

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0090983
(43) 공개일자 2024년06월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7048 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
C07H 17/07 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/7048 (2013.01)
A61K 9/0043 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7017446
- (22) 출원일자(국제) 2022년10월25일
심사청구일자 2024년05월24일
- (85) 번역문제출일자 2024년05월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2022/127372
- (87) 국제공개번호 WO 2023/072069
국제공개일자 2023년05월04일
- (30) 우선권주장
63/271,411 2021년10월25일 미국(US)

- (71) 출원인
천 린이
대만 30013 신주 광 푸 로드 섹션 2 101
천 위-런
대만 30013 신주 광 푸 로드 섹션 2 101
- (72) 발명자
천 린이
중국 대만 30013 신주 광 푸 로드 섹션 2 101
천 위-런
중국 대만 30013 신주 광 푸 로드 섹션 2 101
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
유미특허법인

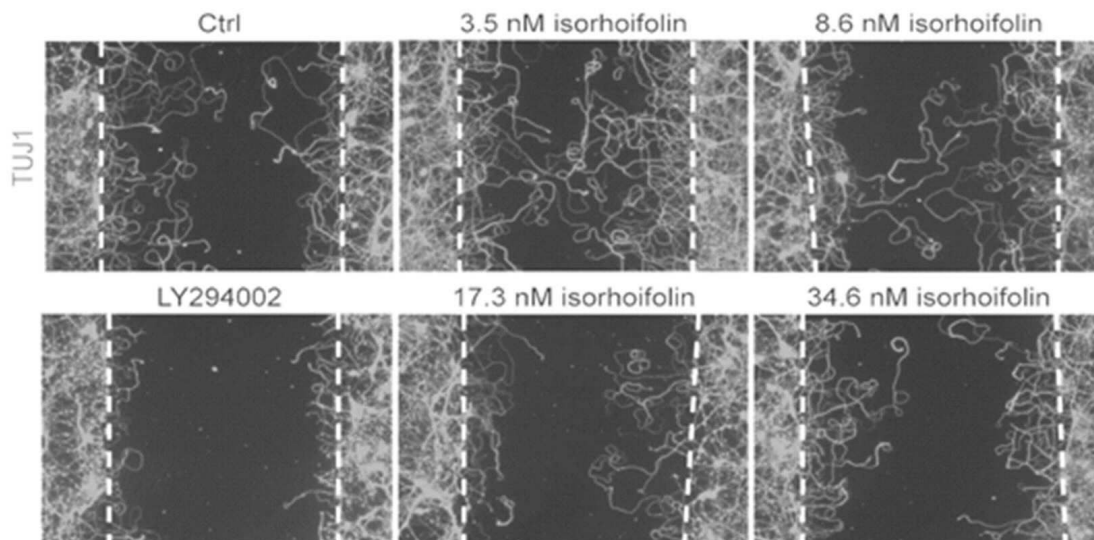
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 신경 복원 촉진에 사용되는 이소로이폴린 및 그 유도체의 용도

(57) 요약

본 발명은 이소로이폴린(Isorhoifolin) 및 그 유도체의 새로운 용도를 제공한다. 상기 이소로이폴린(Isorhoifolin) 및 그 유도체는 손상된 뇌의 뉴런 및 망막 신경의 재생을 촉진하는 데 사용될 수 있다.

대표도 - 도3a



(52) CPC특허분류

A61K 9/0085 (2013.01)

A61P 25/00 (2018.01)

A61P 25/28 (2018.01)

C07H 17/07 (2013.01)

(72) 발명자

랴오 원-링

중국 대만 30013 신주 광 푸 로드 섹션 2 101

왕 이

중국 대만 30013 신주 광 푸 로드 섹션 2 101

리 위-탕

중국 대만 30013 신주 광 푸 로드 섹션 2 101

뤄 텡-취안

중국 대만 30013 신주 광 푸 로드 섹션 2 101

리 자-웨이

중국 대만 30013 신주 광 푸 로드 섹션 2 101

천 팡-이

중국 대만 30013 신주 광 푸 로드 섹션 2 101

자오 환-진

중국 대만 30013 신주 광 푸 로드 섹션 2 101

명세서

청구범위

청구항 1

신경 손상 치료용 의약품 제조에 사용되는 이소로이폴린(Isorhoifolin) 및 그 유도체의 용도.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 이소로이폴린(Isorhoifolin) 유도체는 나리루틴(Narirutin)인, 신경 손상 치료용 의약품 제조에 사용되는 이소로이폴린 및 그 유도체의 용도.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 신경 손상은 중추신경 또는 말초신경 손상인, 신경 손상 치료용 의약품 제조에 사용되는 이소로이폴린 및 그 유도체의 용도.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 신경 손상은 뉴런 손상인, 신경 손상 치료용 의약품 제조에 사용되는 이소로이폴린 및 그 유도체의 용도.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 신경 손상은 피질 신경(cortical neurons), 해마 신경(hippocampal neuros) 또는 망막 신경(retinal neurons)의 손상을 포함하는, 신경 손상 치료용 의약품 제조에 사용되는 이소로이폴린 및 그 유도체의 용도.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 치료는 신경 재생, 신경 수량 증가 또는 신경 복원인, 신경 손상 치료용 의약품 제조에 사용되는 이소로이폴린 및 그 유도체의 용도.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 이소로이폴린 및 그 유도체는 비강 투여로 혈뇌장벽(blood-brain barrier)을 통과하여 대뇌로 유입되는, 신경 손상 치료용 의약품 제조에 사용되는 이소로이폴린 및 그 유도체의 용도.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 이소로이폴린 및 그 유도체의 유효 용량은 1nM 내지 864 μ M인, 신경 손상 치료용 의약품 제조에 사용되는 이소로이폴린 및 그 유도체의 용도.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 신경 복원 촉진에 사용되는 이소로이폴린(Isorhoifolin) 및 그 유도체의 용도를 제공한다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 현재, 외상성 뇌손상(TBI)과 같은 신경 손상은 해마다 세계적으로 약 7천만 명에 달하는 인구가 이 병을 앓고 있다. 통상의 치료 방식은 물리적 치료법, 고압산소 치료법, 경두개골 자기 자극법과 경두개골 직류전류 자극법과 같은 비 침입성 치료법으로, TBI 후의 우울증과 인지 기능을 개선할 수 있으나, 현재는 여전히 뇌손상 이후의 신경 재생을 촉진할 수 있는 효과적인 약물이 없다.
- [0003] 외상성 뇌손상은 외력에 의한 뇌의 손상이며, 해마다 세계적으로 약 7000만에 가까운 확진 사례가 있다. 외상성 뇌손상은 뇌신경에 손상을 일으키며 나아가 환자의 행동 또는 인지 상의 기능 결실을 초래한다. 중추신경계는 손상된 후 재생하여 회복되기 어려우며, 현재의 의학으로는 외상성 뇌손상에 대해 신경 재생을 촉진하는 효과적인 치료법이 없으며, 뇌외상 환자는 일정 시간이 지나면 뇌 병변과 추후 뇌신경 퇴화 질환을 앓는 것이 일반적이다. 따라서, 뇌손상 후 조속히 뇌신경 재생 촉진 약물을 사용하는 것이 치료 해결 방법이다.
- [0004] 이뿐만 아니라, 치료 약물의 선택에 있어서, 대뇌에 혈뇌장벽이 있어 일반적인 약물은 유효 용량에 도달할 만큼 혈뇌장벽을 쉽게 통과할 수 없다. 따라서, 뇌 질환의 치료 시에는 약물의 효과적인 투여는 심각한 문제이다.
- [0005] 이를 감안하여, 현재 신경 손상을 치료할 수 있는 약물을 개발하는 것이 시급히 필요하며, 이 밖에도 혈뇌장벽을 통과할 수 있는 투여 방식도 매우 필요하다.
- [0006] Isorhoifolin(이소로이폴린)은 현재 이미 알려진 화합물이고, 상기 화합물을 약물로써 치료를 진행하는 연구는 찾아보기 어려우며, 정맥 문제 또는 치질의 치료에 사용되는 상기 화합물을 함유하는 조성물의 용도는 볼 수 있으나, 신경 관련 질병 치료에 사용되는 용도는 없다. 따라서 본 발명은 추가적인 연구를 통해 이소로이폴린 및 그 유도체는 신경 복원 및 재생을 효과적으로 촉진하고, 혈뇌장벽을 통과할 수 있고, 외상성 뇌손상 치료에 사용되는 잠재적인 약물을 개발하는데 사용될 수 있음을 발견하였다.

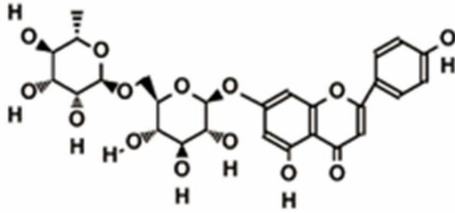
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 발명의 내용은 독자들이 본 개시 내용을 기본적으로 이해하도록, 본 개시 내용의 간단한 요약을 제공하는 것을 취지로 한다. 본 발명의 내용은 본 개시 내용의 완전한 개요가 아니며, 본 발명의 실시예의 중요하거나 핵심적인 구성요소를 지적하거나 또는 본 발명의 범위를 한정하는 의도로 사용되지 않는다.
- [0008] 인체의 신경계는 중추신경과 말초신경으로 구분되며 양자는 모두 뉴런으로 구성된다. 여기서, 삼차신경은 말초신경 중의 뇌신경이고 교뇌(중추신경)에 연결된다. 따라서, 본 발명에 따른 이소로이폴린(Isorhoifolin) 및 그 유도체는 비점막을 통해 후상피세포를 통과하여 후각과 삼차신경 주변의 통로로 유입되어 대뇌로 유입될 경우, 말초신경을 통해 전신 신경을 복원하는 효과도 동시에 구현할 수 있다.
- [0009] 이를 감안하여, 본 발명은 쉽게 복원되지 않는 뇌신경을 실험대상으로 한다. 이로써 신경계의 중추신경과 말초신경을 모두 복원할 수 있는 효과를 구현한다.
- [0010] “중추신경”은 뇌와 척수로 이루어진다. 본 발명에서 말하는 “중추신경”은 후각 뇌, 편도체, 해마, 신피질, 측면 뇌실, 시상상부, 시상, 시상하부, 시상밑부, 뇌하수체, 송과체, 제3 뇌실, 중뇌 시개, 대뇌각, 뇌개전부, 대뇌수도, 교뇌, 소뇌연수, 척수를 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0011] “말초신경”은 체성 신경계(somatic nervous system)와 자율 신경계로 이루어진다. 본 발명에서 말하는 “말초신경”은 감각신경, 운동신경, 뇌신경 척수신경, 교감신경, 부교감신경, 장 신경계를 포함하지만 이에 한정되지 않는다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 신경 복원 촉진에 사용되는 이소로이폴린(Isorhoifolin) 및 그 유도체의 용도를 제공한다.
- [0013] 일부 실시예에서, 이소로이폴린(Isorhoifolin) 유도체는 나리루틴(Narirutin)이다.
- [0014] 일부 실시예에서, 이소로이폴린(Isorhoifolin)의 화학구조는 화학식(1)과 같고,

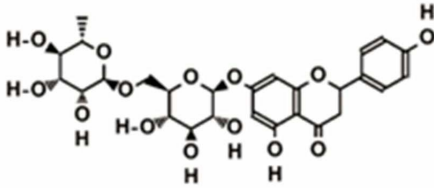


[0015]

화학식(1)

[0016]

일부 실시예에서, 이소로이폴린(Isorhoifolin)의 유도체 나리루틴의 화학구조는 화학식(2)와 같고,



[0017]

화학식(2)

[0018]

일부 실시예에서, 이소로이폴린(Isorhoifolin) 및 그 유도체는 단독 사용 시, 손상된 해마 뉴런(injured hippocampal neurons)의 10%-30%의 재생을 촉진하고, 3D 뇌조직 절편의 신경 재생을 촉진할 수 있고, 상기 화합물이 뉴런의 재생을 효과적으로 촉진할 수 있고, 신경 손상 복원에 사용될 수 있음을 증명한다.

[0019]

일부 실시예에서, 이소로이폴린(Isorhoifolin) 및 그 유도체는 사용자의 혈뇌장벽(blood-brain barrier)을 통과하여 대뇌에 유입되어 상기 손상된 뉴런의 복원을 촉진할 수 있다.

[0020]

일부 실시예에서, 이소로이폴린(Isorhoifolin) 및 그 유도체는 혈뇌장벽(blood-brain barrier)을 통과하여 대뇌에 유입되어 뇌신경 복원, 재생 또는 신경 수량의 증가를 촉진할 수 있다.

[0021]

일부 실시예에서, 이소로이폴린(Isorhoifolin) 및 그 유도체는 외상 후 피질 신경(cortical neurons), 외상 후 해마 신경(hippocampal neurons) 및 외상 후 망막 신경(retinal neurons)의 재생을 촉진할 수 있다.

[0022]

일부 실시예에서 이소로이폴린(Isorhoifolin)은 Neuro2a세포에 대해 독성이 상당히 낮다.

[0023]

일부 실시예에서, 이소로이폴린(Isorhoifolin) 및 그 유도체의 유효 용량 농도는 1nM 내지 864 μM이다.

발명의 효과

[0024]

일부 실시예에서, 이소로이폴린(Isorhoifolin) 및 그 유도체는 신경 복원에 대해 현저한 효과가 있고, 그중 상기 이소로이폴린(Isorhoifolin) 화합물 및 그 유도체는 비강 투여에 의해 혈뇌장벽(blood-brain barrier)을 통과하여 대뇌에 유입되어, 상기 손상된 뉴런의 복원, 뇌신경 복원, 재생 또는 신경 수량의 증가를 촉진하고; 및 외상후 피질 신경(cortical neurons) 및 해마 신경(hippocampal neurons)의 신경축의 재생을 촉진한다.

[0025]

본 발명이 속한 기술분야의 통상의 기술자는 후술되는 실시방식을 참고한 후 본 발명의 실질적인 사상과 그 밖의 다른 발명의 목적, 그리고 본 발명에 이용된 기술적 수단과 실시형태를 쉽게 파악할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026]

도 1은 본 발명에 따른 시험관 내(in vitro) 신경 복원 시험 흐름도이다.

도 2는 본 발명에 따른 갭 폐합률(gap closure rate) 계산 참고 개략도이다.

도 3a-3c는 본 발명에 따른 이소로이폴린(Isorhoifolin) 시험관 내(in vitro) 해마 신경 복원 실험 결과이다.

도 4는 본 발명에 따른 이소로이폴린(Isorhoifolin) 유도체 나리루틴(Narirutin)의 시험관 내(in vitro) 해마 신경 재생 실험 결과이다.

도 5는 본 발명에 따른 이소로이폴린(Isorhoifolin) 유도체 나리루틴(Narirutin)의 시험관 내(in vitro) 피질

신경 재생 실험 결과이다.

도 6은 본 발명에 따른 생체 외(ex vivo) 뇌조직 절편 실험 흐름도이다.

도 7은 본 발명에 따른 이소로이폴린(Isorhoifolin) 생체 외(ex vivo) 뇌조직 절편 실험 결과이다.

도 8은 본 발명에 따른 이소로이폴린(Isorhoifolin) 유도체 나리루틴(Narirutin) 생체 외(ex vivo) 뇌조직 절편의 실험 결과이다.

도 9는 본 발명에 따른 이소로이폴린(Isorhoifolin) 화합물의 세포 독성 실험 결과이다.

도 10은 본 발명에 따른 제어된 피질 충격 뇌외상 모델 실험 흐름도와 이소로이폴린(Isorhoifolin) 화합물이 뇌외상 후 생쥐의 운동협동성 회복 촉진 실험 결과이다.

도 11은 본 발명에 따른 생체 외(ex vivo) 망막 신경 조직의 복원 촉진 흐름도이다.

도 12는 본 발명에 따른 이소로이폴린(Isorhoifolin)이 생체 외(ex vivo) 망막 신경 조직 복원 촉진 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 개시 내용에 대한 설명이 더 상세하고 완전해지도록, 이하 본 발명의 실시형태와 구체적인 실시예에 대해 설명성 기술을 한다. 다만 이는 본 발명의 구체적인 실시예를 실시 또는 적용하는 유일한 형태가 아니다. 실시형태에는 다수의 구체적인 실시예의 특징과, 이들 구체적인 실시예를 조작하는 방법과 용도가 포함되어 있으나, 다른 구체적인 실시예를 이용하여 동일 또는 균등한 기능효과를 달성할 수도 있다. 이들 실시예는 본 발명을 설명하기 위한 것이며 본 발명의 범위를 한정하기 위한 것은 아님을 이해해야 한다.

[0028] **실시예 1: 이소로이폴린(Isorhoifolin) 및 그 유도체의 시험관 내(in vitro) 신경 복원 시험**

[0029] 본 실험 절차는 도 1에 나타난 바와 같이, 임신한지 18일째 되는 쥐(rat)의 태아를 꺼내고, 태아의 대뇌를 대뇌 피질(cortex)과 해마(hippocampus)로 분리했다. 이어서 cortex와 hippocampus를 피질 신경세포(cortical neurons)와 해마 신경세포(hippocampal neurons)로 분리하고, 해마 신경세포를 48 웰 플레이트에 이식했으며, 이 날을 Day In Vitro 0 (DIV0)으로 칭했다. DIV2일 때 사이토신 베타-D-아라비노사이드(Cytosine beta-D-arabinoside, AraC)를 넣어 신경교질세포(glial cell)의 증식을 억제했다. DIV8일 때 마이크로피펫 팁으로 신경세포를 스크래칭하고, 서로 다른 농도의 이소로이폴린(Isorhoifolin)을 넣는다. 이소로이폴린(Isorhoifolin)을 넣어 72시간 지난 후, 면역형광염색법을 통해, TUJ1 항체를 사용하여 신경세포를 마킹한 후 신경 재생 상황을 관찰했다. 이 실험은 Zeiss Observer Z1 microscope를 이용하여 촬영했다.

[0030] 도 2에 나타난 바와 같이, 갭 폐합률(gap closure rate)을 이용하여 신경축의 재생 정도를 정량화했다. 백색 점선은 마이크로피펫 팁으로 스크래칭하여 신경세포에 손상이 발생한 경계이고,中间的의 검정색 부분은 마이크로피펫 팁에 의해 스크래칭된 영역이며, 재생된 신경돌기는 점선의 양측으로부터 중간 방향으로 성장했다. 계산 방법으로는, 손상된 영역에서 50 μm 간격으로 갭(gap) 사이에 하나의 선을 그어 Gap의 폭을 계산하고, 총 10개의 선을 그은 후 평균값을 취해, 손상된 경계 사이의 갭의 길이(Length of gap between injured borders, Lg)로 했다. 일정 시간이 지난 후, 동일한 손상된 영역에서 50 μm 간격으로 하나의 선을 그어, 재생되어 연장된 신경축을 연결하고 그 길이를 계산했다. 10개의 선을 그은 후 평균값을 취해, 재생된 신경 사이의 갭의 길이(Length of gap between regenerated neurons, Ln)로 했다. $(Lg-Ln)/Lg$ 을 통해 갭 폐합률(gap closure rate)을 계산했으며, 축척은 100 μm 로 했다. 이 실험은 Zeiss Observer Z1 microscope를 이용하여 촬영했다.

[0031] 도 3a-3c에 나타난 바와 같이, 백색 점선은 마이크로피펫 팁으로 스크래칭하여 신경세포에 손상이 발생한 경계이고, 축척은 100 μm 로 했다. 이 실험으로부터 알 수 있듯이, 이소로이폴린(Isorhoifolin)은 해마 신경돌기의 증식을 촉진할 수 있다. 그중 3A는 3.5nM 내지 34.6nM의 이소로이폴린(Isorhoifolin) 실험 결과도이고; 3B는 0.009 μM 내지 864 μM 의 이소로이폴린(Isorhoifolin) 실험 결과도이고; 3C는 서로 다른 농도의 이소로이폴린(Isorhoifolin) 갭 폐합률 계산 결과도이다.

[0032] 이소로이폴린(Isorhoifolin)의 유도체 나리루틴(Narirutin)은 손상된 후의 해마 신경 재생 실험을 촉진한다.

[0033] 본 실험의 절차는 도 1에 나타난 바와 같이, 임신한지 18일째 되는 쥐(rat)의 태아를 꺼내고, 태아의 대뇌를 대뇌 피질과 해마로 분리했다. 이어서 피질 신경세포와 해마 신경세포로 분리하고, 해마 신경세포를 48 웰 플레이트에 이식했으며, 이 날을 Day In Vitro 0(DIV0)으로 칭했다. DIV2일 때 사이토신 베타-D-아라비노사이드

(Cytosine beta-D-arabinoside, AraC)를 넣어 신경교질세포의 증식을 억제했다. DIV8일 때 마이크로피펫 팁으로 신경세포를 스크래칭하고, 각각 1nM 및 10nM의 나리루틴을 첨가하고, 0.1% DMSO는 용매 제어군이고, 도면의 결과는 모두 0.1% DMSO군과 표준화했다. 나리루틴(Narirutin)을 넣어 72시간 지난 후, 면역형광염색법을 통해, TUJ1 항체를 사용하여 신경세포를 마킹한 후 신경 재생 상황을 관찰했다. 이 실험은 Zeiss Observer Z1 microscope를 이용하여 촬영했으며, 축척은 100 μ m이다.

[0034] 도 4에 나타난 바와 같이, 갭 폐합률(gap closure rate)을 통해 신경축의 재생 정도를 정량화했고, 이 실험 결과는 나리루틴(Narirutin)은 해마 신경 돌기의 증식을 효과적으로 촉진할 수 있음을 보여준다.

[0035] 이소로이폴린(Isorhoifolin)의 유도체 나리루틴(Narirutin) 피질은 손상된 피질 신경 재생 실험을 촉진한다.

[0036] 본 실험의 절차는 도 1에 도시된 바와 같이, 임신한지 18일째 되는 쥐(rat)의 태아를 꺼내고, 태아의 대뇌를 대뇌피질과 해마로 분리했다. 이어서 피질 신경세포와 해마 신경세포로 분리하고, 해마 신경세포를 48 웰 플레이트에 이식했으며, 이 날을 Day In Vitro 0(DIV0)으로 칭했다. DIV2일 때 사이토신 베타-D-아라비노사이드(Cytosine beta-D-arabinoside, AraC)를 넣어 신경교질세포의 증식을 억제했다. DIV8일 때 마이크로피펫 팁으로 신경세포를 스크래칭하고, 각각 10nM 및 100nM의 나리루틴(Narirutin)을 첨가하고, 0.1% DMSO는 용매 제어군이고, 도면의 결과는 모두 0.1% DMSO군과 표준화했다. 나리루틴을 넣어 72시간 지난 후, 면역형광염색법을 통해, TUJ1 항체를 사용하여 신경세포를 마킹한 후 신경 재생 상황을 관찰했다. 이 실험은 Zeiss Observer Z1 microscope를 이용하여 촬영했으며, 축척은 100 μ m이다.

[0037] 도 5에 나타난 바와 같이, 갭 폐합률(gap closure rate)을 통해 신경축 재생 정도를 정량화했고, 이 실험 결과는 나리루틴(Narirutin)이 피질 신경 돌기의 증식을 효과적으로 촉진할 수 있음을 보여준다.

[0038] **실시예 2: 이소로이폴린(Isorhoifolin) 및 그 유도체의 생체 외(ex vivo) 뇌조직 절편 실험**

[0039] 시험관 내(in vitro)에서 화합물의 신경 재생에 대한 효과를 테스트한 후, 생체 외(ex vivo)(임체)의 상황에서 화합물의 신경 재생에 대한 효과를 관찰한다. 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명은 3D 뇌조직 절편 배양의 방식을 사용하여 화합물의 신경에 대한 효과를 관찰한다. 실험 방법은 임신한지 18일째 되는 쥐(rat)의 태아를 꺼내고, 태아의 대뇌를 꺼낸 후, 저용점 아가로스 겔에 포매하고, Leica microtome VT100으로 뇌를 350 μ m 두께의 절편 조직으로 절단했다. 메스로 뇌 절편을 스크래칭한 후 6웰 플레이트에 삽입하여 배양한다. 이 배양 방식은 뇌 절편이 동시에 매질(medium) 및 공기를 접촉하게 할 수 있고, 동시에 뇌 절편 배양은 시험관 내 배양(체외 배양)에 비해 비교적 진실하게 신경 세포와 대뇌 기타 세포의 상호 작용 및 입체 구조를 반영할 수 있다. 매일 ddH₂O를 넣거나 또는 이소로이폴린(Isorhoifolin)을 넣고, 96시간 배양한 후 형광면역염색법을 이용하여, TUJ1 항체로 신경세포를 마킹하고, GFAP 항체로 신경교질세포를 마킹하고, DAPI 시약으로 세포핵을 마킹했다.

[0040] 도 7에 나타난 바와 같이, TUJ1은 항체로 마킹한 신경세포이고, GFAP는 항체로 마킹한 신경교질세포이고, DAPI는 시제로 마킹한 세포핵이다. 백색 점선은 메스로 스크래칭한 부위를 나타내고, 점선 좌측은 뇌 절편 조직이고, 점선 우측은 신생 신경축이다. 백색 점선의 길이 및 백색 선 우측의 신생 신경축의 면적을 계산하는 것을 통해 신생 신경축 면적에서 백색 점선 길이를 제하고 나아가 신경 돌기 길이(neurite length)를 계산하고, 이로써 이소로이폴린(Isorhoifolin)의 신경 재생 촉진 효과를 정량화했고, 축척은 100 μ m이다. 이 실험은 Zeiss LSM800 confocal microscope를 이용해 촬영했다. 생체 외(ex vivo)의 뇌절편에서 이소로이폴린(Isorhoifolin)의 신경 재생에 대한 효과를 관찰하고, 실험 결과로부터 이소로이폴린(Isorhoifolin)은 신경 재생 촉진 효과가 있음을 알 수 있다.

[0041] 이소로이폴린(Isorhoifolin)의 유도체 나리루틴(Narirutin)의 실험 절차는 도 6에 나타난 바와 같이, 먼저 쥐 태아의 뇌를 꺼내고, 뇌를 저용점 아가로스 겔에 포매하고, Leica microtome VT100으로 뇌를 350 μ m 두께의 절편 조직으로 절단했다. 메스로 뇌 절편을 스크래칭한 후 배양하되, 날마다 ddH₂O를 넣거나 나리루틴(Narirutin)을 넣었다. 96시간 배양한 후 형광면역염색법을 이용하여, TUJ1 항체로 신경세포를 마킹하고, GFAP 항체로 신경교질세포를 마킹하고, DAPI 시약으로 세포핵을 마킹했다. 이 실험의 축척은 100 μ m이다. 이 실험은 Zeiss LSM800 confocal microscope를 이용하여 촬영했다.

[0042] 도 8에 나타난 바와 같이, 생체 외(ex vivo) 뇌절편에서 나리루틴(Narirutin)의 신경 재생에 대한 효과를 관찰하고, 실험 결과로부터 나리루틴(Narirutin)이 신경 재생 촉진 효과가 있는 것을 알 수 있다.

[0043] **실시예 3: 이소로이폴린(Isorhoifolin) 세포 독성 실험**

[0044] CellTiter-Glo cell viability assay를 이용하여, Neuro2a 세포에 대한 이소로이폴린(Isorhoifolin)의 독성을

검출한다. CellTiter-Glo cell viability assay는 세포 내의 ATP의 함량을 측정하여, 세포에 화합물을 첨가한 후의 생존율을 정량화할 수 있다.

[0045] 도 9에 나타난 바와 같이, 결과에서 이소로이폴린(Isorhoifolin)과 Neuro2a 세포에 대한 IC50이 대략 11.616mM의 범위에 있고, 세포에 대한 독성이 상당히 약함을 알 수 있다.

[0046] **실시예 4: 이소로이폴린(Isorhoifolin)의 뇌손상 후 생쥐의 운동협동성 회복에 대한 촉진**

[0047] 단봉(horizontal bar) 실험을 이용하여, 생쥐를 지면으로부터 49 cm 높이에 있는 길이 38 cm, 직경 2 mm, 4 mm, 6 mm의 구리 봉에 놓고, 생쥐로 하여금 앞발로 구리 봉을 잡도록 하고, 생쥐가 구리 봉에 머무는 시간을 계산하고 구리 봉 끝단의 플랫폼에 도달하는지를 확인하여, 생쥐의 운동 협동성 능력을 평가했다. 평가 기준으로 는, 1-5초는 1점, 5-10초는 2점, 10-20초는 3점, 20-30초는 4점, 30초 이상 또는 플랫폼에 도달하면 5점으로 했다.

[0048] 본 실험의 실험 모델은 도 10에 나타난 바와 같으며, 각각 -5, -3, -1 dpi (day post injury) (뇌손상 전 5, 3, 1일)에 예비 트레이닝(pre-training)을 수행하고, 0 dpi에, 제어된 피질 충격 뇌외상 모델(controlled cortical impact model)을 이용하여 생쥐에 뇌손상을 가하고, 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 dpi에 비강 투여 방식으로 14 µg/kg 또는 140 µg/kg의 이소로이폴린(Isorhoifolin)를 투여하고, 1, 3, 6, 10, 13 dpi에 단봉(horizontal bar) 실험을 수행했다.

[0049] 도 10에서 볼 수 있듯이, 뇌손상 후 물(ddH₂O)만 투여한 군은 운동 협동성의 상실이 확인된 반면, 이소로이폴린(Isorhoifolin)을 투여한 군은 운동 협동성이 Sham(가성 수술군)군과 유사했으며, 운동 협동성의 회복을 현저하게 촉진한 것을 확인할 수 있었다.

[0050] **실시예 5: 이소로이폴린(Isorhoifolin)의 생체 외(exo vivo) 망막 신경 조직 복원 촉진**

[0051] 실험 설계 및 절차는 도 11에 나타난 바와 같고, 눈의 망막 조직(retinal explants)은 출생한지 8일 되는 C57BL/6품계 생쥐로부터 취했다. 생쥐를 희생시킨 후 그 눈을 취하고, 이어서 포셉과 미세수술용 가위로 안구와 눈의 망막을 분리하고 유리체를 제거했다. 마지막으로 분리된 눈의 망막을 네 조각으로 베고, 미세수술용 가위로 조직의 가장자리에 대해 트리밍과 스크래칭을 수행하고, 각 조각을 18 mm의 원형 슬라이드 글라스에서 배양하고, 12 웰 플레이트에 놓고 인큐베이터에 넣어, 5% CO₂ 와 35℃의 조건에서 5일간 배양했다. 각 조각의 눈의 망막 조직에 대해 날마다 모두 신선한 배양액으로 교체하고 9 µM 또는 90 µM의 이소로이폴린(Isorhoifolin)를 넣었다. 눈의 망막 조직을 배양한지 5일이 될 때, 0.1% Glutaraldehyde solution과 4% paraformaldehyde의 혼합 용액을 이용하여 실온에서 1시간 고정(Fix)시키고, 1차 항체인 axonal marker beta-III-tubulin (TUB1)과 DAPI를 이용하여 염색하고, 신경세포와 세포핵을 마킹했다. 그리고 초해상도 직립형 공초점 현미경(super-resolution upright confocal microscope)(LSM-800, Carl Zeiss)으로 촬영하고, 이미지 분석 프로그램인 ImageJ를 이용하여, 조직의 경계를 동그라미로 선택하고 둘레의 길이와 조직 외측의 신경섬유 면적을 계산하고, 신경섬유 면적을 조직 경계의 둘레의 길이로 나누어, 단위 둘레의 길이당 신경섬유의 길이를 얻었다.

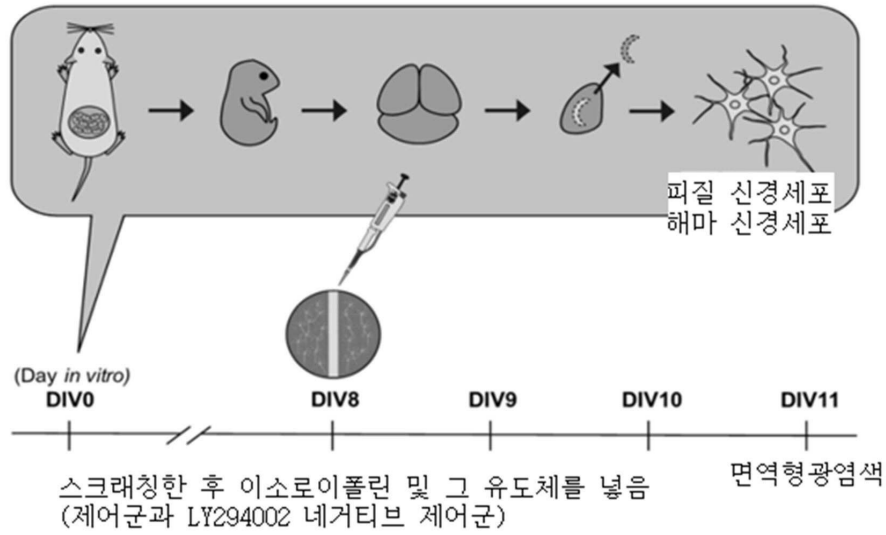
[0052] 도 12에 나타난 바와 같이, 눈의 망막 신경(retinal neurons)이 손상된 후, 이소로이폴린(Isorhoifolin)을 투여한 군은 물(ddH₂O)만 투여한 군에 비해 손상 후 회복 효과가 현저했다.

[0053] 상기 실험 데이터는 특정 조건에서 얻은 1차 실험결과이며, 이는 본 발명의 기술적 내용을 쉽게 파악하거나 참고하기 위한 것일 뿐이며, 다른 관련 실험을 더 수행해야 한다. 당해 실험 데이터와 그 결과는 본 발명의 권리 범위를 한정하기 위한 것은 아니다.

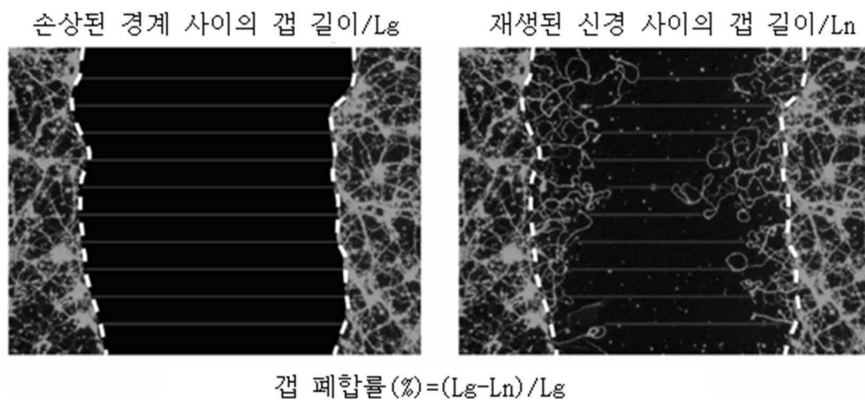
[0054] 전술한 바람직한 실시예는 본 발명과 이의 기술적 특징을 예시를 들어 설명할 뿐이며, 당해 실시예의 기술은 다양한 실질적인 등가 수정과/또는 대체 방식으로 적절하게 실시될 수 있다. 따라서, 본 발명의 권리범위는 특허 청구범위에서 한정된 범위를 기준으로 한다.

도면

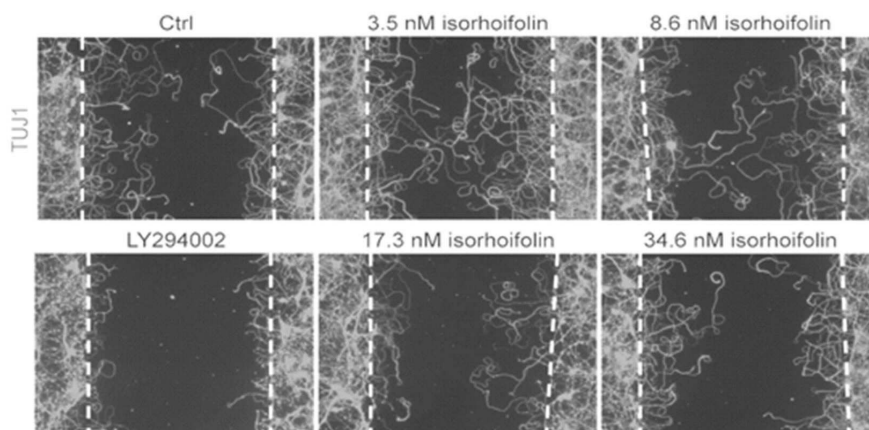
도면1



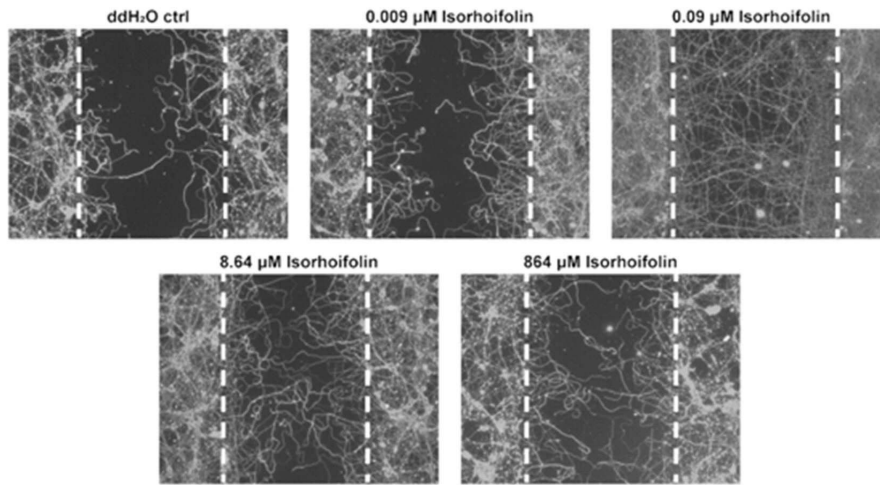
도면2



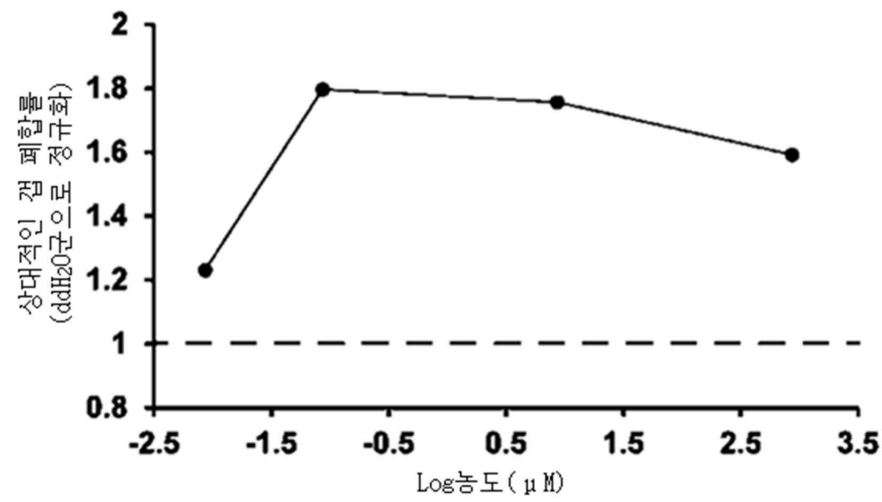
도면3a



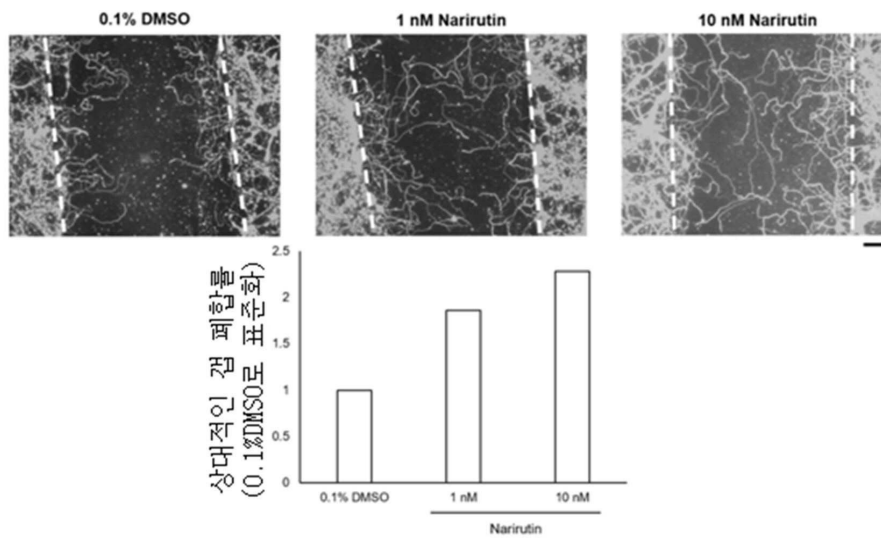
도면3b



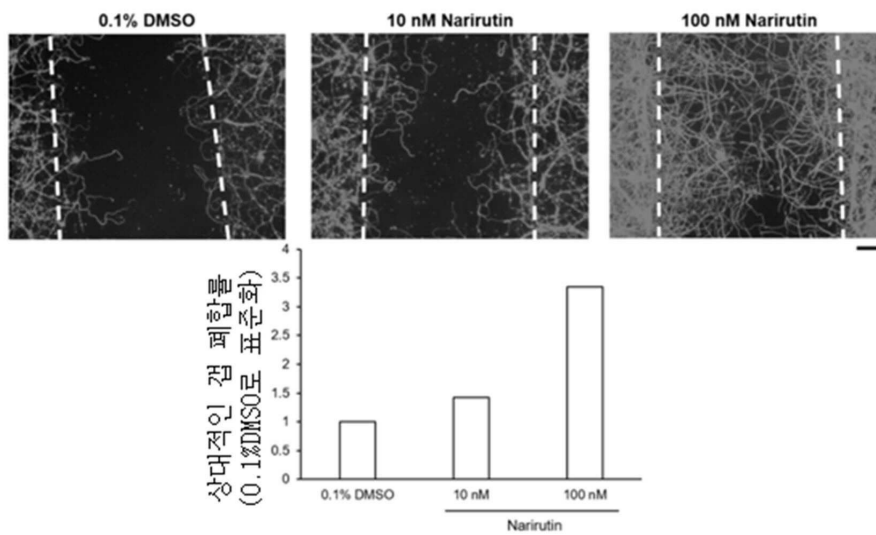
도면3c



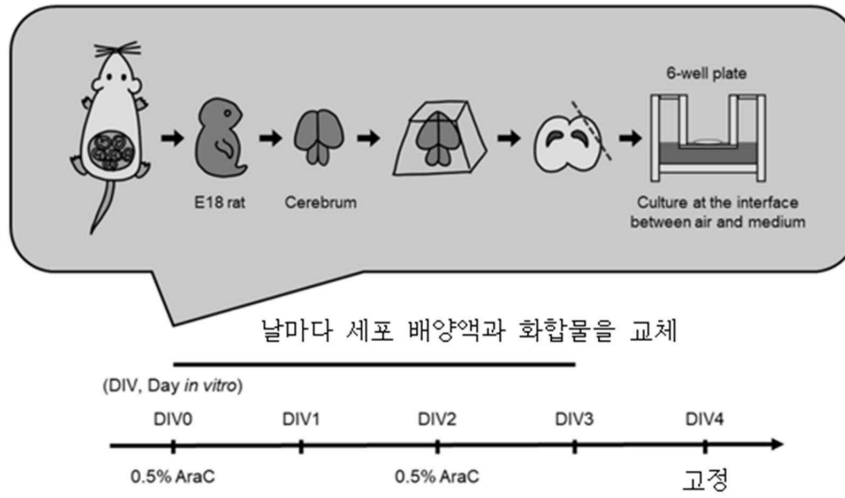
도면4



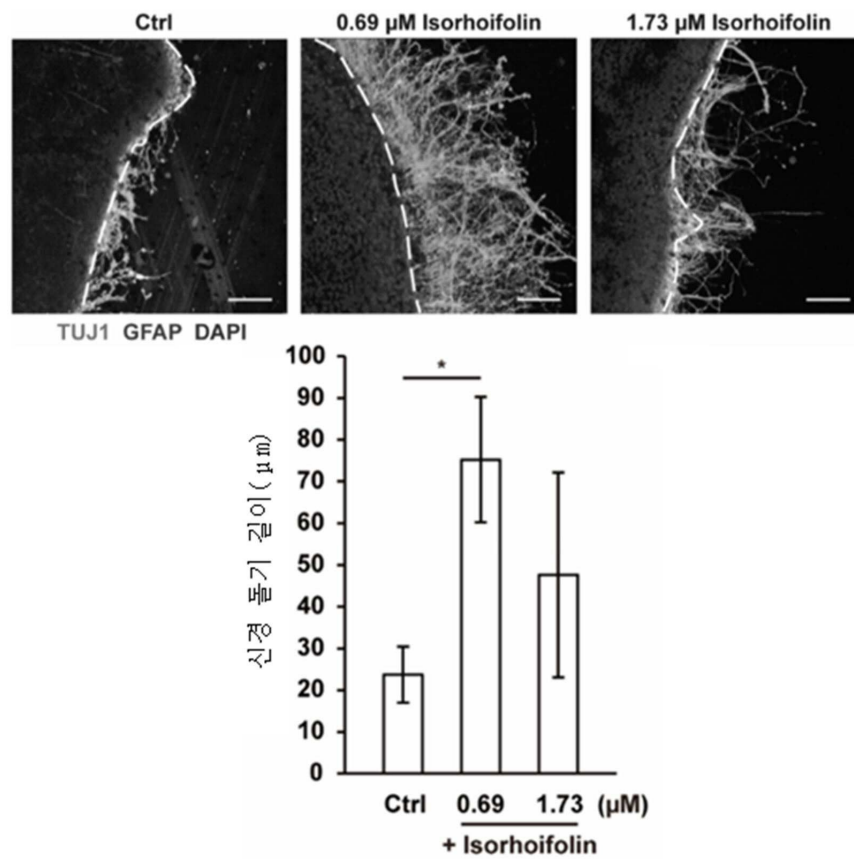
도면5



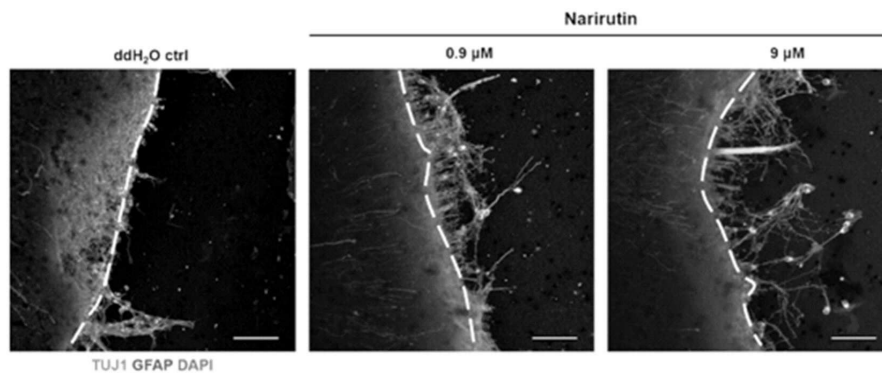
도면6



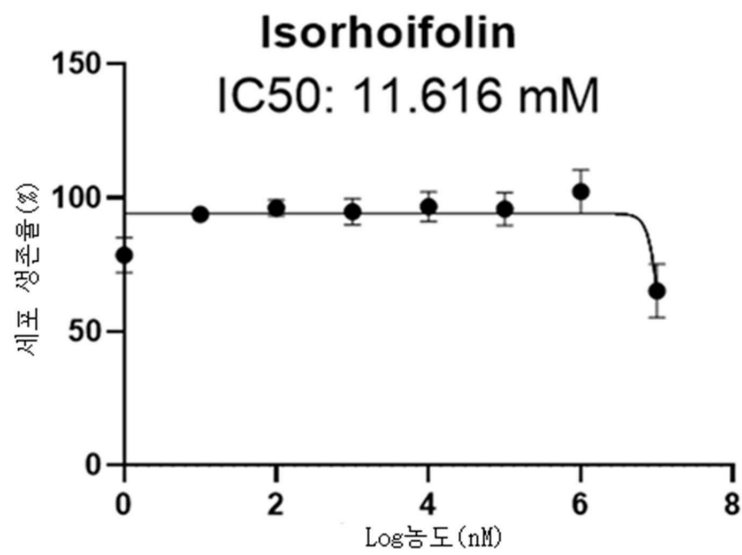
도면7



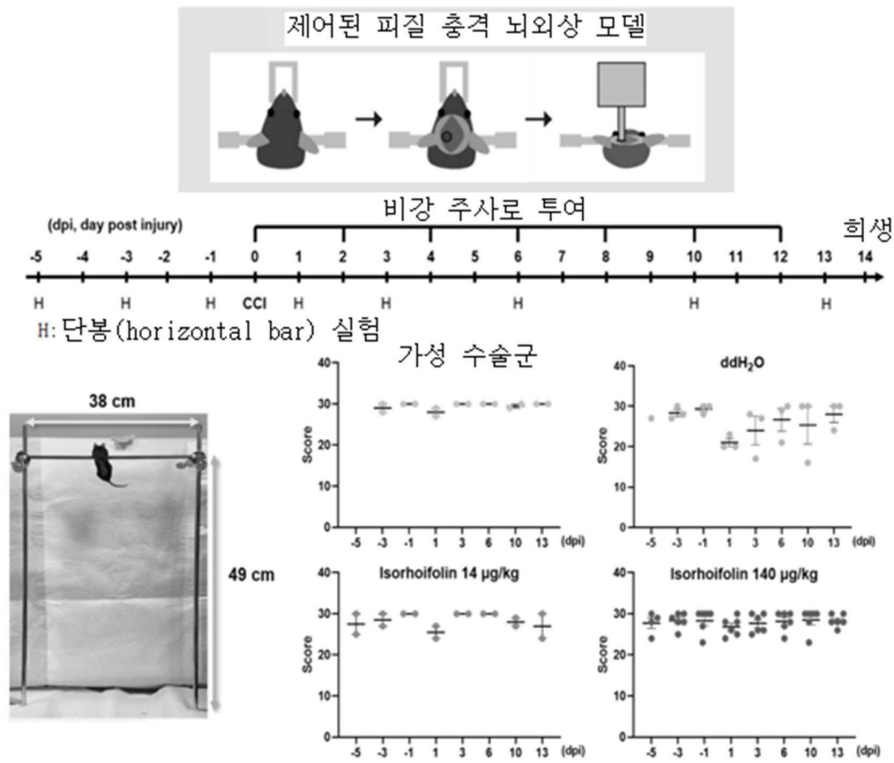
도면8



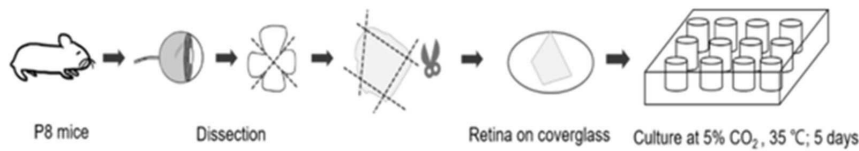
도면9



도면10



도면11



도면12

