



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0036358
(43) 공개일자 2022년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6896 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0122933
(22) 출원일자 2021년09월15일
심사청구일자 2021년09월15일
(30) 우선권주장
1020200118664 2020년09월15일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
최정혜
서울특별시 성동구 독서당로 175 104동 1902호 (옥수동, 극동그린아파트)
오명숙
서울특별시 강남구 삼성로 151, 1동 305호 (대치동, 선경아파트)
(74) 대리인
특허법인(유한)아이시스

전체 청구항 수 : 총 10 항

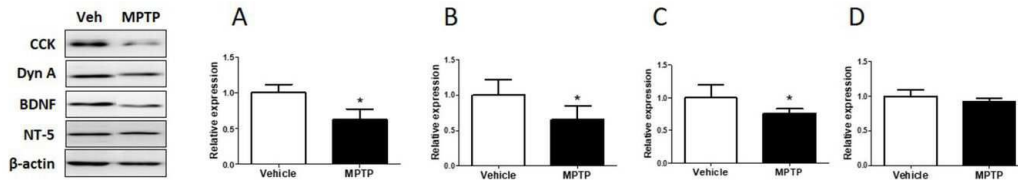
(54) 발명의 명칭 장내 뉴로펩타이드 및 뉴로트로핀을 포함하는 파킨슨병의 진단 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 뉴로펩타이드 및 뉴로트로핀을 포함하는 파킨슨병의 진단 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 파킨슨병이 유도된 마우스 모델의 장내에서 뉴로펩타이드인 CCK, Dyn A와 뉴로트로핀인 BDNF의 mRNA 및 단백질의 발현이 감소한다는 사실을 밝혀내어, 상기 장내의 뉴로펩타이드와 뉴로트로핀이 파킨슨병의 진단을 위해 사용될 수 있음을 확인하였다.

본 발명의 뉴로펩타이드 및 뉴로트로핀을 활용한 파킨슨병 진단 및 치료용도는 기존의 진단방법에 의해 진단할 수 없었던 조기증상을 보이는 파킨슨병을 진단할 수 있으며, 파킨슨병에 대한 치료효과도 뛰어난바, 파킨슨병의 진단 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/2835 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)

(72) 발명자

김동현

서울특별시 성북구 선잠로 92-24 (성북동)

정미란

울산광역시 울주군 삼남면 반구대로 591-16 101동
109호 (대진그린피아아파트)

최진규

서울특별시 은평구 증산로1길 26, 103동 802호 (수
색동,DMC청구아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711112209
과제번호	2017R1A5A2014768
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	뉴로바이오타 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2017.06.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 파킨슨병 진단용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 수준은 대장(large intestine, colon)에서 측정하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 파킨슨병을 조기에 진단할 수 있는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 mRNA의 수준을 측정할 수 있는 제제는 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 단백질의 수준을 측정할 수 있는 제제는 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중, 어느 한 항의 파킨슨병 진단용 조성물을 포함하는, 파킨슨병 진단용 키트.

청구항 7

피검체 유래의 생물학적 시료에서 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 파킨슨병 진단을 위한 정보제공 방법.

청구항 8

CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상 또는 이의 작용제(agonist)를 유효성분으로 포함하는, 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 작용제(agonist)는 6-쇼가올(6-shogaol)인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 10

제 8항에 있어서,

상기 조성물은 대장, 복강 또는 구강에 투여하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 뉴로펩타이드 및 뉴로트로핀을 포함하는 파킨슨병의 진단 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 장내에서 발견되는 뉴로펩타이드 및 뉴로트로핀의 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 수준을 이용한 파킨슨병의 진단 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 파킨슨병은 알츠하이머병 다음으로 흔한 퇴행성 뇌 질환으로서, 중뇌의 흑질(substantia nigra)에 존재하는 도파민 신경세포가 점차 사멸됨에 따라 도파민의 농도가 낮아져서 일어나는 질병이다. 파킨슨병 환자수는 1990년 300만명에서 2015년 620만명으로 증가하였고, 2040년에는 1420만명으로 그 숫자가 증가할 것으로 예상되고 있다. 파킨슨병은 주로 고령의 환자들에게 주로 발생하여 60세 이상 노인가운데 1~1.5%가 파킨슨병을 앓고 있다고 보고되고 있으나, 최근에는 50대 이하 중년 또는 20~30대에서도 파킨슨병이 보고되고 있어 심각성을 더해가고 있으나, 아직까지도 파킨슨병의 정확한 원인은 밝혀지지 않은 상태이다.

[0004] 파킨슨병에 걸리면 운동기능의 감퇴가 나타나게 되고, 주요한 3대 증상으로는 진전, 강직, 서동이 있으나, 이외에도 환자들이 가질 수 있는 증상들은 훨씬 다양한 것으로 알려져 있다. 파킨슨병은 아주 서서히 시작하여 언제부터 병이 시작되었는지 정확하게 파악할 수 없고, 진단 또한 현재까지 확실한 진단방법이 없고, 파킨슨병이 어느정도 진행된 후에 나타나는 운동장애인 휴식 떨림, 경직, 근 긴장 이상, 서동, 보행 곤란, 자세 불안정 등을 진단하는 방법으로 파킨슨병을 진단하고 있는 실정인데(J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2008 Apr; 79(4): 368-76), 이러한 진단 방법은 파킨슨병이 진행된 후에야 비로소 파킨슨병 진단이 가능하기에 조기 진단이 불가능하다는 한계가 있다. 또한, 파킨슨병의 치료를 위한 약물요법, 뇌심부자극술 등은 환자에 따라 치료효과가 상이하고, 파킨슨병을 완치할 수 없는 문제점이 있다. 따라서 파킨슨병을 조기에 진단하여, 그에 따른 치료계획을 수립할 수 있게 하는 진단 기술 및 파킨슨병을 치료할 수 있는 기술의 개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 상기와 같은 배경하에, 본 발명자들은 파킨슨병 환자들의 70%가 파킨슨병 발병 초기에 위장장애를 경험한다는 사실에 주목하여, 파킨슨병을 조기에 진단 및 치료할 수 있는 방법을 개발하기 위해 노력한 결과, 장내의 뉴로펩타이드(neuropeptide) 및 뉴로트로핀(neurotrophin)이 파킨슨병의 진단 및 치료에 활용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0007] 이에, 본 발명은 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 수준을 측정할 수 있는 체제를 포함하는, 파킨슨병 진단용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 파킨슨병 진단용 조성물을 포함하는, 파킨슨병 진단용 키트를 제공하는 것을 다른 목적으

로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 피검체 유래의 생물학적 시료에서 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 파킨슨병 진단을 위한 정보제공 방법을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상 또는 이의 작용제(agonist)를 유효 성분으로 포함하는, 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

[0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명자들은 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 파킨슨병 진단용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일구현예로, 상기 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 수준은 대장(large intestine, colon)에서 측정하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 조성물은 파킨슨병을 조기에 진단할 수 있는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 mRNA의 발현을 측정할 수 있는 제제는 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머 또는 프로브일 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단백질을 측정할 수 있는 제제는 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 파킨슨병 진단용 조성물을 포함하는, 파킨슨병 진단용 키트를 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 피검체 유래의 생물학적 시료에서 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 파킨슨병 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상 또는 이의 작용제(agonist)를 유효 성분으로 포함하는, 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일구현예로, 상기 조성물은 대장, 복강 또는 구강에 투여하는 것을 특징으로 하는, 조성물일 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에서는 파킨슨병 환자의 대장(large intestine, colon)에서 단백질 및 이를 암호화하는 mRNA의 발현이 감소하는 뉴로캡타이드 및 뉴로트로핀을 확인하였고, 상기 뉴로캡타이드 및 뉴로트로핀을 활용하여 파킨슨병을 조기에 진단할 수 있고, 파킨슨병에 대한 치료효과도 뛰어난바, 파킨슨병의 진단 또는 치료에 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0025] 단, 본 발명의 효과는 상기 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 신경독성물질에 의해 파킨슨병 유도된 마우스 모델을 TH 면역염색법(tyrosine hydroxylase immunostaining)을 활용하여 선조체(striatum, ST) 및 흑질치밀부(substantia nigra pars compacta, SNpc)의 도파민 뉴런을 확인하여 파킨슨병 유도 여부 확인한 결과로서, 도 1a는 MPTP 처리한 마우스 모델을 관찰한 결과이고, 도 1b는 MPTP/p 처리한 마우스 모델을 관찰한 결과이다.
- 도 2는 대조군과 파킨슨병 유도된 마우스 모델의 운동능력을 로타로드 테스트(Rota-rod test)로 관찰한 결과로서, 도 2a는 MPTP 처리에 의해 유도된 마우스 모델 및 대조군(vehicle 군)의 로타로드 테스트 결과이고, 도 2b는 MPTP/p 처리에 의해 유도된 마우스 모델 및 대조군(vehicle 군)의 로타로드 테스트 결과이다.
- 도 3은 MPTP 처리에 의해 유도된 파킨슨병 마우스 모델 및 대조군(vehicle 군)의 대장(large intestine, colon)(도 3a) 및 소장(도 3b)에서 12개의 뉴로펩타이드(neuropeptides) 및 4개의 뉴로트로핀(neurotrophin)의 mRNA 발현의 변화를 확인한 결과로서, 각각 (A) NPY, (B) ghrelin, (C) VIP, (D) CRF, (E) GLP-1, (F) leptin, (G) peptide YY, (H) calcitonin gene-related peptide, (I) galanin, (J) CCK, (K) Dyn A, (L) neurotensin, (M) BDNF, (N) NGF, (O) NT3, (P) NT5의 발현변화를 확인한 결과이다.
- 도 4는 MPTP 처리되어 파킨슨병 유도된 마우스 모델 및 대조군(vehicle 군)의 대장(large intestine, colon)에서 (A) CCK, (B) Dyn A, (C) BDNF, (D) NT5 단백질의 발현 수준을 확인한 결과이다,
- 도 5는 MPTP 처리되어 파킨슨병 유도된 마우스 모델 및 대조군(vehicle 군)의 혈청에서 (A) CCK, (B) Dyn A, (C) BDNF 단백질의 발현변화 및 이의 조합된 발현 수준을 확인한 결과이다.
- 도 6는 MPTP/p 처리되어 파킨슨병 유도된 마우스 모델 및 비히클(vehicle) 처리한 마우스 모델(대조군)의 대장(large intestine, colon)에서 (A) CCK, (B) Dyn A, (C) BDNF 단백질의 발현변화를 확인한 결과이다.
- 도 7은 PM 처리되어 파킨슨병 유사 증상 및 도파민 신경 손상을 보이는 마우스 모델 및 비히클(vehicle) 처리한 마우스 모델(대조군)의 대장(large intestine, colon)에서 (A) CCK, (B) Dyn A, (C) BDNF 단백질의 발현변화를 확인한 결과이다.
- 도 8은 6-쇼가올을 처리한 다음, BDNF, CCK, Dyn A의 발현수준 RT-PCR(도 8a) 및 웨스턴 블롯팅(도 8b)으로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명자들은 파킨슨병을 조기에 진단 및 치료할 수 있는 방법을 개발하기 위해 노력한 결과, 파킨슨병이 걸린 동물 모델의 장내에서 뉴로펩타이드(neuropeptide) 및 뉴로트로핀(neurotrophin)의 발현변화가 발생한다는 것을 확인하였으며, 유의한 발현의 변화를 나타내는 뉴로펩타이드 및 뉴로트로핀이 파킨슨병의 진단 및 치료에 활용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0029] 이에, 본 발명은 뉴로펩타이드 또는 뉴로트로핀의 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 파킨슨병 진단용 조성물을 제공한다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 뉴로펩타이드(neuropeptide)는 신경계에서 발견되는 모든 펩타이드를 총칭하는 말로서, 신경 세포 말단에서 다른 신경전달물질들과 공존하면서 상호작용을 통해 분비를 조절하거나, 고유의 기능을 나타낸다. 뉴로펩타이드의 종류는 이에 제한되는 것은 아니지만, NPY(neuropeptide Y), ghrelin, VIP(Vasoactive intestinal peptide), CRF(Corticotropin-releasing factor), GLP-1(Glucagon-like peptide-1), leptin, peptide YY, calcitonin gene-related peptide, galanin, CCK(Cholecystokinin), Dyn A(Dynorphin A) 및 neurotensin일 수 있다.
- [0031] 본 발명에서는 파킨슨병이 유도된 마우스 모델의 대장(large intestine, colon)의 다양한 뉴로펩타이드 중, CCK(Cholecystokinin) 및 Dyn A(Dynorphin A)의 단백질 및 이를 암호화하는 mRNA의 발현이 유의적으로 감소한 것을 확인하여, 파킨슨병의 진단 및 치료용도로 사용할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명에서 뉴로펩타이드는 CCK 및 Dyn A로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 뉴로트로핀(neurotrophin)은 신경을 성장시키는 호르몬 및 단백질을 의미하며, 신경세포를 유지하여 신경세포 사멸을 억제하거나, 새로운 신경형성을 촉발한다. 뉴로트로핀은 이에 제한되는 것은 아니지만, BDNF(Brain-derived neurotrophic factor), NGF(nerve growth factor), NT3(Neurotrophin3) 및 NT5(Neurotrophin5)일 수 있다.

- [0033] 본 발명에서는 파킨슨병이 유도된 마우스 모델의 대장(large intestine, colon)의 다양한 뉴로트로핀 중, BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)의 단백질 및 이를 암호화하는 mRNA의 발현이 유의적으로 감소한 것을 확인하여, 파킨슨병의 진단 및 치료용도로 사용할 수 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명에서 뉴로트로핀은 BDNF일 수 있다.
- [0034] 상기 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 진단을 위한 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 수준은 장내, 특히 대장(large intestine, colon)에서 측정하는 것일 수 있다.
- [0035] 대장에서 상기 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 mRNA 및 단백질을 측정하는 진단 방법은, 일반적인 파킨슨병의 증상을 나타내는 MPTP 처리에 의해 유도된 마우스 모델뿐만 아니라, 조기 및 만성적인 파킨슨병의 증상을 나타내는 MPTP/p 처리에 의해 유도된 마우스 모델을 대조군(vehicle 군)과 비교할 때, 모두 유의한 정도의 mRNA 및 단백질의 발현 저하를 확인할 수 있어, 일반적인 파킨슨병 환자는 물론 기존의 진단 방법으로는 진단할 수 없는 파킨슨병의 조기증상만 나타나는 환자에 대해서도 파킨슨병을 진단할 수 있음을 확인했으며, 혈청 및 소장 등에서는 대조군과 비교할 때 발현의 유의적인 차이가 나타나지 않음을 확인함으로써, 대장에서 상기 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현을 측정하는 것이 유용한 파킨슨병의 진단방법이 될 수 있다는 사실을 확인하였다.
- [0036] 본 발명에 있어서, 파킨슨병(Parkinson's disease)은 주요증상인 서동, 비자발적 떨림, 강직 및 자세불안 등의 주요 증상 등이 특징적으로 나타나는 신경계의 만성 진행성 퇴행성 질환으로서, 상기 파킨슨병은 조기증상을 보이는 파킨슨병일 수 있다.
- [0037] 상기 조기증상을 보이는 파킨슨병이란, 파킨슨병의 주요한 4가지 증상인 서동, 비자발적 떨림, 강직 및 자세불안 중 3가지 이상의 증상이 아직 보이지 않거나 단지 기본적인 증상만을 보이는 상태로서, 기존의 파킨슨병 진단방식으로는 진단에 어려움이 있는 파킨슨병이다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 mRNA의 수준을 측정할 수 있는 제제는 상기 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 센스 및 안티센스 프라이머, 또는 프로브일 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머(Primer)는 DNA 합성의 기시점이 되는 짧은 유전자 서열로서, 진단, DNA 시퀀싱 등에 이용할 목적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 프라이머들은 통상적으로 15 내지 30 염기쌍의 길이로 합성하여 사용할 수 있으나, 사용 목적에 따라 달라질 수 있으며, 공지된 방법으로 메틸화, 캡화 등으로 변형시킬 수 있다. 본 발명에 있어서 프라이머는 중합효소연쇄반응을 수행하는데 이용할 수 있고, 바람직하게는 실시간 중합효소연쇄반응에 이용될 수 있다. 상기 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응을 위한 시약(예컨대, Taq DNA 중합효소) 및 상이한 4가지 dNTP(deoxynucleoside triphosphate)의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서, 상기 프로브(Probe)는 효소 화학적인 분리정제 또는 합성과정을 거쳐 제작된 수 염기 내지 수백 염기 길이의 mRNA와 특이적으로 결합할 수 있는 핵산을 의미한다. 방사성 동위원소나 효소 등을 표지하여 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있으며, 공지된 방법으로 디자인하고 변형시켜 사용할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 있어서, 상기 단백질의 수준을 측정할 수 있는 제제는 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.
- [0042] 상기 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자의 mRNA 발현 수준을 측정하는 경우, 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블로팅, DNA 칩 등을 사용할 수 있으나, 본 발명은 이에 제한되지 않는다. 상기 방법들을 통하여 대조군에서의 mRNA 발현량과 파킨슨병 환자 또는 파킨슨병 의심 환자의 생물학적 시료 내의 mRNA 발현량을 확인할 수 있고, 이들 발현량의 정도를 비교함으로써 파킨슨병 발병 여부를 진단 또는 예측할 수 있다.
- [0043] 상기 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질의 발현 수준을 측정하는 경우, 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 유세포분석(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 상기 방법들을 통하여 대조군에서의 단백질 발현량과 파킨슨병 환자 또는 파킨슨병 의심 환자의 생물학적 시료 내의 mRNA 발현량을 확인할 수 있고, 이들 발현의 수준을 비교

함으로써 파킨슨병 발병 여부를 진단 또는 예측할 수 있다.

- [0044] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 상기 파킨슨병 진단용 조성물을 포함하는, 파킨슨병 진단용 키트를 제공한다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 키트는, 이에 한정되는 것은 아니나, ELISA 키트, 면역크로마토그래피 시험 스트립, 방사 분할 면역검정 디바이스, 플로우-쓰로우(flow-through) 디바이스, DNA 칩 및 RT-PCR 키트로 구성되는 군으로부터 선택되는 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 ELISA 키트 또는 RT-PCR 키트일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 진단용 키트는, 상기한 바와 같은 뉴로펩타이드 및 뉴로트로핀의 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 수준을 측정할 수 있는 진단용 조성물 외에, 분석에 사용되는 적절한 시약 및 도구를 더 포함할 수 있으며, 이러한 시약 및 도구로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지, 용해제, 세정제 등이 포함된다. 또한, 표지물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다.
- [0047] 적합한 담체로는, 이에 한정되지는 않으나, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스틀, 폴리스카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0048] 상기 진단용 키트가 ELISA 키트인 경우, 바람직하게 마커 단백질에 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소(예: 항체와 접합) 및 그의 기질을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조구 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다.
- [0049] 상기 키트가 RT-PCR 키트인 경우, 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있으며, 또한 정량 대조구로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.
- [0050] 상기 진단용 키트가 DNA칩 키트인 경우, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA나 올리고 염기가 부착되어 있는 기판을 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 양태로서, 피검체 유래의 생물학적 시료에서 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 파킨슨병 진단을 위한 정보제공 방법을 제공한다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 생물학적 시료는 파킨슨병의 발생에 의해 상기 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 수준의 차이가 발생한 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 또는 뇨와 같은 시료를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0053] 본 발명에 있어서, 구체적인 실시예를 통해 본 발명에 따른 상기 조성물의 파킨슨병 진단 및 치료효과를 확인하였다.
- [0054] 본 발명의 일 실시예에서는, 신경독성물질(MPTP, MPTP/p)에 의해 파킨슨병 유도된 마우스와 대조군(vehicle 군)의 대장 및 소장에서 12개의 뉴로펩타이드 및 4개의 뉴로트로핀의 mRNA의 발현변화를 관찰한 결과, 소장에서는 유의한 발현 변화가 관찰되지 않았으나, 대장에서는 2개의 뉴로펩타이드(CCK, Dyn A) 및 2개의 뉴로트로핀(BDNF, NT 5)의 mRNA 발현이 유의하게 감소한 것을 확인 하였다(실시예 2-1 참조).
- [0055] 본 발명의 다른 실시예에서는, MPTP에 의해 파킨슨병 유도된 마우스 모델과 대조군의 대장에서 CCK, Dyn A, BDNF 및 NT 5의 단백질 발현을 관찰한 결과, CCK, Dyn A 및 BDNF는 유의한 단백질 발현의 감소가 나타났으나, NT 5의 발현은 유의한 차이를 보여주지 않았다(실시예 2-2 참조). 상기 실험에 2-1 및 2-2를 통해 CCK, Dyn A 및 BDNF의 단백질 및 이를 암호화하는 mRNA의 수준에 유의한 차이를 보이는 상기 CCK, Dyn A, BDNF의 단백질 발현의 변화를 MPTP에 의해 파킨슨병 유도된 마우스와 대조군의 혈청에서 확인한 결과, 대장에서의 결과와 달리, 3가지 모두 유의한 발현의 차이를 보여주지 않아, 다른 조직이 아닌, 대장에서 CCK, Dyn A 및 BDNF의 발현을 측정하는 것이 파킨슨병 진단에 효과적임을 확인하였다(실시예 2-3 참조).
- [0056] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, MPTP/p에 의해 파킨슨병 유도된 마우스 모델과 대조군의 대장에서 CCK, Dyn A 및 BDNF의 단백질 수준을 측정하였는데, MPTP에 의해 유도된 파킨슨병 유도 마우스 모델에 비해 초기 또는 만성 파킨슨병 증상을 보이는 MPTP/p 모델에서도 CCK, Dyn A 및 BDNF의 단백질 발현이 유의하게 감소한 것을 확인하

여, 초기 또는 만성 파킨슨병의 진단 및 치료를 위해서도 효과적으로 사용될 수 있음을 확인하였다(실시예 3 참조).

[0057] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 장내균인 PM(*Proteus mirabilis*)의 처리에 의해 파킨슨병 유사 증상 및 도파민 신경의 손상을 보여주는 마우스 모델의 대장에서 CCK, Dyn A 및 BDNF의 단백질 수준을 측정하였는데, 이 때에도 MPTP 및 MPTP/p를 처리한 모델의 경우와 유사하게 상기 CCK, Dyn A 및 BDNF의 단백질 발현이 유의하게 감소한 것을 확인하여, 도파민 신경이 손상된 파킨슨병 유사증상의 진단에도 활용될 수 있음을 확인하였다(실시예 4 참조).

[0058] 이에, 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 CCK, Dyn A 및 BDNF로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상 또는 이의 작용제(agonist)를 유효성분으로 포함하는, 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

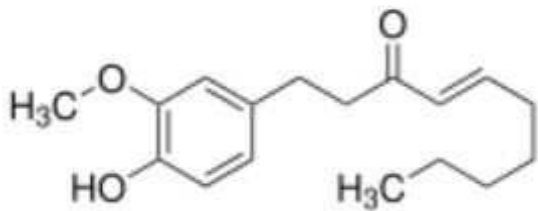
[0059] 본 발명의 "예방"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0060] 본 발명에서, "치료"는 생물학적 대상체(예: 인간 또는 동물)를 목적으로 하는 질병이나 질환의 진행 억제 혹은 중지, 진행 속도 감소, 증상 개선 및 완화, 또는 질병예방 등의 치료 효과를 포함한다.

[0061] 본 발명에 있어서, 작용제(agonist)란 상기 CCK, Dyn A 및 BDNF의 단백질 또는 이를 암호화하고 있는 mRNA의 발현을 증진시킬 수 있는 조성물로서, CCK, Dyn A 및 BDNF의 단백질 또는 mRNA 자체이거나 장내에서 CCK, Dyn A 및 BDNF의 생산에 영향을 주는 미생물의 생육에 영향을 주어 CCK, Dyn A 및 BDNF의 단백질 또는 mRNA의 발현을 증진시킬 수 있는 조성물을 의미하고, 이에 제한되는 것은 아니지만, 6-쇼가올(6-shogaol)일 수 있다.

[0062] 본 발명에 있어서, 6-쇼가올(6-shogaol)은 1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4-decen-3-one의 구조를 가지는 것으로서 하기 화학식 1의 구조를 가지는 것일 수 있다.

[0063] [화학식 1]



[0064]

[0065] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 피부, 비강 또는 기도에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다

[0066] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로덱스트린, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 또는 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제 또는 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액 또는 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립, 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 또는 경구 섭취제 등으로 제제화할 수 있다.

[0067] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있으며, 단순한 부형제 이외에도 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골,

트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [0068] 상기 본 발명의 약학적 조성물은 파킨슨병 환자의 대장, 복강 또는 구강에 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.
- [0069] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0070] 본 발명의 약학적 조성물은 목적 또는 필요에 따라 당업계에서 사용되는 통상적인 방법, 투여량에 및 투여 횟수에 따라 적절하게 개체에 투여될 수 있으며, 실제로 투여되는 본 발명의 약학적 조성물의 양 및 투여 횟수는 치료하고자 하는 증상의 종류, 투여 경로, 성별, 건강 상태, 식이, 개체의 연령 및 체중, 및 질환의 중증도와 같은 다양한 인자에 의해 적절하게 결정될 수 있다.
- [0071] 본 발명에서의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 파킨슨병을 억제 또는 완화하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 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.
- [0072] 또한, 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0073] 본 발명의 용어 "개체"란, 상기 파킨슨병이 발병될 가능성이 있거나, 또는 발병된 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 조성물을 개체에 투여함으로써, 파킨슨병을 완화 또는 치료할 수 있다.
- [0075] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

실시예 1. 실험 준비 및 수행 방법

1-1. 화학 물질 및 시약

Enhanced chemiluminescence(ECL) 시약은 EMD Millipor(Billerica, MA, USA)에서 구입했으며, TBS 버퍼(Tris-buffered saline)는 Boster Biological Technology Ltd.(Wuhan, China)에서 구입하여 사용하였다. CCK, Dyn A, BDNF 및 NT 4/5의 항체들은 Abcam Biotechnology(Cambridge, England)에서 구입하여 사용하였으며, β -actin 항체들은 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입한 것을 사용하였다. 실시간 역전사 중합효소연쇄반응(real-time reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 위한 올리고 뉴클레오티드(oligonucleotide) 프라이머(primer)는 Bioneer(Seoul, South Korea)에서 조달된 것을 사용하였다. Easy Blue kit 및 단백질 용해 완충액(protein lysis buffer)은 Intron Biotechnology(Seoul, South Korea)에서 구입하여 사용하였고, First-Strand cDNA synthesis kit은 Amersham Pharmacia Biotech(Oakville, ON, Canada)에서 구입하여 사용하였다. SYBR Premix Ex Taq는 Takara(Tokyo, Japan)에서 제조된 것을 사용하였으며, CCK, Dyn A 또는 BDNF를 위한 효소결합면역흡착검사(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 키트는 Ray Biotech, Inc(Peachtree Corners, GA, USA)에서 구입하였다.

1-2. 동물 모델

① 실험에 사용된 쥐(mice)는 수컷 C57BL/6 쥐; 7 주령 쥐(MPTP-induced PD mice; n=10/그룹) 및 12 주령 쥐(MPTP/p-induced PD mice; n=10/그룹)를 포함하며, 모두 Daehan Biolink(Eumseong, South Korea)에서 구입하여 사용하였다. 구입한 쥐는 7일간의 적응 기간을 거친 후에, 23 ± 1 °C의 온도 및 60 ± 10 %의 상대 습도에서 12 시간을 명암주기로 하여, 각 그룹을 별개의 케이지에 수용하고 물에 자유롭게 접근할 수 있는 상태로 관리하였다. 모든 동물 연구는 실험실 동물 관리 원칙(NIH 발행 번호 80-23, 1996 년 개정) 및 대한민국 서울 경희대 학교 동물 관리 및 사용 지침(승인 번호: KHUASP (SE) -17-129 및 KHUASP (SE) -18-140)에 의해 허가된 방법을 따라 수행되었다.

- [0084] ② MPTP에 의해 유도된 파킨슨병 마우스 모델(MPTP-induced PD mouse model)은 식염수에 포함된 MPTP 염산염(MPTP hydrochloride)(30 mg/kg/day in saline)을 5일동안 복강에 주사하는 방법으로 제조하였고, 비교를 위한 대조군인 비히클(vehicle-treated group)군도 동일한 방법으로 같은 양의 식염수를 주사하여 제조하였다. 이렇게 제작된 파킨슨병 마우스 모델이 잘 제작되었는지 확인하기 위해, 도파민성 뉴런 마커인 TH 면역염색법(Tyrosine hydroxylase immunostaining)을 수행한 뒤, 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)을 통해 선조체(striatum, ST) 및 흑질치밀부(substantia nigra pars compacta, SNpc)에서 염색된 도파민성 뉴런을 관찰한 결과, 도 1a에서 나타난 바와 같이, 대조군보다 MPTP를 주입한 마우스의 선조체 및 흑질치밀부에서 도파민성 뉴런이 유의하게 감소한 것을 확인하여, 파킨슨병 마우스 모델이 잘 제작되었다는 사실을 확인하였다. 이렇게 제작된 파킨슨병 마우스 모델은 마지막 MPTP 염산염 주입 뒤, 7일의 시간이 경과한 후에 운동분석을 수행하였고, 운동분석을 마친 뒤, 장내 조직 세부분석을 위해 희생되었다.
- [0085] ③ MPTP/p에 의해 유도된 파킨슨병 마우스 모델(MPTP/p-induced PD mouse model)은 식염수에 MPTP 염산염(MPTP hydrochloride)(25 mg/kg/day in saline i.p.)을 프로베네시드(probenecid)(100 mg/kg/day in 5% NaHCO₃, i.p.)과 함께 10회 주사하여 제조하였다(10회 주사는 5주 일정으로 3.5일 간격을 두고 주사하였다). 비교를 위한 대조군인 비히클(vehicle-treated group)군도 동일한 방법으로 같은 양의 살균된 식염수를 주사하여 제조하였다. 프로베네시드는 MPTP 염산염 주입 30분전에 미리 주입되는데, 프로베네시드는 MPTP가 자연적으로 제거되는 것을 방지하여, 주사 후 6개월 동안 선조체(striatal)의 도파민이 만성적으로 결핍시키는 방법을 통해, MPTP의 신경독성을 강화시키기에, 보조제로 사용하였다. 이렇게 제작된 파킨슨병 마우스 모델이 잘 제작되었는지 확인하기 위해, 도파민성 뉴런 마커인 TH 면역염색법(Tyrosine hydroxylase immunostaining)을 수행한 뒤, 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)을 통해, 선조체(striatum, ST) 및 흑질치밀부(substantia nigra pars compacta, SNpc)에서 염색된 도파민성 뉴런을 관찰한 결과, 도 1b에 나타난 바와 같이, 대조군보다 MPTP/p를 주입한 마우스의 선조체 및 흑질치밀부에서 도파민성 뉴런이 유의하게 감소한 것을 확인하여, 파킨슨병 마우스 모델이 잘 제작되었다는 사실을 확인하였다. 이렇게 제작된 마우스 모델은 기존에 알려진 바와 같이 MPTP만 처리한 파킨슨병 마우스 모델에 비해 초기 및 만성적인 파킨슨병의 증상을 나타내었다. MPTP/p 처리에 의해 유도된 파킨슨병 마우스 모델에 대하여 MPTP 및 프로베네시드를 10회 주사를 놓은 다음날 운동분석을 수행하였으며, 운동분석을 마친 후, 장내 조직 세부분석을 위해 희생시켰다.
- [0087] 1-3. 마우스 장 해부
- [0088] 실험을 위해, 마우스를 이산화탄소(CO₂)로 마취하고, 희생시킨 후, 가위로 마우스 중간 복부 피부(mid-abdominal skin)를 자르고, 드레싱 집게로 직장(rectum)/원위 결장(distal colon)을 부드럽게 당겨, 대장(large intestine)의 조직을 분리하였다. 또한, 소장을 분리하기 위해, 장간막(mesentery)에서 소장(small intestine)을 뽑아내고, 유문(pylorus)에서 떨어져 있는 소장을 가로질러 절단하여 소장 조직을 분리하였다. 이렇게 준비된 대장 및 소장 조직은 -80 °C의 온도에서 보관되었다.
- [0090] 1-4. 로타로드 테스트(rota-rod test)
- [0091] 파킨슨병 마우스 모델에서 운동 감소증(hypokinesia)을 측정하기 위해, 로타로드 테스트를 수행하였다. 로타로드 테스트는 MPTP 마지막 주입 후 7일 또는 MPTP/p의 마지막 주입한 다음날 수행하였다. 테스트를 위한 장치는 직경 7.3cm의 회전 스피들(rotating spindle)과 쥐 5마리를 동시에 실험할 수 있도록 구성된 5개의 개별 구획으로 구성되었다. 3 분 동안 8rpm의 회전 속도로 수행한 첫날의 테스트 이후에, 이튿날은 회전속도를 11rpm으로 증가하여 테스트를 수행하였고, 각각의 쥐가 회전하는 막대에 남아있는 시간은 5분의 간격을 둔 3번의 테스트를 통해 각 시험당 최대 300초로 기록하였으며, 3번의 테스트의 평균 시간을 산출하여 데이터에 나타난 결과, MPTP(도 2a) 또는 MPTP/p(도 2b) 처리한 파킨슨병 마우스 모델 모두에서 유의한 운동능력의 감소를 관찰할 수 있었다.
- [0093] 1-5. 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR) 및 실시간 역전사 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)
- [0094] First-Strand cDNA synthesis kit를 활용하여 총 1 µg의 RNA에 대한 역전사를 수행하였으며, Easy Blue kit를 활용하여 역전사된 RNA를 추출하였다. PCR을 위한 프라이머는 하기 표 1의 프라이머를 사용하였고, Thermal

Cycler Dice Real Time PCR system 및 SYBR Premix Ex Taq를 활용하여 cDNA를 증폭하고 해리 곡선(dissociation curve)을 분석한 결과, 단일 피크(single peak)를 확인할 수 있었다. 관심 유전자의 발현은 표적 cDNA의 Ct(threshold cycle) 평균값을 GAPDH을 참조하여 정규화하는 방법인 Ct 비교(comparative Ct) 방법을 사용하여 분석하였다.

표 1

Gene name	Forward primer sequences (5'-3')	Reverse primer sequences (5'-3')
NPY	GCCACGATGCTAGGTAACAA	TTGATGTAGTGTGCGAGAGC
Ghrelin	CCAGAAAGCCCAGAGAAAGG	CTCTTTGACCTCTTCCCAGA
VIP	TACAGCAGACTTCTGGGTCA	TGTAACCTCCCTCTTGCCTGT
CRF	GAGCCCAAGTACGTTGAGAG	TTCTCCTCCCTTGGTAGGTG
GLP-1	CTCTGTCTACACCTGTTCCG	TGGGAATGATCTGGGGTTCT
Leptin	AGGAGTTGACTCTTTCCGGA	CTTTTCTTGGGGCTCACTGT
Peptide YY	GCTCTGTTCTCCAACTGCT	AACATGCAAGTGAAGTCGGT
Calcitonin gene-related peptide	CTCCTCGGCAGAGAACTTC	AGCCTCTGGTAAAGCCTGTA
galanin	GAGAAGAGAGGTGGACCT	TGTAACCTCCCTCTTGCCTGT
CCK	CCTCTGGTTGGGGTGTAAAC	AGTCAAGCCAAATGCAGACA
Dyn A	GGTGGTCCTTGTTGTCTGTA	TCCCCAAGTCCTCTTGTCA
Neurotensin	ATCAGCAAAGCAAGTCTCC	TCATGCATGTCTCTGCTTC
BDNF	ACTTCAGCGAGCTCAATGAG	AAAGCGTCTTTTCCGAGGTT
NGF	AGTTCAGCGAGCTCAATGAG	GCGTCGAATCCTGTTGAGAG
NT3	GGAGGAAACGCTATGCAGAA	CGAATGTCAATGGCTGAGGA
NT5	GCAGGTAGATCATGGCCATC	CCTCCAGGCAATCTTCTGTC
GAPDH	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	TTGATTTTGGAGGGATCTCG

1-6. 효소결합면역흡착검사(ELISA)

항응고제로 EDTA를 사용하여 마우스 혈청(serum)을 수집하였으며, 수집된 표본을 수집 후 30분 이내에 2-8℃에서 15분 동안 1000 x g의 강도로 원심분리 하였다. 1차 원심분리 후, 혈소판을 완전히 제거하기 위해, 2-8℃에서 10분 동안 10,000 x g의 강도로 원심분리를 다시 수행하였다. 원심분리를 통해 얻어진 혈청의 neuropeptides(CCK, Dyn A) 및 neurotrophin(BDNF)는 RayBiotech에서 제조된 EIA kit를 사용하여 측정되었다.

1-7. 웨스턴 블로팅(Western blotting)

조직에서 단백질을 추출하기 위해 단백질 용해 완충액(protein lysis buffer)을 사용했으며, 추출된 단백질의 농도는 Bradford assay에 의해 측정되었다. 단백질은 10-15%의 소듐도데실설페이트폴리아크릴아미드겔(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 전기 영동을 통해 분리되었다. 전기 영동 후, 겔의 단백질을 1시간동안 전기블로팅(electroblotting)하여, 폴리비닐리덴플루오라이드막(polyvinylidene fluoride membranes)으로 옮겼고, 막은 5%의 탈지유(skimmed milk) 및 Tween 20(TBS-T)로 보완된 TBS 버퍼(Tris-buffered saline)을 차단용액(blocking solution)으로 사용하여 20 ℃의 온도에서 30분동안 배양한 뒤, 희석된 CCK, Dyn A, BDNF, NT5 및 B-actin의 1차 항체와 함께 5%의 탈지유와 TBS-T안에서 4 ℃의 온도로 밤새 배양하였다. 배양이 끝난 후, 막을 4회 세척하여 1차 항체를 제거하였고, 그 후, 실온에서 horseradish 과산화 효소(horseradish peroxidase, HRP)를 첨가하여 1시간 동안 추가로 배양하였다. 배양을 마친 뒤, ECL 용액으로 3분 동안 추가 배양한 뒤, Image Quant LAS-4000(Fujifilm Life science, Tokyo, Japan)를 통해 면역반응밴드의 시각화 및 분석을 수행했다.

1-8. 통계 분석

모든 통계적인 매개변수(parameter)는 GraphPad Prism 5.0 프로그램을 이용하여 계산하였고, 값은 평균 ± 표준

편차(SD)로 표현하였다. 산출된 데이터는 양측 테스트(two-tailed test)와 함께 Student's t-test를 통해 분석되었고, p value가 0.05 이하인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0106] 실시예 2. MPTP 처리에 의해 파킨슨병 유도된 마우스 모델의 장내에서 뉴로펩타이드 및 뉴로트로핀의 mRNA 수준 측정

[0107] 2-1. 파킨슨병 유도된 마우스 모델의 소장 및 대장에서 뉴로펩타이드 및 뉴로트로핀의 mRNA 수준 측정

[0108] 대조군(vehicle 군)과 MPTP 처리에 의해 파킨슨병 유도된 마우스 모델의 장내(소장 및 대장)에서 뉴로펩타이드(neuropeptide) 및 뉴로트로핀(neurotrophin)의 mRNA 발현을 측정하기 위해 파킨슨병 마우스 모델의 운동장애(motor impairment) 및 흑질선조체(nigrostriatal) 도파민 뉴런의 퇴화를 관찰함으로써, 파킨슨병이 유도되었음을 확인하였고, 이렇게 준비된 마우스 모델 및 대조군(vehicle 군)의 소장 및 대장에서 12개의 뉴로펩타이드(NPY, ghrelin, VIP, CRF, GLP-1, leptin, peptide YY, calcitonin gene-related peptide, galanin, CCK, Dyn A 및 neurotensin)와 4개의 뉴로트로핀(BDNF, NGF, NT3 및 NT5)의 mRNA를 qRT-PCR을 활용하여 측정한 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, 2개의 뉴로펩타이드인 CCK(0.57 ± 0.09 ; $*p < 0.05$), Dyn A(0.40 ± 0.14 ; $*p < 0.05$) 및 2개의 뉴로펩타이드 BDNF(0.42 ± 0.11 ; $*p < 0.05$), NT5(0.53 ± 0.09 ; $*p < 0.05$)의 mRNA 발현이 대장에서 유의하게 감소한 것을 확인 하였다. 다만, 도 3b에서 나타난 바와 같이, 소장에서는 mRNA의 발현이 유의하게 차이가 나지 않음을 확인할 수 있었는데, 이러한 결과를 통해 몇몇 뉴로펩타이드와 뉴로트로핀이 MPTP로 유도된 파킨슨병 마우스 모델 대장에서 현저하게 감소되어 있음을 확인할 수 있었다.

[0110] 2-2. 파킨슨병 유도된 마우스 모델의 대장에서 뉴로펩타이드 및 뉴로트로핀의 단백질 발현 측정

[0111] 대조군(vehicle 군)과 MPTP 처리에 의해 파킨슨병 유도된 마우스 모델의 대장에서, 상기 실험에 2-1에서 mRNA의 발현이 감소한 2개의 뉴로펩타이드 및 2개의 뉴로트로핀의 mRNA가 암호화하는 단백질을 웨스턴 블로팅(western blotting)을 통해 관찰한 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, CCK(0.63 ± 0.15 ; $*p < 0.05$), Dyn A(0.65 ± 0.19 ; $*p < 0.05$) 및 BDNF(0.76 ± 0.07 ; $*p < 0.05$)의 단백질 발현은 유의하게 감소하였으나, NT 5의 단백질 발현은 파킨슨병 유도된 마우스 모델과 대조군 사이에 차이가 거의 없음을 확인할 수 있었다.

[0113] 2-3. 파킨슨병 유도된 마우스 모델의 혈청에서 뉴로펩타이드 및 뉴로트로핀의 단백질 발현 측정

[0114] 대조군(vehicle 군)과 MPTP 처리에 의해 파킨슨병 유도된 마우스 모델의 혈청(serum)에서 상기 실험에 2-1 및 2-2를 통해 확인한, 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 수준이 모두 감소하는 2개의 뉴로펩타이드 및 1개의 뉴로트로핀의 단백질 수준을 ELISakit를 통해 관찰한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, CCK, Dyn A 및 BDNF 모두에서 감소되는 경향성을 보였으나, 유의한 수준의 저하를 확인할 수 없었다. 다만, 개별인자 측정값을 다양한 조합으로 합하여 평균값을 구하고 Mann Whiteny Test를 이용하여 p value를 계산했을 때, 하기 표 2에 나타난 바와같이 p value 0.023으로 통계적인 유의성을 확인할 수 있었다.

표 2

	Control 평균	MPTP 유도군 평균	P-value
BDNF	2.480	2.020	0.495
CCK	1.687	1.436	0.110
Dyn A	3.070	2.558	0.604
BDNF+CCK	4.167	3.456	0.338
BDNF+Dyn A	5.549	4.578	0.074
CCK+ DynA	4.757	3.993	0.423
BDNF+ CCK+ DynA	7.237	6.014	0.023*

[0117] 실시예 3. MPTP/p 처리에 의해 파킨슨병 유도된 마우스 모델의 대장에서 뉴로펩타이드 및 뉴로트로핀의 단백질

발현 측정

[0118] MPTP/p 처리에 의해 만성적인 파킨슨병 유도된 마우스 모델의 대장에서 웨스턴 블로팅을 통해 상기 실시예 2를 통해 밝혀진 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 발현이 모두 저하되는 것으로 확인된 CCK, Dyn A 및 BDNF의 단백질 발현을 관찰하였다. 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 CCK(0.45 ± 0.03 ; * $p < 0.05$), Dyn A(0.50 ± 0.04 ; * $p < 0.05$) 및 BDNF (0.64 ± 0.09 ; * $p < 0.05$)의 단백질 발현이 유의하게 감소한 것을 확인하여, MPTP 처리에 의해 유도된 일반 파킨슨병 모델뿐만 아니라, MPTP/p 처리에 의해 제작된 초기 및 만성 파킨슨병 증상을 보이는 마우스 모델의 대장에서도 CCK, Dyn A 및 BDNF의 단백질 발현이 감소를 관찰하여, 본 발명의 진단 방법이 파킨슨병의 조기진단에도 활용될 수 있음을 확인했다.

[0120] 실시예 4. PM 처리에 의해 파킨슨병 유사 증상 유도된 마우스 모델의 대장에서 뉴로펩타이드 및 뉴로트로핀의 단백질 발현 측정

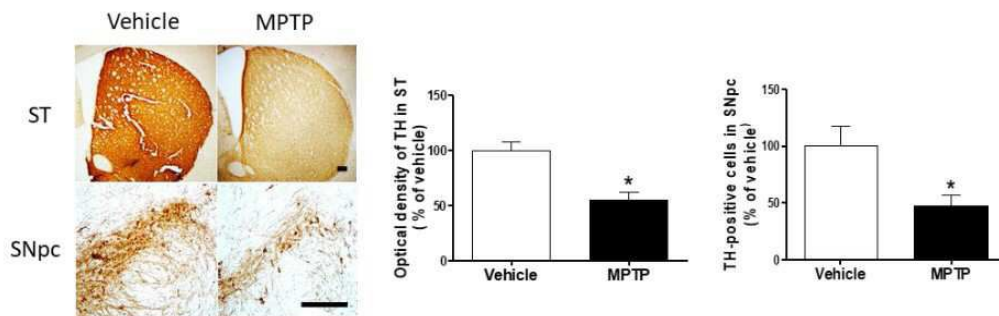
[0121] ① 파킨슨병과 같은 행동 및 도파민 신경의 손상이 발생한다고 밝혀진 장내균인 PM(*Proteus mirabilis*)을 마우스에 처리한 후, 대장(large intestine, colon)에서 웨스턴 블로팅을 통해 상기 실시예 2를 통해 밝혀진 단백질 또는 이를 암호화하는 mRNA의 발현이 모두 저하되는 것으로 확인된 CCK, Dyn A 및 BDNF의 단백질 발현을 관찰하였다. 그 결과, PM을 처리한 마우스의 대장에서도 상기 CCK, Dyn A 및 BDNF의 단백질 발현이 감소하는 것을 확인하였고, 본 발명의 진단 방법이 도파민 신경의 손상이 발생하여 파킨슨병과 유사한 증상(운동장애 등)을 보이는 경우에도 활용될 수 있음을 확인했다.

[0122] ② CCK, Dyn A 또는 BDNF의 작용제(agonist)인 6-쇼가올(6-shogaol)을 세포독성이 없는 농도($0.2-5 \mu\text{M}$)로 처리한 다음, STC1 intestinal enteroendocrine cells과 Caco-2 intestinal epithelial cells에 24시간 처리한 후 RT-PCR 및 Western blotting을 이용해 BDNF, CCK, Dyn A의 mRNA 발현(도 8a) 및 단백질 발현(도 8b)의 수준을 확인했을 때, 6-쇼가올을 처리한 세포에서 BDNF, CCK, Dyn A의 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

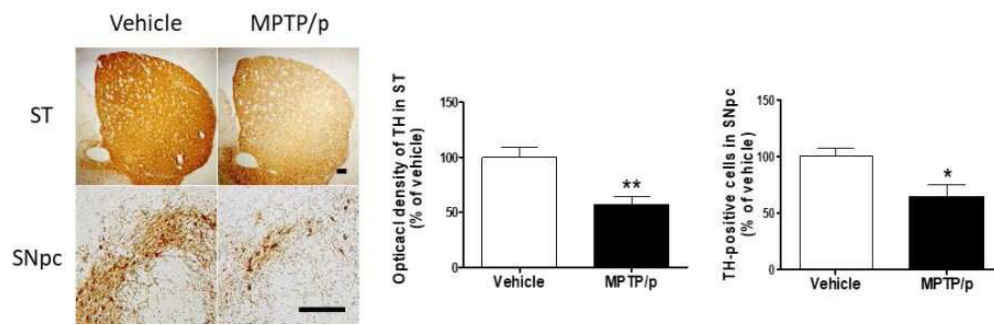
[0124] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

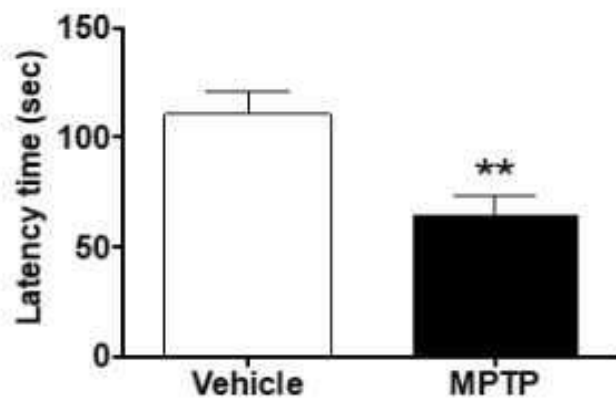
도면 1a



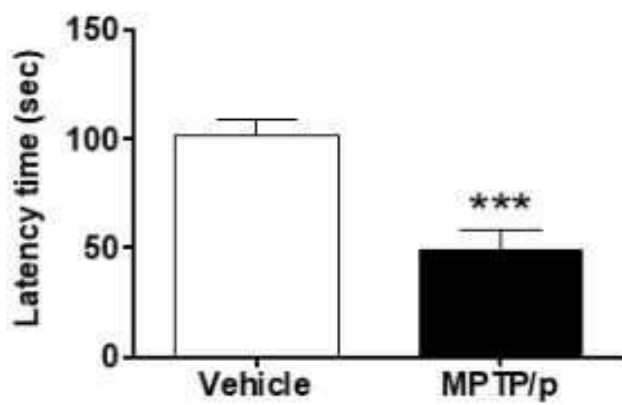
도면1b



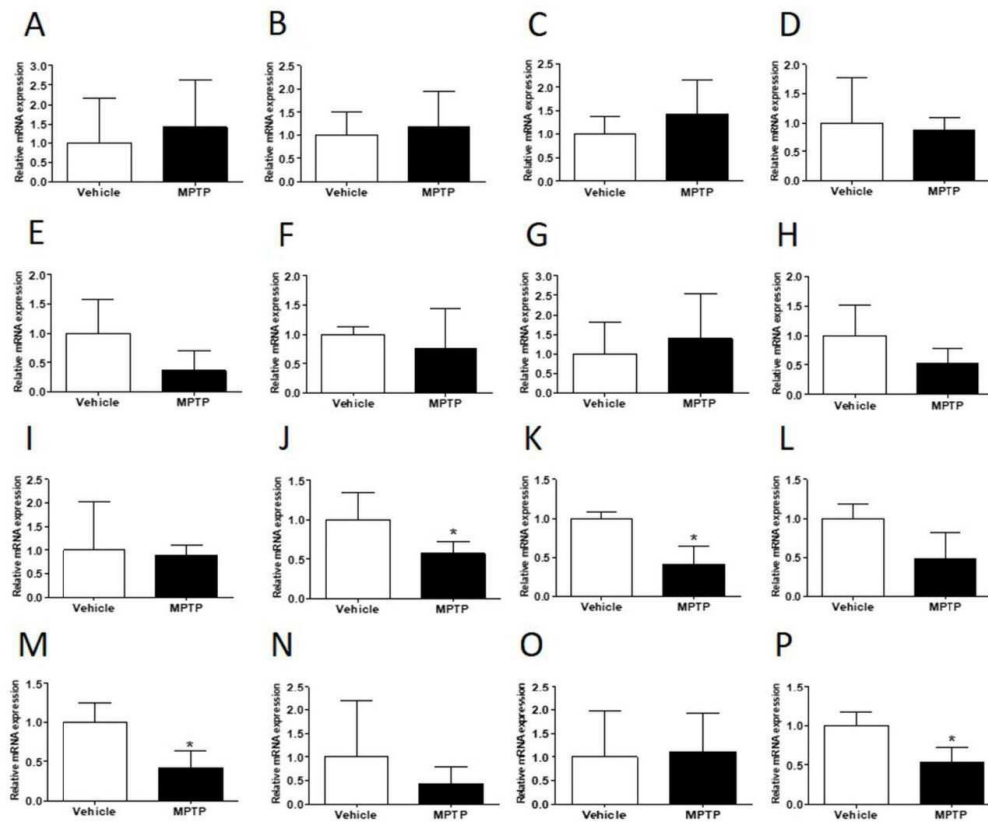
도면2a



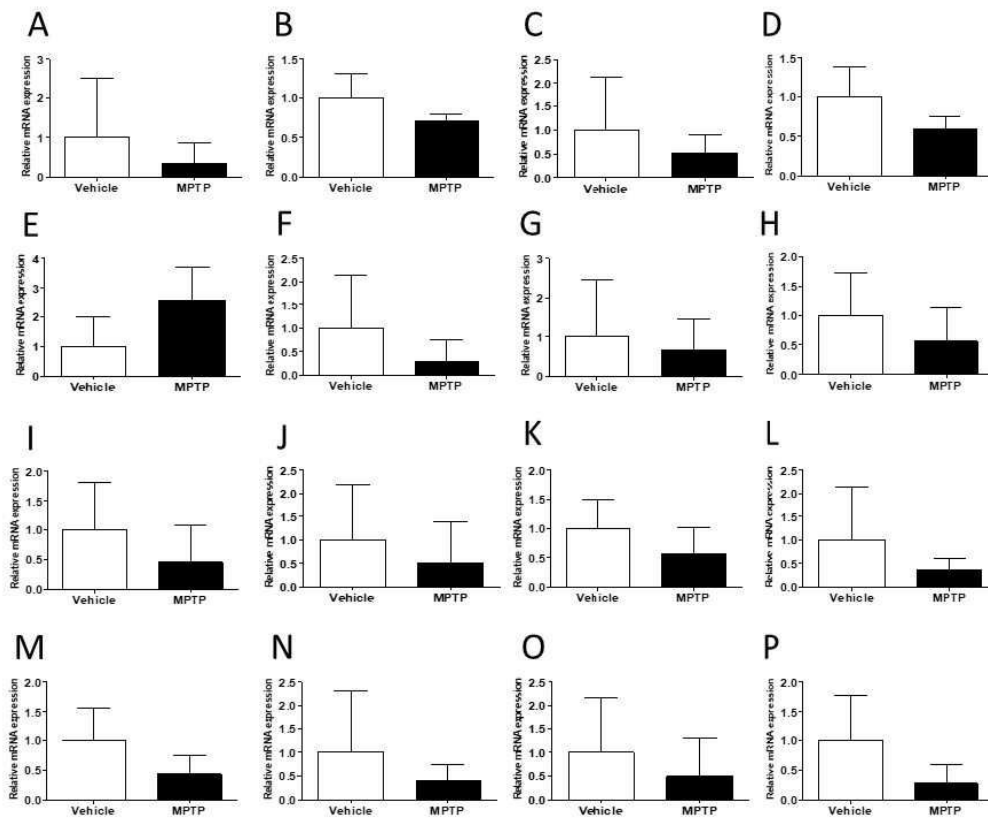
도면2b



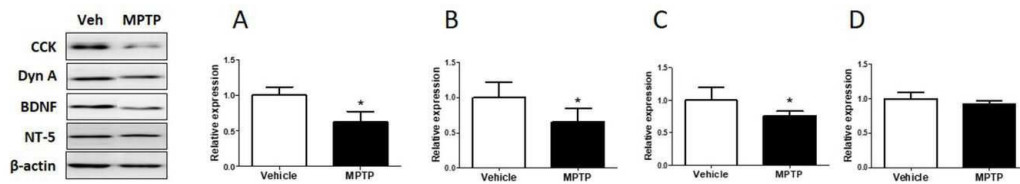
도면3a



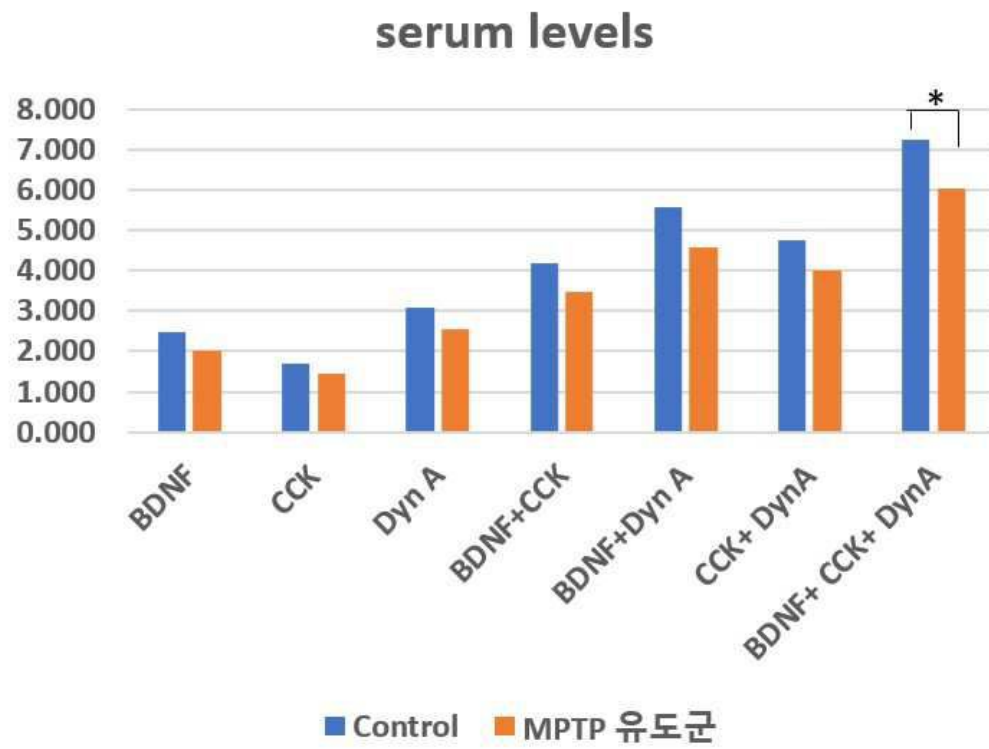
도면3b



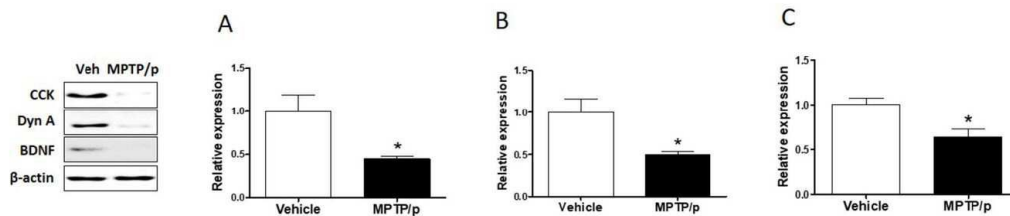
도면4



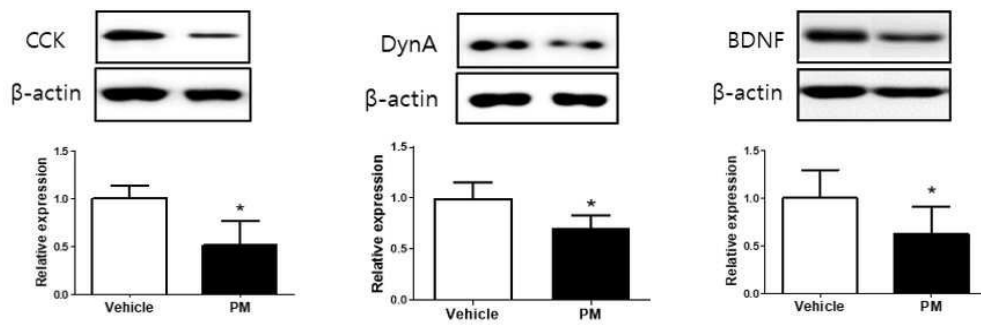
도면5



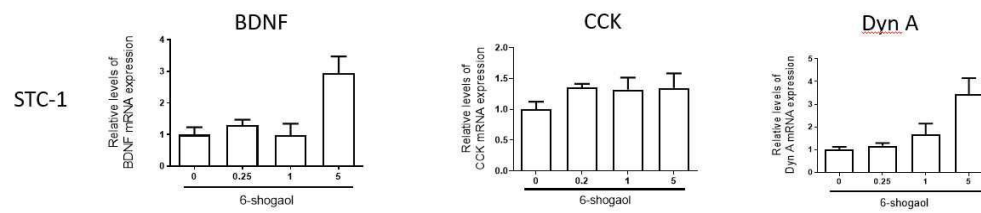
도면6



도면7



도면8a



도면8b

