(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0131816
(43) 공개일자 2019년11월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4706 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 13/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4706 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0056690
(22) 출원일자 2018년05월17일
심사청구일자 2019년05월03일

(71) 출원인
의료법인 성광의료재단
서울특별시 강남구 논현로 566 (역삼동)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
이소영
서울특별시 강남구 삼성로 151, 3동 605호(대치동, 선경아파트)
강전모
인천광역시 남구 미추홀대로626번길 42(주안동)
이상호
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 218동 308호(방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
(74) 대리인
리앤목특허법인

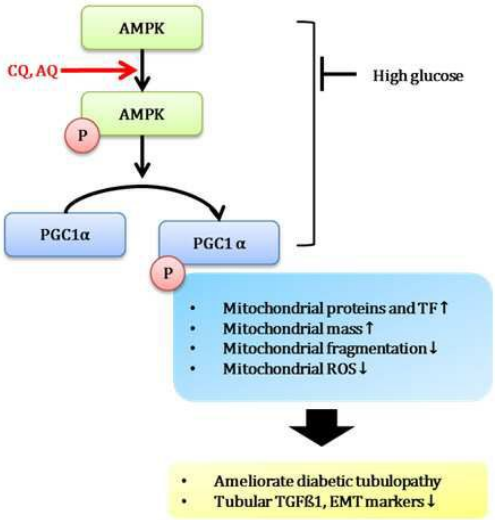
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **클로로퀸 화합물, 또는 아모디아퀸 화합물을 포함하는 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

클로로퀸(Chloroquine) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물; 및 아모디아퀸(Amodiaquin) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 에너지 조절에 관여하는 단백질 AMPK의 인산화를 유도하여 당뇨병성 신증에서 신장 세뇨관 내의 미토콘드리아 이상을 감소시키고 결과적으로 알부민뇨 감소 및 신장 세뇨관의 병리 호전을 유도하는 바, 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 13/12 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2016R1C1B1013814
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구
연구과제명 당뇨병성 신증의 발병과 악화시 마이토파지의 역할 연구
기 여 율 1/1
주관기관 차의과학대학교
연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

클로로퀸(Chloroquine) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

아모디아퀸(Amodiaquin) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 조성물은 PGC1a, 또는 AMPK의 인산화를 증가시키는 것인 조성물.

청구항 4

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 조성물은 미토콘드리아 질량을 증가시키거나 또는 미토콘드리아 분절화를 감소시키는 것인 조성물.

청구항 5

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 조성물은 세포사멸을 억제하는 것인 조성물.

청구항 6

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 조성물은 활성산소의 발생량을 감소시키는 것인 조성물.

청구항 7

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 조성물은 신장의 섬유화를 감소시키는 것인 조성물.

청구항 8

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 조성물은 알부민뇨의 발생을 감소시키는 것인 조성물.

청구항 9

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 조성물은 신장 세뇨관의 손상을 감소시키는 것인 조성물.

청구항 10

클로로퀸 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는 당뇨병성 신증의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

청구항 11

아모디아퀸 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는 당뇨병성 신증의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 클로로퀸 화합물, 또는 아모디아퀸 화합물을 포함하는 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한

것이다.

배 경 기 술

[0002] 당뇨는 내 몸의 중요한 영양분인 포도당이 영양분으로 쓰이지 못하고 소변으로 지속적으로 빠져나가는 병인데 당뇨병이 가장 무서운 이유는 바로 합병증 때문이다. 당뇨 합병증은 당뇨병이 오래 지속되면서 혈관이 좁아지거나 막히면서 발생하게 되는데, 당뇨병 초기에는 환자가 거의 증상을 느끼지 못하는 경우가 많다.

[0003] 우리나라는 OECD 국가 중 두 번째로 당뇨 합병증으로 인한 사망률이 높은 국가인데, 당뇨는 기본적으로 혈관이 존재하는 곳이라면 우리 몸 어느 곳이든 문제를 일으킬 수 있는 병이다.

[0004] 한편, 당뇨병성 신증은 말기신부전의 주된 원인일 뿐 아니라 심혈관질환이나 사망률의 증가와도 밀접하게 연관되어 있어 조기 진단과 치료가 중요하다. 당뇨병성 신증은 지속적인 알부민뇨와 신기능의 저하가 주된 소견으로, 주된 병리학적 변화는 세포외기질의 축적과 사구체와 신세뇨관간질조직에 염증세포가 침착되고 이로 인해 알부민뇨가 발생하게 된다. 정확한 진단은 조직검사를 통한 병리학적 소견이지만 모든 환자를 대상으로 신생검을 시행하기는 어려워, 망막병증 등의 당뇨병성 미세혈관합병증과 함께 지속적인 알부민뇨가 동반되는 경우 임상적으로 당뇨병성 신증으로 진단한다. 조기의 적절한 치료는 만성신질환의 진행을 예방할 수 있으므로 당뇨병성 신증을 조기 진단하여 적극적인 치료를 시행하는 것이 중요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 클로로퀸(Chloroquine) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 다른 양상은 아모디아퀸(Amodiaquin) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 다른 양상은 클로로퀸 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는 당뇨병성 신증의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 다른 양상은 아모디아퀸 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는 당뇨병성 신증의 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 일 양상은 클로로퀸(Chloroquine) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

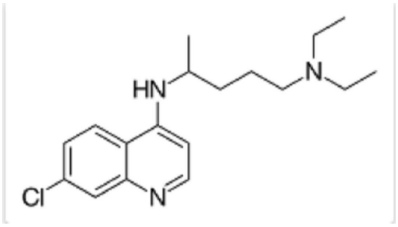
[0010] 다른 양상은 아모디아퀸(Amodiaquin) 화합물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 본 명세서 내 용어 "유효성분"이란 상기 조성물이 개체에 투여되는 경우, 그렇지 않은 경우에 비하여 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료하는 활성을 갖는 것을 포함한다. 상기 개체는 포유동물, 예를 들면, 사람, 마우스, 햄스터, 개, 고양이, 말, 소, 돼지 및 염소로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0012] 본 명세서 내 용어 "예방"이란, 상기 조성물이 투여되지 않은 것에 비하여 알부민배설율(AER)이 감소되는 것을 포함하며, "치료"란, 상기 조성물이 투여되지 않은 것에 비하여, 알부민배설율이 감소되는 것을 포함한다.

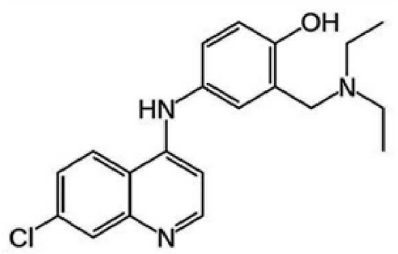
[0013] 상기 클로로퀸은 하기 화학식 1로 표시될 수 있다.

[0014] [화학식 1]

[0015] 

[0016] 상기 아모디아퀸은 하기 화학식 2로 표시될 수 있다.

[0017] [화학식 2]

[0018] 

[0019]

[0020] 일 구체예에 따른 조성물은 PGC1a, 또는 AMPK의 인산화를 증가시킬 수 있다. 또한, 신장 세뇨관 내의 미토콘드리아 이상을 감소시킬 수 있다. , 상기 미토콘드리아 이상은 미토콘드리아 질량(mass)이 감소하는 것 또는 미토콘드리아의 분절화(fragmentation)가 증가되는 것일 수 있다. 미토콘드리아의 장애는 인슐린 저항성을 일으키는 원인이 되는데, 인슐린 저항성이 발생하게 되면 유리지방산을 미토콘드리아 내로 이동 시키는 전달체인 CPT-1(carnitine palmitoyl transferase 1)의 발현이 증가하고 malonyl CoA에 의한 CPT-1의 억제 효과가 감소되어 미토콘드리아의 활성 산소 생성을 증가시킨다. 따라서, 상기 조성물은 PGC1a, 또는 AMPK의 인산화를 증가시킴으로써, 신장 세뇨관 내의 미토콘드리아 질량을 증가시키거나, 또는 미토콘드리아의 분절화를 감소시킴으로써 미토콘드리아의 이상을 감소시킬 수 있으며 고혈당 환경의 신장 근위세뇨관 세포에서 활성산소의 발생을 감소시킬 수 있다.

[0021]

[0022] 또한, 상기 조성물은 고혈당 환경의 신장 근위세뇨관 세포에서 Bax, 시토크롬 C 단백질 등의 발현을 감소시키며, Bcl2 단백질의 발현을 증가시킴으로써, 세포사멸을 억제할 수 있다.

[0024] 또한, 상기 조성물은 TGF-β1, α-SMA 및 피브로넥틴의 발현을 감소시킴으로써, 고혈당 환경의 신장에서 섬유화를 감소시킬 수 있다. 즉, 상기 조성물은 신장 조직의 손상 및 섬유화를 감소시킴에 따라 당뇨병성 신증을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0026] 상기한 바와 같이, 클로로퀸 또는 아모디아퀸은 미토콘드리아의 이상을 감소시킴으로써 신장 내 활성산소의 발생을 감소시킬 수 있으며, 신장 내 세포사멸을 억제하고 신장의 섬유화를 억제함으로써 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구제 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화되어 사용할 수 있고, 제형화를 위하여 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.

[0029] 상기 담체 또는, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리게이트, 셀룰로즈, 메틸

셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다.

[0030] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조할 수 있다.

[0031] 경구 투여를 위한 고형제제는 상기 클로로퀸 또는 아모디아퀸에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 제조할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다.

[0032] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용하는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다.

[0033] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등을 사용할 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등을 사용할 수 있다.

[0034] 일 구체예에 따른 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서는 1일 0.0001 내지 2,000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 2,000 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어서 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량에 의해서 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0035] 일 구체예에 따른 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유 동물에 다양한 경로로 투여할 수 있다. 투여의 모든 방식은 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해서 투여할 수 있다.

[0037] 다른 양상은 클로로퀸 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는 당뇨병성 신증의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다. 상기 클로로퀸의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.

[0038] 다른 양상은 아모디아퀸 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 하는 당뇨병성 신증의 예방 또는 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다. 상기 아모디아퀸의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.

[0039] 상기 당뇨병성 신증의 예방 또는 개선용 건강기능식품에 있어서, 상기 클로로퀸 또는 아모디아퀸을 건강기능식품의 첨가물로 사용하는 경우 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 예방, 건강 또는 치료 등의 각 사용 목적에 따라 적합하게 결정할 수 있다.

[0040] 건강기능식품의 제형은 산제, 과립제, 환, 정제, 캡슐제의 형태뿐만 아니라 일반 식품 또는 음료의 형태 어느 것이나 가능하다.

[0041] 상기 식품의 종류에는 특별히 제한은 없고, 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸콜렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함할 수 있다.

[0042] 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 상기 클로로퀸 또는 아모디아퀸은 원료 100 중량부에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 또한 본 발명은 천연물로부터의 분획물을 이용하는 점에서 안전성 면에서 문제가 없으므로 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.

[0043] 일 구체예에 따른 건강기능식품 중 음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과

같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명에 따른 음료 100 mL당 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g일 수 있다.

[0044] 상기 외에 본 발명에 따른 당뇨병성 신증의 예방 또는 개선용 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제를 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 수면 개선용 조성물은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 제한되지 않으나 본 발명의 건강기능식품 100 중량부 대비 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

발명의 효과

[0045] 일 양상에 따른 조성물은 에너지 조절에 관여하는 단백질인 AMPK의 인산화를 유도하여 신장 세뇨관 내의 미토콘드리아 이상을 감소시킴으로써, 알부민뇨의 감소 및 신장 세뇨관의 병리 호전을 유도하는 바, 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 클로로퀸 및 아모디아퀸의 당뇨병성 신증 치료 메커니즘을 나타내는 모식도이다.

도 2는 클로로퀸 및 아모디아퀸 처리에 의한 PGC1α, AMPK 인산화 증가 여부를 나타낸 결과이다.

도 3은 클로로퀸 및 아모디아퀸 처리에 의한 미토콘드리아 질량 및 분절화 변화를 나타낸 결과이다.

도 4는 클로로퀸 및 아모디아퀸 처리에 의한 세포사멸 관련 단백질의 발현 여부를 나타낸 결과이다.

도 5는 클로로퀸 및 아모디아퀸 처리에 의한 TGF-b1, α-SMA, 및 피브로넥틴의 발현 여부를 나타낸 결과이다.

도 6은 클로로퀸 및 아모디아퀸 처리에 의한 알부민뇨, 신세뇨관 손상 및 간질 섬유화 감소 여부를 나타낸 결과이다.

도 7은 클로로퀸 및 아모디아퀸 처리에 의한 신장에서 미토콘드리아 단백, 및 미토콘드리아 다이나믹스 관련 단백질 발현 여부를 나타낸 결과이다.

도 8은 클로로퀸 및 아모디아퀸 처리에 의한 신장에서 세포사멸 관련 단백질의 발현 여부를 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0048] **[준비예]**

[0049] 인간 신장 근위세뇨관 세포(human renal proximal tubular cells, HKC-8) 3 X 10^5에 각각 D-글루코스 5mM 또는 30mM를 배지에서, 6~24시간 동안 배양한 후 저혈당 또는 고혈당 환경을 조성하였다. 삼투성 대조군으로는 만니톨 30mM를 사용하였다. 클로로퀸, 아모디아퀸은 상기 세포를 30mM의 D-글루코스 배지에서 배양하기 한 시간 전에 첨가하였다.

[0051] **[실시예]**

[0052] **실시예 1. In vitro 에서 클로로퀸 및 아모디아퀸의 항당뇨병성 신증 활성 측정**

[0053] **1-1. PGC1α 및 AMPK 인산화 확인**

[0054] 클로로퀸 및 아모디아퀸의 항 당뇨병성 신증 관련 기전을 조사하기 위하여 상기 준비예에서 배양한 세포에 대해 phospho-AMPK, AMPK, phosphor-PGC1α 및 PGC1α 발현을 웨스턴 블랏 방법으로 조사하였다.

[0055] 인간 신장 근위세뇨관 세포(human renal proximal tubular cells, HKC-8)를 6-웰 플레이트에 3 X 10^5 cell/㎖의 농도로 분주한 후, 37℃에서 하루 동안 배양하면서 클로로퀸 및 아모디아퀸을 각각 200μM, 10μM의 농도로 처리하였다. 클로로퀸 및 아모디아퀸 처리 1시간 후, 상기 세포를 D-글루코스 5mM 또는 30mM 배지로 바꾸어

6~24시간 동안 추가로 배양하였다. 이후, 인산완충식염수로 세척하고, 1,400 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 세포를 획득하였다.

[0056] 획득한 세포에 50 ㎕의 용해 버퍼 (lysis buffer)를 첨가 후, 30분 동안 얼음 상에서 반응시키고, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하여 단백질을 수득하였다. 이후 수득한 단백질을 브래드포드 분석법(Bradford 분석법)을 이용하여 단백질을 정량 후 샘플 버퍼(sample buffer)를 넣고 95 ℃에서 5분 동안 변성시킨 뒤에 SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) 겔을 이용하여 전기영동 하였다. 전기영동 후 니트로셀룰로오스 막(Nitrocellulose membrane)에 옮긴 후, 1차 항체(C/EBP-β, C/EBP-α, Cell signaling, USA)를 5% 탈지분유 (skim milk)에 1:1000, (v/v)으로 희석하여 니트로셀룰로오스 막에 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, 4℃에서 하루 동안 추가로 반응시켰다. 이후 TBST(Tris-Buffered Saline와 Tween 20의 혼합액, 0.1% Tween 20)로 10분마다 3번 세척하고 HRP(horeseradish peroxidase)-conjugated 2차 항체 (Anti-rabbit, Cell signaling, USA)를 5% 탈지분유에 1:2000(v/v)으로 희석하여 5 ㎕ 첨가한 후 상온에서 1시간 동안 반응시켰다.

[0057] 위와 같은 방법으로 TBST를 이용하여 3차례 세척한 후 ECL(enchanced chemiluminescence) 기질 용액을 처리하여 1분 동안 반응시킨 후에 X-ray 필름에 현상하였다. 얻어진 결과를 이미지 J 프로그램 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 수치화하였다.

[0059] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 대조군 세포에 비해 클로로퀸 또는 아모디아퀸을 처리한 세포에서 PGC1α, AMPK의 인산화가 농도 의존적으로 증가하였음을 확인할 수 있었다. 특히, 클로로퀸을 처리한 경우 아모디아퀸을 처리하였을 때보다 인산화의 양이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0061] **1-2. 미토콘드리아의 양, 융합 및 분절에 의한 이상 확인**

[0062] 정상 기능을 하는 미토콘드리아를 염색할 수 있는 MitoTracker Red 염색을 이용하여 준비예에서 배양한 세포 내의 미토콘드리아 양을 분석하였다. 미토콘드리아 이중막 중 외막 구성 성분인 anti-TOM20 항체를 이용하여 웨스턴 블랏 방법 및 면역형광염색으로 조사하였다. 웨스턴 블랏은 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 수행하였다. 또한, 면역형광염색 방법은 하기와 같다.

[0063] 인간 신장 근위세뇨관 세포(human renal proximal tubular cells, HKC-8)를 커버 슬라이드가 들어있는 24-웰 플레이트에 1 X 10^5 cell/㎖의 농도로 분주한 후, 37℃에서 하루 동안 배양하였다. 이후, 클로로퀸 및 아모디아퀸을 각각 200μM, 10μM의 농도로 처리하였다. 클로로퀸 및 아모디아퀸 처리 1시간 후 상기 세포를 D-글루코스 5mM 또는 30mM 배지로 바꾸어 24시간 동안 추가로 배양하였다. 배양한 세포를 PBS(Phosphate Buffer Saline)으로 세척한 후 4% PFA(Paraformaldehide)로 15분간 고정시켰다. 고정된 세포를 0.2% Triton X-100이 들어있는 PBS로 10분씩 3회 세척한 후 1% BSA(Bovine Serum Albumin)가 들어있는 PBS로 1시간 동안 차폐하였다. 차폐된 세포에 1차 항체(Tom20, 1:1000, Santa Cruz, USA)를 1% BSA(Bovine Serum Albumin)가 들어있는 PBS로 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 하룻밤 동안 4℃에 넣어 반응시켰다. 이후, 세포를 PBS로 10분씩 3번 세척하고 1% BSA(Bovine Serum Albumin)가 들어있는 PBS에 Alexa Fluor 488 또는 594(Life Technologies, Korea)와 결합되어 있는 2차 항체를 1시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 세포를 PBS로 10분씩 3번 세척한 후 0.2% Triton X-100이 들어있는 PBS에 핵 염색을 위한 항존유전자인 DAPI(4′,6-diamidino-2-phenylindol)를 15분 간 반응시켰다. 이후 PBS로 10분씩 3번, 3차 증류수로 1번 세척한 후 슬라이드를 제작하였다. 제작된 슬라이드를 confocal microscopy(LSM-700; Carl Zeiss, Jena, Germany)를 이용하여 촬영하였다.

[0065] 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, 대조군 세포에 비해 클로로퀸 또는 아모디아퀸을 처리한 세포에서 Tom20 단백질의 발현량이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 특히, 클로로퀸을 처리한 경우 아모디아퀸을 처리하였을 때보다 Tom20 단백질의 발현량이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0067] 또한, 미토콘드리아 융합 관련 단백질인 Mfn1과 분절 관련 단백질인 Drp1의 발현 정도를 웨스턴 블랏 방법으로 조사하였다. 웨스턴 블랏은 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0068] 그 결과, 도 3c에 나타난 바와 같이, 대조군 세포에 비해 클로로퀸 또는 아모디아퀸을 처리한 세포에서 Mfn1 및 Drp1 단백질의 발현량이 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0070] **1-3. 세포사멸 단백질 발현 확인**

[0071] 준비예의 HKC-8 세포에서 세포사멸 관련 단백질(Bax, 시토크롬 C)과 세포 사멸 억제 관련 단백질(Bcl-2)의 발현을 웨스턴 블랏 방법으로 조사하였다. 웨스턴 블랏은 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0073] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 대조군 세포에 비해 클로로퀸 또는 아모디아퀸을 처리한 세포에서 세포사멸 관련 단백질인 Bax, 시토크롬 C의 발현량은 감소하였고, 세포사멸 억제 관련 단백질인 Bcl-2의 발현량은 유의적으로 증가하였음을 확인할 수 있었다. 즉, 클로로퀸 또는 아모디아퀸에 의해 세포사멸에 억제될 수 있다.

[0075] **1-4. 활성산소 발생 확인**

[0076] 상기 준비예의 세포의 미토콘드리아에서 발생하는 초과산화물(superoxide)과 반응하는 MitoSox Red dye와 세포 내 활성 산소종과 반응하는 H2DCFDA dye를 이용하여 미토콘드리아와 세포 내에서 발생하는 활성 산소 종을 측정하였다. 구체적으로, 인간 신장 근위세뇨관 세포(human renal proximal tubular cells, HKC-8)를 커버 슬라이드가 들어있는 24-웰 플레이트에 1 X 10^5 cell/㎖의 농도로 분주한 후, 37℃에서 하루 동안 배양하였다. 이후, 클로로퀸 및 아모디아퀸을 각각 200㎛, 10㎛의 농도로 처리하였다. 클로로퀸 및 아모디아퀸 처리 1시간 후 상기 세포를 D-글루코스 5mM 또는 30mM 배지로 바꾸어 24시간 동안 추가로 배양하였다. 배양한 세포를 PBS(Phosphate Buffer Saline)으로 세척한 후 4% PFA(Paraformaldehide)로 15분간 고정시켰다. 고정된 세포를 0.2% Triton X-100이 들어있는 PBS로 10분씩 3회 세척한 후 1% BSA(Bovine Serum Albumin)가 들어있는 PBS로 1시간 동안 차폐하였다. 차폐된 세포에 H2-DCFDA 및 MitoSOX(Life Technologies, Seoul, and Republic of Korea)를 1시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 세포를 PBS로 10분씩 3회 세척한 후 0.2% Triton X-100이 들어있는 PBS에 핵 염색을 위한 항존유전자인 DAPI(4′,6-diamidino-2-phenylindol)를 15분 간 반응시켰다. 이후, PBS로 10분씩 3회, 3차 증류수로 1회 세척한 후 슬라이드를 제작하였다. 제작된 슬라이드를 confocal microscopy(LSM-700; Carl Zeiss, Jena, Germany)를 이용하여 촬영하였다.

[0078] 그 결과, 도 4a)에 나타난 바와 같이, 고혈당 환경(30mM D-글루코스)에 노출되었던 근위세뇨관 세포에서 미토콘드리아 유래 활성산소(MitoSox)와 세포 내 활성산소(H2-DCFDA) 발생이 모두 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그러나, 클로로퀸 또는 아모디아퀸을 처리한 후에는 고혈당 환경에서도 신장 근위세뇨관 세포에서 미토콘드리아 유래 활성 산소와 세포 내 활성 산소 발생량이 모두 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 클로로퀸 또는 아모디아퀸은 신장에서 활성 산소의 발생을 감소시킴으로써 당뇨병 신증을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0080] **1-5. 섬유화 관련 사이토카인 및 단백질의 발현 확인**

[0081] 준비예의 HKC-8 세포에서 단백질을 추출한 후 anti-TGFβ1 antibody(섬유화 관련 사이토카인), anti-E-cad antibody(상피세포 표지자), anti-αSMA antibody 및 anti-fibronectin antibody(섬유화 관련 단백)와 반응시켜, 웨스턴 블랏을 수행하여 분석하였다. 단백질 추출 및 웨스턴 블랏은 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0083] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 대조군 세포에 비해 클로로퀸 또는 아모디아퀸을 처리한 세포에서 TGF-β1 α-SMA, 및 피브로넥틴의 발현량이 유의적으로 감소하였음을 확인할 수 있었다. 즉, 클로로퀸 또는 아모디아퀸은 당뇨병에서 신장의 섬유화를 억제할 수 있다.

[0085] **실시예 2. 당뇨병성 신증 유발 모델 마우스에서 클로로퀸 및 아모디아퀸의 항당뇨병성 신증 활성 측정**

[0086] 생후 7주령된 수컷 C57BL/6 마우스 20마리를 오리엔트 바이오로부터 구입하여 1주간 사육실 환경에서 적응시킨 후, 실험에 사용하였다. 동물사육실은 온도 21±2.0℃, 상대습도 50±5%, 12시간 밤낮주기 환경에서 유지되었다. 실험기간 동안 마우스는 일반 고형사료(chow)를 자유로이 물과 함께 공급받았다. 이후, 상기 마우스에 대하여 50㎎/㎏ 스트렙토조토신을 5일간 연속 복강 내 투여 하여 고혈당을 유도하고 일주일 후 혈당이 250 ㎎/㎗ 이상인 개체를 선별하여 실험에 이용하였다.

[0088] **2-1. 클로로퀸 또는 아모디아퀸에 의한 인산화 확인**

[0089] 정상 대조군, 당뇨 대조군 및 클로로퀸/아모디아퀸 처리군 마우스의 신장에서 PGC1α 및 AMPK 인산화 여부를 확인하기 위하여 웨스턴 블랏 방법으로 조사하였다. 웨스턴 블랏은 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0091] 그 결과, 도 6a에 나타난 바와 같이, 당뇨 대조군과 비교하여 클로로퀸/아모디아퀸 처리군 마우스의 신장에서 AMPK 및 PGC1α의 인산화가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0093] **2-2. 클로로퀸 또는 아모디아퀸에 의한 알부민뇨 변화 확인**

[0094] 대사케이지를 이용하여 상기 마우스의 소변(24hr)을 수집한 후, mice specific ELISA kit를 이용하여 소변의 알부민 양을 측정하였다.

[0096] 그 결과, 도 6c에 나타난 바와 같이, 클로로퀸 또는 아모디아퀸을 처리한 모델 마우스의 알부민 양이 당뇨 대조군(DM) 마우스에 비해 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 이와 같은 변화는 클로로퀸을 처리한 마우스에서 보다 아모디아퀸을 처리한 마우스에서 유의적인 변화가 나타났음을 확인할 수 있었다.

[0098] **2-3. 클로로퀸 또는 아모디아퀸에 의한 신장 조직 변화 확인**

[0099] 정상 대조군, 당뇨 대조군 및 클로로퀸/아모디아퀸 처리군 마우스로부터 신장 조직을 분리하였다. 이후, 파라핀 블록을 만들고 4㎛의 두께로 절단하여 조직 슬라이드를 만들었다. 이후, 파라핀 블록을 제거하고 재수분화한 후, PAS 염색, Masson's Trichrome 염색 하여 신장 조직 손상과 섬유화를 분석하였다. 신장 조직 손상은 정상 신세뇨관 비율과 손상된 신세뇨관 비율에 따라 0~3으로 점수화하고 신섬유화는 푸른색으로 염색된 신섬유화 정도에 따라 %로 표시하였다.

[0101] 그 결과 도 6e에 나타난 바와 같이, 당뇨 대조군에 비해 클로로퀸/아모디아퀸 처리군 마우스의 신장 조직 손상 점수가 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한 도 6g에 나타난 바와 같이, 당뇨 대조군에 비해 클로로퀸/아모디아퀸 처리군 마우스의 신장 섬유화가 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 클로로퀸 또는 아모디아퀸은 신장 조직의 손상 및 섬유화를 감소시킴에 따라 당뇨병성 신증을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0103] **2-4. 클로로퀸 또는 아모디아퀸 처리에 미토콘드리아 변화 확인**

[0104] **(1) 미토콘드리아 관련 단백질의 발현 분석**

[0105] 정상 대조군, 당뇨 대조군 및 클로로퀸/아모디아퀸 처리군 마우스의 신장에서 단백질을 추출하여 웨스턴 블랏 방법으로 미토콘드리아 외막 단백질 TOM20, 미토콘드리아 융합 관련 단백질, Mfn1 및 미토콘드리아 분절 관련 단백질 Drp1의 발현을 조사하였다. 단백질 추출 및 웨스턴 블랏은 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0106] 그 결과, 도 7a~b에 나타난 바와 같이, 정상 대조군 및 당뇨병 대조군에 비해 클로로퀸/아모디아퀸 처리군 마우스의 신장에서 Tom20 및 Mfn1 단백질의 발현량이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 반면, Drp1 단백질

의 경우, 정상 대조군 및 당뇨 대조군에 비해 클로로퀸/아모디아퀸 처리군 마우스에서 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0107] **(2) 미토콘드리아 모양 분석**

[0108] 정상 대조군, 당뇨 대조군 및 클로로퀸/아모디아퀸 처리군 마우스의 신장 조직에서 1~3㎜의 조각를 획득하여 전자 현미경(x 10,000~20,000)을 사용하여 신장 세포 내 미토콘드리아의 모양을 분석하였다. 현미경상에서 관찰되는 미토콘드리아의 장축이 2㎛ 이상인 경우, 섬유형(filametous)로 판단하고, 0.5㎛ 이하인 경우, 구형(spherical)로 판단하였다.

[0109] 그 결과, 도 7c에 나타난 바와 같이, 당뇨병 유발 마우스 신장의 세뇨관 세포 내에서는 분절된 구형의 미토콘드리아가 다수 관찰됨을 확인할 수 있었다. 반면, 클로로퀸/아모디아퀸 처리군 마우스의 경우, 신장의 세뇨관 세포 내에서는 정상 대조군의 신장에서처럼 장축이 긴 섬유형의 미토콘드리아 형태로 회복된 건강한 미토콘드리아 네트워크가 형성됨을 확인할 수 있었다. 즉, 클로로퀸 또는 아모디아퀸은 당뇨병 환자의 신장 내 손상된 미토콘드리아의 모양을 정상으로 회복시킬 수 있는바 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

[0110] **2-5. 신장 내 세포사멸 단백질 및 섬유화 단백질의 발현 분석**

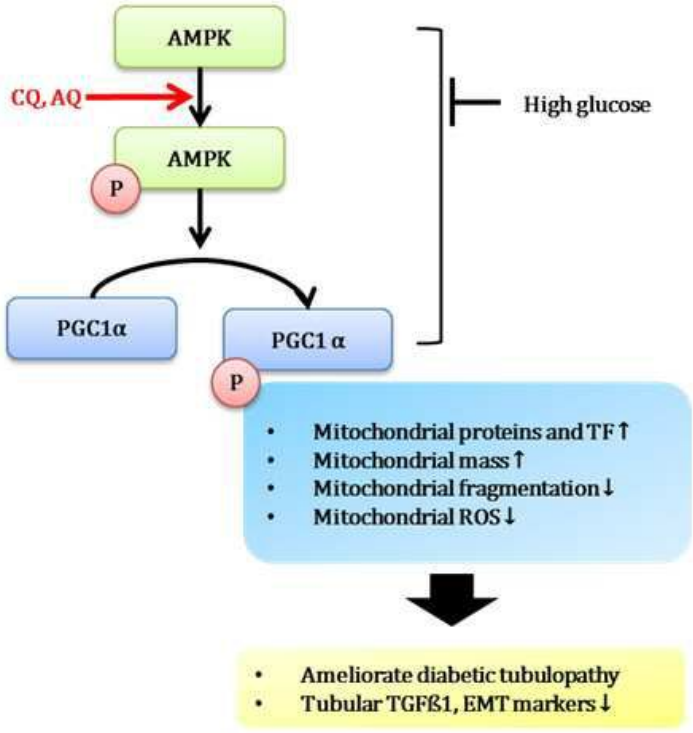
[0111] 정상 대조군, 당뇨 대조군 및 클로로퀸/아모디아퀸 처리군 마우스의 신장에서 단백질을 추출하여 세포사멸 관련 단백질(Bax, 시토크롬 C)과 세포 사멸 억제 관련 단백질(Bcl-2) 및 신섬유화 관련 사이토카인(TGF-β1), 신섬유화 관련 단백질(αSMA, 피프로넥틴)의 발현을 웨스턴 블랏 방법으로 조사하였다. 단백질 추출 및 웨스턴 블랏은 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0112] 그 결과, 도 8a~c에 나타난 바와 같이, 당뇨 대조군에 비해 클로로퀸/아모디아퀸 처리군 마우스의 신장에서 세포사멸 관련 단백질의 발현이 감소하였고, 세포사멸 억제 관련 단백질의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 8d~f에 나타난 바와 같이, 당뇨 대조군에 비해 클로로퀸/아모디아퀸 처리군 마우스의 신장에서 신섬유화 관련 사이토카인 및 단백질의 발현이 감소한 것을 확인할 수 있었다. 즉, 클로로퀸 또는 아모디아퀸은 신장 내 세포사멸을 억제하고 신장의 섬유화를 억제함으로써 당뇨병성 신증의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

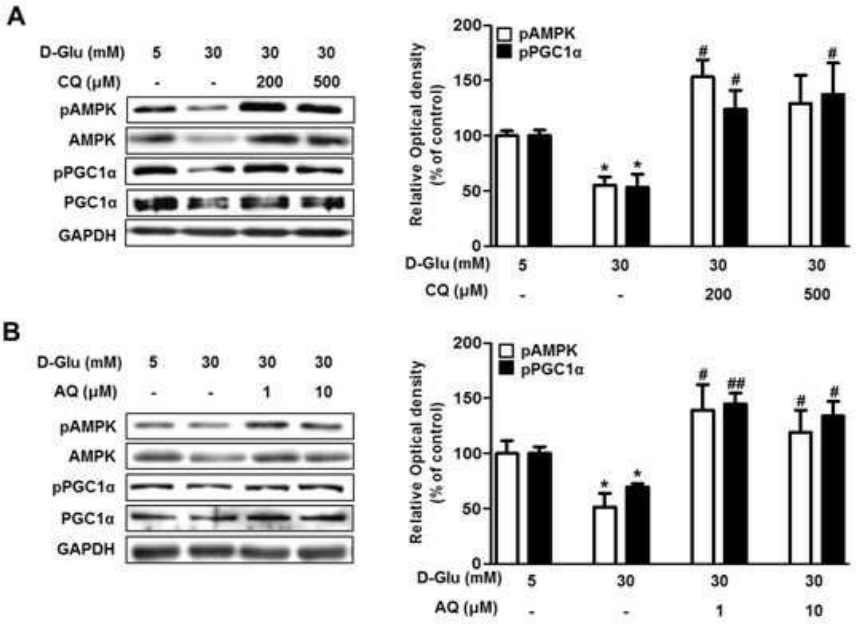
[0114] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

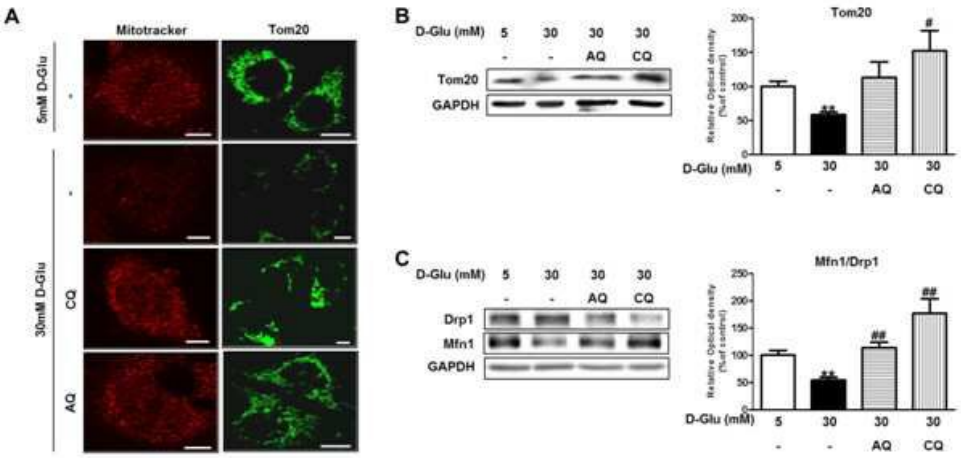
도면1


AMPK
CQ, AQ
AMPK
P
High glucose
PGC1α
PGC1 α
P
• Mitochondrial proteins and TF↑
• Mitochondrial mass↑
• Mitochondrial fragmentation↓
• Mitochondrial ROS↓
• Ameliorate diabetic tubulopathy
• Tubular TGFß1, EMT markers↓

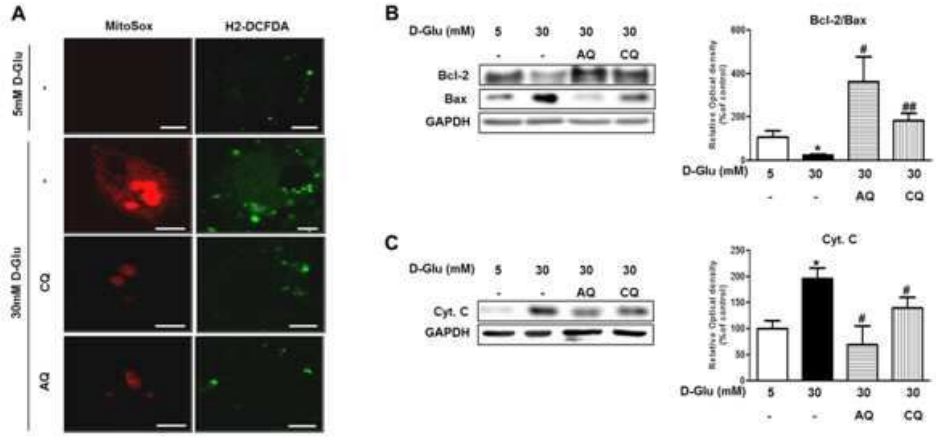
도면2


A
D-Glu (mM) 5 30 30 30
CQ (μM) - - 200 500
pAMPK
AMPK
pPGC1α
PGC1α
GAPDH
pAMPK
pPGC1α
Relative Optical density (% of control)
200
150
100
50
0
D-Glu (mM) 5 30 30 30
CQ (μM) - - 200 500
B
D-Glu (mM) 5 30 30 30
AQ (μM) - - 1 10
pAMPK
AMPK
pPGC1α
PGC1α
GAPDH
pAMPK
pPGC1α
Relative Optical density (% of control)
200
150
100
50
0
D-Glu (mM) 5 30 30 30
AQ (μM) - - 1 10

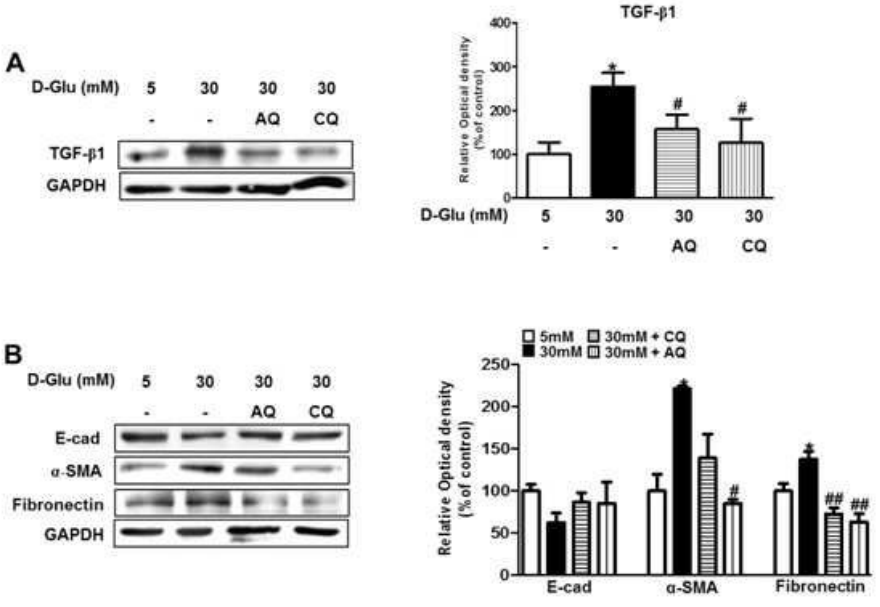
도면3


A
Mitotracker
Tom20
5mM D-Glu
30mM D-Glu
CQ
AQ
B
D-Glu (mM) 5 30 30 30
- - AQ CQ
Tom20
GAPDH
Tom20
Relative Optical density (%of control)
C
Drp1
Mfn1
GAPDH
Mfn1/Drp1

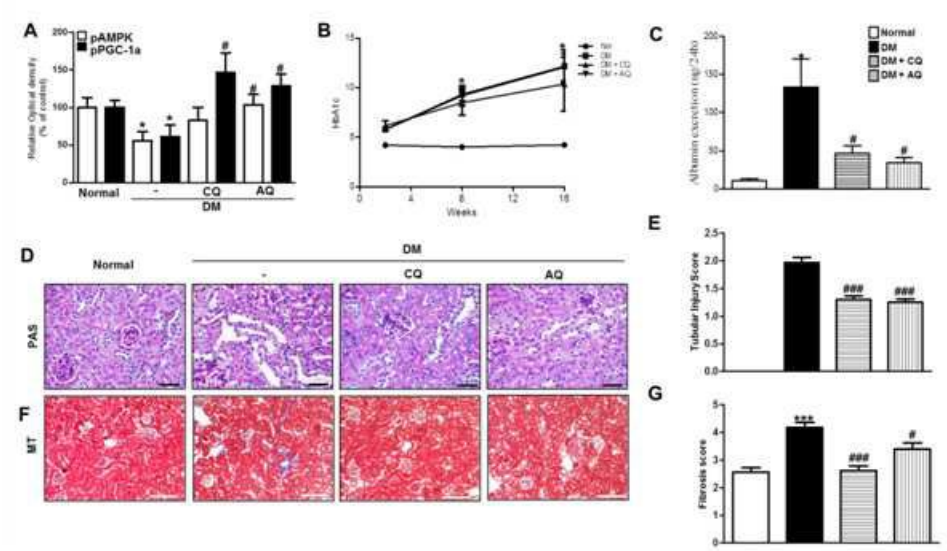
도면4


A
MitoSox
H2-DCFDA
5mM D-Glu
30mM D-Glu
CQ
AQ
B
D-Glu (mM) 5 30 30 30
- - AQ CQ
Bcl-2
Bax
GAPDH
Bcl-2/Bax
C
Cyt. C
GAPDH
Cyt. C

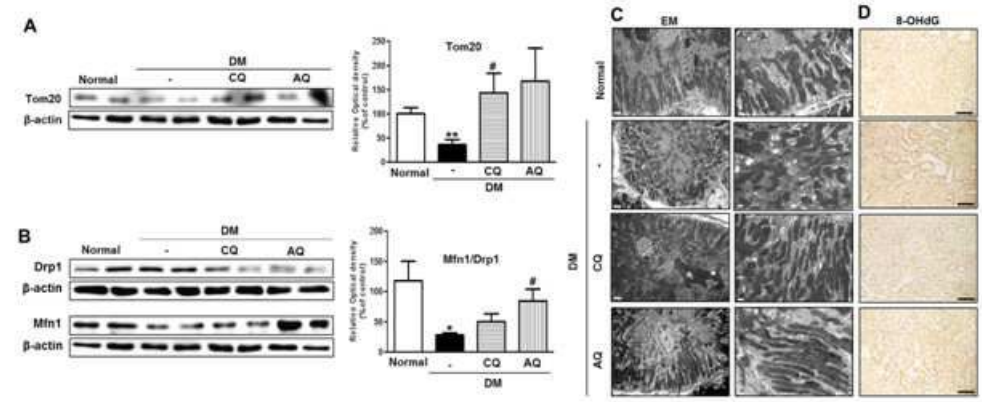
도면5


A
D-Glu (mM) 5 30 30 30
- - AQ CQ
TGF-β1
GAPDH
TGF-β1
Relative Optical density (%of control)
B
E-cad
α-SMA
Fibronectin
GAPDH
5mM
30mM
30mM + CQ
30mM + AQ
E-cad
α-SMA
Fibronectin

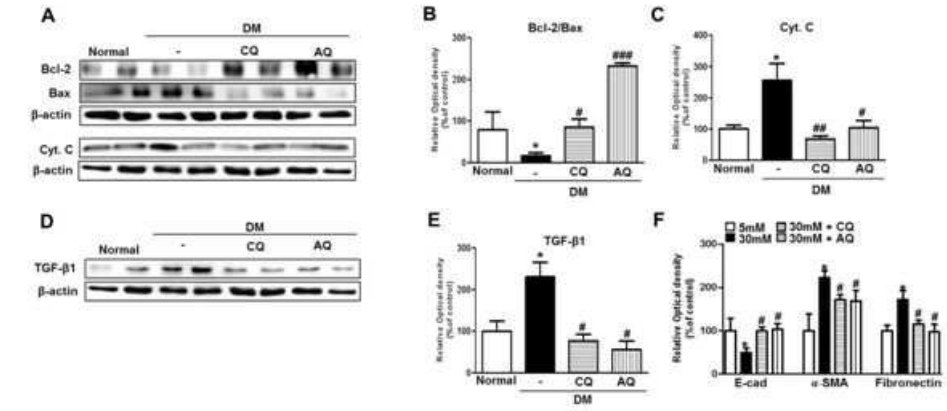
도면6


A
pAMPK
pPGC-1a
Normal
DM
CQ
AQ
B
C
Normal
DM
DM + CQ
DM + AQ
D
PAS
E
Tubular Injury Score
F
MT
G
Fibrosis score

도면7


A
Tom20
β-actin
Normal
DM
CQ
AQ
B
Drp1
Mfn1
C
EM
D
8-OHdG

도면8


A
Bcl-2
Bax
β-actin
Cyt. C
B
Bcl-2/Bax
C
Cyt. C
D
TGF-β1
E
F
5mM
30mM
30mM + CQ
30mM + AQ
E-cad
α-SMA
Fibronectin