



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년12월05일
(11) 등록번호 10-1804849
(24) 등록일자 2017년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/225 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/225 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0145705
(22) 출원일자 2016년11월03일
심사청구일자 2016년11월03일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020150144370 A
KR1020150144370 A

(73) 특허권자
가천대학교 산학협력단
경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
진옥
인천광역시 연수구 갯벌로 155 가천대학교 이길여
암당노연구원
차선신
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 이화여자대
학 자연과학대학 화학생명분자과학부
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 6 항

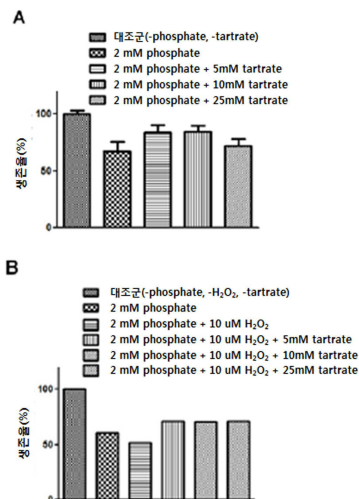
심사관 : 박수진

(54) 발명의 명칭 타르타르산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 타르타르산염(tartrate)을 유효성분으로 함유하는 퇴행성뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 DJ-1의 과발현 세포에 무기인(Inorganic phosphate, P_i)을 처리하였을 때 DJ-1의 응집이 유도되는 것을 확인하였고, 타르타르산염이 DJ-1과 P_i 의 결합부위에 경쟁적으로 결합하여 DJ-1/타르타르산염 복합체를 형성함으로써 P_i 로 유도된 DJ-1의 응집 및 P_i 또는 활성산소로 유도된 세포사멸을 억제하는 것을 확인하여, 본 발명의 타르타르산염은 퇴행성뇌질환 예방 및 치료용 조성물로써 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R 1A2A2A 01004168

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 개인연구지원사업

연구과제명 미생물 특이적 전사 인자인 Fur 계열 단백질들이 기능적 다양성을 획득하는 분자적 원리 연구

기 여 율 25/100

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015M 1A5A 1037480

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 해양극지기초원천기술개발사업

연구과제명 Tubeworm 공생미생물유래 β -lactamase의 고분해능 3차 구조를 활용한 신규 저해제 개발

기 여 율 25/100

주관기관 이화여자대학교

연구기간 2016.06.23 ~ 2017.06.22

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 GCU-2015-5164

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업-일반연구자지원사업-기본연구지원사업

연구과제명 신규 표적 단백질인 Meox-1에 의한 유방암 전이·암줄기세포화 분자기전 규명 및 유방암 유전체 의학 실현을 위한 신약 타겟 발굴

기 여 율 25/100

주관기관 가천대학교

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012R1A2A2A01002728

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업

연구과제명 TrkC에 의해 cancer enviroment 변화로 인한 유방암 암줄기세포 형성 기전 규명

기 여 율 25/100

주관기관 가천대학교

연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

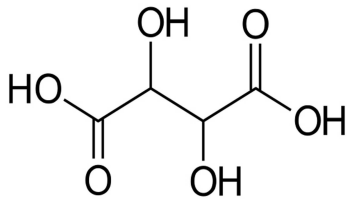
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 퇴행성뇌질환은 뇌졸중(Stroke), 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머 치매(Alzheimer's disease), 헌팅톤병(Huntington's disease), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 알코올성 뇌신경질환, 척수손상(spinal cord injury) 또는 알코올성 치매 및 베르니케-코르사코프 증후군(Wernicke-Korsakoff's syndrome)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 뇌 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 Pi(Inorganic phosphate)에 의한 DJ-1 단백질의 응집을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

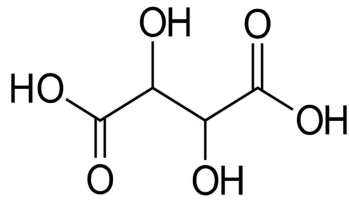
청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 화합물은 Pi 또는 산화스트레스에 의한 세포사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성뇌질환의 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 퇴행성뇌질환은 뇌졸중(Stroke), 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머 치매(Alzheimer's disease), 헌팅톤병(Huntington's disease), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 알코올성 뇌신경질환, 척수손상(spinal cord injury) 또는 알코올성 치매 및 베르니케-코르사코프 증후군(Wernicke-Korsakoff's syndrome)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성뇌질환의 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 타르타르산염(tartrate), 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 퇴행성뇌질환 환자의 뇌에서 공통적으로 발견되는 병리학적 특징으로는 신경세포의 사멸과 특정단백질의 비정상적 응집이 있다. 아밀로이드 베타(amyloid β), 노인반(senile plaque), 신경섬유농축제(neurofibrillary tangle), 알파 시누클린(α -synuclein) 또는 루이소체(lewy body)등의 단백질의 비정상적 응집이 그 자체로 신경세포의 사멸을 유도하거나, 미세아교세포를 활성화해 염증반응을 일으킴으로써 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 또는 파킨슨병(Parkinson's disease) 등의 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 대뇌 흑질(substantia nigra, SN)부위의 도파민성 신경세포(dopaminergic neuron)의 사멸과 더불어 흑질의 도파민성 뉴런내에 존재하는 알파 시누클린의 응집은 파킨슨병의 주요 병리현상이다. 또한, α -synuclein(SNCA), parkin (PARK 2), leucine-rich repeat kinase 2(PARK 8), PTEN-induced putative kinase 1(PINK 1) 또는 DJ-1(PARK 7)등의 유전자들이 파킨슨병의 원인으로 알려져 있다.

[0004] 그중 DJ-1은 20 kDa의 유비퀴틴-세포질성(ubiquitin cytoplasmic) 핵단백질로, 다양한 인간 조직에서 발현되며 Ras와 관련된 신호경로에서 마이트젠 의존적 발암유전자(mitogen-dependent oncogene)로 처음 알려졌다(Nagakubo 등, 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun. 231, 509-513). DJ-1은 또한, 산화스트레스가 진행되는 동안 DJ-1은 글루타티온(glutathione)의 합성을 촉진시키고 A53T 시누클린의 독성을 억제하기 때문에, DJ-1이 정상적으로 기능할 때는 도파민 세포의 사멸이 방지되지만, DJ-1 유전자에 변이가 생기면 기능이상으로 이어져 도파민 세포의 사멸을 촉발시키는 것이 확인되면서 파킨슨병과의 관련성이 알려졌다(Zhou W., 2005, J. Biol. Chem., 280, 43150-43158).

[0005] 정상적인 DJ-1 기능에 대한 몇몇 보고에 따르면, DJ-1의 시스테인 잔기(Cys106)는 과산화수소(hydrogen peroxid, H_2O_2)에 의해 쉽게 산화되고(Lee S.J.등, 2003, J. of Biol. Chem., 278, 44552-44559), 산화된 Cys106은 알파 시누클린의 응집을 억제하며(Shendelman S.등, 2004, PLoS Biol., 2, e362), 또한 DJ-1은 Daxx/ASK1 세포신호경로를 억제함으로써 활성산소에 의한 도파민성 신경세포의 사멸을 보호한다(Junn E.등, 2005, PNAS, 102, 9691-9696).

[0006] 한편, 상기에서 설명한 바와 같이 DJ-1의 기능이상은 파킨슨병의 원인으로 생각되어 지는데, 파킨슨 환자의 뇌에서 불용성의 DJ-1 응집이 증가된 것과(Moore DJ.등, 2005, Hum. Mol. Genet., 14, 71-84; Moore DJ.등, 2005, Annu. Rev. Neurosci., 28, 57-87) DJ-1의 변이체들(L166P, L10P, M26I 및 P158 삭제)의 용해성이 감소하며 봉입체(inclusion)를 형성한다는 보고는(Ramsey CP.등, 2010, Neurosci. Res., 88, 3111-3124; Olzmann JA.등, 2004, J. Biol. Chem., 279, 8506-8515) 이를 뒷받침 한다. 따라서, DJ-1의 변이 및 기능이상을 제어하는 것은 파킨슨병 예방 및 치료에 매우 중요한 타겟이 될 수 있다.

[0007] 무기인(Inorganic phosphate, P_i)은 식품을 통해 섭취되며, 기관(organ)의 발달, 에너지대사 및 세포신호전달과 관련된 다양한 기능을 수행한다. 인간에게서 비정상적인 P_i 섭취에 따른 고인산염혈증(hyperphosphatemia)은 생식저하(Arrata WS.등, 1978, Fertil. Steril., 30, 329-333), 종양생성 증가(Lee S.등, 2015, PLoS One, 10, e0135582; Wulaningsih W.등, 2013, BMC Cancer, 13, 257), 신장기능이상(Alfrey A.C.등, 2004, Kidney Int. Suppl., S13-17), 혈관의 석회화(Jono S.등, 2002, Clin. Calcium, 12, 1067-1072), 세포신호전달 감소, 세포사멸 또는 뼈무기화 저해(Allam O.등, 2011, Br. J. Nutr., 105, 384-392) 등의 병리적 문제를 야기하는 것으로 보고되어 있다. 그러나 파킨슨병 환자에서 P_i 가 증가되어 있다는 보고(Barbiroli B.등, 1999, Mov. Disord., 14, 430-435; Brown G.G.등, 1989, Neurology, 39, 1423-1427)와 최근 P_i 를 매개로 하여 DJ-1의 응집이 유도된다는 보고(Cha SS.등, 2008, J. Biol. Chem., 283, 34069-34075)는 P_i 에 의한 DJ-1의 응집이 파킨슨병의 하나의 원인이 될 수 있음을 시사한다.

[0008] 타르타르산염(tartrate)은 시럽·주스 등에 널리 사용되고, 의약품으로는 청량지갈제(清凉止渴劑)로서, 또 염색 공업·제과·사진·유기합성·금속의 착색 등에 사용되는 화합물이다. 의학적으로 타르타르산염은 Metoprolol tartrate, Rivastigmine tartrate 등과 같이 약효를 나타내는 주 화합물에 부가염으로써 사용될 뿐, 질환에 있어서 타르타르산염 단독 화합물의 효과는 보고된바 없다.

[0009] 이러한 배경하에 본 발명자들은, DJ-1을 형질주입하여 과발현 시킨 Neuro-2A 또는 SH-SY5Y 신경세포주에 무기인(Inorganic phosphate, P_i)을 처리하였을때 DJ-1이 P_i 를 매개로 응집되는 것을 확인하였고, 타르타르산염이 DJ-1과 P_i 의 결합부위에 경쟁적으로 결합하여 DJ-1/타르타르산염 복합체를 형성하고, P_i 으로 유도된 DJ-1의 응집 및 P_i 또는 활성산소로 유도된 세포사멸을 억제하는 것을 확인함으로써, 타르타르산염을 퇴행성뇌질환 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있음을 규명하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

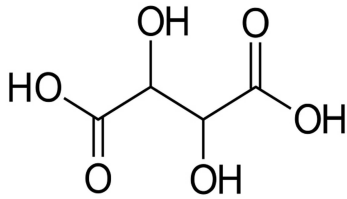
해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 타르타르산염(tartrate)을 유효성분으로 함유하는 퇴행성뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

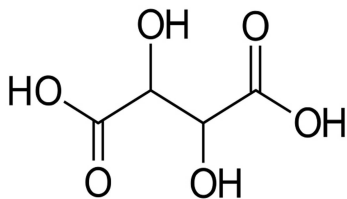
화학식 1



[0012]

[0013] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성뇌질환의 개선용 건강기능식품을 제공한다:

[0014] [화학식 1]



[0015]

발명의 효과

[0016] 본 발명에서는, 타르타르산염이 DJ-1 및 Pi(Inorganic phosphate)의 결합부위에 경쟁적으로 결합하여 DJ-1/타르타르산 복합체를 형성함으로써, Pi로 유도된 DJ-1의 응집, 및 Pi 또는 활성산소로 유도된 세포사멸을 억제하는 것을 확인함으로써, 타르타르산염이 퇴행성뇌질환 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 Pi(Inorganic phosphate)으로 유도된 DJ-1 응집(aggregation)을 확인한 도이다.

도 2는 DJ-1/tartrate 복합체의 결정구조(crystal structure)를 나타낸 도이다.

도 3a는 Neuro-2A 세포에서 타르타르산염의 Pi로 유도된 DJ-1응집에 대한 억제 효과를 나타낸 도이다.

도 3b는 SH-SY5Y 세포에서 타르타르산염의 Pi로 유도된 DJ-1응집에 대한 저해 효과를 나타낸 도이다.

도 4는 타르타르산염의 산화스트레스로 유도된 DJ-1응집 억제 효과를 나타낸 도이다.

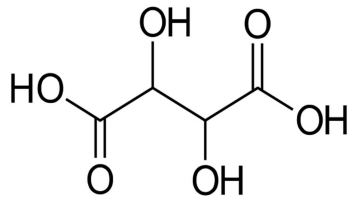
도 5는 타르타르산염의 Pi 및 산화스트레스에 의한 세포사멸에 대한 억제 효과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[0020] [화학식 1]



- [0021]
- [0022] 상기 퇴행성뇌질환은 뇌졸중(Stroke), 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머 치매(Alzheimer's disease), 헌팅톤병(Huntington's disease), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 알코올성 뇌신경질환, 척수손상(spinal cord injury) 또는 알코올성 치매 및 베르니케-코르사코프 증후군(Wernicke-Korsakoff's syndrome)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 한다
- [0023] 또한, 상기 화합물은 P_i (Inorganic phosphate)에 의한 DJ-1 단백질의 응집을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0024] 또한, 상기 화합물은 P_i 또는 산화스트레스에 의한 세포사멸을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0025] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 구체적으로 DJ-1을 과발현하는 SH-SY5Y세포 또는 Neuro-2A 세포에 무기인(Inorganic phosphate, P_i)을 처리하였을때 DJ-1이 응집되는 것을 확인하였고(도 1참조), 상기 화합물 1로 기재되는 본 발명의 타르타르산염이 DJ-1과 P_i 의 결합부위에 경쟁적으로 결합하여 DJ-1/타르타르산염 복합체를 형성하며(도 2참조), SH-SY5Y세포 또는 Neuro-2A 세포에서 P_i 로 유도한 DJ-1응집이 10 mM 또는 25 mM 타르타르산염 처리에 의해 억제되었고(도 3 내지 도 4참조), P_i 또는 활성산소로 유도된 세포사멸을 억제하는 것을 확인하여(도 5참조), 본 발명의 타르타르산염은 퇴행성뇌질환 예방 및 치료용 조성물로써 유용하게 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물뿐만 아니라, 이의 약학적으로 허용되는 염, 이로부터 제조될 수 있는 가능한 용매화물, 수화물, 라세이체 또는 입체이성질체를 모두 포함한다.
- [0027] 본 발명은 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용되는 염의 형태로 사용할 수 있으며, 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 알칸이도에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 숙시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부탄-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.
- [0028] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면 화학식 1로 표시되는 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 동량의 화학식 1로 표시되는 화합물, 및 산 수용액 또는 알코올을 가열하고, 이어서 이 혼합물을 증발시켜서 건조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.
- [0029] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조 시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하

는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0030] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 화합물 1에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 투여를 위해서는 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 산제, 정제, 캡슐제, 환, 과립 또는 주사액제로 제제화 할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0031] 본 발명의 약학적 조성물은, 통상적인 방법에 의해 정제, 캡슐제, 산제, 과립제, 현탁제, 유제, 시럽제, 기타 액제로 제형화될 수 있다.

[0032] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여용 제형, 예를 들면 정제, 트로치제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 또는 우성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제(elixirs)로 제제화된다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제하기 위해 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕해제, 스테아르산 마르네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유가 함유된다. 캡슐제형의 경우는 상기에서 언급한 물질 이외에도 지방유와 같은 액체 담체를 함유한다.

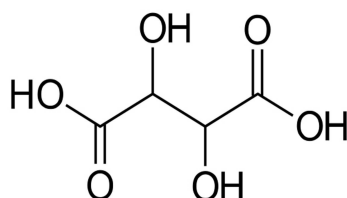
[0033] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 화합물 1과 함께 물에서 혼합하여 현탁액으로 제조하고 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제한다.

[0034] 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성화를 및 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증 정도에 따라 적절히 선택되나, 경구 투여제의 경우 일반적으로 성인에게 1일에 체중 1 kg당 본 발명의 화합물1을 0.0001 ~ 500 mg의 양으로 1회 내지 수회 나누어 투여할 수 있으며, 0.001 ~ 100 mg의 양으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0035] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0036] 아울러, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성뇌질환의 개선용 건강기능식품을 제공한다:

[0037] [화학식 1]



[0038]

[0039] 상기 퇴행성뇌질환은 뇌졸중(Stroke), 파킨슨병(Parkinson's disease), 알츠하이머 치매(Alzheimer's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 알코올성 뇌신경질환, 척수손상(spinal cord injury) 또는 알코올성 치매 및 베르니케-코르사코프 증후군(Wernicke-Korsakoff's syndrome)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

- [0040] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 구체적으로 DJ-1을 과발현하는 SH-SY5Y 세포 또는 Neuro-2A 세포에 무기인(Inorganic phosphate, P_i)을 처리하였을 때 DJ-1이 응집되는 것을 확인하였고(도 1참조), 상기 화합물 1로 기재되는 본 발명의 타르타르산염이 DJ-1과 P_i 의 결합부위에 경쟁적으로 결합하여 DJ-1/타르타르산염 복합체를 형성하며(도 2참조), SH-SY5Y 세포 또는 Neuro-2A 세포에서 P_i 로 유도한 DJ-1 응집이 10 mM 또는 25 mM 타르타르산염 처리에 의해 억제되었고(도 3 내지 도 4참조), P_i 또는 활성산소로 유도된 세포사멸을 억제하는 것을 확인하여(도 5참조), 본 발명의 타르타르산염은 퇴행성뇌질환의 개선용 건강기능식품으로써 유용하게 사용될 수 있다.
- [0041] 본 명세서의 "건강기능식품"이란 일상 식사에서 결핍되기 쉬운 영양소나 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분(기능성 원료)을 사용하여 제조한 것으로, 인체의 정상적인 기능을 유지하거나 생리기능 활성화를 통하여 건강을 유지하고 개선하는 식품으로 식품의약품안전처장이 정한 것을 의미하나, 이에 한정되지 않으며 통상적인 의미의 건강식품을 배제하는 의미로 사용된 것이 아니다.
- [0042] 본 발명의 건강기능식품은 화합물 1을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0043] 또한, 본 발명의 건강기능식품은 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 더 포함한다. 본 발명에 이용될 수 있는 식품학적으로 허용가능한 식품 보조 첨가제는 포도당, 과당, 말토스, 슈크로스, 텍스트린, 시클로텍스트린과 같은 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올과 같은 천연 탄수화물, 타우마틴, 스테비아 추출물 등의 천연 향미제, 사카린, 아스파르탐 등의 합성 향미제, 착색제, 펙트산 또는 그의 염, 알긴산 또는 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산화제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0044] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등) 등을 함유할 수 있다.
- [0045] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해서 상세히 설명한다.
- [0046] 단 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.
- [0047] **<실시예 1> 세포배양 및 DJ-1 형질주입(transfection)**
- [0048] DJ-1의 형질주입세포를 제조하기 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다. 구체적으로 사람 및 쥐(mouse) 뉴로블라스토마(neuroblastoma) 세포 SH-SY5Y 또는 Neuro-2A를 10% 소태아혈청(fetal bovine serum)이 포함된 RPMI1640 배지(Gibco)에서 배양하였다(37°C, 5% CO₂). DJ-1의 형질주입을 위해서, Lipofectamine 2000 (Life Technologies)을 이용하여 제조사의 지침에 따라 Neuro-2A 또는 SH-SY5Y 세포에 DJ-1을 형질주입 하였다.
- [0049] **<실시예 2> DJ-1 분리, 결정화 및 구조분석**
- [0050] 본 발명자들은 상기 실시예 1의 세포로부터 제조한 DJ-1을 분리 및 분석을 위해 하기와 같은 실험을 수행하였다. 구체적으로, DJ-1 단백질은 상기 <실시예 1>의 DJ-1 유전자가 형질도입된 세포로부터 S.J. Lee *et al.* (J. Biol. Chem., 278, 44552-44559(2003))에 개시된 방법에 의해 분리하고, hanging drop vapor diffusion를 이용하여 결정화 하였다. DJ-1 결정(P3121; a = b = 74.80 Å, c = 75.82 Å; 단량체)은 23°C에서 2 μ l의 단백질 용액(~12 mg/ml)을 포함하는 작은 방울(droplets)에서 자랐으며, 1.5 M 타르타르산칼륨나트륨(sodium potassium tartrate), 3.5 M 황화 암모늄(ammonium sulfate) 및 0.1 M 나트륨 카코딜산염(Na-Cacodylate, pH 6.5)을 포함하는 동일한 부피의 침전용액의 회절 해상도(resolution diffraction, Å 1.66 Å) 데이터(표 1) HKL2000을 이용하여 100K의 cryostream 에서 냉각된 결정과 함께 수집하였다. 위상(phasing) 정보는 DJ-1 단량체(PDB 코드 : IJ42)를 검색모델로 하여 PHENIX를 이용한 분자대체(molecular replacement)으로 관찰하였다. 모델 설계 및 정제(refinement)는 COOT, REFMAC5 및 CCP4 suite를 이용하여 실시하였다.

[0051] 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이 DJ-1/타르타르산염 혼합체의 최종모델은 14.9%/16.9%의 R_{work}/R_{free} 를 가지며, 3내지 188의 잔기를 포함하고, 한개의 타르타르산염과 229개의 물분자를 포함한다. 입체적 구조는 PROCHECK를 이용하여 입증하였다.

표 1

[0052] 결정학적 분석 결과

결과수집(Data collection)	
Space group	$P3_12_1$
Unit cell (Å)	$a = b = 74.80, c = 75.82,$ $\alpha = \beta = 90^\circ, \gamma = 120^\circ$
파장(Wavelength; Å)	1.1271
해상도 (Resolution; Å)	30.0-1.66
R_{sym} (%) ^{a, b}	5.0 (9.4)
평균 I/σ	54.3 (36.0)
완전성 (Completeness; > -3σ) (%)	99.8
총 반향(Total reflections)	334507
고유 반향(Unique reflections)	29365
정제 (Refinement; $F > 0\sigma$)	
해상도 (Resolution; Å)	19.92-1.66
R_{work}/R_{free} (%) ^c	14.20/16.39
평균 B-인자 (Å ²)	13.82
반향(reflections)의 수	27853
단백질 원자 수	2995
물분자의 수	229
타르타르산 분자의 수	1
제곱 평균 제곱근 편차 결합(Root mean square deviation bonds; Å)	0.02
제곱 평균 제곱근 각(Root mean square deviation angles; °)	2.50
Ramachandran favored (%)	98.37
Ramachandran outliers (%)	0.54

[0053] <실험예 1> Inorganic phosphate(Pi)에 의한 DJ-1 응집(aggregation)

[0054] DJ-1 이량체(dimer)는 Pi를 매개로 선형으로 적체되어 프로토피라멘트(protofilament)를 형성하며 이들이 다량 모여 사상형(filamentous) 구조를 형성하는 것으로 알려져 있다. 본 발명자들은 Pi가 DJ-1의 응집을 유발하는 지 확인하기 위하여, DJ-1이 형질주입된 Neuro-2A 세포에 2mM의 인산나트륨(sodium phosphate, NaH_2PO_4)를 처리한 뒤 DJ-1의 세포내 발현을 면역형광염색을 이용하여 확인하였다.

[0055] 구체적으로, 대조군 또는 실험군의 세포를 2% 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 및 0.1% 트리톤 X100이 포함된 PBS(phosphate buffered saline)버퍼로 30분 동안 고정시키고, PBS로 3회 세척한 뒤, 10% 염소혈청(goat serum)이 포함된 PBS 버퍼와 반응시켰다. DJ-1 일차항체와 반응시킨 후, 0.1% 트리톤 X100이 포함된 PBS로 3회 세척한 뒤, 이차항체 및 핵을 염색하는 DAPI와 반응시킨 뒤, PBS로 세척하여 immunofluorescence microscope으로 DJ-1 발현을 확인하였다.

[0056] 그 결과, 도 1에서 나타난 바와 같이 Neuro-2A세포에서 2 mM 인산나트륨 처리군에서 DJ-1이 반점형태를 형성하는 것을 관찰하였고, DJ-1이 세포내 응집되는 것을 확인하였다(도 1). 또한, SH-SY5Y세포에서 2 mM 인산나트륨 처리에 의해 세포질내에 봉입체(inclusion)가 형성되는 것을 확인함으로써, 상기 결과로부터 Pi에 노출된 DJ-1은 선천적 입체구조를 잃고 응집되는 것을 알 수 있다.

[0057] <실험예 2> DJ-1/타르타르산염(tartrate) 복합체의 결정구조(crystal structure)

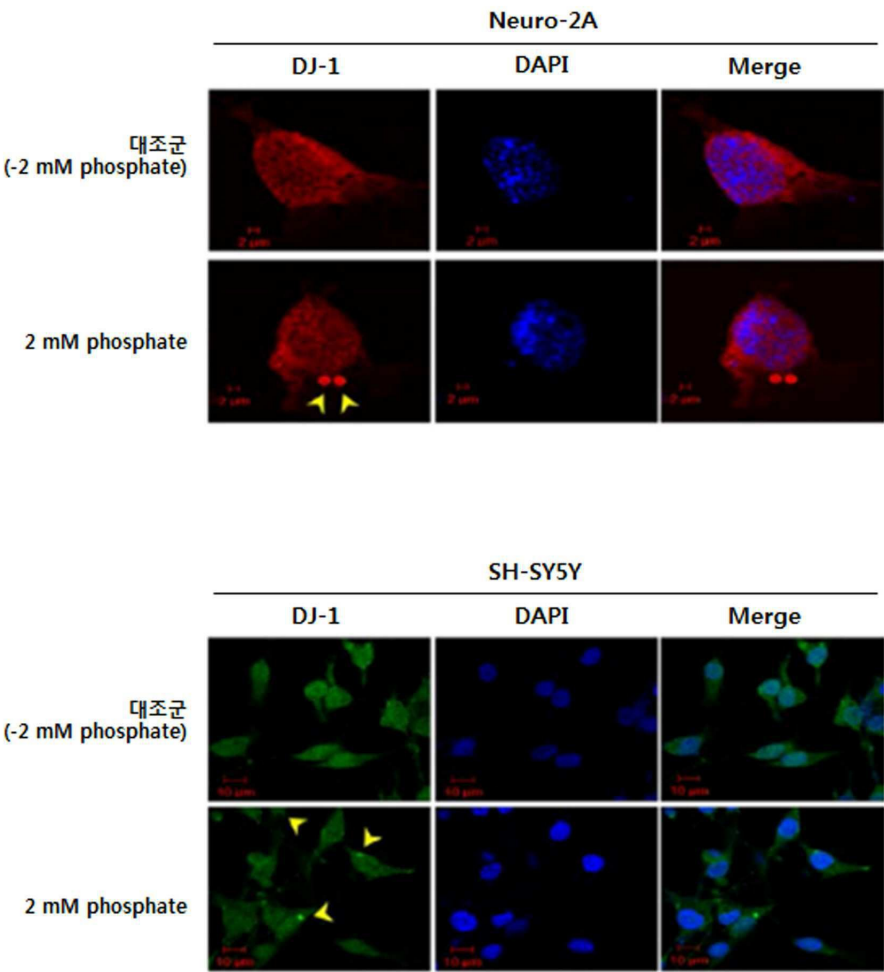
- [0058] 본 발명자들은 DJ-1/타르타르산염 복합체의 결정구조를 확인하기 위하여 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0059] 구체적으로 상기 <실시예 2>에서 수득한 <실시예 2>의 방법으로 인산버퍼를 이용하여 정제한 제조합 DJ-1(pDJ-1)은 사상형으로 응집되어 있는데(도 2A), 정제된 pDJ-1은 0.4 M 타르타르산칼륨나트륨, 2.0 M 황화 암모늄 및 0.1 M 나트륨 카코딜산염(pH 6.5)을 포함하는 결정화 용액에서 막대형태 결정을 형성하였다. 그러나, 타르타르산염의 농도가 상기용액보다 더 높은 경우 (1.5 M 타르타르산칼륨나트륨, 3.5 M 황화 암모늄 및 0.1 M 나트륨 카코딜산염(pH 6.5))는 사방육면체의(rhombohedral) 결정을 얻지 못하였다. 사방육면체 결정은 DJ-1 이량체의 특징이므로, 그 올리고머 상태를 검사하여 pDJ-1의 사방육면체 구조를 해결했다. 그 결과, 1.66 Å 해상도 결정 구조에 따르면, pDJ-1은 사방육면체 구조에서 이량체로 존재하며(도 2B), 상기 이량체 구조는 DJ-1과 동일하다. 또한, pDJ-1의 주요한 특징은 Pi 결합 부위에 Pi 대신 타르타르산염이 존재한다는 것이다(도 2C). 타르타르산염과 Pi의 결합은 Arg48의 구아니듐(guanidium)기의 곁사슬(side-chain) 및 Asn76의 -NH기의 백본(backbone)과 상호결합 한다는 점에서 유사하나, Asn76의 곁사슬 형태는 리간드 엔티티(ligand entity)에 의해 영향받는다.
- [0060] **<실험예 3> 타르타르산염의 Pi로 유도된 DJ-1응집에 대한 저해 효과**
- [0061] <실험예 2>에서 분석한 DJ-1/타르타르산염의 복합체의 존재는 타르타르산염이 Pi가 DJ-1에 결합하여 응집을 유도하는 부위와 동일한 부위에 경쟁적으로 결합하는 것을 의미한다. 따라서, 본 발명자들은 타르타르산염이 Pi에 의한 DJ-1응집을 억제하는지 확인하고자, 하기와 같이 실험하였다.
- [0062] 구체적으로 Neuro-2A 또는 SH-SY5Y 세포에 인산나트륨 및 타르타르산염을 처리한 뒤 면역화학염색을 실시하였다.
- [0063] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 2 mM의 인산 나트륨 처리에 의해 DJ-1이 응집되고, 상기 DJ-1 응집이 10 mM 또는 25 mM의 타르타르산염 처리에 의해 감소하는 것을 확인하였다(도 3 A, B). Neuro-2A 세포에서 10 mM 또는 25 mM의 타르타르산염처리군 모두에서 DJ-1응집을 억제하였고, SH-SY5Y 세포에서는 10 mM의 타르타르산염 처리군에서 DJ-1이 응집이 관찰되기는 하지만 그 규모가 대조군(2 mM 인산나트륨)에 비하여 완화되었으며, 25 mM 타르타르산염 처리군에서는 DJ-1응집이 완전히 억제되었다. 상기 결과는 타르타르산염이 Pi에 의해 유도된 DJ-1응집을 억제하는 것을 의미한다.
- [0064] **<실험예 4> 타르타르산염의 산화스트레스로 유도된 DJ-1응집에 대한 저해 효과**
- [0065] 산화스트레스는 파킨슨병이나 알츠하이머병의 주요한 병인이며 특발성 파킨슨병 환자의 뇌에서 DJ-1이 산화적으로 손상받는 것이 보고되어 있고, 이러한 뇌질환에서 높은 수준의 산화 스트레스가 단백질 응집을 유발하는 기전으로 제시되고 있다. 따라서 본 발명자들은 타르타르산염이 산화 스트레스 및 Pi에 의한 DJ-1의 응집을 억제하는지 확인하고자 하였다.
- [0066] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 SH-SY5Y 세포에서 100 μ M의 과산화수소(H₂O₂)에 의해 DJ-1 응집이 유도되고, 2 mM의 인산나트륨과 100 μ M의 과산화수소의 혼합처리에 의해 DJ-1의 응집이 더욱 심화되었으나, 10 mM 및 25 mM의 타르타르산염의 처리에 의하여 상기 과산화수소 또는 과산화수소 및 Pi의 혼합처리에 의한 DJ-1의 응집이 억제되는 것을 확인하였다(도 4). 상기 결과는 타르타르산염이 Pi 및 산화스트레스에 의한 DJ-1 응집을 억제할 수 있음을 의미한다.
- [0067] **<실험예 5> 타르타르산염의 세포사멸 억제 효과**
- [0068] 타르타르산염이 Pi 및 산화스트레스에 의한 세포사멸을 억제하는 효과가 있는지 확인하기 위하여 본 발명자들은 인산화 나트륨 및 과산화수소를 처리하고 타르타르산염을 처리한 뒤 MTT 분석을 이용하여 세포 생존률을 측정하였다.
- [0069] 구체적으로 96 well 플레이트에 1×10^4 농도로 SH-SY5Y 세포를 분주하고, 2 mM의 인산화 나트륨, 100 μ M의 과산화수소 또는 타르타르산염을 처리하였다. 16시간 후, 0.5 mg/mL의 MTT를 함유하는 RPMI배지 100 μ l을 첨가하고, 37°C에서 3시간 동안 배양한 뒤, DMSO(dimethyl sulfoxide)를 첨가하여 진한 파란색의 포마잔(formazan)

결정을 용해시켜 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 분석기를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

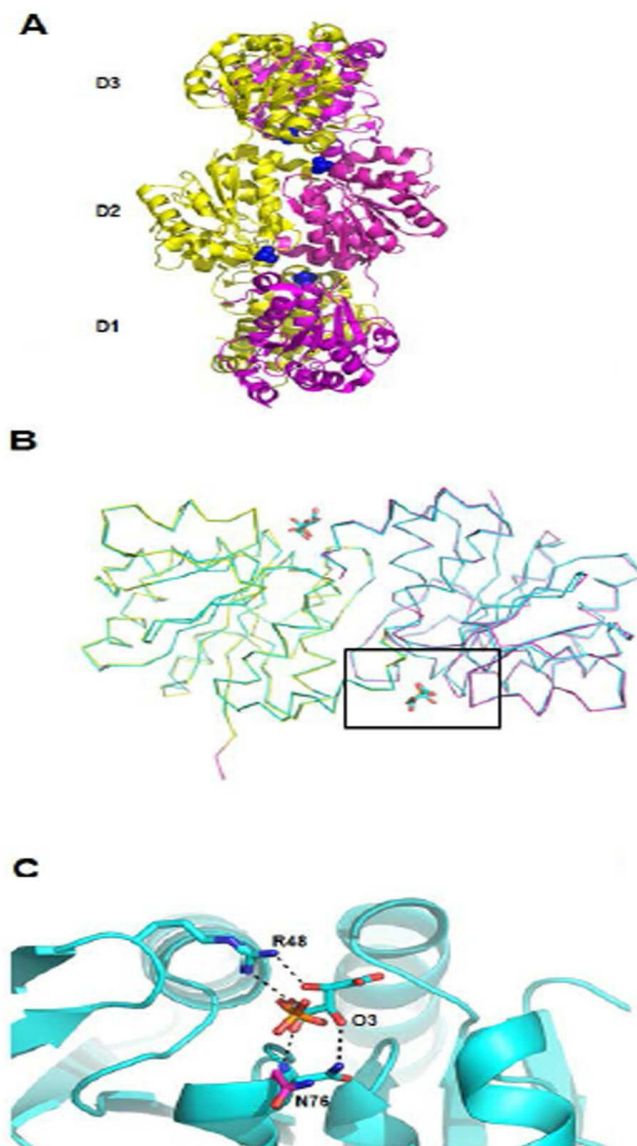
그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 SH-SY5Y 세포의 생존율이 대조구에 비하여 인산화나트륨 또는 인산화나트륨 및 과산화수소 처리에 의해 감소하였고, 5, 10 또는 25 mM의 타르타르산염에 의해 세포생존율이 증가하는 것을 확인하였다(도 5). 상기 결과를 통해 타르타르산염이 Pi 또는 산화스트레스에 의한 세포사멸을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

도면

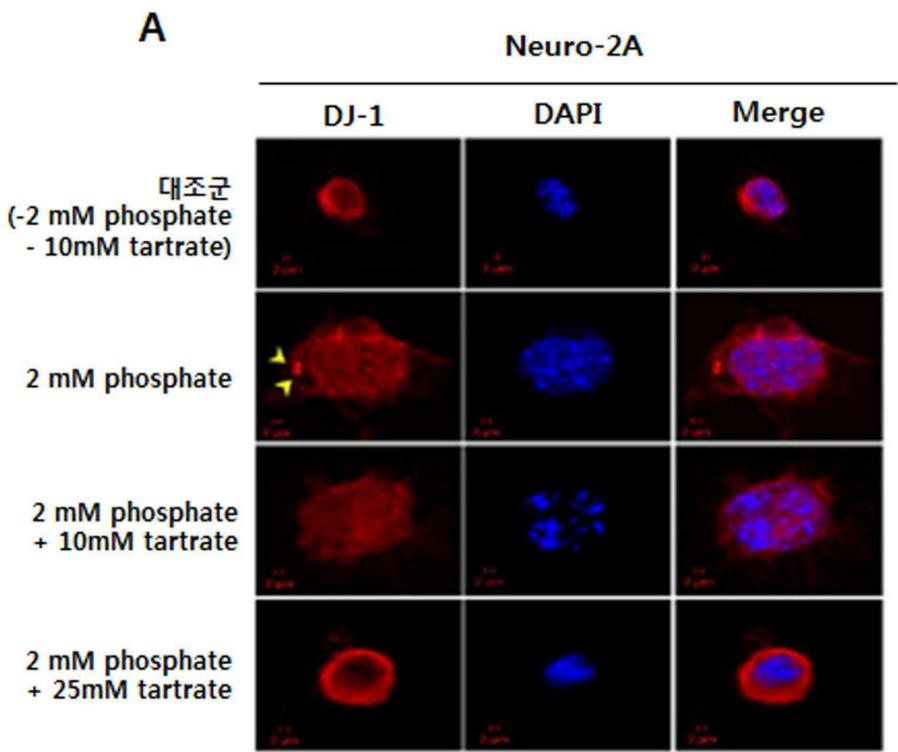
도면1



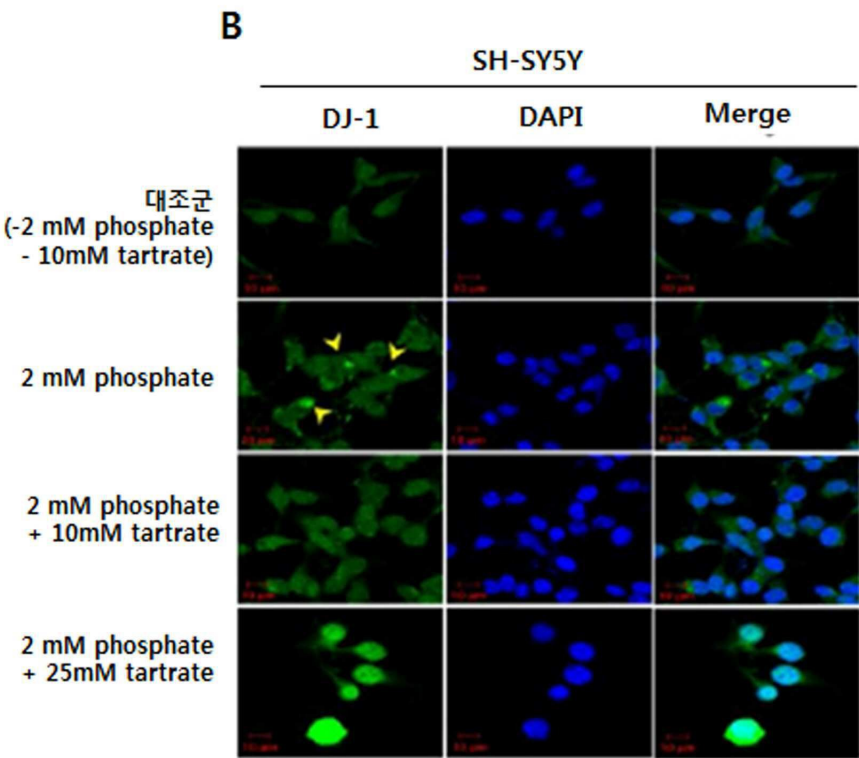
도면2



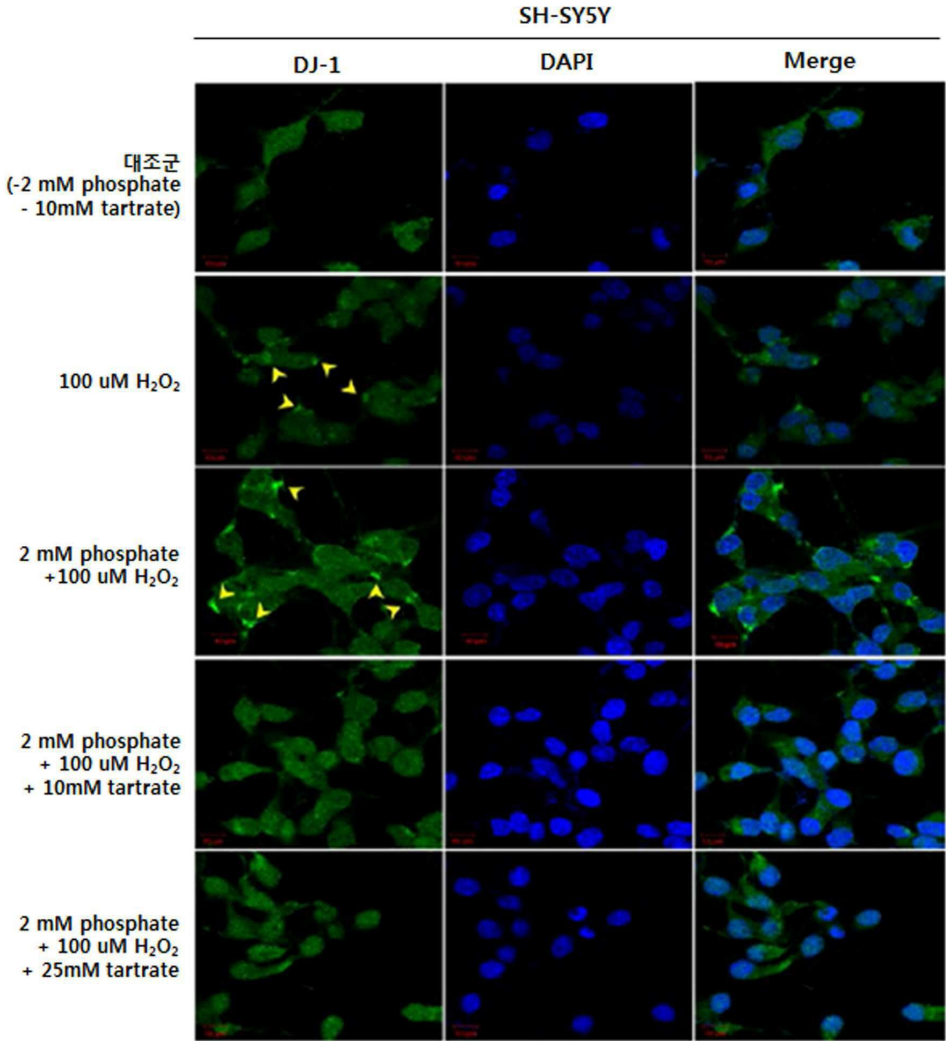
도면3a



도면3b

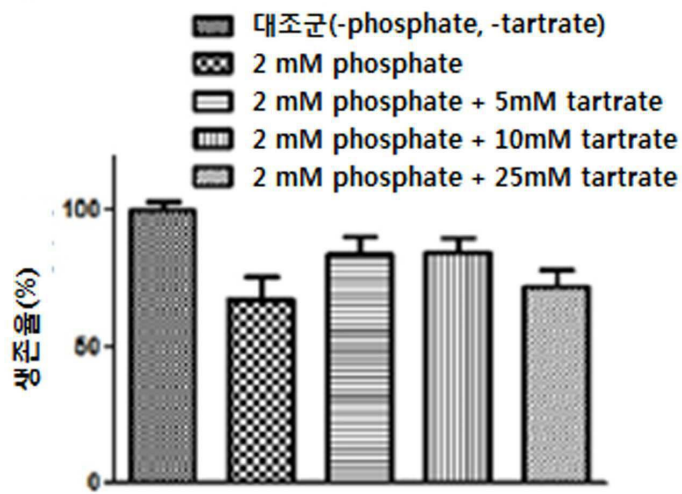


도면4



도면5

A



B

