



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0108066
(43) 공개일자 2016년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/37 (2006.01) A61K 36/60 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01) A61K 9/48 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/37 (2013.01)

A23L 1/30 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0031928

(22) 출원일자 2015년03월06일

심사청구일자 2015년03월06일

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

마웅천

서울특별시 성북구 삼선교로4나길 5 (삼선동1가)

이동호

서울특별시 강남구 삼성로 212, 23동 1402호 (대치동, 은마아파트)

(74) 대리인

리엔목특허법인

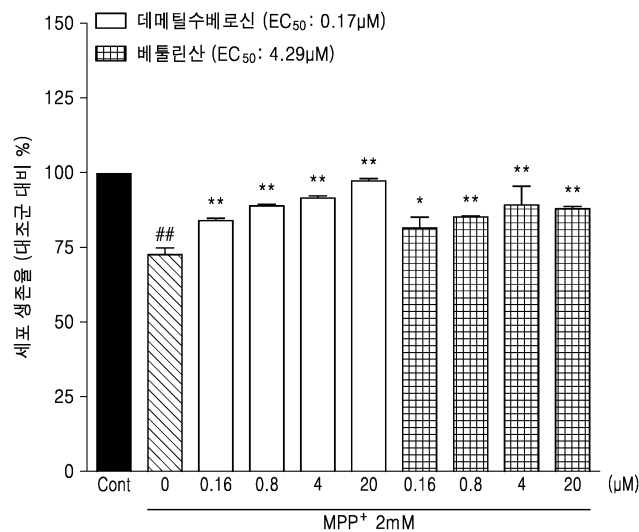
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 데메틸수베로신을 포함하는 신경보호용 조성물

(57) 요약

본 발명은 데메틸수베로신을 포함하는 신경보호용 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 데메틸수베로신을 포함하는 퇴행성 신경 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물, 또는 데메틸수베로신을 포함하는 퇴행성 신경 질환의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/60 (2013.01)

A61K 9/20 (2013.01)

A61K 9/48 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 370C-20140047

부처명 교육부

연구관리전문기관 교육부

연구사업명 기본연구지원사업

연구과제명 UPS 기능이상과 ER stress에 의한 UPR 조절작용 퇴행성 뇌질환치료 선도물질개발

기 여 율 1/1

주관기관 서울대학교 약학대학

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

데메틸수베로신을 포함하는 신경보호용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 퇴행성 신경 질환의 치료를 위한 것인 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 알츠하이머병 또는 파킨슨병의 치료를 위한 것인 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1 내지 3 중 어느 한 항에 있어서, 환제, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 액제, 주사제, 또는 경피 투여제로 제제화된 것인 약학 조성물.

청구항 5

데메틸수베로신을 포함하는 퇴행성 신경 질환의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 정제, 과립제, 당의정, 캡슐제, 유제품, 음료, 또는 고형 식품의 형태로 제조된 것인 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 데메틸수베로신을 포함하는 신경보호용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 데메틸수베로신의 프로테아좀 활성제로서의 작용에 의한 신경세포 사멸로부터의 보호 및 그에 따른 퇴행성 신경 질환의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유비퀴틴-프로테아좀 시스템(UPS)은 손상된 단백질을 제거하는 역할을 수행함으로써 세포 내의 단백질 항상성 유지에 중요한 기능을 한다. 단백질의 미스폴딩 및 응집(aggregation)에 의해서 유도된 UPS가 유비퀴틴화된 단백질을 분해한다. UPS의 기능상실로 인한 유비퀴틴화된 단백질의 축적은 파킨슨병, 알츠하이머병과 같은 퇴행성 뇌 질환의 주요 특징이다(Nature Review Neuroscience (2001) 2: 589-594; Biochemical and biophysical research communications (1986) 134: 743-748; Biochemical and biophysical research communications (1985) 128: 1228-1232). 축적된 단백질들을 제거하는 프로테아좀의 기능이 퇴행성 뇌 질환 모델에서 확연하게 퇴화된 것으로 보고되었다 (Jansen AH et al. (2014) Frontiers in molecular neuroscience 7: 73). 여러 단백질의 대사가 원활히 이루어지지 않는 것이 퇴행성 변화의 주요한 원인으로 작용할 것으로 추정되어 왔다. 단백질 항상성을 위한 UPS 경로에 주요 역할을 하는 프로테아좀을 조절하는 프로테아좀 억제제와 프로테아좀 활성제가 존재한다고 알려져 있다. 암과 같은 질병을 대상으로 하는 에폭소미신(epoxomicin) 및 카르필조립(carfilzomib) 등과 같은 프로테아좀 억제제에 대한 보고가 활발하게 이루어고 있는 반면(Meng L et al. (1999) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96: 10403-10408, Parlati F et al. (2009) Blood 114: 3439-3447), 프로테아좀 활성제는 드물게 보고되고 있다. 최근까지 보고된 프로테아좀 활성제는 베툴린산(betulinic acid)과 올리유로핀(Oleuropein)이 있다. 올리유로핀은 프로테아좀의 세가지 활성인 키모트립신, 트립신, 및 카스파아제 활성을 모두 증가시키나, 베툴린산은 프로테아좀의 세가지 활성 중 키모트립신 활성만을 증가시킨다(Bringmann G et al. (1997) Planta Med 63: 255-257; Katsiki M

et al. (2007) Rejuvenation research 10: 157-172; Huang L (2007) FEBS letters 581: 4955-4959; Katsiki M et al. (2007) Rejuvenation research 10: 157-172). 프로테아좀의 키모트립신, 트립신, 및 카스파아제의 활성을 모두 증가시킬 수 있는 프로테아좀 활성제로서, 신경 세포 독성에 대해 보호 효과를 나타내는 단일 물질은 퇴행성 신경 질환의 치료에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

[0003] 노년층 인구의 비율이 증가되면서 각종 퇴행성 신경 질환 및 심혈관계 질환 등에 대한 관심이 증가하고 있다. 퇴행성 신경 질환은 정상적인 노화의 과정과는 달리, 비정상적인 신경세포의 사멸에 의해 뇌나 척수의 기능이 마비되어, 인지능력, 보행능력, 및 운동 능력 등이 감소되는 질환으로, 뇌졸중과 치매, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴 병 등이 있다.

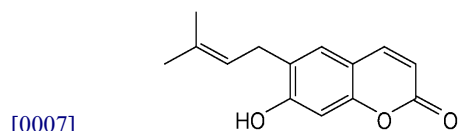
[0004] 현재 퇴행성 신경 질환을 치료하기 위해 세포 이식, 외과적 수술 등 다양한 치료법이 제시되고 있으나, 대부분이 위험요소와 부작용을 가지며, 세포 손상 기전의 복잡성 등으로 인해 실질적으로 신경세포의 손상이나 사멸을 보호하는 치료제는 개발되지 못했다.

[0005] 신경세포를 손상이나 사멸로부터 보호하여 궁극적으로 퇴행성 신경 질환을 치료할 수 있고, 부작용을 유발하지 않는 치료제에 대한 요구가 여전히 존재한다. 이에 본 발명자들은 꾸지뽕나무 뿌리 추출물에 존재하는 데메틸수베로신이 프로테아좀 활성제로 작용하여 신경보호 효과를 갖는다는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 하기 식의 데메틸수베로신을 포함하는 신경보호용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

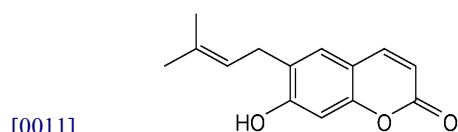


[0008] 또한, 본 발명은 데메틸수베로신을 포함하는 퇴행성 신경 질환의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 양태는 데메틸수베로신을 포함하는 신경보호용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 하기 식을 갖는 데메틸수베로신은 꾸지뽕 나무의 뿌리 추출물을 포함한 식물 추출물로부터 분리될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.



[0012] 데메틸수베로신은 천연 물질로부터 분리된 것 외에, 화학적으로 합성된 것을 포함한다.

[0013] 꾸지뽕 나무의 뿌리 추출물로부터 프로테아좀의 활성을 증가시키고, 이에 의해 신경 세포의 사멸을 감소시키거나 방지하는 활성이 큰 분획을 분리하고, 이로부터 활성 물질을 분리하여 데메틸수베로신으로 확인하였다. 데메틸수베로신은 프로테아좀의 키모트립신-유사 프로테아제, 트립신-유사 프로테아제, 및 카스파아제-유사 프로테아제 활성을 모두 증가시켰다.

[0014] 본 명세서에서, 용어 "신경보호"는 신경 세포를 사멸로부터 보호하여, 신경 세포의 사멸에 의한 신경 퇴행의 효과를 방지하는 것을 의미한다.

[0015] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 약학 조성물은 퇴행성 신경 질환의 치료를 위해 이용될 수 있다.

[0016] 퇴행성 신경 질환은 신경계의 일부에서 서서히 진행되는 신경세포의 사멸에 의해 유발되는 질환을 의미하며, 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 피크병 등이 이에 속한다. 퇴행성 신경 질환의 원인은 다양하며, 그 중 하나가 유비퀴틴화된 단백질의 제거에 의해 단백질 항상성을 유지하는 프로테아좀 활성의 저하에 의한 신경 세포 손상 또는 사멸이다.

- [0017] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 퇴행성 신경 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 또는 피크병일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 약학 조성물은 환제, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 액제, 주사제, 또는 경피 투여제의 제형으로 제제화될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제화에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0020] 본 발명의 약학 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 첨가제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0021] 본 발명의 약학 조성물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 제형은 환제, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 액제, 주사제, 또는 경피 투여제를 포함하나, 이에 한정되지 않는 약제학적 제제에 적합한 제형일 수 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 약학 조성물은 퇴행성 신경 질환에 의해 유발되는 신경세포 손상 또는 사멸로부터 신경을 보호하기 위하여, 유효성분으로서 성인을 기준으로 1일 총 투여량은 약 0.001 내지 약 20 mg/체중 kg/일을 1회에 또는 임의로 수회 나누어서 투여할 수 있다. 상기 투여량은 신경세포 손상을 유발한 질병의 종류, 질병의 진행 정도, 투여 경로, 환자의 성별, 나이, 체중 등을 고려하여 결정될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 양태는 데메틸수베로신을 포함하는 퇴행성 신경 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 일 구체예에서, 데메틸수베로신을 포함하는 식품 조성물은 정제, 과립제, 당의정, 캡슐제, 유제품, 음료, 또는 고형 식품의 형태로 제조될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0025] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 데메틸수베로신을 포함하는 식품 조성물은 식품 제조에서 허용 가능한 통상적인 식품 첨가제, 예를 들면, 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제 등을 더 포함할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명의 일 양태는 데메틸수베로신을 포함하는 약학 조성물을 신경보호를 위한 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 신경세포 손상이나 사멸을 예방, 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 방법은 신경 퇴행성 질환의 치료를 위해 이용될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 유효량은 약 0.001 내지 약 20 mg/체중 kg/일일 수 있고 1일 1회 투여되거나 또는 1일 수회로 나누어 투여될 수 있다.
- [0029] 상기 약학 조성물은 근육내, 피하, 경피, 정맥내 또는 경구 경로로 투여될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 투여 대상의 상태, 연령, 성별, 건강 등을 고려하여 적합한 투여 경로를 선택할 수 있다.
- [0030] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 더욱 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0031] 본 발명의 일 구체예에 따른 데메틸수베로신을 포함하는 신경보호용 조성물은 내성 등의 부작용 없이 신경세포를 손상이나 사멸로부터 보호하고, 이에 의해 알츠하이머병 또는 파킨슨병과 같은 퇴행성 신경 질환의 치료 또는 예방을 위해 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 SH-SY5Y 세포에서 MPP^+ 에 의한 세포 독성에 대한 데메틸수베로신의 뇌세포 보호 효과를 보여준다. 세포를 24시간 동안 96-웰 플레이트에서 배양하고, 데메틸수베로신(0, 0.16, 0.8, 4 및 20 μM)과 MPP^+ (2 mM)를 동시에 48시간 동안 처리했다. 베툴린산을 대조 화합물로 이용했다. 세포 생존율(cell viability)은 대조군의 세포 생존율 대비 퍼센트로 표시하고, 데이터는 3개의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 나타낸다. 대조군 대비 $P < 0.005$ 이고; MPP^+ -유도군 대비 각각 $*P < 0.01$ $**p < 0.005$ 이었다.

도 2는 데메틸수베로신 처리의 신경보호 효과를 보여주는 현미경 사진이다. A는 MPP^+ 나 데메틸수베로신으로 처리되지 않은 대조군 SH-SY5Y 세포, B는 2.0 mM MPP^+ 로 48시간 동안 처리된 SH-SY5Y 세포, C는 2.0 mM MPP^+ 및 20 μM 데메틸수베로신으로 48시간 동안 처리된 SH-SY5Y 세포를 현미경(bright field microscope)으로 관찰한 결과이다. B는 A나 C에 비해 크게 감소된 세포 수를 보인다.

도 3a 내지 3c는 데메틸수베로신의 20S 프로테아좀 활성 효과를 보여준다. 각각 키모트립신-유사 프로테아제 활성(3a), 트립신-유사 프로테아제 활성(3b), 및 카스파아제-유사 프로테아제 활성(3c)을 위한 기질로 사용된 형광원 펩티드는 Suc-LLVY-AMC (40 μM), Boc-LRR-AMC (40 μM) 및 Z-LLE-MCA (80 μM)이었다. 베툴린산을 대조 화합물로 이용했다. 활성은 대조군의 활성 대비 퍼센트로 표시하고, 데이터는 3개의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 나타낸다. 대조군 대비 각각 $P < 0.01$ 및 $**p < 0.005$ 이었다.

도 4a 내지 4c는 SH-SY5Y 세포에서 MPP^+ 에 의해 유도된 프로테아좀 활성의 억제에 대한 데메틸수베로신의 효과를 보여준다. 세포를 24시간 동안 48-웰 플레이트에서 배양하고, 48시간 동안 MPP^+ (2 mM) 및 데메틸수베로신(0, 0.16, 0.8, 4 및 20 μM)으로 처리했다. 베툴린산을 대조 화합물로 이용했다. 활성은 대조군의 활성 대비 퍼센트로 표시하고, 데이터는 3개의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 나타낸다; 대조군 대비 $^{##}P < 0.005$. 각각 MPP^+ -유도군 대비 $P < 0.01$ 및 $**p < 0.005$ 이었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 하기에 실시예에서, 모든 실험 결과는 평균값 $\pm$ 표준편차로 표시하였고, 각 실험군과의 통계학적 유의성은 t-검정(GraphPad software, USA)으로 결정하였고, $p < 0.05$ 의 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 간주하였다. 모든 데이터는 3개 이상의 독립 실험으로부터 획득하였다.

[0034] 실시예 1. 데메틸수베로신의 제조

[0035] 꾸지뽕 뿌리 껍질로부터 데메틸수베로신을 추출하였다.

[0036] 꾸지뽕 나무(*Cudrania tricuspidata*)의 뿌리 껍질은 2008년 9월에 한국, 제주도의 국립산림과학원 남부산림연구소에서 수집하였다. 대조 표본(voucher specimen)(수탁 번호 KH1-4-090814)을 고려대학교 바이오시스템 생물공학과에 기탁하였다. 꾸지뽕 나무 뿌리 껍질 추출물의 프로테아좀 활성제 활성 스크리닝을 실행한 결과 세가지 프로테아좀 프로테아제, 키모트립신-유사 프로테아제, 트립신-유사 프로테아제, 및 카스파아제-유사 프로테아제의 활성을 모두 증가시키는 분획을 확인하고 그 분획으로부터 활성 물질을 분리하고, 데메틸수베로신으로 확인하였다.

[0037] 1-1. 추출 및 분리

[0038] 꾸지뽕 나무의 건조된 뿌리 껍질(13.0 kg)을 분쇄하고, 실온에서 메탄올(48 L, 20 L, 18 L)로 추출하고, 추출물을 35°C에서 진공 상태에서 농축하였다. 수득된 진한 갈색 잔류물(702.1 g)을 H_2O 에 현탁시키고, 순차적으로 *n*-헥산과 에틸아세테이트(EtOAc)에 분배시켰다. EtOAc-가용성 분획(213.0 g)을 실리카 겔 컬럼에 적용하고 $CHCl_3/MeOH$ (1:0 내지 1:1)를 이용하여 7개의 분획을 얻었다(F1 내지 F7). F4 (36.0 g)를 실리카 겔 컬럼 상에서 *n*-헥산/EtOAc (30:1 내지 0:1)을 이용하여 분획시켜 8개의 분획을 얻었다 (F4.1 내지 F4.8). F4.5 (7.2 g)를 실리카 겔 컬럼 상에서 $CHCl_3/MeOH$ (1:0 내지 5:1)를 이용하여 크로마토그래피로 분리하여 7개의 분획을 얻고(F4.5.1 내지 F4.5.7), F4.5.2 (4.6 g)를 $MeOH/H_2O$ (4:1 내지 1:0)을 이용한 C_{18} 역상-실리카 겔 컬럼에 적용

하여 15개의 분획(F4.5.2.1 내지 F4.5.2.15)을 얻었다. F4.5.2.2 (37.1 mg)를 분취용(preparative) HPLC (YMC Pack ODS-A, 5 μ m, 250 x 20 mm i.d., H₂O 중 50 내지 85% MeOH, 유속 8.0 mL/min)로 정제하여 백색 무정형 고체(2.9 mg)를 수득하였다.

[0039] 1-2. 데메틸수베로신의 ¹H NMR 데이터

[0040] 상기 1-1에서 백색 무정형 고체로 분리된 물질의 ¹H NMR 분석을 통해 데메틸수베로신으로 확인하였다. 하기와 같이 수득된 데메틸수베로신의 NMR 스펙트럼은 공지된 데메틸수베로신의 NMR 스펙트럼과 일치했다(Organic & biomolecular chemistry 2009; 7:4173-4176).

[0041] ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ _H 1.80 (3H, s, H-5'), 1.84 (3H, s, H-4'), 3.39 (2H, d, *J*=7.5 Hz, H-1'), 5.31 (1H, t, *J*=7.5 Hz, H-2'), 6.24 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-3), 6.82 (1H, s, H-8), 7.20 (1H, s, H-5), 7.62 (1H, d, *J*=9.5 Hz, H-4); ESIMS (negative) *m/z* 229 [M - H]⁻; ESIMS (positive) *m/z* 231 [M + H]⁺.

[0042] 실시예 2. 데메틸수베로신의 신경 보호 효과

[0043] 2-1. SH-SY5Y 세포 배양 및 데메틸수베로신 처리

[0044] 인간 신경아세포종 SH-SY5Y 세포(ATCC NO. CRL-2266)를 10% 우태혈청 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco-BRL, USA) 및 항생제(antibiotic solution, A5955, Sigma-Aldrich, USA)가 함유된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich, USA) 배지에서 배양하였다. 배양기는 37°C 온도를 유지했고, 95% 공기와 5% CO₂가 혼합된 기체가 계속 공급되어 세포 배양의 적절한 조건에서 배양하였다.

[0045] SH-SY5Y 세포에 처리하는 MPP⁺(1-메틸-4-페닐피리디늄)의 농도는 농도별 세포 생존율을 평가한 후 약 40%의 세포 자멸사를 유발하는 농도인 2 mM로 결정하였다. SH-SY5Y 세포에 대한 데메틸수베로신의 보호 효과를 평가하기 위해, MPP⁺와 데메틸수베로신을 동시에 48시간 동안 처리하였다.

[0046] 2-2. 데메틸수베로신의 신경세포 보호 효과

[0047] 실시예 1에서 분리한 데메틸수베로신의 MPP⁺의 신경세포 독성에 대한 효과를 확인하기 위해, SH-SY5Y 세포 (5 x 10⁴개의 세포/mL)를 96-웰 플레이트 중의 200 μ l/웰의 배양 배지에 접종하여 2-1에 기재된 조건 하에 배양하였다.

[0048] SH-SY5Y 세포에 데메틸수베로신을 농도별로 (0.16, 0.8, 4, 20 μ M) 처리하고, 동시에 2 mM MPP⁺을 48시간 처리한 후, 세포 독성을 측정하기 위해 MTT 분석을 수행하였다. 데메틸수베로신과 MPP⁺로 처리한 SH-SY5Y 세포를 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) 용액 0.5mg/ml로 처리하고 37°C에서 4시간 인큐베이션시켰다. MTT 반응으로 보라색 결정이 생긴 세포를 100% DMSO (dimethyl sulfoxide) 용액에 넣어 용해시키고 Microplate reader (SpectraMax Plus 384 Microplate Reader, Molecular Devices, USA)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. 세포 생존율 (%)은 MPP⁺를 처리하지 않은 정상 대조군의 흡광도 값에 대한 백분율로 나타났다. 도 1 및 도 2는 데메틸수베로신에 의한 세포 보호 효과를 보여준다. 도 1은 데메틸수베로신은 MPP⁺ 유도 세포 사멸로부터 SH-SY5Y 세포를 보호하는 농도-의존적 효과를 보이며, 대조 화합물인 베틀린산에 비해 SH-SY5Y 세포를 보호하는 효과가 우수하다는 것을 보여준다. 도 2는 MPP⁺나 데메틸수베로신으로 처리되지 않은 대조군의 SH-SY5Y 세포(A) 대비 MPP⁺만 처리한 경우(B), 세포 수가 크게 감소하였고, 데메틸수베로신과 MPP⁺를 동시에 처리한 경우(C), 대조군에 비해 세포 수가 감소되었으나, MPP⁺만 처리한 경우에 비해 적게 감소된 것을 보여주어, 데메틸수베로신에 의한 신경 세포의 사멸로부터의 보호 효과를 나타낸다.

[0049] 실시예 3. 데메틸수베로신의 20S 프로테아좀 활성 측정

[0050] 3-1. 데메틸수베로신의 20S 프로테아좀 활성 활성화 측정

[0051] 데메틸수베로신에 의한 프로테아좀 활성의 활성화는 20S 프로테아좀 활성 키트(APT280, Millipore, USA)를 구입하여 측정하였다. 10 μ l의 데메틸수베로신 (DMSO 중 최종 농도 1%)을 키트에 제공되는 버퍼 및 40 μ g의 프로테아좀과 함께 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 키모트립신-유사 프로테아제, 트립신-유사 프로테아제, 및 카스파아제-유사 프로테아제의 기질로 사용되는 형광원적 펩티드로, 각각 40 μ M의 Suc-LLVY-AMC(succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-7-amido-4-methylcoumarin, Millipore, USA), 40 μ M의 Boc-LRR-AMC(t-butyloxycarbonyl-Leu-Arg-Arg-7-amido-4-methylcoumarin, Enzo Life Sciences, USA) 및 80 μ M의 Z-LLE-MCA(benzyloxycarbonyl-Leu-Leu-Glu-4-methyl-coumaryl-7-amide, Enzo Life Sciences, USA)을 사용하였다. 데메틸수베로신 및 기질을 포함하나, 20S 프로테아좀을 포함하지 않는 반응 혼합물을 블랭크(blank)로 사용하였다. 프로테아좀 활성은 형광계(SpectraMax Plus 384 Microplate Reader, Molecular Devices, USA)를 이용하여, 절단 생성물 아미노메틸쿠마린(AMC) (380/460 nm) 또는 메틸쿠마릴아미드(MCA) (380/440 nm)로부터의 형광 방출의 상대적 형광 단위(relative fluorescence unit)의 정량에 의해 측정하였다. 도 3a 내지 3c는 각각 키모트립신-유사, 트립신-유사, 및 카스파아제-유사 프로테아제 활성의 측정 결과를 나타낸다. 대조 화합물로 사용된 베틀린산에 비해 데메틸수베로신은 프로테아좀의 프로테아제 활성의 활성화 효과가 컸다.

[0052] 3-2. 세포 내에서 데메틸수베로신의 20S 프로테아좀 활성 활성화 측정

[0053] 실시예 1에서 분리한 데메틸수베로신의 MPP^+ -유도 프로테아좀 활성의 억제에 대한 효과를 확인하기 위해, SH-SY5Y 세포(ATCC NO. CRL-2266)(1 x 10⁵ 개의 세포/mL)를 48-웰 플레이트 중의 300 μ l/웰의 배양 배지에 접종하여 배양하였다. 10% 우태혈청 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco-BRL, USA) 및 항생제(antibiotic solution, A5955, Sigma-Aldrich, USA)가 함유된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Sigma-Aldrich, USA) 배지에서 37°C 온도를 유지하고, 95% 공기와 5% CO₂가 혼합된 기체 하에 배양하였다. 5% FBS로 보충된 DMEM 배지에서 데메틸수베로신과 MPP^+ (2 mM)를 동시에 48시간 동안 처리하였다.

[0054] 데메틸수베로신과 MPP^+ 로 처리된 세포를 PBS로 두 번 세척한 후, 동결 용해 방법으로 세포를 용해시켰다. 그 후 15,000 rpm에서 15분간 원심분리하고 수득된 상층액을 브래드포드 방법으로 단백질 농도를 측정하였다 (Analytical biochemistry (1985) 146:118-124). 20S 프로테아좀 활성은 실시예 3-1에서 기재된 바와 같이, 20S proteasome activity kit (APT 280; Millipore, USA)를 이용하여 세포 용해액에서 측정하였다. 요약하면, 40 μ l의 세포 용해액을 37°C에서 형광원-결합 펩티드 기질과 함께 제공된 완충액 중에서 인큐베이션시켰다. Suc-LLVY-AMC (40 μ M), Boc-LRR-AMC (40 μ M) 및 Z-LLE-MCA (80 μ M)를 각각 키모트립신-유사 프로테아제, 트립신-유사 프로테아제, 및 카스파아제-유사 프로테아제 활성의 기질로 이용하였다. 세포 용해물을 포함하지 않는 반응 혼합물을 블랭크로 이용하고, 아미노메틸쿠마린(AMC) 또는 메틸쿠마릴아미드(MCA) 형광을 각각 380/460 및 380/440 nm의 여기/방출 파장에서 측정하였다. 도 4a 내지 4c는 각각 키모트립신-유사, 트립신-유사, 및 카스파아제-유사 프로테아제 활성의 측정 결과를 나타낸다. 대조 화합물로 사용된 베틀린산에 비해 데메틸수베로신은 프로테아좀의 프로테아제 활성의 활성화 효과가 컸다.

[0055] 실시예 4. 데메틸수베로신을 포함하는 조성물의 제제화

[0056] 본 실시예는 데메틸수베로신을 유효성분으로 포함하는 조성물의 다양한 제형으로의 제제화를 보여준다.

[0057] 4-1. 정제의 제조

[0058] 데메틸수베로신 50 mg

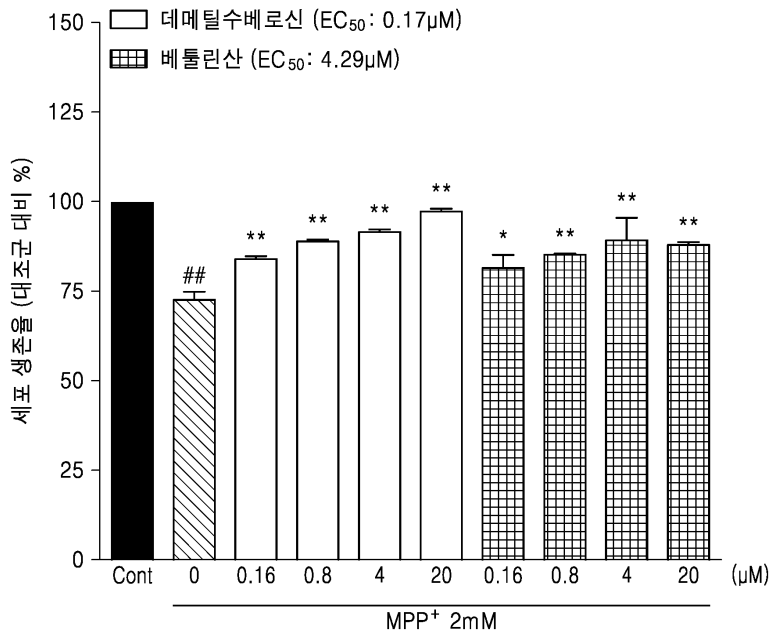
[0059] 유당 50 mg

[0060] 전분 10 mg

- [0061] 스테아린산 마그네슘 적량
- [0062] 상기의 성분들을 혼합하고 통상적인 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0063] 4-2. 산제의 제조
- [0064] 데메틸수베로신 50 mg
- [0065] 유당 30 mg
- [0066] 전분 20 mg
- [0067] 스테아린산 마그네슘 적량
- [0068] 상기의 성분들을 혼합하고, 폴리에틸렌이 코팅된 포에 충전하고 밀봉하여 산제를 제조하였다.
- [0069] 4-3. 캡슐의 제조
- [0070] 데메틸수베로신 50 mg
- [0071] 유당 30 mg
- [0072] 전분 28 mg
- [0073] 탈크 2 mg
- [0074] 스테아린산 마그네슘 적량
- [0075] 상기의 성분들을 혼합하고 통상적인 캡셀제의 제조방법에 따라서 젤라틴 경캡셀에 충전하여 캡셀제를 제조하였다.
- [0076] 4-4. 현탁제의 제조
- [0077] 데메틸수베로신 50 mg
- [0078] 이성화당 10 g
- [0079] 설탕 30 mg
- [0080] 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 100 mg
- [0081] 레몬향 적량
- [0082] 정제수 적량 가하여 전체 100 ml
- [0083] 상기의 성분들을 혼합하여 통상적인 현탁제의 제조방법에 따라 현탁제를 제조한 후 100 ml 용량의 갈색병에 충전하고 멸균하여 현탁제를 제조하였다.

도면

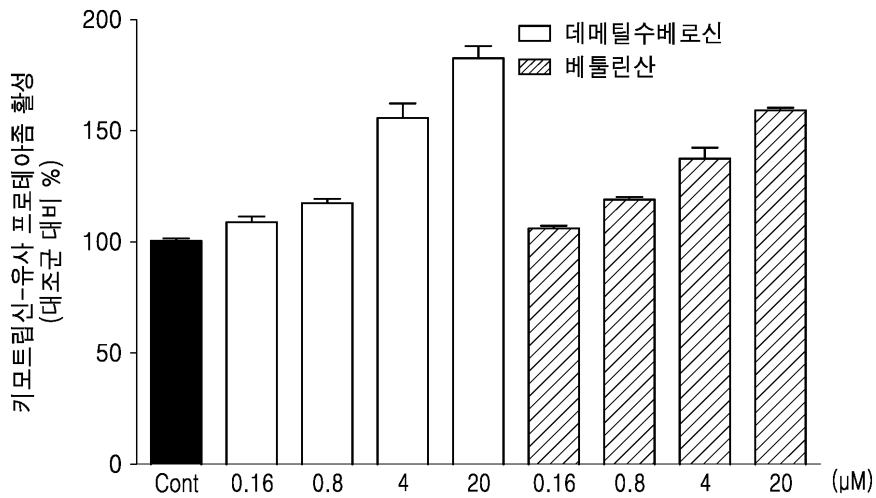
도면1



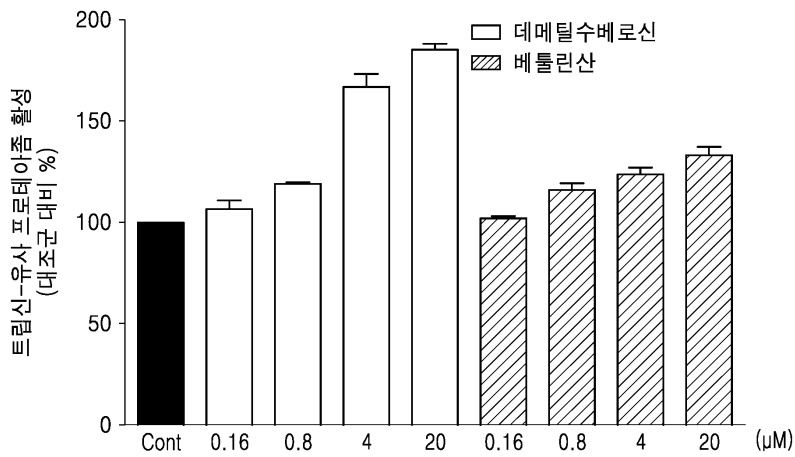
도면2



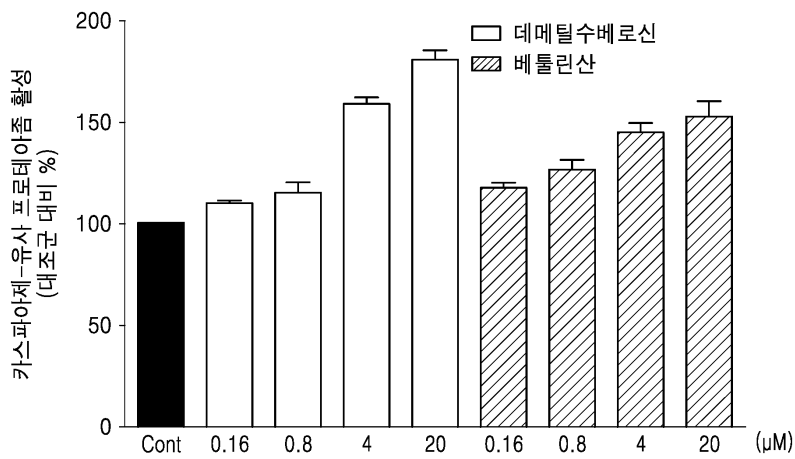
도면3a



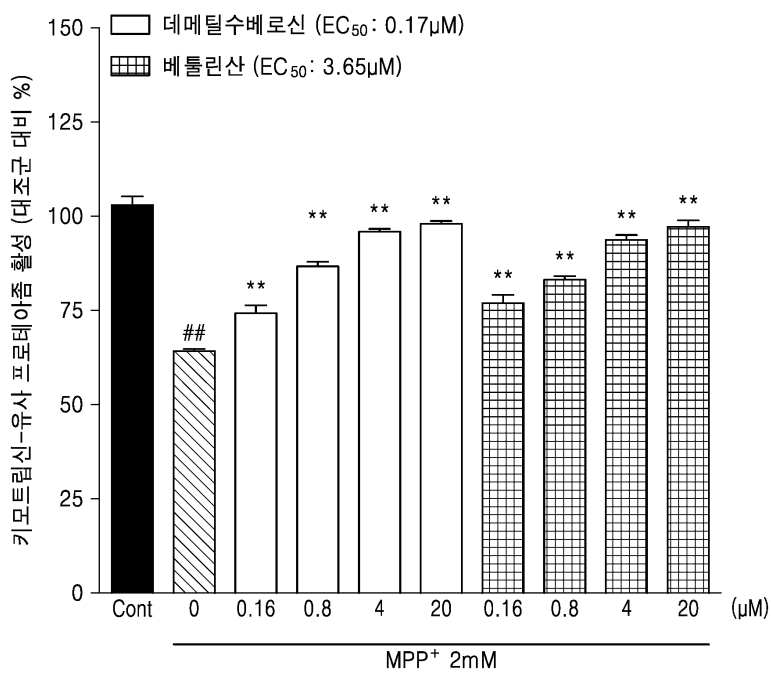
도면3b



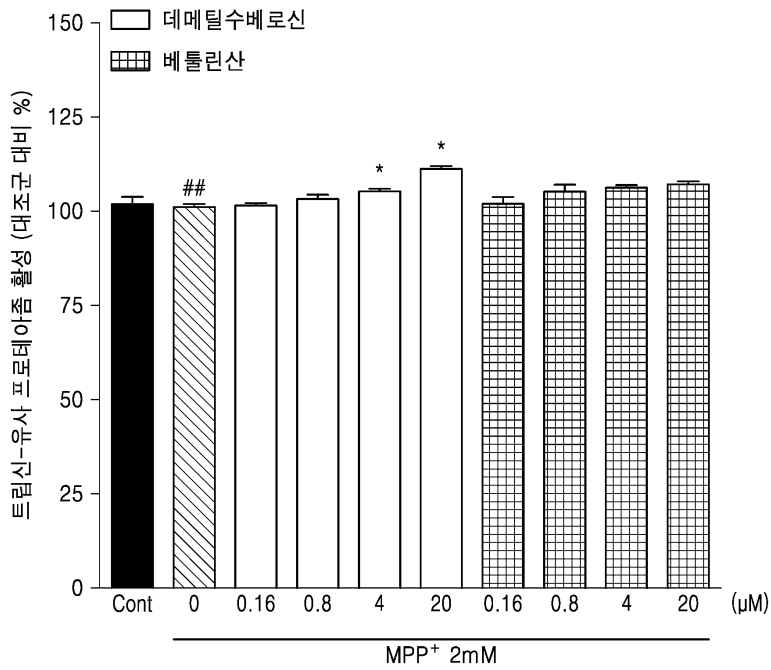
도면3c



도면4a



도면4b



도면4c

