

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0095705

(43) 공개일자 2023년06월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/473 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/473 (2013.01)

A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2021-0185449

(22) 출원일자 2021년12월22일

심사청구일자 2021년12월22일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

김민주

강원도 춘천시 동면 만천로 242, 101동 806호(춘천장학아이파크)

최보영

강원도 춘천시 후석로 459, 105동 604호(후평동, 극동늘푸른아파트)

(74) 대리인

유민규

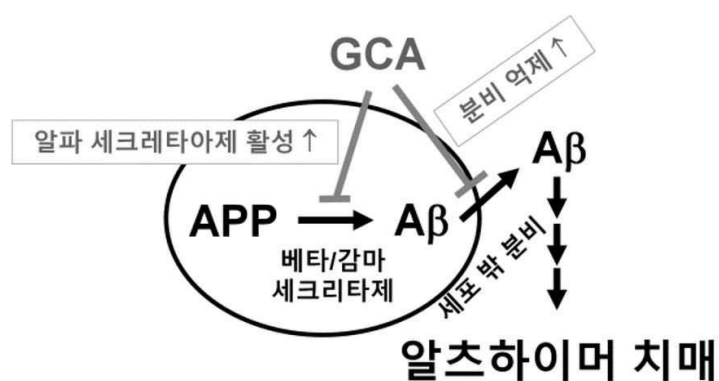
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

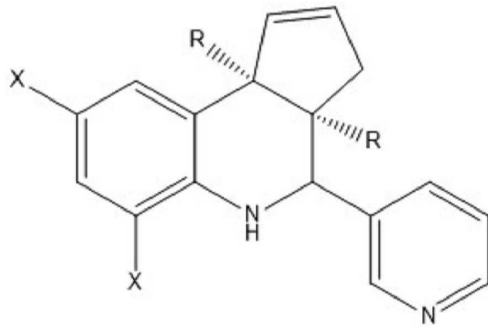
본원은 하기 화학식 1 로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



조성물 에 대한것이다:

[화학식 1]



(상기 화학식 1 에서,

X는 F, Cl, Br 또는 I 이고,

R 은 수소 또는 치환될 수 있는 선형 또는 분지형의 C₁-C₆ 의 알킬임).

(52) CPC특허분류

A61P 25/28 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345343896

과제번호 2019R1I1A3A01045720

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 학문균형발전지원사업(지역대학)

연구과제명 2,4-DAPG에 의한 베타 아밀로이드 생성 억제 기전을 이용한 알츠하이머 치매의 새로

운 치료 표적 발굴

기 여 율 1/1

과제수행기관명 한림대학교

연구기간 2019.06.01 ~ 2022.05.31

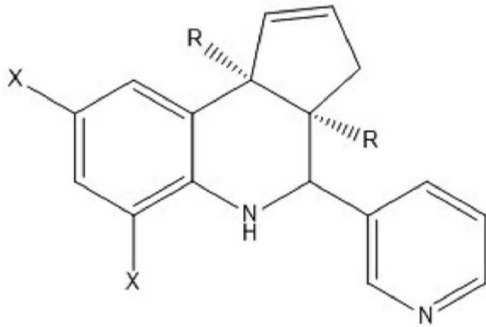
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1 로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물:

[화학식 1]



(상기 화학식 1 에서,

X는 F, Cl, Br 또는 I 이고,

R 은 수소 또는 치환될 수 있는 선형 또는 분지형의 C₁-C₆ 의 알킬임).

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 화합물은 GCA(Golgicide A)를 포함하는 것인, 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 화합물에 의해 베타 아밀로이드(beta-amyloid) 단백질의 생성이 억제되는 것인, 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 화합물에 의해 베타 아밀로이드 단백질의 세포 밖 분비가 억제되는 것인,

신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 화합물에 의해 알파 세크라타아제(alpha-secretase)의 활성이 증가하는 것인, 신경 퇴행성 질환의 예방 또

는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 신경 퇴행성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 전두측두치매, 루이치매, 루게릭병, 피질기저퇴행증, 다계통 측위병, 진행성핵상마비, 헌팅통병, 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 질병을 포함하는 것인,

신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가 포함하는 것인, 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 담체는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 멘톨, 미네랄 오일 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 것을 포함하는 것인, 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서,

상기 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 방부제, 가용화제, 안정화제, 습윤제, 감미료, 착색제, 향미료, 염, 완충액, 산화방지제, 윤활제, 유화제, 현탁제, 보존제 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 성분을 추가 포함하는 것인, 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제 1 항에 있어서,

상기 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 복강투여, 경구투여, 흡입투여, 정맥투여, 근육투여, 피하투여, 진피투여, 자궁내투여, 종양투여, 직장투여 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 방법으로 투여되는 것인, 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 포함하는, 건강 기능 식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본원은 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 알츠하이머병은 서구사회뿐 아니라, 최근 우리나라 65세 노인 인구에서 발생하는 치매(dementia) 중 가장 높은 유병률을 보이는 치매 형태이다. 2010년을 기준으로 볼 때 우리나라 치매 환자는 약 8.8% 정도 되는 것으로 보이며, 이 중 알츠하이머병은 40% 정도가 될 것으로 추산하고 있다. 치매 치료비는 2002년 561억원[4만 8000명]에서 2009년에는 6211억원[21만 5000여명] 정도로 증가하였으며, 국가 차원에서도 2011년부터는 치매관리법이 시행되는 등 관리가 본격화되는 추세이다.

[0003] 현재까지 밝혀진 알츠하이머 치매의 주요 원인물질은 분자생물학적 및 병리학적 관점에서 볼 때, 베타 아밀로이드와 타우(tau) 단백질이다. 베타 아밀로이드는 타우 단백질과 비교할 때, 알츠하이머병 치매 초증기에 중요하다고 생각되며, 타우 단백질이 전측두엽 치매(frontotemporal dementia) 및 미만성 루이소체 치매(dementia with Lewy body)에도 관련되는 것에 비해 베타 아밀로이드는 알츠하이머병 특이성이 높은 것으로 알려져 있다.

[0004] 베타 아밀로이드는 베타 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein; "APP")로부터 생성된다. 그 생성 기전은 APP 특이 절단효소인 베타 세크레타아제(beta-secretase) 및 감마 세크레타아제(gamma-secretase)의 활성화에 의해 APP가 베타 아밀로이드로 생성되는 것이다. 반면, 알파 세크레타아제(alpha-secretase)가 활성화되는 경우는 베타 아밀로이드의 중간을 자르기 때문에 베타 아밀로이드의 생성이 억제된다. 이런 기전에 기초하여 알파 세크레타아제의 활성화제나 베타 및 감마 세크레타아제의 억제제들이 개발되어 왔으나, 여러 부작용 등으로 정식 승인된 약물은 없는 것이 현실이다. 현재 알츠하이머병의 치료는 콜린에스테르 가수분해효소(cholinesterase) 저해제나 글루타메이트(glutamate) 억제제들이 임상에서 사용되고 있으나, 증상만 치료될 뿐 근본적인 치료는 되지 않는 것으로 판단되고 있다.

[0005] 한편, GCA (golgicide A)는 Arf1의 활성을 감소하는 cis-Golgi ArfGEF, GBF1의 저해제로 골지 소포의 단편화를 유도하고 골지 막에서 Arf1 및 COPI 소포 코트의 해리와 TGN (trans-Golgi network)과 골지의 분해를 야기한다고 보고되어 있다. GCA는 급성 심근염의 원인 중 하나인 CVB3 (coxsackievirus B3) 및 인간 엔테로바이러스 종의 복제를 감소하는데 도움이 되는 것으로 보고된 바 있다. 그러나, 아직 뇌질환 관련 용도로 이용된 것이 문헌상 검토된 적이 없으며, 알츠하이머병에서 역시 GCA가 예방 및 치료의 용도로 탐색된 적이 없다.

[0006] 본원의 배경이 되는 기술인 대한민국 공개특허 제 10-2021-0023782호는 유사교세포로 분화 유도된 후기 단계의 인간 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 알츠하이머 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 그러나, 상기 특허에서는 GCA를 유효성분으로 포함하는 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 대해서는 언급하고 있지 않다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본원은 전술한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로서 베타 아밀로이드의 농도를 감소시키는 효과를 가지는 화합물을 포함하는 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

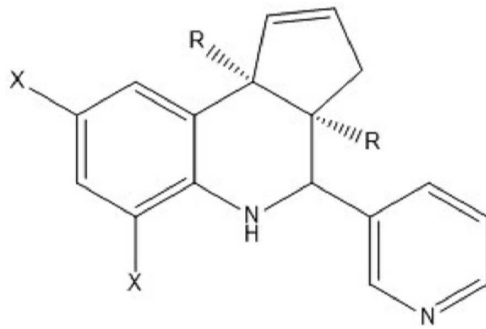
[0008] 또한, 상기 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 포함하는 건강 기능 식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 다만, 본원의 실시예가 이루고자 하는 기술적 과제는 상기된 바와 같은 기술적 과제들로 한정되지 않으며, 또 다른 기술적 과제들이 존재할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기한 기술적 과제를 달성하기 위한 기술적 수단으로서, 본원의 제 1 측면은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다:

[0011] [화학식 1]



[0012]

[0013] (상기 화학식 1 에서,

[0014] X는 F, Cl, Br 또는 I 이고,

[0015] R 은 수소 또는 치환될 수 있는 선형 또는 분지형의 C₁-C₆ 의 알킬임).

[0016] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 화합물은 GCA(Golgicide A)를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 화합물에 의해 베타 아밀로이드(beta-amyloid) 단백질의 생성이 억제되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 화합물에 의해 베타 아밀로이드 단백질의 세포 밖 분비가 억제되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 화합물에 의해 알파 세크라타아제(alpha-secretase)의 활성이 증가하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 신경 퇴행성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 전두측두치매, 루이치매, 루게릭병, 피질기저퇴행증, 다계통측위병, 진행성핵상마비, 헌팅통병, 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 질병을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 담체는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 구산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 멘톨, 미네랄 오일 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 방부제, 가용화제, 안정화제, 습윤제, 감미료, 착색제, 향미료, 염, 완충액, 산화방지제, 윤활제, 유화제, 현탁제, 보존제 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 성분을 추가 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 복강투여, 경구투여, 흡입투여, 정맥투여, 근육투여, 피하투여, 진피투여, 자궁내투여, 종양투여, 직장투여 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 방법으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 또한, 본원의 제 2 측면은, 본원의 제 1 측면에 따른 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 포함하는, 건강 기능 식품을 제공한다.

[0026] 상술한 과제 해결 수단은 단지 예시적인 것으로서, 본원을 제한하려는 의도로 해석되지 않아야 한다. 상술한 예시적인 실시예 외에도, 도면 및 발명의 상세한 설명에 추가적인 실시예가 존재할 수 있다.

발명의 효과

[0027] 본원에 따른 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 세포 독성 없이 알파 세크라타아제의 활성 증

가를 통해서 알츠하이머병의 원인 물질인 베타 아밀로이드의 생성을 감소시킬 수 있으며, 베타 아밀로이드의 세포 밖 분비 또한 감소시킬 수 있다.

[0028] 다만, 본원에서 얻을 수 있는 효과는 상기된 바와 같은 효과들로 한정되지 않으며, 또 다른 효과들이 존재할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1 은 본원의 일 구현예에 따른 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 효과에 대한 모식도이다.

도 2 는 본원의 일 실험예에 따른 베타 아밀로이드를 배양액으로 분비할 수 있는 알츠하이머병 세포 모델인 HEK293-APPsw 세포주에 GCA를 농도별로 처리했을 때, 세포 독성 발생 여부를 측정한 것이다.

도 3 은 세포 모델인 HEK293-APPsw 에 GCA를 3.5uM 농도로 처리하였을 때, 배양액에 베타 아밀로이드 1-40의 양을 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)을 통해 확인한 것이다.

도 4 는 APP (amyloid precursor protein)의 프로세싱과 그 확인 방법에 관한 것이다.

도 5 의 (A)는 본원의 일 실험예에 따른 GCA를 세포 모델인 HEK293-APPsw에 3.5uM 농도로 처리하였을 때, 배양액과 세포 내의 APP 프로세싱의 변화를 웨스턴 블랏법(western blot analysis)을 이용하여 분석한 결과이며, (B)는 이에 대한 정량값을 그래프로 모식화 한 것이다.

도 6 의 (A)는 본원의 일 실험예에 따른 GCA를 3.5uM 농도로 세포 모델에 처리하였을 때 세포 내의 베타 아밀로이드 1-40의 양을 측정한 것이며, (B)는 세포 내와 배지의 베타 아밀로이드 1-40의 상대 비율을 나타낸 것이다

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[0031] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 소자를 사이에 두고 "전기적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다.

[0032] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 "상에", "상부에", "상단에", "하에", "하부에", "하단에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.

[0033] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0034] 본 명세서에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 또한, 본원 명세서 전체에서, "~ 하는 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.

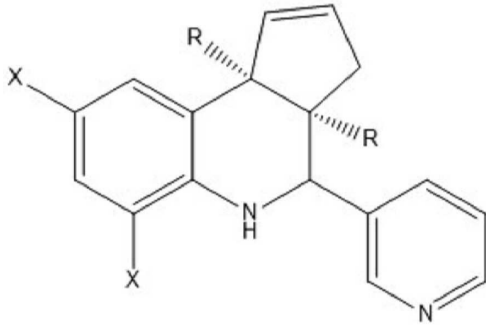
[0035] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.

[0036] 본원 명세서 전체에서, "A 및/또는 B" 의 기재는, "A, B, 또는, A 및 B" 를 의미한다.

[0037] 이하, 본원의 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 대하여 구현예 및 실시예와 도면을 참조하여 구체적으로 설명하도록 한다. 그러나, 본원이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 상기한 기술적 과제를 달성하기 위한 기술적 수단으로서, 본원의 제 1 측면은 하기 화학식 1 로 표시되는 화합물을 유효성분으로 포함하는, 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다:

[0040] [화학식 1]



[0041]

[0042] (상기 화학식 1 에서,

[0043] X는 F, Cl, Br 또는 I 이고,

[0044] R 은 수소 또는 치환될 수 있는 선형 또는 분지형의 C_1-C_6 의 알킬임).

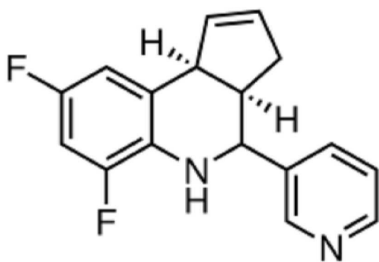
[0045] 본원에 따른 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 상기 화학식 1 로 표시되는 화합물을 유효성 분으로 포함함으로써, 세포 독성 없이 알파 세크라타아제의 활성 증가를 통해서 알츠하이머병의 원인 물질인 베타 아밀로이드의 생성을 감소시킬 수 있으며, 베타 아밀로이드의 세포 밖 분비 또한 감소시킬 수 있다.

[0046] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 화합물은 GCA(Golgicide A)를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 본원의 발명자들은 신경 퇴행성 질환중 하나인 알츠하이머병의 원인 물질인 베타 아밀로이드의 농도를 감소시키는 새로운 물질을 모색하던 중, GCA가 세포 독성 없이 베타 아밀로이드의 생성을 알파 세크라타아제의 활성 증가를 통해 감소시킴을 발견하였고, 또한 베타 아밀로이드의 세포 밖 분비를 억제시킴을 실험적으로 확인하였다.

[0048] GCA(golgicide A)는 하기 화학식 2 와 같은 구조를 가지며, Arf1의 활성을 감소하는 cis-Golgi ArfGEF, GBF1의 저해제로 골지 소포의 단편화를 유도하고 골지 막에서 Arf1 및 COPI 소포 코트의 해리와 TGN (trans-Golgi network)과 골지의 분해를 야기한다고 보고되어 있다. GCA는 급성 심근염의 원인 중 하나인 CVB3 (coxsackievirus B3) 및 인간 엔테로바이러스 종의 복제를 감소하는데 도움이 되는 것으로 보고 된 바 있으나, 현재까지 뇌질환 관련 용도로 이용된 것이 문헌상 검토된 적이 없으며, 알츠하이머병에서 역시 GCA가 예방 및 치료의 용도로 탐색된 적이 없다.

[0049] [화학식 2]



[0050]

[0051] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 화합물에 의해 베타 아밀로이드(beta-amyloid) 단백질의 생성이 억제되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 화합물에 의해 알파 세크라타아제(alpha-secretase)의 활성이 증가하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0053] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 화합물에 의해 베타 아밀로이드 단백질의 세포 밖 분비가 억제되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 도 1은 본원의 일 구현예에 따른 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 효과에 대한 모식도이다.

[0055] 도 1 을 참조하면, 본원에 따른 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 내의 유효성분인GCA가 세포

내 APP(amyloid precursor protein)로부터 베타 아밀로이드가 생성되는 것을 알파 세크라타아제 활성화에 의하여 억제하며, 또한 베타 아밀로이드가 세포 밖으로 분비되는 것도 억제하는 것을 확인할 수 있다.

- [0056] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 신경 퇴행성 질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 전두측두치매, 루이치매, 루게릭병, 피질기저퇴행증, 다계통측위병, 진행성핵상마비, 헌팅통병, 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 질병을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0057] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0058] 상기 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 상기 화학식 1 로 표시되는 화합물을 함유하는 것뿐만 아니라 약리학적으로 허용되는 1 종 또는 그 이상의 담체, 다른 예방 또는 치료를 위한 유효 성분, 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료에 유효한 임의의 다른 성분을 추가 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0059] 상기 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물은 다른 유효 성분을 약리학적으로 허용되는 1 종 또는 그 이상의 담체와 함께 혼합하여, 제제학의 기술 분야에서 잘 알려져 있는 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0060] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 담체는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 멘톨, 미네랄 오일 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 것을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 방부제, 가용화제, 안정화제, 습윤제, 감미료, 착색제, 향미료, 염, 완충액, 산화방지제, 윤활제, 유화제, 현탁제, 보존제 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 성분을 추가 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0062] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 복강투여, 경구투여, 흡입투여, 정맥투여, 근육투여, 피하투여, 진피투여, 자궁내투여, 종양투여, 직장투여 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 방법으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0063] 본원의 일 구현예에 따른 상기 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여 경로는 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료에 효과적인 것을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0064] 상기 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여 형태는 정제, 산제, 과립제, 환제, 현탁제, 유제, 침제, 캡슐제, 시럽제, 주사제, 액제, 엘릭시르제, 액기스제, 링크제, 유동액기스 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 형태를 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0065] 상기 경구투여는 시럽제, 정제, 산제, 과립제 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 제조물을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0066] 상기 시럽제는 물, 슈크로오스, 솔비트, 과당 등의 당류, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 등의 글리콜류, 참기름, 올리브유, 대두유 등의 기름류 등의 희석제, p-히드록시벤조산에스테르류 등의 방부제, 파라옥시벤조산메틸 등의 파라옥시벤조산 유도체, 벤조산나트륨 등의 보존제, 딸기향, 페퍼민트 등의 향료 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 상기 정제, 산제 및 과립지는 유당, 백당, 포도당, 슈크로오스, 만니톨, 소르비톨 등의 당류, 감자, 밀, 옥수수 등의 전분, 탄산칼슘, 황산칼슘, 탄산수소나트륨, 염화나트륨 등의 무기물, 결정 셀룰로오스, 감초 분말, 겐티아나 분말 등의 식물 분말 등의 부형제, 전분, 한천, 젤라틴 분말, 결정 셀룰로오스, 카르멜로오스나트륨, 카르멜로오스칼슘, 탄산칼슘, 탄산수소나트륨, 알긴산나트륨 등의 붕해제, 스테아르산마그네슘, 탈크, 수소 첨가 식물유, 마크로골, 실리콘유 등의 활택제, 폴리비닐알코올, 히드록시프로필셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 카르멜로오스, 젤라틴, 전분 풀액 등의 결합제, 지방산 에스테르 등의 계면활성제, 글리세린 등의 가소제 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0068] 상기 복강투여, 상기 정맥투여, 상기 근육투여, 상기 피하투여, 상기 진피투여, 상기 자궁내투여, 상기 종양투여, 및 상기 직장투여에 적합한 제제는 수용자의 혈액과 등장인 활성 화합물을 포함하는 멸균 수성제로 이루어지는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들면, 주사제의 경우에는 염 용액, 포도당 용액 또는

염수와 포도당 용액의 혼합물로 이루어지는 담체 등을 사용하여 주사용 용액을 제조하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0069] 상기 복강투여, 상기 정맥투여, 상기 근육투여, 상기 피하투여, 상기 진피투여, 상기 자궁내투여, 상기 종양투여, 및 상기 직장투여에 적합한 제제는 희석제, 방부제, 보존제, 향료류, 부형제, 봉해제, 활택제, 결합제, 계면활성제, 가소제 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0071] 또한, 본원의 제 2 측면은, 본원의 제 1 측면에 따른 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 포함하는, 건강 기능 식품을 제공한다.
- [0072] 본원의 제 2 측면에 따른 건강 기능 식품에 대하여, 본원의 제 1 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 그 설명이 생략되었더라도 본원의 제 1 측면에 기재된 내용은 본원의 제 2 측면에 동일하게 적용될 수 있다.
- [0073] 상기 건강 기능 식품은 일반적인 식품의 제조 방법으로 제조할 수 있다.
- [0074] 상기 제조 방법으로 성형 조립, 유동층 조립, 교반 조립, 압출 조립, 전동 조립, 기류 조립, 압축 성형 조립, 파쇄 조립, 분무 조립, 분사 조립, 조립 방법, 팬 코팅, 유동층 코팅, 건식 코팅, 코팅 방법, 퍼프드라이, 과잉수증기법, 폼 매트 방법, 마이크로파 가열 방법, 팽화 방법 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 방법으로 제조하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0075] 상기 건강 기능 식품에는 상기 신경 퇴행성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물이 0.01 중량% 내지 50 중량% 함유하도록 첨가되는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0076] 상기 건강 기능 식품은 건강 식품, 건강 음료, 주스류, 청량 음료수, 스프류, 차류, 유산균 음료, 발효유, 빙과, 버터, 치즈, 요구르트, 가공유, 탈지 분유 등의 유제품, 햄, 소세지, 햄버거 등의 축육 제품, 어육 혼합 제품, 계란말이, 달걀 두부 등의 알제품, 쿠키, 젤리, 스낵 과자, 츄잉껌 등의 과자류, 빵류, 국수류, 김치류, 훈제품, 건물, 해산물 조립, 조미료 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 식품을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0077] 상기 건강 기능 식품은 분말 식품, 시트상 식품, 병조립 식품, 통조립 식품, 레토르트 식품, 캡슐 식품, 정제상 식품, 유동 식품, 드링크제 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 형태인 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0078] 상기 건강 기능 식품은 감미료, 착색료, 보존료, 증점 안정제, 산화 방지제, 발색제, 표백제, 곰팡이 방지제, 껌베이스, 고미료, 효소, 광택제, 산미료, 조미료, 유화제, 강화제, 제조용 제제, 향료, 향신료 추출물 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 첨가물을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0079] 상기 감미료는 아스파탐, 감초, 스테비아, 크실로오스 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0080] 상기 착색료는 카로티노이드나 쿠르쿠민 색소, 후라보노이드, 카라멜 색소, 시콘 색소, 스피룰리나 색소, 엽록소, 퍼플 스위트 감자(Purple sweet potato) 색소, 퍼플 스위트 산감자 색소, 들깨(Perilla) 색소, 블루베리 색소 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0081] 상기 보존료는 아황산나트륨, 벤조산류, 독활(aralia cordata) 추출물, 에고노기 추출물, 사철쑥 추출물, 소르빈산류, 프로피온산류 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0082] 상기 증점 안정제는 아라비아 검이나 크산탄 검 등의 검류, 알긴산류, 키틴, 키토산, 알로에 추출물, 구아 검, 히드록시프로필셀룰로오스, 카제인나트륨, 옥수수 전분, 카르복시메틸셀룰로오스류, 젤라틴, 한천, 텍스트린, 메틸셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 미소 섬유상 셀룰로오스, 미결정 셀룰로오스, 해초 셀룰로오스, 폴리아크릴산소다, 폴리인산나트륨, 카라기난, 효모 세포벽, 곤약 감자 추출물, 나타드코코(Nata de coco), 만난 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0083] 상기 산화 방지제는 비타민 C, 에틸렌디아민 사아세트산나트륨, 에틸렌디아민 사아세트산칼슘, 에리소르빈산,

오리자놀, 카테킨(catechin), 퀘르세틴(quercetin), 클로브 추출물, 효소 처리 루틴, 사과 추출물, 참기름 추출물, 디부틸히드록시톨루엔, 회향 추출물, 서양고추냉이 추출물, 미나리 추출물, 차 추출물, 템페 추출물, 약모밀 추출물, 토코트리에놀, 토코페롤류, 평지 기름 추출물, 원두 커피 추출물, 해바라기 종자, 페룰산, 부틸히드록시아니솔, 블루베리잎 추출물, 프로폴리스 추출물, 고사리은행나무 추출물, 헤스페리딘, 후추 추출물, 봉선화 추출물, 갈산, 소귀나무 추출물, 유칼립투스 추출물, 로즈마리 추출물 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0084] 상기 발색제는 아질산나트륨, 아황산나트륨, 오르토펜올페놀 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0085] 상기 껌베이스는 아세틸리시놀산메틸, 왁스, 에스테르 검, 엘레미(olemi) 수지, 오우리큐우틸로우, 오조케라이트(Ozokerite), 오포파낙스(Opopanax) 수지, 카우리 검, 카르나우바 왁스, 구아이악(guaiac) 수지, 구타카췌, 구타한칸, 구타페르카(Guttapercha), 글리세린지방산 에스테르, 고래 왁스, 코파오바 발삼, 코팔(copal) 수지, 고무, 라이스 왁스, 사탕수수 왁스, 셀락, 젤론, 슈크로오스지방산 에스테르, 소르바, 소르비탄산지방산 에스테르, 탈크, 탄산칼슘, 담마(Dammar) 검, 치클(chicle), 치르테, 쯔누(tunu), 저분자 고무, 파라핀 오일, 퍼발삼, 프로필렌글리콜지방산 에스테르, 분말 펄프, 분말 벼겨, 호호바 오일, 폴리이소부틸렌, 폴리부텐, 마이크로크리스탈 왁스, 유향수(mastic), 맛사란드초콜 레이트, 황랍, 인산칼슘 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0086] 상기 고미료는 이소 알파 고미산, 카페인, 구름버섯 추출물, 키나(kina) 추출물, 황다랑어 추출물, 겐티아나 추출물, 향신료 추출물, 효소 처리 나린진, 자마이카 카시아 추출물, 데오브로민, 나린진, 비가끼 추출물, 약쑥 추출물, 방아풀 추출물, 아가리쿠스 버섯, 버섯 추출물, 보라페트, 메틸티오아데노신, 영지 추출물, 올리브차, 광굴 추출물, 홉 추출물, 머그워트(mugwort) 추출물 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0087] 상기 효소는 아밀라아제, 트립신, 린넷, 유산균 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0088] 상기 광택제는 왁스, 목랍 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0089] 상기 산미료는 아디프산, 이타콘산, 시트르산류, 숙신산류, 아세트산나트륨, 타르타르산류, 이산화탄소, 락트산, 피린산, 푸마르산, 말산, 인산 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0090] 상기 조미료는 아스파라긴, 아스파라긴산류, 글루탐산, 글루타민, 알라닌, 이소류신, 글리신, 세린, 시스틴, 티로신, 류신, 프롤린 등의 아미노산, 이노신산나트륨, 우리딜산나트륨, 구아닐산나트륨, 시티딜산나트륨, 리보뉴클레오티드 칼슘, 리보뉴클레오티드 나트륨 등의 핵산, 시트르산, 숙신산 등의 유기 산, 염화칼륨, 염수 호수 저염 나트륨액, 조제(粗製) 해수 염화칼륨, 유청 미네랄, 인산삼칼슘, 인산수소이칼슘, 인산이수소칼슘, 인산수소이칼슘, 인산이수소나트륨, 인산삼나트륨, 클로렐라 추출물 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0091] 상기 유화제는 지방산 모노글리세라이드, 소르비탄 지방산 에스테르 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0092] 상기 강화제는 아연 염류, 비타민 C, 각종 아미노산, 5-아데닐산, 염화철, 헤스페리딘, 각종 소성 칼슘, 각종 미소성 칼슘, 디벤조일티아민, 수산화칼슘, 탄산칼슘, 티아민염산염, 두나리에라 카로틴, 토코페롤, 니코틴산, 당근 카로틴, 팜유카로틴, 판토텐산칼슘, 비타민 A, 히드록시프롤린, 피롤린산이수소칼슘, 피롤린산 제1 철, 피롤린산 제2 철, 페리틴, 헴철, 메나퀴논, 엽산, 리보플라빈 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0093] 상기 제조용 제제는 아세톤, 이온 교환 수지 등의 가공 조제, 무화과 나뭇잎 추출물, 벗짚 재 추출물, 카울린, 글리세린지방산 에스테르, 뽕나무 추출물, 꿀희, 들깨 추출물, 생강 추출물, 각종 탄닌, 파파야 추출물, 포도종자 추출물, 에탄올 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0094] 상기 향신료 추출물은 고추 추출물, 마늘추출물 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는

것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0095] 상기 건강 기능 식품은 1 일 1 회 내지 5 회로 나누어 섭취함으로써 신경 퇴행성 질환을 예방할 수 있다. 이미 신경 퇴행성 질환이 발병되어 있는 경우에는 상기 건강 기능 식품을 일상적으로 섭취함으로써 신경 퇴행성 질환의 증상을 완화, 치유 등 신경 퇴행성 질환을 치료할 수 있다.
- [0096] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것이며 본원의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다.
- [0098] [실시예] GCA
- [0099] Golgicide A (회사명: Sigma-Aldrich, 제품명: Golgicide A, 카다로그 넘버: G0923)를 구매하여 본원에 따른 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로서 사용하였다.
- [0101] [제조예] 샘플의 준비
- [0102] 실험에 사용할 샘플은 다음과 같은 방법으로 준비되었다.
- [0103] 먼저, 인간 APPsw (amyloid precursor protein swedish mutants) K670N, M671L을 발현하는 플라스미드를 HEK293 세포에 도입하였다. 약 12시간 후에 800 μ g/mL의 G418이 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지로 교환하여 배양하였다. 군체를 형성한 세포만을 24-웰 플레이트 각 웰에 옮겨 배양하며, 성장한 세포는 12-웰 플레이트에 옮겨 600 μ g/mL 농도의 G418이 첨가된 DMEM 배지에서 선별 배양하였다. 다시 60mm 접시를 거쳐 100mm 접시로 계대배양하면서 배지 내 G418의 농도를 200 μ g/mL로 낮추어 선별 배양하였다.
- [0104] 이어서, HEK293-APPsw 세포주를 10% FBS (Fetal bovine serum)와 항생제 (penicillin/streptomycin)를 첨가한 DMEM 배지에 넣어 배양기 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 6-웰 플레이트에 70~80% 포화되도록 세포를 배양한 후, 다음날 DPBS로 한 번 씻었다. 1% FBS를 넣은 DMEM 배지를 각 웰에 1ml씩 가하였다.
- [0105] 마지막으로, GCA를 다양한 농도(0 μ M 내지 5 μ M)로 1% FBS를 첨가한 DMEM 배지에 희석하여 각 웰에 처리하고, 8 시간 후 배지 및 세포들을 수거하여 샘플을 준비하였다.
- [0107] [실험예 1] GCA의 세포 독성 실험(LDH release assay 및 BCA protein assay)
- [0108] 첫번째로, Cytotoxicity detection kit (Takara, Japan)를 이용하여 제조사의 계획서에 따라 세포에서 방출한 젖산 탈수소효소를 측정하여 세포손상을 확인하였다. 6-웰 플레이트에서 배양한 HEK293-APPsw 세포주에 GCA를 농도별로 처리한 후 8시간 뒤에 배지를 수거하여 96-웰 플레이트에 50 μ l의 배지, A, B 용액의 혼합액을 50 μ l 씩 넣어 최소 30분 반응시킨 후, 492nm, 690nm에서 96 웰 분광광도계(molecular probe, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.
- [0109] 두번째로, BCA protein assay kit (PIERCE, USA)를 이용하여 제조사의 계획서에 따라 세포내의 단백질 농도를 측정하여 상대적인 세포의 수의 감소 혹은 증가 유무를 확인하였다. GCA를 8시간 동안 처리한 세포를 10mM Tris (pH 7.4), 150mM NaCl, 1% Triton X-100 및 protease inhibitor와 phosphatase inhibitor가 포함된 완충액으로 용해한 후, 초음파 파쇄를 통하여 시료를 얻었으며, 이를 샘플 당 BCA 용액 A를 200 μ l, BCA 용액 B를 4 μ l 씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켰다. 반응물은 562 nm에서 96 웰 분광광도계(molecular probe, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.
- [0110] 도 2 는 본원의 일 실험예에 따른 베타 아밀로이드를 배양액으로 분비할 수 있는 알츠하이머병 세포 모델인 HEK293-APPsw 세포주에 GCA를 농도별로 처리했을 때, 세포 독성 발생 여부를 측정하는 것이다.
- [0111] 구체적으로, 도 2의 (A)는 LDH (Lactose dehydrogenase) 방법으로 죽은 세포의 배지로 세포 내 LDH 효소가 분비된 정도를 확인한 것이고, 도 2의 (B)는 상기 세포 모델에 GCA를 농도별로 처리하고 세포 내 단백질 농도에 차이가 있는지 BCA protein (Bicinchoninic acid assay) 분석을 측정하는 것이다.
- [0112] 도 2 를 참조하면, HEK293-APPsw 세포주에서의 GCA의 독성을 확인한 결과, GCA를 0.5, 1.5, 5 μ M 농도별로 HEK293-APPsw 세포주에 처리하여 8시간 후 세포 배양액으로 LDH release assay(도 2의 (A))와 BCA protein

assay(도 2의 (B))로 분석하였더니 세포사 (cell death)의 변화가 관찰되지 않았다. 이로부터 사람 유래 세포에서 GCA가 독성을 나타내지 않음을 알 수 있다

[실험예 2] 세포 및 배지에서 베타-아밀로이드의 ELISA 분석

HEK293-APP^{sw} 세포주에 GCA를 3.5 μM로 8시간 처리한 세포 배양액에서 베타-아밀로이드 1-40의 양을 ELISA (Invitrogen) 키트를 이용하여 수행하였다. 배지의 경우 바로 적정 비율로 희석 (2~20배)하였으며, 세포의 경우는 샘플 당 50 μg의 단백질을 2배 희석하여, 일차 항체와 각각 50 μl씩 섞어 다른 항체가 코팅된 96웰 ELISA 플레이트에 분주하여 2시간 정도 실온에서 배양하였다. 이를 세척 완충액으로 5번 정도 씻은 후에, 다시 HRP (horse radish peroxidase)가 표지된 이차항체를 처리하였다. 마지막 세척 후에 TMB (tetrametyhlybenzidine) 용액으로 발색시킨 후, 0.01N HCl 용액으로 고정시키고 96 웰 ELISA 플레이트 (Thermo)로 450nm의 흡광도에서 발색 정도를 측정하였다. 측정한 값은 미리 녹여둔 베타-아밀로이드의 표준곡선에 대입하여, 배지의 베타-아밀로이드 양을 계산하였다. 도5의 B의 경우 샘플 당 배지에 대한 세포의 베타 아밀로이드 비율의 경우 샘플 당 상기 측정된 결과를 하기 식 1에 대입한 후, GCA 비처리군의 비율을 1로 한 상대적인 수치를 제시하였다.

[식 1]

$$\text{상대적 배지에 대한 세포의 베타아밀로이드 비율} = \frac{\text{세포의 베타아밀로이드 측정치}}{\text{배지의 베타아밀로이드 측정치}}$$

도 3 은 세포 모델인 HEK293-APP^{sw} 에 GCA를 3.5 μM 농도로 처리하였을 때, 배양액에 베타 아밀로이드 1-40의 양을 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)을 통해 확인한 것이다.

도 3 을 참조하면, HEK293-APP^{sw} 세포주에 GCA를 3.5 μM로 8시간 처리한 세포 배양액에서 베타 아밀로이드 1-40의 농도를 ELISA로 확인하여 약 60% 가까운 농도가 감소하는 것을 확인하였다. 해당 농도에서 실험예 1 에서 처럼 GCA가 독성을 보이지 않은 것을 감안해 볼 때, GCA는 베타 아밀로이드의 분비량을 세포 독성 없이 감소시키는 것을 알 수 있다.

[실험예 3] GCA에 의한 변화 측정을 위해 웨스턴 블랏법을 통한 APP 프로세싱의 확인

GCA를 처리한 후 APP 프로세싱을 확인하기 위하여, 세포 및 배지를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.

배지의 경우는 sAPP의 양을 측정하기 위하여, 8 μl의 배지를 2 μl의 5x sample buffer에 섞어 끓인 후, 8% acrylamide gel에 로딩하였다. 세포의 경우는 APP 및 APP-CTF (C-terminal fragment) 측정을 위해서 상기 BCA protein assay의 세포용해를 통해 얻어진 시료를 이용하여, 5x sample buffer에 섞어 끓여 로딩한 후, 15 및 8% acrylamide gel을 통하여 전기영동을 하였다.

이렇게 전기영동한 두 종류의 시료는 100 V에서 약 2시간 전기영동 한 후, 젤을 PVDF membrane에 100 V에서 1시간 동안 이동한 후 5% skim milk로 1시간 동안 상온에서 블로킹하였다. TBS-T (Tris buffered saline with 0.1% Tween20)로 3회 씻어준 후, membrane은 TBS-T에 희석된 일차항체와 밤새 반응시켰다. TBST로 3회 씻어준 후, 이차항체 (horseradish peroxidase-conjugated Ig anti-mouse antibody)로 상온에서 1시간 반응시킨 다음 TBST로 3회 씻어주었다. 배지에서 sAPP의 검출을 위해서는 anti-APP N-terminal 항체 (22C11; sAPPs 또는 총 sAPP)를 사용하였으며, 세포에서의 CTF의 검출을 위해서는 anti-APP C-terminal 항체 (Y188; C83, C89, C99, 및 AICD 검출), anti-APP C-terminal 항체 (A8717; APP-FL 혹은 APP 전구체 전체를 검출)를 사용하였다. 검출은 ECL (Enhanced chemiluminescence)과 LAS4000 화학발광탐지기 (GE healthcare)를 이용하여 확인하였다. 얻은 이미지는 이미지 J 소프트웨어 (NIH, USA)를 이용하여 정량화하였다.

도 4 는 APP (amyloid precursor protein)의 프로세싱과 그 확인 방법에 관한 것이다.

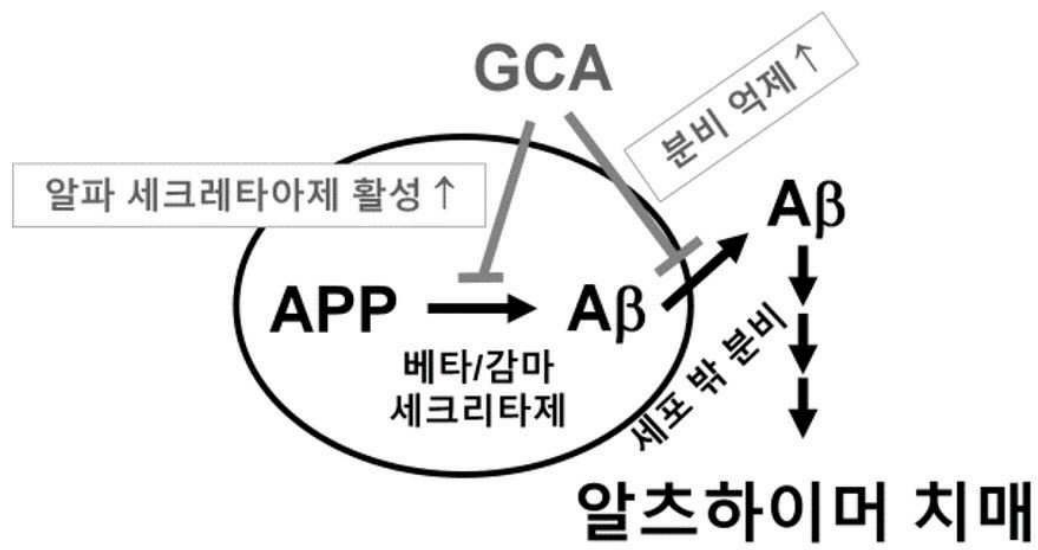
웨스턴블랏 분석에 사용한 항체의 검출 원리는 도 4와 같다. 상기 결과에서 CTF의 검출에서 C83은 알파 세크레타아제의 활성을, C89 및 C99는 베타 세크레타아제의 활성을, AICD는 감마 세크레타아제 활성을 나타내며, 배지에서 sAPPs의 검출 정도는 분비량을 나타낸다.

상기 실험예 2 에서 보인 베타 아밀로이드 감소 효과의 원인을 분석하기 위해서 APP 의 절단 패턴을 웨스턴 블랏을 통해 조사하였다.

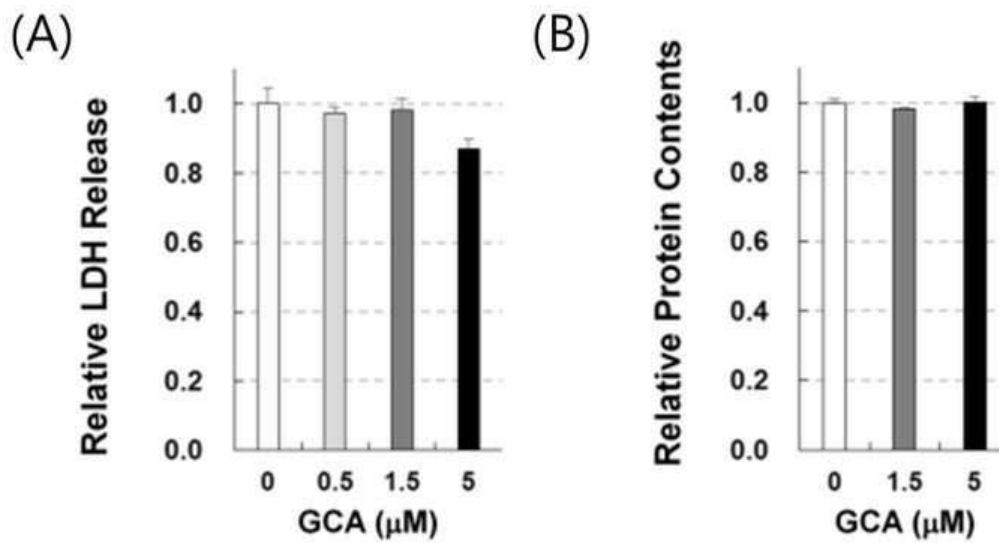
- [0128] 도 5 의 (A)는 본원의 일 실험예에 따른 GCA를 세포 모델인 HEK293-APPsw에 3.5 μ M 농도로 처리하였을 때, 배양액과 세포 내의 APP 프로세싱의 변화를 웨스턴 블랏법(western blot analysis)을 이용하여 분석한 결과이며, (B)는 이에 대한 정량값을 그래프로 모식화 한 것이다.
- [0129] 도 5 를 참조하면, GCA를 3.5 μ M로 8시간 처리한, 우선 세포 내에서는 Y188 항체를 통해 CTF의 증감을 분석하였을 때, C83, C89가 유의하게 증가함을 관찰하였다 (유의값 $p < 0.05$ 기준).
- [0130] 도 4 를 참조하면, C83의 증가는 알파 세크레타아제의 활성 증가를, C89의 증가는 베타 세크레타아제의 활성 증가를 나타낸다. 이런 알파, 베타 세크리타아제의 활성이 모두 증가하였고, 배지의 베타 아밀로이드가 실험예 2에서 감소하였기 때문에, 이 감소는 알파 세크리타아제의 활성 증가에 기인한 것으로 판단할 수 있다.
- [0131] 또한, 배양액에서 22C11 항체를 이용하여 총 수용성 APP (sAPPs)를 측정하였을 때, GCA를 3.5 μ M 처리하였을 때, sAPPs가 분비되지 않음을 알 수 있었다. 따라서 상기 실험예 2의 베타 아밀로이드 농도 감소는 알파 세크레타아제의 활성 증가 뿐 아니라, 수용성 APP의 세포 외 분비 감소와도 관련 있음을 판단할 수 있다.
- [0133] **[실험예 4] 세포 내 베타 아밀로이드 농도 변화 및 배지 당 세포의 베타 아밀로이드 변화 조사**
- [0134] 실험예 3 에서 sAPPs의 분비 감소가 GCA의 처리와 관련 있었으므로, 베타 아밀로이드 생성 뿐 아니라 분비에도 GCA가 관련있는 지를 조사하였다.
- [0135] 도 6 의 (A)는 본원의 일 실험예에 따른 GCA를 3.5 μ M 농도로 세포 모델에 처리하였을 때 세포 내의 베타 아밀로이드 1-40의 양을 측정한 것이며, (B)는 세포 내와 배지의 베타 아밀로이드 1-40의 상대 비율을 나타낸 것이다
- [0136] 도 6 의 (A)를 참조하면, 세포 내에서도 베타 아밀로이드의 생성이 감소되는 지의 여부를 세포 용해액에서 베타 아밀로이드를 측정한 결과, 약 30% 정도의 유의한 감소가 관찰되었다.
- [0137] 이를 기초로 하여, 도 6 의 (B)를 참조하면, 베타 아밀로이드의 세포로부터의 분비 능력을 조사하여 위해, 배지 당 세포의 베타 아밀로이드의 상대 비율을 분석하였을 때, 3.5 μ M의 GCA 처리는 1.6배 정도 유의하게 증가하였다.
- [0138] 이 결과는 GCA를 처리 시, 세포 내의 베타 아밀로이드가 많이 존재한다는 것을 의미하며, 따라서 결국 베타 아밀로이드가 세포 밖으로 해당 값만큼 분비되지 못한다는 것을 판단할 수 있다.
- [0140] 진술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0141] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

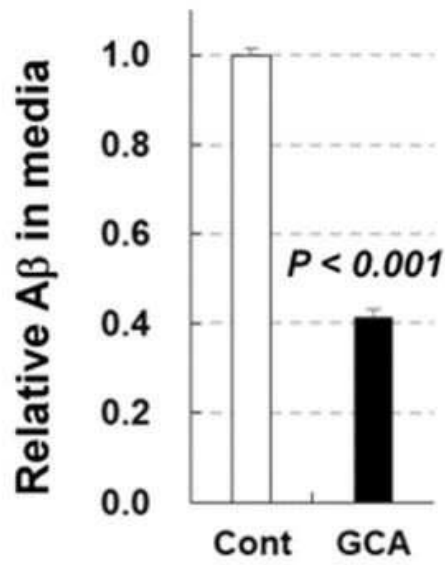
도면1



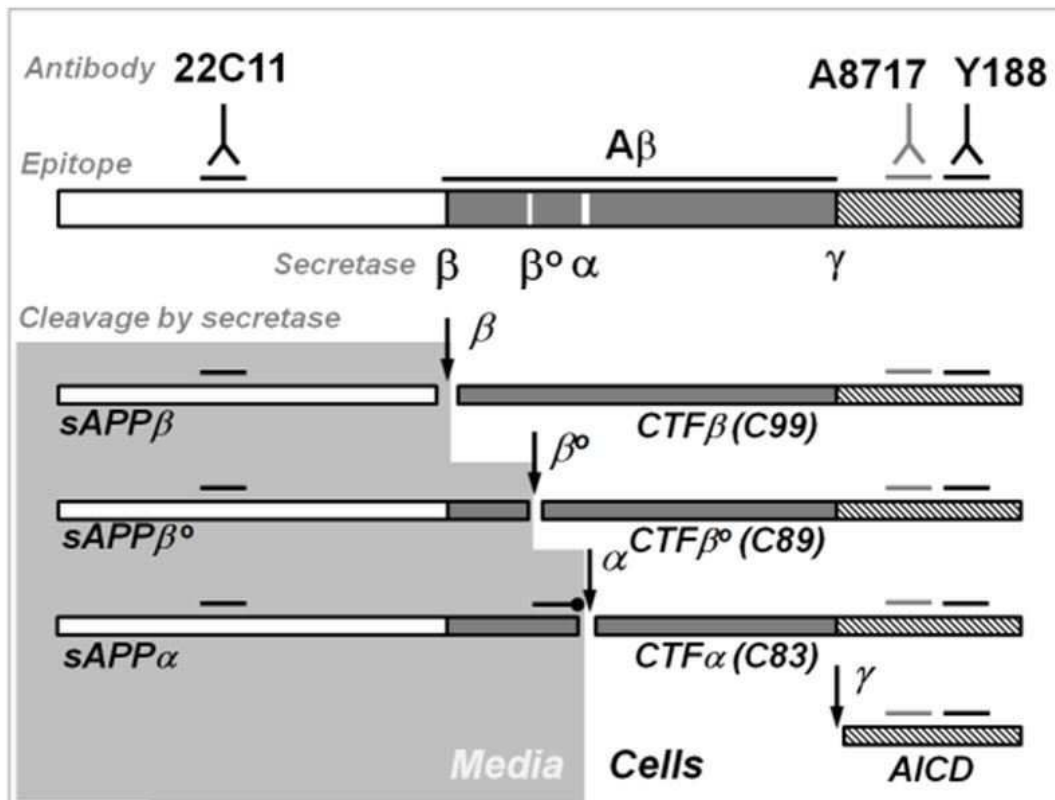
도면2



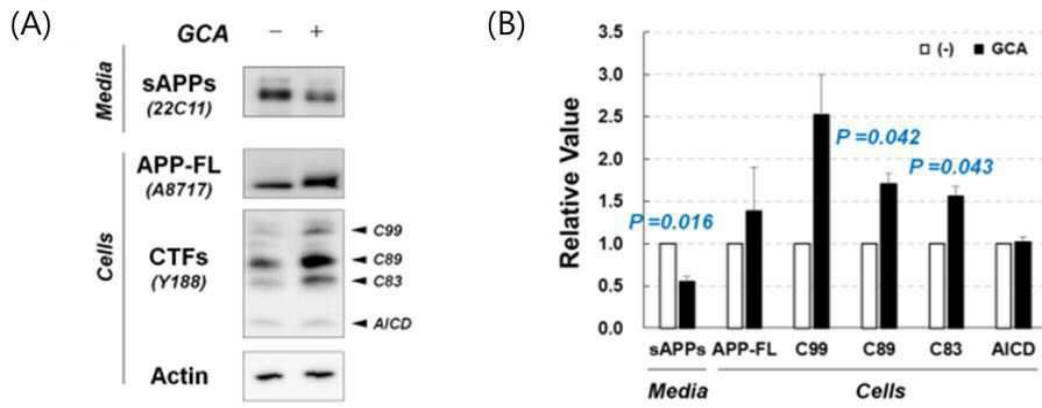
도면3



도면4



도면5



도면6

