



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0132222
(43) 공개일자 2016년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/336 (2006.01) A61K 38/04 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/336 (2013.01)
A61K 38/04 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0063813
(22) 출원일자 2015년05월07일
심사청구일자 2015년05월07일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
권택규
대구광역시 달서구 송현로7길 41 103동 1002호
(상인동, 월촌보성화성타운)
민경진
경상북도 칠곡군 왜관읍 평장3길 47 202동 1201호
(왜관리, 대동다숲아파트)
서보람
경상북도 경산시 경안로56길 14 303동 505호 (중방동, 중방e편한세상3단지)
(74) 대리인
특허법인태백

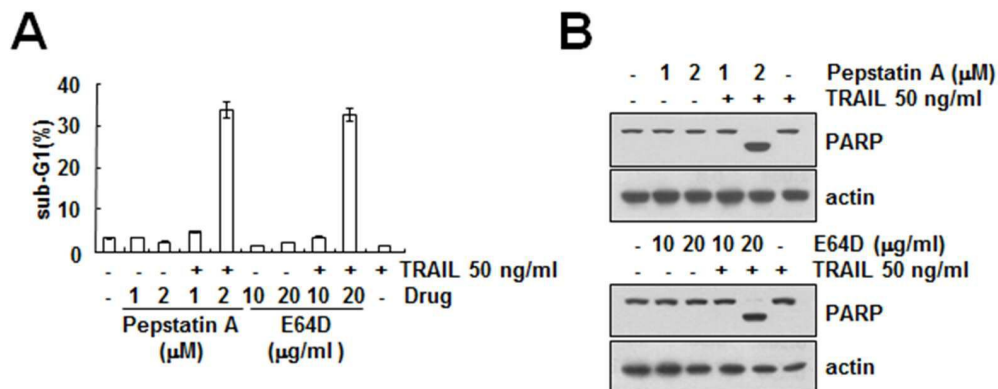
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 카텝신 B 억제제 또는 카텝신 D 억제제와 트레일을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 카텝신 B(Cathepsin B) 억제제 또는 카텝신 D(Cathepsin D) 억제제에서 선택된 하나 이상을 포함하는 트레일 내성을 극복할 수 있는 약학 조성물, 항암 효과 증진용 약학 조성물 및 암세포 사멸 증진 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따르면 카텝신 B 억제제인 E64D 또는 카텝신 D 억제제인 펩스타틴 A와 트레일을 신장암, 유방암 및 신경교종 중 어느 하나의 암세포에 병용투여한 경우 폴리(ADP-리보오스)중합효소[Poly(ADP-Ribose)Polymerase, PARP]의 분열이 증가되며, Bcl-xL이 감소되며 트레일에 의한 암세포의 세포사멸이 증대되므로 신장암, 유방암 및 신경교종의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/191 (2013.01)

A61K 45/06 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A5A2010008

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구지원센터(의과학연구센터) 사업

연구과제명 비만매개질환연구센터

기 여 율 1/1

주관기관 계명대학교

연구기간 2014.05.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

카텝신 B(Cathepsin B) 억제제 또는 카텝신 D(Cathepsin D) 억제제에서 선택된 하나 이상과 트레일(Trail)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 카텝신 B(Cathepsin B) 억제제는 E64D, 키모스타틴(Chymostatin), Mu-Phe-hPhe-FMK, 비오틴-FA-FMK(Biotin-FA-FMK), CA-074 및 CA-074 메틸 에스터(CA-074 methyl ester)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 카텝신 D(Cathepsin D) 억제제는 펩스타틴 A(Pepstatin A) 및 안티펜(Antipain)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 약학 조성물은 카텝신 B(Cathepsin B) 억제제 또는 카텝신 D(Cathepsin D) 억제제에서 선택된 하나 이상 1 내지 50 중량% 및 트레일 50 내지 99 중량%를 포함하는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 암은 신장암, 유방암 및 신경교종으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

카텝신 B(Cathepsin B) 억제제 또는 카텝신 D(Cathepsin D) 억제제에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하며, 트레일(Trail)의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 트레일의 항암 효과 증진용 약학 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 카텝신 B(Cathepsin B) 억제제는 E64D, 키모스타틴(Chymostatin), Mu-Phe-hPhe-FMK, 비오틴-FA-FMK(Biotin-FA-FMK), CA-074 및 CA-074 메틸 에스터(CA-074 methyl ester)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 트레일의 항암 효과 증진용 약학 조성물.

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 카텝신 D(Cathepsin D) 억제제는 펩스타틴 A(Pepstatin A) 및 안티펜(Antipain)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 트레일의 항암 효과 증진용 약학 조성물.

청구항 9

카텝신 B(Cathepsin B) 억제제 또는 카텝신 D(Cathepsin D) 억제제에서 선택된 하나 이상과 트레일(Trail)을 암세포에 병용투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 정상세포에는 영향을 주지 않고 선택적으로 암세포의 세포사멸을 유도하는 트레일의 내성을 극복하여 효과적으로 암세포의 세포사멸을 유도함으로써, 항암 효과를 증진시킬 수 있는 트레일 보조용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대한민국 통계청의 분석에 따르면 암은 대한민국의 제 1의 사망원인으로 남성이 31.7%, 여성이 22.5%를 차지하며 전체 인구의 31.7%가 암으로 사망한다.

[0003] 암을 치료하기 위한 방법으로는 수술을 통한 치료, 방사선 치료 그리고 항암제 투여를 통한 치료 등이 있으나 이러한 치료방법들은 부작용이 수반되거나, 암의 진행 정도에 따라 시술이 제한적으로 적용된다. 특히, 대부분의 항암제는 분열이 왕성한 세포의 세포주기를 멈추게 하고 사멸케 하는 메커니즘으로 작동하기 때문에 세포 이외에도 정상적으로 분열하는 세포를 공격해서 탈모, 식욕부진 그리고 백혈구 감소로 인한 면역력 저하 등의 부작용을 동반한다. 이로 인해 거듭된 연구결과 양적인 측면에서는 그 종류가 늘었지만, 질적인 측면에서는 큰 변화가 없었다.

[0004] 최근 항암제의 부작용을 최소화하기 위해 표적항암제의 개발이 활발히 일어나고 있으며, 현재까지 18종 이상의 표적항암제가 개발되어 임상에 적용 중이고, 200여종 이상이 임상실험 중이다. 하지만 이러한 표적항암제는 같은 종류의 암이라도 특정 표적인자가 나타난 환자에만 효과가 있다는 한계가 있으며, 표적치료제는 장기간에 걸쳐서 투여해야 하기 때문에 내성을 유발하는 문제가 있다. 이를 보완하기 위해서 표적치료제를 기존의 강력한 항암제와 병합하는 각테일 요법과 여러 표적인자를 동시에 공격함으로써, 단시간에 암을 제거하는 단일약물을 사용하는 방법 등이 있는데, 이것 또한 심각한 부작용을 유발할 위험성을 내포하고 있다.

[0005] 트레일(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand; TRAIL)은 종양괴사인자(Tumor Necrosis Factor, TNF)의 일종으로 종양세포의 자가 세포사멸을 유도하는 리간드로서 트레일이 종양세포의 표면에 있는 DR4 및 DR5와 같은 죽음 수용체(death receptor)에 결합하여 종양세포의 사멸을 유도하는 것으로 알려짐에 따라 매우 효과적인 항암치료제이다.

[0006] 그러나 많은 암세포는 죽음 수용체의 감소와 세포의 FLICE 유사 억제 단백질(cellular FLICE-like inhibitory protein, c-FLIP(L)), B-세포 림포마-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2), B-세포 림포마 엑스트라 라지(B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xL) 또는 골수성 백혈병 세포-1(myeloid cell leukemia- 1, Mcl-1)와 같은 항-세포 사멸 단백질을 증가시키는 다양한 메커니즘을 통하여 트레일에 의해 유도된 세포사멸에 저항성을 나타내고 있다.

[0007] 따라서 암세포에 선택적으로 세포사멸을 유도할 수 있는 트레일의 내성을 극복하여 암세포 증식을 막고 세포사멸을 촉진시킬 수 있는 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 10-2014-0009045호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 상기 종래의 문제점을 해결하기 위하여 본 발명은 정상세포에는 영향을 주지 않고 선택적으로 암세포의 세포사멸을 유도하는 트레일의 내성을 극복하여 효과적으로 암세포의 세포사멸을 유도함으로써, 항암 효과를 증진시킬

수 있는 트레일 보조용 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 카텡신 B(Cathepsin B) 억제제 또는 카텡신 D(Cathepsin D) 억제제에서 선택된 하나 이상과 트레일(Trail)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은 카텡신 B(Cathepsin B) 억제제 또는 카텡신 D(Cathepsin D) 억제제에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하며, 트레일(Trail)의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 트레일의 항암 효과 증진용 약학 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 카텡신 B(Cathepsin B) 억제제 또는 카텡신 D(Cathepsin D) 억제제에서 선택된 하나 이상과 트레일(Trail)을 암세포에 병용투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법을 제공한다.
- [0013] 상기 카텡신 B(Cathepsin B) 억제제는 E64D, 키모스타틴(Chymostatin), Mu-Phe-hPhe-FMK, 비오틴-FA-FMK(Biotin-FA-FMK), CA-074 및 CA-074 메틸 에스터(CA-074 methyl ester)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이며, 상기 카텡신 D(Cathepsin D) 억제제는 펩스타틴 A(Pepstatin A) 및 안티펜(Antipain)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명은 카텡신 B(Cathepsin B) 억제제 또는 카텡신 D(Cathepsin D) 억제제에서 선택된 하나 이상을 포함하는 트레일 내성을 극복할 수 있는 약학 조성물, 항암 효과 증진용 약학 조성물 및 암세포 사멸 증진 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따르면 카텡신 B 억제제인 E64D 또는 카텡신 D 억제제인 펩스타틴 A와 트레일을 신장암, 유방암 및 신경교종 중 어느 하나의 암세포에 병용투여한 경우 폴리(ADP-리보오스)중합효소[(Poly(ADP-Ribose)Polymerase, PARP]의 분열이 증가되며, B-세포 림포마 엑스트라 라지(B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xL)가 감소되며 트레일에 의한 암세포의 세포사멸이 증대되므로 신장암, 유방암 및 신경교종의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 트레일에 의해 유도된 사람 신장암 세포의 세포사멸에 관한 E64D 또는 펩스타틴 A의 민감성을 확인한 결과이고,
- 도 2는 E64D 또는 펩스타틴 A에 의한 트레일 민감성 증가 매커니즘을 확인한 결과이고,
- 도 3은 E64D 또는 펩스타틴 A에 의한 B-세포 림포마 엑스트라 라지(B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xL)의 발현 감소가 단백질분해효소 활성화에 영향을 미치는지를 확인한 결과이고,
- 도 4는 E64D 또는 펩스타틴 A에 의한 트레일 민감화 증가 효과와 카텡신(cathepsin)의 발현과의 상관관계를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

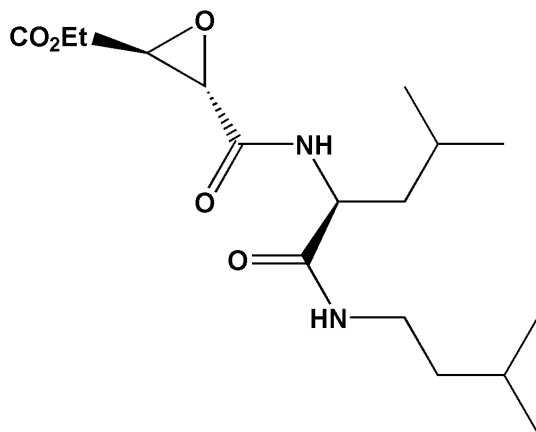
- [0016] 본 발명의 발명자들은 암세포에 선택적으로 세포사멸을 유도할 수 있는 트레일의 내성을 극복할 수 있는 방법에 대하여 연구하던 중, 카텡신 B 억제제인 E64D 또는 카텡신 D 억제제인 펩스타틴 A와 트레일을 신장암 세포에 병용투여한 경우 세포사멸 단백질의 억제자(inhibitor of apoptosis protein, IAP)인 c-FLIP(L)과 미토콘드리아 신호전달 체계를 통한 세포사멸 기전에 중요한 역할을 하는 B-세포 림포마 엑스트라 라지(B-cell lymphoma-extra large, Bcl-xL)가 감소되며, 항암제로 인한 DNA 손상의 회복을 도와 항암제 효과를 감소시키는 폴리(ADP-리보오스)중합효소[(Poly(ADP-Ribose)Polymerase, PARP]의 분열이 증가하고, 트레일에 의한 암세포의 세포사멸이 증대되는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0017] 따라서 본 발명은 카텡신 B(Cathepsin B) 억제제 또는 카텡신 D(Cathepsin D) 억제제에서 선택된 하나 이상과 트레일(Trail)을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0018] 상기 카텡신 B(Cathepsin B) 억제제는 E64D, 키모스타틴(Chymostatin), Mu-Phe-hPhe-FMK, 비오틴-FA-FMK(Biotin-FA-FMK), CA-074 및 CA-074 메틸 에스터(CA-074 methyl ester)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이며, 상기 카텡신 D(Cathepsin D) 억제제는 펩스타틴 A(Pepstatin A) 및 안티펜(Antipain)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이며, 보다 바람직하게는 카텡신 B 억제제는 E64D이고, 카텡신 D 억제제는 펩스타틴 A

이나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019]

상기 E64D는 하기 화학식 1과 같이 표시되며, 뇌에서 베타-시크리테이즈(beta-secretase)가 아밀로이드 전구 단백질(amyloid precursor protein, APP)를 잘라서 독성이 있는 아밀로이드 베타 펩타이드(amyloid beta peptide, AB peptide)를 만드는 것을 저해한다고 알려져 있으며, 베타-사이트 APP 절단 효소 1(beta-site APP cleaving enzyme 1, BACE1)로 알려진 아스파틸(aspartyl) 단백질 분해효소 활성화도 증가시키는 것으로 알려져 있다. 더불어 다른 시스테인(cysteine) 단백질 분해효소인 카텝신(Cathepsin)B의 베타-시크리테이즈 활성을 저해하여 뇌의 AB 펩타이드(AB peptide)를 낮추는 효과도 보고된 바 있다.

화학식 1

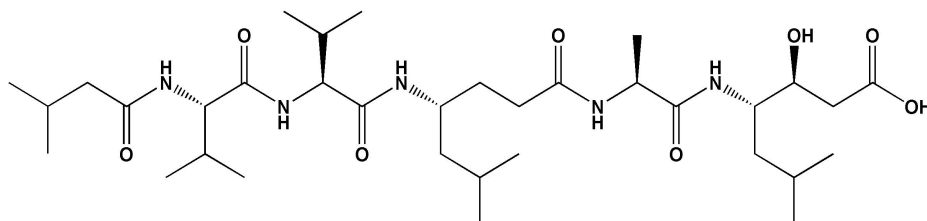


[0020]

[0021]

상기 펩스타틴 A(Pepstatin A)는 하기 화학식 2와 같이 표시되며 펩신(Pepsin), 카텝신 D(cathepsin D)와 카텝신 E(cathepsin E)와 같은 아스파틱 단백질가수분해효소(aspartic proteinases)의 억제제로 알려져 있다.

화학식 2



[0022]

[0023]

본 발명의 일실시예에 따르면, 도 1과 같이 신장암 세포인 Caki 세포에 E64D 또는 펩스타틴 A와 트레일을 병용 처리한 경우 세포사멸이 증가하며, 항암제로 인한 DNA 손상의 회복을 도와 항암제 효과를 감소시키는 폴리(ADP-리보오스)중합효소[(Poly(ADP-Ribose)Polymerase, PARP]의 분열이 증가되는 것을 확인할 수 있다.

[0024]

따라서 상기 결과로부터 E64D 또는 펩스타틴 A는 Caki 세포에서 트레일에 의해 유도되는 세포사멸의 민감성을 증가시키는 것이 확인되었다.

[0025]

본 발명의 또 다른 실시예에 따르면 도 2와 같이, E64D 또는 펩스타틴 A의 트레일 민감성 증가는 Bcl-xL의 발현을 감소시켜 발생한다는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 E64D 또는 펩스타틴 A는 Bcl-xL의 번역 후 발현 수준을 감소시키는 것을 확인할 수 있다.

[0026]

본 발명의 또 다른 실시예에 따르면 도 3과 같이, E64D 또는 펩스타틴 A에 의한 Bcl-xL의 발현 감소를 억제하면 PARP의 분열이 억제된다는 것을 확인할 수 있다.

[0027]

더불어 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면 도 4와 같이, 카텝신 B 혹은 카텝신 D의 억제에 의한 Bcl-xL의 발현 감소와 이로 인한 트레일 민감화 증가 효과를 확인할 수 있다.

[0028]

상기 약학 조성물은 카텝신 B(Cathepsin B) 억제제 또는 카텝신 D(Cathepsin D) 억제제에서 선택된 하나 이상 1

내지 50 중량% 및 트레일 50 내지 99 중량%를 포함할 수 있다.

- [0029] 상기 얇은 신장암, 유방암 및 신경교종으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0030] 더불어 본 발명은 카텝신 B(Cathepsin B) 억제제 또는 카텝신 D(Cathepsin D) 억제제에서 선택된 하나 이상을 유효성분으로 포함하며, 트레일(Trail)의 내성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 트레일의 항암 효과 증진용 약학 조성물을 제공한다.
- [0031] 상기 카텝신 B(Cathepsin B) 억제제는 E64D, 키모스타틴(Chymostatin), Mu-Phe-hPhe-FMK, 비오틴-FA-FMK(Biotin-FA-FMK), CA-074 및 CA-074 메틸 에스터(CA-074 methyl ester)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이며, 상기 카텝신 D(Cathepsin D) 억제제는 펩스타틴 A(Pepstatin A) 및 안티펜(Antipain)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상이며, 보다 바람직하게는 카텝신 B 억제제는 E64D이고, 카텝신 D 억제제는 펩스타틴 A 이나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 덱스트로즈, 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 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0035] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다.
- [0036] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, E64D 0.4 mg/m² /day 내지 10.0 mg/m² /day, 펩스타틴 A 0.4 mg/m² /day 내지 10.0 mg/m² /day 및 트레일 0.05 mg/day 내지 10.0 mg/day의 양을 주 2회 1 내지 4주기로 투여할 수 있다.
- [0038] 또한, 이러한 투여량은 투여 경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0039] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물을 구성하는 카텝신 B 억제제인 E64D, 카텝신 D 억제제인 펩스타틴 A 및 트레일은 이미 다른 의학적 용도에 처방되고 있어 안전성이 확보되어 있는 물질이다.
- [0040] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여 (예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강 상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.
- [0041] 또한 본 발명은 카텝신 B(Cathepsin B) 억제제 또는 카텝신 D(Cathepsin D) 억제제에서 선택된 하나 이상과 트레일(Trail)을 암세포에 병용투여하는 것을 특징으로 하는 암세포 사멸 증진 방법을 제공한다.
- [0043] 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.
- [0045] <참고예 1> 시약, E64D 및 펩스타틴 A(Pepstatin A) 준비

- [0046] PCR 프라이머는 마크로젠(Macrogen Inc, Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 다른 화학물질은 시그마(Sigma, St. Louis, MO)에서 구입하였다.
- [0047] 항-Bcl-2(anti-Bcl2), 항-Bcl-xL(anti-Bcl-xL), 항-Mcl-1, 항-cIAP2 및 항-PARP(anti-PARP) 항체는 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)에서 구입하였다.
- [0048] 항-c-FLIP(L) 항체는 알렉시스 코퍼레이션(ALEXIS Corporation, San Diego, CA)으로부터 구입하였으며, 항-액틴 항체는 시그마(Sigma, St. Louis, MO)로부터 각각 구입하였다.
- [0049] 또한 재조합 사람 트레일(TRAIL)은 코마 바이오테크(KOMA Biotech, Seoul, Korea)로부터 구입하여 사용하였다.
- [0050] E64D는 케이만 케미칼 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI) 으로부터 구입하여 사용하였고, 펩스타틴 A는 엔조 라이프 사이언스 (Enzo Life Sciences, Plymouth meeting, PA)으로부터 구입하여 사용하였다.
- [0052] **<실험예 1> 실험 방법**
- [0053] **1. 세포 준비**
- [0054] **1) 세포배양**
- [0055] 신장암 세포인 Caki 세포는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)으로부터 구입하였으며, 상기 세포를 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 20mM 4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진에탄설향 산(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, HEPES) 버퍼 및 100 μ g/ml 겐타마이신이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)배지에서 배양하였다.
- [0056] **2) E64D 및 펩스타틴 A(Pepstatin A) 처리**
- [0057] E64D는 다이메틸설폭사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)에 20 mg/ml로 녹이고, 펩스타틴 A는 DMSO에 2 mM로 녹여서 세포 배양액에 각 실험별 사용 농도로 직접 처리하였다.
- [0059] **2. 웨스턴 블롯 분석**
- [0060] 웨스턴 블롯 실험을 위해, 각각의 세포를 차가운 인산완충용액(phosphate-buffered saline, PBS)으로 세척하였다. 그런 후 100 μ M 페닐메틸설포닐 플로라이드(phenylmethanesulfonylfluoride, PMSF), 10 μ g/ml 류펩틴(leupeptin), 10 μ g/ml 펩스타틴(pepstatin) 및 2 mM 에틸렌디아민사아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)로 구성된 프로테아제(protease) 억제제를 첨가한 50mM 트리스-HCl(tris-HCL, pH 7.4), 1% 노닐 페녹시폴리에톡시에탄올-40(nonyl phenoxypolyethoxylethanol-40, NP-40), 0.25% Na-데옥시콜레이트(deoxycholate), 150mM NaCl, 1mM Na₃VO₄ 및 1mM NaF로 완충된 방사선 면역 침전(Radioimmunoprecipitation, RIPA) 버퍼를 사용하여 아이스 위에서 용해하였다.
- [0061] 용해물을 4℃에서 10000xg의 속도로 10분간 원심분리한 후 상등액을 수집하였다.
- [0062] 웨스턴 블롯 분석은 웨스턴 블롯팅 키트 제조사의 설명서에 따라 수행하였으며, 단백질을 소듐도데실설파이트-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동(Sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)으로 분리하고 임모빌론-P(immobilon-P) 막으로 옮겼다. 그 후 향상된 화학 발광 플러스 웨스턴 블롯팅 검출 시스템(enhanced chemiluminescence plus western blotting detection system)을 이용하여 특이적 단백질을 검출하였다.
- [0064] **3. 유동세포계수분석(Flow cytometry analysis)**
- [0065] 유동세포계수 분석을 위해, 100 μ l PBS를 세포에 첨가하여 재부유시키고 95% 에탄올 200 μ l를 첨가하여 세포를 와류시킨 후 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후 세포를 PBS로 세척하고 12.5 μ g 리보뉴클레아제(ribonuclease, RNase)가 포함된 pH 8.4의 1.12% 시트르산나트륨(sodium citrate) 용액 250 μ l을 첨가하여 재부유시키고 37℃에서 30분간 추가로 인큐베이션하였다.
- [0066] 그 후 세포에 50 μ g/ml 농도의 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide, PI) 용액 250 μ l를 첨가하고 실온에

서 30분간 세포 DNA를 염색시켰다. 염색된 세포는 유동세포계수분석기(Fluorescence activated cell sorter, FACS)를 통하여 형광 활성화된 세포를 분류하여 상대적인 DNA 함량을 분석하였으며, 적색 형광 강도를 통하여 확인할 수 있었다.

4. 역전사 증합효소 연쇄 반응(RT-PCR)

트라이졸(TriZol)시약(Life Technologies; Gaithersburg, MD)을 사용하여 전체 RNA를 분리하고 M-MLV 역전사 효소(Gibco-BRL; Gaithersburg, MD)를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 cDNA를 합성하였다. 사람 Bcl-xL 및 액틴(actin)을 증폭하기 위해 다음과 같은 프라이머가 사용되었다: [Bcl-xL(sense) 5' - ATG GCA GCA GTA AAG CAA GCG C -3' (서열번호 1)와 (antisense) 5' - TTC TCC TGG TGG CAA TGG CG-3' (서열번호 2)], [액틴 (sense) 5' - GGC ATC GTC ACC AAC TGG GAC -3' (서열번호 3)와 (anti-sense) 5' - CGA TTT CCC GCT CGG CCG TGG -3' (서열번호 4)].

PCR 증폭조건으로 94℃에서 3분간 진행 후 액틴은 17 사이클, Bcl-xL은 23 사이클로 94℃, 45초의 조건으로 진행하였다. 또한 58℃에서 45초, 72℃에서 10분간 진행하여 증폭하였다.

증폭물은 1.5% 아가로스 겔로 전기영동하여 분리하고 UV로 확인하였다.

5. Bcl-xL구조와 안정세포

Flag-tagged Bcl-xL 플라스미드는 월터엘리자홀 의학 연구소(The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne, Victoria, Australia)의 Prof. A. Strasser로부터 공급받았으며, 리포펙트아민 (LipofectAMINE, Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 Caki 세포에 안정적으로 형질주입하였다.

48시간 인큐베이션 후 형질전환된 세포를 선별하여 4μg/ml 퓨로마이신(puromycin, Invitrogen, Carlsbad, CA)이 포함된 세포 배양 배지에서 배양하고, 2 내지 3주 후 독립적인 단일 클론을 무작위로 분리하였다. 각각의 개별 클론을 각기 별도의 플레이트에 분주하고 클론 확장 후 각각의 독립적인 클론의 세포에서 Bcl-xL 발현을 면역블롯팅을 통하여 확인하고 실험에 사용하였다.

6. 단백질분해효소 활성 분석

키모트립신 단백질분해효소 활성을 Suc-LLVY-AMC(chymotryptic substrate, Biomol International, Plymouth Meeting, PA)으로 측정하였다.

측정을 위해 세포를 수집하여 PBS로 세척한 후 용해시켰다. 세포 용해물의 1μg 단백질, 100mM Tris-HCl(pH 8.0), 10mM MgCl₂ 및 2mM 아데노신3인산(adenosine triphosphate, ATP)이 포함된 혼합물에 50 μM Suc-LLVY-AMC를 첨가하여 37℃에서 30분간 인큐베이션하였다.

효소 활성은 380nm 여기 파장과 440nm 방출 파장 조건으로 형광검출기(fluorometric plate reader)를 사용하여 측정하였다.

<실시예 1> 트레일에 의해 유도된 세포사멸에 관한 E64D와 펩스타틴 A의 민감성 확인

E64D 또는 펩스타틴 A가 트레일에 의해 유도된 세포사멸에 어떠한 효과를 나타내는지 사람 신장암세포인 Caki 세포를 이용하여 확인하였다.

먼저, E64D 또는 펩스타틴 A와 트레일의 병용처리에 따른 세포사멸 유도를 확인하기 위해, FACS 분석을 이용한 DNA 함량 측정과 PARP의 분열 확인을 위한 웨스턴 블롯을 수행하였다.

Caki 세포에 트레일 50ng/ml을 처리한 후 1 또는 2 μM의 E64D 또는 펩스타틴 A를 24시간 동안 처리한 세포군 또는 비처리 세포군의 세포사멸 수준을 유동세포 분석기(FACS)의 Sub-G1 분획 측정을 통하여 확인하였다.

그 결과 도 1A와 같이, E64D, 펩스타틴 A 또는 트레일을 단독처리한 경우 세포사멸의 효과가 나타나지

않았으나, E64D 또는 웹스타틴 A와 트레일을 병용처리한 경우 유의한 세포사멸 증가가 확인되었으며, 도 1B와 같이, 웨스턴 블롯 결과에서도 PARP 분열 증가를 확인할 수 있었다.

[0087] 상기 결과로부터 E64D 또는 웹스타틴 A는 Caki 세포에서 트레일에 의해 유도되는 세포사멸의 민감성을 증가시키는 것이 확인되었다.

[0089] <실시예 2> E64D 또는 웹스타틴 A에 의한 트레일 민감성 증가 매커니즘 확인

[0090] E64D 또는 웹스타틴 A에 의한 트레일 민감성 증가 매커니즘을 확인하기 위해, Caki 세포에 E64D 또는 웹스타틴 A를 농도별로 24시간 동안 처리한 후 웨스턴 블롯을 수행하여 Caki 세포에서 Bcl-2를 포함한 세포사멸 관련 단백질, 세포사멸 단백질의 억제자(IAP), c-FLIP(L)과 같은 DISC 성분 및 죽음 수용체의 발현 정도를 확인하였다.

[0091] 그 결과 도 2A와 같이, E64D 또는 웹스타틴 A에 의해 Bcl-xL은 유의적으로 감소하나, 다른 단백질에서는 변화가 나타나지 않은 것을 확인하였다.

[0092] 따라서, E64D 또는 웹스타틴 A와 트레일 병용처리에 의한 세포사멸에 있어서 Bcl-xL의 기능적 역할을 확인하기 위해, Bcl-xL이 과발현된 Hep3B/Bcl-xL 세포에 E64D 또는 웹스타틴 A의 처리 또는 비 처리 조건하에 50ng/ml 트레일을 24시간 동안 처리하였다.

[0093] 그 결과, 도 2B 및 2C와 같이 대조군인 Hep3B/vector 세포에서는 E64D 또는 웹스타틴 A와 트레일의 병용처리에 따른 세포사멸이 증가하였으며, PARP 분열 유도가 확인되었으나, Hep3B/Bcl-xL 세포에서는 E64D 또는 웹스타틴 A와 트레일의 병용처리에 따른 세포사멸이 유도되지 않았다.

[0094] 상기 결과로부터 Bcl-xL의 발현 감소는 E64D 또는 웹스타틴 A의 트레일 민감성 증가에 중요한 역할을 하는 것이 확인되었다.

[0095] Caki 세포에 E64D 또는 웹스타틴 A를 농도별로 처리한 후, 농도별, 시간대별로 E64D 또는 웹스타틴 A에 의한 Bcl-xL의 발현 감소를 확인하였다.

[0096] 그 결과 도 2D 및 2E와 같이, E64D 또는 웹스타틴 A는 농도 의존적으로 Bcl-xL의 발현을 억제시켰으며, 상기 발현 억제는 6시간 이내에 이루어졌다. 그러나 PCR 분석결과, E64D 또는 웹스타틴 A를 처리한 Caki 세포의 Bcl-xL의 mRNA 발현에는 변화가 나타나지 않았다.

[0097] 상기 결과를 확인하기 위해, E64D 또는 웹스타틴 A의 Bcl-xL 단백질 안정성 조절 여부를 확인하였다. 먼저 Caki 세포에 단백질 신생합성 억제자인 사이클로헥산(cyclohexane, CHX) 20 μ g/ml을 단독처리 또는, E64D 또는 웹스타틴 A와 20 μ g/ml CHX를 병용처리한 후 Bcl-xL의 발현을 확인하였다.

[0098] 그 결과 도 2F와 같이 CHX를 단독처리한 Caki 세포군에서 Bcl-xL의 발현 감소가 거의 나타나지 않았고, E64D 또는 웹스타틴 A와 CHX를 병용처리한 Caki 세포군에서 Bcl-xL의 발현 감소를 확인하였다.

[0099] 상기 결과로부터 E64D 또는 웹스타틴 A는 Bcl-xL의 번역 후 발현 수준을 감소시키는 것이 확인되었다.

[0101] <실시예 3> E64D 또는 웹스타틴 A에 의한 Bcl-xL의 발현 감소와 유도된 단백질분해효소 활성 확인

[0102] 보고되어진 바에 의하면, Bcl-xL은 단백질분해효소 유비퀴틴 시스템에 의해 분해되어진다. 따라서 Bcl-xL의 발현 감소가 단백질분해효소 활성화에 영향을 미치는지 확인하였다.

[0103] 먼저, 단백질분해효소 억제자인 MG132와 락타시스틴(lactacystin)이 E64D 또는 웹스타틴 A에 의해 유도된 Bcl-xL의 발현 감소를 역으로 증가시킬 수 있는지 확인하기 위해, Caki 세포에 0.5 μ M MG132 또는 2.5 μ M 락타시스틴을 30분 동안 처리한 후 E64D 또는 웹스타틴 A를 24시간 동안 처리하고 웨스턴 블롯을 진행하였다.

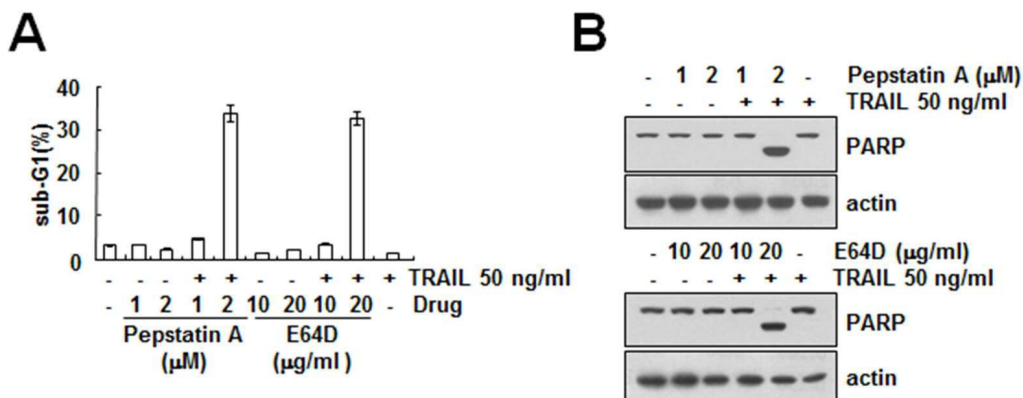
[0104] 그 결과 도 3A와 같이 MG132와 락타시스틴은 E64D 또는 웹스타틴 A에 의한 Bcl-xL의 발현 감소를 억제하였다.

[0105] 더 나아가, E64D 또는 웹스타틴 A가 단백질분해효소의 활성을 증가시키는지 확인하기 위해, 단백질분해효소 기질인 suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC를 이용하여 키모트립신(chymotrypsin)과 같은 단백질분해효소 활성을 확인하였다.

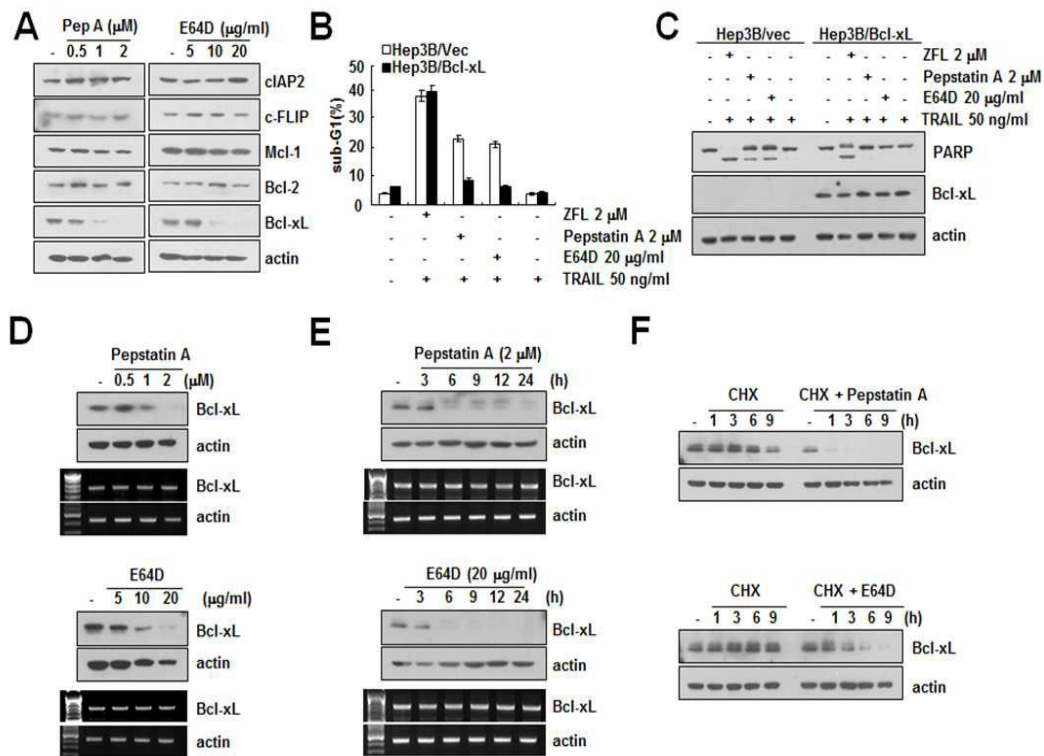
- [0106] 그 결과 도 3B와 같이 E64D 또는 펩스타틴 A는 12시간 이내에 키모트립신과 같은 단백질분해효소의 활성을 증가시켰다.
- [0107] 더불어 도 3C 및 3D에서 MG132와 락타시스틴은 E64D 또는 펩스타틴 A와 트레일을 병합처리하였을 때 나타나는 Bcl-xL의 감소를 억제함으로써 PARP의 분열을 유의적으로 억제시키는 것을 확인하였다.
- [0109] <실시예 4> Cathepsin B 혹은 cathepsin D의 발현 감소에 의한 Bcl-xL의 발현 감소와 트레일 민감화 증가 효과 확인
- [0110] siRNA를 사용하여 E64D 또는 펩스타틴 A에 의한 트레일 민감화 증가 효과와 카텡신의 발현과의 상관관계를 확인하여 그 결과를 도 4에 나타내었다. siRNA 형질 주입에 의한 카텡신 B 혹은 카텡신 D의 발현 감소는 트레일에 의한 세포사멸을 유의적으로 증가시켰고, PARP의 분열을 증대시켰다. 또한 카텡신 B 혹은 카텡신 D의 발현 감소는 Bcl-xL의 발현 감소를 유도하는 것도 확인하였다.
- [0111] 상기 결과들로부터 E64D 또는 펩스타틴 A는 단백질분해효소 활성 증가를 통하여 Bcl-xL의 발현 감소를 유도하고 이를 통하여 트레일의 민감화를 증가시키는 것이 확인되었다.
- [0113] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 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

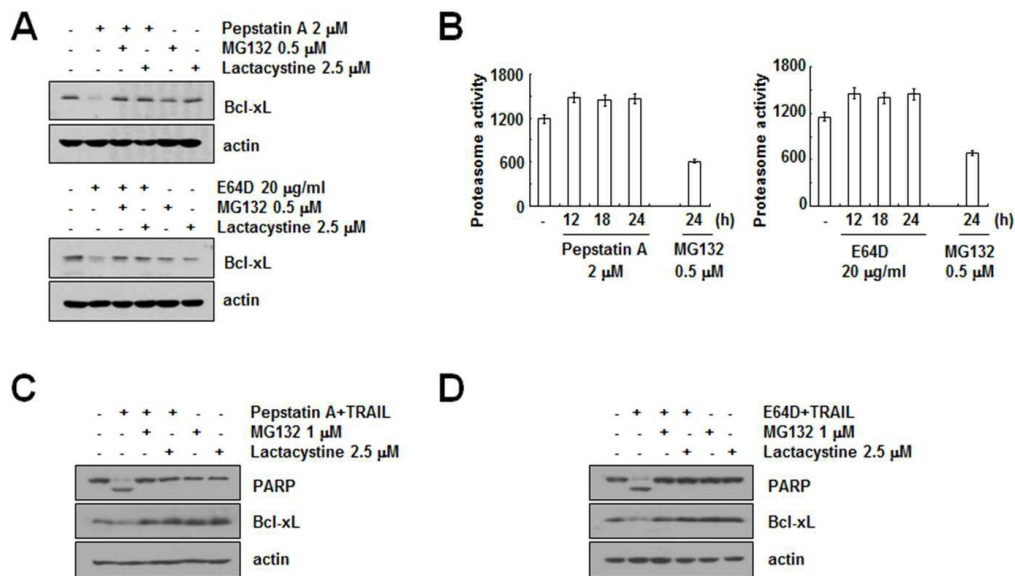
도면1



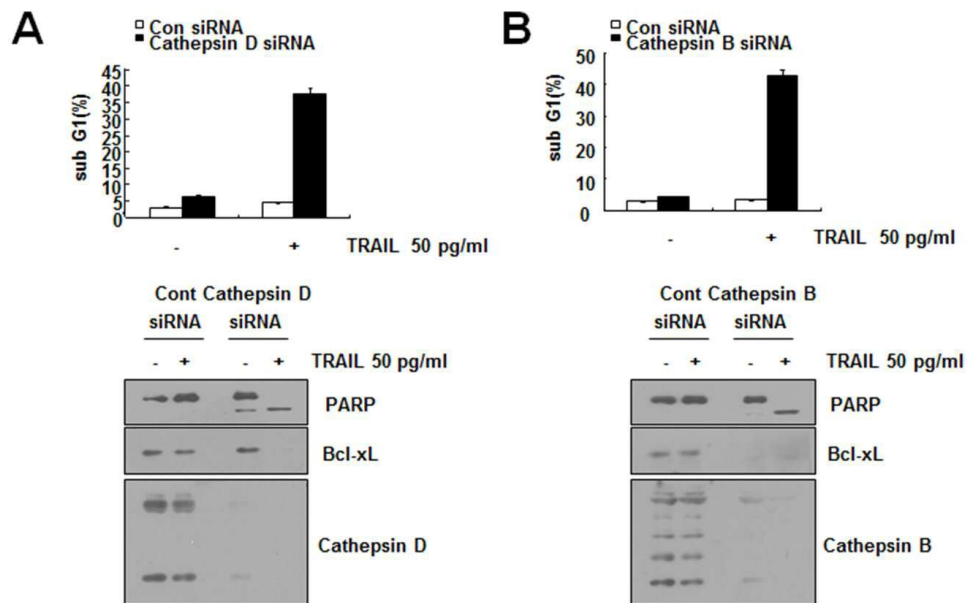
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY

<120> Composition for preventing or treating cancer comprising
Cathepsin B inhibitor or Cathepsin D inhibitor and TRAIL

<130> ADP-2015-0125

<160> 4

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bcl-xL(sense) primer

<400> 1

atggcagcag taaagcaagc gc 22

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Bcl-xL(antisense) primer

<400> 2

ttctcctggt ggcaatggcg 20

<210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> actin(sense) primer
 <400> 3
 ggcatcgtca ccaactggga c 21
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> actin(antisense) primer
 <400> 4
 cgatttcccg ctcggccgtg g 21