(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0012829
(43) 공개일자 2022년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/05 (2006.01) *A61K 31/404* (2006.01)
A61K 31/405 (2006.01) *A61K 31/4245* (2006.01)
A61K 31/426 (2006.01) *A61K 31/428* (2006.01)
A61K 31/4439 (2006.01) *A61K 31/4709* (2006.01)
A61K 31/496 (2006.01) *A61K 31/506* (2006.01)
A61K 31/635 (2014.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/05 (2013.01)
A61K 31/404 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0178143(분할)
(22) 출원일자 2021년12월13일
심사청구일자 2021년12월13일
(62) 원출원 특허 10-2019-0074410
원출원일자 2019년06월21일
심사청구일자 2019년06월21일
(30) 우선권주장
1020180071564 2018년06월21일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
고재영
서울특별시 강남구 광평로51길 22, 101동 1206호 (수서동, 한아름아파트)
김하나
서울특별시 강동구 선사로 120(암사동, 한솔 솔파크 더 리버)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이명진

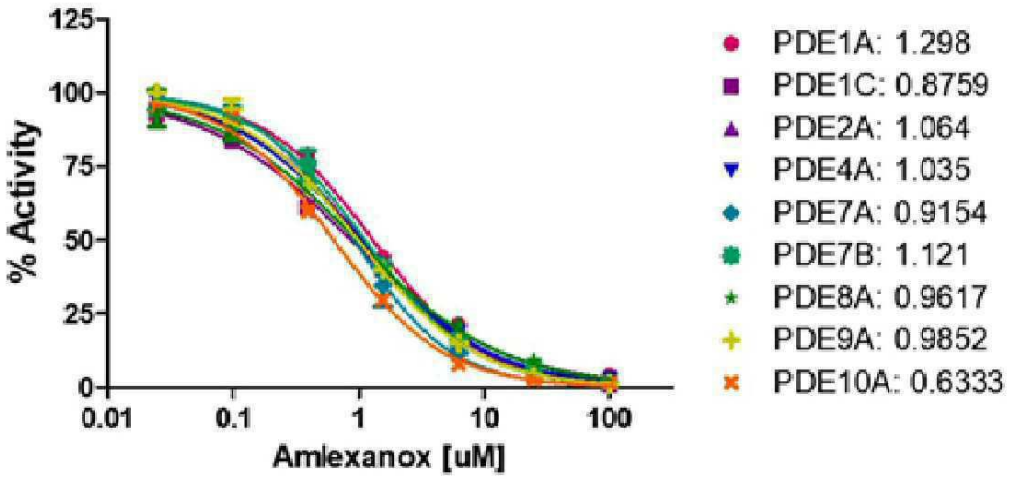
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 임상 실험을 통해 안전성이 검증된 암렉사녹스(amlexanox)를 포함하는 포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제를 이용한 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 암렉사녹스를 이용한 아밀로이드 베타에 의한 세포손상 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 아밀로이드 베타에 기인한 신경퇴행성 질환 및 세포손상을 부작용에 대한 우려 없이 안전하고 효과적으로 개선 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도16



(52) CPC특허분류
A61K 31/405 (2013.01)
A61K 31/4245 (2013.01)
A61K 31/426 (2013.01)
A61K 31/428 (2013.01)
A61K 31/4439 (2013.01)
A61K 31/4709 (2013.01)
A61K 31/496 (2013.01)
A61K 31/506 (2013.01)
A61K 31/635 (2020.08)
(72) 발명자
김태윤
서울특별시 강동구 성내로6길 42-13(성내동, 산성빌리지)
이희경
서울특별시 강동구 성내로13길 58-9(성내동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465029472
과제번호	HI14C1913010019
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	질환극복기술개발(R&D)
연구과제명	Phosphodiesterase(PDE) 억제제와 아연의 자식작용 활성화 기전 연구를 통한 알츠하이머 치매 치료기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	서울아산병원
연구기간	2014.12.01 ~ 2019.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제 또는 이의 약리학적 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 PDE 억제제는 피세아탄올(Piceathanol), 아탈루렌(Ataluren), 마시티닙(Masitinib), JTC-801, 오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate), 도비티닙(Dovitinib), CYC116, 레스베라트롤(Resveratrol), 피피트린(Pifithrin), RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol), 엑시티닙(Axitinib), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 자피를루카스트(Zafirlukast), 헥사클로로펜(Hexachloropene), 페북소스타트(Febuxostat), 및 설파다이아진은(Silver Sulfadiazine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물인 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 PDE는 PDE1A, PDE1B, PDE1C, PDE2A, PDE3a, PDE3B, PDE4A, PDE4B, PDE5A, PDE6A, PDE6B, PDE6C, PDE6D, PDE7A, PDE7B, PDE8A, PDE8B, PDE9A, PDE10A, 및 PDE11A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 PDE 억제제는 아밀로이드 베타 축적에 의한 독성단백질 응집을 예방 또는 저감시키는 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 PDE 억제제는 산화적 스트레스에 의한 세포사멸을 예방 또는 저감하는 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 약리학적 허용 가능한 염은 옥살산, 말레산, 푸마르산, 말산, 타르타르산, 시트르산 및 벤조산 중에서 선택된 유기산이거나, 또는 염산, 황산, 인산 및 브롬화수소산 중에서 선택된 무기산에 의해 형성되는 산부가염의 형태인 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 알츠하이머 질환(AD), 파킨슨 질환(PD), 헌팅턴 병, 루게릭 병(ALS), 외상 후 스트레스 장애(trauma), 다발성 경화증(MS), 대뇌 허혈질환 및 근위축성측색경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 알츠하이머 질환인 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 PDE 억제제는 피세아탄올(Piceathanol), 아탈루렌(Ataluren), 마시티닙(Masitinib), JTC-801, 오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate), 도비티닙(Dovitinib), CYC116, 레스베라트롤(Resveratrol), 피피트린(Pifithrin), RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol), 엑시티닙(Axitinib), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 자피를루카스트(Zafirlukast), 헥사클로로펜(Hexachloropene), 페북소스타트(Febuxostat), 및 설파다이아진은(Silver Sulfadiazine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물인 것을 특징으로 하는, 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 본 발명은 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 루게릭 병과 같은 신경퇴행성 질환 예방 또는 치료에 유용하게 이용될 수 있는 포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 함유하는 신경퇴행성 질환 및 아밀로이드 베타에 의한 세포손상 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0002] 본 출원은 2018년 06월 21일에 출원된 한국특허출원 제10-2018-0071564호에 기초한 우선권을 주장하며, 해당 출원의 명세서 및 도면에 개시된 모든 내용은 본 출원에 원용된다.

배 경 기 술

[0004] 신경퇴행성 질환은 신경세포가 퇴화하고, 기능을 잃거나, 사멸하는 경우의 증상들과 관련된다. 이들은 주로 진행성이기 때문에, 신경퇴행성 질환의 결과는 대단히 파괴적이다. 신경퇴행성 질환을 가진 환자들은 인지(cognitive) 또는 운동(motor) 능력에 있어서의 극심한 퇴화를 겪는다. 따라서, 환자들은 삶의 질이나 삶에 대한 기대감을 전혀 갖지 못하고 있는 실정이다.

[0005] 알츠하이머의 매커니즘에 대한 연구는 대부분 아밀로이드 이론에 근거하였으며, 이를 기반으로 APP, BACE,

Presenilin 유전자에 대한 연구, 세포 내 다른 요인과의 상호작용 및 조절에 대한 연구, 인자들의 생성, 분해 및 신호전달에 대한 연구가 주를 이루어 왔다. 이로 인해, 합성을 통해 단일 화합물을 제조하더라도, 표적물질은 'BACE1', 'amyloid beta fibril 형성 억제'에 초점이 맞춰져 있었다.

[0006] 그러나, 최근 Alzhemed(amyloid beta aggregation inhibitor)와 Flurizan(γ-secretase inhibitor) 등의 화합물이 초기 알츠하이머 치매 환자에 대해서 실질적으로 효과가 없음이 입증되었고, 개발 중인 ACC001(amyloid vaccine)는 면역반응에 의한 부작용이 발견되어 상용화되지 못하고 있는 실정이다.

[0007] 한편, 신경퇴행성 질환 중에서도 루게릭 병으로 널리 알려진 근위축성 측색 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)는 중추신경계의 운동신경세포가 퇴행적으로 사멸하게 되는 것으로, 환자의 몸에 마비가 오고, 마지막에는 호흡곤란 증상이 발생하여 2-5년 내에 사망하게 되는 질병이다. 산발성 ALS(sporadic ALS, sALS)가 전체 ALS 중 90-95%를 차지하고 가족성(familial ALS, fALS)은 5-10% 이며, 가족성 중 약 20% 가 돌연변이 SOD-1 단백질에 의해 발병하는 것으로 밝혀져 있다. ALS의 명확한 병리학적인 기전은 밝혀져 있지 않지만, 유전적 요인 또는 산화성 손상, 비정상적인 단백질의 축적, 흥분독성, 미토콘드리아 손상, 염증 등의 복합적인 요인에 의해 유발된다고 보고된 바 있다. 현재까지 루게릭 병의 치료제로 개발된 약물은 임상실험 중인 라일루졸(riluzole)이 유일하다. 하지만 이마저도 루게릭 병의 진행을 늦추는 것일 뿐, 근본적인 해결책이 되지는 못하고 있다. 따라서 기존에 사용해오던 약물로는 한계가 있다.

[0008] 상기 알츠하이머와 루게릭과 같은 신경퇴행성 질환은 라이소좀의 기능저하가 가장 큰 병리현상으로 작용하고, 상기 라이소좀은 자식작용(Autophagy)과 내포작용(endocytosis)와 관련하여 순환과 분해를 주도하는 세포소기관이다. 이러한 라이소좀의 기능저하는 알츠하이머 치매, 파킨슨, 헌팅턴, 루게릭 등 신경퇴행성 질환에 공통적으로 나타난다. 구체적으로 라이소좀의 기능이 저하될 경우, 돌연변이 단백질의 응축 및 축적이 발생하고, 세포소기관의 항상성 유지에 문제를 유발하는 것으로 확인된 바 있다. 그러나, 아직까지 신경퇴행성 질환을 치료할 수 있는 약제로는 아세틸콜린스테라제 억제제 혹은 메만틴, N-메틸-D-아스파테이트 채널 차단제가 공지되어 있고, 시크리테이즈(secretase) 억제제 등 다양한 약물들의 개발이 시도되고 있을 뿐, 상기 신경퇴행성 질환에서 라이소좀의 기능 혹은 자식작용이 새로운 신경퇴행성 질환 치료의 대안이 될 수 있는지에 대해서는 연구된 바 없고, 그 효과적인 치료법 역시 아직까지 개발되지 않은 상태이다.

[0009]

[0010] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 등록특허 제10-1114800호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명자들은 임상실험이 완료된 종래의 안전한 치료제 중에서 신경퇴행성 질환에 대하여 예방 또는 치료 효과를 갖는 신규 화합물을 발굴하고자 예의 노력을 하였다. 그 결과, 신경퇴행성 질환에서 PDE 억제제의 세포소기관과의 연관성과 관련된 기전이나, 유효효과에 대하여 평가하고자 하였고, 이를 이용하여 알츠하이머 치매를 포함한 신경퇴행성 질환 세포/동물 모델에서 다양한 PDE 억제제의 약리기전 및 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0014] 따라서, 본 발명의 목적은 포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제 또는 이의 약리학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 암렉사녹스(amlexanox, AMX) 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

[0016] 본 발명의 다른 목적은 피세아탄올(Piceathanol), 아탈루렌(Ataluren), 마시티닙(Masitinib), JTC-801, 오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate), 도비티닙(Dovitinib), CYC116, 레스베라트롤(Resveratrol), 피피트린(Pifithrin), RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol), 엑시티닙(Axitinib), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 자피를루카스트(Zafirlukast), 헥사클로로펜(Hexachloropene), 페북소스타트(Febuxostat), 및 설파다이아진은(Silver Sulfadiazine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는데 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 목적은 암렉사녹스 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는데 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 피세아탄올(Piceathanol), 아탈루렌(Ataluren), 마시티닙(Masitinib), JTC-801, 오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate), 도비티닙(Dovitinib), CYC116, 레스베라트롤(Resveratrol), 피피트린(Pifithrin), RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol), 엑시티닙(Axitinib), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 자피를루카스트(Zafirlukast), 헥사클로로펜(Hexachloropene), 페북소스타트(Febuxostat), 및 설파다이아진은(Silver Sulfadiazine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는데 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은 암렉사녹스 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 세포손상 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

[0021] 본 발명의 또 다른 목적은 포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공하는데 있다.

[0022] 본 발명의 또 다른 목적은 암렉사녹스 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공하는데 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 목적은 피세아탄올(Piceathanol), 아탈루렌(Ataluren), 마시티닙(Masitinib), JTC-801, 오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate), 도비티닙(Dovitinib), CYC116, 레스베라트롤(Resveratrol), 피피트린(Pifithrin), RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol), 엑시티닙(Axitinib), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 자피를루카스트(Zafirlukast), 헥사클로로펜(Hexachloropene), 페북소스타트(Febuxostat), 및 설파다이아진은(Silver Sulfadiazine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공하는데 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 목적은 포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 개체에 투여함으로써 신경퇴행성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는데 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 목적은 암렉사녹스 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 개체에 투여함으로써 신경퇴행성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는데 있다.

[0026] 본 발명의 또 다른 목적은 피세아탄올(Piceathanol), 아탈루렌(Ataluren), 마시티닙(Masitinib), JTC-801, 오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate), 도비티닙(Dovitinib), CYC116, 레스베라트롤(Resveratrol), 피피트린(Pifithrin), RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol), 엑시티닙(Axitinib), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 자피를루카스트(Zafirlukast), 헥사클로로펜(Hexachloropene), 페북소스타트(Febuxostat), 및 설파다이아진은(Silver Sulfadiazine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1이상의 화합물또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 개체에 투여함으로써 신경퇴행성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는데 있다.

[0028] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0030] 따라서, 본 발명은 포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명은 암렉사녹스(amlexanox) 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명은 피세아탄올(Piceathanol), 아탈루렌(Ataluren), 마시티닙(Masitinib), JTC-801, 오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate), 도비티닙(Dovitinib), CYC116, 레스베라트롤(Resveratrol), 피피트린(Pifithrin), RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol), 엑시티닙(Axitinib), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 자피를루카스트(Zafirlukast), 헥사클로로펜(Hexachloropene), 페북소스타트(Febuxostat), 및 설파다이아진은(Silver Sulfadiazine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 화합물 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0033] 본 발명은 포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0034] 본 발명은 암렉사녹스 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0035] 본 발명은 피세아탄올(Piceathanol), 아탈루렌(Ataluren), 마시티닙(Masitinib), JTC-801, 오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate), 도비티닙(Dovitinib), CYC116, 레스베라트롤(Resveratrol), 피피트린(Pifithrin), RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol), 엑시티닙(Axitinib), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 자피를루카스트(Zafirlukast), 헥사클로로펜(Hexachloropene), 페북소스타트(Febuxostat), 및 설파다이아진은(Silver Sulfadiazine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0036] 본 발명은 암렉사녹스 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 세포손상 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명은 포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0038] 본 발명은 암렉사녹스 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0039] 본 발명은 피세아탄올(Piceathanol), 아탈루렌(Ataluren), 마시티닙(Masitinib), JTC-801, 오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate), 도비티닙(Dovitinib), CYC116, 레스베라트롤(Resveratrol), 피피트린(Pifithrin), RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol), 엑시티닙(Axitinib), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 자피를루카스트(Zafirlukast), 헥사클로로펜(Hexachloropene), 페북소스타트(Febuxostat), 및 설파다이아진은(Silver Sulfadiazine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 화합 물또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0040] 본 발명은 포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 개체에 투여함으로써 신경퇴행성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0041] 본 발명은 암렉사녹스 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 개체에 투여함으로써 신경퇴행성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0042] 본 발명은 피세아탄올(Piceathanol), 아탈루렌(Ataluren), 마시티닙(Masitinib), JTC-801, 오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate), 도비티닙(Dovitinib), CYC116, 레스베라트롤(Resveratrol), 피피트린(Pifithrin), RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol), 엑시티닙(Axitinib), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 자피를루카스트(Zafirlukast), 헥사클로로펜(Hexachloropene), 페북소스타트(Febuxostat), 및 설파다이아진은(Silver Sulfadiazine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 화합물 또는

이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 개체에 투여함으로써 신경퇴행성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0043] 본 발명의 일실시예에서, 상기 PDE는 PDE1A, PDE1B, PDE1C, PDE2A, PDE3a, PDE3B, PDE4A, PDE4B, PDE5A, PDE6A, PDE6B, PDE6C, PDE6D, PDE7A, PDE7B, PDE8A, PDE8B, PDE9A, PDE10A, 및 PDE11A로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0044] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 암렉사녹스 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염은 아밀로이드 베타 축적에 의한 독성단백질 응집을 예방 또는 저감시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 암렉사녹스 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염은 산화적 스트레스에 의한 세포사멸을 예방 또는 저감하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 약리학적으로 허용 가능한 염은 옥살산, 말레산, 푸마르산, 말산, 타르타르산, 시트르산 및 벤조산 중에서 선택된 유기산이거나, 또는 염산, 황산, 인산 및 브롬화수소산 중에서 선택된 무기산에 의해 형성되는 산부가염의 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 신경퇴행성 질환은 알츠하이머 질환(AD), 파킨슨 질환(PD), 헌팅턴 병, 루게릭 병(ALS), 외상 후 스트레스 장애(trauma), 다발성 경화증(MS), 대뇌 허혈질환 및 근위축성측색경화증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 신경퇴행성 질환은 알츠하이머 질환일 수 있다.

[0049] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 세포손상은 아밀로이드 베타에 의해 라이소좀 pH가 증가되고, 라이소좀 단백질의 활성이 감소되거나 또는 세포 내 아연의 농도가 감소되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 세포는 혈관주위세포, 신경세포 및 성상세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0052] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0053] (ⅰ) 본 발명은 임상 실험을 통해 안전성이 검증된 PDE 억제제를 이용한 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0054] (ii) 또한, 본 발명은 PDE 억제제를 이용한 아밀로이드 베타에 의한 세포손상 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0055] (iii) 본 발명의 조성물은 아밀로이드 베타에 기인한 신경퇴행성 질환 및 세포손상을 부작용에 대한 우려 없이 안전하고 효과적으로 개선 또는 치료하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 신경세포(neuron), 성상세포(astrocyte), 혈관주위세포(pericyte), 661W 광수용체 세포(661W) 각각에서 PDE 이성질체(1~11)의 mRNA 발현여부를 RT-PCR을 통해 확인한 결과이다.

도 2는 CHO7W△E9 세포, SH-SY5Y/swe 세포, ARPE-19 세포 각각에서 PDE 이성질체(1~11)의 mRNA 발현여부를 RT-PCR을 통해 확인한 결과이다.

도 3은 마우스의 혈관주위세포(pericyte)에 형광 염색 시료(FITC)가 부착된 아밀로이드 베타를 처리한 후, 시간에 따라 공촛점 현미경 촬영한 사진과 세포에서의 FITC가 부착된 아밀로이드 베타의 형광세기를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 4는 마우스의 혈관주위세포(pericyte)에 형광 염색 시료(FITC)가 부착된 아밀로이드 베타를 처리한 후, 세포소기관 별 아밀로이드 베타 축적을 공촛점 현미경으로 분석한 결과이다.

도 5는 마우스의 혈관주위세포(pericyte)를 배양하여 CTL(대조군), 아밀로이드 베타(Aβ), 실로스타졸(아밀로이

드 베타+실로스타졸; +cilo)에 따라 1시간 동안 처리한 후, 공촛점 현미경으로 분석한 사진이다.

도 6은 마우스의 혈관주위세포(pericyte)를 배양하여 CTL(대조군), 아밀로이드 베타(Aβ), 실로스타졸(아밀로이드 베타+실로스타졸; +cilo)에 따라 24시간 동안 처리하고, 웨스턴블롯팅으로 분석한 결과이다.

도 7은 마우스의 혈관주위세포(pericyte)를 배양하여 CTL(대조군), 실로스타졸(아밀로이드 베타+실로스타졸; +cilo), cAMP(아밀로이드 베타+cAMP)를 1시간 동안 처리하고, Fluozin-3(세포질에서의 아연 염색), lysotracker(산성 세포소기관에서 아연 염색)로 염색한 결과 사진이다.

도 8a는 마우스의 성상교세포를 Lysosensor Green DND-189로 염색하여 세포 내 pH를 시각화한 것으로, 상기 시각화된 세포에 아밀로이드 베타(Aβ) 또는 아밀로이드 베타와 실로스타졸을 처리(Aβ+cilo)하고, 각 군에서 0 ~ 1 시간동안의 pH 변화를 나타낸 사진이다.

도 8b는 마우스의 성상교세포를 Acridine Orange Dye로 염색하여 세포 내 pH를 시각화한 것으로, 상기 시각화된 세포에 아무것도 처리하지 않거나(CTL;대조군), 바필로마이신 A1(BA)을 투여하거나, 또는 바필로마이신과 실로스타졸을 투여 (+cilo)하거나, 바필로마이신과 cAMP(+cAMP)를 투여한 후, 각 군에서 pH 변화를 나타낸 사진이다.

도 9는 HTS를 위한 실험방법 및 장치를 도시한 것이다.

도 10은 PDE와 cAMP에서, cAMP 농도에 따른 luminescence raw value를 나타낸 그래프이다.

도 11은 PDE3 농도 의존성 테스트 결과로, PDE3 농도에 따른 luminescence raw value를 나타낸 그래프와 PDE3 농도에 따른 상대적 활성(% activity)을 나타낸 그래프이다.

도 12는 PDE3에 대한 실로스타졸(양성 대조군) 농도에 따른 luminescence raw value를 나타낸 그래프와 PDE3억제제 실로스타졸 농도에 따른 상대적 활성(% activity)을 나타낸 그래프이다.

도 13은 PDE3에 대한 FDA 승인약물 800 개 라이브러리(library)에 대한 z'score를 나타낸 그래프이다.

도 14는 PDE 이성질체의 농도에 따른 상대적 활성(% activity) 분석 그래프이다.

도 15는 PDE3에 대한 1차 선정된 화합물(Z001~Z011)의 농도에 따른 상대적 활성(% activity) 분석 그래프이다.

도 16은 다양한 PDE 이성질체에 대하여, 최종 선정된 암렉사녹스(amlexanox, AMX)의 농도에 따른 상대적 활성(% activity)를 나타낸 그래프이다.

도 17 및 도 18은 아밀로이드 베타가 축적된 혈관주위세포 및 성상교세포에, 최종 선정된 암렉사녹스(amlexanox, AMX)를 세포에 처리하여 아밀로이드 베타 발현 양상과 G93A SOD-1, P301L tau의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 분석한 사진이다.

도 19는 마우스의 혈관주위세포에 vATPase 억제제인 바필로마이신 A1(bafilomycin A1)을 처리하고, 라이소센서(lysosensor)를 이용해 시간에 따라 공초점 현미경으로 측정한 사진(좌측)과, 이를 정량화한 데이터(우측)이다.

도 20은 마우스의 혈관주위세포에 최종 선정된 암렉사녹스(amlexanox, AMX)를 처리하지 않은 것(CTL)과, 처리한 군(PDEi)을 공초점 현미경으로 측정한 사진으로, 아연의 농도를 측정하기 위해 아연 이온을 검지하는 형광시약(Zinpyr-1)을 처리하여 형광 정도를 측정하였다.

도 21는 마우스의 성상교세포에 vATPase 억제제인 바필로마이신 A1(Bafilomycin A1)을 처리한 다음, 카텝신 B(cathepsin B)(상단) 또는 카텝신 L(cathepsin L)(하단)의 가수분해정도를 시간에 따라 공초점 현미경으로 측정한 사진이다.

도 22는 바필로마이신 A1(Bafilomycin A1)로 처리된 마우스의 성상교세포에, 최종 선정된 암렉사녹스(amlexanox, AMX)(Z007)를 투여한 다음, 카텝신 B(cathepsin B)(상단) 또는 카텝신 L(cathepsin L)(하단)의 가수분해정도를 시간에 따라 공초점 현미경으로 측정한 사진이다.

도 23은 알츠하이머 동물모델 5X FAD((Swedish mutation(KM670/671NL: Aβ 생산 증가), Florida mutation(I716V: Aβ42의 생산 증가), London mutation(V717I: Aβ42의 생산 증가), human presenilin 1(M146L and L286V: Aβ42의 생산 증가)) 마우스)에 암렉사녹스(AMX)의 약리효능을 평가하기 위한 실험일정을 나타내는 도이다.

도 24 및 도 25는 아밀로이드 베타(Aβ1-42)와 PS1 과발현으로 인지기억능 감소에 대한 암렉사녹스(AMX)의 약리

효과를 hidden platform test와 prove test로 구성된 water maze 평가를 통해 분석한 그래프이다(상: 1 mg/kg, 하: 2.5 mg/kg).

도 26은 루게릭 병 동물모델(G93A SOD-1 마우스)을 두 그룹(AMX 투여군과 대조군(Veh))으로 나누어 실험한 결과이다.

도 27은 성상교세포에 H2O2로 세포 내 산화적 손상을 유발하여 세포사멸을 일으키고, 여기에 암렉사녹스(AMX)를 처리하여 LDH 방법을 이용해 세포사멸을 정량화하여 나타낸 그래프이다.

도 28은 암렉사녹스(AMX)의 GFP-mHttQ 응집 억제 효과를 확인한 결과이다.

도 29는 암렉사녹스(AMX)의 G93A-SOD 마우스 모델의 생존율 개선 효과를 확인한 결과이다.

도 30은 암렉사녹스(AMX)의 G93A-SOD 마우스 모델에서 질병 진행 지연과 관련하여 운동능력 실조 완화 효과를 확인한 결과이다.

도 31은 다양한 PDE 이성질체에 대하여, 피세아탄올(Piceathanol)의 농도에 따른 상대적 활성(% activity)를 나타낸 그래프이다.

도 32는 다양한 PDE 이성질체에 대하여, 아탈루렌(Ataluren)의 농도에 따른 상대적 활성(% activity)를 나타낸 그래프이다.

도 33은 다양한 PDE 이성질체에 대하여, 마시티닙(Masitinib)의 농도에 따른 상대적 활성(% activity)를 나타낸 그래프이다.

도 34는 다양한 PDE 이성질체에 대하여, JTC-801의 농도에 따른 상대적 활성(% activity)를 나타낸 그래프이다.

도 35는 다양한 PDE 이성질체에 대하여, 오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate)의 농도에 따른 상대적 활성(% activity)를 나타낸 그래프이다.

도 36은 다양한 PDE 이성질체에 대하여, 도비티닙(Dovitinib)의 농도에 따른 상대적 활성(% activity)를 나타낸 그래프이다.

도 37은 다양한 PDE 이성질체에 대하여, CYC116의 농도에 따른 상대적 활성(% activity)를 나타낸 그래프이다.

도 38은 다양한 PDE 이성질체에 대하여, 레스베라트롤(Resveratrol)의 농도에 따른 상대적 활성(% activity)를 나타낸 그래프이다.

도 39는 다양한 PDE 이성질체에 대하여, 피피트린(Pifithrin)의 농도에 따른 상대적 활성(% activity)를 나타낸 그래프이다.

도 40은 다양한 PDE 이성질체에 대하여, RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol)의 농도에 따른 상대적 활성(% activity)를 나타낸 그래프이다.

도 41은 다양한 PDE 이성질체에 대하여, 엑시티닙(Axitinib)의 농도에 따른 상대적 활성(% activity)를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 본 발명은 포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0059] 본 발명은 암렉사녹스(amlexanox, AMX) 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0060] 본 발명은 피세아탄올(Piceathanol), 아탈루렌(Ataluren), 마시티닙(Masitinib), JTC-801, 오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate), 도비티닙(Dovitinib), CYC116, 레스베라트롤(Resveratrol), 피피트린(Pifithrin), RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol), 엑시티닙(Axitinib), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 자피를루카스트(Zafirlukast), 헥사클로로펜(Hexachloropene), 페북소스타트(Febuxostat), 및 설파다이아진은(Silver Sulfadiazine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 이상의 화합물 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0061] 본 발명자들은 마우스의 다양한 세포에서 아밀로이드 베타의 축적으로 인해 나타나는 신경세포, 성상세포 및 혈관주위세포에서의 아밀로이드 플라크, tau 단백질 발현을 억제하고, 세포 내 소기관의 활성 감소를 완화 또는 회복시키는 신규 물질을 발굴하고자 노력한 결과, PDE 억제제로 사용되던 암렉사녹스 (amlexanox)가 아밀로이드 베타의 축적에 의해 발생되는 알츠하이머, 루게릭 등의 신경퇴행성 질환을 효과적으로 치료할 수 있음을 확인하였다.

[0062] 본 명세서에서, 용어 “포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제”(이하, PDE 억제제)는 예를 들어, 암렉사녹스, 피세아탄올(Piceathanol), 아탈루렌(Ataluren), 마시티닙(Masitinib), JTC-801, 오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate), 도비티닙(Dovitinib), CYC116, 레스베라트롤(Resveratrol), 피피트린(Pifithrin), RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol), 엑시티닙(Axitinib), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 자피를루카스트(Zafirlukast), 헥사클로로펜(Hexachloropene), 페북소스타트(Febuxostat), 또는 설파다이아진은(Silver Sulfadiazine)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0063] 본 명세서에서, 용어 "신경퇴행성 질환 (neurodegenerative disease)"의 예방 또는 치료 활성은 아밀로이드 베타의 축적에 의해 촉발된 변화가 여러 세포나 신호 전달 체계를 거쳐, 아밀로이드 베타의 비정상적 응집 형성과 tau 단백질의 비정상적인 변화를 유도하여 독성 단백질을 생성하여, 신경세포의 기능 감소 또는 소실에 의해 운동조절능력, 인지기능, 지각기능, 감각기능 및 자율신경의 기능 이상을 의미하며, '퇴행성 뇌질환'과 동일한 의미이다. 상기 신경퇴행성 질환은 임상적 특징으로 분류할 수 있다. 주요 증상으로 진행성 인지기능 장애를 나타내는 질환에는, 알츠하이머병, 치매(전두측두치매, 루이치매, 등), 피질기저퇴행증(corticobasal degeneration) 등이 있고, 진행성 운동실조를 나타내는 질환에는 파킨슨병, 다계통위축증(multiple system atrophy), 헌팅턴병, 진행성핵상마비(progressive supranuclear palsy) 등이 있다. 근력저하 및 근위축 증상을 나타내는 신경퇴행성 질환으로는 루게릭 병, 원발성측삭경화증, 척수근위축병 등이 있다.

[0064] 본 명세서에서 "아밀로이드 플라크"는 아밀로이드 베타를 포함하는 불용성 섬유성 단백질 응집체일 수 있다. 상기 아밀로이드 플라크는 세포 내, 세포 표면에, 및/또는 세포 사이의 공간에 존재하는 것일 수 있다. 예를 들면, 신경조직의 세포 사이의 공간에 존재하는 것일 수 있다.

[0065] 본 명세서에서 "신경조직"은 뇌와 같은, 중추신경계 조직을 포함한다. 뇌 조직은 대뇌, 소뇌 및 해마 조직을 포함할 수 있다. 대뇌 조직은 대뇌 피질을 포함한다. 신경조직은 신경조직 자체뿐만 아니라 신경세포를 포함하며, 신경세포란 신경조직을 이루는 성분 중 하나이다. 이러한 신경세포는 뉴런세포 및/또는 성상교세포를 포함한다. 신경조직의 배양은 인 비트로에서 뉴런세포 및/또는 성상교세포와 같은 신경 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0066] 본 명세서에서 "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 관련 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0067] 본 명세서에서 "예방"은 본원에 따른 조성물의 투여로 관련 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 예를 들어 신경 심리검사를 통하여 경도인지장애(mild cognitive impairment)를 가진 치매 전 단계 환자의 진단이 가능한데, 1년 동안 경도인지장애를 가진 환자의 평균 12%가 알츠하이머 병으로 발전하며, 경도인지장애를 그대로 방치할 경우, 약 6년 경과 시 80%가 알츠하이머 병으로 진전하기 때문에, 아밀로이드 베타를 포함하는 아밀로이드 플라크, 비정상적인 tau 단백질 등의 독성단백질에 의한 독성을 완화 또는 감소시킬 수 있는 본원의 조성물을 투여하면 신경퇴행성 질환의 진행을 막거나 진행을 늦추는 효과를 볼 수 있을 것이다.

[0068] 본 발명의 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 아밀로이드 베타 축적에 의한 독성단백질의 응집을 예방하거나 저감시키고, 알츠하이머 치매를 유발시킨 동물모델 5X FAD 마우스를 대상으로 한 약물투여 및 행동평가 실험에서 기억과 학습 능력을 예방하거나 회복시키는 효능을 나타내었고(실시예 12), 루게릭 병 동물모델인 사람의 ALS와 관련된 유전자인 SOD-1(codon 93번째에서 글라이신이 알라닌으로 치환된 아미노산 발현)의 돌연변이 단백질이 발현되는 G93A SOD-1 마우스를 대상으로 한 약물투여 및 생존률 평가 실험에서, 루게릭 병의 발병시점과 생존률의 연장효능을 확인하였다(실시예 13). 또한, 산화적 세포 손상을 유발시킨 성상교세포를 대상으로 한 인 비트로(in vitro)에서 세포사멸을 현저히 감소시켰다(실시예 14).

[0069] 상기 암렉사녹스의 화학식은 2-amino-7-isopropyl-5-oxo-5H-[1]benzopyrano[2,3-b] pyridine-3-carboxylic acid이고, 분자식은 $C_{16}H_{14}N_2O_4$이며, 분자량은 298.30이다. 암렉사녹스는 냄새가 없고 황백색의 흰색 결정성 분말을 가지며, 구조식은 다음과 같다.

[0070] [구조식 1]



[0071]

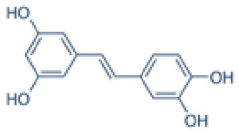
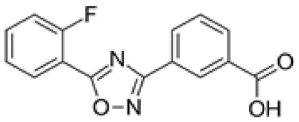
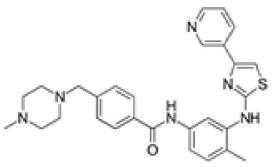
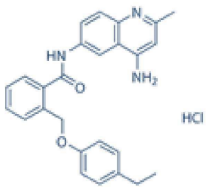
[0072] 암렉사녹스는 아토피성 질환 특히, 알레르기성 천식 및 비염에 임상적으로 효과가 규명된 항알레르기성 약물로 사용되고 있으므로, 안전성이 확보된 화합물이다.

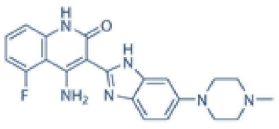
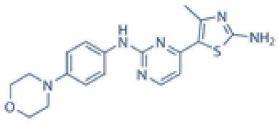
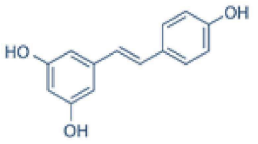
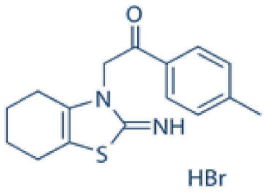
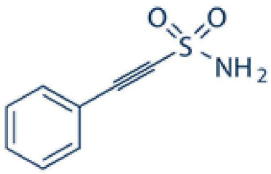
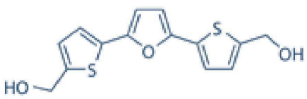
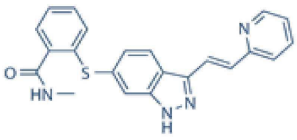
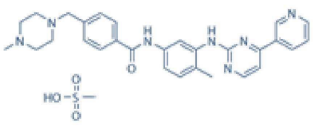
[0073] 상기 암렉사녹스와 유사한 구조식을 갖는 다양한 화합물이 존재하나, 그 중에서도 상대적으로 7 내지 40 배 이상의 현저히 낮은 농도를 사용함에도 동등하거나 더 우수한 효과를 나타내면서, 모든 PDE 이성질체에서 탁월한 감소 효능을 보이는 것은 암렉사녹스(amlexanox, AMX)(ZO07)인 것을 확인하였다(실시예 8, 9).

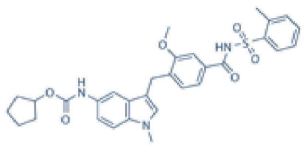
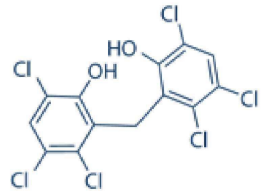
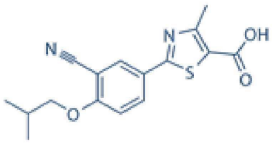
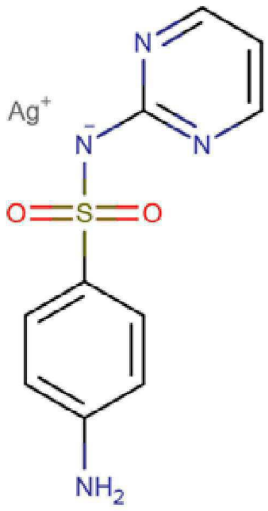
[0075] 본 발명의 PDE 억제제는 하기 표 1에 기재된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

표 1

[0076]

이름	구조식	분자량(g/mol)
피세아탄올(Piceathanol)		244.24
아탈루렌(Ataluren)		284.24
마시티닙(Masitinib)		498.64
JTC-801		411.51
오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate)		413.49

도비티닙(Dovitinib)		392.43
CYC116		368.46
레스베라트롤(Resveratrol)		228.24
피피트린(Pifithrin)	[피피트린-α] 	367.30
	[피피트린-μ] 	181.21
RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol)		292.37
엑시티닙(Axitinib)		386.47
이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate)		589.71

자피를루카스트(Zafirlukast)		575.68
헥사클로로펜(Hexachloropene)		406.9
페북소스타트(Febuxostat)		316.37
설파다이아진은(Silver Sulfadiazine)		357.14

[0077] 본 명세서에서 용어 "유효성분으로 포함하는"이란 PDE 억제제 또는 암렉사녹스의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물 내에서 PDE 억제제 또는 암렉사녹스는 예를 들어, 0.001 mg/kg 이상, 바람직하게는 0.1 mg/kg 이상, 보다 바람직하게는 1 mg/kg 이상, 보다 더 바람직하게는 10 mg/kg 이상 포함된다. PDE 억제제 또는 암렉사녹스는 과량 투여하여도 인체에 부작용이 거의 없으므로 본 발명의 조성물 내에 포함되는 PDE 억제제 또는 암렉사녹스의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

[0078] 본 발명의 조성물에서 유효 성분으로 이용되는 상기 PDE 억제제 또는 암렉사녹스는 그 화합물 자체뿐만 아니라, 그의 약리학적 또는 식품학적으로 허용 가능한 염, 수화물, 용매화물 또는 프로드러그를 포함하는 의미로 해석된다.

[0079] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명의 조성물은 약학적 조성물인 것이다.

[0080] 본 명세서에서 용어, "약리학적으로 허용 가능한 염"은, 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는, 화합물의 제형을 의미한다.

[0081] 상기 약리학적으로 허용 가능한 염 중에서, 약리학적으로 허용가능한 산으로는, 예를 들어, 옥살산, 말레산, 푸마르산, 말산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산과 같은 유기산, 및 염산, 황산, 인산, 브롬화수소산과 같은 무기산이 포함된다.

[0082] 또한, 본 발명의 화합물을 염기와 반응시켜, 암모니움염, 나트륨 또는 칼륨염 등의 알칼리 금속염, 칼슘 또는 마그네슘염 등의 알칼리 토금속염 등의 염, 디시클로헥실아민, N-메틸-D-글루카민, 트리스(히드록시메틸) 메틸아민 등의 유기염기들의 염, 및 아르기닌, 리신 등의 아미노산 염을 형성함으로써 얻어질 수도 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0083] 용어, "약리학적으로 허용 가능한 수화물"은 소망하는 약리학적 효과를 갖는 상기 PDE 억제제 또는 암렉사녹스의 수화물을 나타낸다. 용어, "약리학적으로 허용 가능한 용매화물"은 소망하는 약리학적 효과를 갖는 상기 PDE 억제제 또는 암렉사녹스의 화합물의 용매화물을 나타낸다. 상기 수화물 및 용매화물도 상기한 산을 이용하여 제조될 수 있다.

[0084] 용어, "약리학적으로 허용 가능한 프로드러그"는 상기 PDE 억제제 또는 암렉사녹스의 약리학적 효과를 발휘하기 이전에 생물전환을 하여야 하는 상기 PDE 억제제 또는 암렉사녹스의 유도체를 나타낸다. 이러한 프로드러그는 화학적 안전성, 환자 수용성, 생물학적 이용성, 기관 선택성 또는 조제의 편의를 개선하기 위하여, 작용 기간의 장기화 및 부작용의 감소를 위하여 제조된다. 본 발명의 프로드러그의 제조는 상기 암렉사녹스를 이용하여 당업계의 통상적인 방법(예: Burger's Medicinal Chemistry and Drug Chemistry, 5th ed., 1:172-178 and 949-982(1995))에 따라 용이하게 제조될 수 있다.

[0085] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0086] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 비강 투여, 점안 투여, 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 소망하는 치료 또는 예방에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 본 발명의 약학적 조성물의 1일 투여량은 0.001-100 ㎎/㎏이다.

[0087] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질 중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0088] 본 발명의 약학적 조성물은 피부 외용제, 에어로졸, 스프레이, 점안제, 경구제 및 주사제 형태의 제형으로 제조될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 인간용 또는 동물용으로 사용될 수 있다.

[0090] 또한, 본 발명은 포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0091] 또한, 본 발명은 암렉사녹스 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0092] 또한, 본 발명은 피세아탄올(Piceathanol), 아탈루렌(Ataluren), 마시티닙(Masitinib), JTC-801, 오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate), 도비티닙(Dovitinib), CYC116, 레스베라트롤(Resveratrol), 피피트린(Pifithrin), RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol), 엑시티닙(Axitinib), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 자피를루카스트(Zafirlukast), 헥사클로로펜(Hexachloropene), 페북소스타트(Febuxostat), 및 설파다이아진은(Silver Sulfadiazine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0093] 본 발명에 따른 식품 조성물은 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 알코올 음료류, 과자류, 다이어트바, 유제품, 육류, 초코렛, 피자, 빵류, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다.

[0094] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분으로서 PDE 억제제 또는 암렉사녹스 뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제와 음료류로 제조되는 경우에는 암렉사녹스 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 및 각종 식물 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0095] 본 발명은 PDE 억제제 또는 암렉사녹스 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물로서 건강기능식품을 제공한다. 건강기능식품이란, 암렉사녹스을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다. 이와 같이하여 얻어지는 본 발명의 건강기능식품은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 매우 유용하다. 이와 같은 건강기능식품에 있어서의 PDE 억제제 또는 암렉사녹스의 첨가량은, 대상인 건강기능식품의 종류에 따라 달라 일률적으로 규정할 수 없지만, 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가하면 되며, 대상 식품에 대하여 통상 0.01 내지 50 중량%, 바람직하기로는 0.1 내지 20 중량%의 범위이다. 또한, 환제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태의 건강기능식품의 경우에는 통상 0.1 내지 100 중량%, 바람직하게는 0.5 내지 80 중량%의 범위에서 첨가하면 된다. 한 구체 예에서, 본 발명의 건강기능식품은 환제, 정제, 캡슐제 또는 음료의 형태일 수 있다.

[0096] 본 명세서에서 용어, "식품학적으로 허용 가능한 염"은, 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는, 화합물의 제형을 의미한다. 상기 식품학적 염은, 본 발명의 화합물을, 염산, 브롬산, 황산, 질산, 인산 등의 무기산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산 등의 술폰산, 타타르산, 포름산, 시트르산, 아세트산, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산, 카프릭산, 이소부탄산, 말론산, 숙신산, 프탈산, 글루콘산, 벤조산, 락트산, 푸마르산, 말레인산, 살리실산 등과 같은 유기 카본산과 반응시켜 얻어질 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물을 염기와 반응시켜, 암모니움염, 나트륨 또는 칼륨염 등의 알칼리 금속염, 칼슘 또는 마그네슘염 등의 알칼리토금속염 등의 염, 디시클로헥실아민, N-메틸-D-글루카민, 트리스(히드록시메틸)메틸아민 등의 유기염기들의 염, 및 아르기닌, 리신 등의 아미노산 염을 형성함으로써 얻어질 수도 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0097] 본 발명의 식품 조성물은 인간용 식품 또는 동물용 사료나 사료첨가제 등으로 사용될 수 있다.

[0098] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 암렉사녹스 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 세포손상 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0099] 본 발명자들은 마우스의 다양한 세포에서 아밀로이드 베타의 축적으로 인해 나타나는 신경세포, 성상세포 및 혈관주위세포에서의 아밀로이드 플라크, tau 단백질과 같은 독성단백질에 의한, 세포손상에 대하여 보호활성을 가지면서 장기간 복용하더라도 독성이나 부작용이 낮은 신규 물질을 발굴하고자 노력한 결과, PDE 억제제로 새롭게 발굴한 암렉사녹스(amlexanox)가 아밀로이드 베타의 축적에 의해 발생되는 세포 내 라이소좀의 pH 변화, 라이소좀 단백질의 활성 저하 또는 세포 내 아연 농도 감소 등 세포의 손상을 효과적으로 치료할 수 있음을 확인하였다.

[0100] 본 명세서에서, 용어 "아밀로이드 베타에 의한 세포손상"의 예방 또는 치료 활성은 아밀로이드 베타에 의해 촉발된 변화가 여러 세포나 신호 전달 체계를 거쳐, 아밀로이드 베타의 비정상적 응집 형성과 tau 단백질의 비정상적인 변화를 유도하여 독성 단백질을 생성됨에 따라, 체내 세포 손상이 유발되는 것을 의미하며, 구체적으로는 라이소좀 pH가 증가되고, 라이소좀 단백질의 활성이 감소되며, 세포 내 아연의 농도가 감소되거나, 세포사멸이 유발되는 것일 수 있다. 아밀로이드 베타에 의한 세포손상은 신경퇴행성 질환, 퇴행성 뇌질환, 척수손상, 또는 말초신경 손상에 의해 유발될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 신경퇴행성 질환은 임상적 특징으로 분류할 수 있는데, 주요 증상으로 진행성 인지기능 장애를 나타내는 질환에는, 알츠하이머병, 치매(전두측두치매, 루이치매), 피질기저퇴행증(corticobasal degeneration) 등이 있고, 진행성 운동실조를 나타내는 질환

에는 파킨슨병, 다계통위축증(multiple system atrophy), 헌팅턴병, 진행성핵상마비(progressive supranuclear palsy) 등이 있다. 근력저하 및 근위축 증상을 나타내는 신경퇴행성 질환으로는 루게릭 병, 원발성측삭경화증, 척수근위축병 등이 있다.

[0101] 본 명세서에서 "치료"란 본 발명에 따른 조성물의 투여로 관련 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0102] 본 명세서에서 "예방"은 본원에 따른 조성물의 투여로 관련 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 예를 들어 신경 심리검사를 통하여 경도인지장애(mild cognitive impairment)를 가진 치매 전 단계 환자의 진단이 가능한데, 1년 동안 경도인지장애를 가진 환자의 평균 12%가 알츠하이머 병으로 발전하며, 경도인지장애를 그대로 방치할 경우, 약 6년 경과시 80%가 알츠하이머 병으로 진전하기 때문에, 아밀로이드 베타를 포함하는 아밀로이드 플라크, 비정상적인 tau 단백질 등의 독성단백질에 의한 독성을 완화 또는 감소시킬 수 있는 본원의 조성물을 투여하면 신경퇴행성 질환의 진행을 막거나 진행을 늦추는 효과를 볼 수 있을 것이다.

[0103] 본 발명의 실시예에 따르면, 혈관주위세포에 아밀로이드 베타를 주입하여 축적하게 한 후, AMX를 처리하면 아밀로이드 베타, tau 단백질 응집이 억제되는 것을 확인하였다. 또한 아밀로이드 베타 축적 이외에 Tau, G93A SOD-1의 독성단백질 축적도 AMX가 감소시키고 있음을 확인하였다(실시예 9).

[0104] 또한, 바필로마이신 A1(bafilomycin A1)을 투여하여 세포 내 라이소좀 pH를 알칼리화한 신경세포에 암렉사녹스(amlexanox, AMX)를 투여할 경우, 라이소좀 pH 환경을 60분 내에 원래상태로 회복(산성화)시켰으며, 세포 내 아연의 농도가 정상수준으로 회복 및 증가시킴을 확인하였다(실시예 10).

[0105] 또한, 바필로마이신 A1에 의해 라이소좀 단백질 활성이 저해된 성상교세포에, 암렉사녹스를 처리할 경우, 성상교세포 라이소좀 활성이 60분 내에 원래상태로 회복되는 것을 확인할 수 있었다(실시예 11).

[0106] 또한, 본 발명의 실시예에 따르면, 본 발명의 조성물은 아밀로이드 베타 축적에 의한 독성단백질로 유발되는 산화적 스트레스(글루타메이트 또는 과산화수소 처리)를 받은 성상교세포의 손상에 대한 보호효과를 LDH 방법을 이용해 확인하였다, 그 결과 본원발명의 조성물을 처리한 세포군에서의 생존율이 현저히 높게(40%) 나타났고(실시예 14), 세포 손상으로 인한 형태학적 변화는 거의 없는 것으로 확인되었다.

[0107] 상기 본 발명에 따른 암렉사녹스를 유효성분으로 하는 아밀로이드 베타에 의한 세포손상 예방 또는 치료용 약학 조성물은 세포 손상에 대한 치료 또는 예방에 효과가 있는 의약품으로 활용될 수 있다.

[0108] 상기 암렉사녹스는 아토피성 질환 특히, 알레르기성 천식 및 비염에 임상적으로 효과가 규명된 항 알레르기성 약물로 사용되고 있으므로, 안전성이 확보된 화합물이다.

[0109] 본 발명은 포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0110] 본 발명은 암렉사녹스 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0111] 본 발명은 피세아탄올(Piceathanol), 아탈루렌(Ataluren), 마시티닙(Masitinib), JTC-801, 오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate), 도비티닙(Dovitinib), CYC116, 레스베라트롤(Resveratrol), 피피트린(Pifithrin), RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol), 엑시티닙(Axitinib), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 자피를루카스트(Zafirlukast), 헥사클로로펜(Hexachloropene), 페북소스타트(Febuxostat), 및 설파다이아진은(Silver Sulfadiazine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 신경퇴행성 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.

[0112] 본 발명은 포스포디에스터라제(phosphodiesterase, PDE) 억제제 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 개체에 투여함으로써 신경퇴행성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0113] 본 발명은 암렉사녹스 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 개체에 투여함으로써 신경퇴행성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0114] 본 발명은 피세아탄올(Piceathanol), 아탈루렌(Ataluren), 마시티닙(Masitinib), JTC-801, 오바토클락스 메실

레이트(Obatoclax mesylate), 도비티닙(Dovitinib), CYC116, 레스베라트롤(Resveratrol), 피피트린(Pifithrin), RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol), 엑시티닙(Axitinib), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 자피를루카스트(Zafirlukast), 헥사클로로펜(Hexachloropene), 페북소스타트(Febuxostat), 및 설파다이아진은(Silver Sulfadiazine)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물 또는 이의 약리학적으로 허용 가능한 염을 개체에 투여함으로써 신경퇴행성 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0115] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0116] 본 명세서에 있어서, "개체(individual)"란 본 발명의 PDE 억제제, 또는 그의 약학적으로 허용가능한 염, 또는 그를 포함하는 약학적 조성물이 투여될 수 있는 대상을 말하며, 그 대상에는 제한이 없다. 본 발명의 개체는 바람직하게는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으며, 예를 들어, 인간, 마우스, 랫, 원숭이, 고양이, 개, 소, 돼지 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0118] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0120] **<실험방법 및 재료>**

[0121] 본 발명에서 사용한 시약 및 단백질 염색 시료는 다음과 같이 구입하거나 준비하여 사용하였다. 암렉사녹스(Amlexanox), 바필로마이신 A1(Bafilomycin A1), 과산화수소(Hydrogen peroxide)는 시그마(Sigma)로부터 구입하였고, 베타 아밀로이드(Beta amyloid)(6E10)는 바이오레전드(Biolegend)로부터 구입하였으며, 녹색형광 단백질(GFP)은 산타 크루즈(Santa Cruze)로부터 구입하였다. 또한 GM130 항체는 에피도믹스(Epitomics)로부터 구입하였고, EEA1 항체는 셀 시그널(Cell Signaling)로부터 구입하였으며, LAMP1 항체는 노버스 바이올로지칼(Novus Biological)로부터 구입하였다.

[0122] 세포 내 아연 활성을 염색하기 위한 시료인, FluoZin-3은 Molecular Probe로부터 구입하였고, Zinpyr-1는 Mellitech로부터 구입하였으며, 라이소센서 그린 DND-189(Lysosensor green DND-189)은 Molecular Probe로부터 구입하였다.

[0123] 또한, 세포 내 아밀로이드 베타 축적에 사용한 시료인, 베타-아밀로이드 1-42(Beta-amyloid 1-42)는 아메리칸 펩타이드사(American Peptide company)로부터 구입하였다.

[0124] **1. 약물 스크리닝(Drug screening)**

[0125] 약효 스크리닝을 위해, 고속 다중 스크리닝법(High-Throughput screening, HTS)을 사용하였다. 구체적으로 cAMP를 기반으로 하여 기존 PDE 억제제와 FDA-approved drug library와 selleckchem library 검색을 통해 유효물질을 확보하였다.

[0126] **2. 세포배양**

[0127] **1) 대뇌 피질 성상교세포의 배양**

[0128] 성상교세포의 배양을 위해, 우선 마우스 태아(3일령)로부터 대뇌피질(neocortices)을 분리한 다음, 채취된 대뇌피질 조직을 단일 세포로 나눈다. 다음 상기 단일세포를 분주하고, 배양한 성상교세포를 DMEM + 7% FBS + 7% HS + 100 U/㎖ 페니실린 + 100 ㎍/㎖ 글루타민의 배양 배지를 이용하여 습식배양기(humidified incubator)에서 37℃, 5% 이산화탄소 조건으로 보관하였다. DIV 10-14 이후에 80-90% 이상 자란 세포를 사용하였고, 실험 전에 세포들을 따뜻한 MEM으로 두 번 세정하고 사용하였다. 계대 배양하지 않고 매번 새로운 세포를 배양해서 사용하였다.

[0129] **2) 혈관주위세포 배양**

[0130] 3-4주째 마우스의 대뇌피질(neocortices)을 분리하고, 분리된 조직을 콜라게네이즈(collagenase)를 이용해 단일

세포로 나누었다. 이후 퍼콜(Percoll)을 이용해 혈관세포층을 분리하여 세포를 분지하였다. 약 2주간 DMEM + 20% FBS + 100 U/㎖ 페니실린 + 100 ㎍/㎖ 글루타민의 배양 배지를 이용하여 습식배양기(humidified incubator)에서 37 ℃, 5% 이산화탄소 조건으로 보관하였다. 배양한 후, 계대 배양하여 passage 4 이상 해당하는 세포를 실험에 사용하였다. 실험 전에 세포들을 따뜻한 MEM으로 2회 세정하고 사용하였다.

[0131] **3) 661W 광수용체 세포(661W)**

[0132] 오클라오마 대학(by The university of Oklahoma department)에서 제공받은 세포를 플레이트에 Fibronectin(피브로넥틴) 또는 PLL(poly-L-Lysine) 코팅하여 배양하였다. 배양한 세포는 DMEM + 10% FBS + 100 U/㎖ 페니실린의 배양 배지를 이용하여 습식배양기(humidified incubator)에서 37 ℃, 5% 이산화탄소 조건으로 보관하였다. 실험에 필요할때마다 트립신처리(trypsinization)하여 계대 배양(confluent culture)하여 사용하였다.

[0133] **4) ARPE-19(인간 망막색소상피세포)**

[0134] 세포주 은행에서 세포를 구입하여 사용하였다(ATCC CRL-2302, the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA). 배양한 세포는 DMEM + 5% FBS + 5% HS + 100 U/㎖ 페니실린 + 200 uM 글루타민의 배양 배지를 이용하여 습식배양기(humidified incubator)에서 37 ℃, 5% 이산화탄소 조건으로 보관하였다. 실험에 필요할 때마다 트립신처리(trypsinization)하여 계대 배양(confluent culture)하여 사용하였다.

[0135] **5) CHO7W△E9 세포**

[0136] The Chinese hamster ovary 7W△E9(CHO7W△E9) cell line은 David E. Kang 박사에게 제공받아 사용하였다(USF Health Byrd Alzheimer's Institute, Tampa, FL, USA). 배양한 세포는 RPMI1640 + 10% FBS + 5% HS + 100 U/㎖ 페니실린의 배양 배지를 이용하여 습식배양기(humidified incubator)에서 37 ℃, 5% 이산화탄소 조건으로 보관하였다. 실험에 필요할 때마다 트립신처리(trypsinization)하여 계대 배양(confluent culture)하여 사용하였다.

[0137] **6) SH-SY5Y 세포**

[0138] SH-SY5Y 세포는 10%(v/v) fetal bovine serum(FBS), 100 U/㎖ 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 Dulbecco's modified Eagles medium(DMEM)(Gibco) 배지를 이용하여 습식배양기(humidified incubator)에서 37 ℃, 5% 이산화탄소 조건으로 보관하였다. 실험에 필요할 때마다 트립신처리(trypsinization)하여 계대 배양(confluent culture)하여 사용하였다.

[0139] **3. 공촛점 현미경 분석**

[0140] 생세포 공촛점 현미경(Livecell confocal microscopy)을 이용하여 라이소센서(Lysosensor)(세포 내 pH 측정;녹색)와 라이소트래커(Lysotracker)(세포 소기관 염색;적색)의 형광염료를 30분간 처리하고, 생세포 이미징 용액(Livecell imaging solution)이 함유된 배지로 교환(media change)해 준 다음, 생세포 공촛점 현미경을 이용해 실시간으로 세포소기관의 구조, pH 변화 등을 관찰하였다.

[0141] **4. 면역염색법**

[0142] 상기 배양조건으로 배양한 혈관주위세포를 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 30분간 고정시킨 다음 PBS로 3회 이상 세척 후 블로킹 솔루션(1% BSA + 0.1% Triton X-100)으로 30분간 블로킹(blocking)시키고, 1차 항체(primary antibody)와 하루 밤 동안 반응시켰다. 사용한 1차 항체로는 골지 마커(GM130), 엔도좀 마커(EEA1) 그리고 라이소좀 마커(LAMP1)가 있다. 1차 항체 염색 후 PBS로 3회 이상 세척한 후, 2차 항체(secondary antibody, Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies)와 1시간 동안 반응시키고, 유리판에 표본 제작하였다.

[0143] **5. 웨스턴 블롯팅(Western blotting) 분석법**

[0144] 상기 배양조건으로 각각의 세포를 배양하고, 세포 배양물을 회수한 후, 이로부터 입자 분획물(particulate fraction)을 50 mM Tris 완충액(buffer)에 제조하였다. 상기 세포 배양물로부터 수득된 단백질을 SDS 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)에 전개시킨 후, 이모빌론 P 멤브레인(Immobilon-P membrane)(Millipore, USA)에 전달(transfer)한 뒤, 항체(antibodies)와 하루 동안 반응시켰다. 다음날 웨스턴 블롯팅을 세척하고, 퍼옥시다아제가 결합된 이차항체(peroxidase-linked secondary antibody)과 함께 상온에서 1시간동안 반응시킨 후 4-클로로-1-나프톨(4-chloro-1-naphthol)을 이용하여 밴드를 염색하였다.

[0145] **6. 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)**

[0146] TRIsure(BIOLINE, BIO-38032) 용액을 이용해 세포로부터 RNA를 분리한 후 이소프로판올(isopropanol)과 에탄올(ethanol)을 이용해 RNA를 정제하였다. Quantitect Reverse Transcription Kit(Qiagen, Cat No./ID: 205311)를 이용하여 역전사 중합(Reverse transcription) 반응을 통해 RNA에서 cDNA를 합성하였다. 이 cDNA를 이용하여 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR Master Mix(Thermo Scientific,#K0171))을 통해 세포 내 PDE mRNA의 발현양을 확인하였다.

[0147] PCR에 사용한 PDE 이성질체들의 primer 염기서열은 아래와 같다.

[0148] PDE1A-F_ GAAGCAGCTGGAGAAAGGTGATGTC

[0149] PDE1A-R_ CCTTTCCACAAAAATCCCAGCCTGG

[0150] PDE1B-F_ GCGCTACATGGTGAAGCAGTTGGAG

[0151] PDE1B-R_ CCACGAAGATCCCAGCCTGCAC

[0152] PDE1C-F CGGCTGCCATCCATGACTATGAAC

[0153] PDE1C-R GTTCGAAACTCCCTCCAGTCATCC

[0154] PDE2A-F GGT CAT ACC CCT GCT GGA CAA GG

[0155] PDE2A-R CAGTTGCAGGATCTTTCGGTCATGG

[0156] PDE3a F_ACTTTCATGCTTTGGAGATCGGATA

[0157] PDE3a R_AGGAATCGGCTGTGTTGTGAGA

[0158] PDE3B-F CTCTGGGACTGGGACTTGAAGCAG

[0159] PDE3B-R CTTTGGCCTACAGGAACCTGAGAAAG

[0160] PDE4A-F GCTTGGAGGCAGAAAATGGGCC

[0161] PDE4A-R CGGAGACTGGCCAGCACCTG

[0162] PDE4B-F_ GTGGAAAATGGCCCTTCTCCAGGTC

[0163] PDE4B-R_ GGCAAAAGGAGTGACAATCAGGTCATC

[0164] PDE5A-F_ CGCCTCTTTGATGTTGCTGAAGGTTC

[0165] PDE5A-R_ CCTGATTTCTTGTTGATGGCCTGAGC

[0166] PDE6A-F_ GATGTGTGGCCAGTTCTGATGGGC

[0167] PDE6A-R_ CATCCAGAGGCTCTTTCTGGAATTC

[0168] PDE6B-F_GATAAACGTGCAGGATGTGGCAGAG

[0169] PDE6B-R_CACAGTTGTGGAGGTAGCTTAGGTG

[0170] PDE6C-F_CCGGAGAAGCCAGATCCTTATGTGG

[0171] PDE6C-R_CCTGCCATCTGGAGTCTTTGGTCC

[0172] PDE6D-F GATGAACCTTCGGGATGCCGAAACAG

[0173] PDE6D-R GCCAGGTGTTTGTGGAGTTAGGGATC

[0174] PDE7A-F CAGCTCTCGCAGAGACGTGGAG

[0175] PDE7A-R CCAGCATACACTTGGCTTGTCCATTG

[0176] PDE7B-F GTTGTGTCACCTCTTCAACTCCCATGG

[0177] PDE7B-R GCATGATGTCCAGAGGTGTGAGG

[0178] PDE8A-F GTCACCAAGGAGGTGCAGACTGTC

[0179] PDE8A-R GAGTTACAAGCCCTGAGTTTCAGCTG

[0180] PDE8B-F CAGTGTTTACAGCGTTAGACCACTGTC

[0181] PDE8B-R CGAATGAGGCTCTGTCTGAGAGTTGTC

[0182] PDE9A-F_GACACCTCGACGTGATGTCCCC

[0183] PDE9A-R_CATCTGTGTCACACAGAAGCAGTGC

[0184] PDE10A-F_ GGGATTGCTGGTCAAGTGGCAAGAAC

[0185] PDE10A-R_ GCTTCTCCATGGTAACCCTGTAGATGC

[0186] PDE11A-F_ GCTGGAGGTGGTCAATGACCTC

[0187] PDE11A-R_CTGTCGAAGCAACCAGCTCAGCG

[0188] GAPDH-F GTCGTGGAGTCTACTGGTGTCTTCAC

[0189] GAPDH-R GTTGTCATATTTCTCGTGGTTCACACCC

[0190] hPDE1a-F GCTTGTTCTAGCTGCTGAAACTGACTG

[0191] hPDE1a-R CTGCTTCCAGCACAGATGCCGC

[0192] hPDE1b-F GAGCTTGGACTGGGAGCCCAAAG

[0193] hPDE1b-R GCTGACTTCAGCTCCAGGGGTG

[0194] hPDE1c-F GACAGCCCAAACTATCTCAGCTTCAC

[0195] hPDE1c-R GATCTACCACTGAAGCTTCCCCTCTC

[0196] hPDE3a-F GACCACAAACGAGGGCCAAGAGG

[0197] hPDE3a-R CACTGAGCGAAGTGACGGGATTCAC

[0198] hPDE3b-F CTGCAGCCAGTTACTATGGCAGTTGC

[0199] hPDE3b-R GGC TTG GAT CAG TCA GAA GAT CTG AC

[0200] hPDE4a-F CAG GCG CTT CGA GGC AGA GAA TG

[0201] hPDE4a-R CCT CGC TGG TGA CCG ATG AGT TC

[0202] hPDE4b-F GCC TTT GAC AAC GCT TCC AAG CAT TGC

[0203] hPDE4b-R GCT CGC TTG GAA GAG AAG AGT TTC TCG

[0204] hPDE5a-F CCAGCAGCAGAAGCAGCAGCAG

[0205] hPDE5a-R CAGAGGCAGAGATTTTCCTGGTTGGTG

[0206] hPDE7a-F GGAAGTGTGTTACCAGCTGCCGG

[0207] hPDE7a-R GGCTCCTTACACGTACATCTCCTAGC

[0208] hPDE7b-F CACCGCTCAGAGATTTCACGGCATTC

[0209] hPDE7b-R CTTGGTGCCAATCTCCCCTGAGTATG

[0210] hPDE10a-F GAGTGCTTCCTGAGCCCCAGTTTG

[0211] hPDE10a-R GCTGGTTGTCTCCTCCTGTGTCC

[0212] hGAPDH-F GGCACCGTCAAGGCTGAGAACG

[0213] hGAPDH-R GCAGAGGGGGCAGAGATGATGAC

[0214] **7. 라이소좀 활성 분석**

[0215] 카텝신 B(cathepsin B)와 카텝신 L(cathepsin L) 효소 염색 시료를 세포 배양체에 처리하여, 30분간 반응시키고, 공촛점 현미경을 이용해 세포 내 라이소좀의 활성 변화를 확인하였다.

[0216] **8. 통계학적 분석**

[0217] 평균±표준오차(SEM) 통계적 유의를 나타내는 데이터 값은 Scheffe 테스트로 편차 분석을 통해 측정하였다. 통계적 유의로서 P<0.05의 값을 기준치로 삼았다.

[0218] **실험 및 실험결과**

[0219] **<실시예 1> 세포별 PDE 이성질체(PDE isoform) mRNA 발현 양상**

[0220] 중추신경계는 신경세포와 성상교세포를 포함한 다양한 세포들로 이루어져 있다. 신경세포와 성상교세포 이외에 신경퇴행성 질환과 관련하여 최근 주목을 받고 있는 세포 중에는 신경계 미세순환을 조절하는 혈관주위세포 등이 존재하므로, 이들 다양한 세포에 대하여 PDE 이성질체의 mRNA 발현 여부를 분석하고자 하였다.

[0221] 도 1은 신경세포(neuron), 성상세포(astrocyte), 혈관주위세포(pericyte), 661W 광수용체 세포(661W) 각각에서 PDE 이성질체(1~11)의 mRNA 발현여부를 RT-PCR을 통해 확인한 결과이다. 도 2는 CHO7W△E9 세포, SH-SY5Y/swe 세포, ARPE-19 세포 각각에서 PDE 이성질체(1~11)의 mRNA 발현여부를 RT-PCR을 통해 확인한 결과이다.

[0222] 도 1 및 2에 나타난 바와 같이, 상기 다양한 세포들에 PDE 이성질체(1~11)가 발현되고 있음을 확인하였고, 특히 신경세포에서는 PDE1A, 1B, 1C, 2A, 3A, 3B, 4A, 4B, 5A, 6B, 7A, 7B, 8A, 10A의 mRNA가 발현하고 있었으며, 성상세포는 신경세포와 유사하나, 신경세포보다 1~3의 PDE 이성질체의 mRNA가 추가로 발현됨을 확인하였다. 혈관주위세포에서는 신경세포와 양상이 유사하나, 1, 2의 PDE 이성질체의mRNA 발현이 더 적고 3의 PDE 이성질체의 mRNA 경우에는 발현이 더 많은 것을 확인할 수 있다.

[0223] **<실시예 2.> 혈관주위세포(pericyte)에서 아밀로이드 베타 응집 분석**

[0224] 도 3은 마우스의 혈관주위세포(pericyte)에 형광 염색 시료(FITC)가 부착된 아밀로이드 베타를 처리한 후, 시간에 따라 공촛점 현미경 촬영한 사진과 세포에서의 FITC가 부착된 아밀로이드 베타의 형광세기를 측정하여 나타낸 그래프이다.

[0225] 도 3에 나타난 바와 같이 마우스의 혈관주위세포를 분리, 배양한 후 형광 염색 시료가 부착된 아밀로이드 베타를 처리할 경우, 시간에 따라 아밀로이드 베타가 혈관주위세포 내로 유입되고, 독성단백질로 응집되는 것을 확인하였다.

[0226] **<실시예 3> 혈관주위세포에서 아밀로이드 베타 응집 양상 분석**

[0227] 혈관주위세포에 베타 아밀로이드를 투여할 때, 아밀로이드 베타가 축적되는 세포소기관 위치를 확인하고자 하였다. 이를 위해 GM130(골지 표지인자), EEA1(엔도좀 표지인자), LAMP1(라이소좀 표지인자)에 대한 항체를 사용하여 공촛점 현미경으로 확인하였다.

[0228] 도 4는 마우스의 혈관주위세포(pericyte)에 형광 염색 시료(FITC)가 부착된 아밀로이드 베타를 처리한 후, 세포소기관 별 아밀로이드 베타 축적을 공촛점 현미경으로 분석한 결과로, 이에 따르면, 혈관주위세포에서, 아밀로이드 베타 응집체는 엔도좀과 라이소좀에 집중되고 있음을 확인하였으며, 시간이 경과할수록 점차 양이 증가하고 있음을 확인하였다.

[0229] **<실시예 4.> 아밀로이드 응집과 PDE의 관련성**

[0230] 실시예 1에서의 결과를 통해, 혈관주위세포에서 특이적으로 높은 발현을 보이는 PDE3를 우선 표적물질로 선정하였다. PDE3의 특이적 억제제로 알려져 있는 실로스타졸을 처리하여, 아밀로이드 베타 축적에 어떠한 영향을 미치는지를 관찰하고자 하였다.

[0231] 도 5는 마우스의 혈관주위세포(pericyte)를 배양하여 CTL(대조군), 아밀로이드 베타(Aβ), 실로스타졸(아밀로이드 베타+실로스타졸; +cilo)에 따라 1시간 동안 처리한 후, 공촛점 현미경으로 분석한 사진이다. 도 5의 우측에 있는 그래프는 혈관주위세포에 CTL(대조군), 아밀로이드 베타(Aβ), 실로스타졸(아밀로이드 베타+실로스타졸; +cilo)를 1 시간동안 처리하여 관찰한 후, 이의 형광세기를 측정하여 나타낸 그래프이다.

[0232] 도 6은 마우스의 혈관주위세포(pericyte)를 배양하여 CTL(대조군), 아밀로이드 베타(Aβ), 실로스타졸(아밀로이

드 베타+실로스타졸; +cilo)에 따라 24시간 동안 처리하고, 웨스턴블롯팅으로 분석한 결과이다. 우측의 그래프는 각 군에서 올리고머/actin 발현량, monomer/actin 발현량을 측정하여 나타낸 그래프이다.

[0233] 도 5 및 6에 나타난 바와 같이, 응집된 아밀로이드 베타의 양을 실로스타졸이 현저히 감소시키는 것을 확인하였다. 이는 아밀로이드 베타 응집에 PDE가 영향을 준다는 사실을 입증한 것이라 할 수 있다.

[0234] **<실시예 5.> PDE 억제제에 의한 아연 농도 변화**

[0235] 도 7은 마우스의 혈관주위세포(pericyte)를 배양하여 CTL(대조군), 실로스타졸(아밀로이드 베타+실로스타졸; +cilo), cAMP(아밀로이드 베타+cAMP)를 1시간 동안 처리하고, Fluozin-3(세포질에서의 아연 염색), lysotracker(산성 세포소기관에서 아연 염색)로 염색한 결과 사진이다.

[0236] 도 7에 나타난 바와 같이, PDE3 억제제를 투여하거나, cAMP의 농도를 증가시킬 경우, 세포 내 아연의 농도가 변화하는 것을 확인할 수 있다. PDE 억제제 또는 직접적인 cAMP를 처리한 세포에서 세포 내 아연 농도가 증가하는 것을 아연 염색 시료를 통해 관찰할 수 있었고 그 아연의 농도는 라이소좀 내에 증가하는 것을 발견하였다. 뇌에는 이미 시냅스 아연을 포함해서 많은 양의 아연을 가지고 있는데 세포 외 아연을 세포 안 특히 라이소좀으로 이동시켜주는 약물들이 아밀로이드의 축적을 감소시키며 라이소좀의 pH 까지 변화시키는 것으로 보아 아연이 라이소좀 기능에 중요한 역할을 할 가능성이 있다고 여겨진다.

[0237] **<실시예 6> 라이소좀의 pH 변화**

[0238] 도 8a는 마우스의 성상교세포를 Lysosensor Green DND-189로 염색하여 세포 내 pH를 시각화한 것으로, 상기 시각화된 세포에 아밀로이드 베타(Aβ) 또는 아밀로이드 베타와 실로스타졸을 처리(Aβ+cilo)하고, 각 군에서 0 ~ 1 시간동안의 pH 변화를 나타낸 사진이다.

[0239] 도 8b는 마우스의 성상교세포를 Acridine Orange Dye로 염색하여 세포 내 pH를 시각화한 것으로, 상기 시각화된 세포에 아무것도 처리하지 않거나(CTL;대조군), 바필로마이신 A1(BA)을 투여하거나, 또는 바필로마이신과 실로스타졸을 투여 (+cilo)하거나, 바필로마이신과 cAMP(+cAMP)를 투여한 후, 각 군에서 pH 변화를 나타낸 사진이다.

[0240] 도 8은 PDE 억제제가 처리된 세포에서의 라이소좀 pH 변화를 측정하여 나타낸 것으로, 이는 PDE 억제제의 효과가 실제로 라이소좀 pH 변화와 관련되어 있는지 실험한 것으로써, 아밀로이드 베타가 축적된 군의 경우 라이소좀의 pH가 알칼리화 되는 것을 확인하였다. 한편 PDE3 억제제인 실로스타졸이나 cAMP가 직접 투여된 세포에서는 pH가 산성화되고 그 기능 역시 정상화되는 것을 확인하였다.

[0241] 또한, 바리로마이신 A(Bafilomycin A)와 같이 vATPase를 완전히 억제시키는 화합물이 투여된 경우에는, 세포의 라이소좀 pH를 변화시킨 조건에서도 동일한 결과를 나타냄을 확인하였다. 즉 변형 presenilin1의 경우처럼 vATPase 기능이 저하된 경우에도 cAMP의 효과가 나타날 가능성이 있음을 시사하는 것이라 여겨진다.

[0242] **<실시예 7.> 스크리닝 시스템 구축 및 1차 선별**

[0243] 현재 임상에 쓰이고 있는 FDA 승인약물 및 selleckchem에 대한 라이브러리(library)를 확보하여, 이를 스크리닝에 사용(도 13)하였다. 상기 라이브러리에서도 국내 반입이 가능한 화합물만을 선별하여 실험을 수행하였다.

[0244] 도 9는 HTS를 위한 실험방법 및 장치를 도시한 것이고, 도 10은 PDE와 cAMP에서, cAMP 농도에 따른 luminescence raw value를 나타낸 그래프이고, 도 11은 PDE3 농도 의존성 테스트 결과로, PDE3 농도에 따른 luminescence raw value를 나타낸 그래프와 PDE3 농도에 따른 상대적 활성(% activity)을 나타낸 그래프이다.

[0245] 도 12는 PDE3에 대한 실로스타졸(양성 대조군) 농도에 따른 luminescence raw value를 나타낸 그래프와 PDE3억제제 실로스타졸 농도에 따른 상대적 활성(% activity)을 나타낸 그래프이다.

[0246] 도 13은 PDE3에 대한 FDA 승인약물 800 개 라이브러리(library)의 z'score를 나타낸 그래프이고, 도 14는 PDE 이성질체의 농도에 따른 상대적 활성(% activity) 분석 그래프이다.

[0247] 상기 도 9 내지 14를 통해, 스크리닝 전에, 각 PDE 이성질체에 대한 EC_{50}을 확인하고(도 14), 해당 PDE 이성질체에 특이적 억제제로 알려진 약물의 억제 농도를 확보하여 스크리닝 시, 비교를 위한 기준 약물로 사용하고자 하였다.

[0248] 또한, 이를 통해 본 발명에서는 알츠하이머, 루게릭 등의 신경퇴행성 질환을 치료하기 위한 물질을 스크리닝 하는데 있어서, PDE 이성질체 중에서 PDE3을 타겟대상으로 선정하였으며, 실험에 사용할 최적화된 농도를 선택하

여, 도 9와 같이 약물 스크리닝 시스템을 구축하였다.

[0249] **<실시예 8.> 2차 선정**

[0250] **HTS 스크리닝 방법을 이용한 cAMP 활성물질 스크리닝**

[0251] 고속 대량 스크리닝(HTS, High Throughput Screening)방법을 이용하여 FDA 승인약물 800 개에 대한 라이브러리(library)로부터 cAMP 활성을 증가시키는 후보물질을 선별하였다. 96-웰 플레이트의 한 웰 당 FDA 승인약물 800 개 라이브러리(library)에 포함되어 있는 화합물을 각각 100 μM 농도부터 1/4씩 희석하여 분주하고 거기에 PDE 반응제를 혼합하여 1시간동안 약물과 PDE 반응을 항온 처리하였다. 중지 용액을 AMP 검출 시약과 혼합하여 20 ul씩 웰 단 분주하고 10분간 반응시킨 후 곧바로 발광을 측정하였다(PDELight HTS cAMP phosphodiesterase Kit의 권고대로 시행함).

[0252] 실시예 7에서 구축된 약물 스크리닝 시스템을 통해, PDE3에 대해 800 개의 약물을 스크리닝한 결과, 1차로 21개의 화합물을 선정하였다. 상기 21 개의 약물들의 억제농도인 IC_{50}을 확인한 결과, 2차로 11개의 화합물을 선정하였다.

[0253] 도 15는 PDE3에 대한 2차 선정된 화합물(Z001~Z011)의 농도에 따른 상대적 활성(% activity) 분석 그래프로, 이에 따르면 본 발명의 Z007(AMX)는 다른 약물들에 비해 7 내지 40 배 이상의 현저히 낮은 농도에서 동등하거나 더 우수한 효과를 나타내는 것으로, 종래 약물에 비해 현저한 PDE3에 특이적 억제효과를 가지고 있음을 알 수 있다.

[0254] **<실시예 9.> 인 비트로(in vitro)에서, 여러가지 독성 단백질 축적에 대한 암렉사녹스(amlexanox, AMX)의 영향 분석**

[0255] 실시예 8을 통해 선정된 11개의 화합물들에 대하여, 모든 PDE 이성질체를 타겟으로 한번 더 실시예 7의 HTS를 수행하였고, 모든 PDE 이성질체에서 탁월한 감소 효능을 보이는 암렉사녹스(amlexanox, AMX)(Z007)를 최종 선택하였다.

[0256] 도 16은 다양한 PDE 이성질체에 대하여, 최종 선정된 암렉사녹스(amlexanox, AMX)의 농도에 따른 상대적 활성(% activity)를 나타낸 그래프이고, 도 17 및 도 18은 아밀로이드 베타가 축적된 혈관주위세포 및 성상교세포에, 최종 선정된 암렉사녹스(amlexanox, AMX)를 세포에 처리하여 아밀로이드 베타 발현 양상과 G93A SOD-1, P301L tau의 발현을 웨스턴 블롯팅으로 분석한 사진이다.

[0257] 도 16 내지 도 18에 나타난 바와 같이, 혈관주위세포 및 성상교세포에 아밀로이드 베타를 주입하여 축적하게 한 후, AMX를 처리하면 아밀로이드 베타 단백질 응집이 억제되는 것을 확인하였다. 또한 아밀로이드 베타 축적 이외에 Tau, G93A SOD-1의 독성단백질 축적도 AMX가 감소시키고 있음을 확인하였다.

[0258] **<실시예 10> 인 비트로(in vitro)에서, 세포 내 아연 농도 및 라이소좀 기능에 대한 암렉사녹스(amlexanox, AMX)의 영향 분석**

[0259] 마우스의 혈관주위세포에서, pH에 따라 라이소좀을 염색하는 염료(pH-sensitive lysosomal dye)인 라이소센서(lysosensor)를 이용해 세포 내 라이소좀 pH 변화를 공촛점 현미경으로 시각화할 수 있는 시스템을 확립하였고(실시예 6 참조), 이를 통해 암렉사녹스(AMX)가 세포 내 라이소좀의 pH 변화에 관여하는지를 관찰하고자 하였다.

[0260] 도 19는 마우스의 혈관주위세포에 vATPase 억제제인 바필로마이신 A1(bafilomycin A1)을 처리하고, 라이소센서(lysosensor)를 이용해 시간에 따라 공초점 현미경으로 측정한 사진(좌측)과, 이를 정량화한 데이터(우측)이다.

[0261] 이때, 도 19의 좌측 사진은 마우스의 혈관주위세포에 vATPase 억제제인 바필로마이신 A1(bafilomycin A1)을 처리하고, 라이소센서(lysosensor)를 이용해 시간에 따라 공초점 현미경으로 측정한 사진(상단)과, 상기 바필로마이신 A1(bafilomycin A1)이 처리된 마우스의 혈관주위세포에 최종 선정된 암렉사녹스(AMX)를 처리하고, 라이소센서(lysosensor)를 이용해 시간에 따라 공초점 현미경으로 측정한 사진(하단)으로 나타낼 수 있다.

[0262] 도 19에 나타난 바와 같이, 마우스의 혈관주위세포는 바필로마이신 A1(bafilomycin A1)을 처리한 결과 라이소좀 pH가 증가되어, 알칼리성으로 변화되는 것을 확인하였다. 즉 바필로마이신 A1은 세포 내 라이소좀의 pH 환경을 더욱 악화(알칼리성)시키는데 반해, 본 발명의 HTS 시스템을 통해 최종 선정된 암렉사녹스는 바필로마이신 A1(bafilomycin A1)에 의해 알칼리성으로 변화된 혈관주위세포의 라이소좀 pH 환경을 60분 내에 원래상태로 회

복(산성화)시키는 것을 확인할 수 있었다.

[0263] 도 20은 마우스의 혈관주위세포에 최종 선정된 암렉사녹스(amlexanox, AMX)를 처리하지 않은 것(CTL)과, 처리한 군(PDEi)을 공초점 현미경으로 측정한 사진으로, 아연의 농도를 측정하기 위해 아연 이온을 검지하는 형광시약(Zinpyr-1)을 처리하여 형광 정도를 측정하였다.

[0264] 도 20에 나타난 바와 같이 혈관주위세포에 암렉사녹스(amlexanox, AMX)를 투여할 경우, 세포 내 아연의 농도가 정상수준으로 회복 및 증가되고 있음을 확인하였다.

[0265] **<실시예 11> 라이소좀 기능 활성 검증 연구**

[0266] 성상교세포에 형광이 달린 라이소좀 단백질을 염색한 후, 라이소좀 단백질인 카텝신 B(cathepsin B)와 카텝신 L(cathepsin L)의 가수분해 정도를 분석하고자 하였다.

[0267] 도 21은 마우스의 성상교세포에 vATPase 억제제인 바필로마이신 A1(Bafilomycin A1)을 처리한 다음, 카텝신 B(cathepsin B)(상단) 또는 카텝신 L(cathepsin L)(하단)의 가수분해정도를 시간에 따라 공초점 현미경으로 측정한 사진이다.

[0268] 도 21에 나타난 바와 같이, 마우스의 성상교세포는 바필로마이신 A1가 처리됨에 따라, 라이소좀의 단백질인 카텝신 L과 카텝신 B가 감소되는 것을 확인하였으며, 이를 통해 바필로마이신 A1은 성상교세포에서의 라이소좀 기능을 현저히 저하시킴을 알 수 있다. 다시 말해 BA는 상기 두가지 라이소좀 단백질 모두의 활성을 감소시킴을 확인하였다.

[0269] 도 22는 바필로마이신 A1(Bafilomycin A1)로 처리된 마우스의 성상교세포에, 최종 선정된 암렉사녹스(amlexanox, AMX)(Z007)를 투여한 다음, 카텝신 B(cathepsin B)(상단) 또는 카텝신 L(cathepsin L)(하단)의 가수분해정도를 시간에 따라 공초점 현미경으로 측정한 사진으로, 이에 따르면 바필로마이신 A1(Bafilomycin A1)으로 인해 성상교세포의 라이소좀 단백질 활성 및 기능이 저하되었고, 여기에 암렉사녹스(AMX)가 처리되면 바필로마이신 A1의 영향을 억제하여 성상교세포의 라이소좀 단백질 활성 및 기능이 정상수준으로 회복되는 것을 확인하였다.

[0270] 즉, 암렉사녹스가 처리되면, 성상교세포의 카텝신 B(cathepsin B) 또는 카텝신 L(cathepsin L)의 성상교세포 라이소좀 활성이 60분 내에 원래상태로 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

[0271] **<실시예 12> 알츠하이머 동물모델에서의 암렉사녹스 예방 또는 치료효과 분석**

[0272] 암렉사녹스(amlexanox, AMX)(Z007)가 동물모델에서도 효과가 있는지 확인하기 위해 알츠하이머 치매 동물모델 중 하나인 5X FAD 마우스를 이용하여 실험하였다. 이때 알츠하이머 치매 동물모델 중 하나인 5X FAD 마우스는 국내 분양 받아 사용하였다.

[0273] 약물 투여 및 행동평가는 도 23과 같은 일정으로 실시하였고, 구체적으로 암렉사녹스(amlexanox, AMX)(Z007)를 DMSO에 녹여서 1 mg/kg의 용량으로 1일 1회씩 3개월령 5X FAD 암컷 마우스에 3개월 동안 복강 투여하였다. 투여를 종료한 직후, 기억과 학습능력을 평가할 수 있는 행동실험인 모리스 수중미로 실험(Morris water maze test)를 실시하였다.

[0274] 모리스 수중 미로 테스트는 Behav. Brain Res.(155, 185-196)에 기재된 바에 의하여 수행되었다(참조 : Behav. Brain Res., 155, 185-196). 수중 미로 테스트에 사용된 수조는 지름이 90 cm이고 높이가 60 cm인 원통형 수조이며, 시험 기간 동안 분유를 희석한 23 ± 2 ℃의 물을 채워 사용하였다. 수조 안에는 수면에서 1 cm 아래에 투명한 플랫폼을 장치하였으며, 수조 바깥쪽에 네 개의 표지를 장치하였다. 마우스의 운동궤적은 비디오 트래킹 시스템(Smart3.0, Panlab, USA)을 통하여 분석하였다.

[0275] 시험(trial) 기간 동안 마우스는 네군데의 시작점을 무작위로 선택한 지점에서 플랫폼을 보지 못하는 쪽을 향하여 수조안으로 넣어졌다. 각 시험(trial)에서는 마우스가 수조로 넣어진 후 플랫폼을 찾는 시간(escape latency)을 기록하게 되며, 마우스가 플랫폼을 찾으면 10 초간 플랫폼 위에서 머무르게 한 후 케이지(home cage)로 옮겼다. 마우스가 60초 내로 플랫폼을 찾지 못할 경우 플랫폼을 찾는 시간(escape latency)은 60 초로 기록하였다. 각 시험(trial)은 5일 동안, 하루 네번씩 실행되었다.

[0276] 시험 마지막 5일째에 확인 평가(probe test)를 진행하였다. 플랫폼을 제거한 후, 60초간 마우스로 하여금 수조 안을 수영하게 하면서 플랫폼이 있던 위치에 처음 들어가는 시간과, 몇 번 지나는지 기록하는 방법으로 수행되었다.

[0277] 도 23은 알츠하이머 동물모델 5X FAD((Swedish mutation(KM670/671NL: Aβ 생산 증가), Florida mutation(I716V: Aβ42의 생산 증가), London mutation(V717I: Aβ42의 생산 증가), human presenilin 1(M146L and L286V: Aβ42의 생산 증가)) 마우스)에 암렉사녹스(AMX)의 약리효능을 평가하기 위한 실험일정을 나타내는 도이다. 도 24 및 도 25는 아밀로이드 베타(Aβ1-42)와 PS1 과발현으로 인지기억능 감소에 대한 암렉사녹스(AMX)의 약리효과를 hidden platform test와 prove test로 구성된 water maze 평가를 통해 분석한 그래프이다. 도 24(상: 1 mg/kg, 하: 2.5 mg/kg)는 각 시험군(Veh 군(대조군), AMX 투여군)에서의 타겟을 찾는 동물모델 이동경로를 나타낸 것이다.

[0278] 도 24 및 도 25 (상: 1 mg/kg, 하: 2.5 mg/kg)에 나타난 바와 같이, AMX 투여군(amx)의 동물모델이 Veh(vehicle) 군(대조군)의 동물모델에 비해, 타겟 지점을 찾는 시간이 점차 빨라질 뿐만 아니라 지나는 횟수도 많아지는 것을 확인할 수 있다. 이를 통해 암렉사녹스(AMX)를 투여한 알츠하이머 동물모델은 기억과 학습 능력이 증진됨을 알 수 있다.

[0279] **<실시예 13.> 루게릭 병 동물모델에서의 암렉사녹스 예방 또는 치료효과 분석**

[0280] 사람의 ALS와 관련된 유전자인 SOD-1(codon 93번째에서 글라이신이 알라닌으로 치환된 아미노산 발현)의 돌연변이 단백질이 발현되는 G93A SOD-1 마우스를 루게릭 병 동물모델로 사용하였다. 상기 G93A SOD-1 마우스는 잭슨랩(USA)으로부터 구입하였다.

[0281] 루게릭 병 동물모델은 척수의 운동신경세포사가 일어나 한쪽 또는 양쪽에서 사지 마비가 발생한다. 임상 점수 시스템은 다음의 신경학적 점수 체계를 사용하여 구별하였다.

[0282] 운동 장애의 징후가 없는 정상 : 4점

[0283] 꼬리에 매달린 경우 뒷발 떨림이 있음 : 3점

[0284] 걸음걸이 이상 : 2점

[0285] 적어도 하나의 뒷다리 끌기 : 1점

[0286] 30초 이내에 자신을 바로 잡을 수 없음 : 0점

[0287] 마우스는 0점일 때 안락사 하였다(Weydt et al. 2003). 상기 신경퇴행성 질환 중 하나인 루게릭 병 동물모델에 vehicle 또는 암렉사녹스(AMX)를 2.5 mg/kg를 각각 주 5일 매일 한번씩 복강 투여한 후 행동실험을 통해 생존율을 측정하였다.

[0288] AMX 투여군과 대조군(Veh)에 따라 증상이 나타나기 전부터 시작하여 죽을 때까지 1주일에 1-2회 행동실험을 실시하였다. 4 rpm부터 40 rpm으로 점차 속도를 증사시키는 방법과 15 rpm의 일정한 속도로 5-10분간 운동을 시키는 방법을 채택하였다. rod에서 떨어지기까지 걸리는 시간을 기록하여 AMX 투여군과 대조군에서 차이가 있는지 분석하였다.

[0289] 도 26은 루게릭 병 동물모델(G93A SOD-1 마우스)을 두 그룹(AMX 투여군과 대조군(Veh))으로 나누어 실험한 결과로, G93A SOD-1 마우스에 10주부터 신경학적 점수가 0점일 때까지, vehicle과 암렉사녹스를 각각 2.5 mg/kg 주 5일 매일 한번씩 복강 투여한 후, 생존율을 비교 분석하였다. AMX 투여군(130.2±2.0일)의 생존율이 대조군(veh)(121.3±3.6일)보다 유의하게 증가하였음을 확인하였다. 즉, 암렉사녹스(AMX)를 루게릭 병 동물모델에 투여한 경우, 루게릭 병의 발병시점과 생존률의 연장효과를 얻을 수 있음을 확인하였으며, 이와 같은 결과를 볼 때 본 발명자들에 의해서 새롭게 제시된 암렉사녹스(AMX)는 루게릭병 또는 알츠하이머와 같은 신경퇴행성 질환의 진행과정에서 지속적으로 나타나는 운동증상 악화를 예방하는 효과가 있음이 알 수 있다.

[0290] **<실시예 14.> 세포사멸에 대한 AMX의 세포보호 효과 분석**

[0291] 아밀로이드 베타에 의한 독성단백질의 축적으로 발생하는 세포손상에 있어서, 성상교세포에 대한 암렉사녹스(AMX)의 세포보호 효과를 확인하고자 하였다. 즉, 아밀로이드 베타에 의해 독성단백질의 축적이 유발되고, 이로 인해 세포에 산화적 손상을 유발하여 세포사멸이 발생하게 되므로, 이에 대한 AMX 약리효과를 확인하고자 하는 것이다.

[0292] 구체적으로 성상교세포에 H_2O_2를 주입하여 세포 내 산화적 손상에 의한 세포사멸을 유도하여, 알츠하이머 혹은 루게릭과 같이 신경퇴행성 질환 동물모델과 유사한 세포배양모델을 제작하였다. 이렇게 제작된 세포 모델에 암렉사녹스(AMX)의 세포 보호 효과를 확인하기 위하여 아무것도 처리하지 않은 H2O2 대조군과 여기에 암렉사녹스

(AMX)를 투여한 시험군을 제조하고, 24 시간 뒤 LDH 방법을 이용해 세포사멸을 정량적으로 측정하였다.

[0293] 도 27은 성상교세포에 H2O2로 세포 내 산화적 손상을 유발하여 세포사멸을 일으키고, 여기에 암렉사녹스(AMX)를 처리하여 LDH 방법을 이용해 세포사멸을 정량화하여 나타낸 그래프이다. 이에 따르면 암렉사녹스(AMX)를 처리한 시험군에서는 40%까지 세포사멸이 현저히 감소하였음을 확인하였고, 대조군은 60%까지 세포사멸이 현저히 증가되었음을 확인하였다.

[0294] **<실시예 15.> AMX의 GFP-mHttQ 응집 정리 효과**

[0295] GFP가 붙어 있는 mHttQ 단백질을 세포 내에 주입하여 AMX에 의한 약리반응을 GFP antibody를 통해 확인하였다. mHttQ가 세포 내에 응집되어 축적되어 있는 것을 GFP의 발현으로 확인하였다.

[0296] 그 결과, 도 28에 나타난 바와 같이 감소된 GFP 발현을 통하여 AMX가 응집 단백질의 억제 효과를 보임을 재확인하였다.

[0297] **<실시예 16.> AMX, G93A-SOD 마우스 모델의 생존율 개선**

[0298] AMX 농도별로 G93A-SOD 마우스에 매일 복강주사하여 생존율의 변화를 확인하였다.

[0299] 도 26의 결과와 동일하게 도 29에 나타난 결과, 아무것도 넣지 않은 Veh군의 경우 150일 정도의 생존을 보이는 반면, AMX는 농도의존적으로 생존율이 증가하는 것을 확인하였다.

[0300] **<실시예 17.> AMX의 G93A-SOD 마우스 모델에서 질병 진행을 지연 효과**

[0301] 실시예 15의 생존율 개선 효과와 함께 AMX에 의한 농도별 운동능력 실조 변화를 확인하였다.

[0302] 도 26의 결과와 동일하게 도 30에 나타난 결과, 아무것도 주입하지 않은 대조군의 경우, 운동능력의 실조가 빨리 그리고 급격하게 진행되는 것에 비해 AMX를 농도별로 주입한 군의 경우 운동능력 실조의 시기가 더 늦게 시작되었고 진행 속도 또한 완화되는 것을 확인하였다.

[0303] **<실시예 18.> PDE 억제제 스크리닝**

[0304] PDE 억제에 관한 약물효능 스크리닝을 위해 HTS를 사용하였다. cAMP를 기반으로 기존 PDE 억제제를 기준 삼아 FDA 승인 약물 library와 selleckchem library를 사용하여 스크리닝하였다. FDA 승인 약물 library를 스크리닝할 때와 동일하게 실험을 진행하였다. PDE3 억제제로 알려진 cilostazol을 기준삼아 그와 대비하여 억제활성이 높은 약물들을 선별하였다. 이는 스크리닝하는 약물들 중 cAMP의 활성을 증가시키는 약물들을 선별하고자 함이다. 96웰 플레이트 각 웰 당 스크리닝 library 약물들을 각각 100 uM부터 1/4씩 희석하여 분주하고 PDE 반응제를 혼합하여 1시간 동안 약물과 PDE가 반응할 수 있게 처리하여 보관하였다. 중지용약을 AMP 검출시약과 혼합하여 20ul씩 분주하고 10분간 반응 후 바로 발광을 측정하였고, 사용키트의 권고대로 실험을 시행하였다.

[0305] 처음 선정은 PDE3를 타겟으로 시작하고 후보약물이 선별된 후 전체 PDE isoform을 모두 실험하였다. AMX를 제외하고, 전체 PDE isoform에서 모두 좋은 억제 효능을 보인 11개의 약물이 선별되어 도 31 내지 도 41에 도시하였다 (11개의 약물 : 피세아탄올(Piceathanol), 아탈루렌(Ataluren), 마시티닙(Masitinib), JTC-801, 오바토클락스 메실레이트(Obatoclax mesylate), 도비티닙(Dovitinib), CYC116, 레스베라트롤(Resveratrol), 피피트린(Pifithrin), RITA(5,5'-(2,5-furandiyl)bis-2-thiophenemethanol), 엑시티닙(Axitinib), 이마티닙 메실레이트(Imatinib mesylate), 자피를루카스트(Zafirlukast), 헥사클로로펜(Hexachloropene), 페북소스타트(Febuxostat), 설파다이아진은(Silver Sulfadiazine), 명세서 내 표 1에 기재).

[0306] 도 31에 도시된 바와 같이, Piceatanol의 경우, PDE 억제값이 가장 좋은 약물로 그래프에 기재한 것처럼 각 isoform의 억제값이 최소 0.3nM에서 최대 5.5로 현저히 낮았다. 나머지 약물들의 전체 PDE isoform의 억제값도 우수함을 확인하였다.

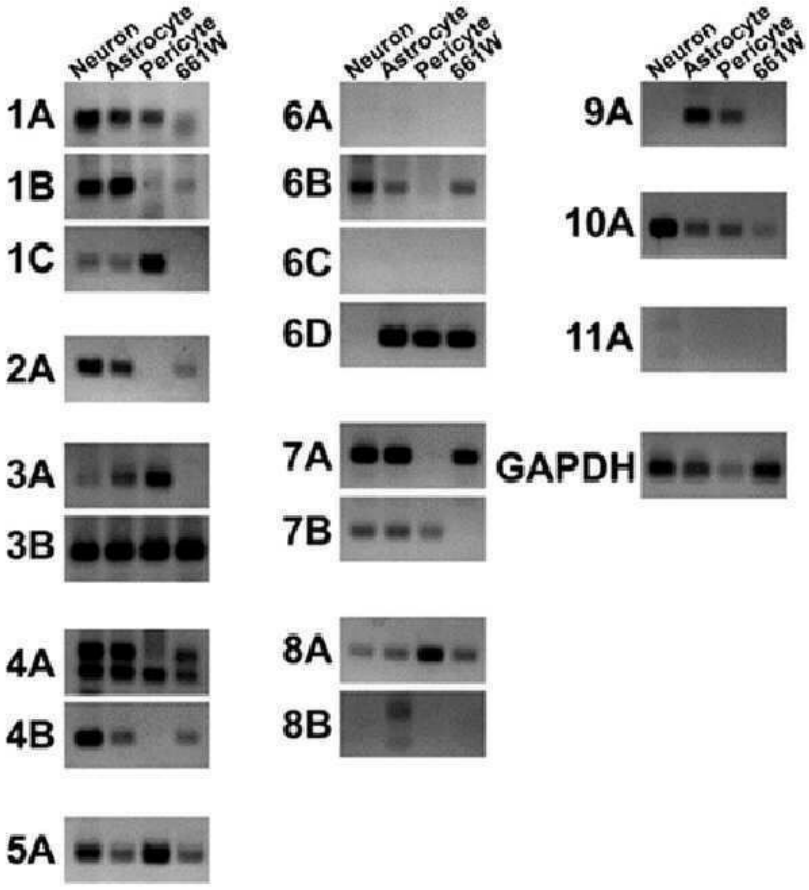
[0308] 즉, PDE 억제제, 특히 암렉사녹스(AMX)는 알츠하이머, 루게릭 병 등의 신경퇴행성 질환에 따른 아밀로이드 베타의 축적에 의한 산화적 손상이 발생한 세포(성상세포, 신경세포, 혈관주위세포)에서의, 세포사멸에 매우 중요한 역할을 수행하며, 세포손상을 회복시키거나 예방하는 약리효과를 가지고 있음을 명확히 확인할 수 있다.

[0310] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한

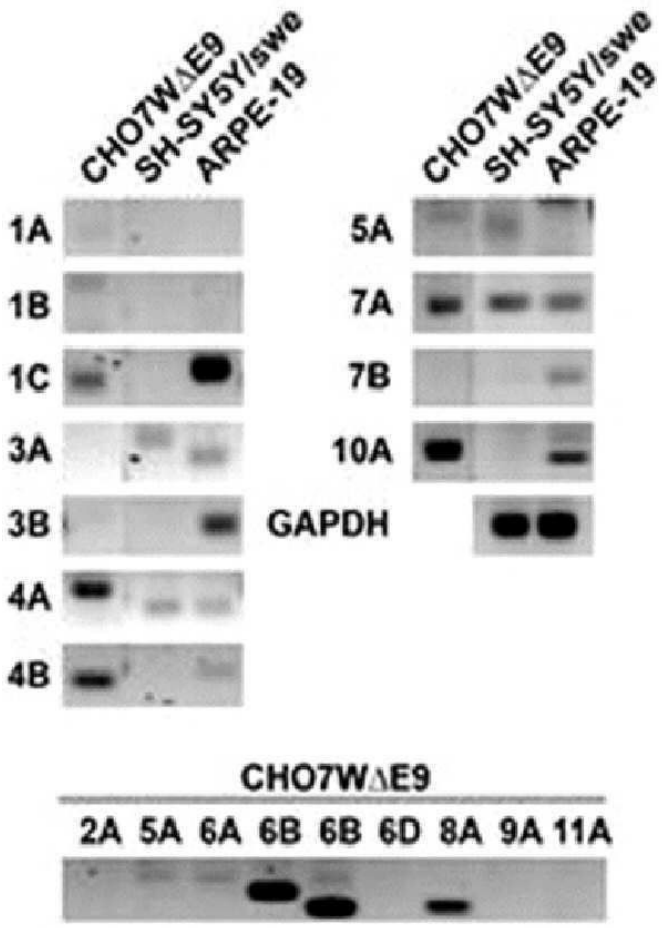
구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

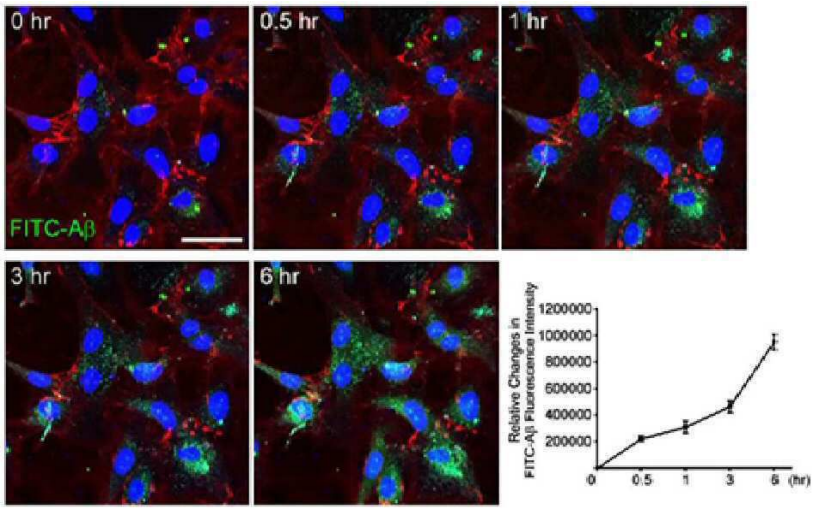
도면1



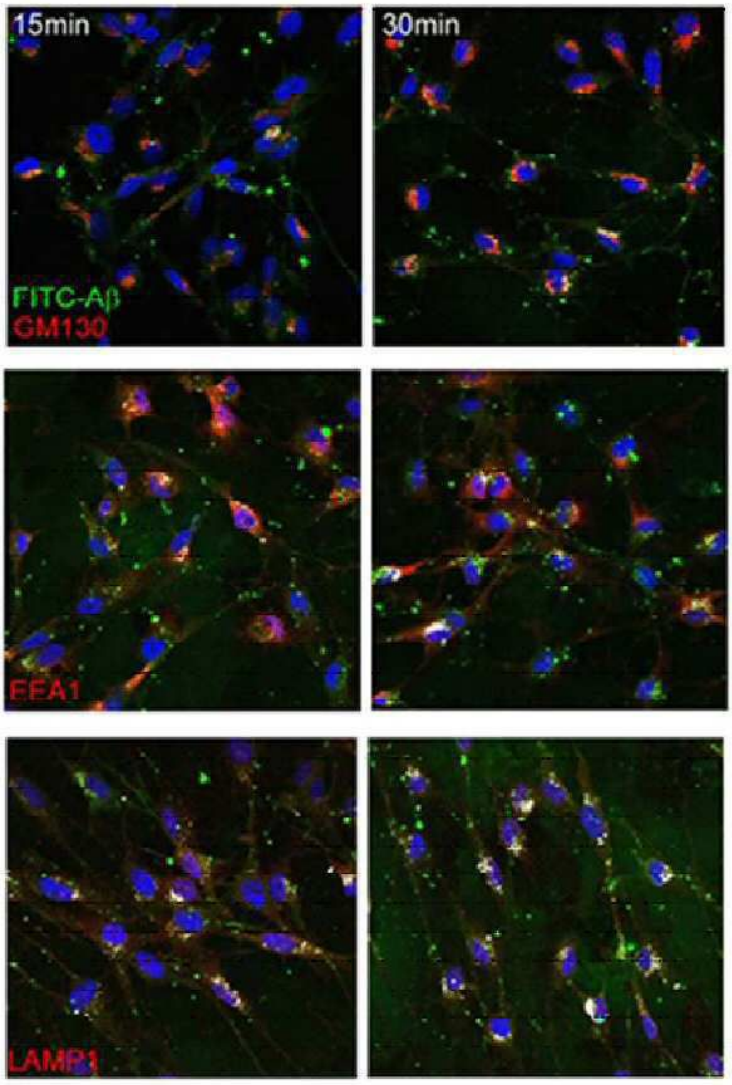
도면2


CHO7WΔE9
SH-SY5Y/sw
ARPE-19
1A
1B
1C
3A
3B
4A
4B
5A
7A
7B
10A
GAPDH
CHO7WΔE9
2A 5A 6A 6B 6B 6D 8A 9A 11A

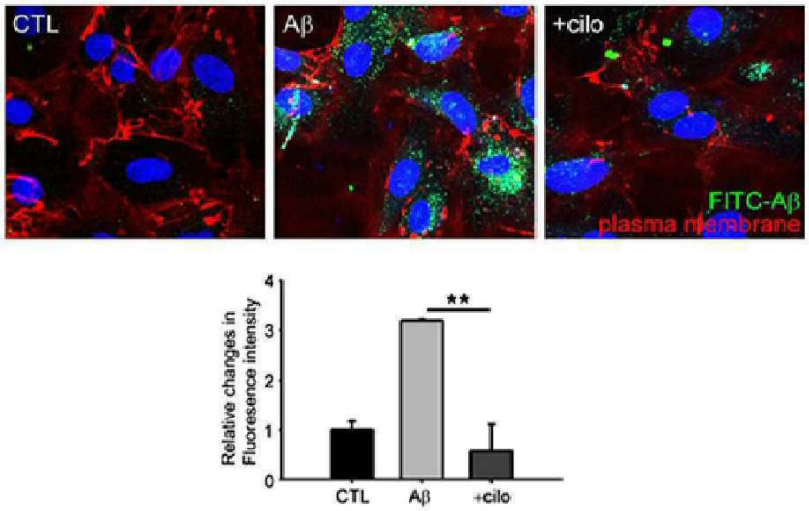
도면3


0 hr
0.5 hr
1 hr
FITC-Aβ
3 hr
6 hr
Relative Changes in FITC-Aβ Fluorescence Intensity
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
0.5
1
3
6 (hr)

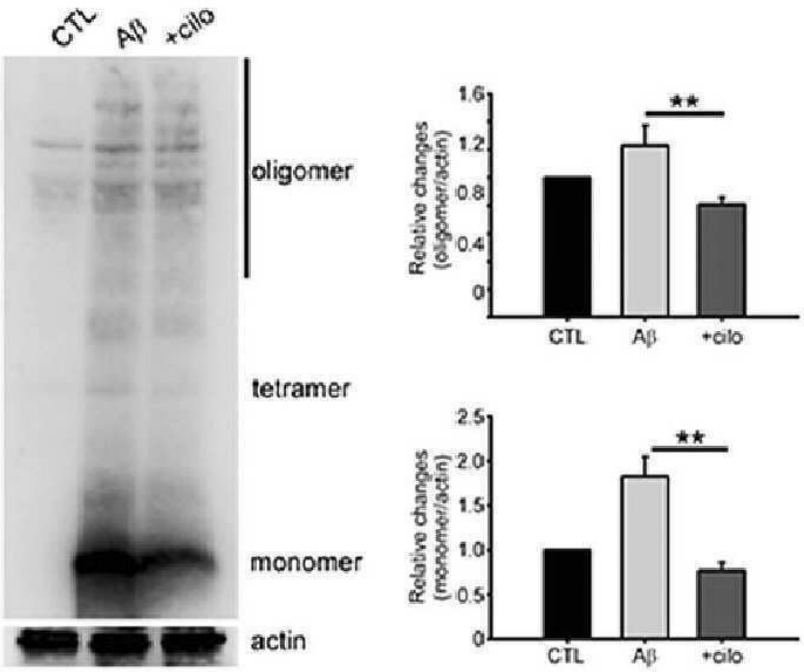
도면4


15min
30min
FITC-Aβ
GM130
EEA1
LAMP1

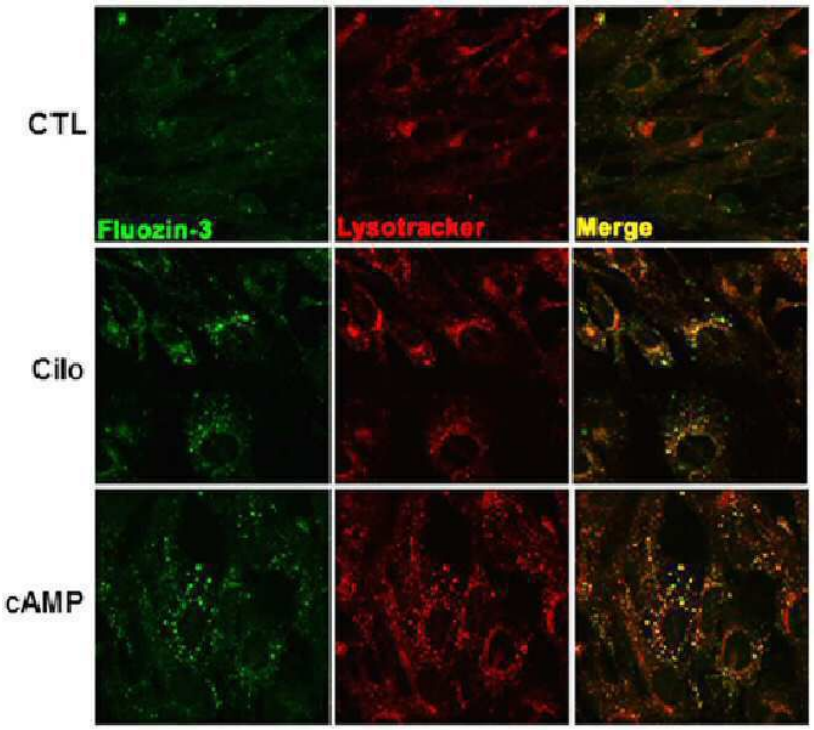
도면5


CTL
Aβ
+cilo
FITC-Aβ
plasma membrane
Relative changes in Fluorescence intensity
0
1
2
3
4
**
CTL
Aβ
+cilo

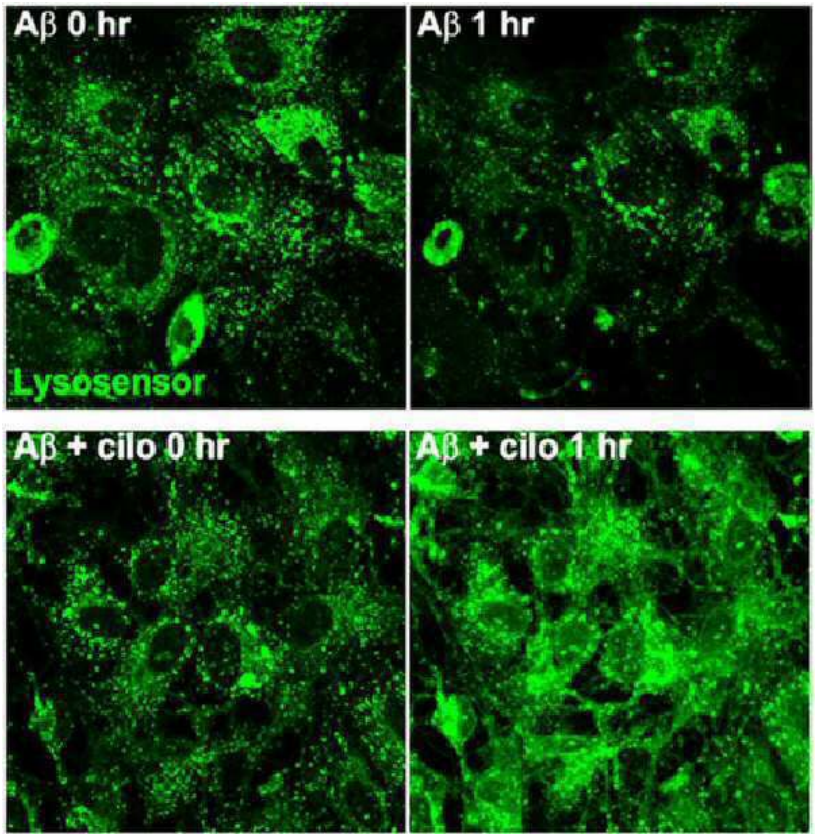
도면6


CTL
Aβ
+cilo
oligomer
tetramer
monomer
actin
Relative changes (oligomer/actin)
1.6
1.2
0.8
0.4
0
**
CTL
Aβ
+cilo
Relative changes (monomer/actin)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0
**
CTL
Aβ
+cilo

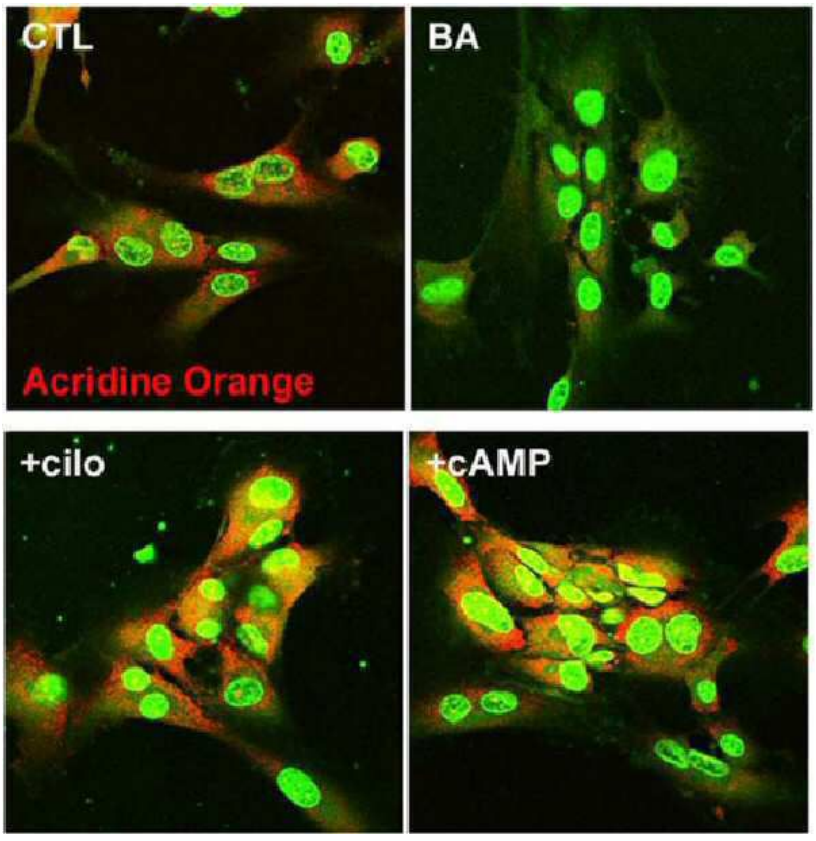
도면7


CTL
Cilo
cAMP
Fluozin-3
Lysotracker
Merge

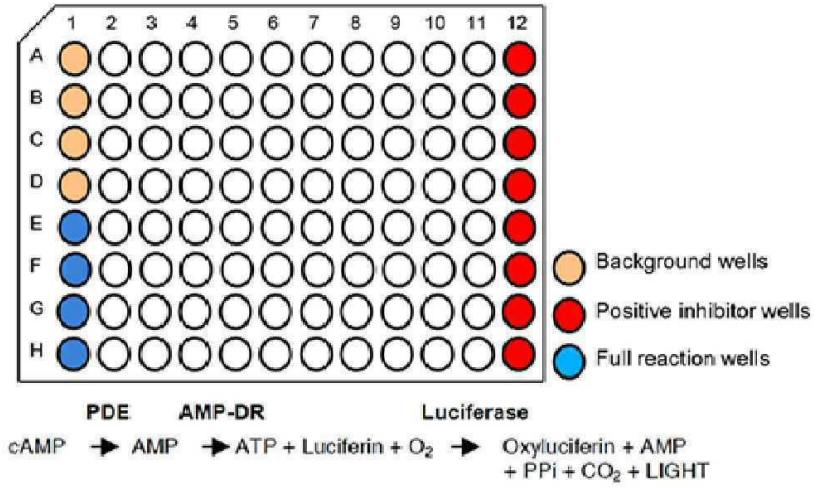
도면8a


Aβ 0 hr
Aβ 1 hr
Lysosensor
Aβ + cilo 0 hr
Aβ + cilo 1 hr

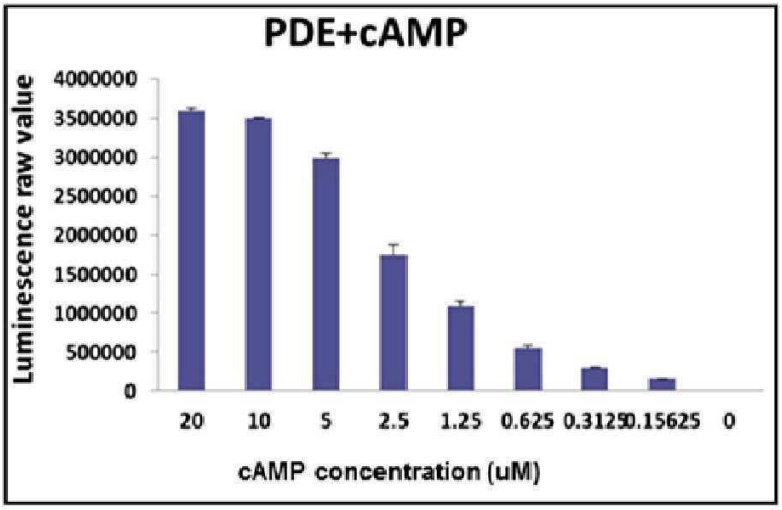
도면8b


CTL
BA
Acridine Orange
+cilo
+cAMP

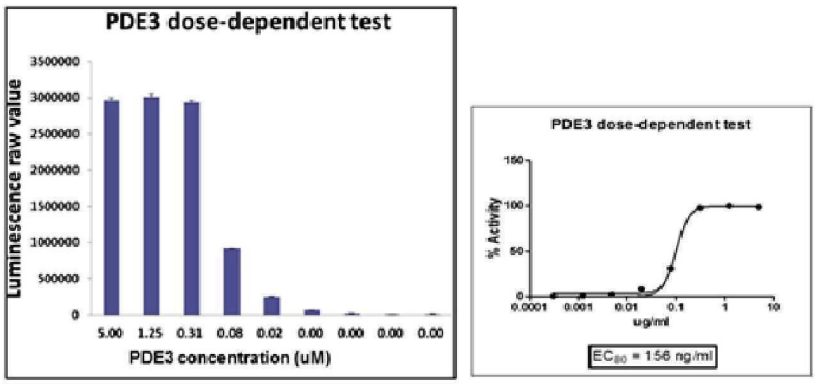
도면9



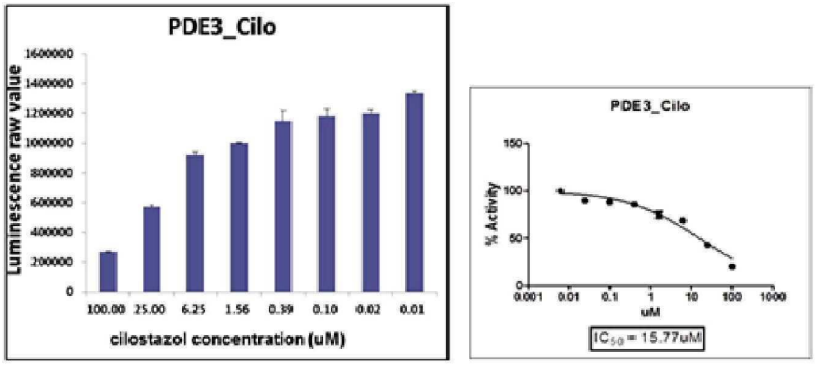
도면10



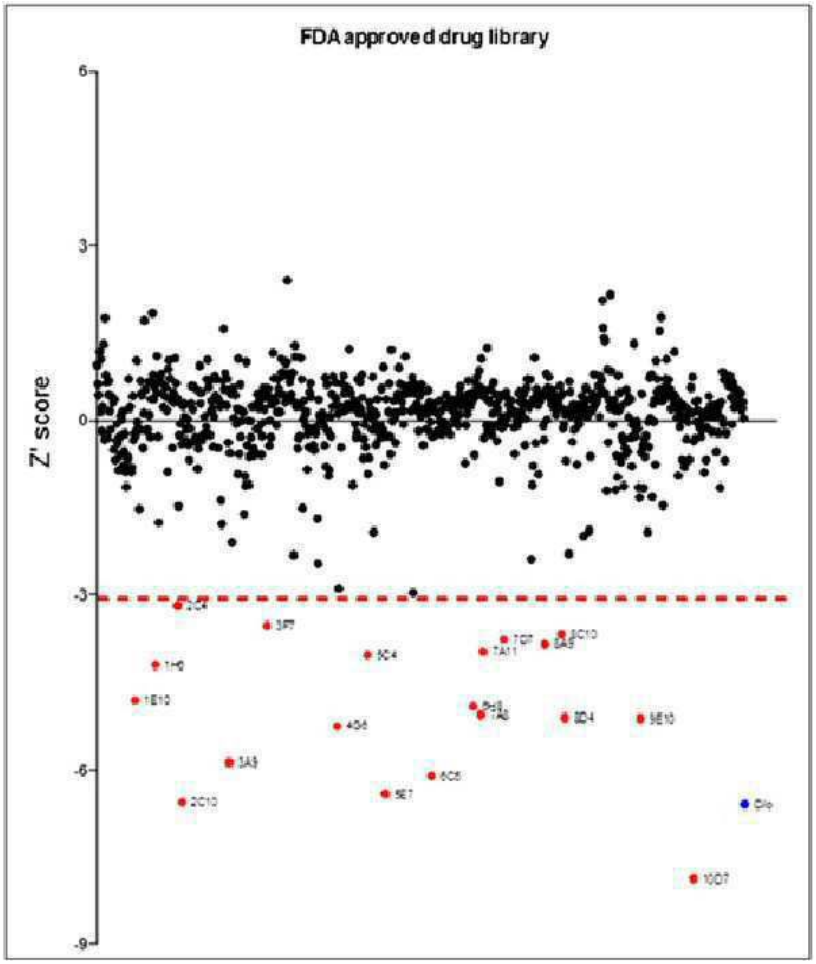
도면11



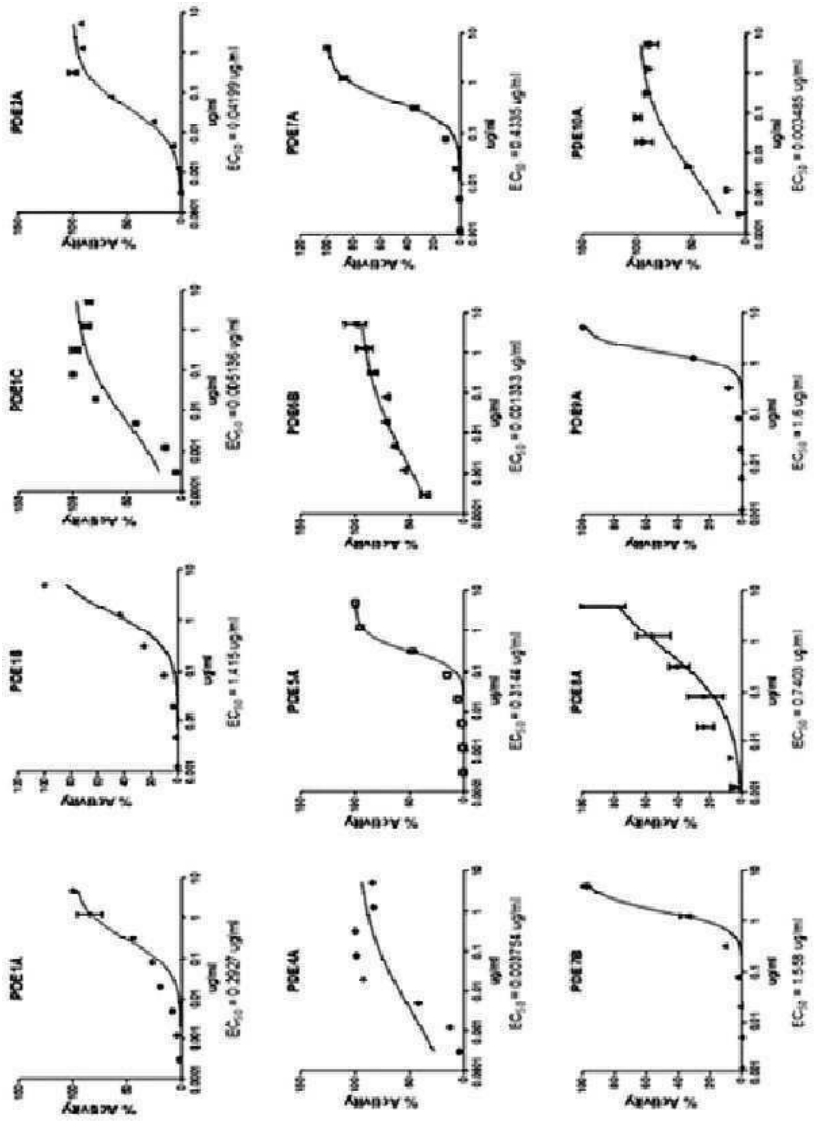
도면12


PDE3_Cilo
Luminescence raw value
1600000
1400000
1200000
1000000
800000
600000
400000
200000
0
100.00 25.00 6.25 1.56 0.39 0.10 0.02 0.01
cilostazol concentration (uM)
PDE3_Cilo
% Activity
150
100
50
0
0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000
uM
IC50 = 15.77uM

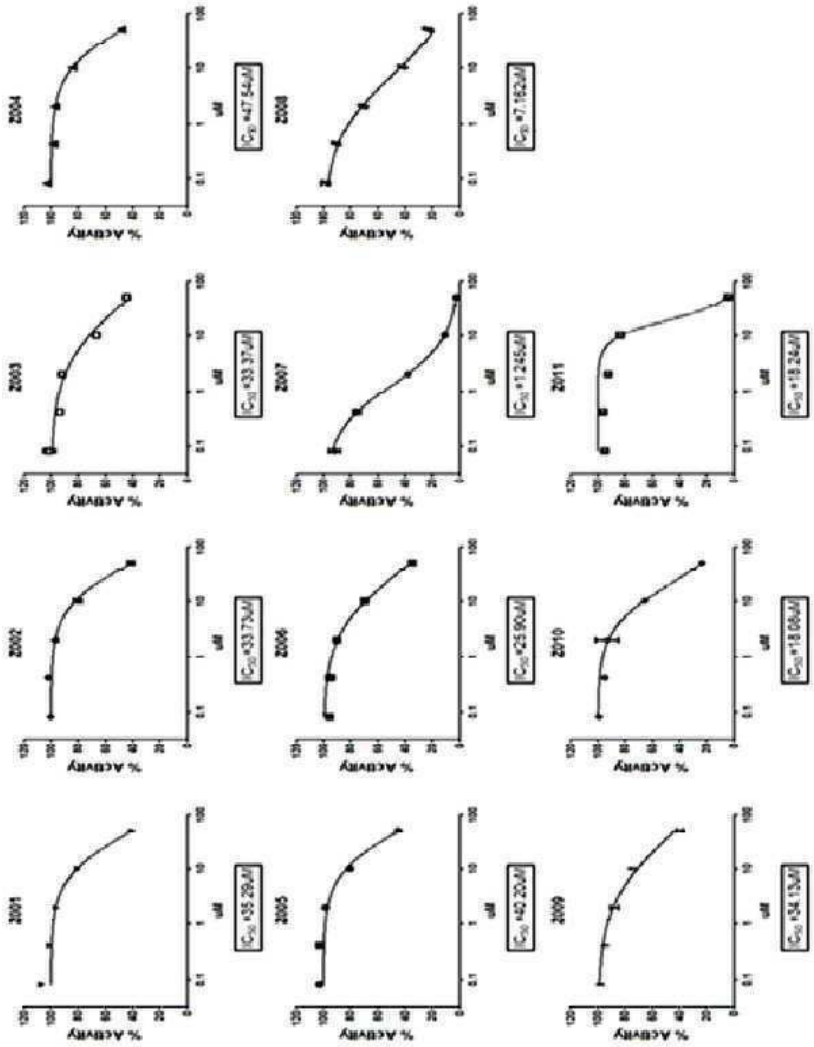
도면13


FDA approved drug library
Z' score
6
3
0
-3
-6
-9

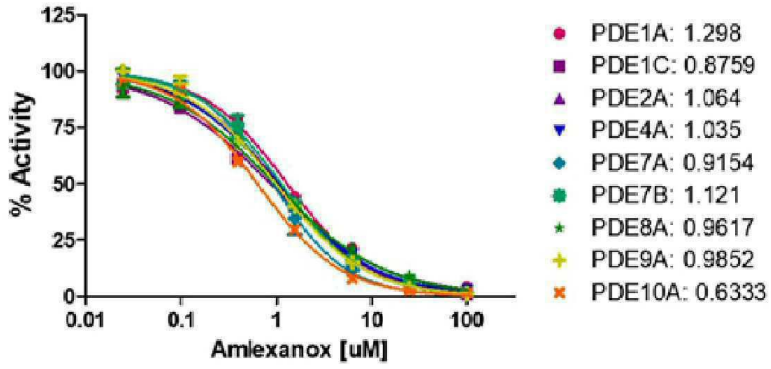
도면14


PDE1A
PDE1C
PDE1B
PDE1A
PDE4A
PDE4B
PDE4A
PDE4A
PDE7A
PDE8B
PDE8A
PDE7B
PDE10A
PDE9A
PDE5A
PDE3B
% Activity
ug/ml

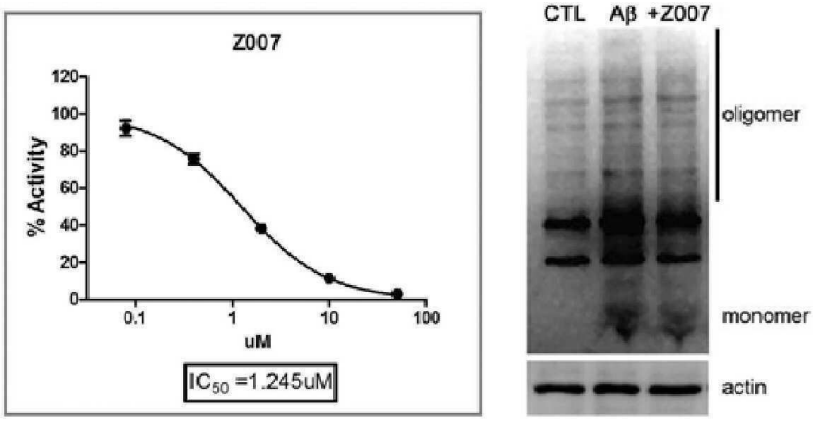
도면15



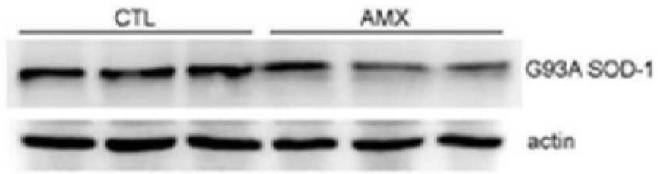
도면16

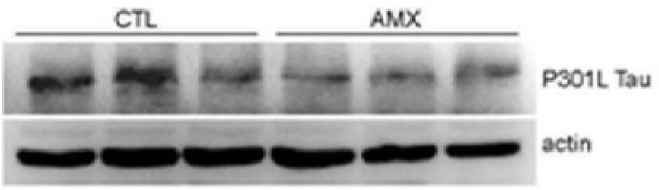

125
100
75
50
25
0
% Activity
0.01
0.1
1
10
100
Amlexanox [uM]
PDE1A: 1.298
PDE1C: 0.8759
PDE2A: 1.064
PDE4A: 1.035
PDE7A: 0.9154
PDE7B: 1.121
PDE8A: 0.9617
PDE9A: 0.9852
PDE10A: 0.6333

도면17

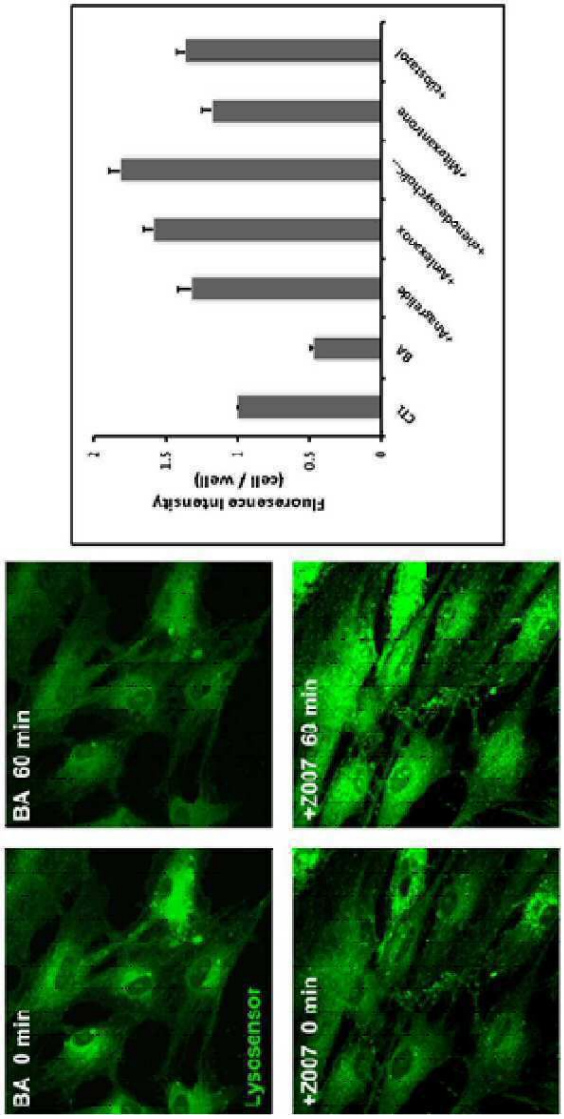

Z007
% Activity
120
100
80
60
40
20
0
0.1
1
10
100
uM
IC50 =1.245uM
CTL
Aβ
+Z007
oligomer
monomer
actin

도면18

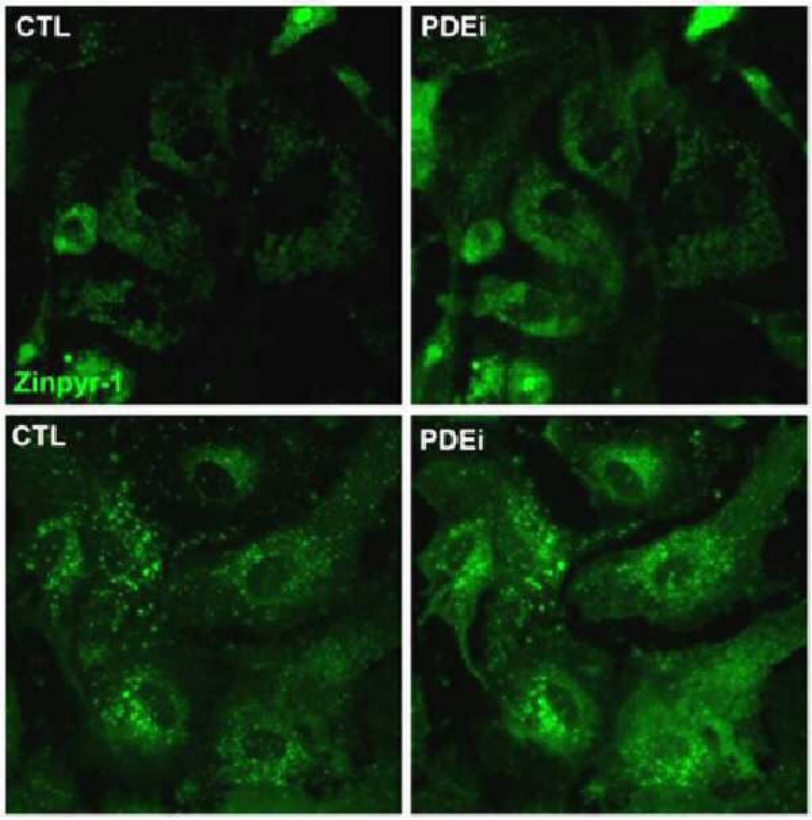

CTL
AMX
G93A SOD-1
actin


CTL
AMX
P301L Tau
actin

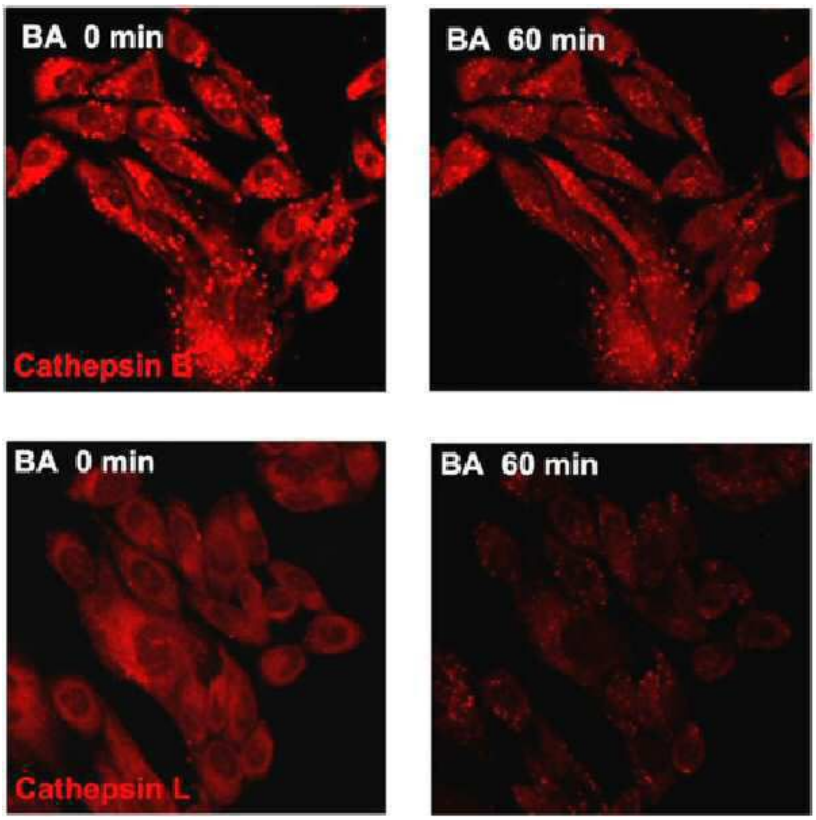
도면19


Fluorescence Intensity
(cell / well)
0
0.5
1
1.5
2
Ctl
BA
+Amitriptyline
+Amlexanox
+Artenodeoxycholic...
+Miltexantrone
+Cobistatpol
BA 60 min
+Z007 60 min
BA 0 min
Lysosensor
+Z007 0 min

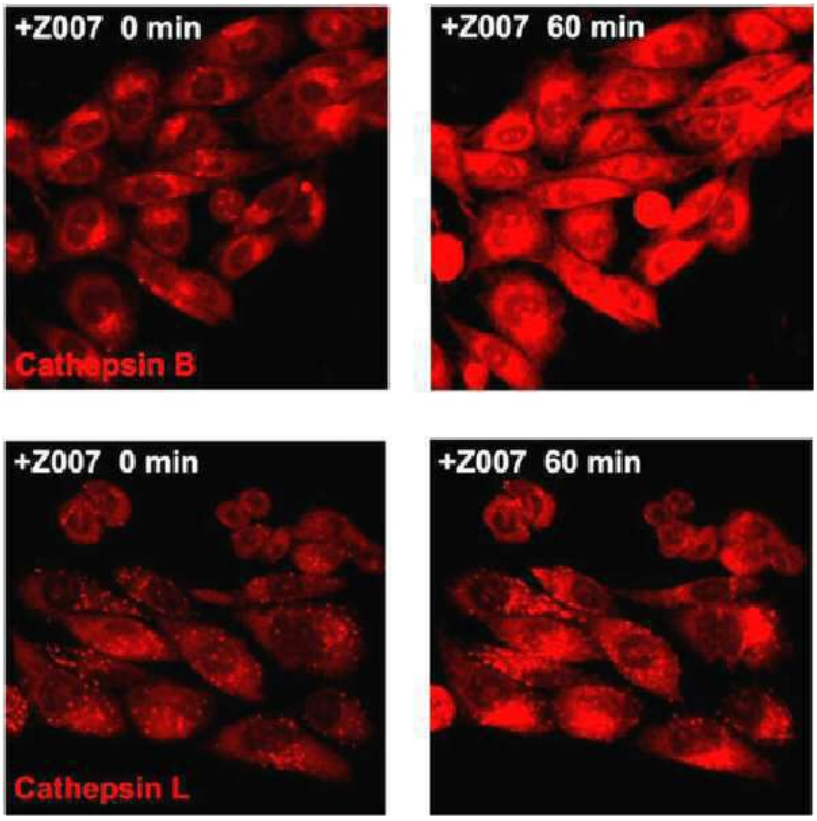
도면20


CTL
PDEi
Zinpyr-1
CTL
PDEi

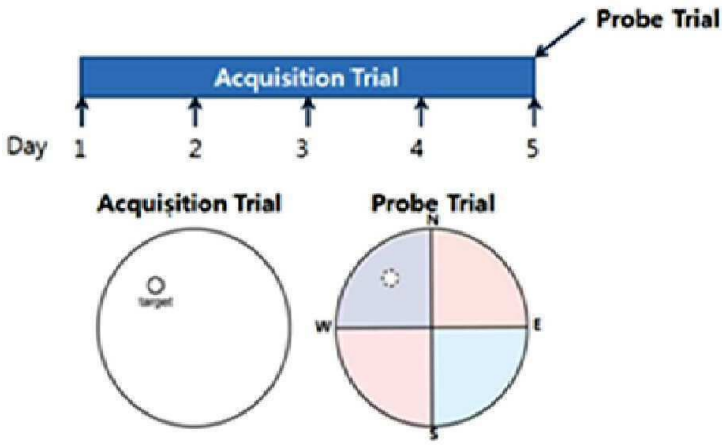
도면21


BA 0 min
BA 60 min
Cathepsin B
BA 0 min
BA 60 min
Cathepsin L

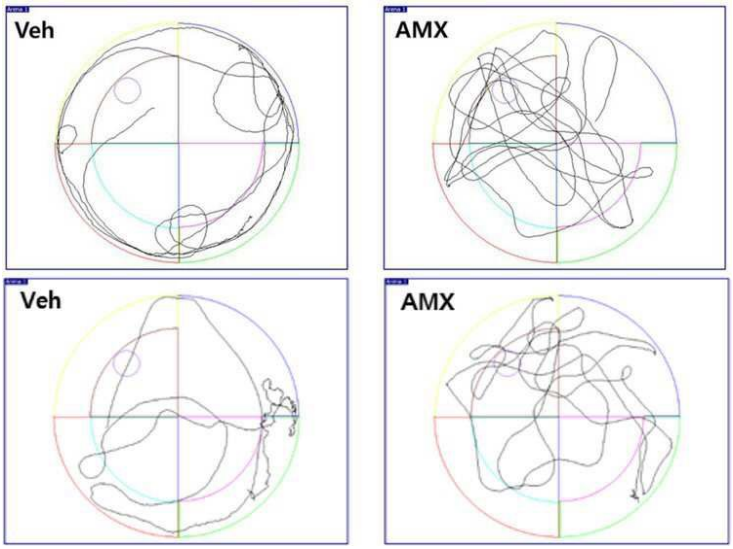
도면22


+Z007 0 min
+Z007 60 min
Cathepsin B
+Z007 0 min
+Z007 60 min
Cathepsin L

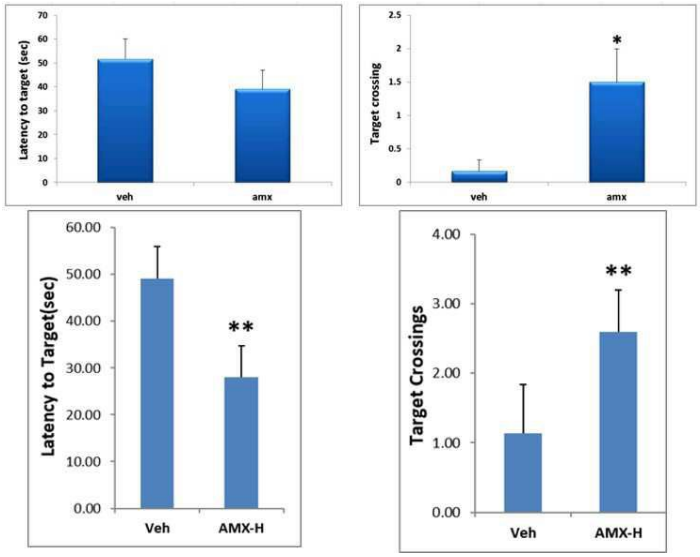
도면23


Probe Trial
Acquisition Trial
Day 1 2 3 4 5
Acquisition Trial
Probe Trial
target
N
W
E
S

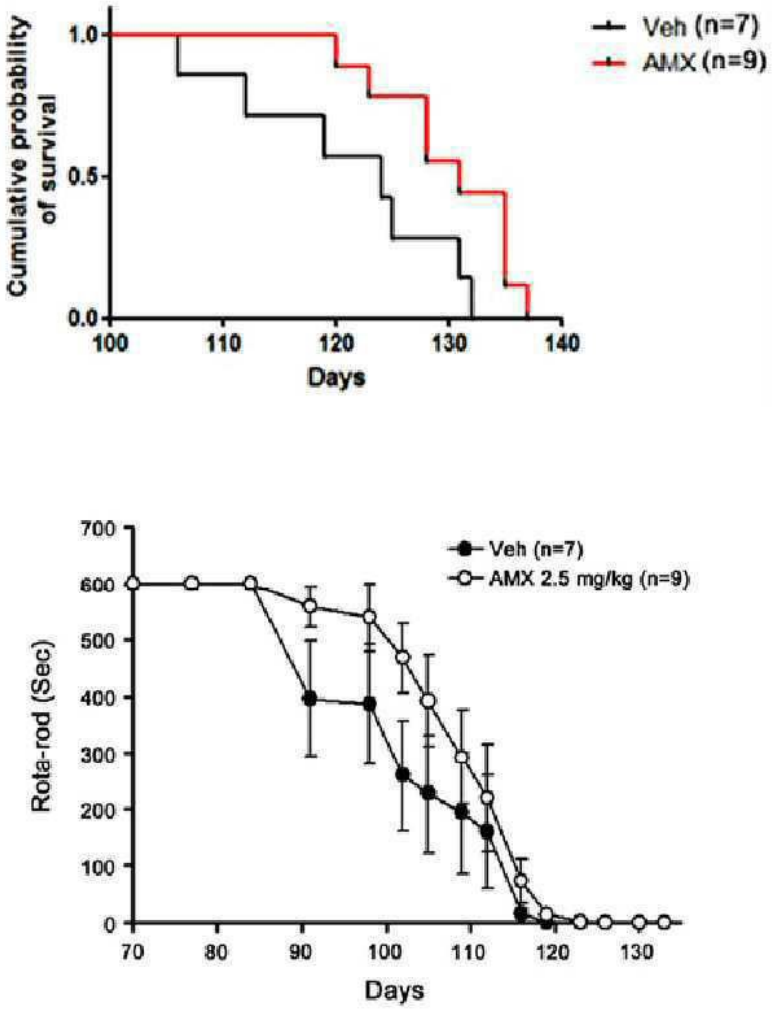
도면24


Veh
AMX
Veh
AMX

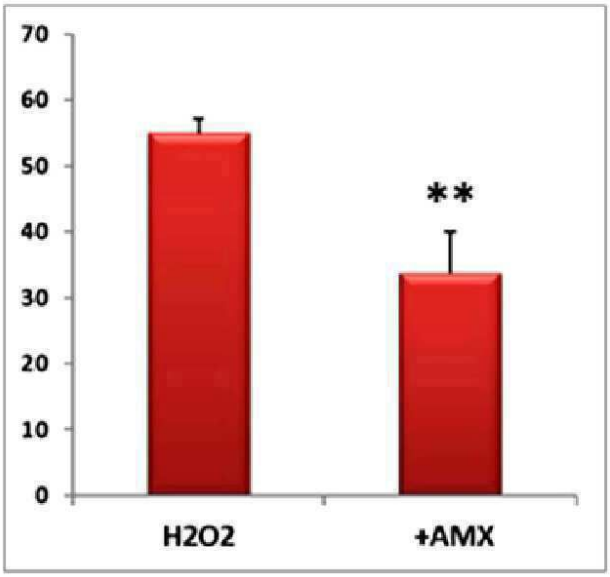
도면25


Latency to target (sec)
70
60
50
40
30
20
10
0
veh
amx
Target crossing
2.5
2
1.5
1
0.5
0
veh
amx
Latency to Target(sec)
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
**
Veh
AMX-H
Target Crossings
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
**
Veh
AMX-H

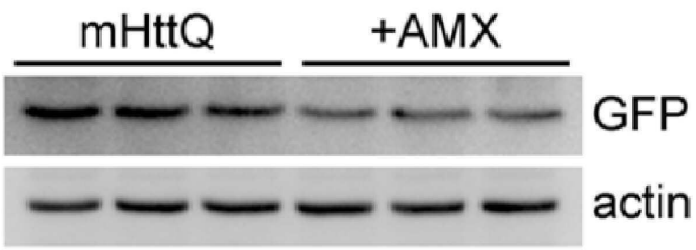
도면26


Veh (n=7)
AMX (n=9)
Cumulative probability of survival
1.0
0.5
0.0
100
110
120
130
140
Days
Veh (n=7)
AMX 2.5 mg/kg (n=9)
Rota-rod (Sec)
700
600
500
400
300
200
100
0
70
80
90
100
110
120
130
Days

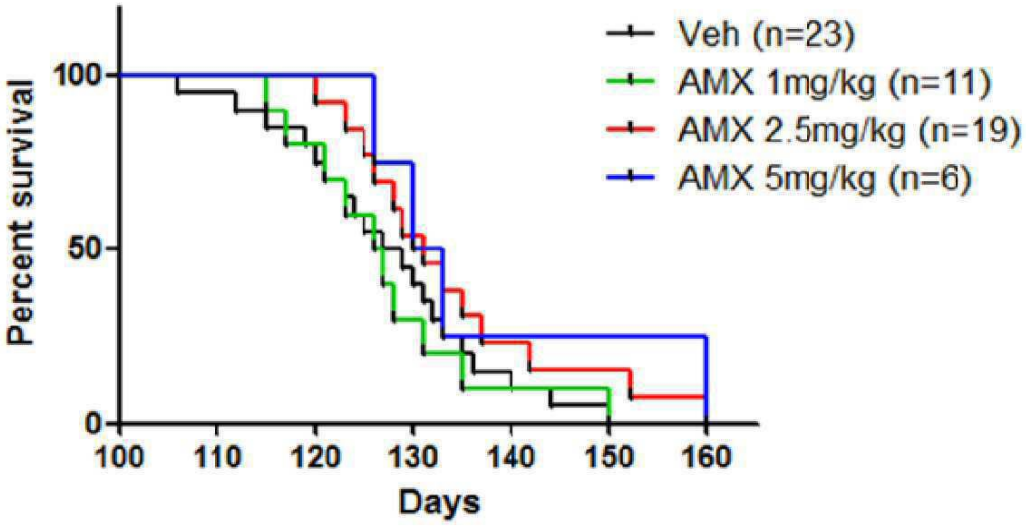
도면27


70
60
50
40
30
20
10
0
**
H2O2
+AMX

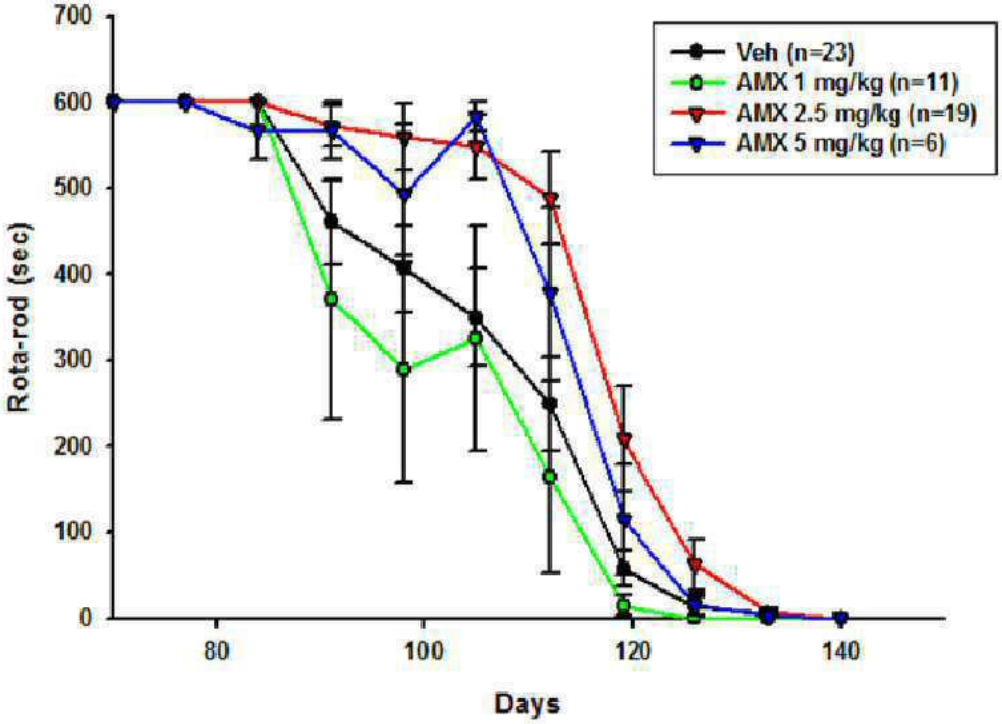
도면28


mHttQ
+AMX
GFP
actin

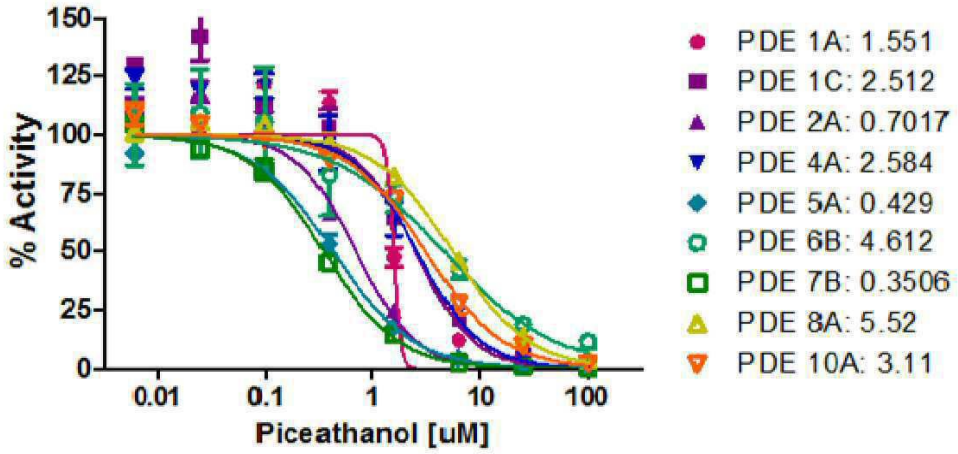
도면29


Veh (n=23)
AMX 1mg/kg (n=11)
AMX 2.5mg/kg (n=19)
AMX 5mg/kg (n=6)
Percent survival
100
50
0
100
110
120
130
140
150
160
Days

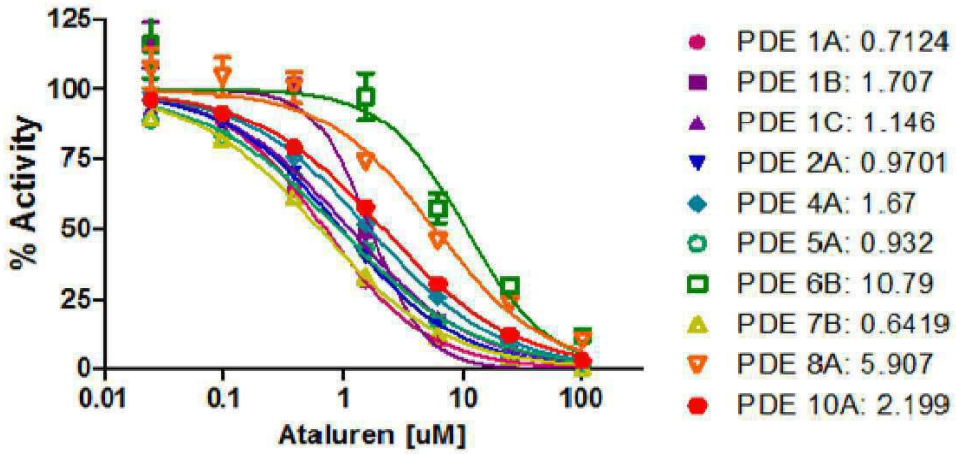
도면30


Veh (n=23)
AMX 1 mg/kg (n=11)
AMX 2.5 mg/kg (n=19)
AMX 5 mg/kg (n=6)
Rota-rod (sec)
700
600
500
400
300
200
100
0
80
100
120
140
Days

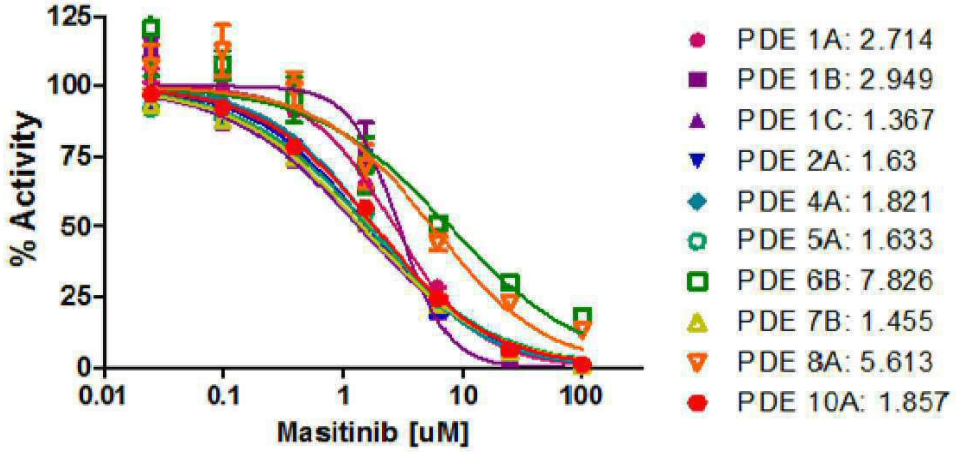
도면31


% Activity
150
125
100
75
50
25
0
0.01
0.1
1
10
100
Piceathanol [uM]
PDE 1A: 1.551
PDE 1C: 2.512
PDE 2A: 0.7017
PDE 4A: 2.584
PDE 5A: 0.429
PDE 6B: 4.612
PDE 7B: 0.3506
PDE 8A: 5.52
PDE 10A: 3.11

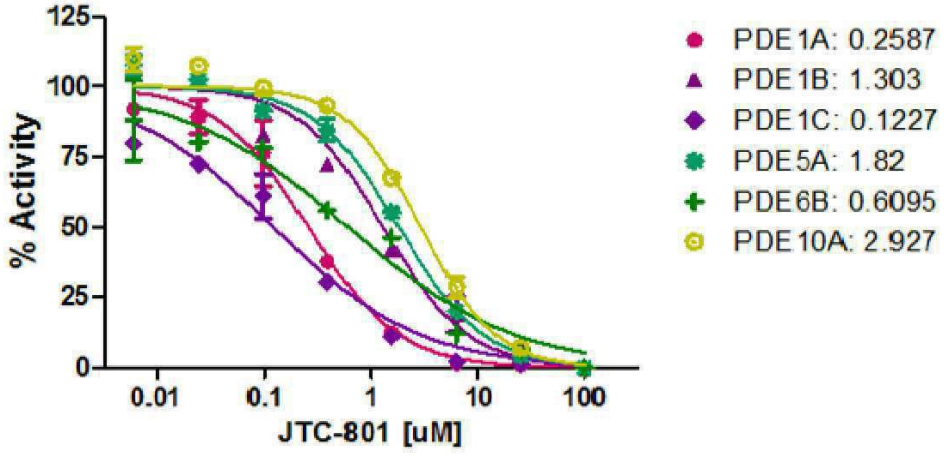
도면32



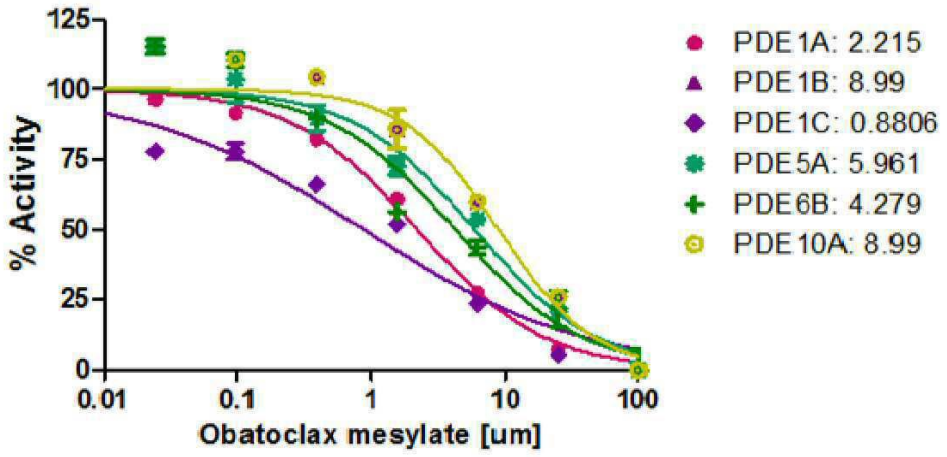
도면33



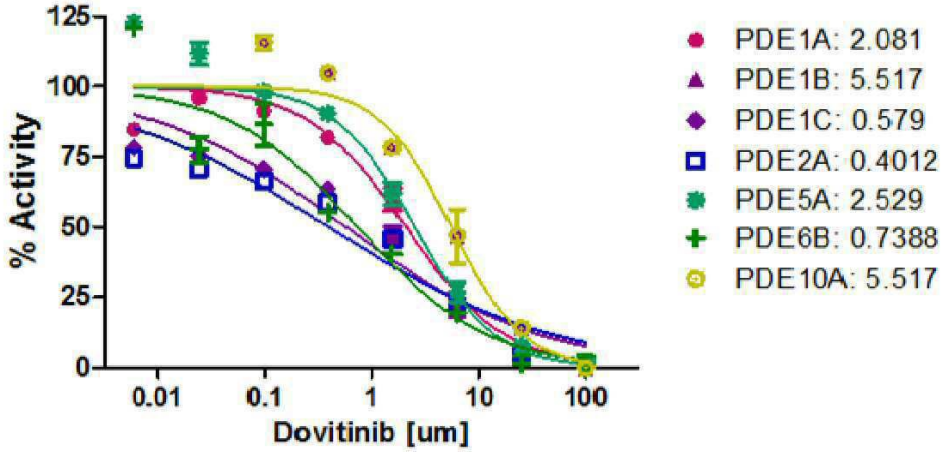
도면34



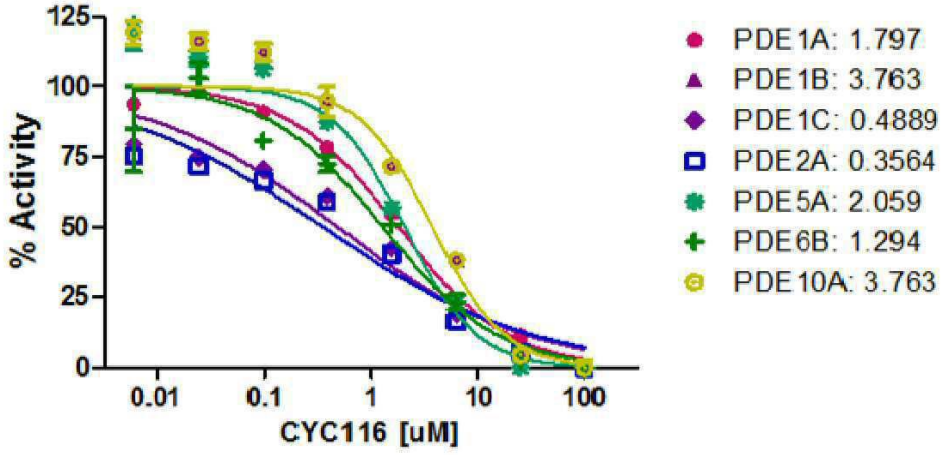
도면35



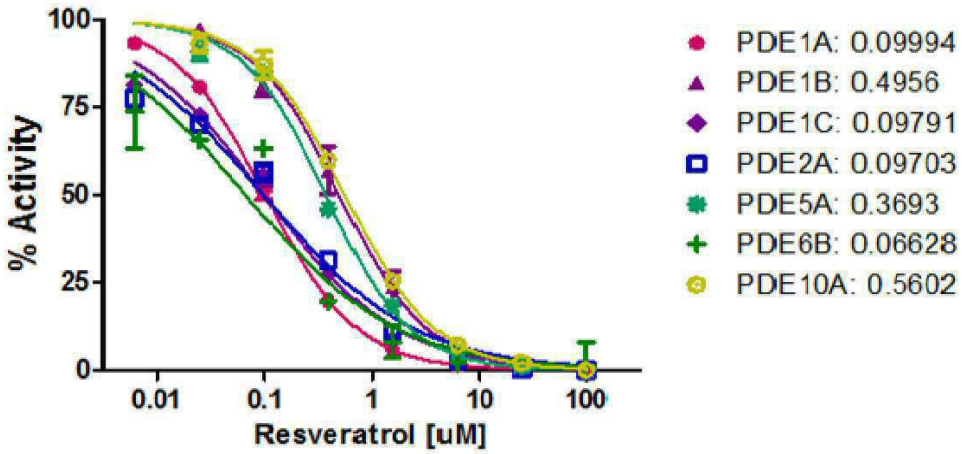
도면36



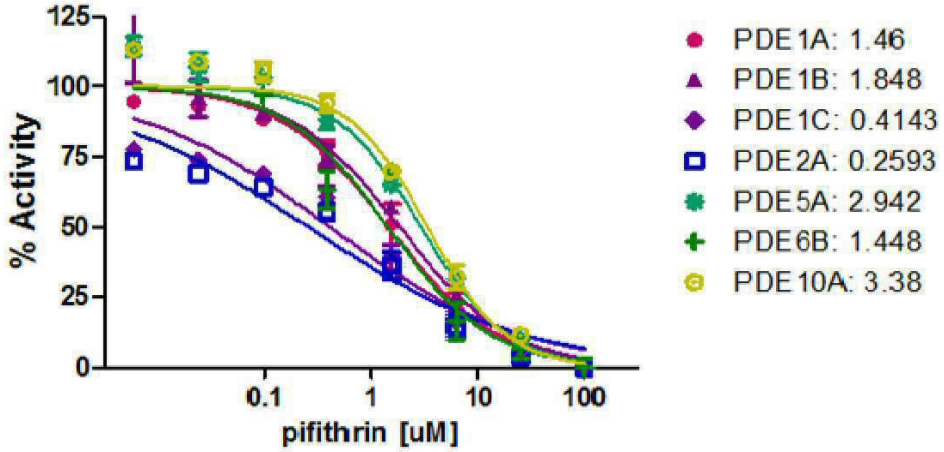
도면37



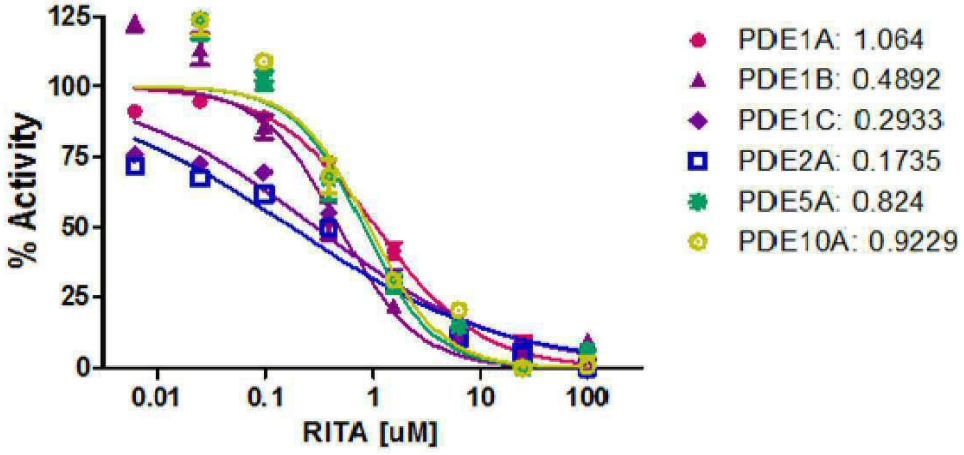
도면38



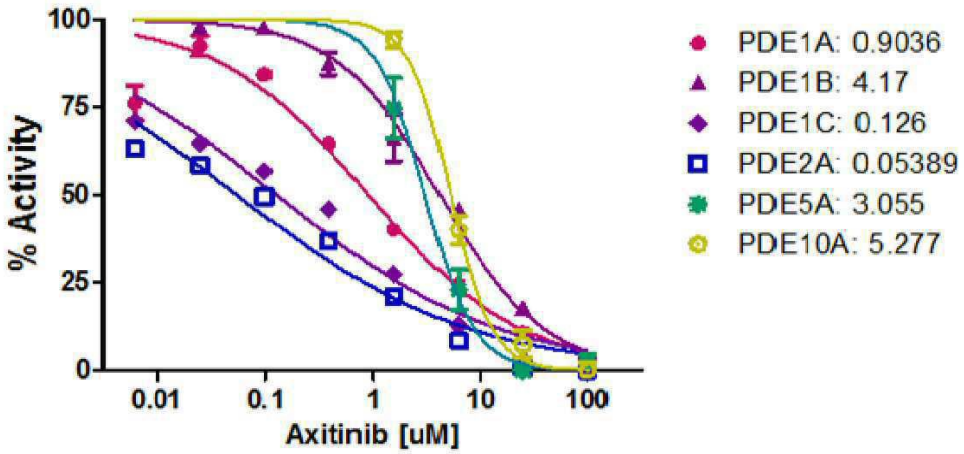
도면39



도면40



도면41



서 열 목 록

<110> THE ASAN FOUNDATION

University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> A Composition for Prevention or Treatment of Neurodegenerative disease

<130> MP19-164D1

<150> KR 10-2018-0071564

<151> 2018-06-21

<160> 66

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE1A-F

<400> 1

gaagcagctg gagaaaggtg atgtc 25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE1A-R

<400> 2

cctttccaca aaaatcccag cctgg 25

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE1B-F

<400> 3

gcgctacatg gtgaagcagt tggag 25

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE1B-R

<400> 4

ccacgaagat cccagcctgc ac 22

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE1C-F

<400> 5

cggctgccat ccatgactat gaac 24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE1C-R

<400> 6

gttcgaaact ccctccagtc atcc 24

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE2A-F

<400> 7

ggtcataccc ctgctggaca agg 23

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE2A-R

<400> 8

cagttgcagg atctttcggt catgg 25

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE3a F

<400> 9

actttcatgc tttggagatc ggata 25

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE3a R

<400> 10

aggaatcggc tgtgttgtga ga 22

<210> 11

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE3B-F

<400> 11

ctctgggact gggacttgaa gcag 24

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE3B-R

<400> 12

ctttggccta caggaacctg agaaag 26

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE4A-F

<400> 13

gcttggaggc agaaaatggg cc 22

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE4A-R

<400> 14

cggagactgg ccagcacctg 20

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE4B-F

<400> 15

gtggaaaatg gcccttctcc aggtc 25

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE4B-R

<400> 16

ggcaaaagga gtgacaatca ggtcatc 27

<210> 17

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE5A-F

<400> 17

cgcctctttg atgttgctga aggttc 26

<210> 18

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE5A-R

<400> 18

cctgatttct tgttgatggc ctgagc 26

<210> 19

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE6A-F

<400> 19

gatgtgtggc cagttctgat gggc 24

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE6A-R

<400> 20

catccagagg ctctttctgg aattc 25

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE6B-F

<400> 21

gataaacgtg caggatgtgg cagag 25

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE6B-R

<400> 22

cacagttgtg gaggtagctt aggtg 25

<210> 23

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE6C-F

<400> 23

ccggagaagc cagatcctta tgtgg 25

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE6C-R

<400> 24

cctgccatct ggagtctttg gtcc 24

<210> 25

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE6D-F

<400> 25

gatgaacctt cgggatgccg aaacag 26

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE6D-R

<400> 26

gccaggtgtt tgtggagtta gggatc 26

<210> 27

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE7A-F

<400> 27

cagctctcgc agagacgtgg ag 22

<210> 28

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE7A-R

<400> 28

ccagcataca cttggcttgt ccattg 26

<210> 29

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE7B-F

<400> 29

gttgtgtcac ctcttcaact cccatgg 27

<210> 30

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE7B-R

<400> 30

gcatgatgtc cagaggtgtg agg 23

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE8A-F

<400> 31

gtcaccaagg aggtgcagac tgtc 24

<210> 32

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE8A-R

<400> 32

gagttacaag ccctgagttt cagctg 26

<210> 33

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE8B-F

<400> 33

cagtgtttac agcgttagac cactgtc 27

<210> 34

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE8B-R

<400> 34

cgaatgaggc tctgtctgag agttgtc 27

<210> 35

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE9A-F

<400> 35

gacacctcga cgtgatgtcc cc 22

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE9A-R

<400> 36

catctgtgtc acacagaagc agtgc 25

<210> 37

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE10A-F

<400> 37

gggattgctg gtcaagtggc aagaac 26

<210> 38

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE10A-R

<400> 38

gcttctccat ggtaaccctg tagatgc 27

<210> 39

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE11A-F

<400> 39

gctggaggtg gtcaatgacc tc 22

<210> 40

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PDE11A-R

<400> 40

ctgtcgaagc aaccagctca gcg 23

<210> 41

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH-F

<400> 41

gtcgtggagt ctactggtgt cttcac 26

<210> 42

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH-R

<400> 42

gttgtcatat ttctcgtggt tcacaccc 28

<210> 43

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE1a-F

<400> 43

gcttgttcta gctgctgaaa ctgactg 27

<210> 44

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE1a-R

<400> 44

ctgcttccag cacagatgcc gc 22

<210> 45

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE1b-F

<400> 45

gagcttggac tgggagccca aag 23

<210> 46

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE1b-R

<400> 46

gctgacttca gctccagggg tg 22

<210> 47

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE1c-F

<400> 47

gacagcccaa actatctcag cttcac 26

<210> 48

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE1c-R

<400> 48

gatctaccac tgaagcttcc cctctc 26

<210> 49

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE3a-F

<400> 49

gaccacaaac gagggccaag agg 23

<210> 50

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE3a-R

<400> 50

cactgagcga agtgacggga ttcac 25

<210> 51

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE3b-F

<400> 51

ctgcagccag ttactatggc agttgc 26

<210> 52

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE3b-R

<400> 52

ggcttggatc agtcagaaga tctgac 26

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE4a-F

<400> 53

caggcgcttc gaggcagaga atg 23

<210> 54

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE4a-R

<400> 54

cctcgctggt gaccgatgag ttc 23

<210> 55

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE4b-F

<400> 55

gcctttgaca acgcttccaa gcattgc 27

<210> 56

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE4b-R

<400> 56

gctcgcttgg aagagaagag tttctcg 27

<210> 57

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE5a-F

<400> 57

ccagcagcag aagcagcagc ag 22

<210> 58

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE5a-R

<400> 58

cagaggcaga gattttcctg gttggtg 27

<210> 59

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE7a-F

<400> 59

ggaagtgtgt taccagctgc cgg 23

<210> 60

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE7a-R

<400> 60

ggctccttac acgtacatct cctagc 26

<210> 61

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE7b-F

<400> 61

caccgctcag agatttcacg gcattc 26

<210> 62

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE7b-R

<400> 62

cttggtgcca atctcccctg agtatg 26

<210> 63

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE10a-F

<400> 63

gagtgcttcc tgagccccag tttg 24

<210> 64

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hPDE10a-R

<400> 64

gctggttgtc tcctcctgtg tcc 23

<210> 65

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hGAPDH-F

<400> 65

ggcaccgtca aggctgagaa cg 22

<210> 66

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hGAPDH-R

<400> 66

gcagaggggg cagagatgat gac 23