



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0151718
(43) 공개일자 2024년10월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/445 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61K 31/198 (2024.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/445 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0138507(분할)
- (22) 출원일자 2024년10월11일
심사청구일자 2024년10월11일
- (62) 원출원 특허 10-2021-0133338
원출원일자 2021년10월07일
심사청구일자 2021년10월07일
- (30) 우선권주장
1020210012659 2021년01월28일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
닥터노아바이오텍 주식회사
경기도 수원시 영통구 창룡대로256번길 91, 1208호 (이의동)
- (72) 발명자
이지현
경기도 수원시 영통구 창룡대로 256번길 91, 1303호 닥터노아바이오텍 내 (이의동)
김은정
경기도 수원시 영통구 창룡대로 256번길 91, 1303호 닥터노아바이오텍 내 (이의동)
- (74) 대리인
이희숙, 김석만

전체 청구항 수 : 총 9 항

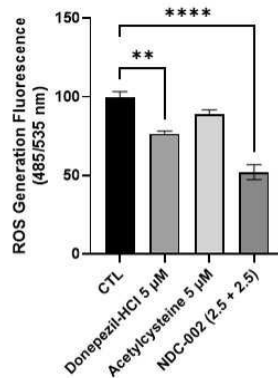
(54) 발명의 명칭 콜린에스터라제 억제제 및 항산화제를 포함하는 뇌질환 치료용 약학적 복합 조성물

(57) 요약

본 발명은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 포함하는 뇌질환 치료용 약학적 복합 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 신경세포 보호 및 분화 촉진에 시너지 효과를 나타내는 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 포함하는 뇌질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 조성물은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 병용 투여함으로써 단독 투여에 비하여 상승된 허혈성 뇌질환 및 퇴행성 신경질환 예방 및 치료효과를 나타낼 수 있으며, 각 약물의 과량 투여 또는 장기 투여에 의해 유발될 수 있는 부작용을 경감시킬 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



NDC-002 실제 효과	Bliss Independence 예측 효과	시너지
47.8	31.95	○

(52) CPC특허분류

A61K 31/198 (2024.01)

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 25/28 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

명세서

청구범위

청구항 1

콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 치매, 인지기능장애, 진행성 핵상마비, 다계통 위축증, 감람핵-뇌교-소뇌 위축증(OPCA), 샤이-드래거 증후군, 선조체-흑질 퇴행증, 헌팅톤병, 근위축성 측색 경화증(ALS), 본태성 진전증, 피질-기저핵 퇴행증, 미만성 루이 소체 질환, 파킨스-ALS-치매 복합증, 니만픽 병 및 픽병으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 콜린에스터라제 억제제는 7-메톡시타크린(methoxytacrine), 알바멜린(alvameline), 암베노니움(ambenonium), 안세쿨린(anseculin), 아레콜린(arecoline), 세비멜린(cevimeline), 시티콜린(citicoline), 데마카리움(demacarium), 도네페질(donepezil), 에드로포니움(edrophonium), 엡타스티그민(eptastigmine), 파스시쿨린(fasciculine), 헵틸-피소스티그민(heptyl-physostigmine), 후페르진(huperzine) A 및 이의 유사체, 이코페질(icopezil), 이피다크린(ipidacrine), 리노피리딘(linopiridine), 메트리포네이트(metrifonate), 밀라멜린(milameline), 네오스티그민(neostigmine), 노메오스티그민(nomeostigmine), 피리도스티그민(pyridostigmine), 노르피리도스티그민(norpyridostigmine), 타크린(tacrine), 피소스티그민(physostigmine), 리바스티그민(rivastigmine), 서브코멜린(subcomeline), 수로나크린(suronacrine), 타크린 유사체, 타크린, 탈사클리딘(talsaclidine), 벨나크린(velnacrine), 자노멜린(xanomeline), 이토프라이드(itopride), 아코티아마이드(acotiamide), 후페르진(huperzine), 갈란타민(galanthamine) 및 지프로실론(zifrosilone)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 염인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 항산화제는 N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine), 아스코르브산(ascorbic acid), 알파-리포산(alpha-lipoic acid), 스코폴레틴(scopoletin), 포르시틴(forsythine), 이소페룰릭산(isoferulic acid), 감마-오리자놀(gamma-oryzanol), 트랜스-아네솔(trans-anethol), 티옥산(thioctic acid), 시스테인(cysteamine), 갈릭산(gallic acid), 살비아놀산(salvianolic acid), 비타민 E(vitamin E), 라파아코니틴(lappaconitine), 셀레늄(selenium), 코엔자임Q10(coenzyme Q10), 비타민 A, 카테킨(catechin), 달트론(daltron) 및 L-셀레노메티오닌(L-selenomethionine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 이의 염인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 신경세포 분화 촉진 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제는 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 식품은 건강기능성 식품인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 9

콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 동물의 퇴행성 신경질환 치료 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 포함하는 뇌질환 치료용 약학적 복합 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 신경세포 보호 및 분화 촉진에 시너지 효과를 나타내는 콜린에스터라제 억제제 및 항산화제를 포함하는 뇌질환 예방 또는 치료용 복합 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 통계청에서 2010년 발표한 자료에 따르면, 우리나라는 2011년 65세 이상 노령인구가 총인구에서 차지하는 비중이 11.4%에 이르렀고, 2050년에는 37.4%가 되어 초고령화 사회에 진입할 것으로 전망되고 있다. 이와 같이 최근 고령화 문제가 사회적인 이슈로 대두됨에 따라 고령인구의 특성이나 주거, 보건, 문화, 여가 등 노인복지 등에 대한 국민의 관심이 높아지고, 이에 대한 통계 수요도 늘어나고 있다.

[0005] 이러한 변화의 핵심은 노령화 인구의 증가로 인해서 지난 50여 년간 사망의 주된 원인이 되었던 급성 전염성 질병보다는 만성 퇴행성 질병이 더욱 큰 문제로 대두되고 있다는 점이다. 특히, 만성 퇴행성 질병 중에서 뇌혈관 질환에 의한 사망은 단일질환에 의한 사망률 중에서 2위를 기록하고 있는 매우 중요한 질환이다.

[0007] 이러한 뇌혈관 질환은 크게 2가지 형태로 분류될 수 있다. 하나는 뇌출혈 등에서 볼 수 있는 출혈성 뇌질환이고, 다른 하나는 뇌혈관의 폐쇄 등에 의해 나타나는 허혈성 뇌질환이다. 출혈성 뇌질환은 교통사고 등에 의해서 주로 나타나며, 허혈성 뇌질환은 주로 노인에게 자주 나타나는 질환이다.

[0009] 대뇌에 일시적인 뇌허혈이 유발되는 경우, 산소와 포도당의 공급이 차단되어 신경세포에서는 ATP 감소 및 부종(edema)이 발생하며, 결국 뇌의 광범위한 손상이 유발된다. 신경세포의 사멸은 뇌허혈이 있는 후 상당한 시간 경과 후에 나타나는데, 이를 지연성 신경세포사(delayed neuronal death)라고 한다. 지연성 신경세포사는 몽골리안 저빌(Mongolian gerbil)을 이용한 일과성 전뇌 허혈모델(transient forebrain ischemic model)을 통한 실험에서 살펴보면, 5분간 뇌허혈 유도 4일 후 해마(hippocampus)의 CA1 영역에서 신경세포사가 관찰되는 것으로 보고되고 있다(Kirino T, Sano K. Acta Neuropathol., 62: 201-208, 1984; Kirino T. Brain Res., 239: 57-

69, 1982).

[0011] 지금까지 가장 널리 알려진 뇌허혈에 의한 신경세포사 기전으로는 2가지가 있다. 하나는 뇌허혈에 의해서 세포 바깥에 과도한 글루타메이트(glutamate)가 축적되게 되며, 이러한 증가된 글루타메이트로 인하여 과도한 세포 내 칼슘의 축적으로 신경세포사가 유발된다는 흥분성 신경세포사 기전(Kang TC, et al., J. Neurocytol., 30: 945-955, 2001)이고, 다른 하나는 허혈-재관류시에 갑작스러운 산소 공급으로 인한 생체 내 라디칼의 증가로 인해 DNA 및 세포질에 손상을 입어 유발된다는 산화성 신경세포사이다(Won MH, et al., Brain Res., 836: 70-78, 1999; Sub AY., Chen YM., J. Biomed. Sci., 5: 401-414, 1998; Flowers F, Zimmerman JJ. New Horiz. 6: 169-180, 1998).

[0013] 이러한 기전적인 연구를 바탕으로 해서 뇌허혈시에 나타나는 신경세포사를 효과적으로 억제하는 물질을 탐색하거나, 물질에 대한 기전을 밝히는 연구가 많이 수행되고 있다. 그러나 아직까지 효과적으로 뇌허혈에 의한 신경세포사를 억제하는 물질은 거의 없는 실정이다.

[0015] 지금까지 유일하게 뇌허혈 치료제로 FDA 공인 시판 중인 조직 플라즈미노겐 활성화자(tissue plasminogen activator)는 혈전용해제로서 뇌허혈을 유발시키는 혈전을 녹여 빠른 산소 및 포도당의 공급을 유도하는 물질이다. 따라서 직접적으로 신경세포를 보호하는 것이 아니기 때문에 빠른 사용이 필요하며, 혈전용해제라는 특징 때문에 과량으로 사용 또는 자주 사용하는 경우에는 혈관벽이 얇아져 결국 출혈성 뇌혈관질환을 유발하게 된다. 또한, 초기의 칼슘 유입을 효과적으로 억제하기 위한 칼슘채널 억제제(calcium channel blocker)인 MK-801의 경우 임상적 테스트가 실행되었으나 그 부작용으로 인해 약품을 폐기한 바 있다. 일본에서는 미즈비시사의 edaravone이라는 합성 항산화제가 일본 내에서 임상시험에 성공함으로써 전 세계 하나 밖에 없는 중풍 치료제로서 일본에서만 처방되고 있으며, 연간 3,000억원의 매출을 보이고 있는데, 부작용이 우려되고 있음에도 불구하고 약의 부재로 인하여 사용되고 있다고 할 수 있다.

[0017] 한편, 알츠하이머병과 같은 인지기능장애는 60세 이상의 고령인구에서 주로 발생되기 때문에 매우 빠른 속도로 진행되고 있는, 우리나라 인구의 고령화 문제와, 환자 본인뿐만 아니라 그 가족과 사회, 국가에 심각한 심리적 고통과 경제적 부담을 줄 수 있는 점을 고려할 때 이러한 질환들의 발병기전의 규명을 위한 연구는 필수적이다. 또한 이 같은 연구가 선행되어야만 증상개선이나 질환의 발전 속도를 늦추는 정도에 그치고 있는 현 시점에서의 질병의 예방이나 질병의 개선효과제의 시급성을 요한다.

[0019] 알츠하이머병 병의 원인으로는 외부적 요인과 내부적 요인으로 나누어 볼 수 있는데, 연령, 유전적 원인, 환경적 영향에 의한 독성물질 등이 외부적 원인으로 거론되고 있으며, 내부적 원인으로는 아세틸콜린(acetylcholine) 농도 저하로 인한 신경전달의 감소, 사이토카인(cytokine) 등에 의한 신경염(neuroinflammation) 발생, 아밀로이드-베타 및 과인산화된 타우단백질(tau protein)의 응집에 의한 세포독성, 산화스트레스에 의한 활성산소의 신경세포 사멸 등이 알려져 있다. 이러한 신경세포의 사멸은 여러 뇌질환에 공통된 근본적인 병리로 지적되고 있어 세포사멸을 유발하는 요인과 분자기전에 대한 연구가 심층적으로 이루어지고 있다. 하지만, 기존에 개발된 분해 효소제라든가, 광범위한 세포 사멸억제제는 부작용과 더불어 임상효과가 감소하는 현실이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 이에, 본 발명자는 임상에서 안전성이 확인된 공지의 물질들 중에서 허혈성 뇌질환과 퇴행성 신경질환 치료에 시너지 효과가 나타나는 치료제 조합을 개발하기 위해 예의 연구를 거듭한 결과, 도네페질과 N-아세틸시스테인의 복합제가 각각의 약물 단독과 비교하여 현저히 향상된 신경세포 보호 및 분화 촉진 효과를 나타낸다는 것을

발견하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0023] 따라서, 본 발명의 목적은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0025] 본 발명의 다른 목적은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0027] 본 발명의 다른 목적은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0029] 본 발명의 다른 목적은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0031] 본 발명의 다른 목적은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 동물의 허혈성 뇌질환 치료 방법을 제공하는 것이다.

[0033] 본 발명의 다른 목적은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 동물의 퇴행성 신경질환 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0035] 전술한 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0039] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0041] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0043] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 동물의 허혈성 뇌질환 치료 방법을 제공한다.

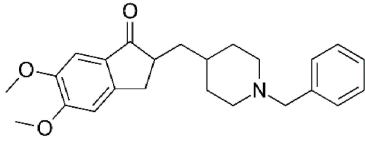
[0045] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산

화제를 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 동물의 퇴행성 신경질환 치료 방법을 제공한다.

- [0047] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0049] 본 발명은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0051] 본 발명은 또한 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0053] 본 발명에서 상기 “콜린에스터라제 억제제”는 신경전달물질 아세틸콜린의 효소 분해(enzymatic degradation)를 저해하고, 따라서 시냅스 간극(synaptic cleft) 내에서 아세틸콜린의 작용 기간 및 수준을 증가시키는 화합물을 의미한다. 2가지 효소가 아세틸콜린, 아세틸콜린에스테라아제 및 부티릴콜린에스테라아제의 분해를 주도적으로 담당한다. “콜린에스터라제 억제제”에는 이들 효소 중에서 한쪽 또는 양쪽의 작용을 저해하거나 달리 감소시키는 물질이 포함된다.
- [0055] 본 발명의 조성물과 방법에서, 콜린에스터라제 억제제는 제약학적으로 효과적인 것으로 간주된다. 본 명세서에서, “제약학적으로 효과적인”은 콜린에스터라제 억제제가 인간에서 치료적으로 유용하다는 것을 의미한다. 이런 이유로, 상기 용어는 살충제(pesticide)로 이용되는 콜린에스터라제 억제제, 예를 들면, 알디카브(aldicarb)(2-메틸-2-(메틸티오)프로피온알데히드 0-메틸카르바모일옥심), 카보푸란(carbofuran)(2,3-디히드로-2,2-디메틸-7-벤조푸라닐 메틸카르바메이트), 그리고 카르바릴(carbaryl)(1-나프틸 메틸카르바메이트), 그리고 화학 무기로 이용될 만큼 인간에게 치명적인 콜린에스터라제 억제제, 예를 들면, 사린(sarin)(2-(플루오르-메틸포스포릴)옥시프로판), VX(S-[2-(디이소프로필아미노)에틸]-0-에틸 메틸포스포노티오에이트), 그리고 소만(soman)(3-(플루오르-메틸-포스포릴)옥시-2,2-디메틸-부탄)를 배제한다. 살충제 및 화학 무기인 대부분의 콜린에스터라제 억제제는 준-가역성(quasi-reversible) 또는 비가역성이다; 제약학적으로 효과적인 대부분의 콜린에스터라제 억제제는 가역성(reversible)이다.
- [0057] 제약학적으로 효과적인 콜린에스터라제 억제제는 당분야에 널리 공지되어 있다. 예로써, 7-메톡시타크린(methoxytacrine), 알바멜린(alvameline), 암베노니움(ambenonium), 안세쿨린(anseculin), 아레콜린(arecoline), 세비멜린(cevimeline), 시티콜린(citicoline), 데마카리움(demacarium), 도네펜질(donepezil), 에드로포니움(edrophonium), 엡타스티그민(eptastigmine), 파스시쿨린(fasciculine), 헵틸-피소스티그민(heptyl-physostigmine), 후페르진(huperzine) A 및 그의 유사체, 이코페질(icopezil), 이피다크린(ipidacrine), 리노피리딘(linopiridine), 메트리포네이트(metrifonate), 밀라멜린(milameline), 네오스티그민(neostigmine), 노메오스티그민(nomeostigmine), 피리도스티그민(pyridostigmine), 노르피리도스티그민(norpyridostigmine), 타크린(tacrine), 피소스티그민(physostigmine), 리바스티그민(rivastigmine), 서브코멜린(subcomeline), 수로나크린(suronacrine), 타크린 유사체, 타크린, 탈사클리딘(talsaclidine), 벨나크린(velnacrine), 자노멜린(xanomeline), 지프로실론(zifrosilone), 이토프라이드(itopride), 아코티아마이드(acotiamide), 후페르진(huperzine), 갈란타민(galanthamine), 이들의 염 등이 포함될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 가장 바람직하게는, 상기 콜린에스터라제 억제제는 도네펜질일 수 있다.
- [0059] 도네펜질은 하기 화학식 1의 구조를 갖는 아세틸콜린에스테라제(AChE; acetylcholinesterase) 억제제(inhibitor)로서 알츠하이머 질환의 경도, 중증도 이상의 치매 치료에 사용된다. 두뇌 속의 콜린 작용성(cholinergic) 신경계 장애가 보고되고 있는 알츠하이머병에 있어서 도네펜질은 두뇌 속에 아세틸콜린을 증가시켜 뇌 속의 콜린 작용성 신경을 활성화한다. 현재 상용적으로 사용되고 있는 도네펜질의 제제는 정제(tablet);

알약) 형태이고, 경구제 형태로 알츠하이머병 환자에게 처방 되어 지고 있다.

[0061] [화학식 1]



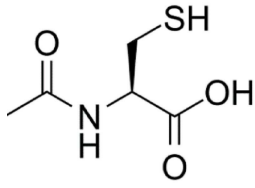
[0062]

[0064] 상기 도네페질의 약학적으로 허용 가능한 염으로는, 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설포산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설페이트, 바이설페이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0066] 본 발명에서 상기 “항산화제”는 우리 몸 안에 생기는 활성산소를 제거하여 산화적 스트레스로부터 인체를 방어하도록 돕는 물질로서 그 종류는 당업계에서 잘 공지되어 있다. 예로써, 상기 항산화제는 N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine), 아스코르브산(ascorbic acid), 알파-리포산(alpha-lipoic acid), 스코폴레틴(scopoletin), 포르시틴(forsythin), 이소페룰릭산(isoferulic acid), 감마-오리자놀(gamma-oryzanol), 트랜스-아네솔(trans-anethol), 티옥산(thioctic acid), 시스테인(cysteamine), 갈릭산(gallic acid), 살비아놀산(salvianolic acid), 비타민 E(vitamin E), 라파아코니틴(lappaconitine), L-셀레노메티오닌(L-selenomethionine), 셀레늄, 코엔자임Q10, 비타민 A, 카테킨, 달트론(daltro) 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 N-아세틸시스테인, 알파-리포산, 달트론 또는 이의 염일 수 있으며, 가장 바람직하게는 N-아세틸시스테인 또는 이의 염일 수 있다.

[0068] 상기 N-아세틸시스테인(N-acetylcysteine)은 약 50년 전에 개발되어 주로 거담제로 사용되거나, 진통제인 아세트아미노펜(acetaminophen) 중독의 치료에 사용되는 하기 화학식 2의 구조를 갖는 산화 스트레스 억제용 약물이다. N-아세틸시스테인은 과산화물, 과산화 수소, 수산화(hydroxyl radical) 등과 직접 반응하여 산화 스트레스를 줄이거나, 또는 글루타치온(glutathione) 생합성의 원료인 시스테인(cysteine)을 제공하여 간접적으로 글루타치온 합성을 증가시킴으로써 항(亢)산화효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. N-아세틸시스테인은 급성 호흡 곤란 증후군의 치료, 급성 폐 산소 독성의 치료 및 조영제에 의한 급성 신부전의 예방 등 다양한 임상 분야에서 수십년간 사용되어 오면서, 부작용을 유발하지 않는 안전한 약물로 알려져 있다.

[0070] [화학식 2]



[0071]

[0073] 본 발명의 일실시예에 따르면, 도네페질과 N-아세틸시스테인을 포함하는 복합제제는 각각의 단일물질과 비교하여 신경세포 보호 및 분화 촉진 효과가 현저히 우수한 것으로 확인되었다.

[0075] 따라서, 도네페질과 N-아세틸시스테인을 포함하는 본 발명의 조성물은 각각의 약물을 단독으로 사용하는 것과 비교하여 더 낮은 용량으로 더 향상된 효과를 나타낼 수 있기 때문에 부작용은 감소하고 뇌질환 치료 효과는 향상되는 이점, 즉 상승작용(synergic effect)의 이점이 있다.

[0077] 효과 A 와 B를 가지는 두 개의 단일 화합물에 대한 블리스 독립 조합 반응값(Bliss independence combined response) C는, $C = A + B - A*B$ 이며, 여기서 각 효과는 0 내지 1의 분수 저해치로 표현된다(문헌[Bliss (1939) Annals of Applied Biology] 참조). 실험적 반응과 계산된 블리스 독립값의 차이로서 정의되는 블리스값은, 조합시킨 두 성분의 효과가 가산적(additive)인지 또는 상승적(synergistic)인지를 나타낸다.

[0079] 블리스값 제로(0)는 가산적이라고 간주된다. 용어 "가산적"이란, 두 종류의 표적 체제를 조합시킨 결과가 개별 약품 각각의 합인 것을 의미한다.

[0081] 용어 "상승효과" 또는 "상승적"이란, 두 종류의 체제 조합의 반응이 개별 체제 각각의 반응의 합보다 큰 것을 의미하는 것으로 사용된다. 보다 특히, 시험관내 상황에서, 상승효과의 한 척도는 "블리스 상승효과"로서 알려져 있다. 블리스 상승효과는, 앞서 정의된 블리스값에 의해 결정되는 "블리스 독립값 초과"를 의미한다. 블리스값이 제로(0)보다 큰 경우, 그것은 상승효과의 지표로 간주된다. 물론, 본 발명에서 사용되는 "상승효과"의 개념은 추가 및/또는 대체 방법에 의해 측정된 시험관내 상승효과도 포함한다.

[0083] 본 발명에서 콜린에스터라제 억제제 및 항산화제의 조합이 시험관내에서 갖는 생물학적 효과(항염증 효과를 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다)가 그 조합의 개별 성분의 합보다 크거나 그와 같다는 것은, 블리스값과 상관될 수 있다. 또한, 본 발명에 사용되는, 성분의 조합이 개별 성분의 합과 같거나 그보다 큰 활성을 나타낼 경우를 포함하는 "상승효과"는 추가 및/또는 대체 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0085] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명의 상기 조성물은 뇌질환을 치료하기 위한 것으로서, 유효량의 콜린에스터라제 억제제 또는 이의 의약적으로 유효한 염, 유도체 또는 대사산물을, 유효량의 항산화제 또는 이의 의약적으로 유효한 염과 상승효과를 달성하는데 충분한 양으로 조합할 수 있다.

[0087] 본 발명의 일 양태에서, 콜린에스터라제 억제제와 항산화제는 1:0.1 내지 2000의 몰비로 조합될 수 있으며, 바람직하게는 1:1 내지 1000의 몰비, 더 바람직하게는 1:50 내지 500의 몰비, 보다 더 바람직하게는 1:100 내지 400의 몰비, 가장 바람직하게는 1:100 내지 350의 몰비로 조합될 수 있다.

[0089] 본 발명에서 상기 허혈성 뇌질환은 뇌혈관 질환으로도 불리며, 혈전, 색전, 뇌혈관비후, 뇌혈관 폐색 등에 의하

여 뇌에 혈류를 공급하는 혈관에 병리학적 이상이 생긴 질환이라면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 허혈성 뇌질환의 비제한적인 예시로, 뇌졸중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상(head trauma), 뇌 순환대사장애, 혈관성 치매 및 뇌기능 혼수가 포함될 수 있다.

- [0091] 본 발명에서 상기 상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 치매, 인지기능장애, 진행성 핵상마비, 다계통 위축증, 감람핵-뇌교-소뇌 위축증(OPCA), 샤이-드래거 증후군, 선조체-흑질 퇴행증, 헌팅턴병, 근위축성 측색 경화증(ALS), 본태성 진전증, 피질-기저핵 퇴행증, 미만성 루이 소체 질환, 파킨스-ALS-치매 복합증, 니만 픽병 및 픽병으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0093] 상기 인지기능장애는 노화와 깊은 관련을 가지면서, 정상적인 노화의 과정과는 달리 급속하게 신경계의 일부 또는 뇌 전체에 비정상적인 신경세포의 죽음이 일어나 뇌와 척수의 기능이 상실되어 인지 능력이 감소하는 질환이라면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 인지기능장애의 비제한적인 예시로 경도 인지장애, 알츠하이머병, 전두측두 치매, 루이소체 질환, 피질-기저핵 퇴행증, 학습장애, 실인증, 건망증, 실어증, 실행증 및 섬망이 포함될 수 있다.
- [0095] 상기 “예방”은 병리학적 현상의 발생 빈도 또는 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다. 예방은 완전할 수 있으며 또는 부분적일 수도 있다. 이 경우에는 개체 내의 발암 증상이 상기 조성물을 사용하지 않은 경우와 비교하여 감소하는 현상을 의미할 수 있다.
- [0097] 상기 “치료”는 치료하고자 하는 대상 또는 세포의 천연 과정을 변경시키기 위하여 임상적으로 개입하는 모든 행위를 의미하며, 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위하여 수행할 수 있다.
- [0099] 목적하는 치료 효과는 질병의 발생 또는 재발을 예방하거나, 증상을 완화시키거나, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과를 저하시키거나, 질병 진행 속도를 감소시키거나, 질병 상태를 경감 또는 일시적 완화시키거나, 예후를 개선시키는 것을 포함할 수 있다.
- [0101] 본 발명의 조성물에서 상기 도네페질과 N-아세틸시스테인은 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여될 수 있고, 상기 도네페질과 N-아세틸시스테인은 체내에서 공동 작용을 통해 뇌질환 예방 또는 치료 활성을 나타낼 수 있다.
- [0103] 통상적으로 상기 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제는 조성물로서 동시에 투여되는 것이 일반적일 것이나, 시차를 두고 상기 각 유효성분이 인체에 투여되더라도 개별적으로 투여된 각 유효성분이 체내에서 동시에 작용함으로써 동등한 수준의 치료 활성을 구현할 수 있다.
- [0105] 구체적으로 '동시에 투여'란 상기 두 유효성분을 함께 동일한 투여 경로를 통하여 투여하거나, 또는 실질적으로 동일한 시간(예를 들어 투여 시간 간격이 15분 또는 그 이하)에 각각 동일 또는 상이한 투여 경로를 통하여 투여하는 것을 의미하는 것이다. 상기 개별적으로 투여란 상기 두 유효성분을 일정 시간 간격(예를 들어, 3일 간격)을 두고 동일 또는 상이한 투여 경로를 통하여 투여하는 것을 의미한다. 상기 순차적으로는 환자의 질환 상태에 따라 상기 두 유효성분을 일정한 선후 규칙을 가지고 동일 또는 상이한 투여경로를 통하여 투여하는 것을 의미한다.
- [0107] 투여 경로로는 경구적 또는 비경구적으로 투여될 수 있다. 비경구적인 투여방법으로는 이에 한정되지는 않으나 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 신경내, 뇌실내(뇌실하 영역), 뇌혈관 내, 복강

내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여될 수 있다.

[0109] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양의 도네페질 및 N-아세틸시스테인만을 포함하거나, 추가적으로 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 상기 '약학적으로 유효한 양'이란 음성대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며, 바람직하게는 뇌질환을 치료 또는 예방하는데 있어서 상기 두 유효성분을 병용 투여함으로써 수명 증가, 운동성 향상, 신경염증 억제, 신경세포 사멸 억제, 신경세포 분화 촉진 효과를 나타내는데 충분한 양을 의미하는 것이다.

[0111] 본 발명의 상기 약학적 조성물은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 병용함에 따른 상승 효과를 나타내기 위해 약학적으로 허용되는 담체와 함께, 당업계에 공지된 방법으로 투여경로에 따라 다양하게 제형화될 수 있다. '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성성분의 작용을 저해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다. 상기 담체로는 모든 종류의 용매, 분산매질, 수중유 또는 유중수 에멀전, 수성 조성물, 리포솜, 마이크로비드 및 마이크로솜이 포함된다. 상기 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 그밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[0113] 상기 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로, 경구 투여시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 또는 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소 투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

[0115] 또한, 본 발명의 조성물은 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 비경구용 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용액, 현탁제, 유제 또는 동결건조제, 주사제, 경피투입제, 비강흡입제 등으로, 경구 투여시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽 또는 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있다. 주사제의 경우에는 단위 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 헵크스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 텍스트로스와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.

[0117] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 부위로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내 주사제, 근육 주사제 또는 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액 또는 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르 (예로, 올레인산에칠 등), 알코올류(예로, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜 또는 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제 (예로, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토크페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제 (예로, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약제학적 담체를 포함할 수 있다. 본 발명의

조성물을 이용하여 퇴행성 신경질환을 치료 또는 예방하는 방법은, 본 발명의 치료용 조성물의 유효량(약학적 유효량)을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 것을 포함한다. 상기 약학적 유효량은 질환의 종류, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법, 투여 횟수, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0119] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다.

[0121] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1kg 당 약 0.01 μ g 내지 10,000mg, 가장 바람직하게는 0.1 μ g 내지 500mg일 수 있다. 그러나 상기 약학적 조성물의 용량은 제제화 방법, 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 본 발명의 조성물의 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

[0123] 본 발명의 상기 조성물은 투여 방법과 투여 경로에 따라, 구성요소인 도네페질 및 N-아세틸시스테인이 하나의 제형에 동시에 포함되도록 제형화될 수도 있고, 상기 각 구성요소가 개별적으로 제형화되어 일일 또는 일회 등의 투여 단위에 따라 하나의 포장에 포함될 수 있다. 개별적으로 제형화된 도네페질 및 N-아세틸시스테인의 제형은 동일할 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 구체적인 제제화 방법과 제형에 포함될 수 있는 약학적으로 허용가능한 담체는 상기 약학적 조성물에서 전술한 바와 같으며, 다음의 문헌을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[0125] 본 발명은 또한 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 포함하는 허혈성 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0127] 본 발명은 또한 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0129] 본 발명의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다.

[0131] 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 이에 한정되지 않지만 예를 들면, 건강식품으로는 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용할 수 있도록 액상화, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 도네페질 및 N-아세틸시스테인과 감염성 질환에 효과가 있다고 알려진 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다. 또한, 기능성 식품으로는 이에 한정되지 않지만 음료(알콜성 음료 포함), 과실 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지, 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 옛, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 첨가제의 형태로 사용

하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다.

[0133] 본 발명의 식품 조성물 중 도네페질 및 N-아세틸시스테인의 바람직한 함유량으로는 이에 한정되지 않지만 바람직하게는 최종적으로 제조된 식품 중 0.1 내지 90 중량%이다. 더 바람직하게는, 본 발명의 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 유효성분으로 함유하는 식품 조성물은 특히, 감염성 질환에 효과가 있는 것으로 알려진 활성 성분과 함께 혼합하여 건강기능식품 또는 식이보충제의 형태로 제조될 수 있다.

[0135] 본 발명은 또한 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 동물의 허혈성 뇌졸중 치료 방법을 제공한다.

[0137] 본 발명은 또한 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여하는 단계를 포함하는, 인간을 제외한 동물의 퇴행성 신경질환 치료 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0139] 본 발명에 따른 조성물은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 병용 투여함으로써 단독 투여에 비하여 상승된 허혈성 뇌졸중 및 퇴행성 신경질환의 예방 및 치료효과를 나타낼 수 있으며, 각 약물의 과량 투여 또는 장기 투여에 의해 유발될 수 있는 부작용을 경감시킬 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0141] 도 1은 신경세포(SH-SY5Y)에 산화스트레스를 유발한 후 도네페질 단독, N-아세틸시스테인(NAC) 단독 또는 도네페질 + NAC 복합처리(NDC-002) 후 활성산소 감소량(항산화 효과)을 평가한 결과이다.

도 2는 미세아교세포(BV2 cell)에 염증 반응 유도 물질인 LPS (lipopolysaccharide)와 함께 도네페질 또는 NAC를 단독 또는 복합 처리한 후 발생하는 IL-6 (Interleukin-6) 수치를 측정하여 항염증 효과를 평가한 결과이다.

도 3은 미세아교세포에 LPS와 함께 도네페질 단독, NAC 단독 또는 도네페질 + NAC 복합처리 후 발생하는 NO 농도를 측정된 결과이다.

도 4는 미세아교세포에 LPS와 함께 도네페질과 항산화제 계열 약물 복합처리 후 발생하는 NO의 양을 측정하여 NAC 유사 계열 약물의 항염증 효과를 평가한 결과이다.

도 5는 미세아교세포에 LPS와 함께 도네페질과 항산화제 계열 약물 복합처리 후 살아있는 세포 수를 측정하여 NAC 유사 계열 약물의 세포 독성을 평가한 결과이다.

도 6은 미세아교세포에 LPS와 함께 도네페질 단독, 항산화제 계열 약물 단독 또는 도네페질 + 항산화제 계열 약물 복합처리 후 발생하는 NO 농도를 측정된 결과이다.

도 7은 신경전구세포(ReNcell VM)에 도네페질 단독, NAC 단독 또는 도네페질 + NAC 복합처리 후 운동신경세포 마커인 HB9의 발현량을 평가한 결과이다.

도 8은 신경전구세포에 콜린에스터라제 억제제 계열 약물과 NAC 복합처리 후 운동신경 세포 마커인 HB9의 발현량과 살아있는 세포 수를 측정하여 도네페질 유사계열 약물의 분화 촉진 효과 및 세포 독성을 평가한 결과이다.

도 9는 신경전구세포에 도네페질과 항산화제 계열 약물 복합처리 후 운동신경세포 마커인 HB9의 발현량을 측정하여 NAC 유사 계열 약물의 분화 촉진 효과를 평가한 결과이다.

도 10은 신경전구세포에 도네페질과 항산화제 계열 약물 복합처리 후 살아있는 세포 수를 측정하여 NAC 유사 계열 약물의 세포 독성을 평가한 결과이다.

도 11은 마우스 태아의 뇌로부터 일차 배양한 신경세포에 도네페질 단독, NAC 단독 또는 도네페질 + NAC 복합처리 후 시냅스 가소성 조절에 관여하는 PSD-95 와 pCREB 의 발현차이를 측정한 결과이다.

도 12는 뇌졸중-재관류 동물모델 유도 후 도네페질 단독, NAC 단독 또는 도네페질 + NAC 복합물을 21일간 처리한 후 1,3,7,14, 21일에 Rotarod latency test의 회복 상승폭을 통해 단독 대비 복합물의 운동기능 회복 효과를 평가한 결과이다.

도 13은 뇌졸중-재관류 동물모델 유도 후 즉시 도네페질 단독, NAC 단독 또는 도네페질 + NAC 복합제를 21일간 처리한 후 뇌 손상부위 정도를 정량화하여 나타낸 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0142] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0144] 실시예 1 : 도네페질 + NAC 복합물의 항산화 효과

[0145] 뇌혈관 질환 중 허혈성 뇌졸중의 경우 허혈 부위에 혈류가 감소하면서 유리 산소기 (free radical) 가 다량으로 생산되고, 그 결과 산화 대사물이 축적된다. 이때 발생하는 유리 산소기는 산화 스트레스를 유발하여 뇌세포를 포함한 여러 기관에 영향을 줄 수 있다. 세포는 활성산소로부터 받는 손상을 최소화하기 위해 항산화제와 항산화 효소를 활성화시켜 중간 부산물(free radical intermediate)을 제거하고, 산화 반응을 억제하여 세포와 신체를 방어한다.

[0147] 본 발명에서는 신경세포 (SH-SY5Y)에 H₂O₂를 처리하여 산화스트레스를 유발시킨 뒤 대조군, 도네페질 단독(5μM), N-아세틸시스테인(NAC) 단독(5μM) 및 도네페질(2.5μM)+NAC(2.5μM) 복합처리 후 활성산소(Reactive oxygen species; ROS) 발생량을 측정하였다.

[0149] 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이 복합처리군에서 ROS가 대조군 대비 유의하게 감소하였으며, 복합처리군은 도네페질 및 NAC 각각의 단독 투여군보다 현저히 향상된 감소율을 보여, 항산화 효과에서 병용에 따른 시너지 효과가 나타난 것을 확인할 수 있었다 (***P*<0.01, *****P*<0.0001, one-way ANOVA)

[0151] 실시예 2 : 도네페질 + NAC 복합물의 항염증 효과

[0152] 본 발명에서는 미세아교세포 (BV2 cell)에 LPS를 처리하여 염증 반응을 일으킴과 동시에 도네페질 단독, NAC 단독 또는 도네페질 + NAC 복합 처리 후 발생하는 일산화질소(Nitrogen Oxide, NO) 또는 염증 마커 (IL-6) 발현량을 측정하여 약물의 신경염증 완화 효과를 확인하였다.

[0154] 미세아교세포에 LPS를 처리하여 염증 반응을 일으킴과 동시에 도네페질 단독, NAC 단독 또는 도네페질 + NAC 복합 처리 후 염증 마커 IL-6의 발현량을 측정한 결과, 도 2와 같이 도네페질 + NAC 복합 처리 시에 가장 현저한 항염증 효과를 보이는 것을 확인하였다. (**** *P* < 0.0001, one-way ANOVA)

[0156] 도 3과 같이 미세아교세포에 LPS처리와 함께 도네페질 단독, NAC 단독 또는 도네페질 + NAC 복합 처리 후 NO 발생량 감소를 정량화하여, 도네페질 + NAC 복합물이 동일 농도의 단일 약물에 비하여 유의미하게 향상된 항염증 효과를 보이는 것을 확인하였다. (**P* < 0.05, ***P* < 0.01, *** *P* < 0.001, **** *P* < 0.0001, one-way ANOVA)

- [0158] 도네페질과 NAC의 복합 처리 시 보여지는 항염증효과가 도네페질과 NAC와 유사계열 약물의 조합에서도 보여지는 지 확인하기 위하여 미세아교세포에 LPS와 함께 도네페질 + NAC의 유사 계열인 항산화제 약물들 (22 종류) 복합 처리 후 발생하는 NO의 양과 살아있는 세포 수를 측정하여 유사계열의 약물 조합에서 세포 독성을 보이지 않는 농도에서 항염증 효과를 확인하였다.
- [0160] 그 결과, 도 4 및 도 5와 같이 도네페질 + 항산화제 복합 처리 조합에서도, LPS만 처리한 그룹에 비하여 유의미하게 NO의 감소를 보였고,
- [0161] 도 6에서와 같이 도네페질 + 항산화제 복합 처리시의 효과가 동일 농도의 단일 약물과 비교하여 시너지 효과를 나타낸 것으로 확인되었다. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, one-way ANOVA)
- [0163] **실시예 3 : 도네페질 + NAC 복합물의 신경전구세포 분화 촉진 효과**
- [0164] 뉴런(Neuron)과 신경아교세포(Glial cell)로 분화할 수 있는 신경전구세포인 ReNcell VM(immortalized human neural progenitor cell line)에 도네페질 단독, NAC 단독 및 도네페질 + NAC 복합처리 후 운동신경세포에 선택적으로 특이적인 결합을 할 수 있는 항체 (anti-HB9 antibody)를 사용하여 면역 염색을 진행하였다. 그 후, HB9 positive signal의 수치를 분석하여 운동신경세포의 수를 확인함으로써, 신경전구세포가 운동신경세포로 분화하는 정도를 측정하였다.
- [0166] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 복합처리군에서 각각의 물질 단독 처리군과 비교해 신경전구세포 분화 촉진에 시너지 효과가 나타난 것으로 확인되었다. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, one-way ANOVA)
- [0168] 도네페질 외 다른 아세틸콜린에스터라제 저해제 + NAC의 복합처리시 그리고, 도네페질 + 항산화제 병용 투여에서도 또한 운동 신경 세포로의 분화능을 갖는지 확인하기 위하여 신경전구세포에 도네페질의 유사계열 약물인 콜린에스터라아제 억제제 약물들 (8 종류) + NAC 혹은 도네페질 +NAC의 유사계열인 항산화제 약물들 (15 종류) 복합 처리 후 HB-9 수치와 살아있는 세포 수를 측정하여 유사 계열 약물 조합의 운동신경세포 분화 촉진 효과 및 세포 독성을 확인하였다.
- [0170] 그 결과, 도 8과 같이 8 종류의 도네페질 유사계열 약물 + NAC 복합 처리 조합에서 도네페질 + NAC 복합처리에 보였던 것과 같이 대조군에 비하여 유의미하게 증가된 운동신경세포로의 분화 촉진 효과를 확인하였다. 또한 도 9 및 도 10과 같이 도네페질 + NAC 유사계열 약물 15 종류의 복합 처리에서도 도네페질 + NAC 복합 처리에서와 같이 대조군에 비하여 유의미하게 증가된 운동신경세포로의 분화 촉진 효과를 확인하였다. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, one-way ANOVA)
- [0172] **실시예 4 : 도네페질 + NAC 복합물의 시냅스 가소성 향상 효과**
- [0173] 마우스 신경세포 (Primary neuron culture)에 도네페질 단독, NAC 단독 또는 도네페질 + NAC 복합 처리 후 Western blot assay를 통해 시냅스 가소성의 바이오 마커인 PSD-95와 pCREB의 발현량을 측정하였다.
- [0175] 그 결과, 도 11과 같이 도네페질 + NAC 복합 처리군에서 대조군 대비 PSD-95 발현 증가 및 pCREB의 증가 효과에 시너지 경향을 보여, 도네페질 + NAC 복합 약물의 시냅스 가소성 향상 효과를 확인하였다. (** $P < 0.01$, one-way ANOVA)

- [0177] 참고로, 인지능력 및 기억력 개선 가능성을 확인하기 위하여 유형별 바이오 마커들이 존재한다. 유형별로 신경 세포 사멸 억제를 통한 신경세포 보호효과, 베타 아밀로이드 형성 및 축적 억제, 신경염증 억제, 신경전달 물질 생성, 분비 및 대사 조절 그리고 시냅스 가소성 조절 등이 있다.
- [0179] 시냅스 가소성 조절은 신경세포간의 신호전달에 관여함으로써 인지능력 효과를 보는 중요한 유형으로, 그 바이오 마커로는 Postsynaptic density-95(PSD-95), CREB, BDNF 등이 있다.
- [0181] Postsynaptic density-95 (PSD-95) 는 시냅스 후 치밀질 (PSD)에 포함되는 필수적인 기능 분자군으로 NMDA 수용체, CaMKII를 비롯하여 장기증강 (long-term potentiation, LTP)유도에 필수적인 역할을 한다. Neuroligin, NMDA 수용체, AMPA 수용체, 칼륨 채널 등에 직간접적으로 결합하여, 시냅스 가소성 및 LTP 동안의 시냅스 변화의 안전성에 중요한 역할을 한다. (Ehrlich et al., PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization, PNAS 2007./ Nagura et al., Impaired synaptic clustering of postsynaptic density proteins and altered signal transmission in hippocampal neurons, and disrupted learning behavior in PDZ1 and PDZ2 ligand binding deficient PSD-95 knockin mice, Molecular Brain, 2012.)
- [0182] 한편, cAMP response element-binding protein (CREB)은 기억과 시냅스 가소성에 관련된 다양한 유전자의 프로모터 부위에 결합하는 전사인자로, CREB의 활성화는 기억 형성 및 강화와 관련된 유전자 (BDNF 등)의 전사를 유도하는 것으로 알려져 있다. (Mizuno et al., CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. Behavioural Brain Research, 2002. / Kida et al., Functional roles of CREB as a positive regulator in the formation and enhanced of memory, Brain Research Bulletin, 2014)
- [0184] 따라서, PSD-95의 발현 증가와 pCREB 발현 증가에 시너지 효과를 나타내는 도네페질 + NAC 복합요법은 인지능력 및 기억력 개선에 시너지 효과를 나타낼 것임을 알 수 있다.
- [0186] **실시예 5 : *in vivo* 실험모델에서 도네페질 + NAC 복합 약물의 단일 대비 시너지 효력 확인**
- [0187] Sprague-Dawley rat(SD rat)을 이용한 뇌경색-재관류 모델을 이용하여 뇌졸중 모델을 제작하였으며, 도네페질 단독, NAC 단독, 도네페질 + NAC 복합 (NDC-002)을 뇌경색-재관류 모델 직후 I.V. 로 21일 간 투여하며 실험을 진행하였다.
- [0188] 뇌졸중 실험 동물모델의 대표적인 운동 조정 평가 시험이 Rota-rod latency 검사를 통하여 동물의 운동 기능을 도네페질 단독, NAC 단독 및 도네페질 + NAC 복합 약물 투여 후 1,3,7,14, 21일째 측정하고 1일째의 결과를 기준으로 운동 기능의 회복율을 분석하였다.
- [0190] 그 결과 도 12에 나타낸 바와 같이 NDC-002 투여군만이 Vehicle 투여군 대비 유의미한 회복율 증가를 보여 NDC-002 복합 약물의 운동 기능 회복 효과를 나타내는 것으로 확인되었다 (** $P < 0.01$, one-way ANOVA).
- [0192] 또한, 도네페질 + NAC 복합 약물 투여군에서의 운동기능 회복율은 도네페질 단독, NAC 단독 투여군 대비 유의미한 회복률 증가를 보여 NDC-002 복합 약물의 운동기능 회복에 있어 시너지 효과를 확인하였다 (### $P < 0.001$, one-way ANOVA).
- [0194] 뇌졸중-재관류 모델 직후부터 도네페질 단독, NAC 단독 및 도네페질 + NAC 복합 약물을 21일간 투여한 후 뇌조직을 신경세포 (NeuN), 미세아교세포(GFAP) 마커 항체, 세포핵 염색액(DAPI)을 통해 면역조직염색법으로 염색하여 뇌 손상 부위 정도를 분석한 결과, 도 13에 나타낸 바와 같이 NDC-002 복합 투여군에서만 Vehicle 투여군 대비 유의미한 뇌 손상 정도 감소를 확인하였다(* $P < 0.05$, one-way ANOVA).

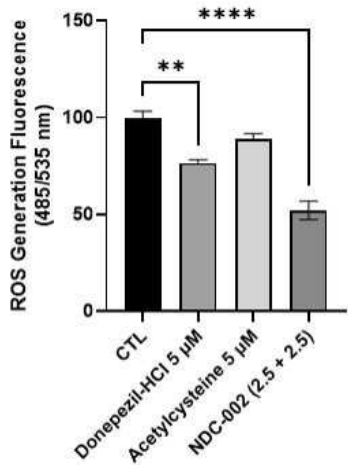
산업상 이용가능성

[0196]

본 발명에 따른 조성물은 콜린에스터라제 억제제(Cholinesterase inhibitor) 및 항산화제를 병용 투여함으로써 단독 투여에 비하여 상승된 뇌 질환의 예방 및 치료효과를 나타낼 수 있으며, 각 약물의 과량 투여 또는 장기 투여에 의해 유발될 수 있는 부작용을 경감시킬 수 있는 효과가 있어 산업상 이용가능성이 높다.

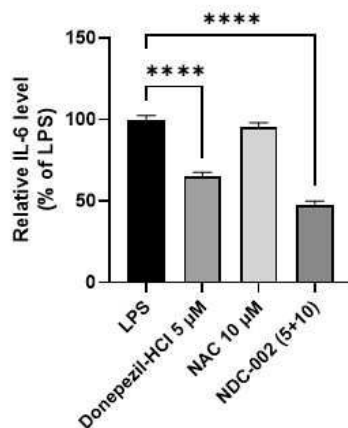
도면

도면1



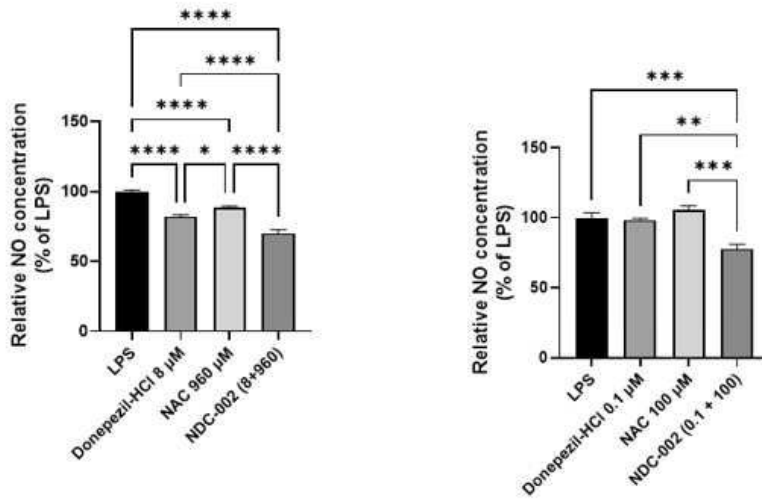
NDC-002 실제 효과	Bliss Independence 예측 효과	시너지
47.8	31.95	○

도면2



NDC-002 실제 효과	Bliss Independence 예측 효과	시너지
52.29	37.82	○

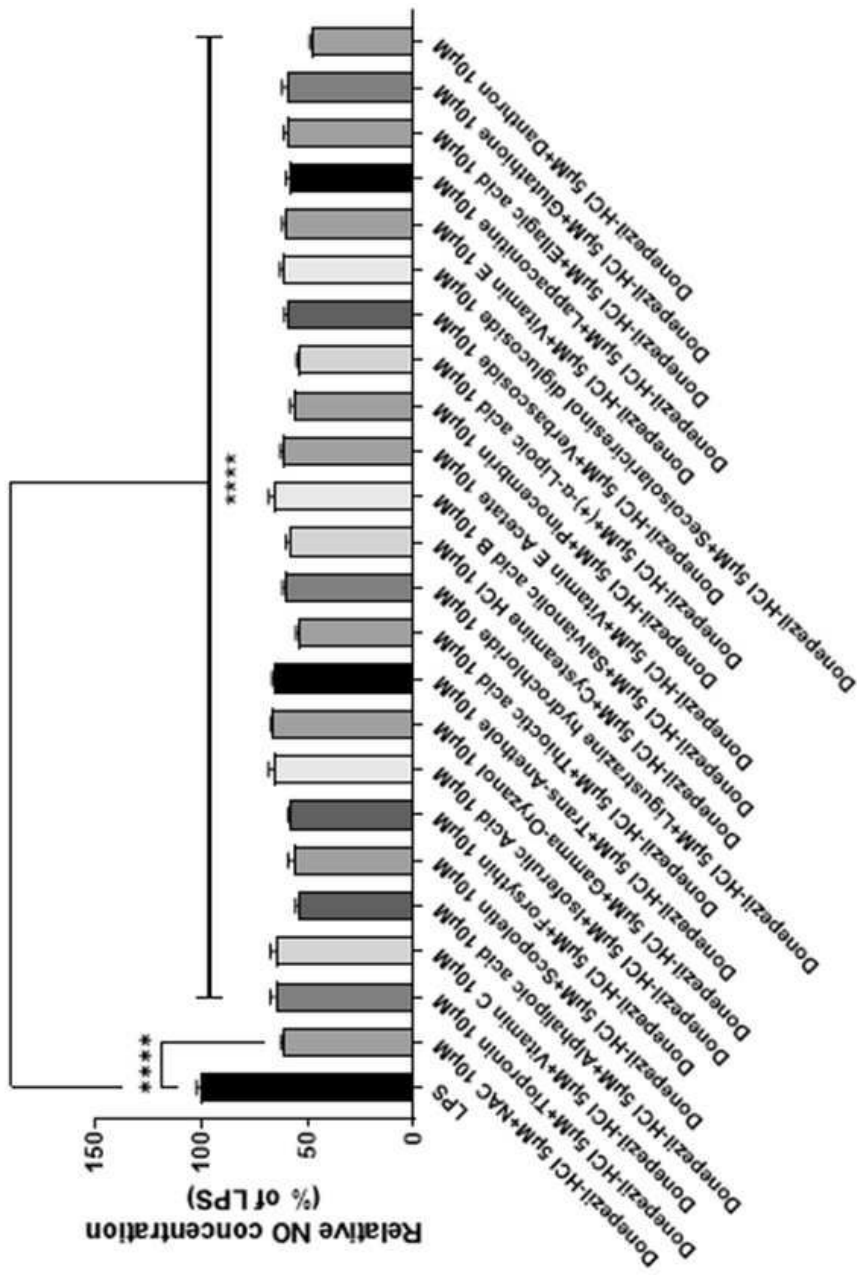
도면3



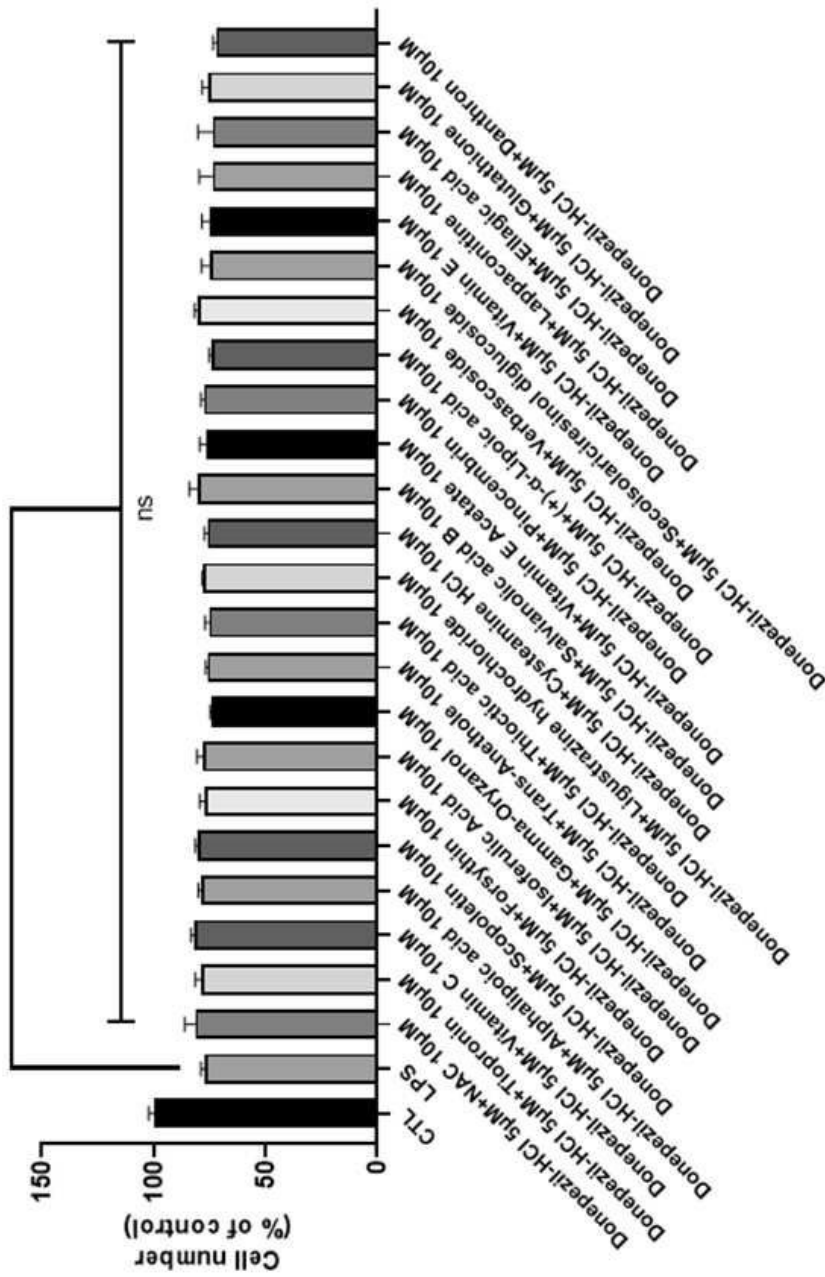
NDC-002 실제 효과	Bliss Independence 예측 효과	시너지
29.93	27.37	○

NDC-002 실제 효과	Bliss Independence 예측 효과	시너지
22.2	-3.91	○

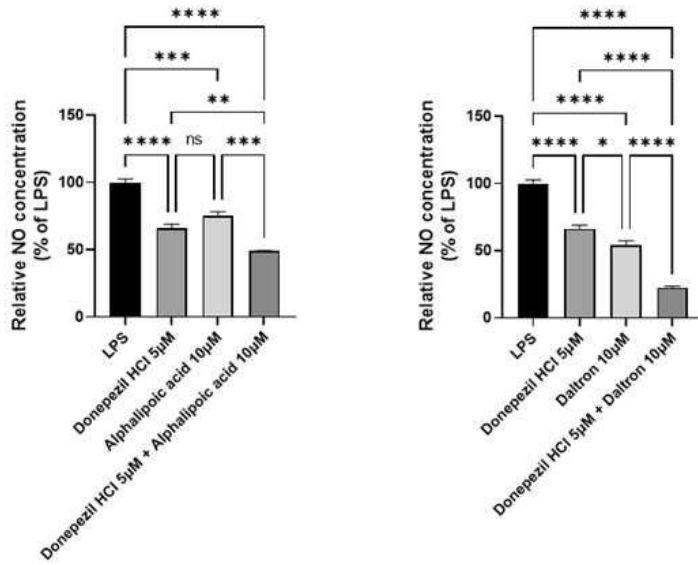
도면4



도면5



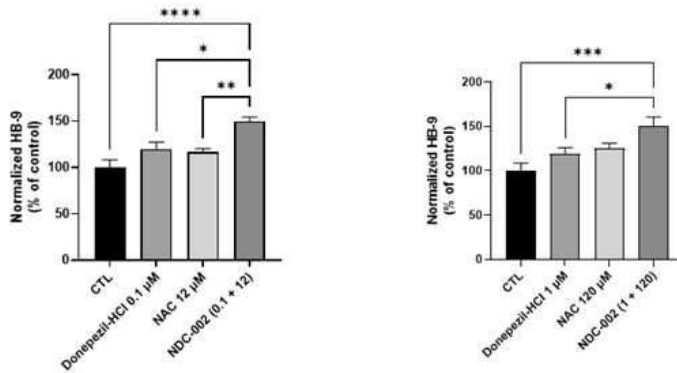
도면6



NDC-002 실제 효과	Bliss Independence 예측 효과	시너지
51.06	50.29	○

NDC-002 실제 효과	Bliss Independence 예측 효과	시너지
77.32	64.07	○

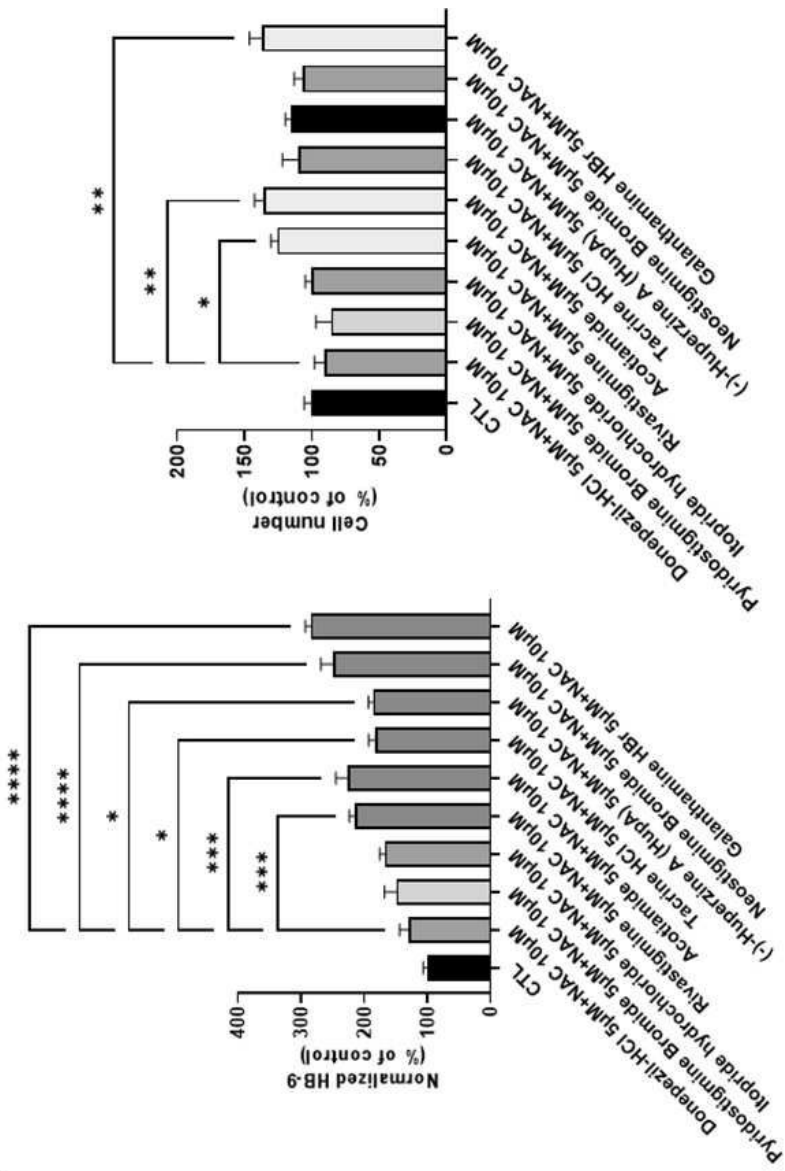
도면7



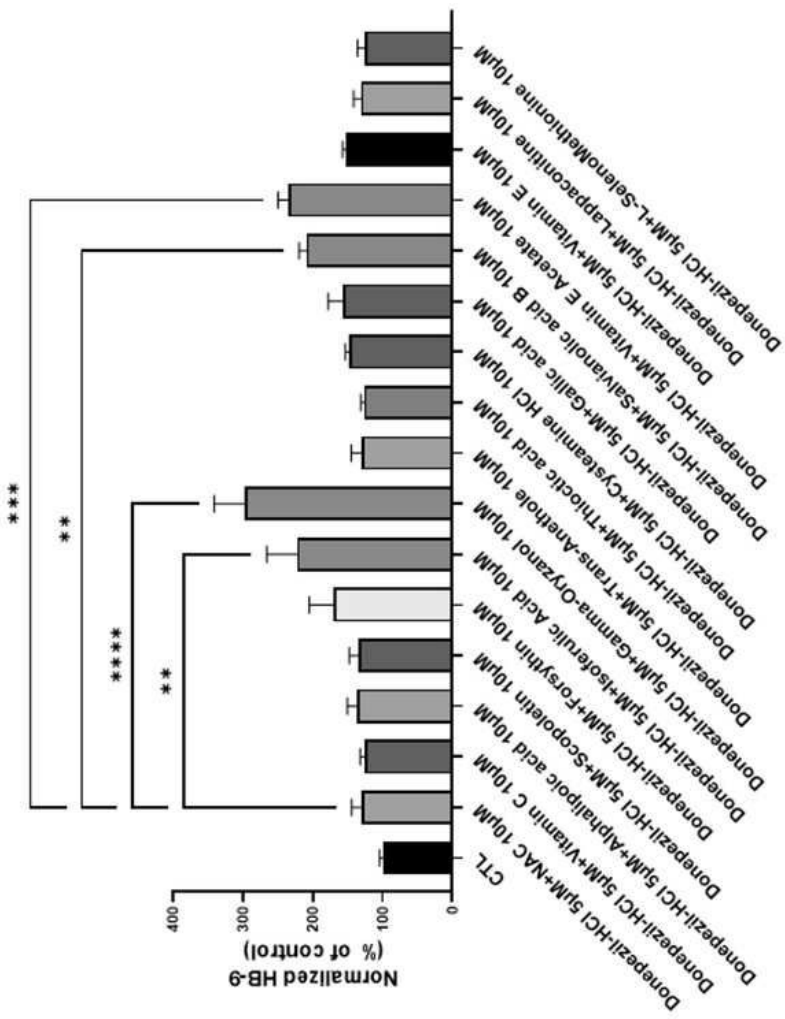
NDC-002 실제 효과	Bliss Independence 예측 효과	시너지
50.1	33.36	○

NDC-002 실제 효과	Bliss Independence 예측 효과	시너지
50.83	39.73	○

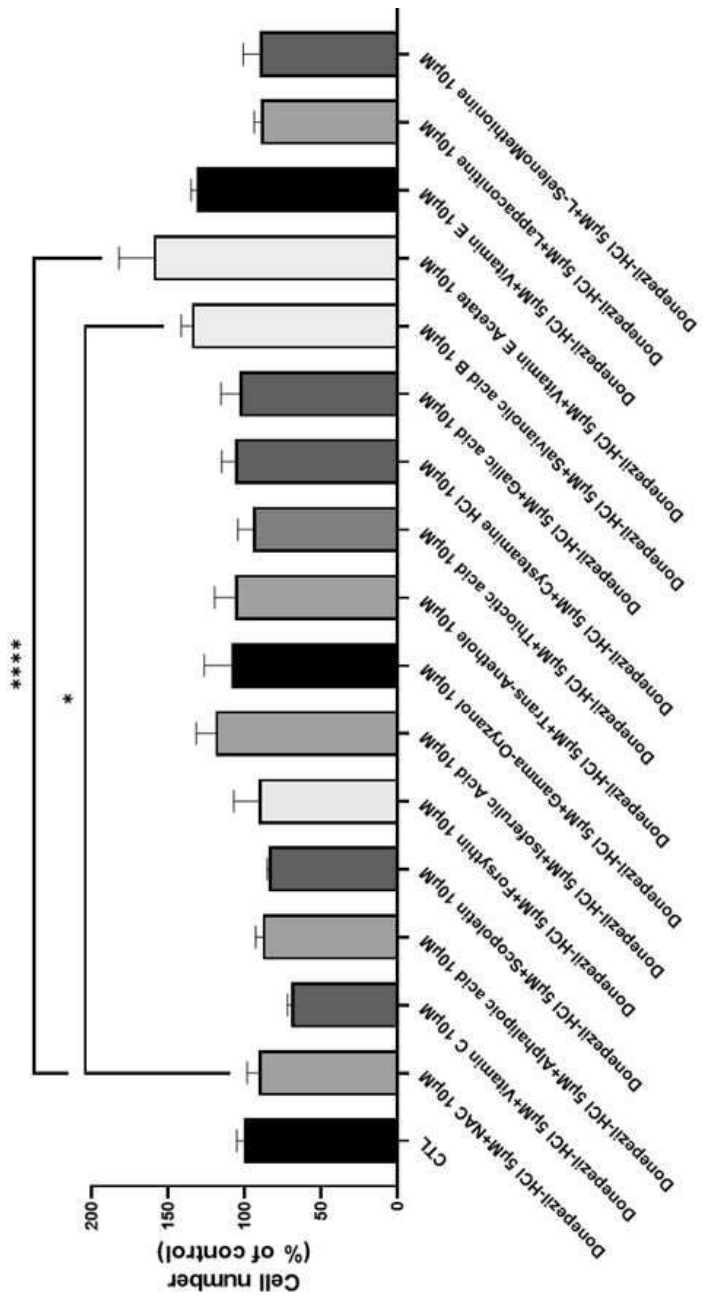
도면8



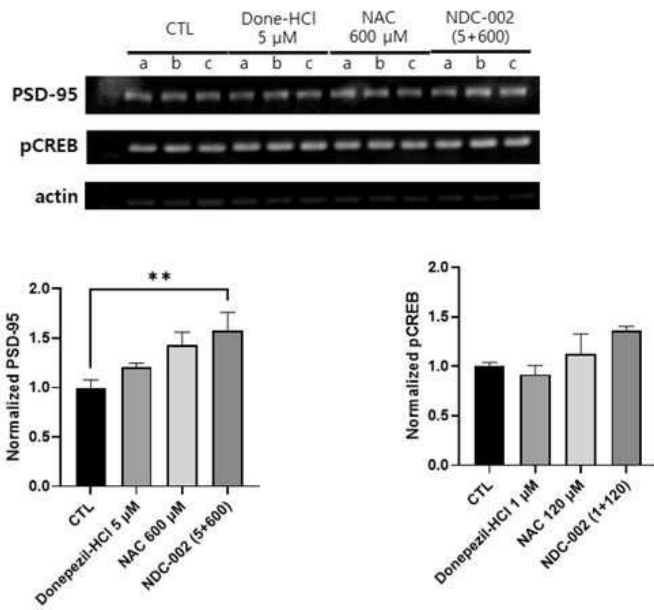
도면9



도면10

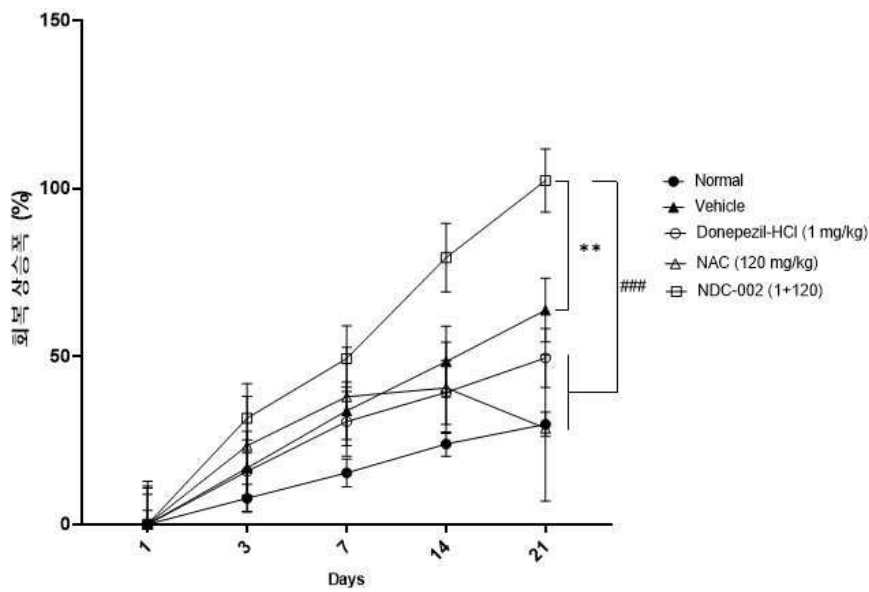


도면11



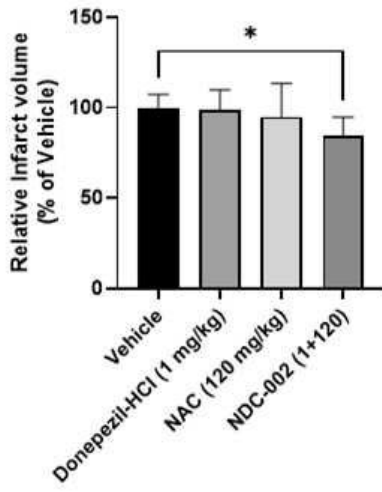
NDC-002 실제 효과	Bliss Independence 예측 효과	시너지	NDC-002 실제 효과	Bliss Independence 예측 효과	시너지
57.88	54.14	○	36.16	5.55	○

도면12



- * Vehicle 대비 유의성
- # 단일 대비 유의성

도면13



NDC-002 실제 효과	Bliss Independence 예측 효과	시너지
16.66	3.77	O