

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2013-0033595 2013년04월04일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/555 (2006.01) A61K 33/24 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0097333 (22) 출원일자 2011년09월27일 심사청구일자 2012년05월31일 기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도	(71) 출원인 울산대학교 산학협력단 울산 남구 무거2동 산29 (72) 발명자 정현택 울산광역시 울주군 언양읍 반천현대아파트 103동 1010호 조연수 울산광역시 울주군 언양읍 동부리 경남아너스빌 107동 1301호 (74) 대리인 특허법인 충정		

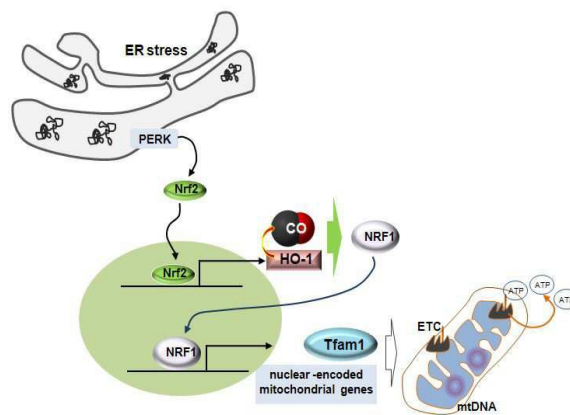
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 소포체 스트레스가 유도된 세포 내에서 미토콘드리아의 생성과 관련된 NRF-1(핵호흡인자1) 및 TFAM(미토콘드리아 전사인자)의 전사적 활성 및 mtDNA 수준을 증대시켜 미토콘드리아의 유전체를 효과적으로 증식시킬 수 있으며, 미토콘드리아 내의 ATP 생산을 촉진시킴으로써 소포체 스트레스를 완하시키는 효과를 갖는다. 따라서 상기와 같은 효과를 갖는 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도19



(72) 발명자

정민

울산광역시 남구 대학로 93, 생명과학부 (무거동,
울산대학교)

김슬기

울산광역시 동구 서부동 257-4번지 미포사택아파트
27동 7호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0087350

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구실육성사업

연구과제명 Meta-inflammation 제어 기전 연구(1)

주관기관 울산대학교

연구기간 2009.09.01 ~ 2014.08.30

특허청구의 범위

청구항 1

일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 일산화탄소 공급체는 RuCO(Ruthenium Carbon Monoxide), CORM1(Mn_2CO_{10} :manganese decacarbonyl), CORM2($[Ru(CO)_3Cl_2]_2$), CORM3($Ru(CO)(3)Cl(glycinate)$) 및 CORM-Al(sodium boranocarbonate)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 소포체 스트레스 관련 질환은 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 면역글로블린 경쇄 아밀로이드증(immunoglobulin light chain amyloidosis), 파킨슨병(Parkinson's disease), 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 혈액투석 연관성 아밀로이드증(haemodialysis-related amyloidosis), 활동성 아밀로이드증(reactive amyloidosis), 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 겸상적혈구 빈혈증(sickle cell anemia), 헌팅턴병(Huntington's disease), 크로이츠펠트-야콥 질환 및 관련 질환(Kreutzfeldt-Jakob disease and related disorders (prion encephalopathies)), 가족성 고콜레스테롤혈증(familial hypercholesterolaemia), 알파1-항트립신 결핍증(Alpha1-antitrypsin deficiency), 경변(cirrhosis), 전신성 폐기종(emphysema systemic), 뇌성 유전성 아밀로이드증(cerebral hereditary amyloidoses), 울콧-랄리슨 증후군(Wolcott-Rallison syndrome), 울프람 증후군(Wolfram syndrome), 염증성 장 질환, 크론씨 병, 궤양성 대장염, 유방암 및 전립선암으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 미토콘드리아 생성(biogenesis)에 관여하는 전사인자인 NFR1(nuclear respiratory factor 1)과 TFAM(mitochondria transcription factor A)의 발현을 증가시키는 기전을 통하여 미토콘드리아 DNA(mt DNA) 복제를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 ATP 생산을 효과적으로 보존함으로써 소포체 스트레스를 완화시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 소포체 스트레스 관련 질환의 개선을 위한 건강기능식품.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 일산화탄소 공급체는 RuCO(Ruthenium Carbon Monoxide), CORM1(Mn_2CO_{10} :manganese decacarbonyl), CORM2($[Ru(CO)_3Cl_2]_2$), CORM3($Ru(CO)(3)Cl(glycinate)$) 및 CORM-Al(sodium boranocarbonate)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 소포체 스트레스 관련 질환은 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 면역글로

블린 경쇄 아밀로이드증(immunoglobulin light chain amyloidosis), 파킨슨병(Parkinson's disease), 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 혈액투석 연관성 아밀로이드증(haemodialysis-related amyloidosis), 활동성 아밀로이드증(reactive amyloidosis), 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 겸상적혈구 빈혈증(sickle cell anemia), 헌팅턴병(Huntington's disease), 크로이츠펠트-야콥 질환 및 관련 질환(Kreutzfeldt-Jakob disease and related disorders (prion encephalopathies)), 가족성 고콜레스테롤혈증(familial hypercholesterolaemia), 알파1-항트립신 결핍증(Alpha1-antitrypsin deficiency), 경변(cirrhosis), 전신성 폐기종(emphysema systemic), 뇌성 유전성 아밀로이드증(cerebral hereditary amyloidosis), 울콧-랄리슨 증후군(Wolcott-Rallison syndrome), 울프람 증후군(Wolfram syndrome), 염증성 장 질환, 크론씨 병, 궤양성 대장염, 유방암 및 전립선암으로 이루어진 군에서 선택된 것임을 특징으로 하는 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 소포체 스트레스 관련 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 조성물에 관한 것으로서, 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 소포체(ER, endoplasmic reticulum)의 내강은 번역 후 변형과 단백질의 폴딩(folding)을 위해 특수화된 세포적 환경이다. 소포체는 핵막으로부터 뻗어 나와 가지를 친 것 같은 막성분의 구조로서 리보솜이 붙어있는 조면소포체(rough endoplasmic reticulum)와 리보솜이 없는 활면소포체(smooth endoplasmic reticulum)의 두 가지가 있다. 세포 내 단백질의 약 1/3이 조면소포체에서 mRNA 에서 단백질로 번역 후 수정(posttranslational modification) 즉 폴딩(folding)과 조립(assembly), 당화(glycation) 및 이황화결합(disulfide bond) 등의 과정을 통해 활성형 단백질 구조가 된다. 또한 활면소포체는 지질과 스테롤의 합성장소이며 칼슘 저장소로 세포 내 칼슘 농도를 조절하는데 중요한 역할을 한다.

[0003] 소포체 스트레스(ER stress)란 생리적 혹은 병리적 환경에 의해 소포체가 처리할 수 있는 능력 이상의 미성숙 단백질이 소포체 내로 유입이 되거나 소포체 내 칼슘이 고갈되어 소포체 기능에 장애가 발생하는 것을 말하며, 주로 단백질 폴딩 용량을 넘어서서 ER 단백질 폴딩 부하를 초과한 상태를 의미한다. 소포체 스트레스가 발생하면 세포는 생존하기 위한 방어기전을 가지는 데 이를 소포체 스트레스 반응(ER stress response)라고 한다. 소포체 스트레스 반응은 소포체 막에 존재하는 세 가지의 신호전달체계인 PERK (pancreatic ER kinase), IRE-1 α /XBP-1 (inositol-requiring 1 α /X-box binding protein 1) 및 ATF6 (activating transcription factor) 에 의해 매개된다.

[0004] 소포체 스트레스 반응은 다음의 네 가지로 일어난다. 첫 번째 반응은 리보솜에서 mRNA로부터 단백질로 번역되는 것을 억제(translational attenuation)하여 소포체 내로 새로운 단백질이 유입되는 것을 감소시키는 것이다. 구체적으로, 정상적으로는 개시 메티오닐이 붙어있는 tRNA를 40S 리보솜 소 단위체로 수집하는 eIF2 (eukaryotic translation initiation factor 2) 중합체의 활성이 감소되는 결과로 단백질 합성이 줄어든다. 또한, 최근에 단백질 폴딩 부하를 줄이는 2가지 이상의 메커니즘이 설명되고 있는데, IRE1(ERN1로도 알려짐)-매개 ER-소체 mRNA 분해 메커니즘(Hollien and Weissman, 2006), 또는 소포체 스트레스를 받은 세포에서는 p58IPK(DNAJC3로도 알려짐)에 의해 ER로 가는 단백질이 합성과 동시에 단백질 분해 소체 분해를 하는 메커니즘이다 (Oyadomari et al., 2006; Rutkowski et al., 2007).

[0005] 두 번째 반응은 단백질을 폴딩 시키는데 필요한 Bip(HSPA5로도 알려짐)와 같은 소포체 샤페론(chaperon)의 발현을 유도하여 소포체의 폴딩 능력을 향상시키는 것이다. 세포질 샤페론이 아닌 소포체 샤페론을 코딩하는 유전자의 전사는 UPR(unfolded protein response)로 알려진 신호전달 경로를 통해 활성화된다. 포유류에서, IRE1, PERK와 ATF6는 소포체 내강에서 잘못 폴딩된 단백질들의 존재를 감지하는 소포체 막 관통 단백질이다. 정상적인 상태에서 이 신호전달 분자들은 단백질 샤페론인 Bip가 있는 내강 영역의 상호작용을 통해 비활성 상태를 유지한다. Bip는 폴딩되지 않은 폴리펩티드 사슬과 상호작용하는 Hsp70 단백질 샤페론 집합체의 ER 소체 구성원이다. 소포체가 스트레스에 노출되었을 때 Bip는 폴딩되지 않은 단백질에 결합하여 이 스트레스 센서들로부터 분리된다. Bip로부터 IRE1의 분리는 UPR 유전자 발현의 주요 전사 인자를 발생시키는 XBP1의 접합을 개시하기 위해 단백질 키나아제와 엔도리보뉴클라제 활성을 활성화시킨다. Bip로부터 분리되었을 때 PERK가 활성화

되고, eIF2의 알파 소단위를 인산화시키고 단백질 합성을 약화시킨다. 역설적으로, eIF2 α 인산화는 선택적 mRNA들의 번역과 동시에 촉진된다. 예를 들면, eIF2 α 인산화에 의한 전사인자 ATF4의 높은 번역 활성은 UPR 유전자의 약 33% 유도를 야기한다. 마지막으로, Bip 분리는 ATF6를 골지체로 이동시키고 골지체에서 핵으로 이동할 세포질 분절로 분해 Bip와 Grp94(HSP90B1로도 알려짐)와 같은 분자 샤페론과 ER 내재 폴딩 효소를 함유하는 UPR 유전자의 전사를 활성화시킨다.

[0006] 세 번째 반응은 소포체 스트레스 관련 분해(ER stress-associated degradation, ERAD)로 소포체에서 폴딩되지 않거나 잘못 폴딩된 단백질을 세포질 내 유비퀴틴-프로테아솜(ubiquitin-proteasome) 시스템을 통해 분해하여 제거하는 과정이다.

[0007] 마지막으로 소포체 스트레스가 위의 세 가지 반응으로 극복이 되지 못할 정도로 심각하게 되고 소포체가 제 기능을 회복할 수 없을 때는 세포자연사(apoptosis) 경로가 활성화되어 손상된 세포를 제거한다.

[0008] 이와 같이 소포체 스트레스 반응은 다양한 세포성 스트레스에서 소포체 기능을 보존하여 세포를 보호하기 위한 중요한 보상 기전이지만, 최근에는 잘못된 신호전달 시스템으로 인하여 과도한 소포체 스트레스 반응이 유발되어 이로 인해 야기되거나 유발되는 질병들이 있다는 것이 알려지고 있다. 즉, 소포체 스트레스 반응은 특히 단백질을 합성하여 분비하는 기능이 활발한 형질세포, 췌장의 베타세포, 간세포, 조골세포와 같은 곳에서 잘 관찰되고 있으며 최근 많은 연구들은 소포체 스트레스가 당뇨병, 파킨슨병, 글루타민다량체 유발 응집 질환, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 허혈성 질환, 심혈관질환, 고호모시스테인증 및 동맥경화증과 같은 여러 가지 질환의 병인으로 작용함을 보여 주고 있다.

[0009] 따라서 소포체 스트레스를 조절하여 암, 당뇨병, 파킨슨병, 글루타민다량체 유발 응집 질환, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 허혈성 질환, 심혈관질환, 고호모시스테인증 및 동맥경화증과 같은 소포체 스트레스 관련 질환의 발생을 예방하고 치료를 할 수 있을 것으로 제시되고 있으나, 소포체 스트레스반응 기전에 대해서는 알려지지 않은 부분이 많아 이에 대한 연구가 부족한 실정이다. 그러므로 효과적으로 소포체 스트레스를 조절할 수 있는 타겟을 개발할 필요성이 있다.

[0010] 한편 일반적으로 미토콘드리아는 세포 내에 존재하는 소기관으로 “세포의 발전소”라고 알려져 있다. 미토콘드리아는 세포에서 ATP를 생성할 뿐 아니라 세포자연사(apoptosis), 이온 항상성(ion homeostasis), 당 및 지방대사(intermediary metabolism), pyrimidine/urea/heme 합성 등 세포/개체의 생명유지에 필수적인 기능을 수행한다.

[0011] 미토콘드리아 이상은 노화와 관련된 퇴행성질환-심혈관질환, 파킨슨병, 헌팅턴병, 치매 및 척수손상-등과도 상관관계가 있는 것으로 조사된다. 즉, 이들 질병 모델에서 미토콘드리아의 전자현미경사진은 정상에 비해 부풀어 커져 있거나, 크리스타(cristae) 구조가 소실되는 등의 구조적 변형을 보이기도 하고, 세포당 미토콘드리아 DNA(mtDNA)의 수가 감소된 경우도 있으며, mtDNA가 돌연변이(mutation)된 경우도 관찰되었다. 사람 및 동물을 대상으로 노화에 따른 미토콘드리아 기능변화를 모니터링하였을 때, 노화가 진행됨에 따라 미토콘드리아 DNA(mtDNA)의 복제 수 및 mtRNA가 감소하였으며(Barazzoni et al., 2000), Attardi 등은 노화에 따라 mtDNA 복제 및 전사의 조절부위인 D-loop중 T414G, T408A mutation이 축적됨을 보고하였다(Michikawa et al., 1999; Wang et al., 2001). 최근에는 이런 신경퇴행성 질환의 발병을 유발하는 인자로 동정되는 물질들이 미토콘드리아에 존재하거나, 또는 미토콘드리아 기능 손상과 밀접한 관련이 있음이 보고되고 있다(Beal, 1995; Chen & Yan, 2007; Scheffler, 2008; Wallace, 2005).

[0012] 인체 질병과 관련되어 과거 미토콘드리아에 관한 유전학적 연구는 미토콘드리아 유전자의 돌연변이(mutation)가 대사 및 신경관련 유전질환을 유발함이 증명되었다(Wallace, 2005). 최근 본 발명의 발명자들의 연구실을 포함한, 다양한 연구실에서 보고한 연구결과들은 유전적, 환경적 원인에 의한 미토콘드리아의 기능 손상이 대사 증후군(metabolic syndrome)(비만, 당뇨, 지질대사이상, 고혈압 중 2가지 이상의 증상이 한 사람에게서 동시에 나타나는 질병이며 인슐린 저항성(insulin resistance)이 원인으로 작용함)을 포함한 만성 염증성 질환, 신경퇴행질환, 노화과정에 직접적으로 연관되어 있음을 보여주고 있다. 한 예로, 노령층(elderly people)에서 나타나는 인슐린 저항증이 체중(lean body mass), 지방량(fat mass)가 상관관계가 있으며, in vivo NMR 기법으로 측정된 노령층의 미토콘드리아 산화적 인산화(oxidative phosphorylation) 활성이 약 40% 저하되어 있어서 미토콘드리아의 기능감소가 인슐린 저항성의 원인 인자일 가능성이 확인되었다(Pettersen et al., 2003). 또한 인슐린 저항성의 새로운 치료제로 사용되고 있는 peroxisome proliferators activated receptor γ (PPAR γ)의 리간드의 활성을 증강시키는 co-activator 인 PGC-1 α 가 미토콘드리아의 생성을 촉진시킴이 보고된 바 있다. 따라서 미토콘드리아의 기능과 인슐린 저항증 및 대사증후군의 발병에는 확실한 인과관계가 성립함이 받아들여지

고 있다.

[0013] 최근 연구에 의하면 소포체와 미토콘드리아 사이의 물리적 근접도로 인한 미토콘드리아의 ATP 생성 및 세포자멸사를 포함하는 소기관의 기능적 연관성이 보고되었다. 즉 미토콘드리아의 손상은 소포체 스트레스를 유도할 수 있으며, 소포체 스트레스 유발인자가 미토콘드리아의 손상을 유도할 수도 있다는 것이다. 또한 이전의 연구에서는 헴옥시게나아제-1(heme oxygenase-1, 이하 간단하게 'HO-1' 라 함)의 활성 증가가 소포체 스트레스에 대하여 세포를 보호(세포사멸억제)한다는 사실이 보고된바 있다.

[0014] 이에 본 발명자들은 이러한 소포체와 미토콘드리아 사이의 기능적 연계를 통한 소포체 스트레스 억제 기작에 대한 연구를 진행하던 중, HO-1의 활성화 및 HO-1의 효소적 활성화에 의한 부산물인 일산화탄소(CO)가 미토콘드리아의 DNA (mtDNA) 복제를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 ATP 생산을 효과적으로 보존함으로써 소포체 스트레스를 완화시킬 수 있다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 따라서 본 발명의 목적은 소포체 스트레스를 완화시키는 효과가 우수한 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 또한, 본 발명의 다른 목적은 소포체 스트레스를 완화시키는 효과가 우수한 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 소포체 스트레스 관련 질환의 개선을 위한 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 공급체는 RuCO(Ruthenium Carbon Monoxide), CORM1(Mn₂CO₁₀:manganese decacarbonyl), CORM2([Ru(CO)₃Cl₂]₂), CORM3(Ru(CO)(3)Cl(glycinate)) 및 CORM-Al(sodium boranocarbonate)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 소포체 스트레스 관련 질환은 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 면역글로블린 경쇄 아밀로이드증(immunoglobulin light chain amyloidosis), 파킨슨병(Parkinson's disease), 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 혈액투석 연관성 아밀로이드증(haemodialysis-related amyloidosis), 활동성 아밀로이드증(reactive amyloidosis), 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 겸상적혈구 빈혈증(sickle cell anemia), 헌팅턴병(Huntington's disease), 크로이츠펔트-야콥 질환 및 관련 질환(Kreutzfeldt-Jakob disease and related disorders (prion encephalopathies)), 가족성 고콜레스테롤혈증(familial hypercholesterolaemia), 알파1-항트립신 결핍증(Alpha1-antitrypsin deficiency), 경변(cirrhosis), 전신성 폐기종(emphysema systemic), 뇌성 유전성 아밀로이드증(cerebral hereditary amyloidoses), 울콧-렐리슨 증후군(Wolcott-Rallison syndrome), 울프람 증후군(Wolfram syndrome), 염증성 장질환, 크론씨 병, 궤양성 대장염, 유방암 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 미토콘드리아 생성(biogenesis)에 관여하는 전사인자인 NFR1(nuclear respiratory factor 1)과 TFAM(mitochondria transcription factor A)의 발현을 증가시키는 기전을 통하여 미토콘드리아 DNA(mt DNA) 복제를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 ATP 생산을 효과적으로 보존함으로써 소포체 스트레스를 완화시킬 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 소포체 스트레스 관련 질환의 개선을 위한 건강기능식품을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 공급체는 RuCO(Ruthenium Carbon Monoxide), CORM1(Mn₂CO₁₀:manganese decacarbonyl), CORM2([Ru(CO)₃Cl₂]₂), CORM3(Ru(CO)(3)Cl(glycinate)) 및 CORM-Al(sodium boranocarbonate)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 소포체 스트레스 관련 질환은 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 알츠하이머 질환

(Alzheimer's disease), 면역글로블린 경쇄 아밀로이드증(immunoglobulin light chain amyloidosis), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 혈액투석 연관성 아밀로이드증(haemodialysis-related amyloidosis), 활동성 아밀로이드증(reactive amyloidosis), 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis), 겸상적혈구 빈혈증(sickle cell anemia), 헌팅턴병(Huntington's disease), 크로이츠펔트-야콥 질환 및 관련 질환(Kreutzfeldt-Jakob disease and related disorders (prion encephalopathies)), 가족성 고콜레스테롤혈증(familial hypercholesterolaemia), 알파1-항트립신 결핍증(Alpha1-antitrypsin deficiency), 경변(cirrhosis), 전신성 폐기종(emphysema systemic), 뇌성 유전성 아밀로이드증(cerebral hereditary amyloidoses), 울콧-렐리슨 증후군(Wolcott-Rallison syndrome), 울프람 증후군(Wolfram syndrome), 염증성 장질환, 크론씨 병, 궤양성 대장염, 유방암 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 일 수 있다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명에 따른 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 소포체 스트레스가 유도된 세포 내에서 미토콘드리아의 생성과 관련된 NRF-1(핵호흡인자1) 및 TFAM(미토콘드리아 전사인자)의 전사적 활성 및 mtDNA 수준을 증대시켜 미토콘드리아의 유전체를 효과적으로 증식시킬 수 있으며, 미토콘드리아 내의 ATP 생산을 촉진시킴으로써 소포체 스트레스를 완화시키는 효과를 갖는다.
- [0025] 따라서 상기와 같은 효과를 갖는 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 소포체 스트레스 유발물질인 TG를 세포에 처리한 후 시간경과에 따른 세포 내 mtDNA 수준을 RT-PCR로 확인한 결과이다.
- 도 2는 소포체 스트레스 유발물질인 TG를 세포에 처리한 후 시간경과에 따른 세포 내 mtDNA 수준을 long PCR technique로 확인한 결과이다.
- 도 3은 소포체 스트레스 유발물질인 TG를 세포에 처리한 후 시간경과에 따른 세포 내 미토콘드리아에 존재하는 시토크롬 C 단백질 함량을 웨스턴 블랏으로 확인한 결과이다.
- 도 4A는 소포체 스트레스 유발물질인 TG를 세포에 처리한 후 시간경과에 따른 세포 내 NRF-1(핵호흡인자1) 및 TFAM(미토콘드리아 전사인자)의 mRNA 수준을 RT-PCR로 확인한 결과이다.
- 도 4B는 소포체 스트레스의 화학 억제제인 TUDCA(0.2mM) 및 4-PBA(1mM)의 처리에 따른 NRF-1(핵호흡인자1) 및 TFAM(미토콘드리아 전사인자)의 mRNA 수준을 RT-PCR로 확인한 결과이다.
- 도 5는 소포체 스트레스 유발물질인 TG를 세포에 처리한 후 시간경과에 따른 세포 내 HO-1 단백질의 발현량을 웨스턴 블랏으로 확인한 결과이다.
- 도 6A는 소포체 스트레스 유발물질인 TG를 세포에 처리한 후 시간경과에 따른 세포 내 HO-1의 mRNA 수준을 RT-PCR로 확인한 결과이다.
- 도 6B는 소포체 스트레스의 화학 억제제인 TUDCA(0.2mM) 및 4-PBA(1mM)의 처리에 따른 HO-1의 mRNA 수준을 RT-PCR로 확인한 결과이다.
- 도 7은 소포체 스트레스 유발물질인 TG를 세포에 농도별로 처리한 후 NRF2의 핵 내로의 이동량을 웨스턴 블랏으로 확인한 결과이다.
- 도 8A는 PERK 기능을 유지하는 야생형 세포 및 PERK 기능을 녹아웃시킨 세포에 소포체 스트레스 유발물질인 TG를 처리한 후 세포 내 mtDNA 수준을 RT-PCR로 확인한 결과이다.
- 도 8B는 PERK 기능을 유지하는 야생형 세포 및 PERK 기능을 녹아웃시킨 세포에 소포체 스트레스 유발물질인 TG를 처리한 후 세포 내 mtDNA 수준을 long PCR technique로 확인한 결과이다.
- 도 9는 PERK 기능을 유지하는 야생형 세포 및 PERK 기능을 녹아웃시킨 세포에 소포체 스트레스 유발물질인 TG를 처리한 후 세포 내 HO-1 및 TFAM의 mRNA 수준을 RT-PCR로 확인한 결과이다.
- 도 10A는 TG와 함께 ZnPP(HO-1 저해제)을 농도별로 세포에 처리한 후 세포 내 mtDNA 수준을 RT-PCR로 확인한 결

과이다.

도 10B는 TG와 함께 ZnPP(HO-1 저해제)을 농도별로 세포에 처리한 후 세포 내 mtDNA 수준을 long PCR technique로 확인한 결과이다.

도 11은 TG와 함께 ZnPP(HO-1 저해제)을 농도별로 세포에 처리한 후 세포 내 NRF-1(핵호흡인자1) 및 TFAM(미토콘드리아 전사인자)의 mRNA 수준을 RT-PCR로 확인한 결과이다.

도 12는 HO-1 siRNA 도입하여 HO-1 발현을 녹다운시킨 세포에 소포체 스트레스를 유발한 후 세포 내 NRF-1(핵호흡인자1) 및 TFAM(미토콘드리아 전사인자)의 mRNA 수준을 RT-PCR로 확인한 결과이다.

도 13은 PERK 기능을 유지하는 야생형 세포 및 PERK 기능을 녹아웃시킨 세포에 소포체 스트레스를 유발한 후 세포사멸 정도를 측정된 그래프이다.

도 14A는 TG와 함께 일산화탄소 소거제(scavenger)로써 헤모글로빈을 농도별로 세포에 처리한 후 세포 내 mtDNA 수준을 RT-PCR로 확인한 결과이다.

도 14B는 TG와 함께 일산화탄소 소거제(scavenger)로써 헤모글로빈을 농도별로 세포에 처리한 후 세포 내 mtDNA 수준을 long PCR technique로 확인한 결과이다.

도 15는 TG와 함께 일산화탄소 소거제(scavenger)로써 헤모글로빈을 농도별로 세포에 처리한 후 세포 내 NRF-1(핵호흡인자1) 및 TFAM(미토콘드리아 전사인자)의 mRNA 수준을 RT-PCR로 확인한 결과이다.

도 16은 TG와 함께 일산화탄소 소거제(scavenger)로써 헤모글로빈을 농도별로 세포에 처리한 후 세포사멸 정도를 측정된 그래프이다.

도 17은 TG와 함께 일산화탄소 소거제(scavenger)로써 헤모글로빈을 세포에 처리한 후 시간경과에 따른 세포 내 ATP 레벨을 측정된 그래프이다.

도 18은 in vivo 상에서 TG와 함께 4PBA(UPP 억제제) 또는 ZnPP(HO-1 저해제)의 처리 유무에 따른 세포 내 NRF-1(핵호흡인자1) 및 TFAM(미토콘드리아 전사인자)의 mRNA 수준 및 mtDNA 수준을 RT-PCR로 확인한 결과이다.

도 19는 소포체 스트레스가 일어나는 경우 세포 내의 HO-1/CO 시스템을 통해 미토콘드리아의 유전체 증식이 발생하는 메카니즘을 개략적으로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 소포체 스트레스 관련 질환을 효과적으로 완화/개선시킬 수 있는 신규한 치료제에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 본 발명은 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

[0028] 이하 본 발명의 내용을 보다 상세히 설명하기로 한다.

[0029] 본 발명의 조성물은 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0030] 본 발명에서 "소포체 스트레스(ER stress)"란 생리적 혹은 병리적 환경에 의해 소포체가 처리할 수 있는 능력 이상의 미성숙 단백질이 소포체 내로 유입이 되거나 소포체 내 칼슘이 고갈되어 소포체 기능에 장애가 발생하는 것을 말한다. 이러한 소포체 스트레스가 일어날 경우 세포 내에서 소포체 스트레스를 중화(완화)시키는 작용은 UPR(unfolded protein response)라고 한다.

[0031] 본 발명에서 "소포체 스트레스 관련 질환"이란 소포체 스트레스로 인해 발생하거나 악화되는 질환을 말하며, 예컨대 세포 내에 단백질의 과도한 축적으로 인해 분해시스템이 더 이상 작동하기 어려워지면서 그 자체가 세포에 독성을 보여 야기되는 질환(신경 퇴행성 질환 등), 또는 잘못된 신호 전달 시스템으로 인하여 과도한 소포체 스트레스 반응이 유발되어 이로 인해 야기되거나 유발되는 질병(당뇨병 등)이 이에 포함될 수 있다. 현재, 당뇨병, 파킨슨병, 글루타민다량체 유발 응집 질환, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 허혈성 질환, 심혈관질환, 고호모시스테인증 및 동맥경화증 등이 소포체 스트레스 관련 질환으로 알려져 있다.

[0032] 구체적으로, 알츠하이머병의 경우 환자의 조직샘플에서 PERK와 그 하부 기질인 eIF2a 경로가 대개 활성화되어

있는 것을 볼 수 있으며, 또 다른 대표적 퇴행성 질환인 파킨슨 병의 경우는 E3 ligase 단백질인 Parkin이 소포체 스트레스와 밀접하게 관련된 것으로 보고되어 있으며, 헌팅턴병의 경우 유전자의 한 부분이 돌연변이로 과대 증폭되면서 나타나는 글루타민의 중합체들이 서로 엉킴을 일으키면서 세포의 분해 능력으로는 더 이상 감당하기 어려운 정도의 단백질 엉킴체 (protein aggregation)를 형성하는 결과 자연스럽게 소포체 스트레스가 발생하게 되고, 신경세포의 사멸이 일어나는 것으로 알려져 있다. 또한, 뇌와 심장에 일어나는 허혈 (Ischemia) 증세는 세포의 산화 환원 조절기능을 붕괴시키면서 접힘이 실시되지 않은 단백질을 증가시켜 소포체 스트레스를 유도하고, 지속적인 스트레스가 세포사멸을 일으킴으로써 질병을 악화시키는 것으로 알려져 있다. 또한, 심장질환인 심장비대증(cardiac myocyte hypertrophy)이나 동맥경화 (atherosclerosis)의 경우는 UPR 단백질들이 많이 관여하는 것으로 알려져 있다. 당뇨의 경우 제 1형과 2형이 모두 소포체 스트레스와 관련된 것으로 보고되고 있고, 이에 관한 연구가 가장 활발하다. 췌장의 베타 세포(beta cell)는 인슐린을 분비하기 위해 특별히 발달된 구조의 소포체를 지니고 있기 때문에, 소포체 기능의 이상은 특히 인슐린의 기능에 문제를 일으키기 쉬우며, 제 1형 당뇨의 경우는 베타 세포 사멸의 상당 부분이 소포체 스트레스의 과정을 통해 일어나고, 2형 당뇨의 경우는 소포체 스트레스로 인해 활성화되는 스트레스 효소들(stress kinases)이 인슐린에 의해 시작되는 세포신호 전달을 붕괴시킴으로써 세포들로 하여금 인슐린에 대해 둔감하게 하는 것으로 보고되었다.

[0033] 한편, 일반적으로 일산화탄소(CO)는 생물에서 독성 및 치사율을 갖는 기체 분자로 알려져 있다. 그러나 최근 보고되고 있는 자료들에 의하면, 일산화탄소가 세포내 및 생물학적 과정에서 여러 반응에 조절 인자로서 작용하며, 특히 뉴런 전송을 매개하고(Verma 등, supra 및 Xhuo 등, *Science* 260: 1946-1950), 혈관운동 긴장을 조절하는 등(Morita & Kourembanas, 1995, *J. Clin. Invest.* 96: 2676-2682.; Morita 등, 1995 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: -1479; 및 Goda 등, 1998, *J. Clin. Inv.* 101: 604-12)의 역할을 담당하는 것으로 밝혀지고 있다. 따라서 이러한 일산화탄소에 대한 생체 내에서의 생리학적 활성화에 대한 연구가 현재 활발히 진행되고 있는데, 본 발명에서는 이러한 일산화탄소가 우수한 소포체 스트레스 완화활성을 가지고 있다는 사실을 확인함으로써, 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료에 유용하다는 사실을 최초로 규명하였다.

[0034] 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 소포체 스트레스가 유도된 세포 내에서 미토콘드리아의 생성과 관련된 NRF-1(핵호흡인자1) 및 TFAM(미토콘드리아 전사인자)의 전사적 활성화 및 mtDNA 수준을 증대시켜 미토콘드리아의 유전체를 효과적으로 증식시킬 수 있으며, 미토콘드리아 내의 ATP 생산을 촉진시킴으로써 소포체 스트레스를 완화시킬 수 있는 특징이 있다.

[0035] 하기 실시예<5-1>에서는 일산화탄소가 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 수준에 미치는 영향을 살펴보았는데, 세포에 소포체 스트레스를 유도할 수 있는 담시가르긴(TG)을 처리와 함께 일산화탄소 소거제(scavenger)로써 헤모글로빈을 적용한 실험군에서 mtDNA 수준이 헤모글로빈 투여량에 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 일산화탄소가 mtDNA 수준 증대에 영향을 미칠 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0036] 또한, 하기 실시예<5-2>에서는 일산화탄소가 미토콘드리아의 생성과 관련된 NRF-1(핵호흡인자1) 및 TFAM(미토콘드리아 전사인자)의 전사적 활성화에 미치는 영향을 살펴보았는데, 세포에 소포체 스트레스를 유도할 수 있는 담시가르긴(TG)을 처리와 함께 일산화탄소 소거제(scavenger)로써 헤모글로빈을 적용한 실험군에서 NRF-1 및 TFAM의 mRNA 수준도 감소된 것으로 나타났다. 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 일산화탄소가 NRF-1 및 TFAM의 전사적 활성화에 영향을 미치며, 이러한 기작이 미토콘드리아를 생성과 연계되어 있음을 유추할 수 있었다.

[0037] 또한 하기 실시예<5-3>에서는 일산화탄소가 실제로 소포체 스트레스가 유도된 세포의 생존에 미치는 영향을 살펴보았는데, 담시가르긴에 의해 유도된 세포 사멸은 세포 내부의 일산화탄소 이용도가 제한될 때(일산화탄소 소거제로써 헤모글로빈을 적용한 경우) 더욱더 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 일산화탄소가 실질적으로 세포사멸을 억제할 수 있음을 유추할 수 있었다.

[0038] 따라서 상기와 같은 특징을 갖는 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 소포체 스트레스 관련 질환 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료할 수 있는 소포체 스트레스 관련 질환으로는 제1형 당뇨, 제2형 당뇨, 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 면역글로불린 경쇄 아밀로이드증(immunoglobulin light chain amyloidosis), 파킨슨병(Parkinson's disease), 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 혈액투석 연관성 아밀로이드증(haemodialysis-related amyloidosis), 활동성 아밀로이드증(reactive amyloidosis), 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 겸상적혈구 빈혈증(sickle cell anemia), 헌팅턴병(Huntington's disease), 크로이츠펠트-야콥 질환 및 관련 질환(Kreutzfeldt-Jakob disease and related

disorders (prion encephalopathies)), 가족성 고콜레스테롤혈증(familial hypercholesterolaemia), 알파1-항트립신 결핍증(Alpha1-antitrypsin deficiency), 경변(cirrhosis), 전신성 폐기종(emphysema systemic), 뇌성 유전성 아밀로이드증(cerebral hereditary amyloidoses), 울콧-랠리슨 증후군(Wolcott-Rallison syndrome), 울프람 증후군(Wolfram syndrome), 염증성 장질환, 크론씨 병, 궤양성 대장염, 유방암 및 전립선암과 같은 질환일 수 있다.

- [0040] 그러므로 본 발명은 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 상기 “일산화탄소(CO)”는 액체 형태로 압출된 또는 수용액에 용해된 기체상인 분자 일산화탄소로 정의할 수 있으며, “일산화탄소를 함유하는 조성물”은 이를 필요로 하는 개체에 처리 또는 투여되어질 수 있는 일산화탄소를 함유하는 기체 또는 액체 조성물을 말한다.
- [0042] 또한, 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분은 일산화탄소 이외에도 일산화탄소 공급체를 포함한다.
- [0043] 본 발명에서 사용할 수 있는 상기 일산화탄소 공급체는 이에 제한되지는 않으나, RuCO(Ruthenium Carbon Monoxide), CORM1(Mn₂CO₁₀:manganese decacarbonyl), CORM2([Ru(CO)₃Cl₂]₂), CORM3(Ru(CO)(3)Cl(glycinate)) 및 CORM-A1(sodium boranocarbonate)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있으며, 바람직하게는 CORM2([Ru(CO)₃Cl₂]₂)일 수 있다.
- [0044] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적 조성물이나 식품 조성물로 사용될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0046] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0047] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 율활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 율활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 약제학적 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들면, 경구 또는 비경구적으로 투여할 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 약제학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화 할 수 있다.
- [0050] 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분

등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0051] 비경구 투여용 제제의 경우에는 주사제, 크림제, 로션제, 외용연고제, 오일제, 보습제, 겔제, 에어로졸 및 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법으로 제형화할 수 있다. 이들 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.

[0052] 본 발명의 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0053] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분인 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0054] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0055] 본 발명은 또한 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 소포체 스트레스 관련 질환의 개선을 위한 건강기능식품을 제공한다.

[0056] 본 발명의 건강기능식품은 소포체 스트레스 관련 질환의 개선을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0057] 본 발명에서 “건강기능식품” 이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제672호에 따른 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0058] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0059] 상기 “식품 첨가물 공전” 에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.

[0060] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 부형제, 결합제, 봉해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

[0061] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

- [0062] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체와 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.
- [0063] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체와 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 건강기능식품은 미토콘드리아 생성(biogenesis)에 관여하는 전사인자인 NFRI(nuclear respiratory factor 1)과 TFAM(mitochondria transcription factor A)의 발현을 증가시키는 기전을 통하여 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 복제를 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 ATP 생산을 효과적으로 보존함으로써 mtDNA 손상으로 야기되는 소포체 스트레스 관련 질환 예방 또는 개선에 효과적이다. 본 발명의 소포체 스트레스 관련 질환은 제1형 당뇨, 제2형 당뇨, 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease), 면역글로블린 경쇄 아밀로이드증(immunoglobulin light chain amyloidosis), 파킨슨병(Parkinson's disease), 근위축성 측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 혈액투석 연관성 아밀로이드증(haemodialysis-related amyloidosis), 활동성 아밀로이드증(reactive amyloidosis), 낭포성 섬유증(cystic fibrosis), 겸상적혈구 빈혈증(sickle cell anemia), 헌팅턴병(Huntington's disease), 크로이츠펠트-야콥 질환 및 관련 질환(Kreutzfeldt-Jakob disease and related disorders (prion encephalopathies)), 가족성 고콜레스테롤혈증(familial hypercholesterolaemia), 알파1-항트립신 결핍증(Alpha1-antitrypsin deficiency), 경변(cirrhosis), 전신성 폐기종(emphysema systemic), 뇌성 유전성 아밀로이드증(cerebral hereditary amyloidosis), 울콧-렐리슨 증후군(Wolcott-Rallison syndrome), 울프람 증후군(Wolfram syndrome), 염증성 장질환, 크론씨 병, 궤양성 대장염, 유방암 및 전립선암일 수 있다.
- [0065] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.
- [0066] 본 발명은 또한 소포체 스트레스 관련 질환 예방 또는 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기한 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 소포체 스트레스 관련 질환 예방 또는 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.
- [0067] 또한 본 발명은 포유동물에게 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 투여하는 것을 포함하는 소포체 스트레스 관련 질환 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0068] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0069] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분 또는 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료 방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1 kg 당 약 0.01 μ g 내지 1,000 mg, 가장 바람직하게는 0.1 μ g 내지 100 mg일 수 있다.
- [0070] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0071] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0072] <실시예 >

[0073] 통계처리

[0074] 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였고, 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 수준 차이는 unpaired Student's *t*-test로 분석하였다. *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

[0075] 반응시약

[0076] 본 발명의 실시예를 위해 사용한 시약 및 이들의 구입처는 다음과 같다.

[0077] 답시가르긴(Thapsigargin, TG), 헤모글로빈(Hb) 및 4-페닐부티릭 에시트(4-PBA)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)로부터 구입하였으며; 아연 프로토포피린(zinc protoporphyrin: ZnPP)은 Porphyrin Products Inc. (Logan, UT)에서 구입하였으며; Tauroursodeoxycholic acid(TUDCA)는 Calbiochem (San Diego, CA)로부터 얻었으며; NRF-1, TFAM, 시토크롬 C, β -actin에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)로부터 구입하였으며; PGC-1에 대한 항체는 cell Signaling (Danvers, MA)로부터 구입하였으며; HO-1에 대한 항체는 Stressgen(Ann Arbor, MI)로부터 구입하였다. 또한 상기 이외의 다른 화학약품은 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다.

[0078] <실시예 1>

[0079] 세포배양 및 동물배양

[0080] <1-1> 세포 배양

[0081] 본 발명에서 사용한 RAW267.4 murine 대식세포는 American Type Culture Collection (Manassas, VA)로부터 얻었으며, murine embryonic fibroblast(MEF) 세포는 Randal Kaufman (University of Michigan Medical School, MI)로부터 얻었다. 상기 세포들은 37°C 인큐베이터(humidified incubator: 5% CO₂ in air)에서 10% heat-activated fetal bovine serum (FBS), 2mM L-글루타민, 100U/ml 페니실린 및 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 보충된 DMEM 배지에서 배양되었다.

[0082] <1-2> 동물 배양

[0083] 본 발명에서 사용한 7주령의 수컷 C57BL/6 야생형 마우스들은 ORIENT (부산, 한국)로부터 구입하였다. 이 마우스들은 개별적으로 사육되었으며, 특별한 멸균 조건에서 18-24°C 및 40-70% 습도 하에 유지되었으며, 12-h light/dark cycle, 및 음식물 및 음료는 자유급이를 실시하였다. 실험에 사용된 모든 마우스들은 Animal Care Committee of the University of Ulsan에 의해 승인되었다.

[0084] <실시예 2>

[0085] 소포체 스트레스에 따른 미토콘드리아의 반응

[0086] 소포체 스트레스가 일어나는 경우 미토콘드리아의 반응을 알아보기 위하여, 본 실험에서는 세포에 소포체 스트레스를 인위적으로 유도한 다음, 미토콘드리아의 반응을 살펴보았다. 자세하게는 상기 실시예<1-1>에 따라 배양된 RAW267.4 대식세포에 소포체의 칼슘 항상성을 파괴하여 소포체 스트레스 유도하는 것으로 알려진 답시가르긴(Tdapsigargin, TG)을 10nM과 100nM의 농도로 각각 처리한 다음 미토콘드리아 DNA(mtDNA) 양적 변화, 시토크롬 C 함량의 증가여부 및 미토콘드리아 생성(biogenesis)과 관련된 NRF-1(핵호흡인자1) 및 TFAM(미토콘드리아 전사인자)의 mRNA 수준을 조사하였다.

[0087] <2-1> 세포 내 mtDNA 수준 측정

[0088] 세포에 소포체 스트레스를 유도한 다음 세포 내 mtDNA 수준을 측정하였다. mtDNA 수준은 Quantative RT-PCR 및 long PCR technique을 이용하여 분석하였다.

[0089] RT-PCR(Reverse transcription-polymerase chain reaction) 수행을 위해, 먼저 TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 사용하여 세포로부터 전체 RNA(0.5 µg)를 분리하였으며, PCR은 94℃ 30초/55℃ 30초/72℃ 60초 조건에서 30 사이클 동안 수행되었다. PCR 프라이머 서열은 하기와 같은 것을 사용하였다. 증폭된 DNA의 밴드 강도는 UV transilluminator 상에서 가시화한 후 비교하였다.

표 1

유전자	프라이머 서열(5'-3')	서열번호
미토콘드리아	포워드-TACTAGTCCGCGAGCCTCAAAGC	1
	리버스-GGGTGATCTTTGTTTGC GGGT	2

[0091] long PCR technique 수행을 위해, 먼저 Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen)을 이용하여 Raw 264.7 세포로부터 전체 DNA를 추출하였다. 상기 표 1과 동일한 프라이머 서열을 사용하여 8636-bp mtDNA 프래그먼트를 증폭시켰다. 참고로 상기 표 1의 포워드 프라이머는 미토콘드리아 DNA의 49644987번째 뉴클레오타이드 서열이며, 리버스 프라이머는 미토콘드리아 DNA의 1359913579번째 뉴클레오타이드 서열이다. PCR 반응은 제조사의 지시에 따라 50피코몰의 상기 프라이머를 이용하여 Expand Long Template PCR system (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)으로 수행하였다. PCR 조건은 하기 표 2에서 나타낸 바와 같다. PCR 산물(5 µl)은 1.5% 아가로스 겔을 이용하여 분리하였으며 브롬화 에티듐(ethidium bromide)으로 염색하였다. 사진은 UV transillumination 하에 수행되었다.

표 2

	PCR 조건
initial denaturation	94℃ 2분
30 cycle	93℃ 10초/ 61℃ 30초/ 68℃ 8분
final extension	68℃ 7분

[0093] RT-PCR 수행 결과는 도 1에서 나타내었으며, long PCR technique 수행 결과는 도 2에서 나타내었다.

[0094] 그 결과 도 1 및 도 2에서 나타난 바와 같이 TG를 10nM 농도로 처리한 실험군의 경우 mtDNA 전사의 상향조절은 소포체 스트레스 유도 초기 단계에서 시간 의존적으로 관찰되었으나, 24시간에 이르러서는 수준을 조절하기 위하여 되돌아가는 양상을 보였다. 또한 TG를 100nM 농도로 처리한 실험군에서는 이러한 반응이 약간 지연되는 것으로 나타났다.

[0095] <2-2> 시토크롬 C 함량 측정

[0096] 세포에 소포체 스트레스를 유도한 다음 세포 내 미토콘드리아의 단백질을 측정하기 위하여 시토크롬 C 함량을 측정하였다. 시토크롬 C 함량은 웨스턴 블로팅법을 이용하여 측정하였다.

[0097] 상기 실시예<1-1>에 따라 배양된 RAW267.4 대식세포를 6 웰 플레이트에 2.0×10^5 개/well로 분주하여 하루 정도 배양한 다음 100nM 농도의 담시가르긴(TG)을 처리하고 18시간 후 세포로부터 미토콘드리아를 분리하였다. 4℃에서 600g로 10분 동안 원심분리에 의해 수집된 세포들은 3ml의 ice-cold isolation buffer(0.1M Tris-MOPS, 0.1M EGTA/Tris, 1M sucrose, pH7.4)로 채부유시켰다. 그 후 상기 세포들은 glass/Teflon Potter Elvehjem homogenizer를 이용하여 균질하였으며, 4℃에서 7000g로 10분 동안 상기 균질물을 원심분리하여 상층액을 얻었

다. 단백질 함량은 BCA protein assay reagent(Pierce, Rockford, IL)로 측정하였다. 상기 샘플은 5분 동안 Laemmli buffer로 끓여서 변성시킨 후, 8% 또는 15% SDS-PAGE에서 분리하였다. 이렇게 분리된 단백질은 폴리비닐리덴 다이플로라이드(PVDF, Whatman) 멤브레인으로 이동시켰다. 이동이 완료된 PVDF 멤브레인은 TBS-트윈(Tris-buffered saline/Tween 20; 0.1% Tween 20, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL)으로 세척한 후 non-specific 한 부위에 항체가 결합하는 것을 방지하기 위해 5% non fat dry milk(Difco)가 함유된 TBS-트윈으로 상온에서 30분 동안 블로킹하였다. 그리고 1차 항체 처리로는 시토크롬 C, β -액틴을 1% nonfat milk를 함유하는 TBS-트윈에 희석한 멤브레인에 처리하였다. 시토크롬 C는 밤새도록 처리하였고, β -액틴은 60분 동안 처리하였다. TBST로 3번 세척한 후, 멤브레인에 HRP-conjugated 2차 항체로 60분 동안 처리하였다. 그 뒤 TBST로 5번의 세척을 마친 후, Amersham ECL system (GE Healthcare, Piscataway, NJ)를 이용하여 검출하였다.

[0098] 그 결과 도 3에서 나타낸 바와 같이, 소포체 스트레스 유도물질인 담시가르긴(TG) 처리에 따라 미토콘드리아의 단백질인 시토크롬 C의 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0099] <2-3> NRF-1 및 TFAM의 mRNA 수준변화

[0100] 본 실험에서는 소포체 스트레스의 화학 억제제인 TUDCA(0.2mM) 및 4-PBA(1mM)를 처리한 실험군 및 이들을 처리하지 않은 실험군으로 나누어 실험을 실시하였다. 먼저 상기 소포체 스트레스 화학 억제제를 세포에 처리 또는 처리하지 않은 후 TG를 이용하여 소포체 스트레스를 유도한 다음, 세포 내 미토콘드리아 생성(biogenesis)과 관련된 NRF-1(nuclear respiratory factor 1) 및 TFAM(mitochondria transcription factor A)의 mRNA 수준을 살펴보았다. 상기 인자들의 mRNA 수준은 RT-PCR를 이용하여 측정하였다.

[0101] RT-PCR은 상기 실시예<2-1>과 동일한 조건에서 실시하였으며, 이때 사용된 프라이머는 하기 표 3에서 나타내었다.

표 3

유전자	프라이머 서열(5'-3')	서열번호
NRF-1	포워드-CCAGTGCCACACAGAACTC	3
	리버스-CTTCCTTTCCCTTCCACTGC	4
TFAM	포워드-CAGCCAGGTCCAGCTCACTA	5
	리버스-ATTAGGAGGGTCTCGCTCCA	6
18S	포워드-CAGTGAACTGCGAATGGCT	7
	리버스-TGCCTTCCTGGATGTGGTA	8

[0103] 그 결과 도 4A에서 나타낸 바와 같이, NRF-1(핵호흡인자1) 및 TFAM(미토콘드리아 전사인자)의 mRNA 수준이 TG 처리 후 12시간이 될 때까지 시간에 의존적으로 증가되는 것으로 나타났으며, 이는 상기 실시예<2-1> 및 실시예<2-2>와 일치하는 결과였다. 특히 도 4B에서는 소포체 스트레스의 화학 억제제인 TUDCA(0.2mM) 및 4-PBA(1mM)의 처리군에서 상기 인자들의 mRNA 수준이 두드러지게 감소되는 것으로 나타나, 핵 내의 NRF-1 및 TFAM의 상향조절이 소포체 스트레스에 의존적임을 확인할 수 있었다.

[0104] <실시예 3>

[0105] 소포체 스트레스에 따른 PERK-의존적 HO-1의 상향조절

[0106] 상기에서 언급한 바와 같이 소포체 스트레스가 일어날 경우 세포 내에서는 소포체 스트레스를 중화(완화)시키는 작용이 일어나게 되는데, 이러한 작용을 UPR(unfolded protein response)이라 한다. 본 실험에서는 이러한 UPR에 해당하는 경로 중 PERK-의존성으로 일어나는 HO-1의 변화를 살펴보았다. 자세하게는 상기 실시예<1-1>에 따라 배양된 RAW267.4 대식세포에 소포체 스트레스를 유발하는 담시가르긴(TG)을 10nM과 100nM의 농도로 각각 처리한 다음 세포 내 HO-1의 단백질 발현변화, HO-1의 전사의 상향조절 여부를 조사하였다. 또한 HO-1의 상향조절이 PERK의 활성화에 의존적으로 일어나는 지를 확인하기 위하여, PERK의 활성화 여부에 따른 NRF2(HO-1의 전사인자)의 핵 내로의 이동을 측정하였다.

[0107]

[0108] <3-1> PERK-의존성 HO-1의 단백질 발현

[0109] 세포에 소포체 스트레스를 유도한 다음 세포 내 HO-1의 단백질 함량을 측정하였다. HO-1 함량은 웨스턴 블로팅 방법을 이용하여 측정하였다.

[0110] 상기 실시예<1-1>에 따라 배양된 RAW267.4 대식세포에 소포체 스트레스 유도를 위해 TG를 처리하고 18시간이 경과한 후 세포를 수득하였다. 수득된 세포는 ice-cold PBS로 2번 세척한 후 0.14M Tris(pH 6.8), 0.21M SDS, 0.24M 글리세롤, 0.3mM 브로모페놀 블루, protease 및 phosphatase inhibitor cocktails을 처리하여 20분 동안 용해하였다. 이러한 과정을 거친 용해물은 4℃에서 15분 동안 13,000rpm에서 원심분리한 후 상등액을 수득하였다. 단백질 함량은 BCA protein assay reagent(Pierce, Rockford, IL)로 측정하였다. 상기 샘플은 5분 동안 Laemmli buffer로 끓여서 변성시킨 후, 8% 또는 15% SDS-PAGE에서 분리하였다. 이렇게 분리된 단백질은 폴리비닐리덴 다이플로라이드 (PVDF, Whatman) 멤브레인으로 이동시켰다. 이동이 완료된 PVDF 멤브레인은 TBS-트윈 (Tris-buffered saline/Tween 20; 0.1% Tween 20, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCL)으로 세척한 후 non-specific 한 부위에 항체가 결합하는 것을 방지하기 위해 5% non fat dry milk (Difco)가 함유된 TBS-트윈으로 상온에서 30분 동안 블로킹하였다. 그리고 1차 항체 처리로는 HO-1, β -액틴을 1% nonfat milk를 함유하는 TBS-트윈에 희석한 멤브레인에 처리하였다. HO-1는 밤새도록 처리하였고, β -액틴은 60분 동안 처리하였다. TBST로 3번 세척한 후, 멤브레인에 HRP-conjugated 2차 항체로 60분 동안 처리하였다. 그 뒤 TBST로 5번의 세척을 마친 후, Amersham ECL system (GE Healthcare, Piscataway, NJ)를 이용하여 검출하였다.

[0111] 그 결과 도 5에서 나타낸 바와 같이, 소포체 스트레스 유도물질인 담시가르긴(TG) 처리에 따라 시간 의존적으로 HO-1 단백질의 발현이 유도되는 것을 확인할 수 있었다.

[0112] <3-2> PERK-의존성 HO-1의 전사의 상향조절

[0113] 상기 실시예<3-1>에서는 세포에 소포체 스트레스를 유도한 경우 HO-1 단백질 발현이 증대되는 것을 확인하였는데, 이러한 발현 증대가 HO-1 유전자의 전사적 상향조절로 인한 것인지 확인하기 위하여 세포에 소포체 스트레스를 유도한 다음 세포 내 HO-1 수준을 측정하였다.

[0114] 본 실험에서는 소포체 스트레스의 화학 억제제인 TUDCA(0.2mM) 및 4-PBA(1mM)를 처리한 실험군 및 이들을 처리하지 않은 실험군으로 나누어 실험을 실시하였다. 먼저 상기 소포체 스트레스 화학 억제제를 세포에 처리 또는 처리하지 않은 후 TG를 이용하여 소포체 스트레스를 유도한 다음, HO-1의 mRNA 수준을 살펴보았다. HO-1의 mRNA 수준은 RT-PCR를 이용하여 측정하였다.

[0115] RT-PCR은 상기 실시예<2-1>과 동일한 조건에서 실시하였으며, 이때 사용된 프라이머는 하기 표 4에서 나타내었다.

표 4

[0116]

유전자	프라이머 서열(5'-3')	서열번호
HO-1	포워드-GAACCAGCCTGAAGTAGCCC	9
	리버스-CAGCCAGGTCCAGCTCACTA	10
18S	포워드-CAGTGAACTGCGAATGGCT	7
	리버스-TGCCTTCCTTGGATGTGGTA	8

[0117] 그 결과 도 6A에서 나타낸 바와 같이, HO-1의 mRNA 수준이 TG 처리 후 6시간이 경과한 다음에 뚜렷이 증대되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 도 4B에서는 소포체 스트레스의 화학 억제제인 TUDCA(0.2mM) 및 4-PBA(1mM)의 처리군에서 HO-1의 전사활성(mRNA 수준)이 감소되는 것으로 나타나, HO-1의 상향조절이 소포체 스트레스에 의존적임을 확인할 수 있었다.

[0118] <3-3> HO-1 전사의 상향조절이 PERK-의존성인지 여부 확인

- [0119] HO-1의 상향조절이 PERK의 활성화에 의존적으로 일어나는 지를 확인하기 위하여, PERK의 활성화 여부에 따른 NRF2(HO-1의 전사인자)의 핵 내로의 이동을 측정하였다. 참고로 NRF2는 HO-1과 같은 항산화 효소를 유도하기 위하여 핵 내로의 이동하여 소포체 스트레스 신호를 전달하는 전사인자이다.
- [0120] 본 실험에서는 PERK의 활성화 여부에 따른 NRF2(HO-1의 전사인자)의 핵 내로의 이동을 측정하기 위해서, PERK의 기능을 제거한 PERK 녹아웃 세포를 이용하여 실험하였으며 대조군으로는 야생형을 사용하였다. 먼저 상기 실험군에 TG(10nM, 100nM, 1000nM)를 이용하여 소포체 스트레스를 유도한 다음, 시토졸과 핵 내에 축적된 NRF2 단백질량을 살펴보았다. NRF2 단백질량은 웨스턴 블로팅법을 이용하여 측정하였다.
- [0121] 웨스턴 블로팅은 항체만 달리하여 상기 실시예<3-1>과 동일한 방법으로 수행되었다. Lamin은 대조군으로 사용되었다.
- [0122] 그 결과 도 7에서 나타낸 바와 같이, 소포체 스트레스를 유도하는 TG를 처리하는 경우, NRF2의 핵 내로의 이동량은 TG 처리량에 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, PERK 녹아웃 실험군에서 시토졸과 핵 내에 축적된 NRF2 단백질의 차이가 없는 것으로 나타나, NRF2의 핵 내로의 이동은 PERK 활성화 없이는 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었다.
- [0123] **<실시예 4>**
- [0124] **소포체 스트레스에 의한 PERK-의존적 HO-1의 유도가 mtDNA 복제 및 세포 생존에 미치는 영향**
- [0125] 상기 실시예에서 살펴본 바와 같이 소포체 스트레스가 일어나는 경우 PERK 활성화를 통해 HO-1이 유도되게 되는 데, 이러한 HO-1의 유도가 mtDNA 복제 및 세포 생존에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다.
- [0126] **<4-1> 소포체 스트레스에 따른 세포 내 mtDNA 수준, PERK-의존적 HO-1 전사 활성화 및 미토콘드리아 생성과 관련된 TFAM(미토콘드리아 전사인자)의 전사 활성화 수준을 상호비교**
- [0127] 본 실험에서는 상기 실시예<1-1>에 따라 배양된 MEFs 세포를 이용하여 PERK의 기능을 제거한 PERK 녹아웃 세포를 이용하여 실험하였으며 대조군으로는 야생형을 사용하였다. 먼저 상기 실험군에 TG(10nM, 100nM)를 처리하여 소포체 스트레스를 유도한 다음, 세포내 mtDNA 수준, HO-1 전사활성 및 TFAM의 전사활성을 측정하였다. mtDNA 수준은 Quantative RT-PCR 및 long PCR technique을 이용하여 측정하였으며, 이는 실시예<2-1>과 동일한 방법으로 수행되었다. 또한 HO-1 전사활성 및 TFAM의 전사활성은 HO-1의 mRNA 수준을 RT-PCR를 이용하여 측정하는 방식으로 이루어졌으며, RT-PCR은 상기 실시예<2-1>과 동일한 조건에서 실시하였다. 이때 사용된 프라이머는 상기 표 3(TFAM) 및 4(HO-1)에서 개시한 것과 동일한 것을 사용하였다.
- [0128] 그 결과 도 8에 나타낸 바와 같이, PERK 기능을 유지하는 야생형 세포에서는 소포체 스트레스 유도로 인해 mtDNA 수준이 증대되는 것을 확인할 수 있었으나, PERK 녹아웃 실험군에서는 mtDNA 수준이 거의 동일하거나 감소되는 것으로 나타났다. 또한 도 9에서 나타낸 바와 같이, PERK 기능을 유지하는 야생형 세포에서는 소포체 스트레스 유도로 인해 HO-1 및 TFAM의 전사활성(mRNA 수준)이 월등히 증대되는 반면, PERK 녹아웃 실험군에서는 HO-1 및 TFAM의 전사활성(mRNA 수준) 거의 변화가 없는 것으로 나타났다.
- [0129] 이를 통해 세포에 소포체 스트레스가 일어나는 경우 HO-1 및 TFAM의 전사활성(mRNA 수준) 증가와 더불어 미토콘드리아의 유전체 증식이 나타나며 이는 PERK 활성화가 필수적임을 유추할 수 있었다. 또한 TFAM가 미토콘드리아 생성에 관여되는 인자라는 것을 이미 알려진 사실인데, 상기 실험에서도 TFAM mRNA 수준과 mtDNA 수준의 변화가 일치되는 경향으로 나타난 것을 알 수 있었다.
- [0130] **<4-2> HO-1 활성이 mtDNA 수준, NRF-1 및 TFAM 전사 활성화에 미치는 영향**
- [0131] 상기 실시예<4-1>을 통해 세포에 소포체 스트레스가 일어나는 경우 HO-1 증가와 더불어 미토콘드리아의 유전체 증식이 일어나는 것을 확인할 수 있었는데, 본 실험에서는 이러한 미토콘드리아의 유전체 증식이 HO-1 활성화에 의해 영향을 받는지 확인하기 위해, HO-1 저해제로 알려진 아연 프로토포피린(zinc protoporphyrin: ZnPP)을 이용하여 HO-1 활성을 억제한 후 세포들의 mtDNA 수준을 측정하였다. 즉 실시예<1-1>에 따라 배양된 MEFs 세포에 TG(10nM, 100nM)를 처리하여 소포체 스트레스를 유도한 다음, 아연 프로토포피린(5mM, 10mM, 20mM)을 처리하여

HO-1 활성을 저해한 후 mtDNA 수준을 Quantative RT-PCR 및 long PCR technique을 이용하여 측정하였다. 이는 실시예<2-1>과 동일한 방법으로 수행되었다. 또한 미토콘드리아의 생성과 관련된 NRF-1(핵호흡인자1) 및 TFAM(미토콘드리아 전사인자)의 mRNA 수준을 RT-PCR를 이용하여 측정하는 방식으로 이루어졌으며, RT-PCR은 상기 실시예<2-1>과 동일한 조건에서 실시하였다.

[0132] 그 결과 도 10 및 도 11에 나타난 바와 같이, 아연 프로토포피린을 처리한 세포에서는 농도 의존적으로 mtDNA 수준이 감소(도 10)와 NRF-1 및 TFAM의 전사활성(mRNA 수준)이 감소되는 것으로 나타났다(도 11).

[0133] 또한 소포체 스트레스에 의한 NRF-1 및 TFAM의 직접적 활성 정도를 측정(PERK-의존적 가능성을 배제)하기 위하여 siRNA 도입하여 HO-1 발현을 녹다운시켰으며, 이렇게 HO-1 발현이 억제된 세포에서 NRF-1 및 TFAM의 mRNA 수준을 측정하였다. mRNA 수준은 RT-PCR를 이용하여 측정하였으며, RT-PCR은 상기 실시예<2-1>과 동일한 조건에서 실시하였다.

[0134] 그 결과 도 12에서 나타난 바와 같이, HO-1 siRNA 도입하지 않은 실험군에서는 TG로 소포체 스트레스를 유도한 경우 NRF-1 및 TFAM의 mRNA 수준이 증가되는 것으로 나타난 반면, HO-1 siRNA 도입한 군에서는 TG의 처리에 의한 소포체 스트레스 유도와 관계없이 TFAM의 mRNA 수준이 변하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 HO-1 활성은 NRF-1 및 TFAM 전사적 활성 증가를 위해 중요한 인자임을 확인할 수 있었다.

[0135] 따라서 이를 통해 TG의 의해 유도되는 HO-1 활성이 mtDNA 수준에 영향을 미칠 뿐만 아니라 NRF-1 및 TFAM의 전사활성에도 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다.

[0136] <4-3> HO-1 활성이 세포 생존에 미치는 영향

[0137] 상기에서는 HO-1 활성이 미토콘드리아의 유전체 증식이나 기타 미토콘드리아의 생성과 관련된 인자들의 전사적 활성에 대한 내용을 살펴보았는데, 본 실험에서는 이러한 HO-1 활성이 직접적으로 세포 생존에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다.

[0138] TG와 함께 다양한 소포체 스트레스 유도자들에게 18시간 동안 노출되어 배양된 세포들을 1000rpm에서 5분 동안 원심분리한 후, 펠렛을 1.0ml의 cold PBS 및 1.0ml의 cold binding buffer(10mM Hepes/NaOH, pH7.4, 140mM NaCl, 및 2.5mM CaCl₂)로 2번 세척하였다. 상기 과정을 통해 수득한 세포들을 Annexin V 및 PI(Apoptosis Detection Kit II, BD Pharmingen)로 15분간 암실의 실온조건에서 염색한 후 FACScanto II flow cytometer(BD Biosciences, San Jose, CA)를 이용하여 분석하였다.

[0139] 그 결과 도 13에서 나타난 바와 같이, PERK 활성이 결핍된 MEF 세포들은 소포체 스트레스에 의한 세포 사멸에서도 취약한 것으로 나타나 상기 실험 결과와 일치된 결과를 보여주었다.

[0140] <실시예 5>

[0141] 소포체 스트레스에 의한 PERK-의존적 HO-1의 유도가 mtDNA 복제 및 세포 생존에 미치는 영향

[0142] 헴옥시게나제 (heme oxygenase, HO)는 헴 (heme)을 빌리버딘 (biliverdin)으로 변환시키는 속도-제한 효소로서, 이때 일산화탄소 (CO)와 철 (Fe)이 부수적으로 생성된다. 빌리버딘은 이어서 빌리루빈 (bilirubin)으로 환원되어 여러 가지 산화물들을 청소하는데 사용된다. 따라서 헴옥시게나제 (heme oxygenase, HO)의 최종 산화물은 빌리루빈과 일산화탄소인 것이다. 특히 HO-1은 여러 자극들에 의해 유도되는 효소로서 특히 산화성 스트레스에 의해서 유도되어지는 것으로 알려져 있다.

[0143] 상기 실시예 4에서는 소포체 스트레스에 의한 HO-1이 활성화가 mtDNA 수준에 영향을 미칠 뿐만 아니라 NRF-1 및 TFAM의 전사활성을 증대시키는 확인하였는데, 이러한 HO-1이 활성화 되는 경우 종국에는 일산화탄소(CO)가 생성된다는 점에서 일산화탄소가 실질적으로 소포체 스트레스 반응에서 어떤 기작으로 작용하는지 알고자 하였다. 따라서 본 실험에서는 일산화탄소가 mtDNA 수준과 NRF-1 및 TFAM의 전사활성에 어떤 영향을 미치는지 조사하였다.

[0144] <5-1> 일산화탄소가 mtDNA 수준에 미치는 영향

[0145] 헴옥시게나제 (heme oxygenase, HO)는 헴 (heme)을 빌리버딘 (biliverdin)으로 변환시키는 속도-제한

효소로서, 이때 일산화탄소 (CO)와 철 (Fe)이 부수적으로 생성된다. 빌리버딘은 이어서 빌리루빈 (bilirubin)으로 환원되어 여러 가지 산화물들을 청소하는데 사용된다. 따라서 헴옥시게나제 (heme oxygenase, HO)의 최종산화물은 빌리루빈과 일산화탄소인 것이다. 특히 HO-1은 여러 자극들에 의해 유도되는 효소로서 특히 산화성 스트레스에 의해서 유도되어지는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서는 HO-1의 최종산화물인 일산화탄소가 소포체 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있는지를 살펴보기 위하여 먼저 mtDNA 수준을 증가시킬 수 있는지를 살펴보았다.

[0146] mtDNA 수준은 Quantative RT-PCR 및 long PCR technique을 이용하여 측정하였으며, 이는 실시예<2-1>과 동일한 방법으로 수행되었다.

[0147] 그 결과 도 14에서 나타낸 바와 같이, 일산화탄소 소거제(scavenger)로써 헤모글로빈을 적용한 실험군에서 mtDNA 수준이 헤모글로빈 투여량에 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0148] <5-2> 일산화탄소가 NRF-1 및 TFAM 전사 활성화에 미치는 영향

[0149] 일산화탄소가 미토콘드리아의 생성과 관련된 NRF-1(핵호흡인자1) 및 TFAM(미토콘드리아 전사인자)의 전사적 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 측정하기 위해, NRF-1 및 TFAM의 mRNA 수준을 RT-PCR를 이용하여 측정하는 방식으로 이루어졌으며, RT-PCR은 상기 실시예<2-1>과 동일한 조건에서 실시하였다.

[0150] 그 결과 도 15에서 나타낸 바와 같이, 일산화탄소 소거제(scavenger)로써 헤모글로빈을 적용한 실험군에서 NRF-1 및 TFAM의 mRNA 수준도 감소된 것으로 나타났다.

[0151] 따라서 이를 통해 일산화탄소가 mtDNA 수준과 NRF-1 및 TFAM의 전사적 활성화에 영향을 미칠 수 있음을 증명하였다. 이러한 결과는 HO-1이 활성화되는 경우 최종산화물인 일산화탄소가 생성되며, 이렇게 생성된 일산화탄소가 NRF-1 및 TFAM의 전사적 활성을 증대시켜 미토콘드리아의 유전체 증식을 통해 소포체 스트레스를 완화할 수 있음을 시사하는 것이다.

[0152] <5-3> 일산화탄소가 세포 생존에 미치는 영향

[0153] 상기에서는 일산화탄소가 미토콘드리아의 유전체 증식이나 기타 미토콘드리아의 생성과 관련된 인자들의 전사적 활성화에 대한 내용을 살펴보았는데, 본 실험에서는 이러한 일산화탄소가 직접적으로 세포 생존에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다.

[0154] TG와 함께 다양한 소포체 스트레스 유도자들에게 18시간 동안 노출되어 배양된 세포들을 1000rpm에서 5분 동안 원심분리한 후, 펠렛을 1.0ml의 cold PBS 및 1.0ml의 cold binding buffer(10mM Hepes/NaOH, pH7.4, 140mM NaCl, 및 2.5mM CaCl₂)로 2번 세척하였다. 상기 과정을 통해 수득한 세포들을 Annexin V 및 PI(Apoptosis Detection Kit II, BD Pharmingen)로 15분간 암실의 실온조건에서 염색한 후 FACScanto II flow cytometer(BD Biosciences, San Jose, CA)를 이용하여 분석하였다.

[0155] 그 결과 도 16에서 나타낸 바와 같이, TG에 의해 유도된 세포 사멸은 세포 내부의 일산화탄소 이용도가 제안될 때(일산화탄소 소거제로써 헤모글로빈을 적용한 경우) 더욱더 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0156] <5-4> 일산화탄소가 세포의 ATP 생성에 미치는 영향

[0157] 본 실험에서는 일산화탄소가 세포의 ATP 생성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 세포 내의 ATP량을 측정하였다.

[0158] 세포의 ATP 함량은 제조사(Promega, Madison, WI)의 지시에 따라 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay에 의해 분석되었다. 세포 배양 시 TG를 첨가하여 소포체 스트레스를 유도하였으며, 억제실험을 위하여 세포들은 일산화탄소 소거제로써 헤모글로빈의 부존재 또는 존재 하에서 30분 동안 사전배양(preincubate)되었다. 배양 후 세포들을 반응시약과 함께 혼합한 후 발광을 제조사의 지시를 따라 확인하였다.

[0159] 그 결과 도 17에서 나타낸 바와 같이, 헤모글로빈을 처리하지 않은 실험군에서는 TG 적용 후 세포 내 ATP 레벨의 생산이 약간 증가하는 것으로 나타났으나, 헤모글로빈(일산화탄소 소거제)과 함께 TG를 18시간 처리한 실험군에서는 ATP 수준이 완전히 감소하는 것으로 나타났다. 이를 통해 일산화탄소가 세포 내 ATP 량에 영향을 미침

을 확인할 수 있었다.

[0160] <실시예 6>

[0161] HO-1 활성화에 의존적인 미토콘드리아 DNA의 소포체 스트레스에 대한 민감성 평가(in vivo)

[0162] 상기 실시예들을 통하여 우리는 HO-1의 활성화에 의존적인 미토콘드리아의 유전체 증식이 소포체 스트레스에 민감하여 이루어지는 것을 in vitro 상에서 확인할 수 있었다. 본 실험에서는 이러한 소포체 스트레스에 민감하게 일어나는 HO-1의 활성화에 의존적인 미토콘드리아의 유전체 증식을 in vivo 상에서 확인하였다.

[0163] 상기 실시예<1-2>에 따라 배양된 7주령의 수컷 C57BL/6 야생형 마우스에 소포체 스트레스 유도물질인 담시가르긴(TG), UPR 억제제인 4-페닐부티르산(4-phenylbutyric acid: 4-PBA) 및 HO-1 활성화 억제제인 아연 프로토포피린(zinc protoporphyrin: ZnPP)를 처리 또는 무처리한 후 마우스를 희생하여 간세포 내의 mtDNA 수준 및 미토콘드리아의 생성과 관련된 NRF-1(핵호흡인자1) 및 TFAM(미토콘드리아 전사인자)의 발현유무를 측정하였다. mtDNA 수준은 Quantative RT-PCR을 이용하여 측정하였으며, 이는 실시예<2-1>과 동일한 방법으로 수행되었다. 또한 NRF-1 및 TFAM의 전사활성은 HO-1의 mRNA 수준을 RT-PCR를 이용하여 측정하는 방식으로 이루어졌으며, RT-PCR은 상기 실시예<2-1>과 동일한 조건에서 실시하였다.

[0164] 그 결과 도 18에서 나타낸 바와 같이, TG를 처리하여 소포체 스트레스를 유발한 실험군에 미토콘드리아의 mtDNA 수준이 월등히 높아지는 것을 확인할 수 있었으나, UPR 억제제인 4-PBA 또는 HO-1 활성화 억제제인 ZnPP를 처리한 실험군에서는 mtDNA 수준이 낮아지는 것으로 나타났다. 또한 NRF-1 및 TFAM의 전사활성도 이와 일치하는 경향을 보여주었다.

[0165]

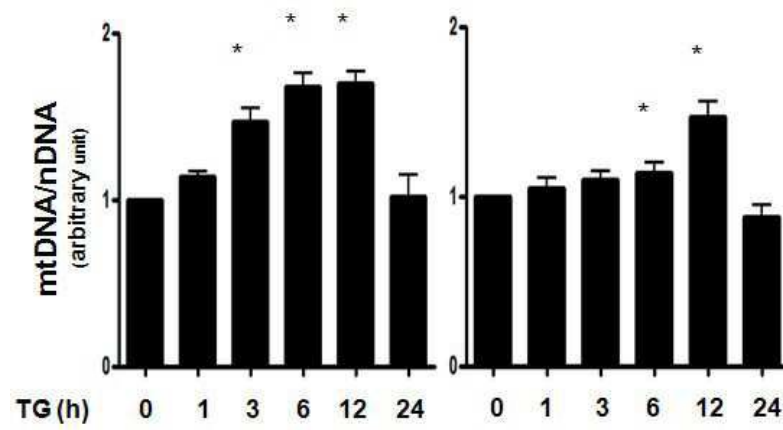
[0166] 상기의 실시예 1 내지 6에서는 소포체 스트레스에 따른 세포 내 반응 기작을 알아보았다. 실시예들의 내용을 종합해 보면 소포체 스트레스가 일어나는 경우 PERK-의존성 HO-1이 활성화되며 이러한 활성화에 따라 일산화탄소가 생산되게 되는데, 이러한 HO-1/CO 시스템을 통해 미토콘드리아의 유전체 증식이 발생하게 되어 세포를 소포체 스트레스로부터 보호하고 세포사멸을 방지한다고 할 수 있다.

[0167] HO-1/CO 시스템을 통해 미토콘드리아의 유전체 증식되는 메커니즘을 다음과 같이 유추할 수 있다. 즉 세포 내 소포체 스트레스가 발생하는 경우 소포체 스트레스 반응(UPR)이 일어나게 되는데, 이러한 UPR 반응 경로 중 하나의 신호전달체계인 PERK (pancreatic ER kinase)에 의해 HO-1의 전사인자인 NRF2가 핵 내로 이동하게 되며, 핵 내로 이동된 NRF2에 의해 HO-1이 활성화하게 되면 HO-1의 활성화에 따른 최종산물 중 하나인 일산화탄소가 생성되게 된다. 이렇게 생성된 일산화탄소는 미토콘드리아 생성과 관련된 NRF1 및 TFAM의 전사적 활성을 증가시킴으로써 미토콘드리아의 유전체 증식 및 ATP 생산이 촉진되어 소포체 스트레스를 완화시켜 세포를 보호하는 일련의 과정을 형성한다고 판단되어진다(도 19 참조).

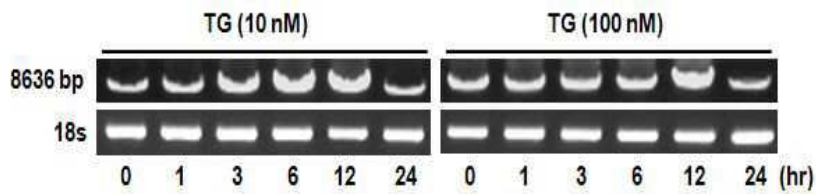
[0168] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

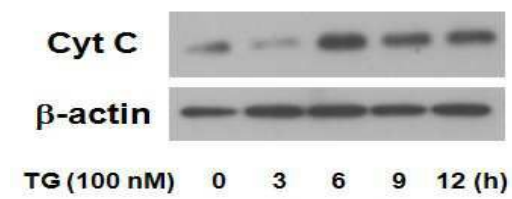
도면1



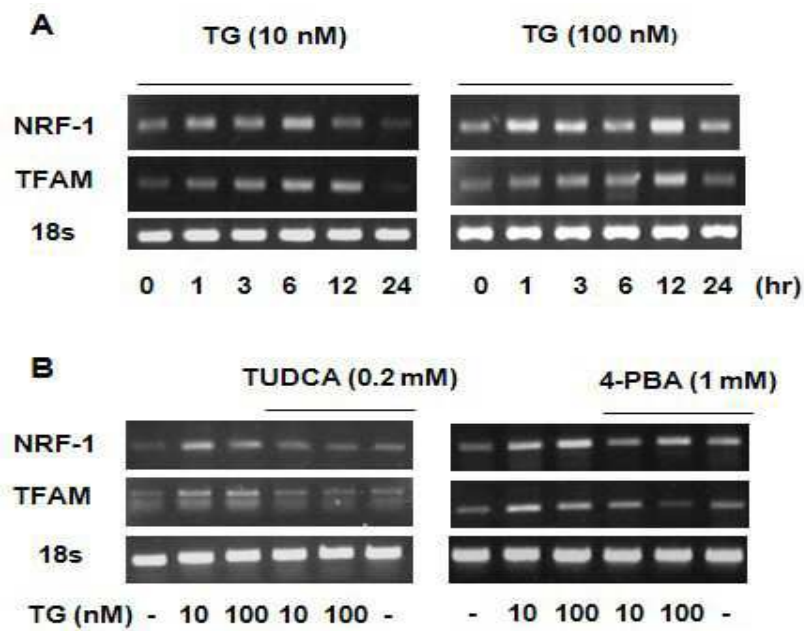
도면2



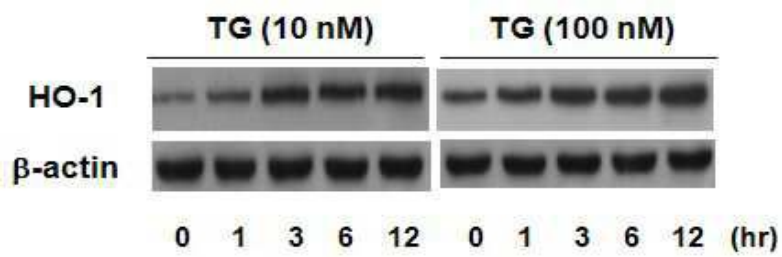
도면3



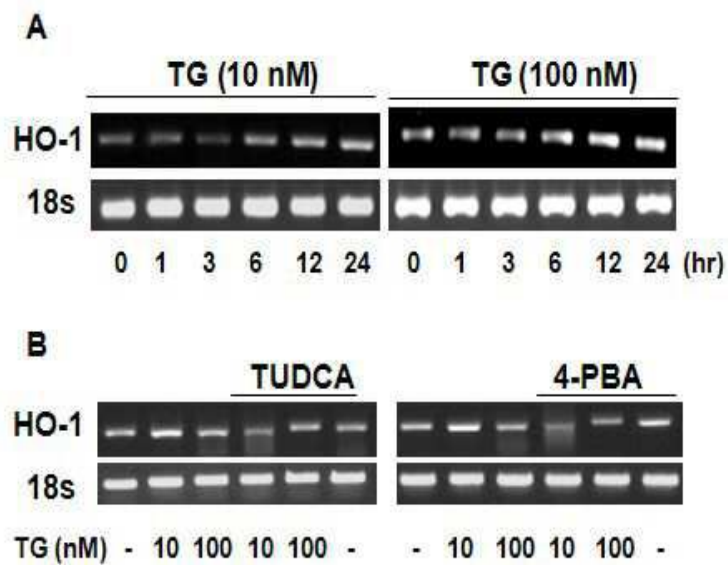
도면4



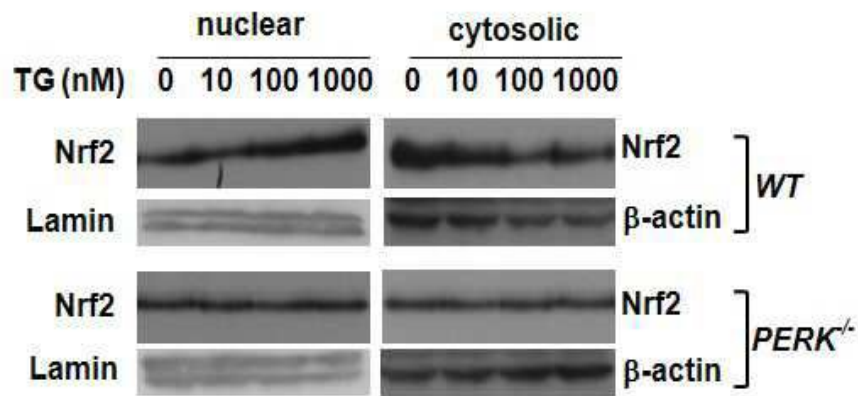
도면5



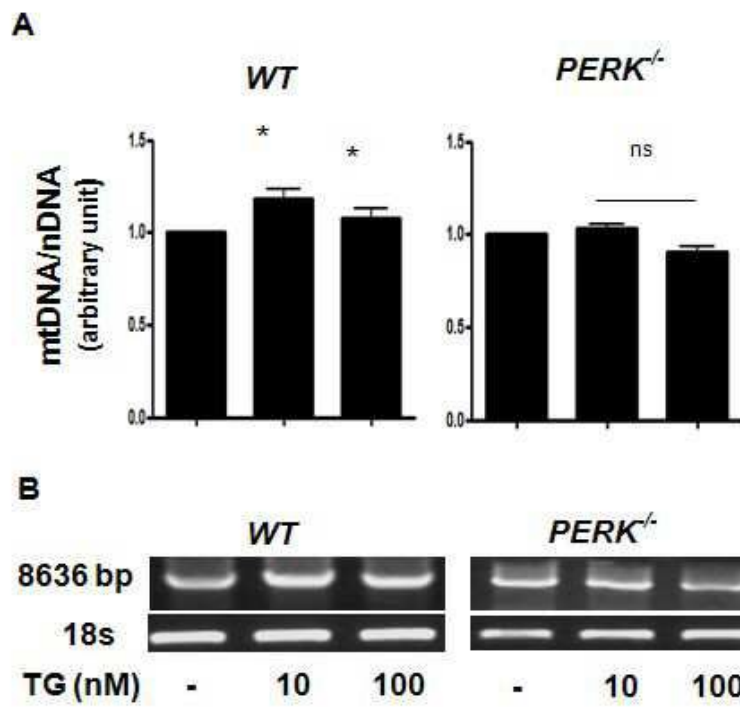
도면6



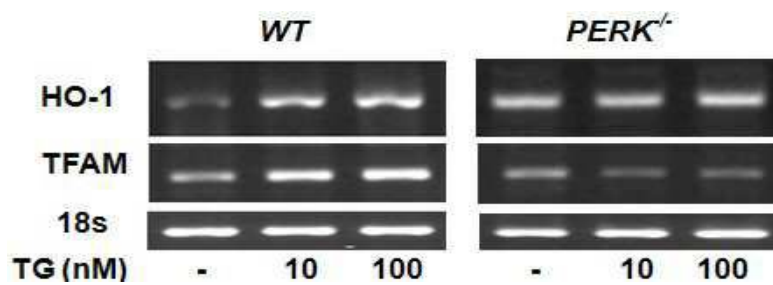
도면7



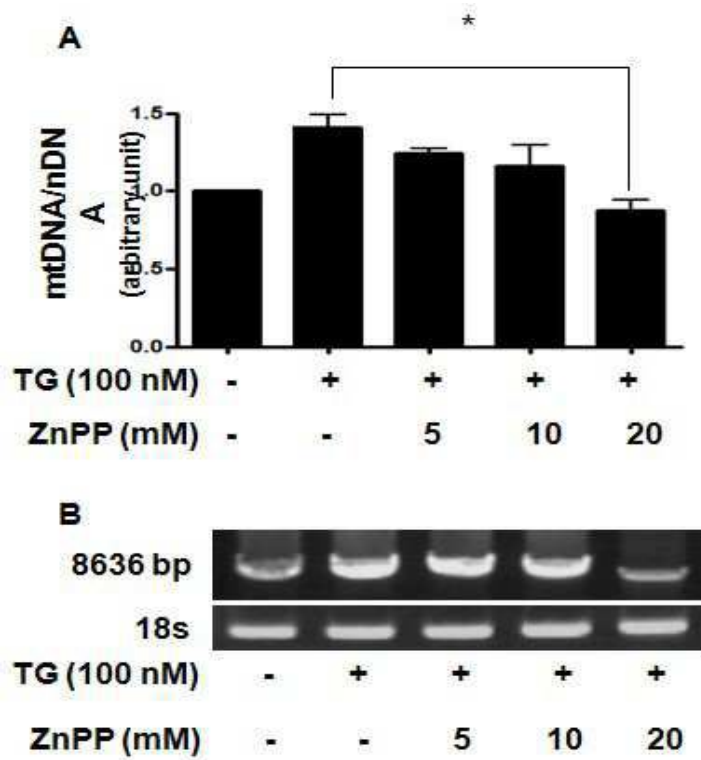
도면8



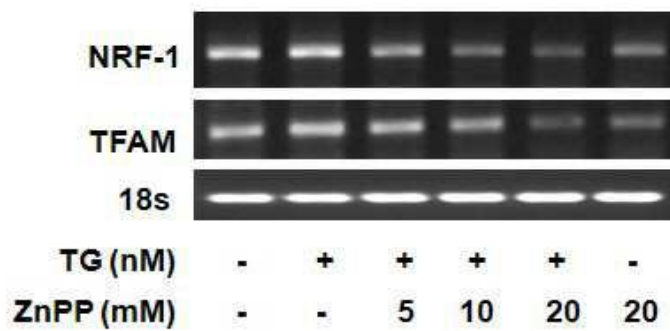
도면9



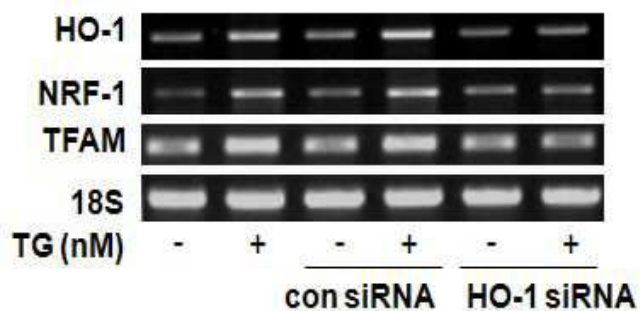
도면10



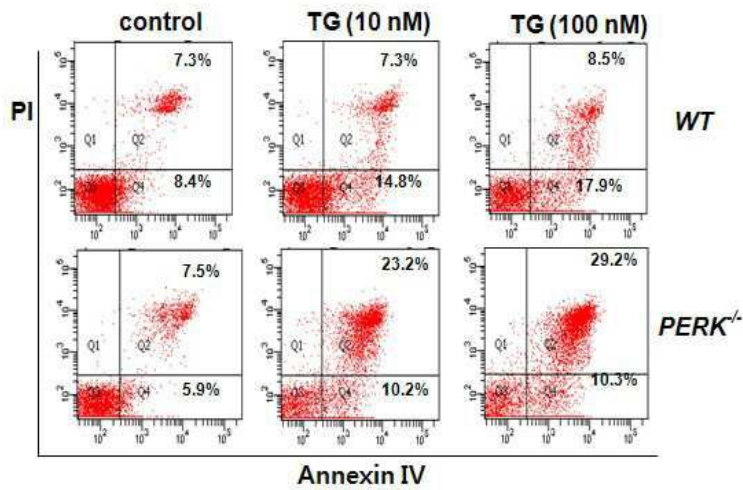
도면11



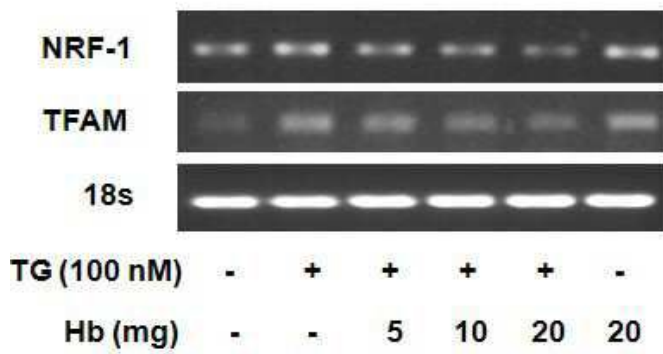
도면12



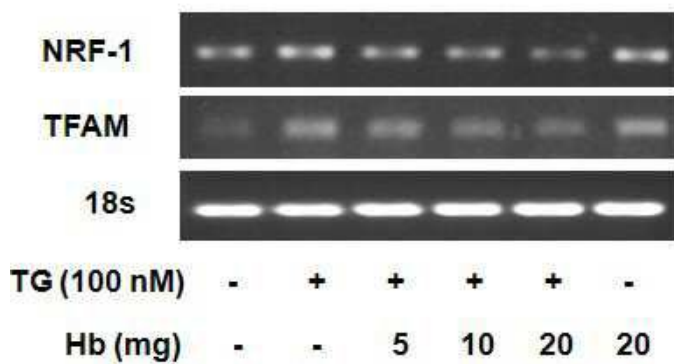
도면13



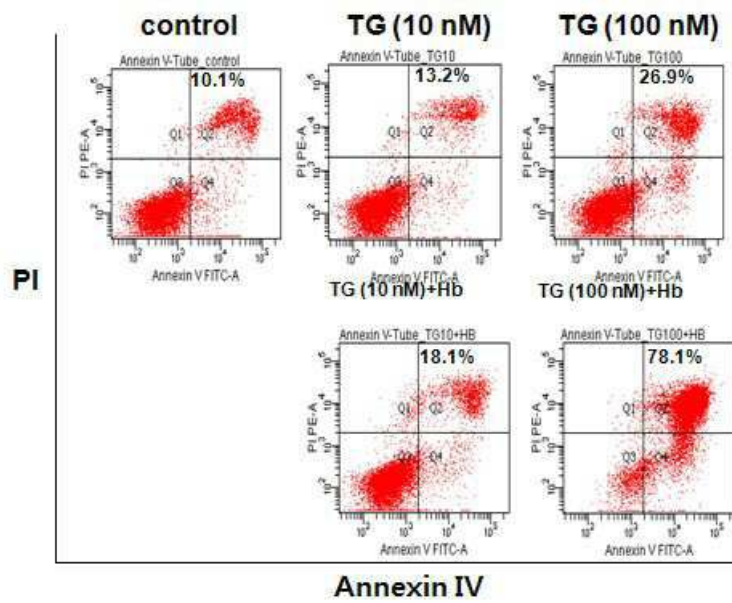
도면14



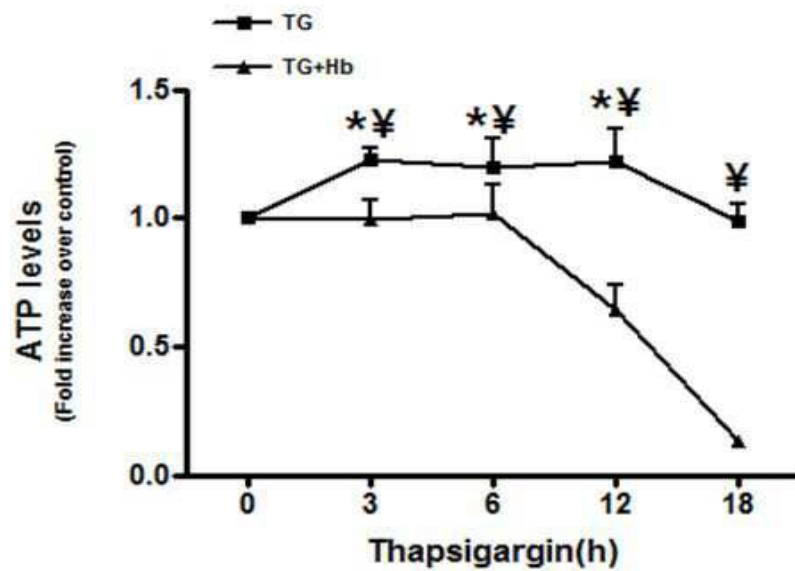
도면15



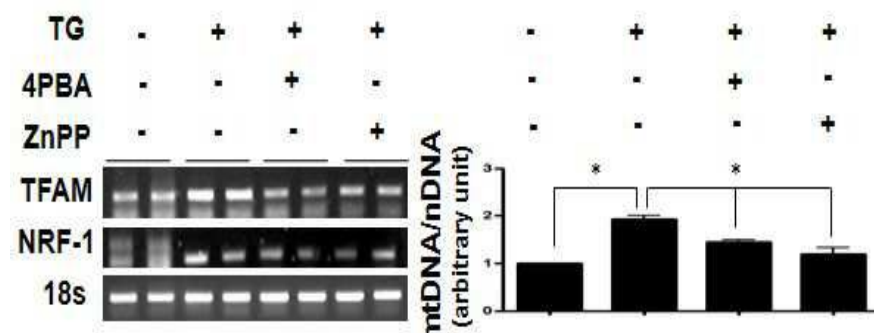
도면16



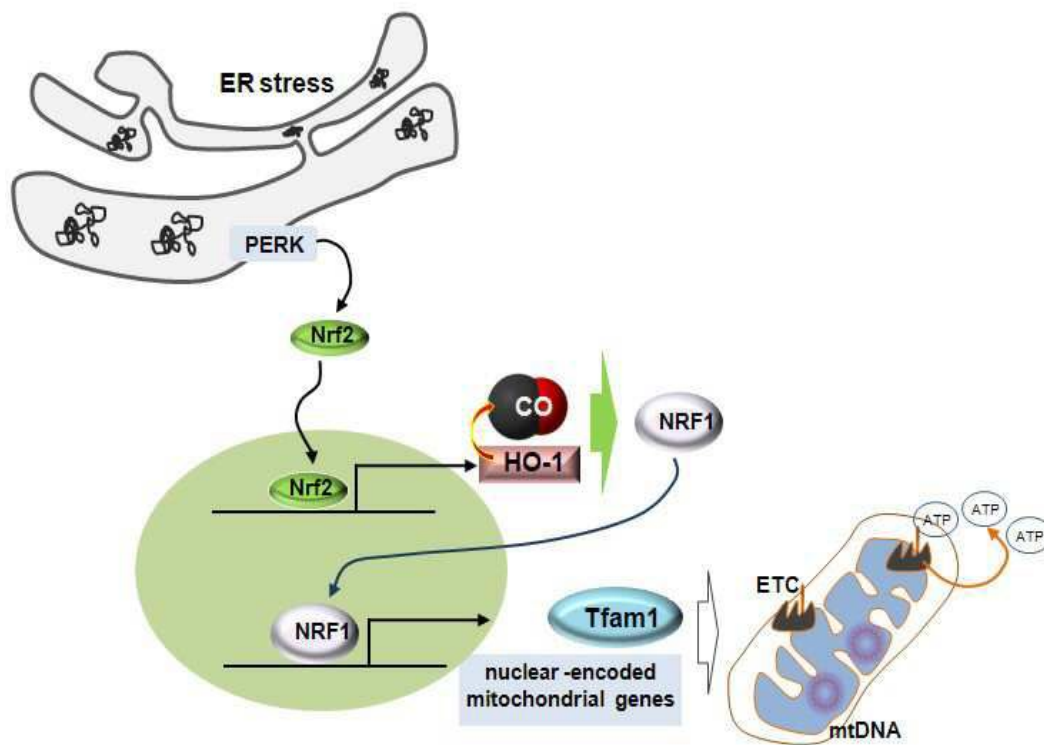
도면17



도면18



도면19



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> Composition for Preventing or Treating an ER-Stress Mediated Disease Comprising Carbon Monoxide or Carbon Monoxide Donor
- <160> 10
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> mitochondria forward primer
- <400> 1
- tactagtccg cgagccttca aagc
- <210> 2
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> mitochondira reverse primer
 <400> 2
 gggtgatctt tgtttgcggg t 21
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NRF-1 forward primer
 <400> 3
 ccagtggcca cacagaactc 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NRF-1 reverse primer
 <400> 4
 cttcctttcc cttccactgc 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TFAM forward primer
 <400> 5
 cagccaggtc cagctcacta 20
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TFAM reverse primer
 <400> 6
 attaggaggg tctcgctcca 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18S forward primer

<400>

> 7

cagtgaaact gcgaatggct 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 18S reverse primer

<400> 8

tgcccttcctt ggatgtggta 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H0-1 forward primer

<400> 9

gaaccagcct gaactagccc 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> H0-1 reverse primer

<400> 10

cagccaggtc cagctcacta 20