(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0047942
(43) 공개일자 2022년04월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) *A61K 36/258* (2006.01)
A61K 38/14 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/168 (2013.01)
A61K 36/258 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0042772(분할)
(22) 출원일자 2022년04월06일
심사청구일자 2022년04월06일
(62) 원출원 특허 10-2020-0028124
원출원일자 2020년03월06일
심사청구일자 2020년03월06일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
조익현
서울특별시 서초구 신반포로 32, 19동 509호(반포동, 반포아파트)
장민희
강원도 영월군 남면 들골안길 2-19
최종희
경상북도 경주시 외동읍 입실시장길 12-3
(74) 대리인
위병갑

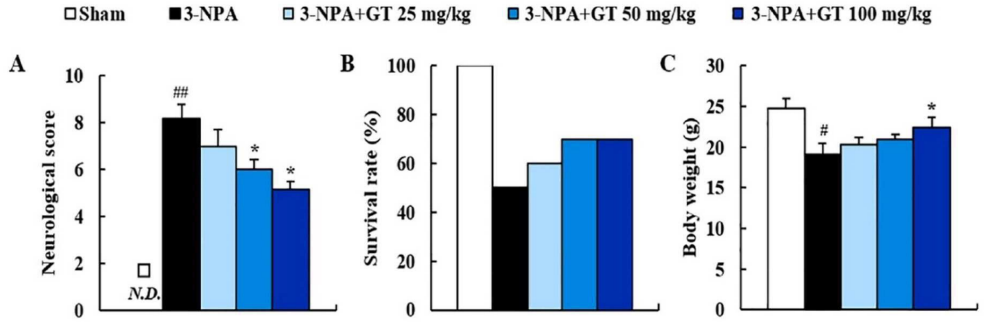
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **진토닌을 유효성분으로 포함하는 헌팅턴병 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 헌팅턴병(Huntington's disease) 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 진토닌을 포함하는 조성물은 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로를 활성화시켜 NF-κB 및 MAPKs 신호 전달 경로를 억제시킴으로써, 3-NPA로 유발된 신경 장애 및 선조체(striatum) 독성을 개선시키고, STHdh 세포 및 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터 감염 헌팅턴병 마우스 모델에서 유리한 효과를 나타냄을 확인함에 따라, 헌팅턴병 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 유용할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 38/14 (2013.01)
A61P 25/14 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20180618
과제번호 20180618
부처명 과학기술정부통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업/중견연구자지원사업(후속)
연구과제명 헌팅턴질환 동물모델에서 미세아교세포 활성화의 병리 기능 및 치료기술 연구 AAV/DJ 벡터와 shRNA 활용
기 여 율 1/1
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2017.09.01 ~ 2020.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

진토닌을 유효성분으로 포함하는, 선조체에서 숙신산 탈수소 효소(succinate dehydrogenase)가 억제; 및 변형된 헌팅틴(mutant huntingtin)의 응집체가 형성;된 헌팅턴병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서,

상기 진토닌은 인삼으로부터 70% 에탄올 추출물을 제조하는 단계; 상기 추출물의 농축물을 물과 혼합하여 물 침전법을 통해 침전물을 얻는 단계; 및 침전물을 동결건조시켜 진토닌을 얻는 단계;를 포함하는 방법으로 제조되는 것이고,

상기 진토닌은 (1) 선조체에서 미세아교세포 활성화를 억제하고; (2) 신경학적 손상에 의한 행동 장애를 억제하며; (3) 헌팅틴(huntingtin)의 응집을 억제하고; (4) 선조체에서 숙신산 탈수소 효소를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 진토닌은 인삼으로부터 추출하여 분리한 당지질단백질인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 헌팅턴병은 3-NPA에 의해 유발되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 진토닌은 선조체에서 신경퇴화, 미토콘드리아 기능 장애, 세포사멸 증가, 아폽토시스 및 염증 매개체의 발현 증가로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 증상을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 진토닌은 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로를 활성화시켜 헌팅턴병 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 진토닌은 3-NPA에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 진토닌은 선조체에서 숙신산 탈수소 효소(succinate dehydrogenase)가 억제된 헌팅턴병 환자에서 상기 숙신산 탈수소 효소를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 진토닌은 선조체에서 Keap1의 생성 또는 발현이 증가된 환자에서 Keap1의 생성 또는 발현을 억제하고, Nrf2, NQO1, GCLs 및 HO-1으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 생성 또는 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 진토닌은, 선조체에서 EM48 및 활성형의 카스파제-3(cleaved caspase-3)의 생성 또는 발현이 증가된 환자에서 상기 EM48 및 활성형 카스파제-3의 생성 또는 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 10

인비트로에서, 진토닌을 3-NPA에 의해 세포 손상 및 사멸이 유발된 신경세포에 처리하여, 선조체 독성을 감소시켜 신경세포 손상 및 사멸을 억제하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 진토닌은, Keap1-Nrf2 신호 전달 경로를 활성화시켜 NF-κB 및 MAPKs 신호 전달 경로를 억제함으로써, 3-NPA에 의한 1차 세포사멸 및 미세아교세포 활성화에 의한 2차 세포사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물

청구항 12

인비트로에서, 진토닌을 STHdh 세포주에 처리하여, 세포 사멸 및 변형된 헌팅틴의 응집을 억제하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 헌팅턴병(Huntington's disease) 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 헌팅턴병(Huntington's disease, HD)은 비정상적인 비자발적 운동, 인지 장애 및 정신 장애를 특징으로 하는 유전적, 진행성 및 퇴행성 신경 질환이다.

[0003] 헌팅턴병은 헌팅틴(huntingtin, HTT) 유전자의 엑손 1에서 위치 4p 16.9에서 CAG(글루타민) 트리뉴클레오티드(three-nucleotide) 반복의 비정상적인 확장(변형)에 의해 발생한다. 변형된 헌팅틴(mutant huntingtin, mHTT) 단백질의 응집체는 신경세포(뉴런, neuron, neuronal cell) 독성, 전사 조절 이상, 흥분 독성, 변경된 에너지 대사에 의한 미토콘드리아 기능 장애, 선조체(줄무늬체, striatum)/피질 내의 축삭 수송 및 시냅스 기능 장애의 변화를 포함하는 다양한 질병 기작을 유도한다.

[0004] 테트라베나진[tetrabenazine; 미국 식품의약국(FDA)에서 유일하게 승인된 헌팅턴병 치료제] 및 항정신병제[올란자핀(Olanzapine) 및 아리피프라졸(Aripiprazole) 등]는 합병증 및 정신병 치료에 가능한 효과적인 제제로 여겨지고 있다. 그러나 이들 약물은 무산소증, 우울증, 현기증, 피로 또는 파킨슨증을 포함하여 잠재적으로 심각한 부작용을 일으킬 위험이 있다. 또한 증상 치료는 운동 기능, 삶의 질 및 안전성에 유리한 영향을 줄 수 있으므로 일부 개인에게 유리할 수 있다. 헌팅턴병의 진행을 지연시키거나 막을 수 있는 확립된 치료법이 없기 때문에, 헌팅턴병 치료를 위한 효율적이고 안전한 약물의 개발이 중요하다. 그러나, 혁신적인 약물뿐만 아니라 헌팅턴병에서 신경세포의 죽음의 근간이 되는 정확한 메커니즘은 불분명하다.

[0005] 산화적 스트레스(oxidative stress)는 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)의 과잉 생산을 특징으로 하며, 이는 미토콘드리아 DNA 돌연변이, 미토콘드리아 호흡 사슬의 손상, 막 투과성 변경 그리고 Ca^{2+} 항상성 및 미토콘드리아 방어 시스템의 기능 장애를 포함하는 미토콘드리아 손상을 초래할 수 있다. 이러한 변화는 헌팅턴병의 발달, 신경 기능 장애를 매개 또는 증폭시키고 신경 변성을 유발할 수 있다. 따라서 산화적 스트레스에서

미토콘드리아 기능 장애와 같은 근본적인 원인 인자를 조절하는 항산화제는 헌팅턴병 치료를 위한 훌륭한 치료제 후보가 될 수 있다. 켈치-유사 ECH-관련 단백질 1(Kelch like ECH associated protein 1, Keap1)-핵 인자 적혈구 2 관련 인자 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)는 부상 및 염증에 의해 유발되는 산화적 손상으로부터 보호하는 항산화 단백질의 발현을 조절하는데 중요하다. 예를 들어, Nrf2가 결실된 마우스는 선천적으로 약물 유발 독성 및 신경계 질환을 포함하는 산화적 스트레스 유발 질환에 걸리기 쉬운 반면, Keap1-Nrf2 신호 전달의 활성화제는 헌팅턴병 등 다양한 생체 내 및 시험관 내 질병 모델에서 산화적 스트레스를 감소시킨다. 시험관 내 및 생체 내 헌팅턴병 연구에 따르면, 크레아틴(creatine) 및 설포라판(sulforaphane)을 포함한 항산화제가 유익한 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나, 항산화 효과에 대한 혁신적인 후보는 아직 보고된 바 없다.

[0006] 미토콘드리아에서 복합 II(complex II)의 비가역적 억제제인 3-니트로프로피오닉산(3-nitropropionic acid, 3-NPA)은 동물 및 인간 모두에서 신경세포독성(neurotoxicity)을 나타내는 것으로 알려져 있다. 3-NPA의 투여 시에 선조체(striatum, 줄무늬체) 및 피질(cortex, 겉질)을 포함한 특정 뇌 부위에서 숙신산 탈수소 효소(succinate dehydrogenase, SDH)를 억제함으로써 세포 에너지 대사를 손상시켜 아데노신 삼인산(adenosine triphosphate, ATP)의 생성을 감소시키고, 산화적 스트레스 및 신경 손상을 생성하며, 헌팅턴병의 많은 조직 병리학적 및 신경 화학적 특징을 모방하고, 보행 이상 및 헌팅턴병-유사 선조체 병변을 초래하는 것으로 알려져 있어, 헌팅턴병 연구를 위한 동물 모델에서 사용되고 있다.

[0007] 한편, 예부터 인삼(ginseng)은 일반적으로 장수/생명연장을 위한 강장제(tonic)로 이용되거나, 또는 아답토겐(adaptogenic agent)으로서 각종 스트레스, 피로, 질병, 암, 당뇨병에 대항하여 생체기능을 향상시킨다. 이러한 인삼은 한국뿐만 아니라 중국과 일본에서 천년 이상 동안 강장제나 아답토겐으로 사용되어 왔는데, 최근 인삼은 세계에서 소비되는 약초 중에서 가장 유명한 것 중 하나이다.

[0008] 인삼 성분 중에서 인삼 사포닌(saponin)으로 불리는 진세노사이드(ginsenosides)는 1960년대 초반에 분리되어 생리학적/약리학적 연구에서 대표적인 성분으로 알려진 뒤로 많이 연구되었다. 이외에도 최근 연구에서는 인삼에 다당류(polysaccharides), 폴리아세틸렌류(polyacetylenes), 수용성 단백질(proteins) 등 알려지지 않은 다른 성분들이 함유되어 있는 것이 밝혀졌다.

[0009] 진토닌(gintonin, GT)은 인삼의 구성성분 중에서 당, 지방 및 단백질 성분으로 구성되어 있는 신규한 당지질단백질(glycolipoproteins)인데(한국등록특허 제10-0973202호), 기존에 알려진 인삼 사포닌(진세노사이드)과는 달리 아직 확인/규명이 안된 세포막 단백질과 상호 작용을 통한 신호경로(membrane signal transducton pathway)를 통해 그 활성이 나타나는 것으로 밝혀졌는데, 예를 들면, 마우스 EAT(Ehrlich Ascites Tumor) 세포에 진토닌의 처리는 G 단백질 연결 수용체(G protein coupled receptors, GPCRs 혹은 7TM 수용체)들이 활성화될 때 이루어지는 신호 전달 경로와 같이 인지질분해효소(phospholipase C, PLC)에 연결되어 있는 신호전달 경로를 통해 세포질내 유리 Ca^{2+}(Free Ca^{2+})의 증가를 일시적으로 유발하고, 또한 개구리알(Xenopus oocytes)에 처리할 경우 PTX(pertussis toxin)-민감하지 않은 G 단백질 → PLC(phospholipase C) → IP3(inositol 1,4,5-triphosphate) → 칼슘 저장고인 세포질내세망(endoplasmic reticulum, ER)에서의 칼슘 방출을 통하여 칼슘 의존성 염소이온 채널(Ca^{2+}activated Chloride Channel, CaCC)이 활성화 되는 것을 밝혀냈다. 그러나 진토닌의 헌팅턴병 예방 및/또는 치료 효과와 항염증 효과와 관련된 기전은 여전히 불분명하다.

[0010] 이에, 본 발명자들은, 진토닌의 마우스 모델에서 3-니트로프로피오닉산(3-nitropropionic acid, 3-NPA)에 의해 유발된 신경 장애 및 선조체(striatum, 줄무늬체) 독성을 개선할 수 있음을 확인하였으며, STHdh 세포(헌팅턴병의 세포모델)와 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated viral, AAV) 벡터에 의한 변형 헌팅틴(mutant huntingtin, mHTT)의 감염 마우스 모델에서 진토닌의 유익한 효과를 확인하였고, 이에 따라, 진토닌을 Keap1-Nrf2 신호 활성화에 의한 헌팅턴병에 대한 새로운 예방 또는 치료용 제제로 사용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0973202호

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2019-0124082호

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Choi, et. al., 2015. Ginseng pharmacology: a new paradigm based on gintonin-lysophosphatidic acid receptor interactions., Front. Pharmacol. 6, 245.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 헌팅턴병(Huntington's disease) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 헌팅턴병(Huntington's disease) 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 3-NPA에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 3-NPA에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0018] 본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 헌팅턴병(Huntington's disease) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 헌팅턴병(Huntington's disease) 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0020] 나아가, 본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 3-NPA에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0021] 더 나아가, 본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 3-NPA에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 진토닌을 포함하는 조성물은 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로를 활성화시켜 NF-κB 및 MAPKs 신호 전달 경로를 억제함으로써, 3-NPA로 유발된 신경 장애 및 선조체(striatum) 독성을 개선시키고, STHdh 세포 및 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터에 의해 감염된 헌팅턴병 마우스 모델에서 유리한 효과를 나타냄을 확인함에 따라, 헌팅턴병 예방, 치료 또는 개선용 조성물로 유용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 3-NPA 및 진토닌(gintonin, GT)을 처리 시점을 나타낸 실험 설계 개요 이미지이다.

도 2는 3-NPA 중독에 의한 신경학적 장애, 치사 및 선조체 신경세포 사멸에 대한 진토닌(gintonin, GT) 처리 농도에 따른 효과를 나타낸 것이다: 마우스의 신경 손상에 대한 신경학적 점수(neurological score; A), 생존율(survival rate; B) 및 평균 체중(body weight; C).

도 3은 3-NPA 중독에서 진토닌 치료시간대를 확인하기 위해 전처리(pre-), 동시처리(co-), 발병처리(onset-) 및 진행처리(progression-)에 따른 마우스의 신경 손상에 대한 신경학적 점수(A), 생존율(B) 및 평균 체중(C)을 나타낸 것이다.

도 4는 3-NPA 및/또는 진토닌 처리에 따른 선조체 신경세포 사멸에 대하여 크레실 바이올렛 염료로 선조체 병변

을 염색한 이미지(A), 선조체 병변을 갖는 마우스 수를 정량한 결과(B), 선조체에서의 평균 병변 면적을 측정한 결과(C) 및 각 그룹별 선조체를 웨스턴 블롯으로 분석하여 β-III-튜불린(tubulin)의 단백질 발현 변화를 정량화한 그래프(D)이다.

도 5는 3-NPA 중독 후 선조체에서의 미토콘드리아 기능 장애 및 아폽토시스(apoptosis)에 대한 진토닌의 전처리 효과를 나타낸 것이다. 여기서, 도 5A 내지 도 5D는 조직화학적분석을 통해 그룹별 SDH 활성 수준을 비교한 이미지이고, 도 5E는 sham 그룹 대비 선조의 SDH 활성(%)을 정량화한 그래프이고, 도 5F 내지 3I는 조직화학적 분석을 통해 mitoSOX 활성 수준을 비교한 이미지이고, 도 5J는 표준화된 mitoSOX 강도로서 양성세포의 수(%)를 정량화한 그래프이고, 도 5K 내지 도 5N 및 도 5O 내지 도 5R은 각각 TUNEL 염색(K-O) 및 FJC 염색(O-R)을 통해 아폽토시스(apoptosis) 발생 세포의 분포를 나타낸 이미지이고, 도 5S는 각 그룹별 선조체를 웨스턴 블롯으로 분석하여 활성형 카스파제-3(cleaved caspase-3)의 단백질 발현 변화를 정량화한 그래프이다.

도 6은 3-NPA 중독 후 선조체에서 미세아교세포(microglia) 활성화 및 염증 반응의 mRNA 발현에 대한 진토닌 전처리의 효과를 나타낸 것이다. 여기서, 도 6A 내지 도 6D는 각 그룹별 항-Iba-1 항체를 사용하여 면역 염색한 결과를 나타낸 이미지이고, 도 6E 및 도 6L은 각각 그룹별 선조체 조직을 웨스턴 블롯으로 분석하여 Iba-1 (E) 및 iNOS (L)의 단백질 발현을 정량화한 그래프이고, 도 6F 내지 도 6K는 각각 그룹별 선조체 조직을 실시간 PCR로 분석하여 OX-42 (F), IL-1β (G), IL-6 (H), TNF-α (I), COX-2 (J) 및 iNOS (K) 의 mRNA 발현을 정량화한 그래프이다.

도 7은 3-NPA 중독 후 선조체에서 성상세포(astrocyte) 활성화 및 GFAP mRNA 발현에 대한 진토닌 전처리의 효과를 나타낸 것이다. 여기서, 도 7A 내지 7D는 각 그룹별 항-GFAP 항체를 이용하여 면역 염색한 결과를 나타낸 이미지이고, 도 7E 및 7F는 그룹별 선조체 조직을 웨스턴 블롯으로 분석하여 GFAP 단백질 발현을 분석한 결과(E) 및 이를 정량화 한 그래프(F)이고, 도 7G는 그룹별 선조체 조직을 실시간 PCR로 분석하여 GFAP의 mRNA 발현을 정량화한 그래프이다.

도 8은 3-NPA 중독 후 선조체에서 급성 세포 사멸에 대한 진토닌 전처리의 효과를 나타낸 것이다. 여기서, 도 8A 내지 도 8D 및 도 8F 내지 도 8I는 각각 그룹별 선조체 부위를 FJC(Fluoro-Jade® C)로 조직화학적 염색한 결과를 나타낸 이미지(A-D) 및 항-Iba-1 항체로 면역 형광 염색한 결과를 나타낸 이미지(F-I)이고, 도 8E 및 도 8J는 각각 상기 FJC(E) 및 항-Iba-1 항체(J)로 염색된 정도를 정량화한 그래프이다.

도 9는 3-NPA 중독 후 선조체에서 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로의 활성화에 대한 진토닌(GT) 전처리의 효과를 나타낸 것이다. 여기서, 도 9A 내지 도 9E은 각각 그룹별 선조체 조직을 실시간 PCR로 분석하여 Keap1(A), Nrf2(B), NQO1(C), GCLs(D), 및 HO-1(E)의 mRNA 발현 수준을 정량화한 그래프이고, 도 9F 및 도 9G는 그룹별 선조체를 웨스턴 블롯으로 분석하여 Nrf2 및 HO-1의 단백질 발현 수준을 측정 한 결과(F) 및 각 단백질을 총 히스톤(histone) 또는 GAPDH에 대한 비율로 정량화한 그래프(G) 이고, 도 9H 및 도 9I는 그룹별 선조체 조직을 항-Nrf2 항체 및 항-HO-1 항체를 이용하여 면역 염색한 결과를 나타낸 이미지(H) 및 염색된 정도를 정량화한 이미지(I)이다.

도 10은 3-NPA 중독 후 선조체에서 MAPKs 및 NF-κB 신호 경로 조절에 대한 진토닌(GT) 전처리 효과를 나타낸 것이다. 여기서, 도 10A 내지 도 10F는 그룹별 선조체 조직을 웨스턴 블롯으로 분석하여 p-ERK, p-JNK, p-p38, NF-κB/p65 및 p-IκBα의 단백질 발현 수준을 측정한 결과 (A) 및 각 단백질을 총 GAPDH에 대한 비율로 정량화한 그래프(B-F)이다.

도 11은 STHdh 세포주에서 세포 사멸 및 변형된 HTT(mutant huntingtin, mHTT) 응집체에 대한 진토닌(GT)의 효과를 나타낸 것이다. 여기서, 도 11A는 $STHdh^{Q7/Q7}$ and $STHdh^{Q111/Q111}$ 세포에서 진토닌 처리 농도 및 시간에 따른 세포 사멸율을 나타낸 그래프이고, 도 11B는 $STHdh^{Q111}$ 세포에서 웨스턴 블롯 분석을 통해 EM48, 활성형의 카스파제-3(cleaved caspase-3) 및 β-III-튜블린의 단백질 발현 수준을 측정한 결과이고, 도 11C는 각 단백질을 총 GAPDH에 대한 비율로 정량화한 그래프이다.

도 12는 AAV-DJ-82Q 벡터 감염된 헌팅턴병 마우스 모델에서 신경학적 손상 및 선조체 독성에 대한 진토닌(GT)의 보호 효과를 나타낸 것이다. 여기서, 도 12A는 폴(pole) 테스트를 통해 폴 바닥까지의 평균 하강 시간(latency to descend)을 측정한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 12B는 로타로드(rotarod) 테스트를 통해 로드 위에서 바닥으로 떨어지는 평균 시간(latency to fall)을 측정한 결과를 나타낸 그래프이고, 도 12C는 체중 변화를 나타낸 것이고, 도 12D는 그룹별 선조체 조직을 웨스턴 블롯을 통해 분석하여 EM48, Nrf2 및 HO-1의 단백질 발현 수준을 조사한 결과이고, 도 12E는 각 단백질을 총 히스톤(histone) 또는 GAPDH(glyceraldehyde 3-phosphate

dehydrogenase)에 대한 비율로 정량화한 그래프이고, 도 12F는 각 그룹의 선조체 부위를 Nrf2 및 HO-1 항체를 사용하여 면역 염색한 결과이고, 도 12G는 면역 염색된 정도를 정량화한 이미지이고, 도 12H는 $STHdh^{Q111}$ 세포를 웨스턴 블롯으로 분석하여 EM48, Nrf2 및 HO-1의 단백질 발현 수준을 평가한 결과이고, 도 12I는 각 단백질을 총 히스톤 또는 GAPDH에 대한 비율로 정량화한 그래프이다.

도 13은 AAV-DJ-82Q 벡터 감염된 헌팅턴병 마우스 모델에서 신경학적 손상 및 선조체 독성에 대한 진토닌(GT)의 보호 효과를 나타낸 것이다. 여기서, 도 13A 내지 13D는 각 그룹별 EM48 항체를 사용하여 면역 염색한 결과를 나타낸 이미지이고, 13E는 이를 정량화 한 그래프이다.

도 14는 Nrf2 억제제 및 siRNA-Nrf2의 처리에 따른 효과를 확인하기 위해, H_2O_2 처리된 $STHdh^{Q111}$ 세포를 웨스턴 블롯으로 분석하여 Nrf2 및 HO-1의 단백질 발현 수준을 평가한 결과(A 및 C) 및 각 단백질을 총 히스톤 또는 GAPDH에 대한 비율로 정량화한 그래프(B 및 D)이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0026] **헌팅턴병 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

[0027] 본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 헌팅턴병(Huntington's disease) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 인삼으로부터 추출하여 분리한 당지질단백질(특허등록 제10-0973202호)을 제공받아 사용한 것일 수 있다.

[0031] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 헌팅턴병은 3-NPA에 의해 유발되는 것일 수 있고, 상기 3-NPA에 의한 신경 장애 및 선조체(striatum) 독성에 의해 유발되는 것일 수 있다. 상기 헌팅턴병은 헌팅턴 무도병(Huntington's chorea)을 포함하는 것일 수 있다.

[0032] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 선조체에서 신경퇴화, 미토콘드리아 기능 장애, 세포사멸 증가, 아폽토시스, 미세아교세포 활성화, 염증 매개체의 발현 증가 및 행동장애로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 증상을 억제하는 것일 수 있다.

[0033] 본 발명의 일실시예에서는, 3-NPA에 의해 선조체에서 세포 사멸, 세포 손상, 미토콘드리아 기능장애, 아폽토시스, 미세아교세포의 침윤 및 활성화, 염증 인자, 행동장애(운동 조절 장애) 등이 유발되는 것을 확인하였고, 진토닌 처리시 이러한 증상들이 억제 및 개선되는 효과가 있으며, 선조체의 3-NPA로 유도된 독성으로부터 보호하는 효과가 있음을 확인하였다(실험예 2 내지 7 참조).

[0034] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로의 활성화를 통하여 미세아교세포의 침윤 및 활성화를 억제함으로써 헌팅턴병 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것일 수 있다. 또한, 상기 진토닌은 NF-κB 및 MAPKs 신호 전달 경로를 억제하여 헌팅턴병 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[0035] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로를 활성화시켜 NF-κB 및 MAPKs 신호 전달 경로를 억제함으로써 3-NPA-유도된 선조체의 독성을 감소시키는 보호 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다(실험예 8 내지 9 참조).

[0036] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 변형된 헌팅틴(mHTT)의 응집을 억제하는 것일 수 있다.

[0037] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로 활성화를 통해, 헌팅턴병의 시험관내 모델로서 STHdh 세포주에서 변형된 헌팅틴(mHTT) 응집체 형성을 억제하고, AAVDJ-82Q 벡터에 감염된 헌팅턴병 마우스 모델에서 AAV로 매개된 인간 돌연변이형 HTT의 과발현에 의해 유도된 헌팅턴병 유사 선조체 독성, 운동 조절 장애 등 헌팅턴병 관련 증상을 완화시킬 수 있음을 확인하였다(실험예 10 내지 11 참조).

[0039] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는, 예를 들면, 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등과 같은 경구투여용 담체 및 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[0040] 본 발명에 따른 약학 조성물은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 적합한 형태로 제형화 될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학 조성물은 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

[0041] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0042] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0043] 상기 약학적 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 담체, 부형제, 또는 희석제는 예를 들어, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 또는 광물유를 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어, "투여"란 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한, 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0045] 상기 용어, "개체"란 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 바람직하게는, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.

[0046] 상기 용어, "약학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며, 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강 상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 일반적으로 약 0.001~100 mg/kg/day이며, 바람직하게는 0.01~35 mg/kg/day이다. 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.07~7000 mg/day이며, 바람직하게는 0.7~2500 mg/day이며, 투여는 상기 권장 투여량을 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[0047] 본 발명의 조성물은 헌팅턴병 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0049] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 선조체에서 숙신산 탈수소 효소(succinate dehydrogenase)가

억제된 헌팅턴병 환자에서 상기 숙식산 탈수소 효소를 증가시키기 위한, 헌팅턴병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0050] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 선조체에서 Iba-1, OX-42, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2 및 iNOS의 생성 또는 발현이 억제된 환자에서 상기 Iba-1, OX-42, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2 및 iNOS의 생성 또는 발현을 증가시키기 위한, 헌팅턴병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0051] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 선조체에서 Keap1의 생성 또는 발현이 증가된 환자에서 Keap1의 생성 또는 발현을 억제하고, Nrf2, NQO1, GCLs 및 HO-1으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 생성 또는 발현을 증가시키기 위한, 헌팅턴병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0052] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 선조체에서 p-ERK, p-JNK, p-p38, NF-κB/p65 및 p-IκBα의 생성 또는 발현이 증가된 환자에서 상기 p-ERK, p-JNK, p-p38, NF-κB/p65 및 p-IκBα의 생성 또는 발현을 억제시키기 위한, 헌팅턴병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0053] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 선조체에서 EM48 및 활성형의 카스파제-3(cleaved caspase-3)의 생성 또는 발현이 증가된 환자에서 상기 EM48 및 활성형 카스파제-3의 생성 또는 발현을 억제시키기 위한, 헌팅턴병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0054] 본 발명에 있어서 상기 환자는 인간 또는 동물인 것일 수 있다.

[0056] **헌팅턴병 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물**

[0057] 본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 헌팅턴병(Huntington's disease) 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0059] 본 발명에서 사용되는 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐제, 환제, 액제, 분말 및 과립 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 통상의 기술분야에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 제조될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품 유래 성분을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 헌팅턴병 치료제의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0060] 또한, 본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 헌팅턴병(Huntington's disease) 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0062] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물 또는 건강식품 조성물에 있어서, 상기 헌팅턴병은 3-NPA에 의해 유발되는 것일 수 있고, 상기 3-NPA에 의한 신경 장애 및 선조체(striatum) 독성에 의해 유발되는 것일 수 있다. 상기 헌팅턴병은 헌팅턴 무도병(Huntington's chorea)을 포함하는 것일 수 있다.

[0063] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물 또는 건강식품 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 선조체에서 신경퇴화, 미토콘드리아 기능 장애, 세포사멸 증가, 아폽토시스, 미세아교세포 활성화, 염증 매개체의 발현 증가 및 행동장애로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 증상을 억제하는 것일 수 있다.

[0064] 본 발명의 일실시예에서는, 3-NPA에 의해 선조체에서 세포 사멸, 세포 손상, 미토콘드리아 기능장애, 아폽토시스, 미세아교세포의 침윤 및 활성화, 염증 인자, 행동장애(운동 조절 장애) 등이 유발되는 것을 확인하였고, 진토닌 처리시 이러한 증상들이 억제 및 개선되는 효과가 있으며, 3-NPA로 유도된 선조체의 독성으로부터 보호하는 효과가 있음을 확인하였다(실험예 2 내지 7 참조).

[0065] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물 또는 건강식품 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로의 활성화를 통하여 미세아교세포의 침윤 및 활성화를 억제함으로써 헌팅턴병 예방 또는 개선 효과를 나타내

는 것일 수 있다. 또한, 상기 진토닌은 NF-κB 및 MAPKs 신호 전달 경로를 억제하여 헌팅턴병 예방 또는 개선 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[0066] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로를 활성화시켜 NF-κB 및 MAPKs 신호 전달 경로를 억제함으로써 3-NPA에 의하여 유도된 선조체의 독성을 감소시키는 보호 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다(실험예 8 내지 9 참조).

[0067] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물 또는 건강식품 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 변형된 헌팅틴(mHTT)의 응집을 억제하는 것일 수 있다.

[0068] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로 활성화를 통해, 헌팅턴병의 시험관내 모델로서 STHdh 세포주에서 변형된 헌팅틴(mHTT) 응집체의 형성을 억제하고, AAVDJ-82Q 벡터에 감염된 헌팅턴병 마우스 모델에서 AAV로 매개된 인간 돌연변이형 HTT의 과발현에 의해 유도된 헌팅턴병-유사 선조체 독성, 운동 조절 장애 등 헌팅턴병 관련 증상을 완화시킬 수 있음을 확인하였다(실험예 10 내지 11 참조).

[0070] 본 발명에 따른 상기 건강기능식품 조성물 또는 건강식품 조성물은 헌팅턴병 예방 또는 개선 효과를 통해 관련 질환을 예방 또는 개선시키기 위한 목적으로 상기 진토닌을 식품, 음료 등의 건강기능식품 또는 건강식품에 첨가할 수 있다.

[0071] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명에 따른 진토닌을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품 및 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0072] 본 발명에 따른 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 상기 진토닌의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 및 건강기능식품 중의 상기 진토닌의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 유지를 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0073] 본 발명의 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명에 따른 진토닌을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트라이톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능성 식품 조성물 100 g당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0074] 상기 외에 본 발명에 따른 진토닌을 함유하는 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 천연 과일쥬스 및 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0075] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 유효물질을 함유하는 건강식품 및 건강기능식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0077] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 선조체에서 숙신산 탈수소 효소(succinate dehydrogenase)가 억제된 헌팅턴병 환자에서 상기 숙식산 탈수소 효소를 증가시키기 위한, 헌팅턴병 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0078] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 선조체에서 Iba-1, OX-42, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2 및 iNOS의 생성 또는 발현이 억제된 환자에서 상기 Iba-1, OX-42, IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2 및 iNOS의 생성 또는 발현을 증가시키기 위한, 헌팅턴병 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0079] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 선조체에서 Keap1의 생성 또는 발현이 증가된 환자에서 Keap1의 생성 또는 발현을 억제하고, Nrf2, NQO1, GCLs 및 HO-1으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 생성 또는 발현을 증가시키기 위한, 헌팅턴병 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0080] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 선조체에서 p-ERK, p-JNK, p-p38, NF-κB/p65 및 p-IκBα의 생성 또는 발현이 증가된 환자에서 상기 p-ERK, p-JNK, p-p38, NF-κB/p65 및 p-IκBα의 생성 또는 발현을 억제시키기 위한, 헌팅턴병 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0081] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 선조체에서 EM48 및 활성형의 카스파제-3(cleaved caspase-3)의 생성 또는 발현이 증가된 환자에서 상기 EM48 및 활성형 카스파제-3의 생성 또는 발현을 억제시키기 위한, 헌팅턴병 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0083] **3-NPA에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

[0084] 나아가, 본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 3-NPA에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0085] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 신경세포의 손상 및 사멸은 3-NPA에 의해 유도된 선조체(striatum) 독성에 의해 유발되는 것일 수 있다.

[0086] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 3-NPA에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸로 인한 질환을 예방 또는 치료하는 것일 수 있다. 이때, 상기 질환은 인지장애, 운동장애, 성격장애 또는 헌팅턴병을 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 헌팅턴병인 것일 수 있다.

[0087] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로를 활성화시켜 3-NPA에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것일 수 있다. 또한, 상기 진토닌은 NF-κB 및 MAPKs 신호 전달 경로를 억제하여 3-NPA에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[0088] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 3-NPA로 유도된 선조체 독성으로부터 보호하여, 세포 사멸, 세포 손상, 미토콘드리아 기능장애, 아폽토시스, 미세아교세포의 침윤 및 활성화, 염증 인자, 행동장애(운동 조절 장애) 등의 증상을 억제 및 개선시키는 효과가 있음을 확인하였다(실험예 2 내지 7 참조).

[0089] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 선조체에서 3-NPA에 의한 1차 세포사멸 및 미세아교세포 활성화에 의한 2차 세포사멸을 보호할 수 있음을 확인하였다(실험예 7 참조).

[0090] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로를 활성화시켜 NF-κB 및 MAPKs 신호 전달 경로를 억제함으로써 3-NPA-유도된 선조체의 독성을 감소시키는 보호 효과를 나타냄을 확인하였다(실험예 8 내지 9 참조).

[0091] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로 활성화를 통해, 헌팅턴병의 시험관내 모델로서 STHdh 세포주에서 변형된 헌팅틴(mHTT) 응집체의 형성을 억제하고, AAVDJ-82Q 벡터-감염된 헌팅턴병 마우스 모델에서 AAV로 매개된 변형된 헌팅틴(mHTT)의 과발현에 의해 유도된 헌팅턴병-유사 선조체 독성, 운동 조절 장애 등 헌팅턴병 관련 증상을 완화시킬 수 있음을 확인하였다(실험예 10 내지 11 참조).

[0093] 더 나아가, 본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 3-NPA에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0094] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 신경세포의 손상 및 사멸은 3-NPA에 의해 유도된 선조체(striatum) 독성에 의해 유발되는 것일 수 있다.

[0095] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 건강기능식품 조성물은 3-NPA에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸로

인한 질환을 예방 또는 개선시키는 것일 수 있다. 이때, 상기 질환은 인지장애, 운동장애, 성격장애 또는 헌팅턴병을 포함하는 것일 수 있고, 바람직하게는 헌팅턴병인 것일 수 있다.

[0096] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로를 활성화시켜 3-NPA에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 개선 효과를 나타내는 것일 수 있다. 또한, 상기 진토닌은 NF-κB 및 MAPKs 신호 전달 경로를 억제하여 3-NPA에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 개선 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[0097] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 3-NPA로 유도된 선조체 독성으로부터 보호하여, 세포 사멸, 세포 손상, 미토콘드리아 기능장애, 아폽토시스, 미세아교세포의 침윤 및 활성화, 염증 인자, 행동장애(운동 조절 장애) 등의 증상을 억제 및 개선시키는 효과가 있음을 확인하였다(실험예 2 내지 7 참조).

[0098] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 선조체에서 3-NPA에 의한 1차 세포사멸 및 미세아교세포 활성화에 의한 2차 세포사멸을 보호할 수 있음을 확인하였다(실험예 7 참조).

[0099] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로를 활성화시켜 NF-κB 및 MAPKs 신호 전달 경로를 억제함으로써 3-NPA-유도된 선조체의 독성을 감소시키는 보호 효과를 나타냄을 확인하였다(실험예 8 내지 9 참조).

[0100] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로 활성화를 통해, 헌팅턴병의 시험관내 모델로서 STHdh 세포주에서 변형된 헌팅틴(mHTT) 응집체의 형성을 억제하고, AAVDJ-82Q 벡터-감염된 헌팅턴병 마우스 모델에서 AAV로 매개된 인간 변형된 헌팅틴(mHTT)의 과발현에 의해 유도된 헌팅턴병-유사 선조체 독성, 운동 조절 장애 등 헌팅턴병 관련 증상을 완화시킬 수 있음을 확인하였다(실험예 10 내지 11 참조).

[0102] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0104] **<실시예 1> 진토닌의 준비**

[0105] 진토닌(gintonin, GT)은 Choi et al.(Front. Pharmacol. 6;245, 2015)의 방법에 따라 제조되었다. 요약하면, 4년근 인삼(한국 인삼 공사, 대전, 대한민국) 1 kg을 작은 조각(> 3 mm)으로 분쇄하고, 80℃에서 8시간 동안 70% 발효된 에탄올로 8회 환류시켜 추출물을 수득하였다. 상기 추출물을 농축하고, 농축물(340 g)을 증류된 냉수에 1:10의 비율로 용해시키고, 4℃에서 24-96시간 동안 보관하면서 물 침전법을 실시하였다. 인삼의 에탄올 추출물의 물 분획(물 침전법)에 의해 수득된 상층액 및 침전물 분획을 원심분리(3000 rpm, 20분)를 통해 분리하였고, 침전물을 동결 건조시켜 진토닌을 수득하였다.

[0106] 진토닌은 탄수화물, 지질 및 인삼 단백질로 구성되며, 진토닌에서 총 탄수화물, 지질 및 단백질의 비율은 각각 약 30%, 20.2% 및 30.3%였고, 기타 다른 미량 성분을 포함한다.

[0107] LC-MS/MS 분석에 기초한 진토닌의 지질 조성은 다음과 같다: 지방산(7.53% 리놀레산, 2.82% 팔미트산 및 1.46% 올레산); 리소인지질 및 인지질(0.60%); 및 인산(1.75%). 진토닌의 총 지질 함량은 약 14.2%이다. 정성 분석 결과 진토닌은 또한 다이아실글리세롤과 트리아실글리세롤을 함유하고 있는 것으로 나타났다.

[0109] **<실험예 1> 동물 모델의 준비 및 실험 방법**

[0110] 1-1. 실험 동물 준비

[0111] 실험 전 1주일 전부터 수컷 성체 C57BL/6NTac 마우스(Narabiotec Co., Ltd., Seoul, Republic of Korea; 체중 23-25 g; 종자 마우스는 Taconic Biosciences Inc.(Cambridge, IN, USA)에서 유래함)를 12시간의 명암 주기(08:00~20:00에는 밝음)로 23±2℃의 온도를 유지하는 사육 시설에서 음식과 물을 자유롭게 제공하며 적응시켰다.

[0113] 1-2. 윤리적 승인

[0114] 모든 실험 절차는 경희대학교 동물실험윤리위원회(KHUASP(SE)-14-040)에 의해 검토 및 승인되었다. 이 과정에서 실험실 동물의 적절한 무작위 배정과 자료 취급은 신경계 질환의 전임상 모델에 대한 NIH 워크샵의 최근 권고에 준거하여 수행되었다(Landis et al., 2012, Nature 490, 187-191).

[0116] 1-3. 3-NPA 및 진토닌의 처리

[0117] 준비된 실험 동물에 3-니트로프로피오닉산(3-nitropropionic acid, 3-NPA) 및 진토닌(gintonin, GT)을 하기와 같은 방법으로 처리하였다.

[0118] 먼저, 3-NPA는 기존에 알려져 있는 방법을 따라 제조 및 처리되었다. 요약하면, 3-NPA(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)를 식염수(50 mg/ml 농도, pH 7.4)에 용해시키고, 0.2-μm 필터를 통과시킨 후, 2일 동안 12시간 간격으로(오전 8시 30분 및 오후 8시 30분) 첫째날 60 mg/kg, 둘째날 80 mg/kg씩 매일 2회(즉, 60-60-80-80 용량 요법) 복강 내(intraperitoneally, i.p.)로 투여하였다(도 1).

[0119] 진토닌의 경우, 식염수에 용해시켜 25, 50 또는 100 mg/kg의 용량으로 경구 투여(per oral, p.o.)하였다. 진토닌의 전처리(pre-treatment) 및 동시처리(co-treatment)는 각각 최초 3-NPA 중독 전, 5일 전 및 1시간 전부터 매일 투여하는 것으로 정의되었다. 발병처리(onset-treatment) 및 진행처리(progression-treatment)는 각각 신경 손상이 처음 관찰되는 시점(세번째 3-NPA 중독 1시간 전; 평균 점수, 0-1)과 신경 손상이 발병 단계 후에 증가하는 시점(네번째(마지막) 3-NPA 중독 1시간 전; 평균 점수, 2-4)으로 정의되었다(도 1).

[0120] 각 실험은 동일한 프로토콜을 사용하여 3회 이상 반복하였으며, 신경 손상의 중증도는 모든 투여 직전 및 실험 종료시 평가되었다.

[0122] 1-4. 실험군

[0123] 실험은 하기 5가지 그룹으로 나누어진 마우스를 사용하여 수행되었다.

[0124] (1) 3-NPA 중독에서 진토닌(GT)의 가장 효과적인 농도를 선택하기 위해, 마우스를 sham, 3-NPA 및 3-NPA+GT(25, 50 및 100 mg/kg/day로 동시처리, p.o.) 그룹으로 무작위로 나누었다.

[0125] (2) 3-NPA 중독에서 진토닌의 치료 시간대(therapeutic time-window)를 조사하기 위해, 마우스를 sham, 3-NPA 및 3-NPA+GT(100 mg/kg/day로 전처리, 동시처리, 발병처리 및 진행처리) 그룹으로 무작위로 나누었다.

[0126] (3) 진토닌의 조직 병리학적 및 분자 메카니즘를 조사하기 위해, 마우스를 무작위로 sham, 3-NPA, 3-NPA+GT(100 mg/kg/day으로 전처리, p.o.) 및 GT 그룹으로 나누었다.

[0127] (4) 3-NPA 중독에서 진토닌의 급성 보호 효과를 조사하기 위해, 마우스를 무작위로 sham, 3-NPA, 3-NPA+GT(100 mg/kg/day으로 전처리, p.o.) 및 GT 그룹으로 나누었다.

[0128] (5) 헌팅턴병의 시험관내 모델로서 STHdh 세포에서 진토닌의 효과를 조사하기 위해, $STHdh^{Q7/Q7}$(WT 세포) 및 $STHdh^{Q111/Q111}$ 세포를 사용하여 정상, 과산화수소(H_2O_2) 및 H_2O_2+GT(0.1, 1 또는 10ul/ml) 그룹으로 나누었다.

[0129] (6) 헌팅턴병의 AAV 벡터 감염 마우스 모델에서 진토닌의 효과를 조사하기 위해, N171-18Q 야생형 HTT(18Q; WT 벡터) 및 N171-82Q 돌연변이형 HTT(82Q)를 함유하는 AAV 벡터 혈청형 DJ(AAV-DJ) 마우스를 sham, AAV-DJ-18Q 및 AAV-DJ-82Q 그룹으로 무작위로 나누었다.

[0131] 1-5. 3-NPA 중독 후 반 정량 행동 평가

[0132] 마우스에서 3-NPA에 의해 나타나는 특이적인 신경학적인 행동변화를 매일 1회씩 관찰하여 신경학적 손상 정도를 평가하였다. 행동변화의 기준은 (1)활동성 감소, (2)뒷다리 움켜쥠, (3)뒷다리 근육긴장이상, (4)흉추 후만 자세 및 (5)정상자세로의 회복력으로 구분하였으며, 각각은 정도에 따라서 0, 1 및 2 단계로 나누어 측정하였고, 각 지표의 단계를 더하여(총 10단계) 비교하였다. 점수가 높을수록 신경학적 행동 증상이 심함을 뜻한다. 또한, 생존율과 몸무게는 3-NPA를 마지막(5회째)으로 투여하고 24시간 후 확인하였다.

[0134] 1-6. AAV 벡터 생성

[0135] AAV-HTT-N171-82Q를 생성하기 위해, pBluescript 클로닝 벡터에 HD-N171-82Q cDNA 구조물을 사용하여 헌팅턴병의 N171-82Q 마우스 모델을 제작했다. David R. Borchelt 박사(Santa Fe Health Care Alzheimer's Disease Research Center, University of Florida)로부터 인간 HTT과 82개의 CAG 유전자 반복(HTT-N171-82Q)을 가진 인간 HTT의 처음 3개의 엑손(171개 아미노산)을 가진 구조물을 제공받아 사용하였다. HTT-N171-82Q 구조물을 EcoRI/XhoI로 이중 분해하고 AAV-MCS 발현 벡터(Cell Biolabs, Inc. cat# VPK-410)의 다중 클로닝 부위에 삽입하였다. 상기 벡터의 발현은 거대세포바이러스(cytomegalovirus, CMV) 전초기(immediate early) 인핸서 및 프로모터 하에서 KIST Virus Facility (http://virus.kist.re.kr)에 의해 이전에 기술된 방법(Jang et al., 2018, Front Cell Neurosci. 12, 157)에 따라 생성되었다. 대조군 벡터(control vector)로서, 18Q CAG 반복을 포함하는 HTT cDNA가 사용되었다. 생산 역가(production titer)는 AAV-DJ-HTT-N171-82Q의 경우 1.3×10^{13} genome copies/ml (GC/ml)이고 AAV-DJ-HTT-N171-18Q의 경우 1.6×10^{13} GC/ml였다.

[0137] 1-7. 정위 뇌 수술에 의한 AAV 벡터 감염

[0138] AAV-DJ 벡터 감염은 종래에 알려진 방법(Jang et al., 2018, Front Cell Neurosci. 12, 157)에 따라 정위 뇌 수술을 통해 수행되었다. 요약하면, 마우스(4주령; 체중 14 내지 15 g)를 깊이 마취(2 내지 3% 이소플루란, 60% O_2, 40% N_2O)하고, 정위 장치(myNeuroLab, St. Louis, MO, USA)에 고정했다. 2 μl의 AAV-DJ-18Q(7.9×10^{12} GC/ml) 및 AAV-DJ-82Q(1.23×10^{12} GC/ml)를 30게이지의 날카로운 팁이 장착된 해밀턴 주사기(Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)를 사용하여 양측 선조체의 중간 관상면(mid-coronal)에 주입하여 AAV-DJ 벡터의 감염을 유발하였다.

[0140] 1-8. AAV 벡터 감염 후 행동 평가

[0141] AAV-DJ-82Q 벡터의 주입이 신경 손상(운동 조절 능력 감소 및 불균형)를 유발하는지 여부를 조사하기 위해 AAV-DJ-82Q 및 AAV-DJ-18Q 벡터 주입 전 1일부터 10주 동안 매주 체중을 측정하고 폴(pole) 및 로타로드(rota-rod) 행동 테스트를 수행했다.

[0143] 1-9. STHdh 세포 배양

[0144] STHdh 세포주의 야생형($STHdh^{Q7/Q7}$) 및 돌연변이형($STHdh^{Q111/Q111}$) 세포(조건적으로 불멸화된 전구 선조체 신경세포의 세포주)를 33℃의 5% CO_2 인큐베이터에서 CT-75cm^2 플라스크 내 10% FBS 및 1% P/S이 보충된 DMEM 및 1% G418(제네티신)에서 배양하였다. 7일 후, 이들 세포를 트립신을 사용하여 세포 배양 플라스크로부터 분리하고, 분석을 위해 2.5×10^5 세포/웰의 밀도로 24-웰플레이트에 시딩(seeding) 하였다.

[0145] 한편, Nrf2 siRNA는 제조사의 프로토콜에 따라 siRNA 형질 감염 시약(Santa Cruz)으로 형질 감염시켰다. 간략하게, 60% 합류를 갖는 $STHdh^{Q111/Q111}$ 세포를 6시간 동안 50 nM의 Nrf2 siRNA 또는 50 nM의 대조군 siRNA(scRNA) 이중체(duplex)/형질 감염 시약 믹스(transfection reagent mix) 및/또는 진토닌(1 μg/ml)을 함유하는 무혈청 배지와 함께 배양하였다. 형질 감염 24시간 후에, 배지를 완전 배지로 변경하고 세포를 24시간 동안 추가 배양하였다. 이어서, 이들 세포를 5시간 동안 H_2O_2(200 μM)로 추가 처리하거나 처리를 생략하였다. 또한 Nrf2 siRNA 대신에, 50 μM Nrf2 억제제(ML385)를 12시간 동안 처리하였다.

[0147] 1-10. 조직 병리학적 분석을 위한 냉동 절편 준비

[0148] 3-NPA 중독 후 선조체의 조직 병리학적 변화는 프로토콜(Jang and Cho, 2016, Mol. Neurobiol. 53, 2619-2635; Jang et al., 2014, Brain Behav. Immun. 38, 151-165; Jang et al., 2013, Evidence Based Complement

Altern. Med. 2013, 237-207)에 의하여 평가되었다. 구체적인 방법은 다음과 같다.

[0149] 세번째 3-NPA 중독 후 12시간 및 마지막(네번째) 3-NPA 중독 후 24시간에 마우스(sham, n=5; 3-NPA, n=8; 3-NPA+GT25, n=8; 3-NPA+GT50, n=8; 3-NPA+GT100, n=8)를 디에틸에테르로 마취시킨 다음에, 0.1 M 포스페이트 완충액(PB, pH 7.4)과 차가운 4% 파라포름알데히드액을 심장 내로 관류하였다. 마우스 뇌 지도(mouse brain atlas; Franklin and Paxinos, 2008)를 참고하고, 동결절편기(CM3050S; Leica, Wetzlar, Germany)를 활용하여 선조체(striatum)를 포함하는 뇌의 부분을 관상 절편(30 μm 두께)으로 제작하고, 0.1 M 포스페이트 완충액에 조직 절편을 수득하였다. 평균 300 μm 당 선조체 조직 절편(210 μm 간격)을 크레실 바이올렛(cresyl violet) 염료로 염색하였다.

[0151] 1-11. SDH 활성도 분석

[0152] 뇌를 고정하지않고 빠르게 동결시킨 후에 선조체를 포함한 부위의 냉동절편(10㎛ 두께)을 제작하고(sham, n=3; 3-NPA, n=5; 3-NPA+GT100, n=5; 및 GT100, n=3), 기존에 알려진 방법에 따라(Jang and Cho, 2016, Mol. Neurobiol. 53, 2619-2635; Jang et al., 2014, Brain Behav. Immun. 38, 151-165; Jang et al., 2013, Evidence Based Complement Altern. Med. 2013, 237-207) SDH 활성도를 평가하였다. SDH 발현 정도의 정량은 NIH Image J 프로그램(Brouillet et al., 1998, J. Neurochem. 70, 794-805)을 사용하여 대뇌 피질 및 가쪽 선조체에서 측정되었다. 측정 영역(regions of interest, ROI)을 디지털화한 이미지로 관찰하여, ROI에서 각 절편의 색상 추출은 채도 값으로 계산하여 SDH 활성도(sham 대비 %)를 분석하였다.

[0154] 1-12. MitoSOX 활동 분석

[0155] MitoSOX 활성은 기존의 방법(Wojtala et al., 2014, Methods Enzymol. 542, 243-262)에 따라 측정하였다. 요약하면, 각 그룹(sham, n=3; 3-NPA, n=5; 3-NPA+GT100, n=5; 및 GT100, n=3)으로부터의 조직 절편을 자유 부유법(free floating)으로 10분 동안 배양하여, 프로브가 세포에 들어가 37℃의 미토콘드리아 내에서 5 mM MitoSOX Red(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 함유하는 0.5 ml의 측정 완충액 중에서 반응을 시작하도록 하였다. 이어서, 조직 절편을 PBS로 2회 세척하고 커버글라스로 덮었다.

[0157] 1-13. 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제 dUTP 닉 엔드 라벨링(TUNEL)

[0158] 3-NPA 중독 후 선조체에서의 아폽토시스 수준을 평가하기 위해, 말단 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제 dUTP 닉 엔드 라벨링(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL)을 실시하였다.

[0159] 구체적으로, 각 그룹(sham, n=3; 3-NPA, n=5; 3-NPA+GT100, n=5; 및 GT100, n=3)으로부터 뇌 조직 절편(30 μm 두께)을 취하여 ApopTag® Peroxidase In situ Apoptosis Detection Kit(S7100)(Millipore, Billerica, MA, USA)를 사용하여 아폽토시스의 정도를 평가하였다.

[0161] 1-14. 플루오로 제이드 C (FJC) 염색

[0162] 플루오로 제이드 C(Fluoro-Jade C, FJC) 염색은 기존의 방법(Schmued et al., 1997, Brain Res. 751, 37-46)에 따라 수행되었다. 구체적인 방법은 다음과 같다. 각 그룹으로부터의 수득된 자유 부유 상태의 절편을 2분 동안 70% 에탄올에 침지하고, 2분 동안 증류수(DW)로 세척하였다. 이어서, 절편을 0.06% 과망간산칼륨 용액에서 20분 동안 배양하고, 증류수로 세척하고, 진탕기에서 10분 동안 0.001% FJC 염료(Millipore) 용액에 침지하였다. 그 다음 절편을 증류수로 3분 동안 세척하고, 30분 동안 공기에서 건조하고, 100% 자일렌(xylene)에 2분 동안 침지한 다음, DPX mounting medium(Sigma-Aldrich)과 함께 봉입(coverslipped)하였다.

[0164] 1-15. 면역 조직 화학 분석

[0165] 면역 조직 화학적 평가는 기존의 방법(Jang and Cho, 2016, Mol. Neurobiol. 53, 2619-2635; Jang et al., 2014, Brain Behav. Immun. 38, 151-165; Jang et al., 2013, Evidence Based Complement Altern. Med. 2013,

237-207)과 같이 수행되었다. 구체적인 방법은 다음과 같다.

[0166] 각 그룹(sham, n=5; 3-NPA, n=8; 3-NPA+GT100, n=8; 및 GT100, n=5)의 뇌 조직 절편(30 μm 두께)을 토끼 항-이온화된 칼슘-결합 어댑터 분자 1(rabbit anti-Iba-1; 1:2,000; WAKO, Chuo-Ku, Japan) 및 토끼 항-아교 섬유성 산성 단백질(rabbit anti-GFAP; 1:5,000; DACO, Carpinteria, CA, USA)과 함께 배양하였다. 각 절편을 비오틴화된 토끼/마우스 IgG 항체(biotinylated rabbit/mouse; 1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA USA)와 배양하고, 아비딘-바이오티닐화된 서양고추냉이 퍼옥시다제-복합체(abidin-biotinylated horseradish peroxidase complex; 1:200; Vector Laboratories)와 함께 배양한 다음, 3,3'-다이아미노-벤지딘(3,3'-diamino-benzidine)으로 염색하여 시각화하였다. 면역 염색된 절편을 DP70 이미지 분석 시스템(Olympus)을 사용하여 분석하였다.

[0167] 또한, 면역 형광 염색은 기존의 방법(Lee et al., 2016a)과 같이 수행하였다. 구체적으로, 냉동된 선조체 조직 절편(각 그룹별 뇌당 n=5)을 일차 항체와 함께 배양한 다음 이차 항체의 혼합물로 FJC 염료(Millipore)로 염색하고, 공초점 이미징 시스템(LSM 5 PASCAL; Carl Zeiss, Germany)으로 분석하였다. 일차 항체는 토끼 항-Nrf2(rabbit-anti-Nrf2; 1:200; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 마우스 항-햄 옥시게나제-1(mouse anti-HO-1; 1:1000; Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) 및 마우스 항-HTT(mouse anti-HTT; 1:400; catalog MAB5374, clone EM48; Millipore) 항체를 포함한다.

[0169] 1-16. 조직 절편의 이미지 분석

[0170] 조직 절편의 염색된 부분을 DP70 이미지 분석 시스템(Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 캡처하고 NIH 이미지 J 프로그램(http://rsbweb.nih.gov/ij/)을 사용하여 분석했다. 병변의 평균 면적은 기존 문헌(Jang and Cho, 2016, Mol. Neurobiol. 53, 2619-2635; Jang et al., 2014, Brain Behav. Immun. 38, 151-165; Jang et al., 2013, Evidence Based Complement Altern. Med. 2013, 237-207)과 같이 선조체의 전체 면적에 대한 상대적인 비율로 측정되었다. 공초점 이미징 시스템(LSM 5 PASCAL; Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 각 조직 절편의 병변 부위를 분석하였다.

[0172] 1-17. 웨스턴 블롯 분석

[0173] 3-NPA 중독 후 단백질 발현을 조사하기 위해 기존 문헌(Jang and Cho, 2016, Mol. Neurobiol. 53, 2619-2635; Jang et al., 2014, Brain Behav. Immun. 38, 151-165; Jang et al., 2013, Evidence Based Complement Altern. Med. 2013, 237-207; Lee et al., 2016, Mol. Neurobiol. 53, 1419-1445)과 같이 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 구체적인 방법은 다음과 같다.

[0174] 마지막 3-NPA 중독 후 24시간에, 마우스(그룹당 n=3)를 마취하고, 선조체를 채취하여 용해 완충제(lysis buffer)에 담그었다. 각 선조체로부터의 단백질(30 μg)을 폴리비닐리덴 플루오라이드(polyvinylidene fluoride; PVDF) 막으로 옮기고 블로킹(blocking)하였다. PVDF 막은 마우스 항-β-III-튜불린 (mouse anti-β-III-tubulin; 1:2,000; Sigma-Aldrich), 토끼 항-활성형 카스파제-3(rabbit anti-cleaved caspase-3; 1:1,000; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), 토끼 항-Iba-1(rabbit anti-Iba-1; 1:1,000; WAKO), 마우스 항-GFAP(mouse anti-GFAP; 1:500; Millipore), 마우스 항-유도성 산화질소 합성 효소(mouse anti-iNOS; 1:200; Santa Cruz Biotechnology), 토끼 항-Nrf2(rabbit-anti-Nrf2; 1:500; Santa Cruz Biotechnology), 마우스 항-HO-1(mouse anti-HO-1; 1:1,000; Enzo Life Sciences), 토끼-항-ap-JNK/p-ERK/p-p38(rabbit-anti-p-JNK/p-ERK/p-p38; 1:1,000; Cell Signaling Technology), 토끼 항-NF-κB/p65(rabbit-anti-NF-κB/p65; 1:1,000; Cell Signaling Technology) 및 토끼 항-p-IκBα(rabbit-anti-p-IκBα; 1:1,000; Cell Signaling Technology)과 마우스 항-HTT(mouse anti-HTT; 1:400; catalog MAB5374, clone EM48; Millipore) 항체로 프로브되었다. 이어서 서양고추냉이 퍼옥시다제(HRP)가 접합된 이차 항체와 배양하고, enhanced chemiluminescence(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 밴드를 확인하였다. 항체 밴드 신호의 표준화를 위해, 막을 스트리핑(stripping)하고, 마우스 항-글리세르알데히드 3-포스페이트 탈수소효소(mouse anti-GAPDH; 1:10,000; Cell Signaling Technology)로 재확인하였다. 웨스턴 블롯을 3회 수행한 후, 각 밴드의 밀도는 Photoshop CS2 프로그램(Adobe, San Jose, CA, USA)을 사용하여 염색된 밴드에 바로 인접한 필름 영역에서 배경 값을 뺀 수치 값으로 변환하였다. 단백질 발현 수준은 각 샘플 단백질을 GAPDH에 대한 비율(%)로 정량화하였다.

[0176] 1-18. 실시간 중합 효소 연쇄 반응 (PCR) 분석

[0177] 염증 매개체의 mRNA 수준을 조사하기 위해 기존 문헌(Jang and Cho, 2016, Mol. Neurobiol. 53, 2619-2635, Mol. Neurobiol. 53, 2619-2635; Jang et al., 2014, Brain Behav. Immun. 38, 151-165, Brain Behav. Immun. 38, 151-165; Jang et al., 2013, Evidence Based Complement Altern. Med. 2013, 237-207, Evidence Based Complement Altern. Med. 2013, 237-207; Lee et al., 2016, Mol. Neurobiol. 53, 1419-1445)과 같이 실시간 (Real-time) PCR(polymerase chain reaction) 분석을 수행하였다. 구체적인 방법은 다음과 같다.

[0178] 마지막 3-NPA 중독 후 12시간에, 마우스(그룹당 n=3)를 마취하고, 선조체를 분리하여 동결시켰다. SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 실시간 PCR 분석을 수행하였다. 각각 10 μM 프라이머, 4 μl cDNA 및 5 μl SYBR Green PCR Master Mix를 함유하는 총 부피 10 μl의 용액으로 반응을 2회씩 수행하였다. 각 표적 유전자의 mRNA 수준은 GAPDH mRNA의 수준으로 표준화하였다. 폴드-유도는 기존의 방법(Livak and Schmittgen, 2001, Methods 25, 402-408)과 같이 2-ΔΔCT 방법을 사용하여 계산되었다. 모든 실시간 PCR 실험은 3회 수행되었다. 하기 표 1은 PCR 분석에 사용한 프라이머(primer)의 서열 정보이다.

표 1

[0179]

	Forward primer(5´→3´)	Reverse primer(5´→3´)
OX-42	GAC CGG TGC AGG ATC ATA CAG	CCT TTC GTC CGC TTC AGA GT
IL-1β	TTG TGG CTG TGG AGA AGC TGT	AAC GTC ACA CAC CAG CAG GTT
IL-6	TCC ATC CAG TTG CCT TCT TGG	CCA CGA TTT CCC AGA GAA CAT G
TNF-α	AGC AAA CCA CCA AGT GGA GGA	GCT GGC ACC ACT AGT TGG TTG T
COX-2	CAG TAT CAG AAC CGC ATT GCC	GAG CAA GTC CGT GTT CAA GGA
iNOS	GGC AAA CCC AAG GTC TAC GTT	TCG CTC AAG TTC AGC TTG GT
Keap1	GAT CGG CTG CAC TGA ACT G	GGA CTC GCA GCG TAC GTT
Nrf2	TCT CCT CGC TGG AAA AAG AA	AAT GTG CTG GCT GTG CTT TA
NQO1	CAT TCT GAA AGG CTG GTT TGA	CTA GCT TTG ATC TGG TTG TCA G
GCLs	ACA AGC ACC CCC GCT TCG GT	CTC CAG GCC TCT CTC CTC CC
HO-1	CCT GGA GCA GGA CAT GGC	AAT CAT CCC TTG CAC GCC
GAPDH	AGG TCA TCC CAG AGC TGA ACG	CAC CCT GTT GCT GTA GCC GTA T
β-Ⅲ-tubulin	CTC AGG GGC CTT TGG ACA TC	CAG GCA GTC GCA GTT TTC AC
Apaf-1	TCT GAT GCT GCG CAA ACA C	CAT CCT GCT CTT TTG CGA CTT C
Cleaved caspase 3	TGT CAT CTC GCT CTG GTA CG	AAA TGA CCC CTT CAT CAC CA
Actin	CTG TCT GGC GGC ACC ACC AT	GCA ACT AAG TCA TAG TCC GC

[0181] 1-19. 통계 분석

[0182] Windows용 SPSS 21.0 패키지 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. 스튜던트 t-테스트를 사용하여 2-표본 비교를 수행하고 사후 테스트와 함께 양방향 ANOVA를 사용하여 다중 비교를 수행하였다. 모든 데이터는 평균±S.E.M.로 나타내었고, 특별히 명시하지 않는 한 통계적 차이는 5% 수준에서 인정된다 (#p<0.05 및 ##p< 0.01는 sham 그룹 대비; *p<0.05 및 **p<0.01는 3-NPA 그룹 대비로 나타내었다).

[0184] **<실험예 2> 진토닌 동시 처리에 따른 3-NPA-유도된 신경학적 행동 및 선조체 세포 사멸에 대한 진토닌의 보호 효과**

[0185] 진토닌(GT)이 3-NPA에 중독된 신경 장애에 유익한 영향을 미치는지 여부를 조사하고 진토닌의 유효량을 결정하기 위해, 마우스를 최초의 3-NPA 중독 1시간 전부터 매일 1회 GT(25, 50, 및 100 mg/kg/day)로 경구투여(동시 처리)하였다(도 2A-C).

[0186] 그 결과, 실험 종료시(마지막(4번째) 3-NPA 중독(60-60-80-80 mg/kg) 24시간 후), 3-NPA 그룹의 모든 마우스는 뒷다리를 움켜잡는 행동(clasping), 자유롭게 움직이는 환경에서의 일반 활동 감소, 뒷다리 긴장, 후만 자세 및 기타 자세 문제에 대한 불균형 조정 등 심각한 신경학적 손상을 나타냈고, 이에 따라 신경학적 점수

(neurological score)가 8.2±0.6로 나타났다. 반면에, 3-NPA+GT 그룹의 마우스는 GT 25, 50, 및 100 mg/kg 처리시 각각 7.0±0.7, 6.0±0.4 및 5.1±0.3으로 3-NPA 그룹과 비교하여 용량 의존적으로 각각 신경학적 점수를 현저하게 감소시켰다(도 2A).

[0187] 실험 종료시, 3-NPA 그룹의 마우스는 50.0%의 생존율을 나타내었고, 3-NPA+GT 그룹의 마우스는 GT 25, 50 및 100 mg/kg 처리 농도에서 각각 60.0%, 70.0% 및 70.0%으로 용량 의존적으로 더 나은 생존율을 나타냈다(도 2B).

[0188] 또한, 3-NPA 그룹의 평균 체중은 sham 그룹(24.8±1.2g)과 비교하여 19.1±1.4g으로 감소되었고, 이러한 체중 손실은 GT 처리(100 mg/kg)에 의해 22.4±1.2g으로 상당히 개선되었다(도 2C).

[0189] 상기와 같은 결과로부터 GT(100 mg/kg/day)의 전처리가 3-NPA-유도된 신경학적 손상에 대해 가장 효과적임을 확인하였다.

[0191] **<실험예 3> 진토닌의 사전, 동시, 발병 및 진행 치료 시간대에 따른 효과**

[0192] 3-NPA-중독된 신경학적 손상에 대한 진토닌(GT)의 치료 시간대를 조사하기 위해, 본 발명자들은 마우스에 진토닌을 경구로 전처리, 동시처리, 발병처리 및 진행처리하였으며, 이때 진토닌의 처리 농도는 상기 실험예에서 25 및 50 mg/kg/day보다 더 효과적으로 나타난 100 mg/kg/day로 하였다(도 3A 내지 도 3C).

[0193] 진토닌 전처리, 동시처리 및 발병처리 그룹에서 관찰된 신경학적 점수는 각각 4.0±0.8, 5.0±1.2 및 7.0±0.4로, 3-NPA 그룹(8.6±0.9)과 비교하여 용량의존적으로 유의하게 낮았다(도 3A).

[0194] 3-NPA 그룹의 생존율은 실험종료시 50%였으며 진토닌 전처리(80%), 동시처리(60%) 및 발병처리(60%)에 의해 시간에 따라 증가했다(도 3B).

[0195] 또한, 진토닌의 전처리 및 동시처리는 3-NPA 중독에 의해 감소된 평균 체중을 상당히 개선시켰다(도 3C).

[0196] 이러한 결과로부터, 진토닌의 전처리가 넓은 치료 시간대를 갖는다는 것을 확인하였다.

[0198] **<실험예 4> 진토닌의 선조체 세포 사멸 억제 효과**

[0199] 진토닌(GT) 100 mg/kg/day의 전처리가 3-NPA로 유도된 신경학적 손상의 심각성을 개선시키는데 가장 효과적이었기 때문에, 동일한 프로토콜을 사용하여 신경 보호 효과가 선조체 세포 사멸의 감소와 관련이 있는지 여부를 추가로 조사하였다. 선조체 세포 사멸 수준은 크레실 바이올렛(Cresyl violet) 염색을 사용하여 마지막 3-NPA 중독 24시간 후에 측정되었다.

[0200] 도 4A는 sham, 3-NPA, 3-NPA+GT(25, 50, 100 mg/kg/day) 및 GT 단독(100 mg/kg/day) 각각의 그룹에 대한 대표적인 선조체 이미지를 나타낸 것이다. 선조체 병변은 상대적으로 창백하게 착색되었다.

[0201] 3-NPA 그룹에서 생존한 생쥐의 66.7%(n=4/6)는 좌우대칭성 선조체 병변을 갖는 반면, 50 및 100 mg/kg/day의 진토닌으로 전처리된 그룹은 각각 50.0%(n=4/8) 및 33.3%(n=3/9)로 감소되었다(도 4B).

[0202] 3-NPA 그룹의 평균 병변 면적은 전체 선조체에 대해 79.8±4.9%를 구성하는 반면, 3-NPA+GT 그룹은 진토닌 50 및 100 mg/kg/day 처리에서 각각 53.8±3.5% 및 39.8±4.0%로 크게 감소했다(도 4C).

[0203] 또한, 선조체 신경세포에 대한 특이적 마커인 β-III-튜불린 단백질 발현은 sham 그룹과 비교하여 3-NPA 그룹에서 유의하게 감소된 반면, 진토닌의 전처리(100 mg/kg/day)에 의해 발현 감소가 유의하게 억제되었다(도 4D). 진토닌 자체는 신경세포 사멸 및 β-III-튜불린 단백질 발현에 영향을 미치지 않았다.

[0204] 이러한 결과는 진토닌의 전처리가 3-NPA-유도된 선조체 손상을 완화시킬 수 있음을 의미한다.

[0206] **<실험예 5> 3-NPA-유도 선조체에서의 미토콘드리아 기능 장애 및 아폽토시스에 대한 진토닌의 보호 효과**

[0207] 3-NPA는 선조체 내부 미토콘드리아 막에 위치한 주요 효소인 SDH를 비가역적으로 억제하기 때문에 숙시네이트(succinate)를 푸마레이트(fumarate)로 전환시키는 역할을 한다. 이에 따라, 본 발명자들은 고정되지 않은 동결된 선조체 부위의 조직화학적 분석을 통해 진토닌(GT)이 마지막 3-NPA-중독후 24시간 동안 SDH 활성의 감소를 차단할 수 있는지 조사하였다.

[0208] SDH 활성의 강도는 sham 그룹(95.6±3.6%)에 비해 3-NPA 그룹(54.6±3.8%)의 선조체에서 현저히 감소한 반면, 감소된 SDH 활성은 GT(72.1±4.8%)의 전처리에 의해 크게 회복되었다(도 5A 내지 도 5E).

[0209] 또한, 3-NPA-유도 미토콘드리아 섭동(perturbation)은 SDH 활성의 감소(depletion)를 통해 활성산소종(ROS) 생산을 증가시키므로, MitoSOX 염색을 사용하여 ROS 생성을 측정했다.

[0210] 도 5F 내지 도3J에 나타난 바와 같이, MitoSOX의 강도는 sham 그룹(100±4.8%) 대비 3-NPA 그룹(286.4±9%)의 선조체에서 증가한 반면, 이러한 MitoSOX 강도의 증가는 진토닌(100 mg/kg/day)의 투여에 의해 186.8±10.3%로 억제되었다.

[0211] 한편, 3-NPA는 SDH 결핍과 선조체에서 ROS 생성을 통해 아폽토시스를 유발하기 때문에, 진토닌이 마지막 3-NPA 중독 24시간 후에 선조체에서 항-아폽토시스 효과가 있는지 여부를 조사했다 (도 5K 내지 도 5S).

[0212] TUNEL 염색(도 5K 내지 도 5N) 및 FJC 염색(도 5O 내지 도 5R)을 통해 분석된 아폽토시스 세포의 수는 3-NPA 군에서 선조체에서 현저히 증가한 반면, 이러한 증가는 진토닌 전처리(100 mg/kg/day)에 의해 크게 억제되는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 웨스턴 블롯 분석에 의해 분석된 활성형 카스파제-3의 발현 변화와 일치하였다(도 5S).

[0213] 한편, 진토닌 자체는 sham 그룹에서와 비교하여 선조체에서 SDH, MitoSOX 및 아폽토시스 작용을 유도하지 않았다(도 5A 내지 3S).

[0214] 결과적으로, 선조체에서의 미토콘드리아 기능 장애 및 아폽토시스에 대한 진토닌의 보호 활성이 3-NPA 중독에 의해 유발되는 신경학적 손상 및 선조체 독성 억제에 기여할 수 있음을 확인하였다.

[0216] **<실험예 6> 3-NPA 중독 후 선조체에서 미세아교세포의 침윤, 염증 및 급성 세포 사멸에 대한 진토닌의 억제 효과**

[0217] 신경계에 분포하는(residental) 미세아교세포는 헌팅턴병을 포함하는 신경계 질환 및 이들의 생체 내 모델의 병변으로 침윤된다(Block and Hong, 2007; Lobsiger and Cleveland, 2007). 따라서, 본 발명자들은 진토닌(GT)의 전처리가 마지막 3-NPA 중독 24시간 후에 면역 병리학적 증상을 조절하는지 여부를 조사하였다(도 6).

[0218] sham 그룹의 선조체에서 Iba-1(미세아교세포에 대한 마커)-면역 반응성(immunoreactive) 미세아교세포는 작은 세포체와 얇은 돌기를 갖는 휴지기 세포의 전형적인 형태를 나타내는 반면에, 3-NPA 그룹에서는 큰 세포체와 넓고 짧고 두꺼운 돌기를 가진 활성형의 형태를 나타냈다(도 6A 및 도 6B). 그러나, 3-NPA 그룹에 비해 진토닌의 전처리에 의해 Iba-1-면역 반응성 미세아교세포가 억제되었으며(도 6C), Iba-1 단백질 발현에 대한 면역 블롯 분석(도 6E) 및 OX-42 mRNA 발현에 대한 실시간 PCR 분석(도 6F)에서도 동일한 결과가 나타났다.

[0219] 성상세포(astrocyte)는 신경 퇴행성 장애의 병변 내 또는 주위에 죽은 세포 또는 침윤/활성화된 미세아교세포 계통의 산물에 의해 활성화 될 수 있다. 그러나, 상기 3-NPA-유도 급성 선조체 독성에서, GFAP-면역 반응성 성상세포는 sham 및 진토닌 그룹(도 7A 내지 도 7D)과 비교하여 선조체 병변 내 또는 주위에서 유의하게 활성화되지 않았고, GFAP의 mRNA 및 단백질 발현이 변하지 않았다(도 7E 내지 도 7G).

[0220] 침윤 및 활성화된 미세아교세포는 신경세포 생존을 위해 유해하거나 유익한 매개체를 방출할 수 있다. 실시간 PCR 분석을 사용하여 미세아교세포 활성화에 대한 진토닌의 억제 효과가 3-NPA 중독 후 선조에의 염증성 매개체의 발현에 관여하는 지의 여부를 조사하였다. 그 결과, sham 및 진토닌-단독 그룹의 선조체에서 IL-1β, IL-6, TNF-α, COX-2 및 iNOS mRNA의 발현은 거의 또는 전혀 검출되지 않았지만, 마지막 3-NPA 중독 후 12시간에 선조체에서는 이들의 발현이 유의하게 향상되었다(도 6G 내지 도 6K). Sham 그룹에 대한 이들 인자의 상대적 유도는 다음과 같았다: IL-1β(7.3배), IL-6(6.6배), TNF-α(4.5배), COX-2(8.0배) 및 iNOS(5.2 배). 반면, 3-NPA 그룹과 비교하여 GT(100 mg/kg/day)로 전처리에 의해 각 인자들의 발현 유도를 현저하게 억제하였다: IL-1β(54%), IL-6(67%), TNF-α(64%), COX-2(66%) 및 iNOS(65%)(도 6G 내지 도 6K). 이러한 결과와 마찬가지로, iNOS(대표적인 염증 매개체)의 단백질 발현 증가 역시 진토닌에 의해 현저하게 감소되었다(도 6L).

[0221] 한편, 진토닌만으로는 미세아교세포 침윤 및 염증을 증가 또는 감소시키지 않았다(도 6A-L).

[0222] 결과적으로, 진토닌의 항염증 효과가 3-NPA에 의해 유발된 선조체 독성 및 신경 기능 장애의 완화에 기여할 수 있음을 확인하였다.

[0224] **<실험예 7> 3-NPA 중독 후 선조체에서 급성 세포 사멸에 대한 진토닌의 억제 효과**

[0225] 선조체 신경세포는 1차적으로 3-NPA에 의해 손상되거나, 미세아교세포 활성화를 포함하는 일련의 세포 과정에 의해 2차적으로 손상될 수 있다. 따라서 두 세포 사멸 기전에 대한 진토닌(GT)의 효과를 구별하기 위해, 3차 3-NPA-중독 12시간 후에 선조체 신경세포 사멸과 미세아교세포 활성화 사이의 상관 관계를 추가로 조사하였다. 본 발명자들의 선행 연구에 따르면, 3-NPA-중독에 의한 1차 세포 사멸은 명백하게 관찰되었지만 미세아교세포 활성화는 초기 단계에서 명확하지 않았다.

[0226] FJC 염색에 의한 선조체에서의 조기 사멸 세포의 수는 3-NPA 그룹(19.7±0.9/striatal section)과 비교하여 3-NPA+GT 그룹(24.7±1.5/striatal section)에서 유의하게 감소되었다(도 8A 내지 도 8E). 3-NPA-중독에 의해 증가된 Iba-1-면역 반응의 강도는 3-NPA 및 3-NPA+GT 그룹간에 유의한 차이를 나타내지 않았다(도 8F 내지 도 8J).

[0227] 이러한 결과는 진토닌이 3-NPA-중독 후 초기 단계에서 1차 세포 사멸로부터 보호함을 시사하였다.

[0229] **<실험예 8> 3-NPA 중독 후 선조체에서 Keap1-Nrf2 경로에 대한 진토닌의 활성화 효과**

[0230] 진토닌(GT)이 Keap1-Nrf2 경로를 조절할 수 있는지 여부를 추가로 조사했다.

[0231] Nrf2의 억제 단백질인 Keap1은 sham 그룹과 비교하여 3-NPA 중독 후 선조체에서 유의하게 증가(3.3배)된 반면, 진토닌의 전처리에 의해 상기 발현 증가가 현저히 감소(32.1%)되었다(도 9A).

[0232] Nrf2의 mRNA 발현 수준은 sham 그룹과 비교하여 2.5배만큼 유의하게 증가되었다. 3-NPA 그룹에서의 이러한 발현 증가는 진토닌으로 전처리함으로써 더욱 증가(196%)되었다(도 9B).

[0233] 실시간 PCR 분석 결과, Nrf2 기작의 생성물인 니코틴아미드-아데닌 디뉴클레오티드 포스페이트:퀴논 옥시도리덕타제-1(nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate:quinone oxidoreductase-1, NQO-1), γ-글루타메이트 시스테인 리가제 조절 서브유닛(γ-glutamate cysteine ligase regulatory subunit, GCLs), 및 햄 옥시게나제-1(heme oxygenase-1, HO-1)의 mRNA 발현은 3-NPA 그룹의 선조체에서 sham 그룹 대비 각각 2.7배, 5.8배 및 4.4배만큼 유의하게 증가되었고, 진토닌 그룹에서 이들의 발현은 각각 165%, 164% 및 184% 더 증가한 것으로 나타났다(도 9C 내지 도 9E).

[0234] 진토닌의 항산화 효과를 더욱 명확히하기 위해, 웨스턴 블롯 분석을 통해 Nrf2 경로의 대표적인 생성물로서 Nrf2 및 HO-1의 단백질 발현 수준을 조사한 결과, 3-NPA+GT 그룹의 선조체에서 Nrf2의 핵 전위 및 HO-1의 세포질 발현이 3-NPA 군과 비교하여 농도 의존적으로 증가하였다(도 9F 및 도 9G).

[0235] 이러한 발현 증가는 면역 형광 염색에 의한 결과에서도 동일한 양상으로 나타났다(도 9H 및 도 9I).

[0236] 결과적으로 진토닌은 Keap1-Nrf2 경로를 안정화시킴을 확인하였다.

[0238] **<실험예 9> 3-NPA 중독 후 선조체에서 MAPKs 및 NF-κB 신호 전달 경로에 대한 진토닌의 억제 효과**

[0239] Nrf2 신호 전달 경로는 MAPKs 및 NF-κB의 억제 및 그의 염증 효과에 관여한다. 따라서, 진토닌(GT)이 3-NPA 중독 후 선조체에서 MAPKs 및 NF-κB 경로를 조절할 수 있는지 여부를 분석하였다.

[0240] 그 결과, 3-NPA 그룹의 경우 sham 그룹과 비교하여, 마지막 3-NPA-중독 24시간 후에 선조체에서 p-ERK, p-JNK, p-p38, NF-κB/p65 및 p-IκBα의 발현이 각각 0.62, 0.77, 0.67, 0.65 및 0.73 배로 유의하게 증가하였으나, 인산화의 이러한 증가는 3-NPA 그룹과 비교하여 진토닌(100 mg/kg)의 전처리에 의해 각각 83%, 68%, 78%, 35% 및 39%만큼 현저히 억제되었다(도 10A 내지 도 10F). 진토닌 자체는 MAPKs 또는 NF-κB 경로의 활성화를 증가시키거나 감소시키지 않았다(도 10A 내지 도 10F).

[0241] 상기와 같은 결과는 진토닌 전처리가 Nrf2 통로의 활성화와 관련된 MAPKs 및 NF-κB 경로 억제를 통해 3-NPA 중독에 의해 유발되는 선조체의 독성을 줄일 수 있음을 나타낸다.

[0243] **<실험예 10> STHdh^{Q111} 세포에서 진토닌의 보호 효과**

[0244] 상기 실험예들을 통해 확인된 생쥐에서 3-NPA 중독에 대한 진토닌(GT)의 신경 보호 효과(도 2 내지 10)는 진토닌이 헌팅턴병 환자에게 긍정적인 영향을 줄 수 있음을 나타낸다. 이에 따라, STHdh^{Q111} 세포에서 진토닌의 효과를 조사했다. 진토닌의 안전한 용량은 MTT 분석에 의해 결정되었고, H_2O_2 처리된 STHdh^{Q111} 세포에 0.1, 1 또는 10 g/ml의 진토닌을 24 및 48시간 동안 처리하였다.

[0245] 젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 분석 결과, H_2O_2 처리 후 STHdh^{Q7}(WT 세포) 및 STHdh^{Q111} 세포 둘 다에서 세포 사멸 수준이 시간 의존적 및 농도 의존적으로 진토닌에 의해 유의적으로 보호되는 것으로 나타났다(도 11A).

[0246] 이후, 본 발명자들은 웨스턴 블롯 분석을 통해 진토닌의 이러한 보호 효과가 STHdh^{Q111} 세포에서 신경세포 사멸, 아폽토시스 및 변형된 HTT 응집의 감소에 기인 한 것인지 여부를 조사하였다.

[0247] 그 결과, 예상 한 바와 같이, H_2O_2 처리된 STHdh^{Q111} 세포에서 β-III-튜불린의 단백질 발현 수준의 감소는 진토닌 처리에 의해 억제되었다. H_2O_2 처리 된 STHdh^{Q111} 세포에서 활성형 카스파제-3 및 EM48의 강화된 단백질 발현 수준 또한 진토닌 처리에 의해 억제되었다(도 11B 및 11C).

[0248] 결과적으로, 본 발명의 상기 실험예에서 확인된 결과들은 진토닌이 헌팅턴병의 세포주에 보호 효과를 발휘할 수 있음을 나타낸다.

[0250] **<실험예 11> AAV/Q82 유발 헌팅턴병 마우스 모델에서 진토닌의 보호 효과**

[0251] 상기 실험예를 통해 확인된 바와 같이, 진토닌(GT)은 마우스 및 H_2O_2 처리된 STHdh^{Q111} 세포에서 3-NPA로 유도된 선조체 독성에 보호 효과를 발휘할 수 있다(도 2 내지 도 11).

[0252] 이와 관련하여, 본 발명자들은 선조체에서 AAV로 매개된 인간 돌연변이 HTT의 과발현에 의해 유도된 헌팅턴병-유사 선조체 독성에 대한 진토닌의 보호 효과를 확인했다.

[0253] 폴(pole) 테스트 결과, 폴 바닥까지의 평균 하강 시간(latency to descend)은 sham 그룹(8.0±0.5초) 또는 AAV-DJ-18Q 주입 그룹(주입 후 4주에 4.1±0.2초)에 비교하여 AAV-DJ-82Q 주입 후 6.6±0.2초로 증가하였고, 반면, 이러한 폴의 바닥까지의 평균 하강 시간의 증가는 진토닌 처리에 의해 8.0±0.5초 내지 5.3±0.2초로 부분적으로 억제되었다(도 12A).

[0254] 로타로드(rotarod) 테스트 결과, AAV-DJ-82Q 주입 후 7주에서 평균 반응 시간(latency to fall)은 294.3±1.8초에서 282.0±1.7초로, sham 그룹(293.9±2.1초에서 294.5±2.1초) 또는 AAV-DJ-18Q 주입 그룹(294.1±1.5초에서 294.5±1.3초)에 비해 감소하였다(도 12B). 그러나 이러한 평균 반응 시간 감소는 진토닌 처리에 의해 294.5±1.4초 내지 287.3±1.3초로 부분적으로 억제되었다(도 12B).

[0255] 체중(body weight)은 AAV-DJ-82Q 주입 후 8주차부터 현저하게 감소하였으나, 이러한 체중 변화는 진토닌 처리에 의해 다소 완화되었다(도 12C). 실험 종료시, 모든 마우스는 살아 있었다.

[0256] 다음으로, 본 발명자들은 상기와 같은 AAV-DJ-Q82-유도된 헌팅턴병 마우스 모델의 운동 조절 능력에 대한 진토닌의 유리한 효과가 변형된 HTT 발현의 감소 및 진토닌 치료에 의한 Nrf2 경로의 활성화와 관련이 있는지를 조사하였다.

[0257] 웨스턴 블롯 분석에서, EM48(돌연변이 HTT에 대한 마커)의 단백질 발현은 AAV-DJ-82Q 주입 그룹에서 현저하게 증가하였고, 이러한 증가된 발현은 진토닌 처리 그룹에서 현저하게 감소하였다(도 12D 및 도 12E). 상기의 결과는 면역 형광 염색법에 의한 EM48 면역 반응성의 결과에 상응한다(도 13A 내지 도 13E).

[0258] 또한, Nrf2의 핵 전위 및 HO-1의 세포질 발현은 AAV-DJ-82Q 주입 그룹에 비해 진토닌 처리 후 선조체에서 현저히 증가하였다(도 12D 및 도 12E). 이러한 발현 패턴은 면역 형광 염색에 의한 결과에 상응하였다(도 12F 및 도 12G).

[0259] 진토닌의 항산화 효과를 더욱 명확히하기 위해, H_2O_2 처리된 $STHdh^{Q111}$ 세포에 대한 진토닌의 효과를 추가로 조사하였다. 그 결과, H_2O_2 처리된 $STHdh^{Q111}$ 세포에서 Nrf2의 핵 전위 및 HO-1의 세포질 발현 수준은 진토닌 처리에 의해 향상되는 반면, 이러한 강화된 발현 수준은 siRNA-Nrf2에 의해 현저히 중화되었고(도 12H 내지 도 12I), 또는 Nrf2 억제제(ML385)에 의해 현저히 중화되었다(도 14A 및 도 14B). 한편, siRNA-Nrf2 자체는 H_2O_2 처리된 $STHdh^{Q111}$ 세포에서 Nrf2의 핵 전위 및 HO-1의 세포질 발현에 유의한 영향을 미치지 않았다(도 14C 및 도 14D).

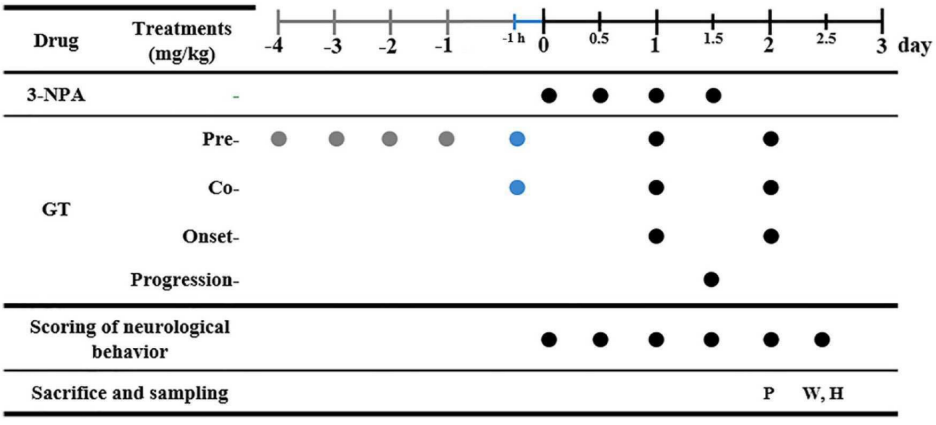
[0260] 결과적으로, 진토닌은 항산화 작용을 통해 AAV-DJ-82Q 감염에 의해 유발된 운동 조절 장애를 완화할 수 있음을 확인하였다.

[0262] 종합적으로, 진토닌은 3-NPA 중독 후 선조체에서 3-NPA에 의한 1차 세포사멸 및 미세아교세포 활성화에 의한 2차 세포사멸을 보호할 수 있음을 확인하였으며, 진토닌은 Keap1-Nrf2 신호 전달 경로를 활성화시켜 NF-κB 및 MAPKs 신호 전달 경로를 억제함으로써 3-NPA-유도된 선조체 독성으로부터의 보호에 기여할 수 있다. 또한, 진토닌의 헌팅턴병에 대한 유리한 효과는 시험관내(STHdh 세포) 및 생체내(HD의 AAV 벡터-감염된 마우스 모델) 모두에서 확인되었으며, Keap1-Nrf2 신호 전달 경로 활성화를 통해, 헌팅턴병의 시험관내 모델로서 STHdh 세포주에서 변형된 HTT 응집체의 형성을 억제하고, AAVDJ-82Q 벡터-감염된 HD 마우스 모델의 증상을 완화시킬 수 있음을 확인하였다. 따라서, 진토닌이 헌팅턴병을 치료하기 위한 치료제로서 유용할 수 있음을 확인하였다.

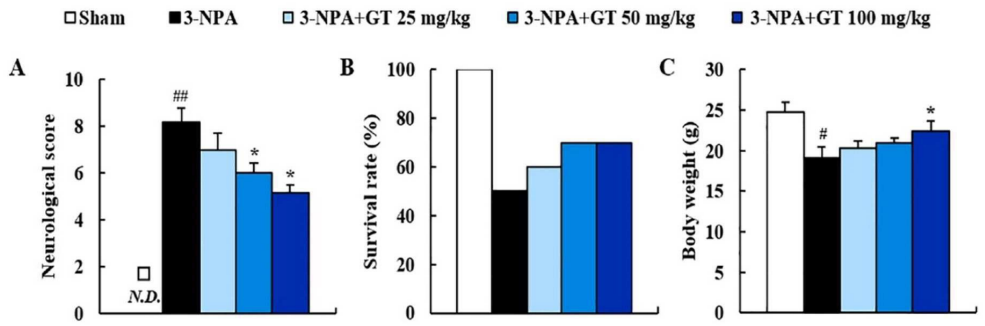
[0264] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특히 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

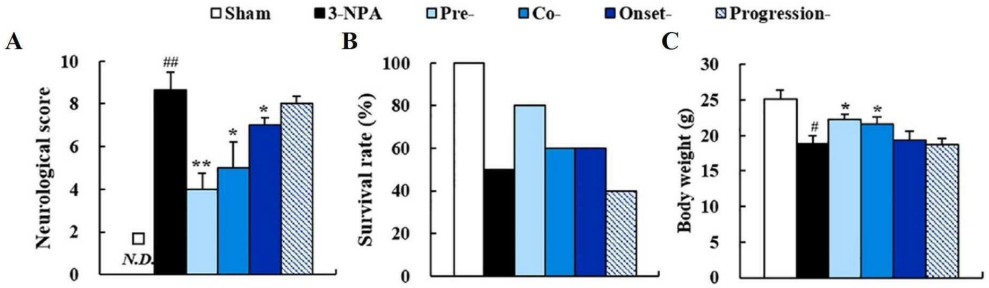
도면1



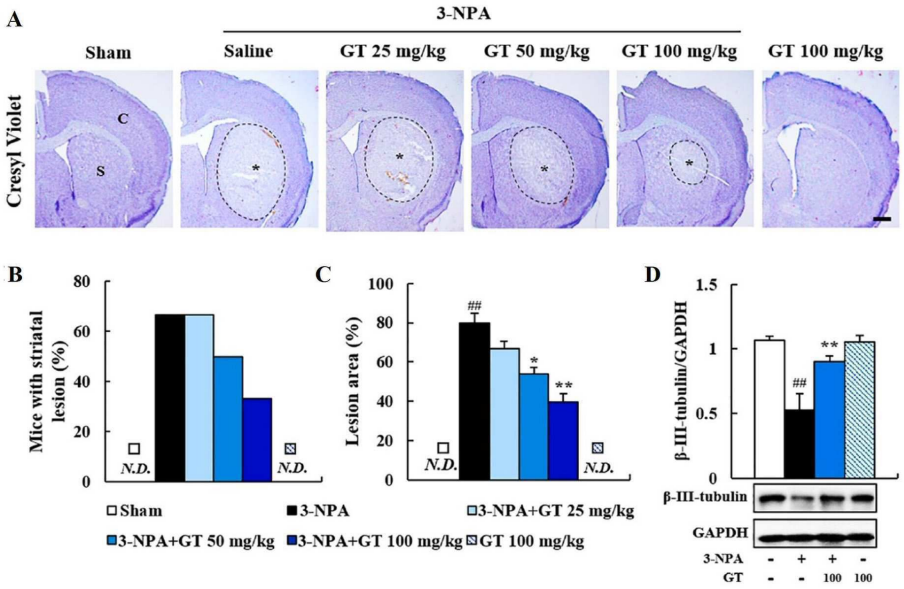
도면2


Sham
3-NPA
3-NPA+GT 25 mg/kg
3-NPA+GT 50 mg/kg
3-NPA+GT 100 mg/kg
A
Neurological score
N.D.
B
Survival rate (%)
C
Body weight (g)

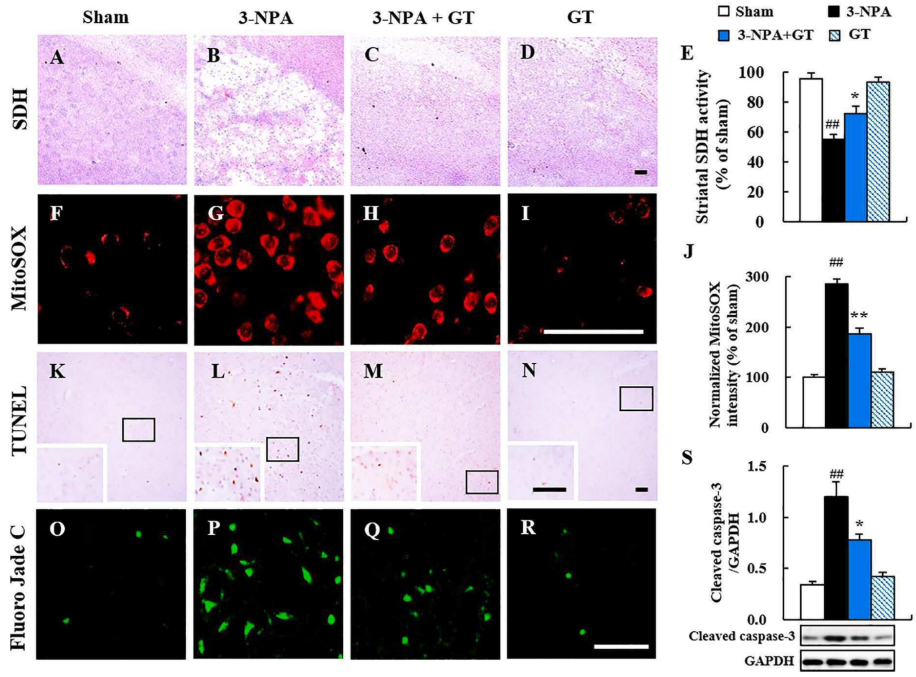
도면3


Sham
3-NPA
Pre-
Co-
Onset-
Progression-
A
Neurological score
N.D.
B
Survival rate (%)
C
Body weight (g)

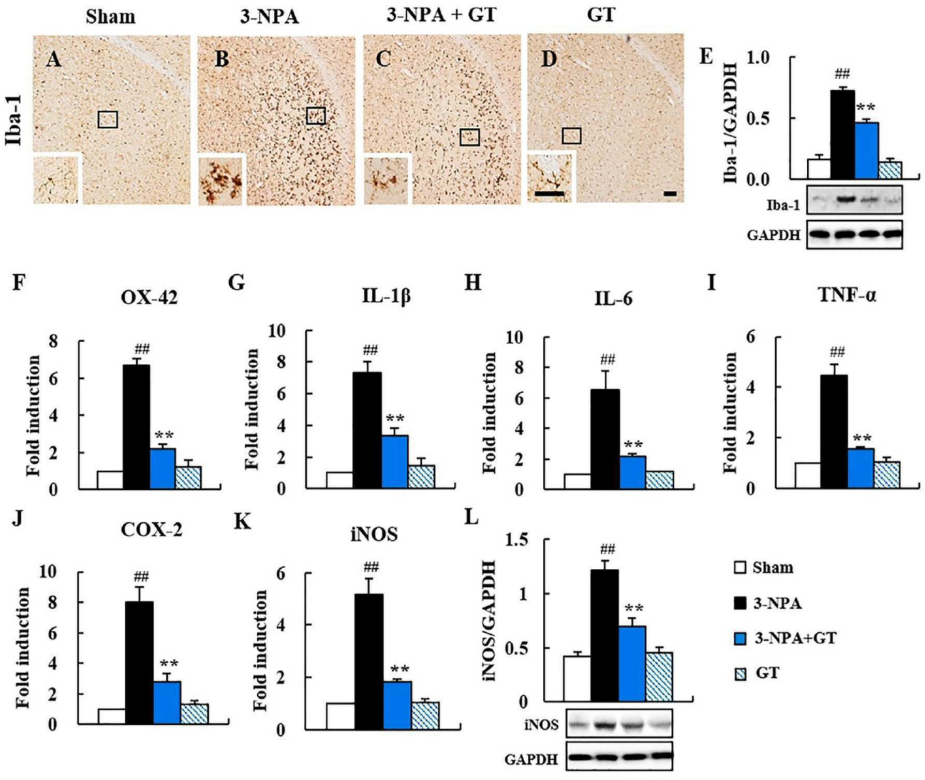
도면4


A
3-NPA
Sham
Saline
GT 25 mg/kg
GT 50 mg/kg
GT 100 mg/kg
GT 100 mg/kg
Cresyl Violet
C
S
B
Mice with striatal lesion (%)
N.D.
C
Lesion area (%)
D
β-III-tubulin/GAPDH
β-III-tubulin
GAPDH
3-NPA
GT
Sham
3-NPA
3-NPA+GT 25 mg/kg
3-NPA+GT 50 mg/kg
3-NPA+GT 100 mg/kg
GT 100 mg/kg

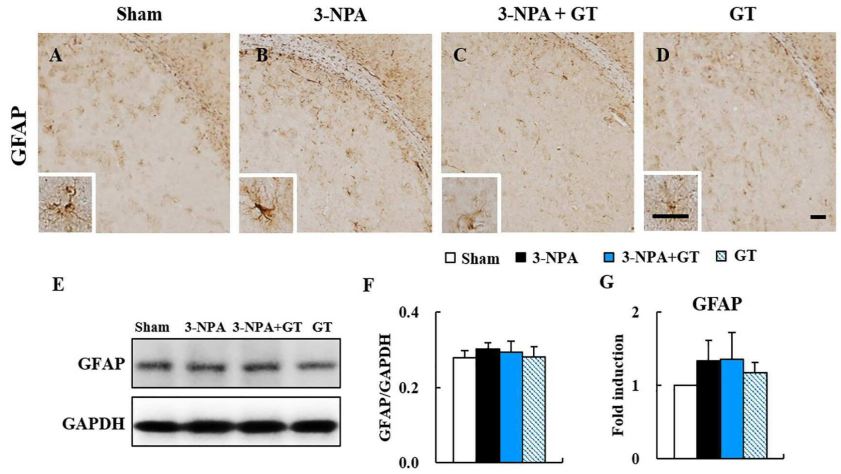
도면5


Sham
3-NPA
3-NPA + GT
GT
SDH
MitoSOX
TUNEL
Fluoro Jade C
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
P
Q
R
S
Striatal SDH activity (% of sham)
Normalized MitoSOX intensity (% of sham)
Cleaved caspase-3 /GAPDH
Cleaved caspase-3
GAPDH
3-NPA+GT

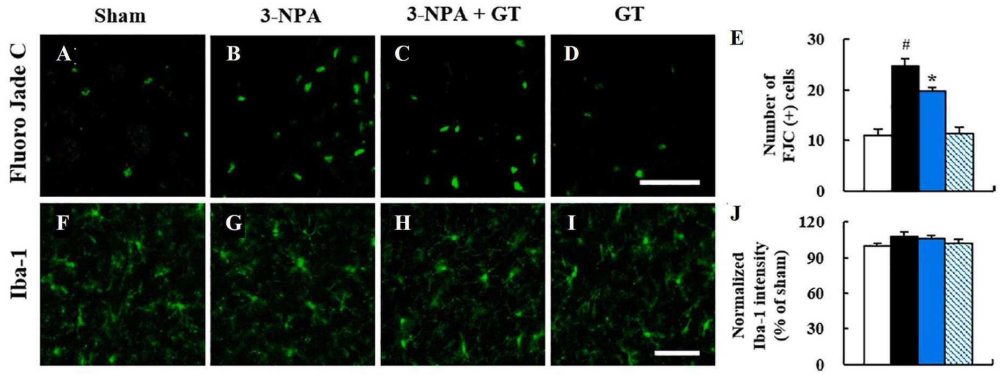
도면6


Sham
3-NPA
3-NPA + GT
GT
Iba-1
A
B
C
D
E
Iba-1/GAPDH
Iba-1
GAPDH
F
OX-42
G
IL-1β
H
IL-6
I
TNF-α
Fold induction
J
COX-2
K
iNOS
L
iNOS/GAPDH
3-NPA+GT

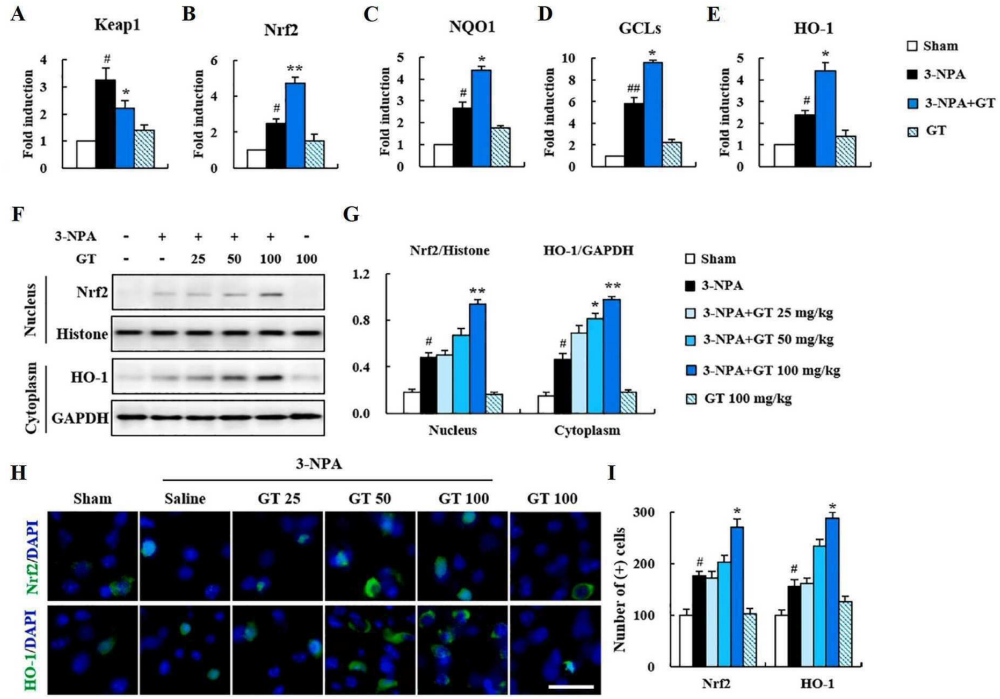
도면7


Sham
3-NPA
3-NPA + GT
GT
A
B
C
D
GFAP
Sham 3-NPA 3-NPA+GT GT
E
GFAP
GAPDH
F
GFAP/GAPDH
G
GFAP
Fold induction

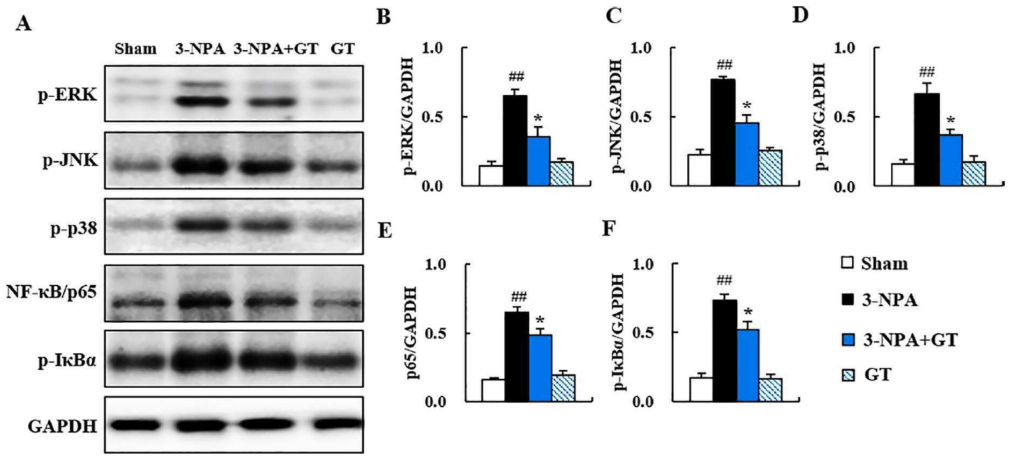
도면8


Sham
3-NPA
3-NPA + GT
GT
Fluoro Jade C
Iba-1
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
Number of FJC (+) cells
Normalized Iba-1 intensity (% of sham)

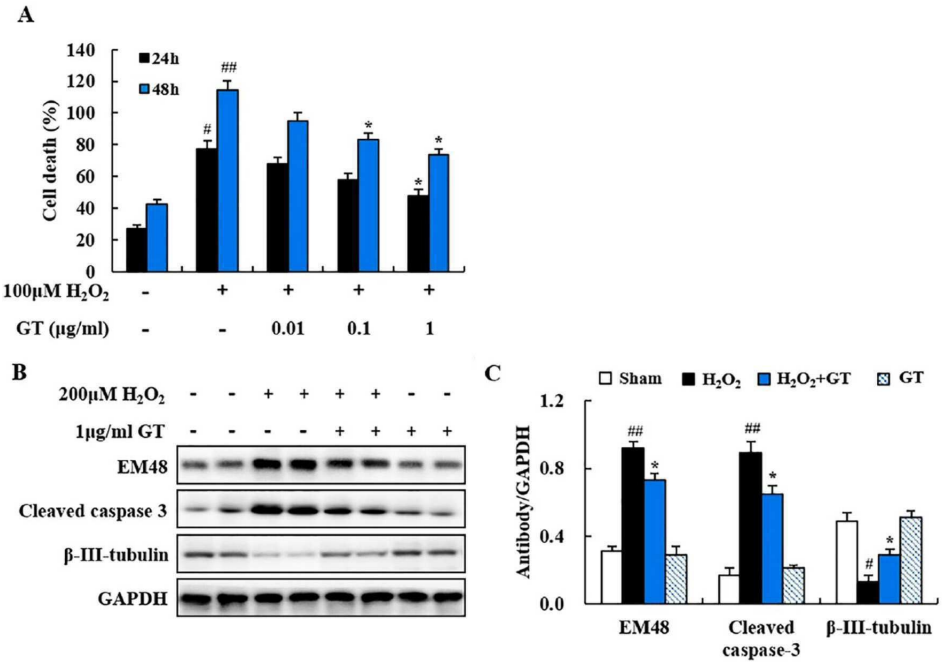
도면9


A
Keap1
B
Nrf2
C
NQO1
D
GCLs
E
HO-1
Fold induction
Sham
3-NPA
3-NPA+GT
GT
F
3-NPA
GT
Nucleus
Nrf2
Histone
Cytoplasm
HO-1
GAPDH
G
Nrf2/Histone
HO-1/GAPDH
Nucleus
Cytoplasm
3-NPA+GT 25 mg/kg
3-NPA+GT 50 mg/kg
3-NPA+GT 100 mg/kg
GT 100 mg/kg
H
3-NPA
Sham
Saline
GT 25
GT 50
GT 100
Nrf2/DAPI
HO-1/DAPI
I
Number of (+) cells

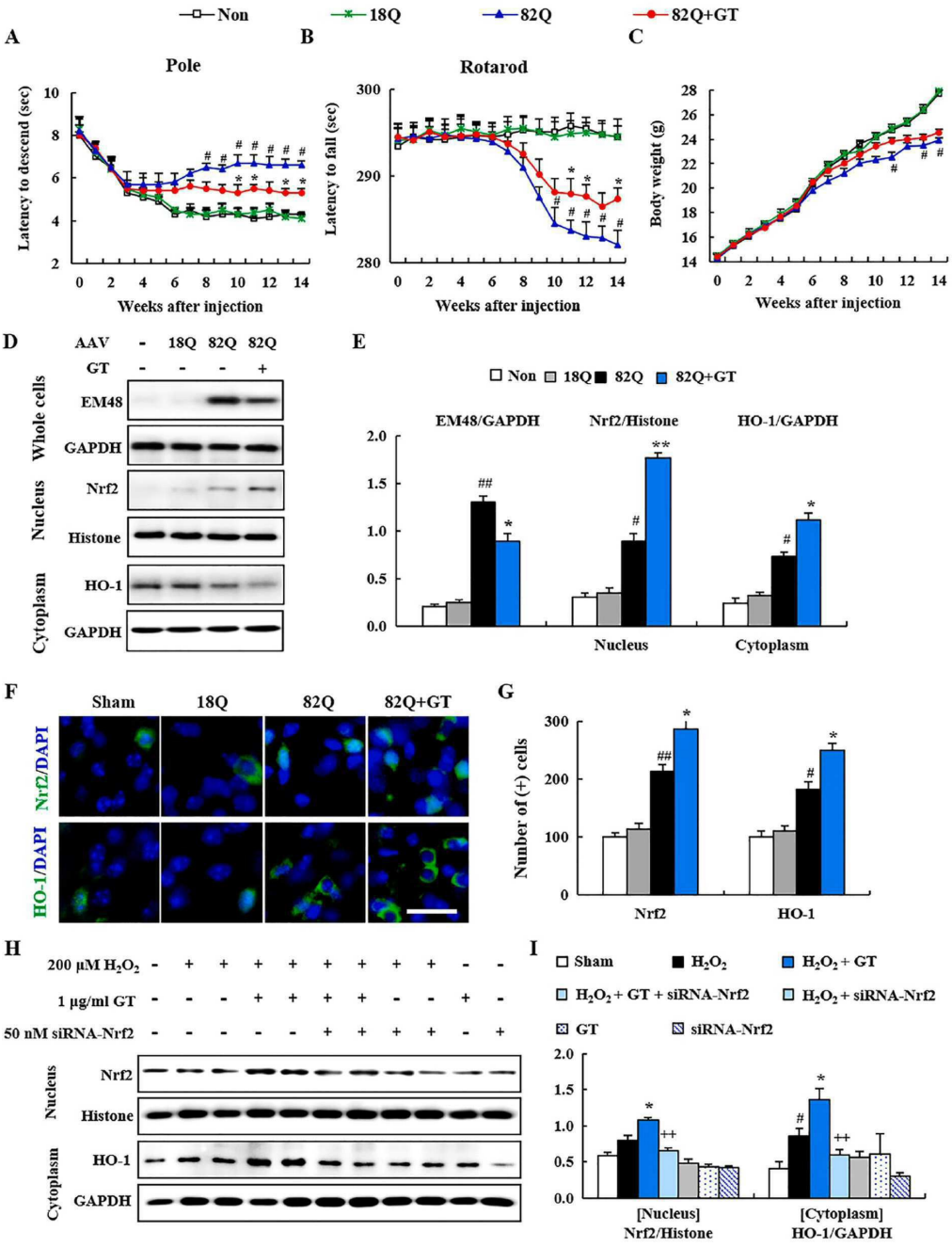
도면10


A
Sham
3-NPA
3-NPA+GT
GT
p-ERK
p-JNK
p-p38
NF-κB/p65
p-IκBα
GAPDH
B
p-ERK/GAPDH
C
p-JNK/GAPDH
D
p-p38/GAPDH
E
p65/GAPDH
F
p-IκBα/GAPDH
Sham
3-NPA
3-NPA+GT
GT

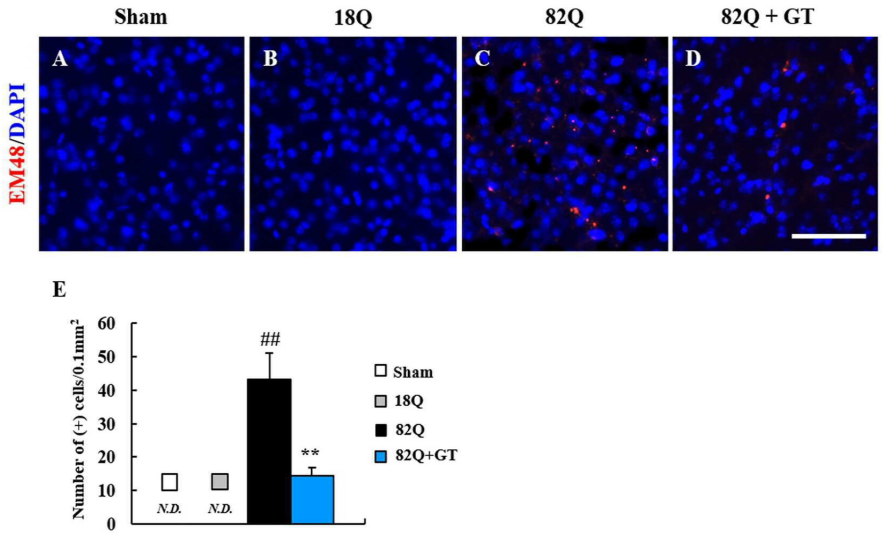
도면11


A
24h
48h
Cell death (%)
100μM H2O2
GT (μg/ml)
0.01
0.1
1
B
200μM H2O2
1μg/ml GT
EM48
Cleaved caspase 3
β-III-tubulin
GAPDH
C
Sham
H2O2
H2O2+GT
GT
Antibody/GAPDH
EM48
Cleaved caspase-3
β-III-tubulin

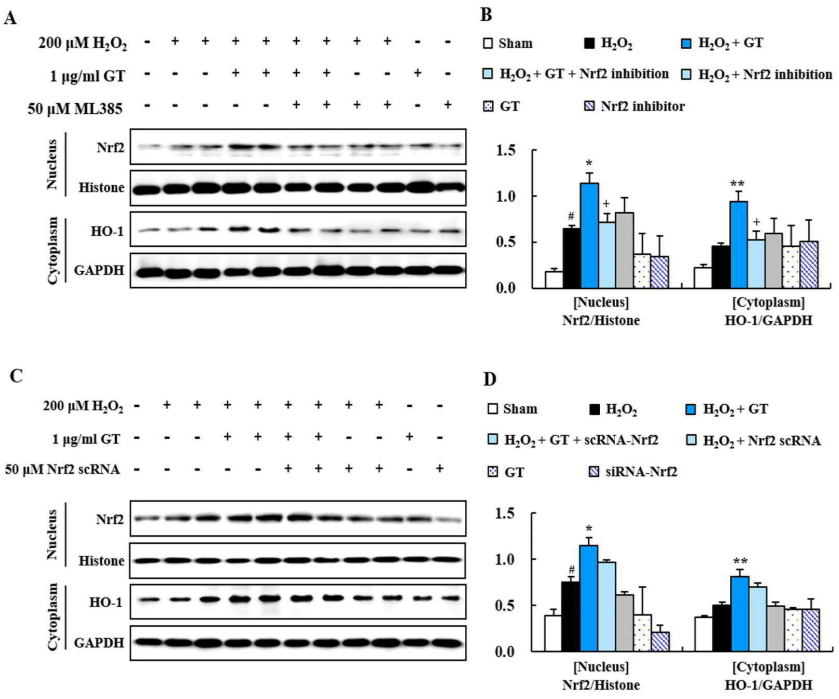
도면12


Non
18Q
82Q
82Q+GT
A
Pole
Latency to descend (sec)
Weeks after injection
B
Rotarod
Latency to fall (sec)
Weeks after injection
C
Body weight (g)
Weeks after injection
D
AAV - 18Q 82Q 82Q
GT - - - +
Whole cells
EM48
GAPDH
Nucleus
Nrf2
Histone
Cytoplasm
HO-1
GAPDH
E
Non 18Q 82Q 82Q+GT
EM48/GAPDH
Nrf2/Histone
HO-1/GAPDH
Nucleus
Cytoplasm
F
Sham
18Q
82Q
82Q+GT
Nrf2/DAPI
HO-1/DAPI
G
Number of (+) cells
Nrf2
HO-1
H
200 μM H2O2
1 μg/ml GT
50 nM siRNA-Nrf2
Nucleus
Nrf2
Histone
Cytoplasm
HO-1
GAPDH
I
Sham
H2O2
H2O2 + GT
H2O2 + GT + siRNA-Nrf2
H2O2 + siRNA-Nrf2
GT
siRNA-Nrf2
[Nucleus]
Nrf2/Histone
[Cytoplasm]
HO-1/GAPDH

도면13


Sham
18Q
82Q
82Q + GT
A
B
C
D
EM48/DAPI
E
Number of (+) cells/0.1mm²
60
50
40
30
20
10
0
##
**
N.D.
N.D.
Sham
18Q
82Q
82Q+GT

도면14


A
200 μM H2O2
1 μg/ml GT
50 μM ML385
Nucleus
Nrf2
Histone
Cytoplasm
HO-1
GAPDH
B
Sham
H2O2
H2O2 + GT
H2O2 + GT + Nrf2 inhibition
H2O2 + Nrf2 inhibition
GT
Nrf2 inhibitor
1.5
1.0
0.5
0.0
[Nucleus]
Nrf2/Histone
[Cytoplasm]
HO-1/GAPDH
C
200 μM H2O2
1 μg/ml GT
50 μM Nrf2 scRNA
Nucleus
Nrf2
Histone
Cytoplasm
HO-1
GAPDH
D
Sham
H2O2
H2O2 + GT
H2O2 + GT + scRNA-Nrf2
H2O2 + Nrf2 scRNA
GT
siRNA-Nrf2
1.5
1.0
0.5
0.0
[Nucleus]
Nrf2/Histone
[Cytoplasm]
HO-1/GAPDH