(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0054138
(43) 공개일자 2023년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/50 (2006.01) *A61P 15/00* (2006.01)
A61P 15/02 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/50 (2013.01)
A61P 15/00 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2021-0137768
(22) 출원일자 2021년10월15일
심사청구일자 2021년10월15일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
국민대학교산학협력단
서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)
(72) 발명자
송권화
충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호
임화선
서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 6층 61호
함지연
서울특별시 성북구 고려대로 38-1, 402호
(74) 대리인
정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 9 항

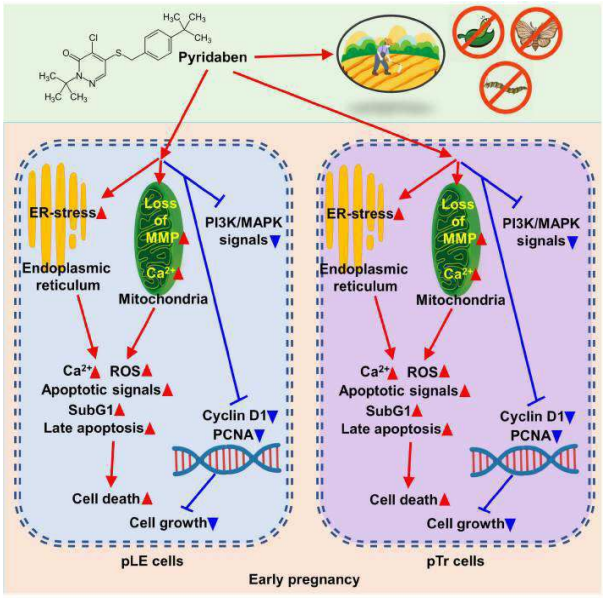
(54) 발명의 명칭 **피리다벤을 포함하는 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 피리다벤(pyridaben)을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 피리다벤을 유효성분으로 포함하는 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도17



본 발명에 따른 피리다벤을 유효성분으로 포함하는 조성물은 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포 내 PI3K/AKT, MAPK 세포전달 메커니즘과 그 하위 신호 전달물질의 인산화를 다양하게 조절하고, 산화스트레스 조절에 관여하는 소포체 스트레스 반응 인자의 발현을 증가시킴으로써 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 증식을 억제하고, 세포 사멸을 유도하는 효과가 있는바, 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식과 관련된 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류
A61P 15/02 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345322995
과제번호 2020R1A6A3A13074214
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 프로필 갈레이트에 의한 남성 생식 기능 장애의 엑소좀 운반 RNA 소편 기반 후생유전학적 조절 기전 규명
기 여 율 2/10
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2020.06.01 ~ 2021.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711129209
과제번호 2021R1C1C1009807
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 멜라토닌에 의한 엑소좀 유래 운반 RNA 소편 기반 자궁내막증 개선 메커니즘 규명
기 여 율 4/10
과제수행기관명 국민대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711133414
과제번호 2021R1A2C2005841
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 멜라토닌을 이용한 모돈-태아 간 상호작용 증진 기술 개발 및 번식능력 예측 조기지표 개발
기 여 율 4/10
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

피리다벤을 유효성분으로 포함하는 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 자궁내막 세포의 비정상적 증식 관련 질환은 자궁내막증(endometriosis), 자궁내막증식증(endometrial hyperplasia), 자궁내막 폴립(endometrial polyp) 및 자궁내막암(endometrial cancer)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환은 임신성 영양막 질환(Gestational trophoblastic disease)인 것을 특징으로 하는 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 임신성 영양막 질환은 융모막암(choriocarcinoma), 포상기태(hydatidiform mole) 및 융모선종(villous adenoma)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 고환 세포는 라이디히(Leydig) 세포 또는 세르톨리(Sertoli) 세포인 것을 특징으로 하는 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질환은 라이디히(Leydig) 세포 종양, 세르톨리(Sertoli) 세포 종양, 고환염, 부고환염, 고환암 및 음낭수종으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 피리다벤이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 하는 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

피리다벤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 자궁내막 세포, 영양막 세

포 또는 고환 세포의 증식, 이주 및 침투 능력을 억제하는 방법.

청구항 9

피리다벤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 피리다벤(pyridaben)을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 피리다벤을 유효성분으로 포함하는 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 자궁내막증, 자궁내막증식증, 자궁내막 폴립, 자궁내막암과 같은 질환은 자궁내막 세포의 비정상적인 증식에 의해 야기되는 질환이다. 그 중, 자궁내막증은 가임기 여성의 난소, 난관, 복벽등에 자궁내막 세포가 비정상적으로 증식하여 35-50% 환자에게서 불임을 야기하는 질환으로서(Vigano et al, Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 2004; Bulun, N Engl J Med, 2009), 이에 대한 병리학적 기전에 대한 연구가 활발하게 수행되고 있으나, 아직까지 정확한 발병 원인은 밝혀지지 않고 있다. 자궁내막증의 기본적인 치료 방법으로는 수술적 제거와 호르몬치료 방법이 있으며, 자궁내막증은 예후 인자를 기반으로 한 진단이 아닌, 증상 위주의 진단이 이루어지기 때문에 수술적 제거를 진행하여도 5년 내 재발률이 30-40%에 육박하는 것으로 알려져 있다(Busacca et al., J Obstet Gynecol, 2006: Vignali et al., J Minim Invasive Gynecol, 2005). 또한, 자궁내막암은 자궁조직의 과잉증식에 의한 악성종양으로 평균 출산 연령의 증가 및 생활 습관의 변화로 인하여 발병이 지속적으로 증가하는 추세이며, 미국에서 발병률이 가장 높은 부인과 종양으로 알려져 있다(Mills, A.M. and T.A. Longacre, Semin Diagn Pathol, 2010).

[0003] 한편, 융모막암, 포상기태, 융모선종와 같은 임신성 영양막 질환은 영양막 세포의 비정상적인 증식, 과도한 이동성과 침투성으로 인해 발병하는 질병이다. 특히 융모막암은 임신성 영양막 질환중 가장 악성의 질병으로 주로 임신 초기에 포상기태로부터 발병하는 경우가 대다수이며(VCMak et al, Carcinogenesis, 2016; LDuffy et al, Journal of clinical medicine research, 2015), 영양막 조직에서 유래된 악성종양인 융모막암은 임신기에 20,000~40,000 명 당 1명의 비율로 나타나는 것으로 보고된바 있다(Soper et al, Gynecol Oncol, 2004). 또한, 융모막암은 혈관침투성이 매우 높으며 폐나 질 같은 타기관으로의 전이가 빈번하게 일어나는 것으로 알려져있다(Geramizadeh and Rad, Indian J Pathol Microbiol, 2012). 일반적인 융모막암의 치료 방법은 EMA-CO라고 불리는 화학적치료법을 실시하는 것이다. 하지만, 융모막암 환자의 15-25%는 이러한 화학적 치료법에 대해 저항성 및 나쁜 예후를 나타낸다(Powles et al, Br J Cancer, 2007). 따라서 융모막암에 나타나는 항암제 내성을 극복하기 위해 더욱 효과적인 치료제 개발을 통한 접근법이 필요한 실정이다.

[0004] 또한, 고환염, 음낭수종, 고환암 등의 남성 생식기관 질환은 고환 세포의 비정상적 증식, 과도한 염증반응으로 인해 발병하는 질병이다. 고환 세포인 라이디히 세포(Leydig cell)와 세르톨리 세포 (Sertoli cell)는 남성 호르몬을 만들어 내고 정자를 생산하는 핵심 세포로서, 손상이 발생하는 경우 생식 세포의 사멸, 세포 주기 조절 단백질 감소, 세포내 활성 산소 증가에 따른 불임이 야기될 수 있다 (Rindone, GM, et al, Reproduction, 2018 156(2): p 93-101 / Kirk, D and U Mittwoch, Humangenetik, 1975 26(2): p 105-11 / Pan, B, et al, Cancer Med, 2016 5(11): p 3214-3222). 상기 남성 생식기관 질환 중 고환암은 국내 10만 명당 0.45명이 발병하는 드문 암이고 병기가 낮은 경우 90% 이상의 완치율을 보이지만, 20-40세 사이의 청장년층에서 발병률이 전 세계적으로 증가하고 있으며 정상 남성보다 불임을 일으킬 확률이 세배 이상 높으며 (Scott M, et al, Urologic Clinics of North America, 2015 42(3): p269-275), 고환암 환자는 통증이 없기 때문에 진행된 병기에서 발견하는 경우가 많고, 림프절을 따라 전이가 쉽게 일어나는 것으로 알려져 있다 (Mariotto AB, et al., CA Cancer J Clin 2014; 64: pp 252-271).

[0005] 이처럼 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식은 다양한 심각한 질환을 야기하며, 이들 질환은 모두 종래 치료법의 한계로 인하여 새로운 치료제의 개발이 요구되고 있다.

[0006] 전술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 자궁내막 세포, 영양막 세포 및 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질

환 치료를 위한 새로운 물질을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 피리다벤(pyridaben)이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호 전달기전의 활성을 조절하여 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 증식과 이주성 및 침투성을 억제하고, 세포 사멸을 유도한다는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 피리다벤을 유효성분으로 포함하는 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 피리다벤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 증식, 이주 및 침투 능력을 억제하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 피리다벤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 피리다벤을 유효성분으로 포함하는 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 피리다벤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 증식, 이주 및 침투 능력을 억제하는 방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 피리다벤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 피리다벤을 유효성분으로 포함하는 조성물은 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포 내 PI3K/AKT, MAPK 세포전달 메커니즘과 그 하위 신호 전달물질의 인산화를 다양하게 조절하고, 산화스트레스 조절에 관여하는 소포체 스트레스 반응 인자의 발현을 증가시킴으로써 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 증식을 억제하고, 세포 사멸을 유도하는 효과가 있는바, 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식과 관련된 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품 및 기능성 식품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 피리다벤이 마우스 고환 세포주의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 피리다벤이 돼지 영양막 세포 및 자궁내막 세포주의 증식에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 피리다벤에 의한 돼지 영양막 세포 및 자궁내막 세포주의 사멸 유도 효과를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 피리다벤에 의한 마우스 고환 세포주 내 미토콘드리아 기능 장애 유발 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 피리다벤에 의한 마우스 고환 세포주 내 칼슘항상성 및 소포체 스트레스 장애 유발 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 피리다벤에 의한 돼지 영양막 세포 및 자궁내막 세포주 내 미토콘드리아, 칼슘 항상성 와해 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 피리다벤에 의한 마우스 고환 세포주 내 미토콘드리아-소포체 상호작용 와해 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 피리다벤 처리에 따른 정소기능 관련 유전자 발현 변화를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 피리다벤이 고환 세포주 내 세포내 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 기전에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다

도 10은 피리다벤과 신호전달기전 억제제의 병용 처리가 고환 세포주 내 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 기전에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 피리다벤이 돼지 영양막 세포 및 자궁내막 세포주 내 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 기전에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 피리다벤과 신호전달기전 억제제의 병용 처리가 돼지 영양막 세포 및 자궁내막 세포주 내 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달 기전에 미치는 영향을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 피리다벤에 의한 돼지 영양막 세포 및 자궁내막 세포주 내 소포체 스트레스 유발 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 피리다벤 처리시 돼지 영양막 세포 및 자궁내막 세포주 내 소포체-미토콘드리아 축 및 자가포식과 관련된 단백질의 발현 변화를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 피리다벤 처리시 마우스 고환 세포주 내 스페로이드 형성 저해 효과를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 16은 피리다벤의 고환 세포주 내 작용 기전을 나타낸 것이다.

도 17은 영양막 세포 또는 자궁내막 세포 내 피리다벤에 의한 세포 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0017] 본 발명에서는 피리다벤의 영양막 세포, 자궁내막 세포 또는 고환 세포의 증식 억제 및 세포 사멸 기전을 밝혔다(도 16, 도 17).

[0018] 본 발명은 일 관점에서 피리다벤을 유효성분으로 포함하는 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0019] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.

[0020] 본 발명에 있어서, 상기 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포는 포유동물 유래의 세포일 수 있으며, 상기 포유동물은 설치목(예를 들어, 생쥐, 쥐, 햄스터, 게르빌루스 및 기니피그), 우제목(예를 들어, 소, 양, 돼지, 염소, 사슴, 기린 및 영양), 기제목(예를 들어, 말, 당나귀, 코뿔소 및 맥), 식육목(예를 들어, 개, 고양이, 호랑이, 늑대, 여우, 사자, 치타, 표범, 너구리, 오소리, 퓨마, 재규어 및 삵쾡이), 토끼목(토끼 및 우는 토끼), 식충목(예를 들어, 고슴도치, 두더지 및 솔레노돈) 및 영장목(예를 들어, 침팬지, 오랑우탄, 고릴라, 보노보노, 일본원숭이, 붉은털원숭이)일 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체를 함유하는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 담체는 이온 교환 수지, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질, 완충 물질, 물, 염, 전해질, 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 및 양모지로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 구강, 심장내, 골수내, 경막내, 경피, 장관, 피하, 설하 또는 국부 투여용으로 제형화하는 것을 특징으로 할 수 있고, 완충제, 항균성 보존제, 계면활성제, 산화방지제, 긴장성 조정제, 방부제, 증점제 및 점도 개질제로 구성된 군에서 선택된 어느 하나 이상의 보조제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 용액, 현탁액, 에멀젼, 겔 및 분말로 구성된 군에서 선택되는 제형을 가지는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0023] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 증상의 경중도, 환자의 체중, 연령, 성, 투여 방식 및 투여시간 등과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정할 수 있다.

[0024] 본 발명에 따르면, 상기 피리다벤이 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0025] 본 발명에 따르면, 상기 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질환은 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 비정상적 발달에 의해 유발되는 것이라면 모두 가능하다. 예를 들어, 상기 자궁내막 세포의 비정상적 증식 관련 질환은 자궁내막증(endometriosis), 자궁내막증식증(endometrial hyperplasia), 자궁내막 폴립(endometrial polyp) 및 자궁내막암(endometrial cancer)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 또한, 상기 영양막 세포의 비정상적 증식 관련 질환은 임신성 영양막 질환(Gestational trophoblastic disease)일 수 있으며, 상기 임신성 영양막 질환은 융모막암(choriocarcinoma), 포상기태(hydatidiform mole) 및 융모선종(villous adenoma)로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다. 또한, 상기 고환 세포의 비정상적 증식 관련 질환은 라이디히(Leydig) 세포 종양, 세르톨리(Sertoli) 세포 종양, 고환염, 부고환염, 고환암 및 음낭수종으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 피리다벤이 세포 내 칼슘항상성 저해를 유도하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 피리다벤이 소포체 스트레스를 유도하고, 스테로이드 생합성, 세포주기, 호르몬 수용체 및 정자형성과정과 연관된 유전자의 발현을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서, 상기 피리다벤이 세포내 활성산소종을 발생시키고, 자가포식 및 소포체-미토콘드리아 간 상호작용을 조절하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0029] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.

[0031] 본 발명은 또 다른 관점에서, 피리다벤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 증식, 이주 및 침투 능력을 억제하는 방법에 관한 것이다.

[0032] 본 발명은 또 다른 관점에서, 피리다벤을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 인간을 제외한 포유동물 유래 자궁내막 세포, 영양막 세포 또는 고환 세포의 사멸 효과를 향상시키는 방법에 관한 것이다.

[0034] [실시예]

[0035] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0037] **실험 방법**

[0038] 실험 재료

[0039] 후보 조성물질인 피리다벤는 Cehm Service로부터 구매하여 사용하였으며, 피리다벤에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 p-Bad, Bcl-xL, Bak, t-Bad, Irela, Vdac, Grp75, p-Erk1/2, t-Erk1/2, p-Akt, t-Akt, p-Rps6kb1, t-Rps6kb1, p-Rps6, t-Rps6, p-Jnk, t-Jnk에 대한 항체를 Cell Signaling Techonology사로부터 구매하였으며, Grp78, Tuba. Atf6a, Gadd153에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology사에서 구입하였다. 또한, Vapb에 대한 항체는 ThermoFisher Scientific에서, Fam82a2는 Abcam에서 구매하였다. 이외에, 신호전달 억제제로서 PI3K 억제제인 LY294002, ERK1/2 억제제인 U0126 및 JNK 억제제인 SP600125를 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다.

[0041] 세포배양

[0042] TM3(immature mouse leydig cell), TM4 (immature mouse sertoli cell) 세포는 한국세포주은행 (KCLB)에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 high glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)에 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함께 혼합하여 사용하였다. pLE, pTr 세포의 경우, DMEM/F12 1:1 배지에 10%의 소태아혈청 및 인슐린을 함께 혼합하여 사용하였다.

[0044] BrdU를 이용한 세포 증식 능력 분석

[0045] 마우스 정소 세포 및 돼지의 자궁내막/영양막 세포주의 증식 능력에 피리다벤이 미치는 영향을 확인하기 위하여 FBS 기아 조건으로 배양한 5 × 10^3개의 세포와 배지 100 ㎕를 96 well에 분주하고 피리다벤을 용량의존적으로 (0, 0.5, 1, 2, 5 μM) 처리하여 24시간 동안 배양한 다음, BrdU 키트 (Cat No: 1167229001, Roche)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 48시간 인큐베이션 후, 10 μM BrdU를 각 well에 추가적으로 넣어 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 2시간 동안 배양하였다. 라이디히 세포와 세르톨리 세포에 BrdU를 labeling하고 세포를 고정하여 anti-BrdU-POD 용액을 상온에서 90분 인큐베이션 시킨 이후 3차례 씻어주었다. 마지막으로 100 μl의 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate으로 세포를 반응시켜 ELISA 리더기를 사용하여 370 nm, 492 nm 내 흡광도를 측정하여 세포 증식 능력을 분석하였다.

[0047] 정량적 역전사 중합효소 연쇄반응

[0048] Trizol reagent를 통해 제조사의 매뉴얼 대로 RNA 추출을 시행하였다. cDNA는 total RNA 1 μg과 AccuPower premix로 합성하였으며, 유전자 발현은 SYBR Green (Sigma-Aldrich)과 StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA)로 측정하였다. 타겟 유전자의 발현은 C_T값으로 계산하였으며, GAPDH 발현을 기준으로 표준화하였다. PCR 조건은 95℃로 3분 진행한 후, 95℃ 30초, 60℃ 30초, 72℃ 30초 조건을 40회 증폭하였다.

[0050] 면역형광법

[0051] 3×10^4개의 라이디히 세포 및 세르톨리 세포를 10% FBS가 포함된 배지 300 μl와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 24시간 FBS 기아상태로 추가로 배양하여 피리다벤을 5 μM으로 24시간 동안 처리한 뒤 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, Santa Cruz Biothecnology사에서 구입하여 2 μg/ml로 희석된 PCNA 항체를 처리하였으며 대조군에는 mouse IgG를 처리하여 4℃에서 16시간 인큐베이션 하였다. 이후, 0.1% BSA (bovine serum albumin)이 포함된 PBS로 2번의 워싱과정을 거쳐 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG Alexa 488 (catalog number: A-11001, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 antibody dilution buffer에 1:200으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 세포 내 타겟 단백질뿐만 아니라 핵을 동시에 관찰할 수 있도록 하였다. 실험 종료 후 LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0053] Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 세포사멸 분석

[0054] 피리다벤에 의한 정소 세포 및 돼지의 자궁내막/영양막 세포의 사멸 효과를 확인하기 위하여 FITC Annexin V 세포 사멸 진단 키트 I (BD Biosciences)를 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 5×10^5 세포를 6 well에 배양하고 60% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 피리다벤을 용량의존적으로 처리하여 24시간 동안 (pLE, pTr 세포는 48h) 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고 1 mL의 1× binding buffer를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 pellet을 얻었다. 다음으로 200 μL의 1× binding buffer으로 세포현탁 배양하여 브라운 1.5 mL 튜브에 100 μL 넣고 Annexin V 5 μL, PI 5 μL를 함께 혼합하여 세포를 15분 동안 실온에 두어 염색하였다. 이후 1× binding buffer를 400 μL 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기

를 사용하여 형광 강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.

[0056] ROS 생성 측정

[0057] 돼지의 자궁내막 (pLE) 및 영양막 (pTr) 세포 5×10^5개를 6 well에 배양하고 60% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 피리다벤을 용량의존적 (0, 200, 400, 800 nM)으로 처리하여 48시간 동안 (pLE, pTr 세포는 48h) 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 이용해 세포를 회수하여 2',7'-dichlorofluorescin diacetate (DCFH-DA)로 염색한 후 유세포 분석기를 사용하여 상대적인 형광 강도를 분석하였다.

[0059] Rhod-2 AM 염색을 통한 미토콘드리아 기질 내 칼슘 농도 측정

[0060] 세포질 내 칼슘농도를 측정하기 위해 Rhod2-AM을 사용하여 측정하였다. 5×10^5 개의 마우스 정소 세포 및 돼지의 자궁내막/영양막 세포를 6 well에 배양하고 60% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 피리다벤을 용량의존적으로 처리하여 24시간 동안 37℃/5% CO2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포는 Rhod2 staining solution에 풀어준 후 빛을 차단시켜 4℃ 냉장상태 내에서 30분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포는 다시 원심분리하여 HBSS (w/o Ca2+, Mg2+) 500 μl로 세포 pellet을 풀어준 후 37℃/5% CO2 인큐베이터 내에서 10분 배양하였다. 이후, 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0062] Fluo-4 AM 염색을 통한 세포질 내 칼슘농도 변화 측정

[0063] 세포질 내 칼슘농도를 측정하기 위해 Fluo-4 AM을 사용하여 측정하였다. 5×10^5 개의 마우스 정소 세포 및 돼지의 자궁내막/영양막 세포를 6 well에 배양하고 60% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 FBS 기아상태로 추가 배양하였다. 이후, 피리다벤을 용량의존적으로 처리하여 정소 세포는 24시간, 자궁내막/영양막세포는 48시간 동안 37℃/5% CO2 인큐베이터 내에서 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포는 Fluo-4 staining solution에 풀어준 후 37℃/5% CO_2 인큐베이터 내에서 20분간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포는 다시 원심분리하여 PBS로 워싱한 후 다시 원심분리로 세포 pellet을 얻었다. 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.

[0065] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0066] 마우스 정소 세포 및 돼지의 자궁내막/영양막 세포에 피리다벤 또는 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 정소 세포주로부터 전체 단백질을 추출하여 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 이후, 추출한 단백질을 95℃에서 5분간 변성하였으며 10% SDS/PAGE 젤을 이용하여 전기영동 수행한 뒤, nitrocellulose membrane으로 옮겨주고, 1차 항체와 2차 항체를 차례로 인큐베이션 시킨 다음 chemiluminescence detection (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL, USA) 시약을 사용하여 ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0068] 스페로이드 형성 분석

[0069] 스페로이드 형성 능력을 평가하기 위해, TM3와 TM4 세포를 10% FBS-DMEM 배지에 6000 cells/drop 농도로 희석하여, 비히클(DMSO) 또는 피리다벤을 5 μM 처리하였다. 배양 접시의 뚜껑에 25 μl씩 drop을 분주하고, 뒤집어 PBS를 채운 dish에 덮어37℃/5% CO2 인큐베이터 내에서 6일까지 배양하였다. 분석을 위해 적어도 3개의 다른 스페로이드 이미지가 Leica DM2500으로 촬영되었으며, Image J software로 분석을 시행하였다.

[0071] 통계분석

[0072] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0074] **결과 및 고찰**

[0075] 피리다벤의 마우스 라이디히 세포 (TM3)와 세르톨리 세포 (TM4) 내 세포증식 억제 효과

[0076] 피리다벤을 농도의존적 (0, 0.5, 1, 2, 5 μM)으로 라이디히 세포에 처리하였을 때, 세포 증식 능력이 77.6%, 66.4%, 67.8%, 54.4%로 감소하였으며, 세르톨리 세포에서는, 세포 증식 능력이 78.8%, 66.2%, 69%, 53.6%까지 감소함을 확인하였다 (도 1A-B). 또한, 세포주기와 관련된 Ccnd1, Cdk4, Ccne1 mRNA의 발현을 확인하였으며, 피리다벤 처리 시 *Ccnd1*의 발현이 대조군에 비해 TM3, TM4 세포에서 각각 0.41배, 0.86배로 감소하였으며, *Cdk4*의 발현은 각각 0.61배, 0.85배로, *Ccne1*의 경우, 0.36배 및 0.75배로 각각 감소함을 확인하였다 (도 1C-E). 추가로, 세포증식 마커인 PCNA의 발현이 피리다벤의 처리로 대조군 의해 61% (TM3), 10% (TM4)까지 감소하는 것을 면역형광법을 통해 확인하였다 (도 1F-G). 이러한 결과를 통해 피리다벤이 라이디히 세포와 세르톨리 세포의 증식력을 유의적으로 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

[0078] 피리다벤의 돼지의 자궁내막 (pLE) 및 영양막 (pTr) 세포주 내 세포증식 억제 효과

[0079] pLE, pTr 세포주에 피리다벤을 용량의존적 (0, 100, 200, 300, 400, 800 nM)으로 처리하여 세포증식력을 측정하였다. 측정 결과, 대조군에 비해 피리다벤 처리시 pLE에서는 300 nM부터 유의적으로 71.4%, 56.4%, 52.1%까지 감소하였으며, pTr에서는 200 nM부터 유의적으로 84%, 79.6%, 66.9%, 62.6%까지 감소하는 것을 확인하였다 (도 2A-B). 또한, 세포주기 진행을 분석한 결과, 800 nM의 피리다벤에 의해 pLE의 sub-G1이 약 8.3배 증가하였으며, G2/M기는 1.3배까지 증가하였으며, G0/G1기는 0.78배 감소하는 경향을 보임을 확인하였다 (도 2C-D). pTr 세포주에서는 800 nM의 피리다벤에 의해 sub-G1이 약 33배가량 증가하고, G2/M기는 1.4배증가 및 G0/G1는 0.66배 가량 감소하는 경향을 보임을 확인하였다 (도 2C-D).

[0081] 피리다벤에 의한 돼지 자궁내막/영양막 세포주 내 세포사멸 및 활성산소종 생성 효과

[0082] pLE 및 pTr 세포에 피리다벤을 용량의존적 (0, 200, 400, 800 nM)으로 처리 시, pLE 세포에서 약 2.2, 3.4, 4.2배까지 세포자멸사의 수가 증가하였으며, pTr 세포에서는 농도의존적으로 1.7, 3.3, 4.8배 가량 후기 세포자멸사의 수가 증가하는 것으로 나타났다 (도 3A-B). DCFH-DA를 이용한 ROS 측정에서도, 400 및 800 nM의 피리다벤은 대조군에 비해 ROS 생성을 pLE에서는 51 ~ 55배, pTr에서는 800 nM 농도에서 23배가량 증가시키는 경향을 보였다 (도 3C-D). 추가적으로, 세포자멸사와 관련된 단백질인, cleaved casepase-3/9 및 cytochrome c의 발현이 유의적으로 증가함을 확인하였다 (도 3E-F).

[0084] 피리다벤에 의한 마우스 정소 세포주 내 미토콘드리아 기능 장애 유발 효과

[0085] 라이디히 세포(TM3) 및 세르톨리 세포(TM4)의 미토콘드리아 기질 내 상대적 칼슘 이온의 농도가 피리다벤 처리에 의해 농도의존적(0, 0.5, 1, 2, 5 μM)으로 감소하여 TM3에서는 최대 44.5%까지, TM4에서는 최대 40.7%까지 감소함을 확이하였다. (도 4A). 또한, 미토콘드리아 세포사멸과 관련된 단백질들의 발현을 확인하기 위해, 웨스턴 블랏을 수행하였다. 그 결과, Bcl-xL 단백질 발현은 피리다벤의 농도의존적 (0, 1, 2, 5 μM) 처리에 따라 라이디히 및 세르톨리 세포에서 대조군에 비해 사대적 발현량이 20%, 30%까지 감소하는 경향을 보였으며 (도 4D), 프로-아폽토틱 단백질인 Bax의 경우, TM3에서의 발현이 대조군에 비해 1.6~1.7배 증가하였으며, TM4에서는 5 μM 농도에서 유의적으로 3.0배까지 증가함을 확인하였다 (도 4C). 하지만, Bak의 경우 TM4에서만 대조군에 비해 1.24배 까지 증가하고, TM3에서는 피리다벤에 의해 오히려 대조군에 비해 0.62배까지 감소하는 경향을 보이는 것으로 나타났다 (도 4E).

[0087] 피리다벤에 의한 마우스 정소 세포주 내 칼슘항상성 및 소포체 스트레스 장애 유발 효과

[0088] 라이디히 세포의 세포내 상대적 칼슘 이온의 농도는 2 μM, 5 μM의 피리다벤 처리에 의해 각각 70%, 60%까지

유의적으로 감소하였으며, 이와는 반대로 세르톨리 세포에서는 상대적 칼슘 이온의 농도가 대조군에 비해 약 1.73 ~ 1.82배가량 증가하였다 (도 5A). 또한, GRP78의 단백질 발현이 피리다벤의 농도의존적(0, 1, 2, 5 μM) 처리에 따라 TM3에서는 최대 1.4배, TM4에서는 최대 1.7배까지 유의적으로 증가하는 경향을 보였다 (도 5B). 또 다른 소포체 스트레스의 마커인 Ire1a의 발현은 TM3에서는 큰 변화가 없었으며, TM4 세포에서는 피리다벤에 의해 1 μM부터 2배이상 증가하였으며, 최대 2.4배까지 증가하였다 (도 5C). ATF6a의 잘린 형태(활성형)의 상대적인 양 또한 라이디히 세포에서 5 μM의 피리다벤 처리 시 2.92배까지 유의적으로 증가하였고, 세르톨리 세포에서는 2 μM의 피리다벤 처리시 최대 1.4배까지 증가하였다 (도 5D). ER stress의 하위조절인자인 Gadd153의 발현 역시 2 μM의 피리다벤 처리부터 유의적으로 증가하였으며, 각 세포주에서 최대 3.4배, 2.9배 가까이 증가하였다 (도 5E).

[0090] 피리다벤의 돼지 자궁내막/영양막 세포주 내 미토콘드리아, 칼슘 항상성 와해 효과

[0091] 피리다벤의 pLE, pTr 세포 내 칼슘 조절과 미토콘드리아 기능에 대해 알아보기 위해 세포내 칼슘 이온 농도, 미토콘드리아 내 칼슘 이온농도와 미토콘드리아 막전위에 대해 분석을 진행하였다. 그 결과, 세포질 내 칼슘 농도는 대조군에 비해 피리다벤(0, 200, 400, 800 nM)이 용량의존적으로 처리된 pLE 세포에서 차례로 122%, 146%, 162%, pTr 세포에서는 259%, 403%, 792%까지 증가하는 것으로 나타났다 (도 6A-B). 또한, 미토콘드리아 내 칼슘 농도는 800 nM의 피리다벤 처리시 pLE에서 353%, pTr 세포에서 225%까지 증가하는 양상을 보였다 (도 6C-D). 마지막으로, 미토콘드리아 내 막전위의 탈분극은 대조군에 비해 피리다벤 처리 pLE, pTr 세포 각각에서 20 ~ 29.5배 또는 3.2 ~ 19.4배가량 증가하는 것으로 나타났다 (도 6E-F).

[0093] 피리다벤의 마우스 정소 세포주 내 미토콘드리아-소포체 상호작용 와해 효과

[0094] 미토콘드리아와 소포체는 둘 다 세포 내 칼슘이온 조절에 관여하기 때문에, 두 세포소기관 사이를 연결하는 연결단백질에 대한 발현 변화를 측정하였다. TM3에서 피리다벤의 용량의존적 (0, 1, 2, 5 μM) 처리에 따라 Vdac의 발현이 대조군에 비해 47%까지 감소하였으며, TM4 세포에서는 대조군에 비해 유의적으로 0.46배, 0.33배가량 감소하는 것을 확인하였다 (도 7A-B). Grp75 단백질의 경우, 5 μM의 피리다벤 처리에 의해 TM3에서는 49%정도가 감소하였고, TM4에서는 33% 정도가 감소하였음을 확인하였다 (도 7A-B). 피리다벤 처리에 의한 Vapb 단백질의 발현은 TM3에서는 큰 유의적인 변화가 없었으며, TM4에서도 5 μM의 피리다벤에 의해 1.21배까지 약간 증가하는 경향을 보였다 (도 7C). Fam82a2의 경우, TM3와 TM4 세포에서 5 μM의 피리다벤의 처리에 따라 약 1.4배까지 증가하였다 (도 7D). 이러한 결과를 통해, 피리다벤이 TM3, TM4 세포 내 미토콘드리아와 소포체 간 칼슘이온의 흐름을 방해하여 칼슘 항상성을 와해시킨다는 것을 확인하였다.

[0096] 피리다벤 처리에 따른 정소기능과 관련된 유전자 발현의 변화

[0097] 피리다벤이 처리된 라이디히 세포와 세르톨리 세포내 각 정소의 기능과 관련된 유전자들의 발현 변화를 측정하였다. 그 결과, 라이디히 세포에서는 대조군에 비해 표피생장인자 수용체 (EGFR) (0.76배), 황체호르몬 수용체 (LHR)(0.35배), 전사인자인 Nr2f2 (0.66배), 펩타이드 호르몬인 Insl3 (0.8배) 및 스테로이드 합성에 관여하는 효소인 Star (0.6배), Hsd17b3 (0.29배), Srd5a1 (0.4배), Cyp19a1 (0.13배)의 mRNA 발현이 5 μM의 피리다벤 처리에 의해 모두 유의적으로 감소하였다 (도 8A-H). 또한, 피리다벤이 처리된 세르톨리 세포에서는 Egfr은 증가하였고, 안드로겐 수용체(Ar)은 유의적인 변화가 없었다 (도 8I-J). 이외에도 정소발달에 관여하는 Adam5 (0.23배), FSH를 억제하는 Inha (0.69배), Inhba (0.83배) 및 전사인자인 Sp1 (0.61배)과 Jun (0.64배)이 피리다벤에 의해 감소하였으며, Jund만 약간 증가하는 경향을 보였다 (도 8K-P). 이러한 결과를 통해, 피리다벤은 라이디히와 세르톨리 세포 내 정소의 기능에 관여하는 유전자들의 발현에 영향을 미친다는 것을 확인하였다.

[0099] 피리다벤에 의한 정소 세포주 내 세포내 신호전달기전 변화

[0100] 세포의 생존과 스테로이드 합성과 같은 기능와 연관된 Mapk과 Pi3k/Akt 신호전달 경로가 피리다벤에 의해 어떻게 조절되는지 분석하였다. 그 결과, Erk1/2의 인산화는 TM3에서 피리다벤에 의해 큰 변화가 일어나지 않았으며, TM4에서는 5 μM의 피리다벤에 의해 1.52배까지 유의적으로 증가하는 양상을 보였다 (도 9A). 또한, Akt의 인산화는 두 세포주 모두에서 피리다벤에 의해 2.6배 및 1.94배까지 점차적으로 증가하는 것으로 나타났

다 (도 9B). 하지만, Rps6kb1의 인산화는 TM3에서 피리다벤 처리시 농도에 상관없이 0.46~0.6배 가량 감소하였으며, 이에 반해 TM4 세포에서는 5 μM 농도에 피리다벤 처리시 대조군에 비해 1.5배까지 증가하는 양상을 보였다 (도 9C). 또한, Rps6의 인산화는 TM3에서 피리다벤에 의해 농도에 상관없이 0.17 ~0.3배 가량으로 매우 억제되었으며, TM4에서는 유의적인 변화가 없었다 (도 9D). Jnk의 인산화의 경우, 두 세포주 모두에서 피리다벤에 의해 0.74배 및 0.41배 수준으로 유의적으로 감소하는 경향을 보였다 (도 9E).

[0102] 피리다벤과 약리학적 억제제와의 병용처리 시 세포 내 신호전달기전 조절 변화

[0103] 약리학적 억제제를 피리다벤 처리 2시간 전 10 μM의 농도로 전처리하였다. 피리다벤에 의해 인산화된 Erk1/2는 TM3세포에서 U0126 (Erk1/2 inhibitor)에 의해 17%가량 억제되었으며, TM4의 경우 피리다벤 처리에 의해 1.9배까지 증가한 Erk1/2의 인산화는 LY294002 (Akt inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor)과의 병용처리에 의해 인산화 수준이 대조군 대비 각 1.1배 및 0.64배로 회복되었다 (도 10A). TM3에서 피리다벤에 의한 Akt의 인산화는 U0126처리에 의해 대조군 대비 4.2배까지 증가하였으며, SP600125 처리에는 피리다벤 처리군과 유의적 변화가 없었다 (도 10B). TM4에서는 피리다벤에 의한 p-AKT의 발현 (대조군 대비 1.8배)은 SP600125에 의해 대조군 대비 0.52배 수준으로 감소하였다 (도 10B). Rps6kb1와 Rps6의 인산화는 약리학적 억제제의 병용처리에 의해 원래의 수준(대조군 대비 0.21배)으로 감소하거나 또는 시너지 효과를 보였다 (도 10C-D). TM3에서 피리다벤에 의해 0.69배까지 감소한 Jnk의 인산화는 U0126에 의해 1.02배인 원래 수준으로 회복되었으며, 그 외 TM3와 TM4에서 다른 억제제와의 유의미한 변화는 없었다 (도 10E).

[0105] 피리다벤 처리시 돼지 자궁내막/영양막 세포주 내 세포내 신호전달기전 억제 효과

[0106] 피리다벤의 자궁내막/영양막 세포주 내 세포 성장과 관련된 세포 신호전달 기전을 웨스턴 블랏을 통해 분석하였다. pLE세포에서 cyclin D1의 인산화 및 PCNA 단백질의 발현은 피리다벤의 용량의존적 처리 (0, 200, 400, 800 nM)에 따라 각각 대조군 대비 0.33배, 0.53배까지 유의적으로 감소하였으며, pTr세포에서는 대조군 대비0.63배 및 0.57배까지 감소함을 확인하였다 (도 11A-B). PI3K/AKT 세포신호전달 경로에서는 pLE세포의 AKT, P70S6K, S6의 인산화 수준이 800 nM의 피리다벤 처리에 의해 각 0.4배, 0.18배, 0.13배로 감소하였으며, pTr 세포의 AKT, P70S6K, S6의 인산화 수준은 800 nM의 피라다벤 처리에 따라 0.36배, 0.22배, 0.08배 감소함을 확인하였다 (도 11C-E). MAPK 신호전달 경로인 ERK1/2, JNK, P38 단백질 역시 800 nM의 피리다벤에 의해 pLE 세포 내 인산화 수준이 대조군 대비 0.32배, 0.16배, 0.31배로 각각 감소함을 확인하였다 (도 11F-H). 또한, pTr 세포내 ERK1/2, JNK, P38 단백질 인산화 수준도 800 nM의 피리다벤 처리에 따라 대조군 대비 0.38배, 0.17배, 0.14배로 감소함을 화인하였다 (도 11F-H).

[0108] 피리다벤에 의한 돼지 자궁내막/영양막 세포주 내 세포내 신호전달기전 변화

[0109] 돼지의 자궁내막/영양막 세포주 내 PI3K 및 MAPK 신호전달 경로 간 상호관계를 확인하기 위해 각 단백질들에 대한 약리학적 억제제를 피리다벤과 병용처리하여 단백질의 발현 변화를 측정하였다. pLE세포에서 피리다벤과 Wortmannin (1 μM), U0126 (20 μM), SB203580 (20 μM)를 병용처리 하였을 시 0.2배로 감소되었던 AKT의 인산화는 각 병용처리로 인해 각각 0.02배, 0.07배, 0.03배로 유의적으로 더욱 감소하였으며, 이와는 반대로 SP600125 (20 μM)와 병용처리 하였을 시에는 오히려 인산화 수준이 대조군처럼 0.67배까지 회복되는 양상을 보였다 (도 12A). P70S6K의 인산화 수준 역시 pLE, pTr 두 세포주 모두에서 피리다벤에 의해 대조군 대비 0.33배, 0.19배 감소하였으나, SP600125와의 병용처리에 의해 대조군 대비 1배 및 0.57배로.의해 회복되는 양상을 보였으며 (도 12B), S6의 인산화는 모든 약리학적 억제제와의 병용처리에서 피리다벤 단독처리보다 더욱 유의적으로 감소하는 양상을 보였다 (도 12C). ERK1/2의 인산화는 U0126에 의해서는 완전히 감소되었지만, SP600125는 피리다벤 단독처리(pLE; 0.27배, pTr: 0.32배)에 비해 오히려 대조군 대비 0.72배 및 0.84배까지 증가하는 양상을 보였으며, Wortmannin이나 SB203580과의 병용처리에서는 유의적 변화가 관찰되지 않았다 (도 12D). pLE세포에서 JNK의 인산화는 U0126과 SP600125의 병용처리에 의해 대조군 대비 0.15배 이하로 감소하였으며, Wortmannin과 SB203580에 의해서는 대조군대비 1.34배 및 1.24배로 인산화 수준이 회복되는 양상을 보였다 (도 5E). pTr세포에서도 Wortmannin과 SB20358과의 병용처리 시, 피리다벤 단독처리 (0.12배)에 비해 대조군대비 각 0.76배, 0.49배까지 인산화 양상이 회복되는 것을 확인하였다 (도 5E). P38 MAPK의 인산화는 U0126, SB203580에 의해 완전히 감소되었다 (도 12F). pLE세포에서는 피리다벤과 SP600125와의 병용처리에 의해 오히려 0.33배까지 감소된

인산화 수준이 0.69배까지 다시금 회복되는 양상을 보였으며, pTr세포에서도 0.21배까지 감소된 P38의 인산화가 SP60015와의 병용처리에 의해 1.34배까지 회복하는 양상을 보였다 (도 12F).

[0111] 피리다벤에 의한 자궁 내막/영양막 세포주 내 소포체 스트레스 유발 효과

[0112] 피리다벤이 pLE, pTr 세포에서 소포체 스트레스를 유도하는지 확인하기 위해, 관련된 단백질들의 발현을 웨스턴 블랏으로 분석하였다. IRE1α의 발현은 피리다벤의 용량의존적 (0, 200, 400, 800 nM) 처리에 의해 pLE에서는 최대 2.61배, pTr에서는 2.31배 까지 증가하는 양상을 보였다 (도 13A). ATF6a의 발현은 pLE, pTr 세포에서 각기 2.8, 1.78배 증가하였으며, PERK의 인산화 역시 두 세포주에서 모두 대조군에 비해 각각 3.11배, 3.64배까지 증가하는 양상을 보였다 (도 13B-C). 이와 유사하게, 하위 신호전달 인자들인 GADD153은 피리다벤의 용량의존적 처리에 따라 pLE와 pTr세포에서 각각 2.32배 및 1.7배까지 증가하였고, eIF2a의 인산화 수준 역시 각 3.5배 및 2.6배까지 증가하였다 (도 13D-E). GRP78의 단백질 발현 역시 피리다벤이 처리된 두 세포주에서 모두 대조군에 비해 최대 2.1배까지 증가하는 것으로 나타났다 (도 13F).

[0114] 피리다벤 처리시 돼지의 자궁내막/영양막 세포주 내 소포체-미토콘드리아 축 및 자가포식과 관련된 단백질의 발현 변화

[0115] 자가포식 및 ER-미토콘드리아 간 단백질들의 발현 변화 또한 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 그 결과, 피리다벤의 용량의존적 처리는 ULK1의 인산화를 대조군 대비 0.09배 및 0.31배까지 pLE와 pTr세포에서 억제하는 양상을 보였다 (도 14A), GRP75의 발현 역시 pLE, pTr세포주에서 각각 800 nM의 피리다벤에 의해 대조군 대비 0.29배, 0.4배까지 감소하였으며, mitofusin-2 (MFN2)의 발현도 대조군에 비해 0.26배 및 0.16배로 억제하는 양상을 보였다 (도 14B-C). pLE 세포에서 피리다벤의 처리에 의해 FAM82A2, IP3R1, VAPB의 단백질 발현이 최대 0.59배, 0.16배, 0.22배 감소하였으며, pTr세포에서는 각각 0.32배, 0.56배, 0.37배까지 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (도 14D-F). 이와는 반대로 VDAC의 발현은 피리다벤에 의해 용량의존적으로 대조군 대비 pLE세포에서 1.5배, pTr 세포에서 1.6배까지 증가하는 양상을 보였다 (도 14G).

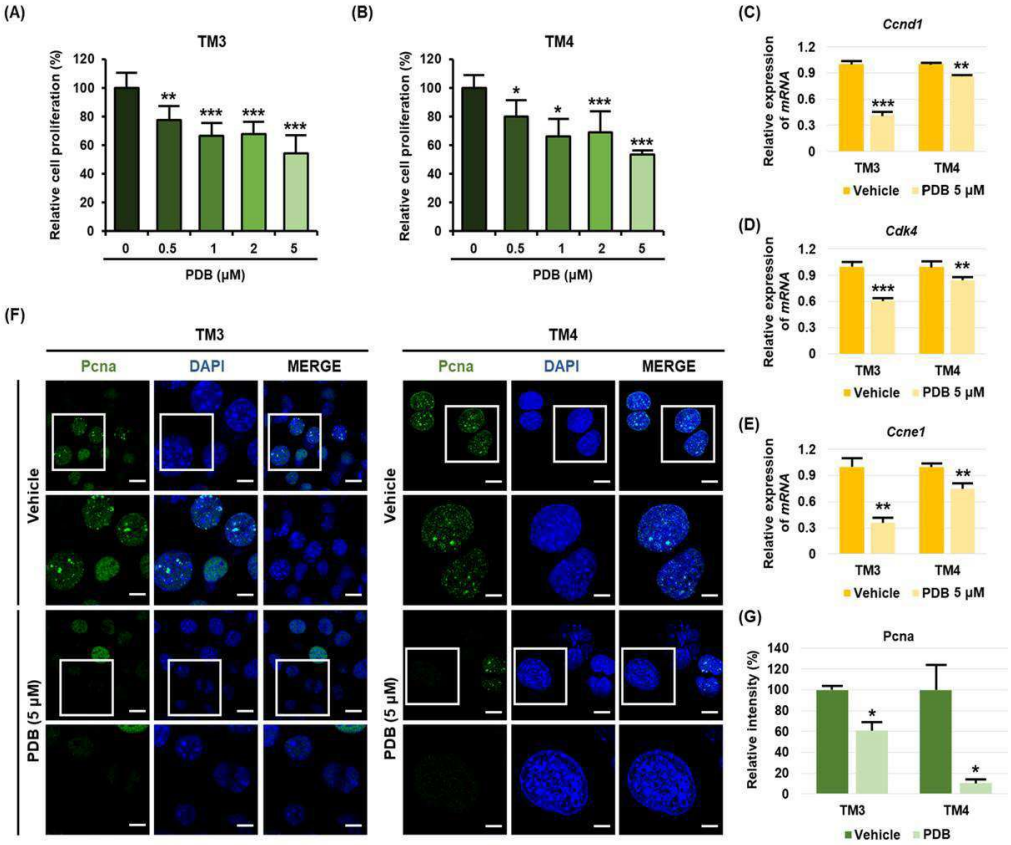
[0117] 피리다벤 처리시 마우스 정소 세포주 내 스페로이드 (3D) 형성 저해 효과

[0118] 피리다벤의 3D 환경에서의 항증식효과 유무를 확인하기 위해, 스페로이드 배양을 수행하였다. 비히클 또는 5 μM의 피리다벤이 처리된 배지에서 스페로이드를 6일까지 배양하였으며, 2일마다 이미지를 촬영하였다 (도 15A). 그 결과, 상대적으로 피리다벤이 처리된 스페로이드가 대조군에 비해 6일차 기준 32% (TM3) 및 39% (TM4)의 밀도를 보였으며 (도 15B-C), 이를 통해 피리다벤이 마우스 정소 세포주 내 스페로이드 형성을 저해한다는 것을 확인하였다.

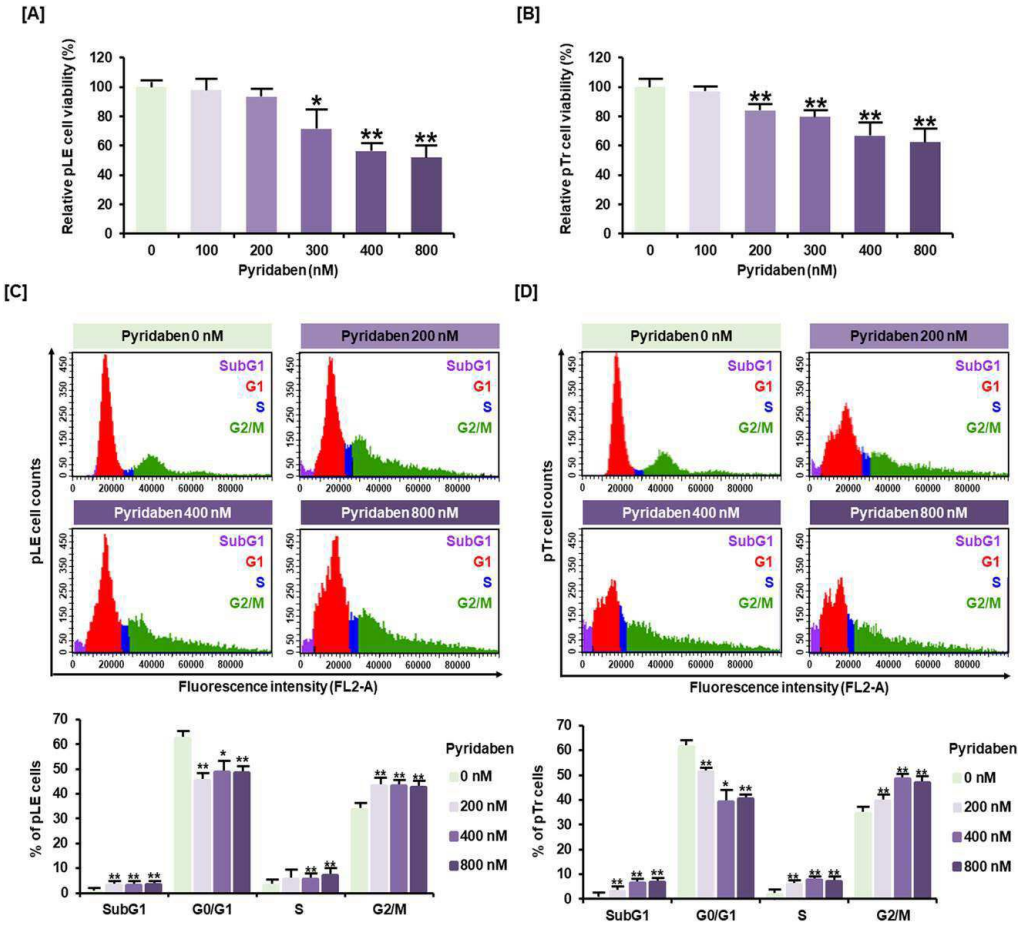
[0120] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

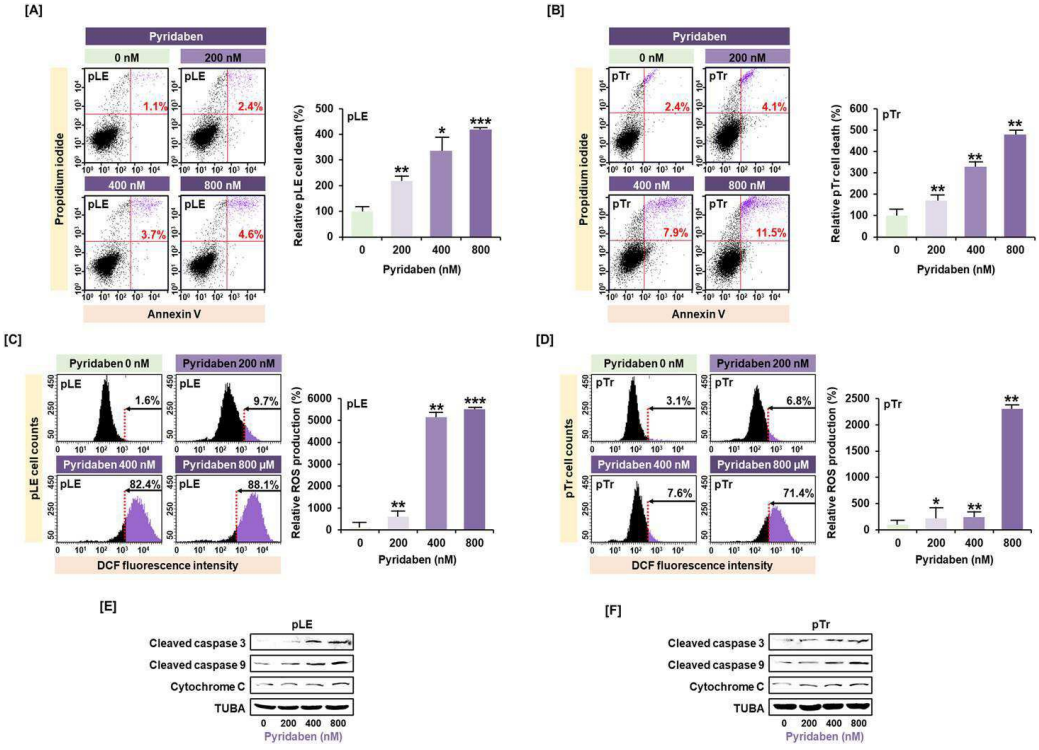
도면1


(A)
TM3
Relative cell proliferation (%)
PDB (μM)
(B)
TM4
(C)
Ccnd1
Relative expression of mRNA
Vehicle
PDB 5 μM
(D)
Cdk4
(E)
Ccne1
(F)
Pcna
DAPI
MERGE
Vehicle
PDB (5 μM)
(G)
Relative intensity (%)
PDB

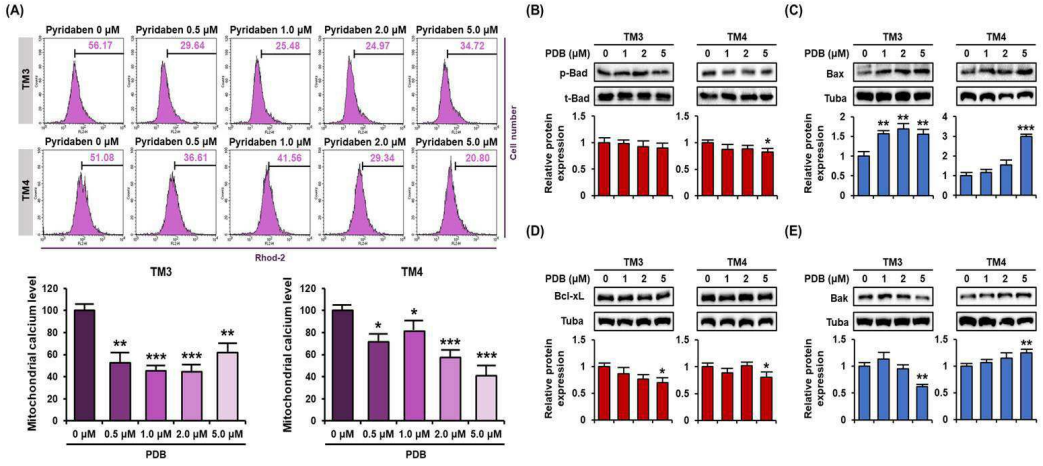
도면2


[A]
Relative pLE cell viability (%)
Pyridaben (nM)
[B]
Relative pTr cell viability (%)
Pyridaben (nM)
[C]
Pyridaben 0 nM
Pyridaben 200 nM
Pyridaben 400 nM
Pyridaben 800 nM
SubG1
G1
S
G2/M
pLE cell counts
Fluorescence intensity (FL2-A)
% of pLE cells
SubG1
G0/G1
S
G2/M
Pyridaben
0 nM
200 nM
400 nM
800 nM
[D]
pTr cell counts
Fluorescence intensity (FL2-A)
% of pTr cells

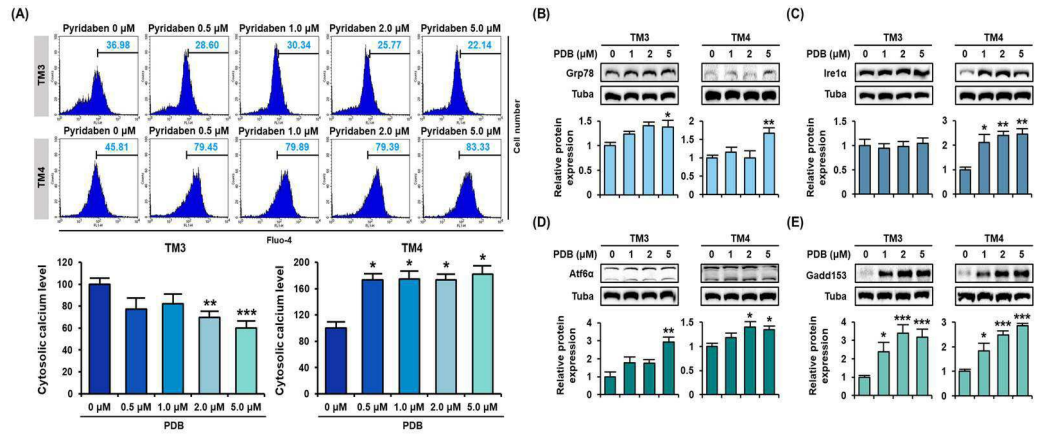
도면3


[A]
Pyridaben
0 nM
200 nM
400 nM
800 nM
pLE
1.1%
2.4%
3.7%
4.6%
Propidium iodide
Annexin V
Relative pLE cell death (%)
Pyridaben (nM)
[B]
pTr
2.4%
4.1%
7.9%
11.5%
Relative pTr cell death (%)
[C]
Pyridaben 0 nM
Pyridaben 200 nM
Pyridaben 400 nM
Pyridaben 800 μM
1.6%
9.7%
82.4%
88.1%
pLE cell counts
DCF fluorescence intensity
Relative ROS production (%)
[D]
3.1%
6.8%
7.6%
71.4%
pTr cell counts
[E]
pLE
Cleaved caspase 3
Cleaved caspase 9
Cytochrome C
TUBA
Pyridaben (nM)
[F]
pTr

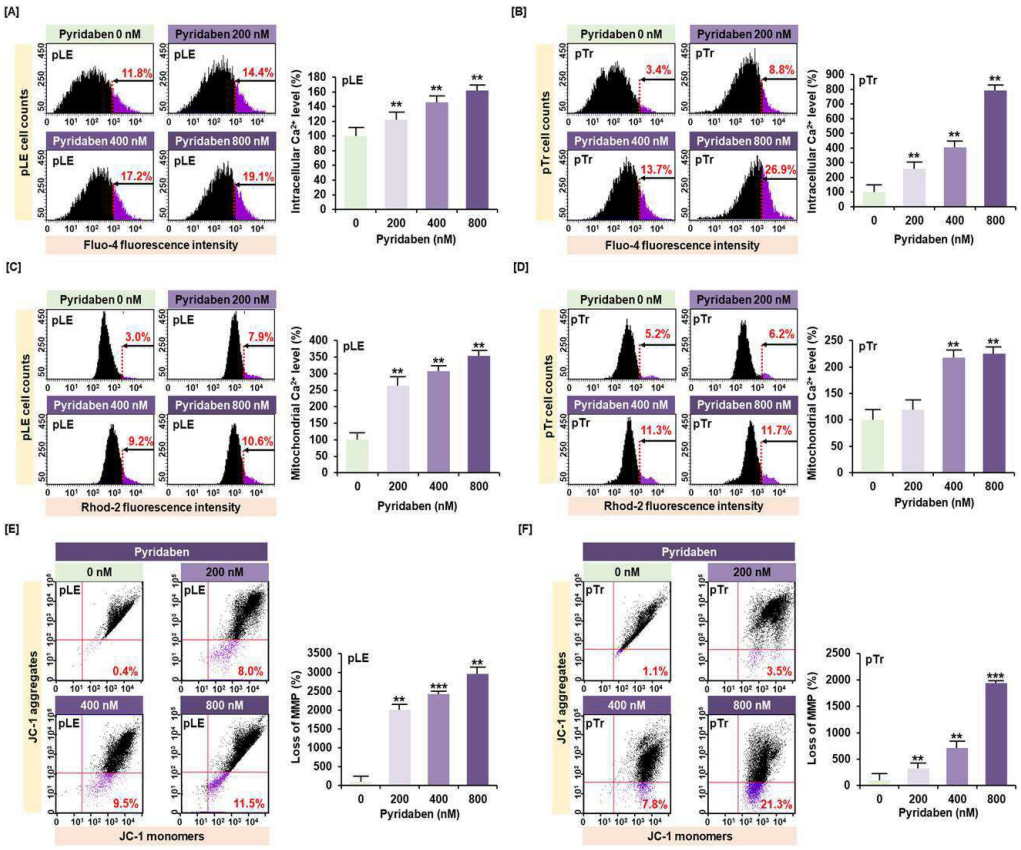
도면4


(A)
Pyridaben 0 μM
Pyridaben 0.5 μM
Pyridaben 1.0 μM
Pyridaben 2.0 μM
Pyridaben 5.0 μM
TM3
TM4
Cell number
Rhod-2
Mitochondrial calcium level
PDB
(B)
(C)
(D)
(E)
PDB (μM)
p-Bad
t-Bad
Bax
Tuba
Bcl-xL
Bak
Relative protein expression

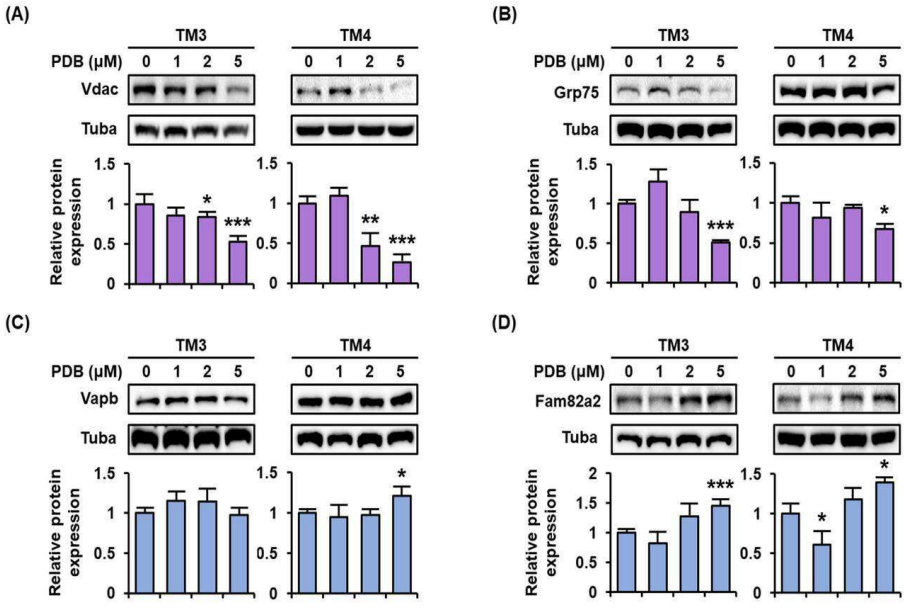
도면5


(A)
Pyridaben 0 μM
Pyridaben 0.5 μM
Pyridaben 1.0 μM
Pyridaben 2.0 μM
Pyridaben 5.0 μM
TM3
TM4
Cell number
Fluo-4
Cytosolic calcium level
PDB
(B)
(C)
(D)
(E)
PDB (μM)
Grp78
Tuba
Ire1α
Atf6α
Gadd153
Relative protein expression

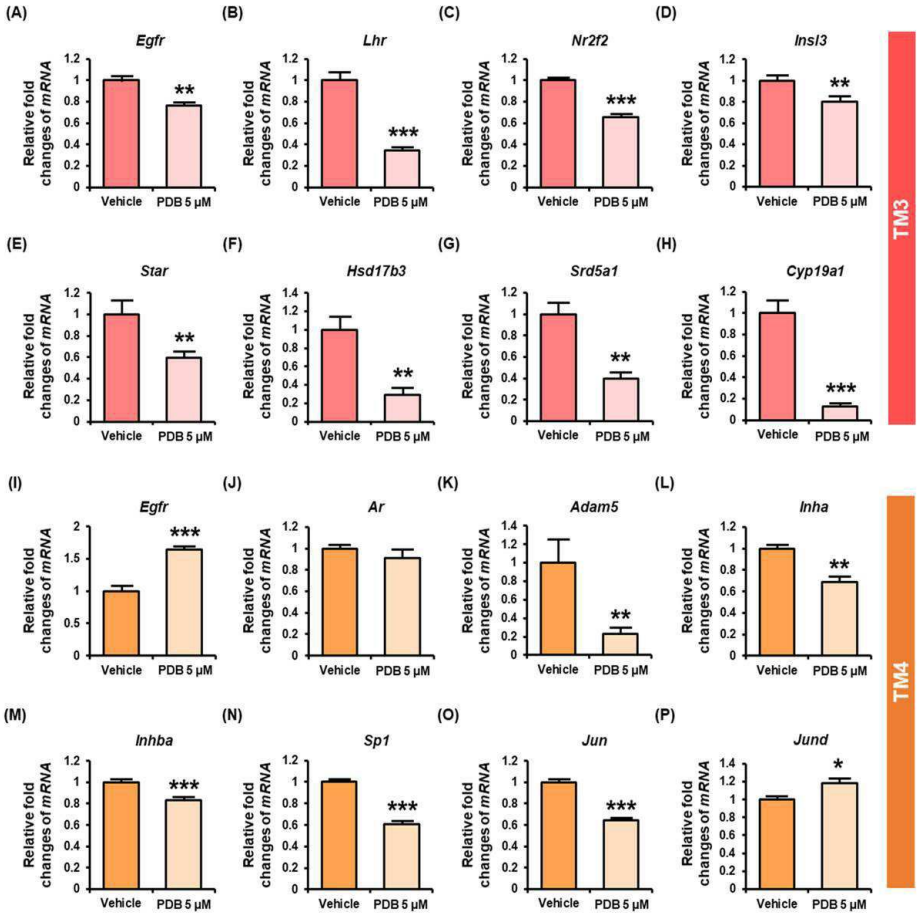
도면6


[A]
Pyridaben 0 nM
Pyridaben 200 nM
Pyridaben 400 nM
Pyridaben 800 nM
pLE
11.8%
14.4%
17.2%
19.1%
pLE cell counts
Fluo-4 fluorescence intensity
Intracellular Ca2+ level (%)
Pyridaben (nM)
[B]
pTr
3.4%
8.8%
13.7%
26.9%
pTr cell counts
[C]
3.0%
7.9%
9.2%
10.6%
Rhod-2 fluorescence intensity
Mitochondrial Ca2+ level (%)
[D]
5.2%
6.2%
11.3%
11.7%
[E]
Pyridaben
0 nM
200 nM
400 nM
800 nM
0.4%
8.0%
9.5%
11.5%
JC-1 aggregates
JC-1 monomers
Loss of MMP (%)
[F]
1.1%
3.5%
7.8%
21.3%

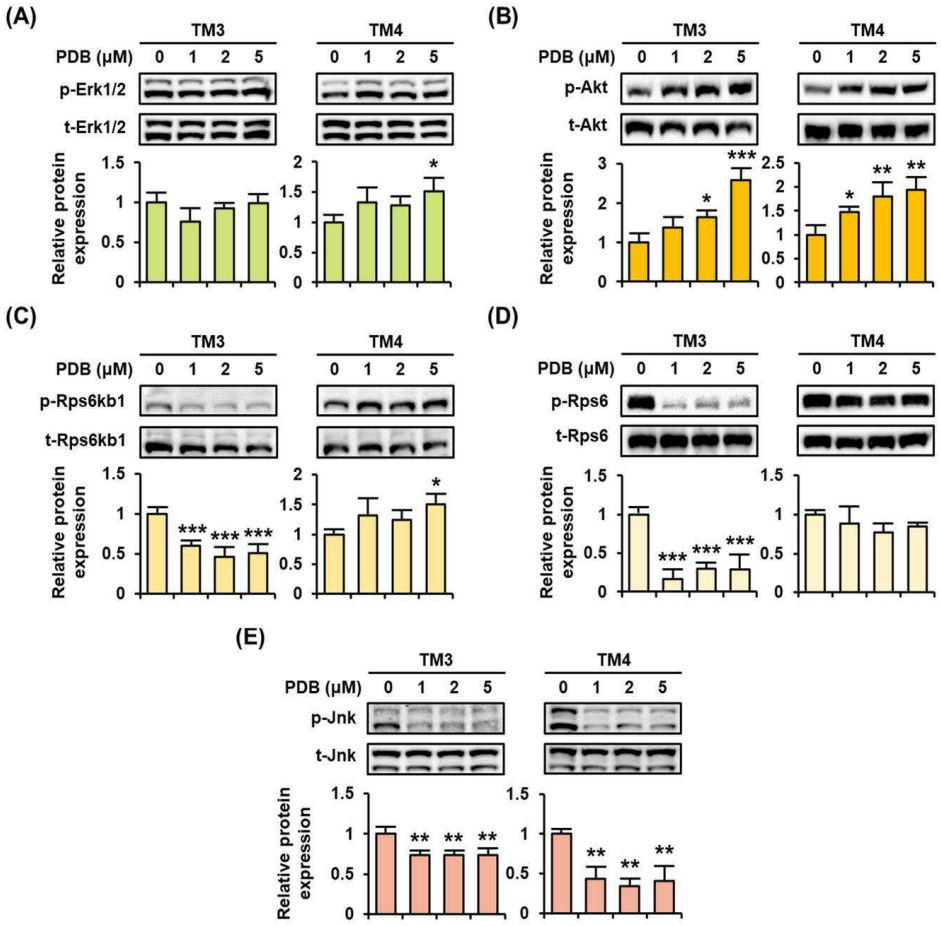
도면7


(A)
TM3
TM4
PDB (μM) 0 1 2 5
Vdac
Tuba
Relative protein expression
(B)
Grp75
(C)
Vapb
(D)
Fam82a2

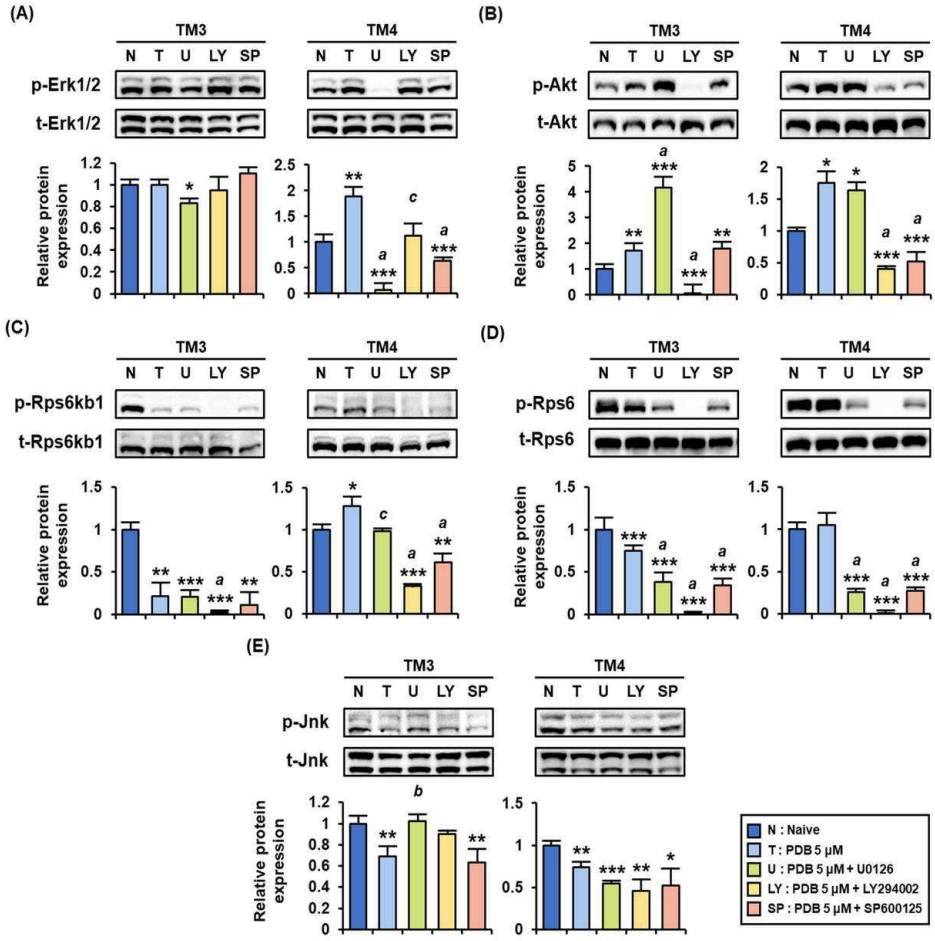
도면8


(A)
Egfr
(B)
Lhr
(C)
Nr2f2
(D)
Insl3
(E)
Star
(F)
Hsd17b3
(G)
Srd5a1
(H)
Cyp19a1
TM3
(I)
Egfr
(J)
Ar
(K)
Adam5
(L)
Inha
(M)
Inhba
(N)
Sp1
(O)
Jun
(P)
Jund
TM4
Relative fold changes of mRNA
Vehicle
PDB 5 μM

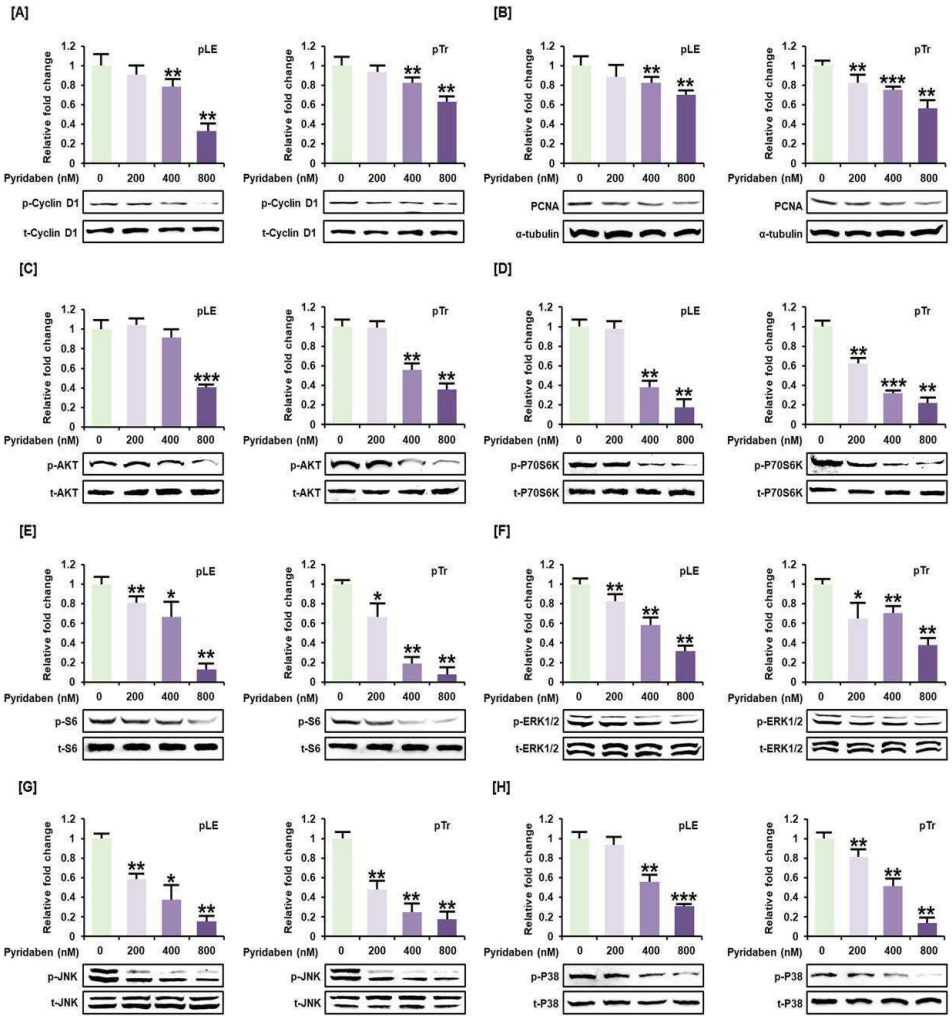
도면9


(A)
TM3
TM4
PDB (μM) 0 1 2 5
p-Erk1/2
t-Erk1/2
Relative protein expression
(B)
p-Akt
t-Akt
(C)
p-Rps6kb1
t-Rps6kb1
(D)
p-Rps6
t-Rps6
(E)
p-Jnk
t-Jnk

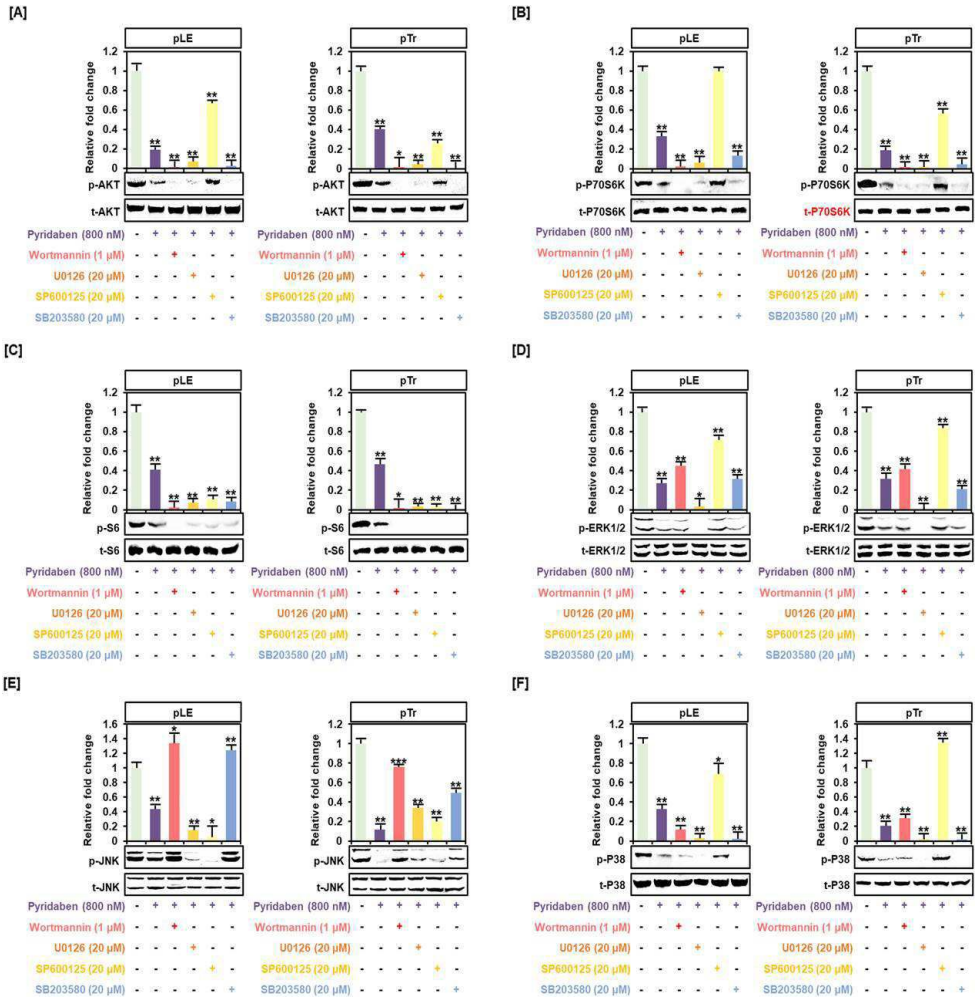
도면10


(A)
TM3
TM4
N T U LY SP
p-Erk1/2
t-Erk1/2
Relative protein expression
(B)
p-Akt
t-Akt
(C)
p-Rps6kb1
t-Rps6kb1
(D)
p-Rps6
t-Rps6
(E)
p-Jnk
t-Jnk
N : Naive
T : PDB 5 μM
U : PDB 5 μM + U0126
LY : PDB 5 μM + LY294002
SP : PDB 5 μM + SP600125

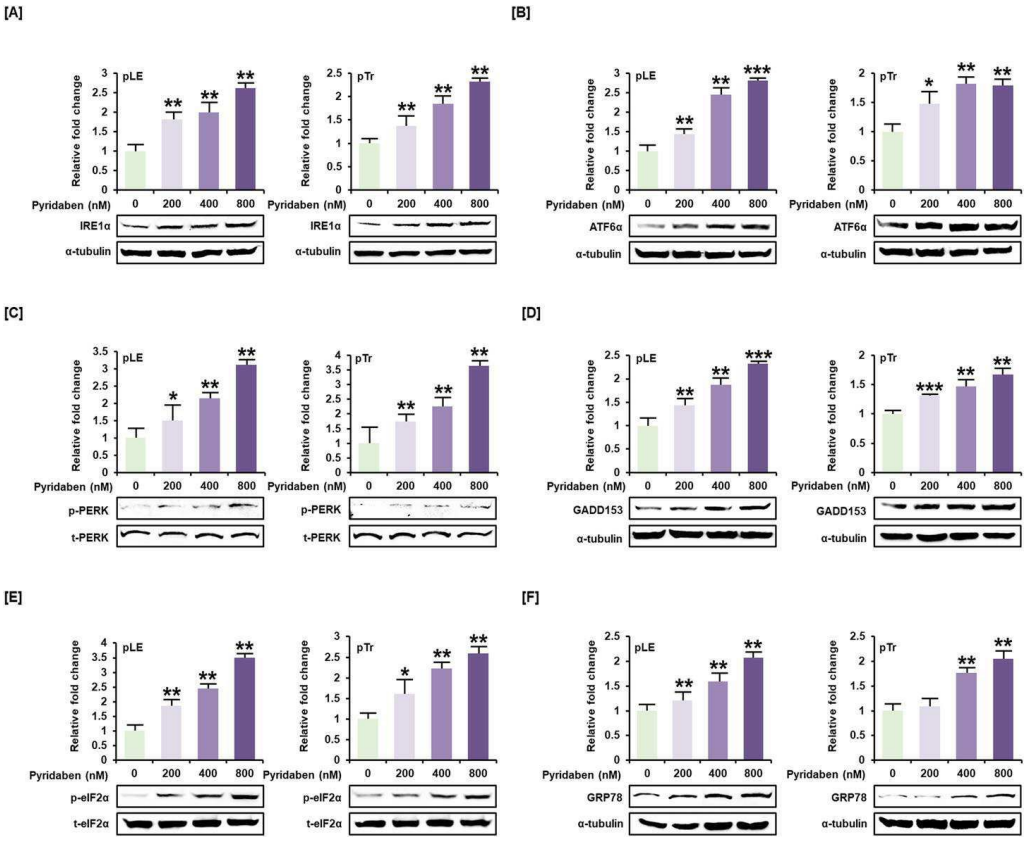
도면11


[A]
[B]
[C]
[D]
[E]
[F]
[G]
[H]
pLE
pTr
Relative fold change
Pyridaben (nM) 0 200 400 800
p-Cyclin D1
t-Cyclin D1
PCNA
α-tubulin
p-AKT
t-AKT
p-P70S6K
t-P70S6K
p-S6
t-S6
p-ERK1/2
t-ERK1/2
p-JNK
t-JNK
p-P38
t-P38

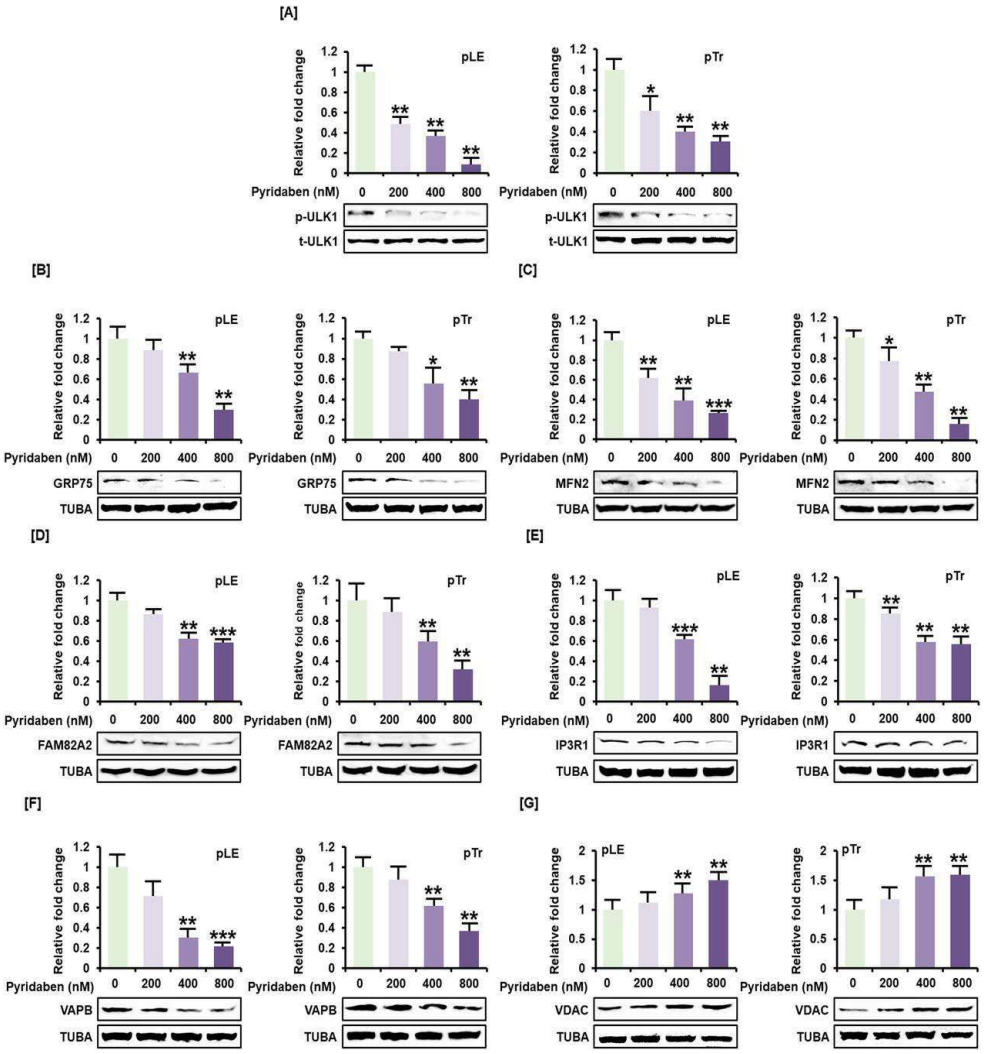
도면12


[A]
pLE
pTr
Relative fold change
p-AKT
t-AKT
[B]
p-P70S6K
t-P70S6K
[C]
p-S6
t-S6
[D]
p-ERK1/2
t-ERK1/2
[E]
p-JNK
t-JNK
[F]
p-P38
t-P38
Pyridaben (800 nM)
Wortmannin (1 μM)
U0126 (20 μM)
SP600125 (20 μM)
SB203580 (20 μM)

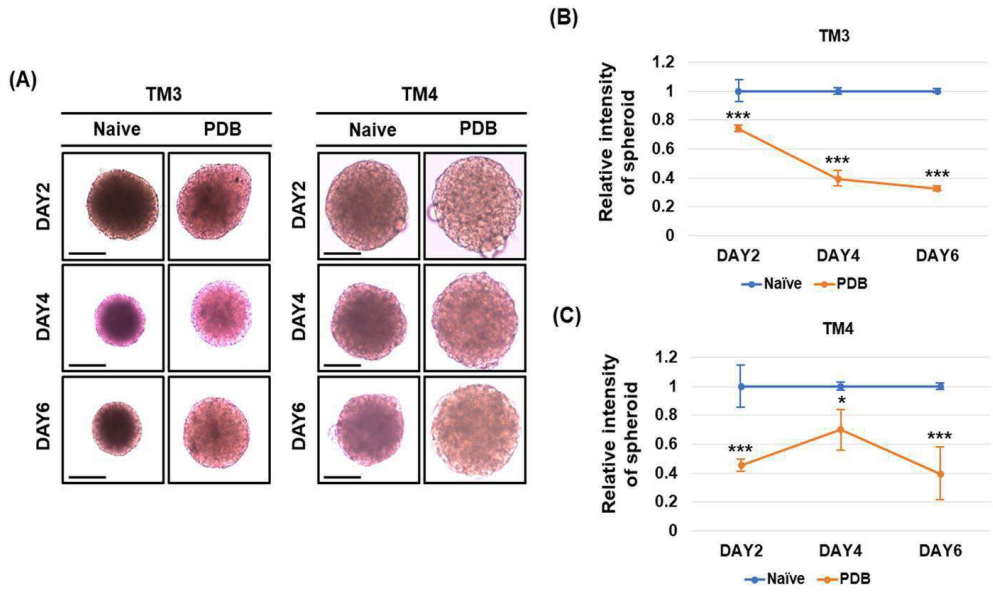
도면13


[A]
pLE
pTr
Relative fold change
Pyridaben (nM)
0
200
400
800
IRE1α
α-tubulin
[B]
ATF6α
[C]
p-PERK
t-PERK
[D]
GADD153
[E]
p-eIF2α
t-eIF2α
[F]
GRP78

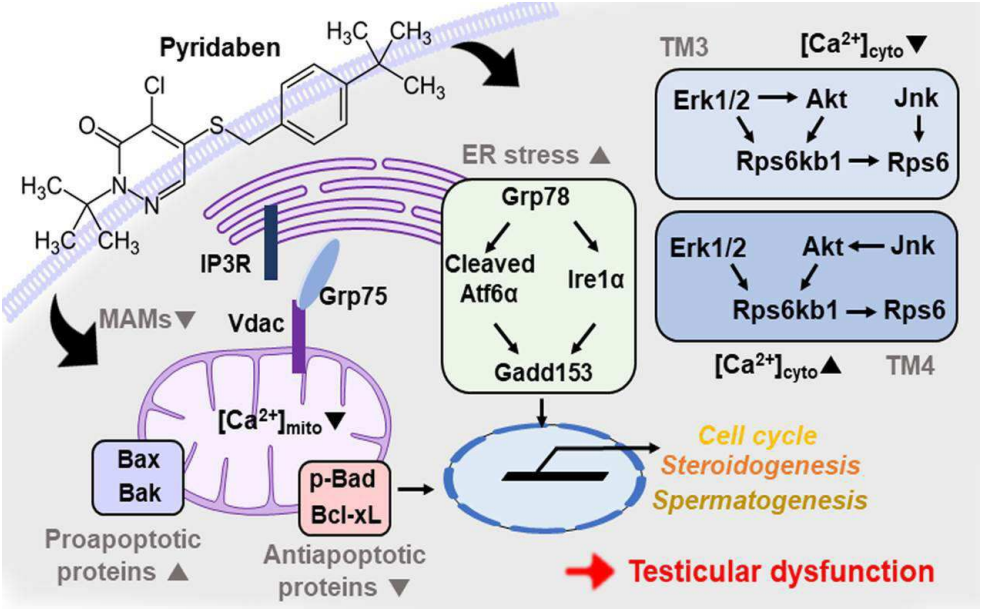
도면14


[A]
pLE
pTr
Relative fold change
Pyridaben (nM) 0 200 400 800
p-ULK1
t-ULK1
[B]
[C]
GRP75
MFN2
[D]
[E]
FAM82A2
IP3R1
[F]
[G]
VAPB
VDAC
TUBA

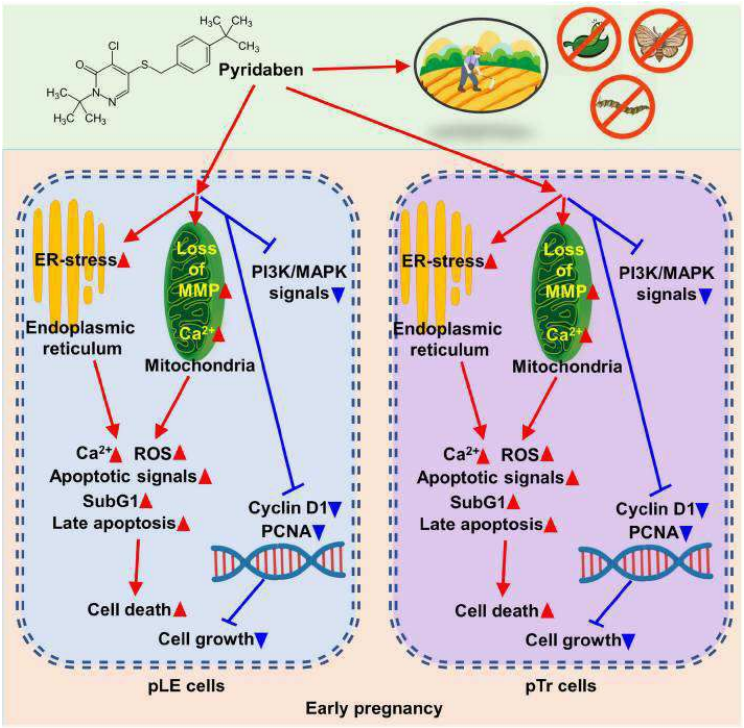
도면15


(A)
TM3
TM4
Naive
PDB
DAY2
DAY4
DAY6
(B)
Relative intensity of spheroid
Naïve
PDB
(C)

도면16


Pyridaben
TM3
$[Ca^{2+}]_{cyto}$▼
Erk1/2 → Akt
Jnk
Rps6kb1 → Rps6
ER stress ▲
Grp78
Cleaved Atf6α
Ire1α
Gadd153
IP3R
Grp75
MAMs▼
Vdac
Erk1/2
Akt ← Jnk
Rps6kb1 → Rps6
$[Ca^{2+}]_{cyto}$▲
TM4
$[Ca^{2+}]_{mito}$▼
Bax
Bak
p-Bad
Bcl-xL
Cell cycle
Steroidogenesis
Spermatogenesis
Proapoptotic proteins ▲
Antiapoptotic proteins ▼
Testicular dysfunction

도면17


Pyridaben
ER-stress▲
Loss of MMP▲
Ca²⁺▲
PI3K/MAPK signals▼
Endoplasmic reticulum
Mitochondria
Ca²⁺▲ ROS▲
Apoptotic signals▲
SubG1▲
Late apoptosis▲
Cyclin D1▼
PCNA▼
Cell death▲
Cell growth▼
pLE cells
pTr cells
Early pregnancy