



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0088390
(43) 공개일자 2010년08월09일

(51) Int. Cl.

A61K 38/05 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0007582

(22) 출원일자 2009년01월30일

심사청구일자 2009년01월30일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산 남구 무거2동 산29

(72) 발명자

김동호

서울특별시 서초구 양재동 우성아파트 112동 101호

윤승용

서울특별시 송파구 석촌동 288-18 402호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

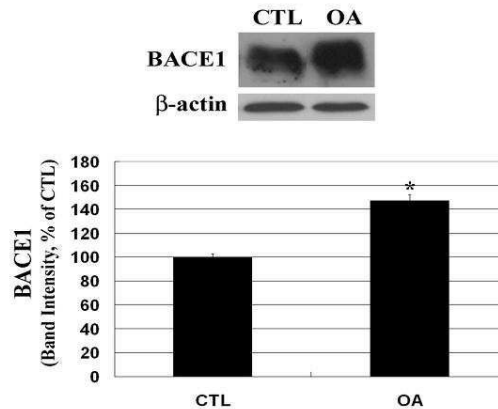
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-루시날을 유효성분으로 함유하는 칼페인 억제제

(57) 요약

본 발명은 N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-루시날을 유효성분으로 함유하는 칼페인 억제제에 관한 것으로, 상기 N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-루시날은 오카다익산 유도성 신경세포 퇴행모델에서 칼페인 억제를 통해 탁월한 신경보호 효과를 나타냄으로써 알츠하이머병, 파킨슨병 등과 같은 신경변성질환의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

최정은

경기도 파주시 파주읍 백석리 4리 153-12

최한석

서울특별시 송파구 석촌동 156번지 501호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R13-2008-023-01001-0

부처명 한국과학재단

연구사업명 기초의학연구과제

연구과제명 2008-0506 알츠하이머병과 당뇨병의 병인기전연구와 세포보호제 개발연구

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2008년 09월 01일 ~ 2009년 08월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-루시날을 유효성분으로 함유하며, 신경보호 효과를 갖는 것을 특징으로 하는 칼페인 억제제.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-루시날은 오카다익산 유도성 신경세포 퇴행모델에서 칼페인 억제를 통해 신경보호 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 칼페인 억제제.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 신경보호는 허혈성 뇌손상 또는 신경변성질환을 치료하거나 예방하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 칼페인 억제제.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 허혈성 뇌손상은 뇌출혈, 허혈성뇌손상 및 척수손상으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 칼페인 억제제.

청구항 5

제 3항에 있어서, 상기 신경변성질환은 칼페인에 의한 급성신경세포사, 알츠하이머병, 파킨슨병 및 헌팅톤병으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 칼페인 억제제.

청구항 6

N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-루시날을 유효성분으로 함유하는 신경보호용 건강보조식품.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 오카다익산 유도성 신경세포 퇴행모델에서 칼페인 억제를 통해 탁월한 신경보호 효과를 나타내는 N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-루시날을 유효성분으로 함유하는 칼페인 억제제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 알츠하이머병의 주요한 병인적 특징 중 하나는 신경섬유 엉킴(neurofibrillary tangles; NFT)로서, 이러한 신경섬유 엉킴은 tau 단백질의 과인산화의 결과물인 PHFs(paired helical filaments)로 이루어진 것이다. 따라서 tau 단백질의 과인산화는 NFT의 형성에 중요한 단계로 이해되고 있다.

[0003] 비록 tau 단백질의 과인산화로 초래되는 특이한 세포성 이벤트가 아직 분명하지 않을지라도, 알츠하이머병의 신경섬유 병인은 단백질 포스파타아제-2A(PP2A)의 활성 감소와 관련하여 일어나는 것으로 예측하고 있다.

[0004] PP2A 저해제인 오카다익산(okadaic acid; OA)은 세포 배양에서 tau 단백질의 과인산화, 신경변성 및 세포사멸을 유도한다. 그리고 동물실험에서는 오카다익산은 β -아밀로이드 침적과 잇따른 신경변성, 시냅스 손실 및 기억 장애 등과 같은 알츠하이머병과 유사한 병리적 특징을 보인다. 따라서 오카다익산 유도성 신경세포 퇴행모델은 신경성 세포사멸 과정 및 tau 단백질의 과인산화와 관련된 알츠하이머병과 같은 신경변성질환의 치료 또는 예방을 위해 유용할 수 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자는 N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-leucinal(z-VLL)이 다른

β -시크리타아제 저해제와 달리 칼페인 억제제를 통해 오카다익산 유도성 신경변성 세포모델에서 신경보호 효과를 나타내는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명의 목적은 알츠하이머병과 같은 신경변성질환의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있는 N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-leucinal(z-VLL)을 유효성분으로 함유하는 칼페인 억제제를 제공하는 데에 있다.

과제 해결수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-루시날을 유효성분으로 함유하는 칼페인 억제제를 제공한다.

[0008] 특히, 상기 N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-루시날은 오카다익산 유도성 신경세포 퇴행모델에서 칼페인 억제제를 통해 신경보호 효과를 나타낸다.

[0009] 상기 신경보호는 허혈성 뇌손상 또는 신경변성질환을 치료하거나 예방하는 것을 포함할 수 있고, 상기 허혈성 뇌손상으로서는 뇌출혈, 허혈성뇌손상 또는 척수손상 등을 들 수 있고, 상기 신경변성질환으로는 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅톤병, 칼페인에 의한 급성신경세포사 등을 들 수 있다.

[0010] 본 발명에 따른 N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-루시날을 오카다익산 처리 전에 처리한 경우, 다른 β -시크리타아제 저해제와 달리 칼페인 억제제를 통해 APP-CTF의 생성을 감소시키고, 오카다익산 처리에 의해 야기되는 신경변성을 보호하는 효과를 나타내었다.

[0011] 본 발명에 따른 칼페인 억제제인 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0012] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 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.

[0013] 상기 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.

[0014] 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 조제한다.

[0015] 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.

[0016] 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 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0017] 상기 칼페인 억제제의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 혈중 농도가 500nM 내지 1 μ M이 되도록 충분한 양을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.

[0018] 또한, 이러한 약학조성물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0019] 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, 비강흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular)주사에 의해 투여될 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-루시날을 유효성분으로 함유하는 신경보호용 건강보조식품을 제공한다.

[0021] 상기 건강보조식품은 N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-루시날 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 적합하게 결정될 수 있다.

[0022] 상기 건강식품에 함유된 N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-루시날의 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.

[0023] 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.

효 과

[0024] 본 발명에 따른 N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-루시날은 오카다익산 유도성 신경변성 세포모델에서 신경보호 효과를 나타냄으로써 알츠하이머병과 같은 신경변성질환 또는 허혈성 뇌손상 등에 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0026] <실시예 1> 신경세포 배양

[0027] 랫트 대뇌피질 신경세포의 초대배양은 태생 16일이 되는 랫트의 뇌로부터 준비되었다. 즉, 랫트의 대뇌피질을 칼슘 및 마그네슘 프리 HBSS(Hank's balanced salt solution)에서 절개하고 37℃에서 10분 동안 0.125% 트립신 용액에서 배양하였다. 트립신을 20% 태아소혈청을 함유한 DMEM으로 불활성화하고, 대뇌피질 조직을 파스퇴르 피펫을 이용하여 시리얼 마쇄에 의해 추가로 분리하였다.

[0028] 얻어진 세포 현탁액을 B27 구성요소(GibcoBRL, Grand Island, NY)로 보강된 NB 배지(neurobasal medium)에서 희석하였고, 폴리-D-라이신-(Sigma, 50μg/ml) 및 라미닌-(1μg/ml, GibcoBRL, Grand Island, NY) 코팅된 48웰 플레이트에 웰 당 5X10⁴ 세포의 밀도로 분주하였다.

[0029] 신경세포는 오카다익산 및 칼페인 저해제-I의 첨가 전 12일 동안 37℃, 5% CO₂ 상태에서 유지되었다. 오카다익산(10nM, Boehringer Mannheim, Germany)은 0.1% 디메틸설폭사이드(DMSO)에서 용해하여 사용하였고, 칼페인 저해제-I(Calbiochem)은 오카다익산 처리 30분 전에 100 μM로 사용하였다.

[0030] 한편, BACE 저해제로서 H-KTEEISEVN-stat-VAEF-OH(I), N-벤질옥시카르보닐-Val-Leu-루시날(z-VLL; II) 및 H-EVNstatineVAEF-NH₂(GL-189; III)를 각각 사용하였다.

[0031] <실시예 2> 웨스턴 블롯 분석

[0032] 실시예 1에서 얻어진 배양물은 세포 스크래퍼로 긁어서 2000rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 세포 펠렛을 제조자의 안내지침에 따라 단백질을 추출용액(Pro-Prep, Intron)에서 재현탁하였고, -20℃에서 20분 동안 용해(lysis)시켰다.

[0033] 그후, 13,000rpm(4℃)에서 5분 동안 원심분리하였고, 상등액을 1.5ml 튜브에 옮겼다. 단백질을 Bradford 법에 의해 정량하였다. 동량의 단백질을 시료 완충액[62.5mM 트리스-HCl(pH 6.8), 1% SDS, 2.5% 글리세롤, 0.5% 2-β-메르캅토에탄올 및 브로모페놀블루로 구성됨]과 혼합하고, 100℃에서 5분 동안 끓이며, 사용 전까지 -20℃에서 저장하였다. 단백질을 일정한 압력전압(130V)에서 SDS-PAGE로 전기이동(electrophoresis)시킨 후, 110mA에서 2시간 동안 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인(포어 사이즈, 0.2mm, Biorad)로 전이시켰다.

[0034] 2% 정상 말혈청과 2% 소혈청알부민(BSA)을 함유한 TTBS 완충액(20mM 트리스, 137mM NaCl 및 0.1% 트윈20)으로 실온에서 1시간 동안 블로킹한 후, 4℃에서 16시간 동안 제1차 항체와 반응시켰다. 이때, 사용된 항체는 m-칼페인 항체(Sigma, 1:1,000), 스펙트린 항체(Biomol, 1:1,000) 및 시냅신-I 항체(Chemicon, 1:1,000)이다.

[0035] 마지막으로, 얻어진 블롯을 TTBS 완충액에서 세정하고, HRP-표식 항-IgG(Pierce, 1:5,000)와 실온에서 1시간 반

응시시키고, ECL 시약(enhanced chemiluminescence; Amersham, Arlington Heights, IL) 및 x-레이 필름을 이용하여 가시화하였다. 밀도 측정은 각 밴드로부터 얻어진 신호를 정량하였다.

[0036] 또한, 실시예 1에서와 같이 배양된 신경세포에 오카다익산 처리 24시간 후, 신경세포 손상을 제조자의 안내지침에 따라 손상된 세포로부터 유리된 LDH 활성을 측정함으로써 정량적으로 판단하였다.

[0037] 그 결과, 도 1에 도시된 바와 같이, 오카다익산의 처리 16시간 후 BACE 단백질 양이 200% 증가하였다. 그리고, 도 2a 내지 도 2c에 도시된 바와 같이 오카다익산 처리에 의해 LDH 유리가 대조군에 비해 200% 증가하였다, 이러한 증가는 오카다익산 처리 30분 전에 zVLL로 전처리한 경우 약 40% 정도 감소하였다. 하지만, 다른 2종의 BACE 저해제에서는 이러한 감소 효과가 확인되지 않았다.

[0038] 또한, BACE 효소 활성 분석 결과, 도 3에 도시된 바와 같이 zVLL 이외의 다른 2종의 BACE 저해제는 BACE 활성을 억제하였으나, zVLL은 1nM 내지 10 μ M의 범위에서 BACE 활성을 억제하지 않았다.

[0039] 또한, APP 대사에 관한 BACE 저해제의 효과를 검토한 결과, 도 4a에 도시된 바와 같이 γ -시크리타아제 저해제 (L685458, 레인 3)의 존재 하에서 오카다익산이 전장 APP 및 CFT의 증가를 유도하였고, BACE-저해제 I은 APP 대사에 어떠한 효과도 나타내지 않았고(레인 4), BACE-저해제 II(zVLL)는 전장 APP 및 APP-CTF의 감소를 나타내었다(레인 5). BACE-저해제 III는 전장 APP를 감소시키고, APP-CTF에 관해서는 어떠한 효과도 나타내지 않았다(레인 6). 또한, 도 4b에 도시된 바와 같이 zVLL는 100nM에서는 CTF형성을 억제하였으며(레인 5), 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M(레인 6,7,8)까지는 농도의존적으로 CTF 형성 뿐만 아니라 전장 APP도 감소시켰다.

[0040] 또한, 오카다익산 유도성 신경변성에 있어서 zVLL의 신경보호 효과가 칼페인 경로와 관련되는지를 검토하기 위하여, 칼페인 기질인 스펙트린 및 Mint-2에 특이적인 항체를 이용하여 웨스턴 블롯하였다. 그 결과, 도 5a에 도시된 바와 같이, 오카다익산 처리 신경세포에서 칼페인에 의해 조각난 스펙트린 단편이 증가되었고(레인 2), 이 칼페인 조각 단편은 칼페인 저해제를 처리했을 때(레인3)와 동일하게 zVLL 전처리 통해 감소되었고(레인4), BACE 억제제-III은 효과가 없었다(레인5). 또, 도 5b에 도시된 바와 같이, 오카다익산 처리에 의해 감소된 Mint-2 (레인2,3)는 zVLL 처리에 의해 정상화되었고(레인6), BACE 억제제-I과 III은 효과가 없었고(레인5,7), 이현상은 칼페인 억제제-I,-II,-III에 의해 억제된 것으로 보아 zVLL이 칼페인 억제를 통해 작용하고 있음을 알 수 있었다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 오카다익산 처리 후 BACE 단백질의 발현 수준을 나타낸 것이고,

[0042] 도 2a 내지 도 2c는 BACE 저해제-I, -II, -III 전처리를 통해 오카다익산 처리에 의한 LDH 유리를 감소시키는 효과를 검토한 것이고,

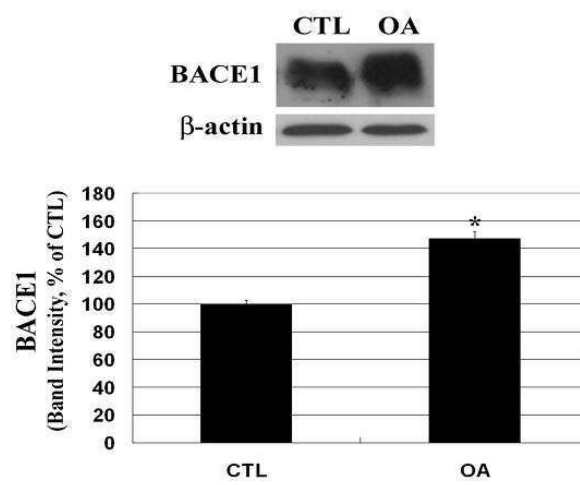
[0043] 도 3은 BACE 효소 활성 분석을 통한 BACE 저해제-I, -II, -III의 활성을 검토한 것이고,

[0044] 도 4a 및 도 4b는 APP 대사에 관한 BACE 저해제의 효과를 나타낸 것이고,

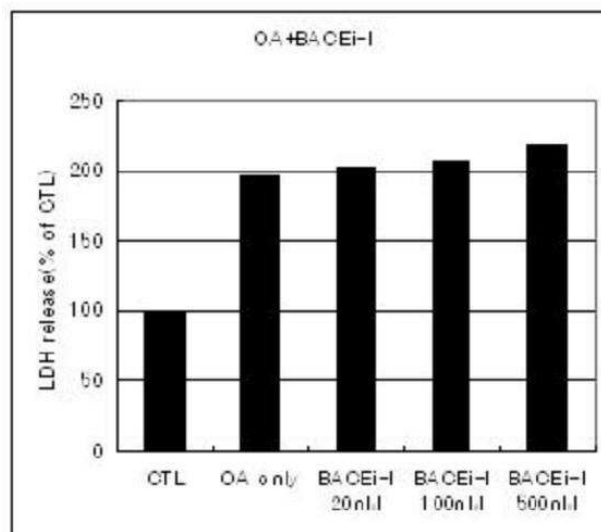
[0045] 도 5a 및 도 5b는 각각 스펙트린과 Mint-2의 단백질 분해과정에 관한 BACE 저해제 및 칼페인 억제제의 효과를 나타낸 것이다.

도면

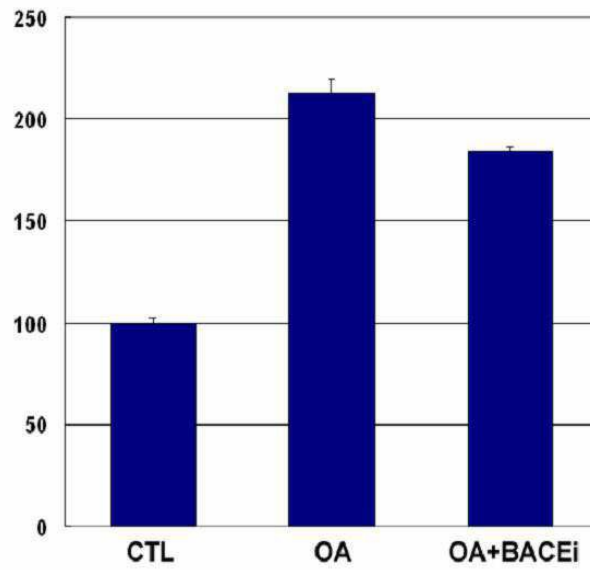
도면1



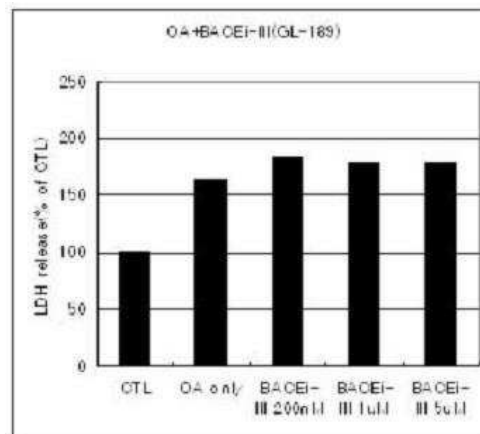
도면2a



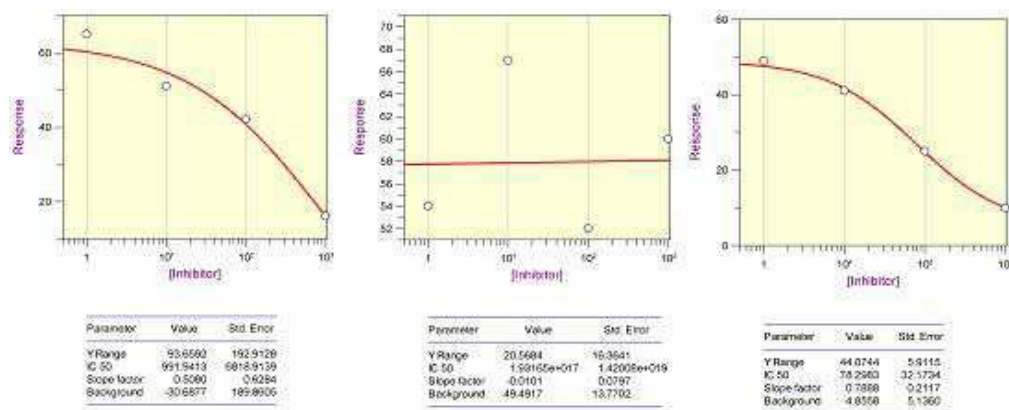
도면2b



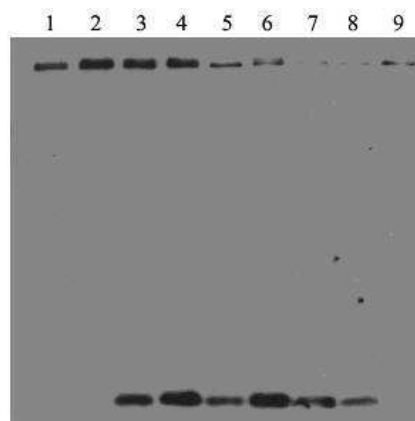
도면2c



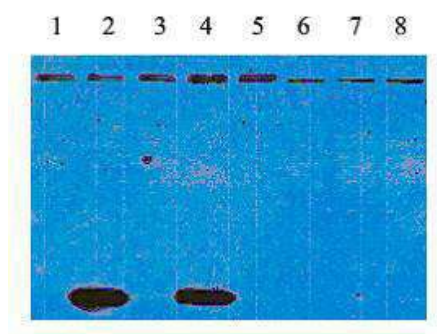
도면3



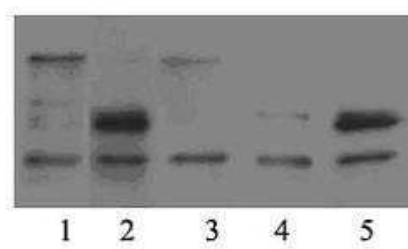
도면4a



도면4b



도면5a



도면5b

