



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0010957
(43) 공개일자 2023년01월20일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/03 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61P 25/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 36/03 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2021-0091400
(22) 출원일자 2021년07월13일
심사청구일자 2021년07월13일
- (71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
- (72) 발명자
이승호
인천광역시 연수구 해돋이로84번길 30, 103동 404호(송도동, 송도금호어울림아파트)
- (74) 대리인
특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 8 항

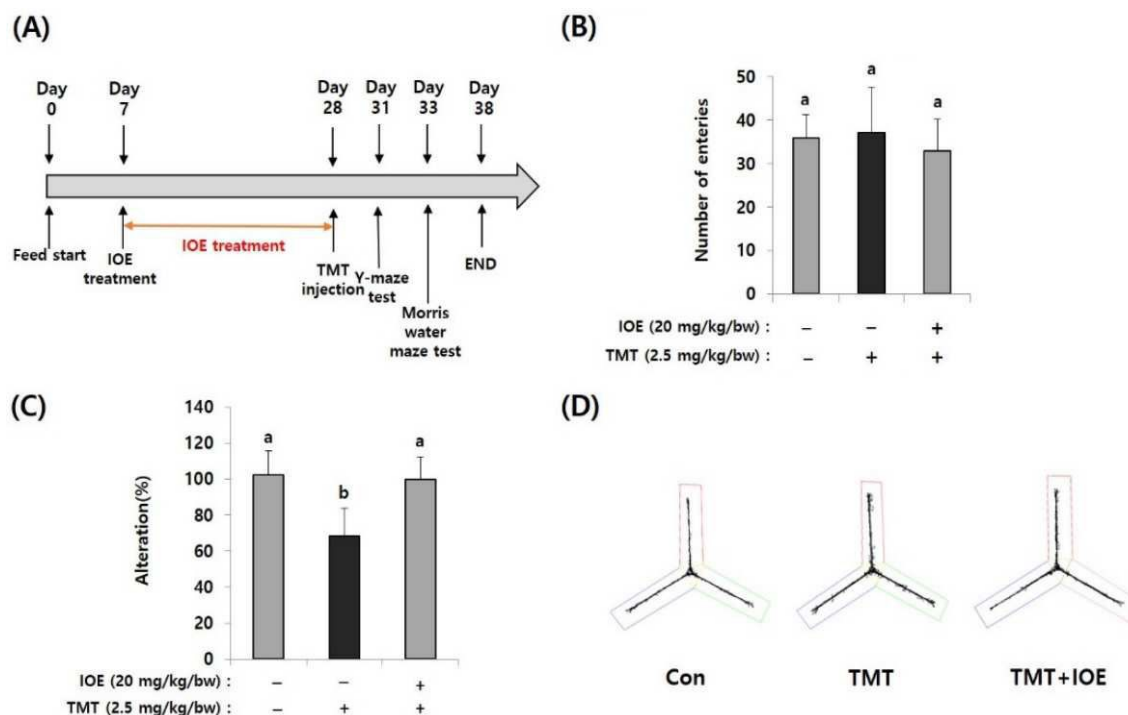
(54) 발명의 명칭 패 추출물을 포함하는 트리메틸틴 매개 신경변성 예방, 개선 또는 치료용 조성물 내지 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 포함하는 신경변성, 특히 트리메틸틴(trimethyltin)으로 인해 발생하는 신경변성 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

또한, 본 발명은 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 처리하는 단계를 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 처리된 뇌(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



세포 보호방법 내지 패 추출물을 포함하는 트리메틸틴 처리된 뇌세포 보호용 조성물에 대한 것이다.

본 발명의 패 추출물은 트리메틸틴 처리로 인해 손상된 뇌세포를 보호하는 효과로서, i) 절단된 카스파아제-3 발현 감소, ii) 절단된 PARP 발현 감소, iii) BDNF(brain-derived neurotrophic factor) 발현 증가, iv) ERK 인산화 감소, v) p38 인산화 감소, vi) JNK 인산화 감소, vii) HO-1(heme oxygenase-1) 발현 증가, 및 viii) Nrf2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 발현 증가 를 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명의 패 추출물은 트리메틸틴 매개 신경변성 예방, 개선 또는 치료용 조성물, 트리메틸틴 처리된 뇌세포 보호방법 내지 보호용 조성물로서 효과적으로 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23V 2250/202 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

패(*Ishige okamurae*) 추출물을 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 매개 신경변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물을 추출용매로 하여 추출된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 트리메틸틴 매개 신경변성은 활동과잉, 공격성, 인지장애, 파킨슨병(Parkinson's disease), 근 위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 헌팅턴병(Huntington's disease) 및 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

패(*Ishige okamurae*) 추출물을 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 매개 신경변성 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

패(*Ishige okamurae*) 추출물을 처리하는 단계를 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 처리된 뇌세포 보호방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 패 추출물은 하기 8 가지 특징으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 특징을 유도하기 위해 처리되는 것을 특징으로 하는 보호방법:

- i) 절단된 카스파아제-3 발현 감소 ;
- ii) 절단된 PARP 발현 감소 ;
- iii) BDNF(brain-derived neurotrophic factor) 발현 증가 ;
- iv) ERK 인산화 감소 ;
- v) p38 인산화 감소 ;
- vi) JNK 인산화 감소 ;
- vii) HO-1(heme oxygenase-1) 발현 증가 ; 및
- viii) Nrf2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 발현 증가.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 뇌세포는 HT22 세포인 것을 특징으로 하는 보호방법.

청구항 8

패(*Ishige okamurae*) 추출물을 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 처리된 뇌세포 보호용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 포함하는 신경변성, 특히 트리메틸틴(trimethyltin)으로 인해 발생하는 신경변성 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.
- [0002] 또한, 본 발명은 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 처리하는 단계를 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 처리된 뇌세포 보호방법 내지 패 추출물을 포함하는 트리메틸틴 처리된 뇌세포 보호용 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

- [0004] 신경 변성은 파킨슨 병, 근 위축성 측삭 경화증, 헌팅턴병, 치명적인 가족성 불면증, 알츠하이머 병과 같은 많은 불치의 신경 퇴행성 질환을 유발하는 신경 세포의 점진적인 기능적 또는 구조적 손실이다. 이러한 신경 퇴행성 질환은 세포 이하 수준에서 많은 유사한 표현형을 가지고 있는 것으로 입증되어 동시에 신경 퇴행성 질환을 개선하는 치료제를 개발할 수 있는 기회를 제공한다. 이러한 이유로 TMT 유도 신경 퇴화 및 글루타메이트 흥분 독성과 같은 여러 모델 시스템이 신경 퇴행성 질환에 대한 치료 후보의 효과를 조사하는데 자주 사용된다.
- [0005] 트리메틸틴(trimethyltin, TMT)은 농업 및 산업 분야에서 널리 사용되는 유기 주석 화합물이다. 인간에게 TMT를 전신 투여하면 중추 신경계 (CNS)에서 활동과잉 및 인지장애와 같은 임상 증상으로 이어지는 신경 변성이 유도된다. 따라서 TMT는 뇌 기능 장애 및 신경 퇴행을 조사하기 위한 잠재적인 모델 신경 독소로 사용되었다. 세포 내 칼슘 과부하, 글루타메이트 흥분 독성, 산화 스트레스를 포함하여 TMT 매개 신경 독성 효과의 몇 가지 기본 메커니즘이 제안되었다. 그러나 TMT로 인한 신경 퇴행의 상세한 세포 및 분자 메커니즘은 여전히 밝혀야 한다.
- [0006] 패(*Ishige okamurae*)는 동아시아 전역에 널리 퍼져있는 일종의 식용 갈조류이다. 패를 비롯한 갈조류는 생리 활성이 저혈당, 항 염증, 항 바이러스 효과를 포함하는 것으로 제안되어 약용 식품에 사용되는 기능성 소재로 주목 받고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 대한민국 특허출원 제10-2020-0109571호
(특허문헌 0002) 대한민국 특허출원 제10-2018-0096791호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 이에 본 발명자들은 TMT 주입 동물 모델과 in vitro 글루타메이트 흥분 독성을 이용하여 알츠하이머 병 (Alzheimer's disease, AD) 이외의 신경변성에도 패 추출물(*Ishige okamurae* extract, IOE)을 적용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 매개 신경변성 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 처리하는 단계를 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 처리된 뇌세포 보호방법, 또는 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 처리된 뇌세포 보호용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 매개 신경변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물을 추출용매로 하여 추출된 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 트리메틸틴 매개 신경변성은 활동과잉, 공격성, 인지장애, 파킨슨병(Parkinson's disease), 근 위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 헌팅턴병(Huntington's disease) 및 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 매개 신경변성 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 처리하는 단계를 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 처리된 뇌세포 보호방법 을 제공한다.

[0019] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 패 추출물은 하기 8 가지 특징으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 특징을 유도하기 위해 처리되는 것일 수 있다:

[0020] i) 절단된 카스파아제-3 발현 감소 ;

[0021] ii) 절단된 PARP 발현 감소 ;

[0022] iii) BDNF(brain-derived neurotrophic factor) 발현 증가 ;

[0023] iv) ERK 인산화 감소 ;

[0024] v) p38 인산화 감소 ;

[0025] vi) JNK 인산화 감소 ;

[0026] vii) HO-1(heme oxygenase-1) 발현 증가 ; 및

[0027] viii) Nrf2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 발현 증가.

[0028] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 뇌세포는 HT22 세포인 것일 수 있다.

[0029] 본 발명은 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 처리된 뇌세포 보호용 조성물 을 제공한다.

발명의 효과

[0031] 본 발명의 패 추출물은 트리메틸틴 처리로 인해 손상된 뇌세포를 보호하는 효과로서, i) 절단된 카스파아제-3 발현 감소, ii) 절단된 PARP 발현 감소, iii) BDNF(brain-derived neurotrophic factor) 발현 증가, iv) ERK 인산화 감소, v) p38 인산화 감소, vi) JNK 인산화 감소, vii) HO-1(heme oxygenase-1) 발현 증가, 및 viii) Nrf2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 발현 증가 를 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명의 패 추출물은 트리메틸틴 매개 신경변성 예방, 개선 또는 치료용 조성물, 트리메틸틴 처리된 뇌세포 보호방법 내지 보

호용 조성물로서 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033]

도 1은 마우스의 패 추출물(IOE) 경구 투여 (A) 에 따른 기억 장애 테스트 방법 및 결과를 나타낸다. Y-미로 테스트의 진입 수(Number of enteries)는 그룹 간에 차이가 없었지만(B) TMT 마우스 그룹에 비해 IOE 마우스에서 TMT에 의한 자발적 변화(Alteration, %)가 회복되었다(C). (D) 는 각 그룹의 경로 추적을 나타낸다. 표시된 데이터는 $\pm$ SD를 의미한다. Con : 대조군 (미처리), a : b와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$).

도 2는 마우스의 패 추출물(Ishige okamurae extract, IOE) 경구 투여 (A) 에 따른 장기 기억 장애 테스트 방법 및 결과를 나타낸다. 모리스 수중 미로 테스트의 탈출 지연 시간 (Escape latency) (A)과 5 일째 W 영역에서의 시간 (Time in W zone, %) (B) 을 나타냈다(n = 5). (C)는 프로브 시험 중 각 그룹의 움직임 패턴을 나타낸다. 표시된 데이터는 $\pm$ SD를 의미한다. Con : 대조군 (미처리), a : b와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$).

도 3은 대조군(Con), 트리메틸틴 투여(TMT), 트리메틸틴 및 패 추출물 투여(TMT+IOE) 그룹의 뇌 조직에서 절단된 Caspase-3 및 절단된 PARP (A) 및 BDNF (B)의 발현을 나타낸다(n = 5). 각 유전자의 발현 수준을 추정하고 GAPDH 것으로 정규화하여 나타냈다. 표시된 데이터는 $\pm$ SD를 의미한다. a : b와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$).

도 4는 대조군(Con), 트리메틸틴 투여(TMT), 트리메틸틴 및 패 추출물 투여(TMT+IOE) 그룹 마우스 뇌의 H & E로 염색된 해마 영역의 대표적인 CA1 하위 필드를 나타낸다. 위쪽 패널에 있는 사각형의 확대된 영역은 아래쪽 패널 (A)에 표시되고 생존 세포 및 농축 핵의 수를 나타냈다 (n = 5) (B). 화살표는 농축 핵을 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ SD로 표현된다. a : b와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$). 배율 200 배 (위쪽 패널) 및 400 배 (아래쪽 패널). 스케일 바 = 50 μ m.

도 5는 대조군(Con), 트리메틸틴 투여(TMT), 트리메틸틴 및 패 추출물 투여(TMT+IOE) 그룹 마우스 뇌 (n = 5)에서 ERK (A), p-38 MAPK (B) 및 JNK (C)의 인산화 수준을 나타내고, 각 그룹 ERK (p-ERK/t-ERK), p38 (p-p38/p38) 및 JNK (p-JNK/JNK)의 상대적 발현율을 나타냈다. 표시된 데이터는 $\pm$ SD를 의미한다. a : b와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$).

도 6은 대조군(Con), 트리메틸틴 투여(TMT), 트리메틸틴 및 패 추출물 투여(TMT+IOE) 그룹 마우스의 뇌에서 Nrf2 및 HO-1의 발현 수준과 (n = 5) (A), 각 그룹 Nrf2 (Nrf2/GAPDH) 및 HO-1 (HO-1/GAPDH)의 상대적 발현율을 나타낸다 (B). 표시된 데이터는 $\pm$ SD를 의미한다. a : b와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$).

도 7은 HT22 세포에 대한 패 추출물(IOE)의 세포 독성을 나타낸다. 글루타메이트 매개 세포 독성은 비 독성 수준의 IOE 처리에 의해 억제되었다. 세포 생존율은 WST-1 분석 키트 (B) 및 세포 계수 (C)로 측정되었다. 표시된 데이터 값은 $\pm$ SD를 의미한다. 대조군에는 처리되지 않은 세포 (IOE- 및 Glu-)가 사용되었다. 비슷한 결과로 실험을 세 번 반복했다. a : b 또는 c와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$) b : a 또는 c와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$), * : 대조군과 비교했을 때 유의한 차이 ($p < 0.01$). Glu : 글루타메이트.

도 8은 HT22 세포에서 글루타메이트 매개 ROS 생산에 대한 IOE 효과를 나타낸다(A). 세포 사멸 관련 유전자 (Bax, Bcl-1 및 절단된 caspase-3)의 발현과 (B, C) (n = 3), Bax/Bcl-2의 비율과 절단된 caspase-3 (절단된 caspase-3/ β 액틴)의 상대적 발현을 나타낸다. 표시된 데이터는 $\pm$ SD를 의미한다. Glu : 글루타메이트. 대조군에는 처리되지 않은 세포 (IOE- 및 Glu-)가 사용되었다. 실험은 세 번 반복되었고 유사한 결과로 세 번 반복되었다. a : b 또는 c와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$) b : a, c 및 d와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$).

도 9는 HT22 세포에서 글루타메이트 (5mM) 유무에 관계없이 IOE로 2 시간 동안 전처리하고, ERK (A), p38 MAPK (B) 및 JNK (C)의 인산화를 측정한 결과를 나타낸다(n = 3). 각 데이터 값은 평균 $\pm$ SD로 표시된다. Glu : 글루타메이트. 대조군에는 처리되지 않은 세포 (IOE- 및 Glu-)가 사용되었다. 실험은 세 번 반복되었고 유사한 결과로 세 번 반복되었다. a : b 또는 c와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$) b : a 또는 c와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$).

도 10은 글루타메이트에 의한 Nrf2 및 HO-1 억제는 IOE (2 시간 전처리)와 MAPK 억제제 (PD98059, SB203580 및 SP600125, 1 시간 전처리)에 의해 회복된 것을 나타낸다. HT22 세포에서 Nrf2 (D-F) 및 HO-1 (A-C)의 글루타메이트 유도 발현은 qRT-PCR (n = 3)에 의해, PD98059 (A, D), SB203580 (B, E) 및 SP600125 (C 및 F)가 Nrf2 및

HO-1의 발현에 미치는 영향은 qRT-PCR ($n = 3$)에 의해 추정되었다. 처리되지 않은 세포 (IOE, Glu 및 억제제-)가 대조군에 사용되었다. 실험은 세 번 반복되었고 유사한 결과로 세 번 반복되었다. 표시된 데이터는 $\pm$ SD를 의미한다. a : b 또는 c와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$) b : a 또는 c와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$).

도 11은 HT22 세포에서 글루타메이트로 유발된 ROS 과잉 생산과 세포 독성은 IOE와 MAPK 억제제에 의해 회복된 것을 나타낸다. IOE (2 시간) 및 MAPK 억제제 (1 시간)로 HT22 세포를 전처리 한 후 (PD98059; MEK 억제제, SB203580; p38 MAPK 억제제, SP600125; JNK 억제제) ROS 과잉 생산(A-C) 및 세포 생존력 (D-F)을 추정했다. 처리되지 않은 세포 (IOE, Glu 및 억제제)가 대조군에 사용되었다. 표시된 데이터는 $\pm$ SD를 의미한다. Glu : 글루타메이트. 실험은 세 번 반복되었고 유사한 결과로 세 번 반복되었다. a : b 또는 c 또는 d와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$) b : a, c 또는 d와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$); c : a, b 또는 d와 비교할 때 유의한 차이 ($p < 0.05$).

도 12는 패 추출물(IOE) 매개 항 신경 변성 효과를 나타낸 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034]

이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0036]

본 발명에서 패(*Ishige okamurae*)가 in vivo에서 트리메틸틴(trimethyltin, TMT)에 의해 유도된 신경 변성에 미치는 영향을 확인하여 식용 갈색 조류인 패(*Ishige okamurae*)가 신경 퇴행 과정에 미치는 억제 역할을 조사했다. 본 발명에서 제조한 TMT 주입 마우스 모델은, 신경변성 마우스 모델을 의미하며 상기 신경변성 마우스 모델은 활동과잉, 공격성, 인지장애, 파킨슨병(Parkinson's disease), 근 위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 헌팅턴병(Huntington's disease) 또는 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 마우스 모델일 수 있다. TMT 주입 마우스에 패 추출물(IOE)을 경구 투여하면 모리스 수중 미로 테스트 및 Y-maze 테스트에서 조사한 TMT 매개 단기 및 장기 기억 장애가 방해를 받았다. IOE는 TMT 매개 세포 사멸과 뇌 유래 신경 영양 인자, Nrf2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 및 HO-1(heme oxygenase-1)의 발현을 마우스 뇌에서 약화시켰다. 또한, 마우스 뇌 조직 및 HT22 세포에서 TMT 에 의해 유도된 MAPK (mitogen-activated protein kinases) 인산화는 IOE 처리에 의해 약화되었다. 종합적으로, 본 발명의 IOE는 MAPK/Nrf-2/HO-1 항산화 경로를 조절함으로써 TMT-매개 신경 세포 조절 장애와 같은 신경변성 과정을 약화 효과를 제공할 수 있다.

[0038]

따라서, 본 발명은 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 매개 신경변성 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0039]

본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합물을 추출용매로 하여 추출된 것일 수 있다. 바람직하게는 물, C1 내지 C4의 저급알코올 또는 이들의 혼합물인 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 물, 메탄올, 에탄올, 프로판올 또는 이들의 혼합물인 것이 바람직하며 가장 바람직하게는 1~100% 에탄올 을 용매로 하는 것이 가장 바람직하다.

[0040]

본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 트리메틸틴 매개 신경변성은 활동과잉, 공격성, 인지장애, 파킨슨병(Parkinson's disease), 근 위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 헌팅턴병(Huntington's disease) 및 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0041]

본 발명의 '예방'이란, 본 발명의 패 추출물로 인해 신경변성 관련 질환이 억제되거나 그 발병이 지연되도록 하는 모든 행위를 의미한다.

[0042]

본 발명의 '개선' 또는 '치료'란, 본 발명의 패 추출물로 인해 신경변성 관련 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도가 호전되거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.

[0043]

본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 상기 조성물을 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충전제, 증량제, 결합제, 아췌반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 습윤제, 붕해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

- [0044] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분(옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분 등 포함), 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 텍스트로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 말티톨, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필 메틸-셀룰로오스 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 예컨대, 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다.
- [0045] 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 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 또는 보존제 등이 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 봉쇄제로 첨가할 수 있으며, 항응집제, 향료, 유화제, 가용화제, 분산제, 향미제, 향산화제, 포장제, 안료 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0046] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사하는 주사제; 또는 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화할 수 있다.
- [0048] 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 헵스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 텍스트로오스와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0049] 흡입 투여제의 경우, 본 발명에 따라 사용되는 화합물은 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압 팽 또는 연무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달 할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 취입기에 사용되는 젤라틴 캡슐 및 카트리지는 화합물, 및 락토즈 또는 전분과 같은 적합한 분말 기체의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 약제학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명은 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 매개 신경변성 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

- [0054] 상기 패 추출물은 상기 약학적 조성물에서 포함하는 것과 동일하므로 설명은 상기 기재로 대신한다.
- [0055] 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 일반 식품으로는 이에 한정되지 않지만 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마야말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀 국수, 라면, 스파게이트, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 옛, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물 유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 패 추출물을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 영양보조제로는 이에 한정되지 않지만 캡슐, 타블렛, 환 등에 본 발명의 패 추출물을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 건강기능식품으로는 이에 한정되지 않지만 예를 들면, 본 발명의 패 추출물 자체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용(건강음료)할 수 있도록 액상화, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 본 발명의 패 추출물을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 패 추출물과 신경변성 질환 예방 또는 개선 효과가 있다고 알려진 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 패 추출물을 건강음료로 이용하는 경우, 상기 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.
- [0057] 또한, 본 발명의 패 추출물은 신경변성 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물의 유효성분으로 함유될 수 있는데, 그 양은 신경변성 질환 예방 또는 개선 작용을 달성하기에 유효한 양으로 특별히 한정되는 것은 아니나, 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%인 것이 바람직하다. 본 발명의 건강기능식품 조성물은 패 추출물과 함께 신경변성 질환에 효과가 있는 것으로 알려진 다른 활성 성분과 함께 혼합하여 제조될 수 있다.
- [0058] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0060] 또한, 본 발명은 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 처리하는 단계를 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 처리된 뇌 세포 보호방법 을 제공한다.
- [0061] 상기 패 추출물은 상기 약학적 조성물에서 포함하는 것과 동일하므로 설명은 상기 기재로 대신한다.
- [0062] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 패 추출물은 하기 8 가지 특징으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 특징을 유도하기 위해 처리되는 것일 수 있다:
- [0063] i) 절단된 카스파아제-3 발현 감소 ;
- [0064] ii) 절단된 PARP 발현 감소 ;
- [0065] iii) BDNF(brain-derived neurotrophic factor) 발현 증가 ;
- [0066] iv) ERK 인산화 감소 ;
- [0067] v) p38 인산화 감소 ;
- [0068] vi) JNK 인산화 감소 ;
- [0069] vii) HO-1(heme oxygenase-1) 발현 증가 ; 및
- [0070] viii) Nrf2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2) 발현 증가.

- [0071] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면 상기 뇌세포는 HT22 세포인 것일 수 있다.
- [0073] 또한, 본 발명은 패(*Ishige okamurae*) 추출물을 포함하는 트리메틸틴(trimethyltin) 처리된 뇌세포 보호용 조성물을 제공한다.
- [0074] 상기 패 추출물은 상기 약학적 조성물에서 포함하는 것과 동일하므로 설명은 상기 기재로 대신한다.
- [0076] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석하지 않는 것은 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명한 것이다.

실시예 1

- [0078] **실험준비**
- [0079] <1-1> 패 추출물 제조
- [0080] 70 % 에틸 알코올을 사용하여 패(*Ishige okamurae*)를 추출하고 상층액을 진공 증발기 (Heidolph Instruments GmbH & Co., Schwabach, Germany)로 농축하고 동결 건조기 (ilShinBioBase, Seoul, Korea)로 동결 건조시켰다. 수율은 13.7 % (w/w) 이었다.
- [0082] <1-2> 마우스 모델 준비
- [0083] 마우스는 하기 실시예 <1-3> 에 기재된 바와 같이 3 주동안 20mg/kg bw/일의 용량으로 IOE를 먹였다. 인체 등가 선량은 체 표면적을 사용하여 계산되었으며, TMT 주사 마우스의 IOE (20mg/kg bw/day) 농도는 36.45mg/60kg bw/day로 인체 섭취량으로 추정할 수 있다. 인간의 이 복용량 (36.45 mg/60 kg bw/일)은 사용 가능한 보충제로 충족될 수 있다.
- [0085] <1-3> 마우스 실험군 준비
- [0086] 4 주령 수컷 C57BL/6 마우스(NARA Biotec; Seoul, South Korea)는 빛 주기 (12 시간 밝음/12 시간 암흑), 온도 (23 ± 3 °C 및 습도 (55 ± 10 %))를 조절하는 케이지에 보관되었다. 생쥐는 표준 음식과 물을 자유롭게 사용할 수 있도록 허용했다 (Orient Bio, Seoul, South Korea). 마우스를 1 주 동안 적응시킨 후 대조군 (용매 주입, n = 5), TMT (TMT 주입, n = 5), TMT+IOE (TMT 주입+경구 IOE 위관법 20mg/kg bw/일, n = 5) 의 3 그룹으로 나뉘었다. TMT+IOE 그룹은 21 일 동안 IOE로 치료되었다. TMT (Sigmadrach, Seoul, South Korea)는 IOE 투여를 마친 후 한 번만 마우스 (2.5mg/kg/bw)에 복강 내 주사 하였다(도 1 A). 대조군 마우스에 동일한 부피의 PBS 를 접종했다. 모든 실험 절차는 인천대학교 실험 동물 관리 및 사용 지침에 따라 수행되었으며, 인천대학교 기관 동물 관리 및 사용위원회 (INU-ANIM-2018-11)의 승인을 받았다.

실시예 2

- [0088] **TMT 매개 인지장애 에 대한 IOE 의 효과**
- [0089] <2-1> Y-미로 테스트
- [0090] 트리메틸틴(TMT) 매개 인지 장애에 대한 패 추출물(IOE)의 영향을 확인하고자 하였다. Y-미로 테스트는 새로운 환경을 탐색하려는 의지를 측정하는 행동 테스트이므로 마우스의 단기 기억을 평가하는 데 사용할 수 있다.
- [0091] 구체적으로, TMT 주입 3 일 후 Y-미로 테스트가 시작되었다 (도 1A). 각 마우스를 한 팔 끝에 놓고 8 분 동안 미로를 자유롭게 움직일 수 있도록 했다. 팔 항목 순서는 SMART 3.0 비디오 추적 시스템 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)을 사용하여 수동으로 기록되었다. 교대(Alteration) 은 3 세트에서 팔에 대한 성공적인 진

입 수로 계산하였다(수학식 1). 동물이 처음 A, B, C 순으로 들어갔을 때 하나의 교대 (실제 교대)로 계산되지만 B, A, B 순서로 들어간 동물은 교대로 계산되지 않는다.

[0092] [수학식 1]

[0093] 가능한 교대 = 총 팔 진입 수 2

[0094] 교대 동작 (%)은 하기 [수학식 2] 를 이용하여 계산하였다.

[0095] [수학식 2]

[0096] 교대 동작 (%) = (실제 교대) / (교대 가능) × 100

[0097] 그 결과, [도 1 B] 에서 나타나는 바와 같이 진입 수는 그룹간에 차이가 없었으며 TMT가 마우스의 기본 기관차 능력에 영향을 미치지 않았음을 시사한다. 그러나 TMT 주사 마우스 그룹 ($68.46 \pm 15.37 \%$)의 자발적인 변화 (%)는 대조군 ($100.20 \pm 13.50 \%$)에 비해 유의하게 감소했다 ($p < 0.05$). 그러나 TMT는 IOE 그룹 ($99.80 \pm 12.58 \%$)의 자발적인 변경에 영향을 미치지 않았으며 (도 1C), IOE의 경구 투여가 TMT 매개 공간 작업 기억 손상을 악화시킬 수 있음을 시사한다. 또한, 대조군 마우스와 비교하여 TMT 주입 마우스에서 불균형한 이동 경로가 확인되었지만 IOE 마우스는 대조군 마우스와 유사한 움직임 패턴을 보였으며 (도 1 D), IOE의 경구 투여로 TMT 매개 비정상적인 행동이 억제될 수 있음을 나타낸다.

[0099] <2-2> 모리스 수중 미로 테스트

[0100] 모리스 수중 미로 테스트(Morris Water Maze Test, MWM) 테스트를 사용하여 공간 및 장기 학습 기억에 대한 TMT 매개 손상에 대한 IOE의 효과를 평가했다.

[0101] 구체적으로, MWM 테스트 장비는 최대 30cm 높이의 물 ($22 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 에 흰색 잉크 (Wilton Industries, Inc., Woodridge, IL, USA)가 채워진 원형 풀 (직경 90cm, 높이 60cm)로 구성되었으며, 4 개의 동일한 사분면으로 나뉘었다. W 구역 중앙에 흰색 탈출 플랫폼이 설치되었다. 마우스를 수영하고 대기 시간을 최대 60 초까지 모니터링했다. 그들은 5 초 동안 플랫폼에 머무르는 것이 허용되었다. 훈련 세션 (TMT 주입 후 5 일)에서 마우스는 하루 3 번의 시험 동안 탈출하기 위해 수영해야 했다. 프로브 테스트 (TMT 주입 후 10 일)는 플랫폼없이 60 초 동안 공간 기억과 장기 기억을 추정하기 위해 수행되었으며, W 구역에서 보낸 시간은 SMART 3.0 비디오 추적 시스템(Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)을 사용하여 기록되었다.

[0102] 그 결과, [도 2 A] 에서 볼 수 있듯이, 대조군 마우스의 플랫폼 (탈출 대기 시간)에 도달하는 시간은 MWM 테스트 중에 감소하는 경향이 있다. 그러나 TMT 마우스 ($55.71 \pm 4.58 \%$)의 탈출 잠복기는 MWM 테스트 동안 감소하지 않았으며 대조군 마우스 ($34.93 \pm 9.79 \%$)에 비해 훈련 시험 3 일째에 유의하게 더 높았다 ($p < 0.05$). 이는 TMT 마우스의 장기 학습 및 공간 기억의 손상을 시사한다. 대조적으로, TMT+IOE 마우스 ($34.21 \pm 8.05 \%$)의 탈출 잠복기는 훈련 시험에서 3 일째에 TMT 마우스 ($55.71 \pm 4.58 \%$)보다 상당히 낮았으며 ($p < 0.05$). 이는 TMT- 장기 학습 및 공간 기억의 매개 장애는 IOE의 경구 투여에 의해 약화된 것을 나타낸다. 또한 TMT 마우스 ($4.32 \pm 1.40 \%$)는 대조군 마우스 ($17.57 \pm 4.21 \%$)에 비해 W 영역에서 더 짧은 시간 동안 머물렀지만 TMT+IOE 마우스 ($21.09 \pm 2.87 \%$)는 TMT 마우스와 비교하였을 때 W에서 더 많은 시간을 보냈다(도 2B, C). 종합하면, 이러한 결과는 기억력 및 학습 손상과 같은 TMT 매개인지 결핍이 IOE의 경구 투여에 의해 억제될 수 있음을 강력하게 시사한다.

실시예 3

[0104] TMT 매개 마우스 뇌 신경세포 손상에 대한 IOE 의 효과

[0105] TMT 주사 마우스 뇌에 대한 IOE의 신경 보호 영향을 평가하고자 하였다.

[0106] 구체적으로, 마우스의 뇌 조직은 조직 고정을 위해 포르말린 용액 (10 % w/v)에 보존되었다. 조직 절편 ($5 \mu\text{m}$)에 H & E(Hematoxylin-Eosin)을 적용하여 해마 영역을 관찰했다. 뉴런과 핵 응집 양성 세포의 수를 현미경으로 세었다 (Nikon, Tokyo, Japan).

[0107] 웨스턴 블랏 분석은, 16 시간 동안 글루타메이트 (5mM) 투여 후 PBS로 세척하고 HT22 세포를 단백질 추출 완충

액 (20mM Tris-HCl (pH 7.4), 70 μ M EDTA)으로 용해했다. 및 150mM NaCl, Nonidet P-40 (1 %, w/v) 포스파타제 억제제 카테일 (Cell Signaling, Danvers, MA, USA))을 얼음에 1 시간 동안 놓았다. 4 °C에서 10 분 동안 원심 분리 (13,000 x g) 한 후 상청액을 사용하여 각 단백질을 측정했다. 동물 실험이 끝날 때 마우스 뇌 조직을 균질화기 (Huanyu Instrument, Zhejiang, China)를 사용하여 전술한 단백질을 추출 버퍼로 분리하고 균질화했다. SDS-PAGE에서 분리하기 위해 각 단백질 샘플 20 μ g을 사용했다. SDS-PAGE를 마친 후 겔을 분리하여 니트로 셀룰로오스 멤브레인으로 옮겼다. 비특이적 신호를 차단하기 위해 5 % 무 지방 우유와 함께 배양한 후, 멤브레인을 각 항체 (1 : 1500)와 함께 4 °C에서 12 시간 동안 배양했다. 토끼 항-절단 caspase 3 (9664S) 또는 토끼 항-뇌-유래 신경 영양 인자 (BDNF) (NBP1-46750)-Novus (Centennial, CO, USA) 을 사용하여 각 단백질을 검출했다. Tween 20 완충액 (20mM Tris, 136mM NaCl, (1 %, w/v), Tween 20; pH 7.4), 양 고추 냉이 과산화효소 (HRP)가 결합된 토끼 또는 마우스 2 차 항체(1 : 3000) (Abcam, Cambridge, UK)와 함께 트리스 완충 식염수로 세척한 후 실온에서 2 시간 동안 추가로 배양하였다. ECL (Enhanced chemiluminescence) 검출 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 각 밴드를 시각화했다.

[0108] 그 결과, [도 3] 에서 볼 수 있듯이, 세포 사멸의 표지자인 절단된 카스파제-3 및 절단된 PARP의 발현은 TMT 주사 마우스의 뇌에서 대조군 마우스 보다 현저하게 증가 되었다($p < 0.05$). 흥미롭게도, IOE의 경구 투여는 TMT 마우스에서 검출된 절단된 카스파제-3 및 절단된 PARP의 상승된 발현을 상당히 역전시켰다 (도 3 A). 또한 기존 뉴런의 생존에 지탱하는 역할을 하는 BDNF(brain-derived neurotrophic factor)의 발현이 TMT 마우스의 뇌 조직에서 대조군 그룹에 비해 유의하게 감소($p < 0.05$)하는 것을 발견했다. 그러나 TMT+IOE 마우스의 뇌 조직에서 BDNF의 발현 수준은 대조군 마우스의 것과 크게 다르지 않았다 ($p > 0.05$) (도 3B). 뇌 조직에 대한 IOE의 신경 보호 효과는 H & E 염색에 의해 추가로 확인되었다.

[0109] 또한, [도 4] 에서 볼 수 있듯이, 해마의 CA1 영역에서 살아남은 뉴런의 수는 대조군 마우스와 비교하여 TMT 마우스에서 감소했으며 ($p < 0.05$), 농축핵(pyknotic nuclei)의 수는 대조군 마우스에 비해 TMT 마우스의 CA1 영역에서 유의하게 증가했다 ($p < 0.05$). 그러나 이러한 신경 손상은 TMT+IOE 마우스의 CA1 영역에서 현저하게 사라졌다 ($p < 0.05$). 종합적으로, TMT로 유도된 신경 세포 사망이 IOE의 경구 투여에 의해 약화될 수 있음을 시사한다.

실시예 4

[0111] **마우스 뇌에서 TMT-유도 MAPK의 비정상적 인산화에 대한 IOE 의 효과**

[0112] MAPK는 세포 사멸 및 유전자 발현과 같은 몇 가지 중요한 세포 규정을 제어하는 잘 알려진 세포 내 신호 전달 분자이다. 또한 MAPK의 비정상적인 활성화는 신경 퇴행 과정과 밀접한 관련이있는 것으로 보고되었다. 따라서 IOE 매개 신경 보호 메커니즘을 담당하는 세포 메커니즘을 밝히기 위해 웨스턴 블랏 분석을 통해 마우스 그룹의 뇌 조직에서 MAPK의 활성화/인산화에 대한 IOE의 효과를 비교했다.

[0113] 웨스턴 블랏은 토끼 항-ERK (9101S), 토끼 항-포스포-p38 (9212S), 토끼 항-p38 (9211S), 토끼 항-포스포-JNK (9251S) 또는 토끼 항-JNK (9252S) 을 이용하여 상기 <실시예 3> 과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0114] 그 결과, [도 5] 에서 나타나는 바와 같이 대조군 마우스에 비하여 TMT 마우스의 뇌 조직에서 ERK (534.65 ± 74.80), p38 MAPK (316.96 ± 56.51) 및 JNK (236.48 ± 54.78)의 인산화가 증가한 것을 확인할 수 있었다(ERK : 100 ± 33.46 , p38 MAPK : 100 ± 33.46 , JNK : 100 ± 42.76). 그러나 IOE의 경구 투여는 TMT 마우스 그룹에서 발견된 ERK, p38 MAPK 및 JNK의 비정상적인 인산화를 유의하게 역전시켰다 ($p < 0.05$). 이러한 결과는 마우스 뇌 조직에서 TMT가 매개하는 MAPK의 비정상적 인산화가 IOE의 경구 투여에 의해 약화될 수 있음을 시사했다.

실시예 5

[0116] **TMT 유도 Nrf2/HO-1의 비정상적 발현에 대한 IOE 의 효과**

[0117] 산화 스트레스가 TMT로 유도된 신경 퇴행 과정의 중요한 원인 중 하나이기 때문에, IOE의 경구 투여가 TMT 주사 마우스 뇌의 항산화 분자 시스템을 제어할 수 있는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0118] 웨스턴 블랏은 토끼 항-HO-1 (43966S)-세포 신호 (Danvers, MA, USA) 및 마우스 항-NRF2 (M200- 3) (Medical &

Biological Laboratories Co., Nagoya, Japan)을 이용하여 상기 <실시예 3> 과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0119] 그 결과, [도 6] 에서 나타나는 바와 같이 여러 항산화 기전 중 산화 스트레스에 보호 역할을 하는 HO-1(heme oxygenase-1)과 HO-1의 주요 전사 인자인 Nrf2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2)의 TMT 매개 비정상 발현이 TMT+IOE 마우스 뇌에서 회복된 것을 확인할 수 있었다. TMT 마우스 그룹 (Nrf2 : 44.52 ± 20.28 , HO-1 : 41.80 ± 16.79)의 뇌 조직에서 Nrf2 및 HO-1의 발현이 크게 감소했다 ($p < 0.05$). 대조군 마우스 그룹 (Nrf2 : 100 ± 19.49 , HO-1 : 100 ± 43.92); 그러나 IOE (Nrf2 : 111.92 ± 33.50 , HO-1 : 92.64 ± 17.96)의 경구 투여로 폐지되었다 ($p < 0.05$). 이 데이터는 마우스 뇌의 세포 항산화 과정에서 중요한 HO-1의 발현을 담당하는 세포 내 신호 전달을 차단함으로써 TMT 매개 신경 퇴행이 발생할 수 있음을 강력하게 제안했다. 흥미롭게도 TMT 주입은 MAPK의 인산화를 증가시키고 (도 5) Nrf2 및 HO-1의 발현을 감소 시켰다 (도 6). 그러나 TMT+IOE 마우스 그룹에서는 이러한 TMT 유발 마우스 뇌의 비정상 세포 과정이 폐지되었다. 이는 TMT 매개 산화 스트레스가 마우스 뇌에서 MAPK/Nrf2/HO-1 경로를 제어함으로써 IOE의 경구 투여에 의해 억제될 수 있음을 시사했다.

실시예 6

[0121] 글루타메이트 매개 흥분 독성에 대한 IOE 의 효과

[0122] 글루타메이트 흥분 독성은 신경 세포에서 산화 스트레스를 유도하여 신경 세포 손상을 일으키는 여러 신경 퇴행성 질환의 원인으로 간주되기 때문에, 동물 실험에서 글루타메이트 흥분 독성의 세포 모델에 대한 IOE 유래 항신경 변성 효과를 추가로 확인하고자 하였다.

[0123] 구체적으로, HT22 세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여 10 % 소 태아 혈청 (FBS) (Corning, NY, USA) 및 1 % 스트렙토마이신/페니실린 을 포함하는 DMEM(HyClone, Logan, UT, USA)와 함께 37 °C의 CO₂ 인큐베이터에서 배양되었다. HT22 세포 (10^4 개 세포/웰)를 96 웰 플레이트에 파종하고 24 시간 동안 배양했다. IOE (0-0.1 mg/mL)를 2 시간 동안 처리한 다음 글루타메이트 (5mM)를 배양 플레이트에 첨가했다. CO₂ 인큐베이터에서 37 °C 에서 14 시간 동안 추가로 인큐베이션했다. 세포 생존율을 측정하기 위해 WST-1 Assay Kit (Dozen, Seoul, Korea)를 사용하고 HT22 세포를 현미경 (Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 사진을 찍고 생존 가능한 HT22 세포의 수를 추정했다.

[0124] 그 결과, 세포 생존력 분석 키트를 사용하여 마우스 해마 신경 세포인 HT22에서 IOE의 무독성 수준을 결정했다. 0.2 mg/mL 농도까지 IOE로 HT22 세포를 처리해도 HT22 세포 생존력을 변경할 수 없었다 ($p < 0.05$) (도 7A). 이 결과를 바탕으로 글루타메이트 매개 세포 독성은 IOE 처리에 의해 용량 의존적으로 악화되었다 (대조군 : 100 ± 7.62 , 글루타메이트 : 9.64 ± 1.24 , 글루타메이트+IOE 0.05 : 44.53 ± 9.36 , 글루타메이트+IOE 0.1 : 103.19 ± 4.27) ($p < 0.05$) (도 7B). 글루타메이트 매개 세포 독성에 대한 IOE의 효과는 HT22 세포의 수를 세어 추가로 확인되었다. 도 7C에 나타난 바와 같이, IOE 투여를 사용하여 다수의 생존 가능한 HT22 세포가 복원되었다 (대조군 : 43.93 ± 2.55 , 글루타메이트 : 21.68 ± 2.27 , 글루타메이트+IOE 0.05 : 32 ± 3.93 , 글루타메이트+IOE 0.1 : 39.62 ± 1.78) ($p < 0.05$). 이는 HT22 신경 세포에서 글루타메이트 유발 흥분 독성이 IOE에 의해 악화될 수 있음을 시사한다.

실시예 7

[0126] 글루타메이트 매개 반응성 산소종 과잉 생산에 대한 IOE 의 효과

[0127] 과도한 글루타메이트는 세포 내 활성 산소 종 (ROS)을 증가시켜 세포 스트레스를 유발하고, 이는 세포 산화 스트레스를 유발하는 것으로 알려져 있다.

[0128] 구체적으로, 글루타메이트로 유도된 세포 내 ROS 수준에 대한 IOE의 효과는 HT22 세포에서 추정되었다. HT22 세포 (10^4 개 세포/웰)를 블랙 플레이트 (96 웰, SPL Life Sciences, Gyeonggi, Korea)에서 24 시간 동안 배양하였다. HT22 세포를 글루타메이트 (5mM)로 처리하고 37 °C 에서 16 시간 동안 IOE 로 처리하였다. 인산염 완충 식염수 (PBS)로 세척한 후, 30 μM의 DCFH-DA(2'-7'-dichlorofluorescein) 용액 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 추가하고 1 시간 동안 37 °C 의 CO₂ 인큐베이터에서 더 배양하였다. 각 웰을 PBS로 2 회 세척한 다음

PBS (100 μ L)를 각 웰에 첨가했다. 형광의 강도는 마이크로 플레이트 형광계 (Tecan, Mannedorf, Switzerland)를 사용하여 488 nm에서 계산되었다.

- [0129] 그 결과, [도 8 A] 에서 볼 수 있듯이 글루타메이트 처리된 HT22 세포의 세포 내 ROS 수준은 대조군 (100 ± 5.64)에 비해 증가했다 (150.24 ± 5.70). 그러나 IOE 처리에 의해 용량 의존적으로 감소되었다 (IOE 0.05 : 139.14 ± 2.11 , IOE 0.1 : 114.76 ± 5.20) ($p < 0.05$). 이러한 결과는 ROS 과잉 생산과 같은 글루타메이트 매개 세포 스트레스가 IOE 투여에 의해 효과적으로 방해될 수 있음을 나타낸다.

실시예 8

- [0131] **글루타메이트 매개 세포 자멸사 활성화에 대한 IOE 의 효과**

- [0132] 글루타메이트 매개 세포 독성과 세포 내 ROS 수준이 IOE에 의해 약화되었기 때문에 (도 7 및 8 A), IOE가 HT22 세포의 글루타메이트 유도 세포 사멸을 억제할 수 있는지 조사했다.

- [0133] 그 결과, 전-세포자멸(pro-apoptosis) 분자인 Bax의 발현은 HT22 세포를 글루타메이트 (1 ± 0.0256)로 처리한 후 크게 증가했으며 IOE 처리 (0.901 ± 0.045)에 의해 약화되었다 (도 8B). 그러나 항-세포자멸 분자인 Bcl-2의 발현은 글루타메이트 처리 (1 ± 0.0354)에 의해 약화되었지만 IOE 처리 (0.834 ± 0.048) 후에 회복되었다 (도 8 B) ($p < 0.05$). 또한 IOE를 사용한 치료는 HT22 세포에서 세포 내 세포자멸사 신호인 절단된 카스파제-3의 글루타메이트 유도 발현을 현저하게 약화시켰다 ($p < 0.05$) (도 8 C). 이러한 결과는 IOE가 주로 세포자멸사 관련 유전자의 발현을 조절함으로써 글루타메이트 유발 HT22 세포 사멸에 대한 억제 활성을 가지고 있음을 시사한다.

실시예 9

- [0135] **글루타메이트 매개 MAPK 활성화에 대한 IOE 의 효과**

- [0136] HT22 세포에서 글루타메이트 흥분 독성에서 IOE의 조절 역할을 추가로 설명하기 위해 글루타메이트 유도 MAPK의 세포 내 활성화에 대한 IOE의 효과를 조사했다.

- [0137] 그 결과, [도 9] 에서 볼 수 있듯이 HT22 세포를 글루타메이트로 처리하면 TMT로 처리한 마우스의 뇌 조직에서 나타난 것과 같이 대조군 그룹에 비하여 ERK, p38 MAPK 및 JNK 단백질의 활성화/인산화가 증가했다 (도 5). 흥미롭게도, 글루타메이트 처리된 HT22 세포에서 MAPK의 이러한 비정상적인 활성화/인산화는 IOE 처리에 의해 용량 의존적으로 약화되었다 ($p < 0.05$) (도 9). 이러한 결과는 HT22 세포에서 글루타메이트에 의한 MAPK의 조절 장애가 IOE 처리로 회복될 수 있음을 시사한다.

실시예 10

- [0139] **글루타메이트 매개 Nrf2 및 HO-1 억제에 대한 IOE 또는 MAPK 억제제의 효과**

- [0140] 글루타메이트 유발 MAPK의 비정상 활성화에 대한 IOE의 조절 효과를 확인한 후 산화 스트레스와 관련된 MAPK의 다운 스트림 경로를 조사했다. 산화 스트레스는 글루타메이트 흥분 독성의 중요한 원인 중 하나로 알려져 있고, TMT 매개 Nrf2 및 HO-1 발현이 마우스 뇌 조직에서 IOE에 의해 회복되었기 때문에 (도 6), HT22 세포에서 글루타메이트 유도 Nrf2 및 HO-1 발현에 대한 IOE의 영향을 조사했다. 또한 MAPK 특이적 억제제 (SB203580, p38 MAPK 억제제, PD98059, MEK 억제제, SP600125, JNK 억제제)에 의한 글루타메이트 유도 Nrf2 및 HO-1 발현에 대한 MAPK의 역할을 추가로 확인했다.

- [0141] 실시간 PCR 은, HT22 세포 (10^5 /웰)를 6 웰 플레이트에 접종하고 24 시간 동안 배양했다. IOE 또는 억제제 (PD98059, SP600125 및 SB203580)와 함께 37°C 에서 16 시간 동안 글루타메이트 (5mM)와 배양한 후, TRIzol Reagent (Invitrogen, Waltham, MA, USA)를 사용하여 총 RNA를 분리했다. $1\mu\text{g}$ 의 전체 RNA와 10pM의 올리고 dT 프라이머를 상보적 DNA (cDNA)의 합성에 사용했다. SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo Co., Tokyo, Japan)는 RT-PCR 검출 시스템 (CFX Connect, Bio-Rad Co., Hercules, CA, 미국). 각 유전자의 상대적 발현은 비교 Ct 방법을 사용하여 추정하고 GAPDH 의 발현으로 정규화되었다. 사용된 프라이머 서열은 하기 [표 1] 과

같다.

표 1

[0143]

유전자	방향	서열 (5'→3')	서열번호
HO-1	Forward	ACATCGACAGCCCCACCA	1
	Reverse	TGAGCAGGAAGGCGGTCT	2
Nrf-2	Forward	ACTCCCAGGTTGCCCACA	3
	Reverse	TCCAGGGCAAGCGACTCA	4
GAPDH	Forward	ACGGGAAGCTCACTGGCA	5
	Reverse	TCCAGGCGGCATGTCAGA	6

[0145]

그 결과, [도 9] 에서 볼 수 있듯이 글루타메이트에 의한 Nrf2 및 HO-1 발현 억제제는 IOE 투여에 의해 회복되었다 ($p < 0.05$). 또한 [도 10] 에서 나타나는 바와 같이 SB203580, PD98059 및 SP600125 투여에 의해 Nrf2 및 HO-1의 글루타메이트 매개 발현이 회복된 것을 확인할 수 있었다 ($p < 0.05$). 이는 글루타메이트가 매개하는 HO-1 발현 억제가 Nrf2와 HO-1의 발현을 조절함으로써 글루타메이트 매개 신경 변성에 결정적으로 관여하는 IOE 및 MAPK (ERK/p38 MAPK/JNK) 경로에 의해 약화될 수 있음을 나타낸다.

실시예 11

[0147]

글루타메이트 매개 ROS 과잉생산 및 세포 생존력 감소에 대한 IOE 또는 ERK, p38 MAPK, JNK 억제제의 효과

[0148]

글루타메이트에 의한 HO-1 억제는 IOE와 MAPK 억제제에 의해 회복되었기 때문에 (도 10), 우리는 글루타메이트에 의한 ROS 생산과 HT22 세포 생존에 대한 IOE 및 MAPK 억제제의 항 신경 변성 효과를 추가로 검증했다.

[0149]

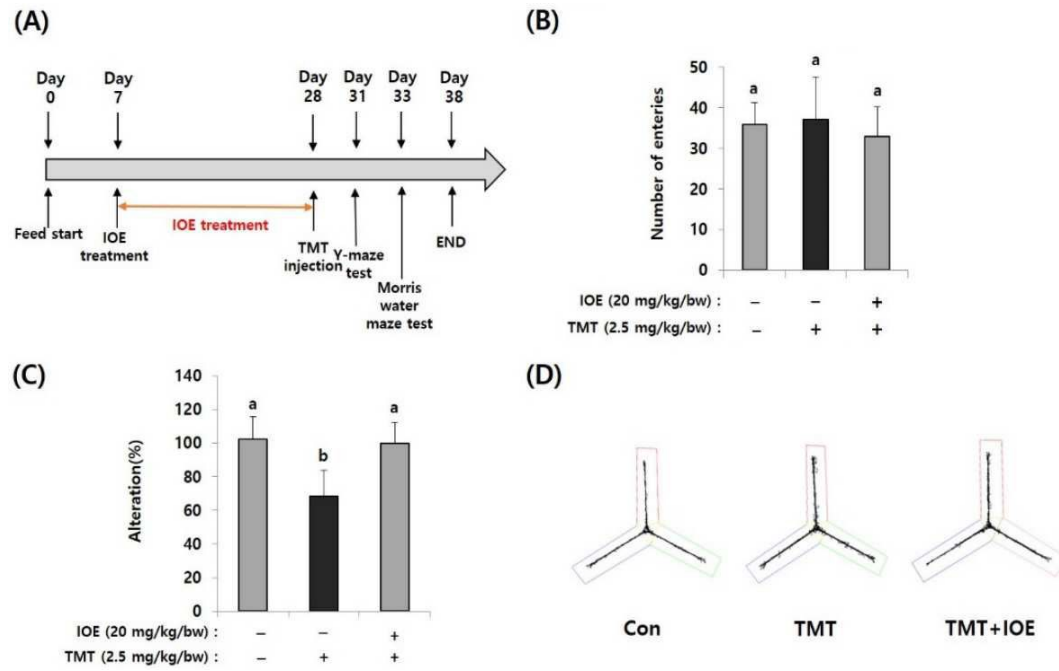
구체적으로, MAPK(mitogen-activated protein kinase) 억제제 (SP600125, Santa Cruz, Dallas, TX, USA; SP600125 및 PD98059, Cell Signaling, Boston, MA, USA)을 이용하여 상기 <실시예 6> 및 <실시예 7> 과 동일한 방법으로 ROS 생산 및 HT22 세포 생존력을 확인하였다.

[0150]

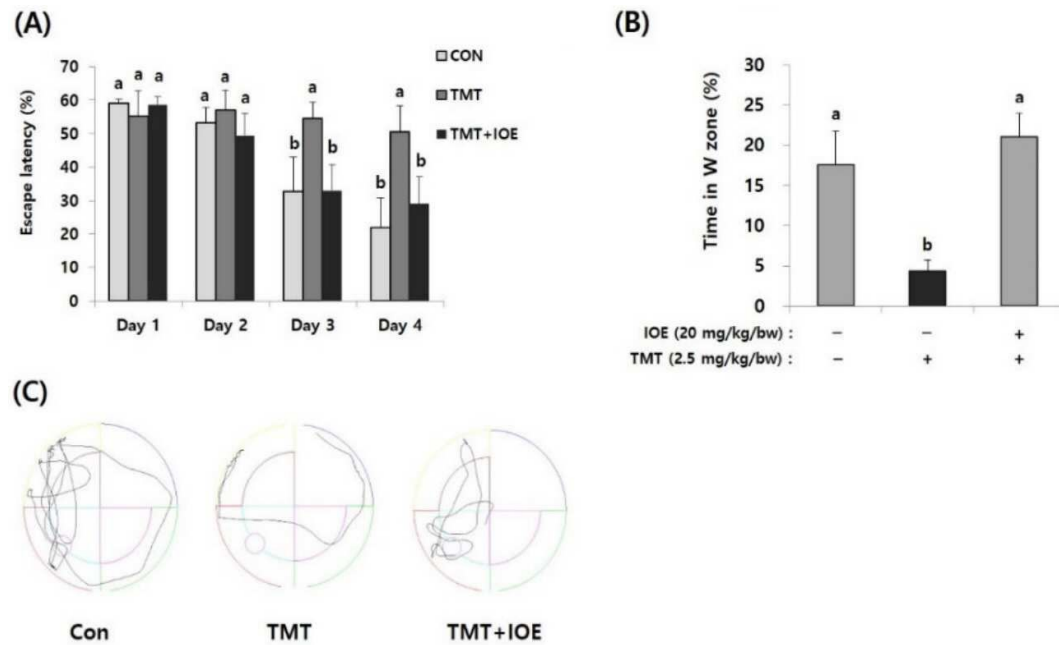
[도 11] 에서 볼 수 있듯이 글루타메이트로 인한 ROS 과잉 생산은 PD98059, SB203580 및 SP600125 처리에 의해 상당히 억제되었다 ($p < 0.05$) (도 11 A-C). 또한 글루타메이트 매개 HT22 세포 생존율이 이러한 억제제를 사용한 치료에 의해 상당히 회복되었음을 발견했다 ($p < 0.05$) (도 11 D-F). 흥미롭게도 0.1 mg/mL 용량의 IOE는 강력한 억제 활성을 가졌다 (각 MAPK 신호 억제제의 최대 10 μ M). 종합하면, 이러한 데이터는 IOE가 MAPK/Nrf2/HO-1 경로의 글루타메이트 매개 조절 장애를 약화시킴으로써 HT22 세포에서 글루타메이트 흥분 독성으로부터 보호할 수 있음을 강력하게 시사한다 (도 12).

도면

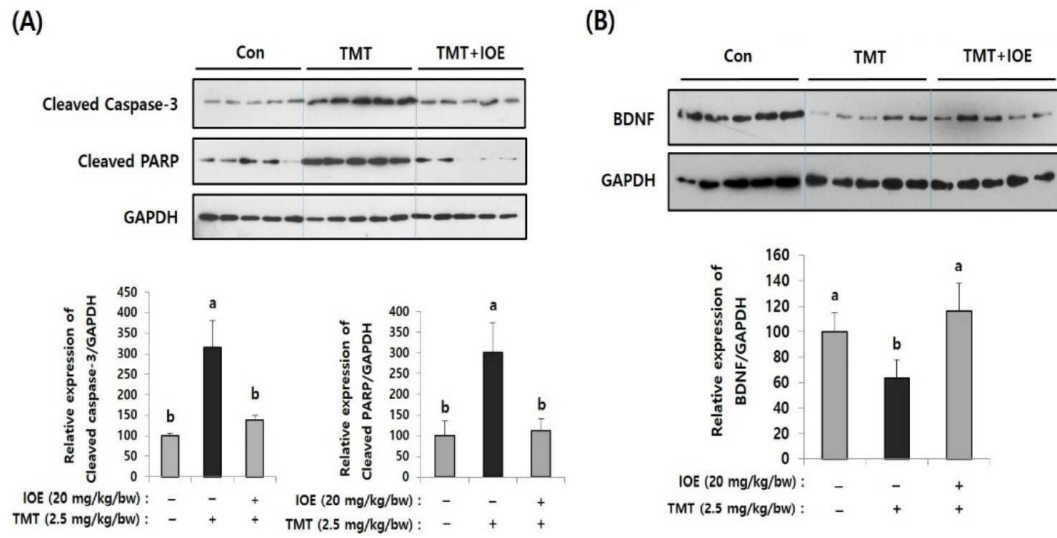
도면1



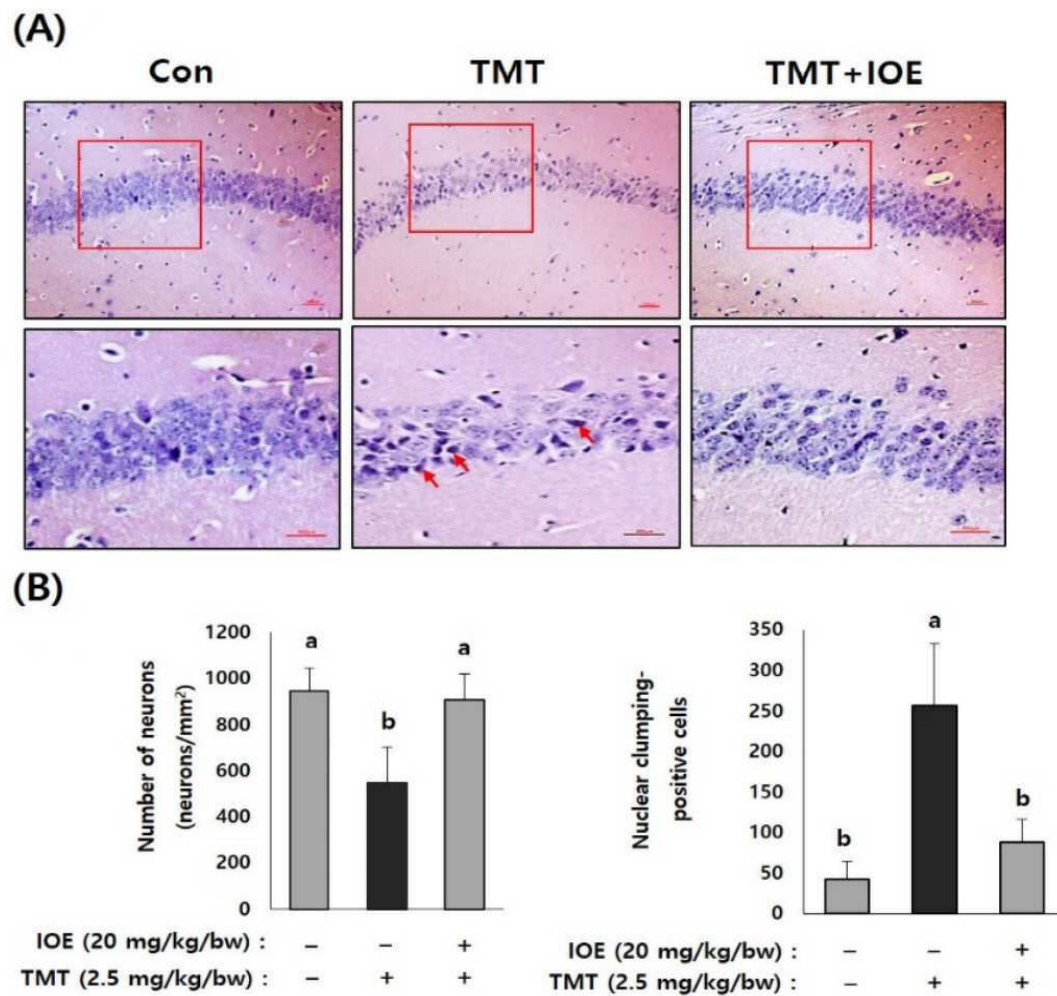
도면2



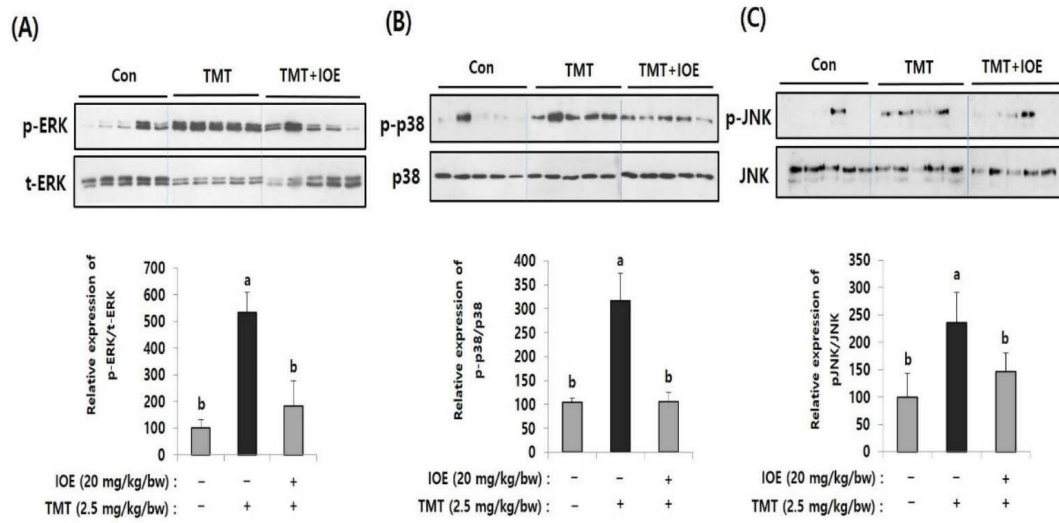
도면3



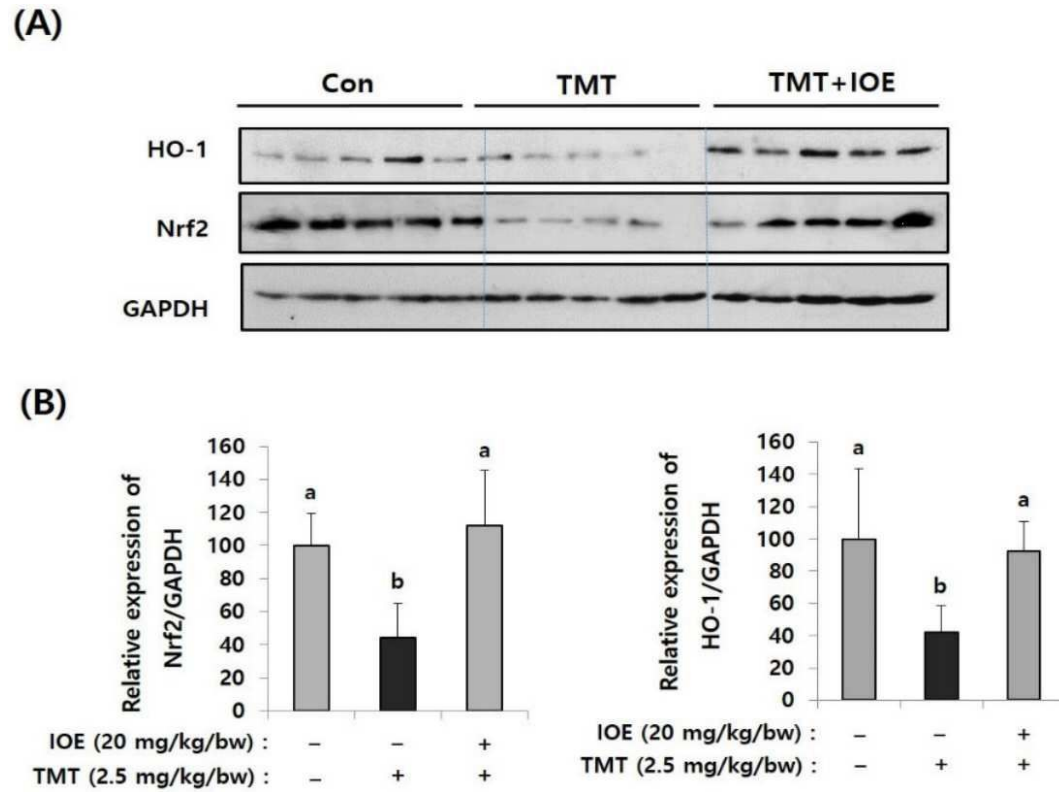
도면4



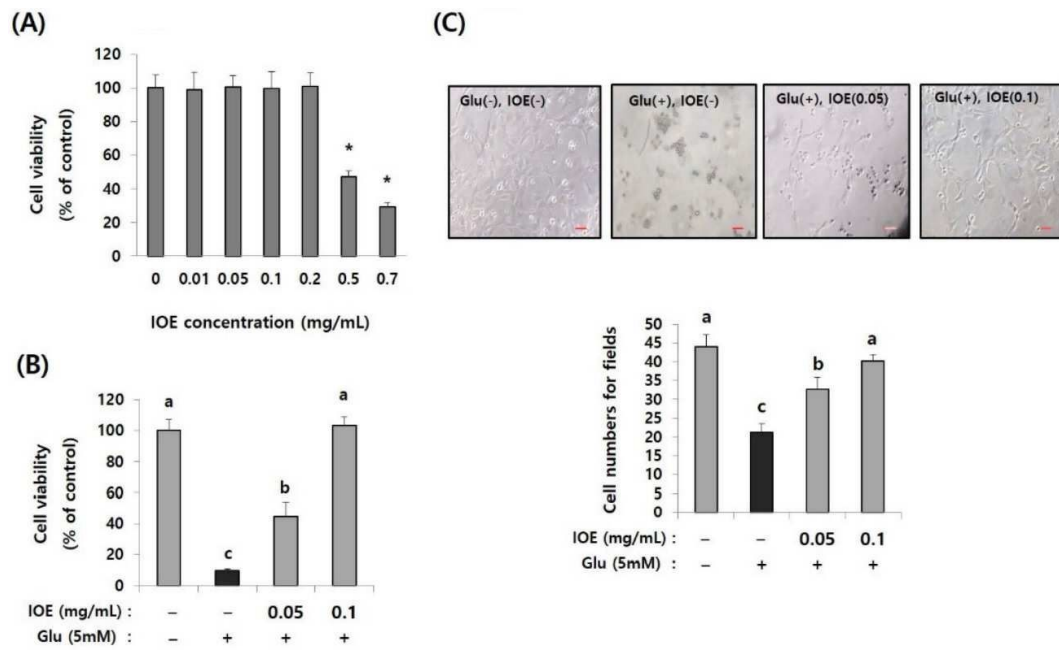
도면5



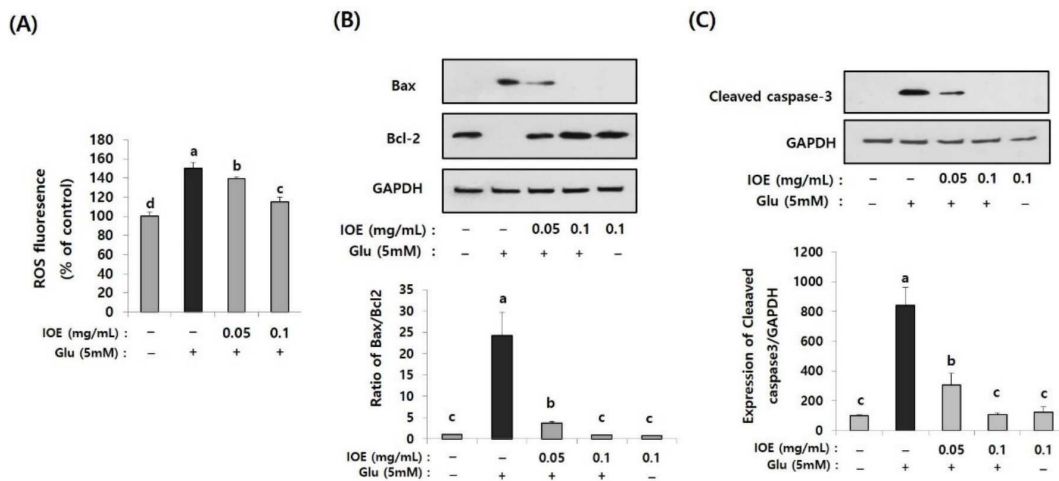
도면6



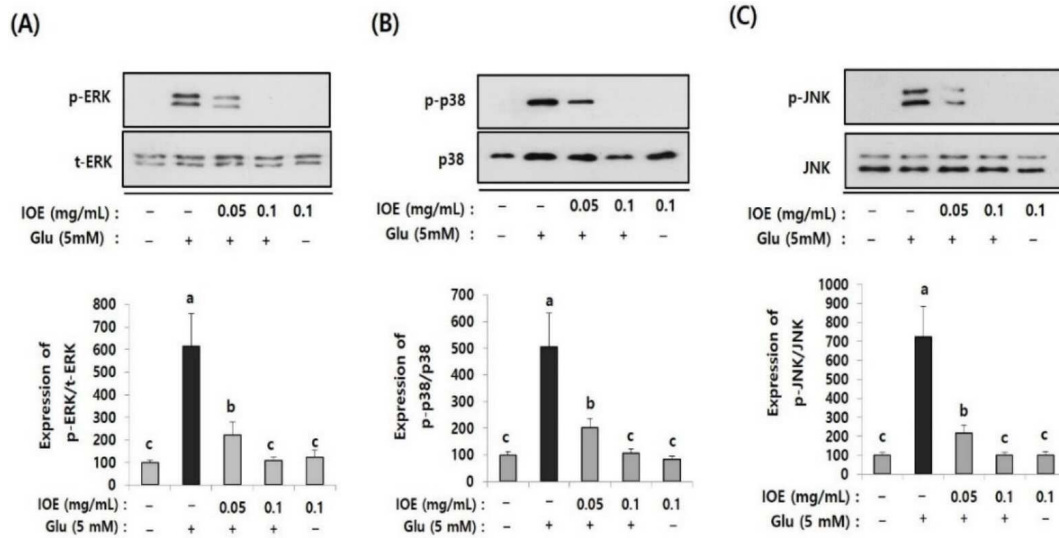
도면7



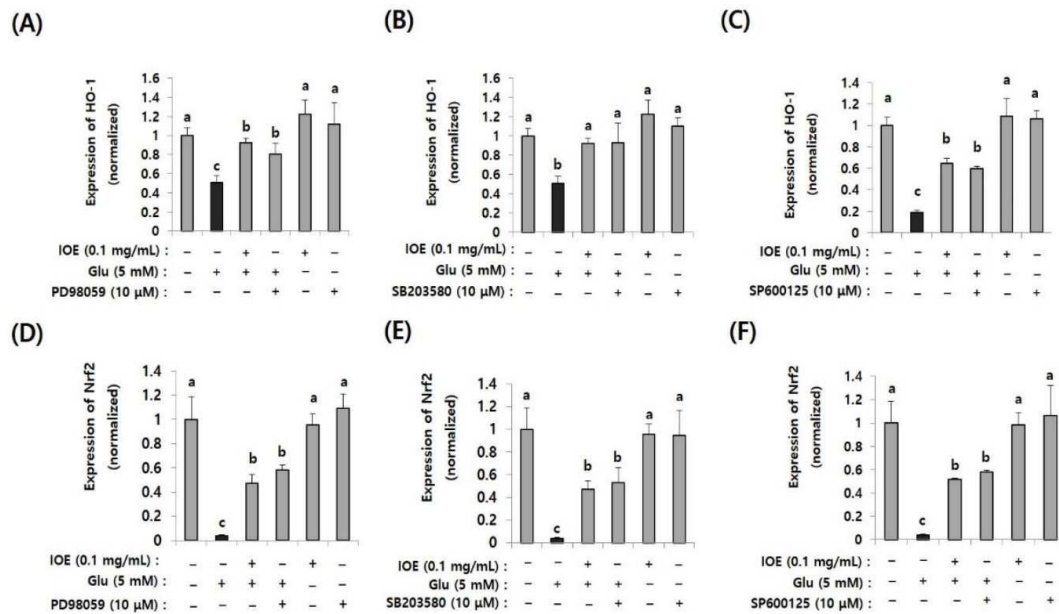
도면8



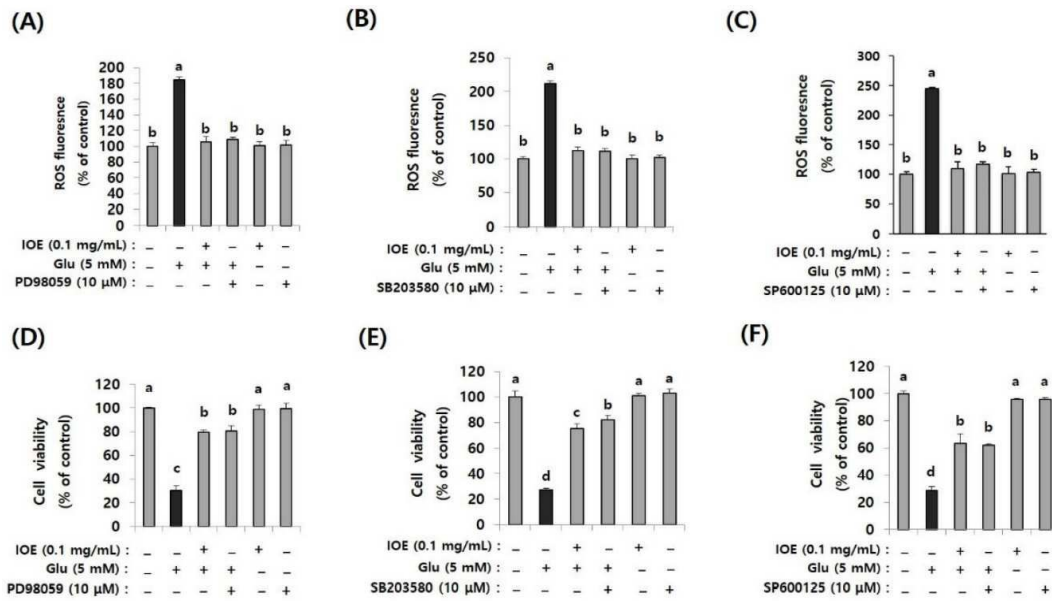
도면9



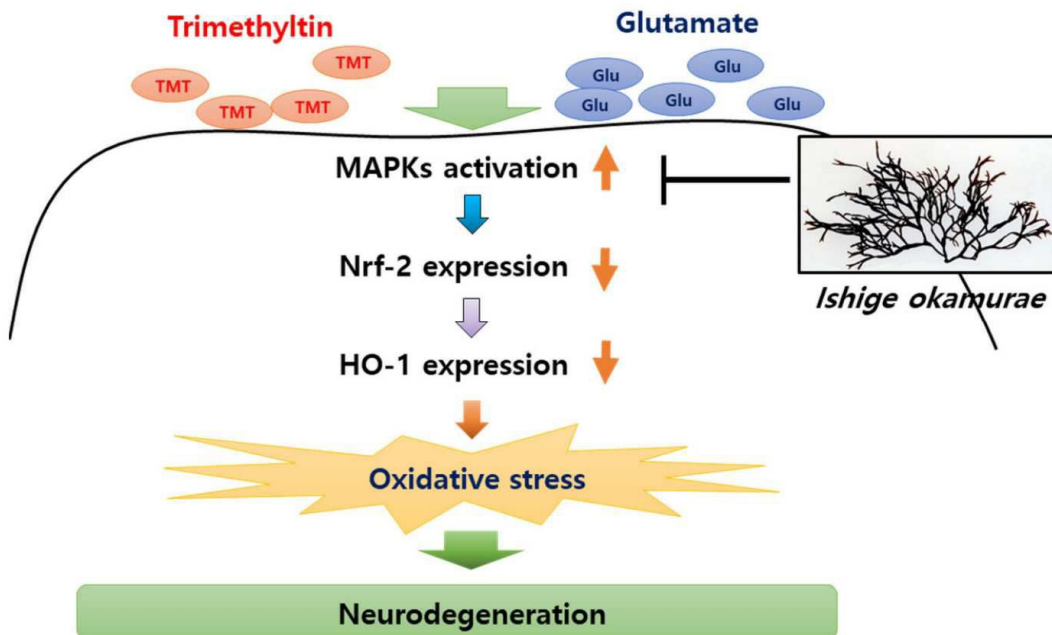
도면10



도면11



도면12



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> INCHEON NATIONAL UNIVERSITY RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION

<120> Composition for preventing, improving or treating
neurodegenerative disorders trimethyltin mediated comprising
Ishige okamurae extract and uses thereof

<130> 1069167

<160> 6

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> HO-1 primer_F

<400> 1

acatcgacag ccccacca 18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> HO-1 primer_R

<400> 2

tgagcaggaa ggcgtct 18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Nrf-2 primer_F

<400> 3

actcccaggt tgcccaca 18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> Nrf-2 primer_R

<400> 4

tccaggga gcgactca 18

<210> 5

<

211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> GAPDH primer_F

<400> 5

acgggaagct cactggca 18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> GAPDH primer_R

<400> 6

tccagcgggc atgtcaga 18