(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0077915
(43) 공개일자 2019년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/407 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/407 (2013.01)
A61K 9/0002 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0179489
(22) 출원일자 2017년12월26일
심사청구일자 2017년12월26일

(71) 출원인
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
(72) 발명자
문민호
대전광역시 서구 관저북로 80, 204동 1404호 (관저동, 원앙마을2단지아파트)
김좌진
대전광역시 서구 관저북로51번길 24-20, 401호 (관저동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김원준

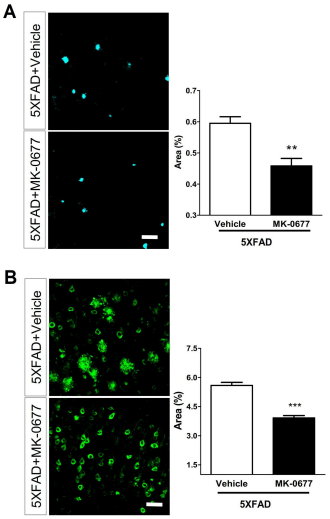
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **이부타모렌을 유효성분으로 하는 아밀로이드 베타 침착 억제용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 아밀로이드 베타의 침착과 신경퇴행 및 신경염증을 억제하는 효능을 갖기 때문에 아밀로이드 베타의 침착과 관련된 질환의 예방에 유용하게 사용될 수 있는 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 이부타모렌을 유효성분으로 함유하는 아밀로이드 베타 침착 억제용 약학 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 9/0019 (2013.01)
A61P 25/00 (2018.01)
A61P 25/28 (2018.01)

(72) 발명자
노주예
대전광역시 서구 구봉산북로 165, 305동 1801호(관저동, 다온숲3단지)
전성각
충청남도 서산시 대산읍 충의로 1839-7, 107동 101호(풍림아파트)

정유온
대전광역시 서구 구봉로147번길 76-26, 105호(관저동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017B0161
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 산학협력 선도대학(LINC+) 육성사업
연구과제명 이부타모렌을 이용한 알츠하이머병 치료용 조성물 개발
기 여 율 1/1
주관기관 건양대학교 산학협력단
연구기간 2017.08.01 ~ 2018.01.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

이부타모렌을 유효성분으로 함유하는 아밀로이드 베타 침착 억제용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

아밀로이드 베타 침착과 관련된 질환인 치매, 알츠하이머병, 다운증후군, 아밀로이드 맥관병증, 대뇌 아밀로이드 맥관병증, 전신성 아밀로이드병, 더취(Dutch)형 아밀로이드증, 봉입체 구염, 반응성 아밀로이드증, 특발성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드증, 아밀로이드증 관련 유전성 뇌출혈 및 뇌 아밀로이드 혈관병증으로 구성된 군에서 선택되는 질환의 예방을 위한 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

아밀로이드 베타 침착 위험군을 대상으로 하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

신경퇴행과 신경염증의 예방 효과를 추가적으로 갖는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 이부타모렌은 서방성 제제로 제형화되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아밀로이드 베타의 침착과 신경퇴행 및 신경염증을 억제하는 효능을 갖기 때문에 아밀로이드 베타의 침착과 관련된 질환의 예방에 유용하게 사용될 수 있는 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 알츠하이머 병은 대표적인 노인성 치매로 85세 이상의 인구 중 1/3에서 발병할 만큼 높은 유병률을 나타낸다. 우리나라 치매 환자 수는 약 62만명으로 2025년에는 100만명을 초과할 것으로 전망된다. 최근에는 노인 뿐 아니라 보다 젊은 세대인 30~50대 치매 환자 역시 증가하는 추세를 나타내고 있어 알츠하이머 병은 환자 개인이나 가족에 한정되지 않고, 사회, 경제 전반에 걸쳐 중요한 문제로 대두되고 있다.

[0003] 알츠하이머 병은 기억 손상, 언어 장애, 인지기능의 손실, 신경 변성 및 신경 염증과 같은 다양한 증상을 유발한다. 알츠하이머 병이 진전될수록 더 많은 기능적 장애가 나타나며, 신경 정신병적 증상 역시 증가한다. 현재, 뇌 내에 아밀로이드 베타(Aβ)의 수준이 증가하면서 침착(deposition)을 일으켜 플라크를 형성하고, 축적된

Aβ 플라크가 뇌 세포들 사이의 신호 전달 통로를 차단하여 뇌세포가 죽고 결국 치매가 유발된다는 '아밀로이드 베타 가설'이 치매 발생 메커니즘의 정설로 받아들여지고 있다. 최근 미국의 치매 치료 연구소에서 기억력 저하와 같은 치매 증상이 전혀 나타나지 않은 상태라도 Aβ 수준이 증가하기 시작하면 치매로 이행될 가능성이 높아진다는 연구 결과가 보고되었고, 이는 아밀로이드 베타 가설을 뒷받침하는 근거가 된다. 캐이드 가설에 따르면, 알츠하이머 병의 주된 병인은 아밀로이드 베타(Aβ) 펩티드의 침착이 주된 원인으로 고려되고 있다.

[0004] 그렐린(Ghrelin)은 1999년에 발견된 새로운 펩타이드 호르몬으로, 28개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 위장 내분비세포에서 주로 분비되며 배고픔을 유발한다. 그렐린은 수용체인 GHS-R1a(growth hormone secretagogue receptor 1a)를 통해 뇌하수체에서 성장호르몬의 분비를 촉진하고, 음식 섭취 및 지방 축적을 증가시키는 것으로 알려져 있다. 최근에는 위장관 뿐 아니라 뇌를 비롯한 다양한 기관에서의 분비와 이에 비롯한 다양한 생리적 기능들이 밝혀지고 있다. 특히, 알츠하이머 병 뇌에서 나타나는 병변과 관련하여 변화되는 뇌 기능에 직접적으로 영향을 줄 수 있음이 알려지고 있다. 즉, 그렐린에 의한 학습과 인지 능력의 증가, 신경세포 보호, 항염증 효과, 시냅스 수 증가, 일주기 리듬 조절, 식욕촉진, 우울감 억제, 대사촉진, 해마(hippocampus) 내의 성체 신경세포생성(neurogenesis) 등의 개선 효과가 증명된 바 있다. 예를들어 Kunath 등(Scientific reports, 5: 11452, 2015)은 그렐린 작용제인 LY444711이 4개월의 장기 투여 시 알츠하이머 동물 모델에서 인지능을 개선시킨다고 보고하였다. 또한 알츠하이머 병 환자들에게서 그렐린의 발현이 감소하는 것이 알려지면서 알츠하이머 병의 치료제로써의 가능성이 지속적으로 제기되고 있다. 그러나 동일 연구그룹은 LY444711가 아밀로이드 베타의 침착이나 신경염증에 관련하는 미세아교세포의 활성화에는 거의 영향을 미치지 않았다고 발표하였다(*Sci Rep* 5, 11452, 2015). 반대로 그렐린의 길항제인 [D-Lys(3)]GHRP-6이 오히려 아밀로이드 베타를 감소시킨다고 보고한 예도 있다(*Indian J Biochem Biophys* 51, 257-262, 2014).

[0005] 이부타모렌(ibutamoren, MK-0677)은 비-펩타이드 형태의 그렐린 유사체로서, 그렐린 수용체(GHS-R1a)에 결합하였을 때 그렐린에 비해 50% 이상 높은 효율을 나타낸다. 이부타모렌은 반감기가 6시간으로, 반감기가 30분으로 매우 짧은 그렐린에 비해 12배 정도 길고 사람을 대상으로 임상 시험 단계를 거친 안정화된 약물로써 잠재적 가치가 높은 물질이다. 선행 연구를 통해 이부타모렌은 정상 쥐에서 식욕 및 체중 증가를 유도하며, 성장 호르몬을 방출시키고, 인슐린 유사 성장 인자-1(IGF-1, insuline like Growth Factor-1)을 증가시키는 등의 긍정적인 기능들이 증명된 바 있다. Sevigny 등(Neurology 71, 1702, 2008)이 알츠하이머 병 환자를 대상으로 이부타모렌을 12개월간 투여한 후 알츠하이머 증상의 개선을 확인하였다. 그러나 이부타모렌은 알츠하이머 병 환자에게서 IGF-1의 발현을 증가시켰으나, 알츠하이머의 증상 개선에는 효과가 없었다. 이에 이부타모렌을 알츠하이머 병의 치료에 이용하고자 하는 시도는 더 이상 진전이 없는 상태이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Kunath 등, Scientific reports, 5: 11452, 2015.

(비특허문헌 0002) Sevigny 등, Neurology 71, 1702, 2008.

(비특허문헌 0003) Kunath 등, Sci Rep 5, 11452, 2015.

(비특허문헌 0004) Madhavadas 등, Indian J Biochem Biophys 51, 257-262, 2014.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 아밀로이드 베타의 침착을 억제하여 아밀로이드 침착과 관련된 질환의 예방에 유용한 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 특히 본 발명은 아밀로이드 베타 침착에 관한 위험군에서 관련 질환을 효과적으로 예방할 수 있는 약학 조성물에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 이부타모렌을 유효성분으로 함유하는 아밀로이드 베타 침착 억제용 약

학 조성물에 관한 것이다.

[0010] 이부타모렌은 아밀로이드 베타의 침착을 억제하는 효능이 있으므로 아밀로이드 베타의 침착과 관련된 질환의 예방에 유용하게 사용될 수 있다. 아밀로이드 베타의 침착과 관련된 질환은 예로서, 치매, 알츠하이머병, 다운증후군, 아밀로이드 맥관병증, 대뇌 아밀로이드 맥관병증, 전신성 아밀로이드병, 더취(Dutch)형 아밀로이드증, 봉입체 구염, 반응성 아밀로이드증, 특발성 아밀로이드증, 가족성 아밀로이드증, 아밀로이드증 관련 유전성 뇌출혈 및 뇌 아밀로이드 혈관병증을 들 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0011] 특히 본 발명의 조성물은 아밀로이드 베타 침착 위험군을 대상으로 더욱 유용하게 사용될 수 있다. 아밀로이드 베타 침착 위험군은 유전적으로 아밀로이드 베타 침착 관련 질환에 취약한 군(예를 들면, 가족 중 알츠하이머 환자나 가족성 아밀로이드증과 같은 질환을 갖는 군)이나, 아밀로이드 베타 침착 관련 질환의 발병율이 높은 연령층(예를 들면, 알츠하이머 발병율이 높은 노인층), 또는 아밀로이드 베타 침착이 뚜렷하게 관측되지는 않았으나 관련 질환의 의심 증세를 나타내는 군을 들 수 있다.

[0012] 본 발명의 조성물은 아밀로이드 베타 침착 뿐 아니라 신경퇴행과 신경염증의 예방 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0013] 본 발명의 조성물은 아밀로이드 베타의 억제를 위한 약제로 이용하기 위하여, 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여용 제제로 제형화 하여 아밀로이드 베타와 관련된 질환의 예방제로 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 제제의 형태, 환자의 연령, 성별 및 상태, 증상의 정도 등에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 일반적인 투여량은 0.001mg/kg · 일~10g/kg · 일이다. 본 발명의 조성물은 인체에 대한 임상시험이 완료된 이부타모렌을 유효성분으로 함유하므로, 독성 및 부작용이 없이 안전하게 사용할 수 있다.

[0014] 본 발명의 조성물에서 상기 이부타모렌은 특히 서방성 제제로 제형화되는 것이 더욱 바람직하다. 이부타모렌은 그렐린에 비해서는 반감기가 길지만, 반감기가 6시간 정도로 여전히 짧은 편이기 때문에 체내에서 빠른 분해를 방지하고 지속적인 분비가 가능하도록 서방성 제제로 제형화되는 것이 좋다. 서방성 제제로 제형화하는 방법은 예를 들면, 나노기술을 이용한 약물 전달체를 활용하는 것으로 PLGA(Poly(lactic acid-co-glycolic acid))와 같은 나노입자에 봉입하는 방법을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것이 아님은 당연하다.

발명의 효과

[0015] 이상과 같이 본 발명의 약학 조성물에 의하면 아밀로이드 베타의 침착을 억제하는 효과가 우수하여, 아밀로이드 침착과 관련된 질환의 예방에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 정상 쥐의 이부타모렌 투여에 의한 식이 및 체중의 변화를 보여주는 그래프.

도 2는 알츠하이머병 모델 쥐의 이부타모렌 투여에 따른 식이 및 체중의 변화를 보여주는 그래프.

도 3은 이부타모렌의 투여가 아밀로이드 베타의 침착에 미치는 영향을 보여주는 공초점 현미경 이미지 및 정량 그래프.

도 4는 이부타모렌의 투여가 신경퇴행에 미치는 영향을 보여주는 공초점 현미경 이미지 및 정량 그래프.

도 5는 이부타모렌의 투여가 신경염증에 미치는 영향을 보여주는 공초점 현미경 이미지 및 정량 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0018] **[실시예]**

[0019] **실시예 1 : 동물의 사육 및 약물처리**

[0020] 알츠하이머 병 동물 모델인 5XFAD 형질전환 마우스는 The Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME)에서 구입하였다. 실험동물은 표준식이(조단백질 22.1%이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상, 삼양사 Co. Korea)와 물을 자유롭게 공급하면서 실험실 환경에 순화시킨 후 실험에 사용하였다.

[0021] 순화 후 건강상태가 양호한 마우스를 선별하여 성별을 고려하여 각 군의 개체수가 6~8마리가 되도록 실험군과 대조군으로 분류하였다. 3개월령의 실험군 실험 동물에 이부타모렌을 5 mg/kg의 용량으로 매일 3주간 복강 내 주사하였다. 대조군에는 동일한 용량으로 식염수를 복강 내 주사하였다.

[0022] **실시예 2 : 식이 및 체중에 대한 이부타모렌의 영향 평가**

[0023] 실시예 1의 방법에 의해 Wild Type 마우스(C57BL/6) 및 5XFAD 마우스에 이부타모렌을 5 mg/kg의 용량으로 매일 복강 내 주사하면서, 투약 기간 중 식이량과 체중을 매일 측정하고, 그 결과를 도 1에 도시하였다. Vehicle로는 동량의 식염수를 주사하였다. 도 1에서 이부타모렌를 투여한 5XFAD 마우스는 식염수를 투여한 5XFAD 마우스보다 식이량이 증가하여 식염수를 투여한 Wild Type 마우스와 유사한 수준의 식이량을 나타내었다. 그러나 이부타모렌 투여군에서도 체중은 Wild Type 마우스에 비해 증가폭이 낮았다.

[0024] 도 2는 이부타모렌 투여량에 따른 식이량과 체중 변화를 관측한 것으로, 실시예 1의 방법에 의해 5XFAD 마우스에 이부타모렌을 0.1, 1 또는 3 mg/kg의 용량으로 매일 복강 내 주사하면서, 투약 기간 중 식이량과 체중을 매일 측정하고, 그 결과를 도시한 것이다. 대조군으로는 이부타모렌 대신 식염수를 투여(이부타모렌 0 mg/kg)하였다. 도 2에서 이부타모렌의 투여에 의해 이부타모렌 투여량에 의존적으로 식이량과 체중이 증가함을 확인할 수 있었다.

[0025] **실시예 3 : 이부타모렌에 의한 아밀로이드 베타 침착 억제 효과 평가**

[0026] 실시예 1의 실험군과 대조군의 수컷 실험동물을 4개월령 때 마취시킨 다음 0.5M PBS를 경심관류로 확산시켜 희생시키고, 4% 파라포름알데하이드를 포함하는 냉각된 0.1M 인산 완충액으로 고정하였다. 뇌 조직을 취하여 4% 파라포름알데하이드를 포함하는 0.1M 인산완충액으로 4℃에서 20시간 후-고정하고, 한랭보호(cryoprotection)를 위하여 30% 수크로스를 함유하는 0.05M PBS로 농축하였다. 시료는 크라이오스태트(Leica)에서 30 ㎛ 두께의 일련의 관상 절편으로 슬라이스하였다. 일련의 관상 절편은 조직 분석을 위하여 사용시까지 동결보호제(cryoprotectant, 25% 에틸렌 글리콜, 25% 글리세롤, 0.05 M 인산완충액) 내에서 4℃로 보관하였다.

[0027] 아밀로이드 플라크 분석, 신경퇴행 및 신경 염증을 정량적으로 분석하기 위하여 뇌심부층(deep cortical layer)을 선택하였으며, 면역반응성을 정량화하기 위하여 ImageJ software(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 분석하였다. 5XFAD 마우스의 뇌심부층은 수동적으로 8-bit 그레이스캐일로 캡쳐된 이미지로부터 측정하였다.

[0028] 구체적으로, 마우스 뇌지도(2001)를 참고하여 브레그마(bregma)에 대하여 -2.6~-4.3 ㎜ 사이의 영역으로부터 각각의 마우스에서 210~240 ㎛ 구간의 뇌절편 6개의 시료를 채취하였다. 4G8, NeuN, iba-1, synaptophysin 및 GFAP의 면역형광을 검출하기 위하여 free-floating 절편을 mouse anti-Aβ antibody 4G8(1:2000; Covance, Princeton, NJ), rabbit anti-NeuN antibody(1:100), mouse anti-iba-1 antibody (1:500; EMD Millipore, Billerica, MA), rat anti-GFAP (1:200; Invitrogen) 및 anti-synaptophysin antibody (1:200; Sigma-Aldrich)와 함께 4℃에서 밤새 배양하였다. 배양 후 PBS로 세척한 후 Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG(1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA)과 Alexa Fluor 594-conjugated goat anti-rabbit IgG(1:500; Invitrogen, Carlsbad, CA)와 함께 상온에서 1시간 배양하였다. 시료는 공초점 현미경(Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관측하였다.

[0029] 도 3의 상단과 하단은 Aβ의 생성 및 침착 정도를 평가하기 위하여 각각 Thioflavine S와 4G8를 마커로 형광면역 분석한 뇌심부층의 공초점 현미경 이미지 및 이로부터 정량된 Aβ 플라크의 양을 그래프로 나타낸 것이다. 이부타모렌 투여군은 Aβ 플라크의 형성이 대조군에 비해 억제되었으며, thioflavine 염색 이미지에서는 23%, 4G8 염색 이미지에서는 30% 감소하는 효과를 나타내었다. 상기 결과로부터 이부타모렌은 Aβ의 생성 및 침착을 효과적으로 억제함을 확인할 수 있었다.

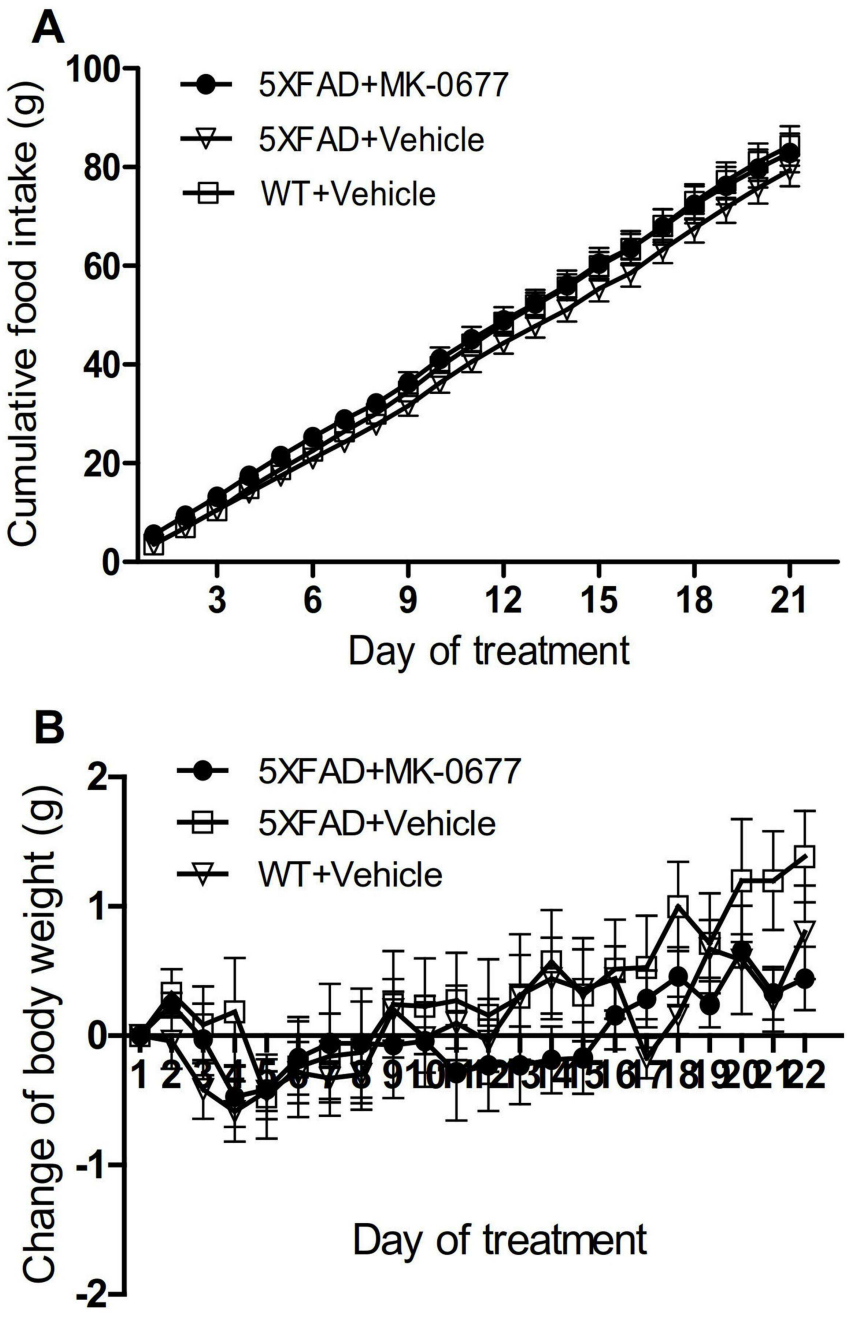
[0030] 신경퇴행에 대한 이부타모렌의 영향을 평가하기 위하여 뉴런세포의 마커로서 NeuN(neuronal nuclei)와 시냅스 마커 단백질로서 SYN(synaptophysin)을 면역형광에 의해 관측하였다. 도 4의 A와 B는 각각 전두엽의 V층에 대

한 NeuN과 SYN의 면역형광 이미지와 그에 의한 정량 그래프이다. 도 4로부터 Vehicle 그룹(이부타모렌을 투여하지 않은 5XFAD 마우스 그룹)에 비해 이부타모렌을 투여한 5XFAD 마우스 그룹에서 NeuN-positive cell이 상당히 증가하였으며, SYN 역시 Vehicle 그룹에 비해 이부타모렌을 투여한 5XFAD 마우스 그룹에서 크게 증가하는 것을 확인할 수 있다. 이는 이부타모렌이 신경퇴행을 억제하는 효과를 나타냄을 의미한다.

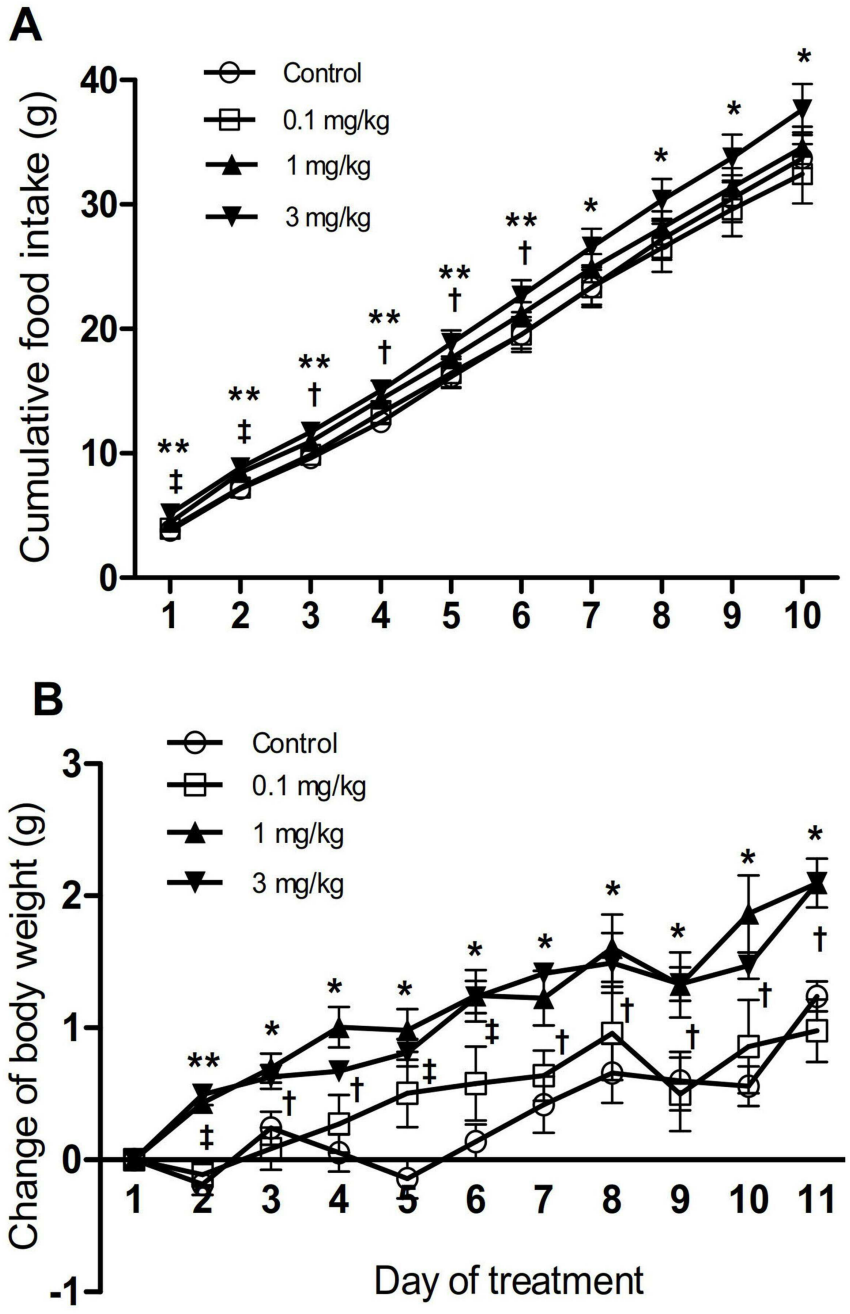
[0031] 신경염증에 대한 이부타모렌의 영향은 미세아교세포(microglia)와 성상교세포(astrocyte)를 각각 Iba-1 및 GFAP를 마커로 형광면역분석으로 확인하였다. 도 5는 전두엽 V층에서의 그 결과를 보여주는 그래프로, Vehicle 그룹(이부타모렌을 투여하지 않은 5XFAD 마우스 그룹)에 비해 이부타모렌을 투여한 5XFAD 마우스 그룹에서 microglia activation이 상당히 감소하였으며, GFAP 역시 Vehicle 그룹에 비해 이부타모렌을 투여한 5XFAD 마우스 그룹에서 actrocyte activation이 크게 감소하는 것을 확인할 수 있다. 상기 결과에 의해 이부타모렌이 신경염증의 억제에 효과가 있음을 알 수 있다.

도면

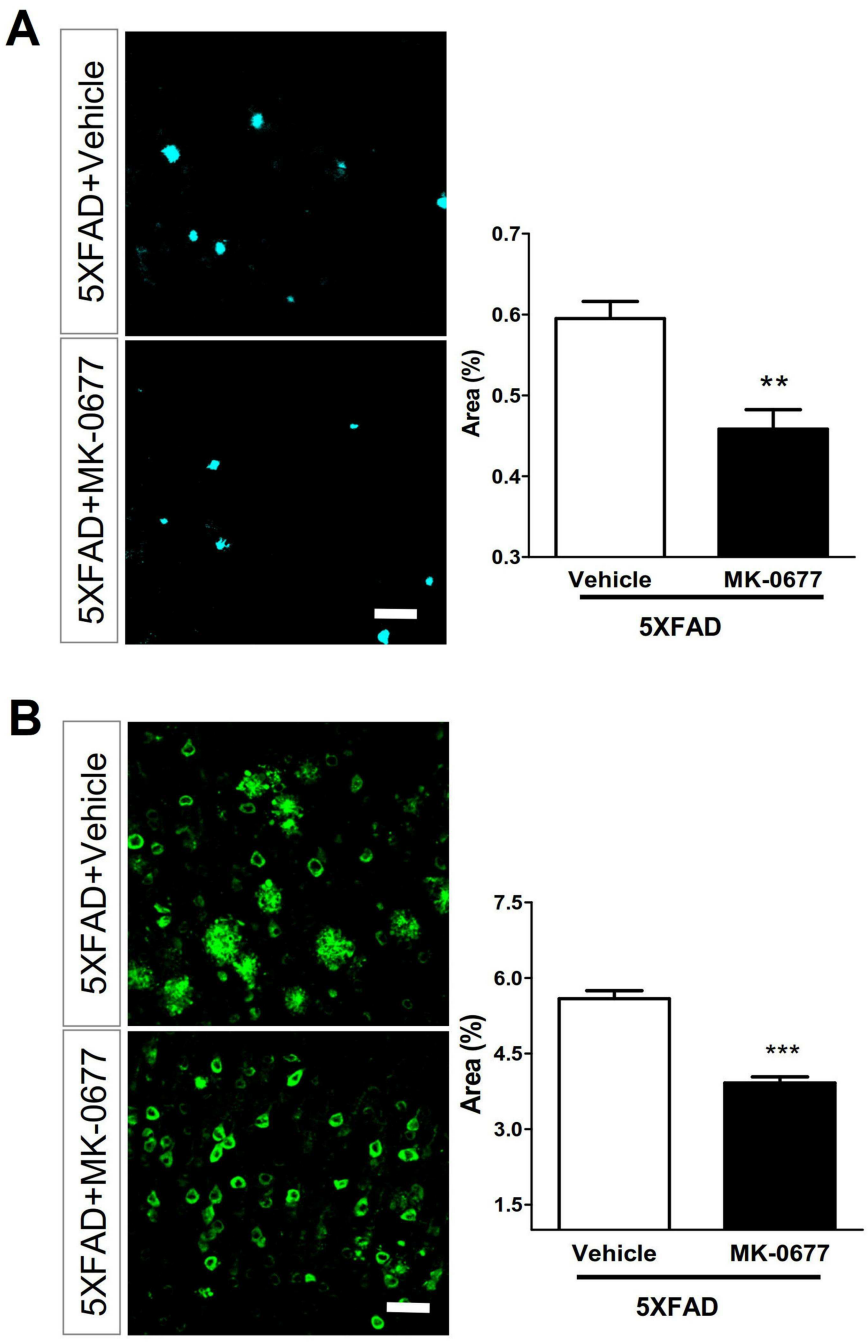
도면1



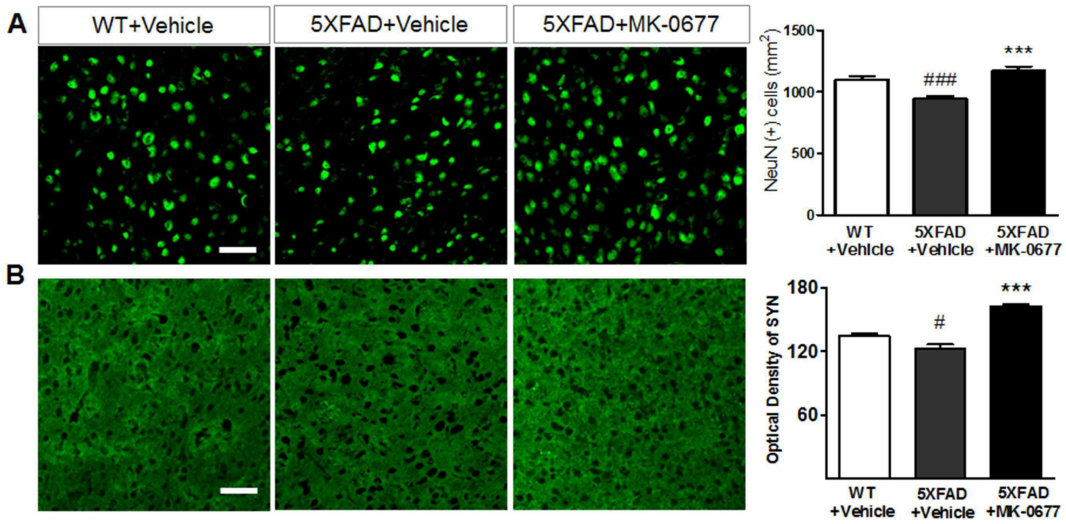
도면2


A
Cumulative food intake (g)
Control
0.1 mg/kg
1 mg/kg
3 mg/kg
B
Change of body weight (g)
Day of treatment

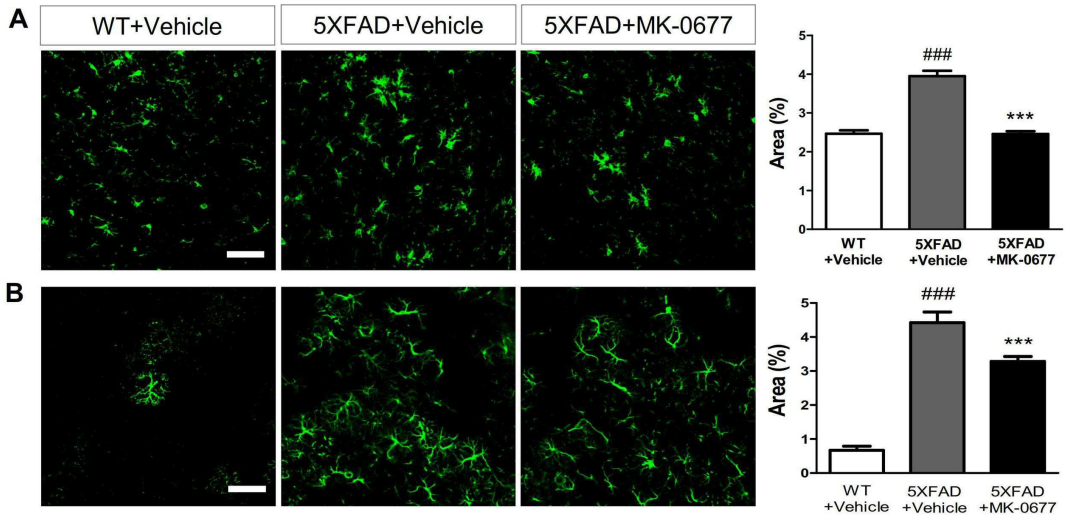
도면3


A
5XFAD+Vehicle
5XFAD+MK-0677
Area (%)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
**
Vehicle
MK-0677
5XFAD
B
5XFAD+Vehicle
5XFAD+MK-0677
Area (%)
7.5
6.0
4.5
3.0
1.5
***
Vehicle
MK-0677
5XFAD

도면4


A
WT+Vehicle
5XFAD+Vehicle
5XFAD+MK-0677
NeuN (+) cells (mm²)
1500
1000
500
0
###
***
WT +Vehicle
5XFAD +Vehicle
5XFAD +MK-0677
B
Optical Density of SYN
180
120
60
#
***
WT +Vehicle
5XFAD +Vehicle
5XFAD +MK-0677

도면5


A
WT+Vehicle
5XFAD+Vehicle
5XFAD+MK-0677
Area (%)
5
4
3
2
1
0
###
***
WT +Vehicle
5XFAD +Vehicle
5XFAD +MK-0677
B
Area (%)
5
4
3
2
1
0
###
***
WT +Vehicle
5XFAD +Vehicle
5XFAD +MK-0677