(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0038871
(43) 공개일자 2023년03월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/37 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A61P 25/00 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/37 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0121496
(22) 출원일자 2021년09월13일
심사청구일자 2021년09월13일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
허준영
대전광역시 유성구 상대남로 26, 918동 2702호(상대동, 도안신도시9블록 트리풀시티아파트)
이민정
충청남도 계룡시 엄사면 번영로 113-32, 108동 1103호(계룡파라디아)
(74) 대리인
최규환

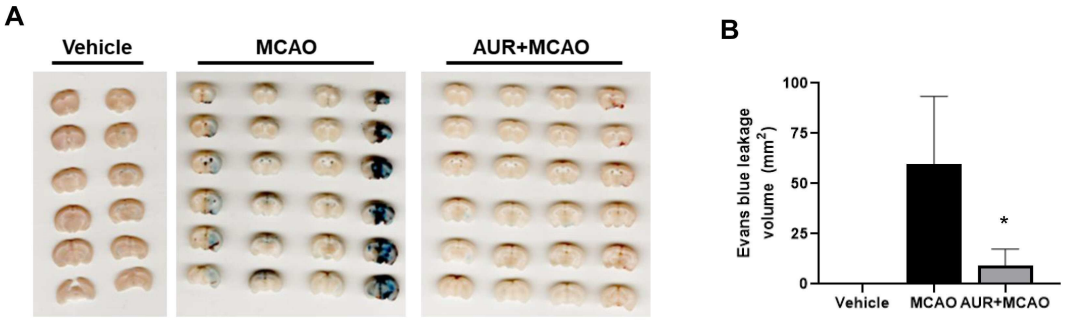
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **아우랍텐을 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 아우랍텐(auraptene)을 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽(blood-brain barrier) 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 아우랍텐은 뇌혈관장벽 유지에 필수적인 뇌혈관내피세포의 연접 단백질(junctional protein)의 발현을 증가시켜 내피세포 간 밀착 연접을 유지시켜 뇌혈관장벽의 기능을 유지 및 강화시키므로, 뇌혈관장벽 붕괴가 관찰되는 뇌혈관 질병에 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A61P 9/10 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2200/326 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711129385
과제번호 2017R1A5A2015385
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원(R&D)
연구과제명 감염 제어 컨버전스 연구센터
기 여 율 5/10
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711129771
과제번호 2019M3E5D1A02068575
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 혁신형의사과학자공동연구사업(R&D)
연구과제명 노화에 따른 감염 감수성 증가 제어를 위한 미토콘드리아 기반 신소재개발
기 여 율 2/10
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711140643
과제번호 2019R1F1A1059586
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 시상하부 특이적 미토콘드리아 미접힘 단백 반응 조절 통한 비만 제어 기전 연구
기 여 율 1/10
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465033097
과제번호 HR20C0025040021
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구중심병원육성(R&D)
연구과제명 암대사 리프로그래밍 · 유전자 · 면역 치료 플랫폼 구축
기 여 율 2/10
과제수행기관명 충남대학교병원
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

아우랍텐(auraptene) 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽(blood-brain barrier) 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아우랍텐은 뇌혈관장벽(blood brain barrier, BBB) 파괴를 억제하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 아우랍텐은 밀착 연접(tight junction) 단백질의 발현을 증진시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 뇌혈관장벽 장애는 척수손상, 만성 또는 급성 뇌졸중, 뇌경색, 뇌종양, 뇌부종, 뇌 허혈, 알츠하이머병 및 다발성 경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

아우랍텐(auraptene) 또는 식품학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 뇌혈관장벽 장애는 척수손상, 만성 또는 급성 뇌졸중, 뇌경색, 뇌종양, 뇌부종, 뇌 허혈, 알츠하이머병 및 다발성 경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아우랍텐(auraptene)을 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 뇌혈관장벽(blood-brain barrier: BBB, 또는 뇌혈관 관문)은 뇌를 포함한 중추 신경계에서 혈액 내의 잠재적인 위험 물질로부터 뇌를 격리시키기 위하여 존재하는 혈관 장벽을 일컫는다. BBB는 높은 선택적 투과성을 가지고 있어 뇌에 필요한 특정 물질만 혈관에서 뇌로 전달되도록 통제한다. BBB는 뇌 안에 존재하는 혈관 중 모세혈관

(capillary)의 벽에 존재하며, 내피세포(endothelial cell)의 밀착 연접(tight junction) 구조로 이루어져 있다. 혈관내피세포 사이의 연접 단백질이 BBB의 선택적 투과성을 가지게 하고 연접 단백질이 망가지면 BBB 붕괴가 일어난다는 많은 보고가 있다. 모세혈관 주변은 별아교세포(astrocyte) 및 혈관주위세포(pericyte)에 둘러쌓여 있으며, 이들 세포의 복합적인 작용에 의해 특정 물질만이 BBB를 넘어 뇌로 전달된다. BBB는 근위축성 측생경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 뇌전증(epilepsy), 뇌의 외상(trauma)이나 부종(edema) 등에 의해 약해질 수 있으며, 이는 뇌의 감염에 직접적인 영향을 미친다. 또한, BBB는 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 불안장애(anxiety), 우울증(depression), 뇌 농양(brain abscess), 뇌수막염(meningitis), 다발성 경화증(multiple sclerosis) 등의 질병과 밀접한 관계가 있다(Abbott NJ et al., Epilepsia. 2012, 53 Suppl 6(06):1-6; Kealy J et al., Neurosci Lett. 2020, 726:133664; Profaci CP et al., J Exp Med. 2020, 217(4):e20190062).

[0003] 아우랍텐(auraptene, IUPAC Name: 7-[(2E)-3,7-dimethylocta-2,6-dienoxy]chromen-2-one)은 쿠마린류 화합물의 일종이며 항암 활성, 항산화 활성, 항염증 작용, PPAR(peroxisome proliferator-activated receptor) 아고니스트 활성, 항균 활성, 항혈소판 활성, 항리슈마니아 활성 등의 생리 활성이 알려져 있다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제1454361호에는 '플루옥세틴 및 비타민 C를 유효성분으로 함유하는 중추신경계 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물'이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1643347호에는 '아우랍텐을 포함하는 신장암의 예방 또는 치료용 조성물'이 개시되어 있으나, 본 발명의 '아우랍텐을 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽 장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 아우랍텐 처리에 의해 뇌혈관내피세포에서 밀착 연접(tight junction) 단백질의 발현이 증가되는 것을 확인하였으며, 산소-포도당 결핍(oxygen glucose deprivation)에 의한 연접 단백질의 발현 저해, MCAO (middle cerebral artery occlusion)에 의한 뇌혈관 누수 및 뇌조직 손상 정도가 아우랍텐 처리에 의해 감소되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 아우랍텐(auraptene) 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽(blood-brain barrier) 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 아우랍텐 또는 식품학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에서는 아우랍텐이 뇌혈관장벽 유지에 필수적인 뇌혈관내피세포의 연접 단백질(junctional protein)의 발현을 증가시켜 내피세포 간 밀착 연접을 유지시켜 뇌혈관장벽의 기능을 유지 및 강화하는 것을 확인하였다. 따라서, 아우랍텐은 뇌혈관장벽 붕괴가 관찰되는 뇌혈관 질병에서 뇌혈관장벽을 보호하는 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 아우랍텐 처리에 따른 뇌혈관내피세포의 연접 단백질 발현 변화를 분석한 결과이다. 1A는 아우랍텐의 세포독성을 확인한 결과이고, 1B는 1μM의 아우랍텐 처리 24시간 후 연접 단백질인 ZO-1 (Zonula occludens-1)의 발현을 형광 염색을 통해 확인한 결과이며, 1C는 1B 이미지에서 ZO-1의 형광 세기를 정량화한 그래프이며, 1D는 1μM의 아우랍텐 처리에 따른 연접 단백질(ZO-1, Ve-cadherin, occludin)의 발현 수준을 웨스턴 블랏으로 확인한 결과이며, 1E 내지 1G는 1D 결과에서 각 연접 단백질의 발현 수준을 정량화한 그래프이다. Veh: DMSO 처리군, *: $p< 0.05$, **: $p< 0.01$, ***: $p< 0.001$.

도 2A 내지 2C는 뇌혈관내피세포에 아우랍텐 1μM 24시간 전처리 후 산소-포도당 결핍(oxygen glucose deprivation, OGD)를 처리하였을 때 연접 단백질(claudin-5, ZO-1, Ve-cadherin)의 발현 변화를 형광 염색을 통해 확인한 결과이고, 2D는 2A 내지 2C 이미지에서 각 연접 단백질의 형광 세기를 정량화한 그래프이며, 2E는 동일 조건에서 연접 단백질(ZO-1, Ve-cadherin)의 발현 수준을 웨스턴 블랏으로 확인한 결과이고, 2F는 2E 결과

에서 각 연접 단백질의 발현 수준을 정량화한 그래프이다. scale bar: 20 ㎛, Veh: DMSO 처리군, *: $p< 0.05$, ***: $p< 0.001$, OGD 군 #: $p< 0.05$, ###: $p< 0.001$.

도 3은 허혈성 뇌졸중 마우스 모델에서 아우랍텐의 뇌손상 보호 효과를 확인한 것으로, 3A는 실험 스케쥴을 나타내며, 3B는 TTC (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride) 염색을 수행한 뇌 조직 이미지로 흰색 부분이 손상 부위를 나타내며, 3C는 3B의 결과에서 조직 손상 부위를 정량화한 그래프이다. Vehicle: 무처리 정상군, MCAO: middle cerebral artery occlusion 처리군, AUR+MCAO: 아우랍텐 처리+middle cerebral artery occlusion 처리군.

도 4는 에반스 블루 누출 어세이를 통한 아우랍텐의 뇌혈관장벽(blood-brain barrier) 보호 효과를 확인한 것이다. Vehicle: 무처리 정상군, MCAO: middle cerebral artery occlusion 처리군, AUR+MCAO: 아우랍텐 처리+middle cerebral artery occlusion 처리군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아우랍텐(auraptene) 또는 약학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽(blood-brain barrier) 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기 아우랍텐은 혈관 내피 세포의 밀착 연접(tight junction) 단백질인 ZO-1 (Zonula occludens-1), Ve-cadherin, occludin, claudin-5 등의 발현을 증진시켜 뇌혈관장벽(blood brain barrier, BBB) 파괴를 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 뇌혈관장벽 장애는 척수손상, 만성 또는 급성 뇌졸중, 뇌경색, 뇌종양, 뇌부종, 뇌 허혈, 알츠하이머병 및 다발성 경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0013] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 염은 통상의 산부가염, 예를 들어 염산, 황산, 질산, 인산, 과염소산, 브롬산과 같은 무기산으로부터 유도된 염 및 개미산, 아세트산, 프로피온산, 옥살산, 숙신산, 벤조산, 시트르산, 말레인산, 말론산, 말산, 타르타르산, 글루콘산, 락트산, 게스티스산, 푸마르산, 락토비온산, 살리실산, 프탈산, 엠본산, 아스파르트산, 글루탐산, 아세틸살리실산과 같은 유기산으로부터 유도된 염을 포함한다. 또한, 상기 염은 글리신, 알라닌, 발린, 아이소루신, 세린, 시스테인, 시스틴, 아스파라진산, 글루타민, 리신, 아르기닌, 타이로신, 프롤린과 같은 아미노산으로부터 유도된 염을 포함한다. 또한, 상기 염은 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, 톨루엔설폰산과 같은 설폰산류의 염을 포함한다.

[0014] 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있으며, 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0015] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 환제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제 및 현탁 용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강 내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하다.

[0016] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효량의 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 의학분야에 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. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부

작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0017] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다.

[0018] 본 발명은 또한, 아우랍텐(auraptene) 또는 식품학적으로 허용가능한 이의 염을 유효성분으로 함유하는 뇌혈관장벽 장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 아우랍텐은 혈관 내피 세포의 밀착 연접(tight junction) 단백질인 ZO-1 (Zonula occludens-1), Ve-cadherin, occludin, claudin-5 등의 발현을 증진시켜 뇌혈관장벽(blood brain barrier, BBB) 파괴를 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0020] 또한, 상기 뇌혈관장벽 장애는 전술한 것과 같다.

[0021] 본 발명의 상기 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

[0022] 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 유효성분을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합 양은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취인 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0023] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 아우랍텐을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합체 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0024] 본 발명의 조성물을 건강 음료로 사용할 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로텐스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마린, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린 또는 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 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.

[0026] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0028] **실시예 1. 아우랍텐 처리에 의한 밀착 연접 단백질의 발현 변화 분석**

[0029] 본 발명의 아우랍텐이 뇌혈관내피세포에서 밀착 연접(tight junction) 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해, 아우랍텐의 세포 독성 및 연접 단백질에 대한 형광 염색 분석을 실시하였다.

[0030] 뇌혈관내피세포주인 bEnd.3 세포를 96 웰 플레이트에 $5x10^3$ 세포/웰로 분주한 뒤, DMSO(대조군, Veh), 1, 2, 또는 4㎛M의 아루랍텐(Sigma-Aldrich, USA)을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 그 후, SRB(Sulforhodamine B) 시약을 사용하여 세포 생존율을 확인하였다. 그 결과, 2 및 4㎛M의 아루랍텐 처리군에서는 약간의 세포 독성이 확인되어(도 1A), 이후 실험은 1㎛M의 아루랍텐을 이용하여 수행하였다.

[0031] 연접 단백질의 발현 변화를 확인하기 위해 bEnd.3 세포를 12 웰 플레이트에 놓인 poly-D 리신(lysine) 코팅된 커버글라스 위에 분주한 뒤 하룻밤 배양하고, DMSO(대조군, Veh), 또는 1㎛M의 아루랍텐을 처리하고 24시간 동안 추가 배양하였다. 그 후, 항-ZO-1 항체 (1:500, Invitrogen, USA)를 12시간 붙이고, 형광이 결합된 2차 항

체를 2시간 반응시킨 뒤, 형광현미경을 이용하여 형광 발현 및 형광 강도를 분석하였다. 그 결과, 아우랍텐 처리에 의해 연접 단백질인 ZO-1의 발현이 증가되는 것이 확인되었다(도 1B 및 1C).

[0032] 또한, 동일한 조건으로 아우랍텐을 처리한 bEnd.3 세포를 이용하여 웨스턴 블랏을 진행하였다. 각 조건의 세포를 RIPA 버퍼를 이용하여 단백질을 분리하고 10㎍ 단백질을 SDS-PAGE 겔에 전기영동한 후, PVDF 멤브레인에 옮겨 3% BSA(bovien serum albumin)로 블록킹 진행 후, 항-occludin 항체 (Abcam, USA),항-VE-cadherin 항체 (Abcam), 항-ZO-1 항체, 항-β-actin 항체 (Santa Cruz Biotechnlogy, USA)를 붙인 후, 각각 1차 항체에 해당되는 2차 HRP-conjugated 항체를 붙인 후, ECL 용액을 이용해 단백질 밴드를 확인하였다. 그 결과, 밀착 연접에 관련된 단백질인 ZO-1, Ve-cadherin 및 occludin 모두 아우랍텐 처리에 의해 발현이 증가되는 것이 확인되었다(도 1D 내지 1G).

[0034] **실시예 2. 산소-포도당 결핍(oxygen glucose deprivation, OGD) 조건에서 뇌혈관내피세포의 밀착 연접 단백질 발현에 미치는 아우랍텐의 영향**

[0035] 본 발명자는 연접 단백질의 발현에 미치는 아우랍텐의 영향을 OGD 조건에서 분석하였다. OGD에 의한 세포 사멸 유도 방법은 실제 뇌 허혈에서 혈액 공급의 차단으로 산소와 영양분의 결핍에 의한 세포 사멸과 가장 유사한 모델이다(Goldberg, M.P. et al., J Neurosci, 1993, 13(8):3510-24; Strasser, U. and G. Fischer, J Neurosci Methods, 1995, 57(2):177-86). 간단하게, bEnd.3 세포를 12 웰 플레이트에 놓인 poly-D 리신(lysine) 코팅된 커버글라스 위에 분주한 뒤 하룻밤 배양한 후 DMSO(대조군, Veh), 또는 1μM의 아루랍텐을 처리하고, 포도당이 포함되지 않은 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에 95% 질소(N_2)와 5% 이산화탄소(CO_2) 혼합가스와 함께 밀폐하여 37℃에 3시간 동안 허혈 상태를 유도하고, 다시 포도당이 포함된 DMEM 배지를 넣어주고, 산소를 공급해주었다.

[0036] 그 결과, OGD 처리에 의해 bEnd.3 세포에서 연접 단백질(claudin-5, ZO-1, Ve-cadherin)의 발현이 감소되는 것이 확인되었으며, 아우랍텐 전처리에 의해 연접 단백질 발현 저해가 억제되는 것이 관찰되었다(도 2). 상기 결과를 통해, 아우랍텐이 뇌 허혈 조건에서 뇌혈관내피세포의 밀착 연접(tight junction) 유지에 기여함을 유추할 수 있었다.

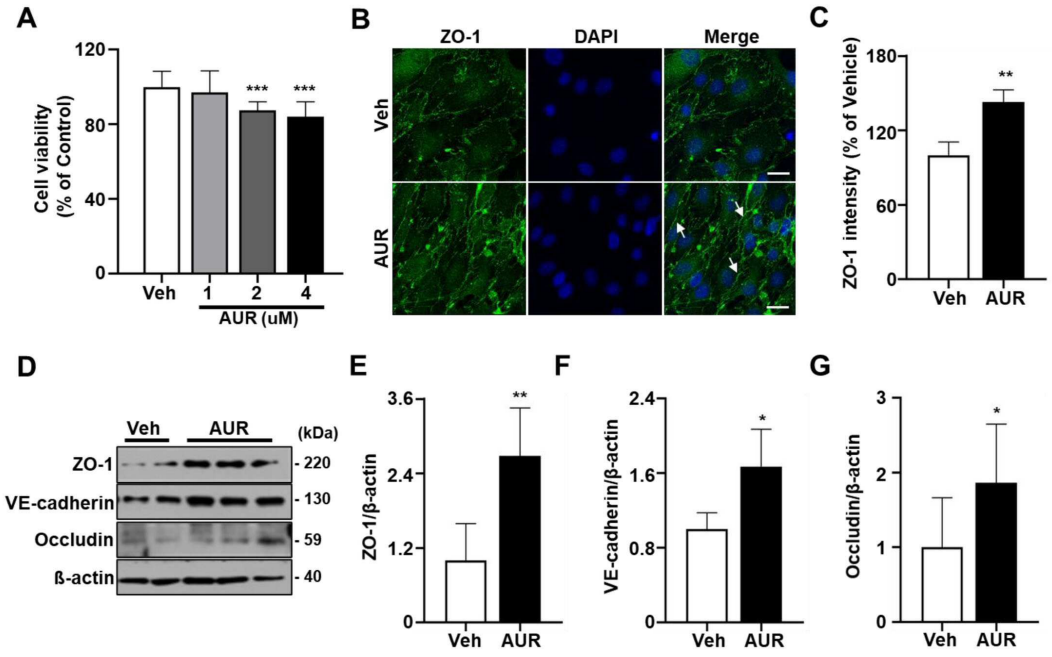
[0038] **실시예 3. 아우랍텐의 뇌혈관장벽(blood-brain barrier, BBB) 보호 효과 분석**

[0039] 본 발명자는 허혈성 뇌졸중 마우스 모델을 이용하여 아우랍텐의 BBB 기능 및 뇌손상 보호 효과를 평가하였다. 실험은 9주령의 수컷 C57B6 마우스를 두열바이오텍에서 구입한 후 일주일간 순화시킨 후, 10주령 마우스를 Koisumi의 방법 (Jpn J Stroke. 1986;8:1-8)의 방법에 따라 MCAO (middle cerebral artery occlusion)을 시행하였다(도 3A). 25 mg/kg의 아우랍텐(DMSO에 녹인 후 생리식염수로 희석)을 복강으로 2회 전처리(24시간 간격)하고 MCAO 수술 후, 재관류 시킨 후 1시간 이내에 1회 복강으로 주입하였다. 재관류(reperfusion) 24시간 후 마우스를 희생시켜 뇌 조직을 적출한 후 TTC 염색으로 조직 손상 정도를 확인하였다. 그 결과, MCAO 그룹에서 확인된 뇌 조직의 손상 부위가, 아우랍텐 처리 그룹에서는 현저하게 감소되었음을 관찰할 수 있었다(도 3).

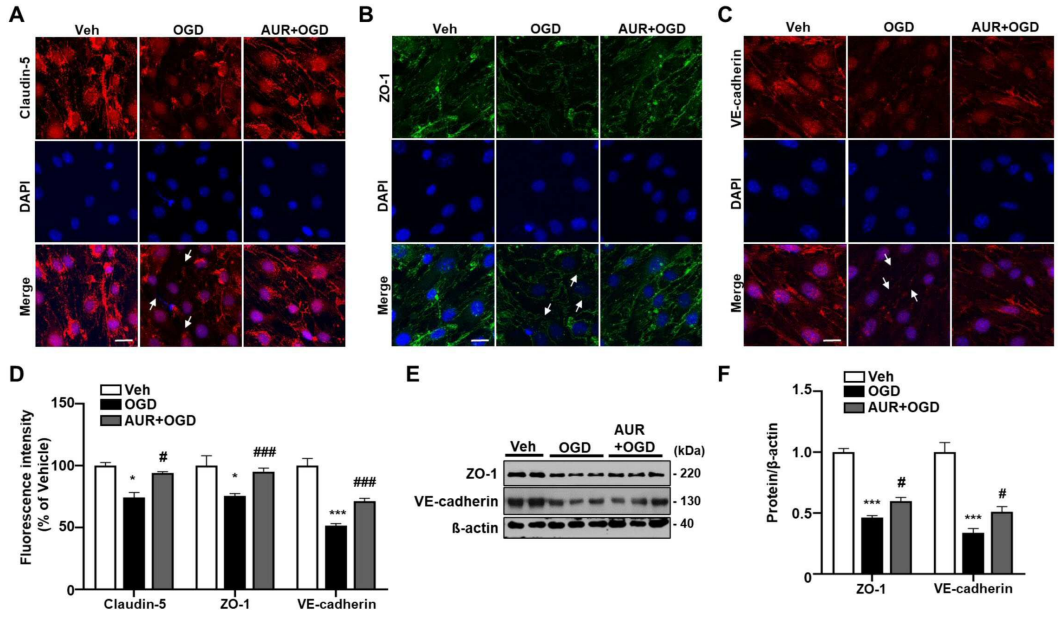
[0040] 또한, 에반스 블루(Evans blue) 시약을 사용하여 허혈성 뇌졸중 마우스 모델에서 BBB 누출(leakage)을 확인하였다. 실험은 도 3과 동일한 조건으로 수행되었으며, 3번째 아우랍텐 처리 3시간 후 생리식염수에 녹인 2% 에반스 블루를 꼬리 정맥으로 주입하고 1시간 뒤 마우스를 희생시켜 뇌 조직을 적출한 후 에반스 블루 시약의 누출 정도를 확인하였다. 그 결과, 도 4에 개시된 바와 같이, MCAO 그룹의 뇌 조직에서는 에반스 블루 시약이 누출되어 파란색 염료가 다수의 뇌 조직에서 확인되었으나, 아우랍텐을 처리한 그룹의 뇌 조직에서는 파란색으로 염색된 조직이 관찰되지 않았다. 상기 결과는 아우랍텐이 BBB의 기능을 유지 및 강화시켜 허혈 조건에서 뇌 손상을 억제하였음을 의미하였다.

도면

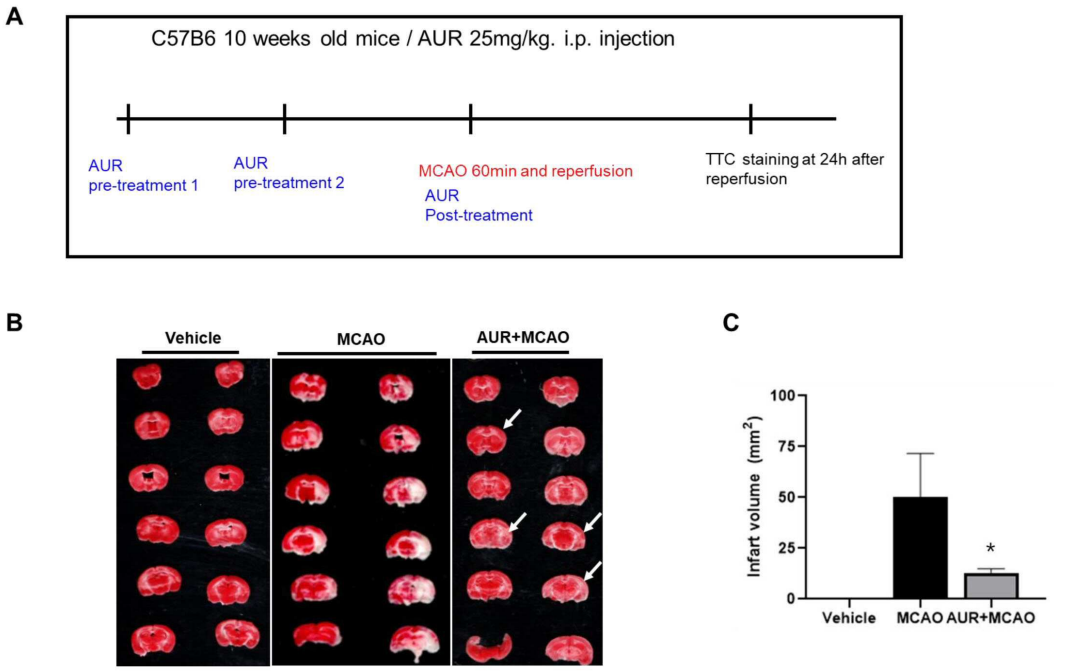
도면1


A
Cell viability (% of Control)
120
80
40
0
***
***
Veh
1
2
4
AUR (uM)
B
ZO-1
DAPI
Merge
Veh
AUR
C
ZO-1 intensity (% of Vehicle)
180
120
60
0
**
Veh
AUR
D
Veh
AUR
(kDa)
ZO-1
VE-cadherin
Occludin
ß-actin
220
130
59
40
E
ZO-1/β-actin
3.6
2.4
1.2
0
**
Veh
AUR
F
VE-cadherin/β-actin
2.4
1.6
0.8
0
*
Veh
AUR
G
Occludin/β-actin
3
2
1
0
*
Veh
AUR

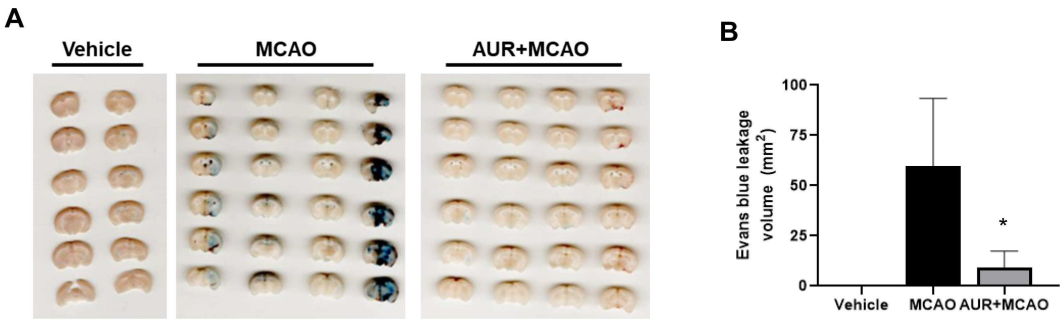
도면2


A
Veh
OGD
AUR+OGD
Claudin-5
DAPI
Merge
B
Veh
OGD
AUR+OGD
ZO-1
DAPI
Merge
C
Veh
OGD
AUR+OGD
VE-cadherin
DAPI
Merge
D
Veh
OGD
AUR+OGD
Fluorescence intensity (% of Vehicle)
150
100
50
0
*
#
*
###
***
###
Claudin-5
ZO-1
VE-cadherin
E
Veh
OGD
AUR +OGD
(kDa)
ZO-1
VE-cadherin
ß-actin
220
130
40
F
Veh
OGD
AUR+OGD
Protein/β-actin
1.5
1.0
0.5
0
***
#
***
#
ZO-1
VE-cadherin

도면3


A
C57B6 10 weeks old mice / AUR 25mg/kg. i.p. injection
AUR
pre-treatment 1
AUR
pre-treatment 2
MCAO 60min and reperfusion
AUR
Post-treatment
TTC staining at 24h after
reperfusion
B
Vehicle
MCAO
AUR+MCAO
C
Infart volume (mm2)
100
75
50
25
0
*
Vehicle
MCAO
AUR+MCAO

도면4


A
Vehicle
MCAO
AUR+MCAO
B
Evans blue leakage volume (mm2)
100
75
50
25
0
*
Vehicle
MCAO
AUR+MCAO