



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0000338
(43) 공개일자 2019년01월02일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 48/00</i> (2006.01) <i>A23L 33/13</i> (2016.01)
 <i>A23L 33/18</i> (2016.01) <i>A61K 39/395</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 48/00</i> (2013.01)
 <i>A23L 33/13</i> (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-0166296(분할)
 (22) 출원일자 2018년12월20일
 심사청구일자 2018년12월20일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2017-0030396
 원출원일자 2017년03월10일
 심사청구일자 2017년03월10일</p> | <p>(71) 출원인
 충남대학교산학협력단
 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
 박종선
 대전광역시 서구 둔산로 201, 204동 301호 (둔산동, 국화아파트)
 박지수
 대전광역시 서구 둔산로 201, 204동 301호 (둔산동, 국화아파트)
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 김순웅</p> |
|---|--|

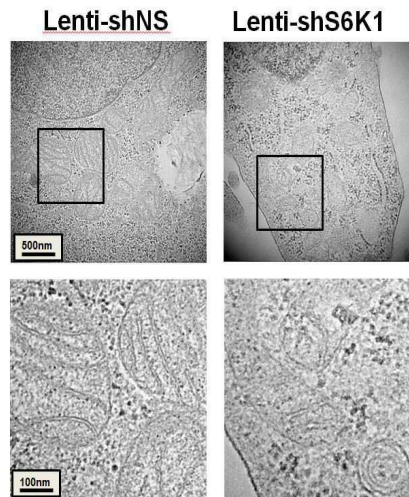
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 내 자가포식 장애로 발생하는 질병의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 내 자가포식 장애로 발생하는 질병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 미토콘드리아 내 자가포식(autophagy)을 조절하는 우수한 효과를 가지고 있는바, 이로 인해 발생하는 질병, 즉 자궁경부암, 폐암, 위암 등을 개선 또는 치료하는 효과를 가지고 있으며, 이에 따라약품, 건강기능식품 등으로 다양하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A23L 33/18 (2016.08)
A61K 39/395 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/308 (2013.01)
A23V 2250/5434 (2013.01)

(72) 발명자

김선환

대전광역시 서구 둔산남로 127, 105동 1306호 (둔산동, 목련아파트)

이현지

대전광역시 서구 정림서로 162-18, 104동 104호 (정림동, 강변들보람아파트)

트란광돈

대전광역시 중구 문화로 266, 402호 (문화동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012M3A9B6055302

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업

연구과제명 폐암에서 멀티모달 오믹스 기법을 이용한 미토콘드리아 혹은 골지체 특이적 자가포식에 대한 핵심단백질 발굴 및 기반 연구

기 여 율 40/100

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.12.01 ~ 2017.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1A2A2A01003597

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 핵심개인연구사업

연구과제명 두경부암에서 Warburg effect의 새로운 조절자로서 CTMP와 LETM1의 분자적 제어 기술 발굴

기 여 율 30/100

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A1A3050752

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 여성과학자지원사업

연구과제명 대사성 질환에서 PHF20 기능 및 작용기전에 관한 연구

기 여 율 30/100

주관기관 충남대학교

연구기간 2014.11.01 ~ 2017.07.03

명세서

청구범위

청구항 1

S6K1(S6 kinase 1) 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 내 자가포식 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 자가포식은 마이토파지(mitophagy)인 것을 특징으로 하는, 미토콘드리아 내 자가포식 억제용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 S6K1 유전자 발현 억제제는 S6K1 유전자에 상보적으로 결합하는 shRNA, siRNA, 리보자임, 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 미토콘드리아 내 자가포식 억제용 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 shRNA는 서열번호 1로 표시되는 염기서열인 것을 특징으로 하는, 미토콘드리아 내 자가포식 억제용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 S6K1 단백질 활성 억제제는 S6K1 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 미토콘드리아 내 자가포식 억제용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 미토콘드리아 내 자가포식 억제는 시험관 내(in vitro) 또는 인간이 아닌 개체에서 작용하는 것인, 미토콘드리아 내 자가포식 억제용 조성물.

청구항 7

S6K1(S6 kinase 1) 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제를 생물학적 시료에 처리하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 내 자가포식을 억제하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 미토콘드리아 내 자가포식 장애로 발생하는 질병의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 물질대사 과정의 중심에 있는 미토콘드리아는 에너지 생산, 예정된 세포 사멸, 그리고 반응성 산소 종 (ROS) 산출에 관련되고, 암, 당뇨병, 신경변성 질환, 그리고 노화를 비롯한 주요 질환의 다양한 시기에 관여한다. 전통적으로, 미토콘드리아는 에너지 생산과 세포 사멸을 조절하는 방대한 양의 세포 신호를 수용하고 처리하는 "중요 기능" 소기관으로서 고려되었다. 하지만, 미토콘드리아에서 세포로 역으로 소통하는 역행성 신호전달은 불량하게 이해되는 생물학적 과정이다.
- [0004] 칼슘, 시토크롬 C, 그리고 ROS는 역행성 미토콘드리아 분자인 것으로 고려되었다. 특히, Durieux 등은 미토콘드리아로부터 유래하는 신호가 세포에서 예쁜꼬마선충 (*C. elegans*)의 수명을 비-자율 방식으로 조절할 수 있다는 것을 제안하였지만, 이런 신호의 성격은 기생충에서 확인되지 않았다 (Durieux et al., Cell 144, 79 (Jan 7, 2011)). 이런 미토콘드리아-유래된 신호의 실체는 2001년에 발견되었는데, 이때 현재 휴마닌 (HN)으로서 알려져 있는 24개 아미노산 펩티드가 알츠하이머 환자의 뇌의 생존 분획물로부터 작제된 cDNA 라이브러리로부터 클로닝되었고 미토콘드리아 16S rRNA 좌위에 지도화되었다.
- [0005] 한편, 자가포식(Autophagy)의 일반적인 기능은 세포 내 영양분이 부족한 환경에서 세포가 자신의 불필요한 단백질, 노화된 소기관 등을 지질 2중층으로 구성된 자식포(membrane vacuole, autophagosome)로 둘러싼 후 라이소좀과 합쳐져 둘러싸인 내부 물질을 분해하도록 유도함으로써 세포 내 영양분을 제공하는 시스템으로 세포의 항상성 유지에 중요한 역할을 한다. 이러한 자가포식이 세포성장, 분화, 신진대사 조절, 암, 뇌 질환, 면역 등 다양한 인간의 생리적 및 병리적 상태를 조절하는데 중요한 역할을 담당한다는 사실이 속속 밝혀지고 있어 전세계적으로 많은 관심이 집중되고 있다.
- [0006] 자가포식(autophagy)은 작동기작과 기능에 따라 거대 자가포식(macroautophagy), 미세 자가포식(microautophagy) 및 샤페론 매개 자가포식(Chaperone Mediated Autophagy; CMA)으로 나누어 지는데, 이들 세 종류의 자가포식은 세포내에 공존하면서 개별적인 형태로 서로 다르게 유도된다. 예를 들면, 정상세포 조건에서도 자가포식은 일어나고 있지만, 영양소 결핍 같은 조건에서는 거대 자가포식이 빠르게 유도되고 6-8시간 동안 스트레스가 유지되면 거대 자가포식은 점차적으로 줄어들며 12-24시간 이후에는 CMA 유도가 이루어진다. 자가포식은 분해되는 카고(cargo) 타입에 따라 다양하게 분류되는데, 손상된 미토콘드리아를 선택적으로 제거함으로써 세포의 손상을 보호하는 미토파지(mitophagy)가 있고, 리보솜(ribosomes), 소포체(endoplasmic reticulum) 및 퍼옥시좀(Peroxisomes)을 분해하는 과정에 따라 리보파지(ribophagy), 레티큘파지(reticulphagy) 및 퍼옥소파지(pexophagy)로 각각 분류된다.
- [0007] 또한 최근에는 거대 자가포식이 지방산에 의해 생성되는 세포내 지방구(lipid droplet)의 직접적인 분해에도 관여한다는 것이 밝혀졌으며, 이를 거대지질 자가포식(macrolipophagy)를 소개하고 있다. 비록 다양한 질환 모델에서 자가포식의 기능이 밝혀지고 있으며 많은 관심을 갖고 있음에도 불구하고 아직까지 정확한 메커니즘과 관여하는 분자의 기능에 대해서 많이 알려져 있지 않다.
- [0008] 이에 본 발명자들은 특정 유전자의 발현 및 이에 의해 발현되는 단백질의 활성 조절을 통하여 미토콘드리아 내 자가포식이 조절됨을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 한국특허공개문헌 제10-2015-0131176호
(특허문헌 0002) 한국특허공개문헌 제10-2015-0129166호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 내 자가포식(autophagy) 장애로 발생하는 질병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 내 자가포식(autophagy) 장애로 발생하는 질병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 내 자가포식 장애로 발생하는 질병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따른 조성물은 미토콘드리아 내 자가포식(autophagy)을 조절하는 우수한 효과를 가지고 있는바, 이로 인해 발생하는 질병, 즉 자궁경부암, 위암, 폐암 등을 개선 또는 치료하는 효과를 가지고 있으며, 이에 따라 약품, 건강기능식품 등으로 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 S6K1 유전자를 녹아아웃한 세포의 외관을 관찰한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 2는 웨스턴 블롯을 통하여 S6K1 유전자를 녹아아웃한 세포의 미토콘드리아 단편화 기작을 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 3은 산소 소비 변화량의 측정을 통하여 S6K1 유전자를 녹아아웃한 세포의 자가포식 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 4는 CCCP를 이용하여 S6K1 유전자를 녹아아웃한 세포의 미토콘드리아 내 활성을 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 5는 라파마이신 및 스타우로포린 처리를 통하여 S6K1 유전자를 녹아아웃한 세포에서의 미토콘드리아 질량 조절 효과를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 6은 발광효소의 활성변화를 통하여 S6K1 유전자를 녹아아웃한 세포의 ATP 생산량 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.
- 도 7은 자가포식 마커를 이용하여 S6K1 유전자를 녹아아웃한 세포의 미토콘드리아 내 특이적인 자가포식 효과를 확인한 도이다.
- 도 8은 전송 전자 현미경 분석법을 이용하여 S6K1 유전자를 녹아아웃한 세포의 미토콘드리아 내 특이적인 자가포식 효과를 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명은 S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 내 자가포식(autophagy) 장애로 발생하는 질병의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0020] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0021] 본 발명에 있어서, 'S6K1'은 S6 kinase 1 또는 리보솜 단백질 S6 카이네이즈 베타-1로 지칭되며, NCBI accession number인 NM_001272060.1으로 특정되는 단백질이다. 세린/트레오닌 카이네이즈로, S6 리보솜 단백질을 기질로하는 효소이다. S6의 안산화는 리보솜에서 단백질 합성을 유도한다.
- [0022] 본 발명에 있어서, '자가포식(autophagy)'은 세포가 영양소 결핍 상황이 되었을 때 자신의 단백질을 분해하거나 불필요한 세포 성분을 스스로 제거해 에너지를 얻는 활동을 지칭하는 것으로, 바람직하게는 마이토파지(mitophagy)인 것을 특징으로 하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 마이토파지는 자가포식에 의한 미토콘드리아의 선택적인 분해를 지칭하는 것으로, 임의의 손상이나 스트레스에 의하여 발생하는 미토콘드리아 특이적 반응이다. 이는 미토콘드리아의 전환(turnover)을 촉진하여 세포 분해를 야기하는 역기능 미토콘드리아의 축적

을 방지하여 미토콘드리아가 건강한 상태로 유지될 수 있도록 하는 것이 특징이다.

- [0023] 즉, 미토콘드리아 내 자가포식이 원활하게 이루어지지 않는 경우 세포 내의 이상 발생으로 암이 발생할 수 있으며, 특히 자궁경부암, 위암, 폐암 등이 쉽게 발생하게 된다. 따라서 상기 미토콘드리아 내 자가포식을 조절하는 것은 상기 질환의 예방 또는 치료에 유용하다.
- [0024] 본 발명에 따르면 S6K1 유전자 발현 또는 S6K1 단백질 활성을 억제함으로써 미토콘드리아 내 자가포식이 촉진되 는바, 미토콘드리아 내 자가포식 장애로 발생하는 질병의 개선 또는 치료 효과를 가져, 이와 관련된 연구에 기여할 수 있으며, 다양한 약물, 건강기능식품 등으로 활용이 가능하다는 이점이 있다.
- [0025] 본 발명에 있어서 상기 S6K1 유전자의 발현 억제제 또는 S6K1 단백질의 활성 억제제와 함께 S6K1 발현 억제 효과를 갖는 공지의 유효성분 또는 미토콘드리아 내 자가포식 장애로 발생하는 질병의 개선 또는 치료 효과를 가지는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, S6K1 유전자의 발현 억제제는 S6K1 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오티드, 짧은 헤어핀 RNA(small hairpin RNA, shRNA), 작은 간섭 RNA(small interfering RNA, siRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상 일 수 있으며, 바람직하게는 shRNA일 수 있으나, 이에 본 발명이 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 상기 shRNA는 서열번호 1로 표시되는 염기서열인 것을 특징으로 하며, 서열번호 1로 표시되는 염기서열의 변이체 또한 본 발명의 범위 내에 포함된다. 본 발명의 서열번호 1로 표시되는 shRNA의 작용성 등가물, 예를 들어, 서열번호 1로 표시되는 서열 중 일부가 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, 이를 통해 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 S6K1 유전자를 녹아웃시키는 shRNA와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다.
- [0028] 구체적으로, shRNA는 각 서열번호 1의 염기서열과 각각 70% 이상, 더욱 바람직하게는 80% 이상, 더 더욱 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 가지는 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산에 대한 "서열 상동성의 %"는 두 개의 최적으로 배열된 서열과 비교 영역을 비교함으로써 확인된다.
- [0029] 상기 siRNA는 S6K1 단백질을 암호화하는 유전자의 mRNA의 염기서열 내에서 선택되는 15 내지 30머(mer)의 센스 서열 및 상기 센스 서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 서열로 구성되며, 이때, 상기 센스 서열은 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명에 있어서, S6K1 단백질의 활성 억제제는 S6K1 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 기질 유사체, 앵타머 및 항체로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 상기 안티센스 뉴클레오티드는 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기쌍에 정의된 바에 따라, DNA, 미성숙-mRNA 또는 성숙된 mRNA의 상보적 염기서열에 결합(혼성화)하여 DNA에서 단백질로서 유전정보의 흐름을 방해하는 것이다.
- [0032] 상기 화합물은 S6K1 단백질에 특이적으로 결합하여 이의 활성을 억제할 수 있는 임의의 화합물을 모두 포함한다.
- [0033] 상기 앵타머(aptamer)는 단일 사슬 DNA 또는 RNA 분자로서, SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)라 불리는 올리고 뉴클레오티드 (oligonucleotide) 라이브러리를 이용한 진화적인 방법에 의해 특정 화학 분자나 생물학적 분자에 높은 친화력과 선택력을 갖고 결합하는 올리고머를 분리하여 수득할 수 있다. 앵타머는 표적에 특이적으로 결합하고 표적의 활성을 조절할 수 있는데, 예컨대, 결합을 통하여 표적의 기능을 차단할 수 있다.
- [0034] 상기 항체는 S6K1 단백질에 특이적이고 직접적으로 결합하여 S6K1 단백질의 활성을 효과적으로 억제할 수 있다. 상기 S6K1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체로는 폴리클로날(polyclonal) 항체 또는 모노클로날(monoclonal) 항체를 사용하는 것이 바람직하며, 상기 항체는 당업자에게 알려진 공지의 방법으로 제작할 수도 있으며, 상업적으로 알려진 항체를 구입하여 사용할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 미토콘드리아 내 자가포식 장애로 발생하는 질병은 자궁경부암, 위암, 폐암, 척추관협착증, 잠재이분척추, 척추관협착증, 관절강직, 무균성 골괴사, 골수염, 알츠하이머 병, 파킨슨 병, 뇌졸중, 타우병증, 근위축성 측삭경화증(ALS), 헌팅턴 병, 전두측두엽 치매, 치매, 척수소뇌성 실조증, 테스민 관련 심근증

(desmin-related cardiomyopathy), 감염성 질환, 염증성 질환 또는 다농병(Danon disease)일 수 있으며, 바람직하게는 자궁경부암, 위암, 폐암이며, 보다 바람직하게는 자궁경부암이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물에 포함되는 S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제의 함량은, 치료제의 사용방법, 복용자의 상태, 질환의 종류 및 중증 정도에 따라 적절히 조절할 수 있다.

[0037] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알릴리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성구산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 실제 임상투여시에 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 이용하는 것이 바람직하다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 있다.

[0039] 상기 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 또한, 상기 경구투여를 위한 액상제제로는 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.

[0040] 상기 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 상기 비경구투여는 피부 외용 또는 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 사용하여 이루어질 수 있다.

[0041] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

[0042] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0043] 본 발명에 있어서, 약학적 조성물은 자가포식 장애로 발생하는 질병의 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0044] 본 발명에서 용어 '치료'는 본 발명의 약학적 조성물에 의해 자가포식 장애로 발생하는 질병에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0046] 또한, 본 발명은 S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 내 자가포식 장애로 발생하는 질병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0047] 본 발명의 건강기능식품은 상기 S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제와 함께 미토콘드리아 내 자가포식 장애로 발생하는 질병의 개선 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있

다.

- [0048] 본 발명에 있어서, "건강기능식품"이란, 질병의 예방 및 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체조절 기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해해야 한다.
- [0049] 본 발명에 있어서, S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제는 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0050] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0051] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.
- [0052] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0054] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.
- [0056] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 및 제제예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 및 제제예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 및 제제예에 한정되는 것은 아니므로 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 본 발명의 실시예 및 제제예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0058] **실시예 1. S6K1(S6 kinase 1) 유전자 녹아웃 세포의 제조**
- [0059] S6K1 유전자 녹아웃 세포를 제조하기 위해 사용한 세포인 헬라 세포는 10% 소태아혈청, 2 mmol/L의 글루타민, 100 units/mL의 페니실린, 및 100 ug/mL의 스트렙토마이신(Life Technology)으로 보충된 돌베코수정이글배지(DMEM)에서 배양하였다. 이 후 서열번호 1로 특정되는 S6K1 유전자를 특이적으로 표적하는 shRNA(small hairpin RNA)를 이용하여 24시간 동안 헬라 세포에 렌티바이러스(Lentivirus)를 감염시켜 S6K1 유전자 녹아웃을 유도하였다(shS6K1이 녹아웃된 헬라세포는 이하에서 'shS6K1-세포'라 지칭하고, S6K1 유전자 녹아웃을 유도하지 않는 헬라세포는 shNA-세포(short hairpin non-silencing RNA-cell)로 지칭함). 이 후 0.5 mg/ml의 푸로마이신을 이용하여 녹아웃 세포를 선택하였고, 이를 이용하여 안정한 shNS-세포주 및 shS6K1-세포주를 구축하였다.

[0061] 실시예 2. S6K1 유전자 녹아웃 세포에서 미토콘드리아 단편화(fragmentation)의 관찰

[0062] S6K1 유전자 녹아웃 세포주에서 공초점 현미경을 이용하여 미토콘드리아 단편화, 특히 분열(fission)을 관찰하였다. 먼저, 실시예 1에서 제조한 S6K1 유전자 녹아웃된 세포주를 50% 내지 70% 정도 계대배양하고 글라스 커버슬립에서 배양한 후 형광단백질인 pDsRed2-mito를 형질주입 시켰다. 형질주입 후 24시간이 경과한 후에 상온에서 10분 동안 4% 파라포름알데하이드를 처리하여 세포를 고정시켰다. 이 후 상온에서 5분 동안 0.2% 트리톤 X100으로 투과화(permeabilized)시켰다. 후에 커버슬립을 Vectashield(Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 마운트하고 Zeiss 공초점 현미경으로 S6K1 유전자를 녹아웃한 세포주의 외관을 관찰하였다. 그 결과는 도 1a에 나타내었고, 이를 추가적으로 분석한 결과를 도 1b, 1c 및 1d에 나타내었다. 연장 인자(Elongation shape factor)는 중심 축 주변 입자에 대한 두번째 모멘트 비의 제곱근 값이고, 헤이우드 원형 인자(Heywood circularity factor)는 페리미터 P 및 영역 A의 기능 값이며, 원의 원형(circularity)은 1이다. 또한, 압축 형태 인자(compactness shape factor)는 극성 제2 모멘트의 입자 및 동일 영역 A에 대한 원형 값으로, 원의 압축 값은 1이다.

[0063] 도 1에 나타난 바와 같이, shNS-세포주에 비하여 shS6K1-세포주의 미토콘드리아가 단편화를 거쳐 보다 작고 컴팩트하게 뭉쳐있는 형태를 가지는 것을 확인할 수 있는바, 이는 S6K1이 미토콘드리아의 형태 변화를 야기함을 시사한다.

[0065] 실시예 3. S6K1 유전자 녹아웃 세포를 통한 미토콘드리아 단편화 기작(mechanism) 확인

[0066] 미토콘드리아 단편화 기작을 확인하기 위하여 미토콘드리아 활성화와 관련된 단백질에서 웨스턴 블롯(Westernblot)을 수행하였다. 먼저, 실시예 1에서 제조한 S6K1 유전자 녹아웃된 세포주를 얼음 위에 놔두고 50 mM의 Tris-HCl, pH 7.5, 1% v/v의 노니덱(Nonidet) P-40, 120 mM의 NaCl, 25 mM의 플루로린화 나트륨(sodium fluoride), 40 mM의 β -인산 글리세롤(β -glycerol phosphate), 0.1 mM의 오르소바나테이트 나트륨(sodium orthovanadate), 1 mM의 PMSF(phenylmethylsulfonyl fluoride), 1 mM의 벤즈아미딘(benzamidine) 및 2 μ M의 마이크로시스틴(microcystin)-LR을 포함하는 용해 버퍼로 추출하여 단백질을 분리하였다. 상기 전체 단백질을 15, 12 및 10 % SDS-PAGE로 로딩한 후, 이모빌론-P 막(Millipore사)으로 옮겼다. 이 후 상기 필터막을 5% 탈지유 및 0.2% 트윈(Tween)-20을 포함하는 1X TBS 버퍼(tri-buffered saline buffer; 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 250 mM Tris-HCl, pH 7.4)에서 1시간 동안 블로킹한 후, 1000배 희석된 일차 항체와 함께 4 °C에서 밤새 배양하였다.

[0067] 이때 사용한 1차 항체는 i) (미토콘드리아 다이내믹, 즉 분열(fission) 단백질 관련 항체) 항-Mfn2, 항-Opa1, 항-Drp1, 항-Fis-1 및 항-S6K1, ii) (미토콘드리아 내 단백질 관련 항체) 항-VDAC, 항-AIF, 항-pT389-S6K1 및 항-COX4, iii) (미토콘드리아 물질대사 관련 항체) mTOR, CPT1, PGC1- α , pMyc, Myc 및 UCP2이고, 대조군으로 항-Hsp60 및 항-액틴(Actin) 항체(Sigma-Aldrich)를 사용하였다. 이 후 블로킹 버퍼를 이용하여 5000 배로 희석한 2차 항체와 함께 반응시켰으며, 사용된 2차 항체는 호스래디쉬(horseradish) 과산화제가 결합된 항-마우스 IgG 또는 항-토끼 IgG(Invirogen 사)를 사용하였다. 이 후 제조사(GE Healthcare, Life Sciences)가 제공하는 메뉴얼에 따라 강화된 화학발광(chemiluminescence)으로 시각화하여 발현된 단백질을 검출하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다. 상기 실험 결과 도출되는 단백질의 농도는 농도계(densitometry)를 이용하여 측정한 뒤 대조군인 액틴 값과 비교하여 정규화하였다.

[0068] 도 2a에 나타난 바와 같이, S6K1 유전자가 녹아웃된 shS6K1 세포주에서 미토콘드리아 분열 단백질인 Drp1 및 Fis1의 발현이 증가하여 표현형이 변화함을 확인하였다. 아울러 도 2b에 나타난 바와 같이, shS6K1-세포주에서 VDAC, AIF, COX4 및 Hsp60와 같은 미토콘드리아 단백질의 발현이 증가됨을 확인하였고, 특히 VDAC 및 COX4에서 현저한 발현 증가를 확인하였다. VDAC는 미토콘드리아 외막, AIF는 미토콘드리아 막간공간, COX4는 미토콘드리아 내막 및 Hsp60는 미토콘드리아 기질에 포함되는 미토콘드리아 단백질인바, 상기 결과는 shS6K1-세포에서 미토콘드리아의 구성물이 보다 견고해지고 동시에 대사 증가로 인하여 질량이 증가됨을 나타낸다.

[0069] 또한 shS6K1-세포주에서 추가적인 물질대사 변화를 확인하기 위하여 지질 산화와 관련된 mTOR, CPT1, 미토콘드리아 생합성에 관한 PGC1- α , 에너지 언커플링(uncoupling)과 관련된 인-Myc, UCP2 단백질의 발현 변화를 확인한 결과를 도 2c에 나타내었다. 도 2c에 나타난 바와 같이, S6K1 유전자가 녹아웃된 세포 내에서 mTOR의 발현은 거의 변화가 없었으나 UCP2, PGC1- α 및 CPT1의 발현이 유의적으로 증가함을 확인하였다. 이는 S6K1 유전자 녹아웃으로 지질 산화를 포함하는 미토콘드리아 생물발생(biogenesis)가 촉진되어 미토콘드리아 내 질량 변화가

발생하였음을 알 수 있다.

[0071] **실시예 4. S6K1 유전자 녹아웃 세포에서 산소 소비 변화량을 통한 mTOR/S6K1 신호 기작의 효과 확인**

[0072] 미토콘드리아의 지질산화와 관련된 mTOR/S6K1 신호 기작을 확인하기 위하여 산소 바이오센서 시스템 플레이트(BD Biosciences 사)를 이용하여 S6K1 유전자가 녹아웃된 세포에서 산소 소비 변화량을 측정하였다. 먼저, 실시예 1에서 제조한 shNS 및 shS6K1-세포주를 하루 동안 배양하였으며, S6K1이 녹아웃된 IL-3 의존성 FL5.12 세포는 David Plas 박사로부터 제공받아 사용하였다(J.F. Barger, C.A. Gallo, P. Tandon, H. Liu, A. Sullivan, H.L. Grimes, D.R. Plas, S6K1 determines the metabolic requirements for BCR-ABL survival, Oncogene 32(4) (2013) 453-61).

[0073] 이들 세포에 대하여 각각 5×10^5 농도의 세포를 96-웰의 BD 산소 바이오센서 시스템 플레이트(BD Biosciences 사)의 각 웰에 첨가하였고 이를 3회 반복하였다. 그리고 나서 DMEM으로 웰 당 최종 부피가 2000 μ l가 되도록 용액을 제조하였고, 플레이트는 37 $^{\circ}$ C로, 5%의 이산화탄소가 유지되는 습한 배양기에서 30분 동안 보관하였다. 상기 플레이트를 170분 동안 10분 간격으로 SAFIRE 다중 모드 마이크로플레이트 분광 광도계로 분석하였다. 도 3b에 shS6K1-세포주에 대한 결과를, 도 3c에 S6K1 유전자 녹아웃된 IL-3 의존성 FL5.12 세포에 대한 결과를 나타내었다.

[0074] 한편, mTOR 신호 기작에 대한 대조군으로서 mTOR의 억제제인 라파마이신을 2시간 동안 1 μ M의 농도로 shNS-세포주에 처리하였고, 이에 대한 결과는 도 3a에 나타내었다.

[0075] 도 3a에 나타낸 바와 같이, 라파마이신 처리로 인하여 mTOR가 억제된 세포주에서는 그렇지 않은 세포주에 비하여 형광 발현이 높은 수치로 관찰되었다. 이를 기반으로 확인한 실험 결과를 나타내는 도 3b 및 3c 결과를 비추어 볼 때, S6K1 유전자가 녹아웃된 경우 헬라 세포주는 물론, IL-3 의존성 FL5.12 세포주에서도 높은 형광 발현이 관찰되었는데, S6K1 유전자의 녹아웃에 의하여 자가포식에서 발생하는 지질 산화가 촉진됨을 알 수 있다.

[0077] **실시예 5. S6K1 유전자 녹아웃 세포에서 CCCP(Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone)를 이용한 미토콘드리아 활성 확인**

[0078] 미토콘드리아 질량, 막 포텐셜(MMP; mitochondrial membrane potential) 및 활성산소종(ROS) 생산을 포함하는 미토콘드리아 관련 활성을 추가적으로 확인하기 위하여 shS6K1 세포를 특이적인 마커로 표지하고 형광표지 세포 분류기(FACS)로 분석하였다. 이때 이 기술분야에 통상적으로 수행되는 방법으로 FACS를 이용하여 분석을 수행하였다.

[0079] 보다 구체적으로는 미토콘드리아 질량 변화를 분석하기 위하여 실시예 1에서 제조한 S6K1 유전자 녹아웃된 세포주에 1시간 동안 미토콘드리아에서 자가포식(autophagy)을 유도하는 것으로 알려진 CCCP(Sigma-Aldrich사)를 30 μ M 농도로 처리한 후 세포를 염색하고 트립신처리법(trypsinization)으로 모았고, 이 후 0.5 ml PBS로 현탁하였으며, 암(dark)상태에서 100 nM Mito Tracker Green FM(mito-GFP)으로 30분 동안 상온에서 염색하였다. 염색한 shS6K1-세포주에 대하여 FACS 칼리버(BD Bioscience)로 세포 당 미토콘드리아 질량 변화를 측정하였다. 그 결과는 도 4a에 나타내었다.

[0080] 아울러, 미토콘드리아 막 포텐셜 및 활성산소종의 발생 변화를 분석하기 위하여 상기 암 상태에서 100 nM의 mito-GFP 대신 100 nM TMRE(분자 프로브) 또는 100 nM DCFDA로 30분 동안 상온에서 염색하고, FACS 칼리버(BD Bioscience)로 미토콘드리아 막 포텐셜 및 활성산소종의 발생 변화를 관찰하였으며, 각각의 결과는 도 4b 및 4c에 나타내었다.

[0081] 도 4a에 나타낸 바와 같이, S6K1 유전자가 녹아웃된 세포주의 경우 그렇지 않은 세포주(shNS)와 달리 CCCP 처리 후에도 미토콘드리아 질량 변화가 관찰되지 않았다. 반면, 도 4b에 나타낸 바와 같이, S6K1 유전자가 녹아웃된 세포주와 그렇지 않은 세포주(shNS) 모두에서의 막 포텐셜이 비슷한 것으로 관찰되었으며, CCCP를 처리한 경우 두 세포주 모두에서 막 포텐셜의 감소가 관찰되었다. 또한 도 4c에 나타낸 바와 같이, S6K1 유전자가 녹아웃된 세포주의 경우 그렇지 않은 세포주(shNS)와 달리 CCCP로 활성산소종의 농도가 현저하게 증가함을 관찰하였다. 이는 자가포식과 관련된 기작이 S6K1 유전자와 상관관계가 있음을 시사한다.

- [0083] 실시예 6. S6K1 유전자 녹아웃 세포를 이용하여 S6K1 유전자의 미토콘드리아 질량 조절 효과 확인
- [0084] S6K1 유전자에 의한 미토콘드리아 내 효과, 특히 mTOR/S6K1 신호 기작과 관련하여 미토콘드리아 질량 조절 효과를 확인하기 위하여 mTOR 신호 기작 억제제인 라파마이신과 스타우로스포린을 이용하여 FACS 관찰 및 웨스턴블롯을 추가적으로 수행하였다.
- [0085] 먼저, i) 실시예 1에서 제조한 S6K1 유전자가 녹아웃된 세포주를 mito-GFP로 염색하였다. ii) 이와 별개로 실시예 1에서 제조한 S6K1 유전자 녹아웃된 세포주를 1시간 동안 1 μ M의 라파마이신을 처리한 후에 mito-GFP로 염색하였다. 이 후 미토콘드리아 질량 측정을 위하여 FACS로 관찰을 수행하였다.
- [0086] 아울러, iii) 상기 실험과 별개로 실시예 1에서 제조한 shS6K1 세포주에 2시간 동안 1 μ M의 라파마이신 또는 10 μ M의 스타우로스포린을 처리하였고, 그 후에 mito-GFP로 세포를 염색한 후 미토콘드리아의 질량 변화를 측정하였다. 마지막으로 iv) 실시예 1에서 배양한 shNS-세포주를 제조자가 제공하는 메뉴얼에 따라 올리고펙타민 (Invitrogen 사) 시약을 이용하여 일시적으로 siNS(short interference NS RNA), siS6K1 RNA 또는 siS6K2 RNA로 형질주입시켰다. 형질주입 후에 mito-GFP로 염색을 수행한 뒤 FACS를 이용하여 미토콘드리아의 질량 변화를 관찰하였다.
- [0087] 추가적으로 S6K1의 발현을 관찰하기 위하여 상기 세포주들에 대하여 항-S6K1 항체를 이용하여 이 기술분야에 알려진 방법에 따라 웨스턴 블롯을 수행하였다. 상기에서 수행한 실험 결과 중 i)에 대한 것은 도 5a에, ii)에 대한 것은 도 5b, iii)에 대한 것은 도 5c에 나타내었으며, iv)에 대한 것은 도 5d에 나타내었다.
- [0088] 도 5에 나타난 바와 같이, 스타우로스포린과 라파마이신 모두에 의하여 S6K1 유전자 녹아웃 세포에서 T389 발현이 억제됨이 관찰되었다. 반면, 라파마이신에 의한 mTOR/S6K1 신호 기작이 억제된 경우에는 미토콘드리아의 질량이 변화하지 않았으나, 세포자멸(apoptophagy)과 관련된 단백질인 스타우로스포린을 처리한 세포주에서는 미토콘드리아 질량이 증가됨을 확인하였다. 아울러, S6K2의 경우와 달리 siS6K1에 의하여 S6K1이 결실된 세포에서 미토콘드리아의 질량이 증가됨을 관찰하였다. 이는 S6K1 녹아웃으로 세포자멸이 발생하나, 상기 세포자멸이 mTOR 신호 기작과 무관하게 발생함을 나타낸다.
- [0090] 실시예 7. S6K1 유전자 녹아웃 세포를 이용하여 ATP 생산량 변화 확인
- [0091] S6K1 유전자에 의한 미토콘드리아에서의 기능을 확인하기 위하여 발광효소의 활성변화를 통해 ATP 생산량 변화를 확인하였다. 세포질 ATP는 반딧불이-발광효소 구조물(pcDNA3.1/Zeo-CHA-Luc)을 이용하여 측정하였고, 미토콘드리아 ATP는 COX8 미토콘드리아 표적 서열(pcDNA3.1/Zeo-CHA-COX 8-Luc)로 결합된 반딧불이-발광효소 구조물을 이용하여 측정하였다. 이를 위하여 실시예 1에서 제조한 안정한 shNS-세포주 또는 shS6K1-세포주를 24시간 동안 pcDNA3.1/Zeo-CHA-Luc 또는 pcDNA3.1/Zeo-CHA-COX8-Luc으로 일시적으로 형질주입시켰다. 이 후 빛 발산은 발광(luminescence)의 최대값에 도달할 때(외인성 ATP로 측정된 값)까지 5초 간격으로 루미노미터로 측정하였다.
- [0092] 형질주입된 세포에서 발광효소 발현의 변동을 표준화시키기 위하여, 각 세포 구획에서의 발광값은 동일한 용해 세포의 동일 부분에서 초과 ATP의 존재 하에 발광효소 분석 키트(Promega 사)를 이용하여 측정된 전체 포텐셜 발광효소에 대한 비율로 나타낸 값은 도 6a에 나타내었다. 또한 세포질 및 미토콘드리아 발광으로부터 축적된 발광에 대한 값은 6b에 나타내었으며, 세포질 및 미토콘드리아 발광 사이의 상대적인 퍼센트 비율 값은 6c에 나타내었다.
- [0093] 도 6에 나타난 바와 같이, 두 종류의 표적 발광효소 발현 벡터를 사용하여 전체 세포질 및 미토콘드리아 ATP 수준을 측정하였다. 일반적으로 ATP 생산은 mTOR 신호 기작의 억제와 무관하게 shS6K1-세포주에서 강화됨을 확인하였다. 또한 전체 ATP는 shS6K1 세포에서 보다 높아짐을 확인하였다. 아울러, 세포질 및 미토콘드리아 사이 ATP 생산 비는 미토콘드리아 ATP 생산의 비가 shS6K1-세포주에서 실질적으로 감소되었음을 나타낸다. 즉, shNS-세포주에서 미토콘드리아-ATP : 세포질-ATP 비는 69% : 31%인 반면, shS6K1-세포주에서 미토콘드리아-ATP : 세포질-ATP의 비는 59% : 41%이며, 이 비율은 mTOR 억제제, 라파마이신에 의하여 영향받지 않음을 나타내는 데, 이는 S6K1의 활성이 세포 내 ATP 수준 조절과 직접적인 상관관계가 있지 않음을 나타낸다. 다만 상기 결과는 S6K1가 미토콘드리아-의존성 ATP 생산시 물질대사 스위치(metabolic switch)로 기능하여 ATP의 전체 생산이 증가됨을 나타낸다.

- [0095] 실시예 8. S6K1 유전자 녹아웃 세포를 이용하여 미토콘드리아 특이적인 자가포식(autophagy) 확인
- [0096] S6K1 유전자의 미토콘드리아 내 기능을 보다 면밀히 분석하기 위하여 자가포식의 마커인 GFP-LC3 아테노바이러스 및 TMRE이 활성 미토콘드리아에서 점차 분리되는 성질을 이용한 미토콘드리아 내 자가포식 기능 변화를 확인하였다. 먼저, 실시예 1에서 제조한 안정한 shNS-세포주 또는 shS6K1-세포주를 24시간 동안 GFP-LC3B 아테노바이러스(GFP-LC3)로 형질주입시켰다. 이 후 20분 동안 테트라메틸로다민 에틸 에스터(tetramethylrhodamine, ethyl ester (Red-TMRE))로 염색하고 공초점 현미경으로 관찰하였다. 상기 관찰 결과는 전체 GFP-LC3 염색 부위와 결합된 부분(노랑)의 백분율로 측정하여 별도의 도로 나타내었다. 이는 도 7에 나타내었다.
- [0097] 또한, Lenti-shNS 및 Lenti-shS6K1 헬라 세포의 초미세구조 관찰을 위하여 전송 전자 현미경 분석법(transmission electron microscopic analysis)을 수행하였다. 이를 위하여 실시예 1에서 제조한 안정한 헬라 세포(shNS 및 shS6K1)를 1시간 동안 4° C 에서 1% 오스미움 옥사이드 4(Osmium Oxide 4; OsO₄) 버퍼 내 2.5%의 글루타알데하이드로 고정하였다. 그 후 세포를 프로필렌 옥사이드 및 에폰(Epon)의 1:1 혼합물에서 침윤하였고 후에 48시간 동안 60° C에서 중합함으로써 에폰에 삽입하였다. 이 후 초미세구조 분석은 전송 전자 현미경(transmission electron microscopy)인 SPIRIT G2 전자 현미경을 이용하여 수행하였다. 그 결과는 도 8에 나타내었다.
- [0098] 도 7 및 8에 나타난 바와 같이, lenti-shS6K1-세포주에서 GFP-LC3 및 TMRE 신호 사이의 겹침이 lenti-shNS-세포주에 비하여 현저하게 증가함을 확인하였으며, 변형되고 기능장애가 발생한(malfunctioned) 미토콘드리아가 lenti-shS6K1-세포주에서 증가함을 확인하였다. 이는 S6K1 유전자 녹아웃에 의하여 자가포식, 특히 미토콘드리아 특이적인 자가포식(mitophagy)가 증가함을 나타낸다.
- [0100] 종합적으로, 상기 실험 결과를 통하여 S6K1 유전자 녹아웃, 즉 S6K1의 억제를 통하여 생물체 내에서 분열(fission)의 증가, 물질대사 증가, 지방산화로 인한 산소소비량 증가, ATP 생산 증가 등의 효과를 확인하였다. 아울러, 기존에는 mTOR에 의한 자가포식만이 공지되어 있었으나, 이번 연구를 통해 mTOR와 무관하게 발생하는 자가포식이 발생함, 즉 미토콘드리아 특이적인 자가포식인 마이토파이지(mitophagy)를 확인하였다. 따라서 S6K1 유전자의 조절로 신경성 퇴행질환, 암, 노화, 비만, 당뇨 등, 특히 암과 같은 마이토파이지(mitophagy)에 의하여 발생할 수 있는 질환의 예방 또는 치료에 다양하게 활용할 수 있다.
- [0102] 상기 통계적인 분석 자료는 독립적으로 3회 이상 반복 수행된 실험을 통해 얻은 값의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 각 그룹의 차이는 스튜던트 t-분포를 이용하여 분석하였고 $P < 0.05$ (*)는 현저함, $P < 0.01$ (**)는 매우 현저함을 나타낸다. 아울러 각 결과의 정량적인 분석은 Image J 소프트웨어(버전 1.45)를 이용하여 수행하였다.
- [0104] 제제예 1. 약학적 제제의 제조
- [0105] 1. 산제의 제조
- [0106] S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제 20 mg
- [0107] 유당 100 mg
- [0108] 탈크 10 mg
- [0109] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.
- [0111] 2. 정제의 제조
- [0112] S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제 10 mg
- [0113] 옥수수전분 100 mg
- [0114] 유당 100 mg
- [0115] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0116] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0118] 3. 캡슐제의 제조

[0119] S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제 10 mg

[0120] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0121] 락토오스 14.8 mg

[0122] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0123] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0125] 4. 주사제의 제조

[0126] S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제 10 mg

[0127] 만니톨 180 mg

[0128] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0129] $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 26 mg

[0130] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0132] 5. 액제의 제조

[0133] S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제 20 mg

[0134] 이성화당 10 g

[0135] 만니톨 5 g

[0136] 정제수 적량

[0137] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0139] **제제예 2. 건강기능식품 제제의 제조**

[0140] S6K1 유전자 발현 억제제 또는 S6K1 단백질 활성 억제제 100 mg

[0141] 비타민 혼합물 적량

[0142] 비타민 A 아세테이트 70 g

[0143] 비타민 E 1.0 mg

[0144] 비타민 B1 0.13 mg

[0145] 비타민 B2 0.15 mg

[0146] 비타민 B6 0.5 mg

[0147] 비타민 B12 0.2 g

[0148] 비타민 C 10 mg

[0149] 비오틴 10 g

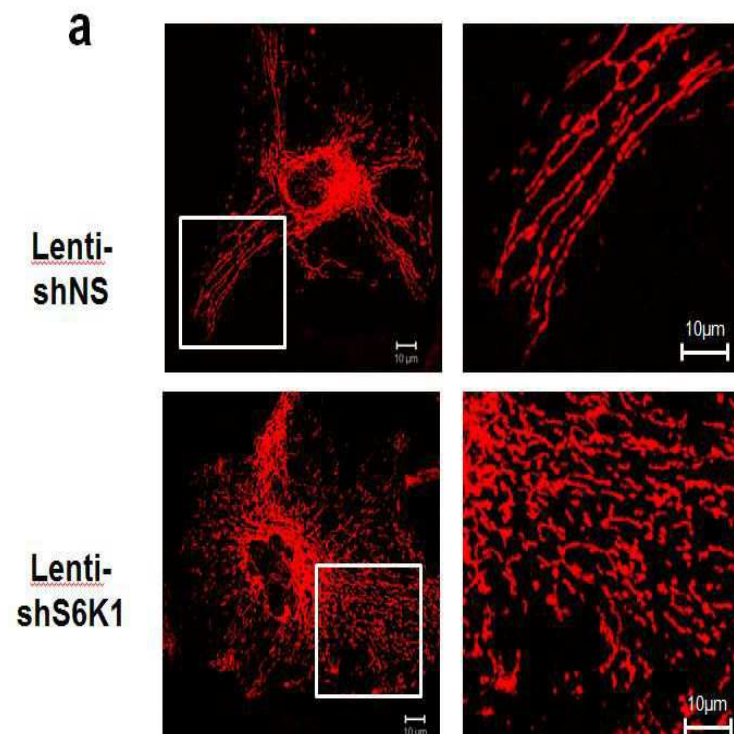
- [0150] 니코틴산아미드 1.7 mg
- [0151] 엽산 50 g
- [0152] 판토텐산 칼슘 0.5 mg
- [0153] 무기질 혼합물 적량
- [0154] 황산제1철 1.75 mg
- [0155] 산화아연 0.82 mg
- [0156] 탄산마그네슘 25.3 mg
- [0157] 제1인산칼륨 15 mg
- [0158] 제2인산칼슘 55 mg
- [0159] 구연산칼륨 90 mg
- [0160] 탄산칼슘 100 mg
- [0161] 염화마그네슘 24.8 mg

[0163] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

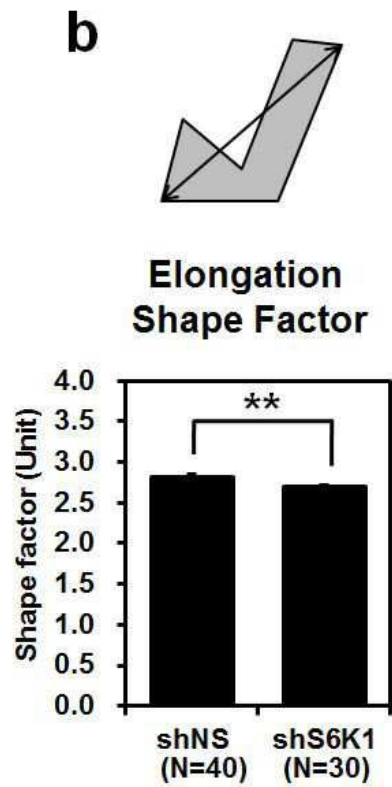
[0165] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

도면

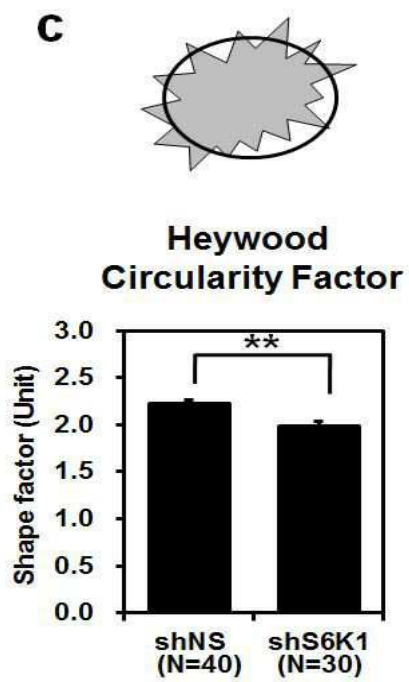
도면1a



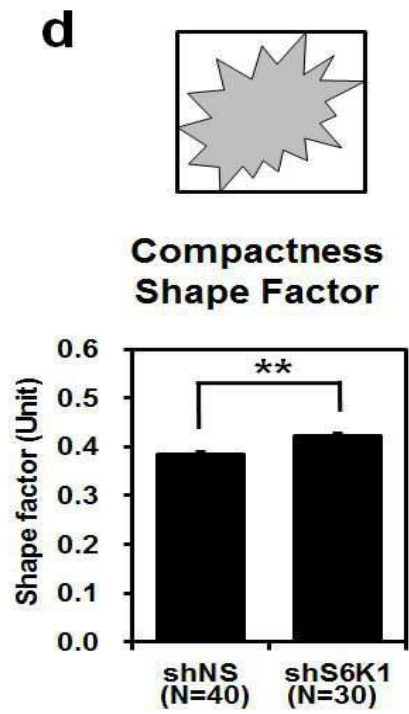
도면1b



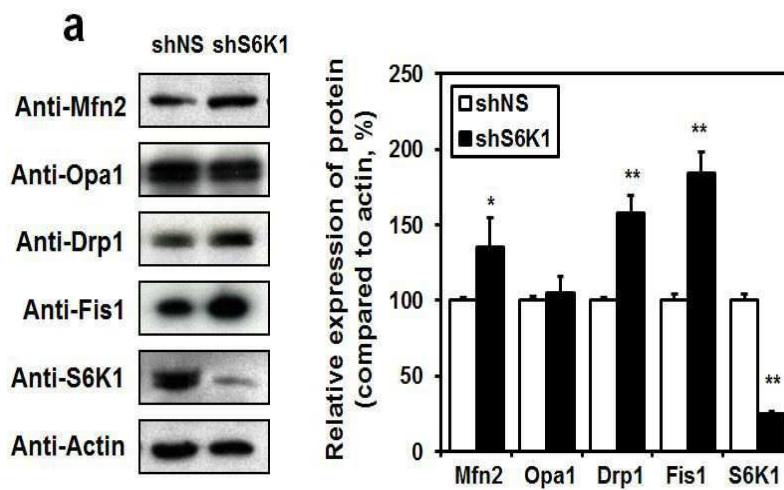
도면1c



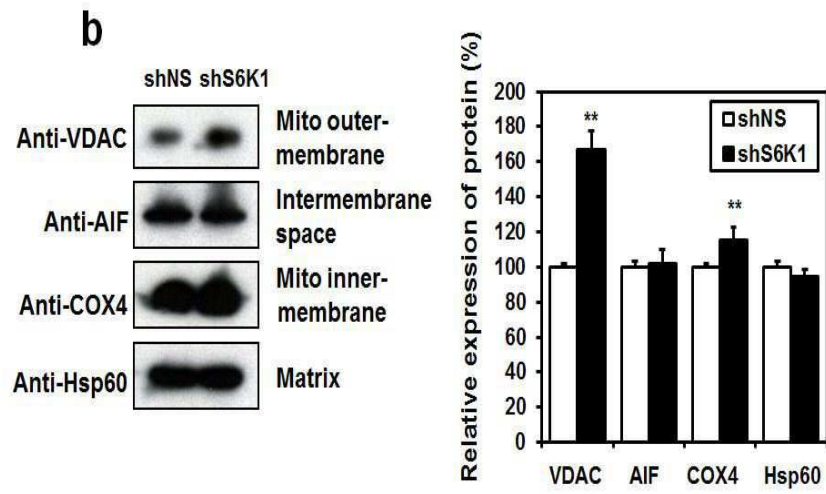
도면1d



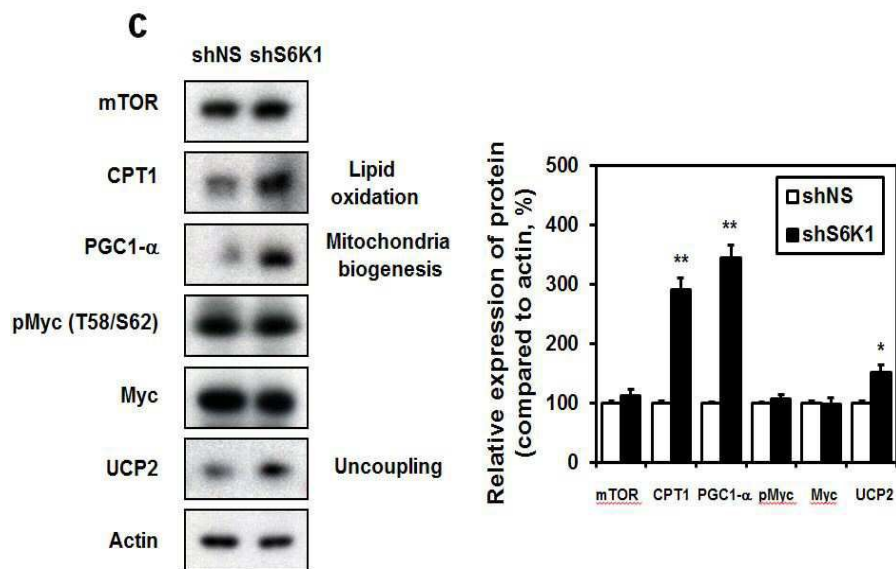
도면2a



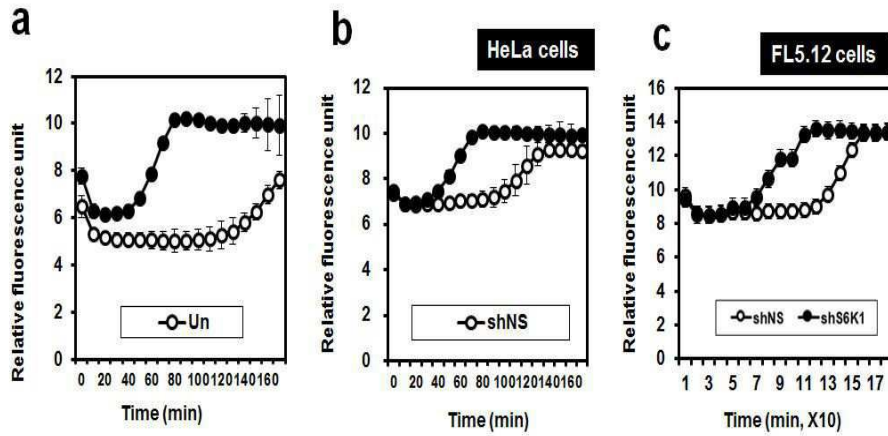
도면2b



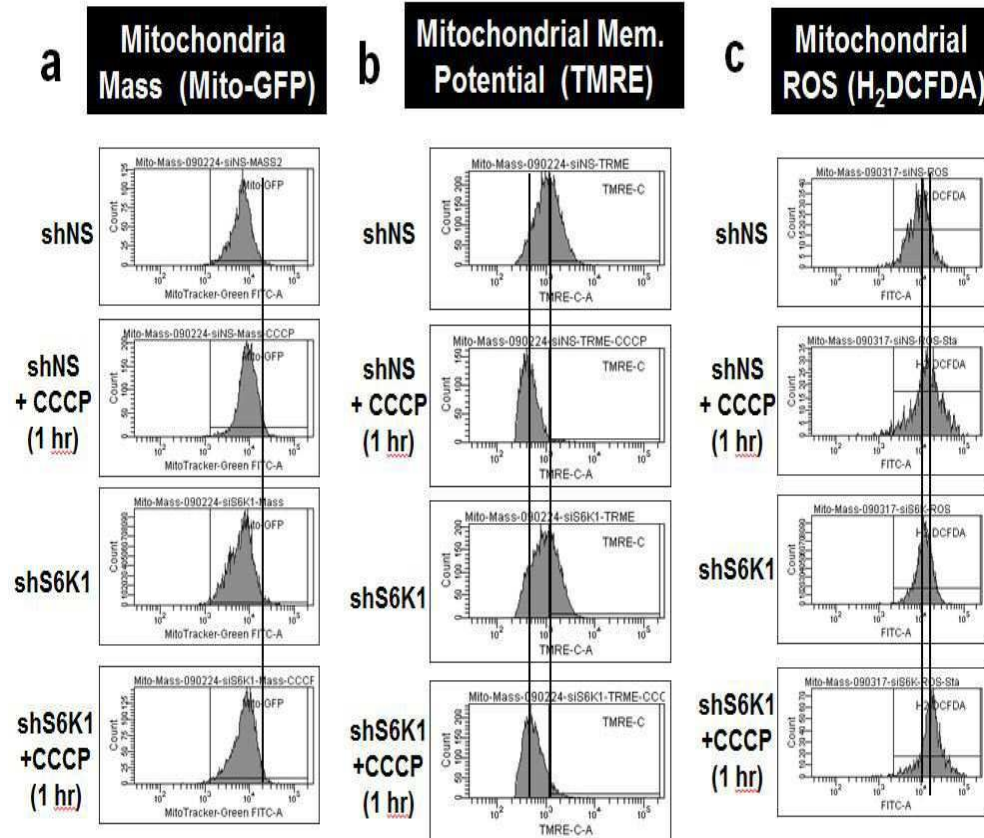
도면2c



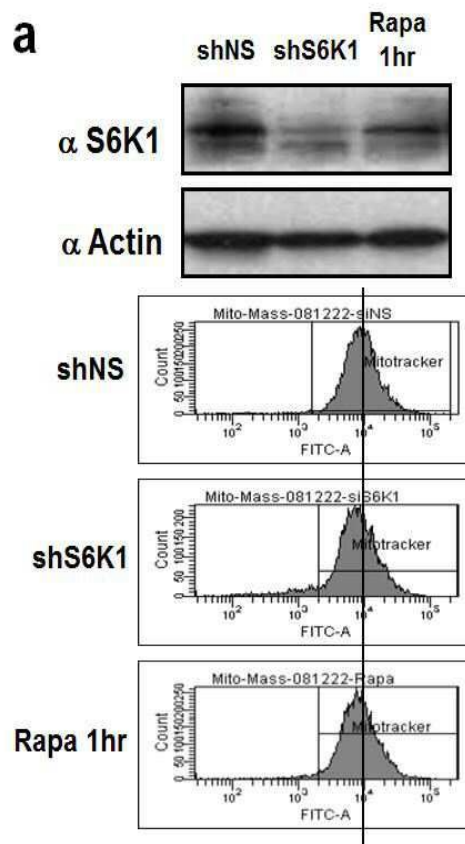
도면3



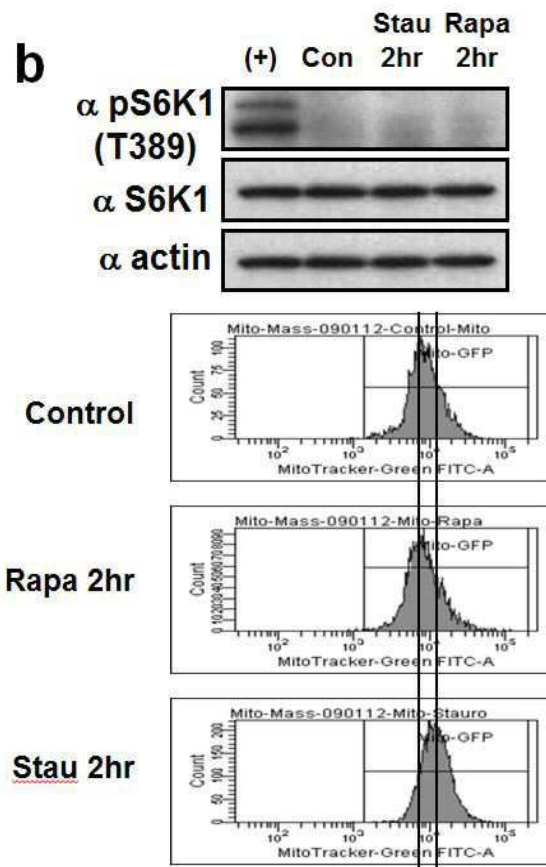
도면4



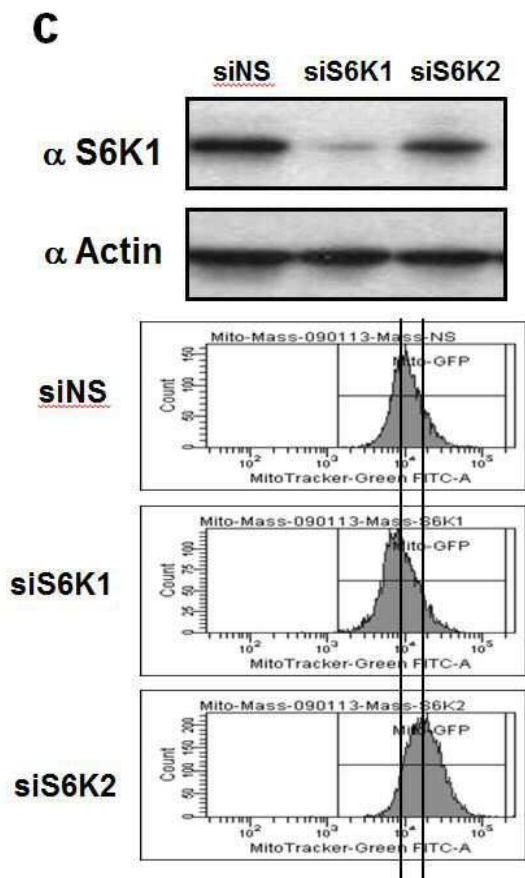
도면5a



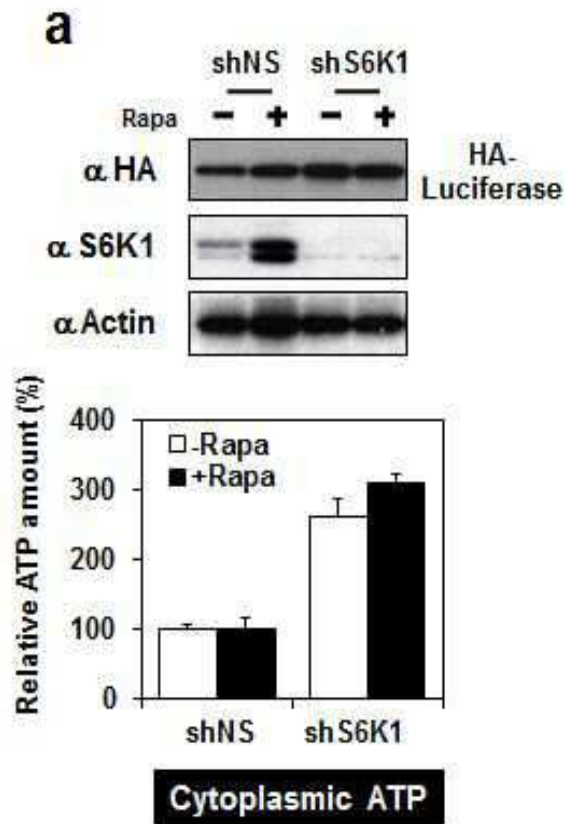
도면5b



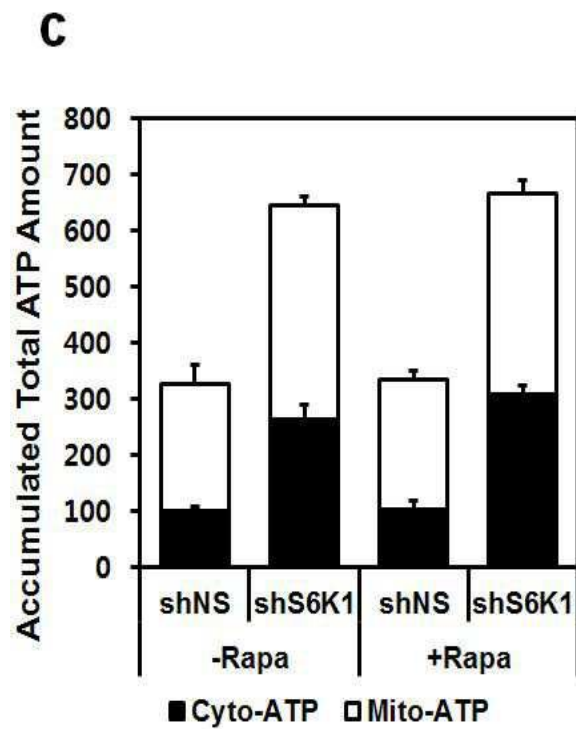
도면5c



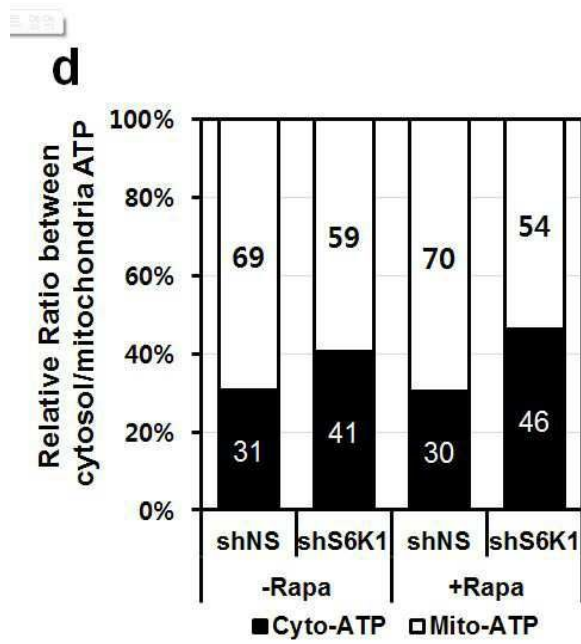
도면6a



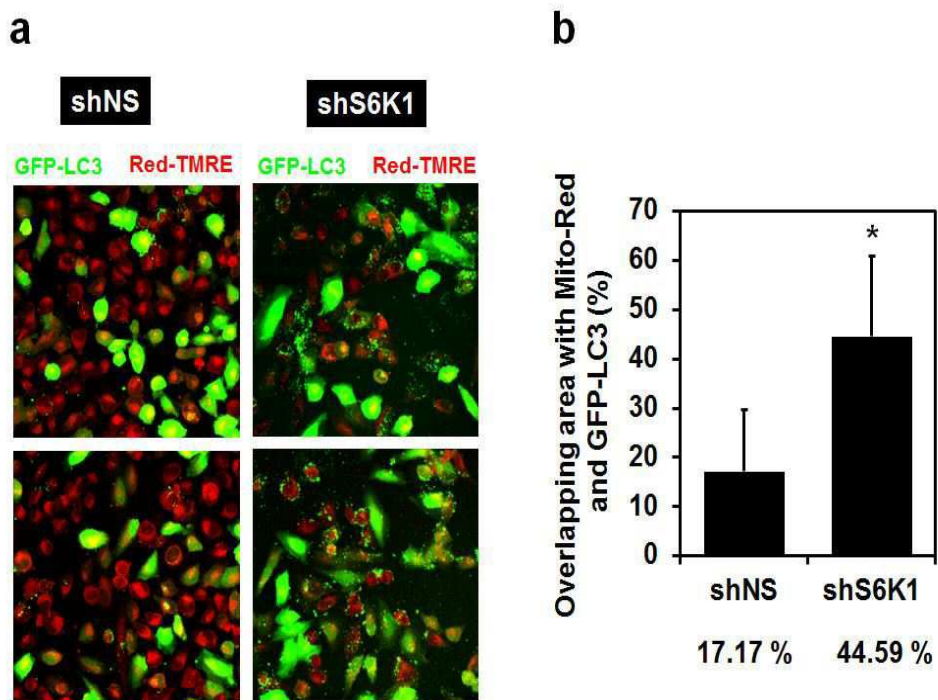
도면6c



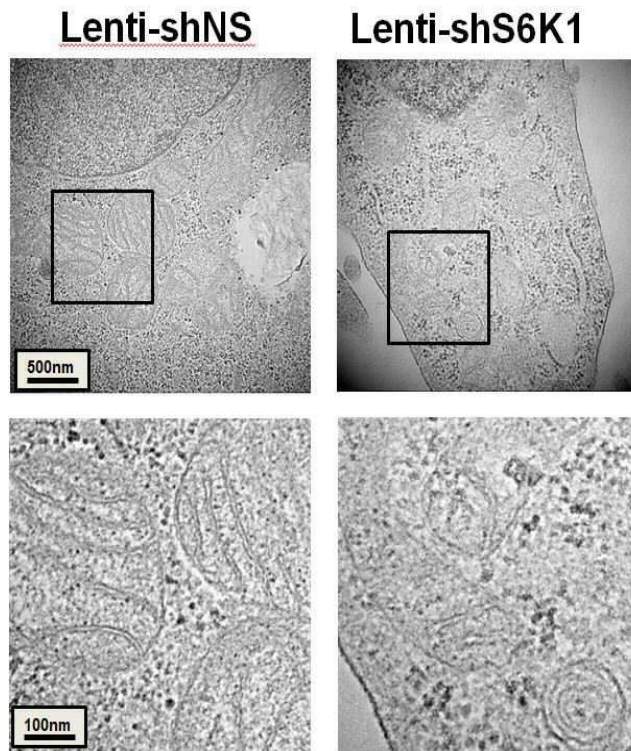
도면6d



도면7



도면8



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> Composition for prevention or treatment of a disease occurred by
autophagy disorder in mitochondria comprising expression
inhibitors of S6K1 gene or activity inhibitors of S6K1 protein
- <130> 1-44P-2
- <160> 1
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> human S6K1 shRNA sequence
- <400> 1
gggtacttgg taaagggggc t