

(43) 공개일자 2024년08월08일

- (71) 출원인

건양대학교산학협력단

- 충청남도 논산시 대학로 121 (내동)

(72) 발명자

문민호

- 대전광역시 서구 원도안로 100, 110동 1701호

- 신수정

대전광역시 유성구 지족북로 33, 104동 2405호

- (74) 대리인

강성혜

(54) 발명의 명칭 퇴행성 신경질환 치료 후보물질의 효능 평가 분석 플랫폼

본 발명은 알츠하이머성 치매에 초점을 맞춰, 알츠하이머성 치매 치료제 후보 물질에 대하여 무세포 (Cell-free) 분석, 인 실리코 분석, 인 비트로 분석 그리고 인 비보 분석을 통해 지금까지 밝혀진 다양한 치매 발병 유발 인자들에 대한 후보 물질의 치료 효능을 비임상 방법으로 평가 및 분석하는 방법을 제공한다.

[illegible]

명세서

청구범위

청구항 1

가) 후보 물질에 대하여 인 실리코 실험을 수행하여 후보 물질과 아밀로이드 베타 및 타우와의 분자 도킹을 시험하는 단계;

나) 인 실리코 실험 단계에서 후보 물질과 아밀로이드 베타 및 타우 중 하나 이상의 분자 도킹이 가능하다는 결과가 나온 경우 인 비트로 실험을 진행하되, 상기 인 비트로 실험은 세포를 사용하지 않는 인 비트로 실험과 세포 기반 인 비트로 실험을 각각 수행하는 단계; 및

다) 세포를 사용하지 않는 인 비트로 실험 또는 세포 기반 인 비트로 실험을 수행한 결과 효과가 있는 경우 인 비보 실험을 수행하는 단계;를 포함하며,

상기 다) 단계의 인 비보 실험에서는 아밀로이드 베타, 타우의 병리 분석 및 알츠하이머병 병리 분석을 수행하고, 3xTg 마우스와 5XFAD 마우스에서 각각 인 비보 실험을 수행하여 후보 물질이 마우스에서 알츠하이머 개선효과를 나타내는지 시험하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 나) 단계에서 세포를 사용하지 않는 인 비트로 실험은

i) 티오플라빈 T 분석 (Thioflavin T assay) 수행에 따른 A β 응집 억제 실험 수행 결과에 따라 "A β 응집 억제 효능 있음"과 "A β 응집 억제 효능 없음"으로 나누는 단계; 및

ii) A β 응집체 분해 실험 수행 결과에 따라 "A β 응집체 분해 효능 있음"과 "A β 응집체 분해 효능 없음"으로 나누는 단계;를 포함하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 나) 단계에서 세포를 사용하지 않는 인 비트로 실험은

i) 티오플라빈 T 분석 (Thioflavin T assay)수행에 따른 Tau 응집 억제 실험 수행 결과에 따라 "Tau 응집 억제 효능 있음"과 "Tau 응집 억제 효능 없음"으로 나누는 단계; 및

ii) Tau 응집체 분해 실험 수행 결과에 따라 "Tau 응집체 분해 효능 있음"과 "Tau 응집체 분해 효능 없음"으로 나누는 단계;를 포함하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 나) 단계에서 세포 기반 인 비트로 실험은

i) HT-22 세포, BV2 세포, APP-H4 세포 및 HEK293 바이오센서 세포에 대하여 WST-1 분석으로 각 세포에 대하여 약물 독성을 확인하는 단계; 및

ii) 상기 i) 단계에서 약물 독성이 없는 것으로 확인된 경우 A β 병리 실험, Tau 병리 실험 및 알츠하이머병 관련 병리 실험 중 하나 이상을 수행하는 단계;를 포함하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석

플랫폼.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 A β 병리 실험은 후보 물질이 A β 생성, A β 축적 및 A β 분해 중 어느 하나 이상에 관여하는지를 시험하는 것인, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼.

청구항 6

청구항 4에 있어서,

상기 Tau 병리 실험은 후보 물질이 Tau 과인산화에 관여하는지 여부, Tau 과인산화 효소에 관여하는지 여부, Tau 전파에 관여하는지 여부 중 하나 이상을 시험하는 것인, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼.

청구항 7

청구항 4에 있어서,

상기 알츠하이머병 관련 병리 실험은 후보 물질이 신경세포사 관여 여부, 시냅스 손상 관여 여부, 신경염증 관여 여부, 미토콘드리아 기능 관여 여부, 자가포식작용 관여 여부 중 하나 이상을 시험하는 것인, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 다) 단계의 인 비보 실험은 Tau 병리학 시험을 하는 경우 3xTg 마우스를 이용한 행동 테스트를 수행하고, Tau 병리학 시험을 하지 않는 경우 5XFAD 마우스를 이용한 행동 테스트를 수행하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 3xTg 마우스를 이용한 행동 테스트는 Y-maze에서 효과가 보였는가? NORT에서 효과가 보였는가? 및 PAT에서 효과가 보였는가?를 각각 시험하되,

Y-maze에서 효과가 보인 경우 단기 기억 개선에 효과가 있다고 판정하는 단계;

NORT 및 PAT에서 효과가 보인 경우 장기 기억 개선에 효과가 있다고 판정하는 단계;

PAT에서 효과가 없는 경우 장기 기억 개선에 효과가 없다고 판정하는 단계; 및

NORT에서 효과가 없는 경우 장기 기억 개선에 효과가 없다고 판정하는 단계;를 포함하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼.

청구항 10

청구항 8에 있어서,

상기 3xTg 마우스를 이용한 행동 테스트 완료 후 $A\beta$, Tau 및 알츠하이머병 관련 병리학 시험을 수행하는 단계;를 수행하되,

상기 $A\beta$ 병리학 실험은 $A\beta$ 생성 효과 여부, $A\beta$ 분해 효과 여부, $A\beta$ 축적 효과 여부 중 하나 이상을 수행하여 각각의 결과를 확인하는 단계;

상기 Tau 병리학 실험은 Tau 과인산화 효과 여부, Tau 탈인산화 효과 여부, Tau 응집 효과 여부 중 하나 이상을 수행하여 각각의 결과를 확인하는 단계; 및

상기 알츠하이머병 관련 병리학 시험은 신경세포 사멸에 효과 여부, 시냅스 손상 효과 여부, 신경 염증에 효과 여부, 미토콘드리아 기능 관여 여부, 자가포식작용 관여 여부 중 하나 이상을 수행하여 각각의 결과를 확인하는 단계;를 포함하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼.

청구항 11

청구항 8에 있어서,

상기 5XFAD 마우스를 이용한 행동 테스트를 수행하는 경로의 경우 행동 테스트 완료 후 Tau 병리학 실험은 수행하지 않고, $A\beta$ 및 알츠하이머병 관련 병리학 시험을 수행하는 단계를 포함하되,

상기 $A\beta$ 병리학 실험은 $A\beta$ 생성 효과 여부, $A\beta$ 분해 효과 여부, $A\beta$ 축적 효과 여부 중 하나 이상을 수행하여 각각의 결과를 확인하는 단계; 및

상기 알츠하이머병 관련 병리학 시험은 신경세포 사멸에 효과 여부, 시냅스 손상 효과 여부, 신경 염증에 효과 여부, 미토콘드리아 기능 관여 여부, 자가포식작용 관여 여부 중 하나 이상을 수행하여 각각의 결과를 확인하는 단계;를 포함하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼.

청구항 12

청구항 8 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

상기 단계를 거쳐 후보 물질이 단기 기억 개선 또는 장기 기억 개선에 효과가 있는지 여부를 확인하고,

상기 수행된 $A\beta$ 및 알츠하이머병 관련 병리학 시험, 또는 $A\beta$, Tau 및 알츠하이머병 관련 병리학 시험을 통해 $A\beta$ 및 알츠하이머병 관련 병리학 또는 $A\beta$, Tau 및 알츠하이머병 관련 병리학에서 후보 물질이 어떤 기작에 관여하는지를 확인하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼.

청구항 13

청구항 1에 있어서,

다) 단계의 인 비모 실험에서 실험동물의 병기를 나누어 치매 환자 등급인 CDR과 연계하여 효능분석을 시행하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼.

청구항 14

청구항 13에 있어서,

상기 실험동물의 병기는 5XFAD 마우스의 경우 4~5개월령은 전구 치매, 6~7개월령은 경증 치매, 8~10개월령은 중등도 치매, 11개월령 이상은 중증 치매에 해당하는 것으로 규정하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼.

청구항 15

청구항 13에 있어서,

상기 실험동물의 병기는 3xTg 마우스의 경우 6~7개월령은 전구 치매, 8~11개월령은 경증 치매, 12~14개월령은 중등도 치매, 15개월령 이상은 중증 치매에 해당하는 것으로 규정하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 퇴행성 신경질환 치료 후보물질의 효능 평가 분석 플랫폼에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 한국에서는 인구의 초고령화 시대 진입과 함께 치매 환자 수가 급증하고 있다. 이에 따라, 2050년에는 치매의 관리를 위한 진료비와 사회적 비용이 GDP 대비 1.5%까지 증가할 것으로 예상된다. 치매는 거대한 시장임과 동시에 국가적 비용과 책임이 뒤따른다.

[0003] 국외 기술 수준 및 시장 현황을 살펴보면, 치매 원인물질인 아밀로이드 베타와 타우뿐만 아니라, 자식작용, 라이소좀 등 새로운 기전을 통해 치매 치료에 접근하고 있다. 그러나 다국적 기업들과 제약사들의 거대한 R&D 투자에도 불구하고 치매에 대한 근본적인 치료제가 없는 상황이다. 2016년 일라이릴리사의 솔라네주맵의 실패로 인해 치매의 조기진단과 조기치료의 필요성이 대두되었으며, 치료 타겟의 스펙트럼 확대가 요구되고 있다.

[0004] 이미 우리나라는 90대 이상 노인의 10명 중 3명이 치매로서, 인구 고령화 시기에 접어들어 따라 지난 5년 사이 약 16만 4천명의 진료인원 증가와 약 7,630억원의 진료비가 증가되었으며, 치매가 사회-경제적 문제로 대두되고 있다. 치매의 다양한 원인들 중에서도 가장 큰 비중을 차지하는 것은 '알츠하이머형 치매'로 50세 이상 진료인원의 약 72%에 달한다. 전 세계 85세 이상 인구의 3명 중 1명이 알츠하이머형 치매에 해당하며 국내 사망 원인 10위, 미국 내 사망원인 6위를 차지한다. 가장 진료비가 비싼 이 질병은 개인과 가족 그리고 사회에 막대한 영향을 미친다.

[0005] 전 세계 수많은 회사들이 제시한 알츠하이머형 치매의 유력한 원인 물질인 아밀로이드베타 (A β)를 타겟으로 하는 신약 후보물질들의 잇단 실패로 인해, 단일 기전에 국한되지 않는 다양한 병리원인에 대한 이해가 요구되고 있다.

[0006] 알츠하이머병에 대한 비임상 및 세포 수준의 임상 스크리닝 플랫폼을 구축한다면, 다양한 후보 물질들의 치매에 대한 범용성 높은 효능 검증과 병리기전의 규명이 가능해지므로 신규 치료 후보물질 발굴 및 임상 단계 진출 가능성을 증진시킬 수 있을 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 알츠하이머병 동물 모델인 5XFAD 마우스, 3xTg 마우스로부터 A β /Tau의 축적 및 이에 따른 신경염증, 신경세포사, 인지기능 장애를 확인하는 방법을 조합하여 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능을 평가 분석하는데 유용한 플랫폼을 발명하였다. 또한, 본 발명은 다양한 상태의 알츠하이머병 환자에 대응하는 다양한 치매 정도를 반영한 동물 모델을 확립하였다.

[0009] 본 발명은 이를 바탕으로 다양한 치매의 종류 중에서도 절반 이상을 차지하는 '알츠하이머병'에 초점을 맞춰, 알츠하이머병 치료제 후보물질에 대하여 무세포 (Cell-free) 분석, 인 실리코 분석, 인 비트로 분석 그리고 인 비보 분석을 통해 지금까지 밝혀진 다양한 치매 발병 유발 인자들에 대한 후보 물질의 치료 효능을 비임상 방법으로 평가 및 분석하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 위와 같이 구축된 시스템에 알츠하이머병 치료제로서의 가능성을 갖고 있는 수많은 후보 물질들을 적용함으로써, 특정 후보 물질의 알츠하이머병에 대한 효능을 한 흐름에 파악할 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 위와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들은 먼저 후보물질에 대하여 인 실리코 실험을 수행하여 후보물질과 아밀로이드 베타 및 타우와의 분자 도킹을 시험한다. 인 실리코 실험 단계에서 분자 도킹이 가능하다는 결과가 나오면, 이후 인 비트로 실험을 진행한다. 인 비트로 실험에서는 세포를 사용하지 않는 인 비트로 실험과 세포 기반 인 비트로 실험을 각각 수행하여 후보물질과 아밀로이드 베타 및 타우의 상호작용 및 병리효과를 분석한다. 최종적으로, 인 비보 실험에서 아밀로이드 베타, 타우의 병리 분석 및 알츠하이머병 병리 분석을 수행한다. 3xTg 마우스와 5XFAD 마우스에서 각각 인 비보 실험을 수행하여 후보물질이 마우스에서 알츠하이머 개선효과를 나타내는지를 시험한다.
- [0013] 본 발명은 이와 같은 순차적인 실험의 조합을 통하여 알츠하이머성 치매 치료 및/또는 개선용 후보물질이 치료 및/또는 개선 작용을 하는지, 어떤 기작으로 효능을 나타내는지 등을 분석할 수 있다.
- [0015] 본 발명은
- [0016] 가) 후보 물질에 대하여 인 실리코 실험을 수행하여 후보 물질과 아밀로이드 베타 및 타우와의 분자 도킹을 시험하는 단계;
- [0017] 나) 인 실리코 실험 단계에서 후보 물질과 아밀로이드 베타 및 타우 중 하나 이상의 분자 도킹이 가능하다는 결과가 나온 경우 인 비트로 실험을 진행하되, 상기 인 비트로 실험은 세포를 사용하지 않는 인 비트로 실험과 세포 기반 인 비트로 실험을 각각 수행하는 단계; 및
- [0018] 다) 세포를 사용하지 않는 인 비트로 실험 또는 세포 기반 인 비트로 실험을 수행한 결과 효과가 있는 경우 인 비보 실험을 수행하는 단계;를 포함하며,
- [0019] 상기 다) 단계의 인 비보 실험에서는 아밀로이드 베타, 타우의 병리 분석 및 알츠하이머병 병리 분석을 수행하고, 3xTg 마우스와 5XFAD 마우스에서 각각 인 비보 실험을 수행하여 후보 물질이 마우스에서 알츠하이머 개선효과를 나타내는지를 시험하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼에 관한 것이다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 나) 단계에서 세포를 사용하지 않는 인 비트로 실험이
- [0021] i) 티오플라빈 T 분석 (Thioflavin T assay) 수행에 따른 A β 응집 억제 실험 수행 결과에 따라 "A β 응집 억제 효능 있음"과 "A β 응집 억제 효능 없음"으로 나누는 단계; 및
- [0022] ii) A β 응집체 분해 실험 수행 결과에 따라 "A β 응집체 분해 효능 있음"과 "A β 응집체 분해 효능 없음"으로 나누는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼에 관한 것이다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 나) 단계에서 세포를 사용하지 않는 인 비트로 실험이
- [0024] i) 티오플라빈 T 분석 (Thioflavin T assay)수행에 따른 Tau 응집 억제 실험 수행 결과에 따라 "Tau 응집 억제 효능 있음"과 "Tau 응집 억제 효능 없음"으로 나누는 단계; 및
- [0025] ii) Tau 응집체 분해 실험 수행 결과에 따라 "Tau 응집체 분해 효능 있음"과 "Tau 응집체 분해 효능 없음"으로 나누는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼에 관한 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명은 상기 나) 단계에서 세포 기반 인 비트로 실험이
- [0027] i) HT-22 세포, BV2 세포, APP-H4 세포 및 HEK293 바이오센서 세포에 대하여 WST-1 분석으로 약물 독성을 확인하는 단계; 및
- [0028] ii) 상기 i) 단계에서 약물 독성이 없는 것으로 확인된 경우 A β 병리 실험, Tau 병리 실험 및 알츠하이머병 관련 병리 실험 중 하나 이상을 수행하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼에 관한 것이다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 A β 병리 실험에서 후보 물질이 A β 생성, A β 축적 및 A β 분해 중 어느 하나 이상에 관

여하는지를 시험하는 것을 특징으로 하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼에 관한 것이다.

- [0030] 또한, 본 발명은 상기 Tau 병리 실험에서 후보 물질이 Tau 과인산화에 관여하는지 여부, Tau 과인산화 효소에 관여하는지 여부, Tau 전파에 관여하는지 여부 중 하나 이상을 시험하는 것을 특징으로 하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼에 관한 것이다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 알츠하이머병 관련 병리 실험에서 후보 물질이 신경세포사 관여 여부, 시냅스 손상 관여 여부, 신경염증 관여 여부, 미토콘드리아 기능 관여 여부, 자가포식작용 관여 여부 중 하나 이상을 시험하는 것을 특징으로 하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼에 관한 것이다.
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 다) 단계의 인 비보 실험에서 Tau 병리학 시험을 하는 경우 3xTg 마우스를 이용한 행동 테스트를 수행하고, Tau 병리학 시험을 하지 않는 경우 5XFAD 마우스를 이용한 행동 테스트를 수행하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼에 관한 것이다.
- [0033] 또한, 본 발명은 상기 3xTg 마우스를 이용한 행동 테스트에서 Y형 미로 (Y-maze)에서 효과가 보였는가? NORT ((Novel object recognition test)에서 효과가 보였는가? 및 PAT (Passive avoidance test)에서 효과가 보였는가?를 각각 시험하되,
- [0034] Y-maze에서 효과가 보인 경우 단기 기억 개선에 효과가 있다고 판정하는 단계;
- [0035] NORT 및 PAT에서 효과가 보인 경우 장기 기억 개선에 효과가 있다고 판정하는 단계;
- [0036] PAT에서 효과가 없는 경우 장기 기억 개선에 효과가 없다고 판정하는 단계; 및
- [0037] NORT에서 효과가 없는 경우 장기 기억 개선에 효과가 없다고 판정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼에 관한 것이다.
- [0038] 또한, 본 발명은 상기 3xTg 마우스를 이용한 행동 테스트 완료 후 A β , Tau 및 알츠하이머병 관련 병리학 시험을 수행하는 단계;를 수행하되,
- [0039] 상기 A β 병리학 실험은 A β 생성 효과 여부, A β 분해 효과 여부, A β 축적 효과 여부 중 하나 이상을 수행하여 각각의 결과를 확인하는 단계;
- [0040] 상기 Tau 병리학 실험은 Tau 과인산화 억제 효과 여부, Tau 탈인산화 효과 여부, Tau 응집 억제 효과 여부 중 하나 이상을 수행하여 각각의 결과를 확인하는 단계; 및
- [0041] 상기 알츠하이머병 관련 병리학 시험은 세포 사멸에 효과 여부, 시냅스 손상 효과 여부, 염증에 효과 여부 중 하나 이상을 수행하여 각각의 결과를 확인하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼에 관한 것이다.
- [0042] 또한, 본 발명은 상기 5XFAD 마우스를 이용한 행동 테스트를 수행하는 경로의 경우 행동 테스트 완료 후 Tau 병리학 실험은 수행하지 않고, A β 및 알츠하이머병 관련 병리학 시험을 수행하는 단계를 포함하되,
- [0043] 상기 A β 병리학 실험은 A β 생성 효과 여부, A β 분해 효과 여부, A β 축적 효과 여부 중 하나 이상을 수행하여 각각의 결과를 확인하는 단계; 및
- [0044] 상기 알츠하이머병 관련 병리학 시험은 세포 사멸에 효과 여부, 시냅스 손상 효과 여부, 염증에 효과 여부 중 하나 이상을 수행하여 각각의 결과를 확인하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼에 관한 것이다.
- [0045] 또한, 본 발명은 상기 다) 단계의 인 비보 실험에서 실험동물의 병기를 나누어 치매 환자 등급인 CDR과 연계하여 효능분석을 시행하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼에 관한 것이다.
- [0046] 또한, 본 발명은 상기 실험동물의 병기가 5XFAD 마우스의 경우 4~5개월령은 전구 치매, 6~7개월령은 경증 치매, 8~10개월령은 중등도 치매, 11개월령 이상은 중증 치매에 해당하는 것으로 규정하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼에 관한 것이다.
- [0047] 또한, 본 발명은 상기 실험동물의 병기가 3xTg 마우스의 경우 6~7개월령은 전구 치매, 8~11개월령은 경증 치매, 12~14개월령은 중등도 치매, 15개월령 이상은 중증 치매에 해당하는 것으로 규정하는, 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능 평가 분석 플랫폼에 관한 것이다.

- [0048] 따라서, 후보 물질의 예측 메카니즘 검토 후 알츠하이머병의 각 치매 단계에 따라 후보 물질이 유의미하게 기능할 것으로 예측되는 치매 단계에 해당하는 실험동물 모델을 선택하여 인 비보 동물 실험을 수행할 수 있으므로, 후보 물질의 작용 기작을 분석하는 데 있어서 매우 유용하다.
- [0050] 아래에서는 각 시험 단계의 목적과 구체적인 방법을 좀 더 자세히 설명한다.
- [0051] <세포를 사용하지 않는 인 비트로 실험에서 후보 물질이 A β 응집에 미치는 효능 검증>
- [0052] 개요 및 목적: 알츠하이머병 (AD)의 가장 잘 알려진 병리인자인 아밀로이드 베타 (A β)와 타우단백질은 자가 응집되는 특성을 가지며, 올리고머가 된 A β 는 신경 독성을 나타낸다. 따라서 특정 후보 물질이 A β /tau에 대한 항응집 (anti-aggregation) 능력을 갖는다면 치료 후보물질로서의 가능성이 있다. 다양한 후보 물질들의 A β /tau에 대한 응집 억제능을 세포를 사용하지 않는 인 비트로 실험에서 빠르고 간편하게 스크리닝함으로써, AD 동물모델에 적용 전 알츠하이머 치료제로써의 가능성을 평가하고자 하는 것이다.
- [0053] <세포를 사용하지 않는 인 비트로 분석 시스템을 통한 A β /tau 응집 억제 및 분해 촉진에 대한 후보 물질의 효능 규명>
- [0054] Thioflavin T (Th T) 분석: A β /tau의 응집체의 β -sheet에 결합하여 흡광도를 나타내는 화학 물질 ThT를 이용하여 후보 물질 처리에 따른 응집 변화를 관찰한다.
- [0055] 원자력간현미경 (atomic force microscope, AFM): A β /tau의 응집으로 인한 올리고머형, 섬유형 (fibril) 생성을 관찰하는 방법으로 후보 물질 처리 후 응집의 변화를 확인한다.
- [0056] <알츠하이머병 세포 모델에서 다양한 치매 관련 병리학적 인자들에 대한 후보 물질의 효능 검증>
- [0057] 개요 및 목적: 알츠하이머병의 주요 병리인자 A β 와 tau는 응집과 축적을 통해 다양한 병리학적 증상들을 유발한다. 본 과정에서는 알츠하이머병 세포 모델들을 통해, 알츠하이머병에서 나타나는 다양한 병리학적 증상에 대한 후보 물질들의 효능을 세포 외 (*in vitro*)에서 세포생존력시험 (WST-1 assay), 웨스턴 블롯 (Western blot), 효소면역흡착검사 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 정량적 중합 효소 연쇄 반응 (quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR), 면역세포화학염색 (immunocytochemistry, ICC)을 통해 검증한다. 이 과정을 통해 비임상 및 임상 시험 단계를 위한 투여용량, 효능, 독성, 기전 등 다양한 정보를 얻을 수 있다.
- [0058] 연구 내용: 다양한 알츠하이머병 세포 모델의 확립
- [0059] - 불멸화된 세포주 (immortalized cell line) + A β 올리고머 처리
- [0060] 불멸화된 세포주로는 신경세포: HT-22 (mouse hippocampal neuronal cell), 미세아교세포: BV-2 (murine microglia) 등을 들 수 있다.
- [0061] - 일차 배양 세포 (primary culture) + A β 올리고머 처리
- [0062] - 알츠하이머병 관련 세포주 (stable cell line) 제작
- [0063] 형질주입을 통해 A β 생성에 관여하는 유전적 변이를 세포에 도입한다. 예컨대 과발현 세포 모델 APP-H4 세포 등을 들 수 있다.
- [0064] - 아밀로이드 베타 (A β) 관련 기전에 대한 후보 물질의 효능 평가
- [0065] A β 의 생성과 분해에 관여하는 효소들과 이들에 의한 중간체들을 분석하는 것은 A β 에 대한 효능이 어떠한 기전을 통해 이루어졌는지 규명하는데 용이하다. 따라서 다양한 인자들의 표지자들과 분석 방법들을 통해 후보 물질의 처리에 따른 A β 관련 기전의 변화를 규명하고자 한다.
- [0066] - A β 생성 관련 효소:
- [0067] α -secretase: sAPP (soluble APP fragments) α , APP-CTF (C-terminal fragment) α , ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase)9, ADAM10, ADAM17
- [0068] β -secretase: sAPP β , APP-CTF β , BACE-1 (beta-amyloid cleaving enzyme-1)
- [0069] γ -secretase: AICD (APP intracellular fragment), Nicastrin, Pen-2, PS1-CTF

- [0070] - A β 분해 관련 효소: IDE (insulin-degrading enzyme), Nep (neprilysin), MMP (matrix metalloproteinase)
- [0071] - A β 응집 및 독성 관련:
- [0072] A $\beta_{42/40}$ ratio: A β_{40} 은 가장 흔한 형태이며, A β_{42} 는 응집과 독성이 높기 때문에, 비율을 통해 독성 정도와 A β 의 양을 분석한다.
- [0073] NU1: 세포독성 및 프로테아좀 기능 억제에 관여하는 A β 올리고머의 표지자
- [0074] Thioflavin T assay, AFM
- [0075] <타우 단백질(tau) 관련 기전에 대한 후보 물질의 효능 평가>
- [0076] 미세소관 (microtubule)에 결합하고 구조를 안정화시키는 tau는 알츠하이머병의 또 다른 주요 병리인자이다. 과인산화된 tau는 미세소관으로부터 탈락되어 미세소관의 불안정화를 유발하고, 스스로 응집되어 이중나선섬유 (paired helical filaments, PHF)와 신경원섬유매듭 (neurofibrillary tangle, NFT)을 형성하여 신경사멸을 유도한다. 따라서 이를 통해 후보 물질 처리에 따른 타우의 인산화 변화 양상과 관련 기전을 다양한 표지자들과 분석법을 통해 규명한다.
- [0077] - tau 응집 유도 인산화 장소(phosphorylation site): AT180 (T231/S235), AT8 (S202/T205), AT270 (T181, 12E8 (S262/S356), CP13 (S202), PHF1 (S396/S404) 항체들을 사용하여 분석 (S: 세린, serine, T: 트레오닌, threonine)
- [0078] - tau 과인산화 관련효소:
- [0079] kinase: cdk5, p35, p44/42 (Erk1/2), GSK3 β 와 전체(total form)
- [0080] phosphatase: DUSP6 (3'UTR of dual-specific phosphatase 6), PPP1CA (protein phosphatase 1 catalytic subunit α isoform), Bcl-W (Bcl-2-like protein 2)
- [0081] <A β /tau 유도된 세포 독성에 대한 후보 물질의 효능 평가>
- [0082] - WST-1 assay, LDH (lactate dehydrogenase) assay, DAPI staining 세포예정사 (apoptosis): Caspase-2, Caspase-3, Cytochrome c, TUNEL Necroptosis: RIP1, RIP3, MLKL
- [0083] <A β /tau 유도된 시냅스 손상에 대한 후보 물질의 효능 평가>
- [0084] 알츠하이머병에서 시냅스의 손실은 인지 저하와 가장 관련 있다. A β , 특히 올리고머는 신경영양인자억제와 글루탐산 수용체 세포 내 유입 촉진으로 시냅스 전달을 억압하고, 신경의 수상 돌기(dendritic spines)의 수를 감소시켜 시냅스 가소성 (synaptic plasticity)을 손상시킨다.
- [0085] - 전시냅스 (presynapse): Synaptophysin, Bassoon
- [0086] - 후시냅스 (postsynapse): PSD-95, Homer1
- [0087] - 신경돌기형성 (neurite outgrowth): Tuj1 (neuron-specific β -tubulin)
- [0088] <A β /tau 유도된 염증 상황에 대한 후보 물질의 효능 평가>
- [0089] 알츠하이머 상황에서 미세아교세포 (microglia)는 A β 를 직접 탐식 (phagocytosis)하고 성상교세포 (astrocyte)는 수용체 매개된 내재화를 통해 A β 를 제거한다. 그러나 이들은 모집되고 자극되어 전염증성 사이토카인과 급성 반응물들을 분비하여 신경변성과 BBB (뇌혈관장벽)의 붕괴를 유도한다.
- [0090] - 미세아교세포/성상교세포의 형태학적 활성화: Iba1, GFAP
- [0091] - 전염증성/항염증성 인자: TNF- α , IL-6 / TGF- β , IL-10
- [0092] <A β /tau 유도된 미토콘드리아 기능 장애에 대한 후보 물질의 효능 평가>
- [0093] A β 는 미토콘드리아의 전자전달계의 손상, 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)으로 인한 지질 과산화, 막 손상을 유도하여, 미토콘드리아 기능에 중요한 막 전위를 손상시키고 세포예정사 (apoptosis)를 유도한다.
- [0094] - ROS 분석: mitoSOX, DCFH, DHE,
- [0095] - 통합 막 단백질: VDAC(외막), SDHA(내막),

- [0096] - 막 투과 전위 ($\Delta \psi_M$): JC-1, MitoTracker red CMXRos.
- [0097] <A β 유도된 자가소화작용 (autophagy) 장애에 대한 후보 물질의 효능 평가>
- [0098] 자가소화작용은 ‘자가포식소체 (autophagosome) + 리소좀 (lysosome) = 자가용해소체 (autolysosome)’의 과정을 거친다. A β 를 포함하는 소낭 (follicles)은 리소좀과 함께 가수분해되고 자가포식소체와 리소좀의 융합 (fusion)을 억제한다. 이로 인해 자가포식소체가 자가용해소체로 성숙되지 못하고 축적되며, 자가소화작용을 통한 A β 제거능이 저하된다.
- [0099] - 자가포식소체: LC3, Atg8, p62,
- [0100] - 리소좀: LAMP-1, LysoTracker,
- [0101] - 자가용해소체: 자가포식소체와 리소좀 표지자의 co-localization.
- [0102] <A β /tau 유도된 뇌혈관장벽 (BBB) 손상에 대한 후보 물질의 효능 평가>
- [0103] A β 는 염증 유도, 세포 내 칼슘 유입과 MMPs (matrix metal loproteinases) 발현을 매개로 세포 간 밀착연접 (tight junction) 구조를 손상시켜 BBB의 투과성을 증가시킨다.
- [0104] - 밀착연접: 단층 배양된 bEnd.3 세포에서 ZO-1 (zonula occludin-1)의 발현,
- [0105] <A β /tau 유도된 신경생성 손상에 대한 후보 물질의 효능 평가>
- [0106] 신경생성 (neurogenesis)은 ‘증식 (proliferation)-분화 (differentiation)-성숙 (maturation)-통합 (integration)’의 과정을 거치며, A β 는 모든 과정 간에 억제자로서 작용한다. A β /tau 유도된 신경생성 손상에 대한 후보 물질의 효능 평가에는 성체 랫트의 신경전구세포 (adult rNPCs)를 이용한다.
- [0107] - 증식: CCK8 assay, BrdU, Ki67 (S-phase의 핵에서 특히 증가).
- [0108] - 분화: DCX (Doublecortin, 성숙 신경의 미세소관 관련),
- [0109] - 성숙: NeuN, TuJ1 면역형광염색,
- [0110] - 통합: 시냅스 손상의 표지자와 동일.
- [0111] <인지행동실험을 통한 알츠하이머병 동물모델에서 후보 물질 투여에 따른 인지기능 개선 효과 검증>
- [0112] 알츠하이머병 동물모델에서 손상된 인지기능에 대한 식의약소재의 효능 검증은 임상으로 가기 위한 첫 번째 관문이다. 이 단계는 동물모델 시험 전 효능이 검증된 후보 물질들을 알츠하이머병 동물 모델과 야생형 동물에 투여한 후 주령별로 다양한 인지행동실험을 수행하여, 후보 물질의 기억, 공간, 학습, 우울, 불안, 후각에 대한 효능을 평가하는 단계이다.
- [0113] <알츠하이머병 동물 모델의 확립>
- [0114] 5XFAD 마우스: 다섯 가지 A β 관련 돌연변이 (APP: 3개, PSEN1: 2개)가 신경 특이적 프로모터 Thy-1에 의해 조절되는, A β 로 인한 AD의 병리학적 증상을 빠르고 유사하게 모사한다.
- [0115] 3xTg 마우스: APP, PSEN1, MAPT 3개의 돌연변이가 Thy1, 2 프로모터로 조절된다. 5XFAD 비해 느리지만 A β 반 (plaque)과 tau의 얽힘 (tangle)을 모두 관찰할 수 있다.
- [0116] <알츠하이머병 동물모델에서 후보 물질 처리에 따른 기억, 공간, 학습 평가>
- [0117] - Y-자형 미로(Y-maze) 시험: Y자 형태로 3개의 통로에서 마우스가 들어갔던 통로를 인지하고 다른 통로로 들어가는 정도를 시험하는 것이다. ‘자발적 변경률’을 통해 단기 기억 능력의 평가하고 ‘전체 통로에 들어간 수’를 통해 운동 능력의 변화를 평가한다.
- [0118] - 신물체 탐색시험(novel object recognition, NORT): 정육면체 상자(open field)에 동일한 두 물체를 인식시킨 후, 하나를 새로운 물체로 변경하여 이를 탐색하는 정도를 시험한다. 기존 물체와 새로운 물체에 머문 시간을 정량화하여 산출한 ‘식별척도 (discrimination index)’를 인지 및 장기기억능력의 지표로 한다.
- [0119] - 수동회피실험 (passive avoidance test): 같은 크기의 두개의 방으로 이루어져 있으며 밝은방과 어두운방으로 나누어져 있고 방 사이에는 문이 있다. 어두운 방에는 바닥에 전기 충격 (0.5 mA, 3 s)호르도록 한다. 설치류의 밝은 것을 피하는 습성을 이용하는 실험으로 어두운 곳의 전기충격을 회피하는 시간을 정량화 하여 산출한 값을

이용하여 인지 및 장기기억능력을 평가한다.

[0120] <알츠하이머병 동물모델에서 후보 물질 처리에 따른 후각 능력의 평가>

[0121] - 묻혀진 먹이 탐색시험 (buried pellet test): 깔짚에 먹이를 숨기고 이를 찾으려 하는 시험이다. ‘숨겨진 먹이를 찾는 시간’ 으로 후각 기능을 평가하고, ‘깔짚 위에 둔 먹이를 찾는 시간’ 으로 시각 의존도를 평가한다.

[0122] - 습관화/탈습관화 (habituation/dishabituation)를 통한 후각 기능의 평가: 방향성 농축액 A를 묻힌 숨을 5일간 노출시켜 습관화시킨 후, 6일차에 새로운 방향성 농축액 B에 노출시켜 탈습관화시키는 시험이다. 오랜 기간 반복 노출되면서 냄새 맡는 시간이 감소할 것이며, 새로운 방향성 농축액에서 다시 증가된다.

[0123] <알츠하이머병 동물모델에서 후보 물질 처리에 따른 우울-좌절-불안의 평가>

[0124] - 꼬리 현수법 (tail suspension): 설치류의 머리가 지상에서 약 10 cm 떨어져 있도록 꼬리를 지지대에 고정된 후 이를 극복하는 정도를 시험하는 것이다. 마우스가 움직이지 않은 ‘부동시간(immobility time)’ 을 우울증-유사행동 및 스트레스의 지표로 한다.

[0125] - 강제수영시험 (forced swim test): 설치류의 발이 바닥에 닿지 않을 정도로 물이 채워진 원통형 수조에서 이를 극복하는 정도를 시험하는 것이다. 마우스가 움직이지 않은 ‘부동시간’ 을 우울증-좌절 행동의 지표로 사용한다.

[0126] - 고가식 십자 미로시험 (elevated plus maze): 새로운 환경을 탐색하려는 경향과 밝고 높은 곳을 기피하는 경향을 이용한 시험이다. 개방된 통로와 폐쇄된 통로에 머문 시간을 비교하여 불안 행동의 지표로 하며, ‘전체 팔에 들어간 수’ 를 운동능력의 지표로 한다.

[0127] <알츠하이머병 동물모델에서 후보 물질 투여에 따른 병리학적 증상들의 변화 및 기전 규명>

[0128] **개요 및 목적:** 인지행동실험 결과 유의적인 개선을 나타낸 후보 물질 투여군에 대한 조직학적, 분자생물학적 기전을 규명하려는 것이다. 본 과정에서는 알츠하이머 동물모델의 뇌에서 면역조직화학염색(IHC), qRT-PCR (qPCR), Western blot (WB), ELISA를 통해, 후보 물질들의 인지기능 개선효과에 대한 기전과 A β /Tau 관련된 병리학적 증상들의 변화를 관찰한다.

[0129] **연구 내용:** 인지행동 실험에서 유의한 개선을 나타낸 그룹에 대하여, 해마형성체를 중심으로 다양한 뇌 부위에 대하여 아래와 같이 분석한다.

[0130] <알츠하이머병 동물모델에서 후보 물질 투여에 따른 A β 관련 기전 변화>

[0131] **A β 생성 관련:**

[0132] α -secretase: sAPP α , APP-CTF α , ADAM9, ADAM10, ADAM17

[0133] β -secretase: sAPP β , APP-CTF β , BACE-1

[0134] γ -secretase: AICD, Nicastrin, Pen-2, PS1-CTF

[0135] **A β 분해 관련:** IDE, Nep, MMP (WB)

[0136] **A β 축적 관련:**

[0137] 4G8: APP의 17-24 영역을 인식하여 A β , APP, oligomer, plaque를 모두 탐지

[0138] Thioflavin S: A β 의 응집구조(역평행 β -sheet)에 들어가 형광을 나타냄

[0139] **A β 응집 및 독성 관련:** A β _{42/40} ratio (ELISA), NUI: 올리고머 표지자 (IHC)

[0140] <알츠하이머병 동물모델에서 후보 물질 투여에 따른 tau 관련 기전 변화>

[0141] tau 인산화 장소: AT180, AT8, AT270, 12E8, CP13, PHF1 (WB)

[0142] tau 인산화 효소: cdk5, p35, Erk1/2, GSK3 β (WB)

[0143] tau 탈인산화 효소: DUSP6, PPP1CA, Bcl-W (WB)

[0144] tau 축적: Thioflavin S, anti-tau antibody (IHC)

- [0145] <알츠하이머병 동물모델에서 후보 물질 투여에 따른 신경사멸 변화>
- [0146] NeuN (IHC), DAPI 염색, Nissl staining (조직화학법)
- [0147] 세포예정사(Apoptosis): Caspase-2, Caspase-3, Cytochrome c, TUNEL
- [0148] Necroptosis: RIP1, RIP3, MLKL
- [0149] <알츠하이머병 동물모델에서 후보 물질 투여에 따른 시냅스 손상의 변화>
- [0150] 전시냅스: Synaptophysin, Bassoon (IHC, WB)
- [0151] 후시냅스: PSD-95, Homer1(IHC, WB)
- [0152] 신경돌기: MAP2 (microtubule-associated protein 2) (IHC)
- [0153] <알츠하이머병 동물모델에서 신경 염증에 대한 후보 물질의 효능 규명>
- [0154] Iba1 (Ionized calcium binding adaptor molecule 1): 대식세포 (macrophage) 계열인 미세아교세포 (microglia)의 표지자
- [0155] Mac-1 (macrophage-1 antigen): CD11b를 인식함으로써 뇌 내 염증 상황에서 미세아교세포를 포함하여 말초에서 유입된 대식세포 계열을 모두 관찰 표지한다.
- [0156] GFAP (glial fibrillary acidic protein): 성상 세포 (astrocyte)의 주요한 중간섬유 단백질로써 성상세포의 표지이다.
- [0158] 또한, 본 발명의 알츠하이머병 치료 또는 개선 후보 물질을 평가하는 개별 분석 방법들은 많은 연구자나 연구실에서 수행하고 있는 것과 유사하다고 볼 수 있다. 그러나, 본 발명자들은 이미 수행하고 있는 개별 분석 방법을 기초로 하여 후보 물질의 추정 작용 기작 (mechanism of action; MoA)을 기반으로 특정 알츠하이머병 병리 효능을 평가하기 위한 개별 분석 방법의 조합이 가능한 플랫폼을 발명하였다.
- [0159] 본 발명의 플랫폼이 아래의 예시에 한정되는 것은 아니지만, 이해를 위하여 구체적인 몇 가지 예시를 들어보겠다.
- [0160] 첫 번째 예시로서, 후보 물질이 아밀로이드 베타 또는 타우 단백질의 응집을 억제하는지 확인할 경우 아래와 같은 조합으로 효능 평가를 시행할 수 있다. 첫째, 도 1의 인 실리코 분자 도킹을 실시하여 아밀로이드 베타 또는 타우와 후보 물질간 분자 도킹 시뮬레이션 상 결합하는지 확인한다. 둘째, 도 2의 티오플라빈 T 분석을 통하여 후보 물질이 아밀로이드 베타 또는 타우의 섬유화를 억제하는지 확인한다. 셋째, 후보 물질이 아밀로이드 베타 또는 타우의 섬유화를 억제하는 것이 확인된 경우 아밀로이드 베타 또는 타우의 독성에 의해 유도된 세포 사멸 억제 효능이 있는지 도 2의 WST-1 분석을 통해 확인한다. 넷째, 후보 물질이 아밀로이드 베타 또는 타우에 의한 신경염증을 억제하는지 확인하기 위해 도 2의 qPCR을 수행한다. 다섯째, 후보 물질이 아밀로이드 베타 또는 타우 과발현 마우스의 인지행동 및 AD 관련 병리에 치료 효능이 있는지 도 3에 나열된 평가를 수행한다.
- [0161] 두 번째 예시로서, 후보 물질이 아밀로이드 베타 생성을 억제하는지 확인할 경우 아래와 같은 조합으로 효능 평가를 시행할 수 있다. 첫째, 도 2의 아밀로이드 베타 과발현 세포모델인 APP-H4 세포에 후보 물질을 처리한 후 ELISA를 수행하여 후보 물질이 아밀로이드 베타의 생성을 유의하게 억제하는지 확인한다. 둘째, 후보 물질을 아밀로이드 베타 과발현 마우스에 투여한 후 아밀로이드 베타 생성 억제를 통한 인지기능 개선 효과 및 AD 관련 병리에 치료 효능이 있는지 도 3에 나열된 평가를 수행한다.
- [0162] 세 번째 예시로서, 후보 물질이 해마 성체 신경발생 (Adult hippocampal neurogenesis)의 개선을 통해 AD 관련 병리에 치료 효능이 있는지 확인하기 위해 아래와 같은 조합으로 효능 평가를 시행한다. 첫째, 도 2의 마우스 해마 신경세포인 HT22 세포를 이용하여 WST-1 분석을 수행하여 세포 증식을 확인한다. 둘째, 웨스턴 블롯 분석, qPCR을 통하여 세포 주기와 관련한 단백질 및 mRNA 변화를 확인한다. 셋째, 도 3의 인 비보 실험을 통해 SVZ, SGZ부위의 DCX 항체 발현 변화 확인 및 동물 행동실험을 수행할 수 있다.
- [0163] 위 예시들은 예시일 뿐이며, 후보 물질의 예측 메커니즘에 따라 다양한 실험의 조합을 수행할 수 있다.

- [0165] 또한, 본 발명은 치매 환자를 나누는 CRD 등급과 알츠하이머병 환자의 바이오마커 변화를 참고하여 실험동물의 병기를 나누어 효능분석을 시행하는 것을 특징으로 한다.
- [0166] 후보물질에 따라 타깃하는 알츠하이머병 진행단계 (무증상, 전구 치매, 경증 치매, 중등도 치매, 중증 치매)가 상이하므로 후보물질의 최대/최적 효능을 평가하기 위해서는 알츠하이머병 병기가 반영된 동물모델 연령 선별이 중요한 요소가 된다. 따라서, 치매 환자의 진행단계를 모사하는 동물모델 연령 선별 기술은 본 출원의 새롭고 진보적인 측면이라고 할 수 있다.
- [0167] 본 발명자들은 동물모델인 3xTg 마우스의 경우 아래와 같은 기준으로 병기를 나누었다. 5XFAD 마우스의 경우에도 아래 기준과 유사한 기준으로 나눈다.
- [0168] - 전구 치매 (Mild Cognitive Impairment; MCI): 가장 초기 인지장애가 4개월에 장기 기억 손상의 형태로 나타남 (뉴런 내 Aβ 축적과 관련 있음).
- [0169] - 경증 치매 (Mild AD): 인지 결여 초기 탐지 (Early detection of cognitive deficits)가 Barnes maze로 탐지된다 (매우 가벼운 인지장애상태). 또한, 6~7개월 이후부터 여러 도구들을 사용해 인지 손상 탐지 (Cognitive impairment detection) 가능함.
- [0170] - 중등도 치매 (Moderate AD): 중등도 치매와 중증 치매를 나누는 기준이 명확하지 않아 아래 표 1의 CDR (Clinical Dementia Rating)을 참고하여 '운동'을 기준으로 병기를 나눔. 12~14개월에 운동기능 현저히 악화됨.
- [0171] - 중증 치매 (Severe AD): 중등도 치매와 중증 치매로 추정되는 연령대에서 한번에 알츠하이머병 병리, 세포 사멸, 인지기능을 본 경우는 없음.

표 1

CDR : Clinical Dementia Rating					
	CDR 0	CDR 0.5	CDR 1	CDR 2	CDR 3
기억력(Memory)	기억장애가 전혀 없거나 경미한 건망증이 때때로 나타남	경미하지만 지속적인 건망증, 사건의 부분적이 회상만 가능 "양성건망증"	중증도의 기억장애: 최근 것에 대한 기억장애가 더 심함: 일상 생활에 지장이 있음	심한 기억장애: 과거에 반복적으로 많이 학습한 것만 기억: 새로운 것은 금방 잊음	심한 기억장애: 부분적이고 단편적인 사실만 보존됨
지남력 (Orientation)	정상	시간에 대한 경미한 장애가 있는 것 외에는 정상	시간에 대해 중증도의 장애가 있음: 사람과 장소에 대해서 검사 상 으로는 정상이나 실생활에서 길 찾기에 장애가 있을 수 있음	시간에 대한 지남력은 상실되어 있고 장소에 대한 지남력 역시 자주 손상됨	사람에 대한 지남력만 유지되고 있음
판단력과 문제해결 능력(Judgment& Problem solving)	일상생활의 문제를 잘 해결하고 사업이나 재정문제도 잘 처리함: 과거에 비해 판단력은 아직 좋음	문제 해결능력, 유사성, 상이성, 해석에 대한 경미한 장애	문제 해결능력, 유사성, 상이성 해석에 대한 중증도의 장애, 사회생활에 대한 판단력은 대부분 유지되어 있음	문제해결, 유사성, 상이성 해석에 대한 심한 장애: 사회생활에서의 판단력이 대부분 손상됨	판단이나 문제해결이 불가능함
사회활동 (Community Affairs)	직장생활, 물건사기, 자원봉사, 사회적 활동 등에서 보통수준의 독립적 기능의 가능함	이와 같은 활동에 있어서의 장애가 의심되려가 약간의 장애가 있음	이와 같은 활동의 일부에 아직 참여하고 있고, 언뜻 보기에는 정상 활동을 수행하는 것처럼 보이나 사실상 독립적인 수행이 불가능함.	집 밖에서 독립적인 활동을 할 수 없으나 외견상으로는 집 밖에서도 기능을 잘할 수 있어 보임. 집 밖에서 독립적인 활동을 할 수 없으나 외견상으로는 집 밖에서도 기능을 잘할 수 있어 보임	집 밖에서 독립적인 활동을 할 수 없고 외견상으로는 기정을 떠나 외부에서의 정상적인 기능을 할 수 없어 보임
집안생활과 취미 (Home and Hobbies)	집안생활, 취미생활, 지적인 관심이 잘 유지되어 있음	집안생활, 취미생활 지적인 관심이 다소 손상되어 있음	집안생활에 경미하지만 분명한 장애가 있고, 어려운 집안일은 포기된 상태임. 복잡한 취미나 흥미(예를 들어 바둑)는 포기됨	아주 간단한 집안일만 할 수 있고 관심이나 흥미가 매우 제한됨	집안에서 의미 있는 기능 수행이 없음
위생 및 몸차장 (Personal Care)	정상		가끔 개인위생에 대한 권고가 필요함	옷 입기, 개인위생, 개인소지품의 유지에 도움이 필요함	개인위생과 몸차장유지에 많은 도움이 필요하며, 자주 대소변의 실금이 있음

[0172]

표 2

단계		전구 치매 (Prodromal AD)	경증 치매 (Mild AD)	중등도 치매 (Moderate AD)	중증치매 (Severe AD)
AD 동물모델	5XFAD mice	4-5 mon	6-7 mon	8-10 mon	11 mon ~
	3xTg mice	6-7 mon	8-11 mon	12-14 mon	15 mon ~

[0173]

발명의 효과

- [0175] 본 발명에서는 후보 물질에 따라 타겟하는 알츠하이머병 진행단계가 다르므로, 동물 모델의 알츠하이머병 단계를 세분하여 후보 물질을 적절한 진행 단계의 동물 모델에서 시험함으로써 좀 더 정확한 효능 시험이 가능하다.
- [0176] 본 발명에 의한 식의약 후보 물질들의 알츠하이머병에 대한 신규 치료 효능 평가 및 분석 방법은 후보물질 발굴 및 임상 성공 가능성을 비약적으로 증가시킬 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0178] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 의한 인 실리코 실험의 흐름도이다.
- 도 2a는 본 발명의 일 실시예에 의한 인 비트로 실험의 전체 흐름도이다. 도 2b와 도 2c는 도 2a의 부분을 확대한 도면이다. 도 2b는 인 비트로 실험 중 무세포 시스템 인 비트로 실험의 흐름도이고, 도 2c는 인 비트로 실험 중 세포 기반 분석 실험의 흐름도이다.
- 도 3a 내지 도 3c는 본 발명의 일 실시예에 의한 인 비보 실험의 흐름도이다. 도 3a는 전체 흐름도이고, 도 3b와 도 3c는 도 3a의 부분을 확대한 도면이다. 도 3b는 3xTg 마우스를 이용한 인 비보 실험의 흐름도이고, 도 3c는 5XFAD를 이용한 인 비보 실험의 흐름도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0179] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속한 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.
- [0181] <실시예 1> 알츠하이머 동물 모델
- [0182] 퇴행성 신경질환 치료 후보 물질의 효능을 평가 및 분석하기 유전적으로 알츠하이머 병 조기 발병과 관련된 5가지 돌연변이를 발현하는 6개월 된 암컷 5XFAD 마우스를 이용한다. 5가지의 돌연변이는 인간 PSEN1 돌연변이 M146L 및 L286V와, APP 돌연변이인 스웨덴 (Swedish, K607N 및 M671L), 플로리다 (Florida, I716V) 및 런던 (London, V717I)을 포함하며, 대조군인 야생형 마우스는 암컷 B6SJL/F1 마우스와 수컷 5XFAD 마우스를 교배하여 얻었다. 구체적으로 마우스를 분류하기 위하여, 마우스의 꼬리로부터 DNA를 분리하고 하기 표 1에 기재된 프라이머를 이용하여, 유전형을 분석하여, 야생형 마우스(WT) 및 알츠하이머 마우스(5XFAD)로 분류 하고, 추가적으로 분류하여 4개의 군으로 나누었다.
- [0183] 구체적으로, 1) 야생형 마우스에 식염수를 투여한 군 (WT+vehicle); 2) 야생형 마우스에 후보 물질 (candidate substance; 이하 "cd"와 혼용함)을 투여한 군 (WT+cd); 3) 알츠하이머 마우스에 식염수를 투여한 군 (5XFAD+vehicle); 및 4) 알츠하이머 마우스에 후보 물질을 투여한 군 (5XFAD+cd);으로 분류하며, 후보 물질은 3주간 100 mg/kg의 농도로 매일 경구 투여하며, 대조군에는 동량의 식염수를 투여한다.
- [0185] <실시예 2> 동물모델 실험
- [0186] 2-1) Y-미로 시험 (Y-Maze Test)
- [0187] 실시예 1과 같이 후보 물질을 처리한 마우스의 인지기억 향상을, 아모다이하퀸 주사 2주 후 Y-미로 시험으로 측정한다. 대조군으로는 후보 물질 대신 식염수를 주사한다.
- [0188] Y-미로 장비는 중앙 공간 (8 × 8 cm)에 120° 각도로 배치된 세 개의 가지 (길이 30 cm, 폭 8 cm, 높이 15 cm)로 이루어져 있다. 각 마우스를 하나의 가지에 놓고 5분간 자유로이 움직이도록 하여 자발적 변경률을 평가한다. 자발적 변경률은 반복 없이 세 개의 다른 가지로 연속적으로 들어가는 (즉, ABA가 아닌 ABC, BCA 등) 회수로 정의하며, 다음 공식에 의해 계산한다.

- [0189] 자발적 변경률 (%)=[successive entries / (total arm entries - 2) × 100]
- [0190] Y-미로 시험 결과, 전체 가지로 들어가는 회수에는 유의적인 차이가 없음에도 불구하고, 자발적 변경률이 유의적으로 증가한 경우에는 이 후보 물질이 운동기능에 영향을 미치지 않으면서도 인지 기억을 향상시킴을 의미한다.
- [0191] 2-2) 신물건 탐색 시험(NORT, Novel object recognition test)
- [0192] 후보 물질을 처리한 마우스의 인지기억 향상을, 후보 물질 주사 2주 후 오픈필드 상자 (45 × 45 × 45 cm)에서의 NORT로 측정한다. 대조군으로는 후보 물질 대신 식염수를 주사한다.
- [0193] 시험 전에, 마우스는 3일 연속 아무런 물건도 없는 시험 상자에서 5분간 순응시킨다. 순응 후, 마우스를 시험상자에 넣고 3분간 동일한 두 개의 물건을 탐색하도록 한다 (친숙화 세션). 본 연구에 사용하는 물건은 동일한 크기의 다른 모양을 갖는 나무 블록이다. 친숙화 세션 24시간 후, 하나의 친숙화된 물건과 하나의 새로운 물건을 3분간 탐색하게 한다 (시험 세션). 모든 세션은 video tracking system (EthoVision XT 10.0, Noldus Information Technology, Wageningen, Netherlands)으로 녹화하고, 마우스가 각 물건을 탐색하거나 인식하는데 소요된 시간을 각 세션마다 분석한다. 물건의 인식 시간 (recognition time)은 물건을 마주하고, 냄새를 맡고, 깨물어 보거나 2cm 이내의 거리에 머무르는 시간을 의미한다. 시험 결과 (식별지수)는 새로운 물건에 대한 인식 시간의 비율로 나타내며, 하기 식으로 계산한다.
- [0194] 식별지수 = $t_{\text{novel}} / (t_{\text{novel}} + t_{\text{familiar}}) \times 100$
- [0196] <실시에 3> 면역조직화학 분석
- [0197] <3-1> 조직 준비
- [0198] 상기 실시예 2의 마우스를 행동실험이 끝난 후 마취하여, 0.05 M의 PBS 용액과 0.1 M의 PB에 4% 포름알데하이드 (paraformaldehyde, PFA)를 혼합한 용액으로 심장 관류 고정하였다. 그 후 뇌를 적출하고, 4% PFA에 침지하여 4℃에서 20시간 동안 고정한 후 동결방지를 위해 0.05M PBS에 30% 수크로오스가 용해된 용액에 침지시켰다. 침지된 뇌 조직은 -25℃의 저온 유지장치를 사용하여 30 μm 두께의 관상 절편으로 절단하였다. 절단된 조직은 면역조직화학 분석의 시행 전까지 4℃에서 25% 에틸렌글리콜 및 글라이세롤이 포함된 0.05M의 PBS 완충액에 보관하였다.
- [0199] <3-2> 면역형광 라벨링
- [0200] Aβ (amyloid-β, 4G8)의 축적은 인지기능 저하의 발병과 진행에 직접적인 영향을 미치는 것으로 알려져 있어, Aβ 플라크 형성을 확인한다. 또한 신경 세포의 사멸을 관찰하기 위하여, 뉴런 바이오 마커인 신경핵 (neuronal nuclei, NeuN) 및 시냅스 소포체 단백질인 시냅토파이신 (synaptophysin, SYN)을 분석하며, 신경 염증 지표인 이온화 칼슘 결합 어댑터 분자 1 (ionized calcium binding adapter molecule, Iba1) 및 신경교 섬유질 산성 단백질 (Glial fibrillary acidic protein, GFAP)에 대한 양성세포를 각각 분석하고자, 면역형광 분석을 시행한다. 구체적으로, 실시예 3-1의 준비된 뇌조직을 150-180 μm (bregma에 대하여 -1.46 및 -2.06 mm) 간격과, 270-350 μm (bregma에 대하여 -2.70 및 -3.80 mm) 간격에서 3-4장의 절편을 골라 염색한다. 제작된 절편은 PBS로 간단히 세척하고, 0.5 mg/ml 농도의 BSA 및 0.3% 트리톤 X-100을 포함하는 PBS로 1차 항체를 희석하여 18 시간동안 반응시킨다. 사용된 1차 항체는 마우스 항-4G8 항체 (1:2,000), 마우스 항-신경핵 (NeuN) 항체 (1:500), 마우스 항-시냅토파이신 (synaptophysin, SYN 1:500), 염소 항-이온화 칼슘 결합 어댑터 분자 1 (ionized calcium binding adapter molecule 1, Iba1, 1:1,000) 항체 및 래트 항-아교세포 섬유질 산성 단백질 (glia fibrillary acidic protein, GFAP, 1:500) 항체를 사용한다. 뇌 조직은 마우스 항-4G8 항체로 반응시키기 전 항원 검출을 위해 20분간 70% 포름산으로 처리한다. 2차 항체는 당나귀 Alexa 488-접합 항-마우스 IgG (1:200) 및 당나귀 Alexa 594-접합 항-마우스 IgG (1:200)을 0.3% 트리톤 X-100을 함유하는 PBS로 희석하여 실온에서 50분 동안 2차 항체와 반응시킨다. 면역조직화학 염색된 절편은 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)를 포함하는 Fluoroshield™를 사용하여 슬라이드에 장착하고 커버 슬립으로 오버레이한다.
- [0201] 5XFAD 마우스에서 후보 물질을 처리하고 대조군 (5XFAD+vehicle)과 비교하여, 4G8 양성 영역, 평균 플라크 크기 및 플라크 수가 감소하는 것을 확인하여, 후보 물질이 Aβ의 축적을 억제하는지 여부를 확인한다.
- [0202] 또한, 5XFAD+vehicle 마우스의 해마에서는 야생형 마우스와 비교하여, SYN (CA1, CA3 및 ML)의 밀도가 감소하는

지 여부를 확인하며, 5XFAD 마우스에 후보 물질을 투여하여, SYN의 밀도가 유의적으로 증가하는지 여부를 확인한다. 야생형 마우스와 비교하여, 5XFAD+vehicle 군의 마우스에서 NeuN 양성세포가 감소하고, 5XFAD 마우스에 후보 물질을 투여하여 NeuN 양성세포가 유의적으로 증가하는지를 확인한다.

[0203] 또한, 신경 염증인자인 Iba1 양성 영역 및 GFAP 양성 영역은 야생형 마우스와 비교하여, 5XFAD+vehicle 마우스에서 유의미하게 증가되며, 5XFAD 마우스에 후보 물질을 처리하면 Iba1 양성 영역 및 GFAP 양성 영역이 유의적으로 감소하는지를 확인한다.

[0204] <3-3> 면역퍼옥시데이즈(Immunoperoxidase) 라벨링

[0205] 후보 물질의 성체 해마의 신경발생에 따른 신경 보호효과를 확인하기 위하여, 성체신경발생인자인 DCX와 Ki-67을 이용해 면역퍼옥시데이즈 분석을 시행한다. 구체적으로, 상기 실시예 3-1의 준비된 뇌조직의 절편을 120~180 μm (bregma에 대하여 -1.70~ 및 2.18 mm) 사이의 간격에서 3-4장의 절편을 얻는다. 얻어진 절편을 PBS로 세척하고, 1% H_2O_2 를 포함하는 PBS로 상온에서 15분간 처리한다. 그 후 조직을 4℃에서 1차 항체인 염소 항-더블 코르틴 (doublecortin, DCX 1:1,000) 항체 및 토끼 항-Ki67 항체(1:2,000)로 처리한다. 1차 항체가 처리된 절편은 비오틴화된 2차 항체(1:200)로 1시간동안 실온에서 반응시킨다. 반응 종료 후 발색을 위해 ABC (avidin-biotin-peroxidase complex) 용액과 DAB (3,3-diaminobenzidine)를 사용한다. 시각화된 절편은 슬라이드에 올려 알코올과 자일렌으로 탈수시킨 후 mounting medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하여 커버 슬립으로 오버레이 한다.

[0207] <실시예 4> 세포생존율 확인

[0208] 쥐 해마 신경세포주인 HT22 세포는 Dulbeccos Modified Eagles Media (DMEM)으로 배양하였으며, 구체적으로 10% 우태아 혈청 및 100 U/ml의 페니실린-스트렙토 마이신이 보충된 배지에서 배양하였고, 5% CO_2 , 37 °C 조건으로 배양하였다. 배양된 세포는 96 well plate에 1×10^4 개 세포가 되도록 접종하였다. 접종 24시간 후 후보 물질을 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 1시간동안 전처리하고, A β 25-35를 처리한다. A β 25-35를 처리하고 48시간 후 제조업체의 가이드에 따라 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카르복시 메톡시페닐)-2-(4 설포페닐) -2H-테트라 졸륨 (MTS) 분석을 사용하여 세포 생존율을 정량화하며, 멀티 모드 마이크로 플레이트 리더 (Biotek Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정한다. 모든 실험은 3번 수행한다.

[0209] A β 가 처리된 HT22 세포를 대조군과 비교하여 세포 생존율 감소 정도를 확인하며, 후보 물질이 처리된 HT22 세포에서 세포 생존율이 증가하는지를 확인한다.

[0211] <실시예 5> 세포 내 ROS 생성 확인

[0212] 세포 내 ROS 생성은 변형된 디클로로-디하이드로-플루오레스-디아세테이트 (dichloro-dihydro-fluorescein diacetate, DCFH-DA)방법으로 분석한다. HT22 세포를 1×10^4 세포수가 되도록 96 well plate에 접종하고, 24시간 동안 배양한다. 그 후 후보 물질을 상기 실시예 4에 기재된 농도로 처리한 후 24시간 동안 추가배양한다. 배양된 세포를 10 μM A β 25-35가 포함된 무혈청 배지 (serum-free medium, SFM)에 20분간 처리하였으며, 이 후 DCF-DA가 포함된 SFM을 30분간 처리한다. 30분 후 세포를 세척하고, 100 μL 의 Dulbecco's 인산-버퍼를 각 웰에 첨가한다. 그 후 485 nm/535 nm에서 각각의 형광을 측정한다.

[0213] HT22 세포에 A β 가 처리되면 ROS의 생성이 대조군보다 1.7배 가량 증가한다. 후보 물질이 처리된 세포에서 A β 에 의해 유도된 ROS 생성이 감소하는지를 확인한다.

[0215] <실시예 6> 이미지 분석

[0216] 상기 실시예 3-2 내지 3-3에서의 면역 반응을 정량화하기 위하여 Zeiss LSM 700 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) 및 Olympus CX23 (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) 현미경을 사용하여 항체로 염색된 뇌 절편에서 이미지를 얻어, ImageJ 소프트웨어를 사용하여 분석한다. 분석은 각 동물의 뇌 절편의 동측 (ipsilateral) 및 반대측 (contralateral) 해마에서 수행한다. 4G8 면역 반응성을 측정하기 위하여 배측 (dorsal) 해마 이행부의 면역 양성 신호에 대한 면적분율 (%), 면적당 (mm^2) 평균 플락 크기 및 평균 플락수를 정량화한다. 또한,

Iba1 및 GFAP의 면역 반응은 동일한 배측 해마 이행부에서 면역 양성 신호의 면적분율로 정량화한다. SYN 면역 반응성은 해마의 형광 강도 (광학 밀도)로 정량화하며, DCX와 Ki67의 면역 반응성은 해마 치상회 (hippocampal dentate gyrus, DG)에서 과립화된 영역 (subgranular zone)의 길이 (mm)당 양성 세포의 수로 정량화한다. 조직학적 정량화, 통계 분석 및 이미지 수득은 4개의 군에 대하여 블라인드 방식으로 수행한다.

[0218]

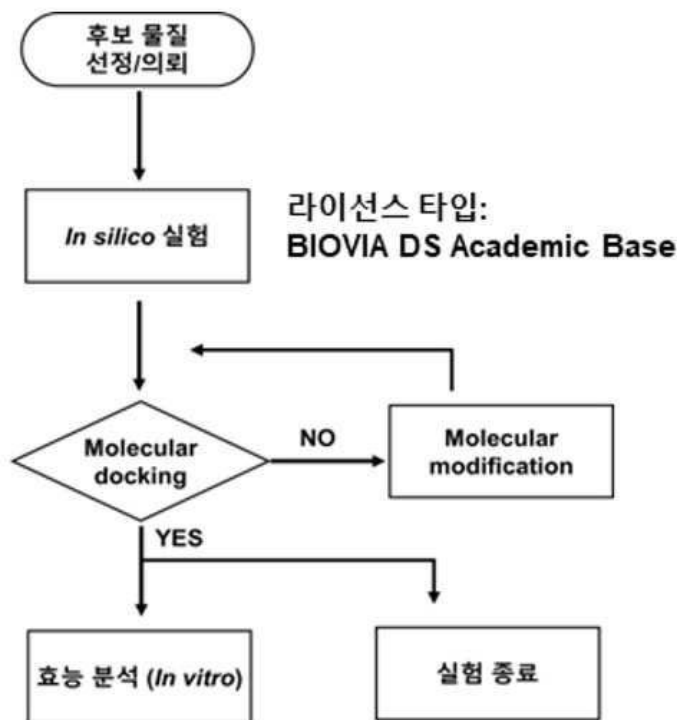
<실시예 7> 통계학적 분석

[0219]

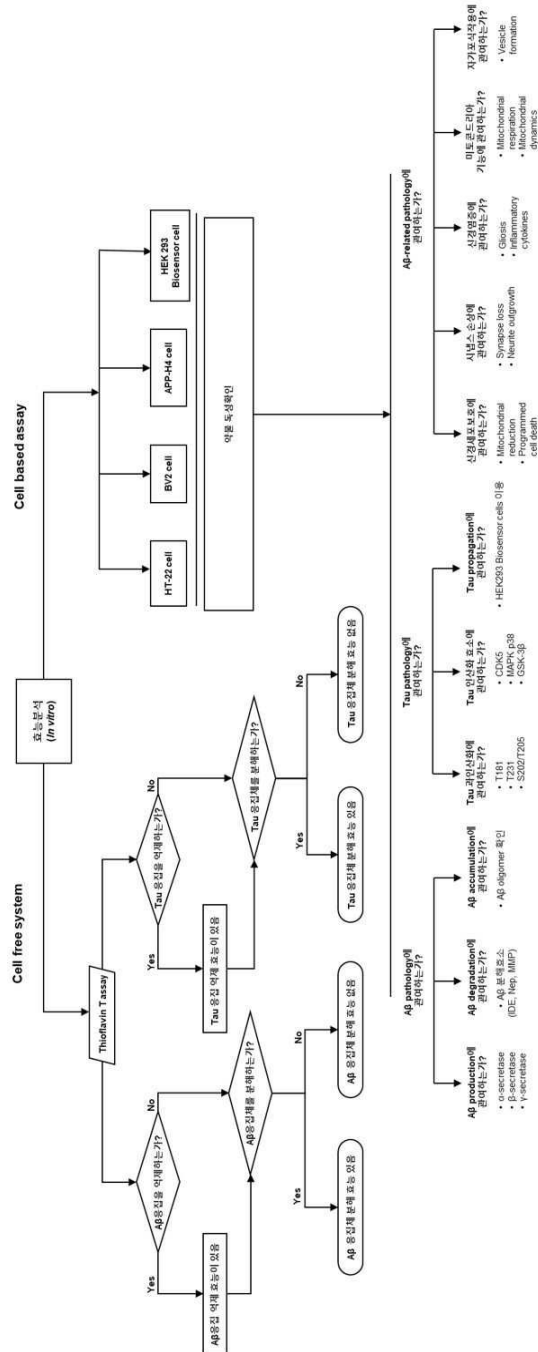
본 발명의 모든 실시예는 4가지 군에 대하여 블라인드 및 무작위로 수행한다. 모든 통계분석은 GraphPad Prism 7.0 소프트웨어 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 사용하며, 모든 데이터는 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차 (SEM)로 표시하고, 두 그룹 간의 차이의 유의성은 독립적인 t-검정을 사용한다. 4개 그룹 간의 통계 분석은 일원 분산 분석에 이어 Fisher의 LSD 및 Tukey의 사후 테스트로 수행하며, p값이 $p < 0.05$ 이면 통계적으로 유의한 것으로 간주하여 분석한다.

도면

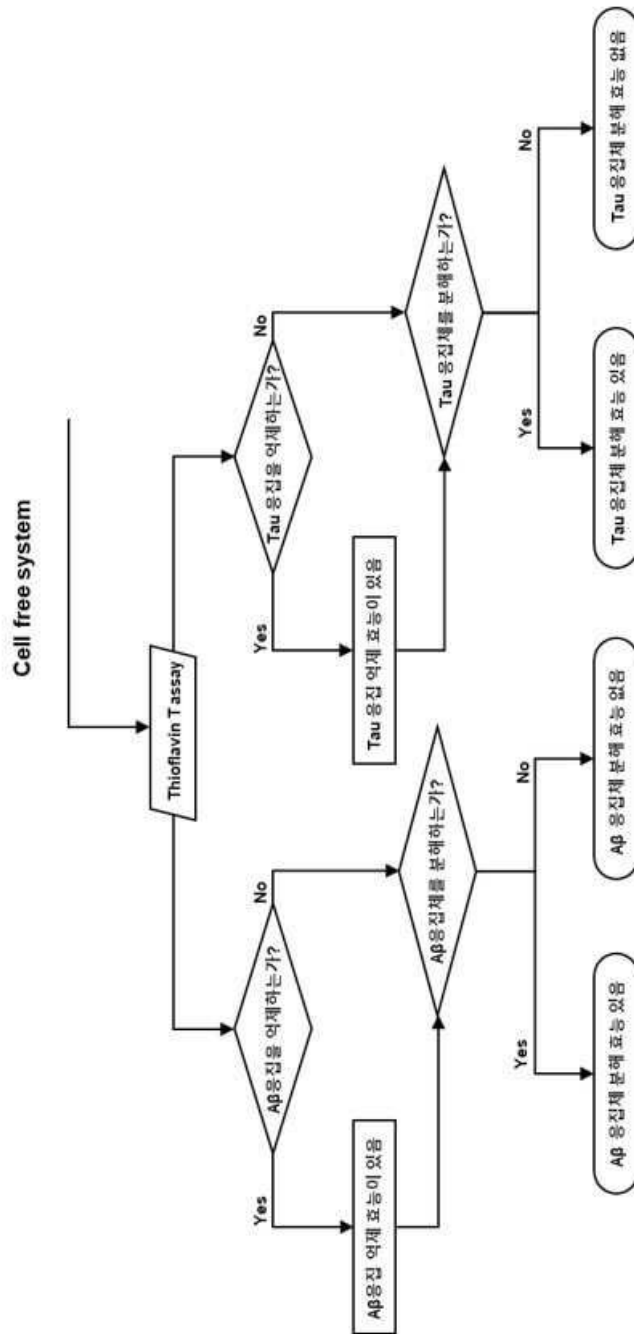
도면1



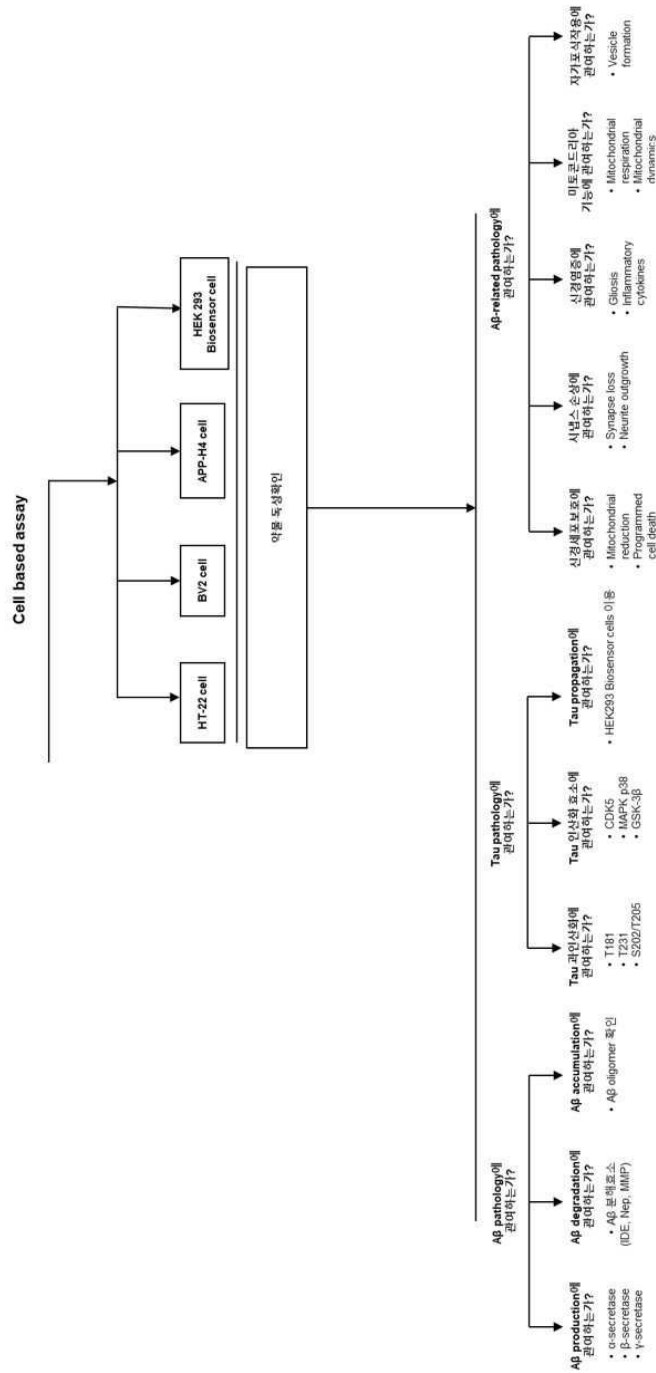
도면2a



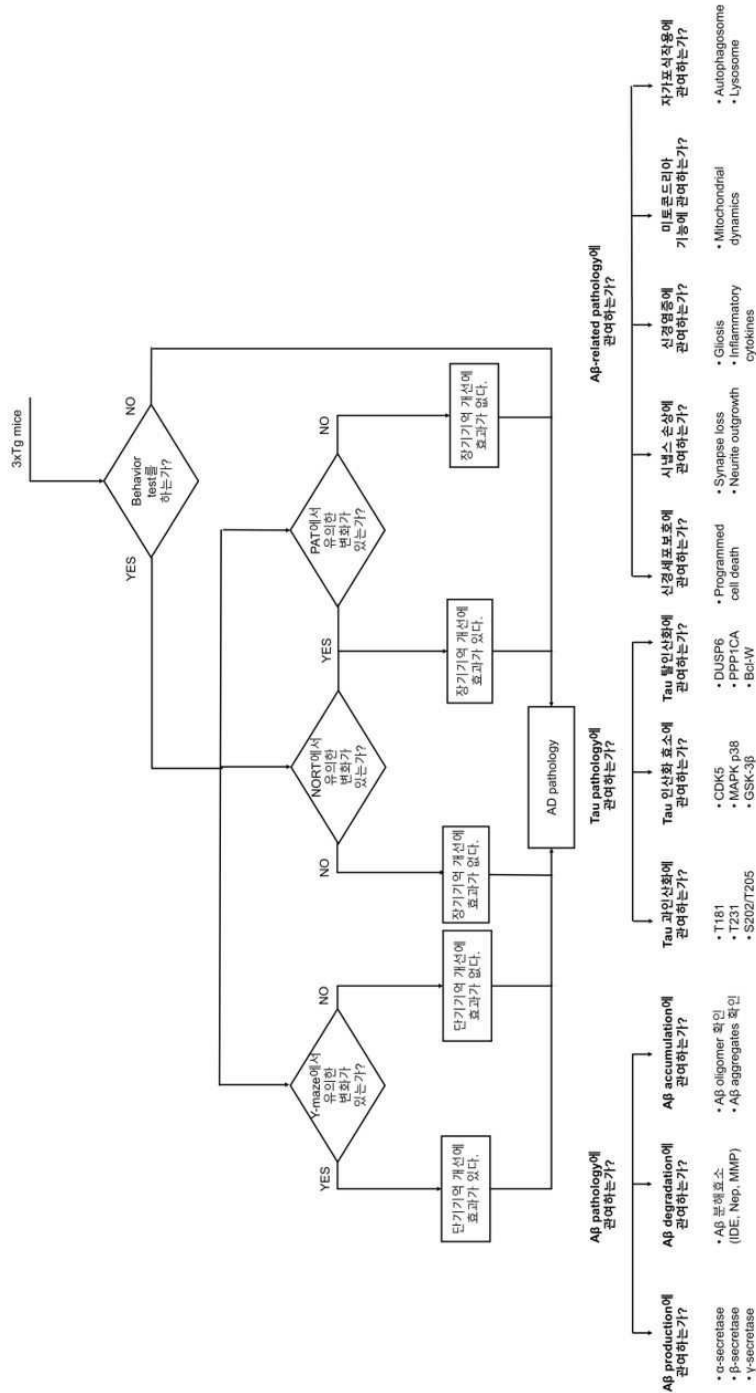
도면2b



도면2c



도면3b



도면3c

