



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0139025
(43) 공개일자 2013년12월20일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 31/7042</i> (2006.01) <i>A61K 31/708</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/37</i> (2006.01) <i>A61P 25/16</i> (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2012-0062693</p> <p>(22) 출원일자 2012년06월12일
 심사청구일자 2012년06월12일</p> | <p>(71) 출원인
 연세대학교 원주산학협력단
 강원도 원주시 흥업면 연세대길 1</p> <p>(72) 발명자
 박준수
 강원도 원주시 흥업면 연세대학교원주캠퍼스 생명
 과학기술학부 미래관 417호
 류현욱
 대구광역시 수성구 수성3가 삼성맨션 316호
 오원근
 광주광역시 북구 두암2동 현대아파트 101-109</p> <p>(74) 대리인
 특허법인충현</p> |
|---|--|

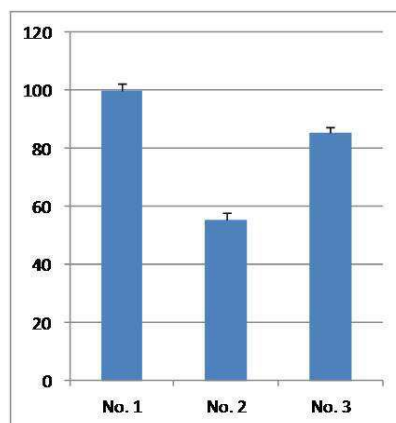
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 왕머루에서 추출한 아무렌신 G를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 예방 및 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 왕머루에서 추출한 아무렌신 G(amurensin G) 또는 그 약학적 허용염을 포함하는 로테논에 의한 신경 세포 사멸 억제용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 왕머루에서 추출한 아무렌신 G를 포함하는 약학적 조성물은 신경 세포 내에서 자식작용을 촉진하여 로테논에 의해서 발생하는 신경 세포의 사멸을 억제할 수 있어 퇴행성 신경 질환의 하나인 파킨슨병을 유효하게 치료 또는 예방할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 유효성분인 아무렌신 G는 천연물인 왕머루에서 추출된 물질이어서 인체에 적용시 부작용의 우려가 없다는 장점이 있다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012-0002036
부처명	교육과학기술부
연구사업명	일반연구자지원(기본연구)
연구과제명	신규유전자 DRAM2의 자식작용 및 암세포 사멸 관련한기전
기 여 율	1/2
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.11 ~ 2012.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	1120280
부처명	보건복지부
연구사업명	암정복추진연구개발
연구과제명	암세포에서 ITM2A단백질의 기능
기 여 율	1/2
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

왕머루에서 추출한 아무렌신 G(amurensin G) 또는 그 약학적 허용염을 포함하는 로테논에 의한 신경 세포 사멸 억제용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 신경 세포 내에서 자식 작용을 촉진하여 로테논에 의해서 발생하는 신경 세포 사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 로테논에 의한 신경 세포 사멸 억제용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 약학적 허용염은 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 황산, 질산, 인산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 포름산, 아세트산, 트리플루오로 아세트산, 프로피온산, 옥살산, 말론산, 숙신산, 푸마르산, 말레산, 젓산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 에탄설폰산, 아스파르트산 및 글루탐산으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 로테논에 의한 신경 세포 사멸 억제용 약학적 조성물.

청구항 4

약학적 수용 가능한 담체 또는 희석제와 함께 활성 성분으로서 왕머루에서 추출한 아무렌신 G(amurensin G) 또는 그 약학적 허용염을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

왕머루에서 추출한 아무렌신 G(amurensin G)을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 건강식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 파킨슨병 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 왕머루에서 추출한 아무렌신 G를 유효성분으로 포함하여 신경세포 내에서 자식작용을 촉진하고, 이에 의해서 로테논에 의한 신경 세포 사멸을 억제할 수 있어 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 파킨슨병(Parkinson's disease)은 전 세계에서 2번째로 흔한 신경 퇴행성 질환으로 55세 이상의 인구의 약 1%에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[A. J. Lees et al, The Lancet (2009) 373:2055-2066]. 파킨슨병은 선조체-흑질(substantia nigra pars compacta)에 위치한 도파민신경계의 50-70%의 손실과 선조체(striatum)의 도파민 감소, 세포질 내에 alpha-synuclein과 유비퀴틴으로 구성된 루이체(Lewy body)의 형성에 의해서 발병된다고 알려져 있다[M. G. Spillantini et al, Nature (1997) 388:839-840]. 파킨슨병의 동물 혹은 세포 모델은 로테논(rotenone)이라는 미토콘드리아 복합체 1번의 저해제를 이용하며, 신경세포주(PC12, SH-SY5Y)에 처리시 신경세포의 사멸이 일어나며, 이를 파킨슨병의 모델로 사용하고 있다[T. Pan et al, Neuroscience (2009) 164:541-551].

[0003] 일차적인 증상으로 느린 움직임, 정지시 떨림, 자세의 불안정, 근육경직이 특징적으로 나타나고, 병의 진행에 따라 우울증, 불면증, 치매 등의 2차적 증상이 동반된다 [1] de Lau et al., Lancet Neurol. 2006, 5, 525-535; 2) Chaudhuri et al., Lancet Neurol. 2009, 8, 464-474; 3) Fahn, In Handbook Exp. Pharmacol, 1989, 8, Calne, D.B., (Ed.) pp. 386-409]. 현재 매해 50,000명 이상이 새롭게 파킨슨병 진단을 받고 있으나, 그 동안의 많은 연구에도 불구하고 병인의 기전에 대한 명확한 원인을 규명하지 못하였다[Arevalo et al., Mov. Disord. 1997, 12, 277-284].

- [0004] 종래 파킨슨병 치료용 조성물의 경우, 그 부작용이 가장 커다란 문제가 되고 있으며, 특히 생약제의 경우 다른 약물에 비하여 부작용이 크게 적은 특징으로 보여주고는 있으나 경우에 따라서는 또 다른 부작용이 우려되고, 치료효과도 아직까지는 충분하지 않아서 효과적인 임상적 효능의 증진이 필요한 실정이므로 이에 관한 개선이 절실히 요구되고 있다.
- [0005] 자식작용(autophagy)은 단백질 분해 및 재생 과정으로써 세포 내 문제가 있는 세포 소기관이 있거나 세포 내에 에너지가 충분하지 않을 때, 세포 소기관을 이중막으로 둘러싸아서 분해 후 제거하는 과정으로서[윤정호 외, Mol Biol Rep (2012) 39:1087-1093], 최근 연구에 따르면 자식작용을 촉진하는 rapamycin 등이 로테논에 의한 신경세포 사멸을 억제할 수 있음을 확인하였으며, 이러한 자식작용을 촉진하게 되면 파킨슨병을 치료 혹은 예방할 수 있음이 여러 논문에서 발표되고 있다[T. Pan et al, Neuroscience (2009) 164:541-551, N. Xiong et al, Neuroscience (2011) 199:292-302]
- [0006] 아무렌신(amurensin) G는 왕머루에서 추출한 물질로서 종래에 다음과 같은 생물학적 기능이 있다는 것이 알려져 있다. 먼저, Amurensin G는 SIRT1의 저해제로써 MDR1의 발현을 억제하여 항암제인 doxorubicin에 대한 반응성을 향상시키는 것으로 알려져 있다[오원근 외, Mol. Pharm. (2010) 78(5):855-864]. 또한, 왕머루(Vitis amurensis)에서 amurensin G를 포함한 추출물이 amyloid beta에 의한 신경독성으로부터 세포를 보호한다고 알려져 있다[정하연 외, Arch. Pharm. Res. (2010) 33(10):1655-64] 또한, Amurensin G는 TRAIL에 저항성을 가지는 백혈병 세포를 TRAIL에 의한 세포 사멸에 반응하게 하는 것으로 알려져 있다[김학봉 외, Biochem. Pharmacol. (2012) in press].
- [0007] 다만, 왕머루에서 추출한 amurensin G를 파킨슨병 치료 물질로 활용한 보고는 전혀 없었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 이에 따라, 본 발명자들은 종래 파킨슨병 치료 조성물이 갖고 있는 부작용에 대한 우려가 없는 식물 소재 추출물에 대한 연구를 수행하였으며, 특히 왕머루에서 추출한 amurensin G가 자식작용을 촉진하여 로테논에 의한 신경세포 사멸을 억제시킬 수 있음을 발견하여 파킨슨병의 치료물질이 될 수 있음을 확인하였다.
- [0009] 따라서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 왕머루에서 추출한 amurensin G를 유효성분으로 포함하여 로테논에 의한 신경세포 사멸을 억제할 수 있고, 이에 따라 신경 퇴행성 질환인 파킨슨병을 예방 및 치료할 수 있는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 왕머루에서 추출한 amurensin G를 유효성분으로 포함하는 건강 기능 식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [0012] 왕머루에서 추출한 아무렌신 G(amurensin G) 또는 그 약학적 허용염을 포함하는 로테논에 의한 신경 세포 사멸 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0013] 상기 약학적 조성물에 포함된 아무렌신 G는 신경 세포 내에서 자식 작용을 촉진하여 로테논에 의해서 발생하는 신경 세포 사멸을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 약학적 허용염은 염산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 황산, 질산, 인산, 메탄설폰산, 벤젠설폰산, 포름산, 아세트산, 트리플루오로 아세트산, 프로피온산, 옥살산, 말론산, 숙신산, 푸마르산, 말레산, 젖산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 에탄설폰산, 아스파르트산 및 글루탐산으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,
- [0016] 약학적 수용 가능한 담체 또는 희석제와 함께 활성 성분으로서 왕머루에서 추출한 아무렌신 G(amurensin G) 또는 그 약학적 허용염을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여,

- [0018] 왕머루에서 추출한 아무렌신 G(amurensin G)을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 건강식품을 제공한다.
- [0019] 상기 '치료'라 함은 발병 증상을 보이는 객체에 사용될 때 질병의 진행을 중단 또는 지연시키는 것을 의미한다.
- [0020] 상기 '약학적 조성물'은 본 발명에 따른 왕머루에서 추출한 아무렌신 G 화합물과 함께 필요에 따라 약학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0021] 상기 '담체(carrier)'라 함은 세포 또는 조직 내로 본 발명에 따른 왕머루에서 추출한 아무렌신 G 화합물의 부가를 용이하게 하는 물질을 의미한다.
- [0022] 상기 '희석제(diluent)'라 함은 본 발명에 따른 왕머루에서 추출한 아무렌신 G 화합물의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 본 발명에 따른 아무렌신 G 화합물을 용해시키는 물에서 희석되는 물질로 정의된다.
- [0023] 상기 '약학적 허용'이라 함은 본 발명에 따른 아무렌신 G 화합물의 생물학적 활성과 물성을 손상시키지 않는 성질을 의미한다.
- [0024] 기타 본 명세서에서 사용된 용어와 약어들은 달리 정의되지 않는 한 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에게 통상적으로 이해되는 의미로서 해석될 수 있다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명에 따른 왕머루에서 추출한 아무렌신 G를 포함하는 약학적 조성물은 신경 세포 내에서 자식작용을 촉진하여 로테논에 의해서 발생하는 신경 세포의 사멸을 억제할 수 있어 퇴행성 신경 질환의 하나인 파킨슨병을 유효하게 치료 또는 예방할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 유효성분인 아무렌신 G는 천연물인 왕머루에서 추출된 물질이어서 인체에 적용시 부작용의 우려가 없다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0026] 도 1은 GFP-LC3의 세포내 형태로서 자식작용 유도를 확인한 형광 현미경 이미지이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 GFP-LC3 세포주에 amurensin G를 20 μ M로 24 시간 처리시 세포질에 autophagosome이 형성됨을 확인한 이미지이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 amurensin G를 다양한 농도로 처리하여 자식작용의 마커인 LC3-II 단백질과 p62 단백질을 관찰한 이미지이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 amurensin G가 로테논에 의해서 일어나는 세포 사멸에 저항성을 가짐을 확인한 실험 결과 그래프이다.
- 도 5는 왕머루 건조 줄기로부터 Amurensin G를 추출 분리하는 과정을 개략적으로 나타낸 흐름도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [0028] 본 발명은 왕머루에서 추출한 아무렌신 G(amurensin G) 또는 그 약학적 허용염을 포함하는 로테논에 의한 신경 세포 사멸 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0029] 상기 아무렌신 G(amurensin G)는 포도나무속(Vitis genus) 식물인 왕머루(Vitis amurensis)의 뿌리 또는 줄기의 추출물에 포함된 화합물로서, 종래에 SIRT1의 저해제로써 MDR1의 발현을 억제하여 항암제인 doxorubicin에 대한 반응성을 향상시키는 것으로 알려져 있으며, 또한, amyloid beta에 의한 신경독성으로부터 세포를 보호한다고 알려져 있다. 또한, TRAIL에 저항성을 가지는 백혈병 세포를 TRAIL에 의한 세포 사멸에 반응하게 하는 것으로 알려져 있다.
- [0030] 본 발명은 이하의 실시예에서 보다 상세히 기술하는 바와 같이, 왕머루에서 추출한 아무렌신 G(amurensin G)의 새로운 용도를 목적으로 하는 것으로서, 구체적으로 아무렌신 G를 신경세포에 처리할 경우 신경 세포 내에서 자식 작용을 촉진함을 확인하였고, 이에 의해서 파킨슨 병의 모델인 로테논에 의해서 발생하는 신경 세포 사멸을 억제함을 실험으로 확인하여 파킨슨병의 유효한 예방 및 치료제가 될 수 있음을 확인하였다.

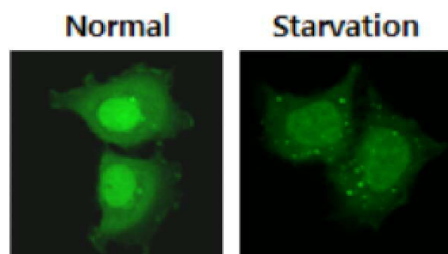
- [0031] 본 발명에 따른 왕머루에서 추출한 아무렌신 G를 유효성분으로 포함하는 조성물은 통상적인 방법에 의해 그의 염으로 전환될 수 있으며, 염의 제조는 별도의 설명이 없이도 당업자에 의해 용이하게 수행될 수 있을 것이다.
- [0032] 상기 약학적 허용염은 약학적으로 허용되는 음이온을 함유하는 무독성 산부가염을 형성하는 산, 예를 들어, 황산, 염산, 질산, 인산, 브롬화수소산, 요오드화수소산 등과 같은 무기산과, 타르타르산, 포름산, 시트르산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 글루콘산, 벤조산, 락트산, 푸마르산, 젖산, 말론산, 말산, 살리실산, 숙신산, 옥살산, 프로피온산, 아스파르탄산, 글루탐산, 구연산 등과 같은 유기산과, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산, 나프탈렌설폰산 등과 같은 설폰산 등에 의해 형성된 산 부가염일 수 있고, 약학적으로 수용 가능한 염기 부가염, 예를 들어, 리튬, 나트륨, 칼륨, 칼슘, 마그네슘 등에 의해 형성된 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염과, 라이신, 아르기닌, 구아니딘 등의 아미노산 염과, 디사이클로헥실아민, N-메틸-D-글루카민, 트리스(하이드록시메틸) 메틸아민, 디에탄올아민, 콜린, 트리에틸 아민 등과 같은 유기염일 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명에 따라 왕머루에서 추출한 아무렌신 G를 유효성분으로 포함하고, 파킨슨병은 치료하고 예방하기 위한 약학적 조성물은 약학적 수용 가능한 담체 또는 희석제를 함께 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면, 버퍼 용액에 용해되어 있는 염을 희석제로 사용하고, 통상 사용되는 버퍼 용액은 인간 용액의 염 형태를 모방하고 있는 포스페이트 버퍼 식염수일 수 있다. 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 본 발명에 따른 조성물의 생물학적 활성을 변형시키지 않는다.
- [0035] 그리고, 약학적으로 수용 가능한 담체 또는 희석제를 함유하는 약학적 조성물로 사용하기 위해 제형화할 수 있다. 통상적인 방법에 따라 일반적으로 제조하여, 약학적으로 적절한 형태로 투여할 수 있다.
- [0036] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 정제, 캡슐, 당-코팅, 필름-코팅 정제, 액체 용액 또는 현탁액의 형태와 같은 경구적으로 투여할 수 있고, 또는 피하나 근육내로 또는 정맥내로 주사 또는 주입의 방법을 통하여 비경구적으로 투여할 수도 있다.
- [0037] 환자의 연령, 체중 및 상태와 투여 경로를 비롯한 각종 요인에 따라 투여량은 결정될 수 있다. 1 일 투여용량은 광범위한 한도치 내에서 변할 수 있으며, 각각의 개별 경우에서 개인적 요인에 맞게 조정될 수 있다. 그러나 일반적으로, 성인에게 단독 투여하는 경우, 투여 경로별로 채택된 투여용량은 0.0001 내지 50 mg/kg 체중이며, 0.001 내지 10 mg/kg 체중의 범위에서 예를 들면 0.01 내지 1 mg/kg 체중으로 할 수 있다.
- [0038] 이러한 투여용량은 예를 들면 1일 1 내지 5 회 제공할 수 있다. 정맥내 주사의 경우, 적절한 1일 용량은 0.0001 내지 1 mg/kg 체중, 바람직하게는 0.0001 내지 0.1 mg/kg 체중이다. 1일 투여용량은 단일 투여분으로서 또는 분할 용량 스케줄에 따라 투여할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명은 왕머루에서 추출한 아무렌신 G를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 건강식품을 제공한다.
- [0040] 본 발명에 따른 건강식품, 특히 음료인 경우 왕머루에서 추출한 아무렌신 G를 유효성분으로 함유하는 것 외에 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료로서 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 그리고, 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명에 따른 건강식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 그밖에 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

- [0042] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않고, 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.
- [0043] <실시예>
- [0044] 실시예 1. Amurensin G 추출 분리
- [0045] 하기 도 5는 왕머루 건조 줄기로부터 Amurensin G를 추출 분리하는 과정을 개략적으로 나타낸 흐름도이다. 하기 도 5에 나타나 있는 바와 같이, 먼저, 왕머루 건조 줄기(2 kg)에 메탄올 10 L를 상온에서 72 시간 동안 2회 가하여 추출하고, 농축하여 왕머루 줄기 조추출물 250 g을 얻었다.
- [0046] 상기 조추출물을 증류수에 현탁시키고, 순차적으로 n-헥산 1.5 L, 에틸 아세테이트 1.5 L, 부탄올 1.5 L로 3회 추출하여 N-헥산, 에틸 아세테이트, 부탄올 분획물을 각각 얻었다.
- [0047] 이후, 에틸 아세테이트 분획물 87 g에 대해서 전개 용매로 n-헥산/아세톤(5:1-0:1)을 사용하고, 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피(10×35 cm, 63-200 μ m 입자 크기)를 이용하여 7 개의 제1 분획 추출물(F1-F7)을 얻었다.
- [0048] 이후, 상기 제1 분획 추출물 중 여섯 번째 분획 추출물(F6)에 대해서 다시 이동상으로 메탄올을 사용하고, Sephadex LH-20 컬럼을 이용하여 3 개의 제2 분획추출물(F6.1-F6.3)을 얻었다.
- [0049] 이후, 상기 제2 분획 추출물 중 두 번째 분획 추출물(F6.2)에 대해서 다시 C-18 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피를 이용하고, 전개용매 메탄올/물(1:1-10:1)에 녹여 분리하여 6 개의 제3 분획추출물(F6.2.1-F6.2.6)을 얻었다.
- [0050] 이후, 상기 제3 분획추출물 중 세 번째 분획추출물(F6.2.3) 300 mg에 대해서 고성능 액체 크로마토그래피[ODS-H80 컬럼(20×150 mm, 4 μ m 입자 크기), 메탄올/0.1% 포름산을 포함한 물(0-25 min, 35% MeOH; 35 min, 100% MeOH); flow rate, 3 mL/min; UV detection 280-320 nm]를 수행하여 갈색의 무정형 아무렌신 G 파우더 28 mg을 얻었다.
- [0051] m.p. 263-264 ; $[\alpha]_D^{25} +28^\circ$ (c 0.1, MeOH); UV (MeOH) max ($\log \epsilon$) 213 (3.80), 217 (3.95), 224 (4.00), 282 (4.32) nm; IR (film) V_{max} 3320, 1610, 1510, 1180, 1040, 840 cm^{-1} ; MS, m/z 681 $[M+H]^+$ (Calc. for $C_{42}H_{32}O_9$).
- [0052] 실험예 1. amurensin G에 의한 자식 작용 활성화 효과
- [0053] (1) GFP-LC3 세포주의 제작
- [0054] GFP-LC3 HEK293을 발현하는 세포주는 GFP-LC3 인코딩 플라스미드를 트랜스펙션시켜서 제조하였으며, 트랜스펙션된 세포를 G418(1 mg/mL)을 함유한 배지에서 5일 동안 배양하였다. 이후 96-well plate에 각각 한 개씩의 세포를 reseeding하였으며, GFP-LC3의 발현은 형광 현미경과 Western blot analysis로 확인하였다.
- [0055] (2) 세포주에서 amurensin G를 처리하여 현미경으로 GFP-LC3 관찰
- [0056] 자식 작용이 일어나면 GFP-LC3라고 하는 자식 작용의 마커가 세포질에서 자가포식소체(autophagosome)를 형성함을 형광 현미경으로 확인할 수 있다. 하기 도 1은 GFP-LC3의 세포내 형태로 자식작용 유도를 확인한 형광 현미경 이미지이다. 따라서, GFP-LC3를 발현하는 세포에 amurensin G를 처리시 세포질에 자가포식소체(autophagosome) 형성을 확인함으로써, amurensin G에 의한 자식작용이 활성화됨을 확인할 수 있다.
- [0057] 구체적으로, GFP-LC3 세포주를 6 well plate에 멸균한 커버슬립에 씨딩한 후에, 24 시간을 배양하였다. 세포가 커버슬립에 완전히 정착하면, 정해진 농도의 amurensin G로 24 시간 동안 처리한 후, 4% paraformaldehyde로 세포를 30분 동안 고정한 후에, PBS(phosphate-buffered Saline) 용액으로 3번 세척하였다. 세포가 붙어있는 커버슬립은 mounting medium을 이용하여 슬라이드 글라스에 올린 후, 형광현미경으로 관찰하였다.
- [0058] 하기 도 2와 같이, GFP-LC3 세포주에 amurensin G를 20 μ M로 24 시간 처리시 세포질에 autophagosome이 형성됨을 확인할 수 있다.

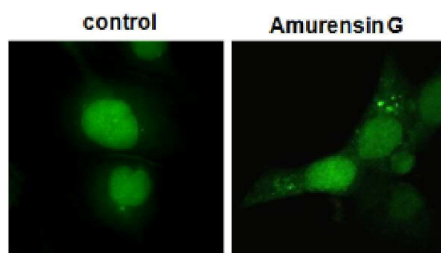
- [0059] (3) GFP-LC3세포주에서 autophagy marker 단백질의 검출
- [0060] 세포주에서 amurensin G를 처리하여 Western blot으로 GFP-LC3 및 p62 단백질의 발현을 관찰하였다.
- [0061] 구체적으로, GFP-LC3 세포주를 6 well plate에 분주한 후에, 하기 도 3에서 나오는 농도가 되도록 amurensin G를 세포배양액에 첨가하였다. 24 시간 후에 세포에 cell lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Hepes (pH 7.5), 1% NP40)를 처리하여 단백질을 추출하였다. 이렇게 추출된 단백질 중, 원심분리를 통해서 녹지 않은 부분을 제거한 후, 상층액 중에서 20 μ g의 단백질을 SDS-PAGE를 통해서 분리하고, nitrocellulose membrane으로 blotting하였다. 그리고 anti-LC3 항체와 anti-p62 항체를 통해서 autophagy marker 단백질인, GFP-LC3-II와 p62의 발현양을 확인하였다.
- [0062] 본 발명의 실험예에서는 상기와 같이, amurensin G가 자식작용을 유도함을 확인하기 위해서 MCF-7세포에 amurensin G를 다양한 농도로 처리하여 자식작용의 마커인 LC3-II 단백질과 p62 단백질을 관찰하였고, 자식작용이 일어나면 LC3-II 단백질이 증가하고 p62 단백질이 감소하게 되는데, 하기 도 3에 나타나 있는 바와 같이, amurensin G에 의해서 자식작용의 마커인 LC3-II가 증가하고, 또 다른 마커인 p62가 감소함을 확인하였다.
- [0063] (4) 신경세포에 로테논 처리를 통한 세포 사멸 유도
- [0064] amurensin G가 로테논에 의해서 일어나는 세포 사멸에 저항성을 가짐을 확인하기 위해서 SH-SY5Y 세포에 2.5 μ M의 로테논을 처리하여 활성을 확인하였다.
- [0065] 구체적으로, 신경세포주인 SH-SY5Y세포를 12 well plate에 분주하였다. amurensin G 처리군은 로테논을 처리하기 12 시간 전에 5 μ M의 amurensin G를 처리하였다. 로테논에 의한 세포사멸을 유도하기 위해서 2.5 μ M의 로테논을 24 시간 처리한 후, MTT assay를 통해서 세포사멸을 확인하였다.
- [0066] 하기 도 4에 그 결과를 나타내었으며, 하기 도 4에서 비교예 1(No. 1)은 아무런 처리가 되어 있지 않은 세포들이고, 비교예 2(No. 2)는 2.5 μ M의 로테논을 처리하여 세포 사멸을 유도한 세포들이며, 실험예 1(No. 3)은 2.5 μ M의 로테논과 5 μ M의 amurensin G를 같이 처리한 것으로서, amurensin G가 로테논에 의한 세포사멸 억제 효과를 보임을 알 수 있다.
- [0067] 상기와 같이, 본 발명자들은 왕머루에서 추출한 amurensin G가 세포내에서 자식 작용을 촉진함을 발견하였으며, 이에 따라 파킨슨병의 모델인 로테논에 의한 신경세포 사멸이 감소시킬 수 있어 파킨슨병의 예방 및 치료 물질로 사용할 수 있다.

도면

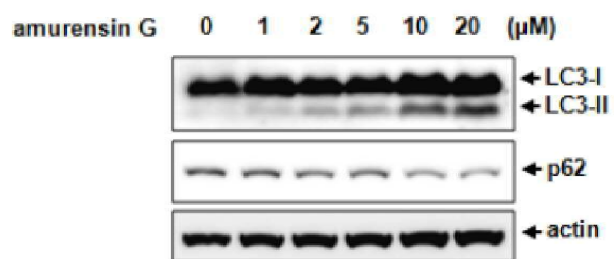
도면1



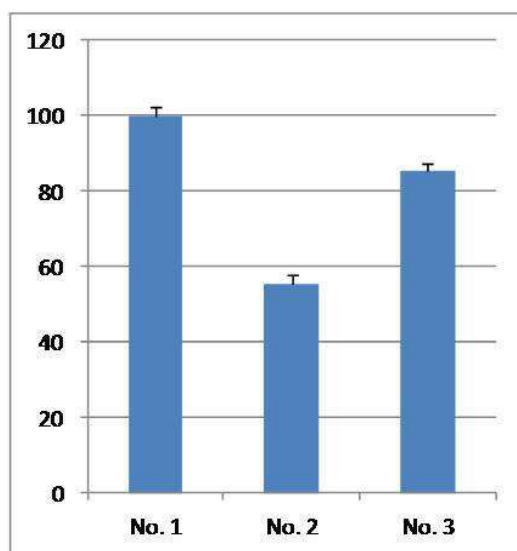
도면2



도면3



도면4



도면5

