



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0159831
(43) 공개일자 2022년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 7/06 (2006.01) A23L 33/18 (2016.01)
A61K 38/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 7/06 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0067900

(22) 출원일자 2021년05월26일

심사청구일자 2021년05월26일

(71) 출원인

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

유자형

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

최후연

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(74) 대리인

리엔목특허법인

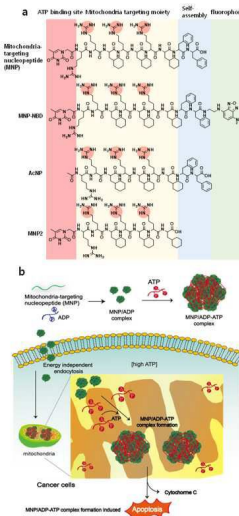
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 미토콘드리아 표적화 뉴클레오타이드 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

일 양상은 미토콘드리아 표적화 뉴클레오타이드 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 상기 뉴클레오타이드는 ADP 및 ATP로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나와 결합하여 복합체를 형성할 수 있다. 상기 뉴클레오타이드를 포함하는 약학적 조성물은 상기 복합체를 형성함으로써 선택적으로 암 세포의 미토콘드리아 내 ATP를 격리(또는 고갈)시킴으로써, 암 세포의 세포 사멸을 유발하여 암의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/00 (2013.01)

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 19/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/308 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119204
과제번호	2020M3A9D8038192
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발(R&D)
연구과제명	노화세포 운명조절을 위한 노화세포 선택적 치료 실용화 방법 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.06.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711118832
과제번호	2020R1A2C3005939
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	세포 안에서 고분자 중합반응과 세포 운명 조절
기 여 율	1/2
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.06.01 ~ 2023.02.28

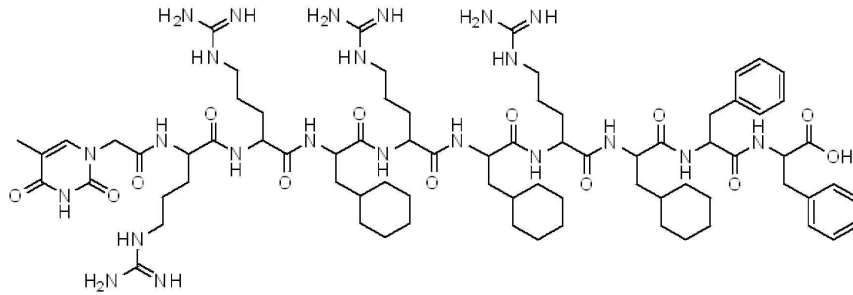
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염:

[화학식 1]



청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 염은 ADP(Adenosine Diphosphate) 및 ATP(Adenosine Triphosphate)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나와 복합체를 형성하는 것인, 화합물 또는 이의 염.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 염은 미토콘드리아 내 ADP(Adenosine Diphosphate) 및 ATP(Adenosine Triphosphate)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나와 결합하는 것인, 화합물 또는 이의 염.

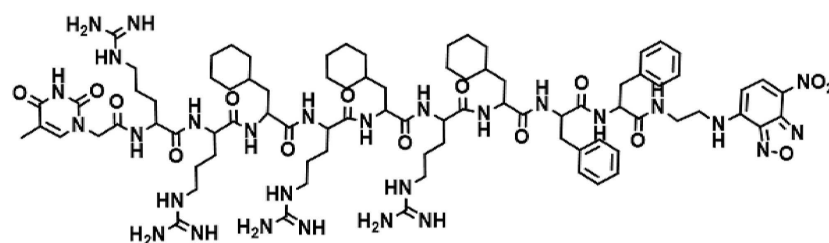
청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 염은 선택적으로 암 세포의 미토콘드리아 내 ADP(Adenosine Diphosphate) 및 ATP(Adenosine Triphosphate)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나와 결합하는 것인, 화합물 또는 이의 염.

청구항 5

하기 화학식 2의 화합물 또는 이의 염:

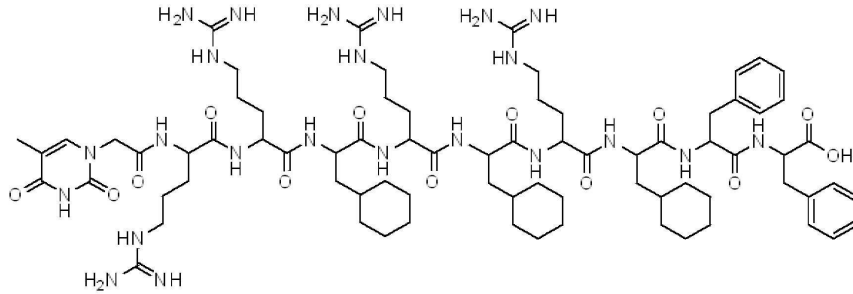
[화학식 2]



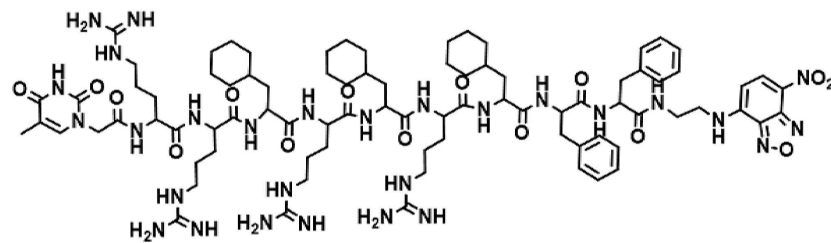
청구항 6

하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 미토콘드리아 표적화용 조성물:

[화학식 1]



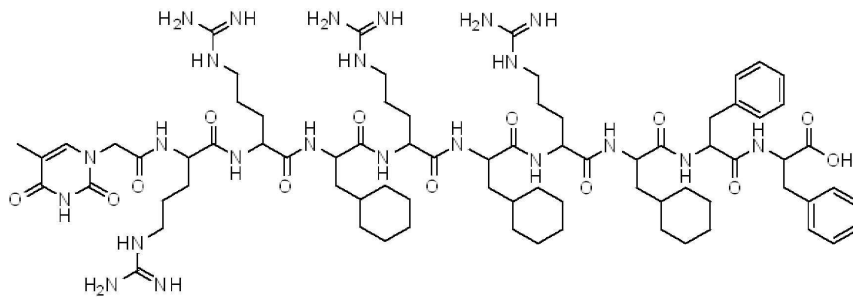
[화학식 2]



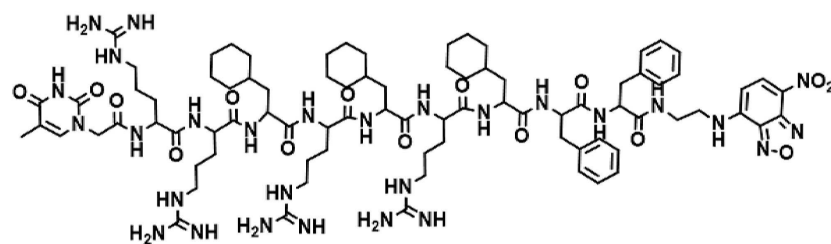
청구항 7

하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



[화학식 2]



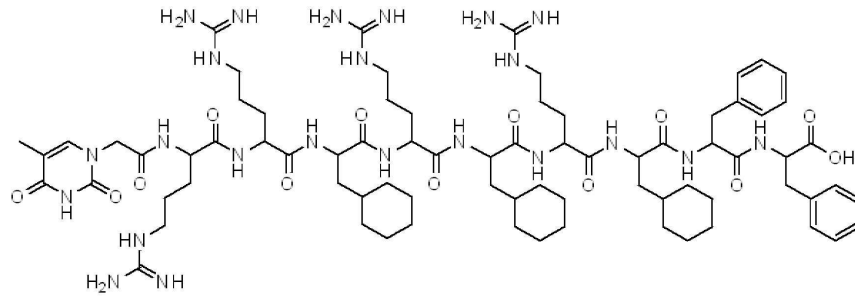
청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 선택적으로 암 세포의 미토콘드리아 내 ADP(Adenosine Diphosphate) 및 ATP(Adenosine Triphosphate)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나와 결합하는 것인, 약학적 조성물.

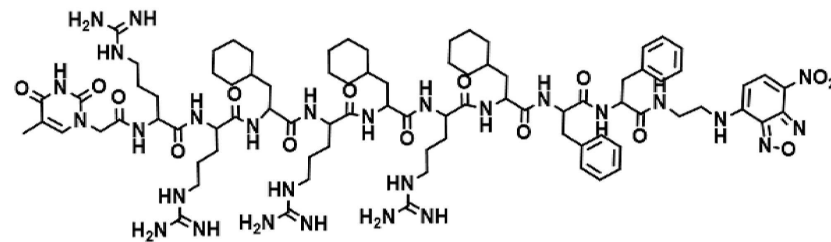
청구항 9

하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 ADP(Adenosine Diphosphate)를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과 ADP는 자가 조립(Self-Assembly)을 통해 MNP(Mitochondria-targeting nucleopeptide)/ADP 복합체를 형성하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 MNP/ADP 복합체는 암 세포의 미토콘드리아 내 ATP(Adenosine Triphosphate)와 결합하여 MNP/ADP/ATP 복합체를 형성하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 MNP/ADP 복합체는 암 세포의 미토콘드리아 내 ATP와 MNP/ADP/ATP 복합체를 형성함으로써 암 세포의 미토콘드리아 내 ATP를 고갈시켜 상기 암 세포의 세포 사멸을 유발하는 것인, 약학적 조성물.

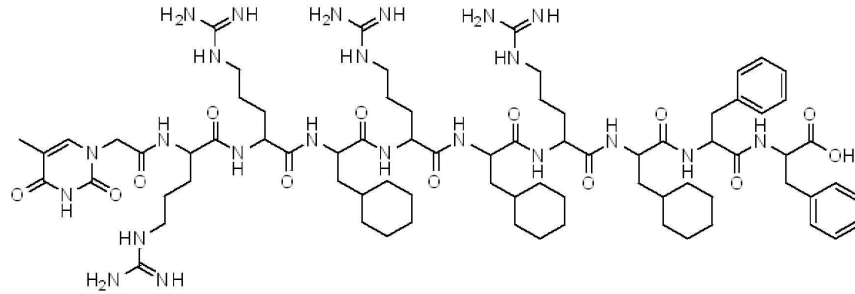
청구항 13

청구항 9에 있어서, 상기 암은 자궁경부암인, 약학적 조성물.

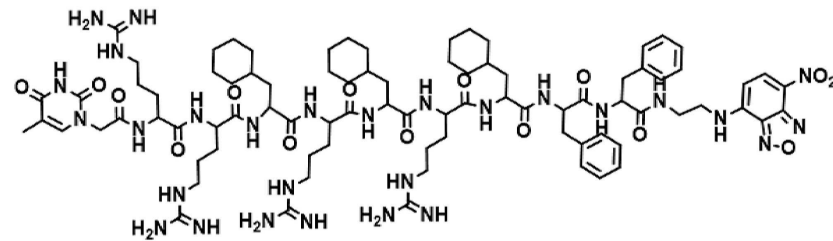
청구항 14

하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



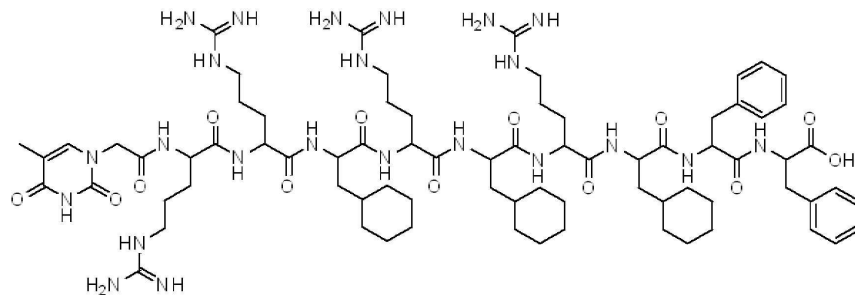
[화학식 2]



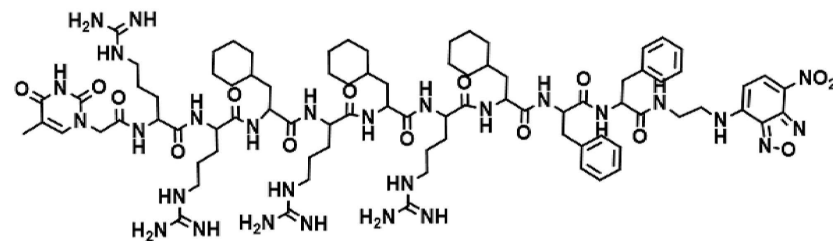
청구항 15

하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염 및 ADP(Adenosine Diphosphate)를 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



[화학식 2]



청구항 16

청구항 7 또는 9의 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 미토콘드리아 표적화 뉴클레오타이드 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 암 세포들의 미토콘드리아가 정상 세포에 비해 유의미하게 생물학적 차이를 나타내는 바(즉, 증진된 막투과 능력, 높은 활성 산소종 수준 및 높은 ATP 농도), 최근 암 세포들의 미토콘드리아를 표적화하는 것이 항암 요법의 효율을 증진시키기 위한 방법으로서 널리 조사되고 있다. 미토콘드리아는 예를 들어, 세포 신호, 칼슘 항상성, 거대 분자 동화 및 이화 작용 및 ATP(adenosine triphosphate) 및 생물에너지 및 생합성을 위한 다른 중간체의 생산에서 중요한 역할을 수행하는 세포 내 기관이다. 많은 미토콘드리아 대사물 중, ATP는 에너지 생산, 세포 호흡 및 대사와 같은 세포 과정에서 매우 중요한 생분자이다. ATP의 농도는 인간 세포에서 보통 수 mM이고, 일부 암세포는 정상 세포 대비 약 3배 높은 ATP 농도를 가진다. 세포와 조직에서, ATP는 GTP(guanosine triphosphate), UTP(uridine triphosphate), ADP(adenosine diphosphate) 및 AMP(adenosine monophosphate)와 같은 다른 퓨린 및 피리미딘에 비해 상당히 높은 농도(즉, 최소 9배 높음)를 가진다. 따라서, 미토콘드리아의 ATP의 제거 또는 표적화는 암 치료법에 효과적인 전략일 수 있다.

[0003] TPP(triphenyl phosphonium), 피리디늄, 구아니듐 및 MPPs(mitochondria-targeting/penetrating peptides)와 같은 미토콘드리아-표적화 리간드들은 매우 음성인 미토콘드리아의 막 전위를 이용하여 미토콘드리아 내부에 축적될 수 있다. 암 세포들의 미토콘드리아는 건강한 정상 세포들의 것보다 더 음성인 막 전위를 갖기 때문에, 언급된 리간드들은 암 세포의 미토콘드리아 내부에 더 높은 축적률을 달성한다. 암 세포 미토콘드리아 및 미토콘드리아의 ATP 모두 표적하는 리간드 중에서 펩티드들은 그들이 다양성, 선택성, 우수한 생체적합성 및 수용액 내 자가 조립능력을 나타내기 때문에 특히 흥미롭다. 뉴클레오타이드들은 핵 염기들에 공유적으로 결합된 펩티드들이다. 특히, 이렇나 화합물들은 핵 염기들, 뉴클레오타이드들 또는 핵산들과 상보적인 수소결합을 통해 상호작용할 것으로 예상된다. 따라서, 뉴클레오타이드들은 인(nucleoli)를 표적하고, RNA 및 DNA 분자들과 상호작용하며, ATP를 격리함으로써 다중 약물 내성(multidrug resistance: MDR)을 해결하기 위해 독소루비신과 결합하는 종뿐만 아니라 하이드로겔레이터(hydrogelator)로서 연구되고 있다. 그들은 왓슨-크릭 염기-짝 수소 결합 및 정전기적 상호작용을 통해 뉴클레오타이드 삼인산과 강하게 상호작용할 수 있고, 그 결과, 추가 연구를 위한 초분자 집합체를 형성할 수 있다.

[0004] 이를 바탕으로, 항암 요법에 새로운 접근법으로서, ATP를 격리하여 미토콘드리아 내부 ATP와 큰 집합체를 형성하는 뉴클레오타이드를 개발하였다.

선행기술문헌

특허문헌

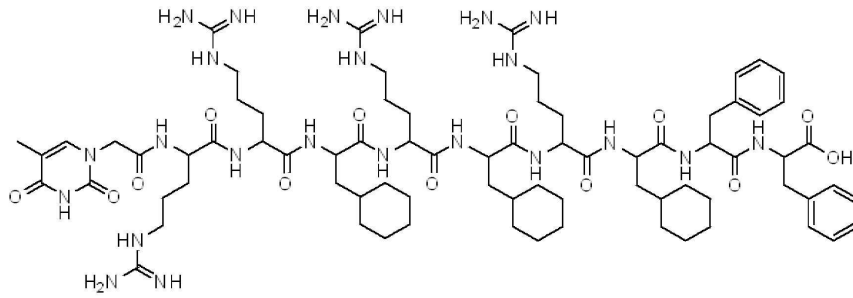
[0005] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2005-0072670호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 양상은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염을 제공하는 것이다:

[0007] [화학식 1]



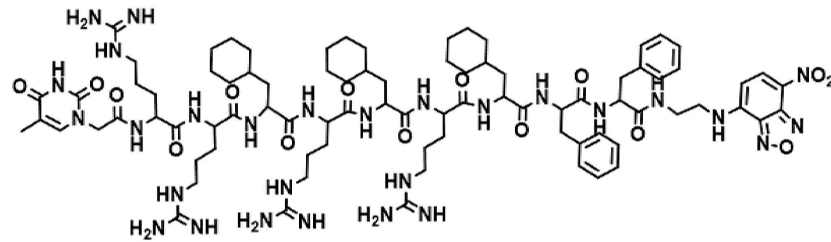
[0008]

[0009]

다른 양상은 하기 화학식 2의 화합물 또는 이의 염을 제공하는 것이다:

[0010]

[화학식 2]



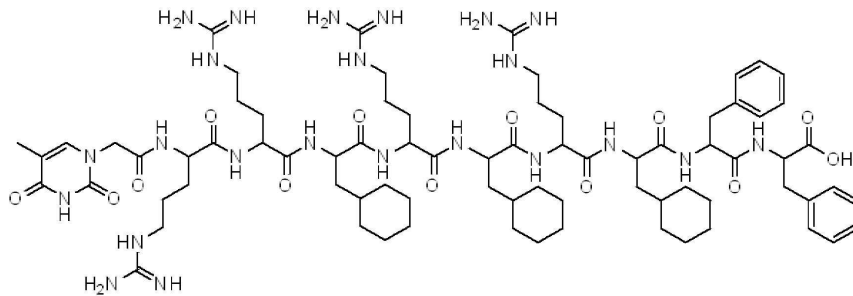
[0011]

[0012]

또 다른 양상은 하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 미토콘드리아 표적화용 조성물을 제공하는 것이다:

[0013]

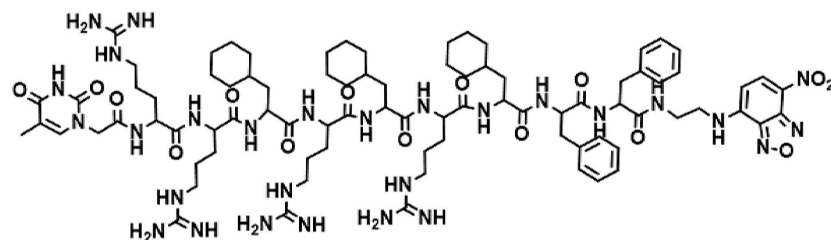
[화학식 1]



[0014]

[0015]

[화학식 2]



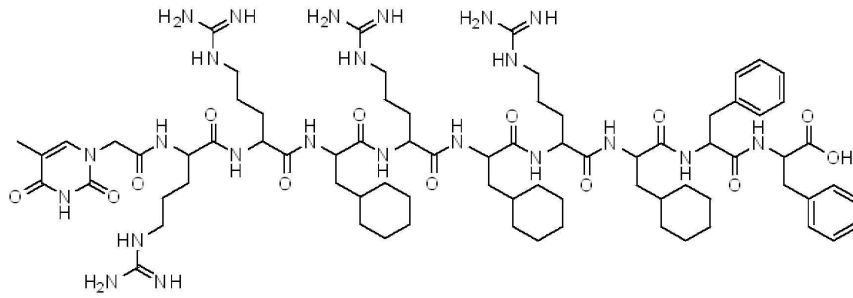
[0016]

[0017]

또 다른 양상은 하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다:

[0018]

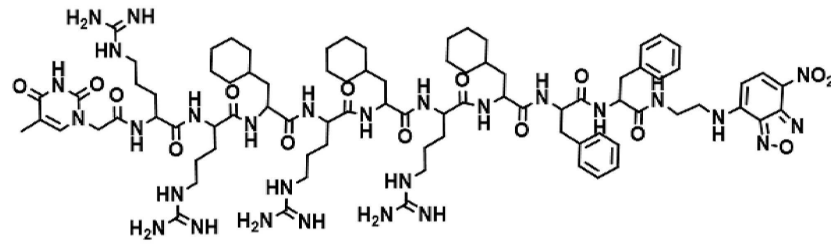
[화학식 1]



[0019]

[0020]

[화학식 2]



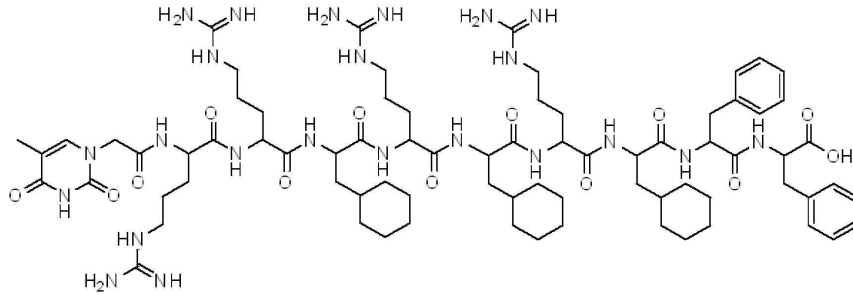
[0021]

[0022]

또 다른 양상은 하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 ADP(Adenosine Diphosphate)를 포함하는 염의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다:

[0023]

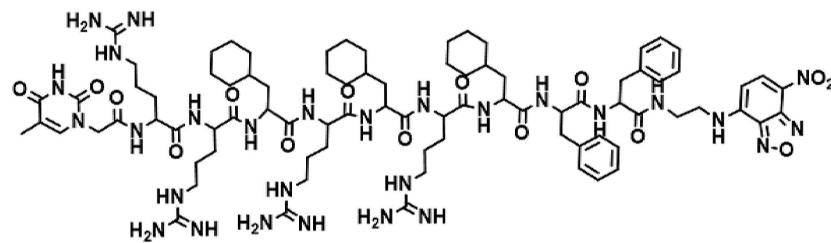
[화학식 1]



[0024]

[0025]

[화학식 2]



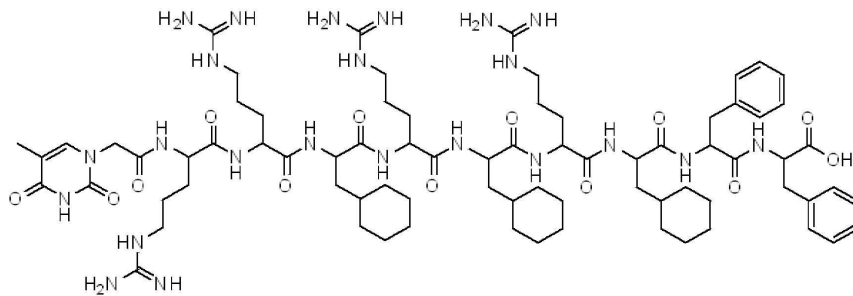
[0026]

[0027]

또 다른 양상은 하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 염의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다:

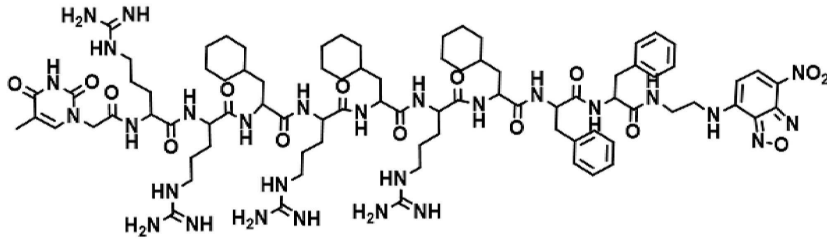
[0028]

[화학식 1]



[0029]

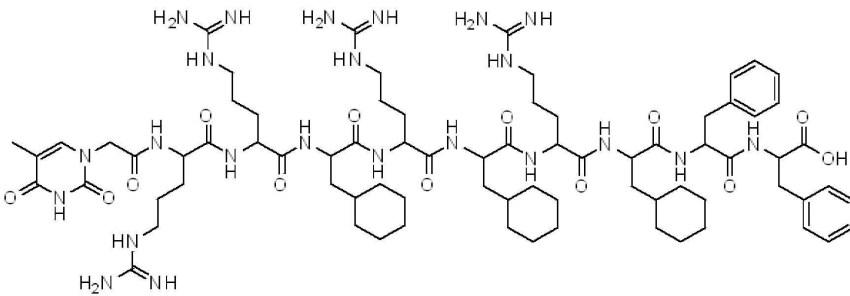
[0030] [화학식 2]



[0031]

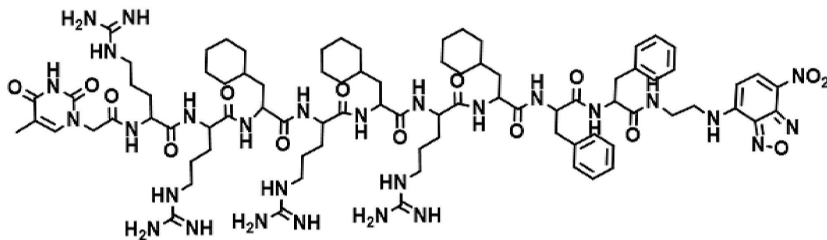
[0032] 또 다른 양상은 하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염 및 ADP(Adenosine Diphosphate)를 포함하는 염의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다:

[0033] [화학식 1]



[0034]

[0035] [화학식 2]



[0036]

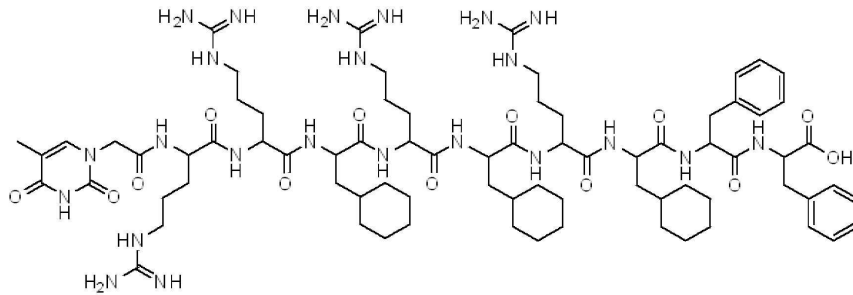
[0037] 또 다른 양상은 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 염의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0038] 본원에 기재된 화합물은 하나 이상의 비대칭 중심을 포함할 수 있으며, 따라서 다양한 이성질체 형태, 예를 들어 거울상 이성질체 및/또는 부분입체 이성질체의 형태로 존재할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 화합물은 개개의 거울상 이성질체, 부분입체 이성질체 또는 기하학적 이성질체의 형태일 수 있거나, 라세미 혼합물 및 하나 이상의 입체 이성질체가 풍부한 혼합물을 포함하는 입체 이성질체의 혼합물의 형태일 수 있다. 이성질체는 키랄 고압 액체 크로마토그래피(high pressure liquid chromatography, HPLC) 및 키랄 염(chiral salt)의 형성 및 결정화를 포함하는 당업자에게 공지된 방법에 의해 혼합물로부터 분리될 수 있고; 또는 바람직한 이성질체는 비대칭 합성에 의해 제조될 수 있다. 본 발명은 실질적으로 다른 이성질체를 포함하지 않는 개개의 이성질체로서, 및 대안적으로 다양한 이성질체의 혼합물로서 본원에 기재된 화합물을 추가로 포함한다. 또한, 본 발명은 본원에 기재된 치환기의 예시적인 목록에 의해 임의의 방식으로 제한되도록 의도된 것은 아니다.

[0039] 일 양상은 하기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염을 제공한다:

[0040] [화학식 1]



[0041]

[0042]

상기 화학식 1의 화합물은 핵산의 염기와 아미노산이 연결된 뉴클레오펙티드(Nucleopeptide)로서, 구체적으로, 핵산의 염기 중 티민 및 아미노산의 알기닌, 알라닌 및 페닐알라닌이 결합된 구조일 수 있다. 상기 핵산의 염기 및/또는 아미노산은 변형된 핵산의 염기 및/또는 변형된 아미노산일 수 있다.

[0043]

구체적으로, 상기 화학식 1의 화합물은 Thy가 티민(Thymine)이고, r이 D-알기닌(D-arginine)이고, Fx는 L-사이클로헥실알라닌(L-cyclohexylalanine)이고, F는 L-페닐알라닌(L-phenylalanine)일 때, Thy-rrFxFxFx의 구조를 가질 수 있다.

[0044]

용어 "염"은 일 양상에 따른 특정 화합물과 비교적 무독성인 산 또는 염기를 이용해서 조제되는 염을 의미한다.

[0045]

상기 용어 "펩티드(Polypeptide)"는 아마이드 결합 (또는 펩티드 결합)으로 연결된 2개 이상의 아미노산으로 이루어진 폴리머를 의미하는 것으로서, 상기 뉴클레오펙티드 중 아미노산 서열은 상기 화학식 1의 아미노산 서열과 각각 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 92% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드를 포함할 수 있다.

[0046]

또한, 보다 나은 화학적 안정성, 강화된 약리 특성(반감기, 흡수성, 역가, 효능 등), 변경된 특이성(예를 들어, 광범위한 생물학적 활성 스펙트럼), 감소된 항원성을 획득하기 위하여, 상기 뉴클레오펙티드의 아미노산의 N-또는 C-말단에 보호기가 결합되어 있을 수 있다. 상기 보호기는 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리틸기, 스테아릴기 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 폴리펩티드의 개질, 특히 폴리펩티드의 안정성 증진시킬 수 있는 성분이라면, 제한없이 포함할 수 있다.

[0047]

상기 용어 "안정성"은 생체 내 단백질 절단효소의 공격으로부터 본 발명의 뉴클레오펙티드를 보호하는 인 비보(in vivo) 안정성뿐만 아니라, 저장 안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 의미하는 것일 수 있다.

[0048]

아울러, 상기 뉴클레오펙티드는 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기를 위한 특정 목적으로 제조된 아미노산 서열도 추가적으로 포함할 수 있다.

[0049]

상기 용어 "상동성(Homology)"은 야생형 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 이러한 상동성의 비교는 당업계에서 널리 알려진 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있으며, 2개 이상의 서열간 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다.

[0050]

상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염은 천연으로부터 유래될 수도 있고, 당해 분야에서 널리 공지된 다양한 합성 방법으로 획득할 수 있다.

[0051]

상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염은 비단백질 화합물, 펩티드, 식물 유래 조직이나 세포의 추출물, 미생물(예를 들어 세균류 또는 진균류, 그리고 특히 효모)의 배양으로 얻어진 생산물일 수 있고, 구체적으로 고체상 펩티드 합성(solid-phase peptide synthesis: SPPS)로 합성되고, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 정제된 것일 수 있다.

[0052]

또한, 용어 MNP(Mitochondrial targeting Nucleopeptide)는 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염을 의미하는 것일 수 있다.

[0053]

일 양상에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염은 ADP(Adenosine Diphosphate) 및 ATP(Adenosine Triphosphate)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나와 복합체를 형성하는 것일 수 있다.

[0054]

또한, 일 양상에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 염은 미토콘드리아 내 ADP(Adenosine Diphosphate) 및 ATP(Adenosine Triphosphate)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나와 결합하는 것일 수 있다.

[0055]

또한, 일 양상에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 염은 선택적으로 암 세포의 미토콘드리아 내 ADP(Adenosine Diphosphate) 및 ATP(Adenosine Triphosphate)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나와 결합하는 것일 수

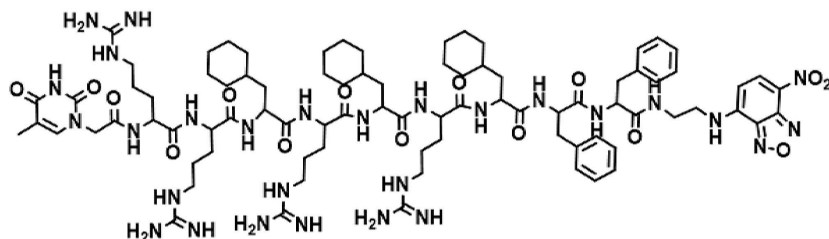
있다.

[0056] 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염은 선택적으로 암 세포 내 미토콘드리아 내 ATP와 결합하여 MNP/ATP 복합체를 형성할 수 있고, 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염은 암 세포 내 미토콘드리아 내 ADP 및 ATP와 결합하여, MNP/ADP/ATP 복합체를 형성할 수 있다.

[0057] 상기 복합체는 자가 조립(Self-assembly)되어, 나노 입자 구조를 형성할 수 있고, 이를 통해 미토콘드리아 내 ATP를 격리(또는 고갈)시키고, 사이토크롬 c(cytochrome c) 및 카스파제 9(Caspase 9)의 발현량을 증가시킴으로써 미토콘드리아 손상에 따라, 암 세포 사멸을 유발할 수 있다.

[0058] 다른 양상은 하기 화학식 2의 화합물 또는 이의 염을 제공한다:

[0059] [화학식 2]



[0060]

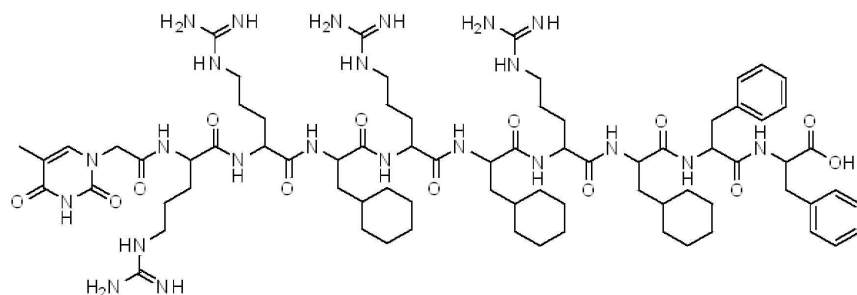
[0061] 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염은 형광단(Fluorephore)과 결합되어 있을 수 있다. 구체적으로, 상기 형광단은 상기 화학식 1의 화합물 또는 이의 염이 ADP 및 ATP로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나와 결합하여 복합체를 형성함에 있어서, 영향을 주지 않는 형광단이라면 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 형광단은 NBD(4-nitro-2,1,3-benzoxadiazole)일 수 있고, 상기 화학식 2의 화합물은 상기 화학식 1의 화합물이 상기 NBD와 결합한 화합물일 수 있다.

[0062] 상기 화학식 2의 화합물 또는 이의 염은 선택적으로 암 세포 내 미토콘드리아 내 ATP와 결합하여 MNP-NBD/ATP 복합체를 형성할 수 있고, 상기 화학식 2의 화합물 또는 이의 염은 암 세포 내 미토콘드리아 내 ADP 및 ATP와 결합하여, MNP-NBD/ADP/ATP 복합체를 형성할 수 있다.

[0063] 상기 복합체는 자가 조립(Self-assembly)되어, 나노 입자 구조를 형성할 수 있고, 이를 통해 미토콘드리아 내 ATP를 격리(또는 고갈)시키고, 사이토크롬 c(cytochrome c) 및 카스파제 9(Caspase 9)의 발현량을 증가시킴으로써 미토콘드리아 손상에 따라, 암 세포 사멸을 유발할 수 있다.

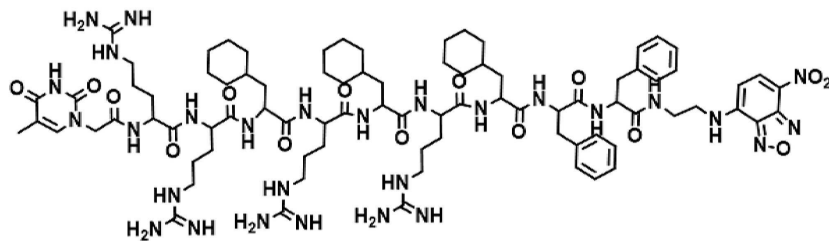
[0064] 또 다른 양상은 하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 미토콘드리아 표적화용 조성물을 제공한다:

[0065] [화학식 1]



[0066]

[0067] [화학식 2]



[0068]

[0069]

상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 정상 세포의 미토콘드리아는 표적화하지 않으며, 암 세포의 미토콘드리아만 선택적으로 표적화할 수 있다.

[0070]

구체적으로, 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 선택적으로 암 세포 내 미토콘드리아 내 ATP와 결합하여 MNP/ATP 복합체 또는 MNP-NBD/ATP 복합체를 형성할 수 있고, 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 암 세포 내 미토콘드리아 내 ADP 및 ATP와 결합하여, MNP/ADP/ATP 복합체 또는 MNP-NBD/ADP/ATP 복합체를 형성할 수 있다.

[0071]

상기 복합체는 자가 조립(Self-assembly)되어, 나노 입자 구조를 형성할 수 있고, 이를 통해 미토콘드리아 내 ATP를 격리(또는 고갈)시키고, 사이토크롬 c(cytochrome c) 및 카스파제 9(Caspase 9)의 발현량을 증가시킴으로써 미토콘드리아 손상에 따라, 암 세포 사멸을 유발할 수 있다.

[0072]

용어 "약학적으로 허용 가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다.

[0073]

용어 "약학적으로 허용 가능한 염"이란, 일 양상에 따른 특정 화합물과 비교적 무독성인 산 또는 염기를 이용해서 조제되는 염을 의미한다. 상기 화합물이 상대적으로 산성 관능기를 포함할 때, 순수 용액 또는 적합한 불활성 용매 중에서 충분한 양의 염기를 이러한 화합물의 중성 형태와 접촉시킴으로써 염기 부가염을 얻을 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염기 부가염은 나트륨, 칼륨, 칼슘, 암모늄, 유기 아민, 혹은 마그네슘의 염 또는 유사한 염이 포함된다. 상기 화합물이 상대적으로 염기성 관능기를 포함할 때, 순수 용액 또는 적합한 불활성 용매 중에서 충분한 양의 산을 이러한 화합물의 중성 형태와 접촉시킴으로써 산 부가염을 얻을 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 산 부가염은 염산, 브롬화 수소산, 질산, 탄산, 탄산 수소 이온, 인산, 인산 1수소 이온, 인산 2수소 이온, 황산, 황산 수소 이온, 요오드화 수소산 또는 아인산 등의 무기산의 염, 그리고 아세트산, 프로피온산, 이소부티르산, 말레산, 말론산, 안식향산, 숙신산, 수베르산, 푸마르산, 락트산, 만델산, 프탈산, 벤젠술폰산, p-톨릴술폰산, 구연산, 주석산, 메탄술폰산 등의 유기산의 염을 들 수 있고, 나아가 아미노산(예를 들면 아르기닌 등)의 염 및 글루쿠론산 등의 유기산의 염도 포함된다.

[0074]

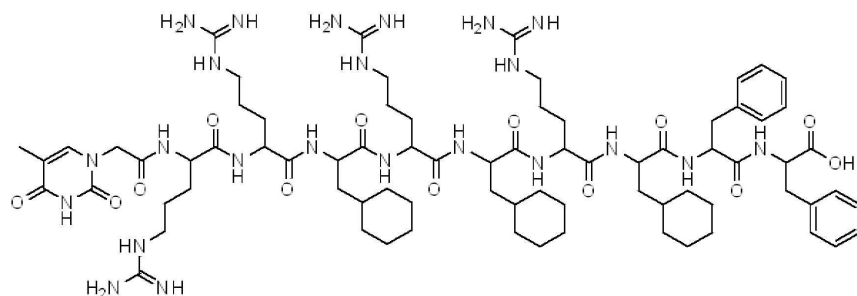
상기 약학적으로 허용 가능한 염은 산성 또는 염기성 부분을 포함하는 모체 화합물로부터 통상적인 화학적 방법으로 합성할 수 있다. 일반적으로 이러한 염은 수증 또는 유기 용매 중 또는 이 2종의 혼합물 중에서, 이들 화합물의 유리산 또는 염기의 형태를 화학량론적으로 적량인 염기 또는 산과 반응시켜서 조제된다. 일반적으로 에테르, 아세트산에틸, 에탄올, 이소프로판올 또는 아세토니트릴 등의 비수성 매질이 바람직하다.

[0075]

또 다른 양상은 하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0076]

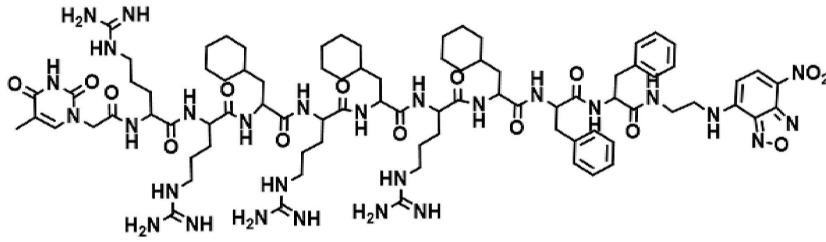
[화학식 1]



[0077]

[0078]

[화학식 2]



[0079]

[0080]

일 양상에 있어서, 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 선택적으로 암 세포의 미토콘드리아 내 ADP(Adenosine Diphosphate) 및 ATP(Adenosine Triphosphate)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나와 결합하는 것일 수 있다.

[0081]

구체적으로, 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 선택적으로 암 세포 내 미토콘드리아 내 ATP와 결합하여 MNP/ATP 복합체 또는 MNP-NBD/ATP 복합체를 형성할 수 있고, 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 암 세포 내 미토콘드리아 내 ADP 및 ATP와 결합하여, MNP/ADP/ATP 복합체 또는 MNP-NBD/ADP/ATP 복합체를 형성할 수 있다.

[0082]

상기 복합체는 자가 조립(Self-assembly)되어, 나노 입자 구조를 형성할 수 있고, 이를 통해 미토콘드리아 내 ATP를 격리(또는 고갈)시키고, 사이토크롬 c(cytochrome c) 및 카스파제 9(Caspase 9)의 발현량을 증가시킴으로써 미토콘드리아 손상에 따라, 암 세포 사멸을 유발할 수 있다.

[0083]

용어 "예방"은 일 양상에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 개체의 암을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0084]

용어 "치료"는 일 양상에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 개체의 암에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0085]

일 양상에 따르면, 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 암 세포의 미토콘드리아 내 ATP를 격리함으로써, 암의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[0086]

상기 약학적 조성물은 유효성분을 단독으로 포함하거나, 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하여 약학적 조성물로 제공될 수 있다.

[0087]

상기 약학적 조성물은 종래에 알려져 있는 암의 예방 또는 치료용 조성물 또는 기존의 다른 항암제와 혼합되어 제공될 수 있고, 상기 다른 항암제는 종래에 알려져 있는 암의 예방 또는 치료용 조성물, 기존의 항암제 또는 새롭게 개발되는 항암제일 수 있다.

[0088]

상기 약학적 조성물이 암의 예방 또는 치료 효과를 가지는 다른 항암제를 포함하는 경우, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양이 혼합되는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0089]

구체적으로, 상기 담체는 예를 들어, 콜로이드 현탁액, 분말, 식염수, 지질, 리포솜, 미소구체(microspheres) 또는 나노 구형입자일 수 있다. 이들은 운반 수단과 복합체를 형성하거나 관련될 수 있고, 지질, 리포솜, 미세 입자, 금, 나노입자, 폴리머, 축합 반응제, 다당류, 폴리아미노산, 텐드리머, 사포닌, 흡착 증진 물질 또는 지방산과 같은 당업계에 공지된 운반 시스템을 사용하여 생체 내 운반될 수 있다.

[0090]

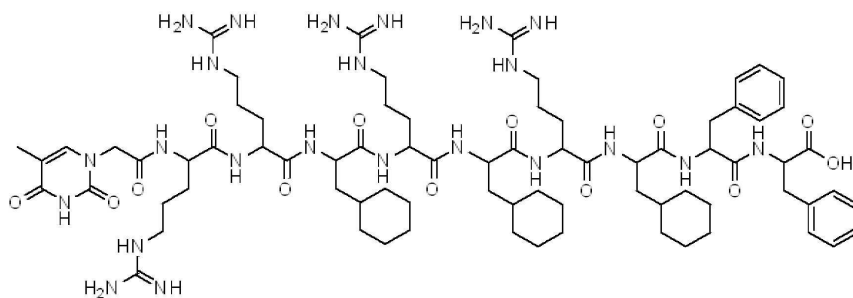
상기 약학적 조성물이 제제화될 경우에는 통상적으로 사용하는 윤활제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제, 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있고, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 과립인 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propyleneglycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텍솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 제라틴 등이 사용될 수 있고, 점안제 형태로 제조 시 공지의 희석제 또는 부형제 등이 사용될 수 있다.

- [0091] 상기 약학적 조성물은 암의 예방 또는 치료 효과를 가지는 공지의 조성물 또는 다른 항암제와 병행하여 투여될 수 있고, 동시에, 별도로, 또는 순차적으로 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0092] 용어 "투여"란 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, "개체"란 암을 보유할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 생물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.
- [0093] 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사, 동맥내 주사, 골수내 주사, 심장내 주사, 경막내 주사, 경피주사, 비강내 주사, 장관내 주사, 국소주사, 설하 주사, 직장내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택할 수 있다.
- [0094] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 구체적으로, 상기 약학적 조성물은 0.001 내지 1000 mg/kg/day로, 보다 구체적으로 0.1 내지 100 mg/kg/day로 투여될 수 있다. 상기 투여는 하루에 한 번 투여되는 것일 수도 있고, 수 회 나누어 투여되는 것일 수도 있다.
- [0095] 용어 "암(cancer)"는 제어 불가능하게 증식하며 정상적인 신체 조직을 침투하고 파괴하는 능력을 갖는 비정상적인 세포의 발생을 특징으로 하는 질병의 부류를 지칭한다.
- [0096] 상기 암은 청각 신경종(acoustic neuroma); 선암종(adenocarcinoma); 부신암(adrenal gland cancer); 항문암(anal cancer); 혈관육종(angiosarcoma)(예를 들어, 림프관육종(lymphangiosarcoma), 림프혈관내피육종(lymphangioendotheliosarcoma), 혈관육종(hemangiosarcoma)); 충수암(appendix cancer); 양성 단세포군 감마글로불린병증(monoclonal gammopathy); 담도암(biliary cancer)(예를 들어, 담관 암종(cholangiocarcinoma)); 방광암(bladder cancer); 유방암(breast cancer)(예를 들어, 유방의 선암종, 유방의 유두상 암종(papillary carcinoma), 유선암(mammary cancer), 유방의 수질 암종(medullary carcinoma)); 뇌암(brain cancer)(예를 들어, 수막종(meningioma), 교모세포종(glioblastoma), 신경교종(glioblastoma)(예를 들어, 성상 세포종(astrocytoma), 핍지교종(oligodendroglioma), 수모세포종(medulloblastoma)); 기관지암(bronchus cancer); 유암 종양(carcinoid tumor); 자궁경부암(cervical cancer)(예를 들어, 자궁경부선암종(cervical adenocarcinoma)); 융모암종(choriocarcinoma); 척색종(chordoma); 머리인두종(craniopharyngioma); 결장암(colorectal cancer)(예를 들어, 대장암(colon cancer), 직장암(rectal cancer), 직결장 선암종(colorectal adenocarcinoma)); 연결 조직 암(connective tissue cancer); 상피 암종(epithelial carcinoma); 상의 세포종(ependymoma); 내피세포육종(endotheliosarcoma)(예를 들어, 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 다발성 특발성 출혈 육종(multiple idiopathic hemorrhagic sarcoma)); 자궁 내막암(endometrial cancer)(예를 들어, 자궁암(uterine cancer), 자궁 육종(uterine sarcoma)); 식도암(esophageal cancer)(예를 들어, 식도의 선암종, 바렛 선암종(Barrett's adenocarcinoma)); 유잉 육종(Ewing's sarcoma); 안암(ocular cancer)(예를 들어, 안내 흑색종(intraocular melanoma), 망막아종(retinoblastoma)); 가족성 과호산구증가증(familial hypereosinophilia); 담낭암(gall bladder cancer); 위암(gastric cancer)(예를 들어, 위 선암(stomach adenocarcinoma)); 위장관 기질적 종양(gastrointestinal stromal tumor; GIST); 생식세포 암(germ cell cancer); 두경부암(head and neck cancer)(예를 들어, 두경부 편평세포암종(head and neck squamous cell carcinoma), 구강암(oral cancer)(예를 들어, 구강 편평세포암종(oral squamous cell carcinoma)); 인후암(throat cancer)(예를 들어, 후두암(laryngeal cancer), 인두암(pharyngeal cancer), 비인두암(nasopharyngeal cancer), 구인두암(oropharyngeal cancer)); 중쇄병(heavy chain disease)(예를 들어, 알파쇄병(alpha chain disease), 감마쇄병(gamma chain disease), 뮤쇄병(mu chain disease)); 혈관모세포종(hemangioblastoma); 하인두암(hypopharynx cancer); 염증성 근섬유모세포 종양(inflammatory myofibroblastic tumors); 면역성 아밀로이드 병증(immunocytic amyloidosis); 신장암(kidney cancer)(예를 들어, 신아세포종(nephroblastoma), 윌름 종양(Wilms' tumor)으로도 알려져 있음, 신세포 암종(renal cell carcinoma)); 간암(liver cancer)(예를 들어, 간 세포암(hepatocellular cancer, HCC), 악성 간암종(malignant hepatoma)); 폐암(lung cancer)(예를 들어, 기관지원성 암종(bronchogenic carcinoma), 소세포 폐암(small cell lung cancer, SCLC), 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 폐의 선암); 평활근육종(leiomyosarcoma; LMS); 비만세포증(mastocytosis)(예를 들어, 전신성 비만세포증(systemic mastocytosis)); 근육암(muscle cancer); 골수이형성 증후군(myelodysplastic

syndrome; MDS); 중피종(mesothelioma); 골수증식성 질환(mesothelioma; myeloproliferative disorder, MPD) (예를 들어, 진성다혈구증(polycythemia Vera; PV), 본태성 혈소판 증가증(essential thrombocytosis; ET), 골수 섬유증(myelofibrosis; MF)으로도 알려진 원인불명 골수화생(agnogenic myeloid metaplasia; AMM), 만성 특발성 골수섬유증(chronic idiopathic myelofibrosis), 만성 골수성 백혈병(chronic myelocytic leukemia, CML), 만성 호중구성 백혈병(chronic neutrophilic leukemia, CNL), 과호산구 증후군(hypereosinophilic syndrome, HES)); 신경아세포종(neuroblastoma); 신경 섬유종(neurofibroma)(예를 들어, 신경 섬유종증(neurofibromatosis, NF) 타입 1 또는 타입 2, 신경초종증(schwannomatosis)); 신경내분비암(neuroendocrine cancer)(예를 들어, 위장관 췌장 신경내분비 종양(gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor; GEP-NET), 카르시노이드 종양(carcinoid tumor)); 골육종(osteosarcoma)(예를 들어, 골암(bone cancer)); 난소암(ovarian cancer)(예를 들어, 낭포선암(cystadenocarcinoma), 난소 배아 암종(ovarian embryonal carcinoma), 난소 선암(ovarian adenocarcinoma)); 유두상 선암(papillary adenocarcinoma); 췌장암(pancreatic cancer)(예를 들어, 췌장 선암(pancreatic adenocarcinoma), 유두상 점액성 종양 유관(intraductal papillary mucinous neoplasm; IPMN), 도세포 종양(Islet cell tumors)); 음경암(penile cancer)(예를 들어, 음경 및 음낭의 파제트병(Paget's disease)); 송과체종(pinealoma); 원시 신경외배엽성 종양(primitive neuroectodermal tumor; PNT); 혈장세포 종양형성(plasma cell neoplasia); 부신생물 증후군(paraneoplastic syndrome); 상피내 신생물(intraepithelial neoplasm); 전립선암(prostate cancer)(예를 들어, 전립선 선암(prostate adenocarcinoma)); 직장암(rectal cancer); 횡문근육종(rhabdomyosarcoma); 침샘암(salivary gland cancer); 피부암(skin cancer)(예를 들어, 편평세포암종(squamous cell carcinoma, SCC), 각질극세포종(keratoacanthoma, KA), 흑색 종(melanoma), 기저세포암종(basal cell carcinoma, BCC)); 소장암(small bowel cancer)(예를 들어, 충수암(appendix cancer)); 연조직 육종(soft tissue sarcoma)(예를 들어, 악성 섬유성조직구종(malignant fibrous histiocytoma, MFH), 지방 육종(liposarcoma), 악성 말초신경초종(malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST), 연골육종(chondrosarcoma), 섬유육종(fibrosarcoma), 점액육종(myxosarcoma)); 피지선 암종(sebaceous gland carcinoma); 소장암(small intestine cancer); 땀샘 암종(sweat gland carcinoma), 활막종(synovioma), 고환암(testicular cancer)(예를 들어, 정상피종(seminoma), 고환 배아 암종(testicular embryonal carcinoma)); 갑상선암(thyroid cancer)(예를 들어, 갑상선의 유두상 암종(papillary carcinoma of the thyroid), 유두상 갑상선 암종(papillary thyroid carcinoma, PTC), 갑상선 수질암(medullary thyroid cancer)); 요도암(urethral cancer); 질암(vaginal cancer); 및 외음부암(vulvar cancer)(예를 들어, 외음부의 파제트병(Paget's disease))로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 암일 수 있고, 구체적으로, 자궁경부암 일 수 있다.

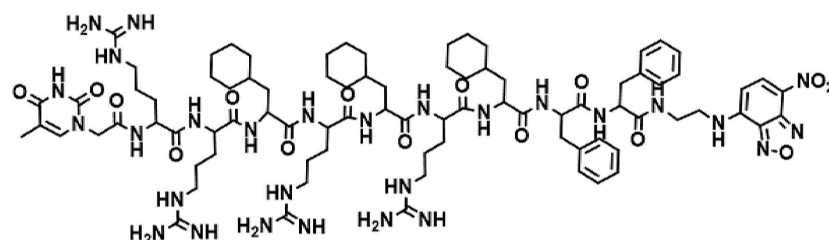
[0097] 또 다른 양상은 하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 및 ADP(Adenosine Diphosphate)를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0098] [화학식 1]



[0099]

[0100] [화학식 2]



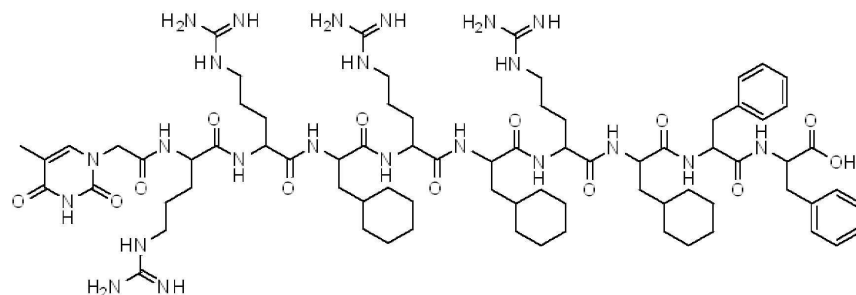
[0101]

- [0102] 상기 용어 “화합식 1의 화합물”, “화합식 2의 화합물”, “약학적으로 허용 가능한 염”, “예방”, “치료”, “암” 등은 전술한 범위 내일 수 있다.
- [0103] 일 양상에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염과 ADP는 자가 조립(Self-Assembly)을 통해 MNP(Mitochondria-targeting nucleopeptide)/ADP 복합체를 형성하는 것일 수 있다.
- [0104] 일 양상에 있어서, 상기 MNP/ADP 복합체는 암 세포의 미토콘드리아 내 ATP(Adenosine Triphosphate)와 결합하여 MNP/ADP/ATP 복합체를 형성하는 것일 수 있다.
- [0105] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 MNP/ADP 복합체는 암 세포의 미토콘드리아 내 ATP와 MNP/ADP/ATP 복합체를 형성함으로써 암 세포의 미토콘드리아 내 ATP를 고갈시켜 상기 암 세포의 세포 사멸을 유발하는 것일 수 있다.
- [0106] 또한, 일 양상에 있어서, 상기 암은 청각 신경종(acoustic neuroma); 선암종(adenocarcinoma); 부신암(adrenal gland cancer); 항문암(anal cancer); 혈관육종(angiosarcoma)(예를 들어, 림프관육종(lymphangiosarcoma), 림프혈관내피육종(lymphangioendotheliosarcoma), 혈관육종(hemangiosarcoma)); 충수암(appendix cancer); 양성 단세포군 감마글로불린병증(monoclonal gammopathy); 담도암(biliary cancer)(예를 들어, 담관 암종(cholangiocarcinoma)); 방광암(bladder cancer); 유방암(breast cancer)(예를 들어, 유방의 선암종, 유방의 유두상 암종(papillary carcinoma), 유선암(mammary cancer), 유방의 수질 암종(medullary carcinoma)); 뇌암(brain cancer)(예를 들어, 수막종(meningioma), 교모세포종(glioblastoma), 신경교종(glioblastoma)(예를 들어, 성상 세포종(astrocytoma), 핍지교종(oligodendroglioma), 수모세포종(medulloblastoma)); 기관지암(bronchus cancer); 유암 종양(carcinoid tumor); 자궁경부암(cervical cancer)(예를 들어, 자궁경부선암종(cervical adenocarcinoma)); 융모암종(choriocarcinoma); 척색종(chordoma); 머리인두종(craniopharyngioma); 결장암(colorectal cancer)(예를 들어, 대장암(colon cancer), 직장암(rectal cancer), 직결장 선암종(colorectal adenocarcinoma)); 연결 조직 암(connective tissue cancer); 상피 암종(epithelial carcinoma); 상의 세포종(ependymoma); 내피세포육종(endotheliosarcoma)(예를 들어, 카포시 육종(Kaposi's sarcoma), 다발성 특발성 출혈 육종(multiple idiopathic hemorrhagic sarcoma)); 자궁 내막암(endometrial cancer)(예를 들어, 자궁암(uterine cancer), 자궁 육종(uterine sarcoma)); 식도암(esophageal cancer)(예를 들어, 식도의 선암종, 바렛 선암종(Barrett's adenocarcinoma)); 윙 육종(Ewing's sarcoma); 안암(ocular cancer)(예를 들어, 안내 흑색종(intraocular melanoma), 망막아종(retinoblastoma)); 가족성 과호산구증가증(familial hypereosinophilia); 담낭암(gall bladder cancer); 위암(gastric cancer)(예를 들어, 위 선암(stomach adenocarcinoma)); 위장관 기질적 종양(gastrointestinal stromal tumor; GIST); 생식세포 암(germ cell cancer); 두경부암(head and neck cancer)(예를 들어, 두경부 편평세포암종(head and neck squamous cell carcinoma), 구강암(oral cancer)(예를 들어, 구강 편평세포암종(oral squamous cell carcinoma)); 인후암(throat cancer)(예를 들어, 후두암(laryngeal cancer), 인두암(pharyngeal cancer), 비인두암(nasopharyngeal cancer), 구인두암(oropharyngeal cancer)); 중쇄병(heavy chain disease)(예를 들어, 알파쇄병(alpha chain disease), 감마쇄병(gamma chain disease), 뮤쇄병(mu chain disease)); 혈관모세포종(hemangioblastoma); 하인두암(hypopharynx cancer); 염증성 근섬유모세포 종양(inflammatory myofibroblastic tumors); 면역성 아밀로이드병증(immunocytic amyloidosis); 신장암(kidney cancer)(예를 들어, 신아세포종(nephroblastoma), 윌름 종양(Wilms' tumor)으로도 알려져 있음, 신세포 암종(renal cell carcinoma)); 간암(liver cancer)(예를 들어, 간세포암(hepatocellular cancer, HCC), 악성 간암종(malignant hepatoma)); 폐암(lung cancer)(예를 들어, 기관지원성 암종(bronchogenic carcinoma), 소세포 폐암(small cell lung cancer, SCLC), 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC), 폐의 선암); 평활근육종(leiomyosarcoma; LMS); 비만세포증(mastocytosis)(예를 들어, 전신성 비만세포증(systemic mastocytosis)); 근육암(muscle cancer); 골수이형성 증후군(myelodysplastic syndrome; MDS); 중피종(mesothelioma); 골수증식성 질환(mesothelioma; myeloproliferative disorder, MPD)(예를 들어, 진성다혈구증(polycythemia Vera; PV), 본태성 혈소판 증가증(essential thrombocytosis; ET), 골수 섬유증(myelofibrosis; MF)으로도 알려진 원인불명 골수화생(agnogenic myeloid metaplasia; AMM), 만성 특발성 골수섬유증(chronic idiopathic myelofibrosis), 만성 골수성 백혈병(chronic myelocytic leukemia, CML), 만성 호중구성 백혈병(chronic neutrophilic leukemia, CNL), 과호산구 증후군(hypereosinophilic syndrome, HES)); 신경아세포종(neuroblastoma); 신경 섬유종(neurofibroma)(예를 들어, 신경 섬유종증(neurofibromatosis, NF) 타입 1 또는 타입 2, 신경초종증(schwannomatosis)); 신경내분비 암(neuroendocrine cancer)(예를 들어, 위장관 췌장 신경내분비 종양(gastroenteropancreatic neuroendocrine tumor; GEP-NET), 카르시노이드 종양(carcinoid tumor)); 골육종(osteosarcoma)(예를 들어, 골암(bone cancer)); 난소암(ovarian cancer)(예를 들어, 낭포선암(cystadenocarcinoma), 난소 배아 암종(ovarian

embryonal carcinoma), 난소 선암(ovarian adenocarcinoma)); 유두상 선암(papillary adenocarcinoma); 췌장암(pancreatic cancer)(예를 들어, 췌장 선암(pancreatic adenocarcinoma), 유두상 점액성 종양 유관(intraductal papillary mucinous neoplasm; IPMN), 도세포 종양(Islet cell tumors)); 음경암(penile cancer)(예를 들어, 음경 및 음낭의 파제트병(Paget's disease)); 송과체종(pinealoma); 원시 신경외배엽성 종양(primitive neuroectodermal tumor; PNT); 혈장세포 종양형성(plasma cell neoplasia); 부신생물 증후군(paraneoplastic syndrome); 상피내 신생물(intraepithelial neoplasm); 전립선암(prostate cancer)(예를 들어, 전립선 선암(prostate adenocarcinoma)); 직장암(rectal cancer); 횡문근육종(rhabdomyosarcoma); 침샘암(salivary gland cancer); 피부암(skin cancer)(예를 들어, 편평세포암종(squamous cell carcinoma, SCC), 각질극세포종(keratoacanthoma, KA), 흑색종(melanoma), 기저세포암종(basal cell carcinoma, BCC)); 소장암(small bowel cancer)(예를 들어, 충수암(appendix cancer)); 연조직 육종(soft tissue sarcoma)(예를 들어, 악성 섬유성 조직구종(malignant fibrous histiocytoma, MFH), 지방 육종(liposarcoma), 악성 말초신경초종(malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST), 연골육종(chondrosarcoma), 섬유육종(fibrosarcoma), 점액육종(myxosarcoma)); 피지선 암종(sebaceous gland carcinoma); 소장암(small intestine cancer); 땀샘 암종(sweat gland carcinoma), 활막종(synovioma), 고환암(testicular cancer)(예를 들어, 정상피종(seminoma), 고환 배아 암종(testicular embryonal carcinoma)); 갑상선암(thyroid cancer)(예를 들어, 갑상선의 유두상 암종(papillary carcinoma of the thyroid), 유두상 갑상선 암종(papillary thyroid carcinoma, PTC), 갑상선 수질암(medullary thyroid cancer)); 요도암(urethral cancer); 질암(vaginal cancer); 및 외음부암(vulvar cancer)(예를 들어, 외음부의 파제트병(Paget's disease))로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나의 암일 수 있고, 구체적으로, 자궁경부암일 수 있다.

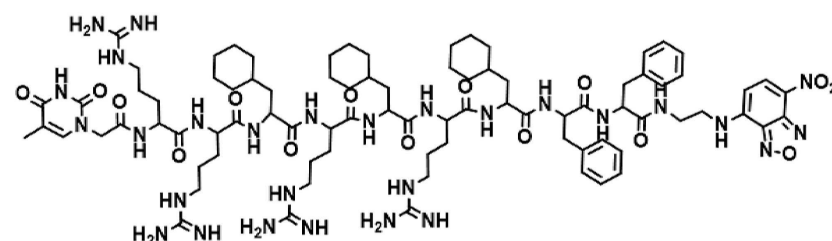
[0107] 또 다른 양상은 하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다:

[0108] [화학식 1]



[0109]

[0110] [화학식 2]



[0111]

[0112] 상기 용어 “화학식 1의 화합물”, “화학식 2의 화합물”, “예방”, “암” 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

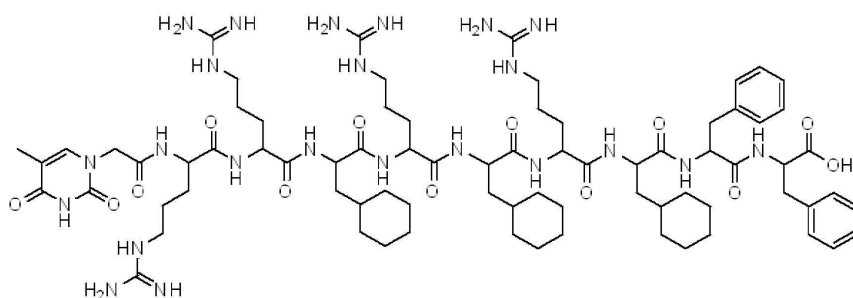
[0113] 상기 용어 “식품학적으로 허용 가능한”이란 상기 화합물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다.

[0114] 상기 용어 “식품학적으로 허용 가능한 염”이란, 일 양상에 따른 특정 화합물과 비교적 무독성인 산 또는 염기를 이용해서 조제되는 염을 의미하며, “염”에 관한 전술한 범위 내일 수 있다.

[0115] 상기 용어 “개선”이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들어, 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다. 이때, 상기 건강기능식품은 암의 예방 또는 개선을 위하여 해당 질의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로 사용될 수 있다.

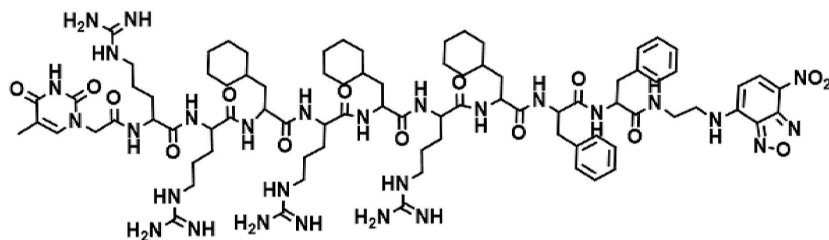
- [0116] 상기 건강기능식품에서, 유효성분은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 상기 건강기능식품은 원료에 대하여 구체적으로 약 15 중량% 이하, 보다 구체적으로 약 10 중량% 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있다.
- [0117] 상기 건강기능식품은 담체, 희석제, 부형제 및 첨가제 중 하나 이상을 더 포함하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제 및 액제 제형으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 제형될 수 있다. 일 양상에 따른 화합물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.
- [0118] 상기 담체, 부형제, 희석제 및 첨가제의 구체적인 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로즈, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 전분, 아카시아 고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸셀룰로즈, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아트산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나일 수 있다.
- [0119] 상기 건강기능식품은 상기 유효성분을 함유하는 것 외에 특별한 제한없이 다른 성분들을 필수 성분으로서 함유할 수 있다. 예를 들어, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올일 수 있다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0120] 상기 외에도, 일 양상에 따른 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [0121] 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염은 선택적으로 암 세포 내 미토콘드리아 내 ATP와 결합하여 MNP/ATP 복합체 또는 MNP-NBD/ATP 복합체를 형성할 수 있고, 상기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염은 암 세포 내 미토콘드리아 내 ADP 및 ATP와 결합하여, MNP/ADP/ATP 복합체 또는 MNP-NBD/ADP/ATP 복합체를 형성할 수 있다.
- [0122] 상기 복합체는 자가 조립(Self-assembly)되어, 나노 입자 구조를 형성할 수 있고, 이를 통해 미토콘드리아 내 ATP를 격리(또는 고갈)시키고, 사이토크롬 c(cytochrome c) 및 카스파제 9(Caspase 9)의 발현량을 증가시킴으로써 미토콘드리아 손상에 따라, 암 세포 사멸을 유발할 수 있다.
- [0123] 또 다른 양상은 하기 화학식 1 또는 화학식 2의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염 및 ADP(Adenosine Diphosphate)를 포함하는 암의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다:

[0124] [화학식 1]



[0125]

[0126] [화학식 2]



[0127]

[0128] 상기 용어 “화학식 1의 화합물”, “화학식 2의 화합물”, “식품학적으로 허용 가능한 염”, “예방”, “암”, “개선”, “건강기능식품” 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

[0129] 또 다른 양상은 상기 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0130] 상기 용어 “개체”, “투여”, “예방”, “치료”, “암” 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

발명의 효과

[0131] 일 양상에 따른 미토콘드리아 표적화 뉴클레오타이드는 ADP 및 ATP로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 하나와 결합하여 복합체를 형성할 수 있다. 상기 뉴클레오타이드를 포함하는 약학적 조성물은 상기 복합체를 형성함으로써 선택적으로 암 세포의 미토콘드리아 내 ATP를 격리(또는 고갈)시킴으로써, 암 세포의 세포 사멸을 유발하여 암의 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0132] 도 1의 a는 미토콘드리아 표적화 뉴클레오타이드 mitochondria-targeting nucleopeptide: MNP), 형광단(NBD)-결합된 MNP, 아세틸기 보호된 뉴클레오타이드(AcNP) 및 MNP2(자가 조립 부위(즉, 두개의 페닐알라닌)가 결실된 MNP)의 화학 구조를 나타내고, b는 세포 사멸을 유발하는 ADP와 MNP의 복합체에 의한 암 세포 내 미토콘드리아 내부에서 ATP의 격리의 예시를 나타낸 도이다.

도 2는 고체상 펩티드 합성(solid phase peptide synthesis: SPPS)을 통해 MNP, AcNP 및 MNP2의 합성 과정을 나타낸 도이다.

도 3은 MNP의 특성 분석을 나타낸 도로서, a는 MNP의 질량 스펙트럼, b는 MNP의 HPLC 순도 추적을 나타낸 도이다.

도 4의 a는 AcNP, b는 MNP2의 질량 스펙트럼을 나타낸 도이다.

도 5는 MNP/ADP, MNP/ATP 및 MNP/ADP-ATP 복합체들의 자가 조립 동작을 나타낸 도로서, a는 수용액 내 200 μ M 농도의 MNP/ADP 복합체의 TEM 이미지를 나타내고, b는 수용액 내 200 μ M 농도의 MNP/ATP 복합체의 TEM 이미지를 나타내며, c는 수용액 내 200 μ M 농도의 MNP/ATP 복합체의 SEM 이미지를 나타내고, d는 수용액 내 200 μ M 농도의 MNP, MNP/ADP 복합체 및 MNP/ATP 복합체의 280 nm에서 투과율을 측정한 샘플 탁도를 나타내며, e는 MNP/ATP 복합체의 공초점 이미지를 나타내고, f는 ATP와 복합체를 이루는 대조군 분자(AcNP, MNP2) 및 MNP 수용액의 사진을 나타내고, g는 MNP/ADP 및 MNP/ATP 복합체의 상호작용 에너지를 나타내고, h 및 i는 MNP/ADP 및 MNP/ATP 복합체의 결합 구성을 나타낸다. 또한, j는 NBD 결합된 MNP(MNP-NBD), MNP-NBD/ADP 복합체, MNP-NBD/ATP 복합체 및 150 μ M의 최종 농도로 ATP가 첨가된 후의 MNP-NBD/ADP 복합체의 형광 스펙트럼을 나타내며, k는 200 μ M 농도에서 MNP/ADP 복합체의 수용액에 ATP 첨가(최종 농도 200 μ M까지)를 나타내고, l은 초기 및 1000 ns 후의 MNP/ADP 복합체 조립 용액에 첨가된 ATP의 구성을 나타내며, m은 MNP/ADP 복합체 나노 입자들에 첨가된 ATP의 방사형 수 밀도를 나타낸다.

도 6의 a는 MNP 자체, b는 MNP-NBD 자체의 TEM 이미지를 나타낸다.

도 7은 대조군 분자(AcNP)의 자가 조립 동작을 나타낸 도로서, 구체적으로 a는 200 μ M에서 AcNP 및 AcNP/ADP 복합체의 사진, b는 200 μ M에서 AcNP/ATP의 TEM 이미지를 나타낸 도이다.

도 8은 40 ns 후의 MNP/ADP 복합체(a) 및 MNP/ATP 복합체(d)의 최종 구성을 나타내고, b와 c는 MNP/ADP 복합체

의 방사형 분포 함수, e와 f는 MNP/ATP 복합체의 방사형 분포 함수를 나타낸다.

도 9의 a는 MNP/ADP 복합체 및 MNP/ATP 복합체에 대한 알기닌, 그룹 및 티민 그룹 간의 방사형 분포 함수($g(r)$)를 나타내며, b는 MNP/ADP 복합체 에 대한 알기닌-티민 그룹의 결합 구성을 나타낸 도이다.

도 10의 a는 500 ns 후 MNP/ADP 복합체의 조립을 나타내고, b는 MNP/ATP 복합체의 조립을 나타내고, c는 MNP/ADP 복합체 및 MNP/ATP에 대한 알기닌 그룹과 물 간의 방사형 분포 함수($g(r)$)를 나타낸 도이다.

도 11의 a는 MNP/ADP 복합체 나노 입자의 500 ns 후 스냅샷을 나타내고, b는 방사형 수밀도를 나타내며, c는 2000 ns 후 MNP/ADP-ATP 복합체 나노 입자 시스템의 스냅샷을 나타낸 도이다.

도 12의 a는 ATP의 포스페이트 그룹(Q), 리보오스(N) 및 아데닌(S) 그룹과 MNP의 알기닌 그룹 간의 방사형 분포 함수($g(r)$)를 나타내고, b는 MNP/ADP 및 MNP/ATP의 방사형 분포 함수($g(r)$)를 나타낸 도이다.

도 13의 a는 50 μ M에서 2시간 동안 mitotracker deep red와 함께 MNP-NBD/ADP 복합체의 미토콘드리아 내 국소화를 나타내고, b는 대조군 및 MNP/ADP 복합체를 사용하여 미토콘드리아 분리의 ATP 고갈 분석 결과를 나타내며, c는 25 μ M에서 2일 배양 후 HS-5(정상) 및 HeLa(암) 세포에 대한 MNP/ADP 복합체 및 HeLa 세포에 대한 AcNP/ADP 및 MNP2/ADP 복합체의 세포 독성을 나타낸 도이다. 또한 d는 대조군 세포 및 e는 50 μ M에서 4시간 동안 MNP/ADP 복합체로 처리된 세포의 TEM 이미지를 나타낸 도이다.

도 14는 세포 내 이입 억제제의 존재 및 상이한 온도 하에서 MNP-NBD/ADP 복합체로 처리된 HeLa 세포의 CLSM 이미지를 나타낸 도로서, a는 4°C, b는 37°C에서 배양한 것이고, c는 수크로오스, d는 M β CD, e는 아밀로라이드 처리한 경우이며, f는 세포 내 이입 억제제 존재 및 낮은 온도에서 MNP-NBD/ADP 복합체의 세포 내 이입에 대한 FACS 데이터를 나타낸 도이다.

도 15는 2일 간 배양에 따른 HeLa(암) 및 HS-5(정상) 세포주에 대한 MNP의 세포 독성을 나타낸 도이다.

도 16의 a는 AcNP 및 AcNP/ADP 복합체, b는 MNP-NBD 및 MNP-NBD/ADP 복합체, c는 MNP2/ADP 복합체의 HeLa 세포주에 대해 2일 간 배양 시 세포 독성을 나타낸 도이다.

도 17의 a는 MitoSOX로부터의 형광에 의해 미토콘드리아 내 ROS 생성, b는 50 μ M에서 2시간 동안 MNP/ADP의 TMRM 염색에 의한 미토콘드리아 막 탈분극을 가시화한 도이다. 또한, c는 20 μ M에서 24시간 배양에 따른 MNP/ADP 복합체가 처리된 HeLa 세포들에 대한 FACS 분석을 나타내고, d는 아무것도 처리되지 않거나, ADP, MNP 또는 MNP/ADP 복합체가 12시간 동안 처리된 HeLa 세포의 전체 세포 분획에서 사이토크롬 C, 카스파제 9, 카스파제 3 및 β -액틴의 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 도이다.

도 18의 a는 대조군(처리되지 않은 HeLa 세포), b는 MNP 및 20 μ M에서 24시간 동안 처리된 HeLa 세포의 FACS 데이터를 나타낸 도이다.

도 19는 a는 ADP, b는 ATP, c는MNP의 AA(All-atom) 및 CG(coarse-grained) 모델을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0133] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0134] 실시예

[0135] **실시예 1. 새로운 미토콘드리아-표적화 뉴클레오펙티드(Mitochondria-targeting nucleopeptide: MNP)의 고안 및 합성**

[0136] 미토콘드리아-표적화 뉴클레오펙티드에 의해 유발되는 미토콘드리아 내부의 초분자 집합체 형성으로 인한 암 세포의 물리적 손상 및 ATP 격리에 의한 새로운 암 치료법을 개발하고자 하였다(도 1).

[0137] 이에, 하기 성분들을 특징으로 하는 분자로서 MNP를 고안하고 합성하였다: i) 반복적인 아미노산의 D, L-조합으로 구성된 MPPs (mitochondria-penetrating peptides, rFxrFxrFx)(r = D-알기닌(D-arginine) 및 Fx = L-사이클로헥실알라닌(L-cyclohexylalanine)); ii) MNP의 자가 조립 능력을 증진시키는 부분인 FF (F = L-페닐알라닌(L-phenylalanine)) 및 iii) 교대로 아데닌과 티민 사이의 염기-짝 상호작용 및 음으로 하전된 트리포스페이트 그룹과 알기닌의 양으로 하전된 구아니딘 그룹 간의 정전기적 인력을 통해 ATP와 상호작용 하기 위한 펩티드의 N-말단의 티민(Thy) 및 rrFxrFxrFx의 D-알기닌. 대체로, MNP는 하기의 구조를 가진다: Thy-rrFxrFxrFxFF. 대조

군 분자로서, N-말단에서 티민 대신 아세틸 그룹이 존재하는 아세틸-보호된 펩티드(AcNP, Ac-rrFxrFxrFxFF) 및 두 개의 페닐알라닌이 제거된 MNP(MNP2, Thy-rrFxrFxrFx)이 합성되었다. 다양한 펩티드들이 고체상 펩티드 합성(solid-phase peptide synthesis: SPPS)를 통해 합성된 후에 고성능 액체 크로마토그래피 및 질량 분석법으로 정제되고 특징화되었다(도 2 내지 4).

[0138] 실시예 2. MNP와 ADP 또는 ATP 간의 상호작용 및 자가 조립 능력의 확인

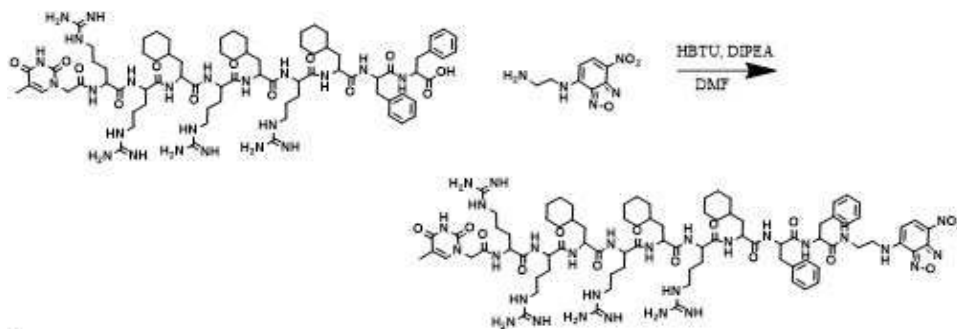
[0139] 먼저, MNP와 ADP 또는 ATP 간의 상호작용 및 자가 조립 능력을 조사하였다.

[0140] 그 결과, MNP 용액은 그 자체로 깨끗하고 투명했으며, 투과전자현미경(transmission electron microscopy: TEM)에 따르면, 200 μ M 농도에서 어떠한 구조도 형성하지 않았다. 대조적으로, MNP/ADP 복합체는 동일한 농도에서 거의 투명하게 유지하며 매우 작은 크기의 불규칙한 나노 구조를 형성하였다(도 5a 및 6a). 하지만, MNP 용액은 ATP의 첨가에 따라 즉시 탁해져서, MNP/ATP 복합체 및 침전물이 생성되었다. 도 5b 및 5c에서 알 수 있듯이, 형성된 나노 구조는 투과전자현미경(TEM) 및 주사전자현미경(scanning electron microscopy: SEM)에 따라 거의 500 nm 크기의 미셀 구조로 구성됨을 알 수 있었다. 이것은 또한, UV-Vis 분광법을 이용하여 투과율에 의해 결정된 용액의 탁도를 통해 확인되었다. 도 5d의 데이터는 ATP의 첨가에 따라 280 nm에서의 투과도가 유의미하게 감소됨을 나타내며, 이는 MNP/ATP 복합체의 용액이 MNP 단독 용액 및 MNP/ADP 복합체의 용액보다 매우 탁하다는 것을 나타낸다.

[0141] 실시예 3. 형광단을 이용한 나노 구조의 형성 확인

[0142] 실시예 2의 용액 내 나노 구조의 형성을 확인하기 위해, 4-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD) 형광단을 아미드 결합 형성을 통해 펩티드 C-말단에 결합시킨 다음, 하기 반응식 1에 기재된 합성 공정을 수행하였다:

[0143] [반응식 1]



[0144] 그 결과, 수용액 내 200 μ M 농도에서 MNP-NBD/ATP 복합체에 대한 공초점 레이저 스캐닝 현미경에 의해 녹색 형광에 의해 특징화된 미셀 구조가 관찰되었다(도 5e). 미셀들은 SEM 및 TEM에 의해 작은 사이즈(~500 nm)를 가진 것으로 관찰되었다. 도 6b에서 알 수 있듯이, MNP-NBD는 수용액에서 작은 크기의 구조를 형성하였다. 하지만, 대조군 분자 AcNP 용액은 그 자체로, 심지어 ADP 존재 하에서도 투명하게 유지되었다(도 7a). ATP의 존재 하에서, 도 7a 및 7b에서 나타나는 바와 같이 약 50 nm 크기의 미셀 구조를 포함하며 AcNP/ATP 복합체 용액은 탁해졌다. 또한, MNP2는 소수성 부위가 없기 때문에, 이 종의 용액은 ATP 존재 하에서 탁해지지 않았다(도 5f). 이러한 결과들은 MNP의 티민 그룹 및 2개의 페닐알라닌 부위가 ATP와의 선택적 상호작용에 중요하다는 것을 나타낸다.

[0146] 실시예 4. MNP/ADP 및 MNP/ATP 복합체들의 서로 다른 결합 동작 및 상호작용 부위의 확인

[0147] MNP/ADP 및 MNP/ATP 복합체들의 다른 결합 동작을 탐색하기 위해, 관련된 상호작용 부위 및 에너지를 계산적으로 조사하였다(하기 참조예 4 참조). 먼저, MNP/ADP 및 MNP/ATP 복합체 시스템 각각에 대한 2개의 시스템을 모델링함으로써 상호작용 부위 및 결합 구조를 조사하고, 분자 역학(AAMD) 연구를 수행하였다(도 8). 상호작용 부위 및 결합 구조는 방사형 분포 함수(radial distribution function: RDF)를 이용하여 분석되었다. MNP의 티민과 알기닌 그룹 및 ADP 및 ATP의 아데닌, 리보오스, 포스페이트 그룹 간의 주요 상호작용 부위를 동정하였다.

[0148] 그 결과, MNP/ADP 복합체에서 ADP의 다이포스페이트 그룹은 MNP의 알기닌 그룹과 강하게 상호작용하고, ADP의 아데닌 그룹과 MNP의 티민 그룹은 약하게 상호작용하였다. MNP/ATP 복합체에서, 티민 그룹(MNP)과 아데닌 그룹(ATP) 사이와 알기닌 그룹(MNP)과 트리포스페이트 그룹(ATP) 사이에 강한 상호작용이 존재하는 것으로 결정되었다. 특히, MNP/ATP 복합체에서 티민 그룹은 수소 결합과 π - π 상호작용을 통해 아데닌 그룹과 상호작용하는 것

으로 결정되었다.

[0149] 또한, RDF 분석을 통해 상기 상호작용 동작에 대해 조사하였다.

[0150] 도 9a에 나타난 바에 의하면, 티민과 알기닌 그룹 간의 상호작용은 MNP/ADP 복합체보다 MNP/ATP 복합체에서 더 강하였다. MNP가 ADP와 상호작용할 때, 4개 중 3개의 알기닌 그룹이 ADP의 다이포스페이트 그룹과 상호작용하는 반면, 4번째 알기닌 그룹은 티민 그룹과 양이온- π 상호작용에 관여하였고, 이 상호작용은 티민과 아데닌 그룹 간의 상호작용을 억제하였다(도 9b). MNP/ATP 복합체에서, MNP의 4개의 알기닌 그룹 모두 ATP의 트리포스페이트 그룹과 상호작용하였고, 결국, 이러한 그룹들은 티민과 아데닌 간의 상호작용을 방해하지 않았다. 도 5g에 나타난 바와 같이, 서로 다른 결합 동작이 주어지면, MNP는 ADP(-578.2 kJ/mol)에 비해 ATP(-637.5 kJ/mol)와 더 강하게 상호작용하였다. 도 5h 및 5i는 매우 안정한 MNP/ADP 복합체 및 MNP/ATP 복합체들의 결합 구조 각각을 나타낸다. 이러한 구조에서, MNP/ATP 복합체 및 MNP/ADP 복합체의 상호작용 부위는 각각 티민-아데닌/알기닌-트리포스페이트 및 알기닌-다이포스페이트이다.

[0151] **실시예 5. MNP/ADP 복합체 및 MNP/ATP 복합체의 자가 조립 구조의 비교**

[0152] 상기 실시예 4의 결과를 바탕으로, CGMD 시뮬레이션을 통해 MNP/ADP 복합체 및 MNP/ATP 복합체의 자가 조립된 구조들을 비교하였다. 먼저, MNP/ADP 및 MNP/ATP 복합체들의 자가 조립 과정을 확인하였다(도 10).

[0153] 그 결과, MNP의 알기닌 그룹이 MNP/ADP 복합체 조립의 표면에 노출됨으로써 발생된 정전기적 반발력 때문에, 대응 부분에 있어서, MNP/ADP 복합체들의 조립이 MNP/ATP 복합체에 비해 작고 느리게 조립됨을 알 수 있었다.

[0154] **실시예 6. ATP 첨가가 자가 조립 과정에 미치는 영향**

[0155] ATP의 첨가가 자가 조립 과정에 미치는 영향을 조사하기 위해, ATP를 MNP/ADP 복합체에 첨가시켜, MNP/ADP-ATP 복합체를 형성하였다. 먼저, MNP와 ATP 간의 상호작용이 MNP-NBD를 이용한 형광 분광법에 의해 조사되었다.

[0156] 그 결과, MNP-NBD-ATP 복합체는 MNP-NBD 및 MNP-NBD/ADP 복합체에 비해, 현저하게 감소된 형광 세기를 나타냈다(도 5j). MNP-NBD/ADP-ATP 복합체의 형광 스펙트럼은 MNP-NBD/ATP 복합체의 스펙트럼과 매우 유사하게 변화하였고, 이는 ATP가 MNP/ADP 복합체를 응집시켰음을 나타낸다. 또한, 도 1k에 나타난 바와 같이, ATP와 MNP/ADP 복합체의 형태와 크기는 MNP/ATP 복합체의 형태와 크기와 유사하였다. 이러한 결과는 MNP는 ATP에 높은 선택성을 가지고 있으며, 심지어, 미리 형성된 MNP/ADP 복합체에서도 높은 선택성을 가지고 있다는 것을 나타낸다.

[0157] 또한, MNP/ADP 복합체와 ATP의 자가 조립 동작은 시뮬레이션을 통해 연구되었다.

[0158] ATP 및 MNP의 상호작용은 작은 MNP/ADP 복합체 입자를 크게 자라도록 유도하였다(도 5l).

[0159] 또한, MNP/ADP 복합체 나노 입자의 응집 동작을 조사하기 위해, 10 nm 크기의 MNP/ADP 복합체 나노 입자를 모델링하였고, 7 nm 떨어진 곳에 상기 나노 입자 2개를 위치시켰다(도 11). ATP 첨가 후, 2개의 MNP/ADP 복합체 나노 입자들의 응집 동작을 모델링하였다.

[0160] 그 결과, 도 11c에 따르면, 2개의 나노 입자들은 MNP 및 ATP 간의 상호작용에 의해 흡착되었다. 2개의 나노 입자들의 방사형 수 밀도 값은 ATP는 MNP/ADP 나노 입자들의 표면에 흡착되었음을 나타낸다(도 5m). 전반적으로, ATP는 분리된 MNP/ADP 복합체 나노 입자들에 흡착되었고, 기존의 경쟁적 결합 사건과 같이 ADP를 대체하지 않았다. 2개의 나노 입자들은 서로 접근하였고, ATP의 트리포스페이트 그룹과 MNP의 알기닌 그룹 간의 정전기적 상호작용 때문에 응집이 이루어졌다(도 12a).

[0161] **실시예 7. MNP/ADP 복합체의 항암 효능의 확인**

[0162] **(1) MNP/ADP의 세포 내 국소화 확인**

[0163] MNP/ADP 복합체 및 ATP의 자가 조립 및 결합 동작을 확인한 후에, MNP/ADP 복합체의 항암 효능이 in vitro 실험에서 테스트되었다. 특히, MNP-NBD는 MNP/ADP의 세포 내 국소화를 연구하는 데 사용되었다.

[0164] 그 결과, 도 13a로부터 알 수 있듯이, MNP-NBD/ADP 복합체의 강한 녹색 형광은 국소화되었고, 진한 빨강의 mitotracker와 겹쳤다. 이러한 관찰은 MNP/ADP 복합체가 세포들에 의해 내재화되었고, MPPs를 통해 미토콘드리아 내부에 축적되었다는 것을 나타낸다.

[0165] **(2) MNP-NBD/ADP 복합체의 세포 내 섭취 메커니즘의 확인**

[0166] 다음으로, 공초점 및 형광-활성화 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting: FACS) 분석들을 통해 MNP-

NBD/ADP 복합체의 세포 내 섭취 메커니즘을 조사하였다.

[0167] 그 결과, 도 14의 데이터는 에너지 독립적 세포 내 섭취 과정을 통해 4℃ 및 37℃에서 2시간 배양 된 HeLa 세포에서 MNP-NBD/ADP 복합체가 내재화되었음을 나타낸다.

[0168] 특히, HeLa 세포들은 세포 내 섭취 방식을 조사하기 위해, methyl-β-cyclodextrin(M-β-CD, 포낭-의존성 세포 내 섭취의 억제제), 수크로오스(클라트린-매개 세포 내 섭취) 및 아밀로라이드(미소 세포 내 섭취)가 처리되었다.

[0169] 상기 억제제들의 존재 하에서 얻어진 MNP-NBD/ADP에 대한 형광 강도 및 내재화 데이터는 그들의 부재 시 얻어진 데이터와 유사하였고, 이는 MNP-NBD/ADP의 세포 내재화가 에너지 의존적 세포 내 섭취에 따르지 않음을 나타낸다.

[0170] (3) MNP-NBD/ADP 복합체의 ATP 격리 능력의 확인

[0171] MNP/ADP의 미토콘드리아 국소화를 확인한 후, 미토콘드리아 및 세포 내 ATP 격리 능력을 확인하였다. ATP 결정 분석은 세포로부터 분리된 미토콘드리아 및 세포질로 수행되었다.

[0172] 그 결과, 처리되지 않은 세포로부터 분리된 미토콘드리아에 비하여, MNP/ADP 복합체로 처리된 세포들로부터 분리된 미토콘드리아는 ATP 농도가 급격하게 감소하여 ATP 고갈로 이어지는 ATP 격리를 나타냈다(도 13b).

[0173] (4) MNP 및 MNP/ADP 복합체의 세포 독성 확인

[0174] MNP의 독성은 정상 골수 섬유아 세포주(HS-5) 및 자궁경부암 세포주(HeLa)에서 조사되었다.

[0175] 그 결과, 고도로 양전하를 띠는 MNP 단독은 HeLa 세포와 관련하여 HS-5에 대해 유의하게 다른 독성을 나타내지 못했다(도 15).

[0176] 그 후, 두 개의 음으로 하전된 포스페이트 그룹을 가진 ADP가 첨가되어, MNP의 양 전하를 차폐함으로써 MNP/ADP 복합체가 형성되었다.

[0177] 그 결과, 25 μM의 농도에서, MNP/ADP 복합체는 약 80%의 HeLa 세포들을 죽였지만, HS-5 세포들은 그보다 적은 20%가 죽었고, 이는 정상 세포에 비해 암 세포들을 선택적으로 억제한다는 것을 나타낸다. 또한, MNP/ADP의 IC₅₀(the half inhibitory maximum concentration)은 HeLa 세포에서 약 15 μM였고, HS-5 세포에서 50 μM였다(도 13c). 대조군 화합물은 AcNP 및 AcNP/ADP 복합체는 HeLa 세포에 대해 25 μM의 농도에서 거의 독성을 나타내지 않았다(도 16a). 또한, MNP2 복합체도 25 μM의 농도에서 거의 독성을 나타내지 않았고, HeLa 세포들은 200 μM 농도의 MNP2 존재 하에서 여전히 70%의 생존율을 나타냈다(도 16b). 나아가, MNP-NBD 및 MNP-NBD/ADP 복합체들은 HeLa 세포들에 대해 MNP/ADP 복합체와 유사한 독성을 보였다(도 16c). 그러므로, 티민 부위 및 2개의 페닐알라닌 그룹들은 ATP 격리에 중요하고, NBD 접합은 독성에 영향을 주지 않는다.

[0178] (5) MNP/ADP 복합체 처리에 따른 세포 내 ATP 격리의 확인

[0179] 세포 내 ATP 격리를 확인하기 위해, TEM으로 미토콘드리아 형태를 결정하였다.

[0180] 그 결과, 도 13d에서 알 수 있듯이, 처리되지 않은 HeLa 세포들은 화살표로 표시되는 크리스테(cristae)를 갖는 충분히 건강한 미토콘드리아를 나타냈다. 대조적으로, MNP/ADP 복합체가 처리된 HeLa 세포들은 많고 커다란 300 nm에서 1 μm 크기의 세포 내 미셀 구조들(화살표로 표시됨)로 특징화되었다. 또한, 미토콘드리아의 크리스테는 MNP/ADP 복합체가 처리된 후에 관찰되지 않았다(도 13e). 이러한 결과들은 MNP/ADP 복합체가 세포 및 미토콘드리아에 내재화되었고, 이 후 MNP/ADP-ATP 복합체를 형성하고, 거대한 조립체를 형성하였음을 나타낸다.

[0181] (6) MNP/ADP 복합체에 따른 미토콘드리아의 손상 확인

[0182] MNP/ADP 복합체가 미토콘드리아의 손상을 유발했음을 입증하기 위해, 미토콘드리아의 활성산소종(reactive oxygen species: ROS) 형성 및 막 전위 파괴를 조사하였다.

[0183] 그 결과, 미토콘드리아의 과산화물의 지표인 MitoSOX의 적색 형광이 세포들이 MNP/ADP 복합체가 처리된 후에 변화되었다는 사실에 의해 MNP/ADP 복합체는 미토콘드리아의 ROS를 생성시켰음을 알 수 있었다(도 17a).

[0184] 또한, 테트라메틸로다민 메틸 에스테르(tetramethylrhodamine methyl ester: TMRM)은 미토콘드리아의 막 전위 손상의 지표이다.

[0185] MNP/ADP 복합체가 처리된 HeLa 세포들은 그들의 미토콘드리아 막 전위를 잃음으로써, 대조군 샘플의 고휘광 미

토콘드리아와 관련하여, TMRM 형광이 감소되었음이 관찰되었다(도 17b).

[0186] 따라서, 이러한 결과들은 MNP/ADP 복합체가 미토콘드리아 및 세포질에서 ATP를 격리시키고, 미토콘드리아의 손상을 일으킨다는 것을 나타낸다.

[0187] **(7) MNP/ADP 복합체 처리에 따른 세포 사멸의 확인**

[0188] 세포 사멸의 양상은 FACS 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 조사되었다. 아넥신 V/PI(Annexin V/ propidium iodide)는 생존, 세포 사멸 및 괴사 세포와 같은 세포 사멸 단계에 따른 원형질 막 무결성 및 투과성에 의해 세포를 염색하는 데 사용되었다.

[0189] 그 결과, 24시간 배양 후, 처리되지 않은 세포들은 100% 생존한 반면, 82%의 MNP/ADP 복합체가 처리된 HeLa 세포들은 후기 세포 사멸의 특징을 나타냈다(도 17c 및 18a). 또한, MNP 자체는 80%의 후기 세포 사멸을 유발하였다(도 18c).

[0190] **(8) MNP/ADP 복합체 처리에 따른 세포 사멸 메커니즘의 확인**

[0191] 웨스턴 블롯 분석을 통해, MNP 및 MNP/ADP 처리에 의한 세포 사멸의 메커니즘을 조사하였다(도 17d).

[0192] 그 결과, 처리되지 않거나 오직 ADP만 처리된 HeLa 세포들에 비해 MNP 또는 MNP/ADP 복합체가 처리된 HeLa 세포들에서 사이토크롬 c(cytochrome c) 및 카스파제 9(Caspase 9)의 발현량이 증가되었다.

[0193] 이러한 결과들은 MNP/ADP 복합체는 미토콘드리아 내에서 ATP와 반응하고, 미토콘드리아로부터 사이토크롬 c의 방출을 통해 암 세포 사멸을 유발하였음을 나타낸다.

[0194] **참조예**

[0195] **참조예 1. 재료 및 기구**

[0196] **(1) 재료**

[0197] 합성에 포함된 모든 아미노산 유도체(Fmoc-기반 아미노산), 2-클로로-트리틸 클로라이드(2-Chloro-trityl chloride) 수지 및 HBTU(0-benzotrazole-N, N, N', N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphate)는 GL Biochem (Shanghai) Ltd 및 Apexbio(USA)에서 구입하였다. DIPEA(N, N-diisopropylethylamine), NBD-Cl(4-chloro-7-nitro-1,2,3-benzoxadiazole) 및 TFA(trifluoroacetic acid)는 TCI로부터 구입하였다. 아데노신 트리포스페이트 다이소듐 수화물 염(Adenosine triphosphate disodium hydrate salt), tert-부틸 브로모아세테이트(tert-butyl bromoacetate) 및 티민(thymine)은 Alfa aesar에서 얻었고, 아데노신 다이포스페이트 다이소듐 수화물(Adenosine diphosphate disodium hydrate), 티민-1-아세트산은 sigma Aldrich(USA)로부터 얻었다. DMF(Dimethylformamide) 및 에틸렌다이아민(ethylenediamine)은 daejung chemicals 및 metals Co. Ltd로부터 구입하였다. MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 ACROS Organics로부터 얻었다.

[0198] DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), FBS(fetal bovine serum) 및 Hela 및 HS-5 세포 배양용 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin)은 Life technologies에 의해 Gibco으로부터 구입하였다. 미토콘드리아 분리 키트는 Thermo Fisher Scientific로부터 구입하였다(CAT#89874). 미토콘드리아는 제조사로부터 제공된 프로토콜에 따라 분리되었다.

[0199] **(2) 기구**

[0200] 모든 펩티드는 C18 컬럼과 Agilent 1100 HPLC 시스템 및 1220 HPLC 시스템에 의해 정제되었다. 질량 분석법은 MALDI-TOF/TOF(Ultraflex III, Bruker)에 의해 수행되었다. 형광은 F-7000(Hitachi)에 의해 측정되었다. MTT 분석 및 발광 ATP 농도 실험은 다중 모드 마이크로 플레이트 리더기(SpectraMax M5e, Molecular Devices)로부터 얻었다.

[0201] **참조예 2. 펩티드의 합성 및 특징화**

[0202] **(1) 펩티드 합성(고체상 펩티드 합성(solid-phase peptide synthesis: SPPS))**

[0203] 고안된 펩티드들은 Fmoc(flourenylmethoxycarbonyl) 기반 고체상 펩티드 합성법에 의해 합성되었다. 첫 번째 아미노산(Fmoc-phenylalanine)은 2-CTC(2-chloro-trityl chloride) 수지 상에 로딩되었다. 첫 번째 아미노산이 수지에 로딩된 후에 capping 시약(DCM: MeOH: DIPEA = 17: 2: 1)이 수지의 모든 활성 부위들을 보호하기 위해

사용되었다. DMF 내 20% 피페리딘의 용액이 Fmoc 그룹을 제거하기 위해 사용되었고, 다음 Fmoc-보호된 아미노산이 커플링 시약으로서 HBTU를 이용하여 자유 아미노산에 커플링되었다. 각 단계에서, 수지는 DCM과 DMF으로 3회 세척되었다. 그리고, 펩티드 사슬 성장을 위해 절차를 반복하였다. 마지막 커플링(아세틸 그룹, 티민 그룹)들도 동일한 절차로 합성되었다. 펩티드들은 절단 카테일(TFA/Water/triisopropylsilane: TIS, 9.5: 0.5: 0.5 (v/v))로 수지로부터 절단되었고, 차가운 다이에틸 에터 내 침전시켜 얻었다. 침전물을 4,000 rpm에서 3분 간 원심 분리시켰다. 에터 상등액을 따라 내고, 남은 고체를 정제에 사용하였다.

[0204] (2) NBD-NH₂의 합성

[0205] 10 mL의 DCM(dichloromethane) 내 다이-tert-부틸 디카르보네이트(di-tert-butyl decarbonate; 0.38 mL, 1.66 mmol) 용액을 질소 대기 하에서 냉각된 0℃의 15 mL의 DCM 내 에틸렌디아민(ethylenediamine; 1.11 mL, 16.61 mmol)에 적가하였다. 반응 혼합물은 실온에서 15시간 동안 교반되었다. 반응 혼합물은 DCM을 제거하기 위해 진공에서 농축되었다. 혼합물은 DCM으로 3회 추출되었고, 식염수로 세척되었고, 황산나트륨으로 건조되었고, 여과되고, 증발되어 무색의 오일을 얻었다(76% 수율)(¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 1.45 (9H, s), 2.70 (2H, t), 3.14-3.25 (2H, m), 4.70 (1H, brs)).

[0206] 1 mL의 DCM 내 NBD-Cl(300 mg, 1.503 mmol)는 실온에서 15시간 내지 20시간 동안 2 mL의 DCM 내 Boc-아민(Boc-amine; 240.8 mg, 1.503 mmol) 및 트리에틸아민(230 μL, 1.653 mmol)에 적가되었다. 반응은 TLC 추적으로 모니터링하여 출발 물질이 사라질 때까지 교반되었다. 반응이 완료된 후, 반응 혼합물은 DCM으로 추출하고, 식염수로 세척하였고, 3회 반복하였다. 유기층을 MgSO₄로 건조하고, 여과하고, 감압 농축하였다. 그 후, 조물질을 DCM(5 mL)에 용해시켰고, TFA(trifluoroacetic)를 조용액에 첨가하였다. 반응은 실온에서 2시간동안 교반되었다. 반응 후, 용액(DCM, TFA)은 증발시켜 제거하여, 약 70% 수율의 갈색 생성물을 얻었다.

[0207] (3) NBD 표지된 MNP(mitochondria-penetrating nucleopeptide)의 합성

[0208] NBD 염료가 결합된 미토콘드리아-침투성 뉴클레오펙티드(mitochondria-penetrating nucleopeptide: MNP-NBD)를 만들기 위해, 합성된 NBD-아민(1.4 mg, 6.4 x 10⁻³ mmol)이 DMF 1 mL 용액 내 MNP (10 mg, 6.4 x 10⁻³ mmol), HBTU (2.4 mg, 6.4 x 10⁻³ mmol) 및 DiPEA (2.2 μL, 1.3 x 10⁻² mmol)에 첨가되었고, 실온에서 밤새 교반되었다. 반응 후, 조 혼합물은 480 nm UV 흡광도로 HPLC(water/acetonitrile)를 통해 정제되었다. 질량은 MALDI-TOF/TOF 분광법으로 특성화되었다.

[0209] 참조예 3. TEM 샘플의 제조

[0210] 투과전자현미경(Transmission electron microscopy: TEM) 이미지들은 JEOL 및 morganini 268에 의해 JEM-1400으로 얻었다. 이미지들은 120 kV의 가속 전압에서 획득되었다. 모든 샘플들(5 μL)은 formvar/carbon 코팅된 300 메쉬 구리 그리드에 배치되었다. 5분 후, 여과지를 사용하여 그리드의 가장자리로부터 샘플들을 부드럽게 흡수하였다. 음성 염색을 위하여, 2% v/v 우라닐 아세테이트(uranyl acetate: UA) 용액이 샘플이 로딩된 그리드에 적가되었다. 5분 후, 염색된 용액은 여과지를 사용하여 그리드의 가장자리로부터 흡수하였다.

[0211] 세포 TEM 샘플 준비를 위해, HeLa 세포들을 시딩하고, 24-웰 플레이트(1 mL의 혈청 포함 배지 내 50,000개 세포)에 위치한 15-mm 직경의 manox coverslips (Nalge Nunc International) 상에서 실험 전 24시간동안 배양하였다. 배지는 혈청 포함 배지 내 모든 샘플들로 교체되었고, 72시간 동안 배양되었다. 모든 샘플들이 포함되어 있는 배지는 버리고, 세포들은 0.1 M 인산 나트륨 완충액(pH 7.0)으로 완전히 3회 세척하였다. 세포들은 그 후 0.05 M 인산 나트륨 완충액(pH 7.0) 내 2% 글루트알데히드와 5% 수크로오스로 30분 간 고정되었고, 5% 수크로오스를 포함하는 0.05 M 인산 나트륨 완충액(pH 7.0)으로 30분 간 3회 세척하였다. 세포들은 0.05 M 인산 나트륨 완충액(pH 7.0) 내 1% 오스뮴 테트라옥사이드와 5% 수크로오스로 1시간 동안 후고정시켰고, 그 후 3차 증류된 물로 3회 행구었다. 이 후, 등급이 매겨진 아세톤 시리즈(20% 단계)로 탈수되고, 에폭시 수지에 묻혔다. 수지를 80℃에서 12시간 동안 중합하였다. 초박형 섹션(100 nm) CR-X 울트라마이크로톰으로 얻었고, 그 후, 120 kV에서 작동시켜 JEM-1400으로 이미지를 얻었다. 데이터는 Gatan Digital Micrograph program으로 분석하였다.

[0212] 참조예 4. 시뮬레이션 상세 내용

[0213] (1) 총-원자 분자 역학(All-atom molecular dynamics: AAMD) 및 밀도 기능 이론(density functional theory: DFT)

- [0214] MNP/ADP 및 MNP/ATP의 상호작용 부위 및 상호작용 에너지를 조사하기 위해, 총-원자 분자 역학(All-atom molecular dynamics: AAMD) 시뮬레이션 및 밀도 기능 이론(density functional theory: DFT) 계산이 각각 수행되었다. AAMD 시뮬레이션에서, 방사형 분포 함수(radial distribution function: RDF) 분석을 비교함으로써, ADP-MNP 및 ATP-MNP에 대한 주요 상호작용 부위를 확인하고, 결합 구조를 선택하였다.
- [0215] AAMD 시뮬레이션은 GROMACS 5.0.6 프로그램을 이용하여 CHARMM27 forcefields로 수행하였다. MNP/ADP 및 MNP/ATP 시스템에 대한 초기 모델 시스템을 구축하기 위해, 3 MNP/3 ADP 및 4 MNP/3 ATP 각각을 TIP 3P water model이 있는 $5 \times 5 \times 5 \text{ nm}^3$ 박스에 무작위로 쌓았다. 전하 중화는 반대 이온의 영향을 최소화하기 위해 MNP 분자에 의해 통제되었다. 등온-등압(즉, NPT) 시뮬레이션은 1 fs의 시간 단계와 함께 40 ns 동안 298K 및 1 atm에서 수행되었고, 마지막 5 ns 궤도는 분석에 이용되었다. 온도 및 압력은 속도-재조정 온도조절기 및 Berendsen 압력조절기에 의해 통제되었다.
- [0216] MNP-ADP 및 MNP-ATP의 상호작용 에너지는 DFT 계산에 의해 계산되었다. AAMD 시뮬레이션에 기초하여, MNP/ADP 및 MNP/ATP의 결합 구성들은 RDF의 첫 번째 최소 거리(즉, 0.2 nm)보다 적은 MNP/ADP 및 MNP/ATP의 거리에 따라 분류함으로써 선택되었다(도 12b). DFT 계산은 Perdew-Burke-Ernzerhof (GGA-PBE) 교환 상관 함수(exchange-correlation functional)를 사용하여, 표준화된 기울기 근사와 함께 DMol³ 프로그램을 이용하여 수행되었다. Tkatchenko-and Scheffler (TS) scheme이 반데르발스 상호작용을 정확하게 설명하기 위해 적용되었다. 물 환경은 물의 유전 상수($\epsilon=78.3$)로 도체형 스크리닝 모델(conductor-like screening model: COSMO) 방법을 적용함으로써 설명되었다. 상호작용 에너지(ΔE_{int})는 하기 수학적 1에 의해 계산되었다:
- [0217] [수학적 1]
- [0218]
$$\Delta E_{\text{int}} = (E_{\text{tot}} - E_{\text{MNP}} - E_{\text{X}}) / n$$
- [0219] 상기 E_{tot} 은 ADP-MNP 또는 ATP-MNP 짝의 총 에너지이며; E_{MNP} 및 E_{X} 는 각각 MNP 분자의 총 에너지 및 $x = \text{ADP}$ 또는 ATP 이다.
- [0220] **(2) 거친 입자 분자 역학(Coarse-grained molecular dynamics: CGMD)**
- [0221] ADP, ATP 및 MNP의 자가 조립 구조를 관찰하기 위해, 거친 입자 분자 역학(Coarse-grained molecular dynamics: CGMD) 시뮬레이션을 GROMACS 5.0.6 프로그램을 이용한 MARTINI forcefield로 수행되었다. ADP, ATP 및 MNP 분자들은 모든 분자 구조를 유지하기 위해 MARTINI scheme을 기반으로 모델링되었다(도 19). MNP/ADP 및 MNP/ATP 복합체들의 자가조립 과정을 관찰하기 위해, 2개의 시스템이 구축되었다. 첫 번째 시스템은 50개의 MNP/ADP 및 50개의 MNP/ATP 쌍을 각각 $20 \times 20 \times 20 \text{ nm}^3$ 의 입방 상자 시스템에 무작위로 쌓으며, 실험적 농도(즉, 200 μM)를 고려하여 구축하였다. 298K 및 1 atm에서 NPT 시뮬레이션이 500 ns 간 수행되었고, 마지막 50 ns 궤적은 분석에 사용되었다. 두 번째로, 195개의 ADP-MNP 쌍을 포함하는 10 nm 직경의 MNP/ADP 나노 입자를 $20 \times 20 \times 20 \text{ nm}^3$ 에 위치시켰고, 500 ns 간 이완시켰다(도 10). 평형화된 MNP/ADP 나노 입자를 이용하여, $35 \times 35 \times 35 \text{ nm}^3$ 입방 상자에 2개의 MNP/ADP 나노 입자들 및 390개의 ATP 분자들을 구축하였고, NPT 시뮬레이션은 298K 및 1 atm에서 2000 ns동안 수행되었다. 모든 CGMD 시뮬레이션 동안, NPT 시뮬레이션은 10 fs의 시간 단계로 수행되었다. 온도 및 압력은 각각 속도 재조정 온도조절기(velocity-rescaling thermostat) 및 Parrinello-Rahman 압력 조절기에 의해 유지되었다.
- [0222] **참조예 5. 세포 배양 및 MTT 분석**
- [0223] HeLa 및 HS-5 세포들은 American-type Culture Collection (ATCC, USA)로부터 구입하였다. HeLa 및 HS-5 세포들은 10% v/v FBS(fetal bovine serum), 100 U/mL 페니실린 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's medium)에서 배양되었다. 모든 세포들은 5% CO₂의 습한 대기 및 37°C에서 배양되었다. MTT 분석을 위해, 세포들은 96-웰 플레이트에서 웰당 5×10^3 세포수의 밀도로 시딩되었다. 24시간 시딩 후, 일련의 농도(5가지 농도 및 대조군)의 샘플 용액들을 각 웰에 첨가하였다. 10 μL MTT 용액(5 mg/mL)을 각 웰에 첨가하였고, 37°C에서 2일 간 배양하였고, 추가로 4시간 동안 배양한 후, 100 μL 의 SDS-HCl 용액을 환원 반응을 중지시키기 위해 첨가하였고, 보라색 포르마잔(formazan)을 용해시켰다. 595 nm에서 각 웰의 흡광도는 다중모드 마이크로플레이트 리더에 의해 측정되었다. 독성 분석은 3회 수행되었고, 3회의 측정의 평균 값

을 얻었다.

[0224] **참조예 6. HeLa 세포들의 CLSM 이미지**

[0225] 공초점 레이저 스캐닝 현미경(Confocal laser scanning microscopy: CLSM) 이미지는 ZIESS의 LSM 780 및 880으로 얻었다. 1×10^4 밀도의 HeLa 세포는 세포 내 이입 실험을 위해 8 well Lab-tek II chambered coverglass (Nunc) 상에 시딩되었고, 1.5×10^5 는 국소화 및 시간 의존적 실험을 위해 3.5 cm의 공초점 접시 상에 시딩되었다. 세포 배양기에서 24시간 동안 HeLa 세포들을 성장시킨 후에, 설계된 농도의 MNP-NBD/ADP 또는 MNP/ADP 복합체들을 배지와 함께 세포에 첨가하였다. 설계된 시간이 지난 후, HeLa 세포들을 3회 동안 배지로 세척하였다. Mitotracker deep red는 $1 \mu\text{M}$ 농도에서 10분 간 미토콘드리아를 염색하기 위해 사용되었고, 완성된 배지로 세포들을 세척하고, 즉시 CLSM을 위해 배지에서 세포들을 유지하였다. 시간 의존적 실험을 위해, 먼저, 준비된 $50 \mu\text{M}$ MNP-NBD/ADP 복합체를 배지와 함께 첨가하기 전에 이미지를 촬영하였다. 10분 마다, 동일한 레이저 강도로 공초점 이미지를 촬영하고, 파워를 얻었다. 세포 내 이입 메커니즘 실험을 위해, 먼저, 서로 다른 세포 내 이입 억제제로서, 수크로오스(400 mM)를 30분간, 아밀로이드(3 mM)를 15분 간 및 $\text{M}\beta\text{CD}$ (10 mM)를 30분 간 미리 배양하였고, 이 후 $50 \mu\text{M}$ 의 MNP-NBD/ADP 복합체를 공초점 접시에 첨가하였다. MNP-NBD/ADP 복합체와 함께 억제제를 2시간 동안 추가로 공배양한 후, 배양 배지를 제거하고, 세포들을 3회 세척하였다.

[0226] MitoSOX 및 TMRM 연구를 위하여, HeLa 세포들을 DMEM 배지 내 90% 합류로 8 well Lab Tek II 챔버 커버글래스 상에 시딩하였다. $50 \mu\text{M}$ 의 MNP/ADP 복합체와 배지를 2시간 동안 배양 후, 세포 배양 배지는 제조사(MitoSox, M36008 및 TMRM, T668)의 프로토콜에 따라 부착 세포들을 떼기 위해, $5 \mu\text{M}$ 의 MitoSox 시약 작업 용액 및 $1 \mu\text{M}$ 의 TMRM(Tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate)을 포함하는 배지로 교체되었다. 그 후, 세포들은 37°C 에서 10분 간 배양되었고, 3회 세척되었다.

[0227] **참조예 7. FACS 분석**

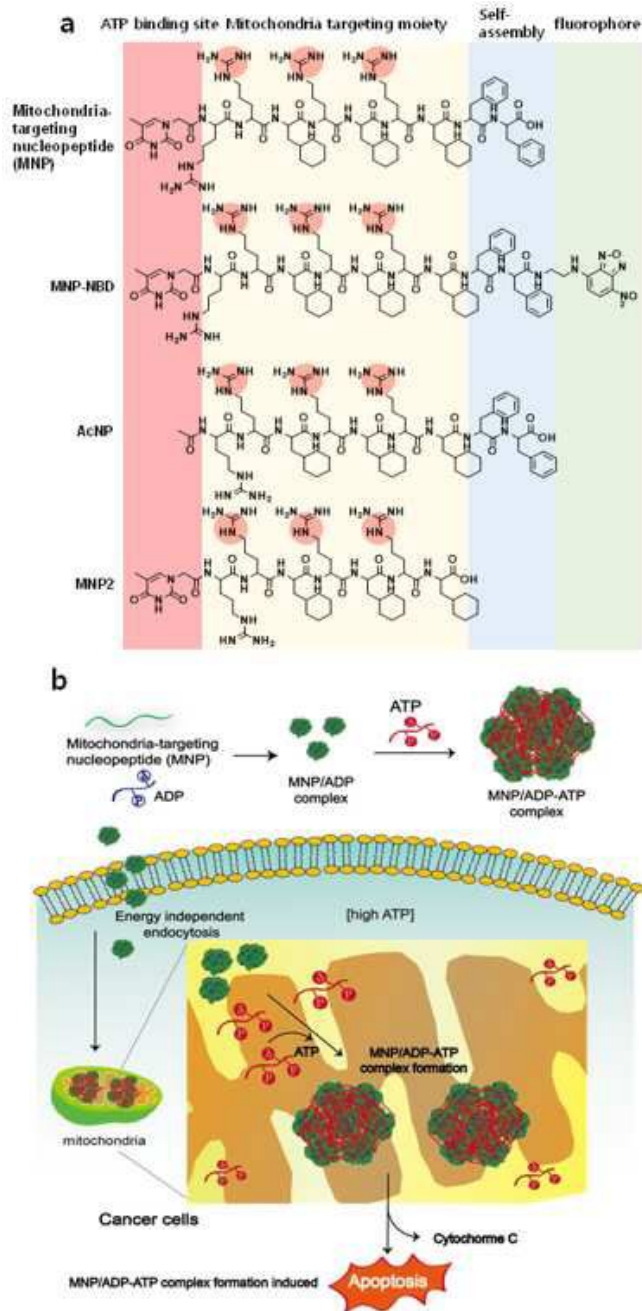
[0228] 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 첨가된 DMEM(Life Technologies) 내 HeLa 세포들(2×10^5 cells/well)은 5% CO_2 및 37°C 조건 하 6-웰 플레이트에서 밤새 배양되었다. 그 후, 세포들은 MNP($20 \mu\text{M}$) 또는 MNP/ADP 복합체($20 \mu\text{M}$)로 24시간 동안 처리되었다. 세포들을 세척한 후에, 트립신 처리하고, 원심 분리하여 수집하였다. 1X 아넥신 결합 완충액으로 세척한 후에, 세포들은 $5 \mu\text{L}$ 의 PI(Propidium iodide)(재고 농도는 $50 \mu\text{g/mL}$ 였음) 및 $5 \mu\text{L}$ 의 아넥신 V(재고 농도는 $200 \mu\text{g/mL}$ 였음)를 포함하는 $100 \mu\text{L}$ 의 1X 아넥신 결합 완충액 용액과 37°C 에서 15분 간 배양되었다. 추가로 $400 \mu\text{L}$ 의 1X 아넥신 결합 완충액을 세포에 첨가한 후, 530 및 610 nm에서 방출 필터를 이용하여 BD FACSVerser 유세포 분석기로 분석하였다.

[0229] **참조예 8. 웨스턴 블롯 분석**

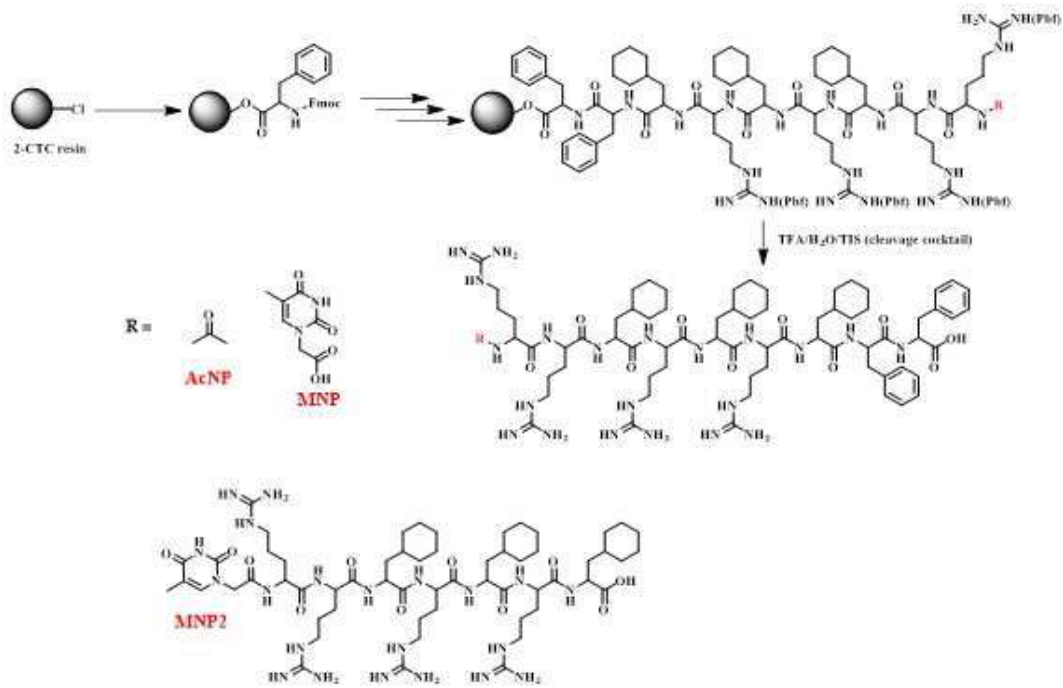
[0230] HeLa 세포들은 6-웰 플레이트에서 DMEM 내 5×10^5 cells/well 밀도로 밤새 시딩되었고, 12시간 동안 MNP($20 \mu\text{M}$) 또는 MNP/ADP 복합체($20 \mu\text{M}$)로 처리되었다. 대조군에는 아무 처리하지 않았다. 세포들은 RIPA 완충액으로 용해되었고, 총 단백질 농도는 Bradford 분석을 이용하여 결정되었다. 단백질은 SDS-PAGE를 이용하여 분리되었고, PVDF(polyvinylidene difluoride) 막(Immobilon-P polyvinylidene fluoride membranes; Millipore Corporation, Bedford, MA, USA)으로 옮겼다. PVDF 막은 비특정 상호작용을 최소화하기 위해 탈지유 용액을 이용하여 차단되었다. 이 후, 1차 항체로 밤새 처리한 후, 2시간 동안 2차 항체를 처리하였다. 단백질 발현은 BCIP[®]/NBT 용액을 이용하여 가시화되었다.

도면

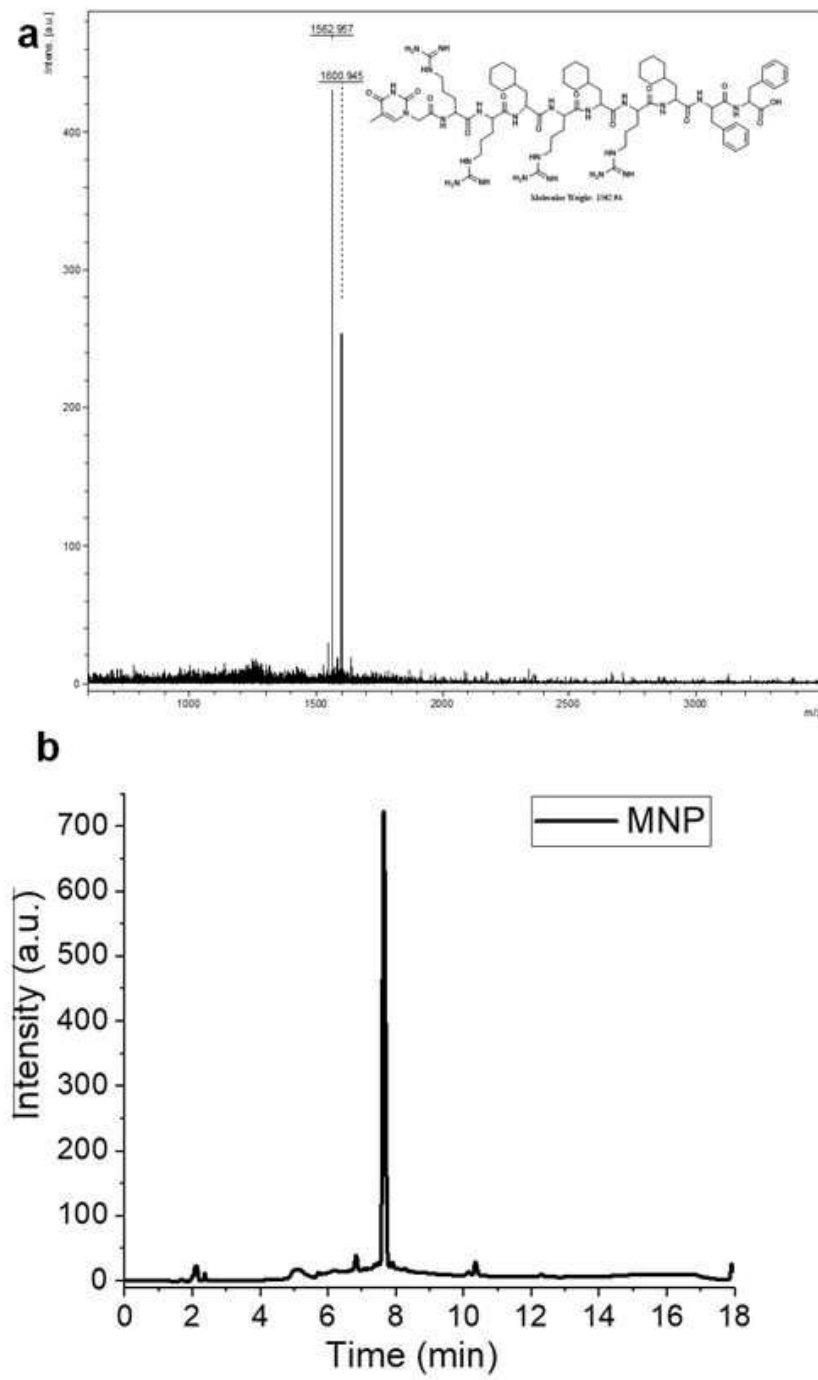
도면1



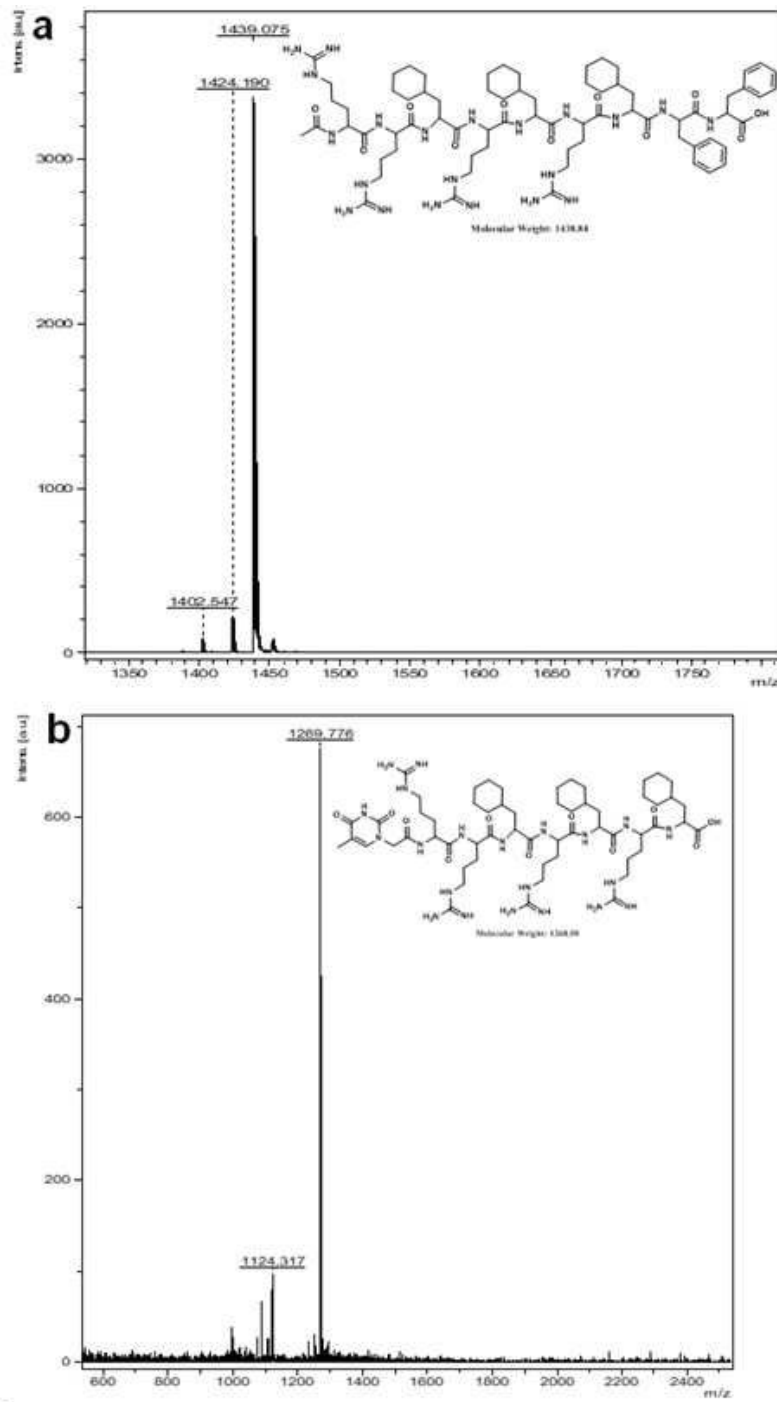
도면2



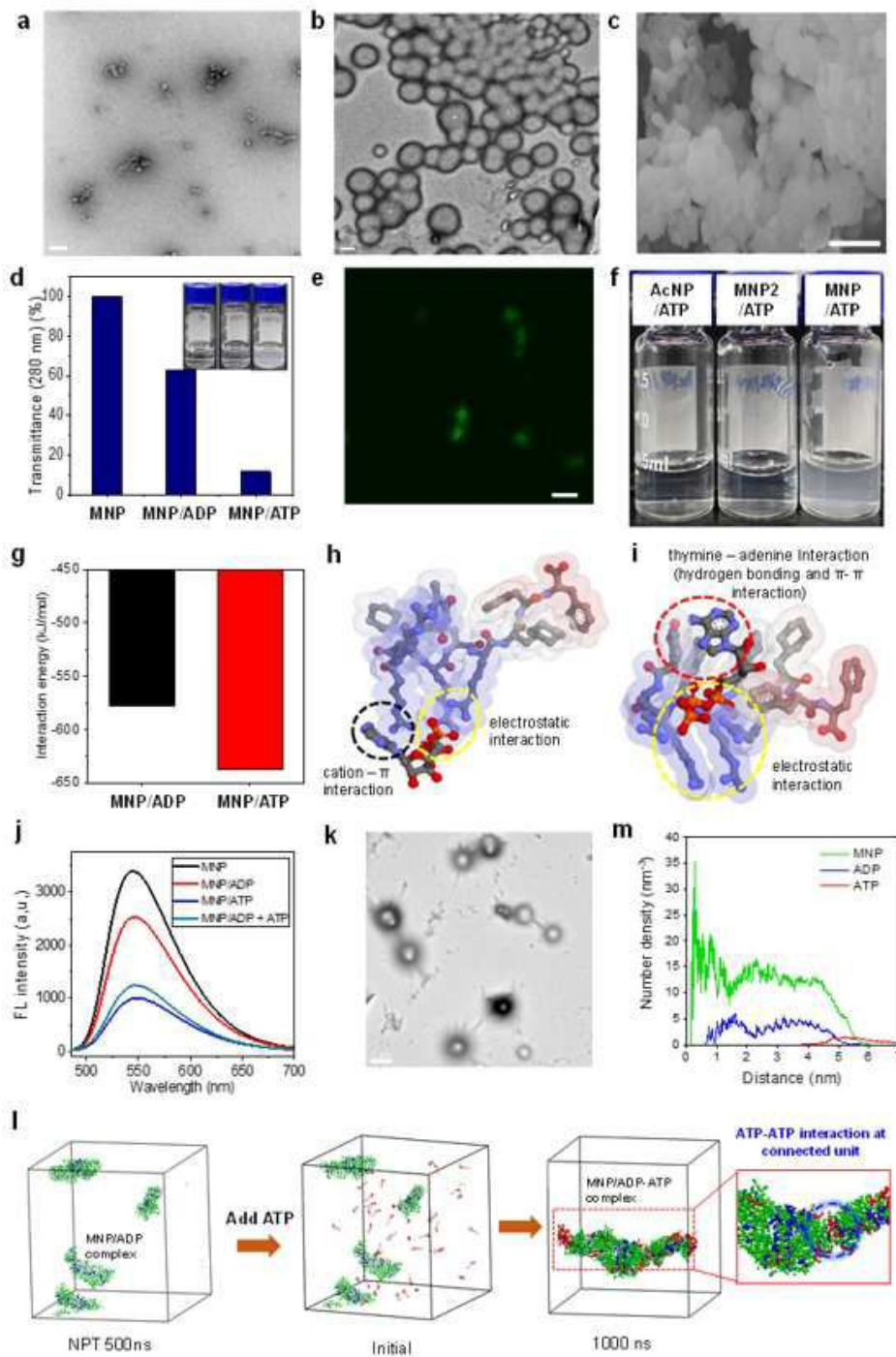
도면3



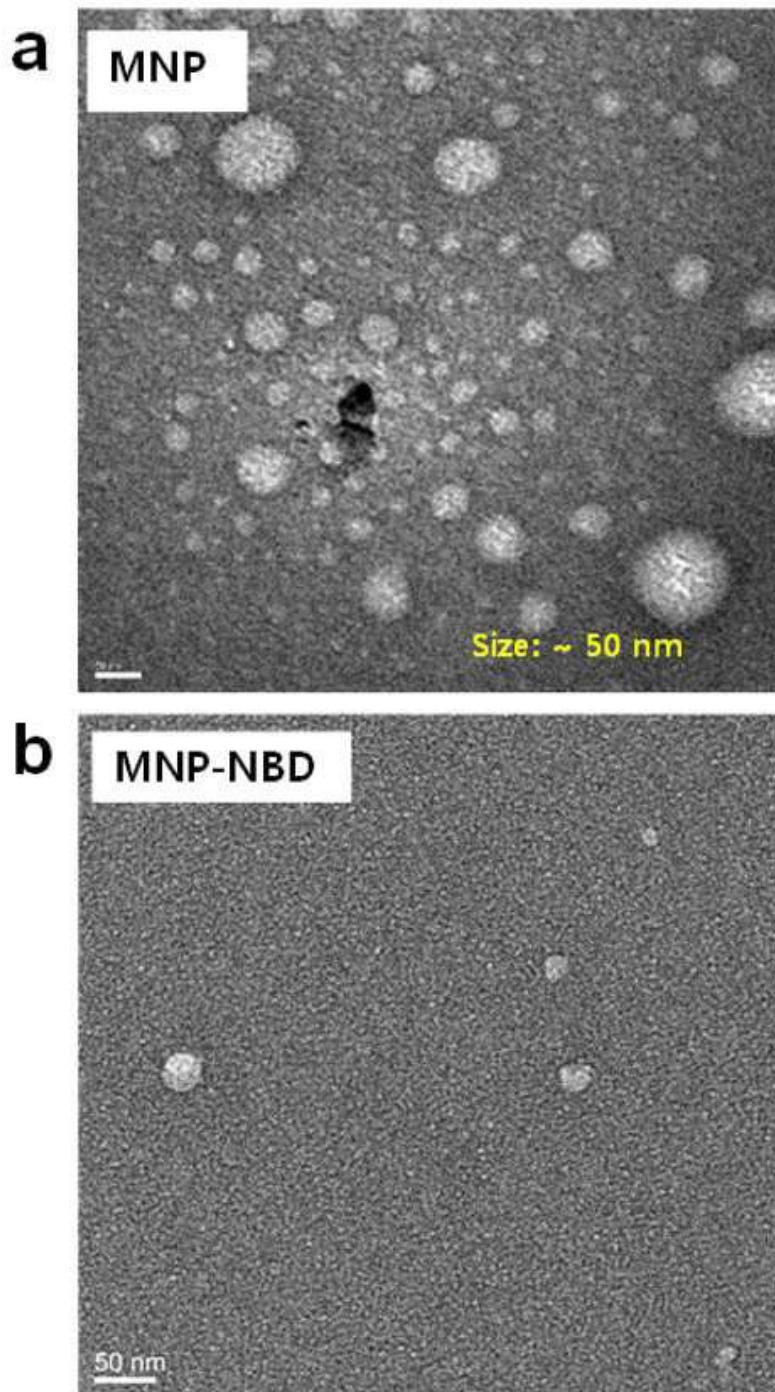
도면4



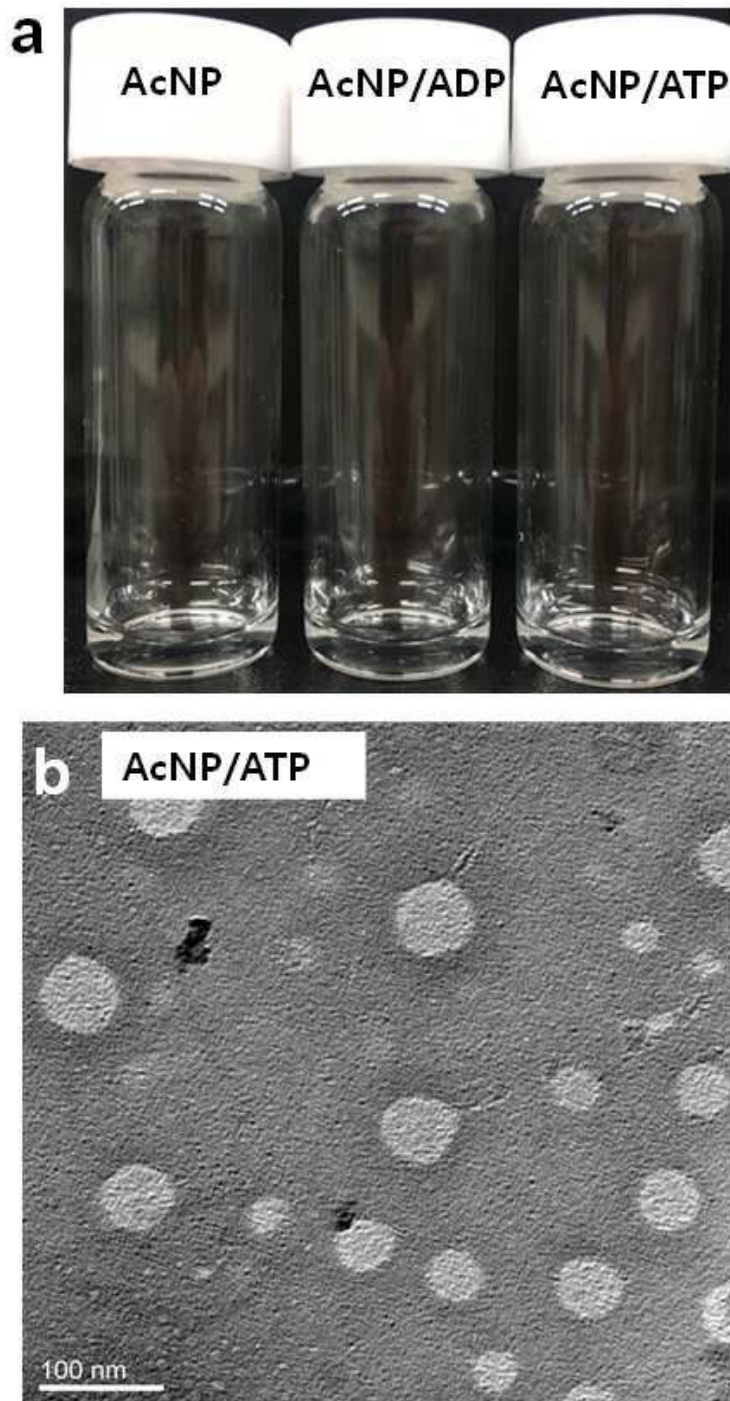
도면5



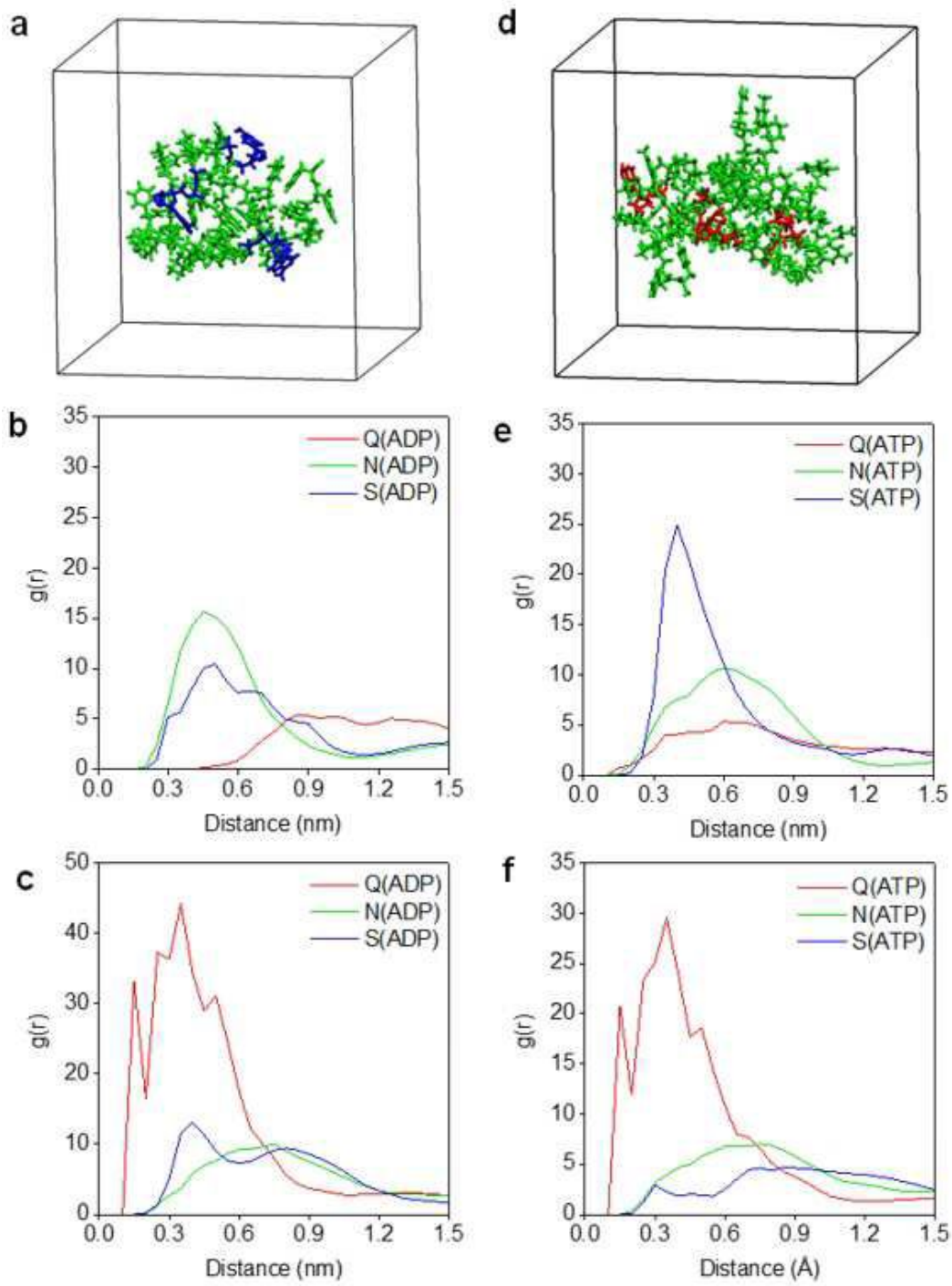
도면6



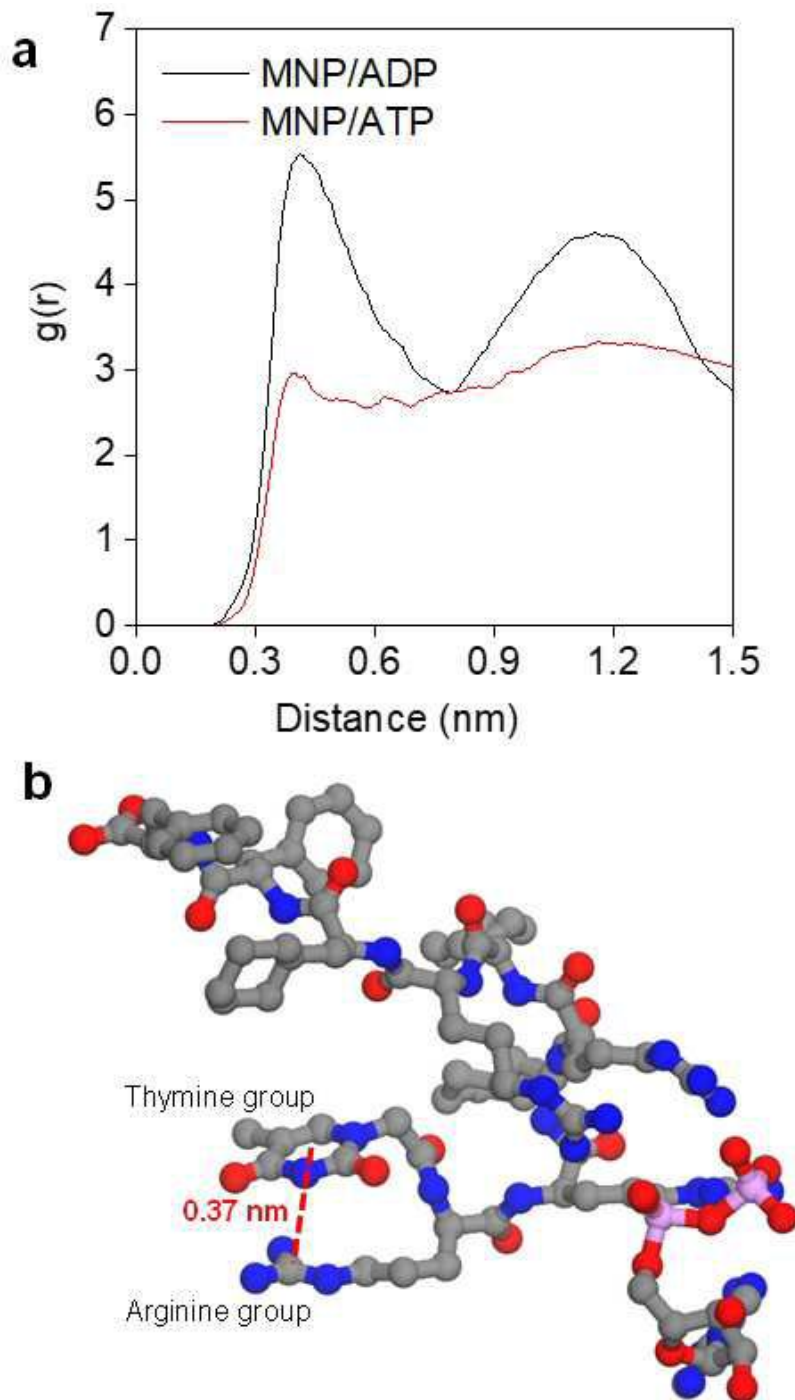
도면7



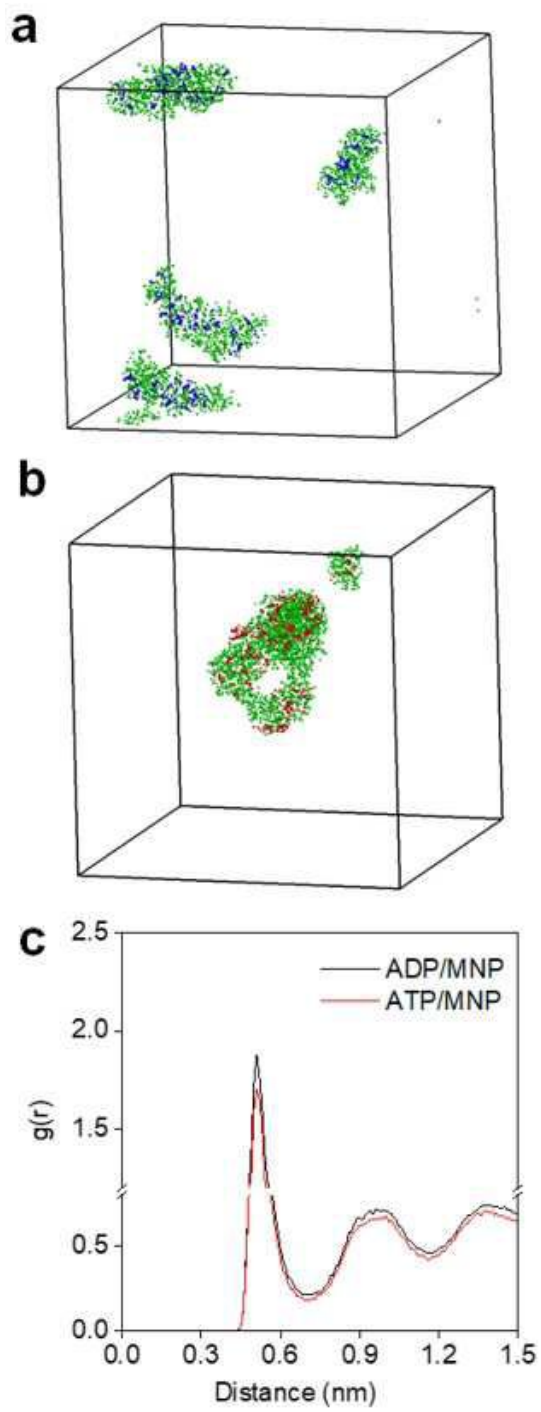
도면8



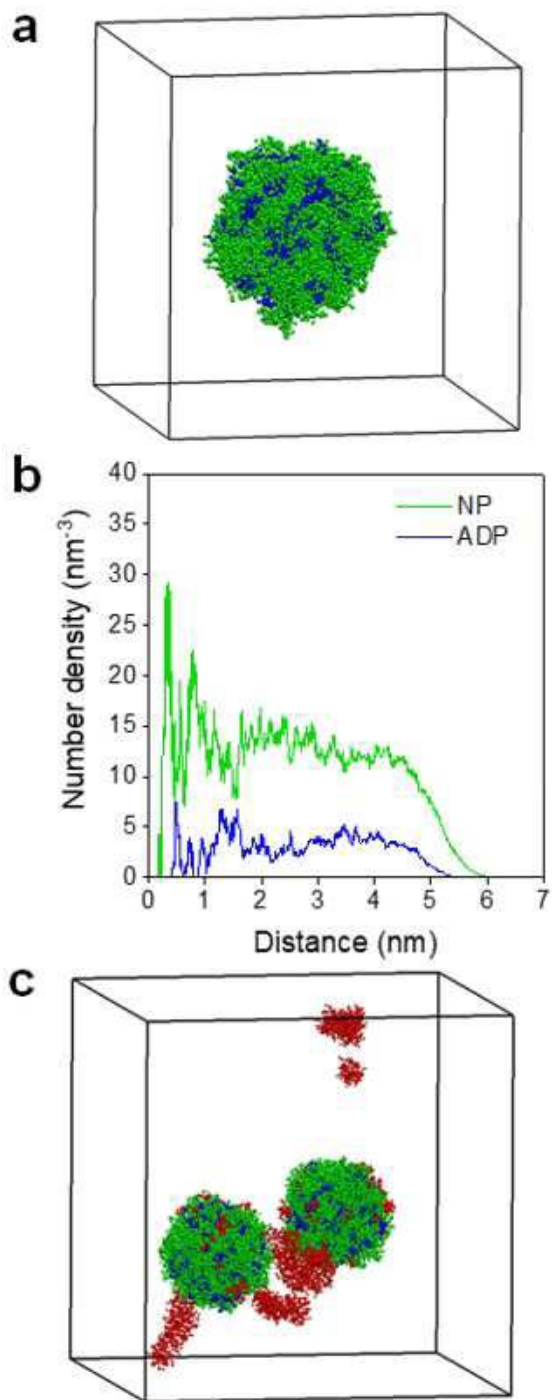
도면9



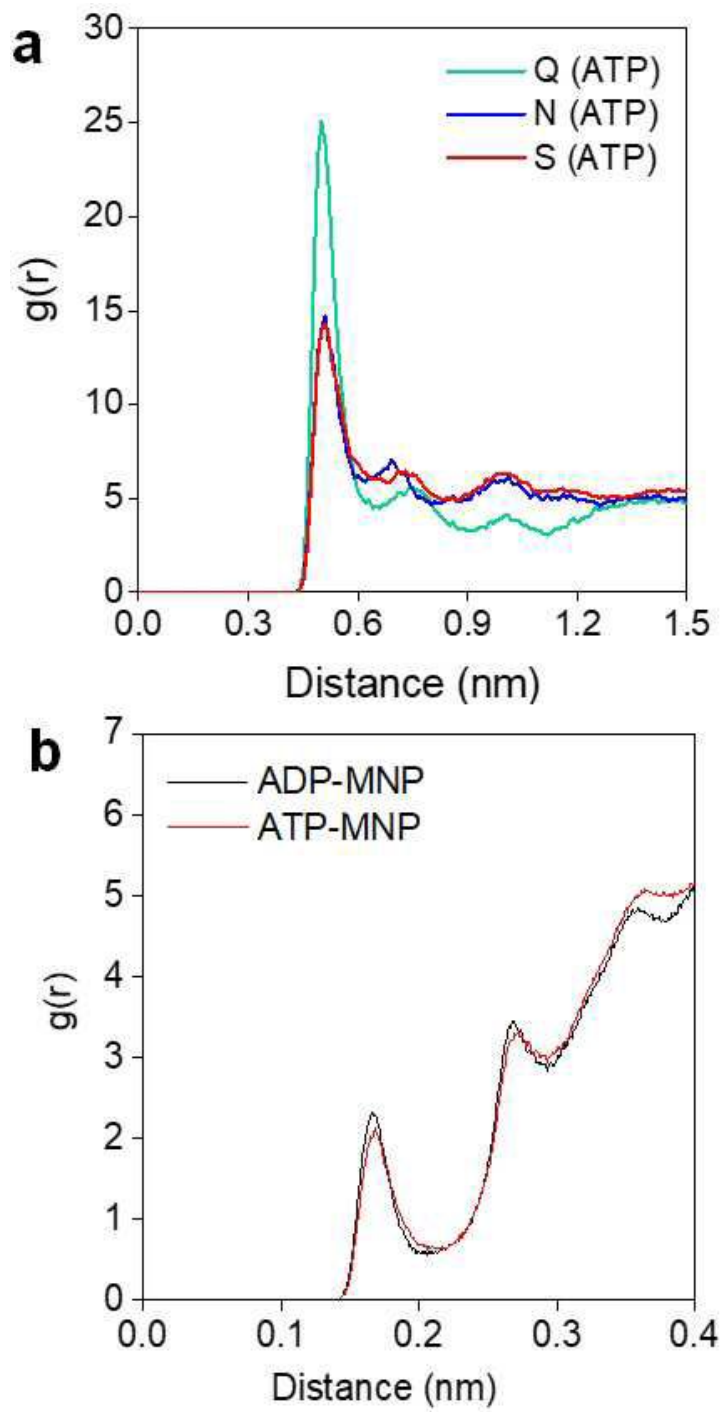
도면10



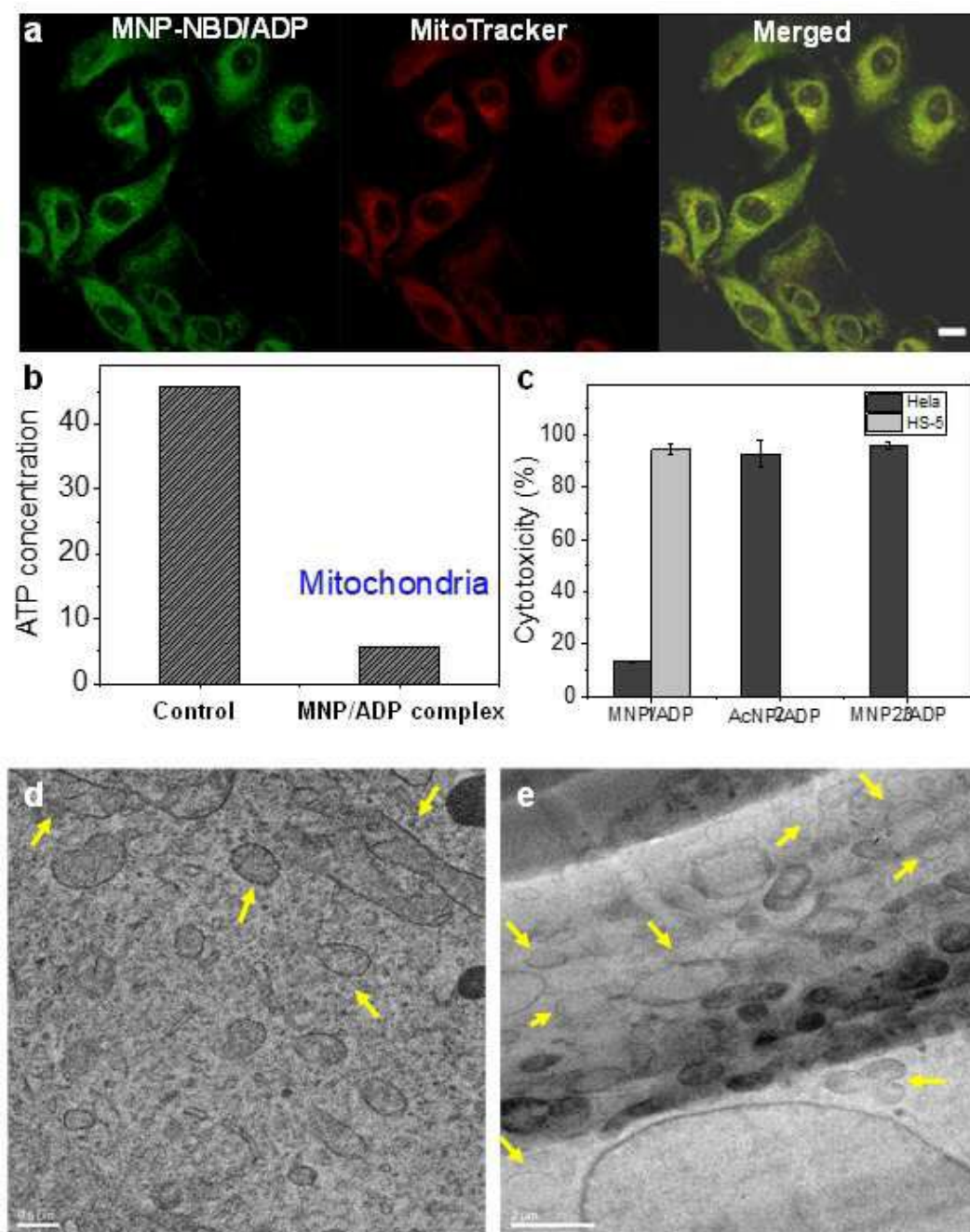
도면11



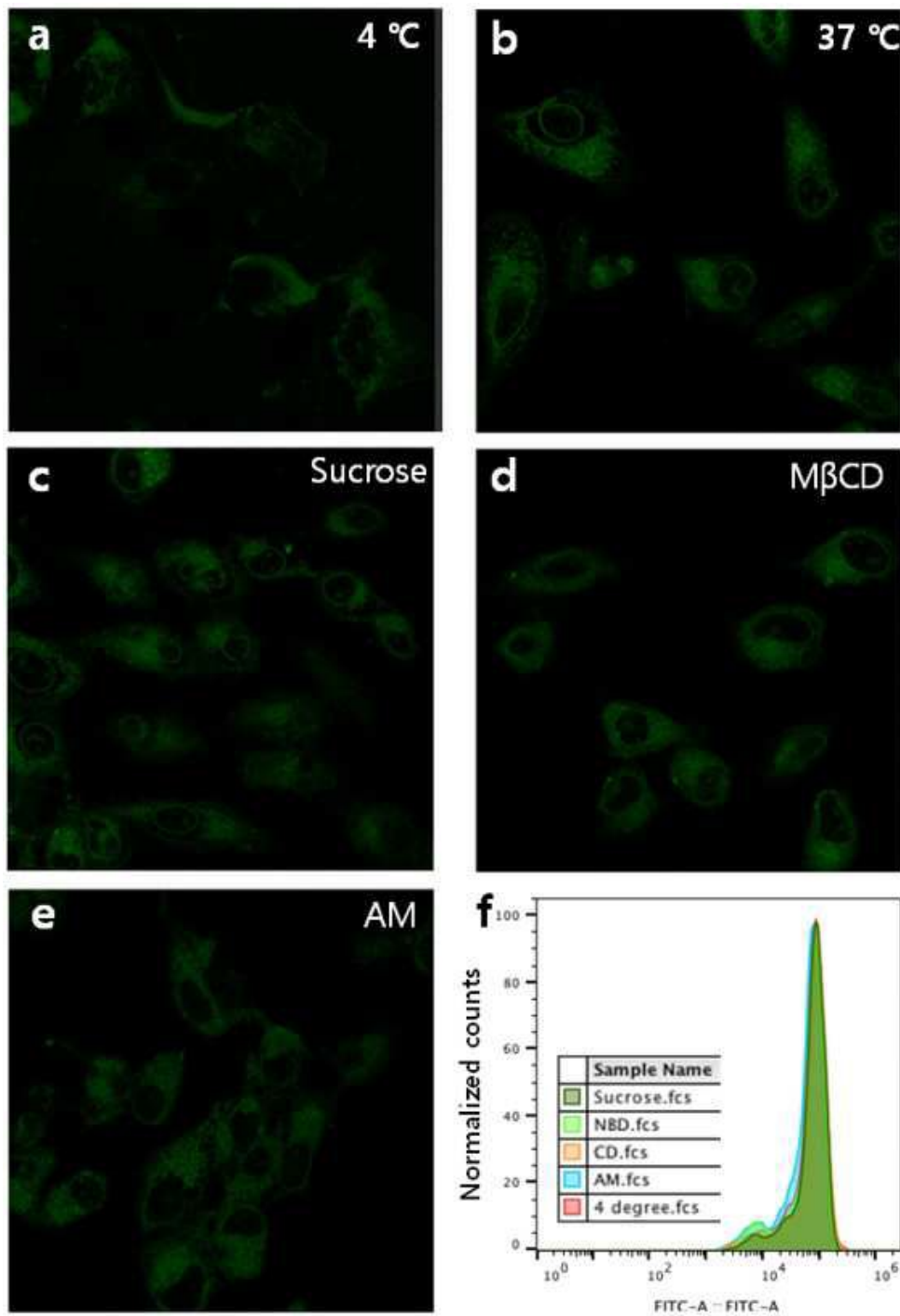
도면12



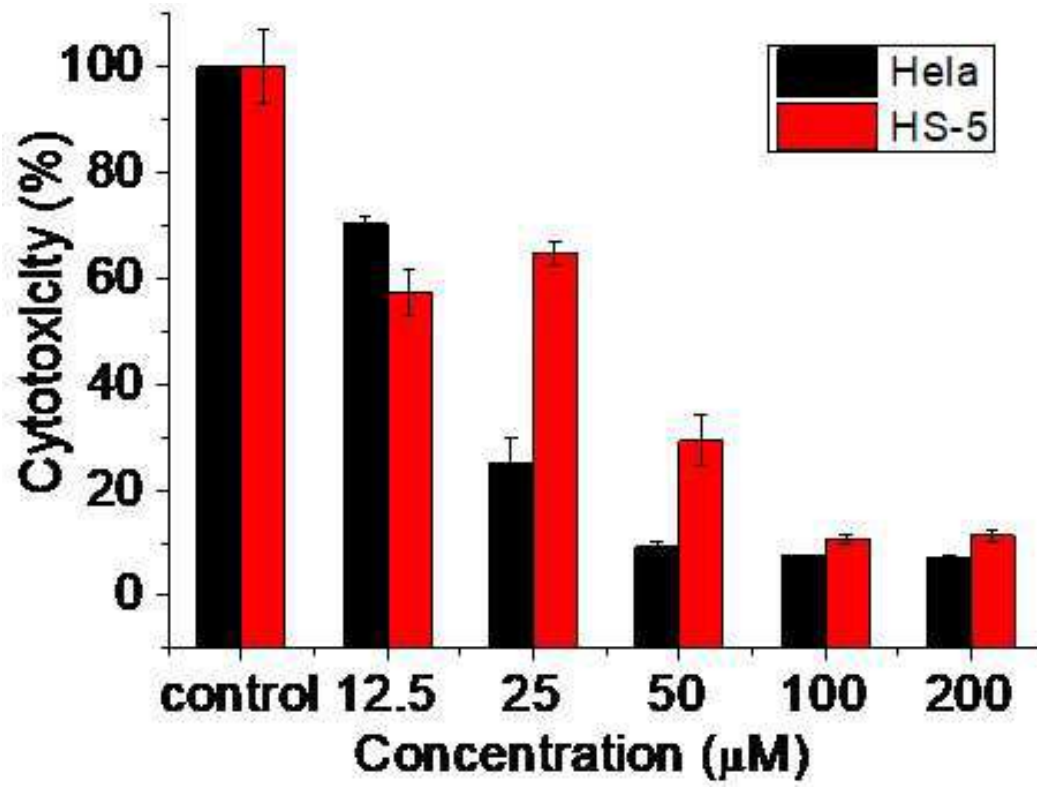
도면13



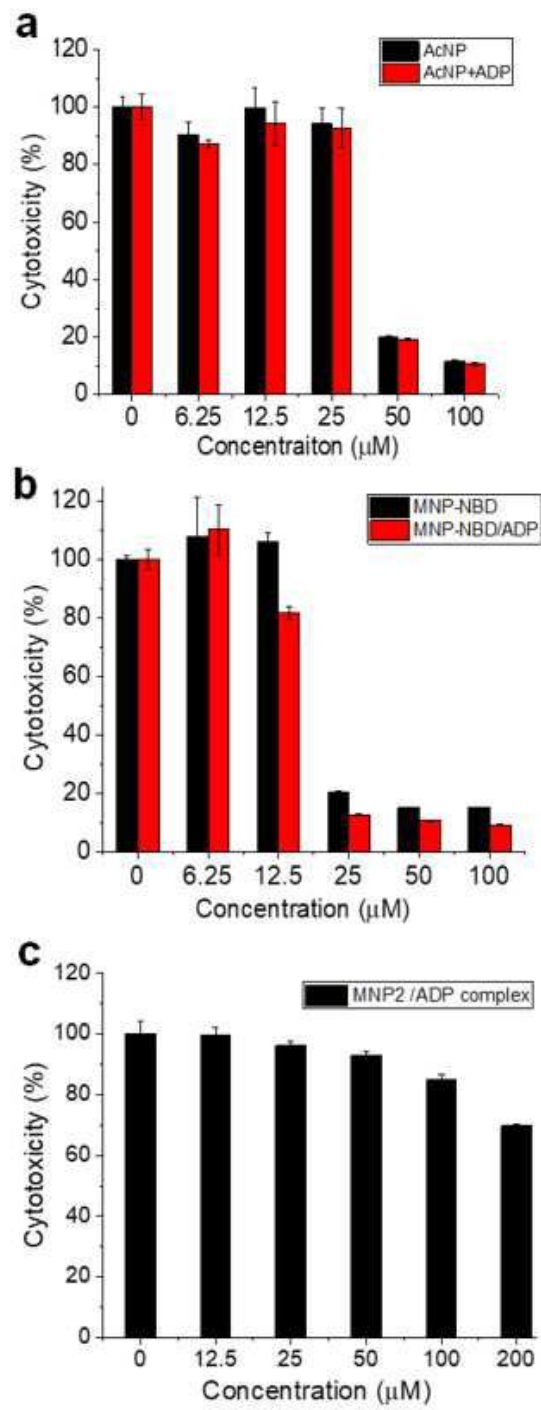
도면14



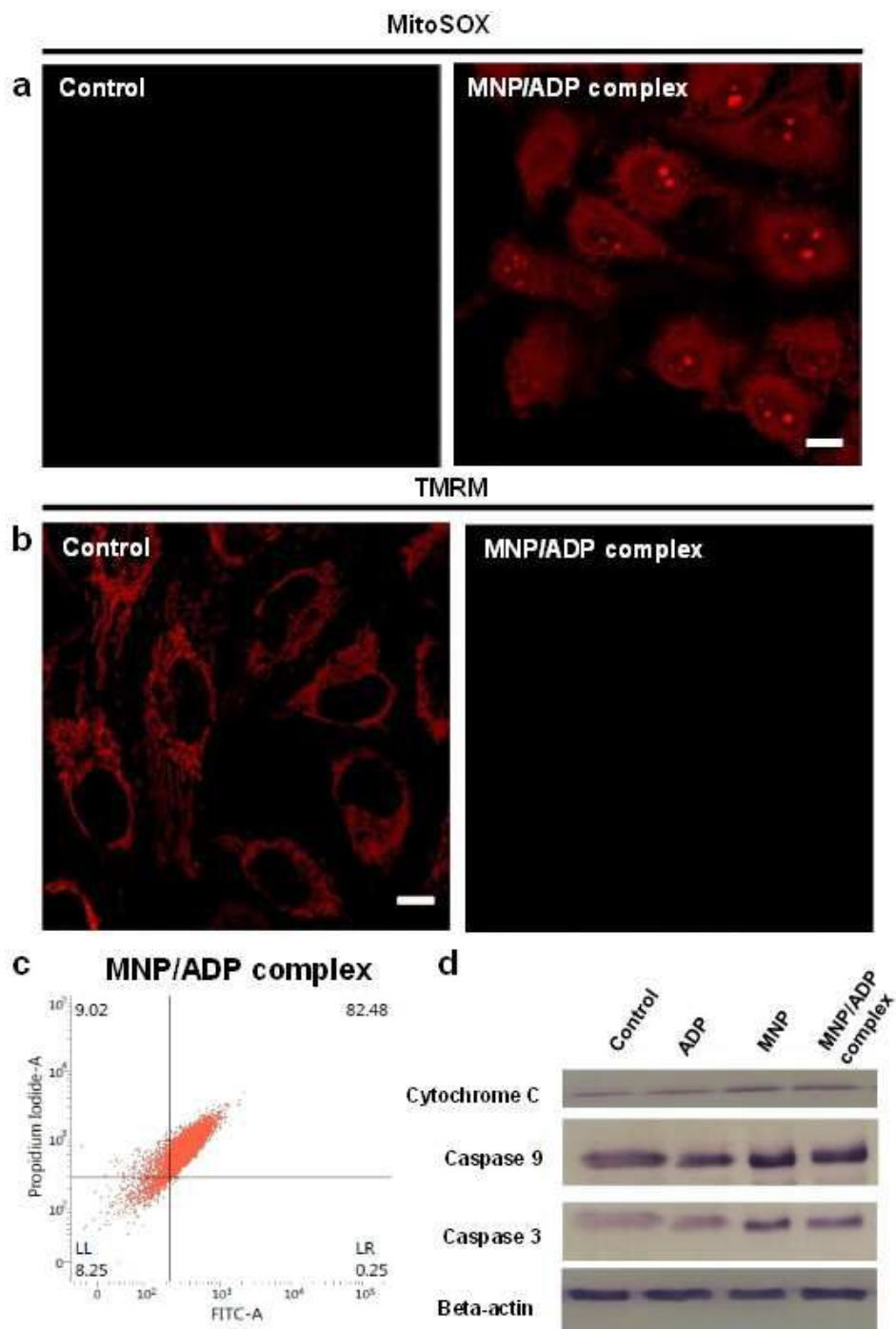
도면15



도면16

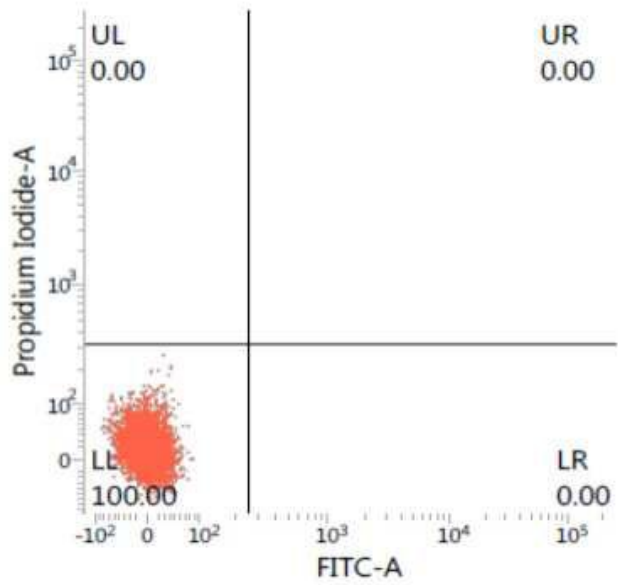


도면17

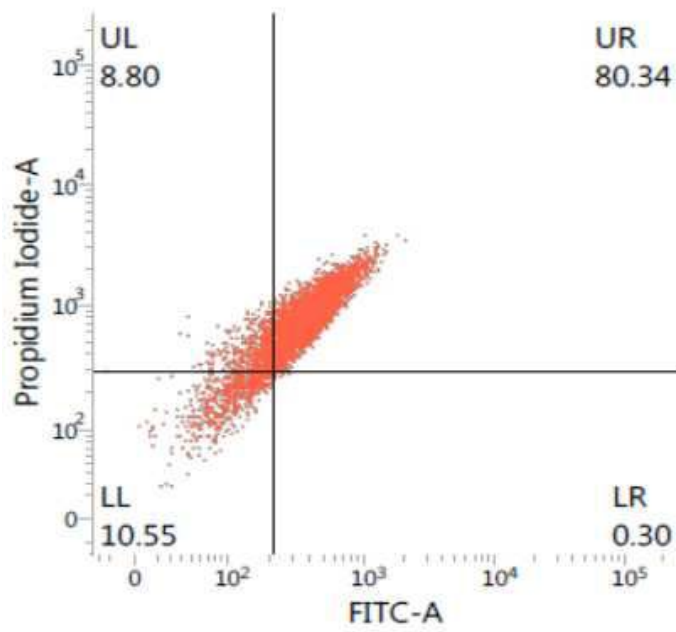


도면18

a Control



b MNP



도면19

