



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0054238
(43) 공개일자 2023년04월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/18 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/18 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2022-0034260
(22) 출원일자 2022년03월18일
심사청구일자 2022년03월18일
(30) 우선권주장
1020210137527 2021년10월15일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
곽지현
서울특별시 강남구 삼성로 629, 303동 1703호(삼성동, 삼성동센트럴아이파크)
이재동
서울특별시 노원구 초안산로2라길 26, 101동 503호(월계동, 월계센트럴아이파크아파트)
(74) 대리인
특허법인 이룸리온

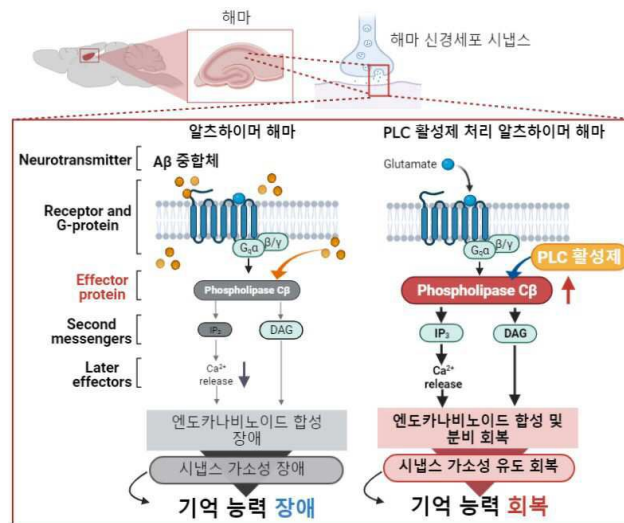
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 PLC 활성제를 유효성분으로 포함하는 알츠하이머 치매 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 PLC 활성제를 유효성분으로 포함하는 알츠하이머 치매 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다. 본 발명의 PLC 활성제를 유효성분으로 포함하는 조성물은 Aβ0에 의해 억제된 S-eCB 동원을 복원시키고, Aβ0로 손상된 시냅스 가소성을 회복시키며, Aβ0 처리 마우스 해마 절편 및 AD 만성 단계의 5XFAD 마우스 해마 절편에서 PLCβ1 단백질 수준을 정상으로 회복시킬 뿐만 아니라, AD 마우스에서 맥락적 공포 기억 손상을 회복시키는 바, 알츠하이머 치매의 예방 또는 치료에 유용하게 사용 가능할 것으로 기대된다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

G01N 33/6896 (2013.01)

G01N 2500/04 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465030372
과제번호	HI19C0646000020
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	국가치매극복기술개발(R&D)
연구과제명	해마-피질 신경회로 제어를 통한 초기 알츠하이머성 치매 기억 치료기술개발
기 여 율	70/100
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465033925
과제번호	HU20C0233000021
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	치매극복연구개발사업(R&D)
연구과제명	다중 신경회로의 동시적 신호측정 및 제어 기법을 통한 알츠하이머성 치매 쥐 모델
에서의 표적 신경회로 발굴 및 손상 기전 규명	
기 여 율	25/100
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
연구기간	2021.06.01 ~ 2022.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711129266
과제번호	2019M3E5D2A01058328
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	미래뇌융합기술개발(R&D)
연구과제명	자연신경망 원리 기반 능동적 적응지능 수리계산 모델링 및 AI 개발
기 여 율	5/100
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

PLC 활성제를 유효성분으로 포함하는, 알츠하이머 치매 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 PLC 활성제는 PLC β 1 단백질의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 PLC 활성제는 엔도카나비노이드(endocannabinoid, eCB)의 합성 및 분비를 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 PLC 활성제는 하기 특징 중 어느 하나 이상을 회복시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물:

- (a) 해마 시냅스 가소성(synaptic plasticity); 및
- (b) 맥락적 공포 기억(contextual fear memory).

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 PLC 활성제는 m-3M3FBS인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

하기 단계를 포함하는 알츠하이머 치매 치료제 스크리닝 방법:

- (a) 알츠하이머 치매 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;
- (b) 상기 시료의 PLC β 1 단백질의 활성 수준, 또는 eCB의 합성 또는 분비 수준을 측정하는 단계; 및
- (c) 후보물질 비처리군과 비교하여, PLC β 1 단백질의 활성 수준, 또는 eCB의 합성 또는 분비 수준이 증가한 경우에, 상기 후보물질을 알츠하이머 치료제로 판정하는 단계.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 시료는 해마 유래 시료인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 (b) 단계의 측정은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 PLC β 1 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 알츠하이머 치매 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 피검체는 인간을 포함하는 포유류인 것을 특징으로 하는, 방법

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 해마 유래 시료인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 방법은 측정한 상기 PLC β 1 단백질의 활성 수준이 대조군의 PLC β 1 단백질의 활성 수준에 비교하여 감소된 경우, 알츠하이머 치매로 판정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 13

제9항에 있어서,

상기 PLC β 1 단백질의 활성 수준은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 PLC 활성제를 유효성분으로 포함하는 알츠하이머 치매 예방 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 치매(dementia)는 정상적인 노화와는 구분해야 할 병적인 현상이며 그 원인에 따라 알츠하이머성 치매

(Alzheimer's disease), 혈관성 치매(vascular dementia), 기타 알콜 중독, 외상, 또는 파킨슨병의 후유증으로 오는 치매로 구별된다.

[0004] 알츠하이머 치매는 주로 65세 이상 노년층에서 발병하며, 점진적인 기억력 감소와 인지기능 손상으로 특징되는 퇴행성 뇌질환이다. 병리수준에서는 베타-아밀로이드 단백질 침전물과 신경섬유 타우 단백질의 엉킴현상이 대표적인 병인이다. 알츠하이머 치매는 그 진행과정에서 인지기능 저하뿐만 아니라 성격변화, 초조행동, 우울증, 망상, 환각, 공격성 증가, 수면 장애 등의 정신행동 증상이 흔히 동반되며 말기에 이르면 경직, 보행 이상 등의 신경학적 장애 또는 대소변 실금, 감염, 욕창 등 신체적인 합병증까지 나타나게 된다. 현미경으로 알츠하이머 치매 환자의 뇌 조직을 검사하였을 때 특징적인 병변인 신경반(neuritic plaque)과 신경섬유다발(neurofibrillary tangle) 등이 관찰되고, 육안 관찰 시에는 신경세포 소실로 인해 전반적 뇌 위축 소견이 보인다. 이러한 뇌 병리 소견은 질병 초기에는 주로 기억력을 담당하는 주요 뇌 부위인 해마와 내후각뇌피질 부위에 국한되어 나타나지만 점차 두정엽, 전두엽 등을 거쳐 뇌 전체로 퍼져나간다. 이러한 뇌 병리 침범 부위의 진행에 따라 초기에는 기억력 저하가 주로 나타나다가 병이 진행됨에 따라 점진적인 경과를 보이면서 임상 증상이 다양해지고 점점 더 심해지게 된다.

[0005] 고령화로 인한 알츠하이머 치매환자가 크게 증가하고 있어 사회적인 해결과제로 급부상하고 있지만 이를 효과적으로 예방하거나 치료할 수 있는 의약품은 거의 존재하지 않고 있는 실정이다. 치매는 65세 노인 인구의 10% 이상이 고통을 받는 신경계질환으로, 치매 중 50% 이상이 알츠하이머 치매로 보고되고 있으며, 2017년 노인 인구 비율은 전 인구의 14%인 700만 명을 넘어 섰고, 2060년도에는 41.0%로 급증할 것으로 예상되고 있다. 또한 치매 환자 수는 2017년도 기준 724천명에 달하고 있고, 고령화가 진전됨에 따라 2040년도에는 168만 명, 2050년도에는 212.7만 명 이상으로 증가할 것으로 예측된다.

[0006] 하지만, 현재 치매의 치료방법은 근본 원인의 해결이 아닌 증상 완화 목적의 처치에 불과하여, 알츠하이머 치매의 발병의 억제, 지연 또는 치료를 위한 물질의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1755097호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 알츠하이머 치매의 예방 또는 치료제의 개발을 위해 연구한 결과, A β 0(amyloid beta oligomers)가 PLC β 를 감소시켜 S-eCB(synergistic enhancement of endocannabinoid) 동원을 억제하는 기전을 확인하였고, 본 발명의 PLC 활성제가 A β 0에 의해 억제된 S-eCB 동원을 복원시키고, A β 0로 손상된 해마 tLTP(timing-dependent potentiation)를 회복시키고, A β 0 처리 마우스 해마 절편 및 AD 만성 단계의 5XFAD 마우스 해마 절편에서 PLC β 1 단백질 수준을 정상으로 회복시킬 뿐만 아니라, AD 마우스에서 맥락적 공포 기억 손상을 회복시키는 것을 확인하였는바, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 이에 본 발명의 목적은 PLC 활성제를 유효성분으로 포함하는, 알츠하이머 치매 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 하기 단계를 포함하는 알츠하이머 치매 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다:

[0012] (a) 알츠하이머 치매 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;

[0013] (b) 상기 시료의 PLC β 1 단백질의 활성 수준, 또는 eCB의 합성 또는 분비 수준을 측정하는 단계; 및

[0014] (c) 후보물질 비처리군과 비교하여, PLC β 1 단백질의 활성 수준, 또는 eCB의 합성 또는 분비 수준이 증가한 경우에, 상기 후보물질을 알츠하이머 치료제로 판정하는 단계.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 PLC β 1 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계

를 포함하는, 알츠하이머 치매 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0016] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 PLC 활성제를 유효성분으로 포함하는, 알츠하이머 치매 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 알츠하이머 치매 치료제 스크리닝 방법을 제공한다:

[0020] (a) 알츠하이머 치매 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;

[0021] (b) 상기 시료의 PLC β 1 단백질의 활성 수준, 또는 eCB의 합성 또는 분비 수준을 측정하는 단계; 및

[0022] (c) 후보물질 비처리군과 비교하여, PLC β 1 단백질의 활성 수준, 또는 eCB의 합성 또는 분비 수준이 증가한 경우에, 상기 후보물질을 알츠하이머 치료제로 판정하는 단계.

[0023] 또한, 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 PLC β 1 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 알츠하이머 치매 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0024] 본 발명의 일 구현예에서 상기 PLC 활성제는 PLC β 1 단백질의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명의 다른 구현예에서 상기 PLC 활성제는 엔도카나비노이드(endocannabinoid, eCB)의 합성 및 분비를 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 PLC 활성제는 하기 특징 중 어느 하나 이상을 회복시키는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:

[0027] (a) 해마 시냅스 가소성(synaptic plasticity); 및

[0028] (b) 맥락적 공포 기억(contextual fear memory).

[0029] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 PLC 활성제는 m-3M3FBS인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 시료는 해마 유래 시료인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 (b) 단계의 측정은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 피검체는 인간을 포함하는 포유류인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 방법은 측정된 상기 PLC β 1 단백질의 활성 수준이 대조군의 PLC β 1 단백질의 활성 수준에 비교하여 감소된 경우, 알츠하이머 치매로 판정하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0034] 본 발명의 또 다른 구현예에서 상기 PLC β 1 단백질의 활성 수준은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 또한, 본 발명은 PLC 활성제를 유효성분으로 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함

하는, 알츠하이머 치매의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0036] 또한, 본 발명은 PLC 활성제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 알츠하이머 치매의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0037] 또한, 본 발명은 알츠하이머 치매 치료용 약제 제조를 위한 PLC 활성제의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0039] 본 발명의 PLC 활성제를 유효성분으로 포함하는 조성물은 A β O에 의해 억제된 S-eCB 동원을 복원시키고, A β O로 손상된 시냅스 가소성을 회복시키며, A β O 처리 마우스 해마 절편 및 AD 만성 단계의 5XFAD 마우스 해마 절편에서 PLC β 1 단백질 수준을 정상으로 회복시킬 뿐만 아니라, AD 마우스에서 맥락적 공포 기억 손상을 회복시키는 바, 알츠하이머 치매의 예방 또는 치료에 유용하게 사용 가능할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1a는 S-eCB 동원 프로토콜을 도식화한 것이다.

도 1b 내지 1d는 그룹 1 mGluR 작용제인 DHPG, 또는 DHPG+CA1 PC(pyramidal cell) 신경발화 조건에서 CB1R 길항제인 AM251 유무에 따른 eIPSC 진폭을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 1e 내지 1h는 DMSO 처리, A β O 처리, 및 스크램블 A β O 처리된 쥐 해마 절편에서 mGluR1 길항제인 LY367385(100 μ M) 또는 mGluR5 길항제인 MPEP(10 μ M)를 처리하고, eIPSC 진폭을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2a 및 2b는 DMSO 처리, A β O 처리, 및 스크램블된 A β O 처리 쥐 해마 절편에 PLC β 차단제인 U73122(5 μ M)를 처리하고, eIPSC 진폭을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2c 및 2d는 DMSO 처리, A β O 처리, 및 스크램블된 A β O 처리 쥐 해마 절편에 PLC β 활성제인 m-3M3FBS(30 μ M)를 처리하고, eIPSC 진폭을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2e 및 2f는 DMSO 처리, A β O 처리, 및 A β O + m-3M3FBS 처리 쥐 해마 절편에서 PLC β 1의 단백질 발현 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3a 및 3b는 S-eCB 동원 보장 tLTP 프로토콜(S-eCB mobilization-ensuring tLTP protocol)의 개략도를 나타낸 것이다.

도 3c는 DMSO 처리 쥐 해마 절편에서 tLTP를 유도한 후 EPSP 기울기를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3d는 DMSO 처리 쥐 해마 절편에서 D-AP5(50 μ M)를 처리하고, tLTP를 유도한 후 EPSP 기울기를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3e는 DMSO 처리 쥐 해마 절편에서 AM251(3 μ M)을 처리하고, tLTP를 유도한 후 EPSP 기울기를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3f는 A β O 처리 쥐 해마 절편에서 tLTP를 유도한 후 EPSP 기울기를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3g는 A β O 처리 쥐 해마 절편에서 m-3M3FBS(30 μ M)를 처리하고 tLTP를 유도한 후 EPSP 기울기를 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3h는 도 3c 내지 3g에서 분석한 EPSP 기울기를 비교 분석하여 나타낸 것이다.

도 4a는 5XFAD 마우스의 양측 해마의 등쪽과 복부쪽 영역 모두에 m-3M3FBS를 주사하는 개략도를 나타낸 것이다.

도 4b 및 4c는 WT 마우스, 5XFAD 마우스, 및 m-3M3FBS를 주사한 5XFAD 마우스의 해마 절편에서 PLC β 1 단백질의 활성을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4d는 기억능력 관련 행동실험을 위하여 해마 의존성 공포기억 실험인 맥락적 공포 조건화(contextual fear conditioning) 실험의 개략도를 나타낸 것이다.

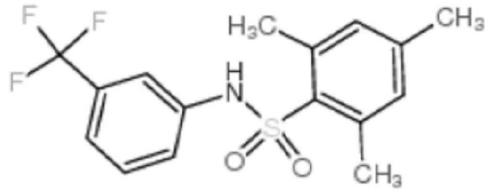
도 4e는 WT 마우스, 5XFAD 마우스, 및 m-3M3FBS를 주사한 5XFAD 마우스의 동결 정도를 분석한 것이다.

도 5는 알츠하이머병 해마에서 PLC 활성화에 의한 시냅스 가소성 손상과 기억 능력 장애의 회복 기전 모식도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

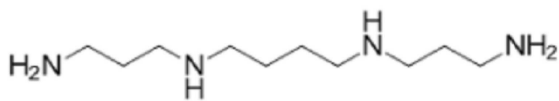
- [0042] 본 발명의 일 실시예에서는 그룹 1 mGluR의 활성화는 eCB 동원을 유도하고, 그룹 1 mGluR 활성화 동안 생체 내 유사 신경발화 트레인이 S-eCB 동원을 유도하며, S-eCB 동원이 AβO에 의해 특이적으로 손상된다는 것을 확인하였다(실시예 1 참조).
- [0043] 본 발명의 다른 실시예에서는 AβO가 PLCβ 경로를 방해하여 CA1 PC에서 S-eCB 동원을 차단하고, m-3M3FBS를 사용하여 PLC 활성화를 증가시키면 AβO에 의해 억제된 S-eCB 동원을 복원시킨다는 것을 확인하였다(실시예 2 참조).
- [0044] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 AβO가 tLTP(timing-dependent potentiation) 유도를 완전히 차단시키는 것을 확인하였고, PLCβ1 단백질 수준을 직접 증가시켜 PLCβ 의존성 S-eCB 동원을 향상시키면, AβO로 손상된 해마 tLTP가 회복된다는 것을 확인하였다(실시예 3 참조).
- [0045] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 m-3M3FBS는 AβO 처리 마우스 해마 절편 및 AD 만성 단계의 5XFAD 마우스 해마 절편에서 PLCβ1 단백질 수준을 정상으로 완전히 회복시키는 것을 확인하였고, AD 마우스에서 맥락적 공포 기억 손상을 회복시키는 것을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0047] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0049] 본 발명은 PLC 활성제를 유효성분으로 포함하는, 알츠하이머 치매 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0050] 또한, 본 발명은 PLC 활성제를 유효성분으로 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 알츠하이머 치매의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0051] 또한, 본 발명은 PLC 활성제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 알츠하이머 치매의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [0052] 또한, 본 발명은 알츠하이머 치매 치료용 약제 제조를 위한 PLC 활성제의 용도를 제공한다.
- [0053] 본 발명에 있어서, 상기 PLC 활성제는 PLCβ1 단백질의 활성을 증가시키거나, 엔도카나비노이드(endocannabinoid, eCB)의 합성 및 분비를 증가시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 PLC 활성제는 하기 특징 중 어느 하나 이상을 회복시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다: (a) 해마 시냅스 가소성(synaptic plasticity); 및 (b) 맥락적 공포 기억(contextual fear memory).
- [0054] 본 발명에 있어서, “PLC(Phospholipase C)”는 세포 내 신호전달에 매우 중요한 효소로, 각종 호르몬과 성장인자 수용체를 통하여 들어온 신호에 의하여 활성화된다. 자극된 PLC는 IP₃와 DAG를 통해 각각 세포 내 칼슘 농도를 높이고 단백질 키나제 C(protein kinase C)를 활성화하여 각종 세포 내 신호전달 체계에 관련되는 효소를 활성화시킨다. 상기 PLC는 PLCβ, PLCγ, PLCδ, PLCε, PLCζ, 또는 PLCη일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 본 발명에 있어서, 상기 PLC 활성제는 PLC의 활성을 증가시키는 물질이면 제한되지 않으며, m-3M3FBS, Spermine, Pseudolaric acid B, 또는 O-3M3FBS일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 PLC 활성제는 전체 조성물에 1 내지 100 μM, 1 내지 70 μM, 1 내지 40 μM, 10 내지 100 μM, 10 내지 70 μM, 10 내지 40 μM, 20 내지 100 μM, 20 내지 70 μM, 또는 20 내지 40 μM로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 m-3M3FBS는 하기 화학식 1로 표시될 수 있고, 상기 Spermine은 하기 화학식 2로 표시될 수 있고, 상기 Pseudolaric acid B는 하기 화학식 3으로 표시될 수 있으며, 상기 O-3M3FBS는 하기 화학식 4로 표시될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0057] [화학식 1]



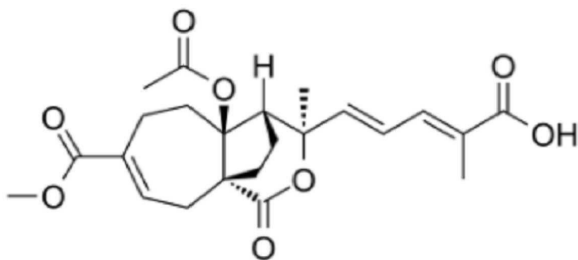
[0058]

[0060] [화학식 2]



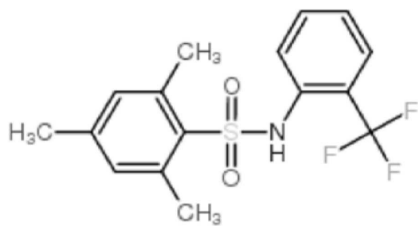
[0061]

[0063] [화학식 3]



[0064]

[0066] [화학식 4]



[0067]

[0068] 본 발명에 있어서, “알츠하이머 치매”는 아밀로이드 베타 펩타이드(Amyloid beta peptide, A β)가 해마를 포함한 다양한 뇌 영역의 신경세포 간 시냅스에 침착됨으로써, 신경세포의 사멸 및 신경회로 붕괴를 야기함에 따른 기억 기능을 포함한 인지 기능 전반에서 장애를 일으키는 신경 퇴행성 질환이다. 상기 A β 가 뇌 해마 영역에서 비정상적으로 침착되는 경우 기억의 생물학적 기전으로 알려진 장기 시냅스 가소성(long-term synaptic plasticity) 현상을 저하시킨다. 상기 eCB는 역행성 신경전달물질로서, 해마 시냅스 가소성 유도에 중요한 역할을 한다.

[0069] 본 발명에 있어서, “시냅스 가소성”은 시냅스가 활동의 증가 또는 감소에 반응하여 시간에 지남에 따라 강화 또는 약화되는 것이다. 기억은 뇌에서 광범위한 신경 전달에 의한 것인 바, 시냅스 가소성은 학습과 기억에서 중요한 역할을 한다. 본 발명의 일 실시예에서는 발화시간 기반 시냅스 강화(tLTP; timing-dependent

potentiation) 프로토콜을 통해 시냅스 가소성을 확인하였으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0070] 본 발명에 있어서, “회복”은 정상의 상태로 돌이키거나, 정상의 상태로 되찾는 것을 의미한다. 본 발명의 실시예에서 알츠하이머 치매에 걸리지 않거나 Aβ0가 처리되지 않은 대조군과 같은 상태로 돌아가는 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0072] 본 발명은 또한, PLC 활성제의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, “약학적으로 허용 가능한 염”이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다.
- [0073] 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 글루콘산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 산부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화합물을 과량의 산 수용액에 용해시키고, 이 염을 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴과 같은 수혼화성 유기 용매를 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동물량의 화합물 및 물 중의 산 또는 알코올을 가열하고 이어서 상기 혼합물을 증발시켜서 건조시키거나, 또는 석출된 염을 흡인 여과시켜 제조할 수 있다.
- [0074] 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리토 금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물염을 여과한 후 여액을 증발, 건조시켜 얻을 수 있다. 이 때, 금속염으로서 특히 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하며, 또한 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리토 금속염을 적당한 은염(예, 질산은)과 반응시켜 얻을 수 있다.
- [0075] 본 발명의 조성물 내의 상기 PLC 활성제의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 또는 0.001 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.
- [0076] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0077] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틸크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [0078] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0079] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0080] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 텍스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로

필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 봉해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜 4000, 폴리에틸렌글리콜 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.

[0081] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스테르류(트윈에스테르), 폴리옥시에칠렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

[0082] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.

[0083] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.

[0084] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.

[0085] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지(PEG), 락테이트 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스틴산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소디움비셀파이드 0.1%, 소디움포름알데히드설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소디움비셀파이드와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.

[0086] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위템솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터+플레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스팬, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 테고-G(Buytyrum Tego-G), 세베스파마 16 (Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈 (Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로(OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기체 IV 타입 (AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D, 299), 수포스탈 (N, Es), 웨코비 (W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기체 (TG-95, MA, 57)와 같은 기체가 사용될 수 있다.

[0087] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추

출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

- [0088] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 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, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0089] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비용, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0090] 본 발명에 따른 약학적 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 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0091] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.
- [0092] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.
- [0093] 본 명세서에 있어서, "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0094] 본 명세서에 있어서, "투여"란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0095] 본 명세서에 있어서, "예방"이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, "개선"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0097] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 알츠하이머 치매 치료제 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0098] (a) 알츠하이머 치매 환자로부터 분리된 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;
- [0099] (b) 상기 시료의 PLC β 1 단백질의 활성 수준, 또는 eCB의 합성 또는 분비 수준을 측정하는 단계; 및
- [0100] (c) 후보물질 비처리군과 비교하여, PLC β 1 단백질의 활성 수준, 또는 eCB의 합성 또는 분비 수준이 증가한 경우에, 상기 후보물질을 알츠하이머 치료제로 판정하는 단계.
- [0101] 본 발명에 있어서, 상기 시료는 해마 유래 시료일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 (b) 단계의 측정은 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사면역 확산법(radioimmunodiffusion), 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 방법으로 측정될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0102] 본 발명에 있어서, 상기 후보 물질은 PLC β 1 단백질의 활성 수준, 또는 eCB의 합성 또는 분비 수준이 정상 수준으로 회복되는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 후보물질은 화합물, 펩타이드, 단백질, 항체 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

- [0104] 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 PLC β 1 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 알츠하이머 치매 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0105] 또한, 본 발명은 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 PLC β 1 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 알츠하이머 치매 진단 방법을 제공한다.
- [0106] 또한, 본 발명은 PLC 활성제를 유효성분으로 포함하는 조성물의 알츠하이머 치매의 진단 용도를 제공한다.
- [0107] 또한, 본 발명은 알츠하이머 치매 진단용 약제 제조를 위한 PLC 활성제의 용도를 제공한다.
- [0108] 본 발명에 따른 알츠하이머 치매 진단 방법은 신속하게 진단을 하여, 치매가 악화되기 전에 치료제 투여 등과 같이 즉각 대응이 가능하다. 이에 본 발명의 진단 방법은 알츠하이머 치매 치료에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0109] 본 발명에 있어서, “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 한 객체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 한 객체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 특정 질병 또는 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)를 판정하는 것을 포함한다.
- [0110] 본 발명에 있어서, 상기 피검체는 인간을 포함하는 포유류일 수 있으며, 알츠하이머 치매가 있을 것으로 의심되는 개체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 생물학적 시료는 해마 유래 시료일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 방법은 측정된 상기 PLC β 1 단백질의 활성 수준이 대조군의 PLC β 1 단백질의 활성 수준에 비교하여 감소된 경우, 알츠하이머 치매로 판정하는 단계를 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 대조군은 정상동물로부터 분리된 생물학적 시료일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0111] 본 발명에 있어서, PLC β 1 단백질의 활성 수준 측정은 당업계에 공지된 단백질의 활성 수준 측정 방법에 의한 것이라면 특별히 제한되지 않으나, 예를 들어, 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사면역 확산법(radioimmunoassay), 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0112] 본 발명에 있어서, “측정”은 목적하는 물질(본 발명에서의 마커 단백질)의 존재(발현) 여부를 측정 및 확인하는 것, 또는 목적하는 물질의 존재 수준(발현 수준)의 변화를 측정 및 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 즉, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 것은 발현 여부를 측정하는 것(즉, 발현 유무를 측정하는 것), 또는 상기 단백질의 질적, 양적 변화 수준을 측정하는 것을 의미한다. 상기 측정은 정성적인 방법(분석)과 정량적인 방법을 모두 포함하여 제한 없이 수행될 수 있다. 단백질 수준의 측정에 있어서 정성적 방법과 정량적 방법의 종류는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 기술한 실험방법들이 이에 포함된다. 각 방법 별로 구체적인 단백질 수준 비교 방식은 당업계에 잘 알려져 있다. 따라서, 상기 목적 단백질 검출은 절단된 PLC β 1의 존재 여부의 검출, 또는 상기 단백질 발현량의 증가(상향 조절) 또는 감소(하향 조절)를 확인하는 것을 포함하는 의미이다.
- [0113] 본 발명에서 있어서, 상기 생물학적 시료는 알츠하이머 치매를 진단하고자 하는 피검체에서 채취된 것이라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들어, 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액, 및 뇨 등이 포함될 수 있으며, 바람직하게는 생물학적 조직 시료 또는 세포 시료, 예를 들어 병변 조직에서 유래한 세포, 조직, 기관, 미세침흡인 검체, 중심부바늘생검(core needle biopsy) 검체 및 진공흡입 생검 검체로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서 측정될 수 있다. 상기 생물학적 시료는 검출 또는 진단에 사용하기 전에 전처리할 수 있다. 예를 들어, 균질화(homogenization), 여과, 증류, 추출, 농축, 방해 성분의 불활성화, 시약의 첨가 등을 포함할 수 있다. 상기 시료는 단백질 마커의 탐지 감도를 증가시키도록 준비될 수 있는데, 예를 들어 피검체로부터 수득한 시료는 음이온 교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피, 크기별 배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography), 액체 크로마토그래피, 연속추출(sequential extraction) 또는 젤 전기영동 등의 방법을 이용하여 전처리될 수 있다.
- [0115] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 알츠하이머 치매의 치료 방법을 제공할 수 있다:
- [0116] (a) 피검체로부터 분리된 생물학적 시료에서 PLC β 1 단백질의 활성 수준을 측정하는 단계;
- [0117] (b) PLC β 1 단백질의 활성 수준이 대조군의 PLC β 1 단백질의 활성 수준에 비교하여 감소된 경우, 알츠하이머 치매로 판정하는 단계; 및

- [0118] (c) 알츠하이머 치매를 치료하는 단계.
- [0119] 본 발명에 있어서, 상기 (c) 단계에서 치료는 약물치료, 수술치료, 인지재활치료, 작업치료 등의 방법을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0120] 본 발명에 있어서, 상기 약물은 도네페질(Donepezil), 리바스티그민(Rivastigmine), 갈란타민(Galantamine), 메만틴(memantine), 및 Tacrine-huperzine A로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나 이상의 약물일 수 있으며, 아세틸콜린 분해효소 억제제 또는 NMDA 수용체 길항제일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0121] 본 발명에 있어서, 상기 약물은 본 발명에 따른 PLC 활성제를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0123] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0125] [실험방법]

[0126] 1. 실험 동물 모델

[0127] 해마 S-eCB 동원에 대한 A β 0(amyloid beta oligomers)의 급성 효과를 테스트하기 위해 Sprague-Dawley 쥐(SD, 2-3주령, 대한바이오링크, 한국)의 해마 절편을 사용하였다. 모든 시험관 내 실험은 수컷 및 암컷 쥐를 사용하였다. 아밀로이드증(amyloidosis)으로 인한 해마 의존성 기억 장애에 대한 A β 0의 만성 효과를 테스트하기 위해, A β 0 침착을 모방하는 알츠하이머병 마우스 모델인 5XFAD 마우스 모델(6-7개월, #34840-JAX, Jackson Laboratory, 미국)을 사용하였다. C57BL/6 마우스(6-7개월, KOATECH, 한국)를 5XFAD 마우스의 야생형(WT) 대조군 마우스로 사용하였다. 수컷 5XFAD 및 C57BL/6 마우스는 모든 생체 내 행동 실험에 사용하였다. 5XFAD 마우스 유전자형은 마우스 꼬리에서 추출한 DNA를 사용하여 중합효소연쇄반응(PCR)으로 확인하였다. 모든 동물 관련 절차는 고려대학교 동물 관리 및 사용 위원회의 지침(SD 쥐에 대한 지침: KUIACUC-2017-103, C57BL/6; 및 5XFAD 마우스에 대한 지침: KUIACUC-2019-0068)을 따랐다.

[0129] 2. A β 0(amyloid beta oligomers) 준비

[0130] 가용성 A β 0는 이전 연구에 따라 준비하였다(BMC Biol. 2020;18(1):7.). 구체적으로, A β 1-42(A β) 및 대조 펩티드로서 A β 의 스크램블된 형태를 분말 형태로 구입하였다. A β 및 스크램블된 A β 를 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol(HFIP, Sigma Aldrich, USA)에 단량체화를 위해 최종 농도 1mM으로 용해하고, 용액을 90분 동안 배양하였다. HFIP를 증발시킨 후, 남아있는 얇고 투명한 A β 또는 스크램블된 A β 필름을 디메틸 설폭사이드(DMSO, Sigma Aldrich, USA)에 용해시켜 5mM의 A β 또는 스크램블된 A β 스톡을 제조하고, 분취하여 -20°C에서 동결시켰다. A β 또는 스크램블된 A β 스톡을 해동하고, 인공뇌척수액(ACSF; artificial cerebrospinal fluid)에서 100 μ M로 희석하였다. 그 후, 올리고머화를 위해 18시간 동안 배양하였다. 최종 A β 0 또는 스크램블된 A β 0 스톡 용액은 31.2 ml ACSF에서 최종 농도 200 nM으로 희석되었으며, 이는 뇌 신호 측정 전에 회복 챔버에서 20분 동안 쥐 해마 절편으로 처리되었다. 비히클을 사용한 정상 뇌 상태에 대한 대조군 실험에서, 쥐 해마 절편을 ACSF에서 0.004% DMSO로 처리하였다.

[0132] 3. 생체 외 해마 절편의 준비

[0133] SD 쥐를 이소플루란(isoflurane) 유도 마취하에 참수 후 뇌를 분리하였고, 126mM NaCl, 3KCl, 1.25mM NaH₂PO₄, 2mM MgSO₄, 2mM CaCl₂, 25mM NaHCO₃, 10mM 포도당(pH 7.2-7.4)을 포함하는 차가운 ACSF로 옮겼다. 상기 ACSF는 95% O₂ /5% CO₂로 지속적으로 산소화되었다. 수평 해마 절편(350 μ m 두께)은 vibratome(VT1000S, Leica Biosystems, Germany)을 사용하여 얻었고, 즉시 실온에서 적어도 1시간 동안 산소 처리된 ACSF로 관류된 챔버에서 배양하였다.

[0135] **4. 체외 eCB 동원(mobilization) 프로토콜**

[0136] eCB 동원을 정량화하기 위해, 전체 세포 전압 클램프 기법을 통해 CA1 PC에서 eCB 동원 유도 SC(Schaffer collateral) 신경다발 자극 유발 억제성 시냅스 후 전류(eIPSC; evoked inhibitory postsynaptic current) 진폭의 변화를 측정하였다. CA1 PC의 전체 세포 전압 클램프 기법은 145mM CsCl, 10mM HEPES, 2mM EGTA, 4mM QX-314, 4mM Mg-ATP, 0.4mM NaCl-GTP, pH 7.2-7.3, 270-280 mOsm/L을 포함하는 세포내 용액으로 채워진 봉규산 전극(팁 저항: 4-8MΩ)을 사용하고, 적외선 차동 간섭 대비 비디오 현미경(BW51W, Olympus, Japan)을 통해 MultiClamp 700B 증폭기(Molecular Devices, USA)를 사용하여 수행하였다. CA1 PC에서 eIPSC를 기록하기 위해, 자극 전극(AM Systems, USA)을 방사층(stratum radiatum)에 배치하여 CA3 PC 엑손을 전달하는 SC 경로를 자극하였다. 정전류 자극기(모델 DS3, Digitimer Ltd., UK)를 사용하여 200-400 μA 진폭(20-40 μs)의 전기 자극 펄스를 생성하였다. eIPSC는 막 전위를 -70mV로 유지하면서 1초마다 CA PC에 기록되었다. CB1R 길항제 AM251을 적용하기 전에, eCB에 민감한 세포를 검출하기 위해 1초 동안 -70mV에서 0mV까지 전압 단계를 적용하여 DSI(depolarization-induced suppression of inhibition)를 유도하였다.

[0137] S-eCB 동원을 유도하기 위해, 그룹 1 mGluR 작용제 (S)-3,5-dihydroxyphenylglycine(DHPG, 50 μM)을 CA1 PC의 체세포 근처에 위치한 퍼프 피펫을 사용하여 국소적으로 주입하였다. S-eCB 동원을 유도하기 위해, 그룹 1 mGluR 활성화와 시냅스 후 탈분극을 결합하였다. 또한, 기억 처리 동안 생체 내에서 관찰되고, 생체 내와 유사한 스파스 CA1 PC 신경발화(1Hz)를 모방하여 생리학적으로 현실적인 시냅스 후 탈분극을 유도하였다. 이를 위해, 60초 동안 1Hz에서 5ms 전압 단계(-70~+40mV)를 전달하였다. DSI는 신경발화 및/또는 DHPG 퍼프에 이어 처음 10개의 연속 eIPSC의 평균 진폭을 이용해 측정하였다. 모든 전압 클램프 기록에서 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione(CNQX, 20 μM) 및 D-2-amino-5-phosphonovarinic acid(D-AP5, 50 μM)는 이온성 글루타메이트성 전류 및 시냅스 가소성 방지를 위해 적용하였다. PLCβ 의존성 S-eCB 동원의 그룹 1 mGluR 하위 유형의존성을 테스트하기 위해 mGluR1 길항제인 LY367385(100 μM) 또는 mGluR5 길항제인 2-methyl-6-(phenylethynyl) pyridine(MPEP, 10 μM)의 존재하에서 실험을 반복하였다. 모든 데이터는 2kHz에서 필터링되었고, ITC-18 AD 보드(HEKA Elektronik, Germany)를 사용하여 5kHz에서 디지털화되었다. 또한, Igor Pro 소프트웨어(WaveMetrics, USA)를 사용하여 명령 신호를 생성하고 데이터를 분석하였다.

[0139] **5. S-eCB 동원 유도 발화시간 기반 시냅스 강화(tLTP; timing-dependent potentiation) 프로토콜**

[0140] S-eCB 동원이 해마 tLTP를 유도할 수 있는지 여부를 직접 테스트하기 위해, PLCβ 의존성 S-eCB 동원 실험 프로토콜은 S-eCB 동원 프로토콜 동안 시냅스 전 CA3 PC 신경발화를 도입하여 tLTP를 유도하도록 수정하였다. 전체 세포 전류 클램프 기록은 pH 7.2-7.3로 하여, 110mM potassium gluconate, 4mM NaCl, 40mM HEPES, 4mM Mg-ATP, 0.3mM NaCl-GTP 및 270-280mOsm/L을 포함하는 세포내 용액으로 채워진 유리 전극을 사용하여 해마 CA1 PCs로부터 만들어졌다. 두 개의 자극 전극이 해마 CA1 영역의 방사층에 위치하였다. 하나는 테스트 경로에서 EPSP(excitatory postsynaptic potential)를 모니터링하는 데 사용되었고, 다른 하나는 대조군 경로에서 EPSP를 모니터링하는 데 사용되었다. tLTP 유도 프로토콜은 테스트 경로에서만 구현하였다. S-eCB 동원이 tLTP 유도와 어떻게 관련되어 있는지 직접 테스트하기 위해, S-eCB 동원 프로토콜을 수정하여 tLTP 유도 패러다임을 설계하였다. SC 자극 유발 시냅스 전 CA3 PC 신경발화는 S-eCB 동원 프로토콜 중에 도입되었다. 1Hz 시냅스 전 CA3 PC 신경발화는 mGluR5의 활성화 동안 1Hz 시냅스 후 CA1 PC 신경발화가 tLTP를 유도하기 10ms 전에 유발되었다. 이는 CA3-CA1 흥분성 시냅스에서 tLTP 유도를 위한 시냅스전 CA3 PC 신경발화와 시냅스후 CA1 PC 신경발화의 패어링 동안 PLCβ 의존적 S-eCB 동원이 유도된 것을 의미한다. 베이스라인 EPSP 기록 동안, SC 자극 유발 EPSP는 최소 10분 동안 6초마다 유발되었다. 안정적인 베이스라인을 구축한 후, SC 자극 유발 시냅스 전 CA3 PC 신경발화가 1Hz에서 10ms 시간대의 전류 펄스(800pA, 3ms 전류 단계)에 의해 유발된 시냅스 후 CA1 PC 신경발화와 패어링하여 tLTP가 유도되었다. 이는 LY367385(100 μM)의 존재 하에 DHPG(50 μM)의 적용을 통해 mGluR5가 활성화되는 동안 200회 반복되었다. SC 자극 유발 EPSP 반응은 tLTP 유도 프로토콜 후 최소 30분 동안 기록되었다. 모든 tLTP 유도 실험에서 CA1 PC의 막 전위는 -70mV로 유지하였다. tLTP 유도 후 시냅스 효능의 변화를 분석하기 위해, 베이스라인 조건 동안, EPSP 피크 진폭에서 20-25%와 75-80% 사이의 EPSP 상승 기울기에 대한 선형 피팅(linear fit)을 사용하여 EPSP 기울기를 측정하였다. tLTP 유도 프로토콜에 의한 시냅스 효능의 변화는 10분 베이스라인의 평균 EPSP 기울기에 대한 백분율 변화로 추정되었다. 다양한 뉴런과 실험 조건에 따른 시냅스 효능 변화를 비교하기 위해, tLTP 유도 프로토콜 종료 후 25-30분 동안 정규화된 EPSP 기울기의 평균을 사용하였다.

[0142] 6. 웨스턴 블로팅

[0143] SD 쥐, C57BL/6 또는 5XFAD 마우스 해마의 PLC β 1은 200 μ L의 RIPA 완충액(Bio-Rad, USA)에 용해된 균질화된 해마로부터 제조되었으며, 4X Laemmli 샘플 완충액(Bio-Rad, USA)을 사용한 비환원성 10% 트리스-글리신-나트륨 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 겔(Bio-Rad, USA)에서 용해되었다. 그 후, 겔은 제조업체의 권장 사항에 따라 0.2 μ m PVDF 멤브레인(Bio-Rad, USA)으로 옮겨졌다. 막은 실온에서 1시간 동안 0.01% Tween 20(TBST, Bio-Rad, USA)을 함유하는 Tris 완충 식염수 중 5% BSA(bovine serum albumin)에서 차단되었다. 블롯은 5% BSA를 포함하는 세척 완충액에서 4°C로 밤새 PLC β 1의 1차 항체(0.4 μ g/mL, NBP2-38220, Novus, USA)와 함께 배양하였다. 그 후, 막을 TBST 완충액으로 3회 세척하였다. 그런 다음, 5% BSA를 포함하는 세척 완충액에서 실온에서 1시간 동안 2차 horseradish peroxidase(HRP)-결합 항-토끼 항체(1:3000, Cat# 170-6515, Control# 64170140, RRID: AB_2617112, Bio-Rad, USA)와 함께 배양하였다. 면역반응성(Immunoreactivity)은 Fluorchem E 시스템(ProteinSimple, USA)을 사용하는 향상된 화학발광(Bio-Rad, USA)으로 확인하고, ImageJ 소프트웨어로 분석하였다. 분자량 값은 Precision Plus Protein™ Dual Color Standards(Bio-Rad, USA)를 사용하여 추정하였다.

[0145] 7. 정위 약물 주입

[0146] 정위 약물 주입을 위해, C57BL/6 또는 5XFAD 마우스를 2% 이소플루란(2mL/min 유속)으로 깊이 마취하고 정위 프레임(Stoelting Co., USA)에 머리를 고정하였다. 개두술은 복부 및 등쪽 해마의 CA1 영역을 표적으로 하기 위해 4개 부위에서 이루어졌다. 이는 motorized stereotaxic injector(Stoetling Co., 미국)를 사용하여 비히클인 DMSO(0.05%)이나 PLC 활성제인 m-3M3FBS(50 μ M) 각 0.5 μ L를 Hamilton 주사기를 통해 0.1 μ L/min의 속도로 주입하기 위한 것이다. 약물이 확산될 수 있도록 주사기를 뇌에 5분 이상 유지하였다가 회수한 뒤 두피를 봉합하고 항생제로 소독하였다. 마우스를 3일 동안 회복을 위해 집으로 돌려보낸 후, 맥락적 공포 조건화를 겪었다.

[0148] 8. 맥락적 공포 조건화(CFC; Contextual fear conditioning) 프로토콜

[0149] CFC는 금속 패널 측벽, Plexiglas 전면 및 후면 벽으로 구성된 컨디셔닝 챔버(Coulbourn Instruments, USA) 및 16개의 그리드 막대로 구성된 스테인리스 스틸 그리드 바닥에서 수행하였다. 그리드 바닥은 1초 동안 0.5mA의 발 충격을 전달하도록 설정된 정밀 동물 충격기(Coulbourn Instruments, USA)에 연결되었다. 천장에 장착된 비디오 카메라는 행동 활동을 기록하였고, 해당 비디오를 맞춤형 컴퓨터 소프트웨어(MATLAB, USA)에 제공하였다. 동물 배치 전에 챔버를 70% 에탄올 용액으로 세척하였다. 1일째, 자유 탐색(습관화)할 수 있도록 C57BL/6 또는 5XFAD 마우스를 20분 동안 컨디셔닝 챔버에 두었다. 2일째, C57BL/6 또는 5XFAD 마우스를 120초 기준 기간 동안, 3회, 0.5mA, 및 약 1초간의 발충격(120초와 동일한 자극 간 간격, 조건화)으로 구성되는 공포 조건화 세션(483초)을 위해 조건화 챔버에 넣었다. 3일째, 전기 충격이 없는 상태에서 마우스의 기억력을 평가하기 위해 2분 동안 컨디셔닝 챔버에 다시 넣었다. 맥락적 조건화 실험 동안 수집된 행동 이동성 데이터는 EthoVision XT(Noldus, USA)의 그레이 스케일링 방법을 사용하여 자동으로 감지되었다. 이 방법은 조건화 챔버 내에서 대상을 결정하기 위해 명암 임계값을 사용하였다. 몸이 얼어붙는 반응(동결)은 기억 세션 동안 CFC에 대한 조건화된 반응으로 간주되기 때문에, 임계값이 이동성의 2.0% 임계값 미만일 때 몸이 얼어붙는 반응이 감지되었다. 즉, 현재와 이전 샘플사이에 감지된 마우스의 픽셀에 2.0%의 변화를 초과할 수 없음을 의미한다. 동결 비율은 호흡이 필요한 움직임을 제외하고는 2초 이상 움직임을 없는 것으로 정의되는 동결 행동을 점수화하였다.

[0151] 9. 약물

[0152] 그룹 1 mGluR 작용제 DHPG(50 μ M, Tocris, UK)를 사용하여 그룹 1 mGluR을 활성화하였다. mGluR5 및 mGluR1a를 차단하기 위해, MPEP(10 μ M, Tocris, UK) 및 LY367385(100 μ M, Tocris, UK)를 쥐 해마 절편에 각각 주입하였다. AM251(3 μ M, Tocris, UK)은 시냅스 전 CB1R을 차단하는 데 사용하였다. U73122(5 μ M, Tocris, UK)를 사용하여 PLC β 활성을 차단하였다. m-3M3FBS(30 μ M, Tocris, UK)를 PLC 활성제로 사용하였다. NMDAR 길항제 D-AP5(50 μ M, Tocris, UK) 및 AMPA 수용체 길항제 CNQX(20 μ M, Tocris, UK)가 eIPSC 기록에 사용되었다. A β 0 및 스캐램블 된 A β 0는 각각 A β 및 스캐램블된 A β 펩티드의 동결건조 분말로부터 합성되었다(Bachem, Japan). 4X

Laemmli 샘플 버퍼(Bio-Rad, USA) 및 Running 버퍼(Bio-Rad, USA)를 웨스턴 블롯 SDS-PAGE에 사용하였다. 웨스턴 블롯팅에서 항체 배양 단계의 경우, 토끼 단일클론 1차 항체(NBP2-38220, Novus, USA), 및 HRP-결합 2차 항-토끼 항체(Cat# 170-6515, Control# 64170140, RRID: AB_2617112, Bio-Rad, USA)가 사용되었다.

10. 통계적 분석

모든 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차(SEM)로 표시된다. 통계적 유의성은 스튜던트 t 검정 또는 일원 분산 분석(ANOVA)에 이어 사후 Tukey 검정을 사용하여 측정하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 로 설정되었다.

실시예 1. 해마 CA1 피라미드 세포에서 A β O가 eCB 동원의 상승적 향상(S-eCB)을 억제하는 효과 확인

CA1 PC에서 PLC β 의존성 eCB 및 S-eCB 동원에 대한 A β O의 영향을 조사하기 위해, 시냅스 후 탈분극 동안 그룹 1 mGluR의 동시 활성화에 의해 유도된 S-eCB 동원을 측정할 수 있는 프로토콜을 확립하였다. 쥐 해마 절편의 CA1 PC에서 전체 세포 전압 클램프 기록을 수행하고, 그룹 1 mGluR 작용제 DHPG(50 μ M)를 사용하여 그룹 1 mGluR의 활성화 전후, 또는 시냅스 후 탈분극과 함께 그룹 1 mGluR의 동시 활성화인 경우 각각 eIPSC 진폭을 기록하였다. 그 결과는 도 1a 내지 1d에 나타내었다.

도 1b 및 1d에 나타난 바와 같이, DHPG 퍼프 단독으로 eIPSC 진폭의 억제를 유도하였고, 처음 10개의 eIPSC 진폭은 DHPG 퍼프 전 기준선에서 측정된 평균 eIPSC 진폭의 $79 \pm 7\%$ 로 감소하였다. 또한, CB1R 길항제 AM251(3 μ M)를 처리한 경우, 진폭의 감소가 차단되었다. 이는 그룹 1 mGluR의 활성화는 eCB 동원을 유도하는 것을 나타낸다.

다음으로, 1Hz에서 60초 길이의 생체 내 유사 시냅스 후 신경발화 트레인과 DHPG 퍼프를 페어링하면 DMSO 처리 쥐 해마 절편에서 S-eCB 동원을 유도할 수 있는지 여부를 확인하였다. 그 결과는 도 1c 및 1d에 나타내었다.

도 1c 및 1d에 나타난 바와 같이, eIPSC 진폭은 AM251에 의해 완전히 차단되어 기준 eIPSC 진폭의 $62 \pm 4\%$ 로 억제되었다. 실제로, 생체 내 유사 신경발화 트레인 동안 DHPG 퍼프는 eIPSC 진폭 억제에서 상승적 향상을 유도하였다. 이는 그룹 1 mGluR 활성화 동안 생체 내 유사 신경발화 트레인이 S-eCB 동원을 유도할 수 있음을 나타낸다.

해마에서 그룹 1 mGluR은 2개의 하위 유형인 mGluR1 및 mGluR5로 구성된다. 따라서 그룹 1 mGluR의 하위 유형이 주로 S-eCB 동원을 유도하는지 확인하기 위해, DMSO 처리, A β O 처리, 및 스크램블 A β O 처리 쥐 해마 절편에서 mGluR1 길항제인 LY367385(100 μ M) 또는 mGluR5 길항제인 MPEP(10 μ M)를 처리하고, S-eCB 동원 실험을 반복하였다. 그 결과는 도 1e 내지 1h에 나타내었다.

도 1e 내지 1h에 나타난 바와 같이, LY367385가 있는 경우, 1Hz 신경발화 동안 60초 길이의 DHPG 퍼프에 따른 eIPSC 진폭은 DMSO 처리 쥐 해마 절편 및 스크램블된 A β O 처리 쥐 해마 절편 모두에서 감소하였다. 그러나 eIPSC 진폭의 억제는 A β O 처리된 쥐 해마 절편에서 완전히 차단되었으며, 이는 DMSO 처리 쥐 해마 절편 및 스크램블된 A β O 처리 쥐 해마 절편에 기록된 것과 현저히 다르다. MPEP가 있는 경우, 1Hz 신경발화 동안 DHPG 퍼프에 따른 eIPSC 진폭은 DMSO 처리, A β O 처리, 또는 스크램블된 A β O 처리 쥐 해마 절편에서 유의한 차이가 없었다.

상기 결과는 mGluR1이 아닌 mGluR5 활성화 동안 생체 내 유사 신경발화 트레인이 S-eCB 동원을 유도할 수 있음을 나타낸다. 또한, 스크램블된 A β O가 S-eCB 동원을 억제하는 바, 이러한 S-eCB 동원이 A β O에 의해 특이적으로 손상된다는 것을 확인하였다.

실시예 2. 해마 CA1 피라미드 세포에서 A β O가 PLC β 를 감소시켜 S-eCB 동원을 손상시키는 효과 확인

eCB 동원에 관여하는 PLC β 동위효소는 시냅스 후 탈분극과 mGluR5 활성화의 동시 활성화를 감지하기 위한 센서로 작용한다. S-eCB 동원이 A β O에 의해 억제된다는 점을 고려할 때, PLC β 또는 eCB 생산에 관여하는 다운스트림 화학적 캐스케이드가 A β O의 영향을 받을 수 있다. 이를 확인하기 위하여, PLC β 차단제 U73122(5 μ M)를 처리하고, DMSO 처리, A β O 처리, 및 스크램블된 A β O 처리 쥐 해마 절편에서 S-eCB 동원 실험을 반복하였다. 그 결과는 도 2a 및 2b에 나타내었다.

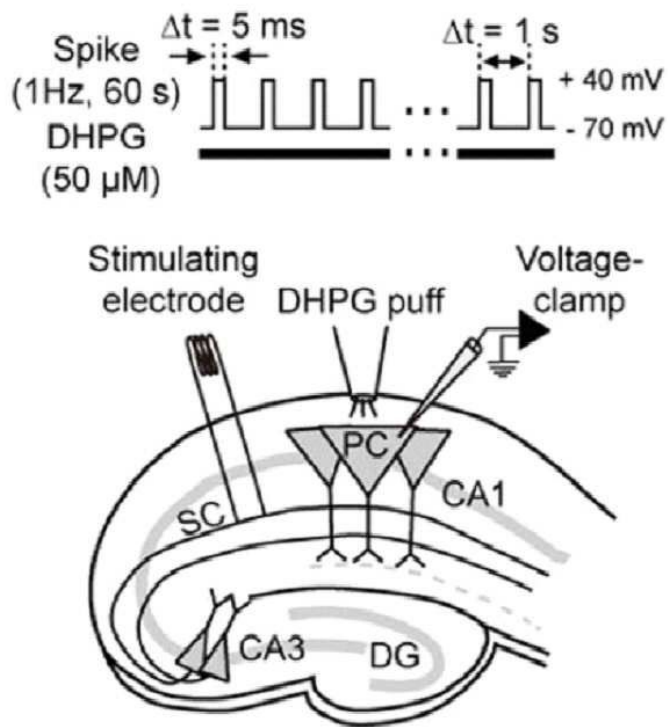
- [0168] 도 2a 및 2b에 나타난 바와 같이, U73122가 DMSO 처리 쥐 해마 절편에서 eIPSC 진폭 억제 of 상승적 향상을 완전히 차단한다는 것을 확인하였다. 또한, A β 0 처리 및 스크램블된 A β 0 처리 쥐 해마 절편에서도 비슷하였다. 이는 A β 0에 의해 억제된 S-eCB 동원이 U73122에 의해 완전히 차단되었음을 나타내며, A β 0가 PLC β 경로를 방해하여 CA1 PC에서 S-eCB 동원을 차단할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0169] PLC β 의 감소가 A β 0 처리 쥐 해마 절편에서 S-eCB 동원을 방해하기 때문에, PLC 활성화제인 m-3M3FBS를 사용한 PLC β 활성의 증가가 S-eCB 동원의 A β 0 유발 손상을 회복할 수 있을 것이라고 가정하였다. 이를 확인하기 위해 DMSO 처리, A β 0 처리, 및 스크램블된 A β 0 처리 쥐 해마 절편에 m-3M3FBS(30 μ M)를 처리하고, S-eCB 동원 실험을 반복하였다. 그 결과는 도 2c 및 2d에 나타내었다.
- [0170] 도 2c 및 2d에 나타난 바와 같이, m-3M3FBS의 존재 하에서, eIPSC 진폭 억제 of 상승적 향상은 A β 0 처리 쥐 해마 절편에서 완전히 회복될 수 있었다. DMSO 처리 및 스크램블된 A β 0 처리 쥐 해마 절편의 기록 또한 유의하게 다르지 않았다. 이는 PLC β 가 A β 0에 의해 손상되어 S-eCB 동원을 방해하고, m-3M3FBS를 사용하여 PLC 활성화를 증가시키면 A β 0에 의해 억제된 S-eCB 동원을 복원할 수 있음을 나타낸다. 해마 PLC β (특히, 해마에 풍부하고 mGluR-유도 eCB 동원에 관여하는 것으로 알려진 PLC β 1) 단백질 발현의 감소가 A β 0에 의해 매개되는지 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯을 수행하였다. 이는 도 2e 및 2f에 나타내었다.
- [0171] 도 2e 및 2f에 나타난 바와 같이, A β 0 처리 쥐 해마 절편에서 PLC β 1의 단백질 발현 수준은 DMSO 처리된 쥐 해마 절편에 비해 현저히 감소하였다. 그러나 m-3M3FBS로 처리하면 A β 0 처리된 쥐 해마 절편에서 PLC β 1 단백질 발현 수준이 완전히 회복되었으며, 이는 DMSO 처리된 쥐 해마 절편에서와 비슷한 수준이었다. 상기 결과는 A β 0가 PLC β 1의 단백질 발현 수준을 직접 감소시켜, PLC β 의존성 eCB 동원을 억제한다는 것을 의미한다.
- [0173] **실시예 3. 해마 CA3-CA1 시냅스에서 PLC β 의 활성화가 발화시간 기반 시냅스 강화의 A β 0 유발 손상을 복원시키는 효과 확인**
- [0174] A β 0에 의해 유도된 S-eCB 동원 억제과 A β 0에 의한 LTP 유도 손상 사이에 인과 관계가 있는지 여부를 확인하기 위하여, S-eCB 동원 프로토콜 동안 시냅스 전 CA3 PC 신경발화를 도입하였다. 이는 시냅스 전 CA1 PC 및 CA3 PC 신경발화가 10ms 시간대로 쌍을 이루어 tLTP를 유도하는 동안, S-eCB 동원을 보장하였다. 또한, S-eCB 동원 보장 tLTP 프로토콜(S-eCB mobilization-ensuring tLTP protocol)은 대조군 경로와 비교하여 테스트 경로에서 EPSP 기울기의 현저한 증가를 유도하였다. 그 결과는 도 3a 내지 3h에 나타내었다.
- [0175] 도 3a 내지 3h에 나타난 바와 같이, mGluR5 매개 장기 억압(LTD; long-term depression)이 대조군 경로에서 유도되었으며, 이는 mGluR5의 활성화가 CA3-CA1 시냅스에서 LTD를 유도한 것을 의미한다. tLTP는 D-AP5(50 μ M)(도 3d) 및 AM251(3 μ M)(도 3e)에 의해 완전히 차단된 반면, mGluR5 매개 LTD는 테스트 및 대조군 경로에서 유도되었다. 이는 mGluR5 매개 LTD가 NMDAR(N-methyl-D-aspartate receptor) 및 CB1R(Cannabinoid type 1 receptor)에 독립적인 반면, S-eCB 동원이 NMDAR 의존적 tLTP의 유도에 필요함을 나타낸다.
- [0176] A β 0 처리된 쥐 해마 절편에서 tLTP 유도를 반복했을 때, A β 0가 테스트 경로에서 tLTP 유도를 완전히 차단한다는 것을 확인하였다(도 3f 및 3h). 반면, 대조군 경로의 mGluR-LTD는 A β 0 처리 및 DMSO 처리 쥐 해마 절편의 대조군 경로와 비교할 때 A β 0의 영향을 받지 않았다(도 3c, 3f, 및 3h). 이는 mGluR5 매개 LTD를 스페어(spare)하면서 A β 0가 S-eCB 동원을 방해하여 NMDAR 의존성 tLTP를 특이적으로 손상시켰음을 의미한다.
- [0177] PLC 활성이 증가되면 S-eCB 동원이 회복되는 바, m-3M3FBS가 A β 0에 의해 손상된 tLTP도 회복시킬 수 있다고 가정하였다. A β 0 처리된 쥐 해마 절편에 m-3M3FBS(30 μ M)를 처리한 결과, tLTP가 완전히 회복되었다(도 3g 및 3h). 이는 DMSO 처리 쥐 해마 절편에서 관찰된 수준과 유사하다. 상기 결과는 PLC β 1 단백질 수준을 직접 증가시켜 PLC β 의존성 S-eCB 동원을 향상시키는 것이 A β 0로 손상된 해마 tLTP를 회복시킬 수 있음을 의미한다. 따라서, PLC 활성화제가 해마 시냅스 가소성을 회복시킨 것을 확인한 것이다.
- [0179] **실시예 4. 5XFAD 마우스에서 PLC β 의 활성화가 해마 PLC β 1 단백질 수준 및 맥락적 공포 기억을 회복시키는 효과 확인**
- [0180] PLC β 1 단백질 수준을 증가시키면 A β 0-손상 tLTP를 회복시킬 수 있고, tLTP가 학습 및 기억의 기초가 되는 시냅스 메커니즘이라는 점을 고려하여, PLC β 1 단백질 수준을 증가시키면 알츠하이머병의 행동 기억 손상을 회복할 수 있다고 가정하였다. 알츠하이머병에서 A β 0 병태생리학을 모사하는 대표적인 설치류 모델로 알려진 알츠

하이머병 5XFAD 마우스 모델을 사용하여 5XFAD 마우스에서 PLC β 1 단백질 수준이 영향을 받는지 여부 및 약리학적으로 m-3M3FBS를 사용하여 회복할 수 있는지 여부를 확인하였다. 또한, 5XFAD 마우스에서 손상된 맥락적 공포 기억이 PLC β 활성화에 의해 회복될 수 있는지 여부를 확인하였다. 그 결과는 도 4a 내지 4e에 나타내었다. 또한, 알츠하이머병 해마에서 PLC 활성화에 의한 시냅스 가소성 손상과 기억 능력 장애의 회복 기전을 도 5에 나타내었다.

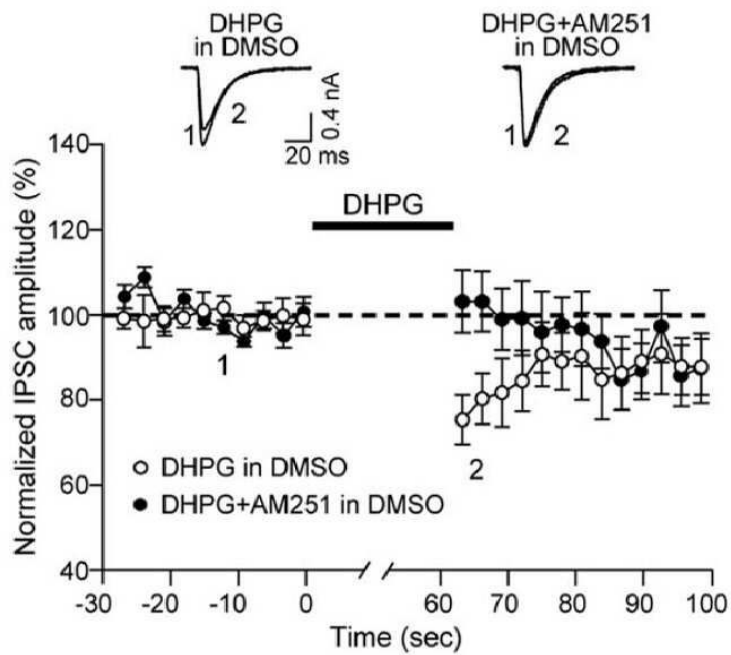
- [0181] 도 4a에 나타난 바와 같이, WT 마우스(C57BL/6)와 5XFAD 마우스에 DMSO를 주사하거나, 5XFAD 마우스의 양측 해마의 등쪽과 복부 영역 모두에 m-3M3FBS를 주사하였다.
- [0182] 주사 3일 후, PLC β 1의 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 도 4b 및 4c에 나타난 바와 같이, DMSO가 주사된 5XFAD 마우스의 해마 절편에서의 PLC β 1 단백질 수준이 DMSO가 주사된 WT 마우스의 해마 절편에 비해 현저히 감소하였다. 이는 A β 0를 처리한 경우와 일치한다. 한편, m-3M3FBS를 주사한 5XFAD 마우스에서 절단한 해마 절편의 PLC β 1 단백질 수준은 회복된 것을 확인할 수 있다. 따라서, 해마 PLC β 1 단백질 수준은 A β 0가 처리된 마우스의 해마 절편뿐만 아니라, AD의 만성 단계의 5XFAD 마우스의 해마에서도 유의하게 감소하였다. 또한, m-3M3FBS는 PLC β 1 단백질 수준을 정상으로 완전히 회복시키는 것을 확인하였다.
- [0183] PLC β 1 단백질 수준의 감소가 알츠하이머병 마우스 모델에서 해마 의존성 기억 장애와 상관 관계가 있는지 여부를 확인하기 위해, DMSO 주사 WT, DMSO 주사 5XFAD 및 m-3M3FBS 주사 5XFAD마우스에서 맥락적 공포 기억 실험을 수행하였다. 그 결과는 도 4d 및 4e에 나타내었다.
- [0184] 도 4d 및 4e에 나타난 바와 같이, 기억 회상 동안 5XFAD 마우스의 동결 반응은 DMSO 주사 WT 마우스보다 상당히 낮았다. 한편, m-3M3FBS 주사 5XFAD 마우스에서 PLC 활성화제가 맥락적 공포 기억 장애를 회복시킬 수 있는지 여부를 확인하였다. 그 결과, m-3M3FBS 주사 5XFAD 마우스는 DMSO 주사 5XFAD 마우스와 비교하여 동결 반응이 현저히 증가하였다. 이는 PLC β 1 단백질 수준이 성공적인 기억 회상과 관련이 있으며, PLC β 1 단백질 수준을 증가시키면 AD 마우스에서 맥락적 공포 기억 손상을 회복할 수 있음을 의미한다.
- [0185] 또한, 도 5에 나타난 바와 같이, PLC 활성화제에 의해 유도된 PLC-eCB 합성 및 분비 경로의 회복으로 인한 장기 시냅스 가소성이 회복되며, 공포기억의 손상도 정상수준으로 회복된 것을 확인하였다.
- [0187] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

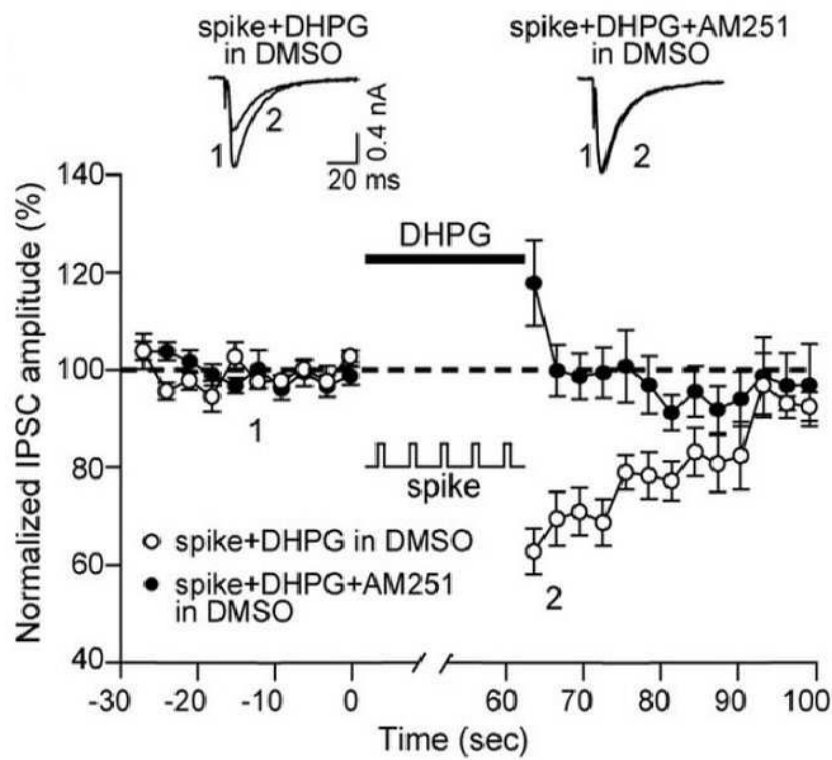
도면1a



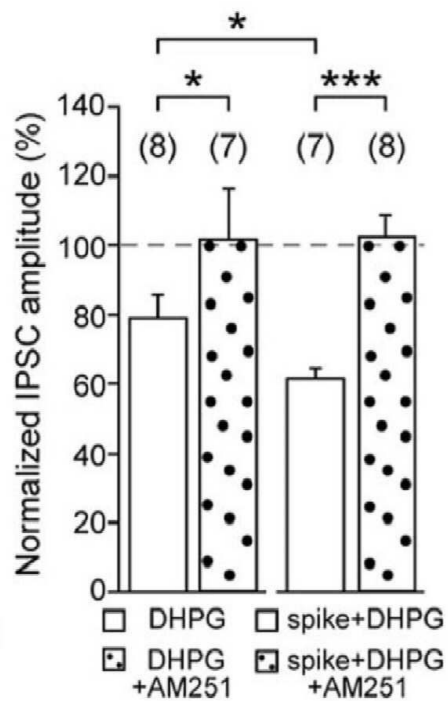
도면1b



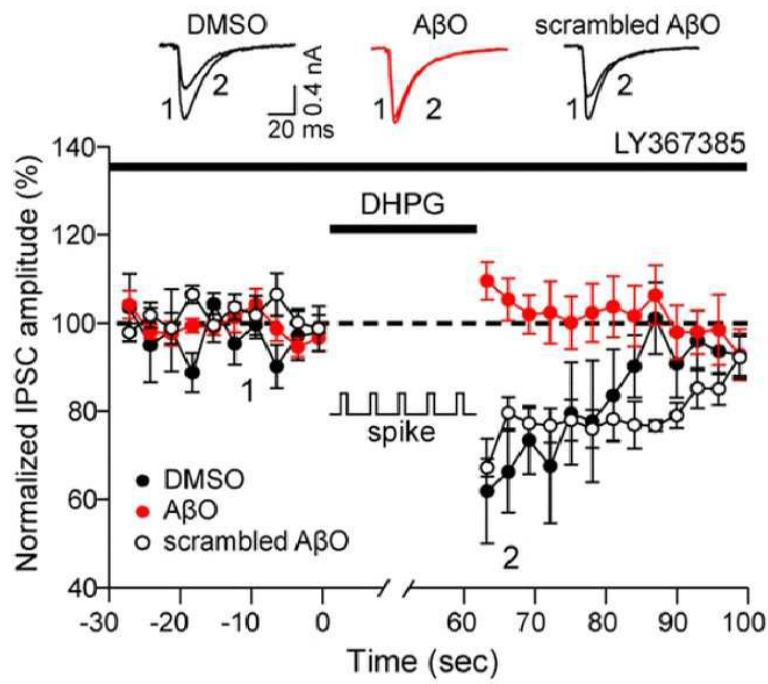
도면1c



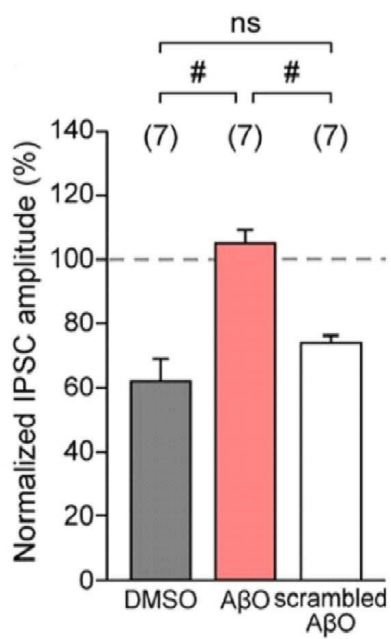
도면1d



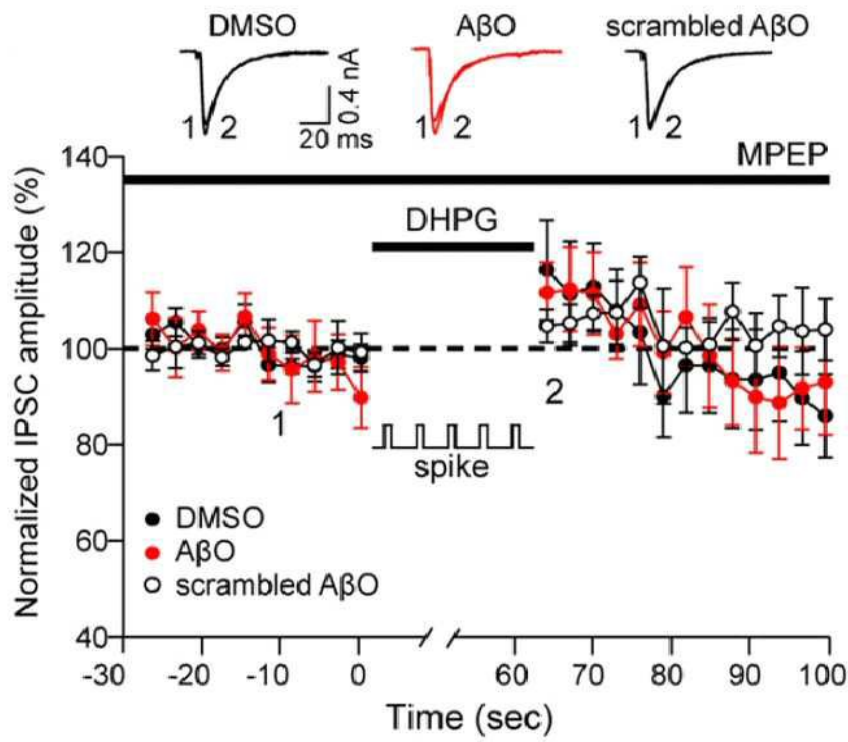
도면1e



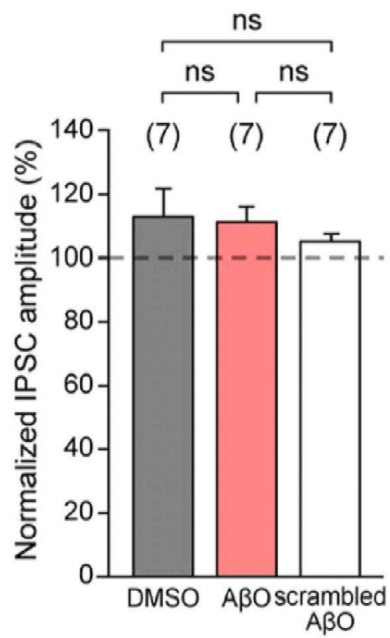
도면1f



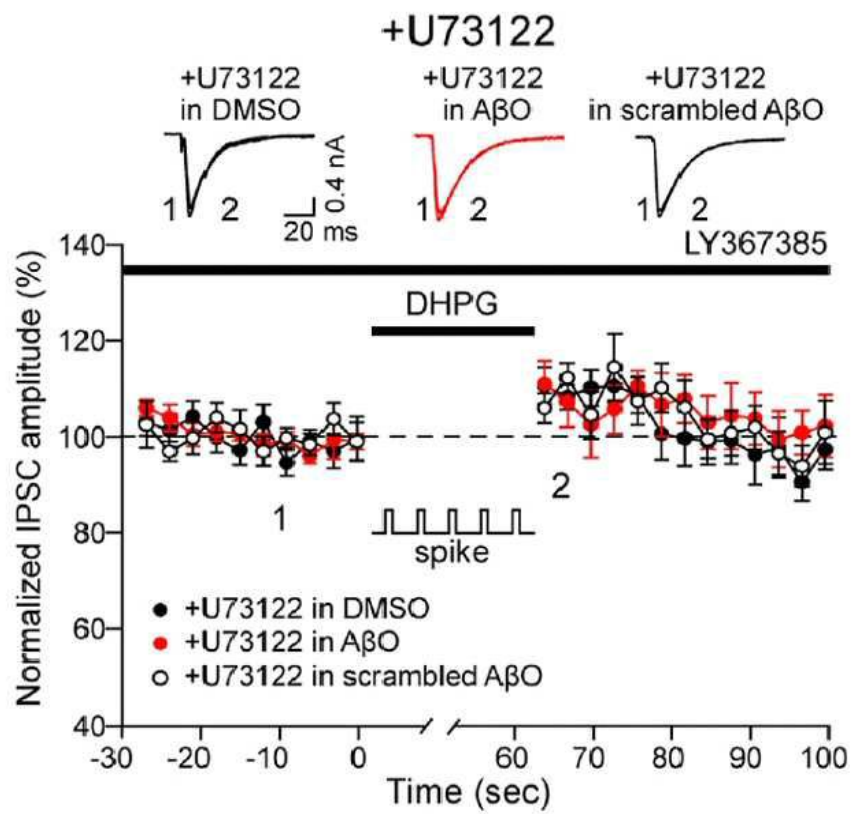
도면1g



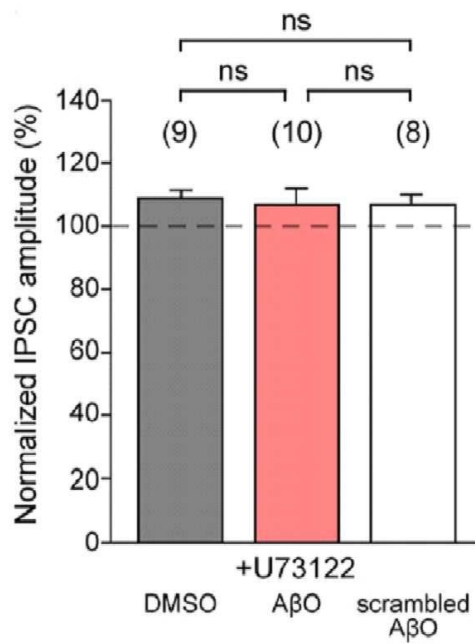
도면1h



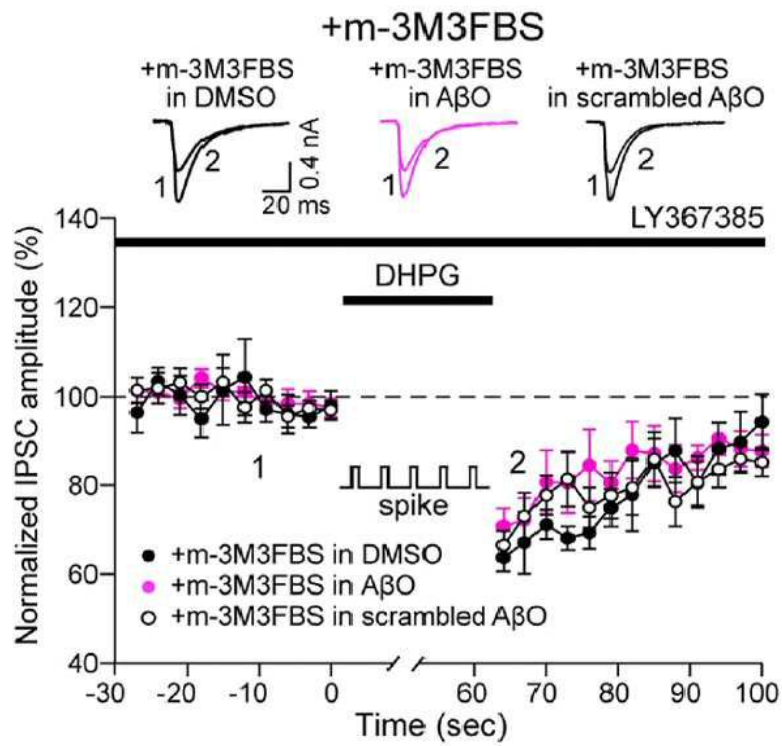
도면2a



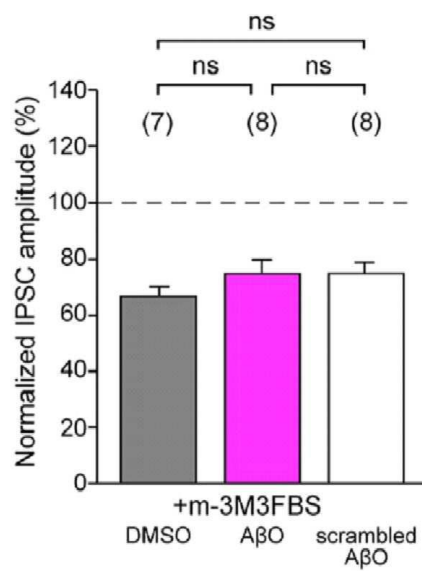
도면2b



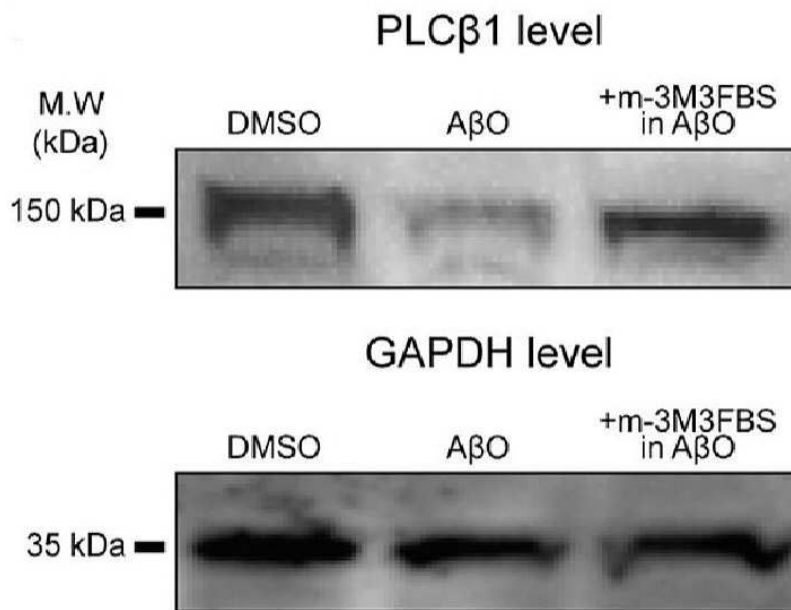
도면2c



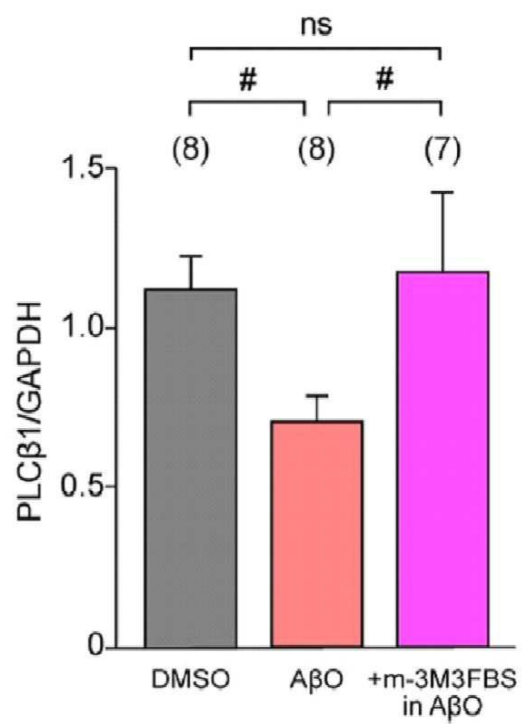
도면2d



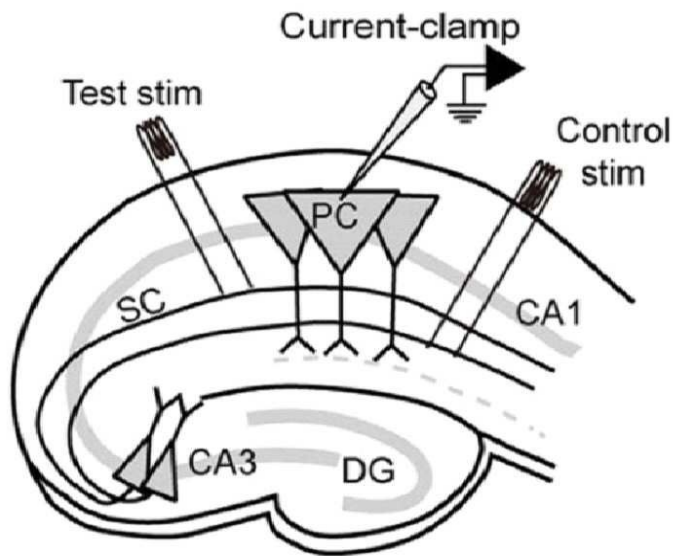
도면2e



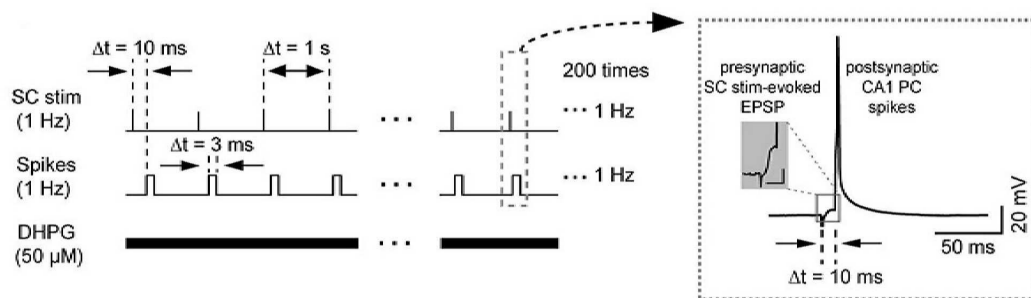
도면2f



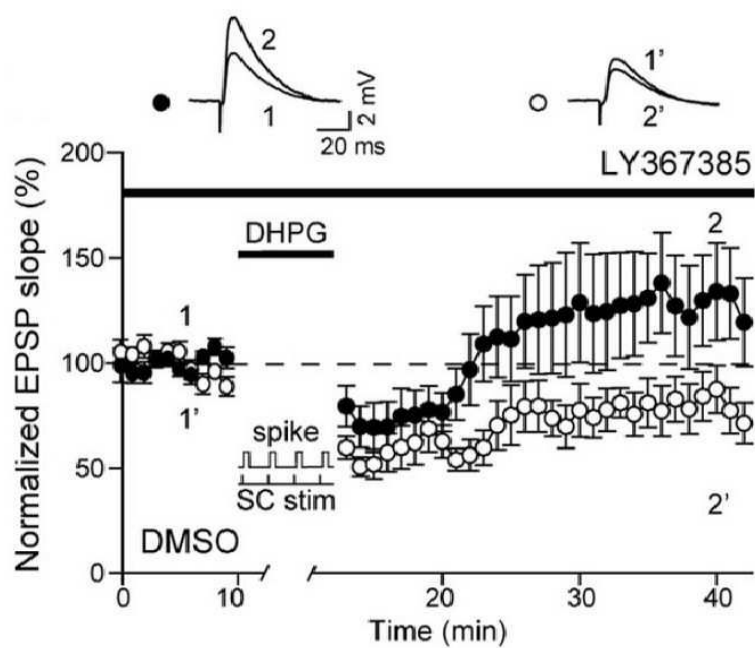
도면3a



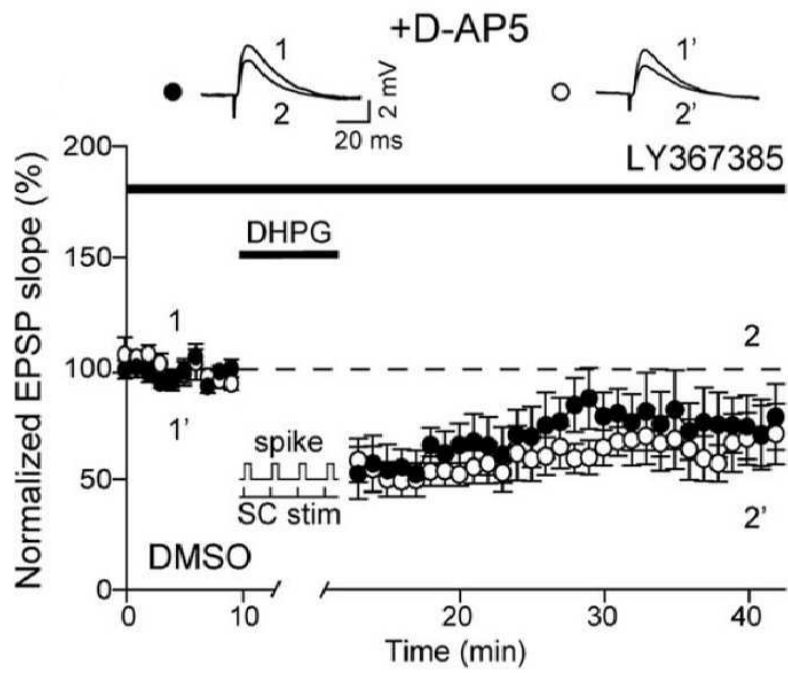
도면3b



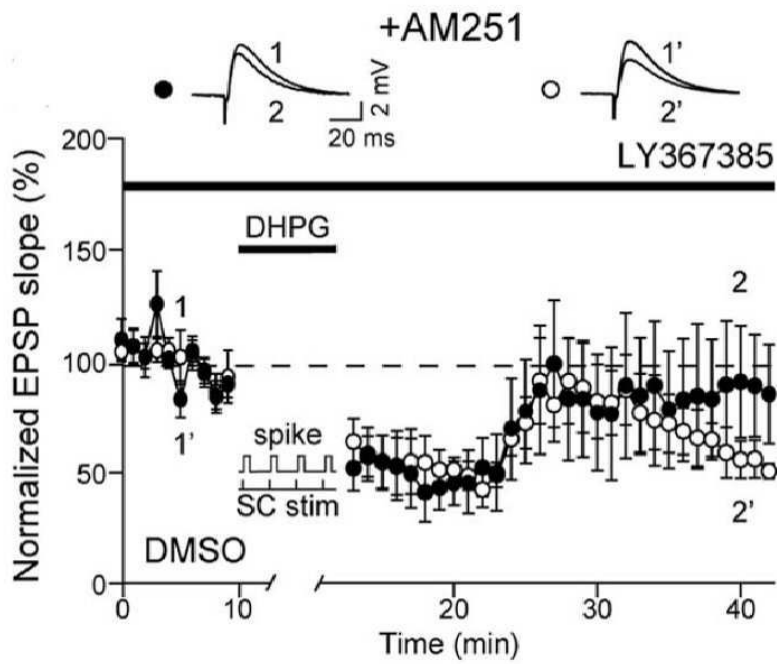
도면3c



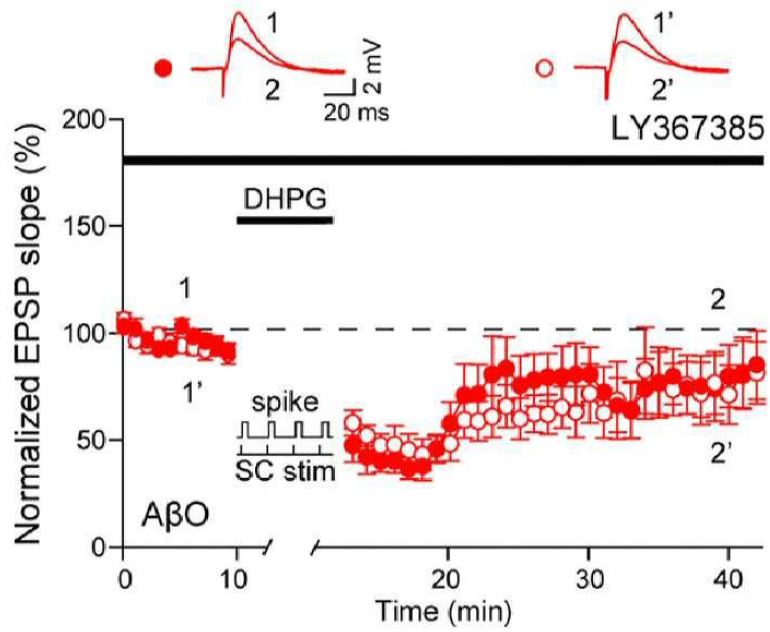
도면3d



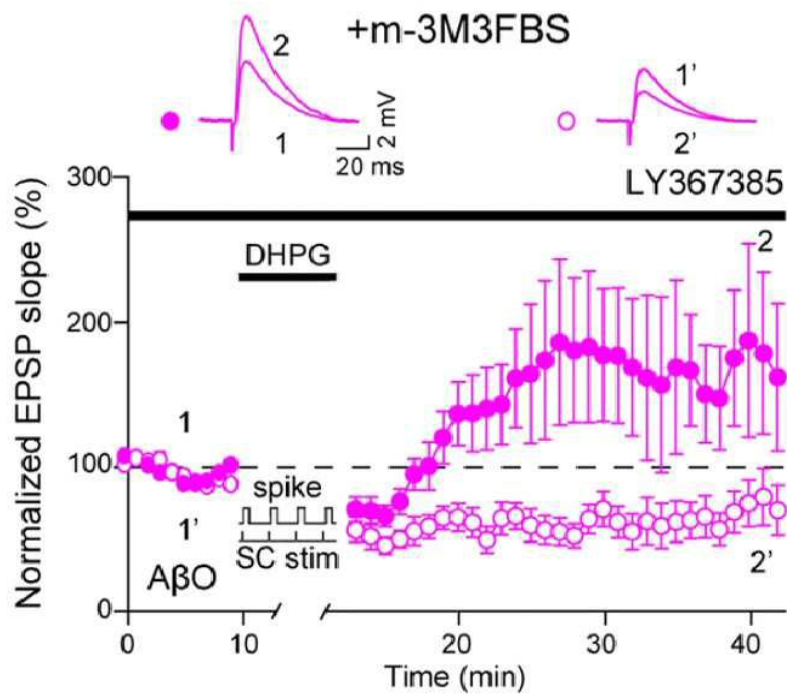
도면3e



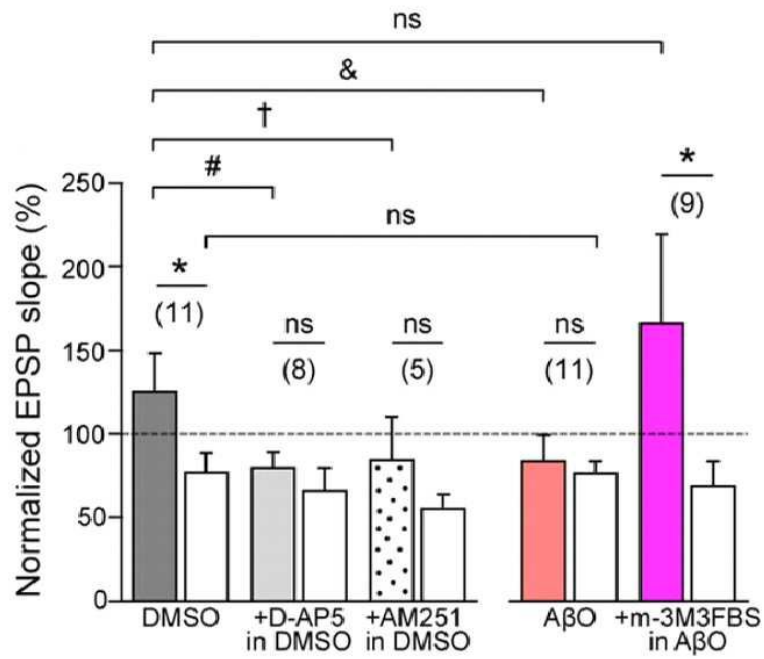
도면3f



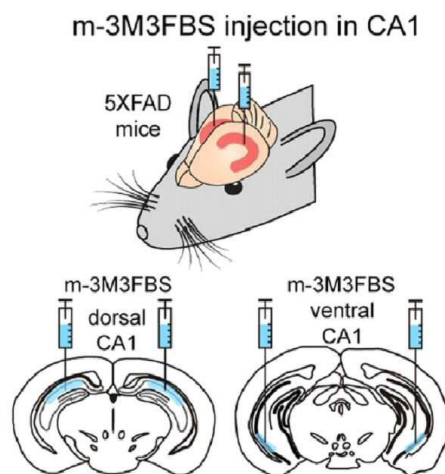
도면3g



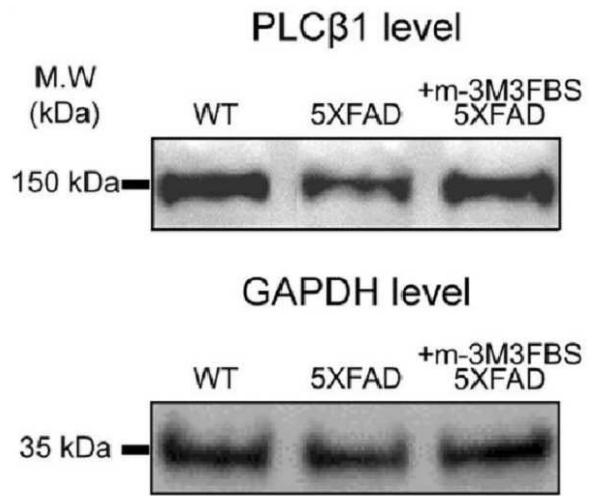
도면3h



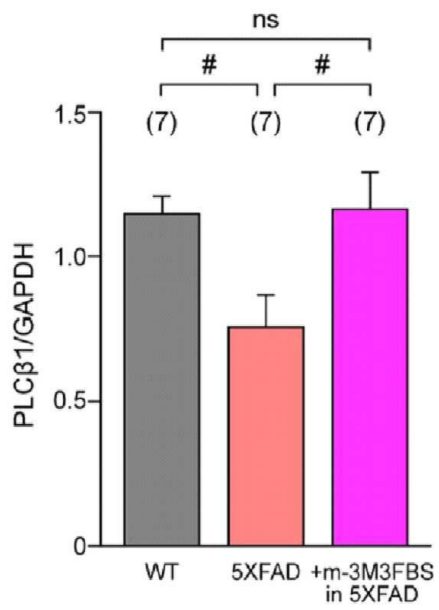
도면4a



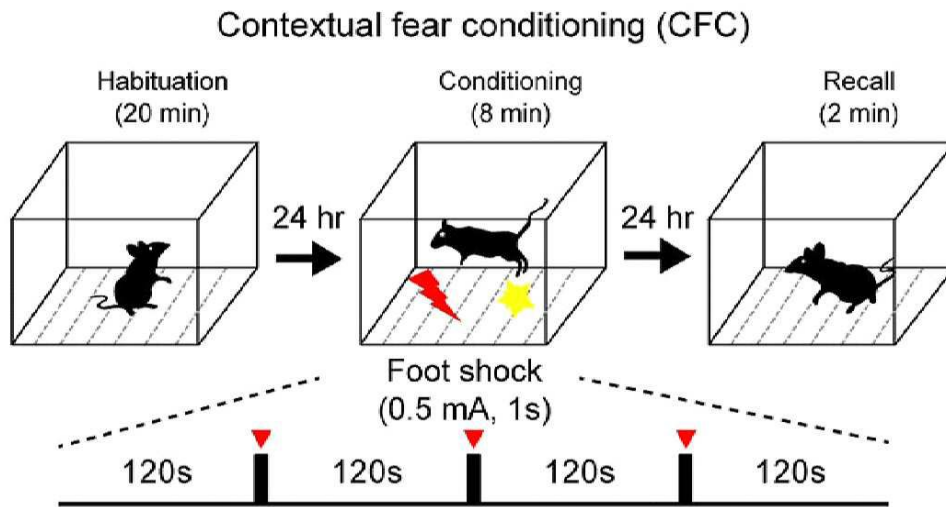
도면4b



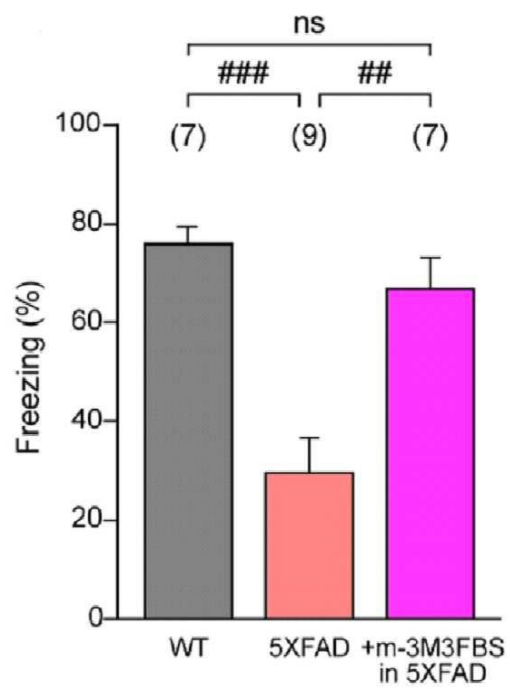
도면4c



도면4d



도면4e



도면5

