



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0103904
(43) 공개일자 2016년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/132 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/132 (2013.01)
A23L 1/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0130921
(22) 출원일자 2015년09월16일
심사청구일자 2015년09월16일
(30) 우선권주장
1020150026202 2015년02월25일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
임미희
울산광역시 남구 대학로 164 웰즈타워 102동 140
2호
(74) 대리인
특허법인태백

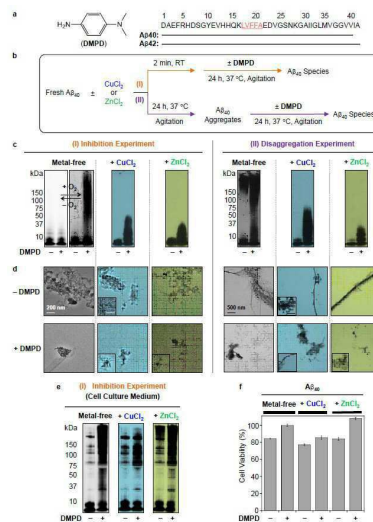
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 다중 타겟을 표적으로 하는 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 알츠하이머병과 같은 퇴행성 뇌질환의 치료효율을 보다 향상시키기 위한 다중 타겟을 표적으로 하는 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 약학조성물에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물은 아밀로이드 베타 펩타이드의 집합과정을 구리 또는 아연과 같은 금속속이 있거나 없는 모든 조건에서 독성을 나타내지 않는 집합체 형성으로 유도할 뿐 아니라, 아밀로이드 베타 펩타이드, 금속-아밀로이드 베타 펩타이드, 금속 및 활성화 산화종 등 알츠하이머병의 다중 타겟에 한꺼번에 반응하여 독성을 억제할 수 있기 때문에 알츠하이머병을 포함한 퇴행성 뇌질환에서 매우 유용한 치료제 또는 건강식품으로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/16 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A2A2A01004877

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 핵심연구(개인)

연구과제명 (미래1차)노령화 사회를 위한 신개념 신약 개발-멀티타겟 치매치료제 개발

기 여 율 1/2

주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2014.10.07 ~ 2016.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014S1A2A2028270

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 글로벌연구네트워크 지원

연구과제명 이상 접힌 단백질을 타겟할 수 있는 저분자 화합물의 다각적 연구

기 여 율 1/2

주관기관 국립대학법인 울산과학기술대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

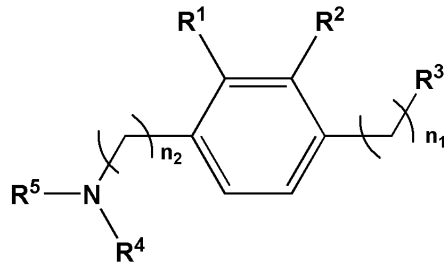
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 약학조성물:

[화학식 1]



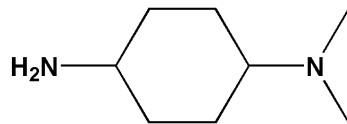
화학식 1에서,

R^1 내지 R^3 은 각각 서로 동일하거나 다르며, 수소, 할로젠, 디(C1 내지 C4의 알킬)아미노 또는 카르복실 중에서 선택된 어느 하나이고,

R^4 및 R^5 는 각각 서로 동일하거나 다르며, 수소 또는 C1 내지 C4의 알킬 중에서 선택된 어느 하나이고,

n_1 및 n_2 는 각각 서로 동일하거나 다르며, 0 또는 1의 정수임.

[화학식 2]



청구항 2

청구항 1에 있어서,

화학식 1에서 R^1 내지 R^2 는 수소, 할로젠 또는 디(C1 내지 C4의 알킬)아미노 중에서 선택된 어느 하나이고, R^3 은 수소, 디(C1 내지 C4의 알킬)아미노 또는 카르복실 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

화학식 1에서 R^1 내지 R^3 중 하나의 치환기는 디메틸아미노 또는 카르복실 중에서 선택되며, 나머지 치환기들은 각각 동일하거나 다르며, 수소 또는 할로겐에서 선택된 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물은 N,N-디메틸-p-페닐렌디아민[N,N-dimethyl-p-phenylenediamine], N¹,N¹-디메틸벤젠-1,2-디아민[N¹,N¹-dimethylbenzene-1,2-diamine], N¹,N¹-디메틸벤젠-

1,3-디아민[N¹,N¹-dimethylbenzene-1,3-diamine], 4-(아미노메틸)-N,N-디메틸아닐린[4-(aminomethyl)-N,N-dimethylaniline], 4-((디메틸아미노)메틸)아닐린[4-((dimethylamino)methyl)aniline], N¹,N¹-디메틸-1,4-사이클로헥산디아민[N¹,N¹-dimethyl-1,4-cyclohexanediamine], 4-(디메틸아미노)벤조산[4-(dimethylamino)benzoic acid], 4-아미노벤조산[4-aminobenzoic acid], 2-(4-(디메틸아미노)페닐)아세트산[2-(4-(dimethylamino)phenyl)acetic acid], 2-(4-아미노페닐)아세트산[2-(4-aminophenyl)acetic acid], 2-플루오로-N¹,N¹-디메틸벤젠-1,4-디아민[2-fluoro-N¹,N¹-dimethylbenzene-1,4-diamine] 및 3-플루오로-N¹,N¹-디메틸벤젠-1,4-디아민[3-fluoro-N¹,N¹-dimethylbenzene-1,4-diamine]으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물은 아밀로이드 베타 펩타이드의 집합과정을 금속이 있거나 없는 조건에서 독성을 나타내지 않는 집합체 형성으로 유도하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물은 아밀로이드 베타 펩타이드, 금속-아밀로이드 베타 펩타이드, 금속 및 활성화 산화종을 포함한 알츠하이머병의 다중 타겟에 한꺼번에 반응하여 독성을 억제하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 7

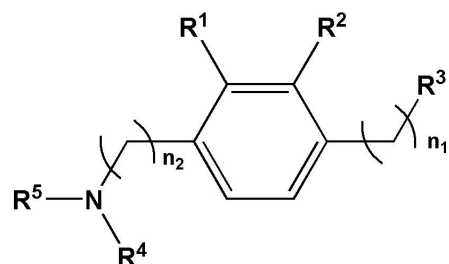
청구항 1에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭병, 치매, 헌팅턴 질환, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 중풍, 뇌졸중 및 경도 인지장애로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 약학조성물.

청구항 8

하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품:

[화학식 1]



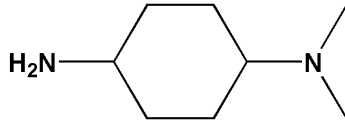
화학식 1에서,

R¹ 내지 R³은 각각 서로 동일하거나 다르며, 수소, 할로젠, 디(C1 내지 C4의 알킬)아미노 또는 카르복실 중에서 선택된 어느 하나이고,

R⁴ 및 R⁵는 각각 서로 동일하거나 다르며, 수소 또는 C1 내지 C4의 알킬 중에서 선택된 어느 하나이고,

n₁ 및 n₂는 각각 서로 동일하거나 다르며, 0 또는 1의 정수임.

[화학식 2]



청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭병, 치매, 헌팅턴 질환, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 중풍, 뇌졸중 및 경도 인지장애로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알츠하이머병과 같은 퇴행성 뇌질환의 치료효율을 보다 향상시키기 위한 다중 타겟을 표적으로 하는 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 약학조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 퇴행성 뇌질환(degenerative brain disease)은 뇌신경세포가 제 기능을 하지 못하게 되면서 생기는 노화와 관계되는 질병이며, 노령화 인구의 급속한 증가와 더불어 퇴행성 뇌질환에 대한 사회적 관심이 커지고 있다.

[0003] 퇴행성 뇌질환은 임상적으로 나타나는 주요 증상과 침범되는 뇌 부위를 고려하여 구분되며, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 다발성 경화증 및 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 등이 포함된다.

[0004] 알츠하이머병은 중추신경, 특히 전뇌(whole brain), 소뇌편도(amygdala), 해마(hippocampus) 및 대뇌피질 같은 피질과 변연계(limbic system)의 신경을 파괴하는데 이들은 뇌에서 학습, 기억, 사고, 행동, 감정조절 등과 관련된 부위이다. 특히 알츠하이머병에서 아세틸콜린과 같은 신경전달물질의 부족이 가장 중요한 지표이며 이것을 회복시키는 것이 알츠하이머병 치료목표의 하나가 되고 있다.

[0005] 알츠하이머병으로서 부교감신경성 약물은 무스카린 효능제 또는 니코틴 효능제, 콜린에스테라아제 억제제(ChEIs), 간접적으로 아세틸콜린 유리를 조절하는 약물들로 나눌 수 있다. 이들 중 ChEIs로서 많은 약물들이 개발되어 사용되어지고 있는데 타크린(tacrine), 피소스티그민(physostigmine), 도네페질(donepezil), 리바스티그민(rivastigmin)과 메만틴(memantin)이 알려져 있다.

[0006] 도네페질(donepezil), 리바스티그민(rivastigmin) 등과 같은 제 2세대 약제들은 타크린과 같은 제 1세대 약제에 비해 작용시간이 길고 안정적이며 혈액-뇌 관문(BBB) 투과율이 높아서 중추신경 내 농도가 높은 경향이 있다. 제 1세대 약제는 AChE, 부티릴콜린에스테라아제(butyrylcholinesterase), 다른 말초 콜린에스테라아제를 비선택적으로 억제하는 반면, 몇몇 새로운 약제들은 AChE에 대한 선택성이 높아 말초부작용의 발생이 감소한다고 알려져 있다. 이러한 약제들의 작용기전은 아세틸콜린(ACh)의 분해를 억제함으로써 시냅스 내의 ACh 농도를 증가시키는 것에 기인하는 것으로 알려져 있다.

[0007] 이러한 종래 알츠하이머병의 치료제들은 장기간 사용으로 인한 부작용이 심각하므로, 종래 약리효능과 유사하거나 더 좋으면서 부작용이 적은 새로운 약제의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제20100-009415호 (2010.01.27 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

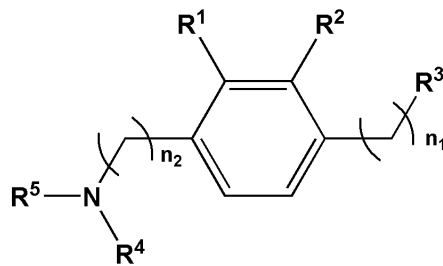
[0009] 본 발명의 목적은 알츠하이머병과 같은 퇴행성 뇌질환의 치료효율을 보다 향상시키기 위한 다중 타겟을 표적으로 하는 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 다중 타겟을 표적으로 하는 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공한다:

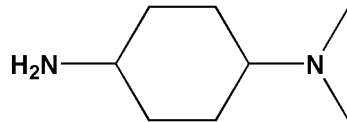
[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] 화학식 1에서, R^1 내지 R^3 은 각각 서로 동일하거나 다르며, 수소, 할로젠, 디(C1 내지 C4의 알킬)아미노 또는 카르복실 중에서 선택된 어느 하나이고, R^4 및 R^5 는 각각 서로 동일하거나 다르며, 수소 또는 C1 내지 C4의 알킬 중에서 선택된 어느 하나이고, n_1 및 n_2 는 각각 서로 동일하거나 다르며, 0 또는 1의 정수일 수 있다.

[0015] [화학식 2]



[0016]

[0017] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 알츠하이머병과 같은 퇴행성 뇌질환의 치료효율을 보다 향상시키기 위한 다중 타겟을 표적으로 하는 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료제로서, 본 발명에 따른 화합물은 아밀로이드 베타 펩타이드의 집합과정을 구리 또는 아연과 같은 금속이 있거나 없는 모든 조건에서 독성을 나타내지 않는 집합체 형성으로 유도할 뿐 아니라, 아밀로이드 베타 펩타이드, 금속-아밀로이드 베타 펩타이드, 금속 및 활성화 산화종 등 알츠하이머병의 다중 타겟에 한꺼번에 반응하여 독성을 억제할 수 있기 때문에 알츠하이머병을 포함한 퇴행성 뇌질환에서 매우 유용한 치료제 또는 건강식품으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 다양한 조건에서 금속이 없거나 금속 유도 $A\beta_{40}$ 응집에 대한 N,N-디메틸-p-페닐렌디아민[N,N-dimethyl-p-phenylenediamine; DMPD]의 효과와, 금속이 없거나 금속 처리 $A\beta_{40}$ 촉발 세포독성에 대한 DMPD의 효과를 검토한 것이다.

도 2는 DMPD와 단량체 $A\beta_{40}$ 간의 상호작용을 나타낸 것이다.

도 3은 DMPD와 Zn(II) 간의 결합을 나타낸 것이다.

도 4는 Cu(I)-/Cu(II)-A β 피브릴과 DMPD 간의 상호작용을 구리 K-경계 X-선 흡수 분광 분석을 통해 나타낸 것이다.

도 5는 Cu(II) 또는 A β_{40} 의 존재 유무에 따른 DMPD의 변형을 UV-vis로 모니터링한 것이다.

도 6은 DMPD와 A β_{40} 의 상호작용에 따른 결과물을 질량 분석과 이온 이동 분광 질량 분석을 통해 나타낸 것이다.

도 7은 마우스에 DMPD를 투여한 후, 뇌의 A β_{40} /A β_{42} 양과 아밀로이드 침착 부하를 조직병리학적으로 평가한 것이다.

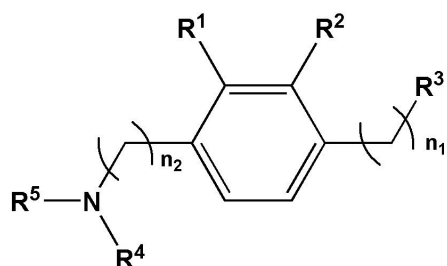
도 8은 마우스에 DMPD를 투여한 후, 인지 장애 개선 효과를 검토한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

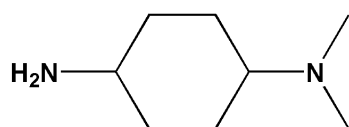
본 발명은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 치료 또는 예방용 약학조성물을 제공한다:

[화학식 1]



화학식 1에서, R¹ 내지 R³은 각각 서로 동일하거나 다르며, 수소, 할로젠, 디(C1 내지 C4의 알킬)아미노 또는 카르복실 중에서 선택된 어느 하나이고, R⁴ 및 R⁵는 각각 서로 동일하거나 다르며, 수소 또는 C1 내지 C4의 알킬 중에서 선택된 어느 하나이고, n₁ 및 n₂는 각각 서로 동일하거나 다르며, 0 또는 1의 정수일 수 있다.

[화학식 2]



화학식 1에서 R¹ 내지 R²는 수소, 할로젠 또는 디(C1 내지 C4의 알킬)아미노 중에서 선택된 어느 하나이고, R³은 수소, 디(C1 내지 C4의 알킬)아미노 또는 카르복실 중에서 선택된 어느 하나일 수 있다.

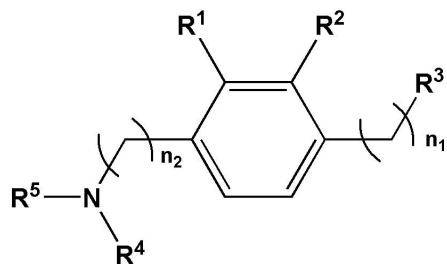
그리고, 화학식 1에서 R¹ 내지 R³ 중 하나의 치환기는 디메틸아미노 또는 카르복실 중에서 선택되며, 나머지 치환기들은 각각 동일하거나 다르며, 수소 또는 할로젠에서 선택될 수 있다.

또한, 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물은 N,N-디메틸-p-페닐렌디아민[N,N-dimethyl-p-phenylenediamine], N¹,N¹-디메틸벤젠-1,2-디아민[N¹,N¹-dimethylbenzene-1,2-diamine], N¹,N¹-디메틸벤젠-1,3-디아민[N¹,N¹-dimethylbenzene-1,3-diamine], 4-(아미노메틸)-N,N-디메틸아닐린[4-(aminomethyl)-N,N-dimethylaniline], 4-((디메틸아미노)메틸)아닐린[4-((dimethylamino)methyl)aniline], N¹,N¹-디메틸-1,4-사이클로헥산디아민[N¹,N¹-dimethyl-1,4-cyclohexanediamine], 4-(디메틸아미노)벤조산[4-(dimethylamino)benzoic acid], 4-아미노벤조산[4-aminobenzoic acid], 2-(4-(디메틸아미노)페닐)아세트산[2-(4-(dimethylamino)phenyl)acetic acid], 2-(4-아미노페닐)아세트산[2-(4-aminophenyl)acetic acid], 2-플루오로-

N^1, N^1 -디메틸벤젠-1,4-디아민[2-fluoro-N1,N1-dimethylbenzene-1,4-diamine] 및 3-플루오로- N^1, N^1 -디메틸벤젠-1,4-디아민[3-fluoro-N1,N1-dimethylbenzene-1,4-diamine]으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

- [0030] 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물은 아밀로이드 베타 펩타이드의 집합과정을 구리 또는 아연과 같은 금속이 있거나 없는 모든 조건에서 독성을 나타내지 않는 집합체 형성으로 유도할 뿐 아니라, 아밀로이드 베타 펩타이드, 금속-아밀로이드 베타 펩타이드, 금속 및 활성화 산화중 등 알츠하이머병의 다중 타겟에 한꺼번에 반응하여 독성을 억제할 수 있기 때문에 알츠하이머병을 포함한 퇴행성 뇌질환에서 매우 유용한 치료제 또는 건강식품으로 이용될 수 있다.
- [0031] 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭병, 치매, 헌팅턴 질환, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 중풍, 뇌졸중 및 경도 인지장애로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 알츠하이머 질환일 수 있다.
- [0032] 상기 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 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 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [0034] 본 발명에 따른 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0035] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다.
- [0036] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 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.
- [0037] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 약학조성물의 유효성분인 화합물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중, 질환에 따라 달라질 수 있으나, 0.001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.01 내지 10 mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명에 따른 화합물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0040] 상기 약학조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 기관지내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다:

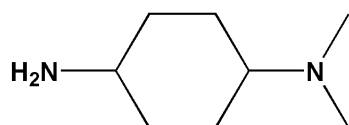
[0042] [화학식 1]



[0043]

[0044] 화학식 1에서, R^1 내지 R^3 은 각각 서로 동일하거나 다르며, 수소, 할로젠, 디(C1 내지 C4의 알킬)아미노 또는 카르복실 중에서 선택된 어느 하나이고, R^4 및 R^5 는 각각 서로 동일하거나 다르며, 수소 또는 C1 내지 C4의 알킬 중에서 선택된 어느 하나이고, n_1 및 n_2 는 각각 서로 동일하거나 다르며, 0 또는 1의 정수일 수 있다.

[0045] [화학식 2]



[0046]

[0047] 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭병, 치매, 헌팅턴 질환, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 중풍, 뇌졸중 및 경도 인지장애로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나일 수 있다.

[0048] 또한, 상기 건강식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강식품은 유효성분인 본 발명에 따른 화합물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적절하게 결정될 수 있다.

[0049] 상기 건강식품에 함유된 화합물의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.

[0050] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

[0051] 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.

[0052] <참조예> 시약 및 기기 등 준비

[0053] 모든 시약은 상업적 업체로부터 구입하였으며, 달리 명시되어 있지 않은 한 그대로 사용하였다. N,N-디메틸-p-페닐렌디아민[N,N-dimethyl-p-phenylenediamine; DMPD]은 Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Aβ₄₀와 Aβ₄₂는 AnaSpec(Fremont, CA, USA)에서 구매하였다(Aβ₄₂ = DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA).

[0054] Agilent 8453 UV-visible(UV-vis) 분광광도계(Santa Clara, CA, USA)는 광 스펙트럼(optical spectra)을 측정하기 위하여 사용하였으며, 혐기성 반응은 N₂가 채워진 글로브 박스(Korea Kiyon, Bucheon-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea) 내에서 실시하였다. 열역학적 파라미터는 VP 등온 적정 열량계(VP isothermal titration calorimeter, MicroCal, Northampton, MA, USA)로 측정하였다.

[0055] 투과 전자 현미경(Transmission electron microscopic, TEM) 이미지는 필립스 CM-100 투과 전자 현미경(Philips CM-100 transmission electron microscope, Microscopy and Image Analysis Laboratory, University

of Michigan, Ann Arbor, MI, USA) 또는 JEOL JEM-2100 투과 전자 현미경(transmission electron microscope, UNIST Central Research Facilities, Ulsan National Institute of Science and Technology, Ulsan, Republic of Korea)을 사용하여 얻었다.

[0056] 세포 생존을 분석을 위한 흡광도 값은 SpectraMax M5 마이크로 플레이트 리더(Molecular Devices, 서니 베일, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

[0057] Bruker HCT basic system mass spectrometer는 전기분무 이온화(electrospray ionization, ESI) 이온 소스(ion source)를 구비하며, A β 와 함께 배양한 DMPD의 시간에 따른 질량 스펙트럼을 얻기 위하여 사용하였다.

[0058] 모든 이온 이동성 질량 분석(ion mobility-mass spectrometry, IM-MS) 실험은 Synapt G2(Waters, Milford, MA, USA)에서 수행되었다.

[0059] Zn(II)이 있거나 없는 경우 DMPD의 NMR 분석은 400 MHz Agilent NMR 분광계를 이용하여 수행하였으며, DMPD와 A β 의 NMR 분석은 TCI triple-resonance inverse detection CryoProbe(Michigan State University, Lansing, MI, USA)를 구비한 900 MHz Bruker 분광광도계를 이용하여 수행하였다.

[0060] <실시예 1> A β 응집에 대한 DMPD의 영향 분석

[0061] 1) A β 응집 실험

[0062] A β 에 대한 실험은 기존 공지된 방법(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 21990-21995, 2010; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 3743-3748, 2013; *J. Am. Chem. Soc.* 136, 299-310, 2014; *J. Am. Chem. Soc.* 131, 16663-16665, 2009; *Inorg. Chem.* 51, 12959-12967, 2012)에 따라 실시하였다.

[0063] A β_{40} 또는 A β_{42} 는 수산화암모늄(ammonium hydroxide, NH₄OH, 1% v/v aq)에 용해한 후 나누어 밤새도록 동결건조하여 -80 °C에서 보관하였다. 본 실험을 위해 A β 의 스탁 용액은 1% NH₄OH(10 μ L) 중에 동결건조 펩타이드를 용해시키고 ddH₂O(deionized distilled water)로 희석하여 제조하였다.

[0064] 용액 내의 A β 펩타이드의 농도는 280 nm에서 용액의 흡광도를 측정하여 결정하였다($\epsilon = 1450 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for A β_{40} ; $\epsilon = 1490 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for A β_{42}).

[0065] 상기 펩타이드 스탁 용액은 HEPES[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid; 20 μ M; pH 6.6 for Cu(II) samples; pH 7.4 for metal-free and Zn(II) samples]과 NaCl(150 μ M)을 함유한 Chelex가 처리된 완충 용액(buffered solution)에서 최종 농도 25 μ M로 희석되었다.

[0066] A β 응집체 형성 억제에 대한 DMPD의 영향을 검토하기 위해, 도 1b의 (i)와 같이 금속 염화물 염(CuCl₂ 또는 ZnCl₂, 25 μ M)이 존재하거나 존재하지 않는 2가지의 경우에 A β 의 샘플(25 μ M)에 DMPD(50 μ M; 1% v/v dimethyl sulfoxide (DMSO))를 첨가하고 24시간 동안 일정하게 교반하면서 37 °C에서 반응시켰다.

[0067] A β 응집체 분해에 대한 DMPD의 영향을 검토하기 위해, 도 1b의 (ii)와 같이 DMPD(50 μ M)의 처리 이전에, A β 를 금속 이온이 존재하거나 존재하지 않는 2가지 경우로 준비하여 일정한 속도로 교반하며 24시간 동안 37 °C에서 반응시켰다.

[0068] 2) 겔 전기영동 및 웨스턴 블롯

[0069] A β 응집체 형성 억제 및 분해 실험에서 샘플은 항-A β 항체(anti-A β antibody, 6E10)를 이용하여 겔 전기영동과 웨스턴 블롯으로 분석하였다.

[0070] 각 샘플(10 μ L)는 10 내지 20% 트리스-트리신 겔(Tris-tricine gel, Invitrogen, Grand island, NY, USA) 상에서 분리하고, 분리된 단백질 샘플은 0.1% Tween-20을 함유한 트리스 완충 생리식염수(TBS-T, 1.00 mM Tris base, pH 8.0, 1.50 mM NaCl)에서 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA, 3% w/v, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)으로 블로킹된 나이트로셀룰로오스 멤브레인으로 실온에서 2시간 동안 이동시켰다.

[0071] 그 후 멤브레인을 2% w/v BSA(in TBS-T)의 용액에 포함된 일차 항체(6E10, Covance, Princeton, NJ, USA; 1:2000)와 함께 밤새도록 4 °C에서 반응시켰다. TBS-T로 세정한 후(10분간, 3번), 이를 2% w/v BSA(in TBS-T) 용액 내의 호올라디쉬 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase)가 결합된 염소 항 마우스(goat anti-mous) 이차

항체(1:5000; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA)와 1시간 동안 실온에서 반응시켰다.

[0072] 그 후, 슈퍼시그널 웨스트 피코 화학발광 기질(SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질 밴드를 시각화하였다.

[0073] 3) 투과 전자 현미경(Transmission Electron Microscopy (TEM))

[0074] 실온에서 2분간 글로우-방전된 그리드(Glow-discharged grids, Formar/Carbon 300-mesh, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA)에 억제 및 분해 실험에서의 A β 샘플을 처리하였다.

[0075] 과량의 완충액은 필터 페이퍼와 블롯팅을 이용하여 신중히 제거하였고, ddH₂O로 두 번 세척하였으며, 각 그리드는 우라닐 아세테이트 염색 용액(1% w/v ddH₂O, 5 mL)에서 1 분 동안 반응시켰다. 과량의 염색 용액은 빨아들인 후, 그리드를 적어도 20분 동안 실온에서 공기 건조시켰다.

[0076] 각 샘플의 이미지는 Philips CM-100(80 kV) 또는 JEOL JEM-2100 TEM(200 kV)를 이용하여 25,000x 확대 촬영하였다.

[0077] 4) 세포 생존 능력 측정

[0078] 인간 신경아세포종(human neuroblastoma)인 SK-N-BE(2)-M17(M17) 세포주는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다.

[0079] 세포는 Minimum Essential Media(MEM; GIBCO, Life Technologies, Grand Island, NY, USA)과 Ham's F12K Kaighn's Modification Media(F12K; GIBCO)이 1:1로 함유된 배지, 10% (v/v) 소태아 혈청(fetal bovine serum, FBS, Atlanta Biologicals, Flowery Branch, GA, USA), 100 U/mL 페니실린(penicillin, GIBCO), 및 100 mg/mL 스트렙토마이신(streptomycin, GIBCO)이 포함된 배지에서 유지하였으며, 5% CO₂가 공급되는 37 °C의 습도가 유지된 환경에서 성장시키고, 유지하였다.

[0080] M17 세포는 기존 공지된 방법(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 21990-21995, 2010; *J. Am. Chem. Soc.* 131, 16663-16665, 2009)에 따라 96웰-플레이트에 각 웰당 15,000 cells/100 μ L의 양으로 분주하였다.

[0081] 이때, 세포에 CuCl₂ 또는 ZnCl₂(1:1 금속/리간드 비율)의 존재 또는 비존재, A β ₄₀ 존재 또는 비존재(A β : 금속 : 리간드 = 10 : 10 : 20 μ M) 하에 다양한 농도의 DMPD(0-10 μ M, 1% v/v DMSO)를 처리하여 실험하였다.

[0082] 37 °C에서 24시간 동안 배양 후, 25 μ L의 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; 5 mg/mL를 첨가한 인산완충식염수(phosphate buffered saline, PBS, pH7.4, GIBCO)를 각 웰에 첨가해 주고 37 °C에서 4시간 동안 반응시켰다.

[0083] 세포에 의해 형성된 포르마잔(Formazan)을 N,N-디메틸포름아미드(N,N-dimethylformamide, DMF, 50% v/v aq, pH 4.5)와 소듐 도데실 설페이트(sodium dodecyl sulfate, SDS, 20% w/v)을 포함한 용액에 밤새도록 실온에서 용해시키고, 마이크로플레이트 리더(microplate reader)로 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0084] 5) 실험 결과

[0085] 응집체 형성 억제 실험에서 DMPD를 처리하지 않은 군과 비교할 때 금속이 있거나 없는 DMPD 처리된 A β ₄₀/A β ₄₂에서 다른 분자량 분포를 나타내었으며(도 1c 왼쪽), 무정형 A β 응집체가거나 좀더 짧고 더 분산된 피브릴을 나타내었다(도 1d 왼쪽). 그리고, 응집체 분해 실험에서 DMPD는 앞서 생성된 금속 없는 A β ₄₀/A β ₄₂ 응집체 및 금속-A β ₄₀/A β ₄₂ 응집체 변형에 주목할 만한 효과를 나타내며(도 1c 오른쪽), 금속이 있든 없든 A β ₄₂ 응집체에 대해 더 낮은 반응성을 나타내었고, DMPD가 처리된 샘플에서 무정형 A β 응집체, 더 짧은 피브릴 또는 2개의 A β 배열의 혼합물이 관찰되었다(도 1d 오른쪽).

[0086] 그리고, 세포 배양배지에서 A β ₄₀에 DMPD를 처리한 경우에도 A β 종의 분자량 분포에서 구별되는 변화가 관찰되었다(도 1e). 따라서, DMPD의 처리가 금속이 없거나 금속으로 유도된 A β 응집체 형성에 있어서 A β 응집체 형성을 억제할 뿐 아니라, 이미 형성된 응집체를 상대적으로 더 작고 덜 구조화된 독성이 없는 A β 응집체로서 변형시킬 수 있었다.

[0087] 또한, DMPD를 A β ₄₀- 또는 금속-A β ₄₀-처리된 M17 세포에 도입한 경우에도 아무런 처리를 하지 않은 세포에 비해

10-20% 정도 세포 생존율을 증가하였다(도 1f).

[0088] <실시예 2> A β 와 DMPD 간의 상호작용 분석

[0089] DMPD의 금속 없는 A β 와의 상호작용을 등은 적정 열량계(ITC) 분석, 2D NMR 분광분석 및 MD 시뮬레이션의 방법으로 분석하였다.

[0090] 1) 등은 적정 열량계(Isothermal Titration Calorimetry, ITC) 분석

[0091] 20 mM HEPES(pH 7.4, 150 mM NaCl)에 용해시킨 DMPD(200 μ M, 10% v/v DMSO) 및 A β_{40} (20 μ M)의 용액을 리간드 용액으로 준비하며, 적정 전 10분 동안 탈기하여 ITC 분석을 수행하였다.

[0092] 리간드 용액(10 μ L)는 310 rpm에서 250 μ L의 주사기 회전을 이용하여 200초의 일정한 간격으로 1초, 25회 주입으로, 25 $^{\circ}$ C에서 A β_{40} 용액(1.4mL)에 적정하였다. 대조 실험으로, 희석용액의 열을 측정하기 위하여 동일한 적정 용액을 A β_{40} 과 함께 동일 완충액에 주입하였다.

[0093] 결합 값의 합리적인 열은 전체 열 변화에서 희석용액 값의 열을 빼서 계산하였다. 적정 데이터는 MicroCal Origin(v.7.0)을 이용하여 분석하였다. A β_{40} 에 결합에 따른 각 리간드의 K_a 의 값(결합 상수)과 ΔH (결합 열 교환)는 적절한 피팅 모델에서 측정하였다. 결합 곡선은 세 개의 결합 부위와 순차적 결합 모델에 가장 적합하였다. $-T\Delta S$ 와 ΔG 의 값은 깁스의 자유 에너지 관계(Gibb's free energy relationship)에서 계산하였다[($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$; $\Delta G = -RT \ln(K_a)$].

[0094] A β_{40} -DMPD 상호작용에 대한 열동력학적 파라미터는 하기 표 1과 같으며, A β_{40} -DMPD 간의 결합이 소수성 결합의 상당한 기여에 의해 열동력학적으로 유리한 것으로 나타났다.

[0095] [표 1]

Thermodynamic Parameters	Values
K_{a1} (M^{-1})	$2.85 \pm 0.88 \times 10^5$
K_{a2} (M^{-1})	$4.34 \pm 2.88 \times 10^4$
K_{a3} (M^{-1})	$3.73 \pm 2.22 \times 10^4$
ΔH_1 (kJ/mol)	-2.63 ± 0.35
ΔH_2 (kJ/mol)	4.79 ± 3.35
ΔH_3 (kJ/mol)	-35.0 ± 6.37
ΔG_1 (kJ/mol)	-31.1 ± 0.77
ΔG_2 (kJ/mol)	-26.5 ± 0.16
ΔG_3 (kJ/mol)	26.1 ± 0.15
$T\Delta S_1$ (kJ/mol)	28.5 ± 0.84
$T\Delta S_2$ (kJ/mol)	31.3 ± 0.37
$T\Delta S_3$ (kJ/mol)	-8.90 ± 0.65

[0096]

[0097] 2) 2D 밴드-선택적 최적화된 플립-각도 짧은 파도 신호(2D Band-Selective Optimized Flip-Angle Short Transient, SOFAST)-이종핵 다중 양성 상관관계 NMR 분광 분석(Heteronuclear Multiple Quantum Correlation (HMQC) NMR Spectroscopy)

[0098] NMR 적정 실험은 공지된 방법(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 3743-3748, 2013; *J. Am. Chem. Soc.* 136, 299-310, 2014; *Chem. Commun.* 50, 5301-5303, 2014)에 따라 수행하였다.

[0099] NMR 샘플은 1 mM NaOH(pH 10)의 100 μ L에서 펩타이드를 다시 현탁하여 1% NH₄OH에서 동결건조한 ¹⁵N-표지 A β ₄₀(¹⁵N-labeled A β ₄₀, rPeptide, Bogart, GA, USA)로 준비하였다.

[0100] 이때, 펩타이드는 최종 농도가 80 μ M이 되도록 하기 위해 200 mM의 인산 완충액(phosphate buffer, pH 7.4)와 1 M NaCl, D₂O 및 물로 희석하였다. 각각의 스펙트럼은 256 복합체 t1 포인트(256 complex t1 points)와 4 $^{\circ}$ C에서의 1초 리사이클 지연(recycle delay)을 이용하여 얻었다.

[0101] 2D 데이터는 탑스핀 2.1(TopSpin 2.1, Bruker, Billerica, MA, USA)을 이용하여 처리하였다. 공명주파수 지정은 지침(Biochem. Biophys. Res. Commun. 411, 312-316, 2011; Angew. Chem. Int. Ed. 50, 5110-5115, 2011)에 따라 A β 에 대해 발행된 지정을 이용한 컴퓨터를 이용한 공명주파수 지정(computer-aided resonance assignment, CARA)에 의하여 수행하였다.

[0102] 편집한 화학적 이동 변화(Compiled chemical shift perturbation, CSP)는 다음의 방정식을 사용하여 계산하였다:

$$\Delta\delta_{HB} = \sqrt{\left(\Delta\delta_H^2 + \left(\frac{\Delta\delta_N}{5}\right)^2\right)}$$

[0103]

[0104] DMPD를 ¹⁵N-표지 A β ₄₀로 적정하였을 때, 도 2a 및 도 2b와 같이 6개의 아미노산 잔기 특히 L17, F20, G33, G37, V39 및 V40에서 상당히 주목할 만한 화학적 이동 변화값(CSPs)이 나타났다. 이러한 잔기들은 자기 인식(잔기 17-21) 및 C-말단 소수성 영역에 해당되며 소수성 상호작용을 통해 A β 응집 및 교차 β 시트 형성에 중요한 것으로 알려져 있다. V40에 대한 CSP는 DMPD와의 상호작용에 의한 것이라기 보다는 내인성 C-말단 문제에 기인한 것으로 판단된다. 관찰된 CSP의 분포는 DMPD가 A β ₄₀의 자기 인식 잔기 및 소수성 잔기 가까이 있는 펩타이드 골격과 상호작용함을 제안하며, 이는 A β ₄₀-DMPD 상호작용에 대한 열동력학적 데이터에 의해서도 뒷받침된다.

[0105] 3) 분자 동력학적(MD) 시뮬레이션

[0106] A β ₄₀와 DMPD의 상호작용을 탐구하기 위해 다단계 계산 전략을 사용하였다.

[0107] 1단계에서, 수용액 중의 100 ns MD 시뮬레이션은 A β ₄₀ 단량체의 평형화된 구조를 얻기 위하여 실시하였다. 상기 시뮬레이션은 GROMACS 프로그램(버전 4.0.5)와 GROMOS 96 53A6 포스 필드를 이용하여 수행하였다. A β ₄₀ 단량체의 출발 구조는 pH가 5.1에서 수성 SDS 미셀로 결정된 NMR 구조에서 추출하였다(model 2, PDB 1BA4). 제공 평균 제곱근 편차(root-mean-square deviations, rmsd)는 시뮬레이션의 시간대 동안 반응계가 평형에 도달하였음을 나타내었다.

[0108] 다음 단계에서, 도킹 절차에 A β ₄₀ 단량체의 유연성을 포함하도록 시뮬레이션을 통해 100회의 스냅샷을 1 나노초(ns) 간격으로 측정하였다. 이러한 스냅샷은 AutoDock Vina 1.1.2 소프트웨어를 사용한 DMPD 분자의 엄격한 도킹을 위해 사용하였다. 이 절차에서, 수용체는 고정되어 유지되었지만, 리간드는 해당 형태가 변경되었다. DMPD 분자는 GaussView 프로그램(B3LYP/Lan13DZ)을 이용하여 구축하고, Gaussian03 프로그램을 이용하여 이론 수준에서 최적화하였다. 도킹 과정에서, 그리드의 크기는 전체 수용체-리간드 복합체를 차지하도록 선택되었다. 각 도킹 평가판(trial)은 20회의 포괄성 값(exhaustiveness value)와 함께 20개 poses를 생산하였다. 도킹 과정은 2000개 poses를 제공하였다. 결합 에너지와 상호작용 부위의 조성에 근거하여, 20개의 다른 poses들이 수용액에서 단기(5 ns) MD 시뮬레이션을 위해 선정되었다.

[0109] 이러한 20개의 다양한 시뮬레이션으로부터, 5개의 구조가 도출되었고 20 ns 시뮬레이션은 동일 프로그램과 force field를 이용하여 수행하였다. 상기 시뮬레이션은 A β ₄₀ 단량체의 L17, F19 및 G38 잔기를 포함하는 결합 부위를 제공하였다. 궤적과 시뮬레이션 구조를 분석하기 위하여, GROMACS 프로그램 패키지 및 YASARA 소프트웨어(v. 13.2.2)에서 유용한 툴이 이용되었다.

[0110] 모든 시뮬레이션의 출발 구조는 7.0x7.0x7.0 nm의 치수로 절단된 입방 박스(cubic box)에 존재한다. 이는 적용된 주기적 경계 조건(periodic boundary conditions, PBC)으로부터 발생할 수 있는 원치 않는 영향을 배제하였

다. 박스는 단일 포인트 전하(single point charge, SPC) 물 분자로 가득 채웠다. 거의 없는 물 분자를 나트륨과 염소 이온으로 대체시켜 상기 반응계를 중화시켰다. 출발 구조는 이어서 3000 단계를 위해 가파른 하강 방법으로 에너지를 최소화하였다. 이러한 최소화의 결과로서 MD 시뮬레이션을 위한 출발 구조를 생성하였다. MD 시뮬레이션은 이어서 일정한 입자의 수(N), 압력(P) 및 온도(T)로 수행하였다(i.e., NPT ensemble).

[0111] LINCIS 알고리즘은 펩타이드의 결합 길이를 제한하기 위해 사용한 반면, SETTLE 알고리즘은 물 분자의 결합 길이와 각도를 제한하는 데 사용되었다. Particle-Mesh Ewald(PME) 방법은 장거리 정전기적 상호작용을 처리하도록 구현하였다. 한 바(bar)의 일정한 압력을 1.0 ps의 커플링 상수에 적용하였다. 펩타이드, 물 분자 및 이온들은 0.1 ps의 커플링 상수로 300 K에서 수욕상으로 각각 결합하였다. 운동 방정식은 개구리도약 알고리즘(leap-frog algorithm)을 사용하여 각각 2 fs 시간 단계에서 통합하였다.

[0112] 상기 시뮬레이션 결과 도 2c와 같이 다양한 상호작용을 나타내었다. 즉, (i) DMPD의 아민기와 L17 및 V18 간의 골격 카르보닐기의 산소 원자의 수소결합(2.08 Å)을 통해 잠재적 결합 포켓이 형성되며, (ii) DMPD의 방향족 고리가 N-H- π 상호작용(3.16 Å)을 통해 G38와 결합하며, (iii) DMPD의 디메틸 아미노기의 메틸기가 C-H- π (F19의 방향족 고리를 가짐) 상호작용(4.10 Å)을 통해 A β -DMPD 상호작용을 안정화시켰다.

[0113] 따라서, ITC, 2D NMR 및 도킹/MD 시뮬레이션 분석을 통해 DMPD와 금속 없는 A β 간의 직접적인 상호작용을 확인하였다.

[0114] <실시예 3> 금속-A β 단량체 및 피브릴과 DMPD 간의 상호작용 분석

[0115] 1) 구리 K-경계 X-선 흡수 분광(XAS) 분석

[0116] 이전 공지(Biochemistry 44, 5478-5487, 2005; J. Am. Chem. Soc. 126, 13534-13538, 2004)된 바와 같이 A β_{42} 를 단량체로 만들었으며, A β_{42} 의 피브릴은 공지(Biochemistry, 47, 5006-5016, 2008)된 프로토콜을 따라 성장시켜 만들었다. 피브릴화 또는 단량체화 한 후, 모든 샘플은 COY 무산소 챔버(COY anaerobic chamber, COY Laboratory, Grass Lake, MI, USA)에서 무산소 분위기(anaerobic atmosphere, N₂) 하에서 조작하였다.

[0117] A β_{42} 는 10 mM의 N-에틸모르폴린 완충액(N-ethylmorpholine buffer, pH 7.4)과 글리세롤(제빙화제로서 사용)을 4:1로 혼합한 혼합물에 용해시킨 후, 동일 당량의 CuCl₂을 첨가하였다. A β_{42} 단량체는 5 °C로 유지하고, 모든 절차는 응집을 방지하기 위하여 신속하게 수행하였다. CuCl₂를 첨가한 후, 2 당량의 아스코르베이트를 첨가하여 Cu(II)-로딩 A β_{42} 펩타이드를 Cu(I)로 환원시켰다. 그후, DMPD(2 당량, DMSO에 용해됨)를 각 용액에 처리하였다. 최종 A β_{42} 의 농도는 250 μ M이었다. DMPD는 24시간 동안 구리가 로딩된 피브릴(copper-loaded fibrils)과 함께 배양하였다. 응집을 방지하기 위해, 구리가 로딩된 A β_{42} 단량체를 15분 동안 반응시켰으며, 이는 응집여부는 겔 투과 크로마토그래피(gel permeation chromatography, GPC)를 통해 확인하였다.

[0118] DMPD와 반응시킨 후, 상기 용액을 캡톤 테이프 윈도우를 갖는 투명 합성수지 샘플 홀더(Lucite sample holders)에 주입하고, 액체 질소에서 재빨리 동결하였다. 모든 데이터는 국립 싱크로트론 광원(National Synchrotron Light Source, Brookhaven National Laboratories, Upton, NY, USA)에서 빔라인 X-3b(beamline X-3b)로 기록되었다.

[0119] 샘플은 He Displex cryostat에 의한 데이터 수집을 통해 ~18 K에서 유지하였다. 에너지 단색화(monochromatization)는 Si(111) 이중 크리스탈 모노크로메이터(Si(111) double crystal monochromator)로 수행하였으며, 고조파 제거를 위해 낮은 각도의 Ni 미러(Ni mirror)를 사용하였다.

[0120] 데이터는 샘플과 검출기 사이에 배치된 3개의 마이크로 Ni 필터를 보유한 Canberra 31 element Ge solid-state detector를 이용하여 형광 스펙트럼(fluorescence spectra)으로써 검출되었고, 구리-포일(제1 변곡점 8980.3 eV)의 동시에 수집된 스펙트럼으로 보정하였다.

[0121] 카운트 비율은 15 내지 30 kHz의 사이에 있었고, 데드타임 보정(deadtime corrections)은 스펙트럼의 품질을 더 향상시키지 않았다.

[0122] 데이터는 경계 아래의 200-20 eV에서 5 eV의 단계(평균 1초 이상), 경계 하 20 eV에서 경계 위 30 eV의 0.5 eV 단계(평균 3초 이상), 경계 위의 30-300 eV의 2 eV(평균 5초 이상), 및 경계 위 300 eV에서 13 k의 5 eV 단계(평균 5초 이상)에서 수집되었다. 각 데이터 세트는 16개의 개별 스펙트럼들의 평균을 나타낸다. 알려진 결합

은 평균 스펙트럼에서 제거되었다. X-선 빔은 매 4회 스캔마다 재 위치시켰고, 주목할 만한 광/광환원 (photodamage/photoreduction)은 없었다. 데이터는 종래 알려진 소프트웨어 패키지 EXAFS123과 FEFF 7.02를 이용하여 분석하였으며, 오류는 ϵ^2 값으로써 보고되었다.

[0123] 2) 분광 분석

[0124] 모든 샘플은 HEPES[20 mM; pH 6.6(Cu(II) 샘플) 또는 pH 7.4(금속-없는 샘플 및 Zn(II) 샘플)] 및 NaCl(150 mM)을 함유한 Chelex-처리 완충액에서 준비되었다. A β 없는 샘플을 위하여, DMPD(50 μ M)와 CuCl₂ 또는 ZnCl₂(25 μ M)을 2분 동안 처리하였다. A β 포함 샘플을 위하여, A β ₄₀(25 μ M)과 CuCl₂ 또는 ZnCl₂(25 μ M)을 2분 동안 처리한 후 DMPD를 첨가하였다. 이렇게 얻어진 용액의 흡수 스펙트럼은 교반 없이 실온에서 24시간 동안 매 2시간 간격으로 얻었다. A β ₄₀ 포함하거나 포함하지 않는 금속 없는 샘플은 혐기성 환경에서 UV-vis를 이용하여 모니터링 하였다. 혐기성 샘플 준비에 필요한 모든 용매는 동결-펌프-해동(freeze-pump-thaw) 사이클을 이용하여 3회 탈기시키고 N₂로 채운 글로브 박스(glove box)에 저장하였고, 혐기성 샘플은 상기 글로브 박스에서 제조하였다. UV-vis 스펙트럼은 교반 없이 실온에서 0, 4시간 및 24시간의 반응 시간에 맞추어 기록하였다.

[0125] 3) 질량 분석

[0126] 본 실험을 위해 DMPD(50 μ M)와 A β ₄₀(25 μ M)를 함유한 샘플을 1 mM NH₄OAc(pH 7.4)의 100 μ L에서 준비하였다. 이렇게 얻어진 용액은 일정한 교반 하에 37 °C에서 0, 2, 4, 8 및 24시간 동안 반응시켰다. 샘플은 240 mL/h의 유속으로 질량 분석기에 직접 주입하였다. ESI 인터페이스는 양이온 모드로 동작시켰고, 분무 전압은 4.5 kV, 모세관 온도는 300 °C, 모세관 출구 전압은 101 V로 설정하였다. 질량 스펙트럼은 m/z 50 내지 500의 범위에서 얻었다.

[0127] 이온 이동 분광 질량 분석(ion mobility-mass spectrometry, IM-MS) 실험은 Synapt G2(Waters, Milford, MA, USA)에서 수행하였다. 샘플들은 양이온 모드에서 조작된 나노-전기분사원(nano-electrospray source)을 이용하여 이온화하였다. MS 계측은 2.7 mbar의 배면 압력과 40 V의 샘플 콘 전압에서 작동시켰다. 데이터는 MassLynx 4.1 및 DriftScope 2.0(Waters, Milford, MA, USA)을 이용하여 분석하였다. 충돌 단면적(Collision cross-section, CCS) 측정은 이미 알려진 단백질의 데이터베이스 및 헬륨의 단백질 복합체 CCS 값을 이용하여 보정하였다. 동결건조한 A β ₄₀ 펩티드(AnaSpec, Fremont, CA, USA)는 1mM 암모늄 아세테이트(ammonium acetate, pH 7.0)에서 25 μ M의 스탁 농도로 준비하였다. A β ₄₀의 일부분은 일정한 교반 없이 50 μ M DMPD(1% v/v DMSO)를 처리하거나 처리하지 않고 25 °C에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 모든 샘플들은 헥사플루오로-2-프로판올(HFIP, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)([A β ₄₀] = 50 μ M)에서 샘플을 재현탁하기 전에 밤새도록 동결건조하였고, 5분 동안 펄스 세팅(pulse setting) 하에 초음파 처리하였다. 샘플들은 1 mM의 암모늄 아세테이트(최종농도 0.5 mM)를 사용하여 50%로 희석하여 최종 A β ₄₀ 농도가 25 μ M이 되도록 한 후 질량 분석을 수행하였다.

[0128] 4) 실험 결과

[0129] i) DMPD의 금속과의 결합 분석

[0130] UV-vis 및 ¹H NMR을 이용하여 DMPD와 Zn(II) 간의 결합을 확인한 결과, 도 3a 및 도 3b와 같이 Zn(II)가 DMPD의 아미노기의 N 원자를 통해 상호작용하는 것으로 확인되었다.

[0131] ii) DMPD의 금속-A β 단량체 및 피브릴와의 결합 분석

[0132] DMPD 처리 후 Cu(I)-로딩 A β ₄₂ 피브릴의 XAS 값은 도 4(붉은색)와 같이 선형 2-배위 Cu(I)(N/O)₂ 환경과 일치하였다. XAS 스펙트럼의 X선 흡수 모서리 근처 구조(XANES) 영역은 Cu (1s → 4p_z) 변환과 동일한 8985.2(2) eV에서 압도적인 프리엣지 특성을 나타내었으며, 이러한 특성은 선형 Cu(I)의 특성이다. 도 4(파란색)와 같이, Cu(II)-로딩된 A β ₄₂ 피브릴에 DMPD를 처리한 경우 선형 2-배위 Cu(I)(N/O)₂ 중심에 Cu(II)의 완전 환원을 나타내었다. XAS 분석으로부터 구리-A β 복합체와 DMPD 간의 상호작용이 DMPD와 A β 에 의해 둘러싸인 구리 중심 간의 가능한 환원반응을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0133] iii) DMPD의 A β 응집에 대한 제어 기전 분석

- [0134] DMPD의 A β 응집에 대한 제어 기전을 규명하기 위하여, 다양한 조건 하에서 DMPD의 A β 에 의한 화학적 변형을 분석한 결과, 도 5a 내지 도 5c와 같이 완충액에 CuCl₂가 있거나 없고 A β ₄₀이 있거나 없는 조건 하에서 DMPD의 시간 의존성 광학 변화를 모니터링한 결과 A β ₄₀로 처리된 DMPD는 A β ₄₀이 없는 조건과는 달리 스펙트럼 이동이 나타났다(도 5a, 도 5b). DMPD의 산화 분해 경로를 통해 형성되는 양이온 라디칼의 형성 지표인 *ca.* 513 및 550 nm에서 나타나는 광학 밴드가 DMPD와 A β 를 반응시키고 24시간 후에도 관찰되지 않았다. A β ₄₀을 함유한 용액에 DMPD의 첨가에 따라 DMPD의 광학 밴드가 295 nm에서 305 nm로 즉시 이동하며, 4시간을 반응 시에는 *ca.* 250 nm에서의 강한 광학 밴드가 *ca.* 280 및 330 nm에서 등흡수점을 나타냄을 의미한다(도 5a, 위). 4시간을 초과하여 더 반응시키면 *ca.* 270 nm에서 등흡수점을 갖는 *ca.* 340 또는 350 nm에서의 새로운 광학밴드가 발생하기 시작하였다(도 5a 및 도 5b, 아래). *ca.* 250 및 340 또는 350 nm에서의 광학 밴드는 벤조퀴논이민(benzoquinoneimine, BQI) 또는 벤조퀴논(benzoquinone, BQ), 및 이들의 단백질과의 부가물 생성의 지표로서 예측된다(도 6). 따라서, DMPD는 A β 의 존재 하에서 다른 경로를 통해 변형되어 A β 와 결합된 변형 DMPD 결합체를 생성한다.
- [0135] 또한, DMPD의 변환에서 산소의 관련성을 검증하기 위하여, A β 존재 또는 비존재 하 혐기성 환경에서 DMPD의 UV-vis 분석을 수행한 결과 도 5c와 같이 24시간 반응에서도 혐기성 조건 하에서 DMPD의 스펙트럼 변화가 관찰되지 않았다. 더불어, DMPD에 의한 A β 응집의 조절은 호기성 조건(도 1c)과 달리 혐기성 조건 하에서는 관찰되지 않았다. 따라서, 산소는 DMPD의 산화적 변형과 독성을 나타내지 않는 A β 응집체 형성에 필수적인 요소이다.
- [0136] 그리고, 0, 2, 4, 8 및 24시간 동안 DMPD와 A β 간의 반응을 MS로 분석한 결과, *m/z* 137에서 DMPD에 대한 신호와 *m/z* 122에서 아민기 손실로 인해 발생한 단편에 대한 신호가 반응시간에 따라 감소하는 것으로 나타났다. MS 신호의 시간 의존성 감소는 DMPD와 A β 간의 상호작용이 변환 산물의 형성을 통해 일어남을 의미한다.
- [0137] 더불어 A β ₄₀-리간드 복합체의 형성을 확인하기 위하여 DMPD를 처리한 A β ₄₀ 샘플의 MS 분석을 실시하였다. 그 결과, 103.93 $\pm$ 0.04 Da의 A β 추가에 따라 새로운 피크가 발생하며(도 6a, i), 이는 DMPD의 공유 결합 변형 산물인 BQ인 것으로 추정된다.
- [0138] DMPD의 변형을 통한 A β -DMPD 상호작용의 모드를 입증하기 위하여, A β ₄₀과 구조적으로 일치하는 BQ의 상호작용을 동일한 실험 조건하에서 조사하였다. 그 결과 BQ는 A β ₄₀에 결합하였으며(도 6b), 이때 DMPD 처리와 일치하게 질량 변화(104.1 $\pm$ 0.1 Da)도 발생하였다. 5급 전하 리간드 결합 전하 상태에 대한 충돌 유발 분리(CID)와 결합된 탠덤 MS(MS/MS)를 수행하였고, 이를 통해 A β ₄₀-변형된 DMPD(A β ₄₀-DMPD_{transformed})의 특성을 결정하였다(도 6c). MS/MS 결과는 상기 결과와 마찬가지로 변형된 DMPD 및 BQ 모두 K16 또는 K28를 통해 A β ₄₀에 공유결합하는 것을 보여주었다. 이 결합된 질량 차이가 A β 와 변형된 DMPD/BQ 사이의 단일 공유 결합 형성(106.1 Da 예상됨)을 지원하기에 너무 작은 반면, A β 와 변형된 DMPD/BQ 사이의 2차 공유 결합의 형성(104.1 Da 예상됨)을 지원하기에 적합했다. 따라서 이를 통해 변형된 DMPD/BQ가 A β 에 가교(crosslinking)할 수 있음을 지원하며, 이 결과는 중전 공지된(FEBS Journal 272, 3661-3672 (2005)) 포라-시누클레인(for-synuclein)과 일치한다.
- [0139] 더불어 채택된 A β 결합 상태의 형태이성질체(conformer)를 평가하기 위하여 4급 전하 상태에서 이온 이동성-질량 분석(IM-MS)을 수행하였다. 아포(apo) 상태에서 비교하였을 때, A β -변형된 DMPD 복합체는 상당히 감소된 이온 이동도(ion mobility, IM) 도착 시간과, 보다 컴팩트한 구조의 A β ₄₀을 보였다(도 6a, ii). 상기 결과와 마찬가지로, A β ₄₀-BQ 결합 또한 IM 도착 시간 감소와, 아포 펩타이드(apopeptide)를 통해 채택한 형태보다 더 컴팩트한 종의 생성 지원을 이끌었다(도 6b, ii).
- [0140] 상기 MS/MS 분석 결과와 상기 결과를 통합하여, 변형된 DMPD/BQ 가교 트랩 A β 는 상대적으로 컴팩트한 구조적(conformational) 상태이며, 이는 아밀로이드 피브릴 형성에 대한 이상 경로(off-pathway)에 관련이 있을 것이라 판단된다.
- [0141] 또한 광학 결과 및 MS 결과에 근거하여, A β -변형된 DMPD 복합체는 도 6d와 같이 2가지의 가능한 기전에 의해 발생할 것으로 판단된다.
- [0142] 호기성 조건 하에서 A β 존재 하에 DMPD는 먼저 2개 전자 산화적 변형을 통해 양이온 이민(CI)-A β 복합체를 형

성할 수 있다(i). CI는 가수분해를 통해 BQI로 변형되며(ii) 이의 이민이 가수분해되어 BQ가 생성된다(iii). BQ는 K16과 같은 초기 아민 보유 잔기(Primary amine containing residue, $A\beta$ + 106.1 Da, **IV**)와의 상호작용을 통해 공유 결합 $A\beta$ -BQ 부가체(adduct)를 생성할 수 있으며, 유사한 작용기($A\beta$ + 104.1 Da, **V**)를 갖는 추가적인 잔기에 추가로 가교할 수 있다. 구조적 압축(structural compaction)을 지시할 수 있는 $A\beta$ 와 BQ의 공유 복합체는 IM-MS 분석(도 6a, b)에서 확인되었고, 이를 통해 무정형의 $A\beta$ 응집으로의 펩타이드 응집 경로에서 DMPD의 방향 수정(redirection)을 설명할 수 있다. 구조적 압축(structural compaction)을 지시할 수 있는 $A\beta$ 와 BQ의 공유 복합화는 IM-MS 분석(도 6a, b)에서 확인되었고, 이를 통해 겔/웨스턴 블롯과 TEM 연구에서 확인한 무정형의 $A\beta$ 응집으로의 펩타이드 응집 경로에서 DMPD의 방향 수정(redirection)을 설명할 수 있다.

[0143] <실시예 4> 아밀로이드 병리 및 인지 장애(cognitive impairment)에 대한 DMPD의 생체 내 효과

[0144] 생체 내(in vivo)에서 AD 병리에 대한 DMPD의 효과를 입증하기 위하여, 생후 3개월령 5xFAD 마우스의 복강 내 경로를 통해 DMPD를 1mg/kg/day의 양으로 30일동안 투여하였다. DMPD 투여 30일이 지난 후, 뇌의 $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ 양과 아밀로이드 침착 부하를 조직병리학적으로 평가하기 위해 생화학 분석을 실시하였다. 이를 위하여, 5xFAD 마우스 중 초기 진행 이후 AD의 심각한 표현형 및 행동 장애(behavioral dysfunction)를 보이는 마우스를 선별하였다. DMPD의 처리를 종료했을 때, 비히클(vehicle-) 및 DMPD가 처리된 5xFAD 마우스의 체중 또는 외관의 유의한 차이는 보이지 않았다.

[0145] ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 통해서 마우스 뇌의 $A\beta$ 펩타이드를 정량하였다.

[0146] DMPD를 처리한 5xFAD 마우스의 PBS- 및 도데실황산나트륨(sodium dodecyl sulfate, SDS)-에 포함된 $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ 및 포름산(Formic acid, FA)에 용해된 $A\beta$ 의 총 레벨은 비히클을 처리한 5xFAD 마우스와 비교하였을 때 ca. 65% 및 47%로 상대적으로 감소되었다(도 7a).

[0147] SDS에 용해된 $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ 의 레벨은(ca. 68% 및 67%) FA에 용해된 $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ 보다(ca. 50% 및 32%) DMPD에 의해 급격하게 감소되었다. 더불어 아밀로이드 축적의 상당한 감소가 DMPD를 처리한 5xFAD 마우스로부터 확인되었고, 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein, APP)/ $A\beta$ -면역반응성의(immunoreactive) 4G8-의 부하(loads) 및 콩고 레드-염색된 아밀로이드 플라그(Congo red-stained amyloid plaques)를 분석한 결과 각각 ca. 23% 및 20%로 감소된 것이 확인되었다.(도 7b, c)

[0148] 그러므로, 이를 통하여 DMPD가 AD 모델 마우스의 뇌에서 아밀로이드 발병을 지연시키거나 전환시킬 수 있다는 것을 확인하였다.

[0149] 더불어, DMPD가 AD 모델 마우스에서 인지 장애(cognitive impairment)를 개선할 수 있는지를 확인하기 위해, 4개월령 5xFAD 마우스에 DMPD를 처리하고 최종 연속 4일 동안 공간 학습 및 기억에 대한 수중미로 실험(Morris water maze test)을 수행하였다.

[0150] 5xFAD 마우스는 같은 배에서 태어난 정상형(wild-type) 마우스와 비교하였을 때 손상된 공간학습(spatial learning)을 보여주었고, 물 풀에서 숨겨진 탈출 플랫폼(escape platform)의 위치를 찾는 것을 더 어려운 반면, DMPD의 반복 투여를 한 5xFAD 마우스는 비히클을 처리한 정상형 마우스와 비교하였을 때 학습과 기억 능력이 향상된 것을 보여주었다(도 8a).

[0151] 수중 미로 실험 3시간 후, 장기 기억력의 성능을 확인하기 위하여 탈출 플랫폼을 제거한 프로브 시험(probe trials)을 수행하였고, 종전 실험과 같은 물 속 위치에 60초 동안 대기시켰다.

[0152] DMPD가 처리된 마우스는 비히클을 처리한 5xFAD 마우스와 비교하였을 때 플랫폼 영역에 도달하는 구별 가능(distinguishably) 시간이 적었고, 플랫폼이 숨겨져 있었던 타겟 사분면(target quadrant, North West, NW)에 더 많은 시간을 할애하였다(도 8B, C).

[0153] 따라서 이 결과를 통해 DMPD가 5xFAD 마우스의 인지 장애를 개선시켰다는 것을 확인하였다.

[0154] 하기에서는 DMPD를 포함하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

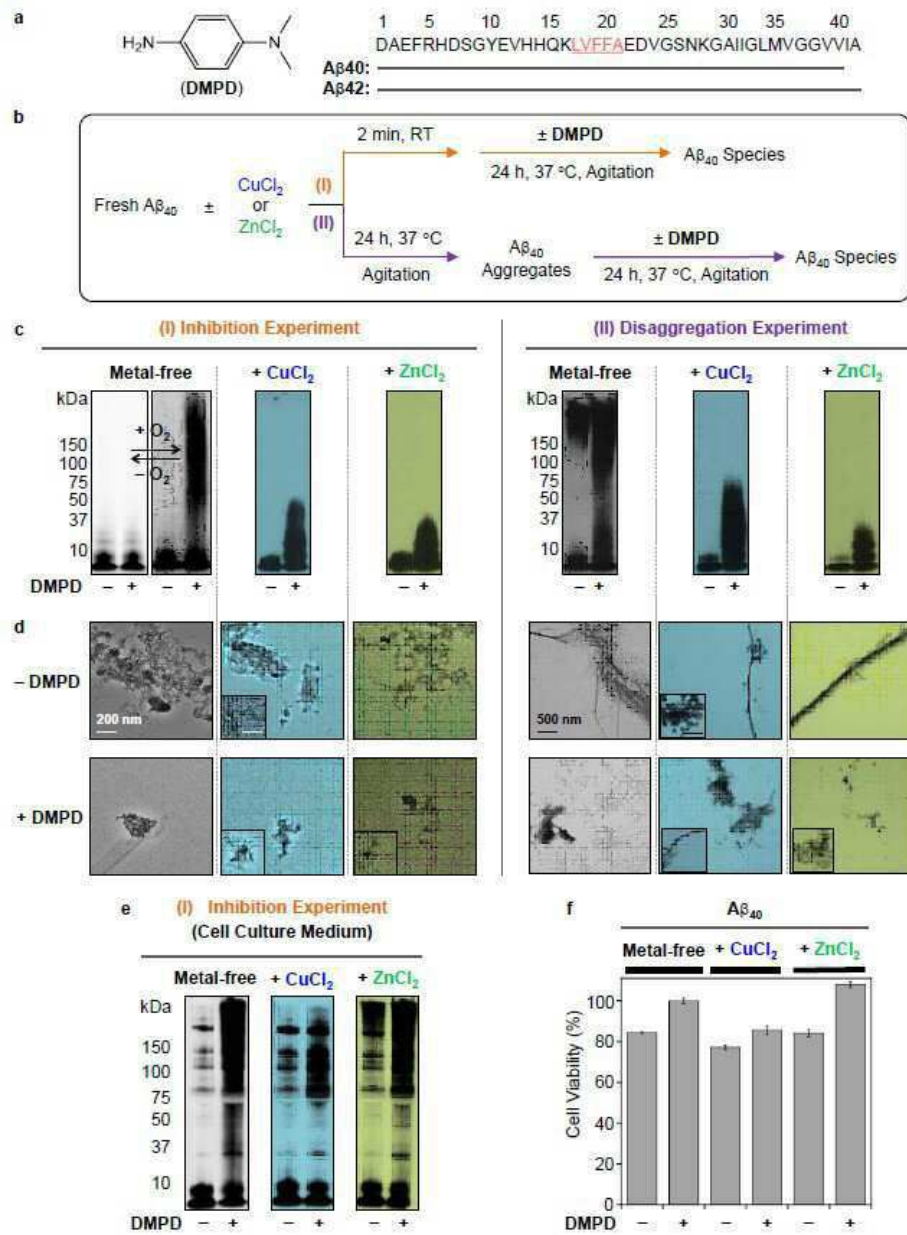
[0155] <처방예 1> 약학조성물의 처방예

[0156] <처방예 1-1> 산제의 제조

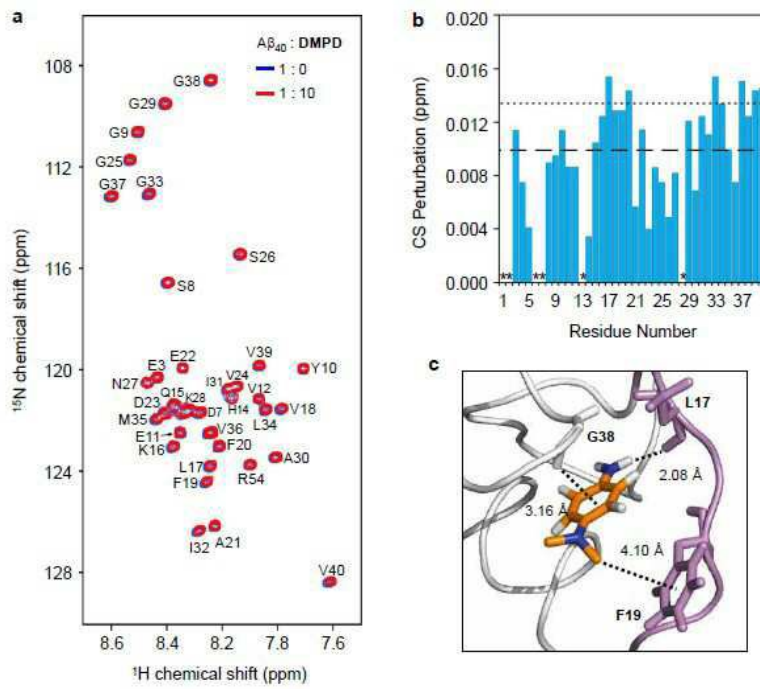
- [0157] DMPD 20 mg, 유당 100 mg 및 탈크 10 mg을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [0158] <처방예 1-2> 정제의 제조
- [0159] DMPD 20 mg, 옥수수전분 100 mg, 유당 100 mg 및 스테아린산 마그네슘 2 mg을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0160] <처방예 1-3> 캡슐제의 제조
- [0161] DMPD 10 mg, 옥수수전분 100 mg, 유당 100 mg 및 스테아린산 마그네슘 2mg을 혼합한 후 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0162] <처방예 1-4> 주사제의 제조
- [0163] DMPD 10 mg, 주사용 멸균 증류수 적량 및 pH 조절제 적량을 혼합한 후 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조하였다.
- [0164] <처방예 1-5> 연고제의 제조
- [0165] DMPD 10 mg, PEG-4000 250 mg, PEG-400 650 mg, 백색바셀린 10 mg, 파라옥시안식향산메칠 1.44 mg, 파라옥시안식향산프로필 0.18 mg 및 잔량의 정제수를 혼합한 후 통상의 연고제의 제조방법에 따라서 연고제를 제조하였다.
- [0166] **<처방예 2> 건강보조식품**
- [0167] <처방예 2-1> 건강식품의 제조
- [0168] DMPD 1 mg, 비타민 혼합물 적량(비타민 A 아세테이트 70 μ g, 비타민 E 1.0 mg, 비타민 B 1 0.13 mg, 비타민 B 2 0.15 mg, 비타민 B 6 0.5 mg, 비타민 B 12 0.2 μ g, 비타민 C 10 mg, 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7 mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5 mg) 및 무기질 혼합물 적량(황산제1철 1.75 mg, 산화아연 0.82 mg, 탄산마그네슘 25.3 mg, 제1인산칼륨 15 mg, 제2인산칼슘 55 mg, 구연산칼륨 90 mg, 탄산칼슘 100 mg, 염화마그네슘 24.8 mg)을 혼합한 다음 과립을 제조하고 통상의 방법에 따라 건강식품을 제조하였다.
- [0169] <처방예 2-2> 건강음료의 제조
- [0170] DMPD 1 mg, 구연산 1000 mg, 올리고당 100 g, 매실농축액 2 g, 타우린 1 g 및 정제수를 가하여 전체 900 ml가 되도록 하며, 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85 $^{\circ}$ C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관하였다.
- [0171] 이상과 같이, 본 발명은 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 본 발명은 이것에 의해 한정되지 않으며 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 본 발명의 기술 사상과 아래에 기재될 청구범위의 균등 범위 내에서 다양한 수정 및 변형이 가능함은 물론이다.

도면

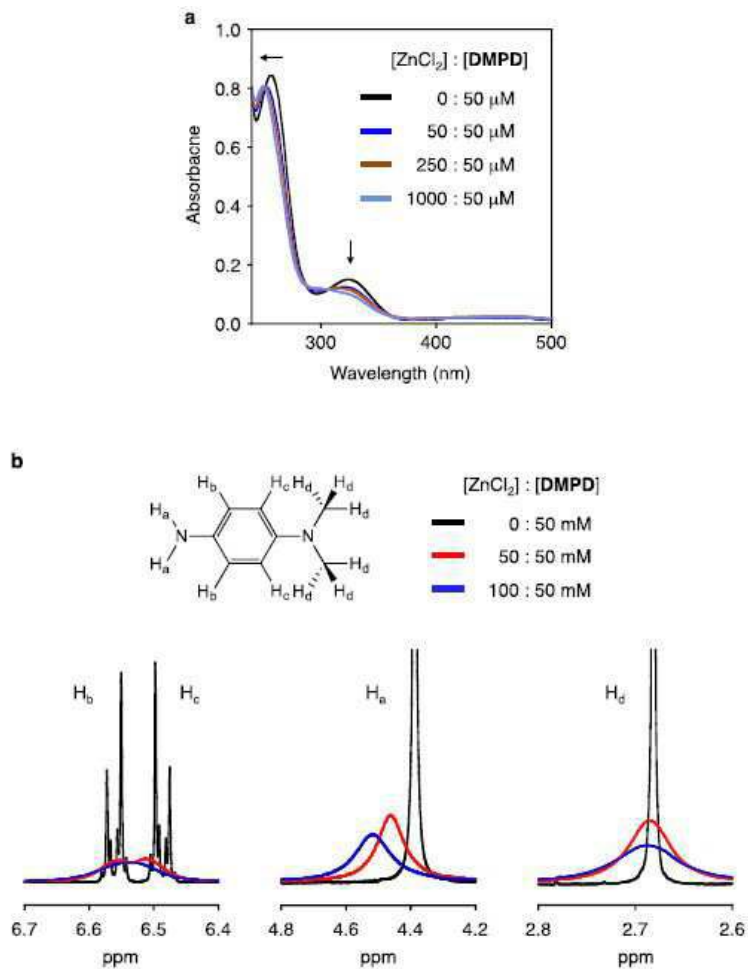
도면1



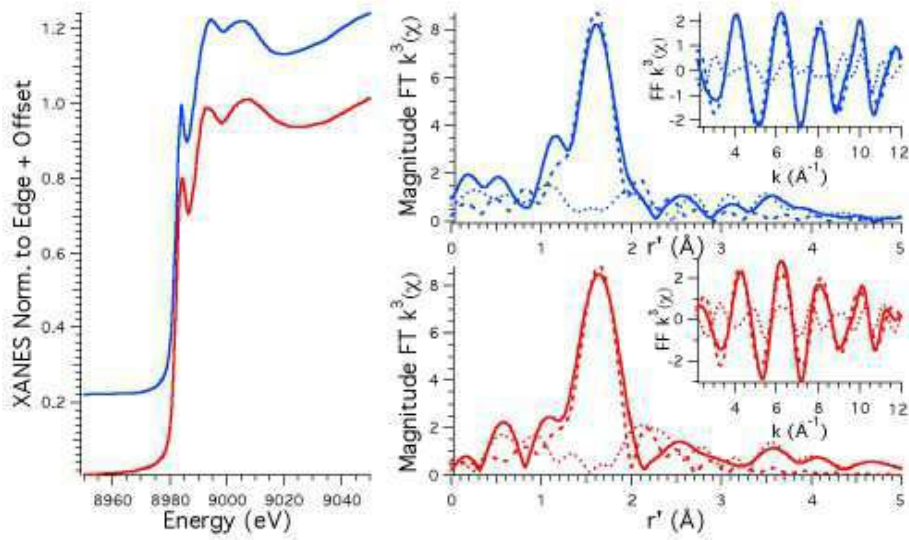
도면2



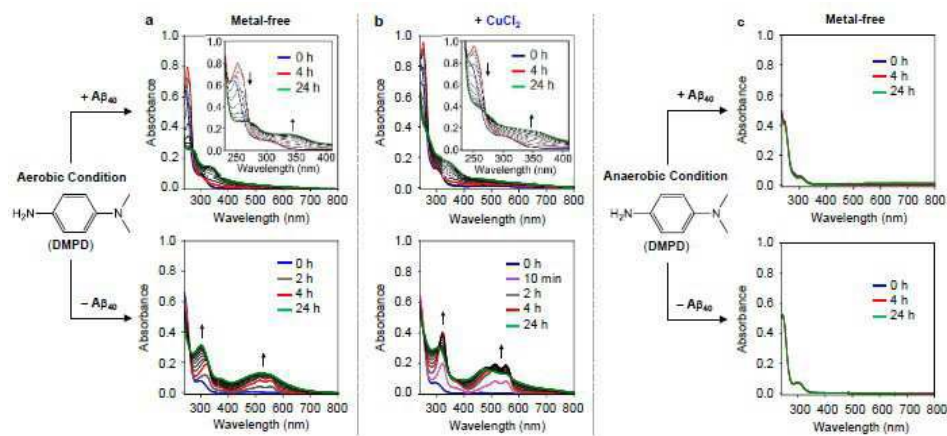
도면3



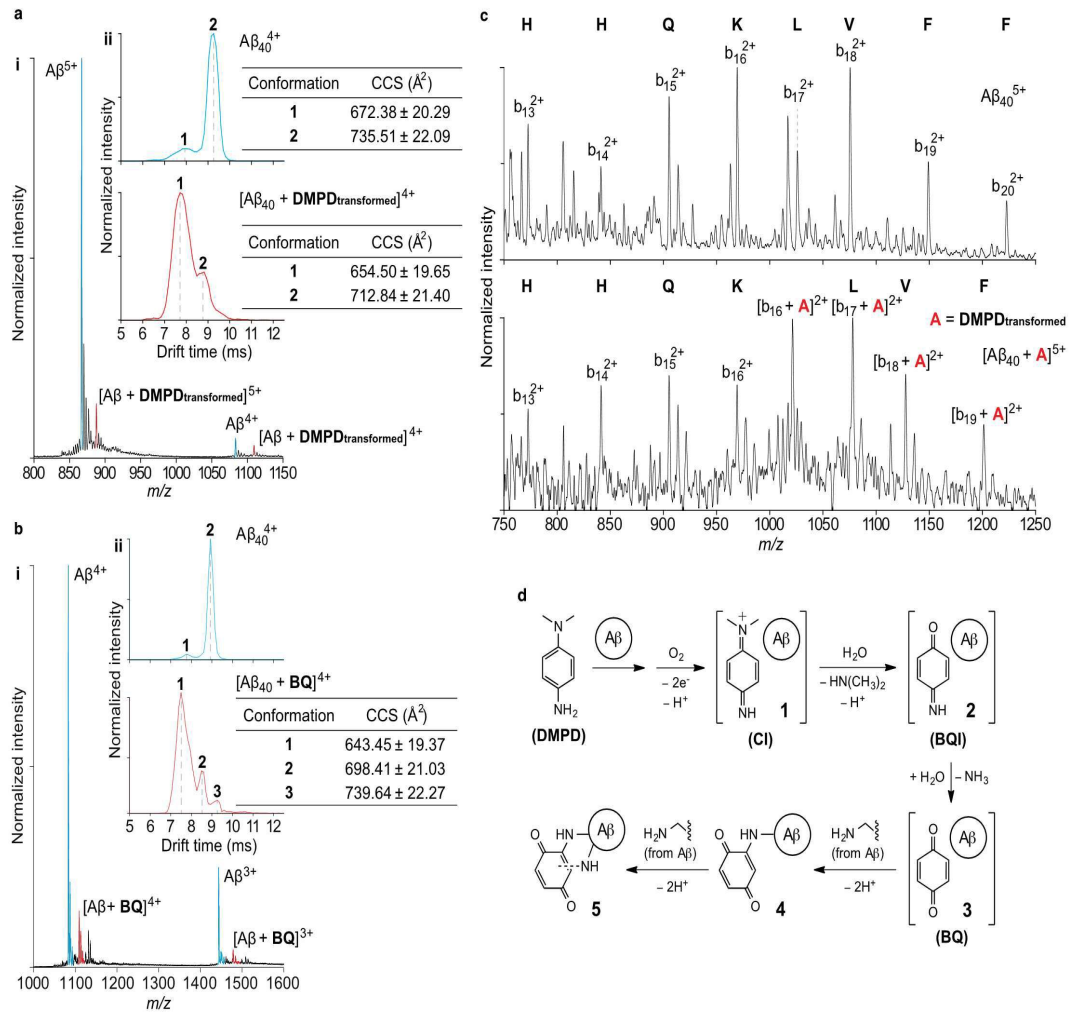
도면4



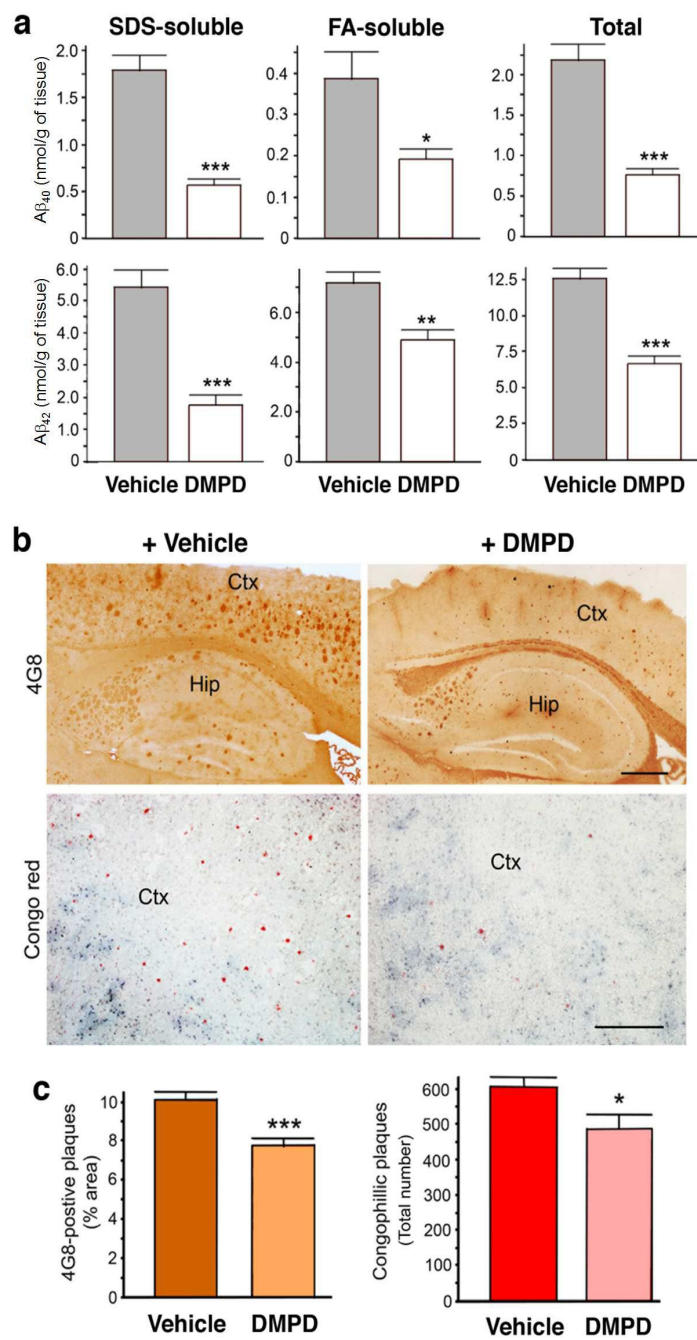
도면5



도면6



도면7



도면8

