

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 11월 17일 (17.11.2016)



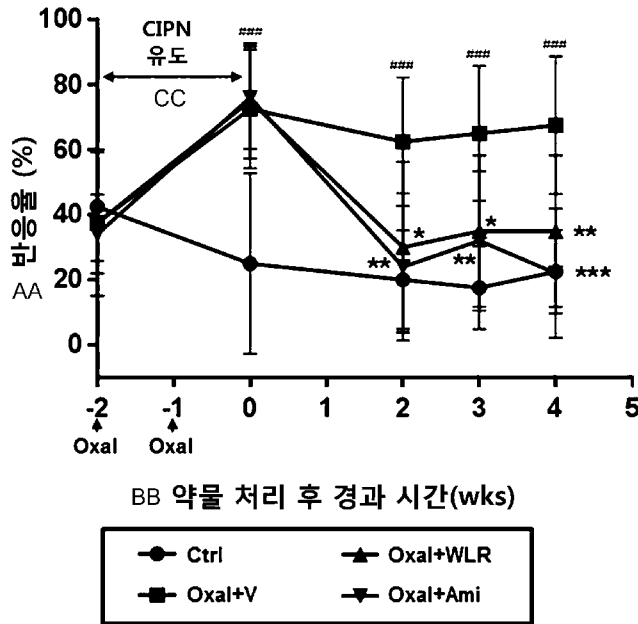
(10) 국제공개번호
WO 2016/182139 A2

- (51) 국제특허분류:
A61K 36/30 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)
A61K 31/282 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2015/010333
- (22) 국제출원일: 2015년 9월 30일 (30.09.2015)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0065825 2015년 5월 12일 (12.05.2015) KR
- (71) 출원인: 한국 한의학 연구원 (KOREA INSTITUTE OF ORIENTAL MEDICINE) [KR/KR]; 34054 대전시 유성구 유성대로 1672, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 김노수 (KIM, No Soo); 34053 대전시 유성구 전민로 71, 113 동 801 호, Daejeon (KR). 박종식 (PARK, Jong-Shik); 30130 세종시 누리로 119, 404 동 401 호, Sejong-si (KR). 이진무 (YI, Jin-Mu); 28170 충청북도 청주시 흥덕구 강내면 사인 2길 56-5, Chungcheongbuk-do (KR). 이유헌 (LEE, You Jin); 34679 대전시 동구 신기로 103, 401 호, Daejeon (KR). 조은상 (CHO, Eun-Sang); 35282 대전시 서구 신갈마로 86 번길 14, 205 동 203 호, Daejeon (KR). 김진희 (KIM, Jin-hee); 34069 대전시 유성구 반석동로 33, 503 동 1103 호, Daejeon (KR). 임채준 (LIM, Chae Jun); 62067 광주시 서구 풍암 1로 53, 102 동 702 호, Gwangju (KR). 방옥선 (BANG, Ok-Sun); 34033 대전시 유성구 배울 2로 134, 103 동 103 호, Daejeon (KR). 김영아 (KIM, Young-ah); 41965 대구시 중구 명륜로 12길 66, A 동 503 호, Daegu (KR).
- (74) 대리인: 최규환 (CHOI, Kyu Whan); 35209 대전시 서구 한밭대로 745, 12 층 그린국제특허법률사무소, Daejeon (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,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION, CONTAINING LITHOSPERMI RADIX EXTRACT AS ACTIVE INGREDIENT, FOR PREVENTING, ALLEVIATING, OR TREATING PERIPHERAL NEUROPATHY

(54) 발명의 명칭: 자근 추출물을 유효성분으로 함유하는 말초신경병증 예방, 개선 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition, containing a Lithospermi Radix extract as an active ingredient, for preventing, alleviating, or treating peripheral neuropathy, especially, chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN). Specifically, it was verified that the Lithospermi Radix extract of the present invention causes no toxicity in normal cells, does not influence an intrinsic cytotoxic effect of an anticancer drug in a human cancer cell line, mitigates the inhibition of neurite growth due to an anticancer drug, and effectively reduces the sensitivity to increased pain stimulation in a chemotherapy-induced peripheral neuropathy animal model, and thus the Lithospermi Radix extract can be favorably used as an active ingredient of the composition for preventing, alleviating, or treating chemotherapy-induced peripheral neuropathy.

(57) 요약서: 본 발명은 자근(Lithospermi Radix) 추출물을 유효성분으로 함유하는 말초신경병증(peripheral neuropathy), 특히 항암제로

[다음 쪽 계속]

AA ... Response rate (%)
BB ... Elapsed time after drug treatment (wks)
CC ... CIPN induction

WO 2016/182139 A2



SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(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, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

유발된 말초신경병증(chemotherapy-induced peripheral neuropathy, CIPN) 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명의 자근 추출물은 정상세포에 독성을 유발하지 않고, 인간 암세포주에서 항암제의 고유한 세포독성 효력에 영향을 주지 않으면서 동시에, 항암제에 의한 신경돌기 성장 억제를 완화하며, 항암제로 유발된 말초신경병증 동물모델에서 증가된 통증 자극에 대한 민감도를 효과적으로 감소시키는 것을 확인함으로써, 상기 자근 추출물은 항암제로 유발된 말초신경병증 예방, 개선 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 자근 추출물을 유효성분으로 함유하는 말초신경병증 예방, 개선 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 자근(Lithospermi Radix) 추출물을 유효성분으로 함유하는 말초신경병증(peripheral neuropathy) 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 말초신경병증(peripheral neuropathy)은 신경조직에 직접 손상을 주거나 혹은 신경조직에 영향을 주는 질병에 의해 발병하는데, 영향을 받는 신경조직의 종류에 따라 감각신경병증(sensory neuropathy), 운동신경병증(motor neuropathy), 자율신경증(autonomic neuropathy)으로 구별할 수 있다. 감각신경병증의 경우 촉각 및 떨림 현상, 온도 변화에 대한 감각이 저하되거나, 따끔거리는 느낌 혹은 타는 듯한 통증을 느끼게 되고, 피부에서 이질통 등을 경험하게 된다. 운동신경병증의 경우에는 균형감각의 손실 및 근력 약화 등이 동반되며, 자율신경병증의 경우에는 해당 신경이 미치는 기관에 따라 방광을 조절하는 기능이 약화되어 요실금을 경험하거나, 비정상적인 혈압 및 심장박동을 유발한다(R.A. Hughes, 2002, BMJ, v324, pp466-469; J.M. Torpy et al., 2010, JAMA, v303, p1556).
- [3] 말초신경병증의 원인으로 다양한 요인들이 제시되었는데, 유전적 질환, 대사 및 내분비계통의 질환, 염증성 질환, 비타민 등 영양결핍, 암치료 과정에서 투여되는 항암제 등이 발병 원인으로 알려져 있다. 이 중 항암제에 의해 유발된 말초신경병증(chemotherapy-induced peripheral neuropathy, CIPN)은 증상의 정도에 따라 환자에게 투여되는 항암제의 용량을 줄이거나 심한 경우 항암치료 자체를 중단해야 하기 때문에 CIPN은 항암 치료에 매우 부정적인 영향을 주는 부작용으로 작용한다. 항암치료를 받은 환자의 약 3분의 1 정도가 CIPN을 경험하며, 또 CIPN을 경험하는 환자의 3분의 1은 영구적으로 신경 손상을 받는다고 알려져 있다(A. Bhagra와 R.D. Rao, 2007, Curr Oncol Rep, v9, pp290-299). CIPN 관련 증상으로는 손가락 및 발가락에 저리고(numbsness), 따끔거리고(tingling), 타는 듯한(burning) 느낌이 오거나 냉감 및 통증을 느끼게 되며, 촉감과 근력이 저하된다(T. Armstrong et al., 2005, Oncol Nurs Forum, v32, pp305-311; C. Visovsky et al., 2008, Clin J Oncol Nurs, v12, pp243-247).
- [4] CIPN을 일으키는 것으로 알려진 항암제로는 플래티넘(platinum) 계열, 탁산(taxane) 계열, 빈카알카로이드(vinca alkaloids), 보르테조밐(bortezomib) 또는 탈리도마이드(thalidomide) 등이 있으며, CIPN 발병률은 사용한 항암제의 종류, 용량 및 투여 기간에 따라 20-75%에 이른다고 알려져 있다(G. Cavaletti et al.,

2011, Curr Treat Options Neurol, v13, pp180-190). 현재 항암제에 의한 신경독성의 기전은 정확히 알려져 있지 않으며, 다만 항암제가 일반 암세포에 작용하는 세포독성 기전과 말초신경계 세포에 작용하는 기전이 서로 비슷할 것이라고 추측될 뿐이다. 환자에게 투여된 항암제는 암조직 뿐만 아니라 말초신경계에 축적되고, 이러한 항암제의 축적이 결국 신경독성의 원인으로 작용하여 CIPN을 유발하는 것으로 알려져 있다.

- [5] 현재까지 CIPN 치료를 목적으로 미국 FDA에서 승인된 표준치료제는 없다. 임상적으로 CIPN의 증상 완화를 위해 가바펜틴(Gabapentin)과 같은 항경련제, 혹은 아미트리프틸린(Amitriptyline)과 같은 항우울제 등이 사용하고 있으나, CIPN에 대한 대규모 임상시험에서 그 효과가 입증되지 못하였다. 또한, 이러한 약물들은 어지럼증, 졸림 등의 부작용을 내재하고 있으며, 낮은 안전역(safety margin)으로 인하여 고용량 투여가 불가능하다는 단점이 있다. 따라서 이러한 CIPN의 의학적 미충족으로 인하여 보다 안전하고 효과가 입증된 CIPN 치료제 및 예방을 위한 새로운 소재 개발이 절실한 상황이다. CIPN은 복합적인 기전을 갖는 질병이기 때문에 다중표적 기반의 소재 개발이 적절하다고 판단되며, 이에 전통적으로 사용되어 온 약용식물 혹은 천연물 소재는 이러한 소재개발전략 관점에서 중요한 출발 물질로 다뤄질 수 있을 것이다.

- [6] 한편, 자근(Lithospermi Radix)은 지치(*Lithospermum erythrorhizon* Siebold et Zuccarini), 신강자초(*Arnebia euchroma* Johnst) 또는 내몽자초(*Arnebia guttata* Bunge) 등의 지치과(*Boraginaceae*)의 뿌리이며, 약간 가늘고 긴 방추형으로 간혹 분지되어 있고 길이 6~10cm, 지름 5~15mm이다. 바깥면은 어두운 보라색~자갈색을 띠고 피부는 거칠고 얇게 벗겨지기 쉽다. 대부분 꼬인 깊은 세로 홈이 있고 때로 목부까지 이른다. 근두에는 때로 줄기의 잔경이 붙어 있다. 꺾어지기 쉽고 꺾인 면은 입상이며 빈틈이 많다. 횡단면을 확대경으로 볼 때 피부의 바깥쪽은 어두운 보라색을 띠고, 안쪽의 연한 갈색 부분은 불규칙하게 배열되고 목부는 노란색에 가깝다. 근두부의 중앙은 때로 빈틈이 있고 그 주변은 적자색을 띤다. 이 약은 특유한 냄새가 약간 있고 맛은 약간 달다. 이는 자주색 염료로 쓰이거나, 열을 내리고, 피를 맑게 하며, 혈액순환을 좋게 한다고 알려져 있고, 한국등록특허 제0558159호에 피로회복과 아동 발육에 탁월한 효과가 있는 자초(*Lithospermi Radix*) 뿌리를 이용한 건강보조식품의 제조방법에 관해 개시되어 있으며, 한국공개특허 제2015-0047173호에 자초 추출물을 유효성분으로 함유하는 급성 췌장염의 전이로 인한 폐의 침투성 염증을 예방 또는 개선하기 위한 조성물이 개시되어 있으나, 자근의 말초신경병증과 관련한 기술은 아직 보고된 바가 없다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명자들은 상기 문제점들을 해결하기 위해 노력한 결과, 자근 추출물이

정상세포에 독성을 유발하지 않고, 항암제와 병용처리하였을 때 인간 암세포주에서 항암제의 고유한 세포독성 효력에 영향을 주지 않으면서 동시에, 항암제에 의한 신경돌기 성장 억제를 완화하며, 항암제 유발 말초신경병증 동물모델에서 증가된 통증 자극에 대한 민감도를 효과적으로 감소시키는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 자근(Lithospermi Radix) 추출물을 유효성분으로 함유하는 말초신경병증(peripheral neuropathy) 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [9] 또한, 본 발명은 자근 추출물을 유효성분으로 함유하는 말초신경병증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [10] 또한, 본 발명은 자근 추출물을 유효성분으로 함유하는 항암 보조제를 제공한다.

발명의 효과

- [11] 본 발명은 자근(Lithospermi Radix) 추출물을 유효성분으로 함유하는 말초신경병증(peripheral neuropathy), 특히 항암제에 의해 유발된 말초신경병증(chemotherapy-induced peripheral neuropathy)의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명의 자근 추출물은 정상세포에 독성을 유발하지 않고, 인간 암세포주에서 항암제의 고유한 세포독성 효력에 영향을 주지 않으면서 동시에, 항암제에 의한 신경돌기 성장 억제를 완화하며, 항암제 유발 말초신경병증 동물모델에서 증가된 통증 자극에 대한 민감도를 효과적으로 감소시키는 효과가 있는 것이다. 따라서 본 발명의 유효성분인 자근 추출물은 항암제에 의해 유발되는 말초신경병증 예방, 개선 또는 치료용으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [12] 도 1의 (A)는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용한 자근(Lithospermi Radix) 추출물(WLR)의 성분 분석 프로파일을 UV 디텍터 254nm 파장에서 확인한 크로마토그램이고, (B)는 HPLC상의 UV 디텍터 254nm 파장에서 보이는 주요 피크(peak)들을 표준품(standard)와 비교하여 동정된 지표성분을 보여주는 표이다.
- [13] 도 2는 신경돌기 성장 분석 키트(NS225, Millipore)를 사용하여 본 발명의 자근(Lithospermi Radix) 추출물(WLR)이 신경성장인자(nerve growth factor, NGF)로 유도되는 PC-12 세포에서의 신경돌기 성장에 미치는 영향을 확인한 결과이다.
- [14] No NGF: 신경성장인자를 첨가하지 않은 PC-12 세포;
- [15] NGF: 신경성장인자(100ng/ml)를 첨가한 PC-12 세포;
- [16] NGF+Oxal: 신경성장인자(100ng/ml) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin, 150nM)을

- 동시에 처리한 PC-12 세포;
- [17] NGF+Oxal+V: 신경성장인자(100ng/ml), 옥살리플라틴(150nM) 및 음성대조군으로 PBS 식염수를 처리한 PC-12 세포; 및
- [18] NGF+Oxal+WLR: 신경성장인자(100ng/ml), 옥살리플라틴(150nM) 및 자근 추출물(100 μ g/ml)을 처리한 PC-12 세포.
- [19] 도 3의 (A)는 본 발명의 자근(Lithospermi Radix) 추출물(WLR)을 순차적으로 증가된 농도로 처리하였을 때, 신경성장인자로 유도된 PC-12 세포에서 신경돌기 성장 효과를 확인한 도이고, (B)는 신경돌기를 형성한 세포의 비율 및 성장한 신경돌기의 길이의 합을 상대적으로 나타낸 도이다.
- [20] No NGF: 신경성장인자를 첨가하지 않은 PC-12 세포;
- [21] NGF: 신경성장인자(100ng/ml)를 첨가한 PC-12 세포;
- [22] NGF+Oxal+V: 신경성장인자(100ng/ml), 옥살리플라틴(200nM) 및 음성대조군으로 PBS 식염수를 처리한 PC-12 세포;
- [23] NGF+Oxal+Ami: 신경성장인자(100ng/ml), 옥살리플라틴(200nM) 및 양성대조군으로 아미포스틴(amifostine, 4 μ g/ml)을 처리한 PC-12 세포;
- [24] NGF+Oxal+WLR(25): 신경성장인자(100ng/ml), 옥살리플라틴(200nM) 및 자근 추출물(25 μ g/ml)을 처리한 PC-12 세포;
- [25] NGF+Oxal+WLR(100): 신경성장인자(100ng/ml), 옥살리플라틴(200nM) 및 자근 추출물(100 μ g/ml)을 처리한 PC-12 세포; 및
- [26] ## 또는 ###은 (+)NGF 처리군(b) 대비 유의성 있게 차이(##, $p < 0.01$; ###, $p < 0.001$)가 있다는 것을 의미하고, *, ** 또는 ***는 NGF+Oxal+V 처리군(c) 대비 유의성 있게 차이(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)가 있다는 것을 의미한다.
- [27] 도 4는 자근(Lithospermi Radix) 추출물(WLR)이 말초신경병증성 통증을 완화하는 효과를 확인하기 위하여, 옥살리플라틴으로 유발된 말초신경병증 동물모델을 이용하여 기계적 이질통(mechanical allodynia)를 측정된 결과이다.
- [28] Ctrl: 정상대조군;
- [29] Oxal+V: 옥살리플라틴(10mg/kg) 및 음성대조군으로 0.5% 카르복시메틸셀룰로스(carboxymethyl cellulose, CMC) 투여;
- [30] Oxal+WLR: 옥살리플라틴(10mg/kg) 및 자근 추출물(250mg/kg) 투여;
- [31] Oxal+Ami: 옥살리플라틴(10mg/kg) 및 양성대조군으로 아미포스틴(100mg/kg) 투여; 및
- [32] ###은 정상대조군(Ctrl) 대비 유의성 있게 차이($p < 0.001$)가 있다는 것을 의미하며, *, ** 또는 ***는 옥살리플라틴(10mg/kg) 및 음성대조군으로 0.5% CMC 투여군(Oxal+V) 대비 유의성 있게 차이(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$)가 있다는 것을 의미한다.
- [33] 도 5는 옥살리플라틴으로 유발된 말초신경병증 동물모델의 척수에서 정상세포(astrocyte) 마커인 GFAP, 미세아교세포(microglial cell) 마커인 Iba-1 및

발바닥에서 내상피신경다발(intraepidermal nerve fiber, IENF) 지표인 PGP9.5 단백질의 조직 내 분포를 관찰함으로써 본 발명의 자근(Lithospermi Radix) 추출물(WLR)이 옥살리플라틴에 의한 신경계 염증 반응 및 손상을 억제할 수 있음을 확인한 도이다.

[34] Ctrl: 정상대조군;

[35] Oxal+Veh: 옥살리플라틴(10mg/kg) 및 음성대조군으로 0.5% 카르복시메틸셀룰로스(carboxymethyl cellulose, CMC) 투여;

[36] Oxal+WLR: 옥살리플라틴(10mg/kg) 및 자근 추출물(250mg/kg) 투여;

[37] Oxal+Ami: 옥살리플라틴(10mg/kg) 및 양성대조군으로 아미포스틴(100mg/kg) 투여;된 것을 의미한다.

[38] #는 정상대조군(Ctrl) 대비 유의성 있게 차이($p < 0.05$)가 있다는 것을 의미하며, *는 옥살리플라틴(10mg/kg) 및 음성대조군으로 0.5% CMC 투여군(Oxal+Veh) 대비 유의성 있게 차이($p < 0.05$)가 있다는 것을 의미한다.

[39] 도 6은 옥살리플라틴으로 유발된 말초신경병증 동물모델에서 뒤뿌리신경절(dorsal root ganglion, DRG)에서 세포핵의 형태학적 변화를 관찰함으로써, 본 발명의 자근(Lithospermi Radix) 추출물(WLR)이 옥살리플라틴에 의한 DRG 신경세포의 손상을 완화할 수 있음을 확인한 도이다.

[40] Ctrl: 정상대조군;

[41] Oxal+Veh: 옥살리플라틴(10mg/kg) 및 음성대조군으로 0.5% 카르복시메틸셀룰로스(carboxymethyl cellulose, CMC) 투여;

[42] Oxal+WLR: 옥살리플라틴(10mg/kg) 및 자근 추출물(250mg/kg) 투여;

[43] Oxal+Ami: 옥살리플라틴(10mg/kg) 및 양성대조군으로 아미포스틴(100mg/kg) 투여; 및

[44] #는 정상대조군(Ctrl) 대비 유의성 있게 차이($p < 0.05$)가 있다는 것을 의미하며, *는 옥살리플라틴(10mg/kg) 및 음성대조군으로 0.5% CMC 투여군(Oxal+Veh) 대비 유의성 있게 차이($p < 0.05$)가 있다는 것을 의미한다.

[45] 도 7은 인간포피섬유아세포(human foreskin fibroblast cell)에서 세포의 생존률을 측정함으로써, 본 발명의 자근(Lithospermi Radix) 추출물(WLR)이 정상세포에서 독성이 없다는 것을 확인한 도이다.

[46] WLR: 자근 추출물(0~1000 μ g/ml)의 처리.

[47] 도 8은 인간폐암세포(A549)와 인간대장암세포(HCT116)에서 항암제인 옥살리플라틴과 본 발명의 자근(Lithospermi Radix) 추출물(WLR)을 함께 처리하였을 때, 자근 추출물이 옥살리플라틴의 고유한 암세포 독성에 영향을 주지 않음을 확인한 도이다.

[48] No treat: 옥살리플라틴(0~100 μ g/ml) 단독 처리;

[49] PBS: 옥살리플라틴(0~100 μ g/ml) 및 음성대조군으로 PBS 식염수 처리;

[50] WLR-10: 옥살리플라틴(0~100 μ g/ml) 및 자근 추출물(10 μ g/ml) 처리;

[51] WLR-30: 옥살리플라틴(0~100 μ g/ml) 및 자근 추출물(30 μ g/ml) 처리; 및

- [52] WLR-100: 옥살리플라틴($0\sim 100\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 자근 추출물($100\mu\text{g}/\text{ml}$) 처리.
- [53] 도 9의 (A)는 본 발명의 자근(Lithospermi Radix) 추출물(WLR)이 인간 약물대사효소인 CYP과 세포내 약물수송체인 P-gp 효소의 활성 억제 효과를 생화학적 시험을 통해 확인한 것이고, (B)는 본 발명의 자근(Lithospermi Radix) 추출물(WLR)에 의해 인간 간세포주인 HepaRG에서 CYP와 P-gp 유전자의 발현 유도 효과를 생체 외(*in vitro*) 시험 및 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)을 통해 확인한 도이다.
- [54] M: 정상 HepaRG 세포;
- [55] V: 음성대조군으로 PBS 식염수를 처리한 HepaRG 세포;
- [56] WLR: 자근 추출물($10, 20, 100, 500\mu\text{g}/\text{ml}$)을 처리한 HepaRG 세포; 및
- [57] PC: 양성대조군으로 CYP1A2과 CYP2B6는 $50\mu\text{M}$ 의 오메프라졸(omeprazole)을, CYP3A4와 P-gp는 $10\mu\text{M}$ 의 리팜피신(rifampicin)을 처리한 HepaRG 세포.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [58] 본 발명은 자근(Lithospermi Radix) 추출물을 유효성분으로 함유하는 말초신경병증(peripheral neuropathy) 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [59] 상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출하는 것이 바람직하며, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것이 바람직하다.
- [60] 상기 자근 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:
- [61] 1) 자근에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [62] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및
- [63] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하는 단계.
- [64] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 자근은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.
- [65] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 자근 추출물의 추출 방법으로는 여과법, 열수 추출, 침지 추출, 환류냉각 추출 및 초음파 추출 등 당업계의 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 추출용매는 건조된 자근 분량의 2 내지 40배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하다. 추출온도는 20 내지 100°C 인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 0.5 내지 10시간인 것이 바람직하며, 구체적으로 1 내지 4시간이 더욱 바람직하고, 보다 구체적으로 2시간이 가장 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출은 2회 반복하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [66] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

- [67] 상기 말초신경병증은 항암제에 의해 유발되는 것이 바람직하고, 상기 항암제는 플래티넘(platinum) 계열, 탁산(taxane) 계열, 빈카알카로이드(vinca alkaloids), 보르테조미브(bortezomib) 또는 탈리도마이드(thalidomide)를 포함하나 이에 한정되지 않으며 임상, 약학, 생의학적으로 사용 가능한 모든 항암제를 포함한다.
- [68] 상기 플래티넘 계열 항암제는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [69] 상기 탁산 계열 항암제는 파클리탁셀(paclitaxel) 또는 도세탁셀(docetaxel) 중 어느 하나 또는 둘 다인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [70] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [71] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [72] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제(base)로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [73] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용 또는 복강 내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하지만 이에 제한하지 않는다.
- [74] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, 약학적으로 유효한 양은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 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 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을

모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [75] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 자근 추출물의 양을 기준으로 0.01 내지 1000mg/kg이고, 바람직하게는 30 내지 500mg/kg이고, 더욱 바람직하게는 50 내지 300mg/kg이며, 하루 1~6 회 투여될 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [76] 본 발명의 약학 조성물은 항암제와 함께 병용하여 사용하는 것이 바람직하나, 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [77] 또한, 본 발명은 자근(Lithospermi Radix) 추출물을 유효성분으로 함유하는 말초신경병증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [78] 상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출하는 것이 바람직하며, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것이 바람직하다.
- [79] 상기 자근 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:
- [80] 1) 자근에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [81] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및
- [82] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하는 단계.
- [83] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 자근은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.
- [84] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 자근 추출물의 추출 방법으로는 여과법, 열수 추출, 침지 추출, 환류냉각 추출 및 초음파추출 등 당업계의 통상적인 방법을 이용할 수 있다. 상기 추출용매는 건조된 자근 분량의 2 내지 40배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하다. 추출온도는 20 내지 100°C인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 0.5 내지 10시간인 것이 바람직하며, 구체적으로 1 내지 4시간이 더욱 바람직하고, 보다 구체적으로 2시간이 가장 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출은 2회 반복하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [85] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [86] 상기 말초신경병증은 항암제에 유발되는 것이 바람직하고, 상기 항암제는 플래티넘(platinum) 계열, 탁산(taxane) 계열, 빈카알카로이드(vinca alkaloids),

보르테조미브(bortezomib) 또는 탈리도마이드(thalidomide)를 포함하나 이에 한정되지 않으며 임상, 약학, 생의학적으로 사용 가능한 모든 항암제를 포함한다.

- [87] 상기 플래티넘 계열 항암제는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [88] 상기 타산 계열 항암제는 파클리탁셀(paclitaxel) 또는 도세탁셀(docetaxel) 중 어느 하나 또는 둘 다인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [89] 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조, 가공될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 법률에 따라 어떤 형태로든지 제조, 가공될 수 있다.
- [90] 본 발명의 자근 추출물을 유효성분으로 함유하는 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [91] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [92] 상기 외에 본 발명의 자근 추출물은 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. 그 밖에 본 발명의 자근 추출물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 자근 추출물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [93] 또한, 본 발명은 자근(Lithospermi Radix) 추출물을 유효성분으로 함유하는 항암

보조제에 관한 것이다. 상기 추출물은 전술한 바와 같다.

[94] 상기 항암 보조제는 플래티넘(platinum) 계열, 탁산(taxane) 계열, 빈카알카로이드(vinca alkaloids), 보르테조미브(bortezomib) 또는 탈리도마이드(thalidomide)를 포함하는 항암제와 병용투여하는 것이 바람직하고, 항암제에 의해 유발된 말초신경병증 예방 또는 치료 효과를 갖는 것이 바람직하다.

[95]

[96] 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.

[97]

[98] [재료 및 방법]

[99] 1. 자근(Lithospermi Radix) 추출물(WLR)의 제조

[100] 광명당제약(울산, 대한민국)으로부터 구입한 건조된 자근(Lithospermi Radix) 100g을 분쇄하여 가루 형태의 시료를 준비하였다. 분쇄된 건조 시료 100g과 물 2ℓ를 둥근 플라스크에 넣어 혼합하였다. 냉각관이 부착된 환류추출장치에 연결된 항온수조(water bath)를 가열하여 1회 2시간씩, 총 2회 반복 추출하였다. 추출된 추출물을 종이여과지(Whatman No. 2)와 진공펌프(vacuum pump)(GAST)를 사용하여 감압 여과하였다. 회전농축기(Rotary Evaporator, EYELA) 기기를 이용하여 여과된 액상 추출물을 감압 농축하였다. 농축된 추출물을 동결건조시킨 후, 막자 사발로 균질화하여 자근 물 추출물(WLR)을 수득하였다. 이는 실험 전까지 밀봉 플라스틱 용기에 담아 4°C 저온 저장소에서 보관하였다.

[101]

[102] 2. 자근(Lithospermi Radix) 추출물(WLR)의 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 분석

[103] [재료 및 방법 1]에서 수득한 자근 추출물(WLR)에 함유된 성분을 확인하기 위해 다음과 같은 조건으로 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 수행하였다. 증류수 1ml에 40mg의 자근 추출물(WLR)을 녹인 후 필터링하였다. HPLC 분석을 위해 20 μ l의 샘플을 주입하였다. 분석에 사용된 이동상 용매 A는 초순수(pure water, Honeywell Brudic-Jackson)에 0.1%(v/v) 트라이플루오로 아세트산(trifluoroacetic acid, TFA, Samchun Pure Chemical Co., Ltd)를 첨가하였으며, 용매 B는 아세토니트릴(acetonitrile, J.T Baker, Avantor Performance Material, Inc.)를 사용하였다. HPLC 분석은 e2695 separation 모듈과 2998 photodiode array 디텍터가 장착된 Waters Alliance e2695(Waters Corporation) 기기를 사용하였으며, 물질 분리에 사용한 컬럼은 Phenomenex Luna C18(2) (250 \times 4.6mm, 5 μ m)을 사용하였다. 컬럼 온도는 40°C, 검출기 파장은 254nm로

설정하였으며, 용매 A와 용매 B를 구배(gradient)를 주어 실시하였다. 0분에서 10분 구간까지 B 용매:A 용매의 비율(v/v)이 90:10%으로, 10분부터 60분까지 B 용매:A 용매의 비율이 90:10에서 40:60%의 비율(v/v)로 농도구배를 주면서 총 60분간 실시하였다. 자근 추출물에 함유되어 있는 물질 확인은 동일한 분석 조건에서 표준품(standard)의 정체시간(retention time, RT)와 UV 스펙트럼을 상호 비교하여 확인하였다.

[104]

[105] **3. 세포의 배양**[106] **3-1. PC-12 세포의 배양**

[107] PC-12 세포는 미국의 ATCC로부터 구입하여 사용하였다. PC-12 세포는 5% 비가열 불활성화 태아소 혈청(non-heat inactivated fetal bovine serum, FBS), 10% 가열 불활성화 말 혈청(Horse serum, HS), 100unit/ml 페니실린(penicillin), 100 μ g/ml 스트렙토마이신(streptomycin)이 함유된 DMEM 성장 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂로 유지되는 배양기에서 콜라겐타입I로 코팅된 100mm 세포 배양 디쉬에 배양하였다. 기본 배지, 혈청 및 기타 첨가물은 써모피셔사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)사로부터 구입하여 사용하였다.

[108]

[109] **3-2. 인간포피섬유아세포(human foreskin fibroblast cell)의 배양**

[110] 인간포피섬유아세포는 시스템바이오사이언스(System Biosciences)사로부터 구입하여 사용하였다. 인간포피섬유아세포를 10% 가열 불활성화 FBS, 100unit/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 함유된 DMEM 성장 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂로 유지되는 배양기에서 100mm 세포 배양 디쉬에 배양하여 추후 생체 외 실험에 사용하였다. 기본 배지, 혈청 및 기타 첨가물은 써모피셔사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)사로부터 구입하여 사용하였다.

[111]

[112] **3-3. 인간폐암세포(A549) 및 인간대장암세포(HCT116)의 배양**

[113] A549와 HCT116 세포는 미국의 ATCC로부터 구입하여 사용하였다. 세포를 10% 가열 불활성화 FBS, 100unit/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신이 함유된 RPMI1640 성장 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂로 유지되는 배양기에서 100mm 세포 배양 디쉬에 배양하여 추후 생체 외 실험에 사용하였다. 기본 배지, 혈청 및 기타 첨가물은 써모피셔사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)사로부터 구입하여 사용하였다.

[114]

[115] **3-4. 인간 간세포주(HepaRG)의 배양**

[116] HepaRG 세포는 써모피셔사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)사를 통해 구입하였다. HepaRG 세포는 구입 후 계대배양 없이 바로 사용하였다. 일반적인 세포배양에는 Thaw, Plate & General purpose supplement가 포함된 William's medium E 배지를 사용하였고, 약물 유도 시에는 Induction Medium Supplement가

포함된 William's medium E 배지를 사용하였으며 콜라겐타입I로 코팅된 24웰 플레이트에서 37°C, 5% CO₂로 유지되는 배양기에서 배양하였다. HepaRG 세포 배양에 사용된 모든 배양 배지와 첨가물들은 써모피셔사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)사를 통해 구입하였다.

[117]

[118] **4. 항암제 유발 말초신경병증(chemotherapy-induced peripheral neuropathy, CIPN) 동물모델의 제조**

[119] 본 발명에서는 옥살리플라틴(oxaliplatin)으로 유발된 말초신경병증 동물모델을 사용하였다. 8주령의 C57BL6 수컷 마우스를 (주)오리엔트바이오사로부터 구입하여 동물 실험실 내 케이지에서 1주일간 순화 기간을 거친 후, 3회에 걸쳐 von Frey filament hair를 이용하여 오른쪽 뒷 발바닥 자극 반응에 대한 기준선(base line, BL)을 잡고 군분리(N=8 마우스/그룹)를 실시하였다. 이 후, 5mg/kg 옥살리플라틴을 주 1회, 2주 동안 총 2회(총 10mg/kg)에 걸쳐 꼬리정맥으로 주사하여 말초신경병증 동물모델을 제조하였다. 옥살리플라틴은 LC Laboratories사로부터 구입하였다.

[120]

[121] **5. 기계적 이질통 (Mechanical allodynia) 측정**

[122] 2주간 옥살리플라틴으로 말초신경병증이 유발된 마우스를 UGO BASILE사의 철조 격자장(wire grid)에 1시간 동안 안정화시킨 후, 마우스의 오른쪽 뒷 발바닥에 von Frey filament hair를 이용하여 0.4g의 동일한 자극을 주어 발바닥을 때는 반응을 보이는 동물의 빈도(%)를 측정하여 기록하였다.

[123]

[124] **6. 실험동물 검체를 이용한 조직학적 분석**

[125] **6-1. 검체 확보**

[126] 옥살리플라틴으로 유발한 말초신경병증 동물 모델에서 자근 추출물(WLR)에 의한 신경 손상 억제효과를 조직학적 분석으로 확인하기 위해 필요한 검체를 확보하였다. 펜토바비탈나트륨(sodium pentobarbital, 50mg/kg) 용액을 복강 내에 주사하여 마취한 후, 0.9% 생리식염수 용액을 좌심실을 통해 대동맥에 관류하여 혈관 내의 혈액을 제거한 후 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)를 함유하는 0.1M의 인산 완충액으로 관류 고정하여 4번에서 6번까지의 요추신경(lumbar spinal cord), 뒤뿌리신경절(dorsal root ganglion), 뒷 발바닥 피부를 절제하였다. 절제한 조직을 동일한 고정 용액에 고정한 후, 파라핀 블록을 제작하여 4 μ m로 세절해 유리 슬라이드 위에 붙여 건조 후 사용 전까지 실온 보관하였다.

[127]

[128] **6-2. 미세아교세포에 대한 면역조직학적 분석**

[129] 4 μ m 두께로 자른 척수 세절편을 신경아교세포 중 정상세포(astrocyte) 마커인 GFAP과 미세아교세포(microglial cell) 마커인 Iba-1에 대한 항체를 사용하여

면역조직화학형광 염색을 실시하였다. 세절편의 탈파라핀 및 함수 과정을 거친 이후, 항체의 반응성을 높이기 위해 마이크로파를 이용하여 구연산염완충용액(Vector lab., USA)에 10분간 노출시켜 항원성의 부활을 유도하였다.

[130] 세절편의 투과성 증가 및 탈락 방지를 위해 0.05% Tween 20을 포함한 트리스완충액(TBS-T) 내에서 모든 반응을 진행시켰다. 조직 절편을 10% 정상 염소 혈청(normal goat serum, NGS)이 포함된 TBS-T 용액에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 항원-항체 반응을 방지하고, 1:200으로 희석한 GFAP, Iba-1의 항체 용액에 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 이 세절편들을 TBS-T 용액으로 3회 세척하고, 1:2000으로 희석한 형광 염료가 부착된 2차 항체용액에 담가 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 다시 TBS-T 용액으로 3회 세척한 후 덮개유리를 씌워 세절편의 손실을 방지하였다.

[131] 신경아교세포의 활성도는 면역 염색된 세포의 면적을 형광현미경을 통하여 관찰된 한 시야 면적에 대한 비율(%)로 나타내었다. 형광현미경 이미지의 분석은 분석소프트웨어(CellSense, Olympus)를 이용하여 대조군과 비교 및 분석하였다.

[132]

[133] **6-3. 내상피신경다발(Intraepidermal nerve fiber, IENF) 정량화를 위한 조직학적 분석**

[134] 4 μ m 두께로 자른 뒷 발바닥 피부 조직을 피부 내 신경분포 마커인 PGP9.5에 대한 항체를 사용하여 면역조직화학형광 염색을 실시하였다. 세절편의 파라핀 제거 및 함수 과정을 거친 이후, 항체의 반응성을 높이기 위해 마이크로파를 이용하여 구연산염완충용액(Vector lab. USA)에 10분간 노출시켜 항원성의 부활을 유도하였다. 세절편의 투과성 증가 및 탈락 방지를 위해 0.05% Tween 20을 포함한 트리스완충액(TBS-T) 내에서 모든 반응을 진행시켰다. 조직 절편을 10% 정상 염소 혈청(normal goat serum, NGS)이 포함된 TBS-T 용액에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 항원-항체 반응을 방지하고, 1:200으로 희석한 PGP9.5의 항체 용액에 4°C에서 24시간 동안 반응시켰다. 이 세절편들을 TBS-T 용액으로 3회 세척하고, 1:2,000으로 희석한 형광염료가 부착된 2차 항체용액에 담가 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 다시 TBS-T 용액으로 3회 세척한 후, 덮개유리를 씌워 세절편의 손실을 방지하였다. 내상피신경다발의 발현 정도는 형광 염색된 진피로부터 시작된 표피 내 신경세포 줄기의 개수를 형광현미경 관찰 시야 내 표피의 기저막 길이에 대한 비율(IENF/mm)로 나타내었다. 형광현미경 이미지의 분석은 분석소프트웨어(CellSense, Olympus)를 이용하여 대조군과 비교 및 분석하였다.

[135]

[136] **6-4. 뒤뿌리신경절(dorsal root ganglion)에서의 세포형태학적 분석**

[137] 4 μ m 두께로 자른 뒤뿌리신경절 조직을 아잔-말로리 삼염색법(Azan-Mallory

trichrome staining)을 이용하여 염색을 실시하였다. 염색된 세절편 내의 핵소체를 광학현미경을 이용하여 관찰하였으며 핵소체를 분별할 수 있는 신경세포 중 탈중심핵소체(eccentric nucleoli) 및 다중세포핵(multinucleated nucleoli)을 갖는 신경세포의 개수를 한 시야에서 관찰된 총 신경세포의 개수에 대한 비율로 나타내었다.

[138]

[139] **7. 인간 약물대사효소(CYP) 및 약물수송체(P-gp) 활성 분석**

[140] **7-1. 생체 외(in vitro) 효소 억제**

[141] 자근 추출물(WLR)이 인간의 약물대사효소(CYP)와 약물수송체(P-gp) 단백질의 활성을 억제하는지 알아보기 위하여 루시페린(luciferin)을 이용한 P450-Glo 어세이 및 Pgp-Glo 어세이를 실시하였다. 사용된 시스템은 프로메가(Promega)사와 써모피셔사이언티픽(Thermo Fisher Scientific)사로부터 구입하였다.

[142] CYP 반응을 위해 96웰 플레이트에 각각의 효소와 기질, 포타슘포스페이트(potassium phosphate) 용액을 섞은 반응혼합물을 12.5 μ l씩 분주하였다. 그 후 자근 추출물을 최종농도가 0~1,000 μ g/ml이 되도록 해당 웰에 분주하고 37°C에서 효소 종류에 따라 10~40분간 전처리 반응시켰다. 효소 반응을 개시하고자 25 μ l의 NADPH 재생 시스템(regeneration system) 용액을 분주하고 반응혼합물을 잘 섞은 후, 37°C에서 효소 종류에 따라 10~45분간 반응시켰다. 50 μ l의 루시페라제(luciferase) 검출 시약을 분주하여 루시페라제 반응을 시작하고 실온에서 10~30분 동안 배양하였다.

[143] P-gp 반응을 위해 96웰 플레이트에 바나듐산나트륨을 해당하는 웰에 20 μ l씩 첨가하였다. 그 후 1mM의 베라파밀(Verapamil)과 자근 추출물을 농도별(0~1000 μ g/ml)로 각각 10 μ l씩 첨가하고 희석된 P-gp 효소를 20 μ l씩 첨가하였다. 37°C에서 5분간 반응시키고 ATP 반응을 개시하고자 최종 P-gp 반응 혼합물의 1/5에 해당하는 MgATP를 10 μ l씩 첨가하고 37°C에서 80분간 배양하였다. 50 μ l의 ATP 검출시약을 첨가한 후 실온에서 20분간 배양하였다.

[144] 발광 정도는 TriStar LB 941 다중모드 마이크로플레이트 리더(Multimode Microplate Reader; Berthold Technologies)를 사용하여 상대발광단위(RLU)로 측정하였다.

[145]

[146] **7-2. 생체 외(in vitro) 효소 유전자 발현 유도**

[147] [재료 및 방법 3-4]에 따라 인간 간 세포주(HepaRG)를 콜라겐 타입I으로 코팅된 24웰 플레이트에 5 \times 10⁵ 개/ml로 씨딩(seeding)하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 72시간 동안 배양하였다. 그 후 세포에 양성대조군으로 사용되는 약물 혹은, 자근 추출물(WLR)을 농도별(10, 20, 100, 500 μ g/ml)로 24시간 동안 처리하였다. 사용된 양성대조군 약물은 CYP1A2와 CYP2B6 유전자 유도에서는 50 μ M의 오메프라졸(omeprazole)을, CYP3A4와 P-gp에서는 10 μ M의

리팜피신(rifampicin)을 사용하였다. 음성대조군으로는 증류수를 사용하였다. 24시간 동안 약물을 처리한 후 easy-spin™ Total RNA 추출 키트(iNtRON Biotechnology)을 사용하여 총 RNA를 추출하였다. 올리고 dT, 총 RNA(500 ng), 그리고 iScript cDNA 합성 키트(Bio-Rad)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. PCR로 증폭한 cDNA를 주형으로 하여, T100 Thermal Cycler(Bio-Rad)과 SYBR Green(Bio-Rad)을 이용하여 95°C에서 5초, 60°C에서 30초간 40회 반복하여 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)을 수행하였다. 상기 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)에 사용된 약물대사효소(CYP), 약물수송체(P-gp) 및 대조군인 GAPDH(glyceraldehde 3-phosphate dehydrogenase) 프라이머들은 하기 표 1에 개시하였다. 약물대사효소(CYP) 및 약물수송체(P-gp)의 C_t 값의 평균은 세 번 반복 실험을 통하여 구했으며, 대조군인 GAPDH의 C_t 값에 의해 보정되었다.

[148] 표 1

[표1]

인간 CYP 및 P-gp 단백질의 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR) 반응을 위한 프라이머 및 염기 서열

표적 유전자	서열번호	프라이머	염기서열(5'→3')
CYP1A2	1	forward	TGAATGGCTTCTACATCCCC
	2	reverse	AGGGCTTGTTAATGGCAGTG
CYP3A4	3	forward	CCCACACCTCTGCCTTTTT
	4	reverse	GCACAGGCTGTTGACCATC
CYP2B6	5	forward	CCCCAAGGACACAGAAGTAT TTC
	6	reverse	GATTGAAGGCGTCTGGTTTT C
P-gp	7	forward	GCCAAAGCCAAAATATCAGC
	8	reverse	TTCCAATGTGTTCGGCATT
GAPDH	9	forward	AAGGCTGAGAACGGGAAG
	10	reverse	GGACTCCACGACGTACTC

[149]

[150] **8. 통계처리**

[151] 실험결과는 평균±표준편차(mean±S.D.)로 표기하였고, 그룹간의 통계학적 평균 비교는 ANOVA/Bonferroni post-hoc 테스트를 실시하였다. p 값은 * 또는 # <0.05, ** 또는 ## <0.01, *** 또는 ### <0.001로 표기하였다.

[152]

[153] 실시예 1. 자근 추출물의 HPLC 지표 분석

- [154] [재료 및 방법 1]에 따라 제조된 자근 추출물(WLR)을 이용하여 [재료 및 방법 2]에 따라 HPLC 분석을 실시하였다. 자근 추출물에 함유되어 있는 성분과 표준품의 정체시간(retention time, RT)과 UV 스펙트럼을 비교하였을 때, 5 개의 peaks를 확인할 수 있었다(도 1). 확인된 5 개의 피크는 각각 RT값이 29.745분인 로즈마린산(rosmarinic acid), 30.101분인 리토스퍼믹산(lithospermic acid), 31.662분인 살비아놀릭산 B(salvianolic acid B), 33.772분인 살비아놀릭산 A(salvianolic acid A), 38.551분인 살비아놀릭산 C(salvianolic acid C)로 확인되었다.
- [155]
- [156] 실시예 2. 생체 외(*in vitro*)에서 자근 추출물의 신경 보호 효과 확인
- [157] 2-1. 자근 추출물의 신경 보호 효과-정성적 분석
- [158] 1 μ m 구멍(pore)의 멤브레인(membrane)을 이용한 신경돌기 성장 분석 키트(NS225, Millipore)를 사용하여 본 발명의 자근 추출물의 신경 보호 효과를 확인하였다.
- [159] 구체적으로, 상기 [재료 및 방법 3-1]에 따라 배양한 PC-12 세포를 실험 전 1%의 말 혈청, 100unit/ml의 페니실린, 100 μ g/ml의 스트렙토마이신, 100ng/ml의 신경성장인자(nerve growth factor, NGF)가 함유된 DMEM 저혈청 분화 배지(low serum differentiation media)로 72시간 동안 배양하였고, 1 μ m 구멍을 가진 멤브레인은 10 μ g/ml 콜라겐 용액이 400 μ l/웰로 들어있는 24웰 플레이트에 담가 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 코팅하였다. 코팅된 멤브레인은 600 μ l의 분화배지가 들어있는 웰로 옮겨주고, 72시간 동안 분화 유도된 PC-12 세포를 75,000세포/100 μ l/멤브레인의 수로 분주하였다. 세포에 신경독성을 유발하는 200nM 옥살리플라틴을 처리하고, 신경돌기 성장에 대한 자근 추출물의 보호 효과를 확인하기 위해, 옥살리플라틴과 상기 [재료 및 방법 1]에서 제조한 100 μ g/ml의 자근 추출물(WLR)을 함께 처리하였다. 또한, 음성대조군으로 옥살리플라틴과 PBS 식염수(V)를 처리하였다. 처리된 세포를 신경돌기가 멤브레인의 아랫면으로 자라 나오도록 37 $^{\circ}$ C에서 48시간 동안 배양한 후, 멤브레인을 꺼내 PBS로 세척하고, 20분 동안 메탄올로 고정하였다. 멤브레인은 400 μ l의 신경돌기 염색 용액이 들어있는 웰에 담가 30분 동안 염색한 후, 신경세포체(cell body)를 제거하기 위해 멤브레인의 윗면을 면봉으로 닦아내었다. 염색된 멤브레인은 PBS로 세척하였고, 멤브레인의 아랫면에 자라나온 신경돌기를 광학현미경으로 관찰하였다.
- [160] 그 결과 도 2에 나타낸 바와 같이, 신경성장인자(NGF)에 의해 PC-12 세포로부터 신경돌기가 자라나오는 것을 관찰할 수 있었고, 신경성장인자로 유도된 신경돌기 성장이 옥살리플라틴(NGF+Oxal)에 의해 억제되며, 이러한 옥살리플라틴의 신경돌기 성장 억제는 자근 추출물(NGF+Oxal+WLR)에 의해 완화되는 것을 확인하였다(도 2).
- [161] 2-2. 자근 추출물의 신경 보호 효과-정량적 분석

- [162] 본 발명의 자근 추출물의 신경 보호 효과를 생체 외(*in vitro*)에서 추가로 검증하기 위하여 신경성장인자(NGF)에 의해 PC-12 세포로부터 유도되는 신경돌기의 성장을 정량적으로 분석하였다.
- [163] 구체적으로, 상기 [재료 및 방법 3-1]의 방법으로 배양한 PC-12 세포를 1×10^4 세포/웰의 농도로 콜라겐 타입 IV로 코팅된 24웰 플레이트에 균일하게 접종한 후 바닥면에 부착되도록 DMEM 성장배지에 배양하였다. 12시간 후 신경돌기의 생성을 유도하기 위하여 혈청 없이 100ng/ml의 신경성장인자(NGF)가 함유된 DMEM 배지로 교체하고, 동시에 신경독성을 유도하기 위하여 200nM의 옥살리플라틴(Oxal)을 처리하였다. 상기 [재료 및 방법 1]에서 제조한 자근 추출물(WLR)은 각각 25, 100 μ g/ml의 농도로 처리하였으며, 양성대조군으로 500 μ M의 아미포스틴(Ami)을 사용하였다. 3일 후, 광학현미경과 이미지 분석을 통해 신경돌기가 생성된 세포의 비율과 신경돌기의 길이를 정량화하였다.
- [164] 그 결과 도 3에 나타낸 바와 같이, 신경성장인자(NGF)에 의해 유도된 신경돌기 성장은 옥살리플라틴(NGF+Oxal+V)에 의해 감소되며, 자근 추출물(WLR)에 의해 옥살리플라틴에 의한 신경돌기 성장 억제가 완화되는 것을 확인하였고(도 3A), 신경돌기를 형성한 세포의 비율과 성장한 신경돌기의 상대적인 길이의 합이 자근 추출물에 의해 회복되는 것을 확인하였다(도 3B).
- [165]
- [166] 실시예 3. 생체 내(*in vivo*)에서 자근 추출물의 CIPN 억제 효과 확인
- [167] 옥살리플라틴으로 유발된 말초신경병증 동물모델에서 기계적 이질통(mechanical allodynia)를 측정함으로써, 본 발명의 자근 추출물의 CIPN 억제 효과를 확인하였다.
- [168] 구체적으로, 상기 [재료 및 방법 4]에 따라 준비된 말초신경병증 동물모델에 통증이 유발된 2주 후부터 상기 [재료 및 방법 1]에서 제조한 250mg/kg의 자근 추출물(WLR) 또는 음성대조군으로 0.5%의 카르복시메틸셀룰로스(carboxymethyl cellulose, CMC)를 주 6회, 4주간 경구투여하였고, 양성대조군으로 100mg/kg 아미포스틴을 주 2회, 4주간 복강 투여하였다. 통증이 유발된 2주 후부터 약물투여 기간 동안 주 1회 마우스의 뒷발바닥(hind paw)에 0.4 g의 동일한 자극을 주는 von Frey filament 테스트를 실시하였다. 자극에 대한 민감도는 자극에 반응하는 동물 개체의 빈도(%)로 표시하였다.
- [169] 그 결과 도 4에 나타낸 바와 같이, 옥살리플라틴 투여는 von Frey filament 자극에 대한 발바닥의 민감도를 약 35%에서 75%까지 증가시켰고, 증가된 민감도는 옥살리플라틴 투여를 종료한 후 4주간 유지되었으며, 자근 추출물은 옥살리플라틴에 의해 증가된 자극 민감도를 효과적으로 감소시켰고, 실험이 종료된 시점까지 꾸준히 민감도를 기초 레벨(basal level) 수준(30~40%)까지 낮추는 것을 확인하였다(도 4).

[170]

- [171] 실시예 4. 조직학적 분석을 통한 자근 추출물의 신경 보호 효과 확인
- [172] **4-1. 면역조직학적 분석을 통한 자근 추출물의 신경 보호 효과 확인**
- [173] 옥살리플라틴으로 유발한 말초신경병증 동물 모델에서 자근 추출물(WLR)에 의한 척수 내 신경아교세포(glial cell)의 활성화 및 발바닥 피부에서의 신경 손상 억제 효과를 확인하였다.
- [174] 구체적으로, [재료 및 방법 4]에 따라 C57BL6 수컷 마우스에서 옥살리플라틴(10 mg/kg)로 말초신경병증을 유발한 후 [재료 및 방법 1]에 따라 제조한 자근 추출물(250mg/kg)과 음성대조군으로 0.5% 카르복시메틸셀룰로스(carboxymethyl cellulose, CMC)를 주 6회 경구투여하였고, 양성대조군으로 100mg/kg 아미포스틴을 주 2회 복강 투여하였다. 2주 동안 약물을 투여한 후 [재료 및 방법 6-1]에 따라 요추신경(lumbar spinal cord) 및 뒷발바닥 피부(hind foot pad)를 절제하였다. 확보된 검체를 이용하여 [재료 및 방법 6-2]에 따라 요추신경의 등쪽뿔(dorsal horn) 부위에서 성상세포(astrocyte)와 미세아교세포(microglial cell)의 활성화를 각각 GFAP, Iba-1 마커 단백질을 탐지하여 측정하였고, 뒷발바닥 피부에서의 내상피신경다발(IENF)의 분포는 [재료 및 방법 6-3]에 따라 PGP9.5 마커 단백질을 탐지하여 측정하였다.
- [175] 도 5에서 나타난 바와 같이, 옥살리플라틴에 의해 활성화된 성상세포(GFAP 양성 세포) 및 미세아교세포(Iba-1 양성 세포)의 분포가 증가하고, 자근 추출물(WLR)과 양성 대조군으로 사용한 아미포스틴을 투여한 군에서 비슷한 수준으로 활성화된 성상세포와 미세아교세포의 분포가 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 뒷발바닥 피부에서 옥살리플라틴에 의해 감소된 내상피신경다발의 분포가 자근 추출물 및 아미포스틴에 의해 회복되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 자근 추출물이 옥살리플라틴에 의해 유발되는 신경세포에서의 염증반응과 상피조직에서의 신경 손상을 완화시킬 수 있음을 의미한다(도 5).
- [176] **4-2. DRG 세포 형태학적 분석을 통한 자근 추출물의 신경 보호 효과 확인**
- [177] 옥살리플라틴으로 유발한 말초신경병증 동물 모델에서 자근 추출물(WLR)에 의한 뒤뿌리신경절(DRG) 신경세포에서의 형태학적 변이를 확인하였다.
- [178] 구체적으로, [재료 및 방법 4]에 따라 C57BL6 수컷 마우스에서 옥살리플라틴(10 mg/kg)로 말초신경병증을 유발한 후 [재료 및 방법 1]에 따라 제조한 자근 추출물(250mg/kg)과 음성대조군으로 0.5% 카르복시메틸셀룰로스(carboxymethyl cellulose, CMC)를 주 6회 경구투여하였고, 양성대조군으로 100mg/kg 아미포스틴을 주 2회 복강 투여하였다. 2주 동안 약물을 투여한 후 [재료 및 방법 6-1]에 따라 뒤뿌리신경절(DRG)을 절제하였다. 확보된 검체를 이용하여 [재료 및 방법 6-4]에 따라 뒤뿌리신경절(DRG)에서 세포핵 및 핵소체의 형태학적 변화를 관찰하였다.
- [179] 도 6에서 나타난 바와 같이, 옥살리플라틴에 의해 DRG 신경세포의 핵소체 위치가 핵의 가장자리로 이동하는 탈중심핵소체(eccentric) 및

다중세포핵(multinucleated)을 갖는 DRG 신경세포의 빈도가 증가하였다. 이러한 세포 형태학적 변화는 자근 추출물(WLR) 및 양성 대조군으로 사용한 아미포스틴을 투여한 군에서 비슷한 수준으로 감소됨을 확인할 수 있었으며, 특히 다중세포핵을 갖는 신경세포는 통계적으로 유의하게 감소하였다. 이는 자근 추출물이 옥살리플라틴에 의한 신경 조직 내 염증 및 병리학적 통증 등의 말초신경병적 손상을 완화시킬 수 있음을 의미한다(Di Cesare Mannelli L, et al., 2013, Pain, v14, pp1585-1600).

[180]

[181] 실시예 5. 생체 외(*in vitro*) 정상세포에서 자근 추출물의 세포독성 확인

[182] 자근 추출물이 정상세포에서 독성을 유발하는지 인간포피섬유아세포(Human foreskin fibroblast cells)를 사용하여 자근 추출물의 세포독성을 확인하였다.

[183] 구체적으로, 상기 [재료 및 방법 3-2]와 동일한 방법으로 인간포피섬유아세포를 배양한 후, 세포를 96웰 배양 디쉬에 웰당 2000개의 세포로 분주하였다. 24시간 후에 [재료 및 방법 1]에 따라 제작된 순차적으로 희석된 자근 추출물을 최종 0~1000 μ g/ml이 되도록 처리하였다. 처리 48시간 후에 Ez-Cytox 세포생존률 측정킷((주)대일랩서비스)을 사용하여 세포생존률을 측정하였다. 자근 추출물을 처리하지 않은 군과 비교하여 상대적인 세포생존률(%)을 계산하였다.

[184] 그 결과 도 7에 나타낸 바와 같이, 자근 추출물을 최대 1,000 μ g/ml의 농도로 처리하여도 인간포피섬유아세포는 95% 이상의 세포생존률을 유지하였고, 따라서, 자근 추출물은 정상세포에서 세포독성을 유발하지 않음을 확인하였다(도 7).

[185]

[186] 실시예 6. 생체 외(*in vitro*) 인간종양세포에서 자근 추출물과 항암제의 상호작용 평가

[187] 종양임상에서 암환자에게 항암제와 자근 추출물을 동시에, 혹은 시간적인 간격을 두고 투여하였을 때, 자근 추출물이 항암제를 이용한 항암치료 결과에 부정적인 영향을 줄 수 있는 가능성을 배제하기 위하여 생체 외 인간종양세포에서 자근 추출물이 항암제의 세포독성에 영향을 주는지 확인하였다.

[188] 구체적으로, 상기 [재료 및 방법 3-3]과 동일한 방법으로 인간폐암세포(A549)와 인간대장암세포(HCT116)를 배양한 후, 각각의 세포를 96웰 배양 플레이트에 웰당 5,000개의 세포로 분주하였다. 24시간 후에 순차적으로 희석된 옥살리플라틴(0~100 μ g/ml)과 [재료 및 방법 1]에 따라 제작된 서로 다른 농도의 자근 추출물(O(PBS), 10, 30, 100 μ g/ml)을 동시에 처리하였다. 음성대조군은 옥살리플라틴만 처리한 세포군을 사용하였다. 처리 72시간 후에 Ez-Cytox 세포생존률 측정킷을 사용하여 세포생존률을 측정하였다. 옥살리플라틴에 의한 세포사멸(% death)은 (100-세포생존률(%))로 표시하였다.

[189] 그 결과 도 8에 나타난 것과 같이, 옥살리플라틴을 단독으로 처리하였을 때,

농도의존적으로 A549 인간폐암세포와 HCT116 인간대장암세포의 성장을 억제하였고(No treat), 자근 추출물을 0(혹은 PBS 식염수)에서 100 $\mu\text{g/ml}$ 까지의 농도로 옥살리플라틴과 함께 처리하여도 자근 추출물이 옥살리플라틴의 암세포성장 억제 효과에 아무런 영향을 주지 않음을 확인하였다(도 8). 따라서, 상기 결과로 자근 추출물은 임상적으로 옥살리플라틴과 함께 암환자에게 병용 투여하였을 때, 옥살리플라틴의 항암 효과에 부정적인 영향을 주지 않음을 확인하였다.

[190]

[191] 실시예 7. 자근 추출물이 인간 약물대사효소(CYPs) 및 약물수송체(P-gp) 활성에 미치는 영향 확인

[192] 자근 추출물과 항암제를 포함한 일반약이 병용 투여될 경우, 자근 추출물과 병용투여되는 약 사이에 약물 상호작용에 의한 부작용이 발생할 가능성이 있다. 병용투여되는 약물 사이의 상호작용은 두 약물이 어떤 형식으로 인간 약물대사 효소의 활성에 영향을 주는지 확인함으로써 예측할 수 있다. 이에 본 발명자들은 자근 추출물이 인간 약물대사 효소의 활성 및 유전자 발현에 영향을 주는지 확인하였다. 조사 대상 효소 중 약물대사의 대부분을 차지하는 CYP과 약물수송체인 P-gp 단백질에 대해 조사하였다.

[193]

[194] 7-1. 자근 추출물에 의한 CYPs 및 P-gp 활성 억제 확인

[195] 자근 추출물이 인간 약물대사 효소인 CYP과 약물수송체인 P-gp의 활성을 억제하는지 [재료 및 방법 7-1]에 따라 생화학적 분석 방법을 통해 조사하였다.

[196] 구체적으로, [재료 및 방법 1]에 따라 제작된 순차적으로 희석된 자근 추출물(WLR)과 각각의 효소와 기질이 포함된 반응혼합물을 섞어 주었다. 효소에 따라 정해진 반응 온도와 시간 동안 효소반응을 진행시키고, 루시페라아제(luciferase) 검출 시약을 분주하여 루시페라아제 효소 반응을 일으키고 방출되는 빛의 세기를 측정하여 상대적인 효소의 활성을 측정하였다.

[197] 각각의 CYP과 P-gp의 활성을 측정한 결과, 자근 추출물이 200 $\mu\text{g/ml}$ 까지 증가하여도 측정에 사용된 모든 CYP 효소의 활성이 50% 이상 유지가 됨을 확인하였다(도 9A). 특히 P-gp의 경우 자근 추출물이 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 까지 증가하여도 특별한 효소 활성 억제가 관찰되지 않았다(도 9A).

[198]

[199] 7-2. 생체 외(*in vitro*) 인간 간세포주(HepaRG)에서 자근 추출물에 의한 CYPs 및 P-gp 유전자 발현 유도 확인

[200] 자근 추출물이 인간 약물대사효소인 CYP과 약물수송체인 P-gp 유전자의 발현에 영향을 주는지 [재료 및 방법 7-2]에 따라 생체 외(*in vitro*) 실험을 통해 인간 간세포주인 HepaRG에서 측정하였다.

[201] 구체적으로, [재료 및 방법 3-4]에 따라 배양된 HepaRG 세포를 [재료 및 방법 1]에 따라 제작된 자근 추출물(10, 20, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$)에 24시간 동안 노출시킨 후,

세포내 총 RNA를 추출하고 이를 주형삼아 cDNA를 합성하였다. 표 1에 개시한 프라이머(primer)와 SYBR Green을 이용하여 실시간 중합효소 연쇄반응(real-time PCR)를 실시하여 HepaRG 세포 내 표적 유전자의 발현 변화를 상대적으로 비교하였다.

- [202] 그 결과, HepaRG 세포에서 CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4, P-gp 단백질이 양성대조군 물질(CYP1A2과 CYP2B6는 오메프라졸(omeprazole), CYP3A4와 P-gp는 리팜피신(rifampicin))에 의해 효과적으로 발현이 증가함을 관찰함으로써 실험에 사용한 생체 외(*in vitro*) 시스템이 적절하게 작동되고 있음을 확인하였다. CYP3A4의 경우, 상대적으로 높은 농도의 자근 추출물에 의해 유전자 발현이 억제되는 현상이 관찰되었는데 자근 추출물 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준에서 약 68%, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준에서 약 75%의 CYP3A4 유전자 발현이 억제되었다. 따라서 CYP3A4에 의해 대사가 되는 항암제 혹은 일반약과 자근 추출물을 병용 투여하는 경우 임상적인 고려가 필요할 수 있다. CYP1A2와 CYP2B6, 및 P-gp 단백질의 경우 자근 추출물이 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 수준까지 증가하여도 유전자 발현은 2배 이상 증가하거나 감소하지 않았다(도 9B).

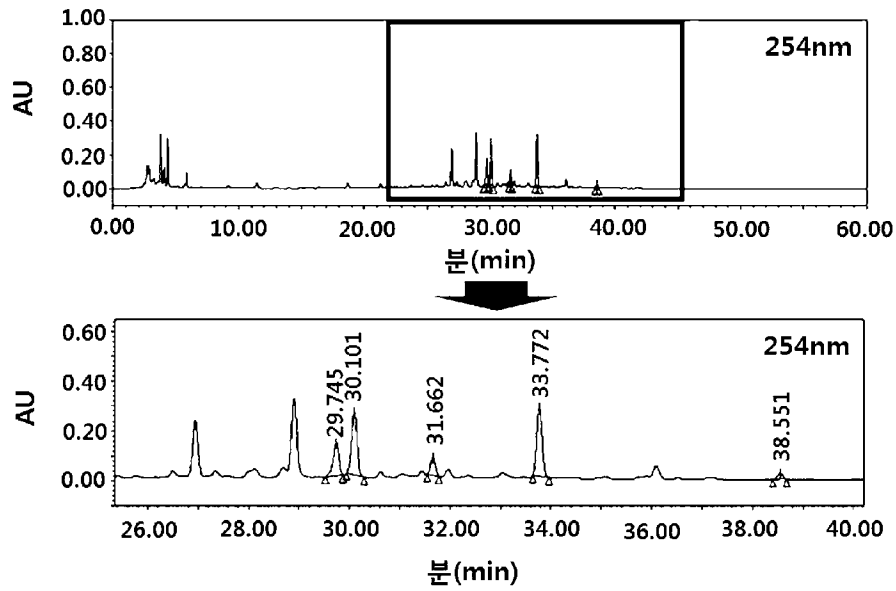
청구범위

- [청구항 1] 자근(Lithospermi Radix) 추출물을 유효성분으로 함유하는 말초신경병증(peripheral neuropathy) 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출하는 것을 특징으로 하는 말초신경병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올인 것을 특징으로 하는 말초신경병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 말초신경병증은 항암제에 의해 유발되는 말초신경병증(chemotherapy-induced peripheral neuropathy)인 것을 특징으로 하는 말초신경병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 항암제는 플래티넘(platinum) 계열, 탁산(taxane) 계열, 빈카알카로이드(vinca alkaloids), 보르테조밍(bortezomib) 또는 탈리도마이드(thalidomide)인 것을 특징으로 하는 말초신경병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 플래티넘 계열 항암제는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin) 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 말초신경병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 탁산 계열 항암제는 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel) 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 말초신경병증 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 8] 자근 추출물을 유효성분으로 함유하는 말초신경병증(peripheral neuropathy) 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출하는 것을 특징으로 하는 말초신경병증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 10] 제9항에 있어서, 상기 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올인 것을 특징으로 하는 말초신경병증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 11] 제8항에 있어서, 상기 말초신경병증은 항암제에 의해 유발되는 말초신경병증(chemotherapy-induced peripheral neuropathy)인 것을 특징으로 하는 말초신경병증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서, 상기 항암제는 플래티넘(platinum) 계열, 탁산(taxane) 계열, 빈카알카로이드(vinca alkaloids), 보르테조밍(bortezomib) 또는 탈리도마이드(thalidomide)인 것을 특징으로 하는 말초신경병증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 13] 제12항에 있어서, 상기 플래티넘 계열 항암제는 시스플라틴(cisplatin),

- 카르보플라틴(carboplatin) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin) 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 말초신경병증의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 14] 제12항에 있어서, 상기 탁산 계열 항암제는 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel) 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 말초신경병증 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 15] 자근 추출물을 유효성분으로 함유하는 항암 보조제.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출하는 것을 특징으로 하는 항암 보조제.
- [청구항 17] 제16항에 있어서, 상기 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올인 것을 특징으로 하는 항암 보조제.
- [청구항 18] 제15항에 있어서, 상기 항암 보조제는 플래티넘(platinum) 계열, 탁산(taxane) 계열, 빈카알카로이드(vinca alkaloids), 보르테조밍(bortezomib) 또는 탈리도마이드(thalidomide)를 포함하는 항암제와 병용투여하여 항암제에 의해 유발된 말초신경병증을 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 하는 항암 보조제.
- [청구항 19] 제18항에 있어서, 상기 플래티넘 계열 항암제는 시스플라틴(cisplatin), 카르보플라틴(carboplatin) 및 옥살리플라틴(oxaliplatin) 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항암 보조제.
- [청구항 20] 제18항에 있어서, 상기 탁산 계열 항암제는 파클리탁셀(paclitaxel) 및 도세탁셀(docetaxel) 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 항암 보조제.

[도 1]

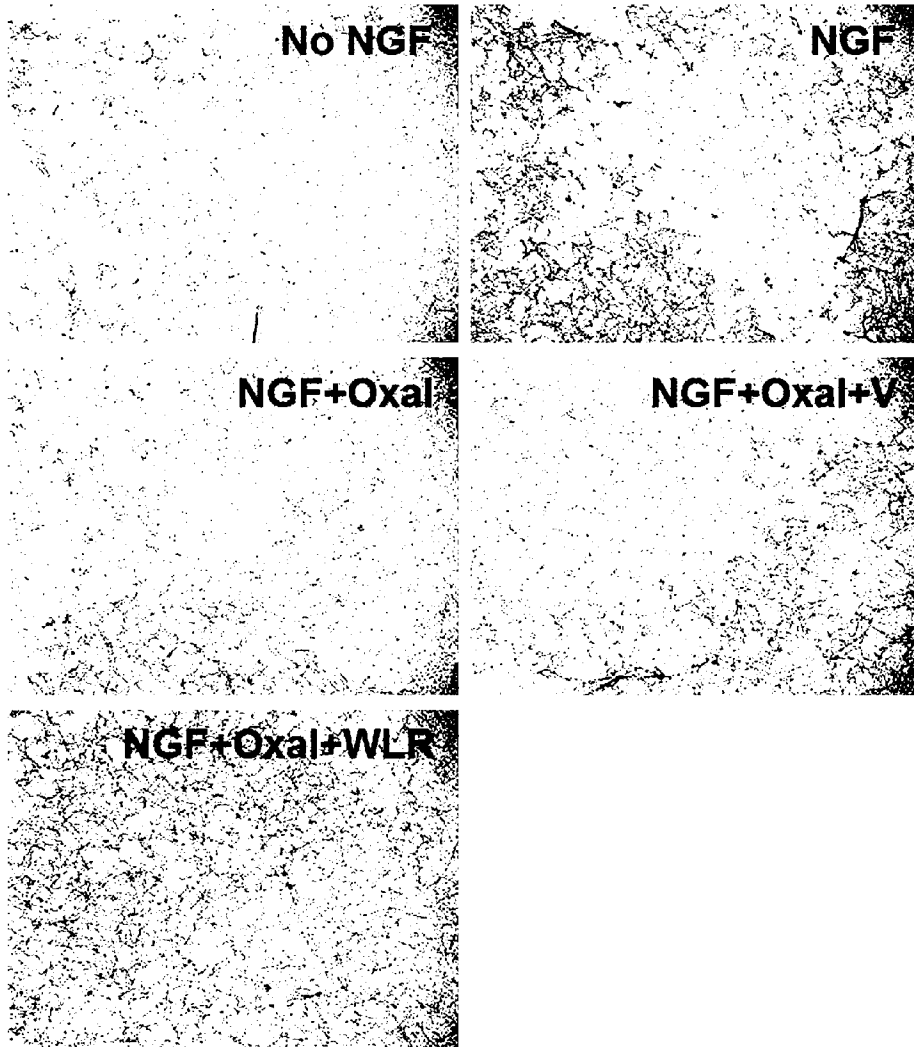
(A)



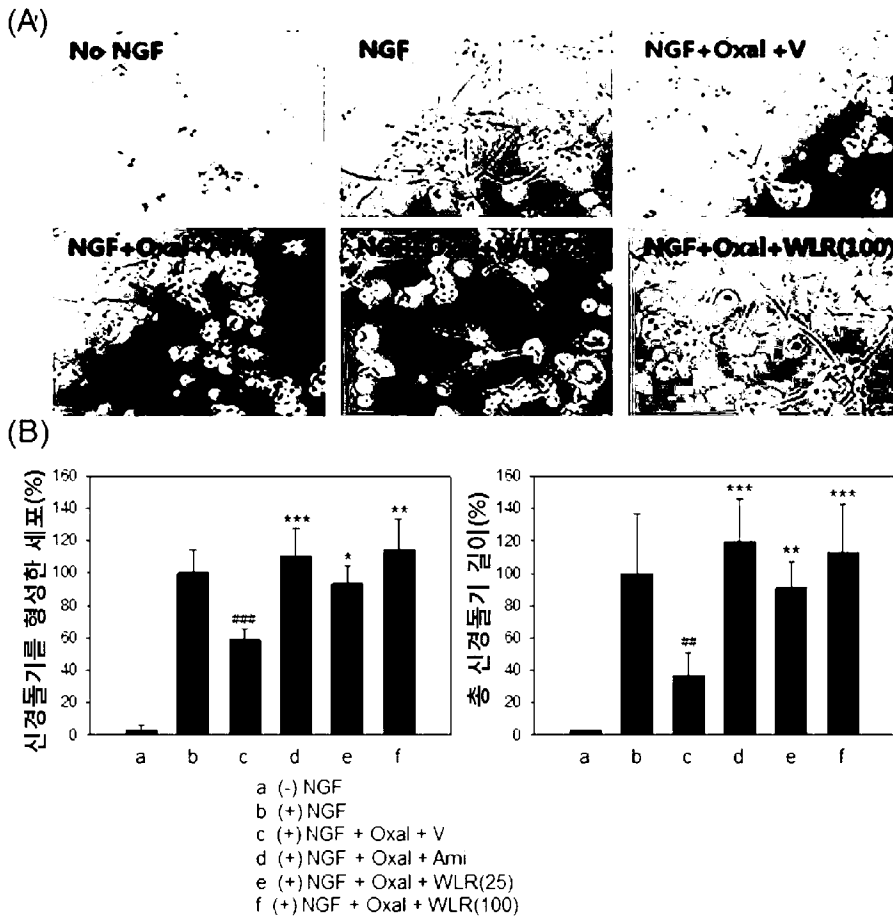
(B)

피크 (peaks)	머무름 시간 (retention time, 분)	동정 물질
A	29.745	로즈마리산(Rosmarinic acid)
B	30.101	리토스퍼믹산(Lithospermic acid)
C	31.662	살비아놀릭산 B(Salvianolic acid B)
D	33.772	살비아놀릭산 A(Salvianolic acid A)
E	38.551	살비아놀릭산 C(Salvianolic acid C)

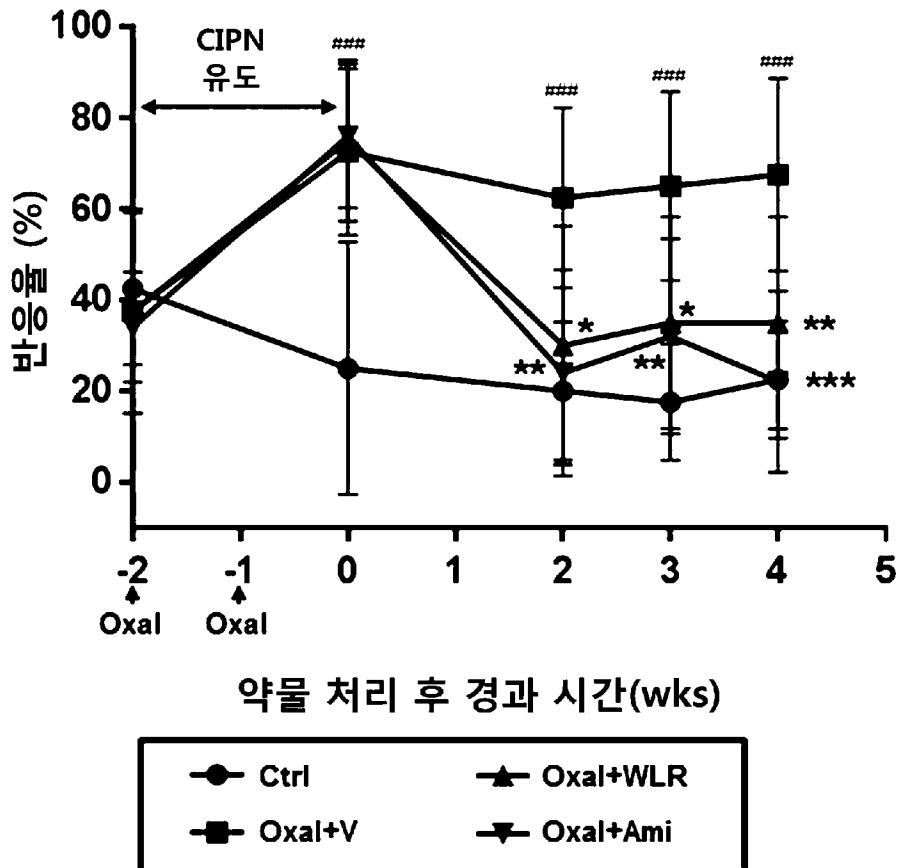
[도2]



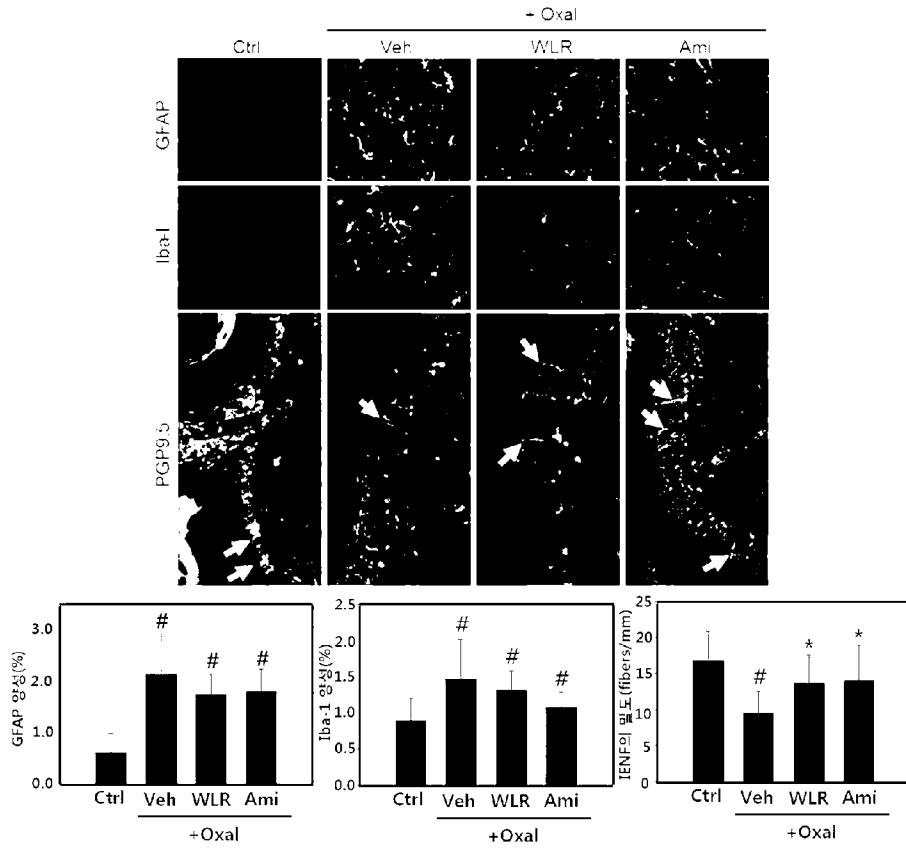
[도3]



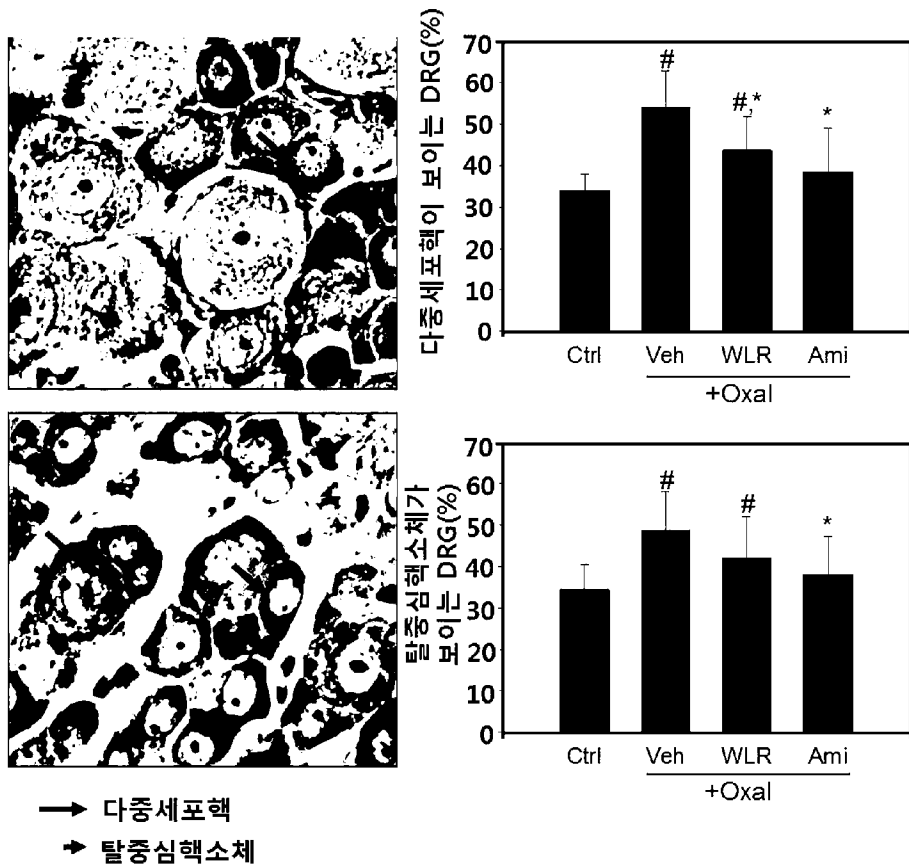
[도4]



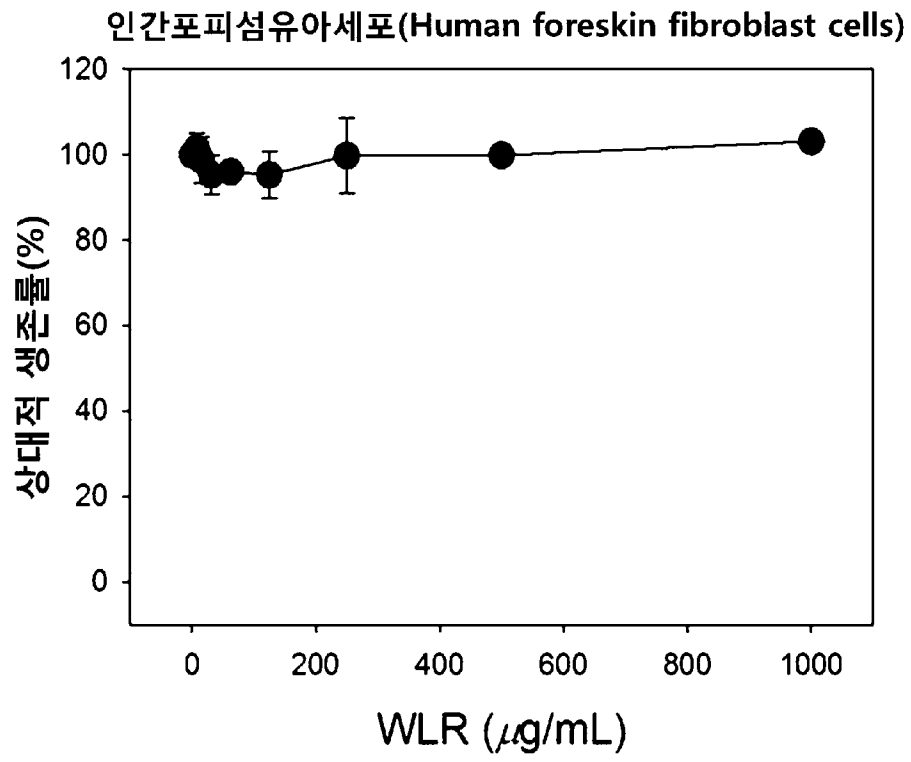
[도5]



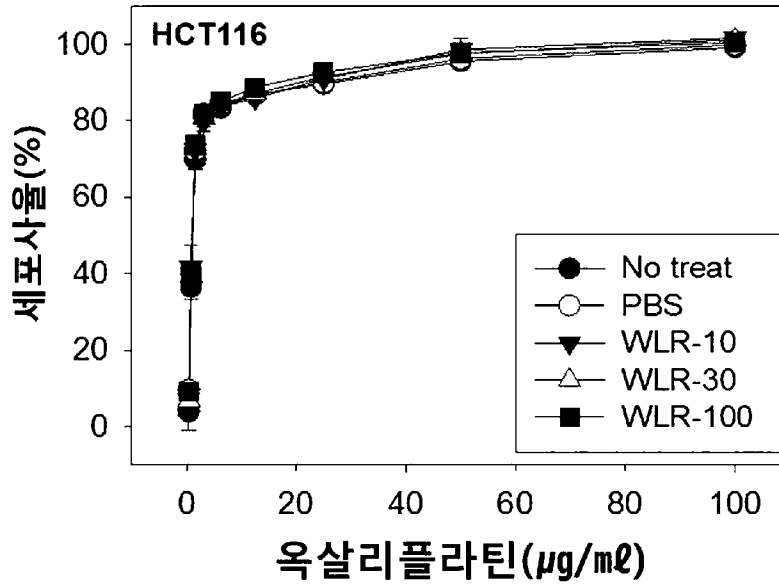
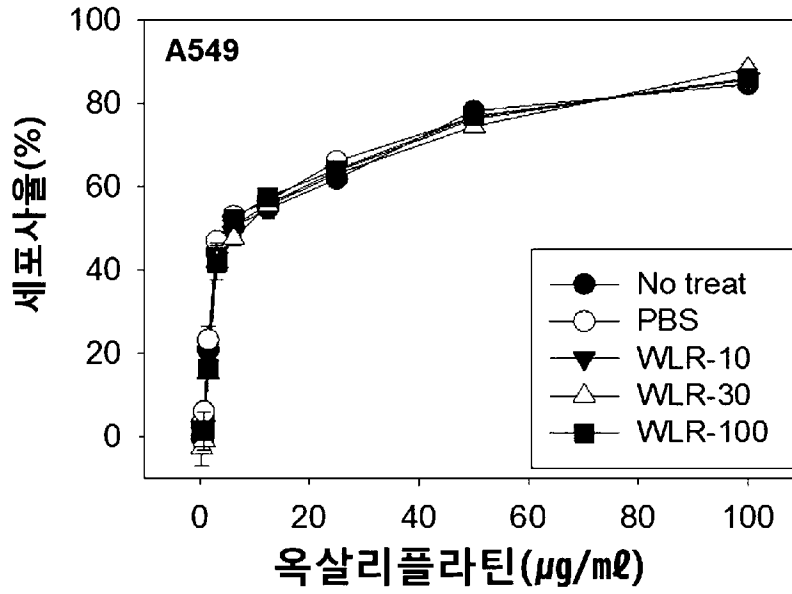
[도6]



[도7]

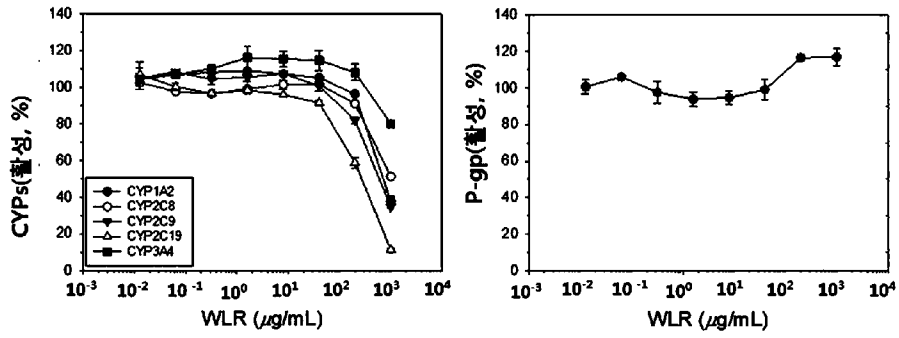


[도8]



[도9]

(A)



(B)

