(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0086704
(43) 공개일자 2014년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/166 (2006.01) *A61K 31/16* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0157522
(22) 출원일자 2012년12월28일
심사청구일자 2012년12월28일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93
(72) 발명자
윤승용
서울 송파구 토성로 38-6, 101동 1003호 (풍납동, 한강극동아파트)
김동호
서울 서초구 바우뫼로 103, 112동 101호 (양재동, 우성아파트)
송하림
서울 성북구 안암로9가길 14, 302호 (안암동4가)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **디나소어를 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 디나소어(dynasore) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 상기 디나소어 화합물은 뉴런간의 베타-아밀로이드 전파를 디나민(dynamin)의 억제를 통해 저해하는 효과를 보이는 바, 베타-아밀로이드로 인한 퇴행성 신경질환, 특히 알츠하이머의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-0002859
부처명	교육과학기술부
연구사업명	신진연구자지원사업
연구과제명	알츠하이머 치매의 신경 회로학적 발병기전 연구를 통한 조기진단 마커 및 치료물질 개발
기 여 율	1/2
주관기관	울산대학교 산학협력단
연구기간	2010.05.01 ~ 2013.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-0029490
부처명	교육과학기술부
연구사업명	선도연구센터(ACE)육성사업기초의약학분야(MRC)
연구과제명	인슐린 저항성 신경퇴행성질환의 세포기능장애 기전연구
기 여 율	1/2
주관기관	울산대학교 산학협력단
연구기간	2010.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

디나소어(dynasore) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 디나소어 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 베타-아밀로이드의 신경세포간 전달을 억제하는 것인 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 퇴행성 신경질환은 뇌졸중, 중풍, 기억력 상실, 기억력 손상, 치매, 건망증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 피크 (Pick)병, 크로이츠펠트-야콥 (Creutzfeld-Kacob)병, 헌팅턴병 및 루게릭병으로 이루어진 군에서 선택되는 질환인 것인 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머인 것인 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물의 제형은 과립제, 산제, 피복정, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택되는 것인 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 디나소어의 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 사람의 수명이 늘어나고, 고령화 사회로 진행하면서, 알츠하이머병, 파킨슨씨병, 헌팅턴병, 루게릭병과 같은 퇴행성 신경질환이 늘어가고 있다. 신경 퇴행성 질환은 뇌조직에 베타-아밀로이드(Aβ)라는 플라크 (senile plaque)(Aβ-플라크)가 축적되고 뇌세포중에 신경섬유성 엉김 (neurofibrillary tangle, NFT)이 나타나며, 이로 인하여 뇌조직 전반에 퇴행성 위축이 일어나고 이와 관련한 각종 증상이 발생한다.

[0003] 파킨슨병 (Parkinson's disease)은 대뇌 기저핵 (basal ganglia)내 흑질(substantia nigra, pars compacta)의 도파민 신경세포 (dopaminergic neuron)가 서서히 퇴행성 변화를 일으켜 선조체 (corpus striatum)의 신경전달

물질인 도파민(dopamine)의 결핍으로 생겨나며, 선조체 전체의 70-80% 이상이 소실되면 진전 (tremer), 서동 (bradykinesia), 경직 (rigidity) 등의 특징적인 운동장애를 나타내는 질환이다. 파킨슨병의 병인론에 관해서는 유전적인 요인, 산화적 스트레스, 유전적 민감성, 세포의 괴사 등을 포함한 다양한 내적, 외적발병 원인들이 거론되고 있으나 아직 정확한 기전은 밝혀져 있지 않다.

[0004] 알츠하이머병 (Alzheimer's disease; AD)은 기억력, 행동, 언어 및 시공간능력이 점진적으로 감퇴하여 결국 사망에 이르며 여러 가지 요인으로 인한 복잡한 신경 퇴행성 질환이다. 환자의 뇌는 세포 외 플라크 (plaque) 베타-아밀로이드 (아베타, Abeta) 펩티드 및 과인산화 (hyperphosphorylated) 형태의 타우 (tau)를 함유한 PHFs (paired helical filaments)로 이루어진 세포 내 신경섬유엉킴 (neurofibrillary tangles)이 축적되는 특징이 있다.

[0005] 베타-아밀로이드의 존재는 상당한 생화학적인 과정을 변화시켜 다른 단백질의 침착화를 초래하고, 소교세포의 식작용을 활성화시켜 결과적으로 신경세포의 소멸과 결과적인 지각 손상을 가져온다. 베타-아밀로이드의 진단을 위한 '최소한의 미시적인 판단기준'은 뇌에서 발견되는 베타-아밀로이드 침착의 양에 의존한다. 이러한 신경염 침착의 아밀로이드는 주로 β-시트 구조로 배열되어있는, 39 ~ 43개의 아미노산으로 이루어진 β-아밀로이드라 알려진 펩타이드로 이루어져 있다 (Kirschner et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1986, 83, 503-507).

[0006] 현재 베타아밀로이드 펩티드의 생성과 베타아밀로이드 펩티드-유도된 산화스트레스를 저해 또는 억제시키기 위한 연구가 계속되고 있으나 개발된 신소재나 약은 없는 실정이다. 또한, 현재까지 알츠하이머병 약물개발의 주 표적은 병에서 나타나는 신경전달물질 이상으로 콜린성 신경 세포를 표적으로 한 콜린에스테라제 억제제들 (Aricept, Exelon, Reminyl 등)과 글루타메이트 길항제인 Memantine이 FDA 승인을 얻어 현재 시판 중에 있는 것이 전부이다. 관련 특허로는 대한민국 공개특허공보 10-2007-0013265 호가 있다. 하지만 상기 언급한 바와 같이 이들 약물은 일시적으로 증상만 완화시킬 뿐이므로 병을 근원적으로 치료하거나 병의 진행 자체를 억제하는 약물 개발 기술이 절실히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명은, 베타-아밀로이드의 이동을 차단하여 병의 진행 자체를 억제하는 효과가 있는, 디나소어 (dynasore) 화합물의 신규 용도를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 디나소어(dynasore) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 디나소어 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염은 베타-아밀로이드의 신경세포간 전달을 억제할 수 있다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따른 디나소어 화합물은 뉴런간의 베타-아밀로이드 전파를 디나민(dynamin)의 억제를 통해 저해하는 효과를 보이는 바, 베타-아밀로이드로 인한 퇴행성 신경질환, 특히 알츠하이머의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 베타-아밀로이드(Aβ)의 축삭돌기(axon)를 통한 세포체로의 역-이동(retro-translocation) 및 세포독성을 보여주는 실시예 1의 실험 결과이다.

도 2는 Aβ 이동의 형태적 의존성을 보여주는 실시예 2의 실험 결과이다.

도 3은 축삭돌기 팽창부위, 라이소좀 및 미토콘드리아에의 Aβ 축적을 보여주는 실시예 3의 실험 결과이다.

도 4는 다양한 화합물이 뉴런의 Aβ 이동에 미치는 효과를 보여주는 실시예 4의 실험 결과이다.

도 5는 본 발명의 화합물인 디나소어 처리가 뉴런의 Aβ 이동 및 축적부위에 미치는 효과를 보여주는 실시예 4의 실험 결과이다.

도 6은 Aβ의 뉴런간 이동을 미세유체역학 챔버 시스템을 통해 보여주는 실시예 5의 실험 결과이다.

도 7은 디나소어 처리에 따른 Aβ의 뉴런간 이동을 미세유체역학 챔버 시스템을 통해 보여주는 실시예 5의 실험 결과이다.

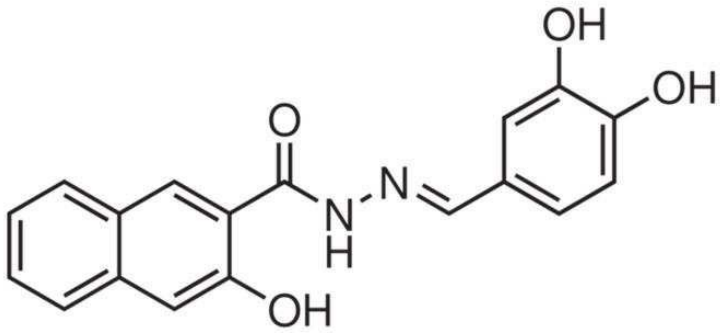
도 8은 디나소어 처리 유무에 따른 Aβ의 뉴런간 이동 차이를 보여주는 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 디나소어(dynasore) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 디나소어(dynasore) 화합물은, 3-하이드록시-나프탈렌-2-카복실산 (3,4-디하이드록시-벤질리덴)-하이드라자이드(Hydroxy-naphthalene-2-carboxylic acid (3,4-dihydroxy-benzylidene)-hydrazide)를 의미하며, 하기 화학식 1의 구조를 가진다.

[0014] [화학식 1]



[0015]

[0016] 본 발명의 상기 디나소어 화합물은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다. 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산, 아황산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레산, 퓨마르산, 글루코산, 메탄설폰산, 아세트산, 글리콘산, 석신산, 타타르산, 4-톨루엔설폰산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 시트르산, 아스파르탄산 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는 무기산으로는 염산, 유기산으로는 메탄설폰산을 사용할 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명의 디나소어 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.

[0018] 본 발명에 따른 부가염은 통상의 방법으로 제조할 수 있으며, 예를 들면 디나소어 화합물을 수혼화성 유기용매, 예를 들면 아세톤, 메탄올, 에탄올, 또는 아세토니트릴 등에 녹이고 과량의 유기산을 가하거나 무기산의 산 수용액을 가한 후 침전시키거나 결정화시켜서 제조할 수 있다. 이어서 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조시켜서 부가염을 얻거나 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.

[0019] 이하의 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 발명자들은 뉴런에서의 베타-아밀로이드 이동에 대해 연구하던 중, 축삭돌기 말단에 베타 아밀로이드를 처리하는 경우, 이는 뉴런의 세포체로 이동하여 분해되거나 방출되어 다른 뉴런으로 전파됨을 미세유체 챔버 시스템을 통해 확인하였고, 상기 베타-아밀로이드의 전파 기작을 본 발명의 디나소어 화합물이 억제하며, 따라서 디나소어 화합물이 베타-아밀로이드로 인한 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료 용도로 사용가능함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0020] 따라서 본 발명은 상기 디나소어(dynasore) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물, 퇴행성 신경질환 치료제의 제조를 위한 디나소어(dynasore) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 용도, 디나소어(dynasore) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 신경질환의 치료 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 퇴행성 신경질환은 뇌졸중, 중풍, 기억력 상실, 기억력 손상, 치매, 건망증, 파킨슨병, 알츠하이머병, 피크 (Pick)병, 크로이츠펠트-야콥 (Creutzfeld-Kacob)병, 헌팅턴병 및 루게릭병으로 이

루어진 군에서 선택되는 질환일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 알츠하이머일 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 구체예에서, 디나소어(dynasore) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0023] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 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 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 상기 디나소어(dynasore) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 통상적인 방법에 따라 과립제, 산제, 피복정, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 제형화하여 사용할 수 있다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0026] 디나소어(dynasore) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0029] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0030] **1. 미세유체역학 챔버 시스템(Microfluidic chamber system)**

[0031] 미세유체역학 챔버는 미세채널(세로 500 μm, 가로 10 μm, 높이 3 μm)로 연결된 컴파트먼트를 포함하는 폴리디메틸실록산(PDMS;polydimethylsiloxan) 프레임으로 구성되었다. 챔버는 커버글라스 위에 놓고, Laboratory Corona Treater (Electro-Technic Products, Inc)로 밀봉하였다. 컴파트먼트는 폴리-D-라이신(Invitrogen) 500 μg/ml과 라미닌(laminin, Invitrogen) 10 μg/ml로 로딩되었고 하룻밤 배양 후 세척되었다. 뉴런을 플레이팅하기 3시간 전, 각 컴파트먼트에 200 μl 신경배지를 첨가하였다. 축삭돌기 쪽에서 세포체 쪽으로 용질이 확산되는 것을 막기 위해, 왼쪽의 (세포체) 컴파트먼트의 배양 배지의 부피는 오른쪽의 (축삭돌기) 컴파트먼트 보다 20%정도 많게 설정하였다.

[0032] **2. 1차 뉴런 배양 (Primary Neuronal Cultures)**

[0033] 1차 대뇌피질뉴런은 배아기 16일 새끼 SD(Sprague-Dawley) 생쥐로부터 수득되었다. 보다 구체적으로, 대뇌피질은 칼슘-프리, 마그네슘-프리 HBSS(Hank' balanced salt solution)에서 절개되었고, 조직 분리를 위해 0.125% 트립신-EDTA 용매에서 37° C에서 10분동안 배양되었다. 20% FBS(fetal bovine serum ; 송아지혈청)가 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)을 첨가함으로써 트립신을 비활성화시켰고, 파스퇴르 파이펫을 사용하여 반복적으로 분쇄하여 좀 더 기계적으로 분리시켰다. ml 당 5 × 10^6 뉴런을 포함하는 세포 현탄액 20 μl 표본을 미리 코팅된 각 웰에 첨가하였다. 최종 배양 배지는 B27 (GibcoBRL), 0.5 mM L-글루타민, 항생제 및 25 μM 글루타메이트로 이루어진 Neurobasal medium(GibcoBRL)를 이용하였다. 모든 배양은 Aβ(베타-아밀로이드)와 약학 억제제를 첨가하기 전에 습기있는 5% CO_2 포함된 공기에서 7-10일 동안 37° C 조건에서 수행되었다.

[0034] **3. Aβ 준비**

[0035] Aβ1-42(Bachem, Bubendorf, Switzerland)는 DMSO에서 500 μM 농도로 용해되었고 -80° C에서 보관되었다. Aβ 1-42 올리고머와 피브릴(fibril)을 준비하기 위해, 최종농도가 1 μM가 되도록 펩타이드가 함유된 조정배지를 첨가하고, 이를 각각 4° C와 37° C에서 24시간 동안 배양하였다.

[0036] **4. 면역형광 분석(Immunofluorescence assay)**

[0037] 라이소좀을 표지하기 위해, 1차 뉴런을 고정하기 전에 50 nM Lysotracker Red (Invitrogen)에서 15분 동안 배양하였다. 미토콘드리아에 직접적인 표지를 하기 위해, 세포배양물은 100 nM Mitotracker Red (Invitrogen) 로 30분 동안 염색 후 고정되었다. 세포막의 지질 뗏목(lipid raft)을 표지하기 위해, 뉴런에 0.05 mg/ml 콜레라톡신 서브유닛 B (Invitrogen)을 처리하여 10분 동안 배양 후, 고정하였다. 세포는 PBS(phosphate-buffered saline) 버퍼로 세척되었고, 4%의 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 상온에서 30분간 고정시켰다. 파라포름알데하이드 제거 후, 세포는 PBS 버퍼로 세척되었다.

[0038] **5. 약학 억제제 (Pharmacological inhibitors)**

[0039] 클로르프로마진(Chlorpromazine, Sigma, 15 μM)과 페닐아르신 옥사이드(PAO;phenylarsine Oxide, Sigma, 3 μM) 는 클라트린-매개 세포 내 섭취 억제제(clathrin-mediated endocytosis inhibitors)로서 사용되었으며, 디나소어(dynasore, Sigma, 80 μM)는 디나민(dynamin) 억제제로 사용되었고, 메틸 베타-사이클로덱스트린(MβCD;methyl β-cyclodextrin, Sigma, 1 mM)은 지질 뗏목 억제제(lipid raft inhibitor)로 사용되었다. 미세소관의 불안정화제(microtubule destabilizer)는 콜히친(colchicine, Sigma, 1 μM)이, 디네인(dynein) 억제제는 바나듐산 염(vanadate, Sigma, 25 μM)이 사용되었다. 모든 억제제는 Aβ 처리 1시간 전에 세포 배양 배지에 첨가되었다. 모든 배양에서 DMSO의 최종 농도는 0.05%로 조절되었다.

[0040] **6. z-단면 공초점 분석 (z-section confocal analysis)**

[0041] 63배율 대물렌즈(numerical aperture 1.4)를 장착한 Zeiss Axiovert 200 LSM510 공초점 현미경 워크스테이션 및 아르곤/크립톤 레이저 excitation source 를 사용하여 이미지를 수득하였다. FITC-Aβ는 488 nm에서 표준 플루오레세인 이소싸이오시아네이트 여기(excitation) 및 505에서 550 nm의 범위의 대역통과 방출 필터(band-pass emission filter)를 사용하여 시각화되었고, 한편, 텍사스 레드-결합된 콜레라 톡신 B(CTB; Texas Red-conjugated cholera toxin B)는 543 nm에서 표준 텍사스 레드 여기 필터 (Standard Texas Red excitation filter) 및 650 nm의 롱-패스 방출 필터(long-path emission filter)를 사용하여 시각화되었다. Hoechst 염색을 시각화 하기위해, 표준 UV 여기 필터를 364 nm 에서 사용하고, 대역통과 방출 필터(band-pass emission filter)는 385 내지 470 nm로 사용하였다.

[0042] **<실시예 1> 베타-아밀로이드(Aβ)의 축삭돌기(axon)를 통한 세포체로의 역-이동(retro-translocation) 검토**

[0043] 뉴런 네트워크를 통한 베타-아밀로이드(Aβ) 전달을 검토하기 위해, 뉴런을 미세유체역학 챔버로 배양하였고, 이를 도 1A에 나타내었다. 도 1A를 참조하면, 상기 챔버 시스템은 신경세포체로부터 축삭돌기를 분리할 수 있으며, 컴파트먼트간의 배지 확산을 막아주는 바, Aβ는 축삭돌기 컴파트먼트(axon compartment)에만 체세포 컴파트먼트(soma compartment)로의 확산 없이 도입될 수 있다. 축삭돌기를 따라 역 이동하는 Aβ를 시각화하기 위해, 축삭돌기 컴파트먼트에 1 μM 단량체 FITC-표지된 Aβ를 가하였다. 4시간 후, 축삭돌기 컴파트먼트 및 마이크로채널에 있는 축삭돌기와, 세포체 컴파트먼트의 세포체에서, FITC-A가 연관되어 있는 것을 확인할 수 있었다(도 1B 참조). 이를 통해 축삭돌기 컴파트먼트에 있는 Aβ가 축삭돌기를 거쳐 세포체로 전달됨을 알 수 있었

다. Aβ가 축삭돌기 컴파트먼트로 적용된 후, 뉴런은 시간의존적으로 사멸하였다(도 1C 화살표 참조).

[0044] 축삭돌기를 따라 Aβ가 이동하는 것과 Aβ에 대한 세포독성 특이성을 조사하기 위해, 본 발명의 발명자들은 축삭돌기 컴파트먼트의 뉴런에 FITC를 동일한 몰농도로 처리하였다. 72시간 후, 세포체와 축삭돌기의 FITC 신호는 미약하게 나타났다(도 1D 참조). FITC-Aβ-양성 뉴런은 사멸하였고(도 1D, 화살표 참조), 뉴런의 축삭돌기는 변성된(도 1D, 화살표 참조) 반면, 대조군인 FITC만을 처리한 뉴런은 건강했고, 변성이 확인되지 않았다(도 1D 참조).

[0045] **<실시예 2> Aβ 이동의 형태적 의존성 검토**

[0046] Aβ 전달이 Aβ 형태에 의해 영향을 받는지를 확인하기 위해, 축삭돌기 컴파트먼트에 FITC-Aβ 단량체, 올리고머, 피브릴을 처리하였고, 그 농도를 세포체 컴파트먼트에서 측정하였다. 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2를 참조하면, FITC-Aβ의 신호 수준은 단량체와 올리고머-처리한 배양과 유사하게 나타났다. 그러나, 이는 피브릴을 처리한 것 보다 훨씬 낮은 농도였고, 이는 Aβ 피브릴(fibril)은 비효율적으로 흡수되었고, 세포체를 빠져나간다는 것을 알 수 있었다.

[0047] **<실시예 3> 축삭돌기 팽창부위, 라이소좀 및 미토콘드리아에의 Aβ 축적 검토**

[0048] 축삭돌기 컴파트먼트에서 FITC-Aβ를 처리하며 3시간 배양한 결과, 축삭돌기의 팽창부위(axonal swelling)에서 Aβ가 관찰되었다(도 3A, 0 min, green, 화살표 참조). 간헐촬영(time-lapse imaging) 시작 60분 후, MaetaMorph 프로그램을 이용하여 0분~60분 동안의 FITC-Aβ 신호차이를 빨간색으로 나타내었다(도 3A, 60 min, red). 도 3A를 참조하면, 축적된 Aβ를 가진 축삭돌기 스웰링은 60분동안 이동하지 못하였으나, 그 신호집중도는 증가하였고(도 3B 참조) 새로운 축적 지점이 나타남을 확인할 수 있었다.

[0049] 축삭돌기 컴파트먼트에서 FITC-Aβ를 4시간 동안 배양 후, Aβ 신호는 세포체에서 나타났고, 소낭 또는 튜브 모양으로 나타났다(도 3C 참조). 따라서 Aβ가 세포체의 라이소좀 또는 미토콘드리아에 축적되었을 것이라고 추측했다. 예측대로, 축적된 FITC-Aβ는 라이소트래커 레드(lysotracker red)(도 3C, 상행 참조)와 미토트래커 레드(mitotracker red)(도 3C, 하행 참조)로 염색되었다. 이는 축삭돌기에서 흡수된 Aβ가 세포체로 전달되었고, 라이소좀에서 가수분해되었거나, 라이소좀, 미토콘드리아에서 축적되었음을 의미하는 것이다. 또한 이를 통해 각 기관들의 통상적인 기능이 상실되어 뉴런변성이 유발되는 것임을 알 수 있었다.

[0050] **<실시예 4> 축삭돌기 막을 따라 전달되는 Aβ 확인**

[0051] 축삭돌기를 따라 전달되는 Aβ의 메커니즘을 규명하기 위해, 본 발명의 발명자들은 뉴런의 엔토사이토시스 또는 미세소관을 표적하는 화합물을 세포체와 축삭돌기 컴파트먼트에 처리하였다. 다양한 화합물이 Aβ 이동에 미치는 효과를 측정하기 위해, FITC-Aβ 신호는 세포체 컴파트먼트에서 정량되었다.

[0052] 클라스린-매개 엔토사이토시스 억제제인 클로로프로마진(Chloropromazine)과 페닐아르신 옥사이드(phenylarsine oxide)는 Aβ 전달을 막지 못하는 것으로 나타났다(도 4A 참조). 콜레스테롤 고갈제(depleter) 및 지질-뗏목 및 카베올린-매개 세포 내 섭취 억제제인 메틸-β-사이클로덱스트린은 세포체에서 FITC-Aβ 신호를 약 20% 정도 감소시켰다(도 4A, 4B 참조). 또한, 뉴런에 미세소관 불안정화제(microtubule destabilizer)인 콜히친(colchicine) 또는 디네인(dynein) 억제제인 바나듐산 염(vanadate)을 처리한 경우에도 세포체에서 FITC-Aβ 신호가 약 20% 정도 감소됨을 확인할 수 있었다(도 4C, 4D 참조). 특히, 디나민(dynamin)억제제인 디나소어(dynasore)는 세포체의 FITC-Aβ 신호를 약 50% 증가시키는 것으로 확인되었다(도 5A 및 5B 참조). 대조군 뉴런에서 FITC-Aβ 가 라이소좀과 미토콘드리아에 편중된 경우와는 대조적으로 디나소어 처리된 실험군에서의 FITC-Aβ 신호는 뉴런의 세포체와 축삭돌기에 널리 분포되어 있었다(도 3C 및 도 5A).

[0053] 디나소어(dynasore)의 효과를 보다 명확히 하기 위해, 세포체 컴파트먼트 또는 축삭돌기 컴파트먼트에 디나소어(dynasore)를 처리하였다. 양쪽 컴파트먼트 모두에 처리될 때와는 대조적으로, 한쪽 컴파트먼트에만 처리되는 경우, Aβ 신호를 증가시키지 않았으며, 세포체에의 신호 또한 증가시키지 않는 것으로 나타났다(도 5 A 참조). 따라서, 이 경우 Aβ는 디나민(dynamin)이 완전히 억제된 뉴런의 원형질막에 부착되어 있을 것이라고 판단하였다.

[0054] 이를 확인하기 위해 본 발명의 발명자들은 FITC-Aβ 처리된 세포를 사용하여 세포막의 지질-뗏목을 표지하기 위해 콜레라 톡신 B(CTB)를 처리하고 공초점 분석(confocal images)을 수행하였다(Nichols et al., 2001). Z-단면 이미지 분석은 디나소어가 양쪽의 컴파트먼트에 처리되었을 때, 뉴런의 세포막에 Aβ가 존재함을 보여주었다(도 5C 참조). 대조적으로, 뉴런의 축삭돌기 컴파트먼트에만 디나소어를 처리하였을 때, Aβ는 지질-뗏목과 함께 내부에 존재하는 것으로 확인되었다(도 5 C 참조).

[0055] **<실시예 5> 디나소어 처리에 따른 Aβ의 뉴런간 이동 확인**

[0056] 축삭돌기쪽에서 흡수된 Aβ가 이웃한 뉴런으로 이동하는지 여부를 확인하기 위해, 본 발명의 발명자들은 3-컴파트먼트 미세유체역학 챔버 시스템을 사용하여 이를 테스트하였고, 결과를 도 6에 나타내었다. 세 번째 컴파트먼트(ε)에 첨가된 FITC-Aβ는 도 1의 결과와 같이, 두 번째 미세소관(δ)의 축삭돌기를 거쳐 두 번째 컴파트먼트(γ)의 세포체로 이동하는 것으로 확인되었다. FITC-Aβ 신호들은 첫 번째 미세채널의 축삭돌기(β) 에서도 발견되었고, 첫 번째 컴파트먼트의 세포체에서도 발견되었다(α) (도 6 참조). 명백히 세 번째 컴파트먼트에 축삭돌기에 첨가한 Aβ는 두 번째 뉴런 세트(α)를 통과할 수 있었고, 이는 뉴런 네트워크를 Aβ가 통과함을 의미하는 것이다.

[0057] 본 발명의 발명자들은 두 번째, 세 번째 컴파트먼트에 디나소어(dynasore)의 첨가여부가 Aβ의 내부 뉴런 통과에 어떤 영향을 미치는지 조사하였고, 결과를 도 7에 나타내었다. 도 7을 참조하면, 두 번째 컴파트먼트(γ)의 Aβ 신호들은 증가한 반면 첫 번째 컴파트먼트의 Aβ 신호는 약 50%로 감소하였다. 상기 실험을 통한 모식도를 도 8에 나타내었다.

[0058] 도 8을 참조하면, 축삭돌기 말단에서 흡수된 Aβ는 세포체로 역 수송 되고, 프로테아좀 및 리소좀에 의해 분해되거나, 세포외부로 엑소좀과 같은 형태로 방출된다(도 8A 참조). 그러나, 디나소어가 처리된 경우, Aβ는 세포막에 부착된 상태로 남아있게되고, 분해 또는 세포외 방출 기작이 이루어지지 않는다(도 8B 참조).

[0059] 상기 결과를 종합하면, 디나민-의존적인 세포 내 섭취와 세포체에서의 Aβ 가공이 Aβ의 교차뉴런 통과에 연관되어 있으며, 이의 억제제인 디나소어(Dyn)를 통해 상기 Aβ의 뉴런간 이동이 차단될 수 있음을 알 수 있다.

[0060] 한편, 본 발명에 따른 디나소어 화합물은 목적에 따라 여러 형태로 제제화가 가능하다. 하기는 본 발명에 따른 상기 화합물을 활성성분으로 함유시킨 몇몇 제제화 방법을 예시한 것으로 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0061] **<제제예 1> 정제(직접 가압)**

[0062] 활성성분 5.0㎎을 체로 친 후, 락토스 14.1 ㎎, 크로스포비돈 USNF 0.8 ㎎ 및 마그네슘 스테아레이트 0.1 ㎎을 혼합하고 가압하여 정제로 제조하였다.

[0063] **<제제예 2> 정제(습식 조립)**

[0064] 활성성분 5.0 ㎎을 체로 친 후, 락토스 16.0 ㎎과 녹말 4.0㎎을 섞었다. 폴리솔베이트 80 0.3 ㎎을 순수한 물에 녹인 후 이 용액의 적당량을 첨가한 다음, 미립화하였다. 건조 후에 미립을 체질한 후 콜로이달 실리콘 디옥사이드 2.7 ㎎ 및 마그네슘 스테아레이트 2.0 ㎎과 섞었다. 미립을 가압하여 정제로 제조하였다.

[0065] **<제제예 3> 분말과 캡슐제**

[0066] 활성성분 5.0 ㎎을 체로 친 후에, 락토스 14.8 ㎎, 폴리비닐 피롤리돈 10.0 ㎎, 마그네슘 스테아레이트 0.2 ㎎와 함께 혼합하였다. 상기 혼합물을 적당한 장치를 사용하여 단단한 No. 5 젤라틴 캡슐에 넣어 캡슐제를 제조하였다.

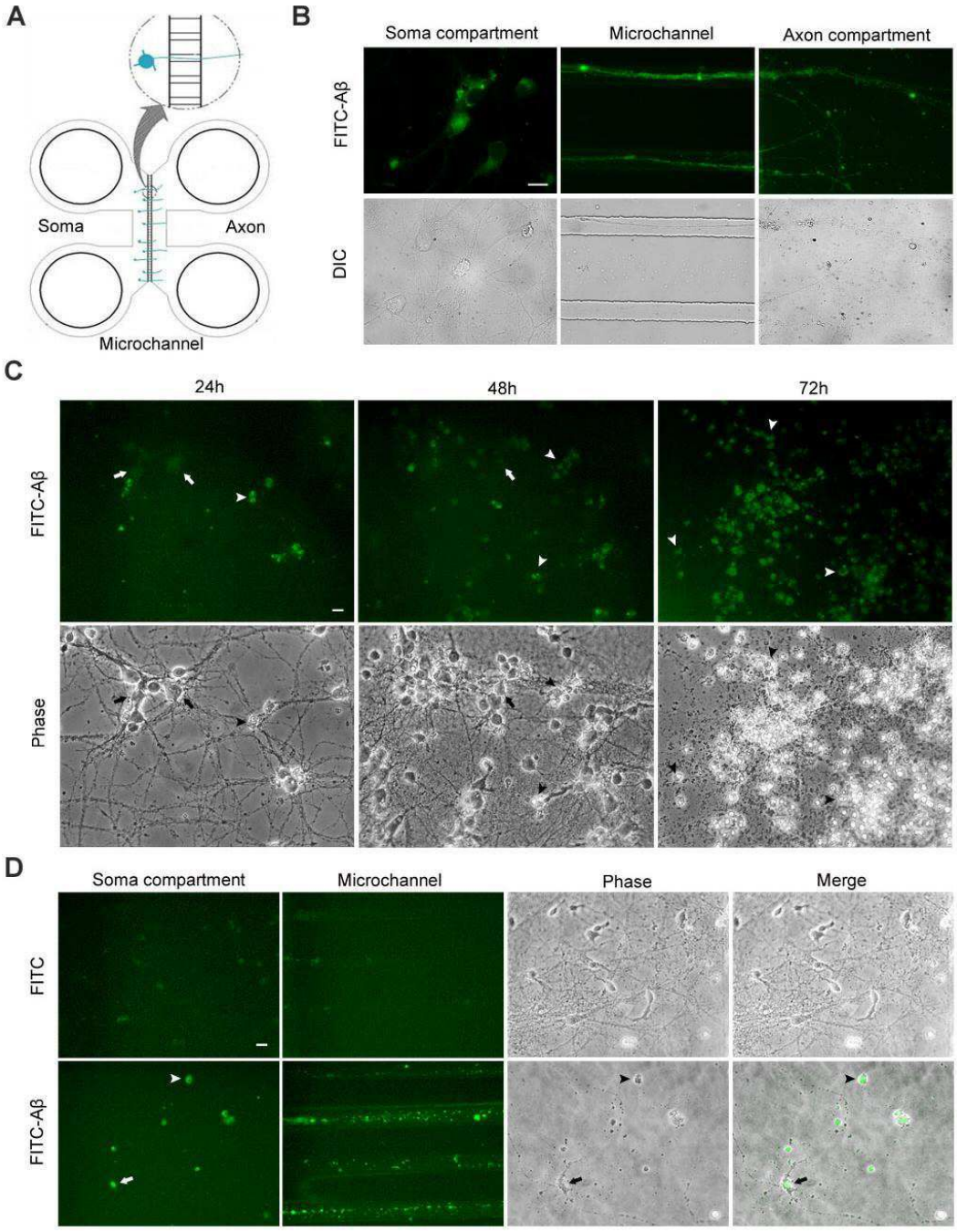
[0067] **<제제예 4> 주사제**

[0068] 활성성분 100 mg, 만니톨 180 mg, $Na_2HPO_4 12H_2O$ 26 mg 및 증류수 2974 mg를 혼합하였다. 상기 혼합 용액을 투명 유리로 된 앰틀 중에 충전시키고, 유리를 용해시킴으로써 상부 격자하에 봉입시키고, 120 ℃에서 15분 이상 오토클레이브시켜 살균하여 주사제를 제조하였다.

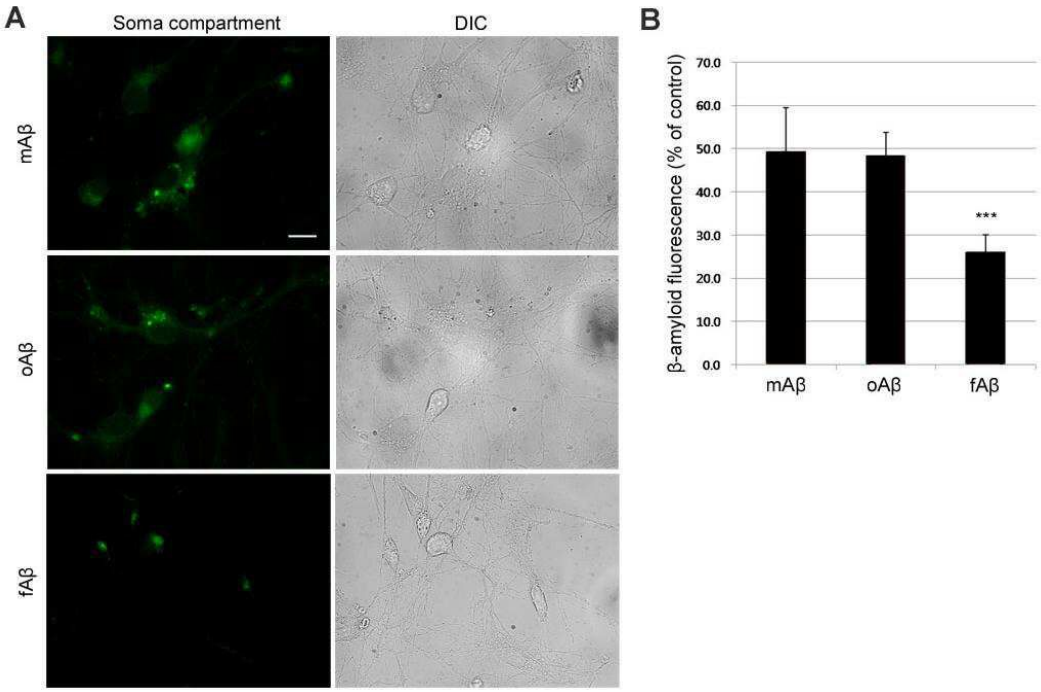
[0069] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

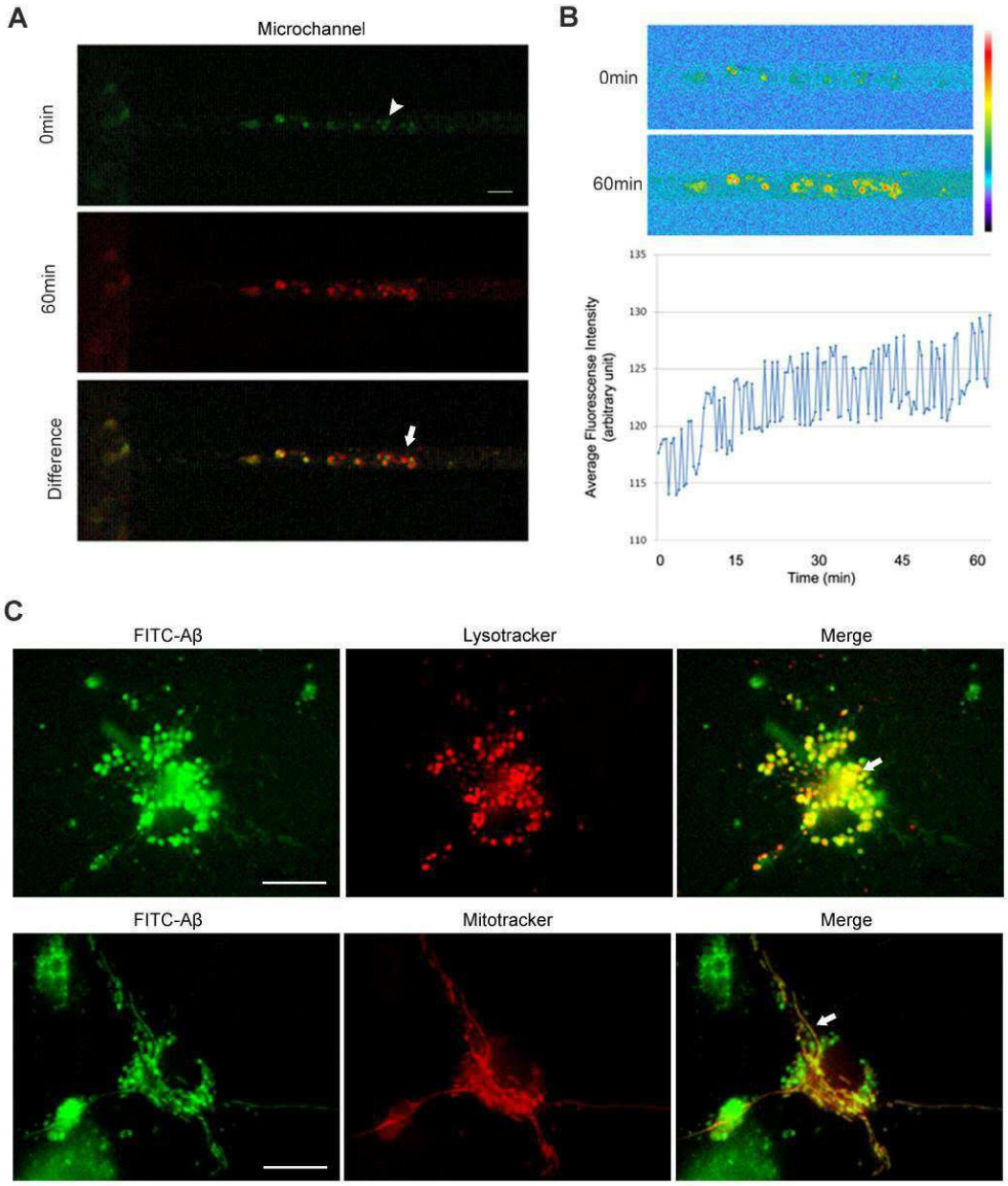
도면1


A
Soma
Axon
Microchannel
B
Soma compartment
Microchannel
Axon compartment
FITC-Aβ
DIC
C
24h
48h
72h
FITC-Aβ
Phase
D
Soma compartment
Microchannel
Phase
Merge
FITC
FITC-Aβ

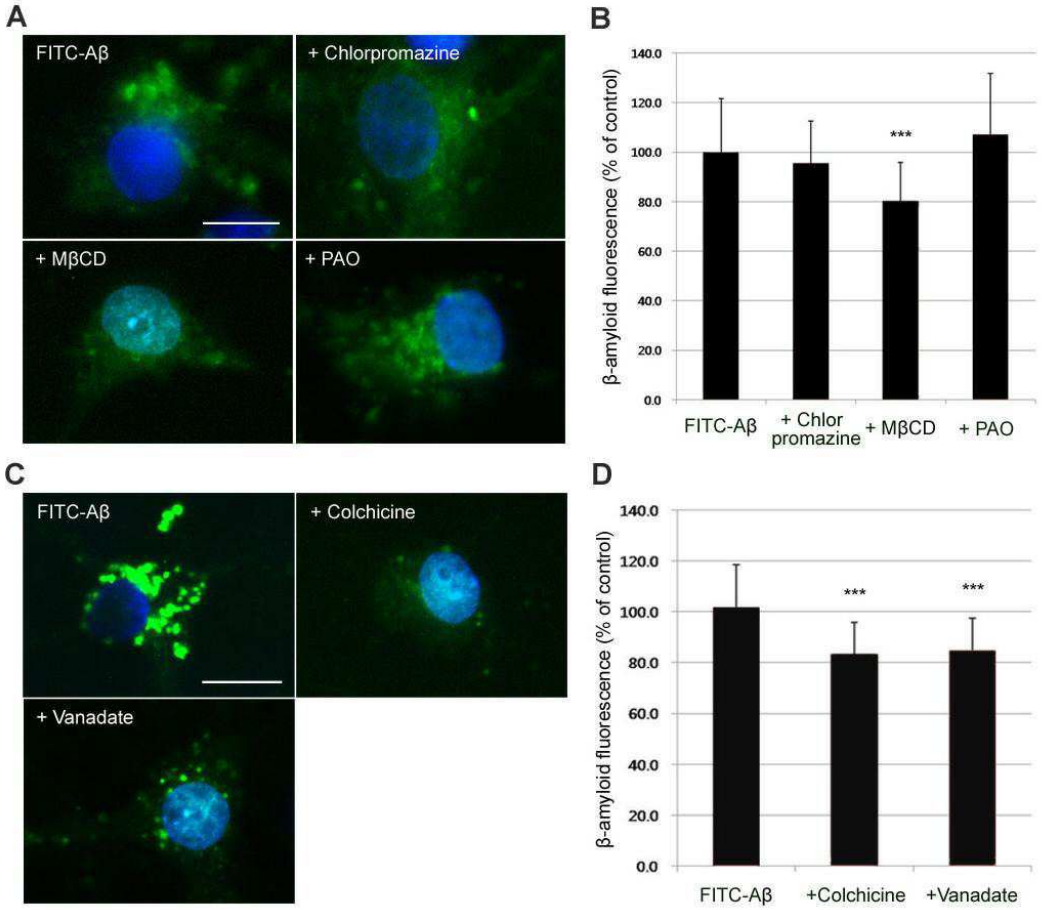
도면2


A
Soma compartment
DIC
mAβ
oAβ
fAβ
B
β-amyloid fluorescence (% of control)
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
***
mAβ
oAβ
fAβ

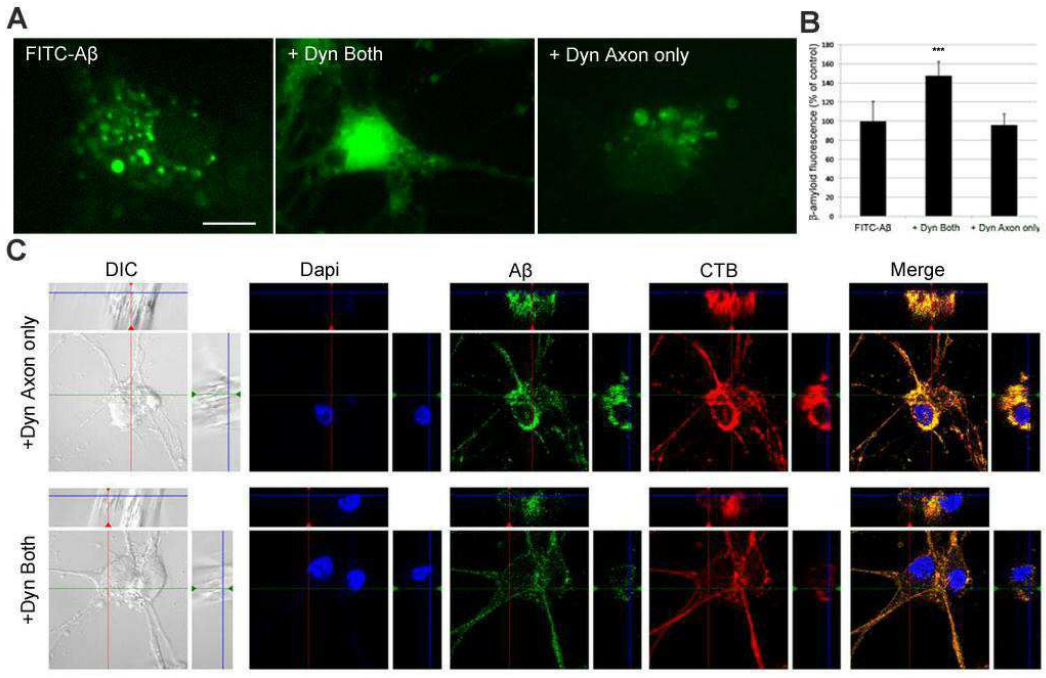
도면3


A
Microchannel
0min
60min
Difference
B
0min
60min
Average Fluorescense Intensity (arbitrary unit)
135
130
125
120
115
110
0
15
30
45
60
Time (min)
C
FITC-Aβ
Lysotracker
Merge
FITC-Aβ
Mitotracker
Merge

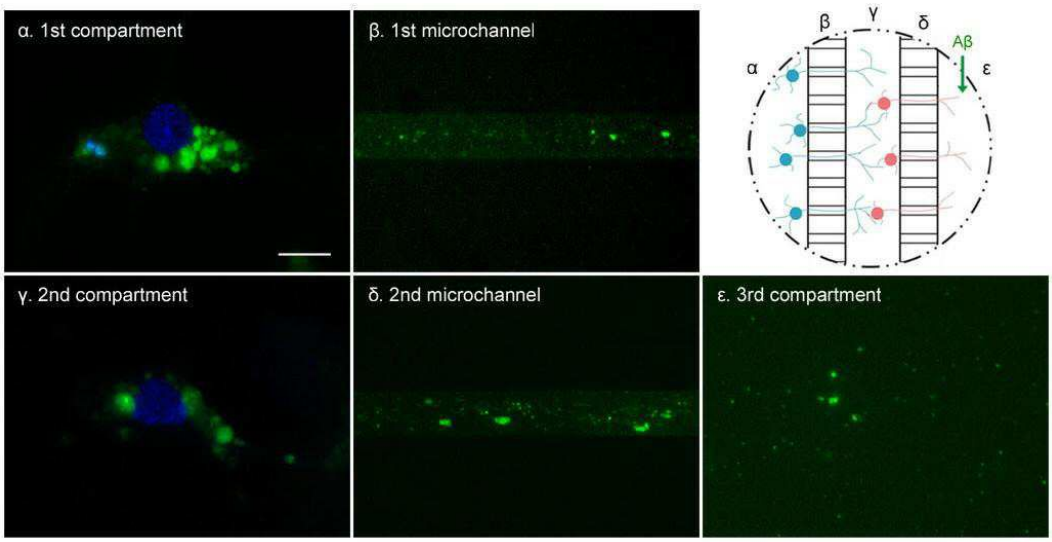
도면4


A
FITC-Aβ
+ Chlorpromazine
+ MβCD
+ PAO
B
β-amyloid fluorescence (% of control)
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
***
FITC-Aβ
+ Chlor promazine
+ MβCD
+ PAO
C
FITC-Aβ
+ Colchicine
+ Vanadate
D
β-amyloid fluorescence (% of control)
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
***
***
FITC-Aβ
+Colchicine
+Vanadate

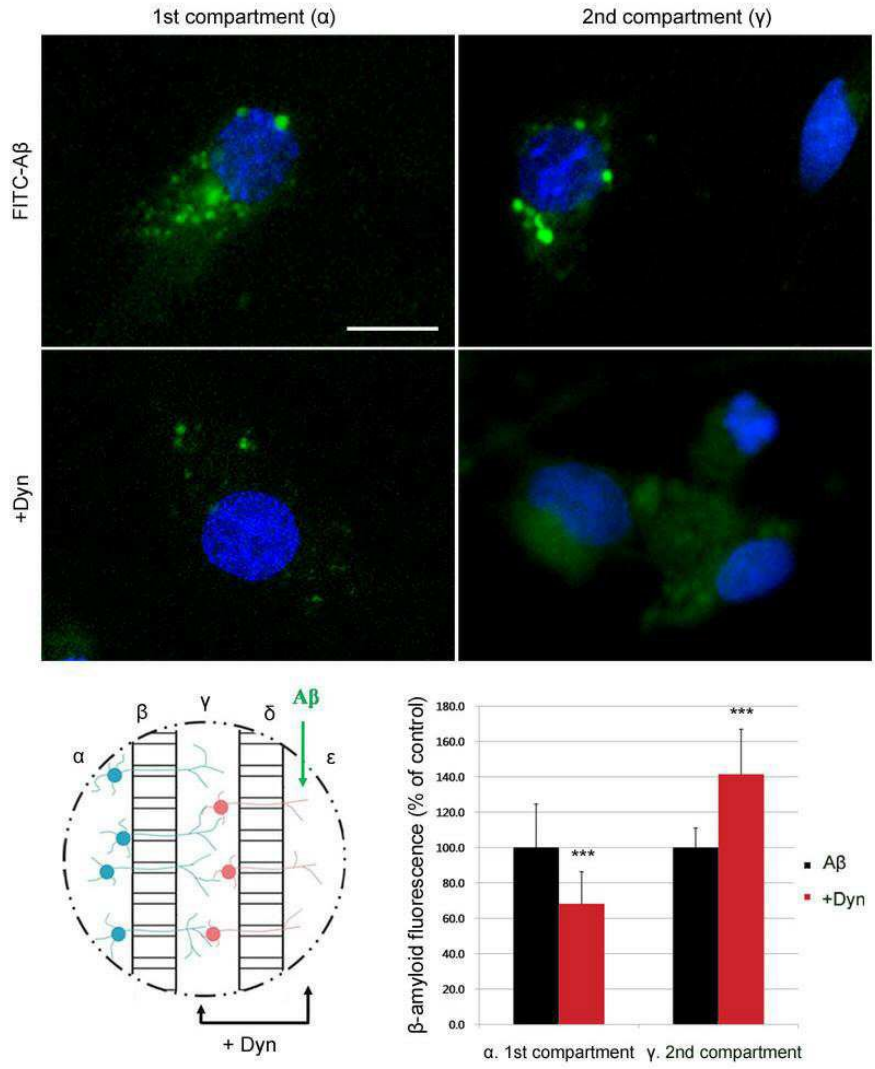
도면5


A
FITC-Aβ
+ Dyn Both
+ Dyn Axon only
B
C
DIC
Dapi
Aβ
CTB
Merge
+Dyn Axon only
+Dyn Both

도면6


α. 1st compartment
β. 1st microchannel
β
γ
δ
α
Aβ
ε
γ. 2nd compartment
δ. 2nd microchannel
ε. 3rd compartment

도면7


1st compartment (α)
2nd compartment (γ)
FITC-Aβ
+Dyn
β
γ
δ
Aβ
α
ε
+ Dyn
β-amyloid fluorescence (% of control)
180.0
160.0
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
***
***
Aβ
+Dyn
α. 1st compartment
γ. 2nd compartment

도면8

