(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0000682
(43) 공개일자 2021년01월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4375 (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *G01N 33/483* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4375 (2013.01)
A61P 25/16 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2020-0077047
(22) 출원일자 2020년06월24일
심사청구일자 2020년06월24일
(30) 우선권주장
1020190075412 2019년06월25일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : **기술양도**

(71) 출원인
동아대학교 산학협력단
부산광역시 사하구 낙동대로550번길 37, 동아대학교 내 (하단동)
(72) 발명자
윤진호
부산광역시 동래구 사직로 80, 123동 2004호(사직동, 사직 쌍용 예가)
김동현
부산광역시 남구 수영로 345, 102동 2805호(대연동, 대연힐스테이트푸르지오)
(74) 대리인
위병갑

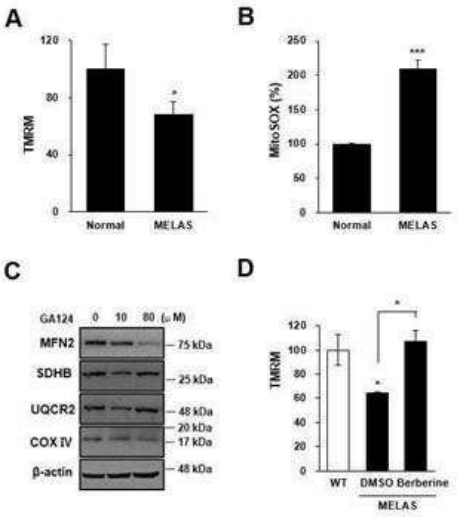
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 베르베린 (berberine)을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 베르베린은 미토파지의 활성을 촉진함으로써 미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환의 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도15



(52) CPC특허분류
A61P 25/28 (2018.01)
G01N 33/4833 (2013.01)
G01N 2500/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711109131
과제번호 2019R1A2C2003991
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 신규 미토파지 조절 키나아제 기능연구를 통한 스트레스성 미토파지 통합 네트워크 규명 및 제어
기 여 율 1/2
과제수행기관명 동아대학교 산학협력단
연구기간 2019.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711103841
과제번호 2016R1A5A2007009
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터지원사업 기초의과학분야 (MRC)
연구과제명 말초신경병증 연구센터
기 여 율 1/2
과제수행기관명 동아대학교 산학협력단
연구기간 2016.06.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

베르베린(Berberine)을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 베르베린은 미토파지 (mitophagy)의 활성을 촉진시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 베르베린은 미토콘드리아의 세포호흡율을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환은 퇴행성 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 퇴행성 질환은 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 루게릭병 (amyotrophic lateral sclerosis), 헌팅턴병 (Huntington's Disease), 다발성 경화증(Multiple sclerosis), 면역계이상 뇌기능 부전, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병(Niemann-Pick disease), 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매(dementia)로 이루어지는 그룹에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환은 MELAS 증후군 (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes), 및 샤르코 마리 투스 질환 (Charcot Marie Tooth disease, CMT)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

(a) 미토케이마 (mt-Keima)를 발현하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및

(b) 미토파지 (mitophagy)의 활성을 측정하는 단계;를 포함하는 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 미토파지의 활성은 유세포분석법 (flow cytometry) 또는 공초점 현미경 (confocal microscopy)에 의하여 측정되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

상기 시험물질이 미토파지의 활성을 촉진시킨 경우 미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환 치료제인 것으로 판단하는 단계를 추가적으로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 7 항에 있어서,

상기 미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환은 퇴행성 질환인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

상기 퇴행성 질환은 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 루게릭병 (amyotrophic lateral sclerosis), 헌팅턴병 (Huntington's Disease), 다발성 경화증(Multiple sclerosis), 면역계이상 뇌기능 부전, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병(Niemann-Pick disease), 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매(dementia)로 이루어지는 그룹에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 7 항에 있어서,

상기 미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환은 MELAS 증후군 (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes), 루게릭병 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 및 샤르코 마리 투스 질환 (Charcot Marie Tooth disease, CMT)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

시험관 내 (*in vitro*)에서 베르베린을 미토콘드리아 기능이상 세포에 처리하는 단계를 포함하는 미토파지의 활성을 촉진시키는 방법.

청구항 14

베르베린(Berberine)을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 15

베르베린(Berberine)을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 베르베린 (berberine)을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 미토파지 (mitophagy)는 손상되었거나 불필요한 미토콘드리아를 제거하는 세포 내 분해기전으로서, 미토콘드리아 손상이 발생하였을 때 막으로 둘러싸 오토파고좀 (autophagosome)을 형성하고 이를 리소좀 (lysosome)과 융합함으로써 손상된 미토콘드리아를 선택적으로 제거하는 역할을 수행하는 것으로 보고되었다. 이러한 미토파지의 활성은 신경세포를 비롯한 여러 세포들에서 미토콘드리아 기능을 조절하고 조직의 기능을 유지하는데 중요하다는 것이 알려져 있다.

[0004] 최근 연구에 따르면, 미토파지의 활성 저해는 손상된 미토콘드리아의 축적을 통해 운동신경의 사멸을 야기하여 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌질환을 일으킬 수 있다는 것이 밝혀졌다. 또한, 미토파지 활성의 이상이 파킨슨병, 알츠하이머병, 루게릭병과 같은 퇴행성 뇌질환을 비롯하여, 말초신경병증, 심장질환, 대사질환, 암 등 광범위한 인체질환들과 관련되는 것으로 보고되면서 인체질환에서 미토파지의 역할과 질환치료에의 이용가능성에 대한 연

구자들의 관심이 높아지고 있다.

[0005] 미토파지 활성 촉진을 통해 질병을 치료하기 위한 미토파지 조절화합물을 발굴하기 위해서는 세포 및 생체 미토파지 변화를 손쉽게 측정할 수 있는 연구시스템이 필수적으로 필요하다. 그러나, 민감하고 정량적으로 미토파지 활성을 측정할 수 있는 실험적 방법의 부재로 미토파지 활성자체를 판독지표 (read-out)로 한 미토파지 조절 화합물의 탐색은 수행된 적이 없었다. 지금까지 널리 사용되고 있는 LC3 기반 검출 방법은 미토파지의 초기단계인 오토파고좀 형성단계만을 측정할 수 있기 때문에 측정감도가 낮고 정량적 측정이 어려운 한계를 지니고 있다. 또한, 몇몇 연구그룹에서 시도된 제어물질 발굴시도도 대부분 PINK-Parkin의 미토콘드리아 이동이나, 미토파지 과정에서 일어나는 미토콘드리아의 분열 (fission) 등 간접적 판독지표들을 사용하여 실제 생리적 조건에서 미토파지 활성을 제어할 수 있는 물질을 발굴하지 못하고 있다.

[0006] 현재 실험적으로 미토파지 활성을 유도하는 방법은 CCCP, FCCP, rotenone 등과 같이 미토콘드리아의 기능이상을 유도하는 소위 '미토콘드리아 독소들 (mitochondrial toxins)'을 처리하는 것이다. CCCP와 FCCP는 미토콘드리아 막전위 저해제 (uncoupler)로서 미토콘드리아 막전위를 탈분극시키며, rotenone은 Complex I 저해제로 작용한다. 이들은 직접적으로 미토콘드리아 손상을 유도함으로써 손상된 미토콘드리아의 제거기전인 미토파지 활성을 유도하지만, 세포에 대한 독성이 강하기 때문에 미토파지 활성 촉진을 위한 약물로는 사용할 수 없는 제한이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) KR 10-1648114 B

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 베르베린 (berberine)을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 미토케이마 (mt-Keima)를 발현하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및 (b) 미토파지 (mitophagy)의 활성을 측정하는 단계;를 포함하는 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 시험관 내 (*in vitro*)에서 베르베린 (berberine)을 미토콘드리아 기능이상 세포에 처리하는 단계를 포함하는 미토파지의 활성을 촉진시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 베르베린(Berberine)을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 베르베린(Berberine)을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 베르베린 (berberine)을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 시험관 내 (*in vitro*)에서 베르베린 (berberine)을 미토콘드리아 기능이상 세포에 처리하는 단계를 포함하는 미토파지의 활성을 촉진시키는 방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 베르베린(Berberine)을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 베르베린(Berberine)을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 조성물은 미토파지의 활성을 촉진하는 효과가 있어, 미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환의 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 유세포 분석법 (Flow cytometry)에 의한 미토파지 활성 측정 방법을 나타낸 것이다.

도 2는 공초점 현미경 (confocal microscopy)에 의한 미토파지의 활성 측정 방법을 나타낸 것이다.

도 3은 인간 폐상피세포주에서 베르베린에 의한 미토파지의 활성을 분석한 결과이다 (A: 유세포 분석법에 의한 경우; B: 공초점현미경에 의한 경우; 및 C: 미토콘드리아의 양을 분석한 경우).

도 4는 Parkin이 발현되는 HeLa 세포 (HeLa-Parkin) (A 및 B), A549 세포 (C) 및 SH-SY5Y 세포 (D)에서 베르베린에 의한 미토파지의 활성을 분석한 결과이다.

도 5는 베르베린의 처리농도 (A) 및 처리시간 (B)에 따른 미토파지의 활성을 분석한 결과이다.

도 6은 베르베린의 처리에 따른 미토파지의 활성 (A) 및 오토파지의 활성 (B)을 분석한 결과이다.

도 7의 7A는 미토콘드리아, ER, Goli 및 peroxisome 형광 마커를 발현하는 Hela 세포주에서, 베르베린을 처리하여, 미토콘드리아의 형광 발현 양상을 형광현미경으로 확인한 도이다.

도 7의 7B는 미토콘드리아, ER, Goli 및 peroxisome 형광 마커를 발현하는 Hela 세포주에서, 베르베린을 처리하여, 미토콘드리아의 형광 발현 양상을 수치화하여 도식화한 것이다.

도 8은 베르베린의 처리에 따른 미토콘드리아 막전위 (A, TMRM assay), 활성산소 (B 및 D: MitoSOX assay; 및 E: DCF-DA) 및 미토파지의 활성 (C)을 분석한 결과이다.

도 9은 베르베린 및 AMPK 억제제 (Compound C)를 처리한 후 미토파지의 활성을 분석한 결과이다.

도 10의 10A는 베르베린을 처리한 후 NAO 형광 염료를 이용하여 미토콘드리아의 양을 분석한 결과이고,

도 10의 10B 내지 10D는 미토콘드리아 생합성의 조절 인자인 PGC-1α (B), NRF1 (C) 및 TFAM (D)의 mRNA 발현량을 RT-PCR을 통해 분석한 결과이다.

도 11의 11A는 PINK1 결핍 MEF 세포주 (KO)에서 미토콘드리아 막전위를 분석한 결과이고, 도 11B는 PINK1 결핍 MEF 세포주 (KO)의 콜로니 수를 측정한 결과이며, 도 11C는 SDHD 단백질의 발현량을 웨스턴블럿을 통해 분석한 결과이고, 도 11D는 PINK1 결핍 MEF 세포주에 베르베린을 처리한 후 미토콘드리아 막전위를 분석한 결과이다.

도 12의 12A는 초파리 모델에서 베르베린을 처리한 후 climbing assay를 수행한 결과이고, 도 12B는 ATP의 양을 분석한 결과이며, 도 12C는 초파리의 survival rate을 측정한 결과이다.

도 13은 PINK1 결핍 MEF 세포주에서, 베르베린을 처리하였을 때, 활성산소가 감소하는 것을 확인한 그래프이다.

도 14는 PINK1 결핍 MEF 세포주에서, 베르베린을 처리하였을 때, 미토콘드리아 호흡율이 증가한 것을 확인한 도이다.

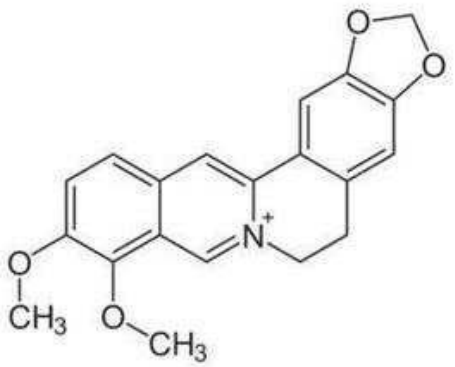
도 15의 15A는 MELAS 증후군 환자 유래 세포에서 미토콘드리아 막전위를 분석한 결과이고, 도 15B는 활성산소의 양을 분석한 결과이며, 도 15C는 MFN2, SDHD, UQCR2 및 COX IV 단백질의 발현량을 웨스턴블럿을 통해 분석한 결과이고, 도 15D는 MELAS 증후군 환자 유래 세포에 베르베린을 처리한 후 미토콘드리아 막전위를 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명은 베르베린 (berberine)을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명에 따른 화합물인 베르베린 (berberine, CAS Number: 2086-83-1)은 하기 화학식 1 로 표시되는 화합물을 의미한다.

[0025] [화학식 1]



[0026]

[0027] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 베르베린은 미토파지 (mitophagy)의 활성을 촉진시키는 것일 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 베르베린은 미토콘드리아의 세포호흡율을 증가시키는 것일 수 있다.

[0029] 본 발명의 용어, "미토파지 (mitophagy)"는 손상되었거나 불필요한 미토콘드리아를 제거하는 세포 내 분해기전으로서, 미토콘드리아의 손상이 발생한 경우 오토파고좀(autophagosome)을 형성하고 리소좀과 융합하여 손상된 미토콘드리아를 선택적으로 분해하여 제거할 수 있다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 베르베린은 0.1 내지 200 μM의 농도로 투여되는 것일 수 있고, 바람직하게는 1 내지 100 μM의 농도인 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 20 내지 100 μM의 농도인 것일 수 있고, 더욱 바람직하게는 20 내지 80 μM의 농도인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제, 기제, 부형제, 윤활제 등 당업계에 공지된 것이라면 제한없이 사용할 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 나아가, 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제 또는 젤의 형태의 피부 외용제의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0033] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 싸이코트리아 루브라 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사

용될 수 있다.

[0034] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어 "투여"란 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0035] 상기 용어, "개체"란 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 바람직하게는, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[0036] 상기 용어, "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강 상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 투여는 상기 권장 투여량을 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환은 퇴행성 질환, 암, 알러지성 질환 및 인지기능 장애로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있다.

[0038] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환은 MELAS 증후군 (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes), 루게릭병 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 및 샤르코 마리 투스 질환 (Charcot Marie Tooth disease, CMT)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

[0039] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 퇴행성 질환은 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis), 헌팅턴병 (Huntington's Disease), 다발성 경화증(Multiple sclerosis), 면역계이상 뇌기능 부전, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병 (Niemann-Pick disease), 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매(dementia)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것일 수 있으며, 바람직하게는 파킨슨병이나, 이에 제한되지는 않는다.

[0040] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 암은 대장암, CTH 생성 종양, 급성 림프구성 또는 림프아구성 백혈병, 급성 또는 만성의 림포구성 백혈병, 급성 비림프구성 백혈병, 방광암, 뇌종양, 유방암, 경관암, 만성 골수성 백혈병, 장암, T-존 림프종, 자궁내막증, 식도암, 담즙 방광암, 에윙스 육종(Ewing's sarcoma), 두 및 목암, 설암, 홉킨스 림프종, 카포시스 육종, 신장암, 간암, 폐암, 중피종, 다발성 골수종, 신경아세포종, 비홉킨 림프종, 골육종, 난소암, 신경아세포종, 유선암, 경관암, 전립선암, 췌장암, 페니스암, 레티노블라스토마, 피부암, 위암, 갑상선암, 자궁암, 고환암, 윌름스 종양, 및 트로포블라스토마로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0041] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 알러지성 질환은, 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 알러지성 피부염 (allergic dermatitis), 접촉성 피부염, 두드러기, 가려움증, 곤충 알러지, 식품 알러지, 약품 알러지, 부종, 과민증(anaphylaxis), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 천식(asthma) 및 알러지성 결막염(allergic conjunctivitis) 중에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0042] 또한, 본 발명은 (a) 미토케이마 (mt-Keima)를 발현하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및 (b) 미토파지 (mitophagy)의 활성을 측정하는 단계;를 포함하는 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0043] 본 발명의 용어, "미토케이마(mt-Keima, mitochondria-targeted Keima)"는 pH 의존적으로 형광특성이 변화하는 산호유래 형광단백질 (Katayama H et al, 2011, Chem Biol)을 말한다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 미토파지의 활성은 유세포분석법 (flow cytometry) 또는 공초점 현미경 (confocal microscopy)에 의하여 측정되는 것일 수 있다.

[0045] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 시험물질이 미토파지의 활성을 촉진시킨 경우 미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환 치료제인 것으로 판단하는 단계를 추가적으로 더 포함하는 것일 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명은 시험관 내 (*in vitro*)에서 베르베린 (Berberine)을 미토콘드리아 기능이상 세포에 처리하는 단계를 포함하는 미토파지의 활성을 촉진시키는 방법을 제공한다.

[0048] 또한, 본 발명은 베르베린 (Berberine)을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0049] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 인지기능 장애는, 무기력, 기억력 감퇴, 건망증, 인지력 감퇴, 학습장애, 주의력 감퇴, 우울증, 청력 감퇴, 무통증, 무발한증 및 식별력 감퇴로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상인 것일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0050] 또한, 본 발명은 베르베린 (Berberine)을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0052] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0054] **실시예 1. 미토파지의 활성 측정 방법**

[0055] **1.1. 미토케이마 발현 세포주의 제작**

[0056] 본 발명자들은 미토케이마가 발현된 세포주를 제작하기 위한 실험을 수행하였다. 간단히, 100-mm 배양 접시는 0.001 % poly-L-lysine으로 실온에서 10분 동안 코팅하여 준비하고, 4 x 10^6 개의 293L 세포를 코팅된 배양접시에 분주한 후, 10 % FBS가 첨가된 DMEM 배양액에서 24시간 동안 배양하였다. 이후, 미토케이마 플라스미드 DNA (pLVX-mt-Keima, 3 μg)와 packaging DNA (psPAX2, 3.75 μg; 및 pVSVG, 0.375 μg)를 넣고 8시간 동안 형질주입 (transfection)을 수행하였다. 이후, 신선한 배양액으로 교환하고 48시간 동안 추가 배양한 후, 바이러스가 포함된 배양액을 취하여 0.45 μm 필터로 걸러 미토케이마 렌티바이러스를 준비하였다.

[0057] 미토케이마를 발현시키고자 하는 세포는 60-mm 배양 접시에서 24시간 배양하여 준비하였고, 미리 제작한 미토케이마 렌티바이러스 1 ml과 배양액 1 ml을 섞은 후 미토케이마를 발현시키고자 하는 세포에 넣어 24시간 동안 감염시켰다. 이후, 배양액을 제거하고, 푸로마이신(puromycin, 2 μg/ml)을 처리하여 바이러스가 도입된 세포만을 선별하였다.

[0059] **1.2. 유세포 분석법 (Flow cytometry)에 의한 미토파지 활성 측정 방법**

[0060] 유세포분석기 (FACS)를 사용한 미토케이마를 발현하는 세포의 미토파지 활성 측정은 기존 논문의 방법에 따라 수행하였다 (J Vis Exp. 2018 Aug 12;(138)). 미토파지의 활성을 분석하기 위하여 미토케이마 형광은 405 nm 및 561 nm의 두 레이저에 의해 동시에 측정하였다. 즉, 각 세포의 405 nm 레이저에 의한 형광신호를 610 ± 10 nm 검출기로 검출한 신호 (BV605)와 동시에 561 nm 레이저에 의한 형광신호를 610 ± 10 nm 검출기로 측정한 신호 (PE-CF594)를 점 도식 (dot plot)으로 표시한 후, 미토파지 활성이 높아 "high" 게이트 내에 위치하는 세포의 비율을 미토파지 활성으로 정의하였다 (도 1).

[0062] **1.3. 공초점 현미경 (confocal microscopy)에 의한 미토파지의 활성 측정 방법**

[0063] 공초점 현미경을 사용한 미토케이마 형광분석에서 488 nm 레이저로부터의 형광신호를 녹색 (green)으로 나태내고, 555 nm 레이저로부터의 형광신호를 적색 (red)으로 나타낸 경우, 정상 미토콘드리아는 녹색으로 나타나고, 미토파지에 의해 리소좀 내로 들어간 미토콘드리아는 적색 반점 (red puncta)으로 나타나게 된다. 미토파지 활성은 공초점 현미경 이미지의 전체 픽셀가운데 미토파지 활성이 높아 적색으로 나타나는 픽셀의 비율을 미토파지 활성으로 계산하였다 (도 2).

[0065] **실시예 2. 미토파지 활성 조절 화합물의 발굴**

[0066] 본 발명자들은 식물유래 생리활성물질 라이브러리를 스크리닝하여 구조적으로 유사한 이소퀴놀린 알카로이드인 베르베린 (Berberine)을 미토파지의 활성 촉진물질로 발굴하였다.

[0068] **실시예 3. 인간 폐상피세포주에서 베르베린에 의한 미토파지의 활성 촉진 효과 분석**

[0069] 본 발명자들은 베르베린에 의한 미토파지의 활성 촉진 효과를 검증하기 위한 실험을 수행하였다. 간단히, 미토케이마를 발현하는 인간 폐상피세포주인 BEAS-2B 세포에 베르베린 (80 μM) 또는 미토콘드리아 막전위 저해제(uncoupler)로 알려진 CCCP (10 μM)를 24 시간 동안 처리한 후, 유세포분석기 또는 공초점현미경을 사용하여 미토파지의 활성을 측정하거나 미토콘드리아 양적 감소에 의한 미토파지의 활성을 측정하였다.

[0070] 그 결과, 유세포분석기를 사용하여 미토파지의 활성을 측정한 경우 베르베린을 처리한 그룹에서는 대조군(con)에 비해 미토파지의 활성이 현저하게 증가되었음을 확인하였다 (도 3A). 또한, 공초점현미경을 사용하여 미토파지의 활성을 측정한 경우에도 베르베린을 처리한 그룹에서는 대조군(con)에 비해 미토파지의 활성이 증가되었음을 확인하였다 (도 3B). 미토콘드리아의 양에 의한 미토파지의 활성을 측정한 경우에도 베르베린을 처리한 경우 대조군(con)에 비해 미토콘드리아의 양이 감소된 것을 확인하였고, 이는 베르베린에 의해 미토파지의 활성이 증가되었음을 간접적으로 확인하였다(도 3C).

[0072] **실시예 4. 다양한 세포주에서 베르베린에 의한 미토파지의 활성 촉진 효과 분석**

[0073] 본 발명자들은 다양한 세포주에서도 베르베린에 의하여 미토파지의 활성이 촉진되는지 확인하는 실험을 수행하였다. 간단히, Parkin (E3 ubiquitin ligase)이 발현되는 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포 (HeLa-Parkin), 인간 폐암 세포주인 A549 세포 및 파킨슨병의 연구에 사용되는 인간 신경모세포종 세포주인 SH-SY5Y 세포에 베르베린 또는 CCCP를 처리한 후 미토파지의 활성을 분석하였다.

[0074] 그 결과, Parkin이 발현되는 HeLa 세포에서는 베르베린의 처리에 의해 미토파지의 활성이 현저하게 증가됨을 확인하였다 (도 4A). 미토콘드리아의 양을 분석한 결과에서도 베르베린을 처리한 경우 미토콘드리아의 양이 감소된 것으로 확인되었고, 이는 유세포분석기를 사용하여 미토파지의 활성을 분석한 결과와 마찬가지로 베르베린을 처리한 경우 미토파지의 활성이 증가됨을 간접적으로 확인하였다 (도 4B).

[0075] 또한, 폐암세포주인 A549 세포에서도 베르베린을 처리한 경우 대조군에 비해 미토파지의 활성이 증가되었고 (도 4C), 신경모세포종 세포주인 SH-SY5Y 세포에서도 베르베린을 처리한 경우 미토파지의 활성이 증가되었음을 확인하였다 (도 4D).

[0077] **실시예 5. 베르베린의 처리농도 및 처리시간에 따른 미토파지의 활성 촉진 효과 분석**

[0078] 본 발명자들은 베르베린의 처리농도 및 처리시간에 따른 미토파지의 활성 촉진 효과를 분석하는 실험을 수행하였다. 간단히, 베르베린은 미토케이마를 발현하는 BEAS-2B 세포에 주어진 농도 (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 및 200 μM)에서 24시간 동안 처리한 후, 유세포분석기을 이용하여 미토파지 활성을 측정하였다. 또한, BEAS-2B 세포에 베르베린 (80 μM)을 주어진 시간 (0, 3, 6, 12, 18 및 24 시간) 동안 처리한 후, 유세포분석기을 이용하여 미토파지 활성을 측정하였다.

[0079] 그 결과, 베르베린의 처리농도가 5 또는 10 μM 에서는 미토파지의 활성에 어떠한 차이가 나타나지 않았고, 20 μM 부터 미토파지의 활성이 증가하였으며, 80 μM 까지 농도의존적으로 증가하였고, 80 μM 이상의 농도로 처리한 경우에는 활성에 큰 차이가 없었음을 확인하였다 (도 5A). 또한, 베르베린의 처리시간의 경우 3 시간부터 미토파지의 활성이 증가하였고, 12 시간에 최대로 활성이 증가하였으며, 12 시간 이상의 처리시간에서는 큰 차이가 나타나지 않았음을 확인하였다 (도 5B).

[0081] **실시예 6. 베르베린에 의한 미토파지 특이적 활성 유도 확인**

[0082] **6.1. 베르베린에 의한 미토파지 특이적 활성 증가 확인(1)**

[0083] 본 발명자들은 베르베린이 미토파지의 활성만을 특이적으로 증가시키는지 확인하는 실험을 수행하였다. 간단히,

미토케이마를 발현하는 BEAS-2B 세포에 CCCP (10 μM) 또는 베르베린 (80 μM)을 24 시간 동안 처리한 후, 공초점현미경으로 미토파지 활성을 분석하였다. 또한, 오토파지 활성 증가를 측정하기 위해 미토케이마를 발현하는 BEAS-2B 세포를 HBSS (Hanks' balanced salts solution)에 3 시간 배양하여 영양결핍상태 (starvation, starv.)를 유도하거나 6 시간 동안 베르베린 (80 μM)을 처리한 후, 공초점현미경으로 오토파지 활성을 측정하였다.

[0084] 그 결과, 베르베린은 CCCP와 동일하게 미토파지의 활성을 촉진하는 효과가 있었다(도 6A). 반면, 영양결핍상태로 3 시간 처리한 경우에는 오토파지를 유도하였으나 베르베린을 6 시간 처리한 경우에는 오토파지의 활성을 증가시키지 않는 것을 확인하였다 (도 6B). 즉, 베르베린은 미토파지의 활성만을 특이적으로 증가시키는 물질임을 확인하였다.

[0086] **6.2. 베르베린에 의한 미토파지 특이적 활성 증가 확인(2)**

[0087] 베르베린이 미토파지의 활성만을 특이적으로 증가시키고, 다른 세포 소기관에 끼치는 영향을 확인하기 위하여, 미토콘드리아(mt-YFP), 세포소기관 ER, 세포소기관 Golgi(Golgi-GFP) 및 세포소기관 peroxisome(peroxi Turqouise)에 형광마커를 각각 발현하는 Hela 세포주에 베르베린을 200 또는 400 μM 농도로 처리하여, 24시간 배양하였다. 배양 후 각 세포소기관 형광신호의 변화를 공초점 현미경으로 분석하여 가시화 하였다.

[0088] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 베르베린의 농도가 증가할수록 미토콘드리아의 형광이 유의적으로 감소하는 것을 확인 하였으며, ER, Golgi 및 peroxisome에서는 형광의 변화가 없는 것을 확인하여, 베르베린이 다른 세포 소기관에는 영향을 끼치지 않으면서, 미토파지를 활성화 시키는 것을 확인하였다.

[0090] **실시예 7. 베르베린에 의한 미토파지 활성화에서 미토콘드리아 막전위 및 활성산소 변화 분석**

[0091] 본 발명자들은 베르베린에 의해 미토콘드리아의 막전위 및 활성산소에 어떠한 변화가 일어나는지 확인하는 실험을 수행하였다. 미토콘드리아의 막전위(mitochondrial membrane potential)는 TMRM (tetramethylrhodamine methyl ester) 어세이로 분석되었고, 미토콘드리아의 활성산소(ROS)는 MitoSOX 어세이 및 DCF-DA 어세이를 통해 분석되었다.

[0092] 그 결과, 베르베린을 처리한 경우 CCCP를 처리한 경우에 비해 미토콘드리아의 막전위에 큰 차이가 나타나지 않았다 (도 8A). 활성산소(ROS)의 경우에도 CCCP를 처리한 그룹에서는 현저하게 증가되었으나, 베르베린을 처리한 그룹에서는 큰 차이가 나타나지 않았다 (도 8B).

[0093] 특히, 항산화제인 NAC (N-Acetylcysteine)를 처리한 경우 CCCP 에 의한 미토파지의 활성은 억제된 반면, 베르베린에 의한 미토파지의 활성은 항산화제의 처리와 관계없이 유지되는 것을 확인하였다 (도 8C). 또한, NAC를 처리한 경우 CCCP에 의해 증가된 ROS가 현저하게 감소되었으나, 베르베린에서는 ROS가 크게 감소되지 않았다 (도 8D 및 8E).

[0094] 상기 결과에 따르면, 베르베린은 CCCP와 같은 미토콘드리아의 독소들과 다른 메커니즘에 의해 미토파지의 활성을 증가시키는 것으로 확인되었다.

[0096] **실시예 8. 베르베린에 의한 미토파지 활성화에서 AMPK (AMP-activated protein kinase) 역할 규명**

[0097] AMPK (AMP-activated protein kinase)의 활성화는 오토파지 및 미토파지의 개시 단계에서 중요한 것으로 보고되고 있다. 이에 본 발명자들은 베르베린이 AMPK에 의존적으로 미토파지의 활성을 촉진하는지 확인하는 실험을 수행하였다. 간단히, 미토케이마를 발현하는 BEAS-2B 세포에 베르베린 (80 μM)을 여러 다른 농도(2.5, 5 및 10 μM)의 AMPK 억제제 (inhibitor)인 Compound C 와 함께 3시간 동안 처리한 후, 유세포분석기를 이용하여 미토파지의 활성을 분석하였다.

[0098] 그 결과, AMPK 억제제의 농도가 증가함에 따라 베르베린에 의한 미토파지의 활성이 감소된 것을 확인하였다 (도 9). 상기 결과로부터, 베르베린은 AMPK에 의존적으로 미토파지의 활성을 촉진한다는 것을 확인하였다.

[0100] **실시예 9. 베르베린에 의한 미토콘드리아 생합성 촉진**

[0101] 본 발명자들은 베르베린에 의한 미토파지의 활성 촉진이 일어난 후에 새로운 미토콘드리아의 생합성이 촉진되는지 분석하는 실험을 수행하였다. NAO (10-N-nonyl acridine orange)인 형광 염료를 이용하여 미토콘드리아의 양을 분석한 결과, 베르베린을 처리한 직후에는 미토콘드리아의 양이 감소하였다가 시간이 지남에 따라 조금씩 회복됨을 확인하였다 (도 10A).

[0102] 또한, 미토콘드리아 생합성에 중요한 조절 인자로 알려진 PGC-1α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), NRF1 (nuclear respiratory factor 1) 및 TFAM (mitochondrial transcription factor A)의 mRNA 발현량을 RT-PCR을 이용하여 확인한 결과, PGC-1α, NRF1 및 TFAM의 mRNA는 베르베린을 처리한 후 48 시간에서 유의미하게 증가하였음을 확인하였다 (도 10B, 10C 및 10D).

[0103] 상기 결과로부터, 베르베린은 미토콘드리아의 생합성을 유도한다는 것을 확인하였다.

[0105] **실시예 10. 파킨슨병 모델에서 베르베린에 의한 미토콘드리아 기능 개선 효과**

[0106] **10.1. 막전위 분석 및 동물 모델에서의 베르베린의 효과 확인**

[0107] 본 발명자들은 파킨슨병 모델에서 베르베린에 의하여 미토콘드리아 기능 개선 효과가 있는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 간단히, 미토콘드리아 기능 저하로 알려진 모델인 PINK1 (PTEN-induced kinase 1) 결핍 MEF (murine embryonic fibroblast) 세포주를 실험에 사용하였고, TMRM (tetramethylrhodamine methyl ester) 어세이를 통해 미토콘드리아 막전위를 분석하였고, 콜로니 수를 측정하여 세포의 증식률을 분석하였다. 그 결과, PINK1 결핍 MEF 세포주 (KO)에서는 정상 세포주 (WT)에 비해 미토콘드리아 막전위의 저하 및 갈락토스 배양액에서 성장 감소 등의 미토콘드리아의 기능 이상이 확인되었다 (도 11A 및 11B).

[0108] 또한, 베르베린에 의한 미토파지 증가여부를 확인하기 위하여 PINK1 결핍 MEF 세포주에 베르베린을 10, 40 및 80 μM 농도로 24시간 처리한 후 미토콘드리아 막단백질의 구성 단백질인 SDHB (succinate dehydrogenase complex subunit B) 단백질의 발현량을 웨스턴블럿으로 분석하였다. 그 결과, 베르베린 처리에 의해 SDHB 단백질의 발현량이 현저히 감소하였음을 확인하였고 (도 11C), 이는 베르베린 처리에 의해 미토파지가 유도되었음을 의미한다.

[0109] 또한, PINK1 결핍 MEF 세포주에 DMSO 또는 80 μM의 베르베린을 24 시간 동안 처리한 후, 4 일 동안 추가로 배양한 후에 미토콘드리아 막전위를 분석하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 베르베린을 처리한 PINK1 결핍 MEF 세포주의 미토콘드리아 막전위는 정상 세포주 (WT)와 비슷한 수준으로 회복되는 효과가 있음을 확인하였다 (도 11D).

[0110] 또한, 본 발명자들은 파킨슨병 초파리 모델에서 베르베린에 의한 미토콘드리아의 기능 개선 효과를 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과, climbing assay 에서는 베르베린을 처리한 경우 대조군에 비해 현저하게 증가되었고 (도 12A), ATP 에 있어서도 대조군에 비해 증가되었으며 (도 12B), survival rate 에 있어서도 베르베린을 처리한 경우 대조군에 비해 증가되었음을 확인하였다 (도 12C).

[0112] **10.2. 베르베린의 미토콘드리아 기능 개선 및 세포호흡율 향상 확인**

[0113] 본 발명자들은 파킨슨병 모델에서, 베르베린이 미토콘드리아의 기능개선 효과를 가지는지 확인하기 위하여, 미토콘드리아 기능이상의 지표인 활성산소 증가를 확인 하였다. 구체적으로, 활성산소를 정량하기 위하여, mitoSox 염색을 시행하였으며, 정상세포주(WT), PINK 결핍 MEF 세포주(PINK KO)를 사용하였다. 양성대조군으로, DMSO를 처리하고, 실험군으로 베르베린을 400 μM농도로 처리하여, 24시간 후 유세포 분석기로 분석하였다. 또한 동일한 조건에서, 미토콘드리아의 호흡율을 XF24 flux analyser로 분석하였다.

[0114] 그 결과, 도 13에 나타낸 바와 같이, PINK1 결핍 MEF 세포주(PINK1 KO, DMSO)가 정상 세포주(WT)보다 활성산소가 증가되어 있음을 확인하였으며, 베르베린을 처리하였을 때, 활성산소가, 정상세포주와 유사한 수준으로 감소하는 것을 확인하였다(도 13).

[0115] 또한, 미토콘드리아의 호흡율을 분석한 결과, 정상세포주(WT)와 비교하여, PINK1 결핍 MEF 세포주(PINK1 KO)에서 미토콘드리아의 호흡율이 현저히 감소되어 있는 것을 확인하였으며, 베르베린을 처리하면 미토콘드리아의 호

흡율이 유의하게 증가한 것을 확인하였다(도 14).

[0117] **실시예 11. MELAS 증후군 (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes)에서 베르베린에 의한 미토콘드리아 기능 개선 효과**

[0118] MELAS 증후군은 미토콘드리아 DNA의 돌연변이에 의해 발생하는 대표적인 유전성 미토콘드리아 질환으로서, MELAS 증후군 환자에서 유래한 세포 역시 미토콘드리아 DNA의 돌연변이에 의해 미토콘드리아의 기능 저하가 나타난다고 보고되어 있다. MELAS 증후군 환자 유래 세포에서는 정상 DNA를 가진 미토콘드리아와 돌연변이 DNA를 가진 미토콘드리아가 섞여 있는 heteroplasmy 상태가 발생하며, 돌연변이 DNA를 가진 미토콘드리아가 일정비율을 넘어설 때 병적 표현형이 나타나게 된다. 이에 본 발명자들은 미토파지에 의해 돌연변이 DNA를 가진 미토콘드리아를 선택적으로 제거함으로써 미토콘드리아 기능을 개선할 수 있는지 확인하는 실험을 수행하였다.

[0119] 그 결과, MELAS 증후군 환자 유래 세포에서는 미토콘드리아 막전위가 정상인 유래 세포주 (normal)에 비해 저하되고, 활성산소가 현저하게 증가되는 등 미토콘드리아 기능이상이 확인되었다 (도 15A 및 15B).

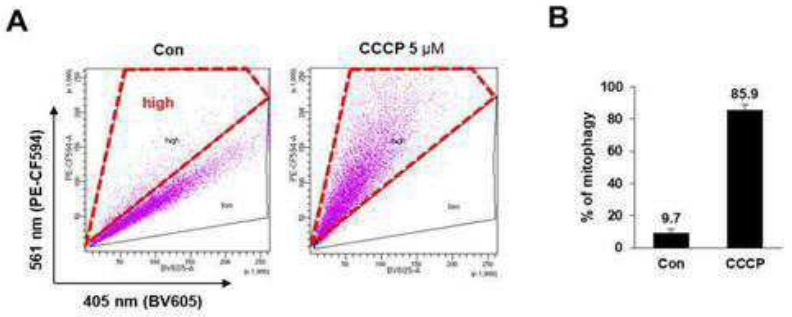
[0120] 또한, 본 발명자들은 MELAS 증후군 환자 유래 세포주에서 베르베린에 의한 미토파지 증가여부를 확인하기 위하여, 베르베린을 10 및 80 μM 농도로 24 시간 처리한 후, 미토콘드리아 마커인 MFN2 (mitofusin-2), SDHB, UQCR2 (ubiquinol-cytochrome c reductase core protein II) 및 COX IV 단백질의 발현량을 웨스턴블럿을 통해 분석하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 베르베린을 처리한 경우 상기 미토콘드리아 마커 중 MFN2의 발현량이 현저하게 감소하였음을 확인하였다 (도 15C). 이로써, MELAS 증후군 환자 유래 세포주에서 베르베린에 의해 미토파지가 유도되었음을 확인하였다.

[0121] 또한, 본 발명자들은 MELAS 증후군 환자 유래 세포주에 DMSO 또는 80 μM의 베르베린을 24 시간 동안 처리한 후, 4 일 동안 추가 배양한 후에 미토콘드리아 막전위를 분석하는 실험을 수행하였다. 그 결과, 베르베린을 처리한 MELAS 증후군 환자 유래 세포주에서는 미토콘드리아 막전위가 정상인 유래 세포주 (normal)와 비슷한 수준으로 회복되는 효과가 있음을 확인하였다 (도 15D).

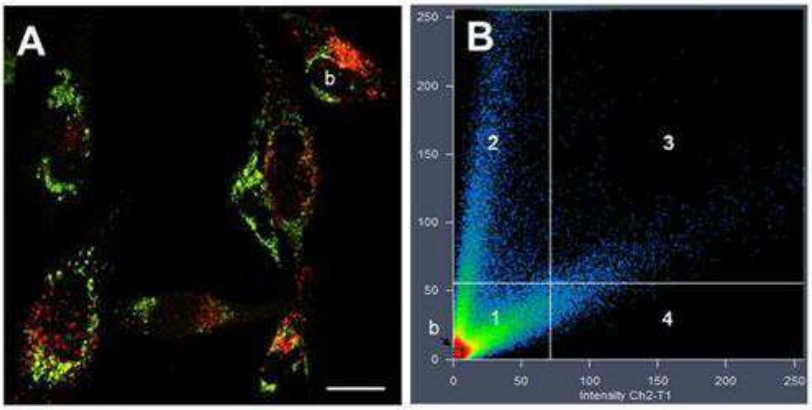
[0123] 따라서, 본 발명의 베르베린은, 미토파지를 유도하여, 기능 이상 미토콘드리아를 제거하는 것을 확인하고, 미토콘드리아의 호흡율은 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 베르베린은 인지기능 장애를 개선시키므로 미토콘드리아 기능이상으로 야기 될 수 있는 퇴행성 질환인 파킨슨병 뿐만 아니라, 대표적인 유전성 미토콘드리아 질환인 MELAS 증후군에서도 치료효과가 우수한 것을 확인하였다.

도면

도면1



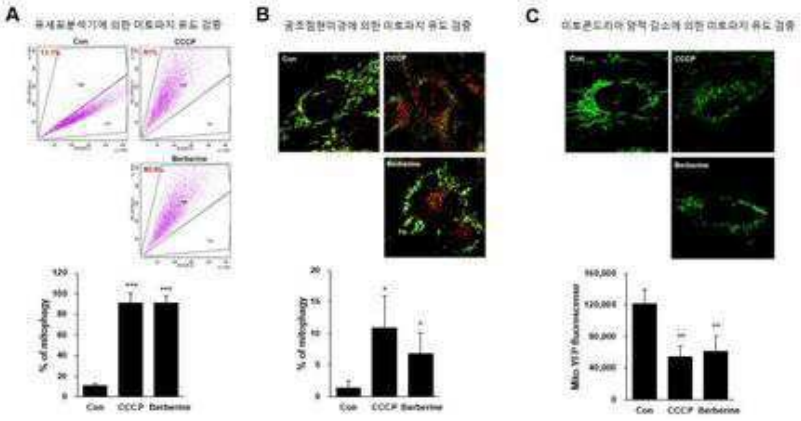
도면2



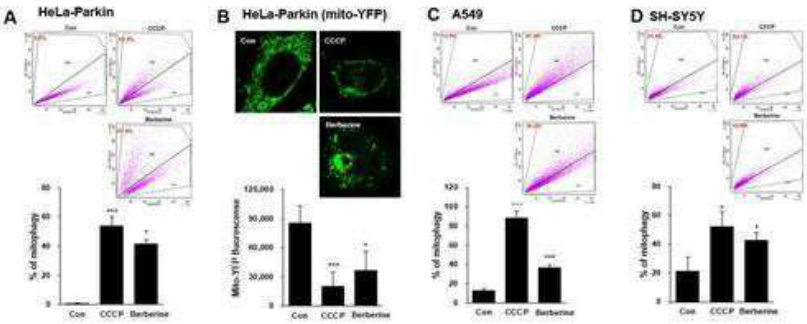
C

$$\% \text{ of mitophagy} = \left(\frac{\text{Pixels in 2}}{\text{Pixels in [(1-b)+2+3+4]}} \right) \times 100$$

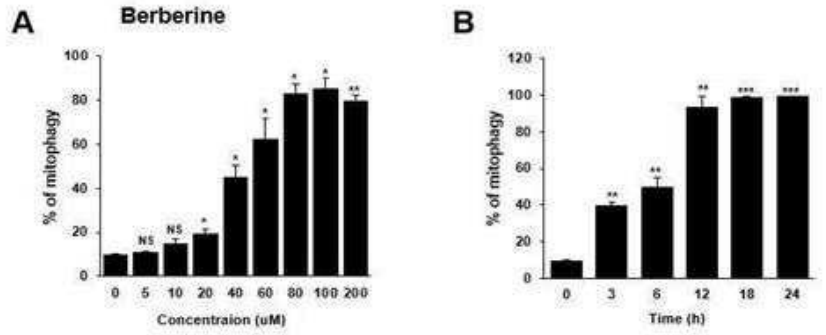
도면3



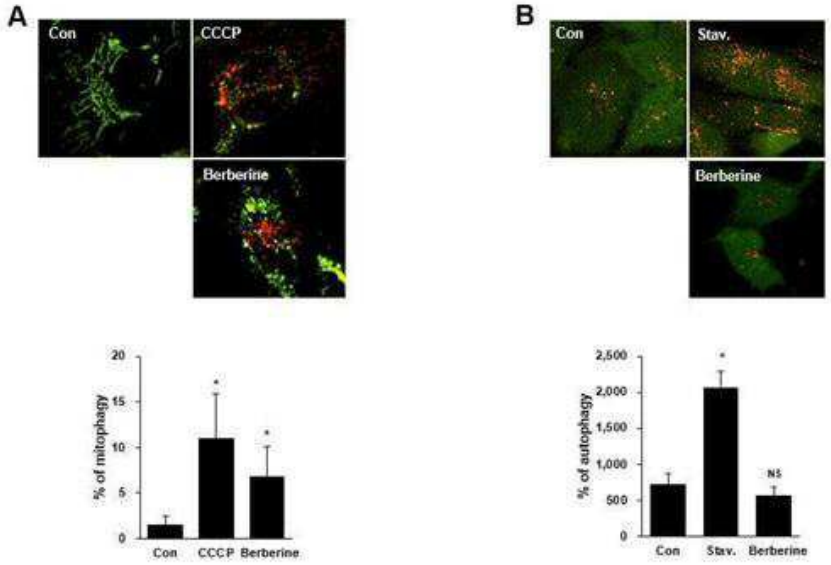
도면4



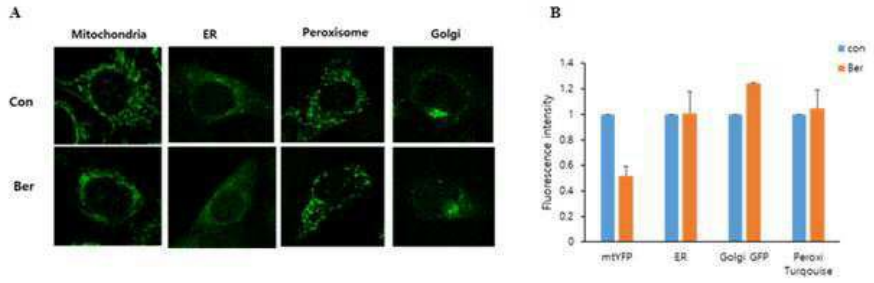
도면5


A
Berberine
% of mitophagy
Concentraion (uM)
B
% of mitophagy
Time (h)

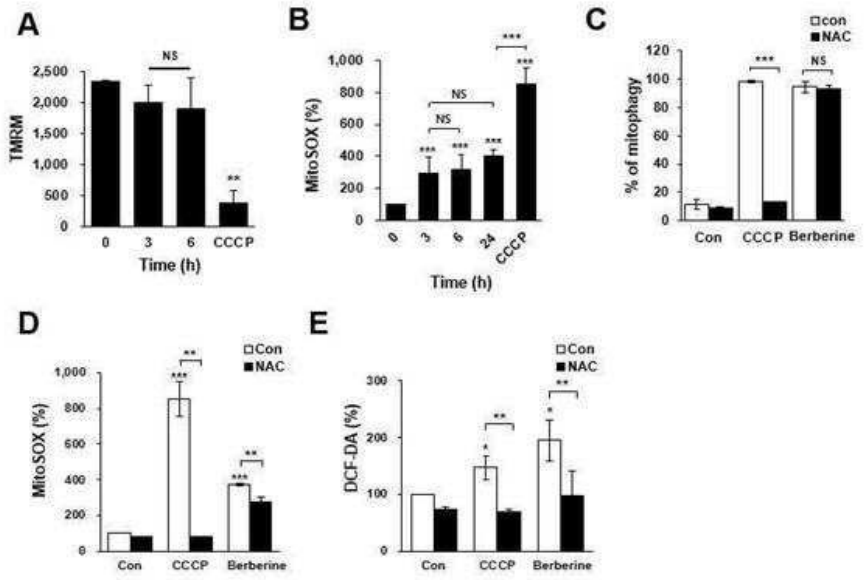
도면6


A
Con
CCCP
Berberine
% of mitophagy
Con CCCP Berberine
B
Con
Stav.
Berberine
% of autophagy
Con Stav. Berberine

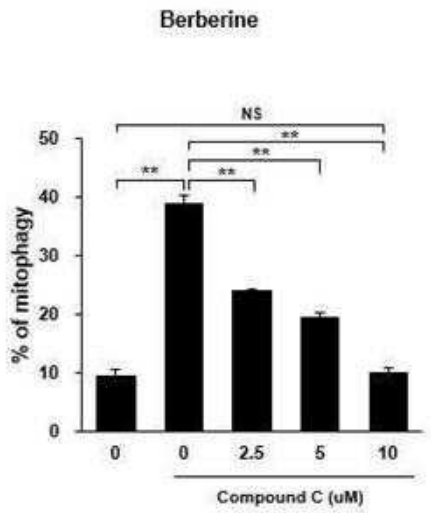
도면7


A
Mitochondria
ER
Peroxisome
Golgi
Con
Ber
B
con
Ber
Fluorescence intensity
mtYFP
ER
Golgi GFP
Peroxi Turqouise

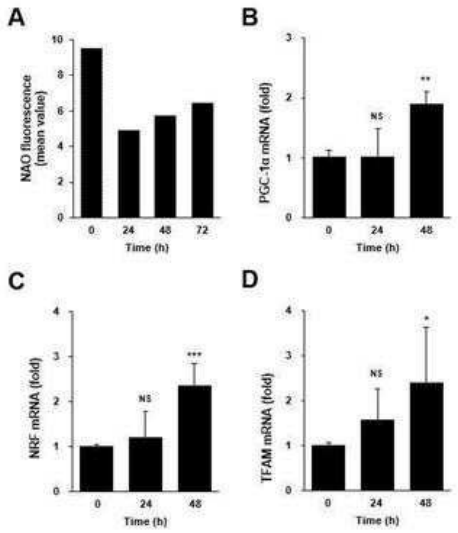
도면8


A
TMRM
Time (h)
0
3
6
CCCP
NS
B
MitoSOX (%)
Time (h)
C
con
NAC
% of mitophagy
Con
CCCP
Berberine
D
Con
NAC
MitoSOX (%)
E
DCF-DA (%)

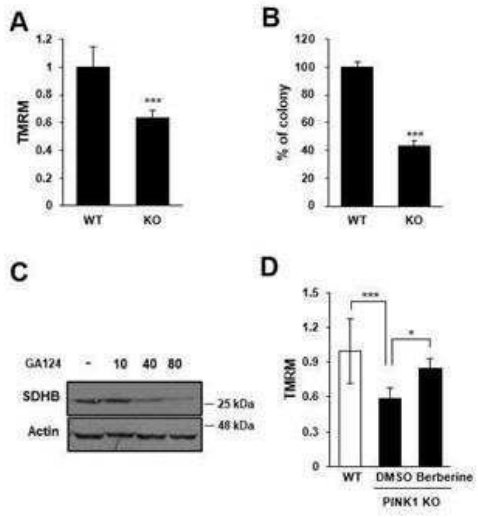
도면9


Berberine
NS
% of mitophagy
Compound C (uM)

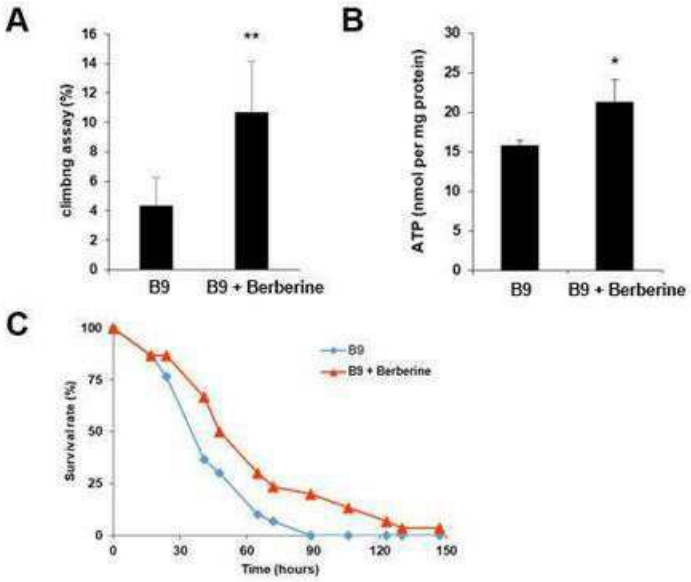
도면10


A
NAO fluorescence (mean value)
Time (h)
B
PGC-1α mRNA (fold)
NS
Time (h)
C
NRF mRNA (fold)
NS
Time (h)
D
TFAM mRNA (fold)
NS
Time (h)

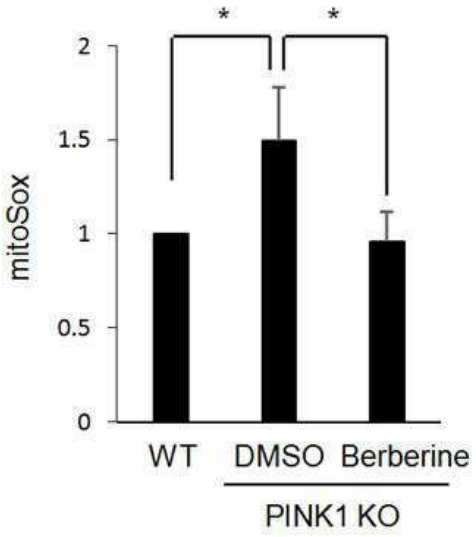
도면11


A
TMRM
WT
KO
B
% of colony
WT
KO
C
GA124 - 10 40 80
SDHB
Actin
25 kDa
48 kDa
D
TMRM
WT
DMSO
Berberine
PINK1 KO

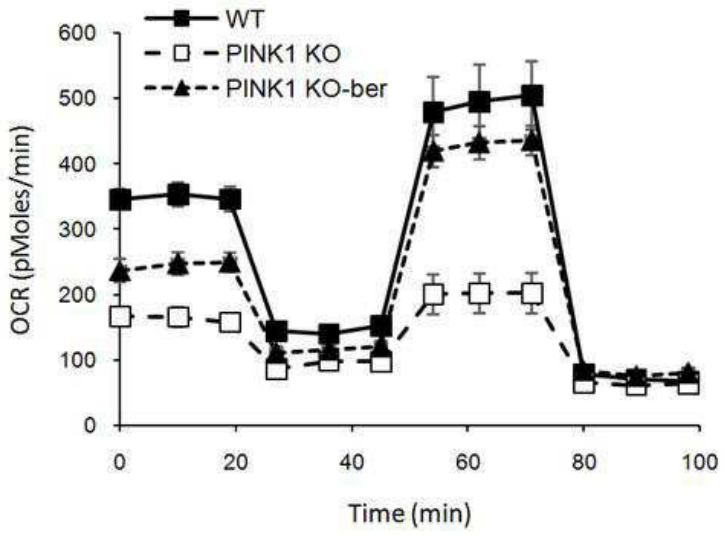
도면12


A
climbng assay (%)
16
14
12
10
8
6
4
2
0
**
B9
B9 + Berberine
B
ATP (nmol per mg protein)
30
25
20
15
10
5
0
*
B9
B9 + Berberine
C
Survival rate (%)
100
75
50
25
0
B9
B9 + Berberine
0
30
60
90
120
150
Time (hours)

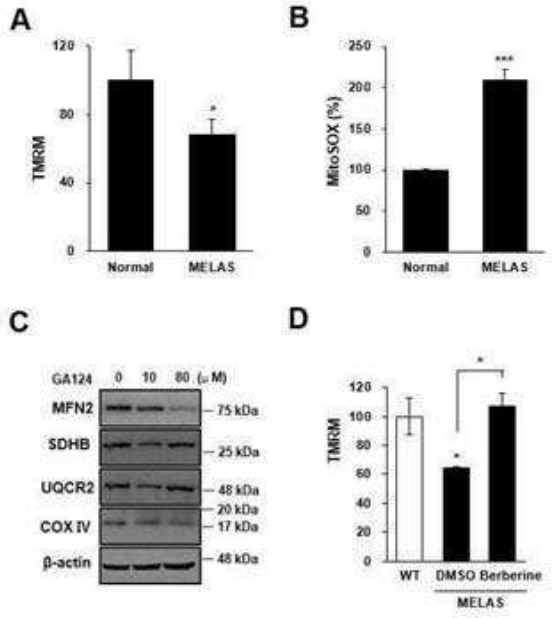
도면13


*
*
mitoSox
2
1.5
1
0.5
0
WT
DMSO
Berberine
PINK1 KO

도면14


WT
PINK1 KO
PINK1 KO-ber
OCR (pMoles/min)
600
500
400
300
200
100
0
0
20
40
60
80
100
Time (min)

도면15


A
TMRM
120
80
40
0
Normal
MELAS
B
MitoSOX (%)
250
200
150
100
50
0
Normal
MELAS
C
GA124 0 10 80 (μM)
MFN2
SDHB
UQCR2
COX IV
β-actin
75 kDa
25 kDa
48 kDa
20 kDa
17 kDa
48 kDa
D
TMRM
120
100
80
60
40
20
0
WT
DMSO
Berberine
MELAS