



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0104824
(43) 공개일자 2016년09월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/65 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 36/232 (2006.01) A61K 36/233 (2006.01)
A61K 36/234 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/65 (2013.01)
A23L 1/3002 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0027406

(22) 출원일자 2015년02월26일

심사청구일자 2015년02월26일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

박희준

경기도 남양주시 북한강로301번길 2-19

전송희

경기도 고양시 일산동구 위시티4로 79 315동 201호 (식사동, 위시티일산블루밍3단지아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 6 항

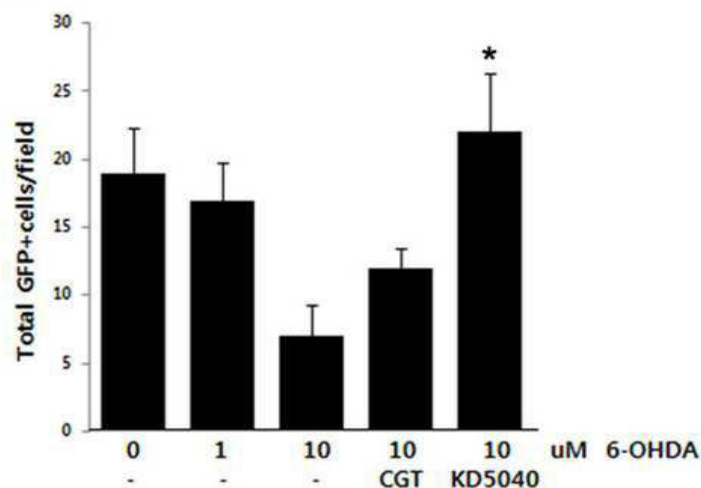
(54) 발명의 명칭 한방 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 작약(*Paeonia lactiflora*), 천궁(*Ligusticum chuanxiong*), 당귀(*Angelica gigas*), 시호(*Bupleurum falcatum*), 치자인(*Gardenia jasminoides*) 및 목단피(*Paeonia suffruticosa*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물, 및 건강기능식품에 관한 것이다.

상기 조성물은 MPTP에 의해 유도된 행동 장애를 개선시키고, 도파민성 뉴런의 손실을 회복시키므로 파킨슨병의 예방, 개선 및 치료에 우수한 효과가 있다.

대표도 - 도3d



(52) CPC특허분류

A61K 36/232 (2013.01)

A61K 36/233 (2013.01)

A61K 36/234 (2013.01)

(72) 발명자

김종필

서울특별시 강동구 풍성로 128 203동 2003호 (성내동, 삼성아파트)

박성욱

서울특별시 강남구 학동로 68길 29, 108동 1104호

구병수

경기도 고양시 일산동구 위시티4로 45 402동 2203호 (식사동, 위시티일산자이4단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C0540

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 한양방협력치료기술개발

연구과제명 파킨슨병 환자 삶의 질 개선을 위한 한양방 협력치료의 최적화 조건탐색 및 기초기전연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2013.05.15 ~ 2016.05.14

명세서

청구범위

청구항 1

작약(*Paeonia lactiflora*), 천궁(*Ligusticum chuanxiong*), 당귀(*Angelica gigas*), 시호(*Bupleurum falcatum*), 치자인(*Gardenia jasminoides*) 및 목단피(*Paeonia suffruticosa*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 정향(*Eugenia caryophyllata*) 또는 곽향(*Pogostemon cablin*) 추출물을 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁-C₄ 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것인, 조성물.

청구항 4

작약(*Paeonia lactiflora*), 천궁(*Ligusticum chuanxiong*), 당귀(*Angelica gigas*), 시호(*Bupleurum falcatum*), 치자인(*Gardenia jasminoides*) 및 목단피(*Paeonia suffruticosa*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 건강기능식품을 정향(*Eugenia caryophyllata*) 또는 곽향(*Pogostemon cablin*) 추출물을 추가로 포함하는 것인, 건강기능식품.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁-C₄ 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것인, 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 작약(*Paeonia lactiflora*), 천궁(*Ligusticum chuanxiong*), 당귀(*Angelica gigas*), 시호(*Bupleurum falcatum*), 치자인(*Gardenia jasminoides*) 및 목단피(*Paeonia suffruticosa*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물, 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 파킨슨병(Parkinson disease, PD)은 흔한 신경병성 장애로, 떨림증(tremor), 경직(rigidity), 운동완서(bradykinesia), 자세의 불안정(postural instability) 등의 증상이 나타난다(Parkinsonism IN: Merritt's

neurology, 2000, Ed 10, 679-693). 또한 파킨슨병은 미세아교세포증(microgliosis), 성상교세포증(astroglisis), 도파민성 뉴런의 진행적인 퇴화, 도파민성 뉴런에서 루이 소체(Lewy bodies)의 존재, 및 뇌흑질 치밀부(substantia nigra pars compacta)에서 알파-시누클레인(α -synuclein)이 축적되는 특징을 가진다(Neuron, 2003, 39, 889-909). 파킨슨병의 증상을 경감시키는 약물이 다 수 있으나, 약물의 만성적인 사용은 심신을 약화시키는 부작용을 초래하고(Neurology, 1991, 41, 202-205), 현재까지는 병의 진행을 막을 수 있는 약물은 개발되지 않은 실정이다. 파킨슨병의 정확한 원인은 알려지지 않았지만, 환경적인 독소, 유전적인 요인, 미토콘드리아의 기능 장애가 관련되어 있는 것으로 파악된다.

[0003] 파킨슨병의 모델로서, 신경독소인 6-히드록시도파민(6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 또는 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라히드로피리딘(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)이 주로 이용된다(Nat Rev Neurosci, 2001, 2(5), 325-334). 6-OHDA는 도파민 수송체(DAT)에 의해 흡수되고, 자유 라디칼(free radical)을 만들어낸다. MPTP는 파킨슨병에 관련된 도파민성 뉴런을 특정 표적으로 하기보다는 인간과 비인간영장류에서 도파민성 뉴런을 감소시키고, 성상교세포증을 일으키며, 뇌흑질 치밀부에서 소교세포를 활성화시켜(Nat Med, 1999, 5(12), 1403-1409), 파킨슨병의 전형적인 생화학적 또는 병리학적 증상을 야기한다(Neurosci, 2000, 16(2), 135-142).

[0004] 전통의학에서 파킨슨병은 몸의 떨림, 무감각, 흐느적거림, 사지가 약해지는 증상 때문에 중풍(shaking palsy)이라고도 일컬어진다. 동아시아 전통 의학의 이론에 따르면, 파킨슨병의 가장 중요한 병리학적 특징은 기(Qi)의 침체와 혈액의 정지, 간-음(liver-Yin)의 부족과 콩팥-음(liver-Yin)의 부족, 및 기와 혈액 모두가 부족한 것이다(Behav Pharmacol, 2006, 17(5-6), 403-410).

[0005] 파킨슨병의 치료를 위한 약물로서, 엘-도파(L-dopa) 제제, 도파민 수용체 작용제, 항콜린 약제, 엘테프릴(Eldepryl) 등이 알려져 있다. 그러나, 이들 약물들 대부분은 원인적인 치료가 아니라 증상을 조절하는 역할을 하는 것이며, 따라서 꾸준히 계속적인 약물의 복용을 필요로 한다. 이러한 약물들의 장기 투여는 약물 부작용의 문제점을 야기하게 된다. 예를 들어, 항콜린 약제들은 자율 신경계 이상이나 정신기능의 이상 등이 나타날 수 있어 고령의 환자들에게 지속적으로 투여하는 것에 한계가 있다. 또한, 엘-도파 제제의 경우 장기간 동안의 복용에 따라 점차적으로 효과가 떨어지고, 몸이 뒤틀리고 손이나 발이 저절로 움직이는 이상운동이 생기는 등의 부작용이 발생하게 된다. 기타, 고주파를 이용한 신경자극술 즉, 고주파 파괴술 또는 심부 뇌자극술 등의 수술 치료도 행해지고 있으나, 침습적인 수술을 필요로 하고 또한 많은 비용이 소모되는 문제가 있다.

[0006] 한편, 중국에는 많은 양의 식물 자원이 존재한다. 146,900종 이상의 식물 종이 중국에서 발견되었고, 이 중 22,500종 이상이 약용 식물로 밝혀졌으나(Fitoterapia, 2013, 84, 273-285), 현재까지 파킨슨병을 효과적으로 치료할 수 있는 약용 식물은 보고된 바 없다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 파킨슨병을 예방 또는 치료할 수 있는 조성물을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 작약(Paeonia lactiflora), 천궁(Ligusticum chuanxiong), 당귀(Angelica gigas), 시호(Bupleurum falcatum), 치자인(Gardenia jasminoides) 및 목단피(Paeonia suffruticosa) 추출물, 또는 이에 추가로 정향(Eugenia caryophyllata) 및/또는 곽향(Pogostemon cablin) 추출물을 포함하는 조성물이 파킨슨병에 효능이 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 작약(Paeonia lactiflora), 천궁(Ligusticum chuanxiong), 당귀(Angelica gigas), 시호(Bupleurum falcatum), 치자인(Gardenia jasminoides) 및 목단피(Paeonia suffruticosa) 추출물, 또는 이에 추가로 정향(Eugenia caryophyllata) 및/또는 곽향(Pogostemon cablin) 추출물, 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0009] 또한, 본 발명은 작약(Paeonia lactiflora), 천궁(Ligusticum chuanxiong), 당귀(Angelica gigas), 시호(Bupleurum falcatum), 치자인(Gardenia jasminoides) 및 목단피(Paeonia suffruticosa) 추출물, 또는 이에 추가로 정향(Eugenia caryophyllata) 및/또는 곽향(Pogostemon cablin) 추출물, 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 작약(*Paeonia lactiflora*), 천궁(*Ligusticum chuanxiong*), 당귀(*Angelica gigas*), 시호(*Bupleurum falcatum*), 치자인(*Gardenia jasminoides*) 및 목단피(*Paeonia suffruticosa*) 추출물(한방혼합 추출물 1) 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 상기 약학적 조성물은 정향(*Eugenia caryophyllata*) 추출물, 곽향(*Pogostemon cablin*) 추출물, 또는 정향 및 곽향 추출물을 추가로 포함하는 것(한방혼합 추출물 2)일 수 있다.
- [0012] 본 발명에서 '한방혼합 추출물 1'은 'CGT'와 동일한 의미로 사용되었으며, '한방혼합 추출물 2'는 'KD5040'과 동일한 의미로 사용되어 혼용될 수 있다.
- [0013] 본 발명에서 사용된 용어 '작약'은, 학명 '*Paeonia lactiflora*'로 일컬어지는 식물로서, 미나리아재비과에 속하는 여러해살이 쌍떡잎식물로 한국, 몽골 및 동시베리아 등에 분포한다. 꽃이 아름다워 원예용으로 쓰며, 뿌리는 진통, 복통, 월경통, 무월경, 토혈, 빈혈, 타박상 등의 약제로 쓰인다.
- [0014] 본 발명에서 사용된 용어 '천궁'은, 학명 '*Ligusticum chuanxiong*'으로 일컬어지는 식물로서, 미나리과에 속하는 쌍떡잎식물로 중국 원산이며 약용 식물로 재배한다. 진정, 진통, 강장 등에 효능이 있어 두통, 빈혈증, 부인병 등을 치료하는데 쓰인다.
- [0015] 본 발명에서 사용된 용어 '당귀'는, 학명 '*Angelica gigas*'로 일컬어지는 식물로서, 한국에서는 참당귀의 뿌리를 사용한다. 당귀의 효능은 피가 부족할 때 피를 생성해 주는 보혈작용이다. 약리학적으로 당귀는 관상동맥의 혈류량을 촉진시키고, 적혈구 생성을 왕성하게 한다.
- [0016] 본 발명에서 사용된 용어 '시호'는, 학명 '*Bupleurum falcatum*'으로 일컬어지는 식물로서, 쌍떡잎 식물 산형화목 미나리과의 여러해살이 풀로 북시호 또는 뿔미나리라고도 한다. 뿌리에는 사포닌과 지방유 등이 함유되어 있어, 한방에서는 해열, 진통, 강장제나 호흡기, 소화기, 순환기 질환 치료 약제로 사용되고 있다.
- [0017] 본 발명에서 사용된 용어 '치자인'은, 학명 '*Gardenia jasminoides*'로 일컬어지는 식물로서, 꼭두서니과에 속하는 사철 푸른 떨기나무로 양혈, 이뇨, 제변, 청열, 해독 효과가 있다.
- [0018] 본 발명에서 사용된 용어 '목단피'는 모란(*Paeonia Suffruticosa*)의 뿌리껍질로, 한의학에서 약제로 사용되고 있는 인체에 무해한 식물이다. 항염증, 항균 및 비만세포에서 히스타민 유리 억제 작용 등이 알려져 있다.
- [0019] 본 발명에서 사용된 용어 '정향'은, 학명 '*Eugenia caryophyllata*'로 일컬어지는 식물로서, 열대 상록성 아교목으로 몰루카 제도가 원산지이며 탄자니아의 잔지바르 섬, 인도네시아의 수마트라, 브라질, 말레이시아 등에서 생산된다. 구토, 위암, 복통, 소화불량과 성기능 증대, 잇몸염증 및 잇몸통증 등에 쓰인다.
- [0020] 본 발명에서 사용된 용어 '곽향'은, 학명 '*Pogostemon cablin*'으로 일컬어지는 식물로서, 약리작용으로 피부 진균, 대장균, 이질균, 폐렴균, 용혈성연쇄상구균 억제, 위액분비 촉진작용 등이 있다.
- [0021] 본 발명의 목적상 상기 작약, 천궁, 당귀, 시호, 치자인, 목단피, 정향 및 곽향은 파킨슨 질환의 예방 또는 치료용으로 사용된다.
- [0022] 본 발명에서 상기 작약, 천궁, 당귀, 시호, 치자인, 목단피, 정향 및 곽향은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명에서 사용된 용어 '추출물'이란 상기 작약, 천궁, 당귀, 시호, 치자인, 목단피, 정향 또는 곽향으로부터 분리하여 얻은 물질을 의미하며, 당업계에서 공지된 통상적인 분획 용매, 예를 들어 물, 에탄올, 메탄올과 같은 C₁-C₄ 알코올(예: 메탄올, 에탄올, 부탄올 등) 등의 극성 용매, 및 헥산, 에틸아세테이트, 클로로포름, 디클로로메탄 등의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매를 사용하여 분리할 수 있다.

- [0024] 구체적으로 본 발명의 추출물은 작약, 천궁, 당귀, 시호, 치자인, 목단피, 정향 또는 곽향을 음건하여 세절한 것을 그 중량의 약 1 내지 10배, 바람직하게는 약 2 내지 5배 부피의 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10, 바람직하게는 1:0.2 내지 1:3의 혼합비를 갖는 혼합용매로 20℃ 내지 100℃, 바람직하게는 30℃ 내지 70℃의 추출 온도에서 약 1 시간 내지 2일, 바람직하게는 2 시간 내지 1일 동안 열수 추출, 환류냉각 추출, 초음파 추출 등의 추출방법, 바람직하게는 환류냉각 추출의 추출방법으로 1회 내지 5회, 바람직하게는 2회 내지 3회 반복하여 추출물을 수득한 후, 감압여과하고 여과한 추출물을 혼합하여 회전진공농축기로 20℃ 내지 100℃, 바람직하게는 50℃ 내지 70℃에서 감압 농축하여 유기용매를 제거하여 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매에 따른 가용추출물인 조추출물을 얻을 수 있다.
- [0025] 또한, 극성용매 가용추출물은 비극성 용매 가용성분 추출과정을 거친 수가용성 분획부에 약 1 내지 10배, 바람직하게는 약 1 내지 5배 부피의 에탄올을 가하여 1 내지 5회, 바람직하게는 2 내지 4회 분획하여 에탄올 가용성 분획부와 수가용성 분획부를 수득할 수 있으며, 용매 분획부를 회전 진공 농축기로 감압농축시켜 용매를 제거하여 각각의 추출물을 얻을 수 있다.
- [0026] 구체적으로, 본 발명의 추출물은 수 가용 추출물 또는 에탄올 가용 추출물일 수 있고, 더욱 구체적으로는 30% 에탄올 추출물일 수 있다.
- [0027] 구체적인 일 실시예에 있어서, 본 발명에 따른 추출물은, 작약, 천궁, 당귀, 시호, 치자인, 목단피의 혼합물 100g을 100℃에서 30% 에탄올로 환류 응축기를 이용하여 추출한 후, 필터를 이용하여 여과한 다음 감압 농축하고 동결 건조하여 에탄올 추출물 15.47g을 제조하였다(한방혼합 추출물 1, 실시예 1).
- [0028] 다른 구체적인 일 실시예에 있어서, 상기 한방혼합 추출물 1에 동일한 방법으로 추출한 정향과 곽향의 추출물의 혼합물(1:1)을 3대 1의 비율로 혼합하여 한방혼합 추출물 2를 수득하였으며, 이를 KD5040으로 명명하였다(실시예 1).
- [0029] 본 발명에서 사용된 용어 '분획물'이란, 특정 용매를 사용하여 상기 한방혼합 추출물 1 또는 2로부터 본 발명에서 목적으로 하는 활성을 가지는 물질을 분획하여 얻은 활성 분획물(fraction)을 의미한다.
- [0030] 상기 분획물을 얻기 위하여 사용되는 용매는 당업계에서 공지된 통상적인 분획 용매, 예를 들어, 물, 에탄올, 메탄올과 같은 C₁-C₄ 알코올(예: 메탄올, 에탄올, 부탄올 등) 등의 극성용매, 및 헥산, 에틸아세테이트, 클로로포름, 디클로로메탄 등의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매를 사용할 수 있다.
- [0031] 구체적으로, 본 발명의 분획물은 한방혼합 추출물 1 또는 한방혼합 추출물 2를 증류수에 현탁시킨 후, 이를 현탁액 부피의 약 1 내지 100배, 바람직하게는 약 1 내지 5배에 달하는 부피의 헥산, 에틸아세테이트, 클로로포름, 디클로로메탄 등의 비극성용매를 가하여 1회 내지 10회, 바람직하게는 1회 내지 5회 추출, 분리하여 비극성용매 가용 분획물을 수득할 수 있으며, 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있다.
- [0032] 본 발명의 한방혼합 추출물 또는 이의 분획물은 정제과정을 추가적으로 적용하여 얻은 것도 포함될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 제조방법에 따른 한방혼합 추출물 또는 이의 분획물을 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외여과막을 통과시켜 얻은 분획, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등으로 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획도 본 발명의 한방혼합 추출물 또는 이의 분획물에 포함된다.
- [0033] 또한, 인체에 유해한 유기용매로부터의 노출을 방지하기 위하여, 한방혼합 조추출물에 이온교환 크로마토그래피(Ion exchange chromatography)법을 수행할 수 있고, 상기 방법에서, 정지상으로 사용한 충전제는 SP207, HP20SS 또는 HP 20을 사용할 수 있으며, HP 20 충전제를 사용함이 바람직하며, 이동상 용매로는 먼저, 극성이 가장 큰 물을 이동시킨 후, 순차적으로 극성이 낮은 용매로 치환시키는 단계를 수행하는데, 예를 들어 물, 물:메탄올 혼합용매, 메탄올 또는 추가적으로 좀더 비극성 용매인 아세톤 등의 용매로 전환시키는 단계를 통하여 각 전개용매에 따라 유출된 분획물을 수득 가능하다.
- [0034] 또한 본 발명의 한방혼합 추출물 또는 이의 분획물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 열풍 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말상태로 제조될 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 한방혼합 추출물 또는 이의 분획물은 MPTP에 의해 유도된 행동 장애를 개선시키고, 도파민성 뉴

런의 손실을 회복시키는 신경세포 보호효과가 있으므로 파킨슨 질환의 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0036] 본 발명에서 사용된 용어 '파킨슨' 질환은 뇌의 흑질(substantia nigra)에 분포하는 도파민의 신경세포가 점차 소실되어 발생하며 안정떨림, 경직, 운동완만 및 자세 불안정성이 특징적으로 나타나는 신경계의 만성 진행성 퇴행성 질환을 의미한다.

[0037] 본 발명에서 사용되는 용어 '예방'은 상기 한방혼합 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물의 투여로 파킨슨 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 사용되는 용어 '치료'는, 상기 한방혼합 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0038] 구체적인 일 실험예에서, 도파민성 뉴런에서 한방혼합 추출물의 신경보호 효과를 확인하기 위해 신경세포에 산화 스트레스를 유발한 뒤 상기 한방혼합 추출물을 처리한 결과도파민성 뉴런의 수와 뉴라이트 프로세스가 증가하는 것을 확인하였다(도 2 및 도 3). 나아가, 본 발명의 구체적인 또 다른 실험예에서 상기 한방혼합 추출물 2는 MPTP-유도 파킨슨병 모델 마우스에서 행동능력을 향상시키고, 흑질 선조체 도파민성 세포를 보호하는 효과를 확인하였다(도 4 및 도 5).

[0039] 따라서 본 발명의 한방혼합 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 항산화 효과 및 신경세포 보호 효과를 가지므로 파킨슨 질환 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있는 것을 알 수 있었다.

[0040] 또한, 본 발명은 상기 한방혼합 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 인간을 포함하는 개체에게 투여하여 파킨슨 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0041] 본 발명에서 용어 '개체'란, 파킨슨 질환이 이미 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 조성물을 개체에게 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다.

[0042] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용된 용어 '약학적으로 유효한 양'은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 증정도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예를 들면, 상기 한방혼합 추출물 또는 이의 분획물은 유효성분으로 1일 0.01 내지 500mg/kg으로, 바람직하게는 10 내지 100mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 한방혼합 추출물 또는 이의 분획물을 0.001 내지 50% 중량백분율로 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0044] 본 발명의 파킨슨 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0045] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게

는, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 충량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함한, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0046] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명은 작약(*Paeonia lactiflora*), 천궁(*Ligusticum chuanxiong*), 당귀(*Angelica gigas*), 시호(*Bupleurum falcatum*), 치자인(*Gardenia jasminoides*) 및 목단피(*Paeonia suffruticosa*) 추출물(한방혼합 추출물 1) 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 파킨슨 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0048] 상기 건강기능식품은 정향(*Eugenia caryophyllata*) 추출물, 곽향(*Pogostemon cablin*) 추출물, 또는 정향 및 곽향 추출물을 추가로 포함하는 것(한방혼합 추출물 2)일 수 있다. 상기 추출물, 이의 분획물, 파킨슨 질환의 정의는 상기에서 설명한 바와 같다.

[0049] 본 발명에서 사용된 용어, '건강기능식품'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0050] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(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 천연 과일주스 및 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품은 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스포, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[0051] 또한 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, '식품첨가물'로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0052] 상기 '식품첨가물공전'에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.

[0053] 상기 건강기능식품을 제조하는 과정에서 음료를 포함한 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 추출물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.

발명의 효과

[0054] 본 발명의 한방혼합 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 MPTP에 의해 유도된 행동 장애를 개선시키고, 도파민성 뉴런의 손실을 회복시키므로 파킨슨병의 예방, 개선 및 치료에 우수한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0055]

도 1은 한방 추출물의 라디칼 포집(scavenging) 활성을 나타낸 것이다. 반응 혼합물은 60 μ M의 DPPH와 12.5, 25, 50, 100 μ g/ml의 한방 추출물을 포함한다. CGT는 한방혼합 추출물 1, SBM은 현삼(*Scrophularia buergeriana*) 추출물, ECT는 정향 추출물, COL은 결명자(*Cassia obtusifolia*) 추출물, PCB는 곽향 추출물을 의미한다.

도 2는 도파민성 뉴런에서 CGT(한방혼합 추출물 1)의 신경보호효과를 나타낸 것이다. (a) Pitx3 GFP knock-in P1 마우스로부터 유래한 GFP+ 도파민성 뉴런의 형광 사진이다. 중뇌 세포는 7DIV에서 H₂O₂를 처리하여 배양하였다. (b) GFP+ 세포의 정량데이터를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 값으로 나타내었다. 독립된 3번의 실험에서 15개의 서로 다른 필드(fields)로부터 세포의 수를 세었다. * $p < 0.05$. (c) 신경 돌기 길이의 정량 데이터를 나타낸 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 값으로 나타내었다. * $p < 0.05$. 독립적인 3번 실험하였고, $n=15$ 개의 세포를 나타낸다.

도 3은 도파민성 뉴런에서 KD5040(한방혼합 추출물 2)의 신경보호 효과를 나타낸 것이다. (a) Pitx3 GFP knock-in P1 마우스로부터 유래한 GFP+ 도파민성 뉴런의 형광 사진이다. 7DIV에서 중뇌 세포에 H₂O₂를 처리하였다. (b) GFP+ 세포의 정량 데이터이다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 값으로 나타내었다. 독립된 3번의 실험으로 15개의 서로 다른 필드(fields)에서 세포의 수를 세었다. * $p < 0.05$. (c) 신경 돌기 길이를 정량화한 것이다. (d) 6-OHDA와 함께 KD5040 또는 CGT를 처리했을 때 GFP+ 세포를 정량화한 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 값으로 나타내었다. 독립된 3번의 실험으로 15개의 서로 다른 필드(fields)에서 세포의 수를 세었다. (e) 6-OHDA와 함께 KD5040 또는 CGT를 처리한 뒤 GFP+ 세포에서 TH(tyrosine hydroxylase)의 qRT-PCR 데이터를 나타낸다. 데이터는 GAPDH로 표준화하였으며, 평균 $\pm$ SEM 값으로 나타내었다; $n=3$, * $p < 0.05$. (f) 6-OHDA와 함께 KD5040 또는 CGT를 처리한 GFP+ 세포에서 DAT의 qRT-PCR 데이터를 나타낸다. 데이터는 GAPDH로 표준화하였으며, 평균 $\pm$ SEM 값으로 나타내었다; $n=3$, * $p < 0.05$.

도 4는 ORP(Overall rod performance) 및 장대 테스트의 결과를 나타낸 것이다. (a) ORP, (b) 장대 테스트의 T-turn 시간, (c) 장대 테스트에서 아래쪽으로 향한 시간을 나타낸다. * $p < 0.0$ 대조군과 비교, # $p < 0.05$ MPTP와 비교, \$ $p < 0.05$ MPTP + KD5040 1 vs MPTP + KD5040 3 값에 비교.

도 5는 선조체(Striatum, ST)에서 TH(Tyrosine Hydroxylase)의 면역조직화학 염색 결과를 나타낸 것이다. (a) 대조군 (b) MPTP (c) MPTP + KD5040 1 (d) MPTP + KD5040 3. 스케일 바(Scale bar) = 200 μ m. (e) 선조체에서 TH-양성(positive) 섬유의 광학적 밀도는 one-way ANOVA를 통해 분석하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 값으로 나타내었다. *: $p < 0.05$ 대조군 그룹의 값과 비교, #: $p < 0.05$ MPTP 그룹의 값과 비교, \$: $p < 0.05$: MPTP + KD5040 1 vs MPTP + KD5040 3의 값과 비교했을 때.

도 6은 흑질(Substantia nigra, SN)에서 티로신 히드록실레이스의 면역조직화학 염색 결과를 나타낸 것이다. (a) 대조군 (b) MPTP (c) MPTP + KD5040 1 (d) MPTP + KD5040 3. 스케일 바(Scale bar) = 100 μ m. (e) 흑질에서 TH-양성(positive) 뉴런의 생존율을 one-way ANOVA를 통해 분석하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 값으로 나타내었다. *: $p < 0.05$ 대조군 그룹의 값과 비교, #: $p < 0.05$ MPTP 그룹의 값과 비교, \$: $p < 0.05$ MPTP + KD5040 1 vs MPTP + KD5040 3의 값과 비교.

도 7은 MPTP를 처리한 마우스의 선조체에서 KD5040의 투여가 TrkA 발현을 증가시키는지 확인한 것이다. 선조체의 용해물을 10% SDS-PAGE를 이용하여 전기영동하였고, 각 항체로 면역블로팅하였다. 단백질 밴드의 세기는 덴시토메트리(densitometry)를 이용하여 정량하였고, 밴드를 액틴(actin)으로 표준화하였다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM 값으로 나타내었다. *: $p < 0.05$ 대조군 그룹의 값과 비교, **: $p < 0.01$ 대조군 그룹의 값과 비교, #: $p < 0.05$ MPTP 그룹의 값과 비교, ##: $p < 0.01$ MPTP 그룹의 값과 비교.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0056]

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 등을 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 발명의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0057] 본 발명에서는 한방 혼합 추출물 1 또는 2(각각 CGT, KD5040)의 처리가 MPTP에 의해 유도된 행동장애를 유의적으로 개선시키고, 도파민성 뉴런의 손실을 회복시킨다는 것을 입증하여, 본 발명의 상기 추출물을 포함하는 조성물이 파킨슨병의 예방 또는 치료에 효과적이라는 것을 확인하였다. 이하 구체적인 실험 내용을 설명한다.

[0058] 실시예 1. 추출물 제조

[0059] 한방혼합 추출물 1(CGT)을 제조하기 위해 작약(*Paeonia lactiflora*)의 뿌리줄기(29.41 g), 천궁(*Ligusticum chuanxiong*)의 뿌리줄기(19.61 g), 당귀(*Angelica gigas*)의 뿌리줄기(19.61 g), 시호(*Bupleurum falcatum*)의 뿌리줄기(15.69 g), 치자인(*Gardenia jasminoides*)의 열매과실(7.84 g), 목단(*Paeonia suffruticosa*)의 뿌리껍질(7.84 g)의 혼합물 100 g을 가루로 만들고, 100℃에서 10배 부피의 30% 에탄올로 환류 응축기를 이용하여 3 시간 동안 두 번 추출하였다. 그 후, 50 μ m의 필터를 이용하여 거르고, 동결 건조기를 이용하여 감압 하에 동결 건조하였다. 전 과정의 최종 산물은 대략 15.47 g의 건조중량이었으며, 평균 수율은 15.47%였다. 정향(*Eugenia caryophyllata*) 꽃봉우리의 산물은 대략 10.69 g(평균 수율 10.69%)이었고, 곽향(*Pogostemon cablin*) 지상부의 산물은 6 g(평균 수율 6%)이었다. 정향과 곽향 추출물의 혼합물(1:1)과 CGT를 1:3의 비율로 혼합하여 한방혼합 추출물 2를 완성하고, KD5040으로 명명하였다.

[0060] 모든 재료는 동양허브(서울, 한국)에서 구입하였다. 건조된 재료들은 사용할 때까지 -80℃에서 보관하였다. 세포 배양을 위해 각 식물을 30% 에탄올을 이용하여 추출하였고, 0.2 μ m 필터를 이용하여 걸렀다.

[0061] 실시예 2. 초대 배양 및 세포 염색

[0062] 갓 태어난 Pitx3 GFP knockin 마우스를 이용하여 중뇌 뉴런의 초대 배양을 준비하였다. 중뇌를 37℃에서 30분간 파파인(papain) 분해(5 U/ml; Worthington Biochemicals)하고, 분해된 조직을 점차적으로 작은 파이펫 팁을 이용하여 단일 세포로 저작하였다. 상기 세포를 250 x g에서 5분 동안 원심분리하고, 5% FBS, 1x B27(invitrogen), 1x GlutaMAX, 0.45% D-글루코스(Sigma-Aldrich), 10 U/ml 페니실린(Invitrogen), 10 μ g/ml 스트렙토마이신(Invitrogen)이 포함된 배지에 재현탁하였다. 중뇌에서 분리한 세포들을 동량으로 폴리-D-라이신(Sigma)과 라미닌(BD Biosciences)이 먼저 처리된 4개의 12-mm 원형 커버슬립(cover slip) 위에 두고, 37℃의 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 접종 후 24시간 후에, 배양액을 5 μ M 시토신 베타-D-아라비노푸라노시드(cytosine β -D-arabinofuranoside, Sigma-Aldrich)가 포함된 배양액으로 교체하였고, 상기 배양액을 교질세포(glia)의 증식을 억제하는데 사용하였다.

[0063] 배양 7일 후, 중뇌 배양체에 서로 다른 약물을 24시간 처리하였다. Pitx3 GFP+ 도파민성 뉴런을 15분 동안 4% PFA(paraformaldehyde)에서 고정하고, 고정된 세포에 1시간 동안 블로킹 용액(10% NDS, 0.1% Triton X-100 in PBS)을 처리하였다. 1차 면역 염색에 GFP 항체(Invitrogen, 1:1000)를 포함한 염색 시약(1% NDS, 0.1% Triton X-100 in PBS)을 사용하였다. 2차 염색은 형광단(fluorophore)이 결합된 마우스 항-IgG 항체를 염색 시약에 1:1500의 비율로 희석하여 1시간 동안 수행하였다. 니콘(Nikon SM 510 Meta) 형광 현미경을 이용하여 사진을 찍고 EGFP 형광 방광에 적합한 여기 및 방사(excitation and emission) 필터를 사용하였다.

[0064] 실시예 3. HPLC 분석

[0065] 10 mg/ml의 농도로 KD5040을 증류수에 용해시켰다. 0.22 μ m 멤브레인 필터를 이용하여 샘플을 걸렀고, UV 탐지기가 장착된 HPLC 시스템(1260 infinity HPLC system, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)에 10 μ l 씩 분주하여 주입하였다. 샘플을 아세토니트릴/물(acetonitrile/water, 52:48 v/v)의 등용매(isocratic) 조건에서 1 ml/분의 속도로 흘렸고, 230 nm에서 용리액(eluent)을 분석 컬럼(Capcell pak analytical column, 250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m; Shiseido)으로 분석하였다. 최종 런타임은 25분이었으며, 각각 6.2분, 14.5분에서 유게놀(Eugenol)과 데커신(decursin)을 찾아내었다. 0.203% 유게놀과 0.002% 데커신을 포함하도록 샘플을 표준화하였다.

[0066] 실시예 4. DPPH 라디칼 포집(scavenging) 활성 측정

[0067] 1 내지 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 다양한 농도에서 한방 추출물을 0.2mM DPPH 에탄올 용액과 1:1의 비율로 혼합하였다. 어두운 상태, 상온에서 30분 동안 배양한 후, 517nm의 분광 광도계(VersaMax microplate reader; Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA)에서 혼합물의 흡광도를 측정하였다. 또한, DPPH 라디칼의 50%를 포집하는 데 필요한 농도로 정의되는 IC_{50} (half maximal inhibiting concentration)으로 추출물의 활성을 나타내었다. IC_{50} 은 Calcsyn 소프트웨어(Biosoft, Cambridge, UK)를 이용하여 계산하였다.

[0068] 실시예 5. 동물

[0069] 22-26g의 무게를 갖는 12주 된 수컷 C57BL/6 마우스(Central Lab. Animal Inc., Seoul Republic of Korea)를 이용하였다. 동물들은 NIH(NIH publication No.85-23, revised 1985)와 한국의료과학아카데미(KHUASP(SE)-14-052)의 가이드라인을 따라 12시간의 낮, 12시간의 밤의 사이클을 갖는 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 의 실내 온도에서 유지하였다.

[0070] 생체 내 시험을 위해 마우스를 무작위적으로 4개의 그룹으로 나누었다: (1) 대조군 ($n=6$; 복강내 식염수 주사), (2) MPTP(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ($n=5$; 복강내 30mg/kg/일 농도로 MPTP 주사) (3) KD5040 1 ($n=5$; 복강내 MPTP+KD5040 1 주사), (4) KD5040 3 ($n=5$; 복강내 MPTP+ KD5040 3 주사). 인간에서 500 mg/60kg/일 또는 1500 mg/60kg/일에 해당하는 양을 적용하기 위해 생쥐에게 100 mg/kg/일 또는 300 mg/kg/일에 해당하는 KD5040 1 또는 KD5040 3을 먹도록 음식을 준비하였고, 감마선에 노출시켰다. 1주일간의 하우징(housing)후, 19일 동안 생쥐에게 KD5040이 포함된 식이요법을 수행하였다. KD5040 그룹에는 KD5040을 일주일 동안 먼저 처리하였고, 식염수에 녹인 30mg/kg/일 MPTP를 5일 동안 처리하였다.

[0071] 실시예 6. 행동 테스트

[0072] (1) ORP(Overall rod performance)

[0073] MPTP, KD5040 1 및 KD5040 3에 의해 유도된 행동학적 영향을 테스트하기 위해 ORP를 수행하였다. 로드 기구(MED associates Inc., VT, USA)를 이용하여 5 마리의 생쥐가 막대기로부터 떨어지는 시간을 기록하였다. 연속적인 레드 스피드(red speed, 0 to 35rpm)를 측정하기 위해 로드 위에서 최대 480초까지 기록하였다.

[0074] (2) 장대 테스트(Pole test)

[0075] 장대 테스트 방법은 파킨슨병(Parkinson's disease, PD)모델에서 운동완서(bradykinesia)를 측정하기에 유용한 방법이다. 마지막 MPTP 주사 후, 7일 째 되는 날 장대 테스트를 수행했다. 도구는 55cm 높이, 1.3cm 직경을 갖는 장대를 이용하였다. 장대 위쪽에 마우스의 머리를 두고, 꼬리로 지탱하는 동안 장대의 꼭대기에 앞발을 두었다. 마우스가 180° 도는 시간(time to turn; T-turn)과 돌아서 바닥에 내려오는 시간(locomotion activity time; T-LA)을 측정하였다. 행동 테스트 전에 하루에 5번 수행하여 테스트를 익히게 했다.

[0076] 실시예 7. 면역조직화학 염색

[0077] 마지막 MPTP 주사 후, 7일 째 되는 날 마우스를 희생시키고, 경심관류로(transcardially) 0.2 M 인산 완충액에 들어있는 차가운 4% PFA(paraform aldehyde)를 뿌렸다. 각각의 뇌를 분리하여 4% PFA를 이용하여 4°C 에서 하루 종일 고정시켰고, 동결 방지를 위해 30% 수크로스 용액에 담갔다. 냉동된 뇌는 동결박편제작기(CM1850; Leica, Germany)를 이용하여 $40\mu\text{m}$ 절편으로 잘랐고, 사용할 때까지 4°C 크라이오프로텍탄트(cryoprotectant, 30% 에틸렌 글리콜, 30% 글리콜, 0.02M PB)에 보관하였다. 면역 조직 화학(Immunohistochemistry)에서, 뇌 절편을 PBS와 3% H_2O_2 가 들어간 0.05 M PBS로 씻어내었고, 1% BSA와 표준 염소 혈청을 이용하여 블로킹하였다. 래빗 항-티로신 히드록실레이스(rabbit anti-tyrosine hydroxylase)에 TH(1:1000; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 넣고 하루 종일 실내 온도에서 인큐베이션하였다. 1시간 동안 비오틴(biotin)이 부착된 항-래빗(anti-rabbit) IgG(Vector Laboratories Inc., CA, USA)를 이용하여 뇌 조직을 인큐베이션한 후, 마지막으로 실내 온도에서 1시간 동안 ABC 시약(Vector Laboratories Inc., CA, USA)을 처리하였다. 퍼옥시다제(peroxidase) 활성을 1 M TBS(tris-buffered saline, pH7.5)에 0.02% 디아미노벤지딘(diaminobenzidine)과 0.003% 히드로젠 퍼옥사이드(hydrogen peroxide)가 들어간 용액에서 2분 동안 인큐베이션했다. 절편을 젤라틴이 코팅된 슬라이드 위에 올리

고, 건조하여 수분을 뺀 후, 커버슬립(coverslip)으로 덮었다. 명시야 현미경(BX51; Olympus, Japan)을 이용하여 선조체(striatum)와 흑질(substantia nigra)의 사진을 찍었다. 선조체에서 TH-면역양성반응(immunopositivity)은 Image Pro version 6.0 for Window(Media Cybernetics Inc., MD, USA)를 이용해 측정하였다. SN에서 TH-양성반응인 세포의 수를 세었다.

[0078] 실시예 8. 웨스턴 블로팅

[0079] 웨스턴 블로팅(western blotting)을 위해, 선조체를 재절편화하고, 50 mM Tris-base(pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% 글리세롤, 10 mM NaF, 10 mM Na-pyrophosphate, 1% NP-40, 프로테아제 저해제(0.1 mM 페닐메틸설포닐플루오라이드(phenylmethylsulfonylfluoride), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 아프로티닌(aprotinin), 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 류펩틴(leupeptin))를 포함하고 있는 용해 완충액에서 균질화하였다. 세포 용해물 30 μg 을 10% 또는 15% SDS-폴리아크릴아마이드 겔에 전기영동하였고, 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membranes)에 이동시켜 항-TH(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 항-DAT, 항-TRK, 항-p53, 항-액틴(Cell signaling technology, Beverly, MA, USA)에 16시간 동안 4°C에서 인큐베이션하였다. TBS-T(0.05%)로 씻은 후, 블롯을 호당무과산화소(horseradish peroxidase)가 결합된 항-래빗 또는 항-마우스 IgG에 인큐베이션하고, ECL 시스템(Thermo Fisher Scientific, USA)을 이용하여 밴드를 가시화하였다. Molecular Imager ChemiDoc XRS+(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 통해 밴드의 이미지를 얻었고, Image LabTM software version 2.0.1 (Bio-Rad)을 이용하여 밴드의 세기를 분석하였다.

[0080] 실시예 9. 통계학적 분석

[0081] 모든 값은 평균 $\pm$ SEM으로 표현하였다. Newman-Keuls의 Multiple Comparison Test에 의한 one-way ANOVA를 이용하여 데이터를 분석하였다. $p < 0.05$ 일 때, 유의적인 차이가 있다고 간주하였다.

[0082] 실험예 1. 자유 라디칼 포집(scavenging) 활성

[0083] 한방혼합 추출물 1(CGT), 한방혼합 추출물 2(KD5040), 및 상기 추출물의 단일 성분의 항산화 능력을 평가하기 위해 DPPH 자유 라디칼 포집(scavenging) 활성 분석을 수행하였다. CGT, KD5040과 상기 추출물의 단일 성분은 농도 의존적으로 활성이 증가하였다. DPPH에서 SBM을 제외하고 모두 높은 활성을 보였으며, 특히 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ KD5040이 가장 높은 포집 활성($96.21 \pm 0.82\%$)을 보였다. IC_{50} 를 계산한 결과, ECT(*Eugenia caryophyllata*, 정향)에서 2.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로, 가장 높은 IC_{50} 를 보였다(도 1).

[0084] 실험예 2. 도파민성 뉴런에서 CGT와 KD5040의 신경보호 효과

[0085] Pitx3-EGFP knock-in 배아줄기 세포 및 Pitx3-EGFP knock-in 마우스 유래 GFP+ 세포는 기능적 중뇌 DA 뉴런으로 알려져 있다. 중뇌의 도파민성 뉴런에서 CGT와 KD5040의 효과를 조사하기 위해 Pitx3-GFP knock-in P1 마우스로부터 초대 중뇌세포 배양을 수행하였고, 전체 세포의 22.5%가 GFP+ 도파민 뉴런인 것을 확인했다(도 2a 및 도 2b).

[0086] CGT와 KD5040의 신경보호 효과를 확인하기 위해 H_2O_2 를 이용하여 신경세포에 산화 스트레스를 유도하였다. H_2O_2 의 처리는 전체 GFP+ 세포의 수 뿐만 아니라 Pitx3 GFP+ 도파민성 뉴런의 수와 가장 긴 뉴런 프로세스(neuronal processes)에 관련된 신경돌기의 길이 모두에서 현저한 감소를 이끌었다. SBM의 처리는 뉴런의 형태를 바꾸지 않았고, GFP+ 뉴런의 수는 H_2O_2 를 처리한 대조군과 비슷하였다. H_2O_2 를 처리한 뉴런에서 ECT의 첨가가 GFP+ 세포와 뉴라이트 프로세스(neurite process)에서 상대적으로 적은 증가를 이끌어낸 반면에, CGT의 첨가는 GFP+ 세포 수와 프로세스 길이의 현저한 증가를 이끌어냈다(도 2c).

[0087] 한편, H_2O_2 를 처리한 뉴런 배양에 KD5040을 첨가한 경우에는, CGT를 첨가한 경우 보다도 GFP+ 도파민성 뉴런의 수와 전체적인 프로세스 길이가 유의하게 증가했다(도 3a 내지 도 3c). 따라서 KD5040은 H_2O_2 로 유도된 산화적 스트레스에 대하여 도파민성 뉴런을 증가시키며 뉴라이트의 길이를 신장시키는 우수한 효능이 있음을 확인하였

다.

[0088] 나아가, 도파민성 뉴런의 퇴화를 유도하는 약물에 대한 KD5040의 보호작용을 테스트하기 위해 $10\mu\text{M}$ 의 6-OHDA를 뉴런에 처리하였다. KD5040을 처리한 뉴런이 CGT를 처리한 경우와 비교하여 상대적으로 GFP+ 세포의 수가 증가하였고(도 3d), TH 및 DAT 유전자 발현 수준이 두드러지게 증가하는 것을 확인하였다(도 3e 및 도 3f). 상기 결과를 통해 KD5040이 중뇌 도파민성 뉴런에서 강한 보호작용을 갖는다는 것을 알 수 있었다.

[0089] 실험예 3. MPTP-유도 파킨슨병 모델 마우스에 대한 KD5040의 행동 능력 향상 효과

[0090] 일반적으로, MPTP 주사 후 수분 이내에 도파민이 고갈되며, 강직, 경련 및 운동완서(bradykinesia)를 포함하는 심각한 파킨슨병의 증상이 나타난다. 먼저, 운동 기능성을 테스트하기 위해 ORP(overall rod performance)를 수행하였다. ORP 시간에 따르면, MPTP 그룹의 마우스는 대조 그룹에 비해 움직임이 상당히 감소하였다. 하지만, KD5040 1 그룹과 KD5040 3 그룹의 마우스는 MPTP 그룹에 비해 ORP 시간이 증가하였다. 특히, KD5040 3 그룹은 대조 그룹과 비슷한 효과를 보였고, 행동이 상당히 향상되었다(도 4a).

[0091] 다음으로, 행동 장애에서 KD5040의 보호 효과를 확인하기 위해 장대 테스트(pole test)를 수행하였다. MPTP 그룹의 T-turn(3 ± 1 초)과 T-LA(28.3 ± 11.6 초)는 대조군과 비교했을 때 더 오래 걸렸다. 하지만, KD5040을 처리한 MPTP-유발 파킨슨병 행동 장애 그룹은 T-turn과 T-LA의 회복을 보였다. 또한, KD5040 3를 처리한 그룹은 대조 그룹과 비슷한 정도까지 KD5040 1을 처리한 것보다 더 좋은 T-turn과 T-LA의 회복을 보였다(도 4b 및 도 4c).

[0092] 실험예 4. MPTP-유도 파킨슨병 모델 마우스에 대한 KD5040의 흑질 선조체 도파민성 세포 보호 효과

[0093] MPTP는 가장 널리 사용되는 도파민성 신경 퇴화를 유도하는 신경독소이다. 따라서, 상기 MPTP를 이용하여 PD의 마우스모델에서 KD5040의 신경보호작용을 확인하기 위해, TH(tyrosine hydroxylase)-항체를 이용한 면역 조직 화학을 수행하였다. 도 5에서 보이는 바와 같이, 선조체에서 TH-양성 섬유의 광학적 밀도를 측정하였다. 선조체에서 TH의 광학적 활성을 대조군과 비교했을 때, MPTP의 투여는 도파민성 섬유의 극적인 퇴화를 야기한다. 하지만, KD5040 1과 KD5040 3의 투여는 MPTP에 의해 유발된 섬유의 손실을 대조군에 비해 각각 $82.59\pm 0.88\%$ 와 $94.61\pm 3.35\%$ 까지 보호하였다(도 5).

[0094] 더 나아가, 흑질에서 손실된 도파민작용성 뉴런 세포의 수를 세었다. MPTP의 처리는 흑질의 TH-양성 뉴런의 상당한 손실을 유도하지만, KD5040 1과 KD5040 3은 대조군에 비해 도파민 작용성 세포가 $39.29\pm 4.50\%$ 와 $64.53\pm 3.38\%$ 만큼 감소하였다(도 6). 이것은 MPTP에 의해 유도된 신경독성에 대해 KD5040이 도파민작용성 뉴런 세포의 사멸을 보호한다는 것을 의미한다.

[0095] 실험예 5. KD5040의 신경 보호 효과의 작용 메커니즘

[0096] KD5040의 신경보호 효과 작용 메커니즘을 밝혀내기 위해 선조체에서 p53, 도파민 수송체(DAT), TH, TrkA, 모에신(moesin)을 확인하였다(도 7). MPTP-유발 선조체에서 TH와 DAT발현은 감소하였다. DAT의 발현은 KD5040처리에 의해 완전히 회복되지 않았으나, KD5040은 선조체에서 농도 의존적으로 TH의 발현량을 상당한 수준으로 회복시켰다.

[0097] 또한, MPTP는 선조체에서 p53의 발현을 유도하였고, KD5040은 p53의 발현을 유의적으로 감소시켰다. p53은 전사 인자로서 ROS를 포함한 무수히 많은 스트레스 요인에 의해 활성화되고, 일 예로 산화적스트레스에 의한 신경세포 사멸을 유도한다. 따라서, KD5040이 p53의 발현을 감소시키는 것을 통해, 신경세포 보호 효과가 있음을 알 수 있다.

[0098] 모에신은 ERM(ezrin-radixin-moesin) 단백질이라고 불리는 상동단백질에 속한다. ERM 단백질은 액틴(actin) 세포골격과 세포막의 가교제(cross linker)로 알려져 있고, 세포의 움직임, 분열, 식세포작용, 파고솜(phagosome)의 성숙, 세포 신호전달, 분비, 막단백질의 재배치같은 액틴-의존적 메커니즘에 중요한 역할을 한다. 최근 대뇌 피질 손상 후 및 뇌 외상 후에 대뇌 피질에서 모에신의 발현이 증가한다는 보고가 있었다. MPTP 및 KD5040을 처리한 경우, 모에신은 선조체에서 MPTP에 의해 발현이 증가했지만, KD5040은 모에신의 발현을 유의적으로 감소시켰다. 이를 통해 MPTP로 유도된 뇌손상에 의해 모에신의 발현이 증가하고, KD5040은 항산화 및 항염증 효과를 통해 초기 뇌손상을 회복시킬 수 있다는 것을 알 수 있다.

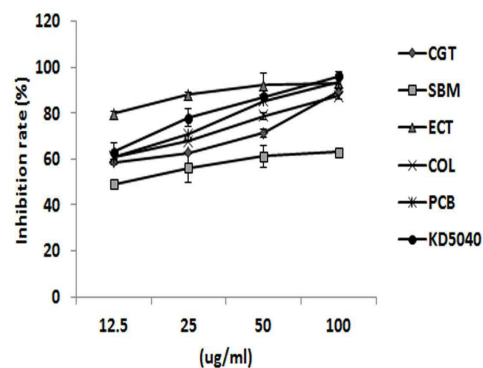
[0099] 종래 파킨슨병에서 BDNF(neurotrophic factor)와 NGF(nerve growth factor), 상기 성장인자들의 수용체, 및 TrkA와 p75를 포함한 뉴트로핀(neurotrophins)의 활성 변화가 보고되어왔다. 특히 Trk의 발현은 뉴런 분화와 관련이 있는데, 선조체에서 TrkA의 발현을 조사한 결과, MPTP는 TrkA의 발현을 상당히 감소시켰지만, KD5040은 TrkA의 발현을 농도 의존적으로 회복시켰다. 이는, KD5040이 파킨슨병에서 뉴트로핀의 활성을 회복시키는 효과가 있다는 것을 의미하며, 뉴런 분화를 유도시킬 수 있다는 것을 시사한다.

[0100] 종합하면 한방혼합 추출물 1(CGT) 및 한방혼합 추출물 2(KD5040)는 6-OHDA에 의해 유도된 세포사멸을 억제하며, MPTP 유발 행동장애를 개선시키고, 도파민 뉴런 사멸을 억제할 뿐만 아니라, 신경분화와 관련된 TrkA의 발현을 유도할 수 있다. 따라서 본 발명의 조성물은 파킨슨병 예방 및 치료를 위한 약물로 사용될 수 있다.

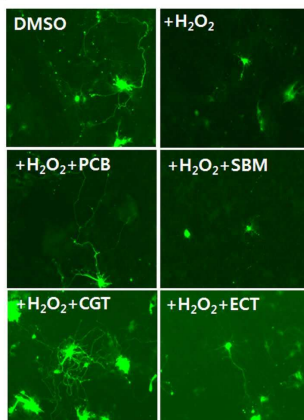
[0101] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 다른 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

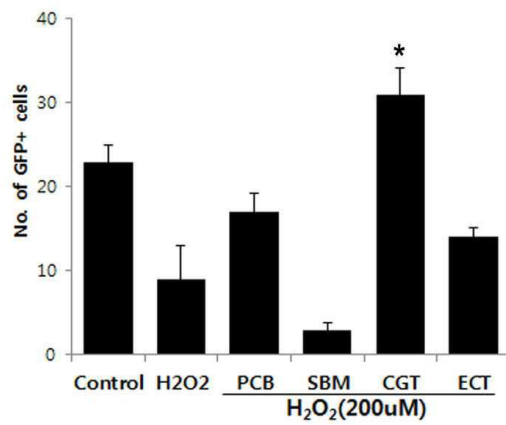
도면1



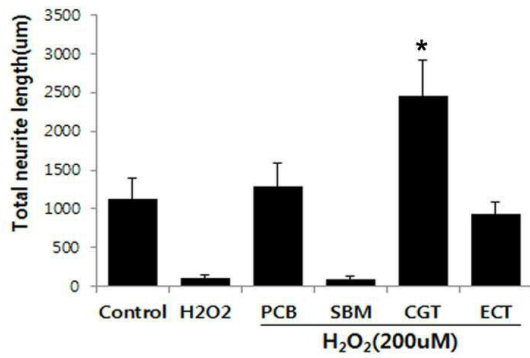
도면2a



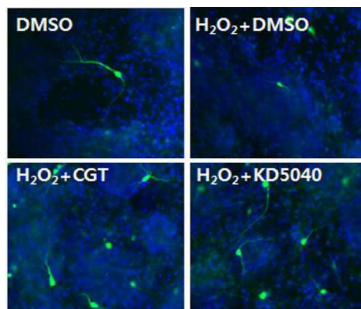
도면2b



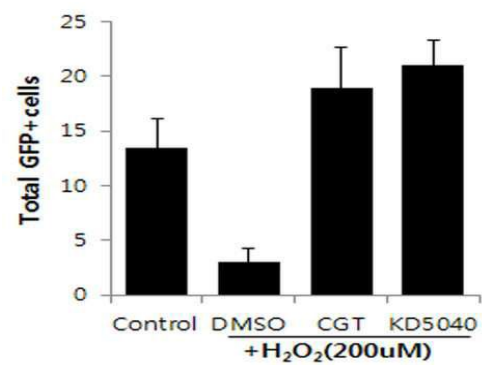
도면2c



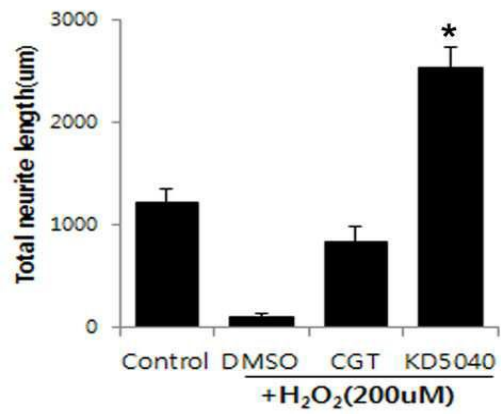
도면3a



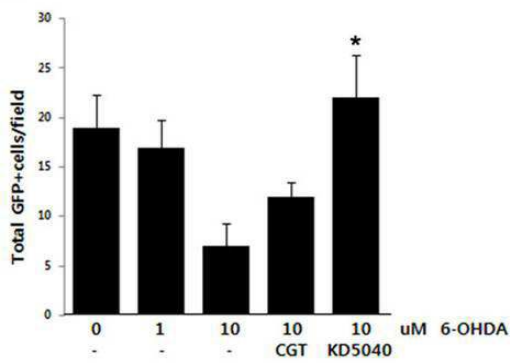
도면3b



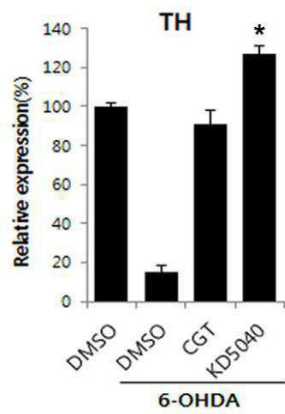
도면3c



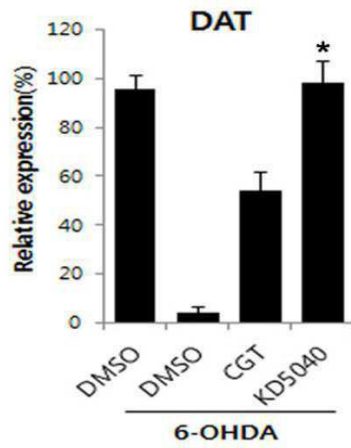
도면3d



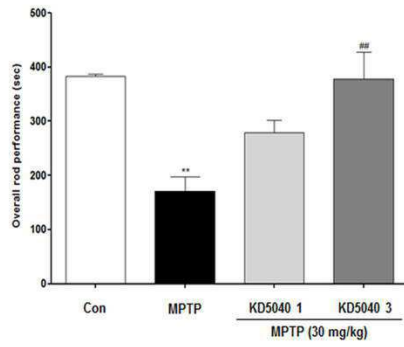
도면3e



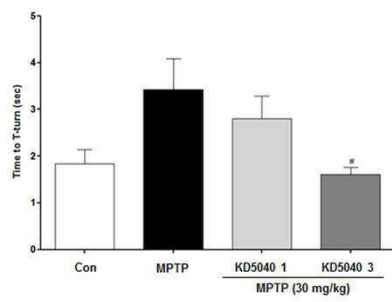
도면3f



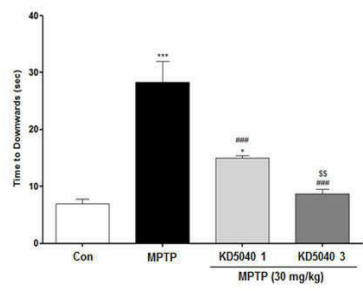
도면4a



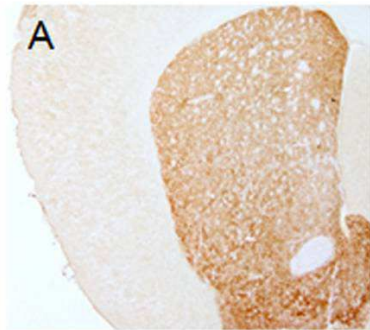
도면4b



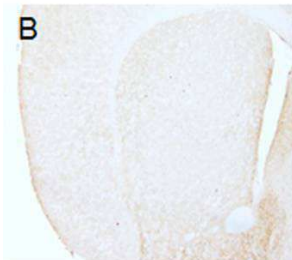
도면4c



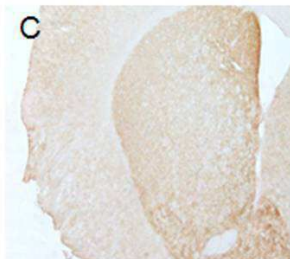
도면5a



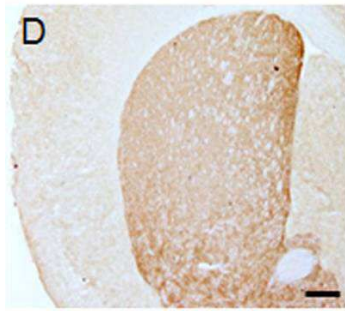
도면5b



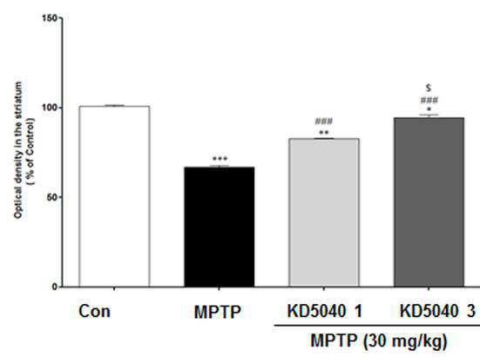
도면5c



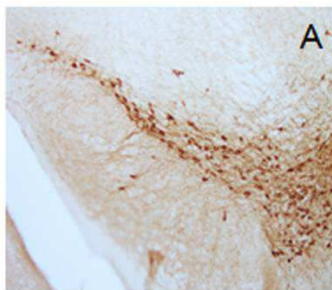
도면5d



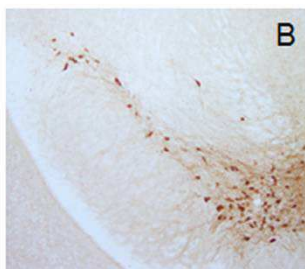
도면5e



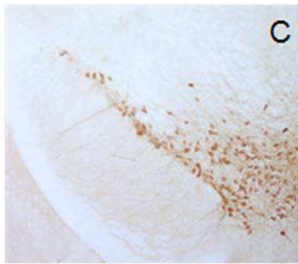
도면6a



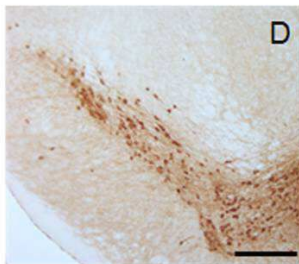
도면6b



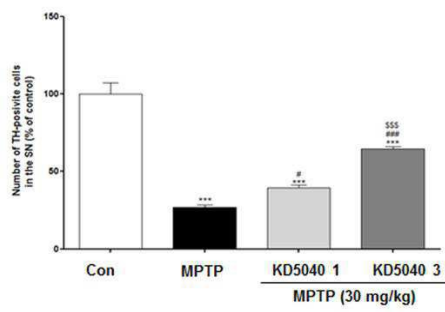
도면6c



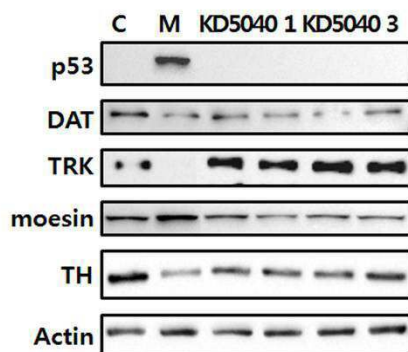
도면6d



도면6e



도면7a



도면7b

