



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0038283
(43) 공개일자 2025년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) A23K 20/121 (2016.01)
A23L 33/10 (2022.01) A61P 25/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2023.05)
A23K 20/121 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2023-0120804
(22) 출원일자 2023년09월12일
심사청구일자 2023년09월12일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김명욱
경상남도 진주시 가호로44번길 7, 102동 303호 (호탄동, 대동디지털황토아파트)
최경환
서울특별시 구로구 경인로 382, 106동 1701호 (개봉동, 한마을아파트)
박준성
경상남도 진주시 진주대로404번길 10-1, 203호 (가좌동)
(74) 대리인
최규환

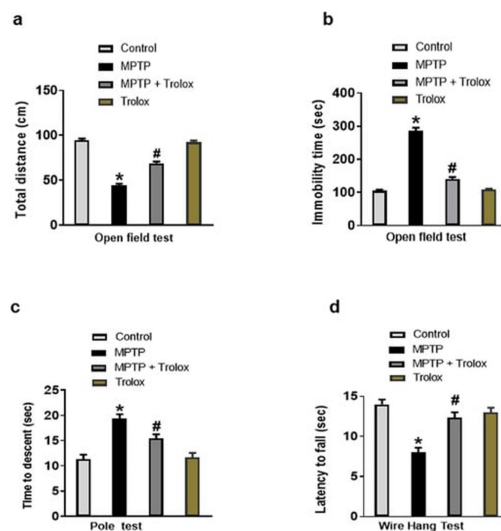
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 트롤록스를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 트롤록스를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 트롤록스는 PD 마우스를 이용한 행동분석에서 운동기능 장애를 개선하는 효과 있으며, PD 마우스의 선조체 및 SNpc에서 α -시누클레인의 발현량을 감소시키고, 도파민 합성 및 수송을 담당하는 도파민성 신경 세포 마커(TH, VMAT2 및 DAT)의 발현량을 증가시키며, 산화스트레스 관련 단백질 Nrf2 및 HO-1의 발현량을 증가시킬뿐만 아니라, ROS 및 LPO 함량을 감소시키는 효과가 있고, 정상세포 및 신경아교세포의 활성 마커인 GFAP 및 Iba1의 발현량을 감소시키는 효과가 있으며, 신경염증을 유발하는 전염증성 사이토카인(NF- κ B, TNF- α 및 IL-1 β)을 감소시키는 효과가 있으므로, 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료를 위한 의약품, 건강기능 식품 또는 사료 첨가제로 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2022.01)

A61P 25/16 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

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 경상국립대학교(뇌신경극복 면역제어연구단)

연구기간 2020.07.01 ~ 2024.12.31

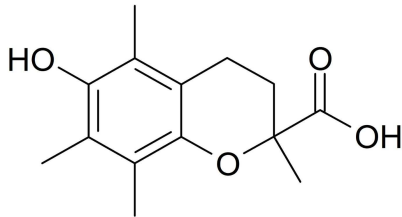
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1의 트롤록스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 약학적으로 허용 가능한 염은 염산, 인산, 황산, 질산 및 주석산 중에서 선택된 어느 하나의 무기산; 메탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 아세트산, 트라이플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 석신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산 및 요오드화수소산(hydroiodic acid) 중에서 선택된 어느 하나의 유기산; 또는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부탄-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔 설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 베타-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 및 만델레이트 중에서 선택된 어느 하나의 무독성 염류;인 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

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

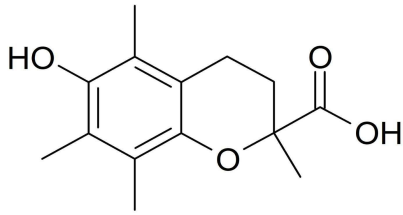
청구항 4

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 5

하기 화학식 1의 트롤록스 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

[화학식 1]



청구항 6

제5항에 있어서, 상기 조성물은 뇌의 선조체(Striatum) 및 흑색질(SNpc)에서 파킨슨병에 의해 감소된 TH(Tyrosine hydroxylase), VMAT2(vesicular monoamine transporter 2), DAT(dopamine transporter), Nrf2(nuclear factor erythroid-related factor 2) 및 HO-1(heme oxygenase 1) 중에서 선택된 하나 이상의 단백질 발현량을 증가시키는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 조성물은 뇌의 선조체(Striatum) 및 흑색질(SNpc)에서 파킨슨병에 의해 증가된 α -시누클레인(α -synuclein), GFAP(glial fibrillary acidic protein), Iba1(ionized calcium-binding adaptor protein-1), NF- κ B(nuclear factor- κ B), TNF- α (tumor necrosis factor- α) 및 IL-1 β (interleukin 1 beta) 중에서 선택된 하나 이상의 단백질 발현량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 조성물은 산화 스트레스를 감소시키는 것을 특징으로 하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

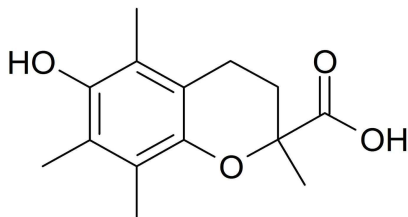
청구항 9

제5항에 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 10

하기 화학식 1의 트롤록스 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 사료 첨가제.

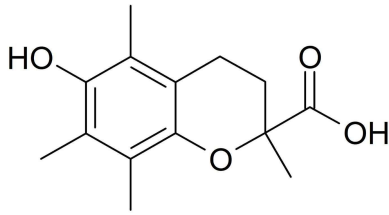
[화학식 1]



청구항 11

하기 화학식 1의 트롤록스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 수의학 조성물.

[화학식 1]



청구항 12

트롤록스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계;를 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 트롤록스를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 파킨슨병(PD)은 1817년 제임스 파킨슨(James Parkinson)에 의해 처음 발견되었으며, 두 번째로 흔한 신경퇴행성 질환이다. 이는 60세 이상 인구의 1.5~2.0%, 4%의 80세 이상 인구에서 발병하는 것으로 알려져 있다. 일차적으로는 운동장애이며, 임상적으로는 안정시 떨림, 자세 불안정, 운동완서, 불분명한 언어, 강직 등의 증상이 나타난다. PD는 복잡한 병인을 지닌 이질적인 장애로, 흑색질(SNpc)의 도파민성 뉴런의 퇴행으로 시작되는 것으로 알려져 있다. PD 관련 미토콘드리아 기능 장애에서는 단백질의 잘못된 접힘, 산화 스트레스 및 신경염증이 발생한다. SNpc의 도파민성 신경 세포 손실은 α -시누클레인(α -syn)으로 구성된 루이체(LB)의 형성을 시작한다. 뇌의 α -시누클레인 응집은 산화 스트레스와 신경변성을 유도하고, 뇌의 산화 스트레스가 증가하면 뇌세포 기능이 손상된다. 항산화 유전자인 Nrf2 신호전달경로 및 이의 하류 표적인 HO-1은 산화 스트레스에서 중요한 역할을 한다. 뇌의 α -시누클레인 올리고머화 및 산화 스트레스는 신경교세포를 더욱 활성화시켜 NF- κ B, TNF- α 및 IL-1 β 와 같은 전염증성 사이토카인을 방출하여 신경염증을 유발시킨다.

[0003] PD의 병태 생리학을 연구하기 위한 두 가지 주요 실험동물 모델은 독소 모델과 유전 모델이다. 환경 독소인 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라히드로피리딘(MPTP)은 PD에 대한 급성 동물 모델을 유도한다. MPTP 투여는 SNpc 및 선조체의 뉴런 사멸을 유발한다. MPTP 유도 PD 모델은 연구자들이 새로운 약물의 신경 보호 특성을 연구하는 데 있어 독특한 기회를 제공한다. 뇌의 MPTP는 미토콘드리아 전자 전달 사슬의 복합체 I을 선택적으로 억제함으로써 독성 대사 산물 MPP⁺로 전환된다. 미토콘드리아 기능 장애는 ATP 장애, 비정상적인 지질 및 아미노산 대사를 초래한다.

[0004] 한편, PD 치료에는 항콜린제 및 기타 약물이 사용된다. 약용 식물에서 얻은 천연 성분은 PD 모델의 예방 및 관리에 가장 선호되는 후보이다. 이러한 천연 물질은 단백질의 잘못된 접힘과 미토콘드리아 항상성을 억제할뿐만 아니라, 항산화 및 항염증 효과도 나타나는 것으로 알려져 있다. 또한, 비타민은 항산화 및 항염증 특성이 있는 것으로 보고되어 다양한 질병의 치료에 사용된다.

[0005] 트롤록스(Trolox)는 모체 화합물인 비타민 E보다 더 강력한 자유 라디칼 제거제로 간주되어 왔다. 트롤록스는 관절염 쥐 모델에서 항산화 및 항염증 특성을 보여주었다. 트롤록스는 인간과 쥐의 일차 폐포 유형 II 세포의 산화 스트레스와 염증을 손상으로부터 예방하는 특징이 있다.

[0006] 트롤록스 관련 기술로 한국등록특허 제1169850호에 트로락스를 포함하는 골 대사성 질환 또는 골 전이성 암 질환 예방 및 치료용 약제학적 조성물이 개시되어 있고, 한국등록특허 제2221365호에 트롤록스-펩타이드 결합체 및 그의 용도가 개시되어 있으나, 아직까지 본 발명의 트롤록스를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대해 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 트롤록스를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하고, 상기 트롤록스는 PD 마우스를 이용한 행동분석에서 운동기능 장애를 개선하는 효과 있으며, PD 마우스의 선조체 및 SNpc에서 α -시누클레인의 발현량을 감소시키고, 도파민 합성 및 수송을 담당하는 도파민성 신경 세포 마커(TH, VMAT2 및 DAT)의 발현량을 증가시키며, 산화 스트레스 관련 단백질 Nrf2 및 HO-1의 발현량을 증가시킬 뿐만 아니라, ROS 및 LPO 함량을 감소시키는 효과가 있고, 정상세포 및 신경아교세포의 활성 마커인 GFAP 및 Iba1의 발현량을 감소시키는 효과가 있으며, 신경염증을 유발하는 전염증성 사이토카인(NF- κ B, TNF- α 및 IL-1 β)을 감소시키는 효과가 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 화학식 1의 트롤록스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 화학식 1의 트롤록스 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 화학식 1의 트롤록스 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 사료 첨가제를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 화학식 1의 트롤록스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 트롤록스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계;를 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 트롤록스를 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 트롤록스는 PD 마우스를 이용한 행동분석에서 운동기능 장애를 개선하는 효과 있으며, PD 마우스의 선조체 및 SNpc에서 α -시누클레인의 발현량을 감소시키고, 도파민 합성 및 수송을 담당하는 도파민성 신경 세포 마커(TH, VMAT2 및 DAT)의 발현량을 증가시키며, 산화 스트레스 관련 단백질 Nrf2 및 HO-1의 발현량을 증가시킬 뿐만 아니라, ROS 및 LPO 함량을 감소시키는 효과가 있고, 정상세포 및 신경아교세포의 활성 마커인 GFAP 및 Iba1의 발현량을 감소시키는 효과가 있으며, 신경염증을 유발하는 전염증성 사이토카인(NF- κ B, TNF- α 및 IL-1 β)을 감소시키는 효과가 있는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 파킨슨병(PD)이 유발된 동물모델에서, 본 발명의 트롤록스(Trolox) 투여에 따른 운동기능 장애 개선 효과를 확인한 결과로, (a), (b) 열린 공간 상자에서, 마우스의 총 이동거리(a) 및 부동자세 시간(b); (c) 폴 테스트 결과; 및 (d) 와이어 행 테스트 결과를 나타낸 것이다. Control은 대조군이고, MPTP는 MPTP를 투여하여 유발시킨 PD 유발군이며, MPTP+Trolox는 MPTP 투여에 의해 유발시킨 PD 유발군에 트롤록스를 투여한 군이고, Trolox는 대조군에 트롤록스를 투여한 군이다. *은 대조군과 PD 유발군의 결과값의 차이가 통계적으로 유의미하다는 것으로, $p < 0.05$ 이고, #은 PD 유발군과 트롤록스 투여군(MPTP+Trolox)의 결과값의 차이가 통계적으로 유의미하다는 것으로, $p < 0.05$ 이다.

도 2는 PD 유발 마우스의 선조체 및 SNpc(substantia nigra pars compacta)에서, Trolox의 투여에 따른 α -synuclein(α -syn)의 발현량 변화를 확인하기 위한, 웨스턴 블랏(a) 및 면역형광(b) 분석 결과이다. *는 Control(대조군) 대비 MPTP(PD 유발군)의 α -syn의 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p < 0.05$ 이고, #은 MPTP(PD 유발군) 대비 본 발명의 트롤록스 투여군(MPTP+trolox)의 α -syn의 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p < 0.05$ 이다.

도 3은 PD 유발 마우스의 선조체 및 SNpc에서, 도파민 관련 단백질(TH, VMAT2 및 DAT)의 발현에 대한 Trolox의 효과를 확인하기 위한, 웨스턴 블랏(a); 면역형광의 이미지(b) 및 TH 양성 뉴런 수(c); 분석 결과이다. *는 Control(대조군) 대비 MPTP(PD 유발군)의 도파민 관련 단백질의 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p < 0.05$ 이고, #은 MPTP(PD 유발군) 대비 본 발명의 트롤록스 투여군(MPTP+trolox)의 도파민 관련 단백질

의 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p < 0.05$ 이다.

도 4는 PD 유발 마우스의 선조체 및 SNpc에서, 본 발명의 트롤록스 투여에 따른 산화 스트레스와 신경변성에 중요한 역할 하는 Nrf2 및 HO-1의 발현량 변화를 웨스턴 블랏(a), 지질 과산화(LPO) 함량(b) 및 활성 산소종(ROS) 함량(c) 변화를 확인한 결과이다. *은 대조군과 PD 유발군의 결과값의 차이가 통계적으로 유의미하다는 것으로, $p < 0.05$ 이고, #은 PD 유발군과 트롤록스 투여군(MPTP+Trolox)의 결과값의 차이가 통계적으로 유의미하다는 것으로, $p < 0.05$ 이다.

도 5는 PD 유발 마우스의 선조체 및 SNpc에서, 본 발명의 트롤록스 투여에 따른 성상세포증 및 신경아교세포증 관련 단백질 GFAP 및 Iba1의 발현량 변화를 확인하기 위한 웨스턴 블랏(a) 및 면역형광(b, c) 분석 결과이다. *는 Control(대조군) 대비 MPTP(PD 유발군)의 GFAP 및 Iba1 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p < 0.05$ 이고, #은 MPTP(PD 유발군) 대비 본 발명의 트롤록스 투여군(MPTP+trollox)의 GFAP 및 Iba1 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p < 0.05$ 이다.

도 6은 PD 유발 마우스의 선조체 및 SNpc에서, 본 발명의 트롤록스 투여에 따른 염증성 사이토카인 p-NF- κ B, TNF- α 및 IL-1 β 의 발현량 변화를 확인한 웨스턴 블랏 결과이다. *는 Control(대조군) 대비 MPTP(PD 유발군)의 p-NF- κ B, TNF- α 및 IL-1 β 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다는 것으로, $p < 0.05$ 이고, #은 MPTP(PD 유발군) 대비 본 발명의 트롤록스 투여군(MPTP+trollox)의 p-NF- κ B, TNF- α 및 IL-1 β 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다는 것으로, $p < 0.05$ 이다.

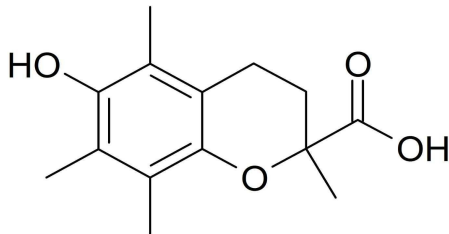
도 7은 동물 모델 마우스의 행동분석 및 트롤록스 투여 기간을 나타낸 개략도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

본 발명은 하기 화학식 1의 트롤록스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

화학식 1



[0016]

[0017]

상기 약학적으로 허용 가능한 염은 염산, 인산, 황산, 질산 및 주석산 중에서 선택된 어느 하나의 무기산; 메탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 아세트산, 트라이플루오로아세트산, 말레인산(maleic acid), 석신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산(fumaric acid), 만데르산, 프로피온산(propionic acid), 구연산(citric acid), 젖산(lactic acid), 글리콜산(glycollic acid), 글루콘산(gluconic acid), 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산(glutaric acid), 글루쿠론산(glucuronic acid), 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산 및 요오드화수소산(hydroiodic acid) 중에서 선택된 어느 하나의 유기산; 또는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔 설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 베타-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 및 만델레이트 중에서 선택된 어느 하나의 무독성 염류;인 것이 바람직하지만 이에 한정하는 것은 아니다.

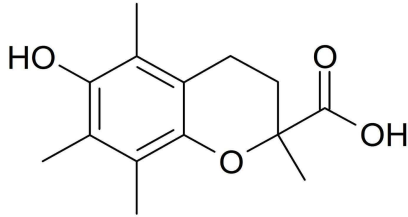
- [0018] 상기 약학 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0019] 상기 약학 조성물의 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 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.
- [0020] 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 위텟솔(witepsol), 마크로글, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명은 화학식 1의 트롤록스 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물에 관한 것이다.
- [0022] 상기 건강기능성식품 조성물은 뇌의 선조체(Striatum) 및 흑색질(SNpc)에서 파킨슨병에 의해 감소된 TH(Tyrosine hydroxylase), VMAT2(vesicular monoamine transporter 2), DAT(dopamine transporter), Nrf2(nuclear factor erythroid-related factor 2) 및 HO-1(heme oxygenase 1) 중에서 선택된 하나 이상의 단백질 발현량을 증가시키는 것이 특징이다.
- [0023] 상기 건강기능성식품 조성물은 뇌의 선조체(Striatum) 및 흑색질(SNpc)에서 파킨슨병에 의해 증가된 α -시누클레인(α -synuclein), GFAP(glial fibrillary acidic protein), Iba1(ionized calcium-binding adaptor protein-1), NF- κ B(nuclear factor- κ B), TNF- α (tumor necrosis factor- α) 및 IL-1 β (interleukin 1 beta) 중에서 선택된 하나 이상의 단백질 발현량을 감소시키는 것이 특징이다.
- [0024] 상기 건강기능성식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있지만, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명의 건강기능성식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 건강기능성식품 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. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 건강기능성식품 조성물은 총 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강을 목적으로 하는 장기간의 섭취인 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있다.
- [0026] 상기 건강기능성식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 상기 건강기능성식품 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.
- [0027] 또한, 본 발명의 건강기능성식품 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, 시클로덱스트린 등) 또는 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등)인 것이 바람직하다. 상기 향미제는 천연 향미제(예컨대,

타우마틴, 스테비아 추출물 등)와 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.

[0028] 상기 건강기능성식품 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 건강기능성식품 조성물 100 중량부에 대하여, 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0029] 또한, 본 발명은 화학식 1의 트롤록스 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 개선용 사료 첨가제에 관한 것이다.

[0030] [화학식 1]

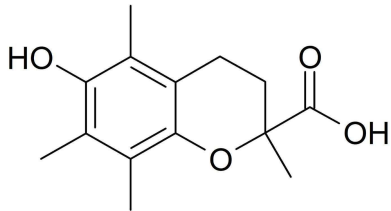


[0031]

[0032] 본 발명의 사료 첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다. 본 발명에서 용어 '사료'는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미할 수 있다. 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 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.

[0033] 또한, 본 발명은 화학식 1의 트롤록스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물에 관한 것이다.

[0034] [화학식 1]



[0035]

[0036] 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, 메칠파라벤, 프로필파라벤 및 광물유를 들 수 있다. 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 충전제, 항응집제, 운환제, 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 캡슐, 좌제, 멸균 주사용액, 멸균 외용제 등의 형태일 수 있다. 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.

[0037] 또한, 본 발명은 트롤록스 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제

의한 동물에게 투여하는 단계;를 포함하는 파킨슨병의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

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. 화합물 및 항체

메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라히드로피리딘 염산염(MPTP)은 시그마-알드리치(미국 미주리주 세인트루이스)에서 구입하였고, 0.9% 멸균 식염수 용액에 고속 교반하면서 30mg/kg의 MPTP 용액을 제조하였다. 트롤록스(Trolox)는 시그마-알드리치에서도 구입하였고, 본 발명의 실시예에서 사용된 항체의 정보는 표 1에 개시하였다.

표 1. 면역블롯 및 면역형광에 사용되는 항체 목록.

Name	Source	Application	Manufacturer	Catalog Number	Concentration
TH	Mouse	WB/IF	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)	AB152	1:1000/1:100
DAT	Mouse	WB	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	SC: 32259	1:1000
α -synuclein	Mouse	WB/IF	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	SC: 58480	1:1000/1:100
Iba-1	Mouse	WB	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	SC: 398406	1:1000
p-NF κ B	Mouse	WB	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	SC: 136548	1:1000
Nrf2	Mouse	WB	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	SC: 365949	1:1000
HO-1	Mouse	WB	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	SC: 136961	1:1000
VMAT2	Mouse	WB	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	SC: 374079	1:1000
TNF- α	Mouse	WB	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	SC: 6254	1:1000
GFAP	Mouse	WB	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	SC: 33673	1:1000
IL-1 β	Mouse	WB	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	SC: 32294	1:1000
β -Actin	Mouse	WB	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)	SC: 47778	1:1000

2. 동물 그룹화 및 약물 투여

8주령의 수컷 야생형(WT) C5BL/6N 마우스(평균 체중 25~30g)를 샘타코 바이오 랩스(대한민국 울산)에서 구입하였다. 모든 마우스를 일주일 동안 60 $\pm$ 10%의 습도, 12시간 명/암 주기 및 실온(25 $^{\circ}$ C) 조건에서 적응시켰다. 적응시킨 후, 마우스를 4개의 그룹(그룹당 n = 10)으로 나누었다[그룹 1: Control(대조군으로, 0.9% 식염수 투여한 정상 마우스군), 그룹 2: MPTP(5일 동안 30mg/kg의 MPTP 투여한 파킨슨병이 유발된 마우스군), 그룹 3: MPTP+Trolox(PD 마우스군에, 10일 동안 50mg/kg/day의 용량으로 트롤록스를 복강 내 투여한 실험군), 그룹 4: Trolox(정상 마우스에, 10일 동안 50mg/kg/day의 용량으로 트롤록스를 복강 내 투여한 비교군)](도 7).

동물과 관련된 모든 실험은 대한민국 경상대학교 응용생명과학부 동물기관관리위원회(IACUC)에서 승인한 지침 및 원칙에 따라 수행되었다(승인 ID: 125).

3. 동물 행동 분석

(1) 열린공간 시험

자발적인 움직임에 대한 활성은 열린공간(직경 40 $\times$ 40 cm, 높이 40cm)을 사용하여 평가되었다. 열린공간을 구성

하는 16개의 동일한 크기로 이루어진 사각형 상자를 통과하는 마우스의 움직임을 비디오 추적 소프트웨어 3.0(Panlab, Barcelona, Spain)을 사용하여 기록하였다. 실험 전 마우스에게 새로운 환경에 적응할 수 있는 몇 시간의 시간을 주었다. 각 마우스는 개별적으로 동일한 모서리에 배치된다. 열린공간을 에탄올 용액(10%)으로 청소하고, 건조하여 각 테스트 사이의 냄새를 제거하였다. 마우스의 총 이동 거리와 중앙에서 보낸 시간을 평가하였고, 지숙 시간은 초(sec) 단위로 표시하였고, 거리는 센티미터(cm) 단위로 표시하였다.

[0050] (2) 폴 테스트(pole test)

[0051] 직경 10mm, 높이 40cm의 나무 폴로 폴 테스트 장치를 구성하였다. 표면이 거친 나무 폴 꼭대기 근처에 마우스 머리를 위로 올려놓고, 해당 수준에 도달하는 데 걸리는 시간을 조사하였다. 테스트는 3번 시행되었으며, 각 시도는 10분 동안 진행되었고, 3번의 하강 시간의 평균이 사용되었다.

[0052] (3) 와이어 행 테스트(wire hang test)

[0053] 와이어 행 테스트는 신경근 강도를 평가하는 데 사용되었다. 실험 전 20~30분 동안 마우스를 행동실에 적응시켰다. 수평으로 긴 와이어 위에 마우스 꼬리로 매끄럽게 지지하도록 배치하고, 앞발과 뒷발을 사용하여 와이어를 잡을 때까지 지지하였다. 추락을 방지하기 위해 와이어를 지면에서 20cm 높이에 고정하였으며, 넘어져도 피해를 주지는 않도록 하였다. 실험은 10회 실시하였고, 평균값을 사용하였다. 각 테스트의 결과는 초(sec) 단위로 "땅에 떨어질 때까지 머무르는 시간"으로 표시하였다.

[0054] (4) 마우스 뇌에서 단백질 추출

[0055] 행동 분석 후, 마우스를 희생시키고, 뇌 조직을 추출한 후, 선조체(Striatum) 및 흑색질(SNpc) 영역을 분리하였다. 선조체와 흑색질을 각각 Pro-PrepTM 단백질 추출 용액(iNtRON Biotechnology, Sungnam, 대한민국)에서 균질화한 후 13,000rpm, 4℃에서 25분 동안 원심분리하였다. 실험에 사용하기 전까지 상청액을 수집하여 -70℃에서 보관하였다.

[0056] (5) 웨스턴 블롯 분석

[0057] Bio-Rad 단백질 분석 도구(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 단백질 농도를 평가하였다. 동일한 양(20 μ g)의 단백질을 10~20% BoltTM Mini Gel에서 전기영동하고 0.2- μ m PVDF Immobilon 멤브레인(Merck Millipore, MA, USA)에서 분리하였다. 비특이적 결합을 최소화하기 위해 4℃에서 밤새 1차 항체(1:1000 희석)와 함께 배양하기 전에 막을 5%(w/v) 탈지유에서 차단하였다. 막을 세척하고, 1차 항체와 함께 배양한 후 HRP-접합 항-마우스(W402B) 프로메가(Madison, WI, USA) 2차 항체로 처리하였다. 특정 밴드는 EzWestLumiOne(ATTO, Tokyo, Japan)에 의해 분석되었다. 밴드 밀도를 측정하기 위해 컴퓨터 기반 이미지 J 소프트웨어(NIH, Maryland MA, USA)를 사용하였으며, 그래프는 GraphPad Prism 8 소프트웨어(San Diego, CA, USA)를 사용하여 생성되었다.

[0058] (6) 지질 과산화(LPO) 분석

[0059] LPO는 산화 스트레스를 평가하기 위해 수행되었다. 선조체 및 SNpc 영역의 조직에서 획득한 균질액은 각각 제조업체의 지침 및 사전 작업에 따라 LPO가 없는 말론디알데히드(MDA)의 마커를 평가하기 위해 지질 과산화(MDA) 비색/형광 분석 시약을 사용하여 평가되었다.

[0060] (7) 반응성 산소종(ROS) 분석

[0061] ROS 분석은 2',7'-디클로로디히드로플루오레세인 디아세테이트(DCFH-DA)가 2',7'-디클로로플루오레세인(DCF)으로 전환되는 과정에 의존한다. 2.5mg의 조직/500 μ l의 최종 농도를 달성하기 위하여, 다양한 그룹의 선조체 및 SNpc 뇌 균질액을 차가운 Lock 완충액으로 1:20 비율로 희석하였다. 이후, DCFH-DA로부터 형광 DCF를 생성하기 위하여, 로크 완충액 조합(pH $\pm$ 7.4) 1ml, 균질액 0.2ml 및 5mM 7-디클로로디히드로플루오레세인 디아세테이트(DCFH-DA) 10ml를 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 마이크로플레이트 스캐너를 사용하여 484nm(여기) 및 530nm(방출)에서 DCFH-DA로부터 DCF의 형성을 측정하였다. DCF(배경 형광)를 계산할 수 있도록 균질액이 없는 상태에서 평형 블랭크를 측정하였다. 값은 DCF(pmol)/단백질의 양(mg)으로 표시되었다.

[0062] (8) 면역형광 분석

[0063] 행동 분석 후, 마우스(그룹당 n=5)를 마취시키고, 일반 식염수(0.9%) 및 4% 차가운 파라포름알데히드를 관류시켰다. 뇌 시료를 즉시 분리하였고, 파라포름알데히드로 72시간 동안 고정하였다. 이후, 모든 뇌를 72시간 동안

20% 수크로스로 옮겼다. 뇌 조직을 최적 절단 온도 화합물(OCT)(Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan)에 첨가하여 적절한 절단 온도를 유지한 상태에서, 저온 마이크로톰(Leica cryostat CM 3050, Germany)을 사용하여, 뇌 조직을 14 μ m 두께의 관상 절편으로 순차적으로 잘라내고, 인산 완충 식염수(PBS)로 10분 동안 세척시킨 후, 뇌 조직을 5분 동안 단백질을 분해효소 K로 처리한 후, PBS(0.01mM)로 세척하고 0.1% Triton X-100이 포함된 PBS에 2% 염소 정상 혈청을 첨가하여 50분 동안 차단하였다. 차단한 후 슬라이드를 4℃에서 밤새 1차 항체로 처리한 다음, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC)로 표지된 2차 항체로 실온에서 90분 동안 처리하였다.

[0064] 이후, 상기 준비된 시료를 DPX(디스티렌 가소제 자일렌)가 포함된 슬라이드 매체에 장착하고 유리 커버슬립으로 덮었다. 이미지는 공초점 주사 현미경(FluoView FV1000; 일본 도쿄 올림푸스)으로 촬영하였다. 이미지 평가는 이미지 J 소프트웨어(버전 1.50, NIH, 2016년 3월 1일, <https://imagej.nih.gov/ij/>, Bethesda, MD, USA)가 사용되었으며, 정량화 그래프는 PRISM8 소프트웨어가 사용되었다.

[0065] [통계 분석]

[0066] X선 필름을 스캔하고 이미지 J 소프트웨어를 사용하여 밴드 밀도를 분석하였다. 밀도는 평균±표준오차(SEM)로 표현되었다. 다양한 그룹을 비교하기 위해 일원 분산 분석(one-way ANOVA)을 사용한 후 독립적인 Student t-test와 Tukey의 다중 비교 분석을 사용하였다. 그래프는 Prism 8 소프트웨어(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 생성되었다. $p < 0.05$ 는 비교군 사이의 결과값이 통계적으로 유의한 차이인 것으로 간주되었다.

[0067] **실시예 1. MPTP로 유발한 PD 마우스에서 트롤록스(Trolox)의 투여에 따른 운동기능 장애 억제 효과 확인**

[0068] MPTP 투여는 정상 마우스에서 파킨슨병과 행동 및 운동기능 장애를 유발한 것으로 보고되었다. 실험동물의 운동 기능에 대한 Trolox의 효과를 조사하기 위해 행동 테스트를 수행하였다.

[0069] 열린공간 시험 결과, 대조군(Control) 대비 MPTP를 투여한 마우스군(MPTP)의 전체 이동 거리는 통계적으로 유의미하게 감소하였고, 본 발명의 트롤록스를 투여한 군의 총 이동거리는 MPTP를 투여한 마우스 대비 유의미하게 증가하였고(도 1a), 대조군(Control) 대비 MPTP를 투여한 마우스군(MPTP)의 부동시간은 통계적으로 유의미하게 증가하였고, 본 발명의 트롤록스를 투여한 군의 부동시간은 MPTP를 투여한 마우스 대비 유의미하게 감소하였다(도 1b).

[0070] 폴(pole) 테스트 결과, 대조군(Control) 대비 MPTP를 투여한 마우스군(MPTP)의 회전하여 아래쪽으로 도달하는 데 걸리는 시간은 통계적으로 유의미하게 증가하였고, 본 발명의 트롤록스를 투여한 군의 회전하여 아래쪽으로 도달하는 데 걸리는 시간은 MPTP를 투여한 마우스 대비 유의미하게 감소하였다(도 1c).

[0071] 와이어 행 테스트(wire hang test) 결과, 대조군(Control) 대비 MPTP를 투여한 마우스군(MPTP)의 와이어 행에서 머무르는 시간은 통계적으로 유의미하게 감소하였고, 본 발명의 트롤록스를 투여한 군의 와이어 행에서 유지하는 시간은 MPTP를 투여한 마우스 대비 유의미하게 증가하였다(도 1d).

[0072] **실시예 2. MPTP로 유발한 PD 마우스의 선조체 및 SNpc에서, 트롤록스(Trolox)의 투여에 따른 α -시누클레인(α -synuclein)의 발현량 감소 효과 확인**

[0073] MPTP 유도 PD 모델에서 과발현된 α -시누클레인의 발현량을 트롤록스 투여에 따른 효과를 웨스턴 블랏(도 2a) 및 면역형광(도 2b) 분석으로 평가하였다.

[0074] 웨스턴 블랏 및 면역형광 분석 결과, MPTP에 의해 유발된 PD 마우스 군의 선조체(Striatum) 및 SNpc에서 α -시누클레인의 발현량은 대조군 대비 통계적으로 유의미하게 증가하였고, 이에 대비하여 본 발명의 트롤록스를 투여한 군에서는 α -시누클레인의 발현량이 유의미하게 감소한 것을 확인하였다(도 2).

[0075] **실시예 3. MPTP로 유발한 PD 마우스의 선조체 및 SNpc에서, 트롤록스(Trolox)의 투여에 따른 도파민 관련 단백질의 발현량 증가 효과 확인**

[0076] 티로신 수산화효소(Tyrosine hydroxylase; TH), 소포성 모노아민 수송체 2(vesicular monoamine transporter 2; VMAT2) 및 도파민 수송체(dopamine transporter; DAT)는 도파민 합성 및 수송을 담당하는 도파민성 신경 세포 마커이고, 상기 단백질들의 감소는 파킨슨병(PD)의 발병에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0077] 웨스턴 블랏 결과, 대조군(Control) 대비 MPTP 유도 PD 마우스의 선조체 및 SNpc에서 TH, VMAT2 및 DAT의 발현량이 유의하게 감소하였고, PD 마우스 군 대비 본 발명의 트롤록스 투여군에서는 TH, VMAT2 및 DAT의 발현량이

유의미하게 증가하였다(도 3a).

[0078] 또한, 면역형광 분석결과, PD 마우스 군의 선조체와 SNpc에서 TH 발현량이 감소하였고, 이에 대비하여 본 발명의 트롤록스 투여군에서는 TH 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였고(도 3b), 이미지 J 소프트웨어 (NIH, Maryland MA, USA)를 사용하여 TH 양성 뉴런 수를 확인한 결과, PD 마우스 군에서 감소된 TH 양성 뉴런 수가 본 발명의 트롤록스 투여군에서는 증가하였다(도 3c).

[0079] **실시예 4. PD 마우스에서 유발된 산화 스트레스의 트롤록스(Trolox)의 투여에 따른 감소 효과 확인**

[0080] Nrf2(Nuclear factor erythroid-related factor 2) 및 이의 하류 유전자인 HO-1(heme oxygenase 1)은 산화 스트레스와 신경변성에 중요한 역할을 한다. Nrf2/HO-1 신호전달 경로의 손상은 산화 스트레스, 활성 산소종(ROS) 생성 및 미토콘드리아 기능 장애를 유발하였다. Nrf2/HO1 신호 전달 경로를 통해 마우스 뇌의 MPTP 유발 산화 스트레스에 대한 Trolox의 항산화 효과를 평가하였다.

[0081] 그 결과, MPTP가 투여된 PD 마우스의 선조체와 SNpc에서 Nrf2 및 HO1의 단백질 발현량이 현저하게 감소하였고, 이에 대비하여 본 발명의 트롤록스를 투여한 군에서는 Nrf2 및 HO1의 단백질 발현량이 유의미하게 증가하였다(도 4a).

[0082] 또한, MPTP 유발 PD 마우스의 선조체 및 SNpc에서 ROS 및 LPO 분석 결과, PD 마우스 뇌의 선조체와 SNpc에서 ROS/LPO 함량이 유의미하게 증가한 반면, 트롤록스 투여군에서는 ROS/LPO 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다(도 4b 및 4c).

[0083] **실시예 5. MPTP에 의해 유발된 PD 마우스의 뇌에서 트롤록스 투여에 따른 신경아교세포(Glial cell) 활성화의 개선 효과**

[0084] MPTP로 유도한 PD 마우스는 활성화된 성상세포증(Astrocytosis) 및 신경아교세포증(microgliosis)이 보고된 바 있다. PD 뇌에서는 소량의 α -시누클레인 단백질이 신경세포에서 방출되어 신경아교세포에 흡수되어 면역 기능과 관련된 유전자의 발현을 유도한다. Iba1(ionized calcium-binding adaptor protein-1) 및 GFAP(glial fibrillary acidic protein)은 각각 뇌의 활성화된 신경아교세포 및 성상세포의 특이적 마커이므로, 활성화된 성상세포 및 신경아교세포에서 발현되는 Iba1(ionized calcium-binding adaptor protein-1) 및 GFAP(glial fibrillary acidic protein)에 대한 트롤록스의 효과를 웨스턴 블랏 및 면역형광 분석으로 평가하였다.

[0085] 그 결과, 대조군(Control) 대비 MPTP에 의해 유발된 PD 마우스(MPTP)의 선조체 및 SNpc에서 GFAP 및 Iba1의 단백질 발현량이 유의미하게 증가하였고, 이에 대비하여 본 발명의 트롤록스 투여군에서는 통계적으로 유의미하게 GFAP 및 Iba1의 단백질 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소하였다(도 5).

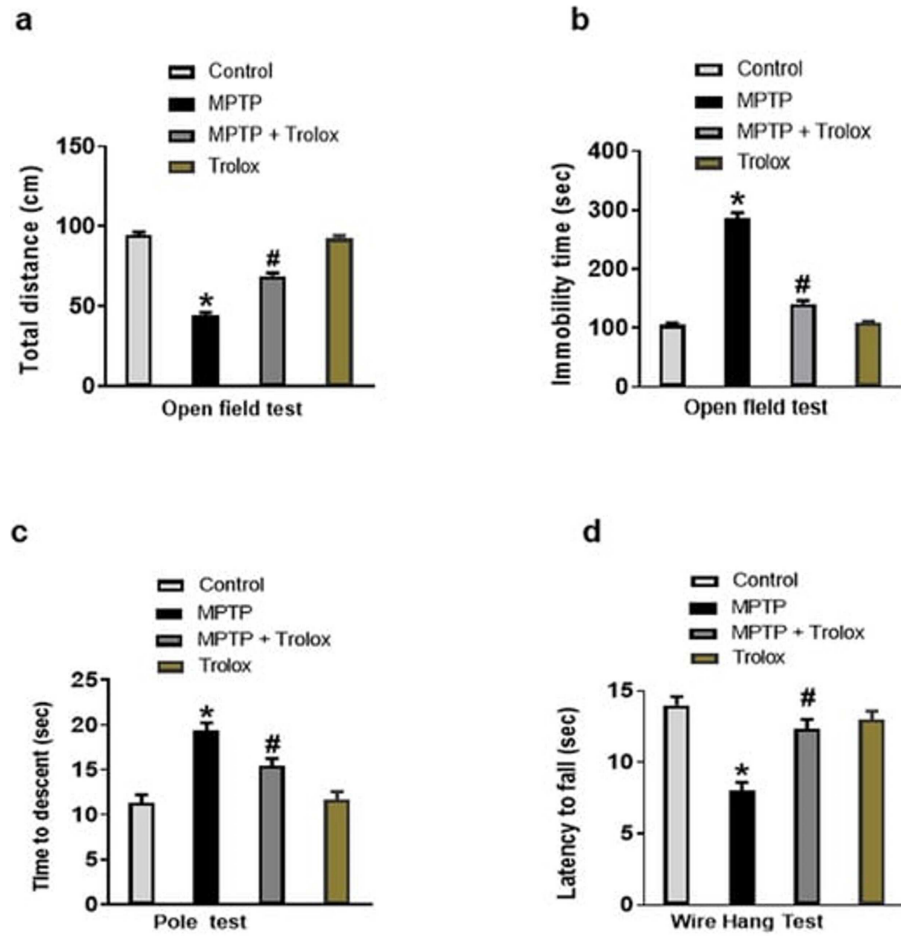
[0086] **실시예 6. PD 마우스의 신경아교세포에서 트롤록스 투여에 따른 염증성 사이토카인의 발현량 변화 확인**

[0087] 활성화된 신경아교세포는 PD의 병인에 기여하는 전염증성 사이토카인을 추가로 방출한다. NF- κ B(nuclear factor- κ B)는 다양한 세포 과정에 관여하며 염증 반응에 기여한다. 인산화된 NF- κ B는 신경염증에서 중요한 역할을 한다. 또한, TN- α (tumor necrosis factor α) 및 IL-1 β (interleukin-1 β)와 같은 다른 유전자의 발현을 활성화하여 신경염증 및 신경퇴행을 유발한다. 따라서 본 발명의 실시예 6에서는 웨스턴 블랏 분석을 통해 염증 마커인 p-NF- κ B, TNF- α 및 IL-1 β 의 발현량 변화를 확인하였다.

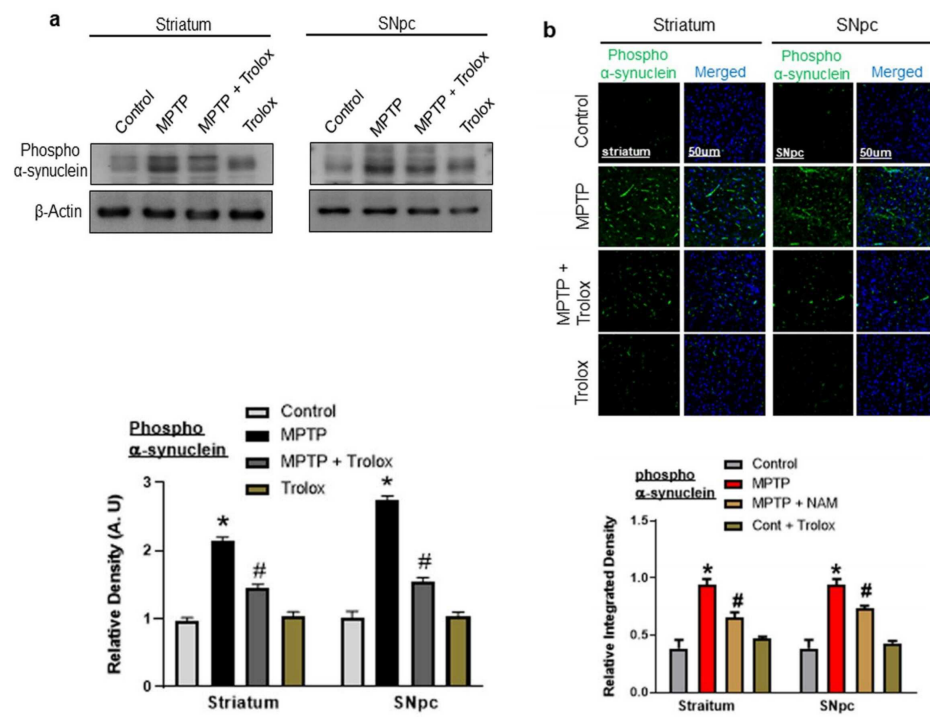
[0088] 그 결과, 도 6에 개시한 바와 같이, MPTP의 투여에 의해 유발된 PD 마우스의 선조체 및 SNpc에서 상기 염증성 마커(p-NF- κ B, TNF- α 및 IL-1 β)의 발현량이 증가하였고, 이에 대비하여 본 발명의 트롤록스를 투여한 군에서는 염증성 마커(p-NF- κ B, TNF- α 및 IL-1 β)의 발현량이 유의미하게 감소하였다.

도면

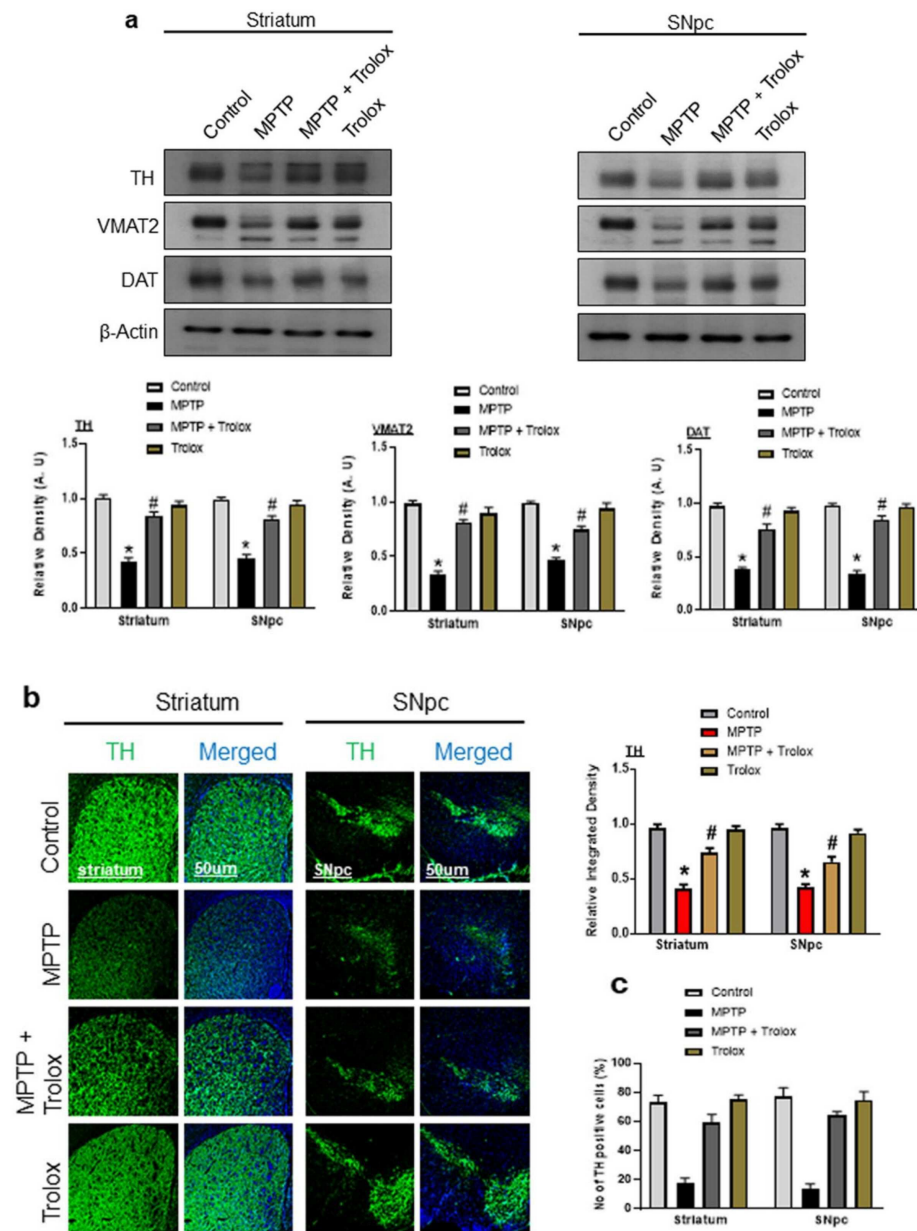
도면1



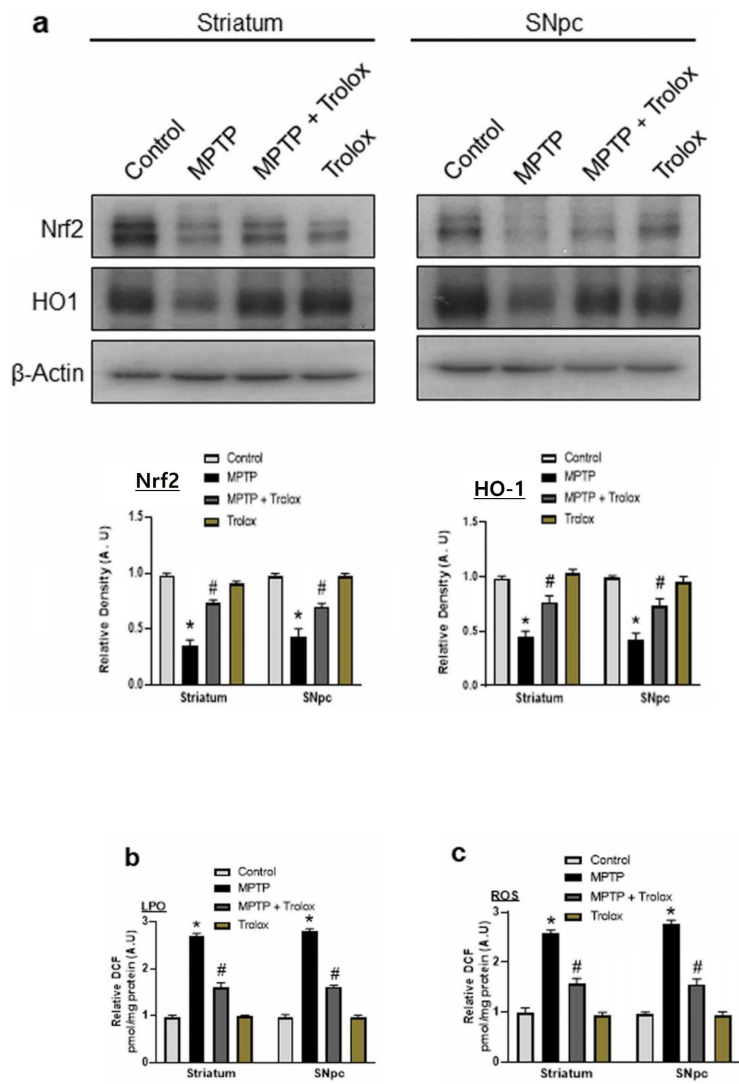
도면2



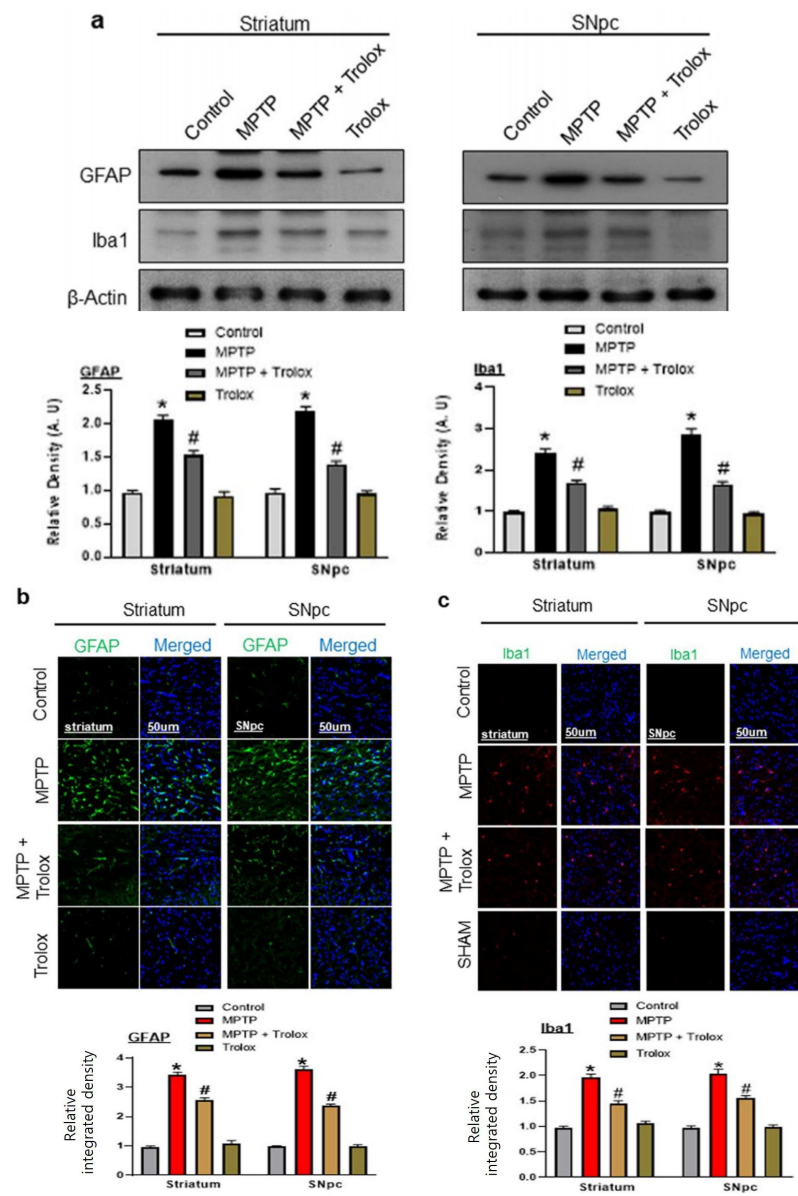
도면3



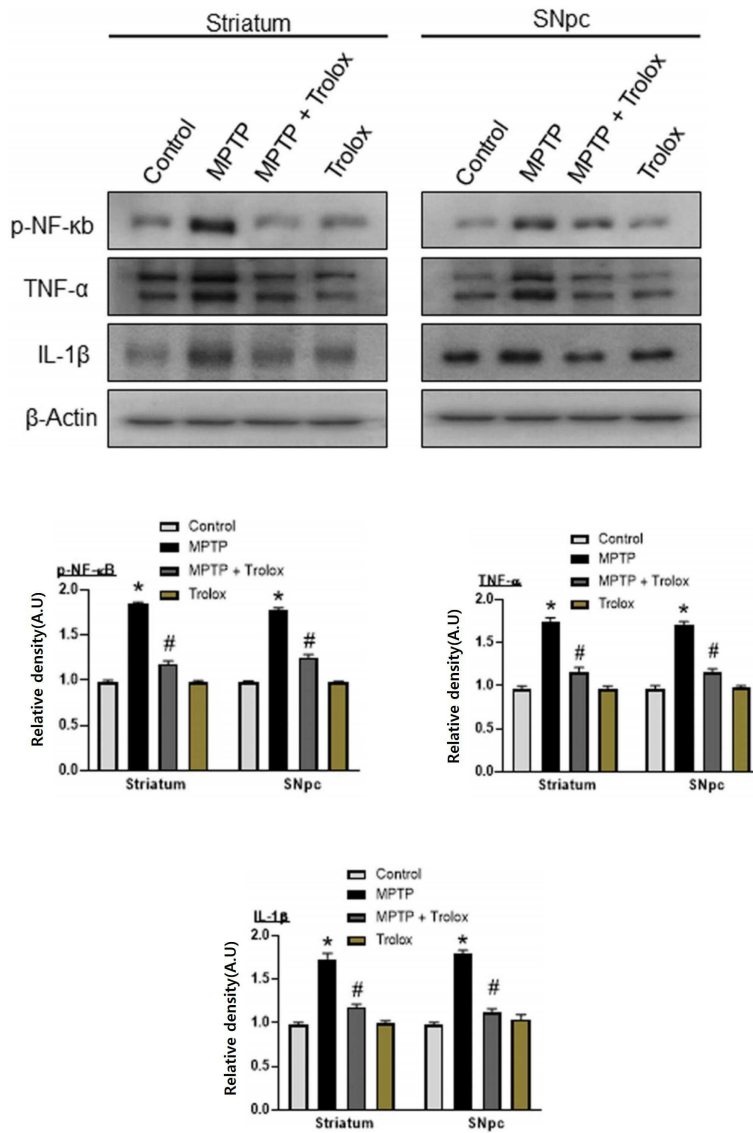
도면4



도면5



도면6



도면7

