



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0120883
(43) 공개일자 2022년08월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4745 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 25/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4745 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2021-0024615
(22) 출원일자 2021년02월24일
심사청구일자 2021년02월24일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김명옥
경상남도 진주시 가호로44번길 7, 102동 303호(호
탄동, 대동디지털황토아파트)
(74) 대리인
최규환

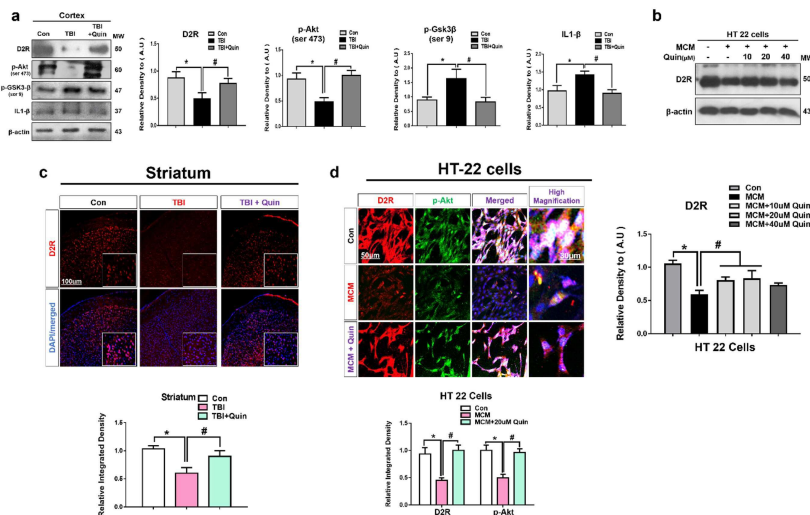
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 퀴피롤을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 퀴피롤을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 유효성분인 퀴피롤이 뇌손상 마우스의 D2R 발현량을 증가시키며, 신경아교증 및 신경세포 사멸을 감소시키고, 뇌혈관 장벽 파괴 및 병변의 부피를 회복시킬 뿐만 아니라, 시냅스 기능 장애를 개선시키는 효과가 있어, 신경염증 질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 의약품 또는 건강기능식품으로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)

A61P 25/28 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711119484

과제번호 2020M3E5D9080660

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 뇌질환극복연구사업(R&D)

연구과제명 면역제어 타겟 신규 물질발굴 및 효능 검증 ; 신개념 파킨슨병 예방치료제 개발에

응용

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경상대학교

연구기간 2020.07.01 ~ 2024.12.31

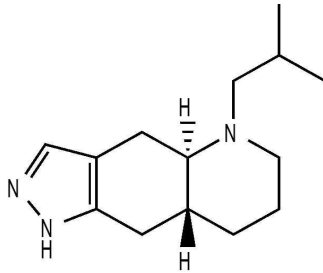
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 퀴피롤 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 신경염증 질환은 파킨슨병, 루게릭 질환, 헌팅턴병, 크로이츠펬트야콥병, 외상 후 스트레스 장애, 인지장애, 기억력 손상, 근위축성측색경화증단신경염, 다발성 단신경염, 다발신경염, 다발성 경화증, 신경모세포종, 허혈성 뇌졸중 및 알츠하이머 중에서 선택된 하나 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 신경염증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유효성분은 D2R 발현량을 증가시키며, 신경아교증 및 신경세포 사멸을 감소시키는 것을 특징으로 하는 신경염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

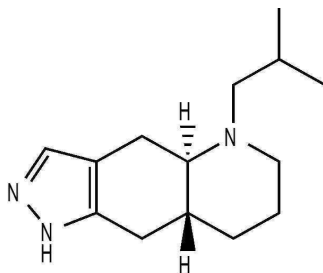
청구항 4

제1항에 있어서, 상기 유효성분은 뇌손상 마우스의 뇌혈관 장벽 파괴 및 병변의 부피를 회복시키고, 시냅스 기능 장애를 개선시키는 것을 특징으로 하는 신경염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

하기 화학식 1의 퀴피롤 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 신경염증 질환의 예방 또는 치료방법.

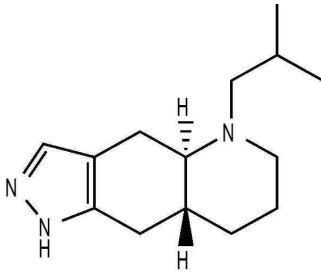
[화학식 1]



청구항 6

하기 화학식 1의 퀴피롤 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

[화학식 1]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 쿼피롤을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 중추신경계는 신경세포와 신경교세포로 이루어져 있다. 신경교세포는 전체 뇌세포의 약 90%를 차지하며, 부피로는 뇌 전체의 약 50%를 차지하고 있다. 상기 신경교세포는 다시 성상세포(astrocytes), 소교세포(microglia) 및 희소돌기아교세포(oligodendrocytes)의 세 종류로 분류할 수 있다. 이 중, 소교세포는 분화된 대식세포(specialized macrophage)의 일종으로, 뇌에 널리 분포한다. 소교세포는 조직 잔해 및 죽은 세포들을 삼키는 식세포로서 작용할 뿐 아니라 뇌의 생체방어활동에 참여하는 역할을 한다. 또한, 소교세포는 만성뇌질환에 있어서 다양한 신경 독소 및 전염증 매개체를 분비함으로써 신경염증 질환을 증가시켜 신경세포사 및 탈수초의 원인이 된다. 뇌손상 또는 신경성 염증 자극에 대한 반응으로, 소교세포는 산화질소(nitric oxide, NO), 반응성 산소종(reactive oxygen species, ROS), 전염증성 사이토카인, 프로스타글란딘 및 종양 괴사 인자- α (TNF- α) 등을 생산함으로써 신경염증 질환에 관여한다. 활성화된 소교세포는 손상된 신경 조직 영역으로 이동하며 미생물 및 세포파편(cell debris)을 포식하고 파괴한다. 그러나 염증세포로서의 소교세포의 역할이 항상 유익한 것은 아니며, 현재 조절되지 않은 소교세포의 활성화는 지속적으로 과도한 신경염증을 유발하여 퇴행성 신경질환을 포함하는 다양한 중추신경계 병리의 원인이 되는 것으로 여겨지고 있다. 기능적으로 활성화된 소교세포는 염증매개물질을 생성 및 분비하여 신경세포 사멸을 초래하며, 이러한 소교세포의 활성화 및 신경염증과 관련된 질환으로는 뇌허혈, 알츠하이머, 파킨슨병, 헌팅턴 질환, 근위축성 측색경화증, 학습장애, 인지장애, 기억력 손상 등의 다양한 신경학적 및 신경퇴행성 질환이 알려져 있다.

[0003] 한편, 도파민 수용체는 몇 가지 형태(예로, D1, D2, D3, D4 및 D5 등)로 구분할 수 있다. 이들 도파민 수용체는 각각 뇌의 특정 영역에서 다른 기능에 참여한다는 것이 알려져 있으며, 이들 수용체에 특이적으로 결합할 수 있는 화합물을 이용하여 관련 질환을 치료하기 위한 기술로는 한국공개특허 제2016-0088886호에 자폐증 스펙트럼 장애의 치료에 사용되는 도파민 D3 수용체 길항제로서의 크로모네 유도체가 개시되어 있고, 한국등록특허 제0991043호에 도파민 D2 수용체에 의한 도파민성 수용체 발달의 조절 방법 및 이의 조성물이 개시되어 있으나, 아직까지 본 발명의 쿼피롤을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대해 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 쿼피롤을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하고, 본 발명의 유효성분인 쿼피롤이 뇌손상 마우스의 D2R 발현량을 증가시키며, 신경아교증 및 신경세포 사멸을 감소시키고, 뇌혈관 장벽 파괴 및 병변의 부피를 회복시킬 뿐만 아니라, 시냅스 기능 장애를 개선시키는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 화학식 1의 쿼피롤 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0006] 또한, 본 발명은 화학식 1의 퀴피롤 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 신경염증 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 화학식 1의 퀴피롤 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명은 퀴피롤을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 유효성분인 퀴피롤이 뇌손상 마우스의 D2R 발현량을 증가시키며, 신경아교증 및 신경세포 사멸을 감소시키고, 뇌혈관 장벽 파괴 및 병변의 부피를 회복시킬 뿐만 아니라, 시냅스 기능 장애를 개선시키는 효과가 있는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 퀴피롤이 손상된 뇌 및 HT22 세포에서 D2R 발현정도를 조절하는 것을 확인한 웨스턴 블랏 및 공초점 현미경 분석 결과이다. a는 뇌손상 마우스의 피질에서 발현되는 D2R, p-Akt, p-GSK3- β 및 IL1- β 의 웨스턴 블랏 사진과 이를 정량화한 그래프이고, b는 HT22 세포에서 D2R의 웨스턴 블랏 결과이며, c는 뇌손상 마우스의 선조체에서 확인한 D2R 발현량 변화를 확인한 면역형광분석 결과이고, d는 HT22 세포에서 확인한 D2R 및 p-Akt 공존(co-localization)을 확인한 결과이다.

도 2는 뇌손상 후 퀴피롤 처리에 따른 p-Akt/p-GSK3- β 및 IL1- β 의 신호 전달을 활성화함으로써 신경염증 감소 효과를 확인한 것으로, a는 선조체에서 확인한 p-GSK3- β (ser9) (FITC-label, 초록색) 및 IL1- β (TRITC-label, 빨간색)의 면역형광분석 결과이고, b와 c는 피질에서 확인한 p-Akt(ser9) 및 IL1- β 의 면역형광분석 결과이다.

도 3은 퀴피롤의 처리에 따른 신경아교증 감소 및 뇌 손상 후, D2R/Akt 발현량 감소를 확인한 결과이다. a는 TBI 마우스 모델에서 퀴피롤 처리에 따른 GFAP 및 D2R 발현량을 피질에서 확인한 공초점현미경 분석 결과이고, b는 뇌 손상 후 퀴피롤 처리에 따른 Iba-1 및 p-Akt 발현량을 피질에서 확인한 공초점현미경 분석 결과이며, c는 뇌 손상 후 퀴피롤 처리에 따른 Iba-1 발현량을 선조체에서 확인한 공초점현미경 분석 결과이고, d는 뇌손상 후 퀴피롤 처리에 따른 피질에서 확인한 GFAP 및 Iba-1의 웨스턴 블랏 사진 및 이를 정량화한 그래프이다.

도 4는 퀴피롤이 뇌손상 후 마우스 뇌의 신경세포 사멸을 억제하는 효과를 확인한 것으로, a는 뇌손상 마우스 피질에서 p-JNK, Bax, Bcl-2 및 PARP-1의 발현량을 분석한 면역블랏 및 이를 정량화한 그래프이며, b는 피질과 선조체에서 caspase-3의 면역활성을 확인한 면역형광 분석결과이고, c는 피질에서의 Nissl 염색으로 확인한 활성화된 신경 수를 확인한 결과이다.

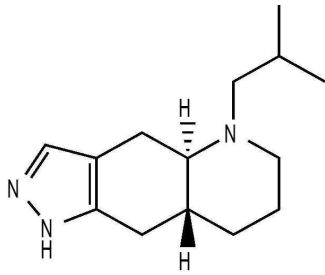
도 5는 뇌 손상 후, 퀴피롤 처리에 따른 뇌혈관벽에 내포된 ZO-1 및 CD31의 발현량을 확인한 결과이다. a는 뇌손상 마우스의 피질에서 ZO-1(TRITC-label, 빨간색) 및 CD31(FITC-label, 초록색) 발현량을 공초점현미경으로 분석한 면역형광 이미지 및 이를 정량화한 그래프이고, b는 TBI 마우스 뇌수술 후 Nissl 염색 이미지와 퀴피롤 처리 여부에 따른 뇌손상 부위의 부피를 비교한 결과이다.

도 6은 퀴피롤의 뇌 손상 후 시냅스 단백질 감소를 조절하는 효과를 확인한 결과로, a 와 b는 뇌손상 후 피질 및 선조체에서 확인한 PSD-95 및 SNAP-23의 발현량을 확인한 공초점현미경 분석 결과이고, c는 뇌손상 마우스의 피질에서 확인한 PSD-95 및 Sanp-23 발현량으로 웨스턴 블랏 사진과 이를 정량화한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 화학식 1의 퀴피롤 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

화학식 1



[0011]

[0012]

본 발명의 약학 조성물에서, 상기 신경염증 질환은 파킨슨병, 루게릭 질환, 헌팅턴병, 크로이츠펠트야콥병, 외상 후 스트레스 장애, 인지장애, 기억력 손상, 근위축성측색경화증단신경염, 다발성 단신경염, 다발신경염, 다발성 경화증, 신경모세포종, 허혈성 뇌졸중 및 알츠하이머 중에서 선택된 하나 이상의 질환인 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다. 상기 유효성분은 D2R 발현량을 증가시키며, 신경아교증 및 신경세포 사멸을 감소시키고, 뇌손상 마우스의 뇌혈관 장벽 파괴 및 병변의 부피를 회복시키며, 시냅스 기능 장애를 개선시키는 것이 특징이다.

[0013]

상기 약학 조성물의 유효성분 이외에 약학적으로 허용가능한 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 중에서 선택된 1종 이상의 담체를 더 함유할 수 있으며, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 계면활성제, 결합제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 및 보존제 중에서 선택된 1종 이상의 보조제를 더 함유할 수 있다.

[0014]

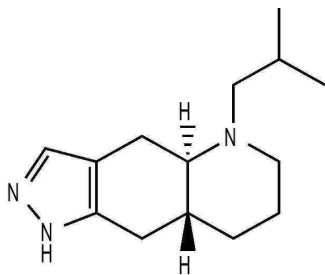
상기 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 경구 또는 비경구의 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 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. 또한, 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0015]

또한, 본 발명은 하기 화학식 1의 쿼피롤 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 신경염증 질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

[0016]

[화학식 1]



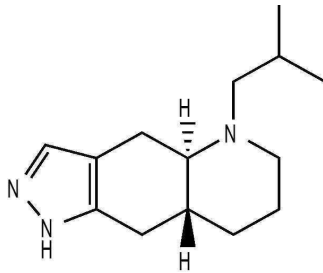
[0017]

[0018]

또한, 본 발명은 하기 화학식 1의 쿼피롤 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경

염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[화학식 1]



상기 건강기능식품 조성물은 음료, 환, 정제(tablet), 캡슐제(capsule), 산제 중에서 선택된 어느 하나의 식품으로 제조하거나, 다른 식품 또는 식품의 성분에 첨가하여 제조될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다.

본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 일례로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 중에서 선택된 어느 하나의 형태일 수 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

상기 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 및 천연 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알킨산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있고, 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 수크로스 및 같은 디사카라이드; 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 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.

[재료 및 방법]

1. 실험동물

생후 7주차 25~30g 무게의 수컷 야생형 C57BL/6N 마우스를 Samtako Bio Korea로부터 분양받아, 경상대학교 동물보호 센터에서, 12시간 명암 주기, 50~70% 습도 및 음식과 물을 자유급이하는 환경에 적응시켰다. 상기 마우스들은 일정 적응 기간 후에 임의적으로 대조군, TBI군 및 TBI+퀸피롤군으로 분류하였다.

2. 퀸피롤(quinpirole) 투여

퀸피롤 대신 식염수를 투여한 대조군. 자창을 낸 외피 부상군, 자창을 낸 외피 부상과 함께 퀸피롤 투여군으로 나누었다.

퀸피롤은 증류수에 용해시켜, 매일 복강 내로 7일 동안 kg 당 1mg의 양을 투여하였다. 각 실험군마다 웨스턴 블랏(n=6) 및 공초점 실험(n=6)을 실시하였다. 퀸피롤은 Tocris-Cookson(Bristol, UK)으로부터 구매하였다.

3. 자창 외피 손상

동물 모델의 뇌 피질에 대한 자창 손상을 일으켰다. 롬폰(Rompun) (0.05ml/100g 체중) 및 조레틸(Zoletil)(0.1 ml/100g 체중)로 상기 동물을 마취시켰다. 마우스를 뇌정위 고정 장치(stereotaxic apparatus)에 위치시키고, 중앙에 종단으로 절개를 넣어 두개골을 노출시켰다. 두개골에 브레그마(bregma) 뒤쪽으로 1mm, 중앙선에서 측면으로 2mm인 4mm의 지름으로 원형 개두술을 진행하였으며, 치과용 드릴이 사용되었다. 자창 손상을 입히기 위하여, 날카로운 메스를 우반구 3mm 부분 마우스의 뇌에 삽입하였고, 뇌 안에서 1분 동안 유지한 다음 천천히 제거하였다. 파열된 두개골에 대해 본왁스(bone wax)를 사용하였고, 이어 실크를 이용한 봉합으로 손상 부위를 닫았

다. 이후, 마우스를 조심스럽게 놓고 가열램프를 이용하여 마취로부터 완전히 깨어날 때까지 지속적인 보온을 제공하였고, 이후 추가적인 실험을 실시하였다.

[0033] 4. 단백질 추출

[0034] 자창 외피 손상을 입힌 마우스를 마취하고, 조심스럽게 안락사에 이르게 하였다. 수술 후, 뇌를 즉시 수집하여 드라이아이스에서 냉동하였다.

[0035] TBI 뇌 조직의 동측 피질은 조직들로부터 단백질을 추출하기 위하여, PRO-PREP 단백질 추출 용액(iNtRON Biotechnology)을 이용하여 균질화하였고, 원심분리한 후, -80℃ 이하에서 보관하였다. 이후, 시료를 4℃에서 13,000rpm으로 25분 동안 원심분리해 획득한 상층액을 수집하여 면역 블롯팅(immunoblotting)을 위해 -80℃에서 보관하였다.

[0036] 5. 웨스턴 블랏 분석

[0037] 웨스턴 블랏 분석은 동측 피질에서 추출한 단백질 20~30μg에 대한 동등한 양을 2× Sample Buffer (Invitrogen)와 혼합시켰다. 단백질을 분리하기 위하여, 단백질의 동등한 양을 10% SDS 폴리아크릴아마이드(10% SDS polyacrylamide) 겔 전기 영동법(gel electrophoresis)으로 단백질을 분리하고, 5% 탈지 우유를 이용하여 블로킹(blocking)함으로써 PVDF 멤브레인으로 이동시켰다. 이후, 상기 PVDF 멤브레인으로부터 탈지유를 제거하기 위하여 약하게 세척하였다. 1차 항체는 하룻밤 동안 4℃에서 1:1000 비율을 갖는 항-(D2R), 항-p-GSK3-β (Glycogen synthase kinase 3)(Ser9), p-Akt(Ser473), 항-GFAP(항-Glial fibrillary acidic protein β), 항-Iba-1(항-ionized calcium-binding adapter molecule 1), 항-p-JNK(항-phospho-c-Jun N-terminal kinase), 항-IL-1β(항-interleukin-1β), 항-caspase-3, 항-PARP-1(항-poly(ADP-ribose) polymerase-1), 항-Bax, 항-Bcl-2 및 항-β-actin으로, Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였다. 항-beta actin은 로딩컨트롤로서 사용한 것이다. 24시간 후 상기 PVDF 멤브레인은 1~2시간 적절하게 1×TBST 내에서 희석된 겨자무 과산화효소 결합(horseradish peroxidase-conjugated) 2차 항체와 함께 배양되었으며, 면역 블롯팅은 제조사(Amersham Pharmacia Biotech)의 지시에 따라 ECL 화학발광 시스템을 이용하여 실시하였다.

[0038] 6. 뇌조직 수집 및 시료 준비

[0039] 뇌 조직 수집을 위하여, 마우스를 마취시켰으며 경심관류로 식염수에 이어 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)를 주입한 후, 4% 파라포름알데히드를 이용하여 48시간 동안 고정시켰다. 이후, 뇌 조직을 20% 수크로스 용액에 48시간 동안 담갔다. 이후, 뇌를 OCT 혼합물(A.O USA)에 수직으로 고정시켰다. 해당 뇌는 진동마이크로톰(vibratome)(Leica, Germany)을 이용해 14μm 크기로 횡단면으로 만들어져 -80℃에 저장되었다.

[0040] 7. 면역형광 염색

[0041] 조직 슬라이드는 실온에서 건조되었고, 이어 PBS 0.01M 용액을 이용해 8~10분 동안 두 번 씻어냈다. 그 조직 슬라이드들은 프로테아제-K(proteinase-K)에서 5분 동안 배양된 후에 PBS 용액으로 5분 동안 두 번 씻어냈다. 다음으로, 단백질은 5% 정상 혈청(goat/rabbit) D2R 및 0.1% Triton X-100을 0.01M PBS 용액 내에서 1시간 동안 블로킹되었다. 상기 조직 슬라이드들을 1차 항체(1:100)와 함께 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 항-p-GSK3-β(ser9), 항-p-Akt, 항-D2R, 항-IL1-β, 항-Caspase-3, 항-PSD-95, 항-SNAP-23, 항-ZO-1 및 항-CD31 항체를 이용하여 면역 형광 검출을 하였다.

[0042] 상기 조직 슬라이드들은 2차 항체(항-goat, 항-rabbit 및 항-mouse)가 1:100로 표지된 FITC(fluorescein isothiocyanate) 및 TRITC(tetramethylrhodamine isothiocyanates)를 처리하고 2시간 동안 배양되었다.

[0043] DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)는 8~10분 동안 핵을 검출하는데 이용되었다. 그 슬라이드들을 형광 봉입제(fluorescent mounting medium)를 함께 이용해 커버슬립으로 덮었다. 공초점레이저주사현미경(confocal laser scanning microscopy)인 FluoView MPE-1000 (Olympus, Tokyo, Japan)이 이미지를 얻는데 사용되었으며, 대표되는 필드(representative field)에서 최대 형광강도가 얻어졌다. 그 이미지는 Tiff 형식으로 변환되었고, 동측의 피질과 선조체(striatum) 영역에 대한 형광 강도가 측정되어, ImageJ win32 software로 계산되었다.

[0044] 8. 뇌 병변의 부피에 대한 평가

[0045] TBI군과 TBI+퀵폴군의 피질 영역의 병변 부피를 측정하기 위하여, 그 조직 슬라이드들을 cresyl violet으로 염색하였고, 이미지는 단순한 광학현미경으로 얻어, 이미지 J 소프트웨어를 이용해 분석하였다. TBI 및 TBI+퀵폴군의 손상된 영역에 대해 윤곽을 표시한 다음 계산하였다. 그 병변의 부피는 두 부분 간의 거리에 의한 동

측의 반구 영역의 합을 곱하여 계산되었다.

9. Nissl 염색

신경 세포의 사멸 및 뇌 손상 이후 병변에 대한 분석을 위하여, Nissl 염색을 실시하였다.

조직 슬라이드들을 0.01M PBS로 15분 동안 두 번 씻어냈고, 이어 cresyl violet 용액을 10~15분 동안 처리하였다. 상기 슬라이드는 증류수를 이용해 씻어냈으며, 70%, 95% 및 100%의 에탄올을 이용해 건조하였다. 이후 그 조직들을 자일렌(xylene) 용액에서 3분 동안 씻어냈으며, 형광 봉입제를 슬라이드에 가한 후 커버슬립을 덮었다. 단순 광학현미경을 이용해 슬라이드들을 확인하였고 이미지를 얻었다.

10. 세포 배양

마우스 해마 세포주 HT22 및 소교세포주 BV2를 키워 10% 소태아혈청(fetal bovine serum)을 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)에서 유지시켰다. 최종 제제는 추가적인 1% 페니실린/스트렙토마이신 설페이트로 구성된다. 세포들은 5% 이산화탄소 공급이 가능한 장치인 습윤한 세포 배양 환경의 인큐베이터에서 배양되었으며, 세포 배지는 매 2일이 지난 후에 규칙적으로 교체하였다. 세포들은 80% confluency 이상인 것을 확인한 후 실험적 대상으로 하였다.

11. 소교세포의 배지 조건

마우스 소교세포주 BV-2를 세포 배양 배지에서 80% confluency 이상까지 배양하였으며, 리포폴리사카라이드($1\mu\text{g}/\text{ml}$)를 처리하였다. 24시간 후에, 배지를 흡입하여 세포와 잔해물을 제거하기 위해 원심분리하였다. 추가적인 생화학 분석을 위하여 맑은 상층액을 수집하였다.

12. 통계 분석

웨스턴 블랏 밴드의 결과들을 스캔하여 시그마 쉘 소프트웨어(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용한 농도계(densitometry)로 분석하였다. 이미지 J 소프트웨어(National Institutes of Health, Bethesda, MD)는 면역조직화학적 분석을 위해 사용되었고, 얻어진 값들은 평균 $\pm$ 표준편차로 계산되었다. 그 데이터 분석은 일원분산 분석 ANOVA를 이용하여 수행되었고 대조군 TBI 및 실험군(키프롤군)의 비교를 위하여 분산의 사후분석을 수행하였다. 데이터 계산 및 그래프에 대해서는 프리즘 5 소프트웨어를 이용하였다. 통계적 유의성에 대한 값들은 $p < 0.05$ 로 간주하여 *는 대조군 및 뇌 손상군 사이의 유의한 차이를, #은 뇌 손상군과 키프롤군 사이의 유의한 차이를 의미하는 것으로 하였다.

실시예 1. 손상된 뇌 및 HT22 세포에서 키프롤의 D2R 발현량 조절 효과 확인

본 실시예 1에서는 웨스턴 블랏 및 공초점 현미경 분석을 통해, 동측의 피질 및 선조체에 대한 뇌 손상이 있는 마우스에서 D2R 발현량과 관련하여 키프롤이 미치는 영향을 분석하였다.

그 결과, 도 1에 개시한 바, 대조군 대비 TBI(traumatic brain injury; 외상성 뇌손상)군에서 D2R 발현량이 감소하였으나, 이에 대비하여 $1\text{mg}/\text{kg}$ 의 키프롤 투여군에서 D2R 발현량이 유의미하게 증가하였다.

또한, GSK3- β 의 탈 조절은 신경 염증 과정의 활성화에 의한 신경퇴행성 질환의 발현 및 진행에 중요한 단계이므로, 이와 관련하여 본 실시예 1에서 TBI 처리 후, p-Akt 및 p-GSK3- β 및 IL-1 β 의 발현량을 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 그 결과 손상된 마우스의 뇌 동측 피질에서 Ser9의 p-GSK3- β 및 IL-1 β 발현량이 증가하였고, Ser473의 p-Akt 발현량이 감소되었으나, 키프롤 투여군에서는 뇌 손상 마우스의 동측피질에서 Akt/GSK3- β 인산화가 조절되었으며, IL-1 β 발현량이 감소되었다.

또한, HT22 세포주에 MCM(microglial conditioned media)을 처리한 후, 24시간 후에 상기 HT22 세포에 $10\mu\text{M}$, $20\mu\text{M}$ 및 $40\mu\text{M}$ 의 키프롤을 처리하였고, 웨스턴 블랏으로 MCM이 유도하는 염증 매개체들이 신경 D2R 악화와 관련이 있다는 것을 확인하였다.

또한, $10\mu\text{M}$ 또는 $20\mu\text{M}$ 의 키프롤 처리가 MCM의 독성 효과를 감소시킨다는 것과 p-Akt의 조절 활성화와 관련되어 있는 것으로 추측되는 D2R을 유의미하게 조절한다는 것을 공초점 현미경을 이용하여 확인하였다. 또한, D2R의 면역 활성화도가 대조군보다 TBI군에서 감소되었으나, 이에 대비하여 키프롤군은 동측 선조체(striatum)에서 D2R의 면역 활성화도가 증가하였다.

한편, p-GSK3- β (Ser9)와 IL-1 β 에 대한 공초점 현미경 분석에서, TBI 마우스의 동측 선조체에서 p-GSK3- β 및 IL-1 β 발현량이 증가된 것을 확인하였으며, post-TBI 키프롤 처리군은 p-GSK3- β 및 IL-1 β 발현량을 유의미하게

감소하였다(도 2a).

[0062] TBI 마우스의 동측 피질에서 p-Akt 및 IL-1 β 발현량을 분석하였는데, TBI 군에서는 대조군 대비 p-Akt 발현량이 감소하였으며, IL-1 β 의 발현량은 증가하였으나, 이에 대비 본 발명의 쿼피롤 처리군은 p-Akt 발현량이 증가하였으며, IL-1 β 의 발현량은 감소하였다(도 2b, 2c).

[0063] **실시예 2. 쿼피롤의 신경아교증 감소 및 뇌 손상 후 D2R/Akt 발현량 감소 효과 확인**

[0064] 본 실시예2에서는 쿼피롤 처리가 우리들의 TBI 마우스 모델에서 신경염증 반응을 억제할 수 있는지 알아보고자 하였다.

[0065] 뇌 손상 후 동측 또는 선조체에서 D2R 및 p-AKT 발현량을 확인하기 위하여, GFAP(glial fibrillary acidic protein)인 성상세포(astrocyte)의 활성화에 대한 지표와 Iba-1(ionized calcium-binding adaptor molecule 1)인 미아교세포(microglia) 활성화에 대한 평가를 실시하였다.

[0066] 면역형광 분석 결과, 대조군 대비 TBI군의 동측 피질에서 GFAP의 면역활성도가 유의미하게 증가되었고, D2R의 발현량이 유의미하게 감소되었으며, 이에 대비하여 post-TBI 쿼피롤군은 GFAP의 면역활성도가 유의미하게 감소되었고, D2R의 발현량이 유의미하게 증가되었다(도 3a).

[0067] p-Akt 발현량은 iba-1와 동시에 분석하였으며, 면역 형광 분석 결과, 대조군 대비 TBI군의 뇌 동측 피질에서 p-Akt의 발현량이 유의미하게 감소되었고, Iba-1의 발현이 유의미하게 증가되었다. 이에 대비하여, post-TBI 쿼피롤군의 p-Akt의 발현량은 유의미하게 증가되었고, Iba-1의 발현이 유의미하게 감소되었다(도 3b).

[0068] 또한, TBI군의 동측 선조체에서 iba-1의 발현량을 확인하였다. 그 결과 대조군 대비 TBI군의 iba-1의 발현량이 유의미하게 증가하였으며, 이에 대비하여 post-TBI 쿼피롤군의 iba-1 발현량은 유의미하게 감소하였다(도 3c).

[0069] 웨스턴 블랏 분석의 결과에서도, 대조군 대비 TBI군의 Iba-1 및 GFAP 발현량이 증가하였으며, 이에 대비하여 TBI 쿼피롤군의 Iba-1 및 GFAP 발현량은 감소하였다.

[0070] 이 결과로부터 대조군보다 TBI군에서 활성화된 소교세포 및 성상세포(astrocyte) 수가 증가하였다는 것으로 판단하였다. 또한, 교질세포의 활성화는 TBI군에서보다 쿼피롤군에서 유의미하게 감소하였다. 쿼피롤의 처리가 잠재적으로 TBI에 의해 유도된 교질세포의 활성을 개선시킨다는 것으로 판단하였다. 교질세포의 이러한 응축은 쿼피롤 처리에 의한 성상세포 및 소교세포에서 D2R 및 p-Akt 조절과 관련되어 있을 것으로 판단하였다.

[0071] **실시예 3. 쿼피롤의 뇌 손상 후 신경세포 사멸의 감소 효과 확인**

[0072] 웨스턴 블랏 분석을 이용하여, 동측 피질에서 신경세포 사멸 지표인 p-JNK, Bax, Bcl-2 및 PARP1의 발현량을 확인하였다.

[0073] 그 결과 대조군 대비 뇌 손상된 TBI군에서 p-JNK, Bax 및 PARP1의 발현량이 유의미하게 증가하였으며, Bcl-2의 발현량이 유의미하게 감소하였고, 이에 대비하여, 쿼피롤을 처리한 군은 p-JNK, Bax 및 PARP1의 발현량이 유의미하게 감소하였으며, Bcl-2의 발현량이 유의미하게 증가하였다(도 4a).

[0074] 면역 형광 분석 결과, 대조군 대비 뇌 손상 마우스(TBI군)에서 피질 및 선조체에서 caspase-3의 발현량이 증가하였다. TBI군 대비, 쿼피롤을 처리한 군은 동측 피질 및 선조체에서 caspase-3의 발현량이 유의미하게 감소하였다(도 4b).

[0075] 또한, 신경세포 사멸을 평가하기 위해 Nissl 염색을 실시하였는데, 그 결과 대조군 대비 뇌 손상 마우스 군에서 동측 피질에서 살아 있는 신경세포 수가 감소되었으며, 이에 대비하여 쿼피롤군의 동측 피질에서 살아 있는 신경세포 수가 유의미하게 증가되었다(도 4c).

[0076] 상기 결과들로부터 뇌 손상의 충격이 동측 피질 및 선조체로 퍼지게 되고, 쿼피롤은 뇌가 손상된 마우스의 동측에서, D2R 활성화에 의한 신경세포 사멸을 억제하는 것으로 판단하였다.

[0077] **실시예 4. 쿼피롤에 의해 유도된 뇌 손상 이후 혈액-뇌 장벽 파괴 및 병변 부피의 회복**

[0078] 본 실시예 4에서는 TBI 마우스 모델에서 BBB(blood-brain barrier)의 손상과 파괴된 BBB의 회복에 대한 쿼피롤의 가능한 역할에 대해 평가하였다. 공초점 현미경 상에서는, 대조군 대비 뇌 손상을 입은 마우스군에서의 ZO-1(zonula occludens-1) 및 CD31 단백질 발현량이 유의미하게 감소되었으며, 이에 대비한 쿼피롤 처리군은 ZO-1(zonula occludens-1) 및 CD31 단백질 발현량이 유의미하게 증가하였다(도 5a).

[0079] 본 실시예 4에서는 TBI 처리 후 7일째 되는 날에 병변 부피를 한번 더 평가하였다. 뇌가 손상된 마우스로부터 얻은 샘플에 대한 조직병리적 검사를 시행한 결과, 타박상(contusion) 및 병변부피가 현저하게 증가되어 있었으나, 퀴놀론 처리군에서는 유의미하게 이들이 감소된 것을 확인하였다(도 5b).

[0080] 실시예 5. 퀴놀론의 뇌 손상 이후 시냅스 기능 장애 개선 효과 확인

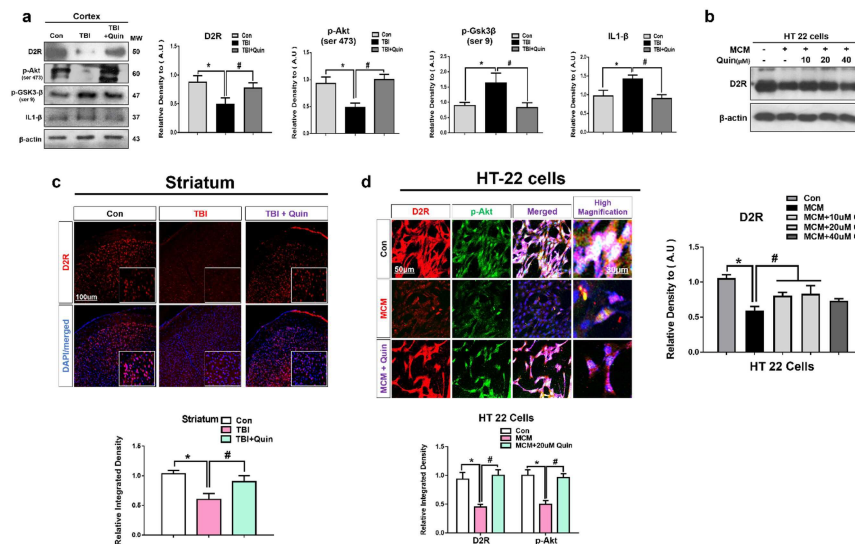
[0081] 본 실시예 5에서는 TBI 마우스의 동측 피질 및 선조체에서 시냅스 단백질 SNAP-23(synaptosomal-associated protein 23) 및 PSD-95(post-synaptic density protein 95)의 발현량을 평가하였다.

[0082] 그 결과 대조군 대비 TBI군에서 PSD-95 및 SNAP-23의 발현량이 유의미하게 감소하였고, 이에 대비하여 퀴놀론군에서는 손상된 뇌에서 소실된 시냅스 단백질 PSD-95 및 SNAP-23의 발현을 유의미하게 증가시키는 것을 확인하였다(도 6a, 6b).

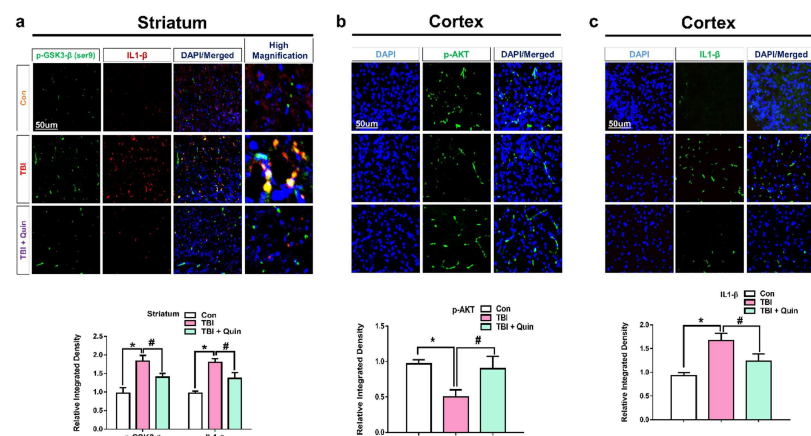
[0083] 웨스턴 블랏 분석에서, 대조군 대비 뇌 손상이 있는 마우스의 동측 피질에서 PSD-95와 SNAP-23 발현량이 감소하였고, 이에 대비하여 퀴놀론 처리군은 시냅스 단백질의 발현량을 유의미하게 회복시켰다(도 6c).

도면

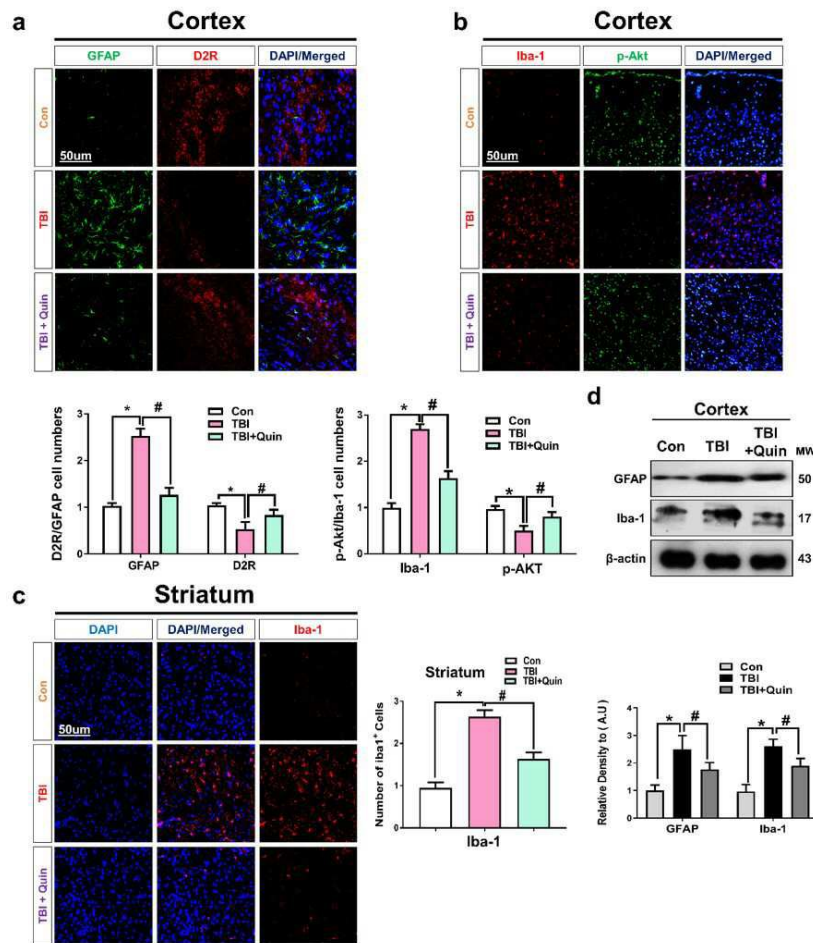
도면1



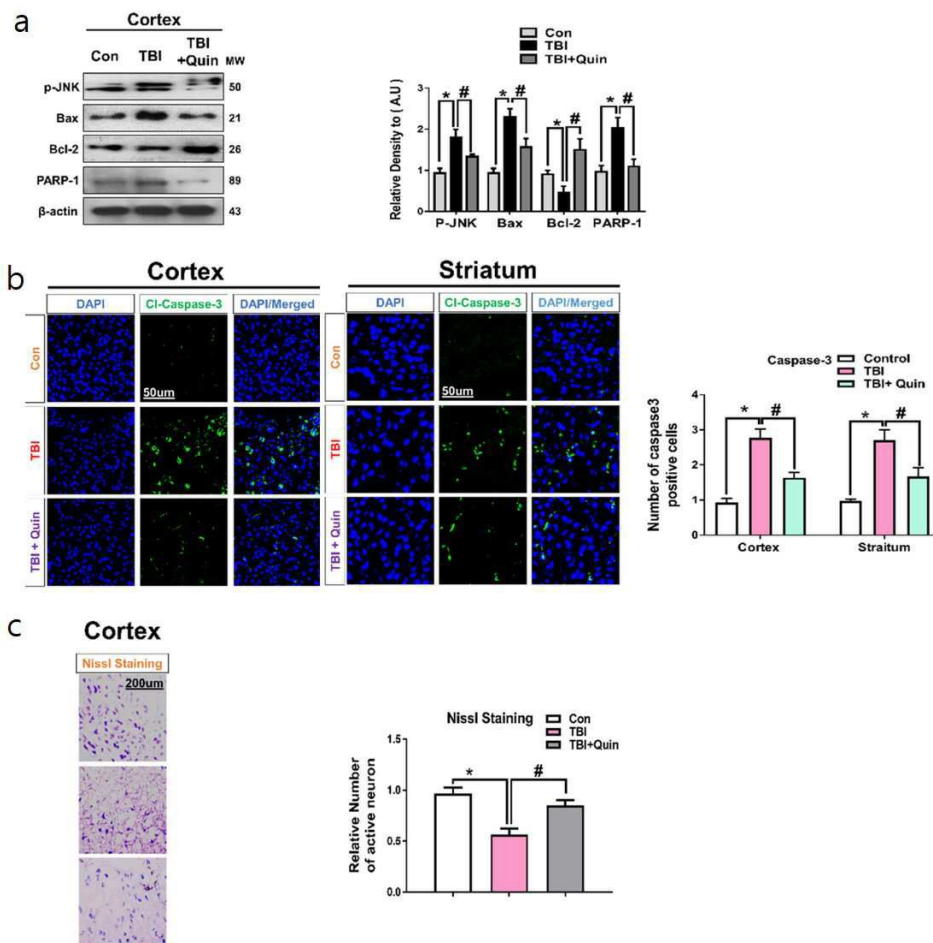
도면2



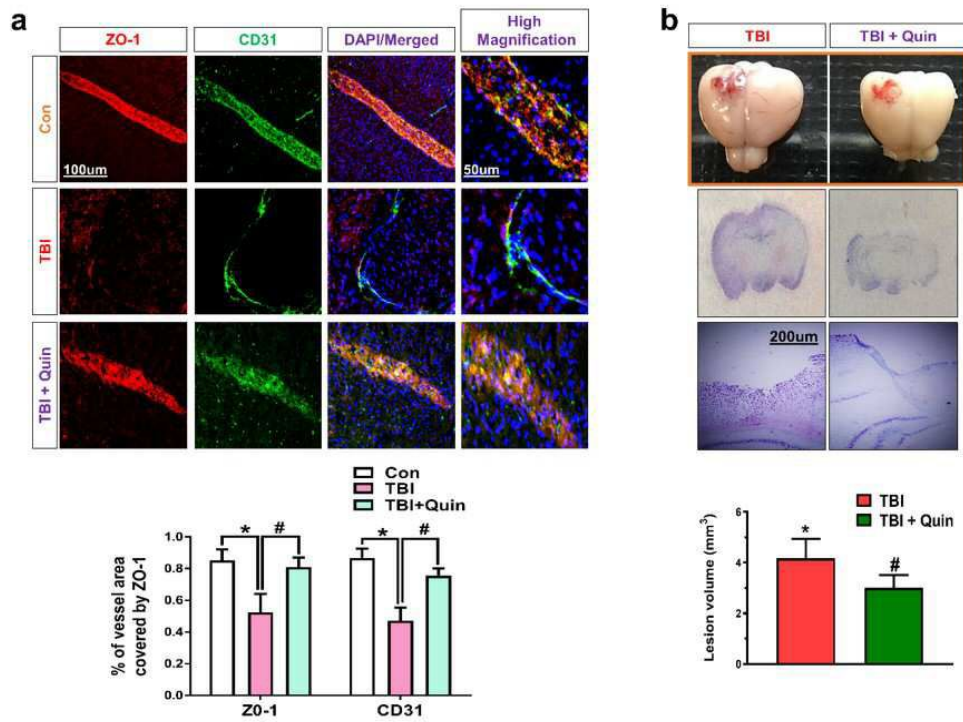
도면3



도면4



도면5



도면6

