



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0077681
(43) 공개일자 2025년06월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/37 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/37 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0164935
(22) 출원일자 2023년11월23일
심사청구일자 2023년11월23일

(71) 출원인
성균관대학교산학협력단
경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
이연중
경기도 수원시 권선구 입북로77번길 62, 101동 304호 (입북동, 서수원 레이크 푸르지오 1단지)
김희정
경기도 수원시 권선구 금곡로102번길 126, 708동 1308호
백승만
경상남도 진주시 영천강로68번길 26, 201호
(74) 대리인
공병욱

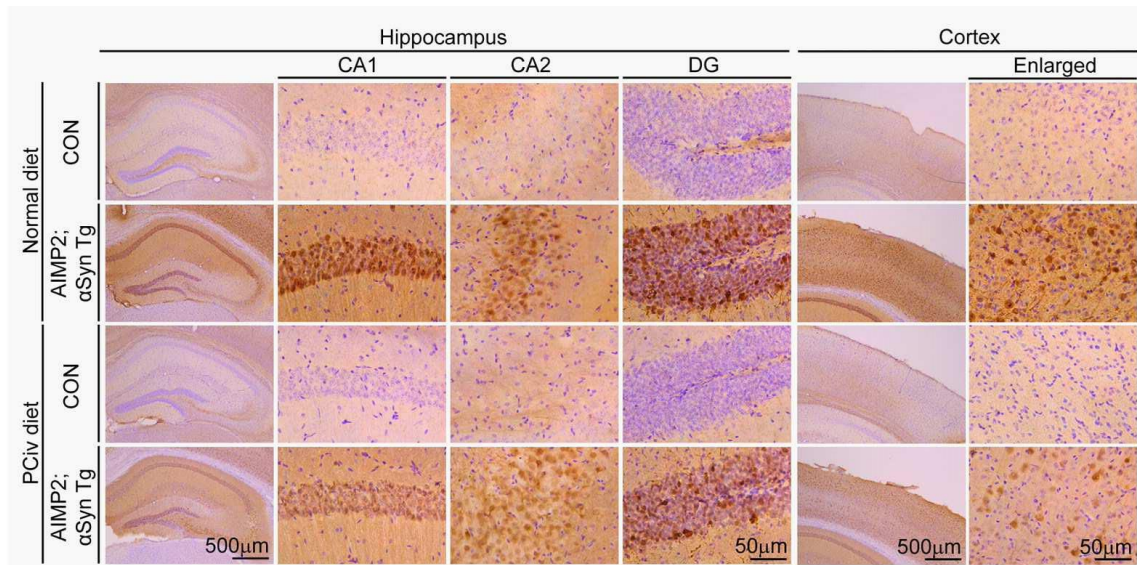
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 류세다노쿠마린 IV를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 치료 또는 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 류세다노쿠마린 IV를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 AIMP2의 응집을 억제하고, 루이소체 병변 형성을 억제하며, 신경세포의 사멸을 억제하고, 신경염증을 억제하는 효과를 가지므로, 현재 실제적인 치료제가 부재한 비정상 단백질 응집체에 의한 퇴행성 뇌질환, 특히 루이소체 치매의 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 25/28 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465036753
과제번호	HU22C0143000022
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	치매극복연구개발사업(복지부)
연구과제명	알파-시누클레인 응집체 형성/전파 촉진 시스템-기반 AIMP2 타겟의 루이소체치매 발
병 원인/기전 및 병변전파뇌 지도 규명	
기 여 율	70/100
과제수행기관명	성균관대학교산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711159599
과제번호	2021M3H4A4079521
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	나노소재기술개발
연구과제명	등온증폭 전기화학 분자 및 디지털 형광 이미징 면역 진단기 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	성균관대학교
연구기간	2022.02.01 ~ 2023.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

푸세다노쿠마린 IV(Peucedanocoumarin IV, PCiv) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 비정상 단백질 응집체에 의하여 유발되는 것인, 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 비정상 단백질 응집체는 AIMP2 응집체, α -시누클레인 응집체, AIMP2 및 α -시누클레인의 응집체, 루이소체(Lewy body) 또는 이들의 조합인 것인, 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 파킨슨병(Parkinson's disease), 루이소체 치매(Lewy body dementia, LBD), 다계통성 신경 위축증(multiple system atrophy)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 비정상 단백질 응집체 형성을 억제하거나 비정상 단백질 응집체를 분해하는 것인, 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 신경세포 사멸을 억제하는 것인, 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 신경염증을 억제하는 것인, 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

청구항 8

푸세다노쿠마린 IV(Peucedanocoumarin IV, PCiv)을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제8항의 식품 조성물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 푸세다노쿠마린 IV를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 치료 또는 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현대 사회가 노령화 사회로 진입하면서, 노화에 따라 발명하는 퇴행성 질환이 의료 및 사회적 문제로 대두되고 있다. 퇴행성 질환 중에서도 알츠하이머 치매(Alzheimer's dementia, AD), 파킨슨병(Parkinson's disease, PD), 루이소체 치매(Lewy body dementia, LBD), 와 같은 퇴행성 뇌질환 환자의 수가 급격하게 증가하는 추세에 있으나, 질환으로 인한 증상을 완화시키는 치료법 외에 병변 진행을 근본적으로 치료할 수 있는 약물은 부재하는 실정이다.

[0003] 퇴행성 뇌질환의 치료에서 가장 중요한 부분은 퇴행성 뇌질환을 유발하는 독성 단백질 응집체의 제어를 통한 세포 사멸 조절로, 단백질 응집체 형성 자체를 억제하거나 이미 생성된 응집체의 제거를 촉진하여 단백질 응집체가 교란하는 생체 내 신호전달 체계를 정상화하고 신경퇴화를 제어할 수 있다는 것이 알려져 있다. 이에 따라, 시험관내(*in vitro*)에서 뇌질환 관련 단백질을 제조하여 다양한 활성 화합물과의 상호 작용을 조사하는 연구, 뇌질환 관련 단백질 과발현 동물 모델을 활용하여 독성 기전을 탐구하는 연구, 산발적으로 뇌질환 치료제를 확인하는 연구들이 진행되고 있다.

[0004] 알츠하이머 치매는 아밀로이드 베타(amyloid-beta, A β) 플라크를 주요 병변으로 하며, 아밀로이드 베타 플라크를 제어할 수 있는 화합물로는 콩고 레드(Congo red), 크리사민 G(Chrysamine G), 커큐민(Curcumin) 및 HEPPS(3-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]propane-1-sulfonic acid)등이 보고된 바 있다.

[0005] 한편, 파킨슨병은 중뇌의 흑질(substantia nigra)에 생성되는 루이소체(Lewy body, LB)를 주요 병변으로 하며, 현재 파킨슨병에 대한 다양한 치료 약물들이 전임상 수준에서 평가되고 있다. 반면, 루이소체가 대뇌 피질 및 변연계에 퍼져 발병하는 루이소체 치매(Lewy body dementia)에 대한 유효 치료 화합물에 대한 평가는 거의 이루어지지 않은 실정이며, 루이소체 치매 연구를 위한 동물 모델도 확립되지 않은 실정이다.

[0006] 이에, 대뇌 피질 및 변연계에서의 루이소체 병변 형성을 억제하여 신경세포 기능 이상 및 신경세포 사멸을 방지할 수 있는 퇴행성 뇌질환 치료제의 개발 및 전임상 동물 모델에서의 유효성 검증이 요구되는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2021-0127609호 (2021.10.22. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 비정상 단백질 응집체의 형성을 억제하여 퇴행성 뇌질환을 치료할 수 있는 치료제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 푸세다노쿠마린 IV(Peucedanocoumarin IV, PCiv)이 AIMP2의 응집을 억제하고, 루이소체 병변 형성을 억제하며, 신경세포의 사멸을 억제하고, 신경염증을 억제하는 효과를 가짐을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 푸세다노쿠마린 IV(Peucedanocoumarin IV, PCiv)을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 푸세다노쿠마린 IV(Peucedanocoumarin IV, PCiv)을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상술한 식품 조성물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 푸세다노쿠마린 IV(Peucedanocoumarin IV, PCiv) 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 뇌질환의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명자들은 비정상 단백질 응집체의 형성을 억제하여 퇴행성 뇌질환을 치료할 수 있는 치료제를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 푸세다노쿠마린 IV(Peucedanocoumarin IV, PCiv)을 합성하였고, 푸세다노쿠마린 IV이 AIMP2의 응집을 억제하고, 루이소체 병변 형성을 억제하며, 신경세포의 사멸을 억제하고, 신경염증을 억제하는 효과를 가짐을 규명하였다.
- [0014] 본 명세서에서, "약제학적으로 허용되는 염"은, 모계 화합물(parent compounds)의 생물학적 유효성 및 특성을 보유하고, 1회 용량(dosage)이 투여될 때, 생물학적으로 또는 다른 방향으로 해롭지 않은 염들을 의미할 수 있다.
- [0015] 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 염기 부가 염들은 무기 및 유기 염기들로부터 제조될 수 있다. 무기 염기들로부터 유도된 염들은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 나트륨, 칼륨, 리튬, 암모늄, 칼슘, 및 마그네슘 염들을 포함할 수 있다. 유기 염기들로부터 유도된 염들은, 이에 제한되는 것은 아니지만, 일차, 이차 및 삼차 아민; 천연적으로 발생하는 치환된 아민들을 포함하는 치환된 아민들; 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 다이에틸아민, 트리에틸아민, 트리프로필아민, 에탄올아민, 2-다이메틸아미노에탄올, 트로메타민(tromethamine), 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 카페인, 프로카인(procaine), 히드라바민 (hydrabamine), 콜린(choline), 베타인(betaine), 에틸렌다이아민, 글루코사민, N-알킬글루카민, 테오브로민(theobromine), 퓨린, 피페라진, 피페리딘, 및/또는 N-에틸피페리딘을 포함하는 사이클릭 아민들의 염들을 포함할 수 있다. 다른 카르복실산 유도체, 예를 들어 카르복사마이드(carboxamides), 저급 알킬 카르복사마이드, 다이(저급 알킬) 카르복사마드 등을 포함하는 카르복실산 아마이드도 본 발명의 실시예에 있어서 유용하다는 것 또한 이해되어야 할 것이다.
- [0016] 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 산 부가 염들은 무기 및 유기산들로부터 제조될 수 있다. 무기산들로부터 유도된 염들은 염산, 브롬산, 황산, 질산, 인산 등을 포함한다. 유기산들로부터 유도된 염들은 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 피루브산, 옥살산, 말산 (malic acid), 말론산, 숙신산, 말레산(maleic acid), 푸마르산, 타르타르산, 시트르산, 벤조산, 신남산(cinnamic acid), 만델산(mandelic acid), 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산, 및/또는 살리실산 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 본 명세서에서, "퇴행성 뇌질환(degenerative brain disease)"은 중추신경계의 신경세포에 퇴행성 변화가 나타나면서 발생하는 모든 뇌질환을 포함하는 광의의 개념이다. 퇴행성 뇌질환은 대부분 발병 원인이 명확하게 알려져 있지 않지만, 연관 신경계를 선택적으로 침범하며, 질병의 발병이 천천히 시작하여 지속적인 진행을 보이는 것이 특징이다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 퇴행성 뇌질환은 루이소체 치매(Lewy body dementia, LBD), 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴 질환(Huntington's disease), 다계통성 신경 위축증(multiple system atrophy), 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis), 루게릭 병(amyolateral sclerosis), 폴리글루타민 확장증(polyglutamine expansion disease), 척 수소뇌성 실조증(spino-cerebellar ataxia), 척수 및 연수 근육위축(spinal and bulbar muscular atrophy), 타우증(tauopathy), 근육긴장 이상(dystonia), 서핀 결핍증(Serin deficiency), 경변증(cirrhosis), 제 II형 당뇨병, 일차 전신성 아밀로이드증, 이차 전신성 아밀로이드증, 프론토-일시적 치매(Fronto-temporal dementias), 노인 전신성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드 다발신경병(familial amyloid polyneuropathy), 유전성 대뇌 아밀로이드 맥관병(hereditary cerebral amyloid angiopathy), 혈투석-관련 아밀로이드증, 황반 퇴화(age-related macular degeneration), 치매(dementia), 알츠하이머 병(Alzheimer's disease, AD), 가족성 AD, 방사선 치료로 유도된 치매(radiotherapy induced dementia), 권투선수 치매(dementia pugilistica), 다운 증후군, 게르스트만-슈트라우슬러 샤인커병, 봉입체 근염(inclusion-body myositis), 프리온 단백질 뇌 아밀로이드 혈관병증(prion protein cerebral amyloid angiopathy), 축삭 돌기 상해(axon injury), 급성확산성 피질억제(acute cortical spreading depression), 알파-시누클레인성 병태(alpha-synucleinopathies), 광의 파킨슨증-치매 복합증(Parkinsonism-dementia complex of Guam), 신경 섬유 엉킴을 갖는 비-과메니언 운동 뉴런 질환(non-Guamanian motor neuron disease with neurofibrillary tangles), 은친화성 입자 질환(argyrophilic grain disease), 피질기저 변성(corticobasal degeneration), 석회화가 있는 확산 신경 섬유 엉킴(diffuse neurofibrillary tangles with calcification), 17번 염색체와 연관된 파킨슨증이 있는 전두측두부 치매 (frontotemporal dementia with

Parkinsonism linked to chromosome 17), 할러포르텐-스파츠병(Hallervorden-Spatz disease), 뇌졸중(stroke), 뇌경색(cerebral infarct), 머리외상(head trauma), 뇌동맥 경화증(cerebral arteriosclerosis), 뇌허혈(brainischemia), 영구 중뇌 허혈(permanent focal cerebral ischemia), 말초 신경 재생(peripheral nerve regeneration), 중첩성 간질 후 모델(post-status epilepticus model), 척수손상(spinal cord injury), 니만-피크 병 C형(Niemann-Pick disease type C), 팔리도-폰토-니그랄 변성(pallido-ponto-nigral degeneration), 픽병, 진행성 피질하 신경아교증(progressive subcortical gliosis), 진행성 핵상 마비 (PSP: progressive supranuclear palsy), 아급성 경화성 범뇌염(subacute sclerosing panencephalitis), 엉킴만 있는 치매(tangle only dementia), 경도 인지 장애(mild cognitive impairment, MCI), 뇌염후 파킨슨증, 근긴장성 이영양증(myotonic dystrophy), 타우 범뇌병증(Tau panencephalopathy), 성상세포가 있는 AD 유사증(AD-like with astrocytes), 노년 심 아밀로이드증(senile cardiac amyloidosis), 아밀로이드증(ocular amyloidosis), 산발성루게릭병(sporadic amyotrophic lateral sclerosis) 및 크로이츠펔트-야콥병으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 질환일 수 있으며, 보다 구체적으로는 파킨슨병(Parkinson's disease), 루이소체 치매(Lewy body dementia, LBD) 또는 다계통성 신경 위축증(multiple system atrophy)일 수 있고, 더욱 구체적으로는 루이소체 치매(Lewy body dementia, LBD)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0019] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 퇴행성 뇌질환은 비정상 단백질 응집체에 의하여 유발되는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상술한 비정상 단백질 응집체는 AIMP2 응집체, α -시누클레인 응집체, AIMP2 및 α -시누클레인의 응집체, 루이소체(Lewy body) 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0021] 퇴행성 뇌질환은 특징적인 변성 단백질 응집체를 주요 병변으로 한다. 특히, 파킨슨병(Parkinson's disease), 루이소체 치매(Lewy body dementia, LBD) 및 다계통성 신경 위축증(multiple system atrophy)의 경우 변성된 α -시누클레인(α -synuclein)이 응집하여 형성된 루이소체를 주요 병변으로 나타내며, 이러한 루이소체 병변으로 인하여 신경세포의 기능 이상 및 사멸이 유도된다. 한편, AIMP2(Aminoacyl-tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein-2)는 루이소체에서 α -시누클레인과 함께 발현되며, 도파민 세포 사멸과 루이소체 형성에 중요한 기능을 하는 질환 단백질이다.
- [0022] 본 명세서에서, “루이소체(Lewy body)”는 파킨슨병, 루이소체 치매와 같은 퇴행성 뇌질환 환자의 신경세포 내에서 발달하는 비정상적인 단백질 응집체를 의미한다. 루이소체는 주로 α -시누클레인의 비정상적인 접힘(abnormal folding)과 응집에 의해 형성되나, α -시누클레인 이외에 AIMP2(Aminoacyl-tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein-2), 파킨(Parkin)의 독성 기질, E3 라이게이스 등의 다양한 단백질도 루이소체에서 발견된다.
- [0023] “ α -시누클레인(α -synuclein, α -Syn)”은 주로 뇌 조직과 신경 세포에서 발견되는 단백질로, 주로 중추 신경계(CNS)의 뉴런에서 발현되며 주로 시냅스전(presynapse)에 위치하여 신경전달 물질 방출은 증가시킴으로써 시냅스 전달(synaptic transmission) 및 시냅스 가소성(synaptic plasticity)에서 핵심적인 역할을 수행한다. 상술한 바와 같이, α -시누클레인이 비정상적으로 접히고 응집하게 되는 경우 루이소체를 형성할 수 있다.
- [0024] “AIMP2(Aminoacyl-tRNA synthetase complex interacting multifunctional protein-2)”는 단백질 합성 전에 특정 아미노산을 tRNA에 결합하는 효소들의 중합체를 안정화시키는 비효소성 구조 단백질이다. AIMP2가 비정상적으로 축적되는 경우, 파킨슨병에서 도파민성 뉴런(dopaminergic neuron, DA)의 손실이 일어나는 것으로 알려져 있다. 또한, AIMP2는 루이소체에서 α -시누클레인과 함께 발견되기도 하여, 루이소체 형성에 중요한 기능을 하는 단백질로 연구되고 있다.
- [0025] 현재까지 시험관 내(*in vitro*)에서 재조합 α -시누클레인 응집 시스템을 활용하여 α -시누클레인의 응집을 억제하는 화합물이나 항체 제제를 발굴함으로써 파킨슨병의 루이소체 병변을 제어하는 연구가 광범위하게 이루어져 왔으나, α -시누클레인과 AIMP2에 동시에 응집 억제 효과를 갖는 물질에 대한 연구는 미비한 실정이었다. 또한, 중뇌의 흑질에 생성되는 루이소체를 주요 병변으로 하는 파킨슨병과는 달리, 루이소체가 대뇌 피질 및 뇌간(해마)에 퍼져 발병하는 루이소체 치매(Lewy body dementia)에 대한 유효 치료 화합물에 대한 평가는 거의 이루어지지 않은 실정이며, 루이소체 치매 연구를 위한 동물 모델도 확립되지 않은 실정이다.
- [0026] “루이소체 치매(Lewy body dementia, LBD)”는 대뇌 피질 또는 해마의 신경세포 내부에 알파-시누클레인이 응집되어 형성되는 루이소체를 병변으로 하는 치매로서, 알츠하이머 치매 다음으로 흔한 퇴행성 치매의 원인 질환이다.

- [0027] 본 명세서에서, 루이소체 치매(Lewy body dementia, LBD)는 정확하게는 “루이소체를 동반한 치매(Dementia with Lewy Bodies, DLB)” 및 “파킨슨병 치매(Parkinson's Disease Dementia, PDD)”를 총칭하는 상위 개념을 의미한다. 치매의 원인으로는 루이소체를 동반한 치매(Dementia with Lewy Bodies, DLB)가 더 일반적이다.
- [0028] 루이소체 치매(Lewy body dementia, LBD)와 파킨슨병(PD)은 모두 루이소체를 주요 병변으로 하나, 루이소체가 두뇌의 어느 부위에 형성되는지에 따라 구분된다.
- [0029] 루이소체 치매의 경우, 대뇌 피질 및 변연계에 루이소체 병변이 광범위하게 발생하여 인지 변동(fluctuation), 인지기능 저하, 환각(hallucination), 램수면행동장애(rapid eye movement sleep behavior disorder, RBD)와 같은 인지기능 장애, 행동 장애 및 정신과적 증상을 주로 나타낸다. 반면, 파킨슨병은 주로 중뇌(mesencephalon)의 흑질(substantia nigra)에 루이소체 병변이 발생한다. 흑질은 운동 조절에 관여하는 부위이므로, 파킨슨병의 주요 증상으로는 안정시 근육의 떨림(tremor), 운동완서(bradykinesia), 근육 강직(rigidity), 자세 불안정(postural instability)과 같은 운동 장애 증상이 나타난다. 치매와 환각은 초기 파킨슨병에서는 거의 나타나지 않는다.
- [0030] 특히, 루이소체 치매(LBD)에 포함되는 파킨슨병 치매(PDD)의 경우, 그 원인이 명확하게 판명되지는 않았으나, 파킨슨병 발병 후 10년 정도의 시간이 경과한 환자의 25% 내지 30%의 환자에게 나타나는 것으로 알려져 있다. 파킨슨병 치매 환자의 경우, 루이소체가 중뇌의 흑색질 뿐만 아니라 대뇌 피질에도 전반적으로 걸쳐 분포하는 상태이므로, 파킨슨병의 운동 장애 증상에 더하여 기억력 감소, 실행기능 장애 등의 심각한 인지기능 장애 증상을 보인다.
- [0031] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 비정상 단백질 응집체 형성을 억제하거나 비정상 단백질 응집체를 분해하는 것일 수 있다.
- [0032] 후술될 실시예에서 입증한 바와 같이, 본 발명의 조성물의 유효성분인 푸세다노쿠마린 IV은 α -시누클레인 응집으로 인한 루이소체 형성을 억제하는 효능을 갖는다.
- [0033] 특히, 본 발명의 조성물의 유효성분인 푸세다노쿠마린 IV이 AIMP2 응집도 억제하였음에 비추어, AIMP2 응집에 의하여 촉발되는 α -시누클레인 응집 병변의 형성도 억제할 수 있음을 알 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 신경세포 사멸을 억제하는 것일 수 있다.
- [0035] 후술될 실시예에서 입증한 바와 같이, 본 발명의 조성물의 유효성분인 푸세다노쿠마린 IV은 이미 형성된 루이소체에 따른 신경세포의 사멸을 억제하는 효능을 갖는다.
- [0036] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 신경염증을 억제하는 것일 수 있다.
- [0037] 후술될 실시예에서 입증한 바와 같이, 본 발명의 조성물의 유효성분인 푸세다노쿠마린 IV은 루이소체 치매로 인한 신경염증을 억제하는 효능을 갖는다.
- [0038] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용가능한 부형제, 담체, 또는 희석제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0039] "약제학적으로 허용가능한(pharmaceutically acceptable)"은 제제가 멸균이고 발열원(pyrogen)이 없는 것을 의미한다. 적절한 약제학적 담체는 약제학 분야에서 잘 알려져 있다. 상기 담체(들)은 본 발명의 유효성분의 효능에 악영향을 미치지 않고 그의 수용자(recipient)에게 해롭지 않다는 의미에서 "허용가능(acceptable)"해야 한다. 전형적으로, 상기 담체는 멸균되고 발열원이 없는 물 또는 식염수일 것이다; 그러나, 다른 허용가능한 담체가 사용될 수 있다. 따라서, "약제학적으로 허용가능한 담체(pharmaceutically acceptable carrier)" 및 "약제학적으로 허용가능한 부형제(pharmaceutically acceptable excipient)"는 단순히 담체로서 작용하도록 의도된, 즉, 그 자체의 생물학적 활성을 갖는 것으로 의도되지 않는, 제제의 일부를 형성하는데 사용된 화합물(들)을 포함한다. 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제는 일반적으로 안전하고, 무독성이다. 본 명세서에 사용된 것과 같은 약제학적으로 허용가능한 담체 및/또는 부형제는 1 이상의 담체 및/또는 부형제를 모두 포함한다.
- [0040] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸 히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0041] 부형제는 하나 이상의 탄수화물, 폴리머, 지질 및 미네랄일 수 있다. 탄수화물의 예는 락토스, 수크로스, 만니톨, 및 시클로덱스트린을 포함하고, 이것은 예를 들어, 동결건조를 가능하게 하기 위해 조성물에 첨가된다. 폴리머의 예는 전분, 셀룰로스 에테르, 셀룰로스 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필메틸 셀룰로스, 히드록시에틸 셀룰로스, 에틸히드록시에틸 셀룰로스, 알기네이트, 카라기난, 히알루론산 및 그의 유도체, 폴리아크릴산, 폴리술포네이트, 폴리에틸렌글리콜/폴리에틸렌 옥시드, 폴리에틸렌옥시드/폴리프로필렌 옥시드 코폴리머, 상이한 가수분해도(degree of hydrolysis)의 폴리비닐알콜/폴리비닐아세테이트, 및 모든 상이한 분자량의 폴리비닐피롤리돈이고, 이들은 예를 들어, 점도 조절을 위해, 점착을 이루기 위해, 또는 화학적 및 단백질 분해성 분해로부터 지질을 보호하기 위해 상기 조성물에 첨가된다. 지질의 예는 지방산, 인지질, 인산, 모노-, 다이-, 및 트리글리세리드, 세라마이드, 모든 상이한 아실 사슬 길이 및 포화의 스펙고지질 및 당지질, 달걀 레시틴, 콩 레시틴, 수소화된 달걀 및 콩 레시틴이고, 이들은 폴리머에 대한 이유와 유사한 이유로 조성물에 첨가된다. 미네랄의 예는 탈크, 산화마그네슘, 산화아연 및 산화티타늄이고, 이들은 액체 축적의 감소 또는 유리한 색소 특성과 같은 이점을 수득하기 위해 상기 조성물에 첨가된다.
- [0042] 희석제(diluent)는 약제학적 제조에서 펩타이드를 희석할 목적을 갖는 수성 또는 비-수성 용액을 의미하는 것으로 의도된다. 희석제는 하나 이상의 식염수(saline), 물, 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 에탄올 또는 (홍화유, 옥수수유, 땅콩 기름, 면실유 또는 참기름과 같은) 오일일 수 있다.
- [0043] 희석제는 또한 완충액으로서 기능할 수 있다. 용어 "완충액(buffer)"은 pH를 안정화하는 목적을 갖는 산-염기 혼합물을 함유하는 수성 용액을 의미하는 것으로 의도된다. 완충액의 예는 Trizma, Bicine, Tricine, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, 포스페이트, 카르보네이트, 아세테이트, 시트레이트, 글리콜레이트, 락테이트, 보레이트, ACES, ADA, 타르타레이트, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, 카코딜레이트, CHES, DIPSO, EPPS, 에탄올아민, 클리신, HEPPSO, 이미다졸, 이미다졸락트산, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO 및 TES이다.
- [0044] 본 발명의 약제학적 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.
- [0045] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 예컨대 정맥내 투여, 피하 투여, 근육 투여, 복강 내 투여, 척수강 내 투여, 뇌내 투여, 흉골내 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 본 발명의 약제학적 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 구현예에 따르면, 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 0.0001-100 mg/kg이다. 본 명세서에서 용어 "약제학적 유효량"은 상술한 질환을 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0047] 본 명세서에서 용어 "예방"은 질환 또는 질환 상태의 방지 또는 보호적인 치료를 의미한다. 본 명세서에서 용어 "치료"는 질환 상태의 감소, 억제, 진정 또는 근절을 의미한다.
- [0048] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 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 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 좌제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 푸세다노쿠마린 IV(Peucedanocoumarin IV, PCiv)을 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 상기 식품 조성물은 건강기능 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가될 수 있다.
- [0051] 본 명세서에서, "개선"은 본 발명의 대상 질환인 퇴행성 뇌질환의 증상을 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0052] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 식품 조성물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품을 제공한다.

- [0053] 상기 건강기능 식품은 음료류, 육류, 초콜릿, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 또는 건강보조 식품류일 수 있다.
- [0054] 상술한 식품 조성물에 함유된 푸세다노쿠마린 IV의 함량은 식품의 형태, 소망하는 용도 등에 따라 적절하게 조절될 수 있고 특별한 제한이 없다. 예컨대, 혼합추출물의 함량은 전체 식품 중량의 0.001 중량% 내지 30 중량% 또는 0.01 중량% 내지 20 중량%일 수 있고, 건강 음료 조성물의 경우 100 ml을 기준으로 0.001 g 내지 15 g, 0.02 g 내지 10 g, 또는 0.3 g 내지 1 g일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 본 발명의 푸세다노쿠마린 IV을 포함하는 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효 성분으로서 상기 추출물뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있다. 상기 첨가 성분은 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 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 상기 추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.
- [0056] 본 발명의 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 식품 조성물은 상술한 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물과 동일하게 유효성분으로서 푸세다노쿠마린 IV을 포함하기 때문에, 양 발명 간에 공통된 사항은 본 명세서의 과도한 중복성을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0057] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 푸세다노쿠마린 IV을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 치료가 필요한 대상체(subject)에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 치료방법을 제공한다.
- [0058] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 대상체는 포유동물 또는 인간이다.
- [0059] 본 발명의 퇴행성 뇌질환의 치료방법은 상술한 약제학적 조성물을 대상체에 투여하는 방법이므로, 중복되는 내용에 대해서는 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [0061] 본 발명은 푸세다노쿠마린 IV를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 치료 또는 개선용 조성물을 제공한다. 본 발명의 조성물은 AIMP2의 응집을 억제하고, 루이소체 병변 형성을 억제하며, 신경세포의 사멸을 억제하고, 신경염증을 억제하는 효과를 가지므로, 현재 실제적인 치료제가 부재한 비정상 단백질 응집체에 의한 퇴행성 뇌질환, 특히 루이소체 치매의 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0062] 도 1a는 반즈 미로(barnes maze) 테스트에서 최대 5분간 마우스가 탈출 박스를 찾아 들어가는 데 걸리는 경로를 기록한 것이다.
- 도 1b는 실험 일차 별 탈출 박스로 나가는 시간을 기록한 그래프이다.
- 도 1c는 Y자 미로 테스트에서 5분간 마우스가 Y자 미로 내 이동한 경로를 기록한 것이다.
- 도 1d는 마우스가 각 구역에 순차적으로 한 번씩 들어간 비율(alternation triplet)을 나타낸 그래프이다.
- 도 1e는 마우스가 Y자 미로에서 이동한 전체 거리를 비교한 그래프이다.
- 도 1f는 마우스가 일정하게 가속되는 로타로드(RotaRod)에서 떨어지지 않고 유지하는 시간을 측정한 결과이다.
- 도 2는 재조합 AIMP2 단백질의 아밀로이드 응집체 형성을 티오플라빈 T(thioflavin T, ThioT) 형광으로 정량한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3a는 각 마우스 군의 해마와 대뇌 피질의 루이소체를 pS129- α -synuclein으로 염색한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3b는 도 3a의 인산화- S129- α -synuclein의 상대적인 양을 나타낸 그래프이다.

도 4a는 각 마우스 군의 해마와 대뇌 피질의 신경세포 사멸을 확인하기 위한 니슬 염색(Nissl staining) 결과를 나타낸 것이다.

도 4b는 도 4a에 나타난 해마 CA1 영역의 두께를 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 4c는 도 4a 나타난 대뇌 피질에서 0.01mm^2 당 니슬 염색된 신경세포의 개수를 비교한 그래프이다.

도 5a는 각 마우스 군의 해마와 대뇌 피질에서 GFAP(Glial fibrillary acidic protein, 신경교섬유질산성단백질)로 표지되는 성상교세포를 염색한 결과를 나타낸 것이다.

도 5b는 도 5a에 나타난 GFAP로 표지된 성상교세포를 단위면적 당 차지하는 %로 나타낸 그래프이다.

도 5c는 각 마우스 군의 해마와 대뇌 피질에서 Iba-1(Ionized calcium binding adaptor molecule 1)로 표지되는 미세아교세포(microglia)를 염색한 결과를 나타낸 것이다.

도 5d는 도 5c에 나타난 Iba-1로 표지된 미세아교세포를 단위면적 당 차지하는 %로 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063]

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 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0065]

실시예

[0067]

본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

[0069]

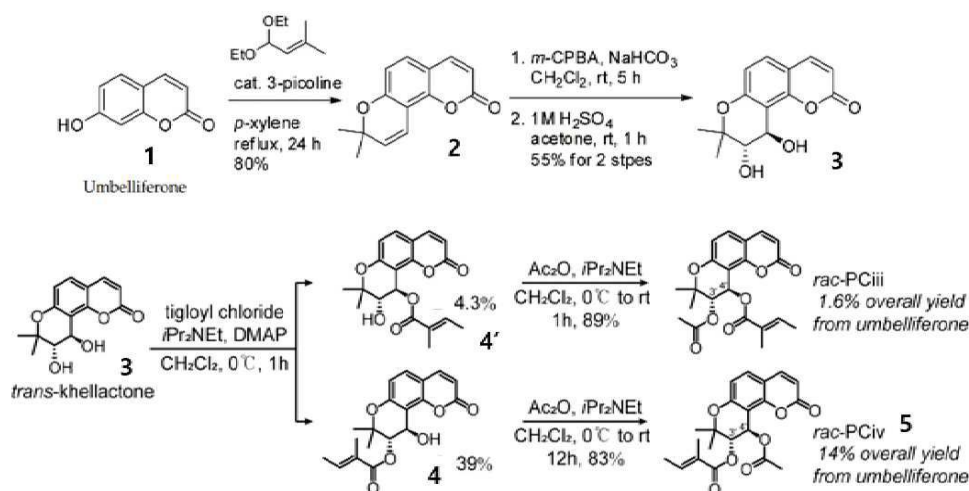
실험재료 및 실험방법

[0070]

1. 퓨세다노쿠마린 IV의 유기 합성

[0071]

퓨세다노쿠마린 IV를 유기적으로 합성하는 전체적인 합성 경로는 다음과 같다.



[0072]

[0073]

움벨리페론(Umbelliferone)(1)에 1,1-다이에톡시-3-메틸-2-뷰텐(1,1-Diethoxy-3-methyl-2-butene)을 처리한 후, 열 조건에서 고리화하여 높은 수율의 세셀린(seselin)(2)을 생성하였다. 이후 세셀린에 존재하는 알켄의 mCPBA 에폭시화를 통하여 trans-diol 형태의 화합물(3)을 얻었으며, 이를 약염기 조건 하에서 tigloyl chloride(trans-2-methyl-2-butenoyl chloride) 또는 무수 아세트산을 사용하여 에스터화하고, 중간체로서 화

합물 **4'** 또는 화합물 **4**를 얻었다. 10 ml의 CH₂Cl₂ 중 340 mg, 1.0 mmol의 화합물(**4**)의 용액에 iPr₂NEt(0.35 mL, 2.0mmol) 및 무수 아세트산(0.14 mL, 1.5mmol)을 0℃에서 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온으로 데우고 12 시간 동안 교반한 후, 반응 혼합물에 NH₄Cl(aq)를 첨가하고 분리 깔때기로 옮겨 CH₂Cl₂로 2 회 추출하였다. 유기 층을 MgSO₄로 건조시키고, 여과한 후 진공에서 증발시켰다. 잔류물을 실리카겔(에틸 아세테이트 : n-헥산 = 1 : 2)에서 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 푸세다노쿠마린 IV(**5**) 라세미체(320mg, 83%)를 비정질 고체로 수득하였다. 푸세다노쿠마린 IV(PCiv) (**5**): ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 7.58 (1H, d, J = 15.6 Hz), 7.35 (1H, d, J = 14.5 Hz), 6.80 (1H, m,), 6.78 (1H, d, J = 14.5 Hz), 6.24 (1H, d, J = 7.5 Hz), 6.21 (1H, d, J = 15.6 Hz), 5.31 (1H, d, J = 8.0 Hz), 2.08 (3H, s), 1.78 (3H, t, J = 1.0 Hz), 1.74 (3H, dd, J = 12.0, 1.5 Hz), 1.41 (3H, s), 1.33 (3H, s); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) δ 169.5, 166.3, 159.9, 156.5, 154.0, 143.3, 138.9, 129.1, 127.7, 114.4, 113.1, 112.5, 107.0, 71.9, 63.8, 24.2, 22.6, 20.7, 14.5, 12.1. LRMS (FAB) m/z 386 (M⁺); HRMS (FAB) Calcd for C₂₁H₂₂O₇ (M⁺): 386.1366, Found 386.1381.

[0075] 2. 실험동물의 준비 및 실험동물에 푸세다노쿠마린 IV 투여

[0076] 다음과 같은 방법으로 AIMP2 및 α-시누클레인(α-synuclein)을 해마와 대뇌 피질에 발현하는 루이소체 치매 마우스 모델을 확립하였다.

[0077] AIMP2와 α-시누클레인(α-synuclein)을 신경세포 특이적으로 발현 유도하기 위해서 Jackson Laboratory로부터 3 종의 마우스 라인(Camk2a-tTA 드라이버 마우스- Tg(Camk2a-tTA)1Mmay; *TetO-AIMP2* 리스폰더(responder) 마우스-Tg(tetO-AIMP2)630Tmd/J ; *TetO-α-synuclein* 리스폰더 마우스-Tg(tetO-SNCA*A53T)E2Cai/J)을 구매하였다. *TetO-AIMP2* 마우스와 *TetO-α-synuclein* 마우스를 교배하여 두 유전자형을 모두 가진 double-Tg 마우스를 만든 후 Camk2-tTA 마우스와 교배하여 최종적으로 triple-Tg(AIMP2;αSyn Tg) 마우스를 만들었다. Camk2a-tTA 유전자형은 Camk2a 프로모터로부터 발현 유도된 tTA가 다운스트림(downstream)의 TetO 프로모터를 활성화시킴으로써 AIMP2 및 α-시누클레인의 신경세포 내 발현을 증폭시킨다. 이렇게 제조된 마우스 모델은 본 발명자들이 특허로 보유(대한민국 등록특허 제10-2198497호, 2020.12.29. 등록) 하고 있는 신규한 마우스 모델로서, 루이소체 형성을 가속화하는 루이소체 치매 마우스 모델이다.

[0078] 상기 루이소체 치매 마우스 모델을 활용하여, 푸세다노쿠마린 IV의 치료 활성을 검증하였다. 루이소체 치매 마우스 모델은 2 개월령이 될 때까지 독시사이클린(doxycycline) 사료를 급여해서 병변 발현을 제어하였고, 이후 독시사이클린을 제거하고 일반 식이(regular diet)를 급여하면서 AIMP2 및 α-시누클레인의 발현을 유도하였다. 병변 유도를 시작하는 2개월령부터, 푸세다노쿠마린 IV 사료 (50mg/kg/day)를 1개월간 경구로 급여하였다.

[0080] 3. 시험관내(in vitro) AIMP2 응집 및 티오플라빈 T(thioflavin T) 분석

[0081] 3 일간 재조합 AIMP2 단백질의 인큐베이션에 의해 나타나는 티오플라빈 T(thioflavin T, ThioT) 형광의 증가를 다음과 같은 방법으로 확인하였다. PBS에 최종 1μM 농도의 단백질 (재조합 AIMP2 모노머 또는 α-시누클레인 모노머)에 적시된 농도의 화합물을 첨가하여 E-tube에 준비하였다. 37℃, 250 rpm 조건으로 3 일 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션이 완료된 단백질 중 80 μl를 티오플라빈 T 분석에 사용하였다.

[0083] 4. 면역조직화학(Immunohistochemistry)

[0084] 동결절편(cryo-section)한 쥐의 뇌 조직을 5% 염소 혈청(goat serum)(0.1% Triton-X100 base)에 넣고 약 1시간 동안 반응시켰다. 블로킹(Blocking) 완료 후 1차 항체를 넣고 4℃ 조건에서 밤새 록킹(rocking)하였다. 이후, 상온에서 0.1% triton-x로 10 분간 3 회 세척하고, 2차 항체를 넣고 약 1시간 상온에서 반응시켰다. 다시 상온에서 0.1% triton-x로 10 분간 3회 세척하고, ABS solution에서 약 1 시간 동안 상온에서 반응시켰다. 1x PBS로 상온에서 10분간 3 회 세척하고, 3,3-diaminobenzidine solution으로 반응시킨 후 1xPBS에 넣어 반응을 중지시켰다. 이후, 시료를 슬라이드에 마운팅하고, 니슬 염색(nissl staining)을 하기와 같이 진행하였다.

[0086] 5. 니슬 염색(Nissl staining)

- [0087] 시료를 100% 에탄올에 5 분간 반응시키고, 95% 에탄올에 2분간 반응시킨 뒤, 증류수에 2 분간 반응시켰다. 이후, Cresyl violet solution에 30 초간 반응시키고, 증류수로 2 분간 2회 세척하였다. destaining solution에 5분간 2 회 반응시키고, 증류수로 2 분간 3 회 세척한 뒤, 100% 에탄올에 5 분간 2 회 반응시키고 자일렌(xylene)에 10 분간 반응시켰다.
- [0089] **6. 행동 검사(Behavior test)**
- [0090] **6-1. 반즈 미로(Barnes maze) 테스트**
- [0091] 지름 90 cm의 원판에 12개의 구멍을 내고 한 곳에만 탈출 박스를 만들었다. 5 분간 쥐가 원판 위를 자유롭게 다닐 수 있게 두고, 2 일간의 training 후 본 실험을 진행하였다. 실험 0 일, 1 일, 5 일차를 각각 DAY1, DAY2, DAY3로 명명하고 원판에서 탈출 박스로 나가는 시간을 기록하였다.
- [0093] **6-2. Y자 미로(Y maze) 테스트**
- [0094] Y 자 미로를 준비하고, 5 분간 쥐가 다닌 경로를 기록하였다.
- [0096] **6-3. 폴 테스트(Pole test)**
- [0097] 높이 60 cm, 지름 1 cm의 폴(pole)을 준비하고, 폴이 있는 케이지에 마우스를 넣고 1 분간 방치하였다. 마우스를 폴의 맨 위에 올려놓고 바닥으로 내려오는 시간을 기록하였다. 테스트는 총 10 회 시도하여 평균값을 분석에 사용하였다.
- [0099] **6-4. 로타로드 테스트(RotaRod test)**
- [0100] 5분간 40 rpm까지 점진적으로 속도가 빨라지는 막대(rod)인 로타로드에서 마우스가 떨어지는 시간을 측정하였다. 2 일간 training 후 3 일차에 테스트를 진행하였다. 로타로드에 마우스를 올려놓고 1 분간 적응시킨 후, 마우스가 떨어지는 시간을 기록하였다.
- [0103] **실시예 1: 퓨세다노쿠마린 IV에 의한 루이소체 치매 동물 모델의 운동 장애 및 비운동 장애 개선 확인**
- [0104] 루이소체 치매 환자에서는 기억력 장애와 함께 운동 장애가 나타난다. 이에, 다음과 같은 방법으로 퓨세다노쿠마린 IV 사료를 1 개월간 급여한 후 비운동 장애 및 운동 장애 증상이 개선되는지 여부를 확인하였다.
- [0105] i) 일반 사료(normal diet)를 급여한 야생형 마우스 군(Normal diet-CON 군), ii) 일반 사료를 급여한 루이소체 치매 마우스 모델 군(Normal diet-AIMP2;aSyn Tg 군), iii) 퓨세다노쿠마린 IV 사료를 급여한 야생형 마우스 군(PCiv diet-CON 군), iv) 퓨세다노쿠마린 IV 사료를 급여한 루이소체 치매 마우스 모델 군(PCiv diet-AIMP2;aSyn Tg 군)을 분석하였다.
- [0106] 마우스의 공간학습과 기억력을 평가하기 위해 수행한 반즈 미로(barnes maze) 테스트에서, 퓨세다노쿠마린 IV 사료를 급여한 루이소체 치매 마우스 모델 군(PCiv diet-AIMP2;aSyn Tg 군)이 일반 사료를 급여한 루이소체 치매 마우스 모델 군(Normal diet-AIMP2;aSyn Tg 군)보다 탈출 박스를 찾는 시간이 감소하여, 야생형 마우스 군과 유사함을 확인할 수 있었다(도 1a 및 도 1b).
- [0107] Y자 미로(Y maze) 테스트에서도, 도 1c 내지 도 1e에 나타난 바와 같이, 퓨세다노쿠마린 IV 사료를 급여한 루이소체 치매 마우스 모델 군(PCiv diet-AIMP2;aSyn Tg 군)의 마우스가 각 구역에 순차적으로 한 번씩 들어간 비율(alternation triplet) 및 전체적으로 이동한 거리가 야생형 마우스 수준으로 개선되었음을 확인할 수 있었다.
- [0108] 마우스의 운동 조율 능력을 측정하는 로타로드(RotaRod) 테스트 결과, 마찬가지로 퓨세다노쿠마린 IV 사료를 급여한 루이소체 치매 마우스 모델 군(PCiv diet-AIMP2;aSyn Tg 군)에서 일반 사료를 급여한 루이소체 치매 마우스 모델 군(Normal diet-AIMP2;aSyn Tg 군)보다 운동 조율 능력이 개선되었음을 확인할 수 있었다(도 1f).

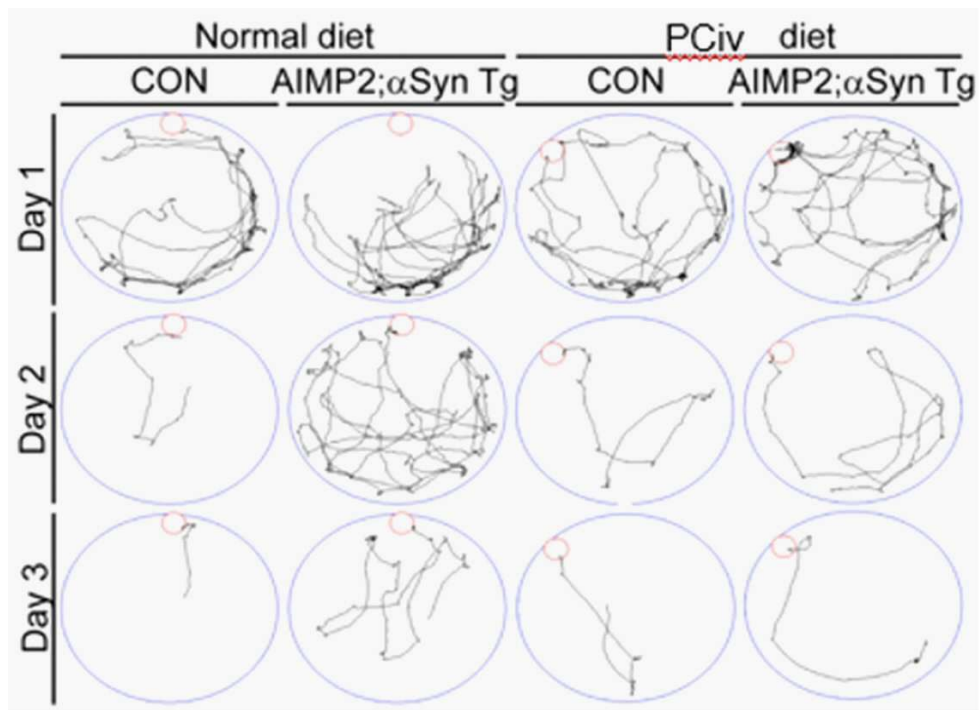
- [0109] 종합하면, 상기 실험에 의하여 푸세다노쿠마린 IV이 AIMP2 및 α -시누클레인 발현에 의하여 나타나는 비운동 장애 및 운동 장애 증상을 개선할 수 있음이 증명되었다.
- [0111] **실시예 2: 푸세다노쿠마린 IV에 의한 루이소체 치매 동물 모델에서의 AIMP2 응집 억제 활성 확인**
- [0112] AIMP2는 α -시누클레인 응집에 관여하여 α -시누클레인 응집에 의한 루이소체 형성에 잠재적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0113] 시험관내(*in vitro*)에서 재조합 AIMP2 단백질의 인큐베이션에 의해 나타나는 티오플라빈 T(thioflavin T, ThioT) 형광의 증가를 확인한 결과를 도 2에 나타냈다. 도 2에 나타난 바와 같이, 푸세다노쿠마린 IV이 AIMP2 응집을 유의적으로 억제함을 확인할 수 있었다.
- [0115] **실시예 3: 푸세다노쿠마린 IV에 의한 루이소체 치매 동물 모델에서의 루이소체 병변 형성 억제 확인**
- [0116] AIMP2와 α -시누클레인을 함께 발현시키면 루이소체를 형성한다. 루이소체는 통상적으로 인산화 형태의 α -synuclein (pS129- α -synuclein)을 표지하는 특이 항체를 이용하여 검출한다. 우선 해마와 대뇌 피질에서 푸세다노쿠마린 IV에 의해 루이소체 형성이 억제되는지를 확인하기 위하여 면역 조직 염색을 수행하였다. pS129- α -synuclein 항체를 사용한 면역 조직 염색 후 확인한 결과, 일반 사료를 급여한 루이소체 치매 마우스 모델 군(Normal diet-AIMP2;aSyn Tg 군)에 비하여, 푸세다노쿠마린 IV 사료를 급여한 루이소체 치매 마우스 모델 군(PCiv diet-AIMP2;aSyn Tg 군)에서 해마와 대뇌 피질의 루이소체 병변이 현저하게 감소함을 확인할 수 있었다(도 3a 및 도 3b).
- [0117] 이와 같이, 푸세다노쿠마린 IV이 α -시누클레인 응집으로 인한 루이소체 형성을 억제하는 효능을 가짐을 확인할 수 있었다.
- [0119] **실시예 4: 푸세다노쿠마린 IV에 의한 루이소체 치매 동물 모델에서의 신경세포 사멸 억제 확인**
- [0120] 다음으로, 푸세다노쿠마린 IV이 루이소체에 의한 신경세포 사멸을 개선하는지를 확인하기 위하여 니슬 염색(Nissl staining)을 수행하였다. 그 결과, 도 4a 내지 도 4c에 나타난 바와 같이, 일반 사료를 급여한 루이소체 치매 마우스 모델 군(Normal diet-AIMP2;aSyn Tg 군)의 경우 해마와 대뇌 피질에서 신경세포의 사멸이 관찰된 반면, 푸세다노쿠마린 IV 사료를 급여한 루이소체 치매 마우스 모델 군(PCiv diet-AIMP2;aSyn Tg 군)의 경우에는 야생형 마우스 군과 차이가 없음을 확인할 수 있었다.
- [0121] 이와 같이, 이미 형성된 루이소체에 따른 신경세포의 사멸을 억제하는 효능을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0123] **실시예 5: 푸세다노쿠마린 IV에 의한 루이소체 치매 동물 모델에서의 신경염증 억제 확인**
- [0124] 루이소체 치매와 같은 퇴행성 뇌질환은 신경 염증을 동반하며, 마찬가지로 AIMP2와 α -시누클레인을 함께 발현시킨 동물 모델에서도 신경염증이 확인된다.
- [0125] 푸세다노쿠마린 IV에 의하여 해마와 대뇌 피질의 신경염증이 억제되는지를 확인하기 위하여, 면역 조직 염색을 수행하였다. 성상교세포(astrocyte)에서 발현되는 GFAP(Glial fibrillary acidic protein, 신경교섬유질산성단백질) 및 미세아교세포(microglia)에서 발현되는 Iba-1(Ionized calcium binding adaptor molecule 1)은 뇌 염증 및 신경염증 과정에서 증가하여 신경염증을 나타내는 바이오마커이다.
- [0126] 면역 조직 염색 수행 결과, GFAP로 표지되는 성상교세포 및 Iba-1로 표지되는 미세아교세포가 푸세다노쿠마린 IV 사료를 급여한 루이소체 치매 마우스 모델 군(PCiv diet-AIMP2;aSyn Tg 군)에서 일반 사료를 급여한 루이소체 치매 마우스 모델 군(Normal diet-AIMP2;aSyn Tg 군)에 비하여 감소하였음을 확인할 수 있었다(도 5a 내지 도 5d).
- [0127] 또한, 형태학적 관점에서 푸세다노쿠마린 IV 사료를 급여한 루이소체 치매 마우스 모델 군(PCiv diet-AIMP2;aSyn Tg 군)에서 일반 사료를 급여한 루이소체 치매 마우스 모델 군(Normal diet-AIMP2;aSyn Tg 군)보다 성상교세포와 미세아교세포의 활성이 감소됨을 확인할 수 있었다(도 5a 및 도 5c).

[0128] 이와 같이, 푸세다노쿠마린 IV이 루이소체 치매로 인한 신경염증을 억제하는 효능이 가짐을 확인할 수 있었다.

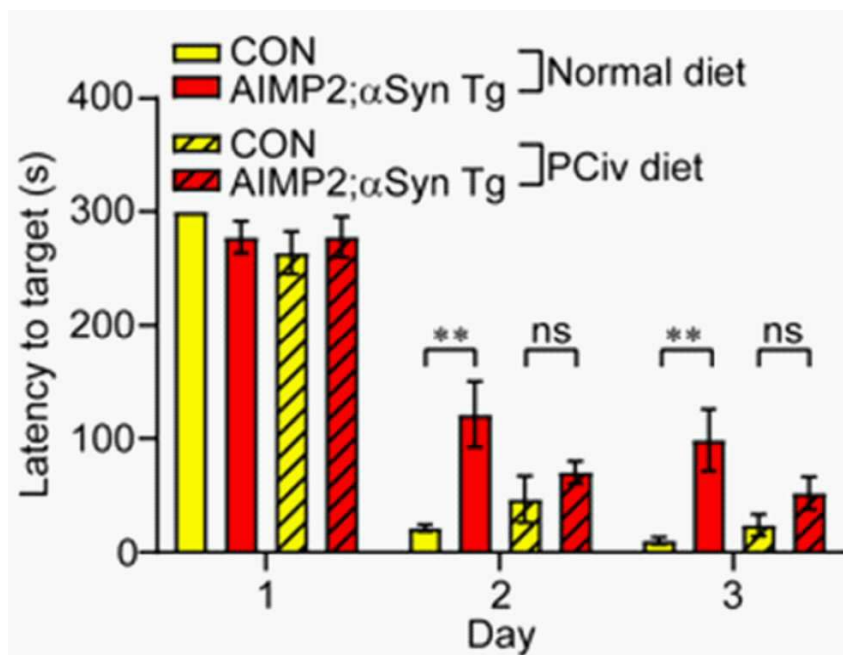
[0130] 이상의 결과로부터, AIMP2 및 α -시누클레인이 동시 발현된 루이소체 치매 동물 모델에서 푸세다노쿠마린 IV이 효과적으로 루이소체 응집을 억제하고, 이미 형성된 루이소체에 따른 신경세포의 사멸을 억제하며, 신경염증을 억제함을 확인할 수 있었다.

도면

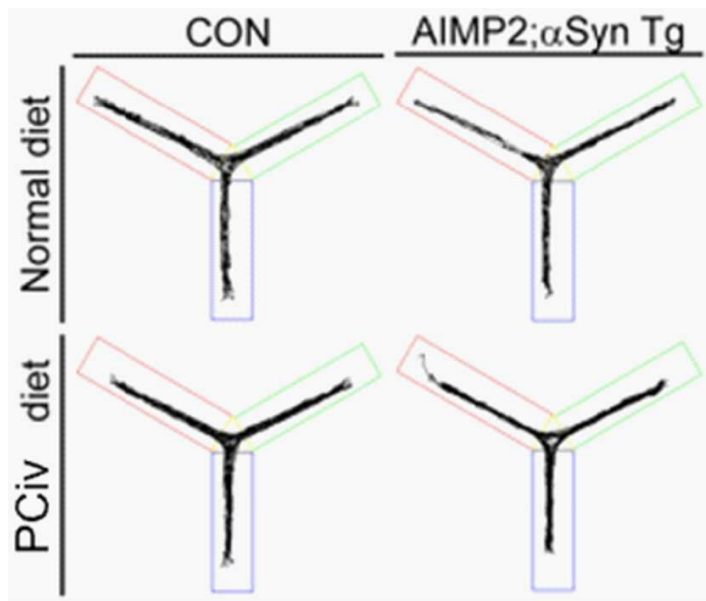
도면1a



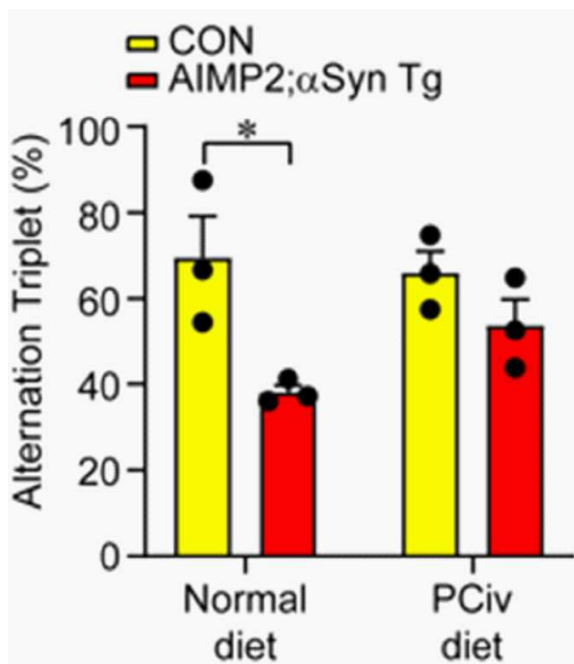
도면1b



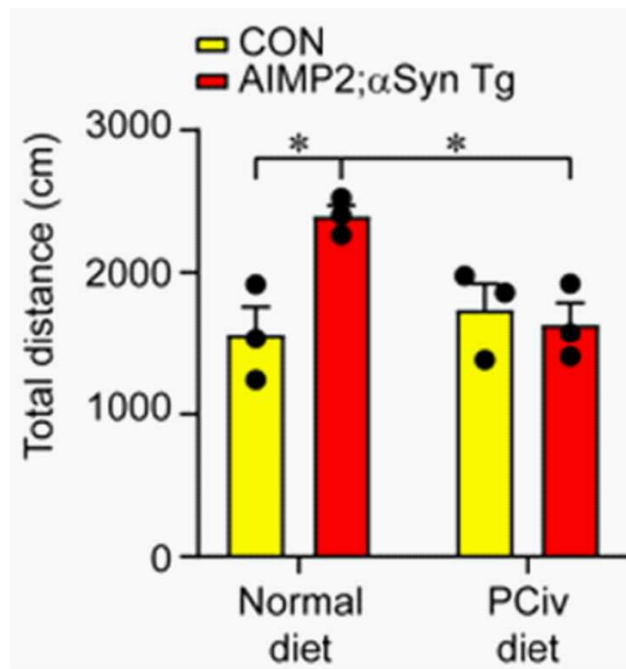
도면1c



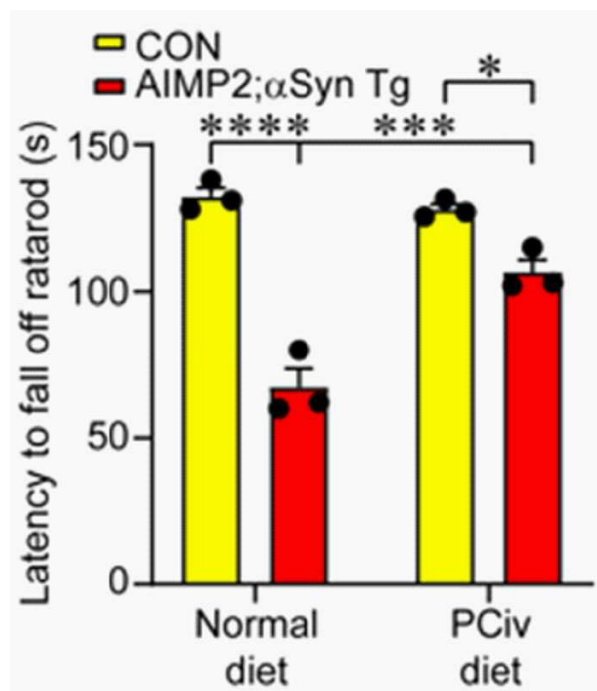
도면1d



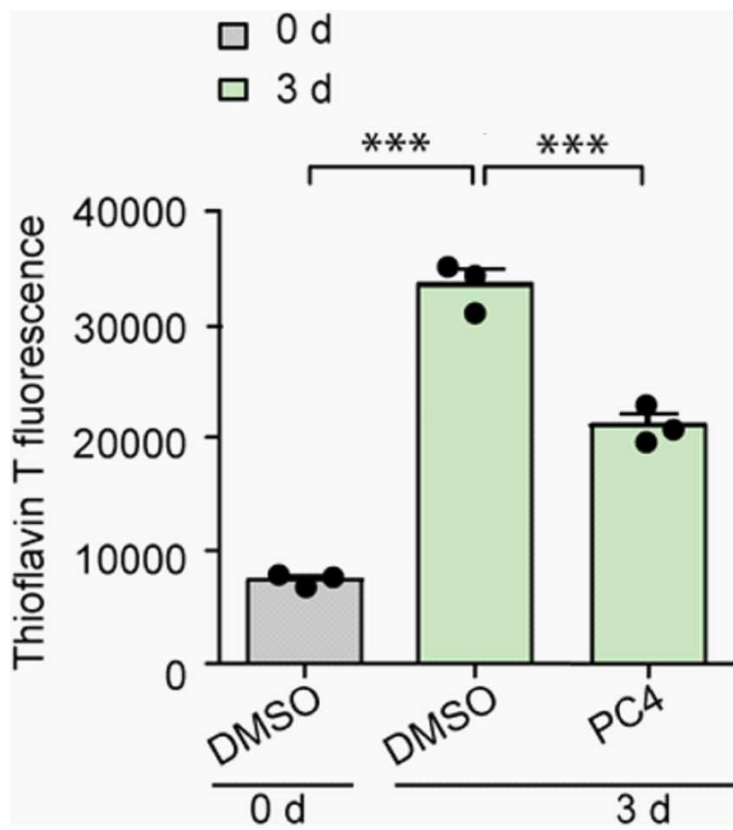
도면1e



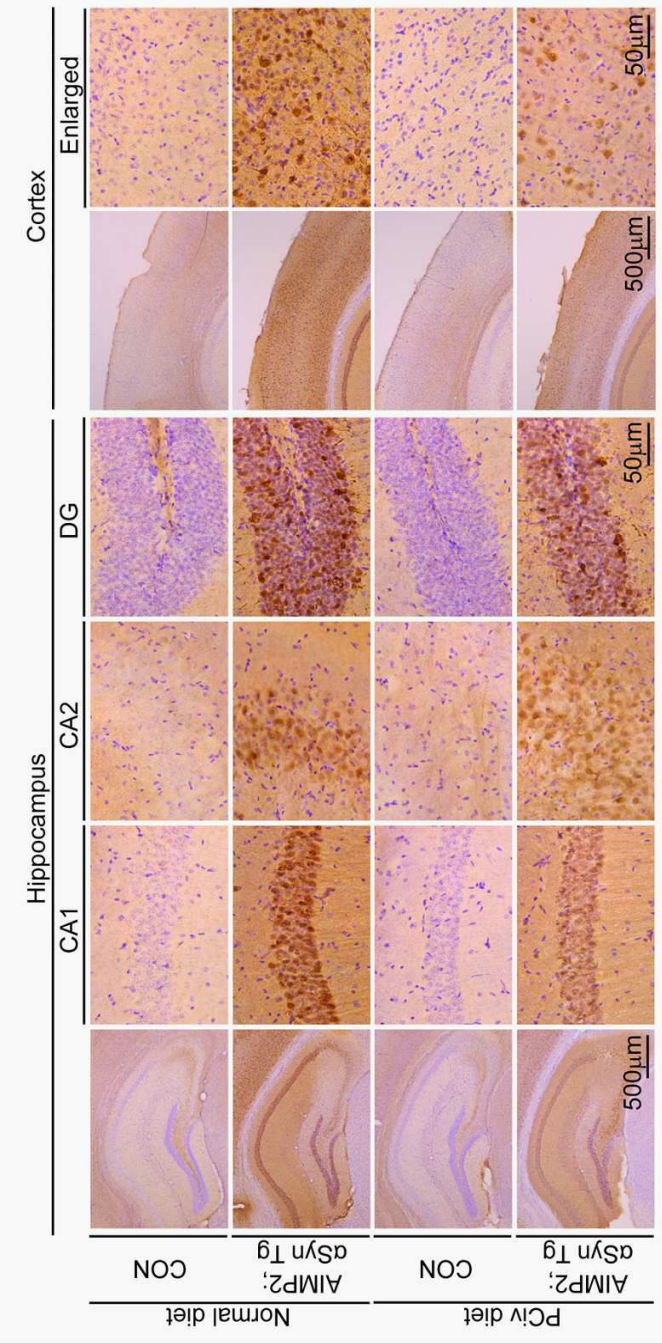
도면1f



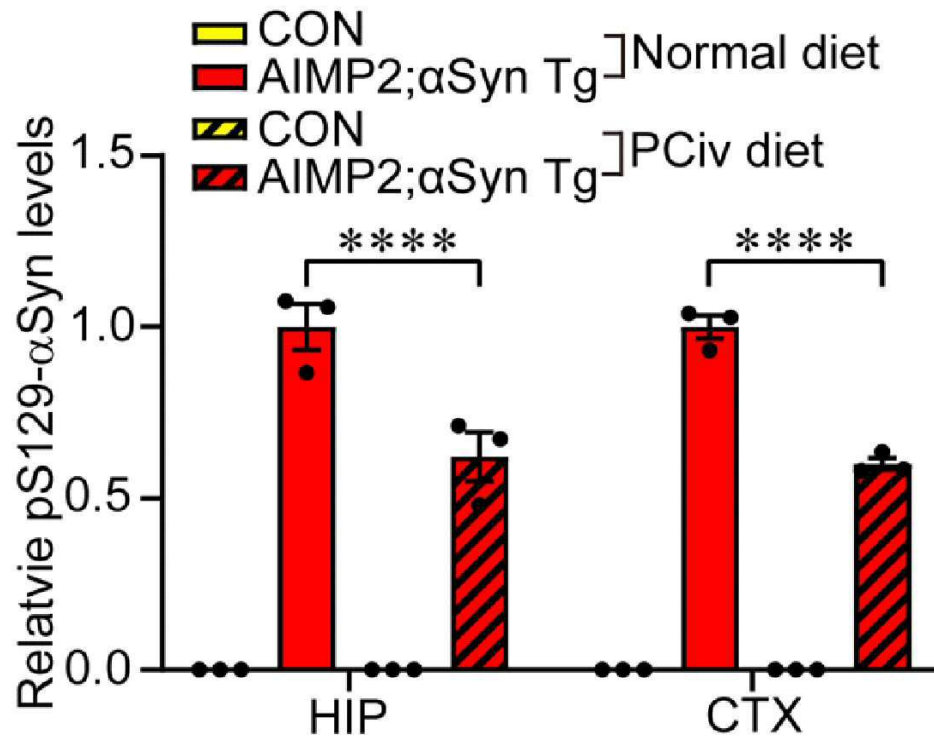
도면2



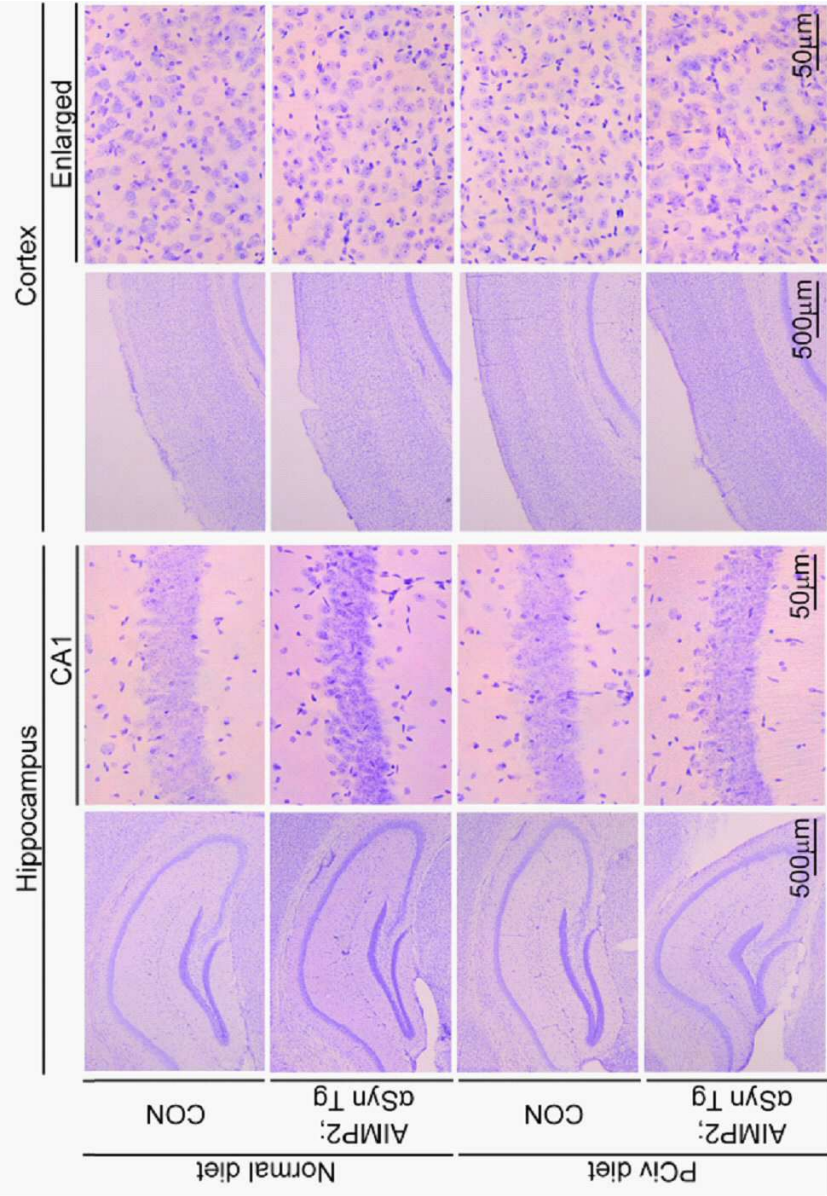
도면3a



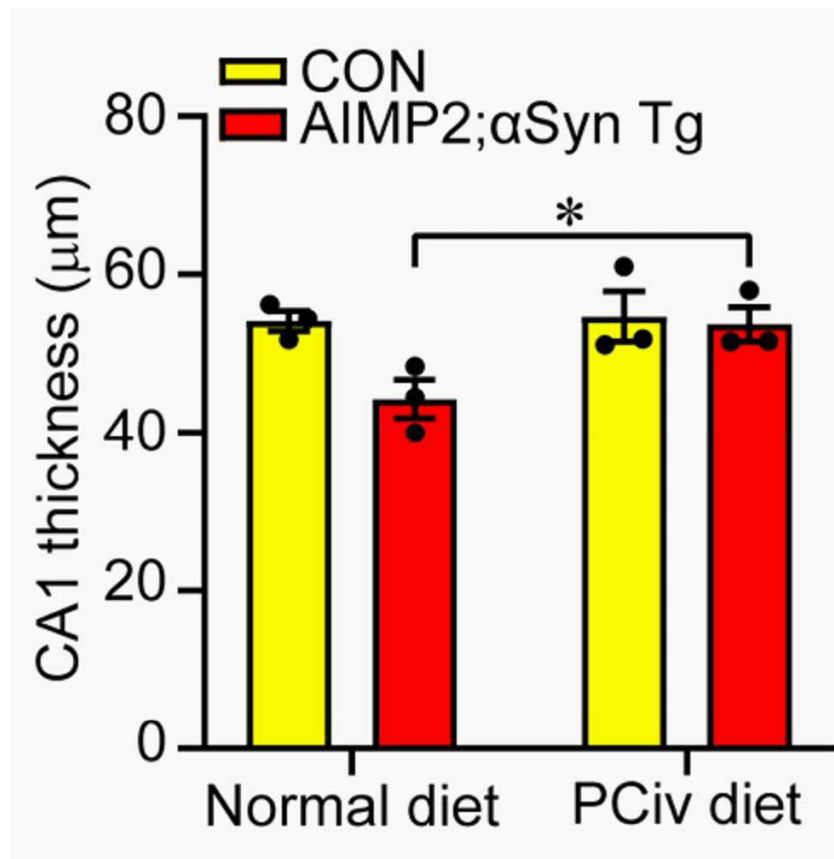
도면3b



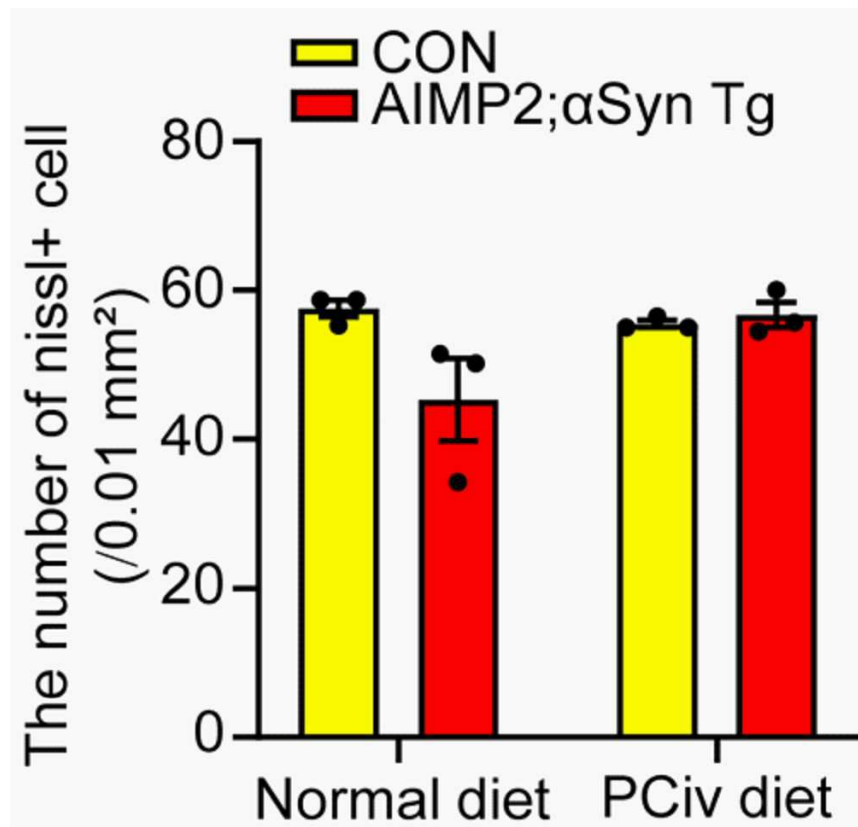
도면4a



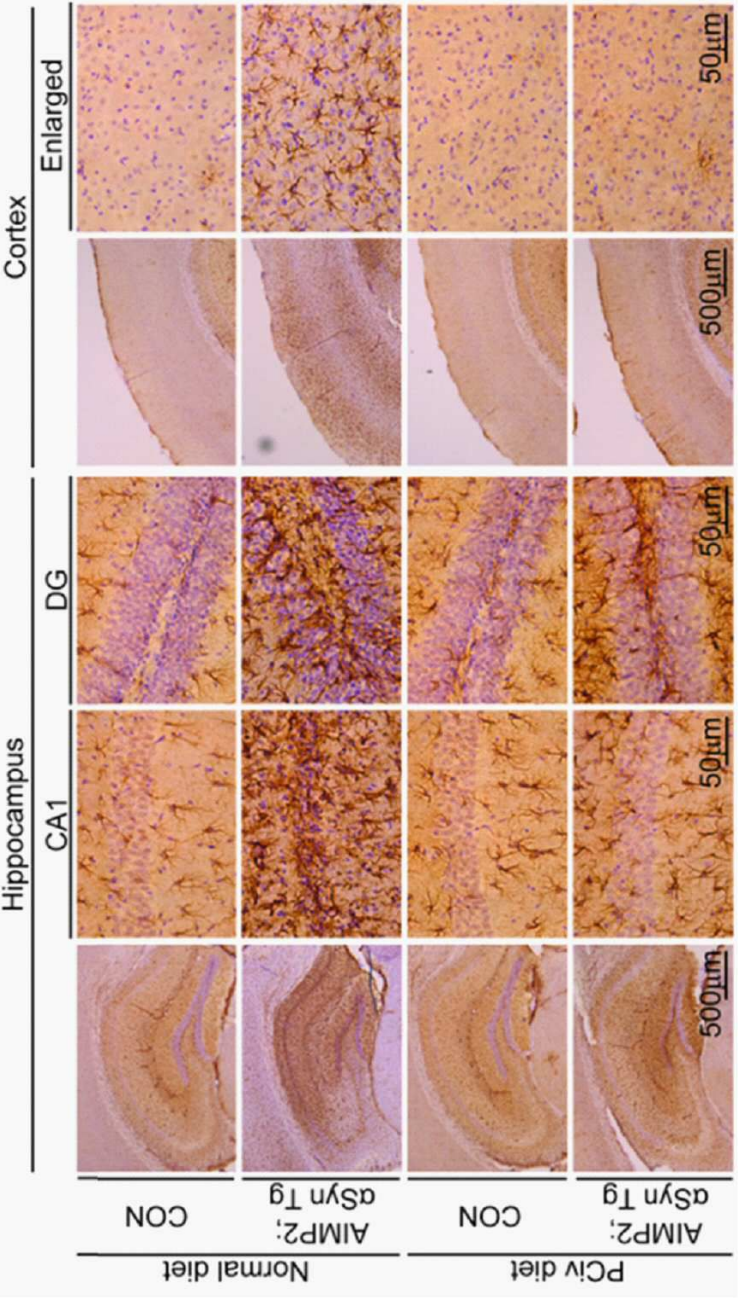
도면4b



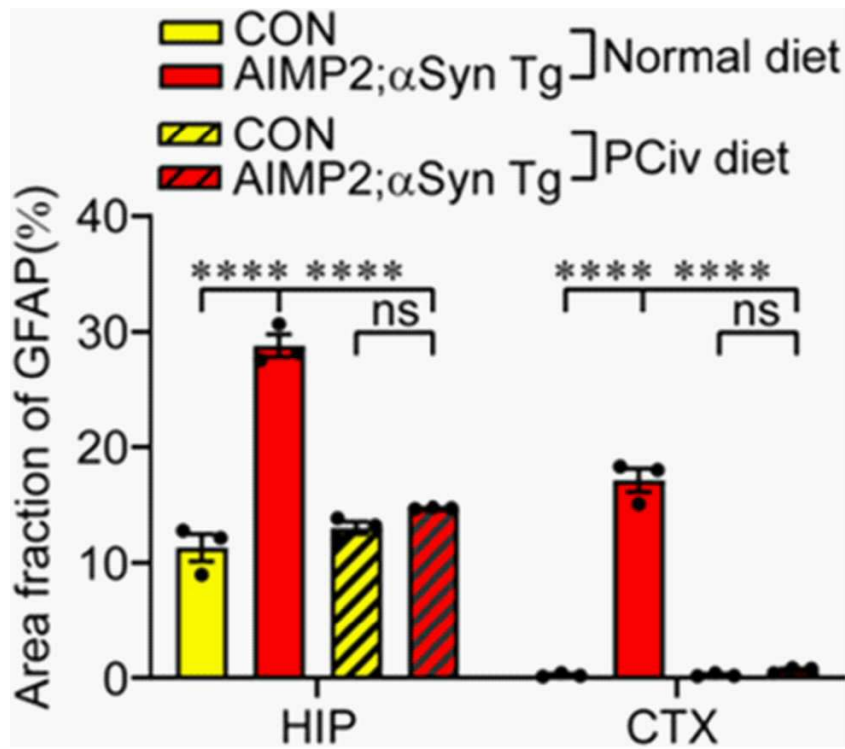
도면4c



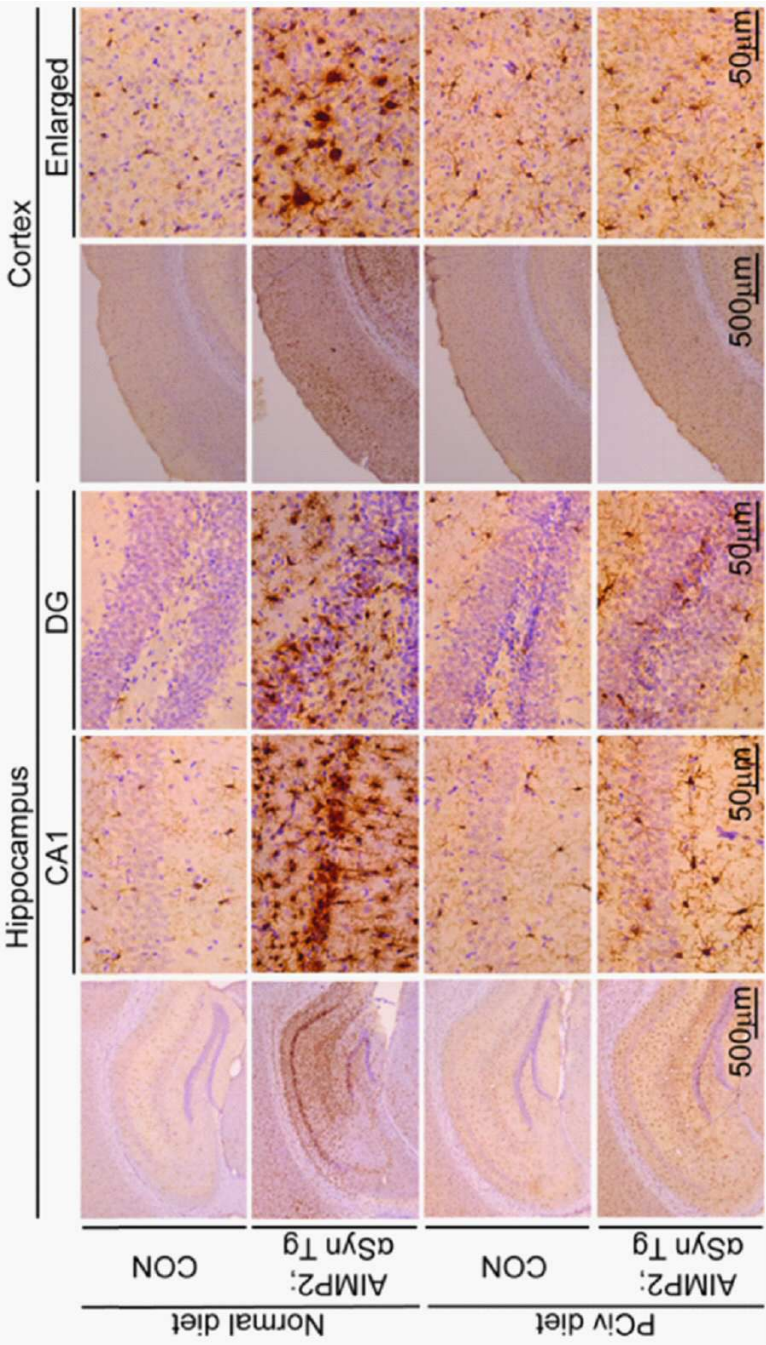
도면5a



도면5b



도면5c



도면5d

