



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0109072
(43) 공개일자 2024년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/121 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 1/16 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/121 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0000772
(22) 출원일자 2023년01월03일
심사청구일자 2023년01월03일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
정현택
울산광역시 울주군 언양읍 언양로 77, 108동 140
1호(e편한세상울산역어반스퀘어아파트)
조연수
울산광역시 울주군 삼남읍 울산역로 274, 101동
302호(울산역 신도시 동문디이스트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

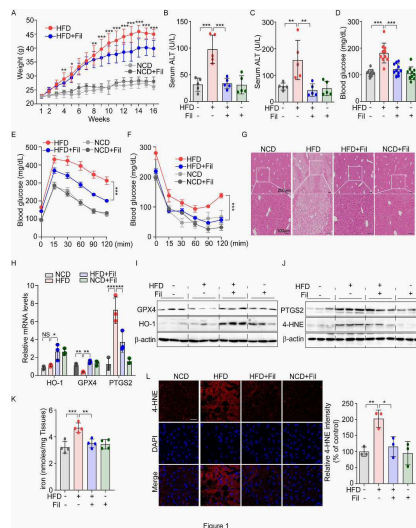
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 필버톤을 유효성분으로 포함하는 폐롭토시스 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 PTGS2 또는 4-HNE 가 증가된 폐롭토시스 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 필버톤(filbertone)이 PTGS2 또는 4-HNE 생성을 감소시키고, GPX4, HO-1 및 SLC7A11의 발현을 증가시킴을 확인하였으며, 자유 철(iron)을 감소시킴을 확인하여, 필버톤을 폐롭토시스 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물뿐만 아니라 건강기능식품 등 다양하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 1/16 (2018.01)

A61P 25/28 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

(72) 발명자

공정현

울산광역시 남구 대학로27번길 9, 206호(무거동)

찬드라완시 소남

울산 남구 신북로23번길 7-1 (무거동) 형설원룸
203호

박정민

울산광역시 남구 수암로 315-2, 2층(야음동)

유리나

울산광역시 남구 대공원로 241, 17층 101동 1703
호(신정동, 대공원코오롱파크폴리스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345347094
과제번호	2014R1A6A1030318
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	대학중점연구소지원사업
연구과제명	고령질환제어 메타엄증연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 PTGS2 또는 4-HNE 생성이 증가된 페롭토시스 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 질환은 간질환 또는 퇴행성 뇌질환인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 간질환은 비알코올성 지방간, 비알코올성 간염 및 간경화로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 다발성경화증 및 근위축성 측삭 경화증으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

청구항 3에 있어서,

상기 약학 조성물은 GPX4, HO-1 및 SLC7A11로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

청구항 3에 있어서,

상기 약학 조성물은 자유 철(iron)을 감소시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

청구항 4에 있어서,

상기 약학 조성물은 도파민 생성 뉴런의 사멸을 억제시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 페롭토시스 억제용 시약 조성물.

청구항 11

청구항 10에 있어서,

상기 조성물은 Nrf2 활성화를 통해 페롭토시스를 억제시키는 것을 특징으로 하는 시약 조성물.

청구항 12

청구항 10에 있어서,

상기 조성물은 PERK 활성화를 통해 페롭토시스를 억제시키는 것을 특징으로 하는 시약 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 필버톤을 유효성분으로 포함하는 페롭토시스 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

배경 기술

[0002] 페롭토시스(Ferroptosis)는 비교적 최근에 발견된 RCD(regulated cell death) 중의 하나로 흔히 2가 철이 축적된 결과로 초래되는 과산화 지질에 의한 세포 죽음이다. 생체 내 존재하는 항산화 물질들의 부족과 세포 내 존재하는 자유 철의 축적으로 많은 양의 ROS가 생성되는 펜톤반응에 의해 세포막의 지질을 공격하게 되면 지질 과산화 작용 과정이 나타나고 세포사를 유도하게 된다. 그 결과 4-Hydroxynonenal(4-HNE)나 malondialdehyde(MDA) 등을 만들어 내고 이들 역시 심각한 세포 손상을 유도한다.

[0003] 파킨슨병(Parkinson's disease)은 알츠하이머 치매와 더불어 노년기에 나타나는 대표적인 퇴행성 신경질환의 하나이며, 65세 인구에서 1% 정도가 발병하며 나이가 들수록 그 발병률이 증가한다. 파킨슨병은 운동성 장애를 나타내며, 안정 시 떨림, 경직, 느린 동작, 자세의 불안정이 대표적인 증후이다. 파킨슨병은 병리학적으로는 중뇌의 흑질에 있는 도파민성 신경세포가 점진적으로 사멸하여 도파민의 분비 감소로 인하여 생기는 질병이다.

[0004] 지방간은 간 내 지방 침착으로 인한 무게가 간 내 무게의 5% 이상으로 이루어진 경우로 정의된다. 비알코올성 지방간 질환(non-alcoholic liver disease)은 그 중 지방간의 원인이 알코올에 기인 되지 않은 경우를 말하며 간내 단순 지방 침착(simple steatosis)부터 지방간염, 간경변에 이르는 일련의 과정을 모두 포함한다. 이의 원인으로서는 인슐린 저항성으로 인한 간 내 지방 침착, 과도한 영양 섭취, 유전적 원인 등이 지목되고 있다.

[0005] 비알코올성 지방간 질환은 수년간 증가하는 추세를 보이고 있으며 이로 인해 매년 만성 간질환이 증가하는 원인이 될 것으로 여겨진다. 실제로 비알코올성 지방간 질환은 바이러스성, 알코올성 등 원인이 뚜렷한 경우를 제외한 만성 간질환의 대부분을 차지하는 것으로 알려지고 있는데 특히 사춘기 전후의 만성 간질환에서는 가장 큰 비중을 차지하고 있다.

[0006] 즉, 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌질환이나 간질환의 치료를 위해서, 안전한 천연물을 이용한 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 10-1949601호.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 PTGS2 또는 4-HNE 생성이 증가된 페롭토시스 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강

기능식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 페롭토시스 억제용 시약 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 PTGS2 또는 4-HNE 생성이 증가된 페롭토시스 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 페롭토시스 억제용 시약 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 PTGS2 또는 4-HNE 생성이 증가된 페롭토시스 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 필버톤(filbertone)이 PTGS2 또는 4-HNE 발현을 감소시키고, GPX4, HO-1 및 SLC7A11의 발현을 증가시킴을 확인하였으며, 자유 철(iron)을 감소시킴을 확인하여, 필버톤을 페롭토시스 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물뿐만 아니라 건강기능식품등 다양하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 필버톤 처리가 GPX4와 HO-1을 증가시켜 HFD로 유도된 NAFLD 및 페롭토시스를 완화할 수 있는지 확인한 결과이다.

도 2는 필버톤이 간세포 수준에서 팔미트산으로 유도된 페롭토시스를 예방하는지 확인한 결과이다.

도 3은 필버톤이 간세포 수준에서 GPX4와 HO-1의 발현을 Nrf2 활성화를 통해 촉진하는지 확인한 결과이다.

도 4는 필버톤이 mtROS-PERK 활성화가 GPX4, HO-1의 전사 조절자인 Nrf2의 활성화를 일으키는지 확인한 결과이다.

도 5는 필버톤이 Nrf2를 핵으로의 전위를 증가시키는 것이 PERK에 의존적인지 확인한 결과이다.

도 6은 팔미트산으로 유도된 페롭토시스를 Fil1이 PERK 활성화를 통해 억제하는지 확인한 결과이다.

도 7은 필버톤의 페롭토시스에 대한 보호 효과가 Nrf2에 의존적인지 확인한 결과이다.

도 8은 필버톤의 처리로 활성화된 PERK-ATF4가 팔미트산으로 유도된 페롭토시스를 보호하는 효과가 Nrf2-SLC7A11 상향조절도 일으키는지 확인한 결과이다.

도 9는 필버톤 처리에 의해 신경세포주 SH-SY5Y 세포의 생존율을 확인한 결과이다.

도 10은 필버톤 처리에 의해 신경세포주 SH-SY5Y 세포에서 PTGS2 단백질 발현 수준이 감소함을 확인한 결과이다.

도 11은 필버톤 처리에 의해 파킨슨병 쥐 모델에서 신경 보호 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0020] 본 발명은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 PTGS2 또는 4-HNE 생성이 증가된 페롭토시스 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0021] 상기 질환은 간질환 또는 퇴행성 뇌질환일 수 있다.

- [0022] 상기 간질환은 비알코올성 지방간, 비알코올성 간염 및 간경화로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 다발성경화증 및 근위축성 측삭 경화증으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 약학 조성물은 GPX4, HO-1 및 SLC7A11로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 발현을 증가시킬 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 약학 조성물은 자유 철(iron)을 감소시킬 수 있다.
- [0026] 상기 약학 조성물은 도파민 생성 뉴런의 사멸을 억제할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 율활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토스, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 율활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 투여량이 0.01 mg/kg 내지 200 mg/kg, 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0029] 또한, 본 발명은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 간질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0031] 상기 건강기능식품은 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, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다. 또한, 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고령색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다. 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 유효성분은

필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량부에 1 중량부 내지 90 중량부 포함되도록 첨가될 수 있다.

[0033] 또한, 본 발명은 필버톤(filbertone)을 유효성분으로 포함하는 페롭토시스 억제용 시약 조성물을 제공한다.

[0034] 상기 조성물은 Nrf2 활성화를 통해 페롭토시스를 억제시킬 수 있다.

[0035] 상기 조성물은 PERK 활성화를 통해 페롭토시스를 억제시킬 수 있다.

[0037] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 등은 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 등에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예 등은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0039] <실시 예 1> 필버톤에 의한 HO-1 및 GPX4 발현 증가에 따른 비알코올성 지방간 및 페롭토시스 완화효과 확인

[0040] 필버톤 처리가 GPX4와 HO-1을 증가시켜 고지방식으로 유도된 비알코올성 지방간(이하 NAFLD라 함.) 및 페롭토시스를 완화할 수 있는지 확인하기 위해, 대조군, 대조군 + 필버톤 투여, 고지방식이 및 고지방식이 + 필버톤 투여군을 나누어 실험을 진행하였다.

[0041] 그 결과 도 1에 따르면, 체중변화와 관련하여 고지방식이를 투여한 군의 체중이 대조군에 비해 크게 증가하였고 고지방식이와 필버톤을 함께 투여한 군의 경우 대조군에 비해 체중은 늘었지만 고지방식이만 투여한 군에 비해 체중이 감소하였음을 확인하였다. 또한, 고지방식이만 투여한 군에 비해 고지방식이와 필버톤을 함께 투여한 군이 대조군과 비슷한 수준으로 ALT 및 AST 수치가 감소함을 확인하였다. 나아가, 혈당 역시 비슷한 양상임을 확인하였다.

[0042] 또한, 항산화 효소인 GPX4 및 HO-1의 mRNA 발현과 관련해서도, 필버톤을 투여한 군이 필버톤을 투여하지 않은 군에 비해 더 많이 발현되었음을 확인하였고, 간 조직에서 PTGS2 와 4-HNE의 단백질 발현 수준을 Western blot 으로 확인한 결과, 고지방식이에 의해 PTGS2 와 4-HNE의 발현이 증가하고 필버톤 투여시 PTGS2 와 4-HNE의 발현 수준이 감소함을 확인하였다.

[0043] 간 조직에서 총 철 양의 변화를 확인한 결과로, 고지방식이에 의해 철 양이 증가하고 필버톤 투여에 의해 철 양이 감소함을 확인하였다.

[0044] 따라서, 필버톤은 항산화 효소를 증가시키고 철의 축적을 감소시켜 비알코올성 지방간 및 페롭토시스를 완화시키는 효과가 있음을 확인하였다.

[0046] <실시 예 2> 필버톤의 팔미트산에 의해 유발된 페롭토시스의 억제 효과

[0047] 필버톤이 간세포 수준에서 팔미트산(이하 PA라 함.)으로 유도된 페롭토시스를 예방하는지 확인하기 위해, 필버톤 20 μ M 및 페롭토시스 억제제(이하 Fer-1라 함.) 1 μ M를 먼저 1시간 동안 처리한 후 PA 250 μ M을 24시간 동안 처리하였다.

[0048] 그 결과, 도 2에 따르면, 마우스 간 세포주인 AML12 와 인간 간 세포주인 HepG2 세포에서 PA처리에 의해 간 세포의 생존율이 감소하고, PA와 필버톤을 함께 처리한 경우 PA만 처리한 군에 비해 유의하게 간 세포의 생존율이 증가하였음을 확인할 수 있었다. 또한, PA에 의해 증가한 지질의 산화가 필버톤의 처리에 의해 감소함을 확인하였고, Fer-1 처리에 의해 역시 지질의 산화가 감소됨을 확인하였다.

[0049] 나아가, 세포 수준에서 PA에 의해 GPX4, HO-1가 감소되고 이후 필버톤 및 Fer-1의 처리에 의해 다시 증가하였으며, PA에 의해 PTGS2가 증가하고 필버톤 및 Fer-1의 처리에 의해 감소함을 확인하였다.

[0050] 필버톤이 항산화 효소의 증가를 통해 PA 처리로 유도된 페롭토시스를 억제한다는 것을 입증하기 위해, GPX4 억제제인 RSL3 100nM을 PA 처리 전 필버톤과 함께 1시간 전처리 하였다.

[0051] 그 결과, 도 2에 따르면, AML12와 HepG2 세포에서 PA 처리에 의해 감소된 세포 생존율은 필버톤 처리에 의해 증

가하였고, RSL3 처리에 의해 다시 PA만 처리한 것과 유사한 수준으로 세포 생존율이 감소함을 확인하였다. 또한, PA 처리에 의해 증가된 지질의 산화가 필버톤의 처리에 의해 유의하게 감소하였으며, RSL3 처리에 의해 다시 PA만 처리한 것과 유사한 수준으로 지질의 산화가 증가함을 확인하여 필버톤이 항산화 효소의 증가를 통해 PA 처리로 유도된 페롭토시스를 억제함을 알 수 있었다. (Data are mean $\pm$ SD (n=3); *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.)

[0053] <실시 예 3> 필버톤의 Nrf2 활성화를 통해 GPX4 및 HO-1 발현 촉진 여부 확인

[0054] 필버톤이 간세포 수준에서 GPX4와 HO-1의 발현을 Nrf2 활성화를 통해 촉진하는지 확인하기 위해, 우선, AML12와 HepG2 세포에 필버톤을 0, 5, 10 및 20 μ M 농도로 4시간 동안 처리한 후 PERK-eIF2 α -ATF4 경로를 활성화를 웨스턴 블롯으로 확인하였고, 그 결과, 도 3에 따르면, 필버톤의 농도가 증가함에 따라, PERK-eIF2 α -ATF4 경로가 활성화 됨을 확인할 수 있었다.

[0055] 또한, 필버톤의 효과가 mitochondrial ROS(이하 mtROS라 함.)를 증가시켜 PERK 활성화에 의존적으로 나타나는지 확인하기 위해 PERK 억제제로 알려진 GSK2606414(GSK) 1 μ M 또는 mtROS 억제제인 mitoTEMPO 100nM을 1시간 동안 전처리 한 후 필버톤을 처리하였다. 그 결과, 도 3에 따르면, 필버톤의 처리에 의해, PERK이 활성화 되며, mtROS가 증가함을 확인하였다.

[0056] 나아가, mtROS-PERK 활성화가 GPX4 및 HO-1의 전사 조절자인 Nrf2의 활성화를 일으키는지 확인하기 위해 필버톤을 0, 5, 10 및 20 μ M로 6시간 동안 처리하여 실험을 진행하였다. 그 결과, 도 4에 따르면, AML12와 HepG2 세포에서 필버톤의 농도 증가에 따라 GPX4 및 HO-1의 발현이 증가함을 확인하였고, 필버톤의 처리가 ARE reporter를 활성화시키는지 확인하기 위해 AML12 세포의 루시페레이즈 활성화를 측정하였고, 그 결과, 도 4에 따르면, 필버톤의 농도 증가에 따라 ARE reporter가 증가함을 확인하였다.

[0057] Nrf2의 인산화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과, 도 4에 따르면, 필버톤의 농도 증가에 따라, Nrf2의 인산화가 증가함을 확인하였으며, Nrf2가 세포질에서 핵으로 전위가 일어남을 확인하였다. 이를 통해 필버톤은 Nrf2 활성화를 통해 GPX4 및 HO-1 발현을 촉진함을 알 수 있었다.(Data are mean $\pm$ SD (n=3); *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.)

[0059] <실시 예 4> 필버톤-mtROS-PERK 활성화에 따른 Nrf2의 핵 전위 향상 여부 확인

[0060] 필버톤이 Nrf2를 핵으로의 전위를 증가시키는 것이 PERK에 의존적인지 확인하기 위해 AML12 및 HepG2 세포에서 PERK 억제제인 GSK 1 μ M을 1시간 동안 전처리 한 후 필버톤 20 μ M을 6시간 동안 처리하여 실험하였다.

[0061] 그 결과 도 5에 따르면, 필버톤 처리에 의해 증가한 GPX4와 HO-1 발현이 GSK처리에 의해 감소함을 확인하였으며, 필버톤 처리에 의해 증가한 핵에서의 Nrf2가 GSK처리에 의해 감소함을 확인하여 필버톤이 Nrf2를 핵으로의 전위를 증가시키는 것이 PERK에 의존적임을 확인하였다.

[0062] 또한, 필버톤의 PERK 의존적 역할을 확인하기 위해 유전적으로 PERK의 발현이 감소된 MEF(Mouse Embryonic Fibroblast) 세포를 사용하여 실험을 진행하였다. 그 결과, 도 2E에 따르면, PERK 유전자 야생형(Perk+/+)과 PERK 유전자 제거형(Perk-/-) MEF에서 필버톤을 처리한 후 GPX4와 HO-1의 mRNA 발현 수준 및 단백질 발현 수준을 확인한 결과, PERK 유전자 제거형(Perk-/-)은 필버톤을 처리하여도 GPX4와 HO-1 발현이 많이 증가하지 않은 반면, PERK 유전자 야생형(Perk+/+)의 경우 필버톤 처리에 의해 GPX4와 HO-1 발현이 유의하게 증가하였음을 확인하였다.(Data are mean $\pm$ SD (n=3); *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.)

[0064] <실시 예 5> 팔미트산에 의한 페롭토시스가 필버톤에 의한 PERK 활성화에 의해 억제되는지 여부 확인

[0065] PA로 유도된 페롭토시스를 필버톤이 PERK 활성화를 통해 억제하는지 확인하고자 하였다. AML12와 HepG2 세포에 PA 250 μ M을 24시간 동안 처리하기 전 GSK 1 μ M과 필버톤 20 μ M을 1시간 전처리하여 실험을 진행하였다.

[0066] 그 결과, 도 6에 따르면, PA 처리에 의해 감소된 GPX4 및 HO-1의 발현은 필버톤의 처리에 의해 증가하였고 다시 GSK 처리에 다시 감소함을 확인하였으며, PA 처리에 의해 증가한 PTGS2의 발현은 필버톤의 처리에 의해 감소하였으며 다시 GSK처리에 의해 증가됨을 확인하였다. 또한, 세포의 생존율 및 지질의 산화 정도 역시 비슷한 양상

을 보임을 확인하였다.(Data are mean $\pm$ SD (n=3); *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.)

[0068] <실시 예 6> Nrf2의 팔미트산 유발 페롭토시스 예방 효과 확인

[0069] 필버톤의 페롭토시스에 대한 보호 효과가 Nrf2에 의존적인지 확인하고자 Nrf2 유전자 야생형(Nrf2+/+) 과 Nrf2 유전자 제거형(Nrf2-/-) 쥐의 일차 간세포를 추출한 후 PA, 필버톤 및 Fer-1을 처리하였다.

[0070] 그 결과, 도 7에 따르면, Nrf2 유전자 야생형(Nrf2+/+)은 PA 처리에 감소된 세포 생존율, GPX4 발현 및 지질의 산화 정도가 필버톤의 처리에 의해 다시 증가하였고 PA 처리에 의해 증가된 PTSG2 및 4-HNE 발현이 필버톤 처리에 의해 다시 감소하였음을 확인하였으며, Nrf2 유전자 제거형(Nrf2-/-)은 PA 처리에 의해 감소된 세포 생존율, GPX4 발현 및 지질의 산화 정도가 필버톤 처리에 의해 다시 증가하지 않았으며, PA 처리에 의해 증가된 PTSG2 및 4-HNE 발현 역시 필버톤 처리에 의해 감소되지 않음을 확인하였다. 이를 통해, 필버톤의 페롭토시스에 대한 보호 효과가 Nrf2에 의존적임을 확인하였다.(Data are mean $\pm$ SD (n=3); *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.)

[0072] <실시 예 7> SLC7A11 상향 조절을 통한 PA 유도 페롭토시스에 대한 Nrf2의 보호 효과 확인

[0073] GPX4의 증가는 GPX4의 기질을 세포안으로 유입시키는 역할을 하는 SLC7A11의 발현 수준에 따라 증가될 수 있고, Nrf2는 SLC7A11의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있는바, 필버톤의 처리로 활성화된 PERK-ATF4가 PA로 유도된 페롭토시스를 보호하는 효과가 Nrf2-SLC7A11 상향조절도 일으키는지 확인하기 위해, AML12 세포에 필버톤을 0, 5, 10 및 20 μ M로 6시간 동안 처리하였다.

[0074] 그 결과, 도 8에 따르면, 필버톤의 처리 농도 증가에 따라 SLC7A11의 발현이 증가함을 알 수 있었으며, 이후 GSK 처리에 의해 다시 필버톤을 처리하기 전과 유사한 정도로 발현이 감소함을 확인하였다. 또한, PERK 유전자 야생형(Perk+/+)은 필버톤의 처리에 의해 SLC7A11의 발현이 증가하였으나, PERK 유전자 제거형(Perk-/-)은 필버톤을 처리하여도 SLC7A11의 발현이 증가하지 않음을 확인하였다. 따라서, 이를 통해 필버톤의 처리로 활성화된 PERK-ATF4가 Nrf2-SLC7A11을 상향조절하여 PA로 유도된 페롭토시스로부터 간세포를 보호하는 효과가 있음을 확인하였다.(Data are mean $\pm$ SD (n=3); *p<0.05, **p<0.01, and ***p<0.001.)

[0076] <실시 예 8> 필버톤의 신경모세포종 세포에서의 페롭토시스 억제 효과

[0077] 필버톤처리가 신경세포주 SH-SY5Y 세포에서 페롭토시스 유도제(RSL3)에 대한 보호 효과를 가지는 지 확인하고자 필버톤 20 μ M 및 Fer-1 1 μ M 을 각각 1시간 동안 전처리 후 RSL3 1 μ M을 8시간동안 처리하여 실험을 진행하였다.

[0078] 그 결과, 도 9에 따르면, 페롭토시스 유도제 처리로 인해 감소한 세포의 생존율이 Fil 및 Fer-1을 함께 처리하였을 때 다시 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 도 10에 따르면, 페롭토시스 유도제 처리로 증가되는 페롭토시스 마커인 PTGS2 단백질 발현 수준이 필버톤과 Fer-1처리로 인해 감소하는 것을 확인하였다. (Data are mean $\pm$ SD (n=4); ***p<0.001.)

[0080] <실시 예 9> 필버톤의 파킨슨병에서의 신경 보호 효과 확인

[0081] 필버톤의 파킨슨병에서의 신경 보호 효과 확인하기 위해 동물실험모델에서 고지방식이 투여 및 파킨슨병을 유발하는 것으로 알려진 MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, 이하 MPTP라 함.)를 필버톤과 함께 마우스에 투여하여 실험을 진행하였다.

[0082] 그 결과, 도 11에 따르면, 고지방식이 또는 MPTP에 의하여 유도된 파킨슨병 모델 쥐의 중뇌에서 도파민을 생성하는 뉴런의 수가 줄어들었고 필버톤을 함께 먹인 경우 도파민 생성 뉴런의 수가 회복됨을 확인하였다.

[0083] 또한, 파킨슨병은 운동성에 문제가 생기므로 rotarod 테스트와 treadmill running 테스트를 실시하였고, 그 결과, 도 11에 따르면 필버톤을 처리한 군에서는 MPTP를 처리한 군에 비하여 정상수준으로 운동성이 회복됨을 확인하였다.

- [0085] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.
- [0086] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1

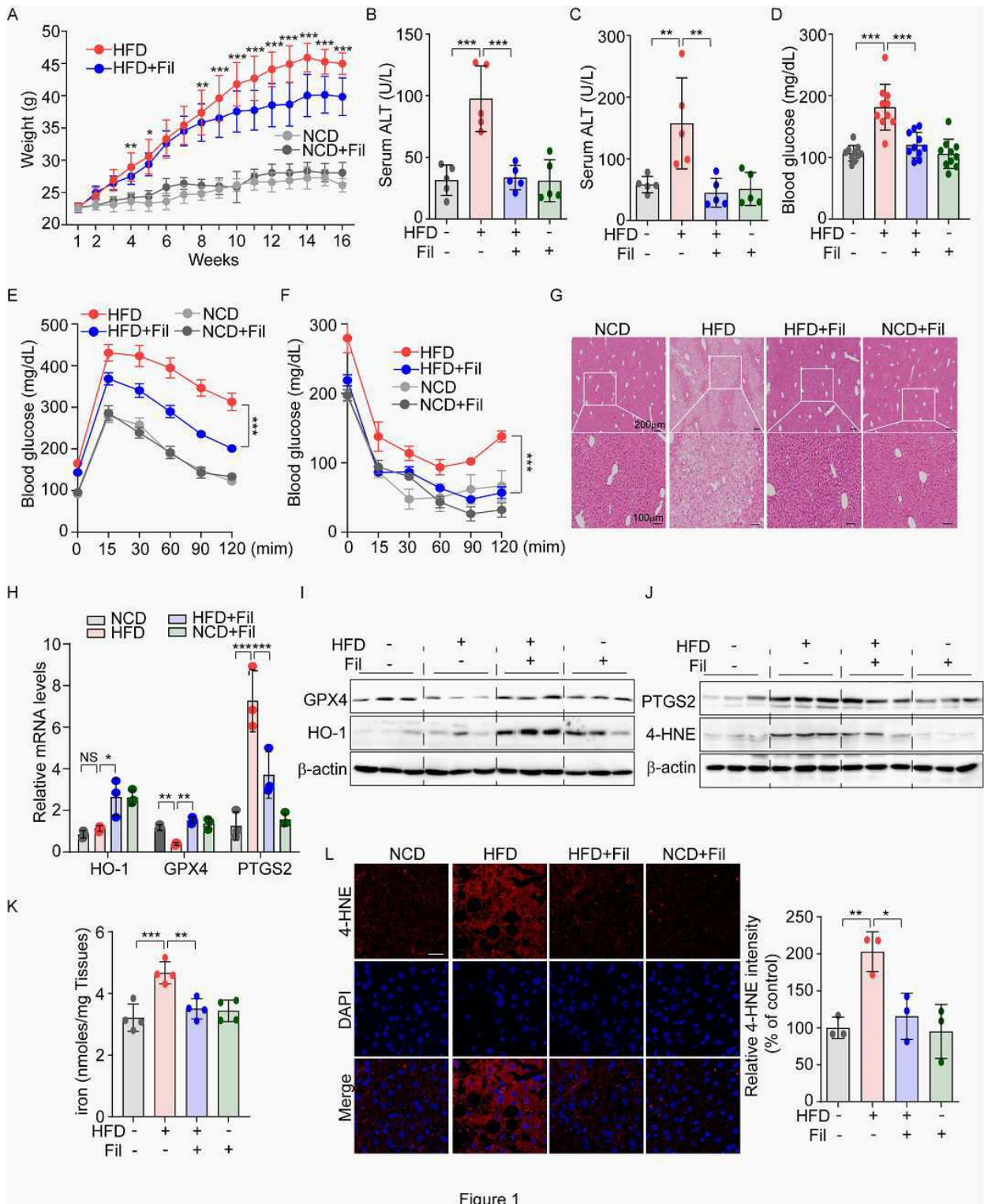


Figure 1

도면2

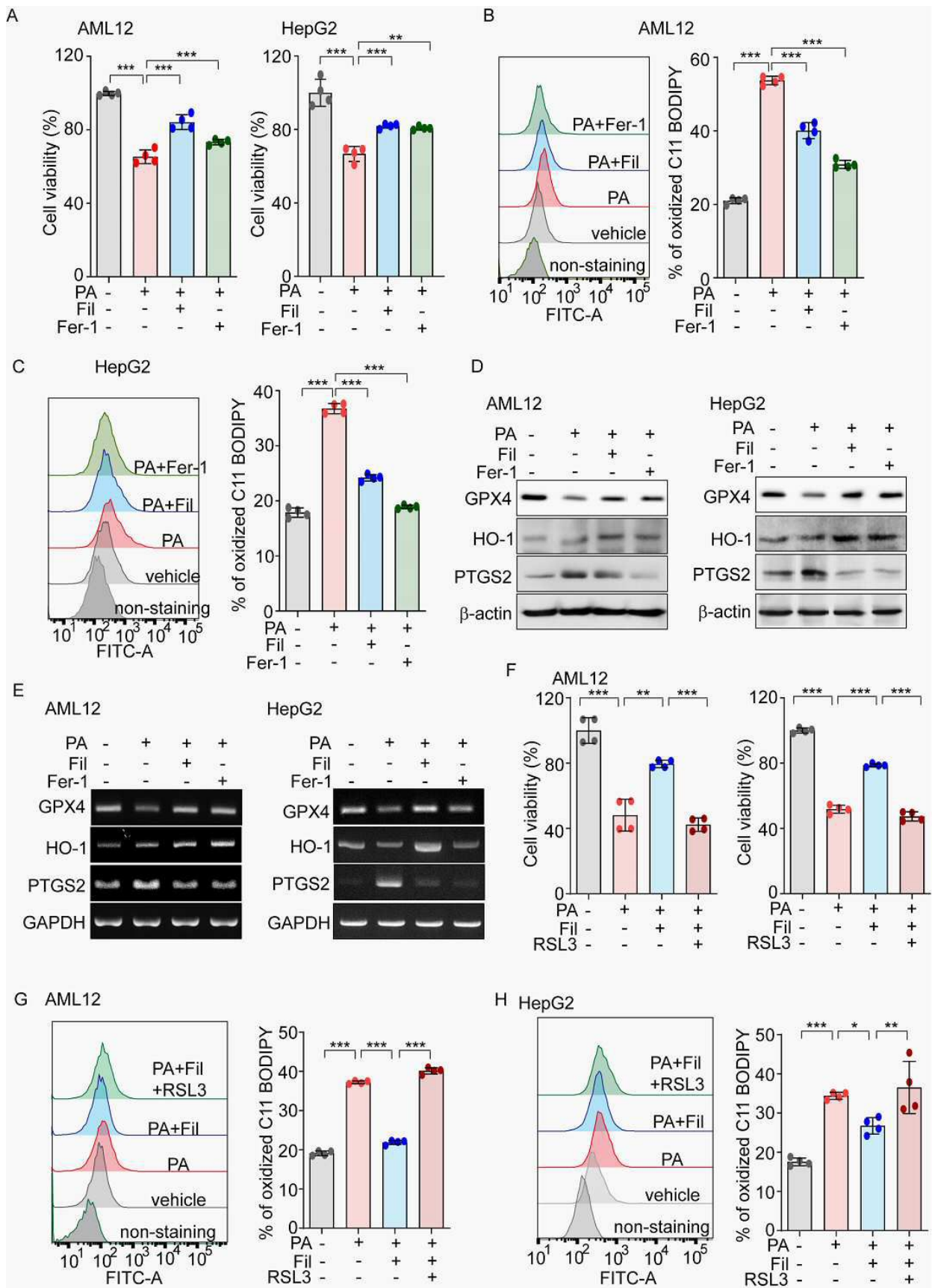
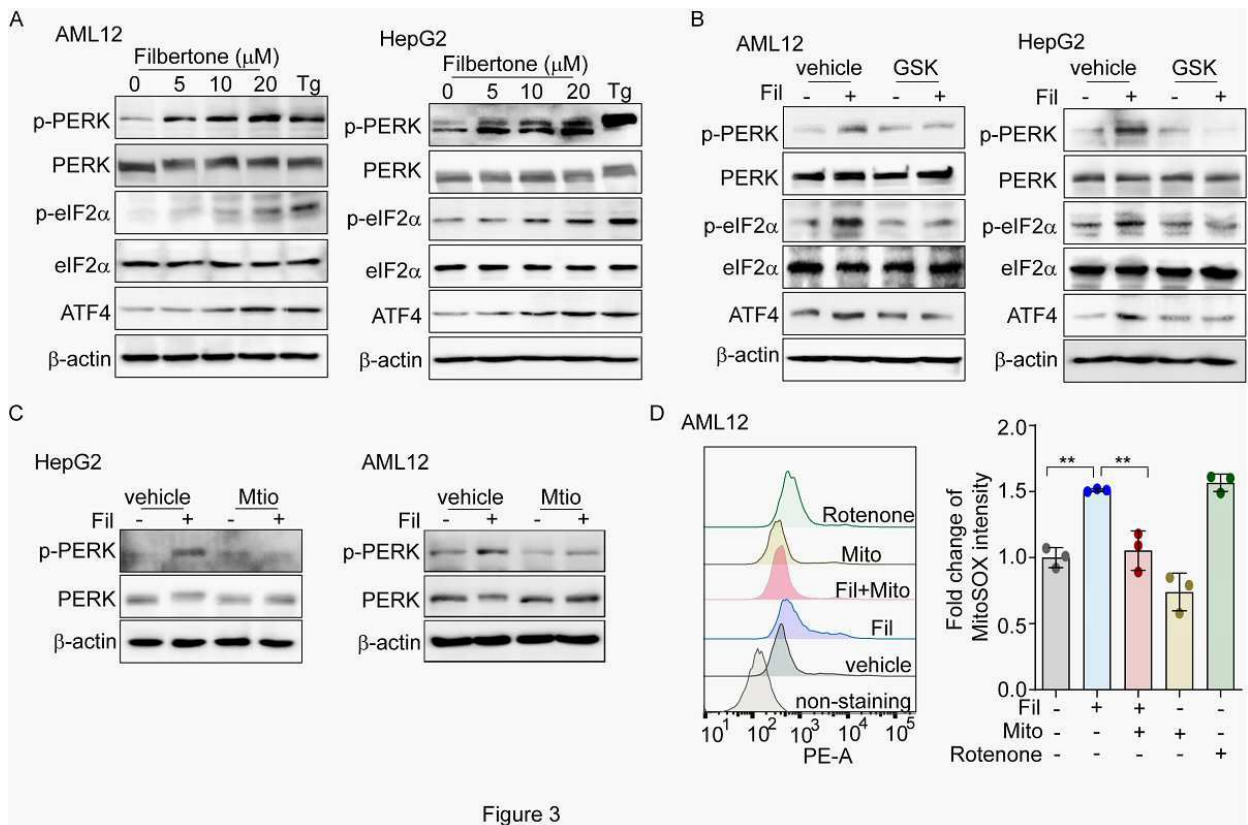
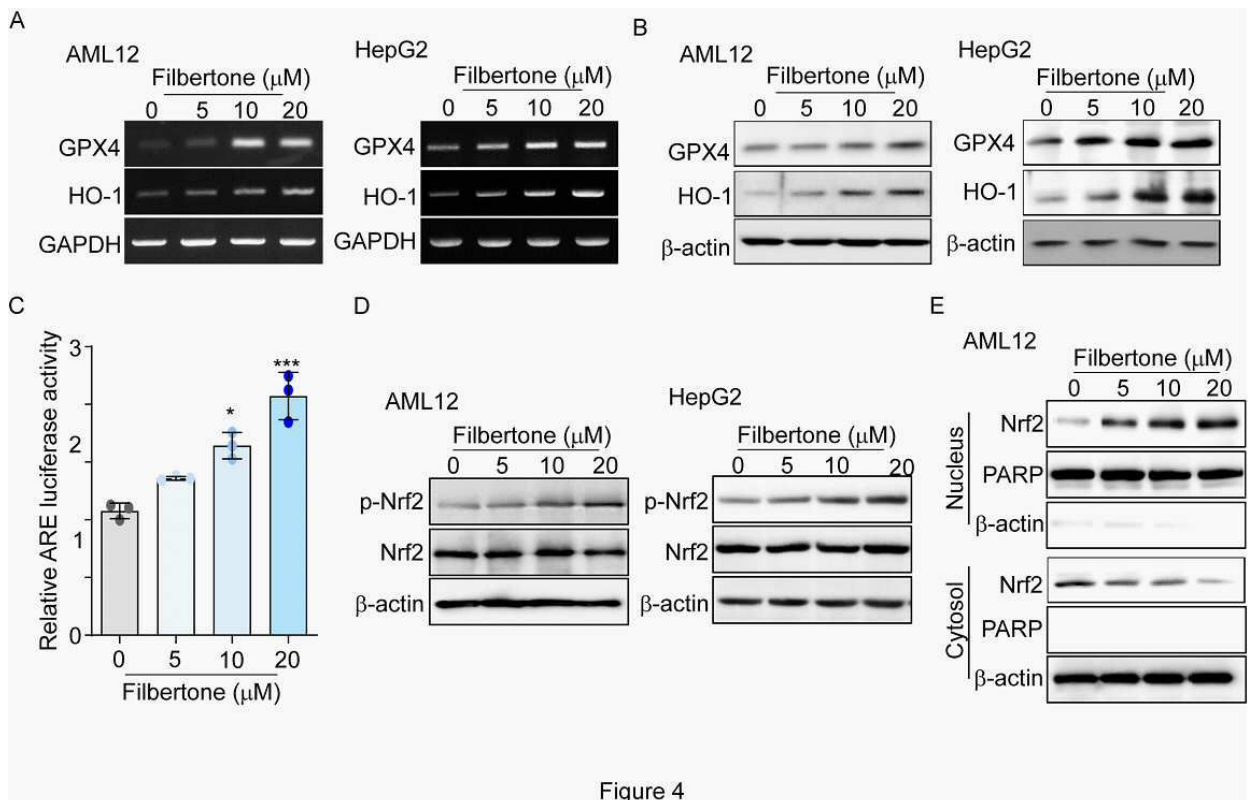


Figure 2

도면3



도면4



도면5

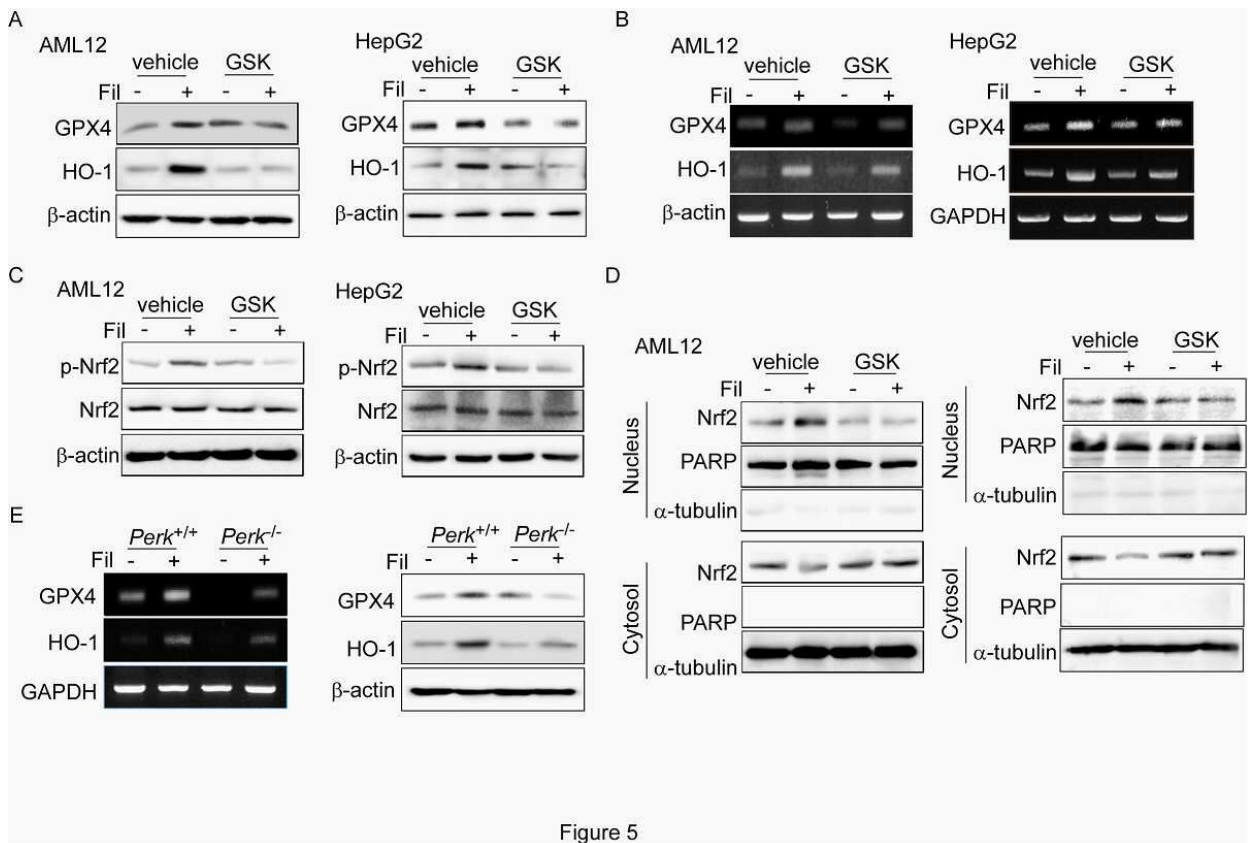


Figure 5

도면6

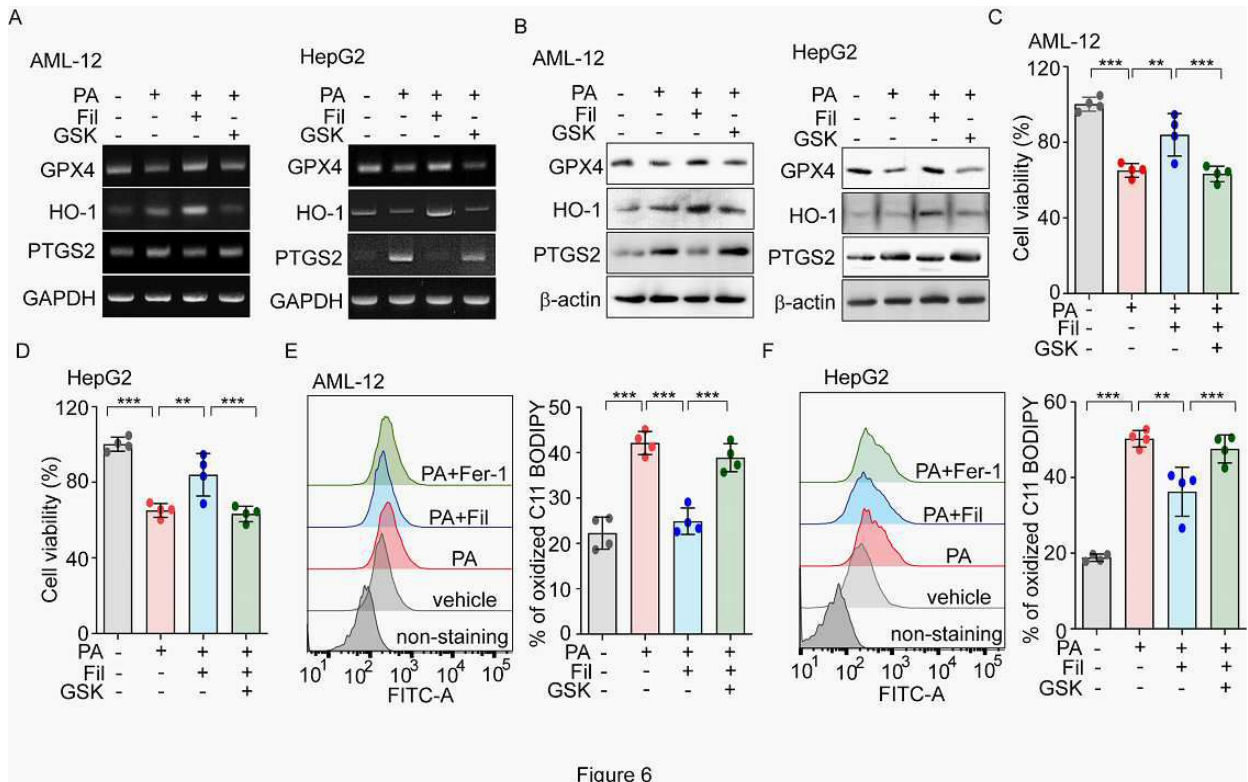


Figure 6

도면7

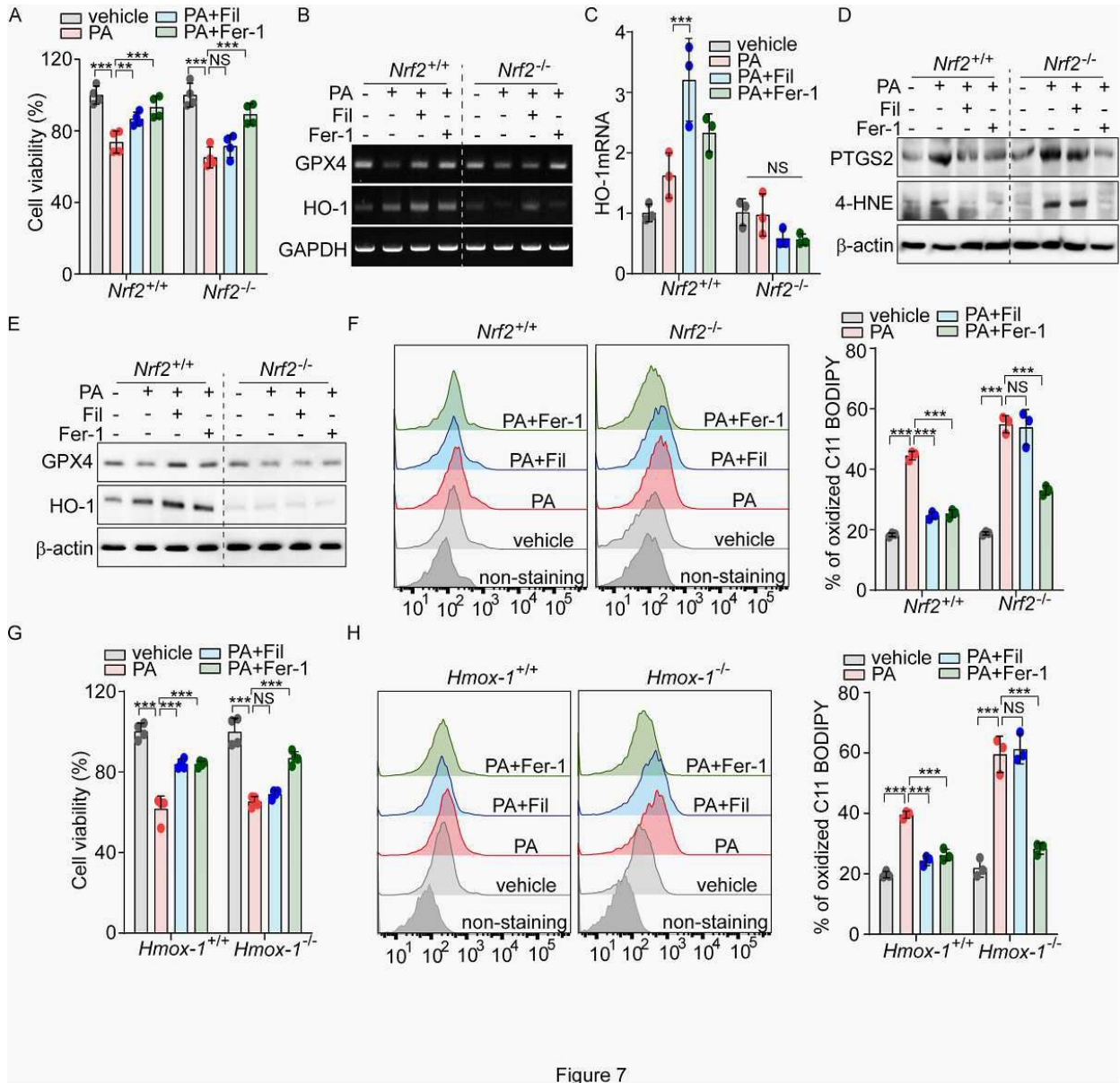


Figure 7

도면8

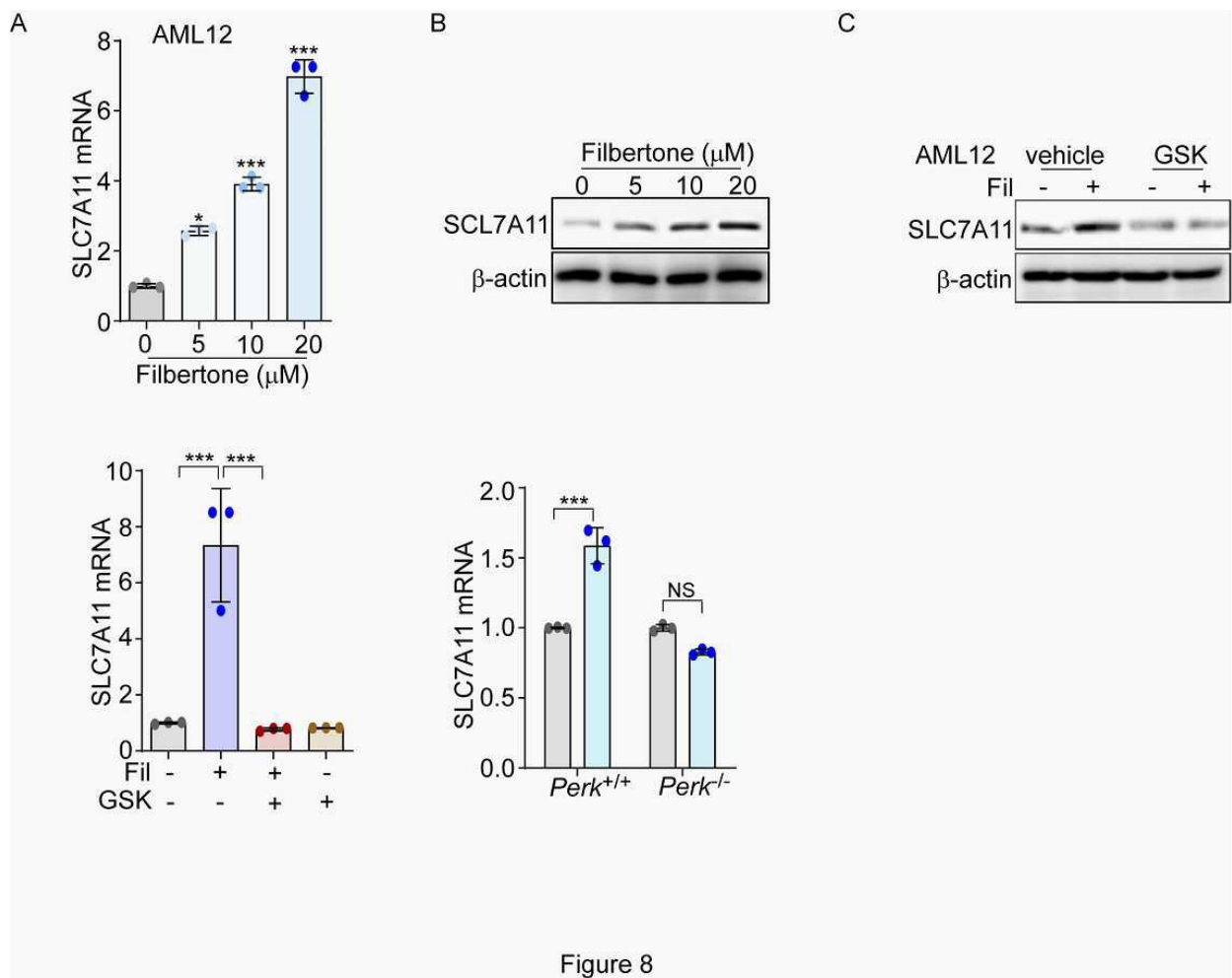
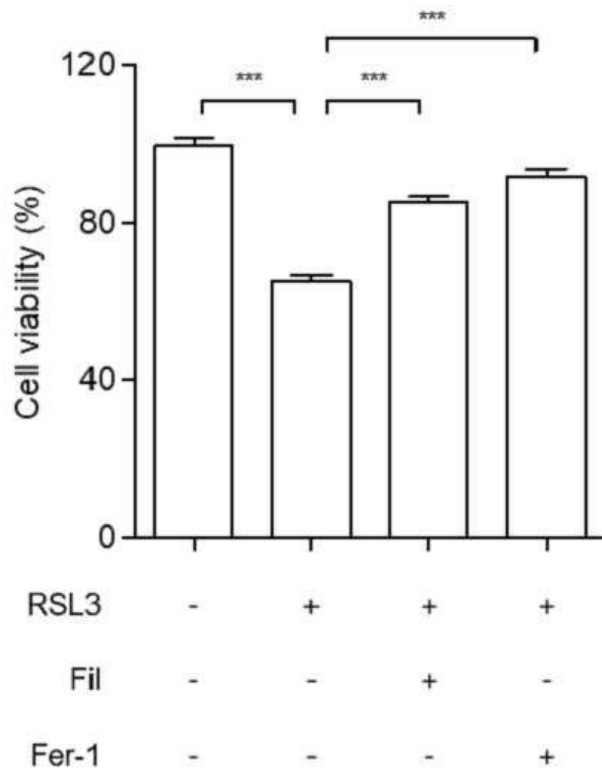
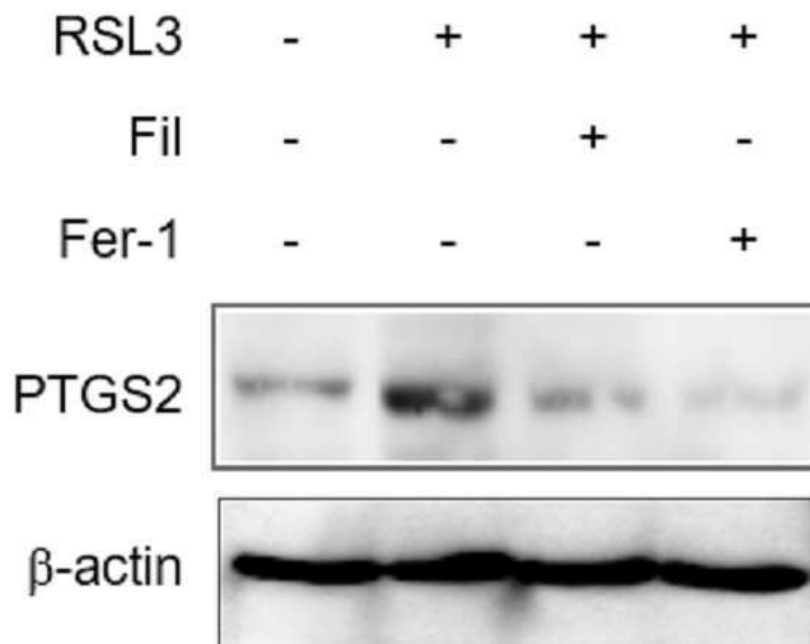


Figure 8

도면9

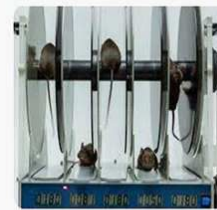
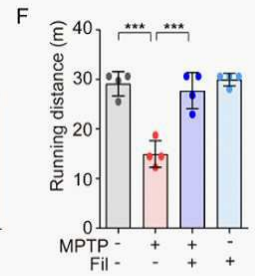
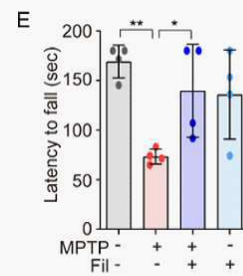
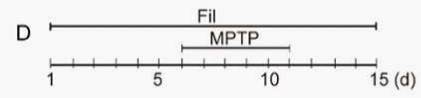
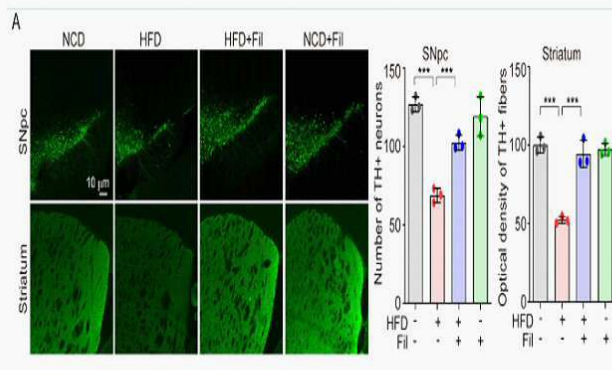


도면10



도면11

Fil: Filbertone



Rotarod test



Treadmill running test