

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 5월 9일 (09.05.2019)



(10) 국제공개번호
WO 2019/088395 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 31/416 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/007287
- (22) 국제출원일: 2018년 6월 27일 (27.06.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2017-0144178 2017년 10월 31일 (31.10.2017) KR
- (71) 출원인: 경상대학교산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION GYEONGSANG NATIONAL UNIVERSITY) [KR/KR]; 52828 경상남도 진주시 진주대로 501, Gyeongsangnam-do (KR).
- (72) 발명자: 김명옥 (KIM, Myeong Ok); 52819 경상남도 진주시 가호로44번길 7 102동 303호, Gyeongsangnam-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 피씨알 (PCR INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 06194 서울특별시 강남구 선릉로90길 70 인텔빌딩 6층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

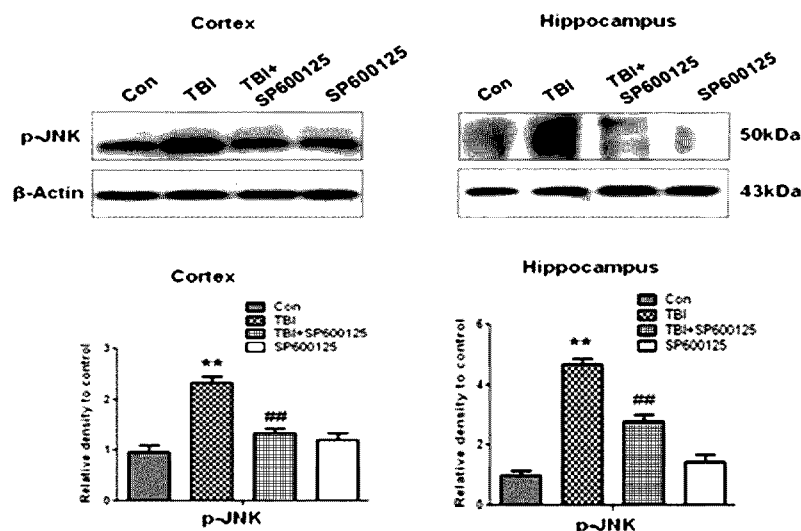
- 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING JNK ACTIVITY INHIBITOR AS ACTIVE INGREDIENT FOR PREVENTING OR TREATING DEGENERATIVE NEUROLOGICAL DISEASES

(54) 발명의 명칭: JNK 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising a JNK activity inhibitor as an active ingredient for preventing or treating degenerative neurological diseases, wherein the composition may inhibit the activity of c-Jun kinases and reduce the inflammatory response and beta amyloid production of neuronal cells.

(57) 요약서: 본 발명은 JNK 활성 억제 물질을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 c-Jun 인산화효소의 활성을 억제하고, 신경세포의 염증반응 및 베타 아밀로이드 생성을 감소시킬 수 있다.



WO 2019/088395 A1

명세서

발명의 명칭: JNK 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 JNK 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 외상성 뇌손상(Tranumatic brain injury, TBI)은 두부에 가해지는 외부의 물리적 힘에 의한 손상으로 의식 저하나 변화를 유발하고, 이로 인한 인지 기능 혹은 육체적 기능의 손상을 야기한다. 또한 행동 장애나 감정적 손상을 유발할 수도 있다. 이러한 손상이나 장애는 일시적 또는 영구적일 수 있으며, 신체 일부의 손상 혹은 전체 기능의 장애나 정신심리학적 문제를 야기할 수 있다.
- [4] 일반적으로 TBI는 손상의 심한 정도에 따라 경도(mild), 중등도(moderate) 및 중증(severe)으로 분류한다. 경도 TBI를 갖는 사람은 의식을 유지할 수 있거나, 수 초 또는 수 분 동안 의식의 상실을 경험할 수 있다. 또는 두통, 혼돈, 현기증(lightheadedness), 어지러움(dizziness), 흐릿한 시야, 눈의 피로, 귀 울림, 행동 또는 기분 변화, 기억, 집중, 주의, 또는 사고의 곤란을 경험할 수 있다. 중등도 또는 중증 TBI를 갖는 사람은 이와 동일한 증상을 나타낼 수 있으며, 악화되거나 사라지지 않는 두통, 반복된 구토 또는 오심, 경련 또는 발작, 불명료한 언어, 사지의 약화 또는 마비 등의 증상을 나타낼 수 있다.
- [5] TBI에 의하여 초래된 장애는 손상의 정도, 손상의 위치 및 환자의 나이와 건강 상태에 따라 달라질 수 있으며, 일부 공통적으로 나타나는 장애에는 인지장애(사고, 기억 및 추론), 감각 처리 장애(시각, 청각, 촉각, 미각 및 후각), 의사소통장애(표현 및 이해), 및 행동 또는 정신건강장애(우울증, 불안, 인격 변환, 공격 및 사회적 부적합) 등이 있다. 이러한 장애를 치료하기 위하여 TBI 환자는 물리 치료, 작업 요법, 언어 치료 등의 재활 치료를 받게 되나, 상기 재활 치료는 장애 개선 속도가 느린 단점이 있다. 따라서 TBI를 보다 효과적으로 치료할 수 있는 기술이 필요한 실정이다.

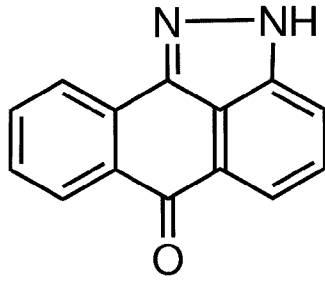
[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 일 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다:
- [8] [화학식 1]

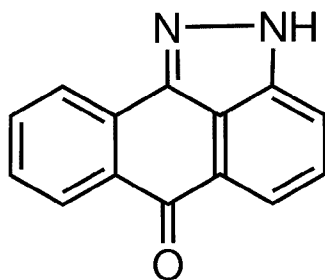
[9]



[10] 본 발명의 다른 목적은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 외상성 뇌손상에 의한 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다:

[11] [화학식 1]

[12]



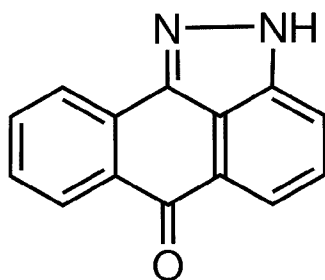
[13]

과제 해결 수단

[14] 본 발명의 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[15] [화학식 1]

[16]



[17]

[18] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 퇴행성 신경질환은 외상성 뇌손상(traumatic brain injury)에 의하여 유도된 것일 수 있다.

[19] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 조성물은 c-Jun 인산화효소(c-Jun N-terminal kinase)의 활성을 억제하는 것일 수 있다.

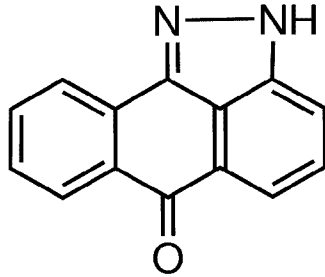
[20] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 조성물은 신경세포의 퇴화 또는 염증반응을 억제하는 것일 수 있다.

[21] 본 발명의 다른 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로

허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 외상성 뇌손상에 의한 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다:

[22] [화학식 1]

[23]



[24]

발명의 효과

[25] 본 발명의 조성물은 c-Jun 인산화효소의 활성을 억제하고, 신경세포의 염증반응 및 베타 아밀로이드 생성을 감소시킬 수 있다.

[26]

도면의 간단한 설명

[27] 도 1은 SP600125 투여에 의한 JNK의 활성 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 확인한 결과를 보여준다.

[28] 도 2는 SP600125 투여 농도에 따른 JNK의 활성 및 APP(amyloid precursor protein) 수준 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 확인한 결과를 보여준다.

[29] 도 3은 SP600125 투여에 의한 JNK의 활성 정도를 외상성 뇌손상 동물모델에서 면역형광염색으로 확인한 결과를 보여준다.

[30] 도 4는 SP600125 투여에 의한 BACE-1(beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1), APP 및 A β (amyloid beta)의 수준 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 확인한 결과를 보여준다.

[31] 도 5는 SP600125 투여에 의한 A β 의 수준 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 면역형광염색으로 확인한 결과를 보여준다.

[32] 도 6은 SP600125 투여에 의한 JNK와 APP의 상호작용 여부를 외상성 뇌손상 동물모델에서 확인한 결과를 보여준다.

[33] 도 7은 SP600125 투여에 의한 A β ₁₋₄₂의 수준 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 확인한 결과를 보여준다.

[34] 도 8은 SP600125 투여에 의한 ADMA17, Neprilysin 및 IDE의 발현 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 확인한 결과를 보여준다.

[35] 도 9는 SP600125 투여에 의한 p-CDK5, pGSK3 β (Ser9), p-Tau(Ser413), p-Tau(Ser404) 및 총 Tau 단백질의 수준 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 확인한 결과를 보여준다.

[36] 도 10은 SP600125 투여에 의한 p-Tau(Ser413)의 수준 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 면역형광염색으로 확인한 결과를 보여준다.

- [37] 도 11은 SP600125 처리에 의한 JNK의 활성화 변화를 뇌 내피세포 세포주에서 확인한 결과를 보여준다.
- [38] 도 12는 SP600125 처리에 의한 APP 및 A β 의 수준 변화를 뇌 내피세포 세포주에서 확인한 결과를 보여준다.
- [39] 도 13은 SP600125 처리 농도에 따른 JNK의 활성화 변화를 뇌 내피세포 세포주에서 확인한 결과를 보여준다.
- [40] 도 14는 SP600125 투여에 의한 혈관뇌장벽 손상 여부, 병변부위 부피 및 뇌 수분 함량 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 측정한 결과를 보여준다.
- [41] 도 15는 SP600125 투여에 의한 claudin-5 및 ZO-1 단백질의 발현 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 확인한 결과를 보여준다.
- [42] 도 16은 SP600125 투여에 의한 claudin-5 및 ZO-1 단백질의 발현 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 시간대별로 확인한 결과를 보여준다.
- [43] 도 17은 SP600125 투여에 의한 절단된 PARP-1, 절단된 caspase-3, Bax 및 Bcl2 단백질의 수준 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 확인한 결과를 보여준다.
- [44] 도 18은 외상성 뇌손상 동물모델에서 SP600125 투여에 의한 절단된 caspase-3의 수준 변화 및 FJB(Fluoro-Jade B) 염색 결과를 보여준다.
- [45] 도 19은 SP600125 투여에 의한 활성산소 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 확인한 결과를 보여준다.
- [46] 도 20은 SP600125 투여에 의한 p-NF- κ B, IL-1 β , TNF- α 및 iNOS의 수준 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 확인한 결과를 보여준다.
- [47] 도 21은 SP600125 투여에 의한 NF- κ B 활성화 및 TNF- α 의 수준 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 시간대별로 확인한 결과를 보여준다.
- [48] 도 22은 SP600125 투여에 의한 IL-1 β 의 수준 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 면역형광염색으로 확인한 결과를 보여준다.
- [49] 도 23은 SP600125 투여에 의한 p-p38, p-ERK1/2 및 p-AKT의 수준 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 확인한 결과를 보여준다.
- [50] 도 24은 SP600125 처리에 의한 p-p38, p-ERK1/2 및 p-AKT의 수준 변화를 뇌 내피세포 세포주에서 시간대별로 확인한 결과를 보여준다.
- [51] 도 25은 SP600125 투여에 의한 PSD-95, SNAP-23 및 SYP의 수준 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 확인한 결과를 보여준다.
- [52] 도 26은 SP600125 투여에 의한 SNAP-23의 수준 변화를 외상성 뇌손상 동물모델에서 면역형광염색으로 확인한 결과를 보여준다.
- [53] 도 27은 SP600125 투여 여부에 따른 외상성 뇌손상 동물모델의 수중미로 실험 결과를 보여준다.
- [54] 도 28은 SP600125 투여 여부에 따른 외상성 뇌손상 동물모델의 플랫폼 도달시간(latency to platform), 수영 속도, 교차 횟수(number of crossing) 및 표적 사분면에서 소모하는 시간(time spent in the target quadrant)을 측정한 결과를 보여준다.

[55] 도 29는 SP600125 투여 여부에 따른 외상성 뇌손상 동물모델의 평행봉 걷기 검사 결과를 보여준다.

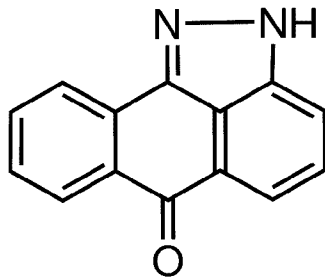
[56]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[57] 본 발명의 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다:

[58] [화학식 1]

[59]



[60]

[61] 본 발명의 일 구체예에 따르면 상기 퇴행성 신경질환은 인지기능 장애, 기억력 손상, 치매, 파킨슨병 및 알츠하이머병으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 외상성 뇌손상(traumatic brain injury)에 의하여 유도될 수 있다.

[62] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면 상기 조성물은 c-Jun 인산화효소(c-Jun N-terminal kinase, JNK)의 활성을 억제할 수 있다. JNK는 c-Jun의 Ser-63 및 Ser-73을 인산화시키는 효소이며, MAPK(mitogen-activated protein kinase) 패밀리에 속한다. 서브도메인 VIII(subdomain VIII)에 위치한 Thr-Pro-Tyr 모티프에서 Thr 및 Tyr 잔기가 인산화됨으로써 활성화되며, 세포 분화(cell proliferation), 유전자 발현 및 세포사멸(apoptosis)과 같은 세포 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 상기 화학식 1의 화합물은 JNK의 인산화를 저해함으로써 JNK의 활성화를 억제할 수 있다.

[63] 본 발명의 일 구체예에 따르면 상기 조성물은 신경세포의 퇴화 또는 염증반응을 억제할 수 있으며, 뇌손상에 의하여 신경세포에서 베타 아밀로이드가 생성되는 것을 저해할 수 있다.

[64] 본 명세서의 용어, "베타 아밀로이드(beta amyloid, A β)"는 아밀로이드 전구 단백질로부터 단백질 분해효소 작용에 의해 생성되는 단백질로, 뇌 조직에 침착되면 뇌세포의 사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다. 대뇌의 신경세포가 변성하여 대량으로 사멸하는 경우 A β 가 축적된 '노인 반점', '신경 원섬유 매듭'이라고 하는 섬유 모양의 구조가 신경세포 내에서 나타나며, 신경세포는 세포사멸 기작에 의해 사멸하는 것으로 알려져 있다.

[65] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될

때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등과 같은 경구 투여용 담체 및 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸-또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). 상기 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 적합한 형태로 제형화 될 수 있다.

[66] 즉, 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있다. 비경구 투여용 제형의 대표적인 것으로는 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는, 이에 한정되지는 않으나, 분말, 과립, 정제, 환약 및 캡슐 등이 있다.

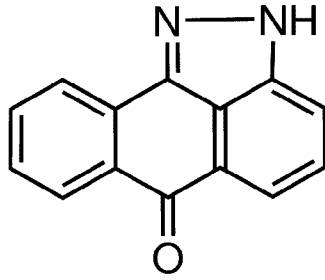
[67] 상기와 같은 방법으로 제형화된 약학적 조성물은 유효량으로 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 상기에서 '유효량'이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 연령, 성별 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으며, 일 구체예에 따르면 비경구 투여의 형태일 때 1 내지 100 mg/kg/day의 유효량으로 투여할 수 있다.

[68]

[69] 본 발명의 다른 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 외상성 뇌손상에 의한 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다:

[70] [화학식 1]

[71]



[72]

[73] 본 발명의 일 구체예에 따르면 상기 건강식품은 상기 화학식 1의 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

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

[75] 본 발명에 따른 화학식 1의 화합물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 화학식 1의 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량으로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[76] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화학식 1의 화합물을 함유하는 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[77] 상기 외에 본 발명의 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을

함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 화합물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[78]

발명의 실시를 위한 형태

[79] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[80]

실험방법

[82] 1. TBI 모델(Traumatic brain injury model)

[83] 8주령의 수컷 C57BL/6J 마우스는 샘타코 바이오(Samtako Bio, 대한민국)에서 구입하여 23°C에서 12시간 명암주기, 습도 60±10% 습도 및 임의 섭식 조건으로 사육하였다. 1주일간의 적응기간을 거친 후, 마우스를 무작위로 4그룹으로 나누었다.

[84]

[85] 1-1. Feeney's 자유 낙하 모델 (Feeney's Weight Drop model)

[86] 기존에 알려진 방법(Feeney et al. 1981; Tian et al. 2012)을 일부 변형시켜 외상성 뇌손상 모델(Traumatic brain injury model; 이하, TBI 모델로 기재함)을 제작하였다. 간략하게, 마우스를 졸레틸(zoletil) 및 롬펀(rompun)으로 마취시켜 뇌 고정장치(stereotaxic)에 고정하고, 세로 방향으로 중간 절개하여 머리뼈를 노출시켰다. 치과용 드릴을 이용하여 5 mm 직경(브레그마(bregma) 후방 1 mm 및 중심선(midline) 측면 2 mm)으로 머리뼈를 원형 절개하였다. 이때 경막(dura)은 손상시키지 않고 남겨두었다. 직경 4 mm의 평면 말단 직경(flat end diameter)을 가지는 50 g 철 막대(steel rod)를 경막 위에 위치한 피스톤(piston)에 낙하시켰다. 표준화된 두부 손상(parietal contusion)을 유도하기 위하여 낙하 높이는 20 cm로 설정하였다. 2 mm의 뇌 변형 깊이(brain deformation depth)를 만들기 위하여, 조직을 최대 4 mm까지 압축할 수 있도록 피스톤을 조정하였다. 머리뼈는 뼈 밀랍(bone wax)으로 봉인하였으며, 피부는 실크 봉합사(silk suture)로 봉합하였다. 대조군 마우스는 두부 손상을 제외하고, 동일한 과정을 진행하였다. 마취에서 깨어날 때까지 열 램프를 이용하여 마우스를 따뜻한 상태에서 회복시켰다. 마취로 인한 활력징후의 변화가 안정될 때까지 15분 내지 20분마다 마우스를 육안으로 모니터하였다.

[87]

[88] 1-2. 반복적인 경도 외상성 뇌손상(Repetitive Mild Traumatic Brain Injury, rmTBI) 모델

[89] 8 내지 10주령의 마우스를 무작위로 2개 그룹으로 나누고, 반복적인 경도

외상성 뇌손상(repetitive mild traumatic brain injury; 이하, rmTBI로 기재함)을 가하거나, 또는 이전에 알려진 방법(J Cereb Blood Flow Metab. 35:443-453.)을 일부 변형시켜 삼 손상(sham injury)을 가하였다. 간략하게, 마우스를 졸레틸과 톨펜으로 마취시킨 후 뇌 고정장치에 고정시키고, 중심선 절개로 머리뼈를 노출시켰다. 마취된 마우스를 비어 있는 가이드 다공 튜브(hollow guided perforated tube) 아래에 놓아 두었다. 이후, 58 g 무게의 물체를 28 cm 높이에서 가이드 다공 튜브를 따라 낙하시켜 머리의 오른쪽 정면에 rmTBI를 유도하였다. 마우스에 4일 동안 3회 rmTBI를 유도하였다. 손상 후, 피부를 봉합하고, 마우스가 완전히 회복될 때까지 따뜻한 상태에서 사육하였다. 회복된 마우스는 케이지로 복귀시켰다. 첫 번째 손상을 유도한 다음날 두 번째 손상을 유도하였다. 두 번째 손상을 유도한 후 1일의 휴식 시간을 주고, 세 번째 손상은 첫 번째 손상을 유도한 후 4일째 되는 날 수행하였다. 삼-손상 마우스는 머리 부상 없이 마취만 실시하였다. 머리 손상 유도는 열 램프로 지속적으로 열을 가하면서 수행하였다. 손상이 유도된 마우스는 실험실에서 신선한 공기에 노출시켰고, 완전히 회복될 때까지 모니터하였다.

- [90] 체외(*in vitro*) TBI 모델을 만들기 위하여, 알려진 방법(Exp Neurol. 237:489-498)에 따라 트랜스액션 모델(transaction model)을 제작하였다. 간략하게, SH-SY5Y를 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)으로 6-웰 플레이트에서 배양하고, 멸균된 파이펫 팁으로 4 mm 간격으로 스크래칭(scratching)하여 9x9 사각 격자(square grid)를 만들었다. 스크래칭 후, 세포를 37°C에서 배양하였다. 세포를 하기 세 그룹으로 나누었다: 무손상 그룹(con), 스크래치 그룹(Scr.Inj), 및 스크래치+SP600125 그룹(Scr.Inj+SP600125). 세포에 SP600125를 처리하여 배양한 후 서로 다른 시간(8, 24 및 36시간)에 세포를 회수하고, 면역블롯을 수행하였다.
- [91] 또한, 뇌 내피세포 세포주(Brain endothelial cells line)인 bEnd.3(ATCC)를 DMEM으로 6-웰 플레이트에서 배양하고, 상기 SH-SY5Y 세포와 동일한 방식으로 스크래칭한 후 세포를 수거하여 면역블롯을 수행하였다.

[92]

[93] **2. SP600125 투여 방법**

- [94] TBI를 유도한 마우스를 하기 두 군으로 나누었다: 개두-자유 낙하 모델(craniotomy-weight drop model=Feeney's 자유 낙하 모델) 및 rmTBI 모델. 개두-자유 낙하 모델 마우스는 하기와 같이 분류하여 투여하였다:
- (1)식염수-투여 대조 그룹; (2)TIB 그룹; (3)TBI+SP600125 (20 mg/kg/i.p./daily); 및 (4)삼 처리 그룹. rmTBI 모델은 하기와 같이 분류하여 투여하였다:
- (1)식염수-투여 대조 그룹; (2)rmTIB 그룹; (3)rmTBI+SP600125 (10 mg/kg/i.p./daily); 및 (4)rmTBI+SP600125 (20 mg/kg/i.p./daily). bEnd.3에는 SP600125 20 uM을 처리하였고, SH-SY5Y에는 서로 다른 농도(10, 20 또는 30 uM)로 처리하였다.

[95]

[96] **3. 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier) 유지 여부 확인**

[97] TIB 마우스의 뇌에서 에반스 블루(Evans blue; 이하, EB로 기재함)의 혈관외유출(extravasation) 여부를 확인하여 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier; 이하, BBB로 기재함)의 투과성(permeability)을 평가하였다(Neuropharmacology, 85:18-26에 개시된 방법을 일부 변형). EB는 0.9% 염화나트륨 용액에 준비하고, TBI 후 24시간이 지난 다음 3 mg/kg 농도의 부피로 마우스의 꼬리에 1분 동안 정맥 주입(40 mg/kg)하였다. 2시간 후, EB 함량을 620 nm에서 측정하였다. 측정 결과는 EB(ng)/순수 뇌 무게(g)로 표시하였다.

[98]

[99] **4. 뇌 수분 함량 (brain water content)**

[100] TBI 이후 24시간이 지난 뒤에 뇌의 부종(edema) 정도를 측정하였다(J Cereb Blood Flow Metab. 25:477-484에 개시된 방법을 일부 변형). 간략하게, 처리군 마우스로부터 뇌를 분리하여 무게를 측정하고, 100°C에서 24시간 동안 건조시켰다. 뇌 무게를 다시 측정하여 뇌의 건조 무게를 확인하고, 뇌의 수분 함량을 하기 수학적 식 1에 따라 계산하였다.

[101]

[102] [수학적 식 1]

[103]
$$\text{뇌 수분 함량(\%)} = \{ \text{뇌의 습윤 무게(wet weight)} - \text{뇌의 건조 무게(dry weight)} \} / \text{뇌의 습윤 무게} \times 100$$

[104]

[105] **5. 평행봉 걷기 검사**

[106] 운동 협응(motor coordination) 및 기능을 확인하기 위하여, TBI 마우스에 대한 평행봉 걷기 검사(beam walking test; 이하, BWT로 기재함)를 수행하였다. BWT는 손상된 동물과 sham 동물 사이에서 정교한 운동 협응 차이를 구분하는 방법이다. 손상된 동물은 열린 공간에서 도망치기 위하여 좁은 평행봉을 걸어 평행봉 반대편의 검정 박스로 들어가는 경향이 있으므로, 검정 박스에 들어가는 시간을 기록하였다. 동물들은 TBI 2시간 전과 TBI 이후 1, 3 및 7일에 3회 검사를 수행하였다.

[107]

[108] **6. 모리스 수중 미로 실험**

[109] TBI-손상 마우스의 인지 능력(cognitive ability) 저하에 대한 SP600125의 효과를 모리스 수중 미로 실험(Morris water maze test; 이하, MWM으로 기재함)으로 분석하였다. MWM 장치는 물이 채워진 원형 탱크이며, 물에 흰색 잉크를 풀어 물을 불투명하게 만들었다. 탱크의 사분 면중 하나에는 물 표면 1 cm 아래에 플랫폼(10 cm 직경)이 숨겨져 있다. 각 실험마다, 60초 동안 마우스가 숨겨진 플랫폼을 발견하도록 하고, 60초 이내에 플랫폼에 도달하지 못하면,

플랫폼을 발견할 수 있도록 가이드하여 30초 동안 플랫폼에서 머무르도록 하였다. 각 마우스들은 4일 연속으로 학습 시험(traing trial)을 4번 받았다. 각 실험마다, 각 마우스의 회피 지연 및 수영 속도를 계산하였다. 다음날, 공간 기억력(spatial memory)을 확인하기 위하여 플랫폼을 제거한 후 프로브 테스트(probe test)를 수행하였다. 프로브 시험(Probe trial)을 위해서, 플랫폼 위치에 도달하는 시간(latency to the platform location), 교차 횟수(the number of crossings), 수영 속도, 및 표적 사분면에 도달하는 시간(time spent in the target quadrant)을 기록하였다. 실험 결과는 비디오 트랙킹 시스템(SMART, Panlab Harvard Apparatus, Bioscience Company)을 이용하여 기록하였다.

[110]

[111] **7. 단백질 추출**

[112] 실험 종료 후, 마우스를 마취하여 희생시킨 후 뇌를 분리하였다. 동측 피질(ipsilateral cortex)과 해마(hippocampus) 영역을 조심스럽게 절개하여, -80°C에 보관하였다. 해마와 피질의 조직은 pro-prep extraction solution(iNtRON Biotechnology; 대한민국)을 이용하여 균질화한 후 원심분리하였다. 단백질은 -80°C에 보관하고, 추후 면역블롯팅 (immunoblotting)을 수행하였다.

[113]

[114] **8. A β_{1-42} ELISA 분석**

[115] 피질과 해마 균질액에서의 A β_{1-42} 수준은 모든 4개 그룹에서 3일 및 5일에 분석하였다. A β_{1-42} 수준은 Sandwich ELISA kit (Cat#: KHB3442; Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 분석하였다.

[116]

[117] **9. 염증 마커(inflammatory marker) 확인**

[118] TBI 이후 3일 및 7일 되는 날에 모든 4그룹의 실험동물에서 피질 균질액의 염증반응 마커를 확인하였다. NF- κ B와 TNF α 수준은 Cat #: KHO037(Thermo Fisher Scientific, 미국) 및 Cat #: DY410(R&D Systems, 미국) 키트를 이용하여 측정하였다.

[119]

[120] **10. 웨스턴 블롯 분석 (Western blot analysis)**

[121] 단백질 발현 수준을 확인하기 위하여 웨스턴을 수행하였다. 간략하게, Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories)로 피질과 해마에서 분리한 단백질의 농도를 측정하였다. 동일한 양의 단백질을 10% SDS 폴리아크릴아미드 젤 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis)으로 분리하고, PVDF 막으로 트랜스퍼하였다. 이후 비특이적 결합을 줄이기 위하여 막을 5%(w/v) 스킵 밀크로 블로킹하고, 1차 항체와 4에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후 막을 세척하고, 2차 항체와 반응시킨 후 ECL chemiluminescence system(Atto Corporation Tokyo, 일본)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 단백질 밴드를 확인하였다. 모든 블롯은 베타 액틴 항체를 이용하여

정규화(normalization)하였다. 사용한 1차 항체를 하기 표 1에 기재하였으며, I.F는 면역형광(immunofluorescence)의 약자이고, W.B는 웨스턴 블롯(Western blot)의 약자이다.

[122]

[123] [표 1]

Antibody	Host	Application	Source
A β ₁₋₄₂	Mouse	I.F/W.B	Santa Cruz Biotechnology
BACE1	Rabbit	W.B	Santa Cruz Biotechnology
p-JNK	Mouse	I.F/W.B	Santa Cruz Biotechnology
APP	Rabbit	I.F/W.B	Millipore USA
Neprilysin	Rabbit	W.B	Santa Cruz Biotechnology
IDE	Goat	W.B	Santa Cruz Biotechnology
p-CDK5	Goat	W.B	Santa Cruz Biotechnology
p-GSK3 β (Ser9)	Goat	W.B	Santa Cruz Biotechnology
p-Tau (Ser413)	Rabbit	I.F/W.B	Santa Cruz Biotechnology
p-Tau (Ser404)	Goat	W.B	Santa Cruz Biotechnology
Total Tau	Rabbit	W.B	ABCAM
ADAM17	Rabbit	W.B	Santa Cruz Biotechnology
PARP-1	Mouse	W.B	Santa Cruz Biotechnology
Cloudin-5	Rabbit	W.B	Santa Cruz Biotechnology
ZO-1	Rabbit	W.B	Santa Cruz Biotechnology
TNF- α	Mouse	W.B	Santa Cruz Biotechnology
Caspase-3	Mouse	I.F/W.B	Santa Cruz Biotechnology
Bax	Rabbit	W.B	Santa Cruz Biotechnology
p-NF- κ B	Mouse	W.B	Santa Cruz Biotechnology
IL1- β	Rabbit	I.F/W.B	Santa Cruz Biotechnology
Synaptophysin	Mouse	W.B	Santa Cruz Biotechnology
SNAP23	Rabbit	I.F/W.B	Santa Cruz Biotechnology
PSD95	Mouse	W.B	Santa Cruz Biotechnology
p-38MAPK	Rabbit	W.B	Santa Cruz Biotechnology
p-ERK1/2Thr202/Tyr204	Rabbit	W.B	Cell signaling
p-AKT(413)	Rabbit	W.B	Santa Cruz Biotechnology
β -Actin	Mouse	W.B	Santa Cruz Biotechnology

[124]

[125] **11. 조직 수집 및 샘플 준비**

[126] 뇌 섹션(brain section) 염색을 위하여, 마우스(n=5)를 마취시키고, 식염수(saline)로 경심관류(transcardial perfusion)를 시행한 후 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정시켰다. 마우스로부터 뇌를 분리하여 20% 수크로스 용액으로 48시간 동안 후고정(postfix)시키고, OCT 컴파운드(OCT compound)로 동결시켰다. Vibratome(Leica, 독일)을 이용하여 14 μm 두께로 뇌를 섹션하고, probe-on plus charged slides (Fisher)에 마운트한 후 -80°C에 보관하였다.

[127]

[128] **12. 뇌 병변 부위(brain lesion) 부피 측정**

[129] 뇌 섹션 슬라이드를 크레실 바이올렛(cresyl violet)으로 염색하여 이미지를 확인하였다. 마우스 뇌의 손상 부위와 SP600125를 처리한 뇌 손상 부위의 디지털 이미지를 촬영한 후 ImageJ software로 분석하였다. TBI 마우스의 손상 부위와 SP600125를 처리한 손상 부위를 추적한 후, 동측 반구 면적(ipsilateral hemispheres area)의 합에 섹션 사이의 거리를 곱하여 병변 부위의 부피를 계산하였다.

[130]

[131] **13. 면역형광 염색 (Immunofluorescence Staining)**

[132] 해마 및 피질 조직을 포함하는 슬라이드를 선택하여 면역형광 염색을 수행하였다. 슬라이드를 하룻밤 동안 실온에서 건조시킨 후 PBS(0.01 mM)로 8 내지 10분씩 2회 세척하였다. 슬라이드를 proteinase K와 5분 동안 반응시키고, PBS(0.01 mM)로 세척한 후 2% 정상 혈청(goat/rabbit normal serum; in PBS containing 0.1% Triton X-100)으로 블로킹하였다. 슬라이드를 1차 항체와 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰으며, 1차 항체는 anti-p-JNK, anti-A β (B-4), anti-p-Tau(Ser413), anticaspase-3, 및 anti-SNAP23 (Santa Cruz Biotechnology)과 anti-APP(Millipore)를 이용하였다. 이후 슬라이드를 tetramethylrhodamine isothiocyanate-fluorescein isothiocyanate(FITC)-결합 2차 항체 (anti-goat, anti-rabbit 및 anti-mouse)와 실온에서 90분 동안 반응시켰다. 마운팅 용액(mounting medium)를 이용하여 슬라이드 위에 커버슬립(cover slip)을 덮고, 공초점레이저주사현미경(confocal laser-scanning microscope; FluoView FV 1000 MPE)으로 염색 이미지를 확인하였다.

[133]

[134] **14. 세포 내 ROS 측정**

[135] 뇌 피질의 ROS(reactive oxygen species) 수준은 당 업계에 알려진 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA) 분석법(Mol Neurobiol. 54:255-271)을 일부 변형하여 이용하였다.

[136]

[137] **15. Fluoro-Jade B 염색**

[138] Fluoro-Jade B(FJB; cat# AG310, Millipore) 염색은 제조사의 프로토콜에 따라

수행하였다. 슬라이드를 실온에서 건조시킨 후 1% 수산화나트륨(sodium hydroxide) 용액 및 80% 에탄올 용액에 4분 내지 5분 동안 담갔다. 이후 슬라이드를 70% 에탄올로 세척하고, 증류수(distilled water, DW)로 2분 내지 3분 동안 행구었다. 슬라이드를 0.06% 염화마그네슘($MgCl_2$) 용액으로 옮겨 10분 동안 담근 후 증류수로 씻어내고, 0.1% 아세트산 및 0.01% FJB를 포함하는 용액에 20분 동안 담궈 염색하였다. 슬라이드를 자일렌(xylene)으로 5분 동안 세척하고, DPX 마운팅 용액을 이용하여 슬라이드에 글래스 커버슬립을 덮었다. 및 DAPI 용액을 마운팅하였다. 공초점레이저주사현미경으로 염색 이미지를 확인하였다.

[139]

[140] **16. 통계 분석**

[141] 면역블롯 밴드는 스캔한 후 Sigma gel software(SPSS Inc.)를 이용하여 텐시토메트리(densitometry)로 분석하였다. 면역조직학적 분석은 ImageJ software(미국 국립보건원에서 제공하는 공개 소프트웨어)를 이용하였고, 실험 결과는 평균±표준 평균 오차(standard error mean, SEM) 수치로 표시하였다. 실험 결과는 Prism 5(graph Pad Software, 미국)를 이용하여 일원 분산 분석(one-way analysis of variance, ANOVA)과 Student's t-test로 분석하였다. 결과값이 $p < 0.05$ 인 경우 유의한 결과로 판단하였다. 기호 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 및 *** $P < 0.01$ 은 대조군과 TBI군 사이에 유의한 차이가 있는 것을 의미하며, 기호 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 및 ### $P < 0.01$ 은 TBI군과 TBI+SP600125군 사이에 유의한 차이가 있는 것을 나타낸다.

[142]

[143] **실험결과**[144] **1. SP600125 투여에 의한 JNK의 인산화 억제**

[145] TBI 마우스의 뇌 균질액에서 웨스턴 블롯으로 활성화된 JNK(active JNK)를 확인하였다.

[146] 확인 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 식염수를 처리한 대조군 마우스에 비해 TBI 자유 낙하 모델 마우스의 동측 피질과 해마에서는 인산화된 JNK(이하, p-JNK로 기재함)의 수준이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, SP600125 10 mg/kg 투여한 마우스는 JNK 단백질 수준이 31% 정도 감소하였고, 20 mg/kg 투여한 마우스에서는 52% 감소한 것을 확인할 수 있었다. SP600125만을 단독 투여한 경우 마우스의 뇌에서 독성 효과를 확인할 수 없었다.

[147] 도 2에 나타난 바와 같이 rmTBI 마우스에서도 유사한 결과를 확인할 수 있었으며, SP600125 투여 농도에 의존적으로 p-JNK의 수준이 감소하는 것을 알 수 있었다.

[148] 또한, 면역형광 염색 결과 도 3에 나타난 바와 같이 TBI 마우스는 해마의 치상핵(dentate gyrus, DG)과 암몬각(cornu ammoni, CA)에서 p-JNK의 수준이 증가하나, SP600125를 투여한 경우 p-JNK 수준이 유의하게 감소하였다.

[149]

[150] **2. SP600125 투여에 의한 APP 및 A β 생성 감소**

[151] TBI 마우스 뇌의 피질 및 해마에서 JNK 저해에 의하여 APP와 A β 의 수준이 변하는지 확인하였다. 웨스턴 블롯 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 TBI 마우스 뇌의 피질 및 해마에서는 APP의 발현이 증가하고, A β 가 축적되는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 2에 나타난 바와 같이 rmTBI 마우스에서도 APP와 A β 수준이 증가하는 것을 알 수 있었다.

[152] 그러나 TBI 마우스 및 rmTBI 마우스 모두에서 SP600125를 투여한 군은 APP와 A β 수준이 유의하게 감소하였다. 도 5에 나타난 바와 같이 면역형광 염색을 통해서도 TBI 마우스의 피질 및 해마에서 APP 및 A β 의 수준이 증가하나, SP600125 투여에 의하여 감소되는 것을 알 수 있었다.

[153] 또한, A β_{1-42} 수준을 TBI 이후 3일, 7일 되는 날에 측정한 결과 도 7에 나타난 바와 같이 TBI 마우스에서 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었으며, SP600125 투여에 의하여 감소되는 것을 알 수 있었다. 식염수 투여군과 SP600125 투여군 사이에 유의미한 차이는 없었다.

[154] 또한, JNK와 APP의 상호작용(interaction) 여부를 TBI 이후 7일 되는 날 피질에서 확인한 결과 도 6에 나타난 바와 같이 서로 상호작용하지 않는 것을 알 수 있었다.

[155]

[156] **3. SP600125 투여에 의한 세크레타제(secretase) 발현 변화**

[157] TBI 마우스의 뇌에서 일부 세크레타제의 발현 이상(J Neural Transm (Vienna). 111:523-536)이 알려져 있기 때문에 SP600125 투여에 의한 세크레타제의 발현 변화를 확인하였다.

[158] 확인 결과, 도 4 및 도 8에 나타난 바와 같이 TBI 마우스의 경우 β -세크레타제(beta-secretase1, beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1, BACE1)의 발현이 증가하였고, α -세크레타제(ADAM metalloproteinase domain 17, ADAM17)의 발현은 감소되어 있었다.

[159] 그러나 도 4 및 도 8에 나타난 바와 같이 SP600125 투여에 의하여 상기 발현 변화는 반전되었다.

[160] 또한, A β 를 분해하는 것으로 알려진 insulin degrading enzyme (IDE)와 NEP의 발현을 확인한 결과, 실험군 사이에 유의미한 차이가 없는 것을 알 수 있었다.

[161] 상기 실험 결과를 통하여 A β 의 분해에는 변화가 없으나 TBI 마우스의 경우 아밀로이드 경로가 활성화되고, 비아밀로이드 경로는 억제되어 A β 생성이 증가하고, SP600125를 투여하면 비아밀로이드 경로가 활성화되고, 아밀로이드 경로는 억제되어 A β 생성이 감소됨을 유추할 수 있다.

[162]

[163] **4. SP600125 투여에 의한 타우 인산화 감소**

[164] 타우(tau) 단백질의 인산화(Ser413 및 Ser404)를 확인한 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 대조군(식염수 투여군)과 비교하여 TBI 마우스에서 타우 인산화가

증가한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 SP600125 투여에 의하여 인산화는 감소하였다.

[165] 또한, 타우 인산화에 관여하는 GSK3 β (glycogen synthase kinase-3b)와 CDK5(cyclin dependent kinase 5)의 인산화 수준을 확인한 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 TBI 마우스 뇌 피질에서 GSK3 β 의 인산화가 증가되어 있는 것을 알 수 있었다. 그러나 SP600125 투여에 의하여 인산화는 감소하였다. 다만 CDK5의 변화는 확인할 수 없었다.

[166] 면역형광 염색을 통해서도 상기 웨스턴 블롯과 유사한 결과를 확인할 수 있었다(도 10). 상기 실험 결과를 통하여 SP600125가 타우 인산화를 저해하여 아밀로이드 생성 경로를 억제함을 유추할 수 있다.

[167]

[168] **5. SP600125 처리에 의한 아밀로이드 생성 경로 억제**

[169] SH-SY5Y 세포에서 스크래치 손상(scratch injury) 8, 24 및 36시간 후에 p-JNK, APP 및 A β 의 발현이 증가하는지 여부를 확인하였다.

[170] 확인 결과, 도 11 및 도 12에 나타난 바와 같이 스크래치 손상 24시간 후에 p-JNK, APP 및 A β 의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 발현 증가는 SP600125 처리(20 μ M)에 의하여 감소하는 것을 알 수 있었다. 상기 실험 결과를 통하여, 신경 손상이 JNK 및 아밀로이드 경로를 활성화시키는 스트레스를 유도함을 유추할 수 있다.

[171] 또한, 서로 다른 농도(10, 20 및 30 μ M)의 SP600125를 처리하고, 24시간 후에 JNK의 활성 억제 수준을 확인한 결과 도 13에 나타난 바와 같이 20 및 30 μ M 농도에서 JNK의 활성이 유의하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[172]

[173] **6.SP600125 투여에 의한 뇌혈관 장벽 및 뇌 병변 부위 변화**

[174] 도 14A에 나타난 바와 같이 EB(Evans blue) 함량은 TBI 마우스의 뇌에서 현저하게 증가하였다. 그러나, SP600125 투여에 의하여 상기 증상은 반전되었다.

[175] 또한, 병변 부위(Lesion volume was)의 부피를 크레실 바이올렛 염색으로 확인한 결과, 도 14B에 나타난 바와 같이 SP600125 투여에 의하여 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[176] 또한, TBI 마우스의 피질에서 BBB 붕괴 마커인 claudin-5 및 ZO-1의 발현 수준을 웨스턴으로 확인하였다. 도 15에 나타난 바와 같이 TBI 마우스에서는 발현이 감소되나, SP600125 투여에 의하여 대조군 수준까지 발현이 회복되는 것을 확인할 수 있었다.

[177] 또한, bEnd.3 세포에서 신경 손상이 BBB 붕괴에 직접적인 영향을 미치는지 확인하였다. 서로 다른 시간에 claudin-5 및 ZO-1의 발현 수준을 확인한 결과, 발현에 차이가 없는 것을 확인할 수 있었다. 본 실험 결과를 통하여 TBI-유도에 의한 신경염증(neuroinflammation)으로 인하여 BBB가 붕괴된다는 것을 유추할 수 있으며, JNK 의존성 기작을 통하여 신경염증을 억제함으로써 BBB 붕괴를

역전시킬 수 있음을 알 수 있다.

[178]

[179] **7. SP600125 투여에 의한 외상 후 뇌 부종(posttraumatic Brain Edema) 형성 변화**

[180] TBI 후 24시간 뒤에 뇌 부종 형성 정도를 분석하였다. 그 결과, 도 14C에 나타난 바와 같이 TBI 마우스와 비교하여 SP600125를 투여한 마우스에서 뇌 수분 함량이 유의하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 대조군과 SP600125만 투여한 마우스 사이에서는 뇌 수분 함량에 유의미한 차이를 발견할 수 없었다.

[181]

[182] **8.SP600125 투여에 의한 세포사멸성 신경퇴화(apoptotic degeneration) 변화**

[183] 웨스턴 블롯 결과, 도 17에 나타난 바와 같이 세포사멸 마커인 절단된 카스파제-3(cleaved caspase-3), Bax 및 PARP(DNA 손상 마커)의 발현이 증가하고, Bcl2의 발현은 감소된 것을 확인할 수 있었다. 이러한 발현 변화는 SP600125 투여에 의하여 반전되어 세포사멸 마커의 작용이 억제된 것을 알 수 있었다.

[184] 또한, 도 18에 나타난 바와 같이 면역형광 염색을 통해서도 SP600125 투여에 의하여 절단된 카스파제-3의 발현이 감소된 것을 확인할 수 있었다. TBI 피질에서는 FJB-양성 세포가 증가하였으나, SP600125를 투여한 경우 FJB-양성 세포의 수가 감소하였다.

[185]

[186] **9. SP600125 투여에 의한 산화적 스트레스 감소**

[187] TBI 이후 7일에 뇌 피질에서 ROS(reactive oxygen species) 생성 정도를 확인하였다.

[188] 확인 결과, 도 19에 나타난 바와 같이 TBI 피질에서는 ROS 생성이 증가하였으나, SP600125 투여에 의하여 ROS 생성이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 본 실험 결과는 JNK를 억제함으로써 TBI 뇌에서 ROS-유도성 신경퇴화를 억제할 수 있음을 의미한다.

[189]

[190] **10. SP600125 투여에 의한 염증성 매개체(Inammatory Mediators) 저해**

[191] TBI 마우스 뇌의 피질에서 웨스턴 블롯으로 염증 반응 관련 마커의 발현을 확인하였다.

[192] 확인 결과, 도 20에 나타난 바와 같이 식염수만 투여한 대조군 마우스와 비교하여 TBI 마우스 뇌의 피질에서는 염증 마커인 p-NF- κ B, TNF- α , IL-1 β 및 iNOS(inducible nitric oxide synthase)의 발현이 증가되어 있는 것을 알 수 있었다. 상기 발현 증가는 SP600125 투여에 의하여 유의하게 감소하였다.

[193] 또한, NF- κ B p65 및 TNF- α 와 같은 염증 반응 매개체들의 수준을 TBI 마우스 뇌의 동측 피질에서 확인하였다. 그 결과, 도 21에 나타난 바와 같이 현저하게 증가된 것을 확인할 수 있었으며, SP600125 투여에 의하여 감소하는 것을 알 수 있었다.

- [194] 또한, 도 22에 나타난 바와 같이 TBI 마우스 뇌의 피질에서 IL-1 β 의 수준이 증가되어 있는 것을 알 수 있었으며, 이러한 증가는 SP600125 투여에 의하여 반전되었다.
- [195] 상기 실험 결과들을 통하여 SP600125가 손상된 뇌 피질에서 발생하는 염증 반응을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있다.
- [196]
- [197] **11.SP600125 투여에 의한 P-p38, p-Akt 및 p-Erk1/2 수준 변화**
- [198] TBI 마우스 뇌의 피질과 SH-SY5Y 세포에서 p38, ERK 및 AKT의 인산화 수준을 확인하였다.
- [199] 확인 결과, 도 23에 나타난 바와 같이 TBI 마우스 뇌의 피질에서 p38의 인산화(P-p38)가 증가된 것을 알 수 있었으며, SP600125 투여에 의하여 반전되는 것을 확인할 수 있었다.
- [200] 반면, 도 23에 나타난 바와 같이 TBI 마우스 뇌의 피질에서 p-ERK1/2 및 p-AKT(ser413) 수준은 감소하였으며, SP600125 투여에 의하여 인산화 수준이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [201] 또한, 도 24에 나타난 바와 같이 SH-SY5Y 세포에서도 유사한 결과를 확인할 수 있었다.
- [202]
- [203] **12.SP600125 투여에 의한 시냅스 단백질 손실(Synaptic Protein Loss) 억제**
- [204] TBI 마우스 뇌의 피질에서 시냅스 마커(synaptic marker)를 웨스턴 블롯 및 공초점현미경으로 확인하였다.
- [205] 확인 결과, 도 25에 개시된 바와 같이 TBI 마우스 뇌의 피질에서 SNAP23, SNAP-25 및 시냅토파이신(synaptophysin)의 수준이 현저하게 감소되어 있는 것을 알 수 있었다. 그러나 SP600125 투여에 의하여 상기 단백질의 수준은 대조군과 유사한 수준으로 회복되었다. 도 26에 나타난 바와 같이 형광염색 결과를 통해서도 유사한 결과를 확인할 수 있었다.
- [206]
- [207] **13.SP600125 투여에 의한 운동 능력 및 기억력 손상 개선**
- [208] 뇌 손상 전과 뇌 손상 후 1, 3 및 7일에 평행봉 걷기 검사를 수행하였다.
- [209] 그 결과, 도 29에 나타난 바와 같이 SP600125 투여군은 TBI 이후 손상되었던 운동 능력이 개선된 것을 확인할 수 있었다.
- [210] 또한, 모리스 미로 실험 결과 도 27에 나타난 바와 같이 TBI 마우스는 학습 기간 동안 식염수-투여 대조군 마우스보다 긴 회피 시간(escape latency; 숨겨진 플랫폼에 도달하는 시간)을 나타내어 공간 학습(spatial learning) 능력이 손상된 것을 알 수 있었다. 그러나 SP600125 투여군은 회피 시간이 감소하여 공간 학습 능력이 개선된 것을 확인할 수 있었다.
- [211] 또한, 도 28에 나타난 바와 같이 5일째에 프로브 트라이얼을 실시한 결과 TBI 마우스는 회피 시간이 증가하나, SP600125 투여군은 회피 시간이 감소하는 것을

알 수 있었다. 아울러, SP600125 투여군은 평균 수영 속도, 표적 사분면에서 머무르는 시간 및 사분면 교차 횟수가 증가하여 운동 능력 및 기억력이 개선된 것을 알 수 있었다.

[212] TBI 없이 SP600125만 투여한 그룹은 대조군과 유의미한 차이를 나타내지 않아 SP600125 자체는 학습 및 기억력에 직접적인 영향을 미치지 않는 것을 알 수 있었다.

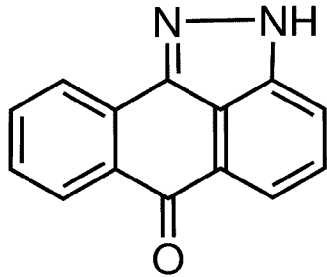
[213]

[214] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



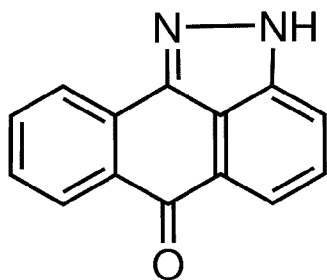
[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 외상성 뇌손상(traumatic brain injury)에 의하여 유도된 것인 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 c-Jun 인산화효소(c-Jun N-terminal kinase)의 활성을 억제하는 것인 조성물.

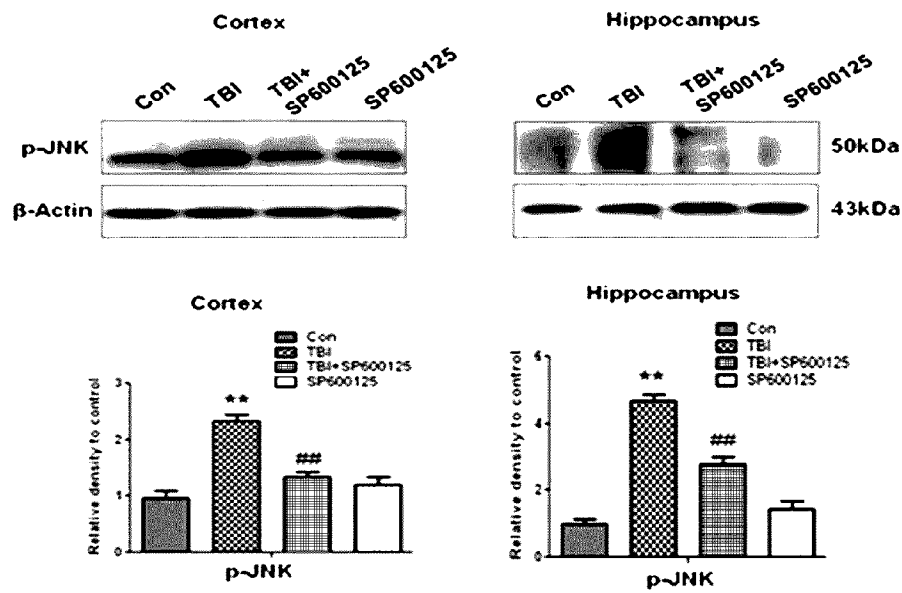
[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 신경세포의 퇴화 또는 염증반응을 억제하는 것인 조성물.

[청구항 5] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는, 외상성 뇌손상에 의한 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품:

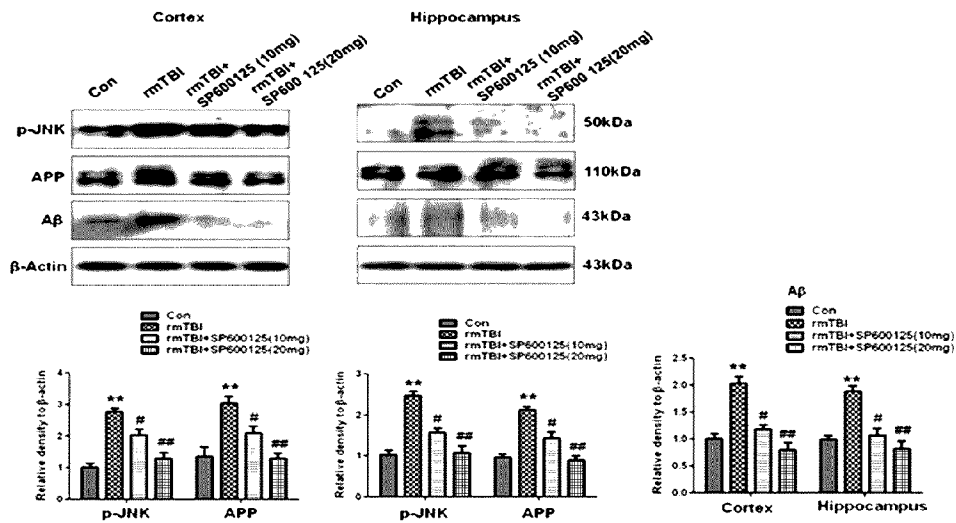
[화학식 1]



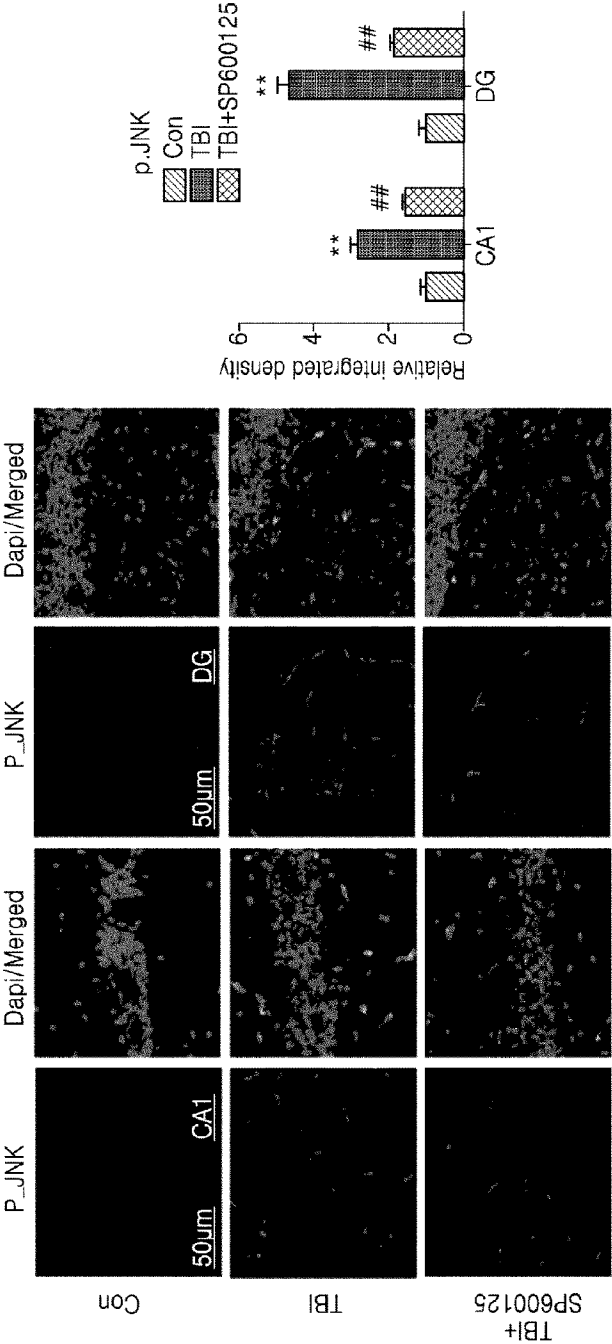
[도1]



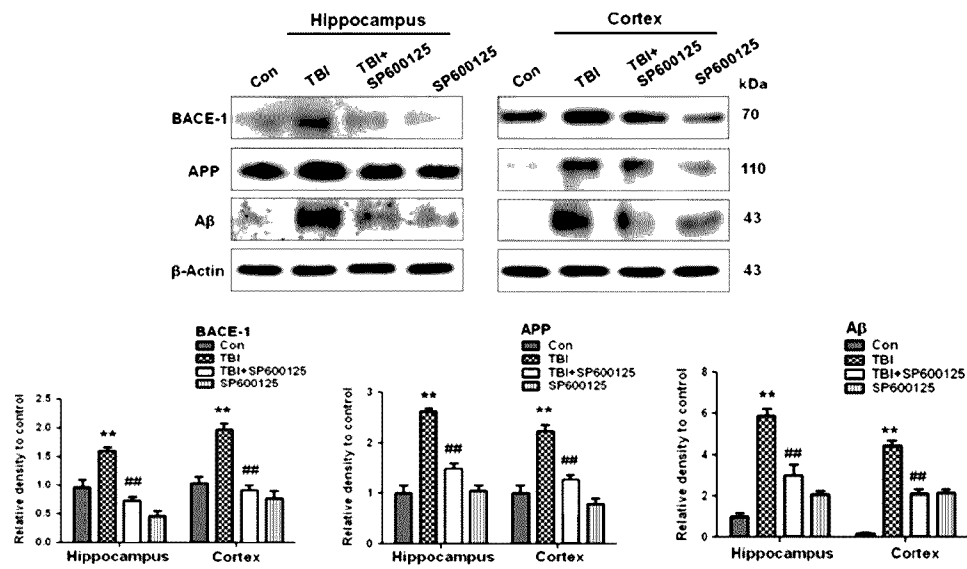
[도2]



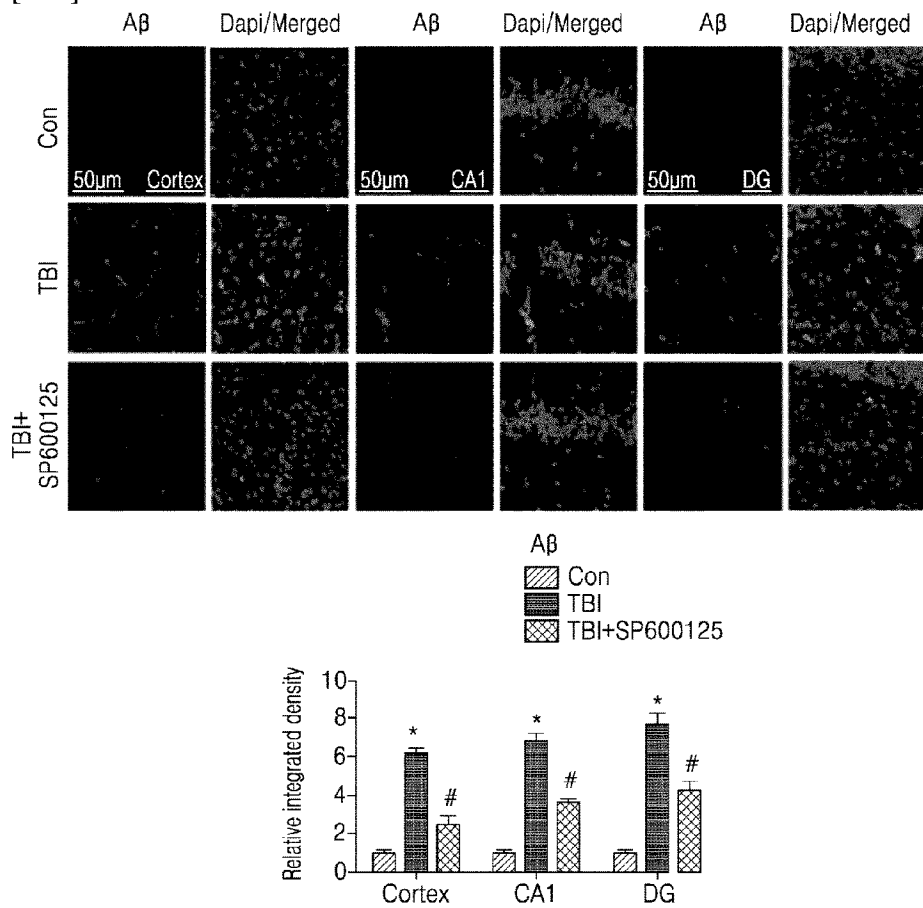
[도3]



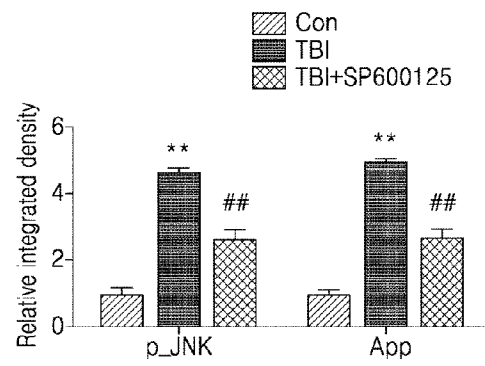
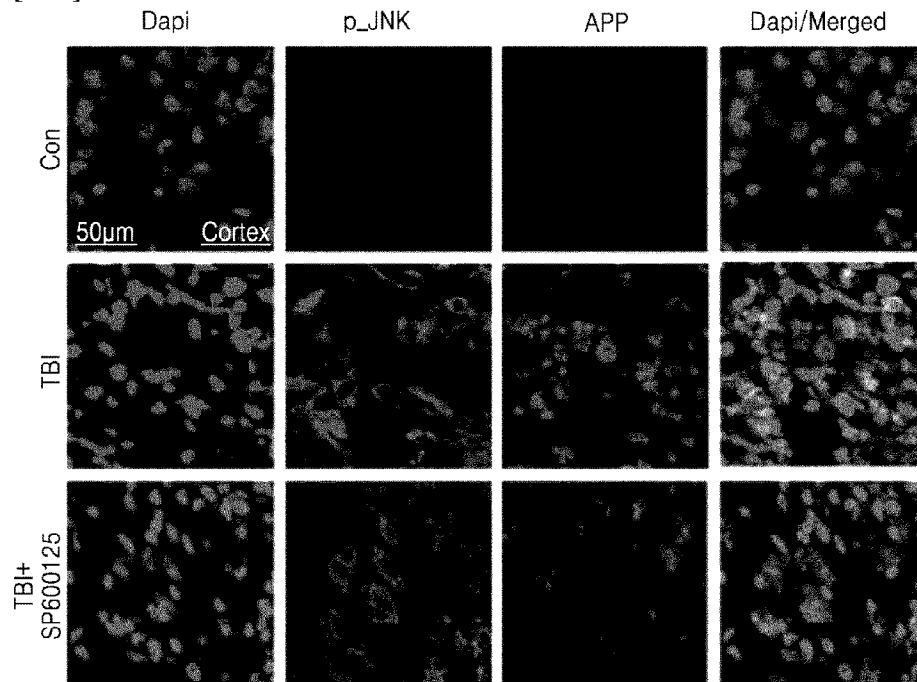
[도4]



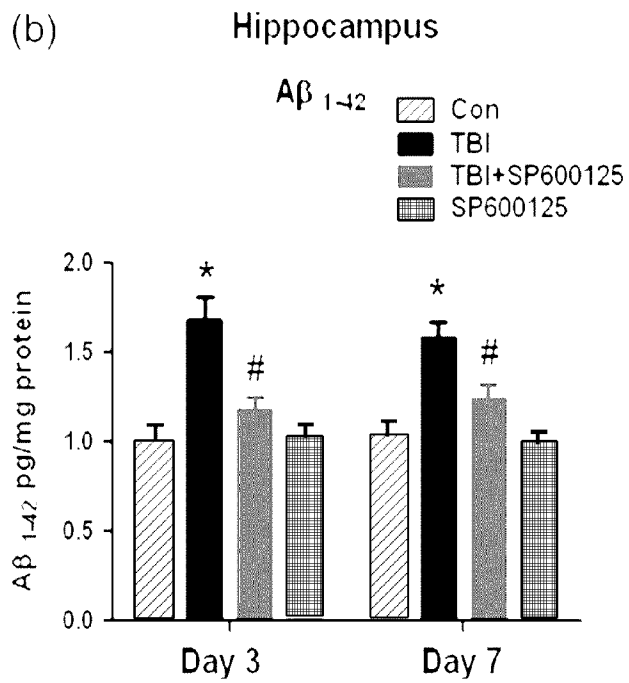
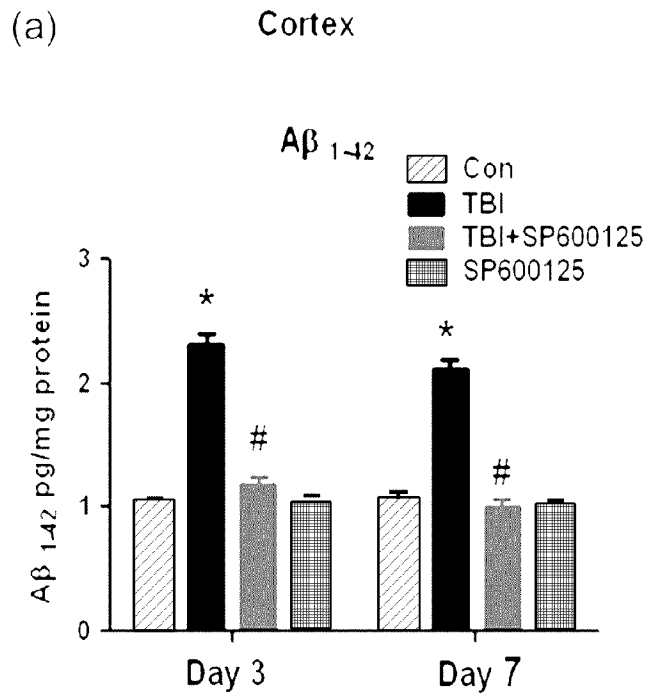
[도5]



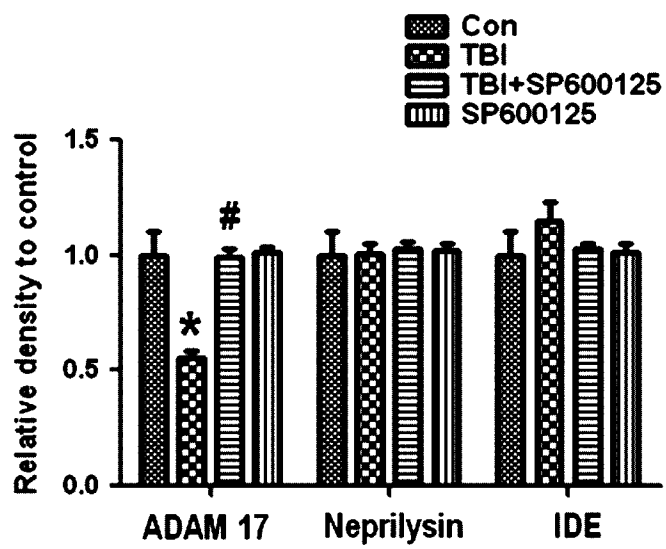
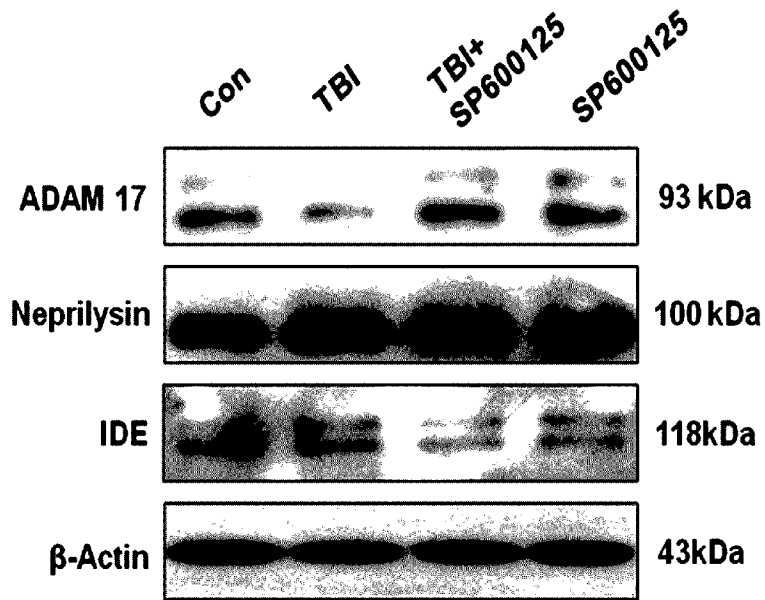
[도6]



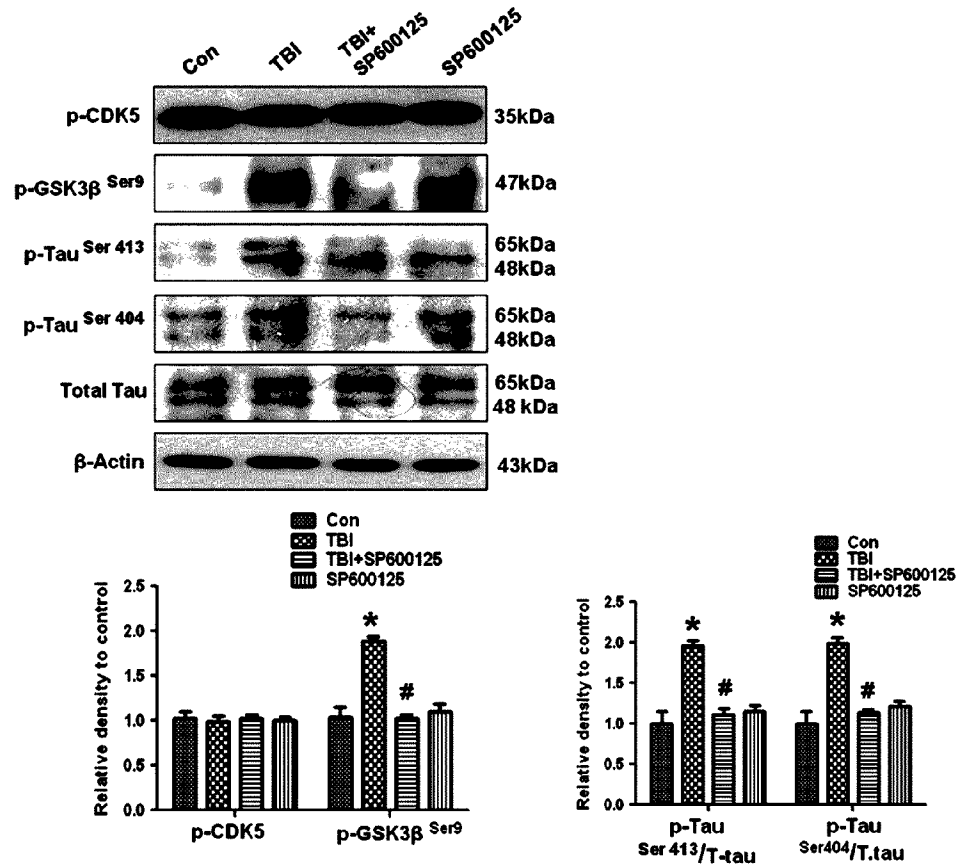
[도7]



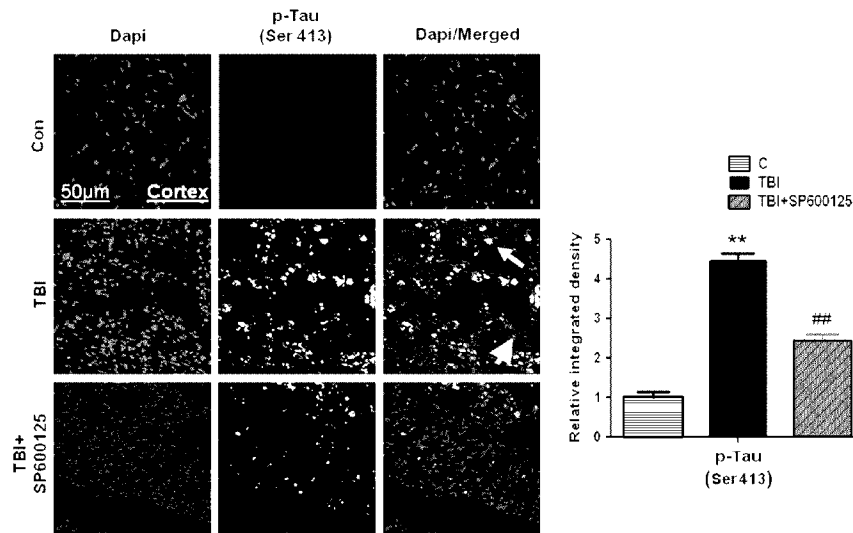
[도8]



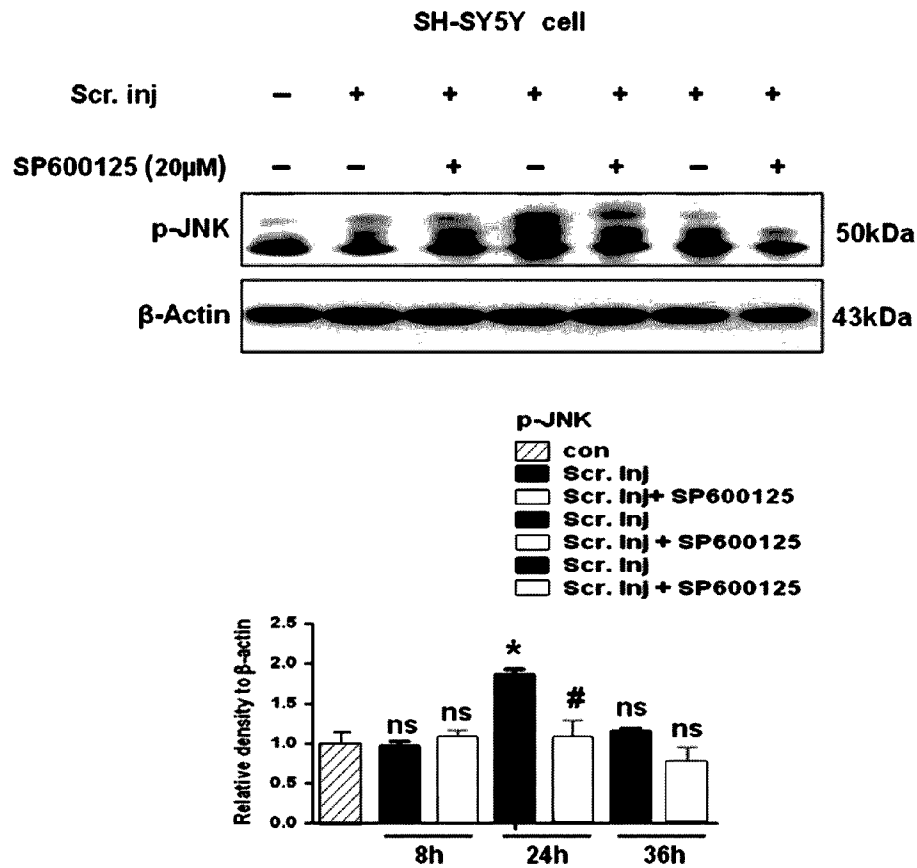
[도9]



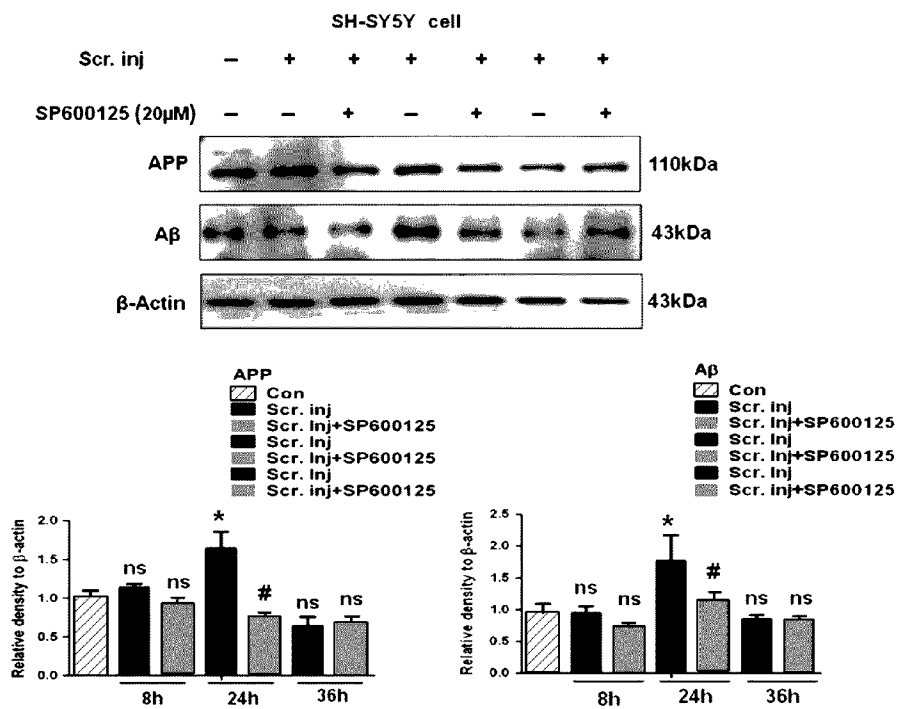
[도10]



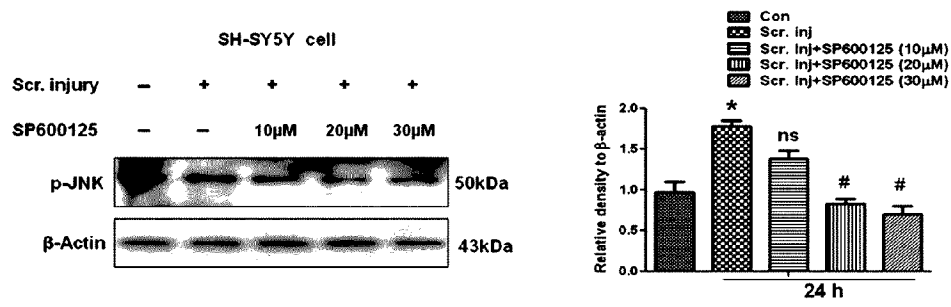
[도11]



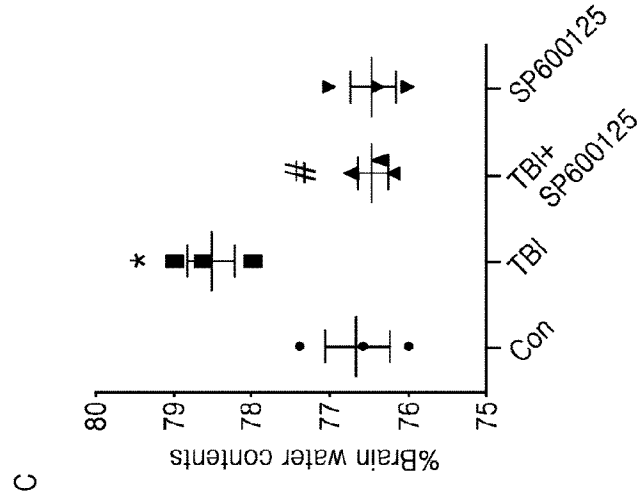
[도12]



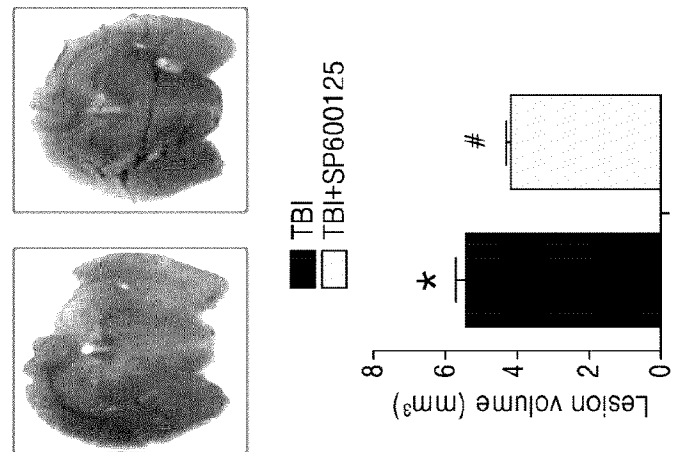
[도13]



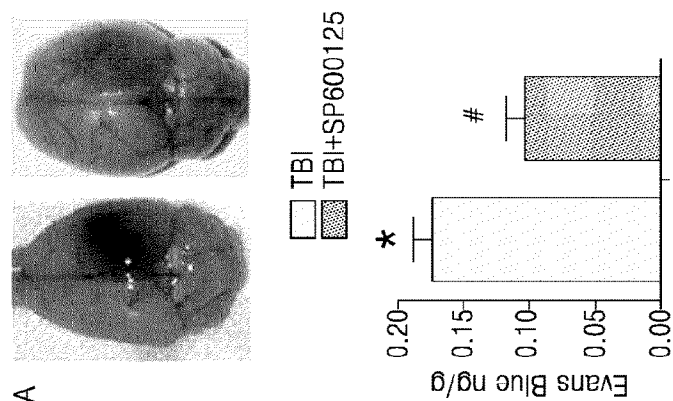
[도14]



C

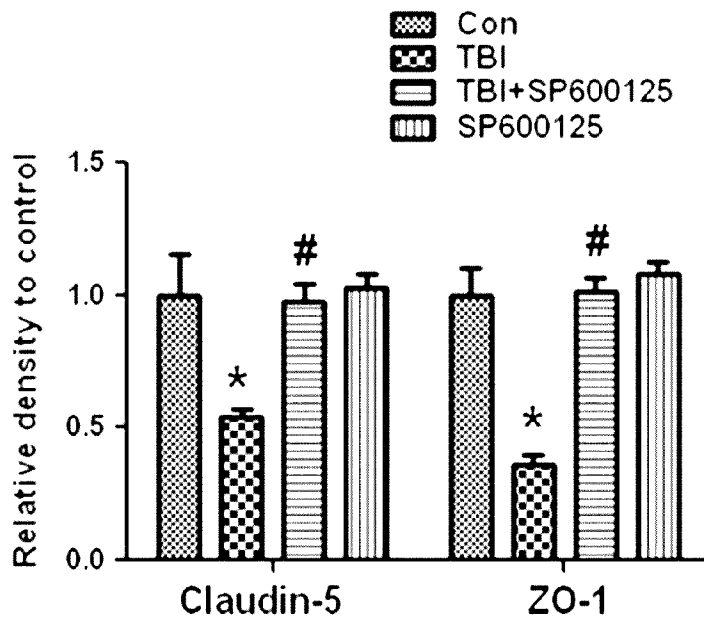
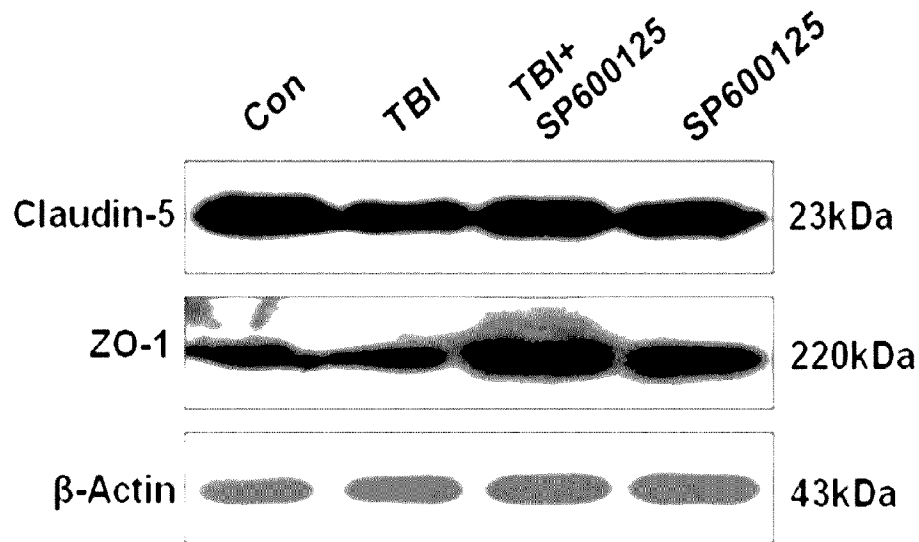


B

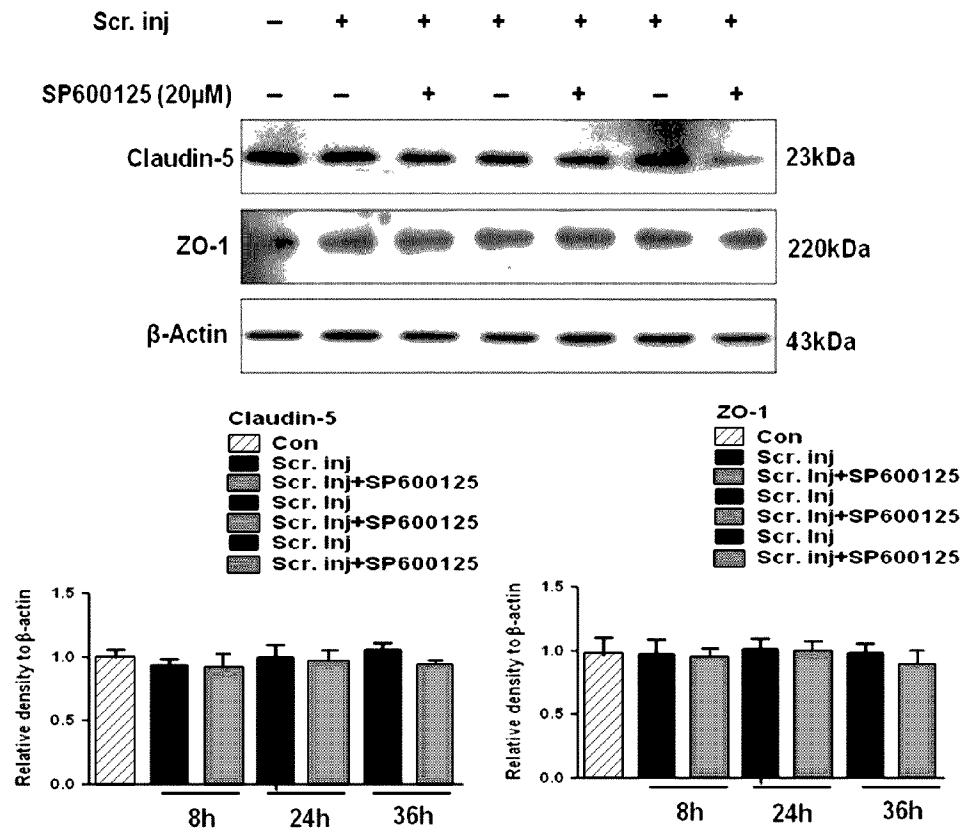


A

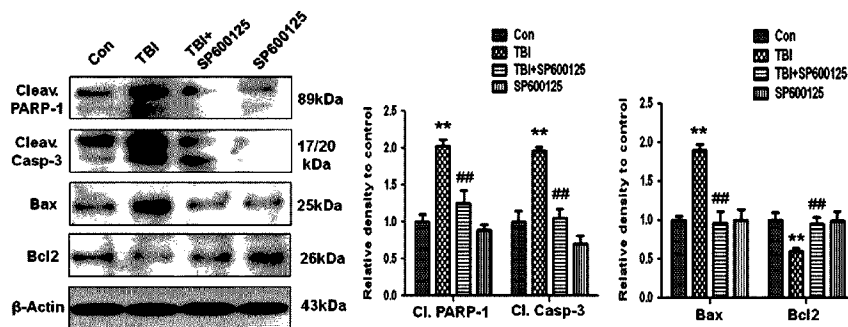
[도15]



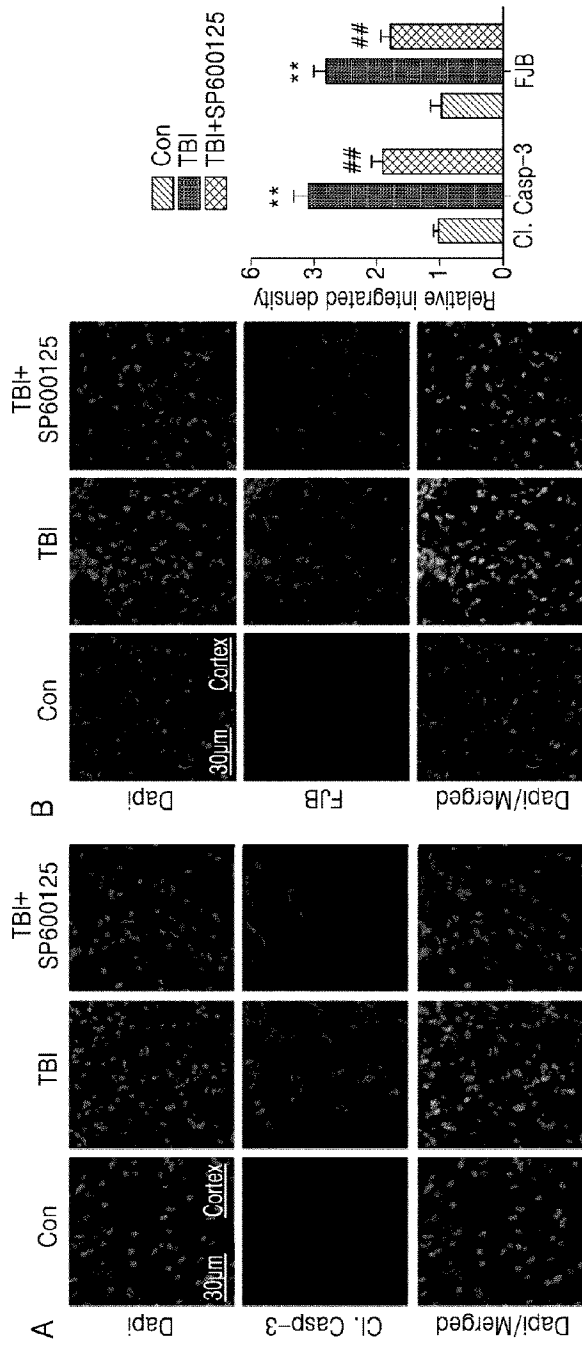
[도16]



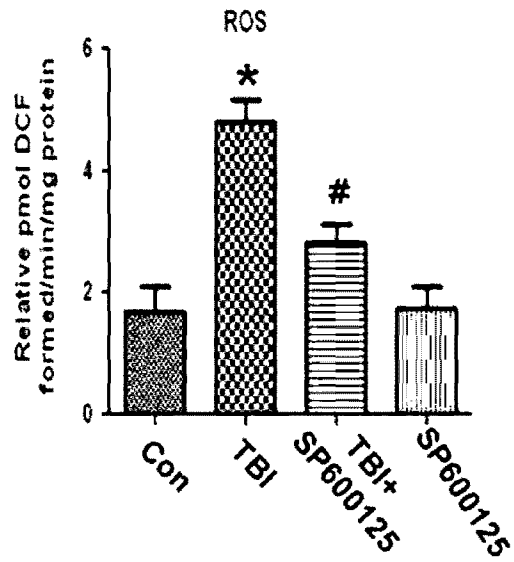
[도17]



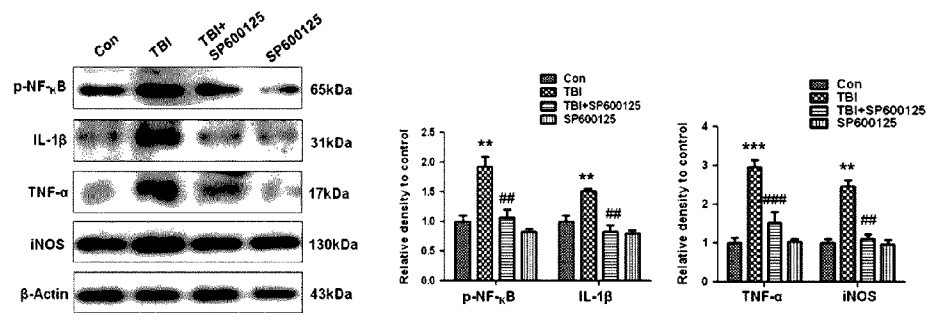
[18]



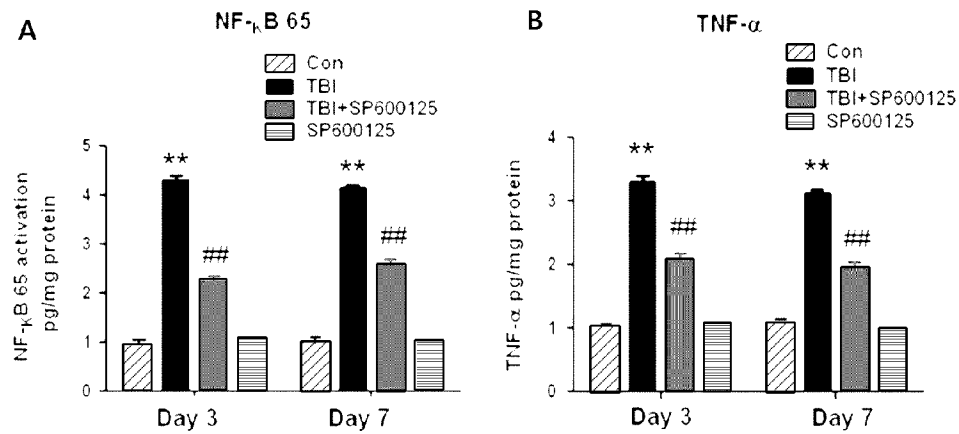
[도19]



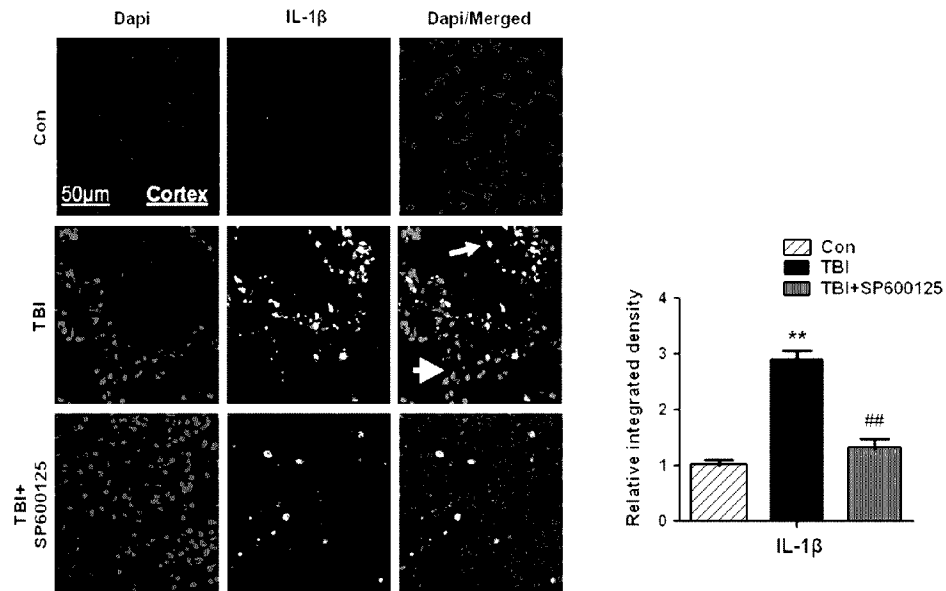
[도20]



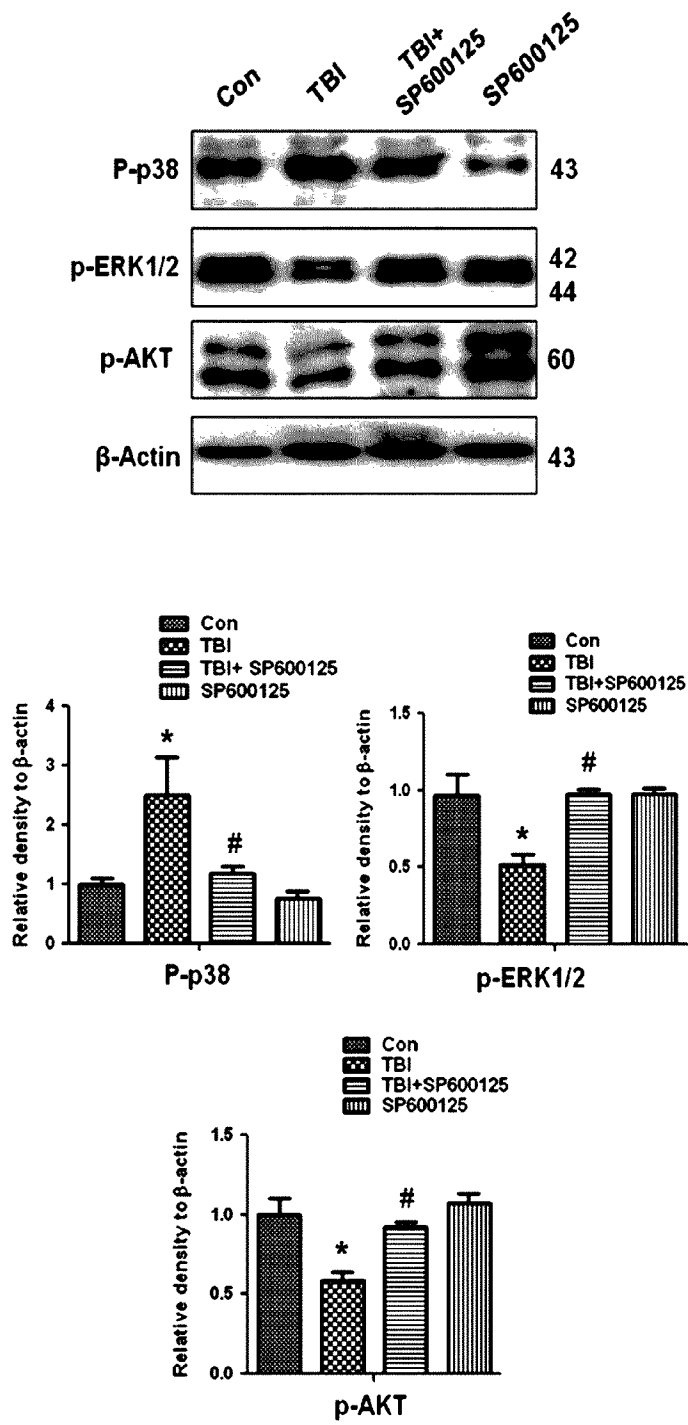
[도21]



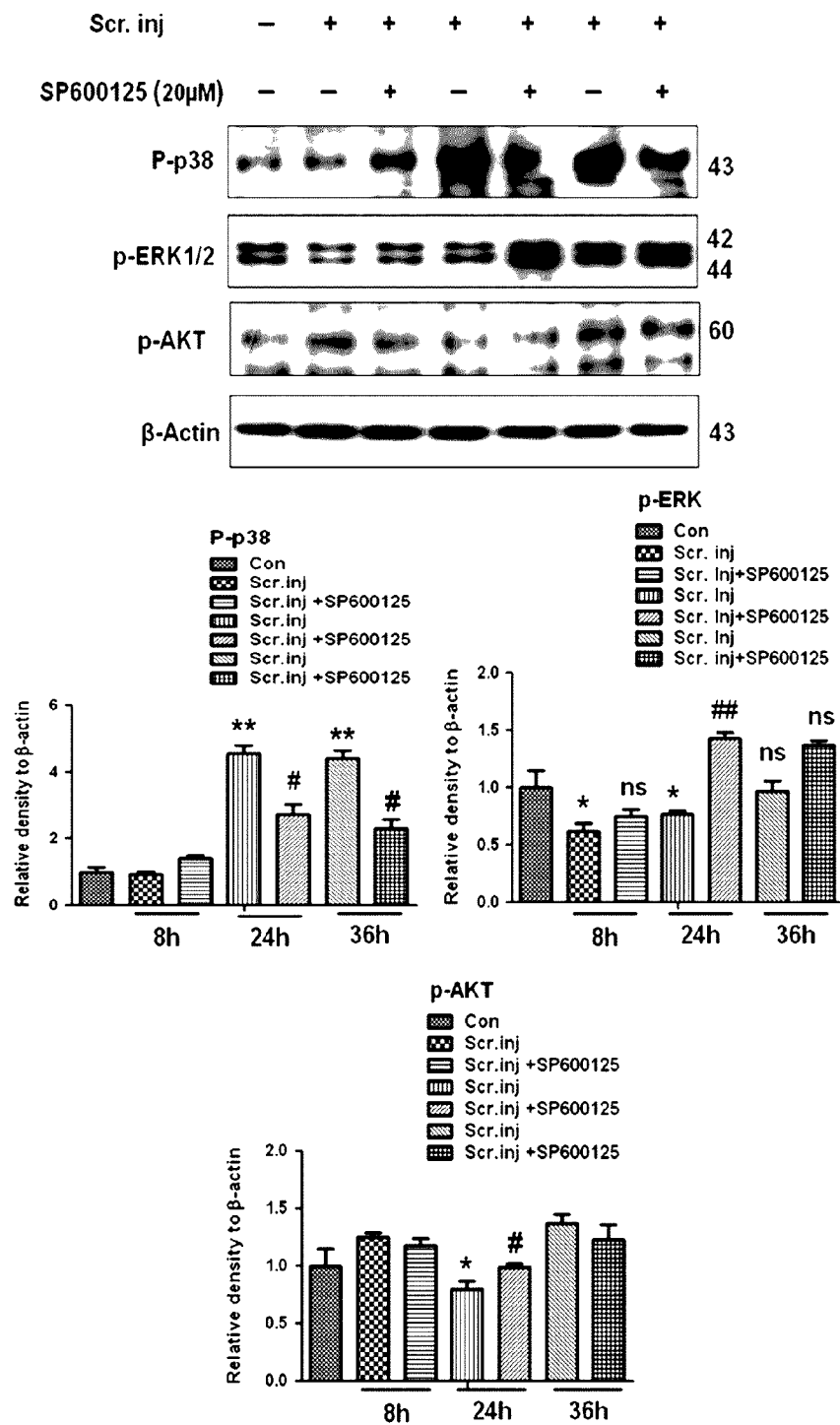
[도22]



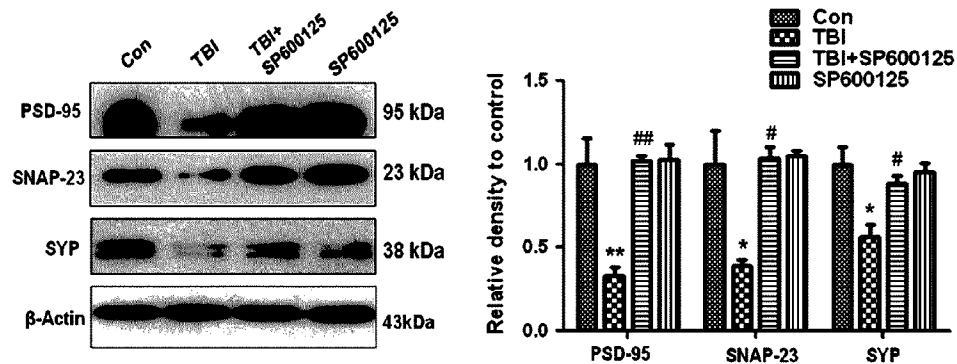
[도23]



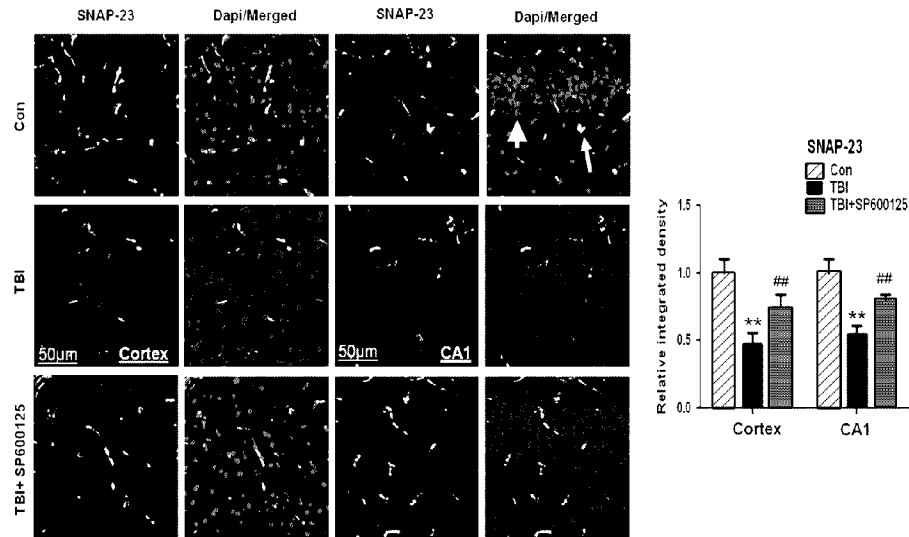
[도24]



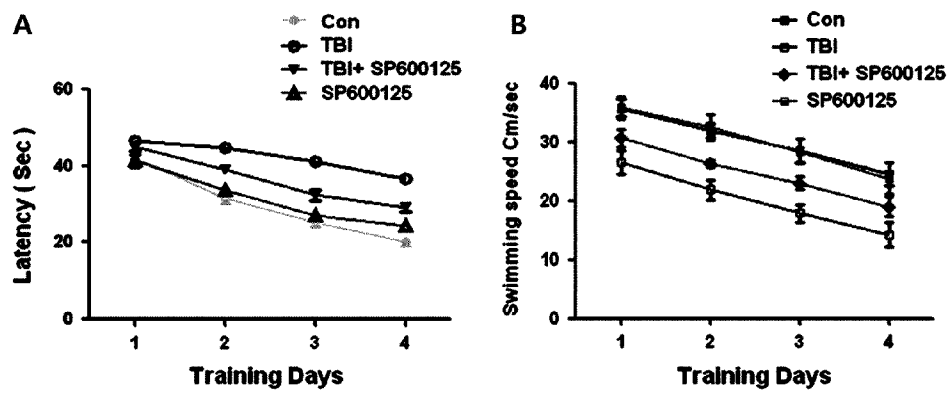
[도25]



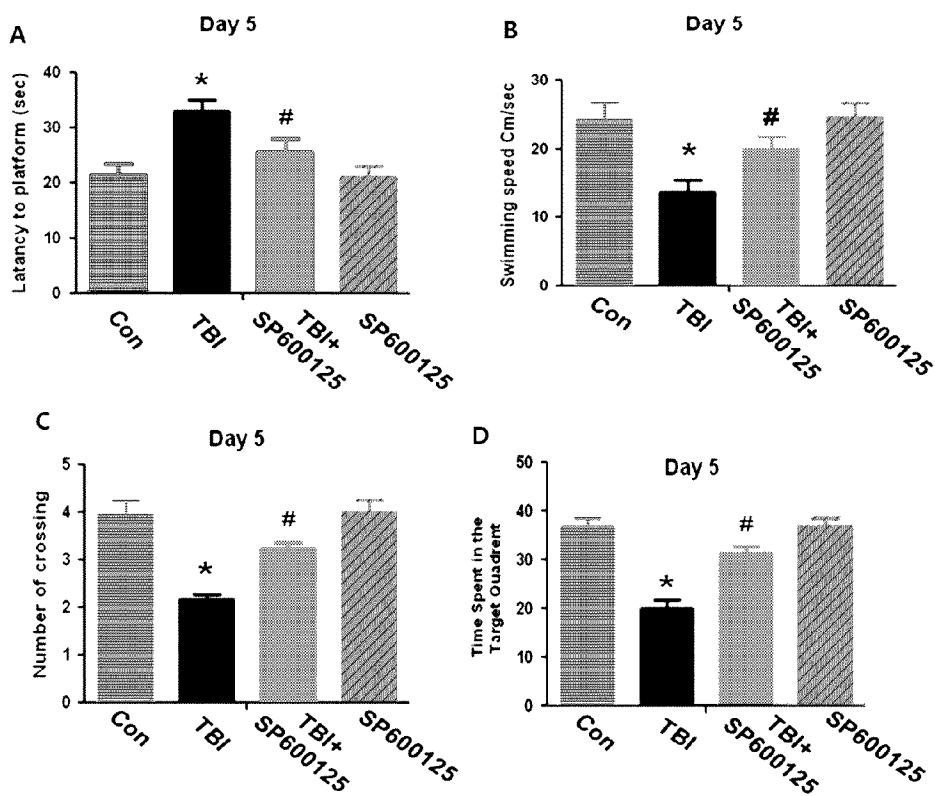
[도26]



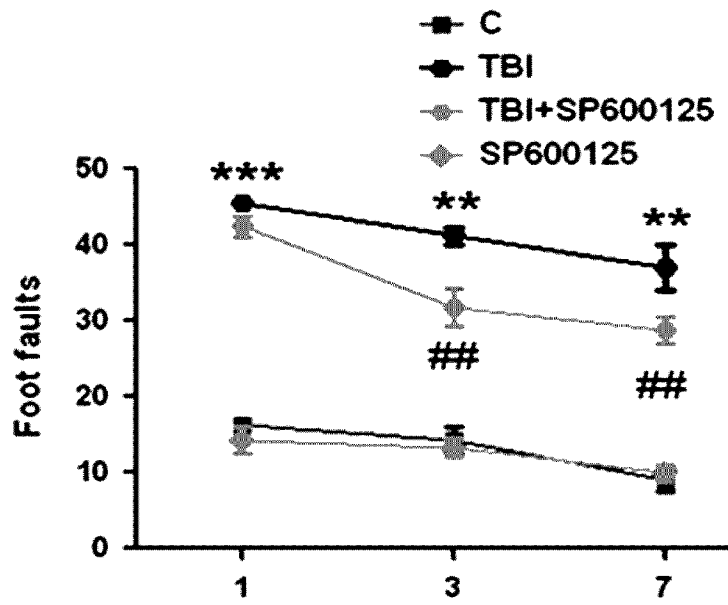
[도27]



[도28]



[도29]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/007287

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/416(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/416; A23L 33/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, Caplus), Google & Keywords: 1,9-pyrazoloanthrone, SP600125, degenerative neurological diseases, traumatic brain injury, c-Jun N-terminal kinase, nerve cell degeneration

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YESTE-VELASCO, M. et al., "Neuroprotection by C-Jun NH2-terminal Kinase Inhibitor SP600125 against Potassium Deprivation-induced Apoptosis Involves the Akt Pathway and Inhibition of Cell Cycle Reentry", Neuroscience, 2009, vol. 159, pages 1135-1147 See abstract; figure 9; and page 1146.	1-5
X	CHEN, X. et al., "The C-Jun N-terminal Kinase Inhibitor SP600125 Is Neuroprotective in Amygdala Kindled Rats", Brain Research, 2010, vol. 1357, pages 104-114 See abstract.	1-5
X	AMBHORE, N. S. et al., "Pharmacokinetic and Tissue Distribution Studies of 1,9-pyrazoloanthrone, a C-Jun-N-terminal Kinase Inhibitor in Wistar rats by a Simple and Sensitive HPLC Method", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, vol. 120, pages 57-64 See abstract; and page 58, left column, paragraph [3].	1-5
X	PRASAD, K. D. et al., "Alkyl Chain Substituted 1,9-pyrazoloanthrones Exhibit Prominent Inhibitory Effect on C-Jun N-terminal Kinase (JNK)", Organic & Biomolecular Chemistry, 2014, vol. 12, pages 4656-4662 See abstract; and figure 5.	1-5



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

04 OCTOBER 2018 (04.10.2018)

Date of mailing of the international search report

04 OCTOBER 2018 (04.10.2018)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/007287

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	UR REHMAN, S. et al., "Inhibition of C-Jun N-terminal Kinase Protects against Brain Damage and Improves Learning and Memory after Traumatic Brain Injury in Adult Mice", Cerebral Cortex, [publication] 30 June 2017, vol. 28, no. 8, pages 2854-2872, inner pages 1-19 See abstract, and inner page 5, left column, paragraph [3]. ※ The above document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/007287

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

None

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 31/416(2006.01)i, A23L 33/10(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 31/416; A23L 33/10

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN (Registry, Caplus), Google & 키워드: 1,9-pyrazoloanthrone, SP600125, 퇴행성 신경질환, 외상성 뇌손상, c-Jun N-terminal kinase, 신경세포 퇴화

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	YESTE-VELASCO, M. 등, "Neuroprotection by c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor SP600125 against potassium deprivation-induced apoptosis involves the Akt pathway and inhibition of cell cycle reentry", Neuroscience, 2009, 159권, 페이지 1135-1147 초록; 도면 9; 및 페이지 1146 참조.	1-5
X	CHEN, X. 등, "The c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 is neuroprotective in amygdala kindled rats", Brain Research, 2010, 1357권, 페이지 104-114 초록 참조.	1-5
X	AMBHORE, N. S. 등, "Pharmacokinetic and tissue distribution studies of 1,9-pyrazoloanthrone, a c-Jun-N-terminal kinase inhibitor in Wistar rats by a simple and sensitive HPLC method", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, 120권, 페이지 57-64 초록; 및 페이지 58, 좌측컬럼, 단락 3 참조.	1-5
X	PRASAD, K. D. 등, "Alkyl chain substituted 1,9-pyrazoloanthrones exhibit prominent inhibitory effect on c-JunN-terminal kinase (JNK)", Organic & Biomolecular Chemistry, 2014, 12권, 페이지 4656-4662 초록; 및 도면 5 참조.	1-5



추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.



대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2018년 10월 04일 (04.10.2018)

국제조사보고서 발송일

2018년 10월 04일 (04.10.2018)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

이기철

전화번호 +82-42-481-3353



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	UR REHMAN, S. 등, “Inhibition of c-Jun N-terminal kinase protects against brain damage and improves learning and memory after traumatic brain injury in adult mice” , Cerebral Cortex, [공개] 2017.06.30., 28권, 8호, 페이지 2854-2872, 내부페이지 1-19 초록; 및 내부페이지 5, 좌측컬럼, 단락 3 참조. ※ 위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임.	1-5

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음