



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년07월17일
(11) 등록번호 10-2001338
(24) 등록일자 2019년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/258 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 36/076 (2006.01) A61K 36/232 (2006.01)
A61K 36/284 (2006.01) A61K 36/484 (2006.01)
A61K 36/804 (2006.01) A61P 25/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/258 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0015867

(22) 출원일자 2018년02월08일

심사청구일자 2018년02월08일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020040023196 A*

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

동국대학교 경주캠퍼스 산학협력단

경상북도 경주시 동대로 123 (석장동)

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

박선동

경기도 고양시 일산동구 은행마울로 16, 108동 1505호

김승남

서울특별시 마포구 월드컵북로 361, 1804호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 피씨알

전체 청구항 수 : 총 7 항

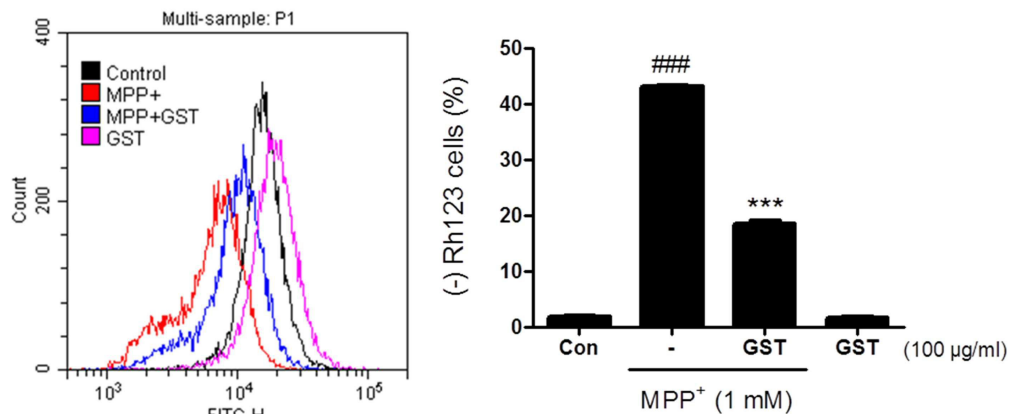
심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 혼합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호의 혼합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물에 관한 것으로 파킨슨병의 증상을 개선할 수 있으며, 레보도파의 부작용을 억제할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 36/076 (2013.01)
A61K 36/232 (2013.01)
A61K 36/284 (2013.01)
A61K 36/484 (2013.01)
A61K 36/804 (2013.01)
A61P 25/16 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(72) 발명자

이주희

경기도 고양시 일산동구 은행마일로 16, 104동 80
2호

박희준

서울특별시 강동구 동남로71길 41, 11동 104호

(56) 선행기술조사문헌

KR1020040087352 A*
 KR1020140080289 A*
 KR1020020092147 A*

송택진, “청간탕가미방과 레보도파와의 상승 및
부작용억제 효과 연구”. 경희대학교 대학원 기초
한의과학과 한의학 전공, 2017년, pp. 1-41*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465022692

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 (재단)통합의료진흥원

연구사업명 통합의료연구지원사업

연구과제명 파킨슨병 치료를 위한 한약+레보도파 병용투여 기술 개발 비임상 연구

기 여 율 1/1

주관기관 동국대학교경주캠퍼스산학협력단

연구기간 2016.12.01 ~ 2017.09.30

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호의 혼합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하고,

상기 혼합 생약 추출물은 인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호를 각각 3 : 2 : 2 : 2 : 2 : 2 : 2 : 2 : 3 : 2 : 2 : 2의 중량비로 혼합하여 추출한 것인 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 혼합 생약 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급알코올, 또는 이들의 혼합용매로 추출된 것인 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 도파민 신경세포 보호 효과 또는 운동능력 개선 효과를 나타내는 것인 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호의 혼합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하고,

상기 혼합 생약 추출물은 인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호를 각각 3 : 2 : 2 : 2 : 2 : 2 : 2 : 2 : 3 : 2 : 2 : 2의 중량비로 혼합하여 추출한 것인 레보도파의 부작용 억제용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 레보도파의 부작용은 운동장애인 것인 레보도파의 부작용 억제용 약학적 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호의 혼합 생약 추출물과 레보도파를 유효성분으로 포함하고,

상기 혼합 생약 추출물은 인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호를

각각 3 : 2 : 2 : 2 : 2 : 2 : 2 : 2 : 2 : 3 : 2 : 2 : 2의 중량비로 혼합하여 추출한 것인 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 9

인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호의 혼합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하고,

상기 혼합 생약 추출물은 인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호를 각각 3 : 2 : 2 : 2 : 2 : 2 : 2 : 2 : 2 : 3 : 2 : 2 : 2의 중량비로 혼합하여 추출한 것인 레보도파의 부작용 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호의 혼합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 레보도파의 부작용 억제용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 파킨슨병(Parkinson's disease)은 진전(tremor), 경직(rigidity), 서동(bradykinesia, 운동 완만증), 보행 장애 등의 증상이 나타나는 만성 퇴행성 신경질환으로, 인류의 노령화와 함께 유병율이 높아지고 경제적으로 큰 부담이 되고 있는 질병이다. 파킨슨병은 뇌의 흑질에 분포하는 도파민 분비 신경세포가 소실됨으로써 도파민(dopamine)이 감소하여 발병하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 파킨슨병의 치료법 중에서 대표적인 것에는 레보도파(levodopa)를 투여하여 뇌내 시냅스에 도파민을 보충하는 방법이 있다. 레보도파를 투여하면 파킨슨병의 증상이 신속하게 완화되는 장점이 있으나, 도파민 조절장애 증후군(dopamine dysregulation syndrome), 이상 운동증(dyskinesia) 및 약효 소실(on-off) 등과 같은 부작용이 발생할 수 있다. 이러한 부작용들은 만성적으로 레보도파를 사용하는 파킨슨병 환자의 50% 이상에서 발생하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 따라서 파킨슨병의 치료 방법 또는 새로운 치료제 연구와 더불어 레보도파의 부작용을 개선하거나, 레보도파의 복용량을 줄이면서도 동일한 효과를 얻을 수 있는 방법이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 제 10-1749675호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 일 목적은 인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호의 혼합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호의 혼합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는, 레보도파의 부작용 억제용 약학적 조성물과 레보도파의 부작용 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양상은 인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호의 혼합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는, 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 명세서에서 사용된 용어, '파킨슨병(Parkinson's disease)은 진전(tremor), 경직(rigidity), 서동(bradykinesia, 운동 완만증), 보행 장애 등의 증상이 나타나는 만성 퇴행성 신경질환이며, 뇌의 흑질에 분포하는 도파민 분비 신경세포가 소실됨으로써 도파민(dopamine)이 감소하여 발병한다.
- [0013] 본 명세서에서 사용된 용어, '혼합 생약 추출물'은 인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호를 일정 비율에 따라 혼합한 후 용매를 첨가하여 제조한 추출물, 또는 상기 12종 생약제 각각의 단독 추출물을 제조한 후 이를 혼합한 추출물을 의미한다.
- [0014] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 혼합 생약 추출물은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 제조될 수 있다. 구체적으로 각각의 생약제를 세척, 건조 및 분쇄한 후, 통상적인 온도와 압력의 조건으로 통상적인 용매를 사용하여 혼합 생약 추출물을 제조할 수 있다.
- [0015] 상기 용매는 증류수, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 에틸아세테이트, 클로로포름, 디에틸에테르, 디클로로메탄, 핵산, 아세톤 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 증류수인 것이 바람직하다.
- [0016] 한편, 상기 혼합 생약 추출물은 상술한 용매 추출법에 의한 추출물뿐만 아니라, 통상적인 정제 과정을 거친 추출물도 포함한다. 예컨대, 일정한 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 이용한 분리, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시한 다양한 정제 방법들 통해 얻어진 분획도 본 발명의 혼합 생약 추출물에 포함될 수 있다. 또한, 상기 혼합 생약 추출물은 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조될 수 있다. 구체적으로, 상기 혼합 생약 추출물은 살균 및 분무건조 과정을 거쳐서 분말 형태로 제조될 수 있으며, 70℃ 내지 90℃의 온도에서 10분 내지 40분 동안 살균한 후, 분무건조기를 이용하여 분말 형태로 제조될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 혼합 생약 추출물은 약학적 조성물 100 중량부를 기준으로 인삼 5 내지 25 중량부, 백출 1 내지 20 중량부, 복령 1 내지 20 중량부, 감초 1 내지 20 중량부, 숙지황 1 내지 20 중량부, 당귀 1 내지 20 중량부, 천궁 1 내지 20 중량부, 작약 1 내지 20 중량부, 황기 5 내지 25 중량부, 천마 1 내지 20 중량부, 조구등 1 내지 20 중량부 및 시호 1 내지 20 중량부를 혼합하여 제조된 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등과 같은 경구 투여용 담체 및 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다.
- [0019] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 적합한 형태로 제형화 될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있다. 비경구 투여용 제형의 대표적인 것으로는 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는, 이에 한정되지는 않으나, 분말, 과립, 정제, 환약 및 캡슐 등이 있다.
- [0020] 상기와 같은 방법으로 제형화된 약학적 조성물은 유효량으로 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 상기에서 '유효량'이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 연령, 성별, 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택할 수 있다. 또한, 상기 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 파킨슨병의 치료를 위하여 레보도파와 병용하여 투여될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호의 혼합 생약 추출물은 도파민 분비 신경세포를 보호하고, 파킨슨병 동물 모델의 운동능력을 개선하는 효과가

있으므로 파킨슨병의 예방 또는 치료 용도로 유용하게 이용될 수 있다.

- [0023] 본 발명의 다른 양상은 인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호의 혼합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는, 레보도파의 부작용 억제용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0024] 상기 레보도파의 부작용 억제용 약학적 조성물은 상기 파킨슨병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물과 동일한 유효성분을 포함하기 때문에 이 둘 사이에 공통된 내용은 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재 생략한다.
- [0025] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 레보도파의 부작용은 운동장애일 수 있으며, 예를 들어 고용량의 레보도파 투여에 의한 운동장애일 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호의 혼합 생약 추출물은 고농도의 레보도파를 투여한 파킨슨병 동물모델에서 이상 행동을 개선시킬 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 양상은 인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호의 혼합 생약 추출물을 유효성분으로 함유하는, 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품과 레보도파의 부작용 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0029] 본 명세서에서 사용된 용어, '건강기능식품'은 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 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0030] 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.
- [0031] 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, 초콜릿, 캔디류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다.
- [0032] 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.
- [0033] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호의 혼합 생약 추출물은 도파민 분비 신경세포를 보호하고, 파킨슨병 동물 모델의 운동능력을 개선하는 효과가 있으므로 파킨슨병의 예방 또는 개선용 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.
- [0034] 또한, 인삼, 백출, 복령, 감초, 숙지황, 당귀, 천궁, 작약, 황기, 천마, 조구등 및 시호의 혼합 생약 추출물은 고농도의 레보도파를 투여한 파킨슨병 동물모델에서 운동장애를 개선하는 효과가 있으므로 레보도파의 부작용 개선용 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 효과

- [0036] 본 발명의 일 실시예에 따른 생약 추출물을 이용하면 파킨슨병의 증상을 개선시킬 수 있으며, 레보도파에 의한 부작용을 감소시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 가감십전대보탕(Gagam-Sipjeondaebotang, GST) 추출물의 세포독성 여부를 확인한 결과를 보여준다.
- 도 2는 GST 추출물의 처리 농도에 따른 신경세포 보호 효능을 확인한 결과를 보여준다.
- 도 3은 신경세포에서 GST 추출물의 활성 산소 생성 억제 효능을 확인한 결과를 보여준다.
- 도 4는 신경세포에서 GST 추출물의 미토콘드리아 기능 손상 억제 효능을 확인한 결과를 보여준다.

도 5는 GST 추출물의 처리 여부에 따른 세포사멸 억제 관련 단백질의 발현 변화를 확인한 결과를 보여준다.

도 6은 GST 추출물의 처리 시간에 따른 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 신호전달경로와 PI3K/Akt 신호전달경로 단백질의 발현 변화를 확인한 결과를 보여준다.

도 7은 GST 추출물의 미토콘드리아 기능 손상 억제 효능에 대한 기작을 신경세포에서 확인한 결과를 보여준다.

도 8은 파킨슨병 동물모델에서 GST 추출물의 운동능력 개선 효능을 확인한 결과를 보여준다.

도 9는 파킨슨병 동물모델에서 GST 추출물의 도파민 신경세포 보호 효능을 확인한 결과를 보여준다.

도 10은 파킨슨병 동물모델에서 레보도파의 운동능력 개선 효능을 확인한 결과를 보여준다.

도 11은 파킨슨병 동물모델에 레보도파와 GST 추출물의 병용 투여한 후 막대 검사를 수행한 결과를 보여준다.

도 12는 파킨슨병 동물모델에 레보도파와 GST 추출물의 병용 투여한 후 로타로드 검사를 수행한 결과를 보여준다.

도 13은 파킨슨병 동물모델에 고농도의 레보도파를 투여한 후 이상 행동 여부를 확인한 결과를 보여준다.

도 14는 파킨슨병 동물모델에 고농도의 레보도파를 투여한 후 GST 추출물 투여에 의한 이상 행동의 개선 여부를 확인한 결과를 보여준다.

도 15는 파킨슨병 동물모델에 고농도의 레보도파를 투여한 후 GST 추출물 투여 기간에 따른 이상 행동의 개선 여부를 확인한 결과를 보여준다.

도 16은 파킨슨병 동물모델에 고농도의 레보도파를 투여한 후 GST 추출물 투여에 의한 p-DARPP-32의 발현 변화를 확인한 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 실험 방법

[0042] 1. 가감십전대보탕 추출물 제조

[0043] 파킨슨병의 증상을 완화시키거나 레보도파의 부작용을 완화시킬 수 있는 한약재를 하기 표 1과 같이 선별하고, 30% 에탄올을 첨가하여 80℃에서 4시간 동안 추출물을 제조하였다. 제조된 추출물을 감압농축하고, 동결건조하여 분말로 제조하였다. 이하에서는 제조된 추출물 분말을 가감십전대보탕 (Gagam-Sipjeondaebo-Tang) 추출물 또는 GST 추출물로 기재한다.

표 1

약재명	비율	수득율(%)
인삼	3	22.7
백출	2	
복령	2	
감초	2	
숙지황	2	
당귀	2	
천궁	2	
작약	2	
황기	3	
천마	2	
조구등	2	
시호	2	

[0046] 2. GST 추출물의 신경세포 보호 효과 확인

[0047] 2-1. 세포 배양

- [0048] 인간 신경아세포종 세포주(human neuroblastoma cell line)인 SH-SY5Y 세포는 Korean Cell Line Bank (KCLB, Korea)에서 구입하여 37℃ 및 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 배지는 10% FBS(소 태아 혈청, Fetal Bovine Serum; Hyclone, USA)와 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin; Hyclone)을 첨가한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Hyclone)을 이용하였다.
- [0050] **2-2. MTT assay**
- [0051] SH-SY5Y 세포를 96-웰 세포 배양 플레이트에 분주(1×10^4 세포/웰)하여 24시간 동안 배양하고, 다양한 농도(0, 10, 30, 50, 100, 300 및 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)의 GST 추출물을 처리하여 24시간 동안 추가로 배양하였다.
- [0052] 또한, MPP+로 유도한 신경독성 모델에서 GST 추출물의 효능을 평가하기 위해 SH-SY5Y 세포를 96-웰 세포 배양 플레이트에 분주(1×10^4 세포/웰)하여 24시간 동안 배양하였다. GST 추출물을 1시간 동안 전처리하고, MPP+(1-Methyl-4-phenylpyridinium; Sigma-Aldrich, USA) 1 mM을 처리하여 24시간 동안 추가로 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고 MTT(3-(4,5-dimethylthazol-2-yl)-2,5-tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich)를 최종 농도 0.2 mg/ml이 되도록 첨가하여 2시간 동안 배양하였다. 이후 DMSO(dimethylsulfoxide)로 포르마잔(formazan) 결정을 용해시키고, 마이크로플레이트 리더기(microplate reader; Tecan, Research Triangle Park, USA)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. MPP+ 또는 GST 추출물을 처리하지 않은 대조군을 기준으로 GST 추출물 처리군의 세포 생존율(%)을 계산하였다.
- [0054] **2-3. 활성 산소(Reactive oxygen species, ROS) 측정**
- [0055] SH-SY5Y 세포를 24-웰 플레이트에서 배양한 후, GST 추출물을 1시간 동안 전처리하고, MPP+ 1 mM을 처리하여 18 시간 동안 추가로 배양하였다. PBS(phosphate buffer saline)로 희석한 DCFH-DA(2', 7-dichlorofluorescein diacetate)를 5 μM 농도로 배지에 첨가하고, 30분 동안 배양한 후 세포를 PBS로 2회 세척하였다. 이후 CytoFLEX flow cytometer(Beckman Coulter Inc., USA)로 형광 강도를 측정하였으며, 대조군과 비교하여 백분율(%)로 DCF 형광 광도의 증가율을 계산하였다.
- [0057] **2-4. 미토콘드리아의 막전위 (Mitochondrial membrane potentials) 측정**
- [0058] 미토콘드리아 기능 손상에 대한 GST 추출물의 효과를 확인하기 위하여 하기와 같이 실험하였다.
- [0059] SH-SY5Y 세포를 24-웰 플레이트에서 배양한 후 GST 추출물을 1시간 동안 전처리하고, MPP+ 1 mM을 처리하여 18 시간 동안 추가로 배양하였다. 이후 세포에 막 투과성 형광 염색 용액인 로다민 123(Rhodamine 123)을 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하여 30분 동안 염색하고, 세포를 회수하여 1% FBS가 포함된 PBS로 세척하였다. CytoFLEX flow cytometer로 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential, MPP) 변화를 측정하였다.
- [0061] **3. 파킨슨병 동물모델에서 GST 추출물의 효과 확인**
- [0062] **3-1. 실험동물 및 처치**
- [0063] 10주령의 C57BL/6 마우스를 오리엔트바이오(Korea)에서 구입하여 동국대학교 동물실험 연구센터에서 12시간 명암주기로 사육하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 며칠 동안의 적응 기간을 거친 후 본 실험에 이용하였다.
- [0064] 마우스는 무작위로 정상군(CON), MPTP 투여군(파킨슨병 동물모델; MPTP), GST 추출물 투여군(CON+GST), MPTP+GST 추출물 투여군(MPTP+GST), MPTP+레보도파 투여군(MPTP+LD) 및 MPTP+레보도파+GST 추출물 투여군(MPTP+GST+LD)으로 나누었다. 모든 실험군은 각각의 처치 스트레스를 최소화하기 위해 동일한 용량과 시간으로 복강 투여 또는 경구 투여하였으며, 대조군에는 생리식염수를 투여하여 투여 행위 자체에 의한 스트레스를 보정하였다. MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine; Sigma Aldrich)는 0.1 ml 생리식염수에 최종 농도 20 mg/kg로 용해시키고, 2시간 간격으로 하루 동안 4번 총 80 mg/kg을 복강에 투여하였다. 레보도파는 5, 10, 15 및 20 mg/kg의 농도를 투여하여 운동능력 향상을 유도하는 최적의 농도를 탐색하여 이용하였다. GST 추출물은 300 mg/kg의 농도로 하루에 1번 경구 투여하였다.
- [0066] **3-2. 운동능력평가**
- [0067] 마우스의 정상 운동능력은 막대 검사(Pole test) 및 로타로드 검사(Rotarod test)를 이용하여 평가하였다.
- [0068] 막대 검사는 파킨슨병 동물모델에서 운동 완만(bradykinesia)의 수준을 측정하는데 이용되는 방법이며, 높이 55

cm 및 직경 1.3 cm의 막대를 이용하여 마우스가 막대의 꼭대기로부터 바닥으로 내려오는 시간을 측정하였다. 이때 마우스는 머리가 하늘을 향하도록 막대의 꼭대기에 놓았으며, 머리가 땅을 향하는 순간부터 마우스가 온전히 바닥에 내려오는 순간까지의 시간을 기록하였다.

[0069] 로타로드 검사는 신경질환 모델에서 운동능력을 평가하는 방법이며, 검사 장치는 Rotarod 트레드밀(ENV-576; Med Associates, USA)을 이용하였다. 마우스를 자동으로 회전하는 로드(rod) 위에 올리면 마우스는 수동적으로 로드 위에서 운동을 지속하다가 떨어지게 되며, 마우스가 떨어질 때까지의 시간을 측정하였다. 측정 시간은 240초를 최대로 하였고, 로드의 속도는 0에서 35 rpm까지 서서히 상승시켰다.

[0071] 3-3. 레보도파의 부작용 평가

[0072] 레보도파에 의한 부작용을 평가하기 위하여 이상 운동증(dyskinesia)을 평가하는 방법인 하지 클래스핑 검사(hindlimb clasping test)를 수행하였다. 바닥으로부터 약 20 cm 높이에서 마우스의 꼬리 끝 2 cm를 잡은 후 15초 동안 비디오로 촬영하여 마우스의 행동을 분석하였다. 하지 운동의 좌우 편차, 축의 기울기 및 근육의 수축과 마비의 3가지 방법으로 측정하였다. 각각의 검사는 블라인드 검사(blind test)로 진행하였고, 클래스핑 스코어는 0은 No clasping; 1은 Occasionally clasping; 2는 Frequently clasping; 및 3은 Continuously clasping의 기준으로 부여하였다.

[0074] 4. 웨스턴 블롯(Western blot analysis)

[0075] GST 추출물을 처리한 SH-SY5Y 세포를 차가운(ice-cold) PBS로 두 번 세척하고, RIPA 버퍼(radioimmunoprecipitation assay buffer; Thermo Scientific, USA)를 첨가하여 세포를 용해시켰다. RIPA 버퍼는 인산가수분해효소 저해제 각테일(phosphatase inhibitor cocktail)과 단백질분해효소 저해제 각테일(protease inhibitor cocktail)을 첨가하여 이용하였다.

[0076] 또한, 도파민 분비 신경세포에서 GST 추출물이 단백질 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 실험 종료 후 실험군 마우스의 두뇌를 적출하여 부위별로 절단하였다. 이후 마우스 뇌 지도(Mouse Brain Atlas)를 기준으로 열음 위에서 흑질세포(Substantia nigra) 부위와 선조체(Striatum) 부위를 분리하여 세척하였다. 다음으로 인산가수분해효소 저해제 각테일과 단백질분해효소 저해제 각테일을 포함하는 RIPA 버퍼를 이용하여 분리한 조직을 용해시켰다. 조직 용해물을 14,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상층액을 회수하고, BCA protein assay kit(Thermo Scientific)와 BSA 표준용액을 이용하여 단백질의 양을 정량하였다.

[0077] 30 내지 50 μ g의 단백질을 10% SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분리하여 PVDF 막(polyvinylidene difluoride membrane)으로 이동시키고, 5% 스킴 밀크(skim milk)로 실온에서 1시간 동안 블로킹하였다. 이후 1차 항체를 첨가하여 4℃에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 PBS-T(PBS+tween20) 용액으로 3회 세척하고, anti-IgG conjugated HRP 항체를 넣어 실온에서 1시간 반응시켰다. 단백질 발현 양상은 ECL(enhanced chemiluminescence) Western blotting detection reagents(Amersham Bioscience, UK)로 발광시킨 후 Fusion FX7 chemiluminescence imaging system(Vilber Lourmat, France)으로 확인하였다.

[0079] 5. 통계 처리

[0080] 모든 실험 결과는 평균±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성은 GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 이용하여 일원분산분석(One-way ANOVA)으로 분석한 후, Tukey's Multiple Comparison Test로 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

[0083] 실험 결과

[0084] 1. 신경세포주에 대한 GST 추출물의 효과 확인

[0085] 1-1. GST 추출물의 세포 독성 평가

[0086] 신경세포주인 SH-SY5Y 세포에 다양한 농도의 GST 추출물을 24시간 동안 처리한 후 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 GST 추출물은 300 μ g/ml 농도까지 처리해도 세포 생존율에 영향이 없는 것을 확인하여 세포 독성이 없는 것을 알 수 있었다. 따라서 이후의 세포 실험은 세포 독성이 없는 300 μ g/ml 이하 농도 범위에서 수행하였다.

[0088] 1-2. 신경 독성에 대한 GST 추출물의 세포 보호 효능 평가

[0089] 파킨슨병을 유발시키는 것으로 알려진 MPP+를 이용하여 신경세포 독성을 유도하고, 처리 농도에 따른 GST 추출

물의 세포 보호 효능을 MTT로 확인하였다.

[0090] 확인 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 MPP+는 SH-SY5Y 세포의 생존율을 대조군 대비 60% 수준으로 감소시켜 신경 독성을 유발하나, GST 추출물을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리한 경우 세포 생존율이 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 GST 추출물이 신경독성으로부터 신경세포를 보호하는 효능이 있음을 의미한다. 따라서 GST 추출물을 이용한 이후의 세포 실험은 우수한 신경세포 보호 효능을 나타내는 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 수행하였다.

[0092] **1-3. GST 추출물에 의한 ROS 생성 억제 효과**

[0093] GST 추출물의 신경세포 보호 효능이 산화적 스트레스 억제에 의한 것인지 확인하기 위하여 ROS(reactive oxygen species)의 생성 정도를 측정하였다. 측정 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 MPP+ 처리군(1 mM)에서는 ROS 생성이 현저하게 증가하나, GST 추출물 처리군(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서는 ROS 생성이 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0095] **1-4. GST 추출물의 미토콘드리아 기능 손상 억제 효과**

[0096] GST 추출물의 신경세포 보호 효능이 산화적 스트레스로 인한 미토콘드리아 기능 손상의 방어와 연관이 있는지 확인하기 위하여 미토콘드리아의 막전위 변화를 측정하였다.

[0097] 측정 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 MPP+ 처리군(1 mM)에서는 미토콘드리아 기능이 손상된 세포 비율이 43.1%를 차지하나, GST 추출물 처리군(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에서는 18.5%로 나타나 미토콘드리아 기능이 손상된 세포의 비율이 유의하게 감소한 것을 확인할 수 있었다. 이는 GST 추출물이 MPP+로 인한 미토콘드리아 기능 손상으로부터 신경세포를 보호할 수 있음을 의미한다.

[0099] **1-5. GST 추출물의 신경세포 사멸 억제 효과**

[0100] SH-SY5Y 세포에 MPP+를 처리하면 산화적 스트레스에 의하여 미토콘드리아 내막에서 complex I의 기능이 감소하고, 이에 따라 신경세포 사멸이 유도되는 것으로 알려져 있다. 따라서 GST 추출물이 세포사멸과 연관된 단백질인 PARP(poly ADP ribose polymerase), caspase-3 및 Bcl2의 발현에 영향을 미치는지 확인하였다.

[0101] 확인 결과, MPP+를 처리하면 세포사멸의 특징인 PARP와 caspase-3의 절단되지 않은 단백질 밴드(proform band)가 현저히 감소하고, Bcl2 밴드의 강도 역시 감소하는 것을 알 수 있었다. 그러나 도 5에 나타난 바와 같이 GST 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 경우에는 MPP+에 의한 발현 변화가 역전되는 것을 확인하여, GST 추출물이 신경세포의 사멸을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0103] **1-6. GST 추출물의 신경세포 보호 기작 확인**

[0104] MAPK 신호전달경로와 PI3K/Akt 신호전달경로는 세포의 성장, 분화, 생존 및 세포사멸에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. GST 추출물의 신경세포 보호 기작을 확인하기 위하여 SH-SY5Y 세포에 다양한 시간 동안 GST 추출물(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리하고, MAPK 신호전달경로와 PI3K/Akt 신호전달경로에서 중요한 기능을 수행하는 단백질들의 발현 변화 및 인산화 수준을 확인하였다.

[0105] 확인 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 인산화된 Akt(phospho-Akt, p-Akt)의 수준이 GST 추출물 처리 후 30분부터 증가하기 시작하여 6시간까지 강하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 인산화된 ERK(phospho-extracellular signal-regulated kinase, p-ERK)의 수준은 GST 추출물 처리 10분 후부터 유도되어 1시간까지 유지되는 것을 알 수 있었다.

[0106] 또한, GST 추출물 처리에 의한 Akt와 ERK의 활성화가 MPP+로 인한 미토콘드리아 기능의 손상을 보호하는데 직접적인 영향을 미치는지 확인하기 위하여, Akt 억제제인 LY294002와 ERK 억제제인 PD98059를 전처리한 후, 미토콘드리아 막전위 변화를 확인하였다.

[0107] 확인 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 MPP+로 인한 미토콘드리아의 기능 손상을 방어하였던 GST 추출물의 보호 효능이 LY294002와 PD98059의 전처리에 의하여 현저하게 감소하는 것을 알 수 있었다. 이는 GST 추출물의 신경세포 보호 기작에 Akt와 ERK의 활성화가 직접적으로 관여하는 것을 의미한다.

[0109] **2. 파킨슨병 동물모델에서 GST 추출물의 효과 확인**

[0110] 실험을 시작하기 전 대조군과 실험군 사이의 무게 변화를 측정하여 모든 마우스가 생리대사적인 측면에서 문제가 없는 것을 확인한 후 본 실험을 수행하였다.

[0112] **2-1. GST 추출물의 운동능력 개선 효과 확인**

[0113] 20 mg/kg의 MPTP를 2시간에 한 번씩, 총 80 mg/kg의 MPTP를 투여하여 파킨슨병 모델 마우스를 제작하고, 300 mg/kg의 GST 추출물을 투여한 후 모델 마우스의 운동 능력을 확인하였다.

[0114] 확인 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 대조군(control)과 비교하여 MPTP 투여군(MPTP)의 운동능력은 현저하게 감소하나, MPTP+GST 추출물 투여군(MPTP+GST)에서는 운동능력이 유의하게 증가하여 대조군 수준까지 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

[0116] **2-2. GST 추출물의 도파민 신경세포 보호 효과 확인**

[0117] 파킨슨병 모델 마우스에 하루에 1번씩 300 mg/kg의 GST 추출물을 5일 동안 투여하고, 도파민 신경세포의 손상 정도를 확인하기 위하여 조직을 분리한 후 티로신 수산화효소(Tyrosine Hydroxylase, TH)의 발현 변화를 확인하였다.

[0118] 확인 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 MPTP 투여군(MPTP)에서는 TH의 발현이 유의미하게 감소하지만, MPTP+GST 추출물 투여군(MPTP+GST)에서는 TH의 발현이 대조군과 유사한 수준까지 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 GST 추출물에 의하여 도파민 신경세포의 손상이 감소한 것을 의미한다.

[0120] **2-3. 파킨슨병 모델 마우스에서 레보도파에 의한 운동능력 개선 확인**

[0121] 파킨슨병 치료에 있어 GST 추출물과 레보도파의 병용 투여에 의한 시너지 효과가 있는지 확인하기 위하여 먼저 레보도파 자체의 운동능력 개선 효능을 확인하였다.

[0122] 확인 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 레보도파의 투여 농도가 증가할수록 파킨슨병 모델 마우스의 운동능력이 개선되는 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로 막대 검사의 경우 MPTP 처리군에서 운동능력(latency to fall)을 50% 개선시키기 위해서는 약 16.45 mg/kg의 레보도파가 필요하고, 로타로드 검사의 경우 MPTP 처리군에서 운동능력(time on rod)을 50% 개선시키기 위해서는 약 14.63 mg/kg의 레보도파가 필요한 것을 알 수 있었다. 따라서 이후 실험에서는 15 mg/kg의 레보도파를 기준 농도로 설정한 뒤 실험을 진행하였다.

[0124] **2-4. GST 추출물과 레보도파의 병용 투여 효과 확인**

[0125] 파킨슨병 모델 마우스에 GST 추출물과 레보도파를 병용 투여한 후 파킨슨병 치료에 대한 시너지 효과가 있는지를 여부를 확인하였다.

[0126] 확인 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 대조군(CON) 대비 MPTP 투여군(MPTP)은 현저하게 운동 능력이 감소하나, MPTP+GST 추출물 투여군(300 mg/kg; MPTP+GST) 또는 MPTP+레보도파 투여군(15 mg/kg; MPTP+LD)에서는 운동능력이 개선되는 것을 확인할 수 있었다. 특히, MPTP 투여군(MPTP)과 비교하여 MPTP+GST 추출물 투여군 또는 MPTP+레보도파 투여군은 약 50% 정도 운동능력이 향상되나, MPTP+레보도파+GST 추출물 투여군(MPTP+GST+LD)에서는 운동능력이 76% 개선되어, GST 추출물과 레보도파의 병용 투여에 의한 시너지 효과를 확인할 수 있었다.

[0127] 또한, 로타로드 검사에서도 유사한 경향을 확인할 수 있었다. 도 12에 나타난 바와 같이 MPTP+GST 추출물 투여군(300 mg/kg; MPTP+GST) 또는 MPTP+레보도파 투여군(15 mg/kg; MPTP+LD)에서는 운동능력이 50% 개선되는 반면, MPTP+레보도파+GST 추출물 투여군(MPTP+GST+LD)에서는 운동능력이 92%까지 향상되어 현저히 우수한 효과를 보이는 것을 알 수 있었다.

[0129] **2-5. GST 추출물의 레보도파 부작용 완화 효능 확인**

[0130] 파킨슨병 모델 마우스(MPTP 동물모델)에 고농도(30 mg/kg)의 레보도파를 5일 동안 투여한 후 하지 클래스핑 검사(hindlimb clasping test)로 레보도파의 부작용 여부를 확인하였다. 확인 결과, 도 13에 나타난 바와 같이 정상군(좌측 사진, 도 13의 A)과 비교하여 고농도의 레보도파 투여군(우측 사진, 도 13의 B)에서 이상 행동(dyskinetic behavior)을 보이는 마우스를 확인할 수 있었다.

[0131] 이후 뚜렷한 이상 행동을 보이는 마우스를 선별하고, 고농도 레보도파 투여군(LD) 및 고농도 레보도파+GST 추출물 투여군(LD+GST)으로 분류하여 매일 하지 클래스핑 검사를 수행하였다.

[0132] 검사 결과, 도 14에 나타난 바와 같이 고농도 레보도파+GST 추출물 투여군(LD+GST)에서는 하지 클래스핑 스코어(hindlimb clasping score)가 감소하여 레보도파에 의한 부작용이 개선되는 것을 확인할 수 있었다. 도 14의 가로축에서 b2d, b1d는 고농도 레보도파 투여군(LD)과 고농도 레보도파+GST 추출물 투여군(LD+GST)으로 분류하기 전(투여 2일 전, 투여 1일 전)을 의미하고, 1d부터 5d는 분류 후 1차 투여기간(1일 내지 5일), 8d부터 11d는

분류 후 2차 투여기간(8일 내지 11일)을 의미한다.

[0133] 또한, 도 15에 나타난 것과 같이 GST 추출물의 투여 기간에 따라 1차(1w), 2차(2w)로 나누어 분석한 경우에도 투여 전(before)과 비교하여 GST 추출물과의 병용 투여에 의하여 레보도파의 부작용이 개선되어 가는 것을 확인할 수 있었다.

[0135] 2-6. GST 추출물과 레보도파의 병용 투여에 의한 레보도파의 부작용 개선 여부 확인

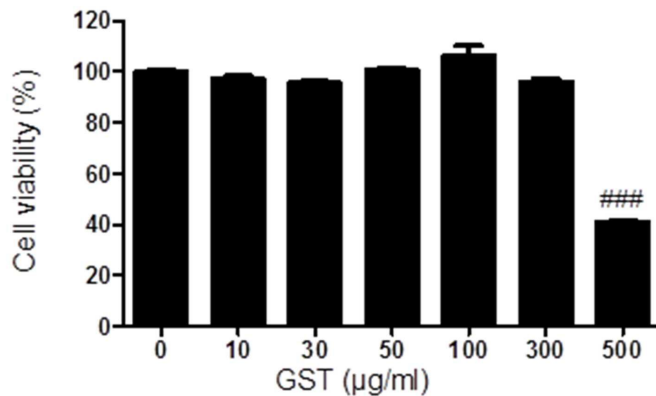
[0136] GST 추출물의 레보도파의 부작용 개선 효과에 대한 기작을 확인하기 위하여, 실험군 마우스의 중뇌 선조체(striatum)에서 레보도파 부작용 관련 지표인 인산화된 DARPP-32 (phospho-dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32kDa, p-DARPP-32)의 발현 변화를 확인하였다.

[0137] 확인 결과, 도 16에 나타난 바와 같이 고용량의 레보도파(LD)에 의하여 p-DARPP-32의 발현이 현저하게 증가하나, 고용량의 레보도파와 GST 추출물을 병용 투여(LD+GST)한 경우 p-DARPP-32의 발현이 유의미하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

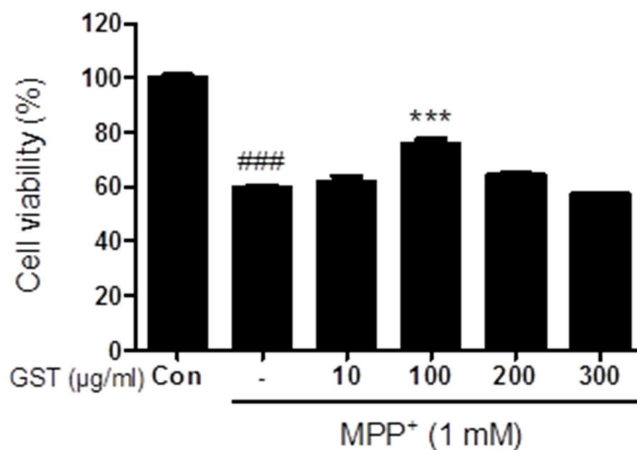
[0139] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

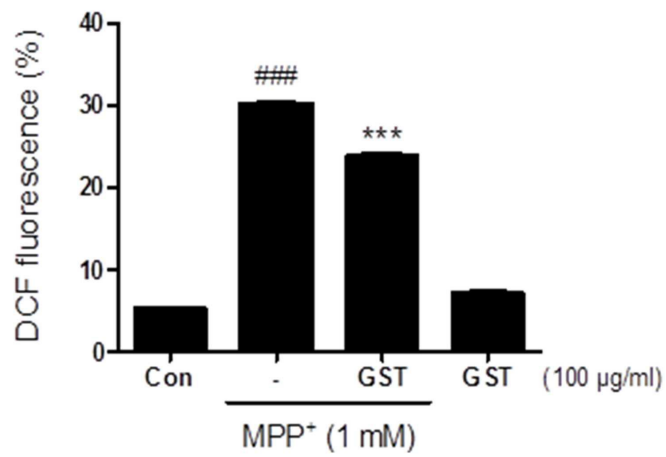
도면1



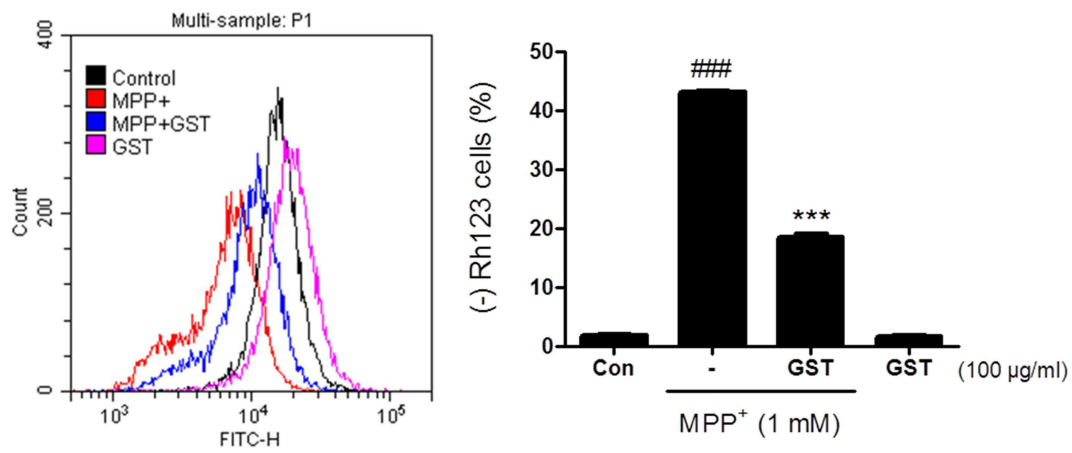
도면2



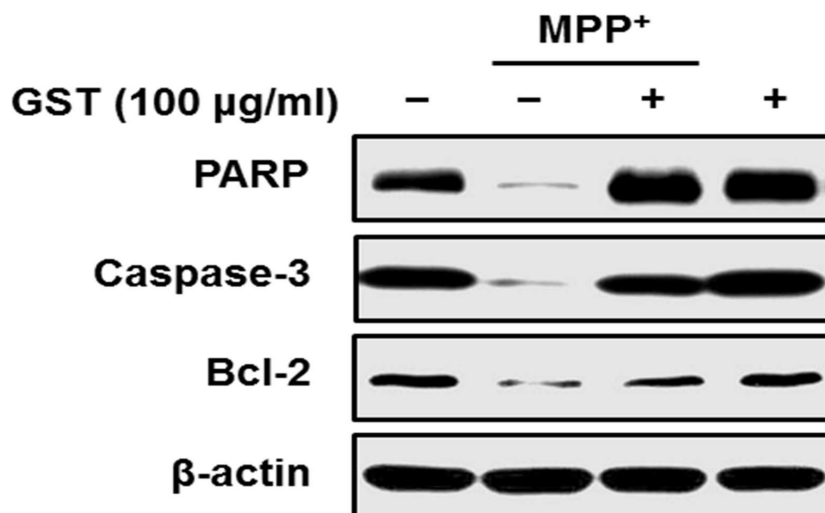
도면3



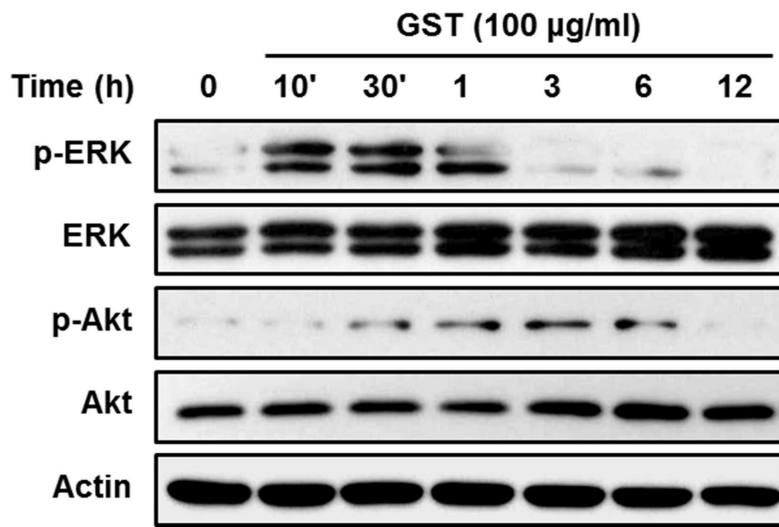
도면4



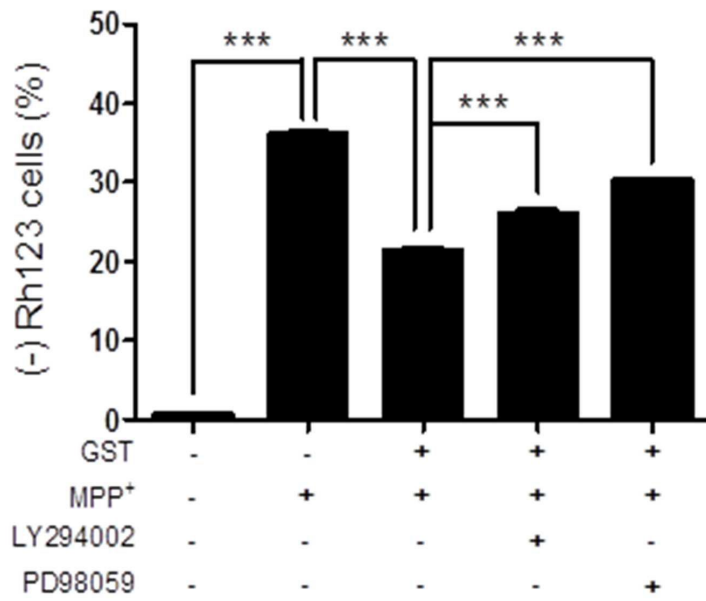
도면5



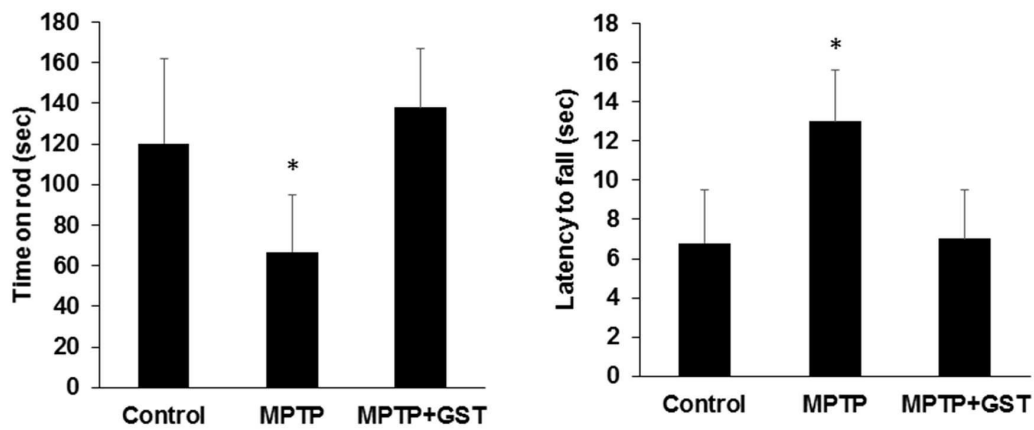
도면6



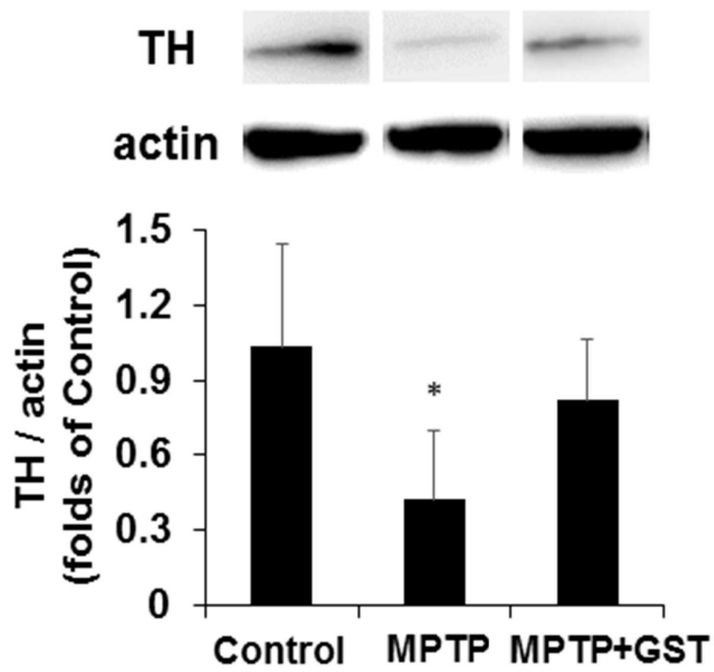
도면7



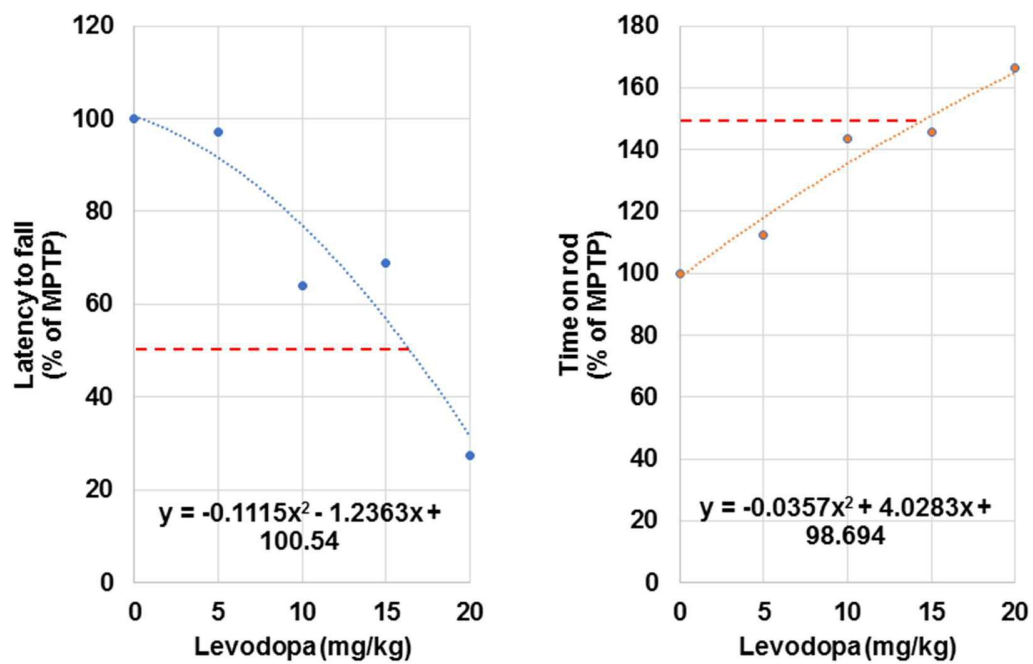
도면8



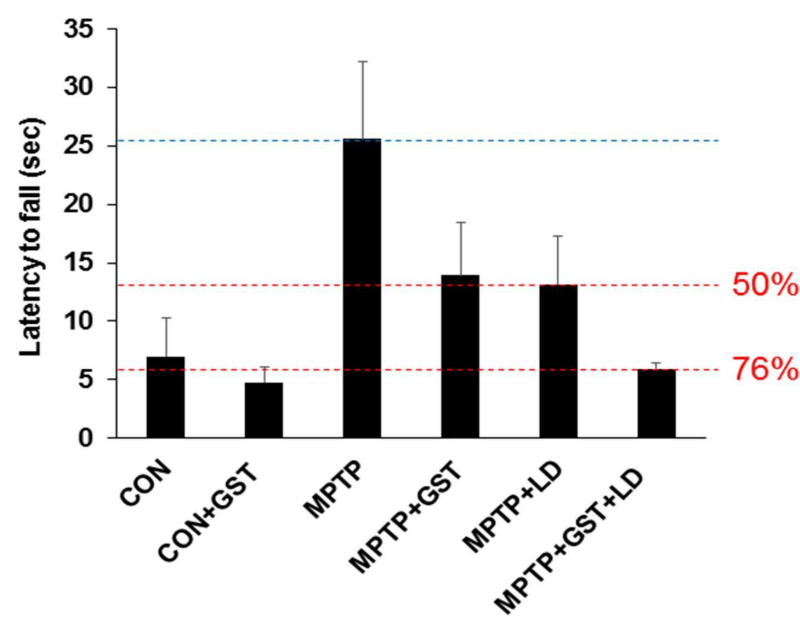
도면9



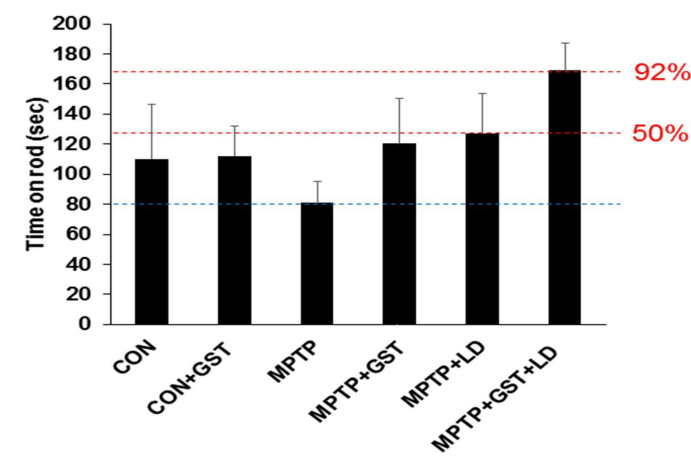
도면10



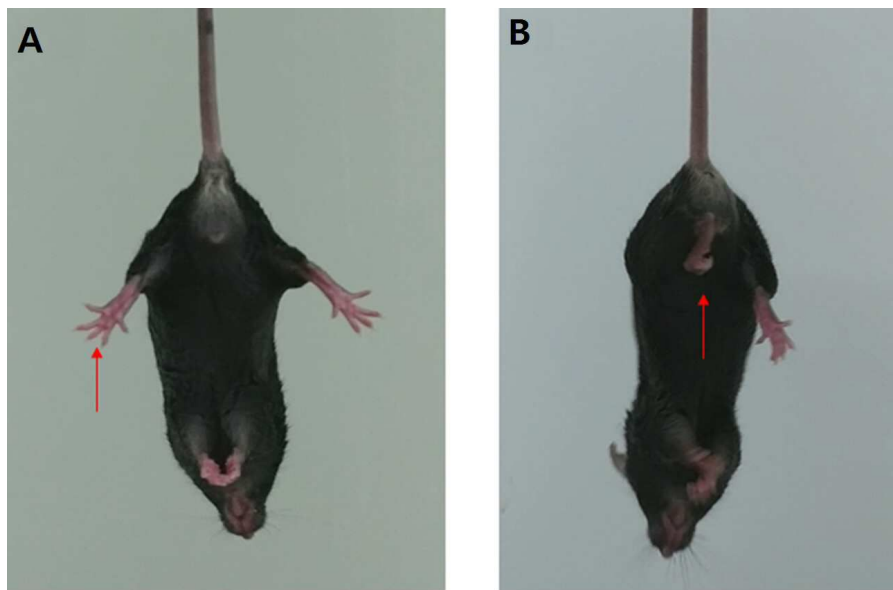
도면11



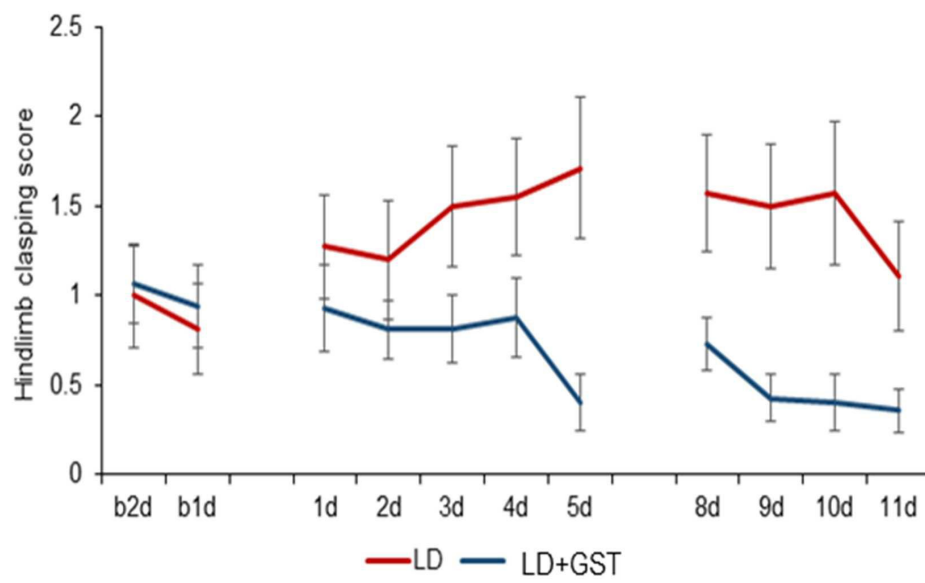
도면12



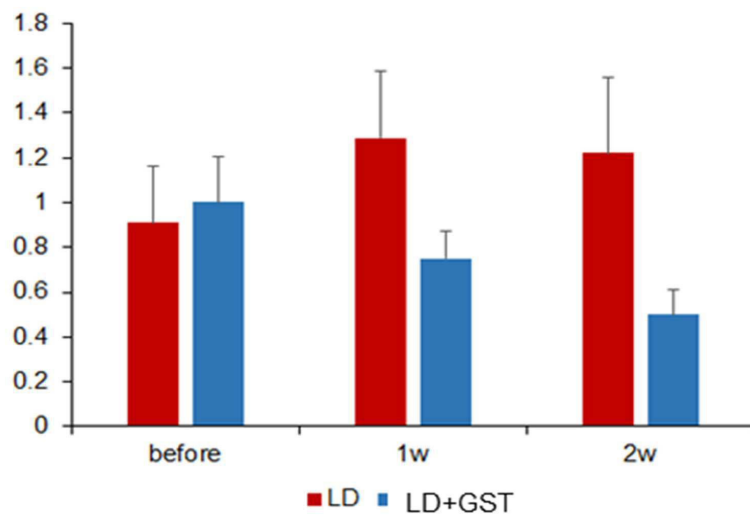
도면13



도면14



도면15



도면16

