



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0044593
(43) 공개일자 2017년04월25일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/22 (2006.01) A23L 33/17 (2016.01)
C07K 14/575 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A61K 38/22 (2013.01)
A23L 33/17 (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0132526</p> <p>(22) 출원일자 2016년10월13일
심사청구일자 2016년10월13일</p> <p>(30) 우선권주장
1020150144177 2015년10월15일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
동국대학교 산학협력단
서울특별시 중구 필동로1길 30 (필동3가, 동국대학교)</p> <p>경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)</p> <p>(72) 발명자
전송희
경기도 고양시 일산동구 위시티4로 79, 315동 201호 (식사동, 위시티블루밍3단지아파트)</p> <p>김종필
서울특별시 강동구 풍성로 128, 203동 2003호 (성내동, 성내동삼성아파트)</p> <p>박희준
경기도 남양주시 조안면 북한강로301번길 2-19</p> <p>(74) 대리인
이명진</p> |
|--|---|

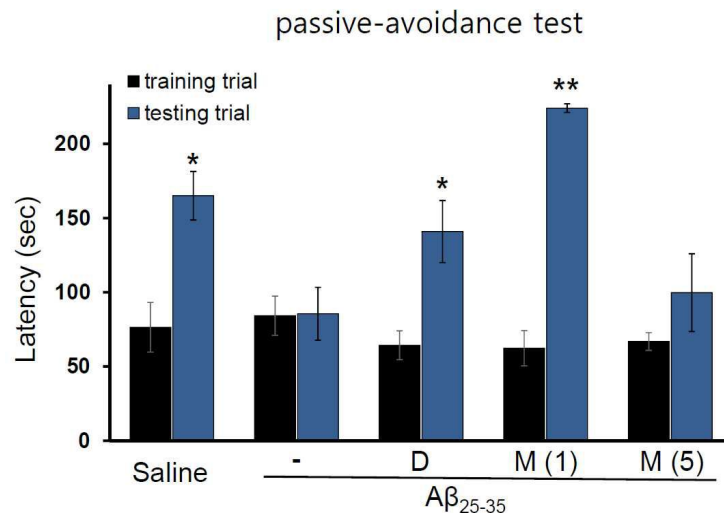
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은, 멜라닌 응집 호르몬(Melanin-concentrating hormone, MCH)을 유효성분으로 함유하는, 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선, 치료용 약학적/건강기능식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 멜라닌 응집 호르몬 함유 조성물은, 부작용이 거의 없고 퇴행성 뇌질환 특히 알츠하이머병이나 치매에 치료 효과가 뛰어나기 때문에, 기존의 치료제를 뛰어넘는 새로운 치료법을 제공할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C07K 14/575 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C0540030015

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 양 · 한방융합기반기술개발

연구과제명 인간병태유사 파킨슨병모델에서의 한양방협력 치료기술작용기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 동국대학교 산학협력단

연구기간 2015.05.15 ~ 2016.05.14

명세서

청구범위

청구항 1

멜라닌 응집 호르몬(melanin concentrating hormone)을 유효성분으로 함유하는, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 멜라닌 응집 호르몬은 아밀로이드 베타(amyloid β)에 의해 유도되는 신경세포 사멸을 저해하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 멜라닌 응집 호르몬은 아밀로이드 베타(amyloid β)에 의해 유도되는 활성산소(ROS) 및 일산화질소(NO)의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 멜라닌 응집 호르몬은 아밀로이드 베타(amyloid β)의 축적을 감소시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 멜라닌 응집 호르몬은 CREB(cAMP response element-binding protein), MAPK(Mitogen-activated protein kinases), 및 GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 beta)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 멜라닌 응집 호르몬은 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor), TrkB(Tropomyosin receptor kinase B), 및 PSD-95 (postsynaptic density protein 95)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병 또는 치매인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

멜라닌 응집 호르몬(melanin concentrating hormone)을 유효성분으로 함유하는, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병 또는 치매인 것을 특징으로 하는, 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 멜라닌 응집 호르몬(Melanin-concentrating hormone, MCH)을 유효성분으로 함유하는, 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선, 치료용 약학적/건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 퇴행성 뇌질환은 많은 보상기전에 의해 처음에는 증상이 드러나지 않기 때문에, 대개는 질병이 많이 진행된 후 진단되고 비가역적으로 서서히 진행되는 경과를 보이므로, 조기에 발견하는 것이 매우 중요하고 질병의 진행을 방지하거나 연장시키는 치료제의 개발이 절실하다. 또한, 퇴행성 뇌질환의 조기진단과 치료를 위해서는 분자생물학적 지식의 발전과 퇴행성 뇌질환의 병태생리기전 규명이 선행되어야 한다.

[0004] 알츠하이머병은 노인성반(senile plaques)이 관찰되는데, 1차적으로 뇌 실질조직 및 뇌혈관에서 아밀로이드 베타(A β) 펩타이드의 침착, 및 신경섬유 엉킴(neurofibrillary tangles)에 의해 유발되며, 주로 시냅스와 뉴런의 소실 뿐만 아니라 미세소관-관련 단백질 타우(tau)의 과인산화 형태가 뉴런 내에 축적되어, 뉴런 기능에 대한 과도한 유해 효과를 야기한다. 아밀로이드 베타와 알츠하이머 사이의 상관관계는 확실하게 밝혀지지 않았으나 알츠하이머를 위한 약물 표적으로써 아밀로이드 베타의 감소에 초점이 맞춰져 있다.

[0005] 최근, 전세계적으로 고령화 사회로 접어들었고, 노령인구가 증가할수록 알츠하이머병(Alzheimer's Disease), 치매와 같은 퇴행성 뇌질환 환자의 유병률이 급격히 증가하므로 앞으로 노령화 사회에서 퇴행성 뇌질환은 보건의료학적인 문제를 넘어서 심각한 사회, 경제적인 부담을 야기할 것이다. 실제, 알츠하이머병(Alzheimer's Disease; AD)은 2050년까지 약 1억명의 환자가 발생할 것으로 예측되고 있다.

[0006] 한편, 멜라닌 응집 호르몬(Melanin-concentrating hormone, MCH)은 뇌하수체로부터 첫 번째로 분리된 고리모양의 19개의 아미노산(Asp-Phe-Asp-Met-Leu-Arg-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Gln-Val)으로 구성된 시상하부의 펩타이드이다. 뇌에서 MCH에 대한 우성 발현은 외측 시상하부에서 발견되었고 뇌 도처에 돌출되어 있다.

[0007] MCH는 에너지를 소모하고 섭식행동을 자극함으로써, 에너지 항상성을 조절하는 물질로 알려져 있다. 특히, 식욕을 유발한다는 것이 알려져 있기 때문에, 대부분 비만 치료를 위한 타겟으로서 MCH의 길항제 개발에 초점이 맞춰져 있다(한국특허공개 제2010-0117059호). 그러나, 알츠하이머병(AD)이나 치매와 같은 퇴행성 뇌질환과 MCH와의 상관관계에 대하여 밝혀진 바는 거의 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에, 본 발명자들은 알츠하이머병(AD)이나 치매와 같은 퇴행성 뇌질환과 MCH와의 상관관계에 대하여 예의 연구한 결과, A β ₂₅₋₃₅에 유도되는 신경세포 사멸효과가 MCH에 의해 감소됨을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은, MCH를 유효성분으로 함유하는, 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선, 치료용 약학적/건강기능식품 조성물을 제공하는 데 있다.

[0011] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 멜라닌 응집 호르몬(melanin concentrating hormone)을 유효성분으로 함유하는, 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료용 약학적 조성물/건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은, 멜라닌 응집 호르몬을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은, 멜라닌 응집 호르몬의 퇴행성 뇌질환 예방, 개선 또는 치료용도를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 일 구현예로, 상기 멜라닌 응집 호르몬은 아밀로이드 베타(amyloid β)에 의해 유도되는 신경세포 사멸을 저해하는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 멜라닌 응집 호르몬은 아밀로이드 베타(amyloid β)에 의해 유도되는 활성산소(ROS) 및 일산화질소(NO)의 생성을 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 본 발명의 또다른 구현예로, 상기 멜라닌 응집 호르몬은 아밀로이드 베타(amyloid β)의 축적을 감소시키는 것을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명의 또다른 구현예로, 상기 멜라닌 응집 호르몬은 CREB(cAMP response element-binding protein), MAPK(Mitogen-activated protein kinases), 및 GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 beta)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명의 또다른 구현예로, 상기 멜라닌 응집 호르몬은 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor), TrkB(Tropomyosin receptor kinase B), 및 PSD-95 (postsynaptic density protein 95)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병 또는 치매인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명의 멜라닌 응집 호르몬 함유 조성물은, 부작용이 거의 없고 퇴행성 뇌질환 특히 알츠하이머병이나 치매에 치료 효과가 뛰어나기 때문에, 기존의 치료제를 뛰어넘는 새로운 치료법을 제공할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명에 의하면, 종래 안정성이 입증된 승인약물(MCH)의 "drug repositioning"을 이용하였기 때문에, 신약개발의 리스크나 비용부담을 줄일 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명에 의하면, 다양한 신호전달 경로를 표적(다중표적)으로 하기 때문에 광범위한 치료효과를 기대할 수 있어, 단일표적 약물의 한계를 극복할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은, 멜라닌 응집 호르몬의 인간 신경모세포종 세포(SH-SY5Y)의 보호효과를 확인하기 위하여, MTT 어세이를 실시한 결과이다.
- 도 2는, 멜라닌 응집 호르몬의 1차 피질신경세포(primary cortical neuron) 보호효과를 확인하기 위하여, MTT 어세이를 실시한 결과이다.
- 도 3은, 멜라닌 응집 호르몬이 아밀로이드 베타로 유도되는 ROS 생성을 억제하는지 확인한 결과(a, b) 및 NO 생성을 억제하는지 확인한 결과(c,d)를 나타낸 도면이다.
- 도 4는, 아밀로이드베타 25-35의 투여 후, 멜라닌 응집 호르몬의 처리에 의한 기억력 증진 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 5는, 피질과 후각에서 멜라닌 응집 호르몬의 처리에 의한 아밀로이드베타 1-42의 축적 감소를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 6은, 대뇌피질에서 멜라닌 응집 호르몬의 처리에 의한 CREB, MAPK 및 GSK3 β 의 발현 수준의 증가를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 7은, 대뇌피질에서 멜라닌 응집 호르몬의 처리에 의한 BDNF, TrkB, 및 PSD-95의 발현 수준 증가를 확인한 결

과를 나타낸 도면이다.

도 8은, 해마에서 멜라닌 응집 호르몬의 처리에 의한 CREB, MAPK 및 GSK3 β 의 발현 수준의 증가를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 9는, 해마에서 멜라닌 응집 호르몬의 처리에 의한 BDNF, TrkB, 및 PSD-95의 발현 수준 증가를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 10은, 멜라닌 응집 호르몬의 기억력 효능을 확인하기 위해서 수행된 실험 방법(a), Locomotor activity 실험 결과(b), 및 Novel object recognition (NOR) test 결과(c)를 나타낸 도면이다.

도 11은, 멜라닌 응집 호르몬의 기억력 효능을 확인하기 위해서 수행된 Passive avoidance 실험 결과(a) 및 Morris water maze 실험 결과(b)를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명은, 멜라닌 응집 호르몬(melanin concentrating hormone)을 유효성분으로 함유하는, 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물/건강기능식품을 제공한다.
- [0029] 본 발명에서 사용된 용어 '멜라닌 응집 호르몬'은 신경펩티드의 일종으로, 중앙 신경계에 분포되어 있고, 음식물의 식이조절 및 체중 조절에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 레트 또는 인체에서 색소 미립자를 응집시켜 색을 연하게 하며, 멜라닌 생성을 억제하는 기능을 갖는 것으로 알려져 있다. 상기 멜라닌 응집 호르몬의 아미노산 서열은 Asp-Phe-Asp-Met-Leu-Arg-Cys-Met-Leu-Gly-Arg-Val-Tyr-Arg-Pro-Cys-Trp-Gln-Val으로 공지되어 있다(Genbank:NP_002665, NM_002674).
- [0030] 본 발명에서 "퇴행성 뇌질환"은 병적인 노화와 관련되어 뇌세포의 조기 사멸로 인해 임상적으로 인지기능 및 운동기능 등에서 병적인 소견이 발생 진행되는 병을 의미한다. 본 발명에 따른 조성물에 의해 예방, 개선 또는 치료될 수 있는 퇴행성 뇌질환에는 제한이 없으나, 알츠하이머병, 치매, 헌팅톤병 등이 포함되며, 특히 알츠하이머병 또는 치매인 것이 바람직하다.
- [0031] 본 발명의 치료 "조성물"은 기존 치료 활성 성분, 기타 보조제, 약제학적으로 허용가능한 담체 등의 성분을 추가로 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 및 에탄올 등을 포함한다.
- [0032] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말 및 소 등의 포유류를 의미한다.
- [0033] 또한 본 발명에서 "약학적 유효량"은 투여되는 질환 종류 및 중증도, 환자의 연령 및 성별, 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 결정되며 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 "투여방법"에는 제한이 없다. 예를 들면, 경구 투여, 동맥 주사, 정맥 주사, 경피 주사, 비강 내 투여, 경기관지 투여 또는 근육 내 투여 등이 포함된다. 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회 나누어 투여하는 것이 바람직하다.
- [0035] 본 발명의 조성물은 퇴행성 뇌질환의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있으며, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 형태로 사용할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서는, A β ₂₅₋₃₅에 유도되는 신경세포 사멸효과가 MCH에 의해 감소되는지 확인하기 위하여, 인간 신경모세포종 세포주(SH-SY5Y) 및 1차 피질신경세포(primary cortical neuron, PCN)를 대상으로 MTT 어세이를 실시한 결과, MCH에 의해 신경세포 사멸이 현저히 감소됨을 확인하였다(실시예 2-1 및 2-2). 또한 본 발명에서는, MCH의 처리 후, 아밀로이드 베타(amyloid β)에 의해 유도되는 ROS 및 NO의 생성이 억제된다는 것을 확인하였고(실시예 2-3 및 2-4), 아밀로이드 베타 1-42의 축적이 감소된다는 것을 확인하였으며(실시예 3-1-2), 신경전달 관련 단백질인 CREB(cAMP response element-binding protein), MAPK(Mitogen-activated protein kinases), GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 beta), BDNF(Brain-derived neurotrophic factor), TrkB(Tropomyosin receptor kinase B), 및 PSD-95 (postsynaptic density protein 95)의 발현을 증가시킨다는 것을 확인하였다

(실시예 3-1-3). 또한, 본 발명은 치매 유도 마우스를 대상으로 수행한 행동 연구 실험을 통해서 실질적인 MCH의 기억력 증진 효과를 확인하였다(실시예 3-2).

[0037] 따라서, 본 발명에 의하면, 부작용이 거의 없고, 알츠하이머병이나 치매에 치료 효과가 뛰어나기 때문에, 기존의 치료제를 뛰어넘는 새로운 치료법을 제공할 수 있다.

[0039] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0041] [실시예]

[0042] **실시예 1: 실험방법**

[0043] **1-1. 세포배양**

[0044] 인간 신경모세포종(SH-SY5Y) 세포는 American Type Culture Collection(Rockville, MD, USA)로부터 구입하였다. 세포는 37℃의 온도, 95%의 공기 및 5%의 CO₂로 구성된 대기에서 10 % 소 태아 혈청(FBS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 unit/ml 페니실린, 및 100 µg/ml 스트렙토마이신(Gibco-BRL, Rockville, MD, USA)을 첨가하고 추가로 트립신-EDTA(Gibco-BRL, Rockville, MD, USA)를 첨가한 DMEM(Dulbeccos modified Eagles minimum essential medium, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 유지하였다.

[0045] 1차 피질신경세포(primary cortical neuron, PCN)는, 임신한 마우스의 17일 된 태아에서 대뇌피질을 적출하여 Neurobasal media에 B27 supplement, 100 unit/ml 페니실린, 및 100 µg/ml 스트렙토마이신(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)이 첨가된 배지에서 5일간 배양하였다.

[0047] **1-2. MTT 어세이**

[0048] 세포 생존률은 MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)를 이용하여 확인하였다. 우선, 세포는 5X10³ 세포/웰의 밀도로 12-웰 플레이트(Corning Incorporated, USA)에 분주하였고, 37℃에서 16시간 동안 안정화시킨 후 24시간 동안 10 µM의 레티노산으로 분화시켰다. 분화된 세포들은 24시간 동안 Aβ₂₅₋₃₅를 처리한 것 또는 처리하지 않은 것으로 나누고 상기 그룹에 각각 표시된 농도로 MCH(Tocris biosciences, Bristol, UK)를 처리하였다. 세포는 2 mg/mL의 MTT 용액과 함께 배양하였다. 5% CO₂, 37℃에서 4시간 동안 배양 후, 상등액은 제거하고, 디메틸 설펡사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO, Sigma, USA)를 추가하였다. 반응물의 광학밀도(optical density, OD)는 마이크로플레이트 리더기(iMARK, Bio-Rad, USA)를 사용하여 580 nm에서 측정하였다. 광학밀도는 다음 식을 사용하여 퍼센트로 바꾸었다: 세포 생존율 (%) = (OD 샘플/OD 음성 대조군) X 100. 음성 대조군 세포는 완벽히 DMEM만을 처리하였다.

[0050] **1-3. ROS 측정**

[0051] 세포내 ROS 생성은 fluorometer (Spectra Max Gemini EM, Molecular Device; Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 측정하였으며 ROS 측정은 염색시약인 dichlorofluorescein diacetate (DCFH)가 ROS와 반응하여 형광물질인 dichlorofluorescein (DCF)를 생성하여 480 nm excitation 과 530 nm emission 파장에서 측정하였다.

[0053] **1-4. Nitric oxide 측정**

[0054] NO 측정은 Nitric oxide colorimetric Assay Kit(Biovision)를 이용하여 측정하였다. 간단히 하면, 세포 상층액 85ul와 nitrate reductase를 섞은 후 상온에서 1시간 동안 반응시켜 nitrate를 nitrite로 전환시킨다. 그 후, Griess reagent를 섞은 후 10분 동안 상온에서 반응시킨다. 반응이 끝난 후, 540nm 필터가 있는 microplate reader를 이용, 흡광도를 측정한다. Standard curve를 이용하여 혈청에 들어있는 nitrite 농도를 측정한다.

- [0056] **1-5. 실험동물**
- [0057] **1-5-1. MCH 처리에 따른 아밀로이드베타 25-35의 주입에 의한 알츠하이머 동물모델에서 인지능력 향상 실험**
- [0058] 실험동물은 오리엔트바이오(주)에서 구입한 외관상 건강한 ICR계 mouse로 웅성 6주령(20~26g)을 사용하였으며, 온도 $22\pm1^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm1\%$, 12시간 light-dark cycle의 통제된 사육실 (동국대 바이오 동물실험 센터)에서 식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 반입 후 7일 동안 적응 사육시킨 후 실험에 사용하였다.
- [0060] 실험군은 1주일간 적응 사육시킨 후 무계별로 균등하게 6마리씩 5 group으로 나누고, 각 group별로 다음과 같이 처치하였다.
- [0062] · Saline group : saline을 intracerebroventricular injection 한 군.
- [0063] · AD group : β -amyloid 25-35을 intracerebroventricular injection 한 군.
- [0064] · AD group + Donepezil : β -amyloid 25-35을 intracerebroventricular injection 한 후 1 mg/kg로 1주일간 구강투여한 군.
- [0065] · AD group + MCH 1 : β -amyloid 25-35을 intracerebroventricular injection 한 후 1 ug/mouse로 1주일간 비강투여한 군.
- [0066] · AD group + MCH 5 : β -amyloid 25-35을 intracerebroventricular injection 한 후 5 ug/mouse로 1주일간 비강투여한 군.
- [0068] 각 group별로 Saline 군을 제외한 네 group은 β -amyloid 25-35를 50 μl Hamilton microsyringe를 이용하여 26 gauge needle로 bregma에 2.4mm 깊이로 5 μl 를 intracerebroventricular injection하였다. 이로써 치매를 유발하였고, 치매 유발 뒤 1주일 후에 passive avoidance task의 training trial을 실시하였다. 다시 24시간 후 passive avoidance task의 retention trial을 실시하였다.
- [0070] **1-5-2. MCH 처리에 따른 아밀로이드베타 1-42의 변화량 확인 및 활성 단백질 변화관찰을 위한 실험 동물**
- [0071] 오리엔트바이오(주)에서 수입한 형질전환 mouse(APPswe/PS1dE9 Tg)로 웅성 2개월 된(20~26g) mouse를 구입하여 일산 동국대 바이오 실험동물실에서 사육하여 사용하였으며, 온도 $22\pm1^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm1\%$, 12시간 light-dark cycle에서 식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 태어난 지 4.3개월이 지난 후 실험에 사용하였다.
- [0073] 실험군은 Tg-APPswe/PS1dE9 mouse 16마리를 두 군으로 나누어 다음과 같이 처치하였다.
- [0074] · Control group (Control): 아무 처치하지 않은 군 (7마리)
- [0075] · MCH group (MCH): 4.5 개월부터 MCH 1 ug/mouse 을 30 ul 증류수에 녹여 코로 매일 주입한 군 (9마리)
- [0077] **1-5-3. 인지기능 저하 유도 마우스에서의 기억력 향상 확인을 위한 실험 동물**
- [0078] ICR 동물에서 MCH 단기 투여시 기억력 감퇴에 어떠한 효과를 가지고 있는지 조사하기 위하여, 실험동물은 오리엔트바이오(주)에서 구입한 외관상 건강한 ICR계 mouse로 웅성 6주령(20~26g)을 사용하였으며, 온도 $22\pm1^{\circ}\text{C}$, 습도 $55\pm1\%$, 12시간 light-dark cycle의 통제된 사육실 (동국대 바이오 동물실험 센터)에서 식이와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 반입 후 7일 동안 적응 사육시킨 후 실험에 사용하였다.
- [0080] 실험군은 1주일간 적응 사육시킨 후 무계별로 균등하게 6마리씩 5 group으로 나누고, 각 group별로 다음과 같이

처리하였다.

[0081] · Saline group : saline을 intracerebroventricular injection 한 군.

[0082] · MCH group : 1 ug/mouse로 1주일간 비강투여한 군.

[0083] · Scop group : scopolamine을 5일 동안 1 mg/kg의 농도로 intracerebroventricular injection 한 군.

[0084] · Scop group + MCH : scopolamine을 5일 동안 30분 전처리한 후 MCH를 1ug/mouse 투여한 군.

[0086] 1-6. 행동연구 방법

[0087] 1-6-1. Passive avoidance task

[0088] ① Passive avoidance test(수동회피실험) 장치

[0089] 측정기기의 형태는 내부가 두 개의 방으로 구성된 상자(shuttle box, 53cmW × 44cmH × 33cmD)로서 가운데에는 두 방 사이의 문 역할을 하는 guillotine door가 있으며 한쪽 방에는 실험동물이 싫어하는 환경을 만들기 위해 매우 밝은 전구를 달고, 다른 한쪽 방에는 바닥(grid floor)전체에 전기쇼크(scrambled foot-shock)를 가할 수 있는 장치가 되어 있다.

[0091] ② Training trial

[0092] Test는 실험군 또는 대조군 각 1마리씩 한쪽 방에 넣고 15초간의 탐색시간을 준 뒤, 위에서 조명과 소음을 가하면 가운데의 guillotine door를 통과하여 조용하고 어두운 다른 방(쇼크실)에 도달하게 하였다. 쥐가 쇼크실에 들어가면 자동적으로 guillotine door가 닫히면서 전기쇼크가 가해지도록 조작되어 있다. 쇼크는 0.3mA의 전류를 3초간 통하게 하였으며 쥐가 foot-shock를 받은 후에 꺼내어 home cage에 다시 넣어두었다. 이러한 방법으로 각각 7마리의 실험군과 대조군에 대하여 전기쇼크를 가하였다. 120초 동안에 쇼크실로 들어가지 않는 쥐는 실험 대상에서 제외시켰다.

[0094] ③ Retention trial

[0095] 24시간 후, 위의 training을 받은 쥐에 대해 전기쇼크를 실시했을 때, 약물의 기억증진효과가 있으면 쥐가 전날의 쇼크를 기억하여 쇼크실로 잘 들어가지 않게 된다. 따라서 도달시간이 길수록 수동회피의 학습과 기억효과가 좋을 것을 나타낸다. 이 때, 쇼크실 도달시간(step-through latency time)은 300초(cut-off time)까지 측정하였다.

[0097] 1-6-2. Water maze test

[0098] Passive avoidance test 후 Water maze test를 5일 동안 실시하였다. 원형의 물탱크(지름 180 cm, 높이 35 cm)에 온도 22±2℃의 물을 15 cm 깊이로 채웠고, 물은 분유를 넣어 부영계 만들었다. 플랫폼(platform, 지름 4.5 cm, 높이 13.5 cm)은 전체 물탱크를 4등분한 중 하나의 부채꼴 중앙에 놓아 플랫폼 상단이 수면 1.5 cm 밑에 위치하도록 하였다.

[0099] Training trial은 1일 3회씩 4일간 연속적으로 실시하였다. 일단 생쥐가 플랫폼을 찾으면 약 10초간 플랫폼에 머무르도록 두었다가 원래의 cage로 돌아가 있도록 한 60분 후에 다음 trial을 실시하였다. 만일 생쥐가 60초 이내에 플랫폼을 찾지 못하면 이를 플랫폼에 10초간 두었다가 시험을 끝냈다. Training이 끝난 동물을 대상으로 마지막 training trial 24시간 후에 probe trial을 실시하였다. 이 때는 물탱크에서 플랫폼을 제거하고 60초 동안에 플랫폼이 놓여 있던 4분원에 머무는 시간을 측정하여 백분율로 나타내었다. 실험은 물탱크 위의 천장에 설치된 videorecorder/tracking device(S-MART; Pan-Lab, Barcelona, Spain)을 이용해 녹화 분석하였다.

[0101] 1-6-3. Open field test (OFT)

[0102] 실험 시작 전에 40 x 40 x 40 cm 아크릴 상자에 실험 동물을 한 마리씩 각각 30분전에 10분씩 적응 시켰다. 30

분이 지난 뒤, 동물을 상자의 가운데에 놔둔 후 5~10분 동안 미리 정해진 시간만큼 비디오 촬영을 했다.

[0104] 1-6-4. Novel object recognition (NOR) test

[0105] OFT에 사용된 40 cm x 40 cm x 40 cm 아크릴 상자를 이용하여 실험을 진행한다. 벽으로부터 10 cm 떨어진 곳에 똑같이 생긴 물체를 두 개 놔두었다(이 때 두 물체간의 간격은 30cm가 되도록 했다). 동물을 두 물체 가운데에 놔두고 10분간 관찰하였다. 1시간이 지난 뒤, 두 물체 중 하나만 전혀 다른 물체로 바꿔주었다 (size만 비슷하고 texture나 shape은 다른것이어야 한다). 다시 동물을 두 물체 가운데 놔두고 10분간 관찰하였다. 측정치는 똑같은 물체를 두고 관찰했을 때의 동물의 물체 접근 시간과 다른 물체를 두고 관찰했을 때의 동물의 새로운 물체 접근 시간을 잰다.

[0107] 1-7. 아밀로이드 베타(A β) assay

[0108] 마우스 뇌 속의 A β 의 양은 A β (1-40)과 A β (1-42)을 특이적으로 잡는 ELISA(human and mouse specific)방법으로 측정하였다. ELISA kit는 Invitrogen(CA, USA)로부터 구입하였다. ELISA 방법은 invitrogen사에서 제공된 방법에 따라 수행하였다. 간략히 요약하면 다음과 같다. Standard peptide 로 제공된 A β (1-40), A β (1-42)을 주어진 standard reconstitution buffer(55 mM sodium bicarbonate, pH 9.0)에 녹이고 standard dilution buffer를 이용하여 희석 시켜 standard curve 를 얻는데 사용하였다. 마우스 brain extract는 100 μ l가 되도록 standard dilution buffer에 섞고 준비된 ELISA strip에 넣었다. 2시간 incubation 한 후에 4번 washing buffer로 씻어주고 detection antibody를 1시간 붙여준 후에 다시 4번 세척하고 HRP conjugation 된 secondary antibody를 30분 붙여준 후에 4번 세척하였다. 30분간 stabilized chromogen을 넣어 발색반응을 시키고 stop solution을 넣어주어 발색반응을 정지시켰다. 발색반응의 정도는 450nm 파장에서 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 각 샘플의 값을 표준 값과 비교하여 샘플 내에 들어있는 A β 의 절대량을 환산해냈다.

[0110] 1-8. Immunohistochemistry

[0111] 실험이 종료된 후 뇌를 적출하여 우측뇌를 4% paraformaldehyde in 0.05 M phosphate buffer (PB) 로 고정 한 후 후고정을 24시간 한 후 30% sucrose에서 24시간을 넣어둔 후 조직을 절편하였다. 면역 염색은 free-floating 방법으로 조직을 cryomicrotome을 이용해 40 μ m 의 두께로 잘라 대뇌피질 부분이 포함된 부위를 사용하였다. 0.05 M PBS 용액에 3% H₂O₂ 가 들어간 용액으로 10분간 부유 후 anti-A β 1-42 (1:100, Biosource USA) 항체를 상온에서 16시간 이상 결합시킨 후 Vectastain Elite ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 이용하여 발색하였다.

[0113] 1-9. Western blot analysis

[0114] 뇌를 적출한 후 해마를 분리하여 완충액(50 mM Tris-HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 30 mM sodium pyrophosphate, 10 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, protease inhibitor cocktail)을 넣고 균질기를 이용하여 균질화하였다. 균질액을 12000 rpm에서 15 분간 4도에서 원심분리 후 상층액을 얻었다. 단백질 정량은 bicinchoninic acid(BCA, Pierce)법을 사용하였다. 상층액은 4X Lammlie의 완충액 (62.5 mmol/l Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol)을 넣고 95℃에서 boiling 하였다. 정량된 단백질 시료 50 μ g을 4-12% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gradient gel(Invitrogen) 전기 영동법(SDS-PAGE)으로 분리되었고, nitrocellulose paper(Amersham)로 옮겼다. 단백질을 옮겨진 막을 Ponceau-S로 염색하여 단백질이 완전하게 옮겨졌음을 확인하고 0.1% Tween 20을 포함하는 Tris-buffered saline(TBS-T)으로 씻은 후 5% 탈지 분유액으로 30분 이상 blocking하였다. 항 인산화 CREB(p-CREB), 항 인산화 MAPK(p-MAPK), MAPK, 항 인산화 GSK3b(p-GSK3b), GSK3b, TrkB, PSD95, b-actin (Cell signaling tech. USA), 항 BDNF 항체(Upstate Biotechnology, USA)와 함께 4℃에서 16시간 동안 반응시킨 후 막을 TBS-T에서 10분씩 3회 세척한 후 blot을 2차 항체와 함께 1 시간동안 반응시켰다. 2차 항체 반응 후 막을 씻고 enhanced chemiluminescence system(ECL, Pierce)으로 원하는 단백질을 가시화 하였다. 단백질의 가시화 및 정량 분석은 image 장비(LAS-3000, Fuji)를 이용하였다.

[0116] **1-10. Data 분석 및 통계처리**

[0117] 모든 측정값은 평균값 표준편차(mean±S.D.)로 표시하였고, 각 실험군 간의 통계학적 분석은 window용 SPSS Program의 one-way ANOVA로 검정하여 p값이 0.05이하인 경우에 유의한 것으로 인정하였다.

[0119] **실시예 2: MCH의 신경세포 보호효과 확인**

[0120] **2-1. SH-SY5Y 세포 보호효과 확인**

[0121] A β ₂₅₋₃₅에 유도되는 신경세포사멸효과가 MCH에 의해 감소되는지 확인하기 위하여, 인간 신경모세포종 세포주(SH-SY5Y)를 대상으로 MTT 어세이를 수행하였다.

[0122] 우선, 10uM의 레티노산(retinoic acid)으로 세포를 분화시킨 후, 상기 세포에 25uM의 아밀로이드 베타(A β ₂₅₋₃₅)를 5, 10, 20 또는 50nM의 MCH와 함께 24시간 처리한 후, MTT 어세이를 수행하였다.

[0123] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, A β ₂₅₋₃₅에 유도되는 신경세포 사멸효과는 5 또는 10nM의 MCH에 의해 감소됨을 확인하였다.

[0125] **2-2. PCN 세포 보호효과**

[0126] A β ₂₅₋₃₅에 유도되는 신경세포사멸효과가 MCH에 의해 감소되는지 확인하기 위하여, 1차 피질신경세포(primary cortical neuron, PCN)를 대상으로 MTT 어세이를 수행하였다.

[0127] 우선, PCN 세포를 씨당한지 5일후, 상기 세포에 25uM의 아밀로이드 베타(A β ₂₅₋₃₅)를 1 또는 2uM의 MCH와 함께 24시간 처리한 후, MTT 어세이를 수행하였다.

[0128] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, A β ₂₅₋₃₅에 유도되는 신경세포 사멸효과는 2uM의 MCH에 의해 감소됨을 확인하였다.

[0130] **2-3. ROS 생성억제 효과**

[0131] MCH가 아밀로이드 베타로 유도되는 ROS 생성 억제 효과가 있는지 규명하기 위해 PCN 세포를 씨당한지 5일후, 상기 세포에 25uM의 아밀로이드 베타(A β ₁₋₄₂)를 1 uM의 MCH와 함께 4시간 처리한 후, 세포내 생성된 ROS의 양을 형광물질인 dichlorofluorescein (DCF)를 생성하여 480 nm excitation 과 530 nm emission 파장에서 측정하였다. MCH의 신호전달을 특이적으로 억제하기 위해 antagonist-MCH를 사용하였다. 그 결과, 도 3a 및 도 3b에 나타난 바와 같이, A β ₁₋₄₂에 유도되는 ROS 생성효과는 1 uM의 MCH에 의해 감소됨을 확인하였다.

[0133] **2-4. NO 생성억제 효과**

[0134] MCH가 아밀로이드 베타로 유도되는 NO 생성 억제 효과가 있는지 규명하기 위해 PCN 세포를 씨당한지 5일후, 상기 세포에 25uM의 아밀로이드 베타(A β ₁₋₄₂)를 1 uM의 MCH와 함께 4시간 처리한 후, 세포내 생성된 NO의 양을 Nitric oxide colorimetric Assay Kit(Biovision)를 이용하여 측정하였다. MCH의 신호전달을 특이적으로 억제하기 위해 antagonist-MCH를 사용하였다. 그 결과 도 3d에 나타난 바와 같이, A β ₁₋₄₂에 유도되는 NO 생성효과는 1 uM의 MCH에 의해 감소됨을 확인하였다. 도 3c는 A β ₁₋₄₂에 유도되는 신경세포의 사멸이 MCH에 의해 억제됨을 면역염색으로 확인하였다.

[0136] **실시예 3: MCH의 뇌 조직에서의 기능 확인**

[0137] **3-1. 뇌 조직에서 아밀로이드 베타 펩타이드에 있어 MCH의 기능 확인**

[0138] **3-1-1. MCH 처리에 따른 아밀로이드베타 25-35의 투여 후 기억력의 변화 확인**

[0139] MCH 처리 효과를 알아보기 위하여 실시예 1-5-1의 방법과 같이 ICR 동물에서 stereotaxic injection 방법을 이용하여 동물 뇌 해마부위에 아밀로이드 베타25-35를 투여한 후, 10일 동안 Saline, Donepezil 및 MCH를 처리하였고, 하루 후에 passive avoidance 행동실험을 실시하였다.

[0140] 그 결과, 도 4에 나타난 것과 같이, MCH 1 μ g을 처리한 군(M(1))에서 양성대조군인 도네페질(D)보다 기억력이 현저하게 증가된다는 것을 확인하였다.

[0142] **3-1-2. MCH 처리에 따른 아밀로이드베타 1-42의 변화 확인**

[0143] 실시예 1-5-2의 방법으로 제조된 APP/PSEN 형질전환동물에서 피질과 흑질에서 아밀로이드베타 1-42의 변화량을 면역염색으로 관찰하였다.

[0144] 그 결과, 도 5에 나타난 결과와 같이 대뇌피질에서 수용상태의 아밀로이드 베타의 양은, 대조군(control)과 비교하여 MCH 처리군(MCH)에서 현저히 줄어들어 있음을 확인하였다.

[0146] **3-1-3. 대뇌 피질 및 해마에서 MCH 처리에 의한 신경전달 관련 단백질의 발현 수준 확인**

[0147] 1-5-2의 방법으로 제조된 마우스에 대하여, MCH 처리 효과를 대뇌피질(cortex)에서 면역블롯방법을 이용하여 확인하였다.

[0148] 그 결과, 도 6과 같이 MCH 군에서 cAMP response element-binding protein(CREB), MAPK(Mitogen-activated protein kinases), 및 GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 beta) 인산화가 모두 증가되었다.

[0149] 또한 도 7에서 MCH 처리 효과를 대뇌피질에서 신경전달에 관여하는 단백질을 면역블롯으로 확인한 결과 MCH 군에서 BDNF(Brain-derived neurotrophic factor), TrkB(Tropomyosin receptor kinase B), 및 PSD-95 (postsynaptic density protein 95)의 발현이 모두 유의하게 증가되었음을 확인하였다.

[0150] 또한, MCH 처리 효과를 해마에서도 확인하였다. 도 8에서 확인할 수 있는 것과 같이, MCH 군에서 cAMP response element-binding protein(CREB), MAPK, 및 GSK3 β 인산화가 모두 증가되었다.

[0151] 아울러, MCH 처리 효과를 해마에서도 신경전달에 관여하는 단백질을 면역블롯으로 확인한 결과, 도 9와 같이 MCH 군에서 BDNF, TrkB, 및 PSD95의 발현이 모두 유의하게 증가되었음을 확인하였다.

[0152] 따라서, MCH의 처리에 의해서 대뇌피질 및 해마에서 신경전달에 관여하는 단백질의 발현을 증가시키며, 이는 MCH의 처리에 의해 신경 전달 효율이 상승된다는 것을 의미하는 것이다.

[0154] **3-2. 행동 연구를 통한 MCH의 기억력 증진 효과 확인**

[0155] 실시예 1-5-3 및 도 10a에 기재된 방법과 같이, ICR 동물에서 MCH 단기 투여시 기억력 감퇴에 어떠한 효과를 가지고 있는지 조사하기 위하여, 기억력 감퇴를 유발하는 scopolamine을 매일 5일 동안 30분 전처리한 후 MCH를 1 μ g 농도로 투여하였다.

[0156] 5일 투여 후 Locomotor activity, Morris water maze 및 passive avoidance 실험을 실시하여 MCH의 기억력 효능을 확인하였다. Locomotor activity 실험결과는 도 10b에 나타내었고, scopolamine을 전처리한 군에서는 바깥 쪽으로 돌아다니는데 비해 MCH 처리군에서는 정상과 유사한 결과를 나타냈다. 또한 새로운 물건에 대한 반응을 관찰한 결과, 도 10c에 나타난 것과 같이 MCH 처리한 군에서 새로운 물건에 대한 호기심을 보이는 시간이 증가됨을 확인하였다.

[0157] Passive avoidance 실험 결과, 도 11a에 나타난 것과 같이 scopolamine을 전처리한 군에서는 기억력이 감소하였으나 MCH를 처리한 군에서 기억력이 현저히 증가한다는 것을 확인하였다. 도 11b에 나타난 Morris water maze 실험 결과에서는, 3일 째 되는 때에 scopolamine 전처리 후 MCH를 처리한 군에서 유의성 있게 기억력이 증진되는 것을 확인하였다.

[0158] 상기 실시예의 결과로부터, 본 발명의 조성물의 유효성분인 MCH의 처리에 의해, 아밀로이드 베타에 의해 유도되

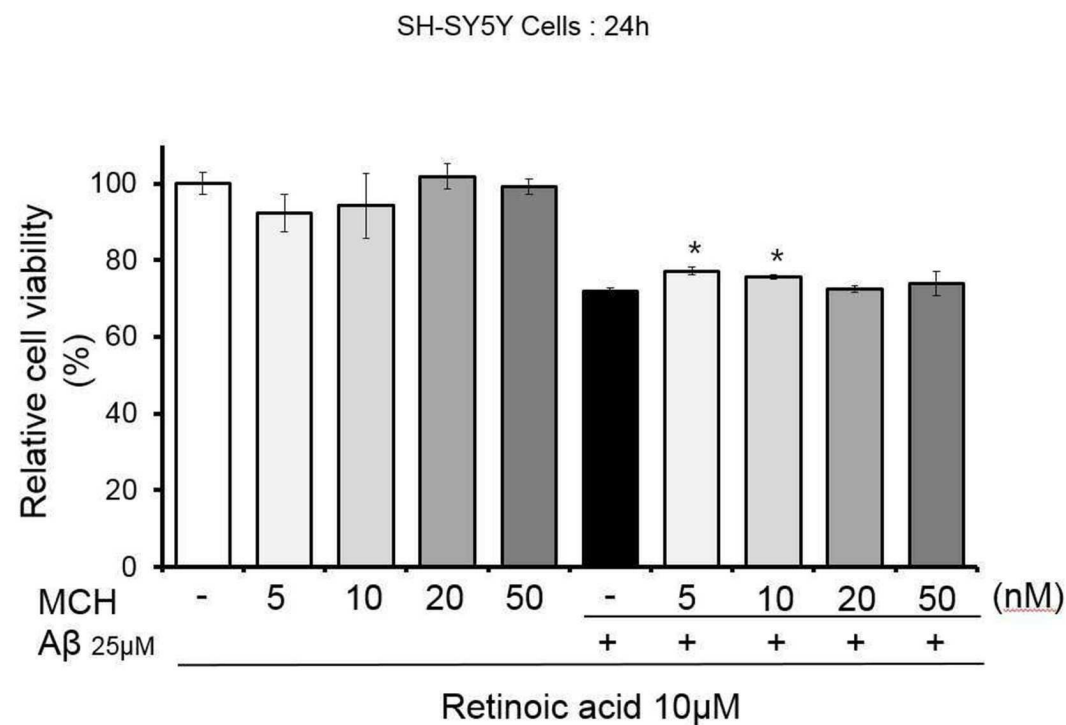
는 신경세포 사멸과, 기억력 저하를 억제할 수 있고, 신경전달에 관여하는 단백질의 발현이 대뇌피질 및 해마에서 모두 증가하며, 행동 연구를 통해 확인한 결과 기억력이 증진된다는 것을 알 수 있는 바, 상기 MCH의 퇴행성 뇌질환 치료 효과가 우수하다는 것을 확인하였다.

[0160]

전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

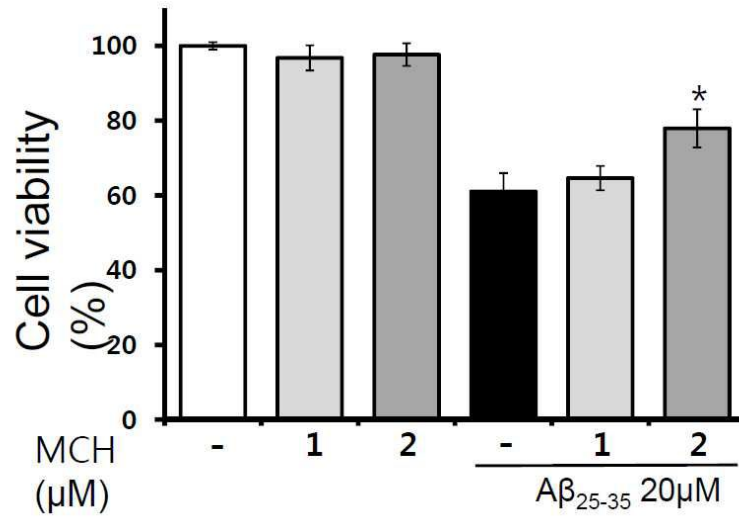
도면

도면1

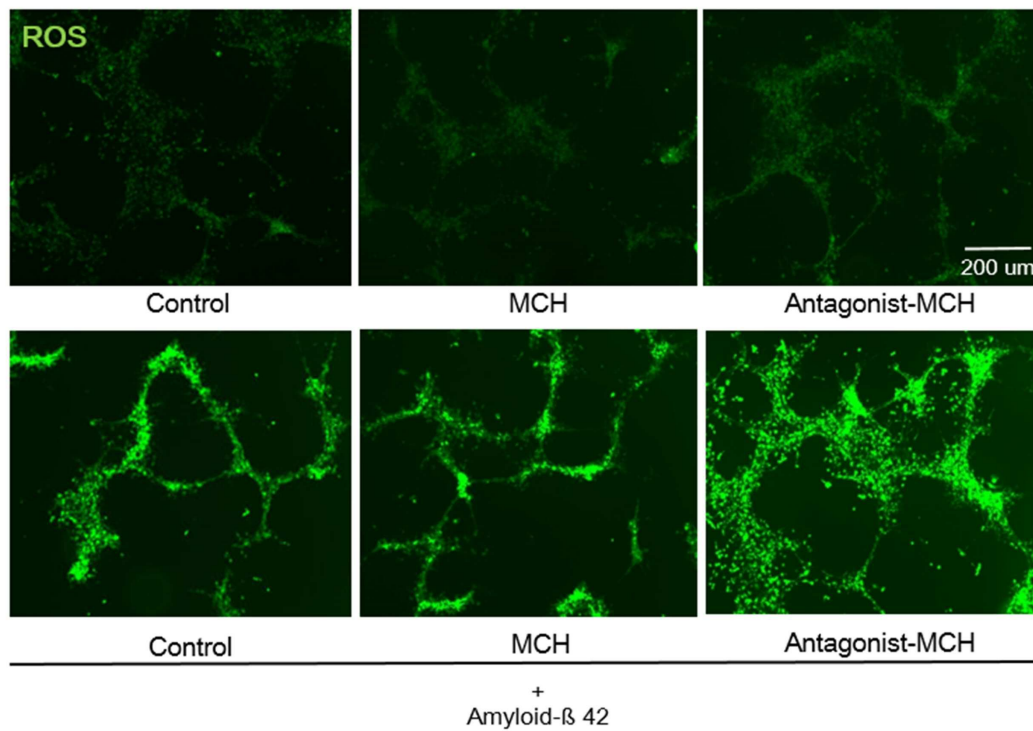


도면2

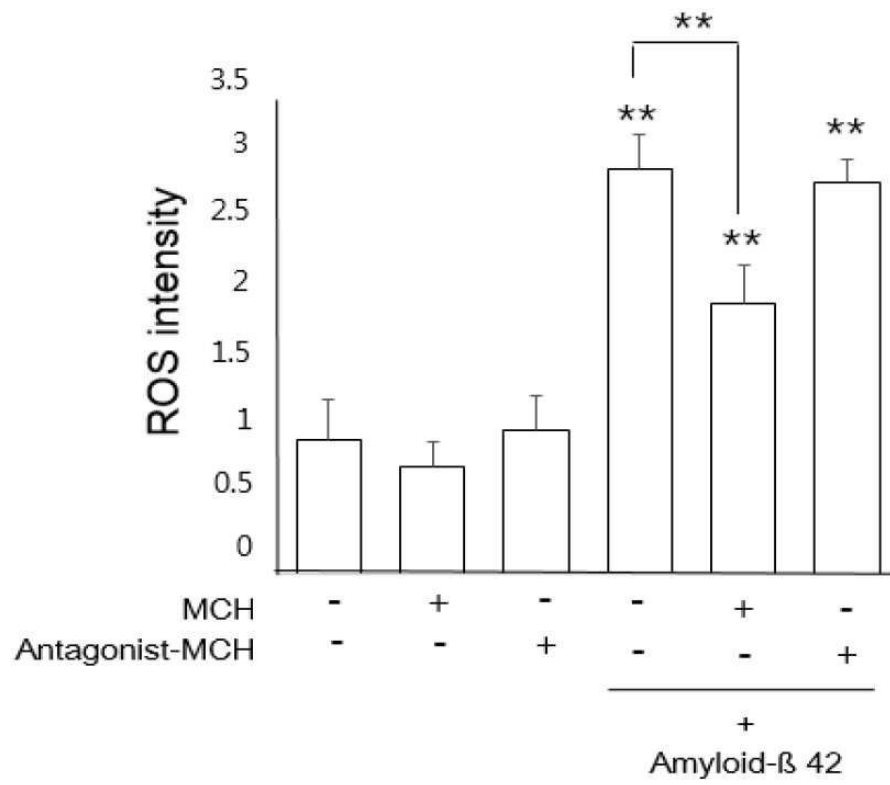
PCN Cells 24h



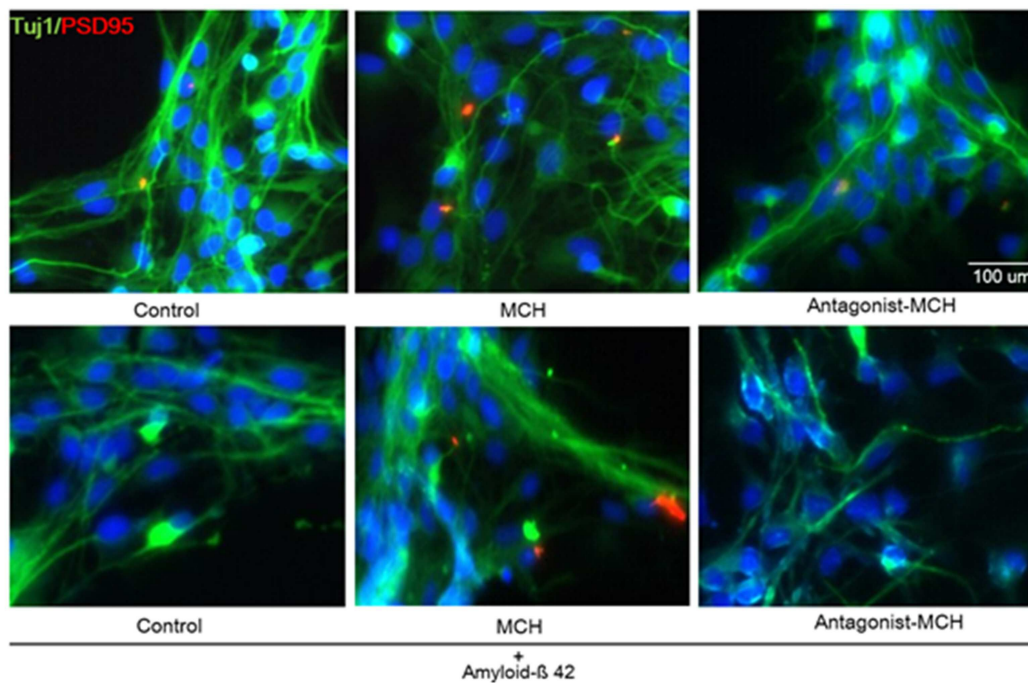
도면3a



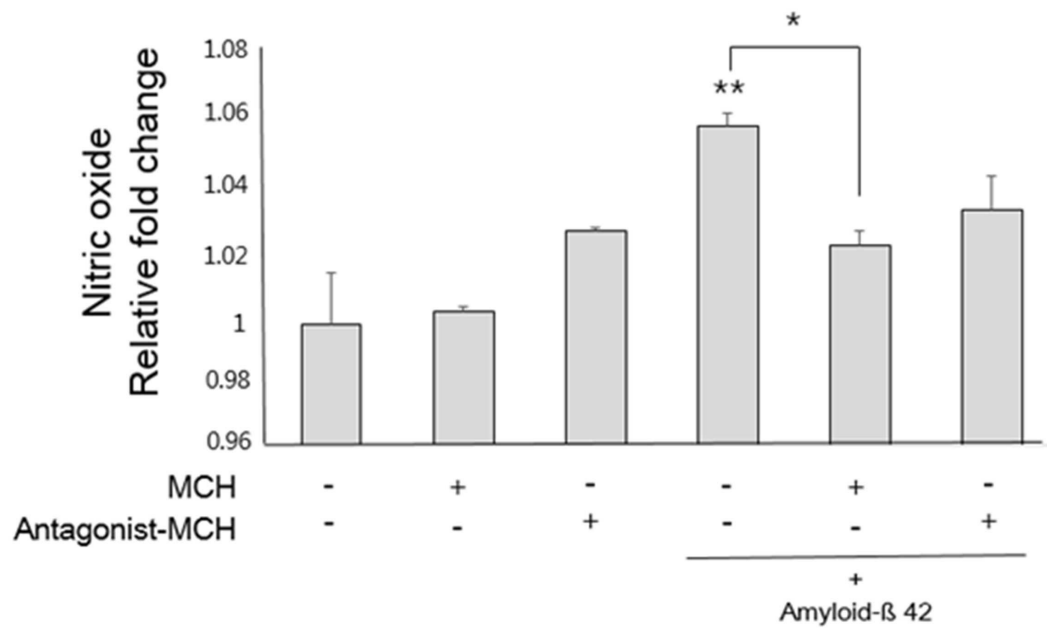
도면3b



도면3c

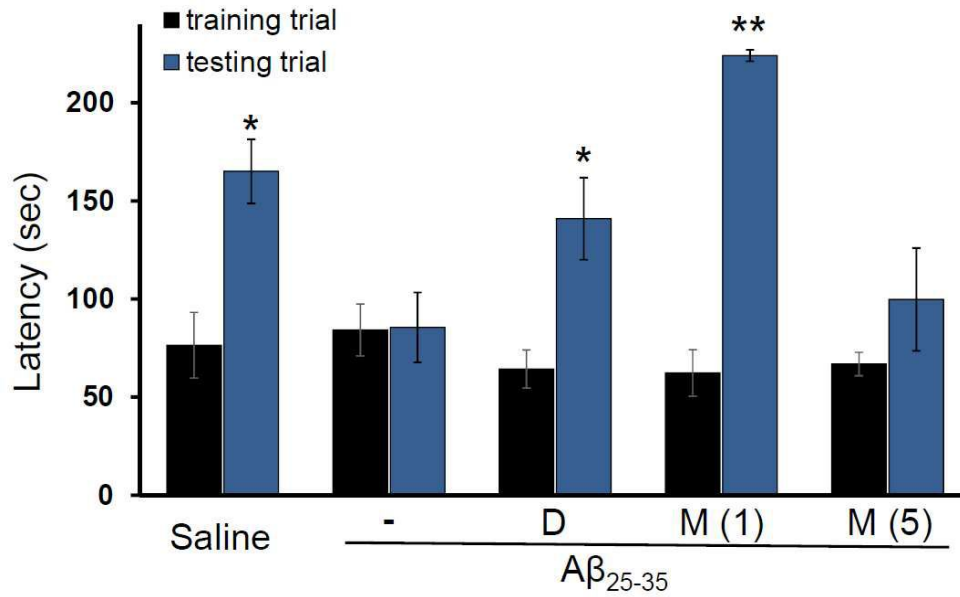


도면3d

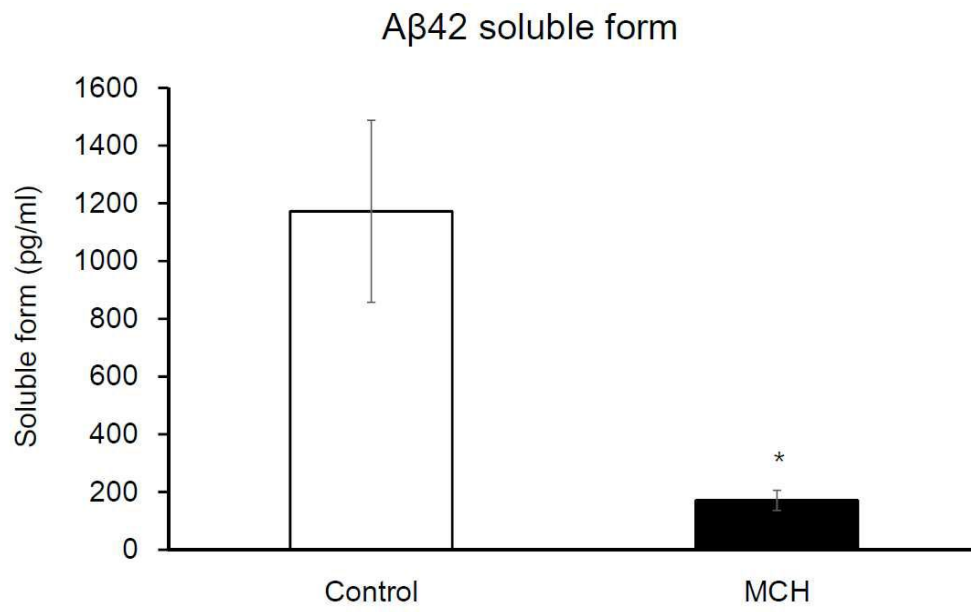


도면4

passive-avoidance test

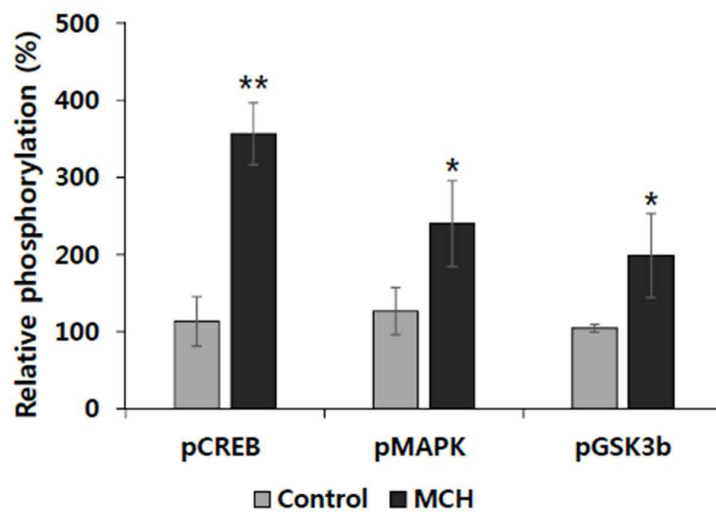
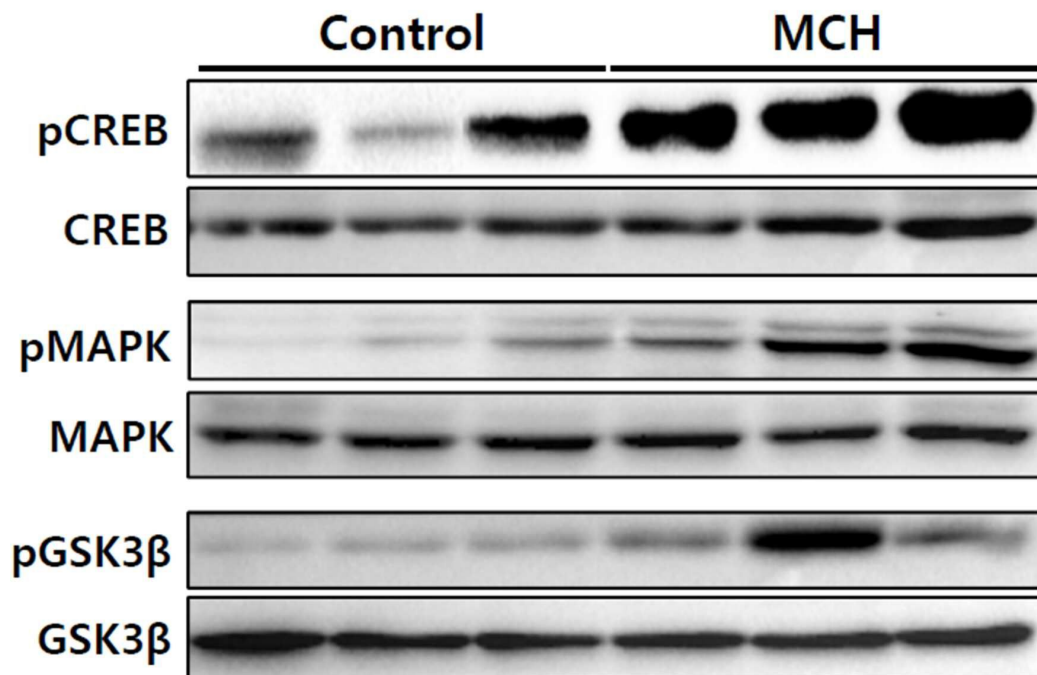


도면5



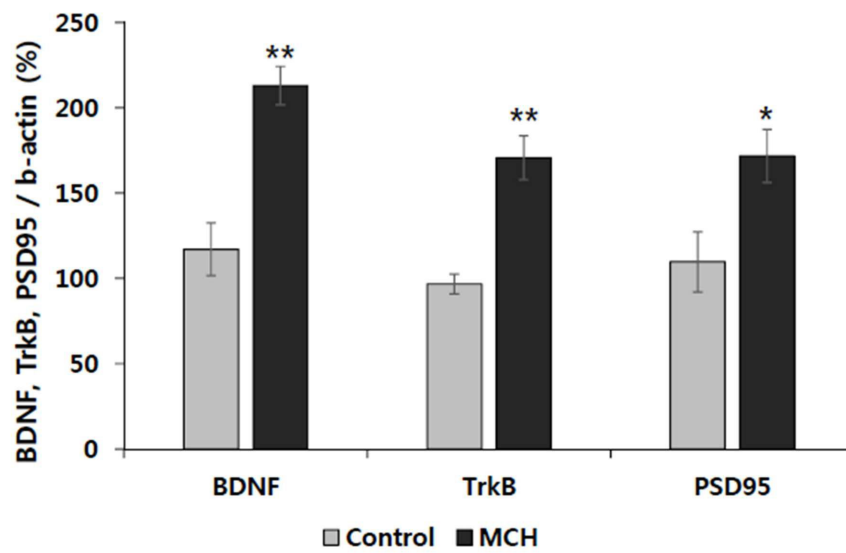
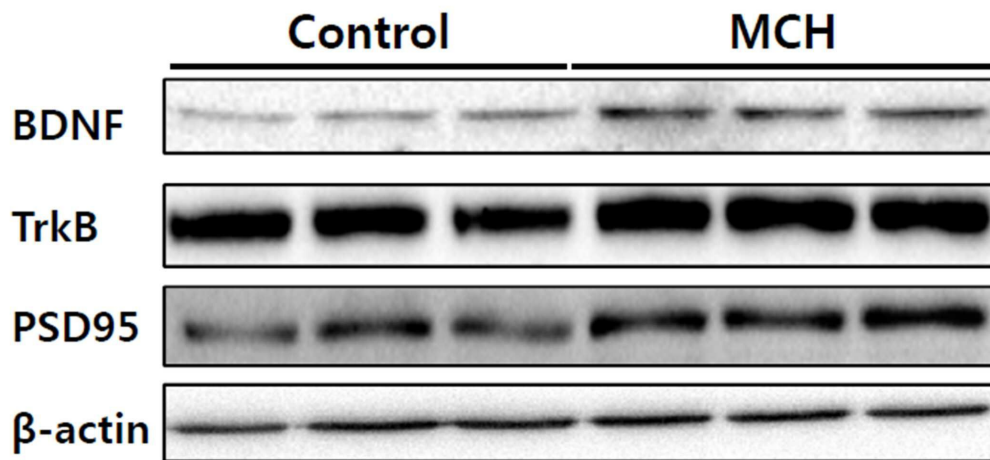
도면6

Cortex

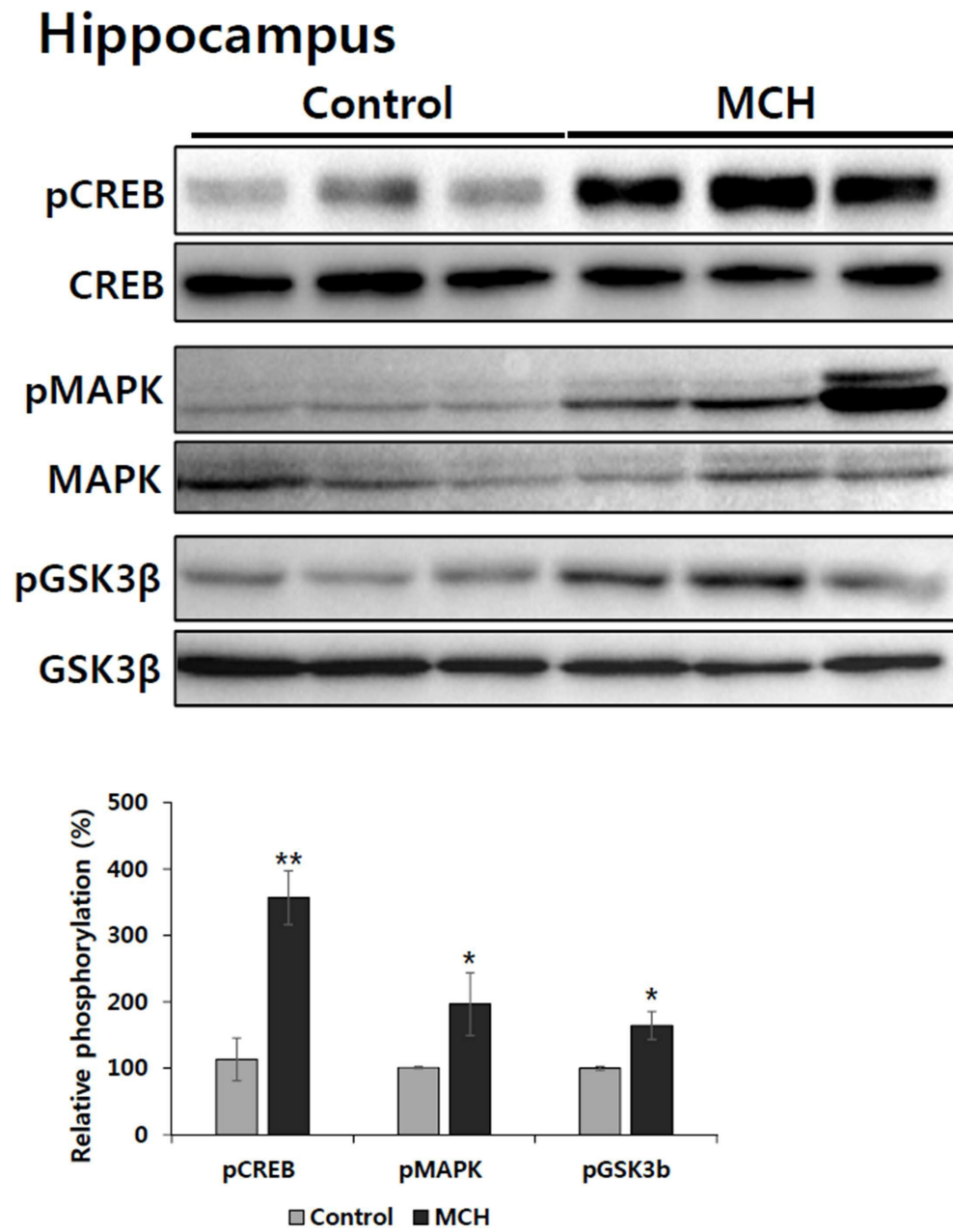


도면7

Cortex

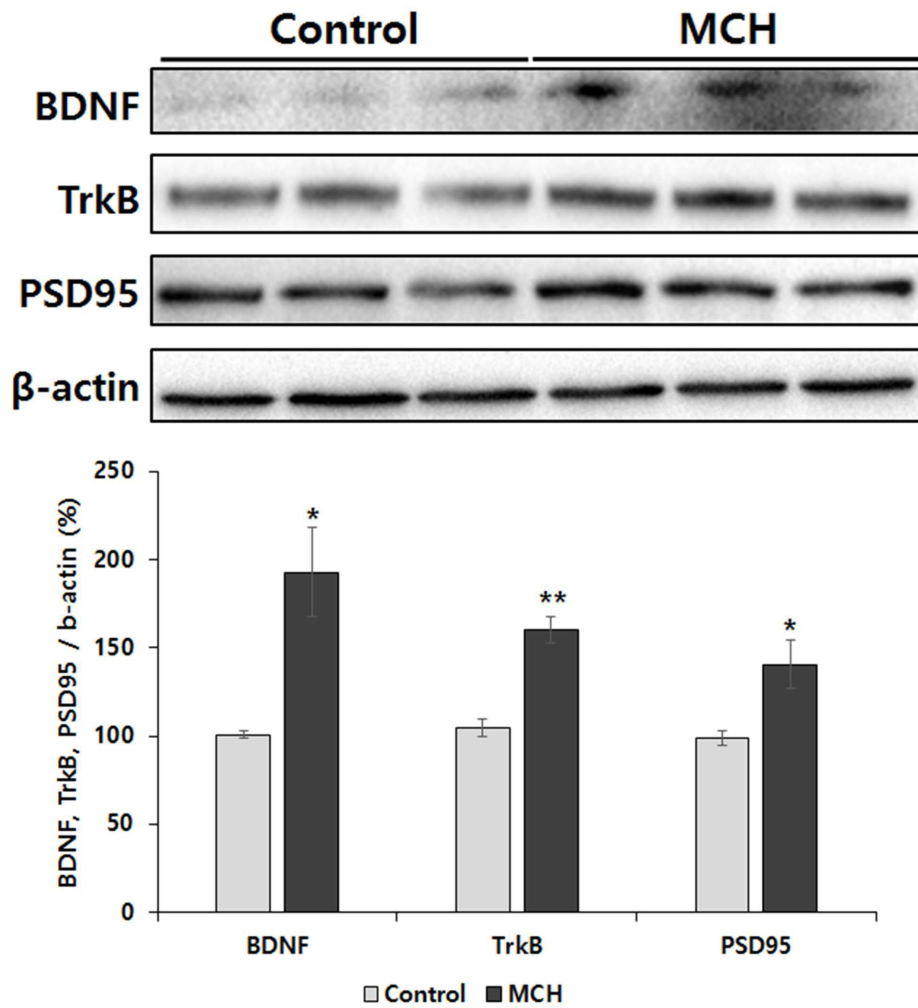


도면8

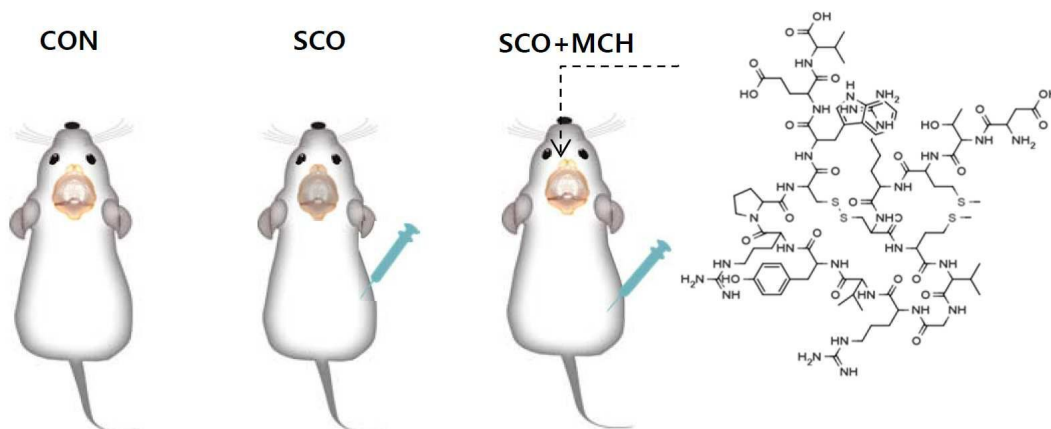


도면9

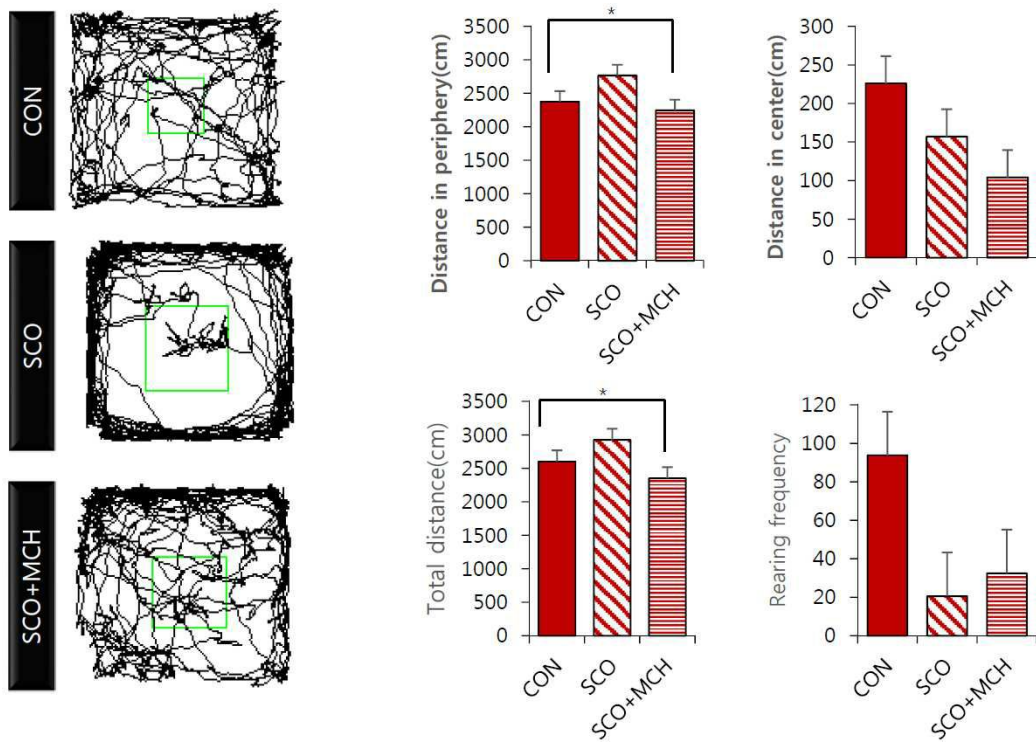
Hippocampus



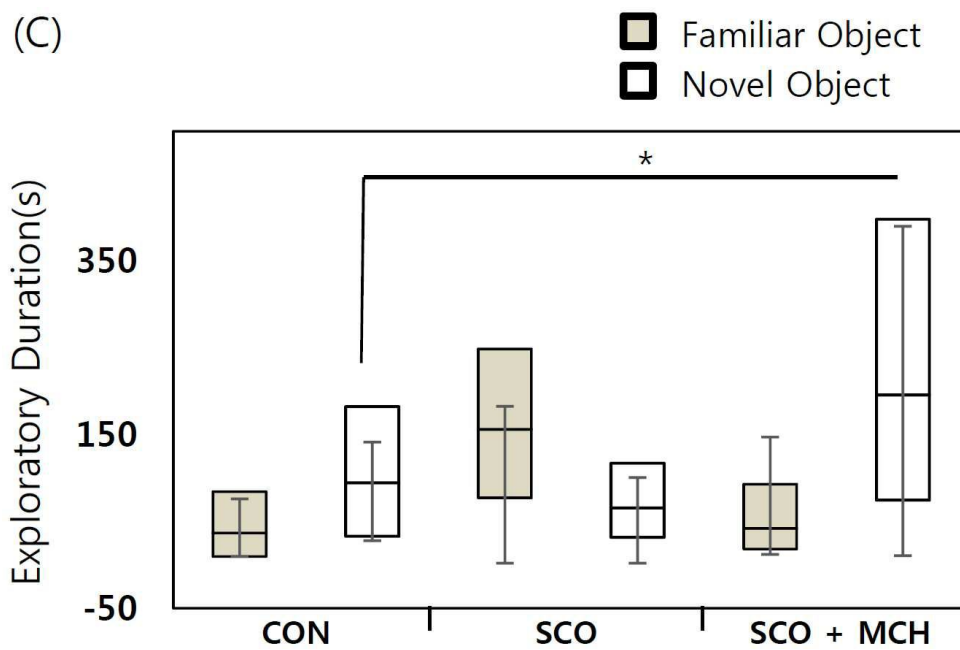
도면10a



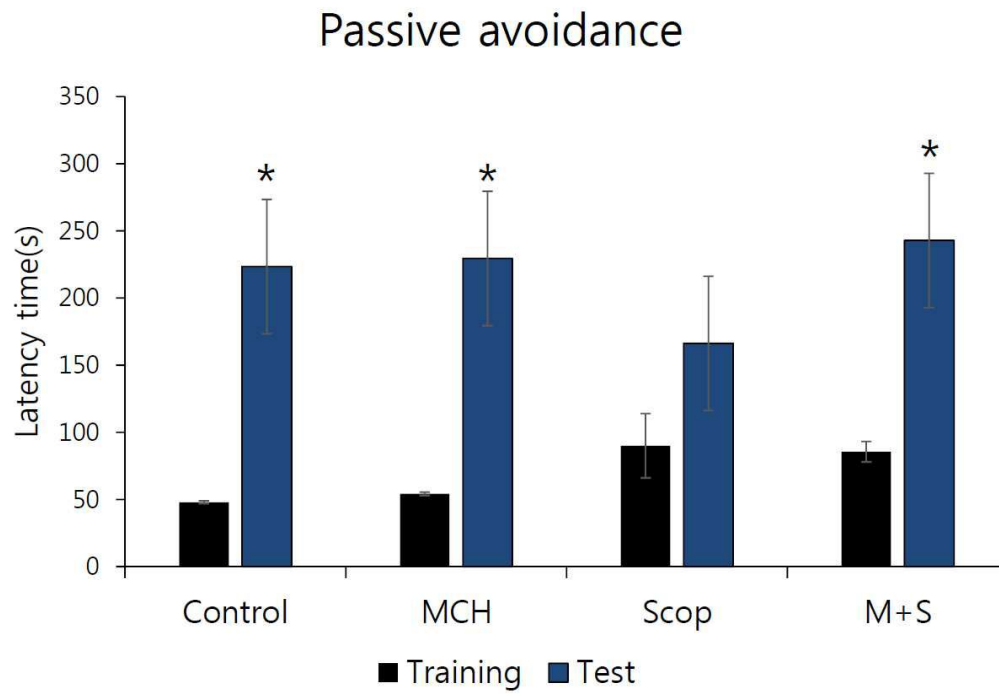
도면10b



도면10c



도면11a



도면11b

