(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년09월13일
(11) 등록번호 10-1656663
(24) 등록일자 2016년09월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/155 (2006.01) *A61K 31/055* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/155 (2013.01)
A61K 31/055 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0105889
(22) 출원일자 2015년07월27일
심사청구일자 2015년07월27일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160060512 A
WO0061561 A1

기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박종선
대전광역시 서구 둔산로 201, 204동 301호 (둔산동, 국화아파트)
박지수
대전시 서구 둔산로 201, 204동 301호 (둔산동, 국화아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충정

전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 박제현

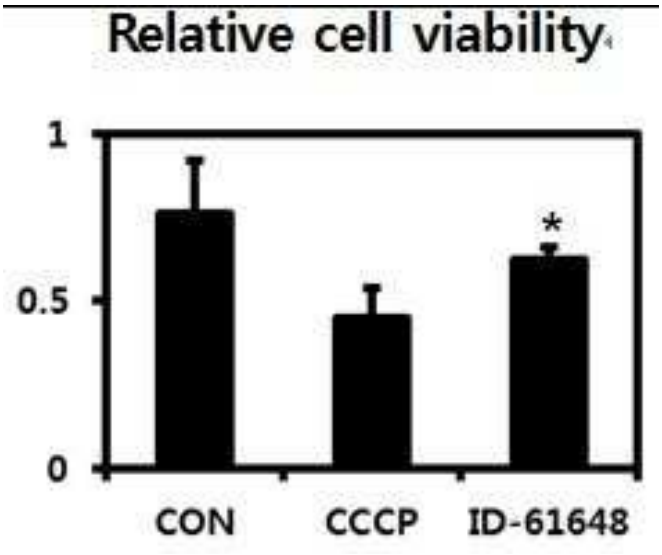
(54) 발명의 명칭 **암 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 (*E*)-1-(4-클로로페닐)-2-시아노구아니딘 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 (*E*)-1-(4-클로로페닐)-2-시아노구아니딘 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 암세포의 미토콘드리아 특이적 자가포식을 유도하여 결과적으로 암세포 사멸을 일으킬 수 있다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

김선환

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

트란쾅돈

대전시 중구 문화로 236 (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 1/2

주관기관 충남대학교

연구기간 2012.12.01 ~ 2015.11.30

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 1/2

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30

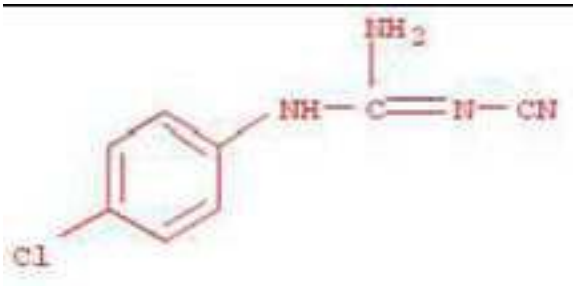
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 암은 폐암인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화합물은 암세포의 자가포식 활성을 통하여 항암효과를 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 자가포식은 LC3 또는 NIX의 활성을 통하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 암 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 구체적으로

[0002] (*E*)-1-(4-클로로페닐)-2-시아노구아니딘((*E*)-1-(4-chlorophenyl)-2-cyanoguanidine)를 암세포에 처리하여 암세포의 자가포식 및 마이토페이지(mitophagy)를 활성화시킴으로서 암세포를 사멸시킬 수 있는 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 자가포식(autophagy)은 세포가 영양소 결핍에 반응하여 자신의 단백질을 분해하거나, 세포의 재구축 등의 과정에서 불필요한 세포 성분을 제거하기 위한 작용이다. 생리학적으로 자가포식 과정은 단순히 제거의 의미 보다는 세포를 개선하거나 항상성을 유지하기 위한 에너지들을 공급하고 새로운 소기관 등 기반을 구축하는 재활용 시스템으로 기관 합성, 단백질 합성 및 합성된 것들을 제거 하는 전체적인 균형을 이루는데 중요한 역할을 담당하고 있다.

[0004] 진핵세포의 세포사멸은 3가지 기작, 즉 형태학적 및 생화학적 특징에 따라 크게 아팝토시스(apoptosis), 자가포식작용(autophagy) 및 괴사(necrosis)로 나타난다. 이 중 자가포식작용은 일정한 상황에서 활성화되는 자가포식소체-리소좀성(autophagosomic-lysosomal) 단백질 분해의 이화 과정으로 정의되는데, 이러한 자가포식 작용은 일반적으로 영양 부족의 조건 하에서 촉발되지만, 발달, 분화, 신경퇴행성 질병, 감염 등의 생리학적 과정과도

연관되어 있는 것으로도 알려져 있다(Reggiori, F. *et al*. (2002) *Eukaryot. Cell* 1, 11-21). 상기 자가포식작용에 의한 세포사멸은 1형 세포사멸로 분류되는 아팝토시스(apoptosis)와는 상이한 경로를 통하는 2형 세포사멸(type Ⅱ programmed cell death)로 분류되고, 영양결핍(nutrient starvation)이나 환경적 스트레스, 또는 다양한 화합물들에 의해 증가되며, 그 과정은 소포체(endoplasmic reticulum, ER)에서 유래되거나 새롭게 합성되는 이중막 구조가 만들어지고, 여기에 세포 내 소기관(미토콘드리아 등)이나 세포질 내 단백질들을 고립시키면서 자가포식소체(autophagosome)를 형성함으로써 이루어진다. 이후 자가포식소체는 궁극적으로 엔도좀(enxosome) 및 리소좀(lysosome)과 융합하여 파괴시키고 분해 산물은 세포에 의해 재활용된다. 자가포식작용이 일정수준 이상이면 세포사멸을 일으키며, 이러한 자가포식작용에 의한 세포사멸을 이용한 질환치료제 개발이 현재 관심을 받고 있다.

[0005] 마이토페이지(mitophagy)는 자가포식작용에 의한 미토콘드리아의 선택적인 분해과정으로, 스트레스등으로 손상된 미토콘드리아에 의하여 발생한다. 마이토페이지는 미토콘드리아의 순환을 촉진하고 세포를 변질 시킬 수 있는 제기능을 하지 못하는 미토콘드리아의 축적을 방지하므로, 세포가 건강을 유지하기 위한 주된 요인이 되고 있다.

[0006] 최근 암세포 자가포식의 조절 기전에 바탕을 둔 활발한 연구 결과 및 자가포식의 중요성이 여러 질병에서 정립되고 있으며, 자가포식은 세포사멸의 한 부분일 뿐 아니라, 암 세포의 생존에도 기여를 하는 것으로 밝혀지고 있다. 그러나 주목할 점은 세포 소기관 특이적 자가포식이 존재하며, 이러한 세부적 자가포식은 특정 세포 사멸을 표적으로 하는 치료제로 개발 될 수 있어 연구 되고 있다는 것이다.

[0007] 이에 본 발명자들은 암세포의 세포 소기관 특이적 자가포식을 유도하여 여러 암을 치료 할 수 있는 방법을 개발하고자 연구를 거듭한 결과 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2003-0097897호 (A)

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2006-0079496호 (A)

발명의 내용

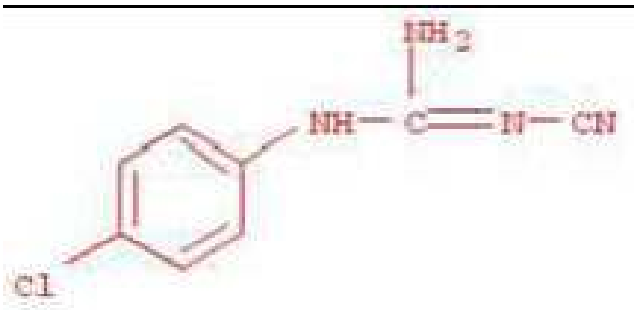
해결하려는 과제

[0009] 따라서 본 발명은 암세포의 미토콘드리아 특이적 자가포식을 활성화하여 암세포 사멸을 유도할 수 있는 암 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

화학식 1

[0011] 

[0012] 본 발명에 있어서 상기 화학식 1은 (*E*)-1-(4-클로로페닐)-2-시아노구아니딘으로, 이 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은, 달리 지시되지 않는 한, 본 발명의 화합물에 존재할 수 있는 산성 또는 염기성기의 염을 포함하는 것으로, 당업계에서 알려진 염의 제조 방법이나 제조과정을 통하여 제조될 수 있다.

[0013] 본 발명에 있어서, 진핵세포의 세포사멸 기작 중 하나인 자가포식작용에 의한 미토콘드리아의 선택적인 분해과정으로 일어나는 마이토페이지를 유도하여 암세포의 세포사멸을 유도함으로써 항암효과를 나타내므로, 상기 암은 암세포의 마이토페이지가 유도될 수 있는 한 모든 암에 적용될 수 있으며, 바람직하게는 폐암일 수 있다.

[0014] 본 발명에 있어서 상기 폐암은 폐에 생긴 악성 종양으로, 폐 자체에서 발생하는 원발성 폐암과 다른 장기에서 생긴 암이 폐로 전이되는 전이성 폐암을 포함한다. 구체적으로 소세포 폐암(small cell lung carcinoma)와 비소세포폐암(non-small cell lung carcinoma)로 구분되는데 비소세포폐암에는 편평상피세포암, 선암, 대세포암 등이 있다. 편평상피세포암은 폐의 기관지 점막을 구성하는 편평상피세포가 변성해서 생기는 폐암으로 주로 폐 중심부에서 발견된다. 선암은 폐 말초부위에 잘 생기는 특정 물질의 분비를 주된 기능으로 하는 선세포에 생기는 암을 의미하고, 대세포암은 폐 표면 근처에서 주로 발생하고 암세포가 대체적으로 크다는 특징이 있으며, 소세포암은 폐 중심부의 기도에서 처음 발병하고 악성도가 강하다는 특징이 있다.

[0015]

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화합물은 암세포의 자가포식 활성을 통하여 항암효과를 갖는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명에 있어서 상기 자가포식은 세포가 영양소 결핍에 반응하여 자신의 단백질을 분해하거나, 세포의 재구축 등의 과정에서 불필요한 세포 성분을 제거하기 위한 작용이다. 생리학적으로 자가포식 과정은 단순히 제거의 의미보다는 세포를 개선하거나 항상성을 유지하기 위한 에너지들을 공급하고 새로운 소기관 등 기반을 구축하는 재활용 시스템이다. 이러한 자가포식작용이 일정수준 이상이면 세포사멸을 일으키며, 이를 활용하면 자가포식작용에 의한 암세포의 사멸을 유도할 수 있다. 구체적으로, 자가포식이 저해되어있는 암세포에 본 발명에 따른 화합물을 포함하는 약학 조성물을 처리할 경우 자가포식과정을 유도할 수 있고 이에 따라 암세포의 자가사멸을 일으킬 수 있는데, 이러한 현상은 암세포 특이적인 현상으로 알려져 있다. 특히 기존 항암제 내성을 가진 환자들 중 세포의 자가포식 혁상이 억제되어 있는 환자들이 있다. 이들에게 본 발명에 따른 약학 조성물을 처리할 경우 암세포의 자가사멸을 유도할 수 있어 표적 약물 개발로도 사용될 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 자가포식은 LC3 또는 NIX의 활성을 통하여 이루어지는 것일 수 있다.

[0019] 본 발명에 있어서 상기 LC3은 자가포식소체의 형성에 관여하는 단백질로, 다음과 같은 기작에 의한다. 포유류의 세포에서, 영양분이 감소하면 atg, FIP200등의 단백질에 의하여 자가포식소체를 형성하게 된다. 이때 자가포식소체 구조를 이루기 위해서는 beclin-1-class Ⅲ PI3K 복합체가 필요하고, LC3(light chain3)-Ⅱ가 자가포식소체의 막에 삽입되어야 하는데, LC3-Ⅱ는 유비퀴틴과 유사한 단백질인 LC3가 해독 후 변형되어 생성된다.

[0020] 본 발명에 있어서 상기 NIX는 마이토페이지 활성과 관련된 단백질 중 하나로 미토콘드리아의 회수를 촉진하고 세포 환경을 저해할 수 있는 기능 이상의 미토콘드리아의 축적을 방지하는 기작에 관여한다. 나아가 마이토페이지의 활성 경로 중 하나는 미토콘드리아 외막 표면에 있는 마이토페이지 리셉터에 의해 이루어 질 수 있는데, 이러한 리셉터에는 NIX1, BNIP3 및 FUNDCI가 있다. 이 중 BNIP3L는 NIX와 복합체를 형성하여 미토콘드리아의 세포질에서 미토콘드리아 매트릭스로의 리소좀 단백질의 이동에 관여한다. 뿐만 아니라 상기 모든 리셉터는 LC3/GABARAP와 결합할 수 있어 미토콘드리아의 분해를 초래할 수 있는 LIR 공통 서열을 포함하고 있다. 상기 리셉터중 하나인 BNIP3는 저산소 환경에서 HIF1α에 의해 상향 조절되고, 이후 BNIP3은 LC3 결합을 촉진시키는 LIR 서열 근처의 세린 잔기에서 인산화가 일어난다. FUNDCI 또한 정상 조건에서 미토콘드리아 외막에 구성됨에도 불구하고 저산소 환경에 민감하다.

[0021] 따라서 암세포에 본 발명에 따른 조성물을 처리할 경우 LC3 및 NIX mRNA 발현 수준을 높여(실시예 3.4 및 3.5 참조), 자가포식소체의 형성을 촉진하여 자가포식을 유도할 수 있고, 결과적으로 세포 사멸을 일으킬 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따르면 (*E*)-1-(4-클로로페닐)-2-시아노구아니딘 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 암세포의 미토콘드리아 특이적 자가포식을 유도하여 결과적으로 암세포 사멸을 일으킬 수 있음이 확인되었다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명에 따른 화합물의 구조를 포함한 정보를 나타내는 그림이다.

도 2는 암 세포주에 본 발명에 의한 조성물을 처리하였을 때와 대조군 및 양성대조군의 사멸 효과를 비교하기 위하여 실시한 MTT 분석 결과이다.

도 3은 본 발명에 의한 조성물을 처리하였을 때와 대조군 및 양성대조군의 자가포식 활성 유전자인 LC3 mRNA의 발현 수준 변화를 나타내는 그래프이다.

도 4는 본 발명에 의한 조성물을 처리하였을 때와 대조군 및 양성대조군의 자가포식 활성 단백질인 LC3의 발현을 확인하기 위한 웨스턴 블롯팅 결과이다.

도 5는 본 발명에 의한 조성물을 처리하였을 때와 대조군 및 양성대조군의 마이토페이지 활성 유전자인 NIX mRNA 발현 수준 변화를 나타내는 그래프이다.

도 6은 본 발명에 의한 조성물을 처리하였을 때와 대조군 및 양성대조군의 PE/FITC 값 측정 결과이다.

도 7은 본 발명에 의한 조성물을 처리하였을 때와 대조군 및 양성대조군의 상대적인 MMP의 양을 비교분석한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0025] **<실시예 1> 실험 준비**

[0026] 1.1 폐암 세포주 배양

[0027] 인간 비소세포암 중 대세포암 세포주인 H460 세포주를 RPMI 1640 미디어(Gibco BRL Life technologies)를 사용하여 우태아 혈청 10%, 항생제 10%, Heps 20%를 첨가한 배양기에서 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양했다.

[0028] 1.2 통계적 분석

[0029] 모든 실험 더이터는 3회의 독립된 실험을 반복한 후, 평균 ± 표준편차로 나타내었고 $p<0.05$(*), $p<0.01$(**)로 기록하였다.

[0030] **<실시예 2> MTT 분석**

[0031] 96웰 플레이트에 상기 실시예 1.1에 따라 배양한 H460 세포주를 $1X10^3$ 세포로 분주 하였다. 다음날 90ul의 새 배지에 Ez-Cyto(MTT) 시약 10ul을 넣고 30분간 반응시켰다. Ez-Cytox는 WST를 이용하여 살아있는 세포의 양을 측정하는 제품으로써 세포 생존률, 증식 및 세포독성 분석 등에 사용 할 수 있다. 기질인 WST는 고-민감 수용성 테트라졸륨(tetrazolium) 염으로서 살아있는 세포의 탈수소효소와 반응 하여 오랜지 색의 수용성 포르마잔(formazan)을 생성하는데, WST와 반응하는 탈수소효소는 대사적으로 왕성한 활동을 하는 세포의 미토콘드리아 전자전달계에 존재하는 효소로써 살아있는 세포에만 유효하다. 따라서 포르마잔의 생성은 살아있는 세포 수와 직선 상관관계를 가지며, 이는 반응이 끝난 플레이트를 450nm (reference 650nm)에서 흡광도를 측정함으로서 확인할 수 있었다.

[0032] 그 결과 도 2와 같이 아무것도 처리 하지 않은 대조군(CON)과 비교하여 본 발명의 조성물을 처리한 군(ID-61648)에서는 세포 생존률이 감소한 것을 확인하였다. 이는 양성대조군(CCCP)과 유사한 결과이므로, 본 발명의 조성물은 암세포 사멸효과가 있음을 확인할 수 있었다.

[0033] **<실시예 3> LC3 및 NIX 발현 분석**

[0034] 3.1 mRNA 추출 및 cDNA 합성

[0035] 상기 실시예 1.1에 따라 배양한 H460 세포주를 6웰 플레이트에 3웰마다 각각 $3X10^5$로 분주하고, 다음 날 3웰에 2ml의 새 미디어로 바꿔주었다. 이후 양성 대조군 웰에는 CCCP를 최종 농도가 30uM가 되도록 처리하였고, 나머지 웰에는 (*E*)-1-(4-클로로페닐)-2-시아노구아니딘(ID-61648화합물)를 최종 농도가 3uM가 되도록 처리하고 8시간 동안 배양하였다.

[0036] 배양 후 미디어를 제거하고, 1X PBS로 세척한 후에 PureHelix RNA Extraction Solution(Nanohelix Co., South

Korea)을 이용하여 제공된 프로토콜에 따라 mRNA를 추출하였다. 이후 GE Nano vue로 정량 후, cDNA합성 Kit-5x RT premix (reverse transciption -elips biotech)를 이용하여 1ug으로 합성하였다.

[0037] 3.2 실시간 정량-PCR(RT Q-PCR)

[0038] PCR은 아래 프라이머(아래 표 1)를 사용하여 수행하였다.

표 1

[0039]

프라이머		Sense	AntiSense
GAPDH	Human	TACGACCAAATCCGTTGACTCCGA	TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT
LC3	Human	GCAGCTTCCTGTTCTGGATAA	TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT
NIx	Human	GGAACACGTACCATCCTCATC	ACTGCCTCTGGAACTACTCT

[0040] cDNA 1ug- GAPDH, 3ug-LC3, 2ug-Nix로 하고, SYBR green Kit-SYBR green with low ROX (enzynomics)10ul, 나머지는 H_2O로 총 20ul가 되도록 하여, StepOne Plus 실시간 PCR system (AB Applied biosystems)기계로 PCR을 수행하였다. PCR Cycle은 아래 표 2와 같다.

표 2

[0041]

	온도	시간
Initial denaturation	95℃	10-15분
Denaturation	95℃	10초
Annealing	60℃	15초
Elingation	72℃	15-30초
Number of Cycles	40회	

[0042] 결과의 통계처리는 평균 ΔCT(normalized cycle threshold) 값과 표준편차 값을 구하고, one-way ANOVA로 분석한 후에 $p<0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다. 항존유전자(House-keeping gene)로 GAPDH의 분석 값과 비교하여 보정한다.

[0043] 3.3 웨스턴 블롯팅 분석

[0044] 상기 실시예 1.1에 따라 배양한 H460 세포주를 6웰 플레이트에 각각 $3X10^5$ 세포수로 3웰을 분주한 후, 다음 날 대조군은 미디어만 바꿔주고, 양성 대조군에는 CCCP(Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone)를 최종 농도가 30uM가 되도록 처리하고, 나머지 한 플레이트에는 미디어 2ml에 본 발명의 조성물을 10uM가 되도록 처리하여 8시간동안 배양하였다.

[0045] 배양 후 미디어를 제거하고, 1X PBS로 세척 한 후에 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, 0.5% NP40, 10 mM β-글리세로인산(β-glycerophosphate), 50 mM 불화 나트륨(sodium fluoride), 0.2 mM 바나듐산 나트륨(sodium vanadate), 10 mM PNPP, 5 mM PMSF and 10 μg/ml 류펩틴(leupeptin)으로 만들어진 용해 버퍼(lysis buffer)로 세포를 용해시켰다. 용해시킨 단백질을 브래드포드법(Bradford protein assay; Bio-Rad, Hercules, CA)으로 단백질 농도를 잰 다음 10ug를 정량하여 Laemmli sample buffer를 농도에 맞게 혼합하여 가열하고, SDS-PAGE에 로딩 한 후 PVDF 멤브레인에 이동시켰다. 이를 탈지 우유(Skim-milk)로 블로킹(blocking)하고, TBS-T 세척하여 1차 항체인 LC3를 넣고 하루 동안 배양하였다. 다음 날 TBS-T 세척 후 토끼 2차 항체를 1시간동안 배양한 뒤, 20분간 3차례 TBS-T로 세척 한 후 필름으로 현상 하였다.

[0046] 3.4 LC3 mRNA 발현 수준 확인

[0047] 상기 실시예 3.1 및 3.2에 따라 합성한 cDNA는 LC3/GAPDH로 보정하였다. 그 결과, 도 3에서와 같이 아무것도 처리하지 않은 대조군(CON)과 비교하여 본 발명의 (*E*)-1-(4-클로로페닐)-2-시아노구아니딘을 처리한 군(ID-61648)에서는 LC3 mRNA 발현 수준이 증가한 것을 확인하였다. 이는 양성대조군(CCCP)과 유사한 결과이며 양성대조군 보다 본 발명의 조성물을 처리하였을 때 더 우수한 효과를 나타내었다.

[0048] 또한, 상기 실시예 3.3에 따라 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과, 도 4에서와 같이 아무것도 처리하지 않은 대조군(CON)과 비교하여 본 발명의 (*E*)-1-(4-클로로페닐)-2-시아노구아니딘을 처리한 군(ID-61648)에서는 양성대조군(CCCP)과 유사하게 LC3의 발현이 증가한 것을 확인하였다.

[0049] 따라서 본 발명의 조성물은 자가포식 소체의 형성에 반드시 필요한 유전자 중 하나인 LC3의 발현을 촉진시킴을 확인할 수 있었다.

[0050] 3.5 NIX 발현 수준 확인

[0051] 상기 실시예 3.1 및 3.2에 따라 합성한 cDNA는 NIX/GAPDH로 보정하였다. 그 결과, 도 5에서와 같이 아무것도 처리하지 않은 대조군(CON)과 비교하여 본 발명의 (*E*)-1-(4-클로로페닐)-2-시아노구아니딘을 처리한 군(ID-61648)에서는 NIX mRNA 발현 수준이 증가한 것을 확인하였다. 이는 양성대조군(CCCP)과 유사한 결과였다. 따라서 본 발명의 조성물은 미토콘드리아의 마이토페이지 활성 유전자 중 하나인 NIX의 발현을 촉진시킴을 확인할 수 있었다.

[0052] **<실시예 4> 세포막 전위 측정**

[0053] 세포(10^6)를 트립신 처리 후 PBS로 세척하였다. 1ml의 미디어와, JC-1 염색약을 최종 농도 2uM가 되도록 첨가하여 30분간 염색하고, PBS로 세척하였다. 이때 JC-1는 미토콘드리아에 축적되는 새로운 양이온성 카보시아닌(cationic carbocyanine) 염료로, 저농도 모노머로 존재하고 플루오레세인(fluorescein)과 유사하게 녹색 형광을 나타낸다. 높은 농도에서는 염료가 J-종합체(J-aggregate)를 형성하여 폭넓은 여기 스펙트럼을 나타내고 590 nm근처에서 최대 방출을 나타낸다. 이러한 특징으로 JC-1은 미토콘드리아 막 전위에 민감한 표지자가 될 수 있다. 다음 다시 1ml의 미디어를 넣은 후, 양성대조군에는 CCCP를 최종 농도가 30uM가 되도록 첨가하고, (*E*)-1-(4-클로로페닐)-2-시아노구아니딘을 최종 농도가 3uM가 되도록 첨가하였다. 이후 10분 이내에 FACS(Fluorescence-activated cell sorting)에서 PE/FITC 값을 측정하였고, 그 결과는 도 7과 같다. 이때, PE 값은 초록색 형광을 측정한 값이고 FITC는 붉은색 형광을 측정한 값이다.

[0054] 도 7의 MMP는 PE 측정값/FITC 측정값을 나타내며 그 값이 작을수록 막전하 차이가 작은 것으로 미토콘드리아의 기능이 저해된 상태를 의미한다. 도 7에서 확인할 수 있듯이 본 발명에 따른 조성물을 처리하였을 때, 상대적인 MMP값은 아무것도 처리하지 않은 대조군보다 감소한 것을 확인할 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 조성물을 처리할 경우 미토콘드리아의 기능을 저해시킨다고 할 수 있다.

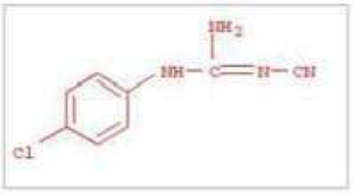
[0055] 즉, 본 발명에 따른 조성물은 암세포에 직접 처리 하였을 때 암세포를 사멸하는 효과를 갖고(실시예 2 참조), 자가포식 활성에 관여하는 LC3의 발현을 촉진 하는 효과가 우수하며(실시예 3.4 참조), 미토콘드리아 기능 조절 및 마이토페이지 활성에 관여하는 NIX의 발현 또한 촉진하는 것이 확인되었다(실시예 3.5 참조). 따라서 본 발명에 따른 조성물을 암세포에 처리함으로써 암세포의 자가포식을 유도하여 암의 치료에 활용가능하다.

[0056] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1

CAS Registry Number 158203-96-4



$C_9 H_7 Cl N_4$

Guanidine, *N*-(4-chlorophenyl)-*N*'-cyano- (9CI)

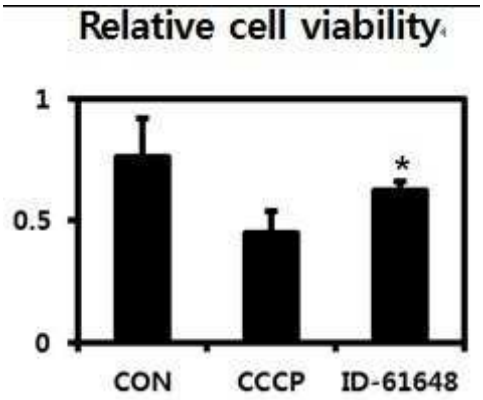
Molecular Weight
194.62

pKa (Predicted)
Value: -2.14±0.70 | Condition: Most Basic Temp: 25 °C

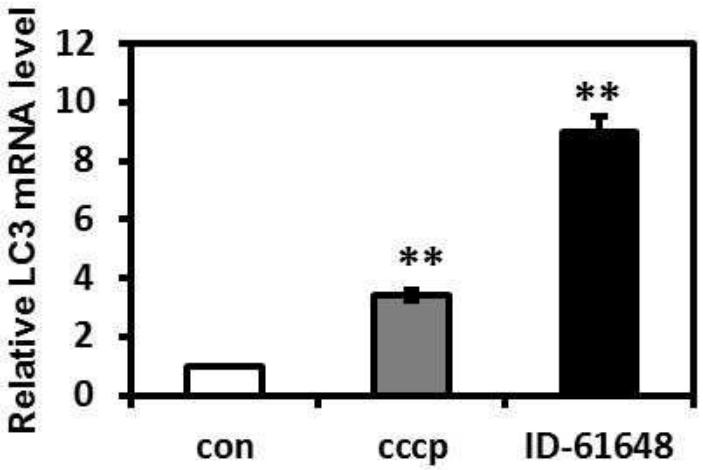
Boiling Point (Predicted)
Value: 329.4±44.0 °C | Condition: Press: 760 Torr

Density (Predicted)
Value: 1.34±0.1 g/cm3 | Condition: Temp: 20 °C Press: 760 Torr

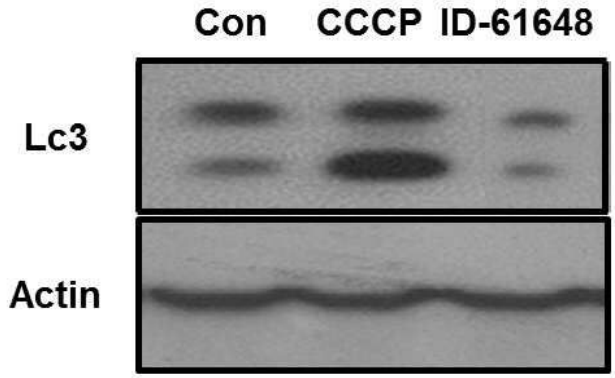
도면2



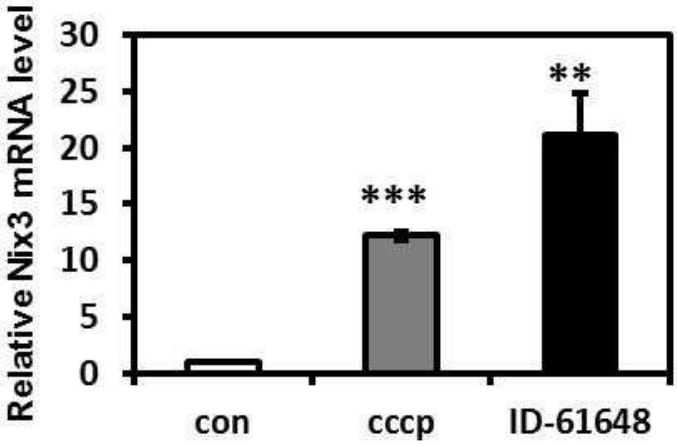
도면3



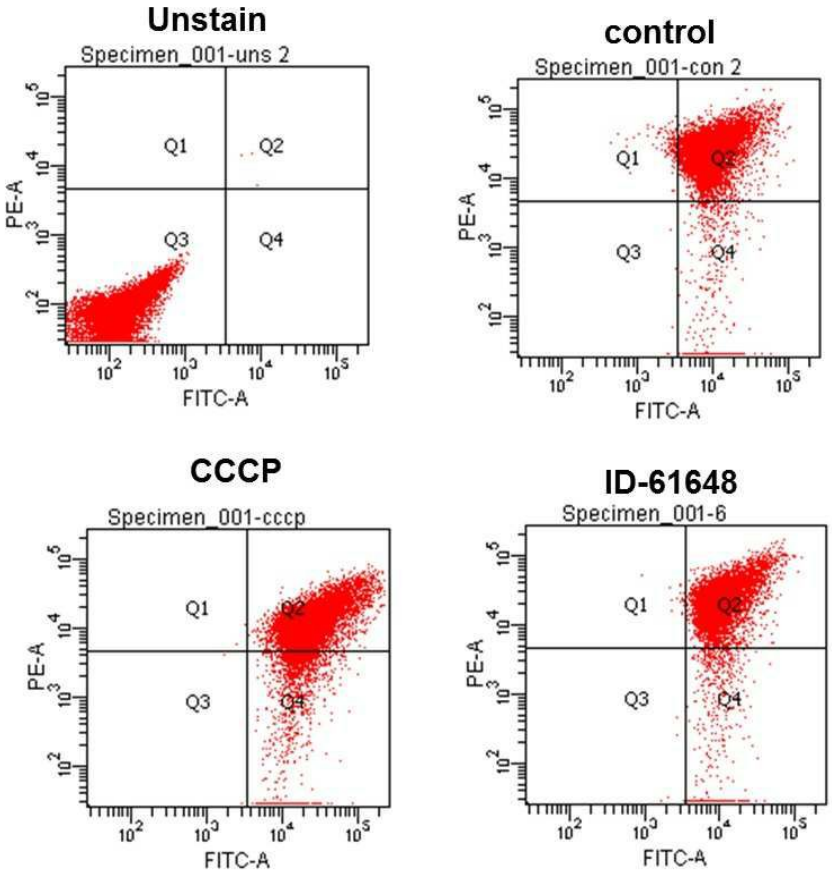
도면4


Con
CCCP
ID-61648
Lc3
Actin

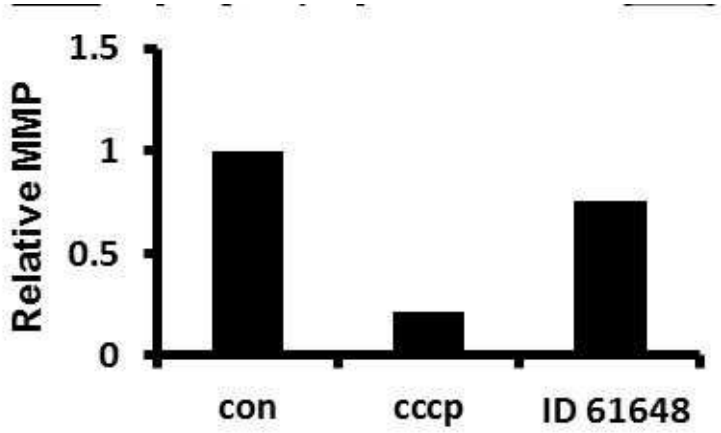
도면5


Relative Nix3 mRNA level
30
25
20
15
10
5
0
***
**
con
cccp
ID-61648

도면6


Unstain
Specimen_001-uns 2
control
Specimen_001-con 2
CCCP
Specimen_001-cccp
ID-61648
Specimen_001-6
Q1
Q2
Q3
Q4
PE-A
FITC-A

도면7


Relative MMP
1.5
1
0.5
0
con
cccp
ID 61648