(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년04월26일
(11) 등록번호 10-1730380
(24) 등록일자 2017년04월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/12 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/12 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0012944
(22) 출원일자 2016년02월02일
심사청구일자 2016년02월02일
(56) 선행기술조사문헌
논문(BIOTECHNOLOGY ADVANCES 31, 2013)
논문(ORG.BIOMOL.CHEM, 2015)
논문(PROS ONE, 2015)*
KR1020130028261 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
김민주
강원도 춘천시 후석로 325, 104동 706호 (후평동, 춘천더샵아파트)
김수연
경기도 남양주시 와부읍 도심길 3-14, C동 401호 (도곡리, 삼성아트빌)
(74) 대리인
강성혜

전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 강승진

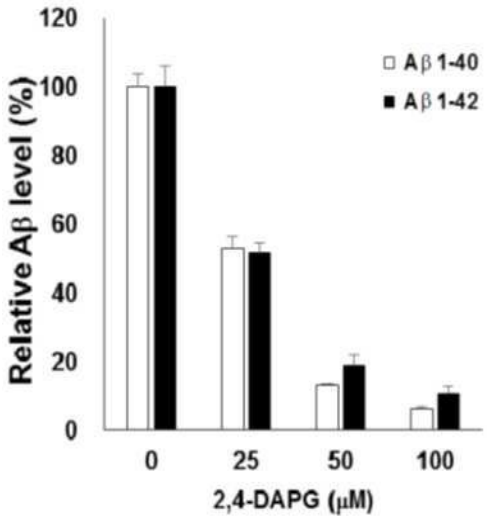
(54) 발명의 명칭 **DAPG를 포함하는 알츠하이머병 예방·치료용 약학 조성물 및 건강 기능성 식품 조성물**

(57) 요 약

과제: 부작용이 적거나 없으며, 효과가 우수한 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것.

해결수단: 본 발명은 DAPG(2,4-diacetylphloroglucinol)를 포함하는 알츠하이머병의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 DAPG는 알츠하이머병의 원인 물질인 베타 아밀로이드 농도를 세포독성 없이 감소시킬 수 있고, 베타 아밀로이드 농도의 감소에 따라 알츠하이머병의 치료효과가 있음을 말해준다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2014R1A1A1002109
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 일반연구자지원사업(신진연구)
연구과제명 Phloroglucinol 유래 물질들의 알츠하이머 치매 병인 억제 효과에 관한 연구
기 여 율 1/1
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2014.05.01 ~ 2016.04.30

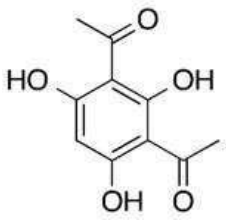
명 세 서

청구범위

청구항 1

화학식 1로 표시되는 DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol)를 포함하는 알츠하이머병의 예방 및 치료용 약학 조성물.

<화학식 1>



청구항 2

청구항 1에 있어서, 약학적으로 허용되는 담체를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 알츠하이머병의 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

청구항 3

DAPG(2,4-diacetylphloroglucinol)를 유효성분으로 하는, 알츠하이머병 개선용 건강 기능성 식품 조성물.

청구항 4

DAPG(2,4-diacetylphloroglucinol)를 유효성분으로 하는 신경 퇴행성 질환의 예방 및 치료용 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol)를 포함하는 알츠하이머병 예방·치료용 약학 조성물 그리고 DAPG를 포함하는 알츠하이머병 개선용 건강 기능성 식품 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 알츠하이머병 (Alzheimer' disease)의 주요 원인인 베타 아밀로이드 (beta-amyloid) 단백질의 농도를 저하시킴으로써 알츠하이머병을 예방 및 치료할 수 있는 약학조성물과 알츠하이머병을 개선할 수 있는 건강 기능성 식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[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 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 활성제나 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, DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol)는 페놀 화합물의 일종으로 슈도모나스 플루오레슨스 (*Pseudomonas fluorescens*)의 대사산물로 항생제 역할을 하는 것으로 보고되어 있다. DAPG는 박테리아, 곰팡이, 선충 등에 독성을 나타내어 토양 유래 질병에 도움이 되는 것으로 알려져 있다. 반면 포유류인 생쥐에 DAPG를 고농도로 투여했을 때는 독성을 나타내지 않는 것으로 보고되어 있어, 토양 및 식물 유래 질병에 사용할 수 있는 장점이 있는 것으로 생각된다. 아직 인체 유래 질병에는 문헌상 검토된 적이 없으며, 알츠하이머병에서 역시 DAPG가 예방 및 치료의 용도로 탐색된 적이 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

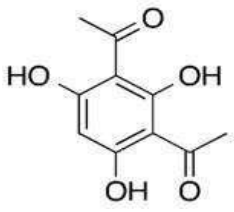
[0006] 본 발명은 알츠하이머병의 원인 물질인 베타 아밀로이드의 농도를 감소시키는 효과를 가지는 DAPG (2,4-diacetylphloroglucinol)를 포함하는 알츠하이머병 예방 및 치료용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은 알츠하이머병의 원인 물질인 베타 아밀로이드의 농도를 감소시키는 새로운 물질을 모색하던 중, DAPG가 베타 아밀로이드의 농도를 감소시킴을 발견하고, DAPG가 알파 세크레타아제 활성에 비해 상대적으로 베타 세크레타아제의 활성을 더욱 저해함을 실험적으로 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 본 발명은 알츠하이머병의 원인 물질인 베타 아밀로이드의 농도를 감소시키는 효과를 가지는 하기 화학식 1로 표시되는 DAPG를 포함하는 알츠하이머병 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

화학식 1

[0010] 

[0011] DAPG를 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구 또는 주사 형태로 제형화할 수 있다. 경구용 조성물로는 예를 들면 정제 및 젤라틴 캡슐이 있으며, 이들은 활성 성분 이외에도 희석제 (예: 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활탁제 (예: 실리카, 탤크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)을 함유하고, 정제는 또한 결합제 (예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐피롤리돈)를 함유하며, 경우에 따라서 붕해제 (예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제 (예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위함 염/또는 완충제)를

함유한다. 또한 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.

[0012] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내 , 피하, 복강 내 투여 또는 국소적용할 수 있다. 용량은 일일 투여량 0.0001~100mg/kg을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.

[0013] 나아가, 본 발명은 상기 DAPG를 유효성분으로 하고 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 알츠하이머병의 예방과 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 다른 실시예에서는 상기 DAPG를 유효성분으로 하는, 알츠하이머병 개선용 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다. 본 발명에서 식품은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 각종 식품, 건강기능 식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함하는 의미로 사용된다. 상기 식품의 예로서 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실,채소류 음료, 두유류, 발효음료류, 아이스크림류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등), 비타민 복합제, 알코올 음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 건강기능식품, 음료, 식품첨가제 또는 음료첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다. 상기 식품 조성물은 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다. 또한, 상기 식품에 있어서, 상기 쪽 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 상기 식품이 음료인 경우에는 식품 전체의 부피 100 ㎖를 기준으로 0.001 g 내지 50 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기 DAPG를 유효성분으로 하며 신경 퇴행성 질환의 예방과 치료에 유용한 약제학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 알츠하이머병 예방 및 치료용 약학 조성물은 DAPG를 유효성분으로 함유하고 있어 세포에 독성이 없고 알츠하이머병의 원인 물질인 베타 아밀로이드의 농도를 감소시켰다.

[0017] 따라서, 본 발명에 따르면 알츠하이머병 및 신경 퇴행성 질환의 치료에도 유용한 약학 조성물을 제공할 수 있게 되었다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 APP (amyloid precursor protein)의 프로세싱과 그 확인 방법에 관한 것이다. 위쪽의 sAPP(수용성 APP)는 세포 외 공간으로 분비된다. 이는 배지에서 22C11 항체를 통해서는 총 sAPP (sAPP α + sAPP β)를 검출할 수 있으며, 6E10 항체는 sAPPα만 검출할 수 있다. 따라서 베타 세크레타아제가 저해된다면, sAPPα/ 총 sAPP의 비율이 증가하게 된다. 세포 용균액에서는 A8717 항체를 이용하여 CTF (C-terminal fragments)를 검출할 수 있다.

도 2는 베타 아밀로이드를 배양액으로 분비할 수 있는 알츠하이머병 세포 모델인 HEK293-APPsw 세포주에 DAPG를 농도별로 처리했을 때, 유의한 세포 독성이 보이지 않는 것을 확인한 것이다.

도 3은 상기 세포 모델에 DAPG를 농도별로 처리하였을 때, 배양액에 베타 아밀로이드 1-40과 1-42가 농도별로 감소함을 보여 주는 것을 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)을 통해 확인한 것이다.

도 4는 상기 베타 아밀로이드 감소 효과가 베타 아밀로이드 생성 효소 중 베타 세크레타아제의 활성이 알파 세크레타아제의 활성에 비해 상대적으로 저해된 데 따른 것임을 웨스턴블랏 분석으로 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에 의하여 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게

자명하다.

[0021] **HEK293-APPsw 세포주의 확립**

[0022] 인간 APPsw (amyloid precursor protein swedish mutants) K670N, M671L을 발현하는 플라스미드를 HEK293 세포에 도입하였다. 약 12시간 후에 800㎍/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㎍/mL 농도의 G418이 첨가된 DMEM 배지에서 선별 배양하였다. 다시 60mm 접시를 거쳐 100mm 접시로 계대배양하면서 배지 내 G418의 농도를 200㎍/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.

[0024] **세포배양 및 DAPG의 처리**

[0025] HEK293-APPsw 세포주를 10% FBS (Fetal bovine serum)와 항생제 (penicillin/streptomycin)를 첨가한 DMEM 배지에 넣어 배양기 (37℃, 5% CO_2)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. DAPG는 25, 50, 100μM의 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.

[0027] **DAPG의 세포 독성 실험**

[0028] MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide} 분석을 통해서 세포독성을 측정하였으며, 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.

[0029]

[0030] **배지에서 베타-아밀로이드의 ELISA 분석**

[0031] DAPG를 8시간 동안 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㎕씩 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.

[0033] **DAPG에 의한 베타 아밀로이드 생성효소의 상대적 활성 확인**

[0034] 감태 부탄올 분획물을 처리한 후 sAPP의 양을 측정하기 위하여, 배지 (20㎕)를 8% 트리스-글라이신 겔에 로딩하였다. 세포 용해물 APP의 CTF (C-terminal fragment) 측정을 위해서 0mM 트리스, pH 7.4, 150mM NaCl, 1% SDS 및 2mM 오르쏘바나듐산나트륨 (sodium orthovanadate)이 포함된 완충액으로 녹인 후, 초음파 파쇄를 통하여 시료를 얻었다. 얻어진 시료는 4~12% NuPAGE 겔 (Invitrogen)을 통하여 전기영동을 하였다. 이렇게 전기영동한 두 종류의 시료는 100V에서 약 2시간 전기영동 한 후, 겔을 PVDF 막에 100V에서 1시간 동안 이동한 후 5% 탈지유로 1시간 동안 상온에서 블로킹하였다. TBS-T (Tris buffered saline with Tween20)로 3회 씻어준 후, 막은 일차 항체 (22C11 또는 6E10)와 밤새 반응시켰다. TBST로 3회 씻어준 후, 이차항체 (horseradish peroxidase-conjugated Ig anti-mouse antibody)로 상온에서 1시간 반응시킨 다음 TBST로 3회 씻어주었다. sAPP의 검출을 위해서는 항-베타 아밀로이드 항체 (6E10; sAPP 알파)와 항-APP 항체 (22C11; sAPPs 또는 총 sAPP)를 사용하였으며, CTF의 검출을 위해서는 항- C말단 APP (A8717; CTF 알파) 항체들을 사용하였다. 검출은 ECL (Enhanced chemiluminescence)과 LAS4000 화학발광탐지기 (GE healthcare)를 이용하여 확인하였다. 얻은 이미지는 이미지 J 소프트웨어 (NIH, USA)를 이용하여 정량화하였다. 웨스턴블랏 분석에 사용한 항체의 검출 원리는 도 1과 같다.

[0036] **결과 1 : DAPG의 독성 확인**

[0037] DAPG를 25, 50, 100mM 농도별로 HEK293-APPsw 세포주에 처리하여 MTT 분석하였을 때 세포사 (cell death)의 변화가 관찰되지 않았다. 이로부터 사람 유래 세포에서 DAPG가 독성을 나타내지 않음을 알 수 있다 (도 2).

[0039] **결과 2 : DAPG 처리에 따른 베타 아밀로이드 농도 변화**

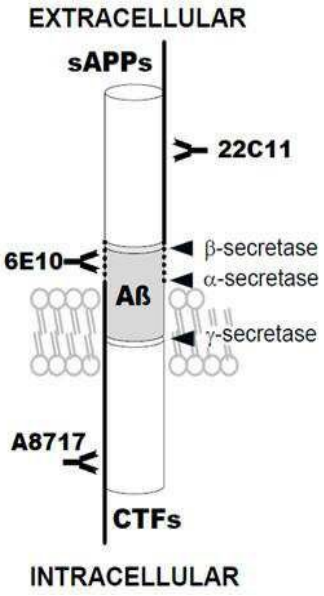
[0040] DAPG를 25, 50, 100mM 농도별로 HEK293-APPsw 세포주에 처리한 후 세포 배양액에서 베타 아밀로이드의 농도를 ELISA로 확인하였다. 베타 아밀로이드 중 가장 많이 존재하는 타입인 1-40과 1-42를 조사한 결과, 두 타입 모두 DAPG 농도 증가에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 해당 농도에서 실시예 1과 같이 독성을 보이지 않은 것을 감안해 볼 때, 베타 아밀로이드 1-40 및 1-42에서 약 90% 가까운 베타 아밀로이드 농도가 감소하였음을 확인하였다 (도 3).

[0042] **결과 3 : 베타 세크레타아제 및 알파 세크레타아제의 활성 조사**

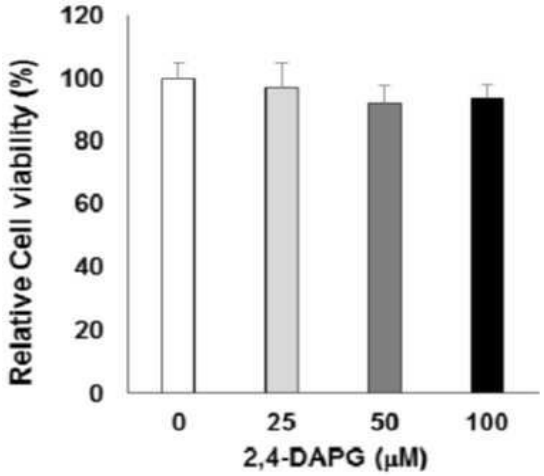
[0043] 상기 베타 아밀로이드 농도 실험에서 보인 베타 아밀로이드 감소 효과의 원인을 분석하기 위해서 베타 아밀로이드 생성효소인 베타- 및 알파-세크레타아제의 활성을 조사하였다. 도 1과 같이 베타-세크레타아제의 활성은 베타 아밀로이드 외에 배양액으로 분비되는 수용성 APP-β를, 세포 내에는 CTF-β를 만들게 되며, 알파-세크레타아제의 활성화는 수용성 APP-α와 CTF-α를 만들게 된다. 배양액에서 22C11 항체를 이용하여 총 수용성 APP (수용성 APP α+ 수용성 APP β)와 6E10 항체를 이용하여 수용성 APP-α를 측정하였을 때, 50mM DAPG에서 수용성 APP-α의 양이 상대적으로 증가함을 알 수 있었다. 또한, 세포 내에서는 CTF-β의 양이 CTF-α에 비해 상대적으로 감소하는 것이 관찰되었다. 따라서 상기 결과 2의 베타 아밀로이드 농도 감소는 베타-세크레타아제와 알파-세크레타아제의 상대 활성에 기인한 것으로 판단할 수 있다 (도 4).

도면

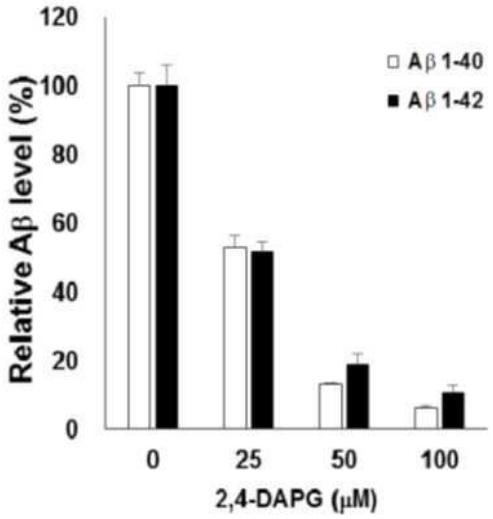
도면1



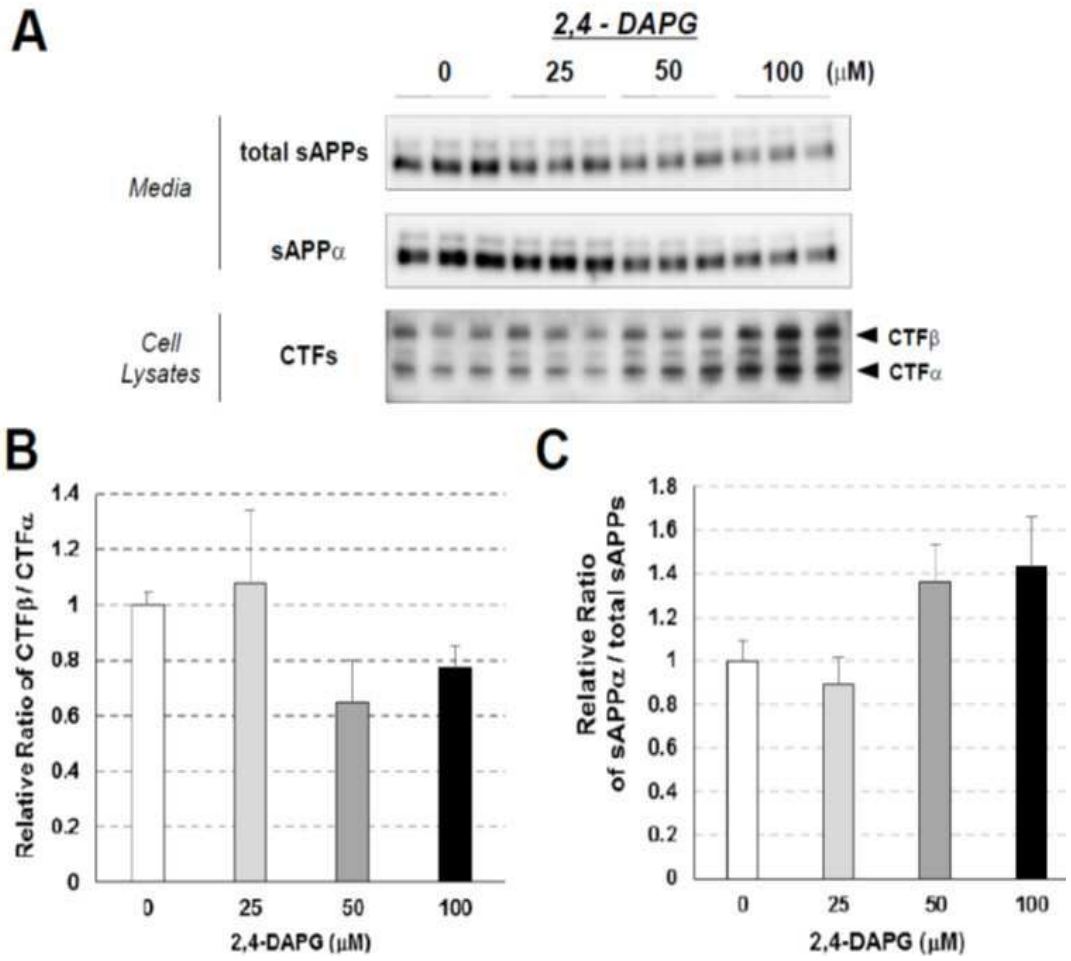
도면2


120
100
80
60
40
20
0
Relative Cell viability (%)
0
25
50
100
2,4-DAPG (μM)

도면3


120
100
80
60
40
20
0
Relative Aβ level (%)
Aβ 1-40
Aβ 1-42
0
25
50
100
2,4-DAPG (μM)

도면4


A
2,4 - DAPG
0
25
50
100 (μM)
Media
total sAPPs
sAPPα
Cell Lysates
CTFs
CTFβ
CTFα
B
Relative Ratio of CTFβ / CTFα
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
25
50
100
2,4-DAPG (μM)
C
Relative Ratio of sAPPα / total sAPPs
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
25
50
100
2,4-DAPG (μM)