(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0036314
(43) 공개일자 2011년04월07일

(51) Int. Cl.
A61K 31/519 (2006.01) *A61P 9/10* (2006.01)
A61P 25/24 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0093906
(22) 출원일자 2009년10월01일
심사청구일자 2009년10월01일

(71) 출원인
인제대학교 산학협력단
경남 김해시 어방동 607 인제대학교 내
(72) 발명자
박원선
부산시 진구 개금2동 현대I APT 201동 1101호
김형규
부산시 진구 개금3동 현대 APT 103동 807호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
윤경민

전체 청구항 수 : 총 9 항

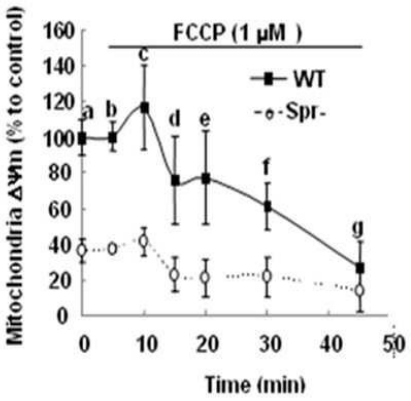
(54) 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 하는 미토콘드리아 질환 치료용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 하는 미토콘드리아 질환 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 미토콘드리아의 에너지 대사 능력 및 세포사멸을 컨트롤할 수 있는 상기 미토콘드리아 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 미토콘드리아 기능 이상에 기인하거나 미토콘드리아 기능 이상을 수반하는 다양한 질환의 치료용 조성물로 기능할 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도4a



(72) 발명자

김나리

부산시 수영구 남천2동 남천삼익비치 APT 210동 1101호

한진

부산시 수영구 망미동 포스코더샵 파크리치 아파트 106동 1003호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A084599

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 인제대학교 산학협력단

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 테트라하이드로비오프테린 생합성 제어 마우스 모델을 이용한 허혈성 심장질환의 치료 표적 발굴

기여율 1/1

주관기관 인제대학교 산학협력단

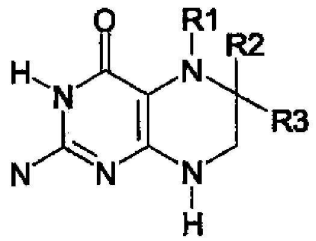
연구기간 2008.11.01 ~ 2010.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 I:

[화학식 I]



[식 I에서 R^1 및 R^2 는 각각 수소 원자를 나타내거나, 또는 R^1 및 R^2 는 함께 단일 결합을 형성하며, R^1 및 R^2 각각 동시에 수소 원자를 나타내는 경우, R^3 는 $-CH(OH)CH(OH)CH_3$, $-CH(OCOCH_3)CH(OCOCH_3)CH_3$, $-CH_3$, $-CH_2OH$ 또는 페닐기를 나타내고, R^1 및 R^2 가 함께 단일 결합을 형성하는 경우, R^3 은 $-COCH(OH)CH_3$ 를 나타낸다]

로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 하는 미토콘드리아 질환 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 [(6R)-L-에리트로-5,6,7,8-테트라하이드로비옵테린(BH4)]인 것을 특징으로 하는 미토콘드리아 질환 치료용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

미토콘드리아의 막전위를 안정화 또는 유지시키는 것을 특징으로 하는 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 하는 미토콘드리아 질환 치료용 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

미토콘드리아의 산화적 인산화과정을 통한 ATP 에너지 합성시 소모되는 산소량을 증가시키는 것을 특징으로 하는 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 하는 미토콘드리아 질환 치료용 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서,

미토콘드리아에서 생성되는 ATP 에너지의 양을 증가시키는 것을 특징으로 하는 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 하는 미토콘드리아 질환 치료용 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서,

미토콘드리아의 활성 산소종의 생산량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 하는 미토콘드리아 질환 치료용 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서,

미토콘드리아 DNA의 산화적 손상량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 하는 미토콘드리아 질환 치료용 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서,

미토콘드리아 DNA의 파쇄(fragmentation)를 감소시키는 것을 특징으로 하는 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 하는 미토콘드리아 질환 치료용 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항에 있어서,

상기 질환은 허혈성 뇌질환 및 허혈성 심질환 등의 허혈성질환; 파킨스 질환, 알쯔하이머 질환 및 헌팅톤 질환 등의 신경퇴행성 질환; 근위축성측색경화증(ALS) 또는 미토콘드리아뇌근증; 자폐증 및 우울증 등의 정신질환; 당뇨, 비만, 뇌졸중, 심장병, 동맥경화, 고혈압, 고콜레스테롤증; 및 비정형 페닐케톤뇨증인 것을 특징으로 하는 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 하는 미토콘드리아 질환 치료용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 하는 미토콘드리아 질환 치료용 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 미토콘드리아의 에너지 대사 능력 및 세포사멸을 컨트롤할 수 있는 상기 미토콘드리아 질환 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 미토콘드리아 기능 이상에 기인하거나 미토콘드리아 기능 이상을 수반하는 다양한 질환의 치료용 조성물로 기능할 수 있을 것이다.

배 경 기 술

[0003] 미토콘드리아는 에너지 대사와 세포사 조절에 관여하는 기능을 가지며, 진핵세포에 존재하는 세포성 소기관이다. 특히 에너지가 필요한 간, 심장, 뇌 등의 신체주요 장기와 근육세포에 주로 존재한다. 미토콘드리아의 주 기능 중 하나는 전자전달계를 경유한 산화성 인산화이고, 상기 과정을 통하여 포도당 또는 지방산과 같은 연료 물질의 대사로부터 유래되는 에너지가 ATP로 전환되며, 이는 다양한 에너지-요구 생합성 및 다른 대사성 활성을 추진시키는 데 이용된다.

[0004] 미토콘드리아 내에서는 호기성 해당과정인 TCA 사이클에 의해 에너지 생성에 필요한 NADH가 생산되고, NADH 는 전자전달계를 통해 전자를 전달하면서 미토콘드리아 내의 수소이온(H+)을 외부로 운송한다. 이로 인해 미토콘드리아 내막과 외부에는 수소이온 농도차이에 의해 생기는 높은 전기화학 포텐셜, -150mV 정도의 미토콘드리아 막전위(Ψm)가 형성되고 이 막전위는 미토콘드리아의 ATP 합성 효소 복합체에서 ATP 를 합성하기 위한 힘으로 작용하여 최종적으로 미토콘드리아에서 ATP가 합성되게 된다.

[0005] 미토콘드리아에 산화스트레스를 유발하는 요소인 활성 산소종(ROS)의 생성이 증가되면 이는 DNA를 손상시키고 결국 세포를 사멸로 유도 할 수 있게 된다. 생체에너지 대사의 중추적 역할을 담당하고 있는 미토콘드리아는 자신의 독립된 DNA을 갖고 있고, 이는 핵 DNA와 분리되어 있으며, 약 16,000 염기쌍을 갖는 환형의 DNA이다. 미

토콘드리아를 구성하는 대부분의 단백질은 핵으로부터 코딩되지만 ATP생산과 관련된 중요한 13개의 단백들은 자체 DNA에 의해서만 코딩된다. 미토콘드리아 DNA는 산소 및 유리 라디칼 등과 같은 활성 산소종(ROS)과 계속 접촉하는 환경에 있지만, 핵 DNA와 비교할 때 히스톤 단백에 의한 보호를 받지 못하며, 손상에 대한 복구능력이 효과적이지 못하기 때문에 쉽게 유전자 변이가 발생할 수 있다. 실제로 미토콘드리아 DNA는 핵 DNA에 비해 10배 이상 빨리 유전자 변이가 발생한다는 사실이 잘 알려져 있다.

[0006] 한편, 인간에게 있어서 다양한 세포 내외의 자극 및 스트레스는 미토콘드리아 막의 탈분극을 야기하며, 이러한 탈분극은 미토콘드리아 기능이상이 중요한 원인으로 알려져 있다. 대부분의 미토콘드리아 DNA는 단백질을 코딩하므로 돌연변이가 발생하면 기능 이상으로 직결될 가능성이 크다. 미토콘드리아의 기능부전은 다양한 질환 상태를 유발한다. 허혈성뇌질환 및 허혈성심질환 등의 허혈성질환, 파킨슨병, 알쯔하이머병, 근위축성측색경화증(ALS), 미토콘드리아뇌근증, 뇌신경질환 및 노화 등은 미토콘드리아의 이상에 의한 기능 장해라고 인정되고 있으며 세계적으로 미토콘드리아와 관련된 연구가 빠르게 진행되고 있는 추세에 있다.

[0007]

[0008] 또한, 당뇨, 비만, 고혈압, 뇌졸중, 심장병 등과 같은 각종 성인병 증상들이 한 사람에게 복합적으로 나타나는 증상인 대사증후군(Metabolic Syndrome)은 현재 전체 성인 인구의 30~40%가 가지고 있는 증상으로서, 이러한 대사증후군의 발병은 미토콘드리아의 기능 손상에 그 원인이 있는 경향이 매우 강하다는 사실이 최근에 밝혀졌다.

[0009]

[0010] 한편, [(6R)-L-에리트로-5,6,7,8-테트라하이드로비옵테린(BH4)](이하, BH4라 함)는 구아노신 트리포스페이트를 기질로 하여, 세피아테린 환원효소(sepiapterin reductase, Spr)를 최종 단계로 생합성되는 조효소이다. 상기 BH4는 내피 NOS(산화질소 합성효소, nitric oxide synthase)와의 커플링에 의해 이량체를 형성하여 NO를 생산할 수 있다.

[0011] 상기 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)는 NO 뿐만 아니라 초과산화물 음이온 등의 활성 산소종(ROS)도 생산할 수 있다. BH4는 NOS에 의한 NO와 초과산화물 음이온 등의 활성 산소종(ROS)의 생성 비율에 영향을 미치기 때문에 NOS의 필수적인 보조 인자로 작용한다. 상기 BH4의 농도가 낮은 조건에서, 내피 NOS는 NO 대신에 독성 산화물 라디칼인 수퍼옥사이드 음이온 등의 활성 산소종(ROS)을 생성하며, 상기 수퍼옥사이드 음이온은 NO와 신속하게 반응하여 혈관독성 과산화질소(peroxynitrite)를 형성하고, 그 결과 NO가 소실되게 된다. 이러한 반응은, 내피 NOS가 NO보다 오히려 수퍼옥사이드를 생산하는 상태로 이르도록 하며, 내피 NOS의 이러한 언커플링(uncoupling) 현상은 산화제 스트레스(oxidant stress)를 야기시킨다.

[0012]

[0013] 이러한 산화 스트레스는 상기 활성산소종(ROS)의 작용과 함께 다수의 산화환원-민감성 신호 경로(redox sensitive signalling pathways)와의 상호작용을 통해 동맥경화증과 같은 심혈관 질환의 발병에 중요한 역할을 한다. 최근 노화 또는 질병에 의한 산화스트레스 증가시에 BH4는 쉽게 산화되고, 이에 따라 NOS와 언커플링(uncoupling)이 일어나면서 신체 대사기능에 영향을 미친다고 보고 되고 있다. 또한, 신경 전달 물질 형성, 혈관이완, 및 면역 반응과 관련된 병리학적 상태 및 다수의 생물학적 과정에 중요한 역할을 한다. BH4의 생산 결핍은 "비정형" 페닐케톤뇨증과 관련되며, 죽상동맥경화증, 당뇨병, 고콜레스테롤혈증 및 흡연에 있어서의 내피의 기능장애에 대한 기초를 제공한다. 또한, 만성 흡연자에서 내피 의존성 혈관확장을 향상시키며, 인간의 관상동맥 혈류 반응은 BH4의 적용에 의해 유의적으로 개선된다고 보고되고 있다.

[0014] 각종 외적 또는 내적요인의 작용으로부터 미토콘드리아 막을 보호하고, 생리적인 막전위를 안정화 또는 유지시켜 미토콘드리아의 에너지 대사 능력을 회복시키거나 미토콘드리아의 산화 스트레스를 감소시켜 궁극적으로 세포사를 억제하는 물질로 BH4가 적용 가능하다면, 이들 질환의 치료나 예방에 유용한 물질로 기능할 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0015] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의

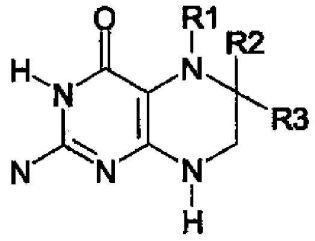
약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 하는 미토콘드리아 질환 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0016] 더욱 상세하게는 미토콘드리아의 에너지 대사 능력 및 세포사멸을 컨트롤할 수 있는 상기 미토콘드리아 질환 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

[0017] 본 발명은 하기 화학식 I:

[0018] [화학식 I]

[0019] 

[0020] [식 I 에서 R^1 및 R^2 는 각각 수소 원자를 나타내거나, 또는 R^1 및 R^2 는 함께 단일 결합을 형성하며, R^1 및 R^2 각각 동시에 수소 원자를 나타내는 경우, R^3 는 $-CH(OH)CH(OH)CH_3$, $-CH(OCOCH_3)CH(OCOCH_3)CH_3$, $-CH_3$, $-CH_2OH$ 또는 페닐기를 나타내고, R^1 및 R^2 가 함께 단일 결합을 형성하는 경우, R^3 은 $-COCH(OH)CH_3$ 를 나타낸다] 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 하는 미토콘드리아 질환 치료용 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명에 있어서 상기 화학식 I 로 표시되는 화합물은 [(6R)-L-에리트로-5,6,7,8-테트라하이드로비옵테린(BH4)]인 것을 특징으로 한다.

[0022] 본 발명에서 상기 질환 치료용 조성물은 미토콘드리아의 막전위를 안정화 또는 유지시키는 것을 특징으로 한다.

[0023] 본 발명에서 상기 질환 치료용 조성물은 미토콘드리아의 산화적 인산화과정을 통한 ATP 에너지 합성시 소모되는 산소량을 증가시키는 것을 특징으로 한다.

[0024] 본 발명에서 상기 질환 치료용 조성물은 미토콘드리아에서 생성되는 ATP 에너지의 양을 증가시키는 것을 특징으로 한다.

[0025] 본 발명에서 상기 질환 치료용 조성물은 미토콘드리아의 활성 산소종의 생산량을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[0026] 본 발명에서 상기 질환 치료용 조성물은 미토콘드리아 DNA의 산화적 손상량을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

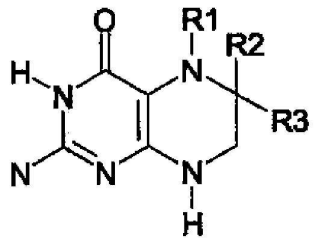
[0027] 본 발명에서 상기 질환 치료용 조성물은 미토콘드리아 DNA의 파쇄 (fragmentation)를 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[0028] 본 발명에서 상기 질환은 허혈성 뇌질환 및 허혈성 심질환 등의 허혈성질환; 파킨스 질환, 알쯔하이머 질환 및 헌팅톤 질환 등의 신경퇴행성 질환; 근위축성측색경화증(ALS) 또는 미토콘드리아뇌근증; 자폐증 및 우울증 등의 정신질환; 당뇨, 비만, 뇌졸중, 심장병, 동맥경화, 고혈압, 고콜레스테롤증; 및 비정형 페닐케톤뇨증인 것을 특징으로 한다.

[0029] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0030] 본 발명은 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 하기 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 유효 성분으로 미토콘드리아 질환 치료용 조성물을 제공한다.

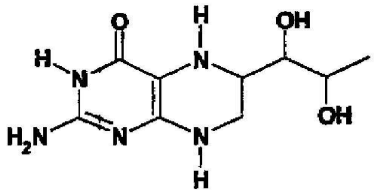
[0031] [화학식 I]



[0032]

[0033] [식 I 에서 R^1 및 R^2 는 각각 수소 원자를 나타내거나, 또는 R^1 및 R^2 는 함께 단일 결합을 형성하며, R^1 및 R^2 각각 동시에 수소 원자를 나타내는 경우, R^3 는 $-CH(OH)CH(OH)CH_3$, $-CH(OCOCH_3)CH(OCOCH_3)CH_3$, $-CH_3$, $-CH_2OH$ 또는 페닐기를 나타내고, R^1 및 R^2 가 함께 단일 결합을 형성하는 경우, R^3 은 $-COCH(OH)CH_3$ 를 나타낸다].

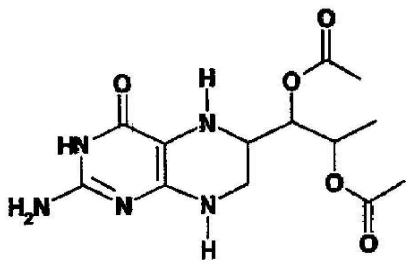
[0034] 본 발명의 상기 화학식 I 로 표시되는 화합물의 특정 예들은 하기 화합물들 및 그의 약학적으로 유효한 염들을 포함한다. 본 발명에서 유용하게 사용될 수 있는 [(6R)-L-에리트로-5,6,7,8-테트라하이드로비옵테린 (BH4)] 또는 이의 유도체에는 EP0908182 및 EP0079574에 하기와 같은 화합물 및 이의 약학적으로 허용 가능한 염이 언급되어 있다:



[0035]

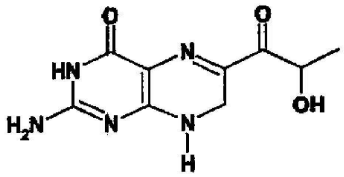
[0036] [(6R)-L-에리트로-5,6,7,8-테트라하이드로비옵테린 (BH4)]

[0037] [(6R, S)-5,6,7,8-테트라하이드로비옵테린]



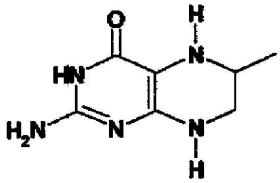
[0038]

[0039] [1', 2'-디아세틸-5,6,7,8-테트라하이드로비옵테린]



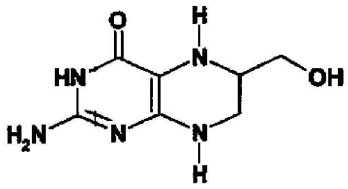
[0040]

[0041] [세피압테린]



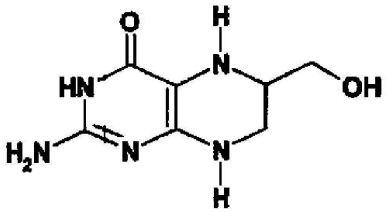
[0042]

[0043] [6-메틸-5,6,7,8-테트라하이드로비옵테린]



[0044]

[0045] [6-히드록시메틸-5,6,7,8-테트라하이드로비옵테린]



[0046]

[0047] [6-페닐-5,6,7,8-테트라하이드로비옵테린]

[0048] 상기 화합물들 중 바람직한 화합물들은 5,6,7,8-테트라하이드로비옵테린 및 그의 염들이다. 가장 바람직한 화합물은 [(6R)-L-에리트로-5,6,7,8-테트라하이드로비옵테린(BH4)] 또는 그의 염이다.

[0049] 상기 화합물은 적절한 염으로서 사용될 수 있다. 이러한 염의 예들은, 염화수소산, 인산, 황산 또는 붕산과 같은 무기산, 및 아세트산, 포름산, 말레산, 푸마르산 또는 메탄술폰산과 같은 유기산을 포함하는 약리학적으로 비독성인 산의 염들을 포함한다.

[0050] 본 발명의 상기 미토콘드리아 질환 치료용 조성물은 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염을 일반적인 약학 제제에 사용되는 담체와 혼합하여 제조될 수 있으며, 경구, 직장 및 비경구 투여 방식에 적합한 약제로 제조될 수 있다.

[0051] 상기 약학 제제에 사용되는 담체는 투여 형태에 따라 달리 선택될 수 있으며, 부형제, 결합제 및 붕괴제의 담체

를 포함할 수 있다. 상기 부형제는 전분, 락토오스, 사카로오스, 글루코오스, 만니톨 및 셀룰로오스로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 상기 결합제는 폴리비닐피롤리돈, 전분, 사카로오스, 히드록시프로필셀룰로오스 및 검 아라빅으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 상기 붕괴제는 전분, 한천, 젤라틴 분말, 셀룰로오스 및 CMC로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 또한 상기 기재된 것 이외에도 일반적으로 사용되는 부형제, 결합제 및 붕괴제가 선택될 수 있다.

[0052] 본 발명의 상기 미토콘드리아 질환 치료용 조성물은 상기 유효 성분의 안정화를 위해 상기 담체들에 추가하여 산화방지제를 함유할 수 있다. 상기 산화방지제는 약학 제제에 일반적으로 사용되는 것으로 아스코르브산, N-아세틸시스테인, L-시스테인, dl-α-토코페롤 및 천연 토코페롤으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염(유효성분)에 대하여 0.2 내지 2.0 : 1의 중량비로 사용되는 것이 바람직하다.

[0053] 또한, 완충제, 풍미 첨가제, 계면활성제, 증점제, 그리스(grease) 및 윤활제로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 보조 성분들을 추가로 첨가할 수도 있다.

[0054] 본 발명의 상기 미토콘드리아 질환 치료용 조성물은 경구 투여에 적합한 방식으로 정제, 설하정, 캡슐, 분말, 가루약, 과립 및 세립제(parvules)의 형태나 또는 시럽, 에멀젼 및 비수성 액체 중의 현탁액 형태로 제공될 수 있다.

[0055] 본 발명의 상기 미토콘드리아 질환 치료용 조성물은 직장 투여에 적합한 방식으로 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 카카오 버터 등의 일반 담체와 혼합하여 좌약으로서 제조될 수 있다.

[0056] 본 발명의 상기 미토콘드리아 질환 치료용 조성물은 비경구 투여에 적합한 방식으로 건조 고체 형태의 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 질소로 정화된 멸균 용기 내로 봉입함으로써 제조될 수 있다.

[0057] 투여되는 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염의 양은 투여 경로, 치료될 증상 및 환자에 따라 다르다. 투여량은 0.1 내지 50 mg/kg(체중)/일 의 범위 내이며, 바람직하게는 0.5 내지 10 mg/kg(체중)/일 의 범위로 투여될 수 있다. 또한 하루 1 회 투여되거나 또는 하루에 2 회 내지 4 회로 분할 투여될 수도 있다.

[0058] 본 발명의 상기 미토콘드리아 질환 치료용 조성물은 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염과 함께 NOS의 기질, 조효소 또는 보조인자인 L-아르기닌, 플라빈(FAD, FMN 등) 및 칼슘으로 이루어지는 군으로부터 선택된 성분을 보조 유효 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 미토콘드리아 질환 치료용 조성물에 함유된 상기 보조 유효 성분의 비율은 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염(유효성분)에 대해 0.1 내지 10의 중량비에서 선택될 수 있고 바람직하게는 0.5 내지 2의 중량비에서 선택될 수 있다.

[0059] 상기 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염(유효성분)과 상기 보조 유효 성분의 혼합 조성물을 치료에 사용하는 경우, 적합한 투여량은 이들 유효 성분의 총 양으로서, 0.1 내지 50 mg/kg(체중)/일 의 범위 내이고, 바람직하게는 0.5 내지 10 mg/kg (체중)/일 의 범위 내에서 투여될 수 있다.

[0060] 치료시 연령, 증상 등을 고려하여 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염(유효성분)만을 함유하는 제제를 사용하거나 또는 상기 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염뿐만 아니라 기타

보조 유효 성분들도 함유하는 제제 중에서 적절하게 선택될 수 있다.

[0061] 본 발명에서 상기 질환 치료용 조성물은 미토콘드리아의 막전위를 안정화 또는 유지시키는 것을 특징으로 한다.

[0062] 본 발명에서 상기 질환 치료용 조성물은 미토콘드리아의 산화적 인산화과정을 통한 ATP 에너지 합성시 소모되는 산소량을 증가시키는 것을 특징으로 한다.

[0063] 본 발명에서 상기 질환 치료용 조성물은 미토콘드리아에서 생성되는 ATP 에너지의 양을 증가시키는 것을 특징으로 한다.

[0064] 본 발명은 미토콘드리아 막에 작용하여 막전위를 안정화 또는 유지시키는 작용을 가지고 있다. 각종 외적 요인 또는 내적 요인에 의한 탈분극 작용으로부터 미코콘드리아 막을 보호하는 것과 동시에 미토콘드리아 막의 생리적인 분극 상태를 유지 또는 회복시켜 미토콘드리아에서의 ATP 에너지 생산능력을 유지 내지 회복시키는 작용을 가진다.

[0065] 내적 또는 외적 요인에 의해 세포내의 칼슘 이온 농도가 증가하면, 미토콘드리아 내부의 칼슘 이온 농도도 증가되고, 미토콘드리아 막의 탈분극이 일어나서 ATP 생산 능력은 저하되게 된다. 본 발명은 상기 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염이, 더욱 바람직하게는 [(6R)-L-에리트로-5,6,7,8-테트라하이드로비옵테린(BH4)]가 미토콘드리아 막전위를 안정화 또는 유지시켜서 산소를 소모하는 산화적 인산화 과정을 통하여 ATP 에너지의 생산능력을 생리적인 상태로 회복시키도록 도와준다.

[0066] 본 발명에서 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 상기 질환 치료용 조성물은 미토콘드리아의 활성 산소종의 생산량을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[0067] 또한, 본 발명에서 상기 질환 치료용 조성물은 미토콘드리아 DNA의 산화적 손상량을 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[0068] 또한, 본 발명에서 상기 질환 치료용 조성물은 미토콘드리아 DNA의 파쇄 (fragmentation) 를 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[0069] 미토콘드리아는 세포의 내부, 외부에서 기인하는 스트레스에 의해 세포의 사멸(apotosis)을 유도하는 메커니즘의 활성화시켜 궁극적으로 세포사를 유발할 수 있다. 스트레스나 방사선 자극과 같은 지나친 내부, 외부 자극은 미토콘드리아로 하여금 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 과다 생성하도록 한다. 상기 과다 생성된 활성 산소종은 미토콘드리아 DNA의 손상을 야기시키게 되고 이로 인해 궁극적으로는 세포의 사멸이 야기될 수 있다.

[0070] 미토콘드리아 DNA는 히스톤 단백질에 의해 보호가 되지 않아 세포의 내부, 외부 스트레스에 의해 DNA는 손상이 쉽게 일어날 수 있다. 이는 세포 내부에 신호를 전달하여 세포의 사멸을 유도하는 메커니즘을 활성화 시키고 궁극적으로는 세포의 사멸을 유도할 수 있다.

[0071] 본 발명은 상기 화학식 I 로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염이, 더욱 바람직하게는 [(6R)-L-에리트로-5,6,7,8-테트라하이드로비옵테린(BH4)]가 미토콘드리아의 활성 산소종 생성량 및 미토콘드리아 DNA의 손상을 감소시켜서 세포의 사멸을 유도하는 메커니즘을 불활성화 시킨다. 따라서, 이로 인해 미토콘드

리아의 기능을 생리적인 상태로 회복시키도록 도와준다.

[0072] 본 발명에서 상기 미토콘드리아 질환은 미토콘드리아 기능 이상에 기인하거나 미토콘드리아 기능 이상을 수반하는 질환을 의미한다. 상기 기능 이상은 상기와 같은 ATP 에너지의 생산능력의 저하를 포함해 미토콘드리아 기능에 실질적으로 어떠한 이상이 발생한 것을 전부 포함하는 개념으로 사용된다.

[0073] 또한, 상기 질환은 미토콘드리아 기능 부전에 기인한다고 알려진 질환으로 유전성 결함 미토콘드리아를 포함하는 선청성 질환뿐만 아니라, 후천성 질환을 포함한다.

[0074] 본 발명에서 상기 질환은 허혈성 뇌질환 및 허혈성 심질환 등의 허혈성질환; 파킨스 질환, 알쯔하이머 질환 및 헌팅톤 질환 등의 신경퇴행성 질환; 근위축성측색경화증(ALS) 또는 미토콘드리아뇌근증; 자폐증 및 우울증 등의 정신질환; 당뇨, 비만, 뇌졸중, 심장병, 동맥경화, 고혈압, 고콜레스테롤증; 및 비정형 페닐케톤뇨증인 것을 특징으로 한다.

효 과

[0075] 본 발명에 따른 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 그의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효 성분으로 하는 미토콘드리아 질환 치료용 조성물의 경우, 미토콘드리아의 막전위를 안정화 또는 유지시킴으로서 ATP 에너지 합성 능력을 향상시킬 수 있다. 또한 활성 산소종의 생성 및 DNA의 손상을 감소시킴으로서 세포의 사멸을 억제할 수 있을 것이다.

[0076] 또한, 본 발명은 미토콘드리아 기능 이상에 기인하거나 미토콘드리아 기능 이상을 수반하는 다양한 질환의 치료용 조성물로 기능할 수 있을 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0077] 이하에서 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 본 발명이 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0078] < 실시예 1 > 실험동물의 제조

[0079] 세피아테린 환원효소(sepiapterin reductase, Spr)는 [(6R)-L-에리트로-5,6,7,8-테트라하이드로비옵테린(BH4)](이하, BH4라 함)의 생합성에 필수적인 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실시예에는 BH4가 결핍된 마우스 모델을 제조하기 위하여 spr 유전자가 녹아웃(knock-out)된 마우스(spr- 마우스)를 하기의 통상적인 녹아웃 마우스의 제조방법에 따라 제조하였다.

[0080] 녹아웃 마우스는 유전자 조작을 통해 내인성 유전자의 발현이 억제됨을 특징으로 하는 형질전환된 포유동물의 특수 유형이다. 특정 내인성 유전자의 파괴는 유전자의 일부를 결실시키거나 널(null) 대립유전자를 생성시키는 다른 서열로 치환시킴으로써 달성될 수 있다. 널 대립유전자를 갖는 이종교배된 동물은 유전자의 활성 복제물이 결여된 동형접합 포유동물을 출산할 수 있다. 다수의 이러한 녹아웃 마우스들이 발생되어 왔으며 미국 특허 제5,616,491호에는 CD28 및 CD45가 억제된 녹아웃 마우스가 기재되어 있다.

[0081] [시험예 1] 제조된 실험동물의 확인

[0082] 1-1. 마우스의 크기 및 체중 확인

[0083] 정상(wild type, WT) 마우스와 비교하여 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 체중을 측정하였다. 도 1a에 도시되는 것과 같이 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스는 정상(wild type, WT) 마우스에 비해 1/3 이하의 크기를 나타내었고, 정상(wild type, WT) 마우스의 체중이 20g 미만인 것에 비해, 약 6g 정도의 체중을 나타내어 spr 유전자를 녹아웃 시켰을 때 마우스의 성장 발육 자체가 현저히 저하된 것을 확인할 수 있었다.

[0084] 1-2. 마우스의 유전자형 확인

[0085] 도 1b에서는 이들 마우스에서 세피아테린 환원효소(sepiapterin reductase, Spr)의 유전자형을 겔(gel) 전기영동을 이용하여 분석하였다. 전기영동 사진의 왼쪽은 DNA 사이즈 마커를 나타낸다. +/-는 세피아테린 환원효소(sepiapterin reductase, spr) 유전자의 이형접합체, -/-는 세피아테린 환원효소(sepiapterin reductase, spr) 유전자의 동형접합체 및 +/+는 세피아테린 환원효소(sepiapterin reductase, spr) 유전자의 야생형인 정상(wild type, WT) 의 유전자형을 나타낸다.

[0086] 본 시험에서 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스는 spr 유전자의 -/- 동형접합체의 유전자형을 나타내어 spr 유전자가 제대로 녹아웃된 마우스가 제조되었음을 확인할 수 있었다.

[0087] 1-3. BH4의 생합성 농도 및 spr 효소의 활성(activity) 측정

[0088] Spr 유전자를 녹아웃 시켰을 때, BH4의 생합성 농도가 감소되는지를 확인하기 위하여 정상(wild type, WT) 및 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 심장을 추출하였다.

[0089] 세피아테린 환원효소는 BH4의 생합성에 관여하는 효소로 이 유전자가 녹아웃 되었을 때 BH4의 생합성이 저하되는지를 도 2a에서 확인하였다. 그 결과 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스는 정상(wild type, WT) 마우스와 비교하여 BH4의 농도가 약 1/4에 불과하여 BH4의 생합성이 현저히 저하되었음을 확인할 수 있었다.

[0090] 도 2b에서는 spr 효소의 활성(activity) 정도를 측정하였다. 그 결과 정상(wild type, WT) 마우스에 비하여 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스에서 상기 효소의 활성이 1/4이하의 수준으로 감소됨을 확인할 수 있었다. 이는 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스에서 세피아테린 환원효소의 유전자가 녹아웃되어 상기 효소의 번역(translation)이 일어나지 않아서 상기 효소의 활성이 저하된 것이다.

[0091] 1-4. 마우스의 심장 조직 및 미토콘드리아 관찰

[0092] `

[0093] 정상(wild type, WT) 및 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 심장 조직을 비교하기 위하여 조직 염색을 수행하였다. 상기 심장 조직을 취하여 포르말린으로 고정시킨 다음 포르말린으로 고정한 심장 조직을 일정 두께의 심장 조직 절편으로 만들어 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin)으로 염색한 후 현미경으로 배율을 조정하면서 상기 조직을 관찰하였다.

[0094] 도 3a에서 제시된 바와 정상(wild type, WT) 마우스의 심장은 조직이 치밀하게 구성되어 있어서, 조직의 밀도가 높았으나, BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 경우는 조직의 치밀성이 낮고 조직의 손상이 관찰되었다. 또한, 도 3b에서 제시된 바와 같이 이들의 미토콘드리아의 모양, 크기 및 수를 관찰했을 때 정상(wild type, WT)과 비교하여 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스는 미토콘드리아의 수가 거의 절반으로 감소하였으며, 세포당 부피도 절반으로 감소하였다. 그러나, 미토콘드리아의 사이즈는 큰 차이가 없었다.

[0095] 본 시험에에서 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 조직의 밀도 감소와 세포내에 존재하는 미토콘드리아의 수 및

세포 당 부피 감소는 일치되는 결과를 보여준 것이다.

[0096] [시험예 2] 단백질체 동정 및 기능 분석

[0097]

[0098] 본 시험에서는 정상(wild type, WT) 및 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 심장내 미토콘드리아의 발현에 차이가 나는 단백질을 2차원 겔(gel) 전기영동과 1차원 액상 크로마토그래피 질량분석을 이용하여 동정하고자 하였다.

[0099] 먼저, BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 심장내 미토콘드리아의 단백질시료(분석용)와 정상(wild type, WT) 마우스의 심장내 미토콘드리아의 비교군 단백질 시료(비교군)를 통상적인 단백질 추출방법에 의해 추출하여 2차원 겔(gel) 전기영동을 하였다. 형광 분석에 의해 상기 전기영동한 겔(gel)을 분석하였고 이를 통해 상기 정상(wild type, WT) 및 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 발현에 차이가 나는 스팟을 분리하였다. 상기 분리된 스팟으로부터 단백질을 분리하여 질량분석방법을 통해 정상(wild type, WT) 마우스와 차이가 나는 단백질을 동정하였다.

[0100] 표 1은 정상(wild type, WT) 마우스와 비교하여 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스에 있어서 발현에 차이가 나는 단백질을 나타낸 것이다. 상기 단백질들의 상호 작용의 조합을 통해 이들 단백질들의 최종적 기능을 결정하였다. 본 발명에서 발현에 차이를 보이는 단백질들은 미토콘드리아의 기능에 관여하는 단백질들로 특히 전자전달계 메커니즘에 관여하는 단백질들이었다. 따라서, 미토콘드리아의 전자전달계 메커니즘의 기능을 평가하는 시험이 요구되었고, 하기의 실시예들에 의해 미토콘드리아의 기능을 평가하였다.

표 1

Protein name	Gene symbol[1]	score[2]	MwPi[3]	No. pept[4]	cov (%)[5]	ave. ratio[6]	p value	Molecular function[7]	Biological process[8]	KOG[9]
acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2	ACAA2	153	42260/8.33	1980	64	1.8	0.664	Other transferase	Other protein metabolism	I
acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)	ACAA2	266	42260/8.33	2549	81	2.4	0.067	Other transferase	Other protein metabolism	I
long-chain acyl-CoA dehydrogenase	ACADL	166	48266/8.34	2860	46	1.7	0.289	Dehydrogenase	Acyl-CoA metabolism;Electron	E
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	ACADL	205	48266/8.34	2860	46	-1.8	0.158	Dehydrogenase	Acyl-CoA metabolism;Electron	E
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	ACADL	221	48266/8.34	2860	49	1.7	0.173	Dehydrogenase	Acyl-CoA metabolism;Electron	E
acyl-Coenzyme A dehydrogenase, long-chain	ACADL	221	48266/8.34	2860	49	1.7	0.113	Dehydrogenase	Acyl-CoA metabolism;Electron	E
aconitase 2, mitochondrial	ACO2	132	86151/8.08	2060	35	ab	0.024	Dehydratase;Hydratase	Tricarboxylic acid pathway	C
Acyl-coenzyme A thioesterase 2, mitochondrial precursor	ACOT2	140	49849/6.91	1860	53	1.9	0.004	Molecular function unclassified	Biological process unclassified	S,O,J
acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	ACSL1	236	78928/6.81	3060	44	2.1	0.049	Other ligase	Fatty acid metabolism	I
cardiac muscle alpha actin 1 proprotein	ACTC1	186	42334/5.23	2358	68	-1.8	0.007	Actin and actin related protein	Exocytosis;Endocytosis;Transport;Cytokinesis;Cell	Z
programmed cell death 8	AIFM1	142	66852/9.23	1320	26	1.6	0.052	Molecular function unclassified	Apoptosis	T
albumin	ALB1	133	70700/5.75	1748	34	dap	0.086	Other transfer/carrier protein	transport	J,O
albumin	ALB1	231	70700/5.75	2340	48	-1.7	0.140	Other transfer/carrier protein	transport	J,O
albumin	ALB1	211	70700/5.75	2246	46	-2.4	0.067	Other transfer/carrier protein	transport	J,O
Aldh4a1 protein	ALDH4A1	66	60764/8.28	1054	32	-1.6	0.268	Dehydrogenase	Other carbon metabolism	E
mitochondrial ATP synthase beta subunit	ATP5B	172	56265/5.19	2259	51	1.9	0.084	Other ion channel;Hydrogen transporter;ATP	Purine metabolism;Electron transport	C
ATP synthase, H+ transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit	ATP5B	79	56265/5.19	1260	34	2.0	0.190	Other ion channel;Hydrogen transporter;ATP	Purine metabolism;Electron transport	C
ATP synthase, H+ transporting mitochondrial F1 complex, beta subunit	ATP5B	115	56265/5.19	1580	38	1.5	0.118	Other ion channel;Hydrogen transporter;ATP	Purine metabolism;Electron transport	C
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d	ATP5H	101	18736/5.52	1255	70	-1.8	0.221	Molecular function unclassified	Biological process unclassified	C
catalase	CAT	126	60013/7.72	1960	44	1.5	0.211	Peroxidase	Electron transport;Antioxidation and free radical removal	P
Cyc1 protein	CYC1	67	34725/9.02	949	37	2.5	0.115	Reductase	Oxidative phosphorylation	C
Cyc1 protein	CYC1	98	34725/9.02	1243	46	2.3	0.003	Reductase	Oxidative phosphorylation	C
es1 protein	D10JHU81E	90	28415/9.00	1149	59	-1.8	0.127	Molecular function unclassified	Biological process unclassified	R
2,4-dienoyl CoA reductase 1, mitochondrial	DECR1	113	36476/9.10	1659	44	1.8	0.114	Dehydrogenase;Reductase	Fatty acid beta-oxidation	R
mKIAA1147 protein	E330009J07RIK	75	41564/5.67	1060	35	1.8	0.100	Molecular function unclassified	Biological process unclassified	S

[0101]

Protein name	Gene symbol[1]	score[2]	MW/PI[3]	No. pept[4]	cov (%)[5]	ave. ratio[6]	p-value	Molecular function[7]	Biological process[8]	KOG[9]
enoyl coenzyme A hydratase 1, peroxisomal	ECH1	122	364377.60	1860	60	2.3	0.049	Synthetase;Dehydrogenase;Acetyltransferase;Acyltransferase;Hydratase;Epimerase/racemase;Ligase	Carbohydrate metabolism;Fatty acid beta-oxidation;Coenzyme metabolism;Vitamin biosynthesis	I
Echs1 protein -enoyl Coenzyme A hydratase, short chain, 1, mitochondrial	ECHS1	115	31636/8.76	1758	45	-2.8	0.004	Synthetase;Dehydrogenase;Acetyltransferase;Acyltransferase;Hydratase;Epimerase/racemase;Ligase	Carbohydrate metabolism;Fatty acid beta-oxidation;Coenzyme metabolism;Vitamin biosynthesis	I
muscle-specific enolase beta subunit	ENO3	165	47337/6.73	2063	56	-1.9	0.270	Lyase	Glycolysis	G
epoxide hydrolase 2, cytoplasmic	EPHX2	162	63045/5.85	1950	57	2.3	0.173	Hydrolase	Detoxification;Other metabolism	I
Protein NipSnap homolog 2 (NipSnap2)	GBAS	89	33083/9.31	1460	46	-1.7	0.170	Membrane trafficprotein	General vesicle transport	S
inner membrane protein, mitochondrial	IMMT	193	84247/6.18	2484	34	1.5	0.063	Molecular function unclassified	Biological process unclassified	M
inner membrane protein, mitochondrial	IMMT	171	84247/6.18	2460	36	2.5	0.043	Molecular function unclassified	Biological process unclassified	M
lactate dehydrogenase B	LDHB	90	36834/5.70	1368	31	2.1	0.118	Dehydrogenase	Glycolysis	C
mitochondrial ATP-dependent protease Lon	LONP1	150	106446/6.21	2660	30	-1.7	0.004	Serine protease	Proteolysis	O
Myosin-binding protein C	MYBPC3	128	141799/6.06	2264	23	-1.8	0.058	Molecular function unclassified	Muscle contraction	Z
Myosin-binding protein C	MYBPC3	222	141799/6.06	3160	35	-2.6	0.120	Molecular function unclassified	Muscle contraction	Z
myosin binding protein C	MYBPC3	292	141799/6.06	3660	39	-2.1	0.320	Molecular function unclassified	Muscle contraction	Z
myosin, light polypeptide 3	MYL3	175	22521/5.03	1760	80	-1.5	0.203	Actin binding cytoskeletal protein;Calmodulin related protein	Muscle contraction	Z
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 10	NDUFA10	147	40863/7.63	1760	60	-1.4	0.255	Oxidoreductase	Oxidative phosphorylation	T
NDUFS2 protein	NDUFS2	216	53698/6.43	2766	66	2.4	0.018	Dehydrogenase;Reductase	Oxidative phosphorylation	J
NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein	NDUFS8	75	24479/5.89	1161	46	-2.4	0.202	Dehydrogenase;Reductase	Oxidative phosphorylation	J
oxoglutarate dehydrogenase	OGDH	76	117572/6.36	1660	21	2.0	0.114	Dehydrogenase	Tricarboxylic acid pathway	G
3-oxoacid CoA transferase 1	OXCT1	95	56352/8.73	1760	45	-3.2	0.006	Other transferase	Carbohydrate metabolism;Fatty acid metabolism;Coenzyme metabolism	I
Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial precursor	PCCA	254	80498/6.83	3260	48	1.6	0.087	Other ligase	Gluconeogenesis	I
pyruvate dehydrogenase E1 alpha 1	PDHA1	70	43888/8.49	1460	31	3.1	0.024	Dehydrogenase	Carbohydrate metabolism	G
pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 2	PDK2	91	46267/6.13	1460	42	2.1	0.134	Protein kinase	Protein phosphorylation	T
succinate dehydrogenase Fp subunit	SDHA	232	73623/7.06	2760	55	3.5	0.037	Dehydrogenase	Carbohydrate metabolism;Oxidative phosphorylation	C
sarcalumenin	SRL	121	99522/4.39	2360	28	1.9	0.095	Select calcium binding protein	Muscle contraction;Muscle development	T
Ubiquinol-cytochrome-c reductase core protein 1	UQCRC1	140	53440/5.81	11/13	29	-1.5	0.269	Reductase;Metalloprotease	Proteolysis;Electron	O
ubiquinol cytochrome c reductase core protein 2	UQCRC2	95	48262/9.26	1460	35	80	0.153	Reductase;Metalloprotease	Proteolysis;Electron	C

[0102]

[0103] < 실시예 2 > BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스에서 미토콘드리아의 에너지 대사기능 장애 분석

[0104] 미토콘드리아는 에너지 대사에 관여하는 진핵세포에 존재하는 세포성 소기관이다. 미토콘드리아의 주 기능 중 하나는 전자전달계를 경유한 산화성 인산화이고, 상기 과정을 통하여 ATP 에너지가 합성된다. 이렇게 합성된 ATP 에너지는 다양한 에너지-요구 생합성 및 다른 대사성 활성을 추진시키는 데 이용된다.

[0105] 한편, 미토콘드리아내 정상적인 막전위의 유지는 미토콘드리아의 에너지 생성에 필수적인 것으로 알려져 있다. 따라서, 상기 단백질 동정을 통해 평가된 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스에서 전자전달계의 기능 손상을 확인하기 위한 방편으로 미토콘드리아 막전위와 ATP 에너지 합성 능력을 측정함으로써 상기 마우스에서 미토콘드리아의 에너지 대사능력을 평가하였다

[0106] < 실시예 2-1 > 미토콘드리아의 막전위 측정

[0107] 먼저 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스에서 미토콘드리아의 에너지 대사능력을 평가하기 위하여 정상(wild type, WT) 및 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스에서 미토콘드리아의 막전위를 측정하였다. 도 4a 및 4b에 도시된 바와 같이 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스는 정상 마우스의 약 40% 정도에 해당하는 막전위를 나타내었다.

[0108] BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스에서 막전위 소실은 전자전달계를 경유한 산화적 인산화 과정 동안 ATP 에너지 생성량에 영향을 줄 것이고 이는 궁극적으로 미토콘드리아의 에너지 대사량에 영향을 주어서 생체내에서 일어나는 다양한 에너지-요구 생합성 및 다른 대사성 활성도 저하시킬 것으로 추측된다.

[0109] 따라서, 상기 막전위 소실이 전자전달계를 경유한 산화적 인산화 과정 동안 ATP 에너지 생성량에 직접적으로 영향을 주는 지를 확인하기 위해서 에너지 합성이 진행되는 동안 소모되는 산소량 및 ATP 에너지 생성량이 측정될 필요가 있을 것이다.

[0110] < 실시예 2-2 > 미토콘드리아의 산화적 인산화과정 중 산소 소모량 측정

[0111] 미토콘드리아는 전자전달계를 통한 산화적 인산화라는 과정 동안 ATP 에너지를 생성하는데, 이 과정에서 산소를 소모하게 된다. 즉, 미토콘드리아 내에서는 호기성 해당과정인 TCA 사이클에 의해 에너지가 생산되므로 이 과정에서 산소의 소모는 필연적이다.

[0112] 도 5a 및 5b는 정상(wild type, WT) 및 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스에서 미토콘드리아의 전자전달계를 통한 산화적 인산화 과정 중 ATP 에너지 합성 동안 소모되는 산소량을 측정하였다. 그 결과 정상(wild type, WT) 마우스와 비교하여 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 경우는 에너지 합성 동안 소모되는 산소량이 에너지 합성이 진행될수록 점차 줄어들었다. 미토콘드리아 내에서는 호기성 해당과정인 TCA 사이클에 의해 에너지가 생산되고, 이 때 산소를 소모하게 되는데 상기 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스에서 산소 소모량이 점차 줄어들게 드는 것은 궁극적으로는 ATP 에너지 생성량도 감소될 수 있음을 시사한다.

[0113] < 실시예 2-3 > 미토콘드리아에서 생성되는 ATP 에너지량 측정

[0114] 도 6에서는 상기 실시예 2-2 에서 확인된 산소 소모량의 감소가 ATP 에너지 합성의 감소에 직접적으로 영향을 주는 지를 확인하기 위해서 심장 조직내 ATP 농도를 측정하였다. 그 결과 예측된 바와 같이 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스에서는 정상(wild type, WT) 마우스에 비교하여 ATP 에너지 농도가 약 1/8에 불과했다.

[0115]

[0116] 상기 실시예들을 통해서 마우스내에 BH4의 농도의 저하는 정상적인 막전위의 소실을 초래했으며, 그 결과 산화적 인산화 과정 동안 ATP합성은 1/8로 감소하였고 이 과정에서 산소 소모량은 현저히 줄어든 것을 볼 수 있다. 즉, BH4의 결핍은 미토콘드리아의 주된 기능인 전자전달계를 경유한 에너지 대사 능력을 감소시킨 것이다.

[0117] < 실시예 3 > 미토콘드리아의 산화스트레스를 통한 세포사 조절 능력 분석

[0118] < 실시예 3-1 > 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 생산량 측정

[0119] 미토콘드리아는 상기 에너지 대사 외에도 세포사 조절에 중요한 기능을 한다. 상기 실시예들에서 확인된 바와 같이 미토콘드리아 전자 전달계의 기능 손상은 정상적인 막전위를 소실시켰고 그 결과 에너지 대사 수준의 감소를 야기하였다. 뿐만 아니라 미토콘드리아는 세포의 내부, 외부에서 기인하는 스트레스에 의해 세포의 사멸(apotosis)을 유도하는 메커니즘을 활성화시켜 궁극적으로 세포사를 유발할 수도 있다. 스트레스나 방사선 자극과 같은 지나친 내부, 외부 자극은 미토콘드리아로 하여금 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)을 과다 생성하도록 한다. 또한, 활성 산소종의 과도한 생산은 지나친 산화 스트레스를 의미하며 결국 세포의 사멸을 유도하게 된다.

[0120] 도 7에서는 안티마이신(antimycin) A 1μm을 처리하여 미토콘드리아에 스트레스를 유발한 후 이들 마우스에서 활성 산소종의 합성량을 측정하였다. 상기 안티마이신(antimycin) A 는 전자전달계의 유바퀴놀(ubiquinol)의 산화를 억제하여 궁극적으로는 미토콘드리아의 ATP 에너지 합성을 저해하는 역할을 한다.

[0121] 도 7에서 제시된 바와 같이 시간이 경과할수록 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스에서는 활성 산소종의 생산이 정상(wild type, WT) 과 비교하여 현저히 증가되었다. 본 실시예를 통해 BH4의 결핍은 산화스트레스를 유발하는 활성 산소종의 생산을 증가시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 과도한 활성 산소증의 증가는 궁극적으로는 세포의 사멸을 이끌게 될 것이다.

[0122] < 실시예 3-2 > 미토콘드리아 DNA의 손상 및 DNA fragmentation 측정

[0123] 본 실시예에서는 상기와 같은 미토콘드리아의 활성 산소종의 증가와 관련하여 세포 내부적으로 미토콘드리아 DNA(mtDNA)의 손상이 일어나는 지를 확인하였다.

[0124] 도 8a에세 도시된 바와 같이 8OH-2dG 방법을 이용하여 미토콘드리아 DNA 의 산화적 손상을 비교한 결과, 활성산소 증가와 비례하여 미토콘드리아 DNA의 산화적 손상이 정상(wild type, WT) 에 비해 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스에서 2배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0125]

[0126] 도 8b 및 8c에서는 증가된 활성 산소종에 의해 미토콘드리아 DNA가 손상되었는지를 확인하기 위하여 DNA의 파쇄 정도를 확인하였다. 먼저 이들 마우스의 미토콘드리아로부터 게놈 DNA를 추출한 후 DNA 파쇄(fragmentation) 정도를 겔(gel) 전기영동방법을 통해 확인하였다. 그 결과 정상(wild type, WT) 에 비해 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 미토콘드리아의 게놈 DNA는 디그라데이션(degradation)되어서 파쇄된 형태를 나타내었고, 이는 정상(wild type, WT) 마우스에 비하여 약 1.5배 정도 이상의 DNA가 파쇄되었음을 확인할 수 있었다.

[0127] BH4의 결핍은 활성 산소종의 생산량 증가 및 상기 증가된 활성 산소종에 의해 미토콘드리아 DNA의 손상을 야기시켰고 이로 인해 궁극적으로는 세포의 사멸을 야기할 것이다.

[0128] 미토콘드리아 DNA는 히스톤 단백질에 의해 보호가 되지 않아 세포의 내부, 외부 스트레스에 의해 DNA는 손상이 쉽게 일어나게 된다. 그 결과는 세포 내부에 신호를 전달하여 세포의 사멸을 유도하는 메커니즘을 활성화 시킬 것이고 이는 궁극적으로는 세포의 사멸을 유도할 것으로 추측된다.

도면의 간단한 설명

[0129] 도 1a는 정상(wild type, WT) 및 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 크기 및 체중을 나타내고, 도 1b는 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 유전자형을 나타낸다.

[0130] 도 2a 및 2b는 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 BH4의 생합성 농도와 spr 효소 활성 정도를 나타낸다.

[0131] 도 3a는 정상(wild type, WT) 및 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 심장 조직, 도 3b는 정상(wild type, WT) 및 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 심장 미토콘드리아의 모양, 크기 및 수를 비교한 것이다.

[0132] 도 4a 및 4b는 정상(wild type, WT) 및 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 미토콘드리아 막전위를 측정한 것이다.

[0133] 도 5a 및 5b는 정상(wild type, WT) 및 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 미토콘드리아의 산소 소모량을 측정한 것이다.

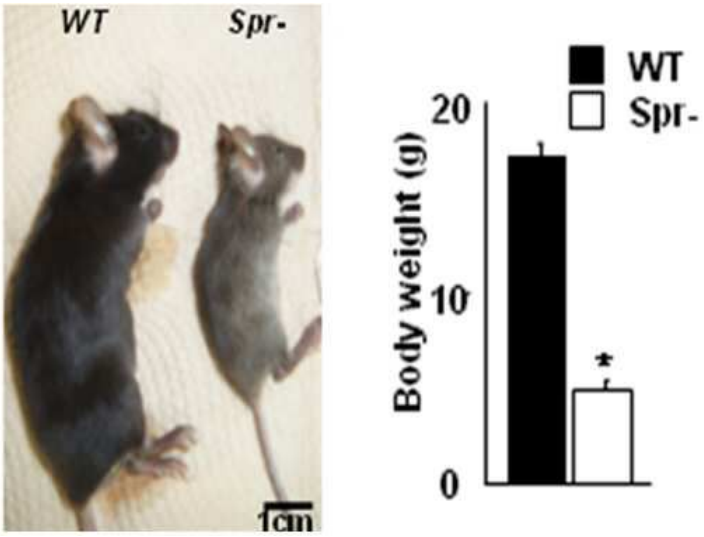
[0134] 도 6c는 정상(wild type, WT) 및 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 심장 조직중의 ATP 함량을 측정한 것이다.

[0135] 도 7은 정상(wild type, WT) 및 BH4 생성이 결핍된 spr- 마우스의 활성 산소종의 생성량을 측정한 것이다.

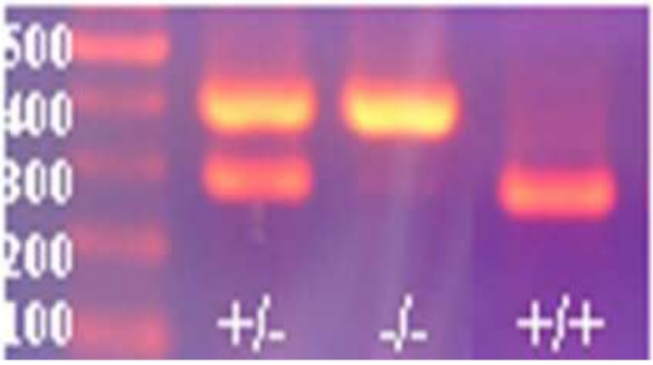
[0136] 도 8a는 8OH-2dG 방법을 이용한 미토콘드리아 DNA의 산화적 손상량을 나타내고, 8b 및 8c는 DNA 파쇄(fragmentation) 및 그 비율을 나타낸 것이다.

도면

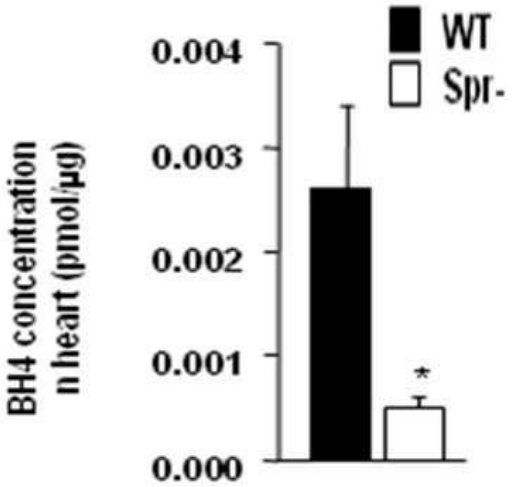
도면1a



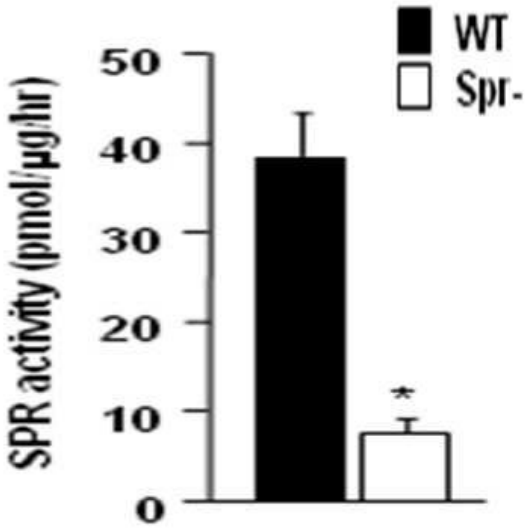
도면1b



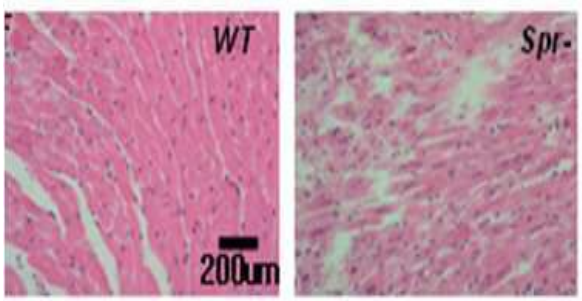
도면2a



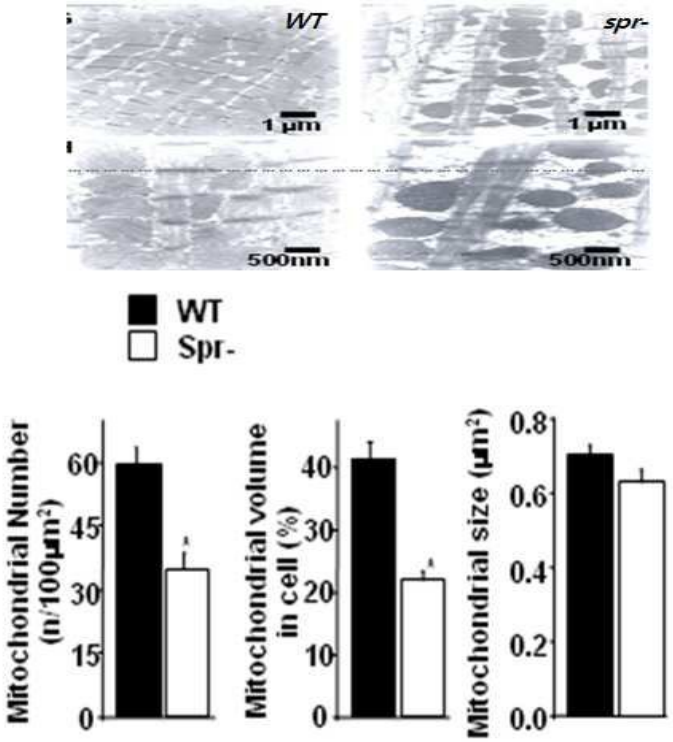
도면2b



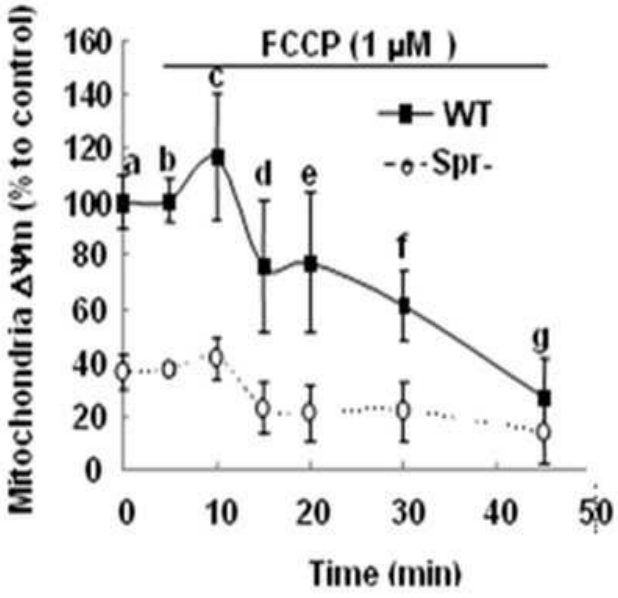
도면3a



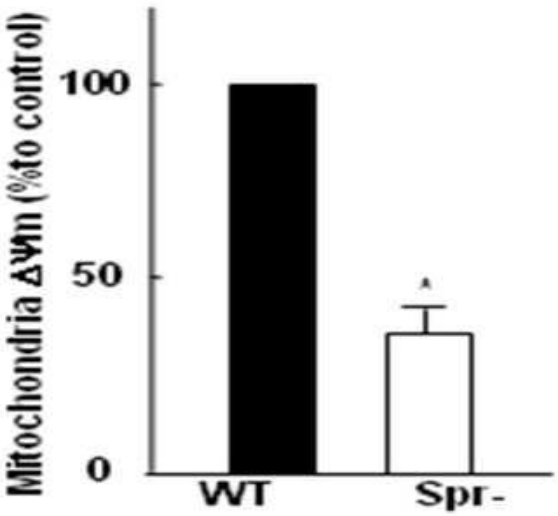
도면3b


WT
spr-
1 μm
1 μm
500nm
500nm
WT
Spr-
Mitochondrial Number (n/100μm²)
Mitochondrial volume in cell (%)
Mitochondrial size (μm²)
0
15
30
45
60
0
10
20
30
40
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8

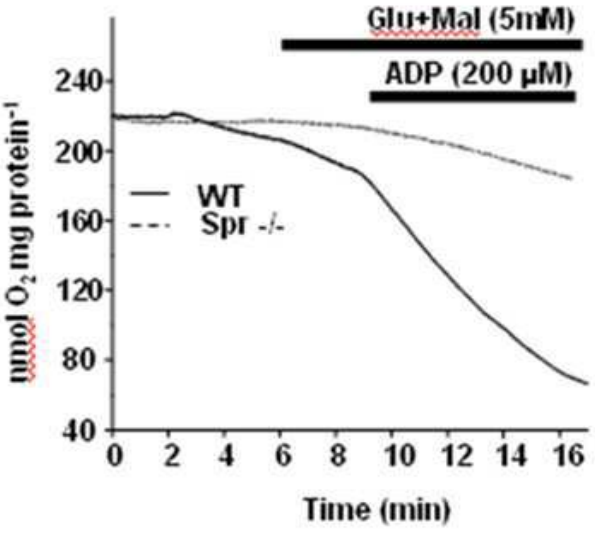
도면4a


FCCP (1 μM)
WT
Spr-
Mitochondria ΔΨm (% to control)
Time (min)
a
b
c
d
e
f
g
0
20
40
60
80
100
120
140
160
0
10
20
30
40
50

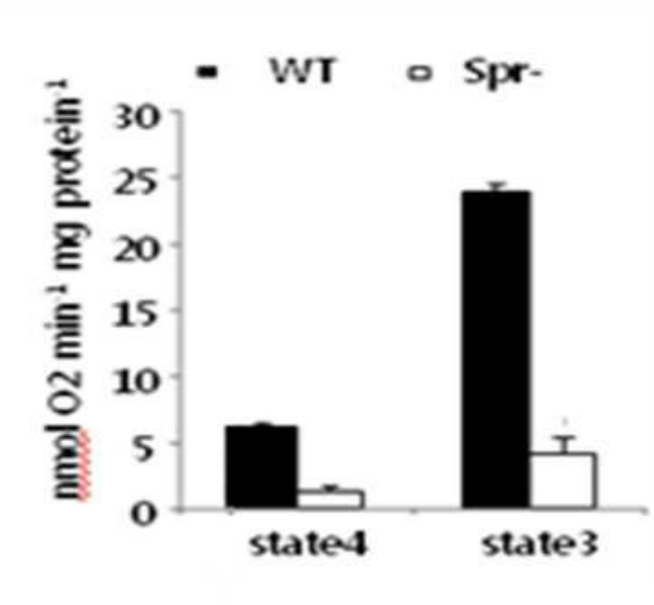
도면4b


Mitochondria ΔΨm (%to control)
100
50
0
WT
Spr-

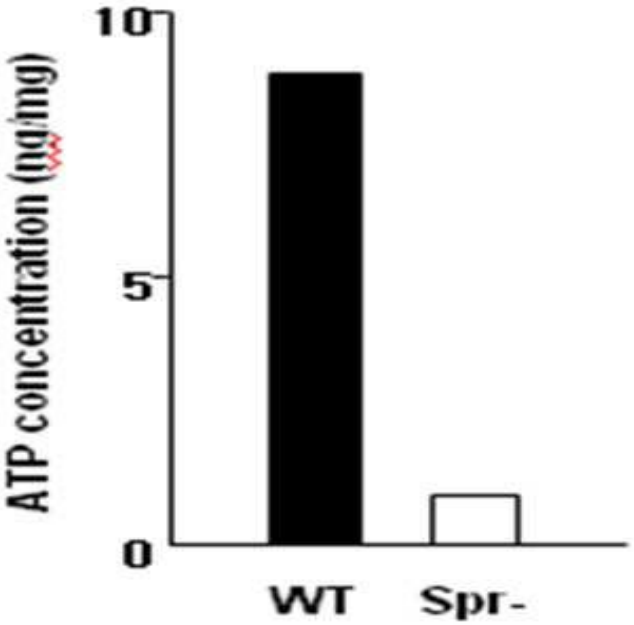
도면5a


Glu+Mal (5mM)
ADP (200 μM)
nmol O2 mg protein-1
240
200
160
120
80
40
WT
Spr -/-
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Time (min)

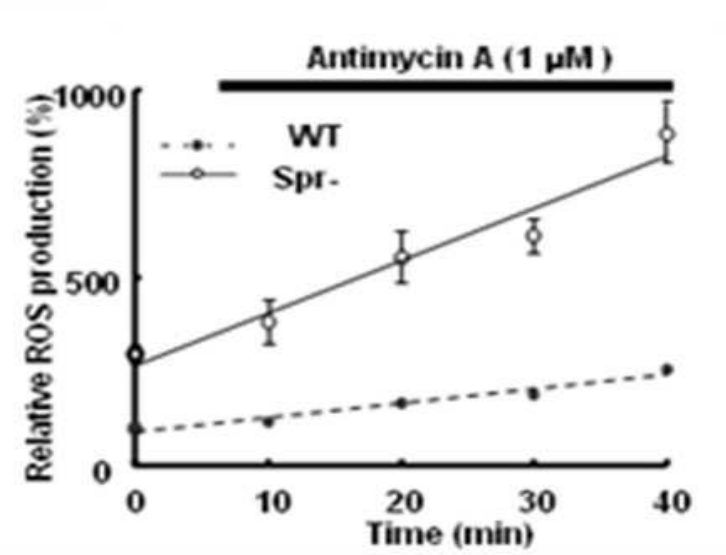
도면5b


WT
Spr-
nmol O2 min-1 mg protein-1
30
25
20
15
10
5
0
state4
state3

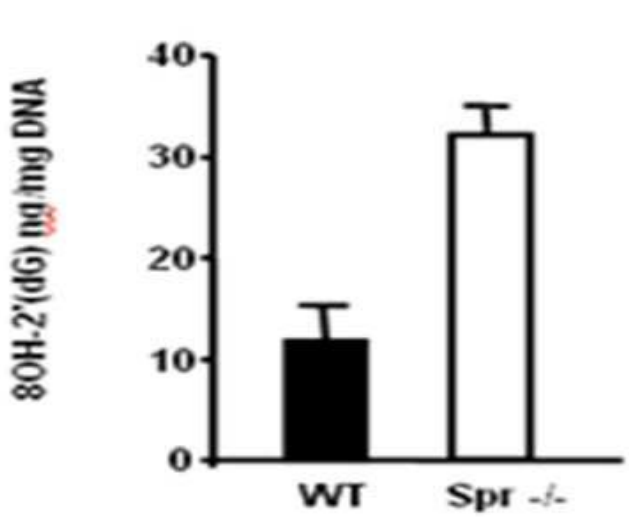
도면6


ATP concentration (ng/mg)
10
5
0
WT
Spr-

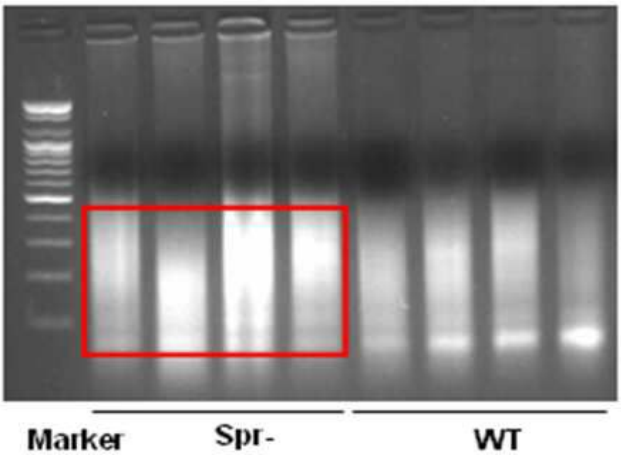
도면7


Antimycin A (1 μM)
Relative ROS production (%)
1000
500
0
WT
Spr-
0
10
20
30
40
Time (min)

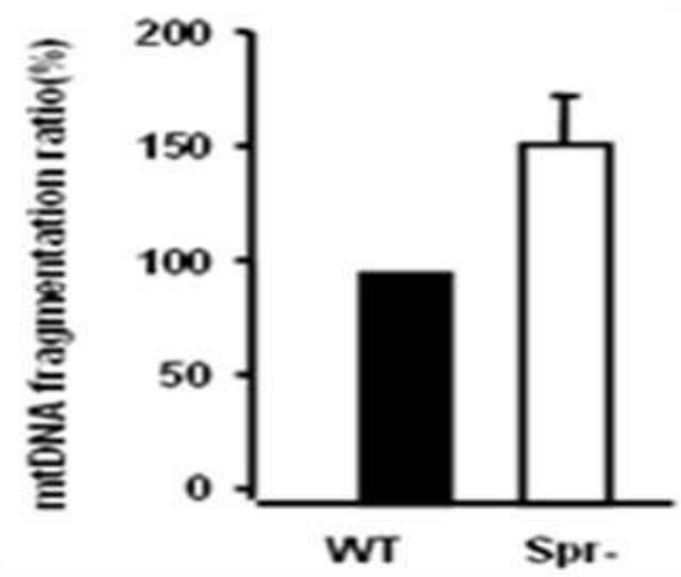
도면8a


8OH-2'(dG) ng/mg DNA
40
30
20
10
0
WT
Spr -/-

도면8b


Marker
Spr-
WT

도면8c


mtDNA fragmentation ratio(%)
200
150
100
50
0
WT
Spr-