



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월13일
(11) 등록번호 10-1968732
(24) 등록일자 2019년04월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/48 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/05 (2006.01) A61K 38/06 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/54 (2017.08)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0152392
(22) 출원일자 2016년11월16일
심사청구일자 2016년11월16일
(65) 공개번호 10-2018-0055062
(43) 공개일자 2018년05월25일
(56) 선행기술조사문헌
molecular pharmaceutics, 6(4), 1138-1144,
2009.
molecules, 20, 19775-19788, 2015.

(73) 특허권자
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
유자형
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
지나 마나애쓰 테케일
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 12 항

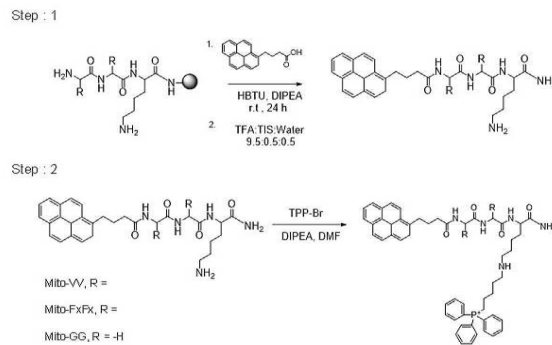
심사관 : 이재정

(54) 발명의 명칭 세포소기관에서 자가조립 가능한 펩타이드 분자를 포함하는 접합체 및 이를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 미토콘드리아 표적화 모이어티, 및 자가조립 가능한 펩타이드 분자를 포함하는 접합체, 및 이를 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/05 (2013.01)

A61K 38/06 (2013.01)

A61K 49/0019 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711036509

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인연구지원

연구과제명 합성 펩타이드의 초분자 구조 및 변형을 이용한 생체재료연구

기여율 1/2

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711039008

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 집단연구지원

연구과제명 다공성 플랫폼 기반 생체모방 촉매

기여율 1/2

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2016.06.01 ~ 2016.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

미토콘드리아 표적화 모이어티 및 (Xaa)_n-Lys로 표시되는 펩타이드를 포함하고, 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티는 TPP (triphenylphosphonium)이며, 상기 펩타이드의 리신 아미노산에 연결되어 있는 것이고,

상기 n은 펩타이드 결합을 통하여 연결된 아미노산 Xaa의 개수로서, 2의 정수이고,

상기 Xaa는 각각 독립적으로 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파라긴, 글루탐산, 아스파르트산, 글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 프롤린, 글루타민, 히스티딘, 리신, 아르기닌, 티로신, 트립토판 및 이들의 C3-C10 사이클로알킬 결합 변이체로 이루어진 군에서 선택되며,

상기 아미노산 사이에 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 형성하는 것이고,

상기 펩타이드는 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 포함하는 것인, 미토콘드리아 내부에서 섬유상 자가조립체를 생성하는 접합체 (conjugate).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아미노산은 페닐알라닌, 알라닌, 사이클로헥실 알라닌, 및 발린으로 이루어진 군에서 선택된 것으로서, 서로 동일한 것인, 접합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 리신의 C-말단 카르복실기의 하이드록시기는 아민, 알킬기, 알코올기, 케톤기, 아실기, 에스터기, 에테르기, 아세틸기, 아실 할라이드기, 및 알데하이드기로 이루어진 군에서 선택된 것과 치환된 것인, 접합체.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 펩타이드에 연결된 미토콘드리아 표적화 모이어티의 개수는 1 내지 상기 (Xaa)_n-Lys로 표시되는 펩타이드에 존재하는 아민기 개수 범위에서 선택된 정수인, 접합체.

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 펩타이드와 미토콘드리아 표적화 모이어티는 직접, 또는 탄소수 1 내지 10개인 알킬기 (alkyl), 또는 알켄기 (alkene), 또는 알카인기 (alkyne), 또는 결합을 형성할 수 있는 관능기 (functional group)를 포함하는 링커를 통하여 연결된 것인, 접합체.

청구항 7

제1항 내지 제4항, 또는 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 형광단 (fluorophore)을 추가로 포함하고, 상기 형광단은 pyrene, NBD (4-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole), perylene, naphthalene, coronene, 및 방향족으로 이루어진 화합물로 평평한 구조를 가지고 있어 파이결합으로 서로 쌓이기 쉬운 형광단으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상인 것이며 상기 펩타이드에 연결된 것인, 접합체.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 형광단은 상기 펩타이드의 N-말단에 아마이드 결합으로 연결된 것인, 접합체.

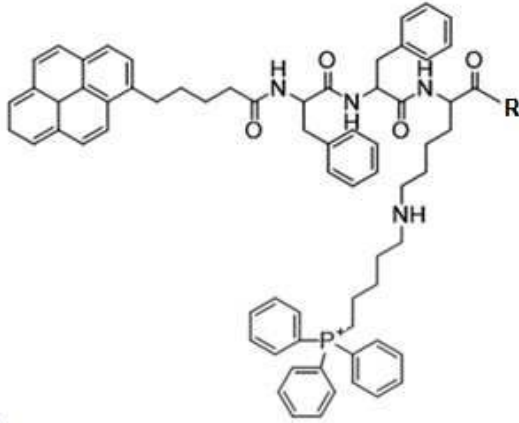
청구항 9

제7항에 있어서, 상기 형광단은 pyrene, NBD (4-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole), perylene, naphtalene, 및 coronene으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상인, 접합체.

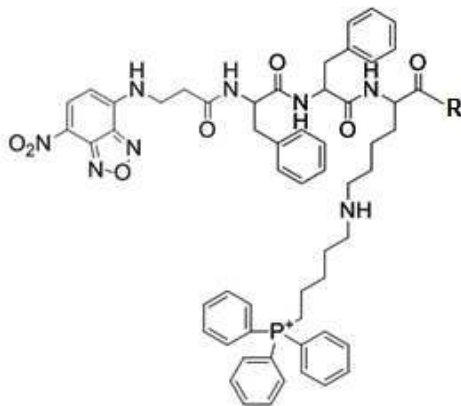
청구항 10

제7항에 있어서, 화학식 2 또는 화학식 3의 구조를 갖는, 접합체.

[화학식 2]



[화학식 3]



청구항 11

제1항 내지 제4항, 또는 제6항 중 어느 한 항의 접합체를 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 약학적 조성물의 상기 접합체는 암 세포 내 미토콘드리아에서 자기조립체를 형성하여 세포 자멸 (Apoptosis)을 유도하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 암은 자궁경부암, 간암, 피부암, 전립선암, 유선암, 유방암, 비인두 선암, 폐암, 또는 뇌종양인, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미토콘드리아 표적화 모이어티, 및 자가조립 가능한 펩타이드 분자를 포함하는 접합체, 및 이를 유효 성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 분자 자가조립 (Self-assembly)은 약물 전달, 조직공학, 유전자 치료 등의 다양한 생의학 분야에 적용될 수 있는 기능성 나노재료를 생성하는데 있어서 주목 받는 분야이다. 대부분 분자의 나노 구조로의 자가조립은 용매에서 연구되어 왔지만, 합성 양친매성 펩타이드의 세포 내부에서의 조립은 많은 연구가 되어 있지 않아서 세포 기능을 조절하기 위한 생체 모방의 조립 분야에 촉망 받는 연구 주제가 되고 있다.

[0003] 미토콘드리아는 산화적 인산화를 통해 에너지를 생산하는 상당히 역동적인 세포소기관으로써, 지방산 산화, TCA 회로, 아미노산 대사작용, 뿐 아니라 세포 자멸 (apoptosis), necrosis 및 necroptosis를 포함하는 세포 사멸 (cell death) 과정에 관련이 있다는 것이 알려져 있다. 미토콘드리아 기능의 이상은 뇌에 단백질 섬유 축적과 연관이 있는 몇몇의 퇴행성 질병, 알츠하이머 (Alzheimer) 병, 파킨슨 (Parkinson) 병, 헌팅턴 (Huntington) 병, 및 루게릭 병 (Amyotrophic lateral sclerosis)에서 보고된 바 있다. 알츠하이머 질병인 환자의 미토콘드리아에서 A β 와 같은 베타-시트 (beta-sheet) conformation이 풍부한 비정상적으로 folding된 단백질이 관찰되고, 이와 같은 비정상적으로 folding된 단백질은 세포 독성 효과를 나타낸다는 것이 알려져 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- (비특허문헌 0001) Molecular pharmaceuticals, 6(4), 1138-1144, 2009.
- (비특허문헌 0002) Molecules, 20, 19775-19788, 2015.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 일례는 미토콘드리아 표적화 모이어티, 세포내 소기관, 예컨대 미토콘드리아에서 자가조립 가능한 펩타이드 분자, 및 형광단 (fluorophore)을 포함하는 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다. 상기 n은 펩타이드 결합을 통하여 연결된 아미노산 개수로서, 2 내지 200, 2 내지 150, 2 내지 100, 2 내지 50, 2 내지 40, 2 내지 30, 2 내지 20, 2 내지 15, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6, 2 내지 4, 또는 2 내지 3의 정수일 수 있고, 상기 Xaa는 각각 독립적으로 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파라긴, 글루탐산, 아스파르트산, 글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 프롤린, 글루타민, 히스티딘, 리신, 아르기닌, 티로신, 트립토판 및 이들의 C3-C10 사이클로알킬 결합 변이체로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0005] 또한, 상기 2개 이상의 아미노산 사이는 베타 시트 (beta-sheet) 2차 구조를 형성할 수 있고, 상기 펩타이드는 베타 시트 (beta-sheet) 2차 구조를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0006] 또 다른 예는 상기 접합체 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은 암 세포의 미토콘드리아 내부에서 생성되는 섬유상 자가조립체가 세포 독성을 유발하여 암 세포를 제거 할 수 있는지 여부를 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[0008] 세포 내부에서의 합성 물질의 섬유 조립 (fibrous assembly)은, 생체 재료로서 적용되는 것 이외에, 세포내부의 밝혀지지 않은 메커니즘의 탐구를 이끌어내는 세포 요소와 상호작용을 통해 세포 기능을 변화시키는 혁신적인 접근이 될 수 있다. 유사한 섬유 (Fibrils) 또는 이들의 올리고머의 형성은 라이소좀 또는 미토콘드리아 같은 막에 결합된 세포기관 (organelle)의 통합성 (integrity)의 손실을 초래하고 결국에는 독성효과를 유도하는 몇몇의 신경 퇴행성 질병에서 보고되어 왔다.

- [0009] 상기의 이전 보고에서 영감을 얻어, 본 발명에서는 암세포의 미토콘드리아 내부에서 합성된 펩타이드의 자가조립 (Self-assembly)체의 형성으로 인해서 막의 완전한 상태의 손실 및 이를 통한 세포 사멸 (programmed cell death)을 유도하는 기술을 개발하였다.
- [0010] 상기 개념을 증명하기 위해서, 본 발명에서는 미토콘드리아로 타겟팅 리간드 역할을 하는 triphenylphosphonium (TPP), 섬유 형성 건축 블록 역할을 하는 페닐알라닌 디펩타이드 (dipeptide of phenylalanine (FF)), 및 미토콘드리아 내부에서 섬유 형성을 형광원으로 탐지하기 위한 형광단 (fluorophore) 역할을 하는 pyrene이 연결된 미토콘드리아 표적화 접합체인 Mito-FF를 제작했다. Pyrene의 형광 현미경 이미지 및 전자 현미경 이미지들을 통해 미토콘드리아에서 Mito-FF의 조립을 확인했다.
- [0011] 자가조립 과정은 암 세포 미토콘드리아의 음성 내부 막 전위에 의해서 촉발되는 미토콘드리아에서 펩타이드의 축적에 의해서 가속된다. 본 발명에서는 정상세포는 음성 막 전위가 감소되어 미토콘드리아 내부에서 섬유 형성이 되지 않기 때문에 상기 Mito-FF가 정상 세포에 대하여는 무해하다는 것을 나타낸다.
- [0012] 본 발명의 일례는 미토콘드리아 표적화 모이어티, 및 (Xaa)_n-Lys로 표시되는 펩타이드 포함하고, 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티는 상기 Lys 에 연결되어 있는 것이고, 상기 n은 펩타이드 결합을 통하여 연결된 아미노산 개수로서, 2 내지 200의 정수이고, 상기 Xaa는 각각 독립적으로 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파라긴, 글루탐산, 아스파르트산, 글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 프롤린, 글루타민, 히스티딘, 리신, 아르기닌, 티로신, 트립토판 및 이들의 C3-C10 사이클로알킬 결합 변이체로 이루어진 군에서 선택되며, 2개 이상의 아미노산 사이에 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 형성하는 것일 수 있고, 상기 펩타이드는 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 포함하는 것인, 접합체 (conjugate)를 제공한다.
- [0013] 상기 펩타이드 (Peptide)는 3 내지 201개의 아미노산이 펩타이드 결합을 통해 연결된 것을 의미하고, 상기 펩타이드는 (Xaa)_n-Lys로 표시될 수 있다. 상기 n은 펩타이드 결합을 통하여 연결된 아미노산 개수로서, 2 내지 200, 2 내지 150, 2 내지 100, 2 내지 50, 2 내지 40, 2 내지 30, 2 내지 20, 2 내지 15, 2 내지 10, 2 내지 8, 2 내지 6, 2 내지 4, 또는 2 내지 3의 정수일 수 있고, 상기 Xaa는 각각 독립적으로 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파라긴, 글루탐산, 아스파르트산, 글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 프롤린, 글루타민, 히스티딘, 리신, 아르기닌, 티로신, 트립토판 및 이들의 C3-C10 사이클로알킬 결합 변이체로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으며, 예컨대 상기 n은 2이고 상기 Xaa는 동일한 페닐알라닌, 알라닌, 사이클로헥실 알라닌, 또는 발린이 펩타이드 결합을 이루는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0014] 상기 펩타이드 (Xaa)_n-Lys는 아미노산의 N-말단에서 C-말단 순으로 각각의 아미노산 또는 아미노산의 R 그룹에 C3-C10 사이클로알킬기가 결합한 변이체 (C3-C10 사이클로알킬 결합 변이체)가 펩타이드 결합으로 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 상기 펩타이드 (Xaa)_n-Lys의 Lys의 C-말단의 카르복실기의 하이드록시기는 아민기, 알코올기, 에테르기, 및 아세틸기로 이루어진 군에서 선택된 것과 치환된 것일 수 있으며, 특정한 화학적 그룹이 결합되지 않을 수도 있으며, 이외에 다른 화학적 그룹이 화학적 결합을 이룬 것 일 수도 있으며, 예컨대 아민기가 결합한 것일 수 있다.
- [0016] 상기 C3-C10 사이클로알킬 결합 변이체는 탄소의 숫자가 3 내지 10인 사이클로알킬이 상기 아미노산의 R 그룹에 결합한 것일 수 있으며, 예컨대 알라닌의 R 그룹인 메틸기의 탄소에 사이클로헥실이 결합한 사이클로헥실 알라닌 (Cyclohexyl alanine; CHA)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 상기 펩타이드는 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 펩타이드는 펩타이드에 내부에 존재하거나 다른 펩타이드에 존재하는 2개 이상의 아미노산 사이에 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 형성하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 상기 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조는 단백질을 구성하는 아미노산 서열간의 상호작용으로 형성되는 2차 구조의 하나로서 수평적으로 연결되는 인접 분자간의 수소결합을 통해 형성된다. 상기 베타 쉬트 2차 구조는 많은 인간의 질병에서 단백질 영집 (aggregates) 또는 섬유 형성과 관계 있는 것으로 알려져 있다.
- [0019] 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티 (moiety)는 세포 내부의 미토콘드리아로 해당 물질을 표적화 시키는 기능을 하는 것을 의미하며, 예컨대 TPP (triphenylphosphonium)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 또한, 본 발명에서 접합체를 구성하는 미토콘드리아 표적화 모이어티로 인하여 본 접합체가 세포 내부의 미토콘드리아로 표적화 될 수 있으며, 미토콘드리아의 이중막을 통과하여 상기 접합체가 미토콘드리아 내부로 들어갈 수 있다.

[0021] 본 발명에서 상기 접합체는 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티로 인하여 미토콘드리아로 들어갈 수 있으며, 상기 미토콘드리아 내부로 들어간 접합체는 암세포 특이적으로 암세포의 미토콘드리아 내부에서 합성된 펩타이드의 자가조립 (Self-assembly)체를 형성하여 세포 자멸을 유도할 수 있다.

[0022] 상기 암 세포 내 미토콘드리아에서 자가조립체의 형성에 관하여, 암 세포의 경우 암 세포 미토콘드리아의 큰 음성 내부 막 전위에 의해서 상기 약학적 조성물에 포함되어 있는 펩타이드가 축적되고 이를 통해 자가조립 과정이 가속되어 일어나지만, 정상세포의 경우는 음성 막 전위가 암세포에 비해 작기 때문에 펩타이드가 충분히 축적되지 못하여 미토콘드리아 내부에서 자가조립에 의한 섬유 형성이 이뤄지지 않아 상기 자가조립체가 형성되지 않는다.

[0023] 상기 펩타이드에 연결된 미토콘드리아 표적화 모이어티의 개수는 1 내지 상기 (Xaa)_n-Lys로 표시되는 펩타이드에 존재하는 아민기 개수 범위에서 선택될 정수일 수 있다. 상기 펩타이드의 C 말단에 아민기가 존재하는 경우, 상기 펩타이드에 연결된 미토콘드리아 표적화 모이어티의 개수는 1 내지 상기 리신 아미노산의 개수 (m)에 1을 더한 숫자인 m+1개 이내의 정수일 수 있다. 일 예에서, 상기 펩타이드에 연결된 미토콘드리아 표적화 모이어티의 개수는 1 개 또는 2개일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

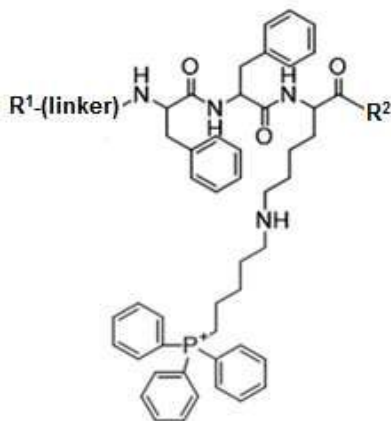
[0024] 본 발명에서 상기 접합체의 펩타이드 N-말단은 형광단과 아마이드 결합으로 연결된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0025] 상기 형광단 (fluorophore)은 유기 화합물이 형광을 발하기 위해 필요한 원자단을 말한다. 본 발명에서 상기 형광단은 상기 펩타이드의 N-말단에 아마이드 결합으로 연결된 것으로, pyrene, NBD (4-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole), perylene, naphtalene, coronene, 및 방향족으로 이루어진 화합물로 평평한 구조를 가지고 있어 파이결합으로 서로 쌓이기 쉬운 형광단으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상이 될 수 있으며, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 상기 펩타이드와 미토콘드리아 표적화 모이어티, 펩타이드와 형광단, 또는 이들 모두는 직접연결 된 것이거나, 링커를 통하여 연결된 것 일 수 있다. 상기 링커는 탄소수 1 내지 10개, 1 내지 5개, 1 내지 4, 또는 2 내지 3 인 알킬기 (alkyl), 알켄기 (alkene), 알카인기 (alkyne)가 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 상기 링커는 한 말단에 펩타이드와 아마이드 결합 등의 적절한 결합을 형성할 수 있는 관능기 (functional group)를 포함하는 것일 수 있다.

[0027] 상기 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 하기 화학식 1로 표현될 수 있다:

[0028] [화학식 1]



[0029]

[0030] 상기 화학식 1에서,

[0031] R¹은 수소 또는 형광단을 의미하는 것으로, 수소, pyrene, NBD (4-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole), perylene, naphtalene, coronene, 및 방향족으로 이루어진 화합물로 평평한 구조를 가지고 있어 파이결합으로 서로 쌓이기 쉬운 형광단으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상일 수 있고,

[0032] 상기 링커 (linker)는 펩타이드의 N-말단과 형광단을 연결해주는 것으로, 존재하지 않거나, 탄소수 1 내지 10개, 1 내지 5개, 1 내지 4, 또는 2 내지 3인 알킬기 (alkyl), 알켄기 (alkene), 알카인기 (alkyne)가 될 수

있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

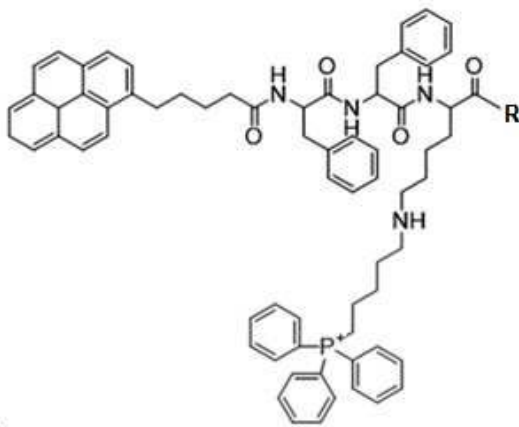
[0033] 또한 상기 링커는 한 말단에 펩타이드와 아마이드 결합 등의 적절한 결합을 형성할 수 있는 관능기 (functional group)를 포함하는 것일 수 있으며, pyrene, NBD (4-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole), perylene, naphtalene, coronene, 및 방향족으로 이루어진 화합물로 평평한 구조를 가지고 있어 파이결합으로 서로 쌓이기 쉬운 형광단으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상과 상기 펩타이드를 아마이드 결합을 통해 연결해 주는 것을 수 있다.

[0034] 다마, 상기 R¹은 수소인 경우, 링커는 존재하지 않을 수 있으며,

[0035] R²는 펩타이드의 C-말단 (즉, 리신의 C 말단) 부위로서, 하이드록시기 (OH), 아민기, 알킬기, 알코올기, 에테르기, 및 아세틸기, (상기, 알킬기, 알코올기, 에테르기 및 아세틸기는 탄소수 1 내지 20, 탄소수 1 내지 10, 또는 탄소수 1 내지 5임)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

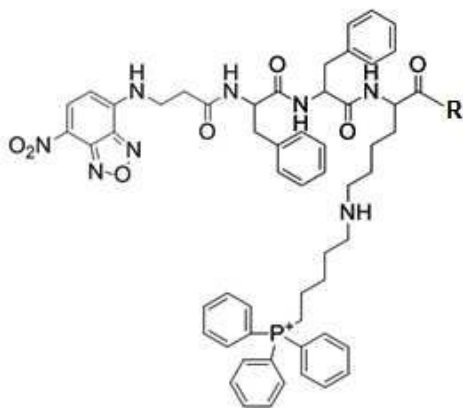
[0036] 일 예에서, 상기 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 화학식 2 또는 화학식 3의 구조를 갖는 것일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] [화학식 2]



[0038] .

[0039] [화학식 3]



[0040] .

[0041] 상기 화학식 2에서 상기 R이 아민기인 것은 하기 실시예에서 Mito-FF라고 불리는 것으로서, 암 세포내의 미토콘드리아에서 서로 같거나 다른 접합체와 자가조립하여 섬유를 형성할 수 있고, 상기 화학식 3에서 상기 R이 아민기인 것은 하기 실시예에서 Mito-FF-NBD라고 불리는 것으로서, 암세포내의 미토콘드리아에서 서로 같거나 다른 접합체와 자가조립하여 섬유를 형성할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 상기 접합체는 양친매성을 나타낼 수 있으며, 상기 양친매성은 극성 및 비극성 물질 모두에 대해 모두 친화성을 갖는 상태를 의미하며, 본 발명의 접합체에서는 펩타이드에 포함된 비극성 아미노산과 형광단이 소수성을, 극성 아미노산이 친수성을 띄어서 접합체 전체적으로 양친매성을 나타낼 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 상기 접합체는 이성질체 형태로 존재할 수 있으며, 이성질체는 분자식은 같으나 공간배열이 동일하지 않은 화합

물을 의미하며, 바람직하게는 입체 이성질체 (Stereoisomer)를 의미한다. 입체 이성질체에는 거울상 이성질체 (Enantiomer)와 부분입체 이성질체 (Diastereomer)가 존재한다. 거울상 이성질체는 오른손과 왼손의 관계처럼 그 거울상과 서로 겹쳐지지 않는 이성질체를 말하며, 이를 광학 이성질체 (Optical isomer)라고도 한다. 부분 입체 이성질체는 거울상 관계가 아닌 입체 이성질체를 말하며, 구성 원자들의 공간적 배열이 다른 부분이성질체와 사이클로알케인과 알켄 화합물에서 탄소-탄소 결합의 자유롭지 못한 회전 때문에 원자의 공간 배열이 달라 생긴 cis-trans 이성질체로 나눌 수 있다.

- [0044] 본 발명의 또 다른 일례는 미토콘드리아 표적화 모이어티 및 (Xaa)_n-Lys로 표시되는 펩타이드 포함하고, 상기 미토콘드리아 표적화 모이어티는 상기 Lys 에 연결되어 있는 것이고, 상기 n은 펩타이드 결합을 통하여 연결된 아미노산 개수로서, 2 내지 200의 정수이고, 상기 Xaa는 각각 독립적으로 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파라긴, 글루탐산, 아스파르트산, 글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 프롤린, 글루타민, 히스티딘, 리신, 아르기닌, 티로신, 트립토판 및 이들의 C3-C10 사이클로알킬 결합 변이체로 이루어진 군에서 선택되며, 2개 이상의 아미노산 사이에 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 형성하는 것이고, 상기 펩타이드는 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 포함하는 것인, 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0045] 상기 접합체는 약학적으로 허용되는 염의 형태로 존재할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 산 또는 염기의 부가염 및 그의 입체화학적 이성체 형태를 모두 포함하며, 예컨대, 유기산 또는 무기산의 부가염일 수 있다. 상기 염에는 투여 대상에서 모화합물 (parent compound)의 활성을 유지하며 바람직하지 못한 효과를 유발하지 않는 염이라면 어느 것이든 포함되는 것으로, 특별히 제한되는 것이 아니다.
- [0046] 이러한 염에는 무기염과 유기염이 포함되며, 예를 들어, 아세트산, 질산, 아스파르트산, 술폰산, 설푸릭산, 말레산, 글루탐산, 포름산, 숙신산, 인산, 프탈산, 탄닌산, 타르타르산, 히드로브롬산, 프로피온산, 벤젠술폰산, 벤조산, 스테아르산, 락트산(lactic acid), 비카르본산, 비설푸릭산, 비타르타르산, 옥살산, 부틸산, 칼슘 이데트, 카르보닉산, 클로로벤조산, 시트르산, 이데트산, 툴루엔술폰산, 푸마르산, 글루세프산, 에실린산, 파모익산, 글루코닉산, 메틸니트릭산, 말론산, 히드로클로린산, 히드로요도익산, 히드록시나프톨산, 이세티온산, 락토비오닉산, 만델산, 점액산, 나프실릭산, 뮤코닉산, p-니트로메탄설폰산, 헥사믹산, 판토테닉산, 노노히드로젠인산, 디히드로젠인산, 살리실산, 술폰산, 술폰산일 수 있다.
- [0047] 또한, 상기 염의 형태로는, 암모늄염, 리튬염, 소듐염, 포타슘염, 마그네슘염 및 칼슘염과 같은 알칼리 및 알칼리 토금속의 염, 예를 들어, 벤자틴, N-메틸-D-글루카민, 하이드라바민 염과 같은 유기 염기를 갖는 염, 및 아르기닌, 리신과 같은 아미노산을 갖는 염을 포함한다. 또한, 상기 염 형태는 적당한 염기 또는 산으로 처리함으로써 유리 형태로 전환될 수도 있다.
- [0048] 상기 접합체, 또는 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 암 세포 내 미토콘드리아에서 자가조립체를 형성하여 세포 자멸을 유도하는 것 일수 있다.
- [0049] 상기 세포 자멸 (apoptosis)은 세포가 유전자에 의해 제어되어 죽는 방식의 한 형태로, 세포의 괴사나 병적인 죽음으로서 화상과 타박, 독극물 등의 자극에 의해 일어나는 세포의 죽음인 네크로시스와는 구별되는 것으로서, 세포가 축소되면서 시작되어, 이후 인접하는 세포 사이에 틈새가 생기고, 세포 내에서는 DNA가 규칙적으로 절단되어 단편화되는 방법으로 세포가 사망하는 것을 말한다.
- [0050] 상기 암 세포 내 미토콘드리아에서 자가조립체의 형성에 관하여, 암 세포의 경우 암 세포 미토콘드리아의 큰 음성 내부 막 전위에 의해서 상기 약학적 조성물에 포함되어 있는 펩타이드가 축적되고 이를 통해 자가조립 과정이 가속되어 일어나지만, 정상세포의 경우는 음성 막 전위가 암세포에 비해 작기 때문에 펩타이드가 충분히 축적되지 못하여 미토콘드리아 내부에서 자가조립에 의한 섬유 형성이 이뤄지지 않아 상기 자가조립체가 형성되지 않는다.
- [0051] 상기 약학적 조성물의 예방 또는 치료의 대상이 되는 암은 고형암 또는 혈액암일 수 있고, 원발성암 또는 전이암일 수 있다. 일 예에서, 상기 암은 자궁경부암, 간암, 피부암, 전립선암, 유선암, 유방암, 비인두 선암, 폐암, 또는 뇌종양으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0052] 본 발명의 약학적 조성물은 의도한 투여 방법에 적합한 임의의 형태일 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 있어서 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 약학적 조성물의 투여경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내

투여, 직장 내 투여 등을 거론할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 유효성분이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

- [0053] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 바람직하게는 경구로 투여된다. 비경구로 투여되는 경우, 본 발명의 약학 조성물은 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입 및 복강 주입 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여 경로가 결정되는 것이 바람직하다.
- [0054] 일 구현예는 경구 투여용 제형 또는 비경구 투여 제형으로 제형화된 것인 암 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0055] 본 명세서에서 제공되는 약학 조성물은, 통상의 방법에 따라 제형화 된, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 또는 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 외용제, 좌제, 멸균 주사 용액, 이식용 제제 등의 비경구용 제형 등으로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0056] 상기 약학 조성물은 유효성분 (즉, 접합체, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염) 이외에 제형화에 사용 가능한 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 약학적 조성물의 제형화에 사용될 수 있는 부형제는 담체, 비히클, 희석제, 용매, 예를 들어 1가 알코올, 예를 들어 에탄올, 이소프로판올 및 다가 알코올, 예를 들어 글리세롤 및 식용 오일, 예를 들어 대두유, 코코넛유, 올리브유, 잇꽃유, 면실유, 유성 에스테르, 예를 들어 에틸 올레에이트, 이소프로필 미리스테이트; 결합제, 애주번트, 가용화제, 증점제, 안정화제, 붕해제, 활택제, 윤활제, 완충제, 유화제, 습윤제, 현탁제, 감미제, 착색제, 풍미제, 코팅제, 방부제, 항산화제, 가공제, 약물 전달 개질제 및 향상제(enhancer), 예를 들어 인산칼슘, 마그네슘 스테이트, 활석, 단당류, 이당류, 전분, 젤라틴, 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 텍스트로스, 하이드록시프로필- β -사이클로덱스트린, 폴리비닐피롤리돈, 저융점 왁스, 이온 교환수지 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0059] 상기 약학적 조성물은 다양한 경구 투여 제형의 형태로 제형화 될 수 있다. 예를 들어, 정제, 환제, 경·연질 캡슐제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭서제(elixirs) 등의 임의의 경구 투여용 제형으로 될 수 있다. 이러한 경구 투여용 제형은 각 제형의 통상적인 구성에 따라 상기 유효 성분 외에, 예를 들어, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로스 및/또는 글리신 등의 희석제나, 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜 등의 활택제 등의 제약상 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [0060] 또한, 상기 경구 투여용 제형이 정제인 경우, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐피롤리딘 등의 결합제를 포함할 수 있고, 경우에 따라, 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염과 같은 붕해제나, 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 또는 감미제 등을 포함할 수도 있다.
- [0061] 그리고, 상기 약학적 조성물은 비경구투여 제형의 형태로 제형화 될 수도 있는데, 이러한 경우 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 등의 비경구투여 방법에 의해 투여된다. 이때, 상기 비경구투여 제형으로 제제화하기 위하여, 상기 약학적 조성물은 유효 성분이 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합되어 용액 또는 현탁액으로 제조되고, 이러한 용액 또는 현탁액이 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제조될 수 있다.
- [0062] 또한, 상기 약학적 조성물은 멸균되거나, 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제를 더 포함할 수도 있고, 기타 치료적으로 유용한 물질을 더 포함할 수도 있으며, 혼합, 과립화 또는 코팅의 통상적인 방법에 따라 제제화될 수 있다.
- [0063] 상기 약학적 조성물 내의 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 함량은 약학 조성물의 사용 목적, 제형의 형태 등에 따라서 적절하게 조절 가능하며, 예컨대, 약학 조성물의 전체 중량 기준으로 0.001 내지 99중량

%, 0.001 내지 90중량%, 0.001 내지 50중량%, 0.01 내지 50중량%, 0.1 내지 50중량%, 또는 1 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 또한, 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 접합체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 치료상 유효량은 질 환 치료 효과를 기대하기 위하여 투여에 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 환자의 질환 종류, 질환의 경중, 투여되는 유효성분의 종류, 제형의 종류, 환자의 연령, 성별, 체중, 건강 상태, 식이, 약물의 투여 시간 및 투여 방법에 따라 조절될 수 있다. 예를 들어, 사람을 포함하는 포유류에 대하여, 하루에 0.01 내지 500 mg/kg(체 중)의 약학적 유효량으로 투여될 수 있다. 상기 약학적 유효량은 원하는 효과, 예를 들어 암의 치료 및/또는 예 방 효과를 얻을 수 있는 양에 따를 수 있다. 상기 약학적 유효량은 1 일 1 회 또는 2 회 이상 분할되어 경구 또 는 비경구적 경로(예를 들어, 정맥 주사, 근육 주사 등)를 통해 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0065] 본 발명은 미토콘드리아 표적화 모이어티 및 (Xaa)_n-Lys로 표시되는 펩타이드 포함하고, 상기 미토콘드리아 표 적화 모이어티는 상기 Lys 에 연결되어 있는 것이고, 상기 n은 펩타이드 결합을 통하여 연결된 아미노산 개수로 서, 2 내지 200의 정수이고, 상기 Xaa는 각각 독립적으로 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 페닐알라닌, 아스파 라긴, 글루탐산, 아스파르트산, 글리신, 알라닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 프롤린, 글루타민, 히스티딘, 리신, 아르기닌, 티로신, 트립토판 및 이들의 C3-C10 사이클로알킬 결합 변이체로 이루어진 군에서 선택되며, 2 개 이상의 아미노산 사이에 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 형성하는 것이고, 상기 펩타이드는 베타 쉬트 (beta-sheet) 2차 구조를 포함하는 것인, 접합체 (conjugate)에 관한 것으로, 상기 접합체 또는 이의 약학적으 로 허용 가능한 염을 포함하는 약학적 조성물을 이용하여 암의 예방 또는 치료에 적용이 가능할 것으로 기대된 다.

도면의 간단한 설명

[0066] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 Mito-FF의 합성과정을 도식화한 것이다.
 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 Mito-FF의 분자 구조를 나타낸 것이다.
 도 3는 본 발명의 실시예에 따른 물에 존재하는 Mito-FF의 TEM 이미지를 나타낸 것이다.
 도 4은 본 발명의 실시예에 따른 pyrene excitation 방법을 이용하여 Mito-FF의 CAC를 결정한 것을 나타낸 것이 다.
 도 5은 본 발명의 실시예에 따른 CGMS (Coarse Grained Molecular Simulation)를 이용하여 Mito-FF의 분자적 시뮬레이션 한 결과를 나타낸 것이다
 도 6은 본 발명의 실시예에 따른 Mito-FF의 radial number density 분석을 나타낸 것으로, 섬유의 표면을 따라 서 Phe 및 TPP의 높은 밀도를 나타낸다.
 도 7은 본 발명의 실시예에 따른 ATR 모드에서 Mito-FF의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 것이다.
 도 8은 본 발명의 실시예에 따른 Mito-FF의 emission 스펙트럼을 나타낸 것으로, monomeric 및 excimer의 emission을 나타낸다.
 도 9은 본 발명의 실시예에 따른 HeLa 세포에서 Mito-FF의 세포 내부화를 나타낸 것으로, 상단은 37℃에서 수행 한 것이고, 하단은 4℃에서 수행한 것을 나타낸다.
 도 10은 본 발명의 실시예에 따른 미토콘드리아의 축적을 결정하기 위한 계통도를 나타낸다.
 도 11은 본 발명의 실시예에 따른 HeLa 세포에서 Mito-FF가 미토콘드리아에 축적됨을 나타낸 것이다.
 도 12은 본 발명의 실시예에 따른 Mito-FF를 처리한 HeLa 세포에서 two photon 분석을 수행한 것으로, monomeric emission 범위인 필터 범위 380 - 420 nm에 비해서 필터 범위 420 - 480 nm에서 excimer emission의 높은 밀도를 나타낸다.
 도 13은 본 발명의 실시예에 따른 Mito-FF-NBD의 분자 구조를 나타낸 것이다.
 도 14은 본 발명의 실시예에 따른 상단은 HeLa 세포에 Mito-FF와 Mito-FF-NBD를 배양한 경우 미토콘드리아 내부 에서 Mito-FF와 Mito-FF-NBD의 공동 조립하여 밝은 녹색 형광으로 나타낸 결과이고, 하단은 Mito-FF-NBD만

HeLa 세포에 배양한 경우 상기 공동 조립이 관찰되지 않은 결과이다.

도 15은 본 발명의 실시예에 따른 마우스 뇌에서 분리된 세포의 미토콘드리아 내부의 Mito-FF 점유를 나타내는 TEM 이미지이다.

도 16은 본 발명의 실시예에 따른 공초점 현미경 분석을 통해서 대조군 (Control)과 대비하여 Mito-FF를 처리했을 때 미토콘드리아의 수축을 확인한 것이다.

도 17은 본 발명의 실시예에 따른 HeLa 세포의 미토콘드리아 내부의 ROS 생성을 Mito Sox를 통해 측정하는 것이다.

도 18은 본 발명의 실시예에 따른 Mito-FF 점유와 배양된 HeLa 세포에서 상당한 ROS 생성되었음을 DHE를 통해 확인한 것이다.

도 19은 본 발명의 실시예에 따른 Mito-VV (상단) 또는 Mito-FxFx (하단)를 HeLa 세포와 배양한 후에 TEM 이미지 관찰 (g, j), TMRM에서의 time laps 형광 발산을 1시간, 및 6시간에서 측정 (h, k)하고, DHE를 사용하여 세포내의 ROS 생성 분석 (i, l)을 수행한 결과이다.

도 20은 본 발명의 실시예에 따른 Mito-GG를 HeLa 세포와 배양한 후에 TEM 이미지 관찰 (m), TMRM에서의 time laps 형광 발산을 1시간, 및 6시간에서 측정 (n)하고, DHE를 사용하여 세포내의 ROS 생성 분석 (o)을 수행한 결과이다.

도 21은 본 발명의 실시예에 따른 Mito-FF의 처리 이후에 미토콘드리아가 심각하게 손상되었음을 확인한 TEM 이미지이다.

도 22은 본 발명의 실시예에 따른 Mito-GG의 처리 이후에 미토콘드리아가 손상되지 않았음을 확인한 TEM 이미지이다.

도 23은 본 발명의 실시예에 따른 TMRM 및 Mito-FF를 HeLa 세포에 처리한 후 미토콘드리아의 시간 의존적인 막 탈분극화를 측정하는 것을 나타낸다.

도 24은 본 발명의 실시예에 따른 DHE를 통해서 대조군 (Control)과 대비하여 ROS의 생성을 측정하는 것을 나타낸다.

도 25은 본 발명의 실시예에 따른 대조구 펩타이드 (Control peptide)의 분자적 디자인을 나타낸다.

도 26은 본 발명의 실시예에 따른 Mito-FF에 의해서 유도된 모델 liposome의 막 파괴를 나타낸 것이다.

도 27은 본 발명의 실시예에 따른 Mito-GG에 의해서 유도된 모델 liposome의 막 파괴를 나타낸 것이다.

도 28은 본 발명의 실시예에 따른 시간의 경과에 따른 Mito-FF 점유의 분자적 시뮬레이션 및 이들의 막 통과 능력을 분석한 것이다.

도 29은 본 발명의 실시예에 따른 HEK293T 세포에서 24시간 배양한 후에 세포 생존력을 측정하는 것이다.

도 30은 본 발명의 실시예에 따른 TPP가 결합된 펩타이드의 분자 구조를 나타낸 것이다.

도 31은 본 발명의 실시예에 따른 TPP가 결합된 펩타이드의 세포 생존력 측정결과이며, 상기 펩타이드는 세포 독성이 없음을 나타낸다.

도 32은 본 발명의 실시예에 따른 HeLa 세포에서 Fxr 펩타이드를 24시간 배양한 후에 세포 생존력을 측정하는 결과이다.

도 33은 본 발명의 실시예에 따른 Mito-펩타이드에 대한 다양한 세포주에서 세포독성 (Cytotoxicity)을 나타낸 것이다.

도 34은 본 발명의 실시예에 따른 Mito-FF에 의한 세포 죽음을 Annexin V/PI 염색을 통해 측정하여, 상기 세포 죽음이 초기 세포 자멸 (early apoptosis)에 의한 것임을 나타낸 것이다.

도 35은 본 발명의 실시예에 따른 유동 세포 분석 (Flow cytometry analysis)를 통해서 Mito-FF에 의해서 유발된 초기 세포 자멸을 확인하는 것을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0067] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [0069] **실시예 1. Mito-FF의 합성과 특징화**
- [0070] Mito-FF는 Phe-Phe-Lys (FFK)의 3개의 펩타이드를 기본 단위로 구성되어 있고, 9-fluorenylmethoxycarbonyl chemistry (Fmoc)를 기초로 표준 고체 상 합성 (standard solid phase synthesis (SSPS))방법을 이용하여 하기와 같이 합성하였다.
- [0071] Mito-FF는 0.25 nmol 규모로 표준 9-fluorenylmethoxycarbonyl solid-phase peptide synthesis를 사용하여 합성했다. 합성된 펩타이드에 대하여 diisopropyl ethyl amine (DIPEA, 500 μ mol)의 존재하에서 1-pyrene carboxylic acid (500 μ mol) 및 O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N''-tetramethyluronium hexafluorophosphate (HBTU) (500 μ mol)을 처리하고 DMF (dimethylformamide)상에서 상온에서 24시간 동안 저어 가며 섞어주었다. Resin은 filtration을 통해 모으고 반응하지 않은 화합물을 제거하기 위해서 DMF로 세척했다. cleavage cocktail TFA/Water/Tri isopropyl amine mixture (9.5:0.5:0.5)를 사용하여 resin에서 절단한 생산물을 차가운 조건에서 침전시켰다. 생산물은 HPLC에 의해서 정제하고, MALDI-TOF/TOF를 사용하여 질량분석을 수행하였다. triphenyl phosphonium (TPP)의 conjugation을 위해서, 합성된 펩타이드 (0.02 mmol)는 DMF 상에서 1-hexyl triphenylphosphonium bromide salt (0.04 mmol)과 tri ethyl amine (0.02 mmol)을 처하고 상온에서 12시간 동안 저어 가며 섞어주었다. 순수한 생산물은 HPLC를 이용하여 정제하고, 말린 후 얼려서 보관한다.
- [0072] 상기의 합성과정은 도 1에 도식화되어 나타나 있다.
- [0073] 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 상기의 방법으로 합성된 Mito-FF는 펩타이드의 N 말단은 형광 검출이 가능하게 하기 위해서 pyrene (butyric acid)과 연결되어 있고, 리신의 곁사슬의 아민 그룹은 미토콘드리아 부티르산 아로 타겟팅을 위해 TPP와 연결되어 있다. Mito-FF에서 pyrene 부분은 형광원으로 작용할 뿐만 아니라 소수성 결합력 및 파이-파이 상호결합을 향상시켜 자가조립을 향상시킨다.
- [0074] 도 3에 나타난 것과 같이, Mito-FF를 saline phosphate buffers (10 mM, PBS) 또는 물에 녹여서 TEM (Transmission electron microscopy) (JEOL, JEM-1400)으로 관찰했을 때, 두 경우 모두에서 왼쪽 방향으로 단일 섬유당 500 nm의 평균길이 및 10 nm의 평균넓이를 가지는 나노섬유 (nanofibers)로 자가조립됨을 확인할 수 있었다.
- [0075] 세포 내부에서 분자가 자가조립이 되기 위해서는 세포내의 분자의 농도가 CAC (Critical aggregation concentration) 값보다 훨씬 높아야 한다. 본 발명의 Mito-FF가 세포 내부에서 자가조립이 될 수 있는지 확인하기 위해서 Mito-FF의 CAC값을 하기와 같은 방법으로 살펴보았다.
- [0076] Pyrene은 응집하지 않은 분자 개체로 존재할때와, 응집하여 존재할때excitation spectrum에서의 344 nm와 339 nm 의 빛의 강도가 달라지게 된다. 상기 344 nm와 339 nm에서의 excitation spectrum을 측정하고 344 nm와 339 nm excitation spectrum의 비율을 구하여 도 4의 표준곡선을 통해 Mito-FF의 CAC값을 결정하였다.
- [0077] 그 결과 도 4에서 나타난바와 같이, Mito-FF의 CAC 값은 60 μ M이다.
- [0078] 상기 CAC 값의 결과를 통해, 본 발명의 Mito-FF가 세포 내부에서 60 μ M 이상의 농도가 될 때, 자가조립을 할 수 있음을 예상 할 수 있었다.
- [0079] Mito-FF이 세포 내부에서 자가조립하는 메커니즘을 알기 위해서, Accelrys 사의 Material Studio 프로그램을 이용한 분자적 시뮬레이션을 제조사의 프로토콜 대로 수행하여 Mito-FF가 반지름 및 길이가 각각 2.5 nm 및 22 nm 인 Coarse-Grained Molecular dynamics (CGMS)를 통해서 자가조립되는지 여부를 확인하였다. 상기 시뮬레이션은 2 us와 1.56 us 사이에서 수행하였고 그 분석은 최종 50 ns의 프레임으로 변환하였다.
- [0080] 그 결과, 도 5의 오른쪽에 나타난 것과 같이 Mito-FF가 자가조립되어 나선형 섬유를 형성하였다. Mito-FF의 자가조립 과정에서, pyrene 및 페닐알라닌 그룹 (Phe)은 pyrene-pyrene 및 페닐알라닌-페닐알라닌의 근접 거리가 0.5 nm인 섬유를 따라서 쌓였다.
- [0081] 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 상기 분자적 시뮬레이션을 통해 얻은 방사상 숫자 밀도 분석 (radial number density analysis) 결과 TPP의 숫자 밀도는 pyrene과 이어지는 섬유의 표면 주위에서 가장 높았다.
- [0082] 상기와 같은 결과를 통해, Mito-FF의 나노섬유 형성을 위한 추진력은 주로 페닐알라닌 그룹 및 pyrene 부분 사

이의 파이-파이 상호작용 및 펩타이드 골격의 수소결합에 기인함을 알 수 있다.

- [0083] 도 7에서 볼 수 있는 바와 같이, FT-IR 분석 결과 아마이드 I 피크가 1637 cm^{-1} 근처에 나타났고, 상기 피크의 존재를 통해 베타 쉬트 (beta-sheet) 구조의 존재를 알 수 있었고, 1675 cm^{-1} 에서의 피크를 통해서 Mito-FF 섬유의 anti-parallel 베타 confirmation이 존재함을 알 수 있었다.
- [0084] Mito-FF의 응집현상을 형광측정으로 살펴보기 위해, PBS와 MeOH 상에서 형광을 살펴보았다. Pyrene 분자는 개별적으로 존재할 때, 400 nm 파장의 옅은 파란색을 보이고, 응집해서 존재할 때는 들뜬 상태에서 복합체를 형성하기 때문에 450 nm의 하늘 파란색을 보인다. 따라서 Pyrene의 발광을 통해 분자의 응집상태인지, 개별상태인지를 살펴볼 수 있다.
- [0085] Mito-FF의 스펙트로 형광측정 분석결과 도 8에서와 같이, PBS 상 (또는 물)의 450 nm에서 강렬한 파란색 (하늘 파란색)을 발산했다. 이를 통해 Mito-FF는 pyrene 복합체를 형성함 (Mito-FF의 응집현상)을 알 수 있었고, 또한 이러한 형광의 발산은 하늘 파란색 발산처럼 UV 램프하에서 맨눈으로 구분이 가능하다. 그러나, MeOH 상에서는 상기 발산이 감소한 옅은 파란색이 관찰되어 비응집 상태에서 pyrene이 존재함을 알 수 있다.
- [0087] **실시예 2. 미토콘드리아의 공동 위치화 및 세포 출입 모드**
- [0088] 암세포는 미토콘드리아 내부 막 전위가 상당히 낮은 음성값을 가지므로, 본발명의 Mito-FF에 존재하는 TPP를 통해서 암 세포 내 흡수 및 미토콘드리아 내부로의 통과가 잘 일어날 수 있다.
- [0089] 미토콘드리아는 신진대사 (Metabolism)를 충실히 조절하기 위해서 다공성 외부 막 및 단백질이 풍부한 안쪽 막으로 구성된 특징이 있고, 이러한 특징으로 인해서 대부분의 외부 물질이 전하를 띤 막을 통과하여 미토콘드리아 내부로 들어가는 것이 제한된다. 막을 가로질러 통과하기 위해서, 분자들은 수반되는 물 분자를 제거하는 것과 관련된 활성화 에너지를 극복하기 위해서 필요하다. 비편재화된 양성 전하를 띤 분자들은 막을 잘 통과 및 미토콘드리아의 내부로 효과적으로 진입하기 위해서 이러한 활성화 에너지를 낮추기 위해서 발견되었다. 3개의 페닐 그룹에서의 비편재화된 양성 전하는 공명에 의해서 안정화되고 이를 통해 TPP가 결합된 분자가 미토콘드리아를 통과하여 들어갈 수 있게 한다.
- [0090] 암 세포의 미토콘드리아로의 진입과정은 주로 대략 -220 mV의 상당한 음성 내부 막 전위에 의해서 촉발된다. 미토콘드리아의 공동위치화를 확인하기 위해서, 20 μm 의 Mito-FF는 37°C에서 1시간동안 HeLa 세포와 배양하고 측정 20분 전에 Mito SOX (mitotracker) red를 배양했다.
- [0091] 공초점 현미경 분석 (confocal microscopy analysis) (LSM-780, Zeiss) 결과는 도 9에 나타나있다. 도 9는 Mito SOX (mitotracker)의 붉은색 형광과 Mito-FF의 푸른색 형광 사이의 겹침을 나타내고, 이것은 Mito-FF가 미토콘드리아에 효과적으로 위치하고 있음을 확인시켜준다. 게다가, lyso-tracker의 형광은 Mito-FF의 형광과 어떠한 겹침도 나타내지 않았고, 이는 공동 위치화가 미토콘드리아에 특이적임을 나타낸다.
- [0092] 4°C에서 세포 흡수 분석은 이와 유사한 결과를 나타냈고 이는 펩타이드가 에너지 독립적인 pathway로 들어감을 나타낸다. 이것은 Mito-FF가 세포 막을 통과해 확산하고 쉽게 세포에 흡수됨을 나타내며 이것은 작은 물질에 기초한 약물의 추가적인 장점이고, 반면에 조립된 구조 또는 높은 분자량 물질은 일반적으로 endocytosis같은 메커니즘에 필요한 복잡한 에너지를 통해 세포 내부를 들어가는 것과 차이가 있다.
- [0094] **실시예 3. 미토콘드리아 내부의 조립 (Intra-Mitochondrial assembly)**
- [0095] 자가조립의 과정의 유발은 순전히 그 분자의 농도에 의해서 결정되기 때문에, 미토콘드리아 내부의 Mito-FF의 농도를 확인하는 것은 중요한 일이다. Mito-FF의 농도 의존적인 발산 스펙트럼 (Emission spectra)을 사용하여 미토콘드리아에서의 Mito-FF의 국소적 농도를 확인하였다. 미토콘드리아에서 Mito-FF의 농도는 하기의 방법으로 수행하였고, 그 구체적인 계통도 (schematic diagram)는 도 10에 나타나 있다.
- [0096] Mito-FF와 HeLa 세포를 3시간 동안 배양하고 세포를 완전히 파괴한 후에 세포적 흡수를 관찰하고 이어서 발산 스펙트럼을 확인하고 동일한 조건하에서 Mito-FF의 교정선 (calibration plot)과 비교했다. Mito-FF에 대한 공초점 이미지 분석은 Mito-FF가 미토콘드리아 내부에 위치하고 이것은 세포 용해물에서 얻은 Mito-FF가 완전히 미토콘드리아에 유래한 것임을 확인시켜준다.
- [0097] 도 11에서 나타난 것과 같이, 미토콘드리아 안에서의 Mito-FF의 농도가 수 mM이상이므로 이는 CAC보다 훨씬 높은 것이기 때문에 자가조립을 할 수 있는 농도임을 확인할 수 있다.

- [0098] 미토콘드리아에서의 조립에 대한 증거를 추가적으로 더 얻기 위해서, Mito-FF를 배양한 HeLa 세포에 대하여 하기와 같은 방법으로 이중 광자 (two photon) 공초점 분석을 수행했다.
- [0099] Two photons은 단일 photon 여기 (excitation) quantum 현상이 일어나기 위해서 필요한 photon의 대략 절반의 에너지 (두 배의 파장)를 가지고 실험을 하는 것으로 Pyrene 여기 최대 파장이 343 nm 주변이므로, 우리는 780 nm에서 여기 파장을 설정하고 Mito-FF를 처리한 HeLa 세포에서 발산을 분석했다._
- [0100] pyrene은 그것의 특별한 분광 및 광 물리학적 특징으로 인해서 단백질, 지방, 핵산, 및 생물 막을 포함한 몇몇의 생물질의 깊이 있는 연구를 하는데 사용되는 분자적 프로브이다. 이것은 단백질 구조, 분자적 조직, 및 conformation에 관한 정보를 얻기 위해서 널리 사용된다. Pyrene의 이러한 특성으로 인해, pyrene이 미토콘드리아 내부의 자가 조립의 표시자로서 작용할 수 있기 때문에 Mito-FF에 pyrene을 결합시켰다.
- [0101] 생물질 conformation 분석을 위해 사용될 수 있는 pyrene 형광 발산의 주목할만한 특징은 두 개의 pyrene이 서로 최소한 10 Å⁰의 거리로 떨어져 있을 때 420 nm에서 480 nm의 긴 파장에서 비구조화된 밴드가 나타난다는 것이다.
- [0102] 이중 광자 (two photon) 공초점 분석을 수행결과 도 12에 나타난 것과 같이, Mito-FF의 CGMS 분자적 시뮬레이션에서 Mito-FF의 조립과정 동안 두개의 pyrene이 0.5 nm의 거리로 서로 향하고 있음을 나타내고, 420 nm의 밝은 발산을 결과를 통해서 활성화 상태의 이량체가 형성되었음을 확인할 수 있다.
- [0103] 한편 도 9에서 나타난 Mito-FF를 처리한 HeLa 세포에 대한 공초점 분석에서 관찰된 파란색 발산은 대략 410 nm이기 때문에 아마도 excimeric pyrene에 속할것으로 보인다. Mito-FF를 처리한 HeLa 세포에서 excimeric 발산과 monomeric 발산의 비율의 통계적 평가에서, two photon 공초점 현미경 분석을 수행하였고 이를 통해 미토콘드리아 내부의 Mito-FF의 국소적 농도와 조립에 관한 관계를 알 수 있었다.
- [0104] 미토콘드리아 내부에서 Mito-FF가 조립됨을 확인하기 위해서, Mito-FF-NBD라고 하는 또 다른 펩타이드를 합성하였다. 도 13에서 나타난 것과 같이, Mito-FF-NBD에서 pyrene은 또 다른 환경에 민감한 염료로 교체하였다; 4-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole (NBD).
- [0105] NBD 염료는 생물학적 요소에 대한 이미징 연구에서 사용되는 형광단으로 친수성 환경에 비해 소수성 환경에서 보다 강렬한 형광을 나타내는 것으로 알려졌고 이러한 성질을 이용하여 세포 내부의 섬유 형성을 확인하는데 사용할 수 있다.
- [0106] 미토콘드리아 내부에서 섬유의 조립을 확인하기 위해서 Mito-FF 및 Mito-FF-NBD를 HeLa 세포와 3시간 동안 공동 배양하고 실시예 2와 같은 방법으로 공초점 현미경으로 관찰하였다.
- [0107] 그 결과 도 14에 나타난 것과 같이, 상단의 Mito-FF와 Mito-NBD를 같이 배양한 것에서는 밝은 발산을 나타냈지만, 하단과 같이 Mito-NBD만을 배양했을 때에는 이러한 밝은 발산이 관찰되지 않았다.
- [0108] 상기 결과를 통해서, Mito-FF-NBD가 Mito-FF 섬유와 공동으로 조립되고 여기에서 NBD는 소수성 환경을 향해서 노출되어야 하고 이를 통해 밝은 형광을 나타냄을 알 수 있다. 그러나, Mito-FF없이 Mito-FF-NBD만 배양하는 경우 섬유를 형성하지 못하고 결과적으로 형광이 나타나지 않음을 알 수 있다.
- [0109] 미토콘드리아에서 Mito-FF 조립의 명확한 증명을 위해서, HeLa 세포에서 미토콘드리아를 종래에 알려진 프로토콜에 따라 분리했다. 미토콘드리아 100 ug를 37 에서 Mito-FF의 10 uM과 함께 배양했다. 대조구는 Mito-FF를 주입하지 않고 미토콘드리아 100 ug를 37 에서 배양했다. 그리고 나서, 실시예 1과 같은 방법으로 TEM으로 미토콘드리아를 관찰했다.
- [0110] TEM으로 관찰한 결과, 도 15에서 볼 수 있는 바와 같이 미토콘드리아 내부에서 섬유가 형성되었다.
- [0111] 도 15의 TEM 이미지는 잘 한정된 크리스탈을 가지고 있는 구형 형태의 대조구에 비교해서 내부에서 형성된 Mito-FF 섬유를 드러낼 뿐 아니라 섬유에 의해서 파괴된 크리스탈을 포함한 미토콘드리아의 막을 나타낸다. 이것은 섬유가 미토콘드리아 대사에서 상당한 오기능 (dysfunction)을 야기하고 결과적으로 전체 세포에 손상을 줄 수 있음을 나타낸다.
- [0113] **실시예 4. Mito-FF 섬유에 의한 미토콘드리아의 오기능 (dysfunction) 및 암 세포 특이적 세포독성 (cytotoxicity)**
- [0114] Mito-FF를 HeLa 세포에 처리한 후, 공초점 현미경으로 관찰한 결과, 도 16에서 볼 수 있는 바와 같이, 대조구에

비해서 Mito-FF를 처리한 후 HeLa 세포에서 미토콘드리아가 상당히 변형되어 손상된 형태를 나타냈다.

- [0115] Mito-FF의 처리에 의한 미토콘드리아의 오기능을 확인하기 위해서, 정상적 상태하에서 밝은 형광을 나타내고 막이 탈분극됨에 따라서 사라지는 tetramethyl rhodamine dye (TMRM)를 이용하여 Mito-FF가 미토콘드리아 막 전위 탈분극을 유도하는 능력을 조사하였다. 정상 조건하에서, 미토콘드리아의 내부 막은 내부 막 공간의 H⁺의 높은 농도로 전기화학적으로 분극화 상태로 되어있다. 막을 통한 전기 화학적 농도 구배는 H⁺가 미토콘드리아의 내부 막으로 흐르게 하고 이러한 과정은 ATP 생성과 결부되어 있다. 이러한 과정을 막을 수 있는 외부 물질은 ATP 생산과 독립적으로 H⁺가 흐르도록 한다. 이러한 조건은 미토콘드리아 탈분극이라고 일컫고, 이것은 미토콘드리아의 예비적 오기능을 나타내는 역할을 한다.
- [0116] Mito-FF의 미토콘드리아 막 전위에 대한 효과를 살펴보기 위해서, HeLa 세포를 TMRM 및 Mito-FF와 배양했다. TMRM에서의 time laps 형광 발산은 1시간, 3시간, 및 6시간에서 측정되었다. TMRM의 붉은색 형광은 미토콘드리아 막이 완전히 분극화되었을 때 나타나지만, 미토콘드리아 막의 탈분극은 TMRM 붉은색 형광을 사라지게 한다. TMRM이 처리된 Mito-FF는 1시간 배양 후에 상당히 높은 붉은 형광을 나타냈고, 이것은 3시간 후에 사라지기 시작해서 6시간 이내에 완전히 사라졌다. 상기 실험 결과는 도 23에 나타나 있고, 이러한 결과를 통해, Mito-FF가 섬유를 형성하면, 미토콘드리아를 탈분극시켜 미토콘드리아의 기능을 저해시킴을 알 수 있다.
- [0117] 미토콘드리아 오기능은 활성 산소 (Reactive oxygen species (ROS)) 과도한 생성을 이끈다. Mito-FF에 의해서 유도된 산화적 스트레스를 확인하기 위해서, 우리는 Mito SOX Red를 사용하여 미토콘드리아 내부에서 ROS의 생성을 확인하였다. Mito SOX Red는 형광원 염료로서, 이것은 선택적 및 급속하게 미토콘드리아에서 축적되고 superoxide에 의해서 산화되어 붉은 형광을 나타낸다.
- [0118] 도 17에서 볼 수 있는 바와 같이, Mito-FF를 HeLa 세포와 6시간 배양한 후에 Mito SOX red에서 나타나는 붉은색 형광은 ROS가 미토콘드리아 내부에서 생성되었음을 나타낸다.
- [0119] 미토콘드리아 스트레스는 결국에는 전체 세포 스트레스를 유발할 수 있다. 이러한 예상을 확인하기 위해서, Dihydroethidium dye (DHE)를 사용하여 세포내의 ROS 생성 분석을 수행하였다. DHE는 핵의 DNA로 끼어들어서 ROS가 존재함에 따라 ethidium으로 산화되어 붉은색 형광을 나타낼 수 있다.
- [0120] 도 18에서와 같이, Mito-FF를 처리했을때 세포내에서 전체적으로 DHE의 적색 형광이 나오게 될 것을 통해 Mito-FF 섬유와 배양된 HeLa 세포에서 상당한 ROS 생성되었음을 확인할 수 있다.
- [0121] 페닐 알라닌은 알츠하이머 질병 및 다른 아밀로이드 질병(Alzheimer's Diseases (AD))에서 유독한 섬유 집합을 형성하여 아밀로이드 조립을 하는데 중요하다고 잘 알려져 있다. 섬유소 형성에 의한 미토콘드리아 손상이 페닐 알라닌 섬유소에 특이적인지 여부를 조사하기 위해서, 본 발명자들은 실험에 사용한 분자 디자인을 페닐알라닌을 발린 및 cyclohexyl 알라닌 (Cha)으로 각각 교체한 도 25와 같은 구조의 Mito-VV 및 Mito-FxFx로 확장하였다.
- [0122] Mito-VV 및 Mito-FxFx에 대하여 실시예 3과 같은 방법으로 TEM 이미지를 관찰하고, 상기와 같은 방법으로 TMRM에서의 time laps 형광 발산을 1시간, 및 6시간에서 측정하고, DHE를 사용하여 세포내의 ROS 생성 분석을 수행하였다
- [0123] 그 결과 도 19에 나타난 것과 같이, Mito-VV 및 Mito-FxFx를 HeLa 세포에 처리한 경우 TMRM의 붉은색 형광이 6시간 이내에 사라지고, 또한 Mito Sox 및 DHE를 통해서 확인되는 ROS의 생성으로 됨을 관찰할 수 있었고, 이를 통해서 섬유소 형성에 의한 미토콘드리아 손상이 페닐알라닌 섬유소에 특이적인 것은 아님을 알 수 있었다.
- [0124] 상기 결과를 다른 방법으로 확인하기 위해서, 페닐 알라닌이 글리신으로 교체된 Mito-GG를 제작하였다. 실시예 1과 같은 방법으로 Pyrene의 excitation spectra를 사용하여 Mito-GG는 114 uM 이상의 CAC를 갖는 것을 확인하였고, 전자 현미경을 통해 50 nm 이하 크기의 마이셀 유사 구조를 형성함을 확인했다.
- [0125] 도 20에 나타난 것과 같이, Mito-VV 및 Mito-FxFx와 동일한 방법으로 Mito-GG에 대하여 실험을 수행한 결과 Mito-GG를 HeLa 세포와 배양했을 경우 TMRM의 붉은색 형광이 다른 섬유 집합에 비교해서 HeLa 세포와 6시간 동안 배양했을 때에도 사라지지 않고 유지되었고, 또한 상당히 적은 ROS가 생산되었음을 알 수 있었다.
- [0126] 상기와 같은 결과를 통해, Mito-GG와 같이 작은 마이셀을 형성하는 경우, 미토콘드리아 스트레스가 다른 Mito-VV 및 Mito-FxFx의 경우에 비해서 낮고, 따라서, 미토콘드리아의 오기능을 유발하는 효과 역시 낮은 것을 알 수 있다.

- [0127] Mito-FF에 의해 유도된 미토콘드리아의 오기능을 시각화하기 위해서, 20 μ M의 Mito-FF가 3시간 동안 처리된 HeLa 세포에 대하여 실시예 3과 같은 방법으로 TEM 이미지 분석을 수행하였다.
- [0128] 그 결과, 도 21에서 나타난 것과 같이 대부분의 미토콘드리아가 Mito-FF의 처리 이후에 심각하게 손상되었음을 확인할 수 있었고, 도 21 오른쪽 끝의 그림을 통해 미토콘드리아 막의 내부에서 밖으로 통과하는 미토콘드리아의 내부의 섬유의 형성을 확인할 수 있었다.
- [0129] 상기 결과를 통해서, 미토콘드리아 내부의 섬유의 형성이 미토콘드리아 막의 파괴를 유발하고 그리하여 조직 전체에 손상을 입힘을 알 수 있다.
- [0130] 그러나, 도 22에서와 같이, 상기 실험과 유사하게 HeLa 세포에 Mito-GG를 처리한 경우 미토콘드리아가 손상되지 않았음을 TEM 이미지를 통해서 확인할 수 있다.
- [0131] 펩타이드 양친매성 물질이 미토콘드리아 내부에서 조립됨을 확인한 후에, Mito-펩타이드의 HeLa (ATCC) (자궁경부암), MDA-MB-486 (ATCC) (유선암) MCF10 (유방암), PC3 (ATCC) (전립선암), SCC7 (ATCC) (피부암), HEK293T (ATCC), NIH-3T3 (ATCC) 등의 암세포를 포함한 다양한 세포에 대한 독성 영향을 하기과 같은 방법으로 분석하였다.
- [0132] 세포 독성 분석을 위해서, 상기 암세포들은 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies)를 포함하는 DMEM (Gibco) 배지하의 37°C 배양기에서 배양하였다. Alamar blue assay (Thermo Fisher Scientific)를 제조사의 프로토콜을 사용하여 세포 생존률을 세포 배양후 24시간 후에 측정했다.
- [0133] 상기 실험 결과, 도 33에 나타난 것과 같이 Mito-FF, Mito-FxFx, Mito-VV 펩타이드는 IC50 10 μ M을 나타냈으나, Mito-GG의 IC50 값은 다른 펩타이드에 비해서 상당히 낮았고, 이를 통해서 Mito-GG는 다른 펩타이드에 비해서 세포 독성이 상당히 낮음을 알 수 있다.
- [0134] 많은 암이 화학요법 약에 대한 저항성을 내는 주요한 메커니즘인 다양한 약 저항성은 많은 형태의 화학요법의 실패의 주요한 인자이다. 저항성은 모든 효과적인 항암제에 대하여 존재하고 약 흡수 저해, 약 유출 증가, 해독 시스템 활성화, DNA 수선 메커니즘의 활성화, 및 약에 의해서 유발된 세포 사멸의 회피 등을 포함한 다양한 메커니즘으로 발달한다.
- [0135] Mito-FF를 처리한 후 시간의 경과에 따라 TMRM을 관찰한 도 23 및 ROS의 생성을 관찰한 도 24에 의하면, 약 저항 세포주 (MCF7/ADR cell)에 대해서 Mito-펩타이드를 처리한 경우, 상기 세포에 상당한 세포독성을 나타냈다.
- [0136] 세포는 섬유 형성을 위해서 미토콘드리아 내부의 충분한 축적을 위한 약간의 시간이 필요하기 때문에, 섬유가 일단 미토콘드리아 안쪽에 형성되면 세포들은 오기능을 시작하고 결국에는 세포 사멸 (apoptosis)이 일어난다.
- [0137] Mito-펩타이드의 처리에 의해서 세포 사멸이 일어나는지 확인하기 위해서, 상기 방법과 같이HEK293T 정상 세포주에 Mito-FF, Mito-FxFx, Mito-VV, 또는 Mito-GG를 처리하고 세포 생존율을 측정하였다.
- [0138] 그 결과 도 29에서 나타난 것과 같이, HEK293T 정상 세포주에서 세포 생존력은 Mito-펩타이드의 처리에 의해서 겨우 20%만 감소했다. 정상 세포에 대한 비독성은 암 세포의 것에 비하여 막 전위가 훨씬 음성인 HEK293T 미토콘드리아 내부의 Mito-FF의 축적의 감소와 부합되어 설명이 가능하다.
- [0139] 따라서, Mito 펩타이드는 일반세포의 미토콘드리아로 침투하는 정도가 암세포에 비해 작기 때문에 일반세포는 Mito 펩타이드를 24시간 동안 처리하여도 독성 효과가 나타나지 않음을 알 수 있다.
- [0140] TPP 분자는 미토콘드리아에 의해서 빠르고 광범위하게 흡수되고 미토콘드리아 기능에 대해서 해로운 효과를 나타내는 것이 알려졌다. TPP의 숫자가 독성에 영향을 주는지 아닌지 확인하기 위해서, 도 30와 같은 구조의 한 개 (왼쪽) 및 두 개 (오른쪽)의 TPP 분자가 연결된 페닐 알라닌 이펩타이드를 합성했다.
- [0141] 모든 펩타이드는 50 nm 이하 크기의 마이셀 형태를 형성하였다. 도 31에서 볼 수 있는 바와 같이, 상기의 실험 결과와 마찬가지로, TPP가 한 개 붙은 것과 TPP가 두 개 붙은 것 모두 암 세포주에 대하여 독성 효과를 나타내지 않았다.
- [0142] 상기 결과를 추가적으로 확인하기 위해서, TPP 분자가 없는 Fxr (Pyrene-FFKFxrFxr 서열)라는 다른 펩타이드를 합성했으나, 이것은 섬유 구조를 형성했다. 펩타이드의 높은 양성 전하로 인해서 이들은 미토콘드리아의 내부에 위치하였고, 도 32에서 볼 수 있는 바와 같이, HeLa 세포에 처리시 상당한 독성을 나타냈다.
- [0143] 미토콘드리아는 내부는 세포 사멸 cascade의 시작에서 핵심적인 역할을 하기때문에, 미토콘드리아에 위치하는

Mito 펩타이드가 미토콘드리아 내부에서 자가조립하여 미토콘드리아에 스트레스를 주어 세포사멸 메커니즘을 작동 시킬 것으로 예상했다. 이러한 예상을 실험적으로 확인하기 위해서, FITC annexin/PI 염색 분석을 수행했다.

[0144] FITC annexin/PI 염색 분석은 위해서 HeLa 세포를 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin (Life Technologies) 를 포함하는 DMEM (Gibco) 배지하의 37°C 배양기에서 배양하고 10 uM의 각각의 펩타이드를 1, 4, 6, 8, 또는 10 시간 동안 배양했다. 제조사의 프로토콜에 따라서 상피세포를 100 uL of annexin-binding buffer solution 하에서 5 uL의 Alexa Fluor 488-conjugated annexin V (Life Technologies, V13241) 및 1 uL의 100 ug/mL PI working solution 상온에서 15분간 배양했다. 배양 후에 염색된 세포들을 실시예 2와 같은 방법으로 공초점 현미경으로 관찰했다.

[0145] 그 결과 도 34에 나타난 것과 같이, Mito-FF가 처리된 HeLa 세포는 Annexin V로 그들의 세포막이 염색되었으나 PI는 그렇지 않았다. 막을 통과하지 못하는 PI는 살아있거나 초기 사멸 세포와 막 온전함을 잃은 후기 세포 사멸 또는 괴사성 (necrotic) 세포를 구분하는데 사용할 수 있다. Annexin V은 세포 외부로 phosphatidylserine 를 노출한 세포 사멸하는 세포와 막 온전함을 잃은 괴사성 세포를 염색할 수 있으나, PI는 그렇지 못하다. 위 염색약을 배제하는 살아있는 세포 및 괴사성 세포는 모든 염색이 가능하다. 도 34의 실험 결과는 Mito-FF의 6시간 이내를 처리한 세포는 초기 세포 사멸 단계로 들어갔음을 나타낸다.

[0146] 세포 사멸에 대한 수량적 분석을 위해서, FACS (FACScalibur, BD Bioscience) FITC annexin V/PI 염색 분석을 제조사의 프로토콜에 따라서 시간의 경과에 따라서 수행되었다.

[0147] 구체적으로, 10 uM Mito-FF를 HeLa 세포에 4 시간, 또는 8 시간 동안 배양하고, FACS 분석을 수행하였다.

[0148] 그 결과, 도 35에 나타난 것과 같이, 약 81.2%의 전체 집단의 세포는 2시간 이내에 초기 세포 사멸 단계로 들어갔고 후기 세포 사멸 단계는 10시간 이후에 일어났다.

[0150] **실시예 5. Mito-FF에 의해서 유발된 세포 사멸 메커니즘**

[0151] Mito-FF 섬유 형성에 의한 세포 죽음은 하기의 두 개의 다른 메커니즘의 상승작용에 의해서 발생한다고 예상한다; (1) 미토콘드리아 막의 온전함의 상실 및 (2) 다양한 단백질 상호작용.

[0152] Endosomal/lysosomal 막의 온전함의 손실이 알츠하이머의 Aβ 발병에서 초기 사건을 나타낸다는 종래의 보고가 있다. 이와 유사하게, Mito-FF의 섬유 조립이 결국 미토콘드리아 막의 온전함의 손실을 야기한다고 예상하였고, 상기 예상은 TEM 결과에 의해서 증명되었다.

[0153] Mito-FF 섬유가 가지고 있는 표면의 높은 양성 전하는 결국 독성을 유도하는 미토콘드리아의 음성 전하의 막과 상호작용을 촉진할 수 있다. 이러한 예상을 확인하기 위해서, liposomal 누출 분석을 실험했다.

[0154] Calcein 같은 자가 quenching 염료의 방출은 일반적으로 이중 지질의 온전함을 확인하기 위해서 사용된다. 다양한 농도의 Mito-FF가 이중 지질의 온전함을 확인하기 위해서 사용되었다. 다양한 농도의 Mito-FF가 소낭 (vesicle)을 포함한 용액에 첨가되어서 소낭에서 캡슐화된 calcein의 누출을 체크하였다.

[0155] 도 26에서 확인 할 수 있는 바와 같이, Mito-FF의 첨가는 시간에 의존적인 방법으로 calcein의 누출을 야기했고 24시간 이내에 100%에 도달했다. 그러나 CAC 이하에서 Mito-FF는 어떠한 염료의 누출을 야기할 수 없었고, 이것은 liposome 누출이 순수하게 섬유가 liposome과 상호작용하여 일어난 것이지 분자와 상호작용하여 일어난 것은 아니라는 것을 나타낸다.

[0156] 그러나, 도 27에서 확인할 수 있는 것과 같이, 마이셀을 형성하는 Mito-GG는 24시간 이내에 겨우 30%의 염료의 누출을 야기하고 이것은 마이셀이 Mito-GG 또는 구형 형태로 인해 야기된 미토콘드리아의 오기능의 감소를 야기하는 미토콘드리아 막과 충분한 상호작용을 제공할 수 없음을 나타낸다.

[0157] 상기의 막의 파괴 뒤에 일어나는 메커니즘을 확인하기 위해서, 실시예 1과 같이 Accelrys 사의 Material Studio 프로그램을 이용한 분자적 시뮬레이션을 제조사의 프로토콜 대로 수행하였다. 상기 시뮬레이션은 2 us와 1.56 us 사이에서 수행하였고 그 분석은 최종 50 ns의 프레임으로 변환되었다.

[0158] 상기 시뮬레이션 결과 Mito-FF 섬유는 1.14 ns 시간 안에 구멍을 형성했다.

[0159] Root mean square fluctuation (RMSF)는 입자의 위치를 기준 위치와 시간에 따라서 비교했고 각 입자의 평균 변동 거리를 나타냈다. Mito-FF가 세포 막과 상호작용했을 때, RMSF는 다른 것에 비해서 클 것이다.

[0160] Accelrys 사의 Material Studio 프로그램을 이용한 분자적 시뮬레이션을 통해 상기RMSF를 측정하였고, 시뮬레이

션은 2 us와 1.56 us 사이에서 수행하였고 그 분석은 최종 50 ns의 프레임으로 변환되었다.

[0161] 상기 RMSF 분석을 통해 Mito-FF의 세포 막과의 상호작용을 확인 할 수 있고, 또한 Mito-FF의 페닐 알라닌은 TPP에 의해서 더욱 상호작용이 용이해짐을 확인 할 수 있다.

[0162] 상기 결과를 통해서 Mito-FF의 Phe 그룹이 섬유 형성, TPP의 높은 밀도 그리고 세포 막의 통과를 야기함을 알 수 있다. Mito-FF 및 세포 막 사이의 정전기적 및 분자간의 전위 에너지의 비교는 어떠한 인자가 세포 막 통과에 더 기여하는지 여부를 나타낼 수 있다. 정전기적 에너지는 P+ 이온과 세포 막의 상호작용, 및 이온과 세포 막을 제외한 다른 그룹의 상호작용에서 유래한 분자간의 전위 에너지에서 유래한다. 정전기적 및 분자간의 전위 에너지는 600 ns에서 2000 ns까지의 통과 간격을 나타낸다. 정전기적 에너지는 안정화 단계에 도달하지만, 분자간의 전위 에너지는 시간이 흘러감에 따라서 감소한다.

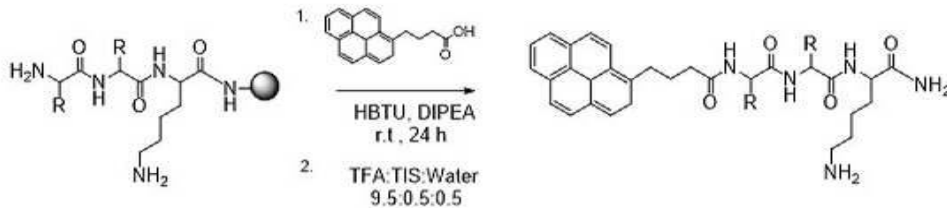
[0163] 도 28에 의하면, 통과 동안에, 분자간 전위 에너지는 불안정한 상태에 머물러 있고, 이것은 TPP, 페닐 및 벤젠 고리를 포함하는 pyrene 그룹이 세포 막을 통과하기 위해서 P+ 이온보다 더 상호작용을 잘함을 나타낸다.

[0164] 그러나, 자가 조립하여 구형 구조를 형성하는 Mito-GG는 pyrene이 쌓이는 구조를 나타내지만, 구의 안쪽 면에는 그러한 구조를 나타내지 않는다. Radial number density는 Mito-GG의 구조를 나타낸다. 구의 표면 근처에, 배경 그룹은 가장 높은 밀도를 갖고 그 다음은 TPP 및 pyrene 그룹이 높았다. 섬유 구조와 다른 전체적 구의 주변의 backbone 그룹 때문에, 벤젠 고리의 표면 밀도는 Mito-FF의 것에 비해서 낮고, 이를 통해 Mito-GG 또는 구형 마이셀의 막의 투과가 감소하는 결과가 나타나게 된다.

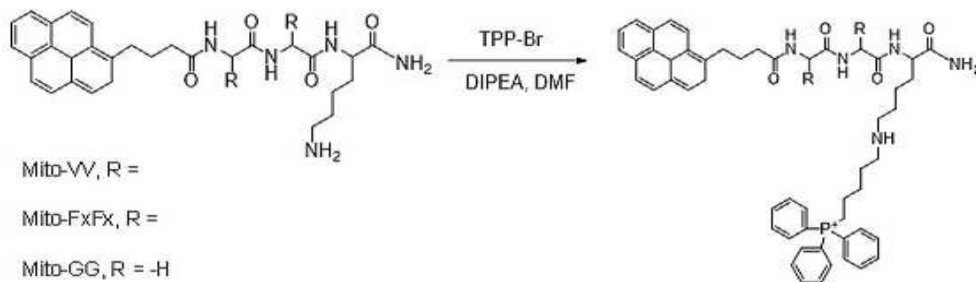
도면

도면1

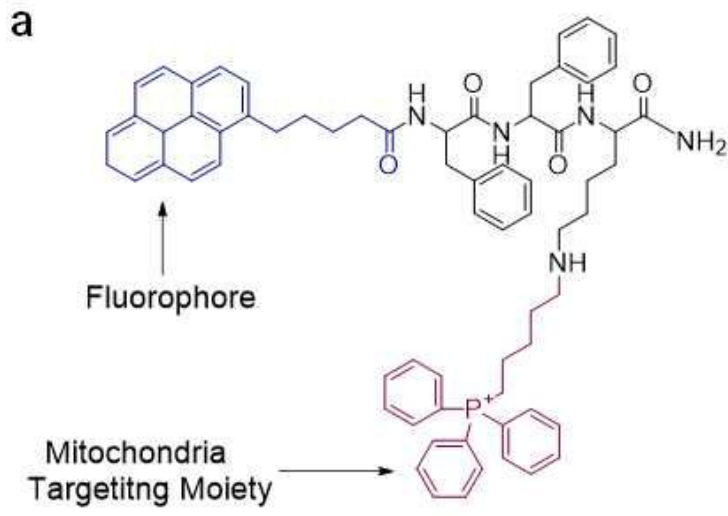
Step : 1



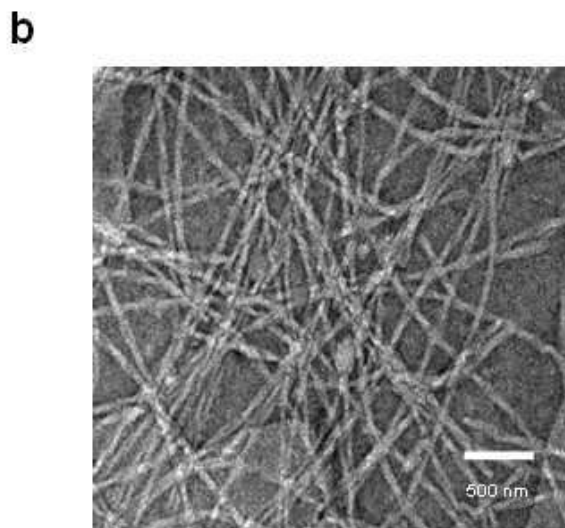
Step : 2



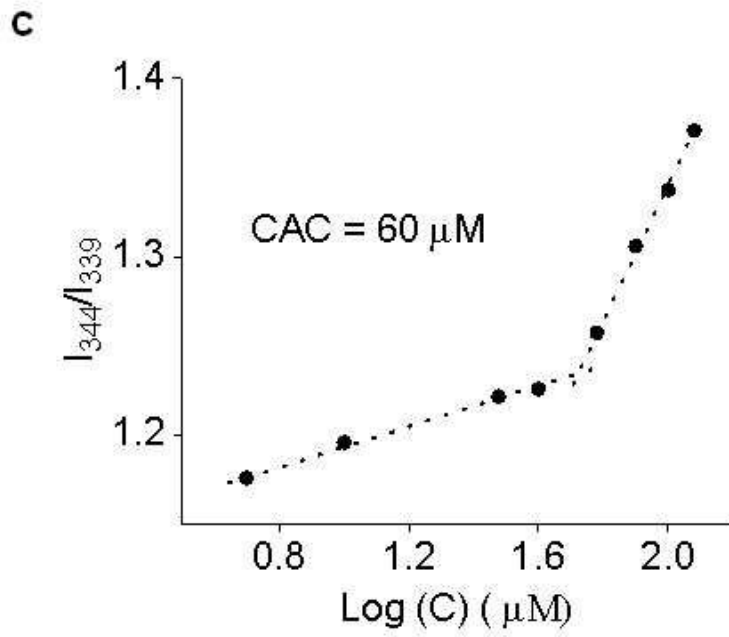
도면2



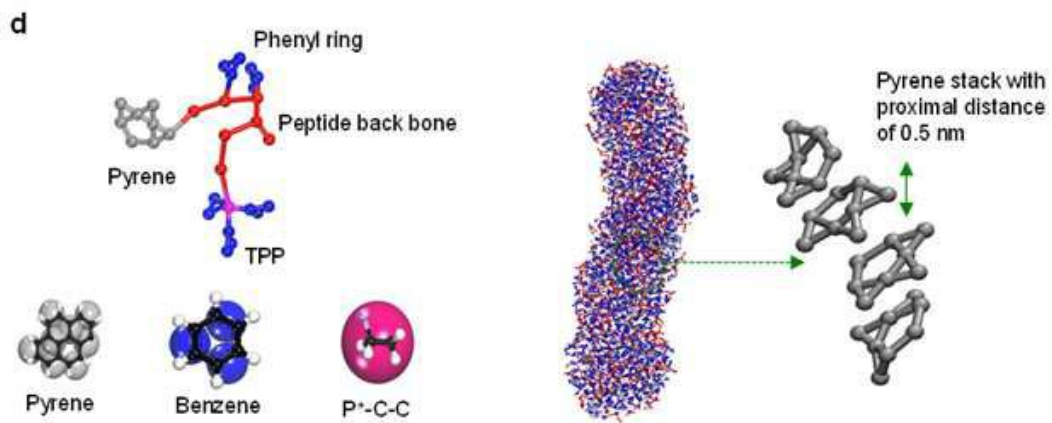
도면3



도면4

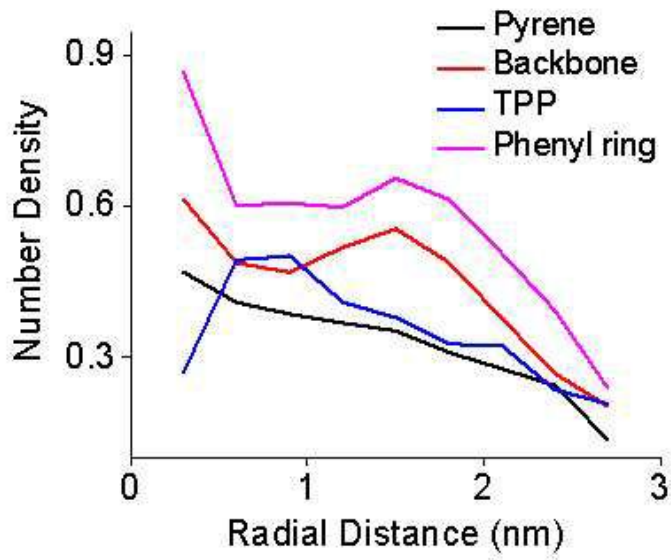


도면5



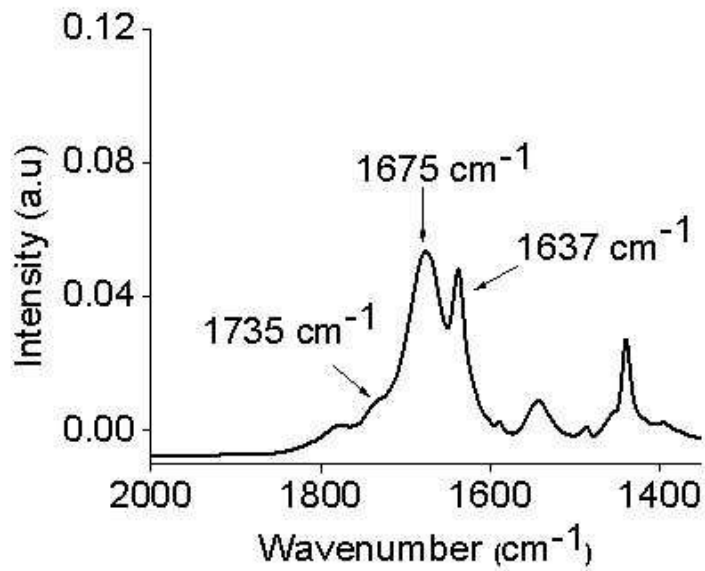
도면6

e



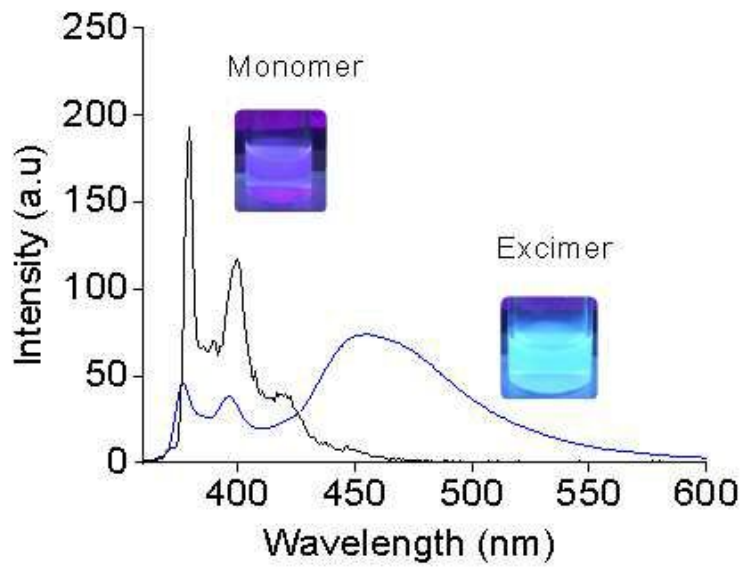
도면7

f

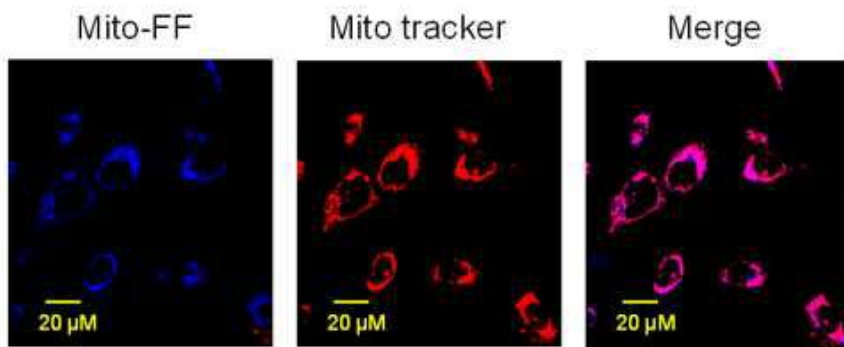


도면8

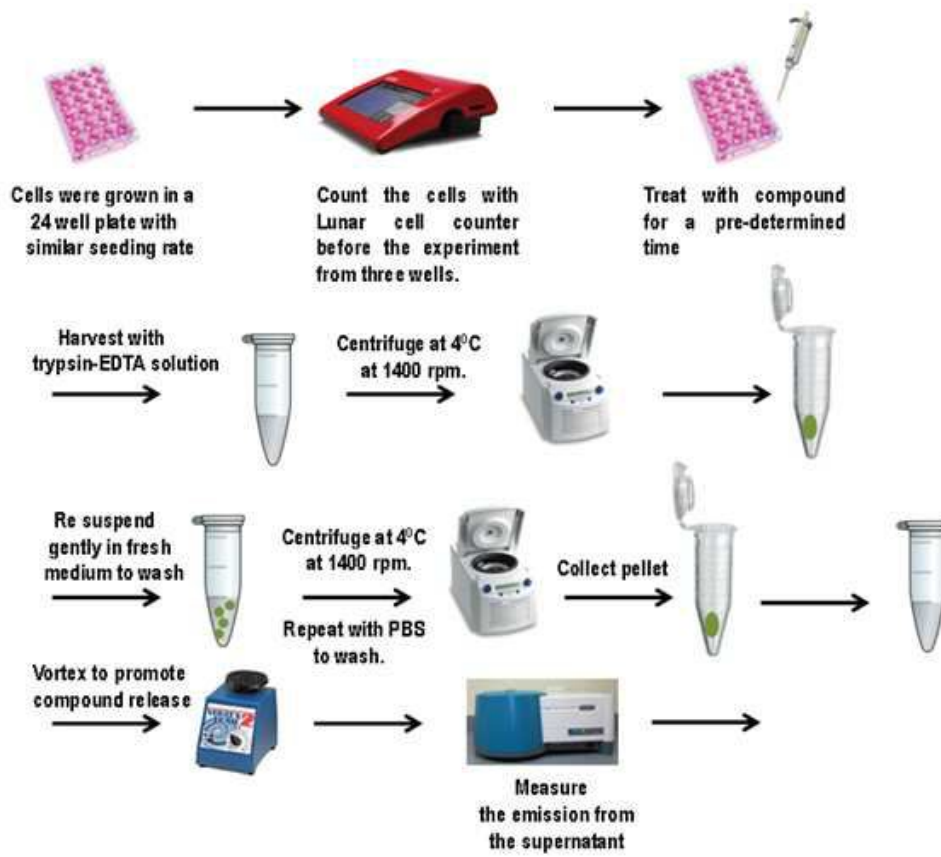
g



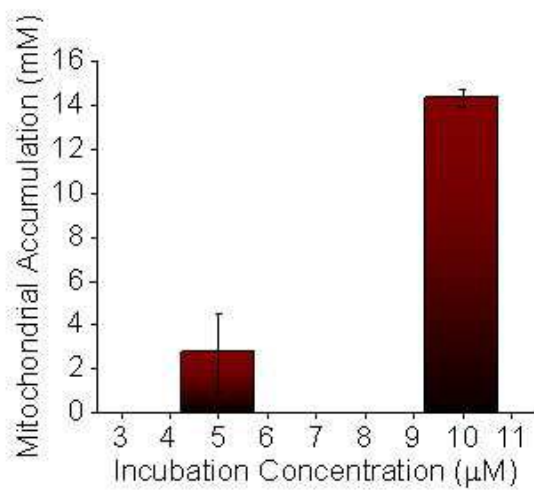
도면9



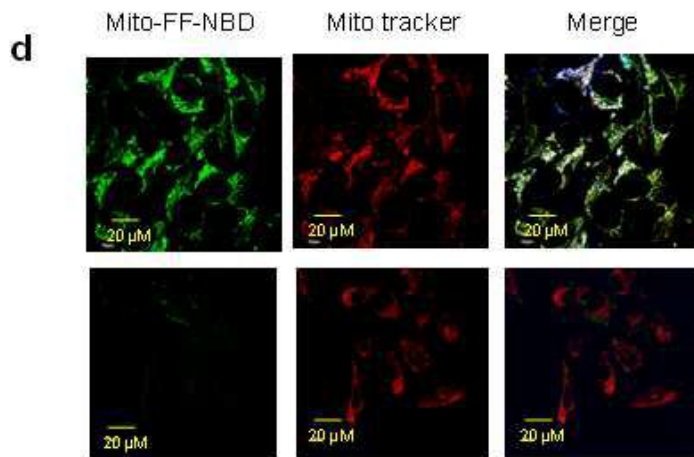
도면10



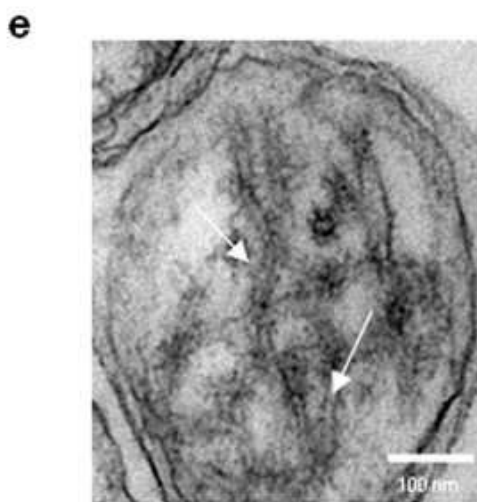
도면11



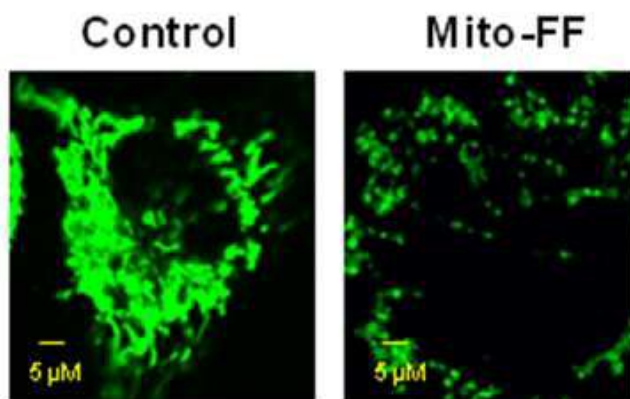
도면14



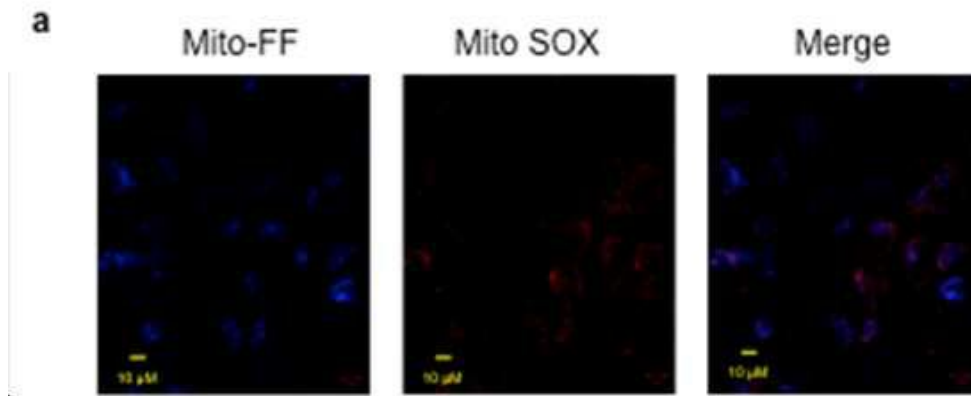
도면15



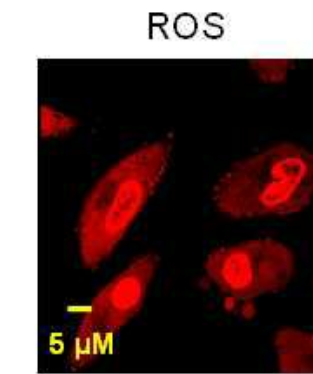
도면16



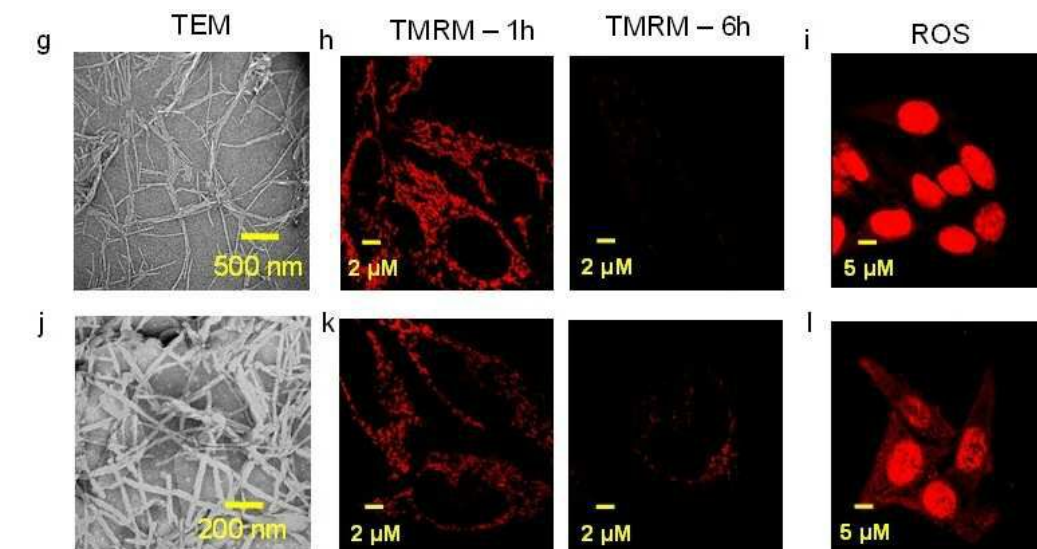
도면17



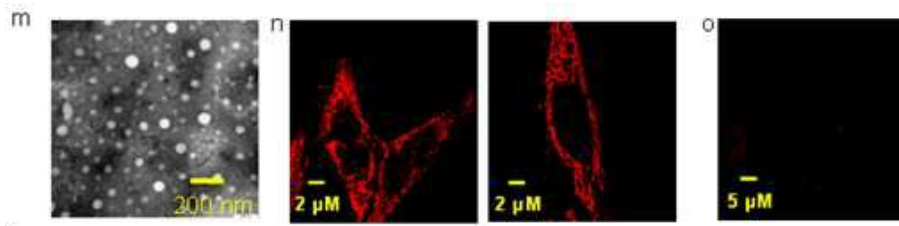
도면18



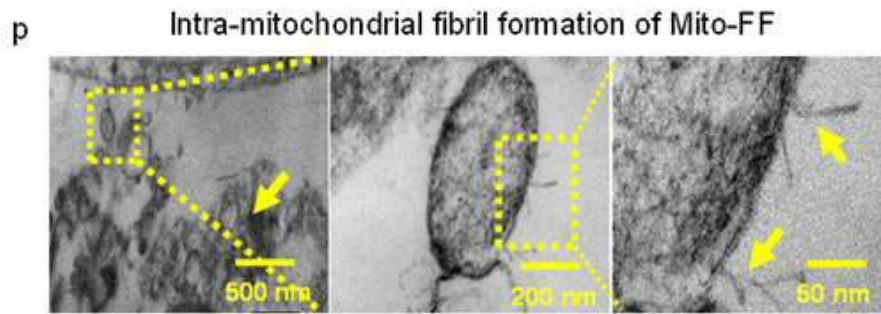
도면19



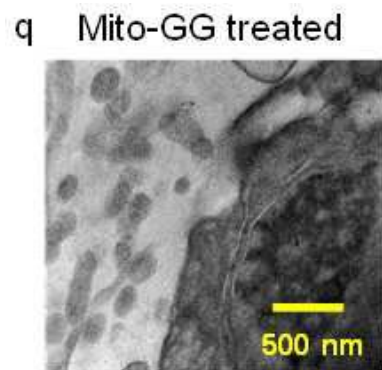
도면20



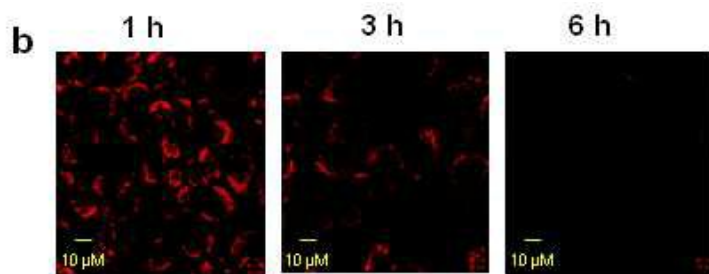
도면21



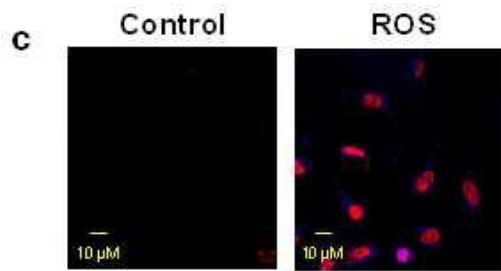
도면22



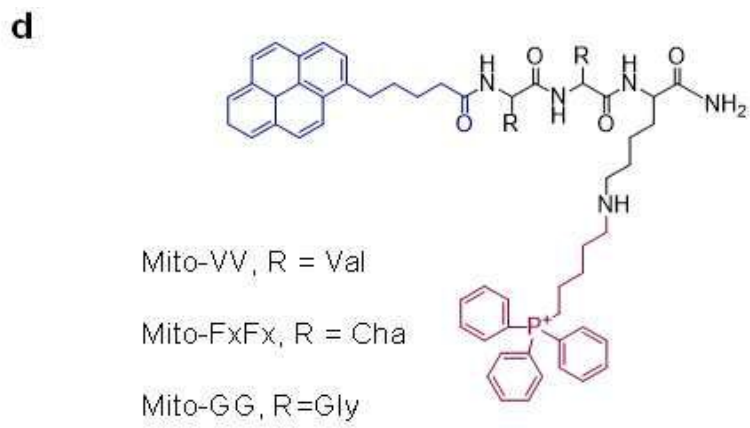
도면23



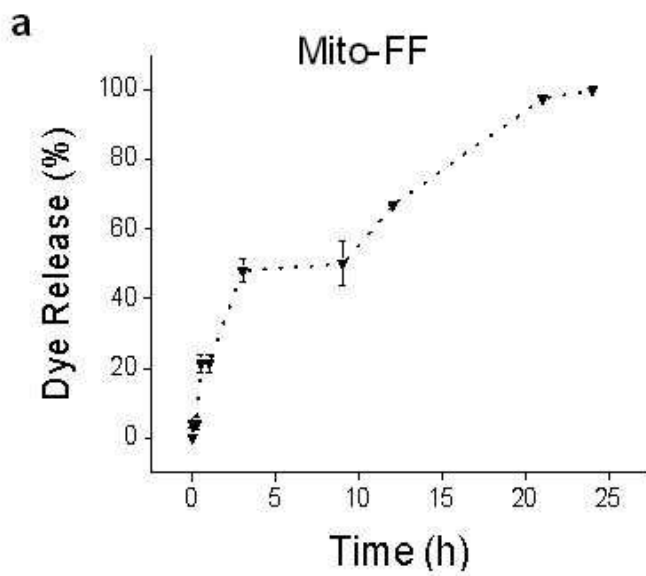
도면24



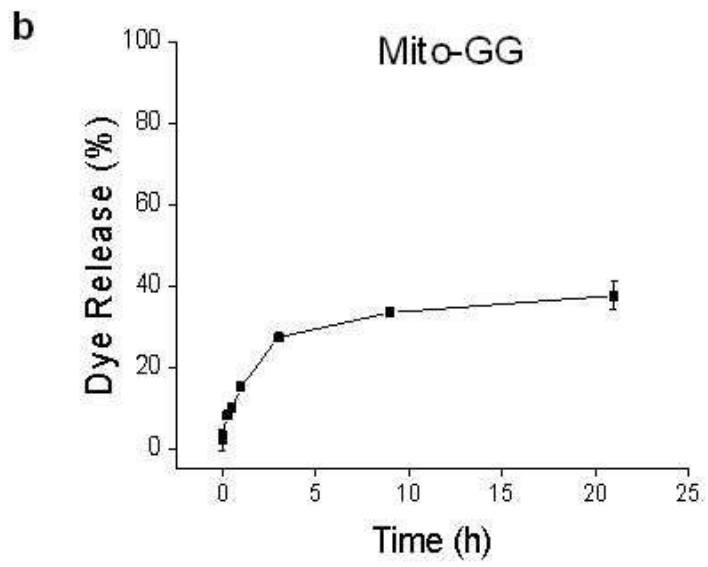
도면25



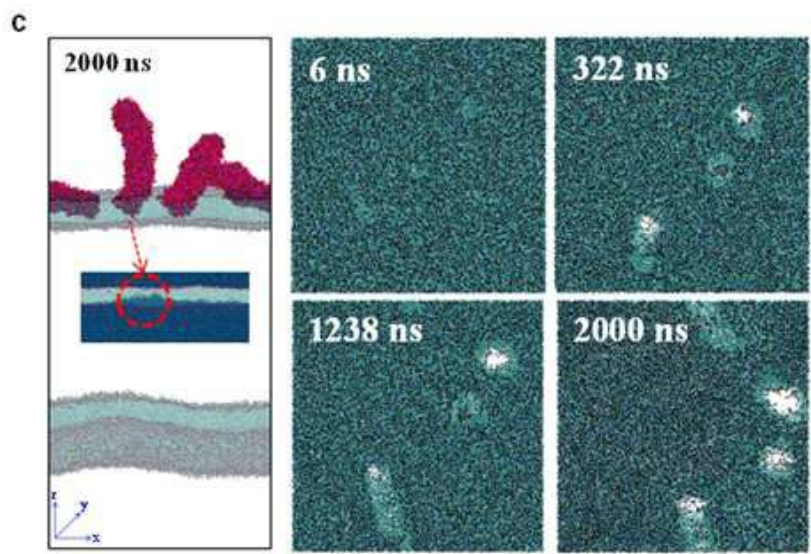
도면26



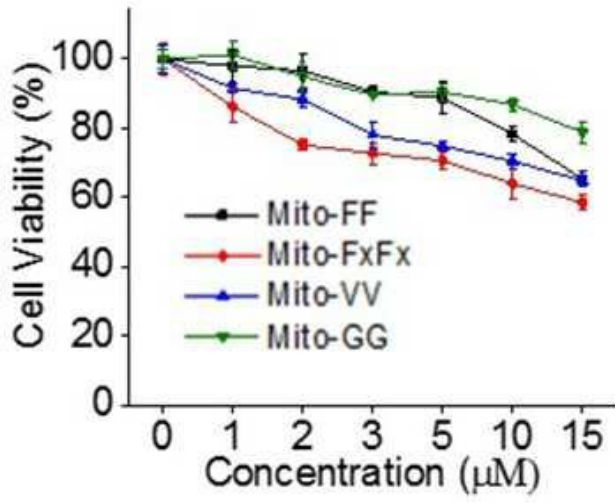
도면27



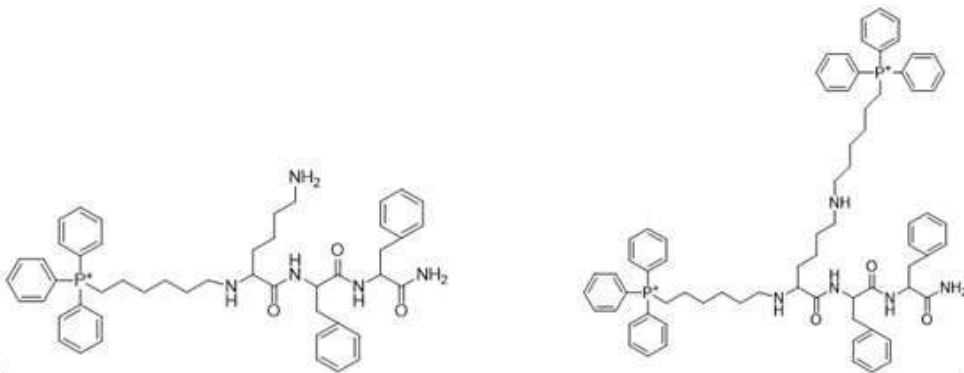
도면28



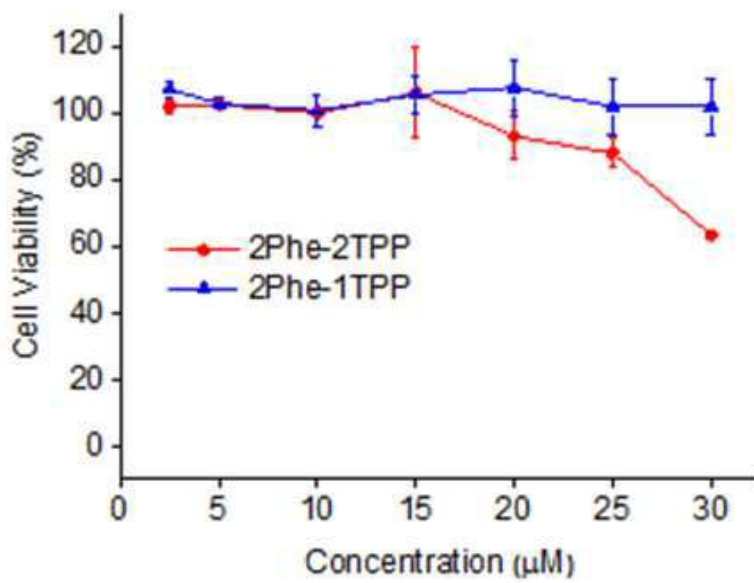
도면29



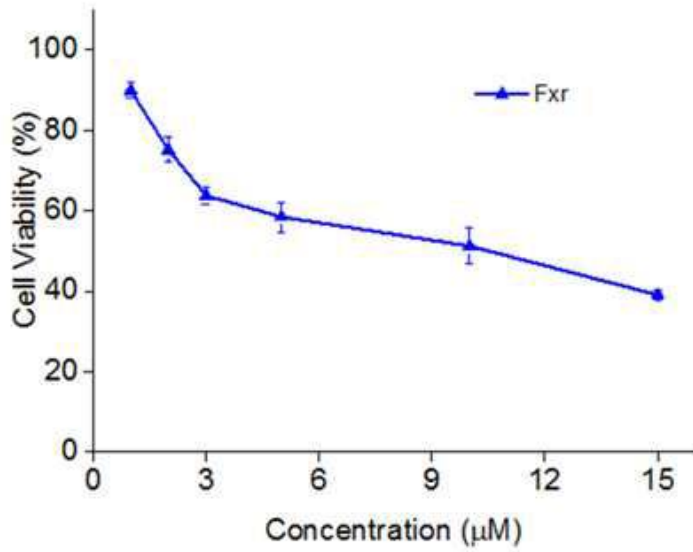
도면30



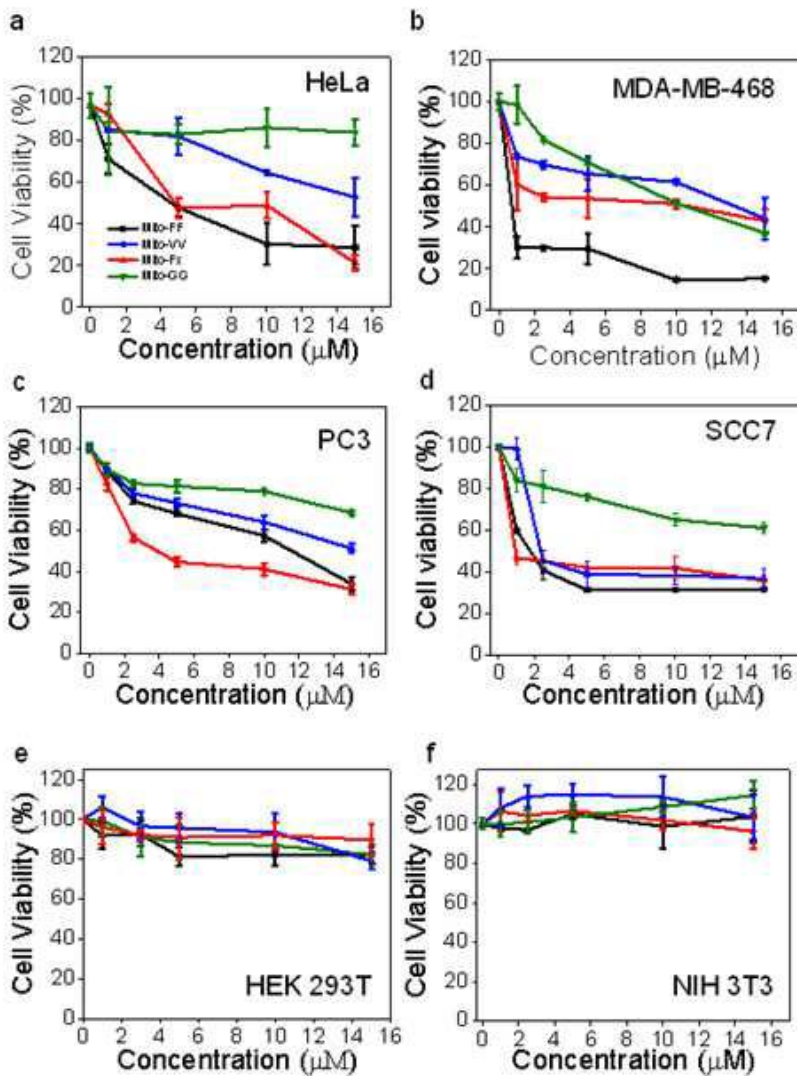
도면31



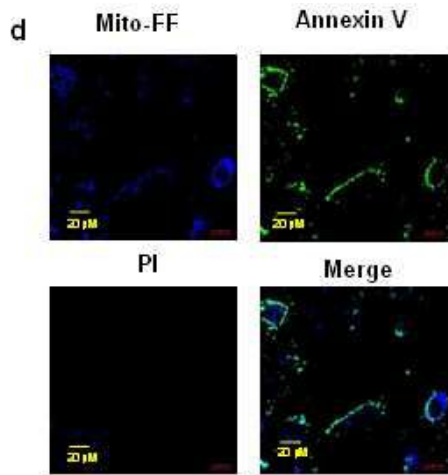
도면32



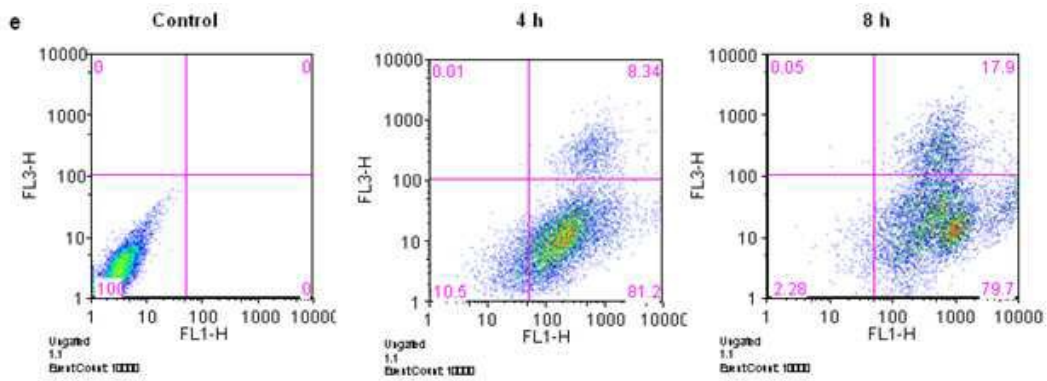
도면33



도면34



도면35



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 7

【변경전】

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

【변경후】

제1항 내지 제4항, 또는 제6항 중 어느 한 항에 있어서,