(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 12 월 30 일 (30.12.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/262971 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 31/4745 (2006.01) *G01N 33/483* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/008247

(22) 국제출원일: 2020 년 6 월 25 일 (25.06.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0075413 2019 년 6 월 25 일 (25.06.2019) KR

(71) 출원인: 동아대학교 산학협력단 (**DONG-A UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION FOR INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION**) [KR/KR]; 49315 부산시 사하구 낙동대로550번길 37, Busan (KR).

(72) 발명자: 윤진호 (**YUN, Jean-Ho**); 47863 부산시 동래구 사직로 80, 123동 2004호, Busan (KR). 김동현 (**KIM, Dong-Hyun**); 48432 부산시 남구 수영로 345, 102동 2805호, Busan (KR).

(74) 대리인: 위병갑 (**WIE, Byoung-Gap**); 06141 서울시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

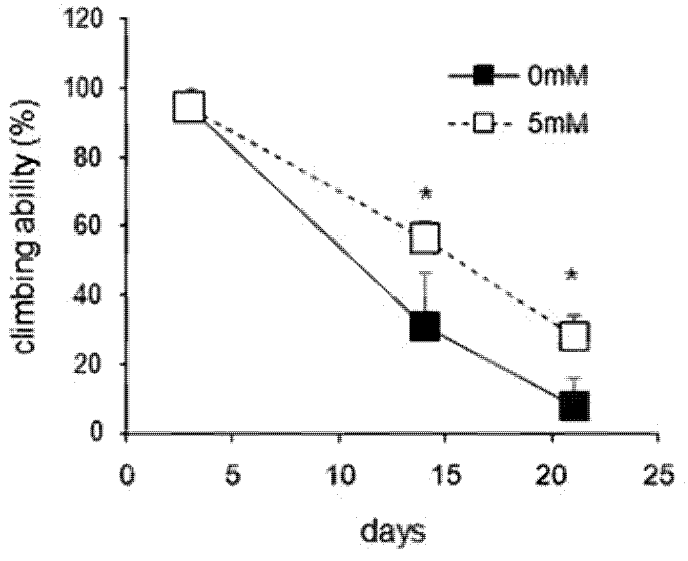
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING DISEASES CAUSED BY MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION

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



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for preventing or treating diseases caused by mitochondrial dysfunction, containing palmatine as an active ingredient, wherein palmatine promotes mitophagy activity, and thus can be effectively used in the treatment of diseases caused by mitochondrial dysfunction.

(57) 요약서: 본 발명은 팔마틴 (palmatine) 을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction) 으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 팔마틴은 미토파지의 활성을 촉진함으로써 미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환의 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

WO 2020/262971 A1

명세서

발명의 명칭: 미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 팔마틴 (palmatine)을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

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

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

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

[5] 현재 실험적으로 미토파지 활성을 유도하는 방법은 CCCP, FCCP, rotenone 등과 같이 미토콘드리아의 기능이상을 유도하는 소위 '미토콘드리아 독소들 (mitochondrial toxins)'을 처리하는 것이다. CCCP와 FCCP는 미토콘드리아 막전위

저해제 (uncoupler)로서 미토콘드리아 막전위를 탈분극시키며, rotenone은 Complex I 저해제로 작용한다. 이들은 직접적으로 미토콘드리아 손상을 유도함으로써 손상된 미토콘드리아의 제거기전인 미토파지 활성을 유도하지만, 세포에 대한 독성이 강하기 때문에 미토파지 활성 촉진을 위한 약물로는 사용할 수 없는 제한이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

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

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

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

[9] 본 발명의 또 다른 목적은 팔마틴(palmatine)을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 또 다른 목적은 팔마틴(palmatine)을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 약학적으로 유효한 양의 상기의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 또 다른 목적은 약학적으로 유효한 양의 상기의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 인지기능 장애의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

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

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

[15] 또한, 본 발명은 시험관 내 (*in vitro*)에서 팔마틴 (palamtine)을 미토콘드리아 기능이상 세포에 처리하는 단계를 포함하는 미토파지의 활성을 촉진시키는

방법을 제공한다.

[16] 또한, 본 발명은 팔마틴 (palamtine)을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[17] 또한, 본 발명은 팔마틴 (palamtine)을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[18] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[19] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 인지기능 장애의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

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

도면의 간단한 설명

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

[22] 도 1B는 유세포 분석법에 의한 (Flow cytometry)에 의한 미토파지 활성을 그래프로 나타낸 것이다.

[23] 도 2A는 공초점 현미경 (confocal microscopy)에 의한 미토파지의 활성을 형광으로 측정한 것이다.

[24] 도 2B는 공초점 현미경 (confocal microscopy)에 의한 미토파지의 활성을 확인한 도이다.

[25] 도 2C는 공초점 현미경 (confocal microscopy)에 의한 미토파지의 활성을 측정하는 수학식을 나타낸 도이다.

[26] 도 3A는 인간 폐상피세포주에서 팔마틴에 의한 미토파지의 활성을 유세포 분석법으로 분석한 결과이다.

[27] 도 3B는은 인간 폐상피세포주에서 팔마틴에 의한 미토파지의 활성을 공초점현미경으로 분석한 결과이다.

[28] 도 3C는은 인간 폐상피세포주에서 팔마틴에 의한 미토콘드리아의 양을 분석한 결과이다.

[29] 도 4A는 Parkin이 발현되는 HeLa 세포 (HeLa-Parkin)에서 팔마틴에 의한 미토파지의 활성을 유세포 분석법으로 분석한 결과이다.

[30] 도 4B는 Parkin이 발현되는 HeLa 세포 (HeLa-Parkin)에서 팔마틴에 의한 미토파지의 활성을 공초점 현미경으로 분석한 결과이다.

[31] 도 5A는 팔마틴의 처리농도에 따른 미토파지의 활성을 분석한 결과이다.

[32] 도 5B는 팔마틴의 처리시간에 따른 미토파지의 활성을 분석한 결과이다.

[33] 도 6A는 미토콘드리아, ER 및 Goli 형광 마커를 발현하는 Hela 세포주에서,

팔마틴을 처리하여, 미토콘드리아의 형광 발현 양상을 공초점 현미경으로 확인한 도이다.

[34] 도 6B는 미토콘드리아, ER 및 Goli 형광 마커를 발현하는 Hela 세포주에서, 팔마틴을 처리하여, 미토콘드리아의 형광 발현 양상을 수치화하여 도식화한 것이다.

[35] 도 7A는 팔마틴의 처리에 따른 미토콘드리아 막전위를 TMRM assay로 분석한 결과이다.

[36] 도 7B는 팔마틴의 처리에 따른 미토콘드리아 활성산소를 MitoSOX assay로 분석한 결과이다.

[37] 도 7C는 팔마틴의 처리에 따른 미토파지의 활성을 분석한 결과이다.

[38] 도 7D는 NAC (N-Acetylcysteine)처리 및 팔마틴의 처리에 따른 미토콘드리아 활성산소 변화를 MitoSOX assay로 분석한 결과이다.

[39] 도 7E는 팔마틴의 처리에 따른 미토콘드리아 활성산소를 DCF-DA assay로 분석한 결과이다.

[40] 도 8은 팔마틴 및 AMPK 억제제 (Compound C)를 처리한 후 미토파지의 활성을 분석한 결과이다.

[41] 도 9A는 팔마틴을 처리한 후 NAO 형광 염료를 이용하여 미토콘드리아의 양을 분석한 결과이다.

[42] 도 9B는 팔마틴을 처리한 후 미토콘드리아 생합성의 조절 인자인 PGC-1α의 mRNA 발현량을 RT-PCR을 통해 분석한 결과이다.

[43] 도 9C는 팔마틴을 처리한 후 미토콘드리아 생합성의 조절 인자인 NRF1의 mRNA 발현량을 RT-PCR을 통해 분석한 결과이다.

[44] 도 9D는 팔마틴을 처리한 후 미토콘드리아 생합성의 조절 인자인 TFAM 의 mRNA 발현량을 RT-PCR을 통해 분석한 결과이다.

[45] 도 10A는 PINK1 결핍 MEF 세포주에서, 팔마틴을 처리하였을 때, 미토콘드리아 단백질인 Mfn2 및 COX2 단백질의 발현을 웨스턴 블랏으로 확인한 것이다.

[46] 도 10B는 PINK1 결핍 MEF 세포주에서, 팔마틴을 처리하였을 때, 활성산소가 감소하는 것을 확인한 그래프이다.

[47] 도 10C는 PINK1 결핍 MEF 세포주에서, 팔마틴을 처리하였을 때, 미토콘드리아 호흡율이 증가한 것을 확인한 도이다.

[48] 도 11은 근위축성 측삭경화증 (Amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 초파리 동물모델에 팔마틴을 투여하여, 운동개선 효과를 확인한 도이다.

[49] 도 12는 알츠하이머 동물모델인 Aβ 과발현 초파리 동물모델에 팔마틴을 투여하여, 운동개선 효과를 확인한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

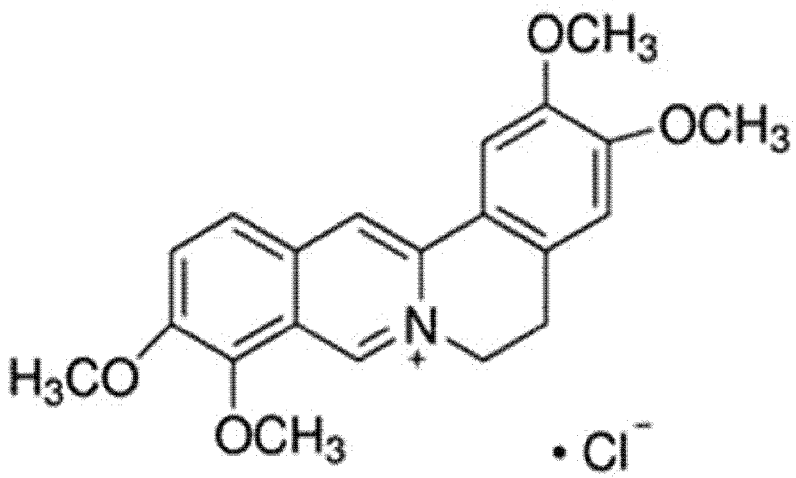
[50] 본 발명은 팔마틴 (palmatine)을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아

기능이상 (mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[51] 본 발명에 따른 화합물인 팔마틴 (palmatine, CAS Number: 3486-67-7)은 하기 화학식 1 로 표시되는 화합물을 의미한다.

[52] [화학식 1]

[53]



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

[55] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 팔마틴은 미토콘드리아의 세포호흡율을 증가시키는 것일 수 있다.

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

[57]

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

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

[60] 또한, 본 발명의 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 나아가, 연고제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 크림제, 산제, 현탁제, 겔제 또는 젤의 형태의 피부 외용제의

형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[70]

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

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

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

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

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

[76] 또한, 본 발명은 팔마틴 (palamtine)을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

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

[78] 또한, 본 발명은 팔마틴 (palamtine)을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[79] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[80] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 인지기능 장애의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[81] 또한 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 미토콘드리아 기능이상 또는 인지기능 장애의 예방 및 치료방법을 제공한다. 본 발명의 약학 조성물은 치료적 유효량 또는 약학으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

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

[83]

[84] **실시예 1. 미토파지의 활성 측정 방법**

[85] **1.1. 미토케이마 발현 세포주의 제작**

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

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

[88]

[89] **1.2. 유세포 분석법 (Flow cytometry)에 의한 미토파지 활성 측정 방법**

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

[91]

[92] **1.3. 공초점 현미경 (confocal microscopy)에 의한 미토파지의 활성 측정 방법**

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

[94]

[95] **실시예 2. 미토파지 활성 조절 화합물의 발굴**

[96] 본 발명자들은 식물유래 생리활성물질 라이브러리를 스크리닝하여 구조적으로 유사한 이소퀴놀린 알카로이드인 팔마틴 (Palmatine)을 미토파지의 활성 촉진물질로 발굴하였다.

[97]

[98] **실시예 3. 인간 폐상피세포주에서 팔마틴에 의한 미토파지의 활성 촉진 효과 분석**

[99] 본 발명자들은 팔마틴에 의한 미토파지의 활성 촉진 효과를 검증하기 위한 실험을 수행하였다. 간단히, 미토케이마를 발현하는 인간 폐상피세포주인 BEAS-2B 세포에 팔마틴 (400 μM) 또는 미토콘드리아 막전위 저해제 (uncoupler)로 알려진 CCCP (10 μM)를 24 시간 동안 처리한 후, 유세포분석기 또는 공초점현미경을 사용하여 미토파지의 활성을 측정하거나 미토콘드리아 양적 감소에 의한 미토파지의 활성을 측정하였다.

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

[101]

[102] **실시예 4. 자궁경부암 세포주에서 팔마틴에 의한 미토파지의 활성 촉진 효과 분석**

[103] 본 발명자들은 다른 세포주에서도 팔마틴에 의하여 미토파지의 활성이 촉진되는지 확인하는 실험을 수행하였다. 간단히, Parkin (E3 ubiquitin ligase)이 발현되는 자궁경부암 세포주인 HeLa 세포 (HeLa-Parkin)에 팔마틴 또는 CCCP를 처리한 후 미토파지의 활성을 분석하였다.

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

[105]

[106] **실시예 5. 팔마틴의 처리농도 및 처리시간에 따른 미토파지의 활성 촉진 효과 분석**

[107] 본 발명자들은 팔마틴의 처리농도 및 처리시간에 따른 미토파지의 활성 촉진 효과를 분석하는 실험을 수행하였다. 간단히, 팔마틴은 미토케이마를 발현하는 BEAS-2B 세포에 주어진 농도 (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400 및 800 μM)에서 24시간 동안 처리한 후, 유세포분석기을 이용하여 미토파지 활성을 측정하였다. 또한, BEAS-2B 세포에 팔마틴 (400 μM)을 주어진 시간 (0, 3, 6, 12,

18 및 24 시간) 동안 처리한 후, 유세포분석기을 이용하여 미토파지 활성을 측정하였다.

[108] 그 결과, 팔마틴의 처리농도가 5 내지 40 μM 에서는 미토파지의 활성에 어떠한 차이가 나타나지 않았고, 80 μM 부터 미토파지의 활성이 증가하였으며, 800 μM 까지 농도의존적으로 증가하였음을 확인하였다 (도 5A). 또한, 팔마틴의 처리시간의 경우 3 시간부터 미토파지의 활성이 증가하였고, 24 시간에 최대로 활성이 증가하였음을 확인하였다 (도 5B).

[109]

[110] **실시예 6. 팔마틴에 의한 미토파지 특이적 유도활성 확인**

[111] 본 발명자들은 팔마틴에 의한 미토파지 특이적 유도활성을 확인하기 위하여, 미토콘드리아(mito-YFP), 세포소기관 ER(ER-GFP) 및 세포소기관 Golgi(Golgi-GFP) 형광마커를 각각 발현하는 Hela 세포주들에 팔마틴을 200 또는 400 μM 농도로 처리하여, 24시간 배양하였다. 배양 후 각 세포소기관 형광신호의 변화를 공초점 현미경으로 분석하여 가시화 하였다.

[112] 그 결과 도 6에 나타낸 바와 같이, 팔마틴의 농도가 증가할수록 미토콘드리아의 형광이 유의적으로 감소하는 것을 확인 하였으며, ER 및 Golgi에서는 형광의 변화가 없는 것을 확인하여, 팔마틴이 다른 세포소기관에는 영향을 끼치지 않으면서, 미토파지에 특이적인 활성화를 유도하는 것을 확인하였다.

[113]

[114] **실시예 7. 팔마틴에 의한 미토파지 활성화에서 미토콘드리아 막전위 및 활성산소 변화 분석**

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

[116] 그 결과, 팔마틴을 처리한 경우 CCCP를 처리한 경우에 비해 미토콘드리아의 막전위에 큰 차이가 나타나지 않았다 (도 7A). 활성산소(ROS)의 경우에도 CCCP를 처리한 그룹에서는 현저하게 증가되었으나, 팔마틴을 처리한 그룹에서는 큰 차이가 나타나지 않았다 (도 7B).

[117] 특히, 항산화제인 NAC (N-Acetylcysteine)를 처리한 경우 CCCP 에 의한 미토파지의 활성은 억제된 반면, 팔마틴에 의한 미토파지의 활성은 항산화제의 처리와 관계없이 유지되는 것을 확인하였다 (도 7C). 또한, NAC를 처리한 경우 CCCP에 의해 증가된 ROS가 현저하게 감소되었으나, 팔마틴에서는 ROS가 크게 감소되지 않았다 (도 7D 및 7E).

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

[119]

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

[121] AMPK (AMP-activated protein kinase)의 활성화는 오토파지 및 미토파지의 개시 단계에서 중요한 것으로 보고되고 있다. 이에 본 발명자들은 팔마틴이 AMPK에 의존적으로 미토파지의 활성을 촉진하는지 확인하는 실험을 수행하였다. 간단히, 미토케이마를 발현하는 BEAS-2B 세포에 팔마틴 (400 μM)을 여러 다른 농도(2.5, 5 및 10 μM)의 AMPK 억제제 (inhibitor)인 Compound C 와 함께 3시간 동안 처리한 후, 유세포분석기를 이용하여 미토파지의 활성을 분석하였다.

[122] 그 결과, 2.5 및 5 μM의 Compund C가 처리된 경우에는 어떠한 효과가 나타나지 않았으나, 10 μM의 Compund C가 처리된 경우 팔마틴에 의해 증가된 미토파지의 활성이 감소되었음을 확인하였다 (도 8). 상기 결과로부터, 팔마틴은 AMPK에 의존적으로 미토파지의 활성을 촉진한다는 것을 확인하였다.

[123]

[124] **실시예 9. 팔마틴에 의한 미토콘드리아 생합성 촉진**

[125] 본 발명자들은 팔마틴에 의한 미토파지의 활성 촉진이 일어난 후에 새로운 미토콘드리아의 생합성이 촉진되는지 분석하는 실험을 수행하였다. NAO (10-N-nonyl acridine orange)인 형광 염료를 이용하여 미토콘드리아의 양을 분석한 결과, 팔마틴을 처리한 직후에는 미토콘드리아의 양이 감소하였다가 시간이 지남에 따라 조금씩 회복됨을 확인하였다 (도 9A).

[126] 또한, 미토콘드리아 생합성에 중요한 조절 인자로 알려진 PGC-1α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), NRF1 (nuclear respiratory factor 1) 및 TFAM (mitochondrial transcription factor A)의 mRNA 발현량을 RT-PCR을 이용하여 확인한 결과, PGC-1α, NRF1 및 TFAM의 mRNA는 팔마틴을 처리한 후 48 시간에서 유의미하게 증가하였음을 확인하였다 (도 9B, 9C 및 9D).

[127] 상기 결과로부터, 팔마틴은 미토콘드리아의 생합성을 유도한다는 것을 확인하였다.

[128]

[129] **실시예 10. 팔마틴의 파킨슨병 개선 효과 확인**

[130] 본 발명자들은 파킨슨병 모델에서, 팔마틴이 미토콘드리아의 기능개선 효과를 가지는지 확인하기 위하여, 파킨슨병 PINK(PTEN-induced kinase 1) 결핍 MEF(murine embryonic fibroblast)세포주를 사용하여, 팔마틴에 의한 기능개선 효과를 확인하였다. 구체적으로, PINK1 결손 MEF세포주에 팔마틴을 100, 200 또는 400 μM 농도로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 팔마틴에 의한 미토파지 증가를 검증하기 위하여 배양 후 세포를 수득하여, 미토콘드리아 단백질인 Mfn2 및 COX2 단백질의 발현을 웨스턴블랏을 이용하여 조사하였다. 또한 미토콘드리아 기능개선 효과는, 미토콘드리아 기능이상의 지표인 활성산소 증가를 mitoSox 염색 후 유세포 분석기로 분석하고, 미토콘드리아 호흡율을 XF24 analyser로 분석하였다. 미토콘드리아 기능개선은 PINK 결핍 MEF

세포주(PINK KO)에 양성 대조군으로, DMSO를 처리하고, 실험군으로 팔마틴을 400 μM농도로 24시간 처리하고, 4일후 미토콘드리아 활성산소 및 미토콘드리아의 호흡율을 분석하여 결정하였다.

[131] 그 결과, 도 10A에 나타낸 바와 같이, 팔마틴을 처리하면, 농도 의존적으로 미토콘드리아 단백질인 Mfn2 및 COX2의 발현이 감소하는 것을 확인하여, 미토파지의 활성이 증가한 것을 확인하였다.

[132] 또한, mitoSox로 염색한 결과, PINK1 결핍 MEF 세포주(PINK1 KO, DMSO)가 정상 세포주(WT)보다 활성산소가 증가되어 있음을 확인하였으며, 팔마틴을 처리하였을 때, 활성산소가, 정상세포주와 유사한 수준으로 감소하는 것을 확인하였다(도 10B).

[133] 미토콘드리아의 호흡율을 분석한 결과, 정상세포주(WT)와 비교하여, PINK1 결핍 MEF 세포주(PINK1 KO)에서 미토콘드리아의 호흡율이 현저히 감소되어 있는 것을 확인하였으며, 팔마틴을 처리하면 미토콘드리아의 호흡율이 유의하게 증가한 것을 확인하였다(도 10C).

[134]

[135] **실시예 11. 팔마틴의 퇴행성 질환 동물모델에서의 운동성 개선 확인**

[136] 퇴행성 질환 중 근위축성측상 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 및 알츠하이머에 대한 팔마틴의 효과를 확인하기 위하여, ALS 초파리 동물모델을 이용하여, 그 효과를 확인하였다. 구체적으로, 대표적인 ALS 초파리 동물모델인 TDP-4 과발현 모델에, 팔마틴을 5 mM을 투여하여, 25일간 climbing assay를 시행하였다. 또한, 알츠하이머 동물모델에서의 운동성을 평가하기 위하여, 상기와 동일한 조건에서, 알츠하이머 표현형을 가지는 Aβ 과발현 초파리 동물모델을 사용하여 동일한 실험을 수행하였다.

[137] 그 결과, 도 11 및 도 12에 나타낸 바와 같이, 팔마틴을 처리하면, 대조군과 비교하여, ALS 및 알츠하이머 질병에서, 운동성이 개선되는 것을 확인하였다.

[138]

[139] 따라서, 본 발명의 팔마틴은, 미토파지를 유도하여, 기능 이상 미토콘드리아를 제거하는 것을 확인하였다. 또한 구체적으로 미토콘드리아의 호흡율은 증가시키는 것을 확인하였으며, 미토콘드리아의 기능이상으로 유발된 퇴행성 질환 동물모델(ALS 및 알츠하이머)에서 운동성을 개선시키는 효과를 나타내어, 효과적으로 인지기능을 개선시킴으로서 퇴행성 질환을 개선시키는 것을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] 팔마틴(palamtine)을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 기능이상(mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 팔마틴은 미토파지 (mitophagy)의 활성을 촉진시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 팔마틴은 미토콘드리아의 세포호흡율을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환은 퇴행성 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 5] 제 4 항에 있어서,
상기 퇴행성 질환은 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis), 헌팅턴병 (Huntington's Disease), 다발성 경화증(Multiple sclerosis), 면역계이상 뇌기능 부전, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병(Niemann-Pick disease), 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매(dementia)로 이루어지는 그룹에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 6] 제 1 항에 있어서,
상기 미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환은 MELAS 증후군 (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes), 루게릭병 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 및 샤르코 마리 투스 질환 (Charcot Marie Tooth disease, CMT)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

[청구항 7] (a) 미토케이마 (mt-Keima)를 발현하는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 및
(b) 미토파지 (mitophagy)의 활성을 측정하는 단계;를 포함하는 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환 치료제의 스크리닝 방법.

[청구항 8] 제 7 항에 있어서,
상기 미토파지의 활성은 유세포분석법 (flow cytometry) 또는 공초점 현미경 (confocal microscopy)에 의하여 측정되는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 9] 제 7 항에 있어서,
상기 시험물질이 미토파지의 활성을 촉진시킨 경우 미토콘드리아

기능이상으로 인한 질환 치료제인 것으로 판단하는 단계를 추가적으로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 10] 제 7 항에 있어서,
상기 미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환은 퇴행성 질환인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 11] 제 10 항에 있어서,
상기 퇴행성 질환은 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis), 헌팅턴병 (Huntington's Disease), 다발성 경화증(Multiple sclerosis), 면역계이상 뇌기능 부전, 진행성 신경퇴행질환, 대사성 뇌질환, 니만-픽병(Niemann-Pick disease), 뇌 허혈 및 뇌출혈로 인한 치매(dementia)로 이루어지는 그룹에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 12] 제 7 항에 있어서,
상기 미토콘드리아 기능이상으로 인한 질환은 MELAS 증후군 (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes), 루게릭병 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 및 샤르코 마리 투스 질환 (Charcot Marie Tooth disease, CMT)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 13] 시험관 내 (*in vitro*)에서 팔마틴(palamtine)을 미토콘드리아 기능이상 세포에 처리하는 단계를 포함하는 미토파지의 활성을 촉진시키는 방법.

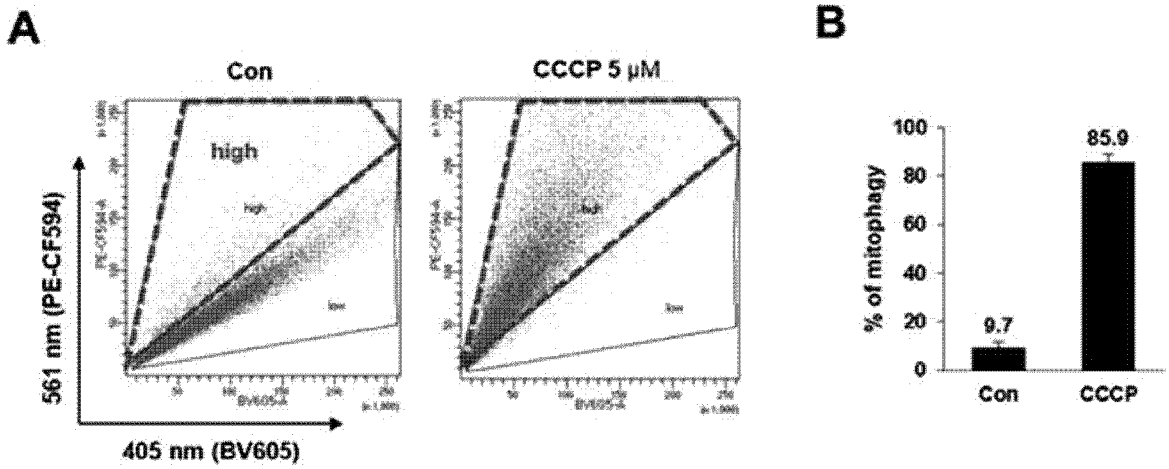
[청구항 14] 팔마틴(palamtine)을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 15] 팔마틴(palamtine)을 유효성분으로 포함하는 인지기능 장애 예방 또는 개선용 식품 조성물.

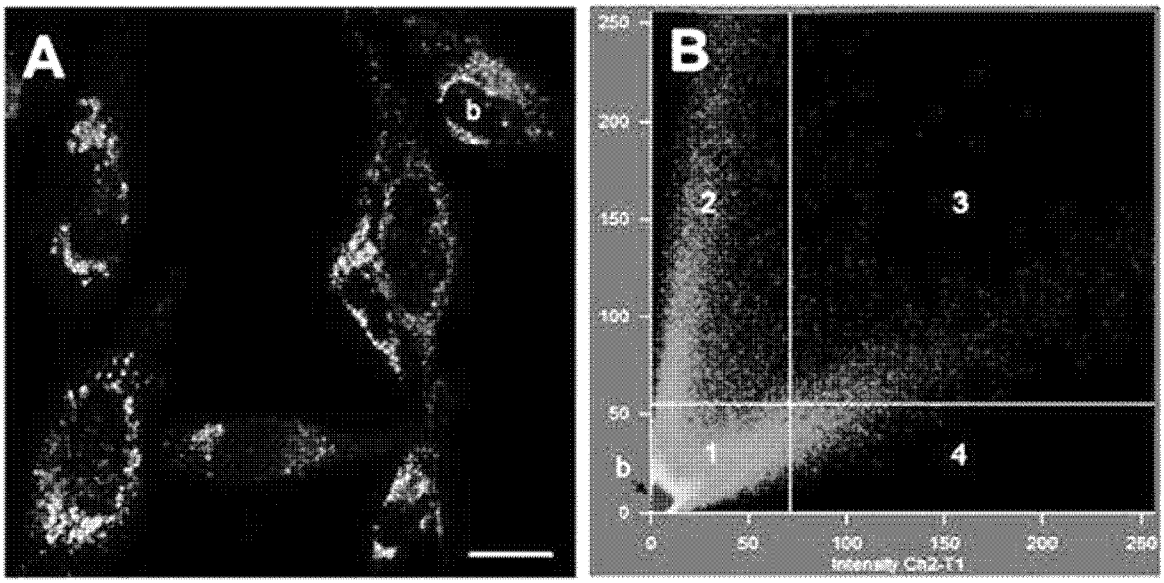
[청구항 16] 약학적으로 유효한 양의 제1항의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction)으로 인한 질환의 예방 또는 치료 방법.

[청구항 17] 약학적으로 유효한 양의 제 14항의 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 인지기능 장애의 예방 또는 치료 방법.

[도1]



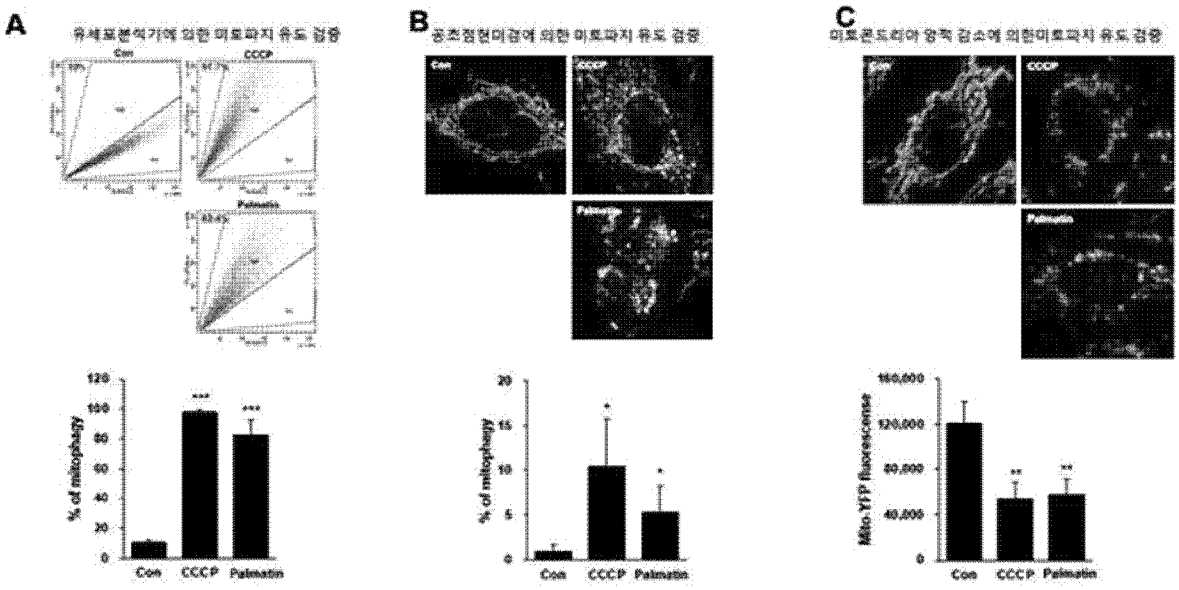
[도2]



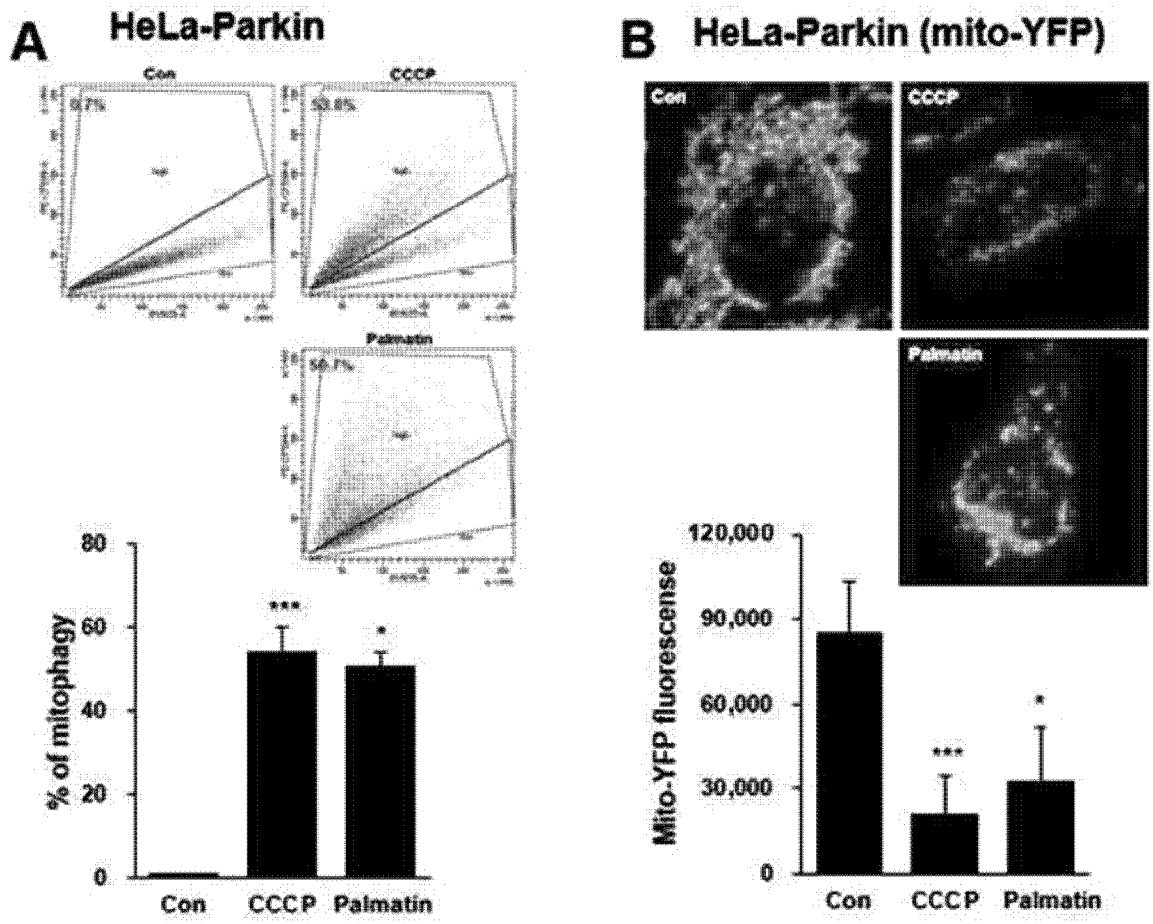
C

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

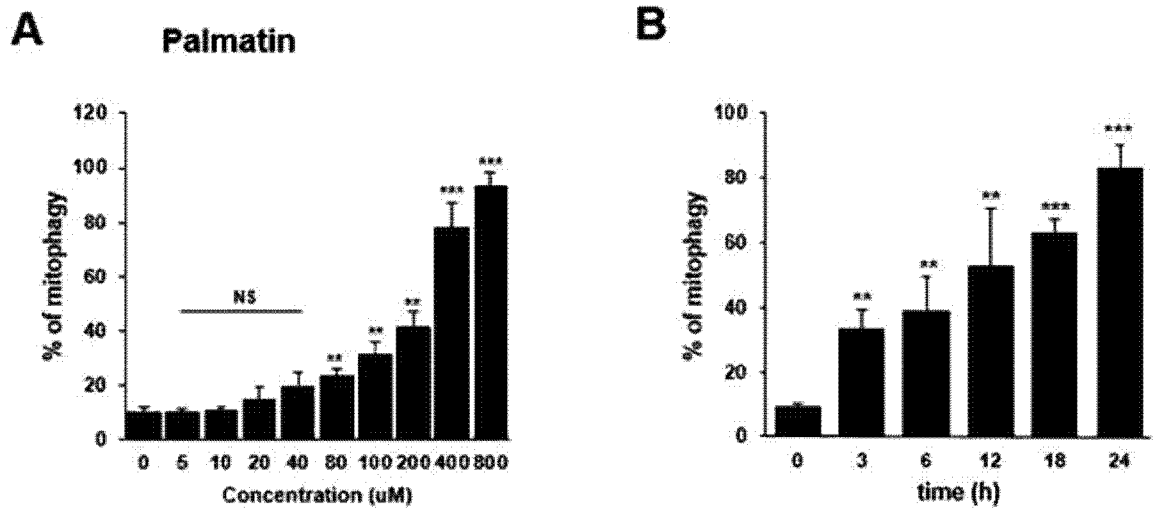
[도3]


A
Con
CCCP
Palmatin
% of mitophagy
Con
CCCP
Palmatin
B
Con
CCCP
Palmatin
% of mitophagy
Con
CCCP
Palmatin
C
Con
CCCP
Palmatin
Mito-YFP fluorescense
Con
CCCP
Palmatin

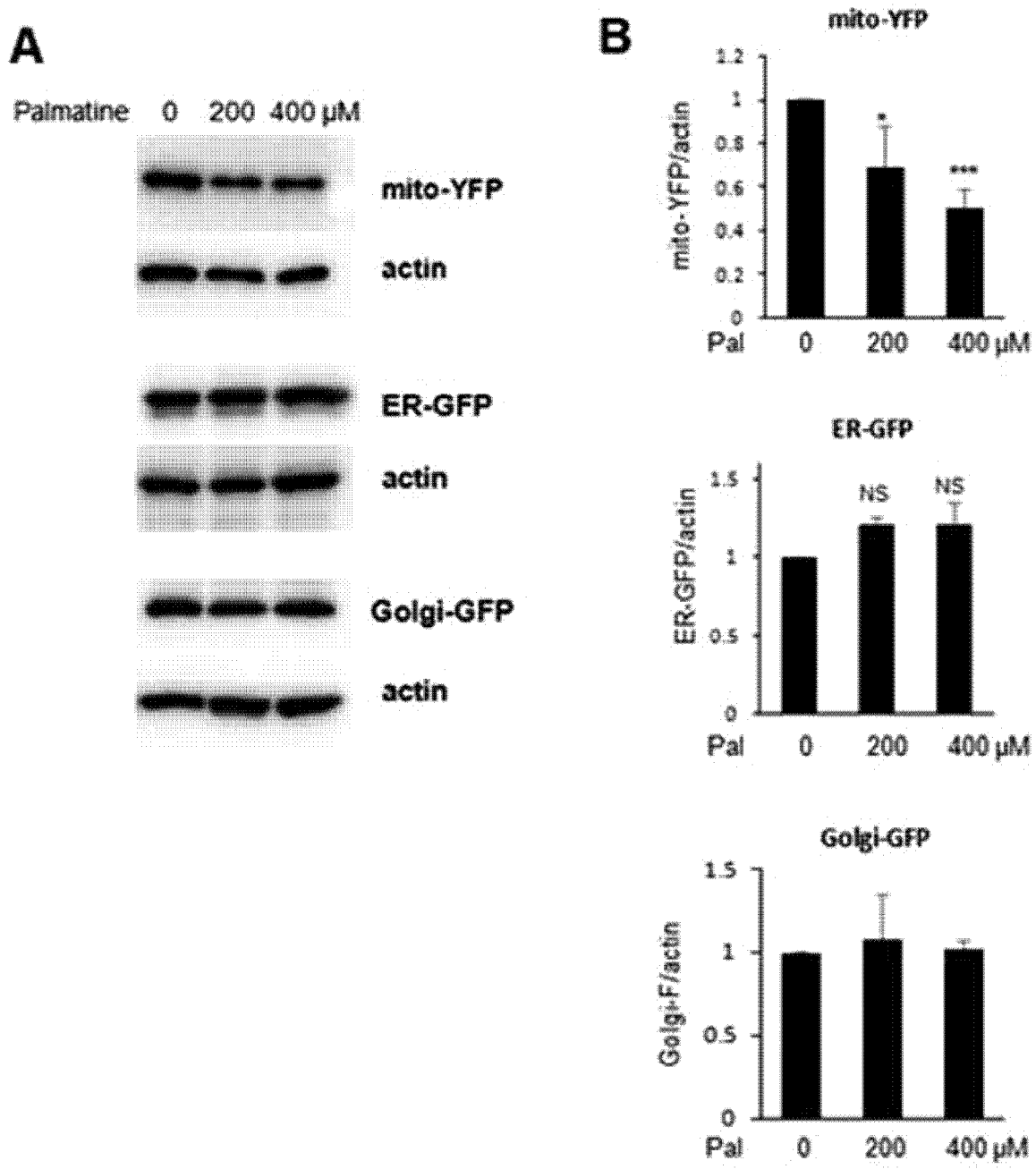
[도4]


A
HeLa-Parkin
Con
CCCP
Palmatin
% of mitophagy
Con
CCCP
Palmatin
B
HeLa-Parkin (mito-YFP)
Con
CCCP
Palmatin
Mito-YFP fluorescense
Con
CCCP
Palmatin

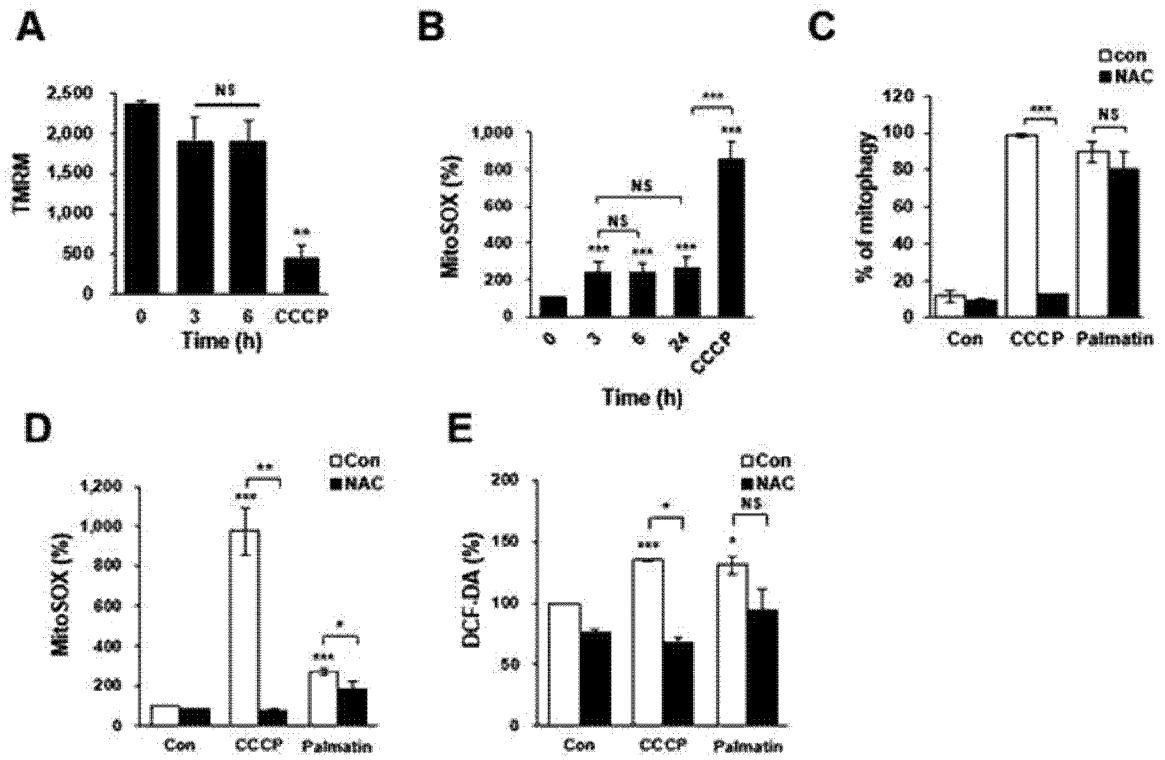
[도5]


A
Palmatin
% of mitophagy
120
100
80
60
40
20
0
NS
**
***
0 5 10 20 40 80 100 200 400 800
Concentration (uM)
B
% of mitophagy
100
80
60
40
20
0
**
***
0 3 6 12 18 24
time (h)

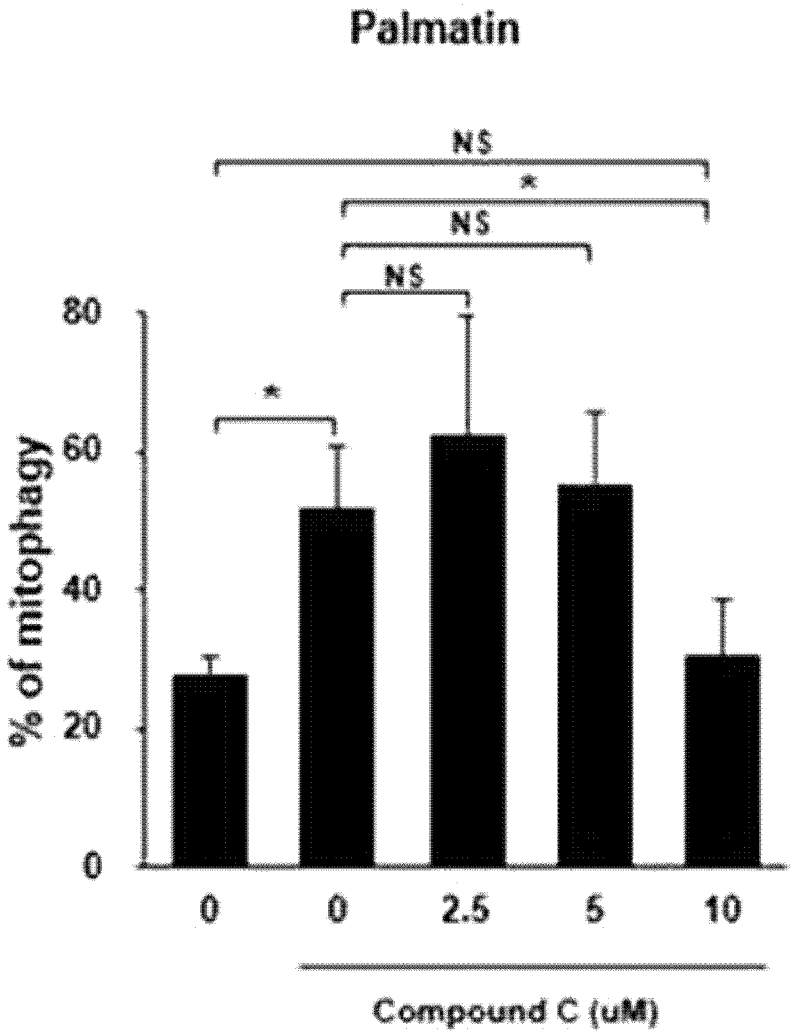
[도6]


A
Palmatine 0 200 400 μM
mito-YFP
actin
ER-GFP
actin
Golgi-GFP
actin
B
mito-YFP
mito-YFP/actin
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
*
***
Pal 0 200 400 μM
ER-GFP
ER-GFP/actin
1.5
1
0.5
0
NS
NS
Pal 0 200 400 μM
Golgi-GFP
Golgi-F/actin
1.5
1
0.5
0
Pal 0 200 400 μM

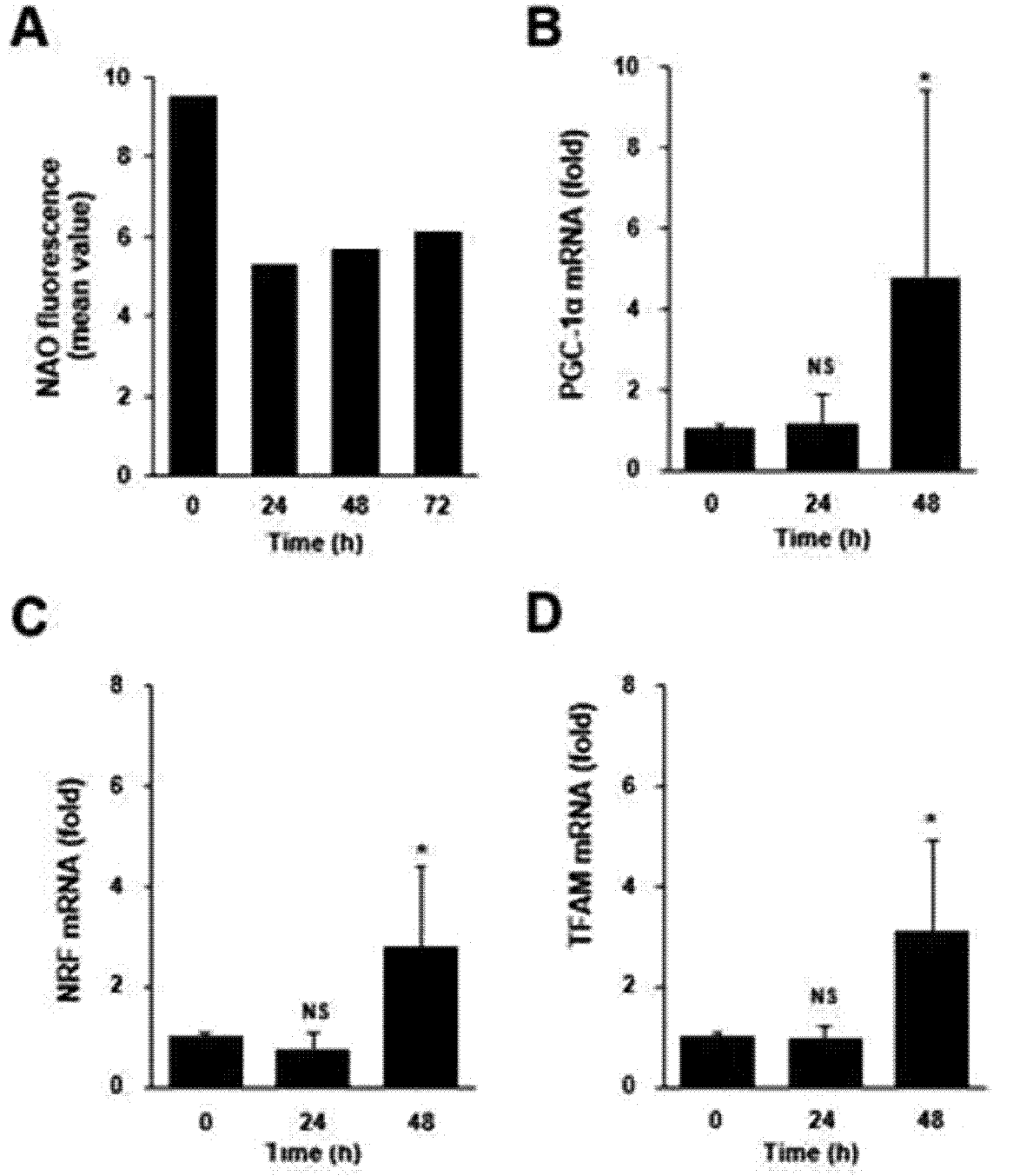
[도7]


A
TMRM
2,500
2,000
1,500
1,000
500
0
NS
**
0
3
6
CCCP
Time (h)
B
MitoSOX (%)
1,000
800
600
400
200
0
***
NS
NS
***
***
***
0
3
6
24
CCCP
Time (h)
C
□con
■NAC
% of mitophagy
120
100
80
60
40
20
0
***
NS
Con
CCCP
Palmatin
D
□Con
■NAC
MitoSOX (%)
1,200
1,000
800
600
400
200
0
**
***
*
***
Con
CCCP
Palmatin
E
□Con
■NAC
DCF-DA (%)
200
150
100
50
0
*
NS
***
*
Con
CCCP
Palmatin

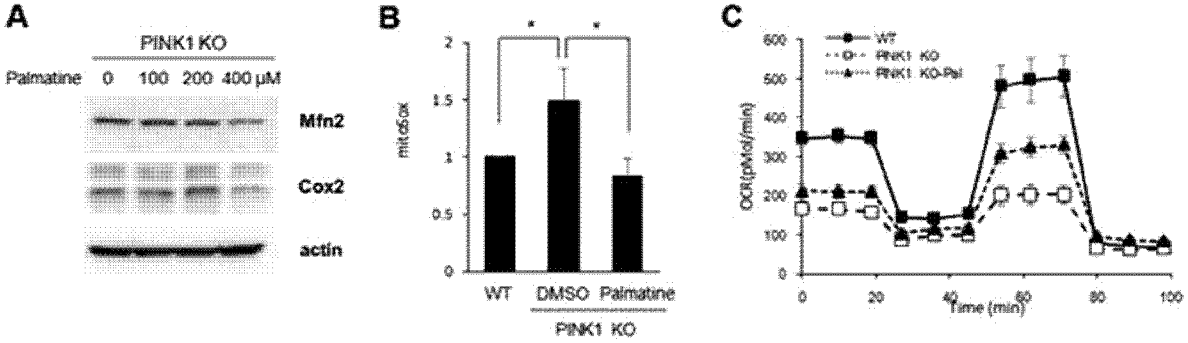
[도8]


Palmatin
NS
*
NS
NS
*
% of mitophagy
80
60
40
20
0
0
0
2.5
5
10
Compound C (uM)

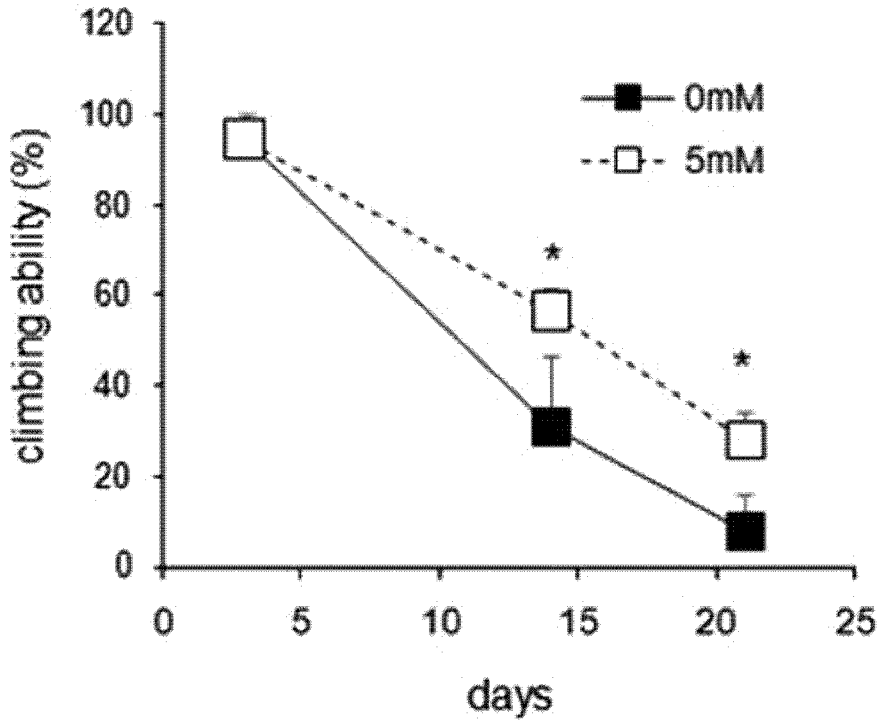
[도9]


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

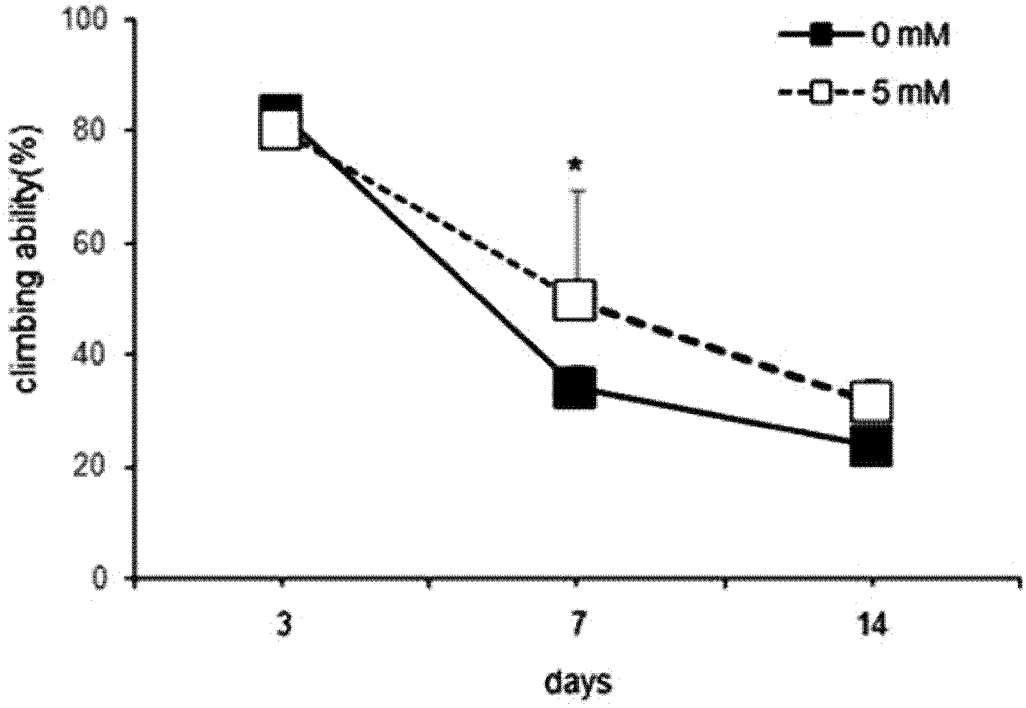
[도10]


A
PINK1 KO
Palmatine 0 100 200 400 μM
Mfn2
Cox2
actin
B
mit65ox
WT DMSO Palmatine
PINK1 KO
C
WT
PINK1 KO
PINK1 KO-Pal
OCR(pMol/min)
Time (min)

[도11]


120
100
80
60
40
20
0
climbing ability (%)
0mM
5mM
*
*
0
5
10
15
20
25
days

[도12]


100
80
60
40
20
0
climbing ability(%)
0 mM
5 mM
*
3
7
14
days

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/008247

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/4745(2006.01)i; ***A61P 25/28***(2006.01)i; **G01N 33/483**(2006.01)i; ***A23L 33/10***(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/4745; C12Q 001/00; C12Q 001/68; A61P 25/28; G01N 33/483; A23L 33/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction), 팔마틴 (palmatine), 퇴행성 질환 (neurodegenerative disorder), 미토케이마 (mt-Keima), 미토파지 (mitophagy)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FRIEDEMANN, T. et al. Neuroprotective activity of coptisine from Coptis chinensis (Franch). Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2015, vol. 2015, thesis no. 827309, pp. 1-9. See abstract; and Conclusion.	1-5,14,15
Y		6,13
A		7-12
Y	US 2003-0044776 A1 (DYKENS, J. A. et al.) 06 March 2003. See abstract; and claims 1, 4 and 5.	6,12
X	윤진호 (YUN, Jin Ho). Exploring the physiological roles and modulation of mitophagy for the development of novel therapeutic approach. 대한약사회 (Korean Pharmaceutical Association) 2018 Fall international convention of the Pharmaceutical Society of Korea. 17-19 October 2018, S24-3. See entire document.	7-11
Y		12,13

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
16 October 2020	**16 October 2020**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, Republic of Korea** **35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	윤진호 (YUN, Jin Ho). Exploring the physiological roles and modulation of mitophagy for the development of novel therapeutic approach. 기초의과학연구센터 2018 연합성과발표회 (Medical science and engineering Research Center 2018 Combined Achievement Conference). 23 October 2018, S5-2. See entire document.	7-11
Y		12,13
X	윤진호 (YUN, Jin Ho). Exploring the physiological roles and modulation of mitophagy for the development of novel therapeutic approach. 2019 KSBMB 제10회 동계학술대회 (2019 KSBMB 10th Winter Conference). 09-11 January 2019, S4-3. See entire document.	7-11
Y		12,13
X	윤진호 (YUN, Jin Ho). Exploring the physiological roles and modulation of mitophagy for the development of novel therapeutic approach. 2019년 제50차 대한비만학회 춘계학술대회 (2019 50th Korean Society for The Study of Obesity Spring Conference). 06 April 2019. See entire document.	7-11
Y		12,13
A	PEREZ-HERNANDEZ, J. et al. A potential alternative against neurodegenerative diseases: Phytodrugs. Oxidative medicine and cellular longevity. 2016, vol. 2016, thesis no. 8378613, pp. 1-19. See abstract; and page 6.	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/008247

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **16-17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 16-17 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertain to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/008247

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2003-0044776 A1	06 March 2003	AU 6162899 A	17 April 2000
		CA 2345066 A1	06 April 2000
		EP 1116027 A1	18 July 2001
		JP 2002-525630 A	13 August 2002
		WO 00-19200 A1	06 April 2000
		WO 00-19200 A9	31 August 2000

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/008247

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/4745(2006.01)i, A61P 25/28(2006.01)i, G01N 33/483(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/4745; C12Q 001/00; C12Q 001/68; A61P 25/28; G01N 33/483; A23L 33/10

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 미토콘드리아 기능이상 (mitochondrial dysfunction), 팔마틴 (palmatine), 퇴행성 질환 (neurodegenerative disorder), 미토케이마 (mt-Keima), 미토파지 (mitophagy)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	FRIEDEMANN, T. 등, 'Neuroprotective activity of coptisine from Coptis chinensis (Franch)', Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015, 2015권, 논문번호 827309, 페이지 1-9 초록; 결론	1-5,14,15
Y		6,13
A		7-12
Y	US 2003-0044776 A1 (DYKENS, J. A. 등) 2003.03.06 요약; 청구항 1, 4, 5	6,12
X	윤진호, 'Exploring the physiological roles and modulation of mitophagy for the development of novel therapeutic approach', 대한약사회 2018 Fall international convention of the Pharmaceutical Society of Korea, 2018.10.17.-19, S24-3 전체 문헌	7-11
Y		12,13
X	윤진호, 'Exploring the physiological roles and modulation of mitophagy for the development of novel therapeutic approach', 기초의과학연구센터 2018 연합성과발표회, 2018.10.23, S5-2 전체 문헌	7-11

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2020년 10월 16일 (16.10.2020)	2020년 10월 16일 (16.10.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
정다원
전화번호 +82-42-481-5373

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/008247

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 16-17
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 16-17은 치료에 의한 사람의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/008247

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y		12,13
X	윤진호, 'Exploring the physiological roles and modulation of mitophagy for the development of novel therapeutic approach', 2019 KSBMB 제10회 동계학술대회, 2019.01.09-11, S4-3 전체 문헌	7-11
Y		12,13
X	윤진호, 'Exploring the physiological roles and modulation of mitophagy for the development of novel therapeutic approach', 2019년 제50차 대한비만학회 춘계학술대회, 2019.04.06 전체 문헌	7-11
Y		12,13
A	PEREZ-HERNANDEZ, J. 등, 'A potential alternative against neurodegenerative diseases: Phytodrugs', Oxidative medicine and cellular longevity, 2016, 2016권, 논문번호 8378613, 페이지 1-19 초록; 페이지 6	1-15

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/008247

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2003-0044776 A1	2003/03/06	AU 6162899 A	2000/04/17
		CA 2345066 A1	2000/04/06
		EP 1116027 A1	2001/07/18
		JP 2002-525630 A	2002/08/13
		WO 00-19200 A1	2000/04/06
		WO 00-19200 A9	2000/08/31