

(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/475 (2006.01) **A61P** 3/00 (2006.01) **A61P** 3/04 (2006.01)

(21) 출원번호 **10-2014-0134597**

(22) 출원일자 **2014년10월06일** 심사청구일자 **2014년10월06일**

기술이전 희망: 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(11) 공개번호 10-2016-0040970

(43) 공개일자 2016년04월15일

(71) 출원인

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(72) 발명자

박준수

강원도 원주시 연세대길 1 연세대학교 생명과학기 술학부 미래관 417호

이강일

강원도 원주시 연세대길 1 연세대학교 매지1학사 233호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이희숙, 김석만

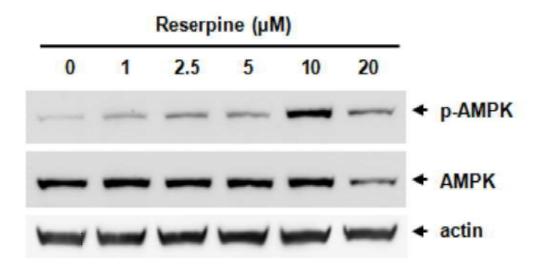
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 레세르핀을 이용한 AMP 활성화 단백질 키나아제의 활성화용 조성물

(57) 요 약

본 발명은 레세르핀을 유효성분으로 하는 AMP활성화 단백질 인산화효소(AMPK) 활성화용 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 레세르핀을 유효성분으로 하는 체지방 이화작용 촉진용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 임상적으로 사용되고 있는 레세르핀 물질의 새로운 용도를 찾아낸 것으로 AMPK 활성화가 필요한 질환을 예방 및 치료하는데 쉽게 적용될 수 있어 효과적이다.

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

남궁심

강원도 홍천군 홍천읍 희망로 3길 8

박락현

경기도 안성시 혜산로 18 (구포동)

박송용

강원도 원주시 흥업면 북원로 1600, 남원주두산위 브아파트 103동 1305호

오원근

서울특별시 관악구 관악로 1, (신림동) 서울대학교 약학대학

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013-053960

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업(기본연구)

연구과제명 세포분화 과정에서 막단백질 ITM2B의 기능 연구

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2015.08.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013-042433 부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단 연구사업명 우주핵심기술개발사업

연구과제명 마이크로중력 환경에서 AMPK 관련 세포신호전달 연구

기 여 율 1/2

주관기관 연세대학교 산학협력단 연구기간 2013.07.01 ~ 2016.06.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식1의 레세르핀을 유효성분으로 포함하는 AMP활성화 단백질 인산화효소(AMPK) 활성화용 조성물.

[화학식 1]

청구항 2

제1항에 있어서, 레세르핀이 AMPK의 172번째 트레오닌(T172)을 인산화 시키는 것을 특징으로 하는 AMP 활성화단백질 인산화효소(AMPK) 활성화용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 AMPK를 활성화할 세포는 신경세포주인 PC12세포와 인간의 신장에서 유래한 HEK293세포 중하나인 것을 특징으로 하는 AMP 활성화 단백질 인산화효소(AMPK) 활성화용 조성물.

청구항 4

하기 화학식1의 레세르핀을 유효성분으로 포함하는 체지방 이화작용 촉진용 조성물.

[화학식 1]

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물은 지방산과 콜레스테롤의 합성을 억제하고, 지방산의 산화를 촉진하는 것을 특징으로 하는 체지방 이화작용 촉진용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 조성물은 AMPK의 172번째 트레오닌(T172)을 인산화 시키는 것을 특징으로 하는 체지방 이

화작용 촉진용 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 체지방 이화작용 촉진이 일어나는 부위가 허벅지, 엉덩이, 종아리, 등, 턱, 팔, 상복부, 하복부, 가슴 또는 얼굴로 이루어진 군에서 선택되는 하나인 것을 특징으로 하는 체지방 이화작용 촉진용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 레세르핀을 유효성분으로 하는 AMP활성화 단백질 인산화효소(AMPK) 활성화용 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 레세르핀을 유효성분으로 하는 체지방 이화작용 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 현대 사회에서는 비만, 당뇨병, 고지혈증 및 심혈관계 질환 등과 같은 대사 질환이 급격히 증가하고 있다. 대사 질환은 신체에서 에너지 항상성의 불균형에 의해서 근육, 간 그리고 지방 세포의 기능 이상을 초래한다. 많은 대사 질환은 혈당을 조절하는 인슐린과 관계가 있다고 알려져 있지만, 이에 대한 자세한 메커니즘은 밝혀지지 않았다.
- [0003] AMP 활성화 단백질 키나아제(AMPK)는 AMP(adenosine monophophate)에 의해서 활성화되는 효소로써, 세포 내의에너지 항상성에 센서 역할을 하는 효소이다. AMPK는 AMP에 의해서 활성화 되기 때문에 몸안의 에너지가 감소한경우 AMP/ATP 비율의 증가에 반응해서 활성화된다. AMPK는 지방산 합성과 콜레스테롤 합성과 같은 대량의 ATP를소비하는 과정을 억제하고, 지방산 산화와 해당과정을 촉진한다.
- [0004] 이처럼 AMPK의 에너지 조절 기작에 의해서 생체내에서 당과 지방의 대사과정에서 AMPK의 작용이 매우 중요하다는 것이 밝혀졌으며, AMPK의 이상은 대사성 질환 뿐아니라 심혈관계 질환, 암 발생과도 깊은 연관성이 있다고 알려져 있다.
- [0005] AMPK의 활성화에 대한 효과는 간, 근육, 지방, 췌장 등이 관여되어 있다. 간에서 AMPK가 활성화가 되면 지방산 과 콜레스테롤의 합성을 억제하고, 지방산의 산화를 촉진한다. 골격근에서 AMPK가 활성화되면 지방산의 산화와 당 흡수를 촉진하며 지방세포에서는 지방분해와 지방생성을 억제한다. 또한 췌장 β세포에서 AMPK의 활성화는 인슐린 분비를 촉진시킨다. 이러한 AMPK의 역할과 관련하여 대사성 질환의 약물 타겟으로 많은 연구가 이루어져 왔다. 이러한 관점에서 볼 때, AMPK는 대사성 질환의 발생에 있어 중추적인 역할을 담당하고 있으며, AMPK의 활성화는 비만, 제2형 당뇨병, 고지혈증 그리고 심혈관계 질환 등과 같은 대사성 질환의 발생을 예방하고, 치료를 하는 데 중요한 역할을 할 수 있다.
- [0006] 이와 같이, AMPK의 활성화는 대사성 질환의 발생을 예방하고, 치료를 하는 데 중요한 역할을 하기 때문에, 대사성 질환의 치료를 위해서 많은 연구가 시행되어 왔다. 특히, 대한민국 등록특허 제10-1062670호에서는 2,5-비스-아릴-3,4-디메틸테트라하이드로퓨란 리그난을 유효성분으로 포함하는 AMPK의 활성화에 의해 매개되는 비만 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 개시하고 있고, 또한, 대한민국 등록특허 제10-1063895호에서는 Pro-Gly을 포함하는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드는 골격근 세포의 AMPK 활성을 에너지 대사를 촉진함으로써 항비만 및 항당뇨 효과를 갖고 있음을 개시하고 있다.
- [0007] 현재 여러가지 물질들이 AMPK를 활성화 시킨다고 알려져 있지만, 대부분이 임상 시험을 거치지 않아 체지방 이화작용 촉진제로 적용하기 어렵다는 문제가 있어왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 이에 본 발명자들은 AMPK 활성화 방법을 연구하였으며, 레세르핀 물질에 의해서 AMPK가 인산화 된다는 사실을 확인하였다. 본 발명은 임상적으로 사용되고 있는 레세르핀 물질의 새로운 용도를 찾아낸 것으로 AMPK 활성화가 필요한 질환을 예방 및 치료하는데 레세르핀이 응용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 따라서, 본 발명의 목적은 레세르핀을 유효성분으로 포함하는 AMP활성화 단백질 인산화효소(AMPK) 활성화용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 레세르핀을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 AMPK의 활성화가 필요한 질 환 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 레세르핀을 세포에 처리하여 AMP 활성화 단백질 키나아제의 활성화 방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 레세르핀을 유효성분으로 포함하는 체지방 이화작용 촉진 용 조성물을 제공한다.
- [0013] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0014] 달리 규정되지 않는 한, 본 발명에 사용된 기술적 및 과학 용어들은 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 이해하는 바와 동일한 의미를 갖고, 다음 문헌에 기재된 바와 부합된다(문헌 : Singleton et al, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, 2nd Ed., J. Wiley & Sons, 1994; and Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, 2001).
- [0015] 본 발명은 하기 화학식1의 레세르핀을 유효성분으로 포함하는 AMP활성화 단백질 인산화효소(AMPK) 활성화용 조성물을 제공한다.
- [0016] [화학식 1]

- [0017]
- [0018] 본 발명의 레세르핀은 인돌알칼로이드의 일종으로 화학식은 C₃₃H₄ON₂O₉이다. 교감신경 억제 및 중추억제작용을 하며, 강압제 혹은 진정제로서 임상에 이용되고 있다.
- [0019] 본 발명에서 AMP 활성화 단백질 키나아제는 AMP-activated protein kinase로도 불리며 약칭은 AMPK이다.
- [0020] 본 발명의 레세르핀은 식물체에서 추출하여 분리한 것이든, 화학적으로 합성한 것이든, 유전공학적으로 합성한 것이든 레세르핀의 수득경로가 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명에서 AMP 활성화 단백질 키나아제의 "활성화"란 생체물질이 그 기능을 쉽게 발휘하도록 하는 것을 의미하며 더욱 바람직하게는 AMPK의 트레오닌 172 부위에 인산화가 되는 것을 의미한다.
- [0022] 본 발명에서 AMP 활성화 단백질 키나아제의 활성화는 레세르핀이 AMPK의 172번째 트레오닌(T172)을 인산화 시키는 것을 특징으로 한다.
- [0023] 본 발명에서 AMPK는 세포에서 고도로 보존된 세린/트레오닌 산화효소의 일종이다. 세포 내 에너지 센서로서 중 요한 역할을 담당하고 있는 AMPK는 α서브 유닛과 조절 작용이 있는 β서브 유닛 및 γ서브 유닛으로 구성된 이

종 삼량체이다. γ서브 유닛에는 ATP가 결합하고 있지만 ATP가 고갈되고 AMP/ATP 비율이 높아지면 γ서브 유닛에 결합되어 있던 ATP가 AMP로 바뀐다. 그 결과로 효소의 입체 구조가 변화하는 알로스테릭 효과에 의해 이 복합체는 2-10배 활성화된다. 거기에 α서브 유닛의 트레오닌 172가 인산화 되면 효소가 더욱 활성화되게 된다 (Stein SC et al., Biochem J. 1;345, 2000).

- [0024] 본 발명의 AMP 활성화 단백질 키나아제의 활성화 방법에서 AMPK를 활성화할 세포는 신경세포주인 PC12세포와 인 간의 신장에서 유래한 HEK293세포 중 하나일 수 있다.
- [0025] 상기 "PC12세포"는 PC12 세포(PC12 cells)은 집쥐(rat)의 부신 수질(adrenal medulla)에 발생한 크롬친화세 포종(pheochromocytoma)에서 유래된 세포주(cell line)이다. 부신 수질에서 카테콜아민 분비기능을 하는 크롬친화세포(chromaffin cells)는 이미 분화되어 분열하지 않으므로, 크롬친화세포를 연구하기 위해 배양 가능한 PC12 세포가 흔히 사용된다. 또한, PC12 세포에 신경성장인자(NGF, nerve growth factor)를 처리하면 신경세포로 최종 분화(terminal differentiation)한다. 이러한 특성으로 인해 PC12 세포는 신경분화 연구의 모델로도 유용하게 사용된다.
- [0026] 상기 "HEK293세포"는 인간 신장에서 유래한 세포로 기르기 용이하며, 형질전환이 쉬워 여러 생물학적 실험에 사용되는 세포주이다.
- [0027] 본 발명은 레세르핀을 유효성분으로 포함하는 체지방 이화작용 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0028] AMPK는 세린/트레오닌 키나아제의 일원으로 하나의 촉매성 α 소단위(catalytic subunit)와 두 개의 조절 소단위(regulatory subunit) β와 γ로 heterotrimeric 복합체를 이루고 있다. α 소단위의 N-말단 부분에는 촉매성 도메인을 포함하고 있으며, 이 도메인에는 upstream 키나아제 에 의한 AMPK의 인산화 및 활성화에 중요한 역할을 하는 트레오닌 잔기 Thr172가 존재한다.
- [0029] AMPK의 활성화는 AMP에 의한 allosteric activation과 upstream 키나아제에 의해 촉매성 소단위에 위치한 트레 오닌 잔기 Thr172의 인산화 과정이 포함된다.
- [0030] 세포 내의 에너지 항상성 유지에 센서 역할을 하는 효소인 AMPK는 대사성 스트레스나 운동에 의해 세포 내의 에너지가 감소하는 경우, 즉 ATP가 고갈되어 AMP/ATP 비율이 증가하는 경우에서 활성화되어 ATP를 소비하는 과정 (예를 들어, 지방산 합성과 콜레스테롤 합성)을 억제하고 ATP를 생산하는 과정(예를 들어, 지방산 산화와 해당 과정)을 촉진한다. 예를 들어, 간에서 AMPK가 인산화되어 AMPK-p 형태로 활성화되면 지방산과 콜레스테롤의 합성을 억제하고 지방산의 산화를 촉진한다. 또 다른 예로, 골격근에서 AMPK가 활성화되면 지방산의 산화와 당 흡수를 촉진하며 지방세포에서는 지방 분해와 지방생성을 억제한다. 이처럼 AMPK의 활성화(AMPK-p)는 체지방 이화작용을 촉진하는 효과를 가지는 것을 특징으로 한다.
- [0031] 본 발명의 레세르핀은 인체 내 체지방의 대사를 촉진시켜 체지방 감소를 돕는 효과가 있다. 더욱 자세하게는 지방산과 콜레스테롤의 합성을 억제하고 지방산의 산화를 도움으로서 체지방 감소 효과를 나타낸다. 본 발명의 조성물은 비만 환자에게 적용될 수 있을 뿐만 아니라 정상인의 비만 예방을 위해 사용될 수 있으며, 국부적으로 체지방을 제거하는데에도 유용하게 쓰일 수 있다. 본 발명의 조성물은 식습관 및 일상 활동 정도를 유지하면서도 상대적으로 지방이 많은 부위의 체지방을 선택적으로 감량할 수 있다.
- [0032] 체지방 이화작용 촉진이 일어나는 부위 또는 체지방 제거 부위로는 허벅지, 엉덩이, 종아리, 등, 턱, 팔, 상복부, 하복부, 가슴 또는 얼굴 등이 될 수 있다.
- [0033] 본 발명은 상기 레세르핀 이외에 이의 유도체, 이의 약학적으로 허용가능한 염을 본 발명의 범위에 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 성분은, 조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 99중량%, 바람직하게는 1 내지 70 중량%로 포함할 수 있으며, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 레세르핀을 함유하는 조성물은, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 약학조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도

제조될 수 있으며 (예: 문헌 [Remington's Pharmaceutical Science, 최신판; Mack Publishing Company, Easton PA), 예를 들면 과립제, 세립제, 산제, 경질캡슐제, 연질캡슐제, 시립제, 유제, 현탁제 또는 액제 등의 경구 투여용 약학 조성물로서 투여해도 되고, 정맥내 투여, 근육내 투여, 또는 피하 투여용 주사제, 점액제, 좌제, 경피흡수제, 경점막 흡수제, 점비제, 점이제, 점안제, 흡입제, 크림제, 연고제, 파프제 등의 비경구 투여용 의약조성물로서 투여하는 것도 가능하다. 분말형태의 약학조성물로서 조제된 제제를 사용시에 용해하여 주사제 또는 점액제로서 사용할 수 있다.

- [0036] 본 발명의 조성물의 제조에는 고체 또는 액체의 제제용 첨가물을 사용할 수 있다. 제제용 첨가물은 유기 또는 무기 중 어느 것이어도 된다. 즉, 경구용 고형제제를 제조하는 경우는, 주약에 부형제, 추가로 필요에 따라 결합제, 붕괴제, 활택제, 착색제 등을 첨가한 후, 통상적인 방법에 의해 정제, 피복정제, 과립제, 산제, 캡슐제 등 형태의 제제를 조제할 수 있다. 사용되는 부형제로서는 예를 들면 유당, 자당, 백당, 포도당, 옥수수 전분(corn starch), 전분, 탈크, 소르비트, 결정 셀룰로오스, 덱스트린, 카올린, 탄산칼슘, 이산화규소 등을 들 수 있다. 결합제로서는 예를 들면 폴리비닐알코올, 폴리비닐에테르, 에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 아라비아고 무, 트래거캔스 (tragacanth), 젤라틴, 셀락 (shellac), 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 구연산칼슘, 덱스트린, 펙틴 (pectin) 등을 들 수 있다. 활택제로서는 예를 들면 스테아린산마그네슘, 탈크, 폴리에틸렌글리콜, 실리카, 경화식물유 등을 들 수 있다. 착색제로서는 통상 의약품에 첨가하는 것이 허가되어 있는 것이라면 선택적으로 사용할 수 있다. 이들의 정제, 과립제에는 당의, 젤라틴코팅, 기타 필요에 따라 적절히 코팅할 수 있다. 또한, 필요에 따라 방부제, 항산화제 등을 첨가할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 조성물의 투여량은 성인 1일당 유효성분인 레세르핀의 투여량은 환자의 연령, 병태, 체중, 증상 등여러 관련 인자에 따라 비추어 결정되는 것이므로, 특정 투여량의 한정보단 상황에 맞추어 투여량을 결정하는 것이 당업자라면 자명할 것이다. 상기 투여는 1일에 1회, 또는 적당한 간격을 두고 하루에 2~3회에 나눠 투여해도 되고, 수일 간격으로 간헐 투여해도 된다.
- [0038] 상기 조성물의 적용대상은 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 가축, 인간 등을 포함한 포유동물일 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 상기 조성물은 지방산과 콜레스테롤의 합성을 억제하고, 지방산의 산화를 촉진하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0040] 따라서 본 발명은 레세르핀을 이용한 AMP 활성화 단백질 키나아제의 활성화 방법을 제공한다. 더욱 상세하게는 레세르핀을 유효성분으로 하는 AMP활성화 단백질 인산화효소(AMPK) 활성화용 조성물을 제공한다. 본 발명은 임 상적으로 사용되고 있는 레세르핀 물질의 새로운 용도를 찾아낸 것으로 AMPK 활성화가 필요한 질환을 예방 및 치료하는데 쉽게 적용될 수 있어 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 기존에 알려진 AMPK 활성화 인자 LKB, CaMKKβ 또는 TAK1에 의해 AMPK의 172번째 트레오닌이 인산화되면 활성화되는 것을 나타내는 모식도이다.

도 2는 레세르핀에 의해서 AMPK가 활성화 되는 것을 확인한 전기영동 사진이다.

도 3은 레세르핀에 의해서 활성화된 AMPK를 p-AMPK/AMPK로 수치화하여 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0042] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0043] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] <실험 방법>

[0045] 시료 및 세포 준비

[0046] HEK293 세포는 10 % 소 태아 혈청(Gibco, USA)이 포함 된 DMEM 배지 (Welgene, 한국)에서 배양 되었다. 그리고 GFP-LC3 플라스미드는 T.Yoshimori에게 얻었다. 실험에 쓰인 레세르핀은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입하였다. HEK293 세포를 각 웰당 100,000세포가 주입되도록 24웰 플레이트에 분주하고, 레세르핀을 각각 0, 1, 2.5, 5, 10, 20 μM 처리하였다.

[0047] 웨스턴 블롯

[0048] 단백질 면역 블롯 분석을 위해, 전체 세포 용해물의 폴리펩타이드를 SDS-PAGE로 분리하고, 니트로셀룰로오스 멤 브레인 필터로 옮겼다. AMPK 및 p-AMPK 단백질은 강화된 화학발광(ECL) 시스템을 통해 1:2000 또는 1:5000로 희 석된 일차항체로 검출하였다. 이미지는 Chemidoc-410 이미징 시스템(UVP, Upland, CA) 및 LAS4000 시스템(GE Healthcare, Uppsala, 스웨덴)을 사용하여 획득 하였다. AMPK, p-AMPK 항체는 Cell Signaling(Beverly, MA)에서 구매하였다.

[0049] <실험 결과>

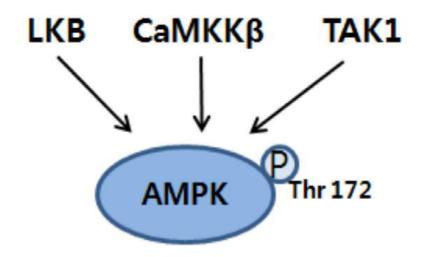
[0050] 도 2와 같이 HEK293세포에 레세르핀을 처리하고 24시간 동안 배양하였고, 세포를 수확하여 단백직을 추출하였다. 그리고 웨스턴 블롯 방법을 통해서 AMPK와 인산화된 p-AMPK (트레오닌 172)의 양을 확인하였다. 연구 결과, 레세르핀의 농도에 따라서 p-AMPK가 증가함을 확인하였다. AMPK의 트레오닌 172의 인산화 정도는 AMPK의 활성화 정도를 반영한다고 알려져 있다. 도3은 도2의 전기영동 사진을 p-AMPK/AMPK로 수치화하여 나타낸 그래프인데 레세르핀의 농도가 증가함에 따라 p-AMPK가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구결과를 통해서 레세르핀은 AMPK를 확성화 시킬 수 있는 물질임을 알 수 있다.

산업상 이용가능성

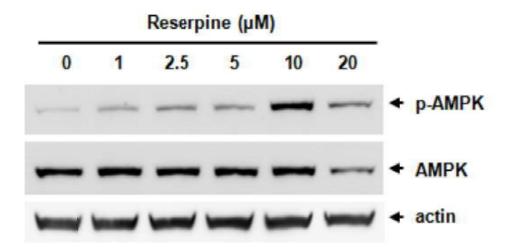
[0051] 본 발명은 임상적으로 사용되고 있는 레세르핀 물질의 새로운 용도를 찾아낸 것으로 AMPK 활성화가 필요한 질환을 예방 및 치료하는데 쉽게 적용될 수 있어 효과적이다.

도면

도면1



도면2



도면3

