유를 형성한 것이다.

[0085] 용액에서의 Mito-FF, Mito-ff, 및 Mito-rac의 섬유 형성을 더 확인하기 위하여 저온 투과 전자 현미경 (cryo-TEM)으로 관찰하였다. Mito-FF와 Mito-ff의 cryo-TEM 이미지는 건조된 TEM에서 관찰된 것과 비슷하게, 직경이 좁은 섬유 구조를 보였다(도 6d,도 6e). Mito-rac의 cryo-TEM 이미지에서는, 등몰 농도의 Mito-FF 및 Mito-ff를 함유하는 용액에서, Mito-FF 및 Mito-ff 섬유보다 두껍고 여러 다른 직경으로 이루어진 수퍼-섬유 구조를 확인했다(도 6f).

[0086] Mito-rac 수퍼-섬유의 구조를 고해상도 공 초점 현미경(confocal microsopy)을 사용하여 추가로 관찰하였다.

[0087] 공 초점 현미경으로 Miro-rac 구조를 확인하기 위해, Mito-FF-NBD라고 하는 또 다른 펩타이드를 합성하였다. Mito-FF-NBD는 Mito-FF의 펩타이드 유사체로서, 피렌 대신 4-니트로-2,1,3-벤즈옥사디아졸 (4-nitro-2,1,3-benzoxadiazole, NBD)을 가진다. NBD 염료는 생물학적 요소에 대한 이미징 연구에서 사용되는 형광단으로 친수성 환경에 비해 소수성 환경에서 보다 강렬한 형광을 나타내는 것으로 알려졌고 이러한 성질을 이용하여 세포 내부의 섬유 형성를 확인하는데 사용할 수 있다.

[0088] PBS에서 Mito-FF, Mito-ff, 및 Mito-rac을 10%의 Mito-FF-NBD로 각각 섞어준 다음, 공 초점 현미경(confocal microsopy)을 사용하여 관찰하였다. 그 결과, Mito-FF 및 Mito-ff는 섬유가 보이지 않고 희미한 이미지를 보인 반면(도 6g, 도 6h), Mito-rac은 직경이 100 nm인 수퍼-섬유를 형성하여 뚜렷한 녹색의 섬유 네트워크가 관찰되었다(도 6i). 이러한 결과는, Mito-FF 및 Mito-ff가 좁은 섬유로 존재하고 Mito-rac은 수퍼-섬유로 존재하여 형태학적 차이가 있음을 의미한다.

[0089] 도 6a는 Mito-FF의 투과 전자 현미경(TEM) 이미지이고; 도 6b는 Mito-ff의 TEM 이미지이며; 도 6c는 Mito-rac의 TEM 이미지이고; 도 6d는 Mito-FF의 Cryo-TEM 이미지이며; 도 6e는 Mito-ff의 Cryo-TEM 이미지이고; 도 6f는 Mito-rac의 Cryo-TEM 이미지이며; 도 6g는 Mito-FF의 공 초점 현미경 이미지이고; 도 6h는 Mito-ff의 공 초점 현미경 이미지이며; 도 6i는 Mito-rac의 공 초점 현미경 이미지이다.

[0090] **실험예 4. Mito-rac의 피렌-피렌 스태킹 분석**

[0091] Mito-rac 수퍼-섬유가 분자 수준에서 형성되는 메커니즘을 확인하기 위해, 코스-그레인드 분자 역학(coarse-grained molecular dynamics, CGMD)을 사용하여 분석하였다. 먼저, Mito-rac과 Mito-FF, Mito-ff 사이의 구조적 차이를 확인하였다. 30 nm의 길이를 갖는 Mito-rac 섬유를 제외하고, 반경과 길이가 각각 약 ~2.5 및 32nm인 좁은 섬유를 형성하는 Mito-FF, Mito-ff 및 Mito-rac에는 피렌, TPP, 페닐 및 백본 (BB) 그룹의 4 가지 구성성분이 존재한다(도 7).

[0092] 또한, 각 섬유에서 피렌 그룹이 서로 다른 스태킹(stacking) 패턴을 보여 주는 것을 확인하였다. 구체적으로, 결합 에너지는 COMPASS Ⅱ force field를 사용하여 분자 역학 계산으로 계산하였다. 그 결과, Mito-FF, Mito-ff 는 안정한 피렌 스태킹으로 패킹(packed)될 때 -138 kcal / mol의 높은 결합 에너지를 나타낸 반면(도 8a, 도 8b), Mito-rac 섬유에서는, Mito-FF와 Mito-ff 가 섬유 내에서 서로 마주 보게 될 때 Mito-FF와 Mito-ff 의 백본 이면각은 서로 중첩되지 않았다(도 8c). 이는 Mito-FF 및 Mito-ff는 각각의 거울상 이성질체의 이면각이 호모 거울상 이성질체 조립체(homo enantiomeric assembly)에서 동일한 분포를 선호하기 때문에, 순수한 거울상 이성질체와 상이한 상호 작용을 갖는다는 것을 의미한다. 이러한 특정 배향은 거울상 이성질체보다 높은 결합 에너지를 가진 Mito-FF 및 Mito-ff 의 밀접하게 대면된 백본 때문에 얻어졌고, 결과적으로 피렌의 느슨한 스태킹을 초래했다(도 8d, 도 8e). 또한, Mito-FF와 Mito-ff 사이의 피렌 스태킹은 도 9에서 방사형 분포 함수(radial distribution functions, RDFs)의 첫 번째 피크에서 상당한 차이가 나타나는 바와 같이, 순수한 거울상 이성질체보다 적게 발생했다. 이러한 Mito-FF / Mito-ff의 낮은 피크 강도는 Mito-FF / Mito-FF 및 Mito-ff / Mito-ff의 것보다 낮은 피렌 스태킹을 의미하고, 도 5c의 방출 스펙트럼에서 Mito-rac의 피렌 엑시머 강도가 Mito-FF 및 Mito-ff보다 낮게 나온것과 일치하는 결과이다.

[0093] 도 7은 코스-그레인드 (Coarse-grained, CG) 모델을 나타낸 그림이다.

[0094] 도 8a는 Mito-FF 섬유에서 피렌 스태킹 구조와 결합에너지를 나타낸 그림이고; 도 8b는 한 쌍의 Mito-FF 백본이 밀접하게 마주하고 있는 구조를 나타낸 그림이며; 도 8c는 Mito-rac에서 Mito-FF와 Mito-ff의 백본이 이루는 이면각의 확률분포를 나타낸 그래프이고; 도 8d 및 도 8e는 Mito-FF와 Mito-ff의 피렌 스태킹 구조와 결합에너지를 나타낸 그림이다.

[0095] 도 9는 방사형 분포 함수 (radial distribution functions, RDFs)를 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0096] **실험예 5. Mito-rac의 섬유 번들 형성 분석**

[0097] Mito-rac 섬유가 피렌 그룹을 갖는 인접 분자와 상호 작용하는 능력을 분석하기 위해, Mito-FF/Mito-ff 용액에 3 개의 Mito-rac 섬유를 넣었다. 그 결과, Mito-FF/Mito-ff는 Mito-rac 섬유의 표면에 즉시 부착되었고, 단일 섬유를 연결하여 섬유 다발을 형성하였다(도 10a). 표면 결합 영역에서, Mito-분자는 규칙적인 구조 또는 결합 부위의 특이적 형성없이 피렌-TPP와 피렌-피렌 상호 작용을 통해 결합되었으며, 이는 RDF 분석에 의해 확인되었다(도 10b). 이에 반해, Mito-FF 분자가 있는 용매 내에서 Mito-FF 섬유는, 섬유 내에 밀집된 피렌으로 인해 번들을 형성하지 못하고 좁은 섬유로 존재했다(도 10c). 이러한 결과는 Mito-rac 수퍼-섬유의 형성이 인접한 분자와의 상호 작용의 결과, 즉 피렌 사이의 거리 증가 때문인 것을 의미한다.

[0098] 도 10a는 Mito-rac 의 섬유 다발을 형성한 것을 나타낸 그림이고; 도 10b는 RDF를 분석한 결과를 나타낸 그래프이며; 도 10c는 Mito-FF 가 이루는 섬유를 나타낸 그림이다.

[0099] **실험예 6. 미토콘드리아 내부에서의 Mito-rac의 자기조립체 형성 분석**

[0100] 미토콘드리아 내부에서 Mito-rac의 자기 조립을 연구하기 위해, 우리는 시간 의존 공 초점 현미경 분석(time-dependent confocal microscopic analysis)을 수행하여, 시간에 따라 L-Mito-FF-NBD와 Mito-FF 또는 Mito-ff의 공동 조립시의 형광을 관찰했다. 구체적으로, HeLa 세포를 40 μM의 L-Mito-FF-NBD / Mito-FF 또는 L-Mito-FF-NBD / Mito-ff 혼합물과 동시에 배양하고, 다른 시간 포인트에서 미토콘드리아에서의 녹색 형광 방출을 관찰했다. 그 결과, L-Mito-FF-NBD / Mito-ff에서는 30분 안에 녹색 형광이 빠르게 나타나는 것에 반해, L-Mito-FF-NBD / Mito-FF에서 녹색 형광이 희미하게 관찰되었다. 1 시간 후에는, L-Mito-FF-NBD / Mito-ff로부터 녹색 형광 방출은 더 증가했다(도 11c). 이러한 L-Mito-FF-NBD / Mito-ff의 빠르고 밝은 녹색 형광 방출은 L-Mito-FF-NBD / Mito-FF와 비교하여 라세미체의 공동 조립이 세포 내 환경에서 가능하다는 것을 의미한다.

[0101] 상기 관찰을 정량적으로 확인하기 위해, 유세포 분석 (Flow cytometric analysis, FACS)을 수행하였다. 구체적으로, HeLa 세포를 37 ℃, 5 % CO_2 조건 하에 10 % FBS 및 1 % 페니실린 / 스트렙토마이신이 함유된 DMEM (Life

Technologies)가 담겨있는 25-mL T-플라스크 (Thermo Scientific)에서 파종하였다. 그 후, 각각 20 μM의 L-Mito-FF-NBD / Mito-FF 및 L-Mito-FF-NBD / Mito-ff 를 세포와 함께 0.5 시간 및 1 시간 동안 배양하였다. 그 다음, 세포를 수집하여 차가운 PBS로 세척한 후, 488 nm에서 유세포 분석기 (FACS ealibur, BD Bioscience)로 형광 방출을 측정하였다. 그 결과 L-Mito-FF-NBD / Mito-FF보다 L-Mito-FF-NBD / Mito-ff를 함께 배양한 세포에서 더 빠르고 강한 녹색 형광 방출을 나타내어, 살아있는 암세포의 미토콘드리아 내부에서 라세믹 공동 조립의 발생을 확인했다(도 11d).

[0102] 도 11a는 L-Mito-FF-NBD의 구조를 나타낸 그림이고; 도 11b는 시간에 따라 L-Mito-FF-NBD가 Mito-FF 또는 Mito-ff와 공동조립을 이루는 것을 나타낸 그림이며; 도 11c는 시간 의존 공 초점 현미경 분석한 결과를 나타낸 이미지이고; 도 11d는 유세포 분석기로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0103] **실험예 7. 미토콘드리아 내부에서의 Mito-rac 자기조립체의 영향 분석**

[0104] 미토콘드리아 내부에서의 Mito-rac 수퍼-구조 섬유의 영향을 관찰하기 위해 공 초점 현미경 분석을 수행하였다. 구체적으로, 인간 백인 전립선 암 세포주 (human Caucasian prostate adenocarcinoma, PC-3)를 Mito Tracker Red FM으로 표지하고, 2μM의 Mito-FF, Mito-ff 및 Mito-rac 을 각각 함께 배양하였다. 24 시간 후 공 초점 이미지를 확인한 결과, Mito-rac과 함께 배양된 세포에서, 미토콘드리아에서 세포질로의 Mito Tacker의 누출과 함께 미토콘드리아의 총 파괴 및 단편화가 관찰되었다. 이에 반해, Mito-FF 또는 Mito-ff 와 함께 배양된 세포에서는 미토콘드리아에 아무런 영향이 없었다(도 12a). 또한, Mito-rac과 함께 배양된 세포의 미토콘드리아 막에서, Mito-FF 또는 Mito-ff와 비교하여 빠른 막의 탈분극이 관찰되었다(도 12b). 이러한 결과는, 상기 관찰했던 Mito-rac의 CAC 및 형태와 관련하여, Mito-rac이 처리되었을 때 수퍼-구조의 형성에 의해 미토콘드리아가 파괴되며, 이에 반해 Mito-FF 또는 Mito-ff 는 미토콘드리아 파괴를 유도하기 위해 훨씬 많은 분자 축적이 필요하다는 것을 의미한다.

[0105] 도 12는 공 초점 현미경 분석 결과를 나타낸 이미지이다:

[0106] 도 12a는 미토콘드리아의 단편화를 관찰한 이미지이고; 도 12b는 미토콘드리아 막의 탈분극을 관찰한 이미지이다.

[0107] **실험예 8. Mito-rac의 세포 독성 분석**

[0108] Mito-rac의 수퍼-섬유 구조에 의한 세포 독성 분석을 수행하였다. 구체적으로, 상기 실시예 1에서 제조한 Mito-FF, Mito-ff, Mito-RAC가 암세포에 대한 세포사멸 활성을 갖는지 확인하였다. 구체적으로, 세포 독성 분석을 위해서, 위의 3종류의 펩타이드를 각각 HT-29 세포 (사람 결장 선암), IMR 90 섬유 아세포와 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies)를 포함하는 DMEM(Life Technologies) 배지하의 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 그 다음, Alamar blue assay(Thermo Fisher Scientific)를 제조사의 프로토콜을 사용하여 세포 생존율을 세포 배양 후 72시간 뒤에 측정하였다. 그 결과, 72 시간 배양 후 HT-29 (사람 결장 선암) 세포주에서는 Mito-FF, Mito-ff 보다 높은 세포 독성을 나타냈다(도 13a). 그러나 암 세포주가 아니라 정상 세포주인 IMR-90 섬유 아세포에서는 미토콘드리아에서 축적이 낮아서 독성을 유발한 분자는 없었다(도 13b). 이러한 결과는 Mito-rac이 정상 세포에 대하여는 무해하다는 것을 의미한다.

[0109] 도 13은 세포 독성 분석 결과를 나타낸 그래프이다:

[0110] 도 13a는 HT-29 암세포에서 세포 독성 결과를 나타낸 그래프이고; 도 13b는 IMR-90 정상 세포에서 세포 독성 결과를 나타낸 그래프이다.

[0111] **실험예 9. 생체 내에서 Mito-rac의 종양 치료 효능 분석**

[0112] 생체 내에서 Mito-rac에 의한 치료 효능을 분석하기 위해 종양 억제 정도를 관찰하였다. 구체적으로, 생쥐 실험은 한국 과학 기술 연구원 (KIST)의 가이드 라인에 따라 수행되었다. 동물 실험을 위해, Zoletil-Rompun 혼합물을 BALB / c 누드 마우스 (수컷, ~ 20g 체중, 생후 5 주; Orient Bio Inc., Korea)의 복강 내에 주사하여 마취시켰다. 그 다음, 마우스에 1.0×10^7 의 HT-29 (인간 결장 선암) 세포를 피하 주사하여 종양을 확립하였다. 약 3주 후에, 70-100 mm^3 부피의 종양이 확립된 후, 종양 치료를 위해 종양 조직 주위에 10 % DMSO를 함유한 60 μL의 PBS (pH7.4)에 있는 펩타이드 (1mg / kg)를 종양 조직 주위에 주사하였고 대조군은 PBS를 주사하였다. 2 틀마다 2 주 동안, 총 7 회 반복하여 주사하였다. 종양의 크기는 $x\ b^2 / 2$로 측정되었고, 여기서 a와 b는 각각 최대 및 최소 직경을 의미한다. 펩타이드의 생체 내 독성을 확인하기 위해, 펩타이드의 처리 기간 동안 마우스

의 체중을 관찰하였다. 그 결과, 펩타이드가 처리된 그룹은 대조군과 비교하여 종양 조직에서의 발적, 부종 및 딱지의 형성과 같은 종양 세포의 사멸의 명백한 징후 및 종양 성장 억제를 보였으며, 특히, Mito-rac은 Mito-FF 또는 Mito-ff보다 더 현저한 종양 억제를 나타냈다(도 14a, 도 14b). 또한, 치료 기간 동안 모든 실험 그룹은 대조군에 비해 눈에 띄는 체중 감소를 보이지 않아, 펩타이드의 생체 내 최소 독성을 나타냈다(도 14c). 또한, Mito-rac이 처리된 두께 70nm의 종양 절편을 TEM 이미지로 보았을 때, Mito-rac의 수퍼-구조 형성으로 인한 미토콘드리아의 수축 및 손상이 관찰되었다(도 14d,e). 이러한 결과는 Mito-rac이 실제로 암 치료를 위해 생체 내에서 작용함을 의미한다.

[0113] Mito-rac에 의한 높은 독성에 대한 원인을 더 분석하기 위해, CGMD 시뮬레이션을 통해 암 세포막 상의 결함을 조사하였다. 그 결과, Mito-rac 수퍼-구조 섬유와 Mito-FF 섬유 둘 다 세포막에 결함을 유발했지만, Mito-rac 슈퍼-섬유에 의해 형성된 결함 영역은 ~ 57.62 nm^2 정도로, Mito-FF 섬유보다 약 6.4 배 더 넓었다(도 15a,b). 상기의 결과들은 Mito-rac 수퍼-섬유가 Mito-FF 또는 Mito-ff의 개별 섬유보다 암 치료에 더 효과적이라는 것을 나타낸다.

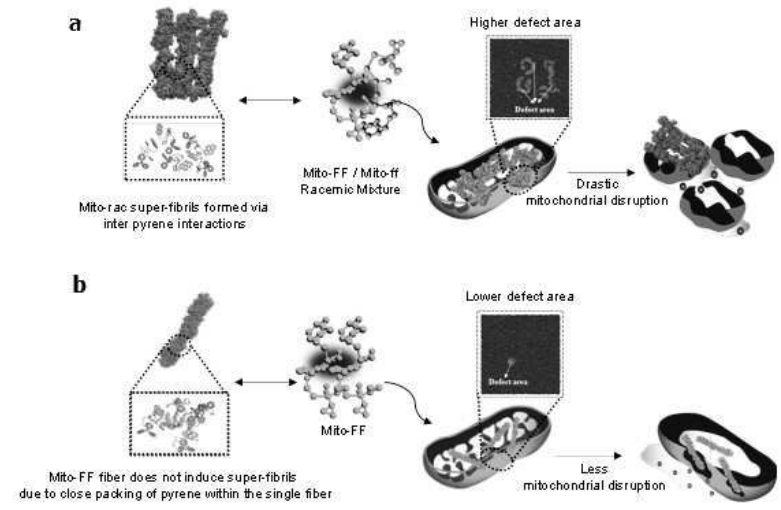
[0114] 도 14a는 마우스에서 종양 치료 효능을 보기 위해 찍은 옵티컬 이미지이고; 도 14b는 시간에 따라 종양의 부피를 나타낸 그래프이며; 도 14c는 시간에 따른 마우스의 체중을 나타낸 그래프이고; 도 14d 및 도 14e는 Mito-rac이 처리된 종양 절편의 미토콘드리아를 찍은 TEM 이미지이다.

[0115] 도 15는 CGMD 시뮬레이션 결과를 나타낸 그림이다:

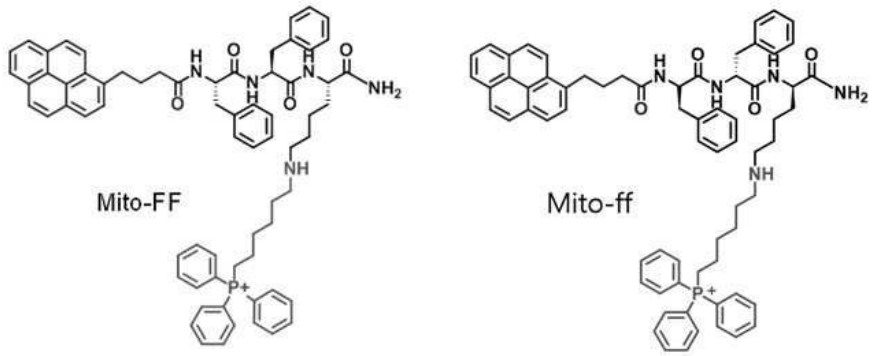
[0116] 도 15a는 Mito-rac에 의한 암 세포막 결함 영역을 나타낸 그림이고; 도 15b는 Mito-FF에 의한 암 세포막 결함 영역을 나타낸 그림이다.

도면

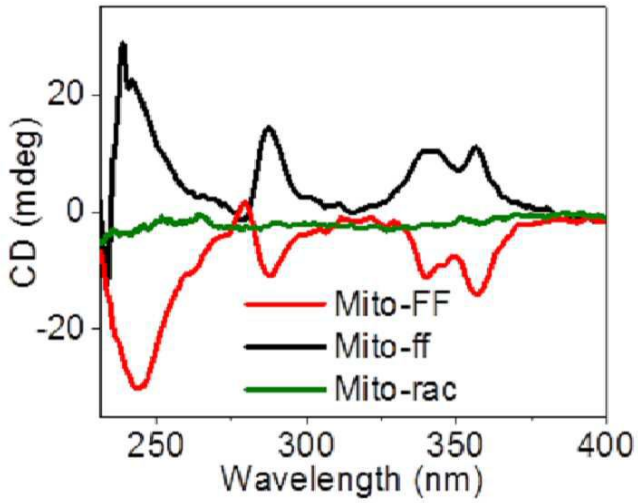
도면1



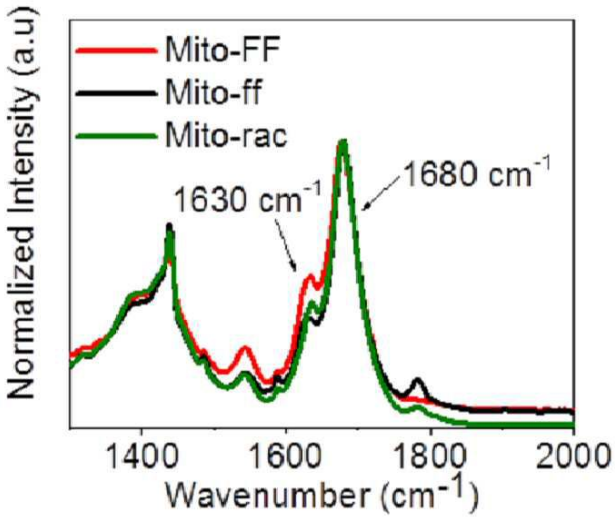
도면2


Mito-FF
Mito-ff

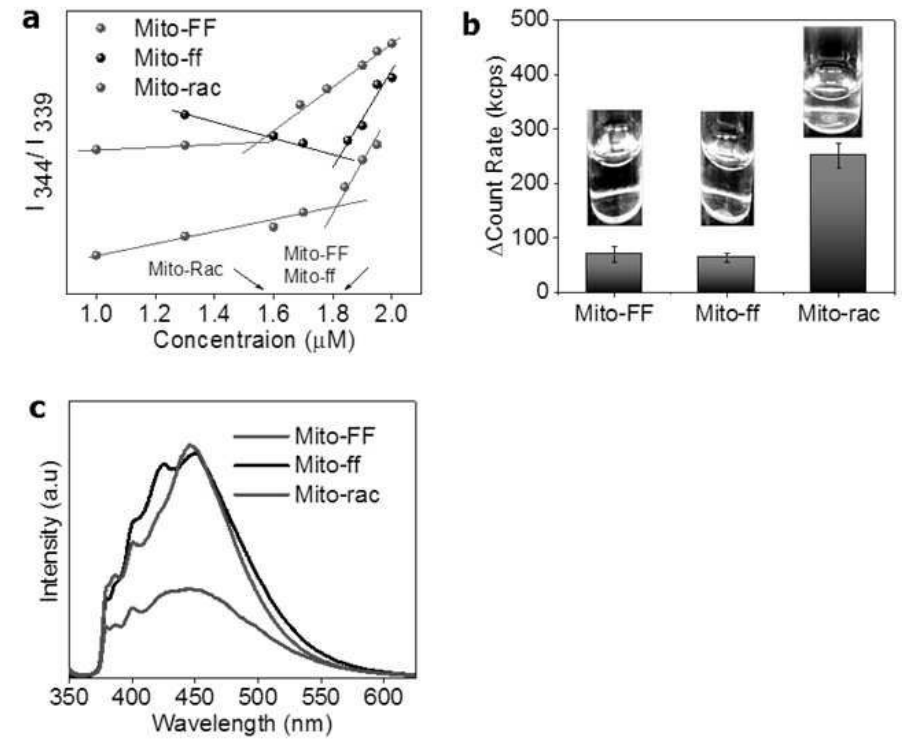
도면3


CD (mdeg)
20
0
-20
250
300
350
400
Wavelength (nm)
Mito-FF
Mito-ff
Mito-rac

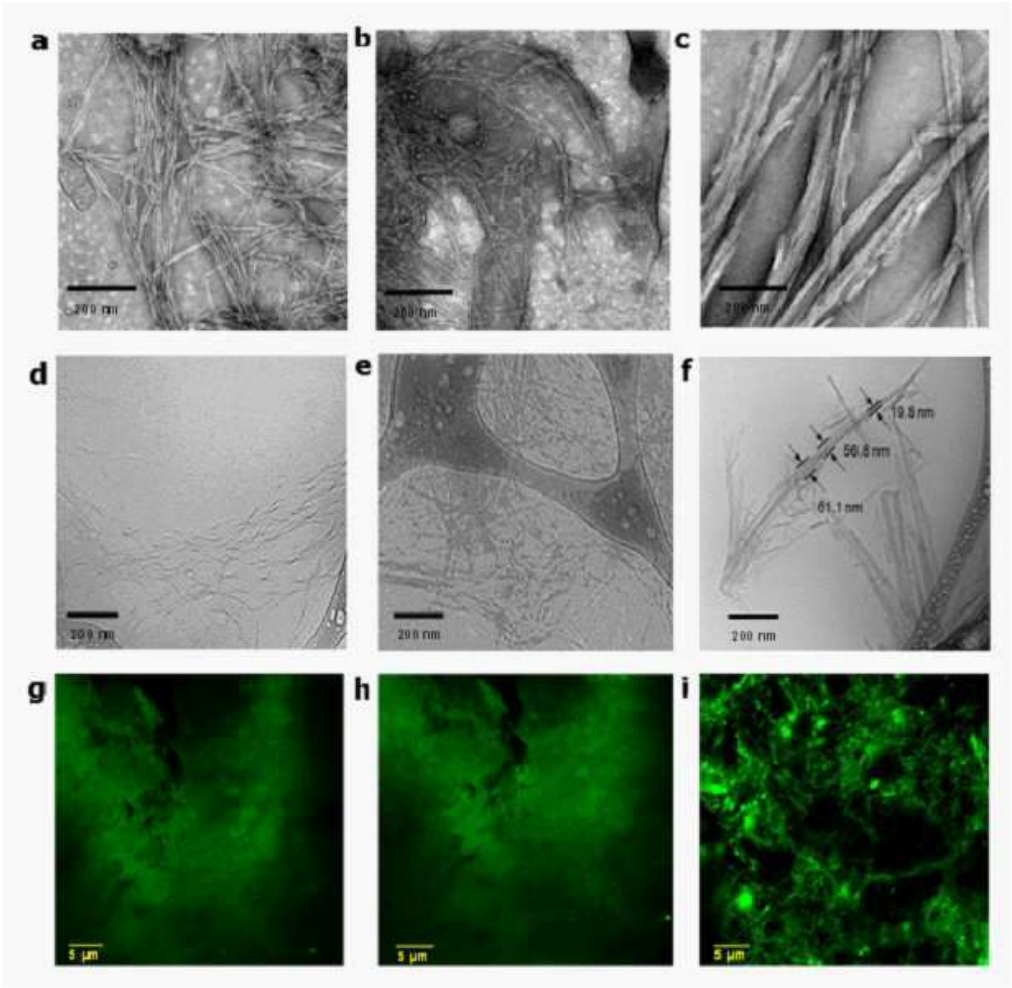
도면4


Normalized Intensity (a.u)
Mito-FF
Mito-ff
Mito-rac
1630 cm-1
1680 cm-1
1400
1600
1800
2000
Wavenumber (cm-1)

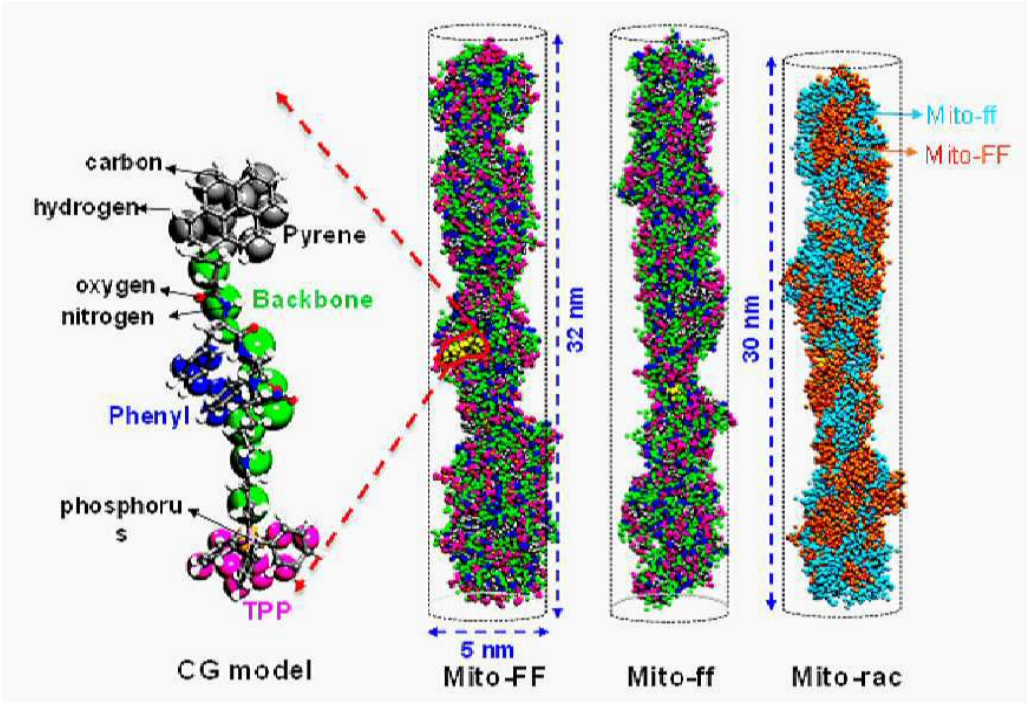
도면5


a
Mito-FF
Mito-ff
Mito-rac
I344/I339
Mito-Rac
Mito-FF
Mito-ff
1.0 1.2 1.4 1.6 1.8 2.0
Concentraion (μM)
b
ΔCount Rate (kcps)
0 100 200 300 400 500
Mito-FF
Mito-ff
Mito-rac
c
Mito-FF
Mito-ff
Mito-rac
Intensity (a.u)
350 400 450 500 550 600
Wavelength (nm)

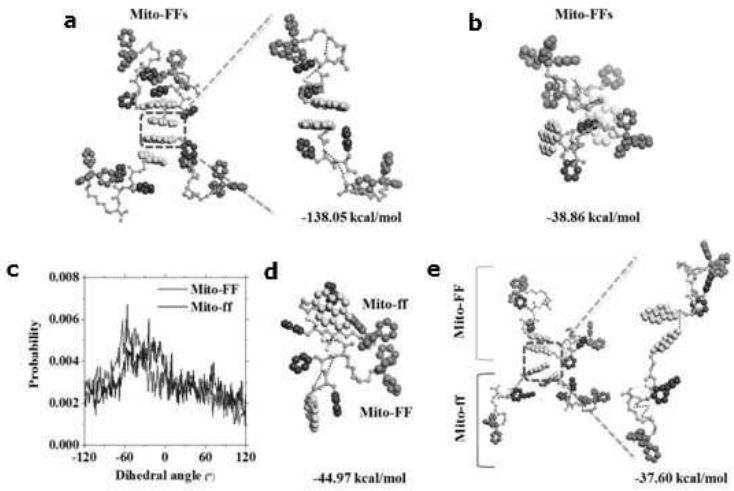
도면6


a
b
c
d
e
f
g
h
i
200 nm
200 nm
200 nm
200 nm
200 nm
200 nm
19.8 nm
56.8 nm
61.1 nm
5 μm
5 μm
5 μm

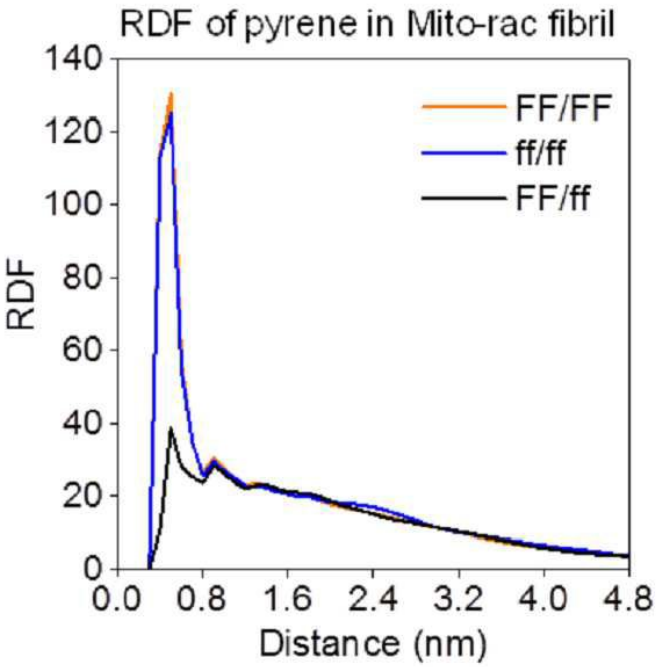
도면7


carbon
hydrogen
oxygen
nitrogen
phosphorus
Pyrene
Backbone
Phenyl
TPP
CG model
32 nm
5 nm
Mito-FF
30 nm
Mito-ff
Mito-ff
Mito-FF
Mito-rac

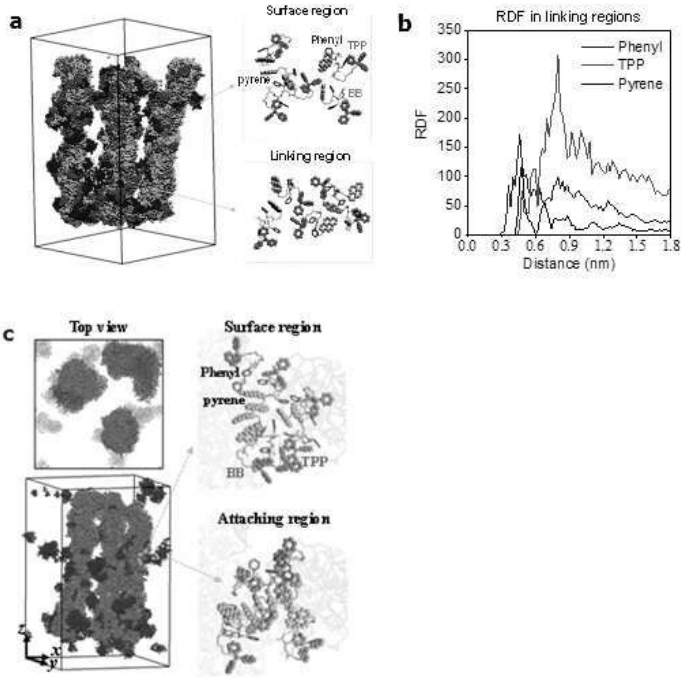
도면8


a
Mito-FFs
-138.05 kcal/mol
b
Mito-FFs
-38.86 kcal/mol
c
Mito-FF
Mito-ff
Probability
Dihedral angle (°)
d
Mito-ff
Mito-FF
-44.97 kcal/mol
e
Mito-FF
Mito-ff
-37.60 kcal/mol

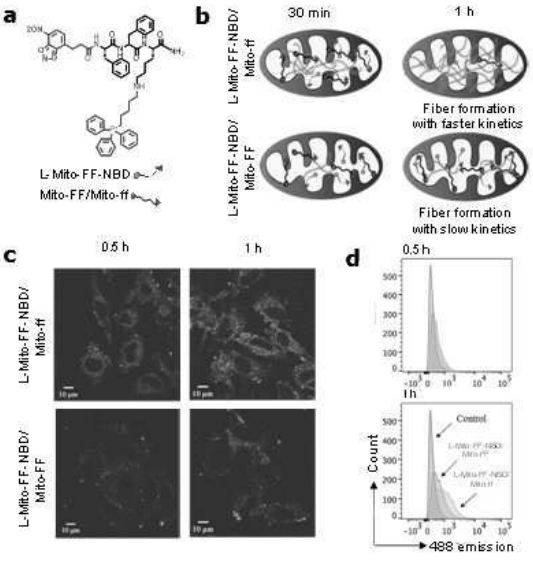
도면9


RDF of pyrene in Mito-rac fibril
FF/FF
ff/ff
FF/ff
RDF
Distance (nm)

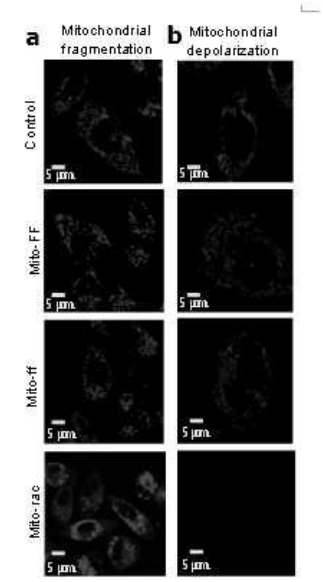
도면10


a
Surface region
Phenyl
TPP
pyrene
BB
Linking region
b
RDF in linking regions
Phenyl
TPP
Pyrene
RDF
Distance (nm)
c
Top view
Surface region
Phenyl
pyrene
BB
TPP
Attaching region

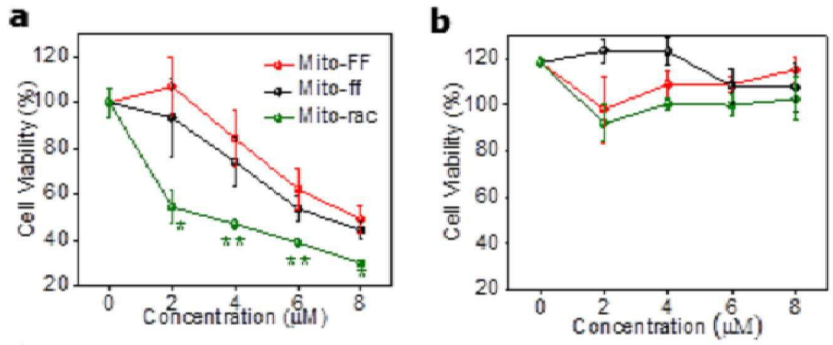
도면11


a
L-Mito-FF-NBD
Mito-FF/Mito-ff
b
30 min
1 h
L-Mito-FF-NBD/ Mito-ff
L-Mito-FF-NBD/ Mito-FF
Fiber formation with faster kinetics
Fiber formation with slow kinetics
c
0.5 h
1 h
L-Mito-FF-NBD/ Mito-ff
L-Mito-FF-NBD/ Mito-FF
d
0.5 h
1 h
Control
Count
488 emission

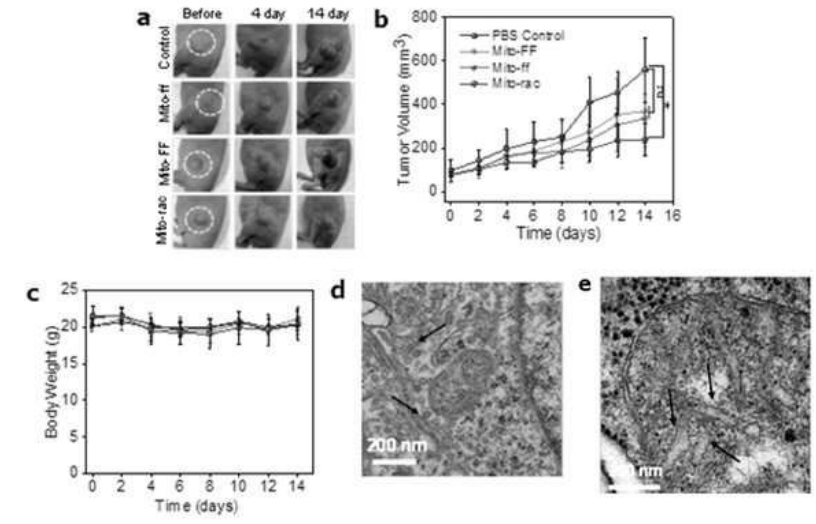
도면12



도면13



도면14



도면15

