



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0071543
(43) 공개일자 2022년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/14 (2006.01) A23L 33/185 (2016.01)

A61K 36/258 (2006.01) A61P 25/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/14 (2013.01)

A23L 33/185 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2020-0158802

(22) 출원일자 2020년11월24일

심사청구일자 2020년11월24일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

조익현

서울특별시 서초구 신반포로 32, 19동 509호(반포동, 반포아파트)

최종희

경상북도 경주시 외동읍 입실시장길 12-3

(74) 대리인

위병갑

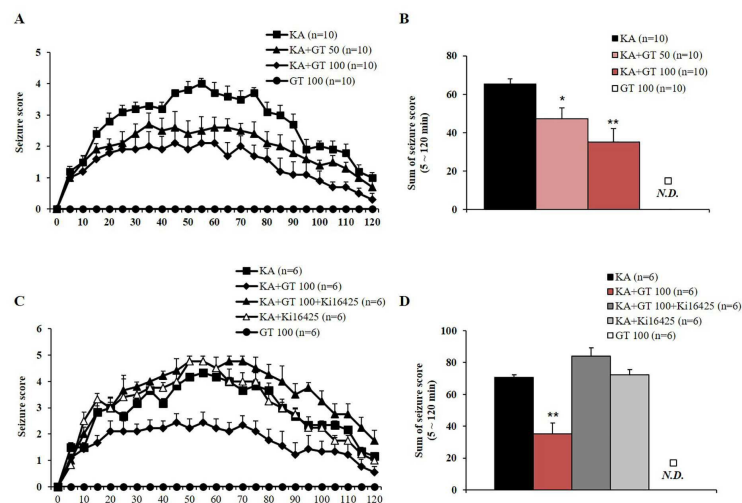
전체 청구항 수 : 총 15 항

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

(57) 요약

본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 뇌전증(epilepsy) 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 진토닌은 카인산(Kainic acid)에 의해 흥분성신경세포사멸이 유발된 측두엽성 뇌전증 동물모델에서 발작행동을 감소시키고, 해마신경세포사멸, 미세아교세포와 별아교세포의 활성화 및 대표적인 염증매개인자인 COX-2와 iNOS의 발현을 현저하게 억제하는 효과가 있으므로, 본 발명의 진토닌을 포함하는 조성물은 뇌전증 예방, 치료 또는 개선용 조성물로 유용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/258 (2013.01)

A61P 25/08 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20200781
과제번호	2017R1A2A2A05069493
부처명	과학기술정부통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업/중견연구자지원사업(후속)
연구과제명	헌팅틴질환 동물모델에서 미세아교세포 활성화의 병리 기능 및 치료기술 연구
AAV/DJ 벡터와 shRNA 활용	
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2017.09.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711103900
과제번호	2016M3C7A1905074
부처명	과학기술정부통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업/뇌과학원천기술개발사업
연구과제명	신경손상 연관 뇌기능조절 microglia 타겟 발굴 및 제어 융합기술 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	서울대학교 산학협력단
연구기간	2016.06.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

진토닌을 유효성분으로 포함하는 뇌전증(epilepsy) 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 진토닌은 인삼으로부터 추출하여 분리한 당지질단백질인 것인 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 뇌전증은 측두엽 뇌전증(temporal lobe epilepsy)인 것인 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 측두엽 뇌전증은 흥분성신경세포사멸이 유발된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 진토닌은 뇌전증에 의한 경련 발작을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 진토닌은 해마의 신경세포사멸, 면역세포 활성화 증가, 경화 및 염증으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 증상을 억제함으로써 뇌전증 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 진토닌은 해마의 Iba-1, GFAP, COX-2 및 iNOS로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 생성 또는 발현 증가를 억제함으로써 뇌전증 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

진토닌을 유효성분으로 포함하는 뇌전증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 형태의 식품인 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 10

진토닌을 유효성분으로 포함하는 카인산(kainic acid)에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

진토닌을 유효성분으로 포함하는 카인산에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 개선용 건강기능 식품 조성물.

청구항 12

진토닌을 유효성분으로 포함하고, 흥분성신경세포사멸이 유발된 뇌전증 환자에서 경련 발작을 감소시키기 위한, 뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

진토닌을 유효성분으로 포함하고, 해마에서 흥분성신경세포사멸을 감소시키기 위한, 뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 14

진토닌을 유효성분으로 포함하고, 해마에서 미세아교세포 및 별아교세포의 활성이 증가된 환자에서 상기 미세아교세포 및 별아교세포의 활성을 감소시키기 위한, 뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 15

진토닌을 유효성분으로 포함하고, 해마에서 Iba-1, GFAP, COX-2 및 iNOS의 생성 또는 발현이 증가된 환자에서 상기 Iba-1, GFAP, COX-2 및 iNOS의 생성 또는 발현을 감소시키기 위한, 뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 뇌전증(epilepsy) 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌전증(epilepsy, 간질)의 유병률은 인구 천 명당 6.5명(우리나라는 4.0명)으로 매우 흔한 신경계 질환이라 할 수 있고, 전 세계적으로 거의 비슷한 정도의 발병률과 유병률을 보인다. 아직까지 근본적인 치료 방법은 없고, 환자의 60%는 항뇌전증 약물(levetiracetam 등)을 복용함으로써 조절될 수 있지만, 장기적인 약물 사용으로 막대한 경제적 부담과 심각한 약물 부작용(자살충동, 졸음, 피로)이 생길 수 있다. 따라서 대중적 치료가 아닌 근본적인 병인적 치료가 가능할 수 있도록 치료기술을 개발하는 하는 것이 시급하다.

[0003] 측두엽 뇌전증(temporal lobe epilepsy)은 성인에서 가장 흔한 뇌전증의 종류로서, 내측두엽(medial temporal lobe), 특히 해마(hippocampus)의 경화(hippocampal sclerosis, 가장 큰 원인), 내측두엽의 종양(cancer), 뇌졸중(stroke), 혈관기형(vascular malformations), 겔질형성이상(cortical dysplasia), 감염(infection) 등이 원인이 될 수 있다. 증상으로는 복합부분발작(가장 흔함), 명치조짐(epigastric aura), 자동증(automat) 등을 동반하며, 발작 후에는 대부분 혼돈이 발생하고, 이차전신발작으로 진행되는 경우도 흔하다. 그러나 다른 국소성 간질에 비하여 항간질약제에 의한 치료효과가 불량한 것으로 알려져 있으며, 아직까지 획기적인 예방 및 치료제는 없는 실정이다.

[0004] 치료가 쉽지 않은 측두엽 간질을 연구하기 위하여, 동물에게 pilocarpine, kainic acid, kindling 등으로 측두엽 간질을 유발한 동물 모델을 사용한다. 그 중 kainic acid(카인산, KA)는 체내에 들어오면 경련 발작을 일으키고, 해마 신경세포를 파괴하고 해마 경화증을 유발하며, 뇌에 염증을 유발하는 등 그 병리 기전이 측두엽 간질과 매우 유사하기에 측두엽 간질 연구에 사용된다. KA로 유도된 간질발작은 조직병리학적으로 사람의 측두엽 간질에서 나타나는 특성과 유사하게 해마의 신경세포파괴와 성상교세포 활성화가 나타난다.

[0005] 한편, 예부터 인삼(ginseng)은 일반적으로 장수/생명연장을 위한 강장제(tonic)로 이용되거나, 또는 아답토젠(adaptogenic agent)으로서 각종 스트레스, 피로, 질병, 암, 당뇨병에 대항하여 생체기능을 향상시킨다. 이러한 인삼은 한국뿐만 아니라 중국과 일본에서 천년 이상 동안 강장제나 아답토젠으로 사용되어 왔는데, 최근 인삼은 세계에서 소비되는 약초 중에서 가장 유명한 것 중 하나이다.

- [0006] 인삼 성분 중에서 인삼 사포닌(saponin)으로 불리는 진세노사이드(ginsenosides)는 1960년대 초반에 분리되어 생리학적/약리학적 연구에서 대표적인 성분으로 알려진 뒤로 많이 연구되었다. 이외에도 최근 연구에서는 인삼에 다당류(polysaccharides), 폴리아세틸렌류(polyacetylenes), 수용성 단백질(proteins) 등 알려지지 않은 다른 성분들이 함유되어 있는 것이 밝혀졌다.
- [0007] 진토닌(gintonin, GT)은 인삼의 구성성분 중에서 당, 지방 및 단백질 성분으로 구성되어 있는 신규한 당지질단백질(glycolipoproteins)로서(한국등록특허 제10-0973202호), 기존에 알려진 인삼 사포닌(진세노사이드)과는 달리 아직 확인/규명이 안된 세포막 단백질과 상호 작용을 통한 신호경로(membrane signal transduction pathway)를 통해 그 활성이 나타나는 것으로 밝혀진바 있다. 예를 들면, 마우스 EAT(Ehrlich Ascites Tumor) 세포에 진토닌의 처리는 G 단백질 연결 수용체(G protein coupled receptors, GPCRs 혹은 7TM 수용체)들이 활성화될 때 이루어지는 신호 전달 경로와 같이 인지질분해효소(phospholipase C, PLC)에 연결되어 있는 신호전달 경로를 통해 세포질내 유리 Ca^{2+} (Free Ca^{2+})의 증가를 일시적으로 유발하고, 또한 개구리알(Xenopus oocytes)에 처리할 경우 PTX(pertussis toxin)-민감하지 않은 G 단백질 → PLC(phospholipase C) → IP3(inositol 1,4,5-triphosphate) → 칼슘 저장고인 세포질내세망(endoplasmic reticulum, ER)에서의 칼슘 방출을 통하여 칼슘 의존성 염소이온 채널(Ca^{2+} activated Chloride Channel, CaCC)이 활성화 되는 것을 밝혀냈다. 그러나 진토닌의 뇌전증 예방 및/또는 치료 효과와 관련된 기전은 여전히 불분명하다.
- [0008] 이에, 본 발명자들은, 진토닌이 카인산(kainic acid, KA)에 의해 유발된 측두엽 뇌전증(temporal lobe epilepsy, 측두엽간질) 동물모델에서 간질발작 정도를 현저하게 감소시키고, 해마(CA3) 영역에서 신경세포사멸, 미세아교세포와 별아교세포의 활성화 정도 및 COX-2와 iNOS 발현정도를 현저히 감소시키는 효과가 있음을 확인하였고, 이에 따라, 진토닌을 흥분성신경세포사멸이 유도된 측두엽 뇌전증에 대한 새로운 예방 또는 치료용 제제로 사용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0973202호
(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2018-0054381호

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Choi, et. al., 2015. Ginseng pharmacology: a new paradigm based on gintonin-lysophosphatidic acid receptor interactions., Front. Pharmacol. 6, 245.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 뇌전증(epilepsy) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 뇌전증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 카인산(kainic acid)에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 카인산에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0016] 본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 뇌전증(epilepsy) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제

공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하는 뇌전증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0018] 나아가, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하는 카인산(kainic acid)에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 더 나아가, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하는 카인산에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 진토닌(gintonin)은 카인산(Kainic acid)에 의해 흥분성신경세포사멸이 유발된 측두엽성 뇌전증 동물 모델에서 발작행동을 감소시키고, 해마신경세포사멸, 미세아교세포와 별아교세포의 활성화 및 대표적인 염증매개 인자인 COX-2와 iNOS의 발현을 현저하게 억제하는 효과가 있으므로, 본 발명의 진토닌을 포함하는 조성물은 뇌 전증 예방, 치료 또는 개선용 조성물로 유용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 카인산(kainic acid, KA)에 의한 뇌전증 동물모델에서 발작행동에 대한 진토닌(gintonin, GT)의 억제 효과를 나타낸 것이다. 여기서, 도 1A는 카인산(KA, 55 mg/kg, i.p.)를 투여하기 2시간 전에 진토닌(GT, 50 및 100 mg/kg)을 구강으로 투여하고, KA 투여 후 2시간 동안 시간 흐름에 따른 발작의 정도를 측정된 결과를 나타낸 그래프이다; 도 1B는 각 그룹별 KA 투여후 5-120분 사이의 발작 등급의 합을 나타낸 그래프이다; 도 1C는 KA (55 mg/kg, i.p.)를 투여하기 2.5시간 전에 Ki16425(30 mg/kg)를 복강으로 투여하고, 2시간 전에 진토닌(100 mg/kg)을 구강으로 투여하고, KA 투여 후 2시간 동안 시간 흐름에 따른 발작의 정도를 측정된 결과를 나타낸 그래프이다; 도 1D는 각 그룹별 KA 투여후 5-120분 사이의 발작 등급의 합을 나타낸 그래프이다(ANOVA test; *P<0.05, **P<0.01 vs KA군).

도 2는 KA에 의한 뇌전증 동물모델에서 해마신경세포사멸에 대한 진토닌의 보호 효과를 나타낸 것이다. 여기서, 도 2A는 KA (0.2 μ g/4 μ l)를 뇌 내로 직접 주입하기 2시간 전에(Pre-2h), 동물모델을 유도한 후 12시간 후에(Post-12h), 동물모델을 유도한 후 36시간 후에(Post-36h) 및 동물모델을 유도한 후 60시간 후에(Post-60h) 진토닌(100 mg/kg)을 구강으로 투여하고, KA 투여 후 72시간 후에 해마의 동결절편으로 니슬염색을 시행한 결과이다(Bar=100 μ m); 도 2B는 상기 니슬염색을 시행한 결과를 정량화 한 값을 나타낸 그래프이다(ANOVA test; *P<0.05, **P<0.01 vs KA군).

도 3은 KA에 의한 뇌전증 동물모델에서 면역세포활성 및 면역매개인자에 대한 진토닌의 억제 효과를 나타낸 그래프이다. 여기서, 도 3A는 KA (0.2 μ g/4 μ l)를 뇌 내로 직접 주입하기 2시간 전에 진토닌(100 mg/kg)을 구강으로 투여하고, KA 투여 후 72시간 후에 해마의 동결절편으로 Iba-1과 GFAP에 대한 면역조직화학적 염색을 시행한 결과이다(Bar=100 μ m); 도 3B는 상기 Iba-1 및 GFAP의 단백질의 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석을 시행한 결과를 나타낸 그래프이다; 도 3C는 상기 Iba-1의 면역반응 정도를 정량화한 값을 나타낸 그래프이다(ANOVA test; *P<0.05, **P<0.01 vs KA군); 도 3D는 상기 GFAP의 면역반응 정도를 정량화한 값을 나타낸 그래프이다(ANOVA test; *P<0.05, **P<0.01 vs KA군).

도 4는 KA에 의한 뇌전증 동물모델에서 염증매개인자의 발현에 대한 진토닌의 억제 효과를 나타낸 것이다. 여기서, 도 4A는 KA (0.2 μ g/4 μ l)를 뇌 내로 직접 주입하기 2시간 전에 진토닌(100 mg/kg)을 구강으로 투여하고, KA 투여 후 72시간 후에 해마의 조직을 취하여 COX-2 와 iNOS 단백질의 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석을 시행한 결과이다(ANOVA test; #P<0.05 vs Sham군; *P<0.05 vs KA군); 도 4B는 상기 iNOS 단백질의 발현 정도를 정량화한 값을 나타낸 그래프이다; 도 4C는 상기 iNOS 단백질의 발현 정도를 정량화한 값을 나타낸 그래프이다(ANOVA test; *P<0.05, **P<0.01 vs KA군).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

- [0024] **뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물**
- [0025] 본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 뇌전증(epilepsy) 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 인삼으로부터 추출하여 분리한 당지질단백질(특허등록 제10-0973202호)을 제공받아 사용한 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 뇌전증은 측두엽 뇌전증(temporal lobe epilepsy)인 것일 수 있고, 상기 측두엽 뇌전증은 흥분성신경세포사멸이 유발된 것일 수 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 뇌전증에 의한 경련 발작을 억제하는 것일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 일실시예에서는, 카인산(Kainic acid)에 의해 흥분성신경세포사멸이 유발된 측두엽성 뇌전증 동물모델에서 발작행동이 증가되는 것을 확인하였고, 진토닌 처리시 이러한 발작행동이 억제 및 개선되는 효과가 있음을 확인하였다(실험예 1 참조).
- [0032] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 해마의 신경세포사멸, 면역세포 활성화 증가, 경화 및 염증으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 증상을 억제함으로써 뇌전증 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것일 수 있다. 이때, 상기 해마는 CA1 영역 및 CA3 영역 중 1종 이상의 영역인 것일 수 있고, 면역세포는 미세아교세포 및 별아교세포 중 1종 이상인 것일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 상기 진토닌은 해마의 CA3 영역의 신경세포사멸, 미세아교세포 활성화 증가, 별아교세포 활성화 증가, 경화 및 염증으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 증상을 억제함으로써 뇌전증 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 카인산 유도성 측두엽 뇌전증 동물 모델에서 해마의 신경세포 사멸에 대한 보호 효과, 미세아교세포와 별아교세포와 같은 면역세포활성을 감소시키는 효과 및 염증매개인자의 발현을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다(실험예 2 내지 4 참조).
- [0034] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 해마의 Iba-1, GFAP, COX-2 및 iNOS로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 생성 또는 발현 증가를 억제함으로써 뇌전증 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것일 수 있다. 이때, 상기 해마는 CA1 영역 및 CA3 영역 중 1종 이상의 영역인 것일 수 있다. 바람직하게는, 해마의 CA3 영역의 Iba-1, GFAP, COX-2 및 iNOS로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 생성 또는 발현 증가를 억제함으로써 뇌전증 예방 또는 치료 효과를 나타내는 것일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 Iba-1(ionized calcium binding adaptor molecule 1) 및 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 발현 억제를 통해 면역세포활성을 감소시키고, COX-2(cyclooxygenase-2) 및 iNOS(inducible nitric oxide) 발현을 억제시킴으로써, 신경세포사멸, 미세아교세포 활성화 증가, 별아교세포 활성화 증가, 경화, 염증 등 뇌전증 관련 증상을 완화시킬 수 있음을 확인하였다(실험예 3 내지 4 참조).
- [0037] 상기 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는, 예를 들면, 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등과 같은 경구투여용 담체 및 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).
- [0038] 본 발명에 따른 약학 조성물은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 적합한 형태로 제형화 될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학 조성물은 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제,

계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조된다.

- [0039] 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환자, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 하나 이상의 본 발명의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0040] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0041] 상기 약학적 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 담체, 부형제, 또는 희석제는 예를 들어, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 또는 광물유를 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어, "투여"란 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한, 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 상기 용어, "개체"란 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미한다. 바람직하게는, 인간을 포함한 포유동물일 수 있다.
- [0044] 상기 용어, "약학적으로 유효한 양"이란 의학 적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며, 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 성별, 연령, 체중, 건강 상태, 질병의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로, 및 배출 비율, 치료 기간, 배합 또는 동시에 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 일반적으로 약 0.001~100 mg/kg/day이며, 바람직하게는 0.01~35 mg/kg/day이다. 몸무게가 70 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.07~7000 mg/day이며, 바람직하게는 0.7~2500 mg/day이며, 투여는 상기 권장 투여량을 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0045] 본 발명의 조성물은 뇌전증 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 흥분성신경세포사멸이 유발된 뇌전증 환자에서 경련 발작을 감소시키기 위한, 뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0048] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 해마에서 흥분성신경세포사멸을 감소시키기 위한, 뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0049] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 해마에서 미세아교세포 및 별아교세포의 활성이 증가된 환자에서 상기 미세아교세포 및 별아교세포의 활성을 감소시키기 위한, 뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0050] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 해마에서 Iba-1, GFAP, COX-2 및 iNOS의 생성 또는 발현이 증가된 환자에서 상기 Iba-1, GFAP, COX-2 및 iNOS의 생성 또는 발현을 감소시키기 위한, 뇌전증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0051] 본 발명에 있어서 상기 환자는 인간 또는 동물인 것일 수 있다.

[0053] **뇌전증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물**

[0054] 본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 뇌전증(epilepsy) 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0056] 본 발명에서 사용되는 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐제, 환제, 액제, 분말 및 과립 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 통상의 기술분야에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 제조될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품 유래 성분을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 건강기능식품은 뇌전증 치료제의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0057] 또한, 본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 뇌전증(epilepsy) 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0059] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물 또는 건강식품 조성물에 있어서, 상기 뇌전증은 측두엽 뇌전증(temporal lobe epilepsy)인 것일 수 있고, 상기 측두엽 뇌전증은 흥분성신경세포사멸이 유발된 것일 수 있다.

[0060] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물 또는 건강식품 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 뇌전증에 의한 경련 발작을 억제하는 것일 수 있다.

[0061] 본 발명의 일실시예에서는, 카인산(Kainic acid)에 의해 흥분성신경세포사멸이 유발된 측두엽성 뇌전증 동물모델에서 발작행동이 증가되는 것을 확인하였고, 진토닌 처리시 이러한 발작행동이 억제 및 개선되는 효과가 있음을 확인하였다(실험예 1 참조).

[0062] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물 또는 건강식품 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 해마의 신경세포사멸, 면역세포 활성화 증가, 경화 및 염증으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 증상을 억제함으로써 뇌전증 예방 또는 개선 효과를 나타내는 것일 수 있다. 이때, 상기 해마는 CA1 영역 및 CA3 영역 중 1종 이상의 영역인 것일 수 있고, 면역세포는 미세아교세포 및 별아교세포 중 1종 이상인 것일 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 상기 진토닌은 해마의 CA3 영역의 신경세포사멸, 미세아교세포 활성화 증가, 별아교세포 활성화 증가, 경화 및 염증으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 증상을 억제함으로써 뇌전증 예방 또는 개선 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[0063] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 카인산 유도성 측두엽 뇌전증 동물 모델에서 해마의 신경세포 사멸에 대한 보호 효과, 미세아교세포와 별아교세포와 같은 면역세포활성을 감소시키는 효과 및 염증매개인자의 발현을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다(실험예 2 내지 4 참조).

[0064] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물 또는 건강식품 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 해마의 Iba-1, GFAP, COX-2 및 iNOS로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 생성 또는 발현 증가를 억제함으로써 뇌전증 예방 또는 개선 효과를 나타내는 것일 수 있다. 이때, 상기 해마는 CA1 영역 및 CA3 영역 중 1종 이상의 영역인 것일 수 있다. 바람직하게는, 해마의 CA3 영역의 Iba-1, GFAP, COX-2 및 iNOS로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 생성 또는 발현 증가를 억제함으로써 뇌전증 예방 또는 개선 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[0065] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 Iba-1(ionized calcium binding adaptor molecule 1) 및 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 발현 억제를 통해 면역세포활성을 감소시키고, COX-2(cyclooxygenase-2) 및 iNOS(inducible nitric oxide) 발현을 억제함으로써, 신경세포사멸, 미세아교세포 활성화 증가, 별아교세포 활성화 증가, 경화, 염증 등 뇌전증 관련 증상을 완화시킬 수 있음을 확인하였다(실험예 3 내지 4 참조).

[0067] 본 발명에 따른 상기 건강기능식품 조성물 또는 건강식품 조성물은 뇌전증 예방 또는 개선 효과를 통해 관련 질환을 예방 또는 개선시키기 위한 목적으로 상기 진토닌을 식품, 음료 등의 건강기능식품 또는 건강식품에 첨가

할 수 있다.

- [0068] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명에 따른 진토닌을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품 및 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0069] 본 발명에 따른 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 상기 진토닌의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 및 건강기능식품 중의 상기 진토닌의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 유지를 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0070] 본 발명의 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명에 따른 진토닌을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능성 식품 조성물 100 g당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.
- [0071] 상기 외에 본 발명에 따른 진토닌을 함유하는 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강식품 및 건강기능식품 조성물은 천연 과일주스 및 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0072] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 유효물질을 함유하는 건강식품 및 건강기능식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0074] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 흥분성신경세포사멸이 유발된 뇌전증 환자에서 경련 발작을 감소시키기 위한, 뇌전증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0075] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 해마에서 흥분성신경세포사멸을 감소시키기 위한, 뇌전증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0076] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 해마에서 미세아교세포 및 별아교세포의 활성이 증가된 환자에서 상기 미세아교세포 및 별아교세포의 활성을 감소시키기 위한, 뇌전증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0077] 또한, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하고, 해마에서 Iba-1, GFAP, COX-2 및 iNOS의 생성 또는 발현이 증가된 환자에서 상기 Iba-1, GFAP, COX-2 및 iNOS의 생성 또는 발현을 감소시키기 위한, 뇌전증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0079] **카인산에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방, 개선 또는 치료용 조성물**
- [0080] 나아가, 본 발명은 진토닌(gintonin)을 유효성분으로 포함하는 카인산(kainic acid)에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0081] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 신경세포의 손상 및 사멸은 카인산에 의해 유도된 해마의 흥분성신경세포사멸인 것일 수 있다.

- [0082] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 카인산에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸로 인한 질환을 예방 또는 치료하는 것일 수 있다. 이때, 상기 질환은 뇌전증(epilepsy)인 것일 수 있고, 바람직하게는 측두엽 뇌전증(temporal lobe epilepsy)인 것일 수 있다.
- [0083] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 카인산에 의해 유발되는 뇌전증에 의한 경련 발작을 억제하는 효과를 나타내는 것일 수 있다. 또한, 상기 진토닌은 카인산에 의해 유발된 해마의 신경세포사멸, 면역세포 활성화 증가, 경화 및 염증으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 증상을 억제하는 효과를 나타내는 것일 수 있다. 또한, 상기 진토닌은 해마의 Iba-1, GFAP, COX-2 및 iNOS로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 생성 또는 발현 증가를 억제하는 효과를 나타내는 것일 수 있다.
- [0084] 본 발명의 일실시예에서는, 카인산에 의해 흥분성신경세포사멸이 유발된 측두엽성 뇌전증 동물모델에서 발작행동이 증가되는 것을 확인하였고, 진토닌 처리시 이러한 발작행동이 억제 및 개선되는 효과가 있음을 확인하였다(실험예 1 참조).
- [0085] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 카인산 유도성 측두엽 뇌전증 동물 모델에서 해마의 신경세포 사멸에 대한 보호 효과를 나타냄을 확인하였다(실험예 2 참조).
- [0086] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 카인산에 의해 유발된 Iba-1(ionized calcium binding adaptor molecule 1) 및 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 발현을 억제시키고, COX-2(cyclooxygenase-2) 및 iNOS(inducible nitric oxide) 발현을 억제시킴으로써, 신경세포사멸, 면역세포인 미세아교세포 및 별아교세포의 활성화 증가, 경화, 염증 등 뇌전증 관련 증상을 완화시킬 수 있음을 확인하였다(실험예 3 내지 4 참조).
- [0088] 더 나아가, 본 발명은 진토닌을 유효성분으로 포함하는 카인산에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0089] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 신경세포의 손상 및 사멸은 카인산에 의해 유도된 해마의 흥분성신경세포사멸인 것일 수 있다.
- [0090] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 건강기능식품 조성물은 카인산에 의해 유발되는 신경세포의 손상 및 사멸로 인한 질환을 예방 또는 개선시키는 것일 수 있다. 이때, 상기 질환은 뇌전증(epilepsy)인 것일 수 있고, 바람직하게는 측두엽 뇌전증(temporal lobe epilepsy)인 것일 수 있다.
- [0091] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 진토닌은 카인산에 의해 유발되는 뇌전증에 의한 경련 발작을 억제하는 효과를 나타내는 것일 수 있다. 또한, 상기 진토닌은 카인산에 의해 유발된 해마의 신경세포사멸, 면역세포 활성화 증가, 경화 및 염증으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 증상을 억제하는 효과를 나타내는 것일 수 있다. 또한, 상기 진토닌은 해마의 Iba-1, GFAP, COX-2 및 iNOS로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 생성 또는 발현 증가를 억제하는 효과를 나타내는 것일 수 있다.
- [0092] 본 발명의 일실시예에서는, 카인산에 의해 흥분성신경세포사멸이 유발된 측두엽성 뇌전증 동물모델에서 발작행동이 증가되는 것을 확인하였고, 진토닌 처리시 이러한 발작행동이 억제 및 개선되는 효과가 있음을 확인하였다(실험예 1 참조).
- [0093] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 카인산 유도성 측두엽 뇌전증 동물 모델에서 해마의 신경세포 사멸에 대한 보호 효과를 나타냄을 확인하였다(실험예 2 참조).
- [0094] 본 발명의 일실시예에서는, 진토닌이 카인산에 의해 유발된 Iba-1(ionized calcium binding adaptor molecule 1) 및 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 발현을 억제시키고, COX-2(cyclooxygenase-2) 및 iNOS(inducible nitric oxide) 발현을 억제시킴으로써, 신경세포사멸, 면역세포인 미세아교세포 및 별아교세포의 활성화 증가, 경화, 염증 등 뇌전증 관련 증상을 완화시킬 수 있음을 확인하였다(실험예 3 내지 4 참조).
- [0096] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0098] <실시예 1> 진토닌의 준비

- [0099] 진토닌(gintonin, GT)은 Choi et al.(Front. Pharmacol. 6;245, 2015)의 방법에 따라 제조되었다. 요약하면, 4년근 인삼(한국 인삼 공사, 대전, 대한민국) 1 kg을 작은 조각(> 3 mm)으로 분쇄하고, 80℃에서 8시간 동안 70% 발효된 에탄올로 8회 환류시켜 추출물을 수득하였다. 상기 추출물을 농축하고, 농축물(340 g)을 증류된 냉수에 1:10의 비율로 용해시키고, 4℃에서 24-96시간 동안 보관하면서 물 침전법을 실시하였다. 인삼의 에탄올 추출물의 물 분획(물 침전법)에 의해 수득된 상층액 및 침전물 분획을 원심분리(3000 rpm, 20분)를 통해 분리하였고, 침전물을 동결 건조시켜 진토닌을 수득하였다.
- [0100] 진토닌은 탄수화물, 지질 및 인삼 단백질로 구성되며, 진토닌에서 총 탄수화물, 지질 및 단백질의 비율은 각각 약 30%, 20.2% 및 30.3%였고, 기타 다른 미량 성분을 포함한다.
- [0101] LC-MS/MS 분석에 기초한 진토닌의 지질 조성은 다음과 같다: 지방산(7.53% 리놀레산, 2.82% 팔미트산 및 1.46% 올레산); 리소인지질 및 인지질(0.60%); 및 인산(1.75%). 진토닌의 총 지질 함량은 약 14.2%이다. 정성 분석 결과 진토닌은 또한 다이아실글리세롤과 트리아실글리세롤을 함유하고 있는 것으로 나타났다.
- [0103] **<준비에 1> 동물 모델의 준비 및 실험 방법**
- [0104] 1-1. 실험 동물 준비
- [0105] 실험에는 7-8주령(체중 22-25 g)의 C57BL/6 계통의 수컷 생쥐(나라바이오텍, 서울, 한국)를 사용하였다. 생쥐가 물과 사료를 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 사육 환경에 일주일 간 적응시킨 후에 사용하였다. 사육실 온도는 23±2℃로, 습도는 55-60%로 유지하였으며, 12시간 사이클(07:00 ~ 19:00)로 점등과 소등을 하였다 모든 실험은 경희대학교 실험동물윤리 규정에 따라 수행하였다.
- [0106] 각 실험예에서 실험 동물은 그룹 당 5~7마리씩 나누었고, 진토닌을 0.9% saline에 녹여 50 과 100 mg/kg의 용량으로 구강으로 투여하였다.
- [0108] 1-2. 통계 처리
- [0109] 모든 결과는 SPSS 21 버전을 이용하여 분석하였으며, 실험결과는 mean ± standard deviation (평균 ± 표준편차) 값으로 표시하였다. 통계적 유의성 검증은 ANOVA (일원배치 분산분석)를 이용하여 분석 후 Tukey post hoc로 사후분석 하였고, 유의확률(p-value) 값은 p<0.05 및 p<0.01 미만인 경우에만 인정하였다.
- [0111] **<실험예 1> KA에 의한 뇌전증 동물모델에서 발작행동에 대한 진토닌의 억제 효과**
- [0112] 진토닌의 간질 발작 예방효능을 확인하고, 효과적인 농도를 선별하기 위하여, 하기와 같이 4개의 그룹으로 나누었다.
- [0113] - KA군; KA 55 mg/kg, i.p. + saline, p.o.
- [0114] - KA+GT50군; KA 55 mg/kg, i.p. + GT 50 mg/kg, p.o.
- [0115] - KA+GT100군; KA 55 mg/kg, i.p. + GT 100 mg/kg, p.o.
- [0116] - GT100군; saline, i.p. + GT 100 mg/kg, p.o.
- [0117] 마우스에 흥분성신경세포사멸을 유도하기 위한 카인산(KA, 55 mg/kg)를 복강으로 주사(i.p.)하기 2시간 전에 진토닌(GT, 50 및 100 mg/kg)을 구강으로 투여(p.o.)하였다. KA를 마우스의 복강으로 주사하면 간질 발작과 비슷한 행동이 일어난다. 마우스의 발작 행동을 약 2시간 동안 측정하며, 하기와 같이 증상에 따라 0 - 6점(grade)으로 점수화하여 도 1에 나타내었다.
- [0118] - Grade 0 : 정상
- [0119] - Grade 1 : 부동
- [0120] - Grade 2 : 앞다리와 꼬리의 긴장, 뻣뻣한 자세
- [0121] - Grade 3 : 머리를 끄덕거림, 간대성 경련, 계속적인 회전

- [0122] - Grade 4 : 전신성 경련, 타액 분비, 일어섰다 넘어짐을 반복
- [0123] - Grade 5 : 계속적인 전신성 경련
- [0124] - Grade 6 : 죽음
- [0125] 도 1A는 카인산(KA, 55 mg/kg, i.p.)를 투여하기 2시간 전에 진토닌(GT, 50 및 100 mg/kg)을 구강으로 투여하고, KA 투여 후 2시간 동안 시간 흐름에 따른 발작의 정도를 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.
- [0126] 도 1B는 카인산(KA, 55 mg/kg, i.p.)를 투여하기 2시간 전에 진토닌(GT, 50 및 100 mg/kg)을 구강으로 투여하고, 각 그룹별 KA 투여후 5-120분 사이의 발작 등급의 합을 나타낸 그래프이다(ANOVA test; *P<0.05, **P<0.01 vs KA군).
- [0127] 그 결과, 진토닌을 투여한 군에서는 농도 의존적으로 발작의 정도가 현저하게 감소하였고, 진토닌이 더 효과적인 농도는 100 mg/kg였다(도 1A, 1B).
- [0129] 진토닌은 lysophosphatidic acid receptors (LPArs)의 리간드이므로, 이것의 antagonist에 의하여 진토닌의 항 간질 효과가 약화되거나 사라질 수가 있다. 이를 검증하기 위하여 동물모델을 유도하기 2.5 시간 전에 Ki16425(LPA의 antagonist; 30 mg/kg)을 복강으로 투여하고, 2시간 전에 진토닌(100 mg/kg)을 구강으로 투여하였고, 상기와 동일한 방법으로 KA 투여 후 2시간 동안의 발작 정도를 측정하였다(ANOVA test; *P<0.05, **P<0.01 vs KA군).
- [0130] 도 1C는 KA (55 mg/kg, i.p.)를 투여하기 2.5시간 전에 Ki16425(30 mg/kg)를 복강으로 투여하고, 2시간 전에 진토닌(100 mg/kg)을 구강으로 투여하고, KA 투여 후 2시간 동안 시간 흐름에 따른 발작의 정도를 측정된 결과를 나타낸 그래프이다.
- [0131] 도 1D는 KA (55 mg/kg, i.p.)를 투여하기 2.5시간 전에 Ki16425(30 mg/kg)를 복강으로 투여하고, 2시간 전에 진토닌(100 mg/kg)을 구강으로 투여하고, 각 그룹별 KA 투여후 5-120분 사이의 발작 등급의 합을 나타낸 그래프이다(ANOVA test; *P<0.05, **P<0.01 vs KA군).
- [0132] 그 결과, 진토닌을 투여한 군에서는 발작의 정도가 현저하게 감소하였으나, 이러한 효과는 Ki16425군에서 나타나지 않았다(도 1C, 1D).
- [0134] <실험예 2> KA에 의한 뇌전증 동물모델에서 해마신경세포사멸에 대한 진토닌의 보호 효과
- [0135] 진토닌의 KA에 의한 해마의 신경세포사멸에 대한 보호효과가 있는지를 확인하기 위하여, KA를 뇌 내로 직접 주입하기 2시간 전에(Pre-2h), 동물모델을 유도한 후 12시간 후에(Post-12h), 동물모델을 유도한 후 36시간 후에(Post-36h) 및 동물모델을 유도한 후 60시간 후에(Post-60h) 진토닌(100 mg/kg)을 구강으로 투여하였다. 구체적으로, 하기와 같이 진토닌의 투여 시점에 따라 6개의 그룹으로 나누었으며, KA는 0.2 μ g/4 μ l 의 농도로 가쪽 뇌실 내 투여(i.c.v.; AP : -2.9, ML : 2.0, DV : -3.8)하였다.
- [0136] - Sham군(Nor); saline 4 μ l, i.c.v. + saline, p.o.
- [0137] - KA군; KA 0.2 μ g/4 μ l, i.c.v. + saline, p.o.
- [0138] - Pre-2h군; KA 0.2 μ g/4 μ l, i.c.v. + GT 100 mg/kg, p.o.; KA를 투여하기 2시간 전에 경구 투여
- [0139] - Post-12h군; KA 0.2 μ g/4 μ l, i.c.v. + GT 100 mg/kg, p.o.; KA를 투여한 뒤 12시간 후부터 경구 투여
- [0140] - Post-36h군; KA 0.2 μ g/4 μ l, i.c.v. + GT 100 mg/kg, p.o.; KA를 투여한 뒤 36시간 후부터 경구 투여
- [0141] - Post-60h군; KA 0.2 μ g/4 μ l, i.c.v. + GT 100 mg/kg, p.o.; KA를 투여한 뒤 60시간 후부터 경구 투여
- [0142] - GT군; saline 4 μ l, i.c.v. + GT 100 mg/kg, p.o.
- [0143] 마우스의 뇌에 KA (i.c.v.)를 주입한 후 72시간 후에 각 마우스를 마취하고 조직학적 분석을 위한 시료(뇌) 표본을 채취하였다. 구체적으로, 마우스를 마취하고, 4% 파라포름알데하이드(PFA, paraformaldehyde)를 심장으로 관류하여 고정하고 뇌를 적출하였다. 적출한 뇌는 4% PFA에 담가 4℃에서 하루 정도 더 고정시킨 다음 30% 수크

로스(sucrose)로 바꾸어 4℃에서 3일 이상 기간 동안 보관하여 동결손상을 방지하였다. 동결 절편기를 이용하여 해마를 30 μm 두께로 잘라 PBS에 보관하였다.

[0144] 30 μm 두께로 자른 해마가 포함된 뇌 동결절편을 코팅된 슬라이드 위에 올려 말린 뒤, 0.5% 크레실 바이올렛(cresyl violet, pH 3.9) 용액에 10-15분 담귀 니슬염색(Nissl stain; cresyl violet stain)을 시행하였다. 70% 에탄올 및 80% 에탄올에 담귀 색을 조절하고 95%, 100% 에탄올에서 탈수가 되면, 자일렌(xylene)에 담근 뒤 커버글라스를 덮었다. 해마의 CA1과 CA3 영역에서 신경세포가 손상되거나 사멸된 정도에 따라 0 - 6의 등급을 나누어 점수화하였다(0, 손상 또는 사멸이 관찰되지 않음; +1, $\leq 10\%$ 손상 또는 사멸이 관찰됨; +2, 11-25% 손상 또는 사멸이 관찰됨; +3, 26-50% 손상 또는 사멸이 관찰됨; +4, 51-75% 손상 또는 사멸이 관찰됨; +5, 76-90% 손상 또는 사멸이 관찰됨; +6, $\geq 91\%$ 세포 손상 또는 사멸이 관찰됨).

[0145] 도 2A는 KA (0.2 $\mu\text{g}/4\ \mu\text{l}$)를 뇌 내로 직접 주입하기 2시간 전에(Pre-2h), 동물모델을 유도한 후 12시간 후에(Post-12h), 동물모델을 유도한 후 36시간 후에(Post-36h) 및 동물모델을 유도한 후 60시간 후에(Post-60h) 진토닌(100 mg/kg)을 구강으로 투여하고, KA 투여 후 72시간 후에 해마의 동결절편으로 니슬염색을 시행한 결과이다(Bar=100 μm).

[0146] 도 2B는 KA (0.2 $\mu\text{g}/4\ \mu\text{l}$)를 뇌 내로 직접 주입하기 2시간 전에(Pre-2h), 동물모델을 유도한 후 12시간 후에(Post-12h), 동물모델을 유도한 후 36시간 후에(Post-36h) 및 동물모델을 유도한 후 60시간 후에(Post-60h) 진토닌(100 mg/kg)을 구강으로 투여하고, KA 투여 후 72시간 후에 해마의 동결절편으로 니슬염색을 시행한 결과를 정량화 한 값을 나타낸 그래프이다(ANOVA test; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs KA군).

[0147] 도 2에 나타난 바와 같이, Pre-2h군의 해마의 CA3 영역에서 신경세포사멸에 대한 현저한 억제 효과를 나타내었다.

[0149] <실험예 3> KA에 의한 뇌전증 동물모델에서 면역세포활성에 대한 진토닌의 억제 효과

[0150] 진토닌의 면역세포활성에 대한 효과가 있는지를 확인하기 위하여, 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 Sham군(Nor), KA 군, Pre-2 h군(KA+GT) 및 GT군 각각의 KA 투여 후 72 시간의 해마조직 동결절편을 가지고 Iba-1과 GFAP에 대한 면역조직화학염색(Immunohistochemistry) 및 웨스턴 블롯(Western blot)을 시행하였다.

[0151] 먼저, 면역조직화학염색을 위해, 조직절편을 3% H_2O_2 에 30분간 처리하여 endogenous peroxidase를 차단하였다. PBS로 10분씩 3회 수세하고 면역염색 중 나타날 수 있는 비특이적 반응을 줄이기 위해 blocking solution (5% normal goat serum, 2% bovine serum albumin, 2% fetal bovine serum 및 0.1% triton X-100 in PBS)에 1시간 동안 반응시켰다. 이 후 각 조직은 1차 항체 rabbit anti-ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba-1; 1:2,000; WAKO, 일본) 또는 rabbit anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:2,000; DACO, 미국)를 18시간 이상 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 조직은 PBS로 10분간 3회 세척하고, 계속하여 goat anti-rabbit IgG (Vector, CA, 미국) 등의 이차항체 및 ABC complex (Vector, CA, 미국)에 상온에서 각 1시간씩 반응시켰다. 항원항체 반응이 끝난 조직은 DAB가 함유된 Tris buffer (pH 7.4)용액에서 3-5분간 발색을 확인한 후 슬라이드에 뇌 조직을 올려 말린다. 탈수와 투명화 과정을 거쳐 mounting용액을 떨어뜨려 커버글라스를 덮어 봉입한 뒤 현미경으로 각각의 면역반응성을 관찰하였다.

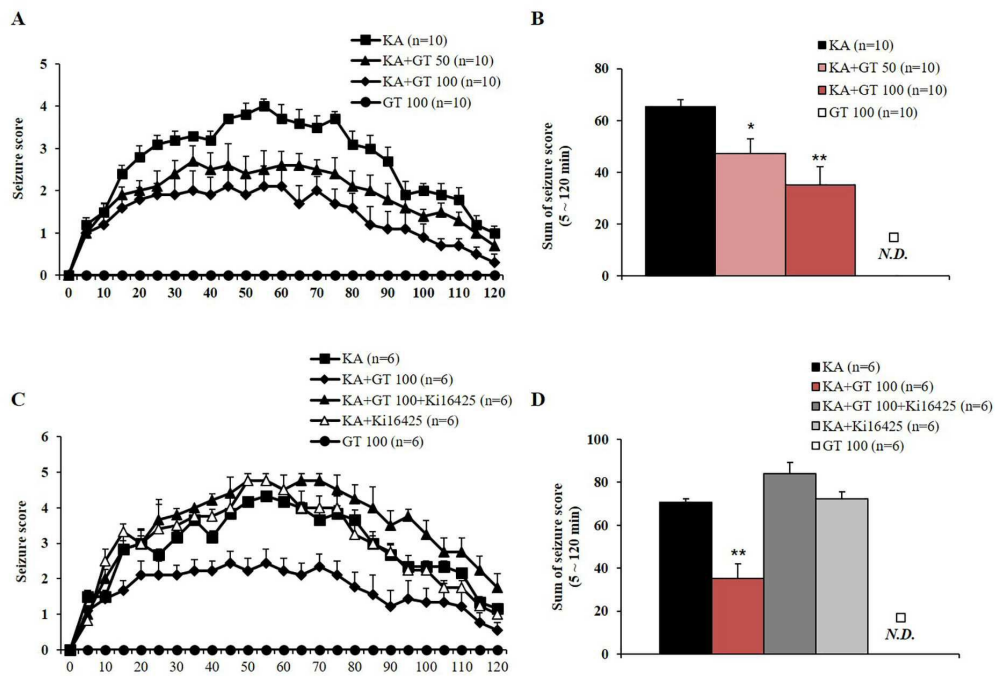
[0152] 또한, 웨스턴 블롯을 위해, 분리된 조직절편 단백질을 소혈청알부민(BSA, bovine serum albumin, sigma, 미국)을 사용한 Bradford (Bio-rad, 미국) 방법을 이용하여 각 개체의 단백질을 정량한 뒤 단백질 25 μg 은 10% SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리하여 PVDF (polyvinylidene difluoride) 멤브레인(membrane, Gendepot, 영국)으로 이동시켰다. PVDF 멤브레인은 5% 탈지유(skimmed milk, BD, 미국)에서 1시간 동안 블로킹시켰다. TBST로 세척한 다음 상기 동일한 항체를 이용하여 3% 탈지유에 1:1,000으로 희석시켜 4℃에서 하루 동안 반응시킨 후 TBST로 10분씩 3회 씻고 2차 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 TBST에 씻은 뒤 ECL system (Santacruz, 미국)으로 밴드를 확인하였다. 단백질의 확인 및 정량 분석은 이미지 장비 ChemiDoc XRS+(Bio-Rad)를 이용하였다.

[0153] 도 3A는 KA (0.2 $\mu\text{g}/4\ \mu\text{l}$)를 뇌 내로 직접 주입하기 2시간 전에 진토닌(100 mg/kg)을 구강으로 투여하고, KA 투여 후 72시간 후에 해마의 동결절편으로 Iba-1과 GFAP에 대한 면역조직화학적 염색을 시행한 결과이다(Bar=100 μm).

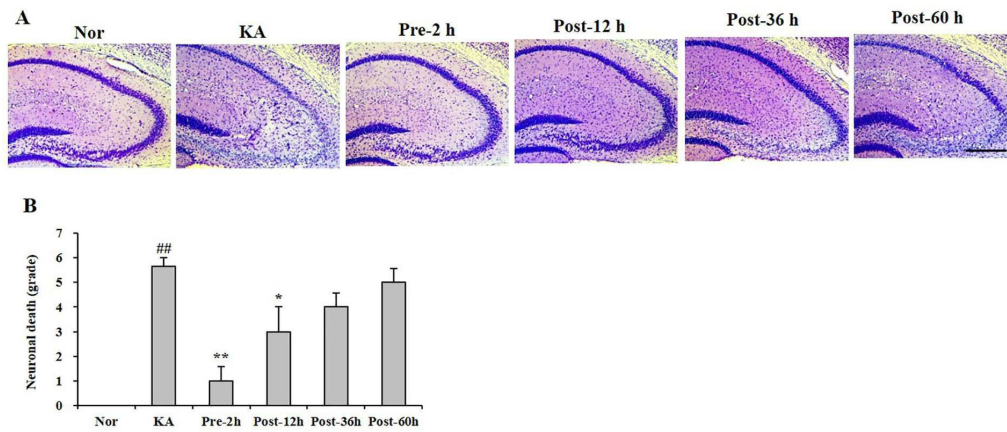
- [0154] 도 3B는 상기 Iba-1 및 GFAP의 단백질의 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석을 시행한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [0155] 도 3C 및 3D는 각각 상기 Iba-1 및 GFAP의 면역반응 정도를 정량화한 값을 나타낸 그래프이다(ANOVA test; *P<0.05, **P<0.01 vs KA군).
- [0156] 그 결과, KA군의 해마에서 Iba-1(+) 미세아교세포와 GFAP(+) 별아교세포의 활성도는 증가하였으나, Pre-2d군에서는 현저히 감소하였다(그림 3A-3C).
- [0158] <실험예 4> KA에 의한 뇌전증 동물모델에서 염증매개인자의 발현에 대한 진토닌의 억제 효과
- [0159] 진토닌의 염증매개인자의 발현에 대한 조절효과가 있는지를 확인하기 위하여, 상기 실험예 2와 동일한 방법으로 Sham군(Nor), KA 군, Pre-2 h군(KA+GT) 및 GT군 각각의 KA 투여 후 72 시간의 해마조직 동결절편을 가지고 COX-2와 iNOS의 단백질 발현정도를 웨스턴 블롯(Western blot)으로 분석하였다.
- [0160] 분리된 단백질은 소혈청알부민(BSA, bovine serum albumin, sigma, 미국)을 사용한 Bradford (Bio-rad, 미국) 방법을 이용하여 각 개체의 단백질을 정량한 뒤 단백질 25 μ g은 10% SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에 의해 분리하여 PVDF (polyvinylidene difluoride) 멤브레인(membrane, Gendepot, 영국)으로 이동시켰다. PVDF 멤브레인은 5% 탈지유(skimmed milk, BD, 미국)에서 1시간 동안 블로킹시켰다. TBST로 씻은 후 1차 항체 mouse anti-cyclooxygenase-2 (COX-2; 1:1,000; BD Biosciences, San Jose, CA, 미국) 및 rabbit anti-inducible nitric oxide (iNOS; 1:500; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, 미국)를 3% 탈지유에 1:1,000으로 희석시켜 4℃에서 하루 동안 반응시킨 후 TBST로 10분씩 3회 씻고 2차 항체와 함께 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 TBST에 씻은 뒤 ECL system (Santacruz, 미국)으로 밴드를 확인하였다. 단백질의 확인 및 정량 분석은 이미지 장비 ChemiDoc XRS+(Bio-Rad)를 이용하였다.
- [0161] 도 4는 KA에 의한 뇌전증 동물모델에서 염증매개인자의 발현에 대한 진토닌의 억제 효과를 나타낸 것이다. 여기서, 도 4A는 KA (0.2 μ g/4 μ l)를 뇌 내로 직접 주입하기 2시간 전에 진토닌(100 mg/kg)을 구강으로 투여하고, KA 투여 후 72시간 후에 해마의 조직을 취하여 COX-2와 iNOS 단백질의 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석을 시행한 결과이다(ANOVA test; #P<0.05 vs Sham군(Nor); *P<0.05 vs KA군); 도 4B는 상기 iNOS 단백질의 발현 정도를 정량화한 값을 나타낸 그래프이다; 도 4C는 상기 iNOS 단백질의 발현 정도를 정량화한 값을 나타낸 그래프이다(ANOVA test; *P<0.05, **P<0.01 vs KA군).
- [0162] 웨스턴블롯 분석 결과, KA군의 해마에서 COX-2와 iNOS의 단백질 발현의 정도가 증가하였으나, Pre-2d군(KA+T)에서는 현저히 억제되었다(도 4A, B).
- [0164] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

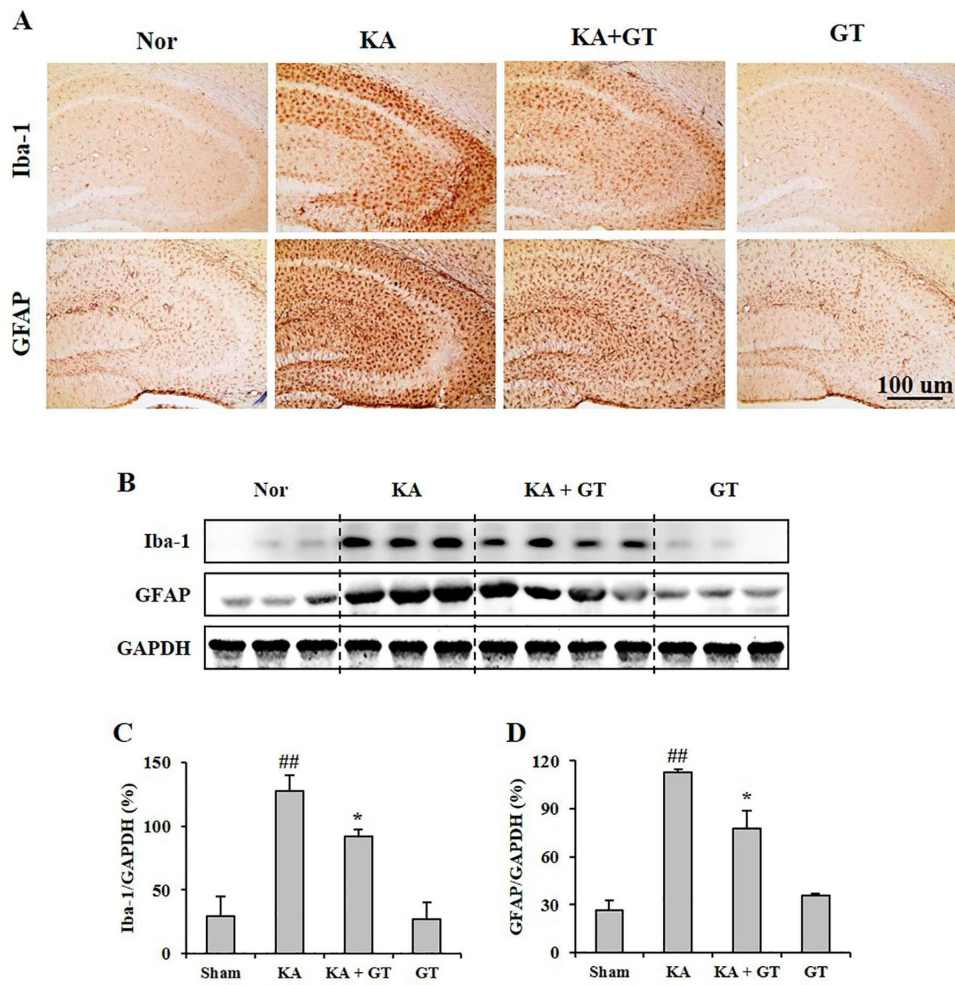
도면1



도면2



도면3



도면4

