



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0094358
(43) 공개일자 2016년08월09일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 38/16</i> (2006.01) <i>A61K 38/17</i> (2006.01)
 <i>A61K 39/02</i> (2006.01) <i>A61K 39/095</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 38/16</i> (2013.01)
 <i>A61K 38/17</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0095451(분할)
 (22) 출원일자 2016년07월27일
 심사청구일자 없음
 (62) 원출원 특허 10-2014-0122028
 원출원일자 2014년09월15일
 심사청구일자 2014년09월15일</p> | <p>(71) 출원인
 경상대학교산학협력단
 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)</p> <p>(72) 발명자
 김명옥
 경상남도 진주시 가호로 44번길 7 102동 303호(호탄동, 대동아파트)
 윤광호
 경상남도 진주시 가좌길29번길 63 (가좌동)</p> <p>(74) 대리인
 한윤호</p> |
|--|---|

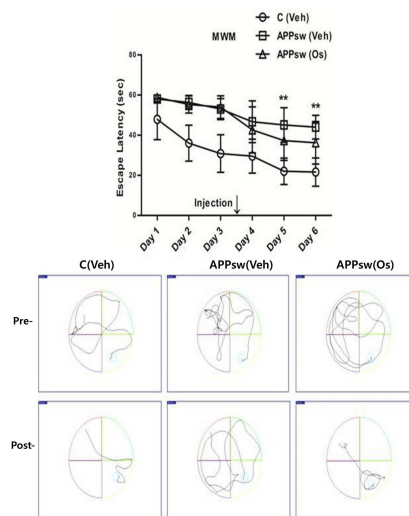
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 새로운 알츠하이머 질환 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 약학적 조성물에 관한 것으로서, 더 상세하게는 오스모틴을 유효성분으로 포함하는 새로운 알츠하이머 질환 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/02 (2013.01)

A61K 39/095 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0009521

부처명 미래부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래유망융합기술 파이오니어사업

연구과제명 치매(뇌기능향진 조절) 치료 천연신물질 소재개발 나노 담체 적합형 약물 기술개발

기 여 율 1/1

주관기관 경상대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

오스모틴을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 오스모틴은 담배속 식물로부터 분리 정제된, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 오스모틴은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는, 약학적 조성물.

청구항 4

오스모틴을 유효성분으로 함유하는 인지기능 개선 및 기억력 증진용 건강기능식품.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 오스모틴은 담배속 식물로부터 분리 정제된, 건강기능식품.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 오스모틴은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는, 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 약학적 조성물에 관한 것으로서, 더 상세하게는 새로운 알츠하이머 질환 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 치매질환은 단기간 및 장기간 기억장애가 기본적이며 또한 중핵증상으로 관찰되며, 기억장애와 이것에 기인한 부위감각상실(disorientation) 및 이것에 대한 고도의 뇌기능 장애로 이루어지는 것으로 생각되어 진다.

[0003] 알츠하이머형 치매증(Alzheimer's dementia, 이하 'AD'로 약칭함)은 운동력과 인지능력 저하의 파행적인 진행과 함께 다양한 심리적, 행동장애 증상이 동반되며 초기의 경미한 증상에서 시작하여 최종적으로 자발적인 개인생활이 불가능할 정도로 진행되어 그 피해가 심각하다. AD에 있어서는, 환자의 아세틸콜린(acetylcholine)계, 글루타민산(glutamic acid)계, 신경펩티드(neuropeptides)계 및 모노아민(monoamine)계에서의 신경전달의 기능저하가 나타나, 이들 신경전달계의 기능 장애가 AD의 주된 원인인 것으로 추정되고 있다. 또한, β -아밀로이드 펩티드(β -amyloid peptide)에 의해 유발된 신경세포 독성작용의 관점으로부터, β -아밀로이드 펩티드의 세포 밖으로의 노인 반점의 집적을 통한 해마 신경세포의 탈락에 의한 발증기전도 AD의 주요 원인 중 하나로 추정되고 있다.

[0004] 오스모틴 관련 치료용 조성물에 관한 선행문헌을 살펴보면, 대한민국 등록특허 제1308232호에 오스모틴을 포함하는 알코올에 의한 뇌손상 예방 및 치료용 조성물이 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 그러나 현재까지 알츠하이머병의 진전을 억제하는 치료제는 개발되고 있으나, 이를 제대로 치료할 수 있는 효과적인 치료방법은 개발되지 않고 있는 실정이다. 본 발명은 상기와 같은 문제점을 포함하여 여러 문제점들을 해결하기 위한 것으로서, 알츠하이머 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 그러나 이러한 과제는 예시적인 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

과제의 해결 수단

- [0006] 본 발명의 일 관점에 따르면, 오스모틴을 유효성분으로 포함하는 알츠하이머 병의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이 제공된다.
- [0007] 본 발명의 일 관점에 따르면, 오스모틴을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선 및 기억력 증진용 건강기능식품이 제공된다.
- [0008] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 치료적으로 유효한 양의 오스모틴을 알츠하이머 병에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 상기 개체의 알츠하이머병을 치료하는 방법이 제공된다.

발명의 효과

- [0009] 상기한 바와 같이 이루어진 본 발명의 일 실시예에 따르면, 알츠하이머 병을 효과적으로 치료할 수 있는 약학적 조성물 및 알츠하이머병을 포함하는 인지 및 기억 장애의 개선 및 기억력 증진용 건강기능식품을 제조할 수 있게 된다. 물론 이러한 효과에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

도면의 간단한 설명

- [0010] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따라 수중미로실험(Morris Water Maze Test)의 탈출대기시간 결과 및 이동경로를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 수중미로실험(Morris Water Maze Test)의 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 Y-미로실험(Y-maze spontaneous alternation test)의 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 담체만 투여한 대조군 마우스, 담체만 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스(APPsw) 및 오스모틴을 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스의 해마에서 시냅스 밀도를 나타내는 표지 단백질의 웨스턴 블롯팅 분석 결과를 나타내는 사진이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 담체만 투여한 대조군 마우스, 담체만 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스(APPsw) 및 오스모틴을 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스의 해마에서의 A β 신경반의 형성과 관련된 표지 단백질에 대한 웨스턴 블롯팅 분석 결과를 나타내는 사진이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 담체만 투여한 대조군 마우스, 담체만 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스(APPsw) 및 오스모틴을 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스의 대뇌피질에서 A β 신경반에 대한 웨스턴 블롯팅 결과를 나타내는 사진이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 담체만 투여한 대조군 마우스, 담체만 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스(APPsw) 및 오스모틴을 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스의 해마에서 tau 인산화와 관련된 일련의 단백질들에 대한 웨스턴 블롯팅 결과를 나타내는 사진이다.
- 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 담체만 투여한 대조군 마우스, 담체만 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스(APPsw) 및 오스모틴을 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스의 대뇌피질에서 tau 인산화 정도를 확인한 웨스턴 블롯팅 결과를 나타내는 사진이다.
- 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 담체만 투여한 대조군 마우스, 담체만 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스(APPsw) 및 오스모틴을 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스의 해마에서 Synasptophysin, GABA_BR에 대한 면역형광 현미경 사진이다. 스케일바는 200 μ m 및 10 μ m이다.

도 10은 상기 9의 결과에서 형광신호를 정량화한 그래프이다. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 및 *** $P<0.001$.

도 11은 본 발명의 일실시예에 따라 담체만 투여한 대조군 마우스, 담체만 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스 (APPsw) 및 오스모틴을 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스의 해마의 DG 섹터에서 NgR1, GABA_BR에 대한 면역형광 분석 결과를 나타내는 이미지이다. 스케일바는 200 μm 및 10 μm 이다.

도 12는 상기 도 11의 결과에서 형광신호를 정량화한 그래프이다. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 및 *** $P<0.001$.

도 13은 본 발명의 일실시예에 따라 담체만 투여한 대조군 마우스, 담체만 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스 (APPsw) 및 오스모틴을 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스의 해마의 CA1 섹터에서 NgR1, GABA_BR에 대한 면역형광 분석 결과를 나타내는 이미지이다. 스케일바는 200 μm 및 10 μm 이다.

도 14는 상기 도 13의 결과에서 형광신호를 정량화한 그래프이다. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 및 *** $P<0.001$.

도 15는 본 발명의 일실시예에 따라 담체만 투여한 대조군 마우스, 담체만 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스 (APPsw) 및 오스모틴을 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스의 해마 부분에서 아밀로이드 신경반에 대한 티오프라빈 S 염색 결과(thioflavin S staining)와 아밀로이드 베타(amyloid β)에 대한 면역형광 현미경 사진이다. 스케일바는 200 μm , 50 μm , 및 10 μm 이다.

도 16은 상기 도 15의 결과에서 형광신호를 정량화한 그래프이다. * $P<0.05$ 및 ** $P<0.01$.

도 17은 본 발명의 일실시예에 따라 담체만 투여한 대조군 마우스, 담체만 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스 (APPsw) 및 오스모틴을 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스의 대뇌피질에서 A β 신경반의 형성의 감쇄를 나타내는 일련의 면역형광 현미경 사진이다.

도 18은 상기 도 17의 면역형광 분석에서의 형광신호를 정량화한 그래프이다.

도 19는 본 발명의 일실시예에 따라 담체만 투여한 대조군 마우스, 담체만 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스 (APPsw) 및 오스모틴을 투여한 알츠하이머 질병 모델 마우스의 해마(A) 및 대뇌피질(B)에서의 인산화 tau(Ser⁴¹³)의 양을 측정한 면역형광 분석 결과를 나타내는 사진이다.

도 20은 상기 도 19의 결과에서 형광신호를 정량화한 그래프이다. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 및 *** $P<0.001$.

도 21은 본 발명의 일실시예에 따라 다양한 농도의 오스모틴이 처리된 백서 태아 해마(A, C, E) 및 대뇌피질(B, D, F) 뉴런에서의 신경세포의 세포생존율(A 및 B), 세포독성(C 및 D) 및 caspase-3/7 활성(E 및 F)을 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 22는 본 발명의 일실시예에 따라 오스모틴이 어떤 경로를 통해 알츠하이머 질병을 완화 시키는지에 대한 실험 결과를 요약한 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

용어의 정의:

본 문서에서 사용되는 "오스모틴(Osmotin)"은 식물에서 분리한 천연단백질로 지방분해 및 당뇨억제 기능을 가진 동물 호르몬인 아디포넥틴과 유사한 화학구조를 가지고 있고 개체에 따라 약 150개 내지 250개의 아미노산으로 구성된다. 오스모틴(24 kDa)은 당분-측정 단백질 타우마틴(sweet-testing protein thaumatin)과 상동성을 가지는 PR-5(Pathogenesis-related protein) 패밀리에 포함되는 안정한 단백질이고, 효모에서 세포 내 신호 전달을 유도하는 것으로 알려져 있다. 또한 인체 내에서 비만 및 당뇨를 억제하는 단백질과 유사한 기능을 한다는 사실이 보고된 바 있다.

본 발명의 일 관점에 따르면, 오스모틴을 유효성분으로 포함하는 알츠하이머병의 치료용 약학적 조성물이 제공된다.

상기 약학적 조성물에 있어서, 상기 오스모틴은 식물체로부터 분리 정제된 것일 수 있고, 상기 식물체는 담배속 식물체일 수 있으며, 상기 오스모틴은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성될 수 있고, 상기 아미노산 서열에 기반하여 원핵생물 또는 효모, 식물세포, 곤충세포, 포유동물 세포와 같은 진핵생물의 세포를 이용하여 유전자 재조합 기술에 의해 생산될 수 있다.

상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입,

근육 주입, 복강 주입 등으로 투여할 수 있다.

[0016] 상기 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 적합한 1일 투여량은, 100 $\mu\text{g/kg}$ 내지 1 mg/kg(체중)이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 몇 주 간 수회 나누어 투여할 수 있다.

[0017] 또한, 상기 본 발명의 일 실시예에 따른 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다. 부형제로서는 예를 들면 유당, 자당, 백당, 포도당, 옥수수 전분(corn starch), 전분, 탈크, 소르비트, 결정 셀룰로오스, 텍스트린, 카올린, 탄산칼슘, 이산화규소 등을 들 수 있다. 결합제로서는 예를 들면 폴리비닐알코올, 폴리비닐에테르, 에틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 아라비아고무, 트래거캔스(tragacanth), 젤라틴, 셀락(shellac), 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메틸셀룰로오스, 구연산칼슘, 텍스트린, 펙틴(pectin) 등을 들 수 있다. 활택제로서는 예를 들면 스테아린 산마그네슘, 탈크, 폴리에틸렌글리콜, 실리카, 경화식물유 등을 들 수 있다. 착색제로서는 통상 의약품에 첨가하는 것이 허가되어 있는 것이라면 모두 사용할 수 있다. 이들의 정제, 과립제에는 당의(糖衣), 젤라틴코팅, 기타 필요에 따라 적절히 코팅할 수 있다. 또한, 필요에 따라 방부제, 향산화제 등을 첨가할 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 관점에 따르면, 오스모틴을 유효성분으로 포함하는 인지기능 개선 및 기억력 증진용 건강기능식품이 제공된다.

[0019] 상기 건강기능식품에 있어서, 상기 오스모틴은 식물체로부터 분리 정제된 것일 수 있고, 상기 식물체는 담배속 식물체일 수 있으며, 상기 오스모틴은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성될 수 있고, 상기 아미노산 서열에 기반하여 원핵생물 또는 효모, 식물세포, 곤충세포, 포유동물 세포와 같은 진핵생물의 세포를 이용하여 유전자 재조합 기술에 의해 생산될 수 있다.

[0020] 본 발명의 다른 일 관점에 따르면, 치료적으로 유효한 양의 오스모틴을 알츠하이머 병에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 상기 개체의 알츠하이머병을 치료하는 방법이 제공된다.

[0021] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명하고자 한다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있는 것으로, 이하의 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호범위는 첨부된 특허청구범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

[0022] 실시예 1: 동물행동학적 분석을 통한 인지기능측정

[0023] 1-1: 실험동물

[0024] 본 발명에서 체중 23 ± 1.5 g의 8주령 웅성 C57BL/6J 마우스(WT)와 형질전환된 C57BL/6J-Tg(NSE-APPsw)KLAR 마우스(이하, 'APPsw'로 약칭함)를 각각 미국의 Jackson's laboratory 및 식품의약품안전처(대한민국)에서 구입하였다. 상기 마우스의 사육조건은 낮 16시간/밤 8시간 명암주기, 온도는 23°C , 습도는 60 ± 10 %를 유지하였고, 물과 음식은 임의로 접근할 수 있는 조건에 두었다.

[0025] 1-2: 오스모틴 처리

[0026] 본 발명에서 종래에 보고된 428 mM NaCl-적응 배양된 담배(*Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin38) 세포로부터 균질하게 정제된 오스모틴을 본 발명에서 분리하여 사용하였다(Shah et al. *Cell Death & Disease*, 5: e1026, 2014). 오스모틴은 멸균 용액(3 mg/ml, 1/8배 PBS)으로 제공됐으며, 활성은 *Saccharomyces cerevisiae* strain BWG1-7a에 대한 IC_{50} (오스모틴 처리시 50%의 상기 균주가 사멸하는 오스모틴의 농도)인, 0.2 μM 로 측정되었다. 9개월이 된 WT 마우스(30 ± 1.2 g)와 APPsw 마우스(39 ± 0.8 g)를 사용하였다. 멸균된 증류수(vehicle)를 사용하여 오스모틴을 희석한 후, 복강내 주입(intraperitoneal injection)을 통해 전달하였다(15 mg/kg 체중). 뇌조직에서 오스모틴 효과의 분자적 분석을 위하여, 행동실험(behavior test) 이후에 각 마우스에 담체(vehicle) 또는 오스모틴을 반복적으로 주입을 하였고 12시간 후에 희생시켰다.

[0027] **1-3: 수중미로실험(Morris Water Maze Test)**

[0028] 본 발명에서 공간 기억 및 장기 공간 기억의 습득을 포함하여 해마 의존 학습(hippocampal-dependent learning)을 분석하기 위해 수중미로실험(Morris Water Maze Test; MWM)을 수행하였다. 종래에 개시된 방법(Morris, R.G.M., *Learning and Motivation* 12, 239-260, 1981)을 응용하여 하기의 방법으로 실시하였다. 원형의 수조(지름 10 cm x 높이 40 cm)와 탈출용 지지대(platform, 지름 10cm)로 이루어진 실험장비를 준비하여, 수조의 물(온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$)은 26 cm의 높이까지 채웠다. 감춰진 10 cm 지름의 지지대를 수면 밑 대략 1 cm, 사분면의 가운데 고정된 위치에 두었고, 무독성 백색-수용성 염료를 물에 첨가하여 불투명하여 혼탁해지도록 하였다. 수면훈련은 6일 동안 연속적으로 이루어졌다. 수중미로실험은 실험동물이 수조 주변의 표지물을 이용하여 지지대를 찾아가기 때문에 주변의 환경 변화가 없도록 표지물을 실험기간 동안 일정하게 유지 하였다. 각 마우스는 하루에 2회 훈련 기간을 실시하였고, 각 훈련은 사분면의 다른 방향에서 시작하도록 2회 실험으로 구성하였다. 수중 미로에서 탈출하는 대기 시간은 60초 관찰 기간 동안 계산하였다. 만약 마우스가 60초 안에 수중의 지지대를 찾지 못한다면, 마우스를 부드럽게 지지대로 안내하고 10초 동안 지지대에 머물 수 있게 하여 주변의 단서를 다시 기억할 수 있도록 하였다. 최초 3일까지는 오스모틴 또는 담체의 투여 없이 수행되었고, 훈련 개시 3일 경과 후에, 치매모델 마우스에 오스모틴(osmotin) 또는 담체(vehicle)만을, 대조군인 정상마우스에는 담체(vehicle)만을 복강 내 주사하였고, 동일한 훈련을 상기와 같이 반복하였다. 상기 지지대는 탐침 시험(probe test)을 위해 제거하였다. 지지대 사분면에 각각의 실험동물에 의해 소비되는 시간을 기록하였다. 공간적 작업 기억에 오스모틴의 효과를 조사하기 위해, 변경 조사는 먼저 미처리-마우스에서 수행한 다음, 오스모틴 또는 담체만을 복강 내 주사한 치매모델 마우스에서 반복 수행하였다. 기억력은 지지대에서 탈출하기까지 대기시간을 기록함으로써 측정하였다(도 1). 그 결과, 탈출 대기 시간이 모든 그룹에 대해 시간 서서히 감소하였고 3일째에 치매모델 마우스는 정상마우스에 비해 훨씬 더 높은 탈출 대기 시간(~ 1.8 배)을 기록하였다. 훈련 개시 3일 후에도 치매모델 마우스는 담체만 또는 오스모틴을 복강 내 주입하였고 매일 훈련은 지속되었다. 탈출대기 시간은 모든 그룹에서 6일에 거쳐 점차적으로 줄어들었으나, 담체만 처리한 치매모델 마우스에 비해 오스모틴을 투여한 치매모델 마우스에서의 감소율이 더 컸다. 5일 및 6일 째에 두 그룹 사이에서 탈출 대기시간과 운동경로 길이에서 확연한 차이를 관찰할 수 있었다. 그러나, 오스모틴을 투여한 치매모델 마우스의 탈출대기시간의 평균치는 여전히 담체만 처리한 정상마우스에 비해 높았는데, 이는 실험 조건 하에 오스모틴이 공간적 기억 손실을 부분적으로 회복시킴을 시사하는 것이다. 그런 다음, 본 발명자는 7일째에 숨겨진 지지대 없이 MWM probe test를 수행하였다(도 2). 종래에 숨겨진 플랫폼을 포함하는 사분면에서의 마우스의 체류시간을 기억 기능의 척도로 간주하였다. 그 결과 도 2에서 나타난 바와 같이, 해당 사분면에서의 체류시간은 담체만 처리한 정상마우스(대조군)에서 가장 컸고, 오스모틴이 투여된 치매모델 마우스는 중간 정도의 체류시간을 나타냈으며, 담체만 처리한 치매모델 마우스에서 유의하게 낮았다. 이러한 결과는 오스모틴이 치매모델 마우스에서 해마의 공간기억 결손을 억제함을 나타낸다.

[0029] **1-4: Y-미로 실험(Y-maze spontaneous alternation test)**

[0030] 본 발명자들은 자발적 변경 Y-미로 실험을 이용하여 형질전환 치매모델 마우스[APPsw]의 공간적 기억기능에 대한 오스모틴의 효과를 조사하였다. Y-미로 장치는 3개의 팔(arm)로 구성되어 있으며 각 각지의 길이는 50 cm, 넓이 10 cm, 높이는 20 cm이고 각 가지는 서로 120° 의 일정한 각도로 배치된 것을 사용하였다. 각 마우스는 백색 Y-미로를 탐험할 수 있는데, 행동실험 시작하기 전에 각 마우스를 Y-미로에 두고 10분 동안 환경에서 적응할 수 있도록 하였다. 그런 다음 마우스를 무작위로 선택된 방향으로 두 팔의 교차점(junction)에 직면하도록 Y-미로의 중앙에 위치시켰고, 8분 동안 미로를 탐험할 수 있도록 하였다. 각 팔로의 총 진입수와 연속적인 3순차진입(triplets)을 행동 소프트웨어 시스템으로 기록하였다. 각 팔에 진입한 횟수 및 순서를 측정함으로써 자발적 변경율(spontaneous alteration, %)을 평가하였다. 변경(alteration)은 3개의 다른 팔에 순차적으로 들어가는 경우 1점(실제 변경: actual alternation, 즉 ABC, BCA, CAB의 순서로 진입한 경우)으로 인정하였다. 연속으로 들어가지 않을 경우 점수로 인정하지 않았다. 따라서 변경율은 하기 수학적식으로 계산하였다:

[0031] 변경률(%) = [연속적인 3순차진입 세트/팔에 들어간 총 진입 횟수-2] X 100.

[0032] 상기와 같이 계산된 변경률은 공간기억 능력과 상관관계가 있는 것으로 간주된다.

[0033] 오스모틴의 공간기억 기능에 대한 영향을 조사하기 위해, 우선 담체만 투여된 치매모델 마우스에 대하여 변경 Y-미로 실험을 수행하였다. 그런 다음 상기 마우스에 대하여 오스모틴 또는 담체만을 복강투여하고, 동일 실험을 반복하여 결과를 비교하였다(도 3). 도 3에 나타난 바와 같이, 치매모델 마우스의 경우 예상대로 대조군에 비하여 더 낮은 변경율을 기록하였는데, 이는 더 낮은 공간기억을 나타낸다. 담체만 투여한 그룹들의 경우 양

그룹(대조군인 정상마우스 및 치매모델 마우스) 모두에서 변경율에 대한 어떠한 유의한 변화를 야기하지 않은 반면, 치매모델 마우스에 오스모틴을 투여한 그룹에서는 변경율이 유의하게 증가하여 단기 기억 장애를 경감시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0034] **실시예 2: 면역분석학적 분석**

[0035] **2-1: 웨스턴 블롯팅**

[0036] 마우스의 해마(hippocampus) 및 대뇌피질(cortex) 조직 각각 10 mg을 PRO-PREP(인트론, 한국) 단백질 추출 용액(600 μ l)을 이용하여, 제조사의 지시에 따라 4℃에서 추출하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 분석 키트(Bio-Rad, 미국)를 사용하여 결정하였다. 용해물(단백질 20 μ g)을 4~12% BoltTM Mini Gels(Life Tech, 미국)에서 SDS-PAGE 전기영동을 한 후 니트로셀룰로오즈 막에 전이시킨 후, 5% 탈지유(또는 BSA)로 블로킹하였다. 4℃에서 1차 항체로 12시간 이상 반응시킨 후 HRP(horseradish peroxidase)가 부착된 2차 항체에 반응시킨 후에 ECL로 교차 반응(cross-reacting) 단백질을 검출하였다. PARP-1, phospho-CDK5 (Tyr 15), CDK5, SNAP-25, IDE, neprilysin/CD10(NEP), β -amyloid, BACE1 및 phospho-tau(Ser⁴¹³)의 1차 항체는 Santa Cruz Biotech(미국)에서 구입하여 사용하였고, 반면 베타-액틴, 시냅토피신(synaptophysin), phospho-AMPA R(Ser⁸⁴⁵), GABA_BR, Calpain1 및 phospho-CREB(Ser¹³³)에 대한 1차 항체는 Cell Signaling사(미국)에서 구입하여 사용하였다. 아밀로이드 전구체 단백질(APP) C-말단, Nogo A, 및 Nogo-66 수용체에 대한 1차 항체는 Millipore로부터 구입하였다. 각 밴드별 정량분석은 Sigma Gel 소프트웨어(SPSS, 미국)를 사용하여 실시하였다. 밀도값(Density values)은 임의 단위(A.U.)로 계산하였다.

[0037] 알츠하이머 치매에서 인지 기억 감소가 아밀로이드 베타 플라크(A β plaques) 또는 NFT22, 23의 출현(appearence)보다 질병 초기단계에서 해마에서 시냅스 밀도 손실과 더 밀접하게 관련되어 있다(Scheff SW *et al.*, *Neurobiol. Aging.*, 27(10):1372-1384, 2006). 웨스턴 블롯팅 분석결과 오스모틴 처리시 APP^{sw} 마우스에서 시냅스전 소포막-특이적 단백질(presynaptic vesicle membrane-specific proteins), 시냅토피신(synaptophysin) 및 SNAP-25의 발현수준이 유의하게 증가했음을 확인하였다(도 4). 한편, AMPA 수용체 소단위체 GluR1의 Ser⁸³¹ 및 Ser⁸⁴⁵에서의 인산화는 시냅스 가소성(synaptic plasticity)에서 중요한 역할을 하는데, 웨스턴 블롯팅 분석 결과 오스모틴 처리 치매모델(APP^{sw}) 마우스에서 AMPA 수용체 소단위체 GluR1의 Ser⁸⁴⁵ 위치에서의 인산화 형태의 양이 유의하게 증가함을 확인하였다.

[0038] AMPA 수용체뿐만 아니라 노고 수용체(Nogo receptor)는 시냅스 가소성(synaptic plasticity)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. GABABRs의 발현은 부분적으로 Nogo-66 receptor 1(NgR1)와 그의 리간드인 Nogo-66(axon-inhibiting N-terminal domain of Nogo A)의 상호작용에 의해 조절된다. 따라서 본 발명자들은 NgR1, Nogo A 및 GABA_BR의 발현수준을 웨스턴 블롯팅 분석한 결과, 대조군 마우스와 비교하여 치매모델(APP^{sw}) 마우스의 해마에서 NgR1 및 Nogo A의 발현이 현저하게 증가하고 GABA_BR의 발현의 감소하나, 오스모틴 투여시 이러한 현상이 회복됨을 확인하였다(도 4). 인산화-CREB는 A β 의 해로운 영향에 대해 더욱 저항하게 하는 시냅스를 만들고, 알츠하이머 모델 마우스에서 학습과 기억 시냅스 기능에서 장기적인 개선과 관련된 유전자 발현을 활성화한다. 따라서, 본 발명자들은 웨스턴 블롯팅 분석을 통해 인산화 CREB의 발현 양상도 조사하였는데, 그 결과 인산화-CREB(Ser¹³³)의 양은 대조군에 비해 담체만 처리한 APP^{sw} 마우스에서 더욱 낮아졌음을 나타낸 반면, APP^{sw} 마우스에 오스모틴 처리시 인산화-CREB(Ser¹³³)의 발현이 증가함을 확인하였다(도 4). 이러한 분자수준의 변화는 오스모틴이 알츠하이머 모델의 해마에서 시냅스 가소성(synaptic plasticity)을 강화하고 신경축삭의 재생을 증가시키며, 시냅스 활성을 강화함을 시사하는 것이다.

[0039] 알츠하이머병에 걸린 뇌에서의 기억 손상을 야기하는 시냅스 장애는 아밀로이드 베타 올리고머의 축적 및 아밀로이드 베타 신경반의 생성에 의한 야기되는 것으로 종래에 보고되었다(Saul *et al.*, *Neurobiology of Aging*, 34(11), 2564-2573, 2013). 따라서, 아밀로이드 베타 올리고머 및 응집체는 뇌조직에서 알츠하이머병의 조기 병리학적 표지가 된다. 이에, 본 발명자들은 상기 베타 아밀로이드 올리고머 및 응집체의 축적에 대한 오스모틴의 영향을 조사하기 위해, 오스모틴 투여 후의 해마 조직에서의 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein, APP) 및 아밀로이드 베타 펩타이드의 발현양을 웨스턴 블롯팅 분석을 통해 분석하였다(도 5). 도 5의 결과를 통해 담체만 투여한 경우 APP^{sw} 마우스의 해마에서의 APP 및 아밀로이드 베타 펩타이드의 발현양이 대조

군 마우스보다 더 높음을 확인할 수 있었다.

[0040] 한편, $A\beta_{1-40}$ 을 분해할 수 있는 아연 금속단백질분해효소(zinc metalloproteinase)인 인슐린 분해 효소(insulin degrading enzyme, IDE) 및 네프릴라이신(neprilysin, NEP)은 알츠하이머병의 병리현상을 반전시킬 수 있는 것으로 강력하게 시사되어 왔다. 따라서, 본 발명자들은 상기 아밀로이드 베타 펩타이드와 아밀로이드 전구 단백질 외에도 상기 IDE 및 NEP의 발현을 웨스턴 블롯팅 분석으로 조사하였다. 그 결과 IDE 및 NEP의 발현양은 대조군 마우스보다 치매모델(APPsw) 마우스의 해마에서 유의하게 낮고, 오스모틴 투여 후에 유의하게 증가함을 확인하였다. 더 나아가, 단백질 절단에 의해 아밀로이드 베타 펩타이드의 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 BACE1(beta-secretase 1)의 수준도 함께 조사하였는데, 상기 BACE1의 발현은 담체만 처리한 대조군과 비교하여 담체만 처리한 APPsw 마우스에서 더 높은 것으로 확인된 반면, 오스모틴 처리시 그 발현이 유의하게 감소함을 확인할 수 있었다(도 5).

[0041] 또한, 오스모틴이 아밀로이드 베타 펩타이드 및 아밀로이드 베타 신경반의 대뇌피질에서의 축적을 억제할 수 있는지 여부를 확인하기 위해, 대뇌피질 조직에 대한 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다(도 6). 그 결과 담체만 처리된 대조군 마우스와 비교하여 담체만 처리한 APPsw 마우스의 전전두엽(prefrontal) 및 이상엽(piriform) 피질에서 $A\beta$ 신경반은 물론 APP 및/또는 $A\beta$ 펩타이드가 증가하였고, 오스모틴 처리시 APPsw 마우스에서 이들 알츠하이머 마커가 감소됨을 확인하였다(도 6).

[0042] 미세소관(microtubule)-연관 단백질 tau의 S/T-P 모티프에서의 인산화는 알츠하이머 병 환자의 뇌에서 발견되는 나선 쌍 섬유(paired helical filaments, PHF)에서 tau의 봉입(inclusion)의 원인으로 알려지고 있다(Noble *et al.*, *Neuron*. 38(4):555-565, 2003). 이러한 병리현상은, 알츠하이머 병 환자의 신경세포의 특성으로 Cdk5 활성의 상향조절을 통해 $A\beta$ 펩타이드에 의해 유도되는 것으로 알려지고 있다. 특히, $A\beta$ 펩타이드는 Cdk5 활성화 단백질 p35의 Cdk5 활성화에 있어서 더 강력한 활성화제인 p25로의 calpain-매개 단백질 절단을 유도하는 것으로 알려져 있다(Lee *et al.*, *Nature*. 405(6784):360-364, 2000). p35/p25와 관련된 활성화 외에도, Cdk5는 Tyr¹⁵의 인산화에 의해서도 활성화된다. 이에, 본 발명자들은 세 가지 실험군(대조군 마우스, 담체만 투여한 APPsw 마우스 및 오스모틴 투여 APPsw 마우스)의 해마를 대상으로 상기 알츠하이머 질병 마커 단백질인 calpain, p25, 인산화-Cdk5(Tyr¹⁵), 인산화-tau(Ser⁴¹³)에 대한 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였고(도 7), 상기 세 가지 실험군의 대뇌피질 조직을 대상으로 인산화-tau에 대한 웨스턴 블롯팅 분석을 수행하였다(도 8). 그 결과 도 7에서 나타난 바와 같이, 대조군에 비해 담체만 투여한 APPsw 마우스의 해마조직에서 calpain, p25, 인산화-Cdk5(Tyr¹⁵) 및 인산화-tau(Ser⁴¹³)가 유의하게 증가하였으나, 오스모틴을 투여한 APPsw 마우스에서는 이들 마커의 발현이 감소하였다. 그러나, Cdk5 자체의 발현은 변화가 없는 것으로 나타나 이들 변화가 Cdk5 자체의 발현의 변화에 기인한 것 이라기보다는 Cdk5의 인산화의 조절에 의한 것임을 알 수 있었다. 한편, 대뇌피질에 대한 웨스턴 분석 결과에서도 인산화-tau(Ser⁴¹³)이 대조군에 비해 담체만 투여한 APPsw 마우스에서 증가한 반면, 오스모틴을 투여한 APPsw 마우스에서는 감소하여(도 8), 오스모틴이 이들 알츠하이머 치매병과 관련된 분자 마커의 수준을 해마는 물론 대뇌피질에서 억제함을 확인할 수 있었다.

[0043] 이와 같은 결과는 오스모틴인 APPsw 마우스에서 이미 생성된 아밀로이드 베타를 제거함은 물론 APP로부터 아밀로이드 베타 펩타이드의 생성을 감소시킴으로써 알츠하이머병의 병리현상을 경감시킬 수 있음을 시사하는 것이다.

[0044] 2-2: 조직형태학 분석

[0045] 본 발명자들은 상기 실시예의 웨스턴 블롯팅 분석 상 분자 수준의 변화가 실제 뇌 조직에서 일어나는 것인지 조사하기 위해, 오스모틴 처리시의 마우스의 뇌조직에 대한 조직형태학적 분석을 수행하였다. 먼저, 마우스를 병냉 4% 파라포름알데히드로 경심관류로(transcardially) 고정시켰다. 뇌를 수집한 후 72시간 동안 4% 파라포름알데히드로 후고정하였고 최종적으로 20% sucrose로 이동시켜 72시간 동안 정치하였다. 뇌조직은 액체 질소 하에 OCT(optimal cutting temperature compound)로 포매한(embedded) 후 CM 3050C cryostat(Leica)을 사용하여 14 μ m 두께로 관상면(coronal) 절편으로 잘랐다. 조직 절편은 ProbeOn Plus slides(Fisher, USA)으로 봉입하였다. 면역형광 분석을 위하여, 슬라이드는 0.01 M PBS로 15분 동안 2회 세척하였다. 각 절편은 Proteinase K 용액과 함께 커버슬립을 씌운 후 37℃의 습윤챔버에서 5분 동안 두었고 그후 각 절편은 5% 정상 염소 혈청 및 0.3% Triton X-100이 함유된 PBS 차단 용액에 1시간 동안 정치시켰다. 블로킹 단계를 수행한 후, 슬라이드에 1차 항체(블로킹 용액에 1:100 희석)를 처리하고 하룻밤동안 반응시켰다. 분석을 위해 β -amyloid, phospho-

tau(Ser⁴¹³), 시냅토피신(synaptophysin), GABA_BR, 및 Nogo-66 수용체 각각에 대한 1차 항체를 사용하였다. 1차 항체 반응 후, 면역복합체(immunocomplexes)는 2차 FITC-labeled 항체 또는 2차 TRITC-labeled 항체(Santa Cruz Biotechnology, 1:50)와 1.5 시간 동안 반응시킨 후 시각화하였다. 슬라이드는 Prolong Antifade 시약(Molecular Probes, 미국)으로 봉입하였고, 공초점 레이저현미경(Fluoview FV 1000)으로 조사하였다. 아밀로이드 플라크(amyloid plaques)에 대한 티오플라빈 S 염색(thioflavine S staining)은 동결절편(cryosection)을 수분 동안 미지근한 흐르는 수돗물에서 세척한 후 수행하였다. 상기 세척된 절편을 5분 동안 0.25% 과망간산 칼륨(potassium permanganate)에 담가 둔 후, 1% K₂S₂O₅ 및 1% 옥살산에 5분 동안 담가 둔 후 8분 동안 0.02% thioflavine-S 용액에 담가 두었다. 그런 다음 뇌조직 절편을 1분 동안 2회 80% 에탄올에 행구고, 천천히 흐르는 수돗물로 4-5분 동안 세척하였다. 그리고 나서 70, 80, 95% 알코올을 연속적으로 담가서 탈수하였고 자일렌에 담구었다. 커버슬립으로 봉입한 후 조직 절편을 공초점 레이저현미경(Fluoview FV 1000)으로 조사하였다. 모든 형광 신호는 Image J Software(National Institutes of Health, USA)를 사용하여 정량하였고, 적분 광밀도(integral optical density, IOD)로 나타냈다. 그 결과, 오스모틴 투여시 해마의 치상회(dentate gyrus, DG) 영역에서 시냅토피신의 발현이 증가하였음을 확인하였다. 한편, 상기 치상회 영역에서의 GABA_BR의 발현 역시 담체만 처리한 APP^{sw} 마우스에서 감소하였으나, 오스모틴 처리시 대조군 수준으로 회복됨을 확인하였다(도 9 및 도 10).

[0046] 노고 수용체(Nogo receptor) 역시 시냅스 가소성(synaptic plasticity)에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, GABA_BRs의 발현은 부분적으로 Nogo-66 receptor 1(Ngr1)와 그의 리간드인 Nogo-66(axon-inhibiting N-terminal domain of Nogo A)의 상호작용에 의해 조절됨이 보고되었다. 따라서 본 발명자는 면역형광 분석을 통해 대조군 마우스와 비교하여 APP^{sw} 마우스의 해마의 아몬각1(Cornu Ammonis 1, CA1) 치상회(DG)에서의 Ngr1의 발현을 조사하였다. 그 결과 대조군에 비해 APP^{sw} 마우스의 해마의 CA1 및 DG에서의 Ngr1의 과발현이 관찰되었고, 상기 APP^{sw} 마우스에 오스모틴 투여시 Ngr1의 발현양이 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다. 특히 DG의 경우 Ngr1의 발현수준이 대조군 수준으로 감소하였다. 반면, GABA_BR의 경우 Ngr1과 반대의 결과를 나타냈다(도 11 내지 도 14).

[0047] 아울러, 본 발명자들은 알츠하이머 치매의 원인물질로 알려지고 있는 아밀로이드 베타 신경반에 대한 면역형광 분석 및 아밀로이드 베타를 특이적으로 염색하는 것으로 알려진 티오플라빈 S 염색(thioflavin S staining)을 수행하였다(도 15 및 도 16). 그 결과 A β 펩타이드 및 A β 신경반은 담체만 처리한 대조군 마우스의 해마에서 거의 발견할 수 없었고 담체만 처리한 APP^{sw} 마우스 해마의 DG 및 CA1 영역에서 주로 축적됨을 확인하였다. 오스모틴을 투여한 APP^{sw} 마우스에서는 담체만 처리한 APP^{sw} 마우스와 비교하여 해마의 DG 및 CA1 영역에서 전체 아밀로이드 β 펩타이드와 A β 신경반의 축적을 감소시켰다. 마찬가지로 대뇌 피질에서 조직 화학 분석을 수행하였는데(도 17 및 도 18), 이 역시 상술한 웨스턴 블롯팅 분석과 유사한 결과가 도출되었다.

[0048] 아울러, 본 발명자들은 해마 및 대뇌피질에서의 인산화-tau(Ser⁴¹³)의 양을 면역형광 분석으로 분석하였다(도 19 및 도 20). 도 19에서 A는 해마에서의 p-tau(Ser⁴¹³)의 염색 결과이고 B는 대뇌피질에서의 p-tau(Ser⁴¹³)의 염색 결과를 나타내며, 도 20은 상기 면역형광 분석 결과를 정량화한 그래프이다. 대조군 마우스와 비교하여 APP^{sw} 마우스에 담체만 투여한 경우 해마 및 대뇌피질에서의 p-tau(Ser⁴¹³)의 양은 현저히 증가한 반면, APP^{sw} 마우스에 오스모틴을 투여한 경우에는 p-tau(Ser⁴¹³)의 양이 현저히 감소함을 확인하였다(도 19 및 도 20).

[0049] 실시예 3: 세포생존, 세포독성 및 Caspase-3 활성

[0050] 본 발명자들은 임신일(gestational day, GD)로부터 17.5일 경과한 랫트 태아의 뇌조직을 발생중인 대뇌피질 및 해마의 신경세포의 1차 배양을 위해 수득하였다. 2x10⁴ 세포를 포함하는 분취시료(100 μ L)를 10% FBS 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 함유된 세포성장 DMEM 배지가 들어있는 두 96-웰 플레이트에 나누었고 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 온도 조건에서 배양하였다. 3일 후에 배지를 완전히 제거하고 하나의 플레이트에는 새로운 성장배지 100 μ L를 첨가하였고(플레이트 1), 다른 하나에는 5 mM β -아밀로이드 펩타이드(A β ₁₋₄₂, Sigma, USA)가 포함된 성장배지로 대체하였다(플레이트 2). 24시간 동안 배양하였고, 이후 플레이트 1은 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 μ g/ml의 오스모틴이 보충된 배지로 교체되었고, 반면 플레이트 2는 A β ₁₋₄₂(5 mM) 및 0, 0.1, 0.2 또는 0.4 μ g/ml의 오스모틴이 함유된 성장배지로 교체하였다. 24시간 후에 세포생존, 세포독성 및 caspase-3/7 활성을 ApoTox-GloTM

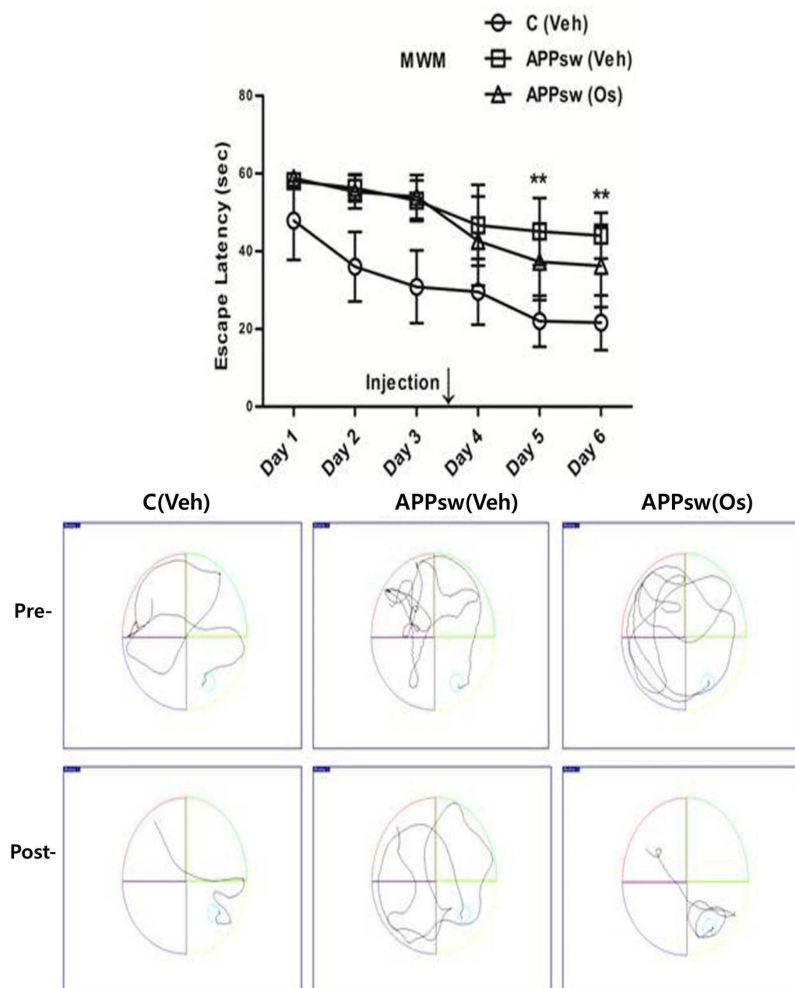
Triplex Assay(Promega, USA) 키트와 Glomax Multi^{TE} Detection System(Promega, USA)을 사용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다. 오스모틴 농도 0.4 μ M(10 μ g/ml)까지 해마 및 대뇌피질의 두 가지 유형의 신경 세포의 생존 또는 세포독성의 효과에 유의한 영향을 미치지 않았다(도 21의 A 내지 D). 세포독성 및 caspase-3/7 활성의 증가에 수반되는 세포생존도에 대한 감소는 A β ₁₋₄₂ 펩타이드 처리 시 해마와 대뇌피질의 신경세포(cortical neurons)에서 관찰되었다(도 21의 E 및 F). 최대 0.4 μ M까지의 오스모틴을 A β ₁₋₄₂ 펩타이드와 함께 처리할 경우, 해마 및 대뇌피질 신경이 세포생존, 세포 독성, 및 caspase-3/7의 활성화에 대한 A β ₁₋₄₂의 해로운 작용으로부터 보호되었다(도 21의 E 및 F). 그 결과는 상기 실시예에 사용된 실험관 내 실험의 농도에서 오스모틴은 비독성이고, A β 에 의해 유도되는 신경 손상으로부터 신경세포를 보호하며, 이는 상기 생체 내 실험결과를 뒷받침하는 것이다. 상기 각 데이터는 평균±표준편차로 표현하였고 Prism 5(GraphPad Software, Inc., San Diego, California)를 사용하여 Students' *t*-test에 의한 ANOVA분석을 수행하였다. *P* < 0.05에서 통계적 유의성을 나타냈다. 도 22는 오스모틴이 어떤 경로를 통해 알츠하이머 질병을 완화시키는지에 대한 실험 결과를 요약한 이미지이다. 오스모틴은 AMPK의 활성을 통해 APP 프로세싱, 시냅스 기능장애(synaptic dysfunction), 신경섬유매듭(neurofibrillary tangle)을 변화시키는 것으로 추정된다.

[0051]

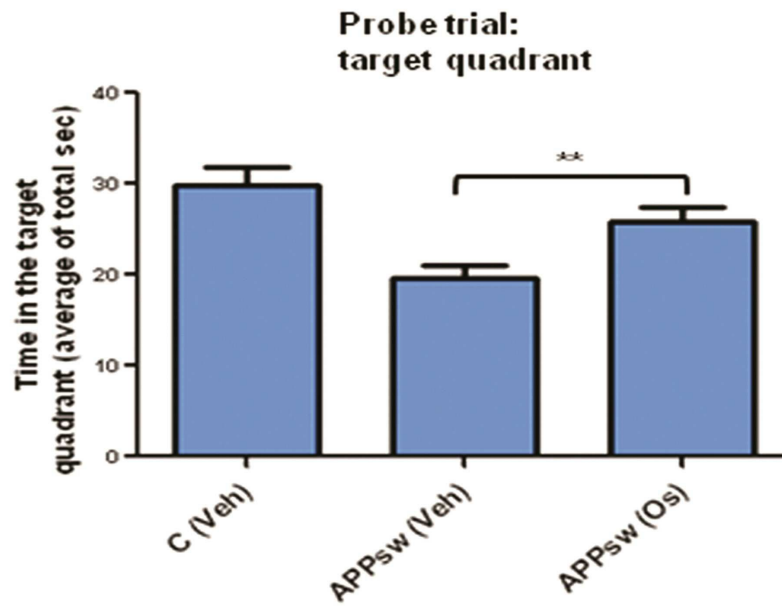
본 발명은 상술한 실시예를 참고로 설명되었으나 이는 예시적인 것에 불과하며, 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 이로부터 다양한 변형 및 균등한 다른 실시예가 가능하다는 점을 이해할 것이다. 따라서 본 발명의 진정한 기술적 보호 범위는 첨부된 특허청구 범위의 기술적 사상에 의하여 정해져야 할 것이다.

도면

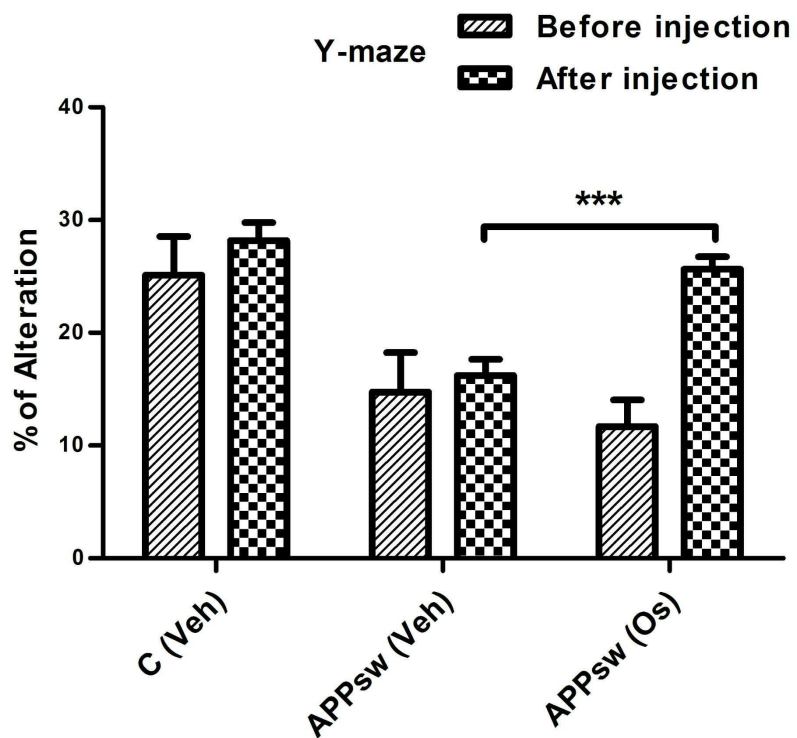
도면1



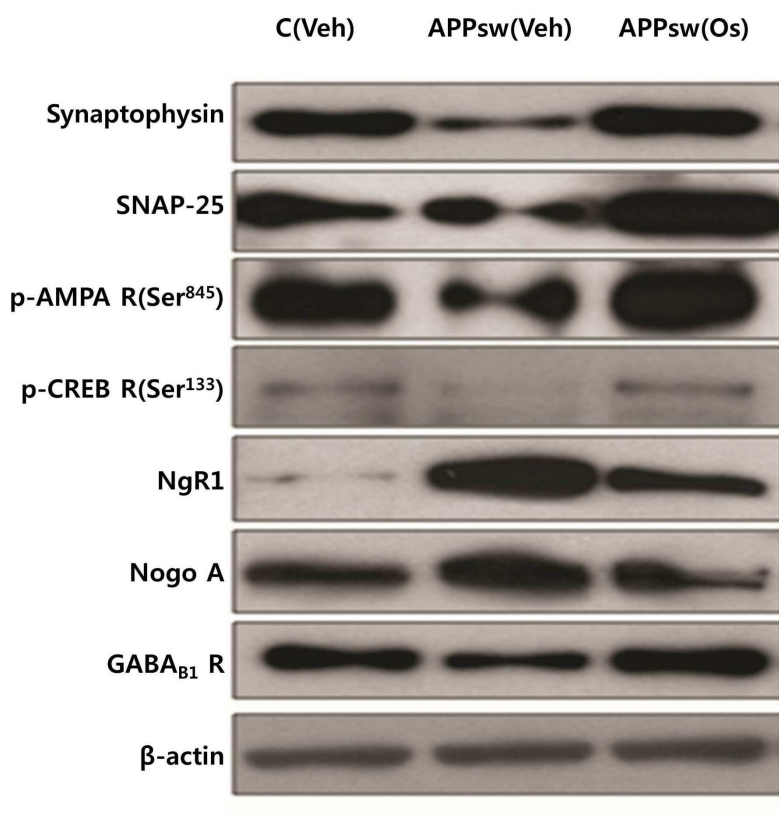
도면2



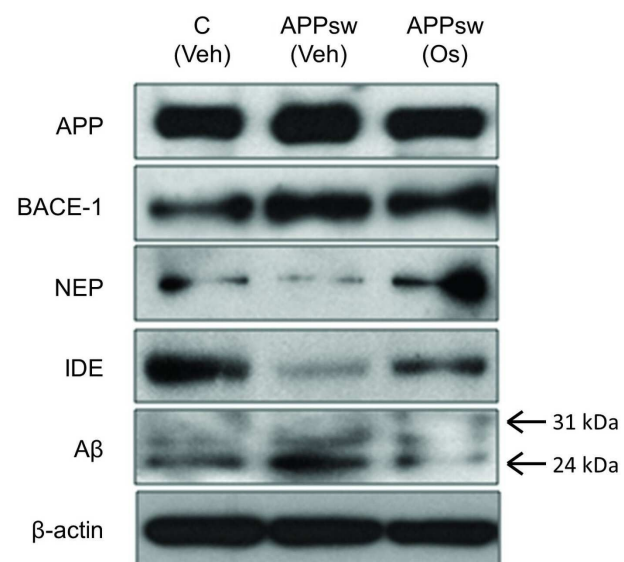
도면3



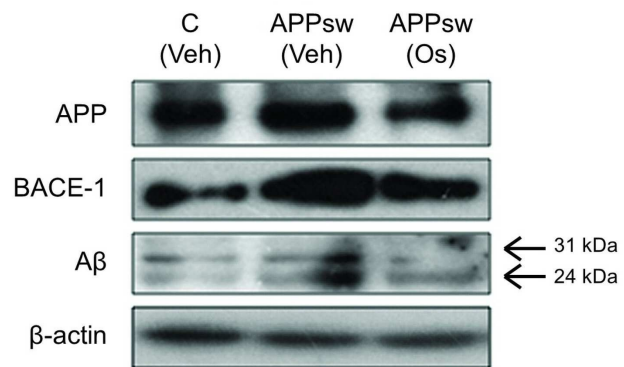
도면4



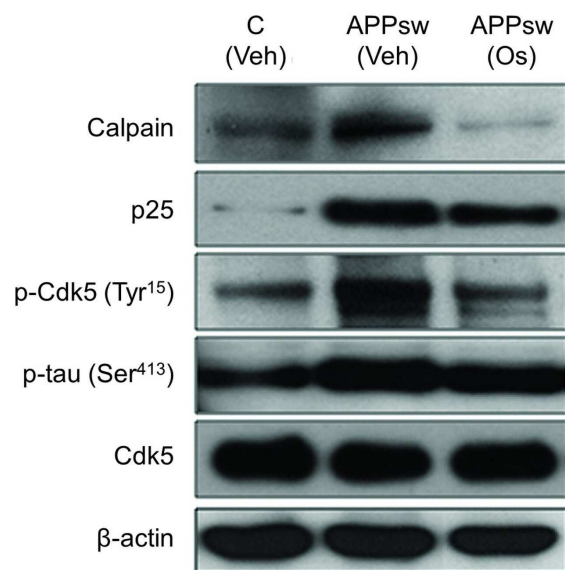
도면5



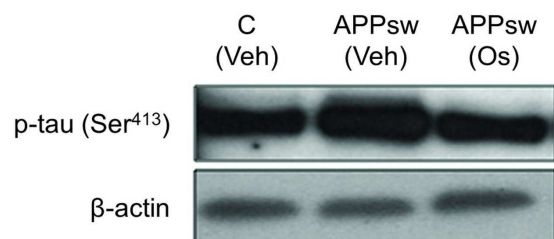
도면6



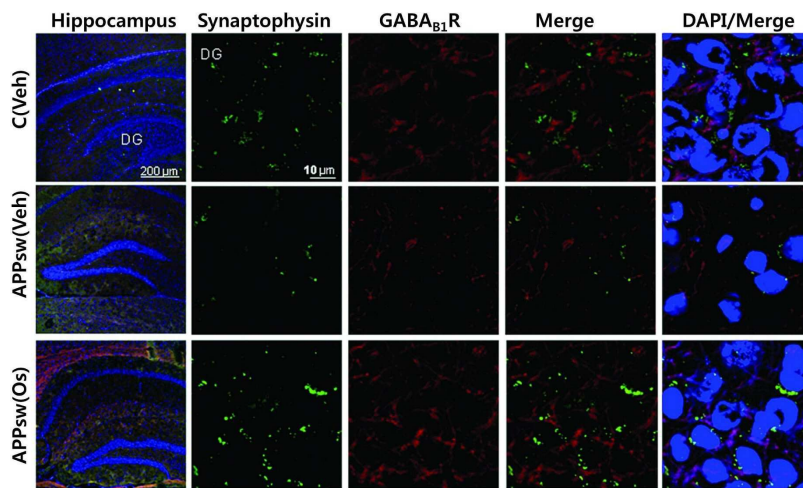
도면7



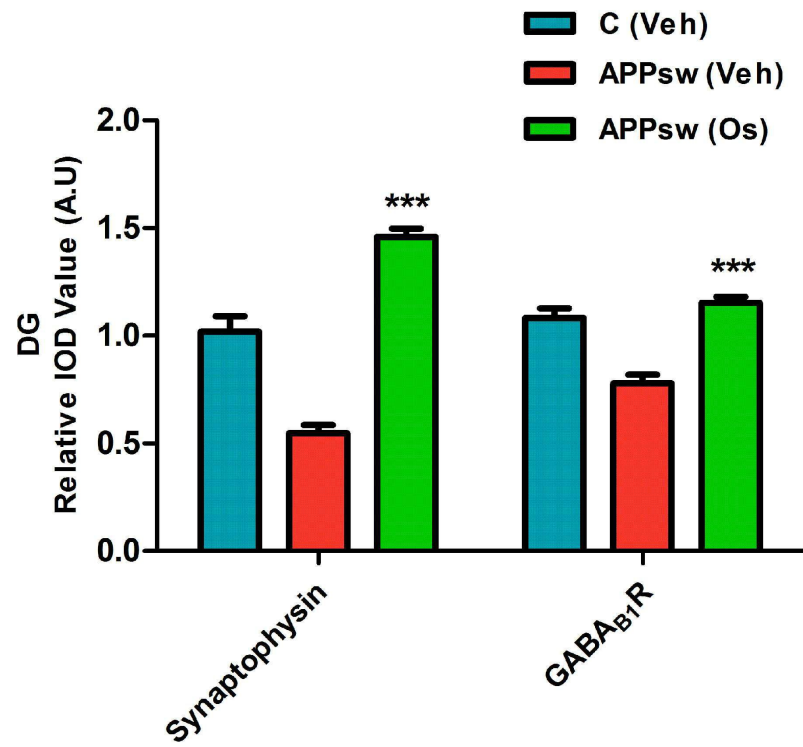
도면8



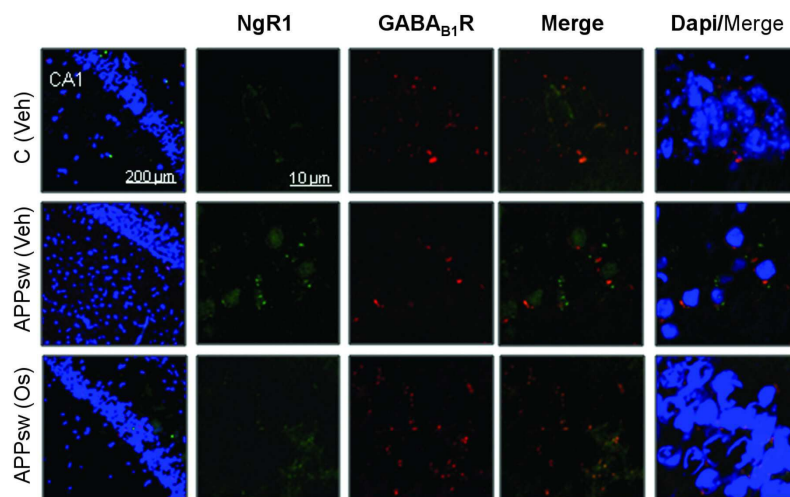
도면9



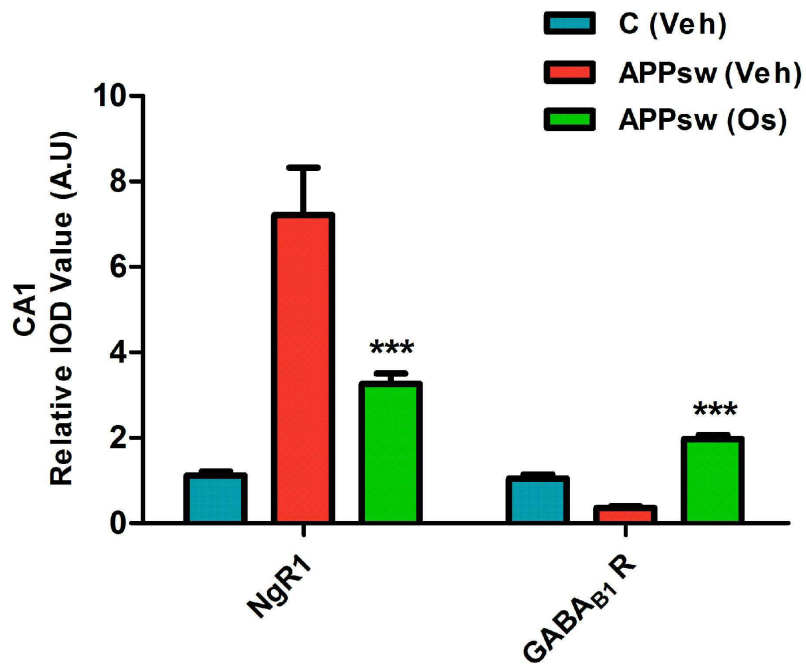
도면10



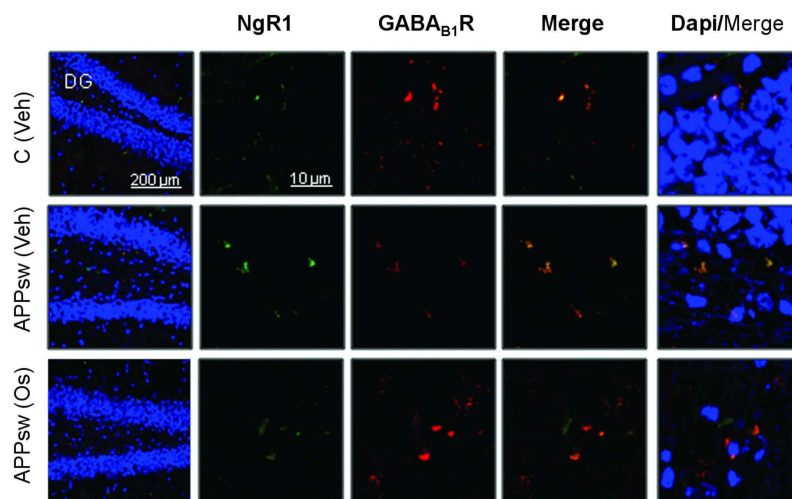
도면11



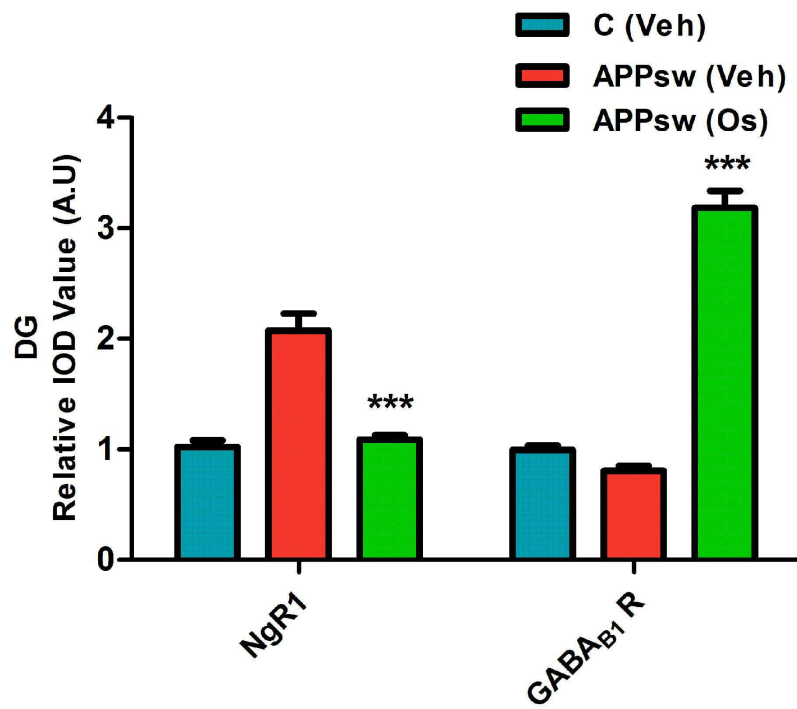
도면12



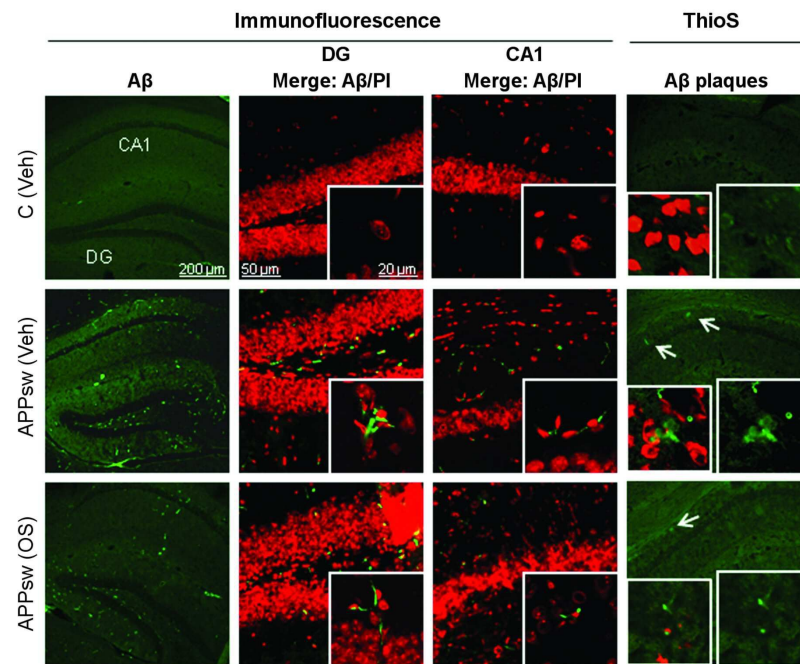
도면13



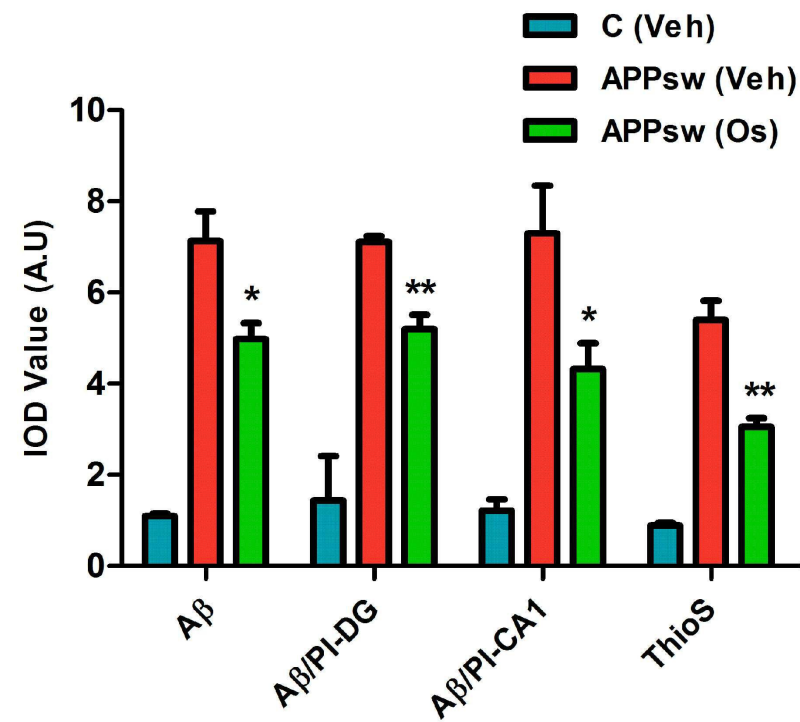
도면14



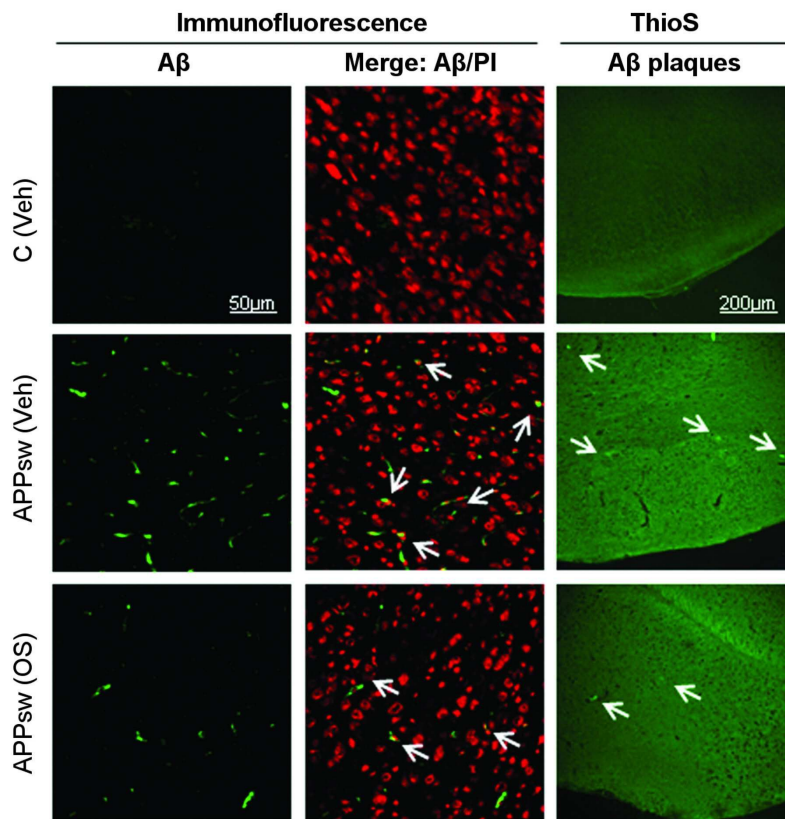
도면15



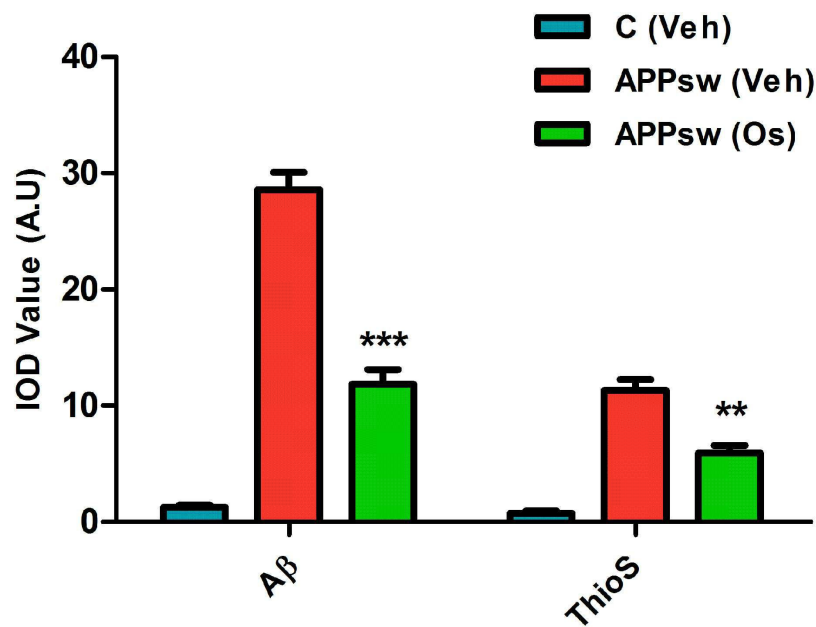
도면16



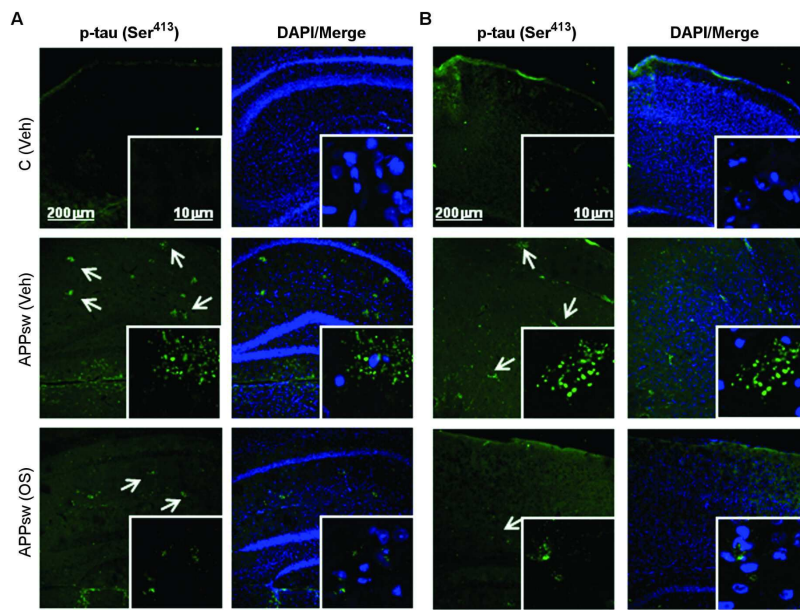
도면17



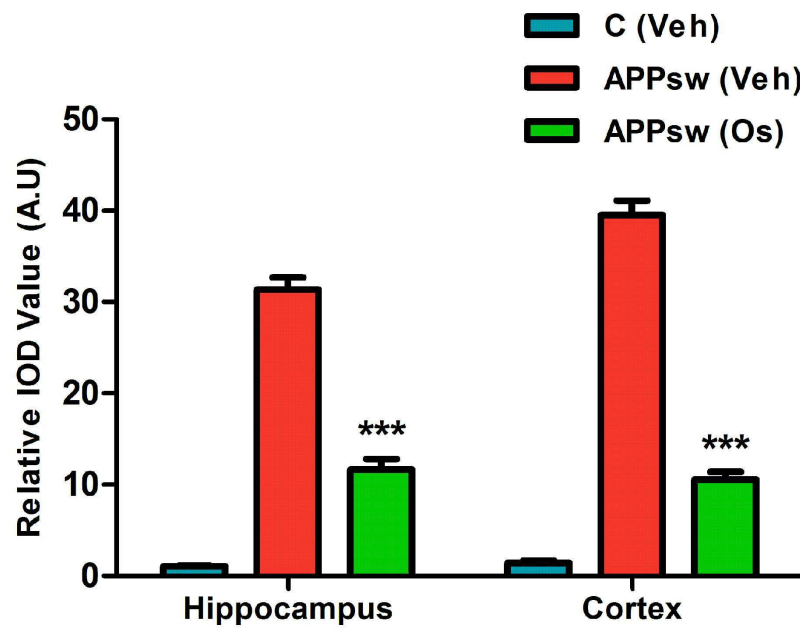
도면18



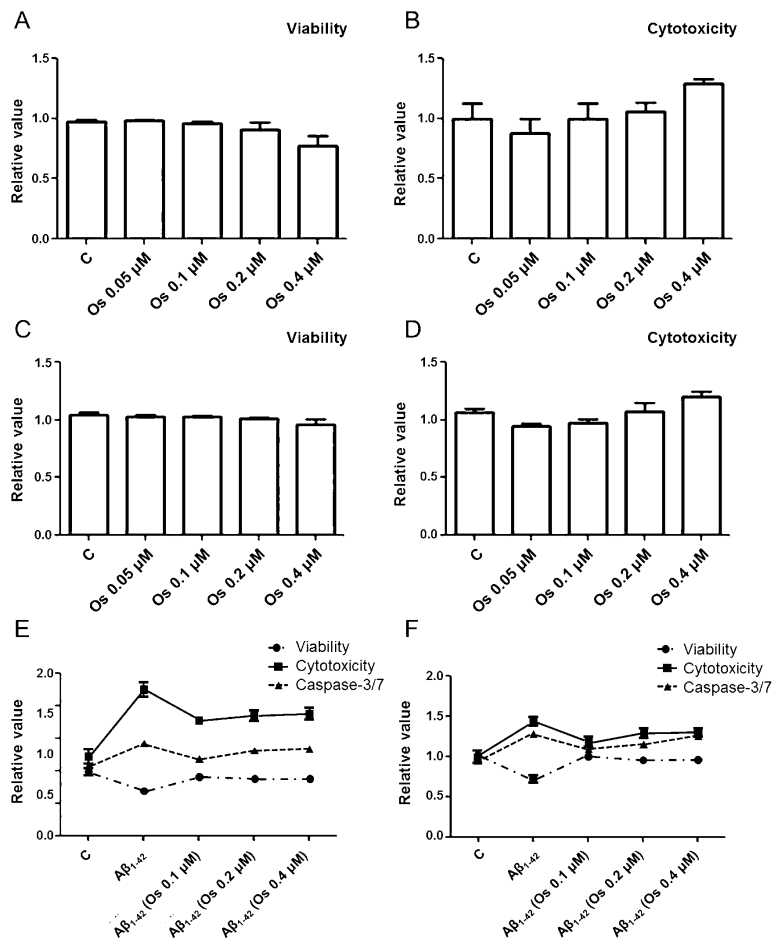
도면19



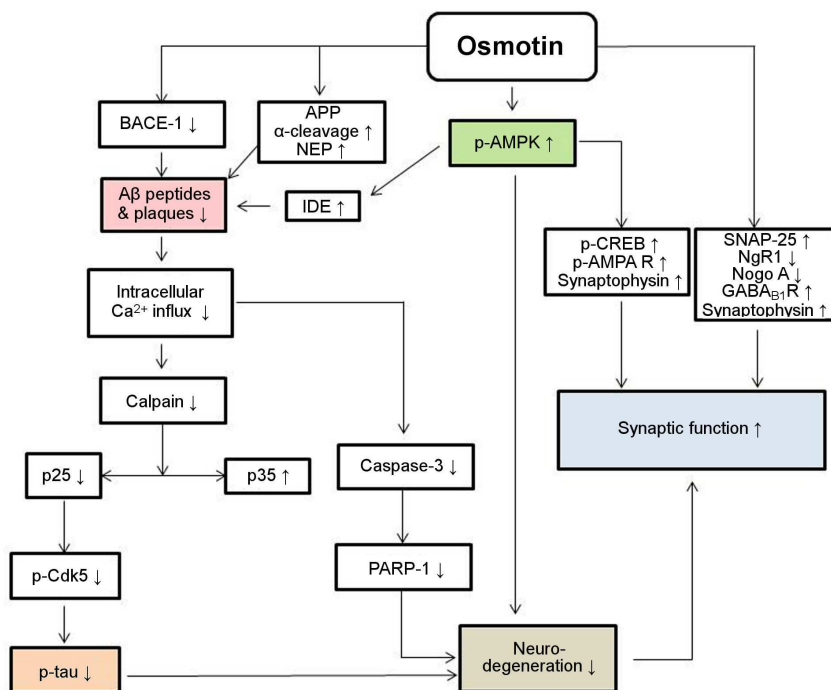
도면20



도면21



도면22



서열 목록

<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY
 <120> A novel pharmaceutical composition for treating Alzheimer's
 dementia
 <130> PD14-5107-D1
 <160> 1
 <170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> Nicotiana tabacum
 <400> 1

Met Gly Asn Leu Arg Ser Ser Phe Val Phe Phe Leu Leu Ala Leu Val
 1 5 10 15

Thr Tyr Thr Tyr Ala Ala Thr Ile Glu Val Arg Asn Asn Cys Pro Tyr
 20 25 30

Thr Val Trp Ala Ala Ser Thr Pro Ile Gly Gly Gly Arg Arg Leu Asp
 35 40 45

Arg Gly Gln Thr Trp Val Ile Asn Ala Pro Arg Gly Thr Lys Met Ala
 50 55 60

Arg Val Trp Gly Arg Thr Asn Cys Asn Phe Asn Ala Ala Gly Arg Gly
 65 70 75 80

Thr Cys Gln Thr Gly Asp Cys Gly Gly Val Leu Gln Cys Thr Gly Trp
 85 90 95

Gly Lys Pro Pro Asn Thr Leu Ala Glu Tyr Ala Leu Asp Gln Phe Ser
 100 105 110

Gly Leu Asp Phe Trp Asp Ile Ser Leu Leu Asp Gly Phe Asn Ile Pro
 115 120 125

Ile Thr Phe Pro Thr Asn Pro Ser Gly Gly Lys Cys His Ala Leu Cys
 130 135 140

Thr Ala Ile Asn Gly Glu Cys Pro Ala Glu Leu Arg Val Pro Gly Gly
 145 150 155 160

Cys Asn Asn Pro Cys Thr Thr Phe Gly Gly Gln Gln Tyr Cys Cys Thr

				165				170				175			
Gln	Arg	Pro	Cys	Gly	Pro	Thr	Phe	Phe	Ser	Lys	Phe	Phe	Lys	Gln	Arg
				180				185				190			
Cys	Pro	Asp	Ala	Tyr	Ser	Tyr	Pro	Gln	Asp	Asp	Pro	Thr	Ser	Thr	Phe
				195				200				205			
Thr	Cys	Pro	Gly	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Arg	Val	Ile	Phe	Cys	Pro	Asn
				210				215				220			
Gly	Gln	Ala	His	Pro	Asn	Phe	Pro	Leu	Glu	Met	Pro	Gly	Ser	Asp	Glu
225				230				235				240			
Val Ala Lys															