



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0120153
(43) 공개일자 2011년11월03일

(51) Int. Cl.

A61K 31/015 (2006.01) A61K 36/752 (2006.01)

A61P 25/20 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0039699

(22) 출원일자 2010년04월28일

심사청구일자 2010년04월28일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

이성준

서울특별시 강남구 청담동 삼성청담공원@ 104-402

조보람

인천광역시 계양구 작전2동 854-12 동아 아파트
C동 503호

박효민

서울특별시 강남구 도곡2동 타워팰리스 D-803호

(74) 대리인

이문섭

전체 청구항 수 : 총 5 항

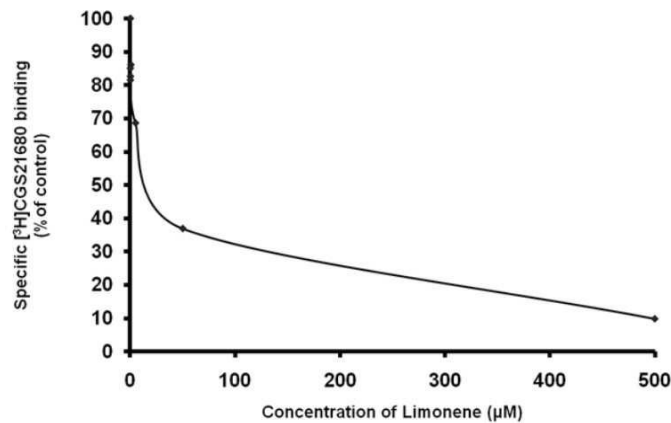
(54) 리모넨을 함유하는 아데노신 A2a 수용체 작용제

(57) 요약

본 발명은 리모넨을 함유하는 아데노신 A2a 수용체 작용제에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 리모넨(limonene)을 유효성분으로 함유하는 아데노신 A2a 수용체 작용제 및 이를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 리모넨은 아데노신 A2a 수용체에 강한 결합력을 갖는다. 또한 아데노신 A2a 수용체의 하위 신호 전달 물질인 cAMP의 농도, PKA의 활성화, 및 세포내 칼슘 농도를 증가시킨다. 따라서 리모넨은 아데노신 A2a 수용체의 작용제(agonist)로서 효과적인 물질이며 이러한 리모넨의 특성에 따라 아데노신 A2a 수용체와 관련된 수면 유도, 항염증 활성 등에 사용할 수 있는 약학 조성물의 유효성분으로 매우 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

리모넨(limonene)을 유효성분으로 함유하는 아데노신 A2a 수용체 작용제.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 리모넨은 감귤 껍질에서 추출된 것을 특징으로 하는 아데노신 A2a 수용체 작용제.

청구항 3

제 1항의 아데노신 A2a 수용체 작용제를 포함하는 수면 유도용 약학 조성물.

청구항 4

제 1항의 아데노신 A2a 수용체 작용제를 포함하는 항염증 활성을 갖는 약학 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 약학 조성물은 성인성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 기관지염, 만성 기관지염, 만성 폐쇄성 폐 질환, 낭포성 섬유증, 천식, 폐기종, 기관지확장증, 만성 축농증 및 비염으로 구성된 군에서 선택된 호흡기 질환에 사용되는 항염증제인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 리모넨 함유하는 아데노신 A2a 수용체 작용제에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 리모넨(limonene)을 유효성분으로 함유하는 아데노신 A2a 수용체 작용제 및 이를 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 아데노신은 내생의 뉴클레오타이드로서 A1, A2a, A2b 및 A3로 통상 일컬어지는 4가지 유형의 원형질막 수용체와 결합하여 수면 유도 [Shinsuke Satoh et al, Eur J Pharmacol. 1998; 351: 155-162], 면역 반응 및 염증 반응 [Sitkovsky et al, Nat. Rev. Immunol. 2005; 5, 712-721]을 비롯하여 광범위한 생리학적 활성을 갖는다. 각각의 수용체들은 세포내의 아데노신 3', 5'-cyclic monophosphate (이하 cAMP라 함)를 다른 방식으로 조절함으로써 생리학적 활성을 갖는다 [Van calker et al, J. Neurochem. 1979; 33: 999-1005. Londos et al, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980; 77: 2551-2554]. 본 발명에서 사용된 아데노신 A2a 수용체는 아데닐산 사이클라제 (adenylate cyclase)를 자극함으로써 cAMP의 농도를 증가시키고 이 cAMP는 단백질 키나아제 A (protein kinase A, 이하 PKA라 함)를 활성화 시킨다. 또한 아데노신 A2a 수용체의 작동제는 세포내 칼슘(calcium)의 농도를 증가시키는 것으로 알려져 있다 [L Hove-Madsen et al, Cardiovasc Res. 2006; 72 (2): 292-302].

[0003] 아데노신은 중요한 재생 수면 촉진 물질로 알려져 있다. 최근 연구에서 아데노신 A2a 수용체를 제거한 쥐에서 수면유도 효과가 나타나지 않은 것으로 나타났고 [Urade et al, NEUROLOGY 2003; 61: S94-S96], 아데노신 A2a 수용체의 작동제인 CGS 21680과 APEC를 처리했을 때 비-급성안구운동(non-rapid eye movement, 이하 NREM) 수면을 증가시키는 것으로 나타났다 [Satoh et al, Eur J Pharmacol. 1998; 351: 155-162]. A2a 수용체는 림프구, 호중구, 호산구, 대식세포, 상피세포 및 이들과 상호작용하는 혈관 상피세포 상에 존재하며 매우 다양한 면역세포 및 염증세포에 관련된 소염활성 작용을 한다 [Sullivan GW, Curr Opin Investig Drugs. 2003; 4(11), 1313-

1319]. 간단히 말하면, A2a 수용체에 아데노신이 결합하면 다수의 이들 유형의 세포의 활성화에 영향을 끼침으로써 염증을 감소시킬 수 있다. 또한 성인성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 기관지염, 만성 기관지염, 만성 폐쇄성 폐질환, 낭포성 섬유증, 천식, 폐기종, 기관지확장증, 만성 축농증 및 비염 같은 호흡기관의 질환의 치료에서 항염증제로서 유용하다. 이는 또한 패혈성 쇼크, 남성 발기 장애, 남성 인자 불임, 여성 인자 불임, 고혈압, 발작, 간질, 중추신경계 허혈증, 말초 혈관 질환, 허혈후 재관류 손상, 당뇨병, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 건선, 피부염, 알레르기성 피부염, 습진, 궤양성 대장염, 크론씨 병, 염증성 장질환, 헬리코박터 파일로리 위염, 비-헬리코박터 파일로리 위염, 위-장 관의 비-스테로이드 항염증제-유도된 손상 또는 정신적 장애의 치료, 또는 상처의 치유를 위해 사용될 수 있다.

[0004] 한편, 오렌지 등 감귤류 껍질의 추출물 가운데 95% 이상을 차지하고 있는 리모넨(limonene)은 모노테르페노이드(monoterpenoid)의 일종으로 향수나 음식, 주스에서 레몬의 향과 맛을 내기 위한 첨가제로 다양하게 사용되고 있으며 최근 항암작용에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있는 매우 흥미로운 물질이다. 리모넨은 동물세포의 콜레스테롤 합성과 비슷한 경로로 합성되며, HMG-CoA 환원효소(HMG-CoA reductase)의 비경쟁적 저해제로 체내에서 콜레스테롤의 합성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라, 식이로 섭취 시에 독성효과가 적으며 체내에서 대사되어 생긴 여러 대사산물들이 발암을 억제하는 작용이 있다고 한다.

[0005] 본 발명에서는 리모넨이 아데노신 A2a 수용체에 높은 결합력을 가지며 관련 신호전달 체계를 순차적으로 활성화 시킴을 증명하였고, 이 효과를 이용하여 리모넨이 다양한 아데노신 A2a 수용체와 관련 있는 다양한 질병의 치료 조성물의 유효 물질로 쓰일 수 있음을 증명하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 아데노신 A2a 수용체에 강한 결합력을 갖는 리모넨을 함유하는 아데노신 A2a 수용체 작용제를 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 아데노신 A2a 수용체 작용제를 포함하는 아데노신 A2a 수용체와 관련된 수면 유도, 및 항염증 활성을 갖는 약학 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 리모넨(limonene)을 유효성분으로 함유하는 아데노신 A2a 수용체 작용제를 제공한다.

[0009] 본 발명에 있어서, 아데노신 A2a 수용체란 아데닐산 사이클라제(adenylate cyclase)를 자극함으로써 cAMP의 농도를 증가시키고 이 cAMP는 단백질 키나아제 A (PKA)를 활성화 시키며 세포내 칼슘(calcium)의 농도를 증가시키는 작용을 하는 단백질 수용체를 말한다. 본 발명의 실시예 6 내지 8에서는 리모넨 처리시 cAMP 농도, PKA 활성화 및 세포내 칼슘 농도의 증가를 유도함을 입증하였다.

[0010] 본 발명의 아데노신 A2a 수용체 작용제에서, 상기 리모넨은 리모넨을 함유하고 있는 것으로 공지된 다양한 식물들, 예컨대 감귤 껍질, 오렌지 껍질, 형개, 측백엽 등으로부터 분리 및 정제하거나 상업적으로 구입하여 사용할 수 있다.

[0011] 본 발명에 사용된 유효성분인 리모넨을 식물로부터 분리 및 정제하는 방법은 다음과 같다. 먼저 오렌지의 껍질을 벗겨내어 껍질 안쪽의 하얀 중과피를 긁어서 제거한다. 중과피가 제거된 남은 껍질의 질량을 잔후 150 mL의 증류수에 넣고 걸죽한 상태가 될 때까지 균질화시킨다. 그 다음 500 mL 크기의 원형 비커에 옮긴후 증류추출기를 이용하여 추출을 수행한다.

[0012] 본 발명에 있어서, 상기한 유효성분을 효과적으로 추출하기 위해서는 대상 식물의 종류 및 대상 추출 성분에 따라 최적 추출량을 얻을 수 있는 용매의 선택이 필요하며, 용매의 제거 용이성 및 잔류 허용량 등도 함께 고려하여야 할 필요가 있다.

[0013] 상기 추출 용매로서는 에틸에테르, 에탄올, 메탄올, 1-부탄올, 이소프로판올, 클로로포름, 벤젠을 사용할 수 있

으며, 유효 성분의 검출 여부 및 검출량 분석은 HPLC, GC 또는 GC-MS를 이용하여 수행할 수 있다. 감귤 껍질로부터의 리모넨의 추출에는 메탄올이 특히 바람직하다. 형개로부터의 리모넨의 추출에는 에틸에테르가 가장 바람직하나, 메탄올, 1-부탄올 및 이소프로판올도 사용 가능하다. 측백엽으로부터의 리모넨의 추출에는 에탄올과 이소프로판올이 바람직하다.

[0014] 또한 상기 리모넨을 분리 및 정제된 형태로서 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)사로부터 상업적으로 구입하여 사용할 수 있다. 상기 리모넨을 바람직하게는 순도가 95% 이상, 더욱 바람직하게는 98% 이상의 것을 사용하는 것이 적당하다.

[0015] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 아데노신 A2a 수용체 작용제를 포함하는 수면 유도용 약학 조성물을 제공한다. 최근 연구에서 아데노신 A2a 수용체를 제거한 쥐에서 수면유도 효과가 나타나지 않은 것으로 나타났다 [Urade et al, NEUROLOGY 2003; 61: S94-S96], 아데노신 A2a 수용체의 작동제인 CGS21680 (2-(4-(2-carboxyethyl)phenylethylamino)adenosine-5'-N-ethylcarboxamideadenosine) 과 APEC (2-[(2-aminoethyl-aminocarbonyl)ethyl]phenylethylamino]-5'-N-ethyl-carboxamidoadenosine)를 처리했을 때 비-급성안구운동(NREM) 수면을 증가시키는 것으로 나타났다 [Sato et al, Eur J Pharmacol. 1998; 351: 155-162]. 따라서 본 발명에 따른 조성물의 유효성분인 리모넨이 상기 CGS 21680 또는 APEC와 유사하거나 더 높은 아데노신 A2a 수용체 작용제로서 사용될 수 있음을 증명함으로써(실시예 2 내지 6 참조) 리모넨이 수면 유도용 약학 조성물로 사용될 수 있음을 판단할 수 있다.

[0016] 본 발명의 실시예 4에서는, 리모넨과 아데노신 A2a 수용체와의 결합력을 알아보기 위하여 방사성리간드 결합 분석(radioligand binding assay) 실험을 이용하여 리모넨이 아데노신 A2a 수용체에 강력한 결합력을 보임을 증명하였다 (도 1 참조). 구체적으로, 래트의 선조체 막(triatal membrane)에 존재하는 아데노신 A2a 수용체와의 결합력을 동위원소를 이용한 결합분석을 통해, 아데노신 A2a 수용체의 작동제(agonist)로서 수면유도 효과가 있는 것으로 알려진 CGS 21680에 동위원소가 라벨링된 형태의 리간드를 이용하여 리모넨과 아데노신 A2a 수용체와의 상대적 결합력의 변화를 검토함으로써 리모넨의 아데노신 A2a 수용체에 대한 결합력을 파악하였다. 결과로부터, 리모넨을 처리 하지 않은 그룹에서 CGS-21680이 아데노신 A2a 수용체와 100% 결합을 한다고 가정할 때 상대적으로 리모넨을 처리한 그룹에서는 CGS-21680과 아데노신 A2a 수용체와의 결합이 최대 9.8%까지 떨어졌다. 이는 리모넨이 아데노신 A2a 수용체에 결합함으로써 CGS-21680이 아데노신 A2a 수용체에 결합하지 못함으로써 생겨난 결과이다. 따라서 본 발명의 리모넨이 아데노신 A2a 수용체에 강한 결합력을 갖는 것으로 판단하였다. 또한 아데노신 A2a 수용체의 활성 효과를 알아보기 위하여 cAMP의 증가와 PKA 활성의 증가를 확인하였으며 (도 2, 3 참조). 세포 내의 칼슘 농도의 변화를 확인하였다. 이로써, 리모넨이 아데노신 A2a 수용체의 신호전달 경로의 활성을 증가시키는 것으로 판단하고 리모넨이 정상적으로 아데노신 A2a 수용체 작동제로 작용하였다는 사실을 입증하였다.

[0017] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 아데노신 A2a 수용체 작용제를 포함하는 항염증 활성을 갖는 약학 조성물을 제공한다.

[0018] 또 다른 연구에서, 아데노신 A2a 수용체는 림프구, 호중구, 호산구, 대식세포, 상피 세포 및 이들과 상호작용하는 혈관 상피세포 상에 존재하며 매우 다양한 면역세포 및 염증세포에 관련된 소염 활성 작용을 하는 것으로 나타났다 [Sullivan GW, Curr Opin Investig Drugs. 2003; 4(11), 1313-1319]. 또한 다양한 화합물들이 아데노신 A2a 수용체 작용제로 사용되어 염증성 질환의 치료에 사용되어 항염 효과를 나타내는 것이 알려져 있는데, 예를 들어, 폐쇄성 기도 질환의 치료를 위한 아데노신 A2A 수용체 작용제 및 항콜린제의 조합물 (공개특허 10-2003-0097901), 아데노신 A2A 수용체 아고니스트로서 사용하기 위한 퓨린 유도체 (공개특허 10-2007-0073798) 등에서 아데노신 A2a 수용체 작용제의 처리 시 항염 효과를 나타냄을 설명하고 있다. 또한 다른 연구에서, 아데노신 A2a 수용체 작용제 처리시 항염 효과를 나타내는 것으로 보고되어 있다 [Montesinos et al. Arthritis Rheum. 2003; 48: 240-247]. 따라서 본 발명에 따른 조성물의 유효성분인 리모넨이 아데노신 A2a 수용체에 강하게 결합하여 다수의 이들 유형의 세포의 활성에 영향을 끼침으로써 염증을 감소시킬 수 있는 사실에 근거하여, 리모넨이 아데노신 A2a 수용체 작용제로서 사용될 수 있음을 증명함으로써 (실시예 2 내지 6 참조) 리모넨이 항염증 활성을 갖는 약학 조성물로 사용될 수 있음을 판단할 수 있다.

[0019] 본 발명의 항염증 활성을 갖는 약학 조성물은, 상기과 같은 항염증 활성을 가짐으로서 성인성 호흡 곤란 증후군(ARDS), 기관지염, 만성 기관지염, 만성 폐쇄성 폐 질환, 낭포성 섬유증, 천식, 폐기종, 기관지확장증, 만성 축농증 및 비염으로 구성된 군에서 선택된 호흡기 질환에 사용되는 항염증제일 수 있다.

[0020] 본 발명에 따른 약학 조성물은 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석

제로 희석하여 제조될 수 있다. 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 상기 약학 조성물은 충전제, 항응집제, 운환제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[0021] 본 발명에 따른 약학 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 경구를 통해 투여될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 성인을 기준으로 약 0.01 내지 1000 mg/kg, 보다 바람직하게는 약 0.1 내지 100 mg/kg이다. 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명에 따른 리모넨은 수면 유도, 또는 염증질환의 예방 또는 치료 목적으로 건강식품 조성물의 형태로 제조되거나 식품에 첨가될 수 있다. 따라서, 본 발명은 리모넨을 포함하는 기능성 식품 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 본 발명의 리모넨은 당업계에 통상적인 방법으로 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 가공되어 건강기능식품으로서 제공될 수 있다. 또한, 본 발명의 리모넨은 음료(알콜성 음료도 포함함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지, 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게이트, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소오스 등) 등에 첨가될 수 있다.

발명의 효과

[0023] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 리모넨은 아데노신 A2a 수용체에 강한 결합력을 갖는다. 또한 아데노신 A2a 수용체의 하위 신호 전달 물질인 cAMP의 농도, PKA의 활성화, 및 세포내 칼슘 농도를 증가시킨다. 따라서 리모넨은 아데노신 A2a 수용체의 작동제(agonist)로서 효과적인 물질이며 이러한 리모넨의 특성에 따라 아데노신 A2a 수용체와 관련된 수면 유도, 항염증 활성화 등에 사용할 수 있는 약학 조성물의 유효성분으로 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명에 따른 리모넨의 아데노신 A2a 수용체에 대한 결합력을 나타낸 그래프이다.
 도 2는 본 발명에 따른 리모넨이 아데노신 A2a 수용체-트랜스펙션된 CHO 세포에서 cAMP 농도를 증가시키기를 나타내는 그래프이다.
 도 3은 본 발명에 따른 리모넨이 아데노신 A2a 수용체-트랜스펙션된 CHO 세포에서 PKA 활성을 증가시키기를 나타내는 그래프이다.
 도 4는 본 발명에 따른 리모넨이 아데노신 A2a 수용체-트랜스펙션된 CHO 세포에서 칼슘 농도의 증가를 유도함을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0026] 실시예 1. 선조체 막(Striatal membrane) 준비

[0027] 본 발명에서 사용된 일반 래트의 선조체 막(srtriatal membrane)은 래트에서 뇌를 적출한 후 차가운 50 mM Tris HCl 버퍼 (10 mM MgCl₂, pH 7.5)에 넣고 호모게나이저를 이용하여 분쇄한 후, 48,000×g 속도로 4℃에서 10분간

원심분리 시켰다. 남아있는 펠렛을 아데노신 데아미나제(adenosine deaminase)가 첨가된 동일한 버퍼를 섞어준 후 37℃에서 30분간 인큐베이션 시켜 남아있는 아데노신(adenosine)을 제거하여 추후 실험에서 아데노신에 의해 생길 수 있는 오차 가능성을 제거하였다. 그리고, 4℃에서 다시 48,000×g의 속도로 원심분리 시킨 후 남은 펠렛을 아데노신 데아미나제가 첨가되지 않은 처음과 동일한 버퍼를 사용하여 섞어준 후 실험에 사용하였다.

[0028] 실시예 2. 결합력 측정 실험

[0029] 본 발명에서 리모넨(limonene)과 아데노신 A2A 수용체(adenosine A2A receptor)의 결합력은 방사성리간드 결합 분석(radioligand binding assay) 기법을 이용하여 측정하였다. 먼저 96웰 플레이트에 농도별로 희석된 리모넨(시그마)을 각 농도별로 10 μL씩 4회 반복하여 로딩하였다. 각 웰에 [³H]CGS-21680 (Perkin elmer)이 첨가된 50 mM Tris HCl 버퍼 pH 7.5로 최종농도 5 nM이 되도록 10 μL씩 추가로 로딩하였다. 마지막으로 준비된 선조체 막을 0.2 mg의 단백질이 되도록 정량하고, 이를 180 μL씩 96웰 플레이트의 각 웰에 로딩하여 각 웰의 최종 양이 200 μL가 되도록 채워주었다. 약 90분간 25℃에서 인큐베이션 시킨 후, 왓만 필터(Whatman GF/C fiber glass filters)에 필터레이션 시킴으로써 반응을 종료시켰다. 이 필터는 50 mM Tris HCl 버퍼 pH 7.5로 씻어준 후 말리고 5 mL의 신틸레이션 콕테일(Ultima Gold scintillation cocktail)을 첨가시킨 후에 방사능(radioactivity)을 측정하였다. 비특이적 결합(Non specific binding)은 5'-(N'-Ethylcarboxamido)(이하 NECA로 함)를 사용하여 측정하였다.

$$\text{Binding (\%)} = \frac{(\text{Extract DPM} - \text{NB DPM})}{(\text{TB DPM} - \text{NB DPM})} \times 100$$

DPM : disintegrations per minute (분당 붕괴도)

NB : nonspecific binding (비특이적 결합)

TB : total binding (총 결합)

[0030] 측정결과, 도 1에서 볼 수 있듯이, 리모넨을 처리하지 않은 그룹(0 μM)에서 CGS-21680이 아데노신 A2A 수용체와 100% 결합을 한다고 가정하고 상대적으로 리모넨을 처리한 그룹에서는 50 μM 농도까지 CGS-21680과 아데노신 A2A 수용체와의 결합이 급격히 감소하였으며, 500 μM에서는 최대 9.8% 까지 떨어졌다. 이는 리모넨이 아데노신 A2A 수용체에 결합함으로써 CGS-21680이 아데노신 A2A 수용체에 결합하지 못함으로써 생겨난 결과이다. 따라서 본 발명의 리모넨이 아데노신 A2A 수용체에 강한 결합력을 갖는 것으로 판단된다.

[0032] 실시예 3. 세포의 배양과 아데노신 A2a 수용체의 과발현

[0033] 본 발명에서 사용한 CHO (chinese hamster ovary) 세포는 10% FBS와 1% 페니실린, 및 스트렙토마이신이 포함된 F-12 배지에서 키워졌으며, 37℃, 5% 이산화탄소 배양기에서 배양되었다. 과발현을 위해, 인간 아데노신 A2a 수용체 벡터 (Origene, USA)를 구입하여 트랜스펙션 시약인 Hilymax (Dojindo, Japan)을 사용, CHO 세포에 트랜스펙션 시킴으로써 CHO 세포에서 아데노신 A2a 수용체를 과발현 시켰다.

[0034] 실시예 2에서 리모넨이 아데노신 수용체에 결합력을 갖고 있는 것으로 확인되었기 때문에, 본 발명자들은 리모넨이 세포에 미치는 효과가 아데노신 수용체로 인한 것인지를 확인하기 위하여 CHO 세포에서 아데노신 A2a 수용체의 과발현을 수행하였다. 과발현 시키지 않은 세포에서도 같은 실험을 진행하였고, 그 결과 리모넨을 처리하였을 때 나타나는 효과는 과발현시킨 세포에 비해 상대적으로 떨어지는 것으로 나타났으며, 이는 리모넨이 세포에 미치는 효과가 아데노신 수용체로 인한 것임을 의미한다.

[0035] 실시예 4. cAMP 농도 변화 측정

[0036] 본 발명에서 cAMP 농도 변화는 Direct Cyclic AMP Enzyme Immunoassay Kit (Assay design, INC. USA)를 사용하여 측정하였다. 구체적으로, 96웰 플레이트의 각 웰 당 세포 20,000개 정도의 양이 들어가도록 계산하여 CHO 세포를 24시간 트랜스펙션 시킨 후, 리모넨 0 μM, 5 μM, 10 μM, 25 μM 4구간과, 양성대조군(positive

control)으로서 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (NECA) 10 μ M을 30분간 처리하였다. 30분 인큐베이션 후, 0.1 M HCl로 세포를 깨고 그 용해물을 각 웰에 로딩하였고 제조사의 프로토콜에 따라 시약들을 처리한 후, 최종적으로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 최종 농도는 표준시약의 흡광도값과 비교하여 환산하였다.

[0037] 측정결과, 도 2에서 볼 수 있듯이, 리모넨은 10-25 μ M의 처리농도에서 아데노신 A2A 수용체의 하위 신호 전달 물질인 cAMP의 농도가 유의하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 아데노신 수용체는 G protein coupled receptor의 한 종류로서 activation이 되면 adenylic cyclase가 증가하면서 cAMP가 증가하고 cAMP가 증가하면 PKA activity가 차례로 증가하게 된다. 따라서 아데노신 신호전달 과정의 첫 번째 단계가 시작되는 것을 확인한 실험 결과이다. 여기서, NECA는 아데노신 A2a의 강력한 agonist이기 때문에 양성대조군으로 사용하였다. 즉, NECA를 처리했을 경우 그 결과는 아데노신 수용체가 활성화되어 나타난 결과라고 할 수 있기 때문에 리모넨 처리 결과가 아데노신 리셉터의 활성화 결과인지 확인할 수 있다.

[0038] 실시예 5. PKA 활성 변화 측정

[0039] 본 발명에서 PKA 활성 변화는 PKA Kinase Activity Assay Kit (Assay design, INC. USA)를 사용하여 측정하였다. 상기 실시예 4과 같은 조건에서 세포를 트랜스펙션 시켰으며 추가로 forskolin 10 μ M을 처리한 그룹을 만들었다. 1시간 인큐베이션 이후, 제조사에서 권고한 세포 용해제를 이용하여 세포를 용해시켰으며 프로토콜에 따라 시약들을 처리한 후, 최종적으로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 상대적 PKA 활성 변화를 확인하였다.

[0040] 측정결과, 도 3에서 볼 수 있듯이, 리모넨은 10-25 μ M의 처리농도에서 아데노신 A2A 수용체의 하위 신호 전달 물질인 PKA의 활성이 유의하게 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 실시예 4에서 cAMP가 증가하는 것을 확인했기 때문에 그 다음 단계인 PKA 활성을 측정하였다. 예상대로 cAMP가 증가하고 PKA의 활성 역시 증가한 것으로 보아 리모넨이 아데노신 수용체를 활성화시킨 것을 확인 할 수 있었다. 여기서, NECA는 실시예 5와 같이 아데노신 수용체 agonist이고 10은 10 μ M 농도 처리를 의미한다. 그리고 Forskolin은 cAMP의 농도를 증가시키는 물질로서 이 실험에서 양성대조군으로 사용되었다. cAMP를 증가시킨 경우 PKA가 높아지기 때문에 인위적으로 cAMP의 농도를 높인 경우와(forskolin 처리) 리모넨을 처리한 경우를 비교해본 것이다.

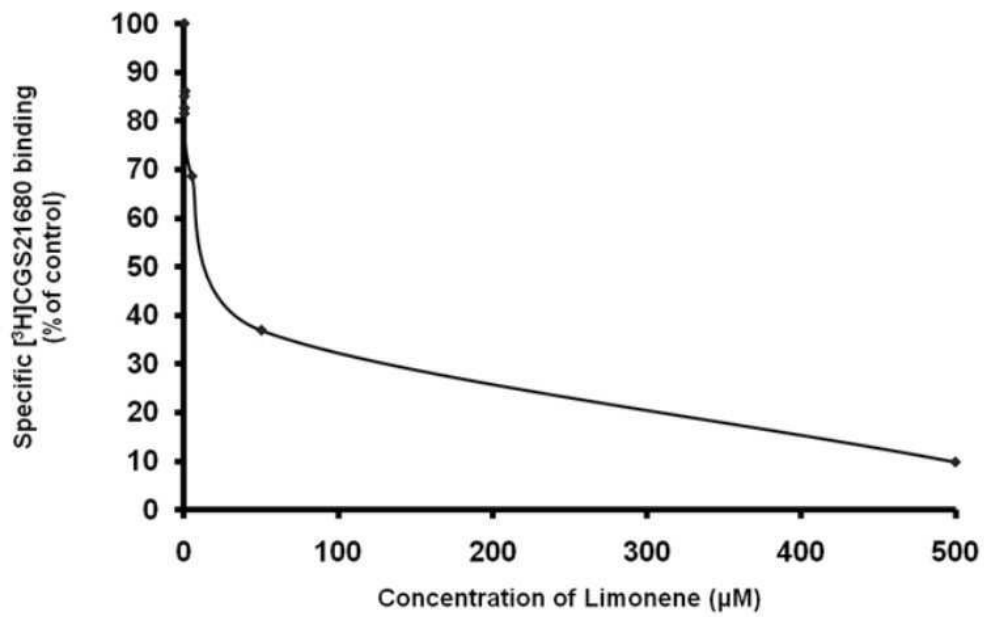
[0041] 실시예 6. 칼슘 농도 변화 측정

[0042] 본 발명에서 칼슘 농도 변화는 리모넨을 상기 실시예 6과 동일하게 처리한 후, Fluo-4 NW Calcium Assay Kit (Invitrogen, USA)를 사용하여 측정하였다.

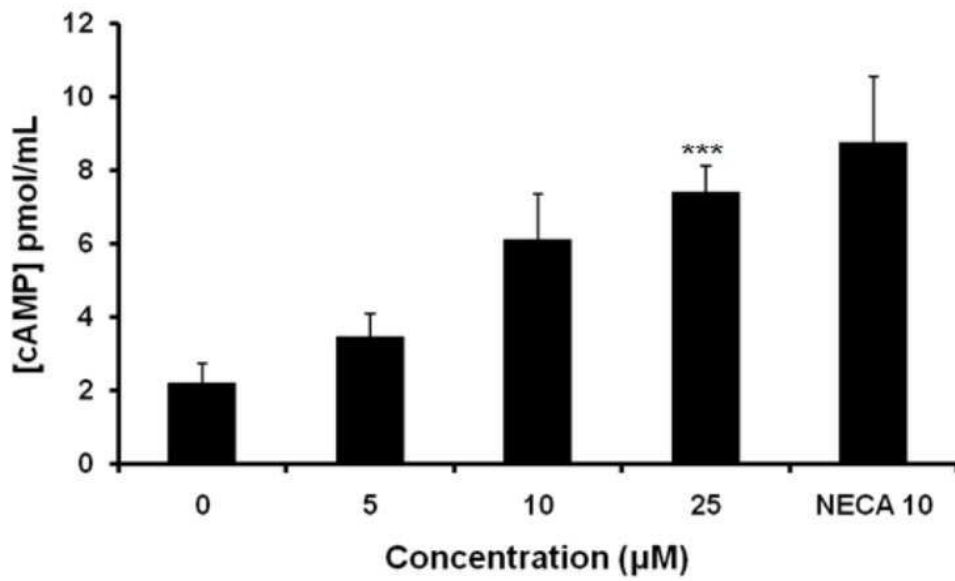
[0043] 측정결과, 도 4에서 볼 수 있듯이, 리모넨은 5-25 μ M의 처리농도에서 세포내 칼슘 농도를 증가시키는 것을 확인할 수 있었다.

도면

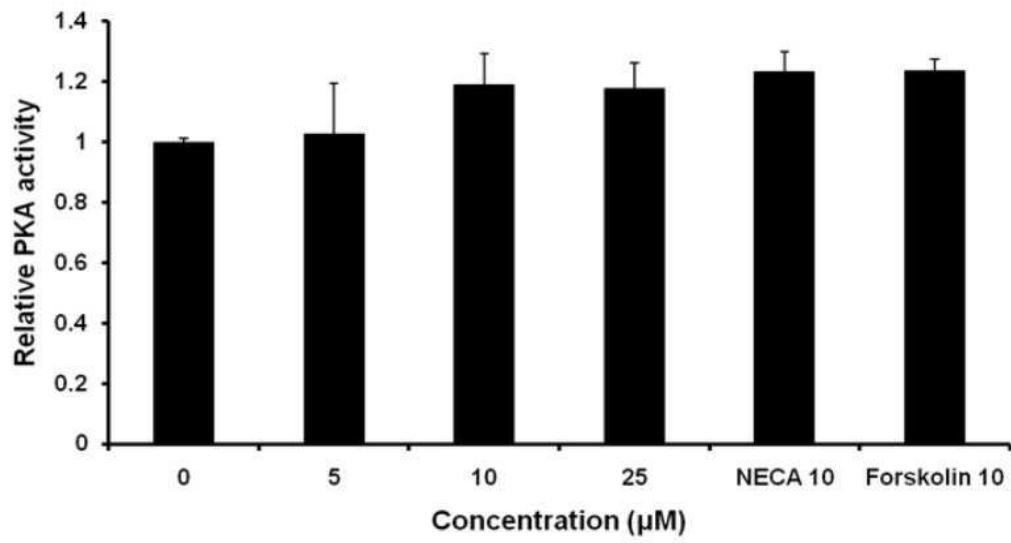
도면1



도면2



도면3



도면4

