



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0111880
(43) 공개일자 2022년08월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 33/00 (2006.01) *A23L 33/16* (2016.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 33/00 (2013.01)

A23L 33/16 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0015229

(22) 출원일자 2021년02월03일

심사청구일자 2021년02월03일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

김민주

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

이지선

경기도 남양주시 진건읍 진건오남로 86 번길 58, 103동 405호(금강아파트)

(74) 대리인

특허법인본

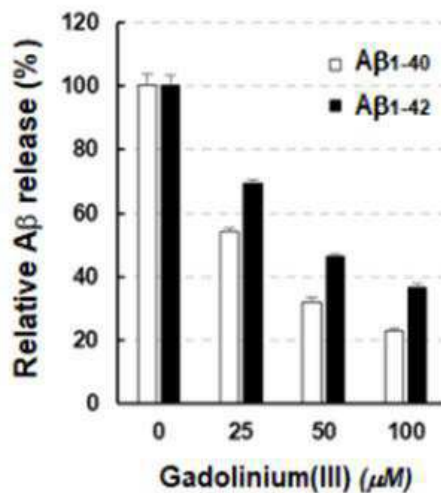
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

가돌리늄 포함하는 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 알츠하이머병 (Alzheimer's disease)의 주요 원인인 베타 아밀로이드 (beta-amyloid) 단백질의 분비를 저하시킴으로써 알츠하이머병을 예방 또는 치료할 수 있는 약학조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61P 25/28 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345312950
과제번호	2019R1I1A3A01045720
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	지역대학우수과학자지원사업(1년~5년)
연구과제명	2,4-DAPG에 의한 베타 아밀로이드 생성 억제 기전을 이용한 알츠하이머 치매의 새로운 치료 표적 발굴
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

가돌리늄 이온을 유효성분으로 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 가돌리늄 이온은, 가돌리늄 이온의 약학적 허용 가능한 염으로부터 유래된 것인 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 가돌리늄 이온의 약학적 허용 가능한 염은, 할로겐화 가돌리늄, 산화가돌리늄 및 수산화가돌리늄 중 적어도 어느 하나인 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 가돌리늄 이온은 베타 아밀로이드 단백질의 분비를 저하시키는 것인, 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는, 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

가돌리늄 이온을 유효성분으로 포함하는 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 신경퇴행성 질환은 파킨슨병, 피크병, 헌팅톤병, 다발성 경화증, 간질, 중풍, 뇌졸중, 허혈성 뇌질환, 기억력 감퇴, 외상성 중추 신경계 질환, 척수 손상 질환, 말초신경손상, 근위축성 측색 경화증, 말초신경질환, 행동 장애, 발달 장애, 정신 지체, 다운증후군 또는 정신분열증으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 8

가돌리늄 이온을 유효성분으로 포함하는 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 가돌리늄 포함하는 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 알츠하이머병 (Alzheimer's disease)의 주요 원인인 베타 아밀로이드 (beta-amyloid) 단백질의 분비를 저하시킴으로써 알츠하이머병을 예방 또는 치료할 수 있는 약학조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 알츠하이머병은 서구사회뿐 아니라, 우리나라 65세 노인 인구에서 발생하는 치매 (dementia) 중 가장 높은 유병률을 보이는 형태이다. 우리나라 보건 복지부 치매 유병률 조사에 따르면, 2012년 기준 65세 이상 노인의 치매 환자는 9.18% 정도 되는 것으로 보이며, 이 중 알츠하이머병은 71.3% 정도로 추산하였다. 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 초·중기에 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, 가돌리늄은 희토류에 해당되는 금속(Gd)으로, 원자번호 64번에 해당된다. 이는 주로 3가의 양이온(Gd^{3+} 혹은 $Gd(III)$)을 생성하게 되며, 이 이온은 다양한 용도로 활용된다. Gadolinium-157 방사선 동위원소는 중성자 중량 제거하는 수술에 사용되기도 하며, 자기장을 띄는 특성으로 인해 MRI 조영제로도 사용이 된다.
- [0006] 이 밖에 질병에는 용도가 없으나, 가돌리늄 이온은 세포 내 TRP (Transient receptor potential) channel의 저해제로 사용되는 용도가 있으며, 세포 내 calcium 이온의 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 관련 생리학적 활성으로 vasopressin이나 catecholamine 같은 호르몬이나 신경전달물질의 분비를 조절하는 바가 보고되어 있다. 아직 인체 유래 질병에는 문헌상 검토된 적이 없으며, 알츠하이머병에서 역시 가돌리늄 이온이 예방 및 치료의 용도로 탐색된 적이 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 10-1856838
(특허문헌 0002) 한국등록특허 10-2187922

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 따라서, 본 발명은 상기한 실정을 고려하여 종래 기술들에서 야기되는 여러 가지 결점 및 문제점들을 해결하고자 하는 것으로서, 알츠하이머병의 원인 물질인 베타 아밀로이드의 농도를 감소시키는 효과를 가지는 가돌리늄 이온을 포함하는 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 따르면, 가돌리늄 이온을 유효성분으로 포함하는

알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학 조성물이 제공될 수 있다.

- [0011] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 가돌리늄 이온은, 가돌리늄 이온의 약학적 허용 가능한 염으로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 가돌리늄 이온의 약학적 허용 가능한 염은, 할로겐화 가돌리늄, 산화가돌리늄 및 수산화가돌리늄 중 적어도 어느 하나일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 가돌리늄 이온은 베타 아밀로이드 단백질의 분비를 저하시키는 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학 조성물이 제공될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 가돌리늄 이온을 유효성분으로 포함하는 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이 제공될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 신경퇴행성 질환은 파킨슨병, 피크병, 헌팅톤병, 다발성 경화증, 간질, 중풍, 뇌졸중, 허혈성 뇌질환, 기억력 감퇴, 외상성 중추 신경계 질환, 척수 손상 질환, 말초신경손상, 근위축성 측색 경화증, 말초신경질환, 행동 장애, 발달 장애, 정신 지체, 다운증후군 또는 정신분열증으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 가돌리늄 이온을 유효성분으로 포함하는 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물이 제공된다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명의 알츠하이머병 예방 또는 치료용 약학 조성물은 가돌리늄 이온을 유효성분으로 함유하고 있어 세포에 독성이 없고 알츠하이머병의 원인 물질인 베타 아밀로이드의 농도를 감소시키는 효과가 있으며, 이에 따라, 알츠하이머병 및 신경 퇴행성 질환의 치료에도 유용한 약학 조성물을 제공할 수 있는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 APP (amyloid precursor protein, 아밀로이드 전구 단백질)의 프로세싱에 의한 APP cleavage(절단)와 그 확인 방법에 관한 것이다. 위쪽의 sAPP(수용성 APP)는 세포 외 공간으로 분비된다. 이는 배지에서 22C11 항체[빨간색]를 통해서 총 sAPPs (sAPP α + sAPP β)를 검출할 수 있으며, 2B3항체[주황색]는 sAPP α 만 검출할 수 있다. 세포 내에서는 A8717[녹색] 혹은 Y188[파란색] 항체를 이용하여 사이즈에 따라 CTF (C-terminal fragments) 및 APP-FL(full length of APP)를 검출할 수 있다. CTF 중 C83은 알파 세크리타아제에 의하여 생성되며, C89와 C99는 베타 세크리타아제에 의하여 생성되며, AICD(APP intracellular domain)는 감마 세크리타아제에 의해 생성된다. 베타 및 감마 세크리타아제의 활성은 베타 아밀로이드의 생성을, 감마 세크리타아제의 활성은 베타 아밀로이드의 감소를 초래하게 된다.
- 도 2는 베타 아밀로이드를 배양액으로 분비할 수 있는 알츠하이머병 세포 모델인 HEK293-APPsw 세포주에 가돌리늄 이온을 농도별로 처리했을 때, LDH release assay를 통해 유의한 세포 독성이 보이지 않는 것을 확인한 것이다.
- 도 3은 베타 아밀로이드를 배양액으로 분비할 수 있는 알츠하이머병 세포 모델인 HEK293-APPsw 세포주에 가돌리늄 이온을 농도별로 처리했을 때, MTT reduction assay를 통해 유의한 세포 독성이 보이지 않는 것을 확인한 것이다.
- 도 4는 상기 세포 모델에 가돌리늄 이온을 농도별로 처리하였을 때, 배양액으로 분비된 베타 아밀로이드 1-40과 1-42가 농도별로 감소함을 보여 주는 것을 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)을 통해 확인한 것이다.
- 도 5는 상기 베타 아밀로이드 감소 효과가 베타 아밀로이드 생성 효소 중 알파 세크레타아제의 활성의 증가되고, soluble APPs(sAPPs)의 분비가 저해됨에 의해 따른 것임을 western blot analysis로 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선

의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원 시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

- [0021] 본 발명의 일 실시예에 따라, 가돌리늄 이온을 유효성분으로 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학 조성물이 제공된다.
- [0022] 본 명세서 전체에서 사용되는 용어 "예방"은 알츠하이머병을 억제시키거나 발생을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0023] 또한, 본 명세서 전체에서 사용되는 용어 "치료"는 상기 조성물의 투여에 의해 알츠하이머 병에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0024] 본 명세서 전체에서 사용되는 용어 "가돌리늄(Gadolinium)"은 희토류에 해당되는 금속(Gd)으로, 원자번호 64번의 원소로서, 산, 알칼리, 금속에 반응하여 주로 3가의 양이온(Gd^{3+} 혹은 $Gd[III]$)을 생성하게 되며, 이 이온은 다양한 용도로 활용된다.
- [0025] 이때, 본 발명의 일 실시예에 따라 상기 가돌리늄 이온은, 가돌리늄 이온의 약학적 허용 가능한 염으로부터 유래된 것일 수 있으며, 본 명세서 전체에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 투여용량에서 무독한 염을 의미하여, 무기산, 유기산 또는 무독성 염류 등의 통상 사용되는 염을 포함한다.
- [0026] 본원에서 상기 무기산의 예로는 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요오드화수소산, 아질산, 아인산이 있으나, 이에 제한되지 않으며, 상기 유기산의 예로는 아세트산, 락트산, 구연산, 말산, 숙신산, 푸마르산, 말레산, 주석산, 벤조산, 프탈산, 클루콘산, 삭카린산, 메탄 술폰산(methane sulphonc acid), 에탄 이술폰산(ethane disulphonic acid), 지방족 모노 및 디카복실레이트(aliphatic mono and dicarboxylate), 페닐-치환된 알카노에이트(phenylsubstituted alkanoate), 하이드록시 알카노에이트(hydroxy alkanoate) 및 알칸디오에이트(alkanedioate), 방향족 산류(aromatic acid), 지방족 및 방향족 설폰산류(aliphatic and aromatic sulfonic acid)가 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 상기 무독성 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디하이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 베타-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트, 또는 만텔레이트가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 이때, 바람직한 일 실시예에 따라, 상기 가돌리늄 이온의 약학적 허용 가능한 염은, 할로젠화 가돌리늄, 산화가돌리늄 및 수산화가돌리늄 중 적어도 어느 하나일 수 있으며, 더 바람직한 예로 할로젠화 가돌리늄일 수 있다.
- [0029] 한편, 본 발명의 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0030] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 본원에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0031] 한편, 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약효를 증가시키지는 않으나 약학적 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 성분을 추가로 포함할 수 있다.

- [0032] 또한, 본원의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 예컨대, 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0034] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0035] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다.
- [0036] 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0037] 한편, 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따라 가돌리늄 이온을 유효성분으로 포함하는 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물이 제공된다.
- [0038] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "신경 퇴행성 질환"은 나이가 들어감에 따라 발생하는 퇴행성 질환 중에서 신경에서 발생하는 질환을 의미하는 것으로, 현재까지 알려지지 않은 원인으로 뇌와 척수의 특정 뇌세포군이 서서히 그 기능을 잃고 뇌신경계의 정보전달에 가장 중요한 뇌신경세포의 사멸, 뇌신경 세포와 뇌신경세포 사이의 정보를 전달하는 시냅스의 형성이나 기능상의 문제, 뇌신경의 전기적 활동성의 이상적 증가나 감소로 인하여 야기되는 것으로 알려져 있다. 뇌와 척수의 신경세포들은 위치에 따라 매우 다양한 기능을 하고 있어 어느 부위의 신경세포들이 먼저 손상되고 기능을 잃어가는냐에 따라, 또 이러한 기능장애가 어떤 형태로 진행되는가에 따라 매우 다양한 임상 양상을 보이게 된다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 있어서, 상기 신경 퇴행성 질환은 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 피크병, 헌팅턴병, 다발성 경화증, 간질, 중풍, 뇌졸중, 허혈성 뇌질환, 기억력 감퇴, 외상성 중추 신경계 질환, 척수 손상 질환, 말초신경 손상, 근위축성 측색 경화증, 말초신경질환, 행동 장애, 발달 장애, 정신 지체, 다운증후군 또는 정신분열증으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 본 발명의 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물은 유효한 양으로 투여할 수 있다.
- [0041] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 감염된 바이러스 종류, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물 또는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염은 각각 1일 00001 내지 1000 mg/kg으로, 바람직하게는 0001 내지 100 mg/kg으로 투여할 수 있다.
- [0042] 상기 투여는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 구체적으로, 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하 주사, 정맥 주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0043] 본원의 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 매일 투여 또는 간헐적으로 투여해도 좋고, 1일당 투여 횟수는 1회 또는 2~3회로 나누어 투여하는 것이 가능하다. 두 유효성분이 각각 단제인 경우의 투여횟수는 같은 횟수여도 좋고, 다른 횟수로 해도 된다. 또한, 본원의 약학적 조성물은 신경계 질환의 예방 또는 치

료를 위하여 단독으로, 또는 다른 약물 치료와 병용하여 사용할 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0044] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따라, 가돌리늄 이온을 유효성분으로 포함하는 신경 퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물이 제공된다.

[0045] 본원 명세서 전체에서 사용되는 용어 "건강기능(성) 식품(functional food)"은 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로서, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 기능(성)이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본원의 건강기능식품 조성물은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 건강기능식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 식품은 면역증진 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다. 건강 식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강보조 목적의 식품을 의미한다. 경우에 따라, 건강기능식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다.

[0046] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0047] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 건강기능식품 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 건강기능식품 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니솔(BHA), 부틸히드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.

[0050] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 경 퇴행성 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능 식품 중의 상기 조성물의 양은 전체 식품 중량의 01 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 유지를 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0051] 본원의 일 실시예에 따른 건강기능식품 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 유효물질을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본원의 건강기능식품 조성물 100당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 본원의 일 실시예에 따른 건강기능식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본원의 건강기능식품 조성물은 천연 과일주스 및 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0053] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본원의 건강기능식품 조성물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0055] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0057] HEK293-APPsw 세포주의 확립

[0058] 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. 이를 통하여 만들어진 안정적인 군체는 웨스턴블랏 분석을 통해 APPsw 단백질 발현 여부와 배양액에서의 베타-아밀로이드 1-40/1-42의 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay; Biosource, USA)를 통하여 확인하였다.

[0060] 세포배양 및 가돌리늄 이온의 처리

[0061] 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. 12-웰 플레이트에 70~80% 포화되도록 세포를 배양한 후, 다음날 DPBS로 한 번 씻었다. 1% FBS를 넣은 DMEM 배지를 각 웰에 1ml씩 가하였다. gadolinium 이온은 25, 50, 100 μ M의 농도가 되도록 1% FBS를 첨가한 DMEM 배지에 희석하여 각 웰에 처리하였다. 48시간 후, 배지 및 세포들을 수거하여 베타-아밀로이드 1-40/1-42의 ELISA 및 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다.

[0063] 가돌리늄 이온의 세포 독성 실험

[0064] MTT reduction assay와 LDH release assay를 통하여 세포 독성을 측정하였다. MTT reduction assay는 살아있는 세포내의 미토콘드리아의 산화 환원 능력을 측정하는 것이며, LDH release assay는 죽은 세포는 세포막이 손상될 경우 세포안의 LDH 효소가 배지로 세어나오는 것을 이용하여 세포의 손상된 양을 측정하는 것이다. MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide 분석을 통해서 세포독성을 측정하였으며, 농도별의 가돌리늄 이온을 8시간 처리한 후, 5mg/mL의 MTT 용액을 1/5로 배양액에 처리하여 1시간 반응시킨 후, 배양액을 제거하고 DMSO로 첨가하여 용해시켰다. 용해된 샘플은 570nm에서 96 웰 분광광도계(molecular probe, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. LDH release assay는 Takara 사의 LDH cytotoxicity detection kit를 통해 측정하였으며, 농도별의 가돌리늄 이온을 8시간 처리한 후, 배양된 세포 배지와 LDH 효소 기질을 1:1로 실온에서 30분~1시간 반응시켜, 492nm에서 96 웰 분광광도계(molecular probe, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

[0065]

[0066] 배지에서 베타-아밀로이드의 ELISA 분석

[0067] 농도별의 가돌리늄 이온을 8시간 처리한 배지 시료에서 베타-아밀로이드 1-40과 1-42의 양을 ELISA (Invitrogen) 키트를 이용하여 수행하였다. 적정 비율로 희석 (2~20배)한 배지를 일차 항체와 각각 50 μ l씩 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 (tetrametyhybenzidine) 용액으로 발색시킨 후, 0.01N HCl 용액으로 고정시키고 96 웰 ELISA 플레이트

(Thermo)로 450nm의 흡광도에서 발색 정도를 측정하였다. 측정된 값은 미리 녹여둔 베타-아밀로이드의 표준곡선에 대입하여, 배지의 베타-아밀로이드 양을 계산하였다.

[0069] 가돌리늄 이온에 의한 변화 측정을 위해 western blot을 통한 APP processing의 확인

[0070] 가돌리늄 이온을 처리한 후 APP processing을 확인하기 위하여, 세포 및 배지를 이용하여 western blot을 수행하였다. 배지의 경우는 sAPP의 양을 측정하기 위하여, 8 μ l의 배지를 2 μ l의 5x sample buffer에 섞어 끓인 후, 8% acrylamide gel에 로딩하였다. 세포의 경우는 APP 및 APP-CTF (C-terminal fragment) 측정을 위해서 10mM Tris (pH 7.4), 150mM NaCl, 1% SDS 및 protease inhibitor와 phosphatase inhibitor가 포함된 완충액으로 용해한 후, 초음파 파쇄를 통하여 시료를 얻었다. 얻어진 시료는 5x sample buffer에 섞어 끓여 로딩한 후, 15 및 8% acrylamide gel을 통하여 전기영동을 하였다. 이렇게 전기영동한 두 종류의 시료는 100V에서 약 2시간 전기영동 한 후, 젤을 PVDF membrane에 100V에서 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)와 anti-soluble APP α (2B33; sAPP α 또는 sAPP α)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), anti-soluble APP α 항체를 사용하였다. 검출은 ECL (Enhanced chemiluminescence)과 LAS4000 화학발광탐지기 (GE healthcare)를 이용하여 확인하였다. 얻은 이미지는 이미지 J 소프트웨어 (NIH, USA)를 이용하여 정량화하였다. 웨스턴블롯 분석에 사용한 항체의 검출 원리는 도 1과 같다. 상기 결과에서 CTF의 검출에서 C83은 알파 세크레타아제의 활성을, C89 및 C99는 베타 세크레타아제의 활성을, AICD는 감마 세크레타아제 활성을 나타낸다.

[0072] 결과 1 : LDH release assay에 의한 가돌리늄 이온의 독성 확인

[0073] 가돌리늄 chloride(GdCl₃)를 25, 50, 100 μ M 농도별로 HEK293-APPsw 세포주에 처리하여 LDH release 분석하였을 때 세포사 (cell death)의 변화가 관찰되지 않았다. 이로부터 사람 유래 세포에서 가돌리늄 이온이 독성을 나타내지 않음을 알 수 있다 (도 2).

[0075] 결과 2 : MTT reduction assay에 의한 가돌리늄 이온의 독성 확인

[0076] 가돌리늄 chloride(GdCl₃)를 25, 50, 100 μ M 농도별로 HEK293-APPsw 세포주에 처리하여 MTT 분석하였을 때 세포 생존 (cell viability)의 변화가 관찰되지 않았다. 이로부터 사람 유래 세포에서 가돌리늄 이온이 독성을 나타내지 않음을 알 수 있다 (도 3).

[0078] 결과 3 : 가돌리늄 이온 처리에 따른 베타 아밀로이드 분비 농도 변화

[0079] 가돌리늄 chloride(GdCl₃)를 25, 50, 100 μ M 농도별로 HEK293-APPsw 세포주에 처리한 후 세포 배양액에서 베타 아밀로이드의 농도를 ELISA로 확인하였다. 베타 아밀로이드 중 가장 많이 존재하는 타입인 1-40과 1-42를 조사한 결과, 두 타입 모두 가돌리늄 이온 농도 증가에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 해당 농도에서 결과 1과 2에서처럼 독성을 보이지 않은 것을 감안해 볼 때, 베타 아밀로이드 1-40 및 1-42에서 각각 약 80% 및 65%의 베타 아밀로이드 농도가 감소하였음을 확인하였다 (도 4).

[0081] 결과 4 : APP 프로세싱의 활성 조사

[0082] 상기 베타 아밀로이드 농도 실험에서 보인 베타 아밀로이드 감소 효과의 원인을 분석하기 위해서 APP 프로세싱의 절단 패턴을 western blot을 통해 조사하였다. 도 1과 같이 베타-세크레타아제의 활성은 베타 아밀로이드 외에 배양액으로 분비되는 수용성 APP β 를, 세포 내에는 CTF β 를 만들게 되며, 알파-세크레타아제의 활성화는 배양액에서는 수용성 APP α 와 세포내 CTF α 를 만들게 되고, 감마 세크레타아제의 활성은 세포 내에서 AICD를 만들

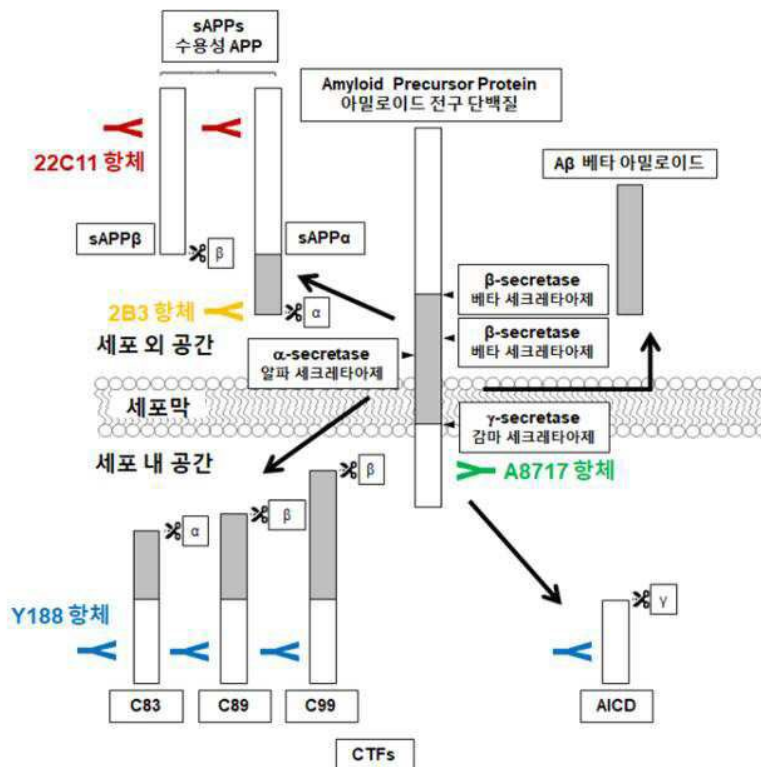
게 된다. 세포에 100 μ M 가돌리늄 이온 처리를 한 후, 우선 세포 내에서는 Y188 항체를 통해 CTF의 증감을 분석하였을 때, C83, C89, AICD가 증가함을 관찰하였다. 알파, 베타, 감마 세크리타아제의 활성이 모두 증가하였고, 베타 아밀로이드가 결과3에서 감소하였기 때문에, 이 감소는 알파 세크리타아제의 활성 증가에 기인한 것으로 판단할 수 있다. 또한, 배양액에서 22C11 항체를 이용하여 총 수용성 APP (sAPPs: 수용성 APP α + 수용성 APP β)와 2B3 항체를 이용하여 수용성 APP α 를 측정하였을 때, 100 μ M 가돌리늄 이온 처리에 의해 수용성 APP α 및 APP β 모두 분비되지 않음을 알 수 있었다. 따라서 상기 결과 3의 베타 아밀로이드 농도 감소는 알파 세크리타아제의 활성 증가 및 수용성 APP의 세포 외 분비 감소에 기인한 것으로 판단할 수 있다 (도 5).

[0084]

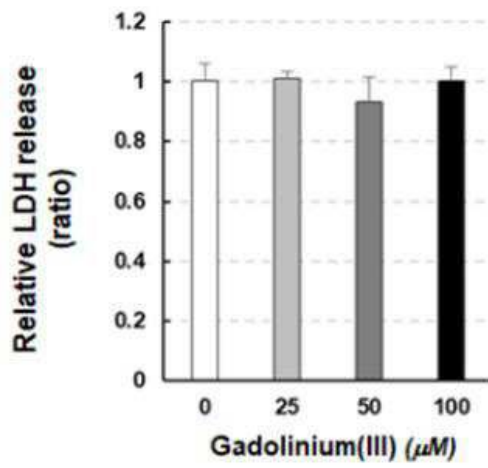
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

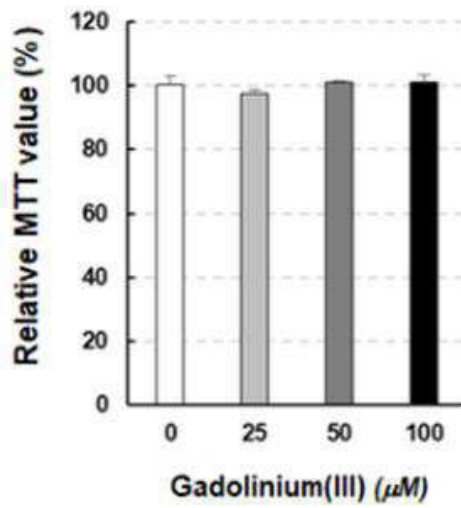
도면1



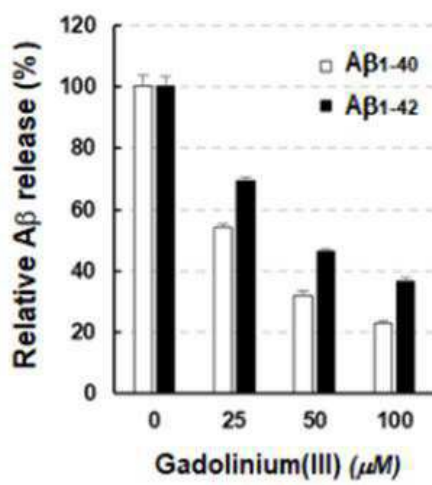
도면2



도면3



도면4



도면5

