

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0101452 (43) 공개일자 2016년08월25일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/05 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)	(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)	
(52) CPC특허분류 A61K 31/05 (2013.01) A23L 1/30 (2013.01)	(72) 발명자 김준범 서울특별시 관악구 인현16가길 17	
(21) 출원번호 10-2015-0024032	(74) 대리인 강성혜	
(22) 출원일자 2015년02월17일 심사청구일자 2015년02월17일		

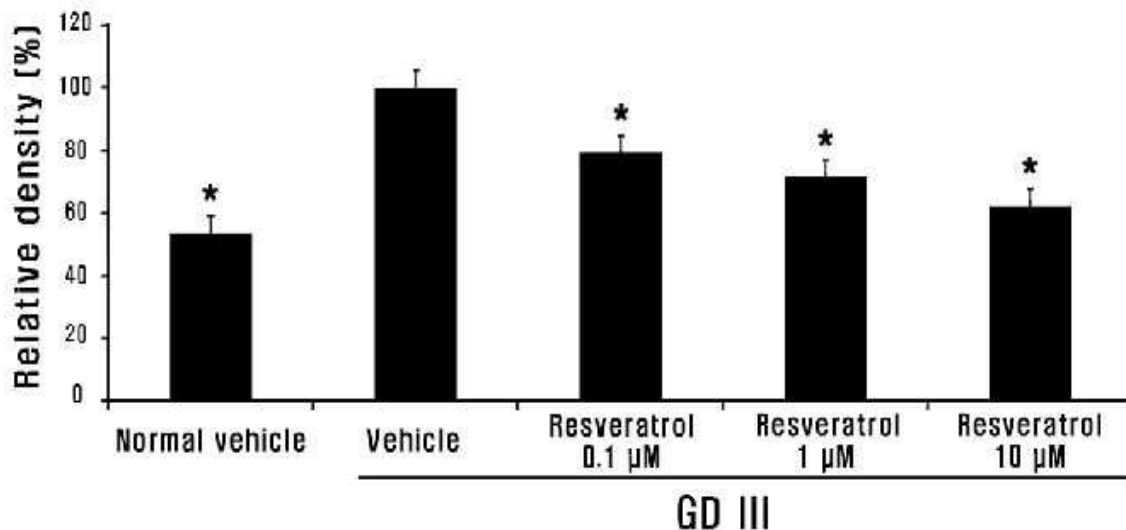
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 레스베라트롤을 함유하는 III형 고셔병 치료용 약학 조성물

(57) 요약

현재 고셔병 치료제로 널리 사용되는 효소치료제는 혈관-뇌 장벽을 통과하지 못해 뇌조직 내로 이동하지 못함으로 인해 간질 등 신경학적 증상을 나타내는 II형 및 III형 고셔병의 치료제로 적합하지 못하다. 레스베라트롤은 항염증, 항산화, 신경보호효과와 같은 다양한 특성을 갖는 천연 폴리페놀 성분으로 혈관-뇌 장벽을 통과한다. 본 (뒷면에 계속)

대표도 - 도4b



발명자는 II형 및 III형 고셔병 환자 유래 섬유아세포에 대한 레스베라트롤의 치료 효과를 평가하였다. 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT 분석으로 평가하였고, 고셔병 환자 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 웨스턴 면역블랏으로 AIF, Bax, 절단된 캐스페이즈-3, ACAT1, E3BP 및 CS의 발현 변화를 평가하였다. 또한, 레스베라트롤 처리한 세포의 세포 내 글루코실세라마이드(글루코세레브로사이드) 농도를 박막 크로마토그래피로 확인하였다. 그 결과, 레스베라트롤 처리 세포는 대조군 세포와 비교하여 생존율이 현저히 증가하였다. 레스베라트롤 처리 후 세포 사멸인자인 AIF, Bax 및 절단된 캐스페이즈-3의 발현 수준은 투여량 의존적으로 감소하였고, ACAT1, E3BP 및 CS의 발현 수준은 투여량 의존적으로 증가하였다. TLC 결과는 레스베라트롤 처리한 II형 및 III형 고셔병 환자의 세포에서 고셔병의 원인 독성성분인 글루코실세라마이드가 현저히 감소함을 보여주었다. 이러한 결과들은 레스베라트롤이 세포사멸을 감소시키고, 글루코실세라마이드 농도를 낮추어 신경학적 증상을 동반하는 II형 및 III형 고셔병 치료제로 사용될 수 있음을 말해준다.

명세서

청구범위

청구항 1

레스베라트롤을 함유하는 II형 및 III형 고셔병 치료용 약학 조성물.

청구항 2

레스베라트롤을 함유하는 II형 및 III형 고셔병 예방 또는 개선용 건강 기능성 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 레스베라트롤을 함유하는 II형 및 III형 고셔병 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 레스베라트롤을 처리하면 II형 및 III형 고셔병 환자의 세포에서 글루코세레브로사이드가 현저히 감소하고, 세포사멸인자의 발현이 현저히 감소하였다.

배경 기술

[0002] 고셔병(Gaucher disease, GD)은 세포 내 글루코세레브로시다이스 (glucocerebrosidase, GCase)를 암호화하는 유전자의 돌연변이로 인한 효소의 기능상실로 발생하는 질환으로 글루코세레브로사이드(glucocerebroside; 이하 "글루코실세라마이드"와 혼용함)가 비장, 간, 폐, 골수, 뇌에 축적되며 간과 비장이 커지고, 피로증상을 동반한 빈혈이 관찰되며, 혈소판 감소로 지혈이 잘 되지 않는 일반적인 병증과 더불어 과도한 지질 축적으로 인해 뇌세포 손상이 초래되는 것으로 알려져 있다 (Beutler and Grabowski, 2001). 고셔병은 크게 세 가지 형태로 분류된다. 첫 번째 I형은 간비비대, 골격계 이상, 빈혈, 혈소판 감소 등 혈액질환을 동반하는 만성적인 비신경계 질환으로 적절한 치료가 이루어지지 않을 경우 사망한다. 두 번째 II형은 급성 신경병증형(acute neuropathic form)이라 불리는데, 병증의 진행속도가 빠르며, 생후 1년 이내에 증상이 시작되어 신경계에서 이상 증상이 발생하는데, 주로 유아기 및 신생아 시기의 뇌에 글루코세레브로사이드 축적으로 인한 신경학적 합병증이 특징적으로 수반된다. 생후 6개월 이내에 비장의 비대가 발생하고, 수족 경화증상이 발생하며, 성장이 지연되고, 대부분 3년 이내에 사망하는 것으로 알려져 있다. 세 번째로 아급성 신경병증형(subacute neuropathic form)으로 불리는 III형은 전신계적으로 광범위한 인종들에서 대략 50,000명당 1명의 빈도로 발생한다. 신경계 증상은 II형보다 비교적 느리게 진행되고, 증상의 발현 시기는 매우 다양하지만 일반적으로 아동기나 청소년기에 나타난다. 신경학적 합병증으로는 정신지체, 운동능력상실, 간대성 근경련 등이 발생하고 있으며 간질성 폐질환이 발병하기도 한다. II형과 III형 모두 뇌 기능에 장애가 발생하여 간질과 발작을 일으키는 특징을 나타낸다 (Beutler and Grabowski, 2001).

[0003] 고셔병의 원인 중 하나는 소포체 내에 돌연변이체 글루코세레브로시다이스가 축적되기 때문이다. 결함 있는 GCase가 소포체로부터 리소솜으로 이동할 수 없게 되어 소포체 내에 축적되므로 이는 소포체 스트레스 (ER stress)를 유도하여 Bcl-2 패밀리의 멤버 및 캐스페이즈(caspases)와 같은 자기세포사멸 경로에 관여하는 효소를 활성화시켜 세포 사멸에 이르게 한다 (Zong et al., 2003; Wei et al., 2008). 뿐만 아니라, 고셔병에서는 인슐린 저항성 및 비정상적인 지질 대사와 같은 대사 반응의 손상도 나타난다 (Wennekes et al., 2009).

[0004] 현재 가장 널리 사용되고 있는 고셔병 치료제인 효소치료제는 혈관-뇌 장벽을 통과하지 못해 신경학적 증상을 동반하는 II형과 III형 고셔병의 치료효과가 부족하며, 이로 인해 신경학적 증상의 개선을 포함한 좀 더 효과적인 고셔병 치료제 개발이 시급한 실정이다.

[0005] 레스베라트롤(resveratrol, trans-3,5,4'-Trihydroxystilbene)은 많은 식물이 곰팡이, 박테리아 감염 등 다양한 외부 환경으로부터 자신을 보호하기 위해 스스로 생성하는 파이토알렉신(phytoalexin) 계열의 폴리페놀 물질로서 지방 과산화 억제 및 자유 라디칼 소거 기능과 같은 항산화 작용, 사이클로옥시제네이스 저해 등의 항염증

작용, 암세포 성장 억제 및 암 예방 효능, 혈소판 응집억제, 심혈관계질환 방지, 신경보호작용 및 수명 연장 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며(Liu et al., 2011), 포도 껍질, 블루베리, 땅콩 등에서 발견된다. 뿐만 아니라, 레스베라트롤은 혈관-뇌 장벽을 통과하며 지질과 포도당 대사를 조절하는 효과가 있다(Baur et al., 2006; Bradamante et al., 2004; Vallianou et al., 2013). 그러나, 특징적인 신경학적 증상을 동반하는 II형 및 III형 고셔병에서의 치료효과 및 대사와 관련한 레스베라트롤의 효과는 아직 알려진바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2014-0138850호
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제10-2009-0001069호

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Cox TM. Gaucher disease: clinical profile and therapeutic developments. *Biologics* 2010;4:299-113.
- (비특허문헌 0002) Ron I, Horowitz M. ER retention and degradation as the molecular basis underlying Gaucher disease heterogeneity. *Hum Mol Genet* 2005;14:2387-98.
- (비특허문헌 0003) Wei H, Kim SJ, Zhang Z, et al. ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones. *Hum Mol Genet* 2008;17:469-77.
- (비특허문헌 0004) Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, et al. Bax and Bak can localize to endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol* 2003;162:59-69.
- (비특허문헌 0005) Wennekes T, Berg R, Boot R, et al. Glycosphingo-lipids nature, function, and pharmacological modulation. *Angew Chem Int Ed Engl* 2009;48:8848-69.
- (비특허문헌 0006) Liu C, Shi Z, Fan L, et al. Resveratrol improves neuron protection and functional recovery in rat model of spinal cord injury. *Brain Res* 2011;1374:100-9.
- (비특허문헌 0007) Saha A, Sarkar C, Singh SP, et al. The blood-brain barrier is disrupted in a mouse model of infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: amelioration by resveratrol. *Hum Mol Genet* 2012;21:2233-44.
- (비특허문헌 0008) Vallianou NG, Evangelopoulos A, Kazazis C. Resveratrol and diabetes. *Rev Diabet Stud* 2013;10:236-42.
- (비특허문헌 0009) Bradamante S, Barengli L, Villa A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc Drug Rev* 2004;22:169-88.
- (비특허문헌 0010) Kim SJ, Kang SY, Kim JB. Possible therapeutic effects of myxobacterial metabolites on type I Gaucher disease. *Gene* 2012;504:156-9.
- (비특허문헌 0011) Bravo R, Gutierrez T, Paredes F, et al. Endoplasmic reticulum: ER stress regulates mitochondrial bioenergetics. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44:16-20.
- (비특허문헌 0012) Szegezdi E, Logue S, Gorman A, et al. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006;7:880-5.
- (비특허문헌 0013) Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999;397:441-6.
- (비특허문헌 0014) Sullivan A, Singh M, Srere P, et al. Reactivity and inhibitor potential of

hydroxycitrate isomers with citrate synthase, citrate lyase, and ATP citrate lyase. J Biol Chem 1977;252: 7583-90.

(비특허문헌 0015) Roche TE, Baker JC, Yan X, et al. Distinct regulatory properties of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase isoforms. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 2001;70: 33-75.

(비특허문헌 0016) Buhaescu I, Izzedine H. Mevalonate pathway: a review of clinical and therapeutical implications. Clin Biochem 2007;40:575-84.

(비특허문헌 0017) Baur JA, Pearson KJ, Price NL, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. Nature 2006;444:337-42.

(비특허문헌 0018) Marambaud P, Zhao H, Davies P. Resveratrol promotes clearance of Alzheimer's disease amyloid-beta peptides. J Biol Chem 2005;280:37377-82.

(비특허문헌 0019) Okawara M, Katsuki H, Kurimoto E, et al. Resveratrol protects dopaminergic neurons in midbrain slice culture from multiple insults. Biochem Pharmacol 2007;73:550-60.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008]

본 발명자들은 현재 적절한 치료제가 없는 II형 및 III형 고셔병의 신경학적 증상을 개선 또는 치료할 수 있는 II형 및 III형 고셔병 치료용 약학 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009]

본 발명자는 II형 및 III형 고셔병 환자 유래 세포에 대하여 세포 생존율을 평가하고, 대사 및 세포사멸 경로에 관련된 바이오마커를 평가하고 글루코세레브로사이드 농도를 측정함으로써 레스베라트롤의 치료제 가능성을 연구하였다.

[0010]

레스베라트롤의 유용한 활성에 대한 종래의 연구들 중 고셔병에 관한 것은 없었다. 소포체는 단백질 합성, 가공 및 성숙이 일어나는 장소이다. 돌연변이 GCCase의 잘못된 가공은 소포체 내강에 이 단백질을 축적시키고, 이는 소포체 스트레스를 일으킬 수 있다. 지속되는 소포체 스트레스는 세포사멸 경로를 활성화시킬 수 있고, 이는 궁극적으로 캐스페이즈-3와 같은 효과인자 캐스페이즈를 활성화시켜 세포를 사멸에 이르게 한다. 본 발명의 결과는 레스베라트롤이 II형 고셔병 세포 및 III형 고셔병 세포에서 세포 생존율을 증가시킬 뿐 아니라 AIF, Bax 및 절단된 캐스페이즈-3의 발현 수준을 투여량 의존적으로 감소시킴을 알아내었다. AIF는 캐스페이즈 비의존적인 세포사멸 경로를 매개한다. 따라서, 이 결과는 레스베라트롤이 캐스페이즈-의존적 및 캐스페이즈-비의존적인 세포사멸 경로 모두에 영향을 미치는 넓은 범위의 대사 스펙트럼을 가지고 있음을 말해준다. 뿐만 아니라, 고셔병에서 인슐린 저항성 및 지질 대사 손상과 같은 대사 이상이 보고된바 있었고(Wennekes et al., 2009), 레스베라트롤이 포도당과 지질 대사를 개선한다는 발표가 있었기 때문에(Vallianou et al., 2013; Bradamante et al., 2004), 본 발명자들은 II형 고셔병 세포 및 III형 고셔병 세포에서 이러한 대사 경로에 연관된 인자들에 대한 레스베라트롤의 영향을 평가하였다. 그 결과, 레스베라트롤 처리한 고셔병 세포에서는 글루코세레브로사이드 농도가 현저하게 투여량 의존적으로 감소하는 것으로 나타났고, 탄수화물 대사 및 구연산회로에 관여하는 효소들인 E3BP 및 CS 발현이 투여량 의존적으로 증가할 뿐 아니라, 지질 대사에 관련된 효소인 ACAT1 발현도 투여량 의존적으로 증가하였다(도 3). CS는 구연산회로의 첫 단계에 관여하는 조절효소로서 손상되지 않은 미토콘드리아의 마커로 알려져 있고, 아세틸-CoA와 옥살로아세테이트를 반응시켜 구연산을 합성하는 반응을 촉매하며(Sullivan et al., 1977), E3BP는 피루브산을 아세틸-CoA로 비가역적으로 산화적 디카복실화하는 반응을 촉매하고 당분해 및 구연산 회로를 연결한다(Roche et al., 2001). 글루코세레브로사이드는 정상적으로 대사되면 라이소솜에서 포도당과 세라마이드로 분해되고, 이 과정에서 생성된 포도당은 구연산 회로를 통해 주요 에너지원으로 이용될 수 있다. 본 발명 실시예의 결과들은 레스베라트롤이 세포에서 글루코세레브로사이드 축적을 감소시킴으로써 세포내 스트레스를 감소시키고, 세포는 아세틸-CoA 요구를 증가시킴으로써 대사경로 활성을 증가시켜 병증에서 회

복될 수 있음을 제시한다(도 5). ACAT1 효소는 두 분자의 아세틸-CoA로부터 아세토아세틸-CoA 형성을 촉매하며, 이것은 메발로네이트 경로를 통한 성장, 분화 및 유지를 포함하는 다양한 세포 과정에 필요한 분자 합성의 기초가 된다(Buhaescu and Izzedine, 2007). 그러므로, GD 세포에서 레스베라트롤 처리에 의한 ACAT1의 상향 조절은 글루코세레브로사이드 분해시 부산물인 아세틸-CoA가 아세토아세틸-CoA로 변환되며, 이것은 메발로네이트 경로에 의한 세포 성장, 증식 및 분화에 필요한 분자들을 생산하는데 이용될 수 있음을 말해준다. 본 발명에서 레스베라트롤은 GCase 활성을 증가시키지는 않았다(데이터 나타내지 않음). 따라서, II형 섬유아세포 및 III형 GD 섬유아세포에서 글루코세레브로사이드의 감소는 기질의 분해로 인한 것으로 보이며, 이는 포도당을 생성하여 포도당과 지질 대사경로의 상향조절에 관여한다.

[0011] 결론적으로 본 발명자들은 인비트로에서 II형 고셔병 세포 및 III형 고셔병 세포에 대한 레스베라트롤의 효과를 평가하였다. 그 결과를 보면, II형 고셔병 세포 및 III형 고셔병 세포에서 레스베라트롤은 글루코세레브로사이드 축적을 감소시키고 세포사멸인자의 발현을 감소시키며, 세포 생존율과 포도당 및 지질 대사와 관련된 효소의 발현을 증가시켰다. 레스베라트롤은 혈관-뇌 장벽을 가로질러 통과할 수 있고 알츠하이머 병 및 파킨슨 병과 같은 신경퇴행성 질환에서 보호 활성을 나타낸다. 따라서, 레스베라트롤은 간질 등 II형 고셔병 및 III형 고셔병의 난치성 신경학적 증상을 치료하는데 유용할 것으로 판단된다.

[0012] 본 발명은 레스베라트롤을 유효성분으로 함유하는 II형 고셔병 및 III형 고셔병 치료용 약학 조성물을 제공한다. 레스베라트롤을 유효성분으로 함유하는 II형 및 III형 고셔병 치료용 약학 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구 또는 주사 형태 등으로 제형화할 수 있다. 경구용 조성물로는 예를 들면 정제 및 젤라틴 캡슐이 있으며, 이들은 활성 성분 이외에도 희석제(예: 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제(예: 실리카, 탭크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐피롤리돈)를 함유하며, 경우에 따라서 붕해제(예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보존제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0013] 나아가, 본 발명은 상기 레스베라트롤을 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, II형 및 III형 고셔병 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0014] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소적용할 수 있다. 용량은 일일 투여량 0.01 μ g~100mg/kg을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기 레스베라트롤을 유효성분으로 하는 II형 및 III형 고셔병 예방 또는 개선용 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 의하면 현재 적절한 치료제가 없는 II형 고셔병 및 III형 고셔병 환자의 세포에 레스베라트롤을 처리하면 세포 내 글루코세레브로사이드 농도가 현저히 감소하므로, 세포 생존율이 높아진다.

[0017] 또한, 본 발명에 의하면 II형 및 III형 고셔병 환자의 세포에 레스베라트롤을 처리하는 경우 대조군에 비하여 세포사멸인자의 발현이 현저히 낮아져 세포 생존율이 높아진다.

[0018] 따라서, 레스베라트롤을 함유한 약학 조성물을 II형 및 III형 고셔병 환자에게 투약할 경우 분자량이 크지 않은 레스베라트롤은 혈관-뇌 장벽을 가로질러 통과할 수 있어 II형 및 III형 고셔병 환자에서 특이적인 신경학적 증상을 개선할 수 있고, 레스베라트롤이 천연 폴리페놀 성분이므로 특별한 부작용 없이 세포 생존율이 높아지고 글루코세레브로사이드 축적이 저하되어 현재 적절한 치료제가 없는 II형 및 III형 고셔병 증상의 현저한 개선을 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019]

도 1은 III형 고서병 세포 생존율에 대한 레스베라트롤의 효과를 나타낸다. MTT 분석 결과 레스베라트롤 처리한 고서병 세포의 생존율은 증가하였다. DMSO(담체)로 처리한 I형 고서병 세포의 생존율을 상대적 세포 생존율 100%로 정의하였다.

Normal-vehicle: DMSO로 처리한 정상 세포; GD III, III형 고서병 섬유아세포. *는 담체군과 다른 군 간의 유의한 차이를 나타낸다. *, $P < 0.05$ by Student's *t*-test.

도 2a, 2b는 세포사멸인자를 웨스턴 블랏과 밀도 분석한 결과이다. (도 2a) III형 GD 세포에서 레스베라트롤은 AIF, Bax 및 절단된 캐스페이즈-3의 발현을 감소시켰다. (2b) 밀도계 분석 결과 단백질 농도가 투여량 의존적으로 감소하였다. β -액틴은 대조군으로 이용하였다. 담체군(vehicle)은 III형 GD 세포를 DMSO로 처리한 것이고, 이를 상대적 밀도 100%로 정의하였다. Normal-vehicle, DMSO로 처리한 정상세포; GD I, I형 고서병 섬유아세포. *는 담체군과 다른 군 간의 유의한 차이를 나타낸다. *, $P < 0.05$ by Student's *t*-test.

도 3a, 3b는 대사 마커에 대한 웨스턴 블랏과 밀도 분석 결과를 나타낸다. (3a) III형 GD 세포에서 레스베라트롤은 ACAT1(acetyl-coenzyme A acetyltransferase 1), E3BP(E3-binding protein) 및 CS(citrate synthase) 단백질 발현을 증가시켰다. (3b) 밀도계 분석 결과 단백질 농도가 투여량 의존적으로 증가하였다. β -액틴은 대조군으로 이용하였다. 담체군(vehicle)은 III형 GD 세포를 DMSO로 처리한 것이고, 이를 상대적 밀도 100%로 정의하였다. Normal-vehicle, DMSO로 처리한 정상세포; GD III, III형 고서병 섬유아세포. *는 담체군과 다른 군 간의 유의한 차이를 나타낸다. *, $P < 0.05$ by Student's *t*-test.

도 4a, 4b는 세포 내 글루코세레브로사이드(글루코실세라마이드; GluCer) 농도를 박막크로마토그래피(4a) 및 밀도분석(4b)으로 측정한 결과이다. III형 GD 세포에서 레스베라트롤은 글루코세레브로사이드 농도를 감소시켰다. 담체군(vehicle)은 III형 GD 세포를 DMSO로 처리한 것이고, 이를 상대적 밀도 100%로 정의하였다. Normal-vehicle, DMSO로 처리한 정상세포; GD III, III형 고서병 섬유아세포. *는 담체군과 다른 군 간의 유의한 차이를 나타낸다. *, $P < 0.05$ by Student's *t*-test.

도 5는 III형 GD 세포에서 레스베라트롤의 활성을 나타내는 개요도이다. AIF, apoptosis-inducing factor; ACAT1, acetyl-coenzyme A acetyltransferase 1; E3BP, E3-binding protein; CS, citrate synthase.

Fig. 1. Effects of resveratrol on cell viability. The MTT assay demonstrates that type II GD cells treated with resveratrol exhibit increased cell viability. The viability of type II GD cells treated with DMSO was defined as 100% relative cell viability. Normal-vehicle, normal cells treated with DMSO; GD II, type II GD cells. * $P < 0.05$ vs vehicle by Student's *t*-test.

Fig. 2. Western blot and densitometric analyses of AIF, Bax, and caspase-3 proteins. (A) Resveratrol dose-dependently reduced expression levels of AIF, Bax, and cleaved caspase-3 in type II GD cells. (B) Densitometric analysis. β -actin served as a loading control. Vehicle represents type II GD cells treated with DMSO, which was defined as 100% relative density. Normal-vehicle, normal cells treated with DMSO; GD II, type II GD cells. * $P < 0.05$ vs vehicle by Student's *t*-test.

Fig. 3. Western blot and densitometric analyses of ACAT1, E3BP, and CS proteins. (A) Resveratrol dose-dependently increased expression levels of ACAT1, E3BP, and CS in type II GD cells. (B) Densitometric analysis. β -actin served as a loading control. Vehicle represents type II GD cells treated with DMSO, which was defined as 100% relative density. Normal-vehicle, normal cells treated with DMSO; GD II, type II GD cells. * $P < 0.05$ vs vehicle by Student's *t*-test.

Fig. 4. Measurement of intracellular glucosylceramide by TLC (A) and densitometric analysis (B). Resveratrol reduced the concentration of glucosylceramide in GD cells. Vehicle represents type II GD cells treated with DMSO, which was defined as 100% relative density. Normal-vehicle, normal cells treated with DMSO; GD II, type II GD cells. * $P < 0.05$ vs vehicle by Student's *t*-test.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재범위로 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0021] **세포주와 세포배양**

[0022] III형 고서병 섬유아세포는 Coriell Institute for Medical Research (GM# 20272; homozygous for the L444P mutation, Coriell, Camden, NJ, USA)에서 II형 고서병 섬유아세포(GM# 08760; homozygous for the L444P mutation, Coriell, Camden, NJ, USA)도 같은 곳에서 입수하였다. 정상 섬유아세포는 한국 세포주은행(KCLB# 21947, CCD-986sk; Seoul, South Korea)에서 입수하였다. 세포는 20% 우태혈청(Thermo Scientific, South Logan, UT, USA), 100 units/mL 페니실린, 100 µg/mL 스트렙토마이신 및 0.25 µg/mL 암포테리신(amphotericin) B (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)(Mediatech Inc., Herndon, VA, USA)이 든 100-mm 접시에서 배양하였다. 배양액은 5% CO₂가 든 인큐베이터에서 37℃로 유지하였다.

[0023] **세포 생존율 분석**

[0024] II형과 III형 GD 섬유아세포와 정상 섬유아세포는 100 µl의 배지가 든 96-웰 플레이트(10³ 세포/200 µl)(Thermo Scientific)에서 37℃ 온도의 CO₂ 배양기 내에서 24시간 배양하였고, 그 후 0.1 µM, 1 µM 또는 10 µM 레스베라트롤(다이메틸설폭사이드(DMSO)에 용해하여 준비함; Sigma, Saint Louis, MO, USA)을 함유하는 DMEM에서 24시간 동안 37℃로 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. II형 GD 섬유아세포, III형 GD 섬유아세포 및 정상 섬유아세포 모두 담체 대조군으로서 0.1% DMSO로 처리하였다. 10 µl의 MTT{EZ-cytox 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide} 분석 용액(Daeillab service, Seoul, South Korea)을 각 웰에 가하고 37℃로 두 시간 동안 배양하였다. 배양 후, 생성된 MTT 포마잔의 양은 마이크로플레이트 분광기(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 405nm에서의 흡광도를 측정하여 결정하였다. 세포 생존율은 대조군 세포 생존율에 대한 백분율로 나타내었다.

[0025] **웨스턴 블랏**

[0026] 약 1×10⁶ II형과 III형 GD 섬유아세포 및 정상 섬유아세포를 레스베라트롤(0.1 µM, 1 µM 또는 10 µM)이 든 배양 배지를 함유하는 100-mm 접시에서 37℃로 배양하였다. II형과 III형 GD 섬유아세포 및 정상 섬유아세포 모두를 0.1% DMSO(담체 대조군)에서도 배양하였다. 24시간 배양 후 차가운 PBS로 세포를 세척하고 프로테이즈 저해제 콕테일(Roche, Penzberg, Germany)이 함유된 총세포 용균 완충액(20mMHEPES pH 7.5, 0.5mM EDTA, 0.1mM EGTA, 350mM NaCl, 10mM NaF, 1mM MgCl₂ 및 1% Triton X-100 [Sigma])에서 용균시켰다. 단백질 농도는 쿠마시+단백질 분석제제(Pierce, Rockford, IL, USA)로 측정하였다. 각 시료에서 30µg의 단백질을 모아 전기영동 젤에 러닝하고, 폴리비닐리덴 다이플루오라이드 막(Millipore, Billerica, MA, USA)에 옮겼다. 막은 AIF 항체(Abcam, Cambridge, MA, USA), Bax(Bcl-2-associated X protein) 항체(Cell Signaling, Beverly, USA), 절단된 캐스페이즈-3 항체(Cell Signaling), E3BP(E3-binding protein) 항체(Abcam), CS(citrate synthase) 항체(Abcam), ACAT1(acetyl-coenzyme A acetyltransferase 1) 항체(Abcam) 및 β-액틴 항체(Sigma)와 함께 배양하였다. 그런 다음 막을 항-마우스 2차 항체(Abcam) 및 항-토끼 2차 항체(Abcam)와 함께 배양하였다. 띠는 enhanced chemiluminescence system (SuperSignalWest Pico Luminol/Enhancer Solution, Pierce)으로 시각화하였다. TINA 2.0 소프트웨어(Raytest Isotopenmessgerate GmbH, Straubenhardt, Germany)로 단백질 농도를 정량하기 위해 밀도 분석을 수행하였다.

[0027] **지질 추출 및 글루코세레브로사이드 농도 측정**

[0028] 레스베라트롤 또는 DMSO(담체 대조군)로 처리한 세포의 글루코세레브로사이드 농도의 정량적 변화를 박막 크로마토그래피(TLC)로 측정하였다. 지질 추출 및 글루코세레브로사이드 분리는 종래 기술에 따라 수행하였다 (Kim et al., 2012). TINA 2.0 소프트웨어(Raytest Isotopenmessgerate GmbH)를 이용하여 글루코세레브로사이드 농도

를 측정하기 위해 밀도 분석을 수행하였다.

[0029] **통계 분석**

[0030] 각 실험은 최소 세 번에서 최대 여섯 번까지 독립적으로 수행하였다. Student's t-test는 유의한 차이가 존재함을 확인하기 위해 수행하였다. $P < 0.05$ 값은 유의한 것으로 판단된다.

[0031] **결과 1: 레스베라트롤 처리 후 세포 생존율**

[0032] II형 및 III형 GD 섬유아세포를 0.1 μM , 1 μM 및 10 μM 의 레스베라트롤로 처리하고 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT 분석법으로 분석하였다. 0.1 μM , 1 μM 및 10 μM 의 레스베라트롤을 처리하면 DMSO로 처리한 GD 섬유아세포와 비교하여 III형 GD 섬유아세포의 생존율은 투여량 의존적으로 17-46% 증가하였고($P < 0.05$, 도 1), II형 GD 섬유아세포의 생존율은 투여량 의존적으로 27-49% 증가하였다($P < 0.05$, 도 6). 레스베라트롤의 보호 활성을 규명하기 위해 세포사멸과 관련된 AIF, Bax 및 절단된 캐스페이즈-3의 발현 패턴을 평가하였다. 0.1 μM , 1 μM 및 10 μM 레스베라트롤을 III형 GD 섬유아세포에 처리하면 AIF (34-63%; $P < 0.05$), Bax (23-46%; $P < 0.05$) 및 절단된 캐스페이즈-3 (35-70%; $P < 0.05$) 발현이 DMSO-처리 GD 섬유아세포와 비교하여 투여량 의존적으로 감소하였고(도 2a, 2b), II형 GD 섬유아세포에 처리하면 AIF (38-62%; $P < 0.05$), Bax (26-41%; $P < 0.05$) 및 절단된 캐스페이즈-3 (53-75%; $P < 0.05$) 발현이 DMSO-처리 GD 섬유아세포와 비교하여 투여량 의존적으로 감소하였다(도 7a, 7b).

[0033] **결과 2: 대사 마커에 대한 웨스턴 블랏 분석**

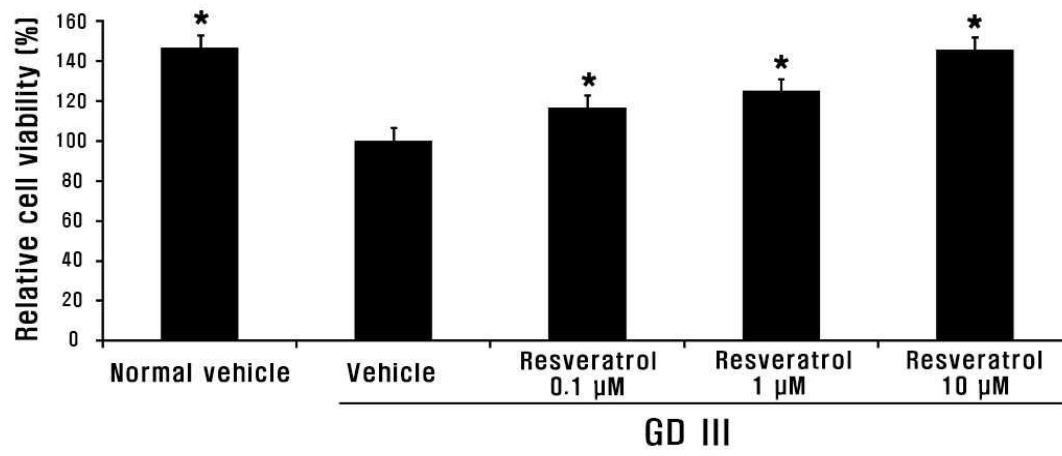
[0034] 고서병에서 인슐린 저항성 및 지질대사 손상과 같은 대사 이상이 보고된바 있고(Wennekes et al., 2009), 포도당과 지질 대사에 대한 레스베라트롤의 조절 효과가 보고된바 있기 때문에(Vallianou et al., 2013; Bradamante et al., 2004), II형 및 III형 GD 섬유아세포에서 레스베라트롤이 대사 경로에 관여하는 인자들의 농도를 조절하는지를 알아보았다. 농도별로 레스베라트롤을 처리하고 24시간 경과한 후 담체 대조군과 비교하여 ACAT1 및 E3BP 발현 농도는 투여량 의존적으로 증가하였다(III형 세포에 대해서 각각 23-58% 및 19-67%, II형 세포에 대해서 각각 13-66%, 11-57%, $P < 0.05$). 또한, 미토콘드리아 마커 효소인 CS 발현농도는 III형 세포에 대해 투여량 의존적으로 10-54% 증가하였고, II형 세포에 대해 투여량 의존적으로 10-48% 증가하였다($P < 0.05$, 도 3a, 3b, 8a, 8b).

[0035] **결과 3: 세포 내 글루코세레브로사이드 농도 변화 측정**

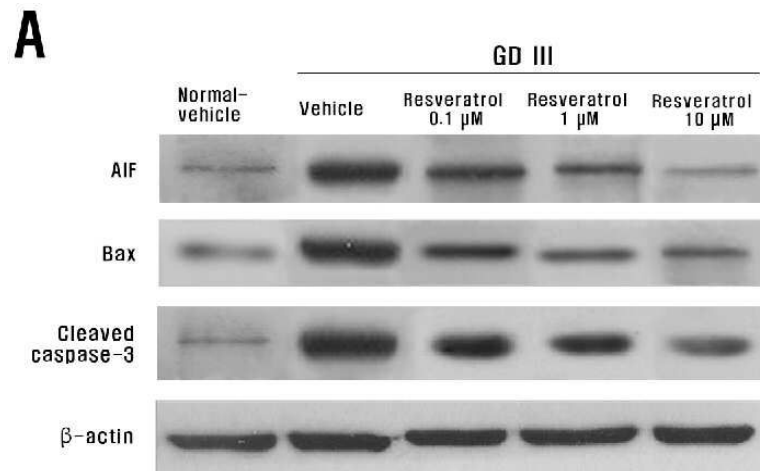
[0036] II형 및 III형 GD 섬유아세포에서 글루코세레브로사이드의 정량적 변화는 박막 크로마토그래피로 평가하였다. 정상세포와 비교하여 DMSO로 처리한 GD 세포에서 글루코세레브로사이드 농도는 증가하였다. 레스베라트롤 농도를 증가시키면서 처리한 GD 세포에서는 글루코세레브로사이드 축적이 투여량 의존적으로 감소하였다(상대적 밀도 스캔에 의하면 III형 세포에서 21-38% 감소하고, II형 세포에서 11-37% 감소함, $P < 0.05$, 도 4a, 4b, 9a, 9b).

도면

도면1

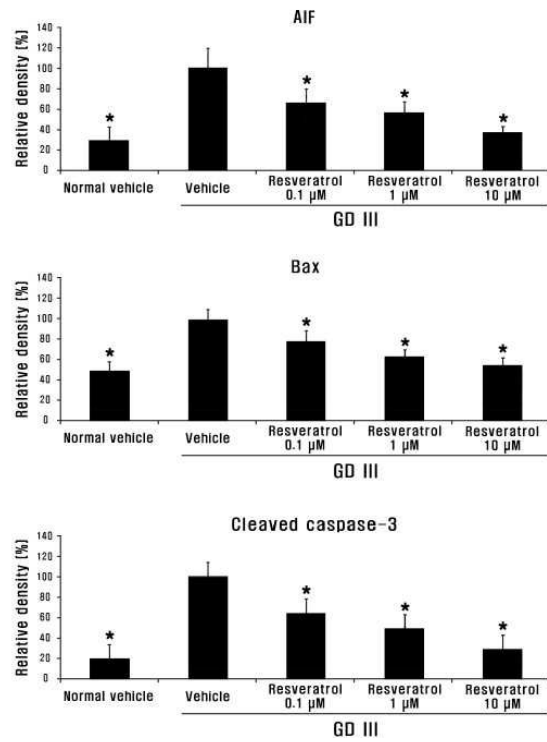


도면2a

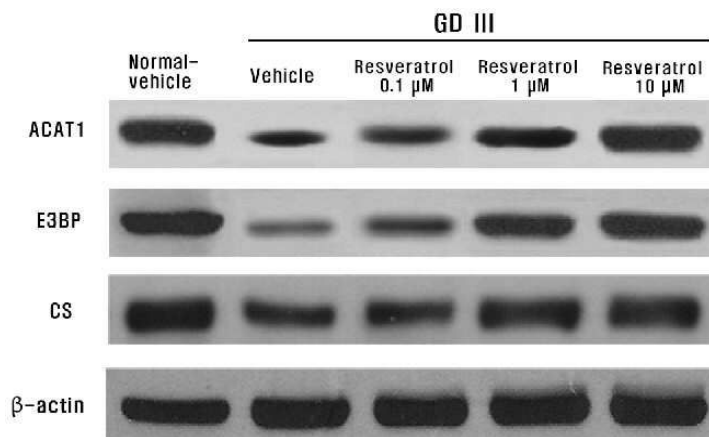


도면2b

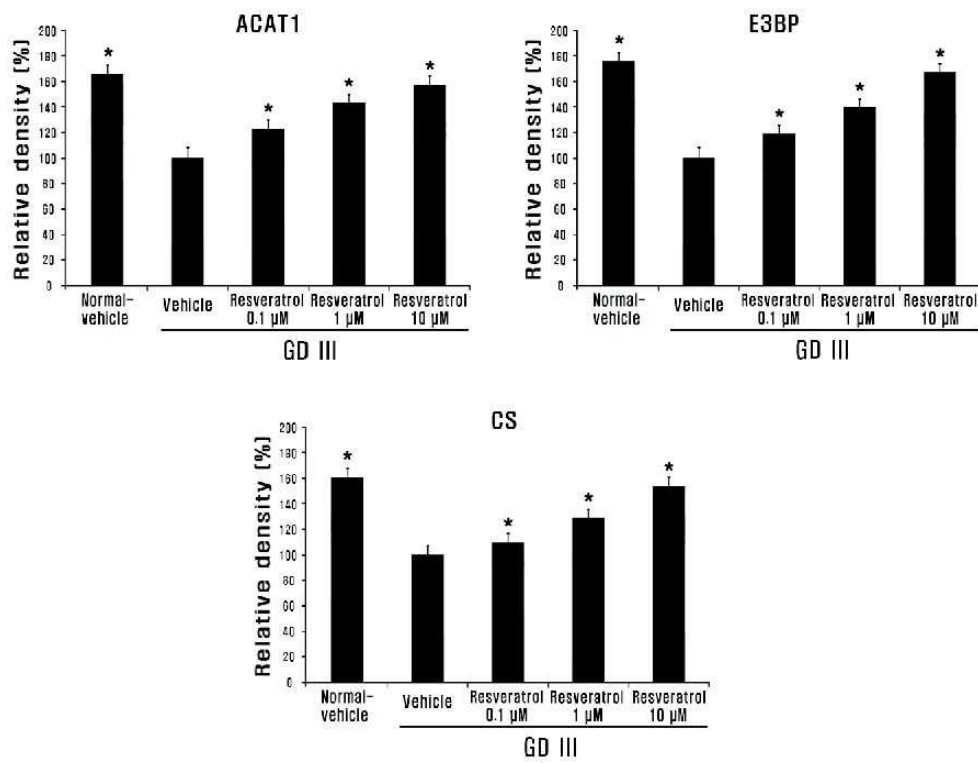
B



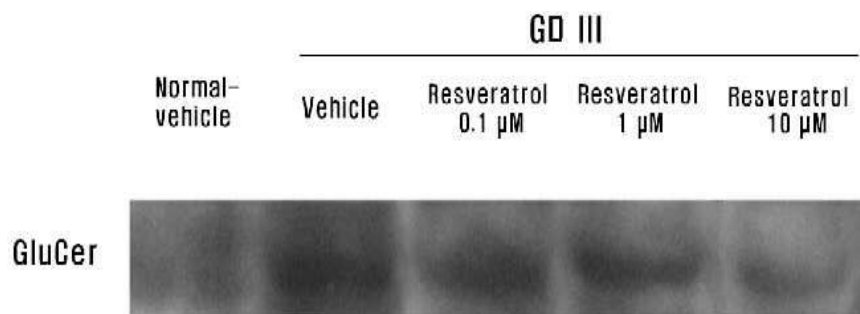
도면3a



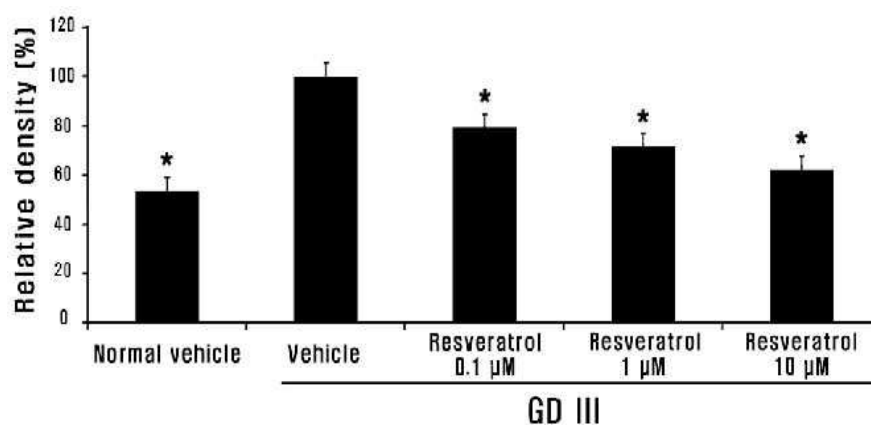
도면3b



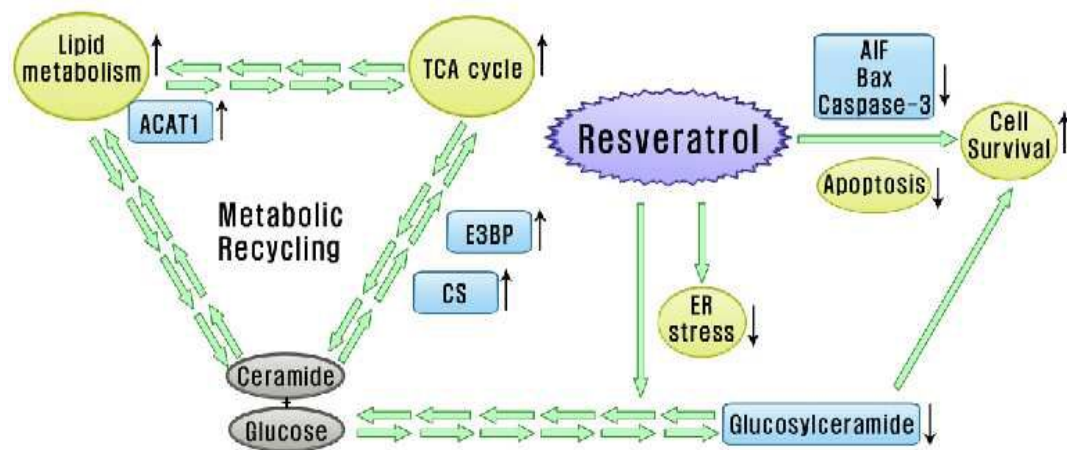
도면4a



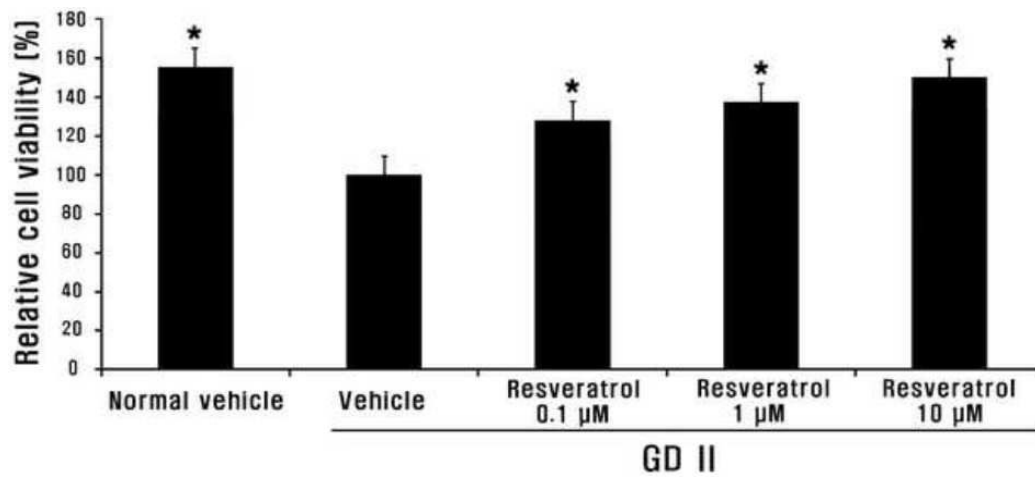
도면4b



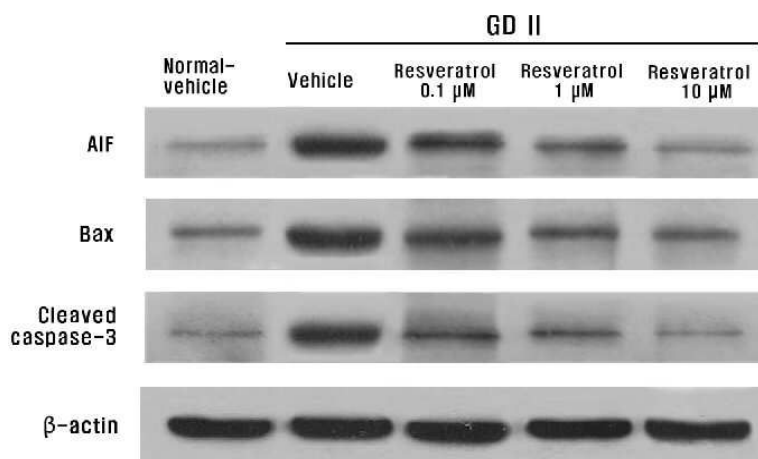
도면5



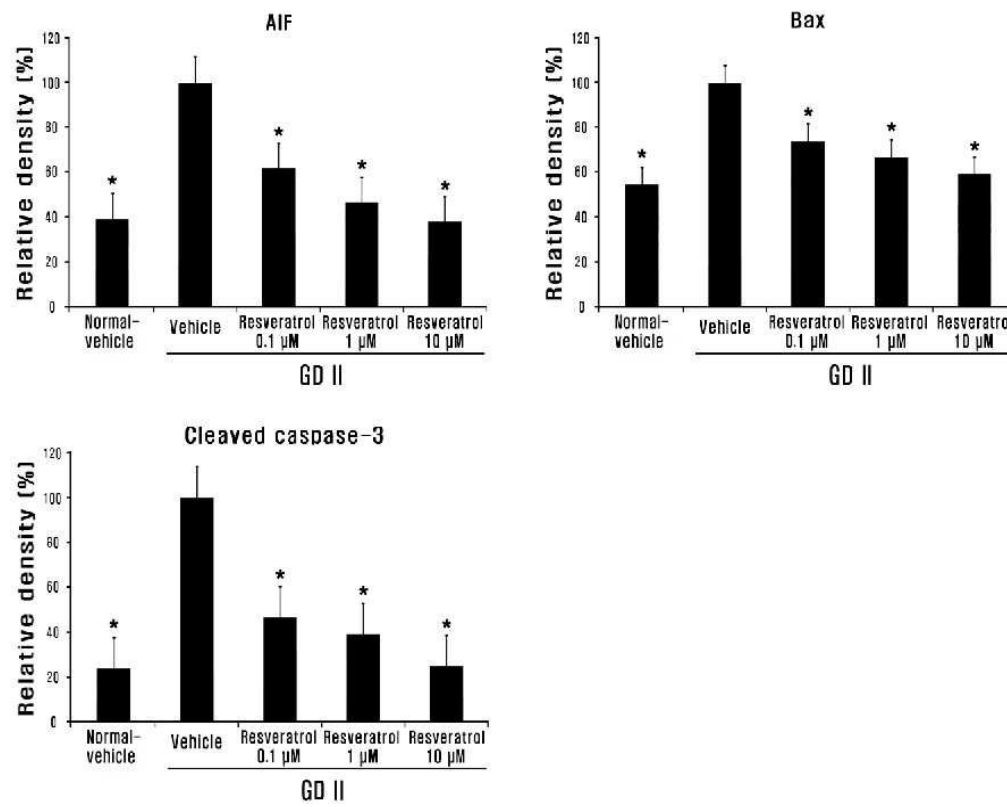
도면6



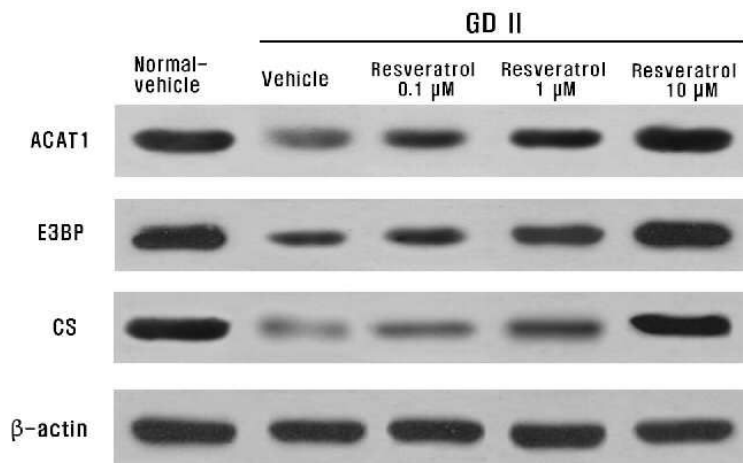
도면7a



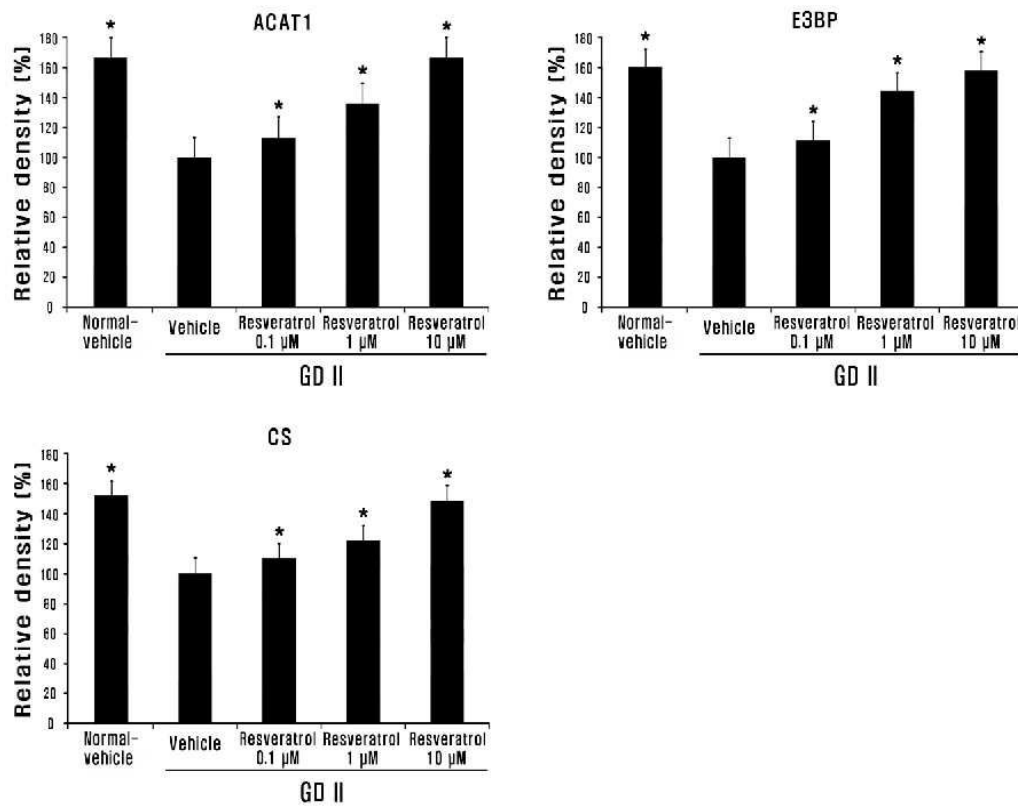
도면7b



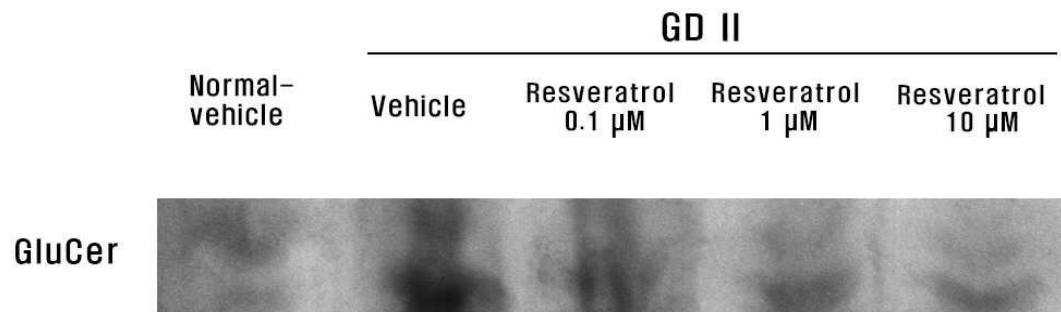
도면8a



도면8b



도면9a



도면9b

