

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0047341 (43) 공개일자 2012년05월14일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/455 (2006.01) A61K 31/44 (2006.01) A61K 31/66 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)	(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)	
(21) 출원번호 10-2010-0102708	(72) 발명자 김명옥 경상남도 진주시 호탄동 대동아파트 102동 303호 올라, 나집 대한민국 경남 진주시 가좌동 900 박문석 경상남도 진주시 가좌동 900	
(22) 출원일자 2010년10월21일 심사청구일자 2010년10월21일	(74) 대리인 손민	

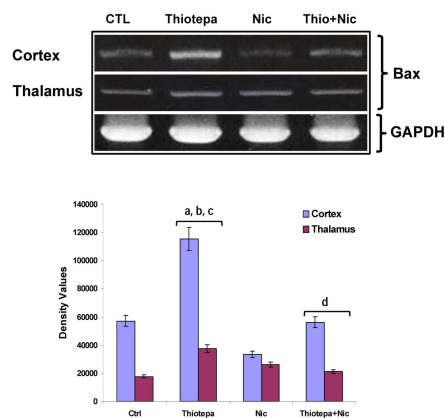
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 니코틴아미드를 유효성분으로 포함하는 알킬화 약물-유도성 신경퇴행의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 알킬화 약물-유도성 신경퇴행 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것으로, 보다 상세하게는 니코틴아미드(nicotinamide)를 포함하는 알킬화 약물-유도성 신경퇴행 예방 또는 치료용 조성물, 상기 유효성분을 포함하는 신경 퇴행이 예방 및 개선을 위한 건강기능식품용 조성물 및 상기 조성물을 투여하여 신경 질환을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	어젠다 PJ007361
부처명	농촌진흥청
연구사업명	어젠다
연구과제명	콩의 특수성분 고함유 자원 개발 및 산업화 연구, 검정콩 안토시아닌을 이용한 치매, 기억
력 개선효과연구	
주관기관	경상대학교
연구기간	2010.01.01 ~ 2012.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2010-0000206
부처명	한국연구재단
연구사업명	중견과학자지원연구
연구과제명	태아 신경장애 동물모델에서 세포간의 신호전달 및 세포사멸연구, siRNA의 응용
주관기관	경상대학교
연구기간	2010.03.01 ~ 2011.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

니코틴아미드(nicotinamide)를 유효성분으로 포함하는 알킬화 약물-유도성 신경퇴행 예방 또는 치료용 조성물

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 알킬화 약물은 멜파란(melpan), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 클로람부실(clorambucil), 디하이드록시 부설판(dihydroxy busulfan) 및 티오테파(thiotepa)로 이루어진 군에서 선택된 항암제인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 알킬화 약물-유도성 신경퇴행은 신경독성으로 인해 유도된 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 니코틴아미드는 신경세포의 아포토시스(apoptosis)를 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 니코틴아미드는 Bax의 조절상승의 억제, 세포질로의 시토크롬-c의 방출 감소, 활성화된 카스파제-3의 발현 또는 PARP-1의 절단의 감소를 일으키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 니코틴아미드의 농도는 투여 개체의 체중(g) 당 0.1mg 내지 5mg인 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 알킬화 약물-유도성 신경퇴행은 유·소아기에 일어나는 것인 조성물.

청구항 9

니코틴아미드를 유효성분으로 포함하는 알킬화 약물-유도성 신경퇴행의 예방 또는 개선을 위한 건강기능성 식품용 조성물.

청구항 10

니코틴아미드를 유효성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는 알킬화 약물-유도성 신경퇴행의 예방 또는 치료방법.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 알킬화 약물-유도성 신경퇴행 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것으로, 보다 상세하게는 니코틴아미드(nicotinamide)를 포함하는 알킬화 약물-유도성 신경퇴행 예방 또는 치료용 조성물, 상기 유효성분을 포함하는 신경 퇴행 예방 및 개선을 위한 건강기능식품용 조성물 및 상기 조성물을 투여하여 신경 질환을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 신경 기능장애는 암 치료의 부작용으로 잘 알려져 있다. 어린이들에서 고등의 정신적 능력 발달, 인지 상태, 및 학문적 성취에 해로운 영향을 미치는 신경퇴행 질환의 증가는 암치료의 화학요법과 연관이 있다. 항암제(뇌경색, 뇌졸중, 백질뇌증 등)에 의해 발생한 신경 장애는 그들의 독성 때문인 것으로 여겨진다. 독성 자극은 두 가지 잘 알려진 아포토시스적 연쇄반응을 통한 신경 세포 사멸에 원인이다. 몇몇 항암제의 영향 아래에서 시토크롬-c는 세포질로 방출되는데, 이는 Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1)의 올리고머화, ATP를 이용한 카스파제-9 및 카스파제-3의 활성화의 원인이 된다. 티오테파 (N,N',N'-triethylenethiophosphoramidate)는 유방, 결장, 폐, 뇌, 위, 방광 및 난소암에 사용되는 알킬화 약물로 PARP-1(poly (ADP-ribose) polymerase) 활성을 초래할 수 있다.
- [0003] 한편, 비타민 B3의 아미드인 니코틴아미드는 세포 기능 및 대사에 필수적이라고 여겨지는 보조효소인 β -니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD⁺)에 대한 전구체이다. 니코틴아미드의 전임상 유효성은 잘 알려져 있으나, 신경보호에 대한 정확한 메커니즘은 여전히 확실히 밝혀지지 않고 있다. 심한 세포 손상의 결과로서, PARP-1 활성이 증가하는데, 이는 NAD⁺ 고갈 및 아포토시스를 일으킨다. 그러나 NAD⁺의 필수적인 전구체인 니코틴아미드의 존재 하에서는, NAD⁺ 축적이 다시 보충되고 손상된 DNA는 더욱 효과적으로 회복된다. 따라서, 니코틴아미드는 자유 라디칼 노출 및 산화적 스트레스같은 다양한 공격 중 또는 후에 뉴런 생존을 향상시킬 수 있을 것이다.
- [0004] 암 치료에서 화학요법은 흔히 간과될 수 없는 필수적인 것이다. 암치료의 화학요법에서는 심한 신경독성 효과에도 불구하고, 암을 진단받은 사람들은 화학요법을 받는다. 따라서 티오테파-유도성 신경퇴행이 일어나는 정확한 분자적 메커니즘을 이해하고 신경독성을 경험한 신생아 및 소아들의 신경학적 결과의 개선을 위해 신경 보호적 치료제를 개발하는 것이 아주 중요하다.

- [0005] 이러한 배경하에 본 발명자들은 알킬화 약물-유도성 신경퇴행의 치료용 조성물을 찾기 위해 예의 노력한 결과, 니코틴아미드가 발달 랫드에서 티오테파-유도성 신경퇴행을 효과적으로 억제할 수 있는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 하나의 목적은 니코틴아미드(nicotinamide)를 유효성분으로 포함하는 알킬화 약물-유도성 신경퇴행 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 또 하나의 목적은 니코틴아미드를 유효성분으로 포함하는 알킬화 약물-유도성 신경퇴행의 예방 또는 개선을 위한 건강 기능성 식품용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조성물을 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 알킬화 약물-유도성 신경퇴행 치료방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 하나의 양태로서, 본 발명은 니코틴아미드(nicotinamide)를 유효성분으로 포함하는 알킬화 약물-유도성 신경퇴행 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0010] 본 발명에서 용어, "니코틴아미드(nicotinamide)"는 비타민 PP(Pellagr Preventive)로 불려지는 비타민 B의 일종인 물질이다. 니코틴아미드는 생체 내의 2가지 중요한 수소전달 보조효소인 NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide)와 NADP(Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)의 구성성분으로서, 여러 가지 효소의 생리작용에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 알츠하이머, 뇌졸중에 의한 신경퇴행을 완화하는 효과가 있다고 알려져 있다. 그러나, 본 발명과 같이 알킬화 약물-유도성 신경퇴행을 예방 또는 치료할 수 있는 효과에 대해서는 전혀 개시된 바가 없다. 알킬화 약물에 의해 유도된 신경퇴행은 알츠하이머나 뇌졸중과는 달리 알킬화 약물인 항암제에 의해 일어나는 질환으로 그 기작 및 증상이 상이하다.
- [0011] 본 발명에서 용어, "알킬화 약물"은 항암제로 이에 제한되지는 않으나, 그 예로 멜파란(melpalan), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 클로람부실(clorambucil), 디하이드록시 부설판(dihydroxy busulfan), 또는 티오테파(thiotepa)인 항암제일 수 있다. 바람직하게는, 티오테파일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 티오테파는 화학요법적 항암제의 하나로 암 세포에 독을 주어 치료하는 방법에 쓰이는 것으로 생명현상 유지의 기본인 DNA 및 RNA 생성을 억제한다. 이는 백혈병, 에틸렌이민계 악성 종양 등을 치료하고 항종양 스펙트럼이 넓은 것이 특징이다. 티오테파는 새끼 랫트의 뇌에서 신경퇴행을 일으키며, 미토콘드리아 에너지 대사의 붕괴와 연관이 있는 것으로서 산화적 스트레스, 및 세포 사멸 연쇄 반응의 활성을 초래한다. 본 발명자들은 구체적인 실시예에서 뇌에서 티오테파를 처리하면 신경세포가 아포토시스를 일으키는 것을 확인하였다.
- [0013] 본 발명에서 알킬화 약물-유도성 신경퇴행은 신경독성으로 인한 것이다. 본 발명에서 신경독성이란 암 치료의 화학요법 중 흔히 일어나며, 종종 약물-제한적 복잡성과 관련이 있다. 암환자에서 화학요법 시 이러한 신경독성으로 인해 일어나는 신경학적 부작용을 관리하는데 집중적인 노력과 신경보호적 물질의 개발에 대한 노력에도 불구하고, 현재는 일반적으로 어떠한 치료법도 없는 상태이다. 본 발명의 조성물은 이와 같은 신경 독성에 의한 신경퇴행을 예방 또는 치료할 수 있을 것이다.
- [0014] 본 발명에서 용어, "예방"이란 조성물의 투여에 의해 신경퇴행을 억제시키거나 발생을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본 발명에서 용어, "치료"란 조성물의 투여에 의해 신경퇴행에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 조성물은 항암제인 알킬화 약물에 의해 유도된 신경퇴행을 예방 또는 치료할 수 있으며, 보다 바람직하게는 티오테파에 의해 유도된 신경퇴행을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 발달 랫트의 뇌에서 Bax mRNA 발현의 티오테파-유도성 조절상승에 대한 니코틴아미드 후처리의 효과를 검사하기 위해서 RT-PCR 분석을 한 결과, 피질 및 시상에서 Bax mRNA 발현 수치가 유의미하게 감소한 것을 확인하였다(도 1a). 또한 니코틴아미드의 티오테파-유도성 아포토시스적 신경퇴행 및 보호의 분자학적 메커니즘을 이해하기 위해, 미토콘드리아적 경로와 연관된 아포토시스적 단백질 변화를 모니터링한 결과, 발달 랫트 뇌의 피질 및 시상에서 Bax의 수치가 대조군과 비교할 때 티오테파 처리한 경우 조절상승하였고, 티오테파 후 니코틴아미드로 후처리한 경우 조절상승이 억제된 것을 확인하였다(도 2a). 또한 본 발명자들은 티오테파에 대한 니코틴아미드의 보호를 확인하기 위해 세포질 시토크롬-c 수치를 피질, 해마 및 시상에서 측정하였는데, 측정된 결과 티오테파 후 니코틴아미드로 처리한 것은 티오테파 처리 그룹과 비교할 때 미토콘드리아로부터 세포질로의 시토크롬-c 방출이 유의미하게 감소한 것을 확인하였다(도 3). 뿐만 아니라, 티오테파 후 니코틴아미드의 후처리는 활성화된 카스파제-3의 수치를 유의미하게 감소시켰으며, 피질 및 시상에서 절단 PARP-1 수치 또한 유의미하게 감소시킨 것을 확인하였다(도 5). 결론적으로, 발달 랫트 뇌의 피질, 해마 및 시상에서 티오테파-유도성 신경퇴행 및 니코틴아미드의 보호의 전체적인 정도를 확인하기 위해, Nissl-염색, Fluoro-Jade B(FJB), TUNEL 염색을 수행한 결과, 티오테파-유도성 신경퇴행이 감소한 것을 확인하였다(도 6 및 7).

- [0016] 바람직하게 니코틴아미드를 포함하는 본 발명의 조성물은 신경세포의 아포토시스를 억제하는 것을 특징으로 한다.
- [0017] 본 발명에서 용어, "아포토시스(apoptosis)"란 세포가 유전자에 의해 제어되어 죽는 방식의 한 형태로 세포의 피사나 병적인 죽음인 피사(Necrosis)와는 구별된다. 아포토시스는 발생 과정에서 몸의 형태 만들기를 담당하고, 성체에서는 정상적인 세포를 갱신하거나 이상이 생긴 세포를 제거하는 일을 담당하고 있다. 암 세포 내의 세포 소실, 바이러스 감염과 약물, 방사선 등에서 일어나는 점은 유사한 과정인 프로그램 세포사 (programed cell death, PCD)와 다른 점이다.
- [0018] 바람직하게 니코틴아미드를 포함하는 본 발명의 조성물은 Bax의 조절상승의 억제, 세포질로의 시토크롬-c의 방출 감소, 활성화된 카스파제-3의 발현 또는 PARP-1의 절단의 감소를 일으키는 것을 특징으로 한다.
- [0019] 본 발명에서 용어, "Bax"는 아포토시스 유도인자로 알려져 있으며, Bcl-2와 유전자 염기서열이 비슷하여 Bcl-2 패밀리에 속한다. Bax가 활성화되면 아포토시스를 촉진하여 세포사멸이 증가하고, 반대로 Bcl-2가 활성화되면 아포토시스를 억제하여 세포사멸이 감소하게 되므로 Bcl-2 및 Bax 발현은 세포가 아포토시스로 진행될 때의 감수성을 결정하게 된다.
- [0020] 본 발명의 조성물은 티오테파에 대항하는 니코틴아미드의 보호적 효과가 미토콘드리아 본래의 상태유지, Bax의 조절상승의 억제, 미토콘드리아 매개의 시토크롬-c의 억제, 활성화된 카스파제-3의 억제 및 NAD^+ 수치의 유지를 수반함으로써 발달 랫트의 뇌에서 아포토시스적 및 피사적 세포 사멸을 억제하는데 기여하는 것을 확인하였다 (도 7).
- [0021] 본 발명에서 상기 카스파제-3는 DNA 복구에 중요한 단백질로, 과하게 활성화된 PARP-1(폴리 (ADP 리보스) 폴리머라제-1)를 자른다. 구체적인 실시예에서 피질, 해마 및 시상에서 활성화된 카스파제-3 수치를 웨스턴 블랏을 통해 측정하였는데, 티오테파 후 니코틴아미드 후처리 시 대조군 그룹과 비교할 때 피질 및 시상에서 활성 카스파제 양성 뉴런의 숫자가 눈에 띄게 감소한 것을 확인하였다(도 4b).
- [0022] 본 발명에서 상기 PARP-1은 DNA 복구에 기능이 있음에도 불구하고, 뉴런 흥분 독성에서 PARP-1의 과활성은 퇴행을 유도한다. 구체적인 실시예에서 티오테파 후 니코틴아미드를 후처리한 경우 절단된 PARP-1의 수치가 유의미하게 감소하였음을 확인하였다(도 5).
- [0023] 바람직하게 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 조성물은 투여경로에 따라 당업자의 선택에 의해 경구 또는 비경구의 제형으로 제조될 수 있다. 또한 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0026] 한편, 본 발명의 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본

발명의 조성물은 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0027] 바람직하게 본 발명의 니코틴아미드는 랫트의 경우 투여 개체인 체중(g)에 비례해서 0.001 내지 1000 mg/g의 양으로 투여될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 0.1 내지 500 mg/g의 양으로 투여할 수 있으며, 더더욱 바람직하게는 0.1 mg/g 내지 5 mg/g, 가장 바람직하게는 1 mg/g의 농도로 투여될 수 있다. 다만 이러한 니코틴아미드의 투여량은 투여되는 세포 또는 개체의 종류, 부피, 특징, 무게 등의 다양한 요인에 따라 시험에 의해 당업자가 결정할 수 있다.

[0028] 상기 알킬화 약물-유도성 신경퇴행은 유·소아기에 일어나는 것일 수 있다. 태아 또는 10 내지 20세 이하, 바람직하게는 15세 이하의 유·소아의 뇌 발달 과정에서 항암제에 노출되어 일어나는 신경퇴행일 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 7일령의 발달 랫트에서 티오테파 유도의 신경퇴행을 니코틴아미드가 개선시키는 것을 확인하였다.

[0029] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 니코틴아미드를 포함하는 알킬화 약물-유도성 신경퇴행의 예방 및 개선을 위한 건강기능식품용 조성물에 관한 것이다. 즉, 본 발명의 조성물은 신경퇴행을 예방 또는 개선하기 위하여 신경퇴행의 발병 단계 이전 또는 발병 후, 질환치료를 위한 약제와 동시에 또는 별개로서 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명에서 용어, “개선”이란 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0031] 또한 본 발명의 건강기능식품용 조성물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0032] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0033] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연

[0034] 연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 당업자의 선택에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[0035] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등

[0036] 을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및

[0037] 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율 또한 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.

[0038] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 니코틴아미드를 포함하는 조성물을 동물에 투여하는 단계를 포함하는 신경퇴행의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

[0039] 본 발명에서 동물은 소, 말, 코끼리, 돼지, 쥐, 인간, 사슴, 다람쥐, 토끼, 호랑이, 사자, 늑대, 염소, 표범, 곰, 고래, 물개, 박쥐, 고양이, 참새, 제비, 펭, 매, 독수리, 고니, 천둥오리, 펭귄, 비둘기, 타조, 앵무, 뱀,

도마뱀, 거북이, 악어, 개구리, 두꺼비, 도롱뇽, 붕어, 메기, 잉어, 가물치, 농어, 조기, 고등어, 꽂치, 갈치, 쏘가리, 광어, 우럭 또는 가오리 등이 있으나, 상기 예에 의해 본 발명의 조성물이 투여될 수 있는 개체가 제한되는 것은 아니다.

[0040] 바람직하게 본 발명의 치료 또는 예방 방법은 Bax의 조절상승의 억제, 세포질로의 시토크롬-c의 방출 감소, 활성화된 카스파제-3의 발현 또는 PARP-1의 절단의 감소를 통해 달성될 수 있다.

[0041] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여, 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0042] 한편, 본 발명의 조성물은 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인

[0043] 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

[0044] 본 발명에 따른 니코틴아미드를 포함하는 조성물을 사용하는 경우, 신경세포를 티오테파와 같은 항암제-유도성 신경독성으로부터 보호할 수 있어, 알킬화 약물-유도성 신경퇴행의 치료 또는 예방의 용도로 유용하게 사용될 수 있다. 또한 항암제 치료에 의한 부작용인 신경퇴행의 치료 또는 예방 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 티오테파-유도성 Bax 및 Bcl-2 mRNA 수치에 대한 니코틴아미드 후처리의 효과를 나타낸 도이다. 제시된 RT-PCR 분석은 7일령 랫트 새끼의 피질 및 시상에서 (a) Bax 및 (b) Bcl-2 mRNA의 발현 수치를 보여준다. 피질 및 시상에서 4시간 동안 티오테파(30 mg/kg)의 처리는 Bax mRNA 수치를 증가시켰다. 4시간 동안 니코틴아미드(1 mg/g)의 후처리는 피질 및 시상에서 Bax mRNA 수치의 티오테파 유도성 조절상승을 유의미하게 감소시켰음을 보여준다. RT-PCR의 mRNA 밴드는 Sigma Gel 소프트웨어를 사용해 수량화하고 밴드들 사이의 차이는 그래프에서 나타낸다. GAPDH는 mRNA 로딩 대조군으로 사용했다. 밀도 값은 평균 $\pm$ SEM(n = 4 animals/group)로서 표현했다. Y축 상의 밀도 값은 임의의 유닛(AU)으로서 표현된다. (^aCTL과 유의미하게 다름; ^b니코틴아미드와 유의미하게 다름; ^c티오테파+니코틴아미드와 유의미하게 다름; ^d티오테파와 유의미하게 다름). 유의미성 = $P < 0.05$.

도 2는 티오테파-유도성 Bax 및 Bcl-2 단백질 수치의 발현에 대한 니코틴아미드 후처리의 효과를 나타낸 도이다. 제시된 웨스턴 블랏 분석은 7일령 랫트 새끼의 피질 및 시상에서 (a)Bax 및 (b)Bcl-2 단백질의 발현 수치를 보여준다. 피질 및 시상에서 4시간 동안 티오테파(30 mg/kg)의 처리는 Bax 단백질 수치를 증가시켰다. 4시간 동안 니코틴아미드(1 mg/g)의 후처리는 피질 및 시상에서 Bax 단백질 수치의 티오테파 유도성 조절상승을 억제하였음을 보여준다. 웨스턴 블랏의 단백질 밴드는 Sigma Gel 소프트웨어를 사용해 수량화하고 밴드들 사이의 차이는 그래프에서 나타낸다. 액틴은 단백질 로딩 대조군으로 사용했다. 밀도 값은 존재하는 Bcl-2 및 Bax의 상응하는 단백질의 평균 $\pm$ SEM (n = 4-5 실험동물/그룹)으로서 표현했다. Y축 상의 밀도 값은 임의의 유닛(AU)으로 표현된다. (^aCTL과 유의미하게 다름; ^b니코틴아미드와 유의미하게 다름; ^c티오테파+니코틴아미드와 유의미하게 다름; ^d티오테파와 유의미하게 다름). 유의미성 = $P < 0.05$.

도 3은 티오테파-유도성 세포질 시토크롬-c 수치에 대한 니코틴 아미드 후처리의 효과를 나타낸 도이다. 티오테파의 투여 후 피질 및 시상에서 시토크롬-c의 세포질에서의 수치가 유의미하게 증가했다. 4시간 동안 니코틴아미드 후처리는 피질 및 시상에서 티오테파-유도성 세포질 시토크롬-c 수치를 유의미하게 감소시켰음을 보여준다. 웨스턴 블랏의 단백질 밴드는 Sigma Gel 소프트웨어를 사용해 수량화하고 밴드들 사이의 차이는 그래프에서 나타낸다. 액틴 활성은 단백질 로딩 대조군으로서 사용했다. 밀도 값은 존재하는 시토크롬-c 및 활성화된 카스파

제-9의 상응하는 단백질의 평균 $\pm$ SEM ($n = 4-5$ 실험동물/그룹)으로서 나타낸다. Y축 상의 밀도값은 임의의 유닛으로서 나타낸다(AU). (^aCTL과 유의미하게 다름; ^b니코틴아미드와 유의미하게 다름; ^c티오테파+니코틴아미드와 유의미하게 다름; ^d티오테파와 유의미하게 다름). 유의미성 = $P < 0.05$.

도 4a는 티오테파-유도성 활성화된 카스파제-3의 발현에 대한 니코틴아미드 후처리의 효과에 대해 나타낸 도이다. 제시된 웨스턴 블랏 분석은 7일령 랫트 새끼의 피질 및 시상에서 활성화된 카스파제-3의 수치를 보여준다. 티오테파의 투여는 활성화된 카스파제-3 발현 수치를 유의미하게 향상시켰음을 보여준다. 니코틴아미드의 후처리는 대조군과 비교할 때 피질과 시상 양쪽에서 티오테파-유도성 활성화된 카스파제-3 수치를 유의미하게 감소시켰다. 웨스턴 블랏의 단백질 밴드는 Sigma Gel 소프트웨어를 사용해 수량화하고 밴드들 사이의 차이는 그래프에서 나타낸다. 액틴은 단백질 로딩 대조군으로 사용했다. 액틴 반응성은 단백질 로딩 대조군으로서 사용했다. 밀도 값은 존재하는 카스파제-3의 상응하는 단백질의 평균 $\pm$ SEM ($n = 4-5$ 동물실험/그룹)로서 나타낸다. Y축 상의 밀도값은 임의의 유닛으로서 나타낸다(AU). (^aCTL과 유의미하게 다름; ^b니코틴아미드와 유의미하게 다름; ^c티오테파+니코틴아미드와 유의미하게 다름; ^d티오테파와 유의미하게 다름). 유의미성 = $P < 0.05$.

도 4b는 24시간 후 티오테파-유도성 활성화 카스파제-3 발현에 대한 니코틴아미드 후처리의 효과를 나타낸 도이다. 니코틴아미드의 존재 또는 부재시 티오테파(30mg/kg) 처리 후 24시간 동안 면역 조직 화학 분석을 보여주는 제시된 현미경 사진을 나타낸다. 밝은 현미경 사진은 티오테파 처리 후 띠 피질 및 시상(Dd 및 Ff)의 활성화 카스파제-3 양성 뉴런 띠 피질 및 시상의 LDN을 보여주며, 해마에서는 전혀 관찰되지 않았다(Ee). 화살표는 높은 카스파제-3 발현을 가진 사멸한 뉴런 세포를 나타낸다. 티오테파 후 니코틴아미드(1mg/g)의 처리는 대조군 그룹에 비교할 때(Aa 및 Cc) 피질과 시상(Gg 및 Ii)에서 활성화 카스파제-양성인 뉴런의 숫자가 눈에 띄게 감소하였음을 보여준다. 이미지는 적어도 그룹당 4-6 실험동물로부터 준비된 단편에서 얻은 염색을 나타낸다. (A) 판넬 (a-i = 40 $\times$)은 판넬(A-I = 20 $\times$)로 부터 확대된 그림, 스케일 바 = 50 μ m. (B) 60 $\times$ objective field를 가진 더 높은 확대율에서 판넬 (C-K), 스케일 바 = 20 μ m. (^a살린과 유의미하게 다름; ^b티오테파+니코틴아미드와 유의미하게 다름; ^c티오테파와 유의미하게 다름). 유의미성 = $P < 0.05$.

도 5는 PARP-1 수치의 티오테파-유도성 절단에 대한 니코틴아미드 후처리의 효과를 나타낸 도이다. 랫트의 피질 및 시상에서 절단된 PARP-1 수치의 웨스턴 블랏 분석을 보여준다. 티오테파 투여는 활성화 카스파제-3 및 PARP-1의 절단된 89-kDa 아포토시스-연관의 단편의 카스파제-3 매개의 높은 수치의 유의미하게 강화된 발현 수치를 보인다. 니코틴아미드 후처리는 대조군 그룹과 비교할 때 피질 및 시상 양쪽에서 티오테파-유도성 활성화 카스파제-3 및 절단된 PARP-1 수치가 유의미하게 감소하였음을 보여준다. 웨스턴 블랏의 단백질 밴드는 Sigma Gel 소프트웨어를 사용해 수량화하고 밴드들 사이의 차이는 그래프에서 나타낸다. 액틴은 단백질 로딩 대조군으로 사용했다. 액틴 반응성은 단백질 로딩 대조군으로서 사용했다. 밀도 값은 존재하는 상응하는 단백질 카스파제-3의 평균 $\pm$ SEM ($n = 4-5$ 동물실험/그룹)로서 나타낸다. Y축 상의 밀도값은 임의의 유닛으로서 나타낸다(AU). (^aCTL과 유의미하게 다름; ^b니코틴아미드와 유의미하게 다름; ^c티오테파+니코틴아미드와 유의미하게 다름; ^d티오테파와 유의미하게 다름). 유의미성 = $P < 0.05$.

도 6a는 티오테파-유도성 뉴런 세포 사멸의 니코틴아미드 후처리의 효과를 나타낸 도이다. (a)조직에서 크레실 바이올렛 염색된 뉴런의 밝은 현미경 사진은 티오테파 후 니코틴아미드를 처리한 발달 랫트 뇌 절편을 보여준다. 티오테파-유도성 퇴행 뉴런 세포(흔히 관찰되는 바와 같이, 일반적으로 모양이 수축한)의 대다수는 전면부 띠 피질, 해마의 CA1 및 시상의 LDN에서 나타난다(F, G, 및 H). 화살표는 수축되고 손상된 뉴런을 나타낸다. 티오테파 후에 즉시 니코틴아미드를 처리한 경우, 거의 완벽한 보호가 관찰되었다(I, J 및 K).

도 6b는 조직화학 분석의 제시된 현미경 사진은 티오테파 투여 후 니코틴아미드 처리시 사멸한 뉴런을 보여준다. 티오테파 투여 24시간 후 FJB 염색된 손상되고 사멸한 뉴런 세포를 보여준다. 티오테파 (Ff, Gg, 및 Hh)의 투여 24시간 후 띠 피질, 해마의 CA1 및 시상의 LDN에서 수많은 유의미하게 높은 숫자의 EJB 양성 세포를 보여준다. 화살표는 FJB 염색된 사멸 및 손상된 뉴런을 나타낸다. 대조군 그룹과 비교한 바와 같이(Cc, Dd 및 Ee), 24시간 동안 티오테파 후 니코틴아미드 처리한 것은 Fluoro-Jade B 양성 세포(Ii, Jj 및 Kk)가 눈에 띄게 감소하였음을 보여준다. 이미지는 적어도 4-6 실험동물/그룹으로부터 분비된 절편에서 획득한 염색으로 나타낸다. (6a) 40 $\times$ objective field를 가진 더 높은 확대율에서 Nissl 염색된 뇌 조직의 판넬(A-I), 스케일 바= 20 μ m. (6b) FJB의 판넬 (c-k = 60 $\times$)은 판넬(C-K = 20 $\times$)로부터 확대된 그림. (^a살린과 유의미하게 다름; ^b티오

테파+니코틴아미드와 유의미하게 다름; ^c티오테파와 유의미하게 다름). 유의미성 = $P < 0.05$.

도 7은 티오테파-유도성 아포토시스 퇴행에 대한 니코틴아미드 후처리의 영향을 나타낸 도이다. TUNEL 염색의 제시된 현미경 사진은 티오테파 투여에 이은 니코틴아미드 처리 후에 아포토시스적 사멸한 뉴런 세포를 보여준다. 화살표는 피질 및 시상에서 티오테파-유도성 TUNEL 염색된 아포토시스적 사멸 뉴런(B 및 J) DAPI (C 및 K)를 가지고 염색된 카운터를 나타낸다. 니코틴아미드 처리는 TUNEL-양성 세포(D 및 L)의 부재에서 증명된 바와 같이 티오테파-유도성 아포토시스를 효과적으로 막았다. $40\times$ objective field을 가진 더 높은 확대율에서 TUNEL 염색된 뇌 조직의 판넬 (A-L), 스케일 바 = 20 μm . (^a살린과 유의미하게 다름; ^b티오테파+니코틴아미드와 유의미하게 다름; ^c티오테파와 유의미하게 다름). 유의미성 = $P < 0.05$.

도 8은 발달 랫트의 뇌에서 티오테파-유도성 아포토시스적 신경퇴행에 대항하는 니코틴아미드의 보호를 보여주는 도식적인 그림을 보여준다. 티오테파-유도성 신경퇴행은 Bax의 조절-저하, 미토콘드리아에서 세포질로부터 방출되는 시토크롬-c의 증가, NAD^+ 의 감소(파란 화살표 ↓) 및 PARP-1의 절단 및 과활성에 의한 피사와 활성 카스파제-3의 발현으로 시작되는 미토콘드리아-의존적 아포토시스의 과활성에 의해 발생한다. NAD^+ 카스파제 의존적 세포 사멸은 (검정 화살표 →)로 나타낸다. X-사인에 의해 나타낸 것과 같이 니코틴아미드의 효과는, Bax의 조절-저하, 미토콘드리아로부터 세포질로 시토크롬-c의 방출의 감소, 활성 카스파제-9, 카스파제-3 발현의 억제 및 PARP-1 절단의 억제에 의한 피사와 ATP 및 NAD^+ 감소의 방지(↓붉은 화살표)를 시작으로 하는 아포토시스적 연쇄반응에서 여러 가지 중요한 구성요소를 억제하며 발달 랫트의 뇌에서 티오테파-유도성 아포토시스적 및 피사적 세포 사멸에 대항하여 신경 세포를 보호하는 결과를 초래한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0047] 실험방법

[0048] 실시예 1: 동물의 준비

[0049] 모든 실험에서 7일령 Sprague-Daley 랫트 새끼(평균 몸무게 15g)를 사용하였고, 4개의 서로 다른 그룹으로, 즉 대조군, 티오테파, 니코틴아미드, 및 티오테파+니코틴아미드 그룹으로 균등 분배하였다. 모든 실험방법은 경상대학교 생물과 응용과학 부서의 지역 동물 윤리 위원회의 승인 아래 시행하였다.

[0050] 실시예 2: 약물처리

[0051] 발달 랫트의 피하에 티오테파(30 mg/kg)를 주입하였고, 곧이어 (5분에서 10분) 0.9% 식염수에 녹인 니코틴아미드(1 mg/g)로 처리했다. 실험 동물은 서로 다른 약물 처리 4-24 시간 후 희생시켰다. 동일 부피의 식염수를 주입한 것을 대조군으로 사용했다.

[0052] 실시예 3: RT-PCR 분석

[0053] 피질, 해마 및 시상을 재빨리 수득하고, 분리하여 액체 질소에 재빨리 담갔다. 시료들은 다음 과정까지 -80°C 에서 보관하였다. 전체 세포 RNA는 산성의 페놀/클로로폼 추출을 이용해 분리하였다. 분리한 RNA는 정제하고 -80°C 에서 보관하였다. 그 후 2 μg 의 전체 RNA를 M-MLV 역전사효소(Promega, Madison, WI, USA)와 함께 올리고(dT)₁₂₋₁₈ 프라이머 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 단일 가닥의 cDNA로 역전사시켰다. PCR 반응 동안, 4 μl 의 cDNA를 각각 20 pmol의 정방향 및 역방향 프라이머(Bioneer Corporation, Seoul, South Korea), PCR 버퍼를 포함한 GoTaq[®]Green Master Mix 2x, 25 mM 마그네슘 클로라이드, 10 mM dNTP mix 및 Taq 효소(Promega, Madison, WI, USA)와 반응시키고, 증폭하였다. 각 전사체의 프라이머는 다음과 같다: Bcl-2; 5'-CGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGC-3'(정방향, 서열번호 1) 및 5'-CCGCATGCTGGGGCCGTACAGTTCC-3'(역방향, 서열번호 2), Bax; 5'-GTGCACCAAGGTGCCGAC-3'(정방향, 서열번호 3) 및 5'-TCAGCCCATCTTCTCCAGA-3'(역방향, 서열번호

4), 및 β -액틴(로딩 대조군으로 사용) 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'(정방향, 서열번호 5) 및 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'(역방향, 서열번호 6). PCR 조건은 94℃에서 5분간 초기, 94℃에서 1분간 변성, 1분간 어닐링 반응(Bcl-2: 68℃, Bax: 53℃, 카스파제-3: 55℃, 및 β -액틴: 63℃), 그리고 72℃에서 1분간 연장반응을 25 사이클 수행하고, 또 다른 최종 연장 단계로서 72℃에서 10분간 PC-812 Thermal Cycler (Astec, Fukuoka, Japan)에서 반응시켰다. PCR 산물은 에티뮴 브로마이드(1 μ l/ml in PBS)를 포함한 1% 아가로스 겔로 25분간 전기 영동하고 밴드를 찍기 위해서 UV 램프에 노출시켰다. 증폭된 산물의 분자 사이즈는 PCR 산물과 같은 방향으로 내린 분자량 마커(100 bp DNA ladder; Promega, Madison, WI, USA)와 비교해서 결정하였다. mRNA 밴드의 밀도는 Molecular Analyst™ version 1.4.1 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 분석하였다.

[0054] 실시예 4: 웨스턴 블랏 분석

[0055] Bax와 Bcl-2의 mRNA 발현 프로파일의 변화가 발달 랫트 새끼 단백질에서 상응하는 변화에 매치하는 지를 평가하기 위해서 대조군, 티오테파, 니코틴아미드 및 티오테파+니코틴아미드를 처리한 그룹에서 단백질 수치를 확인하였다. 실험동물은 4시간 동안 티오테파(30 mg/g)의 투여 후 즉시 니코틴아미드(1 mg/g)를 처리한 후 죽였다. 그리고 뇌를 즉시 절개해 피질, 해마 및 시상을 조심스럽게 제거하고 수거한 조직은 드라이아이스에서 얼렸다. 7일령 랫트 새끼로부터 얻은 뇌 조직은 0.2 M PBS 단백질 분해효소 각테일에서 균등화시켰다. 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 분석 용액을 이용해 측정하였다. 시료당 동량의 단백질 40 μ g을 감소조건 하에 10-15% 겔 SDS-PAGE를 통해 이동시키고 PVDF(polyvinylidene difluoride)막(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)으로 옮겼다. 넓은 범위, 6-175 kDa (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA)인 사전 염색된 단백질 마커는 단백질의 분자량을 검출하기 위해 같은 방향으로 이동시켰다. 막은 비특이적 결합을 줄이기 위해 5%(w/v) 탈지유로 블로킹하고, 면역 블랏팅은 토끼 유래의 항-Bcl-2, 항-Bax, 및 항-카스파제-3, 항-PARP-1 항체 그리고 염소 유래의 다클론 항-시토크롬-c (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 사용하여 수행하였다. 항- β -액틴 항체(1:500; Sigma, St. Louis, MO, USA)는 균질 로딩을 입증하기 위해 대조군으로 채택했다. 막은 염소 유래의 HRP(Horseradish peroxidase)가 결합된 항-토끼 IgG (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)로 표지하였고, 면역복합성(Immunocomplexes)은 강화된 화학발광 ECL-검출시약 (Amersham Pharmacia Biotech, Western blotting detection reagents)을 이용해 시각화하였다. X-ray 필름을 스캔하고 웨스턴 블랏의 광학밀도는 컴퓨터 시스템인 Sigma Gel(version 1.0) (Jandel Scientific, San Rafael, Chicago, USA)을 사용하여 밀도측정을 하여 분석하였다

[0056] 실시예 5: 조직 분리 및 준비

[0057] 실험동물은 시약 처리 24시간 후 희생시켰다. 대조군 랫트로부터의 뇌 절편 및 24시간 동안 티오테파 주입 후 뒤이은 니코틴아미드를 처리한 랫트로부터의 뇌 절편을 분석하였다. 조직 분석을 위해(그룹 당 n = 4-5), 발달 랫트 새끼는 차가운 4% 파라포름알데하이드로 관류시킨 후에, 1× PBS 로 경심(transcardially) 관류하였다. 그리고 뇌를 4% 파라포름알데하이드에서 밤새 후-고정시켰으며, 상기 뇌가 튜브의 바닥으로 가라앉을 때까지 20% 수크로스로 이동시켰다. 뇌는 O.C.T 혼합물에서(A.O. USA) 얼리고, 16 μ m 두께로 관상면 절편(coronal plane)을 제작하였다(Leica cryostat CM 3050C, Germany). 절편을 탐침이 있는 양이온 슬라이드(Fisher)에 얼리고 고정하였다.

[0058] 실시예 6: 면역조직화학 염색

[0059] 카스파제-3의 활성을 밝히기 위해(Young et al., Role of caspase-3 in ethanol-induced developmental neurodegeneration. Neurobiology of Disease. 20, 608-614, 2005)에 의해 이전 기술된 면역조직화학법을 약간 변경하여 실행하였다. 슬라이드를 0.01 M PBS로 세척하고, 3% 과산화수소가 포함된 메탄올 용액에서 10분간 냉각시켰다. 그 후 블로킹 용액(2% BSA/0.2% milk/0.1% Triton-X 100 in PBS)에서 한 시간 동안 배양하고, 이어서 블로킹 용액에 1:1000로 희석한 토끼 항-활성 카스파제-3 항혈청(Cell Signaling Technology, Beverly, MA)에서 밤샘 배양하였다. 일차적인 항혈청과 함께 배양한 후, 절편은 90분 동안 이차적인 항혈청(블로킹 용액 내에 염소 항-토끼 1:200)에서 배양하였고, 그 후 90분 동안 암실에서 ABC 시약(standard Vectastain ABC Elite Kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA)에서 반응시켰다. 절편을 PBS로 두 차례 세척하고, VIP 시약(Vector VIP substrate kit for peroxidase, Vector Labs, Burlingame, CA)과 함께 보라색을 발현시키기 위해

배양하였다. 이미지는 형광 광학현미경으로 관찰하였다. 각 절편의 다른 부위에서 활성 카스파제-3-양성 세포는 처리조건에 따른 관찰자의 오차를 최소화해서 그 숫자를 계산했다.

[0060] **실시예 7: 크레실 바이올렛(크레실 바이올렛) 염색**

[0061] 크레실 바이올렛은 뉴런 손실의 조직학적 검사 및 측정을 위해 조직 절편을 염색하는데 사용되었다. 발달 랫트 뇌의 Nissl 조직학과 사멸 및 손상된 뉴런의 존재 및 부재는 16 μ m 두께의 뇌 절편을 고정시킨 슬라이드를 현미경으로 분석하였다. 모든 검사한 랫트의 새끼로부터 얻은 절편은 상등 알코올(70-100%)에서 탈지하고, 강하 알코올(95-70%)에서 수산화하고, 아세테이트 버퍼 pH 5.0에서 세척한 후, 뒤이어 0.25% 크레실 바이올렛으로 약 15분간 염색하였다. 절편을 증류수로 세척하고 다단계 에탄올에서 탈수소시켰다. 이미지는 형광 광학현미경을 가지고 관찰했다.

[0062] **실시예 8: FJB(Fluoro-Jade B) 염색**

[0063] (Sas et al., Kynurenine diminishes the ischemia-induced histological and electrophysiological deficits in the rat hippocampus. Neurobiology of Disease. 32, 302-308, 2008)에서 이전 기술된 바와 같이 일부 변경된 FJB(Fluoro-Jade B) 염색을 수행하였다. 약물 처리 24시간 후, 실험동물을 깊게 마취시키고, 0.9% 살린, 뒤이어 0.1 M PBS(phosphate-buffered saline) 내에 차가운 4% 파라포름알데하이드로 경심(transcardially) 관류시켰다. 요약하면, 뇌 절편을 슬라이드에 고정하고, 밤새 공기건조시켰다. 슬라이드를 1% 수산화나트륨 및 80% 에탄올 용액에 5분간 담근 후, 2분간 70% 알코올, 뒤이어 2분간 증류수에 담갔다. 그 후 슬라이드를 0.06% 과망간산칼륨 용액에서 10분간 이동시켰다. 물로 씻어준 후, 슬라이드를 0.1% 아세트산 및 0.01% FJB (Chemicon International, USA) 용액에 20분간 담갔다. 슬라이드를 증류수로 2번 세척하였고, 10분간 건조시켰다. 유리 커버 슬립을 고정 배지에 있는 유리 슬라이드에 고정하였다. 공초점 레이저 현미경(confocal laser scanning microscope)(Fluoview FV 1000, Olympus, Japan)의 사용에 의한 FJB(녹색)를 검출하기 위해 FITC 필터를 사용하였다. 각 절편의 다른 부위에서 FJB-양성의 세포는 처리조건에 따른 관찰자의 오차를 최소화해서 그 숫자를 계산했다.

[0064] **실시예 9: TUNEL 및 DAPI 염색**

[0065] 아포토시스의 전형적인 특징을 검출하기 위해서, 핵 DNA를 TUNEL (GenScript Corporation USA)로 염색하고 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)을 사용하여 카운터 염색하였다. 아포토시스 세포 사멸의 인 시투 검출(In situ detection)은 말단 디옥시뉴클레오티드 트랜스퍼라제 (TdT)-매개의 dUTP Nick 말단 표지 (TUNEL) 을 사용해서 응집된 동결 절편(16 μ m)에서 수행하였다. TUNEL 염색은 인 시투 세포 사멸 검출 키트 형광(In Situ Cell Death Detection kit Fluorescein)(Genescript USA)을 사용하여 공급자의 권고에 따라서 수행하였다. 응집된 동결절편(16 μ m)은 그 후 10분 동안 실온에서 DAPI (Molecular probes, Eugene, OR, USA)와 같이 배양하고 증류수로 씻어주었다. 유리 커버 슬립을 고정 배지가 있는 유리 슬라이드에 고정하였다. DAPI 염색(파란색)을 검출하기 위해 DAPI 필터를 사용하였고 TUNEL(녹색)을 검출하기 위해서 FITC 필터를 사용하였다. TUNEL 양성(녹색) 및 DAPI(파란) 염색 패턴은 공초점 레이저 현미경(Fluoview FV 1000, Olympus, Japan)을 사용하여 확인하였다. 각 절편의 다른 부위에서 TUNEL-양성의 세포는 처리조건에 따른 관찰자의 오차를 최소화해서 그 숫자를 계산하였다.

[0066] **실시예 10: 데이터 분석 및 통계**

[0067] RT-PCR 및 웨스턴 블랏으로부터의 목적 밴드를 스캔하고 Sigma Gel System (SPSS Inc., Chicago, IL)을 사용하여 밀도측정을 함으로써 분석하였다. 밀도 값은 $\pm$ 표준오차(SEM)로서 표현하였다. 통계학적 차이는 ANOVA(one-way analysis of variance)와 뒤 이은 Student's *t*-test로 결정하였다. 모든 실험에서, 통계적인 유의미성을 위한 허용 수준은 $P < 0.05$ 로 고려하였다

[0068] **결과**

[0069] **발달 랫트의 뇌에서 티오테파-유도의 Bax mRNAs 발현 조절상승에 대한 니코틴아미드 후처리의 효과**

[0070] 발달 랫트의 뇌에서 티오테파-유도성 Bax mRNAs 발현 조절상승에 대한 니코틴아미드 후처리의 효과를 검사하기 위해서 RT-PCR 분석을 하였다. 발달 랫트의 뇌에서 Bax 단백질의 양의 변화와 연관이 있는 티오테파 후 니코틴아미드 처리에 의한 Bax mRNA 수치의 조절 상승의 역전은, Bax의 과발현처럼, 미토콘드리아 기능장애 및 세포 사멸을 초래한다. 4시간 동안 (30 mg/kg) 항암제(티오테파)의 일회 주입 후에, 아포토시스지향적 Bax mRNA 발현 수치는 피질과 시상에서 유의미하게 증가하였으나, 해마에서는 변화가 없었다. 4시간 동안 티오테파 후에 니코틴아미드 처리는 발달 랫트의 피질과 시상에서 Bax mRNA 발현 수치를 유의미하게 감소시켰다(도 1a). 또한 니코틴아미드 처리시 또는 미처리시, 티오테파에 노출된 발달 랫트의 피질, 해마 및 시상에서의 Bcl-2 mRNA 발현 수치에서는 어떠한 특징적인 변화도 관찰되지 않았다(도 1b).

[0071] **발달 랫트의 뇌에서 티오테파-유도의 Bax 단백질 조절상승에 대한 니코틴아미드 후처리의 효과**

[0072] 니코틴아미드에 의한 티오테파-유도성 아포토시스적 신경퇴행 및 보호의 분자학적 메커니즘을 이해하기 위해, 본 발명자들은 미토콘드리아적 경로와 연관된 아포토시스적 단백질의 변화를 모니터링했다. Bcl-2 패밀리의 멤버인 아포토시스 지향의 Bax 및 항 아포토시스의 Bcl-2는 아포토시스 경로의 결정적인 조절자이다. 따라서 본 발명자들은 니코틴아미드 존재시와 부재시, 4시간 동안 티오테파 처리 후 피질, 해마 및 시상에서 Bax 및 Bcl-2 단백질의 발현 수치를 측정하였다. 피질 및 시상에서 Bax의 수치는 대조군과 비교할 때 티오테파 처리에 따라 조절상승 된 것으로 나타났다. 티오테파 처리 후 니코틴아미드로 후처리한 경우는 Bax의 조절상승이 유의미하게 역전되었고(도 2a), 반면 해마에서 Bax 발현에서는 어떠한 특징적 차이점도 없었다. 대조군과 비교할 때 약물을 처리한 그룹 전부에서 피질, 해마 및 시상에서의 Bcl-2 발현 수치에 대해서는 어떠한 특징적인 변화도 관찰되지 않았다(도 2b). 흥미롭게도, Bax 및 Bcl-2 단백질 발현 수치는 상응하는 mRNA 수치와 비슷한 경향을 나타냈다. 이러한 결과는 4시간 동안 티오테파를 투여하는 것은 신경아포토시스 선호적이며 Bax/Bcl-2 비의 상승을 일으켰고, 반면 니코틴아미드 보충은 신경보호 선호적으로 Bax/Bcl-2 비를 유의미하게 감소시키는 것을 시사하는 것으로, 니코틴아미드가 티오테파-유도의 신경세포의 아포토시스를 억제하는 것을 의미한다.

[0073] **미토콘드리아로부터 세포질로의 티오테파-유도성 시토크롬-c의 방출에 대한 니코틴아미드 후처리의 효과**

[0074] 미토콘드리아의 아포토시스 연쇄반응에는 미토콘드리아 내막 단백질인 시토크롬-c를 세포질로 방출하는 것이 요구되는데, 이는 세포질에서 증가된 시토크롬-c의 수치가 카스파제-9 및 카스파제-3의 활성화와 뒤이은 뉴런 사멸을 유도하기 때문이다. 티오테파에 대한 니코틴아미드의 보호 효과는 미토콘드리아로부터 세포질로 시토크롬-c가 방출하는 것을 억제하기 때문일 것이다. 따라서 본 발명자들은 세포질 시토크롬-c의 단백질 수치를 피질, 해마 및 시상에서 측정하였는데, 이는 세포질 시토크롬-c의 단백질 수치가 미토콘드리아 연쇄반응의 활성화에 대한 마커이기 때문이다. 그 결과, 피질과 시상 양쪽에서 Bax 수치가 증가한 것을 발견하였는데, 이는 티오테파 투여 후 시토크롬-c의 수치가 증가한 것과 관련이 있으며, 반면 해마에서는 시토크롬-c의 세포질 수치에 어떠한 유의미한 차이도 없었다. 티오테파의 처리 4시간 후 피질 및 시상에서 시토크롬-c의 세포질 수치에 유도성 상승이 있었고, 반면 티오테파 후에 니코틴아미드로 처리한 것은 티오테파 처리 그룹과 비교할 때 미토콘드리아로부터 세포질로의 시토크롬-c 방출이 유의미하게 감소하였다(도 3).

[0075] **발달 랫트의 뇌에서 활성 카스파제-3의 티오테파-유도성 발현에 대한 니코틴아미드 후처리의 효과**

[0076] 카스파제는 시스테인 단백질 분해효소로 아포토시스에서 중요한 역할을 한다. 본 발명자들은 다음으로 활성화된 카스파제-3의 억제와 같이, 다운스트림 세포 경로의 수치에서 발생하는 것으로 나타나는 미토콘드리아막의 탈분극 및 시토크롬-c 방출을 막는 니코틴아미드의 효과에 대해서 시험하였다. 본 발명자들은 피질, 해마 및 시상에서 활성화된 카스파제-3 수치를 웨스턴블랏 분석을 통해서 측정하였는데, 이는 상기 아포토시스 마커가 티오테파에 의해서 과활성화되기 때문이다. 대조군과 비교할 때, 티오테파 투여 후에 활성화된 카스파제-3의 수치는 피질과 시상 양쪽에서 유의미하게 증가하였고(도 4a), 반면에 해마에서는 이러한 카스파제 수치에 어떠한 특징적인 변화도 없었다. 본 발명자들이 대조군에서 또한 카스파제-3 활성의 낮은 수치를 검출하였기 때문에, 조직 추출은 카스파제-3 활성의 낮은 수치를 유도할 것이다; 그러나, 이러한 수치는 실험 그룹에서의 수치보다 상당히 낮았다. 티오테파 후 니코틴아미드 처리는 티오테파 처리 그룹과 비교할 때 피질과 시상에서 활성화된 카스

파제-3의 수치를 유의미하게 감소시켰다.

[0077] **발달 랫트의 뇌에서 티오테파-유도의 PARP-1의 절단에 대한 니코틴아미드의 효과**

[0078] DNA 복구에서 PARP-1의 기능에도 불구하고, 뉴런 흥분독성에서 PARP-1의 과활성은 퇴행을 유도한다. 활성화된 카스파제-3는 DNA 복구에서 중요한 PARP-1(폴리 (ADP 리보스) 폴리머라제-1)을 포함하는 단백질을 자르기 때문에, 아포토시스를 촉진하고, 반면 PARP-1의 과활성은 NAD⁺와 ATP을 고갈시켜, 피사를 초래한다. 웨스턴블랏 분석결과와 피질과 시상에서 PARP-1의 절단이 아포토시스 동안에 증가된 카스파제-3 활성 때문이라는 것을 보여주었다. 티오테파를 처리한 그룹의 피질과 시상에서 절단된 PARP-1 수치는 대조군과 니코틴아미드 처리한 그룹과 비교할 때 유의미하게 높았다. 티오테파 후 니코틴아미드 처리는 발달 랫트의 피질과 시상에서 89Kda 카스파제-3 절단 산물의 감소와 동시에 일어나는 전체 길이 116Kda PARP-1의 수치를 현저하게 감소시켰다(도 5). 종합해 보면, 티오테파에 노출된 랫트의 뇌에 피질과 시상에서 PARP-1 절단이 전체적으로 증가한 것을 확인하였고, 반면 티오테파 후 니코틴아미드를 처리한 경우는 피질과 시상 부위에서 절단 PARP-1 수치가 유의미하게 감소하였고, 대조군에서 관찰된 것과 비슷한 수치를 유지하였다.

[0079] **발달 랫트의 뇌에서 티오테파 처리 24시간 후 활성 카스파제-3 발현에 대한 니코틴아미드 후처리의 효과**

[0080] RT-PCR과 웨스턴 블랏 결과에 추가로 면역조직화학적 분석을 하였다. 증가된 활성 카스파제-3 단백질 발현은 뉴런 세포 사멸에 기여한다. 티오테파 처리 24시간 후 뉴런 사멸의 발병학에서 카스파제-3의 발현에 대해 피질, 해마 및 시상에서 분석하였다. 티오테파를 처리한 랫트의 띠 피질 및 시상의 LDN에서 강력한 활성 카스파제-3 면역반응성을 갖는 무수한 숫자의 손상되고 사멸한 뉴런이 관찰되었는데(도 4b, 판넬 Dd와 Ff), 반면 해마의 CA1에서는 어떠한 활성 카스파제-3 면역반응성도 관찰되지 않았다(도 4b, 판넬 Ee). 티오테파 후 즉시 니코틴아미드를 처리한 경우 피질과 시상 양쪽에서 활성 카스파제-3 양성 세포는 점차적으로 감소하였다(도 4b, 판넬 Gg 및 Ii).

[0081] **24시간 후 발달 랫트 뇌에서 티오테파-유도성 신경퇴행에 대한 니코틴아미드 후처리의 효과**

[0082] 본 발명자들은 다음으로 발달 랫트의 뇌의 피질, 해마 및 시상에서 티오테파에 의해 유도된 신경퇴행 및 니코틴아미드 보호에 관해 전체적인 정도를 연구하였다. 피질, 해마 및 시상에서 티오테파에 의한 뉴런세포 사멸 및 니코틴아미드의 보호의 정도를 검사하기 위해 Nissl-염색을 수행하였다. Nissl-염색은 모든 구조를 확인하는데, 특히 핵과 핵산은 보라색으로 나타나고, 뉴런은 흐린 파랑색으로 나타난다. 절편에서 염색된 뉴런은 띠 피질, 해마의 CA1 및 시상의 LDN에서 뉴런의 죽은 세포를 명확히 확인할 수 있도록 한다(예를 들어, 크고 작으며, 응축된 단편 그리고 어두운 세포핵 그리고 아포토시스 바디들). 형태학적으로 정상으로 나타난 대조군(도 6a, 판넬 C, D 및 E)과 비교할 때, 티오테파를 처리한 그룹(도 6a, 판넬 F, G 및 H)의 전면부 띠 피질, 해마의 CA1 및 시상의 LDN에서 유의미하게 증가된 핵포화, 뉴런 손실, 및 조직 파괴가 나타났다. 퇴행된 뉴런의 숫자는 낮은 세포 사멸 수치를 나타낸 해마와 비교할 때 피질과 시상에서 유의미하게 높았다. 티오테파 후 니코틴아미드의 처리는 이러한 부위에서 유의미하게 적은 핵포화 및 뉴런 감소와 연관이 있었다(도 6a, 판넬 I, J 및 K).

[0083] 뉴런 취약성에 대한 신뢰성이 있는 마커인 음이온 형광색소 FJB(Fluoro-Jade B)를 생존기 이후 퇴행한 뉴런을 염색하게 위해 사용하였다. 수많은 퇴행된 세포가 티오테파 투여 24시간 후 전면 띠 피질, 해마의 CA1 및 시상의 LDN에서 관찰되었다. 실험에 따르면 티오테파를 처리한 랫트의 전면 띠 피질과 시상의 LDN에서 FJB 양성 세포의 전체 숫자는 유의미하게 증가하였다(도 6b, 판넬 Ff, Gg, 및 Hh). FJB 양성 세포의 숫자는 약간의 세포 사멸이 나타난 해마와 비교할 때 피질과 시상에서 현저하게 높았다. 대조적으로, 티오테파 후 니코틴아미드 처리된 랫트의 새끼는 이러한 뇌 부위에서 FJB 양성의 세포의 숫자가 유의미하게 감소한 것으로 나타났다(도 6b, 판넬 Ii, Jj, 및 Kk).

[0084] DNA 손상은 아포토시스의 특징 중 하나로서, TUNEL 염색에 의한 시각화가 가능하며, DNA 손상에 대한 분석은 자유 3' 말단의 효소적 표지에 의해서 가능하다. 티오테파에 의해 유도되는 세포 사멸이 아포토시스적이며 니코틴아미드 후처리가 발달 랫트의 뇌에서 티오테파-유도성 아포토시스 신경퇴행에 대한 보호적 역할을 하는지 여부를 결정하기 위해서, 뇌 조직에 핵의 형태를 TUNEL와 DAPI 염색을 이용해 평가하였다. 아포토시스 바디의 출현과 같이, 발달 랫트의 뇌 피질 및 시상에서 티오테파-유도성 신경 아포토시스, 핵 분열은 TUNEL와 DAPI 염색에

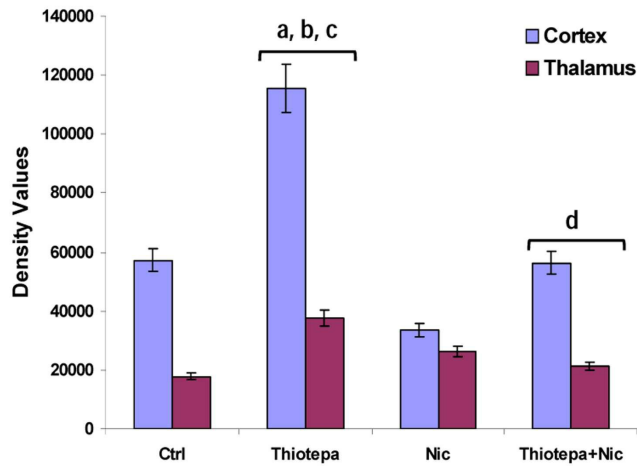
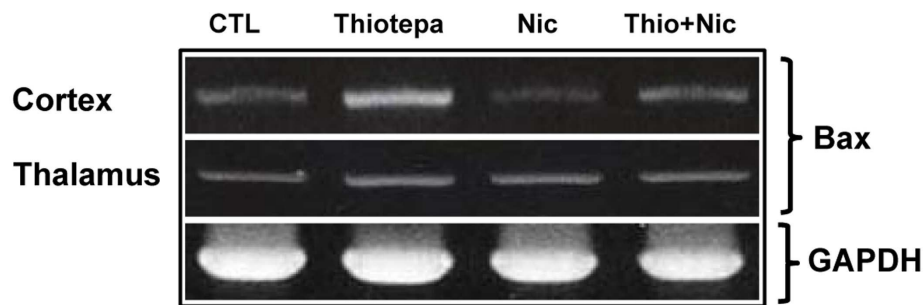
의해 밝혀졌다. 대조군과 비교할 때(도 7, 판넬 A와 C), 티오테파의 처리는 수축되고 응축된 작은 복합의-DNA 집합체 (아포토시스의 전형적인 특징)를 가진 TUNEL 양성 세포의 숫자가 피질 및 시상에서 현저히 증가된 것이 관찰되었다(도 7, 판넬 D 및 F). 티오테파-처리한 랫트의 해마의 CA1에서 TUNEL-양성 세포는 검출되지 않았다(도 7, 판넬 E 및 H). 발달 랫트의 뇌 피질과 시상에서 대부분의 TUNEL-양성 세포는 아포토시스적 뉴런 사멸(도 7, 판넬 G 및 I)을 보이는 DAPI 염색에 나타난 것과 겹쳤다. 티오테파 후 니코틴아미드 처리는 이러한 뇌 부위에서 DAPI를 가지고 염색한 TUNEL 양성 세포의 숫자 카운터를 유의미하게 감소시켰다(도 7, 판넬 J 및 L).

[0085]

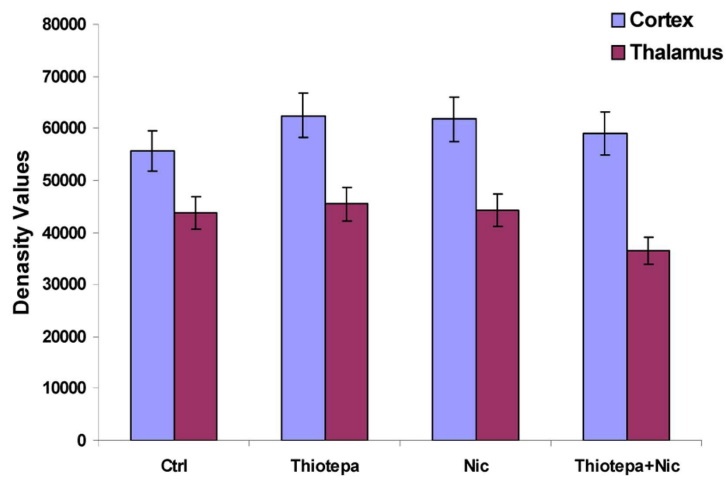
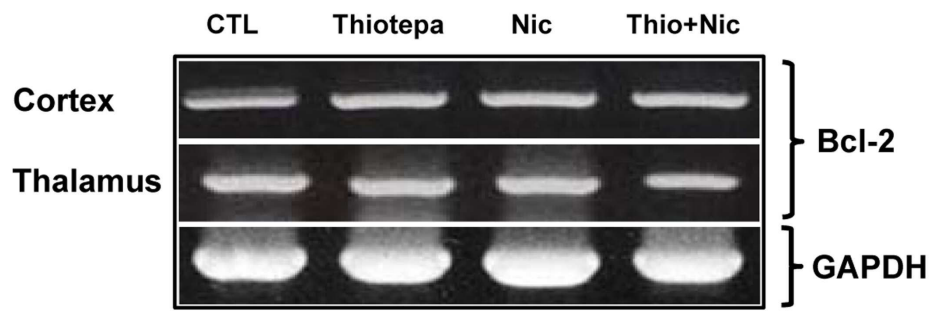
상기와 같은 결과들은 본 발명의 니코틴아미드를 포함하는 조성물이 알킬화 약물-유도성 신경퇴행을 예방 또는 치료할 수 있음을 시사하는 것이다.

도면

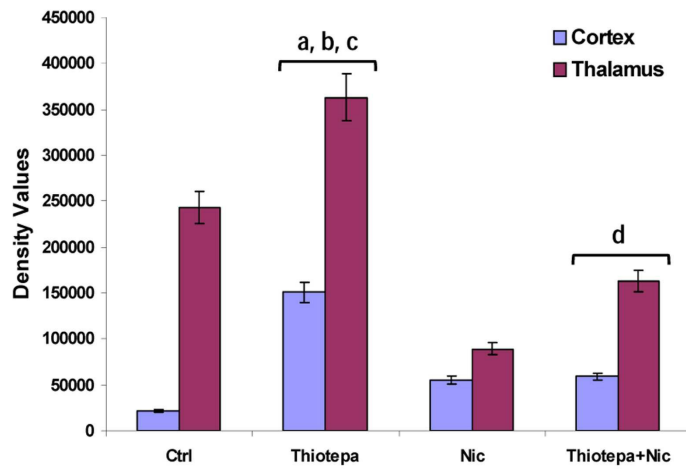
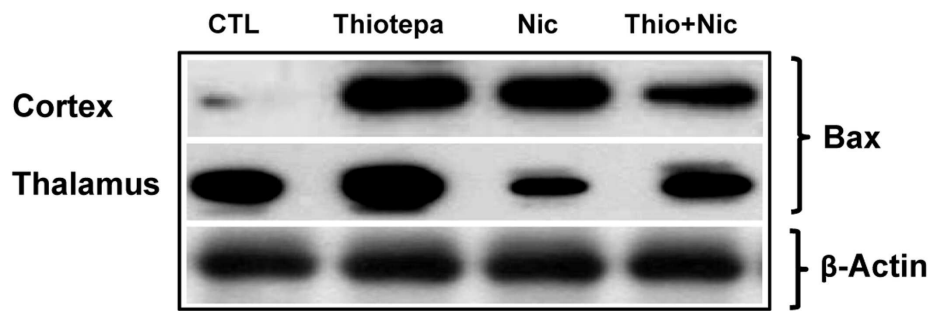
도면1a



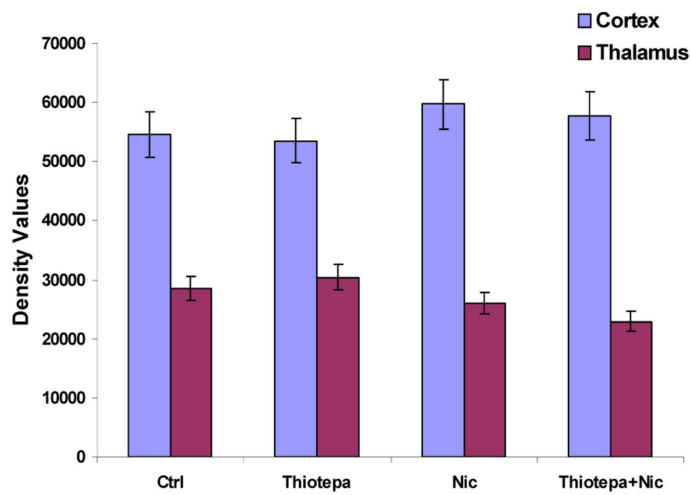
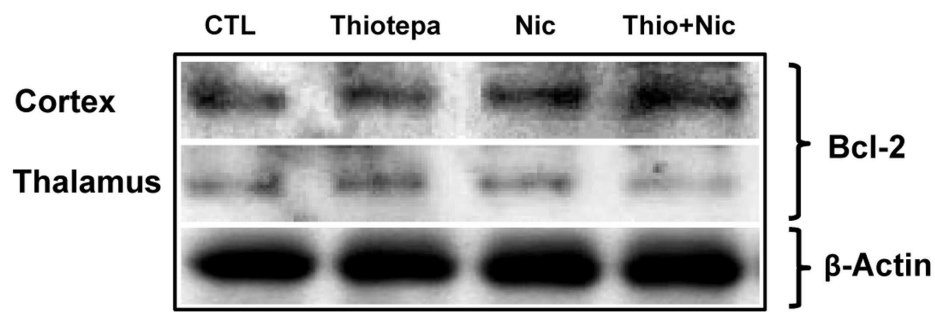
도면1b



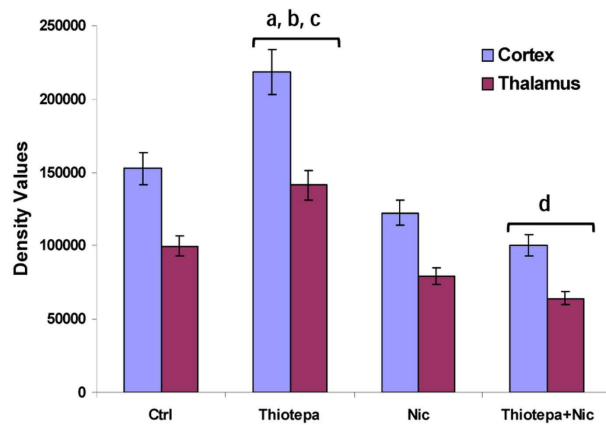
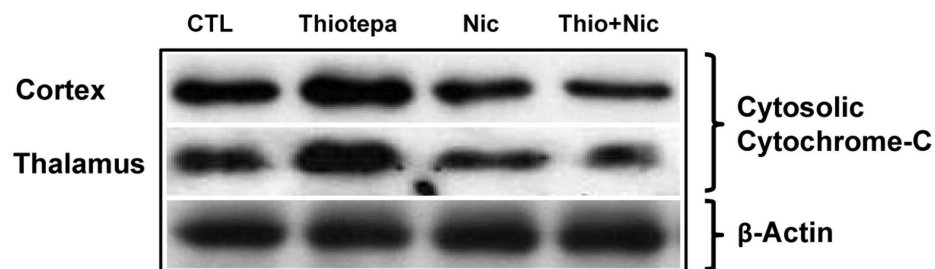
도면2a



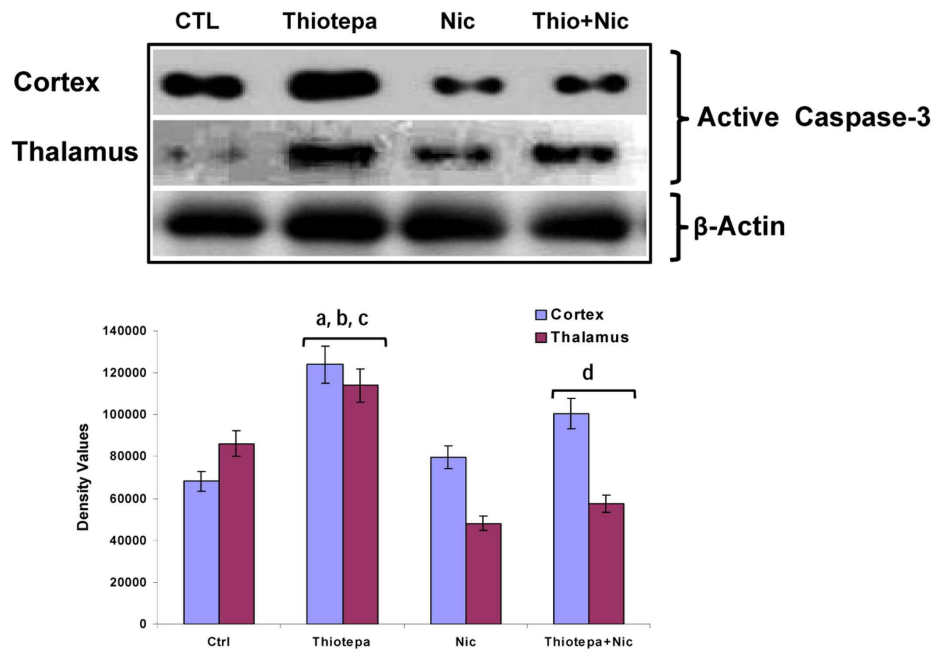
도면2b



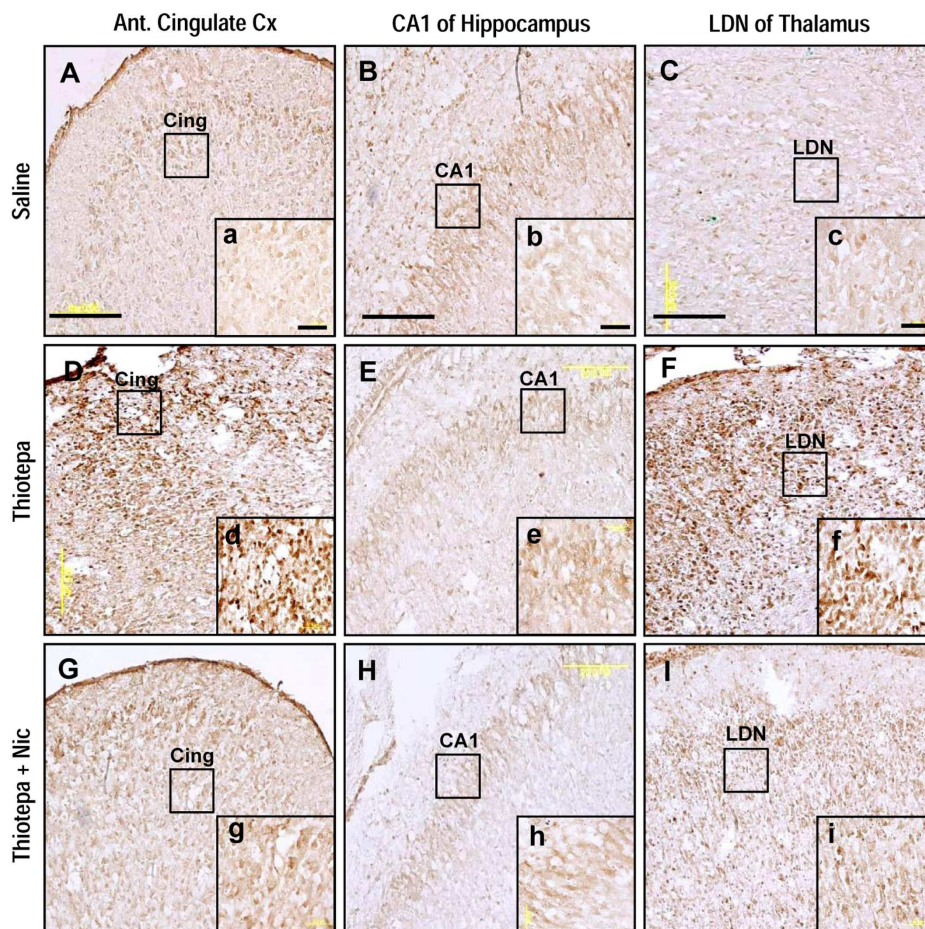
도면3



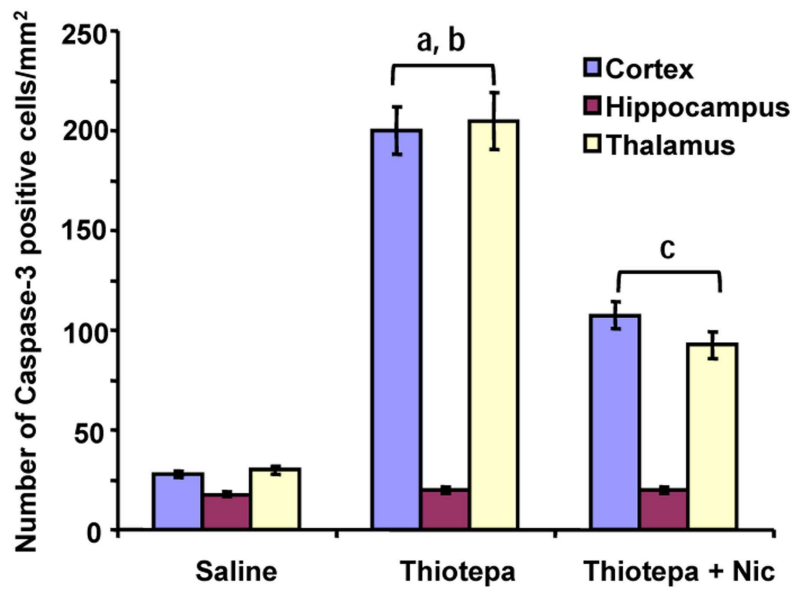
도면4a



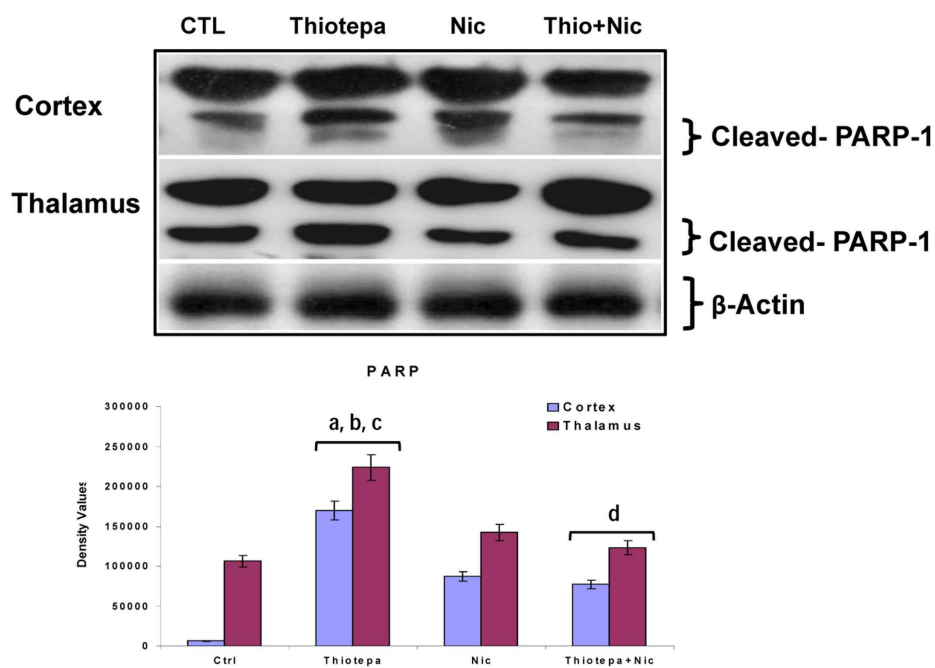
도면4b



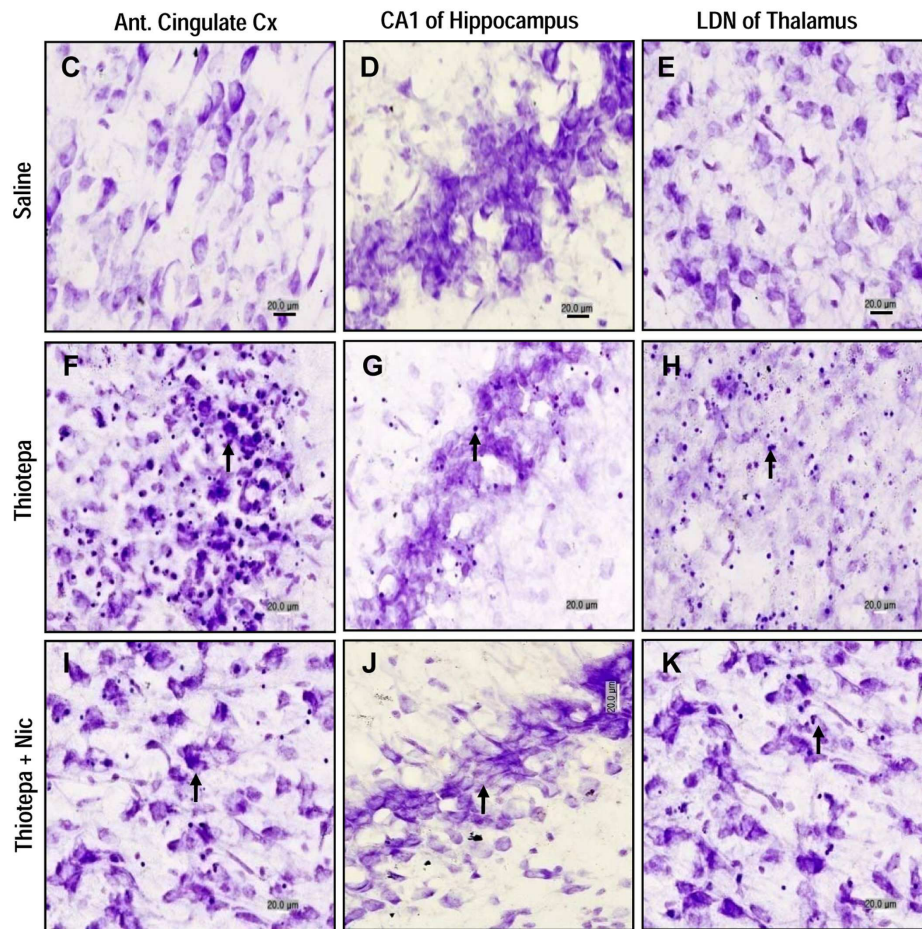
도면4c



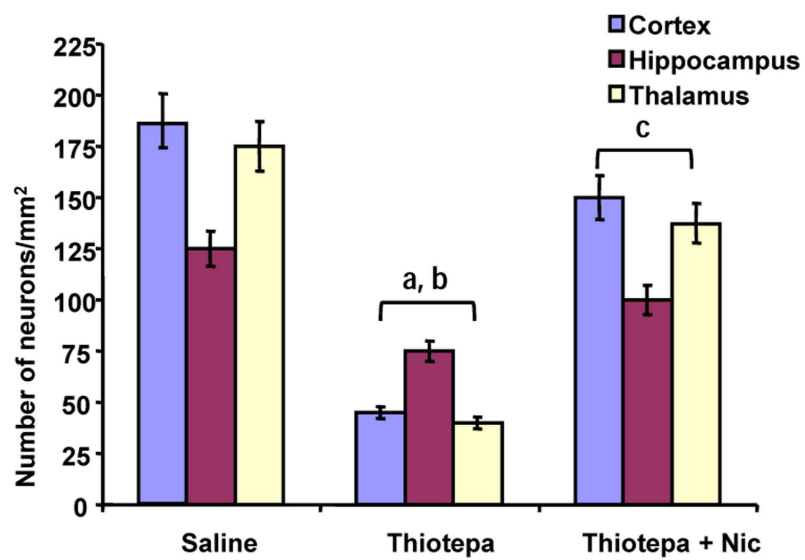
도면5



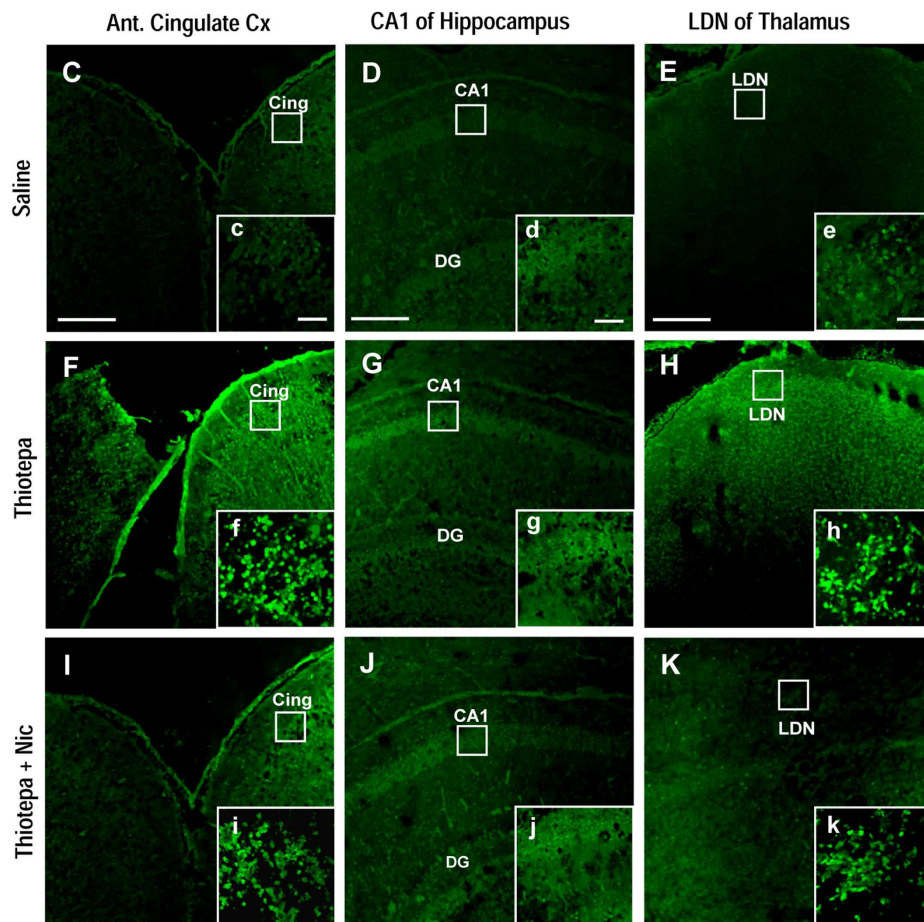
도면6a



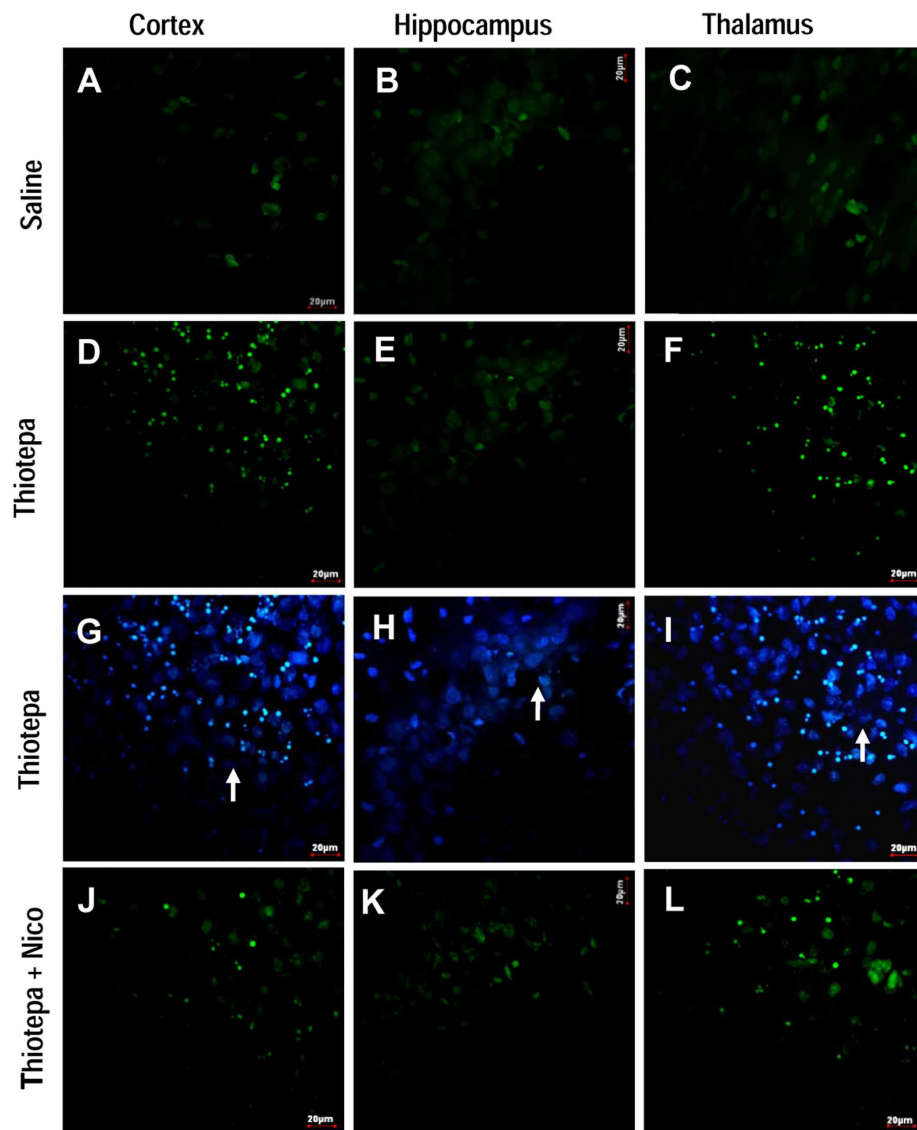
도면6b



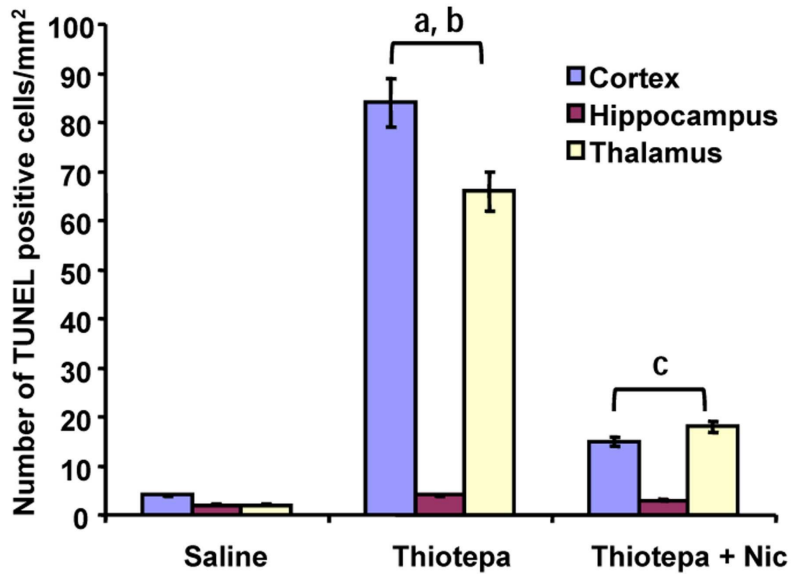
도면6c



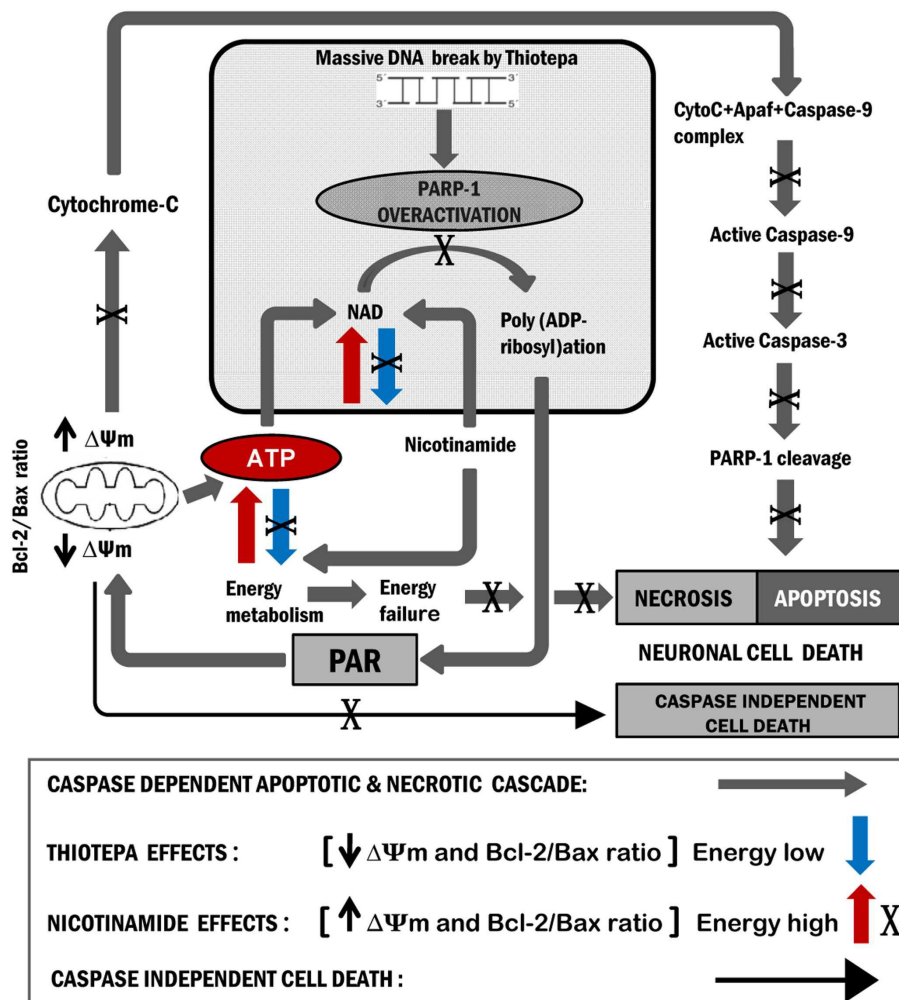
도면7a



도면7b



도면8



<110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY

<120> Composition for preventing or treating neurodegeneration
comprising nicotinamide as an active ingredient

<130> PA100541KR

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for Bcl-2

<400> 1

cgacgacttc tccgccgct accgc 25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for Bcl-2

<400> 2

ccgcatgctg gggccgtaca gttcc 25

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for Bax

<400> 3

gtgcaccaag gtgccggac 19

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for Bax

<400> 4

tcagcccatc ttcttcaga

20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for beta- actin

<400> 5

gtggggcgcc ccaggcacca

20

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for beta-actin

<400> 6

ctccttaatg tcacgcagga ttic

24