



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0160833
(43) 공개일자 2024년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/614 (2015.01) A23K 10/22 (2016.01)
A23L 33/10 (2022.01) A61P 25/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/614 (2013.01)
A23K 10/22 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2023-0057640
(22) 출원일자 2023년05월03일
심사청구일자 2023년05월03일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김의경
경상남도 진주시 진주대로 501, 경상대학교 501동 307호 (가좌동)
황두현
경상남도 진주시 진주대로 501, 경상대학교 501동 307호 (가좌동)
(74) 대리인
최규환

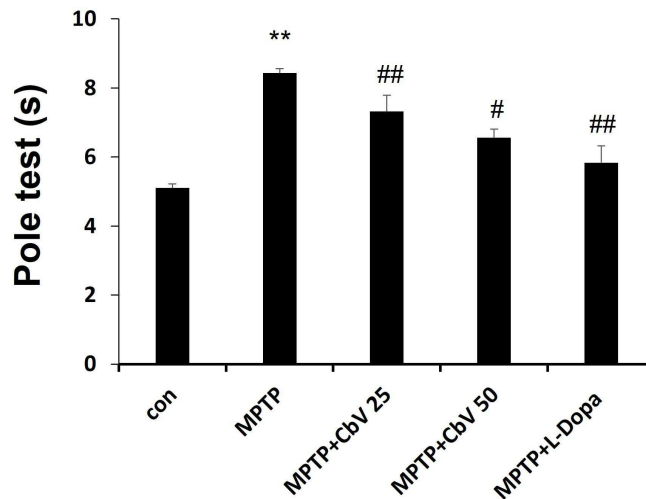
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 해파리 독소, 구체적으로 작은상자 해파리(*Carybdea brevipedalia*)로부터 획득한 해파리 독소가 1-메틸-4-페닐피리디늄 아이오다이드(1-methyl-4-phenylpyridinium iodide)에 의해 촉진된 신경세포의 사멸을 억제하고, 파킨슨이 유발된 동물모델에서, 감소된 운동능력을 향상시키며, 파킨슨이 유발된 동물모델의 뇌 조직에서 도파민 전구체 관련 효소인 TH(Tyrosine hydroxylase)의 발현을 증가시키는 효과가 우수하므로, 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2022.01)

A61P 25/16 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23V 2250/2042 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 해파리는 작은상자 해파리(*Carybdea brevipedalia*)인 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 해파리 독소는 신경세포의 사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 해파리 독소는 파킨슨병에 의해 감소된 운동능력을 향상시키는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

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

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 현탁액, 에멀전, 시럽 및 에어로졸 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물.

청구항 10

해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 사료 첨가제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 파킨슨병(parkinson's disease; PD)은 알츠하이머 치매와 더불어 대표적인 퇴행성 뇌신경질환의 하나로서, 도파민 호르몬을 분비하는 뇌의 흑질부위 신경세포가 점점 사멸해가면서 발병한다. 도파민은 뇌의 기저핵에 작용하

여 우리가 원하는 대로 몸을 정교하게 움직일 수 있도록 하는 중요한 신경 전달계 물질인데, 이를 분비하는 신경세포들이 사멸하면서 떨림증(tremor), 경직(rigidity), 운동완서(bradykinesia), 자세의 불안정(postural instability) 등의 운동성 장애가 생긴다.

[0003] 파킨슨병은 65세 인구에서 약 1% 정도가 발병하며 나이가 들수록 그 발병률이 증가하는 것으로 알려져 있으나, 정확한 원인을 알 수 없는 특발성(idiopathic)인 경우가 대부분이며, 일부 유전적 요인, 환경적 요인이 알려져 있다. 주요 병인으로는, 중뇌 흑질의 도파민 신경세포 사멸, 알파-시누클레인(α -synuclein) 단백질 응집, 신경염증 등이 있다.

[0004] 현재 초기 파킨슨병의 증상을 완화시키는 약물로는 레보도파(Levodopa, L-DOPA), 도파민 작용제(agonist), 항콜린 제제, 아만타딘 등이 있으나, 이들 약물은 지속적인 도파민 신경의 손실을 막아내지 못하므로 5~6년 내에는 약물 효과가 급격히 감소하며, 이후에는 이상운동증, 불면, 식욕감소 등의 부작용이 증가한다는 문제가 있다. 따라서, 파킨슨병을 치료할 수 있는 새로운 약물의 개발이 절실한 실정이다.

[0005] 한편, 해양식물, 해양동물 및 해양미생물로부터 생리활성물질을 분리하거나 그들의 시스템 공정과 기능을 이용하고자 하는 학문 또는 산업을 마린 바이오프로스펙팅(marine bioprospecting)이라고 한다. 자포동물문(Cnidaria)은 해파리, 산호, 말미잘 등이 포함되어 있는 동물군으로 11,000여 종 이상으로 구성되어 있으며 이들로부터 분리한 생리활성물질이 현재까지 3,000여 종 이상이다. 그 중 해파리는 지구 온난화 등으로 인해 전 세계적으로 출현빈도가 잦으며, 이들의 대량출현으로 어업(어망손상 및 어획량 감소), 발전소, 사람(해파리 독소)에게 많은 피해를 주고 있다.

[0006] 지금까지 해파리 독소의 약리 독성학적 작용은 별로 알려진 바가 없었으며, 최근에 그 작용 기작의 일부가 보고되고 있을 뿐이다. 일반적으로 독소를 가지는 동물에 대한 연구는 뱀, 전갈, 거미, 벌 등의 육상동물에 치우쳐져 있었다. 이에 반해, 해파리 독소에 대한 연구는 심순환기에 초점이 맞추어져 있고, 실제로 해파리 독소는 심장 및 순환기에 강한 억제작용을 나타내고 있다.

[0007] 해파리는 종류에 따라 독소의 종류가 달라 각기 다른 양상의 약리학적 작용을 나타내고 있지만, 아직 구체적으로 밝혀진 바는 없으므로, 해파리 독소를 이용하여 해파리를 해로운 동물이 아닌 마린 프로스펙팅의 자원으로 이용하고자 한다.

[0008] 한편, 한국공개특허 제2009-0114999호에는 봉독을 포함하는 간경변 치료용 약학조성물에 대해 개시하고 있으며, 한국등록특허 제1536215호에는 해파리 콜라겐 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 항산화, 항염, 미백 및 주름 개선용 화장료 조성물에 대해 개시하고 있지만, 본 발명의 해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대해서는 아직까지 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로, 해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하고, 해파리 독소, 구체적으로 작은상자 해파리(*Carybdea brevipedalia*)로부터 획득한 해파리 독소가 신경세포의 사멸을 억제하고, 파킨슨이 유발된 동물모델에서, 감소된 운동능력을 향상시키며, 파킨슨이 유발된 동물모델의 뇌 조직에서 도파민 전구체 관련 효소인 TH(Tyrosine hydroxylase)의 발현을 증가시키는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 사료 첨가제를 제공한다.

발명의 효과

[0014]

본 발명은 해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 해파리 독소, 구체적으로 작은상자 해파리(*Carybdea brevipedalia*)로부터 획득한 독소가 신경세포의 사멸을 억제하고, 도파민 전구체 관련 효소인 TH(Tyrosine hydroxylase)의 발현을 증가시키는 효과가 우수하고, 파킨슨이 유발된 동물모델에서, 막대실험, 악력 시험 및 좁은 빔 실험(time on narrow beam test)을 통해 감소된 운동능력을 향상시키는 효과가 우수한 것을 확인하였으며, 동물모델의 뇌 조직에서 해파리 독소 처리에 의해 도파민 전구체 관련 효소인 TH(Tyrosine hydroxylase)의 발현이 현저히 증가되는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0015]

도 1은 신경모세포종(human neuroblastoma) 유래 세포주인 SH-SY5Y에서, 해파리 독소(*Carybdea brevipedalia* venom, CbV; A) 및 MPP+(1-methyl-4-phenylpyridinium iodide; B)의 세포독성을 확인한 결과이다.

도 2는 SH-SY5Y에 MPP+를 처리하여 유도된 신경 독성모델에서, 해파리 독소(CbV) 처리에 따른 세포생존율 변화를 확인(A)하고, 세포를 관찰한 결과(B)이다. **은 무처리군 대비 MPP+ 단독 처리군의 세포생존율이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p<0.01$ 이다. #, ##은 MPP+ 단독 처리군 대비 CbV를 함께 처리한 군의 세포생존율이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, #은 $p<0.05$, ##은 $p<0.01$ 이다.

도 3은 SH-SY5Y에 MPP+를 처리하여 유도된 신경 독성모델에서, 해파리 독소(CbV) 처리에 따른 세포 형태를 DAPI 염색을 통해 확인(A)하고, 세포자살이 일어난 세포수를 정량한 결과(B)이다. **은 무처리군 대비 MPP+ 단독 처리군의 세포자살이 일어난 세포수가 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p<0.01$ 이다. #, ##은 MPP+ 단독 처리군 대비 CbV를 함께 처리한 군의 세포자살이 일어난 세포수가 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, #은 $p<0.05$, ##은 $p<0.01$ 이다.

도 4는 SH-SY5Y에 MPP+를 처리하여 유도된 신경 독성모델에서, 해파리 독소(CbV) 처리에 따른 TH(Tyrosine hydroxylase) 단백질 발현 변화를 웨스턴 블롯(Western blot)으로 확인한 결과이다.

도 5는 파킨슨병 동물모델을 이용한 실험 일정을 도식화한 것이다.

도 6은 MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) 투여를 통해 유도된 파킨슨병 동물모델에서, 해파리 독소가 투여된 마우스가 막대를 내려오기 위해 아래로 향하는 시간 변화를 확인한 막대 실험(Pole test) 결과이다. con은 아무것도 처리하지 않은 정상 대조군이고, MPTP는 MPTP를 투여하여 파킨슨병을 유도한 군이고, MPTP+CbV 25는 MPTP 및 $25\mu\text{g/kg}$ 의 CbV를 투여한 군이고, MPTP+CbV 50은 MPTP 및 $50\mu\text{g/kg}$ 의 CbV를 투여한 군이며, MPTP+L-Dopa는 MPTP 및 레보도파(L-Dopa)를 투여한 양성 대조군이다. **은 정상군 대비 파킨슨병 동물모델(MPTP)에서 막대를 내려오기 위해 아래로 향하는 시간이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p<0.01$ 이다. #, ##은 파킨슨병 동물모델 대비 파킨슨병 동물모델에 해파리 독소(CbV) 또는 L-Dopa를 투여한 군의 막대를 내려오기 위해 아래로 향하는 시간이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, #은 $p<0.05$, ##은 $p<0.01$ 이다.

도 7은 MPTP 투여를 통해 유도된 파킨슨병 동물모델에서, 해파리 독소가 투여된 마우스의 악력 강도 변화를 확인한 악력 시험(Grip strength) 결과이다. 그립 강도는 그램(g) 단위로 나타났다. con은 아무것도 처리하지 않은 정상 대조군이고, MPTP는 MPTP를 투여하여 파킨슨병을 유도한 군이고, MPTP+CbV 25는 MPTP 및 $25\mu\text{g/kg}$ 의 CbV를 투여한 군이고, MPTP+CbV 50은 MPTP 및 $50\mu\text{g/kg}$ 의 CbV를 투여한 군이며, MPTP+L-Dopa는 MPTP 및 레보도파(L-Dopa)를 투여한 양성 대조군이다. **은 정상군 대비 파킨슨병 동물모델(MPTP)의 악력이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p<0.01$ 이다. #, ##은 파킨슨병 동물모델 대비 파킨슨병 동물모델에 해파리 독소(CbV) 또는 L-Dopa를 투여한 군의 악력이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, #은 $p<0.05$, ##은 $p<0.01$ 이다.

도 8은 MPTP 투여를 통해 유도된 파킨슨병 동물모델에서, 해파리 독소가 투여된 마우스의 모터 조정 능력을 확인한 좁은 빔 실험(time on narrow beam test) 결과이다. 마우스를 바닥 위 100cm 높이에 위치한 고정식 목재의 좁은 평면 빔(1cm)에서 움직이도록 훈련한 후, 각 마우스가 한쪽 끝에서 다른 쪽 끝으로 걷는 시간을 기록하였다. con은 아무것도 처리하지 않은 정상 대조군이고, MPTP는 MPTP를 투여하여 파킨슨병을 유도한 군이고, MPTP+CbV 25는 MPTP 및 $25\mu\text{g/kg}$ 의 CbV를 투여한 군이고, MPTP+CbV 50은 MPTP 및 $50\mu\text{g/kg}$ 의 CbV를 투여한 군이며, MPTP+L-Dopa는 MPTP 및 레보도파(L-Dopa)를 투여한 양성 대조군이다. *은 정상군 대비 파킨슨병 동물모델(MPTP)의 한쪽 끝에서 다른 쪽 끝으로 걷는 시간이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것을 의미하며, $p<0.05$

이다. #은 파킨슨병 동물모델 대비 파킨슨병 동물모델에 해파리 독소(CbV) 또는 L-Dopa를 투여한 군의 한쪽 끝에서 다른 쪽 끝으로 걷는 시간이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것을 의미하며, $p < 0.05$ 이다.

도 9는 MPTP 투여를 통해 유도된 파킨슨병 동물모델의 뇌 조직에서, 해파리 독소(CbV) 투여에 따른 TH(Tyrosine hydroxylase) 발현 변화를 면역화학염색으로 확인한 결과이다. con은 아무것도 처리하지 않은 정상 대조군이고, MPTP는 MPTP를 투여하여 파킨슨병을 유도한 군이고, MPTP+CbV 25는 MPTP 및 $25\mu\text{g/kg}$ 의 CbV를 투여한 군이고, MPTP+CbV 50은 MPTP 및 $50\mu\text{g/kg}$ 의 CbV를 투여한 군이며, MPTP+L-Dopa는 MPTP 및 레보도파(L-Dopa)를 투여한 양성 대조군이다.

도 10은 MPTP 투여를 통해 유도된 파킨슨병 동물모델의 뇌 선조체에서, 해파리 독소(CbV) 투여에 따른 TH(Tyrosine hydroxylase) 단백질 발현 변화를 확인한 결과이다. L-Dopa는 양성 대조군으로 사용하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0017] 상기 해파리는 작은상자 해파리(*Carybdea brevipedalia*)인 것이지만, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 해파리 독소는
- [0019] 1) 해파리로부터 분리된 촉수를 세척한 후, 촉수에 바닷물을 첨가한 다음 자가분해하는 단계;
- [0020] 2) 상기 단계 1) 이후에, 상기 단계 1)의 자가분해물을 원심분리하여 자포가 포함된 상등액을 수집하고, 원심분리 후 남은 침전물에 다시 바닷물을 첨가한 후 자가분해한 다음 원심분리하여 상등액을 수집하는 과정을 1~4회 반복하는 단계;
- [0021] 3) 상기 단계 2)에서 획득된 상등액을 동결건조하여 자포 분말을 획득하는 단계;
- [0022] 4) 상기 단계 3)에서 획득한 자포 분말에 인산완충식염수 및 유리구슬을 첨가한 후, 진탕하여 물리적인 충격을 가한 다음 얼음을 이용해 냉각시키는 과정을 8~12회 반복하여 독소를 추출하는 단계; 및
- [0023] 5) 상기 단계 4) 이후에, 원심분리한 다음 상층액의 독소를 획득하는 단계;를 포함하여 제조될 수 있고,
- [0024] 바람직하게는
- [0025] 1) 해파리로부터 분리된 촉수를 바닷물로 세척한 후, 촉수 1 중량부에 대하여 2~4 중량부의 바닷물을 첨가한 다음 20~28시간 동안 자가분해하는 단계;
- [0026] 2) 상기 단계 1) 이후에, 상기 단계 1)의 자가분해물을 원심분리하여 자포가 포함된 상등액을 수집하고, 원심분리 후 남은 침전물에 다시 바닷물을 첨가한 후 20~28시간 동안 자가분해한 다음 원심분리하여 상등액을 수집하는 과정을 1~4회 반복하는 단계;
- [0027] 3) 상기 단계 2)에서 획득한 상등액을 동결건조하여 자포 분말을 획득하는 단계;
- [0028] 4) 상기 단계 3)에서 획득한 자포 분말 70mg에 인산완충식염수 0.8~1.2mL 및 유리구슬을 첨가한 후, 진탕하여 물리적인 충격을 가한 다음 얼음을 이용해 1분간 냉각시키는 과정을 8~12회 반복하여 독소를 추출하는 단계; 및
- [0029] 5) 상기 단계 4) 이후에, 원심분리한 다음 상층액의 독소를 획득하는 단계;를 포함하여 제조될 수 있으며,
- [0030] 더 바람직하게는
- [0031] 1) 해파리로부터 분리된 촉수를 바닷물로 세척한 후, 촉수 1 중량부에 대하여 3 중량부의 바닷물을 첨가한 후, 24시간 동안 자가분해하는 단계;
- [0032] 2) 상기 단계 1) 이후에, 상기 단계 1)의 자가분해물을 원심분리($1,000\times g$, 10분)하여 자포가 포함된 상등액을 수집하고, 원심분리 후 남은 침전물에 다시 바닷물을 첨가한 후 24시간 동안 자가분해한 다음 원심분리($1,000\times g$, 10분)하여 상등액을 수집하는 과정을 3~4회 반복하는 단계;
- [0033] 3) 상기 단계 2)에서 획득한 상등액을 동결건조하여 자포 분말을 획득하는 단계;
- [0034] 4) 상기 단계 3)에서 획득한 자포 분말 70mg에 인산완충식염수 1mL 및 유리구슬을 첨가한 후, 3000rpm으로 40초 동안 진탕하여 물리적인 충격을 가한 다음 얼음을 이용해 1분간 냉각시키는 과정을 10회 반복하여 독소를 추출

하는 단계; 및

- [0035] 5) 상기 단계 4) 이후에, 원심분리(12000×g, 30분)한 다음 상층액의 독소를 획득하는 단계;를 포함하여 제조되는 것이지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명의 일 구현 예에서, 상기 해파리 독소는 1-메틸-4-페닐피리디늄 아이오다이드(1-methyl-4-phenylpyridinium iodide)에 의해 촉진된 신경세포의 사멸을 억제하고, 파킨슨병에 의해 감소된 운동능력을 향상시킬 수 있으며, 파킨슨이 유발된 동물모델의 뇌 조직에서 도파민 전구체 관련 효소인 TH(Tyrosine hydroxylase)의 발현을 증가시킬 수 있지만, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명에서의 용어 '예방'이란 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여에 의해 파킨슨병의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하고, '치료'란 상기 약학 조성물의 투여에 의해 파킨슨병의 의심 및 발병 개체의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0038] 본 발명의 약학 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 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 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다.
- [0039] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 상기 약학 조성물의 효과적 투여를 위한 투약 경로는 특별히 제한하지 않고, 적절하게 투약 경로를 채택하여 환자에게 사용될 수 있다. 예를 들어, 경구, 직장, 경피, 비경구(피하, 근육, 혈관), 경막, 국부, 흡입 및 기타의 투여방법이 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명에 따른 상기 약학 조성물의 투여형태로는 제제학 분야에 알려진 통상의 방법에 따라 다양한 제형을 통해서 투여할 수 있는데, 바람직한 일례로는 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 현탁액, 에멀전, 시럽 및 에어로졸 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 '약학적으로 유효한 양'이란 의학적 예방 또는 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 예방 또는 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적으로 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 중요하다.
- [0043] 또한, 본 발명은 해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0044] 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있지만, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 건강기능식품 조성물을 그대로 첨가하거나

다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 양은 그의 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0046] 상기 건강기능식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 상기 건강기능식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0047] 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 식품, 특히 기능성 식품으로 제조될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분 이외에 천연 탄수화물 또는 향미제를 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로스 등), 올리고당, 폴리사카라이드(예컨대, 텍스트린, 시클로텍스트린 등) 또는 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리스리톨 등)인 것이 바람직하다. 상기 향미제는 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등)와 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.

[0048] 상기 건강기능식품 조성물 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 함유할 수 있다. 이러한 상기 첨가되는 성분의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강기능식품 조성물 100 중량부에 대하여, 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0049] 또한, 본 발명은 해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.

[0050] 본 발명의 수의학적 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 수의학적 조성물에 포함될 수 있는 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 세탄올, 스테아릴알콜, 유동파라핀, 솔비탄모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 메틸파라벤, 프로필파라벤 및 광물유를 들 수 있다.

[0051] 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향신료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있는데, 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있고, 제형은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀, 좌제, 멸균 주사용액, 멸균 외용제 등의 형태일 수 있다.

[0052] 본 발명에 따른 수의학적 조성물의 유효한 양은 동물의 개체에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 질환 내지 상태의 중증도, 개체의 연령, 체중, 건강상태 또는 성별에 따른 본 발명의 유효성분에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 기간, 상기 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 다른 조성물을 포함한 요소 및 기타 생리 내지 수의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0053] 또한, 본 발명은 해파리 독소를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 사료 첨가제를 제공한다.

[0054] 상기 유효성분은 파킨슨의 예방 또는 개선을 목적으로 사료 조성물로 첨가할 수 있다. 상기 사료용 조성물은 사료 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다.

[0055] 본 발명에서 용어 '사료'는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한 끼 식의 성분을 의미할 수 있다. 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비 제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

- [0057] 이하, 제조에 및 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 제조에 및 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.
- [0059] **제조예 1. 해파리 독소 추출**
- [0060] 2021년 8월 대한민국 삼천포 연안 해역에서 작은상자 해파리(*Carybdea brevipedalia*)를 채집한 후, 촉수만 분리한 다음 즉시 얼음에 넣었다. 그 후, 해부된 촉수를 4℃의 깨끗한 바닷물(4% sea salt; 시그마 알드리치 S9883)로 행구어 잔해물을 제거한 다음 촉수 1 중량부 대비 3 중량부의 깨끗한 바닷물(4% sea salt; 시그마 알드리치 S9883)을 넣고 4℃에서 부드럽게 회전시키며 24시간 동안 자가분해시켰다. 24시간 후, 원심분리(1,000×g, 10분)하여 자포(nematocyst)가 포함된 상등액을 수집한 후, 상등액을 -70℃에서 보관하였고, 다시 남아있는 촉수에 바닷물을 첨가한 후, 24시간 동안 추가로 자가분해를 수행하였다. 상기 과정을 3~4일 동안 반복한 후, 획득된 상등액을 동결건조하여 획득된 자포(nematocyst)를 분말화한 후, -70℃에서 보관하였다.
- [0061] 상기 동결 건조된 자포(nematocyst) 분말 70mg에 차가운 인산완충식염수(PBS, pH7.4, 4℃) 1mL 및 유리구슬(glass beads, 직경 0.5mm)을 혼합한 후, 3000rpm으로 40초 동안 진탕하여 물리적인 충격을 가한 다음 얼음을 이용해 1분간 냉각시키는 과정을 10회 반복하여 독소를 추출하였다. 그 후, 추출된 자포세포 잔해물과 독소를 분리하기 위해 4℃에서 30분 동안 원심분리(12000×g)한 다음 상층액의 독소만 분리하여 해파리 독소(CbV)로 사용하였다.
- [0063] **실시예 1. SH-SY5Y에 MPP+를 처리하여 유도된 신경 독성모델에서, 해파리 독소 처리에 따른 세포생존율 변화 확인**
- [0064] 1) SH-SY5Y에서, 해파리 독소(CbV) 또는 MPP+의 세포독성 확인
- [0065] 신경모세포종(human neuroblastoma) 유래 세포주인 SH-SY5Y는 시험관 내 파킨슨병 모델을 확립하기 위해 사용하였다. SH-SY5Y 세포는 37℃, 5% CO₂ 농도의 가습 인큐베이터에서, 10%(v/v) FBS, 100U/mL 페니실린(penicillin) 및 100μg/mL 스트렙토마이신(streptomycin)이 포함된 DMEM을 사용하여 배양하였다.
- [0066] 세포독성을 확인하기 위해, 1×10⁵ 세포수/mL의 밀도로 24웰 플레이트에 세포를 분주한 후, 24시간 동안 배양한 다음, 다양한 농도의 CbV 및 MPP+를 처리하여 24시간 동안 재배양하였다. 24시간 후, MTT 시약을 각 웰에 50μl 씩 처리하였고, 3시간 동안 반응시킨 후, 배지를 제거하고, 500μl의 DMSO를 첨가하여 보라색 포마진을 용해시켰고, 마이크로플레이트 리더를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0067] 세포독성은 세포생존율로 확인하였고, 세포생존율은 하기 식 1과 같이, 정상군의 값을 control로 하고 이때의 O.D.(Optical density)값을 세포의 생존도가 100% 라고 정의하고, 나머지 군의 O.D. 값을 상대치로 환산하여 계산하였다. 결과는 3회 반복 실험한 평균값으로 나타냈다.
- [0068] [식 1]
- [0069] 세포생존율=(실험군 O.D. 값/ 정상군 O.D. 값)×100
- [0071] 그 결과, 도 1에 개시된 바와 같이 해파리 독소(CbV)는 3ng/mL까지 세포생존율에 전혀 영향을 미치지 않아, 이후 실험에서는 해파리 독소를 3ng/mL 농도까지 사용하였다.
- [0072] MPP+는 2mM 처리시 세포생존율이 50%로 나타나, 이후 실험에서는 MPP+의 처리 농도를 2mM로 사용하였다.
- [0074] 2) SH-SY5Y에 MPP+를 처리하여 유도된 신경 독성모델에서, 해파리 독소(CbV) 처리에 따른 세포보호 효과 확인
- [0075] 세포보호 효과는 세포생존율로 확인하였다.
- [0076] 상기와 동일한 조건으로 1×10⁵ 세포수/mL의 밀도로 24웰 플레이트에 분주한 후, 24시간 동안 배양한 후, 2mM MPP+를 3시간 동안 전처리한 뒤 CbV를 0.3, 1 및 3ng/mL 농도로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 광

학 현미경을 통해 세포를 관찰한 다음 상기와 동일한 방법으로 세포생존율을 확인하였다.

[0077] 그 결과, 도 2에 개시된 바와 같이 광학 현미경 하에서 SH-SY5Y 세포에 MPP+가 처리된 그룹에서 세포 사멸과 관련된 형태학적 변화인 세포 수축 및 퇴화가 관찰되었고, CbV를 함께 처리한 그룹에서는 MPP+에 의해 유도된 형태학적 변화가 개선되는 것을 확인하여, CbV가 MPP+에 의해 유도된 세포독성에 대한 세포보호 효과를 가져 세포 생존율이 향상되는 것을 확인하였다.

[0079] 3) DAPI 염색

[0080] 세포독성과 세포자살(apoptosis)이 관련이 있는지를 확인하기 위해, DAPI 염색을 통해 핵 염색을 실시하였다.

[0081] 상기와 동일한 조건으로 1×10^5 세포수/mL의 밀도로 24웰 플레이트에 분주한 후, 24시간 동안 배양한 다음 2mM MPP+를 3시간 동안 전처리한 뒤 CbV를 0.3, 1 및 3ng/mL 농도로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포를 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)로 염색한 후, 세포 형태 및 사멸 정도를 확인하였다.

[0082] 구체적으로, 세포를 PBS로 세척한 후, 실온에서 10분 동안 4%(v/v) 포르말데히드로 고정한 후, 5분 동안 PBS에서 Triton X-100 0.2%(v/v)와 함께 인큐베이션한 다음, 세포를 실온에서 15분 동안 DAPI(1 μ g/mL)와 함께 인큐베이션한 후, 커버-슬립핑하고 현미경(Termo)으로 관찰하였다. 세포자살(apoptosis) 세포의 형태학적 변화는 DAPI 염색에 의해 가시화되었고, 대표적인 이미지는 200x 대물렌즈를 사용하여 현미경(Termo)으로 포착되었다. DAPI 양성 세포는 현미경 하에서 400x 배율로 무작위로 선택된 10개의 필드에서 정량화한 후 계산하였다.

[0083] 그 결과, 도 3에 개시된 바와 같이 SH-SY5Y 세포에 CbV 만을 처리한 그룹에서는 핵 모양의 변화 및 세포자살이 일어나지 않았으나, MPP+만 처리된 그룹에서는 핵이 깨어지고 응축되었으며, 핵 크기 역시 매우 감소하여 세포자살이 일어난 세포수가 크게 증가됨을 확인하였다. 반면, MPP+ 및 CbV를 처리한 그룹에서는 농도 의존적으로 세포자살이 일어난 세포수가 크게 줄어들었다.

[0085] **실시예 2. SH-SY5Y에 MPP+를 처리하여 유도된 신경 독성모델에서, 해파리 독소(CbV) 처리에 따른 TH(Tyrosine hydroxylase) 발현 변화 확인**

[0086] TH(Tyrosine hydroxylase)는 도파민 생합성의 속도 제한 효소이며, TH 발현의 감소는 도파민 합성 감소를 초래하고 파킨슨병으로 이어진다. 따라서 해파리 독소 처리에 따른 도파민 전구체 관련 효소인 TH의 단백질 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 확인하였다.

[0087] 구체적으로, 프로테아제 억제제 카테일을 포함하는 RIPA(radioimmunoprecipitation assay) 완충액(TransLab, Daejeon, Korea)을 사용하여 세포로부터 단백질을 추출한 후, 브래드 포드 분석을 통해 단백질 농도를 측정하였다. 동량의 단백질 샘플을 SDS-PAGE 샘플 버퍼(62.5mM Tris-HCl pH 6.8, 10% 글리세롤, 2% SDS, 0.01% 브로모페놀 블루)와 혼합하고 10분 동안 끓인 후, 각 샘플을 12% SDS-PAGE(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gradient gel) 영동법으로 분리하였고, PVDF(polyvinylidene fluoride) 멤브레인으로 옮겼다. 멤브레인은 5%(w/v) BSA에서 블로킹(blocking)한 다음, 4℃에서 하룻밤 동안 1차 항체로 반응시킨 후, TBS-T에서 10분씩 3회 세척하였다. 그 후, 2차 항체와 함께 1시간 동안 반응시킨 다음 세척한 뒤 ECL(enhanced chemiluminescence system, Amersham Biosciences, UK)로 시각화하고, Chemi doc XRS(Bio-Rad, CA USA)를 사용하여 분석하였다. 단백질 밴드 분석은 Hewlett-Packard 스캐너와 NIH Image 소프트웨어(Image J, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 수행되었다.

[0088] 그 결과, 도 4에 개시된 바와 같이 아무것도 처리하지 않은 대조군 세포에 비해 MPP+ 단독 처리군은 TH 발현이 유의하게 감소한 반면, MPP+ 및 CbV를 처리한 군은 MPP+ 단독 처리군과 비교하여 TH 발현을 증가시켰다.

[0090] **실시예 3. 파킨슨병 동물모델에서, 해파리 독소(CbV) 투여에 의한 운동능력 향상 효과 확인-행동분석**

[0091] 1) 실험동물 사육

[0092] 실험동물은 C57BL/6 마우스(8주령, 21~25g)을 샘타코(Osan, Korea)에서 공급받아 일주일 동안 실험동물실 환경에 적응 및 순화를 시켰다. 동물 사육장의 온도는 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도는 $55 \pm 10\%$ 를 유지하였으며, 조명은 12시간을

주기로 조절하였다. 물과 고형사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2) 파킨슨병 동물모델 확립 및 해파리 독소(CbV) 처리

MPTP는 카테콜아민(catecholamine)성 신경만을 선택적으로 파괴하는 신경독성 물질로, 파킨슨병 연구용 동물모델에 널리 사용되는 물질이다. MPTP는 체내에 흡수되어 뇌혈관 장벽(brain-blood barrier)을 통과한 후, 정상 세포(astrocyte)에서 MAO-B(monoamineoxidase B)에 의해 MPP+(1-methyl-4-phenylpyridinium)로 대사되어 기저핵의 흑질에 있는 도파민성 신경세포에만 선택적으로 작용한다.

C57BL/6 마우스를 난괴법으로 하기 표 1과 같이 5개 그룹(그룹당 6마리)으로 그룹화하였다.

표 1

	그룹명
1	정상 대조군(control)
2	MPTP 그룹
3	MPTP+CbV 25 μ g/kg 그룹
4	MPTP+CbV 50 μ g/kg 그룹
5	MPTP+ L DOPA 10mg/kg 그룹(양성 대조군)

정상 대조군은 마우스에 식염수를 14일 동안 매일 복강내(i.p) 주사하였다. MPTP 그룹은 마우스에 연속 5일 동안 매일 30mg/kg의 최종 농도로 MPTP(PBS에 용해됨)를 i.p 주사한 다음, 나머지 9일 동안은 식염수로 처리하였다. MPTP+CbV 또는 L-DOPA 그룹은 마우스에 4일간 CbV 또는 L-DOPA를 전처리 주사하였고, 5일 동안은 주사 1시간 후 MPTP를 투여하였으며, 다음 5일 동안은 CbV 또는 L-DOPA를 각각 i.p 주사하였다.

실험 종료 시점에 행동 테스트를 실시했고, 행동 변화 분석 후, 동물을 마취시켜 희생시키고, 즉시 해부하였다. 실험 일정은 도 5에 도식화한 바와 같다.

3) 막대 실험(Pole test)

마우스를 표면이 거친 수직 막대(직경 1cm, 높이 50cm) 위에 놓고 막대 바닥에 도달할 때까지의 시간(초)을 기록하였다. 실제 테스트 전 마우스를 훈련했으며, 세 번 시도의 평균 시간을 기록하였다.

그 결과, 도 6에 개시된 바와 같이 정상 대조군 대비 파킨슨병 동물모델에서 증가된 막대 바닥에 도달할 때까지의 시간이 CbV 또는 L-Dopa를 투여한 경우 감소하여 운동능력이 향상된 것을 확인할 수 있었다.

4) 악력 시험(Grip strength)

악력 시험은 악력 측정기(JD-A-22, Jeungdo, Instruments, Inc., Korea)를 사용하여 수행하였다. 마우스 꼬리를 잡고 앞발로 그리드를 잡도록 한 후, 뒷다리가 그리드와 접촉하지 않도록 마우스를 꼬리로 들어올린 후, 더 이상 그리드를 잡을 수 없을 때까지 마우스를 꼬리로 부드럽게 뒤로 당겼다. 그립 강도는 그램(g) 단위로 점수화하였고, 3회 평균을 계산하였다.

그 결과, 도 7에 개시된 바와 같이 정상 대조군 대비 파킨슨병 동물모델에서 감소된 악력이 CbV 또는 L-Dopa를 투여한 경우 다시 증가한 것을 확인하였다.

5) 좁은 빔 실험(time on narrow beam test)

좁은 빔 실험은 모터 조정을 측정하기 위해 수행되었다. 먼저, 마우스를 바닥 위 100cm 높이에 위치한 고정식 목재의 좁은 평면 빔(1cm)에서 움직이도록 훈련한 다음 마우스가 한쪽 끝에서 다른 쪽 끝으로 걷는 시간을 기록하였다. 결과는 각 그룹의 동물에 대해 세 번 반복하여 마우스에 걸린 평균 총 시간(s)으로 표시하였다.

[0112] 그 결과, 도 8에 개시된 바와 같이 정상 대조군 대비 파킨슨병 동물모델에서 마우스가 막대를 내려오기 위해 아래로 향하는 시간이 증가된 반면, CbV 또는 L-Dopa를 투여한 경우 마우스가 막대를 내려오기 위해 아래로 향하는 시간이 다시 감소한 것을 확인하였다.

[0114] 실시예 4. 파킨슨병 동물모델에서, 해파리 독소(CbV) 투여에 의한 도파민 전구체 관련 효소 증가 효과 확인

[0115] 1) TH의 면역화학염색

[0116] 상기 실시예 3의 행동실험 종료 후, 마우스 뇌 조직을 적출한 후, 즉시 10% 인산염 완충 포르말린으로 24시간 동안 고정하였고, 파라핀 섹션을 처리하였다. 24시간 후, 30% 수크로스(sucrose)에서 24시간을 넣어둔 다음 조직절편기(cryomicrotome)를 이용하여 5 μ m의 두께로 절단하여 흑질(substantia nigra, SN) 부분이 포함된 부위를 획득하였다. 파라핀 절편을 3% 과산화수소 용액에 넣고 실온의 암실에서 20분 동안 배양한 다음 탈색 진탕기에서 5분 동안 총 3회 세척하였다. 세척 후, 조직을 실온에서 30분 동안 3% BSA와 함께 인큐베이션한 다음 용액을 제거하고 조직 절편을 1차 TH 항체와 함께 4℃에서 16시간 동안 배양하였다. 배양 후, 절편을 PBS에서 3회 세척한 다음, Vectastain Elite ABC kit(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 이용하여 2차 항체와 ABC 시약을 처리한 후 DAB 기질(substrate)을 넣어 발색을 유도한 후, 염색된 도파민 신경세포를 관찰하였다. 섹션에서 양성 항체 발현은 짙은 갈색이었고 이미지는 현미경으로 확인하였다.

[0117] SN에서 TH-면역 반응성 뉴런의 수를 확인하였고, Image J(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 도파민성 뉴런 점유의 강도를 정량화하였다.

[0118] 그 결과, 도 9에 개시된 바와 같이 CbV를 투여한 실험군은 MPTP에 의해 감소된 흑질에서의 TH 발현을 파킨슨 질환 치료제인 L-dopa를 투여한 실험군과 유사한 수준으로 유의하게 증가시켰다.

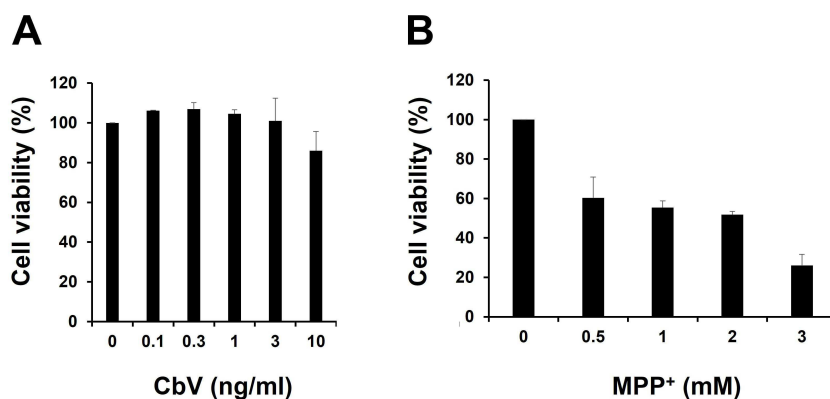
[0120] 2) 웨스턴 블롯 분석

[0121] 파킨슨병 동물모델의 뇌 선조체에서 CbV 투여에 의한 도파민 전구체 관련 효소인 TH의 발현변화를 웨스턴 블롯 분석으로 확인하였다. 웨스턴 블롯 분석은 실시예 2와 동일한 방법으로 진행하였다.

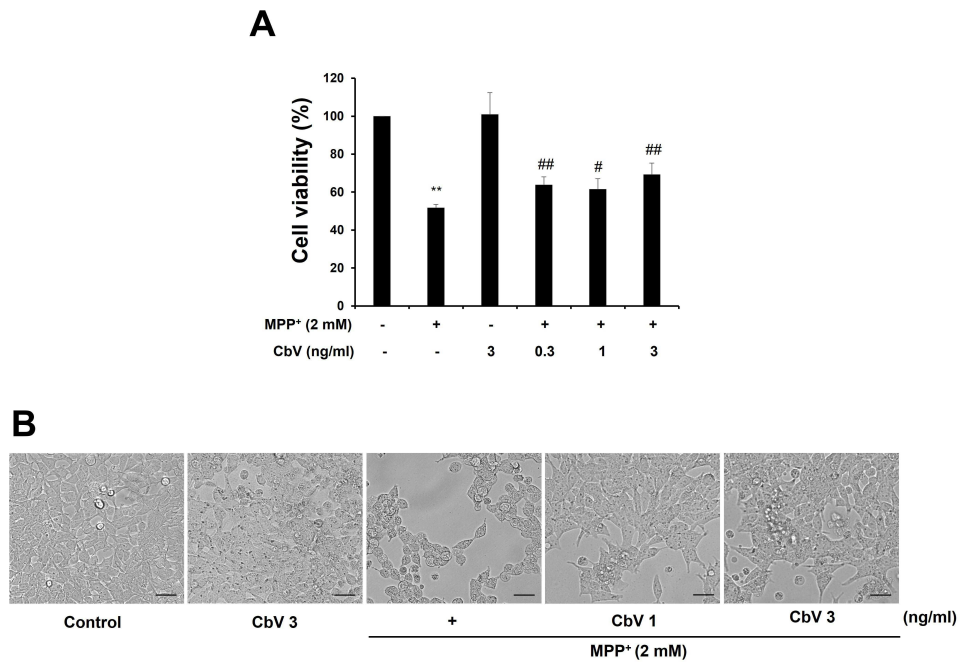
[0122] 그 결과, 도 10에 개시된 바와 같이 CbV를 투여한 실험군은 MPTP에 의해 감소된 TH의 발현을 농도의존적으로 증가시켰다.

도면

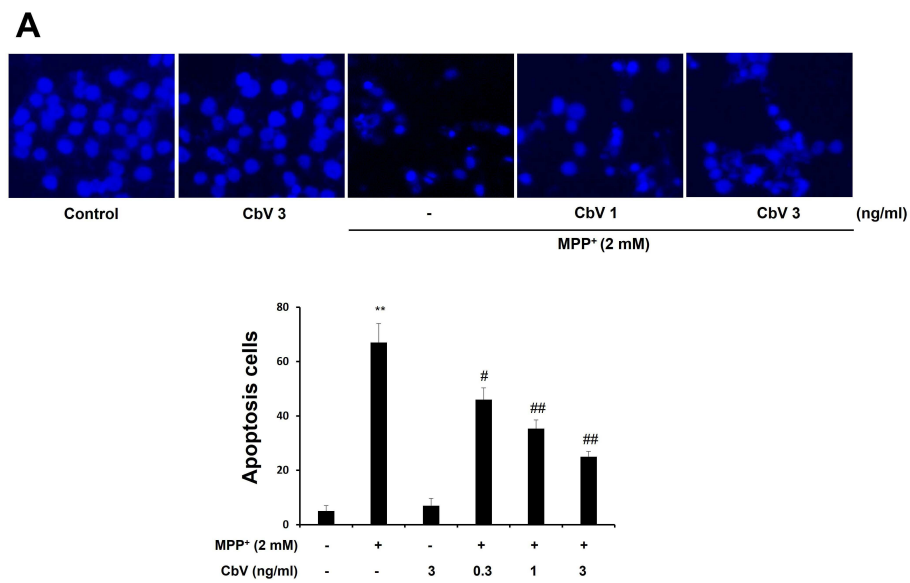
도면1



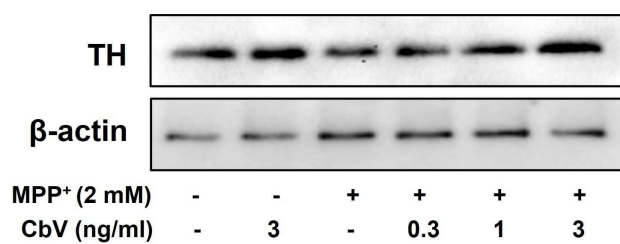
도면2



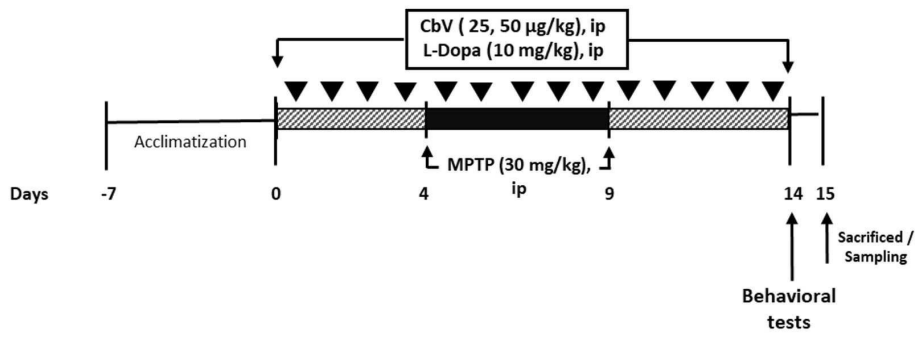
도면3



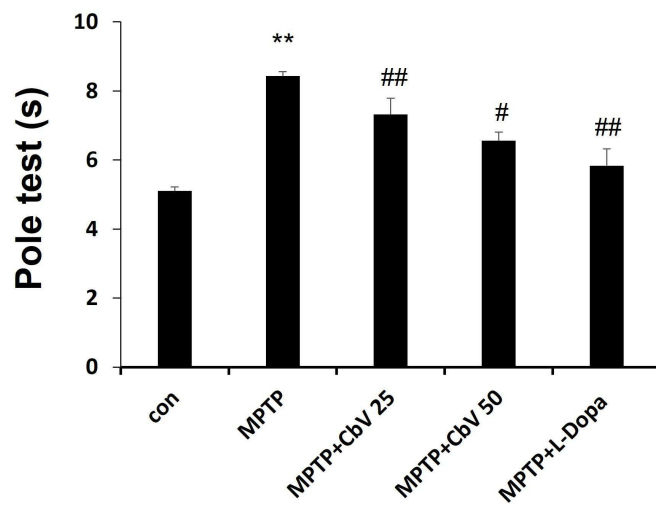
도면4



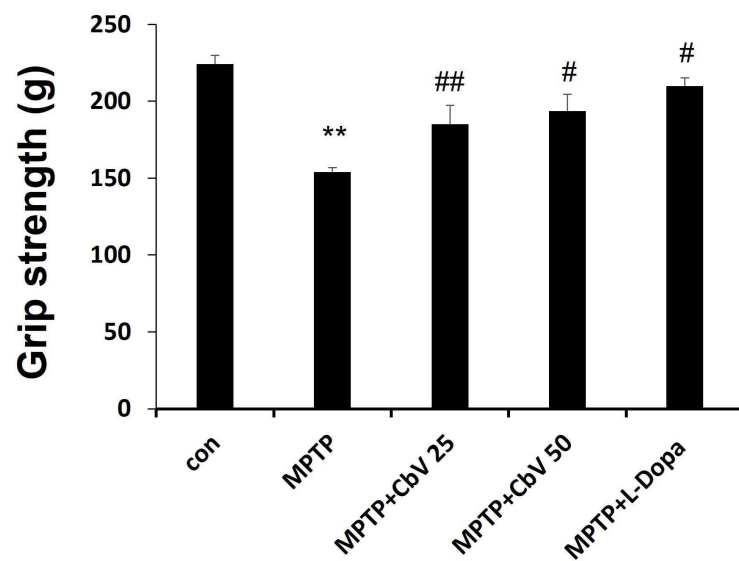
도면5



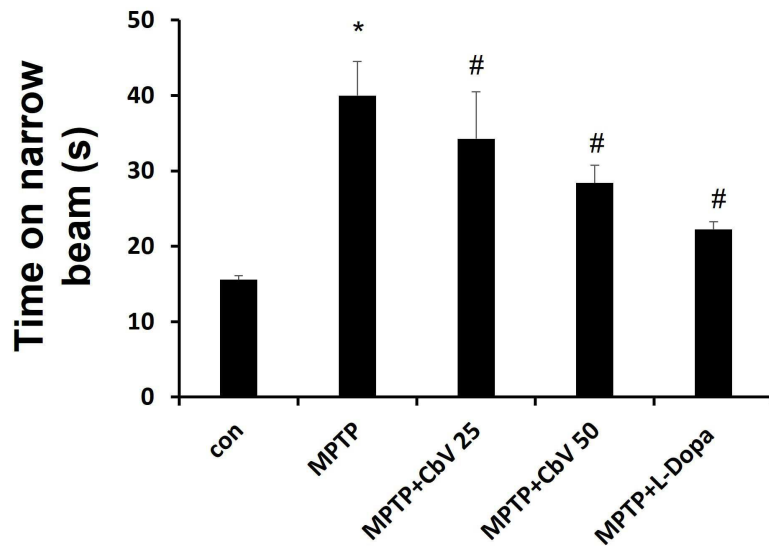
도면6



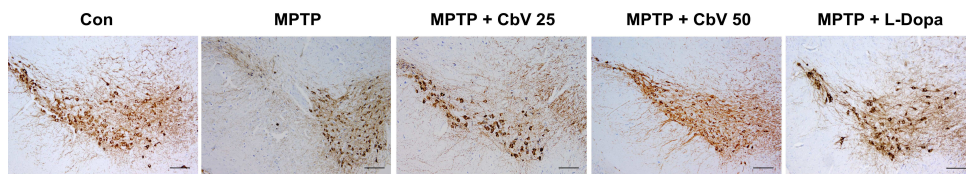
도면7



도면8



도면9



도면10

