



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0004056

(43) 공개일자 2016년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 33/26 (2006.01) A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0082413

(22) 출원일자 2014년07월02일

심사청구일자 2014년07월02일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

(72) 발명자

손형진

서울특별시 용산구 서빙고로 35, 102동 3402호 (한강로3가, 용산시티파크1단지)

강민지

서울특별시 서초구 방배로 63, 202동 1301호 (방배동, 방배현대오피스 2)

한지영

서울특별시 서대문구 이화여대2길 30, 202호 (대현동)

(74) 대리인

안소영

전체 청구항 수 : 총 13 항

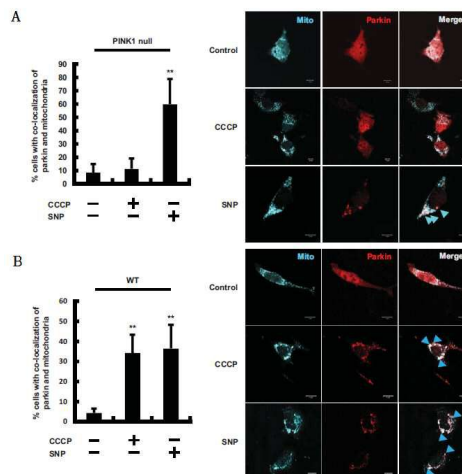
(54) 발명의 명칭 일산화질소를 이용한 세포 내 미토콘드리아 제거 기술

(57) 요약

본 발명은 일산화질소 공여체를 유효성분으로 포함하는 암, 대사성 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 일산화질소 공여체를 유효성분으로 포함하는 암, 대사성 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 세포 내 손상된 미토콘드리아들이 제거됨으로써 암, 대사성 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료에 현저한 효과를 가진다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345204594

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)(2013)-일반연구자지원사업-기본연구

연구과제명 도파민신경의 새 mTOR조절 중심축을 통한 오토파지 장애의 통합적 제어

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

일산화질소 공여체를 유효성분으로 포함하는 암, 대사성 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨 병인 암, 대사성 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 파킨슨 병은 유전성 파킨슨 병인 암, 대사성 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 암, 대사성 질환 또는 퇴행성 뇌질환은 미토콘드리아 이상에 의한 것인 암, 대사성 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 일산화질소 공여체는 미토파지 유도를 통해 손상 미토콘드리아를 제거하는 것인 암, 대사성 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 일산화질소 공여체는 나이트로프루사이드 나트륨, S-나이트로소-N-아세틸-DL-페니실아민, 실테나필 시트레이트 또는 진세노사이드 Re 중 선택된 어느 하나 이상인 암, 대사성 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

일산화질소 공여체를 유효성분으로 포함하는 암, 대사성 질환 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강 기능 식품.

청구항 8

일산화질소 공여체(nitric oxide donor)를 유효성분으로 포함하는 미토파지(mitophagy) 유도용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 일산화질소 공여체는 나이트로프루사이드 나트륨, S-나이트로소-N-아세틸-DL-페니실아민, 실테나필 시트레이트 또는 진세노사이드 Re 중 선택된 어느 하나 이상인 미토파지(mitophagy) 유도용 조성물.

청구항 10

미토파지(mitophagy) 유도 방법으로써,

- 1) 일산화질소 공여체(nitric oxide donor)를 세포에 처리하는 단계; 및
- 2) 일산화질소 공여체(nitric oxide donor)가 처리된 세포를 배양하는 단계를 포함하는 미토파지 유도 방법.

청구항 11

하기 단계를 포함하는 파킨슨 병의 진단 및 스크리닝 방법:

(1) 세포에 미토파지 유도체 및 일산화질소 공여체를 처리하는 단계; (2) 상기 (1)의 세포를 배양하는 단계; 및 (3) 배양된 세포를 수거하여 파킨의 발현을 확인하고 정상세포와 대비하여 파킨 발현 수준을 비교하는 단계.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 미토파지 유도체는 카보닐 시아나이드 3-클로로페닐히드라존이며, 상기 일산화질소 공여체는 나이트로프루사이드 나트륨, S-나이트로소-N-아세틸-DL-페니실아민, 실데나필 시트레이트 또는 진세노사이드 Re 중 선택되는 파킨슨 병의 진단 및 스크리닝 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 (3)의 파킨의 발현을 확인하는 것은 웨스턴 블랏 또는 ELISA를 통해 수행되는 파킨슨 병의 진단 및 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 일정 농도의 일산화질소를 이용한 세포 내 손상 미토콘드리아 제거 기술 및 손상 미토콘드리아 제거를 통한 관련 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 미토콘드리아 손상과 관련되어 있는 질환 중 하나로 파킨슨 병(Parkinson's disease)은 만성적, 진행성 운동신경계 질환이다. 매년 대략 50,000명의 미국인이 파킨슨 병 진단을 받는다. 본 퇴행성 뇌질환의 1차적 증상은 떨림, 경직, 느린 운동 및 균형 손상이다. 추가적으로, 다수의 파킨슨병 환자가 감정 변화, 기억 상실, 언어 문제, 또는 수면 장애를 포함하는, 다양한 다른 증상을 경험한다. 질환이 진행할수록, 다수의 환자에게 있어 보행, 언행, 삼킴 또는 단순한 업무의 수행이 점점 더 어려워지게 된다.

[0003] 파킨슨 병은 단백질 구조 변성 및 응집과 연관되어 있다. 파킨슨 병에서 변성된 단백질의 축적은 변성된 단백질의 생성과 제거의 불균형으로부터 발생하며, 이에 대한 인체 내 대응의 실패가 병리학적 기전으로 작용하는 것으로 보인다. 파킨슨 병으로 인한 사망률은 국내뿐만 아니라 세계적으로 매년 증가하고 있는 추세이며, 오늘날 파킨슨 병 치료 약물 개발에 많은 관심이 모이고 있다. 그러나 임상적으로 유효한 상기 질환들의 약물들은 다양한 부작용들 때문에 사용에 신중을 기해야 하는 단점이 있으며, 다양한 질환을 복합적으로 치료 및 예방할 수 있는 약물은 현재까지 전무한 실정이다.

[0004] 한편, 미토파지(Mitophagy)는 손상되거나 많은 양의 미토콘드리아를 제거하는데 요구되는 중요한 조절 메커니즘이다. 최근 연구에 따르면 미토파지 결함은 PINK1(PTEN-induced putative kinase 1) 또는 파킨(Parkin) 돌연변이와 같은 파킨슨 병의 상염색체 열성형의 하나로 알려져 있다. 또한, PINK1 결핍은 파킨슨병 환자-유래 섬유아세포 배양, PINK1-결핍 마우스 및 초파리, 및 PINK1-결핍 도파민계 신경세포에서 미토콘드리아 복합체의 활성에 감소를 유도하는 것으로 알려져 있다. 그러나 손상된 미토콘드리아에서 PINK1에 의한 파킨슨 병의 회복 메커니즘은 거의 알려진 바가 없다.

[0005] 또한, 현재까지 손상된 미토콘드리아에 의한 발생할 수 있는 질환으로 암, 대사성 질환, 퇴행성 뇌질환 등이 알려져 있지만, 이들의 손상 미토콘드리아를 제거하여 질환을 치료할 수 있는 물질 내지 치료 방법에 대해서 거의 알려진 바가 없다.

[0006] 이러한 배경 하에, 미토콘드리아 이상과 관련된 질환 치료를 위한 신규한 약물 내지 치료 방법, 질환의 정도를 파악할 수 있는 스크리닝 방법 등에 대한 발굴이 절실한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-2012-0136791, 2012.12.20

(특허문헌 0002) KR 10-2011-0045618, 2011.05.04

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 일산화질소 공여체(nitric oxide donor)를 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 이상 관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.
- [0009] 본 발명은 또한 일산화질소 공여체(nitric oxide donor)를 유효성분으로 포함하는 파킨슨 병 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하고자 한다.
- [0010] 본 발명은 또한 일산화질소 공여체(nitric oxide donor)를 유효성분으로 포함하는 미토파지(mitophagy) 유도 조성물을 제공하고자 한다.
- [0011] 본 발명은 또한 미토파지(mitophagy) 유도 방법으로써,
- [0012] 1) 일산화질소 공여체(nitric oxide donor)를 세포에 처리하는 단계; 및
- [0013] 2) 일산화질소 공여체(nitric oxide donor)가 처리된 세포를 배양하는 단계를 포함하는 미토파지 유도 방법을 제공하고자 한다.
- [0014] 본 발명은 또한 (1) 세포에 미토파지 유도제 및 일산화질소 공여체를 처리하는 단계; (2) 상기 (1)의 세포를 배양하는 단계; 및 (3) 배양된 세포를 수거하여 파킨의 발현을 확인하고 정상세포와 대비하여 파킨 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는 파킨슨 병의 진단 및 스크리닝 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명자들은 손상된 미토콘드리아의 제거 방법에 대해 예의 연구한 결과, 일정 농도의 일산화질소 공여체 투여를 통해 미토파지를 유도함으로써 손상 미토콘드리아를 제거하여 암, 대사성 질환, 퇴행성 뇌질환 등의 미토콘드리아 손상과 관련된 질환의 치료가 가능함을 발견하고 본 발명을 완성하였다.
- [0016] 본 발명은 일산화질소 공여체(nitric oxide donor)를 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 이상 관련 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하고자 한다.
- [0017] 본 발명에 있어서 일산화질소 공여체는 투여 경로에 관계없이 세포, 조직 내지 인체로 일산화질소를 제공하거나, 일산화질소 생성을 활성화 시키거나 그 하부 시그널(downstream signaling pathway)에 작용할 수 있는 모든 물질들을 포함한다. 본 발명에 따른 일산화질소 공여체는 이에 한정되지 않으나 예를 들어 글리세릴 트리나이트레이트(Glyceryl trinitrate; GTN), 아이소소비드 모노나이트레이트(isosorbide mononitrate; ISMN), 펜타에리스리틸 테트라나이트레이트(Pentaerythrityl tetranitrate; PETN), 나이트로프로사이드 나트륨(Sodium nitroprusside; SNP, 다이에틸아민 노노에이트(Diethylamine NONOate), S-나이트로소-N-아세틸-DL-페니실아민(S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine; SNAP))을 포함하며, 바람직하게 나이트로프로사이드 나트륨(Sodium nitroprusside; SNP) 또는 S-나이트로소-N-아세틸-DL-페니실아민(S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine; SNAP)이다. 일산화질소 하부 시그널(cGMP-dependent signaling)에 작용하는 실데나필 시트르산염(sildenafil citrate) 또는 일산화질소 생성을 활성화시키는 진세노사이드 Re(Ginsenoside Re)도 본 발명의 일산화 질소 공여체 범주에 포함된다.
- [0018] 본 발명의 일산화질소 공여체는 일정 농도의 일산화질소를 세포에 제공하여 미토파지를 유도할 수 있는 농도가 바람직하며, 지나치게 높은 농도의 일산화질소 공여체의 처리는 미토파지 유도 효과가 미비할 수 있다. 약학적 조성물으로써 작용하기에 적절한 농도 수준의 일산화질소는 20 nM - 10 uM, 바람직하게는 50 - 200 nM이다. 이러한 수준의 일산화질소를 유도하거나 관련 효과를 나타내기 위한 일산화질소 공여체의 농도는, 예를 들어 나이트로프로사이드 나트륨(Sodium nitroprusside; SNP)은 20 nM - 10 uM, 보다 바람직하게는 50 - 200 nM 이며, S-나이트로소-N-아세틸-DL-페니실아민(S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine; SNAP)은 100 nM - 10 uM, 보다 바람직하게는 100 - 200 nM 이며, 실데나필 시트르산염은 1 - 10 uM, 보다 바람직하게는 2 - 4 uM 이며, 진세노사이드 Re(Ginsenoside Re)는 1 - 5 uM, 보다 바람직하게는 2 - 3 uM 이다. 본 발명의 일산화질소 공여체는 세포 내에서 일산화질소를 생성한 후 세포에 이를 제공하여 neuronal nitric oxide synthase (nNOS 혹은 NOS1)의 활

성화를 통한 일산화질소 생성과정을 우회하여 파킨의 이동(translocation)을 유발함으로써, 미토파지를 일으켜 손상된 미토콘드리아를 제거한다. 이러한 일련의 과정에 따라 미토콘드리아 이상과 관련된 질환에 있어 이상 세포 내 손상된 미토콘드리아들이 제거되어 손상되지 않은 새로운 미토콘드리아 합성을 유도함으로써 미토콘드리아 이상과 관련된 질환의 예방 및 치료 효과를 제공한다.

[0019] 본 발명에 있어서, 미토콘드리아 이상 관련 질환은 암, 대사성 질환, 퇴행성 뇌 질환 등 미토콘드리아 이상과 관련된 질환을 포함한다. 미토콘드리아 기능에 이상이 생길 경우, 산화스트레스 증가 및 세포내 분자, 소기관, 세포막, DNA 손상 축적, ATP 에너지 생성 감소, 세포내 프로테아좀 기능 저하, 세포내 생합성 저하, 세포내 칼슘 항상성 손상, 그리고 세포 사멸기전 활성화 등의 문제점을 가진다. 본 발명에 있어서 미토콘드리아 이상 관련 질환은 바람직하게는 파킨슨 병이다. 본 발명에 있어서 파킨슨 병은 유전성 파킨슨 병, 미토콘드리아 이상 병리가 수반되는 비유전성 (sporadic form) 파킨슨 병을 포함하며, 바람직하게는 PINK1(PTEN-induced putative kinase 1) 또는 파킨(Parkin)과 연관된 유전성 파킨슨 병이다.

[0020] 본 발명의 조성물은 상기 유효성분을 조성물 총 중량에 대하여 0.001~20 중량 % 함유할 수 있다.

[0021] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리코디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다.

[0022] 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 일산화질소 공여체를 유효성분으로 포함하는 조성물 100중량부에 대해 1 ~ 70 중량부, 바람직하게는 1~ 50 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0025] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 일산화질소 공여체를 포함하는 조성물의 양을 기준으로 0.5 내지 10 mg/kg이고, 바람직하게는 0.5 내지 3mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.

[0026] 아울러, 본 발명은 일산화질소 공여체를 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 이상과 관련된 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0027] 본 발명의 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0028] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0029] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사

용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다.

[0030] 본 발명은 또한 일산화질소 공여체(nitric oxide donor)를 유효성분으로 포함하는 미토파지(mitophagy) 유도용 조성물을 제공하고자 한다.

[0031] 본 발명에 있어서 일산화질소 공여체(nitric oxide donor)는 상기 언급된 바와 같다. 본 발명의 일산화질소 공여체(nitric oxide donor)는 일정 농도의 일산화질소를 세포에 제공하여 시험관 내에서 미토파지를 유도하여 손상된 미토콘드리아를 제거한다. 시험관 내 세포에 미토파지 유도에 적절한 농도 수준의 일산화질소는 20 nM - 10 μ M, 바람직하게는 50 - 200 nM 이다. 이러한 수준의 일산화질소를 유도하거나 관련 효과를 나타내기 위한 일산화질소 공여체의 농도는, 예를 들어, 나이트로프루사이드 나트륨 (Sodium nitroprusside; SNP)은 20 nM- 10 μ M, 보다 바람직하게는 50 - 200 nM 이며, S-나이트로소-N-아세틸-DL-페니실아민(S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine; SNAP)은 100 nM - 10 μ M, 보다 바람직하게는 100 - 200 nM 이며, 실데나필 시트르산염은 1 - 10 μ M, 보다 바람직하게는 2 - 4 μ M 이며, 진세노사이드 Re(Ginsenoside Re)은 1 - 5 μ M, 보다 바람직하게는 2 - 3 μ M 이다.

[0032] 본 발명의 미토파지 유도용 조성물은 바람직하게 신경 손상 세포로 예를 들어, PINK1-null 도파민신경세포, 암 세포로 예를 들어, Hela 세포, Glioma 등에서 미토파지를 유도할 수 있다. 본 발명의 일산화질소 공여체(nitric oxide donor)를 유효성분으로 포함하는 미토파지(mitophagy) 유도용 조성물은 세포에서 미토파지를 유도하고 손상된 미토콘드리아를 제거함으로써 i) 손상된 미토콘드리아에서 과량 생성되던 활성산소 감소를 통한 산화스트레스 및 세포 손상을 방지하고, ii) 손상된 미토콘드리아와 건강한 미토콘드리아의 융합 (fusion)을 방지함으로써 건강한 미토콘드리아의 손상 확산을 방지하고 새로운 미토콘드리아 생성을 증가시키며, iii) 그 결과로 미토콘드리아 전자전달계 복합체의 활성 및 ATP 생성을 증가시켜 세포 항상성 회복과 세포 사멸기전의 활성화방지를 통해 세포 정상기능을 회복시키는 등의 현저한 효과를 가진다.

[0033] 본 발명은 또한 미토파지(mitophagy) 유도 방법으로써,

[0034] 1) 일산화질소 공여체(nitric oxide donor)를 세포에 처리하는 단계; 및

[0035] 2) 일산화질소 공여체(nitric oxide donor)가 처리된 세포를 배양하는 단계를 포함하는 미토파지 유도 방법을 제공하고자 한다. 세포에 미토파지를 유도하기 위한 적절한 농도 수준의 일산화질소는 20 nM - 10 μ M, 바람직하게는 50 - 200 nM 이다. 이러한 수준의 일산화질소를 유도하거나 관련 효과를 나타내기 위한 일산화질소 공여체의 농도는, 예를 들어, 나이트로프루사이드 나트륨 (Sodium nitroprusside; SNP)의 투여량은 20 nM - 10 μ M, 보다 바람직하게는 50 - 200 nM 이며, S-나이트로소-N-아세틸-DL-페니실아민(S-nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine; SNAP)의 투여량은 100 nM - 10 μ M, 보다 바람직하게는 100 - 200 nM 이며, 실데나필 시트르산염의 투여량은 1 - 10 μ M, 보다 바람직하게는 2 - 4 μ M 이며, 진세노사이드 Re(Ginsenoside Re)의 투여량은 1 - 5 μ M, 보다 바람직하게는 2 - 3 μ M 이다. 본 발명의 미토파지 유도 방법에 의하면 손상된 미토콘드리아를 제거하여 손상된 세포 기능을 회복시킨다.

[0036] 본 발명은 또한 (1) 세포에 미토파지 유도제 및 일산화질소 공여체를 처리하는 단계; (2) 상기 (1)의 세포를 배양하는 단계; 및 (3) 배양된 세포를 수거하여 파킨의 발현을 확인하고 정상세포와 대비하여 파킨 발현 수준을 비교하는 단계를 포함하는 파킨슨 병의 진단 및 스크리닝 방법을 제공한다.

[0037] 상기 (1)에서 세포는 미토콘드리아 이상이 의심되는 환자로부터 얻은 시료로 바람직하게는 피부 또는 신경 세포이다. 미토파지 유도제는 미토파지를 유도할 수 있는 물질로 바람직하게 카보닐 시아나이드 3-클로로페닐히드라존이고, 일산화질소 공여체는 상기 기술한 바와 같다. 상기 (2)에서 미토파지 유도제 및 일산화질소 공여체가 처리된 세포는 1시간 내지 24시간 배양됨으로써 파킨의 이동을 유도한다. 상기 (3)에서 배양된 세포는 수거되어 바람직하게 웨스턴 블랏 또는 ELISA를 통해서 파킨의 이동 발현을 확인한다. 예컨대, 카보닐 시아나이드 3-클로로페닐히드라존에 의한 파킨의 미토콘드리아내 이동 발현 여부를 근거로 미토파지 장애를 판단하여 (예를 들어, 카보닐 시아나이드 3-클로로페닐히드라존에 의한 파킨의 미토콘드리아내 이동 발현이 결여되거나, 정상세포 대조군에 비해 30% 이상 감소된 경우), 이들의 회복 치료효과는 파킨의 미토콘드리아내 이동 발현의 회복정도를 일산화질소 공여체의 상기 농도별 정량적 분석으로 치료 정도를 판단한다. 이처럼 파킨의 이동 정도 및 회복 정도를 정량적으로 확인하고 정상 대조군과 비교함으로써, 회복 효과 및 치료 효과를 예측하여 파킨슨 병을 진단 및 스크리닝한다. 상기에서 진단되는 파킨슨 병은 바람직하게, 미토콘드리아 이상 병리가 수반되는 PINK1(PINK1-induced putative kinase 1) 또는 미토콘드리아 이상 병리가 수반되는 일부 비유전성 (sporadic

form) 파킨슨병이다.

발명의 효과

[0038] 본 발명의 일산화질소 공여체를 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 이상 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 세포 내 손상된 미토콘드리아들을 제거하고 세포 내 미토콘드리아 작용을 원활하게 이끌어냄으로써 미토콘드리아 이상 관련 질환의 예방 및 치료에 현저한 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 PINK1 결핍 도파민 신경 세포에서 일산화질소 공여체 처리에 따른 파킨 이동을 보여주는 도이다.
 도 2는 PINK1 결핍 도파민 신경 세포에서 일산화질소 공여체 처리에 따른 파킨의 이동으로 미토파지를 유도하는 것을 보여주는 도이다.
 도 3은 정상 세포에서 nNOS 저해시에 파킨의 이동이 억제되는 것을 보여주는 도이다.
 도 4는 정상 세포에서 nNOS 억제시에 미토파지가 억제됨을 보여주는 도이다.
 도 5의 A는 nNOS-null MEF 세포 제조를 확인한 결과를 보여주는 도이며, 도 5의 B는 nNOS-null MEF 세포에서 미토파지 유도가 억제됨을 보여주는 도이다.
 도 6은 PINK1 결핍 도파민 신경 세포에서 일산화질소 공여체 처리에 따른 미토콘드리아 전자전달계 활성 효과를 보여주는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0041] <실시예 1> PINK-1 결핍 도파민 신경 세포에서 일산화질소 공여체에 의한 미토파지 유도 확인

[0042] 1. 웨스턴 블랏을 통한 파킨(Parkin) 단백질의 미토콘드리아로 이동 확인

[0043] 유전성 파킨슨병에서는 미토파지가 정상적으로 일어나지 않아 미토콘드리아 장애가 발생한다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 일산화질소 공여체 처리에 따른 미토파지 유도 여부를 확인하였다.

[0044] PINK 돌연변이 신경 세포(PINK-1 deficient dopaminergic neuronal cell, Mitochondrion 2011; 11: 707-15) 모델에 일산화질소 공여체인 나이트로프루사이드 나트륨 (SNP, 시그마-알드리치 71778) 또는 S-나이트로소-N-아세틸-DL-페니실아민(SNAP, 시그마-알드리치 N3398)를 처리함으로써 파킨 단백질 발현을 확인하였다. 파킨 단백질의 발현은 미토파지 유도에 대한 지시자로 사용된다.

[0045] PINK1 결핍 도파민 신경세포는 33 °C 및 5% CO₂ 하에 RF 배지[DMEM, 10 % FBS, 1% 글루코즈, 페니실린(100 unit/ml), 스트렙토마이신 (100 g/ml) 및 L-글루타민(2mM)]에서 배양되었다. PINK1 결핍 도파민 신경세포 세포 60x10⁴ 개를 48시간 동안 10cm 배양 접시에서 배양한 후, 정상 세포에서 미토파지 유도 물질인 카보닐 시아나이드 3-클로로페닐히드라존(10 μM), 일산화질소 공여체인 나이트로프루사이드 나트륨 또는 S-나이트로소-N-아세틸-DL-페니실아민을 농도 별로 처리하고 2시간 동안 더 배양하였다. 배양된 세포를 수거하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 웨스턴 블랏을 수행하기 위하여 세포는 PBS로 워싱하고 10분간 50 mM Tris (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5 mM EDTA, 포스파타아제 억제제 (0.2 mM Na₃VO₄, 4mg/ml NaF) 및 프로타아제 억제제를 포함하는 버퍼로 용해하였다. 단백질 용해물은 12% SDS-폴리아크릴아마이드 겔로 분리하고 PVDF 멤브레인에 트랜스퍼하였다. anti-parkin 및 anti-TOM20 일차항체로 처리 후 워싱한 후 2차 항체를 처리하고 ECL로 처리한 후에 이를 확인하였다.

[0046] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0047] 도 1에 나타난 바와 같이, 나이트로프루사이드 나트륨 또는 S-나이트로소-N-아세틸-DL-페니실아민 처리에 따라

일정 농도 수준(SNP 50 nM, SNAP 50~100nM)에서 파킨(Parkin)이 확인되었고 이를 통하여 미토파지가 일어난 것을 확인하였다.

2. 공초점 현미경을 이용한 파킨(Parkin) 단백질의 미토콘드리아로 이동 확인

PINK1 결핍 도파민 신경세포 0.2×10^4 개를 48시간 동안 폴리-L-리신 코팅된 1cm 슬라이드 디쉬에 배양한 후에, 카보닐 시아나이드 3-클로로페닐히드라존 또는 나이트로프루사이드 나트륨을 각각 10 μ M 또는 50 nM 농도로 2 시간 동안 처리하였다. 이에 indicated 플라스미드를 처리하고 10분간 상온에서 파라포름알데하이드로 고정한 후 PBS로 워싱하였다. 슬라이드는 0.1% 트리톤 X-100을 가지는 PBS 내 1% BSA로 블로킹되고 FLAG 일차 항체로 배양되었다. 다음으로 세포는 Alexa Fluor 488 goat 항-마우스 항체로 라벨링되었다. 슬라이드는 Vectashield aqueous mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 고정되고 Zeiss LSM510 META 레이저 스캐닝 공초점 현미경 (Carl Zeiss, Germany)으로 분석되었다. 이미지 프로세싱 및 분석은 Zeiss LSM510 version 2.3 software로 수행되었으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 여기서 빨간색은 m-체리-파킨을 나타내며, 청록색은 pMito-ECFP이다.

도 2에 나타난 바와 같이, PINK1 결핍 도파민 신경세포에서 일산화질소 공여체인 SNP에 의해 파킨 이동이 일어나고 미토파지 유도가 일어나는 것을 확인하였다.

즉, 상기 결과를 통해서 세포에 질산화적 독성 스트레스를 주지 않는 범위의 농도에서 일산화질소가 파킨의 이동을 촉진하고 미토파지를 유도함을 확인하여, 미토콘드리아 이상 관련 질환의 치료제로 사용될 수 있음을 확인하였다.

<실시예 2> nNOS에 의한 파킨 이동의 확인

1. 웨스턴 블랏을 통한 nNOS의 기능 확인

파킨(Parkin) 이동에서 neuronal nitric oxide synthase의 역할을 확인하고자 정상 도파민 신경 세포 SN4741(J Neurosci 1999; 19: 10-20)에서 nNOS 억제에 따른 파킨의 이동 효과를 확인하였다.

도파민 신경세포 SN4741는 33 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂하에 RF 배지[DMEM, 10 % FBS, 1% 글루코즈, 페니실린(100 unit/ml), 스트렙토마이신 (100 g/ml) 및 L-글루타민(2mM)]에서 배양되었다. 도파민 신경세포 세포 SN4741 60×10^4 개를 48시간 동안 10cm 배양 접시에서 동안 배양한 후, 미토파지 유도 물질인 카보닐 시아나이드 3-클로로페닐히드라존(10 μ M)을 처리한 2시간 처리하였다. 여기에 pan-NOS 억제제인 L-NAME(Nw-니트로-L-아르기닌 메틸 에스테르) 또는 nNOS 특이적 억제제인 NAAN(N-[(4S)-4-아미노-5-[(2-아미노에틸)아미노]페닐]-N'-니트로구아니딘 트리스(트리플루오로아세테이트))을 12시간 처리하여 파킨의 발현을 상기 실시예 1과 같이 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다.

그 결과를 도 3에 나타내었다.

도 3에 나타난 바와 같이, 미토파지 유도물질인 카보닐 시아나이드 3-클로로페닐히드라존 처리에 의해 파킨이 발현되었지만 nNOS 억제에 의해 파킨의 발현이 크게 감소하는 것을 확인하였다.

2. 공초점 현미경을 이용한 nNOS의 기능 확인

카보닐 시아나이드 3-클로로페닐히드라존(10 μ M, 2시간)로 처리되거나 카보닐 시아나이드 3-클로로페닐히드라존(10 μ M, 2시간)과 NAAN(1 μ M, 12시간)로 처리된 세포에 대하여 상기 실시예 1의 방법과 동일하게 공초점 현미경 분석을 수행하여, 그 결과를 도 4에 나타내었다. 여기서 빨간색은 m-체리-파킨을 나타내며, 청록색은 pMito-ECFP이다.

도 4에 나타난 바와 같이, 카보닐 시아나이드 3-클로로페닐히드라존만을 처리한 실험군에서는 미토파지가 유도되는 것을 확인할 수 있었으나, NAAN이 처리되어 nNOS가 억제된 실험군에서는 미토파지가 억제됨을 확인하였다.

3. nNOS-null MEF 세포에서 파킨 이동 억제 확인

nNOS가 결핍된 돌연변이 세포를 제조하여 미토파지 유도인자인 카보닐 시아나이드 3-클로로페닐히드라존의 처리에 따른 파킨의 발현을 확인하였다.

primary MEF는 Jackson 실험실로부터 nNOS-null 마우스를 구매(Cell 1993; 75:1273-86)하여 C57BL6/J 마우스와

교배하여 nNOS(+/-) 마우스를 얻었다. 임신 12.5일령의 마우스로부터 자궁을 적출하고 태아를 분리하여 MEF(mouse embryonic fibroblast) 세포를 제조하였으며, 10% FBS를 포함하는 DMEM에 보관하였다.

[0064] 제조된 nNOS-null MEF 세포에서 nNOS가 발현되지 않음은 nNOS 발현 여부(도 5의 A)를 확인함으로써 명확히 하였다.

[0065] 제조된 nNOS-null MEF 세포와 이의 야생형 세포에 대하여 카보닐 시아나이드 3-클로로페닐히드라존(10 μ M, 2시간)을 처리하여 파킨 발현 여부를 확인하였으며, 그 결과를 도 5의 B에 나타내었다.

[0066] 도 5의 B에 나타난 바와 같이, 야생형의 경우 카보닐 시아나이드 3-클로로페닐히드라존 처리에 따라 파킨이 이동하는 것을 확인할 수 있었지만, nNOS가 결핍된 세포에서는 카보닐 시아나이드 3-클로로페닐히드라존을 처리하더라도 파킨의 이동이 유도되지 않음을 확인하였다.

[0067] 상기 1 내지 3의 결과를 통해서 미토파지의 유도가 nNOS를 매개로 이루어지는 것을 확인하였다.

[0068] <실시예 3> 일산화질소 공여체에 의한 PINK1 결핍 신경세포 모델에서 전자전달계 활성 증진 효과 확인

[0069] 일산화질소 공여체에 의한 PINK1 결핍 신경세포 모델에서 전자전달계 활성 증진 효과를 확인하였다.

[0070] PINK1 결핍 도파민 신경세포 60x10⁴ 개를 48시간 동안 10cm 배양 접시에서 배양한 후, 미토파지 유도 물질인 일산화질소 공여체인 나이트로프루사이드 나트륨(50 nM), S-나이트로소-N-아세틸-DL-페니실아민(100 nM), 실테나필 시트레이트(2 μ M) 또는 진세노사이드 Re (3 μ M)를 처리하고 24시간 또는 46시간 동안 더 배양하였다. 배양된 세포를 수거하여 미토콘드리아 분리를 수행하였다.

[0071] 미토콘드리아 분리를 위해 세포는 PBS로 워싱되고 프로테아제 억제제 칩을 포함한 10 mM 트리스 버퍼에 섞어주었다. 세포에 1.5 M 수크로스를 추가로 넣은 후에 1 ml 시린지를 사용하여 이를 분리하였고 700g 및 2℃에서 10분간 원심분리하였다. 상청액은 14,000g 및 2℃에서 10분간 원심분리 후 남은 펠렛을 워싱하고 프로테아제 억제제 칩을 포함하는 10 mM 트리스에 resuspension하였다. 일부 펠렛은 정량을 위해 용해되었으며, 나머지는 분석까지 얼음에서 보관하였다.

[0072] 미토콘드리아의 ETC 효소의 활성은 다음 방법으로 측정하였다.

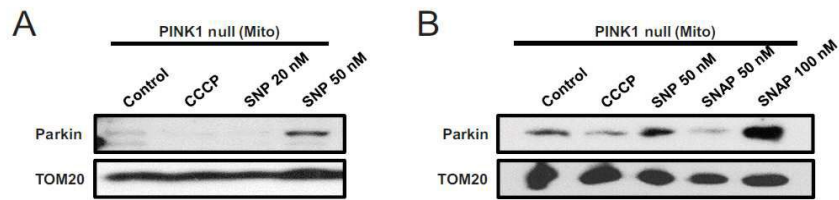
[0073] 복합체 I의 경우, 25 mM 인산칼륨, 3.5 g/L BSA, 60 μ M DCIP, 70 μ M decylubiquinone, 1.0 μ M 안티마이신-A, 및 3.2 mM NADH (pH 7.8)를 함유하는 240 μ l에서 배양하여 600 nm로 활성을 측정하였다. 미토콘드리아 시료는 NADH가 없는 버퍼에서 3분간 37 ℃로 선처리되었고; 그 후 시료에 160 mM NADH 5 μ l이 첨가되었으며; 흡광도는 30-s 간격으로 5분간 37 ℃에서 측정되었다. 5분 후에, 2.5 μ l 로테논(rotenone)이 첨가되고 흡광도는 30-s 간격으로 5분간 37 ℃에서 측정되었다.

[0074] 복합체 II의 경우, 80 mM 인산칼륨, 1 g/L BSA, 2 mM EDTA, 0.2 mM ATP, 10 mM 숙시네이트, 0.3 mM 포타슘 시아나이드, 60 μ M DCIP, 50 μ M decylubiquinone, 1 μ M 안티마이신 A, 및 3 μ M 로테논 (pH 7.8)을 함유하는 240 μ l에서 배양하여 600 nm로 활성을 측정하였다. 미토콘드리아 시료는 10분간 37 ℃에서 숙시네이트 및 포타슘 시아나이드 없이 선처리되었다. 1.5M 숙시네이트 20 μ l 및 0.1 M KCN 0.75 μ l가 후에 첨가되었고 흡광도는 30-s 간격으로 5분간 37 ℃에서 측정되었다. Blank는 5mM 말로네이트를 함유하였다.

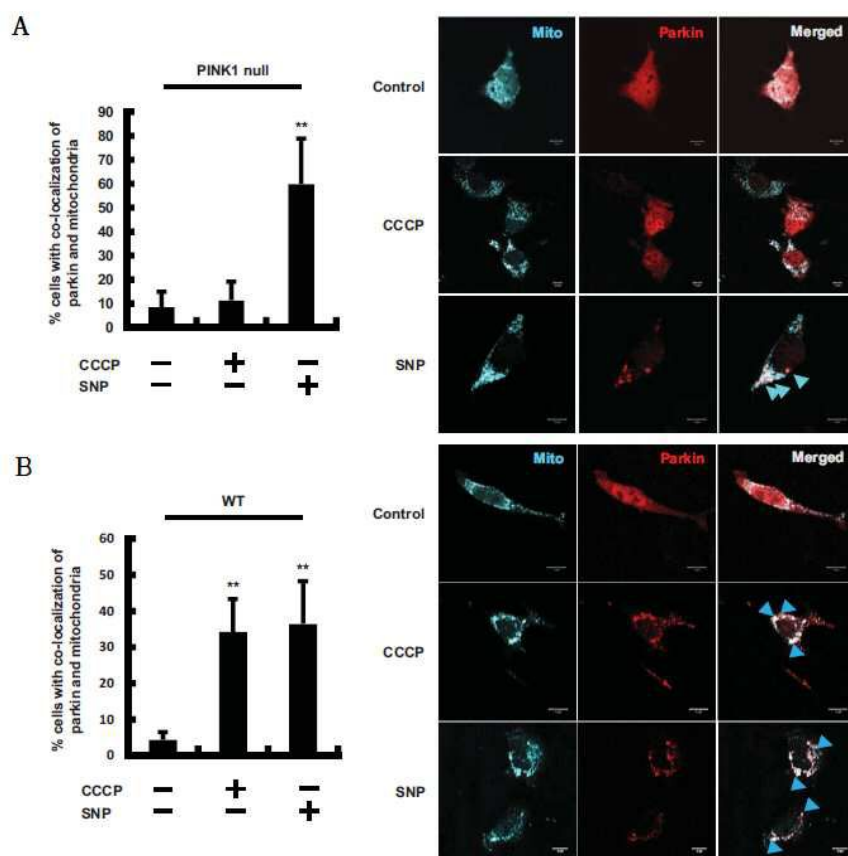
[0075] 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에 나타난 바와 같이 유전성 파킨슨 병 질환 모델인 PINK1 결핍 도파민 신경세포 모델에서 일산화질소 공여체인 나이트로프루사이드 나트륨(50 nM), S-나이트로소-N-아세틸-DL-페니실아민(100 nM), 또는 일산화질소 시그널을 활성화하는 실테나필 시트레이트(2 μ M) 또는 진세노사이드 Re (3 μ M) 처리에 따라 복합체 I 및 II 모두 전자 전달계 활성이 증진되는 것을 확인하였다. 즉, 일산화질소 공여체에 의한 일산화질소 투여는 미토파지를 유도하여 손상 미토콘드리아들을 제거하고 미토콘드리아의 효율을 증진시키는 것을 확인하였다.

도면

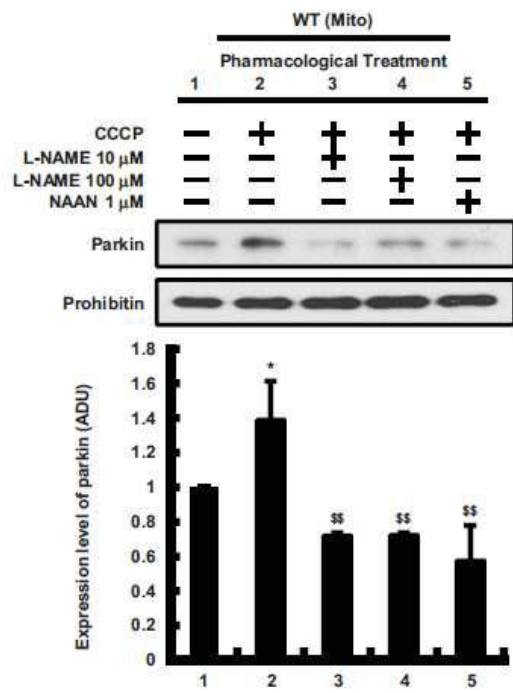
도면1



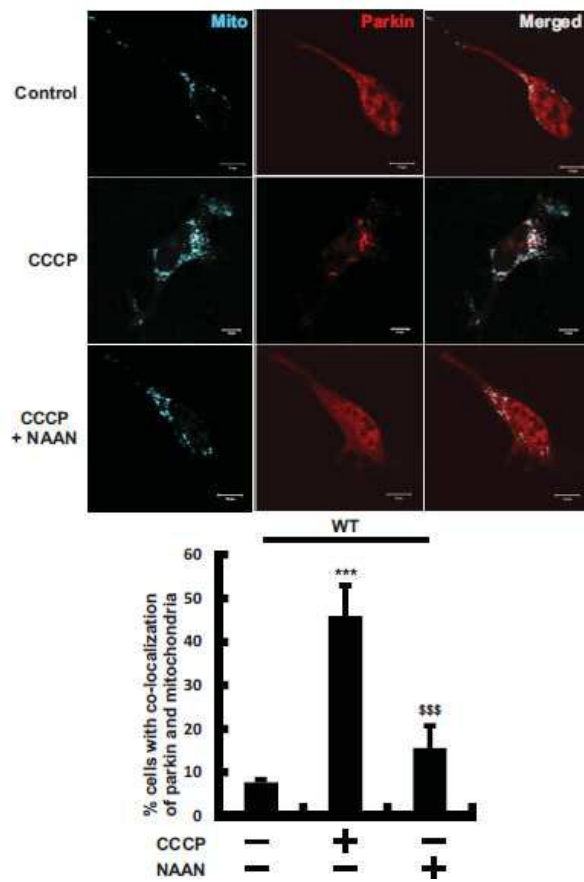
도면2



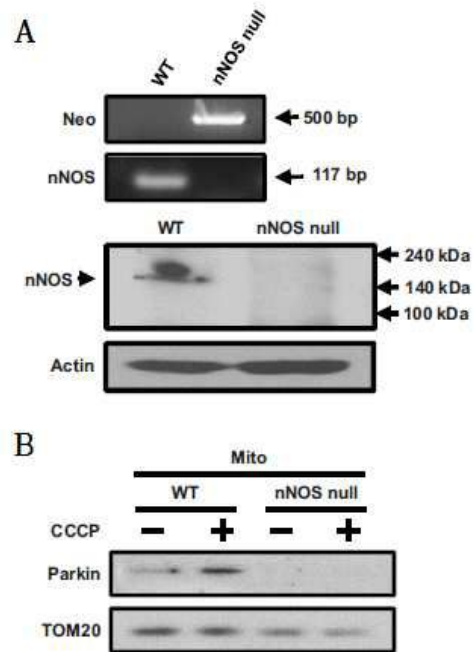
도면3



도면4



도면5



도면6

