

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0116467 (43) 공개일자 2016년10월10일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A61K 36/708</i> (2006.01) <i>A61K 36/286</i> (2006.01) <i>A61K 36/481</i> (2006.01) <i>A61K 36/537</i> (2006.01) (52) CPC특허분류 <i>A61K 36/708</i> (2013.01) <i>A61K 36/286</i> (2013.01)		(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(21) 출원번호 10-2015-0044214 (22) 출원일자 2015년03월30일 심사청구일자 2015년03월30일 기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도	(72) 발명자 박종선 대전광역시 서구 둔산로 201, 204동 301호 (둔산동, 국화아파트) 박지수 대전시 서구 둔산로 201, 204동 301호 (둔산동, 국화아파트) 김선환 대전광역시 서구 둔산남로 127, 105동 1306호 (둔산동, 목련아파트)	
	(74) 대리인 특허법인충정	

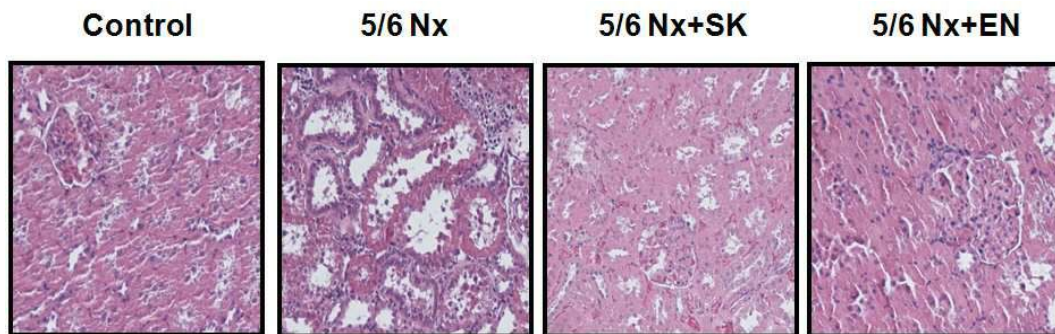
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **센강을 함유하는 신장질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 중국전통 생약으로 알려져 있는 센강(Shen-Kang)을 유효성분으로 함유하는 신장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 센강은 사구체 병변의 진행을 감소시키고, 혈액 내 SCr 및 BUN 농도를 감소시켜 신장 기능을 개선시키며, 산화 스트레스에 의한 세포사멸에 대한 보호 효과를 나타내고, 세포내 산화 스트레스를 감소시키며, 특히 ERK 및 p38 MAPK 시그널링 경로를 저해함으로써 산화 스트레스에 의해 유도되는 세포사멸에 대한 보호 효과를 나타낼 수 있다. 따라서 신장질환을 예방 또는 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/481 (2013.01)

A61K 36/537 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9B6055302

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업

연구과제명 폐암에서 멀티모달 오믹스 기법을 이용한 미토콘드리아 혹은 골지체 특이적 자가포식에 대한 핵심단백질 발굴 및 기반 연구

기여율 1/2

주관기관 충남대학교

연구기간 2012.12.01 ~ 2015.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2007-0054932

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터지원사업

연구과제명 감염-염증에 의한 만성질환발생 기전 규명 및 그 극복 기술개발

기여율 1/2

주관기관 충남대학교

연구기간 2012.03.01 ~ 2016.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

중국전통 생약인 센강(Shen-Kang)을 유효성분으로 함유하는 신장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 센강은 대황(rhubarb), 쉐비어(salvia), 홍화(safflower) 및 황기(astragalus)를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 센강은 혈청 크레아티닌(Scr) 및 혈중 요소질소(BUN) 감소 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 센강은 ERK(extracellular-signal-regulated kinases), 및 p38 MAPK(mitogen-activated protein kinases) 시그널링 경로를 저해함으로써 산화 스트레스에 의해 유도되는 세포사멸에 대한 보호 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 센강을 함유하는 신장질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 중국전통 생약으로 알려져 있는 센강(Shen-Kang)을 유효성분으로 함유하는 신장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 만성 신장질환(chronic kidney disease, CKD)은 전세계의 공중 보건에 큰 영향을 미치고 사망과 심혈관질환에 대한 중요한 위험 요소이다 (Canaud G, et al. *Nature medicine*. 2013;19:1288-96). CKD는 신장 기능의 점진적 상실, 만성 염증, 산화 스트레스, 혈관 리모델링, 및 사구체와 세뇨관 간질성 반흔(glomerular and tubule interstitial scarring)으로 특징된다 (Impellizzeri D, et al. *Pharmacological research*. 2014;81:91-102). CKD 진행이 스트레스를 극복하는 잔여 네프론(residual nephrons)의 용량에 따라 달라질 수 있으나, CKD 진행을 설명하는 메커니즘은 아직 완전하게 밝혀지지 않았다.

[0003] 다양한 동물 CKD 모델이 보고되고 있기는 하지만, 설치류 모델이 실험적인 CKD 연구에 적용되는 경향이 있다. 부분적으로 신장절제된(nephrectomize, Nx) 래트 모델은 CKD의 전형적인 병리학적 변화들을 조사하기 위해 광범위하게 이용되어 왔다. 인간 질병 과정과 유사하게, 남은 Nx 래트 신장은 손상 후 수일 내에 적응성(adaptive), 보상 성장(compensatory growth)을 나타낸다 (Suzuki Y, et al. *Experimental and toxicologic pathology* : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie. 2013;65:667-76).

[0004] 중국 전통 약제로 알려져 있는 Shen-Kang (이하, 'SK' 라고도 함)은 4가지 타입의 약제: 대황(rhubarb), 쉐비어(salvia), 홍화(safflower) 및 황기(astragalus)를 포함한다.

[0005] 산화와 항산화 시스템 사이의 불균형으로 인한 활성산소종(ROS)의 과도한 수준에 의해 특징되는 산화 스트레스

는 CKD 시 관찰되는 다양한 병리학적 시스템과 관련되어 있다 (Miyamoto Y, et al. *Biochemical pharmacology*. 2012;84:1207-14). 근위세뇨관 상피세포(proximal tubular epithelial cells, HK-2)는 CKD에서 가장 빈번하게 위축성(atrophic)이다 (David MS, et al. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants: INTECH*; 2013. 233-64).

[0006] 본 발명자들은 5/6 Nx 래트 모델의 신장 세뇨관 상피세포에서 SK의 보호 특성을 분석하였다. SK의 유익한 효과에 대한 초기 평가는 in vivo CKD 모델(5/6 Nx Rats)을 이용하여 수행하였다. 이 결과를 ROS 생산, 세포자살 및 세포생존능을 관찰할 수 있는 인간 신장 근위세뇨관 상피세포(HK-2 cells)의 in vitro 모델을 이용하여 좀 더 평가하였다. 나아가 SK의 잠재적인 보호 효과를 설명하는 분자적 메커니즘도 조사하였다.

[0007] 이에 본 발명자들은 SK의 의약적 용도로서 신장질환의 치료에 적용할 수 있을 것으로 예상하고, 이러한 신장질환의 치료에 있어 분자적 메커니즘을 밝혀냄으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서 본 발명의 목적은, 손상된 신장 기능의 개선과 함께 ERK 및 p38 MAPK 시그널링 경로를 저해함으로써 산화 스트레스에 의해 유도되는 세포사멸에 대한 보호 효과를 나타내는 쎌강을 유효성분으로 함유하는 신장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 중국전통 생약인 쎌강(Shen-Kang, SK)을 유효성분으로 함유하는 신장질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명에서, 상기 쎌강(SK)은 중국 전통 생약으로서, 4가지 타입의 약제: 대황(rhubarb), 쎌비어(salvia), 홍화(safflower) 및 황기(astragalus)를 포함하는 것으로 알려져 있다. 상기 쎌강은 Xi' an Shi Ji Sheng Kang pharmaceutical industry (Xi' an, Shaanxi, China)로부터 구입할 수 있으며, 정제(tablet), 주사제(injection) 등의 제형으로 판매되고 있다.

[0011] 본 발명에서, 상기 “신장질환”이란, 신장이 배설, 조절, 대사 및 내분비적 기능을 정상적으로 수행하지 못하고 전체적으로 기능이 저하되거나 이상이 초래된 상태를 모두 일컫는다. 넓은 의미의 신장질환은 만성적인 모든 신장병이 포함되고, 좁은 의미로는 원인이 뚜렷하지 않고 기질적 변화와 사구체 여과 기능이 저하되어 가는 질환들을 모두 포함한다. 신장의 손상으로 인한 기능의 저하는 신장 및 관련 구조의 증대, 신장의 위축, 체액량의 변화, 전해질 불균형, 대사성 산증, 가스교환장애, 항감염 기능 손상, 요독성 독소의 축적 등을 초래한다.

[0012] 본 발명에서 상기 신장질환의 종류로는 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어 사구체신염, 당뇨병성 신증(Diabetic nephropathy), 만성 신부전증(Chronic Renal Failure), 급성 신부전증(Acute Renal Failure), 아급성 신부전증(Subacute Renal Failure), 악성신경화증, 혈관성 미세혈관병증, 이식 거부, 사구체병증, 신장비대, 신장 증식증, 단백뇨, 조영제 유발성 신장병, 독소 유발된 신장 손상, 산소 유리-라디칼 매개된 신장병, 신장염 등을 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에서는, 5/6 신장절제술(Nx) 래트 동물모델을 대상으로 사구체 병변의 진행, 혈청 크레아티닌(SCr) 및 혈중 요소질소(BUN) 농도, 산화 스트레스에 의한 세포사멸을 측정함으로써 신장질환에 유효한 효과를 갖는 생약재임을 확인하였다. 그 결과 본 발명의 쎌강은 사구체 병변의 진행을 감소시키고 (실험결과 1), SCr 및 BUN 농도를 감소시켜 신장 기능을 개선시키며 (실험결과 2), 산화 스트레스에 의한 세포사멸에 대한 보호 효과를 나타내고 (실험결과 3), 세포내 산화 스트레스를 감소시키며 (실험결과 5), 특히 ERK 및 p38 MAPK 시그널링 경로를 저해함으로써 산화 스트레스에 의해 유도되는 세포사멸에 대한 보호 효과(실험결과 6)를 나타낼 수 있다. 이러한 작용을 통해 본 발명의 쎌강은 신장질환을 예방 또는 치료할 수 있다는 사실을 확인하였다.

[0014] 본 발명에 따른 신장질환의 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 유효한 양의 쎌강을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 신장질환의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다.

- [0015] 본 발명에 따른 센강의 약학적으로 유효한 양은 0.5 내지 100 mg/day/체중kg, 바람직하게는 0.5 내지 5 mg/day/체중kg이다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 신장질환 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- [0016] 또한, 상기에서 “약학적으로 허용되는” 이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 상기 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. 또한, 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 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.
- [0018] 본 발명에 따른 신장질환의 예방 또는 치료용 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명의 조성물에 포함되는 센강은 다음과 같은 효과를 나타낸다.
- [0020] 1. 사구체 병변의 진행을 감소시킨다.
- [0021] 2. 혈액 내 SCr 및 BUN 농도를 감소시켜 신장 기능을 개선시킨다.
- [0022] 3. 산화 스트레스에 의한 세포사멸에 대한 보호 효과를 나타낸다.
- [0023] 4. ERK 및 p38 MAPK 시그널링 경로를 저해함으로써 산화 스트레스에 의해 유도되는 세포사멸에 대한 보호 효과를 나타낸다.
- [0024] 5. 이러한 작용을 통해 손상된 신장 기능의 개선시켜 신장질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 5/6 Nx 패트의 신장에서 조직병리학적 변화에 대한 SK의 효과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 5/6 Nx 래트에서 혈청 크레아틴(SCr) 및 혈중 요소질소(BUN) 수준의 변화를 나타낸 것이다.
- 도 3은 HK-2 세포의 세포생존능에 대한 SK의 효과를 나타낸 것이다. 세포 생존능은 24시간 동안 약물 처리한 후 MTT로 분석하였다.
- 도 4는 HK-2 세포의 SK 전처리에 의한 H₂O₂ 유도된 세포사멸의 저해를 나타낸 것이다.
- 도 5는 HK-2 세포에서 H₂O₂ 유도된 산화 스트레스에 대한 SK의 효과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 HK-2 세포에서 MAPK 인산화에 대한 SK 및 H₂O₂의 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 실험 재료

- [0028] Shen-Kang (SK)은 Xi' an Shi Ji Sheng Kang 제약(Xi' an, Shaanxi, China)으로부터 입수하였다. 에날라프릴

(Enalapril)은 머크밀리포아(Merck Millipore; Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. 항-ERK (anti-extracellular signal-regulated kinases), 항-p-ERK (anti-phospho-ERK), 항-p38, 및 항-p-p38 MAPK (anti-phospho-p38 MAPK)는 Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)로부터 구입하였다. 항-JNK (Anti-c-Jun N-terminal kinase), 항-p-JNK (Anti-phospho-JNK), 항-PARP (anti-poly ADP ribose polymerase) 및 항-액틴 (anti-actin) 항체들은 Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)로부터 입수하였다. HRP 콘쥬게이트된 항-마우스 및 항-토끼 IgG 항체는 Merck Millipore (Billerica, MA, USA)로부터 입수하였다. 과산화수소(H₂O₂)는 삼전화학(Seoul, South Korea)으로부터 입수하였다.

[0029] 실험 동물

[0030] 체중 200±20 g의 6주령 수컷 SD(Sprague-Dawley) 래트는 Fourth Military Medical University (Xi' an, Shaanxi, China)로부터 입수하였다. 상기 래트는 실험 전 1주일 동안 일정한 실온 및 12 h 밤/낮 사이클 하에서 사육하였다. 래트는 설치류 표준 식단을 먹이고 물은 자유롭게 섭취토록 하였다.

[0031] 실시예 1. 외과적 절차 및 약물 투여

[0032] 각 래트는 복강내 주사를 통해 클로랄 하이드레이트(chloral hydrate) 용액 (33 mg/100 g)으로 마취시켰다. 20 마리 래트는 왼쪽 신장의 위아래 끝단 및 오른쪽 신장 전체를 제거하는 5/6 신장절제술(5/6 Nx)을 시행하였다 (Fedorova LV, et al. *BMC nephrology*. 2013;14:209). sham 수술(sham operation)은 비-Nx 대조군(sham)으로서 추가 6마리 래트에 대해 수행하였다. Nx 래트는 무작위로 세 그룹으로 나누었다: SK 처리하지 않은 군(5/6 Nx, n=6) 및 SK로 처리한 군(5/6 Nx + SK, n=6) 또는 에날라프릴로 처리한 군(5/6 Nx + EN, n=6, 양성대조군). SK (450 mg/kg/d)(꼬리정맥으로 주사) 또는 에날라프릴 (5 mg/kg/d)(복강내 주사)은 수술 후 일주일간 매일 처리한 반면, 비이클(vehicle)은 처리하지 않은 Nx 래트 및 sham 그룹에 주사하였다. 동물들은 수술 후 30일째에 희생시켰다.

[0033] 실시예 2. 생화학 분석

[0034] 혈액 샘플은 수술 후 0, 7, 20일째에 안와(orbit)로부터 수집하였다. 연구 마지막에, 혈액 샘플은 희생 후 즉시 복대동맥(abdominal aorta)으로부터 입수하였다. 혈액 요소질소(blood urea nitrogen) 및 혈청 크레아틴의 혈청 농도는 표준절차에 의해 측정되었다 (Hamada K, et al. *Clinical and experimental nephrology*. 2013;17:848-56).

[0035] 실시예 3. 조직화학 분석

[0036] 10% 중성 완충포르말린(neutral buffered formalin)에 고정시킨 신장 조직의 슬라이스를 파라핀에 포매시키고, 2 μm 두께 절편을 형태학적 연구를 위해 잘라내었다. 이 절편들을 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하였다 (Ding ZH, et al. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2014;2014:621756). 모든 조직 샘플은 상기 래트가 속하는 군에 대한 사전 정보 없이 독립된 조사자에 의해 평가되었다. 각 표본의 모든 사구체(glomeruli) 및 전체 현미경 영역을 평가하였다.

[0037] 실시예 4. 세포 배양

[0038] 정상 인간 신장 세뇨관 상피(HK-2) 세포주는 ATCC(Manassas, VA, USA)로부터 입수하였다. HK-2 세포는 매 2-3주마다 10% 우태아혈청, 2 mM 글루타민, 100 unit/ml 페니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신 (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)이 보충된 DMEM/F12(1:1)를 포함하는 100 mm 디쉬에서 계대배양하였다. 상기 세포들을 가습된 5% CO₂ 대기에서 37℃로 성장시켰다. 이 세포들을 지시된 농도의 SK가 있거나 없이 H₂O₂로 처리하였다. 실험에 사용하는 동안, 상기 세포들은 추가 분석을 위해 처리 마지막에 회수하였다.

[0039] 실시예 5. 세포 생존능 분석

[0040] 세포생존능은 EZ-Cytox Cell Viability Assay Kit (MTT)를 이용하여 측정하였다. MTT 분석은 테트라졸륨 염의 수용성 포르마잔으로의 절단에 근거한다 (Kwon JT, et al. *Toxicol Res.* 2013;29:181-5). 살아있는 세포에 의해 생성된 포르마잔은 460 nm에서 염료 용액의 흡광도를 측정함으로써 정량될 수 있다. HK-2 세포들을 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 DMEM/F12 배지가 있는 96웰 플레이트(5×10³ cells/well)에 씨딩하였다. 배양 배양시킨 후, 상기 세포들을 H₂O₂ (200, 300, 400 및 500 μM) 노출 1시간에 앞서 SK(300, 600 및 900 μg/ml)가 있거나 없이 24시간 동안 배양하였다. 10 μl의 키트 시약으로 세포의 최종 배양은 37℃에서 45분간 수행하였다. 460 nm에서의 흡광도는 마이크로플레이트 리더(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 세포 생존능을 계산하여 평균을 내었다. 대조군 세포는 동일한 방법으로 H₂O₂ 없이 처리되었으며, 세포생존능은 비처리 대조군의 퍼센트로 나타내었다.

[0041] 실시예 6. 유세포 분석

[0042] H₂O₂에 의해 초기 세포자살 및 후기 세포자살/세포괴사를 정량적으로 검출하기 위해, 세포자살을 Annexin V-FITC 세포자살 검출 키트(Invitrogen, Grand Island, NY, USA)를 이용하여 측정하였다 (Lee KE, et al. *European journal of pharmacology.* 2013;715:304-11). 간략히 설명하면, H₂O₂ 및/또는 SK 처리한 후, 원심분리하여 세포들을 수집하고, PBS로 세척한 다음, Ca²⁺ 풍부한 결합 용액(10 mM HEPES, pH7.4, 140 mM NaCl 및 2.5 mM CaCl₂)에 현탁시키고, 10 μM FITC(fluorescein isothiocyanate)-결합된 아넥신(annexin)-V 단백질 및 PI(propidium iodide)로 암조건에서 15분간 반응시킨 후 2색 유세포 분석법으로 분석하였다. 상기 세포 샘플들은 488 nm 여기 및 530 nm 방출에서 형광을 측정하는 FACS Calibur 유세포 분석기(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)의 FL1-H 및 FL2-H 채널에서 즉시 검출하였다. 세포자살성 세포를 정량하여 퍼센트로 계산하였다.

[0043] 실시예 7. DAPI 염색 분석

[0044] 세포자살성 세포의 핵 형태학의 변화는 DNA 특이적 형광 염료 DAPI(4'-6-diamidino-2-phenylindole) 염색 (VECTA SHIELD, Burlingame, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. HK-2 세포를 글라스 커버슬립 상에 성장시킨 후 24시간 동안 H₂O₂ 및/또는 SK로 처리하였다. 처리된 세포들을 4% 파라포름알데히드로 15분간 실온에서 고정시키고, PBS로 세척한 다음, 0.2% 트리톤 X-100으로 10분간 실온에서 침투시키고, PBS로 다시 세척한 후 고정된 세포에 20 μl 마운팅 배지(DAPI)를 5분간 첨가하였다. 완료된 슬라이드를 4℃에서 보관하여 빛으로부터 보호되도록 하고 형광현미경으로 측정하여 크로마틴 응축(chromatin condensation) 및 핵의 단편화를 평가하였다. 감소된 핵 크기, 크로마틴 응축, 강한 형광 및 핵 단편화를 나타내는 세포들을 세포자살성으로 간주하였다.

[0045] 실시예 8. 산화 스트레스의 측정

[0046] 세포내 활성산소종 생성은 디하이드로에티뎴(dihydroethidium)으로 측정하였다 (ROS Fluorescent Probe-DHE). 간략히 설명하면, HK-2 세포를 6 cm 플레이트에 씨딩하고 300 μg/ml SK가 있거나 없이 6시간 동안 500 μM H₂O₂로 배양한 후, 실험 마지막에, 세포들을 5 μM DHE로 30분간 배양한 다음, 세포들을 세척하고 원심분리로 수집한 후 PBS에 현탁시켰다. 형광 강도는 FACSCalibur™ 유세포 분석기로 측정하였다. 한편, TAC 분석 키트 (OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity Assay Kit; Cell Biolabs, San Diego, CA, USA)를 이용하여 총 항산화 용량(total antioxidant capacity, TAC)을 측정하였다. 간략히 설명하면, HK-2 세포를 300 μg/ml SK가 있거나 없이 6시간 동안 500 μM H₂O₂로 배양한 후, 차가운 PBS로 3회 세척하고 차가운 PBS에서 균질화한 다음, 10,000×g에서 4℃, 10분간 원심분리하였다. 그 상층액을 -80℃에 보관하고 적절한 대조군과 함께 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였다.

[0047] 실시예 9. 웨스턴 블롯 분석

[0048] H_2O_2 및/또는 SK로 HK-2 세포를 처리한 후, 세포들을 얼음에 방치한 다음, 차가운 PBS로 두 번 세척하고 세포 용해 버퍼(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1% (v/v) Nonidet P-40, 250 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L phenyl methyl sulfonyl fluoride, 0.1 mmol/L sodium vanadate, 20 mmol/L β -glycerol phosphate, 2 mmol/L DTT, 1 mmol/L Leupeptin 및 10 mmol/L PNPP)에서 4°C, 30분간 용해시켰다. 그 후 상기 세포용해물을 16,000×g에서 4°C, 20분간 원심분리하였다. 그 상층액을 수집하여 SDS-PAGE에 사용하고 소혈청알부민 단백질 분석법으로 단백질 함량을 평가하였다. 단백질들은 β -메르캅토에탄올을 포함하는 샘플 버퍼와 혼합하고 100°C에서 2분간 가열하였다. 40 마이크로그램의 각 세포용해물을 10% 폴리아크릴아마이드 겔에서 SDS-PAGE로 분획하고 니트로셀룰로오스 막으로 옮겼다. 0.02% Tween 20을 포함하는 TBS(tri-buffered saline)에 녹인 5% 탈지유로 실온에서 1시간 동안 블로킹시킨 후, 일차 항체(1:1000 희석)로 4°C에서 밤새 반응시켰다. 액틴(1:5000 희석)은 로딩 대조군으로 사용하였다. 일차 항체로 반응시킨 후, 5% 탈지유를 포함하는 TBS/Tween-20에 녹여 1:2000 희석된 염소 항-마우스 또는 항-토끼 HRP(horse radish peroxidase)-결합 항체로 실온에서 1시간 동안 반응시키기 전에 블롯들을 TBS/Tween-20에서 4회 세척하였다. TBS/Tween-20에서 세척한 후, 상기 블롯들을 강화된 화학발광 시스템을 이용한 항원 검출에 사용하였다. 단백질들은 ECL-화학발광 키트(GE Healthcare, Life Sciences)로 가시화하였다.

[0049] **실험결과 1. SK의 투여는 래트에서 5/6 Nx-유도된 사구체 병변(glomerular lesion) 진행을 개선한다.**

[0050] 신장 기능에 대한 SK의 추정되는 효과를 평가하기 위해, 5/6 Nx 래트의 신장 절편에서 조직병리학적 변화를 조사하였다 (도 1); 대조군에서 근위 및 원위 세뇨관(proximal and distal tubule)은 정상 구조를 나타내었다 (조직학적 병변 없음; 도 1의 첫 번째). 현저하게 큰 신장 조직학적 이상은 삼-처리된 군 대비 5/6 Nx에서 관찰되었다 (도 1의 두 번째); 이러한 이상(abnormalities)은 5/6 Nx 군과 비교하여 5/6 Nx + SK 군에서 현저하게 감소하였으며 (도 1의 세 번째), 이는 에날라프릴(EN)-처리된 군에서도 관찰되었다 (도 1의 네 번째). CKD 환자에 널리 효과적으로 사용되는 약인 에날라프릴은 대조군 처리로서 사용되었다. 이러한 결과는 SK가 CKD의 치료에 유익할 수 있음을 시사한다.

[0051] **실험결과 2. 5/6 Nx 래트에서 SK 및 EN 처리에 의한 신장 기능의 개선**

[0052] 신장 기능을 평가하기 위해, 혈청 크레아틴(serum creatinine, SCr)과 혈중 효소질소(blood urine nitrogen, BUN)를 모니터링하였다. SCr 및 BUN은 삼-처리된 군 대비 5/6 Nx에서 현저하게 증가하였으며 (도 2), 이는 5/6 Nx 모델이 신장 기능 장애를 성공적으로 확립하고 반영함을 시사한다. 특히, SCr 및 BUN은 5/6 Nx 군과 비교하여 5/6 Nx + SK 및 5/6 Nx + EN 군에서 현저하게 감소하였으며 (도 2의 A-B), 이는 SK 투여가 EN과 유사한 방식으로 신장 기능을 개선시켰음을 의미한다.

[0053] **실험결과 3. HK-2 세포에서 SK에 의한 H_2O_2 -매개된 세포사멸에 대한 보호**

[0054] SK의 효과를 설명하는 분자 메커니즘을 확인하기 위해, 인간 신장 근위세뇨관 (HK-2) 세포를 사용하여 과산화수소(H_2O_2)로 세포를 처리함으로써 유도된 신장 세뇨관 세포사멸에 대한 SK의 효과를 조사하였다. HK-2 세포를 다양한 농도의 H_2O_2 로 처리하고, 24시간 동안 37°C에서, 세포생존능을 MTT 분석으로 측정하였다. 도 3의 A에 따르면, 세포생존능은 H_2O_2 -처리된 세포에서 투여량-의존적으로(200-500 μ M) 감소하였다. 특히, H_2O_2 -매개된 세포사멸은 H_2O_2 손상(500 μ M)에 앞서 SK 처리(300, 600, 900 μ g/ml; 도 3의 B)에 의해 차단되었으며, 이는 SK 투여가 H_2O_2 -유도된 세포사멸에 대하여 HK-2 세포를 효과적으로 보호할 수 있음을 의미한다.

[0055] **실험결과 4. HK-2 세포에 대한 과산화수소 및 SK의 형태학적, 생화학적 효과**

[0056] H_2O_2 -매개된 세포사멸에 대한 SK의 효과를 더 조사하기 위해, 아넥신-V 및 PI(propidium iodide) 염색을 사용하여 세포사멸을 조래하는 이벤트를 확인하였다. 아넥신-V 및 PI 염색을 이용한 FACS 분석은 24시간 동안 H_2O_2 처리에 의해 유도된 세포사멸성 개체군이 $3.4 \pm 0.1\%$ 에서 $32.1 \pm 0.4\%$ 까지 증가하였음을 나타낸다 (도 4a); 이러한 증가는 SK로 전처리 후 H_2O_2 에 의해서는 $19.1 \pm 0.3\%$ 로 감소하였다. 추가적인 통계 분석은 SK 처리가 HK-2 세포에

서 (H_2O_2 에 의해 유도된) 세포자살성 세포사멸에 대한 보호 효과를 부여함을 검증하였다 (도 4a의 아래 패널). SK의 효과를 좀 더 평가하기 위해, 형광현미경과 함께 DAPI 염색을 이용하여 핵에서 형태학적 변화를 모니터 하였다. 정상적인 핵은 단색의 염색 및 규칙적인 타원형과 둥근 모양을 나타낸다 (도 4b, 왼쪽 패널). 응축된 핵 및 핵 단편화로 표시되는, 세포자살성 핵은 $500 \mu M H_2O_2$ 에 24시간 노출 후 나타났다 (도 4b, 중앙 패널). 그러나, 이러한 핵 특성에서의 변화는 HK-2 세포에서 SK로 전처리에 의해 개선되었으며 (도 4b, 오른쪽 패널), 이는 세포자살 조건 하에서 분절(cleaved)되는 PARP(Poly (ADP-ribose) polymerase)의 웨스턴 블롯 분석으로 확인되었다 (Chatterjee PK, et al. *Kidney international*. 2004;65:499-509). 도 4c에 도시된 바와 같이, PARP의 분절된 형태는 H_2O_2 에 24시간 노출에 의해 현저하게 증가되었다. PARP 분절 유도는 세포의 SK 전처리에 의해 저해되었으며 (도 4c), 이는 SK가 세포자살성 시그널링에 관련된 분자 이벤트를 방지할 수 있음을 의미한다.

[0057] **실험결과 5. HK-2 세포에서 SK 처리 후 세포내 산화 스트레스의 저해**

[0058] 산화 스트레스가 세포자살의 원인이 된다는 것은 잘 알려져 있다 (Lee KE, et al. *European journal of pharmacology*. 2013;715:304-11). 따라서 세포내 활성산소종(ROS) 수준, 및 총 항산화 용량(TAC)을 HK-2 세포에서 모니터 하였다. DHE 염색으로 측정된 ROS 생성은 H_2O_2 에 의해 증가되고; SK 처리는 ROS 생성을 현저하게 감소시켰다 (도 5a). 또한 TAC는 SK에 의해 증가되었다 (도 5b). 종합하면, 이러한 결과는 SK-유도된 ROS 생성의 저해가 HK-2 세포에서 증가된 TAC에 의해 매개됨을 시사한다.

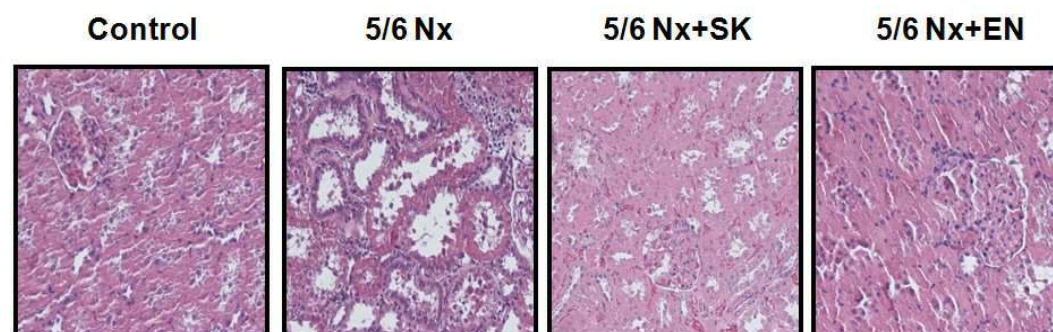
[0059] **실험결과 6. HK-2 세포에서 SK에 의한 MAPK 시그널링의 조절**

[0060] SK가 H_2O_2 -유도된 세포자살의 원인이 되는 시그널링 메커니즘을 조절할 수 있는지를 확인하기 위해, 웨스턴 블롯 분석을 이용하여 ERK(extracellular-signal-regulated kinases), JNK(c-Jun N-terminal kinases) 및 p38MAPK(p38 mitogen-activated protein kinases)을 포함하는 서로 다른 MAPK 시그널링 경로의 활성화를 모니터 하였다. 특히, ERK 및 p38의 H_2O_2 -매개된 활성화는 관찰되었지만 JNK 활성화는 H_2O_2 처리에 의해 영향을 받지 않았다 (도 6a). 또한 SK로 HK-2 세포의 전처리는 ERK와 p38을 저해하였지만, JNK 인산화는 그렇지 않았다.

[0061] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

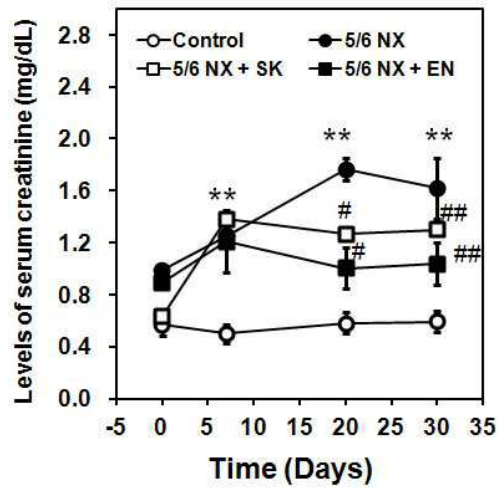
도면

도면1

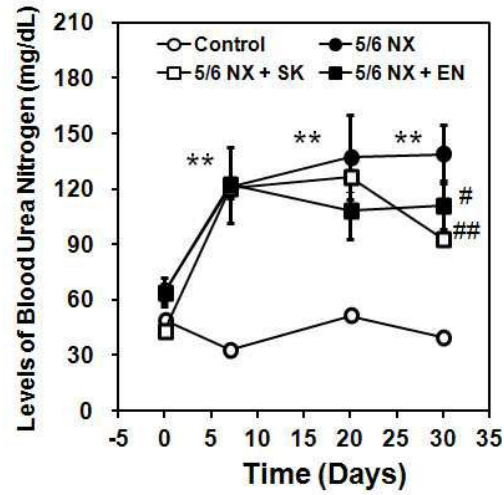


도면2

A

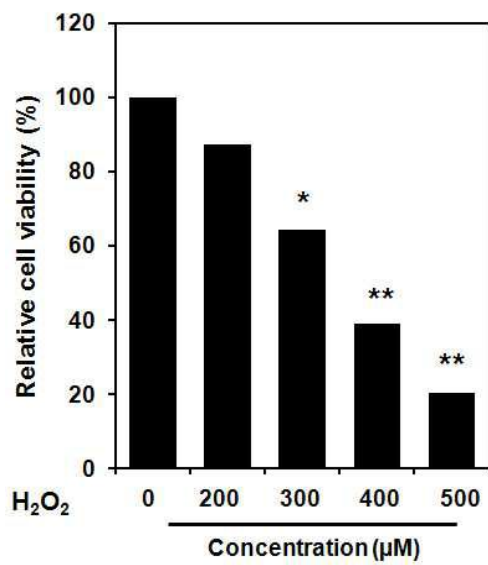


B

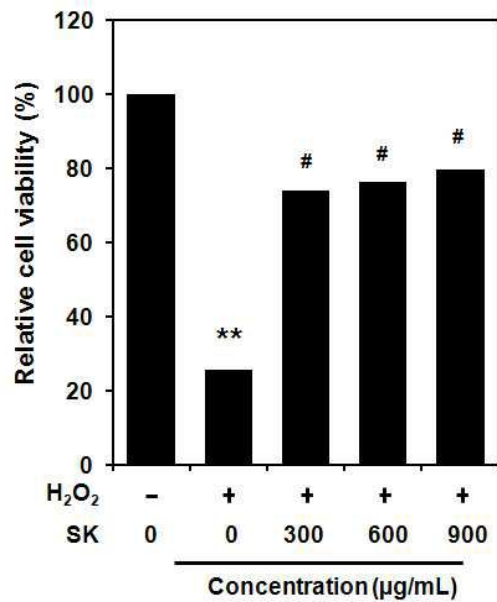


도면3

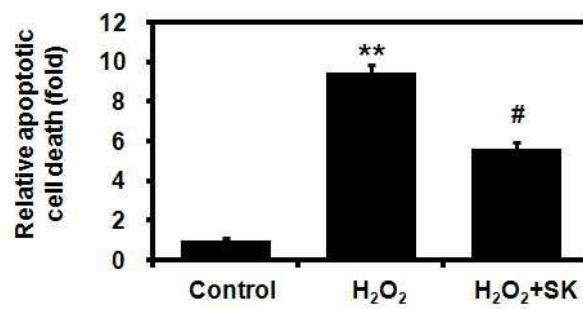
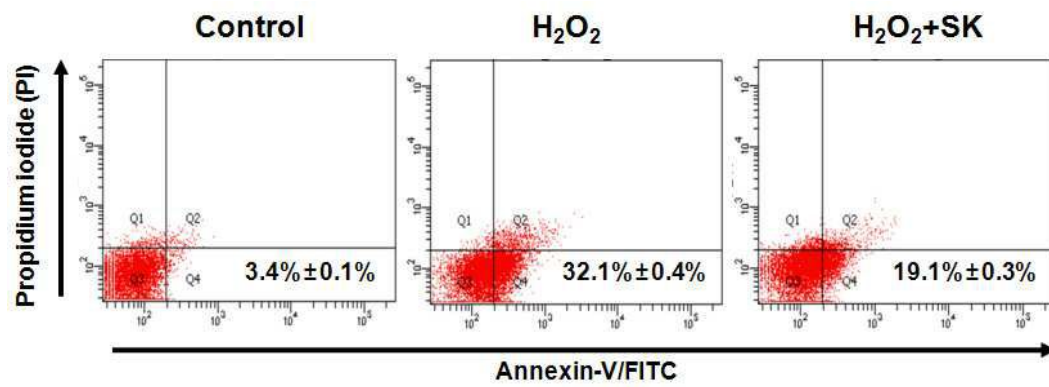
A



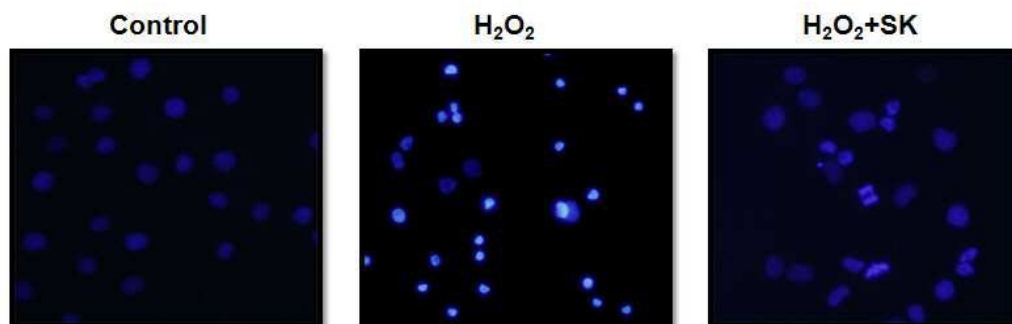
B



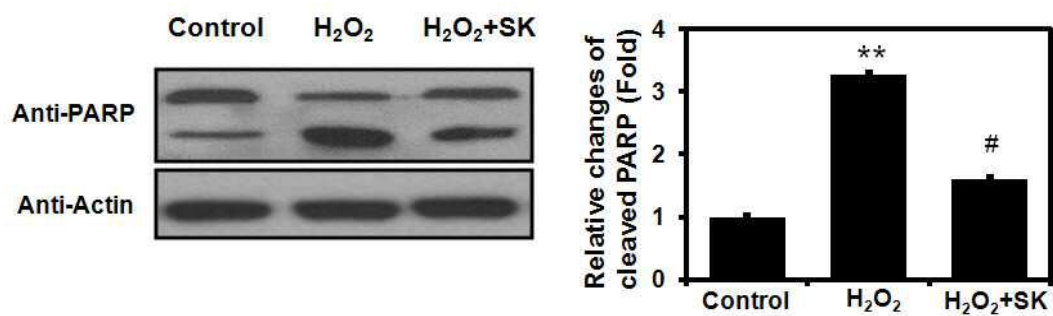
도면4a



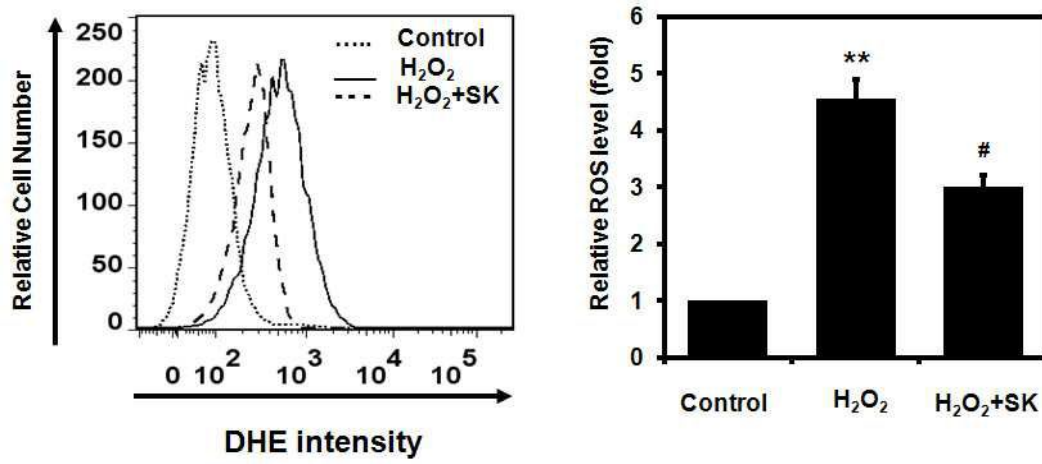
도면4b



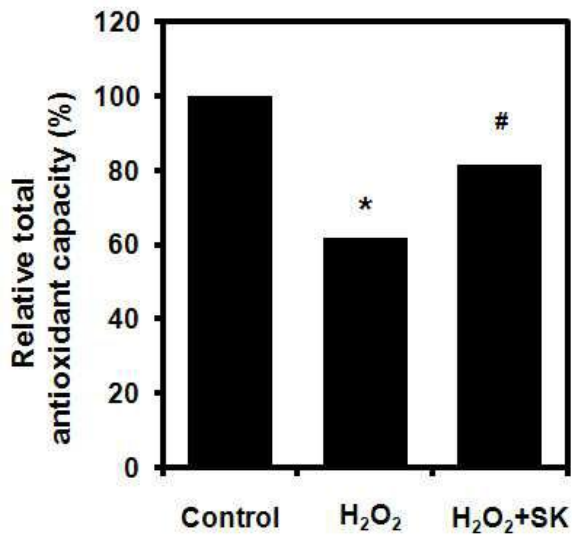
도면4c



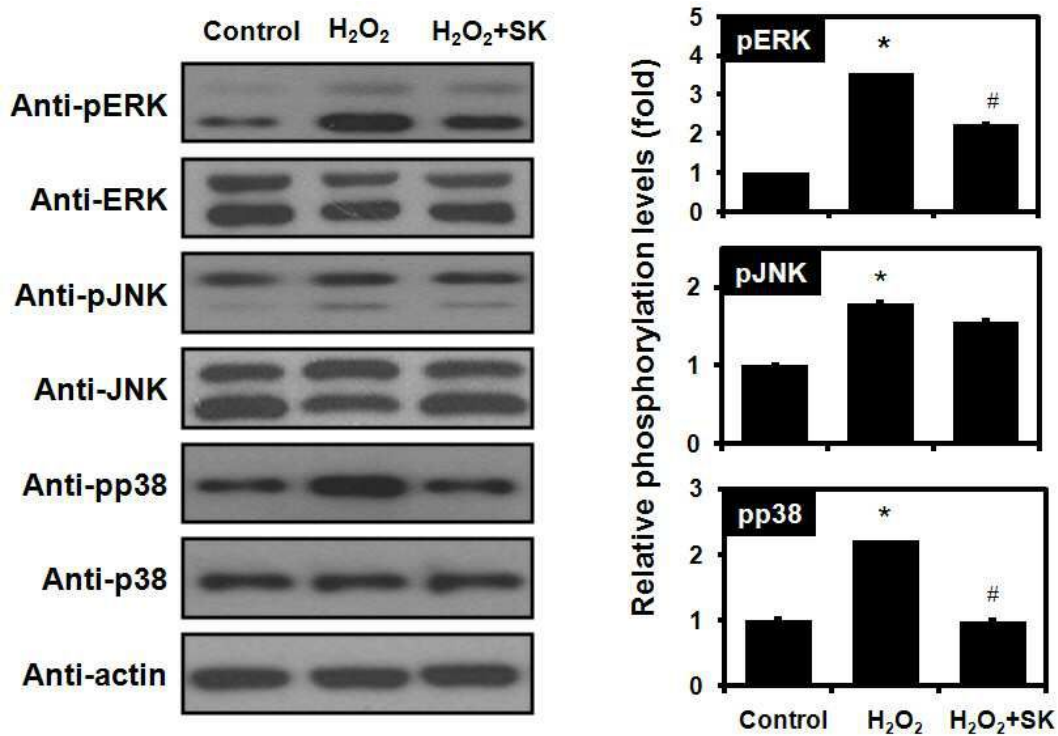
도면5a



도면5b



도면6a



도면6b

