

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 1월 26일 (26.01.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/014545 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 38/22 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/007884
- (22) 국제출원일: 2016년 7월 20일 (20.07.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0102459 2015년 7월 20일 (20.07.2015) KR
- (71) 출원인: 동국대학교 산학협력단 (DONGGUK UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 04620 서울시 중구 필동로 1길 30, Seoul (KR). 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 박희준 (PARK, Hi Joon); 12281 경기도 남양주시 조안면 북한강로 301 번길 2-19, Gyeonggi-do (KR). 전송희 (JEON, Song Hee); 10325 경기도 고양시 일산

동구 위시티 4로 79, 315 동 201호, Gyeonggi-do (KR).
김종필 (KIM, Jong Pil); 05393 서울시 강동구 풍성로 128, 203 동 2003호, Seoul (KR).

(74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재천로 163 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).

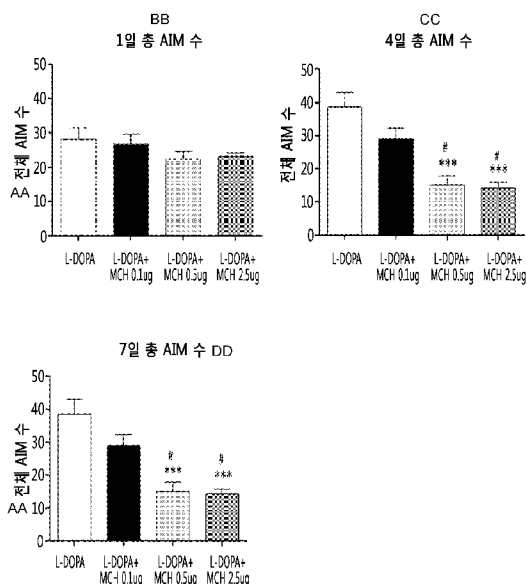
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING PARKINSON'S DISEASE AND INHIBITING SIDE EFFECTS OF LEVODOPA, CONTAINING MELANIN CONCENTRATING HORMONE AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭 : 멜라닌 응집 호르몬을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 치료 및 레보도파 부작용 억제용 약학 조성물



AA ... Number of total AIM
BB ... Number of total AIM on first day
CC ... Number of total AIM on fourth day
DD ... Number of total AIM on seventh day

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition and a health functional food for treating Parkinson's disease or inhibiting the side effects of levodopa, containing a melanin concentrating hormone as an active ingredient. The composition of the present invention, containing a melanin concentrating hormone as an active ingredient, recovers the loss of dopaminergic nerve cells, thereby having an excellent effect in treating and preventing Parkinson's disease, and alleviating dyskinesia induced by levodopa.

(57) 요약서: 본 발명은 멜라닌 응집 호르몬(melanin concentrating hormone)을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 치료 또는 레보도파 부작용 억제용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다. 본 발명의 멜라닌 응집 호르몬을 유효성분으로 포함하는 조성물은 도파민 신경세포의 손실을 회복시키므로 파킨슨병의 치료 및 예방에 우수한 효과가 있으며, 레보도파에 의해 유발되는 이상운동증을 개선시키는 효과가 있다.

WO 2017/014545 A1



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, **공개:**

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 멜라닌 응집 호르몬을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 치료 및 레보도파 부작용 억제용 약학 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 멜라닌 응집 호르몬(melanin concentrating hormone)을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 치료 및 레보도파 부작용 억제용 약학 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 파킨슨 병은 흑질 치밀부(substantia nigra pars compacta, SNc)에서 도파민작동성 뉴런의 신경퇴화가 특징으로써, 이는 선조체(striatum)에서 점차 도파민의 고갈을 일으킨다. 파킨슨병의 특징은 기저핵 순환의 균형을 망가뜨리고 운동뉴런의 제 기능을 못하게 하여, 경직(rigidity), 진전(tremor), 운동불능(akinesia)을 일으킨다. 50대 이상의 인구의 1~5 %가 두 번째로 가장 흔하게 겪는 신경퇴화 질병이다.
- [4] 파킨슨병의 궁극적인 원인은 아직 밝혀지지 않은 상황이나 정상인의 중뇌의 흑질(substantia nigra) 부위의 신경세포에서 만들어지는 뇌의 신경전달 물질인 도파민(dopamine)의 결핍으로 인해 여러 증상들이 나타나는 것으로 알려져 있다.
- [5] 뇌의 흑질에 분포하는 신경세포에서 생성된 도파민은 선조체(corpus striatum)를 포함하는 뇌의 기저핵(basal ganglia)과 연결된다. 기저핵은 뇌의 운동피질 및 기타 여러 부위와 복잡하게 연결되어 있어 인체의 운동을 부드럽고 조화롭게 그리고 정확하게 수행할 수 있도록 해주는 매우 중요한 부위이다. 이러한 도파민성 신경의 손상에 의하여 결과적으로 기저핵 도파민성 신경 말단에서 유리되는 도파민의 결핍이 파킨슨병에서 나타나는 운동성 장애의 주요 원인이다.
- [6] 파킨슨병의 원인, 즉, 무엇 때문에 흑질의 신경세포가 파괴되는가에 대하여 아직 정확한 해답이 없으나, 이를 규명하기 위하여 활발한 연구가 진행되고 있다. 바이러스성 뇌염 등 감염설, 면역기전이 관계된다는 면역설, 선천적으로 그 기질을 타고난다는 유전설, 유리기가 생성되어 신경세포를 파괴한다는 설, 신경독성 물질의 중독설, 그리고 도파민의 생성 및 대사과정에 문제가 있다는 설 등이 있으나 아직 파킨슨병 전체를 설명하기에는 부족한 점이 많다.
- [7]
- [8] 파킨슨병의 모델로서, 신경독소인 6-히드록시도파민(6-hydroxydopamine, 6-OHDA) 또는 1-메틸-4-페닐-1,2,3,6-테트라히드로피리딘(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, MPTP)이 주로 이용된다(Nat Rev Neurosci, 2001, 2(5), 325-334). 6-OHDA는 도파민 수송체(DAT)에 의해 흡수되고, 자유 라디칼(free radical)을 만들어낸다.

MPTP는 파킨슨병에 관련된 도파민성 뉴런을 특정 표적으로 하기보다는 인간과 비인간영장류에서 도파민성 뉴런을 감소시키고, 성상교세포증을 일으키며, 뇌흑질 치밀부에서 소교세포를 활성화시켜(Nat Med, 1999, 5(12), 1403-1409), 파킨슨병의 전형적인 생화학적 또는 병리학적 증상을 야기한다(Neurosci, 2000, 16(2), 135-142).

[9]

[10] 파킨슨병의 치료를 위한 약물로서, 엘-도파(L-dopa) 제제, 도파민수용체 작용제, 항콜린 약제, 엘테프릴 등이 알려져 있다. 파킨슨병 초기에 운동 뉴런의 기능이 극적인 개선효과가 나타나기 때문에 도파민 전구물질인 L-dopa(레보도파)를 사용하는 것이 파킨슨병 치료에 있어 절대적 기준이다. 그러나 레보도파는 환각(hallucination), 불면증(insomnia), 메스꺼움(nausea) 및 운동장애(dyskinesia)와 같은 부작용을 일으킨다. 이러한 부작용 중에서 레보도파로 유발되는 운동장애(LID)는 레보도파를 만성적으로 사용하고 있는 파킨슨 병 환자에서 일어나는 가장 심각한 부작용이다. 만성적으로 레보도파를 사용하고 있는 파킨슨병 환자의 50 % 이상이 5년 안에 이러한 부작용을 겪었다. 항콜린 약제들은 자율 신경계 이상이나 정신기능의 이상 등이 나타날 수 있어 고령의 환자들에게 지속적으로 투여하는 것에 한계가 있다. 기타, 고주파를 이용한 신경자극술 즉, 고주파 파괴술 또는 심부 뇌자극술 등의 수술 치료도 행해지고 있으나, 침습적인 수술을 필요로 하고 또한 많은 비용이 소모되는 문제가 있다.

[11]

[12] 한편, 멜라닌 응집 호르몬(Melanin-concentrating hormone, MCH)은 뇌하수체로부터 첫 번째로 분리된 고리모양의 19개의 아미노산으로 구성된 시상하부의 펩타이드이다. 뇌에서 MCH에 대한 우성 발현은 외측 시상하부에서 발견되었고 뇌 도처에 돌출되어 있다. MCH는 에너지를 소모하고 섭식행동을 자극함으로써, 에너지 항상성을 조절하는 것으로 알려져 있으나, 도파민작동성 신경세포에 대해 MCH의 손실과 관련된 기능은 아직 발견되지 않았다.

[13]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [14] 본 발명의 하나의 목적은 멜라닌 응집 호르몬(melanin concentrating hormone)을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 또한, 본 발명의 다른 목적은 멜라닌 응집 호르몬을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 개선 또는 예방용 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [16] 또한, 본 발명의 다른 목적은 MCH 및 레보도파를 포함하는 파킨슨병 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[17] 또한, 본 발명의 다른 목적은 멜라닌 응집 호르몬 및 레보도파를 포함하는 레보도파 부작용 억제용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[18]

과제 해결 수단

[19] 따라서, 본 발명자들은 MCH를 이용하여 파킨슨병을 치료하고, 레보도파로 유발되는 부작용을 억제할 수 있는 조성물을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, 일차 도파민 신경세포 및 파킨슨병 마우스 모델에서 MCH가 도파민 신경세포에 대하여 보호효과를 가지고 레보도파로부터 유발되는 운동장애를 경감시킴을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[20]

발명의 효과

[21] 본 발명의 멜라닌 응집 호르몬을 유효성분으로 포함하는 조성물은 도파민 신경세포의 손실을 회복시키므로 파킨슨병의 치료 및 예방에 우수한 효과가 있으며, 파킨슨병 치료제인 레보도파에 의해 유발되는 이상운동증을 개선시키는 효과가 있다.

[22]

도면의 간단한 설명

[23] 도 1은 중뇌 도파민 신경세포에 MCH, MCH + 항 MCH를 처리한 후 도파민 신경세포 수의 변화를 나타낸 도이다. 도 2는 중뇌 도파민 신경세포에 MCH, MCH + 항 MCH를 처리하여 Tuj1 및 MAP2의 면역형광염색을 통해 도파민 신경세포 수의 변화를 나타낸 도이다.

[24] 도 3은 중뇌 도파민 신경세포에 MCH를 처리한 후 MAP2, DAT, TH, AADC의 도파민 신경세포 마커 유전자의 qRT-PCR 결과를 나타낸 도이다. 도 4는 중뇌 도파민 신경세포에서 농도별 MCH의 처리에 따른 도파민 신경세포 수를 나타낸 것이다. 도 5는 상기 마커 유전자의 발현량을 나타낸 도이다.

[25] 도 6은 6-히드록시도파민 또는 MPP+를 처리한 중뇌 도파민 신경세포에 MCH를 처리한 후 도파민 신경세포 수의 변화를 나타낸 도이다. 도 7은 6-히드록시도파민 또는 MPP+를 처리한 중뇌도파민 신경세포 및 상기 약물을 처리하지 않은 중뇌 도파민 신경세포에 MCH를 처리한 후 TH, MAP2에 대한 면역형광염색을 통해 도파민 신경세포 수의 변화를 나타낸 도이다. 도 8은 6-히드록시도파민 또는 MPP+를 처리한 중뇌 도파민 신경세포에 MCH를 처리한 후 TH, DAT 및 synapsin에 대한 qRT-PCR를 통해 상기 유전자의 발현량을 나타낸 도이다.

[26] 도 9는 중뇌 도파민 신경세포에 MCH를 처리한 후 전체적 유전자 발현을 분석한 도이다. 도 10은 중뇌 도파민 신경세포에 MCH를 처리한 후 웨스턴 블랏을 통해 pCREB, pGSK-3 β , pAkt 및 pERK의 단백질의 발현을 나타낸 도이다. 도 11은 중뇌 도파민 신경세포에 MCH를 처리한 후 인산 특이적 항체를

이용하여 pCREB, pGSK-3 β , pAkt 및 pERK의 인산화 수준을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

- [27] 도 12는 MCH를 처리한 중뇌 도파민 신경세포에 PI3K 및 PKA 시그널링 특이적인 억제제를 처리한 후, Tuj1 및 MAP2의 면역형광염색을 통해 신경세포 보호효과가 억제됨을 나타낸 도이다. 도 13은 도 12의 결과를 수치로 나타낸 도이다.
- [28] 도 14는 MPP+로 유도된 중뇌 도파민 신경세포 사멸환경에 MCH를 처리한 후, PI3K 및 PKA 시그널링 억제제를 처리한 후, Tuj1 및 MAP2의 면역형광염색을 통해 신경세포 사멸에 대한 신경세포 보호효과가 억제됨을 나타낸 도이다. 도 15는 도 14의 결과를 수치로 나타낸 도이다.
- [29] 도 16은 6-OHDA로 유도된 인간 신경모세포종 SY-SY5Y 세포에 MCH를 0, 50 및 100 nM의 MCH 처리에 의해 세포사멸이 억제됨을 나타낸 도이다. 도 17은 6-OHDA로 유도된 인간 신경모세포종 SY-SY5Y 세포에 MCH를 처리한 후 웨스턴 블랏을 통해 Ikb- α 및 p38의 인산화 수준을 측정한 도이다. 도 18은 도 17의 결과를 수치로 나타낸 도이다.
- [30] 도 19는 MPTP를 처리한 마우스에 MCH를 주입한 후 흑질에서 TH-양성 신경세포의 변화를 나타낸 도이다. 도 20은 MPTP를 처리한 마우스에 MCH를 주입한 후 선조체에서 TH-양성 섬유의 밀도 변화를 나타낸 도이다. 도 21은 MPTP를 처리한 마우스에 MCH를 주입한 후 운동기능이 개선됨을 나타낸 도이다.
- [31] 도 22는 MPTP를 처리한 마우스에 MCH를 주입한 후 웨스턴 블랏을 통해 흑질에서 TH 및 시냅토파이신(synaptophysin) 단백질의 발현을 나타낸 도이다. 도 23은 도 22의 결과를 TH, 시냅토파이신/ β -actin(%)으로 나타낸 도이다. 도 24 및 도 25는 MPTP를 처리한 마우스에 MCH를 주입한 후 웨스턴 블랏을 통해 pAkt 및 pCREB의 인산화 수준을 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [32] 도 26은 A53T 알파-시누클레인 형질전환 마우스에 MCH를 주입한 후 2주 및 4주 짜 로타로드 테스트를 통해 운동기능을 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [33] 도 27은 A53T 알파-시누클레인 형질전환 마우스에 MCH를 주입한 후 웨스턴 블랏을 통해 pGSK-3 β 및 pAMPK의 인산화 수준을 측정한 결과를 나타낸 도이다. 도 28은 도 27의 결과를 수치화한 도이다. 도 29는 A53T 알파-시누클레인 형질전환 마우스에 MCH를 주입한 후 시누클레인, BDNF의 단백질 발현을 나타낸 도이다. 도 30은 도 29의 결과를 시누클레인, BDNF/ β -actin으로 나타낸 도이다.
- [34] 도 31은 6-히드록시도파민으로 유도된 파킨슨병 모델 동물에 레보도파와 MCH를 0.1 μ g, 0.5 μ g 및 2.5 μ g의 농도로 주입한 후 1일, 4일 및 7일 짜 비정상 불수의 운동 수치(AIM)을 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- [35]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [36] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 멜라닌 응집 호르몬(melanin concentrating hormone)을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.
- [37]
- [38] 본 발명에서 사용된 용어 '멜라닌 응집 호르몬'은 신경펩티드의 일종으로, 중앙 신경계에 분포되어 있고, 음식물의 식이조절 및 체중 조절에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 레트 또는 인체에서 색소 미립자를 응집시켜 색을 연하게 하며, 멜라닌 생성을 억제하는 기능을 갖는 것으로 알려져 있다. 그러나, 멜라닌 응집 호르몬이 도파민 신경세포에서 신경세포 보호효과를 가지며, 이를 통해 파킨슨병 치료효과 및 레보도파로부터 유발되는 운동이상증 개선효과를 가지는 것은 본 발명을 통해 처음으로 규명하였다. 상기 멜라닌 응집 호르몬의 아미노산 서열 및 이를 코딩하는 유전자의 염기서열 정보는 NCBI에 공지되어 있다(Genbank:NP_002665, NM_002674).
- [39]
- [40] 본 발명에서 사용된 용어 '파킨슨병'은 뇌의 흑질(substantia nigra)에 분포하는 도파민의 신경세포가 점차 소실되어 발생하며 안정떨림, 경직, 운동완만 및 자세 불안정성이 특징적으로 나타나는 신경계의 만성 진행성 퇴행성 질환을 의미한다.
- [41]
- [42] 본 발명에서 사용되는 용어 '예방'은 상기 멜라닌 응집 호르몬을 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여로 파킨슨 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [43]
- [44] 본 발명에서 사용되는 용어 '치료'는, 상기 멜라닌 응집 호르몬을 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [45] 본 발명에서 파킨슨병의 치료는 신경세포 보호, 운동기능 개선 또는 신경세포의 수 증가에 의한 것일 수 있다.
- [46] 상기 신경세포는 도파민 신경세포로서, 주요 신경전달물질이 도파민인 신경세포를 의미할 수 있고, 중뇌의 복측피개영역(ventral tegmental area, VTA), 흑질 치밀부(substantia nigra pars compacta), 시상하부 궁상핵(arcuate nucleus of the hypothalamus) 또는 선조체(striatum)에 위치할 수 있다.
- [47] 구체적인 일 실시예에서, 본 발명의 멜라닌 응집 호르몬을 도파민 신경세포에 처리한 후, Tuj1(class III beta-tubulin) 및 MAP2(microtubule associated protein 2)와 같은 신경세포 관련 유전자에 대해 면역형광염색을 수행하여 도파민 신경세포의 수가 증가하는 것을 확인하였고, 항 멜라닌 응집 호르몬을 처리하여

- 도파민 신경세포의 수가 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 1 내지 도 2).
- [48] 또한, 구체적인 일 실시예에서, MPP⁺ 또는 6-OHDA를 처리한 도파민 신경세포에 멜라닌 응집 호르몬을 처리한 후, TH 및 MAP2에 대한 면역형광염색을 통해, 멜라닌 응집 호르몬이 MPP⁺ 또는 6-OHDA로 유도된 신경세포의 사멸을 회복시킴을 확인하였다(도 6 내지 도 8).
- [49]
- [50] 본 발명의 조성물은 파킨슨병 치료제인 레보도파 부작용을 억제하는 것 일 수 있다.
- [51] 본 발명에서 사용되는 용어 "레보도파"는 파킨슨병을 치료하는데 있어, 현재 가장 널리 쓰이고 있는 약물로서, 투여된 레보도파는 혈액뇌장벽을 자유롭게 통과하여 인위적으로 도파민 분비를 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 상기 레보도파는 파킨슨병 치료를 위해 가장 광범위하게 사용되고 있으나, 부작용이 있는 것으로 알려져 있다. 상기 레보도파의 부작용으로는 환각(hallucination), 불면증(insomnia), 메스꺼움(nausea) 및 운동장애(dyskinesia)가 있는데, 상기 부작용 중에서 운동장애에는 운동손상, 예를 들어 느리고 비협동적인 불수의운동, 진탕(shaking), 경직(stiffness) 및 보행 장애의 출현이 포함된다. 레보도파로 치료받은 환자는 종종 감소된 파킨슨병 증상을 가지나, 이들은 서있거나 심지어 앉아있는 것을 유지하기가 점점 더 곤란해지는 것을 경험한다.
- [52]
- [53] 본 발명의 조성물은 티로신수산화효소(tyrosine hydroxylase, TH), 도파민 트랜스포터(dopamine transporter, DAT), 방향족 1-아미노산 탈탄산카르복실화효소(aromatic 1-amino acid decarboxylase, AADC), MAP2(microtubule associated protein 2) 및 시냅신(synapsin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자의 발현을 증가시키거나, 뇌유래신경영양인자(brain-derived neurotrophic factor) 단백질, 시냅토파이신(synaptophysin) 또는 티로신수산화효소(tyrosine hydroxylase, TH) 단백질의 발현을 증가시키거나, 또는 시누클레인(synuclein) 단백질의 발현을 감소시키는 것일 수 있다.
- [54] 상기 MAP2는 미세소관 관련 단백질(microtubule associated protein)에 속하는 것으로, 미세소관 조립에 관여한다. 주로 미세소관이 다른 미세소관 및 중간섬유와 결합하여 미세소관 조립에 관여한다고 알려져 있다.
- [55] 구체적인 일 실시예에서, 본 발명의 멜라닌 응집 호르몬을 도파민 신경세포에 처리한 후, qRT-PCR 분석을 통해 티로신 수산화효소(tyrosine hydroxylase, TH), 도파민 트랜스포터(dopamine transporter, DAT), 방향족 1-아미노산 탈탄산카르복실화효소(aromatic 1-amino acid decarboxylase, AADC) 및 MAP2(microtubule associated protein 2)를 포함하는 도파민 신경세포 관련 유전자들의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 1 내지 도 3).

- [56] 또한, 구체적인 일 실시예에서, MPP⁺ 또는 6-OHDA를 처리한 도파민 신경세포에 멜라닌 응집 호르몬을 처리한 후, qRT-PCR을 수행한 결과, 멜라닌 응집 호르몬에 의해 TH, DAT, synapsin 유전자의 발현이 증가됨을 확인하였다(도 6 내지 도 8).
- [57] 구체적인 다른 일 실시예에서, 본 발명의 멜라닌 응집 호르몬을 MPTP를 주입한 마우스에 비강 내로 주입한 후, 면역화학염색법을 통해 흑질에서 TH-양성 신경세포가 증가함을 확인하였고, 선조체에서 TH-양성인 점유가 높은 밀도로 존재함을 확인하였다(도 19). 또한, 상기와 같이 MPTP를 처리한 마우스의 흑질에 멜라닌 응집 호르몬을 처리하였을 경우, TH 단백질 및 시냅토파이신 단백질의 발현이 회복되는 것을 확인하였다(도 22).
- [58] 구체적인 또 다른 일 실시예에서, 웨스턴 블랏을 통해 멜라닌 응집 호르몬이 A53T 알파-시누클레인 형질전환 마우스의 흑질에서 뇌유래신경영양인자 단백질의 발현을 증가시키고, 시누클레인 단백질의 발현을 감소시킴을 확인하였다(도 29 및 도 30).
- [59]
- [60] 본 발명의 조성물은 pCREB, pGSK, pAkt 또는 pAMPK의 활성을 증가시키거나, Ikb α 또는 p38의 활성을 억제시키거나, PI3K 또는 PKA의 활성을 증가시키는 것일 수 있다.
- [61] 구체적인 일 실시예에서, 멜라닌 응집 호르몬을 처리한 도파민 신경세포에서 전체적 유전자 발현 분석을 통해 Akt 시그널링 관련 유전자의 발현이 증가함을 확인하였고 pCREB, pGSK 및 pAkt에 대한 웨스턴 블랏을 통해 pCREB, pGSK 및 pAkt를 포함하는 Akt 시그널링 관련 단백질의 인산화가 증가함을 확인하였다(도 9 내지 도 11).
- [62] 또한, MPTP를 처리한 마우스의 흑질에 멜라닌 응집 호르몬을 처리하였을 경우, Akt 및 CREB의 인산화 수준이 회복되는 것을 확인하였다(도 24 및 도 25).
- [63] 또한, PI3K 및 PKA 시그널링에 대한 억제제를 이용한 실험에서, PI3K, PKA가 멜라닌 응집 호르몬에 의한 신경세포 보호효과에 관여함을 확인하였다(도 14 및 도 15).
- [64] 구체적인 다른 일 실시예에서, 6-OHDA로 유도된 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포에서 멜라닌 응집 호르몬 처리에 의해 세포사멸이 억제되는 것을 확인하였고, 6-OHDA로 유도된 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포에서 멜라닌 응집 호르몬 처리에 의해 Ikb α 또는 p38의 활성이 억제되는 것을 확인하였다(도 16 내지 도 18)).
- [65] 또한, 웨스턴 블랏을 통해 멜라닌 응집 호르몬이 A53T 알파-시누클레인 형질전환 마우스의 흑질에서 BDNF 단백질의 발현을 증가시키고, 시누클레인 단백질의 발현을 감소시킴을 확인하였다(도 27 내지 도 30).
- [66]
- [67] 본 발명에 사용되는 용어 "A53T 알파-시누클레인 형질전환 마우스"는 53번째

아미노산인 알라닌이 트레오닌으로 변이가 일어난 형질전환체로서, 상기 돌연변이체는 도파민 신경 퇴화유도 단백질인 알파-시누클레인이 응집되고 도파민 신경세포의 퇴화를 일으킨다. 본 발명에서는 A53T 알파-시누클레인 형질전환 마우스를 이용하여 멜라닌 응집 호르몬의 신경세포 보호효과를 확인하였다.

- [68] 상기 알파-시누클레인(synuclein)은 베타- 및 감마-시누클레인 및 시노레틴(synoretin)을 비롯한 큰 단백질 패밀리의 일부이다. 이중 알파-시누클레인은 시냅스와 관련된 정상 상태에서 발현되고 신경 가소성, 학습 및 기억에 있어서 일정한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 알파-시누클레인은 신경세포사 및 신경염증을 유발할 수 있고, 뇌에서 응집체 퍼짐(aggregate spreading)의 매개체가 될 수 있기 때문에, 파킨슨병 및 관련질병에 있어 중요한 단백질이 될 수 있다(Proc Natl Acad Sci U S A, 2009; 106: 13010-5; J Biol Chem, 2010a; 285: 9262-72).
- [69] 본 발명의 일 실시예에서, A53T 알파-시누클레인 형질전환 마우스에 멜라닌 응집 호르몬을 주입한 그룹이 주입하지 않은 그룹보다 로드 위에 있던 시간이 더 길었음을 확인하였고 이를 통해 멜라닌 응집 호르몬이 운동개선 효과를 가짐을 알 수 있었다(도 26).
- [70]
- [71] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다.
- [72] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 질병의 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와 순차적 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 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르며, 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으나, 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양일 수 있다.
- [73] 상기 조성물은 파킨슨병의 예방 또는 치료를 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 개체이든 적용가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간동물 및 인간 등 어느 개체에나 적용할 수 있으며, 투여의 방식은 당업계의 통상적인 방법이라면 제한 없이 포함한다. 예를 들어, 국소도포 등을 통한 경피투여 방식을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 특별한 제한이 있는

것은 아니지만 상기 조성물을 비강으로 주입하는 것도 가능하다.

- [74] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 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 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [75] 본 발명의 파킨슨병의 치료 또는 예방용 약학적 조성물은 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [76] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 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 광물유를 들 수 있다.
- [77] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로콜, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [78] 본 발명의 상기 약학적 조성물의 투여 경로는 경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 비강 내, 근육 내, 정맥 내 및 동맥 내로 이루어진 군으로부터 선택된 하나인 것일 수 있다. 본 발명에서는 멜라닌 응집 호르몬을 뇌로 전달하기 위해, 멜라닌 응집 호르몬을 염류용액에 용해 시킨 후 MPTP를 주입 한 마우스 또는 A53T 알파-시누클레인 형질전환 마우스의 비강 내로 멜라닌 응집 호르몬 용액을 주입하였다.
- [79] 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에

따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[80]

[81] 또한, 본 발명은 멜라닌 응집 호르몬을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 개선 또는 예방용 건강기능식품을 제공한다.

[82]

상기 본 발명의 건강기능식품은 파킨슨병 개선제인 레보도파 부작용을 억제하는 것일 수 있다. 구체적으로, 파킨슨병 개선제인 레보도파의 부작용으로부터 유발되는 운동장애를 억제하는 것일 수 있다.

[83]

[84] 상기 멜라닌 응집 호르몬, 파킨슨병의 정의는 상기에서 설명한 바와 같다.

[85]

[86] 본 발명에서 사용된 용어, '건강기능식품'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[87]

상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[88]

그 밖에 천연 과일주스 및 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품은 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.

[89]

또한 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, '식품첨가물'로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[90]

상기 '식품첨가물공전'에 수제된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.

[91]

[92] 또한, 본 발명의 조성물은 멜라닌 응집 호르몬 및 레보도파를 포함하는 파킨슨병 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[93]

상기 본 발명의 조성물은 레보도파 단독 투여군에 비해 레보도파 부작용이 억제되는 것일 수 있다. 구체적으로, 레보도파 단독 투여군에 비해

레보도파로부터 유발되는 운동장애가 억제되는 것 일 수 있다.

- [94] 상기 본 발명의 조성물은 도파민 신경세포 보호 효과를 나타내므로, 단독으로 투여하여 파킨슨병을 치료할 수도 있고, 본 발명의 약학조성물과 레보도파를 병행하여 투여함으로써, 파킨슨병을 치료할 수 있다. 특히, 상기 본 발명의 약학조성물과 파킨슨병 치료제인 레보도파를 병용 투여할 경우에는, 종래의 파킨슨병 치료제가 나타내는 활성과 본 발명의 약학 조성물이 나타내는 치료활성이 중복되어 보다 효과적으로 파킨슨병을 치료할 수 있으며, 레보도파가 가지는 부작용인 운동장애 역시 억제하는 효과를 가진다. 또한, 이때, 사용될 수 있는 병용 투여제로는 레보도파 뿐만 아니라, 파킨슨 병의 치료활성을 나타내는 한 특별히 이에 제한되지 않는다.

- [95] 구체적인 일 실시예에서, 6-히드록시도파민(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)으로 유도된 파킨슨병 모델 동물에서 레보도파만을 단독으로 투여한 그룹보다 레보도파와 멜라닌 응집 호르몬을 병용 투여한 그룹에서 이상운동증이 더 적게 유발되었다(도 31).

[96]

- [97] 또한, 본 발명은 멜라닌 응집 호르몬 및 레보도파를 포함하는 레보도파 부작용 억제용 약학 조성물을 제공한다.

- [98] 상기 본 발명의 조성물은 레보도파 단독 투여군에 비해 레보도파 부작용이 억제되는 것일 수 있다. 구체적으로, 레보도파 단독 투여군에 비해 레보도파로부터 유발되는 운동장애가 억제되는 것 일 수 있다.

- [99] 상기 본 발명의 조성물은 레보도파의 부작용을 억제하므로 본 발명의 약학조성물과 레보도파를 병행하여 투여함으로써, 레보도파 부작용을 억제할 수 있다. 특히, 상기 본 발명의 약학조성물과 파킨슨병 치료제인 레보도파를 병용 투여할 경우에는 종래의 파킨슨병 치료제가 나타내는 활성과 본 발명의 약학 조성물이 나타내는 치료활성이 중복되어 보다 효과적으로 파킨슨병을 치료할 수 있으며, 레보도파가 가지는 부작용인 운동장애 역시 억제하는 효과를 가진다.

[100]

발명의 실시를 위한 형태

- [101] 이하, 실시예를 통하여 본 발명의 구성 및 효과를 더욱 자세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[102]

- [103] 실시예 1: 일차 도파민 신경세포 및 인간 신경모세포종 세포에 있어 MCH의 기능적인 역할 및 신경세포 보호 메카니즘

[104]

- [105] 1-1: 일차 도파민 신경세포 배양

[106]

[107] 출생한 마우스의 중뇌로부터 분리된 일차 세포를 배양하였다. 간단하게, SNC 및 VTA를 포함하는 중뇌는 37 °C에서 30분 동안 파파인을 처리하여 쉽게 잘랐다(5 U/ml; Worthington Biochemicals). 잘라진 조직은 작은 피펫 팁을 사용하여 저작을 통해 단세포로 만들었다. 그리고 나서 세포들은 250 x g로 5분 동안 원심분리하고 5 % 소태아혈청, 1x B27(Invitrogen), 1x GlutaMAX(Invitrogen), 0.4 % D-글루코스(Sigma-Aldrich), 10 U/ml 페니실린(Invitrogen), 및 10 µg/ml 스트렙토마이신(invitrogen)을 첨가한 플레이팅 배지에 현탁하였다. 각 중뇌로부터 분리된 세포는 동일하게 나누어, 4개의 폴리-D-리신(poly-D-lysine, Sigma) 및 라미닌(BD Bioscience)이 미리 코팅된 12-mm-원형 커버슬립 위에 분주한 후, 이산화탄소로 가습화된 인큐베이터에서 37 °C로 유지하였다. 분주 후 24시간 켜, 배지는 5 uM 사이토신 β-D-아라비노푸라노시드(β-D-arabinofuranoside, Sigma Aldrich)를 첨가한 혈청이 없는 배지(serum-free medium)로 바꿔주었고 이는 교세포(glia)의 증식을 억제하기 위해 사용하였다. 플레이팅 후 3일 켜 배지에 MCH 또는 다른 약물을 처리하였다.

[108]

[109] **1-2. 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포 배양**

[110]

[111] 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)로부터 구입하였다. 세포는 37 °C의 온도, 95 %의 공기 및 5 %의 CO₂로 구성된 대기에서 10 % 소 태아 혈청(FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 unit/ml 페니실린, 및 100 µg/ml 스트렙토마이신(Gibco-BRL, Rockville, MD, USA)을 첨가하고 추가로 트립신-EDTA(Gibco-BRL, Rockville, MD, USA)를 첨가한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 유지하였다.

[112]

세포 생존률은 티아졸릴 블루 테트라졸리움 브로마이드(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, MTT)를 이용하여 확인하였다. 간단하게, 세포는 5 X 10³ 세포/웰의 밀도로 12-웰 플레이트(Corning Incorporated, USA)에 분주하였고, 37 °C에서 16시간 동안 안정화시킨 후 24시간 동안 10 uM의 레티노산으로 분화시켰다. 분화된 세포들은 24시간 동안 100 uM의 6-OHDA(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 처리한 것 또는 처리하지 않은 것으로 나누고 상기 그룹에 각각 표시된 농도로 MCH(Tocris biosciences, Bristol, UK)를 처리하였다. 세포는 2 mg/mL의 MTT 용액과 함께 배양하였다. 5 % CO₂, 37 °C에서 4시간 동안 배양 후, 상등액은 제거하고, 디메틸 설펡사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO, Sigma, USA)를 추가하였다. 반응물의 광학밀도(optical density, OD)는 마이크로플레이트 리더기(iMARK, Bio-Rad, USA)를 사용하여 580 nm에서 측정하였다. 광학밀도는 다음 식을 사용하여 퍼센트로 바꾸었다: 세포 생존율

(%) = (OD 샘플/OD 음성 대조군) X 100. 음성 대조군 세포는 완벽히 DMEM만을 처리하였다.

[113]

[114] **1-3: 면역세포화학법(Immunocytochemistry)**

[115]

[116] 4 % 파라포름알데하이드가 포함된 PBS로 세포를 고정시키고 표준 프로토콜에 따라 다음의 일차 항체들을 이용하여 면역염색을 수행하였다: Tuj1 (마우스 단일클론, Covance); TH (토끼 다클론, Pelfreez); 적절한 분자적 프로브(Molecular Probes) Alexa Fluor® 염색제가 연결된 이차항체를 사용하였다. 핵은 4, 6-디아미디노-2-페닐린돌(4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI, Invitrogen)로 대비염색하였다(counterstained). 세포들은 Nikon Eclipse Ti로 이미지화하였고, 이미지들은 Adobe Photoshop 소프트웨어로 처리 및 분석하였다. 면역블랏팅은 표준 프로토콜에 따라 수행하였다.

[117]

[118] **1-4: 전체 게놈 발현 분석**

[119]

[120] RNeasy Mini Kit(QIAGEN)를 사용하여 배양한 신경세포로부터 전체 RNA(total RNA)를 분리하였다. 전체 RNA(total RNA)의 2 µg은 바이오틴 결합 cDNA를 제조하기 위해 사용하였다(Affymetrix One Cycle cDNA Synthesis Kit). 간단히 말해서, 이 방법은 첫 가닥(first strand) cDNA를 만들기 위해서 T7-Oligo(dT) 프로모터 프라이머를 사용하는 SuperScript II-유도 역전사(directed reverse transcription)를 이용하였다. RNase H를 처리한 두번째 가닥 cDNA(RNase H-mediated second-strand cDNA)는 T7 RNA 합성효소에 의해 시험관 내 전사(T7 RNA Polymerase-directed in vitro transcription)를 통해 합성되었다. 시험관내 전사를 통해 만들어진 cRNA는 cDNA를 합성하는 과정에서 바이오틴이 결합된 뉴클레오티드 아날로그와 결합시켰다. 샘플은 Affymetrix 혼성화 매뉴얼에 따라 1X 혼성화 각테일에 15 µg의 바이오틴이 결합된 cDNA를 넣어 제조하였다.

[121] 유전자칩 어레이(GeneChip array, mouse genome 430A 2.0 arrays)은 60 RPM으로 16시간 동안 45 °C에서 유전자칩 혼성화 오븐에서 혼성화하였다. 세척은 Affymetrix GeneChip Hybridization, Wash, 및 Stain Kit에서 제공되는 완충용액으로 GeneChip Fluidics Station 450에서 수행하였다. 분석 결과는 GeneChip Scanner 3000로 스캔하였고, 이미지는 GeneChip Operating Software v1.4로 추출하고 분석하였다. 통계적 분석을 위해, CEL 파일을 GeneSpring 7.0을 사용하여 처리하였고 로부스트 멀티-어레이 분석(robust multi-array analysis)을 사용하여 정규화하였다(normalized).

[122]

[123] **1-5. 웨스턴 블랏**

[124]

[125] 세포는 50 mM 트리스-베이스 (pH 7.5), 150 mM 염화나트륨, 2 mM EDTA, 1% 글리세롤, 10 mM 플루오린화나트륨(NAF), 10 mM 나트륨-파이로포스페이트(Na-pyrophosphate), 1% NP-40 및 프로테아제 억제제 (0.1 mM 페닐메틸설포닐플루오라이드(phenylmethylsulfonylfluoride), 5 µg/ml 아프로티닌(aprotinin), 및 5 µg/ml 루벵틴(leupeptin))를 포함하는 용해 완충용액에서 균질화하였다. 30 µg의 용해물(lysate)은 10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동하였고 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 이동시킨 후, 16시간 동안 4 °C에서 항-포스포-CREB(pCREB), 항-CREB, 항-포스포-GSK-3β(pGSK-3β), 항-GSK-3β, 항-포스포-Akt(pAkt), 항-Akt, 항-포스포-ERK, 항-ERK(Cell signaling technology, Beverly, MA, USA), 항-포스포-p38, 항-p38, 항-포스포-Ikba 및 항-Ikba(Cell signaling technology, Beverly, MA, USA) 항체와 함께 반응시켰다. 다음으로, TBS-T (0.05%)로 세척한 후, 블랏을 홀스라디쉬 퍼옥시데이즈(horseradish peroxidase)-연결된 항-토끼 항체와 함께 반응시켰고, 그 밴드는 ECL system(Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 관찰하였다. 밴드 이미지는 Molecular Imager ChemiDoc XRS+(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 얻었고 밴드의 강도는 Image Lab™ 소프트웨어 버전 2.0.1(Bio-Rad)를 이용하여 분석하였다.

[126]

[127] **1-6. 중뇌 도파민 신경세포의 생존에 있어 MCH의 기능**

[128]

[129] 중뇌 도파민 신경세포의 유지 및 생존에 있어 MCH의 기능을 알아보기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[130] 출생후, 1일된 마우스 중뇌로부터 일차 도파민 신경세포를 분리하였으며, 이를 배지에 분주한 후 5일째 MCH를 처리하고 24시간 동안 배양시켰다. 상기 배양시킨 MCH를 처리한 도파민 신경세포를 포함한 배지에서 도파민 신경세포를 관찰하고 Tuj1 및 MAP2와 같은 신경세포 관련 유전자에 대해 면역형광염색을 수행하여 도파민 신경세포의 수를 확인하였다. 그 결과, MCH 처리에 의해 도파민 신경세포의 수가 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 상기 MCH를 처리한 신경세포 배지에 항 MCH를 처리한 경우에는 도파민 신경세포의 수가 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다(도 1 및 도 2).

[131] 다음으로, MCH를 처리한 도파민 신경세포 배지를 이용하여 qRT-PCR를 수행하였다. 그 결과, 상기 MCH 처리에 의해 티로신수산화효소(tyrosine hydroxylase, TH), 도파민 트랜스포터(dopamine transporter, DAT), 방향족 L-아미노산 탈탄산카르복실화효소(aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC) 및 미세소관 연관 단백질 2(microtubule associated protein 2, MAP2)를 포함하는 도파민(dopamine, DA) 마커 유전자의 발현이 증가함을 확인하였다(도 3).

[132] 또한, 도파민 신경세포 배지에 다양한 농도의 MCH를 처리한 후, TH, DAT, AADC 및 MAP2와 같은 도파민 신경세포 마커에 대한 qRT-PCR을 수행하였고

이를 분석하였다. 그 결과, MCH의 농도가 2 μ M일 경우, 도파민 신경세포 수와 상기 마커의 발현이 가장 큰 증가율을 보여주었다(도 4 및 도 5).

[133]

[134] **1-7. 6-히드록시 도파민 또는 MPP+ 처리 후 중뇌 도파민 신경세포에서 MCH의 기능**

[135]

[136] 다음으로, 중뇌 도파민 신경세포에서 파킨슨병 모델을 유발하는 약물을 처리한 후 MCH의 신경세포 보호효과를 알아보기 위해, 플레이팅 후 5일 째, MPP+ 또는 6-OHDA를 노출시킨 도파민 신경세포에 MCH를 처리하였다.

[137] 도파민 신경세포의 수를 관찰하고 TH 및 MAP2에 대한 면역염색을 수행한 결과, MCH가 도파민 신경세포에서 MPP+ 또는 6-OHDA로부터 유도된 신경세포의 사멸을 회복시킴을 알 수 있었다(도 6 및 도 7). 또한, TH, DAT 및 synapsin에 대하여 qRT-PCR을 수행한 결과, 역시 MCH가 TH, DAT 및 synapsin 유전자의 발현을 증가시킴을 확인하였으며, 이에 의해 신경세포 보호효과를 가짐을 확인하였다(도 8).

[138] 따라서, 상기의 결과를 통해 MCH가 중뇌 도파민 신경세포의 유지 및 생존에 있어 중요한 역할을 수행하고 있음을 알 수 있었다.

[139]

[140] **1-8. 도파민 신경세포에서 MCH의 신경보호 메커니즘**

[141]

[142] 도파민 신경세포에서 보여주는 MCH의 신경세포 보호효과 메커니즘을 알아보기 위하여, MCH를 처리한 도파민 신경세포에서의 전체적 유전자 발현(global gene expression)을 분석하였다. 도파민 신경세포에 MCH를 처리하고 24시간 후, 이 도파민 신경세포의 전사체(transcriptome)를 분석하였고, 대조군과 전사 프로파일(transcriptional profile)을 비교하였다. 그 결과, MCH가 전체적인 유전자 발현을 변화시킴을 확인하였고 그 중에 Akt 시그널링 관련 유전자의 발현이 MCH를 처리한 후 증가하는 것을 확인하였다(도 9).

[143] 또한, Akt 시그널링 단백질인 pCREB, pGSK-3 β , pAkt 및 pERK에 대하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 그 결과, 상기 결과와 동일하게, 대조군(untreated culture)과 비교하여 MCH를 처리한 일차 도파민 신경세포에서 pCREB, pGSK-3 β 및 pAkt를 포함하는 Akt 시그널링 단백질의 발현이 현저히 증가함을 확인하였다(도 10).

[144] 다음으로, 도파민 신경세포에서 MCH의 시그널링 경로를 알아보기 위해, MCH를 처리한 일차 도파민 신경세포에서 인산 특이적 항체(phospho-specific antibody)를 처리하여 CREB, Akt, GSK-3 β 또는 ERK 활성을 확인하였다. 2mM의 MCH를 처리한 후 3시간이 되었을 때, 세포들을 수득하였고 각각의 항체를 이용하여 면역블랏을 수행하였다. 그 결과, 도 11에서 보듯이, CREB, GSK-3 β 및 Akt의 인산화 수준은 MCH 처리에 의해 증가하였지만, ERK의 인산화 수준은 증가하지 않았다(도 11).

- [145] 따라서, 상기의 결과를 통하여, MCH의 신경세포 보호 메커니즘에는 Akt 시그널링이 관여하고 Akt 시그널링에 있어서도 CREB, Akt, GSK-3 β 이 관여하고 ERK는 관여하지 않음을 알 수 있었다.
- [146]
- [147] **1-9.** MCH의 신경세포 보호효과에 있어 포스파티딜이노시톨 3-키나아제(phosphatidylinositol 3-kinase) 및 프로테인 키나아제(protein kinase A)의 관여
- [148]
- [149] PI3K/Akt, 및 PKA/CREB가 도파민 신경세포에서 MCH의 신경세포 보호효과에 관여하는지 알아보기 위해, MCH를 처리한 일차 도파민 신경세포에 PI3K(LY294002) 및 PKA(H89) 시그널링 특이적인 억제제를 처리하여 Tuj1 및 MAP2에 대한 면역형광염색을 수행하였다. 그 결과, PI3K/Akt 및 PKA/CREB 시그널링 특이적인 억제제 LY294002 및 H89가 MCH에 의해 나타나는 신경세포 보호효과를 억제하였다(도 12 및 도 13).
- [150] 또한, MPP⁺로 유도된 도파민 신경세포에서도 MCH와 함께 PI3K(LY294002) 및 PKA(H89) 시그널링 특이적인 억제제를 처리하였다. 그 결과, MPP⁺로 유도된 도파민 신경세포 사멸(neuronal death)에 대한 MCH의 신경세포 보호효과가 PI3K/Akt 및 PKA/CREB의 억제제에 의해 억제되는 것을 확인하였다(도 14 및 도 15).
- [151] 따라서, PI3K, PKA 시그널링 억제제를 이용하여 MCH에 의해 유도되는 도파민 신경세포 보호효과에 있어 Akt 및 CREB이 관여함을 알 수 있었다.
- [152]
- [153] **1-10.** 6-OHDA로 유도된 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포에서 MCH의 신경세포 보호효과
- [154]
- [155] 6-OHDA로 유도된 인간 신경모세포종 SH-SY5Y 세포에서 MCH의 신경세포 보호효과를 알아보기 위해, 24시간 동안 10 μ M의 레티노산으로 세포를 분화시킨 후, 상기 세포에 100 μ M의 6-OHDA를 50 또는 100 nM의 MCH와 함께 처리하거나 또는 MCH 없이 처리하였다. 그 결과, SH-SY5Y 세포에서 6-OHDA로 유도된 세포사멸은 100 nM의 MCH 처리에 의해서 상당히 억제됨을 확인하였다(도 16).
- [156] 다음으로, MCH의 신경세포 보호효과에 관여하는 시그널링 경로를 알아보기 위해, SH-SY5Y 세포에서 6-OHDA를 처리한 후, 웨스턴 블랏을 통해 I κ b- α 또는 p38의 인산화 수준을 확인하였다. 그 결과, MCH가 6-OHDA에 의해 유도되는 I κ b- α 또는 p38의 인산화를 억제함을 확인하였다(도 17 및 도 18).
- [157] 따라서, 상기 결과를 통해 MCH가 I κ b- α 또는 p38의 활성화를 억제함으로써 신경세포에서 강한 보호효과를 나타냄을 알 수 있었다.
- [158]

[159] 실시예 2: MPTP로 유도된 파킨슨병 모델 동물에서 MCH의 효과

[160]

[161] 2-1. MPTP로 유도된 파킨슨병 모델 동물 준비

[162]

[163] 몸무게가 23~25 g이고 12주된 수컷 C57BL/6 마우스(Central Laboratories Animal Inc, Republic of Korea)를 12시간은 빛, 12시간은 어둠을 주기로 하여 유지하였고 물과 음식에 대해 자유롭게 접근을 가능하게 하였으며 방 온도는 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다. 모든 실험은 동물 복지를 위한 경희대학교 동물 보호 위원회의 승인을 받았다.

[164] 먼저, 마우스를 무작위로 6개의 그룹으로 나누었다: CON (대조군, n=5), MPTP (MPTP만 처리, n= 5), AP (MPTP + 경혈에 침술 치료, n=5), CP (MPTP + 대조군 지점에 침술 치료, n= 5), MCH (MPTP+MCH, i.n., n=5), 및 aMR1 (MPTP+AP+ MCH-R1 길항제, i.p.). 모든 그룹들은 5일 동안 MPTP(30mg/kg, 염류용액에 용해; Sigma-Aldrich, MO, USA) 또는 염류용액(saline)을 복강 내 주입하였다.

[165]

[166] 2-2. MCH 주입

[167]

[168] 비강에서 뇌로 약물을 전달하기 위해 혈액뇌관문을 우회하는 비침입성 방법인 비강 내 주입방법으로 MCH를 주입하였다. 비록 대뇌심실내부의(intracerebroventricular) 주입이 특정약물의 뇌 특이적인 전달에 있어 광범위하게 사용되고 있으나, 이는 침입적인 방법이고 실험동물을 마취시킬 필요가 있다. 그러므로 뇌로 MCH를 전달하기 위해 차선의 방법으로 비강 내 주입을 선택하였다. 비강 내 주입은 De Rosa et al., 2005에서 기술한 대로 수행하였다. MCH(Tocris biosciences, Bristol, UK)는 MPTP 주입 후 2시간이 지나 마우스에 비강 내로 주입하였다. 주입 전, MCH는 염류용액(saline, 0.5mg/30 μL)에 용해시켜 4°C 에 보관하였다. 모든 마우스는 바로 선 자세로 머리와 목을 잡고 움직이지 않도록 하였으며, 15 μL 의 MCH 용액을 하나의 비강 안으로 약 15초 동안 피펫으로 천천히 주입하였다. 2분 내지 3분 후에, 다른 콧구멍에서 같은 주입을 반복하였다. 다른 그룹의 마우스들은 염류용액(i.n.)을 주입하였다.

[169]

[170] 2-3. 면역화학염색

[171]

[172] 동물들은 첫 MPTP 또는 염류용액을 주입 후 12일째에 희생시켰고 4 % 파라포름알데하이드를 포함하는 0.2 M 인산 완충용액을 이용하여 경심관류로 관류하였다(perfused). 뇌는 제거하였고 이후 고정하였으며(postfixed), 동결보존하였다(cryoprotected). 면역화학염색은 Hirsch & Faucheux, 1998; Hirsch et al., 1998에서 기술한대로 흑질(substantia nigra) 및 선조체(마우스 뇌의

아틀라스를 따라 중뇌의 브레그마로부터 AP -3.08 ~ -3.28 mm 사이 수준 및 선조체의 브레그마로부터 AP +0.38 ~ +0.98의 사이 수준)를 포함하는 프리-플로팅 동결조직절편기-컷 섹션(free-floating cryomicrotome-cut sections)에서 수행하였다(Keith & Franklin, 2008).

- [173] 다음으로, 흑질을 염색하기 위해, Hirsch & Faucheux, 1998; Hirsch et al., 1998에서 기술한 대로 면역화학염색법을 수행하였다. 3 % H₂O₂를 포함하는 0.05 M 인산-완충 식염수(phosphate-buffered saline)에서 반응시킨 후 섹션은 1 % BSA 및 일반적인 염소 혈청으로 블로킹했다. 그리고 나서, 조직 섹션은 1차 항체로 실온에서 밤새도록 반응시켰다. 토끼의 TH (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)는 1차 항체로서 사용하였다. 조직 섹션은 바이오틴이 결합된 항토끼 IgG(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)로 1시간 동안 실온에서 반응시켰으며, ABC 시약(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)으로 1시간 동안 실온에서 반응시켰고, 0.02 % 디아미노벤지딘 및 0.003 % 과산화 수소를 포함한 1 M 트리스-완충 식염수(pH 7.5)에서 2분 동안 반응시켰다. 반응 후, 조직섹션은 젤라틴으로 코팅된 슬라이드에 고정시키고 말렸으며, 물을 제거하고 커버를 덮었다. 브라이트필드(brightfield) 현미경(BX51; Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여, 선조체 및 흑질의 사진을 찍었다. 예상되는 결과를 모르는 3명의 독립적 관찰자가 흑질에서 TH-양성인 신경세포를 카운팅했다. 카운팅된 세포는 데이터의 유효성을 위해 3번 확인하였다.

[174]

[175] **2-4. 웨스턴 블랏**

[176]

- [177] 흑질(substantia nigra, SN)은 50 mM 트리스-베이스 (pH 7.5), 150 mM 염화나트륨, 2 mM EDTA, 1% 글리세롤, 10 mM 플루오린화나트륨(NAF), 10 mM 나트륨-파이로포스페이트(Na-pyrophosphate), 1% NP-40 및 프로테아제 억제제 (0.1 mM 페닐메틸설포닐플루오라이드(phenylmethylsulfonylfluoride), 5 µg/ml 아프로티닌(aprotinin), 및 5 µg/ml 루펩틴(leupeptin))를 포함하는 용해액에서 균질화하였다. 30 µg의 용해물(lysate)을 10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동하였고 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 이동시킨 후, 16시간 동안 4 °C에서 항-시냅토피신 및 항-β-액틴(Cell signaling technology, Beverly, MA, USA) 및 항-TH(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 항체와 함께 반응시켰다. TBS-T (0.05%)로 세척한 후, 블랏을 홀스라디쉬 퍼옥시데이즈(horseradish peroxidase)-연결된 항-토끼 항체와 함께 반응시켰고, 그 밴드는 ECL system (Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 관찰하였다. 밴드 이미지는 Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 얻었고 밴드의 강도는 Image Lab™ 소프트웨어 버전 2.0.1 (Bio-Rad)를 이용하여 분석하였다.

[178]

[179] **2-5. MPTP로 유도된 파킨슨병 모델 동물에서 MCH의 효과**

[180]

[181] MPTP를 처리한 마우스에서 MCH가 도파민 신경세포 보호효과에 있어 중요한 역할을 하는지 알아보기 위해, MPTP로 유도된 파킨슨병 모델에서 MCH의 효과를 하기의 실험을 통해 확인하였다.

[182] 그 결과, MPTP를 처리한 마우스에 MCH를 비강 내로 주입한 것은 확실히 효과적이었다. MCH를 주입한 그룹은 MPTP만을 처리한 그룹보다 마우스의 흑질에서 TH-양성 신경세포가 상당히 많았고($P<0.001$)(도 19), 또한, 선조체에서 TH-양성 섬유의 밀도가 높았다(도 20). 상기의 실험결과와 유사하게, 로타로드 시험(rotarod test)을 수행한 결과에서도 MCH가 운동기능을 개선시킴을 확인하였다(도 21).

[183]

[184] **2-6. MPTP를 처리한 마우스에서 티로신수산화효소(tyrosine hydroxylase), 시냅토파이신(synaptophysin), pAkt 및 pCREB에 대한 MCH의 효과**

[185]

[186] MCH의 신경세포 보호효과를 확인하기 위해, 흑질에서 TH 및 시냅토파이신의 발현을 확인하였다. 그 결과, MPTP로 유도된 흑질에서 TH 및 시냅토파이신의 발현은 감소되었지만, MCH를 주입한 마우스의 흑질에서 TH 및 시냅토파이신 단백질의 발현은 상당히 회복되었다(도 22 및 도 23).

[187] 다음으로, 뇌에서 MCH 주입 또는 침술에 따른 시그널링 경로를 확인하기 위해, MPTP를 처리한 마우스로부터 분리한 흑질에서 Akt 및 CREB의 인산화 수준을 확인하였다. 그 결과, 도 24 및 도 25에서 볼 수 있듯이, Akt 및 CREB의 인산화 수준은 MPTP를 처리한 마우스의 흑질에서 감소하였지만, MCH를 주입 또는 침술을 한 마우스의 흑질에서는 회복되었다(도 24 및 도 25).

[188]

[189] **실시예 3. A53T 알파-시누클레인 형질전환 마우스에서 MCH의 효과**

[190]

[191] **3-1. 형질전환 마우스**

[192]

[193] A53T 알파-시누클레인(B6; C3-Tg-Prnp/SNCA*^{A53T/83Vle/J}) 유형의 브리더(heterozygous breeder)는 잭슨 실험실(Bar Harbor, ME, USA)에서 구입하였고, A53T 형질전환 및 비형질전환 한배 새끼를 얻기 위해 사육하였다. 형질전환 마우스를 동정하기 위해, 센스(5'-TGT AGG CTC CAA AAC CAA GG -3', 서열번호 1)와 안티센스(5'-TGT CAG GAT CCA CAG GCA TA -3', 서열번호 2) 프라이머를 사용하여 표준 PCR을 수행하였고 1.5 % 아가로스 겔에서 전기영동을 통해 분석하였다. 유전형이 분석된 마우스는 12시간 명/암 주기로 온도와 습도가 조절되는 방에서 물과 음식을 자유롭게 먹을 수 있도록 사육되었다. MCH(Tocris biosciences, Bristol, UK)는 염류용액(0.5mg/30μL)에서

용해하였고 4 °C에 보관하였다. 그리고 나서, 마우스의 목을 고정시켜 15 μ L의 MCH 약물을 천천히 피펫으로 주입하였다. 상기 과정을 5분 후에 반복하였다. 대조군(CON) 그룹은 염류용액으로 처리하였다. 10개월에서 12개월 된 수컷 형질전환 마우스는 무작위로 두 그룹으로 나누었다: 대조군 그룹(n=5) 및 MCH를 주입한 그룹(n=5), 각 그룹은 4주 동안 염류용액 또는 MCH를 매일 비강 내로 주입하였다. 영양상태를 검사하기 위해 체중증가량을 매주 측정하였고 4주 동안 같은 시간에 매 주마다 음식 섭취량을 기록하였다.

[194]

[195] **3-2. 행동실험**

[196]

[197] 4주째, 로타로드 실험을 수행하여 마우스의 행동방식을 측정하였다. 마우스는 실험 한 시간 전에 가속중인 로드 스피드 모드에서 2분 동안 미리 연습하였다.

[198] 로드 위에 있었던 시간은 연속적인 로드 스피드에서 최고 480초를 기록하였다. 떨어지는 시간(latency time)도 분석하였다.

[199]

[200] **3-3. 웨스턴 블랏**

[201]

[202] 웨스턴블랏팅을 위해서, 세포 및 조직은 50 mM 트리스-베이스 (pH 7.5), 150 mM 염화나트륨, 2 mM EDTA, 1% 글리세롤, 10 mM 플루오린화나트륨(NAF), 10 mM 나트륨-파이로포스페이트(Na-pyrophosphate), 1% NP-40 및 프로테아제 억제제 (0.1 mM 페닐메틸설포닐플루오라이드(phenylmethylsulfonylfluoride), 5 μ g/ml 아프로티닌(aprotinin), 및 5 μ g/ml 루페틴(leupeptin))를 포함하는 용해액에서 균질화하였다. 30 μ g의 용해물(lysate)을 10% SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 전기영동하였고 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 이동시킨 후, 16시간 동안 4 °C에서 항-포스포 Thr¹⁷²AMPK α , 항-AMPK α , 항-BDNF 항체, 항-시누클레인, 및 항- β -액틴(Cell signaling technology, Beverly, MA, USA), 항-TH(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 항체와 반응시켰다. TBS-T (0.05%)로 세척한 후, 블랏을 홀스라디쉬 퍼옥시데이즈(horseradish peroxidase)-연결된 항-토끼 항체와 함께 반응시켰고, 그 밴드는 ECL system (Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 관찰하였다. 밴드 이미지는 Molecular Imager ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 얻었고 밴드의 강도는 Image Lab™ software version 2.0.1 (Bio-Rad)를 이용하여 분석하였다.

[203]

[204] **3-4. A53T 알파-시누클레인 형질전환 마우스에서 운동기능, pGSK-3 β , pAMPK, 시누클레인 및 뇌유래신경영양인자 단백질 발현에 있어서 MCH의 효과**

[205]

[206] A53T 알파-시누클레인 형질전환 마우스에서 MCH의 효과를 확인하기 위하여,

MCH를 주입한 그룹과 주입하지 않은 그룹, 두 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다.

[207] MCH를 주입하기 전, 두 그룹의 로드 위에 있던 시간(latency time)은 차이가 없었다. 4주 쯤, MCH를 주입한 그룹은 MCH를 주입하지 않은 그룹보다 로타로드 테스트에서 로드 위에 훨씬 오래 있었다($p < 0.01$)(도 26). 또한, 두 그룹 간의 체중 및 섭취량에서도 차이가 없었다.

[208] A53T 알파-시누클레인 형질전환 마우스에서 MCH의 작용 메커니즘을 조사하기 위하여, 흑질에서 Akt의 타겟으로서 GSK3 β 의 인산화, AMPK의 인산화, 뇌유래신경영양인자(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 발현, AMPK의 다운스트림 타겟으로써 시누클레인(synuclein)의 발현을 확인하였다. 그 결과, MCH가 A53T 알파-시누클레인 형질전환 마우스의 흑질에서 GSK3- β 및 AMPK의 인산화 발현을 증가시켰고 BDNF 단백질의 발현 역시 증가시켰으며, 시누클레인 단백질의 발현은 감소시켰다(도 27 내지 도 30).

[209]

[210] **4. 6-**히드록시도파민으로 유도되는 파킨슨병 모델에서 레보도파로 유발되는 부작용에 있어 MCH의 효과

[211]

[212] **4-1. 동물 모델 준비**

[213]

[214] 각각 24-26 g의 무게를 가지는 9주된 수컷 C57BL/6 마우스(Central Lab. Animal Inc., Seoul, Republic of Korea)를 사용하였다. 모든 실험은 동물 복지를 위한 경희대학교 동물 보호 위원회의 승인을 받았고, NIH 및 대한의학회의 가이드라인에 따라 엄격하게 유지하였다. 입체 정위 수술(stereotaxic surgery)은 마우스의 스트리아타(striata)에서 편측 6-OHDA 병변(unilateral 6-OHDA lesions)을 만들어 수행하였다.

[215]

[216] **4-2. 편측 병변에 대한 입체 정위 수술**

[217]

[218] 입체 정위 수술을 위해서, 마우스를 티레타마인 + 졸라제팜(tiletamine + zolazepam, 30 mg/kg; Zoletil 50, Virbac, France) 및 자일라진(xylazine, 10 mg/kg; Rompun, Bayer Korea, Republic of Korea)을 포함하는 생리식염수로 마취시켰고 마우스 어답터(mouse adaptor, Stoelting Co., USA)로 정위적 틀(stereotactic frame)에서 고정시켰다. 6-OHDA-HCl 혼합액(3.0 mg/ml; Sigma Aldrich, USA)은 0.02 % 아스코르브산-기반 생리식염수에 용해시켰다. 마우스에는 마우스의 뇌 아틀라스(atlas)에 따라 편측으로 우측 선조체에 염류용액 또는 6-OHDA를 주입하였다: +1.0 mm of AP, -2.1 mm of ML, -3.2 mm of DV; 및 +0.3 mm of AP, -2.3 mm of ML, -3.2 mm of DV(BJ and GP, 2008). 각각의 주입률(flow rate)은 0.5 $\mu\text{l}/\text{min}$ 이다.

[219]

[220] **4-3. 비정상불수의 운동(AIM) 수치**

[221]

[222] 레보도파로 유발되는 운동장애(levodopa induced dyskinesia, LID)를 정량화하기 위해, 관찰자(blinded observer)가 비정상 행동을 평가할 수 있도록 분리된 케이지에 각각의 마우스를 두었다. 레보도파 또는 운반체(vehicle, Cenci et al., 1998)를 주입한 후 20분부터 140분까지 20분마다 각각 관찰하였다. 그들이 보여주는 행동이 다음 조건들을 만족시킨다면 LID에 의한 움직임이라고 간주하였다: (1) 레보도파 주입 후 개선된 움직임 (2) 병변의 반대편으로 향하는 움직임 (3) 반복적이고 목적이 없고 명확히 자연스럽지 않은 움직임.

[223] 그리고 나서, AIM 수치를 하위유형을 분리하였다: (1) 축의 AIM(axial AIM), 반대편을 향해 몸과 목을 비틀은 자세; (2) 사지 AIM, 반복적이고 규칙적인 경련 또는 앞다리의 근긴장이상 자세; 및 (3) 입 및 혀의 AIM(orolingual AIM), 비정상 저작 움직임 및 때때로 혀의 과장된 움직임. 이러한 하위유형을 수치화하기 위해, 이상운동증은 빈도수를 반영하는 4점 규모로 수치화하였다(0, 없음; 1, 때때로; 2, 자주; 3, 외부의 자극에 의해 중단되지만 계속적인; 4, 외부의 자극에 의해 중단되지 않고 계속적이고 심각한). 수치화 후, 각 그룹의 비교를 위해, AIM 수치의 3가지 하위유형(축, 사지, 오로링구어 AIM)을 통합하였다.

[224]

[225] **4-4. 레보도파에 의해 유발된 비정상 불수의 운동에 있어 MCH의 효과**

[226]

[227] 레보도파에 의해 유발된 부작용에 있어 MCH의 효과를 알아보기 위해, L-도파 주입 후 AIM 수치를 평가하였다.

[228] 그 결과, L-도파(20 mg/kg)를 투여한 그룹은 6-OHDA 그룹 및 대조군과 비교하여 이상운동증($p < 0.05$)이 더 많이 유발되었다. 또한, L-도파와 함께 MCH(0.5 mg/kg)를 주입한 그룹은 L-도파만을 투여한 그룹들보다($p < 0.05$) 이상운동증이 더 적게 유발되었다(도 31). AIM 수치의 하위 분석(sub-analysis)은 AIM 수치의 모든 하위 카테고리(subcategories)도 이런 경향을 가지고 있음을 보여주었다.

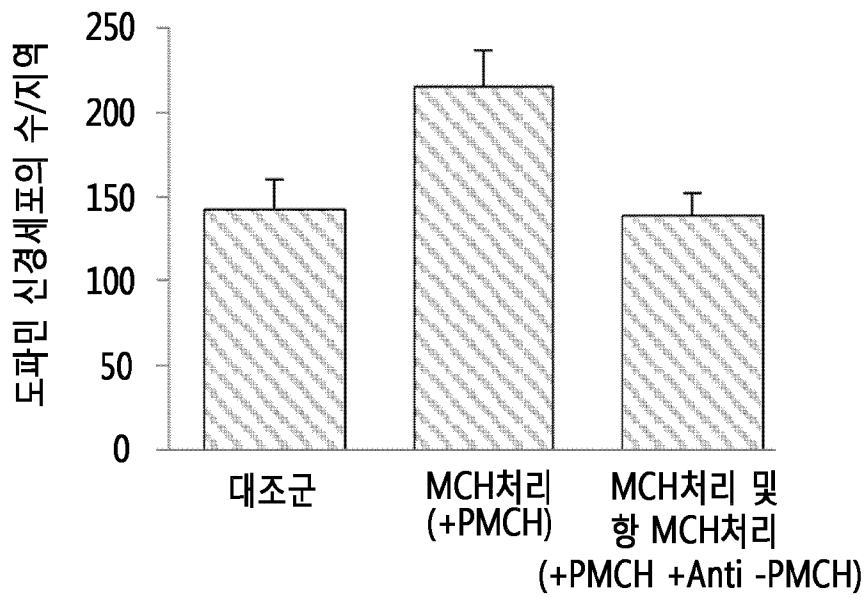
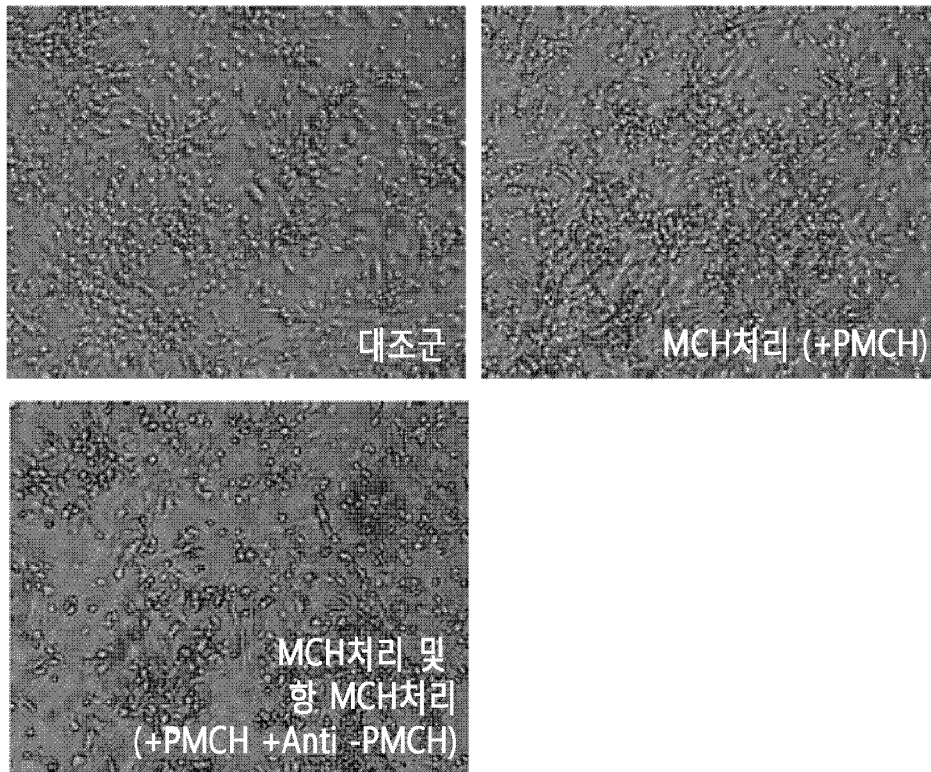
[229]

[230]

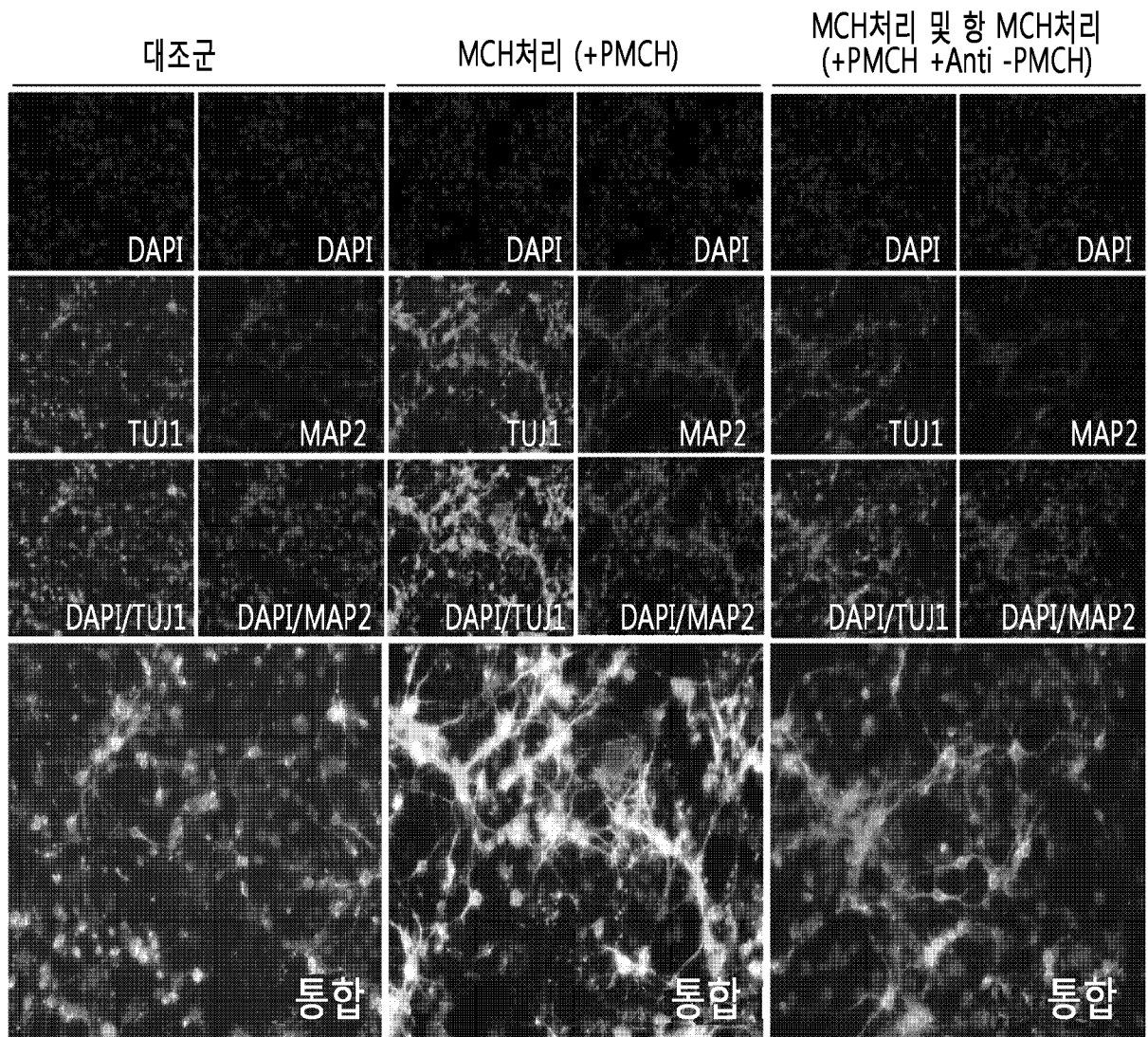
청구범위

- [청구항 1] 멜라닌 응집 호르몬(melanin concentrating hormone)을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 파킨슨병 치료제인 레보도파 부작용을 억제하는 것인, 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 레보도파 부작용은 운동장애인 것인, 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 파킨슨병의 치료시 레보도파와 병용하여 투여되는 것인, 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 6] 멜라닌 응집 호르몬을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 개선 또는 예방용 건강기능식품.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 건강기능식품은 파킨슨병 개선제인 레보도파 부작용을 억제하는 것인, 건강기능식품.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 레보도파 부작용은 운동장애인 것인, 건강기능식품.
- [청구항 9] 멜라닌 응집 호르몬 및 레보도파를 포함하는 파킨슨병 치료 또는 예방용 약학 조성물.
- [청구항 10] 멜라닌 응집 호르몬 및 레보도파를 포함하는 레보도파 부작용 억제용 약학 조성물.

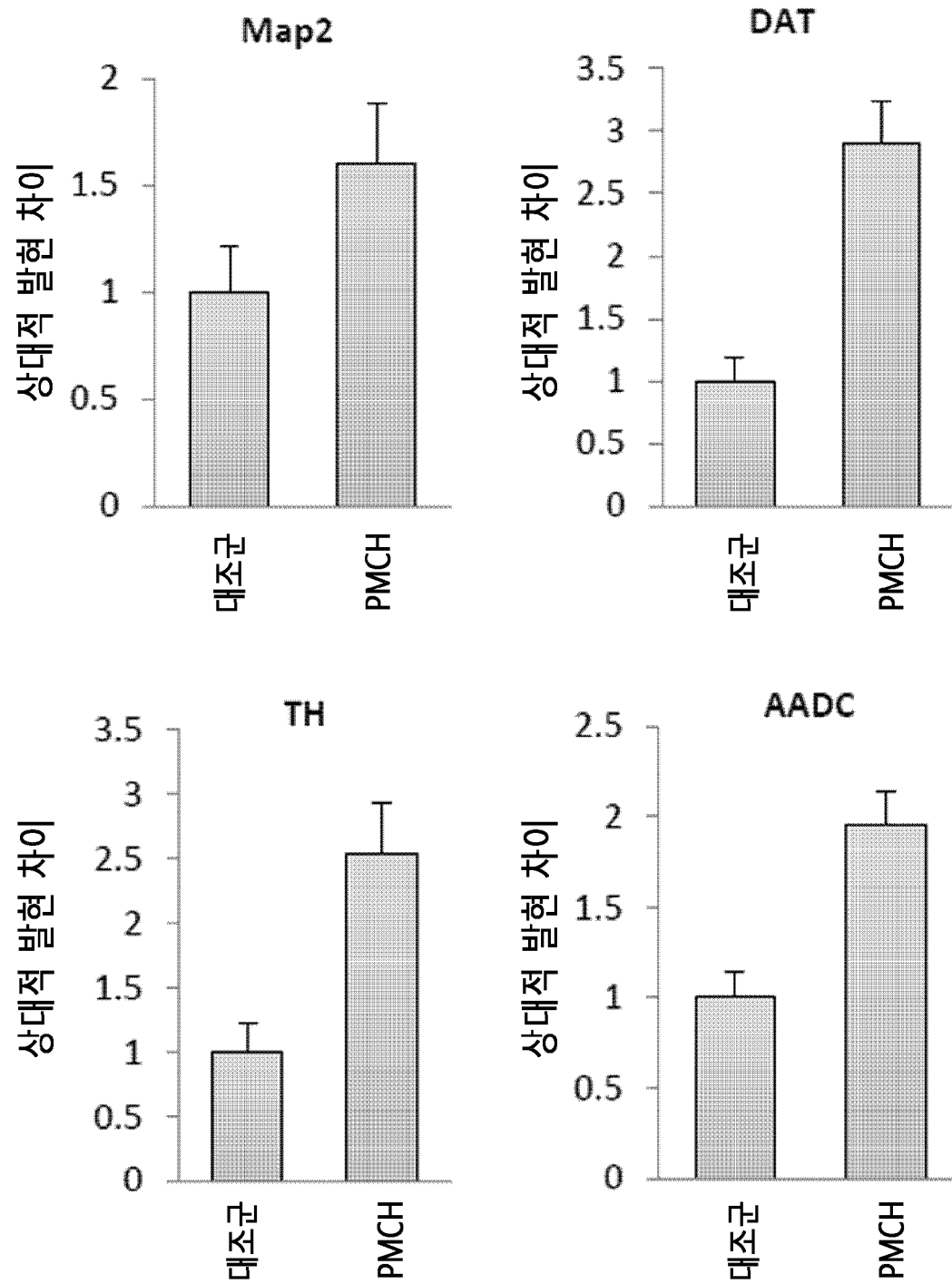
[도1]



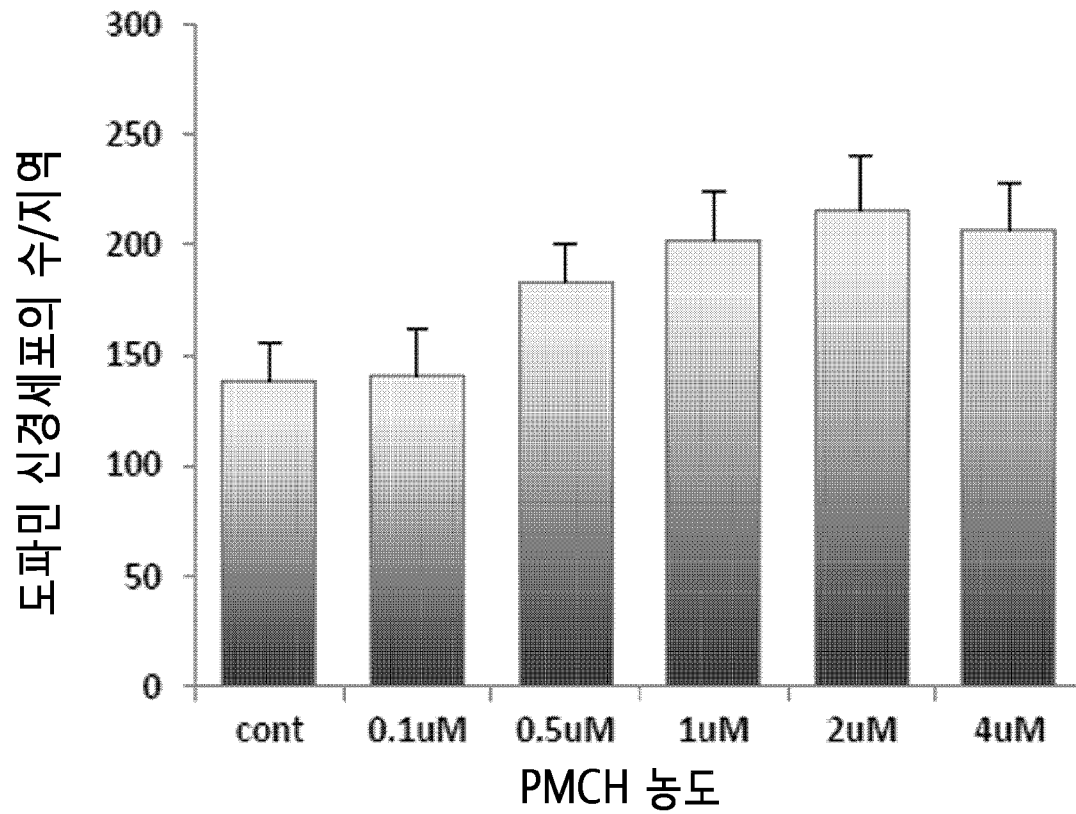
[도2]



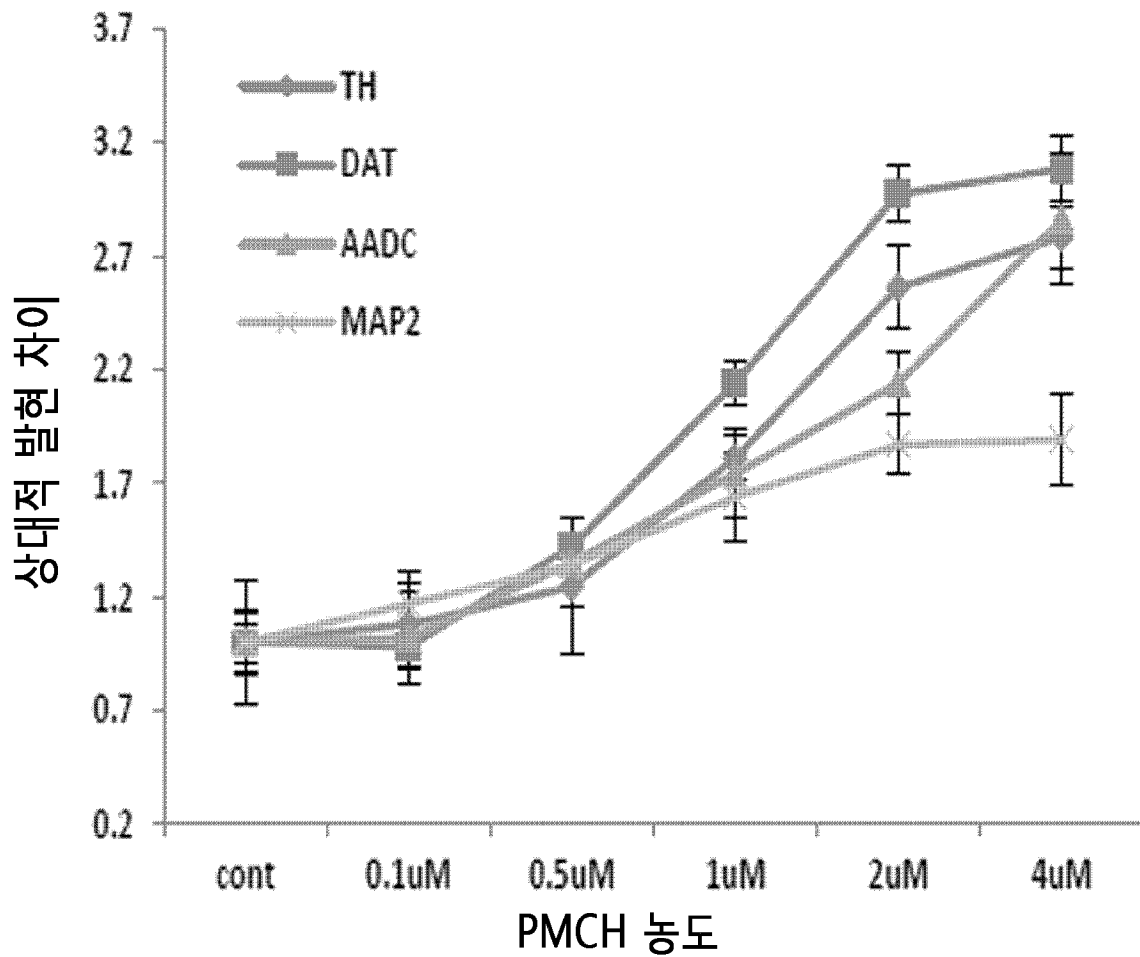
[도3]



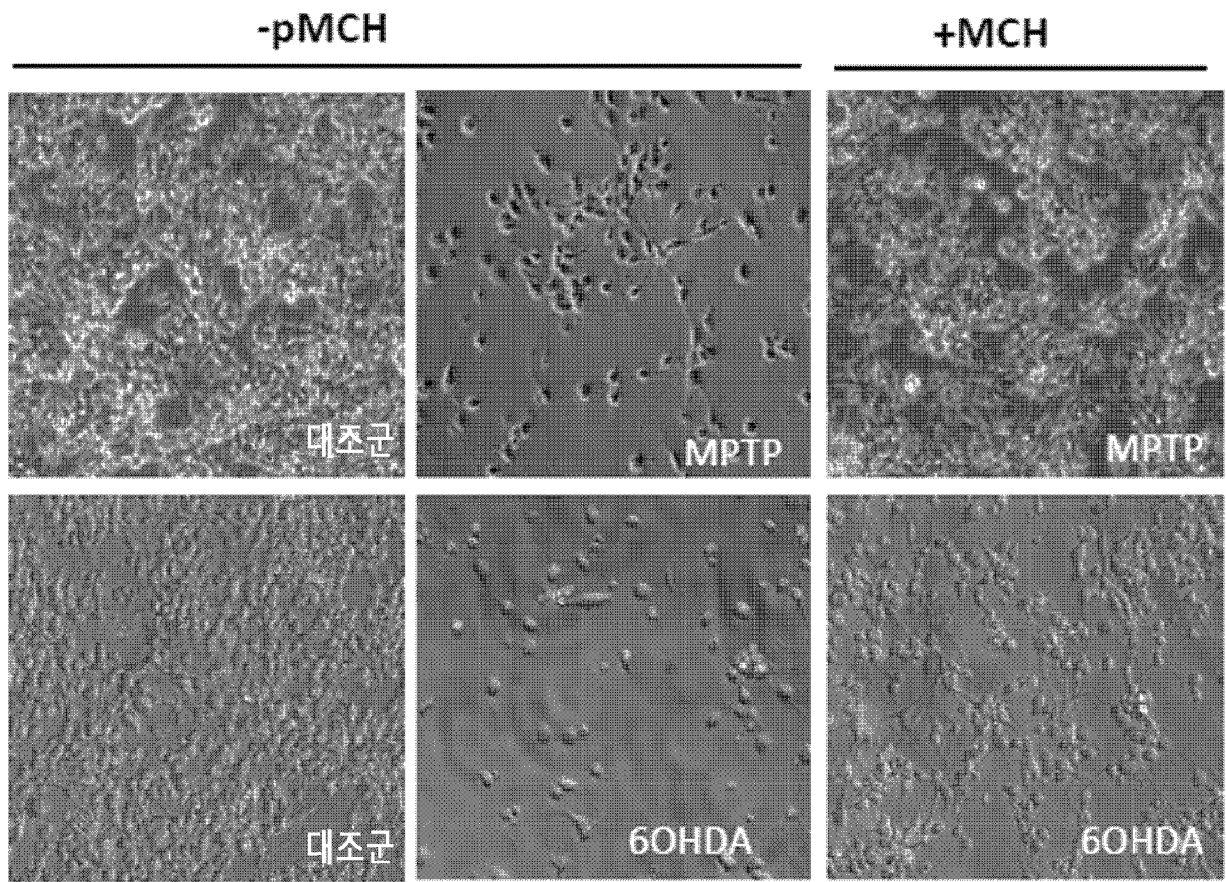
[도4]



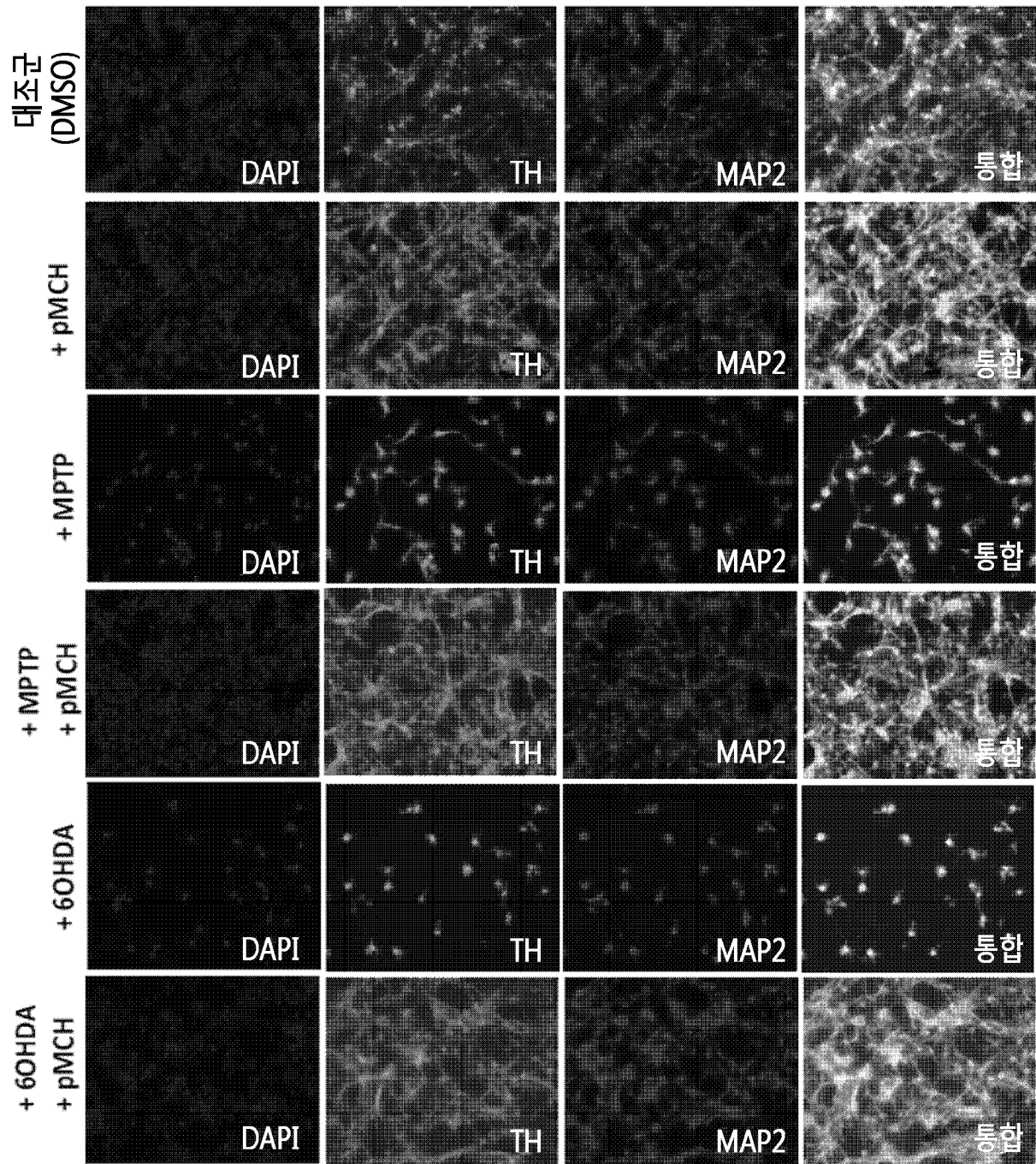
[도5]



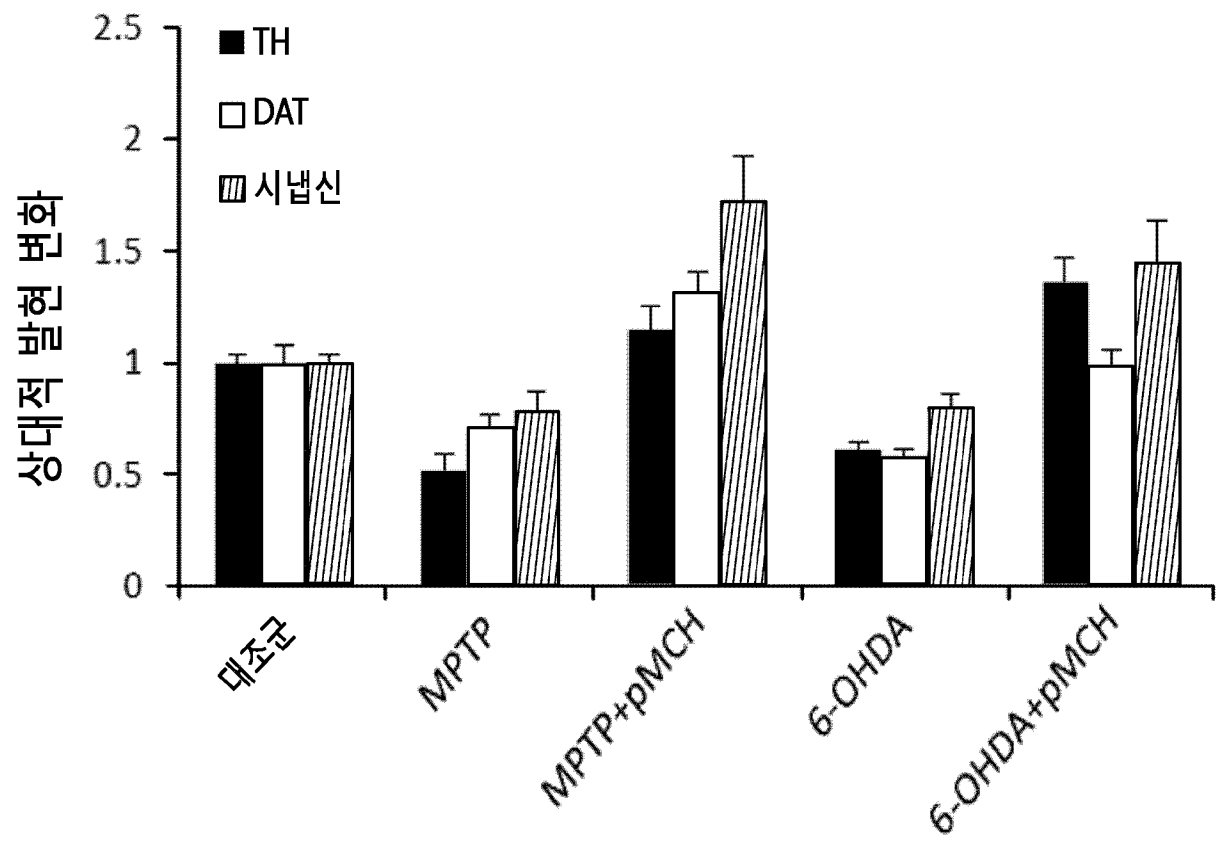
[도6]



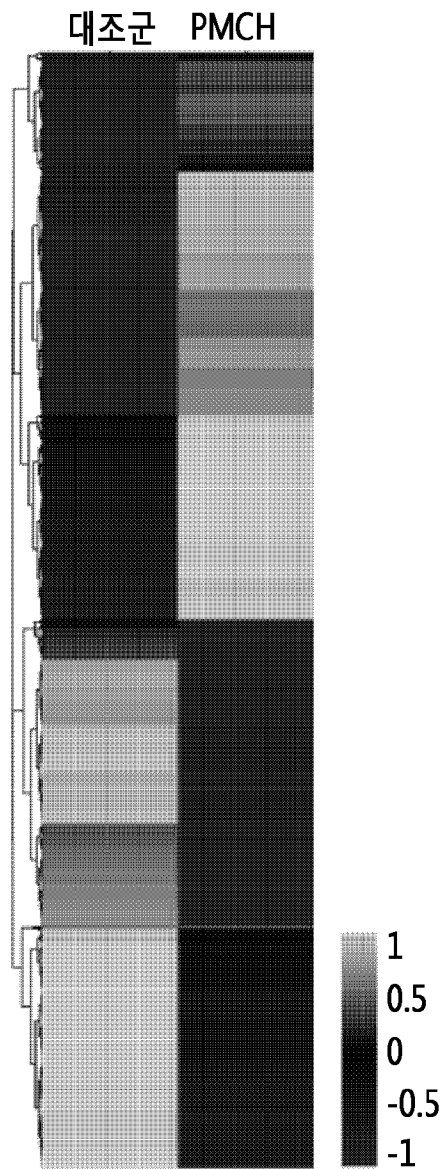
[도7]



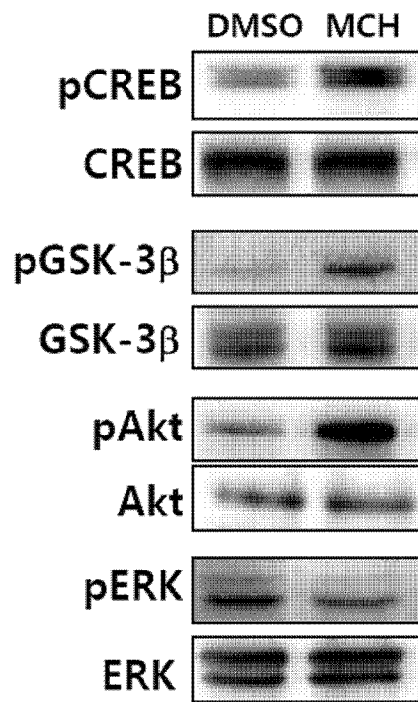
[도8]



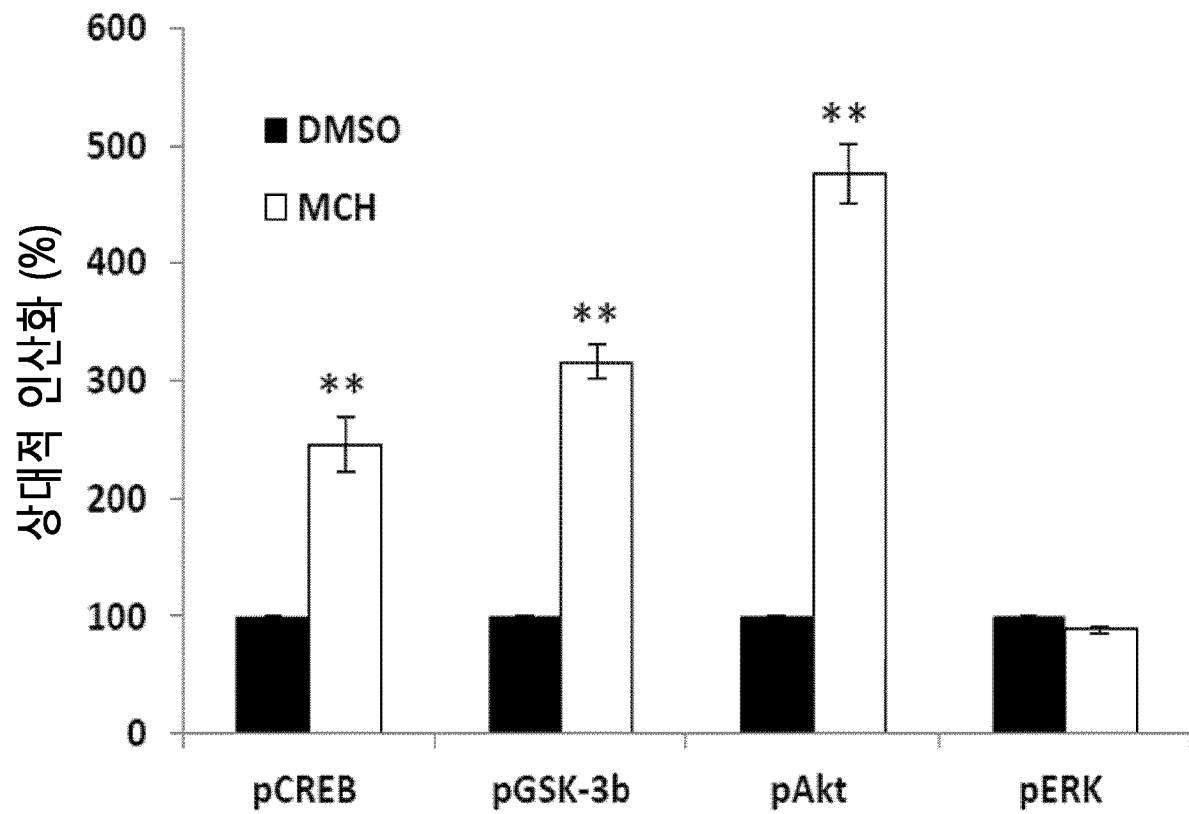
[도9]



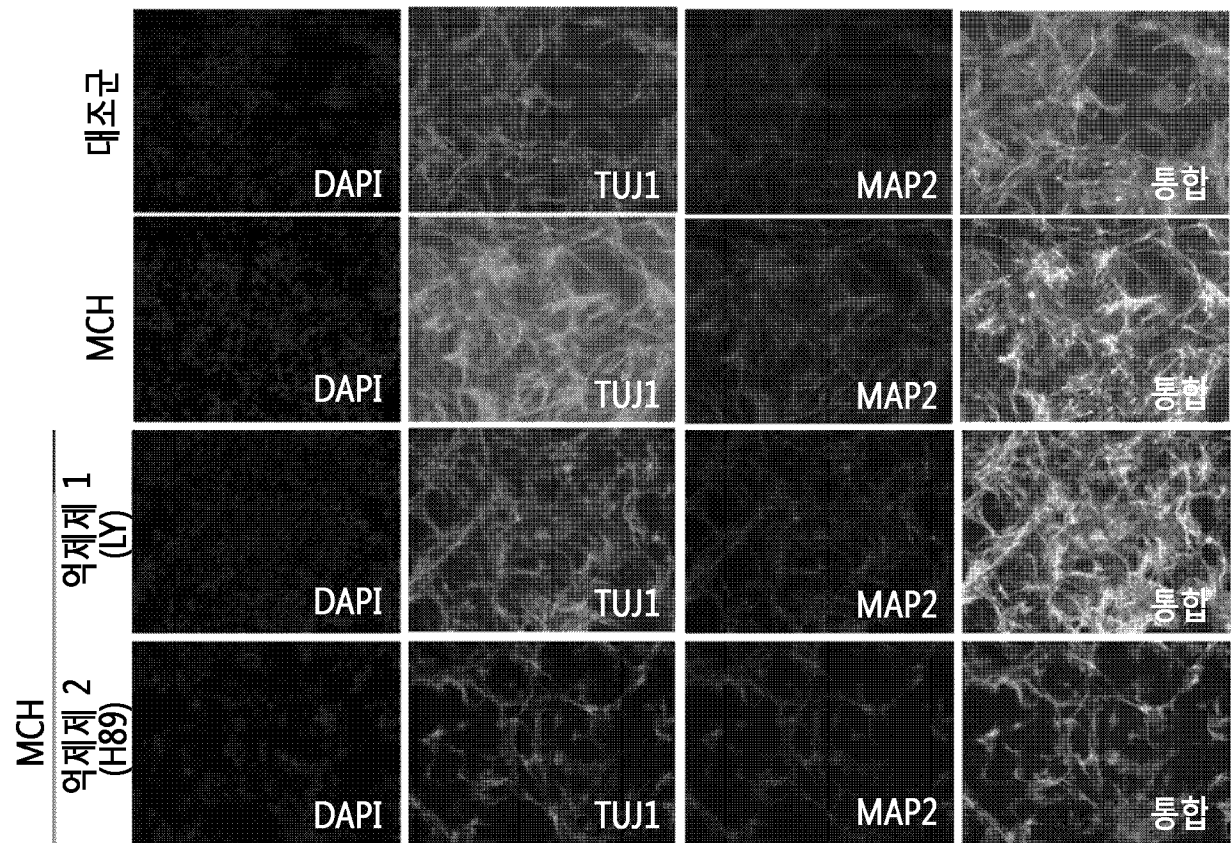
[도10]



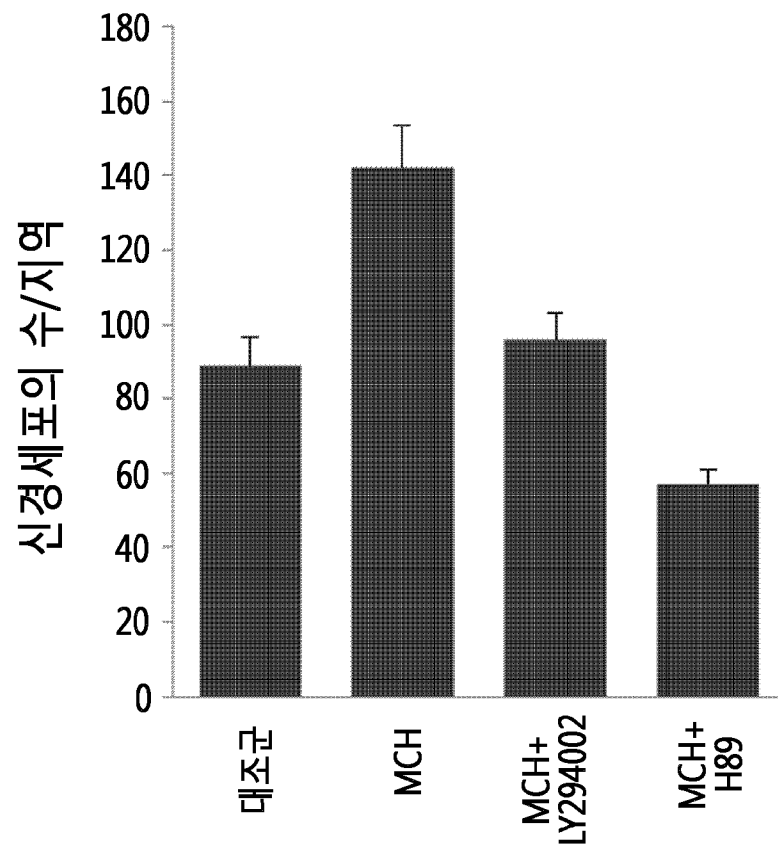
[도11]



[도12]

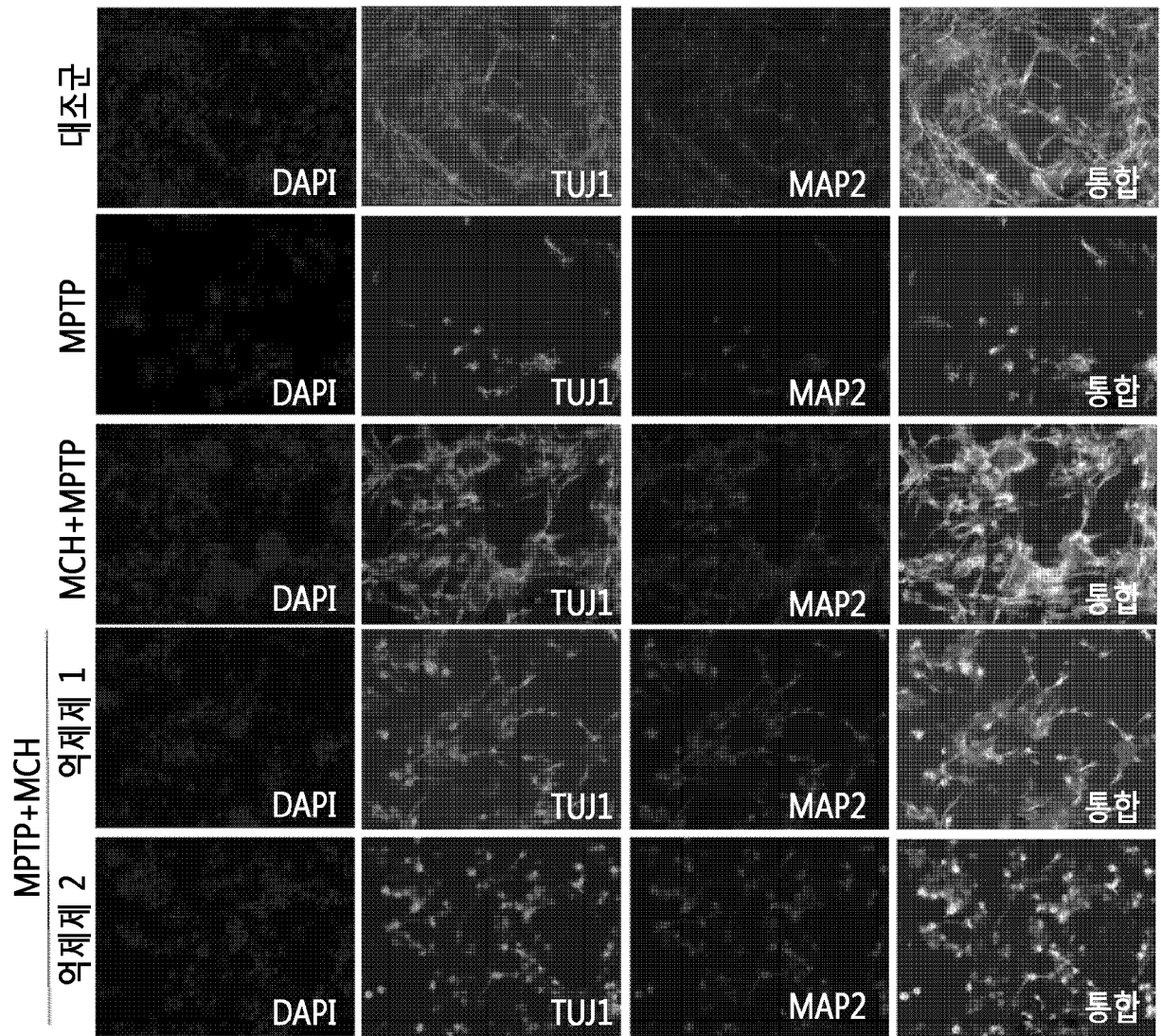


[도13]

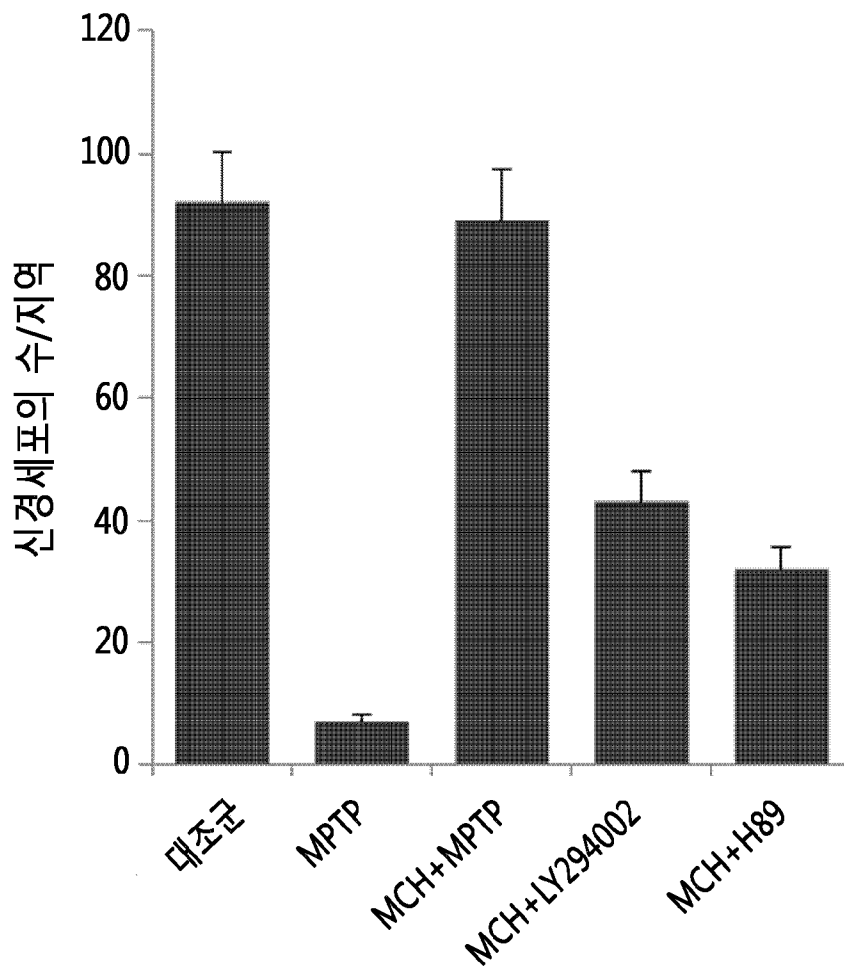


H89: 잠재적 PKA 억제제

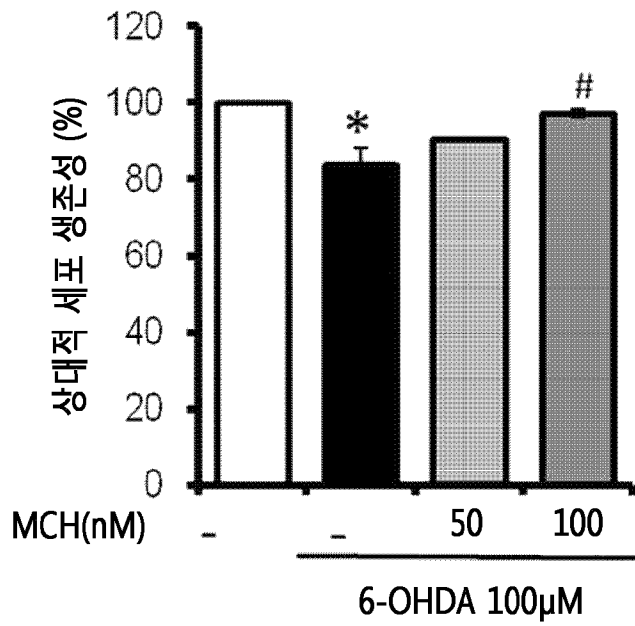
[도 14]



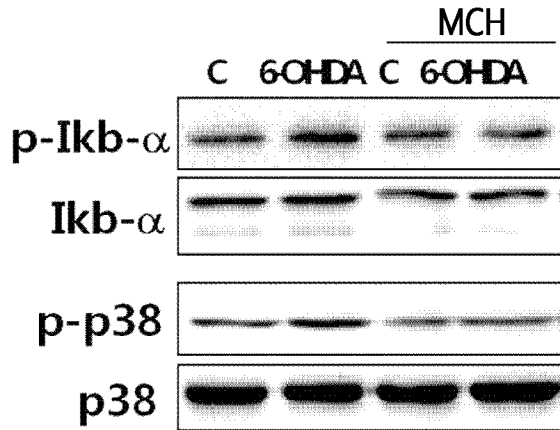
[도15]



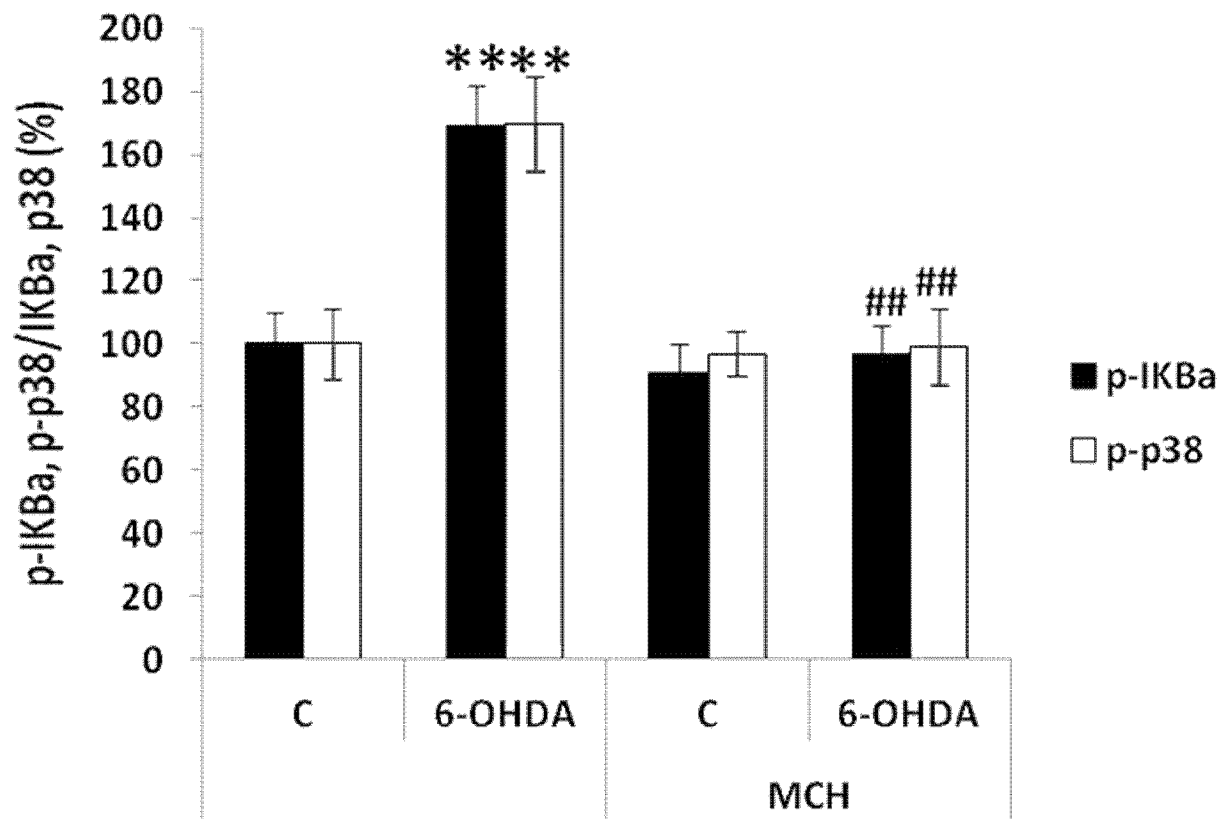
[도16]



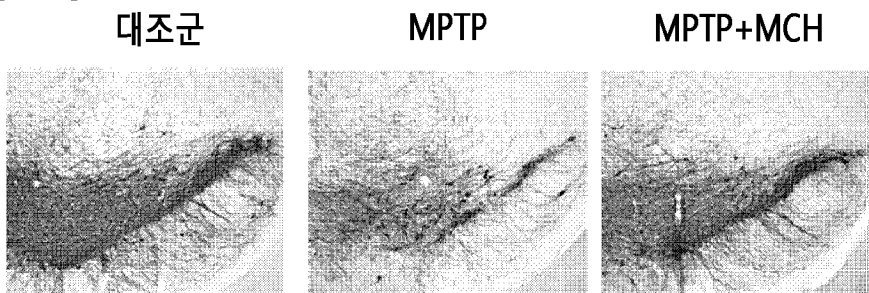
[도17]



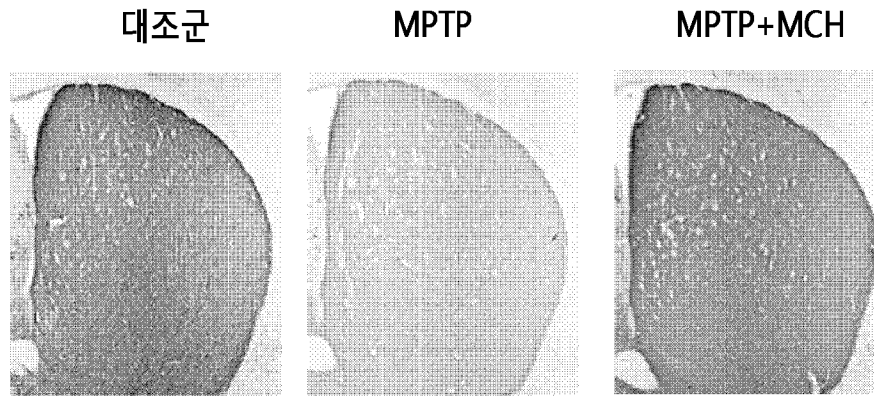
[도18]



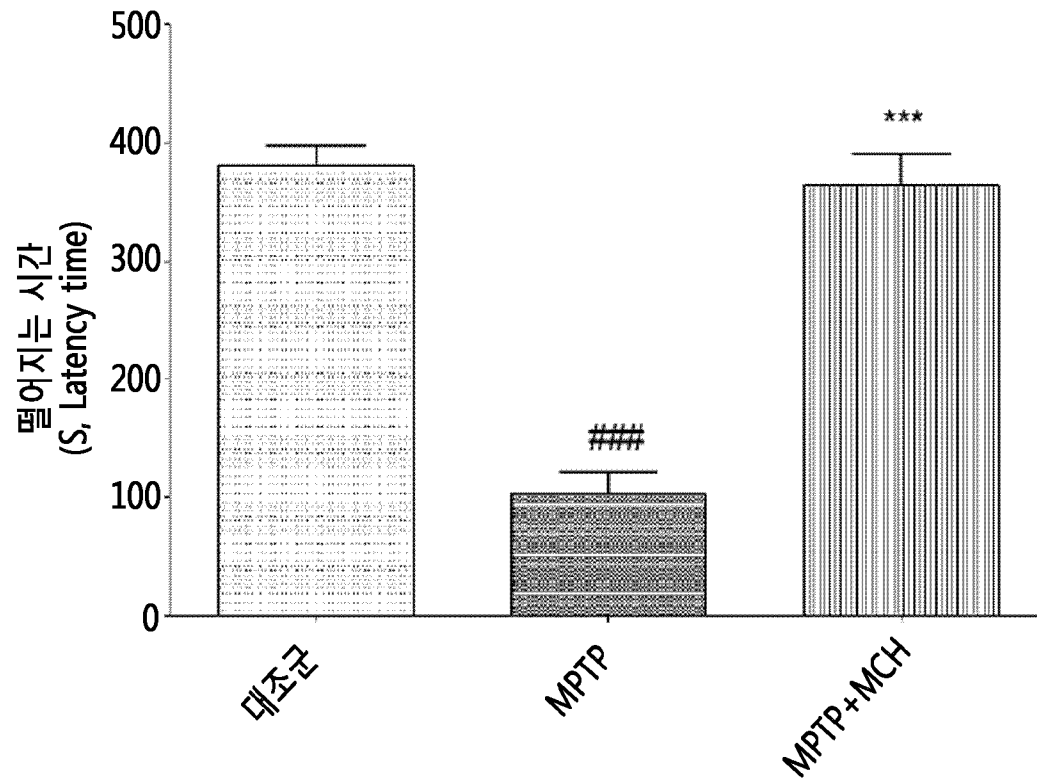
[도19]



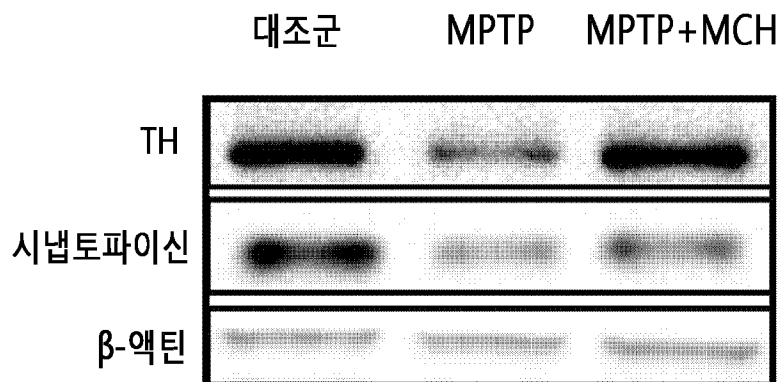
[도20]



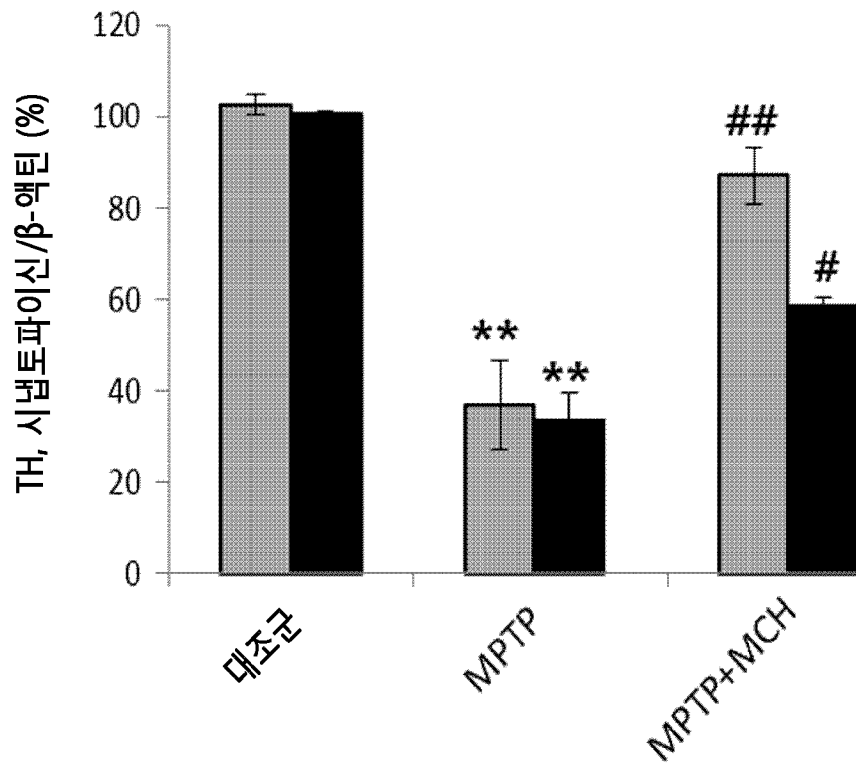
[도21]



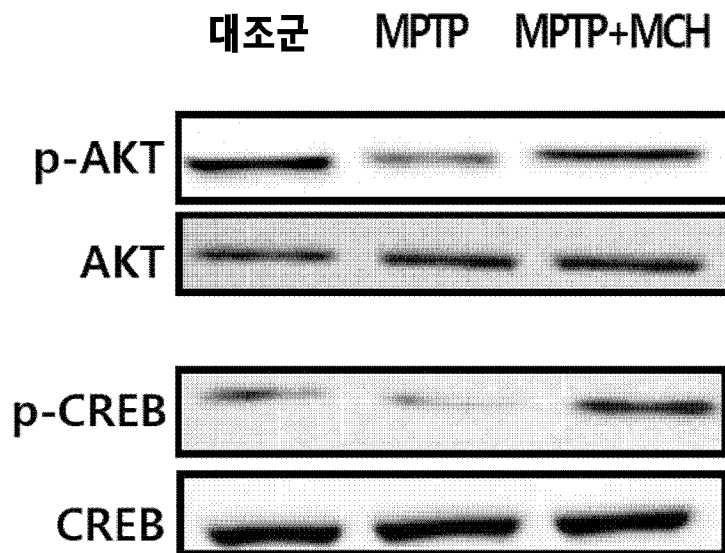
[도22]



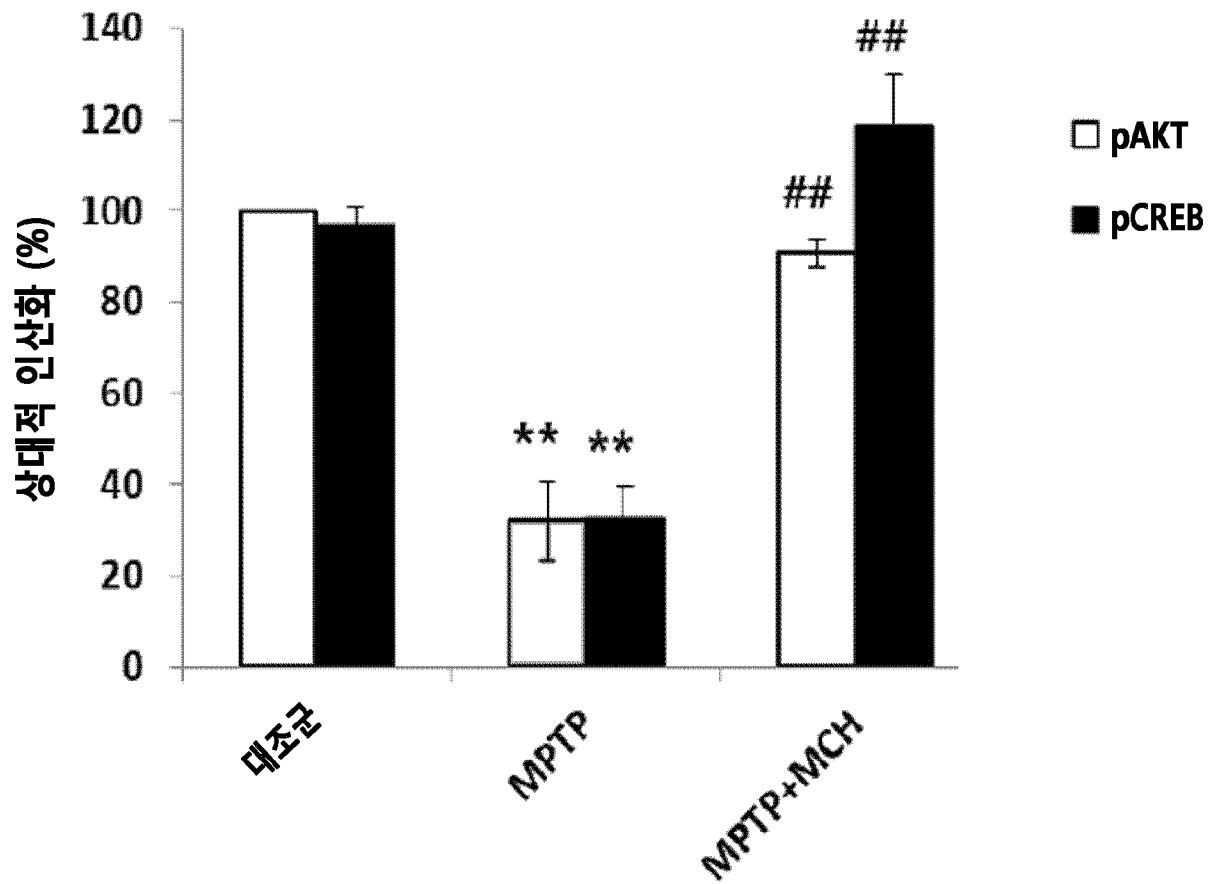
[도23]



[도24]

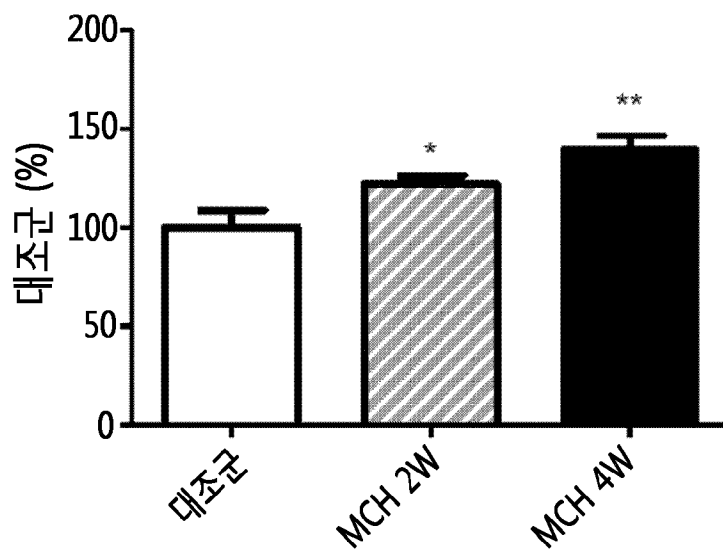


[도25]

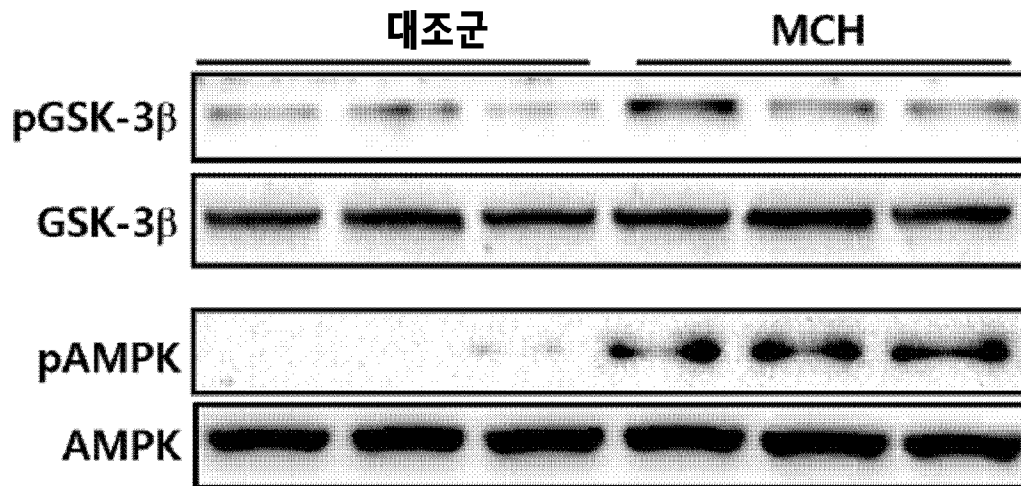


[도26]

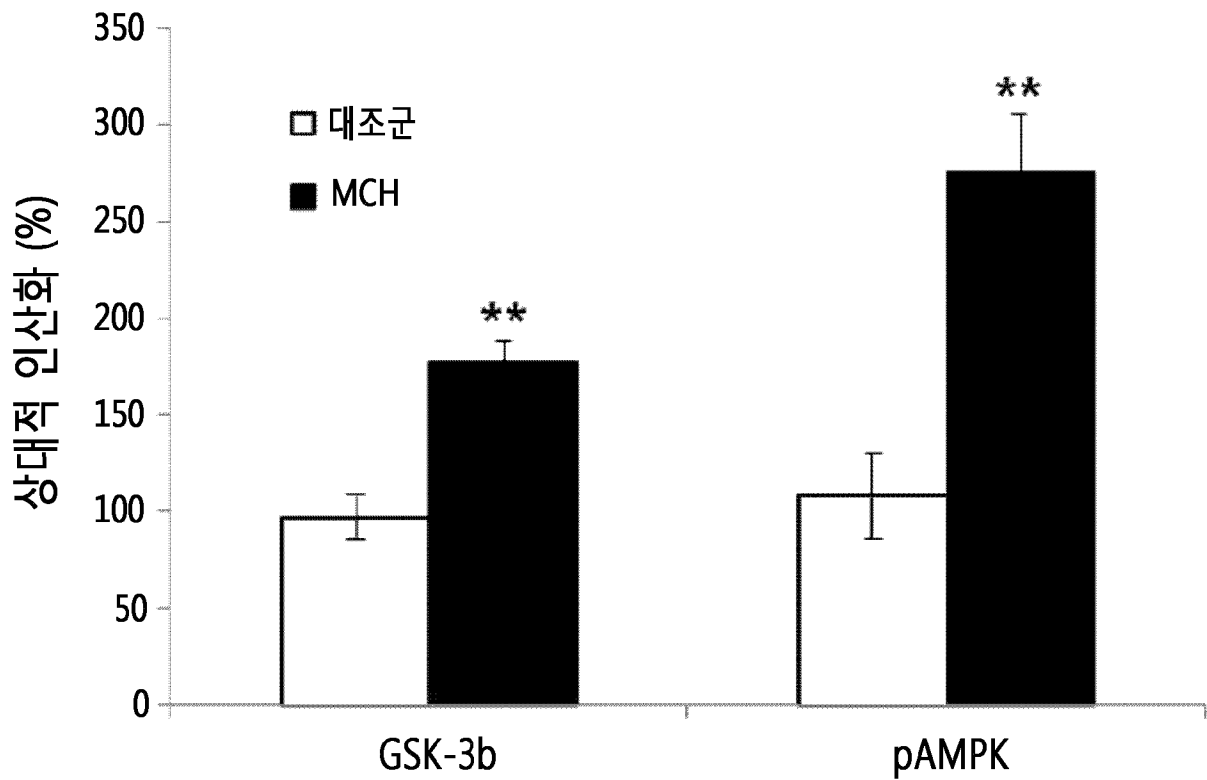
*A53T 시누클레인 tg



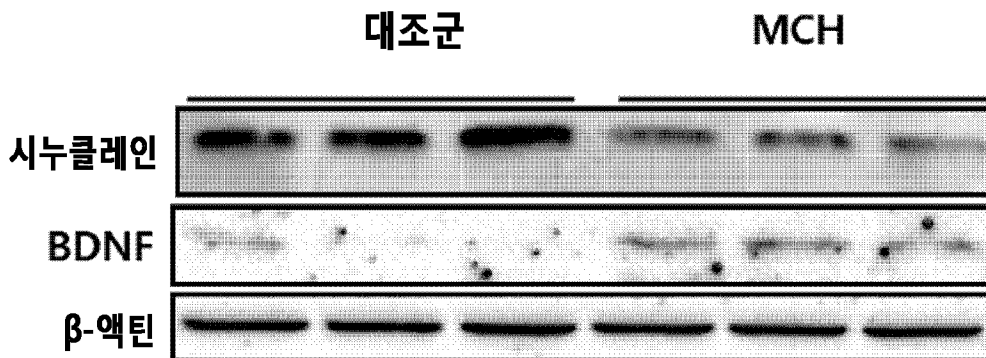
[도27]



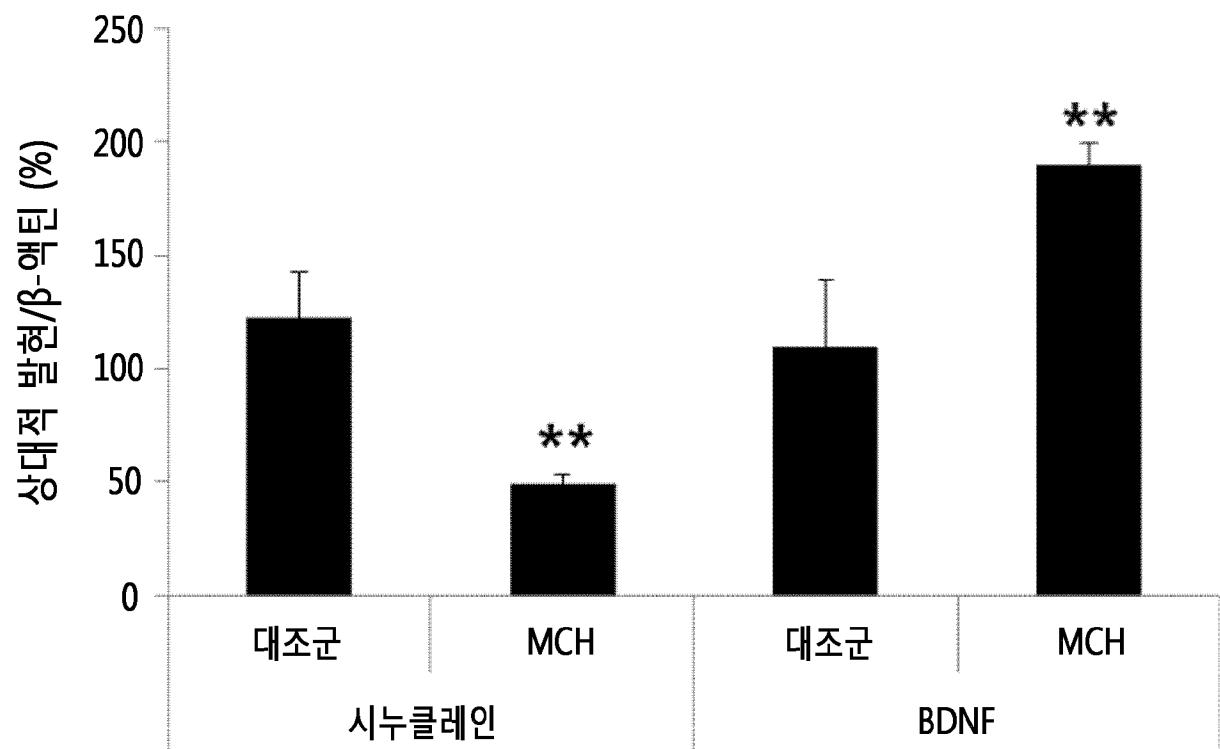
[도28]



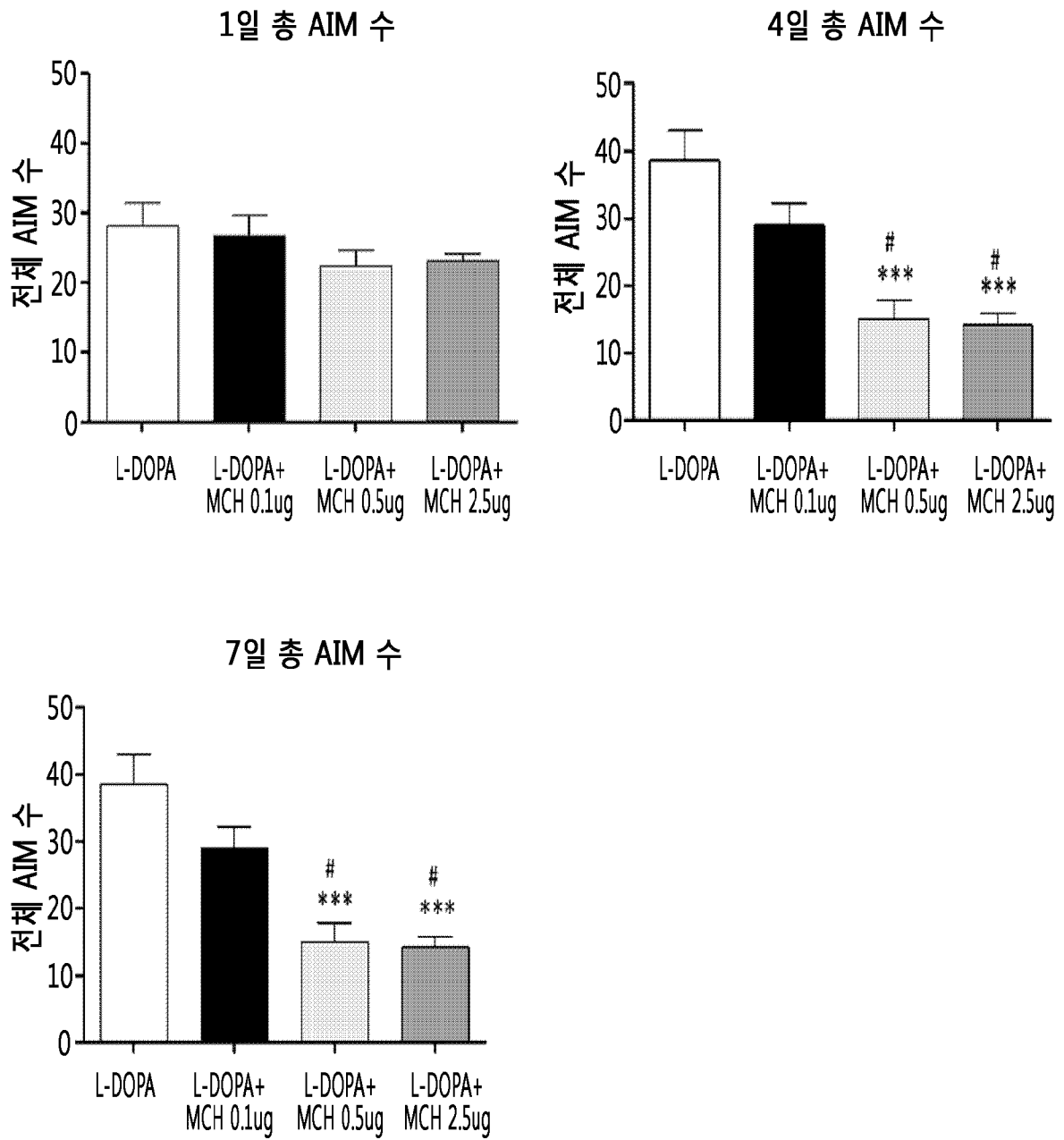
[도29]



[도30]



[도31]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/007884**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A61K 38/22(2006.01)i, A61K 31/198(2006.01)i, A23L 1/30(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/22; A61K 31/496; A61K 31/404; A61K 37/00; A61K 31/4427; A61K 31/198; A61K 9/24; A23L 1/30

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: melanin concentrating hormone, levodopa, motor disorder, carrier, excipient, diluent, Parkinson's disease

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5210076 A (BERLINER et al.) 11 May 1993 See abstract; columns 9-12, 25-26, 41-42; claims 1-5.	1-3,5-8
A		4,9-10
A	KR 10-2015-0017763 A (PSYCHOGENICS INC.) 17 February 2015 See the entire document.	1-10
A	KR 10-2010-0088136 A (NOVARTIS AG.) 06 August 2010 See the entire document.	1-10
A	US 2003-0031707 A1 (RUBIN) 13 February 2003 See the entire document.	1-10
A	THANVI et al., "Levodopa-induced Dyskinesia in Parkinson's Disease: Clinical Features, Pathogenesis, Prevention and Treatment", Postgraduate Medical Journal, vol. 83, pp. 384-388 (2007) See the entire document.	1-10
PX	LEE, "A Novel Target for L-dopa Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease: the Role of Melanin Concentrating Hormone", Master's Thesis of Kyunghee University (February 2016) See the entire document.	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 OCTOBER 2016 (20.10.2016)

Date of mailing of the international search report

20 OCTOBER 2016 (20.10.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/007884

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 5210076 A	11/05/1993	EP 0434750 A1	03/07/1991
		EP 0434750 B1	09/07/1997
		EP 0510186 A1	28/10/1992
		EP 0510186 B1	03/02/1999
		JP 04-500672 A	06/02/1992
		JP 2002-037743 A	06/02/2002
		JP 2002-058498 A	26/02/2002
		JP 2810953 B2	15/10/1998
		US 5703051 A	30/12/1997
		US 5776968 A	07/07/1998
		US 5817631 A	06/10/1998
		WO 90-02551 A2	22/03/1990
		WO 92-07580 A1	14/05/1992
KR 10-2015-0017763 A	17/02/2015	AU 2013-274667 A1	19/12/2013
		CA 2876203 A1	19/12/2013
		EP 2858649 A2	15/04/2015
		JP 2015-523989 A	20/08/2015
		WO 2013-188210 A2	19/12/2013
		WO 2013-188210 A3	02/07/2015
KR 10-2010-0088136 A	06/08/2010	AU 2008-309621 A1	16/04/2009
		CA 2701853 A1	16/04/2009
		CN 101854935 A	06/10/2010
		EP 2211859 A2	04/08/2010
		EP 2211859 B1	06/01/2016
		JP 2011-500529 A	06/01/2011
		JP 2014-240425 A	25/12/2014
		JP 5743545 B2	01/07/2015
		US 2010-0249136 A1	30/09/2010
		WO 2009-047296 A2	16/04/2009
US 2003-0031707 A1	13/02/2003	US 6238699 B1	29/05/2001
		US 6756056 B2	29/06/2004

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/22(2006.01)i, A61K 31/198(2006.01)i, A23L 1/30(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/22; A61K 31/496; A61K 31/404; A61K 37/00; A61K 31/4427; A61K 31/198; A61K 9/24; A23L 1/30

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 멜라닌 응집 호르몬, 레보도파, 운동장애, 담체, 부형제, 희석제, 파킨슨 병

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 5210076 A (BERLINER 등) 1993.05.11 요약; 칼럼 9-12, 25-26, 41-42; 청구항 1-5 참조.	1-3, 5-8
A		4, 9-10
A	KR 10-2015-0017763 A (싸이코제닉스 아이엔씨.) 2015.02.17 전체 문헌 참조.	1-10
A	KR 10-2010-0088136 A (노파르티스 아게) 2010.08.06 전체 문헌 참조.	1-10
A	US 2003-0031707 A1 (RUBIN) 2003.02.13 전체 문헌 참조.	1-10
A	THANVI 등, 'Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: clinical features, pathogenesis, prevention and treatment' Postgraduate Medical Journal, Vol.83, pp.384-388 (2007) 전체 문헌 참조.	1-10
PX	LEE, 'A novel target for L-dopa induced dyskinesia in Parkinson's disease: the role of melanin concentrating hormone' 경희대학교 석사 학위논문 (2016.02) 전체 문헌 참조.	1-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 10월 20일 (20.10.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 10월 20일 (20.10.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

김승범

전화번호 +82-42-481-3371



제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 기초하여 수행되었습니다.

a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록

☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일

☐ 서면 혹은 이미지 파일

b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록

☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))

☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 5210076 A	1993/05/11	EP 0434750 A1 EP 0434750 B1 EP 0510186 A1 EP 0510186 B1 JP 04-500672 A JP 2002-037743 A JP 2002-058498 A JP 2810953 B2 US 5703051 A US 5776968 A US 5817631 A WO 90-02551 A2 WO 92-07580 A1	1991/07/03 1997/07/09 1992/10/28 1999/02/03 1992/02/06 2002/02/06 2002/02/26 1998/10/15 1997/12/30 1998/07/07 1998/10/06 1990/03/22 1992/05/14
KR 10-2015-0017763 A	2015/02/17	AU 2013-274667 A1 CA 2876203 A1 EP 2858649 A2 JP 2015-523989 A WO 2013-188210 A2 WO 2013-188210 A3	2013/12/19 2013/12/19 2015/04/15 2015/08/20 2013/12/19 2015/07/02
KR 10-2010-0088136 A	2010/08/06	AU 2008-309621 A1 CA 2701853 A1 CN 101854935 A EP 2211859 A2 EP 2211859 B1 JP 2011-500529 A JP 2014-240425 A JP 5743545 B2 US 2010-0249136 A1 WO 2009-047296 A2 WO 2009-047296 A3	2009/04/16 2009/04/16 2010/10/06 2010/08/04 2016/01/06 2011/01/06 2014/12/25 2015/07/01 2010/09/30 2009/04/16 2009/08/20
US 2003-0031707 A1	2003/02/13	US 6238699 B1 US 6756056 B2	2001/05/29 2004/06/29